TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGCC
GATTACGATTTTTGGAGTGGTTATTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
TCCTCA

142 Heavy Chain Protein:
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARADYDFWSGYFDYWGQGTLVTV
SS

143 Light Chain DNA:
GACATCCAGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAATGGGGTCCCATCA
AGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATAGTTACCCGTGGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAAC

144 Light Chain Protein:
DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQNGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPWTFGQGTKVEIK

Antibody U1-26

145 Heavy Chain DNA:
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGATTACTACTGGAGCTGGATCCGC
CAGTACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC
TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC
TCCCTGAAGCTGGGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTTCTGTGCGAGAGCC
GATTACGATTTTTGGAGTGGTTATTTTGACTTCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
TCCTC

146 Heavy Chain Protein:
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQYPGKGLEWIGYIYYSGSTY
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLGSVTAADTAVYFCARADYDFWSGYFDFWGQGTLVTV
S

147 Light Chain DNA:
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
AGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATGGTTACCCGTGGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAAC

148 Light Chain Protein:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNGYPWTFGQGTKVEIK

Antibody U1-27

149 Heavy Chain DNA:
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGATTACTACTGGAGCTGGATCCGC
CAGTACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC
TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC
TCCCTGAAGCTGGGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTTCTGTGCGAGAGCC
GATTACGATTTTTGGAGTGGTTATTTTGACTTCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
TCCTC

150 Heavy Chain Protein:

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQYPGKGLEWIGYIYYSGSTY
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLGSVTAADTAVYFCARADYDFWSGYFDFWGQGTLVTV
S

151 Light Chain DNA:
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
AGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATGGTTACCCGTGGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAAC

152 Light Chain Protein:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNGYPWTFGQGTKVEIK

Antibody U1-28

153 Heavy Chain DNA:
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTAGTGGTGATTACTACTGGAGCTGGATCCGC
CAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC
TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGCG
GATTACGATTTTTGGAGTGGTTATTTTGACTCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
TCCTCA

154 Heavy Chain Protein:
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARADYDFWSGYFDSWGQGTLVTV
SS

155 Light Chain DNA:
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGATACCT
GGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
AGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATGGTTACCCGTGGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAA

156 Light Chain Protein:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQIPGKAPKRLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNGYPWTFGQGTKVEIK

Antibody U1-31

157 Heavy Chain DNA:
CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTC
TCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACCAACTATGGTATCAGCTGGGTGCGGCAGGCC
CCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACGATGGTTACAGAAACTAT
GCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGACCACTGCCTAC
ATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATGTT
CAAGACTACGGTGACTACGACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
TCCTCA

158 Heavy Chain Protein:
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYDGYRNY
AQKLQGRVTMTTDTSTTTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDVQDYGDYDYFDYWGQGTLVTV
SS

159 Light Chain DNA:
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC

ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGTTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAACCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
AGATTCAGGGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCCATCACCTTCGGCCAA
GGGACACGACTGGAGATTAAA

160 Light Chain Protein:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPNLLIYAASSLQSGVPS
RFRGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPITFGQGTRLEIK

Antibody U1-32

161 Heavy Chain DNA:
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTTACAGACCCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGATTACTACTGGAGCTGGATCCGC
CAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGACCACCTAC
TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC
GCCCTGAAGCTGAACTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGCC
GATTACGATTTTTGGAGTGGTTATTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
TCCTCA

162 Heavy Chain Protein:
QVQLQESGPGLVKPLQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGTTY
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFALKLNSVTAADTAVYYCARADYDFWSGYFDYWGQGTLVTV
SS

163 Light Chain DNA:
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAGGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTCAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
AGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCTCTCTCACAATCTCCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATAGTTACCCGTGGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAAC

164 Light Chain Protein:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAGQGIRNDLGWYQQKPGKAPQRLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTEFSLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPWTFGQGTKVEIK

Antibody U1-35

165 Heavy Chain DNA:
CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTC
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTGACTACTACATGAGCTGGATCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATATATTAGTAGTAGTGGTAATAACATATACCAC
GCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACTCACTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGAGA
TATAGTGGCTACGACGACCCTGATGGTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACC
GTCTCTTCA

166 Heavy Chain Protein:
QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVSYISSSGNNIYH
ADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERYSGYDDPDGFDIWGQGTMVT
VSS

167 Light Chain DNA:
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCCAGGCGAGTCAGGACATTAGCAACTATTTAAGTTGGTTTCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCCACGATGCATCCAATTTGGAAACAGGGGTCCCTTCA
AGGTTCAGTGGAAGTGGATCTGGGACAGATTTTACTTTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATATTGCAACATATTACTGTCAACAGTATGATAATCCCCCGTGCAGTTTTGGCCAG
GGGACCAAGCTGGAGATCAAA

168 Light Chain Protein:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLSWFQQKPGKAPKLLIHDASNLETGVPS
RFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQYDNPPCSFGQGTKLEIK

Antibody U1-36

169 Heavy Chain DNA:
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTTATTACTACTGGAGCTGGATCCGC
CAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGACCACCTAC
TACAATCCGTCCTTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC
TCCCTGAAACTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGCC
GATTACGATTTTTGGAGTGGTCACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
TCCTCA

170 Heavy Chain Protein:
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGYYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGTTY
YNPSFKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARADYDFWSGHFDYWGQGTLVTV
SS

171 Light Chain DNA:
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
AGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATAGTTACCCGTGGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAA

172 Light Chain Protein:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPWTFGQGTKVEIK

Antibody U1-37

173 Heavy Chain DNA:
CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTC
TCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCC
CCTGGACAAGGACTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACGATGGTCACACAAACTAT
GCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAACACAGCCTAC
ATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGAGAGACCCC
CATGACTACAGTAACTACGAGGCTTTTGACTTCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
TCCTC

174 Heavy Chain Protein:
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYDGHTNY
AQKLQGRVTMTTDTSTNTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDPHDYSNYEAFDFWGQGTLVTV
S

175 Light Chain DNA
atgaggtcccctgctcagctcctggggctcctgctactctggctccgaggtgccagatgtg
acatccagatgacccagtctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccat
cacttgccgggcaagtcagagcattagcagttatttaaattggtatcagcagaaaccaggg
aaagcccctaacctcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtggggtcccatcaagat
tcagtggcagtggatctgggacagatttcactctcaccatcagcagtctgcaacctgaaga
ttttgcaacttactactgtcaacagagttacagtacccccatcaccttcggccaagggaca
cgactggagattaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatg
agcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagaga
ggccaaagtacagtggaaggtggataacgcc

176 Light Chain Protein:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPITFGQGTRLEIK

Antibody U1-34

177 Heavy Chain DNA:
accatggactggacctggagggtccttttcttggtggcagcagcaacaggtgcccactccca
ggttcagctggtgcagtctggagctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcct
gcaaggcttctggttacacctttaccaactatggtatcagctgggtgcggcaggcccctgga
caagggcttgagtggatgggatggatcagcgcttacgatggttacagaaactatgcacagaa
gctccagggcagagtcaccatgaccacagacacatccacgaccactgcctacatggagctga
ggagcctgagatctgacgacacggccgtgtattactgtgcgagagatgttcaagactacggt
gactacgactactttgactactggggccagggaaccctggtcaccgtctcctcagcttccac
caagggcccatccgtcttccccctggtgccctgctccaggagcacctccgagagcacagccg
ccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccg

178 Heavy Chain Protein
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYDGYRNYA
QKLQGRVTMTTDTSTTTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDVQDYGDYDYFDYWGQGTLVTVSS

179 Light Chain DNA:
cagctcctggggctcctgctactctggctccgaggtgccagatgtgacatccagatgaccc
agtctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggcaag
tcagagcattagcagttatttaaattggtatcagcagaaaccagggaaagcccctaacctc
ctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtggggtcccatcaagattcagtggcagtggat
ctgggacagatttcactctcaccatcagcagtctgcaacctgaagattttgcaacttacta
ctgtcaacagagttacagtacccccatcaccttcggccaagggacacgactggagattaaa
cgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctg
gaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtg
gaaggtggataacgcc

180 Light Chain Protein:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPITFGQGTRLEIK

Antibody U1-1

181 Heavy Chain DNA:
catctgtggttcttcctcctgctggtggcagctcccagatgggtcctgtcccaggtgcagc
tgcaggagtcgggcccaggactggtgaagccttcacagaccctgtccctcacctgcactgt
ctctggtggctccatcaacagtggtgattactactggagctggatccgccagcacccaggg
aagggcctggagtggattgggtacatctattacagtgggagcacctactacaacccgtccc
tcaagagtcgagttaccatatcagtagacacgtctaagaaccagttctccctgaagctgag
ctctgtgactgccgcggacacggccgtgtattactgtgcgagagcagattacgatttttgg
agtggttactttgactactggggccagggaaccctggtcaccgtctcctcagcctccacca
agggcccatcggtcttcccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacaacggc
cctgg

182 Heavy Chain Protein
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSINSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYY
NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARADYDFWSGYFDYWGQGTLVTVSS

183 Light Chain DNA:
atgagggtccctgctcagctcctggggctcctgctgctctggttcccaggtgccaggtgtga
catccagatgacccagtctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatca
cttgccgggcaagtcagggcattagaaatgatttaggctggtatcagcagaaaccagggaaa
gcccctaagcgcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtggggtcccatcaaggttcag
cggcagtggatctgggacagaattcactctcacaatcagcagcctgcagcctgaagattttg
caacttattactgtctacagcataatagttacccgtggacgttcggccaagggaccaaggtg
gaaatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagtt
gaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaag
tacagtggaaggtggataacgc

184 Light Chain Protein
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSR
FSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPWTFGQGTKVEIK

Antibody U1-3

185 Heavy Chain DNA:
tggttcttccttctgctggtggcagctcccagatgggtcctgtcccaggtgcagctgcagga
gtcgggcccaggactggtgaagccttcacagaccctgtccctcacctgcactgtctctggtg
gctccatcagcagtggtggttactactggagctggatccgccagcacccagggaagggcctg
gagtggattgggtacatctattacagtgggagcacctactacaacccgtccctcaagagtcg
agttaccatatcagtagacacgtctaagaaccagttctccctgaagctgagctctgtgactg
ccgcggacacggccgtgtattactgtgcgagagatggctatgatagtagtggttattaccac
ggctactttgactactggggccagggaaccctggtcaccgtctcctcagcctccaccaaggg
cc

186 Heavy Chain Protein
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYY
NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDGYDSSGYYHGYFDYWGQGTLVT
VSS

187 Light Chain DNA:
H3_130_1N1K
caggtcttcatttctctgttgctctggatctctggtgcctacggggacatcgtgatgaccc
agtctccagactccctggctgtgtctctgggcgagagggccaccatcaactgcaagtccag
ccagagtgttttatacagctccaacaataagaactacttagcttggtaccagcagaaacca
ggacagcctcctaagctgctcatttactgggcatctacccgggaatccggggtccctgacc
gattcagtggcagcgggtctgggacagatttcactctcaccatcagcagcctgcaggctga
agatgtggcagtttattactgtcagcaatattatagtactccgctcactttcggcggaggg
accaaggtggagatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctg
atgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccag
agaggccaaagtacagtggaaggtggataacgc

188 Light Chain Protein:
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRE
SGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPLTFGGGTKVEIK

Antibody U1-4
H3_133_1N1G1
189 Heavy Chain DNA
ctgtggttcttcctcctgctggtggcagctcccagatgggtcctgtcccaggtgcagctgca
ggagtcgggcccaggactggtgaagccttcacagaccctgtccctcacctgcactgtctctg
gtggctccatcagtagtggtgattactactggagctggatccgccagcacccagggaagggc
ctggagtggattgggtacatctattacagtgggagcacctactacaacccgtccctcaagag
tcgagttaccatatcagtagacacgtctaagaaccagttctccctgaagttgagctctgtga
ctgccgcggacacggccgtgtattactgtgcgagagccgattacgatttttggagtggttat
tttgactactggggccagggaaccctggtcaccgtctcctcagcctccaccaagggcccatc
ggtcttcccccctggcaccctc

190 Heavy Chain Protein
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYY
NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARADYDFWSGYFDYWGQGTLVTVSS

191 Light Chain DNA
H3_133_1N1K
gtgcccgctcagcgcctggggctcctgctgctctggttcccaggtgccaggtgtgacatcc
agatgacccagtctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttg
ccgggcaagtcagggcattagaaatgatttaggctggtatcagcagaaaccagggaaagcc
cctaagcgcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtggggtcccatcaaggttcagcg
gcagtggatctgggacagaattcactctcacaatcagcagcctgcagcctgaagattttgc
aacttattactgtctacagcataataattacccgtggacgttcggccaagggaccaaggtg
gaaatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagt
tgaaatctggaactg

192 Light Chain Protein
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRF
SGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNNYPWTFGQGTKVEIK

Antibody U1-5
193 Heavy Chain DNA:
H3_138_1N1G1
tggttcttccttctgctggtggcagctcccagatgggtcctgtcccaggtgcagctgcagga
gtcgggcccaggactggtgaagccttcacagaccctgtccctcacctgcactgtctctggtg
gctccatcagcagtggtgattactactggagctggatccgccagcacccagggaagggcctg
gagtggattgggtacatctattacagtgggagcacctactacaacccgtccctcaagagtcg
agttaccatatcagtagacacgtctaagaaccagttctccctgaagctgagctctgtgactg
ccgcggacacggccgtgtatttctgtgcgagagccgattacgattttggagtggttatttt
gactactggggccagggaaccctggtcaccgtctcctcagcctccaccaagggcc

194 Heavy Chain Protein
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYYN
PSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYFCARADYDFWSGYFDYWGQGTLVTVSS

195 Light Chain DNA:
H3_138_1N1K
atgagggtccccgctcagctcctggggctcctgctgctctggttcccaggtgccaggtgtga
catccagatgacccagtctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatca
cttgccgggcaagtcagggcattagaaatgatttaggctggtatcagcagaaaccagggaaa

10 20 30 40

gcccctaagcgcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtggggtcccatcaaggttcag
cggcagtggatctgggacagaattcactctcacaatcagcagcctgcagcctgaagattttg
caacttattactgtctacagcataatacttacccgtggacgttcggccaagggaccaaggtg
gaaatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagtt
gaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaag
tacagtggaaggtggataacgc

196 Light Chain Protein
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNTYPWTFGQGTKVEIK

Antibody U1-6
197 Heavy Chain DNA:
H3_162_1N1G1
tggttcttccttctgctggtggcagctcccagatgggtcctgtcccaggtgcagctgcagga
gtcgggcccaggactggtgaagccttcacagaccctgtccctcacctgcactgtctctggtg
gctccatcagcagtggtgattactactggagctggatccgccagcacccagggaagggcctg
gagtggattgggtacatctattacagtgggagcacctactacaacccgtccctcaagagtcg
agttaccatatcagtagacacgtctaagaaccagttctccctgaagctgagctctgtgactg
ccgcggacacggccgtgtatttctgtgcgagagccgattacgattttggaatggttatttt
gactactggggccagggaaccctggtcaccgtctcctcagcctccaccaagggccc

198 Heavy Chain Protein
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYFCARADYDFWNGYFDYWGQGTLVTV
SS

199 Light Chain DNA:
H3_162_1N1K
atgagggtccccgctcagctcctggggctcctgctgctctggttcccaggtgccaggtgtga
catccagatgacccagtctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatca
cttgccgggcaagtcagggcattagaaatgatttaggctggtatcagcagaaaccagggaaa
gcccctaagcgcctgatctatgctgcttccagtttgcaaagtggggtcccatcaaggttcag
cggcagtggatctgggacagaattcactctcacaatcagcagcctgcagcctgaagattttg
caacttattactgtctacagcataatacttacccgtggacgttcggccaagggaccaaggtg
gaaatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagtt
gaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaag
tacagtggaaggtggataacgcc

200 Light Chain Protein
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNTYPWTFGQGTKVEIK

Antibody U1-8
201 Heavy Chain DNA:
H3_174_1N1G1
ttggtggcagcagctacaggcacccacgcccaggtccagctggtacagtctggggctgaggt
gaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaaggtttccggatacaccctcactgaat
tatccatgtactgggtgcgacaggctcctggaaaagggcttgagtggatgggaggttttgat

cctgaagatggtgaaacaatctacgcacagaagttccagggcagagtcaccatgaccgagga
cacatctacagacacagcctacatggagctgagcagcctgagatctgaggacacggccgtgt
attactgtgcaactgggtggaactacgtctttgactactggggccagggaaccctggtcacc
gtctcctcagcctccaccaagggccc

202 Heavy Chain Protein
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMYWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIYA
QKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATGWNYVFDYWGQGTLVTVSS

203 Light Chain DNA:
H3_174_1N1K
ggatccagtggggatattgtgatgactcagtctccactctccctgcccgtcacccctggaga
gccggcctccatctcctgcaggtccagtcagagcctcctgcatagtaatggatacaactatt
tggattggtacctgcagaagccagggcagtctccacagctcctgatctatttggattctcat
cgggcctccggggtccctgacaggttcagtggcagtggatcaggcacagattttacactgaa
aatcagcagagtggaggctgaggatgttggggtttattactgcatgcaagctctacaaactc
cgctcactttcggcggagggaccaaggtggagatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtc
ttcatcttcccgccat

204 Light Chain Protein
DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLDSHRA
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPLTFGGGTKVEIK

Antibody U1-11
205 Heavy Chain DNA:
H3_178_1N1G1
tggttcttccttctgctggtggcagctcccagatgggtcctgtcccaggtgcagctgcagga
gtcgggcccaggactggtgaagccttcacagaccctgtccctcacctgcactgtctctggtg
gctccatcagcagtggtgattactactggagctggatccgccagcacccagggaagggcctg
gagtggattgggtacatctattacagtgggagcacctactacaacccgtccctcaagagtcg
agttaccatatcagtagacacgtctaagaaccagttctccctgaagctgagctctgtgactg
ccgcggacacggccgtgtatttctgtgcgagagccgattacgatttttggagtggttatttt
gactactggggccagggaaccctggtcaccgtctcctcagcctccaccaagggcccatcgag
tcttccccctgg

206 Heavy Chain Protein
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYFCARADYDFWSGYFDYWGQGTLVTV
SS

207 Light Chain DNA:
H3_178_1N1K
atgagggtccccgctcagctcctggggctcctgctgctctggttcccaggtgccaggtgtg
acatccagatgacccagtctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccat
cacttgccgggcaagtcagggcattagaaatgatttaggctggtatcagcagaaaccaggg
aaagcccctaagcgcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtggggtcccatcaaggt
tcagcggcagtggatctgggacaaaattcactctcactatcagcagcctgcagcctgaaga
ttttgcaacttattactgtctacagcataatacttacccgtggacgttcggccaagggacc
aaggtggaaatcagacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatg
agcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagaga
ggccaaagtacagtggaaggtggataacgcc

208 Light Chain Protein
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVP
SRFSGSGSGTKFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNTYPWTFGQGTKVEIR

Antibody U1-16
209 Heavy Chain DNA:
H3_221_1N1G1
accatgaaacatctgtggttcttcctcctgctggtggcagctcccagatgggtcctgtccc
aggtgcagctgcaggagtcgggcccaggactggtgaagccttcacagaccctgtccctcac
ctgcactgtctctggtggctccatcagcagtggtgattactactggagctggatccgccag
cacccagggaagggcctggagtggattgggtacatctattacagtgggagcacctactaca
acccgtccctcaagagtcgagttaccatatcagtagacacgtctaagaaccagttctccct
gaagctgagctctgtgactgccgcggacacggccgtgtattactgtgcgagagcggattac
gatttttggagtggttattttgactactggggccagggaatcctggtcaccgtctcctcag
cctccaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagaacacctctggggg
cacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcctgg
aactcaggcgccctg

210 Heavy Chain Protein
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYY
NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARADYDFWSGYFDYWGQGILVTVSS

211 Light Chain DNA:
H3_221_1N1K
atgagggtccccgctcagctcctggggctcctgctgctctggttcccaggtgccaggtgt
gacatccagatgacccagtctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcacc
atcacttgccgggcaagtcagggcattagaaatgatttaggctggtatcagcagaaacca
gggaaagcccctaagcgcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtggggtcccatca
aggttcagcggcagtggatctgggacagaattcactctcacaatcagcagcctgcagcct
gaagattttgcaacttattactgtctacagcataatagttacccgtggacgttcggccaa
gggaccaaggtggaaatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgcca
tctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctat
cccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgcc

212 Light Chain Protein
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSR
FSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPWTFGQGTKVEIK

Antibody U1-17
213 Heavy Chain DNA:
H3_224_1N1G1
tggttcttccttctgctggtggcagctcccagatgggtcctgtcccaggtgcagctgcagg
agtcgggcccaggactggtgaagccttcacagaccctgtccctcacctgcactgtctctgg
tggctccatcagcagtggtgattactactggagctggatccgccagcacccagggaagggc
ctggagtggattggatacatctattacagtgggagcacctactacaattcgtccctcaaga
gtcgagttaccatatcagtagacacgtctaagaaccagttctccctgaagctgagctctgt
gactgccgcggacacggccgtgtattactgtgcgagagcggattacgatttttggagtggt
tattttgactactggggccagggaaccctggtcaccgtctcctcagcctccaccaagggcc
catcg

214 Heavy Chain Protein
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYY
NSSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARADYDFWSGYFDYWGQGTLVTVSS

215 Light Chain DNA:
H3_224_1N1K
ggtgccaggtgtgacatccagatgacccagtctccatcctccctgtctgcatctgtaggag
acagagtcaccatcacttgccgggcaagtcagggcattagaaatgatttaggctggtatca
gcagaaacctgggaaagcccctaagcgcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtggg
gtcccatcaaggttcagcggcagtggatctgggacagaattcactctcacaatcagcagcc
tgcagcctgaagattttgcaacttattactgtctacagcacaatagttacccgtggacgtt
cggccaagggaccaaggtggaaatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttc
ccgcca

216 Light Chain Protein
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPWTFGQGTKVEIK

Antibody U1-18
217 Heavy Chain DNA:
H3_227_1N1G1
aggttcttccttctgctggtggcagctcccagatgggtcctgtcccaggtgcagctgcagg
agtcgggcccaggactggtgaagccttcacagaccctgtccctcacctgcactgtctctgg
tggctccatcagcagtggtgattactactggagctggatccgccagcacccagggaagggc
ctggagtggattggatacatctattacagtgggagcacctactacaacccgtccctcaaga
gtcgagttaccatatcagtagacacgtctaagaaccagttctccctgaagctgagctctgt
gactgccgcggacacggccgtgtattactgtgcgagagccgattacgatttttggagtggt
tattttgactactggggccagggaaccctggtcaccgtctcctcagcctccaccaagggcc
catcggtcttcccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagcggccctggg
ctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccct

218 Heavy Chain Protein
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYY
NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARADYDFWSGYFDYWGQGTLVTVSS

219 Light Chain DNA:
H3_227_1N1K
atgagggtccccgctcagctcctggggctcctgctgctctggttcccaggtgccaggtgtga
catccagatgacccagtctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatca
cttgccgggcaagtcagggcattagaaatgatttaggctggtatcagcagaaaccagggaaa
gcccctaagcgcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtggggtcccatcaaggttcag
cggcagtggatctgggacagaattcactctcacaatcagcagcctgcagcctgaagattttg
caacttattactgtctacagcataatagttacccgtggacgttcggccaagggaccaaggtg
gaaatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagtt
gaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaag
tacagtggaaggtggataacg

220 Light Chain Protein
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPWTFGQGTKVEIK

Antibody U1-33

221 Heavy Chain DNA:
H4_14_1N1G4

ctgtggttcttccttctgctggtggcagctcccagatgggtcctgtcccaggtgcagctgc
aggagtcgggcccaggactggtgaagccttcacagaccctgtccctcacctgcactgtctc
tggtggctccatcagcagtggtgattactactggagctggatccgccagcacccagggaag
ggcctggagtggattgggtacatctattacagtgggagcacctactacaacccgtccctca
agagtcgagttaccatgtcagtagacacgtctaagaaccagttctccctgaagctgagctc
tgtgactgccgcggacacggccgtgtattactgtgcgagagccgattacgatttttggagt
ggtcactttgactgctggggccagggaaccctggtcaccgtctcctcagcttccaccaagg
gccccatccgtcttccccc

222 Heavy Chain Protein
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYY
NPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARADYDFWSGHFDCWGQGTLVTVSS

223 Light Chain DNA:
H4_14_1N1K

atgagggtccccgctcagctcctggggctcctgctgctctggttcccaggtgccaggtgtga
catccagatgacccagtctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatca
cttgccgggcaagtcagggcattagagatgatttaggctggtatcagcagaaaccagggaaa
gcccctaagcgcctgatctatgctgaatccagtttgcaaagtggggtcccatcaaggttcag
cggcagtggatctgggacagaattcactctcacaatcagcagcctgcagcctgaagattttg
caacttattactgtctacagcatcatagttacccgtggacgttcggccaagggaccaaggtg
gaaatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgcc

224 Light Chain Protein
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRDDLGWYQQKPGKAPKRLIYAESSLQSGVPSR
FSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHHSYPWTFGQGTKVEIK

Antibody U1-29

225 Heavy Chain DNA:
H4_107_1N1G4

tggctgagctgggttttcctcgttgctcttttaagaggtgtccagtgtcaggtgcagctgg
tggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcgtc
tggattcaccttcaatagctatgacatgcactgggtccgccaggctccaggcaaggggctg
gagtgggtggcagttatatggtatgatggaagtaataaatactatgcagactccgtgaagg
gccgattcaccatctctagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcct
gagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagagaccgcttgtgtactaatggtgta
tgctatgaagactacggtatggacgtctggggccaagggaccacggtcaccgtctcctcag
cttccaccaagggcccatccgtcttccccctggcgccctgctccaggagcacctccgagag
cacagccgccctgggc

226 Heavy Chain Protein
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFNSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYYA
DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRLCTNGVCYEDYGMDVWGQGTTV
TVSS

227 Light Chain DNA:
H4_107_1N1K

atgagggtccctgctcagctcctggggctcctgctgctctggctctcaggtgccagatgtga
catccagatgacccagtctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatca

cttgccaggcgagtcaggacattagcaactatttaaattggtatcagcagaaaccagggaaa
gcccctaaggtcctgatctacgatgcatccaatttggaaacaggggtcccatcaaggttcag
tggaagtggatctgggacagattttactttcaccatcagcagcctgcagcctgaagatgttg
caacatattactgtcaacactatgatactctcccgctcactttcggcggagggaccaaggtg
gagatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagtt
gaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaag
tacagtgg

228 Light Chain Protein
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYDASNLETGVPSR
FSGSGSGTDFTFTISSLQPEDVATYYCQHYDTLPLTFGGGTKVEIK

Antibody U1-30
229 Heavy Chain DNA:
H4_116_1_1N1G4
ggactgtgcaagaacatgaaacacctgtggttcttcctcctgctggtggcagctcccagatg
ggtcctgtcccaggtgcagctgcaggagtcgggcccaggactggtgaagcctttacagaccc
tgtccctcacctgcactgtctctggtggctccatcagcagtggtgattactactggagctgg
atccgccagcacccagggaagggcctggagtggattgggtacatctattacagtgggaccac
ctactacaacccgtccctcaagagtcgagttaccatatcagtagacacgtctaagaaccagt
tcgccctgaagctgaactctgtgactgccgcggacacggccgtgtattactgtgcgagagcc
gattacgatttttggagtggttattttgactactggggccagggaaccctggtcaccgtctc
ctcagcttccaccaagggcccatccgtcttccccctgg

230 Heavy Chain Protein
QVQLQESGPGLVKPLQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGTTYY
NPSLKSRVTISVDTSKNQFALKLNSVTAADTAVYYCARADYDFWSGYFDYWGQGTLVTVSS

231 Light Chain DNA:
H4_116_1_1N1K
atgagggtccctgctcagctcctggggctcctgctgctctggttcccaggtgccaggtgtg
acatccagatgacccagtctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccat
cacttgccgggcaggtcagggcattagaaatgatttaggctggtatcagcagaaaccaggg
aaagcccctcagcgcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtggggtcccatcaaggt
tcagcggcagtggatctgggacagaattctctctcacaatctccagcctgcagcctgaaga
ttttgcaacttattactgtctacagcataatagttacccgtggacgttcggccaagggacc
aaggtggaaatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatg
agcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagaga
ggccaaagtacagtggaaggtggataacgccttccaatcggg

232 Light Chain Protein
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAGQGIRNDLGWYQQKPGKAPQRLIYAASSLQSGVPSR
FSGSGSGTEFSLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPWTFGQGTKVEIK

【0073】

【化１５】

CDR配列の表

抗体鎖	Pat. 番号:	CDR1	CDR2	CDR3
重	U1-1	GGSINSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
軽		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNSYPWT
重	U1-2	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLRS	ADYDFWSGYFDY
軽		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNGYPWT
重	U1-3	GGSISSGGYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	DGYDSSGYYHGYFDY
軽		KSSQSVLYSSNNKNYLA	WASTRES	QQYYSTPLT
重	U1-4	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
軽		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNNYPWT
重	U1-5	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
軽		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNTYPWT
重	U1-6	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWNGYFDY
軽		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNTYPWT
重	U1-7	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
軽		RASQDIRNDLG	AASSLQS	LQHNSYPWT
重	U1-8	GYTLTELSMY	GFDPEDGETIYAQKFQG	GWNYVFDY
軽		RSSQSLLHSNGYNYLD	LDSHRAS	MQALQTPLT
重	U1-9	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWNGYFDY
軽		RASQDIRNDLG	AASSLQS	LQHNSYPWT
重	U1-10	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
軽		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNNYPWT
重	U1-11	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
軽		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNTYPWT
重	U1-12	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
軽		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNNYPWT
重	U1-13	GGSISSGGYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	EDDGMDV
軽		RSSQSLLHSNGYNYLE	LGSNRAS	MQALQTPIT
重	U1-14	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
軽		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNTYPWT

重	U1-15	GGSVSSGGYYWS	YIYYSGSTNYNPSLKS	DGDVDTAMVDAFDI
軽		RASQSLSGNYLA	GASSRAT	QQYDRSPLT
重	U1-16	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
軽		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNSYPWT
重	U1-17	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNSSLKS	ADYDFWSGYFDY
軽		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNSYPWT
重	U1-18	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
軽		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNSYPWT
重	U1-19	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	GDYDFWSGEFDY
軽		sequence not available		
重	U1-20	GGSISSGGYYWS	YIYDSGSTYYNPSLKS	DQGQDGYSYGYGYYYGMDV
軽		QASQDISNYLN	VASNLET	QQCDNLPLT
重	U1-21	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
軽		RASQDIRNDLG	AASRLQS	LQHNSYPWT
重	U1-22	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
軽		RASQGIRNDLG	AASSLQN	LQHNSYPWT
重	U1-23	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
軽		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNSYPWT
重	U1-24	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWNGYFDY
軽		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNNYPWT
重	U1-25	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
軽		RASQGIRNDLG	AASSLQN	LQHNSYPWT
重	U1-26	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDF
軽		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNGYPWT
重	U1-27	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDF
軽		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNGYPWT
重	U1-28	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDS
軽		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNGYPWT
重	U1-29	GFTFNSYDMH	VIWYDGSNKYYADSVKG	DRLCTNGVCYEDYGMDV
軽		QASQDISNYLN	DASNLET	QHYDTLPLT
重	U1-30	GGSISSGDYYWS	YIYYSGTTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
軽		RAGQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNSYPWT

重	U1-31	GYTFTNYGIS	WISAYDGYRNYAQKLQG	DVQDYGDYDYFDY
軽		RASQSISSYLN	AASSLQS	QQSYSTPIT
重	U1-32	GGSISSGDYYWS	YIYYSGTTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
軽		RAGQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNSYPWT
重	U1-33	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGHFDC
軽		RASQGIRDDLG	AESSLQS	LQHHSYPWT
重	U1-34	GYTFTNYGIS	WISAYDGYRNYAQKLQG	DVQDYGDYDYFDY
軽		RASQSISSYLN	AASSLQS	QQSYSTPIT
重	U1-35	GFTFSDYYMS	YISSSGNNIYHADSVKG	ERYSGYDDPDGFDI
軽		QASQDISNYLS	DASNLET	QQYDNPPCS
重	U1-36	GGSISSGYYYWS	YIYYSGTTYYNPSFKS	ADYDFWSGHFDY
軽		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNSYPWT
重	U1-37	GYTFTSYGIS	WISAYDGHTNYAQKLQG	DPHDYSNYEAFDF
軽		RASQSISSYLN	AASSLQS	QQSYSTPIT
重	U1-38	GFSLSTSGVGVG	LIYWNDDKRYSPSLKS	RDEVRGFDY
軽		RSSQSLVYSDGYTYLH	KVSNWDS	MQGAHWPIT
重	U1-39	GFTVSSNYMS	VIYSGGSTYYADSVKG	GQWLDV
軽		RSSQSLLHSNGYNYLD	LGFHRAS	RQALQTPLT
重	U1-40	GGSISSGGYYWS	YIYSSGSTYYNPSLKS	DRELELYYYYYGMDV
軽		RSSQSLLYSNGYNYLD	LGSNRAS	MQALQTPLT
重	U1-41	GGSISSGGYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	DRELSGYSNYYGVDV
軽		RASQAISNYLN	AASSLQS	QQNNSLPIT
重	U1-42	GYSFTSYWIG	IIYPGDSDTRYSPSFQG	HENYGDYNY
軽		RASQSIRSYLN	AASSLQS	QQSNGSPLT
重	U1-43	GGSISSGGYYWS	YIYYSGSTYYNPSLRS	DRERFWDDYGDPQGMDV

軽		RASQSISSYLH	AASSLQS	QQSYSNPLT
重	U1-44	GYSFTSYWIG	IIWPGDSDTIYSPSFQG	HENYGDYNY
軽		RASQSIRSYLN	AASSLQS	QQSISSPLT
重	U1-45	GYTFTSYDIN	WMNPNSGDTGYAQVFQG	FGDLPYDYSYYEWFDP
軽		RASQSISSYLN	AASSLQS	QQSYSTPLT
重	U1-46	GDSVSSNSAAWN	RTYYRSKWYNDYAVSVKS	DLYDFWSGYPYYYGMDV
軽		配列入手不能		
重	U1-47	GDSVSSNSAAWN	RTYYRSKWYNDYAVSVKS	DYYGSGSFYYYYGMDV
軽		RASQSISSYLN	AASNLQS	QQSYSTPRT
重	U1-48	GGSISSYYWS	HIYTSGSTNYNPSLKS	EAIFGVGPYYYYGMDV
軽		配列入手不能		
重	U1-49	GYTFTGYYMH	WINPNIGGTNCAQKFQG	GGRYSSSWSYYYYGMDV
軽		KSSQSLLLSDGGTYLY	EVSNRFS	MQSMQLPIT
重	U1-50	GGSVSSGGYYWS	YIYYSGSTNYNPSLKS	GGDSNYEDYYYYYGMDV
軽		RASQSISIYLH	AASSLQS	QQSYTSPIT
重	U1-51	GGSISSYYWS	YIYYSGSTNYNPSLKS	DSSYYDSSGYYLYYYAMDV
軽		KSSQSVLYSSNNKNYLA	WASTRES	QQYYTTPLT
重	U1-52	GGSISSGGYYWS	NIYYSGSTYYNPSLKS	GGTGTNYYYYYGMDV
軽		RASQSVSSSYLA	GASSWAT	QQYGSSPLT
重	U1-53	GFTFSIYSMN	YISSSSSTIYYADSVKG	DRGDFDAFDI
軽		QASQDITNYLN	DASNLET	QQCENFPIT
重	U1-55.1	GGSVSSGGYYWN	YINYSGSTNYNPSLKS	DRELELYYYYYGMDV
軽		U1-55と同一		
重	U1-55	U1-55.1と同一		
軽		RSSQSLLYSNGYKYLD	LGSNRAS	MQALQTPIT
重	U1-57.1	U1-57と同一		

軽		RSSQSLLYSNGYKYLD	LGSNRAS	MQALQTPIT
重	U1-57	GGSVSSGGYYWN	YINYSGSTNYNPSLKS	DRELELYYYYYGMDV
軽		U1-57.1と同一		
重	U1-58	GFTFSSYGMH	VIWYDGSNKYYADSVKG	AARLDYYYGMDV
軽		RASQSINSYLN	GASGLQS	QQSYSSPLT
重	U1-59	GGSFSGYYWS	EINHSGSTNYNPSLKS	DKWTWYFDL
軽		RSSQSVLYSSSNRNYLA	WASTRES	QQYYSTPRT
重	U1-61.1	GVSISSGGYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	DSESEYSSSSNYGMDV
軽		RASQTISSYLN	AASSLQG	QQSYSNPLT
重	U1-61	GVSISSGGYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	DSESEYSSSSNYGMDV
軽		U1-61.1と同一		
重	U1-62	GYSFTSYWIG	IIYPGDSDTRYSPSFQG	QMAGNYYYGMDV
軽		RASQSVISIYLA	GASSRAT	QQYGSSPCS

【００７４】

新たに作製されたモノクローナル抗体が、Ｕ１－４９、Ｕ１－５３、Ｕ１－５９、Ｕ１－７又はＵ１－９抗体の結合する部分ペプチド又は部分立体構造に結合すれば、該抗体がＵ１－４９、Ｕ１－５３、Ｕ１－５９、Ｕ１－７又はＵ１－９抗体と同一のエピトープに結合すると判定することができる。また、Ｕ１－４９、Ｕ１－５３、Ｕ１－５９、Ｕ１－７又はＵ１－９抗体のＨＥＲ３に対する結合に対して該抗体が競合する（すなわち、該抗体がＵ１－４９、Ｕ１－５３、Ｕ１－５９、Ｕ１－７又はＵ１－９抗体とＨＥＲ３の結合を妨げる）ことを確認することによって、具体的なエピトープの配列又は構造が決定されていなくても、該抗体がＵ１－４９、Ｕ１－５３、Ｕ１－５９、Ｕ１－７又はＵ１－９抗体と同一のエピトープに結合すると判定することができる。エピトープが同一であることが確認された場合、該抗体がＵ１－４９、Ｕ１－５３、Ｕ１－５９、Ｕ１－７又はＵ１－９抗体と同等の生物活性を有していることが強く期待される。

【００７５】

本発明によれば、本発明のＨＥＲ３結合タンパク質は、ＨＥＲ３の細胞外部分中の少なくとも１つのエピトープと相互作用する。エピトープは、好ましくは、アミノ末端ドメインであるドメインＬ１（アミノ酸１９から１８４）、システインに富む２つのドメインであるドメインＳ１（アミノ酸１８５から３２７）及びＳ２（アミノ酸５００から６３２）、システインに富む２つのドメインに隣接しているドメインＬ２（３２８から４９９）又はＨＥＲ３ドメインの組み合わせの中に位置する。エピトープは、Ｌ１及びＳ１の一部によって構成されるエピトープ等（但し、これに限定されない。）のドメインの組み合わせ中にも位置し得る。さらに、本発明の結合タンパク質は、ＨＥＲ３へのその結合がＨＥＲ

３によって媒介されるシグナル伝達を低下させることをさらに特徴とする。本発明に従って、ＨＥＲ３によって媒介されるシグナル伝達の低下は、例えば、細胞表面からＨＥＲ３分子を少なくとも部分的に消失させるＨＥＲ３の下方制御によって、又は実質的に不活性な形態（すなわち、安定化されていない形態に比べて、より低いシグナル伝達を示す形態）の、細胞表面上のＨＥＲ３の安定化によって引き起こされ得る。或は、ＨＥＲ３によって媒介されるシグナル伝達の低下は、ＨＥＲ３への、リガンド又はＨＥＲファミリーの別のメンバーの結合、ＨＥＲ－２へのＧＲＢ２の結合若しくはＳＨＣへのＧＲＢ２の結合に影響を与える（例えば、減少又は阻害する）ことによって、受容体チロシンリン酸化、ＡＫＴリン酸化、ＰＹＫ２チロシンリン酸化若しくはＥＲＫ２リン酸化を阻害することによって、又は腫瘍の浸潤性を減少させることによっても引き起こされ得る。或は、ＨＥＲ３によって媒介されるシグナル伝達の低下は、他のＨＥＲファミリーのメンバーとのＨＥＲ３含有二量体の形成に影響を与える（例えば、減少又は阻害する）ことによっても引き起こされ得る。とりわけ、１つの例は、ＨＥＲ３－ＥＧＦＲタンパク質複合体の形成を減少又は阻害することであり得る。

【００７６】

さらに、本発明において、配列番号１乃至２３２のいずれか一つに示されているアミノ酸配列中の僅かな変動は、本発明によって包含されるものと想定されるが、但し、アミノ酸配列中の変動は、配列番号１乃至２３２のいずれか一つに示されている配列の少なくとも７５％、より好ましくは少なくとも８０％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％及び最も好ましくは９９％を維持する。変動は、フレームワーク領域内（すなわち、ＣＤＲ外）、ＣＤＲ内、又はフレームワーク領域及びＣＤＲ内に生じ得る。配列番号１から２３２に示されているアミノ酸配列中の好ましい変動、すなわち、１乃至数個のアミノ酸の欠失、挿入及び／又は置換は、機能的ドメインの境界付近に生じる。構造的及び機能的ドメインは、ヌクレオチド及び／又はアミノ酸配列データを、公共の配列データベース又は独自の配列データベースと比較することによって同定することが可能である。公知の構造及び／又は機能の他の結合タンパク質中に生じる配列モチーフ又は予測されるタンパク質立体構造ドメインを同定するために、コンピュータ化された比較法を使用することが可能である。公知の三次元構造に折り畳まれるタンパク質配列を同定するための方法は公知である。例えばＢｏｗｉｅ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５３，１６４（１９９１）；Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ（Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ，Ｅｄ．，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８４））；Ｉｎｔｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｔｏ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ（Ｃ．Ｂｒａｎｄｅｎ ａｎｄ Ｊ．Ｔｏｏｚｅ，ｅｄｓ．，Ｇａｒｌａｎｄ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．（１９９１））；及びＴｈｏｒｎｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３５４：１０５（１９９１）を参照されたい（これらは全て、参照により本明細書中に組み込まれる。）。したがって、当業者であれば、本発明に従って構造及び機能的ドメインを定義するために使用され得る配列モチーフ及び構造的立体構造を認めることができる。その様なアミノ酸配列中の変動を有する重鎖及び軽鎖を組み合わせて得られる抗体の中から、元の抗体（親抗体）と同等の又は親抗体より優れた抗体を選択することが可能である。本発明のＨＥＲ３結合蛋白質、抗ＨＥＲ３抗体等は、前述の様にアミノ酸配列中に変動が生じても、ＨＥＲ３結合活性を保持する。

本発明において「相同性」は「同一性」と同義である。二種類のアミノ酸配列間の相同性は、Ｂｌａｓｔ ａｌｇｏｒｉｔｈｍ ｖｅｒｓｉｏｎ ２．２．２（Ａｌｔｓｃｈｕｌ，Ｓｔｅｐｈｅｎ Ｆ．，Ｔｈｏｍａｓ Ｌ．Ｍａｄｄｅｎ，Ａｌｅｊａｎｄｒｏ Ａ．Ｓｃｈａｅｆｆｅｒ，Ｊｉｎｇｈｕｉ Ｚｈａｎｇ，Ｚｈｅｎｇ Ｚｈａｎｇ，Ｗｅｂｂ Ｍｉｌｌｅｒ，ａｎｄ Ｄａｖｉｄ Ｊ．Ｌｉｐｍａｎ（１９９７），「Ｇａｐｐｅｄ ＢＬＡＳＴ ａｎｄ ＰＳＩ－ＢＬＡＳＴ：ａ ｎｅｗ ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎ ｄａｔａｂａｓｅ ｓｅａｒｃｈ ｐｒｏｇｒａｍｓ」，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：３３８９－３４０２）のデフォルトパラ

メーターを使用することによって決定することができる。Ｂｌａｓｔ ａｌｇｏｒｉｔｈｍは、例えば、インターネットでwww.ncbi.nlm.nih.gov/blastにアクセスすることによっても使用することができる。

【００７７】

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

本発明の抗ＨＥＲ３抗体には、ＭＥＨＤ－７９４５Ａ（又はｄｏｌｉｇｏｔｕｚｕｍａｂ）、ＲＧ－７１１６、ＭＭ－１１１、ＭＭ－１２１（又はｓｅｒｉｂａｎｔｕｍａｂ）、ＭＭ－１４１、ＬＪＭ－７１６、ｈｕＨＥＲ３－８、ｔｒｉ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ ａｎｔｉ－ＥＧＦＲ／ＥｒｂＢ３ ｚｙｂｏｄｙ、ＧＳＫ－２８４９３３０、ＲＥＧＮ－１４００、ＫＴＮ－３３７９、ＡＶ－２０３、ｍｏｎｏｓｐｅｃｉｆｉｃ ｓｕｒｒｏｂｏｄｙ （ＥｒｂＢ３）、ｌｕｍｒｅｔｕｚｕｍａｂ、ＭＰ－ＥＶ－２０、ＺＷ－９、Ｄｉｍｅｒｃｅｐｔ™、ａｎｔｉ－Ｅｒｂ３ ｓｕｒｒｏｂｏｄｙ（ＳＬ－１７５又はＳＬ－１７６）、ＳＹＭ－０１３、それらの改変体、活性断片、修飾体等も含まれる。

【００７８】

抗体の性質を比較する際の別の指標の一例としては、抗体の安定性を挙げることができる。示差走査カロリメトリー（ＤＳＣ）は、蛋白の相対的構造安定性のよい指標となる熱変性中点（Ｔｍ）を素早く、また正確に測定することができる装置である。ＤＳＣを用いてＴｍ値を測定し、その値を比較することによって、熱安定性の違いを比較することができる。抗体の保存安定性は、抗体の熱安定性とある程度の相関を示すことが知られており（Ｌｏｒｉ Ｂｕｒｔｏｎ，ｅｔ．ａｌ．，Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ａｎｄ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（２００７）１２，ｐ．２６５－２７３）、熱安定性を指標に、好適な抗体を選抜することができる。抗体を選抜するための他の指標としては、適切な宿主細胞における収量が高いこと、及び水溶液中での凝集性が低いことを挙げることができる。例えば収量の最も高い抗体が最も高い熱安定性を示すとは限らないので、以上に述べた指標に基づいて総合的に判断して、ヒトへの投与に最も適した抗体を選抜する必要がある。

【００７９】

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

【００８０】

また、本発明の抗体に結合している糖鎖修飾を調節すること（グリコシル化、脱フコース化等）によって、抗体依存性細胞傷害活性を増強することが可能である。抗体の糖鎖修飾の調節技術としては、国際公開第１９９９／５４３４２号、同２０００／６１７３９号、同２００２／３１１４０号等が知られているが、これらに限定されるものではない。本発明の抗体には当該糖鎖修飾が調節された抗体も含まれる。

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

真核細胞を宿主として使用する場合、動物細胞、植物細胞、真核微生物を用いることができる。特に動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば、サルの細胞であるＣＯＳ細胞（Ｇｌｕｚｍａｎ，Ｙ．Ｃｅｌｌ（１９８１）２３，ｐ．１７５－１８２、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－１６５０）、マウス線維芽細胞ＮＩＨ３Ｔ３（ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－１６５８）やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ細胞、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－６１）のジヒドロ葉酸還元酵素欠損株（Ｕｒｌａｕｂ，Ｇ．ａｎｄ　Ｃｈａｓｉｎ，Ｌ．Ａ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．（１９８０）７７，ｐ．４１２６－４２２０）を挙げることができる。

原核細胞を使用する場合は、例えば、大腸菌、枯草菌を挙げることができる。

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

【００８１】

なお、哺乳類培養細胞で生産される抗体の重鎖のカルボキシル末端のリシン残基が欠失することが知られており（Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ　Ａ，７０５：１２９－１３４（１９９５））、また、同じく重鎖カルボキシル末端のグリシン、リシンの２アミノ酸残基が欠失し、新たにカルボキシル末端に位置するプロリン残基がアミド化されることが知られている（Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，３６０：７５－８３（２００７））。しかし、これらの重鎖配列の欠失及び修飾は、抗体の抗原結合能及びエフェクター機能（補体の活性化や抗体依存性細胞障害作用等）には影響を及ぼさない。したがって、本発明に係る抗体には、当該修飾を受けた抗体及び当該抗体の機能性断片も含まれ、重鎖カルボキシル末端において１又は２のアミノ酸が欠失した欠失体、及びアミド化された当該欠失体（例えば、カルボキシル末端部位のプロリン残基がアミド化された重鎖）等も包含される。但し、抗原結合能及びエフェクター機能が保たれている限り、本発明に係る抗体の重鎖のカルボキシル末端の欠失体は上記の種類に限定されない。本発明に係る抗体を構成する２本の重鎖は、完全長及び上記の欠失体からなる群から選択される重鎖のいずれか一種であってもよいし、いずれか２種を組み合わせたものであってもよい。各欠失体の量比は本発明に係る抗体を産生する哺乳類培養細胞の種類及び培養条件に影響を受け得るが、本発明に係る抗体の主成分としては２本の重鎖の双方でカルボキシル末端の１つのアミノ酸残基が欠失している場合を挙げることができる。本発明の全長抗体（本発明においては、単に「抗体」とも記載される）の範囲には、それらの欠失体、１種又は２種以上のそれらの欠失体を含む混合物等も含まれる。また、本発明の「抗体」には、Ｎ末端がグルタミンの場合にそれが環化してピログルタミンになっている重鎖又は軽鎖、及び／又は、システインの一部がシステイニル（cysteinyl）化している重鎖又は軽鎖を含むものも含まれる。

【００８２】

本発明の抗ＨＥＲ３抗体のアイソタイプとしては、例えば、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ又はＩｇＭ型、好ましくは、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＭ１及びＩｇＭ２型等を挙げることができるがそれらに限定されるものではなく、より好適にはＩｇＧ又はＩｇＭ型のものであり、最適にはＩｇＧ１、ＩｇＧ２又はＩｇＧ４である。

【００８３】

抗体の生物活性としては、一般的には抗原結合活性、抗原と結合することによって該抗原を発現する細胞に内在化する活性、抗原の活性を中和する活性、抗原の活性を増強する活性、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）活性、補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）活性及び抗体依存性細胞媒介食作用（ＡＤＣＰ）を挙げることができるが、本発明に係る抗体が有する機能は、ＨＥＲ３に対する結合活性であり、好ましくはＨＥＲ３と結合することによっ

てＨＥＲ３発現細胞に内在化する活性である。さらに、本発明の抗体は、細胞内在化活性に加えて、ＡＤＣＣ活性、ＣＤＣ活性及び／又はＡＤＣＰ活性を併せ持っていてもよい。

【００８４】

ある観点において、例えば、治療候補物としてＨＥＲ３に対する抗体を作製することに関して、本発明の抗ＨＥＲ３抗体は、補体を固定し、補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）に関与できることが望ましい場合があり得る。マウスＩｇＭ、マウスＩｇＧ２ａ、マウスＩｇＧ２ｂ、マウスＩｇＧ３、ヒトＩｇＭ、ヒトＩｇＧ１、ヒトＩｇＧ３及びヒトＩｇＡ等（但し、これらに限定されない。）、補体の固定及び補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）への関与が可能な抗体のイソタイプが多数存在する。作製される抗体は、この様なイソタイプを最初から有する必要はなく、むしろ、作製された抗体は、あらゆるイソタイプを有することができること、並びに、本分野において周知である慣用の分子生物学的技術を用いて、適切な発現ベクター中に分子クローニングされた定常領域遺伝子又はｃＤＮＡへ、分子クローニングされたＶ領域遺伝子又はｃＤＮＡを付加し、次いで、本分野で公知の技術を用いて宿主細胞中で抗体を発現させることによって抗体をイソタイプ交換できることが理解される。イソタイプ交換された抗体は、天然に存在する変種に比べて優れたＣＤＣを有する様に分子的に加工され（Ｉｄｕｓｏｇｉｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１６６，２５７１－２５７５）、本分野で公知の技術を用いて、宿主細胞中で組換え的に発現されたＦｃ領域も有し得る。この様な技術には、とりわけ、直接的な組換え技術（例えば、米国特許第４，８１６，３９７号を参照。）、細胞－細胞融合技術（例えば、米国特許第５，９１６，７７１号及び米国特許第６，２０７，４１８号）の使用が含まれる。細胞－細胞融合技術では、何れかの所望のイソタイプを有する重鎖を保有する骨髄腫又は他の細胞株（ＣＨＯ等）が調製され、さらに軽鎖を保有する別の骨髄腫又は他の細胞株（ＣＨＯ等）が調製される。その後、この様な細胞を融合し、完全な状態の抗体を発現する細胞株を単離することができる。例として、（抗体の特異性及び抗体の親和性の幾つかを規定する）同じ可変領域を有しながら、ヒトＩｇＭ、ヒトＩｇＧ１又はヒトＩｇＧ３イソタイプを作製するために、ＨＥＲ３抗原への所望の結合を有するヒト抗ＨＥＲ３ＩｇＧ４抗体を容易にイソタイプ交換させ得る。その後、この様な分子は、補体を固定し、ＣＤＣへ関与することが可能であり得る。

【００８５】

さらに、本発明の抗ＨＥＲ３抗体は、単球及びナチュラルキラー（ＮＫ）細胞等のエフェクター細胞上のＦｃ受容体へ結合することができ、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）に関与することも望ましい場合があり得る。マウスＩｇＧ２ａ、マウスＩｇＧ２ｂ、マウスＩｇＧ３、ヒトＩｇＧ１及びヒトＩｇＧ３等（但し、これらに限定されない。）、上記のことが可能な抗体のイソタイプが多数存在する。作製される抗体は、この様なイソタイプを最初から有する必要はなく、むしろ、作製された抗体は、あらゆるイソタイプを有することができること、並びに、本分野において周知である慣用の分子生物学的技術を用いて、適切な発現ベクター中に分子クローニングされた定常領域遺伝子又はｃＤＮＡへ、分子クローニングされたＶ領域遺伝子又はｃＤＮＡを付加した後、本分野で公知の技術を用いて抗体を宿主細胞中で発現させることによって、抗体のイソタイプ交換を実施できることが理解される。イソタイプ交換された抗体は、天然に存在する変種に比べて優れたＡＤＣＣを有する様に分子的に加工され（Ｓｈｉｅｌｄｓ ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ．，２７６，６５９１－６６０４）、本分野で公知の技術を用いて、宿主細胞中で組換え的に発現されたＦｃ領域も有し得る。この様な技術には、とりわけ、直接的な組換え技術（例えば、米国特許第４，８１６，３９７号を参照。）、細胞－細胞融合技術（例えば、米国特許第５，９１６，７７１号及び米国特許第６，２０７，４１８号を参照。）の使用が含まれる。細胞－細胞融合技術では、何れかの所望のイソタイプを有する重鎖を保有する骨髄腫又は他の細胞株（ＣＨＯ等）が調製され、及び軽鎖を保有する別の骨髄腫又は他の細胞株（ＣＨＯ等）が調製される。その後、この様な細胞を融合し、完全な状態の抗体を発現する細胞株を単離することができる。例として、（抗体の特異性及び抗体の親和性の幾つかを規定する）同じ可変領域を有しながら、ヒトＩｇＧ１又はヒトＩｇＧ３イソタイ

プを作製するために、ＨＥＲ３抗原への所望の結合を有するヒト抗ＨＥＲ３ＩｇＧ４抗体を容易にイソタイプ交換させ得る。次いで、この様な分子は、エフェクター細胞上のＦｃγＲへ結合し、ＡＤＣＣに関与することが可能であり得る。

【００８６】

得られた抗体は、均一にまで精製することができる。抗体の分離、精製は通常の蛋白質で使用されている分離、精製方法を使用すればよい。例えばカラムクロマトグラフィー、フィルター濾過、限外濾過、塩析、透析、調製用ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組み合わせれば、抗体を分離、精製することができる（Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ ｆｏｒ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ ａｎｄ Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｃｏｕｒｓｅ Ｍａｎｕａｌ, Ｄａｎｉｅｌ Ｒ．Ｍａｒｓｈａｋ ｅｔ ａｌ．ｅｄｓ．, Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９９６）；Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ．Ｅｄ Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｄａｖｉｄ Ｌａｎｅ, Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（１９８８））が、これらに限定されるものではない。

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

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

アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインＡカラム、プロテインＧカラムを挙げることができる。例えばプロテインＡカラムを用いたカラムとして、Ｈｙｐｅｒ Ｄ，ＰＯＲＯＳ，Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆ．Ｆ．（ファルマシア社）等を挙げることができる。

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

【００８７】

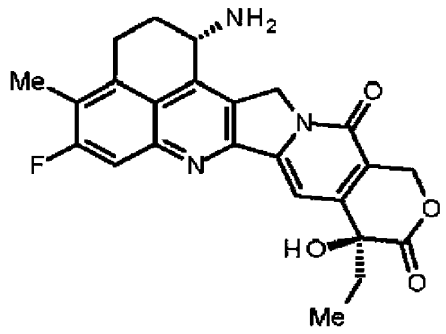
［抗腫瘍性化合物］

本発明の抗ＨＥＲ３抗体－薬物コンジュゲートに結合される抗腫瘍性化合物について述べる。本発明で使用される抗腫瘍性化合物としては、抗腫瘍効果を有する化合物であって、リンカー構造に結合できる置換基、部分構造を有するものであれば特に制限はない。抗腫瘍性化合物は、リンカーの一部又は全部が腫瘍細胞内で切断されて抗腫瘍性化合物部分が遊離して抗腫瘍効果が発現される。リンカーが薬物との結合部分で切断されれば抗腫瘍性化合物が未修飾の構造で遊離され、その本来の抗腫瘍効果が発揮される。

本発明で使用される抗腫瘍性化合物として、カンプトテシン誘導体であるエキサテカン（(1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3′,4′:6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン；次式：）

【００８８】

【化１６】



【００８９】
を好適に使用することができる。このエキサテカンは、優れた抗腫瘍活性を有しているものの、抗腫瘍薬として市販されるには至っていない。同化合物は、公知の方法で容易に取得でき、１位のアミノ基をリンカー構造への結合部位として好適に使用することができる。また、エキサテカンはリンカーの一部が結合した状態で腫瘍細胞内で遊離される場合もあるが、この様な構造であっても優れた抗腫瘍効果が発揮される優れた化合物である。

エキサテカンはカンプトテシン構造を有するので、酸性水性媒体中（例えばpH3程度）ではラクトン環が形成された構造（閉環体）に平衡が偏り、一方、塩基性水性媒体中（例えばpH10程度）ではラクトン環が開環した構造（開環体）に平衡が偏ることが知られている。この様な閉環構造及び開環構造に対応するエキサテカン残基を導入した薬物コンジュゲートであっても同等の抗腫瘍効果が期待され、いずれの状態のものも本発明の範囲に包含されることはいうまでもない。

【００９０】
他の抗腫瘍性化合物として例えば、ドキソルビシン、ダウノルビシン、マイトマイシンＣ、ブレオマイシン、シクロシチジン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、メトトレキセート、白金系抗腫瘍剤（シスプラチン若しくはその誘導体）、タキソール若しくはその誘導体、その他のカンプトテシン若しくはその誘導体（特開平6-87746号公報に記載された抗腫瘍剤）等を挙げることができる。

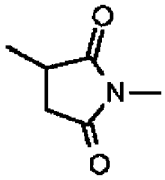
【００９１】
抗体－薬物コンジュゲートにおいて、抗体１分子への薬物の結合数は、その有効性、安全性に影響する重要因子である。抗体－薬物コンジュゲートの製造は、薬物の結合数が一定の数となるよう、反応させる原料・試薬の使用量等の反応条件を規定して実施されるが、低分子化合物の化学反応とは異なり、異なる数の薬物が結合した混合物として得られるのが通常である。抗体１分子への薬物の結合数は平均値、すなわち、平均薬物結合数として特定され、表記される。本発明でも原則として断りのない限り、すなわち、異なる薬物結合数をもつ抗体－薬物コンジュゲート混合物に含まれる特定の薬物結合数をもつ抗体－薬物コンジュゲートを示す場合を除き、薬物の結合数は平均値を意味する。

抗体分子へのエキサテカン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個程度のエキサテカンを結合させることができるが、好ましくは２から８個であり、より好ましくは３から８個である。なお、当業者であれば本願の実施例の記載から抗体に必要な数の薬物を結合させる反応を設計することができ、エキサテカンの結合数をコントロールした抗体－薬物コンジュゲートを取得することができる。

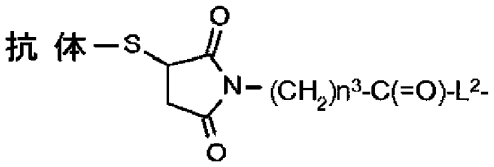
本発明の抗体－薬物コンジュゲートは抗体１分子への薬物の結合数が多くなった場合でも、凝集、不溶性、フラグメンテーション等は生じ難い。

【００９２】
［リンカー構造］
本発明の抗ＨＥＲ３抗体－薬物コンジュゲートにおいて、抗腫瘍性化合物を抗ＨＥＲ３抗体に結合させるリンカー構造について述べる。当該リンカーは、次式：

$-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$又は$-L^1-L^2-L^P-$
の構造を有しており、抗体はL^1の末端（L^2が結合するのとは反対側の末端）で結合し、抗腫瘍性化合物は$-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$部分のカルボニル基又はL^PのＣ末端で結合する。
n^1は、０から６の整数を示すが、好ましくは１から５の整数であり、より好ましくは１から３である。
【００９３】
１．L^1
L^1は、
$-(Succinimid-3-yl-N)-(CH_2)n^3-C(=O)-$
の構造で示される。
ここで、n^3は、２から８の整数であり、『$-(Succinimid-3-yl-N)-$』は、次式：
【００９４】
【化１７】



【００９５】
で示される構造を有する。この部分構造における３位が抗ＨＥＲ３抗体への結合部位である。この３位での該抗体との結合は、チオエーテルを形成して結合することが特徴である。この構造部分の１位の窒素原子は、この構造が含まれるリンカー内に存在するメチレンの炭素原子と結合する。すなわち、$-(Succinimid-3-yl-N)-(CH_2)n^3-C(=O)-L^2-$は次式で示される構造である（ここで、「抗体－Ｓ－」は抗体由来である。）。
【００９６】
【化１８】



【００９７】
式中、n^3は、２から８の整数であるが、好ましくは２から５である。
【００９８】
L^1の具体例としては、
$-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-$、
$-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$、
$-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$、
$-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$
等を挙げることができる。
【００９９】
２．L^2
L^2は、
$-NH-(CH_2CH_2-O)n^4-CH_2CH_2-C(=O)-$
で示される構造であるが、L^2は存在しなくともよく、この場合L^2は単結合となる。特に本発明の薬物－リンカー構造においてはL^Pが薬物に直接結合する場合があるが、その場合に

はこのL^2は、単結合であることが特に好ましい。n^4は、１から６の整数であり、好ましくは２から４である。L^2は末端のアミノ基でL^1に結合し、反対の末端のカルボニル基でL^Pと結合する。

【０１００】

L^2の具体例としては、

-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-、
-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-、
-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-、
-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-、
-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-、
-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-

等を挙げることができる。

【０１０１】

３．L^P

L^Pは、２から７個のアミノ酸で構成されるペプチド残基である。すなわち、２から７個のアミノ酸がペプチド結合したオリゴペプチドの残基によって構成される。L^Pは、Ｎ末端においてL^2に結合し、Ｃ末端においてリンカーの-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-$(CH_2)n^2$-C(=O)-部分のアミノ基に結合する。

【０１０２】

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-又はD-アミノ酸であり、好ましくはL-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、フェニルアラニン（Phe；F）、チロシン（Tyr；Y）、ロイシン（Leu；L）、グリシン（Gly；G）、アラニン（Ala；A）、バリン（Val；V）、リシン（Lys；K）、シトルリン（Cit）、セリン（Ser；S）、グルタミン酸（Glu；E）、アスパラギン酸（Asp；D）等を挙げることができる。これらのうちで好ましくは、フェニルアラニン、グリシン、バリン、リシン、シトルリン、セリン、グルタミン酸、アスパラギン酸を挙げることができる。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。アミノ酸の数は、２から７個でよい。

【０１０３】

L^Pの具体例として、

-GGF-、
-DGGF-、
-(D-)D-GGF-、
-EGGF-、
-GGFG-、
-SGGF-、
-KGGF-、
-DGGFG-、
-GGFGG-、
-DDGGFG-、
-KDGGFG-、
-GGFGGGF-

を挙げることができる。上記の『(D-)D』はD-アスパラギン酸を意味する。本発明の抗体－薬物コンジュゲートの特に好ましいL^Pとして、-GGFG-及び-DGGFG-ペプチド残基を挙げることができる。さらに、本発明の薬物－リンカー構造においてL^Pが薬物に直接結合する場合があるが、その場合に好ましいL^Pとして、-DGGFG-のペンタペプチド残基を挙げることができる。

【０１０４】
４．$L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$
$L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$におけるL^aは、-O-の構造であるか、又は単結合である。n^2は、０から５の整数であるが、好ましくは０から３であり、より好ましくは０又は１である。
$L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$としては以下の構造のものを挙げることができる。
$-O-CH_2-C(=O)-$、
$-O-CH_2CH_2-C(=O)-$、
$-O-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$、
$-O-CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$、
$-O-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$、
$-CH_2-C(=O)-$、
$-CH_2CH_2-C(=O)-$、
$-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$、
$-CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$、
$-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$。
これらのうちでは、
$-O-CH_2-C(=O)-$、
$-O-CH_2CH_2-C(=O)-$
である場合か、L^aが単結合でn^2が０である場合が好ましい。
【０１０５】
リンカーの$-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$で示される構造の具体例として、
$-NH-CH_2-C(=O)-$、
$-NH-CH_2CH_2-C(=O)-$、
$-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-$、
$-NH-CH_2CH_2-O-C(=O)-$、
$-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-$、
$-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$、
$-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$、
$-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$、
等を挙げることができる。
【０１０６】
これらのうちでより好ましくは、
$-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$、
$-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-$、
$-NH-CH_2CH_2-O-C(=O)-$
である。
【０１０７】
リンカーの$-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$は、鎖長として４から７原子の鎖長であるものが好ましいが、さらに好ましくは５又は６原子の鎖長を有するものである。
【０１０８】
本発明の抗ＨＥＲ３抗体－薬物コンジュゲートは、腫瘍細胞内に移動した後にはリンカー部分が切断され、$NH_2-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-(NH-DX)$で示される構造の薬物誘導体が遊離して抗腫瘍作用を発現すると考えられる。本発明の抗体－薬物コンジュゲートから遊離されて抗腫瘍効果を発現する抗腫瘍性誘導体としては、先に挙げたリンカーの$-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$で示される構造の末端がアミノ基となった構造部分を有する抗腫瘍性誘導体を挙げることができるが、特に好ましいものは次のものである。
$NH_2-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$、
$NH_2-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$、
$NH_2-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$、
$NH_2-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$。

なお、$NH_2-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$の場合は同分子内にあるアミナール構造が不安定であるため、さらに自己分解して
$HO-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$
が遊離されることが確認された。これらの化合物は本発明の抗体－薬物コンジュゲートの製造中間体としても好適に用いることができる。

また、本発明の薬物－リンカー構造においてL^Pが薬物に直接結合する場合がある。この場合において、L^PのＣ末端がグリシンであるときには、遊離される抗腫瘍性薬物はエキサテカン自体であるか又はエキサテカンのアミノ基にグリシンが結合した化合物である。

【０１０９】

薬物をエキサテカンとする本発明の抗体－薬物コンジュゲートにおいては、下記の構造の薬物－リンカー構造部分
$-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-(NH-DX)$、又は
$-L^1-L^2-L^P-(NH-DX)$
を抗体に結合させたものが好ましい。これらの薬物－リンカー構造部分は、１抗体あたりの平均結合数として、１から１０を結合させればよいが、好ましくは２から８であり、より好ましくは３から８である。

$-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$、
$-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$、
$-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$、
$-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$、
$-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$、
$-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$、
$-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$、
$-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$、
$-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$、
$-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$、
$-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$、
$-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$、
$-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$、
$-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$、
$-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-(NH-DX)$、
$-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-(NH-DX)$、
$-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-(NH-DX)$、
$-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-(NH-DX)$。

これらのうちでより好ましくは、次のものである。

$-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$、
$-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$、
$-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$、
$-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$、
$-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$、
$-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$、
$-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$、

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-(NH-DX)、
-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-(NH-DX)。
さらに、好ましくは、次のものである。
-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、
-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、
-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、
-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-(NH-DX)。
特に、好ましくは、次のものである。
-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、
-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、
-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)。

【０１１０】

本願の抗体－薬物コンジュゲートにおいて、抗ＨＥＲ３抗体と薬物とを結合するリンカー構造は、これまで述べたリンカー各部において示した好ましい構造のものを結合することで好ましいリンカーを構築することができる。この様なリンカー構造として以下の構造のものを好適に使用することができる。なお構造の左端が抗体との結合部位であり、右端が薬物との結合部位である。

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-、
-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-、
-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-、
-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-、
-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-、
-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-、
-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-、
-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-、
-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-、
-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-、
-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-、
-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-、
-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-、
-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-、
-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-、
-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-、
-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-、
-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-。
これらのうちでより好ましくは、次のものである。
-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-、
-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-、
-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-、
-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-、
-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-、
-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-、
-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-

C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-、
-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-、
-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-。
さらに、好ましくは、次のものを挙げることができる。
-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-、
-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-、
-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-、
-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-。
特に、好ましくは、次のものを挙げることができる。
-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-、
-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-、
-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-。

【０１１１】

［製造方法］

次に、本願発明の抗体－薬物コンジュゲート或はその製造中間体の代表的な製造方法について説明する。なお、以下において、化合物を、各反応式中に示される番号で示す。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。

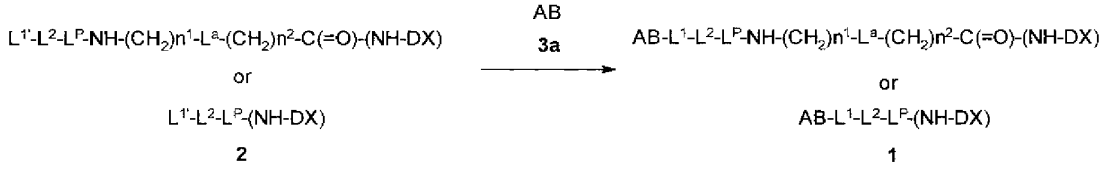
【０１１２】

１．製造方法１

式（１）で示される、チオエーテルを介して抗体と薬物－リンカー構造が結合している抗体－薬物コンジュゲートは、例えば下記の方法によって製造することができる。

【０１１３】

【化１９】

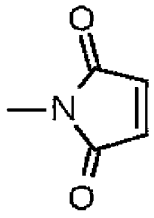


【０１１４】

［式中、ABは、スルフヒドリル基を有する抗体を示し、$L^{1'}$は、L^1で示されるリンカー構造において、リンカー末端がマレイミジル基（次式）：

【０１１５】

【化２０】

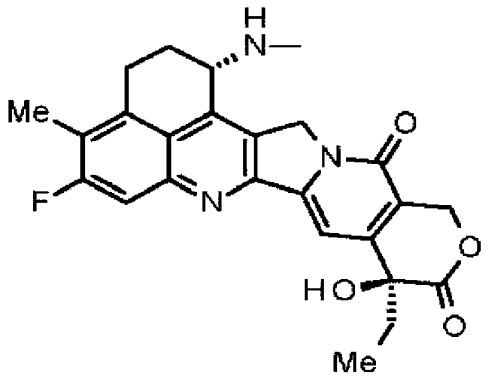


【０１１６】

に変換された構造である（ここで、窒素原子が結合部位である。）。具体的には、-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-で示されるL^1の構造において、当該-(Succinimid-3-yl-N)-部分がマレイミジル基となった構造のリンカーを示す。また、-(NH-DX)は次式：

【０１１７】

【化２１】



【０１１８】
で示される構造であり、エキサテカンの１位のアミノ基の水素原子１個が除かれて生成する基を示す。］

【０１１９】
なお、上記の反応式において、式（１）の化合物では、薬物からリンカー末端までの構造部分１個が１個の抗体に対して結合した構造として解釈され得る。しかしながら、これは説明のための便宜的な記載であって、実際には当該構造部分が抗体分子１個に対して複数個が結合している場合が多い。この状況は以下の製造方法の説明においても同様である。

【０１２０】
すなわち、後述する方法によって入手しうる化合物（２）と、スルフヒドリル基を有する抗体（３ａ）を反応させることによって、抗体－薬物コンジュゲート（１）を製造することができる。

スルフヒドリル基を有する抗体（３ａ）は、当業者周知の方法で得ることができる（Hermanson, G.T, Bioconjugate Techniques, pp.56-136, pp.456-493, Academic Press(1996)）。例えば、Ｔｒａｕｔ’ｓ試薬を抗体のアミノ基に作用させる；Ｎ－サクシンイミジル　Ｓ－アセチルチオアルカノエート類を抗体のアミノ基に作用させた後、ヒドロキシルアミンを作用させる；Ｎ－サクシンイミジル　３－（ピリジルジチオ）プロピオネートを作用させた後、還元剤を作用させる；ジチオトレイトール、２－メルカプトエタノール、トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩（ＴＣＥＰ)等の還元剤を抗体に作用させて抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元してスルフヒドリル基を生成させる；等の方法を挙げることができるがこれらに限定されることはない。

具体的には、還元剤としてＴＣＥＰを、抗体内ヒンジ部ジスルフィド１個当たりに対して０．３乃至３モル当量用い、キレート剤を含む緩衝液中で、抗体と反応させることで、抗体内ヒンジ部ジスルフィドが部分的若しくは完全に還元された抗体を得ることができる。キレート剤としては、例えばエチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）やジエチレントリアミン５酢酸（ＤＴＰＡ）等を挙げることができる。これ等を１ｍＭ乃至２０ｍＭの濃度で用いればよい。緩衝液としては、リン酸ナトリウムやホウ酸ナトリウム、酢酸ナトリウム溶液等を用いることができる。具体的には、抗体は４℃乃至３７℃で１乃至４時間ＴＣＥＰと反応させることで部分的若しくは完全に還元されたスルフヒドリル基を有する抗体（３ａ）を得ることができる。

ここでスルフヒドリル基を薬物－リンカー部分に付加させる反応を実施することでチオエーテル結合によって薬物－リンカー部分を結合させることができる。

スルフヒドリル基を有する抗体（３ａ）１個あたり、２乃至２０モル当量の化合物（２）を使用して、抗体１個当たり２個乃至８個の薬物が結合した抗体－薬物コンジュゲート（１）を製造することができる。具体的には、スルフヒドリル基を有する抗体（３ａ）を含む緩衝液に、化合物（２）を溶解させた溶液を加えて反応させればよい。ここで、緩衝

液としては、酢酸ナトリウム溶液、リン酸ナトリウムやホウ酸ナトリウム等を用いればよい。反応時のｐＨは５乃至９であり、より好適にはｐＨ７付近で反応させればよい。化合物（２）を溶解させる溶媒としては、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）、ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）、ジメチルアセトアミド（ＤＭＡ）、Ｎ－メチル－２－ピロリドン（ＮＭＰ）等の有機溶媒を用いることができる。

化合物（２）を溶解させた有機溶媒溶液を、スルフヒドリル基を有する抗体（３ａ）を含む緩衝液に１乃至２０％ｖ／ｖを加えて反応させればよい。反応温度は、０乃至３７℃、より好適には１０乃至２５℃であり、反応時間は、０．５乃至２時間である。反応は、未反応の化合物（２）の反応性をチオール含有試薬によって失活させることによって終了できる。チオール含有試薬は例えば、システイン又はＮ－アセチル－Ｌ－システイン（ＮＡＣ）である。より具体的には、ＮＡＣを、用いた化合物（２）に対して、１乃至２モル当量加え、室温で１０乃至３０分インキュベートすることにより反応を終了できる。

製造した抗体－薬物コンジュゲート（１）は、以下の共通操作によって濃縮、バッファー交換、精製、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を行い、抗体－薬物コンジュゲート（１）の同定を行うことができる。

【０１２１】

共通操作Ａ：抗体又は抗体－薬物コンジュゲート水溶液の濃縮

Ａｍｉｃｏｎ Ｕｌｔｒａ（５０，０００ ＭＷＣＯ，Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）の容器内に抗体又は抗体－薬物コンジュゲート溶液を入れ、遠心機（Ａｌｌｅｇｒａ Ｘ－１５Ｒ，Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｉｎｃ．）を用いた遠心操作（２０００Ｇ乃至３８００Ｇで５乃至２０分間遠心）にて、抗体又は抗体－薬物コンジュゲート溶液を濃縮した。

【０１２２】

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。ここで、２８０ｎｍ吸光係数は、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、抗体ごとに異なる２８０ｎｍ吸光係数（１．３ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$乃至１．８ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$）を用いた。Ｕ１－５９の場合、そのアミノ酸配列に従って、１．７６８ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$の２８０ｎｍ吸光係数を推定値として用いた。

【０１２３】

共通操作Ｃ：抗体のバッファー交換

Ｓｅｐｈａｄｅｘ Ｇ－２５担体を使用したＮＡＰ－２５カラム（Ｃａｔ．Ｎｏ．１７－０８５２－０２，ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｊａｐａｎ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）を、メーカー規定の方法に従い、塩化ナトリウム（１３７ｍＭ）及びエチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ，５ｍＭ）を含むリン酸緩衝液（１０ｍＭ，ｐＨ６．０；本明細書でＰＢＳ６．０／ＥＤＴＡと称する。）にて平衡化させた。このＮＡＰ－２５カラム一本につき、抗体水溶液２．５ｍＬをのせた後、ＰＢＳ６．０／ＥＤＴＡ３．５ｍＬで溶出させた画分（３．５ｍＬ）を分取した。この画分を共通操作Ａによって濃縮し、共通操作Ｂを用いて抗体濃度の測定を行った後に、ＰＢＳ６．０／ＥＤＴＡを用いて１０ｍｇ／ｍＬに抗体濃度を調整した。

【０１２４】

共通操作Ｄ：抗体－薬物コンジュゲートの精製

Ｓｏｒｂｉｔｏｌ（５％）を含む酢酸緩衝液（１０ｍＭ，ｐＨ５．５；本明細書でＡＢＳと称する。）にてＮＡＰ－２５カラムを平衡化させた。このＮＡＰ－２５カラムに、抗体－薬物コンジュゲート反応水溶液（約２．５ｍＬ）をのせ、メーカー規定の量の緩衝液で溶出させることで、抗体画分を分取した。この分取画分を再びＮＡＰ－２５カラムにのせ、緩衝液で溶出させるゲルろ過精製操作を計２乃至３回繰り返すことで、未結合の薬物リンカーや低分子化合物（トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩（ＴＣＥＰ

）、Ｎ－アセチル－Ｌ－システイン（ＮＡＣ）、ジメチルスルホキシド）を除いた抗体－薬物コンジュゲートを得た。

【０１２５】

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（１）

抗体－薬物コンジュゲートにおける結合薬物濃度は、抗体－薬物コンジュゲート水溶液の２８０ｎｍ及び３７０ｎｍの二波長におけるＵＶ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。

$$A_{280} = A_{D,280} + A_{A,280} = \varepsilon_{D,280} C_D + \varepsilon_{A,280} C_A \quad 式（１）$$
$$A_{370} = A_{D,370} + A_{A,370} = \varepsilon_{D,370} C_D + \varepsilon_{A,370} C_A \quad 式（２）$$

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_{370}は３７０ｎｍ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、$A_{A,370}$は３７０ｎｍ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、$A_{D,370}$は３７０ｎｍにおけるコンジュゲート前駆体の吸光度を示し、$\varepsilon_{A,280}$は２８０ｎｍにおける抗体のモル吸光係数を示し、$\varepsilon_{A,370}$は３７０ｎｍにおける抗体のモル吸光係数を示し、$\varepsilon_{D,280}$は２８０ｎｍにおけるコンジュゲート前駆体のモル吸光係数を示し、$\varepsilon_{D,370}$は３７０ｎｍ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、$\varepsilon_{A,280}$、$\varepsilon_{A,370}$、$\varepsilon_{D,280}$、$\varepsilon_{D,370}$は、事前に用意した値（計算推定値又は化合物のＵＶ測定から得られた実測値）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。$\varepsilon_{A,370}$は、通常、ゼロである。Ｕ１－５９の場合、そのアミノ酸配列に従って、$\varepsilon_{A,280}$は推定値として２５９４００を用いた。$\varepsilon_{D,280}$及び$\varepsilon_{D,370}$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。抗体－薬物コンジュゲート水溶液のA_{280}及びA_{370}を測定し、これらの値を式（１）及び（２）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で除することで１抗体あたりの薬物平均結合数が求めることができる。

本発明においては、以上に説明した、１抗体あたりの薬物平均結合数の求め方を「ＵＶ法」と呼ぶ。

【０１２６】

共通操作Ｆ：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の測定（２）

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（ＨＰＬＣ）分析によっても求めることができる。

［Ｆ－１．ＨＰＬＣ分析用サンプルの調製（抗体－薬物コンジュゲートの還元）］

抗体－薬物コンジュゲート溶液（約１ｍｇ／ｍＬ、６０μＬ）をジチオトレイトール（ＤＴＴ）水溶液（１００ｍＭ、１５μＬ）と混合する。混合物を３７℃で３０分インキュベートすることで、抗体－薬物コンジュゲートのＬ鎖及びＨ鎖間のジスルフィド結合を切断したサンプルを、ＨＰＬＣ分析に用いる。

［Ｆ－２．ＨＰＬＣ分析］
ＨＰＬＣ分析を、下記の測定条件にて行う。
ＨＰＬＣシステム：Ａｇｉｌｅｎｔ １２９０ ＨＰＬＣシステム（Ａｇｉｌｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）
検出器：紫外吸光度計（測定波長：２８０ｎｍ）
カラム：ＰＬＲＰ－Ｓ（２．１×５０ｍｍ、８μｍ、１０００Å；Ａｇｉｌｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｐ／Ｎ ＰＬ１９１２－１８０２）
カラム温度：８０℃
移動相Ａ：０．０４％トリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）水溶液
移動相Ｂ：０．０４％ＴＦＡを含むアセトニトリル溶液
グラジエントプログラム：２９％－３６％（０分－１２．５分）、３６％－４２％（１２．５－１５分）、４２％－２９％（１５分―１５．１分）、２９％－２９％（１５．１分―２５分）
サンプル注入量：１５μＬ
［Ｆ－３．データ解析］
〔Ｆ－３－１〕 薬物の結合していない抗体のＬ鎖（L_0）及びＨ鎖（H_0）に対して、薬物の結合したＬ鎖（薬物が一つ結合したＬ鎖：L_1）及びＨ鎖（薬物が１個結合したＨ鎖：H_1、薬物が２個結合したＨ鎖：H_2、薬物が３個結合したＨ鎖：H_3）は、結合した薬物の数に比例して疎水性が増して保持時間が大きくなることから、L_0、L_1、H_0、H_1、H_2、H_3の順に溶出される。L_0及びH_0との保持時間比較により検出ピークをL_0、L_1、H_0、H_1、H_2、H_3のいずれかに割り当てることができる。
〔Ｆ－３－２〕 薬物リンカーにＵＶ吸収があるため、薬物リンカーの結合数に応じて、Ｌ鎖、Ｈ鎖及び薬物リンカーのモル吸光係数を用いて下式に従ってピーク面積値の補正を行う。

【０１２７】
【数１】

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

【０１２８】
【数２】

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

【０１２９】
ここで、各抗体におけるＬ鎖及びＨ鎖のモル吸光係数（２８０ｎｍ）は、既知の計算方法（Protein Science, 1995, vol.4, 2411-2423）によって、各抗体のＬ鎖及びＨ鎖のアミノ酸配列から推定される値を用いることができる。Ｕ１－５９の場合、そのアミノ酸配列に従って、Ｌ鎖のモル吸光係数として３４６９０を、Ｈ鎖のモル吸光係数として９５０００を推定値として用いた。また、薬物リンカーのモル吸光係数（２８０ｎｍ）は、各薬

物リンカー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、マレイミド基をサクシニイミドチオエーテルに変換した化合物の実測のモル吸光係数（２８０ｎｍ）を用いた。

〔Ｆ－３－３〕　ピーク面積補正値合計に対する各鎖ピーク面積比（％）を下式に従って計算する。

【０１３０】

【数３】

$$\text{L鎖ピーク面積比} = \frac{A_{Li}}{A_{L0} + A_{L1}} \times 100$$

$$\text{H鎖ピーク面積比} = \frac{A_{Hi}}{A_{H0} + A_{H1} + A_{H2} + A_{H3}} \times 100$$

A_{Li}, A_{Hi}：L_i, H_i各々のピーク面積補正値

【０１３１】

〔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を、下式に従って計算する。

薬物平均結合数＝（L_0ピーク面積比ｘ０＋L_0ピーク面積比ｘ１＋H_0ピーク面積比ｘ０＋H_1ピーク面積比ｘ１＋H_2ピーク面積比ｘ２＋H_3ピーク面積比ｘ３）／１００ｘ２

【０１３２】

以下に製造方法1において使用される製造中間体化合物について述べる。製造方法１における式（２）で示される化合物は次式：

【０１３３】

(maleimid-N-yl)-$(CH_2)n^3$-C(=O)-L^2-L^P-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-$(CH_2)n^2$-C(=O)-(NH-DX)又は
(maleimid-N-yl)-$(CH_2)n^3$-C(=O)-L^2-L^P-(NH-DX)

で示される化合物である。

式中、

n^3は、整数の２から８を示し、

L^2は、-NH-$(CH_2CH_2-O)n^4$-CH_2CH_2-C(=O)-又は単結合を示し、

ここで、n^4は、１から６の整数を示し、

L^Pは、フェニルアラニン、グリシン、バリン、リシン、シトルリン、セリン、グルタミン酸、アスパラギン酸から選ばれる２から７個のアミノ酸で構成されるペプチド残基を示し、

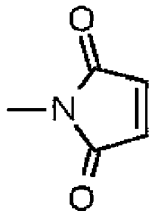
n^1は、０から６の整数を示し、

n^2は、０から５の整数を示し、

L^aは、-O-又は単結合を示し、

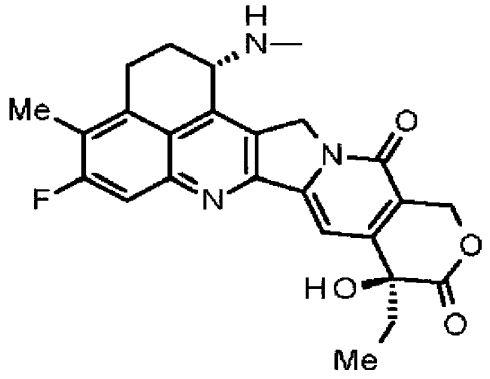
(maleimid-N-yl)-は、次式：

【化２２】



【０１３４】

で示される、マレイミジル基（2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl基）で、窒素原子が結合部位となっている基であり、
-(NH-DX)は、次式：
【化２３】



【０１３５】
で示される、１位のアミノ基の窒素原子が結合部位となっている基である。
【０１３６】
L^Pのペプチド残基としては、フェニルアラニン、グリシン、バリン、リシン、シトルリン、セリン、グルタミン酸、アスパラギン酸から選ばれるアミノ酸からなるアミノ酸残基であるものが製造中間体として好ましい。この様なペプチド残基L^Pのうち、４又は５個のアミノ酸で構成されるペプチド残基であるものが製造中間体として好ましい。より具体的には、L^Pが-GGFG-のテトラペプチド残基又は-DGGFG-のペンタペプチドであるものが製造中間体として好ましいが、さらに好ましくは-GGFG-である。
【０１３７】
また、$-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-$としては、$-NH-CH_2CH_2-$、$-NH-CH_2CH_2CH_2-$、$-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-$、$-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$、$-NH-CH_2-O-CH_2-$、又は$-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$であるものが製造中間体として好ましく、$-NH-CH_2CH_2CH_2-$、$-NH-CH_2-O-CH_2-$、又は$-NH-CH_2CH_2-O-CH_2$であるものがより好ましい。
n^3としては、整数の２から８であるものが製造中間体として好ましい。
L^2は、単結合であるか、$-NH-(CH_2CH_2-O)n^4-CH_2CH_2-C(=O)-$であって$n^4$が整数の２から４のものが製造中間体として好ましい。
【０１３８】
さらに、n^3が、整数の２から５であり、L^2が単結合であり、$-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-$が、$-NH-CH_2CH_2-$、$-NH-CH_2CH_2CH_2-$、$-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-$、$-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$、$-NH-CH_2-O-CH_2-$、又は$-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$であるものが製造中間体として好ましい。そして、これらのうちでより好ましくは、$-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-$が、$-NH-CH_2CH_2-$、$-NH-CH_2CH_2CH_2-$、$-NH-CH_2-O-CH_2-$、又は$-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$である化合物である。さらに、$n^3$が、整数の２又は５であるものが好ましい。
【０１３９】
また、n^3が、整数の２から５であり、L^2が$-NH-(CH_2-CH_2-O)n^4-CH_2-CH_2-C(=O)-$であって、$n^4$が整数の２から４であり、$-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-$が、$-NH-CH_2CH_2-$、$-NH-CH_2CH_2CH_2-$、$-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-$、$-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$、$-NH-CH_2-O-CH_2-$、又は$-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$であるものが製造中間体として好ましい。より好ましくは、n^4が整数の２又は４の化合物である。さらに、$-NH-(CH_2)n^1-L^a-$が、$-NH-CH_2CH_2CH_2-$、$-NH-CH_2-O-CH_2-$、又は$-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$であるものが好ましい。
【０１４０】
この様な本発明化合物の製造に有用な中間体として好ましいものとしては以下のものを例示することができる：

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-(NH-DX)、又は
(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-(NH-DX)。

【０１４１】

上記の製造中間体化合物の群から選ばれる薬物－リンカー化合物を、抗Ｈｅｒ３抗体又はその反応性誘導体と反応させることによって抗Ｈｅｒ３抗体のヒンジ部に存在するジスルフィド結合部分においてチオエーテル結合を形成させて本発明の抗Ｈｅｒ３抗体－薬物コンジュゲートを製造することができる。この場合、抗Ｈｅｒ３抗体の反応性誘導体を使用することが好ましく、特に抗Ｈｅｒ３抗体を還元処理して得られる反応性誘導体が好ましい。

【０１４２】

以下のものが製造中間体としてより好ましい化合物である。

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-(NH-DX)。

【０１４３】

また、上記の中間体化合物群の中では次式：
(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、又は
(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-(NH-DX)。
で示される中間体がさらに好ましい化合物である。

特に好ましくは次式：
(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、
(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、又は
(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)。
で示される化合物である。

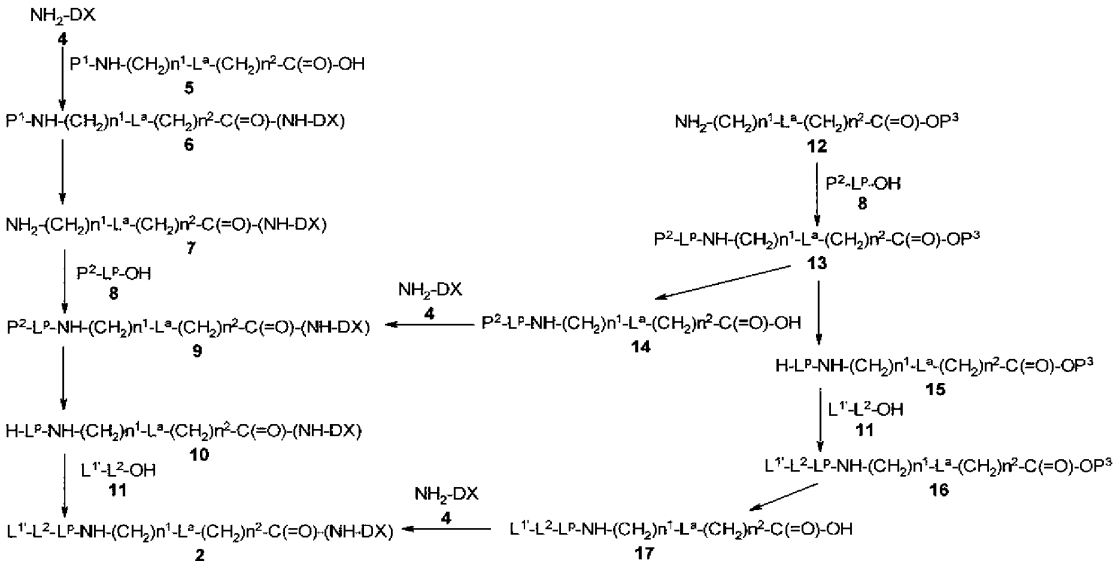
【０１４４】

２．製造方法２

先の製造方法で使用した中間体である式（２）で示される化合物又はそれらの薬理上許容される塩は、例えば下記の方法によって製造することができる。

【０１４５】

【化２４】



【０１４６】

［式中、L^{1}’はL^{1}の末端がマレイミジル基に変換された構造であり、P^{1}、P^{2}及びP^{3}は保護基を示す。］

【０１４７】

カルボン酸（５）を活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物等に誘導し、塩基存在下、NH_2-DX［エキサテカンを示す；化学名：(1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン］（４）又はその薬理上許容される塩と反応させることによって化合物（６）を製造することができる。

この反応は、ペプチド合成に通常用いる反応試薬や条件を準用すればよい。活性エステルには各種のものがあるが、例えばｐ－ニトロフェノール等のフェノール類、Ｎ－ヒドロキシベンゾトリアゾール或はＮ－ヒドロキシスクシンイミド等とカルボン酸（５）をＮ，Ｎ’－ジシクロヘキシルカルボジイミド或は１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド・塩酸塩等の縮合剤を用いて反応させれば製造できる。また、活性エステルは、カルボン酸（５）とペンタフルオロフェニルトリフルオロアセテート等との反応；カルボン酸（５）と１－ベンゾトリアゾリルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファイトとの反応；カルボン酸（５）とシアノホスホン酸ジエチルとの反応（塩入法）；カルボン酸（５）とトリフェニルホスフィン及び２，２’－ジピリジルジスルフィドとの反応（向山法）；カルボン酸（５）と４－（４，６－ジメトキシ－１，３，５－トリアジン－２－イル）－４－メチルモルホリニウムクロライド（ＤＭＴＭＭ）の様なトリアジン誘導体との反応；等によっても製造することができる。また、カルボン酸（５）を塩基存在下に塩化チオニル、オキザリルクロリド等の酸ハロゲン化物で処理することによって製造できる酸ハライド法等によって反応を行うこともできる。

上記の様に得たカルボン酸（５）の活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物を化合物（４）と適当な塩基存在下に不活性な溶媒中で－７８℃～１５０℃の反応温度で反応させることによって化合物（６）を製造することができる。なお、「不活性な溶媒」とはその溶媒が採用された反応において実施される目的とされた反応を阻害することのない溶媒を意味する。

【０１４８】

上記の各工程に用いる具体的な塩基としては、例えば、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム

、ナトリウムエトキシド、カリウムブトキシド、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水素化ナトリウム、水素化カリウム等の、アルカリ金属又はアルカリ土類金属の炭酸塩、アルコキシド、水酸化物、又は水素化物；ｎ－ブチルリチウム等のアルキルリチウム、リチウムジイソプロピルアミド等のジアルキルアミノリチウムに代表される有機金属塩基；リチウムビス（トリメチルシリル）アミド等のビスシリルアミンの有機金属塩基；又は、ピリジン、２，６－ルチジン、コリジン、４－ジメチルアミノピリジン、トリエチルアミン、Ｎ－メチルモルホリン、ジイソプロピルエチルアミン、ジアザビシクロ［５．４．０］ウンデク－７－エン（ＤＢＵ）等の有機塩基等を挙げることができる。

【０１４９】

本反応に用いる不活性な溶媒としては、ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素等のハロゲン化炭化水素系溶媒；テトラヒドロフラン、１，２－ジメトキシエタン、ジオキサン等のエーテル系溶媒；ベンゼン、トルエン等の芳香族炭化水素系溶媒；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－メチルピロリジン－２－オン等のアミド系溶媒；を挙げることができ、これらに加えて場合によってはジメチルスルホキシド、スルホラン等のスルホキシド系溶媒；アセトン、メチルエチルケトン等のケトン系溶媒；メタノール、エタノール等のアルコール系の溶媒等を使用することも可能である。さらにはこれ等を混合して使用することもできる。

【０１５０】

化合物（６）の末端アミノ基の保護基P^1としては、ｔｅｒｔ－ブチルオキシカルボニル基や９－フルオレニルメチルオキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基等、ペプチド合成に通常用いられているアミノ基の保護基を用いることができる。他のアミノ基の保護基としては、アセチル基等のアルカノイル基；メトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基等のアルコキシカルボニル基；パラメトキシベンジルオキシカルボニル基、パラ（又はオルト）ニトロベンジルオキシカルボニル基等のアリールメトキシカルボニル基；ベンジル基、トリフェニルメチル基等のアリールメチル基；ベンゾイル基等のアロイル基；２，４－ジニトロベンゼンスルホニル基、オルトニトロベンゼンスルホニル基等のアリールスルホニル基；を挙げることができる。保護基P^1は、アミノ基を保護する化合物の性質等に応じて選択すればよい。

得られた化合物（６）の末端アミノ基の保護基P^1を脱保護させることによって化合物（７）を製造することができる。この脱保護は、その保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。

Ｎ末端をP^2で保護したペプチドカルボン酸（８）を活性エステル、混合酸無水物等に誘導し、得られた化合物（７）に反応させることによって、化合物（９）を製造することができる。ペプチドカルボン酸（８）と化合物（７）のペプチド結合を形成する反応条件や試薬、塩基、及び不活性な溶媒は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。保護基P^2は、化合物（６）の保護基で述べたものから適宜選択して使用すればよく、アミノ基を保護する化合物の性質等に応じて選択すればよい。また、ペプチド合成に通常用いられている様に、ペプチドカルボン酸（８）を構成するアミノ酸又はペプチドを順次反応と脱保護を繰り返し、伸長させて化合物（９）を製造することもできる。

得られた化合物（９）のアミノ基の保護基P^2を脱保護させることによって化合物（１０）を製造することができる。この保護基は、その保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。

カルボン酸（１１）を活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物等に誘導し、得られた化合物（１０）に反応させることによって、化合物（２）を製造することができる。カルボン酸（１１）と化合物（１０）のペプチド結合を形成する反応条件や試薬、及び塩基、不活性溶媒は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

【０１５１】

化合物（９）は例えば下記の方法でも製造することができる。

Ｎ末端をP^2で保護したペプチドカルボン酸（８）を活性エステル、混合酸無水物等に誘

導し、塩基存在下、カルボキシ基をP^3で保護したアミン化合物（１２）と反応させることによって化合物（１３）を製造することができる。ペプチドカルボン酸（８）と化合物（１２）のペプチド結合を形成する反応条件や試薬、塩基、及び不活性な溶媒は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

化合物（１３）のアミノ基の保護基P^2としては、通常用いられる保護基であれば特に制限はない。具体的には水酸基の保護基としては、メトキシメチル基等のアルコキシメチル基；ベンジル基、４－メトキシベンジル基、トリフェニルメチル基等のアリールメチル基；アセチル基等のアルカノイル基；ベンゾイル基等のアロイル基；ｔｅｒｔ－ブチルジフェニルシリル基等のシリル基；等を挙げることができる。カルボキシ基は、メチル基、エチル基、ｔｅｒｔ－ブチル基等のアルキル基、アリル基、又はベンジル基等のアリールメチル基とのエステル等として保護することができる。アミノ基は、ｔｅｒｔ－ブチルオキシカルボニル基、メトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基等のアルキルオキシカルボニル基；アリルオキシカルボニル基、又は９－フルオレニルメチルオキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基、パラメトキシベンジルオキシカルボニル基、パラ（又はオルト）ニトロベンジルオキシカルボニル基等のアリールメトキシカルボニル基；のほか、アセチル基等のアルカノイル基；ベンジル基、トリフェニルメチル基等のアリールメチル基；ベンゾイル基等のアロイル基；又は２，４－ジニトロベンゼンスルホニル基、オルトニトロベンゼンスルホニル基等のアリールスルホニル基；等を挙げることができる。

カルボキシ基の保護基P^3としては、有機合成化学、中でもペプチド合成においてカルボキシ基の保護基として通常用いられている保護基を使用すればよく、具体的にはメチル基、エチル基、ｔｅｒｔ－ブチル等のアルキルエステル、アリルエステル、ベンジルエステル等であり上記の保護基から適宜選択して使用すればよい。

この場合に、アミノ基の保護基とカルボキシ基の保護基が異なる方法又は条件で除去できることが好ましい。例えばP^2がｔｅｒｔ－ブチルオキシカルボニル基であり、P^3がベンジル基である組み合わせ等を代表的なものとして挙げることができる。それらの保護基はアミノ基とカルボキシ基を保護する化合物の性質等に応じて上述したものから選択すればよく、それらの保護基の切断に際してもその保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。

得られた化合物（１３）のカルボキシ基の保護基P^3を脱保護させることによって化合物（１４）を製造することができる。この脱保護は、その保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。

得られた化合物（１４）を活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物等に誘導し、塩基存在下、化合物（４）と反応させることによって化合物（９）を製造することができる。この反応はペプチド合成に通常用いる反応試薬や条件を準用すればよく、反応条件や試薬、塩基、及び不活性な溶媒は化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

【０１５２】

化合物（２）は例えば下記の方法でも製造することができる。

化合物（１３）のアミノ基の保護基P^2を脱保護させることによって化合物（１５）を製造することができる。この脱保護は、その保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。

カルボン酸誘導体（１１）を活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物等に誘導し、塩基存在下、得られた化合物（１５）と反応させることによって化合物（１６）を製造することができる。ペプチドカルボン酸（１１）と化合物（１５）のアミド結合を形成する反応条件や試薬、塩基、及び不活性な溶媒は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

得られた化合物（１６）のカルボキシ基の保護基を脱保護させることによって化合物（１７）を製造することができる。この脱保護は、化合物（１４）の製造におけるカルボキシ基の脱保護と同様に行うことができる。

化合物（１７）を活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物等に誘導し、塩基存在下、化合物（４）と反応させることによって化合物（２）を製造することができる。

この反応はペプチド合成に通常用いる反応試薬や条件を準用すればよく、反応条件や試薬、塩基、及び不活性な溶媒は化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

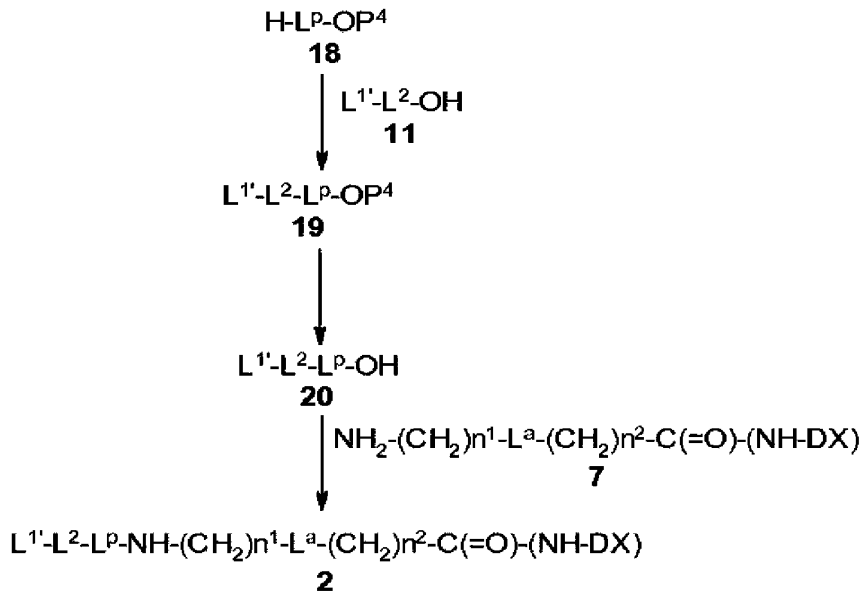
【０１５３】

３．製造方法３

中間体の式（２）で示される化合物は下記の方法によっても製造することもできる。

【０１５４】

【化２５】



【０１５５】

［式中、L^1’はL^1の末端がマレイミジル基に変換された構造であり、P^4は保護基を示す］

【０１５６】

化合物（１１）を活性エステル、混合酸無水物等に誘導し、塩基存在下、Ｃ末端をP^4で保護したペプチドカルボン酸（１８）と反応させることによって化合物（１９）を製造することができる。ペプチドカルボン酸（１８）と化合物（１１）のペプチド結合を形成する反応条件や試薬、塩基、及び不活性な溶媒は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。化合物（１８）のカルボキシ基の保護基P^4は先に述べた保護基から適宜選択して使用すればよい。

得られた化合物（１９）のカルボキシ基の保護基を脱保護させることによって化合物（２０）を製造することができる。この脱保護は、化合物（１４）の製造におけるカルボキシ基の脱保護と同様に行うことができる。

得られた化合物（２０）を活性エステル、又は混合酸無水物等に誘導し、化合物（７）に反応させることによって、化合物（２）を製造することができる。この反応はペプチド合成に通常用いる反応試薬や条件を準用すればよく、反応条件や試薬、塩基、及び不活性な溶媒は化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

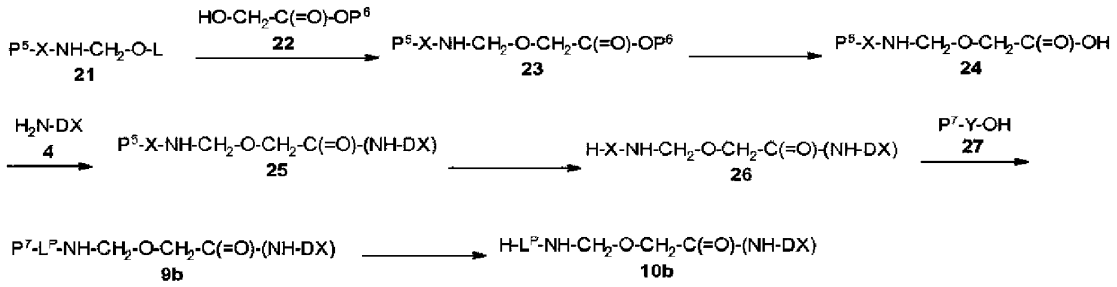
【０１５７】

４．製造方法４

以下に、製造方法２に記載の製造中間体（１０）のうち、n^1=1、L^a=0となった化合物（１０ｂ）の製造方法について詳述する。式（１０ｂ）で示される化合物、その塩又はそれらの溶媒和物は、例えば下記の方法で製造することができる。

【０１５８】

【化２６】



【０１５９】

［式中、L^Pは前記と同じものを示し、Lはアシル基であって、アセチル基等のアルカノイル基若しくはベンゾイル基等のアロイル基であるか、又は水素原子等を示し、Ｘ及びＹは１から３個のアミノ酸からなるオリゴペプチドを、P^5及びP^7はアミノ基の保護基を、P^6はカルボキシ基の保護基を示す］

【０１６０】

式（２１）で示される化合物は、特開２００２－６０３５１号公報に記載される手法や文献（J. Org. Chem., 51巻, 3196頁, 1986年）記載の方法、又はその方法を応用して必要に応じて保護基の除去や官能基変換を行うことによって製造することができる。この他、末端アミノ基が保護されたアミノ酸又はアミノ基が保護されたオリゴペプチドの酸アミドをアルデヒド又はケトンと処理することによって得ることができる。

化合物（２１）を、不活性な溶媒中、酸又は塩基存在下で冷却下から室温での温度条件で水酸基を有する化合物（２２）と反応させることによって、化合物（２３）を製造することができる。

ここで使用できる酸としては例えば、フッ化水素酸、塩酸、硫酸、硝酸、リン酸、ホウ酸等の無機酸；酢酸、クエン酸、パラトルエンスルホン酸、メタンスルホン酸等の有機酸；テトラフルオロボレート、塩化亜鉛、塩化スズ、塩化アルミニウム、塩化鉄等のルイス酸；等を挙げることができる。これらのうちではスルホン酸類が好ましく、特にパラトルエンスルホン酸が好ましい。さらに塩基としては、既に述べられた塩基の中から適宜選択して使用すればよく、特にカリウム　ｔｅｒｔ－ブトキシド等のアルカリ金属アルコキシド、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等のアルカリ金属又はアルカリ土類金属水酸化物；水素化ナトリウム、水素化カリウム等のアルカリ金属水素化物；リチウム　ジイソプロピルアミド等のジアルキルアミノリチウムに代表される有機金属塩基；リチウム　ビス（トリメチルシリル）アミド等のビスシリルアミンの有機金属塩基等が好ましい。

反応に用いる溶媒としては、テトラヒドロフラン、１，４－ジオキサン等のエーテル系溶媒；ベンゼン、トルエン等の芳香族炭化水素系溶媒；等が用いられる。上記の溶媒は水との混合物としてもよい。

また、P^5として示されるアミノ基の保護基としては、通常、アミノ基の保護に用いられる基であれば特に制限はない。代表的なものとして製造方法２で記載したアミノ基の保護基を挙げることができるが、本反応中においてP^5として示されるアミノ基の保護基が切断される場合がある。その場合には、必要に応じて適当なアミノ基の保護試薬と適宜反応させて再度保護基を導入すればよい。

化合物（２４）は、化合物（２３）の保護基P^6を除去することによって製造することができる。ここで、P^6として示されるカルボキシ基の保護基としては、製造方法２に代表的なものが記載されており、ここから適宜選択することができる。化合物（２３）において、アミノ基の保護基P^5とカルボキシ基の保護基P^6が異なる方法又は条件で除去できる保護基であることが望ましい。例えば、P^5が９－フルオレニルメチルオキシカルボニル基であり、P^6がベンジル基である組み合わせ等を代表的なものとして挙げることができる。それらの保護基は、アミノ基及びカルボキシ基を保護する化合物の性質等に応じて選択すれば

よく、それらの保護基の除去に際してもその保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。

カルボン酸（２４）を活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物等に誘導し、塩基存在下、化合物（４）又はその薬理上許容される塩と反応させることによって化合物（２５）を製造し、得られた化合物（２５）の保護基P^5を除去することによって化合物（２６）を製造することができる。化合物（４）とカルボン酸（２４）との反応及び保護基P^6を除去する反応では、製造方法２で述べた試薬や反応条件と同様なものを用いればよい。

化合物（２６）と末端アミノ基が保護されたアミノ酸又はアミノ基が保護されたオリゴペプチド（２７）を反応させることによって化合物（９ｂ）を製造し、得られた化合物（９ｂ）の保護基P^7を除去することによって化合物（１０ｂ）を製造することができる。P^7として示されるアミノ基の保護基としては、通常、アミノ基の保護に用いられる基であれば特に制限はなく、代表的なものとして製造方法２で記載したアミノ基の保護基を挙げることができ、その除去に際しても保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。化合物（２６）と化合物（２７）との反応では、ペプチド合成に通常使用される反応試薬や条件を準用すればよい。上記の方法で製造した化合物（１０ｂ）は、上述の製造方法に従って本発明化合物（１）に導くことができる。

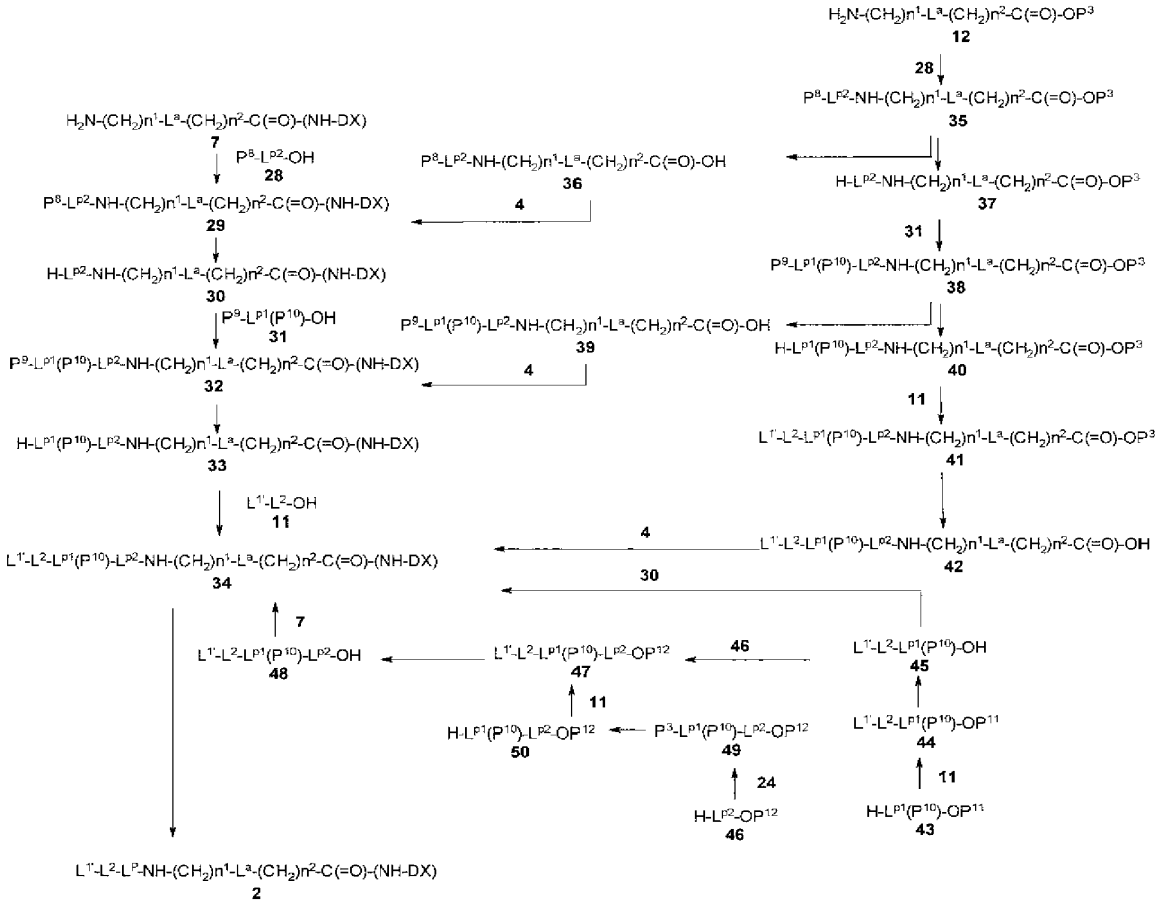
【０１６１】

５．製造方法５

中間体の式で示される化合物（２）は下記の方法によっても製造することもできる。

【０１６２】

【化２７】



【０１６３】

［式中、、Ｌ１’はＬ１の末端がマレイミジル基に変換された構造であり、ＬＰは-ＬＰ１-ＬＰ２-からなる構造を、Ｐ３、Ｐ８、Ｐ９、Ｐ１０、Ｐ１１、及びＰ１２は保護基を示す。］

【０１６４】

ＬＰは、ＬＰ１及びＬＰ２を結合させて形成されるため、ＬＰのＮ末端の親水性アミノ酸はＬＰ１由来となるので、ＬＰ１はＮ末端が親水性アミノ酸であるものを採用すればよい。なお、親水性アミノ酸は複数個であってよい。また、ＬＰ２に親水性アミノ酸があるものを採用すれば、その位置に応じて、ＬＰのＮ末端又はＮ末端とそれ以外の位置に複数個の親水性アミノ酸を含むＬＰを製造することができる。

【０１６５】

Ｎ末端をＰ２で保護したペプチド又はアミノ酸（２８）を活性エステル、混合酸無水物等に誘導し、得られた化合物（７）に反応させることにより、化合物（２９）を製造することができる。ペプチド又はアミノ酸（２８）と化合物（７）のアミド結合を形成する反応条件や試薬、塩基、及び溶媒は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。アミノ基の保護基Ｐ８は、化合物（６）の保護基で述べたものから適宜選択して使用すればよく、その化合物の性質等に応じて選択すればよい。また、ペプチド合成に通常用いられている様に、ペプチド又はアミノ酸（２８）を構成するアミノ酸又はペプチドを順次反応と脱保護を繰り返し、伸長させて化合物（２９）を製造することもできる。

得られた化合物（２９）のアミノ基の保護基Ｐ８を脱保護させることにより化合物（２３）を製造することができる。脱保護にはその保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい

。

Ｎ末端をP^8で、側鎖のカルボキシ基水酸基、又はアミノ基をP^9で保護したアミノ酸又はペプチド（３１）を活性エステル、混合酸無水物等に誘導し、得られた化合物（３０）に反応させることにより、化合物（３２）を製造することができる。アミノ酸又はペプチド（３１）と化合物（３０）のペプチド結合を形成する反応条件や試薬、塩基及び溶媒は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。保護基P^8及びP^9としては、化合物（６）のアミノ基、カルボキシ基又は水酸基の保護基で述べたものから適宜選択して使用すればよい。ただし、この場合に、アミノ基の保護基P^9と側鎖の官能基の保護基P^{10}が異なる方法又は条件で除去できる必要がある。例えばP^9が９－フルオレニルメチルオキシカルボニル基であり、P^{10}がカルボキシ基の保護基であればｔｅｒｔ－ブチル基等、水酸基の保護基であればメトキシメチル基等、アミノ基の保護基であればｔｅｒｔ－ブチルオキシカルボニル基等である組み合わせ等を代表的なものとして挙げることができる。側鎖の官能基の保護基P^{10}は酸性条件に付すことによって脱保護可能な保護基が好ましいが、これに限定されることはなく、保護する化合物のアミノ基、カルボキシ基又は水酸基の性質等に応じて上述したものから選択すればよい。また、それらの保護基の切断に際してもその保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。なお、ペプチド合成に通常用いられている様に、化合物（３２）は構成するアミノ酸又はペプチドを順次反応、脱保護を繰り返し、伸長させて製造することもできる。

得られた化合物（３２）の末端アミノ基の保護基P^9を脱保護させることにより化合物（３３）を製造することができる。この脱保護は、その保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。

カルボン酸誘導体（１１）を活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物等に誘導し、得られた化合物（３３）に反応させることにより、化合物（３４）を製造することができる。ここでカルボン酸誘導体（１１）は$L^{1'}$のリンカー末端がマレイミジル基を有する構造の化合物である。

カルボン酸誘導体（１１）と化合物（３３）のペプチド結合を形成する反応条件や試薬、塩基及び溶媒は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

得られた化合物（３４）のペプチド部分のアミノ酸側鎖のカルボキシ基又は水酸基、アミノ基の保護基P^{10}を脱保護させることにより化合物（２）を製造することができる。その保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。

【０１６６】

化合物（２９）は例えば下記の方法でも製造することができる。

Ｎ末端をP^3で保護したペプチド又はアミノ酸（２８）を活性エステル、混合酸無水物等に誘導し、塩基存在下、末端のカルボキシ基をP^3で保護したアミン化合物（１２）と反応させることにより化合物（３５）を製造することができる。ペプチド又はアミノ酸（２８）と化合物（１２）のペプチド結合を形成する反応条件や試薬、塩基、及び溶媒は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。化合物（３５）のアミノ基の保護基P^8は化合物（６）の保護基で述べたものから適宜選択して使用すればよい。カルボキシ基の保護基P^3としては、有機合成化学、中でもペプチド合成においてカルボキシ基の保護基として通常用いられている保護基を使用すればよく、具体的にはメチル基、エチル基、ｔｅｒｔ－ブチル等のアルキルエステル、アリルエステル、ベンジルエステル等、化合物（６）の保護基で述べたものから適宜選択して使用すればよい。この場合に、アミノ基の保護基P^8とカルボキシ基の保護基P^3が異なる方法又は条件で除去できる必要がある。例えばP^8がｔｅｒｔ－ブチルオキシカルボニル基であり、P^3がベンジル基である組み合わせ等を代表的なものとして挙げることができる。それらの保護基はアミノ基とカルボキシ基を保護する化合物の性質等に応じて上述したものから選択すればよく、それらの保護基の切断に際してもその保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。

得られた化合物（３５）のカルボキシ基の保護基P^3を脱保護させることにより化合物（３６）を製造することができる。脱保護は、その保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。

得られた化合物（３６）を活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物等に誘導し、塩基存在下、化合物（４）と反応させることにより化合物（２９）を製造することができる。この反応はペプチド合成に通常用いる反応試薬や条件を準用すればよく、反応条件や試薬、塩基及び溶媒は化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

【０１６７】

化合物（３２）は例えば下記の方法でも製造することができる。

化合物（３５）のアミノ基の保護基P^8を脱保護させることにより化合物（３７）を製造することができる。脱保護は、その保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。

アミノ酸又はペプチド（３１）を活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物等に誘導し、塩基存在下、得られた化合物（３７）と反応させることにより化合物（３８）を製造することができる。アミノ酸又はペプチド（３１）と化合物（３７）のアミド結合を形成する反応条件や試薬、塩基及び溶媒は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。ここで、アミノ酸又はペプチド（３１）の保護基P^9、P^{10}と化合物（３７）の保護基P^3がそれぞれ異なる方法又は条件で除去できる必要がある。例えばP^9が９－フルオレニルメチルオキシカルボニル基であり、P^{10}がｔｅｒｔ－ブチルオキシカルボニル基やｔｅｒｔ－ブチル基、又はメトキシメチル基、P^3がベンジル基等である組み合わせ等を代表的なものとして挙げることができる。また、上述した様に側鎖の官能基の保護基P^{10}は酸性条件に付すことによって脱保護可能な保護基が好ましいが、これに限定されることはなく、保護する化合物のアミノ基、カルボキシ基又は水酸基の性質等に応じて上述したものから選択すればよく、それらの保護基の切断に際してもその保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。

得られた化合物（３８）のカルボキシ基の保護基P^3を脱保護させることにより化合物（３９）を製造することができる。脱保護は、その保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。

化合物（３９）を活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物等に誘導し、塩基存在下、化合物（４）と反応させることにより化合物（３２）を製造することができる。この反応はペプチド合成に通常用いる反応試薬や条件を準用すればよく、反応条件や試薬、塩基及び溶媒は化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

【０１６８】

化合物（３４）は例えば下記の方法でも製造することができる。

化合物（３８）のアミノ基の保護基P^9を脱保護させることにより化合物（４０）を製造することができる。脱保護は、その保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。

カルボン酸誘導体（１１）を活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物等に誘導し、塩基存在下、得られた化合物（４０）と反応させることにより化合物（４１）を製造することができる。カルボン酸誘導体（１１）と化合物（４０）のアミド結合を形成する反応条件や試薬、及び塩基、溶媒は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

得られた化合物（４１）のカルボキシ基の保護基P^3を脱保護させることにより化合物（４２）を製造することができる。脱保護は、その保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。

化合物（４２）を活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物等に誘導し、塩基存在下、化合物（４）と反応させることにより化合物（３４）を製造することができる。この反応はペプチド合成に通常用いる反応試薬や条件を準用すればよく、反応条件や試薬、塩基及び溶媒は化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

【０１６９】

化合物（３４）は例えば下記の方法でも製造することができる。

カルボン酸誘導体（１１）を活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物等に誘導し、塩基存在下、カルボキシ基をP^{11}で、側鎖のカルボキシ基、水酸基又はアミノ基をP^{10}で保護したアミノ酸又はペプチド（４３）と反応させることにより化合物（４４）を製

造することができる。カルボン酸誘導体（１１）と化合物（４３）のアミド結合を形成する反応条件や試薬、及び塩基、溶媒は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。ここで化合物（４４）の保護基P^{10}及びP^{11}としては、化合物（６）のカルボキシ基、水酸基、又はアミノ基の保護基で述べたものから適宜選択して使用すればよい。ただし、この場合に、カルボキシ基の保護基P^{11}と側鎖の官能基の保護基P^{10}が異なる方法又は条件で除去できる必要がある。例えばP^{11}がベンジル基であり、P^{10}がカルボキシ基の保護基であればｔｅｒｔ－ブチル基等、水酸基の保護基であればメトキシメチル基等、アミノ基の保護基であればｔｅｒｔ－ブチルオキシカルボニル基等である組み合わせ等を代表的なものとして挙げることができる。側鎖の官能基の保護基P^{10}は酸性条件に付すことによって脱保護可能な保護基が好ましいが、これに限定されることはなく、保護する化合物のアミノ基、カルボキシ基又は水酸基の性質等に応じて上述したものから選択すればよく、それらの保護基の切断に際してもその保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。

得られた化合物（４４）のカルボキシ基の保護基P^{11}を脱保護させることにより化合物（４５）を製造することができる。この脱保護は、その保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。

化合物（４５）を活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物等に誘導し、塩基存在下、化合物（３０）と反応させることにより化合物（３４）を製造することができる。この反応はペプチド合成に通常用いる反応試薬や条件を準用すればよく、反応条件や試薬、塩基及び溶媒は化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

また、化合物（４５）を活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物等に誘導し、塩基存在下、カルボキシ基をP^{12}で保護したアミノ酸又はペプチド（４６）と反応させることにより化合物（４７）を製造することができる。この反応はペプチド合成に通常用いる反応試薬や条件を準用すればよく、反応条件や試薬、塩基及び溶媒は化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。ここで化合物（４７）の保護基P^{10}及びP^{12}としては、化合物（６）のカルボキシ基、水酸基又はアミノ基の保護基で述べたものから適宜選択して使用すればよい。ただし、この場合に、カルボキシ基の保護基P^{12}と側鎖の官能基の保護基P^{10}が異なる方法又は条件で除去できる必要がある。例えばP^{12}がベンジル基であり、P^{10}がカルボキシ基の保護基であればｔｅｒｔ－ブチル基等、水酸基の保護基であればメトキシメチル基等、アミノ基の保護基であればｔｅｒｔ－ブチルオキシカルボニル基等である組み合わせ等を代表的なものとして挙げることができる。側鎖の官能基の保護基P^{10}は酸性条件に付すことによって脱保護可能な保護基が好ましいが、これに限定されることはなく、保護する化合物のアミノ基、カルボキシ基又は水酸基の性質等に応じて上述したものから選択すればよく、それらの保護基の切断に際してもその保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。また、化合物（４７）は構成するアミノ酸又はペプチドを順次反応、脱保護を繰り返し、伸長させて製造することもできる。

得られた化合物（４７）のカルボキシ基の保護基P^{12}を脱保護させることにより化合物（４８）を製造することができる。その保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。

化合物（４８）を活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物等に誘導し、塩基存在下、化合物（７）と反応させることにより化合物（３４）を製造することができる。この反応はペプチド合成に通常用いる反応試薬や条件を準用すればよく、反応条件や試薬、塩基及び溶媒は化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

化合物（４７）は例えば下記の方法でも製造することができる。

アミノ酸又はペプチド（４６）を活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物等に誘導し、塩基存在下、Ｎ末端をP^{9}で、側鎖のカルボキシ基、水酸基又はアミノ基をP^{10}で保護したアミノ酸又はペプチド（３１）と反応させることによりペプチド（４９）を製造することができる。アミノ酸又はペプチド（４６）とアミノ酸又はペプチド（３１）のペプチド結合を形成する反応条件や試薬、塩基及び溶媒は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。ここでアミノ酸又はペプチド（４６）のカルボキシ基の保護基P^{12}と、アミノ酸又はペプチド（３１）の保護基P^{9}及びP^{10}としては、上述の

通りであるが、互いに異なる方法又は条件で除去できる必要がある。例えばP^9が９－フルオレニルメチルオキシカルボニル基であり、P^{10}がカルボキシ基の保護基であればｔｅｒｔ－ブチル基等、水酸基の保護基であればメトキシメチル基等、アミノ基の保護基であればｔｅｒｔ－ブチルオキシカルボニル基等であり、P^{12}がベンジル基である組み合わせ等を代表的なものとして挙げることができる。側鎖の官能基の保護基P^{10}は酸性条件に付すことによって脱保護可能な保護基が好ましいが、これに限定されることはなく、保護する化合物のアミノ基、カルボキシ基又は水酸基の性質等に応じて上述したものから選択すればよく、それらの保護基の切断に際してもその保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。

得られたペプチド（４９）のＮ末端の保護基P^9を脱保護させることによりペプチド（５０）を製造することができる。その保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。

カルボン酸誘導体（１１）を活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物等に誘導し、塩基存在下、得られたペプチド（５０）と反応させることにより化合物（４７）を製造することができる。カルボン酸誘導体（１１）とペプチド（５０）のアミド結合を形成する反応条件や試薬、及び塩基、溶媒は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

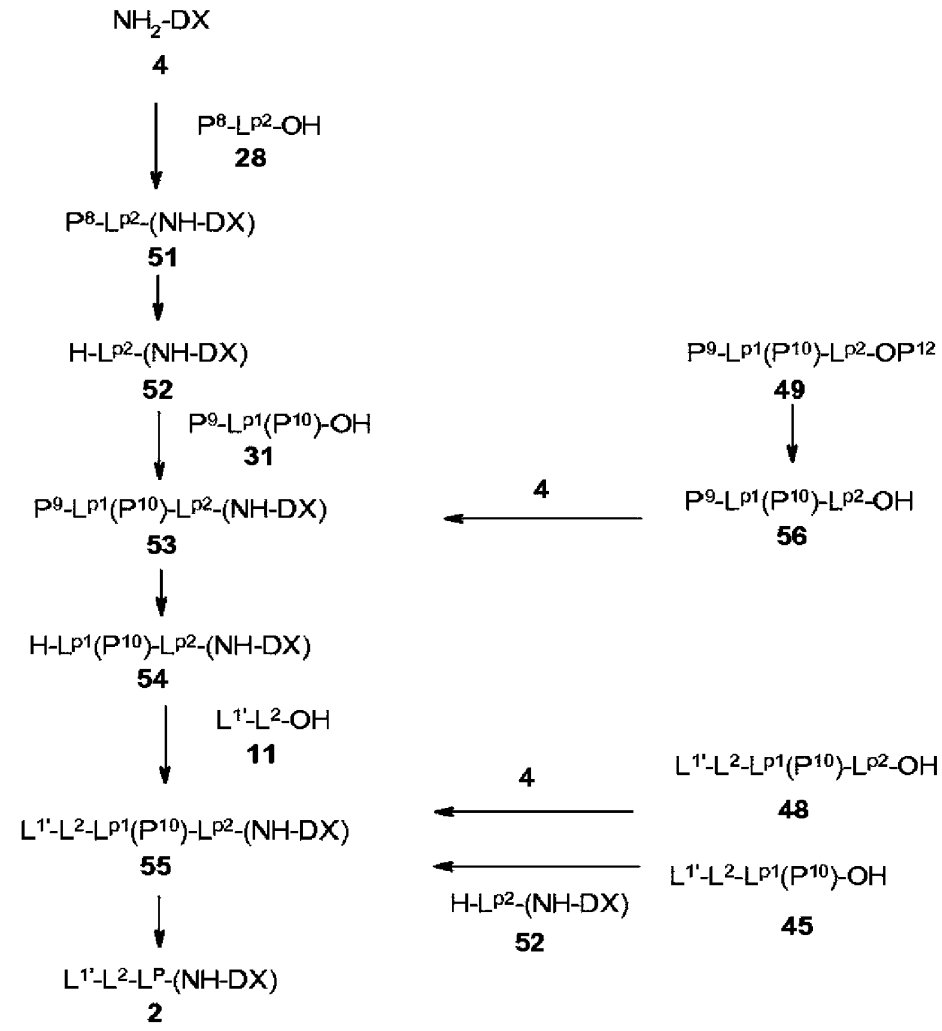
【０１７０】

６．製造方法６

製造中間体（２）のうち、リンカーが、$-L^1-L^2-L^P-$で示される構造であり、当該L^Pは、そのＮ末端が親水性アミノ酸であるペプチド残基であって、当該Ｎ末端に存在する親水性アミノ酸がグリシン以外の親水性アミノ酸であるペプチド残基であるものは下記の方法によっても製造することができる。

【０１７１】

【化２８】



【０１７２】

［式中、は、L^{1}’は、L^{1}の末端がマレイミジル基に変換された構造であり、L^{P}は-L^{p1}-L^{p2}-からなる構造を、P^{8}、P^{9}、P^{10}、及びP^{12}は保護基を示す。］

【０１７３】

L^{P}は、L^{p1}及びL^{p2}を結合させて形成されるため、L^{P}のＮ末端の親水性アミノ酸はL^{p1}由来となるので、L^{p1}はＮ末端が親水性アミノ酸であるものを採用すればよい。なお、親水性アミノ酸は複数個であってよい。また、L^{p2}に親水性アミノ酸があるものを採用すれば、その位置に応じて、L^{P}のＮ末端又はＮ末端とそれ以外の位置に複数個の親水性アミノ酸を含むL^{P}を製造することができる。

製造方法５に記載のＮ末端をP^{8}で保護したペプチド又はアミノ酸（２８）を活性エステル、混合酸無水物等に誘導し、化合物（４）及びその塩に反応させることにより、化合物（５１）を製造することができる。ペプチド又はアミノ酸（２８）と化合物（４）のペプチド結合を形成する反応条件や試薬、塩基及び溶媒は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。保護基P^{8}は、化合物（６）の保護基で述べたものから適宜選択して使用すればよく、アミノ基を保護する化合物の性質等に応じて選択すればよい。また、ペプチド合成に通常用いられている様に、ペプチド又はアミノ酸（２８）を構成するアミノ酸又はペプチドを順次反応と脱保護を繰り返し、伸長させて化合物（５１）

を製造することもできる。

得られた化合物（５１）のアミノ基の保護基P^8を脱保護させることにより化合物（５２）を製造することができる。この脱保護は、その保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。

製造方法４に記載の、Ｎ末端をP^9で、側鎖のカルボキシ基、水酸基、又はアミノ基をP^{10}で保護したアミノ酸又はペプチド（３１）を活性エステル、混合酸無水物等に誘導し、得られた化合物（５２）に反応させることにより、化合物（５３）を製造することができる。アミノ酸又はペプチド（３１）と化合物（５２）のペプチド結合を形成する反応条件や試薬、及び塩基、溶媒は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。保護基P^9及びP^{10}としては、製造方法５に記載した通りである。また、ペプチド合成に通常用いられている様に、化合物（５３）は構成するアミノ酸又はペプチドを順次反応、脱保護を繰り返し、伸長させて製造することもできる。

得られた化合物（５３）のアミノ基の保護基P^9を脱保護させることにより化合物（５４）を製造することができる。この脱保護は、その保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。

カルボン酸誘導体（１１）を活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物等に誘導し、得られた化合物（５４）に反応させることにより、化合物（５５）を製造することができる。カルボン酸誘導体（１１）と化合物（５４）のペプチド結合を形成する反応条件や試薬、塩基及び溶媒は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

得られた化合物（５５）のカルボキシ基又は水酸基、アミノ基の保護基P^{10}を脱保護させることにより化合物（２）を製造することができる。この脱保護は、その保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。

【０１７４】

化合物（５３）は例えば下記の方法でも製造することができる。

製造方法５に記載のペプチド（４９）のカルボキシ基の保護基P^{12}を脱保護させることによりペプチド（５６）を製造することができる。この脱保護は、その保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。

得られたペプチド（５６）を活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物等に誘導し、化合物（４）又はその塩に反応させることにより、化合物（５３）を製造することができる。化合物（５６）と化合物（４）のペプチド結合を形成する反応条件や試薬、塩基及び溶媒は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

【０１７５】

化合物（５５）は例えば下記の方法でも製造することができる。

製造方法５に記載の化合物（４８）を活性エステル、混合酸無水物等に誘導し、塩基存在下、化合物（４）と反応させることにより、又は製造方法５に記載のアミノ酸又はペプチド（４５）を活性エステル、混合酸無水物等に誘導し、塩基存在下、上述の化合物（５２）と反応させることにより、化合物（５５）を製造することができる。それぞれのペプチド結合を形成する反応条件や試薬、塩基及び溶媒は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

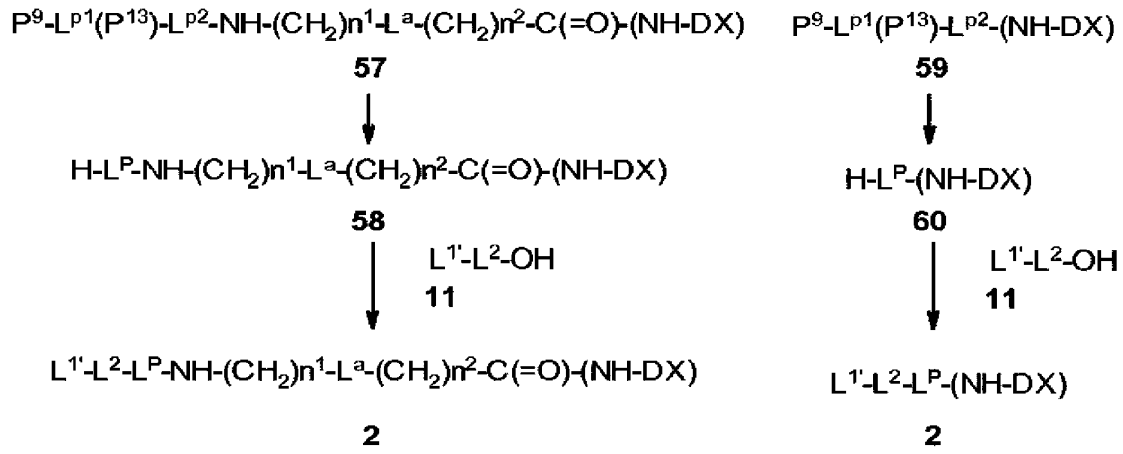
【０１７６】

７．製造方法７

式（２）で示される製造中間体のうち、リンカーが、$-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$で示される構造であり、当該$L^P$は、そのＮ末端が親水性アミノ酸であるペプチド残基であって、Ｎ末端に存在する当該親水性アミノ酸がグリシン以外の親水性アミノ酸である場合は、例えば下記の方法によっても製造することができる。

【０１７７】

【化２９】



【０１７８】

［式中、L^1’は、L^1の末端がマレイミジル基に変換された構造であり、L^Pは$-L^{p1}-L^{p2}-$からなる構造を、P^9、P^{13}は、保護基を示す。］

【０１７９】

式（２）で示される製造中間体には、リンカーが、$-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$で示される構造と、$-L^1-L^2-L^P-$で示される構造の二つの態様がある。

リンカーが、$-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$で示される構造の化合物（２）は以下の様に製造することができる。

化合物（５７）は製造方法５に記載の化合物（３２）と同様に合成することができるが、化合物（３２）と異なり、そのアミノ基の保護基P^9と側鎖の官能基の保護基P^{13}を異なる方法又は条件で除去できることは必要ではない。側鎖の官能基はカルボキシ基又は水酸基であり、そのアミノ基の保護基P^9と側鎖のカルボキシ基又は水酸基の保護基P^{13}を同時に脱保護させることもできる。例えばP^9がｔｅｒｔ－ブチルオキシカルボニル基であり、P^{13}がｔｅｒｔ－ブチル基やトリチル基、或はP^3がベンジルオキシカルボニル基であり、P^{13}がベンジル基等である組み合わせ等を代表的なものとして挙げることができる。それらの保護基は、保護する化合物のアミノ基、カルボキシ基又は水酸基の性質等に応じて化合物（６）の保護基で述べたものから適宜選択して使用すればよく、それらの保護基の切断に際してもその保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。化合物（５７）は、上記の性質を満たす保護されたアミノ酸又はペプチドを用いれば、製造方法５と同様に合成することができる。

化合物（５７）の保護基P^9、P^{13}を順次又は同時に脱保護させることにより化合物（５１）を製造することができる。その保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。

化合物（５８）は、L^Pの親水性側鎖の官能基は特に保護されていないが、塩基存在下、活性エステル、混合酸無水物等に誘導した化合物（１１）と反応させることにより、化合物（２）を製造することができる。それぞれのペプチド結合を形成する反応条件や試薬、塩基及び溶媒は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

リンカーが、$-L^1-L^2-L^P-$で示される構造の化合物（２）は以下の様に製造することができる。

化合物（５９）も製造方法６に記載の化合物（５３）と同様に合成することができるが、化合物（５３）と異なり、そのアミノ基の保護基P^3と側鎖の官能基の保護基P^8を異なる方法又は条件で除去できることは必要ではない。側鎖の官能基はカルボキシ基又は水酸基であり、そのアミノ基の保護基P^9と側鎖のカルボキシ基又は水酸基の保護基P^{13}を同時に脱保護させることもできる。例えばP^9がｔｅｒｔ－ブチルオキシカルボニル基であり、P^{13}がｔｅｒｔ－ブチル基やトリチル基、或はP^3がベンジルオキシカルボニル基であり、P^{13}

がベンジル基等である組み合わせ等を代表的なものとして挙げることができる。それらの保護基は、保護する化合物のアミノ基、カルボキシ基、又は水酸基の性質等に応じて化合物（６）の保護基で述べたものから適宜選択して使用すればよく、それらの保護基の切断に際してもその保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。化合物（５９）は、上記の性質を満たす保護されたアミノ酸又はペプチドを用いれば、製造方法６と同様に合成することができる。

化合物（５９）の保護基P^9、P^{13}を順次又は同時に脱保護させることにより化合物（５３）を製造することができる。その保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。

化合物（６０）は、L^Pの親水性側鎖の官能基は特に保護されていないが、塩基存在下、活性エステル、混合酸無水物等に誘導した化合物（１１）と反応させることにより、化合物（２）を製造することができる。それぞれのペプチド結合を形成する反応条件や試薬、塩基及び溶媒は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

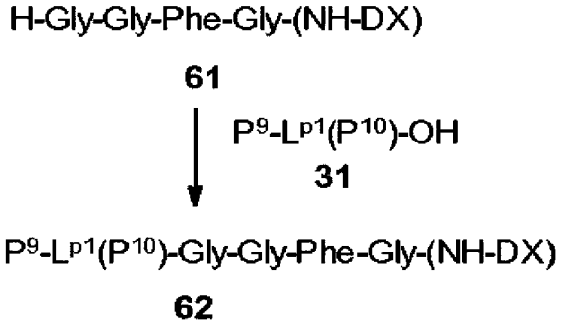
【０１８０】

８．製造方法８

製造方法５に示される化合物（４３）のうち、リンカー-L^P-が、-L^{P1}-Gly-Gly-Phe-Gly-からなる構造を有する場合は下記の方法によっても製造することができる。

【０１８１】

【化３０】



【０１８２】

[式中、P^9、P^{10}は、保護基を示す。]

【０１８３】

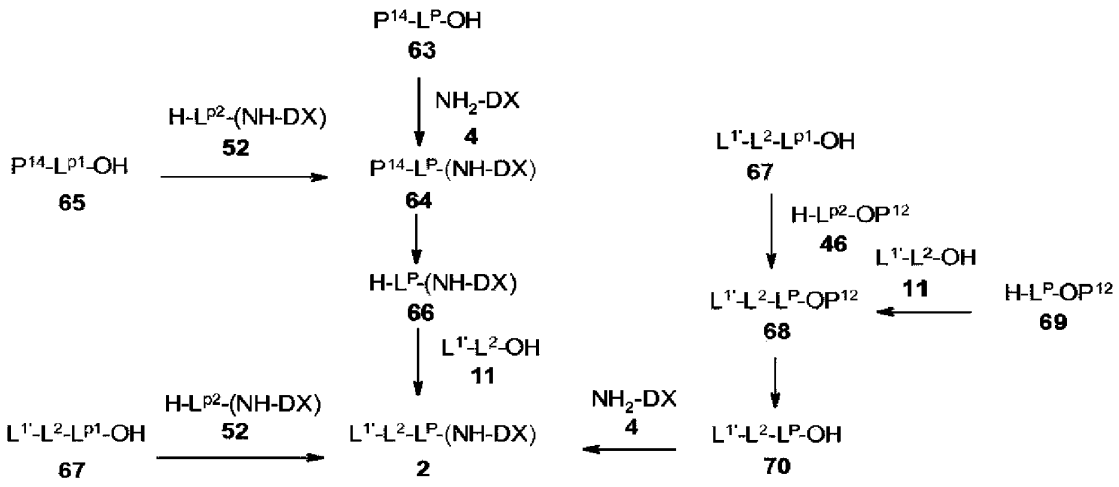
製造方法５に記載のアミノ酸又はペプチド（３１）を活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物等に誘導し、塩基存在下、グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］グリシンアミド（国際公開第１９９７／４６２６０号に記載された医薬化合物のフリー体）（６１）又はその塩と反応させることにより化合物（６２）を製造することができる。アミノ酸又はペプチド（３１）と化合物（６１）のペプチド結合を形成する反応条件や試薬、塩基及び溶媒は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。Ｎ末端の保護基P^3、側鎖の官能基の保護基P^{10}としては、製造方法５にて上述の通りである。なお、側鎖の官能基の保護基P^{10}はなくてもよく、Ｎ末端のみを保護したアミノ酸又はペプチド（３１）を用いて反応を行い、化合物（６２）を得ることができる。

【０１８４】

９．製造方法９

式（２）で示される化合物のうち、リンカーが、-L^1-L^2-L^P-で示される構造であり、当該L^Pは、そのＣ末端が２又は３以上のグリシンからなるオリゴペプチドであって薬物に結合し、かつ当該ペプチド残基のＮ末端が親水性アミノ酸である場合はグリシンであるペプチド残基である場合は、例えば下記の方法でも製造できる。

【０１８５】
【化３１】



【０１８６】
［式中、L^1’は、L^1の末端がマレイミジル基に変換された構造であり、L^PはL^{p1}-L^{p2}からなる構造を、P^{12}及びP^{14}は、保護基を示す。］
【０１８７】
L^Pは，L^{p1}及びL^{p2}を結合させて形成されるので、これらに含まれるL^PのＣ末端を構成するためグリシンの数は、L^Pが有するＣ末端のグリシンの数、さらに反応時にこれらを使用する反復回数を考慮して設計すればよい。
ペプチド（６３）はそのＣ末端が２又は３以上のグリシンからなるオリゴペプチドであり、かつ当該ペプチド残基のＮ末端が親水性アミノ酸となる場合にはグリシンであるペプチド残基であって、当該Ｎ末端はP^{14}で保護されている。ペプチド（６３）はペプチド合成に通常用いられている様に、その構成するアミノ酸又はペプチドを順次縮合反応と脱保護を繰り返して合成できる。
ペプチド（６３）を活性エステル、混合酸無水物等に誘導し、化合物（４）又はその塩と反応させることにより、化合物（６４）を製造することができる。ペプチド（６３）と化合物（４）のペプチド結合を形成する反応条件や試薬、塩基及び溶媒は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。保護基P^{14}は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。
また、化合物（６４）は、Ｎ末端をP^{14}で保護したアミノ酸又はペプチド（６５）を活性エステル、混合酸無水物等に誘導し、製造方法６に記載の化合物（５２）に反応させることによっても製造することができる。アミノ酸又はペプチド（６５）と化合物（５２）のペプチド結合を形成する反応条件や試薬、塩基及び溶媒は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。保護基P^{14}は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。
得られた化合物（６４）のアミノ基の保護基P^{14}を脱保護させることにより化合物（６６）を製造することができる。その保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。
カルボン酸誘導体（１１）を活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物等に誘導し、得られた化合物（６６）に反応させることにより、化合物（２）を製造することができる。カルボン酸誘導体（１１）と化合物（６６）のアミド結合を形成する反応条件や試薬、塩基及び溶媒は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。
化合物（２）は下記の方法でも製造することができる。
化合物（６７）はL^{p1}のＮ末端のグリシンがL^2と結合し、製造方法５に記載の化合物（

４５）と同様に合成することができる。製造方法５に記載したアミノ酸又はペプチド（４６）を活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物等に誘導し、化合物（６７）に反応させることにより、化合物（６８）を製造することができる。ここで、ここで、アミノ酸又はペプチド（４６）は、グリシンか又はそのＣ末端が２又は３以上のグリシンからなるオリゴペプチドであり、そのＣ末端がP^{12}で保護されている。アミノ酸又はペプチド（４６）と化合物（６７）のアミド結合を形成する反応条件や試薬、塩基及び溶媒は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

化合物（６８）は、化合物（１１）を活性エステル、混合酸無水物等に誘導し、Ｃ末端をP^{12}で保護したペプチド（６９）に反応させることによっても製造することもできる。ここで、ペプチド（６９）はそのＣ末端が２又は３以上のグリシンからなるオリゴペプチドであり、かつＮ末端が親水性アミノ酸となる場合においてはグリシンとなるペプチド残基である。ペプチド（６９）はペプチド合成に通常用いられている様に、その構成するアミノ酸又はペプチドを順次縮合反応と脱保護を繰り返して合成できる。ペプチド（６９）と化合物（１１）のペプチド結合を形成する反応条件や試薬、塩基及び溶媒は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。保護基P^{12}は、酸条件で脱保護可能な保護基が好ましいが、これに限定されることはなく、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

得られた化合物（６８）のカルボキシ基の保護基P^{12}を脱保護させることにより化合物（７０）を製造することができる。この脱保護は、その保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。

化合物（７０）を活性エステル、混合酸無水物等に誘導し、化合物（４）又はその塩に反応させることにより、化合物（２）を製造することができる。化合物（７０）と化合物（４）のペプチド結合を形成する反応条件や試薬、塩基及び溶媒は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

他に化合物（２）は下記の方法でも製造することができる。

製造方法６に記載の化合物（５２）を活性エステル、混合酸無水物等に誘導し、塩基存在下、化合物（６７）に反応させることにより、化合物（２）を製造することができる。化合物（６７）と化合物（５２）のペプチド結合を形成する反応条件や試薬、塩基及び溶媒は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

【０１８８】

なお、製造方法１から製造方法９の中間体の化合物はいずれも塩及び/又は水和物となってもよい。

【０１８９】

本発明の抗体－薬物コンジュゲートは、大気中に放置したり、又は再結晶等の精製操作を行うことにより、水分を吸収し、或は吸着水が付着する等して、水和物になる場合があり、その様な水を含む化合物又は塩も本発明に包含される。

また、本発明には、種々の放射性又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（^{2}H）、トリチウム（^{3}H）、ヨウ素-125（^{125}I）又は炭素-14（^{14}C）等を挙げることができる。また、本発明化合物は、例えば、トリチウム（^{3}H）、ヨウ素-125（^{125}I）、炭素-14（^{14}C）、銅-64（^{64}Cu）、ジルコニウム-89（^{89}Zr）、イオジン-124（^{124}I）、フルオリン-18（^{18}F）、インジウム-111（^{111}I）、炭素-11（^{11}C）又はイオジン-131（^{131}I）の様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、治療又は予防剤、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、放射性であると否とを問わず、本発明の範囲に包含される。

【０１９０】

［医薬］

本発明の抗ＨＥＲ３抗体－薬物コンジュゲートは、癌細胞に対して細胞傷害活性を示す

ことから、医薬として、特に癌に対する治療剤及び／又は予防剤として使用することができる。

すなわち本発明の抗ＨＥＲ３抗体－薬物コンジュゲートは、癌治療の主要な治療法である化学療法のための薬剤として選択して使用することができ、その結果として、癌細胞の成長を遅らせ、増殖を抑え、さらには癌細胞を破壊することができる。これ等によって、癌患者において、癌による症状からの解放や、ＱＯＬの改善を達成でき、癌患者の生命を保って治療効果が達成される。癌細胞の破壊には至らない場合であっても、癌細胞の増殖の抑制やコントロールによって癌患者においてより高いＱＯＬを達成しつつより長期の生存を達成させることができる。

このような薬物療法においての薬物単独での使用の他、アジュバント療法において他の療法と組み合わせる薬剤としても使用でき、外科手術や、放射線療法、ホルモン療法等と組み合わせることができる。さらにはネオアジュバント療法における薬物療法の薬剤として使用することもできる。

以上のような治療的使用の他、微細な転移癌細胞の増殖を押さえ、さらには破壊する効果も期待することができる。特に原発性の癌細胞においてＨＥＲ３の発現が確認されたときに本発明の抗ＨＥＲ３抗体－薬物コンジュゲートを投与することよって癌転移の抑制や、予防効果を期待することができる。例えば、転移過程で体液中にある癌細胞を抑制し破壊する効果や、いずれかの組織に着床した直後の微細な癌細胞に対する抑制、破壊等の効果が期待できる。したがって、特に外科的な癌の除去後においての癌転移の抑制、予防効果が期待できる。

本発明の抗ＨＥＲ３抗体－薬物コンジュゲートは、患者に対しては全身療法として投与する他、癌組織に局所的に投与して治療効果を期待することができる。

抗体－薬物コンジュゲート（１）は、優れた抗腫瘍活性、安全性及び物性を有し、in vitroで抗乳癌作用、抗肺癌作用及び抗メラノーマ作用を示した。

抗体－薬物コンジュゲート（２）は、優れた抗腫瘍活性、安全性及び物性を有し、in vitroで抗乳癌作用、抗肺癌作用、抗大腸癌作用及び抗メラノーマ作用を、in vivoではＵ１－５９より強い抗乳癌作用及び抗メラノーマ作用を示した。

抗体－薬物コンジュゲート（３）は、優れた抗腫瘍活性、安全性及び物性を有し、in vitroで抗乳癌作用、抗肺癌作用、抗卵巣癌、抗大腸癌作用及び抗メラノーマ作用を、in vivoではＵ１－５９より強い抗乳癌作用、抗肺癌作用、抗大腸癌作用、抗胃癌作用、及び抗メラノーマ作用を示した。

抗体－薬物コンジュゲート（４）は、優れた抗腫瘍活性、安全性及び物性を有し、in vitroで抗乳癌作用を示した。

抗体－薬物コンジュゲート（５）は、優れた抗腫瘍活性、安全性及び物性を有し、in vitroで抗乳癌作用、抗肺癌作用、抗メラノーマ作用を示した。

抗体－薬物コンジュゲート（６）は、優れた抗腫瘍活性、安全性及び物性を有し、in vitroで抗乳癌作用、抗肺癌作用、抗メラノーマ作用を、in vivoではＵ１－５９より強い抗乳癌作用を示した。

抗体－薬物コンジュゲート（７）は、優れた抗腫瘍活性、安全性及び物性を有し、in vitroで抗乳癌作用、抗肺癌作用、抗メラノーマ作用を示した。

抗体－薬物コンジュゲート（８）は、優れた抗腫瘍活性、安全性及び物性を有し、in vitroで抗乳癌作用、抗肺癌作用、抗メラノーマ作用を、in vivoではＵ１－５９より強い抗乳癌作用を示した。

抗体－薬物コンジュゲート（９）は、優れた抗腫瘍活性、安全性及び物性を有し、in vitroで抗乳癌作用、抗肺癌作用、抗卵巣癌、抗大腸癌作用及び抗メラノーマ作用をを示した。

抗体－薬物コンジュゲート（１０）は、優れた抗腫瘍活性、安全性及び物性を有し、in vitroで抗乳癌作用、抗肺癌作用、抗大腸癌作用及び抗メラノーマ作用を、in vivoではＵ１－５９より強い抗乳癌作用、抗肺癌作用、抗大腸癌作用、抗胃癌作用、及び抗メラノーマ作用を示した。

抗体－薬物コンジュゲート（１１）は、優れた抗腫瘍活性、安全性及び物性を有し、in vitroで抗乳癌作用を示した。

抗体－薬物コンジュゲート（１２）は、優れた抗腫瘍活性、安全性及び物性を有し、in vitroで抗乳癌作用、抗肺癌作用、抗卵巣癌、抗大腸癌作用及び抗メラノーマ作用ををを示した。

抗体－薬物コンジュゲート（１３）は、優れた抗腫瘍活性、安全性及び物性を有し、in vitroで抗乳癌作用、抗肺癌作用、抗大腸癌作用及び抗メラノーマ作用を、in vivoではＵ１－５９より強い抗乳癌（トリプルネガティブ乳癌を含む）作用、抗肺癌作用、抗大腸癌作用、抗胃癌作用、抗膵臓癌作用、及び抗メラノーマ作用を示した。

抗体－薬物コンジュゲート（１４）は、優れた抗腫瘍活性、安全性及び物性を有し、in vitroで抗乳癌作用を示した。

抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）は、優れた抗腫瘍活性、安全性及び物性を有し、in vivoで抗乳癌（ルミナル乳癌及びトリプルネガティブ乳癌を含む）作用、抗メラノーマ作用、抗卵巣癌作用、抗膀胱癌作用、抗肺癌作用、抗頭頸部癌作用及び抗胃癌作用を、単独で又はトラスツズマブ、ゲフィチニブ、セツキシマブ、パニツムマブ若しくはペルツズマブとの併用で、示した。

【０１９１】

本発明の抗ＨＥＲ３抗体－薬物コンジュゲートが適用される癌の種類としては、例えば、肺癌、腎癌、尿路上皮癌、大腸癌、前立腺癌、多形神経膠芽腫、卵巣癌、膵癌、乳癌、転移性乳癌、ルミナール乳癌、メラノーマ、肝癌、膀胱癌、胃癌、胃腸間質腫瘍、子宮頸癌、頭頸部癌、食道癌、扁平上皮癌、腹膜癌、多形グリア芽細胞腫、肝臓癌、肝細胞癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌腫、肛門癌腫、又は陰茎癌等を挙げることができる。特に乳癌の中のトリプルネガティブ乳癌（ＨＥＲ２、Ｅｓｔｒｏｇｅｎ受容体、Ｐｒｏｇｅｓｔｅｒｏｎ受容体を非発現）は、現行治療に化学療法しかなく、予後不良と言われている。トリプルネガティブ乳癌にてＨＥＲ３発現についてはほとんど報告されていないが、もしＨＥＲ３発現がトリプルネガティブ乳癌患者で認められるならば、本発明の抗ＨＥＲ３抗体－薬物コンジュゲートは、治療剤及び／又は予防剤として使用することができる。但し、治療対象となる癌細胞において抗体－薬物コンジュゲート中の抗体が認識できるタンパクを発現している癌細胞であればこれらには限定されることはない。

本発明の抗ＨＥＲ３抗体－薬物コンジュゲートは、治療対象となる癌細胞において、抗体－薬物コンジュゲート中の抗体が認識できるＨＥＲ３蛋白を発現している癌細胞が治療対象となる。本明細書において、「ＨＥＲ３蛋白を発現している癌」とは、その細胞表面にＨＥＲ３蛋白を有する細胞を含む癌、又は血液中にＨＥＲ３蛋白を分泌する癌である。ＨＥＲ３蛋白はさまざまなヒトの腫瘍において過剰発現しており、腫瘍（原発、転移）検体におけるＨＥＲ３蛋白の過剰発現を評価する免疫組織化学染色法（ＩＨＣ）やＨＥＲ３遺伝子の増幅を評価する蛍光in situハイブリダイゼーション法（ＦＩＳＨ）、また血液検体におけるＨＥＲ３蛋白の過剰発現を評価する酵素結合免疫吸着法（ＥＬＩＳＡ）等、この分野で通常実施される方法を用いて評価することができる。

また、本発明の抗ＨＥＲ３抗体－薬物コンジュゲートは、その抗ＨＥＲ３抗体が癌細胞表面で発現しているＨＥＲ３蛋白を認識し、さらに内在化することによって抗腫瘍効果が発現されることから、本発明の抗ＨＥＲ３抗体－薬物コンジュゲートの治療対象は「ＨＥＲ３蛋白を発現している癌」に限定されることはなく、例えば白血病、悪性リンパ腫、形質細胞種、骨髄腫、又は肉腫も治療対象とすることができる。

【０１９２】

本発明の抗ＨＥＲ３抗体－薬物コンジュゲートは、哺乳動物に対して好適に投与することができるが、より好ましくはヒトである。

【０１９３】

本発明の抗ＨＥＲ３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。

【０１９４】

本発明の抗ＨＥＲ３抗体－薬物コンジュゲートは、１種以上の薬学的に適合性の成分を含む薬学的組成物として投与され得る。例えば、上記薬学的組成物は、代表的には、１種以上の薬学的キャリア（例えば、滅菌した液体）を含む。ここで液体には、例えば、水及び油（石油、動物起源、植物起源又は合成起源の油）が含まれる。油は、例えば、ラッカセイ油、大豆油、鉱油、ゴマ油等であってよい。水は、上記薬学的組成物が静脈内投与される場合に、より代表的なキャリアである。食塩水溶液、並びにデキストロース水溶液及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、この分野で公知のものから適宜選択することができる。上記組成物はまた、所望であれば、微量の湿潤剤若しくは乳化剤、又は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。

【０１９５】

種々の送達システムが公知であり、本発明の抗ＨＥＲ３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、及び皮下の経路を挙げることができるが、これらに限定されることはない。投与は、例えば、注入又はボーラス注射によるものであり得る。特定の好ましい実施形態において、上記リガンド薬物結合体の投与は、注入によるものである。非経口的投与は、好ましい投与経路である。

【０１９６】

代表的実施形態において、上記薬学的組成物は、ヒトへの静脈内投与に適合した薬学的組成物として、常習的手順に従って処方される。代表的には、静脈内投与のための組成物は、滅菌の等張性の水性緩衝液中の溶液である。必要である場合、上記医薬はまた、可溶化剤及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又はサシェ等に密封してシールされた容器中の乾燥凍結乾燥粉末又は無水の濃縮物として、別個に、又は単位剤形中で一緒に混合して、のいずれかで供給される。上記医薬が注入によって投与される形態の場合、それは、例えば、滅菌の製薬グレードの水又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、注射用滅菌水又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様に、提供され得る。

【０１９７】

本発明の医薬組成物には有効成分として本願の抗ＨＥＲ３抗体－薬物コンジュゲートのみを含んでもよいし、抗ＨＥＲ３抗体－薬物コンジュゲート及び少なくとも一つのこれ以外の他の薬剤（例えば癌治療剤）を含んでもよい。本発明の抗ＨＥＲ３抗体－薬物コンジュゲートは、他の癌治療剤と共に投与することもでき、これによって抗癌効果を増強させることができる。この様な目的で使用される他の抗癌剤等の薬剤は、例えば、投与した後に本発明の抗ＨＥＲ３抗体－薬物コンジュゲートを有効成分として含む医薬組成物を投与するか、抗ＨＥＲ３抗体－薬物コンジュゲートを有効成分として含む医薬組成物を投与した後に投与するか、抗体－薬物コンジュゲートと同時に、別々に（個別に）、或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。本発明の抗ＨＥＲ３抗体－薬物コンジュゲートを本発明においては、抗体－薬物コンジュゲートと他の薬剤を単一の製剤として同時に投与される場合、および、別々の製剤として同時に、連続して、又は投与間隔を変えて投与される場合のいずれも、「抗体－薬物コンジュゲート及び他の薬剤を含む医薬組成物」の意味に包含される。この様な癌治療剤として、５－ＦＵ、ｔｒａｓｔｕｚｕｍａｂ、ｔｒａｓｔｕｚｕｍａｂ　ｅｍｔａｎｓｉｎｅ（Ｔ－ＤＭ１）、ｃｅｔｕｘｉｍａｂ、ｇｅｆｉｔｉｎｉｂ、ｐａｎｉｔｕｍｕｍａｂ、ｐｅｒｔｕｚｕｍａｂ、ａｂｒａｘａｎｅ、ｅｒｌｏｔｉｎｉｂ、ｃａｒｂｏｐｌａｔｉｎ、ｃｉｓｐｌａｔｉｎ、ｇｅｍｃｉｔａｂｉｎｅ、ｃａｐｅｃｉｔａｂｉｎｅ、ｉｒｉｎｏｔｅｃ

ａｎ（ＣＰＴ－１１）、ｐａｃｌｉｔａｘｅｌ、ｄｏｃｅｔａｘｅｌ、ｐｅｍｅｔｒｅｘｅｄ、ｓｏｒａｆｅｎｉｂ、ｖｉｎｂｌａｓｔｉｎ、ｖｉｎｏｒｅｌｂｉｎｅ，ｖｅｍｕｒａｆｅｎｉｂ又は国際公開第２００３／０３８０４３号パンフレットに記載の薬剤、さらにＬＨ－ＲＨアナログ（リュープロレリン、ゴセレリン等）、エストラムスチン・フォスフェイト、エストロジェン拮抗薬（タモキシフェン、ラロキシフェン等）、アロマターゼ阻害剤（アナストロゾール、レトロゾール、エキセメスタン等）等を挙げることができるが、抗腫瘍活性を有する薬剤であれば限定されることはない。これらの癌治療剤を、その標的に基づき、ｃｅｔｕｘｉｍａｂ、ｇｅｆｉｔｉｎｉｂ、ｐａｎｉｔｕｍｕｍａｂ等の抗ＦＧＥＲ剤、ｔｒａｓｔｕｚｕｍａｂ、Ｔ－ＤＭ１、ｐｅｒｔｕｚｕｍａｂ等の抗ＨＥＲ２剤、ｐａｔｒｉｔｕｍａｂ、ＭＭ－１２１、ＭＭ－１１１等の抗ＨＥＲ３剤、ｉｎｆｌｉｘｉｍａｂ、ａｄａｌｉｍｕｍａｂ等の抗ＶＥＧＦ剤等と分類することができる。さらに、ｃｅｔｕｘｉｍａｂ、ｐａｎｉｔｕｍｕｍａｂ等の抗ＥＧＦＲ抗体、ｔｒａｓｔｕｚｕｍａｂ、ｐｅｒｔｕｚｕｍａｂ等の抗ＨＥＲ２抗体、ｐａｔｒｉｔｕｍａｂ、ＭＭ－１２１、ＭＭ－１１１等の抗ＨＥＲ３抗体、ｉｎｆｌｉｘｉｍａｂ、ａｄａｌｉｍｕｍａｂ等の抗ＶＥＧＦ抗体等と分類することができる。本発明の抗ＨＥＲ３抗体－薬物コンジュゲートは、ｉ）胃癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌等の治療において抗ＨＥＲ２剤又は抗ＨＥＲ２抗体と組み合わせて投与すると、又は、ｉｉ）肺癌、頭頸部癌、胃癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌等の治療において抗ＥＧＦＲ剤又は抗ＥＧＦＲ抗体と組み合わせて投与すると、優れた治療効果を奏する。また、他の薬剤は１又は２以上であり、他の薬剤は抗癌剤であっても、併用剤に起因する副作用を軽減するための薬剤でもよい。

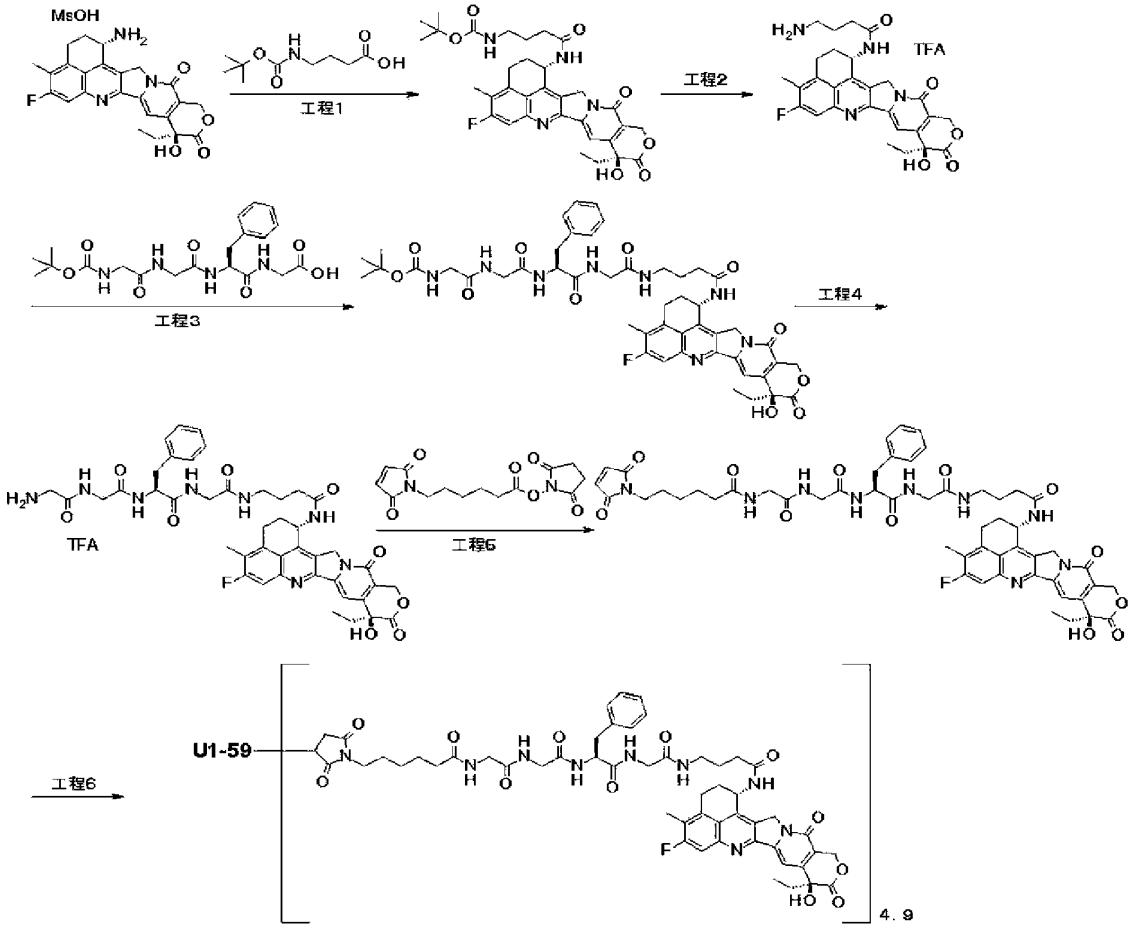
【０１９８】

本発明において、「抗ＨＥＲ３抗体－薬物コンジュゲート及び他の薬剤を含む医薬組成物」は、「抗ＨＥＲ３抗体－薬物コンジュゲートと他の薬剤を組み合わせて投与される医薬組成物」と同義である。本発明において、抗ＨＥＲ３抗体－薬物コンジュゲートと他の薬剤を「組み合わせて投与される」とは、ある一定期間において、被投与対象の体内に、抗ＨＥＲ３抗体－薬物コンジュゲートと他の薬剤剤が取り込まれることを意味する。抗ＨＥＲ３抗体－薬物コンジュゲートと他の薬剤が単一製剤中に含まれた製剤が投与されてもよく、またそれぞれが別々に製剤化され、別々に投与されても良い。別々に製剤化される場合、その投与の時期は特に限定されず、同時に投与されてもよく、時間を置いて異なる時間に、又は、異なる日に、投与されても良い。抗ＨＥＲ３抗体－薬物コンジュゲートと他の薬剤が、それぞれ異なる時間又は日に投与される場合、その投与の順番は特に限定されない。通常、それぞれの製剤は、それぞれの投与方法に従って投与されるため、それらの投与は、同一回数となる場合もあり、異なる回数となる場合もある。また、それぞれが別々に製剤化される場合、各製剤の投与方法（投与経路）は同じであってもよく、異なる投与方法（投与経路）で投与されてもよい。また、抗ＨＥＲ３抗体－薬物コンジュゲートと他の薬剤が同時に体内に存在する必要は無く、ある一定期間（例えば一ヶ月間、好ましくは１週間、さらに好ましくは数日間、さらにより好ましくは１日間）の間に体内に取り込まれていればよく、いずれかの投与時にもう一方の有効成分が体内から消失していてもよい。

「抗ＨＥＲ３抗体－薬物コンジュゲートと他の薬剤を組み合わせて投与される医薬組成物」の投与形態としては、例えば、１）抗ＨＥＲ３抗体－薬物コンジュゲートと他の薬剤を含む単一の製剤の投与、２）抗ＨＥＲ３抗体－薬物コンジュゲートと他の薬剤とを別々に製剤化して得られる２種の製剤の同一投与経路での同時投与、３）抗ＨＥＲ３抗体－薬物コンジュゲートと他の薬剤を別々に製剤化して得られる２種の製剤の同一投与経路での時間差をおいての投与、４）抗ＨＥＲ３抗体－薬物コンジュゲートと他の薬剤を別々に製剤化して得られる２種の製剤の異なる投与経路での同時投与、５）抗ＨＥＲ３抗体－薬物コンジュゲートと他の薬剤とを別々に製剤化して得られる２種の製剤の異なる投与経路での時間差をおいての投与などを挙げることができる。「抗ＨＥＲ３抗体－薬物コンジュゲートと他の薬剤を組み合わせて投与される医薬組成物」の投与量、投与間隔、投与形態、製剤等は、本発明の抗ＨＥＲ３抗体－薬物コンジュゲートを含有する医薬組成物のそれら

に準ずるが、それらに限定されるものではない。
かかる医薬組成物は、それが２種の異なる製剤にされた場合には、それらを含むキットであってもよい。
本発明において、抗ＨＥＲ３抗体－薬物コンジュゲートおよび他の薬剤の「組合せ」とは、抗ＨＥＲ３抗体－薬物コンジュゲートおよび他剤を「組み合わせて投与される」ことを意味する。
【０１９９】
この様な医薬組成物は、選択された組成と必要な純度を持つ製剤として、凍結乾燥製剤或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。
【０２００】
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ＨＥＲ３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（Ｋｄ値）の点において、親和性が高い（Ｋｄ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回或は１～１８０日間に１回の間隔で複数回投与すればよい。
【実施例】
【０２０１】
以下に示す実施例によって本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。また、これらはいかなる意味においても限定的に解釈されるものではない。また、本明細書において、特に記載のない試薬、溶媒及び出発材料は、市販の供給源から容易に入手可能である。
【０２０２】
参考例１　Ｕ１－５９の作製
Ｕ１－５９は、国際公開２００７／０７７０２８号に記載の方法に基づいて作製した。
【０２０３】
実施例１　抗体－薬物コンジュゲート（１）

【化３２】



【０２０４】

工程１：ｔｅｒｔ－ブチル　（４－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－４－オキソブチル）カーバメート

４－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルアミノ）ブタン酸（０．２３７ｇ、１．１３ｍｍｏＬ）をジクロロメタン（１０ｍＬ）に溶解し、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（０．１３０ｇ、１．１３ｍｍｏＬ）、及び１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（０．２１６ｇ、１．１３ｍｍｏＬ）を加えて１時間撹拌した。その反応溶液をエキサテカンのメシル酸塩（０．５００ｇ、０．９４ｍｍｏＬ）、及びトリエチルアミン（０．１５７ｍＬ、１．１３ｍｍｏＬ）を加えたＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド溶液（１０ｍＬ）に滴下し、室温にて一日撹拌した。溶媒を減圧留去し、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［クロロホルム～クロロホルム：メタノール＝８：２（ｖ／ｖ）］にて精製し、標記化合物（０．５９５ｇ、定量的）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－$ｄ_{6}$）δ：０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），１．３１（９Ｈ，ｓ），１．５８（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），１．６６（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），１．８９－１．８２（２Ｈ，ｍ），２．１２－２．２１（３Ｈ，ｍ），２．３９（３Ｈ，ｓ），２．９２（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．５Ｈｚ），３．１７（２Ｈ，ｓ），５．１６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１９．２Ｈｚ），５．２４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．４２（２Ｈ，ｓ），５．５９－５．５５（１Ｈ，ｍ），６．５３（１Ｈ，ｓ

），６．７８（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．３Ｈｚ），７．３０（１Ｈ，ｓ），７．７９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），８．４０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ）．
ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：６２１（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$．

【０２０５】

工程２：４－アミノ－Ｎ－［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］ブタンアミドトリフルオロ酢酸塩

上記工程１で得た化合物（０．３８８ｇ、０．６１ｍｍｏＬ）をジクロロメタン（９ｍＬ）に溶解した。トリフルオロ酢酸（９ｍＬ）を加えて４時間撹拌した。溶媒を減圧留去し、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［クロロホルム～クロロホルム：メタノール：水＝７：３：１（ｖ／ｖ／ｖ）の分配有機層］にて精製し、標記化合物（０．３４３ｇ、定量的）を得た。
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），１．７９－１．９２（４Ｈ，ｍ），２．１０－２．１７（２Ｈ，ｍ），２．２７（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ），２．４０（３Ｈ，ｓ），２．８０－２．８６（２Ｈ，ｍ），３．１５－３．２０（２Ｈ，ｍ），５．１５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．２６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．４２（２Ｈ，ｓ），５．５４－５．６１（１Ｈ，ｍ），６．５５（１Ｈ，ｓ），７．３２（１Ｈ，ｓ），７．７２（３Ｈ，ｂｒｓ），７．８２（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），８．５４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ）．
ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：５２１（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$．

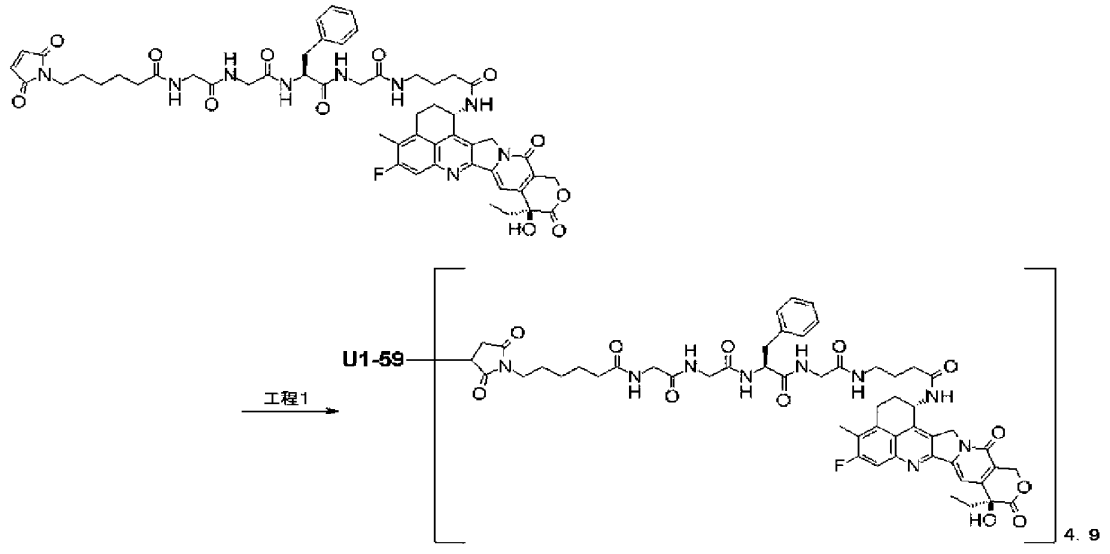
【０２０６】

工程３：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－Ｎ－（４－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－４－オキソブチル）グリシンアミド

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（０．０８１ｇ、０．１９ｍｍｏＬ）をジクロロメタン（３ｍＬ）に溶解し、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（０．０２１ｇ、０．１９ｍｏＬＬ）、及び１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（０．０３６ｇ、０．１９ｍｍｏＬ）を加えて３．５時間撹拌した。その反応溶液を上記工程２で得た化合物（０．０８０ｇ、０．１５ｍｍｏＬ）を加えたＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド溶液（１．５ｍＬ）に滴下し、室温にて４時間撹拌した。溶媒を減圧留去し、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［クロロホルム～クロロホルム：メタノール＝８：２（ｖ／ｖ）］にて精製し、標記化合物（０．１０６ｇ、７３％）を得た。
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），１．３６（９Ｈ，ｓ），１．７１（２Ｈ，ｍ），１．８６（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．８Ｈｚ），２．１５－２．１９（４Ｈ，ｍ），２．４０（３Ｈ，ｓ），２．７７（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１２．７，８．８Ｈｚ），３．０２（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１４．１，４．７Ｈｚ），３．０８－３．１１（２Ｈ，ｍ），３．１６－３．１９（２Ｈ，ｍ），３．５４（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝５．９Ｈｚ），３．５７－３．７７（４Ｈ，ｍ），４．４６－４．４８（１Ｈ，ｍ），５．１６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１９．２Ｈｚ），５．２５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．４２（２Ｈ，ｓ），５．５５－５．６０（１Ｈ，ｍ），６．５３（１Ｈ，ｓ），７．００（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．３Ｈｚ），７．１７－７．２６（５Ｈ，ｍ），７．３１（１Ｈ，ｓ），７．７１（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），７．８０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），７．９２（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），８．１５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．２Ｈｚ），８．２７（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），８．４６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．２Ｈｚ）．
ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：９３９（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$．

【０２０７】
工程４：グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－（４－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－４－オキソブチル）グリシンアミドトリフルオロ酢酸塩
上記工程３で得た化合物（１．９７ｇ、２．１０ｍｍｏＬ）をジクロロメタン（７ｍＬ）に溶解した。トリフルオロ酢酸（７ｍＬ）を加えて１時間撹拌した。溶媒を減圧留去し、トルエンを加えて共沸し、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［クロロホルム～クロロホルム：メタノール：水＝７：３：１（ｖ／ｖ／ｖ）の分配有機層］にて精製し、標記化合物（１．９７ｇ、９９％）を得た。
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），１．７１－１．７３（２Ｈ，ｍ），１．８２－１．９０（２Ｈ，ｍ），２．１２－２．２０（４Ｈ，ｍ），２．４０（３Ｈ，ｓ），２．７５（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．７，９．４Ｈｚ），３．０３－３．０９（３Ｈ，ｍ），３．１８－３．１９（２Ｈ，ｍ），３．５８－３．６０（２Ｈ，ｍ），３．６４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝５．９Ｈｚ），３．６９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝５．９Ｈｚ），３．７２（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），３．８７（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１６．８，５．９Ｈｚ），４．５０－４．５６（１Ｈ，ｍ），５．１６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１９．２Ｈｚ），５．２５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．４２（２Ｈ，ｓ），５．５５－５．６０（１Ｈ，ｍ），７．１７－７．２７（５Ｈ，ｍ），７．３２（１Ｈ，ｓ），７．７８－７．８１（２Ｈ，ｍ），７．９５－７．９７（３Ｈ，ｍ），８．３３－８．３５（２Ｈ，ｍ），８．４８－８．５１（２Ｈ，ｍ）．
ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：８３９（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$．
【０２０８】
工程５：Ｎ－［６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサノイル］グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－（４－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－４－オキソブチル）グリシンアミド
上記工程４で得た化合物（３３７ｍｇ，０．３５３ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（１．２ｍＬ）溶液に、トリエチルアミン（４４．３ｍＬ，０．３１８ｍｍｏＬ）、６－マレイミドヘキサン酸Ｎ－スクシンイミジル（１１９．７ｍｇ，０．３８８ｍｍｏＬ）を加え、室温で１時間撹拌した。溶媒を減圧留去し、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［クロロホルム～クロロホルム：メタノール＝５：１（ｖ／ｖ）］にて精製し、標記化合物（２７８．０ｍｇ，７６％）を淡黄色固体として得た。
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ），１．１２－１．２２（２Ｈ，ｍ），１．４０－１．５１（４Ｈ，ｍ），１．６６－１．７６（２Ｈ，ｍ），１．８０－１．９１（２Ｈ，ｍ），２．０５－２．２１（６Ｈ，ｍ），２．３９（３Ｈ，ｓ），２．７９（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１４．０，９．８Ｈｚ），２．９８－３．２１（５Ｈ，ｍ），３．５５－３．７７（８Ｈ，ｍ），４．４１－４．４８（１Ｈ，ｍ），５．１５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．９Ｈｚ），５．２４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．９Ｈｚ），５．４０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１７．１Ｈｚ），５．４４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１７．１Ｈｚ），５．５４－５．６０（１Ｈ，ｍ），６．５３（１Ｈ，ｓ），６．９９（２Ｈ，ｓ），７．２０－７．２７（５Ｈ，ｍ），７．３０（１Ｈ，ｓ），７．７０（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），７．８０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），８．０３（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．８Ｈｚ），８．０８（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），８．１４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．９Ｈｚ），８．２５（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．１Ｈｚ），８．４６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ）．
ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：１０３２（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$．

【０２０９】
工程６：抗体－薬物コンジュゲート（１）
抗体の還元：参考例１にて作製したＵ１－５９を、製造方法１に記載した共通操作Ｂ及びＣを用いて、媒体をＰＢＳ６．０／ＥＤＴＡに置換し、１０ｍｇ／ｍＬの抗体濃度に調製した。本溶液（１．００ｍＬ）を２．０ｍＬポリプロピレン製チューブに入れ、ここに１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．０３０７ｍＬ；抗体一分子に対して４．６当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（Ｎａｃａｌａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎｃ．；０．０５０ｍＬ）を加えた。本溶液のｐＨが７．４±０．１内であることを確認した後に、３７℃で１時間インキュベートすることで、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。
抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液を２２℃水浴で10分間インキュベートした後に、ジメチルスルホキシド（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ；０．０５８６ｍＬ）と上記工程５で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．０６１５ｍＬ；抗体一分子に対して９．２当量）を加え、２２℃水浴にて４０分間インキュベートし、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．０１２３ｍＬ）を加え、さらに室温でチューブ・ローテーター（ＭＴＲ－１０３，アズワン株式会社）を用いて２０分間撹拌し、薬物リンカーの反応を停止させた。
精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を６ｍＬ得た。
特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（ドラッグリンカーのモル吸光係数として、$\varepsilon_{D,280}$＝７２８０ $\varepsilon_{D,370}$＝２３４００を使用）を使用して、下記の特性値を得た。
抗体濃度：１．２９ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：７．７４ｍｇ（７７％），共通操作Ｅにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：４．９。
【０２１０】
実施例２　抗体－薬物コンジュゲート（２）
【化３３】



【０２１１】
工程１：抗体－薬物コンジュゲート（２）
参考例１にて作製したＵ１－５９及び実施例１工程５で得た化合物を用いて、実施例１工程６と同様の方法により、標記抗体－薬物コンジュゲートを得た。

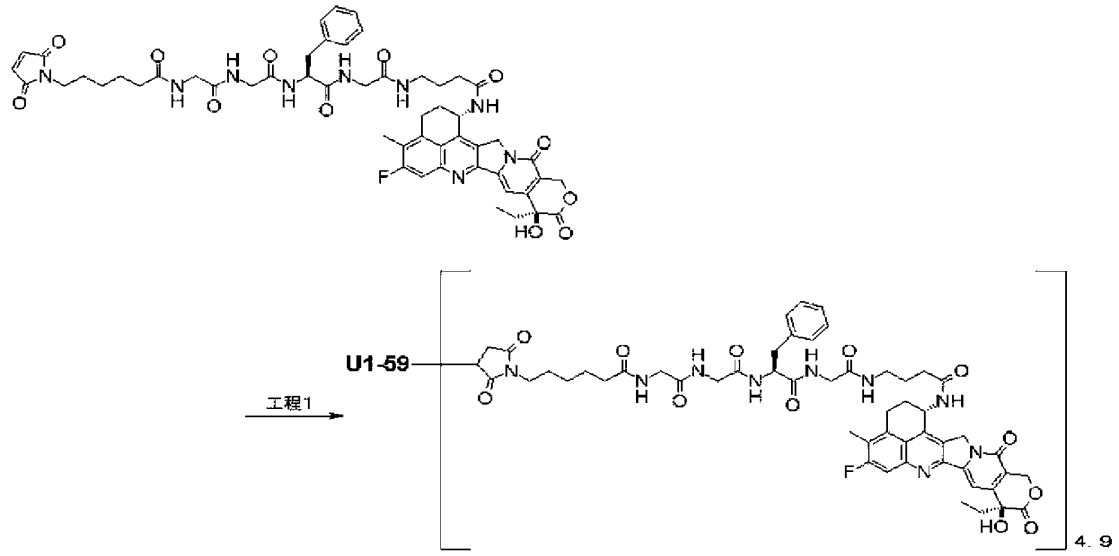
OnCusp
Ex. 1002

抗体濃度：１２．０ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：２２６．８ｍｇ（９１％），共通操作Ｅにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：４．９。

【０２１２】

実施例３　抗体－薬物コンジュゲート（３）

【化３４】



【０２１３】

工程１：抗体－薬物コンジュゲート（３）

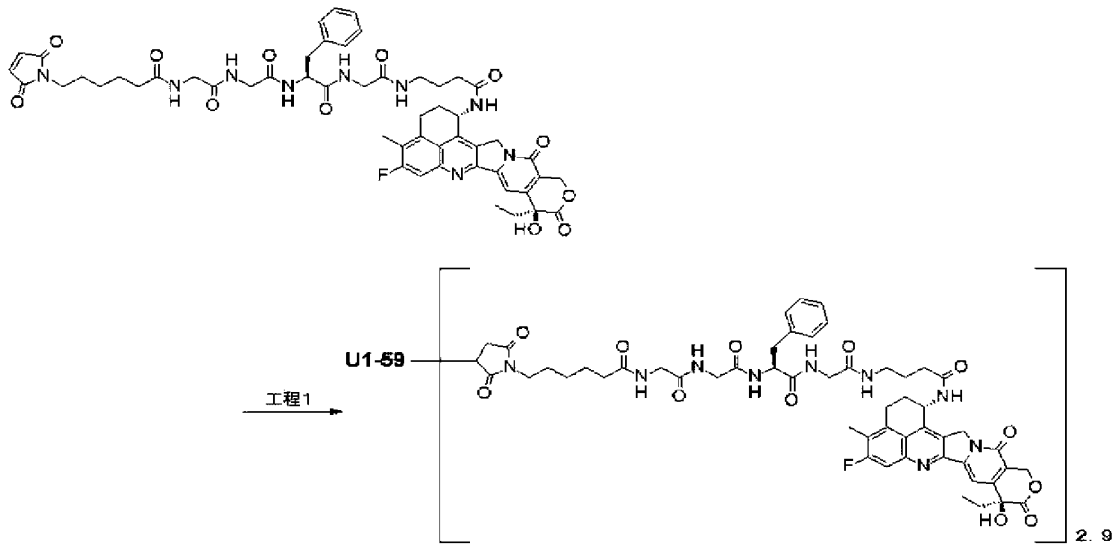
参考例１にて作製したＵ１－５９及び実施例１工程５で得た化合物を用いて、実施例１工程６と同様の方法により、標記抗体－薬物コンジュゲートを得た。

抗体濃度：１６．９ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：２１９．７ｍｇ（８８％），共通操作Ｅにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：４．９。

【０２１４】

実施例４　抗体－薬物コンジュゲート（４）

【化３５】



【０２１５】

工程１：抗体－薬物コンジュゲート（４）

抗体の還元：参考例１にて作製したＵ１－５９を、製造方法１に記載した共通操作Ｂ及び共通操作Ｃを用いて、媒体をＰＢＳ６．０／ＥＤＴＡに置換し、１０ｍｇ／ｍＬの抗体濃度に調製した。本溶液（１．００ｍＬ）を１．５ｍＬポリプロピレン製チューブに入れ、ここに１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．０１８７ｍＬ；抗体一分子に対して２．８当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（Ｎａｃａｌａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎｃ．；０．０１７０ｍＬ）を加えた。本溶液のｐＨが７．０±０．１内であることを確認した後に、３７℃で１時間インキュベートすることで、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液へ、上記工程５で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．０３１４ｍＬ；抗体一分子に対して４．７当量）を室温で加え、１５℃で１時間インキュベートし、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．０１２３ｍＬ；抗体一分子に対して１８．４当量）を加え、さらに室温で２０分間インキュベートし、薬物リンカーの反応を停止させた。

精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を６ｍＬ得たのち、共通操作Ａを使用して、溶液を濃縮した

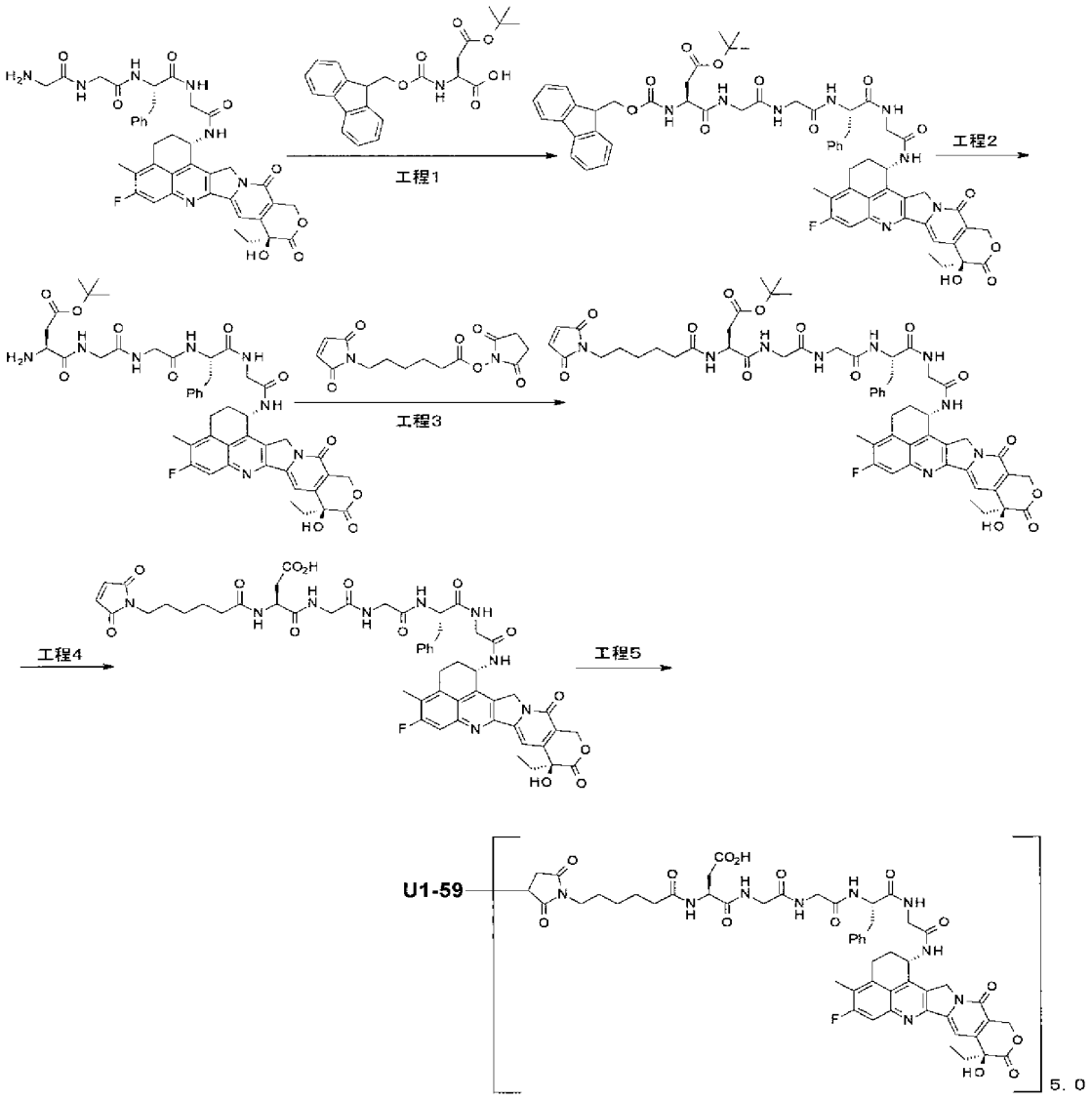
特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（ドラッグリンカーのモル吸光係数として、$\varepsilon_{D,280}$＝５０００、$\varepsilon_{D,370}$＝１９０００を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：１．０２ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：６．１ｍｇ（６１％），共通操作Ｅにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：２．９；共通操作Ｆ（ドラッグリンカーのモル吸光係数として、$\varepsilon_{D,280}$＝５０００を使用）にて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．２。

【０２１６】

実施例５　抗体－薬物コンジュゲート（５）

【化３６】



【０２１７】

工程１：ｔｅｒｔ－ブチル　（５Ｓ，１４Ｓ）－５－ベンジル－１－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－１４－｛［（９Ｈ－フルオレン－９－イルメトキシ）カルボニル］アミノ｝－１，４，７，１０，１３－ペンタオキソ－３，６，９，１２－テトラアザヘキサデカン－１６－オエート

氷冷下、グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］グリシンアミド（国際公開第１９９７／４６２６０号に記載された医薬化合物のフリー体；０．２５０ｇ，０．３３２ｍｍｏＬ）、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（５７．２ｍｇ，０．４９７ｍｍｏＬ）、及

びＮ－［（９Ｈ－フルオレン－９－イルメトキシ）カルボニル］－Ｌ－アスパラギン酸４－ｔｅｒｔ－ブチル（０．２０５ｇ，０．４９７ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（１０．０ｍＬ）溶液に、Ｎ，Ｎ’－ジシクロヘキシルカルボジイミド（０．１２３ｇ，０．４９７ｍｍｏＬ）を加え、室温にて２日間撹拌した。溶媒を減圧留去し、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［クロロホルム～クロロホルム：メタノール＝９：１（ｖ／ｖ）］にて精製し、標記化合物（０．２７８ｇ，７３％）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８６（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．１Ｈｚ），１．３５（９Ｈ，ｓ），１．７９－１．９０（２Ｈ，ｍ），２．０３－２．２５（２Ｈ，ｍ），２．４０（３Ｈ，ｓ），２．４０－２．５１（２Ｈ，ｍ），２．６４－２．８２（２Ｈ，ｍ），２．９８（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．７，４．６Ｈｚ），３．１６（２Ｈ，ｂｒｓ），３．５５（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１６．７，５．７Ｈｚ），３．６３－３．８０（４Ｈ，ｍ），４．１６－４．３４（３Ｈ，ｍ），４．３６－４．５０（２Ｈ，ｍ），５．２３（２Ｈ，ｓ），５．３７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１６．５Ｈｚ），５．４３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１６．５Ｈｚ），５．５１－５．６２（１Ｈ，ｍ），６．５２（１Ｈ，ｓ），７．１０－７．２５（５Ｈ，ｍ），７．２６－７．３３（３Ｈ，ｍ），７．３９（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ），７．６５－７．７２（３Ｈ，ｍ），７．８０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），７．８６（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．３Ｈｚ），７．９８（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），８．０７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．８Ｈｚ），８．１５（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），８．３１（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），８．４１（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．７Ｈｚ）．ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：１１４７（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$．

【０２１８】

工程２：ｔｅｒｔ－ブチル　（５Ｓ，１４Ｓ）－１４－アミノ－５－ベンジル－１－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－１，４，７，１０，１３－ペンタオキソ－３，６，９，１２－テトラアザヘキサデカン－１６－オエート

上記工程１で得た化合物（０．２７９ｇ，０．２４２ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（２．００ｍＬ）溶液に、ピペリジン（０．２４０ｍＬ，２．４２ｍｍｏＬ）を加え、室温で１時間撹拌した。溶媒を減圧留去し、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［クロロホルム～クロロホルム：メタノール＝２：１（ｖ／ｖ）］にて精製し、標記化合物（０．２６５ｇ，定量的）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８８（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），１．３９（９Ｈ，ｓ），１．８１－１．９４（１Ｈ，ｍ），２．０７－２．２８（２Ｈ，ｍ），２．３７（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１５．８，８．０Ｈｚ），２．４３（３Ｈ，ｓ），２．６０（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１５．８，４．９Ｈｚ），２．７５－２．８２（１Ｈ，ｍ），３．００（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．９，４．５Ｈｚ），３．１６－３．２５（２Ｈ，ｍ），３．５０－３．６１（２Ｈ，ｍ），３．６５－３．８１（５Ｈ，ｍ），４．４０－４．５１（１Ｈ，ｍ），５．２７（２Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝２４．１，１９．０Ｈｚ），５．４３（２Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝２１．３，１６．２Ｈｚ），５．５６－５．６５（１Ｈ，ｍ），６．５５（１Ｈ，ｓ），７．１５－７．２８（５Ｈ，ｍ），７．３３（１Ｈ，ｓ），７．８３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），８．０４（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），８．０９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．２Ｈｚ），８．２６－８．３９（２Ｈ，ｍ），８．４４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．２Ｈｚ）．

【０２１９】

工程３：ｔｅｒｔ－ブチル　（５Ｓ，１４Ｓ）－５－ベンジル－１４－｛［６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサノイル］アミノ｝－１－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベ

ンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－１，４，７，１０，１３－ペンタオキソ－３，６，９，１２－テトラアザヘキサデカン－１６－オエート

上記工程２で得た化合物（０．１００ｇ，０．１０８ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（２．００ｍＬ）溶液に、６－マレイミドヘキサン酸Ｎ－スクシンイミジル（４０．０ｍｇ，０．１３０ｍｍｏＬ）を加え、室温で２日間撹拌した。溶媒を減圧留去し、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［クロロホルム～クロロホルム：メタノール＝９：１（ｖ／ｖ）］にて精製し、標記化合物（８０．０ｍｇ，６６％）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－$ｄ_{6}$）δ：０．８８（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），１．１３－１．２３（２Ｈ，ｍ），１．３７（９Ｈ，ｓ），１．４２－１．５４（４Ｈ，ｍ），１．８０－１．９６（２Ｈ，ｍ），２．０８－２．２５（４Ｈ，ｍ），２．３５－３．７６（１５Ｈ，ｍ），２．４３（３Ｈ，ｓ），４．３９－４．４９（１Ｈ，ｍ），４．５５－４．６７（１Ｈ，ｍ），５．２１－５．３４（２Ｈ，ｍ），５．４３（２Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝２１．１，１６．４Ｈｚ），５．５６－５．６４（１Ｈ，ｍ），６．５５（１Ｈ，ｓ），７．０１（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝０．８Ｈｚ），７．１６－７．２６（５Ｈ，ｍ），７．３３（１Ｈ，ｓ），７．８３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．３Ｈｚ），８．０４－８．１８（３Ｈ，ｍ），８．３０－８．３７（１Ｈ，ｍ），８．４３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ）．

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：１１１８（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$．

【０２２０】

工程４：Ｎ－［６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサノイル］－Ｌ－α－アスパルチルグリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］グリシンアミド

氷冷下、上記工程３で得た化合物（７０．０ｍｇ，６２．６μｍｏＬ）にトリフルオロ酢酸（４．００ｍＬ）を加え、室温にて１時間撹拌した。溶媒を減圧留去し、標記化合物（５５．０ｍｇ，８３％）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－$ｄ_{6}$）δ：０．８８（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），１．１４－１．２４（２Ｈ，ｍ），１．４１－１．５３（４Ｈ，ｍ），１．７９－１．９５（２Ｈ，ｍ），２．０８－２．２８（４Ｈ，ｍ），２．３７－２．６０（２Ｈ，ｍ），２．４２（３Ｈ，ｓ），２．６３－２．８２（２Ｈ，ｍ），２．９９（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１４．１，５．１Ｈｚ），３．１２－３．２５（２Ｈ，ｍ），３．２９－３．４４（１Ｈ，ｍ），３．５２－３．８０（６Ｈ，ｍ），４．３８－４．４８（１Ｈ，ｍ），４．５６（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．７，７．４Ｈｚ），５．２７（２Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝２４．３，１８．８Ｈｚ），５．４３（２Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝２１．５，１６．４Ｈｚ），５．５７－５．６２（１Ｈ，ｍ），６．５５（１Ｈ，ｓ），７．０１（２Ｈ，ｓ），７．１５－７．２６（５Ｈ，ｍ），７．３３（１Ｈ，ｓ），７．８２（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），７．９８（１Ｈ，ｂｒｓ），８．０８（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．７Ｈｚ），８．１５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．８Ｈｚ），８．３４（１Ｈ，ｂｒｓ），８．４４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ），１２．２６（１Ｈ，ｂｒｓ）．

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：１０６２（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$．

【０２２１】

工程５：抗体－薬物コンジュゲート（５）

参考例１にて作製したＵ１－５９及び上記工程４で得た化合物を用いて、実施例１工程６と同様の方法により、標記抗体－薬物コンジュゲートを得た。

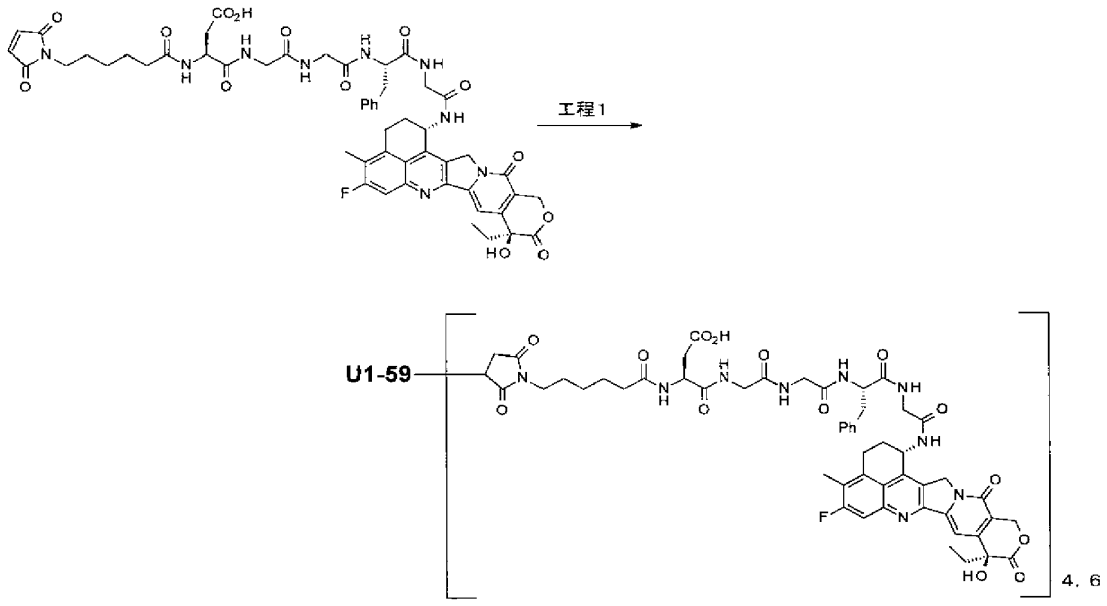
抗体濃度：１．３６ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：８．１６ｍｇ（８２％），共通操作Ｅ（ドラッグリンカーのモル吸光係数として、$\varepsilon_{D,280}$＝７６２０、$\varepsilon_{D,370}$＝２３７００を使用

）にて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：５．０。

【０２２２】

実施例６　抗体－薬物コンジュゲート（６）

【化３７】



【０２２３】

工程１：抗体－薬物コンジュゲート（６）

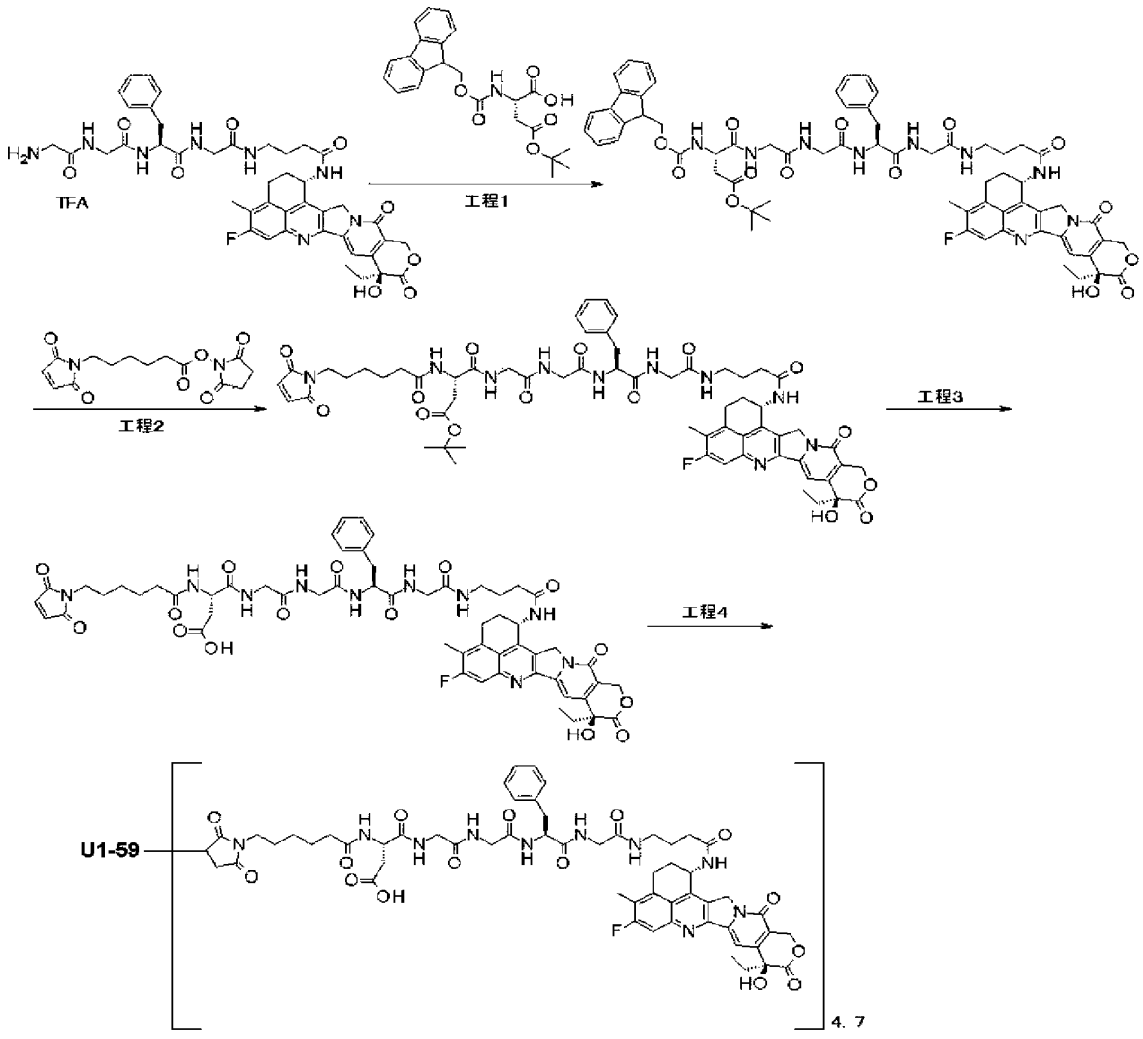
参考例１にて作製したＵ１－５９及び実施例５工程４で得た化合物を用いて、実施例１工程６と同様の方法により、標記抗体－薬物コンジュゲートを得た。

抗体濃度：１１．５ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：２２４．２ｍｇ（９０％），共通操作Ｅ（ドラッグリンカーのモル吸光係数として、$\varepsilon_{D,280}$＝７６２０、$\varepsilon_{D,370}$＝２３７００を使用）にて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：４．６。

【０２２４】

実施例７　抗体－薬物コンジュゲート（７）

【化３８】



【０２２５】

工程１：ｔｅｒｔ－ブチル　（３Ｓ，１２Ｓ）－１２－ベンジル－２１－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－３－｛［（９Ｈ－フルオレン－９－イルメトキシ）カルボニル］アミノ｝－４，７，１０，１３，１６，２１－ヘキサオキソ－５，８，１１，１４，１７－ペンタアザヘニコサン－１－ノエート

（２Ｓ）－４－ｔｅｒｔ－ブトキシ－２－｛［（９Ｈ－フルオレン－９－イルメトキシ）カルボニル］アミノ｝－４－オキソブタン酸（０．６２５ｇ、１．５２ｍｍｏＬ）をジクロロメタン（１０．０ｍＬ）に溶解し、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（０．１７５ｇ、１．５２ｍｏＬ）、及び１－（３－ジメチルアミノプロピル）－３－エチルカルボジイミド塩酸塩（０．２９１ｇ、１．５２ｍｍｏＬ）を加えて１時間撹拌した。その反応溶液を実施例1工程４で得た化合物（１．００ｇ、１．０１ｍｍｏＬ）を加えたＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド溶液（１０．０ｍＬ）に滴下し、室温にて２０時間撹拌した。溶媒を減

圧留去し、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［クロロホルム～クロロホルム：メタノール＝８：２（ｖ／ｖ）］にて精製し、標記化合物（０．８７３ｇ、７０％）を淡黄色固体として得た。
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８８（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），１．３７（９Ｈ，ｓ），１．６８－１．７８（２Ｈ，ｍ），１．８１－１．９３（２Ｈ，ｍ），２．１０－２．２３（４Ｈ，ｍ），２．４１（３Ｈ，ｓ），２．６８－２．８５（３Ｈ，ｍ），２．９９－３．２２（５Ｈ，ｍ），３．５８－３．８１（６Ｈ，ｍ），４．１９－４．３６（３Ｈ，ｍ），４．３８－４．５２（２Ｈ，ｍ），５．１７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１９．２Ｈｚ），５．２５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１９．２Ｈｚ），５．４３（２Ｈ，ｓ），５．５４－５．６２（１Ｈ，ｍ），６．５５（１Ｈ，ｓ），７．１５－７．３４（８Ｈ，ｍ），７．４１（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），７．６６－７．７５（４Ｈ，ｍ），７．８１（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），７．８８（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），８．０１－８．０６（１Ｈ，ｍ），８．１４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．２Ｈｚ），８．１７－８．２２（１Ｈ，ｍ），８．２５－８．３０（１Ｈ，ｍ），８．４７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ）．
ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：１２３２（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$．
【０２２６】
工程２：ｔｅｒｔ－ブチル　（３Ｓ，１２Ｓ）－１２－ベンジル－３－｛［６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサノイル］アミノ｝－２１－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－４，７，１０，１３，１６，２１－ヘキサオキソ－５，８，１１，１４，１７－ペンタアザヘニコサン－１－ノエート
上記工程１で得た化合物（０．８００ｇ、０．６４９ｍｍｏＬ）をＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（３．００ｍＬ）に溶解し、ピペリジン（０．６４３ｍＬ、６．４９ｍｍｏＬ）を加え１時間撹拌した。溶媒を減圧乾固し、得られた残留物をＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（１０ｍＬ）に溶解した。６－マレイミドヘキサン酸Ｎ－スクシンイミジル（０．３００ｇ、０．９７４ｍｍｏＬ）を加え、２０時間撹拌した。溶媒を減圧留去し、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［クロロホルム～クロロホルム：メタノール＝８：２（ｖ／ｖ）］にて精製し、標記化合物（０．２２４ｇ、２９％）を淡黄色固体として得た。
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．６Ｈｚ），１．１５－１．２２（２Ｈ，ｍ），１．３５（９Ｈ，ｓ），１．４４－１．４７（４Ｈ，ｍ），１．７１－１．７３（２Ｈ，ｍ），１．８０－１．９１（２Ｈ，ｍ），２．０８（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．６Ｈｚ），２．１３－２．２０（４Ｈ，ｍ），２．４０（３Ｈ，ｓ），２．６７（１Ｈ，ｄｔ，Ｊ＝１１．１，４．８Ｈｚ），２．７８（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．６，９．４Ｈｚ），２．９９－３．１７（６Ｈ，ｍ），３．３１－３．３６（２Ｈ，ｍ），３．５７－３．７６（６Ｈ，ｍ），４．４５－４．４７（１Ｈ，ｍ），４．５７－４．６０（１Ｈ，ｍ），５．１６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．７Ｈｚ），５．２５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．７Ｈｚ），５．４２（２Ｈ，ｓ），５．５５－５．６０（１Ｈ，ｍ），６．５３（１Ｈ，ｓ），６．９９（２Ｈ，ｓ），７．１５－７．２７（５Ｈ，ｍ），７．３１（１Ｈ，ｓ），７．７０（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．４Ｈｚ），７．８０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１０．９Ｈｚ），７．９９（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），８．０９－８．１２（３Ｈ，ｍ），８．２５（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．０Ｈｚ），８．４５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝９．１Ｈｚ）．
ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：１２０３（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$．
【０２２７】
工程３：Ｎ－［６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサノイル］－Ｌ－α－アスパラチルグリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ

－（４－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－４－オキソブチル）グリシナミド

上記工程２で得た化合物（０．２２４ｇ、０．１８６ｍｍｏＬ）を実施例１の工程２と同様に反応させ、標記化合物（２１．２ｍｇ、１０％）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），１．１３－１．２１（２Ｈ，ｍ），１．４２－１．４５（６Ｈ，ｍ），１．７０－１．７２（２Ｈ，ｍ），１．８５－１．８８（２Ｈ，ｍ），２．０６－２．２０（６Ｈ，ｍ），２．３９（３Ｈ，ｓ），２．６３－２．６７（１Ｈ，ｍ），２．７８－２．８１（１Ｈ，ｍ），３．０４－３．１２（６Ｈ，ｍ），３．６３－３．７０（６Ｈ，ｍ），４．４６－４．５２（２Ｈ，ｍ），５．１６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１９．２Ｈｚ），５．２５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．４２（２Ｈ，ｓ），５．５５－５．５８（１Ｈ，ｍ），６．５３（１Ｈ，ｓ），６．９９（２Ｈ，ｓ），７．１８－７．２３（６Ｈ，ｍ），７．３０（１Ｈ，ｓ），７．７１（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），７．７９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１０．９Ｈｚ），７．９９－８．０２（１Ｈ，ｍ），８．１０－８．１１（３Ｈ，ｍ），８．２７－８．３０（１Ｈ，ｍ），８．４７－８．５０（１Ｈ，ｍ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：１１４７（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$．

【０２２８】

工程４：抗体－薬物コンジュゲート（７）

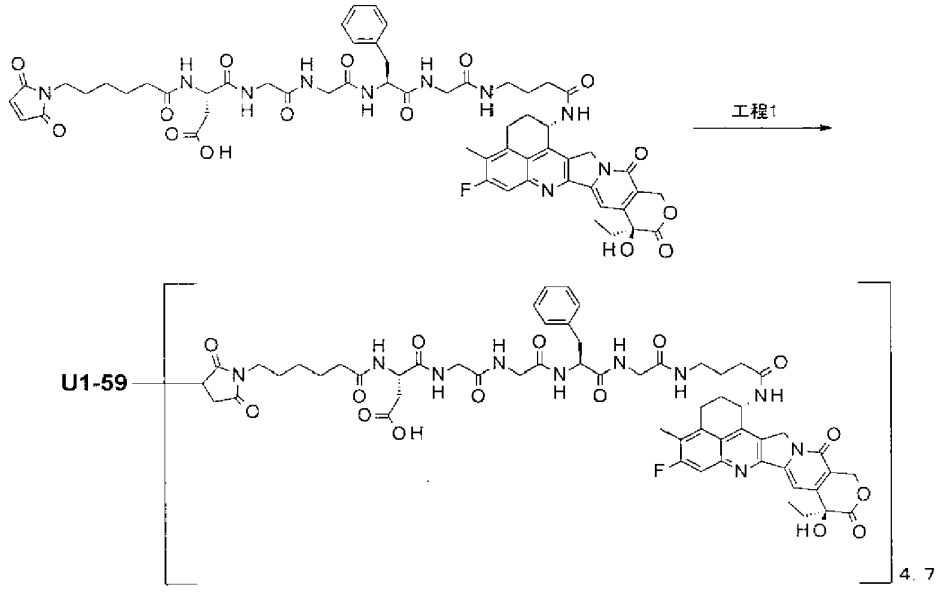
参考例１にて作製したＵ１－５９及び上記工程３で得た化合物を用いて、実施例１工程６と同様の方法により、標記抗体－薬物コンジュゲートを得た。

抗体濃度：１．３９ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：８．３４ｍｇ（８３％），共通操作Ｅ（ドラッグリンカーのモル吸光係数として、$\varepsilon_{D,280}$＝７６７０、$\varepsilon_{D,370}$＝２４８００を使用）にて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：４．７。

【０２２９】

実施例８　抗体－薬物コンジュゲート（８）

【化３９】



【０２３０】

工程１：抗体－薬物コンジュゲート（８）

参考例１にて作製したＵ１－５９及び実施例７工程３で得た化合物を用いて、実施例１工程６と同様の方法により、標記抗体－薬物コンジュゲートを得た。

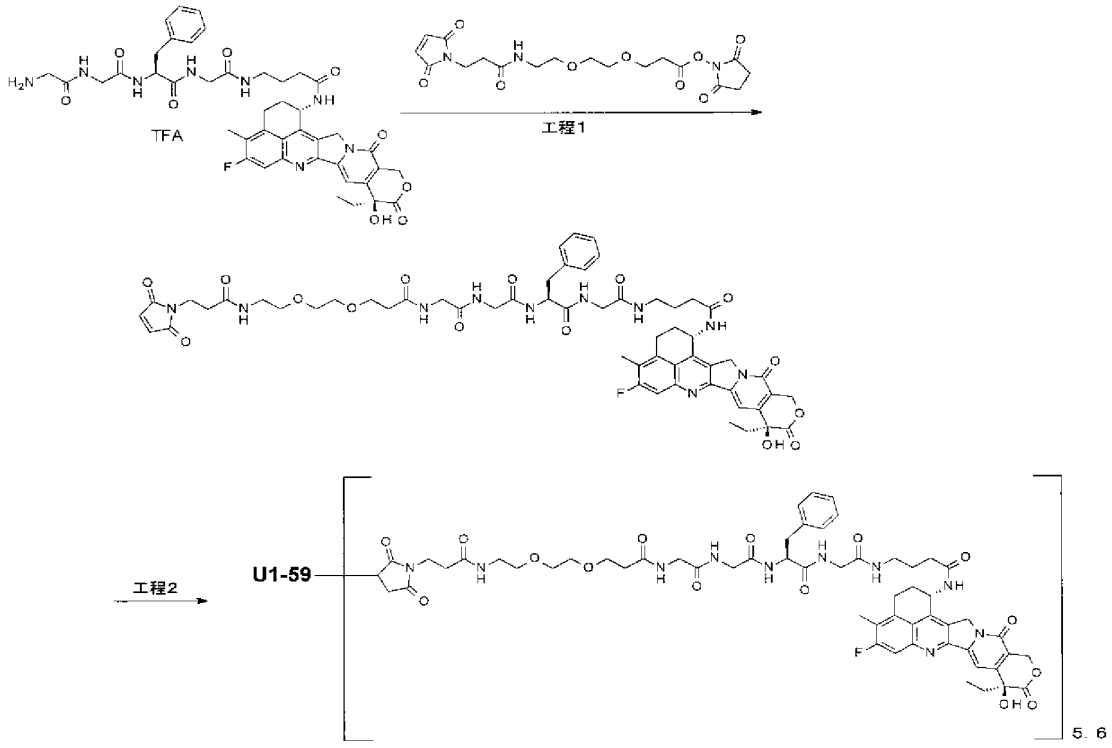
抗体濃度：１１．２ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：２２８．５ｍｇ（９１％），共通操作Ｅ（ドラッグリンカーのモル吸光係数として、$\varepsilon_{D,280}$＝７６７０、$\varepsilon_{D,370}$＝２４８００を使用）にて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：４．７。

【０２３１】

実施例９　抗体－薬物コンジュゲート（９）

【０２３２】

【化４０】



【０２３３】

工程１：Ｎ－｛３－［２－（２－｛［３－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）プロパノイル］アミノ｝エトキシ）エトキシ］プロパノイル｝グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－（４－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－４－オキソブチル）グリシンアミド

実施例１の工程４で得た化合物（１００ｍｇ，０．１１９ｍｍｏＬ）を、６－マレイミドヘキサン酸Ｎ－スクシンイミジルの代わりに３－（２－（２－（３－マレインイミドプロパンアミド）エトキシ）エトキシ）プロパン酸Ｎ－スクシンイミジル（５０．７ｍｇ，０．１１９ｍｍｏＬ）を用いて、実施例１の工程５と同様に反応させ、標記化合物（６６．５ｍｇ，４８％）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－d_6）δ：０．８５（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），１．６５－１．７４（２Ｈ，ｍ），１．７７－１．９０（２Ｈ，ｍ），２．０７－２．１９（４Ｈ，ｍ），２．３０（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），２．３３－２．３６（２Ｈ，ｍ），２．３８（３Ｈ，ｓ），２．７６（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．７，９．８Ｈｚ）

，２．９６－３．１８（９Ｈ，ｍ），３．４２－３．４４（４Ｈ，ｍ），３．５３－３．７６（１０Ｈ，ｍ），４．４３（１Ｈ，ｔｄ，Ｊ＝８．６，４．７Ｈｚ），５．１４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．２３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．３８（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１７．２Ｈｚ），５．４２（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１７．２Ｈｚ），５．５２－５．５８（１Ｈ，ｍ），６．５２（１Ｈ，ｓ），６．９８（２Ｈ，ｓ），７．１２－７．１７（１Ｈ，ｍ），７．１８－７．２５（４Ｈ，ｍ），７．２９（１Ｈ，ｓ），７．６９（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），７．７８（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．３Ｈｚ），７．９８－８．０３（２Ｈ，ｍ），８．１１（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．８Ｈｚ），８．１６（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），８．２３（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．９Ｈｚ），８．４４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝９．０Ｈｚ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：１１４９（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$．

【０２３４】

工程２：抗体－薬物コンジュゲート（９）

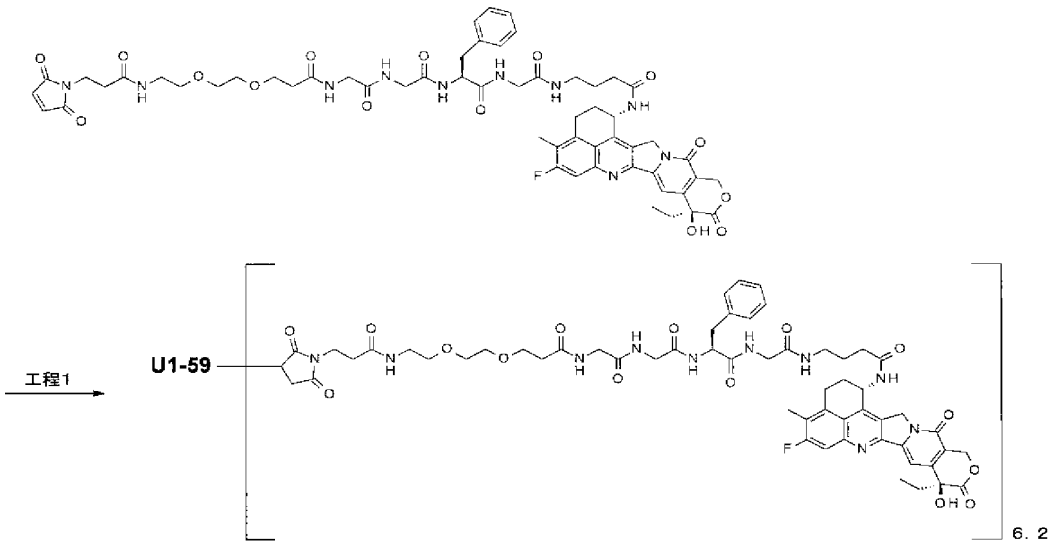
参考例１にて作製したＵ１－５９及び上記工程１で得た化合物を用いて、実施例１工程６と同様の方法により、標記抗体－薬物コンジュゲートを得た。

抗体濃度：２．０８ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：１８．７ｍｇ（９４％），共通操作Ｅ（ドラッグリンカーのモル吸光係数として、$\varepsilon_{D,280}$＝４９６４、$\varepsilon_{D,370}$＝１８９８２を使用）にて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：５．６。

【０２３５】

実施例１０　抗体－薬物コンジュゲート（１０）

【化４１】



【０２３６】

工程１：抗体－薬物コンジュゲート（１０）

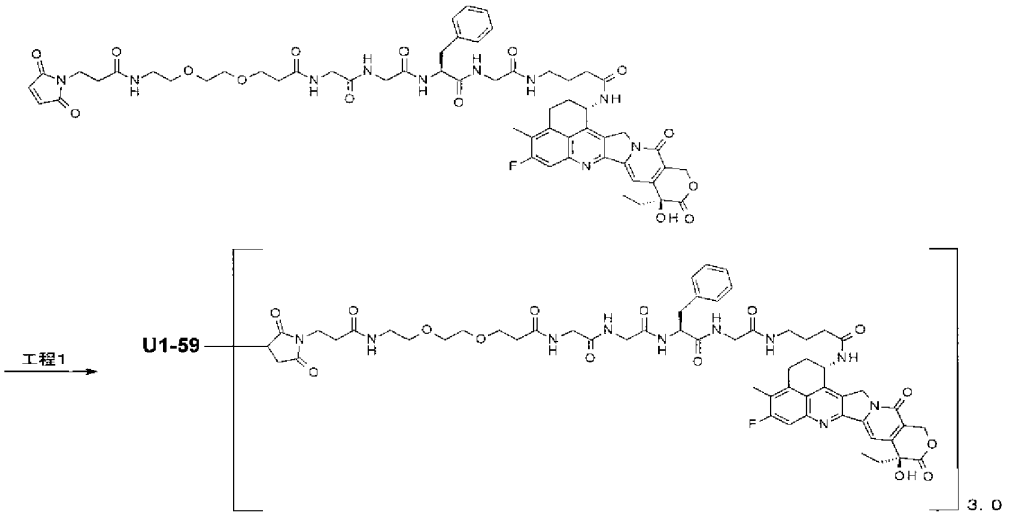
参考例１にて作製したＵ１－５９及び実施例９工程１で得た化合物を用いて、実施例１工程６と同様の方法により、標記抗体－薬物コンジュゲートを得た。

抗体濃度：１９．７ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：２３６．４ｍｇ（９５％），共通操作Ｅ（ドラッグリンカーのモル吸光係数として、$\varepsilon_{D,280}$＝４９６４、$\varepsilon_{D,370}$＝１８９８２を使用）にて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：６．２；共通操作Ｆ（ドラッグリンカーのモル吸光係数として、$\varepsilon_{D,280}$＝４９６４を使用）にて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：６．４。

【０２３７】

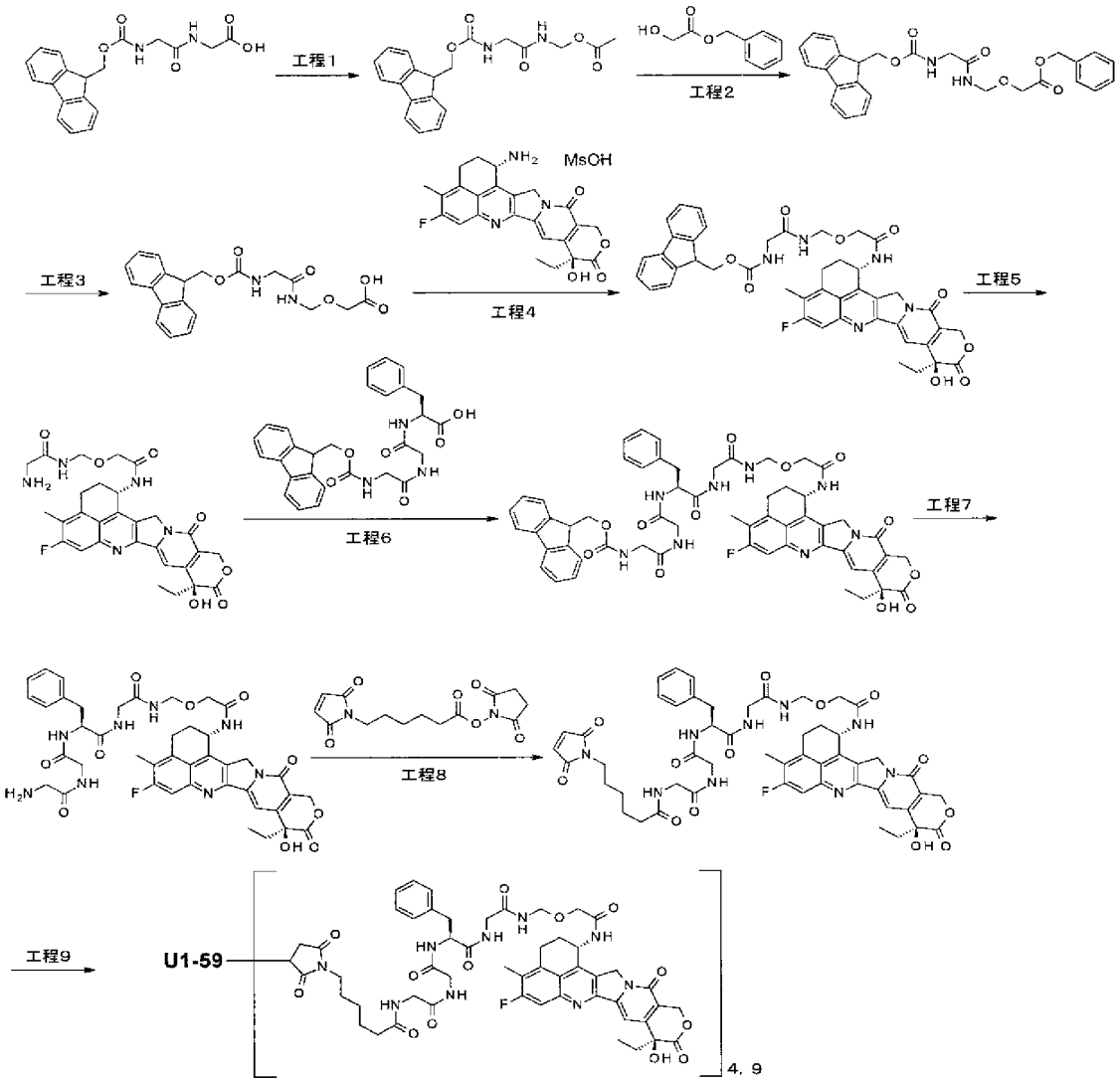
実施例１１　抗体－薬物コンジュゲート（１１）

【０２３８】
【化４２】



【０２３９】
工程１：抗体－薬物コンジュゲート（１１）
参考例１にて作製したＵ１－５９及び実施例９工程１で得た化合物を用いて、実施例４工程１と同様の方法により、標記抗体－薬物コンジュゲートを得た。
抗体濃度：０．８８ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：５．２８ｍｇ（５３％），共通操作Ｅ（ドラッグリンカーのモル吸光係数として、$\varepsilon_{D,280}$＝４９６４、$\varepsilon_{D,370}$＝１８９８２を使用）にて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．０；共通操作Ｆ（ドラッグリンカーのモル吸光係数として、$\varepsilon_{D,280}$＝４９６４を使用）にて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．３。
【０２４０】
実施例１２　抗体－薬物コンジュゲート（１２）

【化４３】



【０２４１】

工程１：（｛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

Ｎ－９－フルオレニルメトキシカルボニルグリシルグリシン（４．３３ｇ，１２．２ｍｍｏｌ）、テトラヒドロフラン（１２０ｍＬ）、及びトルエン（４０．０ｍＬ）からなる混合物に、ピリジン（１．１６ｍＬ，１４．７ｍｍｏｌ）及び四酢酸鉛（６．８４ｇ，１４．７ｍｍｏｌ）を加え、５時間加熱還流した。反応液を室温まで冷却した後、不溶物をセライト濾過によって除き、濾液の溶媒を減圧下濃縮した。得られた残留物を酢酸エチルに溶解し、水及び飽和食塩水で洗浄後、有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を減圧下で留去した後、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［ヘキサン：酢酸エチル＝９：１（ｖ／ｖ）～酢酸エチル］にて精製し、標記化合物（３．００ｇ，６７％）を無色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ：２．０７（３Ｈ，ｓ），３．９０（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝５．１Ｈｚ），４．２３（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ），４．４６（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．６Ｈｚ），５．２６（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．０Ｈｚ），５．３２（１Ｈ，ｂｒｓ）

，６．９６（１Ｈ，ｂｒｓ），７．３２（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ），７．４１（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ），７．５９（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．３Ｈｚ），７．７７（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．３Ｈｚ）．

【０２４２】

工程２：ベンジル　［（｛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］アセテート

上記工程１で得た化合物（３．６８ｇ，１０．０ｍｍｏＬ）及びベンジルグリコレート（４．９９ｇ，３０．０ｍｍｏＬ）のテトラヒドロフラン（４０．０ｍＬ）溶液に、カリウム　ｔｅｒｔ－ブトキシド（２．２４ｇ，２０．０ｍｍｏＬ）を０℃で加え、室温にて１５分間撹拌した。反応溶液に酢酸エチル、水を０℃で加え、酢酸エチル、クロロホルムで抽出し、得られた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過した。溶媒を減圧留去し、得られた残留物をジオキサン（４０．０ｍＬ）、水（１０．０ｍＬ）に溶解し、炭酸水素ナトリウム（１．０１ｇ，１２．０ｍｍｏＬ）、クロロギ酸９－フルオレニルメチル（２．５９ｇ，１０．０ｍｍｏＬ）を加え、室温で２時間撹拌した。反応溶液に水を加え、酢酸エチルで抽出し、得られた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過した。溶媒を減圧留去し、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［ヘキサン：酢酸エチル＝１００：０（ｖ／ｖ）～０：１００］にて精製し、無色油状の標記化合物（１．８８ｇ、４０％）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ：３．８４（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），４．２４（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．５Ｈｚ），４．４９（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．７Ｈｚ），４．８８（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．７Ｈｚ），５．１５－５．２７（１Ｈ，ｍ），５．１９（２Ｈ，ｓ），６．７４（１Ｈ，ｂｒｓ），７．３１－７．３９（７Ｈ，ｍ），７．４３（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），７．６１（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），７．７９（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．４Ｈｚ）．

【０２４３】

工程３：［（｛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

上記工程２で得た化合物（１．８８ｇ、３．９６ｍｍｏＬ）をエタノール（４０．０ｍＬ）、酢酸エチル（２０．０ｍＬ）に溶解した。パラジウム炭素触媒（３７６ｍｇ）を加え、水素雰囲気下、室温で２時間撹拌した。不溶物をセライト濾過によって除き、濾液の溶媒を減圧留去し、標記化合物（１．５２ｇ、定量的）を無色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：３．６２（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．３Ｈｚ），３．９７（２Ｈ，ｓ），４．１８－４．３２（３Ｈ，ｍ），４．６０（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．７Ｈｚ），７．２９－７．４６（４Ｈ，ｍ），７．５８（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．９Ｈｚ），７．７２（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），７．９０（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），８．７１（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．５Ｈｚ）．

【０２４４】

工程４：９Ｈ－フルオレン－９－イルメチル（２－｛［（２－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－２－オキソエトキシ）メチル］アミノ｝－２－オキソエチル）カーバメート

氷冷下、エキサテカンのメシル酸塩（０．２８３ｇ，０．５３３ｍｍｏＬ）、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（６１．４ｍｇ，０．５３３ｍｍｏＬ）、及び上記工程３で得た化合物（０．２０５ｇ，０．５３３ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（１０．０ｍＬ）溶液に、Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（９２．９μＬ，０．５３３ｍｍｏＬ）及びＮ，Ｎ’－ジシクロヘキシルカルボジイミド（０．１４３ｇ，０．６９３ｍｍｏＬ）を加え、室温で３日間撹拌した。溶媒を減圧留去し、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［クロロホルム～クロロホルム：メタノール：水＝７：３：１（ｖ／ｖ／ｖ）の分配有機層］にて精製し、標記化合物（０．３５２ｇ，８２％）を淡茶色

固体として得た。
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_6$）δ：０．８１（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），１．７３－１．８７（２Ｈ，ｍ），２．０６－２．２０（２Ｈ，ｍ），２．３４（３Ｈ，ｓ），３．０１－３．２３（２Ｈ，ｍ），３．５８（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．７Ｈｚ），３．９８（２Ｈ，ｓ），４．１３－４．２５（３Ｈ，ｍ），４．６０（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．７Ｈｚ），５．０９－５．２２（２Ｈ，ｍ），５．３２－５．４２（２Ｈ，ｍ），５．５０－５．５９（１Ｈ，ｍ），６．４９（１Ｈ，ｓ），７．２４－７．３０（３Ｈ，ｍ），７．３６（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），７．５３（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．３Ｈｚ），７．６６（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），７．７５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），７．８４（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），８．４７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ），８．７７（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．７Ｈｚ）．
ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：８０２（Ｍ＋Ｈ）$^+$．
【０２４５】
工程５：Ｎ－［（２－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－２－オキソエトキシ）メチル］グリシンアミド
上記工程４で得た化合物（０．８８１ｇ，１．１０ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（１１．０ｍＬ）溶液に、ピペリジン（１．１ｍＬ）を加え、室温で２時間撹拌した。溶媒を減圧留去し、標記化合物を含む混合物を得た。本混合物は、これ以上の精製は行わずに次の反応に用いた。
【０２４６】
工程６：Ｎ－［（９Ｈ－フルオレン－９－イルメトキシ）カルボニル］グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－［（２－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－２－オキソエトキシ）メチル］グリシンアミド
氷冷下、上記工程５で得た混合物（０．４３９ｍｍｏＬ）、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（０．１０１ｇ，０．８７８ｍｍｏＬ）、及びＮ－［（９Ｈ－フルオレン－９－イルメトキシ）カルボニル］グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニン（特開２００２－６０３５１号公報に記載された化合物；０．４４０ｇ，０．８７８ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（５０．０ｍＬ）溶液に、Ｎ，Ｎ’－ジシクロヘキシルカルボジイミド（０．１８１ｇ，０．８７８ｍｍｏＬ）を加え、室温で４日間撹拌した。溶媒を減圧留去し、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［クロロホルム～クロロホルム：メタノール＝９：１（ｖ／ｖ）］にて精製し、標記化合物（０．２６９ｇ，５８％）を淡橙色固体として得た。
ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：１０６３（Ｍ＋Ｈ）$^+$．
【０２４７】
工程７：グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－［（２－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－２－オキソエトキシ）メチル］グリシンアミド
上記工程６で得た化合物（０．２６９ｇ，０．２５３ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（４．００ｍＬ）溶液に、ピペリジン（０．２５１ｍＬ，２．５３ｍｍｏＬ）を加え、室温で２時間撹拌した。溶媒を減圧留去し、標記化合物を含む混合物を得た。本混合物は、これ以上の精製は行わずに次の反応に用いた。
【０２４８】
工程８：Ｎ－［６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル

）ヘキサノイル］グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－［（２－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－２－オキソエトキシ）メチル］グリシンアミド

上記工程７で得た化合物（０．２５３ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（１０．０ｍＬ）溶液に、６－マレイミドヘキサン酸Ｎ－スクシンイミジル（０．１５６ｇ，０．５０６ｍｍｏＬ）を加え、室温で３日間撹拌した。溶媒を減圧留去し、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［クロロホルム～クロロホルム：メタノール＝９：１（ｖ／ｖ）］にて精製し、標記化合物（０．１００ｇ，３８％）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８３（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），１．０９－１．２１（２Ｈ，ｍ），１．３３－１．４７（４Ｈ，ｍ），１．７５－１．９０（２Ｈ，ｍ），２．００－２．２３（４Ｈ，ｍ），２．３６（３Ｈ，ｓ），２．６９－２．８１（１Ｈ，ｍ），２．９４－３．０３（１Ｈ，ｍ），３．０６－３．２２（２Ｈ，ｍ），３．２３－３．７４（６Ｈ，ｍ），３．９８（２Ｈ，ｓ），４．３９－４．５０（１Ｈ，ｍ），４．６０（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．７Ｈｚ），５．１７（２Ｈ，ｓ），５．３９（２Ｈ，ｓ），５．５３－５．６１（１Ｈ，ｍ），６．５０（１Ｈ，ｓ），６．９６（２Ｈ，ｓ），７．１１－７．２４（５Ｈ，ｍ），７．２８（１Ｈ，ｓ），７．７５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），７．９７（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），８．０３（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．９Ｈｚ），８．０９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．８Ｈｚ），８．２７（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．５Ｈｚ），８．４８（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝９．０Ｈｚ），８．６０（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．５Ｈｚ）．

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：１０３４（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$．

【０２４９】

工程９：抗体－薬物コンジュゲート（１２）

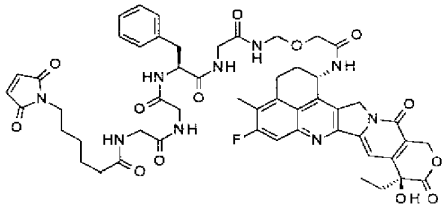
参考例１にて作製したＵ１－５９及び上記工程８で得た化合物を用いて、実施例１工程６と同様の方法により、標記抗体－薬物コンジュゲートを得た。

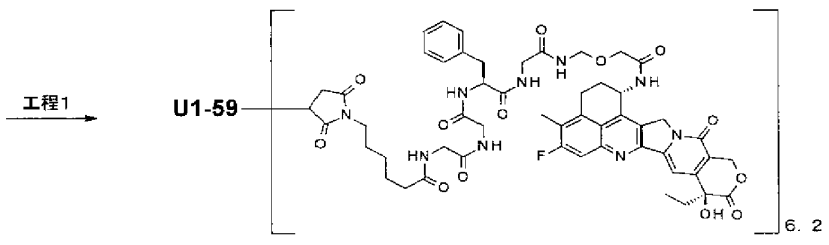
抗体濃度：２．１１ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：１９．０ｍｇ（９５％），共通操作Ｅ（ドラッグリンカーのモル吸光係数として、$\varepsilon_{D,280}$＝５１７８、$\varepsilon_{D,370}$＝２０２１７を使用）にて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：４．９。

【０２５０】

実施例１３　抗体－薬物コンジュゲート（１３）

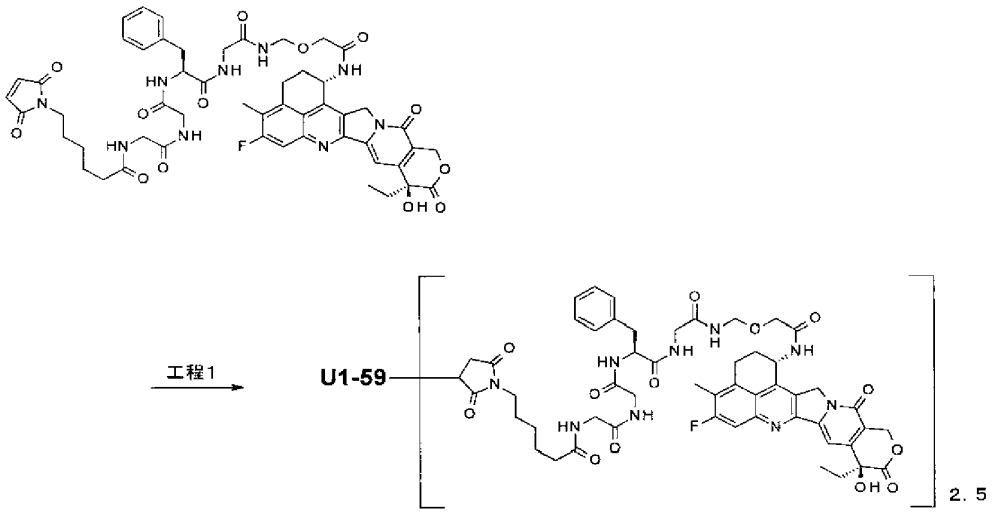
【化４４】





【０２５１】
工程１：抗体－薬物コンジュゲート（１３）
参考例１にて作製したＵ１－５９及び実施例１２工程８で得た化合物を用いて、実施例１工程６と同様の方法により、標記抗体－薬物コンジュゲートを得た。
抗体濃度：２２．２ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：２４４．２ｍｇ（９８％），共通操作Ｅ（ドラッグリンカーのモル吸光係数として、$\varepsilon_{D,280}$＝５１７８、$\varepsilon_{D,370}$＝２０２１７を使用）にて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：６．２；共通操作Ｆ（ドラッグリンカーのモル吸光係数として、$\varepsilon_{D,280}$＝５１７８を使用）にて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：７．０。

【０２５２】
実施例１４　抗体－薬物コンジュゲート（１４）
【化４５】



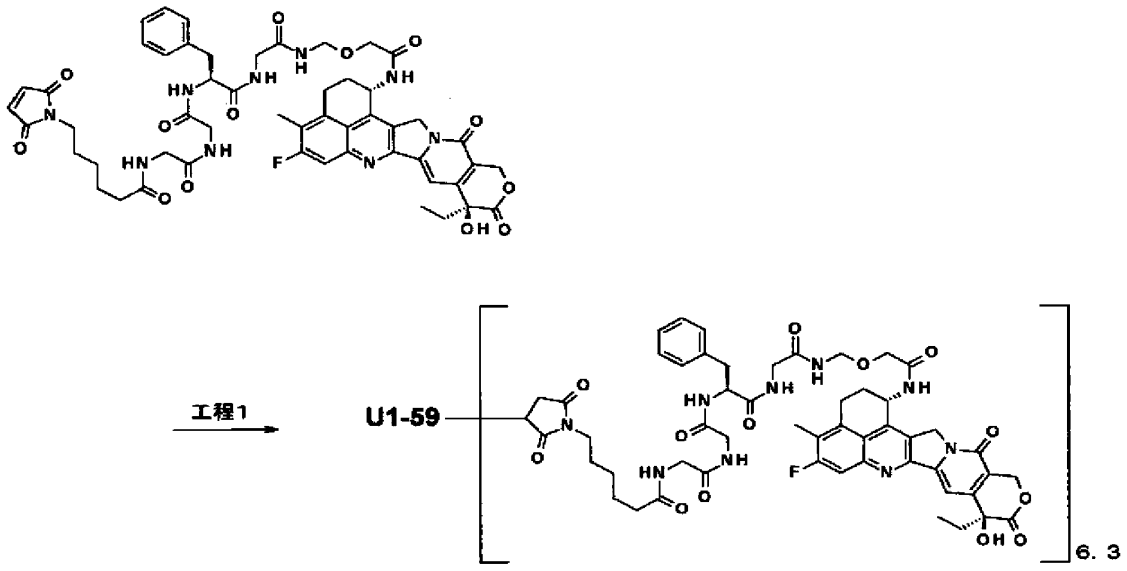
【０２５３】
工程１：抗体－薬物コンジュゲート（１４）
抗体の還元：参考例１にて作製したＵ１－５９を、製造方法１に記載した共通操作Ｂ及び共通操作Ｃを用いて、媒体をＰＢＳ６．０／ＥＤＴＡに置換し、１０ｍｇ／ｍＬの抗体濃度に調製した。本溶液（１．００ｍＬ）を２．０ｍＬポリプロピレン製チューブに入れ、ここに１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．０１６０ｍＬ；抗体一分子に対して２．４当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（Ｎａｃａｌａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎｃ．；０．０１５０ｍＬ）を加えた。本溶液のｐＨが７．０±０．１内であることを確認した後に、３７℃で１時間インキュベートすることで、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。
抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液を１５℃水浴で10分間インキュベートした後に、ジメチルスルホキシド（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ；０．０２０９ｍＬ）と実施例１２工程８で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．０３１５ｍＬ；抗体一分子に対して５．０当量）を加え、１５℃水浴にて６０分間インキュベートし、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．００５０ｍＬ）を加え、さらに室温でチューブ・ローテーター（ＭＴＲ－１０３，アズワン株式会社）を用いて２０分間撹拌し、薬物リンカーの反応を停止させた。
実施例１工程６と同様の精製操作及び特性評価により、下記の特性値を得た。
抗体濃度：１．４６ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：８．７６ｍｇ（８８％），共通操作Ｅ（ド

ラッグリンカーのモル吸光係数として、$\varepsilon_{D,280}$＝５１７８、$\varepsilon_{D,370}$＝２０２１７を使用）にて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：２．５；共通操作Ｆ（ドラッグリンカーのモル吸光係数として、$\varepsilon_{D,280}$＝５１７８を使用）にて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：２．９。

【０２５４】

実施例１５　抗体－薬物コンジュゲート（１５）

【化４６】



【０２５５】

工程１：抗体－薬物コンジュゲート（１５）

抗体の還元：参考例１にて作製したＵ１－５９を、製造方法１に記載した共通操作Ｂおよび共通操作Ｃを用いて、媒体をＰＢＳ６．０／ＥＤＴＡに置換し、１０ｍｇ／ｍＬの抗体濃度に調製した。本溶液（１００ｍＬ）をポリカーボネート製の２５０ｍL三角フラスコ容器に入れ、マグネティックスターラー撹拌下、室温にて１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（１．７０ｍＬ）を加えた後、１０ｍＭ　ＴＣＥＰ水溶液（４．０１０ｍＬ；抗体一分子に対して６．０当量）を加えた。本溶液のｐＨが７．０±０．１内であることを確認した後に、撹拌を停止し、３７℃で１時間インキュベートすることにより、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元した。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液を１５℃に冷却後、撹拌下、実施例１２工程８で得た化合物を１０ｍＭ含むＤＭＳＯ溶液（６．６８４ｍＬ；抗体一分子に対して１０．０当量）をゆっくり滴下して加えた。１５℃にて、最初の３０分間撹拌し、次の１時間は撹拌を停止させてインキュベートし、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、撹拌下、１００ｍＭ　ＮＡＣ水溶液（０．８６２ｍＬ；抗体一分子に対して１２．９当量）を加え、さらに室温下２０分間インキュベートし、未反応の薬物リンカーの反応性を停止させた。

精製：撹拌下、上記溶液に２０％酢酸水（約０．６ｍＬ）とＡＢＳ（１００ｍＬ）をゆっくり加え、本溶液のｐＨを５．５±０．１にした。この溶液を精密ろ過（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｃｏ．　Ｍｉｌｌｅｘ－ＨＶフィルター、０．４５μｍ、ＰＶＤＦ膜）を行い白濁物を除いた。この溶液に対して、限外ろ過膜（メルク株式会社、Ｐｅｌｌｉｃｏｎ　ＸＬ　Ｃａｓｓｅｔｔｅ、Ｂｉｏｍａｘ　５０ＫＤａ）、チューブポンプ（米国コールパーマー社マスターフレックスポンプ　ｍｏｄｅｌ　７７５２１－４０、ポンプヘッド　ｍｏｄｅｌ　７５１８－００）及びチューブ（米国コールパーマー社マスターフレックスチュ

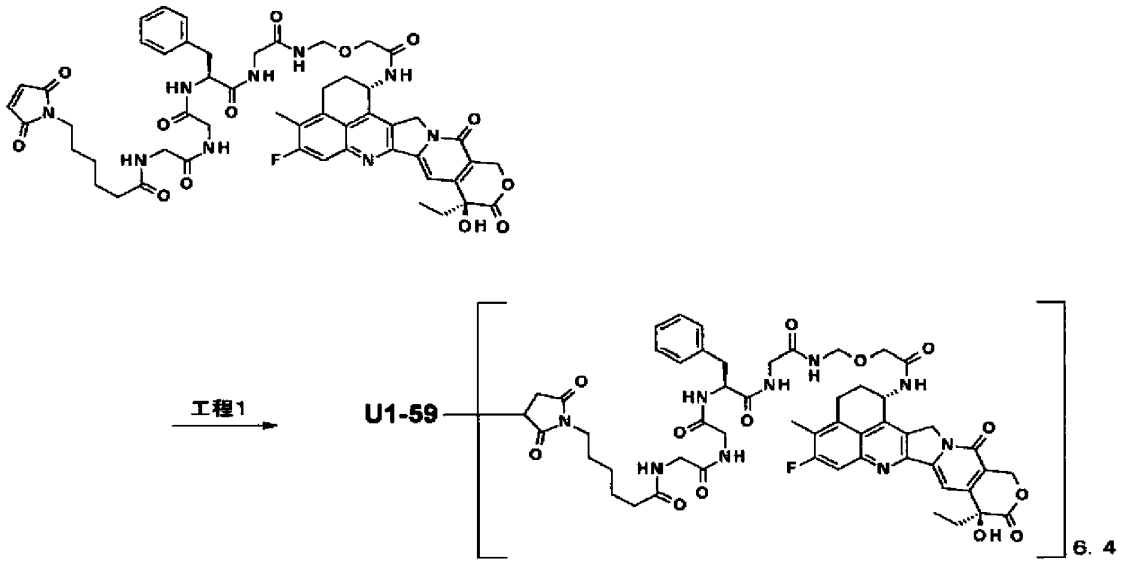
ーブ　Ｌ／Ｓ１６）で構成された限外ろ過装置を用い、限外ろ過精製を行った。すなわち、反応液に精製緩衝液としてＡＢＳを滴下しながら（計１６００ｍＬ）、限外ろ過精製を行うことで、未結合の薬物リンカー及び他の低分子量試薬を除去するとともに緩衝液をＡＢＳへ置換し、さらに濃縮まで行った。得られた精製溶液に対して、精密ろ過（０．２２μｍ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｃｏ．　Ｍｉｌｌｅｘ－ＧＶフィルター、ＰＶＤＦ膜）を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を３７．５ｍＬ得た。

抗体濃度：２６．５ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：９９３．０ｍｇ（９０％），共通操作Ｅ（ドラッグリンカーのモル吸光係数として、$\varepsilon_{D,280}$＝５１７８、$\varepsilon_{D,370}$＝２０２１７を使用）にて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：６．３；共通操作Ｆ（ドラッグリンカーのモル吸光係数として、$\varepsilon_{D,280}$＝５１７８を使用）にて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：７．３。

【０２５６】

実施例１６ａ　抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）

【化４７】



【０２５７】

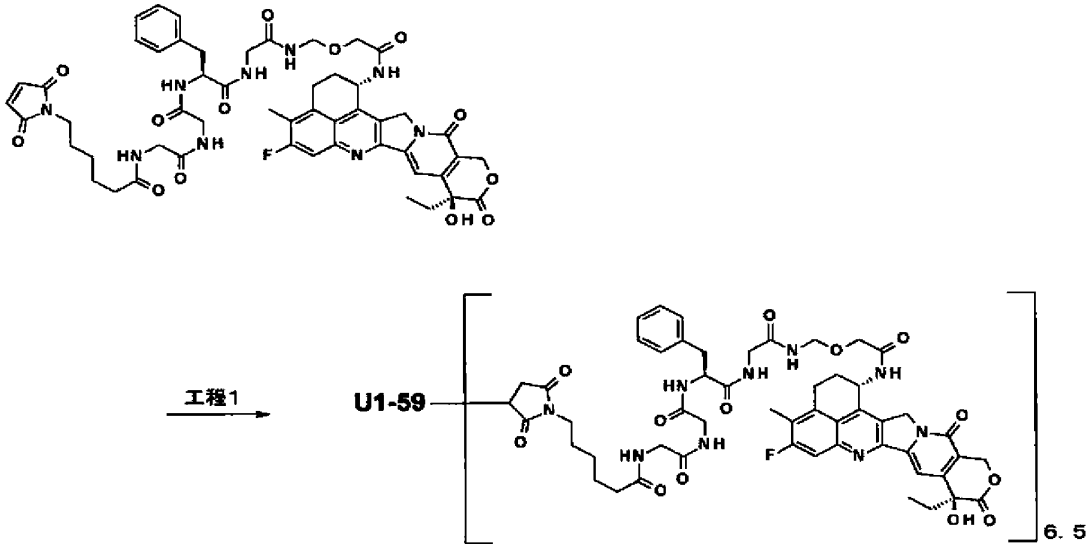
工程１：抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）

抗体の還元：参考例１にて作製したＵ１－５９を、製造方法１に記載した共通操作Ｂおよび共通操作Ｃを用いて、媒体をＰＢＳ６．０／ＥＤＴＡに置換し、１０ｍｇ／ｍＬの抗体濃度に調製した。本溶液（１５ｍＬ）をポリエチレンテレフタラート製の５０ｍL容器に入れ、マグネティックスターラー撹拌下、室温にて１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（０．２５５ｍＬ）を加えた後、１０ｍＭ　ＴＣＥＰ水溶液（０．６０１ｍＬ；抗体一分子に対して６．０当量）を加えた。本溶液のｐＨが７．０±０．１内であることを確認した後に、３７℃で２時間インキュベートすることにより、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元した。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液を１５℃に冷却後、撹拌下、実施例１２工程８で得た化合物を１０ｍＭ含むＤＭＳＯ溶液（１．００２ｍＬ；抗体一分子に対して１０．０当量）をゆっくり滴下し加えた。１５℃にて、３０分間撹拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、撹拌下、１００ｍＭ　ＮＡＣ水溶液（０．１２９ｍＬ；抗体一分子に対して１２．９当量）を加え、さらに室温下２０分間インキュベートし、未反応の薬物リンカーの反応性を停止させた。実施例１工程６と同様の精製操作及び特性評

価により、下記の特性値を得た。
抗体濃度：２．３６ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：１４０ｍｇ（５９．５ｍＬ）（９４％），共通操作Ｅ（ドラッグリンカーのモル吸光係数として、$\varepsilon_{D,280}$＝５１７８、$\varepsilon_{D,370}$＝２０２１７を使用）にて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：６．４；共通操作Ｆ（ドラッグリンカーのモル吸光係数として、$\varepsilon_{D,280}$＝５１７８を使用）にて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：７．７。

【０２５８】
実施例１６ｂ　抗体－薬物コンジュゲート（１６ｂ）
【化４８】



【０２５９】
抗体の還元：参考例１にて作製したＵ１－５９を、製造方法１に記載した共通操作Ｂおよび共通操作Ｃを用いて、媒体をＰＢＳ６．０／ＥＤＴＡに置換し、１０ｍｇ／ｍＬの抗体濃度に調製した。本溶液（９００ｍＬ）をポリカーボネート製の２０００mL三角フラスコ容器に入れ、マグネティックスターラー撹拌下、室温にて１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（１５．３ｍＬ）を加えた後、１０ｍＭ　ＴＣＥＰ水溶液（３６．１ｍＬ；抗体一分子に対して６．０当量）を加えた。本溶液のｐＨが７．０±０．１内であることを確認した後に、撹拌を停止し、３７℃で２時間インキュベートすることにより、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元した。
抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液を１５℃に冷却後、撹拌下、実施例１２工程８で得た化合物を１０ｍＭ含むＤＭＳＯ溶液（６０．１６ｍＬ；抗体一分子に対して１０．０当量）をゆっくり滴下し加えた。１５℃にて３０分間撹拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、撹拌下、１００ｍＭ　ＮＡＣ水溶液（７．７６ｍＬ；抗体一分子に対して１２．９当量）を加え、さらに室温下２０分間インキュベートし、未反応の薬物リンカーの反応性を停止させた。
精製：撹拌下、上記溶液に２０％酢酸水（約５ｍＬ）とＡＢＳ（１０００ｍＬ）をゆっくり加え、本溶液のｐＨを５．５±０．１にした。この溶液を精密ろ過（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｃｏ．　Ｓｔｅｒｉｃｕｐ、０．４５μｍ、ＰＶＤＦ膜）を行い白濁物を除いた。この溶液に対して、限外ろ過膜（メルク株式会社、Ｐｅｌｌｉｃｏｎ　２　ｍｉｎｉ　ｃａｓｅｔｔｅ、Ｕｌｔｒａｃｅｌ　３０ＫＤａ、０．１m^2）、チューブポンプ（米国コールパーマー社マスターフレックスポンプ　ｍｏｄｅｌ　７５２８－２０、ポンプヘッド

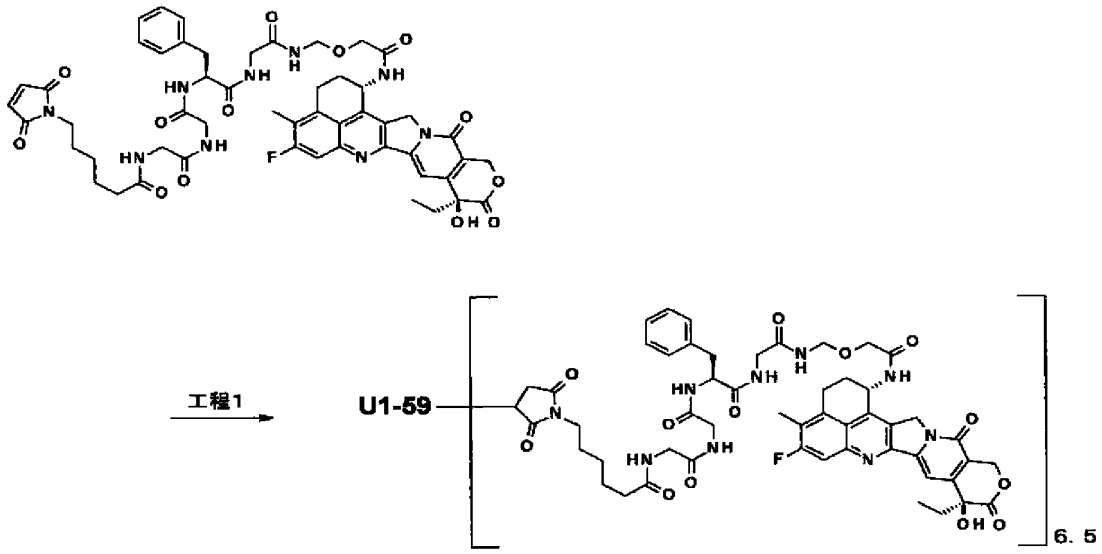
ｍｏｄｅｌ　７７８００－６２）及びチューブ（米国コールパーマー社マスターフレックスチューブ　Ｌ／Ｓ２４及び２５）で構成された限外ろ過装置を用い、限外ろ過精製を行った。すなわち、反応液に精製緩衝液としてＡＢＳを滴下しながら（計１６Ｌ）、限外ろ過精製を行うことで、未結合の薬物リンカー及び他の低分子量試薬を除去するとともに緩衝液をＡＢＳへ置換し、さらに濃縮まで行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を約５００ｍL得た。

抗体濃度：１９．６６ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：９８３０ｍｇ（１０９％），共通操作Ｅ（ドラッグリンカーのモル吸光係数として、$\varepsilon_{D,280}$＝５１７８、$\varepsilon_{D,370}$＝２０２１７を使用）にて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：６．５。

【０２６０】

実施例１６ｃ　抗体－薬物コンジュゲート（１６ｃ）

【化４９】



【０２６１】

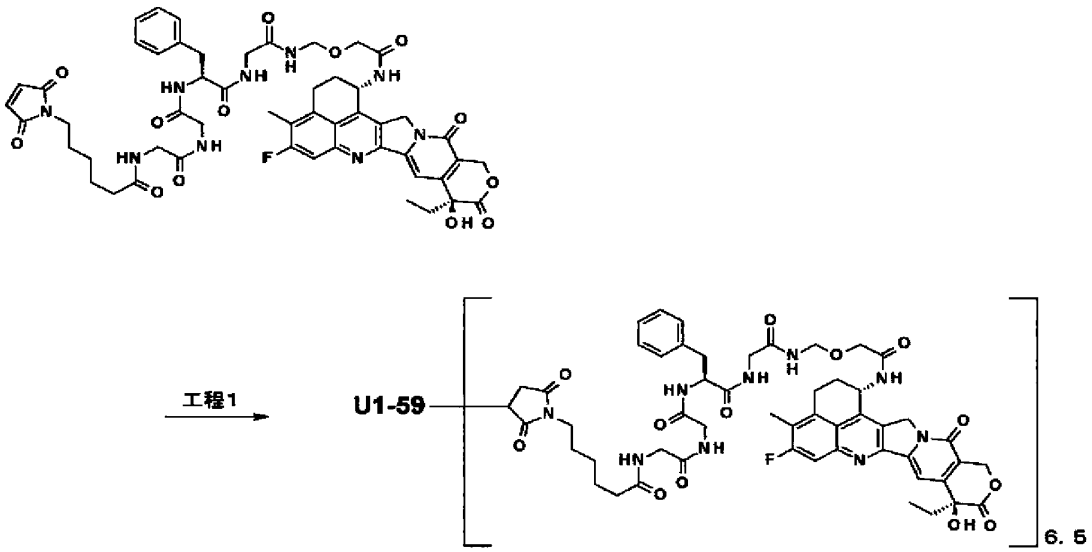
参考例１にて作製したＵ１－５９及び実施例１２工程８で得た化合物を用いて、実施例１６ｂと同様の方法により、標記抗体－薬物コンジュゲートを得た。

抗体濃度：１６．２１ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：９７２６ｍｇ（６００ｍＬ、１０８％），共通操作Ｅ（ドラッグリンカーのモル吸光係数として、$\varepsilon_{D,280}$＝５１７８、$\varepsilon_{D,370}$＝２０２１７を使用）にて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：６．５。

【０２６２】

実施例１６ｄ　抗体－薬物コンジュゲート（１６ｄ）

【化５０】



【０２６３】

実施例１６ａ、１６ｂ及び１６ｃで作製した抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）、（１６ｂ）及び（１６ｃ）を混合し（計約１８ｇ）、さらに、実施例１６ｂと同様の限外ろ過精製を行った（１１ＬのＡＢＳを使用）。得られた精製溶液に対して、精密ろ過（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｃｏ．　Ｓｔｅｒｉｃｕｐ、０．４５μｍ及び０．２２μｍ、ＰＶＤＦ膜）を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を７４５ｍＬ得た。さらにＡＢＳ　１１０ｍＬを加えることで、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を８５５ｍＬ得た。

抗体濃度：２０．０ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：１７．１ｇ（９４％），共通操作Ｅ（ドラッグリンカーのモル吸光係数として、$\varepsilon_{D,280}$＝５１７８、$\varepsilon_{D,370}$＝２０２１７を使用）にて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：６．５；共通操作Ｆ（ドラッグリンカーのモル吸光係数として、$\varepsilon_{D,280}$＝５１７８を使用）にて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：７．８。

【０２６４】

試験例１　Ｕ１－５９と比較した抗体－薬物コンジュゲートのＨＥＲ３への結合親和性

方法：

ＡＴＣＣ由来のヒト乳癌細胞株ＨＣＣ１５６９（ＣＲＬ－２３３０）をＲＰＭＩ１６４０メディウム（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎより購入、１０％ウシ血清アルブミン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ製）と２ｍＭのＬ－ｇｕｌｔａｍｉｎｅ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ製）を含む）にて培養した。細胞をＡＣＣＵＴＡＳＥ（登録商標）ＳＯＬＵＴＩＯＮ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ，ＳＣＲ００５）又はＥＤＴＡ（５ｍＭ、ｐｈｏｓｐｈａｔｅ ｂｕｆｆｅｒｅｄ ｓａｌｉｎｅ（ＰＢＳ，１３７ｍＭ ｓｏｄｉｕｍ ｃｈｌｏｒｉｄｅ，２．７ｍＭ ｐｏｔａｓｓｉｕｍ ｃｈｌｏｒｉｄｅ，１．４７ｍＭ ｐｏｔａｓｓｉｕｍ ｄｉｈｙｄｒｏｇｅｎ ｐｈｏｓｐｈａｔｅ，１０．５ｍＭ ｄｉｓｏｄｉｕｍ ｈｙｄｒｏｇｅｎ ｐｈｏｓｐｈａｔｅ））にて培養プレートから剥がし、トリパンブルー処理により生細胞数を測定した。Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ－ａｃｔｉｖａｔｅｄ ｃｅｌｌ ｓｏｒｔｉｎｇ（ＦＡＣＳ）バッファー（３％　ＦＢＳ及び０．００４％ ｓｏｄｉｕｍ ａｚｉｄｅを含むＰＢＳ）に懸濁した同数の細胞を９６穴Ｕ底プレートに播種し、遠心分離により細胞を沈殿させ、１００μＬの氷冷した抗体又は抗体－薬物コンジュゲート希釈液、又

はＦＡＣＳバッファーに懸濁した。
抗体又は抗体－薬物コンジュゲートはＦＡＣＳバッファーにて１／３で段階希釈を行い３０μｇ／ｍＬ～５ｎｇ／ｍＬ（２００ｎＭ～０．０３ｎＭ）に調整した。一次抗体を添加しないＦＡＣＳバッファーにて処理した細胞をコントロール群とした。
抗体又は抗体－薬物コンジュゲートとして、Ｕ１－５９、抗体－薬物コンジュゲート（３）、抗体－薬物コンジュゲート（１０）、抗体－薬物コンジュゲート（１３）を評価した。
各細胞を一次抗体希釈液で氷上にて４５分間反応させた後、ＦＡＣＳバッファーで洗浄した。さらに１００μＬのＦＡＣＳバッファー、又は二次抗体を１／１００で希釈した（ｐｈｙｃｏｅｒｙｔｈｒｉｎ（ＰＥ）－ｃｏｕｐｌｅｄ ａｎｔｉ ｈｕｍａｎ ａｎｔｉｂｏｄｙ，Ｄｉａｎｏｖａ ＃７０９－１１６－１４９）反応液を添加した。暗闇氷上で４５分間処理した後に、ＦＡＣＳバッファーで洗浄し、ＦＡＣＳバッファー又は７－Ａｍｉｎｏａｃｔｉｎｏｍｙｃｉｎ Ｄ（７ＡＡＤ，Ｓｉｇｍａ，＃Ａ９４００，１．１μｇ／ｍＬ）を添加したＦＡＣＳバッファーで死細胞を排除した。
生細胞における蛍光シグナルは、Ａｃｃｕｒｉ Ｃ６ Ｆｌｏｗ ｃｙｔｏｍｅｔｅｒ（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ／Ａｃｃｕｒｉ（登録商標）Ｃｙｔｏｍｅｔｅｒｓ Ｉｎｃ，ｓｅｒｉａｌ ｎｕｍｂｅｒ １４２４）及びＣＦｌｏｗ ｓｏｆｔｗａｒｅ（ＣＦｌｏｗ ｓａｍｐｌｅｒ Ｖｅｒｓｉｏｎ １．０．２６４．１３）を用いて評価した。
ＰＥ及び７－ＡＡＤ由来シグナル補正のため、Ｕ１－５９（３０μｇ／ｍＬ）とＰＥ標識二次抗体又は７－ＡＡＤで染色した細胞の蛍光シグナルを評価した。
細胞でのＵ１－５９特異的な蛍光シグナルを定量するため、二次抗体又は７－ＡＡＤのみを処理した細胞のＦＬ－２シグナルを差し引いた値を使用した。平衡的な結合親和性（ＫＤ）及び最大結合強度（Ｂｍａｘ）は、ＧｒａｐｈＰａｄ Ｐｒｉｓｍソフトウェア（バージョン ５．０４ ｆｏｒ Ｗｉｎｄｏｗｓ（登録商標）（ｏｎｅ－ｓｉｔｅ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｂｉｎｄｉｎｇ））にて計算した。

【０２６５】

結果を図３及び表１に示す。図３及び表１は、Ｕ１－５９又は抗体－薬物コンジュゲートの連続希釈液で処理したＨＣＣ１５６９の平均蛍光強度を示す。平衡結合親和性ＫＤ及び最大結合強度ＢｍａｘはＧｒａｐｈＰａｄ Ｐｒｉｓｍソフトウェアにより計算した。

【０２６６】

【表１】

	U1-59	抗体―薬物複合体（３）	抗体―薬物複合体（１０）	抗体―薬物複合体（１３）
Bmax	31830	28981	28841	28415
Kd (nM)	1.672	1.653	1.554	2.757

【０２６７】

ＨＣＣ－１５６９に対する抗体－薬物コンジュゲート（３）又は抗体－薬物コンジュゲート（１０）の平均結合親和性ＫＤは、非コンジュゲートである抗ＨＥＲ３抗体Ｕ１－５９と同程度のＫＤを示した。さらに抗体－薬物コンジュゲート（１３）の平均結合親和性ＫＤは、非コンジュゲートである抗ＨＥＲ３抗体Ｕ１－５９と同程度のＫＤ（２．７ｎＭと１．６ｎＭ）を示した。異なる抗体－薬物コンジュゲートのＫＤ値から、抗体－薬物コンジュゲーション・プロセスは、Ｕ１－５９の結合親和性を有意に損なわないことを示唆した。

【０２６８】

試験例２　抗ＨＥＲ３抗体―薬物コンジュゲートによるＨＥＲ３シグナルの阻害
方法：

Ｃｅｌｌ Ｌｉｎｅ Ｓｅｒｖｉｃｅ由来のヒト肺癌細胞株Ａ５４９（ＣＲＳ－３００１１４）をトリプシン処理にて剥がし、６穴ウェルに５０，０００個の生細胞を３ｍＬのＤＭＥＭ／Ｆ１２（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，＃２１３３１－０２０）＋１０％ ＦＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，＃１０２７０－１０６）に播種した。細胞を３日培養した後に、２ｍＬの新鮮なメディウムに交換した。

抗体及び抗体－薬物コンジュゲートを最終濃度１０μｇ／ｍＬになる様に、６ウェルの各２ｍＬ培地に直接添加した（１μｇ／μＬの抗体又は抗体－薬物コンジュゲートのストック溶液２０μＬを添加）。

抗体又は抗体－薬物コンジュゲートとして、Ｕ１－５９、抗体－薬物コンジュゲート（３）、抗体－薬物コンジュゲート（１０）、抗体－薬物コンジュゲート（１３）を使用し、非処理群をコントロールとした。

細胞を２日間培養し、ＰＢＳで１回洗浄し、１００μＬの氷冷バッファー（５０ｍＭ４－（２－ｈｙｄｒｏｘｙｅｔｈｙｌ）－１－ｐｉｐｅｒａｚｉｎｅｅｔｈａｎｅｓｕｌｆｏｎｉｃ ａｃｉｄ（ＨＥＰＥＳ）ｐＨ７．５，１５０ｍＭ ｓｏｄｉｕｍ ｃｈｌｏｒｉｄｅ，１ｍＭ ｅｔｈｙｌｅｎｅｄｉａｍｉｎｅｔｅｔｒａａｃｅｔｉｃ ａｃｉｄ（ＥＤＴＡ），１２．５％ ｇｌｙｃｅｒｉｎｅ，１％ Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００，１０ｍＭ ｓｏｄｉｕｍ ｐｙｒｏｐｈｏｓｐｈａｔｅ ｔｅｔｒａｂａｓｉｃにｐｒｏｔｅｉｎａｓｅ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｓ（Ｒｏｃｈｅ，＃１１６９７ ４９８ ００１），１０ｍＭ ｓｏｄｉｕｍ ｆｌｕｏｒｉｄｅ，１ｍＭ ｓｏｄｉｕｍ ｖａｎａｄａｔｅ，１ｍＭ ｐｈｅｎｙｌ－ｍｅｔｈａｎｅ－ｓｕｌｆｏｎｙｌ－ｆｌｕｏｒｉｄｅ（ＰＭＳＦ），１０μｇ／ｍＬ ａｐｒｏｔｉｎｉｎ（Ｓｉｇｍａ，Ａ１１５３）を添加）にて、４℃で３０分処理を行い、可溶化（ｌｙｓｉｓ）した。ライセートを１３０００ｒｐｍ、４℃で２０分間洗浄し、上清をＢｒａｄｆｏｒｄ ａｓｓａｙ（Ｓｉｇｍａ，＃Ｂ６９１６，ＢＳＡ ｓｔａｎｄａｒｄ ｗａｓ ｆｒｏｍ Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，＃２３２０９）による、タンパク質濃度測定に使用した。タンパク質量１２０μｇを一サンプルとして、４倍濃度のＬＤＳバッファー（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、最終濃度１６６．６７ｍＭのＤＴＴを含む）を添加し、最終的に水で４０μＬとした。サンプルを７０度１０分煮沸し、ＮｕＰａｇｅ Ｍｉｎｉ Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓ ｇｅｌ（４％－１２％，１．５ｍｍ厚、１０ ｓｌｏｔｓ／ｇｅｌ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）のウェルに添加した。タンパク質スタンダードとして、７．５μＬのＮｏｖｅｘ（登録商標）ｓｈａｒｐ ｌａｄｄｅｒ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｐ／Ｎ ５７３１８）を添加した。サンプルは１７５ボルトでＮｕＰａｇｅ ａｎｔｉｏｘｉｄａｎｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，ＮＰ０００５，Ｌｏｔ １３５６６２９を含む１ｘＭＯＰＳ Ｒｕｎｎｉｎｇ ｂｕｆｆｅｒ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を内部チャンバーに加えて、７０分間泳動した。ゲル電気泳動により分離したタンパク質は、１０％ ｍｅｔｈａｎｏｌとＮｕＰａｇｅ ａｎｔｉｏｘｉｄａｎｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，ＮＰ０００５，Ｌｏｔ １３５６６２９，１：１０００ ｄｉｌｕｔｉｏｎ）を含むＮｕＰａｇｅ転写バッファー（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて、０．４５μｍ ｐｏｒｅ ｓｉｚｅのニトロセルロース膜（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）に転写（ｔｒａｎｓｆｅｒ）した。タンパク質は３０Ｖ定圧で８０分転写した。

転写膜を切断し、１００ｋＤａ以上及び３０－１００ｋＤａの分画に分け、０．１％Ｔｗｅｅｎ－２０を含むＰＢＳにて２回洗浄し、Ｏｄｙｓｓｅｙ Ｂｌｏｃｋｉｎｇ ｓｏｌｕｔｉｏｎ（ＬＩ－ＣＯＲ，＃９２７－４０００）にて室温一時間で振とうさせることで、ブロッキングを行なった。ブロッキング後、転写膜は一次抗体を希釈した溶液（Ｏｄｙｓｓｅｙ ｂｌｏｃｋｉｎｇ ｓｏｌｕｔｉｏｎとＰＢＳを等量混合した）の処理を４℃一晩行なった。

一次抗体として、抗ＨＥＲ３抗体（Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ，ＳＣ－８１４５５，１：５００希釈）、抗リン酸化ＨＥＲ抗体（Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，＃４７９１ １：１０００）そして、泳動コントロールとして抗ａｃｔｉｎ抗体（Ｎｅｏｍａｒｋｅｒｓ，＃ＭＳ１２９５，ｄｉｌｕｔｉｏｎ １：３３３３）を使用した

。
転写膜は０．１％Ｔｗｅｅｎ－２０を含むＰＢＳにより３回洗浄（各５分）され、二次抗体を含む希釈液（Ｏｄｙｓｓｅｙ ｂｌｏｃｋｉｎｇ ｓｏｌｕｔｉｏｎとＰＢＳを等量混合した）により暗室にて室温で１時間反応させた。
二次抗体として、ｇｏａｔ ａｎｔｉ ｍｏｕｓｅ ＩＲＤｙｅ ６８０ＲＤ（Ｌｉ－ＣＯＲ，＃９２６－６８０７０，ｄｉｌｕｔｉｏｎ １：２５０００）又はｇｏａｔ ａｎｔｉ ｒａｂｂｉｔ ＩＲ Ｄｙｅ ８００ＣＷ（Ｌｉ－ＣＯＲ，＃９２６－３２２１１，１：１００００希釈）を使用した。転写膜は０．１％ Ｔｗｅｅｎ－２０を含むＰＢＳにより各６分間、３回洗浄され、Ｌｉ－ＣＯＲ／Ｏｄｙｓｓｅｙ ｉｎｆｒａｒｅｄ ｉｍａｇｅｒによりシグナルを検出した。

【０２６９】
結果を図４に示す。Ａ５４９細胞を２日間、Ｕ１－５９又は異なる抗体－薬物コンジュゲートと共に培養した。ＨＥＲ３又はリン酸化ＨＥＲ３をウェスタンブロッティングにより評価した。泳動コントロールとして、ｐａｎ－Ａｃｔｉｎを検出した。

【０２７０】
Ａ５４９をＵ１－５９又は抗体－薬物コンジュゲート１０μｇ／ｍＬと共に２日間培養した結果、非処理細胞に比べて、ＨＥＲ３のリン酸化は低下した。このＨＥＲ３リン酸化の低下はＵ１－５９及び抗体－薬物コンジュゲートで同程度であり、複数の薬物コンジュゲート操作によりＵ１－５９由来のＨＥＲ３シグナル阻害機能は損なわれなかったことを示唆した。
Ａ５４９をＵ１－５９及び抗体－薬物コンジュゲートで２日間処理した場合、非処理細胞に比べて、ＨＥＲ３の発現低下も観察された。発現低下の度合いはＵ１－５９及び抗体－薬物コンジュゲートで同程度であり、これはＵ１－５９介在性の内在化（内在化の試験例を参照）及びＵ１－５９誘導性ＨＥＲダウンレギュレーション（シグナル阻害の試験例を参照）は、複数の薬物コンジュゲート操作により損なわれなかったことを示唆している。

【０２７１】
試験例３ Ｕ１－５９及び抗体－薬物コンジュゲートによる細胞表面ＨＥＲ３の発現低下方法：
Ｕ１－５９及び抗体－薬物コンジュゲートによるＨＥＲ３の内在化は、Ｆｌｏｗ ｃｙｔｏｍｅｔｒｙにより評価した。７０，０００個の生細胞ＨＣＣ１５６９（ＡＴＣＣ由来）を、０．５ｍＬのＲＰＭＩ１６４０（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，＃３１８７０－０２５）（１０％ＦＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，＃１０２７０－１０６又はＰＡＮ Ｂｉｏｔｅｃｈ，＃ １５０５－Ｐ１３１３０４）と２ｍＭ ｇｌｕｔａｍｉｎｅ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，＃２５０３０－０２４）と含む）に懸濁し、２４ウェルプレートの各ウェルに播種した。細胞は４日間培養し、内在化試験開始前に０．５ｍＬの新鮮な培地に交換した。５μｇの抗体又は抗体－薬物コンジュゲートを、２４ウェルプレートの各ウェル０．５ｍＬに添加し最終濃度を１０μｇ／ｍＬとした。細胞を３７℃で抗体又は抗体－薬物コンジュゲートの存在下で１時間培養した。抗体又は抗体－薬物コンジュゲートとして、Ｕ１－５９、抗体－薬物コンジュゲート（３）、抗体－薬物コンジュゲート（１０）、又は抗体－薬物コンジュゲート（１３）を使用した。ポジティブコントロール、またネガティブコントロールとしての細胞は、一部の操作を未処理とした。
Ｆｌｏｗ ｃｙｔｏｍｅｔｒｙ解析のため、細胞をＰＢＳで１度洗浄し、ＡＣＣＵＴＡＳＥ（登録商標）ＳＯＬＵＴＩＯＮ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ，ＳＣＲ００５）又はＰＢＳに溶解した５ｍＭ ＥＤＴＡ（１００μＬ／ｗｅｌｌ）で細胞を剥がした。２００μＬの氷冷ＦＡＣＳバッファー（３％ ＦＢＳと０．００４％ ｓｏｄｉｕｍ ａｚｉｄｅを含むＰＢＳ）に懸濁した後、９６穴Ｕ底プレートの各ウェルに添加し、氷上に置いた。細胞をＦＡＣＳバッファーで１度洗浄し、１００μＬのＦＡＣＳバッファーに希釈したＵ１－５９（１０μｇ／ｍＬ）又はＦＡＣＳバッファーのみを各サンプルに加えた。細胞を氷上で振とうさせながら４５分間処理した後にＦＡＣＳバッファーで洗浄し、１００μＬのＰＥ

標識二次抗体ａｎｔｉ－ｈｕｍａｎ ａｎｔｉｂｏｄｙ（Ｄｉａｎｏｖａ，７０９－１１６－１４９）を１：１００でＦＡＣＳバッファーに溶解したもの、又はＦＡＣＳバッファーのみを各ウェルに添加した。細胞を氷上で振とうさせながら４５分間暗室処理した。細胞をＦＡＣＳバッファーで洗浄し、ＦＡＣＳバッファー又は死細胞を染める７ＡＡＤ（Ｓｉｇｍａ，Ａ９４００，１．１μｇから１．２５μｇ／ｍＬ）を含むＦＡＣＳバッファーで処理した。Ａｃｃｕｒｉ Ｃ６ Ｆｌｏｗ ｃｙｔｏｍｅｔｅｒにより生細胞の蛍光シグナルを測定し、ＰＥ及び７－ＡＡＤのシグナルを補正するために、Ｕ１－５９（１０μｇ／ｍＬ）とＰＥ標識二次抗体又は７－ＡＡＤのみで染色した細胞を使用した。

ＨＥＲ３特異的なシグナル定量のために、二次抗体又は７－ＡＡＤのみで染色した値を、一次抗体と二次抗体、さらには７－ＡＡＤで染色したＦＬ－２値より差し引いた。

Ｕ１－５９又は抗体－薬物コンジュゲート処理しなかった（内在化させなかった）細胞のＦＬ－２シグナルを最大値として、３７℃処理したＵ１－５９又は抗体－薬物コンジュゲートによる細胞表面ＨＥＲ３の低下（内在化）を計算した。

ポジティブコントロール（３７℃の処理はせず）及びネガティブコントロール（一次抗体添加せず）は、２～３のウェルから算出される平均値として、各処理群のウェルの内在化を定量化した。

【０２７２】

結果を図５に示す。図には、Ｕ１－５９又は抗体－薬物コンジュゲート処理（３７℃，１時間）によるＨＣＣ１５６９細胞表面のＨＥＲ発現低下の平均値を示した。細胞におけるＨＥＲ３発現の最大値は、Ｕ１－５９又は抗体－薬物コンジュゲートを添加しない群とした。バックグラントの値として二次抗体のみ又は７－ＡＡＤ処理のみの群とした。Ｕ１－５９又は各抗体－薬物コンジュゲートを１時間処理したものを処理群とした。Ｕ１－５９及び抗体－薬物コンジュゲートによりＦＬ－２の値はほぼ同じであった。

【０２７３】

ＨＣＣ－１５６９をＵ１－５９又は各抗体－薬物コンジュゲートで処理することにより生じた蛍光が低下したことは、ＨＥＲ３発現の低下を示している。Ｕ１－５９によるＨＥＲ３の発現低下が約５０％であることと比較して、各抗体－薬物コンジュゲートによるＨＥＲ３発現低下も同等かそれ以上の値を示していることから、ＨＥＲ３を内在化させる抗体の機能は抗体への薬物コンジュゲート操作により損なわれたかったことを示唆している。

【０２７４】

試験例４　ＨＥＲ３抗体－薬物コンジュゲートによる、ヒト癌細胞株におけるin vitro増殖・生存シグナルの抑制

方法：

ＨＥＲ３抗体－薬物コンジュゲートによる増殖・生存シグナルの阻害活性は、１０％ＦＢＳ存在下で測定した。細胞の増殖及び成長は、非処理及び抗体－薬物コンジュゲート処理群のａｄｅｎｏｓｉｎｅ ｔｒｉｐｈｏｓｐｈａｔｅ（ＡＴＰ）活性を測定することで評価した。接着性の癌細胞株（ＡＴＣＣ由来のヒト乳癌細胞株ＨＣＣ１５６９（ＣＲＬ－２３３０）、ＡＴＣＣ由来のヒト乳癌細胞株ＭＤＡ－ＭＢ－４５３（ＣＬＢ－２２）及びＰｒｏＱｉｎａｓｅ由来のヒト大腸癌細胞株ＨＴ－２９（ＣＰＱ－５７））は２Ｄ培養系で、浮遊性の（接着性ではない）癌細胞株（ＡＴＣＣ由来のヒトメラノーマ細胞株Ａ３７５（ＣＲＬ－１６１９）及びＣｅｌｌ Ｌｉｎｅ Ｓｅｒｖｉｃｅ由来のヒト肺癌細胞株Ａ５４９（ＣＲＳ－３００１１４））は３Ｄ培養系で培養した。

接着細胞の処理

癌細胞株は低密度で（ＨＴ－２９は５００ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌ、ＭＤＡ－ＭＢ－４５３は８００ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌ、ＨＣＣ－１５６９は１０００ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌ）で１００μＬの各メディウムに懸濁し、９６マイクロウェルオプティカルボトムプレート（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ／Ｎｕｎｃ，＃１６５３０６、白壁透明底）に播種した。ＨＣＣ－１５６９及びＭＤＡ－ＭＢ－４５３に関しては、１０％ ＦＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，１０２７０－１０６）及び２ｍＭ ｇｌｕｔａｍｉｎｅ（Ｉｎｖｉ

ｔｒｏｇｅｎ，　２５０３０－０２４）を含むＲＰＭＩ１６４０メディウム（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，　３１８７０－０２５）で、ＨＴ－２９に関しては１０％　ＦＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，　１０２７０－１０６）及び２ｍＭ　ｇｌｕｔａｍｉｎｅ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，　２５０３０－０２４）を含むＭｃ　Ｃｏｙ’ｓ　５Ａ　メディウム（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，　２６６００－０２３）で培養した。各プレートの縁のウェルは、１００μＬ　ｍｅｄｉｕｍで満たした。

細胞を３日間培養し、抗体－薬物コンジュゲート処理前に９５μＬの新鮮な培地に交換した。

抗体－薬物コンジュゲート（３）、抗体－薬物コンジュゲート（１０）、そして抗体－薬物コンジュゲート（１３）を使用し、通常の細胞増殖を測定するために無処理群をコントロールとして置いた。

２０倍濃度に濃縮した抗体－薬物コンジュゲート５μＬを、９６ウェルプレートの各ウェルに入っている９５μＬの培養メディウム（１０％　ＦＢＳ）に添加することで最終濃度とした。コントロールのウェルには５μＬの培地のみを添加した。１サンプルあたりＴｒｉｐｌｉｃａｔｅで実施した。

細胞の増殖・生存を５０％低下させる抗体－薬物コンジュゲートの濃度を算出するため、抗体－薬物コンジュゲートの濃度は、４倍希釈で作成し（１０μｇ／ｍＬから０．１５ｎｇ／ｍＬ、又は４０μｇ／ｍＬ～０．１５ｎｇ／ｍＬ）、細胞を処理して、無処理群とＡＴＰ活性を比較した。抗体－薬物コンジュゲートを加えた後、ＨＴ－２９に関しては５日間、ＨＣＣ－１５６９とＭＤＡ－ＭＢ－４５３に関しては７日間の培養で評価した。抗体－薬物コンジュゲートの活性を評価するため、ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（登録商標）Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ　Ｃｅｌｌ　Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ　Ａｓｓａｙを利用した。これは、代謝活性のある生細胞をＡＴＰ活性を基準に測定し、最終的に生細胞数を見積もる方法で、キットとしてＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（登録商標）Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ　Ｃｅｌｌ（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｇ７５７３）を使用した。

１００μＬのＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（登録商標）ｒｅａｇｅｎｔを９６穴ウェルプレートの各ウェルに加え、Ｗａｌｌａｃ　Ｖｉｃｔｏｒ２　１４２０　Ｍｕｌｔｉｌａｂｅｌ　Ｃｏｕｎｔｅｒ（ｐｒｏｇｒａｍ　ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｃｅ，測定時間０．５ｓ）で測定する前に２５分から６５分間暗室室温で保存した。細胞は播種せずに培養液のみを含むウェルを、ブランクとして測定した。ＡＴＰ活性の低下を測定するため、各条件３ウェルずつの平均発光値を算出した（Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ　Ｅｘｃｅｌ　２０１０）。細胞非依存的なシグナルを除去するために、ブランク平均発光値を、抗体－薬物コンジュゲート処理した細胞の平均発光値から差し引いた（Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ　Ｅｘｃｅｌ　２０１０）。発光低下率（％）は、無処理群の細胞と比較することで算出し（Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ　Ｅｘｃｅｌ　２０１０）、この値を細胞増殖・生存阻害率（％）として解釈した。

浮遊細胞の処理

Ａ３７５とＡ５４９は他の細胞株よりも増殖速度が速いため、非接着の３Ｄ培養系にて増殖測定を実施した。

癌細胞株は低密度で（Ａ３７５は５００ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌ、Ａ５４９は１５００ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌ）で７５μＬの各メディウムに懸濁し、９６丸底ウェル非接着３Ｄ培養プレート（Ｐｒｉｍｅ　Ｓｕｒｆａｃｅ　９６Ｕ；Ｓｕｍｉｔｏｍｏ　Ｂａｋｅｌｉｔｅ　Ｃｏ，　Ｌｔｄ．；ｏｒｄｅｒ　ｎｏ．　ＭＳ－９０９６Ｕ）に播種した。Ａ３７５に関しては、１０％　ＦＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，１０２７０－１０６）及び２ｍＭ　ｇｌｕｔａｍｉｎｅ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，２５０３０－０２４）を含むＤＭＥＭメディウム（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，４１９６５－０３９）で、Ａ５４９に関しては１０％　ＦＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，１０２７０－１０６）及び２ｍＭ　ｇｌｕｔａｍｉｎｅ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，２５０３０－０２４）を含むＤＭＥＭ／Ｆ１２メディウム（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，２１３３１－０２０）で培養した。各プレートの縁のウェルは、１５０μＬ　ｍｅｄｉｕｍで満たした。細胞を３日間培養し、抗体－薬物コンジュゲート

添加前に６７．５又は７５μＬの新鮮な培地を添加して、最終用量を１４２．５μＬ又は１５０μＬとした。抗体－薬物コンジュゲート（３）、抗体－薬物コンジュゲート（１０）、又は抗体－薬物コンジュゲート（１３）を使用し、通常の細胞増殖を測定するために無処理群をコントロールとして置いた。

２０倍濃度に濃縮した抗体－薬物コンジュゲート７．５又は８μＬを、９６ウェルプレートの各ウェルに入っている１４２．５又は１５０μＬの培養メディウム（１０％　ＦＢＳ）に添加することで最終濃度とし、最終用量は１５０μＬ又は１５８μＬとした。コントロールにはメディウムのみを７．５又は８μＬを添加した。１サンプルあたりＴｒｉｐｌｉｃａｔｅで実施した。

細胞の増殖・生存を５０％低下させる抗体－薬物コンジュゲートの濃度を算出するため、抗体－薬物コンジュゲートの濃度は、４倍希釈で作成し（１０μｇ／ｍＬから０．１５ｎｇ／ｍＬ、又は４０μｇ／ｍＬ～０．１５ｎｇ／ｍＬ）、細胞を処理し、無処理群とＡＴＰ活性を比較した。抗体－薬物コンジュゲートを加えた後、７日間の培養で評価した。抗体－薬物コンジュゲートの活性を評価するため、ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（登録商標）Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ　Ｃｅｌｌ　Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ　Ａｓｓａｙを利用した。これは、代謝活性のある生細胞をＡＴＰ活性を基準に測定し、最終的に生細胞数を見積もる方法で、キットとしてＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（登録商標）Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ　Ｃｅｌｌ（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｇ７５７３）を使用した。

測定前に５０μＬのメディウムを各ウェルから除去し、１００μＬのＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（登録商標）ｒｅａｇｅｎｔを９６穴ウェルプレートの各ウェルに加え、Ｗａｌｌａｃ　Ｖｉｃｔｏｒ２　１４２０　Ｍｕｌｔｉｌａｂｅｌ　Ｃｏｕｎｔｅｒ（プログラム：ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｃｅ，測定時間０．５秒）で測定する前に３０分から５５分間暗室室温で保存した。測定前に各ウェルの１８０μＬを採取し、測定可能な９６マイクロウェルオプティカルボトム白色プレートに移し変えた。細胞は播種せずに培養液のみを含むウェルを、ブランクとして測定した。細胞の増殖・生存を５０％阻害する抗体－薬物コンジュゲートの濃度算出方法に関しては、接着細胞の評価法に記載した。

【０２７５】

ヒト乳癌株ＨＣＣ１５６９及びＭＤＡ－ＭＢ４５３での結果をそれぞれ図６及び図７に示す。また、ヒトメラノーマ株Ａ３７５の結果を図８に、ヒト大腸癌株ＨＴ２９の結果を図９に、ヒト肺癌株Ａ５４９の結果を図１０に示す。Ａ：１０％　ＦＢＳ存在下での抗体－薬物コンジュゲート由来の細胞増殖・生存を示す。縦軸は各サンプルのＡＴＰ活性となる発光値を示し、横軸は各抗体－薬物コンジュゲートの濃度を示す。データはトリプリケートの平均±標準誤差を示す。Ｂ：無処理群を１００％とした場合の抗体－薬物コンジュゲート処理による発光低下率を示す。

【０２７６】

１０％　ＦＢＳ存在下で、三種類の抗体－薬物コンジュゲートを様々なヒト癌細胞株に添加して、２Ｄ又は３Ｄでのin vitro増殖を評価した。ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（登録商標）によるＡＴＰ活性の測定から、無処理及び抗体－薬物コンジュゲートによる細胞の増殖・成長阻害率を算出した。ＡＴＰ活性の評価から、抗体－薬物コンジュゲートは２種類の乳癌細胞株（ＨＣＣ－１５６９、ＭＤＡ－ＭＢ－４５３）及び一種類のヒトメラノーマ株Ａ３７５の細胞増殖・生存を強く阻害した。

抗体－薬物コンジュゲートを添加し７日間培養（１０％ＦＢＳ存在下）することで、ＨＣＣ１５６９では５５から７５％、ＭＤＡ－ＭＢ－４５３では６０－８３％、Ａ３７５では６０から７０％ＡＴＰ活性が低下した。ヒト乳癌株及びヒトメラノーマ株と比較して、ヒト大腸癌株ＨＴ－２９とヒト肺癌株Ａ５４９では抗体－薬物コンジュゲートによる細胞増殖・生存の阻害活性は強くなかった。ＨＣＣ－１５６９及びＭＤＡ－ＭＢ－４５３において、抗体－薬物コンジュゲート（１０）が強い阻害活性を示し、抗体－薬物コンジュゲート（３）の阻害活性ともin vitroでは大差なかった。対して、双方のヒト乳癌株では、抗体－薬物コンジュゲート（１３）は低い活性を示し、抗体－薬物コンジュゲート（３）や抗体－薬物コンジュゲート（１０）が１ｎＭ以下で阻害できる細胞増殖・生存の５０％

阻害を達成するには、抗体－薬物コンジュゲート（１３）は１５ｎＭの濃度を必要とした。ヒト乳癌株に対してヒトメラノーマ株では、抗体－薬物コンジュゲート（１３）の活性は、抗体－薬物コンジュゲート（３）や抗体－薬物コンジュゲート（１０）と同等であった。

全ての抗体－薬物コンジュゲートは６１から６８％程の最大阻害率を支援し、ＡＴＰ活性５０％阻害に抗体－薬物コンジュゲートは１から４ｎＭの濃度で達成した。

上記に加えて、抗体－薬物コンジュゲート（１３）によるヒト卵巣癌細胞株ＯＶＣＡＲ－８への細胞増殖・生存阻害活性もin vitroにて確認している（データ示さず）。

【０２７７】

試験例５　ヒト癌細胞株のin vitro細胞増殖・生存における抗体－薬物コンジュゲートのドラッグロード数（高、中）による阻害率の比較

方法：

異なるドラッグローディング数を持つ抗体－薬物コンジュゲートのin vitroの細胞増殖・生存の阻害活性を評価した。高ドラッグローディングとは５から７個、中ドラッグローディングとは約３個の薬剤が抗体にコンジュゲートされている状態を示す。１抗体にコンジュゲートされた薬剤の平均個数をＵＶ法（本発明の他の部分に記載）によって測定した。

【０２７８】

１個の抗体にコンジュゲートされた薬剤の平均個数：

高ドラッグローディング　〈ＨＤＬ：Ｈｉｇｈ　ｄｒｕｇ　ｌｏａｄｉｎｇ〉

抗体－薬物コンジュゲート（３）：　４．９個

抗体－薬物コンジュゲート（１０）：　６．２個

抗体－薬物コンジュゲート（１３）：　６．２個

中ドラッグローディング〈ＭＤＬ：Ｍｉｄｄｌｅ　ｄｒｕｇ　ｌｏａｄｉｎｇ〉

抗体－薬物コンジュゲート（４）：　２．９個

抗体－薬物コンジュゲート（１１）：　３．０個

抗体－薬物コンジュゲート（１４）：　２．５個

【０２７９】

ＨＥＲ３抗体－薬物コンジュゲートによる増殖・生存シグナルの阻害活性は、１０％ＦＢＳ存在下で測定した。細胞の増殖及び成長は、非処理及び抗体－薬物コンジュゲート処理群のａｄｅｎｏｓｉｎｅ　ｔｒｉｐｈｏｓｐｈａｔｅ（ＡＴＰ）活性を測定することで評価した。癌細胞株は低密度で（ＡＴＣＣ由来のヒト乳癌細胞株ＭＤＡ－ＭＢ－４５３（ＣＬＢ－２２））は７５０ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌ）で１００μＬの各メディウムに懸濁し、９６マイクロウェルオプティカルボトム白色プレート（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ／Ｎｕｎｃ，＃１６５３０６）に播種した。１０％　ＦＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，１０２７０－１０６）及び２ｍＭ　ｇｌｕｔａｍｉｎｅ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，２５０３０－０２４）を含むＲＰＭＩ１６４０メディウム（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，３１８７０－０２５）で培養した。各プレートの縁のウェルは、１００μＬ　ｍｅｄｉｕｍで満たした。

細胞を３日間培養し、抗体－薬物コンジュゲート添加前に９５μＬの新鮮な培地に交換した。抗体－薬物コンジュゲート（３）、抗体－薬物コンジュゲート（１０）、抗体－薬物コンジュゲート（１３）、抗体－薬物コンジュゲート（４）、抗体－薬物コンジュゲート（１１）、又は抗体－薬物コンジュゲート（１４）を使用し、通常の細胞増殖を測定するために無処理群をコントロールとして置いた。

２０倍濃度に濃縮した抗体－薬物コンジュゲート５μＬを、９６ウェルプレートの各ウェルに入っている９５μＬの培養メディウム（１０％　ＦＢＳ）に添加することで最終濃度とした。コントロールのウェルには５μｌメディウムのみを添加した。１サンプルあたりＴｒｉｐｌｉｃａｔｅで実施した。細胞の増殖・生存を５０％低下させる抗体－薬物コンジュゲートの濃度を算出するため、抗体－薬物コンジュゲートの濃度は、４倍希釈で作成し（１０μｇ／ｍＬから０．１５ｎｇ／ｍＬ）、細胞を処理し、無処理群とＡＴＰ活性

を比較した。抗体－薬物コンジュゲートを加えた後、７日間の培養で評価した。抗体－薬物コンジュゲートの活性を評価するため、ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（登録商標）Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ Ｃｅｌｌ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ａｓｓａｙを利用した。これは、代謝活性のある生細胞をＡＴＰ活性を基準に測定し、最終的に生細胞数を見積もる方法で、キットとしてＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（登録商標）Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ Ｃｅｌｌ（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｇ７５７３）を使用した。１００μＬのＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（登録商標）ｒｅａｇｅｎｔを９６穴ウェルプレートの各ウェルに加え、Ｗａｌｌａｃ Ｖｉｃｔｏｒ２ １４２０ Ｍｕｌｔｉｌａｂｅｌ Ｃｏｕｎｔｅｒ（プログラム：ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｃｅ、測定時間：０．５秒）で測定する前に、２５分から５５分間暗室室温で保存した。細胞は播種せずに培養液のみを含むウェルを、ブランクとして測定した。ＡＴＰ活性の低下を測定するため、各条件３ウェルずつの平均発光値を算出した（Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ Ｅｘｃｅｌ ２０１０）。細胞非依存的なシグナルを除去するために、ブランク平均発光値を、抗体－薬物コンジュゲート処理した細胞の平均発光値から差し引いた（Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ Ｅｘｃｅｌ ２０１０）。発光低下率（％）は、無処理群の細胞と比較することで算出し（Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ Ｅｘｃｅｌ ２０１０）、この値を細胞増殖・生存阻害率（％）として解釈した。

【０２８０】

結果を図１１～１３に示す。図１１は、抗体－薬物コンジュゲート（３）と抗体－薬物コンジュゲート（４）の比較、図１２は、抗体－薬物コンジュゲート（１０）と抗体－薬物コンジュゲート（１１）の比較、図１３は、抗体－薬物コンジュゲート（１３）と抗体－薬物コンジュゲート（１４）の比較の結果を示す。各図において、左図は、３回実施した試験の１回における、１０％ ＦＢＳ存在下での抗体－薬物コンジュゲート由来の細胞増殖・生存阻害率を示す。縦軸は各サンプルのＡＴＰ活性を示す発光を示し、横軸は各抗体－薬物コンジュゲートの濃度を示す。右図は、無処理群を１００％とした場合の抗体－薬物コンジュゲート処理による発光低下率を高ドラッグローディング（ＨＤＬ）と中ドラッグローディング（ＭＤＬ）で比較した。

【０２８１】

高ドラッグロード及び中ドラッグロードの抗体－薬物コンジュゲートは、ＭＤＡ－ＭＢ－４５３への処理及び７日間の培養により、細胞増殖・生存を阻害した。既に高ドラッグロードの結果で示しているが、中ドラッグロードの抗体－薬物コンジュゲート（１１）が、抗体－薬物コンジュゲート（４）と同じ程の高い活性を示した。ドラッグロード数での比較では、高ドラッグロード数の抗体－薬物コンジュゲートが、中ドラッグロードのものより高いＡＴＰ低下を示した。高ドラッグロード数の、抗体－薬物コンジュゲート（３）は６８％、抗体－薬物コンジュゲート（１０）は７６％、抗体－薬物コンジュゲート（１３）は５６％の阻害率を１０μｇ／ｍＬの濃度にて示したが、同濃度において中ドラッグロード数の抗体－薬物コンジュゲート（４）は４４％、抗体－薬物コンジュゲート（１１）は４７％、抗体－薬物コンジュゲート（１４）は２７％の阻害率しか示さなかった。癌細胞の増殖・生存の５０％阻害濃度から、高ドラッグロード数の抗体－薬物コンジュゲートが、中ドラッグロード数の抗体－薬物コンジュゲートよりも優れていた。高ドラッグロード数の抗体－薬物コンジュゲート（３）又は抗体－薬物コンジュゲート（１０）がＡＴＰ活性値を５０％低下させるために１５ｎｇ／ｍＬ（１ｎＭ）の抗体－薬物コンジュゲートを必要とし、抗体－ドラッグコンジュゲート（１３）は少なくとも試験した最高濃度で５０％低下させたが、中ドラッグロード数の抗体－薬物コンジュゲートは評価濃度範囲内１０００ｎｇ／ｍＬ（６７ｎＭ）以下では、これに相当するＡＴＰ活性低下は観察されなかった。In vitroの高ドラッグロード数と中ドラッグロード数の比較から、in vivoでも抗体－薬物コンジュゲートの癌細胞の増殖に対する阻害活性は、高ドラッグロード数が優れていることが示唆された。

【０２８２】

試験例６ 抗体－薬物コンジュゲート（３）、（１０）、（１３）はヒト乳癌抗腫瘍in vivo試験において抗腫瘍効果を示した

馴化後の体重が１５から２０ｇの５週齢の雌性ＢＡＬＢ／ＣヌードマウスをＩＶＣ、各ケージに最大４匹）で室温及び湿度が一定に保たれた。マウスは換気ケージ（無作為化後にマウス体重を１日置きに測定し、毎日動物の行動を記録した。ＡＴＣＣ由来のヒト乳癌細胞株ＨＣＣ１５６９（ＣＲＬ－２３３０）５×１０^{6}個を、５０μＬのＰＢＳとＭａｔｒｉｇｅｌ（ＰＢＳ：ＰＡＡ　＃Ｈ２１－００２，　Ｍａｔｒｉｇｅｌ：ＢＤ　＃３５４２３０）を１対１で混合した調整液に懸濁し、ＢＡＬＢ／Ｃヌードマウスの右体側部に、２９Ｇ針を用いて、皮下移植した。

体重は体重計（Ｍｅｔｔｌｅｒ　Ｔｏｌｅｄｏ　ＰＢ６０２－Ｌ）により計測した。腫瘍の長径及び短径を電子式デジタルキャリパー（ｍａｕａｌ　ｃａｌｉｐｅｒ，ＯＭＣ　Ｆｏｎｔａｎａ）で１週間に２回測定し、腫瘍体積（ｍｍ^{3}）を計算した。計算式は以下に示す通り（以下の試験例においても同様）。

腫瘍体積（ｍｍ^{3}）＝１／２×長径（ｍｍ）×［短径（ｍｍ）］^{2}

Ｄａｙ１９で腫瘍径が約１５０ｍｍ^{3}になったところで、腫瘍径を用いて７０匹の動物を無作為に７群への群分けを実施した。同日、抗体－薬物コンジュゲート（３）、（１０）、（１３）及び対照群としてＰＢＳを下記の用量で尾静脈内投与した。

【０２８３】

投与群：ＰＢＳを、抗体－薬物コンジュゲートと同容量で、週１回静注。

投与群：抗体－薬物コンジュゲート（３）、３又は１０ｍｇ／ｋｇで、週１回静注。

投与群：抗体－薬物コンジュゲート（１０）、３又は１０ｍｇ／ｋｇで、週１回静注。

投与群：抗体－薬物コンジュゲート（１３）、３又は１０ｍｇ／ｋｇで、週１回静注。

【０２８４】

全てのデータは、±ＳＥＭの平均値として示し、腫瘍径及び体重はＭｅａｎ±ＳＥＭにて評価した。全てのデータ解析はＭｉｃｒｏｓｏｆｔ　Ｅｘｃｅｌ　２００９を用いた（以下の試験例においても同様）。

【０２８５】

結果を図１４に示す。許容される最大腫瘍径を超えた為に、ＰＢＳ投与群は、移植後５３日目に安楽死させた。全ての抗体－薬物コンジュゲートの投与において、対照群と比較して、ヒト乳癌細胞株の腫瘍増殖抑制を観察した。またマウスの体重減少は、処置群で観察されなかった。

【０２８６】

試験例７　抗体－薬物コンジュゲート（３）、（１０）、（１３）はヒトメラノーマ抗腫瘍試験において抗腫瘍効果を示した

馴化後の体重が２２から２６ｇで５から６週齢の雌性ＮＭＲＩヌードマウスを使用した。マウスは換気ケージ（ＩＶＣ、各ケージに最大４匹）で室温及び湿度が一定に保たれた。無作為化後にマウス体重を１日置きに測定し、毎日動物の行動を記録した。

ＡＴＣＣ由来のヒトメラノーマ細胞株ＨＴ－１４４（ＨＴＢ－６３）５×１０^{6}個を、５０μＬのＰＢＳとＭａｔｒｉｇｅｌ（ＰＢＳ：ＰＡＡ　＃Ｈ２１－００２，Ｍａｔｒｉｇｅｌ：ＢＤ　＃３５４２３０）を１対１で混合した調整液に懸濁し、ＮＭＲＩヌードマウスの右体側部に、２９Ｇ針を用いて、皮下移植した。

体重、腫瘍径の測定と、腫瘍体積の測定、算出は試験例６記載の方法により行った。

Ｄａｙ２２で腫瘍径が約１５０ｍｍ^{3}になったところで、腫瘍径を用いて８０匹の動物を無作為に８群への群分けを実施した。同日、Ｕ１－５９又は抗体－薬物コンジュゲート（３）、（１０）、（１３）及び対照群としてＰＢＳを下記の用量で尾静脈内投与した。

【０２８７】

投与群：ＰＢＳを、抗体－薬物コンジュゲートと同容量で、週１回静注。

投与群：Ｕ１－５９、２５ｍｇ／ｋｇで、週２回皮下注射。

投与群：抗体－薬物コンジュゲート（３）、３又は１０ｍｇ／ｋｇで、週１回静注。

投与群：抗体－薬物コンジュゲート（１０）、３又は１０ｍｇ／ｋｇで、週１回静注。

投与群：抗体－薬物コンジュゲート（１３）、３又は１０ｍｇ／ｋｇで、週１回静注。

【０２８８】

結果を図１５に示す。許容される最大腫瘍径を超えた為に、ＰＢＳ及びＵ１－５９投与群は、それぞれ移植後４８日目、５２日目に安楽死させた。全ての抗体－薬物コンジュゲートの投与において、対照群及びＵ１－５９投与群と比較して、ヒトメラノーマ細胞株の腫瘍増殖抑制を観察した。

【０２８９】

試験例８　抗体－薬物コンジュゲート（３）、（１０）、（１３）はヒト乳癌株抗腫瘍試験において抗腫瘍効果を示した

馴化後の体重が１７－から２５．５ｇで１６週齢の雌性ＳＣＩＤヌードマウスを使用した。マウスは換気ケージで室温及び湿度が一定に保たれた。

ＡＴＣＣ由来のヒト乳癌細胞株ＭＤＡ－ＭＢ－４５３（ＣＬＢ－２２）の固形腫瘍は、継代１回目（Ｂａｔｃｈ　１０８９）はＭＤＡ－ＭＢ－４５３を３匹のマウスに移植（１匹に対して２箇所、右体側部と左体側部）して１３から１７週後に腫瘍片を回収し、凍結保存した。継代２回目は継代１回目の腫瘍片（２×２×２ｍｍ）をさらに皮下移植（１０匹、１匹に対して２箇所で右体側部と左体側部）して増殖させて７週間腫瘍を形成させた。ここで形成した腫瘍を腫瘍片（２×２×２ｍｍ、継代２回目）にして、ＳＣＩＤヌードマウスの右体側部に移植した。

体重は体重計により計測した。腫瘍の長径（ｌｅｎｇｔｈ）及び直径（ｄｉａｍｅｔｅｒ）を電子式デジタルキャリパー（Ｐｒｏ－Ｍａｘ　１５０　ｍｍ　ｈａｎｄ－ｈｅｌｄ　ｃａｌｉｐｅｒｓ、Ｆｒｅｄ　Ｖ．　Ｆｏｗｌｅｒ　Ｃｏ．，　Ｉｎｃ）で測定し、腫瘍体積（mm^3）を計算した。計算式は以下に示す通り。

腫瘍体積（mm^3）＝π／６×長径（ｍｍ）×［直径（ｍｍ）］^{2}

Ｄａｙ４０で腫瘍径が約１４３mm^3になったところで、７２匹の動物を無作為に８群への群分けを実施した。同日、Ｕ１－５９又は抗体－薬物コンジュゲート（３）、（１０）、（１３）及び対照群としてＰＢＳを下記の用量で尾静脈内投与した。

【０２９０】

投与群：ＰＢＳを、抗体－薬物コンジュゲートと同容量で、週１回静注。
投与群：Ｕ１－５９、２５ｍｇ／ｋｇで、週２回皮下注射。
投与群：抗体－薬物コンジュゲート（３）、３又は１０ｍｇ／ｋｇで、週１回静注。
投与群：抗体－薬物コンジュゲート（１０）、３又は１０ｍｇ／ｋｇで、週１回静注。
投与群：抗体－薬物コンジュゲート（１３）、３又は１０ｍｇ／ｋｇで、週１回静注。

【０２９１】

結果を図１６に示す。全ての抗体－薬物コンジュゲートの投与において、対照群及びＵ１－５９投与群と比較して、ヒト乳癌細胞株の腫瘍増殖抑制を観察した。また、マウスの体重減少は、処置群で観察されなかった。また、ヒト乳癌細胞株ＨＣＣ１９５４又はＪＩＭＴ１－ＰＲ１０（ｔｒａｓｔｕｚｕｍａｂ耐性、ｐｅｒｔｕｚｕｍａｂ耐性、Ｔ－ＤＭ１耐性）を用いた抗腫瘍試験において、抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）はｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍効果を示した。

【０２９２】

試験例９　抗体－薬物コンジュゲート（３）、（１０）、（１３）はヒト大腸癌株抗腫瘍試験において抗腫瘍効果を示した

馴化後の体重が１５から２０ｇで５から６週齢の雌性ＮＭＲＩヌードマウスを使用した。マウスは換気ケージ（ＩＶＣ、各ケージに最大４匹）で室温及び湿度が一定に保たれた。無作為化後にマウス体重を１日置きに測定し、毎日動物の行動を記録した。

ＰｒｏＱｉｎａｓｅ由来のヒト大腸癌細胞株ＨＴ－２９（ＣＰＱ－５７）４×10^6個を、ＰＢＳとＭａｔｒｉｇｅｌ（ＰＢＳ：ＰＡＡ　＃Ｈ２１－００２，Ｍａｔｒｉｇｅｌ：ＢＤ　＃３５４２３０）を１対１で混合した調整液に懸濁し、ＮＭＲＩヌードマウスの右体側部に、２９Ｇ針を用いて、皮下移植した。

体重、腫瘍径の測定と、腫瘍体積の測定、算出は試験例６記載の方法により行った。

Ｄａｙ８で腫瘍径が約１５０mm^3になったところで、腫瘍径を用いて７０匹の動物を無作為に７群への群分けを実施した。同日、抗体－薬物コンジュゲート（３）、（１０）

、（１３）及び対照群としてＰＢＳを下記の用量で尾静脈内投与した。

【０２９３】

投与群：ＰＢＳを、抗体－薬物コンジュゲートと同容量で、週１回静注。
投与群：抗体－薬物コンジュゲート（３）、３又は１０ｍｇ／ｋｇで、週１回静注。
投与群：抗体－薬物コンジュゲート（１０）、３又は１０ｍｇ／ｋｇで、週１回静注。
投与群：抗体－薬物コンジュゲート（１３）、３又は１０ｍｇ／ｋｇで、週１回静注。

【０２９４】

結果を図１７に示す。許容される最大腫瘍径を超えた、又は潰瘍形成の為に、ＰＢＳ投与群（１０匹中６匹）、抗体―薬物コンジュゲート（３）の３ｍｇ／ｋｇ（１０匹中３匹）、１０ｍｇ／ｋｇ（１０匹中４匹）、抗体―薬物コンジュゲート（１０）の３ｍｇ／ｋｇ（１０匹中２匹）、１０ｍｇ／ｋｇ（１０匹中２匹）、抗体―薬物コンジュゲート（１３）の３ｍｇ／ｋｇ（１０匹中２匹）を、移植後５０日目に安楽死させた。全ての抗体－薬物コンジュゲートの投与において、対照群と比較して、ヒト大腸癌細胞株の腫瘍増殖抑制を観察した。また抗体－薬物コンジュゲート（１３）は、抗体－薬物コンジュゲート（３）や抗体－薬物コンジュゲート（１０）よりも強い抗腫瘍活性を示した。またマウスの体重減少は、処置群で観察されなかった。

【０２９５】

試験例１０　抗体－薬物コンジュゲート（３）、（１０）、（１３）はヒト肺癌株抗腫瘍試験において抗腫瘍効果を示した

馴化後の体重が２４から２８ｇで５から６週齢の雌性ＣＤ１ヌードマウスを使用した。マウスは換気ケージ（ＩＶＣ、各ケージに最大４匹）で室温及び湿度が一定に保たれた。無作為化後にマウス体重を１日置きに測定し、毎日動物の行動を記録した。

Ｃｅｌｌ　Ｌｉｎｅ　Ｓｅｒｖｉｃｅ由来のヒト肺癌細胞株Ａ５４９（ＣＲＳ－３００１１４）５×10^6個を、２００μＬのＰＢＳとＭａｔｒｉｇｅｌ（ＰＢＳ：ＰＡＡ　＃Ｈ２１－００２，Ｍａｔｒｉｇｅｌ：ＢＤ　＃３５４２３０）を１対１で混合した調整液に懸濁し、ＣＤ１ヌードマウスの右体側部に、２９Ｇ針を用いて、皮下移植した。

体重、腫瘍径の測定と、腫瘍体積の測定、算出は試験例６記載の方法により行った。

Ｄａｙ３８で腫瘍径が約２００ｍｍ^{3}になったところで、腫瘍径を用いて７０匹の動物を無作為に７群への群分けを実施した。同日、抗体－薬物コンジュゲート（３）、（１０）、（１３）及び対照群としてＰＢＳを下記の用量で尾静脈内投与した。

【０２９６】

投与群：ＰＢＳを、抗体－薬物コンジュゲートと同容量で、週１回静注。
投与群：抗体－薬物コンジュゲート（３）、３又は１０ｍｇ／ｋｇで、週１回静注。
投与群：抗体－薬物コンジュゲート（１０）、３又は１０ｍｇ／ｋｇで、週１回静注。
投与群：抗体－薬物コンジュゲート（１３）、３又は１０ｍｇ／ｋｇで、週１回静注。

【０２９７】

結果を図１８に示す。全ての抗体－薬物コンジュゲートの投与において、対照群と比較して、ヒト肺癌細胞株の腫瘍増殖抑制を観察した。またマウスの体重減少は、処置群で観察されなかった。

【０２９８】

試験例１１　抗体－薬物コンジュゲート（１３）はヒトトリプルネガティブ乳癌株抗腫瘍試験においてin vivoで抗腫瘍効果を示した

トリプルネガティブ乳癌とは、ホルモン受容体（エストロゲンレセプター及びプロゲステロンレセプター）を発現せず、またＨＥＲ２を発現しない乳癌を指す。これらの受容体が発現していないことから、ホルモン治療（Ｔａｍｏｘｉｆｅｎ等）や抗ＨＥＲ２治療（Ｔｒａｓｔｕｚｕｍａｂ、Ｔｒａｓｔｕｚｕｍａｂ　ｅｍｔａｎｓｉｎｅ、Ｐｅｒｔｕｚｕｍａｂ）が利用できないため生存率が低い乳癌であり、現在でも臨床試験で多くの治療剤が試されている。ヒトトリプルネガティブ乳癌株であるＭＤＡ－ＭＢ－４６８にてＨＥＲ３の発現が確認されたため（データ示さず）、抗体－薬物コンジュゲートの抗腫瘍活性を評価した。

馴化後の体重が１５から２０ｇで５－６週齢の雌ＣＡｎＮ．Ｃｇ－Ｆｏｘｎ１［ｎｕ］／ＣｒｌＣｒｌｊ〔Ｆｏｘｎ１ｎｕ／Ｆｏｘｎ１ｎｕ〕ヌードマウス（日本チャールス・リバー社）を使用した。マウスは換気ケージ（ＩＶＣ、各ケージに最大４匹）で室温及び湿度が一定に保たれた。無作為化後にマウス体重を１日置きに測定し、毎日動物の行動を記録した。

ＡＴＣＣ由来のヒトトリプルネガティブ乳癌細胞株ＭＤＡ－ＭＢ－４６８（ＣＲＬ－２３２２）５×１０^{6}個を、２００μＬのＰＢＳとＭａｔｒｉｇｅｌ（ＰＢＳ：ＰＡＡ　＃１００１０－０２３，Ｍａｔｒｉｇｅｌ：ＢＤ　＃３５４２３４）を１対１で混合した調整液に懸濁し、ヌードマウスの右体側部に、２９Ｇ針を用いて、皮下移植し移植した。体重は体重計（Ｍｅｔｔｌｅｒ　Ｔｏｌｅｄｏ　ＰＢ６０２－Ｌ）により計測した。

腫瘍の長径及び短径を電子式デジタルキャリパー（ＣＤ－１５ＣＸ、Ｍｉｔｓｕｔｏｙｏ　Ｃｏｒｐ）で測定し、腫瘍体積（ｍｍ^{3}）を計算した。計算式は以下に示す通り。

腫瘍体積（ｍｍ^{3}）＝１／２×長径（ｍｍ）×［短径（ｍｍ）］^{2}

Ｄａｙ２０で腫瘍径が約１７０ｍｍ^{3}になったところで、腫瘍径を用いて１８匹の動物を無作為に３群への群分けを実施した。同日、Ｕ１－５９又は抗体－薬物コンジュゲート（１３）及び対照群としてＰＢＳを下記の用量で尾静脈内投与した。

【０２９９】

投与群：ＰＢＳを、抗体－薬物コンジュゲートと同容量で、週１回静注。

投与群：Ｕ１－５９、１０ｍｇ／ｋｇで、週１回静注。

投与群：抗体－薬物コンジュゲート（１３）、１０ｍｇ／ｋｇで、週１回静注。

【０３００】

結果を図１９に示す。抗体－薬物コンジュゲートの投与において、対照群及びＵ１－５９投与群と比較して、ヒトトリプルネガティブ乳癌株の腫瘍増殖抑制を観察した。またマウスの体重減少は、いずれの処置群でも観察されなかった。

【０３０１】

試験例１２　抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）はヒトルミナール乳癌株抗腫瘍試験においてin vivo抗腫瘍効果を示した

ヒトルミナール乳癌とは、ホルモン受容体（エストロゲンレセプター）を発現し、ＨＥＲ２を発現しない乳癌を指す。これらの受容体が発現していないことから、抗ＨＥＲ２治療（Ｔｒａｓｔｕｚｕｍａｂ、Ｔｒａｓｔｕｚｕｍａｂ　ｅｍｔａｎｓｉｎｅ、Ｐｅｒｔｕｚｕｍａｂ）が利用できないため生存率が低い乳癌であり、現在でも臨床試験で多くの治療剤が試されている。ヒトルミナール乳癌株であるＭＣＦ－７にてＨＥＲ３の発現が確認されたため（データ示さず）、抗体－薬物コンジュゲートの抗腫瘍活性を評価した。

馴化後の体重が１５から２０ｇで５－６週齢の雌Ａｔｈｙｍｉｃヌードマウス Ｎｕｄｅ－Ｆｏｘｎ１^{nu}（Ｐｒｏｑｉｎａｓｅ）を使用した。マウスは換気ケージ（ＩＶＣ、各ケージに最大４匹）で室温および湿度が一定に保たれた。無作為化後にマウス体重を１日置きに測定し、毎日動物の行動を記録した。

ヒトルミナール乳癌細胞株ＭＣＦ－７（ＣＲＱ－＃３２７）５×１０^{6}個を、２００μＬのＰＢＳとＭａｔｒｉｇｅｌ（ＰＢＳ：ＰＡＡ　＃１００１０－０２３，Ｍａｔｒｉｇｅｌ：ＢＤ　＃３５４２３４）を１対１で混合した調整液に懸濁し、ヌードマウスの右体側部に、２９Ｇ針を用いて、皮下移植した。体重は体重計（Ｍｅｔｔｌｅｒ　Ｔｏｌｅｄｏ　ＰＢ６０２－Ｌ）により計測した。

腫瘍の長径および短径を電子式デジタルキャリパー（ＣＤ－１５ＣＸ、Ｍｉｔｓｕｔｏｙｏ　Ｃｏｒｐ）で測定し、腫瘍体積（ｍｍ^{3}）を計算した。計算式は以下に示すとおり。

腫瘍体積（ｍｍ^{3}）＝１／２×長径（ｍｍ）×［短径（ｍｍ）］^{2}

Ｄａｙ１１で腫瘍径が約２５０ｍｍ^{3}になったところで、腫瘍径を用いて２０匹の動物を無作為に２群への群分けを実施した。同日、抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）および対照群としてＰＢＳを下記の用量で投与した。

【０３０２】

投与群：ＰＢＳを、抗体－薬物コンジュゲートと同容量で、単回静注。
投与群：抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）、１０ｍｇ／ｋｇで、単回静注。
【０３０３】
結果を図２０に示す。抗体－薬物コンジュゲートの投与において、対照群と比較して、ヒトルミナール乳癌株の腫瘍増殖抑制を観察した。またマウスの体重減少は、いずれの処置群で観察されなかった。
【０３０４】
試験例１３　抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）はヒトメラノーマ株抗腫瘍試験においてin vivo抗腫瘍効果を示した
馴化後の体重が１５から２０ｇで５－６週齢の雌ＣＡｎＮ．Ｃｇ－Ｆｏｘｎ１［ｎｕ］／ＣｒｌＣｒｌｊ〔Ｆｏｘｎ１ｎｕ／Ｆｏｘｎ１ｎｕ〕ヌードマウス（日本チャールス・リバー社）を使用した。マウスは換気ケージ（ＩＶＣ、各ケージに最大４匹）で室温および湿度が一定に保たれた。無作為化後にマウス体重を１日置きに測定し、毎日動物の行動を記録した。
ＡＴＣＣ由来のヒトメラノーマ細胞株ＷＭ－２６６－４（ＣＲＬ－１６７６）３×10^6個を、Ｍａｔｒｉｇｅｌ（ＢＤ　＃３５４２３４）に混合・懸濁し、ヌードマウスの右体側部に、２９Ｇ針を用いて、皮下移植した。体重は体重計（Ｍｅｔｔｌｅｒ　Ｔｏｌｅｄｏ　ＰＢ６０２－Ｌ）により計測した。
腫瘍の長径および短径を電子式デジタルキャリパー（ＣＤ－１５ＣＸ、Ｍｉｔｓｕｔｏｙｏ　Ｃｏｒｐ）で測定し、腫瘍体積（mm^3）を計算した。計算式は以下に示すとおり。
腫瘍体積（mm^3）＝１／２×長径（ｍｍ）×［短径（ｍｍ）］^{2}
Ｄａｙ１９で腫瘍径が約２２０mm^3になったところで、腫瘍径を用いて８匹の動物を無作為に２群への群分けを実施した。同日、抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）、および対照群としてＰＢＳを下記の用量で投与した。
【０３０５】
投与群：ＰＢＳを、抗体－薬物コンジュゲートと同容量で、単回静注。
投与群：抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）、１０ｍｇ／ｋｇで、単回静注。
【０３０６】
結果を図２１に示す。抗体－薬物コンジュゲートの投与において、対照群と比較してヒトメラノーマ株の腫瘍増殖抑制を観察した。またマウスの体重減少は、いずれの処置群で観察されなかった。また他のヒトメラノーマ株Ｃ３２の抗腫瘍試験においても、抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）はｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍効果を示した。
【０３０７】
試験例１４　抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）はヒト卵巣癌株抗腫瘍試験においてin vivo抗腫瘍効果を示した
馴化後の体重が１５から２０ｇで５－６週齢の雌ＣＡｎＮ．Ｃｇ－Ｆｏｘｎ１［ｎｕ］／ＣｒｌＣｒｌｊ〔Ｆｏｘｎ１ｎｕ／Ｆｏｘｎ１ｎｕ〕ヌードマウス（日本チャールス・リバー社）を使用した。マウスは換気ケージ（ＩＶＣ、各ケージに最大４匹）で室温および湿度が一定に保たれた。無作為化後にマウス体重を１日置きに測定し、毎日動物の行動を記録した。
ＡＴＣＣ由来のヒト卵巣癌細胞株ＯＶＣＡＲ－８（ＨＴＢ－１６１）５×10^6個を、Ｍａｔｒｉｇｅｌ（ＢＤ　＃３５４２３４）に混合・懸濁し、ヌードマウスの右体側部に、２９Ｇ針を用いて、皮下移植した。体重は体重計（Ｍｅｔｔｌｅｒ　Ｔｏｌｅｄｏ　ＰＢ６０２－Ｌ）により計測した。
腫瘍の長径および短径を電子式デジタルキャリパー（ＣＤ－１５ＣＸ、Ｍｉｔｓｕｔｏｙｏ　Ｃｏｒｐ）で測定し、腫瘍体積（mm^3）を計算した。計算式は以下に示すとおり。
腫瘍体積（mm^3）＝１／２×長径（ｍｍ）×［短径（ｍｍ）］^{2}
Ｄａｙ２１で腫瘍径が約１４０mm^3になったところで、腫瘍径を用いて８匹の動物を

無作為に２群への群分けを実施した。同日、抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）、および対照群としてＰＢＳを下記の用量で投与した。

【０３０８】

投与群：ＰＢＳを、抗体－薬物コンジュゲートと同容量で、単回静注。

投与群：抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）、１０ｍｇ／ｋｇで、単回静注。

【０３０９】

結果を図２２に示す。抗体－薬物コンジュゲートの投与において、対照群と比較して、ヒト卵巣癌株の腫瘍増殖抑制を観察した。またマウスの体重減少は、いずれの処置群で観察されなかった。

【０３１０】

試験例１５　抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）はヒト膀胱癌株抗腫瘍試験においてin vivo抗腫瘍効果を示した

馴化後の体重が１５から２０ｇで５－６週齢の雌ＣＡｎＮ．Ｃｇ－Ｆｏｘｎ１［ｎｕ］／ＣｒｌＣｒｌｊ〔Ｆｏｘｎ１ｎｕ／Ｆｏｘｎ１ｎｕ〕ヌードマウス（日本チャールス・リバー社）を使用した。マウスは換気ケージ（ＩＶＣ、各ケージに最大４匹）で室温および湿度が一定に保たれた。無作為化後にマウス体重を１日置きに測定し、毎日動物の行動を記録した。

ＡＴＣＣ由来のヒト膀胱癌細胞株ＳＷ－７８０（ＣＲＬ－２１６９）８×１０^{6}個を、Ｍａｔｒｉｇｅｌ（ＢＤ　＃３５４２３４）に混合・懸濁し、ヌードマウスの右体側部に、２９Ｇ針を用いて、皮下移植した。体重は体重計（Ｍｅｔｔｌｅｒ　Ｔｏｌｅｄｏ　ＰＢ６０２－Ｌ）により計測した。

腫瘍の長径および短径を電子式デジタルキャリパー（ＣＤ－１５ＣＸ、Ｍｉｔｓｕｔｏｙｏ　Ｃｏｒｐ）で測定し、腫瘍体積（ｍｍ^{3}）を計算した。計算式は以下に示すとおり。

腫瘍体積（ｍｍ^{3}）＝１／２×長径（ｍｍ）×［短径（ｍｍ）］^{2}

Ｄａｙ７で腫瘍径が約１９０ｍｍ^{3}になったところで、腫瘍径を用いて１０匹の動物を無作為に２群への群分けを実施した。同日、抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）、および対照群としてＰＢＳを下記の用量で投与した。

【０３１１】

投与群：ＰＢＳを、抗体－薬物コンジュゲートと同容量で、単回静注。

投与群：抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）、１０ｍｇ／ｋｇで、単回静注。

【０３１２】

結果を図２３に示す。抗体－薬物コンジュゲートの投与において、対照群と比較して、ヒト膀胱癌株の腫瘍増殖抑制を観察した。またマウスの体重減少は、いずれの処置群で観察されなかった。

【０３１３】

試験例１６　抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）はヒト乳癌株抗腫瘍試験においてＨＥＲ３依存的なin vivo抗腫瘍効果を示した

ヒト乳癌株であるＭＤＡ－ＭＢ－４５３はＨＥＲ３を発現しており、試験例８で記載されているように抗体－薬物コンジュゲート（１３）に対して感受性である。しかしこの薬効がＨＥＲ３を介したものかは証明できていなかった為、Ｕ１－５９を事前投与することでＨＥＲ３をカバーし、薬効が低下するか否かを評価した。

馴化後の体重が１５から２０ｇで５－６週齢の雌ＣＡｎＮ．Ｃｇ－Ｆｏｘｎ１［ｎｕ］／ＣｒｌＣｒｌｊ〔Ｆｏｘｎ１ｎｕ／Ｆｏｘｎ１ｎｕ〕ヌードマウス（日本チャールス・リバー社）を使用した。マウスは換気ケージ（ＩＶＣ、各ケージに最大４匹）で室温および湿度が一定に保たれた。無作為化後にマウス体重を１日置きに測定し、毎日動物の行動を記録した。

ＡＴＣＣ由来のヒト乳癌細胞株ＭＤＡ－ＭＢ－４５３（ＣＬＢ－２２）１×１０^{7}個を、Ｍａｔｒｉｇｅｌ（ＢＤ　＃３５４２３４）に混合・懸濁し、ヌードマウスの右体側部に、２９Ｇ針を用いて、皮下移植した。体重は体重計（Ｍｅｔｔｌｅｒ　Ｔｏｌｅｄｏ

ＰＢ６０２－Ｌ）により計測した。
腫瘍の長径および短径を電子式デジタルキャリパー（ＣＤ－１５ＣＸ、Ｍｉｔｓｕｔｏｙｏ　Ｃｏｒｐ）で測定し、腫瘍体積（ｍｍ^3）を計算した。計算式は以下に示すとおり。

腫瘍体積（ｍｍ^3）＝１／２×長径（ｍｍ）×［短径（ｍｍ）］^{2}

Ｄａｙ１１で腫瘍径が約１３０ｍｍ^{3}になったところで、腫瘍径を用いて１６匹の動物を無作為に４群への群分けを実施した。同日、抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）、Ｕ１－５９および対照群としてＰＢＳを下記の用量で投与した。

【０３１４】

投与群：ＰＢＳを、抗体－薬物コンジュゲートと同容量で、単回静注。
投与群：Ｕ１－５９、３０ｍｇ／ｋｇで、単回静注。
投与群：抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）、３ｍｇ／ｋｇ、単回静注。
投与群：Ｕ１－５９を投与（単回静注）した３０分後に、抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）、３ｍｇ／ｋｇで単回静注。

【０３１５】

結果を図２４に示す。抗体－薬物コンジュゲートの投与において、対照群と比較して、ヒト乳癌株の腫瘍増殖抑制を観察したが、この腫瘍抑制効果はＵ１－５９の事前投与により減弱した。以上のことから、抗体－薬物コンジュゲートによる腫瘍抑制効果はＨＥＲ３を介している薬効であることが証明された。またマウスの体重減少は、いずれの処置群で観察されなかった。

【０３１６】

試験例１７　抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）はヒト乳癌株抗腫瘍試験において、トラスツズマブとのｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍併用効果を示した

ヒトＨＥＲ２陽性乳癌の治療薬にはトラスツズマブが承認されている。しかしトラスツズマブ耐性が知られており、耐性機構の一つにＰＩＫ３ＣＡの変異〈Ｈ１０４７Ｒ，　Ｈ４２０Ｒ〉が関与していることが報告されている。本試験では、トラスツズマブ耐性である乳癌株に対して、トラスツズマブと抗体－薬物コンジュゲートの併用に効果があるか否かを評価した。

馴化後の体重が１５から２０ｇで５－６週齢の雌ＣＡｎＮ．Ｃｇ－Ｆｏｘｎ１［ｎｕ］／ＣｒｌＣｒｌｊ〔Ｆｏｘｎ１ｎｕ／Ｆｏｘｎ１ｎｕ〕ヌードマウス（日本チャールス・リバー社）を使用した。マウスは換気ケージ（ＩＶＣ、各ケージに最大４匹）で室温および湿度が一定に保たれた。無作為化後にマウス体重を１日置きに測定し、毎日動物の行動を記録した。

ＡＴＣＣ由来のヒト乳癌細胞株ＭＤＡ－ＭＢ－４５３（ＣＬＢ－２２，　ＰＩＫ３ＣＡ　Ｈ１０４７Ｒ変異）１×１０^{7}個を、Ｍａｔｒｉｇｅｌ（ＰＢＳ：ＰＡＡ　＃１００１０－０２３，Ｍａｔｒｉｇｅｌ：ＢＤ　＃３５４２３４）に混合・懸濁し、ヌードマウスの右体側部に、２９Ｇ針を用いて、皮下移植した。体重は体重計（Ｍｅｔｔｌｅｒ　Ｔｏｌｅｄｏ　ＰＢ６０２－Ｌ）により計測した。

腫瘍の長径および短径を電子式デジタルキャリパー（ＣＤ－１５ＣＸ、Ｍｉｔｓｕｔｏｙｏ　Ｃｏｒｐ）で測定し、腫瘍体積（ｍｍ^3）を計算した。計算式は以下に示すとおり。

腫瘍体積（ｍｍ^3）＝１／２×長径（ｍｍ）×［短径（ｍｍ）］^{2}

Ｄａｙ１１で腫瘍径が約１３０ｍｍ^{3}になったところで、腫瘍径を用いて１６匹の動物を無作為に４群への群分けを実施した。同日、抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）、トラスツズマブ、両剤の併用、および対照群としてＰＢＳを下記の用量で投与した。

【０３１７】

投与群：ＰＢＳを、抗体－薬物コンジュゲートと同容量で、単回静注。
投与群：トラスツズマブ（Ｒｏｃｈｅ）、１ｍｇ／ｋｇで、単回静注。
投与群：抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）、３ｍｇ／ｋｇ、単回静注。
投与群：トラスツズマブ（Ｒｏｃｈｅ）を投与（単回静注）した３０分後に、抗体－薬

物コンジュゲート（１６ａ）、３ｍｇ／ｋｇで単回静注。

【０３１８】

結果を図２５に示す。トラスツズマブと抗体－薬物コンジュゲート投与において、各単剤と比較して、ヒト乳癌株（ＰＩＫ３ＣＡ　Ｈ１０４７Ｒ）における抗腫瘍併用効果を観察した。以上から、抗体－薬物コンジュゲートの薬効ははトラスツズマブとの併用により増強することが示された。またマウスの体重減少は、いずれの処置群で観察されなかった。また他のヒト乳癌株（ＰＩＫ３ＣＡ　Ｈ１０４７Ｒ）のＨＣＣ１９５４の抗腫瘍試験においても、抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）はトラスツズマブとのｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍併用効果を示した。

【０３１９】

試験例１８　抗体－薬物コンジュゲート（１５）はヒト乳癌株抗腫瘍試験において、トラスツズマブとのin vivo抗腫瘍併用効果を示した

ヒトＨＥＲ２陽性乳癌の治療薬にはトラスツズマブが承認されている。しかしトラスツズマブ耐性が知られており、耐性機構の一つにＰＩＫ３ＣＡの変異〈Ｈ１０４７Ｒ，　Ｈ４２０Ｒ〉が関与していることが報告されている。本試験では、トラスツズマブ耐性である乳癌株に対して、トラスツズマブと抗体－薬物コンジュゲートの併用に効果があるか否かを評価した。

馴化後の体重が１５から２０ｇで５－６週齢の雌ＣＡｎＮ．Ｃｇ－Ｆｏｘｎ１［ｎｕ］／ＣｒｌＣｒｌｊ〔Ｆｏｘｎ１ｎｕ／Ｆｏｘｎ１ｎｕ〕ヌードマウス（日本チャールス・リバー社）を使用した。マウスは換気ケージ（ＩＶＣ、各ケージに最大４匹）で室温および湿度が一定に保たれた。無作為化後にマウス体重を１日置きに測定し、毎日動物の行動を記録した。

ＡＴＣＣ由来のヒト乳癌細胞株ＪＩＭＴ－１（ＡＣＣ－５８９　ＰＩＫ３ＣＡ　Ｈ４２０Ｒ変異）５×１０^{6}個を、ＰＢＳ（ＰＡＡ　＃１００１０－０２３）に懸濁し、ヌードマウスの右体側部に、２９Ｇ針を用いて、皮下移植した。体重は体重計（Ｍｅｔｔｌｅｒ　Ｔｏｌｅｄｏ　ＰＢ６０２－Ｌ）により計測した。

腫瘍の長径および短径を電子式デジタルキャリパー（ＣＤ－１５ＣＸ、Ｍｉｔｓｕｔｏｙｏ　Ｃｏｒｐ）で測定し、腫瘍体積（ｍｍ^{3}）を計算した。計算式は以下に示すとおり。

腫瘍体積（ｍｍ^{3}）＝１／２×長径（ｍｍ）×［短径（ｍｍ）］^{2}

Ｄａｙ１０で腫瘍径が約２００ｍｍ^{3}になったところで、腫瘍径を用いて２４匹の動物を無作為に４群への群分けを実施した。同日、抗体－薬物コンジュゲート（１５）、トラスツズマブ、両剤の併用、および対照群としてＰＢＳを下記の用量で投与した。

【０３２０】

投与群：ＰＢＳを、抗体－薬物コンジュゲートと同容量で、週１回静注。　投与群：トラスツズマブ（Ｒｏｃｈｅ）、１０ｍｇ／ｋｇで、週一回静注。

投与群：抗体－薬物コンジュゲート（１５）、１０ｍｇ／ｋｇ、週１回静注。

投与群：トラスツズマブ（Ｒｏｃｈｅ）を投与（週１回静注）した３０分後に、抗体－薬物コンジュゲート（１５）、１０ｍｇ／ｋｇで週１回静注。

【０３２１】

結果を図２６に示す。トラスツズマブと抗体－薬物コンジュゲート投与において、各単剤と比較して、ヒト乳癌株（ＰＩＫ３ＣＡ　Ｈ４２０Ｒ）における抗腫瘍併用効果を観察した。以上から、抗体－薬物コンジュゲートの薬効はトラスツズマブとの併用により増強することが示された。またマウスの体重減少は、いずれの処置群で観察されなかった。

【０３２２】

試験例１９　抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）はヒト肺癌株抗腫瘍試験において、ゲフィチニブとのin vivo抗腫瘍併用効果を示した

ヒト肺癌の治療薬にはゲフィチニブが承認されている。本試験では、ゲフィチニブと抗体－薬物コンジュゲートの併用に効果があるか否かを評価した。

馴化後の体重が１５から２０ｇで５－６週齢の雌ＣＡｎＮ．Ｃｇ－Ｆｏｘｎ１［ｎｕ］

／ＣｒｌＣｒｌｊ〔Ｆｏｘｎ１ｎｕ／Ｆｏｘｎ１ｎｕ〕ヌードマウス（日本チャールス・リバー社）を使用した。マウスは換気ケージ（ＩＶＣ、各ケージに最大４匹）で室温および湿度が一定に保たれた。無作為化後にマウス体重を１日置きに測定し、毎日動物の行動を記録した。

ＡＴＣＣ由来のヒト肺癌細胞株ＰＣ－９（ＲＣＢ０４４６）３×１０^{6}個を、ＰＢＳ（ＰＡＡ　＃１００１０－０２３）に懸濁し、ヌードマウスの右体側部に、２９Ｇ針を用いて、皮下移植した。体重は体重計（Ｍｅｔｔｌｅｒ　Ｔｏｌｅｄｏ　ＰＢ６０２－Ｌ）により計測した。

腫瘍の長径および短径を電子式デジタルキャリパー（ＣＤ－１５ＣＸ、Ｍｉｔｓｕｔｏｙｏ　Ｃｏｒｐ）で測定し、腫瘍体積（ｍｍ^{3}）を計算した。計算式は以下に示すとおり。

腫瘍体積（ｍｍ^{3}）＝１／２×長径（ｍｍ）×［短径（ｍｍ）］^{2}

Ｄａｙ１４で腫瘍径が約２７０ｍｍ^{3}になったところで、腫瘍径を用いて１６匹の動物を無作為に４群への群分けを実施した。同日、抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）、ゲフィチニブ、両剤の併用、および対照群としてＰＢＳを下記の用量で投与した。

【０３２３】

投与群：ＰＢＳを、抗体－薬物コンジュゲートと同容量で、週１回静注。

投与群：ゲフィチニブ（Ａｓｔｒａ　Ｚｅｎｅｃａ）、６ｍｇ／ｋｇで、日１回経口投与。

投与群：抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）、１０ｍｇ／ｋｇ、週１回静注。

投与群：ゲフィチニブ（Ａｓｔｒａ　Ｚｅｎｅｃａ）を投与（日１回経口投与）した３０分後に、抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）、１０ｍｇ／ｋｇで週１回静注。

【０３２４】

結果を図２７に示す。ゲフィチニブと抗体－薬物コンジュゲート投与において、各単剤と比較して、ヒト肺癌株における抗腫瘍併用効果を観察した。以上から、抗体－薬物コンジュゲートの薬効はゲフィチニブとの併用により増強することが示された。またマウスの体重減少は、いずれの処置群で観察されなかった。

【０３２５】

試験例２０　抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）はヒトトリプルネガティブ乳癌株抗腫瘍試験において、セツキシマブおよびパニツムマブとのin vivo抗腫瘍併用効果を示した

ヒトトリプルネガティブ乳癌に対して、抗ＥＧＦＲ抗体であるセツキシマブやパニツムマブの臨床試験が実施されている。本試験では、セツキシマブやパニツムマブと抗体－薬物コンジュゲートの併用に効果があるか否かを評価した。

馴化後の体重が１５から２０ｇで５－６週齢の雌ＣＡｎＮ．Ｃｇ－Ｆｏｘｎ１［ｎｕ］／ＣｒｌＣｒｌｊ〔Ｆｏｘｎ１ｎｕ／Ｆｏｘｎ１ｎｕ〕ヌードマウス（日本チャールス・リバー社）を使用した。マウスは換気ケージ（ＩＶＣ、各ケージに最大４匹）で室温および湿度が一定に保たれた。無作為化後にマウス体重を１日置きに測定し、毎日動物の行動を記録した。

ＡＴＣＣ由来のヒトトリプルネガティブ乳癌細胞株ＭＤＡ－ＭＢ－４６８（ＣＲＬ－２３２２）５×１０^{6}個を、２００μＬのＰＢＳとＭａｔｒｉｇｅｌ（ＰＢＳ：ＰＡＡ　＃１００１０－０２３，Ｍａｔｒｉｇｅｌ：ＢＤ　＃３５４２３４）を１対１で混合した調整液に懸濁し、ヌードマウスの右体側部に、２９Ｇ針を用いて、皮下移植した。体重は体重計（Ｍｅｔｔｌｅｒ　Ｔｏｌｅｄｏ　ＰＢ６０２－Ｌ）により計測した。

腫瘍の長径および短径を電子式デジタルキャリパー（ＣＤ－１５ＣＸ、Ｍｉｔｓｕｔｏｙｏ　Ｃｏｒｐ）で測定し、腫瘍体積（ｍｍ^{3}）を計算した。計算式は以下に示すとおり。

腫瘍体積（ｍｍ^{3}）＝１／２×長径（ｍｍ）×［短径（ｍｍ）］^{2}

Ｄａｙ２１で腫瘍径が約１６０ｍｍ^{3}になったところで、腫瘍径を用いて３０匹の動物を無作為に６群への群分けを実施した。同日、抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）、セツキシマブ、パニツムマブ、両剤の併用、および対照群としてＰＢＳを下記の用量で投与

した。
【０３２６】
投与群：ＰＢＳを、抗体－薬物コンジュゲートと同容量で、単回投与。
投与群：セツキシマブ（Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ　Ｓｑｕｉｂｂ）、１０ｍｇ／ｋｇで、単回投与。
投与群：パニツムマブ（ＡＭＧＥＮ）、１０ｍｇ／ｋｇで、単回投与。
投与群：抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）、１０ｍｇ／ｋｇ、単回投与。
投与群：セツキシマブ（Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ　Ｓｑｕｉｂｂ）を投与（単回投与）した３０分後に、抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）、１０ｍｇ／ｋｇで単回投与。
投与群：パニツムマブ（ＡＭＧＥＮ）を投与（単回投与）した３０分後に、抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）、１０ｍｇ／ｋｇで単回投与。
【０３２７】
結果を図２８に示す。セツキシマブ（Ａ）またはパニツムマブ（Ｂ）と抗体－薬物コンジュゲート投与において、各単剤と比較して、ヒトトリプルネガティブ乳癌株における抗腫瘍併用効果を観察した。以上から、抗体－薬物コンジュゲートの薬効はセツキシマブまたはパニツムマブとの併用により増強することが示された。またマウスの体重減少は、いずれの処置群で観察されなかった。また他のヒトトリプルネガティブ乳癌株MDA-MB-231を用いても、抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）はセツキシマブまたはパニツムマブとの併用により抗腫瘍併用効果を示した。
【０３２８】
試験例２１　抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）はヒト頭頸部癌株抗腫瘍試験において、セツキシマブおよびパニツムマブとのin vivo抗腫瘍併用効果を示した
ヒト頭頸部癌に対して抗ＥＧＦＲ抗体であるセツキシマブは承認されており、またパニツムマブの臨床試験が実施されている。本試験では、セツキシマブやパニツムマブと抗体－薬物コンジュゲートの併用に効果があるか否かを評価した。
馴化後の体重が１５から２０ｇで５－６週齢の雌ＣＡｎＮ．Ｃｇ－Ｆｏｘｎ１［ｎｕ］／ＣｒｌＣｒｌｊ〔Ｆｏｘｎ１ｎｕ／Ｆｏｘｎ１ｎｕ〕ヌードマウス（日本チャールス・リバー社）を使用した。マウスは換気ケージ（ＩＶＣ、各ケージに最大４匹）で室温および湿度が一定に保たれた。無作為化後にマウス体重を１日置きに測定し、毎日動物の行動を記録した。
ＡＴＣＣ由来のヒト頭頸部癌細胞株Ｆａｄｕ（ＨＴＢ－４３）４×１０^{6}個を、２００μＬのＰＢＳ（ＰＡＡ　＃Ｅ１００１０－０２３）に懸濁し、ヌードマウスの右体側部に、２９Ｇ針を用いて、皮下移植した。体重は体重計（Ｍｅｔｔｌｅｒ　Ｔｏｌｅｄｏ　ＰＢ６０２－Ｌ）により計測した。
腫瘍の長径および短径を電子式デジタルキャリパー（ＣＤ－１５ＣＸ、Ｍｉｔｓｕｔｏｙｏ　Ｃｏｒｐ）で測定し、腫瘍体積（ｍｍ^{3}）を計算した。計算式は以下に示すとおり。

腫瘍体積（ｍｍ^{3}）＝１／２×長径（ｍｍ）×［短径（ｍｍ）］^{2}

Ｄａｙ６で腫瘍径が約３３０ｍｍ^{3}になったところで、腫瘍径を用いて３０匹の動物を無作為に６群への群分けを実施した。同日、抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）、セツキシマブ、パニツムマブ、両剤の併用、および対照群としてＰＢＳを下記の用量で投与した。
【０３２９】
投与群：ＰＢＳを、抗体－薬物コンジュゲートと同容量で、単回投与。
投与群：セツキシマブ（Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ　Ｓｑｕｉｂｂ）、５ｍｇ／ｋｇで、単回投与。
投与群：パニツムマブ（ＡＭＧＥＮ）、５ｍｇ／ｋｇで、単回投与。
投与群：抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）、１０ｍｇ／ｋｇ、単回投与。
投与群：セツキシマブ（Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ　Ｓｑｕｉｂｂ）を投与（単回投

与）した３０分後に、抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）、１０ｍｇ／ｋｇで単回投与。

投与群：パニツムマブ（ＡＭＧＥＮ）を投与（単回投与）した３０分後に、抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）１０ｍｇ／ｋｇで単回投与。

【０３３０】

結果を図２９に示す。セツキシマブ（Ａ）またはパニツムマブ（Ｂ）と抗体－薬物コンジュゲート投与において、各単剤と比較して、ヒト頭頸部癌株における抗腫瘍併用効果を観察した。以上から、抗体－薬物コンジュゲートの薬効はセツキシマブまたはパニツムマブとの併用により増強することが示された。またマウスの体重減少は、いずれの処置群で観察されなかった。

【０３３１】

試験例２２　抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）は胃癌患者腫瘍の移植抗腫瘍試験において、セツキシマブおよびペルツツマブとのin vivo抗腫瘍併用効果を示した

ヒト胃癌に対して抗ＥＧＦＲ抗体であるセツキシマブ、および抗ＨＥＲ２抗体のペルツツマブの臨床試験が実施されている。本試験では、セツキシマブとペルツツマブと抗体－薬物コンジュゲートの併用に効果があるか否かを評価した。また通常のヒト癌株を用いた評価系でなく、患者由来の腫瘍をマウスに移植して抗腫瘍試験を行なうことで、患者の間質を含んだ臨床に近い状態で評価を実施した。

馴化後の体重が１５から２０ｇで５－６週齢の雌ＣＡｎＮ．Ｃｇ－Ｆｏｘｎ１［ｎｕ］／ＣｒｌＣｒｌｊ〔Ｆｏｘｎ１ｎｕ／Ｆｏｘｎ１ｎｕ〕ヌードマウス（日本チャールス・リバー社）を使用した。マウスは換気ケージ（ＩＶＣ、各ケージに最大４匹）で室温および湿度が一定に保たれた。無作為化後にマウス体重を１日置きに測定し、毎日動物の行動を記録した。

独立行政法人・医薬基盤研究所由来の胃癌患者由来腫瘍ＮＩＢＩＯ－Ｇ０１６を、ヌードマウスの右体側部に皮下移植した。体重は体重計（Ｍｅｔｔｌｅｒ　Ｔｏｌｅｄｏ　ＰＢ６０２－Ｌ）により計測した。

腫瘍の長径および短径を電子式デジタルキャリパー（ＣＤ－１５ＣＸ、Ｍｉｔｓｕｔｏｙｏ　Ｃｏｒｐ）で測定し、腫瘍体積（mm^3）を計算した。計算式は以下に示すとおり。

腫瘍体積（mm^3）＝１／２×長径（ｍｍ）×［短径（ｍｍ）］^{2}

Ｄａｙ５６で腫瘍径が約２２０mm^3になったところで、腫瘍径を用いて３０匹の動物を無作為に６群への群分けを実施した。同日、抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）、セツキシマブ、ペルツツマブ、両剤の併用、および対照群としてＰＢＳを下記の用量で投与した。

【０３３２】

投与群：ＰＢＳを、抗体－薬物コンジュゲートと同容量で、単回投与。

投与群：セツキシマブ（Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ　Ｓｑｕｉｂｂ）、１０ｍｇ／ｋｇで、単回投与

投与群：ペルツツマブ（Ｒｏｃｈｅ）、１０ｍｇ／ｋｇで、単回投与。

投与群：抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）、１０ｍｇ／ｋｇ、単回投与。

投与群：セツキシマブ（Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ　Ｓｑｕｉｂｂ）を投与（単回投与）した３０分後に、抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）、１０ｍｇ／ｋｇで単回投与。

投与群：ペルツツマブ（Ｒｏｃｈｅ）を投与（単回投与）した３０分後に、抗体－薬物コンジュゲート（１６ａ）、１０ｍｇ／ｋｇで単回投与。

【０３３３】

結果を図３０に示す。セツキシマブ（Ａ）またはペルツツマブ（Ｂ）と抗体－薬物コンジュゲート投与において、各単剤と比較して、胃癌患者由来腫瘍モデルにおける抗腫瘍併用効果を観察した。以上から、抗体－薬物コンジュゲートの薬効はセツキシマブまたはパニツムマブとの併用により増強することが癌患者由来の腫瘍モデルにおいて示された。ま

たマウスの体重減少は、いずれの処置群で観察されなかった。また、ヒト膵臓癌細胞株ＢｘＰＣ３を用いた抗腫瘍試験においても、抗体－薬物コンジュゲート（１３）は、ＰＢＳ投与の対象群もしくはＵ１－５９投与群と比較して強い抗腫瘍効果を示した。また、トラスツズマブおよびペルツツマブの併用への耐性又はトラスツズマブ・エムタンシンへの耐性を獲得したＨＥＲ２陽性乳癌細胞株ＪＩＭＴ１を用いたin vivo抗腫瘍モデルでも、その抗体－薬物コンジュゲートは強い抗腫瘍効果を示した。

【０３３４】

試験例２３　抗体－薬物コンジュゲートの非ヒト動物における安全性

本発明の抗ＨＥＲ３抗体－薬物コンジュゲート及びそれを含む医薬組成物は、疾患の治療又は予防剤として安全性に優れている。例えば、抗体－薬物コンジュゲート（５）、（１０）又は（１３）を３０ｍｇ／ｋｇまで、交差種であるラットに週１回の間隔で計２回投与して最終投与後７日まで観察した結果、いずれの抗体－薬物コンジュゲートについても重篤な毒性所見は認められなかった。また、抗体－薬物コンジュゲート（５）、（１０）又は（１３）を３０ｍｇ／ｋｇまで、交差種であるサルに単回投与して７日間観察した結果、いずれの抗体－薬物コンジュゲートについても顕著な毒性所見は認められなかった。

また、サルに複数回投与〈３週間間隔〉して観察した結果、いずれの抗体－薬物コンジュゲートにおいても顕著な毒性所見は認められなかった。このように、本発明の抗体－薬物コンジュゲートは、疾患の治療又は予防のための医薬組成物として優れた安全性を具備している。

【配列表フリーテキスト】

【０３３５】

配列番号１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３９重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列

配列番号２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３９重鎖可変領域のアミノ酸配列

配列番号３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３９軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列

配列番号４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３９軽鎖可変領域のアミノ酸配列

配列番号５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４０重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列

配列番号６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４０重鎖可変領域のアミノ酸配列

配列番号７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４０軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列

配列番号８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４０軽鎖可変領域のアミノ酸配列

配列番号９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３８重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列

配列番号１０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３８重鎖可変領域のアミノ酸配列

配列番号１１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３８軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列

配列番号１２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３８軽鎖可変領域のアミノ酸配列

配列番号１３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４１重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列

配列番号１４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４１重鎖可変領域のアミノ酸配列

配列番号１５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４１軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列

配列番号１６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４１軽鎖可変領域のアミノ酸配列

配列番号１７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４２重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列

配列番号１８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４２重鎖可変領域のアミノ酸配列

配列番号１９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４２軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩

基配列
配列番号２０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４２軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号２１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４３重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号２２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４３重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号２３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４３軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号２４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４３軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号２５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４４重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号２６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４４重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号２７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４４軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号２８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４４軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号２９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４５重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号３０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４５重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号３１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４５軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号３２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４５軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号３３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４６重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号３４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４６重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号３５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４７重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号３６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４７重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号３７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４７軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号３８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４７軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号３９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４８重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号４０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４８重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号４１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４９重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号４２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４９重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号４３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４９軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号４４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４９軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号４５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５０重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号４６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５０重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号４７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５０軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号４８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５０軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号４９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５１重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号５０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５１重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号５１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５１軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号５２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５１軽鎖可変領域のアミノ酸配列

配列番号５３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５３重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号５４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５３重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号５５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５３軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号５６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５３軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号５７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５５軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号５８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５５軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号５９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５５．１重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号６０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５５．１重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号６１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５７重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号６２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５７重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号６３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５７．１軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号６４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５７．１軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号６５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５８重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号６６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５８重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号６７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５８軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号６８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５８軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号６９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５９重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号７０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５９重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号７１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５９軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号７２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５９軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号７３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５２重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号７４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５２重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号７５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５２軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号７６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５２軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号７７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－６１重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号７８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－６１重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号７９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－６１．１重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号８０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－６１．１重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号８１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－６１．１軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号８２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－６１．１軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号８３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－６２重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号８４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－６２重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号８５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－６２軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列

配列番号８６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－６２軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号８７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号８８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号８９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号９０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号９１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－７重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号９２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－７重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号９３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－７軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号９４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－７軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号９５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－９重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号９６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－９重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号９７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－９軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号９８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－９軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号９９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１０重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号１００：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１０重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１０１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１０軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号１０２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１０軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１０３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１２重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号１０４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１２重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１０５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１２軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号１０６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１２軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１０７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１３重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号１０８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１３重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１０９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１３軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号１１０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１３軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１１１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１４重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号１１２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１４重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１１３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１４軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号１１４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１４軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１１５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１５重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号１１６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１５重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１１７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１５軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号１１８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１５軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１１９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１９重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする

塩基配列
配列番号１２０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１９重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１２１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２０重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする
塩基配列
配列番号１２２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２０重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１２３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２０軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする
塩基配列
配列番号１２４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２０軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１２５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２１重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする
塩基配列
配列番号１２６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２１重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１２７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２１軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする
塩基配列
配列番号１２８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２１軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１２９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２２重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする
塩基配列
配列番号１３０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２２重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１３１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２２軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする
塩基配列
配列番号１３２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２２軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１３３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２３重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする
塩基配列
配列番号１３４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２３重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１３５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２３軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする
塩基配列
配列番号１３６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２３軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１３７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２４重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする
塩基配列
配列番号１３８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２４重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１３９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２４軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする
塩基配列
配列番号１４０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２４軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１４１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２５重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする
塩基配列
配列番号１４２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２５重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１４３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２５軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする
塩基配列
配列番号１４４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２５軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１４５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２６重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする
塩基配列
配列番号１４６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２６重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１４７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２６軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする
塩基配列
配列番号１４８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２６軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１４９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２７重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする
塩基配列
配列番号１５０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２７重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１５１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２７軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする
塩基配列
配列番号１５２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２７軽鎖可変領域のアミノ酸配列

配列番号１５３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２８重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号１５４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２８重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１５５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２８軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号１５６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２８軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１５７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３１重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号１５８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３１重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１５９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３１軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号１６０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３１軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１６１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３２重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号１６２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３２重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１６３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３２軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号１６４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３２軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１６５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３５重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号１６６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３５重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１６７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３５軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号１６８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３５軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１６９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３６重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号１７０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３６重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１７１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３６軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号１７２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３６軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１７３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３７重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号１７４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３７重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１７５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３７軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号１７６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３７軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１７７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３４重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号１７８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３４重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１７９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３４軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号１８０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３４軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１８１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号１８２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１８３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号１８４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１８５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列

配列番号１８６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１８７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号１８８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１８９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号１９０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１９１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号１９２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１９３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号１９４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１９５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号１９６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１９７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－６重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号１９８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－６重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号１９９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－６軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号２００：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－６軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号２０１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－８重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号２０２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－８重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号２０３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－８軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号２０４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－８軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号２０５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１１重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号２０６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１１重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号２０７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１１軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号２０８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１１軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号２０９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１６重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号２１０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１６重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号２１１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１６軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号２１２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１６軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号２１３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１７重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号２１４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１７重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号２１５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１７軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号２１６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１７軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号２１７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１８重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする塩基配列
配列番号２１８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１８重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号２１９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１８軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする

塩基配列
配列番号２２０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１８軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号２２１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３３重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする
塩基配列
配列番号２２２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３３重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号２２３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３３軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする
塩基配列
配列番号２２４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３３軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号２２５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２９重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする
塩基配列
配列番号２２６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２９重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号２２７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２９軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする
塩基配列
配列番号２２８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２９軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号２２９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３０重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする
塩基配列
配列番号２３０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３０重鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号２３１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３０軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードする
塩基配列
配列番号２３２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３０軽鎖可変領域のアミノ酸配列
配列番号２３３：プライマー
配列番号２３４：プライマー
配列番号２３５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号２３６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号２３７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号２３８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号２３９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号２４０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号２４１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号２４２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号２４３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号２４４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号２４５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号２４６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号２４７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号２４８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号２４９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号２５０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号２５１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号２５２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号２５３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号２５４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号２５５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号２５６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号２５７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号２５８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号２５９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号２６０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号２６１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号２６２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列

配列番号２６３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号２６４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号２６５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－６重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号２６６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－６重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号２６７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－６重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号２６８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－６軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号２６９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－６軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号２７０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－６軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号２７１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－７重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号２７２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－７重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号２７３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－７重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号２７４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－７軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号２７５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－７軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号２７６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－７軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号２７７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－８重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号２７８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－８重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号２７９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－８重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号２８０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－８軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号２８１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－８軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号２８２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－８軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号２８３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－９重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号２８４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－９重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号２８５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－９重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号２８６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－９軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号２８７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－９軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号２８８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－９軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号２８９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１０重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号２９０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１０重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号２９１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１０重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号２９２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１０軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号２９３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１０軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号２９４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１０軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号２９５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１１重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号２９６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１１重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号２９７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１１重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号２９８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１１軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号２９９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１１軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号３００：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１１軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号３０１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１２重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号３０２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１２重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号３０３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１２重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号３０４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１２軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号３０５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１２軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号３０６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１２軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号３０７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１３重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号３０８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１３重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号３０９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１３重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号３１０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１３軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号３１１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１３軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号３１２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１３軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列

配列番号３１３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１４重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号３１４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１４重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号３１５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１４重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号３１６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１４軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号３１７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１４軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号３１８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１４軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号３１９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１５重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号３２０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１５重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号３２１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１５重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号３２２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１５軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号３２３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１５軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号３２４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１５軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号３２５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１６重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号３２６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１６重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号３２７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１６重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号３２８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１６軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号３２９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１６軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号３３０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１６軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号３３１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１７重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号３３２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１７重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号３３３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１７重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号３３４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１７軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号３３５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１７軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号３３６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１７軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号３３７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１８重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号３３８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１８重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号３３９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１８重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号３４０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１８軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号３４１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１８軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号３４２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１８軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号３４３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１９重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号３４４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１９重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号３４５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－１９重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号３４６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２０重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号３４７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２０重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号３４８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２０重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号３４９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２０軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号３５０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２０軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号３５１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２０軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号３５２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２１重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号３５３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２１重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号３５４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２１重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号３５５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２１軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号３５６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２１軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号３５７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２１軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号３５８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２２重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号３５９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２２重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号３６０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２２重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号３６１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２２軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号３６２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２２軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列

配列番号３６３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２２軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号３６４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２３重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号３６５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２３重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号３６６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２３重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号３６７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２３軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号３６８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２３軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号３６９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２３軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号３７０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２４重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号３７１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２４重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号３７２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２４重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号３７３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２４軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号３７４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２４軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号３７５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２４軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号３７６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２５重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号３７７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２５重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号３７８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２５重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号３７９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２５軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号３８０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２５軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号３８１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２５軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号３８２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２６重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号３８３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２６重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号３８４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２６重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号３８５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２６軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号３８６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２６軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号３８７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２６軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号３８８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２７重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号３８９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２７重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号３９０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２７重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号３９１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２７軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号３９２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２７軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号３９３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２７軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号３９４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２８重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号３９５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２８重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号３９６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２８重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号３９７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２８軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号３９８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２８軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号３９９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２８軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号４００：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２９重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号４０１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２９重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号４０２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２９重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号４０３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２９軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号４０４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２９軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号４０５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－２９軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号４０６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３０重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号４０７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３０重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号４０８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３０重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号４０９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３０軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号４１０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３０軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号４１１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３０軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号４１２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３１重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列

配列番号４１３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３１重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号４１４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３１重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号４１５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３１軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号４１６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３１軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号４１７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３１軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号４１８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３２重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号４１９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３２重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号４２０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３２重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号４２１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３２軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号４２２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３２軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号４２３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３２軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号４２４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３３重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号４２５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３３重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号４２６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３３重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号４２７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３３軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号４２８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３３軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号４２９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３３軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号４３０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３４重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号４３１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３４重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号４３２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３４重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号４３３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３４軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号４３４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３４軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号４３５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３４軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号４３６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３５重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号４３７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３５重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号４３８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３５重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号４３９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３５軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号４４０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３５軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号４４１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３５軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号４４２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３６重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号４４３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３６重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号４４４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３６重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号４４５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３６軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号４４６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３６軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号４４７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３６軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号４４８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３７重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号４４９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３７重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号４５０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３７重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号４５１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３７軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号４５２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３７軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号４５３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３７軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号４５４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３８重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号４５５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３８重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号４５６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３８重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号４５７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３８軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号４５８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３８軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号４５９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３８軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号４６０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３９重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号４６１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３９重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号４６２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３９重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列

配列番号４６３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３９軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号４６４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３９軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号４６５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－３９軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号４６６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４０重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号４６７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４０重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号４６８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４０重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号４６９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４０軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号４７０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４０軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号４７１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４０軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号４７２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４１重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号４７３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４１重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号４７４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４１重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号４７５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４１軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号４７６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４１軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号４７７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４１軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号４７８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４２重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号４７９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４２重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号４８０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４２重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号４８１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４２軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号４８２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４２軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号４８３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４２軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号４８４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４３重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号４８５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４３重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号４８６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４３重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号４８７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４３軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号４８８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４３軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号４８９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４３軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号４９０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４４重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号４９１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４４重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号４９２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４４重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号４９３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４４軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号４９４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４４軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号４９５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４４軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号４９６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４５重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号４９７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４５重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号４９８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４５重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号４９９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４５軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号５００：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４５軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号５０１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４５軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号５０２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４６重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号５０３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４６重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号５０４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４６重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号５０５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４７重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号５０６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４７重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号５０７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４７重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号５０８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４７軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号５０９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４７軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号５１０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４７軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号５１１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４８重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号５１２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４８重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列

配列番号５１３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４８重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号５１４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４９重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号５１５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４９重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号５１６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４９重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号５１７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４９軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号５１８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４９軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号５１９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－４９軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号５２０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５０重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号５２１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５０重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号５２２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５０重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号５２３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５０軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号５２４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５０軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号５２５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５０軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号５２６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５１重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号５２７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５１重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号５２８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５１重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号５２９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５１軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号５３０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５１軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号５３１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５１軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号５３２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５２重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号５３３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５２重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号５３４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５２重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号５３５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５２軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号５３６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５２軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号５３７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５２軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号５３８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５３重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号５３９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５３重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号５４０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５３重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号５４１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５３軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号５４２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５３軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号５４３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５３軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号５４４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５５．１重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号５４５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５５．１重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号５４６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５５．１重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号５４７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５５軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号５４８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５５軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号５４９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５５軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号５５０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５７．１軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号５５１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５７．１軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号５５２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５７．１軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号５５３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５７重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号５５４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５７重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号５５５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５７重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号５５６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５８重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号５５７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５８重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号５５８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５８重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号５５９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５８軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号５６０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５８軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号５６１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５８軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号５６２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５９重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列

配列番号５６３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５９重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号５６４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５９重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号５６５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５９軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号５６６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５９軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号５６７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５９軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号５６８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－６１．１重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号５６９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－６１．１重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号５７０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－６１．１重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号５７１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－６１．１軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号５７２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－６１．１軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号５７３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－６１．１軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号５７４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－６１重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号５７５：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－６１重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号５７６：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－６１重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号５７７：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－６２重鎖ＣＤＲＨ１アミノ酸配列
配列番号５７８：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－６２重鎖ＣＤＲＨ２アミノ酸配列
配列番号５７９：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－６２重鎖ＣＤＲＨ３アミノ酸配列
配列番号５８０：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－６２軽鎖ＣＤＲＬ１アミノ酸配列
配列番号５８１：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－６２軽鎖ＣＤＲＬ２アミノ酸配列
配列番号５８２：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－６２軽鎖ＣＤＲＬ３アミノ酸配列
配列番号５８３：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５９重鎖の全長アミノ酸配列
配列番号５８４：抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５９軽鎖の全長アミノ酸配列

【図１】

抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５９重鎖の全長アミノ酸配列（配列番号５８３）

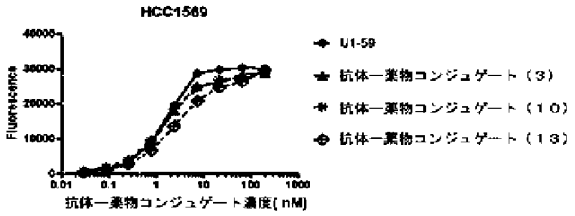
```
QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSW
IRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRVTISVE
TSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARPKWIWYFDLWG
RGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE
PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK
```

【図２】

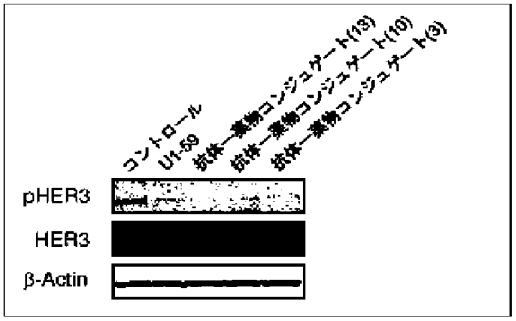
抗ＨＥＲ３ヒト抗体Ｕ１－５９軽鎖の全長アミノ酸配列（配列番号５８４）

```
DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSNR
NYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSG
SGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFGQGT
KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGEC
```

【図３】

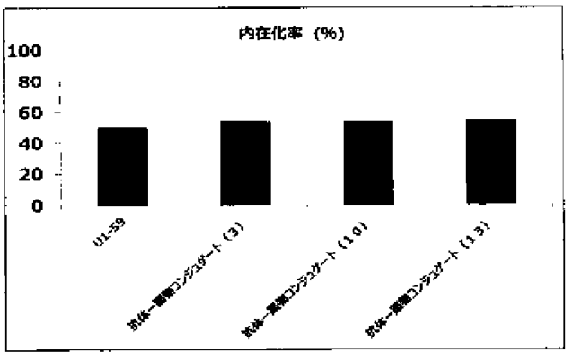


【図４】

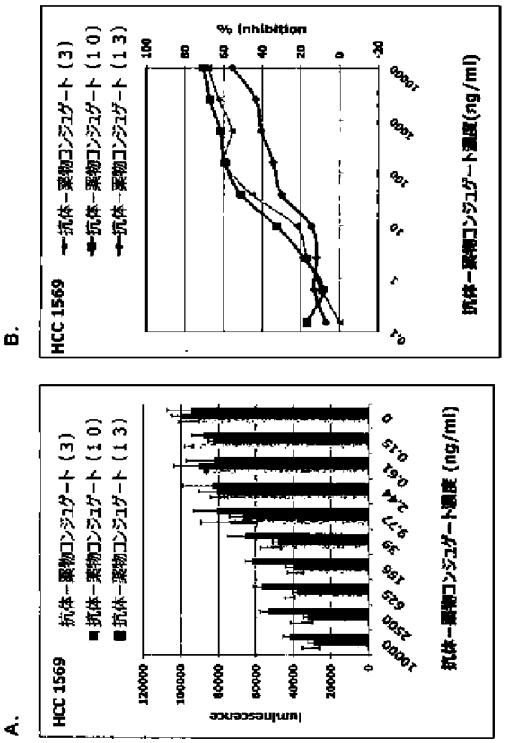


OnCusp
Ex. 1002

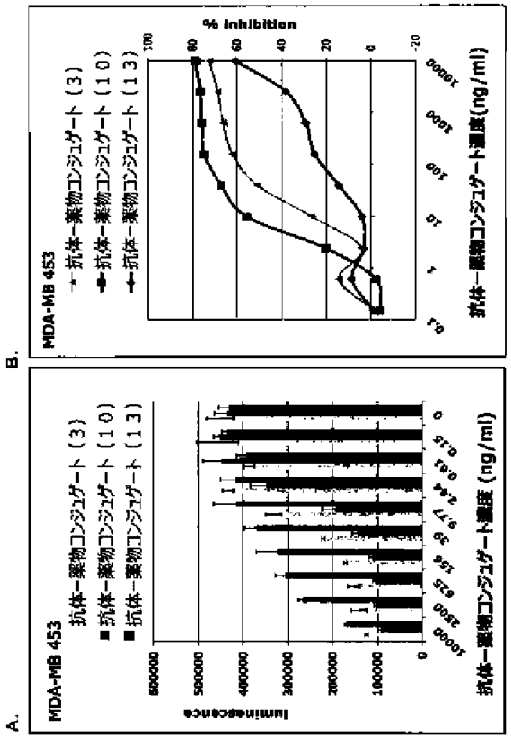
【図５】



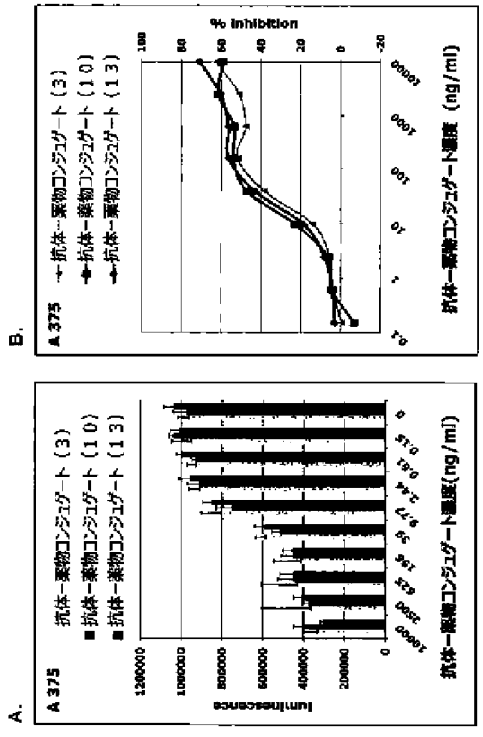
【図６】



【図７】

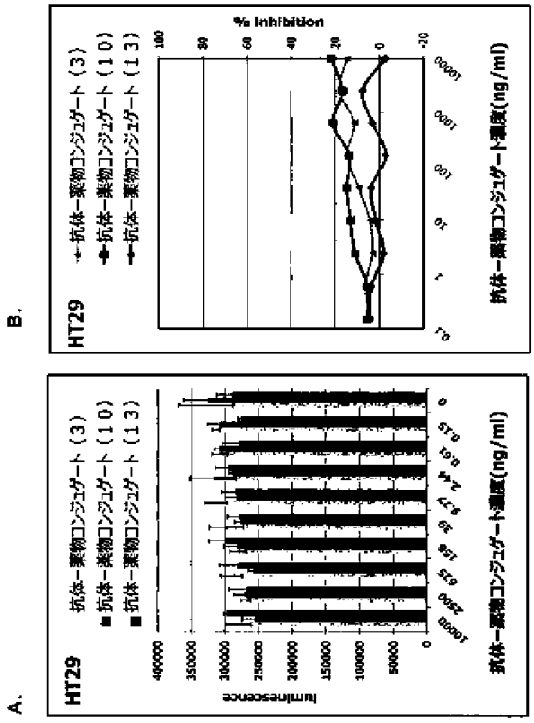


【図８】

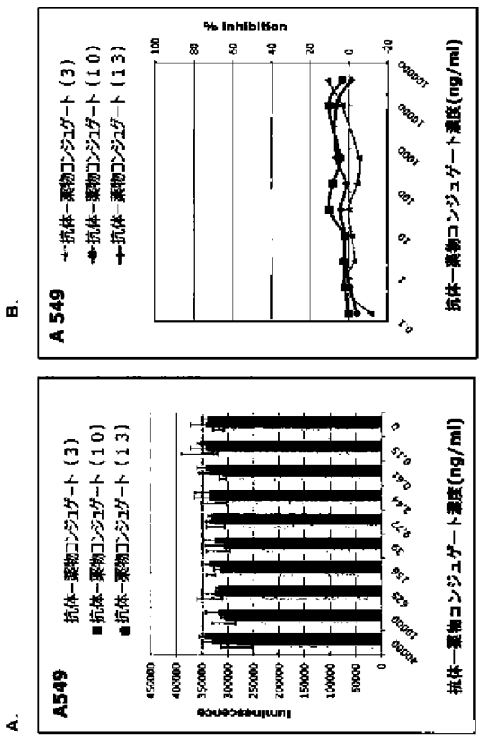


OnCusp
Ex. 1002

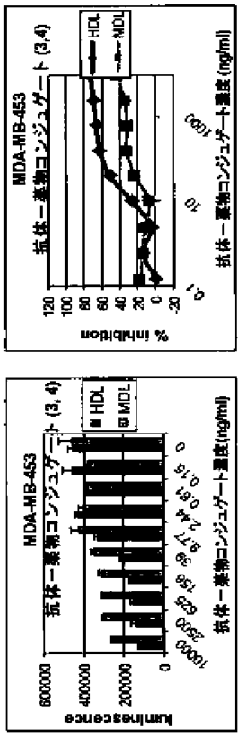
【図９】



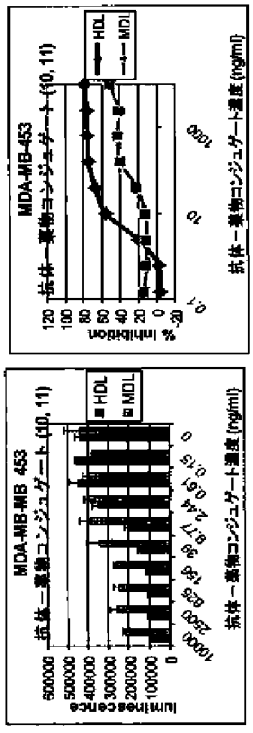
【図１０】



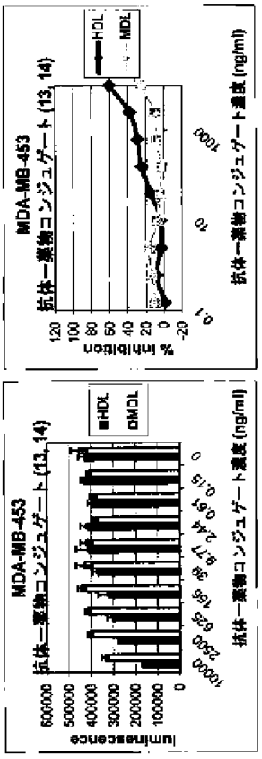
【図１１】



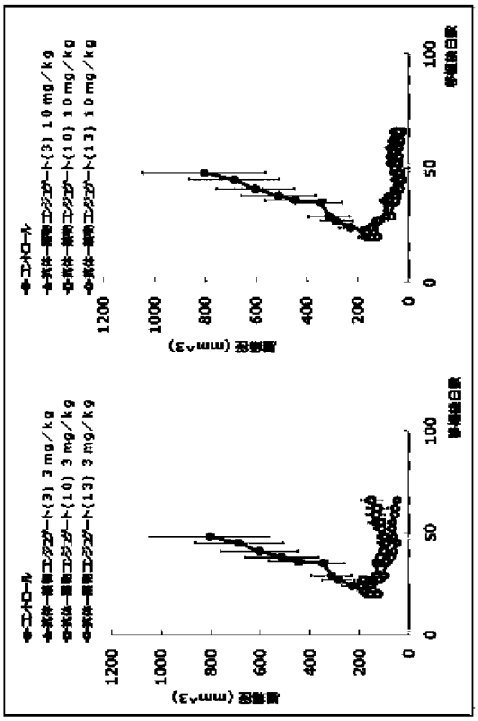
【図１２】



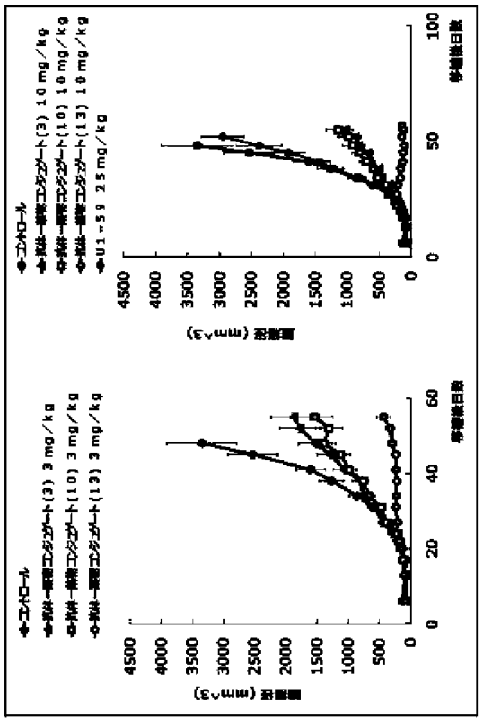
【図１３】



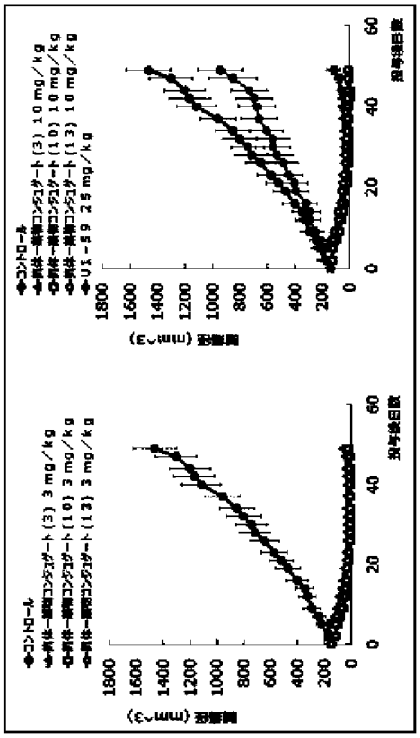
【図１４】



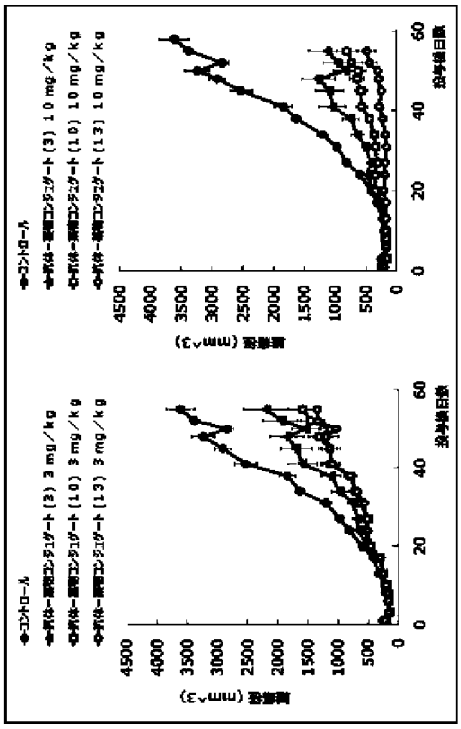
【図１５】



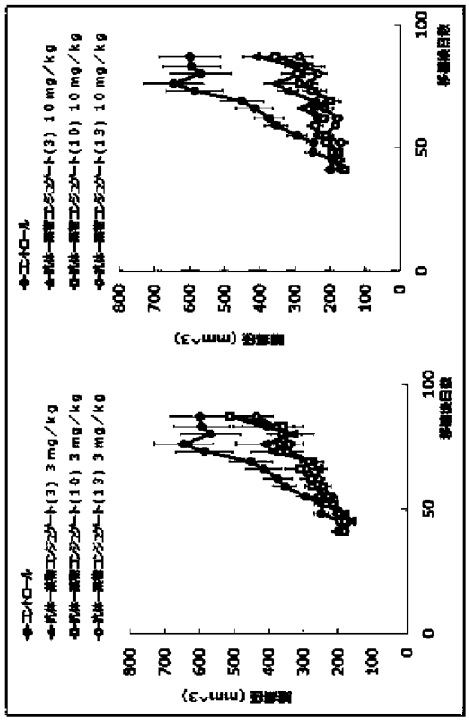
【図１６】



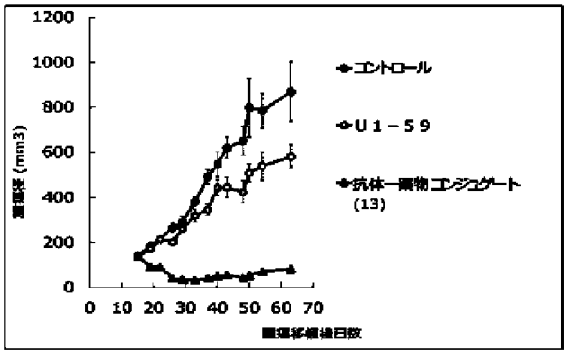
【図１７】



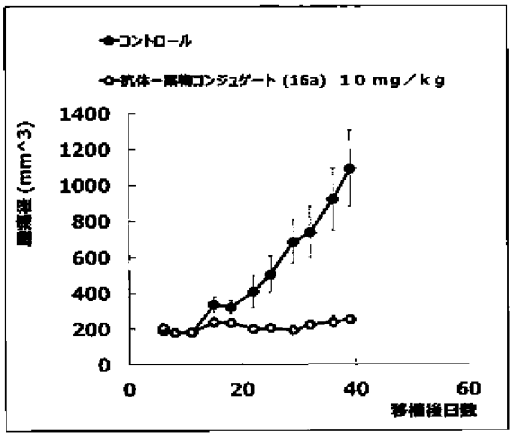
【図１８】



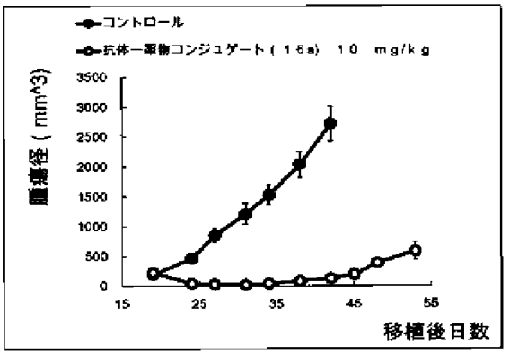
【図１９】



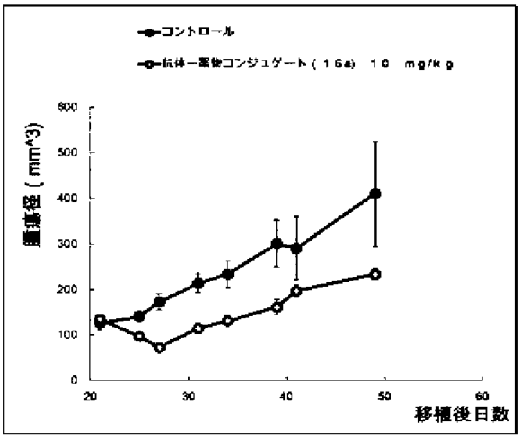
【図２０】



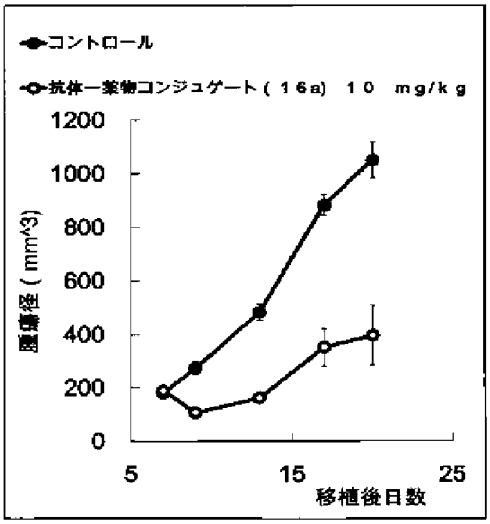
【図２１】



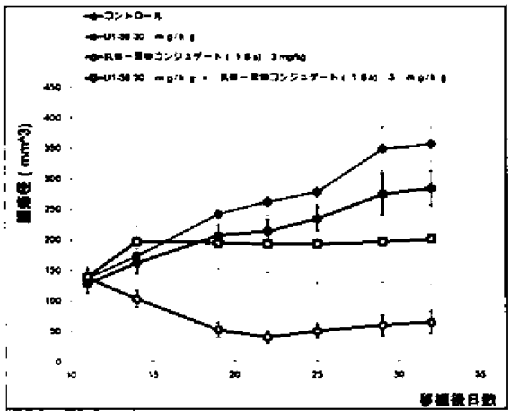
【図２２】



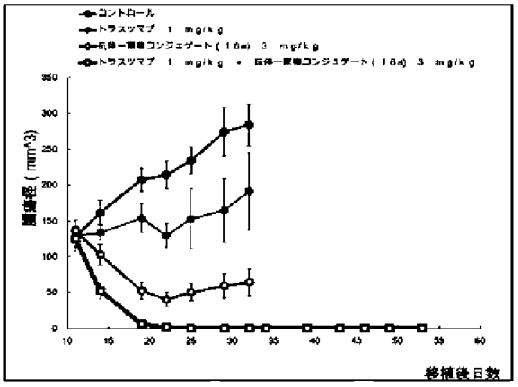
【図２３】



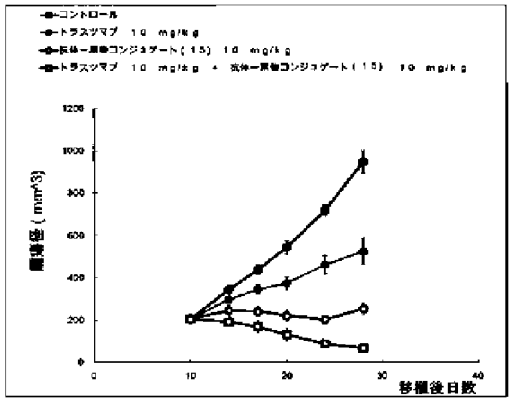
【図２４】



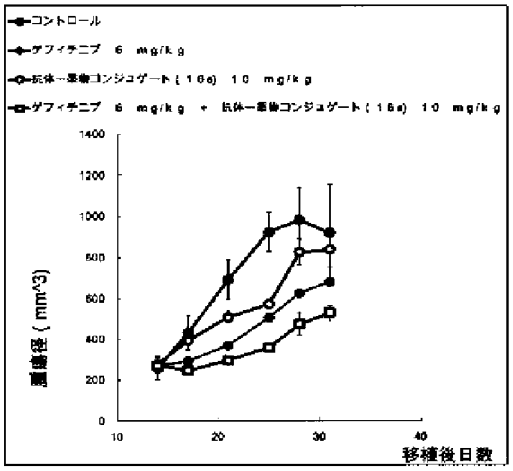
【図２５】



【図２６】

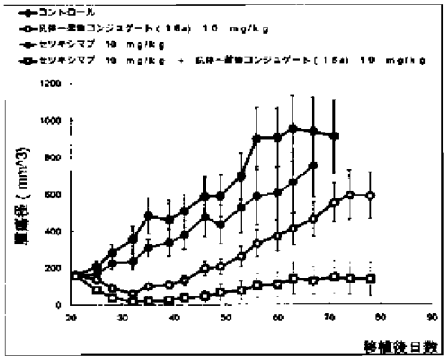


【図２７】

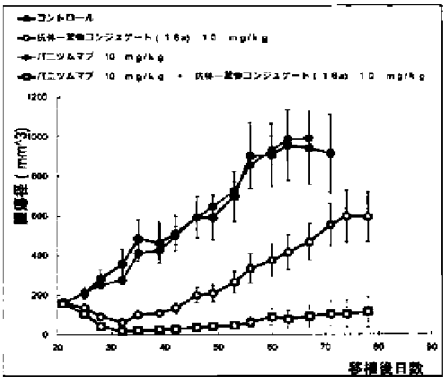


【図２８】

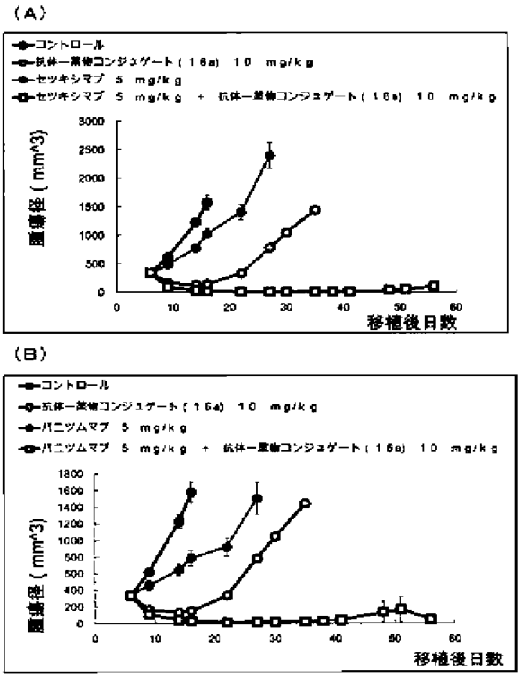
（A）



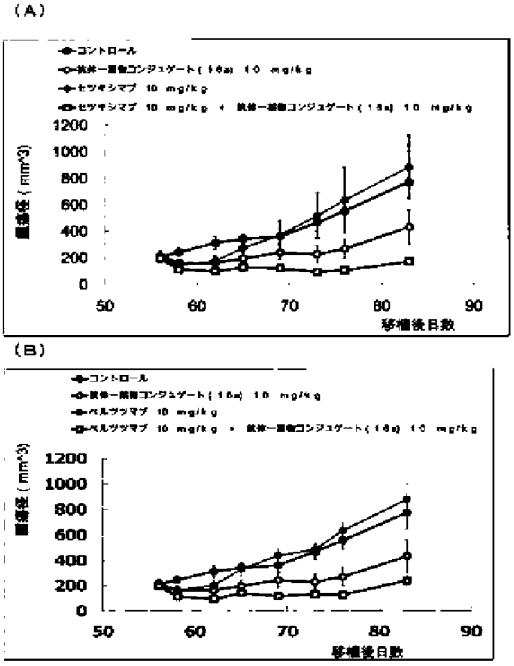
（B）



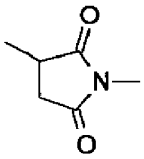
【図２９】



【図３０】

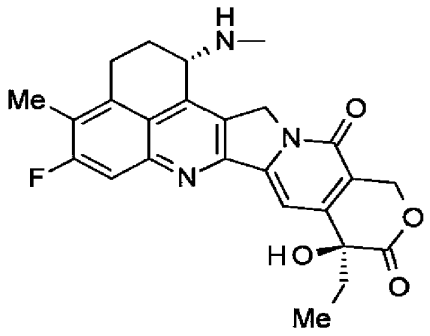


【配列表】
2017503784000001.app
【手続補正書】
【提出日】平成28年7月7日(2016.7.7)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
次式で示されるリンカー及び薬物と、抗ＨＥＲ３抗体と、が結合した抗体－薬物コンジュゲート。
-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)。
（式中、
-(Succinimid-3-yl-N)-は次式：
【化１】



で示される構造であり、このものの３位で抗ＨＥＲ３抗体とチオエーテル結合によって結合し、１位の窒素原子上でこれを含むリンカー構造内のメチレン基と結合し、
-(NH-DX)は次式：

【化２】



で示される、１位のアミノ基の窒素原子が結合部位となっている基を示す。）

【請求項２】

薬物－リンカー構造の１抗体あたりの平均結合数が２から８個の範囲である請求項１記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項３】

薬物－リンカー構造の１抗体あたりの平均結合数が３から８個の範囲である請求項１記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項４】

請求項１～３のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物を含有する医薬。

【請求項５】

請求項１～３のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物を含有する抗腫瘍薬及び／又は抗癌薬。

【請求項６】

肺癌、腎癌、尿路上皮癌、大腸癌、前立腺癌、多形神経膠芽腫、卵巣癌、膵癌、乳癌、メラノーマ、肝癌、膀胱癌、胃癌、胃腸間質腫瘍、子宮頸癌、頭頸部癌、食道癌、扁平上皮癌、腹膜癌、多形グリア芽細胞腫、肝臓癌、肝細胞癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌腫、肛門癌腫、又は陰茎癌に適用するための請求項５記載の抗腫瘍薬及び/又は抗癌薬。

【請求項７】

請求項１～３のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物を活性成分とし、薬学的に許容される製剤成分とを含有する医薬組成物。

【請求項８】

肺癌、腎癌、尿路上皮癌、大腸癌、前立腺癌、多形神経膠芽腫、卵巣癌、膵癌、乳癌、メラノーマ、肝癌、膀胱癌、胃癌、胃腸間質腫瘍、子宮頸癌、頭頸部癌、食道癌、扁平上皮癌、腹膜癌、多形グリア芽細胞腫、肝臓癌、肝細胞癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌腫、肛門癌腫、又は陰茎癌に適用するための請求項７記載の医薬組成物。

【請求項９】

Ｕ１－４９、Ｕ１－５３、Ｕ１－５９、Ｕ１－７又はＵ１－９のＣＤＲＨ１乃至Ｈ３及びＣＤＲＬ１乃至Ｌ３を重鎖及び軽鎖にそれぞれ含有する、請求項１～３のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

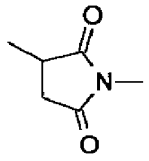
【請求項１０】

Ｕ１－４９、Ｕ１－５３、Ｕ１－５９、Ｕ１－７又はＵ１－９の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を重鎖及び軽鎖にそれぞれ含有する、請求項１～３及び９のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項１１】

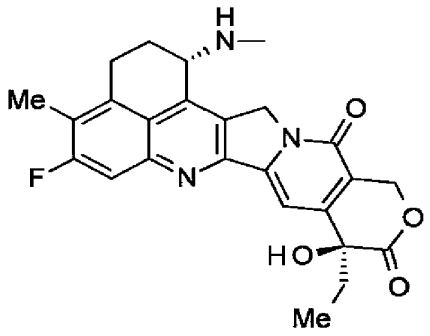
配列番号４２及び４４、５４及び５６、７０及び７２、９２及び９４、若しくは、９６

及び９８で示されるアミノ酸配列を重鎖及び軽鎖にそれぞれ含有する、請求項１～３、９及び１０のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。
【請求項１２】
配列番号５８３及び５８４を重鎖及び軽鎖にそれぞれ含有する、請求項１～３及び９～１１のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。
【請求項１３】
請求項９～１２のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物を活性成分とし、薬学的に許容される製剤成分とを含有する医薬組成物。
【請求項１４】
請求項９～１２のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物を含有する医薬。
【請求項１５】
肺癌、腎癌、尿路上皮癌、大腸癌、前立腺癌、多形神経膠芽腫、卵巣癌、膵癌、乳癌、メラノーマ、肝癌、膀胱癌、胃癌、胃腸間質腫瘍、子宮頸癌、頭頸部癌、食道癌、扁平上皮癌、腹膜癌、多形グリア芽細胞腫、肝臓癌、肝細胞癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌腫、肛門癌腫、又は陰茎癌に適用するための、請求項１３に記載の医薬組成物又は請求項１４に記載の医薬。
【手続補正書】
【提出日】平成28年12月14日(2016.12.14)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
次式で示されるリンカー及び薬物と、抗ＨＥＲ３抗体と、が結合した抗体－薬物コンジュゲート。
-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)。
（式中、
-(Succinimid-3-yl-N)-は次式：
【化１】



で示される構造であり、このものの３位で抗ＨＥＲ３抗体とチオエーテル結合によって結合し、１位の窒素原子上でこれを含むリンカー構造内のメチレン基と結合し、
-(NH-DX)は次式：

【化２】



で示される、１位のアミノ基の窒素原子が結合部位となっている基を示す。）

【請求項２】

薬物－リンカー構造の１抗体あたりの平均結合数が２から８個の範囲である請求項１記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項３】

薬物－リンカー構造の１抗体あたりの平均結合数が３から８個の範囲である請求項１記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項４】

請求項１～３のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物を含有する医薬。

【請求項５】

請求項１～３のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物を含有する抗腫瘍薬及び／又は抗癌薬。

【請求項６】

肺癌、腎癌、尿路上皮癌、大腸癌、前立腺癌、多形神経膠芽腫、卵巣癌、膵癌、乳癌、メラノーマ、肝癌、膀胱癌、胃癌、胃腸間質腫瘍、子宮頸癌、頭頸部癌、食道癌、扁平上皮癌、腹膜癌、多形グリア芽細胞腫、肝臓癌、肝細胞癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌腫、肛門癌腫、又は陰茎癌に適用するための請求項５記載の抗腫瘍薬及び/又は抗癌薬。

【請求項７】

請求項１～３のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物を活性成分とし、薬学的に許容される製剤成分とを含有する医薬組成物。

【請求項８】

肺癌、腎癌、尿路上皮癌、大腸癌、前立腺癌、多形神経膠芽腫、卵巣癌、膵癌、乳癌、メラノーマ、肝癌、膀胱癌、胃癌、胃腸間質腫瘍、子宮頸癌、頭頸部癌、食道癌、扁平上皮癌、腹膜癌、多形グリア芽細胞腫、肝臓癌、肝細胞癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌腫、肛門癌腫、又は陰茎癌に適用するための請求項７記載の医薬組成物。

【請求項９】

Ｕ１－４９、Ｕ１－５３、Ｕ１－５９、Ｕ１－７又はＵ１－９のＣＤＲＨ１乃至Ｈ３及びＣＤＲＬ１乃至Ｌ３を重鎖及び軽鎖にそれぞれ含有する、請求項１～３のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項１０】

Ｕ１－４９、Ｕ１－５３、Ｕ１－５９、Ｕ１－７又はＵ１－９の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を重鎖及び軽鎖にそれぞれ含有する、請求項１～３及び９のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項１１】

配列番号４２及び４４、５４及び５６、７０及び７２、９２及び９４、若しくは、９６

及び９８で示されるアミノ酸配列を重鎖及び軽鎖にそれぞれ含有する、請求項１～３、９及び１０のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項１２】

配列番号５８３及び５８４で示されるアミノ酸配列を重鎖及び軽鎖にそれぞれ含有する、請求項１～３及び９～１１のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項１３】

請求項９～１２のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物を活性成分とし、薬学的に許容される製剤成分とを含有する医薬組成物。

【請求項１４】

請求項９～１２のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物を含有する医薬。

【請求項１５】

肺癌、腎癌、尿路上皮癌、大腸癌、前立腺癌、多形神経膠芽腫、卵巣癌、膵癌、乳癌、メラノーマ、肝癌、膀胱癌、胃癌、胃腸間質腫瘍、子宮頸癌、頭頸部癌、食道癌、扁平上皮癌、腹膜癌、多形グリア芽細胞腫、肝臓癌、肝細胞癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌腫、肛門癌腫、又は陰茎癌に適用するための、請求項１３に記載の医薬組成物又は請求項１４に記載の医薬。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/JP2015/002020

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K47/48
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2012/019024 A2 (IMMUNOGEN INC [US]; SETIADY JULIANTO [US]; SKALETSKAYA ANNA [US]; RUI) 9 February 2012 (2012-02-09) cited in the application Claims 1, 40	1-38
A	WO 2012/064733 A2 (MEDIMMUNE LLC [US]; DIMASI NAZZARENO [US]) 18 May 2012 (2012-05-18) Figure 11; page 120, example 8	1-38
X,P	WO 2014/061277 A1 (DAIICHI SANKYO CO LTD [JP]) 24 April 2014 (2014-04-24) claims 1, 50-54	1-38

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
9 July 2015	20/07/2015

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Bettio, Andrea

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/JP2015/002020

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012019024 A2	09-02-2012	NONE	
WO 2012064733 A2	18-05-2012	EP 2638066 A2	18-09-2013
		JP 2014505463 A	06-03-2014
		US 2013330350 A1	12-12-2013
		WO 2012064733 A2	18-05-2012
WO 2014061277 A1	24-04-2014	TW 201420118 A	01-06-2014
		WO 2014061277 A1	24-04-2014

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード（参考）
A61P 13/02		***(2006.01)***	A61P	11/00	
A61P 13/12		***(2006.01)***	A61P	13/02	
A61P 1/04		***(2006.01)***	A61P	13/12	
A61P 13/08		***(2006.01)***	A61P	1/04	
A61P 25/00		***(2006.01)***	A61P	13/08	
A61P 15/00		***(2006.01)***	A61P	25/00	
A61P 1/18		***(2006.01)***	A61P	15/00	
A61P 17/00		***(2006.01)***	A61P	1/18	
A61P 1/16		***(2006.01)***	A61P	17/00	
A61P 13/10		***(2006.01)***	A61P	1/16	
A61P 1/02		***(2006.01)***	A61P	13/10	
C12N 15/09		*(2006.01)*	A61P	1/02	
			C12N	15/00	A

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

(74)代理人 100119183
弁理士 松任谷 優子
(74)代理人 100149076
弁理士 梅田 慎介
(74)代理人 100173185
弁理士 森田 裕
(72)発明者 トーレ・ヘットマン
ドイツ連邦共和国、８２１５２・マルテインスリート、フラウンホーフアーシユトラーセ・２２、ウー３・フアルマ・ゲー・エム・ベー・ハー内
(72)発明者 ライマー・アブラハム
ドイツ連邦共和国、８２１５２・マルテインスリート、フラウンホーフアーシユトラーセ・２２、ウー３・フアルマ・ゲー・エム・ベー・ハー内
(72)発明者 ザビーネ・ブルーム
ドイツ連邦共和国、８２１５２・マルテインスリート、フラウンホーフアーシユトラーセ・２２、ウー３・フアルマ・ゲー・エム・ベー・ハー内
(72)発明者 上野 傑
東京都品川区広町１丁目２番５８号 第一三共株式会社内

Ｆターム(参考) 4C085 AA26 CC23 EE01
4C086 CB22 MA01 MA02 MA04 MA05 NA20 ZA01 ZA02 ZA59 ZA66
ZA67 ZA75 ZA81 ZA89 ZB26
4H045 AA11 AA20 AA30 BA72 CA40 DA75 DA76 EA20 FA74

【要約の続き】
：
$-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$又は$-L^1-L^2-L^P-$

で示される構造のリンカーを介して結合させたことを特徴とする抗体－薬物コンジュゲート（抗ＨＥＲ３抗体はL^1の末端において結合し、抗腫瘍性化合物は、１位のアミノ基の窒素原子を結合部位として、$-(CH_2)n^2-C(=O)-$部分のカルボニル基に又はL^PのＣ末端に結合する）を提供する。
【選択図】なし

OnCusp
Ex. 1002

(19)日本国特許庁（ＪＰ）　(12) **公開特許公報（Ａ）**　(11)特許出願公開番号

特開平5－59061

(43)公開日　平成５年(1993)３月９日

(51)Int.Cl.[5]	識別記号	庁内整理番号	ＦＩ	技術表示箇所
Ｃ０７Ｄ 491/22		7019－4C		
495/22		7329－4C		
// Ａ６１Ｋ 31/47	ＡＤＵ	7252－4C		

審査請求　未請求　請求項の数３（全 41 頁）

(21)出願番号　特願平3－320688

(22)出願日　平成３年(1991)12月４日

(31)優先権主張番号　特願平3－15812

(32)優先日　平３(1991)１月16日

(33)優先権主張国　日本（ＪＰ）

(71)出願人　000002831
第一製薬株式会社
東京都中央区日本橋３丁目14番10号

(71)出願人　000006884
株式会社ヤクルト本社
東京都港区東新橋１丁目１番19号

(72)発明者　寺沢　弘文
東京都江戸川区北葛西１丁目16番13号　第一製薬中央研究所内

(72)発明者　江島　明男
東京都江戸川区北葛西１丁目16番13号　第一製薬中央研究所内

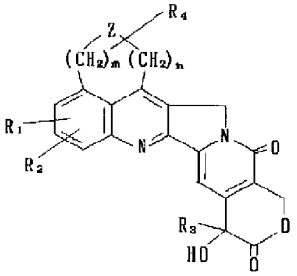
(74)代理人　弁理士　有賀　三幸　（外２名）

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　六環性化合物

(57)【要約】　（修正有）

【構成】　下記式（１）



（１）

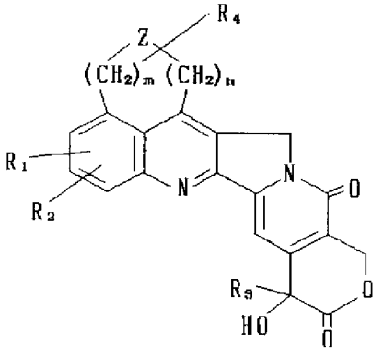
〔式中、R_1 及びR_2 は水素原子、ヒドロキシル基、ハロゲン原子など、R_3 は炭素数１～６のアルキル基、R_4 は水素原子、保護基を有することもあるアミノ基など、Ｚは酸素原子、イオウ原子、CR_5R_6 又はＮR_7、R_5 及びR_6 は水素原子および炭素数１～６のアルキル基、R_7 は水素原子、炭素数１～６のアルキル基など、ｍ及びｎは０、１又は２を示す〕で表される六環性カンプトテシン誘導体及びその製造方法。

【効果】　この化合物は、抗腫瘍活性に優れ、安全性が高く、水溶性であり、抗腫瘍剤として有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項１】　次の一般式（１）で表される化合物及びその塩。

【化１】



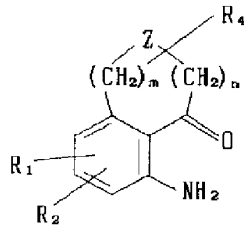
（１）

〔式中、R_1及びR_2は、それぞれ水素原子；ヒドロキシル基；ヒドロキシル基、ハロゲン原子、ニトロ基もしくはシアノ基を有することもある炭素数１～６のアルキル基；炭素数１～６のアルケニル基；炭素数１～６のアルキニル基；炭素数１～６のアルコキシル基；炭素数１～６のアミノアルコキシル基；ハロゲン原子；ニトロ基；シアノ基；メルカプト基；アルキルチオ基；保護基を有することもあるアミノ基；アミノ部分に保護基もしくは炭素数１～６のアルキル基を有することもある炭素数１～６のアミノアルキル基；アミノ部分に保護基もしくは炭素数１～６のアルキル基を有することもある炭素数１～６のアミノアルキルアミノ基；炭素数１～６のアルキル基、炭素数１～６のアルコキシル基、アミノ基、ハロゲン原子、ニトロ基もしくはシアノ基を有することもある複素環を有する炭素数１～６のアルキル基；炭素数１～６のアルキル基、炭素数１～６のアルコキシル基、アミノ基、ハロゲン原子、ニトロ基もしくはシアノ基を有することもある複素環を有するカルボニル基；炭素数１～６のアルキル基、炭素数１～６のアルコキシル基、保護基を有することもあるアミノ基、ハロゲン原子、ニトロ基、シアノ基もしくは保護基を有することもある複素環を有する炭素数１～６のアルキルアミノ基；複素環の窒素原子もしくはアミノ部分に保護基もしくは炭素数１～６のアルキル基を有することもあるアミノ複素環基；複素環の窒素原子もしくはアミノ部分に保護基もしくは炭素数１～６のアルキル基を有することもある複素環アミノ基；又は保護基もしくは炭素数１～６のアルキル基を有することもあるカルバモイル基を示し、R_3は、炭素数１～６のアルキル基を示し、R_4は、水素原子；保護基を有することもあるアミノ基；保護基を有することもある炭素数１～６のアルキルアミノ基；保護基を有することもある炭素数１～６のアミノアルキル基；保護基を有することもある炭素数１～６のアルキルアミノアルキル基；スルホン酸基；又はカルボキシル基を示し、Ｚは、酸素原子；イオウ原子；CR_5R_6（R_5、R_6はそれぞれ水素原子又は炭素数１～６のアルキル基を意味する）；又はNR_7（R_7は水素原子；炭素数１～６のアルキル基；保護基を有することもある炭素数１～６のアミノアルキル基；保護基を有することもある炭素数１～６のアルキルアミノアルキル基；又はアミノ基の保護基を意味する）を示し、ｍ及びｎはそれぞれ０、１又は２を意味する。〕

【請求項２】　一般式（１）において、Ｆ環の置換基の立体配置がＳ型である特許請求の範囲第１項の化合物。

【請求項３】　次の一般式（２）

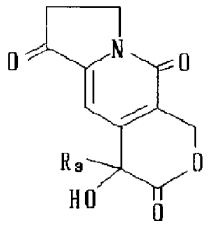
【化２】



（２）

で表されるアミノケトン化合物と次の一般式（３）

【化３】



（３）

で表されるピラノインドリジン化合物を、酸又は塩基の存在下に縮合閉環反応せしめることを特徴とする請求項１記載の化合物の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【産業上の利用分野】本発明は、抗腫瘍作用を有する新規化合物及びその製造法に関する。

【０００２】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】カンプトテカ・アクミナタ（Camptotheca acuminata）の樹

皮、根、果実、葉などから単離されたカンプトテシンは、五環性のアルカロイドであり、核酸合成を阻害することによって抗腫瘍活性を示すことが知られている。しかしながら、米国で実施された臨床試験の結果、毒性の面で問題があり、医薬品としての開発は中止されている。その後、毒性の軽減や活性の増強を目的としたカンプトテシン誘導体の研究が世界的に進められているが、いまだ医薬品として実用化されているものはない。

【０００３】ところで、カンプトテシンは水に難溶なため、医薬として投与する上で問題がある。カンプトテシンを水溶性化する一つの方法として、ラクトン環を開裂してカルボン酸のナトリウム塩とする方法が知られているが、このものは抗腫瘍活性が数分の一に減弱するという欠点を有しており、ラクトン環を開裂することなしに水溶化できるカンプトテシン誘導体が望まれている。

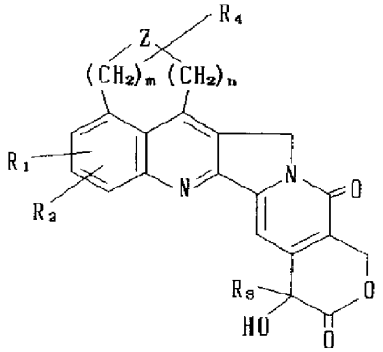
【０００４】

【課題を解決するための手段】かかる実情において本発明者らは、作用が優れ、安全性が高く、しかも医薬として投与するうえで望ましい物性を持つカンプトテシン誘導体を得べく種々研究を行った結果、カンプトテシンに水溶性基を有する環を一つ付加した６環性化合物が、カンプトテシンを凌駕する特性を示すことを見いだし、本発明を完成した。

【０００５】すなわち本発明は、次の一般式（１）で表される化合物及びその塩並びにその製造方法を提供するものである。

【０００６】

【化４】



（１）

【０００７】〔式中、R_1及びR_2は、それぞれ水素原子；ヒドロキシル基；ヒドロキシル基、ハロゲン原子、ニトロ基もしくはシアノ基を有することもある炭素数１～６のアルキル基；炭素数１～６のアルケニル基；炭素数１～６のアルキニル基；炭素数１～６のアルコキシル基；炭素数１～６のアミノアルコキシル基；ハロゲン原子；ニトロ基；シアノ基；メルカプト基；アルキルチオ基；保護基を有することもあるアミノ基；アミノ部分に保護基もしくは炭素数１～６のアルキル基を有することもある炭素数１～６のアミノアルキル基；アミノ部分に保護基もしくは炭素数１～６のアルキル基を有することもある炭素数１～６のアミノアルキルアミノ基；炭素数１～６のアルキル基、炭素数１～６のアルコキシル基、アミノ基、ハロゲン原子、ニトロ基もしくはシアノ基を有することもある複素環を有する炭素数１～６のアルキル基；炭素数１～６のアルキル基、炭素数１～６のアルコキシル基、アミノ基、ハロゲン原子、ニトロ基もしくはシアノ基を有することもある複素環を有するカルボニル基；炭素数１～６のアルキル基、炭素数１～６のアルコキシル基、保護基を有することもあるアミノ基、ハロゲン原子、ニトロ基、シアノ基もしくは保護基を有することもある複素環を有する炭素数１～６のアルキルアミノ基；複素環の窒素原子もしくはアミノ部分に保護基もしくは炭素数１～６のアルキル基を有することもあるアミノ複素環基；複素環の窒素原子もしくはアミノ部分に保護基もしくは炭素数１～６のアルキル基を有することもある複素環アミノ基；又は保護基もしくは炭素数１～６のアルキル基を有することもあるカルバモイル基を示し、R_3は、炭素数１～６のアルキル基を示し、R_4は、水素原子；保護基を有することもあるアミノ基；保護基を有することもある炭素数１～６のアルキルアミノ基；保護基を有することもある炭素数１～６のアミノアルキル基；保護基を有することもある炭素数１～６のアルキルアミノアルキル基；スルホン酸基；又はカルボキシル基を示し、Ｚは、酸素原子；イオウ原子；CR_5R_6（R_5、R_6はそれぞれ水素原子又は炭素数１～６のアルキル基を意味する）；又はNR_7（R_7は水素原子；炭素数１～６のアルキル基；保護基を有することもある炭素数１～６のアミノアルキル基；保護基を有することもある炭素数１～６のアルキルアミノアルキル基；又はアミノ基の保護基を意味する）を示し、ｍ及びｎはそれぞれ０、１又は２を意味する。〕

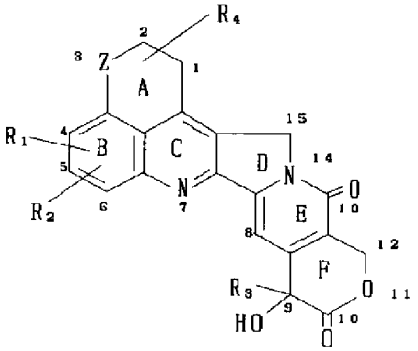
【０００８】上記一般式（１）において、R_1又はR_2の好ましいものとしては、メチル基、エチル基、ヒドロキシメチル基、ヒドロキシル基、メトキシル基、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ニトロ基、アミノ基、シアノ基、アミノメチル基、ジメチルヒドラジノ基、モルホリン-1-イル基、ピペラジン-1-イル基等が挙げられる。R_3の好ましいものとしては、エチル基等が挙げられる。R_4の好ましいものとしては、アミノ基、又は炭素数１

～６のアルキルアミノ基、アミノアルキル基もしくはアルキルアミノアルキル基が、特にメチルアミノ基、ジメチルアミノ基、アミノメチル基、メチルアミノ基、ジメチルアミノ基、アミノエチル基、メチルアミノエチル基、ジメチルアミノエチル基等が挙げられる。Ｚの好ましいものとしては、メチレン、酸素原子、イオウ原子、イミノ、アルキルイミノ等が挙げられる。アミノ基の保護基の好ましいものとしては、ホルミル基、アセチル基、トリチル基、第三級ブトキシカルボニル基、ベンジル基、p-メトキシベンジルオキシカルボニル基、フタロイル基、トリフルオロアセチル基等が挙げられる。複素環基の好ましいものとしては、アゼチジン、ピロリジン、ピペリジン、イミダゾール、チアゾール、オキサゾール、ピリジン等から導かれる基が挙げられる。

【０００９】また、本発明化合物(１)のうち、Ａ環が６員環である化合物(１A)が特に好ましい。

【００１０】

【化５】



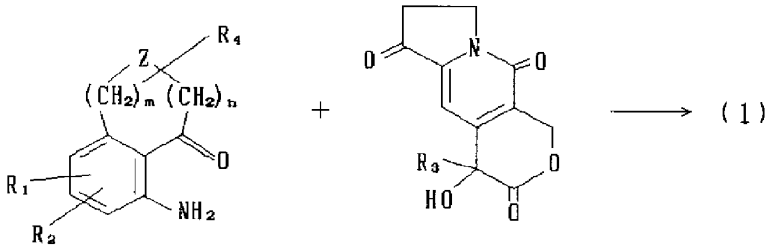
（ＩＡ）

【００１１】更に、本発明化合物(１)のうち、９位の不斉炭素原子に関する立体配置（Ｆ環の置換基）がＳ型である化合物が、作用の点から好ましい。

【００１２】本発明の化合物は、次の反応式に例示する方法によって製造することができる。

【００１３】

【化６】



（２）　　（３）

【００１４】すなわち、アミノケトン化合物(２)とピラノインドリジン化合物(３)をフリードレンダー反応によって縮合させることにより、化合物(１)が得られる。

【００１５】アミノケトン化合物(２)は、公知化合物であるか、又は公知方法に準じて容易に調製される化合物である。化合物(２)と(３)の縮合閉環反応の条件は、酸又は塩基の存在下で常温ないし加熱する条件から適宜選択するのが適当である。使用できる溶媒としては、反応に対して不活性ならば特に限定されないが、例えば、ベンゼン、トルエン、キシレン等の芳香族炭化水素；ジクロロメタン、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン等のハロゲン化炭化水素；ジエチルエーテル、ジイソプロピルエーテル、テトラヒドロフラン、ジメチルセロソルブ、ジエチルセロソルブ、ダイグライム等のエーテル類；メタノール、エタノール、プロパノール、第三級ブタノール等の低級アルコール類；アセトアミド、ジメチルアセトアミド、N,N-ジメチルホルムアミド等のアミド類；酢酸等を挙げることができるが、特にベンゼン、トルエン、酢酸等が好ましい。

【００１６】使用できる酸としては、無機酸又は有機酸のいずれでもよい。無機酸としては、塩酸、硫酸等が挙げられる。有機酸としては、メタンスルホン酸、トリフロロメタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、ピリジンパラトルエンスルホネート等のスルホン酸類；酢酸等のカルボン酸類等が挙げられるが、特にp-トルエンスルホン酸、ピリジンパラトルエンスルホネート、酢酸等が好ましい。ここで、酢酸を使用する場合は、溶媒を兼ねさせることもできる。

【００１７】使用できる塩基としては、無機塩基又は有機塩基のいずれでもよい。無機塩基としては、水酸化リチウム、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸リチウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸水素カリウム、水素化ナトリウム等のアルカリ金属の水酸化物、炭酸塩、炭酸水素塩、水素化物等が

挙げられる。有機塩基としては、ナトリウムメトキシド、ナトリウムエトキシド、カリウム第三級ブトキシド等のアルカリ金属アルコキシド類；トリエチルアミン、N,N-ジイソプロピルエチルアミン等の三級アルキルアミン類；N,N-ジメチルアニリン、N,N-ジエチルアニリン、N,N-ジメチルアミノピリジン等の芳香族三級アミン類；ピリジン、1,8-ジアザビシクロウンデセン等を例示することができるが、特に炭酸カリウム、トリエチルアミン等が好ましい。

【００１８】また、原料化合物(３)の中には、塩基に対して不安定な物もあり、そのような場合には十分に反応条件の設定に注意するのが好ましく、例えば氷冷等の比較的低温で反応を行う、反応時間を短縮する、酸性条件下で反応を行う等の検討をすべきである。反応温度は、20～150℃の範囲、特に80～120℃の範囲とするのが好ましい。しかしながら、上記のように原料の性質によっては氷冷下の温度が好ましいこともある。反応時間は１～48時間の範囲でよく、通常は１～24時間で完結する。代表的な条件としては、例えばピリジンパラトルエンスルホネートの存在下、ベンゼン、トルエン又は酢酸中で加熱還流する方法を挙げることができる。

【００１９】なお、R_1、R_2、R_4又はそれらの有する置換基が、保護基を有するアミノ基の場合には、酸やアルカリによる加水分解又は還元反応によって保護基を除去することができる。アルコキシル基を有する化合物は、トルエン、ベンゼン等の不活性な溶媒中で塩化アルミニウム、臭化アルミニウム等で処理するか、臭化水素酸溶液中で加熱することによって、対応するヒドロキシ化合物に導くことができる。また、ニトロ基を有する化合物は、白金やパラジウムなどを用いて接触還元することにより、対応するアミノ化合物に導くことができる。更に、アミノ基を有する化合物は、酸性溶媒中で低温下、亜硝酸ナトリウム等で処理してジアゾ化し、得られたジアゾニウム塩溶液を加水分解することにより、対応するヒドロキシ化合物に導くことができる。また更に、アミノ基を有する化合物は、上記と同じ方法でジアゾニウム塩に導き、次いでザンドマイヤー反応を行うことにより、対応するハロゲン化合物に導くことができる。ザンドマイヤー反応は、一般に用いられている条件で、塩化第一銅や臭化第一銅等の試薬を用いて行えばよい。

【００２０】本発明化合物は、所望によりアルカリ金属、アルカリ土類金属の水酸化物等を用いてそれらの塩に変換し、あるいはアミノ基等を有する塩基性化合物の場合は、塩酸、硫酸、燐酸等の無機酸又はギ酸、酢酸、メタンスルホン酸等の有機酸の塩に変換して、生理学的に許容される塩とすることができる。

【００２１】

【作用及び発明の効果】次に実験例により、叙上のごとくして得られた本発明化合物の抗腫瘍効果を示す。

実験例

P388マウス白血病細胞を、2.5×10^3 cells/wellになるように96ウェル－マイクロプレートに播種し、24時間後に検体を添加した。その後、５％CO_2下、37℃で３日間培養し、薬剤接触終了４時間前にMTT〔3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide〕を添加した。0.04NのHClを含むイソプロピルアルコールを200μl/ml加え、540nmにて吸光度を測定し、IC_{50}値を求めた。この結果を表１に示す。

【００２２】

【表１】

	IC_{50}値 (ng/ml)
実施例２の化合物 (isomer A)	3.38
〃 (isomer B)	12.40
実施例４の化合物 (isomer A)	9.21
〃 (isomer B)	27.80
実施例７の化合物 (isomer A)	11.40
〃 (isomer B)	11.90

【００２３】本発明化合物(1)は、表１から明らかなように抗腫瘍活性に優れ、また安全性が高く、水溶性であり、抗腫瘍剤として有用である。

【００２４】

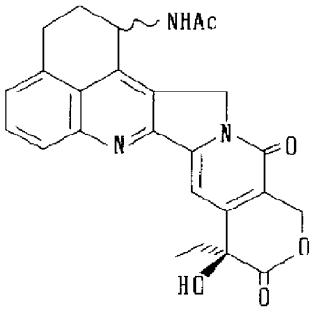
【実施例】次に実施例を挙げ、本発明を更に詳しく説明する。

【００２５】実施例１

(9S)-1-アセチルアミノ-9-エチル-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンの合成：

【００２６】

【化７】



【００２７】(1) 8-アセチルアミノ-1-テトラロン：1-アセチルアミノテトラリン10gをアセトン400ml及び15%硫酸マグネシウム水溶液40mlの混合溶媒に溶解した後、０℃に保って過マンガン酸カリウム42gを加えさらに同温度で20分間撹拌した。溶媒を濃縮して得られた残渣に水800mlを加え析出物をクロロホルムで抽出した。抽出液を飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルムで展開し目的物を含む画分を濃縮することにより、標記化合物5.46gを得た。

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：2.08-2.14(2H,m),2.23(3H,s)，2.70(2H,t,J=6.8Hz),2.97(2H,t,J=6.8Hz)，6.93(1H,d,J=6.8Hz),7.41(1H,t,J=8.3Hz)，8.59(1H,d,J=8.3Hz)

【００２８】(2) 8-アセチルアミノ-2-ハイドロキシイミノ-1-テトラロン：カリウム第三級ブトキシド316mgをテトラヒドロフラン（以下THFと略す）18mlに懸濁後窒素気流下０℃に冷却して得られた反応液に、(1)で得られた化合物500mgをTHF２mlに溶解した溶液を少量ずつ加えた。同温で10分間撹拌後、亜硝酸ブチル0.35mlを加え、50℃で１時間加熱撹拌した。反応液にジエチルエーテルを加えた後、析出物を濾取して得られる粉末を10%塩酸水溶液に懸濁させ、酢酸エチルで抽出した。抽出液を飽和食塩水で洗浄し硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、酢酸エチル－ヘキサン（１：１）の混合溶媒で展開し目的物を含む画分を濃縮することにより、標記化合物320mgを得た。

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}：3440，1698，1678，1608，1580，1518

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：2.26(3H,s)，3.08(4H,s)，6.98(1H,d,J=7.4Hz),7.53(1H,t,J=7.7Hz)，8.64(1H,d,J=8.5Hz)

ＭＡＳＳ m/z：232(M^+)

【００２９】(3) 2,8-ジアセチルアミノ-1-テトラロン：(2)で得られた化合物300mgを酢酸10ml及び無水酢酸10mlの混合溶媒に溶解した溶液に、室温下亜鉛末１gを加え、同温度で40分間撹拌した。不溶物を沪過により除き、沪液を濃縮して得られた残渣を酢酸エチル及びヘキサンを用いて再結晶することにより、標記化合物263mgを得た。

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}：3280，1660，1596，1516

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：1.6-2.0(1H,m)，2.11(3H,s)，2.23(3H,s),2.6-3.0(1H,m)，3.1-3.4(2H,m)，4.6-4.8(1H,m),6.93(1H,d,J=6.8Hz)，7.49(1H,t,J=8.3Hz),8.59(1H,d,J=8.3Hz)

ＭＡＳＳ m/z：260(M^+)

【００３０】(4) 2-アセチルアミノ-8-アミノ-1-テトラロン：(3)で得られた化合物245mgを３Ｎ塩酸水溶液40mlに溶解し、60℃で１時間加熱撹拌した。反応液を０℃に冷却後、炭酸ナトリウムで中和しクロロホルムで抽出した。抽出液を硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を濃縮して得られる残渣を酢酸エチル及びヘキサンを用いて再結晶することにより、標記化合物150mgを得た。

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}：3424，3304，1668，1632，1558，1508

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：1.6-2.0(1H,m)，2.09(3H,s)，2.6-3.2(3H,m),4.41-4.67(1H,m)，6.47-6.71(2H,m)，7.12-7.26(1H,m)

ＭＡＳＳ m/z：218(M^+)

【００３１】(5) (9S)-1-アセチルアミノ-9-エチル-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン：(4)で得られた化合物300mgをトルエン200mlに溶かした溶液に(S)-4-エチル-4-ヒドロキシ-7,8-ジヒドロ-1H-ピラノ[3,4-f]インドリジン-3,6,10(4H)-トリオン（以下トリオンと略す）361mgを加え、ディーンスタークの装置を用い10分間加熱還流後、ピリジニウムp-トルエンスルホネート（以下PPTSと略す）１mgを加え、更に24時間加熱還流した。放冷後、トルエンを濃縮して得られた残渣をクロロホルム－メタノール（10：１）の混液300mlに懸濁し、不溶物を沪過により除いた。沪液を濃縮して得られた残渣をメタノールを用いて粉末化することにより、標記化合物336mgを得た。

融点：240℃以上（分解）

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}：3452，1750，1660

ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.89(3H,t，J=7.2Hz)，1.83-1.92(2H,m),1.94(3H,d，J=4Hz)，2.09-2.17(2H,m),3.14-3.31(2H,m)，5.21(2H,d,J=5.6Hz),5.42(2H,d,J=5.6Hz),5.58-5.61(1H,d),6.50(1H,br s)，7.35(1H,d,J=2.4Hz),7.52(1H,d,J=7.2Hz)，7.79(1H,t,J=7.2Hz),8.02(1H,d,J=8.7Hz)，8.52(1H,t,J=9.5Hz)

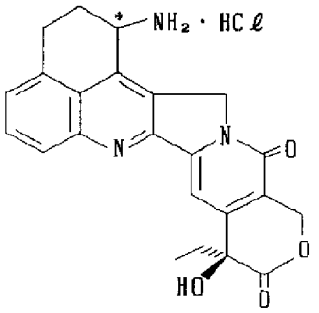
ＭＡＳＳ m/z：445(M^+)

【００３２】実施例２

(9S)-1-アミノ-9-エチル-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン・塩酸塩の合成：

【００３３】

【化８】



【００３４】実施例(1)で得られた化合物300mgを６Ｎ-塩酸水溶液100mlに加えて得られた反応液を４時間加熱還流した。放冷後、反応液を濃縮して得られた残渣に水100mlを加え、不溶物をFALCON7105(0.22μm)を用いて除き、沪液を濃縮して得られた残渣を逆層高速液体クロマトグラフィー〔CAPCELL PAK C18(資生堂製)；アセトニトリル：水：１N塩酸（20：80：２）で展開〕で精製し、２種のジアステレオアイソマーを分離した。最初に溶出する画分を濃縮して得られる残渣を、メタノール及びアセトニトリルを用いて再沈殿することにより、標記化合物（アイソマーＡ）74mgを得た。次いで２番目に溶出する画分を同様に操作することにより、標記化合物（アイソマーＢ）90mgを得た。なお、以下の実施例においても同様に、逆層高速液体クロマトグラフィーにおいて先に溶出するアイソマーをＡ、後に溶出するアイソマーをＢとする。

アイソマーＡ：

融点：　240℃以上（分解）

$[\alpha]_D^{20}$＝+178°（c=0.25,H_2O中）

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}：　3440，1738，1658

ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.90(3H,t,J=7.2Hz)，1.85-1.94(2H,m),2.17-2.23(1H,m)，3.20-3.23(1H,m),3.36-3.43(1H,m)，5.12(1H,br s),5.42-5.46(3H,m),5.94(1H,d,J=19Hz)，6.53(1H,s),7.38(1H,s)，7.61(1H,d,J=7.2Hz)，7.85(1H,t,J=7.2Hz)，8.09(1H,d,J=8.8Hz),8.77(3H,br)

ＭＡＳＳ m/z：　403(M^+)

$[\alpha]_D^{20}$＝-38°（c=0.25,H_2O中）

アイソマーＢ：

融点：　240℃以上（分解）

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}：　3444，1740，1658

ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.89(3H,t,J=7.2Hz)，1.84-1.93(2H,m),2.16-2.23(1H,m)，3.21-3.24(1H,m),3.38-3.45(1H,m)，5.13(1H,br s)，5.42-5.49(3H,m),5.98(1H,d,J=19Hz)，7.38(1H,s)，7.61(1H,d,J=7.2Hz),7.86(1H,t,J=7.2Hz),8.09(1H,d,J=8.8Hz),8.77(3H,br)

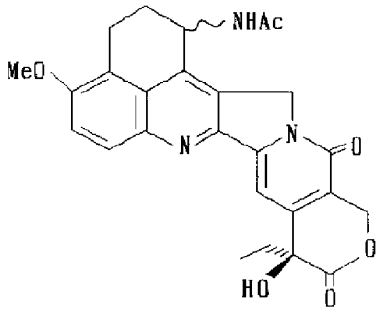
ＭＡＳＳ m/z：　403(M^+)

【００３５】実施例３

(9S)-1-アセチルアミノ-9-エチル-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メトキシ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンの合成：

【００３６】

【化９】



【００３７】(1) 2-ハイドロキシイミノ-5-メトキシ-8-ニトロ-1-テトラロン：実施例１-(2)において、8-アセチルアミノ-1-テトラロンの代わりに5-メトキシ-8-ニトロ-1-テトラロン1.5gを用い、実施例１-(2)の場合と同様に反応させ、後処理を行うことにより、標記化合物740mgを得た。

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}：　3428，3256，1696，1604，1580，1534

ＮＭＲ(DMSO-d6中)δ：2.95(4H,s)，3.94(3H,s)，7.32(1H,d,J=8.7Hz),7.78(1H,d,J=8.7Hz)

ＭＡＳＳ m/z：　251(M^+)

【００３８】(2) 2,8-ジアセチルアミノ-5-メトキシ-1-テトラロン：実施例１-(3)において、8-アセチルアミノ-2-ハドロキシイミノ-1-テトラロンの代わりに上記(1)で得られた化合物500mgを用い、実施例１-(3)と同様に反応させ、後処理を行うことにより、標記化合物225mgを得た。

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}：　3432，1696，1642，1532

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：1.6-2.0(1H,m)，2.11(3H,s)，2.21(3H,s),2.6-3.2(3H,m)，3.85(3H,s)，4.5-4.8(1H,m),7.09(1H,d,J=9.2Hz)，8.55(1H,d,J=9.2Hz)

ＭＡＳＳ m/z：　290(M^+)

【００３９】(3) 2-アセチルアミノ-8-アミノ-5-メトキシ-1-テトラロン：実施例１-(4)において、2,8-ジアセチルアミノ-1-テトラロンの代わりに上記(2)で得られた化合物200mgを用い、実施例１-(4)と同様に反応させ、後処理を行うことにより、標記化合物130mgを得た。

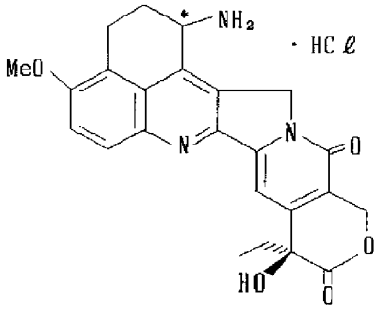
ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}：　3444，2940，1632，1564，1534

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：1.6-2.0(1H,m)，2.08(3H,s)，2.6-3.4(3H,m),3.77(3H,s)，4.52-4.61(1H,m)，6.52(1H,d,J=9.2Hz),6.98(1H,d,J=9.2Hz)

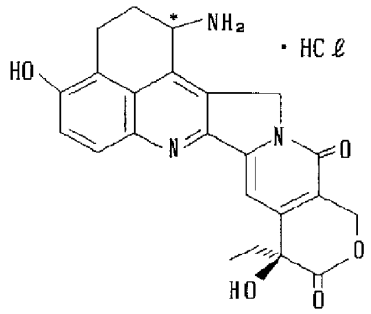
ＭＡＳＳ m/z：　248(M^+)

【００４０】(4) (9S)-1-アセチルアミノ-9-エチル-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メトキシ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-1

0,13(9H,15H)-ジオン：(3)で得られた化合物125mg及びトリオン133mgを、実施例１-(5)と同様に24時間反応させ、後処理を行うことにより、標記化合物207mgを得た。
融点：　240℃以上（分解）
ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}：　3448，1748，1660，1600
ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.88(3H,dt,J=3.2,7.2Hz)，1.84-1.89(2H,m),1.92(3H,d,J=4.8Hz)，2.06-2.07(2H,m),3.07-3.08(2H,m)，4.00(3H,s)，5.20(2H,d,J=4.8Hz),5.41(2H,d,J=4.8Hz)，5.52-5.54(1H,m),6.48(1H,d,J=1.6Hz)，7.28(1H,d,J=2.4Hz),7.77(1H,d,J=9.5Hz)，8.08(1H,d,J=9.5Hz),8.44(1H,t,J=9.5Hz)
ＭＡＳＳ　m/z：　475(M^+)
【００４１】実施例４
(9S)-1-アミノ-9-エチル-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メトキシ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン・塩酸塩の合成：
【００４２】
【化１０】

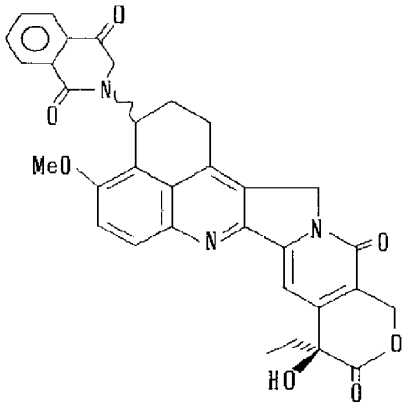


【００４３】実施例３-(4)で得られた化合物102mgを実施例２と同様に６時間反応させ、後処理を行うことにより、標記化合物をアイソマーＡ（50mg）及びアイソマーＢ（44mg）としてそれぞれ得た。
アイソマーＡ：
融点：　240℃以上（分解）
$[\alpha]_D^{20}$＝+78°（c=0.25,H_2O中）
ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}：　3448，2936，1740，1658，1598
ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.90(3H,t,J=7.2Hz)，1.84-1.93(2H,m),2.07-2.12(1H,m)，2.94-3.00(1H,m),3.25-3.33(1H,m)，4.03(3H,s)，5.07(1H,br),5.40-5.44(3H,m)，5.91(1H,d,J=19Hz)，7.32(1H,s),7.83(1H,d,J=9.5Hz)，8.15(1H,d,J=8.8Hz),8.75(3H,br)
ＭＡＳＳ　m/z：　433(M^+)
アイソマーＢ：
融点：　240℃以上（分解）
$[\alpha]_D^{20}$＝-34°（c=0.25,H_2O中）
ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}：　3448，1744，1654
ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.89(3H,t,J=7.2Hz)，1.84-1.91(2H,m),2.06-2.12(1H,m)，2.95-3.01(1H,m)，4.03(3H,s),5.07(1H,br)，5.41-5.44(3H,br s),5.93(1H,d,J=19Hz)，7.32(1H,s)，7.84(1H,d,J=9.5Hz),8.16(1H,d,J=8.8Hz)，8.78(3H,br)
ＭＡＳＳ　m/z：　433(M^+)
【００４４】実施例５
(9S)-1-アミノ-9-エチル-2,3-ジヒドロ-4,9-ジハイドロキシ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン・塩酸塩の合成：
【００４５】
【化１１】

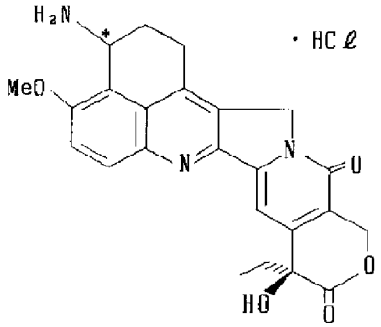


【００４６】実施例３-(4)で得られた化合物90mgを、47%臭化水素酸水溶液30mlに加え、３時間加熱還流後、減圧下に溶媒を濃縮して得られた残渣に水30mlを加え、不溶物をFALCON7105(0.22μm)を用いて除去した。沪液を濃縮して得られた残渣を逆層高速液体クロマトグラフィー〔CAPCELL PAK C18（資生堂製）；アセトニトリル：水：１N塩酸（20：80：２）で展開〕で精製することにより、標記化合物をアイソマーＡ（34mg）及びアイソマーＢ（35mg）としてそれぞれ得た。
アイソマーＡ：
融点：　240℃以上（分解）
$[\alpha]_D^{20}$＝+135°（c=0.2,H_2O中）
ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.89(3H,t,J=7.2Hz)，1.83-1.92(2H,m),2.04-2.09(1H,m)，2.88-2.95(1H,m),3.20-3.24(1H,m)，5.04(1H,br)，5.43(3H,m),5.89(1H,d,J=19Hz)，7.29(1H,s)，7.61(1H,d,J=8.7Hz),7.99(1H,d,J=9.5Hz)，8.71(3H,br)，10.5(1H,br)
ＭＡＳＳ　m/z：　419(M^+)
アイソマーＢ：
融点：　240℃以上（分解）
$[\alpha]_D^{20}$＝-6.0°（c=0.2,H_2O中）
ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.89(3H,t,J=7.2Hz)，1.84-1.91(2H,m),2.07-2.09(1H,m)，2.88-2.95(1H,m),3.21-3.24(1H,m)，5.05(1H,br)，5.39-5.47(3H,m),5.88(1H,d,J=19Hz)，7.29(1H,s)，7.61(1H,d,J=8.7Hz),7.98(1H,d,J=8.7Hz)，8.68(3H,br)，10.5(1H,br)
ＭＡＳＳ　m/z：　419(M^+)

【００４７】実施例６
(9S)-9-エチル-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メトキシ-3-(1,3-ジオキソイソインドリン-2-イル)-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンの合成：
【００４８】
【化１２】



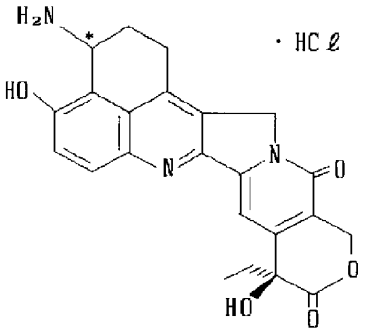
【００４９】(1) 4-ヒドロキシ-5-メトキシ-8-ニトロ-1-テトラロン：
5-メトキシ-8-ニトロ-1-テトラロン（特開平1-279891号公報）2.0g及びN-ブロモコハク酸イミド2.05gを50mlの四塩化炭素に加えた後、触媒量の過酸化ベンゾイルを加え、４時間加熱還流した。反応混合物を室温まで冷却した後、クロロホルム50mlを加え、10%水酸化ナトリウム、水及び飽和食塩水で順次洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を濃縮して得られた残渣に、テトラヒドロフラン５ml、エタノール５ml、水８ml及び炭酸カルシウム250mgを加え、16時間加熱還流後、溶媒を濃縮した。残渣に水50mlを加えクロロホルムで抽出し、抽出液を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し溶媒を濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルム－酢酸エチル（４：１）の混合溶媒で展開し、目的物を含む画分を濃縮することにより、標記化合物1.49gを淡黄色粉末として得た。
NMR($CDCl_3$中) δ：2.2-2.4(2H,m), 2.5-2.7(2H,m), 3.0-3.2(1H,m),4.00(3H,s), 5.29(1H,s), 7.09(1H,d,J=8.8Hz),7.52(1H,d,J=8.8Hz)
【００５０】(2) 8-アミノ-5-メトキシ-4-(1,3-ジオキソイソインドリン-2-イル)-1-テトラロン：(1)で得られた化合物424mg、フタルイミド288mg、トリフェニルホスフィン517mgを20mlの乾燥THFに加え、氷浴中で冷却しながら、0.34mlのアゾジカルボン酸ジエチル（以下DEADと略す）のTHF溶液を徐々に加えた。同温で30分間攪拌後、水30mlを加えクロロホルムで抽出した。クロロホルム層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し溶媒を留去した。残渣にジオキサン50ml及びエタノール50mlを加え、10%パラジウム－炭素280mgを加えて接触水素添加を行った後、触媒を濾去し、濾液を濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルム－酢酸エチル（９：１）の混合溶媒で展開し、目的物を含む画分を濃縮することにより、標記化合物306mgを得た。
NMR($CDCl_3$中) δ：2.1-3.2(4H,m), 3.36(3H,s), 5.70(1H,m),6.56(1H,d,J=9Hz), 6.86(1H,dJ=9Hz), 7.6-7.8(4H,m)
【００５１】(3) (9S)-9-エチル-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メトキシ-3-(1,3-ジオキソイソインドリン-2-イル)-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン：トルエン30mlに(2)で得られた化合物306mg及びトリオン220mgを加え、触媒量のPPTSを添加した後、デイーンスターク装置を用いて６時間加熱還流した。反応液を冷却し、析出物を濾取することにより、標記化合物390mgを得た。
NMR($CDCl_3$中) δ：1.04(3H,t,J=7.6Hz), 1.8-2.0(2H,m,), 2.3-2.4(1H,m),2.5-2.56(1H,m), 3.1-3.2(1H,m), 3.3-3.41(1H,m),3,87(3H,s), 5.25(2H,s), 5.31,5.75(2H,ABq,J=15.9Hz),6.05(1H,m), 7.52(1H,d,J=9.5Hz), 7.6-7.8(5H,m),8.28(1H,d,J=9.5Hz)
【００５２】実施例７
(9S)-3-アミノ-9-エチル-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メトキシ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン・塩酸塩の合成：
【００５３】
【化１３】



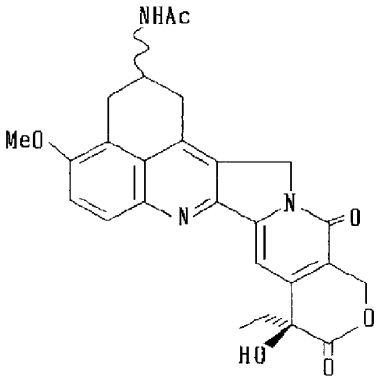
【００５４】実施例６の(3)で得られた化合物224mgをクロロホルム14mlに溶解し、メタノール10mlを加えた後、1.2mlのヒドラジン１水和物を加え２時間撹拌した。溶媒を濃縮後、残渣に５Ｎ塩酸７mlを加え１時間加熱還流した。冷後、水10mlを加え不溶物を濾過により除き、濾液を濃縮して得られた残渣を、高速液体クロマトグラフィー〔CAPCELL PAK C18；アセトニトリル－水－１Ｎ塩酸（20：80：１）で展開〕で精製し、標記化合物をアイソマーＡ（94mg）及びアイソマーＢ（80mg）として得た。

OnCusp
Ex. 1002

アイソマーＡ：
融点： 215℃以上（分解）
ＮＭＲ(CD_3OD中)δ：1.00(3H,t,J=7.2Hz)，1.95(2H,m)，2.4-2.5(1H,m)，2.5-2.6(1H,m)，3.2-3.4(2H,m)，4.12(3H,s)，5.17(1H,m)，5.23，5.32(2H,ABq,J=19.1Hz)，5.37，5.55(2H,ABq,J=16.7Hz)，7.62(1H,s)，7.85(1H,d,J=9.5Hz)，8.28(1H,d,J=9.5Hz)
アイソマーＢ：
融点： 180℃以上（分解）
ＮＭＲ(CD_3OD中)δ：1.01(3H,t,J=7.1Hz)，1.97(2H,m)，2.3-2.45(1H,m)，2.5-2.6(1H,m)，3.2-3.4(2H,m)，4.16(3H,s)，5.18(1H,m)，5.25，5.38(2H,ABq,J=19.1Hz)，5.39，5.57(2H,ABq,J=16.7Hz)，7.67(1H,s)，7.89(1H,d,J=9.5Hz)，8.31(1H,d,J=9.5Hz)
【００５５】実施例８
(9S)-3-アミノ-9-エチル-2,3-ジヒドロ-4,9-ジヒドロキシ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン・塩酸塩の合成：
【００５６】
【化１４】



【００５７】実施例７で得たアイソマーＡ94mgを酢酸25mlに溶かし、47%臭化水素酸20mlを加えた後、30時間加熱還流した。溶媒を溜去した後、水10mlを加え、不溶物を濾去した。濾液を高速液体クロマトグラフィー〔CAPCELL PAK C18；アセトニトリル－水－１Ｎ塩酸（20：80：１）で展開〕で精製し、目的物を含む画分を濃縮後、残渣をメタノール－エタノール－酢酸エチルを用いて再沈澱することにより、標記化合物をアイソマーＡ（17mg）として得、これと同様の操作で、実施例７のアイソマーＢ68mgから標記化合物をアイソマーＢ（11mg）として得た。
アイソマーＡ：
融点： 170℃以上（分解）
ＮＭＲ($DMSO-d_6$中)δ：0.89(3H,t,J=7.2Hz)，1.82(2H,m)，2.1-2.2(1H,m)，2.4-2.6(1H,m)，3.15-3.35(2H,m)，4.93(1H,m)，5.21，5.33(2H,ABq,J=19.1Hz)，5.41，5.45(2H,ABq,J=15.9Hz)，7.28(1H,s)，7.64(1H,d,J=9.5Hz)，8.20(1H,d,J=9.5Hz)，8.25-8.35(3H,m)
アイソマーＢ：
融点： 195℃以上（分解）
ＮＭＲ($DMSO-d_6$中)δ：0.89(3H,t,J=7.6Hz)，1.8-2.0(2H,m)，2.1-2.2(1H,m)，2.4-2.6(1H,m)，3.15-3.35(2H,m)，4.94(1H,m)，5.21，5.34(2H,ABq,J=19.1Hz)，5.43(2H,s)，7.28(1H,s)，7.65(1H,d,J=9.5Hz)，8.10(1H,d,J=9.5Hz)，8.25-8.35(3H,m)
【００５８】実施例９
(9S)-2-アセチルアミノ-9-エチル-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メトキシ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンの合成：
【００５９】
【化１５】



【００６０】(1) 2-アセチルアミノ-8-メトキシテトラリン：8-メトキシ-2-テトラロン〔J. Chem. Soc.，2636(1965)〕5.18gをメタノール100mlに溶解した溶液に、水素化シアノホウ素ナトリウム560mg及び酢酸アンモニウム4.86gを加え室温で89時間撹拌した。反応液を水冷し、濃塩酸でpHを１以下に調整後水500mlを加えエーテルで洗浄後、水層を水酸化カリウムでpH10以上に調整し、エーテルで抽出した。抽出液を硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を濃縮して得られた残渣を塩化メチレン50mlに溶解した後、ピリジン２ml及び無水酢酸2.4mlを加え室温にて１時間撹拌した。反応液を10%塩酸水溶液、飽和重曹水溶液、飽和食塩水の順で洗浄し硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を濃縮し残渣を酢酸エチル及びヘキサンを用いて再結晶することにより、標記化合物2.47gを得た。
ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：1.75-2.11(2H,m)，1.98(3H,s)，2.49-2.58(1H,m)，2.79-3.32(3H,m)，3.80(3H,s)，4.21-4.37(1H,m)，6.62-6.76(2H,m)，7.12(1H,t,J=7.9Hz)
【００６１】(2) 2-アセチルアミノ-8-メトキシ-5-ニトロテトラリン：無水酢酸20mlを０℃に冷却し、発煙硝酸1.75mlをゆっくり加えさらに濃硫酸１滴を加えた溶液に、(1)で得られた化合物2.2gを少量ずつ加え、20分間撹拌した。次いで25%水酸化ナトリウム水溶液40mlを反応液に加え30分間撹拌した。析出物を沪取し水で洗浄

後、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し溶媒を濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルム： メタノール＝80：１の混合溶媒で展開し目的物を含む画分を濃縮することにより、標記化合物770mgを得た。

融点： 207-210℃

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：1.6-2.2(2H,m)，2.01(3H,s)，2.3-2.6(1H,m),3.10-3.24(3H,m)，3.89(3H,s)，4.26(1H,m)，6.76(1H,d,J=9.1Hz)，7.96(1H,d,J=8.9Hz)

【００６２】(3) 2,5-ジアセチルアミノ-8-メトキシテトラリン：(2)で得られた化合物320mgを酢酸５mlと無水酢酸５mlの混合溶媒に溶解後、10%パラジウム炭素80mgを加え５時間接触水素添加を行う。触媒を沪過により除き、濾液を濃縮して得られた残渣をクロロホルムを用いて再結晶することにより、標記化合物190mgを得た。

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：1.6-2.2(2H,m)，1.96(3H,s)，2.16(3H,s),2.4-2.9(4H,m)，3.80(3H,s)，4.0-4.4(1H,m),6.68(1H,d,J=8.5Hz)，7.18(1H,d,J=8.5Hz)

【００６３】(4) 3,8-ジアセチルアミノ-5-メトキシ-1-テトラロン：(3)で得られた化合物190mgをアセトン16mlと15%硫酸マグネシウム水溶液４mlの混液に懸濁し、過マンガン酸カリウム543mgを加えた後、室温で1.5時間撹拌した。反応液に水150mlを加えクロロホルムで抽出し、抽出液を飽和食塩水で洗浄後硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を濃縮して得られた残渣を酢酸エチル及びヘキサンを用いて再結晶することにより、標記化合物124mgを得た。

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：1.96(3H,s)，2.21(3H,s)，2.6-3.4(4H,m)，3.84(3H,s),4.4-4.7(1H,m)，7.11(1H,d,J=9.2Hz),8.61(1H,d,J=9.2Hz)

【００６４】(5) 3-アセチルアミノ-8-アミノ-5-メトキシ-1-テトラロン：(4)で得られた化合物102mgを３Ｎ－塩酸水溶液20mlに加え、60℃で２時間加熱撹拌した。反応液を０℃に冷却し炭酸ナトリウムで中和した後、クロロホルムで抽出し、抽出液を硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルム－メタノール（40：１）で展開し、目的物を含む画分を濃縮することにより、標記化合物66mgを得た。

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：1.94(3H,s)，2.51-3.34(4H,m)，3.76(3H,s),4.06-4.75(1H,m)，6.55(1H,d,J=9.0Hz),7.00(1H,d,J=9.0Hz)

【００６５】(6) (9S)-2-アセチルアミノ-9-エチル-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メトキシ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン：(5)で得られた化合物126mg及びトリオン134mgを実施例１-(5)と同様に24時間反応させ、後処理することにより、標記化合物103mgを得た。

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}： 3392,1748,1660,1600

ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.89(3H,t,J=7.3Hz)，1.85(3H,s)，1.87-1.93(2H,m),2.67-2.81(1H,m)，3.02-3.09(1H,m)，3.97(3H,s),4.22(1H,br)，5.09-5.25(2H,m)，5.37-5.46(2H,m),6.47(1H,br s)，7.29(1H,s)，7.71(1H,d,J=9.3Hz),8.03(1H,d,J=9.3Hz)，8.13(1H,br)

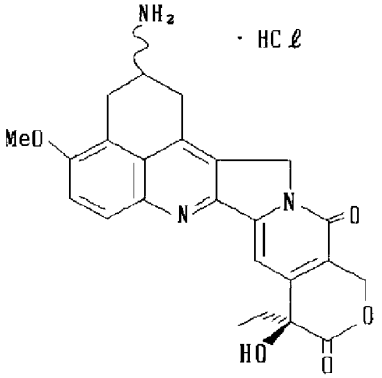
ＭＡＳＳ m/z： 475(M^+)

【００６６】実施例10

(9S)-2-アミノ-9-エチル-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メトキシ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン・塩酸塩の合成：

【００６７】

【化１６】



【００６８】実施例９で得られた化合物48mgを実施例２と同様に６時間反応させ、後処理することにより、標記化合物42mgを得た。

融点： 240℃以上（分解）

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}： 3440,1744,1658,1592

ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.89(3H,t,J=7.3Hz)，1.83-1.93(2H,m),2.95-3.02(1H,m)，3.26-3.33(1H,m)，3.76(1H,br),4.00(3H,s)，5.15-5.26(2H,m)，5.43(2H,s),7.30(1H,s)，7.77(1H,d,J=9.3Hz),8.09(1H,d,J=9.3Hz)，8.55(3H,br)

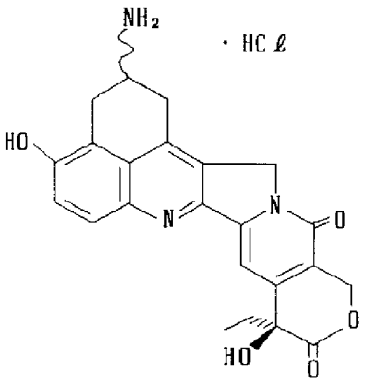
ＭＡＳＳ m/z： 433(M^+)

【００６９】実施例11

(9S)-2-アミノ-9-エチル-2,3-ジヒドロ-4,9-ジハイドロキシ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン・塩酸塩の合成：

【００７０】

【化１７】



【００７１】実施例９で得られた化合物46mgを実施例５と同様に反応させ、後処理することにより、標記化合物18mgを得た。

融点：　240℃以上（分解）

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}：　3420,1742,1658,1590

ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.89(3H,t,J=7.3Hz)，1.85-1.92(2H,m),2.91-2.98(1H,m)，3.24-3.31(1H,m)，3.75(1H,br),5.23(2H,d,J=6.4Hz)，5.42(2H,s)，7.27(1H,s),7.55(1H,d,J=9.3Hz)，7.93(1H,d,J=8.8Hz),8.48(3H,br s)，10.5(1H,br s)

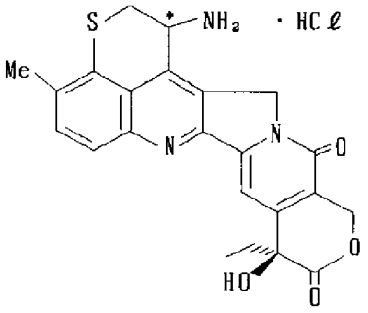
ＭＡＳＳ m/z：　419(M^+)

【００７２】実施例12

(9S)-1-アミノ-9-エチル-1,2-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-12H-チイノ[4,3,2-de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン・塩酸塩の合成：

【００７３】

【化１８】



【００７４】(1) 3,5-ジアセチルアミノ-8-メチル-4-チオクロマノン：153mgのカリウム-t-ブトキシドを含むTHF溶液３mlに、窒素気流下０℃で撹拌しながら、5-アセチルアミノ-8-メチル-4-チオクロマノン〔J. Heterocyclic Chem., 11, 515(1974)〕291mgを含むTHF溶液９mlを加え、５分間撹拌後、亜硝酸n-ブチル0.22mlを加え、室温で１時間撹拌した。反応液にエーテル20mlを加え、１時間撹拌した後、析出物を濾取し、エーテルでよく洗浄した。析出物を酢酸20mlと無水酢酸20mlの混液に溶かし、室温で撹拌しながら、亜鉛末約200mgを徐々に加え、更に0.5時間撹拌した。不溶物を濾去後、溶媒を溜去し、クロロホルム20mlを加え、水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水の順で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を溜去後、残さをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン－酢酸エチル（４：１）の混合溶媒で展開して、目的物を含む画分を濃縮することにより、標記化合物109mgを得た。

ＮＭＲ(CDCl$_3$中)δ：2.12(3H,s)，2.23(3H,s)，2.26(3H,s),3.06(1H,dd,J=12.5Hz,13.7Hz),3.60(1H,dd,J=4.4Hz,12.5Hz),4.94(1H,ddd,J=4.4Hz,4.9Hz,13.7Hz)，6.82(1H,m),7.29(1H,d,J=8.8Hz)，8.39(1H,d,J=8.8Hz)

【００７５】(2)3-アセチルアミノ-5-アミノ-8-メチル-4-チオクロマノン：(1)で得られた化合物109mgを６Ｎ塩酸10mlに加え、90℃で20分間撹拌した。冷却後、水酸化ナトリウム水溶液を加えアルカリ性とした後、クロロホルムで抽出し、クロロホルム層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルム－酢酸エチル（４：１）の混合溶媒で展開して、目的物を含む画分を濃縮することにより、標記化合物51mgを得た。

ＮＭＲ(CDCl$_3$中)δ：2.09(3H,s)，2.16(3H,s)，2.98(1H,m)，3.60(1H,m),4.6-5.0(1H,m)，6.33(1H,d,J=9Hz)，702(1H,d,J=9Hz)

【００７６】(3) (9S)-1-アミノ-9-エチル-1,2-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-12H-チイノ[4,3,2-de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン・塩酸塩：(2)で得られた化合物45mg及びトリオン47mgをトルエン10mlに加え、触媒量のPPTSを添加後、デイーンスターク装置を用いて15時間加熱還流した。反応液を冷却し、溶媒を溜去後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルム－メタノール（98：２）で展開して、目的物を含む画分を濃縮して得られた残渣に、６Ｎ塩酸10mlを加え４時間撹拌した。溶媒を濃縮後、水10mlを加え不溶物を濾過により除き、濾液を高速液体クロマトグラフィー〔CAPCELL PAK C18；アセトニトリル－水－１Ｎ塩酸（20：80：１）で展開〕で精製し、標記化合物をアイソマーＡ（37mg）及びアイソマーＢ（36mg）として得た。

アイソマーＡ：

融点：　210℃以上（分解）

ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.89(3H,t,J=7.3Hz)，1.8-1.95(2H,m),3.5-3.65(2H,m)，5.38(1H,m),5.43,5.89(2H,ABq,J=19.5Hz)，5.44(2H,s),6.53(1H,s)，7.34(1H,s)，7.78(1H,d,J=8.3Hz),7.96(1H,d,J=8.3Hz)，8.88(3H,m)

アイソマーＢ：

融点：　224℃以上（分解）

ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.89(3H,t,J=7.3Hz)，1.8-1.95(2H,m),3.54(1H,dd,J=14.2Hz,1.5Hz),3.63(1H,dd,J=14.2Hz,3.4Hz)，5.39(1H,m),5.45(2H,m)，5.47,5.92(2H,AB

OnCusp
Ex. 1002

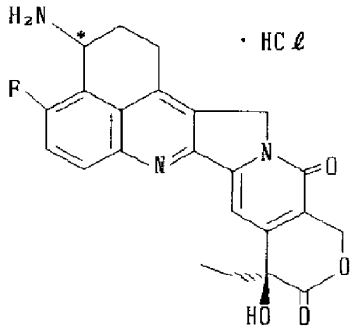
q,J=19.5Hz),6.54(1H,s), 7.36(1H,s), 7.79(1H,d,J=8.8Hz),7.97(1H,d,J=8.8Hz), 8.94(3H,m)

【００７７】実施例13

(9S)-3-アミノ-4-フルオロ-9-エチル-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン・塩酸塩の合成：

【００７８】

【化１９】



【００７９】(1) 2-フルオロシンナミックアシッド　メチルエステル：2-フルオロ桂皮酸15gをメタノール100ml中に懸濁させ、０℃に保って塩化チオニル1.7gをゆっくりと加えた。滴下終了後０℃で30分間撹拌した後、室温で更に１時間撹拌した。溶媒を濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルムで展開し目的物を含む画分を濃縮することにより、標記化合物17.8gを得た。

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：3.82(3H,s), 6.54(1H,d,J=16.2Hz), 6.97-7.63(4H,m),7.82(1H,d,16.2Hz)

【００８０】(2) 3-(2-フルオロフェニル)プロパノイックアシッド　メチルエステル：(1)で得られた化合物17.8gをメタノール200mlに溶かし、６gの10%パラジウム－炭素を触媒として接触水素添加を行った。触媒を濾去し溶媒を留去することにより、標記化合物14.7gを得た。

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：2.53-2.72(2H,m),2.8-3.1(2H,m), 3.67(3H,s),6.97-7.28(4H,m)

【００８１】(3) 3-(2-フルオロフェニル)プロパノール：2.2gのリチウムアルミニウムハイドライドを110mlの乾燥THFに懸濁させ、室温で１時間撹拌した後、(2)で得られた化合物５gのTHF溶液（40ml）を15分間かけて加えた。室温で12時間撹拌した後、20mlの酢酸エチルを加えて更に３時間撹拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液5mlを加えて30分撹拌した後、析出物を濾去した。濾液を水、飽和食塩水で順次洗浄し無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、標記化合物4.27gを得た。

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：1.6-2.1(2H,m), 2.75(2H,t,J=7.5Hz),3.68(2H,t,J=6.34Hz), 6.8-7.6(4H,m)

【００８２】(4) 3-(2-フルオロフェニル)プロピル　トシレート：乾燥ピリジン200mlに(3)で得られた化合物17.75gを溶解し、０℃でトシルクロリド24.25gをゆっくりと加え、室温で３時間撹拌した。エーテル300mlを加え水で洗浄した後、６Ｎ塩酸を酸性を示すまで加えて飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を留去することにより、標記化合物31.3gを得た。ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：1.8-2.2(2H,m), 2.45(3H,s), 2.68(2H,t,J=7.8Hz),4.04(2H,t,J=6.2Hz), 6.8-7.4(4H.m), 7.33(2H,d,J=8Hz),7.79(2H,d,J=8Hz)

【００８３】(5) 4-(2-フルオロフェニル)ブタノニトリル：ジメチルスルホキシド（以下DMSOと略）35mlに9.89gのシアン化ナトリウムを溶解させ、室温で(4)で得られた化合物31.2gのDMSO溶液70mlを滴下し12時間撹拌した。水500mlを加え、エーテル200mlで２回抽出した後、水、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後溶媒を留去することにより、標記化合物15.4gを得た。

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：1.8-2.2(2H,m), 2.15-2.42(2H,m), 2.81(2H,t,J=7.65Hz), 6.8-7.3(4H.m)

【００８４】(6) 4-(2-フルオロフェニル)ブタノイックアシッド：５%水酸化ナトリウム水溶液400mlとジエチレングリコールモノエチルエーテル400mlの混液に(5)で得られた化合物15.4gを加え、3.5時間加熱還流した後、室温まで冷却しエーテルで洗浄した。水層に濃塩酸を加え酸性にした後、酢酸エチル500mlで２回抽出し、抽出液を水、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後溶媒を留去することにより、標記化合物15.9gを得た。

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：1.75-2.15(2H,m),2.28-2.55(2H,m),2.71(2H,t,J=7.43Hz), 6.8-7.4(4H.m)

【００８５】(7) 5-フルオロ-1-テトラロン：200gのポリリン酸を80℃に加温し撹拌しながら(6)で得られた化合物15.9gを１時間かけて加え、さらに同温で１時間撹拌した。反応液を氷水中に注ぎクロロホルムで抽出した後、抽出液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、水、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後溶媒を留去することにより、標記化合物14.1gを得た。

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：2.16(2H,m), 2.67(2H,t,J=6.3Hz), 2.96(2H,t,J=6.3Hz),7.20-7.31(2H,m), 7.84(1H,d,J=7.81Hz)

【００８６】(8) 5-フルオロ-8-ニトロ-1-テトラロン：濃硫酸100mlに(7)で得られた化合物14gを溶かし-５℃に冷却した後、硝酸カリウム9.05gの濃硫酸溶液80mlを、内温を５℃以下に保ちながら滴下した。滴下終了後さらに30分間撹拌した後反応液を氷水中に注ぎクロロホルムで抽出した後、抽出液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、水、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後溶媒を留去した。残渣をメタノールから再結晶することにより、標記化合物9.15gを得た。

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：2.18-2.24(2H,m),2.74(2H,t,J=6.3Hz),2.99(2H,t,J=6.3Hz), 7.29(1H,t,J=8.3Hz),7.38(1

H,dd,J=4.4Hz,8.8Hz)

【００８７】(9) 5-フルオロ-8-ニトロ-4-(1,3-ジオキソイソインドリン-2-イル)-1-テトラロン：四塩化炭素20mlに、(8)で得られた化合物323mg、N-ブロモスクシイミド323mg及び触媒量の過酸化ベンゾイルを加え、4.5時間加熱還流した。室温まで冷却した後クロロホルム30mlを加え、冷３％水酸化ナトリウム水溶液、水、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後溶媒を留去した。残渣を15mlのジメチルホルムアミド（以下DMFと略）に溶かし０℃に冷却した後、100mgのアジ化ナトリウムを少量ずつ加え、０℃で30分間さらに室温で１時間撹拌した後、水30mlを加えた。エーテルで２回抽出した後、水、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン－酢酸エチル（４：１）の混合溶媒で展開し、目的物を含む画分を濃縮することにより、４位アジド体308mgを得た。得られたアジド体にベンゼン10ml、トリフェニルホスフィン390mg、無水フタル酸220mgを加え、７時間加熱還流した後、37mgのテトラ-n-ブチルアンモニウムシアニドを加え、さらに12時間加熱還流した。室温まで冷却した後酢酸エチル20mlを加え、水、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン－酢酸エチル（２：１）の混合溶媒で展開し、目的物を含む画分を濃縮することにより、標記化合物395mgを得た。

ＮＭＲ(CDCl$_3$中)δ：2.51-2.62(2H,m),2,78-2.84(1H,m), 3.06-3.10(1H,m),5.87(1H,t,J=5.0Hz), 7.28(1H,t,J=8.8Hz),7.51(1H,dd,J=4.4Hz,8.8Hz), 7.74-7.78(2H,m),7.82-7.87(2H,m)

【００８８】(10) 8-アミノ-5-フルオロ-4-(1,3-ジオキソイソインドリン-2-イル)-1-テトラロン：(9)で得られた化合物320mgにジオキサン９mlとエタノール15mlを加え、10%パラジウム－炭素290mgを加えて接触水素添加を行った後、触媒を沪去し、沪液を濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン－酢酸エチル（２：１）の混合溶媒で展開し、目的物を含む画分を濃縮することにより、標記化合物206mgを得た。

ＮＭＲ(CDCl$_3$中)δ：2.3-2.55(2H,m), 2.61-2.70(1H,m), 2.85-2.30(1H,m),5.78(1H,m), 6.59(1H,dd,J=4.4Hz,8.8Hz),6.96(1H,t,J=8.8Hz), 7.65-7.75(2H,m), 7.75-7.85(2H.m)

【００８９】(11) (9S)-9-エチル-4-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-3-(1,3-ジオキソイソインドリン-2-イル)-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン：トルエン10mlに(10)で得られた化合物74mg及びトリオン66mgを実施例１-(5)と同様に15時間反応させ、後処理することにより、標記化合物120mgを得た。

ＮＭＲ(DMSO-d$_6$中)δ：0.90(3H,t,J=7.3Hz), 1.89(2H,m), 2.36(1H,m),2.45-2.5(1H,m), 3.25-3.4(2H,m), 5.34(2H,s),5.45(2H,s), 5.99(1H,m), 7.36(0.5H,s),7.37(0.5H,s), 7.69(1H,t,J=9.3Hz), 7.86(4H,s),8.18(1H,dd,J=5.4Hz,9.3Hz)

【００９０】(12) (9S)-3-アミノ-4-フルオロ-9-エチル-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン・塩酸塩：(11)で得られた化合物120mgをクロロホルム７ml、メタノール５mlの混液に溶かし、ヒドラジン１水和物0.7mlを加え１時間加熱還流した。反応液を濃縮乾固した後、残渣に４Ｎ塩酸７mlを加え１時間加熱還流した。反応液を濃縮乾固した後、残渣に水10mlを加え不溶物を沪去した。沪液を実施例７と同様の方法で精製し、標記化合物をアイソマーＡ（32mg）及びアイソマーＢ（20mg）として得た。

アイソマーＡ：

融点： 196℃以上（分解）

ＮＭＲ(DMSO-d$_6$中)δ：0.90(3H,t,J=7.3Hz), 1.87(2H,m), 2.15-2.30(1H,m),2.4-2.6(1H,m), 3.3-3.5(2H,m), 5.08(1H,m),5.26,5.40(2H,ABq,J=19.0Hz), 5.44(2H,s), 7.35(1H,s), 7.88(1H,t,J=9.3Hz),8.30(1H,dd,J=5.5Hz,9.3Hz), 8.70(3H,m)

アイソマーＢ：

融点： 215℃以上（分解）

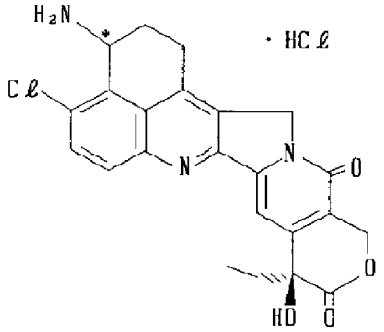
ＮＭＲ(DMSO-d$_6$中)δ：0.89(3H,t,J=7.3Hz), 1.88(2H,m), 2.15-2.30(1H,m),2.4-2.6(1H,m), 3.3-3.4(2H,m), 5.08(1H,m),5.28,5.40(2H,ABq,J=19Hz), 5.45(2H,s), 7.36(1H,s),7.89(1H,t,J=9.3Hz), 8.30(1H,dd,J=5.4Hz,9.3Hz),8.65(3H,m)

【００９１】実施例14

(9S)-3-アミノ-4-クロロ-9-エチル-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン・塩酸塩の合成：

【００９２】

【化２０】



【００９３】(1) 5-クロロ-8-ニトロ-4-(1,3-ジオキソ

イソインドリン-2-イル)-1-テトラロン：四塩化炭素20ml1に5-クロロ-8-ニトロ-1-テトラロン403mg、N-ブロモスクシイミド412mg及び触媒量の過酸化ベンゾイルを加え、６時間加熱還流した。室温まで冷却した後クロロホルム30mlを加え、冷３％水酸化ナトリウム水溶液、水、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後溶媒を留去した。残渣を10mlのDMFに溶かし０℃に冷却した後、140mgのアジ化ナトリウムを少量ずつ加え、０℃で30分さらに室温で１時間撹拌した後、水30mlを加えた。エーテルで２回抽出した後水、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン－酢酸エチル（４：１）の混合溶媒で展開し、目的物を含む画分を濃縮することにより、４位アジド体450mgを得た。得られたアジド体にベンゼン20ml、トリフェニルホスフィン487mg、無水フタル酸275mgを加え、７時間加熱還流した後40mgのテトラ-n-ブチルアンモニウムシアニドを加え、さらに12時間加熱還流した後溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン－酢酸エチル（２：１）の混合溶媒で展開し、目的物を含む画分を濃縮することにより、標記化合物356mgを得た。

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：2.40-2.48(1H,m),2.56-2.67(1H,m)，2.75-2.83(1H,m),2.96-3.75(1H,m)，5.83(1H,dd,J=2.9Hz,4.9Hz),7.46(1H,d,J=8.3Hz)，7.63(1H,d,J=8.3Hz),7.74-7.78(2H,m)，7.82-7.84(2H,m)

【００９４】(2) 8-アミノ-5-クロロ-4-(1,3-ジオキソイソインドリン-2-イル)-1-テトラロン：(1)で得られた化合物320mgにジオキサン９mlとエタノール15mlを加え、10％パラジウム－炭素200mgを加えて接触水素添加を行った後、触媒を沪去し、沪液を濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン－酢酸エチル（２：１）の混合溶媒で展開し、目的物を含む画分を濃縮することにより、標記化合物176mgを得た。

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：2.4-3.3(4H,m)，5.72(1H,m)，6.60(1H,d,J=8.3Hz),7.17(1H,d,J=8.3Hz)，7.6-7.9(4H,m)

【００９５】(3) (9S)-3-アミノ-4-クロロ-9-エチル-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン・塩酸塩：トルエン15mlに(2)で得られた化合物176mg及びトリオン135mgを実施例１-(5)と同様に16時間反応させ、後処理することにより、(9S)-9-エチル-4-クロロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-3-(1,3-ジオキソイソインドリン-2-イル)-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン193mgを３位異性体の混合物として得た。得られた混合物171mgを実施例13-(12)と同様に処理することにより、標記化合物をアイソマーＡ（63mg）及びアイソマーＢ（59mg）として得た。

アイソマーＡ：

融点： 190℃以上（分解）

ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.89(3H,t,J=7.3Hz)，1.86(2H,m)，2.24(1H,m),2.61(1H,m)，3.2-3.5(2H,m)，5.09(1H,m),5.23,5.39(2H,ABq,J=19.5Hz)，5.44(2H,s),7.35(1H,s)，7.98(1H,d,J=9.3Hz),8.23(1H,d,J=9.3Hz)，8.69(3H,m)

アイソマーＢ：

融点： 215℃以上（分解）

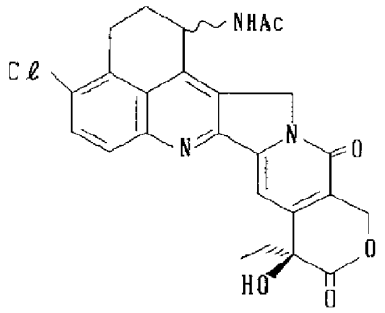
ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.88(3H,t,J=7.3Hz)，1.88(2H,m)，2.24(1H,m),2.54(1H,m)，3.3-3.5(2H,m)，5.12(1H,m),5.27,5.42(2H,ABq,J=19.0Hz)，5.45(2H,s),7.36(1H,s)，8.00(1H,d,J=9.3Hz),8.26(1H,d,J=9.3Hz)，8.56(3H,m)

【００９６】実施例15

(9S)-1-アセチルアミノメチル-4-クロロ-9-エチル-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンの合成：

【００９７】

【化２１】



【００９８】(1) 8-アセチルアミノ-5-クロル-2-ハイドロキシメチレン-1-テトラロン：ギ酸エチル８mlを氷冷撹拌下、60％水素化ナトリウム960mgを加え、室温に戻して５分後、8-アセチルアミノ-5-クロル-1-テトラロン1.43gをジメトキシエタン30mlに溶解した溶液を徐々に加え、さらにエタノール0.06mlを加えて30分間撹拌した。反応液を14％塩化ナトリウム水溶液300mlに注ぎ、酢酸エチルを加えて抽出し、10％クエン酸水溶液、飽和食塩水で洗浄し無水硫酸ナトリウムで乾燥後濃縮し、残渣にエーテルを加えて析出物を沪取して標記化合物1.30gを得た。

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}： 1650，1574，1502，1194

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：2.23(s,3H)，2.49(t,2H,J=7Hz)，3.03(t,2H,J=7Hz),7.50(d,1H,J=9Hz)，8.56(d,1H,J=9Hz)

ＭＡＳＳ m/z： 265(M^+)，267(M^++2)

【００９９】(2) 9-アセチルアミノ-6-クロロ-4,5-ジヒドロナフト[1,2-d]イソオキサゾール：(1)で得られた化

合物1.29gを酢酸30mlに溶解し、ヒドロキシルアミン・塩酸塩339mgを加え、120℃で10分間加熱撹拌した。反応液を冷却後、水を加えて析出物を沪取し、水、ヘキサンで洗浄して標記化合物1.1gを得た。

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}： 1664, 1524, 1390, 1288

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：2.29(s,3H), 2.80(t,2H,J=8Hz), 3.18(t,2H,J=8Hz),7.37(d,1H,J=9Hz), 8.25(s,1H), 8.30(d,1H,J=9Hz),8.80(s,1H)

ＭＡＳＳ m/z： 262(M^+), 264(M^++2)

【０１００】(3) 8-アセチルアミノ-5-クロル-2-シアノ-1-テトラロン：(2)で得られた化合物1.54gを無水エタノール20mlに溶解し撹拌下、ソジウムメトキサイド460mgを無水エタノール50mlに溶解した溶液を徐々に加えた後、３時間室温で撹拌した。反応液に、１Ｎ塩酸10ml及び水を加えた後、クロロホルムで抽出し、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し濃縮して標記化合物1.36gを得た。

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}： 2251, 1702, 1658, 1598, 1522

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：2.26(s,3H), 2.3-2.7(m,2H), 2.9-3.5(m,2H),3.83(dd,1H,J=12Hz,5Hz), 7.61(d,1H,J=9Hz),8.70(d,1H,J=9Hz), 11.56(s,1H)

ＭＡＳＳ m/z： 262(M^+), 264(M^++2)

【０１０１】(4) 8-アセチルアミノ-2-アセチルアミノメチル-5-クロル-1-テトラロン：(3)で得られた化合物1.36gを用いて、実施例28-(3)と同様に反応させ、後処理を行うことにより、標記化合物1.20gを得た。

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：2.01(s,3H), 2.25(s,3H), 1.7-2.4(m,2H),2.6-3.0(m,2H), 3.1-3.6(m,2H), 3.6-3.8(m,1H),6.23(br.s,1H), 7.52(d,1H,J=9Hz), 8.60(d,1H,J=9Hz),11.89(s,1H)

ＭＡＳＳ m/z： 308(M^+), 310(M^++2)

【０１０２】(5) 2-アセチルアミノメチル-8-アミノ-5-クロル-1-テトラロン：実施例１-(4)において、2,8-ジアセチルアミノ-1-テトラロンの代わりに上記(4)で得られた化合物1.20gを用い、実施例１-(4)と同様に反応させ、後処理することにより、標記化合物823mgを得た。

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：1.98(s,3H), 1.7-2.3(m,2H), 2.5-3.0(m,2H),3.0-3.5(m,2H), 3.7-3.9(m,1H), 6.37(br.s,2H),6.48(d,1H,J=9Hz), 7.23(d,1H,J=9Hz)

ＭＡＳＳ m/z： 266(M^+), 268(M^++2)

【０１０３】(6) (9S)-1-アセチルアミノメチル-4-クロロ-9-エチル-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン：(5)で得られた化合物820mg及びトリオン808mgを実施例１-(5)と同様に24時間反応後、反応液を濃縮し、残渣に酢酸20mlを加え、110℃で６時間加熱撹拌した。反応液を濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルム　メタノール（40：１）の混合溶媒で展開し目的物を含む画分を濃縮することにより、標記化合物420mgを得た。

ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.88(t,3H,J=7Hz), 1.87(s,3H), 1.7-2.0(m,2H),2.2-3.6(m,7H), 5.37(s, 2H), 5.45(s, 2H),6.52(br.s,2H), 7.34(s,1H), 7.88(d,1H,J=9Hz),8.04(d,1H,J=9Hz)

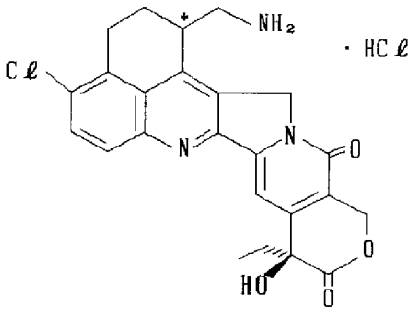
ＭＡＳＳ m/z： 493(M^+), 495(M^++2)

【０１０４】実施例16

(9S)-1-アミノメチル-4-クロロ-9-エチル-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン・塩酸塩の合成：

【０１０５】

【化２２】



【０１０６】実施例15-(6)で得られた化合物100mgを実施例２と同様に８時間反応させ、後処理することにより、標記化合物をアイソマーＡ（25mg）及びアイソマーＢ（22mg）としてそれぞれ得た。

アイソマーＡ：

融点： 230-240℃（分解）

ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.88(t,3H,J=7Hz), 1.8-2.0(m,2H), 1.9-3.8(m,7H),5.32,5.48(ABq,2H,J=17Hz), 5.46(s,2H),6.56(br.s,1H), 7.35(s,1H), 7.91(d,1H,J=9Hz),8.07(d,1H,J=9Hz), 8.14(s,3H)

ＭＡＳＳ m/z： 451(M^+), 453(M^++2)

アイソマーＢ：

融点： 250-255℃（分解）

ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.88(t,3H,J=7Hz), 1.8-2.0(m,2H), 1.9-3.8(m,7H),5.32,5.48(ABq,2H,J=19Hz), 5.45(s,2H),6.57(br.s,1H), 7.35(s,1H), 7.90(d,1H,J=9Hz),8.06(d,1H,J=9Hz)

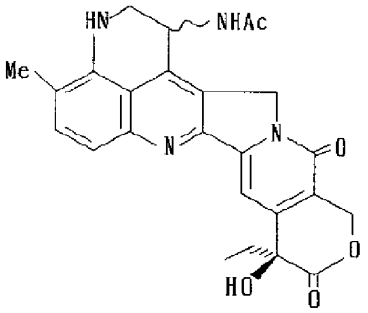
ＭＡＳＳ m/z： 451(M^+), 453(M^++2)

【０１０７】実施例17

(9S)-1-アセチルアミノ-9-エチル-1,2-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-3H,12H-ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-c]ベンゾ[ij][2,7]ナフチリジン-10,13(9H,15H)-ジオンの合成：

【０１０８】

【化２３】



【０１０９】(1) 1-アセチル-5-アセチルアミノ 8-メチル-2,3-ジヒドロキノリン-4-オン ：5-アミノ 8-メチル-2,3-ジヒドロキノリン-4-オン（特開平1-279891号公報）7.0gをジクロルメタン30ml及びジオキサン80mlの混合溶媒に溶解した後、アセチルクロライド15mlを加え、２時間加熱還流した。溶媒を濃縮して得られた残渣に酢酸エチル200mlを加え、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を濃縮し、残渣をエーテルを用いて再結晶することにより、標記化合物7.45gを得た。

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：1.95(s,3H)，2.23(s,3H)，2.27(s,3H)，2.0-5.5(m,5H),7.45(d,1H,J=8Hz)，8.59(d,1H,J=8Hz)

【０１１０】(2) 1-アセチル-5-アセチルアミノ-3-ハイドロキシイミノ 8-メチル-2，3-ジヒドロキノリン-4-オン：実施例１-(2)において、8-アセチルアミノ-1-テトラロンの代わりに上記(1)で得られた化合物2.6gを用い、実施例１-(2)と同様に反応させ、後処理を行うことにより、標記化合物2.89gを得た。

融点： 195-205℃（分解）

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}： 1674，1590，1518，1404

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：2.24(s,9H)，1.8-5.5(m,3H)，7.54(d,1H,J=8Hz),8.62(d,1H,J=8Hz)

ＭＡＳＳ m/z： 289(M^+)

【０１１１】(3) 1-アセチル-3,5-ジアセチルアミノ-8-メチル-2,3-ジヒドロキノリン-4-オン：実施例１-(3)において、8-アセチルアミノ-2-ハイドロキシイミノ-1-テトラロンの代わりに上記(2)で得られた化合物2.89gを用い、実施例１-(3)と同様に反応させ、後処理を行うことにより、標記化合物1.65gを得た。

融点： 216-221℃

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}： 1662，1594，1518

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：2.12(s,3H)，2.23(s,6H)，2.54(s,3H)，3.3-5.0(m,1H),6.1-6.6(br.s,1H)，7.44(d,1H,J=8Hz)，7.60(d,1H,J=8Hz)

ＭＡＳＳ m/z： 317(M^+)

【０１１２】(4) 3-アセチルアミノ-5-アミノ-8-メチル-2,3-ジヒドロキノリン-4-オン：実施例１-(4)において、2,8-ジアセチルアミノ-1-テトラロンの代わりに上記(3)で得られた化合物1.40gを用い、実施例１-(4)と同様に反応させ、後処理を行うことにより、標記化合物0.79gを得た。

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：2.01(s,3H)，2.08(s,3H)，3.0-4.5(m,3H),5.89(d,1H,J=8Hz)，6.95(d,1H,J=8Hz)，5.7-6.8(br.s,2H)

ＭＡＳＳ m/z： 233(M^+)

【０１１３】(5) (9S)-1-アセチルアミノ-9-エチル-1,2-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-3H,12H-ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-c]ベンゾ[ij][2,7]ナフチリジン-10,13(9H,15H)-ジオン：(4)で得られた化合物790mgにトリオン900mg、PPTS ３mg及び酢酸20mlを加えた後、窒素気流中で７時間、100℃で加熱撹拌した。反応液を濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルム－メタノール（20：１）の混合溶媒で展開し、目的物を含む画分を濃縮することにより、標記化合物210mgを得た。

融点： 225-235℃

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}： 1746，1658，1596，1156

ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.87(t,3H,J=7Hz)，1.8-2.0(m,2H),1.90,1.91(each s,3H)，2.30(s,3H),5.16,5.25(ABq,2H,J=18Hz)，5.42(s,2H),5.3-5.6(m,1H),6.17(br.s,1H)，7.26(s,1H),7.36(d,1H,J=8Hz)，7.52(d,1H,J=8Hz)

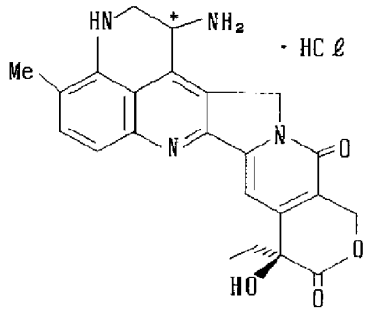
ＭＡＳＳ m/z： 460(M^+)

【０１１４】実施例18

(9S)-1-アミノ-9-エチル-1,2-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-3H,12H-ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-c]ベンゾ[ij][2,7]ナフチリジン-10,13(9H,15H)-ジオン・塩酸塩の合成：

【０１１５】

【化２４】



【０１１６】実施例17-(5)で得られた化合物400mgを実施例２と同様に４時間反応させ、後処理を行うことにより、標記化合物をアイソマーＡ（80mg）及びアイソマーＢ（55mg）としてそれぞれ得た。

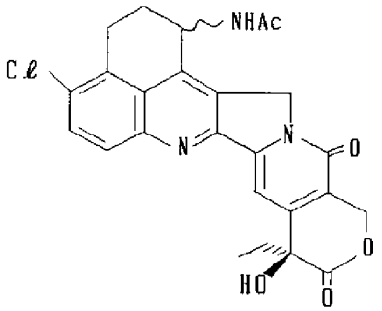
アイソマーＡ：

融点： 230-250℃（分解）

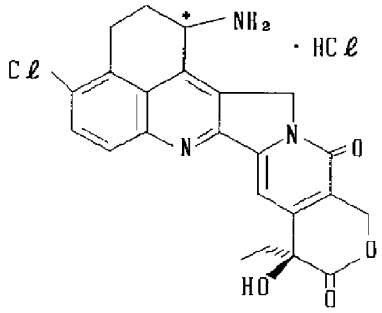
ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}： 1756，1658，1614

ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.88(t,3H,J=7Hz)，1.7-2.0(m,2

H), 2.35(s,3H),3.50,3.87(each d,1H,J=12Hz), 5.0-5.2(m,1H),5.44(s,2H), 5.37,5.83(ABq,2H,J=10Hz), 7.31(s,1H),7.44(d,1H,J=8Hz), 7.59(d,1H,J=8Hz), 8.77(br.s,3H)
ＭＡＳＳ m/z: 418(M⁺)
アイソマーＢ:
融点: 220-240℃（分解）
ＩＲν_{max}^{KBr} cm⁻¹: 1746, 1658, 1592
ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ: 0.88(t,3H,J=7Hz), 1.7-2.0(m,2H), 2.35(s,3H),3.50,3.86(each d,1H,J=12Hz), 5.0-5.2(m,1H),5.45(s,2H), 5.39,5.79(ABq,2H,J=9Hz),6.3-6.5(br,1H), 6.54(s,1H), 7.32(s,1H),7.45(d,1H,J=8Hz), 7.60(d,1H,J=8Hz), 8.70(br.s,3H)
ＭＡＳＳ m/z: 418(M⁺)
【０１１７】実施例19
(9S)-1-アセチルアミノ-4-クロロ-9-エチル-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンの合成:
【０１１８】
【化２５】



【０１１９】(1) 2,8-ジアセチルアミノ-5-クロロ-1-テトラロン: 実施例１-(2)において、8-アセチルアミノ-1-テトラロンの代わりに8-アセチルアミノ-5-クロロ-1-テトラロン600mgを用い、実施例１-(2)の場合と同様に反応させ、後処理を行い8-アセチルアミノ-5-クロロ-2-ハイドロキシイミノ-1-テトラロンを粗製し、次いで得られた化合物を実施例１-(3)と同様に反応させ、後処理を行うことにより、標記化合物304mgを得た。
ＩＲν_{max}^{KBr} cm⁻¹: 3296, 1652, 1574, 1464
ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ: 1.75-2.04(1H,m),2.12(3H,s), 2.23(3H,s),2.70-3.18(3H,m), 4.55-4.83(1H,m), 6.4(1H,br),7.55(1H,d,J=9.0Hz), 8.61(1H,d,9.2Hz)
ＭＡＳＳ m/z: 294(M⁺)
【０１２０】(2) 2-アセチルアミノ-8-アミノ-5-クロロ-1-テトラロン: 実施例１-(4)において、2,8-ジアセチルアミノ-1-テトラロンの代わりに上記(1)で得られた化合物270mgを用い、実施例１-(4)と同様に反応させ、後処理を行うことにより、標記化合物160mgを得た。
ＩＲν_{max}^{KBr} cm⁻¹: 3448, 1614, 1458
ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ: 1.73-1.87(1H,m),2.09(3H,s), 2.66-3.15(3H,m),4.53-4.74(1H,m)6.50(1H,d,J=9.0Hz),7.26(1H,d,J=9.0Hz)
ＭＡＳＳ m/z: 252(M⁺)
【０１２１】(3) (9S)-1-アセチルアミノ-4-クロロ-9-エチル-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン: (2)で得られた化合物130mg及びトリオン136mgを実施例１-(5)と同様に24時間反応させ、後処理を行うことにより、標記化合物174mgを得た。
融点: 240℃以上（分解）
ＩＲν_{max}^{KBr} cm⁻¹: 3416, 1660, 1494
ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ: 0.86-0.90(3H,m), 1.85-1.89(2H,m), 1.91(3/2H,s),1.92(3/2H,s), 2.16(2H,br s), 3.24(2H,br s),5.18-5.30(2H,m), 5.43(2H,s),5.57-5.62(1H,m),6.52(1H,s), 7.33(1H,s), 7.89(1H,d,J=8.8Hz), 8.05(1H,d,J=8.8Hz), 8.46-8.50(1H,m)
ＭＡＳＳ m/z: 479(M⁺)
【０１２２】実施例20
(9S)-1-アミノ-4-クロロ-9-エチル-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン・塩酸塩の合成:
【０１２３】
【化２６】



【０１２４】実施例19-(3)で得られた化合物124mgを実施例２と同様に６時間反応させ、後処理を行うことにより、標記化合物をアイソマーＡ（8.2mg）及びアイソマーＢ（8.2mg）としてそれぞれ得た。
アイソマーＡ:
融点: 240℃以上（分解）
ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ: 0.89(3H,t,J=6.8Hz), 1.81-1.92(2H,m),2.18-2.25(1H,m), 3.16-3.25(1H,m), 5.13(1H,br),5.45-5.49(3H,m), 5.95(1H,d,J=19Hz), 6.56(1H,s), 7.37(1H,s), 7.97(1H,d,J=9.3Hz),8.13(1H,d,J=9.3Hz), 8.79(1H,br)
アイソマーＢ:
融点: 240℃以上（分解）

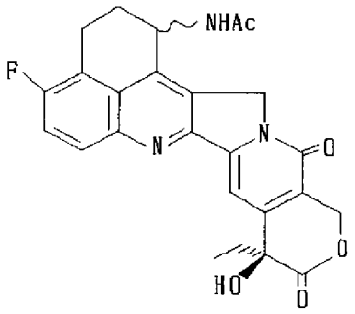
ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.88(3H,t,J=7.3Hz)，1.81-1.92(2H m),2.18-2.25(1H,m)，3.16-3.25(1H,m)，5.14(1H,br),5.46-5.50(3H,m)，5.90(1H,d,J=19Hz)，6.56(1H,s)，7.38(1H,s)，7.98(1H,d,J=9.3Hz),8.14(1H,d,J=9.3Hz)，8.66(1H,br)

【０１２５】実施例21

(9S)-1-アセチルアミノ-9-エチル-4-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンの合成：

【０１２６】

【化２７】



【０１２７】(1) 2,8-ジアセチルアミノ-5-フルオロ-1-テトラロン：実施例１-(2)において、8-アセチルアミノ-1-テトラロンの代わりに8-アセチルアミノ-5-フルオロ-1-テトラロン600mgを用い、実施例１-(2)の場合と同様に反応させ、後処理を行い8-アセチルアミノ-5-フルオロ-2-ハイドロキシイミノ-1-テトラロンを粗製し、次いで得られた化合物を実施例１-(3)と同様に反応させ、後処理を行うことにより、標記化合物372mgを得た。

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}：3264，1698，1614，1538，1400

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：1.83-2.04(1H,m),2.11(3H,s)，2.22(3H,s),2.65-3.19(3H,m)，4.61-4.82(1H,m)，6.5(1H,br s),7.26(1H,t,J=9.2Hz)，8.62(1H,dd,J=4.6,9.6Hz)

ＭＡＳＳ m/z：278(M^+)

【０１２８】(2) 2-アセチルアミノ-8-アミノ-5-フルオロ-1-テトラロン：実施例１-(4)において、2,8-ジアセチルアミノ-1-テトラロンの代わりに上記(1)で得られた化合物300mgを用い、実施例１-(4)と同様に反応させ、後処理を行うことにより、標記化合物182mgを得た。

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}：3428，2960，1622，1472

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：1.73-1.88(1H,m),2.10(3H,s)，2.69-3.08(3H,m),4.49-4.69(1H,m)6.43-6.54(1H,m),7.06(1H,t,J=8.8Hz)

ＭＡＳＳ m/z：236(M^+)

【０１２９】(3) (9S)-1-アセチルアミノ-9-エチル-4-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン：(2)で得られた化合物160mg及びトリオン179mgを実施例１-(5)と同様に24時間反応させ、後処理を行うことにより、標記化合物224mgを得た。

融点：240℃以上（分解）

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}：3292，2944，1750，1660，1598

ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.88(3H,t,J=8.8Hz)，1.82-1.92(2H,m)，1.93(3H,s),2.09-2.14(2H,m)，3.16-3.19(2H,m),5.18-5.29(2H,m)，5.43(2H,s)5.57-5.62(1H,m),6.51(1H,s)，7.33(1H,s)，7.78(1H,t,J=9.3Hz),8.11(1H,dd,J=5.4,9.3Hz)，8.51(1H,d,J=8.8Hz)

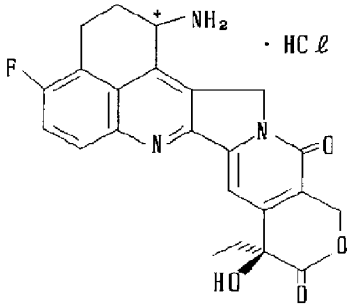
ＭＡＳＳ m/z：463(M^+)

【０１３０】実施例22

(9S)-1-アミノ-9-エチル-4-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン・塩酸塩の合成：

【０１３１】

【化２８】



【０１３２】実施例21-(3)で得られた化合物180mgを実施例２と同様に５時間反応させ、後処理を行うことにより、標記化合物をアイソマーＡ（10mg）及びアイソマーＢ（14mg）としてそれぞれ得た。

アイソマーＡ：

融点：240℃以上（分解）

ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.89(3H,t,J=7.3Hz)，1.81-1.94(2H,m),2.13-2.21(1H,m)，3.14-3.22(1H,m)，5.13(1H,br),5.43-5.48(3H,m)，5.92(1H,d,J=19Hz)，6.55(1H,s)，7.37(1H,s)，7.85(1H,t,J=9.3Hz),8.18(1H,dd,J=5.4,9.3Hz)，8.68(1H,br)

アイソマーＢ：

融点：240℃以上（分解）

ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.89(3H,t,J=7.3Hz)，1.83-1.93(2H,m),2.16-2.20(1H,m)，3.15-3.25(1H,m)，5.16(1H,br),5.45-5.50(3H,m)，5.95(1H,d,J=19Hz)，7.37(1H,s)，7.85(1H,t,J=9.3Hz)，8.19(1H,dd,J=5.4,9.3Hz),8.81(1H,br)

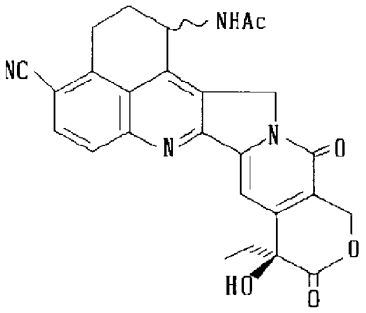
【０１３３】実施例23

(9S)-1-アセチルアミノ-4-シアノ-9-エチル-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,

7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンの合成：

【０１３４】

【化２９】



【０１３５】(1) 2,8-ジアセチルアミノ-5-シアノ-1-テトラロン：実施例１-(2)において、8-アセチルアミノ-1-テトラロンの代わりに8-アセチルアミノ-5-シアノ-1-テトラロン１gを用い、実施例１-(2)の場合と同様に反応させ、後処理を行い8-アセチルアミノ-5-シアノ-2-ハイドロキシイミノ-1-テトラロンを粗製し、次いで得られた化合物を実施例１-(3)と同様に反応させ、後処理を行うことにより、標記化合物270mgを得た。

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}：3292, 2228, 1708, 1666, 1588, 1518

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：1.71-2.05(1H,m),2.12(3H,s), 2.27(3H,s),2.66-3.43(3H,m), 4.60-4.87(1H,m), 6.3(1H,br),7.77(1H,d,J=8.7Hz), 8.78(1H,d,J=9.0Hz)

ＭＡＳＳ m/z：285(M^+)

【０１３６】(2) 2-アセチルアミノ-8-アミノ-5-シアノ-1-テトラロン：実施例１-(4)において、2,8-ジアセチルアミノ-1-テトラロンの代わりに上記(1)で得られた化合物250mgを用い、実施例１-(4)と同様に反応させ、後処理を行うことにより、標記化合物182mgを得た。

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}：3428, 3336, 2216, 1652, 1614, 1542

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：1.6-2.0(1H,m), 2.09(3H,s), 2.56-3.39(3H,m),4.51-4.71(1H,m), 6.59(1H,d,J=9.0Hz),7.40(1H,d,J=9.0Hz)

ＭＡＳＳ m/z：243(M^+)

【０１３７】(3) (9S)-1-アセチルアミノ-4-シアノ-9-エチル-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン：(2)で得られた化合物165mg及びトリオン179mgを実施例１-(5)と同様に43時間反応させ、後処理を行うことにより、標記化合物135mgを得た。

融点：240℃以上（分解）

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}：3296, 2940, 2228, 1752, 1662, 1602

ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.86-0.90(3H,m), 1.81-1.91(2H,m), 1.93(3/2H,s),1.94(3/2H,s), 2.16-2.34(2H,m), 3.38-3.51(2H,m),5.20-5.31(2H,m), 5.43-5.44(2H,m), 5.61-5.66(1H,m), 6.55(1H,s), 7.37(1/2H,s),7.38(1/2H,s), 8.09(1H,d,J=8.8Hz),8.14(1H,d,J=8.8Hz), 8.51-8.54(1H,m)

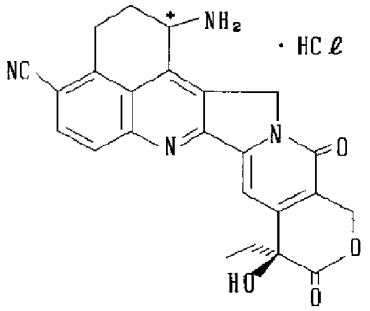
ＭＡＳＳ m/z：470(M^+)

【０１３８】実施例24

(9S)-1-アミノ-4-シアノ-9-エチル-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン・塩酸塩の合成：

【０１３９】

【化３０】



【０１４０】実施例21-(3)で得られた化合物124mgを実施例２と同様に３時間反応させ、後処理を行うことにより、標記化合物をアイソマーＡ（29mg）及びアイソマーＢ（30mg）としてそれぞれ得た。

アイソマーＡ：

融点：240℃以上（分解）

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}：3428, 2928, 2232, 1740, 1660, 1600

ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.89(3H,t,J=6.8Hz), 1.87-1.91(2H,m),2.2-2.4(1H,m), 2.6-2.7(1H,m), 3.4-3.6(2H,m),5.18(1H,br), 5.46-5.51(3H,m), 5.96(1H,d,J=19Hz),6.58(1H,s), 7.42(1H,s), 8.17(1H,d,J=8.8Hz),8.22(1H,d,J=8.8Hz), 8.79(1H,br)

ＭＡＳＳ m/z：428(M^+)

アイソマーＢ：

融点：240℃以上（分解）

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}：2884, 2228, 1754, 1658, 1590

ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.88(3H,t,J=7.3Hz), 1.83-1.94(2H,m),2.26-2.33(1H,m), 2.54-2.68(1H,m),3.38-3.57(2H,m), 5.20(1H,br), 5.47-5.52(3H,m),5.97(1H,d,J=19Hz), 6.58(1H,s), 7.38(1H,s),8.18(1H,d,J=8.8Hz), 8.23(1H,d,J=8.8Hz),8.85(1H,br)

ＭＡＳＳ m/z：428(M^+)

【０１４１】実施例25

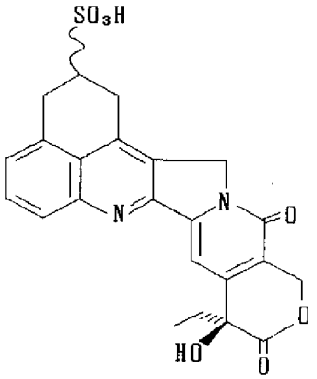
(9S)-9-エチル-9-ハイドロキシ-2-スルホニル-2,3-ジヒドロ-1H,12H-ベンゾ[de][3',4':6,7]インドリジノ[1,2-

OnCusp
Ex. 1002

b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンの合成：

【０１４２】

【化３１】



【０１４３】3-スルホニル-8-アミノ-1-テトラロン〔Ann., 638, 43-56(1960)〕500mg及びトリオン355mgを実施例17-(5)と同様に16時間反応させた。放冷後、反応液を濃縮し、残渣を水で希釈後、ダイヤイオンHP-20によるカラムクロマトグラフィーに付し、25%エタノール水溶液で展開して、目的物を含む画分を濃縮することにより、標記化合物220mgを得た。

融点： 190-200℃（分解）

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}： 1744, 1660, 1164, 1038

ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.89(t,3H,J=7Hz), 1.8-2.0(m,2H), 2.9-3.6(m,5H),5.1-5.4(ABq,2H), 5.43(s,2H), 6.50(br,1H),7.31,7.32(each s,1H), 7.49(d,1H,J=7Hz),7.73(t,1H,J=7Hz), 7.96(d,1H,J=7Hz)

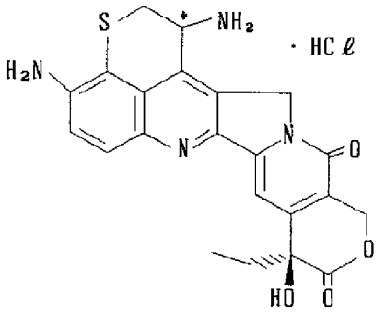
ＭＡＳＳ m/z： 468(M^+)

【０１４４】実施例26

(9S)-1,4-ジアミノ-9-エチル-1,2-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-12H-チイノ[4,3,2-de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン・塩酸塩の合成：

【０１４５】

【化３２】



【０１４６】(1) 8-アセチルアミノ-5-ベンジルオキシカルボニルアミノ-4-チオクロマノン：40mlのジクロロメタンに570mgの8-アセチルアミノ-5-アミノ-4-チオクロマノン及び１mlのピリジンを加え、0℃で撹拌しながらカルボベンゾイルクロリド0.69mlを加え一時間撹拌した。反応液を希塩酸、水、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後溶媒を留去した。残渣をメタノールから再結晶して、標記化合物710mgを得た。

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：2.21(3H,s), 3.03(2H,m), 3.16(2H,m), 5.21(2H,s),6.97(1H,br.s), 7.3-7.5(5H,m), 7.79(1H,d,J=8.8Hz),8.30(1H,d,J=8.8Hz), 11.60(1H,br.s)

【０１４７】(2) 3,8-ジアセチルアミノ-5-アミノ-4-チオクロマノン：168mgのカリウム-t-ブトキシドを含むTHF溶液５mlに、窒素気流下０℃で撹拌しながら、(1)で得られた化合物370mgを含むTHF溶液５mlを加え、５分間撹拌後、亜硝酸n-ブチル0.24mlを加え、室温で１時間撹拌した。反応液にエーテル20mlを加え１時間撹拌後、析出物を濾取し、エーテルでよく洗浄した。析出物を酢酸20mlと無水酢酸20mlの混液に溶かし、室温で撹拌しながら、亜鉛末約200mgを徐々に加え、更に30分間撹拌した。不溶物を濾去後、溶媒を溜去し、クロロホルム20mlを加え、水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水の順で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を溜去後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン－酢酸エチル（４：１）の混合溶媒で展開して、目的物を含む画分を濃縮した。残渣をジオキサン－メタノール（１：１）の混合溶媒20mlに溶かし、５%パラジウム－炭素100mgを用いて接触水素添加を行う。触媒を濾去した後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン－酢酸エチル（４：１）の混合溶媒で展開して、目的物を含む画分を濃縮することにより、標記化合物23mgを得た。

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：2.10(3H,s), 2.19(3H,s), 2.99(1H,t,J=13Hz),3.56(1H,dd,J=4Hz,12Hz), 4.79(1H,dt,J=4Hz,13Hz),6.40(1H,d,J=8.8Hz)6.85(1H,m), 6.92(1H,d,J=4Hz),7.35(1H,d,J=8.8Hz)

【０１４８】(3) (9S)-1,4ジアミノ-9-エチル-1,2-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-12H-チイノ[4,3,2-de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン・塩酸塩：(2)で得られた化合物23mg及びトリオン20mgをトルエン５mlに加え、触媒量のPPTSを添加後、デイーンスターク装置を用いて20時間加熱還流した。反応液を冷却し、溶媒を溜去後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルム－メタノール（95：５）で展開して、目的物を含む画分を濃縮して得られた残渣に、６Ｎ塩酸４mlを加え1.5時間撹拌した。溶媒を濃縮後、水４mlを加え不溶物を濾過により除き、濾液を高速液体クロマトグラフィー〔CAPCELL PAK C18；アセトニトリル－水－１Ｎ塩酸（20：80：１）で展開〕で精製し、標記化合物をアイソマーＡ（10mg）及びアイソマーＢ（7.4mg）として得た。

アイソマーＡ：

融点： 220℃以上（分解）

ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.88(3H,t,J=7.3Hz)，1.86(2H,m),3.34(1H,d,J=14.0Hz)，3.50(1H,dd,J=14.0Hz,3.2Hz),5.29(1H,m)，5.36,5.76(2H,ABq,J=19.5Hz),5.43(2H,s)，6.11(2H,s)，6.49(1H,s)，7.22(1H,s),7.42(1H,d,J=9.3Hz)，7.82(1H,d,J=9.3Hz),8.66(3H,m)

アイソマーＢ：

融点：220℃以上（分解）

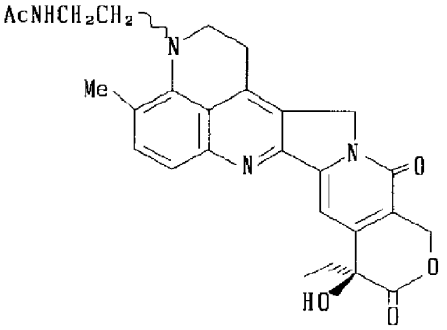
ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.88(3H,t,J=7.3Hz)，1.87(2H,m),3.35(1H,d,J=13.7Hz)，3.48(1H,dd,J=13.7Hz,3.0Hz),5.28(1H,m)，5.35,5.74(2H,ABq,J=19.5Hz),5.43(2H,s)，6.11(2H,s)，6.49(1H,s)，7.22(1H,s),7.41(1H,d,J=9.3Hz)，7.82(1H,d,J=9.3Hz)，8.61(3H,m)

【０１４９】実施例27

(9S)-3-(2-アセチルアミノエチル)-9-エチル-1,2-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-3H,12H-ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-c]ベンゾ[ij][2,7]ナフチリジン-10,13(9H,15H)-ジオンの合成：

【０１５０】

【化３３】



【０１５１】(1) 5-アセチルアミノ-8-メチル-2，3-ジヒドロキノリン-4-オン：5-アミノ-8-メチル-2,3-ジヒドロキノリン-4-オン2.0gをジクロルメタン20ml及びピリジン1.3mlの混合溶媒に溶解し、氷冷撹拌下アセチルクロライド1.2mlを加えて、４時間撹拌した。反応液に水を加え、クロロホルムで抽出後、飽和食塩水で洗浄し無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を濃縮して得られた残渣をエーテルで結晶化することにより、標記化合物1.24gを得た。

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：2.01(s,3H)，2.20(s,3H)，2.72(t,2H,J=7Hz),3.61(t,2H,J=7Hz)，7.19(d,1H,J=8Hz)，7.94(d,1ll,J=8Hz)

【０１５２】(2) 5-アセチルアミノ-1-シアノメチル-8-メチル-2,3-ジヒドロキノリン-4-オン：(1)で得られた化合物1.95gをDMF40mlに溶解し、ブロムアセトニトリル６mlを加えて、３時間加熱還流した。反応液を濃縮し、残渣にクロロホルムを加え、飽和食塩水で洗浄し無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルム－メタノール（100：１）の混合溶媒で展開し目的物を含む画分を濃縮することにより、標記化合物605mgを得た。

融点：190-193℃

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}：1696，1644，1506，1392，1248

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：2.22(s,3H)，2.29(s,3H)，2.93(t,2H,J=6.5Hz),3.68(t,2H,J=6.5Hz)，4.01(s,2H)，7.38(d,1H,J=8Hz),8.43(d,1H,J=8Hz)

ＭＡＳＳ m/z：257(M^+)

【０１５３】(3) 5-アセチルアミノ-1-(2-アミノエチル)-8-メチル-2,3-ジヒドロキノリン-4-オン：(2)で得られた化合物650mgを酢酸10ml及び無水酢酸30mlの混合溶媒に溶解し、ラネーニッケル２mlを加えて接触水素添加を行う。触媒を沪過により除き、沪液を濃縮して得られた残渣にクロロホルムを加え、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を濃縮した。得られた残渣をクロロホルム及びエーテルを用いて再結晶することにより、標記化合物510mgを得た。

融点：151-153℃

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}：1690，1646，1520

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：2.00(s,3H)，2.21(s,3H)，2.26(s,3H),2.76(t,2H,J=7Hz)，3.14(t,2H,J=7Hz)，3.4-3.7(m,4H),5.98(br,1H)，7.30(d,1H,J=8Hz)，8.27(d,1H,J=8Hz)

ＭＡＳＳ m/z：303(M^+)

【０１５４】(4) 5-アミノ-1-(2-アミノエチル)-8-メチル-2,3-ジヒドロキノリン-4-オン：実施例１-(4)において、2,8-ジアセチルアミノ-1-テトラロンの代わりに上記(3)で得られた化合物510mgを用い、実施例１-(4)と同様に反応させ、後処理を行うことにより、標記化合物220mgを得た。

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：1.99(s,3H)，2.16(s,3H)，2.6-2.9(m,4H),3.3-3.7(m,4H)，5.8-6.8(br,1H)，6.20(d,1H,J=8Hz),7.04(d,1H,J=8Hz)

ＭＡＳＳ m/z：261(M^+)

【０１５５】(5) (9S)-3-(2-アセチルアミノエチル)-9-エチル-1,2-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-3H,12H-ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-c]ベンゾ[ij][2,7]ナフチリジン-10,13(9H,15H)-ジオン：(4)で得られた化合物210mg及びトリオン230mgを実施例17-(5)と同様に７時間反応させ、後処理を行うことにより、標記化合物195mgを得た。

融点：155-165℃（分解）

ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.88(t,3H,J=7Hz)，1.7-2.0(m,2H)，1.82(s,3H),2.47(s,3H)，2.9－3.1(m,2H)，3.2-3.3(m,2H),3.4-3.7(m,4H)，5.26(s,2H)，5.3-5.5(m,2H),7.34(s,1H)，7.67(d,1H,J=7Hz)，7.74(d,1H,J=7Hz),8.0-8.1(br.s,1H)

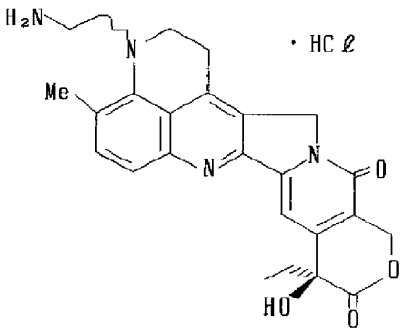
ＭＡＳＳ m/z：488(M^+)

【０１５６】実施例28

(9S)-3-(2-アミノエチル)-9-エチル-1,2-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-3H,12H-ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-c]ベンゾ[ij][2,7]ナフチリジン-10,13(9H,15H)-ジオンの合成：

【０１５７】

【化３４】



【０１５８】実施例27-(5)で得られた化合物190mgを実施例２と同様に反応させ、後処理を行うことにより、標記化合物120mgを得た。

融点：　210-230℃　（分解）

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}：　1746,1660,1594

ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.88(t,3H,J=7.5Hz)，1.8-1.9(m,2H)，2.49(s,3H),3.1-3.5(m,8H)，5.26(s,2H)，5.43(s,2H),7.32(s,1H),7.69(d,1H,J=9Hz)，7.78(d,1H,J=9Hz),8.1-8.3(br.s,3H)

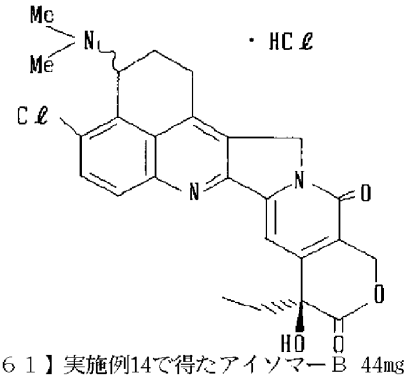
ＭＡＳＳ　m/z：　446(M^+)

【０１５９】実施例29

(9S)-4-クロロ-9-エチル-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-3-ジメチルアミノ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン・塩酸塩の合成：

【０１６０】

【化３５】



【０１６１】実施例14で得たアイソマーＢ　44mgを、50％含水メタノール５mlに溶かし35％ホルマリン水溶液0.5mlと10％パラジウム－炭素50mgを加えて接触水素添加を行う。反応終了後触媒を濾去し、溶媒を留去した。水４mlを加え不溶物を濾過により除き、濾液を高速液体クロマトグラフィー〔CAPCELL PAK C18；アセトニトリル－水－１Ｎ塩酸（20：80：１）で展開〕で精製し、標記化合物８mgを得た。

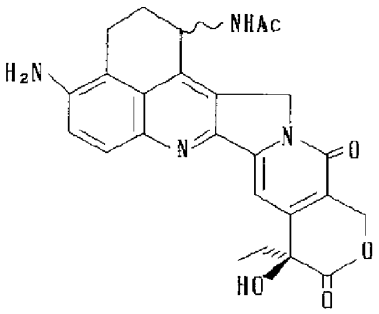
ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.89(3H,t,J=7.3Hz)，1.88(2H,m)，2.2-2.4(1H,m),2.4-2.6(1H,m)，2.67(3H,m)，3.06(3H,m),3.3-3.5(2H,m)，5.19(1H,m),5.21,5.43(2H,ABq,J=18.6Hz)，5.45(2H,s),6.56(1H,s)，7.37(1H,s)，8.03(1H,d,J=9.3Hz),8.31(1H,d,J=9.3Hz)

【０１６２】実施例30

(9S)-1-アセチルアミノ-4-アミノ-9-エチル-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンの合成：

【０１６３】

【化３６】



【０１６４】(1) 2,5,8-トリアセチルアミノ１テトラロン：実施例１-(2)において、8-アセチルアミノ-1-テトラロンの代わりに5,8-ジアセチルアミノ-1-テトラロン1.65gを用い、実施例１-(2)の場合と同様に反応させ、後処理を行い5,8-ジアセチルアミノ-2-ハイドロキシイミノ-1-テトラロンを粗製し、次いで得られた化合物を実施例１-(3)と同様に反応させ、後処理を行うことにより、標記化合物950mgを得た。

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}：　3280，1660，1596，1516

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：1.79-2.02(1H,m),2.11(3H,s)，2.18(3H,s),2.23(3H,s),2.4-3.0(3H,m)，4.54-4.69(1H,m)，7.60(1H,d,J=9.0Hz)，8.55(1H,d,J=9.0Hz)

ＭＡＳＳ　m/z：　317(M^+)

【０１６５】(2) 2-アセチルアミノ-5,8-ジアミノ-1-テトラロン：実施例１-(4)において、2,8-ジアセチルアミノ-1-テトラロンの代わりに上記(1)で得られた化合物500mgを用い、実施例１-(4)と同様に反応させ、後処理を行うことにより、標記化合物290mgを得た。

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}：　3436，3352，3296，2444，1626，1556

ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：1.74-1.87(1H,m)，1.90(3H,s)，2.14-2.16(1H,m),2.54-2.77(2H,m)，4.41-4.47(1H,m)，6.48(1H,d,J=8.3Hz)，6.83(1H,d,J=8.3Hz),8.04(1H,d,J=7.8Hz)

ＭＡＳＳ m/z： 233(M⁺)

【０１６６】(3) (9S)-1-アセチルアミノ-4-アミノ-9-エチル-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン：(2)で得られた化合物234mg及びトリオン261mgを酢酸30mlに溶解し、窒素気流下14時間加熱還流した。以下、実施例１-(5)と同様に後処理を行うことにより、標記化合物134mgを得た。

融点： 240℃以上（分解）

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}： 3380, 2984, 2940, 1748, 1662, 1602

ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.89(3H,t,J=7.2Hz), 1.82-1.92(2H,m),1.93(3/2H,s), 1.94(3/2H,s), 2.08-2.09(2H,m),3.08(2H,br), 5.16-5.26(2H,m), 5.39-5.46(2H,m), 5.53-5.56(1H,m), 6.51(1H,s), 7.32(2H,s),7.96(1H,d,J=9.5Hz), 7.99(1H,d,J=8.7Hz),8.54(1H,t,J=8.7Hz)

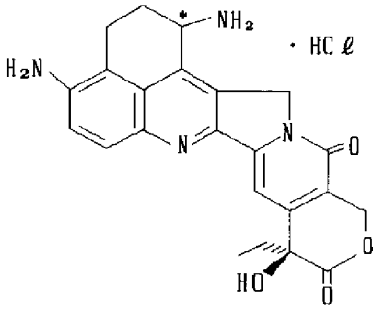
ＭＡＳＳ m/z： 458(M⁺)

【０１６７】実施例31

(9S)-1,4-ジアミノ-9-エチル-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン・塩酸塩の合成：

【０１６８】

【化３７】



【０１６９】実施例21-(3)で得られた化合物113mgを実施例２と同様に６時間反応させ、後処理を行うことにより、標記化合物をアイソマーＡ（28mg）及びアイソマーＢ（28mg）としてそれぞれ得た。

アイソマーＡ：

融点： 240℃以上（分解）

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}： 3392, 3232, 2936, 1742, 1652, 1590

ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.89(3H,t,J=6.8Hz), 1.82-1.92(2H,m),2.03-2.09(1H,m), 2.67-2.93(2H,m), 4.97(1H,br),5.32-5.46(3H,m), 5.74-5.81(1H,m), 6.47(1H,s),7.21(1H,s), 7.39(1H,d,J=8.8Hz),7.83(1H,d,J=8.8Hz), 8.60(1H,br)

ＭＡＳＳ m/z： 418(M⁺)

アイソマーＢ：

融点： 240℃以上（分解）

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}： 3436, 3232, 1746, 1658, 1592

ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.89(3H,t,J=6.8Hz), 1.81-1.92(2H,m),2.03-2.09(1H,m), 2.68-2.95(2H,m), 4.99(1H,br),5.37-5.47(3H,m), 5.81(1H,d,J=19Hz), 7.23(1H,s), 7.43(1H,d,J=8.8Hz), 7.85(1H,d,J=8.8Hz),8.64(1H,br)

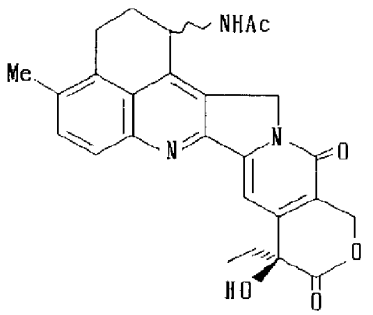
ＭＡＳＳ m/z： 418(M⁺)

【０１７０】実施例32

(9S)-1-アセチルアミノ-9-エチル-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンの合成：

【０１７１】

【化３８】



【０１７２】(1) メチル (2'-トリル)アセテート：o-トリル酢酸25gをメタノール350mlに溶解した後、濃塩酸１mlを加え一晩加熱還流した。溶媒を濃縮して得られた残渣に水200mlを加え析出物をクロロホルムで抽出した。抽出液を飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を濃縮し標記化合物27.2gを得た。

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：2.30(3H,s), 3.64(2H,s), 3.68(3H,s), 7.17(4H,s)

【０１７３】(2) メチル 4-(2'-トリル)-3-ブテネート：(1)で得られた化合物13.1gをトルエン100mlに溶解した溶液を-65℃に冷却し、１M水素化ジイソブチルアルミニウムのトルエン溶液80mlを１時間かけて滴下し、同温で１時間撹拌した。メタノールを加え反応を停止した。反応液を酢酸エチルで希釈し、10%塩酸水溶液、水、飽和食塩水の順に洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を濃縮した。残渣をベンゼン100mlに溶解した溶液にメチル(トリフェニルフォスフォラニリデン)アセテート26.5gを加え、室温で一晩撹拌した。溶媒を濃縮し、残渣に酢酸エチル： n-ヘキサン（１：９）の混合溶媒を加え不溶物を沪去した。沪液を濃縮して得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィーに付し、酢酸エチル： n-ヘキサン（１：９）で展開し目的物を含む画分を濃縮することにより、標記化合物12.7gを得た。

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：2.27(3H,s), 3.46-3.54(2H,m), 3.70(3H,s),5.70(1H,d,15.5Hz), 6.95-7.24(5H,m)

【０１７４】(3) 4-(2'-トリル)酪酸：(2)で得られた化合物12.6gをメタノール200mlに溶解した溶液に、10%パラジウム炭素を加え水素気流下20分間接触還元を行った。触媒を沪去し、反応液を約150mlになるまで濃縮した。濃縮した溶液に１Ｎ水酸化ナトリウム溶液70mlを加え50℃で１時間加熱撹拌した。室温に戻した後、反応液を氷冷し濃塩酸でpH１以下にした。析出物をクロロホルムで抽出し、飽和食塩水で洗浄し無水硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を濃縮することにより、標記化合物11.4gを得た。

融点： 54-56℃

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}： 3416, 2944, 1748, 1660, 1602

ＮＭＲ($CDCl_3$中) δ：1.83-1.99(2H,m),2.31(3H,s), 2.34-2.75(4H,m),7.12(4H,m)

ＭＡＳＳ m/z： 178(M^+)

【０１７５】(4) 5-メチル-1-テトラロン：ポリリン酸120gを70℃に加温し、(3)で得られた化合物10.0gを粉末状態で30分間かけて加え同温で20分間撹拌した。反応液を氷水600mlに注ぎ、析出物を沪取した。水で洗浄後、得られた粉末を酢酸エチルに溶解し飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を濃縮することにより、標記化合物8.19gを得た。

融点： 43-47℃

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}： 3452,2952,1676,1592,1464

ＮＭＲ($CDCl_3$中) δ：2.07-2.27(2H,m),2.31(3H,s), 2.57-2.93(4H,m),7.11-7.33(2H,m), 7.89-7.98(1H,m)

ＭＡＳＳ m/z： 160(M^+)

【０１７６】(5) 8-ニトロ-5-メチル-1-テトラロン：(4)で得られた化合物8.1gを濃硫酸70mlに溶解した溶液を-５℃に冷却し、硝酸カリウム5.37gを濃硫酸50mlに溶かした溶液を、反応温度が５℃を超えないように滴下し、さらに同温で30分間撹拌した。反応液を氷水600mlに注ぎ、クロロホルムで抽出、飽和重曹水、飽和食塩水の順に洗浄し無水硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィーに付し、酢酸エチル： n-ヘキサン（１： 15）で展開し目的物を含む画分を濃縮することにより、標記化合物5.82gを得た。

融点： 104-107℃

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}： 3452, 2964, 1690, 1596

ＮＭＲ($CDCl_3$中) δ：2.17-2.22(2H,m),2.37(3H,s), 2.69-2.72(2H,m),2.89(2H,t,J=5.9Hz), 7.25(1H,d,J=8.3Hz),7.40(1H,d,J=7.8Hz)

ＭＡＳＳ m/z： 205(M^+)

【０１７７】(6) 8-アセチルアミノ-5-メチル-1-テトラロン：(5)で得られた化合物2.5gを、酢酸50ml及び無水酢酸50mlの混合溶媒に溶解した後、10%パラジウム炭素800mgを加え水素気流下１時間接触還元を行った。触媒を沪去し沪液を濃縮することにより得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィーに付し、クロロホルムで展開し目的物を含む画分を濃縮することにより、標記化合物2.22gを得た。

融点： 92-94℃

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}： 3512, 3176, 2940, 1690, 1650, 1604

ＮＭＲ($CDCl_3$中) δ：1.95-2.18(2H,m),2.22(3H,s), 2.25(3H,s),2.61-2.93(4H,m), 7.33(1H,d,J=8.5Hz),8.51(1H,d,J=8.5Hz)

ＭＡＳＳ m/z： 217(M^+)

【０１７８】(7) 2,8-ジアセチルアミノ-5-メチル-1-テトラロン：実施例１-(2)において、8-アセチルアミノ-1-テトラロンの代わりに8-アセチルアミノ-5-メチル-1-テトラロン１gを用い、実施例１-(2)の場合と同様に反応させ、後処理を行い8-アセチルアミノ-2-ハイドロキシイミノ-5-メチル-1-テトラロンを粗製し、次いで得られた化合物を実施例１-(3)と同様に反応させ、後処理を行うことにより、標記化合物476mgを得た。

融点： 195-198℃

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}： 3312, 2928, 1712, 1638, 1596, 1520

ＮＭＲ($CDCl_3$中) δ：1.74-1.98(1H,m),2.11(3H,s), 2.22(3H,s),2.24(3H,s),2.66-3.03(3H,m), 4.52-4.79(1H,m),6.5(1H,br), 7.36(1H,d,J=8.5Hz), 8.50(1H,d,8.5Hz)

ＭＡＳＳ m/z： 274(M^+)

【０１７９】(8) 2-アセチルアミノ-8-アミノ-5-メチル-1-テトラロン：実施例１-(4)において、2,8-ジアセチルアミノ-1-テトラロンの代わりに上記(7)で得られた化合物400mgを用い、実施例１-(4)と同様に反応させ、後処理を行うことにより、標記化合物265mgを得た。

融点： 192-194℃

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}： 3460, 3360, 2924, 1618, 1566, 1536

ＮＭＲ($CDCl_3$中) δ：1.76-1.87(1H,m),2.10(3H,s), 2.16(3H,s),2.63-2.69(1H,m), 2.91-2.97(2H,m),4.55-4.56(1H,m), 6.55(1H,d,J=8.3Hz),7.13(1H,d,J=8.3Hz)

ＭＡＳＳ m/z： 232(M^+)

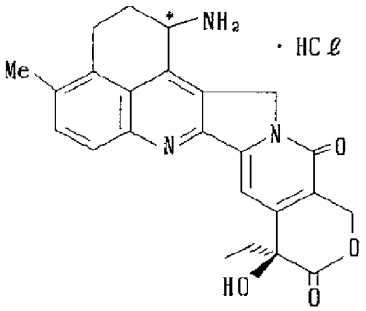
【０１８０】(9) (9S)-1-アセチルアミノ-9-エチル-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン：(8)で得られた化合物200mg及びトリオン227mgを実施例１-(5)と同様に23時間反応させ、後処理を行うことにより、標記化合物287mgを得た。

融点： 270℃以上（分解）

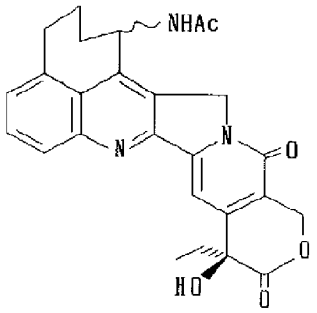
ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}： 3428, 2944, 1754, 1660, 1608, 1556

ＮＭＲ(DMSO-d_6中) δ：0.86-0.90(3H,m), 1.75-1.89(2H,m), 1.91(3/2H,s),1.92(3/2H,s), 2.11-2.14(2H,m), 2.47(3/2H,s),2.48(3/2H,s), 3.08-3.11(2H,m), 5.19-5.21(2H,m),5.43(2H,s), 5.52-5.57(1H,m), 6.50(1/2H,

s),6.51(1/2H,s), 7.31(1H,s), 7.71(1H,d,J=8.3Hz),7.94(1H,d,J=8.3Hz), 8.47(1H,t,J=8.3Hz)
ＭＡＳＳ m/z： 459(M⁺)
【０１８１】実施例33
(9S)-1-アミノ-9-エチル-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン・塩酸塩の合成：
【０１８２】
【化３９】



【０１８３】実施例32-(9)で得られた化合物150mgを実施例２と同様に７時間反応させ、後処理を行うことにより、標記化合物をアイソマーＡ（58mg）及びアイソマーＢ（62mg）としてそれぞれ得た。
アイソマーＡ：
融点： 250℃以上（分解）
ＩＲν_{max}^{KBr} cm⁻¹： 3432, 2936, 1746, 1658, 1594
ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.90(3H,t,J=6.8Hz), 1.83-1.91(2H,m),2.15-2.22(1H,m), 2.56-2.59(1H,m),3.12-3.28(2H,m), 5.09(1H,br), 5.40-5.45(3H,m),5.90(1H,d,J=19Hz), 6.52(1H,s), 7.34(1H,s),7.76(1H,d,J=8.8Hz), 8.01(1H,d,J=8.8Hz),8.73(3H,br)
ＭＡＳＳ m/z： 417(M⁺)
アイソマーＢ：
融点： 250℃以上（分解）
ＩＲν_{max}^{KBr} cm⁻¹： 3448, 2936, 1746, 1658, 1596
ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.89(3H,t,J=6.8Hz), 1.83-1.93(2H,m),2.17(1H,br),2.61-2.68(1H,m), 3.10-3.21(2H,m),5.10(1H,br), 5.43-5.48(3H,m), 5.93(1H,d,J=19Hz),7.35(1H,s), 7.78(1H,d,J=8.8Hz),8.02(1H,d,J=8.8Hz), 8.80(3H,br)
ＭＡＳＳ m/z： 417(M⁺)
【０１８４】実施例34
(10S)-1-アセチルアミノ-10-エチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-10-ハイドロキシ-13H-シクロヘプト[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-11,14(10H,16H)-ジオンの合成：
【０１８５】
【化４０】



【０１８６】(1) 1-アセチルアミノ-6,7,8,9-テトラヒドロ-5H-ベンゾシクロヘプテン：1-ニトロ-6,7,8,9-テトラヒドロ-5H-ベンゾシクロヘプテン〔J. Am. Chem. Soc., 5820(1969)〕8.7gを無水酢酸150ml及び酢酸50mlの混合溶媒に溶解し、ラネーニッケル10mlを加えて接触水素添加を行う。触媒を沪去後、沪液を濃縮し残渣にクロロホルムを加え飽和炭酸水素ナトリウム、飽和食塩水で洗浄し無水硫酸ナトリウムで乾燥後、濃縮して標記化合物6.17gを得た。
ＮＭＲ(CDCl₃中)δ：1.5-1.9(m,6H), 2.15,2.20(each s,3H), 2.6-2.9(m,4H),6.9-7.4(m,3H)
ＭＡＳＳ m/z： 203(M⁺)
【０１８７】(2) 1-アセチルアミノ-6,7,8,9-テトラヒドロ-5H-ベンゾシクロヘプテン-9-オン：実施例１-(1)において、1-アセチルアミノテトラリンの代わりに上記(1)で得られた化合物200mgを用い、実施例１-(1)と同様に反応させ、後処理することにより、標記化合物55mgを得た。
融点： 155-162℃
ＮＭＲ(CDCl₃中)δ：1.5-2.0(m,6H), 2.17(s,3H), 2.6-2.9(m,4H),6.93(d,1H,J=8Hz), 7.38(t,1H,J=8Hz), 8.30(d,1H,J=8Hz)
ＭＡＳＳ m/z： 217(M⁺)
【０１８８】(3) 1,8-ジアセチルアミノ-6,7,8,9-テトラヒドロ-5H-ベンゾシクロヘプテン-9-オン：実施例１-(2)において、8-アセチルアミノ-1-テトラロンの代わりに上記(2)で得られた化合物270mgを用い、実施例１-(2)と同様に反応させ、後処理し得られた化合物を、さらに実施例１-(3)と同様に反応させ、後処理することにより、標記化合物126mgを得た。
融点： 220-223℃（分解）
ＩＲν_{max}^{KBr} cm⁻¹： 1722, 1682, 1616, 1548
ＮＭＲ(CDCl₃中)δ：2.08(s,3H), 2.19(s,3H), 1.5-2.4(m,4H),2.7-3.1(m,2H), 4.7-4.9(m,1H), 6.1-6.3(br.s,1H),6.94(d,1H,J=8Hz), 7.34(t,1H,J=8Hz),8.32(d,1H,J=8Hz), 9.01(br.s,1H)
ＭＡＳＳ m/z： 274(M⁺)
【０１８９】(4) 8-アセチルアミノ-1-アミノ-6,7,8,9-テトラヒドロ-5H-ベンゾシクロヘプテン-9-オン：実施

例１-(4)において、2,8-ジアセチルアミノ-1-テトラロンの代わりに上記(3)で得られた化合物115mgを用い、実施例１-(4)と同様に反応させ、後処理することにより、標記化合物90mgを得た。

ＮＭＲ($CDCl_3$中) δ：2.04(s,3H)，1.5-1,7(m,2H)，2.0-3.2(m,4H),4.9-5.1(m,1H)，5.98(br.s,1H)，6.53(d,1H,J=8Hz),6.54(d,1H,J=8Hz)，6.72(br.s,1H),7.23(t,1H,J=8Hz)

【０１９０】(5) (10S)-1-アセチルアミノ-10-エチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-10-ハイドロキシ-13H-シクロヘプト[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-11,14(10H,16H)-ジオン：(4)で得られた化合物90mg、及びトリオン105mgを実施例１-(5)と同様に21時間反応させ、後処理を行うことにより、標記化合物72mgを得た。

融点：203-206℃（分解）

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}：1748，1660，1600，1160

ＮＭＲ($CDCl_3$中) δ：0.96,1.03(each t,3H,J=7Hz)，1.5-4.0(m,6H),2.15,2.27(each s,3H)，5.0-6.0(m,2H)，7.3-8.2(m,4H)

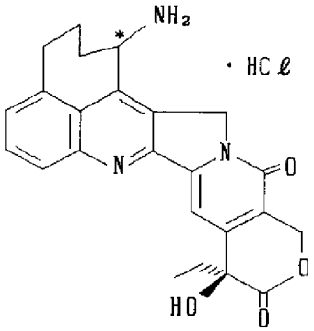
ＭＡＳＳ m/z：459(M^+)

【０１９１】実施例35

(10S)-1-アミノ-10-エチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-10-ハイドロキシ-13H-シクロヘプト[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-11,14(10H,16H)-ジオン・塩酸塩の合成：

【０１９２】

【化４１】



【０１９３】実施例34-(5)で得られた化合物65mgを実施例２と同様に４時間反応させ、後処理を行うことにより、標記化合物をアイソマーＡ（17mg）及びアイソマーＢ（21mg）としてそれぞれ得た。

アイソマーＡ：

融点 200-220℃（分解）

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}：1746，1660，1600，1164

ＮＭＲ(DMSO-d_6中) δ：0.88(t,3H,J=7Hz)，1.7-2.0(m,2H)，2.0-3.5(m,6H),5.15(s,1H)，5.46(s，2H)，5.53,5.73(ABq,2H,J=19Hz),6.56(s,1H)，7.35(s,1H)，7.63(d,1H,J=8Hz),7.79(t,1H,J=8Hz)，8.09(d,1H,J=8Hz)，8.79(br.s,3H)

ＭＡＳＳ m/z：417(M^+)

アイソマーＢ：

融点 210-230℃（分解）

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}：1744，1664，1600，1160

ＮＭＲ(DMSO-d_6中) δ：0.88(t,3H,J=7Hz)，1.7-2.0(m,2H)，2.0-3.5(m,6H),5.0-5.2(m,1H)，5.46(s,2H),5.54,5.72(ABq,2H,J=19Hz)，6.56(s,1H)，7.35(s,1H),7.62(d,1H,J=8Hz)，7.77(t,1H,J=8Hz),8.09(d,1H,J=8Hz)，8.61(br.s,3H)

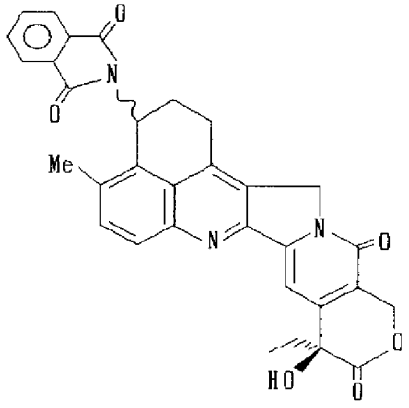
ＭＡＳＳ m/z：417(M^+)

【０１９４】実施例36

(9S)-9-エチル-2,3-ジヒドロ-3-(1,3-ジオキソイソインドリン-2-イル)-9-ハイドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10，13(9H,15H)-ジオンの合成：

【０１９５】

【化４２】



【０１９６】(1) 4-アジド-5-メチル-8-ニトロ-1-テトラロン：実施例13-(9)において、5-フルオロ-8-ニトロ-1-テトラロンの代わりに5-メチル-8-ニトロ-1-テトラロン410mgを用い、実施例13-(9)の場合と同様に反応させ、後処理を行うことにより、標記化合物490mgを得た。

ＮＭＲ($CDCl_3$中) δ：2.33-2.50(2H,m),2.55(3H,s)，2.69-2.75(1H,m),2.98-3.07(1H,m)，5.07(1H,t,J=2.9Hz)，7.42(1H,d,J=7.8Hz)，7.54(1H,d,J=8.8Hz)

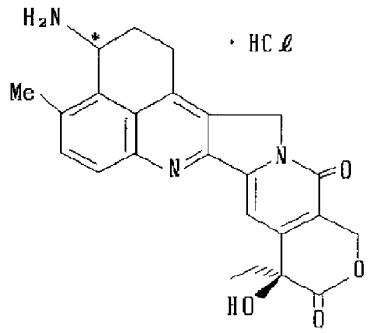
【０１９７】(2) 5-メチル-8-ニトロ-4-(1,3-ジオキソイソインドリン-2-イル)-1-テトラロン：実施例13-(9)において、4-アジド-5-フルオロ-8-ニトロ-1-テトラロンの代わりに上記(1)で得られた化合物490mgを用い、実施例13-(9)と同様に反応させ、後処理を行うことにより、標記化合物366mgを得た。

融点：220-223℃

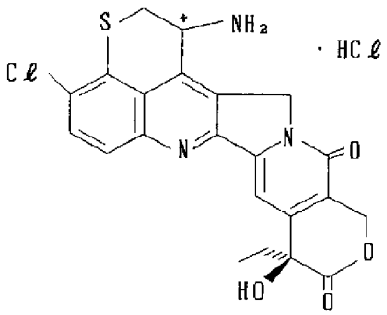
ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}：3456，3084，2940，1770，1712，1596

ＮＭＲ($CDCl_3$中) δ：2.26(3H,s)，2.38-2.44(1H,m)，2.

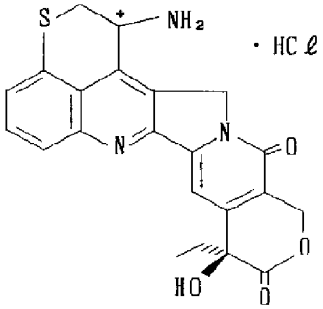
55-2.65(1H,m),2.72-2.79(1H,m), 2.93-3.02(1H,m),5.70-5.72(1H,m), 7.39(1H,d,J=8.3Hz),7.42(1H,d,J=8.3Hz), 7.74-7.84(4H,m)
ＭＡＳＳ m/z： 350(M⁺)
【０１９８】(3) 8-アミノ-5-メチル-4-(1,3-ジオキソイソインドリン-2-イル)-1-テトラロン：実施例13-(10)において、5-フルオロ-8-ニトロ-4-(1,3-ジオキソイソインドリン-2-イル)-1-テトラロンの代わりに上記(2)で得られた化合物145mgを用い、実施例13-(10)と同様に触媒として10%パラジウム炭素の代わりにラネーニッケルを用い反応させ、後処理を行うことにより、標記化合物75mgを得た。
融点： 163-165℃
ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}： 3456, 3344, 2952, 1770, 1710, 1622
ＮＭＲ($CDCl_3$中) δ：2.02(3H,s), 2.25-2.32(1H,m), 2.41-2.50(1H,m),2.58-2.64(1H,m), 2.88-2.98(1H,m),5.60-5.62(1H,m), 6.58(1H,d,J=8.3Hz),7.05(1H,d,J=8.3Hz), 7.70-7.81(4H,m)
ＭＡＳＳ m/z： 320(M⁺)
【０１９９】(4) (9S)-9-エチル-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-3-(1,3-ジオキソイソインドリン-2-イル)-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン：(3)で得られた化合物62mg及びトリオン51mgを実施例６-(3)と同様に18時間反応させ、後処理を行うことにより、標記化合物86mgを得た。
融点： 285-290℃（分解）
ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}： 3448, 2944, 1748, 1714, 1660, 1600
ＮＭＲ(DMSO-d_6中) δ：0.89-0.93(3H,m), 1.82-1.93(2H,m), 2.32(3H,s),2.46(1H,br), 3.18-3.22(2H,m), 5.22-5.48(4H,m),5.85(1H,br), 6.49(1/2H,s), 6.51(1/2H,s),7.36(1H,s), 7.65(1H,d,J=8.3Hz), 7.79-7.84(4H,m),8.04(1H,d,J=8.3Hz)
ＭＡＳＳ m/z： 547(M⁺)
【０２００】実施例37
(9S)-3-アミノ-9-エチル-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン・塩酸塩の合成：
【０２０１】
【化４３】



【０２０２】実施例36-(4)で得られた化合物74mgを実施例７と同様に反応させ、後処理を行うことにより、標記化合物をアイソマーＡ（14mg）及びアイソマーＢ（15mg）としてそれぞれ得た。
アイソマーＡ：
融点 250℃以上（分解）
ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}： 3448, 2936, 1742, 1656, 1592
ＮＭＲ(DMSO-d_6中) δ：0.90(3H,t,J=7.3Hz), 1.84-1.91(2H,m),2.13-2.20(1H,m), 2.54-2.58(1H,m), 2.68(3H,s),5.05(1H,br), 5.19-5.44(4H,m), 6.50(1H,s),7.33(1H,s), 7.76(1H,d,J=8.8Hz),8.10(1H,d,J=8.8Hz), 8.27(3H,br)
ＭＡＳＳ m/z： 417(M⁺)
アイソマーＢ：
融点： 250℃以上（分解）
ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}： 3400, 3236, 2976, 1746, 1662, 1614
ＮＭＲ(DMSO-d_6中) δ：0.89(3H,t,J=7.3Hz), 1.83-1.94(2H,m),2.13-2.20(1H,m), 2.59-2.62(1H,m), 2.69(3H,s),3.27-3.42(2H,m), 5.07(1H,br), 5.19-5.44(4H,m), 7.34(1H,s), 7.78(1H,d,J=8.8Hz),8.12(1H,d,J=8.8Hz), 8.53(3H,br)
ＭＡＳＳ m/z： 417(M⁺)
【０２０３】実施例38
(9S)-1-アミノ-4-クロロ-9-エチル-1,2-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-12H-チイノ[4,3,2-dc]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン・塩酸塩の合成：
【０２０４】
【化４４】



【０２０５】(1) 5-アセチルアミノ-8-クロロ-4-チオクロマノン：5-アセチルアミノ-8-アミノ-4-チオクロマノン（特開平1-279891号公報）500mgを濃塩酸12ml、水3mlに懸濁した溶液を０℃に冷却した溶液に、亜硝酸ソーダ153mgを水２mlに溶解した溶液を徐々に滴下後５分間撹拌した溶液を、塩化第一銅270mgを濃塩酸３mlに溶解した溶液に０℃で注ぎ込む。室温で一夜撹拌した後、さらに70℃で20分間撹拌し、反応液をクロロホルムで抽出し、抽出液を無水硫酸マグネシウムで乾燥後溶媒を濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルムで展開して目的物を含む画分を濃縮することにより、標記化合物478mgを得た。
ＮＭＲ($CDCl_3$中) δ：2.22(3H,s)，2.45-3.42(4H,m)，7.43(1H,d,J=9Hz),8.50(1H,d,J=9Hz)
【０２０６】(2) 3,5-ジアセチルアミノ-8-クロロ-4-チオクロマノン：実施例12-(1)において、5-アセチルアミノ-8-メチル-4-チオクロマノンの代わりに(1)で得られた化合物477mgを実施例12-(1)と同様に反応させ、後処理することにより、標記化合物171mgを得た。
ＮＭＲ($CDCl_3$中) δ：2.08(3H,s)，2.20(3H,s)，3.20(1H,d,J=13Hz),3.51(1H,dd,J=13,9Hz)，4.7-4.9(1H,m),7.50(1H,d,J=9.2Hz)，8.54(1H,d,J=9.2Hz)
【０２０７】(3) 3-アセチルアミノ-5-アミノ-8-クロロ-4-チオクロマノン：(2)で得られた化合物171mgを実施例12-(2)と同様に反応させ、後処理することにより、標記化合物22mgを得た。
ＮＭＲ($CDCl_3$中) δ：2.09(3H,s)，3.07(1H,d,J=13Hz)，3.60(1H,dd,J=12.5Hz,4.5Hz)，4.7-4.9(1H,m),6.36(1H,d,J=9Hz)，7.00(1H,d,J=9Hz)
【０２０８】(4) (9S)-1-アミノ-4-クロロ-9-エチル-1,2-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-12H-チイノ[4,3,2-de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン・塩酸塩：(3)で得られた化合物22mg及びトリオン23mgを実施例12-(3)と同様に11時間反応させ、後処理することにより、標記化合物をアイソマーＡ（12mg）及びアイソマーＢ（11mg）として得た。
アイソマーＡ：
ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}：3444，1744，1660，1590，1556
ＮＭＲ(DMSO-d_6中) δ：0.90(3H,t,J=7.3Hz)，1.89(2H,m),3.62(2H,d,J=1.95Hz)，5.46(2H,s),5.47,5.85(1H,ABq,J=19.5Hz)，6.54-6.58(1H,br.s),7.39(1H,s)，7.97(1H,d,J=8.8Hz),8.06(1H,d,J=8.8Hz)，8.80-8.87(3H,m)
ＭＡＳＳ m/z：456(M^++1)
アイソマーＢ：
ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}：3452，1746，1662，1596，1556
ＮＭＲ(DMSO-d_6中) δ：0.89(3H,t,J=7.3Hz)，1.88(2H,m)，3.60-3.63(2H,m),5.46(2H,s)，5.48,5.81(2H,ABq,J=19.5Hz),6.54-6.57(1H,br.s)，7.40(1H,s),7.97(1H,d,J=8.8Hz)，8.06(1H,d,J=8.8Hz),8.75-8.82(3H,m)
ＭＡＳＳ m/z：456(M^++1)
【０２０９】実施例39
(9S)-1-アミノ-9-エチル-1,2-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-12H-チイノ[4,3,2-de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン・塩酸塩の合成：
【０２１０】
【化４５】



【０２１１】(1) 3,5-ジアセチルアミノ-4-チオクロマノン：実施例12-(1)において、5-アセチルアミノ-8-メチル-4-チオクロマノンの代わりに5-アセチルアミノ-4-チオクロマノン360mgを用い、実施例12-(1)と同様に反応させ、後処理することにより、標記化合物133mgを得た。
ＮＭＲ($CDCl_3$中) δ：2.11(3H,s)，2.23(3H,s)，3.06(1H,d,J=12.7Hz),3.52(1H,dd,J=12.5Hz,4.8Hz)，4.83-5.09(1H,m),6.7-6.9(1H,br)，6.93(1H,dd,J=7.9Hz,1.3Hz)，7.2-7.4(1H,br)，7.27-7.46(1H,m),8.46(1H,dd,J=8.4Hz,1.2Hz)
【０２１２】(2) 3-アセチルアミノ-5-アミノ-4-チオクロマノン：(1)で得られた化合物132mgを実施例12-(2)と同様に反応させ、後処理することにより、標記化合物62mgを得た。
ＮＭＲ($CDCl_3$中) δ：2.09(3H,s)，3.13(1H,d,J=13Hz)，3.52(1H,dd,J=13Hz,9Hz)，4.72-4.97(1H,m),6.36(1H,dd,J=8.3Hz,1Hz),6.50(1H,dd,J=7.66Hz,1.09Hz)，6.75-7.1(1H,br),7.09(1H,t,J=8Hz)
【０２１３】(3) (9S)-1-アミノ-9-エチル-1,2-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-12H-チイノ[4,3,2-de]ピラノ[3',4':

6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン・塩酸塩：(2)で得られた化合物62mg及びトリオン76mgを実施例12-(3)と同様に10時間反応させ、後処理することにより、標記化合物をアイソマーＡ（19mg）及びアイソマーＢ（11mg）として得た。

アイソマーＡ：

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}：3444，1746，1660，1596，1502

ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.94(3H,t,J=7.3Hz)，1.89(2H,m),3.58(2H,ABq,J=15Hz,14Hz)，5.43(2H,s),5.49(1H,d,J=16.1Hz)，5.91(1H,d,J=19.5Hz),6.47-6.55(1H,br.s)，7.43(1H,s),7.69(1H,d,J=6.84Hz)，7.78-7.82(1H,m),8.04(1H,d,J=8.3Hz)，8.86-8.95(3H,br)

ＭＡＳＳ m/z：422(M$^+$+1)

アイソマーＢ：

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}：3420，1746，1660，1598，1504

ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.89(3H,t,J=7.3Hz)，1.89(2H,m)，3.51-3.63(1H,m),5.39-5.52(4H,m)，5.91(1H,d,J=19.5Hz),6.49-6.60(1H,br)，7.40(1H,s),7.71(1H,d,J=7.33Hz)，7.79-7.83(1H,m),8.04(1H,d,J=8.3Hz)，8.87-9.0(3H,br)

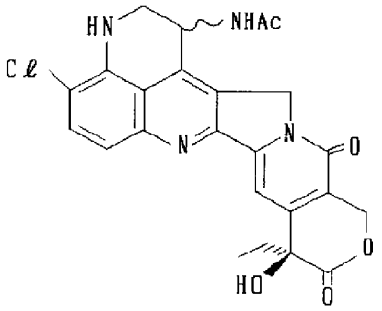
ＭＡＳＳ m/z：422(M$^+$+1)

【０２１４】実施例40

(9S)-1-アセチルアミノ-9-エチル-4-クロル-1,2-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-3H,12H-ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-c]ベンゾ[ij][2,7]ナフチリジン-10,13(9H,15H)-ジオンの合成：

【０２１５】

【化４６】



【０２１６】(1) 1-アセチル-5-アセチルアミノ-8-クロル-2,3-ジヒドロキノリン-4-オン：実施例17-(1)において、5-アミノ-8-メチル-2,3-ジヒドロキノリン-4-オンの代わりに5-アミノ-8-クロル-2,3-ジヒドロキノリン-4-オン（特開平1-279891号公報）3.8gを用い、実施例17-(1)と同様に反応させ、後処理を行うことにより、標記化合物2.8gを得た。

融点：175-177℃

ＮＭＲ(CDCl$_3$中)δ：2.14(s,3H)，2.26(s,3H)，2.0-6.2(m,5H),7.60(d,1H,J=9Hz)，8.66(d,1H,J=9Hz)

【０２１７】(2)1-アセチル-3,5-ジアセチルアミノ-8-クロル-2,3-ジヒドロキノリン-4-オン

実施例１-(2)において、8-アセチルアミノ-1-テトラロンの代わりに上記(1)で得られた化合物1.4gを用い、実施例１-(2)と同様に反応させ、後処理し、得られた化合物をさらに実施例１-(3)と同様に反応させ、後処理を行うことにより、標記化合物0.62gを得た。

融点：206-210℃

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}：1680，1662，1576，1512，1284

ＮＭＲ(CDCl$_3$中)δ：2.06(s,3H)，2.12(s,3H)，2.25(s,3H)，3.5-6.5(m,3H),7.5-8.7(m,2H)，11.44(br.s,1H)

ＭＡＳＳ m/z：337(M$^+$)，339(M$^+$+2)

【０２１８】(3) 3,5-ジアミノ-8-クロル-2,3-ジヒドロキノリン-4-オン：(2)で得られた化合物514mgに６Ｎ塩酸8mlを加え、110℃で1.5時間加熱撹拌した。反応液を冷却し、クロロホルムを加え撹拌させながら１Ｎ水酸化ナトリウム水溶液50mlを加え、クロロホルム層を抽出し飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濃縮して標記化合物260mgを得た。

ＮＭＲ(CDCl$_3$中)δ：3.2-3.5(m,1H)，3.6-3.8(m,2H)5.00(br.s,2H),5.89(d,1H,J=9Hz)，6.37(br.s,2H)，7.09(d,1H,J=9Hz)

【０２１９】(4) 3-アセチルアミノ-5-アミノ-8-クロル-2,3-ジヒドロキノリン-4-オン：(3)で得られた化合物260mgをジクロルメタン５ml及びＴＨＦ５mlの混合溶媒に溶解し氷冷撹拌下、ピリジン0.16ml及び無水酢酸0.13mlを加え20分間撹拌した。反応液を濃縮し、残渣にクロロホルムを加え飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し濃縮した。得られた残渣をエーテル及び石油エーテルで粉末化して標記化合物287mgを得た。

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}：3428，1614，1498，1316，1146

ＮＭＲ(CDCl$_3$中)δ：2.09(s,3H)，3.0-4.7(m,3H)，5.10(br.s,1H),5.89(d,1H,J=9Hz)，6.51(br.s,1H)，7.11(d,1H,J=9Hz)

ＭＡＳＳ m/z：253(M$^+$)，255(M$^+$+2)

【０２２０】(5) (9S)-1-アセチルアミノ-9-エチル-4-クロル-1,2-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-3H,12H-ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-c]ベンゾ[ij][2,7]ナフチリジン-10,13(9H,15H)-ジオン：

(4)で得られた化合物267mg及びトリオン277mgを実施例17-(5)と同様に７時間反応させ、後処理を行うことにより、標記化合物202mgを得た。

融点：250-270℃（分解）

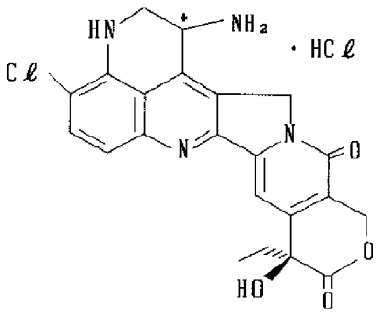
ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}：1748，1662，1608，1158

ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.87(t,3H,J=7Hz)，1.7-2.0(m,2H)，2.50(s,3H),3.4-3.6(m,2H)，5.19,5.27(ABq,2H,J=19Hz),5.43(s,2H)，5.4-5.6(m,1H)，6.52(s,1H),7.29,7.30(each s,1H)，7.40(d,1H,J=9Hz),7.71(d,1H,J=9Hz)，8.52(t,1H,J=8Hz)

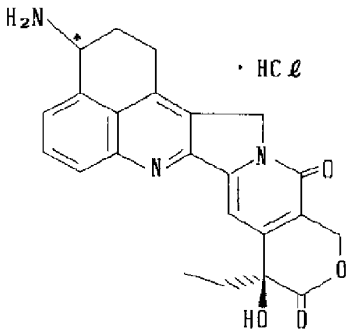
ＭＡＳＳ m/z：480(M$^+$)，482(M$^+$+2)

OnCusp
Ex. 1002

【０２２１】実施例41
(9S)-1-アミノ-9-エチル-4-クロル-1,2-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-3H,12H-ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-c]ベンゾ[ij][2,7]ナフチリジン-10,13(9H,15H)-ジオン・塩酸塩の合成：
【０２２２】
【化４７】



【０２２３】実施例40-(5)で得られた化合物190mgを実施例２と同様に３時間反応させ、後処理を行うことにより、標記化合物をアイソマーＡ（67mg）及びアイソマーＢ（40mg）としてそれぞれ得た。
アイソマーＡ：
融点 130-150℃（分解）
ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}： 1744, 1658, 1606, 1162
ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.88(t,3H,J=7Hz), 1.7-2.0(m,2H),3.45(q,1H,J=7Hz), 3.57,3.89(each d,1H,J=12Hz), 4.2-4.5(br,1H), 5.15(s,1H),5.39,5.79(ABq,2H,J=19Hz), 5.45(s,2H), 6.55(s,1H),6.85(s,1H), 7.34(s,1H), 7.49(d,1H, J=9Hz),7.78(d,1H,J=9Hz), 8.68(br.s,3H)
ＭＡＳＳ m/z： 438(M^+), 440(M^++2)
アイソマーＢ：
融点 250-270℃（分解）
ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}： 1750, 1600, 1608, 1160
ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.88(t,3H,J=7Hz), 1.7-1.9(m,2H),3.56,3.89(ABq,1H,J=12Hz), 5.16(s,1H),5.41,5.78(ABq,2H,J=19Hz), 5.45(s,2H), 6.56(s,1H),6.86(s,1H), 7.34(s,1H), 7.49(d,1H,J=9Hz),7.79(d,1H,J=9Hz), 8.67(br.s,3H)
ＭＡＳＳ m/z： 438(M^+), 440(M^++2)
【０２２４】実施例42
(9S)-3-アミノ-9-エチル-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン・塩酸塩の合成：
【０２２５】
【化４８】



【０２２６】(1) 8-アセチルアミノ-4-(1,3-ジオキソイソインドリン-2-イル)-1-テトラロン：四塩化炭素60mlに8-アセチルアミノ-1-テトラロン1.07g、N-ブロモスクシイミド1.28g及び触媒量の過酸化ベンゾイルを加え、１時間加熱還流した。室温まで冷却した後、析出物を濾去し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルムで展開し目的物を含む画分を濃縮して得たブロム体を20mlのDMFに溶かし０℃に冷却した後、440mgのアジ化ナトリウムを少量ずつ加え、０℃で30分さらに室温で１時間撹拌した後、水30mlを加えた。エーテルで２回抽出した後水、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン－酢酸エチル（４：１）の混合溶媒で展開し、目的物を含む画分を濃縮することにより、４位アジド体1.17gを得た。得られたアジド体にベンゼン50ml、トリフェニルホスフィン1.38g、無水フタル酸781mgを加え12時間加熱還流後、40mgのテトラ-n-ブチルアンモニウムシアニドを加え、さらに４時間加熱還流した後溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン－酢酸エチル（２：１）の混合溶媒で展開し、目的物を含む画分を濃縮することにより、標記化合物1.25gを得た。
ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：2.26(3H,s), 2.2-2.3(1H,m), 2.75-3.0(3H,m),5.69(1H,dd,J=5.4Hz,10.8Hz), 6.74(1H,d,J=7.8Hz),7.44(1H,t,J=7.8Hz), 7.75-7.80(2H,m),7.85-7.82(2H,m), 8.71(1H,d,J=7.8Hz), 12.18(1H,s)
【０２２７】(2) 8-アミノ-4-(1,3-ジオキソイソインドリン-2-イル)-1-テトラロン：(1)で得られた化合物339mgを４Ｎ塩酸10mlに加え、１時間加熱還流した。室温まで冷却した後、炭酸水素ナトリウムを加えてアルカリ性にした後、クロロホルムで抽出した。抽出液を水、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン－酢酸エチル（４：１）の混合溶媒で展開し、目的物を含む画分を濃縮することにより、標記化合物190mgを得た。
ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：2.15-2.21(1H,m),2.7-3.0(3H,m), 5.60(1H,dd,J=4.6Hz,11.5Hz), 6.22(1H,d,J=7.8Hz),6.5

5(1H,d,J=7.8Hz)，7.12(1H,t,J=7.8Hz),7.74-7.79(2H,m)，7.86-7.90(2H,m)

【０２２８】(3) (9S)-3-アミノ-9-エチル-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン・塩酸塩：トルエン20mlに(2)で得られた化合物190mg及びトリオン163mgを実施例１-(5)と同様に15時間反応させ、後処理することにより、(9S)-9-エチル-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-3-(1,3-ジオキソイソインドリン-2-イル)-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン263mgを３位異性体の混合物として得た。得られた化合物223mgを実施例13の(12)と同様に処理することにより、標記化合物をアイソマーＡ（73mg）及びアイソマーＢ（58mg）として得た。

アイソマーＡ：

融点：　190℃以上（分解）

ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.90(3H,t,J=7.3Hz)，1.87(2H,m)，2.2-2.5(2H,m),3.2-3.45(2H,m)，4.98(1H,m)，5.30(2H,s),5.44(2H,s)，7.36(1H,s)，7.85-7.93(2H,m),8.17(1H,d,J=8.3Hz)，8.88(3H,m)

アイソマーＢ：

融点：　218℃以上（分解）

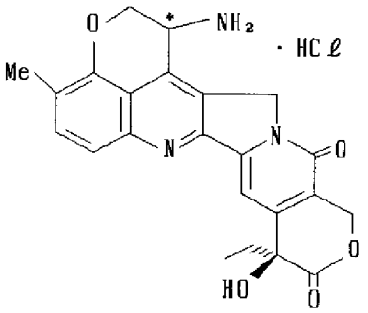
ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.90(3H,t,J=7.3Hz)，1.88(2H,m)，2.3-2.5(2H,m),3.3-3.4(2H,m)，4.91(1H,m)，5.32(2H,s),5.45(2H,s)，7.37(1H,s)，7.85(1H,d,J=6.8Hz),7.92(1H,dd,J=6.8Hz,7.7Hz)，8.19(1H,d,J=7.7Hz),8.80(3H,m)

【０２２９】実施例43

(9S)-1-アミノ-9-エチル-1,2-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-12H-ピラノ[4,3,2-de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン・塩酸塩の合成：

【０２３０】

【化４９】



【０２３１】(1) 3,5-ジアセチルアミノ-8-メチル-4-クロマノン：実施例12-(1)において、5-アセチルアミノ-8-メチル-4-チオクロマノンの代わりに5-アセチルアミノ-8-メチル-4-クロマノン（特開平1-279891号公報）１gを用い、同様に反応させ、後処理することにより、標記化合物105mgを得た。

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：2.11(3H,s)，2.17(3H,s)，2.22(3H,s),3.98(1H,dd,J=12.1Hz,15.1Hz)，4.70-5.05(2H,m)，6.26(1H,m)，7.34(1H,d,J=8.3Hz)，8.18(1H,d,J=8.3Hz)

【０２３２】(2) 3-アセチルアミノ-5-アミノ-8-メチル-4-クロマノン：(1)で得られた化合物100mgを濃塩酸３ml に加え、80℃で１時間撹拌した。冷却後、氷水５mlを加え炭酸ナトリウムを加えアルカリ性とした後、クロロホルムで抽出し、クロロホルム層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルム－酢酸エチル（４：１）の混合溶媒で展開して、目的物を含む画分を濃縮することにより、標記化合物48mgを得た。

融点：　178-180℃

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}：　3448，3328，1650，1628，1484

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：2.06(3H,s)，2.08(3H,s)，3.7-4.1(1H,m),4.65-5.05(2H,m)，6.14(1H,d,J=8.3Hz),7.06(1H,d,J=8.3Hz)

【０２３３】(3) (9S)-1-アミノ-9-エチル-1,2-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-12H-ピラノ[4,3,2-de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン・塩酸塩：(2)で得られた化合物139mg及びトリオン156mgを酢酸12mlに加え、６時間加熱還流した。反応液を冷却し、溶媒を溜去後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルム　メタノール（98：２）で展開して、目的物を含む画分を濃縮して得られた残渣に、濃塩酸５mlを加え80℃で２時間撹拌した。反応液を濃縮後、残渣に水20mlを加え不溶物を濾過により除き、濾液を高速液体クロマトグラフィー〔CAPCELL PAK C18；アセトニトリル－水－１Ｎ塩酸（18：82：１）で展開〕で精製し、標記化合物をアイソマーＡ（77mg）及びアイソマーＢ（93mg）として得た。

アイソマーＡ：

融点：　200℃以上（分解）

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}：　3432，1756，1658，1602

ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.89(3H,t,J=6.8Hz)，1.83-1.92(2H,m)，2.44(3H,s),4.44(1H,d,J=12.2Hz)，4.91(1H,d,J=12.2Hz),5.20(1H,brs)，5.39,5.78(2H,ABq,J=19Hz)，5.44(2H,s)，7.37(1H,s)，7.78(1H,d,J=8.8Hz),7.80(1H,d,J=8.8Hz)，8.88(3H,br)

ＭＡＳＳ　m/z：　420(M^++1)

アイソマーＢ：

融点：　200℃以上（分解）

ＩＲν_{max}^{KBr} cm^{-1}：　3444，1746，1658，1596

ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.90(3H,t,J=7.3Hz)，1.83-1.92(2H,m)，2.45(3H,s),4.44(1H,d,J=11.7Hz)，4.91(1H,d,J=11.7Hz),5.20(1H,brs)，5.41,5.78(2H,ABq,J=19.5Hz),5.44,5.48(2H,ABq,J=16.6Hz)，7.40(1H,s),7.78(1H,d,J=8.8Hz)，7.82(1H,d,J=8.8Hz),8.97(3H,br)

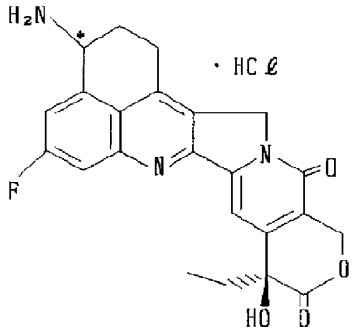
ＭＡＳＳ m/z： 420(M⁺+1)

【０２３４】実施例44

(9S)-3-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン・塩酸塩の合成：

【０２３５】

【化５０】



【０２３６】(1) 4-(4-フルオロフェニル)-4-オキソブタノイックアシッド：フルオロベンゼン79.6gに無水コハク酸50gと塩化アルミニウム133.3gを加え、６時間加熱還流した。過剰のフルオロベンゼンを留去した後、残渣を冷１％塩酸水溶液２lに加え、析出物を沪取し、水で洗浄した後、乾燥することにより、標記化合物73gを得た。

ＮＭＲ(CDCl$_3$中)δ：2.82(2H,t,J=6.6Hz)，3.29(2H,t,J=6.6Hz),7.1-7.2(2H,m)，7.9-8.1(2H,m)

【０２３７】(2) 4-(4-フルオロフェニル)ブタノイックアシッド　メチルエステル：(1)で得られた化合物73gを酢酸600mlに溶解し、40％過塩素酸20ml及び10％パラジウム－炭素10gを加え、５気圧で接触水素添加を行う。酢酸を留去した後水100mlを加え、酢酸エチルで抽出した後、飽和炭酸水素ナトリウム、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去した後、残渣にジクロロメタン100ml、炭酸ナトリウム74g、塩化チオニル30mlを加え、３時間加熱還流した後０℃に冷却した。メタノール150mlを徐々に加え室温で12時間撹拌した後、酢酸エチル300mlを加え、水、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を留去することにより、標記化合物66.7gを得た。

ＮＭＲ(CDCl$_3$中)δ：1.93(2H,quintet,J=7.8Hz)，2.32(2H,t,J=7.8Hz),2.62(2H,t,J=7.8Hz)，3.66(3H,s)，6.96(2H,m),7.13(2H,m)

【０２３８】(3) 4-(4-フルオロ-2-ニトロフェニル)ブタノイックアシッド　メチルエステル：(2)で得られた化合物66.7gを冷濃硫酸600mlに加え、内温５℃以下に保ちながら硝酸カリウム50gの濃硫酸溶液300mlを滴下した。滴下終了後さらに30分間撹拌した後、反応液を氷水中に注ぎ酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン－酢酸エチル（40：３）の混合溶媒で展開し、目的物を含む画分を濃縮することにより、標記化合物39.3gを得た。

ＮＭＲ(CDCl$_3$中)δ：1.98(2H,m)，2.40(2H,t,7.3Hz)，2.91(2H,t,J=7.8Hz),3.69(3H,s)，7.27(1H,ddd,J=2.9Hz,7.8Hz,8.3Hz),7.37(1H,dd,J=5.3Hz,8.3Hz),7.66(1H,dd,J=2.9Hz,8.8Hz)

【０２３９】(4) 4-(2-アセチルアミノ-4-フルオロフェニル)ブタノイックアシッド　メチルエステル：(3)で得られた化合物39.3gと10％パラジウム－炭素３gをメタノール200mlに加え６時間接触水素添加を行う。触媒を沪去し溶媒を留去した後、残渣にクロロホルム50mlを加え、室温で撹拌しながら無水酢酸50mlを加え、３時間撹拌した。反応液を濃縮乾固することにより、標記化合物42.0gを得た。

ＮＭＲ(CDCl$_3$中)δ：1.72-1.85(2H,m),2.31(3H,s)，2.45(2H,m),2.56(2H,m)，3.76(3H,s)，6.71(1H,dt,J=2.5Hz,8.3Hz),7.04(1H,dd,J=6.3Hz,8.3Hz),8.08(1H,dd,J=2.5Hz,10.8Hz)

【０２４０】(5) 5-アセチルアミノ-7-フルオロ-1-テトラロン：(4)で得られた化合物42gをメタノール100mlに溶かし、１Ｎ水酸化ナトリウム200mlを加えて室温で３時間撹拌した。反応液を約200mlに濃縮した後、濃塩酸を加えて酸性とし酢酸エチル100mlで３回抽出を行う。酢酸エチル層を水、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を留去を留去した。残渣にジクロロメタン100mlを加え、さらに炭酸ナトリウム17g、塩化チオニル12mlを加えた後、２時間加熱還流した。室温まで冷却し、不溶物を沪去した。沪液を濃縮し、残渣に200mlの1,2-ジクロロエタンと塩化アルミニウム40gを加え70℃で３時間、90℃で１時間撹拌した。反応液を氷水中に注ぎ、クロロホルムで抽出した後、水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルム－酢酸エチル（７：３）の混合溶媒で展開し、目的物を含む画分を濃縮することにより、標記化合物17gを得た。

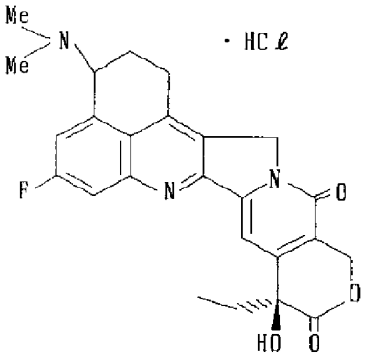
ＮＭＲ(CDCl$_3$中)δ：2.16(2H,m)，2.24(3H,s)，2.66(2H,t,J=6.83Hz),2.78(2H,t,J=6.0Hz)，7.08(1H,br.s),7.59(1H,dd,J=2.4Hz,8.3Hz)，7.84(1H,dd,J=2.4Hz,7.8Hz)

【０２４１】(6) 5-アセチルアミノ-7-フルオロ-1,2,3,4-テトラヒドロナフタレン：(5)で得られた化合物10.5g、10％パラジウム－炭素５g及び過塩素酸５mlを酢酸300mlに加え、５気圧で６時間接触水素添加を行う。触媒を沪去し、反応液を約50mlに濃縮した後、水100mlを加えクロロホルムで３回抽出を行う。クロロホルム層を

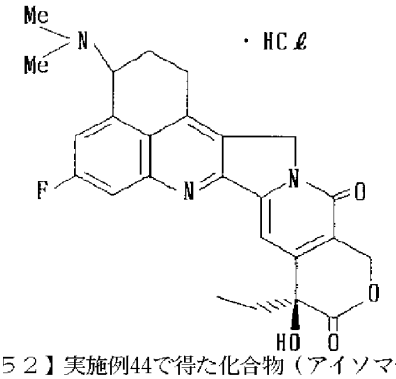
水、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を留去することにより、標記化合物9.5gを得た。
ＮＭＲ(CDCl$_3$中)δ：1.7-1.9(4H,m)，2.20(3H,s)，2.52(2H,m)，2.75(2H,m),6.61(1H,d,J=8.8Hz)，6.94(1H,m)，7.59(1H,d,J=9.8Hz)
【０２４２】(7) 8-アセチルアミノ-6-フルオロ-1-テトラロン：(6)で得られた化合物9.46gをアセトン420mlに溶かし、42mlの15%硫酸マグネシウム水溶液を加え、０℃に冷却し、過マンガン酸カリウム21.7gを少量づつ加えた。添加終了後０℃で50分間撹拌し、さらに室温で１時間撹拌した後、反応液を水１１に注ぎクロロホルムで３回抽出した。クロロホルム層を水、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン－酢酸エチル（３：１）の混合溶媒で展開し、目的物を含む画分を濃縮することにより、標記化合物7.98gを得た。
ＮＭＲ(CDCl$_3$中)δ：2.08(2H,m)，2.24(3H,s)，2.69(2H,t,J=6.4Hz),2.96(2H,t,J=6.1Hz)，6.64(1H,dd,J=2.4Hz,8.3Hz),8.42(1H,dd,J=2.4Hz,12.0Hz)，12.35(1H,br.s)
【０２４３】(8) 6-フルオロ-8-トリフェニルメチルアミノ-1-テトラロン：(7)で得られた化合物287mgに４Ｎ塩酸10mlを加え、１時間加熱還流した。反応液を氷水中に注ぎ酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン－酢酸エチル（７：３）の混合溶媒で展開し、目的物を含む画分を濃縮した。残渣にジクロロメタン５ml、トリエチルアミン0.8ml、トリフェニルメチルクロリド1.5gを加え、４時間加熱還流した。室温まで冷却した後、ジクロロメタン20mlを加え、水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン－酢酸エチル（３：１）の混合溶媒で展開し、目的物を含む画分を濃縮することにより、標記化合物706mgを得た。
ＮＭＲ(CDCl$_3$中)δ：2.03(2H,m)，2.66(2H,t,J=6.4Hz)，2.84(2H,t,J=6.1Hz),5.67(1H,dd,J=2.4Hz,12.7Hz),6.02(1ll,dd,J=2.4llz,8.8llz)，7.2-7.4(15ll,m),11.29(1ll,s)
【０２４４】(9) 6-フルオロ-8-トリフェニルメチルアミノ-4-(1,3-ジオキソイソインドリン-2-イル)-1-テトラロン：四塩化炭素30mlに(8)で得られた化合物706mg、N-ブロモスクシイミド231mg及び触媒量の過酸化ベンゾイルを加え、30分間加熱還流した。室温まで冷却した後クロロホルム30mlを加え、１Ｎ冷水酸化ナトリウム、水、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を留去した。残渣を５mlのDMFに溶かし０℃に冷却した後、160mgのアジ化ナトリウムを少量ずつ加え、０℃で１時間さらに室温で１時間撹拌した後、水30mlを加えた。エーテルで２回抽出した後水、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン－酢酸エチル（９：１）の混合溶媒で展開し、目的物を含む画分を濃縮することにより、４位アジド体344mgを得た。得られたアジド体にベンゼン20ml、トリフェニルホスフィン205mg、無水フタル酸116mgを加え、12時間加熱還流した後40mgのテトラ-n-ブチルアンモニウムシアニドを加え、さらに８時間加熱還流した後溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルム－ヘキサン（１：１）の混合溶媒で展開し、目的物を含む画分を濃縮することにより、標記化合物440mgを得た。
ＮＭＲ(CDCl$_3$中)δ：2.15(1H,m)，2.7-3.1(3H,m),5.55(1H,dd,J=4.40Hz,12.2Hz),5.75(1H,dd,J=2.4Hz,7.8Hz)，5.77(1H,dd,J=2.4Hz,10.2Hz)，7.2-7.4(15H,m),7.67(2H,m)，7.88(2H,m)，11.41(1H,s)
【０２４５】(10) 8-アミノ-6-フルオロ-4-(1,3-ジオキソイソインドリン-2-イル)-1-テトラロン：０℃に冷却したぎ酸８mlに(1)で得られた化合物423mgを加え、撹拌しながら濃塩酸１滴を加えた。室温で１時間撹拌した後、溶媒を留去した。残渣をクロロホルムに溶解し、濃縮した後エーテル－ヘキサン混合溶媒を加えて析出する結晶を沪取することにより、標記化合物132mgを得た。
ＮＭＲ(CDCl$_3$中)δ：2.16(1H,m)，2.7-3.05(3H,m),5.56(1H,dd,J=4.4Hz,11.7Hz)，5.95(1H,dm,J=9.8Hz),6.21(1H,dd,J=2.0Hz,10.8Hz)，7.78(2H,m)，7.90(2H,m)
【０２４６】(11) (9S)-3-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン・塩酸塩：トルエン10mlに(10)で得られた化合物125mg及び(S)-4-エチル-4-ヒドロキシ-7,8-ジヒドロ-1H-ピラノ[3,4-f]インドリジン-3,6,10(4H)-トリオン104mgを実施例１-(5)と同様に22時間反応させ、後処理することにより、(9S)-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-3-(1,3-ジオキソイソインドリン-2-イル)-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン119mgを３位異性体の混合物として得た。得られた化合物119mgを、実施例13の(12)と同様に処理することにより、標記化合物をアイソマーＡ（31mg）及びアイソマーＢ（35mg）として得た。
アイソマーＡ：
融点：　206℃から徐々に着色（分解）
ＮＭＲ(DMSO-d$_6$中)δ：0.88(3H,t,J=7.3Hz)，1.87(2H,m)，2.21-2.33(1H,m),2.40-2.55(1H,m)，3.25-3.40(2H,m)，4.92(1ll,m),5.31(2ll,s)，5.45(2ll,s)，6.54(1ll,s)，7.35(1H,s),7.81(1H,dd,J=2.4Hz,9.3Hz),7.97(1H,dd,J

OnCusp
Ex. 1002

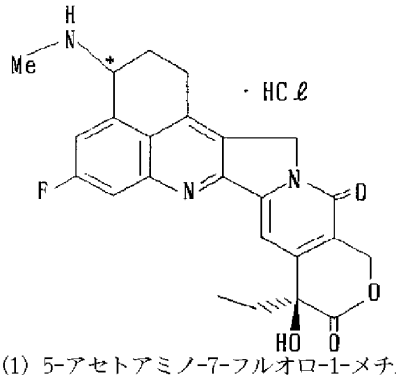
=2.4Hz,10.3Hz)，8.70(3H,br.s)
アイソマーＢ：
融点：194℃から徐々に着色（分解）
ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.88(3H,t,J=7.3Hz)，1.88(2H,m)，2.2-2.3(1H,m),2.4-2.5(1H,m)，3.3-3.4(2H,m)，4.94(1H,m),5.31(2H,s)，5.45(2H,s)，7.36(1H,s),7.82(1H,dd,J=2.4Hz,9.3Hz),7.98(1H,dd,J=2.4Hz,10.2Hz)，8.81(3H,br.s)
【０２４７】実施例45
(9S)-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-3-ジメチルアミノ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン・塩酸塩の合成：
【０２４８】
【化５１】



【０２４９】実施例44で得た化合物（アイソマーＡ）15mgに、35%ホルマリン水溶液１ml、ぎ酸0.08mlおよび１Ｎ水酸化ナトリウム0.03mlを加え、１時間加熱還流した後、溶媒を留去した。残渣に１Ｎ塩酸２mlを加え、溶媒を留去後、水４mlを加え不溶物を濾過により除き、濾液を高速液体クロマトグラフィー〔CAPCELL PAK C18；アセトニトリル－水－１N塩酸（17：83：１）で展開〕で精製し、標記化合物９mgを得た。
融点：182℃以上（分解）
ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.88(3H,t,J=7.3Hz)，1.87(2H,m)，2.3-2.7(2H,m),2.85(3H,d,J=4.4Hz)，2.87(3H,d,J=4.4Hz),3.2-3.6(2H,m)，4.99(1H,m),5.25,5.36(2H,ABq,J=19Hz)，5.45(2H,s),6.55(1H,m)，7.36(1H,s)，8.0-8.1(2H,m),10.42(1H,m)
【０２５０】実施例46
(9S)-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-3-ジメチルアミノ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン・塩酸塩の合成：
【０２５１】
【化５２】

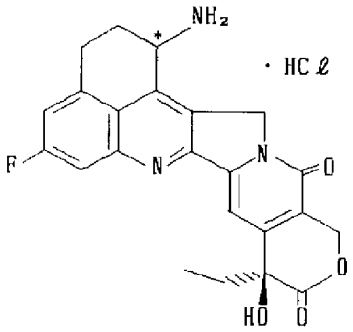


【０２５２】実施例44で得た化合物（アイソマーＢ）20mgを、実施例45と同様に処理した後、高速液体クロマトグラフィー〔CAPCELL PAK C18；アセトニトリル－水－１N塩酸（21：79：１）で展開〕で精製し、標記化合物９mgを得た。
融点：230℃以上（分解）
ＮＭＲ(DMSO-d6中)δ：0.88(3H,t,J=7.3Hz)，1.88(2H,m)，2.3-2.7(2H,m),2.86(3H,d,J=4.4Hz)，2.89(3H,d,J=4.9Hz),3.3-3.5(2H,m)，4.99(1H,m),5.26,5.37(2H,ABq,J=19Hz)，5.45(2H,s),6.55(1H,m)，7.36(1H,s)，8.01(1H,dm,J=9.3Hz),8.05(1H,dm,J=9.8Hz)，10.25(1H,m)
【０２５３】実施例47
(9S)-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-3-メチルアミノ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン・塩酸塩の合成：
【０２５４】
【化５３】



【０２５５】(1) 5-アセトアミノ-7-フルオロ-1-メチルトリフルオロアセトアミノテトラロン：エタノール20mlに実施例44の(5)で得た化合物1.02g、11mlの40%メチルアミン水溶液および1.2gの10%パラジウム－炭素を加え、9.5時間接触水素添加を行った後、触媒を濾去し、濾液を濃縮乾固した。残渣を20mlのクロロホルムに溶解し、２mlのトリエチルアミンを加え、0℃で撹拌しながら無水トリフルオロ酢酸４mlを加えた後、室温で１時間撹拌した。反応液を希塩酸、水、飽和食塩水で順次洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を留去し

て、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルム－酢酸エチル（９：１）で展開し、目的物を含む画分より標記化合物1.33gを得た。
ＮＭＲ(CDCl$_3$中)δ：1.7-2.0(1.6H,m),2.0-2.3(2.4H,m),2.22(3H,s),2.5-2.7(2H,m),2.71,2.84(3H,each s),5.15(0.4H,m),5.79(0.6H,m),6.54(0.6H,d,J=8.3Hz),6.65(0.4H,d,J=8.3Hz),6.97(1H,m),7.65-7.75(1H,m)
【０２５６】(2) 8-アセトアミノ-6-フルオロ-4-メチルトリフルオロアセトアミノ-1-テトラロン：(1)で得た化合物1.32gに、アセトン60mlと６mlの15%硫酸マグネシウム水溶液を加え、０℃で撹拌しながら1.9gの過マンガン酸カリウムを徐々に加える。添加終了後、同温度で30分間、さらに室温で30分間撹拌した後、水60mlを加え、クロロホルムで３回抽出した。抽出液を水、飽和食塩水で順次洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルム－酢酸エチル（９：１）で展開し、目的物を含む画分より標記化合物748mgを得た。
ＮＭＲ(CDCl$_3$中)δ：2.0-2.4(2H,m),2.26(3H,s),2.7-3.0(2H,m),2.84,2.97(3H,each small m),5.30(0.3H,dd,J=4.9Hz,11.7Hz),5.96(0.7H,dd,J=4.4Hz,11.7Hz),6.43(0.7H,dm,J=7.3Hz),6.56(0.3H,dm,J=7.3Hz),8.57(0.7H,dd,J=2.4Hz,11.2Hz),8.60(0.3H,dd,J=2.9Hz,11.7Hz),12.3(1H,br.s)
【０２５７】(3) 8-アミノ-6-フルオロ-4-メチルトリフルオロアセチルアミノ-1-テトラロン：(2)で得た化合物722mgに20mlの４Ｎ塩酸を加え、５時間加熱還流した。室温まで冷却した後、飽和炭酸水素ナトリウムを加え弱アルカリ性とした後、クロロホルムで３回抽出した。抽出液を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去した後、残渣に50mlのジクロロメタンと0.29mlのトリエチルアミンを加え、氷塩浴中（-12℃）で冷却撹拌しながら、無水トリフルオロ酢酸0.29mlを含むジクロロメタン溶液15mlを滴下した。同温度で１時間撹拌した後、反応液を水、飽和クエン酸水溶液、水、飽和食塩水で順次洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルム－酢酸エチル（19：１）で展開し、目的物を含む画分より標記化合物421mgを得た。
ＮＭＲ(CDCl$_3$中)δ：2.0-2.4(2H,m),2.6-2.9(2H,m),2.86,2.98(3H,each s),5.20(0.35H,dd,J=4.4Hz,11.7Hz),5.87(0.65H,dd,J=4.4Hz,11.7Hz),5.97(0.65H,dm,J=9.3Hz),6.09(0.35H,dm,J=9.3Hz),6.26(0.65H,dd,J=2.4Hz,8.7Hz),6.28(0.35H,dd,J=2.0Hz,8.8Hz)
【０２５８】(4) (9S)-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-3-メチルアミノ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン・塩酸塩：トルエン24mlに(3)で得た化合物378mgおよびトリオン330mgを加え、実施例１の(5)と同様に19時間反応させ、後処理することにより(9S)-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-3-メチルトリフルオロアセチルアミノ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン340mgを３位異性体の混合物として得る。得られた化合物300mgに濃塩酸30mlを加え、80℃で2.5時間撹拌した後、溶媒を留去した。残渣に水15mlを加え、不溶物を濾過により除き、濾液を高速液体クロマトグラフィー〔CAPCELL PAK C18；アセトニトリル－水－１Ｎ塩酸（20：80：１）で展開〕で精製し、標記化合物をアイソマーＡ（83mg）とアイソマーＢ（103mg）として得た。
アイソマーＡ：
融点：　230℃以上（分解）
ＮＭＲ(DMSO-d$_6$中)δ：0.89(3H,t,J=7.3Hz),1.87(2H,m),2.3-2.6(2H,m),2.70(3H,br.s),3.3-3.5(2H,m),4.81(1H,m),5.26,5.37(2H,ABq,J=19.1Hz),5.45(2H,s),6.55(1H,s),7.36(1H,s),7.90(1H,dd,J=2.4Hz,9.3Hz),8.03(1H,dd,2.4Hz,J=9.8Hz),9.2-9.4(2H,m)
アイソマーＢ：
融点：　230℃以上（分解）
ＮＭＲ(DMSO-d$_6$中)δ：0.88(3H,t,J=7.3Hz),1.88(2H,m),2.3-2.6(2H,m),2.70(3H,br.s),3.3-3.5(2H,m),4.82(1H,m),5.26,5.37(2H,ABq,J=19Hz),5.45(2H,s),6.54(1H,s),7.36(1H,s),7.91(1H,dd,J=2.4Hz,9.3Hz),8.03(1H,dd,2.4Hz,J=10.3Hz),9.2-9.5(2H,m)
【０２５９】実施例48
(9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン・塩酸塩の合成：
【０２６０】
【化５４】



【０２６１】(1) 2,8-ジアセチルアミノ-6-フルオロ-1-テトラロン：THF溶液60mlに2.28gのカリウム-t-ブトキシドを加え、窒素気流下０℃で撹拌しながら、実施例44の(7)で得た化合物３ｇを含むTHF溶液90mlを徐々に加

え、10分間撹拌した後、亜硝酸n-ブチル2.44mlを加え、室温で１時間撹拌した。反応液を希塩酸水溶液に注ぎ、クロロホルムで３回抽出した。抽出液を水、飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣に酢酸87mlと無水酢酸87mlを加え、室温で撹拌しながら亜鉛末11gを徐々に加え、さらに10分間撹拌した。不溶物を濾去し、溶媒を留去した後、残渣をクロロホルム100mlに溶解し、水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水の順で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン－酢酸エチル（２：３）の混合溶媒で展開して、目的物を含む画分を濃縮することにより、標記化合物2.82gを得た。

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：1.8-2.0(1H,m)，2.11(3H,s)，2.14(3H,s),2.67(1H,m)，3.02(1H,m)，3.25(1H,m),4.65(1H,ddd,J=4.9Hz,5.4Hz,13.2Hz),6.48(1H,br.s)，6.64(1H,dd,J=8.3Hz,2.4Hz),8.43(1H,dd,J=8.2Hz,2.4Hz)

【０２６２】(2) 8-アミノ-6-フルオロ-2-トリフルオロアセトアミノ-1-テトラロン：(1)で得た化合物1.23gに濃塩酸20mlを加え、100℃で12時間撹拌した。室温まで冷却した後、水200mlを加え、クロロホルムで２回洗浄した。水層に水酸化ナトリウムを加えアルカリ性にした後、クロロホルムで４回抽出した。抽出液を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を留去した。残渣を乾燥THF50mlに溶かし、トリエチルアミン0.59mlを加えた後、氷　塩浴中で冷却しながら0.6mlの無水トリフルオロ酢酸を含むTHF溶液10mlを滴下した。同温度で１時間撹拌した後、水５mlを加え溶媒を留去した。残渣に水30mlを加え、クロロホルムで３回抽出した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルムで展開して、目的物を含む画分を濃縮することにより、標記化合物1.1gを得た。

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：1.88(1H,ddd,J=4.4Hz,13.2Hz,25.4Hz)，2.79(1H,m),2.97(1H,m)，3.15(1H,m),4.50(1H,ddd,J=4.4Hz,4.9Hz,13.2Hz)，6.21(2H,m)

【０２６３】(3) (9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン・塩酸塩：(2)で得た化合物144mgとトリオン130mgをトルエン30mlに加え、触媒量のPPTSを添加後、デイーンスターク装置を用いて41時間加熱還流した。反応液を冷却し、溶媒を溜去後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルム－メタノール（99：１）で展開して、目的物を含む画分を濃縮して得られる残渣に、メタノール５ml、水５ml、４Ｎ塩酸４mlを加え80℃で５時間撹拌した。溶媒を濃縮した後、水４mlを加え不溶物を濾過により除き、高速液体クロマトグラフィー〔CAPCELL PAK C18；アセトニトリル－水－１Ｎ塩酸（22：78：１）で展開〕で精製し、標記化合物をアイソマーＡ（19mg）およびアイソマーＢ（16mg）として得た。

アイソマーＡ：

融点：200℃以上（分解）

ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.89(3H,t,J=7.3Hz)，1.89(2H,m)，2.15-2.27(1H,m),2.40-2.55(1H,m)，3.20-3.45(2H,m)，5.07(1H,m),5.42,5.84(2H,ABq,J=19.5Hz)，5.46(2H,s),6.55(1H,s)，7.38(1H,s),7.60(1H,dd,J=2.4Hz,9.3Hz),7.86(1H,dd,J=2.4Hz,10.3Hz)，8.2-8.6(3H,m)

アイソマーＢ：

融点：210℃以上（分解）

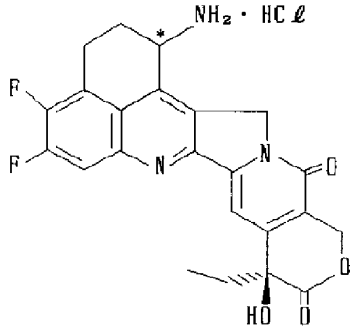
ＮＭＲ(DMSO-d_6中)δ：0.88(3H,t,J=7.3Hz)，1.88(2H,m)，2.15-2.27(1H,m),2.45-2.60(1H,m)，3.20-3.45(2H,m)，5.12(1H,m),5.42,5.83(2H,ABq,J=19.1Hz)，5.46(2H,s),6.55(1H,s)，7.38(1H,s),7.62(1H,dd,J=2.4Hz,8.8Hz),7.86(1H,dd,J=2.4Hz,10.2Hz)，8.4-8.6(3H,m),7.86(1H,dd,J=2.4Hz,10.2Hz)，8.4-8.6(3H,m)

【０２６４】実施例49

(9S)-1-アミノ-9-エチル-4,5-ジフルオロ-9-ハイドロキシ-2,3-ジヒドロ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンの合成：

【０２６５】

【化５５】



【０２６６】(1) 4-(3,4-ジフルオロフェニル)-4-オキソブタノイックアシッド：ジフルオロベンゼン57gに無水コハク酸45gと塩化アルミニウム130.7gを加え、４時間加熱還流した。反応液に１％塩酸水溶液200mlを加え、クロロホルムで抽出し、水洗し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィに付し、クロロホルム-メタノール（30：１）の混合溶媒で展開し、目的物を含む画分を濃縮することにより標記化合物30gを得た。

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：2.82(2H,t,J=7Hz)，3.26(2H,t,J=7Hz)，7.0-7.9(3H,m)

【０２６７】(2) 4-(3,4-ジフルオロフェニル)ブタノイックアシッド：(1)で得た化合物30gを酢酸200mlに溶解し、60％過塩素酸８mlおよび10％パラジウム-炭素３gを加え、6.5気圧で接触水素添加を行った。触媒を沪去

し、酢酸を留去した後、残渣に酢酸エチル600mlを加え、水洗し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去することにより、標記化合物26gを得た。
NMR($CDCl_3$中)δ：1.8-2.1(2H,m)，2.37(2H,t,J=7Hz)，2.64(2H,t,J=7Hz),6.9-7.1(3H,m)

【０２６８】(3) 4-(4,5-ジフルオロ-2-ニトロフェニル)ブタノイックアシッド：(2)で得た化合物500mgを冷濃硫酸４mlに加え、内温５℃以下に保ちながら硝酸カリウム371mgを含む濃硫酸溶液2.5mlを滴下した。滴下終了後30分間撹拌した後、反応液を氷水中に注ぎ、クロロホルム100mlで抽出した。クロロホルム層を水洗し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去することにより、標記化合物480mgを得た。
NMR($CDCl_3$中)δ：1.8-2.1(2H,m)，2.48(2H,t,J=7Hz)，2.9-3.0(2H,m),7.21(1H,dd,J=7Hz,10Hz)，7.90(1H,dd,J=7Hz,10Hz)

【０２６９】(4) 4-(2-アセチルアミノ-4,5-ジフルオロフェニル)ブタノイックアシッド：(3)で得た化合物380mgを酢酸５ml、無水酢酸10mlの混合溶媒に溶解し、10%パラジウム-炭素60mgを加え、接触水素添加を行った。触媒を沪去し、沪液を濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィに付し、クロロホルム-メタノール（10：１）の混合溶媒で展開し、目的物を含む画分を濃縮することにより標記化合物90mgを得た。
NMR($CDCl_3$中)δ：1.7-1.9(2H,m)，2.29(3H,s)，2.4-2.6(4H,m),6.93(1H,dd,J=8Hz,12Hz)，8.09(1H,dd,J=8Hz,12Hz),8.53(1H,br s)

【０２７０】(5) 5-アセチルアミノ-7,8-ジフルオロ-1-テトラロン：(4)で得た化合物9.07gをジクロルメタン450mlに溶解し、室温撹拌下、五塩化リン7.71gを加え、１時間撹拌した。反応液を濃縮し、残渣にジクロルメタンを加えて再び留去した。残渣に1,2-ジクロルエタン500ml、無水塩化アルミニウム9.88gを加え、70℃で１時間撹拌後、15時間穏やかに加熱還流した。反応液を氷水中に注ぎ、クロロホルムで抽出し、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィに付し、クロロホルム-メタノール（50:１）の混合溶媒で展開し、目的物を含む画分を濃縮することにより標記化合物2.31gを得た。
NMR($CDCl_3$中)δ：2.1-2.2(2H,m)，2.23(3H,s)，2.5-2.7(2H,m),2.7-2.9(2H,m)，6.93(1H,br s)，7.84(1H,dd,J=7Hz,11Hz)

【０２７１】(6) 5-アセチルアミノ-7,8-ジフルオロ-1,2,3,4-テトラヒドロナフタレン：(5)で得た化合物１gをエタノール20mlに溶解し、室温撹拌下、水素化ホウ素ナトリウム166mgを加え、20分間撹拌した。反応液にクロロホルム、10%クエン酸を加え、クロロホルム層を抽出した。クロロホルム層を濃縮し、残渣にトルエン20ml、およびp-TsOHを少量加えて１時間加熱還流した。反応液に酢酸エチル100mlを加えて、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し溶媒を留去した。得られた残渣をエタノール20ml、ジオキサン20mlおよび酢酸0.2mlの混合溶媒に溶解し、酸化白金200mgを加え接触水素添加を行った。触媒を沪去し、沪液を濃縮し残渣にエーテルを加えて析出物を沪取して標記化合物0.8gを得た。
NMR($CDCl_3$中)δ：1.79(4H,br s)，2.18(3H,s)，2.52(2H,br s),2.73(2H,br s)，6.91(1H,br s)，7.4-7.6(1H,m)

【０２７２】(7) 8-アセチルアミノ-5,6-ジフルオロ-1-テトラロン：(6)で得た化合物810mgをアセトン30mlに溶解し、15%硫酸マグネシウム3mlを加えて撹拌下、過マンガン酸カリウム1.17gを徐々に加えた。１時間後、反応液にクロロホルムを加えて抽出し、水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去することにより標記化合物806mgを得た。
NMR($CDCl_3$中)δ：2.05-2.17(2H,m)，2.23(3H,s)，2.68(2H, t,J=5.85Hz),3.00(2H,t,J=5.85Hz)，8.61(1H,dd,J=7.8Hz,13.2Hz),12.1-12.23(1H,br s)

【０２７３】(8) 2,8-ジアセチルアミノ-5,6-ジフルオロ-1-テトラロン：(7)で得られた化合物300mgを7.5mlのTHFに溶解した溶液を、第３級カリウムブトキシド309mgを含むTHF15mlおよび第３級ブタノール１.5mlの混合溶媒に、N_2気流下０℃で徐々に加える。同温度で10分間撹拌後、n-ブチルナイトライト0.22mlを０℃で滴加した後徐々に温度を20℃まで上げながら1.5時間撹拌する。１Ｎ塩酸を用いてpHを１とした後、クロロホルムで抽出する。飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去して得られる残渣に酢酸15ml、無水酢酸15mlを加え、さらに亜鉛末１gを加えて20℃で18時間撹拌する。不溶物を沪過により除き、溶媒を留去した後、残渣をクロロホルムで抽出、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去して得られる残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィに付す。クロロホルム－メタノール（97：３）の混合溶媒で展開し、目的物を含む画分を濃縮することにより標記混合物311mgを得た。
NMR($CDCl_3$中)δ：1.83-1.94(1H,m),2.10(3H,s)，2.21(3H,s),2.59-2.67(1H,m)，2.92-3.01(1H,m)，3.18-3.26(1H,m),4.62-4.68(1H,m)，6.70(1H,d,J=5.9Hz),8.56(1H,dd,J=7.3Hz,13.2Hz)，11.64-11.67(1H,br s)

【０２７４】(9) 2,8-ジアミノ-5,6-ジフルオロ-1-テトラロン：(8)で得られた化合物300mgを３Ｎ塩酸50mlに加え、60℃で3.5時間撹拌する。ついで濃塩酸15mlを加え90℃で30分間撹拌した後、冷却し炭酸水素ナトリウムを用いて反応液を中和し300mlのクロロホルムで抽出する。飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去することにより標記化合物140mgを得た。
NMR($CDCl_3$中)δ：1.79-1.93(1H,m),2.68-2.81(2H,

OnCusp
Ex. 1002

m)，3.16-3.20(1H,m),3.53-3.56(1H,m)，6.26-6.29(2H,m)，6.34-6.45(2H,m),7.28(1H,s)

【０２７５】(10) 8-アミノ-5,6-ジフルオロ-2-トリフルオロアセチルアミノ-1-テトラロン：(9)で得られた化合物140mgをTHF10mlに溶解し、０℃に冷却後トリエチルアミン75mgを加え、さらに無水トリフルオロ酢酸155mgを徐々に加える。1.5時間撹拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えクロロホルムで抽出する。飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去して得られる残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィに付し、クロロホルム－メタノール（97：３）の混合溶媒で展開し、目的物を含む画分を濃縮することにより標記混合物93mgを得た。

ＮＭＲ(CDCl$_3$中)δ：1.85(1H,ddd,J=4.4Hz,13Hz,26.1Hz)，2.75-2.84(2H,m),3.20-3.26(1H,m)，4.5(1H,dd,J=4.9Hz,13.7Hz),6.31(1H,dd,J=6.3Hz,11.7Hz),6.35-6.44(2H,br s),7.54-7.6(1H,br s)

【０２７６】(11) (9S)-9-エチル-4,5-ジフルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-1-トリフルオロアセチルアミノ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン：(10)で得た化合物90mgをトルエン20mlに溶解し、トリオン81mg、およびPPTS20mgを加えた後、窒素気流中で111時間加熱還流した。反応液を濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィに付し、クロロホルム-メタノール（30：１）の混合溶媒で展開し、目的物を含む画分を濃縮することにより標記化合物98mgを得た。

ＮＭＲ(CDCl$_3$中)δ：1.01(3H,t,J=7Hz)，1.80-1.83(2H,m)，2.01(1H,s),2.33(1H,s)，2.96(1H,dd,J=6.35Hz,7.32Hz),4.32-4.36(1H,m)，5.23(3H,dd,J=6.35Hz,17.1Hz),5.67(1H,d,J=17.1Hz)，7.55(1H,s)

【０２７７】(12) (9S)-1-アミノ-9-エチル-4,5-ジフルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン　塩酸塩：(11)で得た化合物95mgを１Ｎ塩酸30mlに加え１時間加熱還流した後、溶媒を留去して得られる残渣に水30mlを加え不溶物を沪過により除く。沪液を高速液体クロマトグラフィー［CAPCELL　PAK　C18；アセトニトリル：水：１Ｎ塩酸（20：80：１）で展開］で精製し、標記化合物をアイソマーＡ（6.2mg）およびアイソマーＢ（5.9mg）として得た。

アイソマーＡ：

ＩＲν_{max}^{KBr}cm^{-1}：3416,1746,1660,1602,1512

ＮＭＲ(DMSO-d$_6$中)δ：0.87(3H,t,J=7.3Hz)，1.82-1.91(2H,m),2.15-2.26(1H,m)，5.11-5.18(1H,br s),5.44,5.84(2H,ABq,J=19Hz)，5.45(2H,s)，7.35(1H,s),8.18(1H,dd,J=７.8Hz,11.5Hz),8.55-8.64(3H,br)

ＭＡＳＳ m/z：439(M$^+$)

アイソマーＢ：

ＩＲν_{max}^{KBr}cm^{-1}：2932,1750,1658,1596,1508

ＮＭＲ(DMSO-d$_6$中)δ：0.86(3H,t,J=7.3Hz)，1.83-1.9(2H,m),2.15-2.24(1H,m)，5.12-5.16(1H,br s),5.44,5.82(2H,ABq,J=19Hz)，5.45(2H,s)，6.55(1H,s)，7.35(1H,s)，8.19(1H,dd,J=7.8Hz,11.5Hz),8.53-8.66(3H,br)

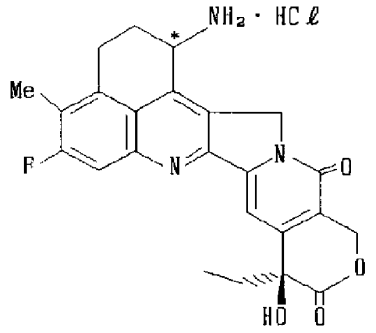
ＭＡＳＳ m/z：439(M$^+$)

【０２７８】実施例50

(9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン　塩酸塩：

【０２７９】

【化５６】



【０２８０】(1) 4-(4-フルオロ-3-メチルフェニル)-4-オキソブタノイックアシッド：2-フルオロトルエン250ml に無水コハク酸200gと塩化アルミニウム800gを加え、80℃で１時間加熱する。反応液を冷１％塩酸水溶液５１に加え、酢酸エチルで抽出し、１Ｎ塩酸および水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し溶媒を留去することにより標記化合物345gを得た。

ＮＭＲ(CDCl$_3$中)δ：1.89-1.97(2H,m),2.24(3H,s)，2.36(2H,t,J=7.3Hz),2.60(2H,t,J=7.3Hz)，6.84-6.99(3H,m)

【０２８１】(2) 4-(4-フルオロ-3-メチルフェニル)ブタノイックアシッド　メチルエステル：(1)で得た化合物172gを酢酸700mlに溶解し、40％過塩素酸10mlおよび10％パラジウム-炭素30gを加え、６気圧で接触水素添加を行う。不溶物を沪過により除去した後、酢酸を留去して得られる残渣に水２１を加え、クロロホルムで抽出した後、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥する。溶媒を留去した後、残渣にメタノール１１を加え０℃に冷却する。この溶液に塩化チオニル269gを徐々に滴加した後、ジメチルホルムアミド10mlを加え室温で12時間撹拌した後反応液を濃縮し、クロロホルムで抽出後、水、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を留去することにより、標記化合物153gを得た。

ＮＭＲ(CDCl$_3$中)δ：1.91(2H,quintet,J=7.5Hz)，2.24(3H,d,J=2Hz),2.31(2H,t,7.5Hz)，2.57(2H,t,J=7.5Hz)，3.66(3H,s),6.89(1H,t,J=9Hz)，6.93(1H,ddd,J=9Hz,5H

z,3Hz),6.97(1H,dd,J=7Hz,3Hz)

【０２８２】(3) 4-(4-フルオロ-3-メチル-6-ニトロフェニル)ブタノイックアシド　メチルエステル：(2)で得た化合物10.9gを冷濃硫酸６mlに加え、内温５℃以下に保ちながら硝酸カリウム5.8gの濃硫酸溶液15mlを滴加する。滴加終了後さらに20分間撹拌した後、反応液を氷水中に注ぎ酢酸エチルで抽出する。酢酸エチル層を水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を留去する。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィに付し、ヘキサン－酢酸エチル（90：７）の混合溶媒で展開し、目的物を含む画分を濃縮することにより標記化合物7.1gを得た。

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：1.97(2H,quintet,J=8Hz)，2.34(3H,d,J=2Hz),2.41(2H,t,J=8Hz)，2.90(2H,t,J=8Hz)，3.69(3H,s)，7.18(1H,d,J=7Hz)，7.66(1H,d,J=9Hz)

【０２８３】(4) 7-フルオロ-8-メチル-5-ニトロ-1-テトラロン：(3)で得た化合物7.1gをメタノール20mlに溶かし、15%水酸化ナトリウム10mlを加えて室温で３時間撹拌する。反応液を濃縮した後、濃塩酸を加えて酸性としクロロホルムで抽出し、クロロホルム層を水、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を留去を留去する。残渣を110℃に加熱したポリリン酸50mlに徐々に加えた後、4.5時間撹拌する。反応液を氷水100mlに加え、酢酸エチルで抽出後、水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を留去する。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィに付し、ヘキサン－酢酸エチル（１：１）の混合溶媒で展開し、目的物を含む画分を濃縮することにより標記化合物1.7gを得た。

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：2.11(2H,quintet,J=7Hz)，2.60(3H,d,J=2Hz),2.72(2H,t,J=7Hz)，3.14(2H,t,J=6.0Hz),7.74(1H,d,J=9Hz)

【０２８４】(5) 5-アセチルアミノ-7-フルオロ-8-メチル-1,2,3,4-テトラヒドロナフタレン：(4)で得た化合物1.35gをエタノール５mlおよびTHF15mlに溶解し、室温撹拌下、水素化ホウ素ナトリウム114mgを加え、20分間撹拌した。反応液を濃縮し　残渣にトルエン25ml、およびp-TsOH840mgを加えて30分間加熱還流した。反応液に酢酸エチル100mlを加えて、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し溶媒を留去した。得られた残渣を酢酸エチル20mlに溶解し、酸化白金400mgを加え４時間接触水素添加を行った。触媒を沪去し、沪液を濃縮して得られる残渣にジクロルメタン10mlを加え、さらにトリエチルアミン1.2ml、および無水酢酸0.81mlを加え40分間撹拌した。反応液をクロロホルム50mlで希釈し、希塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム溶液、および飽和食塩水で順次洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し溶媒を留去することにより標記化合物1.23gを得た。

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：1.79(4H,s)，2.10(3H,s)，2.19(3H,s)，2.53(2H,s),2.62(2H,s)，7.46(1H,d,J=9Hz)

【０２８５】(6) 8-アセチルアミノ-6-フルオロ－５－メチル－１－テトラロン

(5)で得た化合物1.2gを実施例49-(7)と同様に反応させ、後処理を行うことにより標記化合物825mgを得た。

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：2.08(2H,quintet,J=7Hz)，2.15(3H,d,J=2Hz)，2.22(3H,s),2.66(2H,t,J=7Hz)，2.88(2H,t,J=6Hz),8.42(1H,d,J=13Hz)

【０２８６】(7) 2,8-ジアセチルアミノ-6-フルオロ-5-メチル-1-テトラロン：(6)で得た化合物4.7gを、実施例49-(8)と同様に反応させ、後処理を行うことにより標記化合物3.85gを得た。

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：1.7-1.9(1H,m)，2.11(3H,s)，2.15(3H,s)，2.23(3H,s),2.7-2.8(1H,m)，2.9-3.1(2H,m)，4.5-4.7(1H,m),6.53(1H,br s)，8.43(1H,d,J=13Hz),11.76(1H,s)

【０２８７】(8) 2,8-ジアミノ-6-フルオロ-5-メチル-1-テトラロン：

(7)で得た化合物3.85gを、６Ｎ－塩酸100mlに加え80℃で６時間撹拌する。反応液を水100mlに注ぎ込み、15%水酸化ナトリウム水溶液でpH10としクロロホルムで抽出する。抽出液を水、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去することにより標記化合物1.66gを得た。

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：1.83(1H,dq,13Hz,4Hz)，2.04(3H,s),2.25-2.4(1H,m)，2.75(1H,ddd,J=14Hz,13Hz,4Hz),2.98(1H,ddd, J=14Hz,4Hz,3Hz),3.53(1H,dd,J=13Hz,4Hz)，6.20(1H,d,J=12Hz),6.42(1H,br s)

【０２８８】(9) 8-アミノ-6-フルオロ-5-メチル-2-トリフルオロアセチルアミノ-1-テトラロン：(8)で得た化合物1.66gをエタノール70mlおよびTHF10mlの混合溶媒に溶解した溶液にトリエチルアミン２mlおよびエチルトリフルオロアセテート1.51mlを加え、20℃で20時間撹拌する。反応液を希塩酸水に加え、クロロホルムで抽出し、水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を留去する。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィに付し、クロロホルムで展開し、目的物を含む画分を濃縮することにより標記化合物1.79gを得た。

ＮＭＲ($CDCl_3$中)δ：1.81(1H, dq,J=13Hz,5Hz)，2.06(3H,d,J=0.5Hz),2.8-3.1(3H,m)，4.48(1H,dt,13Hz,4Hz)，6.26(1H,d,J=13Hz)，7.64(1H,br s)

【０２８９】(10) (9S)-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-1-トリフルオロアセチルアミノ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン：(9)で得た化合物４gおよびトリオン4.57gを実施例49-(11)と同様に47時間反応させ、後処理を行うことにより標記化合物4.21gを得た。

ＮＭＲ(MeOH-d_4＋$CDCl_3$中)δ：0.94,0.96(3H,t,J=7Hz)，

1.75-1.95(2H,m),2.36(3H,s), 2.3-2.5(2H,m), 3.05-3.35(2H,m),5.05-5.75(5H,m), 7.30(0.5H,d,J=11Hz),7.45(0.5H,s), 7.56(0.5H,d,J=11Hz),7.57(0.5H,s)

【０２９０】(11) (9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン　塩酸塩：(10)で得た化合物625mgを濃塩酸7.5ml、メタノール18mlおよび水12mlの混合液に加え、80℃で７時間撹拌する。不溶物を沪過により除き、沪液を高速液体クロマトグラフィー［CAPCELL PAK　C18；アセトニトリル：水：１N塩酸（20：80：１）で展開］で精製し、標記化合物をアイソマーA（138mg）およびアイソマーB（143mg）として得た。

アイソマーA：

融点：220-250℃(分解)

$[\alpha]_D^{20}$＝+198°（c=0.42, H_2O中）

IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1}：3400,1748,1660,1592

NMR(D_2O中)δ：0.73(3H,t,J=7.3Hz), 1.74(2H,q,J=7.3Hz), 2.13(3H,s),2.45-2.55(1H,m), 2.6-2.7(1H,m), 2.85-3.0(1H,m),3.2-3.3(1H,m), 5.11(1H,m), 5.18,5.25(2H,ABq,J=19Hz),5.18, 5.32(2H,ABq,J=16Hz), 7.05(1H,s),7.09(1H,d,J=11Hz)

アイソマーB：

融点：220-230℃(分解)

NMR(D_2O中)δ：0.82(3H,t,J=7.3Hz), 1.83(2H,q,J=7.3Hz), 2.13(3H,s),2.1-2.3(1H,m), 2.5-2.6(1H,m), 2.9-3.1(1H,m),3.1-3.3(1H,m), 4.97(1H,br s), 5.06,5.32(2H,ABq,J=19Hz),5.24,5.37(2H,ABq,J=16Hz), 6.99(1H,d,J=11Hz), 7.16(1H,s)

フロントページの続き

(72)発明者　大薄　悟
東京都江戸川区北葛西１丁目16番13号　第一製薬中央研究所内

(72)発明者　魚戸　浩一
東京都江戸川区北葛西１丁目16番13号　第一製薬中央研究所内

Espacenet

JPH08337584A CONDENSED SIX-MEMBERED CYCLIC AMINO COMPOUND, MEDICINE CONTAINING THE SAME AND PRODUCTION OF THE SAME

Applicants: DAIICHI SEIYAKU CO, YAKULT HONSHA KK
Inventors: KANAI KAZUAKI, KANBARA SHINJI, KITAOKA HIROAKI, NOGUCHI SHIGERU, TERASAWA HIROFUMI

IPC ***A61K31/47; A61P35/00; C07B53/00; C07B63/00; C07D491/22;*** (IPC1-7): A61K31/47; C07B53/00; C07B63/00; C07D491/22; C07M7/00;

CPC Y02P20/55 (EP);

Application number: JP8817496A
Priority numbers: JP8371795A 1995-04-10; JP8817496A 1996-04-10
Publication date: 1996-12-24
Filing date: 1996-04-10
Priority date: 1995-04-10
Published as: JPH08337584A

Abstract: CONDENSED SIX-MEMBERED CYCLIC AMINO COMPOUND, MEDICINE CONTAINING THE SAME AND PRODUCTION OF THE SAME

PURPOSE: To obtain the subject new compound, a specific camptothecin derivative consisting of a condensed six-membered cyclic amino compound, free from hygroscopicity, excellent in filterability and solubility, advantageous to handle, having antineoplastic activity, thus useful as e.g. a highly safe antineoplastic agent. CONSTITUTION: This new compound is a new camptothecin derivative methanesulfonate (hydrate) of formula I, being free from hygroscopicity, excellent in filterability and solubility, advantageous to handle, high in safety, thus being useful as e.g. an antineoplastic agent. This compound is obtained by the following process: 2-acetyl-amino-8-amino-6-fluoro-5-methyl-1-tetralone of formula II (X is a protecting group eliminable by methanesulfonic acid) is reacted with dihydro-pyrano-indolidin-trione of formula III to form a camptothecin derivative of formula IV, which is then treated with methanesulfonic acrid and the product is recrystallized.

OnCusp
Ex. 1002

(19)日本国特許庁（ＪＰ）　(12) **公開特許公報（Ａ）**　(11)特許出願公開番号

特開平8－337584

(43)公開日　平成８年(1996)12月24日

(51)Int.Cl.[6]	識別記号	庁内整理番号	ＦＩ		技術表示箇所
Ｃ０７Ｄ 491/22		9271－4Ｃ	Ｃ０７Ｄ 491/22		
Ａ６１Ｋ 31/47	ＡＤＵ		Ａ６１Ｋ 31/47	ＡＤＵ	
Ｃ０７Ｂ 53/00		7419－4Ｈ	Ｃ０７Ｂ 53/00	Ａ	
63/00		7419－4Ｈ	63/00	Ｅ	
// Ｃ０７Ｍ 7:00					

審査請求　未請求　請求項の数７　ＯＬ　（全 ８ 頁）

(21)出願番号　特願平8－88174

(22)出願日　平成８年(1996)４月10日

(31)優先権主張番号　特願平7－83717

(32)優先日　平７(1995)４月10日

(33)優先権主張国　日本（ＪＰ）

(71)出願人　000002831
第一製薬株式会社
東京都中央区日本橋３丁目14番10号

(71)出願人　000006884
株式会社ヤクルト本社
東京都港区東新橋１丁目１番19号

(72)発明者　神原　新治
東京都江戸川区北葛西１丁目16番13号　第一製薬株式会社東京研究開発センター内

(72)発明者　金井　和昭
東京都江戸川区北葛西１丁目16番13号　第一製薬株式会社東京研究開発センター内

(74)代理人　弁理士　有賀　三幸　（外３名）

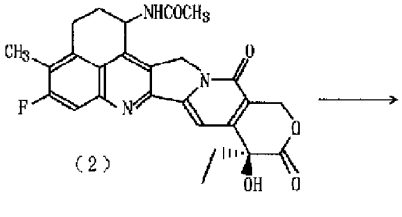
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　縮合六環式アミノ化合物、これを含有する医薬及びその製法

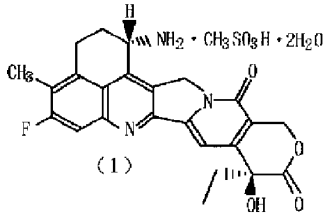
(57)【要約】

【解決手段】　下記式（２）で表わされる化合物をメタンスルホン酸で処理した後、再結晶する式（１）で表わされる化合物の製造法、この化合物（１）又はその水和物及びこれを含有する医薬。

【化１】



（２）

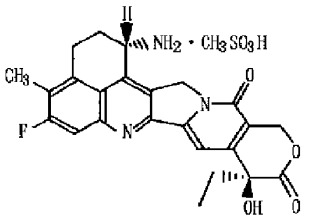


（１）

【効果】　化合物（１）は、吸湿せず、沪過性及び溶解性に優れ、取扱いに有利である。また本発明製造法は、不要な異性体を目的とするものに変換でき、更に分離も容易である。

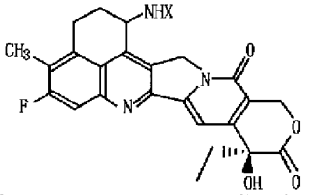
OnCusp
Ex. 1002

【特許請求の範囲】
【請求項１】　次の式（１）
【化１】



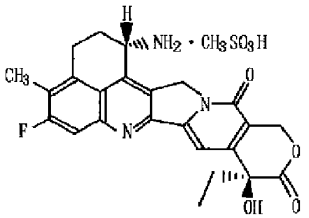
（１）

で表わされるカンプトテシン誘導体のメタンスルホン酸塩又はその水和物。
【請求項２】　請求項１記載の化合物を有効成分とする医薬。
【請求項３】　抗腫瘍剤である請求項２記載の医薬。
【請求項４】　次の式（２）
【化２】



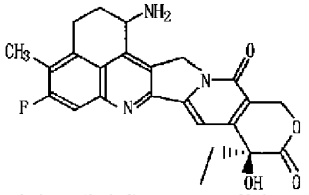
（２）

〔式中、Ｘはメタンスルホン酸によって除去することができる保護基を示す〕で表わされる化合物をメタンスルホン酸で処理した後に、再結晶することを特徴とする次の式（１）
【化３】



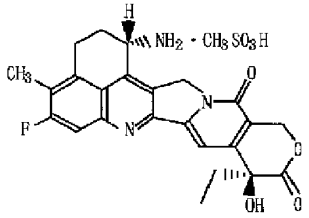
（１）

で表わされるカンプトテシン誘導体のメタンスルホン酸塩又はその水和物の製造法。
【請求項５】　次の式（３）
【化４】



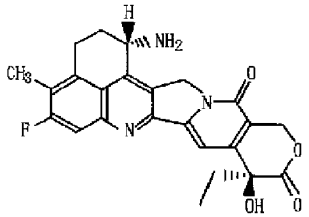
（３）

で表わされる化合物のアミノ基を、メタンスルホン酸によって除去することのできる保護基によって保護し、次いでメタンスルホン酸で処理した後、再結晶することを特徴とする次の式（１）
【化５】



（１）

で表わされるカンプトテシン誘導体のメタンスルホン酸塩又はその水和物の製造法。
【請求項６】　メタンスルホン酸によって除去することのできる保護基がアセチル基である請求項４又は５記載の製造法。
【請求項７】　再結晶に用いる溶媒が水とアルコールの混合物である請求項４、５又は６記載の製造法。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【発明の属する技術分野】本発明は、抗腫瘍活性を有するカンプトテシン誘導体、これを含有する医薬及びその工業的に有利な製造法に関する。
【０００２】
【従来の技術】次の式（４）
【０００３】
【化６】



（４）

【０００４】で表わされる化合物、すなわち［(1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン］又はその塩は優れた抗腫瘍性を示すカンプトテシン誘導体である。しかしながら、この化合物の従来の塩酸塩、硫酸塩、臭化水素酸塩又は硝酸塩等は、吸湿性がある、沪過性又は溶解性が低い等の欠点があり、製造上の取扱いが面倒であった。
【０００５】また、これらの無機塩を薬理学上有用な酸付加塩である酒石酸塩、マロン酸塩又はリンゴ酸塩とするには、無機塩を一旦難溶性のフリー体とした後、更に必要とする塩にしなければならず、工程が増えるとともに、フリー体が難溶性で取扱いが困難であり工業的に不利であった。
【０００６】一方、この化合物（４）は、従来の製造法によれば、目的の立体異性体と共に不要な立体異性体が理論的には等量生成してしまい、収率が悪く、更に必要な立体異性体を取得するには高速液体クロマトグラフィーを用いなければならず、工業的に有利に製造できなか

OnCusp
Ex. 1002

った。

【０００７】

【発明が解決しようとする課題】従って本発明の目的は、吸湿せず、沪過性及び溶解性に優れ、薬理学上有用なカンプトテシン誘導体の新規な酸付加塩、これを含有する医薬及びこの酸付加塩の工業的に有利な製造法を提供することにある。

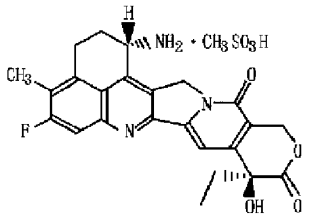
【０００８】

【課題を解決するための手段】斯かる実情に鑑み本発明者らは鋭意研究を行ったところ、下記式（２）で表わされる化合物をメタンスルホン酸で処理すればアミノ基の保護基が除去される際に異性化が進行し、目的とする異性体が収率よく得られること、またこの反応をくり返し行えば、必要な異性体を分離した後の不要な異性体を更に目的とする異性体に変換できること、また不要な異性体との溶解度の差を利用して再結晶によって容易に目的物を分取できること、更に目的物たるメタンスルホン酸塩は、吸湿性がなく、沪過性及び溶解性が良好であるため医薬として有用であることを見出し本発明を完成した。

【０００９】すなわち本発明は、次の式（１）

【００１０】

【化７】



（１）

【００１１】で表わされるカンプトテシン誘導体のメタンスルホン酸塩又はその水和物、及びその製造法を提供するものである。また本発明はこのカンプトテシン誘導体のメタンスルホン酸塩又はその水和物を有効成分とする医薬を提供するものである。

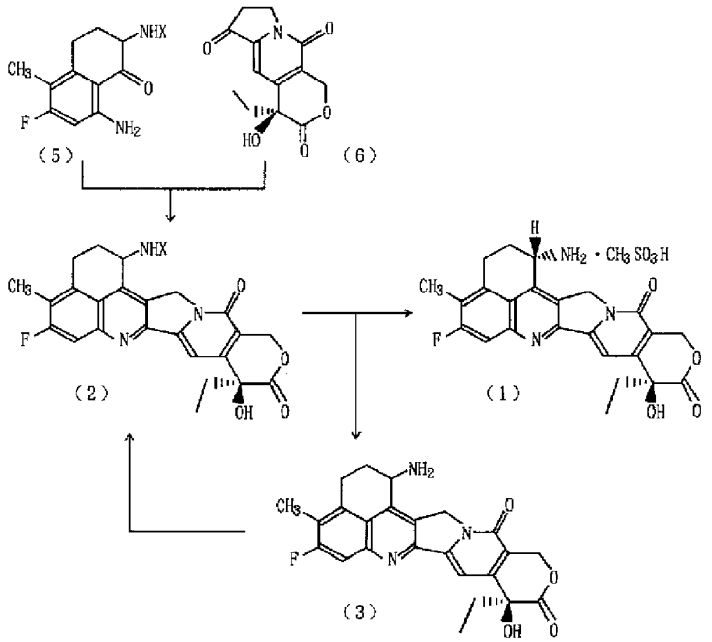
【００１２】

【発明の実施の形態】上記一般式（１）で表わされるメタンスルホン酸塩又はその水和物は吸湿性がなく、沪過性及び溶解性に優れた結晶であり、操作及び取扱いが容易である。また水和物としては、メタンスルホン酸塩の２水和物が好ましい。

【００１３】本発明のメタンスルホン酸塩（１）は、例えば次の反応式に従って製造することができる。

【００１４】

【化８】



【００１５】〔式中、Ｘはメタンスルホン酸によって除去することができる保護基を示す〕

すなわち、公知の方法（特開平６－８７７４６号公報）に従い、化合物（５）と化合物（６）を反応せしめて化合物（２）を得、これをメタンスルホン酸で処理した後に再結晶すれば、式（１）で表わされるカンプトテシン誘導体のメタンスルホン酸塩又はその水和物を得ることができる。

【００１６】また、式（３）で表わされる化合物のアミノ基をメタンスルホン酸によって除去することのできる保護基、例えばアシル基、より好ましくはアルカノイル基、特に好ましくはアセチル基により保護し、次いでメ

タンスルホン酸で処理した後に再結晶しても本発明のメタンスルホン酸塩（１）又はその水和物を得ることができる。この際化合物（３）は、化合物（１）を分離した後の不要な異性体から導かれるものであっても、化合物（１）に変換できるので使用できる。

【００１７】以下、これら製造法について詳細に説明する。化合物（２）は公知の方法（特開平６－８７７４６号公報記載の方法等。）によって、化合物（５）と化合物（６）との反応によって得ることができる。化合物（２）において保護アミノ基の結合した炭素原子は不斉炭素である。化合物（２）は、通常、この不斉炭素原子上での保護アミノ基の配置がＳ及びＲの混合の状態で得られる。

【００１８】本発明のメタンスルホン酸塩（１）又はその水和物は、化合物（２）をメタンスルホン酸で処理した後、再結晶すれば得ることができる。ここで、化合物（２）のアミノ基の保護基は、後のメタンスルホン酸処理によって脱離するものが好ましい。このような保護基としては、例えば、アセチル基、クロロアセチル基、トリクロロアセチル基、トリフルオロアセチル基等のハロゲンが置換していてもよいアルカノイル基及びベンゾイル基等のアシル基類；第三級ブチルオキシカルボニル基等のアルコキシカルボニル基；トリチル基；ピバロイルオキシメチル基等のアルカノイルオキシメチル基；テトラヒドロピラニル基及びホルミル基等が挙げられる。これらのうちではアシル基が好ましいが、ハロゲンが置換していてもよいC_2～C_6アルカノイル基がより好ましく、特にアセチル基が経済性や操作性の点で好ましい。

【００１９】メタンスルホン酸による処理は、化合物（２）の脱保護と同時に、吸湿性がなく沪過性及び溶解性等に優れ、安定で操作が容易である塩を形成させるため及び必要な異性体への変換のため行われる。

【００２０】脱保護および塩形成反応に際して使用するメタンスルホン酸の使用量は化合物（２）に対して５～３０倍（体積／重量：化合物（２）１ｇに対してメタンスルホン酸を１mlの割合で使用するときを１倍とする。）の範囲が好ましいが、特に好ましくは１５倍程度である（メタンスルホン酸を重量で秤量して使用するとき、使用量は体積量を比重倍、すなわち約１．５倍すればよい。）。

【００２１】メタンスルホン酸による処理の際に、メタンスルホン酸は水溶液として使用するのが簡便である。メタンスルホン酸水溶液の濃度は１０～６０％の範囲が好ましいが、より好ましくは３０％程度の濃度である。

【００２２】メタンスルホン酸による処理は、メタンスルホン酸の水溶液だけで行ってもよいが、他の有機溶媒を共存させてもよい。このような溶媒としては、トルエン、キシレンなどの芳香族系溶媒；メタノール、エタノール、イソプロパノールなどのアルコール系溶媒；ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル系溶媒等を例示することができる。有機溶媒を使用する際の使用量はメタンスルホン酸溶液の２倍量程度までの範囲とすることが好ましい。

【００２３】処理の際の温度は、室温から使用する溶媒の還流する温度の範囲でよいが、好ましくは、１００～１２０℃の範囲である。

【００２４】処理に要する時間は、１時間～数日間でよいが、通常はおよそ７時間程度、撹拌下で、処理すれば脱保護は完結する。

【００２５】このメタンスルホン酸を使用した処理によって目的の立体配置を有する本発明の立体異性体と、不要な立体異性体の割合がほぼ１：１である立体異性体混合物が生成する。脱保護体はメタンスルホン酸塩となっており、水相に溶解している。この水相の水を除去することによって固体状の混合物が得られる。

【００２６】この固体状の異性体の混合物を、水とアルコールとの混合物例えばメタノール、エタノール、イソプロパノールなどのアルコール系溶媒と水の混合溶媒で再結晶すると、意外にも、化合物（３）のうちの目的とする立体配置の化合物である、１位のアミノ基の配置がＳで、９位がＳの配置を有する化合物（４）のメタンスルホン酸塩である化合物（１）が選択的に得られる。すなわち目的とする配置の異性体のメタンスルホン酸塩の方が溶解度が低いために結晶として得られ、容易に目的物を分取できる。したがって、不要な配置の立体異性体は再結晶母液中に溶液として得られる。

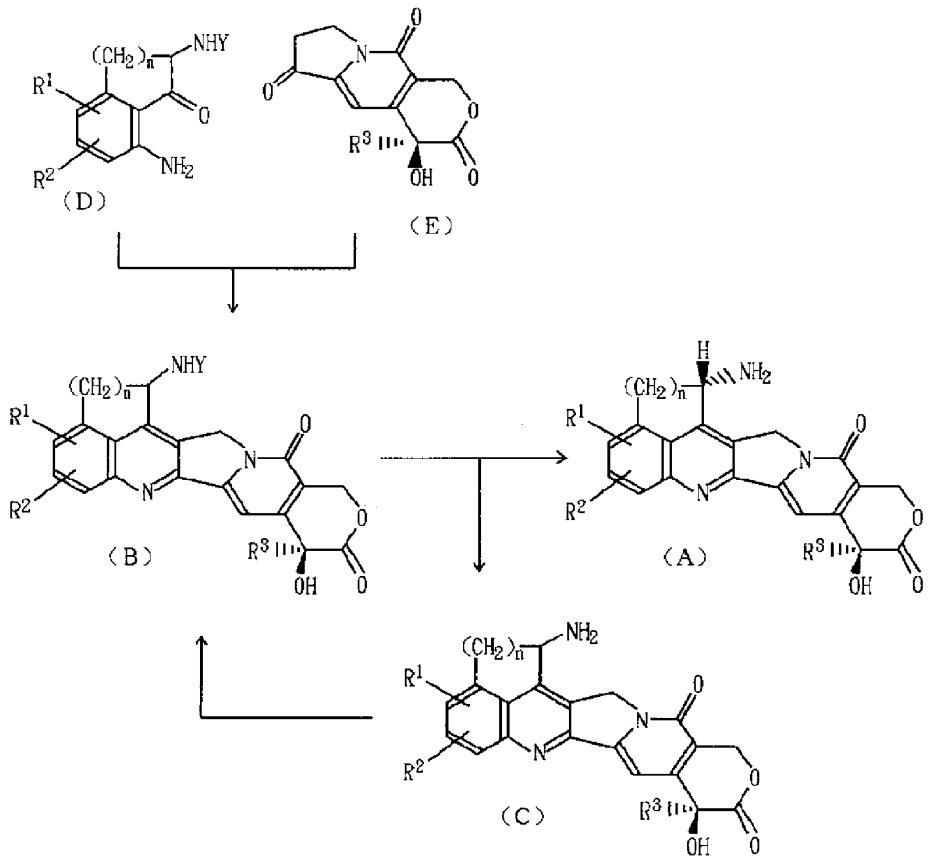
【００２７】なお、この再結晶によってさらに純粋な目的の異性体を得るには更に再結晶を数回反復すればよい。

【００２８】再結晶母液中に残存した化合物（３）のうちの不要な立体異性体は、更に次の方法によって目的の立体配置を有する化合物（１）に変換できる。すなわち、不要な立体異性体、例えば１位のアミノ基の立体配置がＲ、９位がＳである立体配置を有する化合物の１位のアミノ基に保護基を導入して、次いでこれを脱保護反応に付せば脱保護と同時にアミノ基の結合した炭素原子上での異性化が進行し、目的とする化合物（１）が得られる。ここで保護基の導入及び脱保護反応は前記と同様の条件で行われる。これら一連の反応を反復して行えば、化合物（３）及び化合物（２）はほとんど化合物（１）へ変換することができる。

【００２９】本発明方法は、更に次の反応式に示す如く、化合物（Ａ）及び（Ｃ）を得る方法に応用することができる。

【００３０】

【化９】



【００３１】［式中、R^1およびR^2は各々独立に、水素原子、ハロゲン原子、水酸基または炭素数１～６のアルキル基を示し、R^3は炭素数１～６のアルキル基を示し、Ｙは酸により除去することができる保護基を示し、ｎは１～３の整数を示す］

すなわち、公知の方法（特開平６－８７７４６号公報）により、化合物（Ｄ）と（Ｅ）から化合物（Ｂ）を得て、この化合物（Ｂ）を酸存在下処理した後、再結晶すれば、化合物（Ａ）が得られる。また式（Ｃ）で表わされる化合物のアミノ基を酸により除去することのできる置換基により保護し、次いで酸で処理した後再結晶しても化合物（Ａ）を得ることができる。

【００３２】もちろん、これは、式（Ｂ）で表わされる化合物の置換基『　ＮＨＹ』部分の立体配置がＲである異性体を多く含む異性体混合物を、酸存在下に処理した後、再結晶することによって式（Ａ）で表される化合物の置換基『－ＮＨＹ』部分の立体配置がＳである異性体およびその塩を選択的に製造する方法としても応用できる。

【００３３】本発明のカンプトテシン誘導体のメタンスルホン酸塩（１）又はその水和物は、特開平６　８７７４６号公報記載の如く抗腫瘍活性を有し、かつ安全性が高いだけでなく、後記試験例に示す如く、吸湿せず、沪過性及び溶解性に優れ、取扱いが有利であることから医薬品、特に抗腫瘍剤として有用である。

【００３４】本発明化合物（１）を有効成分とする抗腫瘍剤は、例えば肺癌、消化器癌、卵巣癌、子宮癌、乳癌、肝癌、頭頸部癌、血液癌、腎癌、コウ丸腫瘍等の各種癌の治療剤として用いることができる。

【００３５】本発明の医薬は、静脈内注射、筋肉内注射、皮下注射等の各種注射剤として、あるいは経口投与、経皮投与等の種々の方法によって投与することができる。これらの投与法の中では水性製剤による静脈内投与、及び経口投与が好ましい。製剤の調製方法としては投与法に応じ適当な製剤を選択し、通常用いられている各種製剤の調製法にて調製できる。本発明の医薬の剤型のうち経口用製剤としては例えば錠剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤や、溶液剤、シロップ剤、エリキシル剤、油性ないし水性の懸濁液等を例示できる。注射剤の場合は製剤中に安定剤、防腐剤、溶解補助剤等を使用することもできる。これらの補助剤等を含むこともある溶液を容器に収納後、凍結乾燥等によって固形製剤として用時調製の製剤としても良い。液体製剤としては、溶液、懸濁液、乳液剤等を挙げることができるが、これらの製剤を

調製する際、添加剤として懸濁化剤、乳化剤等を使用することもできる。

【００３６】本発明医薬は、哺乳類、特にヒトの癌治療に用いることができ、ヒトに投与する場合、非経口投与のときには、一般に１日当たり体表面積１m^2につき約０．５mgから５０mg、好ましくは約１mgから２０mgの範囲で一回投与し、３～４週毎に繰り返すのが望ましい。経口投与のときには、１日当たり体表面積１m^2につき約０．５mgから５０mg、好ましくは約１mgから２０mgの範囲で一回投与し、適当な間隔で繰り返すのが望ましい。

【００３７】

【実施例】次に、本発明を実施例によって詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

【００３８】参考例１

(4S)-4-エチル-7,8-ジヒドロ-4-ヒドロキシ-1H-ピラノ[3,4-f]インドリジン-3,6,10(4H)-トリオン

(4S)-4-エチル-6,6-(エチレンジオキシ)-7,8-ジヒドロ-4-ヒドロキシ-1H-ピラノ[3,4-f]インドリジン-3,10(4H)-ジオン３．５ｇを９０％トリフルオロ酢酸９０mlに室温下５分かけて加え、同温にて３０分撹拌した。反応終了後、減圧下に溶媒を留去し、更に、真空ポンプにてよく溶媒を留去した。得られた残留物に酢酸エチル２０mlを加え、析出した結晶を沪取し、標記の化合物２．４ｇを得た。

【００３９】参考例２

(9S)-1-アセチルアミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン

2-アセチルアミノ-8-アミノ-6-フルオロ-5-メチル-1-テトラロン１５０mgと(4S)-4-エチル-7,8-ジヒドロ-4-ヒドロキシ-1H-ピラノ[3,4-f]インドリジン-3,6,10(4H)-トリオン１５８mgにトルエン３０ml、次いで、ピリジニウム　p-トルエンスルホナート１５０mgを加え、外温１２０℃にて２８時間加熱還流した。反応終了後、減圧下に溶媒を留去し、残留物にアセトンを加えて析出した結晶を沪取して標記の化合物１６９mgを得た。

【００４０】融点：225 - 235 ℃（分解）

^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ：1.05(3H, t, J = 7.4 Hz), 1.88(2H, q, J = 7.4Hz), 2.15(3H, s),2.19 - 2.43(2H, m), 2.44(3H, s), 3.12 - 3.17(2H, m), 3.72(1H, s),5.15 - 5.33(3H, m), 5.58 - 5.72(2H, m), 5.98(1H, br-s),7.57(1H, s), 7.67(1H, d, J = 10.9 Hz).

【００４１】参考例３

(9S)-1-アセチルアミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ－4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン

2-アセチルアミノ-8-アミノ-6-フルオロ-5-メチル-1-テトラロン 2.00ｇと(4S)-4-エチル-7,8-ジヒドロ-4-ヒドロキシ-1H-ピラノ[3,4-f]インドリジン-3,6,10(4H)-トリオン２．１０ｇにトルエン２５０ml、次いでピリジニウム　p-トルエンスルホナート０．１ｇを加え、３時間加熱還流した後、ピリジニウム　p-トルエンスルホナート０．１ｇを加えて加熱還流を２．５時間、更にピリジニウム p-トルエンスルホナート０．１ｇを加え、３８時間加熱還流した。反応液を冷却し、減圧下に溶媒を留去した。結晶性残留物にアセトンを加え、析出した結晶を沪取して標記の化合物３．４８ｇを得た。

【００４２】融点：225 - 235℃（分解）

^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ：1.05(3H, t, J = 7.4 Hz), 1.88(2H, q, J = 7.4 Hz), 2.15(3H, s),2.19 - 2.43(2H, m), 2.44(3H, s), 3.12 - 3.17(2H, m), 3.72(1H, s),5.15 - 5.33(2H, m), 5.58 -5.72(2H, m), 5.98(1H, br-s), 7.57(1H, s), 7.67(10H, d, J = 10.9 Hz).

【００４３】実施例１

(1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン・メタンスルホン酸塩・二水和物

(9S)-1-アセチルアミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン５．０ｇに水１５０mlを加え、更にメタンスルホン酸７５mlを加えた後、トルエン１５０mlを加え、６．５時間加熱還流した。反応液を冷却し、分液ロートにて水層を分取した。得られた水層はガラスフィルターにて沪過した。ろ液の溶媒を留去し、得られた残留物にメタノール３００ml、次いで、エタノール２００mlを加え冷却後、生じた結晶を沪取してエタノールにて洗浄し、粗晶２．６ｇと母液を得た。

【００４４】得られた粗晶はメタノール中でスラリー状態として撹拌処理を行い、粗晶２．２ｇを得た。更に、得られた粗晶に水１４０mlを加え、メンブランフィルターにて沪過した後、エタノールを加えて留去した。得られた残留物にエタノール：水＝４：１の混合溶媒、１６５mlを加えて、加熱して溶解した後、室温にて１晩放置した。析出した結晶を沪過し、エタノールにて洗浄して標記の化合物１．６ｇを得た。

【００４５】融点：245 - 255 ℃（分解）

^{1}H-NMR(D_2O)δ：0.73(3H, t, J = 7.3 Hz), 1.75(2H, q, J = 7.3 Hz), 2.13(3H, s),2.50 - 2.62(2H, m), 2.65(3H, s), 2.83 - 3.00(1H, m),3.18 - 3.30(1H, m), 5.16 - 5.45(5H, m), 7.06(1H, s),7.10(1H, d, J = 10.6 Hz).

【００４６】元素分析値；$C_{24}H_{22}FN_3O_4 \cdot CH_3SO_3H \cdot 2H_2O$として：

計算値：C, 52.90; H, 5.33; N, 7.40(%)

実測値：C, 52.74; H, 5.15; N, 7.35(%)

OnCusp
Ex. 1002

【００４７】IR(KBr)cm^{-1}：3409，2936，1747，1658，1589，1503，1420，1252，1165，1112，1044,884，773，554.

【００４８】実施例２

実施例１にて得られた母液を減圧濃縮し、得られた残留物にメタノール２００mlを加え、氷冷下、トリエチルアミン１６２mlを滴下し、反応液が酸性でないことを確かめてから、室温にて無水酢酸９．９mlを加え、同温にて１時間撹拌した。反応終了後、反応液に水を加え、析出した結晶を沪過して、水、エタノールにて洗浄後、減圧下に乾燥して、(9S)-1-アセチルアミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン１．９ｇを得た。本品は実施例１に従って脱保護を行うことにより、(1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン・メタンスルホン酸塩に導くことができた。

【００４９】試験例１

本発明の(1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン・メタンスルホン酸塩・二水和物とこの塩酸塩（比較品）との吸湿性について試験を行った。すなわち、それぞれの塩を２５℃で相対湿度８３％と９３％の高湿度条件下に置き、その重量変化を５日間にわたり調べた。結果を図１に示す。この結果から比較品が高吸湿性で吸湿変化が速やかであるのに対し、本発明のメタンスルホン酸塩は若干吸湿性はあるものの、その変化はゆるやかで少ないことが判る。

【００５０】なお、比較品は、高相対湿度下に保存した資料は着色変化（黄褐色～褐色：原体；黄色）が認められ、吸湿による分解の可能性が示唆された。そこで色差計による着色変化の度合を調べた。この比較品を相対湿度９３％に保存して測定を行い、得られた結果を表１に示す。ここでＬａｂは色度（明るさ）を、ΔＥ（Ｈ）は色差の度合を示し、このΔＥ（Ｈ）が３～４以上では肉眼でも明らかに色差があることを示す。２５℃で相対湿度９３％で１カ月保存した試料のΔＥ（Ｈ）は７～８、２カ月保存した試料ではΔＥ（Ｈ）が１５～１９と得られ、比較品は吸湿することにより分解すると断定した。

【００５１】

【表１】

保存期間（月）	色	Ｌａｂ	ΔＥ（Ｈ）
0	yellow	81.68～81.69	－
1	brown-yellow	74.96～75.23	7.16～7.38
2	brown-yellow	62.65～67.43	14.53～19.24

【００５２】一方、本発明のメタンスルホン酸塩は着色変化は認められなかった。

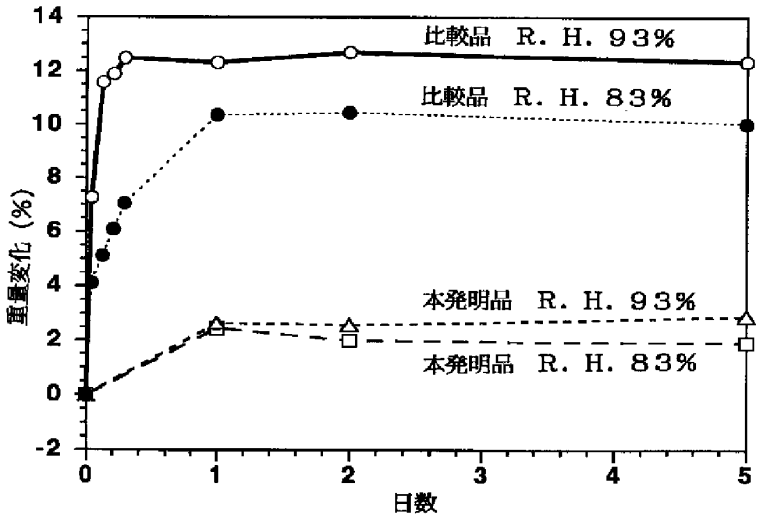
【００５３】

【発明の効果】本発明のカンプトテシン誘導体のメタンスルホン酸塩（１）又はその水和物は、優れた抗腫瘍活性を有し、かつ安全性が高いだけでなく、吸湿せず、沪過性及び溶解性に優れ、取扱いが有利であることから医薬品、特に抗腫瘍剤として有用である。また、本発明の製造法は、メタンスルホン酸処理を行うことにより、不要な異性体を目的とする異性体に変換でき、再結晶により、目的物を容易に分取でき、工業的に有利である。

【図面の簡単な説明】

【図１】本発明品と比較品の吸湿による重量変化を示す図である。

【図１】



フロントページの続き

(72)発明者　野口　滋
東京都江戸川区北葛西１丁目16番13号　第一製薬株式会社東京研究開発センター内

(72)発明者　寺沢　弘文
東京都江戸川区北葛西１丁目16番13号　第一製薬株式会社東京研究開発センター内

(72)発明者　北岡　宏章
東京都江戸川区北葛西１丁目16番13号　第一製薬株式会社東京研究開発センター内

Espacenet

JPH1095802A CAMPTOTHECINE DERIVATIVE

Applicants: TANABE SEIYAKU CO

Inventors: KAWAGUCHI TAKAYUKI, OKUNO SATORU, TSUJIHARA KENJI, YANO TOSHIRO

IPC ***A61K31/47; A61K31/495; A61K31/715; A61P35/00; A61P35/02; C07D491/22; C08B37/00; C08B37/02;*** (IPC1-7): A61K31/47; A61K31/495; A61K31/715; C07D491/22; C08B37/00; C08B37/02;

Application number: JP34937296A

Priority numbers: JP34357595A 1995-12-28; JP20010596A 1996-07-30; JP34937296A 1996-12-27

Publication date: 1998-04-14

Filing date: 1996-12-27

Priority date: 1995-12-28

Published as: JPH1095802A

Abstract: CAMPTOTHECINE DERIVATIVE

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain new camptothecine derivs. having an improved antineoplastic effect by combining a comptoecine compd. with a carboxylated polysaccharide through an amino acid or a peptide. SOLUTION: Comptothecine derivs. obtained by combining a compd. of the formula I [wherein two of R<1> to R<5> adjacent to each other form alkylene or each represent H, one of R<1> to R<5> represents -Xn -AlKm -R<6> , other two of R<1> to R<5> each represent H, alkyl or halogen; or two o them adjacent to each other are bonded to each other to form alkylene in which one C is substd. by -Xn -AlKm -R<6> and other three of them represent H, alkyl or halogen (one or two methylenes of the alkylenes may be substd. by -O-, -Sor -NH-; X represents -O- or -NH-; alk represents alkylene; and R<6> represents -NH2 , formula II, -OH or the like)] with a carboxylated polysaccharide through an amino acid or a peptide.

(19)日本国特許庁（ＪＰ）　(12) **公開特許公報（Ａ）**　(11)特許出願公開番号

特開平10－95802

(43)公開日　平成10年(1998)４月14日

(51)Int.Cl.[6]		識別記号	ＦＩ		
Ｃ０８Ｂ	37/00		Ｃ０８Ｂ	37/00	Ｇ
					Ｄ
Ａ６１Ｋ	31/47	ＡＤＵ	Ａ６１Ｋ	31/47	ＡＤＵ
	31/495	ＡＤＶ		31/495	ＡＤＶ
	31/715			31/715	

審査請求　未請求　請求項の数14　ＯＬ　（全 24 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平8－349372

(22)出願日　平成８年(1996)12月27日

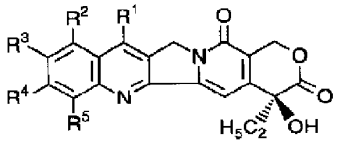
(31)優先権主張番号　特願平7－343575
(32)優先日　平７(1995)12月28日
(33)優先権主張国　日本（ＪＰ）
(31)優先権主張番号　特願平8－200105
(32)優先日　平８(1996)７月30日
(33)優先権主張国　日本（ＪＰ）

(71)出願人　000002956
田辺製薬株式会社
大阪府大阪市中央区道修町３丁目２番10号
(72)発明者　辻原　健二
埼玉県浦和市大字大牧1149番地133
(72)発明者　川口　隆行
東京都豊島区巣鴨１丁目15番２－406号
(72)発明者　奥野　哲
埼玉県三郷市早稲田８丁目５－18
(72)発明者　矢野　敏朗
埼玉県浦和市上木崎１－２－20　セルテーヌ上木崎502
(74)代理人　弁理士　青山　葆　（外１名）

(54)【発明の名称】　カンプトテシン誘導体

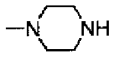
(57)【要約】
【課題】　副作用の少なくかつ著しく増強された抗腫瘍作用を有するカンプトテシン誘導体を提供する。
【解決手段】　７位～１２位の隣接位の置換基が環を形成すると共に、アミノアルコキシ基、ヒドロキシアルコキシ基等を有するカンプトテシン化合物を、アミノ酸またはペプチドを介して、カルボキシル基を含有する多糖類と結合されて所望のカンプトテシン誘導体に導く。

【特許請求の範囲】
【請求項１】　一般式
【化１】

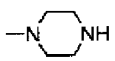


[I]

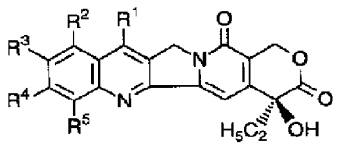
〔式中、R^1～R^5は(A)R^1～R^5のうち、隣接する２つが互いに結合してアルキレン基を形成しているか、または、２つとも水素原子であり、残りのR^1～R^5のうち１つが$-X_n-Alk_m-R^6$であり、他の２つが水素原子、アルキル基またはハロゲン原子であるか、あるいは(B)R^1～R^5のうち、隣接する２つが互いに結合してアルキレン基を形成し、そのアルキレン基のいずれかの炭素原子に$-X_n-Alk_m-R^6$が置換しており、R^1～R^5の残りの３つが水素原子、アルキル基またはハロゲン原子であることを表し、(A)および(B)におけるアルキレン基中の１つまたは２つのメチレン基は－Ｏ－、－Ｓ－または－ＮＨ－で置き換えられていてもよく、Ｘは－Ｏ－または－ＮＨ－であり、Ａ1kはアルキレン基であり、R^6は$-NH_2$、
【化２】



または－ＯＨであり、ｍおよびｎは共に０または１であるか、ｍが１、ｎが０である〕で示される化合物とカルボキシル基を有する多糖類とがアミノ酸またはペプチドを介して結合してなるカンプトテシン誘導体またはその薬理学的に許容しうる塩。
【請求項２】　多糖類のカルボキシル基の一部または全部とアミノ酸またはペプチドのアミノ基が酸アミド結合し、このアミノ酸またはペプチドにおけるカルボキシル基の全部または一部と化合物［Ｉ］のR^6とが酸アミド結合またはエステル結合してなる請求項１に記載の化合物またはその薬理的に許容しうる塩。
【請求項３】　多糖類のカルボキシル基の一部または全部とアミノ酸またはペプチドのＮ末端アミノ基とが酸アミド結合し、このアミノ酸またはペプチドのＣ末端カルボキシル基と化合物〔Ｉ〕のR^6とが酸アミド結合またはエステル結合してなる請求項２に記載の化合物またはその薬理的に許容しうる塩。
【請求項４】　化合物〔Ｉ〕のR^6が式：$-NH_2$または
【化３】



であり、カルボキシル基を有する多糖類がカルボキシメチル化されたデキストランまたはプルランであり、両成分がペプチドを介して結合してなる請求項３に記載の化合物またはその薬理的に許容しうる塩。
【請求項５】　(1)R^1及びR^2が結合してトリメチレン基、R^3が３－アミノプロピルオキシ基、R^4及びR^5が水素原子、(2)R^1がピペラジノメチル基、R^2及びR^5が水素原子、R^3及びR^4が結合してエチレンジオキシ基、(3)R^1がアミノメチル基、R^2及びR^5が水素原子、R^3及びR^4が結合してエチレンジオキシ基、(4)R^1、R^2、R^4及びR^5が水素原子、R^3が３－アミノプロピルオキシ基、(5)R^1及びR^2が結合してアミノ置換トリメチレン基、R^3がメチル基、R^4がフッ素原子、R^5が水素原子、または(6)R^1、R^3、R^4及びR^5が水素原子、R^2がアミノ基である請求項４記載の化合物またはその薬理的に許容しうる塩。
【請求項６】　該ペプチドがグリシル－グリシル－ＬまたはＤ－フェニルアラニル－グリシン、グリシル－グリシル、グリシル－グリシル－グリシン、グリシル－グリシル－グリシル－グリシン、グリシル－グリシル－グリシル－グリシル－グリシン、ＬまたはＤ－フェニルアラニル－グリシンまたはＬまたはＤ－ロイシル－グリシンである請求項５に記載の化合物またはその薬理的に許容しうる塩。
【請求項７】　該ペプチドがグリシル－グリシル－Ｌ－フェニルアラニル－グリシンである請求項６記載の化合物またはその薬理的に許容しうる塩。
【請求項８】　該ペプチドがグリシル－グリシンである請求項６記載の化合物またはその薬理的に許容しうる塩。
【請求項９】　該ペプチドがグリシル－グリシル－グリシンである請求項６記載の化合物またはその薬理的に許容しうる塩。
【請求項１０】　該ペプチドがグリシル－グリシル－グリシル－グリシンである請求項６記載の化合物またはその薬理的に許容しうる塩。
【請求項１１】　該ペプチドがＬまたはＤ－フェニルアラニル－グリシンである請求項６記載の化合物またはその薬理的に許容しうる塩。
【請求項１２】　多糖類のカルボキシメチル化度が０．３以上０．８以下である請求項７、８、９、１０または１１記載の化合物またはその薬理的に許容しうる塩。
【請求項１３】　一般式
【化４】

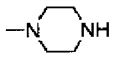


[I]

〔式中、R^1～R^5は(A)R^1～R^5のうち、隣接する２つが互いに結合してアルキレン基を形成しているか、または、２つとも水素原子であり、残りのR^1～R^5のうち１

つが－X_n－Alk_m－R^6であり、他の２つが水素原子、アルキル基またはハロゲン原子であるか、あるいは(B)R^1～R^5のうち、隣接する２つが互いに結合してアルキレン基を形成し、そのアルキレン基のいずれかの炭素原子に－X_n－Alk_m－R^6が置換しており、R^1～R^5の残りの３つが水素原子、アルキル基またはハロゲン原子であることを表し、(A)および(B)におけるアルキレン基中の１つまたは２つのメチレン基は－Ｏ－、－Ｓ－または－ＮＨ－で置き換えられていてもよく、Ｘは－Ｏ－または－ＮＨ－であり、Alkはアルキレン基であり、R^6は－NH_2、

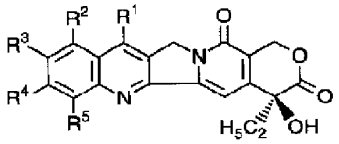
【化５】



または－ＯＨであり、ｍおよびｎは共に０または１であるか、ｍが１、ｎが０である]で示される化合物とアミノ酸またはペプチドとが結合してなるカンプトテシン化合物を、アミノ基またはカルボキシル基が保護されている場合はその保護基を除去したのち、カルボキシル基を有する多糖類と反応させ、所望により、生成物を薬理的に許容しうる塩とすることを特徴とする、化合物［Ｉ］とカルボキシル基を有する多糖類とがアミノ酸またはペプチドを介して結合してなるカンプトテシン誘導体またはその薬理的に許容しうる塩の製法。

【請求項１４】　一般式

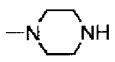
【化６】



[I]

〔式中、R^1～R^5は(A)R^1～R^5のうち、隣接する２つが互いに結合してアルキレン基を形成しているか、または、２つとも水素原子であり、残りのR^1～R^5のうち１つが－X_n－Alk_m－R^6であり、他の２つが水素原子、アルキル基またはハロゲン原子であるか、あるいは(B)R^1～R^5のうち、隣接する２つが互いに結合してアルキレン基を形成し、そのアルキレン基のいずれかの炭素原子に－X_n－Alk_m－R^6が置換しており、R^1～R^5の残りの３つが水素原子、アルキル基またはハロゲン原子であることを表し、(A)および(B)におけるアルキレン基中の１つまたは２つのメチレン基は－Ｏ－、－Ｓ－または－ＮＨ－で置き換えられていてもよく、Ｘは－Ｏ－または－ＮＨ－であり、Alkはアルキレン基であり、R^6は－NH_2、

【化７】



または－ＯＨであり、ｍおよびｎは共に０または１であるか、ｍが１、ｎが０である]で示される化合物と、アミノ酸またはペプチドとを反応させ、得られた化合物のアミノ基またはカルボキシル基が保護されている場合はその保護基を除去し、所望により、生成物を塩とすることを特徴とする、化合物［Ｉ］とアミノ酸またはペプチドとが結合してなるカンプトテシン化合物またはその塩の製法。

【発明の詳細な説明】

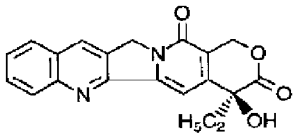
【０００１】

【発明の属する技術分野】本発明は、増強された抗腫瘍作用を示す新規なカンプトテシン誘導体に関する。さらに詳しくは、本発明は、アミノアルコキシ基またはヒドロキシアルコキシ基を有するカンプトテシン化合物等をアミノ酸またはペプチドを介してカルボキシル基を有する多糖類に結合させてなる新規なカンプトテシン誘導体、さらにそれらの製造法に関する。本発明のカンプトテシン誘導体は、標的作用部位に多量かつ選択的に送達され、その部位で所望の薬理学的作用を発揮することができるものであって、カンプトテシン化合物の有する抗腫瘍作用が著しく増強されると共に、その副作用が軽減され、医薬品として極めて有用なものである。

【０００２】

【従来の技術】カンプトテシンは植物アルカロイドの一種であって、下記の化学構造式：

【化８】



を有し、抗白血病作用および抗腫瘍作用を有することが知られており、その誘導体であるイリノテカン塩酸塩（ＣＰＴ－１１）はすでに市販にも供されている。しかしながら、この化合物は、臨床において強い抗腫瘍活性を示す反面、他の抗腫瘍剤等と同様に副作用が強く、その使用に制限を受けている〔癌と化学療法、２１巻、７０９頁（１９９４年）〕。また、種々のカンプトテシン化合物が合成され、それらが抗腫瘍活性を有することも報告されている〈特開平１－２７９８９１号、特開平５－２２２０４８号、特開平６－８７７４６号、特開平６－２２８１４１号、特表平４－５０３５０５号、特表平４－５０２０１７号等〉。

【０００３】一方、この種の副作用の強い薬物について抗腫瘍活性を増大させると共にその副作用をできるだけ抑えるために、近年、薬物を必要な組織に必要な量だけ送達する、いわゆるドラッグ・デリバリー・システム（Drug Delivery System）の技術が研究されている。特に、癌化学療法においては、腫瘍細胞と正常細胞との間で抗癌剤感受性に十分な差異が得られないことが問題であり、抗癌剤を癌病巣へ選択的に送達するターゲッテ

ィング型ドラッグ・デリバリー・システムの研究が盛んに行われており、例えば、ドキソルビシン－多糖類複合体(WO ９４／１９３７６号)、ドキソルビシン封入リポソーム〔抗癌剤の効果増強とターゲッティング療法(サイエンス・フォーラム株式会社発行)、２２７頁(１９８７年)〕、デキストラン結合マイトマイシン〔抗癌剤の効果増強とターゲッティング療法(サイエンス・フォーラム株式会社発行)、２７８頁(１９８７年)〕等が知られている

【０００４】

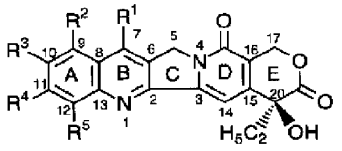
【発明が解決しようとする課題】カンプトテシン化合物は、上述の如く、優れた抗腫瘍作用を有し、医薬として極めて有用である反面、その強い副作用のためにその使用が著しく制限されるという問題がある。したがって、その優れた薬物活性を保持しつつ、好ましくない副作用の発現を抑えた新しい誘導体の開発が望まれている。

【０００５】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記カンプトテシン化合物の持つ問題点を排除した優れたカンプトテシン誘導体を得るべく、前記ドラッグ・デリバリー・システムの技術を応用し、WO ９４／１９３７６号に記載の方法をさらに発展させてカンプトテシン化合物に応用する研究を重ねた結果、反応性基を有するカンプトテシン化合物に、アミノ酸またはペプチドを介してカルボキシル基を有する多糖類を結合させたカンプトテシン誘導体が、所望の効果を有することを見い出し、本発明を完成するに至った。

【０００６】すなわち、本発明によれば、アミノアルコキシ基、ヒドロキシアルコキシ基等を有する、下記の一般式

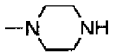
【化９】



[I]

〔式中、R^1～R^5は(A)R^1～R^5のうち、隣接する２つが互いに結合してアルキレン基を形成しているか、または、２つとも水素原子であり、残りのR^1～R^5のうち１つが$-X_n-Alk_m-R^6$であり、他の２つが水素原子、アルキル基またはハロゲン原子であるか、あるいは(B)R^1～R^5のうち、隣接する２つが互いに結合してアルキレン基を形成し、そのアルキレン基のいずれかの炭素原子に$-X_n-Alk_m-R^6$が置換しており、R^1～R^5の残りの３つが水素原子、アルキル基またはハロゲン原子であることを表し、(A)および(B)におけるアルキレン基中の１つまたは２つのメチレン基は－Ｏ－、－Ｓ－または　ＮＨ　で置き換えられていてもよく、Ｘは　Ｏ　または－ＮＨ－であり、Alkはアルキレン基であり、R^6は－NH_2、

【化１０】



または－ＯＨであり、ｍおよびｎは共に０または１であるか、ｍが１、ｎが０である〕で示されるカンプトテシン化合物に、アミノ酸またはペプチドを介して、カルボキシル基を有する多糖類と結合させたカンプトテシン誘導体は著しく強い抗腫瘍作用を有すると共に毒性が低いことが判明した。

【０００７】本発明の目的は、式〔Ｉ〕で示されるカンプトテシン化合物とカルボキシル基を有する多糖類とをアミノ酸またはペプチドを介して結合させてなる新規なカンプトテシン誘導体を提供するものである。本発明の他の目的は、該カンプトテシン誘導体の製造法を提供するものである。

【０００８】

【発明の実施の形態】本発明のカンプトテシン誘導体としては、カンプトテシン化合物〔Ｉ〕とカルボキシル基を有する多糖類とがアミノ酸またはペプチドを介して結合してなるものをあげることができる。その具体例としては、多糖類のカルボキシル基の一部または全部とアミノ酸またはペプチドのアミノ基が酸アミド結合し、そのアミノ酸またはペプチドにおけるカルボキシル基の全部または一部と化合物〔Ｉ〕のR^6とが酸アミド結合またはエステル結合している化合物をあげることができ、より具体的には多糖類のカルボキシル基の一部または全部とアミノ酸またはペプチドのＮ末端アミノ基が酸アミド結合し、そのアミノ酸またはペプチドのＣ末端カルボキシル基と化合物〔Ｉ〕のR^6とが酸アミド結合またはエステル結合している化合物等をあげることができる。

【０００９】本発明の式〔Ｉ〕で示される化合物における各置換基はつぎの基を含む。(A)におけるR^1～R^5のうち隣接する２つが互いに結合して形成されるアルキレン基(１つまたは２つのメチレン基が－Ｏ－、－Ｓ－または－ＮＨ－で置き換えられていてもよい)としては、一般式〔Ｉ〕において７位と９位、９位と１０位、１０位と１１位、または１１位と１２位で形成され、炭素数２～６個の直鎖または分岐鎖アルキレン基(例えば、エチレン基、トリメチレン基、テトラメチレン基、ペンタメチレン基、ヘキサメチレン基、メチルメチレン基、メチルエチレン基、メチルトリメチレン基)が挙げられる。

【００１０】該アルキレン基のうち１つのメチレン基が、－Ｏ－、－Ｓ－または－ＮＨ－で置き換えられたアルキレン基として、末端のメチレン基、末端以外の１つのメチレン基が－Ｏ－、－Ｓ－または－ＮＨ－で置き換えられたアルキレン基が挙げられ、具体的には、式－Ｏ－Alk'－(Alk'はアルキレン基を意味する。以下同様)で示されるアルキレンオキシ基(例えば、メチレンオキシ基、エチレンオキシ基、トリメチレンオキシ基、テト

OnCusp
Ex. 1002

ラメチレンオキシ基、メチルエチレンオキシ基）；式－ＮＨ－Ａ1k'－で示されるアルキレンアミノ基(例えば、メチレンアミノ基、エチレンアミノ基、トリメチレンアミノ基、テトラメチレンアミノ基、メチルエチレンアミノ基）；式－Ｓ－Ａ1k'－で示されるアルキレンチオ基(例えば、メチレンチオ基、エチレンチオ基、トリメチレンチオ基、テトラメチレンチオ基、メチルエチレンチオ基）；式－Ａ1k'－Ｏ－Ａ1k'－で示されるアルキレンオキシアルキル基(例えば、メチレンオキシメチル基、エチレンオキシメチル基、トリメチレンオキシメチル基、メチルエチレンオキシメチル基）；式－Ａ1k'－ＮＨ－Ａ1k'－で示されるアルキレンアミノアルキル基(例えば、メチレンアミノメチル基、エチレンアミノメチル基、トリメチレンアミノメチル基、メチルエチレンアミノメチル基）；式－Ａ1k'－Ｓ－Ａ1k'－で示されるアルキレンチオアルキル基(例えば、メチレンチオメチル基、エチレンチオメチル基、トリメチレンチオメチル基、メチルエチレンチオメチル基)等が挙げられる。

【００１１】また該アルキレン基のうち２つのメチレン基が－Ｏ－、－Ｓ－または－ＮＨ－で置き換えられたアルキレン基としては、末端のメチレン基、末端以外の２つのメチレン基が－Ｏ－、－Ｓ－または－ＮＨ－で置き換えられたアルキレン基が挙げられ、具体的には、式－Ｏ－Ａ1k'－Ｏ－で示されるアルキレンジオキシ基(例えば、メチレンジオキシ基、エチレンジオキシ基、トリメチレンジオキシ基、テトラメチレンジオキシ基、メチルエチレンジオキシ基）；式－ＮＨ－Ａ1k'－ＮＨ－で示されるアルキレンジアミノ基(例えば、メチレンジアミノ基、エチレンジアミノ基、トリメチレンジアミノ基、テトラメチレンジアミノ基、メチルエチレンジアミノ基）；式－Ｓ－Ａ1k'－Ｓ－で示されるアルキレンジチオ基(例えば、メチレンジチオ基、エチレンジチオ基、トリメチレンジチオ基、テトラメチレンジチオ基、メチルエチレンジチオ基)等が挙げられる。

【００１２】式－X_n－$A1k_m$－R^6で示される基におけるＡ１ｋは炭素数１～６個の直鎖または分岐鎖アルキレン基(例えば、メチレン基、エチレン基、トリメチレン基、テトラメチレン基、ペンタメチレン基、ヘキサメチレン基、メチルエチレン基、メチルトリメチレン基)が挙げられ、該－X_n－$A1k_m$－R^6で示される基の具体例としては、アミノアルキルオキシ基(例えば、アミノエチルオキシ基、アミノプロピルオキシ基)、ピペラジニルアルキルオキシ基(例えば、ピペラジニルエチルオキシ基、ピペラジニルプロピルオキシ基、ピペラジニルブチルオキシ基、ピペラジニルペンチルオキシ基)、ヒドロキシアルキルオキシ基(例えば、ヒドロキシエチルオキシ基、ヒドロキシプロピルオキシ基、ヒドロキシブチルオキシ基、ヒドロキシペンチルオキシ基)、アミノアルキルアミノ基(例えば、アミノエチルアミノ基、アミノプロピルアミノ基、アミノブチルアミノ基、アミノペンチルアミノ基)、ピペラジニルアルキルアミノ基(例えば、ピペラジニルエチルアミノ基、ピペラジニルプロピルアミノ基、ピペラジニルブチルアミノ基、ピペラジニルペンチルアミノ基)、ヒドロキシアルキルアミノ基(例えば、ヒドロキシエチルアミノ基、ヒドロキシプロピルアミノ基、ヒドロキシブチルアミノ基、ヒドロキシペンチルアミノ基)、アミノアルキル基(例えば、アミノメチル基、アミノエチル基、アミノプロピル基、アミノブチル基、アミノペンチル基)、ピペラジニルアルキル基(例えば、ピペラジニルメチル基、ピペラジニルエチル基、ピペラジニルプロピル基、ピペラジニルブチル基、ピペラジニルペンチル基)、ヒドロキシアルキル基(例えば、ヒドロキシメチル基、ヒドロキシエチル基、ヒドロキシプロピル基、ヒドロキシブチル基、ヒドロキシペンチル基)、アミノ基、ピペラジノ基、およびヒドロキシ基等が挙げられる。

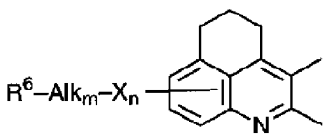
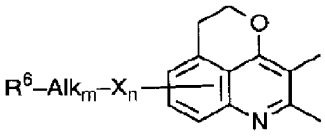
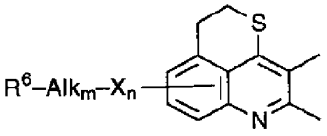
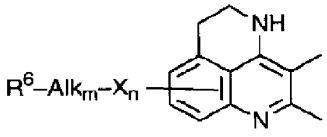
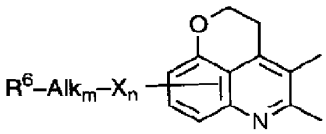
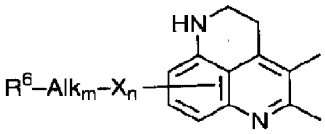
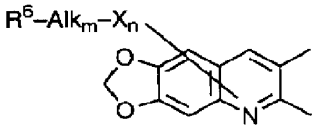
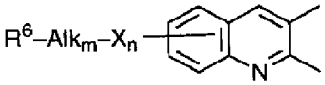
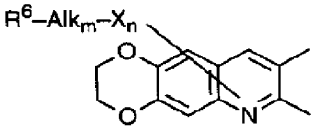
【００１３】また、(Ｂ)におけるR^1～R^5のうち隣接する２つが互いに結合して形成されるアルキレン基(１つまたは２つのメチレン基が－Ｏ－、－Ｓ－または－ＮＨ－で置き換えられていてもよい)であって、そのアルキレン基のいずれかの炭素原子に－X_n－$A1k_m$－R^6が置換している基としては、一般式〔Ｉ〕において、７位と９位、９位と１０位、１０位と１１位または１１位と１２位間で形成され、炭素数２～６個の直鎖または分岐鎖アルキレン基(例えば、エチレン基、トリメチレン基、テトラメチレン基、ペンタメチレン基、ヘキサメチレン基、メチルエチレン基、メチルトリメチレン基)が挙げられ、そのアルキレン基のうち１つのメチレン基が－Ｏ－、－Ｓ－または－ＮＨ－で置き換えられたアルキレン基および２つのメチレン基が－Ｏ－、－Ｓ－または－ＮＨ－で置き換えられたアルキレン基の具体例としては、いずれも前記と同じものが挙げられる。また、これらのうちの１つの炭素原子に置換している－X_n－$A1k_m$－R^6も上記と同じものが例示される。

【００１４】また、上記R^1～R^5のうち隣接してアルキレン基を形成する以外の残りの基におけるアルキル基としては、炭素数１～６個の直鎖または分岐鎖アルキル基(例えば、メチル基、エチル基、ｎ－プロピル基、イソプロピル基、ｎ－ブチル基、イソブチル基、sec－ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基)が挙げられ、またハロゲン原子としてはフッ素、塩素、臭素およびヨウ素が挙げられる。

【００１５】さらに、具体的な化合物として、(Ａ)における環Ａ・環Ｂ部分の部分構造の具体例としては、次のものが挙げられる。

【化１１】

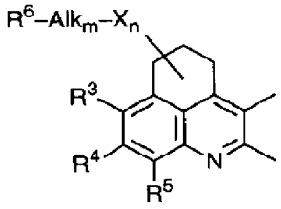
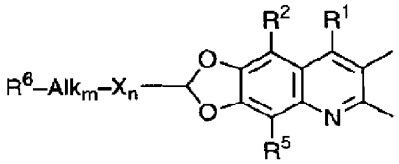
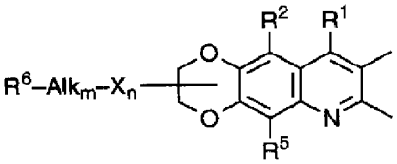
OnCusp
Ex. 1002

〔式中、X、Alk、R^6、mおよびnは前記に同じ〕

【００１６】また、(B)における環Ａ・環Ｂ部分の部分構造の具体例としては、次のものが挙げられる。

【化１２】

［式中、R^1、R^2、R^3、R^{4}およびR^{5}はアルキル基、ハロゲン原子、または水素原子を意味し、X、Alk、R^6、mおよびnは前記に同じ］このうち、R^1～R^{5}の好ましい組み合わせとして、次のものを挙げることができる。

(1)R^{1}及びR^{2}が結合してトリメチレン基、R^{3}が３－アミノプロピルオキシ基、R^{4}及びR^{5}が水素原子

(2)R^{1}がピペラジノメチル基、R^{2}及びR^{5}が水素原子、R^{3}及びR^{4}が結合してエチレンジオキシ基

(3)R^{1}がアミノメチル基、R^{2}及びR^{5}が水素原子、R^{3}及びR^{4}が結合してエチレンジオキシ基

(4)R^1、R^2、R^{4}及びR^{5}が水素原子、R^{3}が３－アミノプロピルオキシ基

(5)R^{1}及びR^{2}が結合してアミノ置換トリメチレン基、R^{3}がメチル基、R^{4}がフッ素原子、R^{5}が水素原子

(6)R^1、R^3、R^{4}及びR^{5}が水素原子、R^{2}がアミノ基

【００１７】本発明における、カンプトテシン化合物〔Ｉ〕とアミノ酸またはペプチドを介して結合される「カルボキシル基を有する多糖類」とは、前記ＷＯ ９４／１９３７６号に開示されている物質と同じものを含み、本来的にその構造中にカルボキシル基を有する多糖類(例えば、ヒアルロン酸、ペクチン酸、アルギン酸、コンドロイチン、ヘパリンなど)と、本来的にカルボキシル基を有さない多糖類(例えば、プルラン、デキストラン、マンナン、キチン、マンノグルカン、キトサンなど)にカルボキシル基を導入したものを含む。このうち、多糖類としてはデキストランが特に好ましく、その平均分子量は２０，０００～４００，０００、とりわけ５０，０００～１５０，０００〔ゲル浸透クロマトグラフィー(ＧＰＣ)法、新生化学実験講座第２０巻第７頁〕の範囲であるのが好ましい。本来的にカルボキシル基を有さない多糖類にカルボキシル基を導入したものは、そのカルボキシル基を有さない多糖類の、一部もしくは全部の水酸基の水素原子がカルボキシ－C_{1-4}アルキル基で置換されているものを意味する。また、本発明の「カルボキシル基を有する多糖類」には、本来的にカルボキシル基を有さない多糖類をいったん還元剤で処理後、一部または全部の水酸基の水素原子をカルボキシ－C_{1-4}アルキル基で置換したものも含まれる。

【００１８】上記多糖類の水酸基の水素原子と置換されるカルボキシ－C_{1-4}アルキル基のアルキル部分は直鎖または分岐鎖のいずれであってもよい。カルボキシ　C_{1-4}アルキル基の好ましい例としては、カルボキシメチル基、１－カルボキシエチル基、３－カルボキシプロピル基、１－メチル－３－カルボキシプロピル基、２－メチル－３－カルボキシプロピル基、４－カルボキシブチル基などが挙げられ、特にカルボキシメチル基、１－カルボキシエチル基が好ましい。本発明においては、カルボキシル基を有する多糖類がカルボキシメチル化されたデキストランまたはプルランであるものが好ましい。なお、上記のカルボキシアルキル基を導入する場合、その導入の程度は、糖残基一つあたりのカルボキシアルキル基の数として定義される「置換度」によって表すことができる。すなわち、

【数１】

$$\text{置換度} = \frac{\text{分子中のカルボキシアルキル基の数}}{\text{分子中の糖残基の総数}}$$

と表すことができる。なお、以下この置換度を、カルボキシアルキル基がカルボキシメチル基である場合には「カルボキシメチル(ＣＭ)化度」という。多糖類がプルラン、デキストランまたはマンノグルカンの場合、全ての水酸基が置換された場合には置換度は３であり、０．３以上０．８以下が好ましい。多糖類がキチンである場合、全ての水酸基が置換された場合には置換度は２であり、０．３以上０．８以下が好ましい。なお、多糖類が元来カルボキシル基を有するものである場合を除き、多糖類分子中に少なくとも１つのカルボキシアルキル基が存在していることが必要である。従って、この意味で置換度が０である化合物は本発明の多糖類から除かれる これらのカルボキシル基を有する多糖類は、ＷＯ ９４／１９３７６号に記載の方法によって製造されうる。

【００１９】カンプトテシン化合物〔Ｉ〕とカルボキシル基を有する多糖類との結合に際して介在させるべきアミノ酸としては、天然アミノ酸および合成アミノ酸(Ｄ－アミノ酸、Ｌ－アミノ酸、これらの混合物を含む)のいずれも含み、また中性アミノ酸、塩基性アミノ酸および酸性アミノ酸のいずれであってもよい。さらにα－アミノ酸に限らず、β－アミノ酸、γ－アミノ酸、ε－アミノ酸等も含まれる。具体例としては、グリシン、α－アラニン、β－アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、スレオニン、システイン、メチオニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、リシン、アルギニン、フェニルアラニン、チロシン、ヒスチジン、トリプトファン、プロリン、オキシプロリン、γ－アミノ酪酸、ε－アミノカプロン酸等が挙げられる。

【００２０】またペプチドとしては、上記アミノ酸から導かれるペプチドのほか、鎖中の一部にアミノ酸以外の化合物を含む場合も包含する。例えば、コハク酸のようなジカルボン酸、エチレンジアミンの様なジアミンあるいはエチレングリコールの様なジオールがペプチド鎖の中にまたは末端に存在していてもよい。また、ペプチド鎖の結合方向は、多糖類のカルボキシル基にＮ末端から酸アミド結合によって結合しているのが通常であるが、ペプチド鎖中塩基性アミノ酸(例えば、リジン)が存在する場合にはそのε－アミノ基を多糖類のカルボキシル基と結合させ、α-アミノ基をペプチド鎖のＣ末端と結合させることによってペプチド鎖の結合方向を逆転させてもよい。このようなペプチドは２以上のアミノ酸がペプチド結合したもの、すなわちペプチド鎖２以上のものであって、好ましくは、ペプチド鎖２～５のものである。その具体的なペプチド鎖の例としては、例えば、－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－ＬまたはＤ－Ｐｈｅ－Ｇｌｙ－、－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－、－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－、－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－、－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－、－ＬまたはＤ－Ｐｈｅ－Ｇｌｙ－、－ＬまたはＤ－Ｔｙｒ－Ｇｌｙ－または－ＬまたはＤ－Ｌｅｕ－Ｇｌｙ－および鎖中にこの配列を含むペプチド鎖が挙げられる(ここで、これらペプチドおよびこれら配列を含むペプチド鎖のＮ末端側が多糖類のカルボキシル基に導入される)。これらペプチドのうち、－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－ＬまたはＤ－Ｐｈｅ－Ｇｌｙ－、－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－、－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－、－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－、－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－、－ＬまたはＤ－Ｐｈｅ－ＧｌｙおよびＬまたはＤ－Ｌｅｕ－Ｇｌｙ－であるものがより好ましく、　Ｇｌｙ　Ｇｌｙ　Ｌ　Ｐｈｅ　Ｇｌｙ－、－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－、－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－、－Ｇｌｙ－

OnCusp
Ex. 1002

Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－、－ＬまたはＤ－Ｐｈｅ－Ｇｌｙ－がとりわけ好ましい。

【００２１】本発明のカンプトテシン誘導体を製造するには、通常、式〔Ｉ〕で示される化合物にアミノ酸またはペプチドを結合させ、ついでこれにカルボキシル基を有する多糖類を反応させて結合させる方法が採用される。化合物〔I〕とアミノ酸またはペプチドとの反応により、式〔I〕中R^6が式：$-NH_2$またはピペラジノ基のときはアミノ酸またはペプチドのＣ末端カルボキシル基との間で酸アミド結合され、またR^6が－ＯＨのときはエステル結合される。この際、該酸アミド結合またはエステル結合にあずからないアミノ酸またはペプチド中の他の官能基、例えばＮ末端アミノ基また他のカルボキシル基等は常法により保護しておくのが好ましい。そのような保護基は一般にアミノ酸の保護に用いられているものであればとくに制限されないが、例えばアミノ基の保護基としてはｔ－ブトキシカルボニル基、ｐ－メトキシベンジルオキシカルボニル基などが、またカルボキシル基の保護基としては低級アルキル基(例えばｔ－ブチル基)、ベンジル基などを挙げることができる。

【００２２】上記酸アミド結合およびエステル結合の形成は、常法に従って行うことができ、例えば、適当な溶媒中、縮合剤の存在下で行うことができる。溶媒としては、ジメチルホルムアミド、テトラヒドロフラン等を、縮合剤としてはジシクロヘキシルカルボジイミド、１－（３　ジメチルアミノプロピル）　３　エチルカルボジイミド塩酸塩等を用いるのが好ましい。

【００２３】上記のようにして得られるアミノ酸またはペプチドが結合したカンプトテシン化合物を、アミノ基またはカルボキシル基が保護されている場合は、必要に応じて、その保護基を常法により除去したのち、カルボキシル基を有する多糖類を反応させることにより目的とするカンプトテシン誘導体が製造される。この反応により、多糖類のカルボキシル基の一部または全部と、上記カンプトテシン化合物〔Ｉ〕に結合したアミノ酸またはペプチドのＮ末端アミノ基とが酸アミド結合する。

【００２４】カンプトテシン化合物〔Ｉ〕にアミノ酸またはペプチドが結合したものとカルボキシル基を有する多糖類との反応は、常法に従って行うことができ、例えば、適当な溶媒中、縮合剤の存在下で行うことができる。溶媒としては、水、エタノール、ジメチルホルムアミドまたはこれらから選択される混合溶媒、縮合剤としては、１－(３－ジメチルアミノプロピル)－３－エチルカルボジイミド塩酸塩、２－エチルオキシ－１－エチルオキシカルボニル－１,２－ジヒドロキノリン等を用いるのが好ましい。

【００２５】本発明のカンプトテシン誘導体において、多糖類と薬効成分たるカンプトテシン化合物〔Ｉ〕との結合割合は多糖類の種類によって適宜選択されるが、一般的にカンプトテシン化合物〔Ｉ〕の含有率は以下の割合とするのが好ましい。多糖類がプルラン、デキストラン、キチン、マンノグルカンおよびＮ－アセチル－脱Ｎ－硫酸ヘペリンの場合には０.１～２０重量％が好ましく、２～１０重量％が特に好ましい。本発明において、カンプトテシン誘導体の平均分子量(ＧＰＣ法で測定)は、多糖類がデキストランである場合は、例えば、３０,０００～５００,０００、好ましくは６０,０００～２００,０００である。

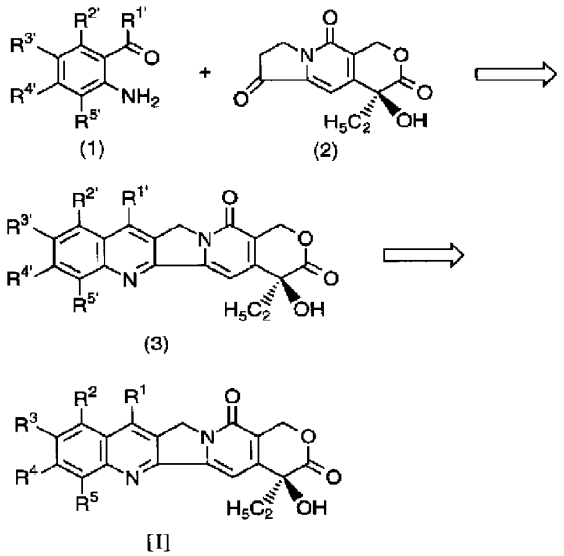
【００２６】なお、上記の方法で得られるカンプトテシン誘導体は、所望により、その薬理的に許容される塩に導くことができる。そのような塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩のようなアルカリ金属またはアルカリ土類金属の塩、アルギニン塩、リジン塩のようなアミノ酸塩などが挙げられる。

【００２７】本発明におけるカンプトテシン化合物〔Ｉ〕は、公知化合物を含み(例えば、特開平１－２７９８９１号、特開平５－２２２０４８号、特開平６－８７７４６号、特開平６－２２８１４１号、特表平４－５０３５０５号、特表平５－５０２０１７号等に記載)、公知の方法で製造され、例えば、下記反応式１で示す方法で製造される。

【化１３】

OnCusp
Ex. 1002

反応式１



〔式中、R^1、R^2、R^3、R^4およびR^5は前記に同じ、$R^{1'}$、$R^{2'}$、$R^{3'}$、$R^{4'}$および$R^{5'}$はそれらのいずれかに含まれる置換基－X_n－Alk_m－R^6中のアミノ基、ピペラジノ基またはヒドロキシ基が保護されている以外は、それぞれR^1、R^2、R^3、R^4およびR^5と同じである〕

【００２８】すなわち、アミノカルボニル化合物(１)を公知物質のピラノインドリジン(２)(ＥＰ－０２２０６０１－Ａを参照)とフリードランダー縮合反応として知られている方法(オルガニック・リアクションズ(Organic Reactions)２８,pp３７～２０２,John Wiley & Sons. Inc. New York(１９８２)を参照)によって縮合させ、ついで保護基を除去することにより目的とするカンプトテシン化合物〔Ｉ〕を得る。

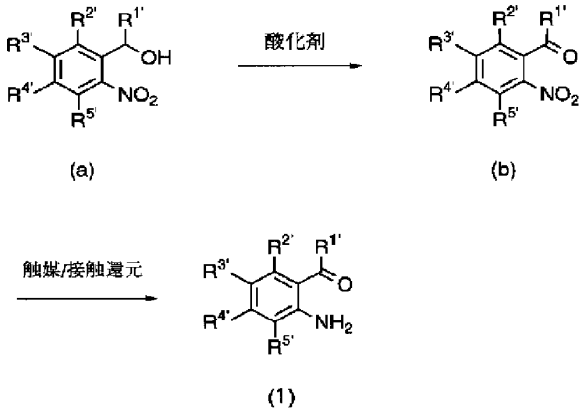
【００２９】なお、上記の製法において、$R^{1'}$～$R^{5'}$のいずれかに含まれる式：－X_n－Alk_m－R^6基は、mが１、nが１の場合には、該フリードランダー縮合反応後に導入することもできる。すなわち、出発化合物(１)の代わりに、該化合物(１)において対応する基が水酸基(ＨＯ－)またはアミノ基(H_2N－)である化合物を用い、それを化合物(２)とフリードランダー縮合反応に付し、ついで得られた縮合生成物に、式：$R^{6'}$－Alk_m－OH($R^{6'}$は保護されたアミノ基、ピペラジノ基またはヒドロキシ基、Alkおよびmは前記に同じ)で示される保護されたアミノアルカノールまたはヒドロキシアルカノールまたはそれらの反応性誘導体(例えば、保護されたアミノアルキルハライド、保護されたヒドロキシアルキルハライド)を作用させ、ついで保護基を除去することにより所望の化合物〔Ｉ〕を得る。

【００３０】上記の方法において用いられる出発化合物(１)は、例えば、下記反応式２に示される方法で製造される。

【化１４】

OnCusp
Ex. 1002

反応式２



〔式中、$R^{1'}$、$R^{2'}$、$R^{3'}$、$R^{4'}$および$R^{5'}$は前記に同じ〕

【００３１】すなわち、ヒドロキシ化合物(a)を酸化剤、例えば、ピリジニウムジクロメートで処理して、ケトン化合物(b)とし、ついでこれを適当な触媒、例えば、Ｐｄ－Ｃの存在下に接触還元することにより、化合物(１)を得る。

【００３２】また、上記ヒドロキシ化合物（ａ）において、$R^{1'}$、$R^{2'}$、$R^{3'}$、$R^{4'}$および$R^{5'}$のいずれかに含まれる$-X_n-Alk_m-R^6$はmが１、nが１の場合には、対応する基が水酸基(ＨＯ－)またはアミノ基(H_2N-)である化合物と一般式：

【化１５】

$$HO-Alk-R^6$$

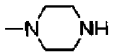
〔式中、AlkおよびR⁶は前記に同じ〕で示される化合物またはその反応性誘導体(例えば、置換アルキルハライド)と反応させることにより、製造することができる。

【００３３】本発明のカンプトテシン誘導体またはその薬理的に許容しうる塩は、各種腫瘍に対し、優れた抗腫瘍作用を示し、とりわけ、固形腫瘍[例えば、肺癌、子宮癌、卵巣癌、乳癌、消化器癌(大腸癌、胃癌等)]に対して優れた治療効果を有する。

【００３４】本発明のカンプトテシン誘導体またはその薬理的に許容しうる塩は、非経口的(例えば、静脈注射)に投与するのが好ましく、通常、液剤(例えば、溶液、懸濁液、エマルジョン)として用いられる。

【００３５】本発明の目的物の投与量は、投与方法、患者の年令、体重、状態等によっても異なるが、通常、１日あたり、カンプトテシン化合物〔Ｉ〕(R⁵が式：$-NH_2$である場合には塩酸塩、式：

【化１６】



である場合には塩酸塩または二塩酸塩)に換算して、０．０２～５０mg／kg、とりわけ０．１～１０mg／kgとなるような範囲で投与するのが好ましい。

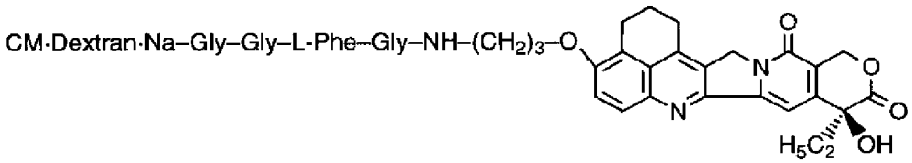
【００３６】

【実施例】本発明の化合物およびその製法を以下の実施例によってさらに具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されない。

【００３７】実施例１

下記式で表されるカンプトテシン誘導体の合成

【化１７】



〔ＣＭ－Dextran・Naはカルボキシメチルデキストラン・ナトリウム塩を表す〕

(１)３－(t－ブトキシカルボニルアミノ)プロパノールの合成

３－アミノプロパノール６．０gを塩化メチレン５０mlに溶解し、氷冷撹拌下にて、ジ－t－ブチルジカルボネート１８．３gを滴下する。室温下１２時間撹拌後、反応混合物を濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分離精製して、無色油状の標記化合物１３．９８gを得る。

【００３８】収率：９９．９％
ＩＲ(neat)：$\nu_{max}^{cm^{-1}}$＝３３８０，１７９０
Mass：m/z＝１７６([M＋H]$^+$)
NMR(３００MHz,ＣＤＣｌ$_3$)：δ^{TMS}＝１．４５(９H，s)，１．６２－１．７２(２H,m)，３．０(１H,brs)，３．２９(２H,dd,Ｊ＝１２Hzおよび６Hz)，３．６６(２H,dd,Ｊ＝１２Hzおよび６Hz)，４．８０(１H,brs)
【００３９】(２)３－(ｔ－ブトキシカルボニルアミノ)プロピル トシレートの合成
３－(ｔ－ブトキシカルボニルアミノ)プロパノール１０．０gを塩化メチレン１００mlに溶解し、氷冷撹拌下にてトリエチルアミン８．６６gおよびトシルクロリド１６．３gを加え、反応混合物を室温下一晩撹拌する。反応混合物を濃縮し、残渣を水－酢酸エチルに溶解後、有機層を分離し、飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥する。溶媒を留去後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分離精製して、淡黄色油状の標記化合物１５．３７gを得る。
【００４０】収率：８２％
ＩＲ(neat)：$\nu_{max}^{cm^{-1}}$＝３４００，３３４０，１７００
Mass：m/z＝３５２([M＋Na]$^+$)
NMR(３００MHz,ＣＤＣｌ$_3$)：δ^{TMS}－１．４２(９H，s)，１．７８－１．９０(２H,m)，２．４５(３H,s)，３．１１－３．２２(２H,m)，４．０９(２H,t,Ｊ＝６Hz)，４．５－４．６５(１H,m)，７．３６(２H,d,Ｊ＝８Hz)，７．７７　７．８３(２II,m)
【００４１】(３)５－[３'－(ｔ－ブトキシカルボニルアミノ)プロピルオキシ]－１－ヒドロキシ－８－ニトロ－１，２，３，４－テトラヒドロナフタレンの合成
１，５－ジヒドロキシ－８－ニトロ－１，２，３，４－テトラヒドロナフタレン２．０g(Ｊ．Med．Chem．，１９７３，１６(３)，２５４）を乾燥ＤＭＦ８０mlに溶解し、炭酸カリウム２当量、ヨウ化ナトリウム１．４当量および３－(ｔ－ブトキシカルボニルアミノ)プロピル トシレート１．４当量を加える。反応混合物を５０℃にて２４時間撹拌後、酢酸エチルを加え、飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウム上で乾燥する。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離精製して、淡黄色無定型粉末状の標記化合物３．０５gを得る。
【００４２】収率：８７％
ＩＲ(neat)：$\nu_{max}^{cm^{-1}}$＝３３６０，１６９５
Mass：m/z＝３８４([ＭＩＮＨ$_4$]$^+$)
NMR(３００MHz,ＣＤＣｌ$_3$)：δ^{TMS}＝１．３６(９H，s)，１．５７－１．９０(６H,m)，２．５２－２．７１(２H,m)，３．１１(２H,q,Ｊ＝６Hz)，４．０７(２H,t,Ｊ＝６Hz)，５．１２－５．１７(２H,m)，６．８９(１H,t,Ｊ－５．５Hz)，６．９６(１H,d,Ｊ＝９Hz)，７．６８(１H,d,Ｊ＝９Hz)
【００４３】(４)５［３'（ｔ　ブトキシカルボニルアミノ)プロピルオキシ]－８－ニトロ－１，２，３，４－テトラヒドロナフタレン－１－オンの合成
５－[３'－(ｔ－ブトキシカルボニルアミノ)プロピルオキシ]－１－ヒドロキシ－８－ニトロ－１，２，３，４－テトラヒドロナフタレン２．４６gを乾燥塩化メチレン１１０mlに溶解し、モレキュラーシーブス３Ａ(molecular sieves ３A)６．７３gおよびピリジニウムジクロロクロメート１．５当量を加え、加熱還流する。反応終了後、反応混合物にエーテルを加えて希釈し、不溶物をセライトで沪過して除き、沪液を濃縮、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分離精製して無色粉末状の標記化合物１．８７gを得る。
【００４４】融点：７６～７７℃
収率：７６％
ＩＲ(Melt)：$\nu_{max}^{cm^{-1}}$－３５５０，１７００
Mass：m/z－３８２([M＋ＮＨ$_4$]$^+$)
NMR(３００MHz,ＣＤＣｌ$_3$)：δ^{TMS}＝１．４４(９H，s)，２．０２－２．２０(４H,m)，２．６８－２．７３(２H,m)，２．９２(２H,t,Ｊ＝６Hz)，３．３６(２H,q,Ｊ＝６．５Hz)，４．１２(２H,t,Ｊ＝６Hz)，４．７８(１H,brs)，６．９５(１H,d,Ｊ＝９Hz)，７．３９(１H,d,Ｊ＝９Hz)
【００４５】(５)８－アミノ－５－[３'－(ｔ－ブトキシカルボニルアミノ)プロピルオキシ]－１，２，３，４－テトラヒドロナフタレン－１－オンの合成
５－[３'－(ｔ－ブトキシカルボニルアミノ)プロピルオキシ]　８　ニトロ　１，２，３，４　テトラヒドロナフタレン－１－オン３．５５gをエタノール１６０mlに溶解し、１０％Ｐｄ－Ｃ４２０mgを加え、水素雰囲気下、１．５時間撹拌する。触媒を沪過して除き、沪液を濃縮し、残渣をシリカゲルガラムクロマトグラフィーにより分離精製して黄色油状の標記化合物３．５６gを得る。
【００４６】融点：１１２～１１５℃
収率：８３％
ＩＲ(Nujol)：$\nu_{max}^{cm^{-1}}$＝３４４０，３３４０，１７００，１６５０
Mass：m/z＝３３５([M＋H]$^+$)
NMR(３００MHz,ＣＤＣｌ$_3$)：δ^{TMS}＝１．４５(９H，s)，１．９２－２．６７(４H,m)，２．６１(２H,t,Ｊ＝６Hz)，２．８７(２H,t,Ｊ＝６Hz)，３．３５(２H,q,Ｊ＝６．５Hz)，３．９４(２H,t,Ｊ＝６Hz)，４．８５(１H,brs)，６．１０(２H,brs)，６．４８(１H,d,Ｊ＝９Hz)，６．９４(１II,d,Ｊ＝９IIz)
【００４７】(６)１０－[３'－(ｔ－ブトキシカルボニルアミノ)プロピルオキシ]－７，９－トリメチレン－(２０Ｓ)－カンプトテシンの合成
８－アミノ－５－[３'－(ｔ－ブトキシカルボニルアミノ)プロピルオキシ]－１，２，３，４－テトラヒドロナフタレン－１－オン２．０３gをエタノール８５mlに溶解し、(４Ｓ)　７，８　ジヒドロ　４　エチル　４　ヒドロキシ－１Ｈ－ピラノ[３，４－ｆ]インドリジン－３，６，

１０(４Ｈ)－トリオン８００mgおよびp－トルエンスルホン酸５８mgを加え、１７時間加熱還流する。反応終了後、溶媒を留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分離精製して淡黄色粉末状の標記化合物８５０mgを得る。

【００４８】融点：２２５～２２７℃(分解)
収率：５０％
ＩＲ(Nujol)：$\nu_{max}^{cm^{-1}}$＝３４４０,３３２５,１７５０,１７４０,１６５５,1620
Mass：m/z＝５６２([M＋H]$^+$)
ＮＭＲ(３００MHz,$CDCl_3$)：δ^{TMS}＝１.０３(３H,t,Ｊ＝７.５Hz),１.４５(９H,s),１.８２－２.１８(６H,m),３.０６－３.１３(４H,m),３.４１(２H,q,Ｊ－６Hz),３.７９(１H,s),４.２４(２H,t,Ｊ－６Hz),４.９(１H,br),５.１６(２H,s),５.３０(１H,d,Ｊ＝１６Hz),５.７５(１H,d,Ｊ＝１６Hz),７.５１(１H,d,Ｊ＝９Hz),７.６１(１H,s),８.０６(１H,d,Ｊ＝９Hz)

【００４９】(７)１０－(３'－アミノプロピルオキシ)－７,９－トリメチレン－(２０Ｓ)－カンプトテシン塩酸塩の合成
１０－[３'－(t－ブトキシカルボニルアミノ)プロピルオキシ]－７,９－トリメチレン－(２０Ｓ)－カンプトテシン８３６mgをジオキサン３０mlに懸濁し、氷冷下撹拌しながら１８％塩酸－ジオキサン１５mlを滴下する。反応混合物を室温下撹拌し、反応終了後、イソプロピルエーテルを加え、撹拌する。析出する粉末を沪取し、エーテル洗浄後、減圧乾燥し得られた黄色粉末を水に溶解し、凍結乾燥して黄色粉末状の標記化合物６２０mgを得る。

【００５０】融点：１９４℃以上(分解)
収率：８４％
ＩＲ(Nujol)：$\nu_{max}^{cm^{-1}}$＝１７４０,１６５５
Mass：m/z＝４６２([M－Cl]$^+$)
ＮＭＲ(３００MHz,d_6－ＤＭＳＯ)：δ^{TMS}＝０.８８(３H,t,Ｊ＝７.５Hz),１.８１－１.９４(２H,m),１.９７－２.１５(４H,m),３.０１－３.１４(６H,m),４.２８(２H,t,Ｊ＝６Hz),５.２３(２H,s),５.４３(２H,s),７.２８(１H,s),７.７１(１H,d,Ｊ＝９.５Hz),７.９５－８.０８(３H,brs),８.０３(１H,d,Ｊ＝９.５Hz)

【００５１】(８)１０ [３' (t 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ルアミノ)プロピルオキシ]－７,９－トリメチレン－(２０Ｓ)－カンプトテシンの合成
１０－(３'－アミノプロピルオキシ)－７,９－トリメチレン－(２０Ｓ)－カンプトテシン塩酸塩１５８mgとジイソプロピルエチルアミン４９mgを撹拌下、ＤＭＦ５mlに溶解し、これにt 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２７８mgおよびＮ－ヒドロキシスクシンイミド１４３mgを乾燥ＤＭＦ８mlに溶解した溶液を加えて、さらに氷冷下撹拌しながら１－(３－ジメチルアミノプロピル)－３－エチルカルボジイミド塩酸塩１８３mgを加え、１６時間室温下撹拌する。反応終了後、溶媒を留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分離精製して、淡黄色粉末状の標記化合物２８５mgを得る。

【００５２】収率：定量的収率
ＩＲ(Nujol)：$\nu_{max}^{cm^{-1}}$＝３２９０,１６６０
Mass：m/z＝８８０([M＋H]$^+$)
ＮＭＲ(３００MHz,$CDCl_3$)：δ^{TMS}＝１.０２(３H,t,Ｊ＝７.５Hz),１.４３(９H,s),１.８５－１.９４(２H,m),２.０２－２.１０(４H,m),２.９７－３.０５(５H,m),３.２３(１H,dd,Ｊ－１４Hzおよび５Hz),３.４９(２H,q,Ｊ－６.５Hz),３.６０－３.８０(６H,m),４.２０(１H,t,Ｊ＝６Hz),４.５０－４.５６(１H,m),５.１１(２H,s),５.２９(１H,d,Ｊ＝１６.５Hz),５.７１(１H,d,Ｊ＝１６.５Hz),５.８５(１H,brt),７.０８(１H,m),７.１８－７.２７(５H,m),７.４５(１H,d,Ｊ＝７Hz),７.５２(１H,d,Ｊ＝９.５Hz),７.５８(１H,s),７.７１(１H,m),７.９９(１H,d,Ｊ－９.５Hz)

【００５３】(９)１０－[３'－(グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニルグリシルアミノ) プロピルオキシ]－７,９－トリメチレン－(２０Ｓ)－カンプトテシン塩酸塩の合成
１０－[３'－(t－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ルアミノ)プロピルオキシ]－７,９－トリメチレン－(２０Ｓ)－カンプトテシン２７３mgをジオキサン１０mlに溶解し、氷冷下撹拌しながら１８％塩酸－ジオキサン１５mlを滴下する。反応混合物を室温下撹拌し、反応終了後イソプロピルエーテルを加え、撹拌、析出する粉末を沪取する。得られた粉末をエーテル洗浄後、減圧乾燥し、得られた黄色粉末を水に溶解後、凍結乾燥して黄色粉末状の標記化合物２１０mgを得る。

【００５４】融点：１７４℃以上(分解)
収率：８３％
ＩＲ(Nujol)：$\nu_{max}^{cm^{-1}}$＝３１９０,１７４５,１６５０
Mass：m/z＝７８０([M－Cl]$^+$)
ＮＭＲ(３００MIIz,d_6 ＤＭＳＯ)：δ^{TMS}＝０.８９(３H,t,Ｊ＝７Hz),１.２６－１.３２(２H,m),１.８６－２.０４(６H,m),２.７９(１H,dd,Ｊ＝１４Hzおよび１０Hz),２.９８－３.０５(５H,m),３.２８－３.３６(２H,m),３.５４－３.８８(６H,m),４.２０(２H,t,Ｊ＝６Hz),４.４５－４.５４(１H,m),５.１９(２H,s),５.４３(２H,s),７.１１－７.２７(５H,m),７.３５(１II,s),７.７１(１II,t,Ｊ＝９.５IIz),７.９７(１H,t,Ｊ＝５.５Hz),８.０３(１H,d,Ｊ＝９.５H

z),８.１９(３H,br),８.３５(１H,t,Ｊ＝６Hz),８.４３(１H,d,Ｊ＝８Hz),８.６５(１H,t,Ｊ＝５.５Hz)

【００５５】以上の合成により得た、アミノ基を有するカンプトテシン化合物をカルボキシメチルデキストラン(以下、ＣＭ－デキストラン)などカルボキシル基を持つ水溶性高分子と縮合することによりカンプトテシン誘導体へ導くことができる。縮合反応は水溶性カルボジイミド(１－(３－ジメチルアミノプロピル)－３－エチルカルボジイミド塩酸塩、２－エトキシ－１－エトキシカルボニル－１,２－ジヒドロキノリン)等の縮合剤の存在下にて水または水－有機溶媒混合溶媒中にて行うことができる。

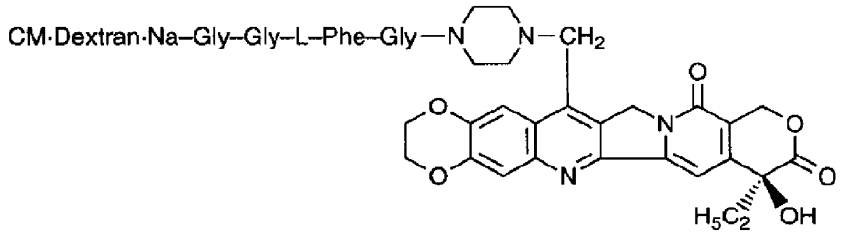
【００５６】(１０)カンプトテシン誘導体の調製

ＣＭ－デキストラン・ナトリウム塩５００mg(ＣＭ化度＝０.５)を水２０mlに溶解し、１０℃以下にて撹拌しながら１０－[３'－(グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニルグリシルアミノ)プロピルオキシ]－７,９－トリメチレン－(２０Ｓ)－カンプトテシン塩酸塩５０mgを加える。１－(３－ジメチルアミノプロピル)－３－エチルカルボジイミド塩酸塩１.５gを加え、その間反応液のｐＨを０.１Ｎ塩酸を用いて６.５～７.０に保つ。１０℃以下にて撹拌しながら２時間反応後、０.１Ｎ水酸化ナトリウムを用いてｐＨを９に調整する。反応混合物をイオン交換カラムクロマトグラフィー(BioRadAGMP－５０、３０ml、Na型)で精製し、目的物を含む分画３０mlに３Ｍ食塩水１.２mlを加え、エタノール１５０ml中に注ぐ。沈殿を遠心分離し、水２０mlを加え沪過する。沪液に３Ｍ食塩水０.４mlを加え、エタノール８０mlに撹拌下加えて、沈殿生成させる。沈殿を遠心分離して集め、溶媒洗浄後、減圧乾燥して前記化１３で示されるカンプトテシン誘導体４１５mgを得る。３８０nmにおける吸収により求めた薬物(１－(７)で得られる化合物；１０－(３'－アミノプロピルオキシ)－７,９－トリメチレン－(２０Ｓ)－カンプトテシン塩酸塩)含量は４.４%である。ゲル浸透カラムクロマトグラフィー(ＧＰＣ)による分析の結果、求められる平均分子量は１６０,０００、多分散度Mw／Mnは１.５７である(ＧＰＣ分析条件：Ｇ４０００ＳＷＸＬ(東ソー社製)、０.２Ｍリン酸緩衝液(ｐＨ７.０))。

【００５７】実施例２

下記式で表されるカンプトテシン誘導体の合成

【化１８】



(１)７－(４'－(ｔ－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ル)ピペラジノ)メチル－１０,１１－エチレンジオキシ－(２０Ｓ)－カンプトテシンの合成

実施例１－(８)と同様にして７－ピペラジノメチル－１０,１１－エチレンジオキシ－(２０Ｓ)－カンプトテシン塩酸塩４５０mgとｔ－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２当量より黄色粉末状の標記化合物５１８mgを得る。

【００５８】収率：７４%

ＩＲ(Nujol)：$\nu_{max}^{cm^{-1}}$＝３２８０,１７５０,１６５５

Mass：m/z＝９２３([Ｍ＋Ｈ]$^+$)

ＮＭＲ(３００MHz,d_6－ＤＭＳＯ)：δ^{TMS}＝０.８９(３H,t,Ｊ＝７.５Hz),１.３７(９H,s),１.８５－２.１(２H,m),２.３－２.６(４H,m),２.７５(１H,dd,Ｊ＝１４Hzおよび１０Hz),３.０５(１H,dd,Ｊ＝１４Hzおよび４.５Hz),３.３－３.６(６H,m),３.５８(１H,dd,Ｊ＝２１Hzおよび５.５Hz),３.７４(１H,dd,Ｊ＝１７Hzおよび５.５Hz),３.９－４.１(４H,m),４.４４(４H,s),４.５８(１H,m),５.２４(２H,s),５.４２(２H,s),６.５０(１H,s),６.９７(１H,t,Ｊ＝６Hz),７.１－７.３(６H,m),７.５５(１H,s),７.７７(１H,s),７.８－７.９(１H,br),８.０５－８.２(２H,m)

【００５９】(２)７－(４'－(グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニルグリシル)ピペラジノ)メチル－１０,１１－エチレンジオキシ－(２０Ｓ)－カンプトテシン塩酸塩の合成

実施例１－(９)と同様にして、７－(４'－(ｔ－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ル)ピペラジノ)メチル　１０,１１　エチレンジオキシ－(２０Ｓ)－カンプトテシン４７８mgより黄色粉末状の標記化合物４０９mgを得る。

【００６０】融点：２３７－２３９℃(分解)

ＩＲ(Nujol)：$\nu_{max}^{cm^{-1}}$－３２５０,１７４５,１６５５

Mass：m/z＝８２３([Ｍ－Ｃｌ]$^+$)

ＮＭＲ(３００MHz,d_6　ＤＭＳＯ)：δ^{TMS}＝０.８８(３H,t,Ｊ＝７Hz),１.８-１.９９(２H,m),２.７９(１

H,dd,J＝１４Hzおよび１０Hz),３.０７(１H,dd,J＝１４Hzおよび４Hz),３.１－４.３(１６H,m),４.４７(４H,s),４.５５－４.７０(１H,m),５.４４(２H,s),５.６７(２H,s),７.１５－７.３２(６H,m),７.６５(１H,s),８.０５(１H,s),８.０５－８.２０(３H,br),８.２９(１H,br),８.３９(１H,d,J＝８.５Hz),８.５７(１H,t,J＝５.５Hz)

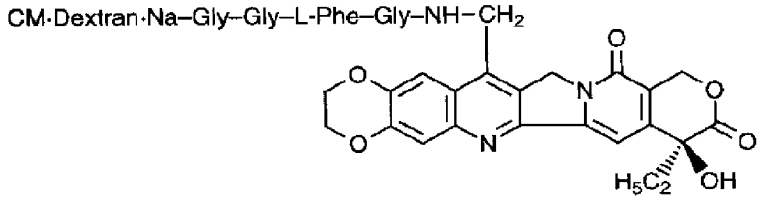
【００６１】（３）カンプトテシン誘導体の調製

実施例１－(１０)と同様にして、ＣＭ－デキストラン・ナトリウム塩(ＣＭ化度＝０.５)１.２gと７－(４'－(グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニルグリシル)ピペラジノ)メチル－１０,１１－エチレンジオキシ－(２０Ｓ)－カンプトテシン塩酸塩１６８mgより淡黄色粉末状の前記化１４で示されるカンプトテシン誘導体７９８mgを得る。３８０nmにおける吸収により求めた薬物(７－ピペラジノメチル－１０,１１－エチレンジオキシ－(２０Ｓ)－カンプトテシン塩酸塩)含量は１.１％である。ゲル浸透カラムクロマトグラフィー(ＧＰＣ)により分析の結果、求められる平均分子量は１６９,０００、多分散度Mw／Mnは１.３２である(ＧＰＣ分析条件：Ｇ４０００ＳＷＸＬ(東ソー社製)、０.２Ｍリン酸緩衝液(pH７.０))。

【００６２】実施例３

下記式で表されるカンプトテシン誘導体の合成

【化１９】



(１)７－Ｎ－(ｔ－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ル)アミノメチル－１０,１１－エチレンジオキシ－(２０Ｓ)－カンプトテシンの合成

実施例１－(８)と同様にして７－アミノメチル－１０,１１　エチレンジオキシ　(２０Ｓ)　カンプトテシン塩酸塩２２２mgとｔ－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２当量より黄色粉末状の標記化合物２３２mgを得る。

【００６３】収率：５８％

ＩＲ(Nujol)：$\nu_{max}^{cm^{-1}}$－３２８５,１７５０,１６５０

Mass：m/z＝８５４([M＋H]$^+$)

ＮＭＲ(３００MHz,d_6－ＤＭＳＯ)：δ^{TMS}＝０.８８(３H,t,J＝７.５Hz),１.３５(９H,s),１.７８－１.９４(２H,m),２.７４(１H,dd,J＝１４Hzおよび１０Hz),２.９９(１H,dd,J＝１４Hzおよび４.５Hz),３.４－３.８(４H,m),４.３４－４.５０(１H,m),４.４２(４H,s),４.６６－４.８２(２H,m),５.４２(４H,brs),６.５０(１H,s),６.９８(１H,t,J＝６Hz),７.１２－７.２８(５H,m),７.２６(１H,s),７.５６(１H,s),７.８０(１H,s),７.９１(１H,br),８.１４(１H,d,J＝７.５Hz),８.３２(２H,t,J＝７.５Hz),８.５８(１H,m)

【００６４】（２）７－Ｎ－(グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニルグリシル)アミノメチル－１０,１１－エチレンジオキシ－(２０Ｓ)－カンプトテシン塩酸塩の合成

実施例１　(９)と同様にして、７　Ｎ　(ｔ　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ル)アミノメチル－１０,１１－エチレンジオキシ－(２０Ｓ)－カンプトテシン２０３mgより黄色粉末状の標記化合物１６４mgを得る。

【００６５】融点：＞２１１℃(分解)

ＩＲ(Nujol)：$\nu_{max}^{cm^{-1}}$＝３２２０,１７４５,１６５５

Mass：m/z＝７５４([M－Cl]$^+$)

ＮＭＲ(３００MHz,d_6－ＤＭＳＯ)：δ^{TMS}＝０.８８(３H,t,J＝７Hz),１.８０－１.９３(２H,m),２.７７(１H,dd,J＝１４Hzおよび１０Hz),３.００(1H,dd,J－１４Hzおよび４Hz),３.６－４.５５(７H,m),４.４２(４H,s),４.６５－４.８５(２H,m),５.４２(２H,s),５.４５(２H,s),７.１３－７.２６(５H,m),７.２７(１H,s),７.５７(１H,s),７.８３(１H,s),８.０３－８.１６(３H,br),８.３４－８.４０(２H,m),８.５４(１H,br),８.７３(２H,br)

【００６６】（３）カンプトテシン誘導体の調製

ＣＭ－デキストラン・ナトリウム塩(ＣＭ化度＝０.５)７７２mgを水５０mlに溶解し、ＤＭＦ２５mlを加える。氷冷下撹拌し、７－(Ｎ－(グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニルグリシル)アミノメチル)－１０,１１－エチレンジオキシ　(２０Ｓ)　カンプトテシン塩酸塩１０６mgおよび２－エトキシ－１－エトキシカルボニル－１,２－ジヒドロキノン１.５７ｇを加える。一夜反応後、反応混合物をエタノール４５０mlに加えて沈殿生成し、実施例１－(１０)と同様に処理して、淡黄色粉末状の前記化１５で示されるカンプトテシン誘導体５４５mgを得る。３７５nmにおける吸収により求めた薬物(７－アミノメチル　１０,１１　エチレンジオキシ　(２０Ｓ)－カンプトテシン塩酸塩)含量は５.５％である。ゲ

ル浸透カラムクロマトグラフィー(ＧＰＣ)により分析の結果、求められる平均分子量は１６５，０００、多分散度Mw／Mnは１．４０である(ＧＰＣ分析条件：Ｇ４０００ＳＷＸＬ(東ソー社製)、０．２Ｍリン酸緩衝液(ｐＨ７．０))。

【００６７】実施例４

１０－(３'－アミノプロピルオキシ)－(２０Ｓ)－カンプトテシン塩酸塩の合成

(１)５－[３'－(ｔ－ブトキシカルボニルアミノ)プロピルオキシ]－２－ニトロベンズアルデヒド ジメチルアセタールの合成

５－ヒドロキシ－２－ニトロベンズアルデヒド ジメチルアセタール３．０gを乾燥ジメチルホルムアミド５０mlに溶解し、ヨウ化ナトリウム３．１５gおよび炭酸カリウム１．９３g並びに３－(ｔ－ブトキシカルボニルアミノ)プロピル トシレート６．９５gを加える。５０℃にて３時間撹拌後、室温に戻して酢酸エチルを加える。抽出液を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウム上で乾燥する。溶媒を留去後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離精製して、淡黄色油状の標記化合物５．２２gを定量的に得る。

ＩＲ(Neat)：$\nu_{max}^{cm^{-1}}$－３３６０，１７１０

Mass：m／z＝３９３([Ｍ＋Na]$^+$)

ＮＭＲ(３００MHz,ＣＤＣｌ$_3$)：δ^{TMS}＝１．４４(９H,s)，２．０２(２H,quint.，Ｊ＝６Hz)，３．３３(２H,dd,Ｊ＝１３IIzおよび６IIz)，３．４４(６II,s)，４．１１(２H,t,Ｊ＝６Hz)，４．７(１H,brs)，６．０１(１H,s)，６．９０(１H,dd,Ｊ＝９Hzおよび３Hz)，７．２９(１H,d,Ｊ＝３Hz)，７．９７(１H,d,Ｊ＝９Hz)

【００６８】(２)１０－[３'－(ｔ－ブトキシカルボニルアミノ)プロピルオキシ]－(２０Ｓ)－カンプトテシンの合成

５－[３'－(ｔ－ブトキシカルボニルアミノ)プロピルオキシ]－２－ニトロベンズアルデヒド ジメチルアセタール１２７０mgをエタノール２０mlに溶解し、１０％パラジウム－炭素１２０mgを加えて、水素雰囲気下で１．５時間撹拌する。反応混合物から触媒を沪過して除き、沪液に(４Ｓ)－７，８－ジヒドロ－４－エチル－４－ヒドロキシ－１Ｈ－ピラノ[３，４－f]インドリジン－３，６，１０(４H)－トリオン３００mgおよびp－トルエンスルホン酸２２mgを加えて一夜室温にて撹拌する。反応混合物から溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離精製して、淡黄色粉末状の標記化合物２０４mgを得る。

【００６９】融点：２２３－２２４℃(分解)

収率：３４％

ＩＲ(Nujol)：$\nu_{max}^{cm^{-1}}$＝３３６０，１７５０，１６９０

Mass：m／z＝５２２([Ｍ＋Ｈ]$^+$)

ＮＭＲ(３００MIIz,ＣＤＣｌ$_3$)：δ^{TMS}＝１．０３(３II,t,Ｊ＝７．５Hz)，１．４６(９H,s)，１．８－２．０(２H,m)，２．０８(１H,dd,Ｊ＝１２．５Hzおよび６．５Hz)，２．１０(１H,dd,Ｊ＝１２．５Hzおよび６Hz)，３．４０(２H,q,Ｊ＝６．５Hz)，４．１８(２H,t,Ｊ＝６Hz)，４．８２(１H,brs)，５．２４(２H,s)，５．２９(１H,d,Ｊ－１６Hz)，５．７３(１H,d,Ｊ－１６Hz)，７．１２(１H,d,Ｊ＝３Hz)，７．４３(１H,dd,Ｊ＝９Hzおよび３Hz)，７．６１(１H,s)，８．０９(１H,d,Ｊ＝９Hz)，８．２０(１H,d,Ｊ＝９Hz)

【００７０】(３)１０－(３'－アミノプロピルオキシ)－(２０Ｓ)－カンプトテシン塩酸塩の合成

１０－[３'－(ｔ－ブトキシカルボニルアミノ)プロピルオキシ]－(２０Ｓ)－カンプトテシン３５２mgを乾燥ジオキサン－エタノール(７ml－１ml)に溶解し、氷冷撹拌下、この溶液に１９％塩酸－ジオキサン５mlを加える。反応混合物を室温で撹拌後、さらにイソプロピルエーテル１０mlを加え、析出する粉末を沪取後、洗浄して、黄色粉末状の標記化合物３３９mgを得る。

【００７１】融点：２１４－２１８℃(分解)

ＩＲ(Nujol)：$\nu_{max}^{cm^{-1}}$＝３４７０，３２８０，１７４５

Mass：m／z＝４２２([Ｍ－Cl]$^+$)

ＮＭＲ(３００MHz,d_6－ＤＭＳＯ)：δ^{TMS}－０．８９(３H,t,Ｊ＝７．５Hz)，１．８０－１．９５(２H,m)，２．１０－２．２２(２H,m)，２．９６－３．１０(２H,m)，４．２７(２H,t,Ｊ＝６Hz)，５．２５(２H,s)，５．４２(２II,s)，７．２９(１II,s)，７．４９　７．５５(２II,m)，８．０８(１H,d,Ｊ＝１０Hz)，８．１９(３H,brs)，８．５４(１H,s)

【００７２】実施例５

１０－[３'－(グリシル－グリシル－Ｌ－フェニルアラニル－グリシルアミノ)プロピルオキシ]－(２０Ｓ)－カンプトテシン塩酸塩の合成

(１)１０－[３'－(ｔ－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ルアミノ)プロピルオキシ]－(２０Ｓ)－カンプトテシンの合成１０－(３'－アミノプロピルオキシ)－(２０Ｓ)－カンプトテシン塩酸塩３２５mgを乾燥ジメチルホルムアミド１０mlに溶解し、氷冷撹拌下、この溶液に４当量のＮ－ヒドロキシコハク酸イミド、２当量のジイソプロピルエチルアミン、２当量のＮ－ｔ－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および４当量の１　(３　ジメチルアミノプロピル)　３　エチルカルボジイミド塩酸塩を加える。反応混合物を室温で一晩撹拌後溶媒を留去する。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離精製して、黄色粉末状の標記化合物５９７mgを定量的に得る。

【００７３】ＩＲ(Nujol)：$\nu_{max}^{cm^{-1}}$＝３２８０，１７５０，１６６０

Mass：m／z＝８４０([Ｍ－II]$^+$)

ＮＭＲ(３００MHz,d_6－ＤＭＳＯ)：δ^{TMS}＝０．８８

(３H,t,Ｊ＝７Hz),１.３６(９H,s),１.８－２.０４(４H,m),２.７２－２.８４(１H,m),３.００－３.１２(１H,m),３.２４－３.３６(２H,m),３.５０－３.８０(６H,m),４.１８(２H,t,Ｊ＝６Hz),４.４４－４.５４(１H,m),５.２４(２H,s),５.４２(２H,s),６.５０(１H,s),６.９９(１H,t,Ｊ＝６Hz),７.１２－７.２７(５H,m),７.２８(１H,s),７.４８－７.５５(１H,m),７.５０(１H,s),７.８８－７.９６(１H,m),８.０７(１H,d,Ｊ＝９Hz),８.１２－８.３６(２H,m),８.５１(１H,s)

【００７４】(２)１０－[３'－(グリシル－グリシル－Ｌ－フェニルアラニルグリシルアミノ)プロピルオキシ]－(２０Ｓ)－カンプトテシン塩酸塩の合成

１０－(３'－(t－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ルアミノ)プロピルオキシ)－(２０Ｓ)－カンプトテシン５８０mgより実施例４－(３)と同様に処理して、黄色粉末状の標記化合物４３８mgを得る

【００７５】収率：８２％

融点：１９４－１９９℃(分解)

ＩＲ(Nujol)：$\nu_{max}^{cm^{-1}}$＝３１９０,１７４５,１６５０

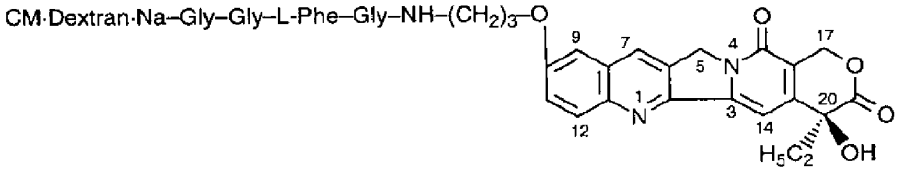
Mass：m／z＝７４０([M－Cl]$^{+}$)

NMR(３００MHz,d_6－ＤＭＳＯ)：δ^{TMS}－０.８８(３H,t,Ｊ＝７Hz),１.８０－２.０３(４H,m),２.７９(１H,dd,Ｊ＝１４Hzおよび１０Hz),３.０５(1H,dd,Ｊ＝１４Hzおよび５Hz),３.２－３.５(２H,m),３.５２－３.６２(２H,m),３.６２－３.８３(４H,m),４.１９(２H,t,Ｊ＝６Hz),４.４８－４.５８(１H,m),５.２５(２H,s),５.４２(２H,s),６.５(１H,brs),７.１３－７.２６(５H,m),７.２８(１H,s),７.４９－７.５５(１H,m),７.５０(１H,s,Ｊ＝９.５Hz),７.９３(１H,t,Ｊ－６Hz),８.０－８.１４(４H,m),８.３２－８.４１(２H,m),８.５１(１H,s),８.５６(１H,t,Ｊ＝５.５Hz)

【００７６】実施例６

下記式で表されるカンプトテシン誘導体の合成

【化２０】

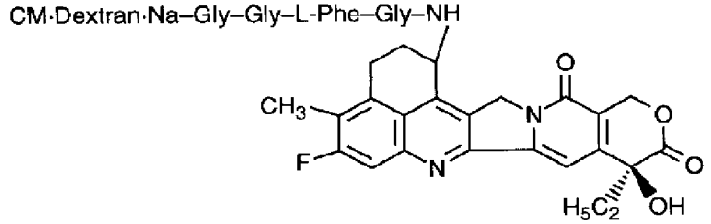


ＣＭ　デキストラン・ナトリウム塩(ＣＭ化度＝０.５)５１３mgを水５０mlに溶解し、内温１０℃以下に保ちながら、１０－[３'－(グリシル－グリシル－Ｌ－フェニルアラニル－グリシルアミノ)プロピルオキシ]－(２０Ｓ)－カンプトテシン塩酸塩７７mgおよび１－(３－ジメチルアミノプロピル)－３－エチルカルボジイミド塩酸塩１.５４gを加える。内温１０℃以下、pHを０.２Ｎ塩酸を用いて６.０～６.５に保ちながら、２時間撹拌する。反応混合物をイオン交換カラムクロマトグラフィー(BioRadAGMP－５０、３０ml、Na型)で精製して、目的物を含む分画を沪過後、沪液にエタノールを加えて沈澱を分取し、洗浄後、減圧乾燥して淡黄色粉末状複合体４９２mgを得る。３８０nmにおける吸収により求めた薬物(１０－(３'－アミノプロピルオキシ)－(２０Ｓ)－カンプトテシン塩酸塩)含量は２.８％である。ゲル沪過カラムクロマトグラフィー(ＧＰＣ)による分析の結果、求められる平均分子量は１７９,０００、多分散度Mw／Mnは1.４２である(ＧＰＣ分析条件：Ｇ４０００ＳＷＸＬ(東ソー社製)、０.２Mリン酸緩衝液(pH＝７.０))。

【００７７】実施例７

下記式で表されるカンプトテシン誘導体の合成

【化２１】



(１)(９Ｓ)－１－(t－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ルシルアミノ)－９－エチル－５－フルオロ－２,３－ジヒドロ－９－ヒドロキシ　４　メチル　１H,１２H　ベンゾ[de]ピラノ[３',４':６,７]インドリジノ[１,２－b]キノリン－１０,１３[９H,１５H]－ジオンの合成

実施例１－(８)と同様にして、(９Ｓ)－１－アミノ－９－エチル－５－フルオロ－２,３－ジヒドロ－９－ヒドロキシ　４　メチル　１H,１２H　ベンゾ[de]ピラノ[３',４':６,７]インドリジノ[１,２－b]キノリン－１

OnCusp
Ex. 1002

０，１３（９Ｈ，１５Ｈ）－ジオン塩酸塩１６６mgと、２当量のt－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より淡黄色不定形固体の標記化合物２４７mgを得る。

【００７８】収率：８２％

ＩＲ(Nujol)：$\nu_{max}^{cm^{-1}}$＝３２９０，１７１０，１６５５

Mass：m／z＝８５４（[Ｍ＋Ｈ]$^+$）

ＮＭＲ(３００MHz,d_6－ＤＭＳＯ)：δ^{TMS}＝０．８７(３Ｈ,t,Ｊ＝７Hz)，１．３７(９Ｈ,s)，１．８－１．９５(２Ｈ,m)，２．０５－２．３(１Ｈ,m)，２．４２(３Ｈ,s)，２．５－２．８５(２Ｈ,m)，２．９－３．１(１Ｈ,m)，３．１５－３．４(２Ｈ,m)，３．５－３．８(６Ｈ,m)，４．４－４．５５(１Ｈ,m)，５．２６(２Ｈ,s)，５．４２(２Ｈ,s)，５．５５－５．６５(１Ｈ,m)，６．５３(１Ｈ,s)，６．９９(１Ｈ,t,Ｊ＝５Hz)，７.1-7.３(５Ｈ,m)，７．３２(１Ｈ,s)，７．８１(１Ｈ,d,Ｊ＝１１Hz)，７．８－７．９５(１Ｈ,m)，８．１－８．２(１Ｈ,m)，８．３－８．４(１Ｈ,m)，８．４－８．５(１Ｈ,m)

【００７９】(２)(９Ｓ)－１－(グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニルグルシルアミノ)－９－エチル－５－フルオロ－２，３－ジヒドロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ[de]ピラノ[３’，４’：６，７]インドリジノ[１，２－b]キノリン－１０，１３[９Ｈ，１５Ｈ]－ジオンの合成

実施例１　(９)と同様にして、上記(１)で得る化合物２２０mgより、淡黄色粉末状のの標記化合物１９３mgを得る。

融点：＞１６５℃（分解）

ＩＲ(Nujol)：$\nu_{max}^{cm^{-1}}$＝３３５０，１７４５，１６６０，１６１５

Mass：m／z＝７５４（[Ｍ－Ｃl＋Ｈ]$^+$）

ＮＭＲ(３００MHz,d_6－ＤＭＳＯ)：δ^{TMS}＝０．８７(３Ｈ,t,Ｊ＝７Hz)，１．８０－１．９４(２Ｈ,m)，２．０８－２．２７(２Ｈ,m)，２．４１(３Ｈ,s)，２．７７(１Ｈ,dd,Ｊ－１３Hz,９Hz)，３．０１(１Ｈ,dd,Ｊ－１３Hz,５Hz)，３．１５－３．２８(２Ｈ,m)，３．５－３．９１(６Ｈ,m)，４．４５－４．５６(１Ｈ,m)，５．２５(２Ｈ,s)，５．４１(１Ｈ,d,Ｊ＝１３Hz)，５．４２(１Ｈ,d,Ｊ＝１３Hz)，５．５７(１Ｈ,m)，７．１２－７．３０(５Ｈ,m)，７．３２(１Ｈ,s)，７．８０(１Ｈ,d,Ｊ＝１１Hz)，８．０－８．２(３Ｈ,br)，８．３２(１Ｈ,d,Ｊ＝７Hz)，８．４３(１Ｈ,t,Ｊ＝５．５Hz)，８．５０－８．６２(２Ｈ,m)

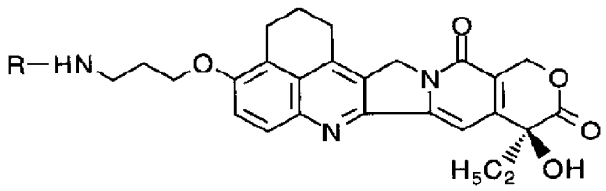
【００８０】（３）カンプトテシン誘導体の調製

ＣＭ－デキストラン・ナトリウム塩(ＣＭ化度－０．６５)２０００mgと上記(２)で得る化合物１７０ｍｇを用いて、実施例３－(３)と同様に処理し、淡黄色粉末状の所望のカンプトテシン誘導体１８０３ｍｇを得る。３７６nmにおける吸収により求めた薬物((９Ｓ)－１－アミノ－９－エチル－５－フルオロ－２，３－ジヒドロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ[de]ピラノ[３’，４’：６，７]インドリジノ[１，２－b]キノリン－１０，１３[９Ｈ，１５Ｈ]－ジオン塩酸塩)含量は３．０％である。ゲル沪過カラムクロマトグラフィー(ＧＰＣ)による分析の結果、求められる平均分子量は１８７，０００、多分散度Mw／Mnは1.５１である(ＧＰＣ分析条件：Ｇ４０００ＳＷＸＬ(東ソー社製)、０．２Ｍリン酸緩衝液(pＨ＝７．０))。

【００８１】実施例８～２４

前記実施例１－６と同様にして下記表１記載の化合物を得る。

【表１】



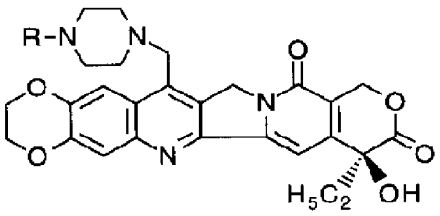
実施例番号	R	実施例番号	R
8	CM·Dextran·Na–L-Phe–	１６	CM·Pullulan·Na–L-Phe–
9	CM·Dextran·Na–Gly–Gly–	１７	CM·Pullulan·Na–Gly–Gly–
１０	CM·Dextran·Na–L-Leu–Gly–	１８	CM·Pullulan·Na–L-Leu–Gly–
１１	CM·Dextran·Na–L-Phe–Gly–	１９	CM·Pullulan·Na–L-Phe–Gly–
１２	CM·Dextran·Na–L-Tyr–Gly–	２０	CM·Pullulan·Na–L-Tyr–Gly–
		２１	CM·Pullulan·Na–Gly–Gly–L-Phe–Gly–
１３	CM·Dextran·Na–Gly–Gly–Gly–	２２	CM·Pullulan·Na–Gly–Gly–Gly–
１４	CM·Dextran·Na–Gly–Gly–Gly–Gly–	２３	CM·Pullulan·Na–Gly–Gly–Gly–Gly–
１５	CM·Dextran·Na–Gly–Gly–Gly–Gly–Gly–	２４	CM·Pullulan·Na–Gly–Gly–Gly–Gly–Gly–

〔ＣＭ－Pullulan・Naはカルボキシメチルプルラン・ナトリウム塩を表す〕

【００８２】実施例２５～４１

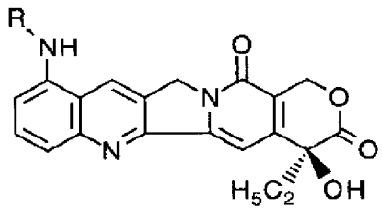
前記実施例１－６と同様にして下記表２記載の化合物を得る。

【表２】



実施例番号	R	実施例番号	R
２５	CM·Dextran·Na–L-Phe–	３３	CM·Pullulan·Na–L-Phe–
２６	CM·Dextran·Na–Gly–Gly–	３４	CM·Pullulan·Na–Gly–Gly–
２７	CM·Dextran·Na–L-Leu–Gly–	３５	CM·Pullulan·Na–L-Leu–Gly–
２８	CM·Dextran·Na–L-Phe–Gly–	３６	CM·Pullulan·Na–L-Phe–Gly–
２９	CM·Dextran·Na–L-Tyr–Gly–	３７	CM·Pullulan·Na–L-Tyr–Gly–
		３８	CM·Pullulan·Na–Gly–Gly–L-Phe–Gly–
３０	CM·Dextran·Na–Gly–Gly–Gly–	３９	CM·Pullulan·Na–Gly–Gly–Gly–
３１	CM·Dextran·Na–Gly–Gly–Gly–Gly–	４０	CM·Pullulan·Na–Gly–Gly–Gly–Gly–
３２	CM·Dextran·Na–Gly–Gly–Gly–Gly–Gly–	４１	CM·Pullulan·Na–Gly–Gly–Gly–Gly–Gly–

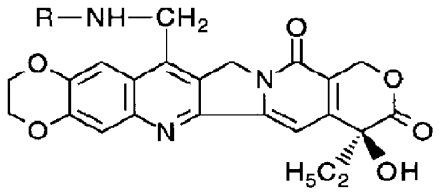
【００８３】実施例４２～５９　　得る。
前記実施例１－６と同様にして下記表３記載の化合物を　　【表３】



実施例番号	R	実施例番号	R
４２	CM·Dextran·Na–L-Phe–	５１	CM·Pullulan·Na–L-Phe–
４３	CM·Dextran·Na–Gly–Gly–	５２	CM·Pullulan·Na–Gly–Gly–
４４	CM·Dextran·Na–L-Leu–Gly–	５３	CM·Pullulan·Na–L-Leu–Gly–
４５	CM·Dextran·Na–L-Phe–Gly–	５４	CM·Pullulan·Na–L-Phe–Gly–
４６	CM·Dextran·Na–L-Tyr–Gly–	５５	CM·Pullulan·Na–L-Tyr–Gly–
４７	CM·Dextran·Na–Gly–Gly–L–Phe-Gly–	５６	CM·Pullulan·Na–Gly–Gly–L-Phe–Gly–
４８	CM·Dextran·Na–Gly–Gly–Gly–	５７	CM·Pullulan·Na–Gly–Gly–Gly–
４９	CM·Dextran·Na–Gly–Gly–Gly–Gly–	５８	CM·Pullulan·Na–Gly–Gly–Gly–Gly–
５０	CM·Dextran·Na–Gly–Gly–Gly–Gly–Gly–	５９	CM·Pullulan·Na–Gly–Gly–Gly–Gly–Gly–

【００８４】実施例６０～７６
前記実施例１－６と同様にして下記表４記載の化合物を得る。

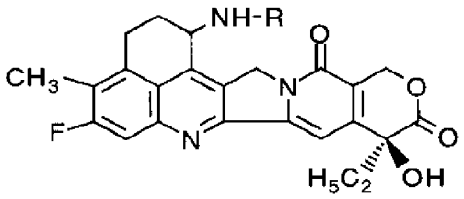
【表４】



実施例番号	R	実施例番号	R
６０	CM·Dextran·Na–L-Phe–	６８	CM·Pullulan·Na–L-Phe–
６１	CM·Dextran·Na–Gly–Gly–	６９	CM·Pullulan·Na–Gly–Gly–
６２	CM·Dextran·Na–L-Leu–Gly–	７０	CM·Pullulan·Na–L-Leu–Gly–
６３	CM·Dextran·Na–L-Phe–Gly–	７１	CM·Pullulan·Na–L-Phe–Gly–
６４	CM·Dextran·Na–L-Tyr–Gly–	７２	CM·Pullulan·Na–L-Tyr–Gly–
		７３	CM·Pullulan·Na–Gly–Gly–L-Phe–Gly–
６５	CM·Dextran·Na–Gly–Gly–Gly–	７４	CM·Pullulan·Na–Gly–Gly–Gly–
６６	CM·Dextran·Na–Gly–Gly–Gly–Gly–	７５	CM·Pullulan·Na–Gly–Gly–Gly–Gly–
６７	CM·Dextran·Na–Gly–Gly–Gly–Gly–Gly–	７６	CM·Pullulan·Na–Gly–Gly–Gly–Gly–Gly–

【００８５】実施例７７～９３
前記実施例１－６と同様にして下記表５記載の化合物を得る。

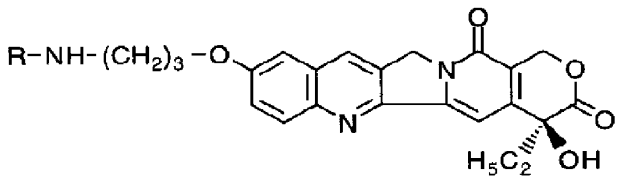
【表５】



実施例番号	R	実施例番号	R
７７	CM·Dextran·Na–L-Phe–	８５	CM·Pullulan·Na–L-Phe–
７８	CM·Dextran·Na–Gly–Gly–	８６	CM·Pullulan·Na–Gly–Gly–
７９	CM·Dextran·Na–L-Leu–Gly–	８７	CM·Pullulan·Na–L-Leu–Gly–
８０	CM·Dextran·Na–L-Phe–Gly–	８８	CM·Pullulan·Na–L-Phe–Gly–
８１	CM·Dextran·Na–L-Tyr–Gly–	８９	CM·Pullulan·Na–L-Tyr–Gly–
		９０	CM·Pullulan·Na–Gly–Gly–L-Phe–Gly–
８２	CM·Dextran·Na–Gly–Gly–Gly–	９１	CM·Pullulan·Na–Gly–Gly–Gly–
８３	CM·Dextran·Na–Gly–Gly–Gly–Gly–	９２	CM·Pullulan·Na–Gly–Gly–Gly–Gly–
８４	CM·Dextran·Na–Gly–Gly–Gly–Gly–Gly–	９３	CM·Pullulan·Na–Gly–Gly–Gly–Gly–Gly–

【００８６】実施例９４～１１０
前記実施例１－６と同様にして下記表６記載の化合物を得る。

【表６】



実施例番号	R	実施例番号	R
９４	CM·Dextran·Na–L-Phe–	１０２	CM·Pullulan·Na–L-Phe–
９５	CM·Dextran·Na–Gly–Gly–	１０３	CM·Pullulan·Na–Gly–Gly–
９６	CM·Dextran·Na–L-Leu–Gly–	１０４	CM·Pullulan·Na–L-Leu–Gly–
９７	CM·Dextran·Na–L-Phe–Gly–	１０５	CM·Pullulan·Na–L-Phe–Gly–
９８	CM·Dextran·Na–L-Tyr–Gly–	１０６	CM·Pullulan·Na–L-Tyr–Gly–
		１０７	CM·Pullulan·Na–Gly–Gly–L-Phe–Gly–
９９	CM·Dextran·Na–Gly–Gly–Gly–	１０８	CM·Pullulan·Na–Gly–Gly–Gly–
１００	CM·Dextran·Na–Gly–Gly–Gly–Gly–	１０９	CM·Pullulan·Na–Gly–Gly–Gly–Gly–
１０１	CM·Dextran·Na–Gly–Gly–Gly–Gly–Gly–	１１０	CM·Pullulan·Na–Gly–Gly–Gly–Gly–Gly–

【００８７】参考例１

（１）デキストラン〔ファルマシア社製、Dextran Ｔ－１１０、平均分子量：１００,０００(ＧＰＣ)法〕２９ｇを水２９０mlに溶解する。この溶液に０～５℃で水素化ホウ素ナトリウム１.４５ｇを加え、５℃で１夜撹拌する。反応混合物に酢酸を滴下してｐＨ５とし、室温で更に３時間撹拌する。２Ｎ水酸化ナトリウムでｐＨ７に調整し、激しく撹拌しながら、エタノール１.２リットルを加える。静置して不溶物を沈殿させたのち、デカンテーションにより上澄みを除去し、残渣を遠心分離する。残渣を水０.５リットルに溶解して凍結乾燥し、白色粉末２６.３ｇを得る。

（２）上記（１）で得られる白色粉末５０ｇを水５００mlに溶解し、この溶液に氷冷下で水酸化ナトリウム２００ｇを加え、３０分間撹拌する。反応混合物を室温に戻した後、モノクロロ酢酸（１１０ｇ）の水（１５０ml）溶液を滴下し、４０℃で１８時間撹拌する。反応混合物を１０℃以下に冷却し、酢酸でｐＨ８～９に調整する。反応混合物を激しく撹拌しながら、メタノール８リットルを加え、不溶物を沈殿させる。不溶物を沪取し、純水５リットルに溶解し、限外沪過で脱塩する。得られた溶液を減圧濃縮し、濃縮液を沪過後、エタノールを加え、析出沈殿物を沪取し、水性エタノール、アセトンで洗浄後、室温および５０℃で減圧乾燥することにより、カルボキシメチルデキストラン（ＣＭ－デキストラン）ナトリウム塩〔カルボキシメチル化度（中和滴定法）：０.５〕５０.２ｇを得る。

【００８８】参考例２

モノクロロ酢酸の使用量を変え、参考例１と同様に実施することにより、カルボキシメチル化度が０.６５のＣＭ－デキストラン・ナトリウム塩を得る。

OnCusp
Ex. 1002

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[6]	識別記号	ＦＩ
Ｃ０７Ｄ 491/22		Ｃ０７Ｄ 491/22
Ｃ０８Ｂ　37/02		Ｃ０８Ｂ　37/02

(translation)
JPH11-092405

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : **11-092405**
(43)Date of publication of application : **06.04.1999**

(51)Int.Cl. **A61K 47/48**

// C07K 5/103

(21)Application number : **09-254780**
(22)Date of filing : **19.09.1997**

(71)Applicant : **DAI ICHI SEIYAKU CO LTD**
DDS KENKYUSHO:KK
(72)Inventor : **INOUE KAZUHIRO**
SUZAKI HIROSHI
IKEDA MASAHIRO

(54) **MEDICINAL COMPLEX**

(57)Abstract:
PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject complex capable of site-specifically delivering a medicinal complex, staying in blood for a long time, and useful for anti-tumor medicines, anti-inflammatory medicines and the like by binding a carboxyalkylpullulan polyalcohol to the residue of a medicinal compound through a specific spacer.
SOLUTION: This medicinal complex is obtained by binding a carboxy 1-4C alkylpullulan polyalcohol (especially a carboxymethylpullulan polyalcohol having a mol.wt. of 5,000-500,000 and a carboxymethylation degree of 0.01-2.66) to the residue of a medicinal compound (especially doxorubicin or the like) through a spacer comprising an amino acid or a spacer comprising 2-8 amino acids bound to each other through peptide bonds [especially (N-terminal)-Gly-Gly-Phe- Gly].

(translation)
JPH11-092405

* NOTICES *

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2.**** shows the word which can not be translated.
3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]
[Claim 1]A drug conjugate, wherein carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol and a residue of a pharmaceutical compound have joined together via a spacer which consists of one amino acid, or a spacer which consists of 2 thru/or 8 amino acid which carried out the peptide bond.
[Claim 2]pullulan polyalcohol which constitutes carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol --- substantial --- completely --- polyalcohol --- the drug conjugate according to claim 1 being the pullulan polyalcohol produced by processing pullulan under conditions [-izing / conditions].
[Claim 3]The drug conjugate according to claim 1 or 2 whose carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol is carboxymethyl pullulan polyalcohol.
[Claim 4]A drug conjugate of a description in any 1 item of Claims 1-3 whose pharmaceutical compound is an antitumor agent or an anti-inflammatory agent.
[Claim 5]The drug conjugate according to claim 4 which is an antitumor agent in which a pharmaceutical compound reveals concentration-dependent antitumor action.
[Claim 6]The drug conjugate according to claim 4 which is an antitumor agent which reveals antitumor action for which a pharmaceutical compound depended on time.
[Claim 7]An antitumor agent Doxorubicin or-1-(1S, 9S). Amino-9- ethyl-5- The fluoro- 2 and 3-. The dihydro- 9 - hydroxy --- 4 - the methyl-1H,12H-benzo [de] PIRANO [3',4':6,7] yne DORIJINO [1,2-b] quinolin- 10,13 (9H,15H) - the drug conjugate according to claim 4 which is dione.
[Claim 8]Dipeptide as which a spacer is expressed in -X-Z- (from an amino group of an amino terminal of dipeptide and a carboxyl group of a C terminal which become the amino terminal and C terminal side, respectively, and are formed by carrying out a peptide bond, hydrophobic-amino-acid (X) and a hydrophilic amino acid (Z) -X-Z-) a residue except one hydrogen atom and one hydroxyl group is shown, respectively -- it is -- or -- or a drug conjugate of a description in any 1 item of Claims 5-7 which are the spacers which contain this dipeptide as partial peptide arrangement.
[Claim 9]The drug conjugate according to claim 8 whose hydrophobic amino acid is phenylalanine and whose hydrophilic amino acid is a glycine.
[Claim 10]The drug conjugate according to claim 9 whose spacer is -(amino terminal) Gly-Gly-Phe-Gly-.
[Claim 11]An introduction amount of a residue of an antitumor agent is 1 to 15 % by weight. A drug conjugate of a description in any 1 item of Claims 5-10 which are ranges.
[Claim 12]An introduction amount of a residue of an antitumor agent is 3 to 10 % by weight. A drug conjugate of a description in any 1 item of Claims 5-10 which are ranges.
[Claim 13]Introduction amounts of a residue of an antitumor agent are 4-7. A drug conjugate of a description in any 1 item of Claims 5-10 which are the ranges of weight % .

[Claim 14]An amino terminal of peptide shown by H_2N-Gly-Gly-Phe-Gly-COOH is carrying out acid amide bonds to a carboxyl group of carboxymethyl pullulan polyalcohol, A C terminal of this peptide-1-(1S, 9S). Amino-9- ethyl-5- The fluoro- 2 and 3-. The dihydro- 9 - hydroxy -- 4 - the methyl-1H,12H-benzo [de] PIRANO [3',4':6,7] yne DORIJINO [1,2-b] quinolin- 10,13 (9H,15H) - the drug conjugate according to claim 1 which carried out acid amide bonds to 1-amino group of dione.
[Claim 15](1S,9S)-1-amino-9- Ethyl-5-. Fluoro-2,3- dihydro-9- Hydroxy 4-. Methyl-1H,12H-benzo [de] PIRANO [3',4':6,7] yne DORIJINO [1,2-b] quinolin-10,13(9H,15H)- An introduction amount of a dione residue is 2 to 10 % by weight. The drug conjugate according to claim 14 which is a range.
[Claim 16]The drug conjugate according to claim 14 or 15 whose carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol is the carboxymethyl pullulan polyalcohol of the range of the molecular weights 5,000 thru/or 500,000 and a range of whose degree of carboxymethyl-izing is 0.01-2.66.
[Claim 17]The drug conjugate according to claim 14 or 15 whose carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol is the carboxymethyl pullulan polyalcohol of the range of the molecular weight 10,000-350,000 and ranges of whose degree of carboxymethyl-izing are 0.1-1.0.
[Claim 18]The drug conjugate according to claim 14 or 15 whose carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol is the carboxymethyl pullulan polyalcohol of the range of the molecular weight 50,000-200,000 and ranges of whose degree of carboxymethyl-izing are 0.3-0.6.
[Claim 19](1S,9S)-1-amino-9- Ethyl-5-. The fluoro- 2,3 - the dihydro- 9 - hydroxy -- 4 - the methyl-1H,12H-benzo [de] PIRANO [3',4':6,7] yne DORIJINO [1,2-b] quinolin- 10,13 (9H,15H) - an introduction amount of a dione residue being the range of 5-7 weight % , and, The drug conjugate according to claim 14 whose degree of carboxymethyl-izing a molecular weight of carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol is the abbreviation 83,000, and is abbreviation 0.5.
[Claim 20]It is a carrier of drug delivery for combining a pharmaceutical compound, and is a carrier of drug delivery which consists of carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol.
[Claim 21]Carrier of the drug delivery according to claim 20 ranges of a molecular weight of carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol are 5,000-500,000, and ranges of whose carboxy C_{1-4} alkylation degree are 0.01-2.66.
[Claim 22]Carrier of the drug delivery according to claim 20 a range of a molecular weight of carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol is 10,000-350,000, and ranges of whose carboxy C_{1-4} alkylation degree are 0.1-1.0.
[Claim 23]Carrier of the drug delivery according to claim 20 a range of a molecular weight of carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol is 50,000-200,000, and ranges of whose carboxy C_{1-4} alkylation degree are 0.3-0.6.
[Claim 24]Carrier of drug delivery of a description in any 1 item of Claims 20-23 whose carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol is carboxymethyl pullulan polyalcohol.
[Claim 25]Use of carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol for manufacture of a drug conjugate containing carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol combined with a residue of a pharmaceutical compound.
[Claim 26]Use of carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol for manufacture of a drug conjugate combined without a residue of a pharmaceutical compound and carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol passing a spacer via a spacer.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]
[0001]

[Field of the Invention]The present invention relates to a drug conjugate useful as medicine. Speaking still more specifically, the present invention's relating to the drug conjugate which combined the carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol and pharmaceutical compounds, such as an antitumor agent and an anti-inflammatory agent, which are polysaccharide derivatives via the spacer.

[0002]

[Description of the Prior Art]The antitumor agent used when treating blood cancers, such as solid carcinota, such as lung cancer and digestive organ cancer, and leukemia, exerts a curative effect by shifting to a specific tumor site, and checking thru/or inhibiting growth of a cancer cell, after being prescribed for the patient systemic by routes of administration, such as intravenous administration and internal use. However, since the antitumor agent in which the whole body was prescribed for the patient is promptly incorporated into liver and a reticuloendothelial system organ out of blood or urinary excretion is carried out promptly, blood drug concentration may be deteriorated and its shift to a tumor site may not be sufficient. Since the transition selection nature (tumor selectivity) to a tumor site is low at the usual antitumor agent itself, Since an antitumor agent is uniformly distributed over the various cells and tissues of the whole body and acts as cytotoxin also to a normal cell and tissue, there is a problem of making high rate generate side effects, such as vomiting, fever, or depilation, extremely. Therefore, the development of a means to which an antitumor agent is made to shift efficiently and selectively in a tumor site is called for.

[0003]The method of combining an antitumor agent with a polysaccharide polymer, and delaying the disappearance out of the blood of an antitumor agent as one of such the means, and improving the directivity to a cancer tissue is proposed. For example, JP,7-84481,B has disclosed the drug conjugate which introduced a daunorubicin, doxorubicin, mitomycin-C, or bleomycin into the carboxymethyl-ized MANNO glucan derivative via a Schiff base and acid amide bonds. The carboxymethyl-ized MANNO glucan polyalcohol is also used as a MANNO glucan derivative in this invention. However, since the MANNO glucan derivative had much branching, its structure was complicated, and it was difficult for the thing of uniform quality suitable for manufacture of drugs to come to hand.

[0004]International-Publication WO94/19376 item has disclosed the drug conjugate which the peptide chain (1-8 amino acid) is combined with the carboxyl group of the polysaccharide which has a carboxyl group, and combined doxorubicin, a daunorubicin, mitomycin-C, or bleomycin via this peptide chain further. The polysaccharide which has a carboxyl group in the structure inherently as a polysaccharide which has a carboxyl group. The polysaccharide which does not have a carboxyl group in the structure inherently besides being (for example, hyaluronic acid) etc. The polysaccharide etc. which introduced the carboxy C_{1-4} alkyl group into hydroxyl groups, such as (for example, pullulan, dextran, chitin, etc.), or carried out the ester bond of the polybasic acid, such as malonic acid and succinic acid, and introduced the carboxyl group are illustrated. This drug conjugate makes it a structural feature for drugs and the above-mentioned polysaccharide portions, such as doxorubicin, to have joined together via a spacer.

While anticancer efficacy superior to doxorubicin is acquired, toxicity and side effects are reduced.

[0005]In addition, about the technology about the drug conjugate using the polyalcohol-ized polysaccharide derivative as a delivery carrier of a drug, "The blood Nakayasu quality of research and a polysaccharide carrier and the relation; of anticancer efficacy "the research and the moving state in the living body about a polysaccharide-peptide doxorubicin complex, and anticancer efficacy" about a polysaccharide-peptide doxorubicin complex" (the collection of the 10th Japan Society of Drug Delivery System lecture summaries, 279, 1994). the collection of the 9th Japanese-Society-for-the-Study-of-Xenobiotics annual convention lecture summaries, and 292 -- the collection of the 1994; 19th research-and-development trend seminar (OPSR sponsorship) summaries, D-9, 1995, and

"research on the drug delivery to the tumor by a polysaccharide carrier" (the 12th colloid and interface technical symposium, Chemical Society of Japan, and the collection of lecture summaries --) ; There is a report of 51, 1995, etc.

[0006]

[Problem to be solved by the invention]There is the problem given to the present invention in providing the drug conjugate which can make active principles, such as an antitumor agent and an anti-inflammatory agent, shift to a part selection target to a tumor site etc. It is the problem given to the present invention to provide more specifically the drug conjugate which is a drug conjugate which contains pharmaceutical compounds, such as an antitumor agent and an anti-inflammatory agent, as a substructure, and can stagnate into blood for a long time, and can send this pharmaceutical compound into a part selection target to a tumor site or an inflammation part. There is another problem of the present invention in providing the manufacturing method of the drug conjugate which has the above-mentioned characteristics.

[0007]

[Means for solving problem]The inventors are International-Publication WO94/19376 that the above-mentioned problem should be solved. The result of having tried improvement of the drug conjugate disclosed in the item, If what carboxy-C_{1-4}-alkylated the dextran derivative which changed to the polysaccharide which has a carboxyl group and polyalcohol-ized dextran is used as a polysaccharide portion, While the medicine after administration was maintained at high concentration over the long time, it found out that the part selectivity to a tumor site or an inflammation part was substantially improvable. With such a compound, while chief remedy effects, such as anticancer efficacy, were reinforced notably, it found out that toxicity was reduced (PCT/JP97/01914). It found out that the inventor had the property as the above-mentioned drug conjugate containing carboxy alkyl dextran polyalcohol in which the drug conjugate which contains carboxy alkyl pullulan polyalcohol as a polysaccharide portion is the same as a result of advancing research further. The present invention is completed based on these knowledge.

[0008]Namely, the present invention, A drug conjugate, wherein carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol and the residue of a pharmaceutical compound have joined together via the spacer which consists of one amino acid or the spacer which consists of 2 thru/or 8 amino acid which carried out the peptide bond is provided. The object for injection of the form of the medicinal composition which contains the medicine; which consists of the above-mentioned drug conjugate and the above-mentioned drug conjugate as an active principle, for example, the freeze-drying article with which the vial was filled up, or the pharmaceutical preparation for a drop by drop titration is provided by another mode of the present invention. According to mode with the another present invention, the manufacturing method of the above-mentioned drug conjugate is provided.

[0009]As a preferable mode of the above-mentioned invention, the pullulan polyalcohol which constitutes carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol, substantial --- completely --- polyalcohol --- pullulan under the conditions [-izing / conditions]. [process and] That it is the obtained pullulan polyalcohol. The above-mentioned drug conjugate by which it is characterized; the antitumor action for which the above-mentioned drug conjugate; pharmaceutical compound whose carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol is carboxymethyl pullulan polyalcohol, and in which a certain above-mentioned drug conjugate; pharmaceutical compound is an antitumor agent or an anti-inflammatory agent depended on concentration. The antitumor agent to reveal (the antitumor agent which reveals stronger antitumor action by high concentration: in this Description) it may be called a concentration-dependent antitumor agent -- it is -- the antitumor agent (the antitumor agent which reveals stronger antitumor action by long reaction time: in this Description) which reveals the antitumor action for which the above-mentioned drug conjugate; pharmaceutical compound depended on time it may be called a time-

dependent type antitumor agent -- it is -- the above-mentioned drug conjugate; -- and, An antitumor agent The doxorubicin or-1-(1S, 9S). Amino-9- ethyl-5- The fluoro- 2 and 3-. The dihydro- 9 - hydroxy -- 4 - the methyl-1H,12H-benzo [de] PIRANO [3',4':6,7] yne DORIJINO [1,2-b] quinolin-10,13 (9H,15H) - the above-mentioned drug conjugate which is dione is provided.

[0010]Similarly as a preferable mode, Dipeptide as which a spacer is expressed in -X-Z- (from the amino group of the amino terminal of dipeptide and the carboxyl group of a C terminal which become the amino terminal and C terminal side, respectively, and are formed by carrying out a peptide bond, hydrophobic-amino-acid (X) and a hydrophilic amino acid (Z) -X-Z-) the residue except one hydrogen atom and one hydroxyl group is meant, respectively -- it is -- or, Or the above-mentioned drug conjugate which is a spacer which contains this dipeptide as partial peptide arrangement; Hydrophobic amino acid is phenylalanine, the above-mentioned drug conjugate; whose hydrophilic amino acid is a glycine -- the above-mentioned drug conjugate; whose spacer is -(amino terminal) Gly-Gly-Phe-Gly- and, The introduction amount of the residue of an antitumor agent is 1 to 15 % by weight. 3 - 10 % by weight and the above-mentioned drug conjugate which is the ranges of 4-7 weight % still more preferably are provided preferably.

[0011]As an especially preferable mode of the present invention, the amino terminal of the peptide shown by H_2N-Gly-Gly-Phe-Gly-COOH is carrying out acid amide bonds to the carboxyl group of carboxymethyl pullulan polyalcohol, The C terminal of this peptide-1-(1S, 9S). Amino-9- The ethyl-5-fluoro- 2 and 3-. The dihydro- 9 - hydroxy -- 4 - the methyl-1H,12H-benzo [de] PIRANO [3',4':6,7] yne DORIJINO [1,2-b] quinolin- 10,13 (9H,15H) - the above-mentioned drug conjugate which carried out acid amide bonds to 1-amino group of dione; (1S,9S)-1-amino-9- Ethyl-5-. Fluoro-2,3- dihydro-9-Hydroxy 4-. Methyl-1H,12H-benzo [de] PIRANO [3',4':6,7] yne DORIJINO [1,2-b] quinolin-10,13(9H,15H)- The introduction amount of a dione residue is 2 to 10 % by weight. The above-mentioned drug conjugate which is a range; in a row, carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol -- the range of the molecular weights 5,000-500,000 -- preferable -- the range of 10,000-350,000 -- It is the carboxymethyl pullulan polyalcohol of the range of 50,000-200,000 more preferably, the degree of carboxymethyl-izing -- the range per [0.01-2.66] constituent sugar residue -- the range of 0.1-1.0 and the above-mentioned drug conjugate which is the ranges of 0.3-0.6 more preferably are provided preferably.

[0012]According to another mode of the present invention, the carrier of the drug delivery which consists of carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol is provided. In the preferable mode of this invention, the molecular weight of carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol The range of 5,000-500,000, preferable -- the range of 10,000-350,000 -- it being the range of 50,000-200,000 more preferably, and, a carboxy C_{1-4} alkylation degree -- the range per [0.01-2.66] constituent sugar residue -- preferable -- the range of 0.1-1.0 -- it is the range of 0.3-0.6 more preferably. Carboxymethyl pullulan polyalcohol is provided as most preferable carrier. From another viewpoint of this invention, use of the carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol for manufacture of the drug conjugate containing the carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol combined with the residue of the pharmaceutical compound is provided.

[0013]As a preferable mode of this invention, The residue of a pharmaceutical compound and carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol via a spacer. The use; of the carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol for manufacture of the united drug conjugate and the spacer which consists of one amino acid, or 2-8 that carried out the peptide bond Via the spacer which consists of the amino acid of an individual. Use of the carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol for manufacture of a drug conjugate, wherein carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol and the residue of a pharmaceutical compound have joined together is provided.

[0014]

[Mode for carrying out the invention]The drug conjugate of the present invention is a spacer which

consists of one amino acid, or 2-8 which carried out the peptide bond. It is characterized by carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol and the residue of a pharmaceutical compound having joined together via the spacer which consists of the amino acid of an individual.

[0015]The residue of the pharmaceutical compound contained in the drug conjugate of the present invention originates in the pharmaceutical compound used for the mammalian sick therapy and/or prevention which contain Homo sapiens as medicines, such as an antitumor agent, an anti-inflammatory agent, and an antimicrobial agent, for example, and is constituted by the substructure. But the pharmaceutical compound in which this residue originates is not limited to the above-mentioned thing. As long as it has 1 or two or more reactive functional groups (for example, an amino group, a carboxyl group, a hydroxyl group, a sulfhydryl group, an ester group, etc.) which can participate in combination with a spacer as a pharmaceutical compound, what kind of thing may be used. When calling it a pharmaceutical compound in this Description, the prodrug compound which can reproduce this compound in the living body including the main structures of a compound where itself has a medicine operation, as the substructure is also contained.

[0016]In this Description, more specifically with the residue of a pharmaceutical compound, When it is assumed that combination with a spacer and a pharmaceutical compound residue was formed by the reactions (for example, dehydration condensation etc.) of the reactive functional group in a pharmaceutical compound and the reactive functional group in a spacer, the substructure originating in the pharmaceutical compound which exists in the compound after combination is meant. For example, when a pharmaceutical compound is denoted by D-NH_2, D-COOH, D-COOR, D-OH, D-SH, D-$CONH_2$, and D-NH-COOR (R is a low-grade alkyl group etc.), The residue of a pharmaceutical compound, respectively D-NH- (D-NH-CO-Q etc.), D-CO- (D-CO-NH-Q, D-CO-O-Q, D-CO-S-Q, etc.), D-CO- (D-CO-NH-Q, D-CO-O-Q, D-CO-S-Q, etc.), (D-O-CO-Q, D-O-Q, etc.) D-O- D-S- (D-S-CO-Q, D-S-Q, etc.), It is expressed with D-CONH- (D-CO-NH-CO-Q etc.) and D-NH-CO- (D-NH-CO-O-Q, D-NH-CO-NH-Q, etc.) (the inside of a parenthesis combination with a spacer and a pharmaceutical compound residue). [show and] Q shows the remaining substructures excluding the reactive functional group from the spacer. But the kind of combination with a spacer and a pharmaceutical compound residue is not limited to the above-mentioned thing. The residue of a pharmaceutical compound may be combined with the reactive functional group which exists in the amino acid which constitutes a spacer besides the amino terminal amino group of a spacer, or a C terminal carboxyl group.

[0017]As a residue of a pharmaceutical compound, for example The doxorubicin, a daunorubicin, Mitomycin-C, bleomycin, a cyclo cytidine, vincristine, Vinblastine, methotrexate, a platinum system antitumor agent (cisplatin or its derivative), taxol or its derivative, camptothecin, or its derivative (the antitumor agent described in JP,6-87746,A ---) -1-(1S, 9S) preferably described in Claim 2. Amino-9-ethyl-5- The fluoro- 2 and 3-. The dihydro- 9 - hydroxy --- 4 - the methyl-1H,12H-benzo [de] PIRANO [3',4':6,7] yne DORIJINO [1,2-b] quinolin- 10,13 (9H,15H) - dione etc. --- etc. --- the residue of an antitumor agent can be used suitably. For example, the residue of non-steroidal anti-inflammatory drugs, such as steroid system anti-inflammatory agents, such as hydrocortisone succinate and prednisolone succinate, or mefenamic acid, flufenamic acid, diclofenac, ibuprofen, and tinoridine, is also suitable.

[0018]As a spacer combined with the residue of a pharmaceutical compound, it is a spacer which consists of one amino acid, or 2-8 which carried out the peptide bond. The spacer which consists of the amino acid of an individual can be used. More specifically a spacer The residue of one amino acid (the residue except one hydrogen atom and one hydroxyl group is meant from the amino group and carboxyl group of amino acid, respectively), Or it has a form of the residue (the residue except one hydrogen atom and one hydroxyl group is meant from the amino group of an amino terminal, and the

carboxyl group of a C terminal, respectively) of the oligopeptide which consists of 2 thru/or 8 amino acid which carried out the peptide bond.

[0019]A preferable spacer is a residue of the oligopeptide which consists of 2-6 amino acid. although the kind in particular of amino acid which constitutes a spacer is not limited --- for example, L- or D- amino acid --- L-amino acid can be used preferably and beta-alanine, epsilon-aminocaproic acid, gamma-aminobutyric acid, etc. besides the alpha-amino acid may be used. As for amino acid other than such alpha-amino acid, it is preferable to be arranged at the position close to a polysaccharide derivative.

[0020]Although the joint direction in particular of a spacer is not limited, it can combine the amino terminal of a spacer with the carboxyl group of carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol by acid amide bonds, and, generally, can combine the C terminal of a spacer with the amino group of a pharmaceutical compound. If lysine residue is included as a constitutional unit of a peptide spacer and the acid amide bonds of alpha-amino group and epsilon-amino group of lysine residue are carried out to the carboxyl group of other amino acid for example, respectively, Since the both ends of a peptide spacer turn into an amino terminal, it becomes possible to combine the carboxyl group of a pharmaceutical compound. The residue (for example, residue of dicarboxylic acid, such as a residue of diamine, such as ethylenediamine, and succinic acid) of one piece, two diamine compounds or more, or a dicarboxylic acid compound is included as a constitutional unit into the spacer, In both ends, the spacer and both ends of an amino terminal may use the spacer of a C terminal, respectively.

[0021]The residue of the dipeptide as which a spacer is expressed in -X-Z-, for example although the amino acid sequence in particular of a spacer is not limited (X the residue of hydrophobic amino acid) [show and] Z shows the residue of a hydrophilic amino acid, -X-Z- becomes the amino terminal and C terminal side, respectively, and hydrophobic-amino-acid (X) and a hydrophilic amino acid (Z), respectively from the amino group of the amino terminal of dipeptide and the carboxyl group of a C terminal which carried out the peptide bond one hydrogen atom and one hydroxyl group. the removed residue is meant -- it is -- or -- or the spacer which contains the residue of this dipeptide as partial peptide arrangement can be used suitably. As hydrophobic amino acid, phenylalanine, tyrosine, leucine, etc. can be used and a glycine, an alanine, etc. can be used as a hydrophilic amino acid, for example. The spacer may have the iterative arrays (for example, -X-Z-X-Z-, -X-Z-X-Z-X-Z-, etc.) of such a dipeptide residue.

[0022]If a spacer including such a dipeptide structure is used, a spacer will be hydrolyzed by the tumor site and inflammation part which are considered that peptidase is abundant, and a pharmaceutical compound will separate to high concentration in the part concerned. The substructure which the spacer and pharmaceutical compound containing the above-mentioned dipeptide join together, and is formed is a preferable substructure of the drug conjugate of the present invention. Especially the thing for which it uses the spacer which contains the above-mentioned spacer or this dipeptide residue which consists of a dipeptide residue shown by -X-Z- as partial peptide arrangement as a residue of a pharmaceutical compound, for example in using a concentration-dependent antitumor agent (for example, doxorubicin) etc. is preferable.

[0023]Also when using the time-dependent type antitumor agent which needs continuation of reaction time above fixed concentration as a residue of a pharmaceutical compound, high anticancer efficacy may be able to be attained by using the above-mentioned spacer. As such an antitumor agent, the antitumor agent described in JP,H6-87746,A and the antitumor agent preferably described in Claim 2 are mentioned, for example. Generally, it is necessary to choose a preferable spacer from viewpoints of the operation mechanism of an antitumor agent, a moving state in the living body and the characteristics of a toxic manifestation, the isolation nature of the antitumor agent in the inside of the body, etc., without being limited to the above-mentioned spacer. It is preferable to choose the above-

mentioned spacer which can separate a high-concentration pharmaceutical compound in a short time to the quick cancer type of growth generally.

[0024]Although the example of a spacer is shown in the following tables, it cannot be overemphasized that a person skilled in the art is selectable suitably so that the spacer used for the drug conjugate of the present invention may not be limited to the following and an isolation speed [optimum / pharmaceutical compound] may be given. Among front, left-hand side is an amino terminal and the residue of a pharmaceutical compound combines a peptide sequence with the C terminal side. D-Phe shows D-phenylalanine residue and other amino acid shows L-amino acid. The size of isolation speed is judged with the degree of a manifestation of the drug effect to the Walker 256 cancer-bearing rat of the drug conjugate which combined the doxorubicin, or the isolation doxorubicin concentration in the tumor site of a Walker 256 cancer-bearing rat. It is preferable to use the spacer which can separate a high-concentration pharmaceutical compound for a short time, such as -(amino terminal) Gly-Gly-Phe-Gly-, to the doxorubicin among these spacers.

[0025]

[Table 1]----------. (a) Isolation speed. Large spacer -Leu-Gly- -Tyr-Gly- -Phe-Gly- -Gly-Phe-Gly- -Gly-Gly-Phe-Gly- -Gly-Phe-Gly-Gly- -Phe-Gly-Gly-Gly- -Phe-Phe-Gly-Gly- -Gly-Gly-Gly-Phe-Gly-. Spacer Gly-Gly-Phe-Phe whose (b) isolation speed is comparatively large - -Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly - Spacer Phe-Phe whose (c) isolation speed is comparatively small - -Ala-Gly-. - Pro-Gly - -Gly-Gly-Gly-Phe-. (d) Spacer with a small isolation speed - Gly - -D-Phe-Gly - -Gly-Phe - -Ser-Gly - -Gly-Gly - -Gly-Gly-Gly - -Gly-Gly-Gly-Gly - ----------

[0026]Although a maltotriose residue is water-soluble alpha-glucan connected by 1->alpha6 combination and pullulan can obtain as a commercial item what was generally produced by Aureobasidium pullulans as an extracellular polysaccharide from sucrose etc., The origin of pullulan for using for manufacture of the drug conjugate of the present invention is not limited to the above-mentioned thing. although the molecular weight in particular of pullulan is not limited -- a molecular weight -- about [10,000 degree to] 2,000,000 thing -- the thing of 1,000,000 degree can be preferably used about from 100,000.

[0027]Although the degree of polyalcohol-izing in particular of the carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol which constitutes the polysaccharide derivative portion of the drug conjugate of the present invention is not limited, the pullulan polyalcohol which constitutes carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol -- substantial -- completely -- polyalcohol -- it is preferable to be obtained by processing pullulan under the condition [-izing / a condition]. For example, the pullulan polyalcohol which made sodium periodate and sodium borohydride of the overlarge act on pullulan sequentially, and polyalcohol-ized pullulan completely substantially is suitable as a raw material compound of the drug conjugate of the present invention. But the method of polyalcohol-izing of pullulan is not limited to the above-mentioned thing, and as long as it is available to a person skilled in the art, it may adopt what kind of method.

[0028]As C_{1-4} alkyl which constitutes a carboxy C_{1-4} alkyl group, although the C_{1-4} alkyl of a straight chain or a branched chain, specifically a methyl group, an ethyl group, n-propyl group, an isopropyl group, n-butyl group, a sec-butyl group, etc. can be used, A methyl group can be used preferably. Carboxy C_{1-4} alkylation to the hydroxyl group of pullulan polyalcohol, for example The chloroacetic acid, Bromoacetic acid, alpha-chlor propionic acid, alpha-methyl-alpha-chlor propionic acid, beta-chlor propionic acid, alpha-methyl-beta-chlor propionic acid, alpha-chlor butanoic acid, It can carry out halogenation C_{1-4} alkyl carboxylic acid, such as beta-chlor butanoic acid and gamma-chlor butanoic acid, and by making the chloroacetic acid react preferably and carboxy-C_{1-4}-alkylating a hydroxyl group partially or completely.

[0029]For example, the inert solvent which does not participate pullulan polyalcohol in a reaction. It

dissolves in (for example, water, N.N-dimethylformamide, dimethyl sulfoxide, etc.), What is necessary is to add halogenation C_{1-4} alkyl carboxylic acid or its salt under existence of bases (for example, sodium hydroxide, a potassium hydrate, etc.), and just to make it react for several minutes thru/or several days under ice-cooling thru/or in the temperature requirement of a 100 ** degree. The degree of introduction of a carboxy C_{1-4} alkyl group, For example, by choosing suitably the quantity of the halogenation C_{1-4} alkyl carboxylic acid used as the reaction temperature and the reagent of carboxy C_{1-4} alkylation, and a base, it can adjust easily and such a means is well-known at a person skilled in the art. although the degree in particular of the carboxy C_{1-4} alkylation over the hydroxyl group of pullulan polyalcohol is not limited -- the range per [0.01-2.66] constituent sugar residue -- preferable -- 0.1-1.0 -- it is the range of 0.3-0.6 more preferably. the case where the molecular weight of carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol is measured by a gel-filtration method -- 5,000 to about 500,000 -- preferable -- 10,000 -350,000 degree -- it is 50,000 -200,000 degree more preferably.

[0030]The above-mentioned carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol is useful as a carrier of drug delivery. The drug conjugate which combined a pharmaceutical compound and carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol has the outstanding selectivity, such as tumor selectivity, for example, and there are the characteristics that high blood drug concentration is maintainable for a long time. The method of combining [as combination with a pharmaceutical compound and carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol] both via a spacer with proper method of making both coupling directly, spacer described to the above, etc. by an ester bond etc., for example etc. are employable.

[0031]About the drug conjugate combined via a spacer, The drug conjugate of the present invention can be manufactured by combining the spacer combined with the residue of the pharmaceutical compound to the carboxyl group of the carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol produced by performing it above. The combination with a spacer and the carboxyl group of carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol, Generally, it can form by combining the amino terminal amino group of a spacer, and the carboxyl group of carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol by acid amide bonds. But the combination with a spacer and the carboxyl group of carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol may be combination which is not limited to the above-mentioned thing and used other chemical bonds, and 1 or two or more spacers. For example, an acid anhydride may be made to form by the C terminal carboxyl group of a spacer, and the carboxyl group of carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol. The acid amide bonds of each carboxyl group may be carried out to each amino group of diamine, using diamine compounds, such as ethylenediamine, as a spacer.

[0032]In combining the amino terminal amino group of a spacer, and the carboxyl group of carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol by acid amide bonds, N like the usual dehydration condensation agent used for a synthesis of a peptide chain, for example, N,N'-dicyclohexylcarbodiimide, (DCC), N'-dicycloalkyl carbodiimide, Carbodiimide derivatives, such as a 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDAPC), 1-carboethoxy- 2 besides benzotriazole derivatives like 1-hydroxybenzotriazol (HOBT) - Ethoxy- 1,2 - Dihydroxyquinoline (EEDQ) etc. can be used. It may react by the active ester process, the acid halide method, etc.

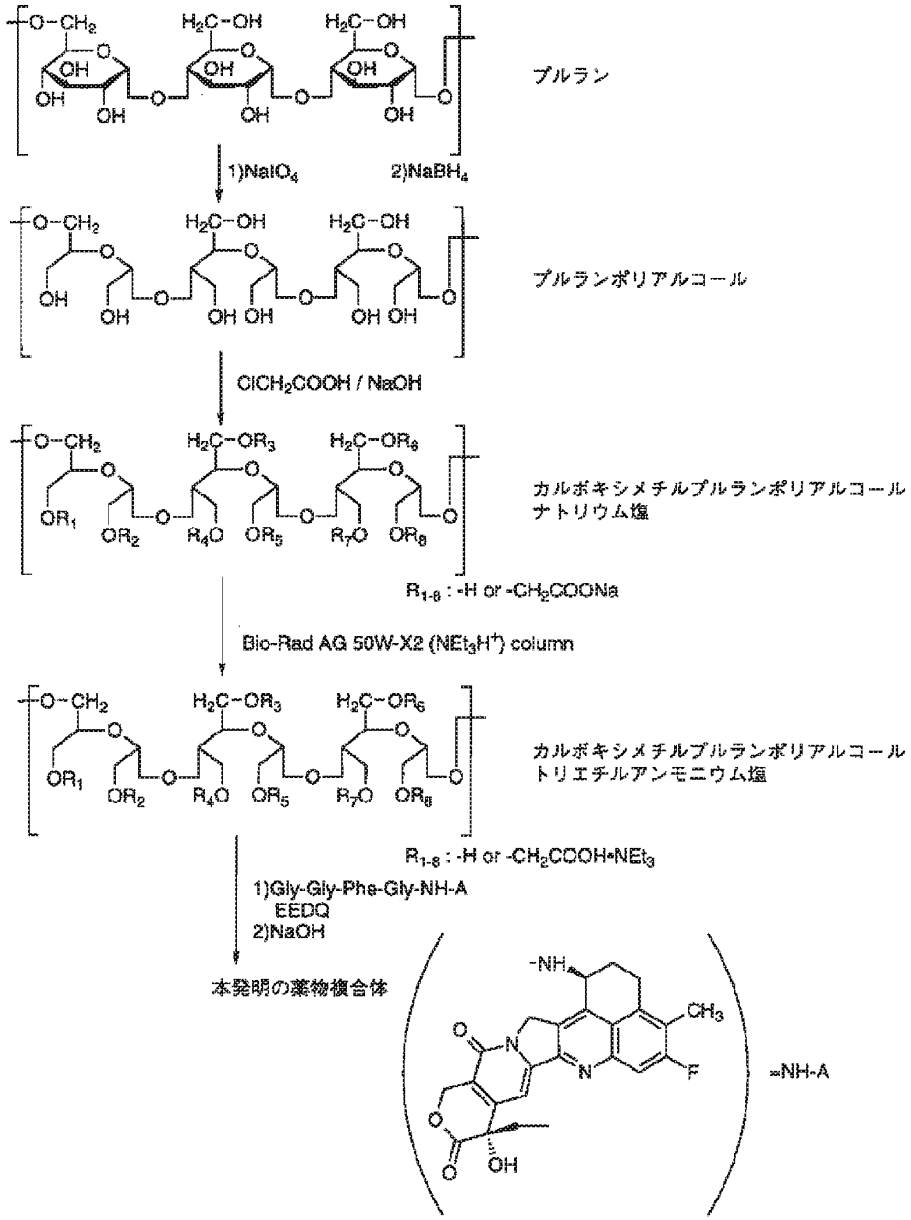
[0033]Although the quantity in particular of the pharmaceutical compound residue introduced into carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol is not limited, it should be suitably chosen from viewpoints of the physicochemical quality of a pharmaceutical compound residue and the moving state of the drug conjugate of the present invention in the living body, drug effect, toxicity, etc. Generally, it is 4-7 especially preferably three to 10% by weight still more preferably one to 15% by weight preferably 0.1 to 30% by weight. The range of a weight % degree can be chosen. For example, the ratio of the pharmaceutical compound residue introduced into carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol can be easily determined by absorbance analysis etc.

[0034]Although a manufacturing method is shown in the following schemes about the case where the

residue of the pharmaceutical compound which is the antitumor agent described in Claim 2 of JP,6-87746,A as an example of the manufacturing method of the drug conjugate of the present invention is introduced, A drug conjugate of the present invention and a manufacturing method for the same are not limited to what was shown in this scheme. In the following scheme, the introduction amount of a pharmaceutical compound residue is about 2 to 10 % by weight preferably one to 15% by weight, for example. Although only the constitutional unit into which one piece or two carboxymethyl groups were introduced among the constitutional units of polyalcohols was described in illustration into the following scheme, he should understand that the polysaccharide derivative portion of the drug conjugate of the present invention is not what is constituted by repetition of the above-mentioned constitutional unit.

[0035]

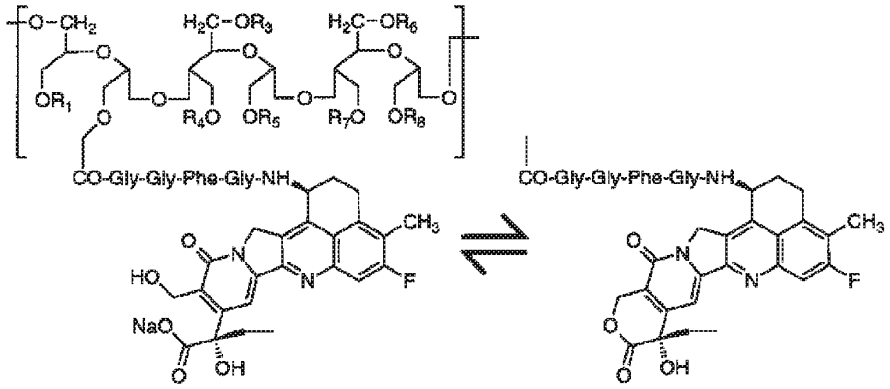
[Chemical formula 1]



[0036]

(translation)
JPH11-092405

[Chemical formula 2]
本発明の薬物複合体



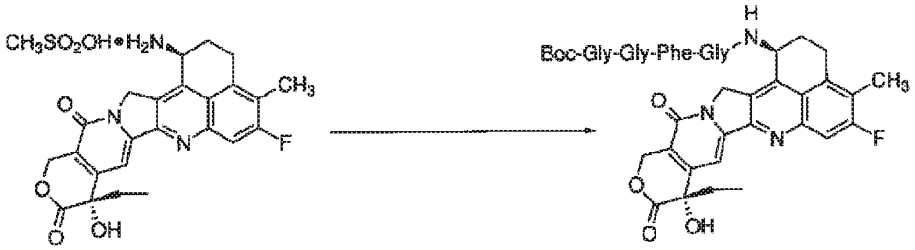
[0037]Although it is known in the acid water nature medium (for example, about three pH) that a balance inclines toward the compound (ring closure object) in which the lactone ring was formed, and a balance inclines toward the compound (ring-opened body) in which the lactone ring carried out ring opening in the basic aqueous medium (for example, about ten pH) on the other hand, the above-mentioned pharmaceutical compound, The drug conjugate which introduced the residue corresponding to such a ring closure object and a ring-opened body has equivalent anticancer efficacy, and it cannot be overemphasized that all are included by the range of the present invention. If the reacting species the lactone ring carried out [reacting species] ring opening exist in the system of reaction, the uniform drug conjugate which a reaction yield is not only deteriorated remarkably, but a condensation reaction advances between the carboxyl group originating in a lactone ring and the amino group of spacer origin, and it makes into the purpose may not be obtained. Such a side reaction is avoidable by using a ring closure object selectively as reacting species.

[0038]Namely, after converting the sodium salt of carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol to triethylammonium salt, By making the amino terminal amino group of the spacer which combined the residue of the above-mentioned pharmaceutical compound to the carboxyl group of carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol by the nonaqueous system (inside of the organic solvent which does not contain water) condense, A side reaction can be inhibited and it becomes possible to manufacture an object efficiently. As a salt of the carboxy C_{1-4} alkyl pullulan polyalcohol which can dissolve in an organic solvent, For example, it is possible to use the salt of the organic base of N-methyl morpholine, N-methylpyrrolidine, dimethylamino pyridine (DMAP) besides trialkylammonium salts, such as triethylammonium salt and trimethylammonium salt, etc. N.N-dimethylformamide, dimethyl sulfoxide, etc. can be used as an organic solvent.

[0039]According to the kind (for example, residue of pharmaceutical compounds, such as an antitumor agent or an anti-inflammatory agent) of residue of a pharmaceutical compound, the drug conjugate of the present invention, It has the characteristics that the toxicity which can be made to reveal desired medicine activity specifically on parts, such as a tumor site and an inflammation part, and the pharmaceutical compound itself has can be reduced. Although not necessarily adhered to what kind of specific theory, since the polysaccharide derivative portion (for example, carboxymethyl pullulan polyalcohol) of the drug conjugate of the present invention has the extremely outstanding retentivity in blood, and the accumulation nature to a tumor and an inflammation part, it is useful as a carrier of drug delivery, The drug conjugate of the present invention has tumor selectivity and inflammation part selectivity. Since it is thought that protease (peptidase) is revealed by the tumor site or the inflammation part, the spacer of the drug conjugate of the present invention is hydrolyzed easily, and

the separated pharmaceutical compound exerts drug effect.
[0040]the medicine containing the drug conjugate of the present invention can usually be filled up with the form of a freeze-drying article etc. into a vial etc. -- business -- the time -- a dissolved type -- although provided for clinical as pharmaceutical preparation for parenteral administration, such as an object for injection, or pharmaceutical preparation for a drop by drop titration, the medicinal formulation of the present invention is not limited to the above-mentioned mode. The available additive for pharmaceutical preparation can be used for manufacture of the above-mentioned pharmaceutical preparation in this industry, such as a solubilizing agent, a pH regulator, and a stabilizing agent, for example. Although the medicinal dose in particular of the present invention is not limited, it should usually take into consideration and determine the dose of the pharmaceutical compound which constitutes a pharmaceutical compound residue, the quantity of the residue of the pharmaceutical compound introduced into the drug conjugate of the present invention, a patient's condition, the kind of disease, etc. For example, the residue of the antitumor agent described in Claim 2 of JP,6-87746,A is about 6 % by weight. In carrying out parenteral administration of the drug conjugate of the present invention introduced at a ratio which is a degree, general -- per day -- per surface-area-of-a-body 1 m^2 -- the abbreviation 1 - a 500 mg degree -- a medicine is preferably prescribed once for the patient in the range of about ten to 100 mg -- repeating for every 3-4 week is preferable.
[0041]
[Working example]Hereafter, although the present invention is described still more specifically according to an working example, the range of the present invention is not limited to the following working example. In the pharmaceutical compound (it is called "DX-8951" among an working example.) by which "A-NH -" was described in Claim 2 of JP,6-87746,A among the working example, the pharmaceutical compound in which the lactone ring carried out the ring closure -- $A-NH_2$ -- a table -- the bottom expresses the pharmaceutical compound residue of a case (the basis shown by A-NH- in the above-mentioned scheme: thing in which the lactone ring was formed). A'-NH- shows that the lactone ring in the pharmaceutical compound residue denoted by A-NH- is ring closure type or ring opening type either or those mixed form voice.
[0042]The degree of carboxymethyl-izing of carboxymethyl pullulan polyalcohol (the degree of substitution of the carboxymethyl group per constituent sugar residue), It asked by dissolving in the 0.1N sodium hydroxide aqueous solution after converting the sodium salt of carboxymethyl pullulan polyalcohol to a free acid type, and titrating with 0.1N chloride. It is an aqueous solution of the sodium salt of carboxymethyl pullulan polyalcohol Bio-Rad AG50 W-x 2 (H^+) The column was given, passage liquid was freeze-dried and it used as a sample. This sample was dissolved in the 0.1N sodium hydroxide aqueous solution of the predetermined excessive amount, and it titrated with 0.1N chloride by using a phenolphthalein as an indicator. The titration value of a (ml) and 0.1N chloride was set [the output of the sample] to b (ml) for the predetermined excessive amount of s (mg) and a 0.1N sodium hydroxide aqueous solution, and it asked for the degree of carboxymethyl-izing by the formula of 15.4(a-b)/[s-5.8 (a-b)]. The introduction amount (% by weight) of the drug was calculated from the absorbance analysis using the characteristic absorption of the drug (near 362 nm). Gel filtration technique was performed according to the following conditions (column: TSK gel G4000 PW_{XL}, eluate:0.1M NaCl, flow rate:0.8 ml/min, column temperature:40 degree C).
[0043]Example 1:3'-N-(Boc-Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A[Chemical formula 3]

(translation)
JPH11-092405



Boc-Gly-Gly-Phe-Gly and (600 mg) N-hydroxysuccinimide (160 mg) are dissolved in N.N-dimethylformamide (20 ml), After cooling at 4 degrees C, N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (280 mg) was added. the N.N-dimethylformamide solution (30 ml) which dissolved the methanesulfon acid chloride (600 mg: compound described in the working example 50 of JP,6-87746,A) of DX-8951, and triethylamine (0.16 ml) in this solution --- in addition, It was made to react, agitating at a room temperature under protection from light for 16 hours. Decompression hardening by drying of this reaction mixture was carried out, silica gel column chromatography (eluate: dichloromethane:methanol = 10:1 which contain acetic acid 0.5% solution) refined residue, and the mark compound (1.0g) was obtained.

[0044] ^{1}H-NMR () DMSO-$d_6$delta:8.40 (d,1H,J=8.3 Hz), 8.10-8.17 (m,2H), 7.91-8.01 (m,1H), 7.78 (d,1H,J=10.75 Hz), 7.32 (s,1H), 6.94-6. 96 (m,1H), 6.50 (s,1H), 5.57 (t,1H,J= 4.5Hz), 5.43 (s,2H), 5.23 (s,2H), 3.77 (dd,2H,J= 5.85Hz,J=8.80Hz), 3.70 (d,2H,J= 4. 40 Hz, 3.65 (d, 2H, J = 5.35 Hz), and 3.56 (d, 2H, J= 5.85), 3.15-3.25 (m, 2H), 2.40 (s, 3H), 2.05-2.25 (m, 1H), 1.86 (m, 2H), 1.35 (s, 9H), and 0.88.(t, 3H, J = 7.35) Mass; (FAB) m/e 854 (M+1) [0045]3'-N-(Boc-Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A (79 mg) obtained in the example 1 of a synthesis of example 2:3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A trifluoroacetate was melted in trifluoroacetic acid (3 ml), and was neglected for 1 hour. After having distilled off the solvent, and methanol (30 ml's) having performed azeotropy and performing azeotropy twice by ethanol (30 ml), ether washed residue and the mark compound (80 mg) was obtained.

^{1}H-NMR delta (DMSO-d_6): 8.53 (d,1H,J= 8.3Hz), 8.40-8.48 (m,2H), 8.28 (d,1H,J= 8.3Hz), 7.95-8.07 (br,3H), 7.81 (d,1H,J= 10.2Hz), 7.30-7.37 (m,2H), 7.15-7.30 (m, 5H), 6.50-6.55 (br, 1H), 5.50-5.57 (m, 1H), 5.41 (d, 2H, J = 7.82 Hz), and 5.25 (s) 2H), 4.55-4.62 (m,1H), 3.55-3.92 (m,6H), 3.15-3.25 (br,2H),2.98-3.03 (m,1H), 2.73-2.82 (m,1H), 2.40 (s, 3H, 2.05-2.25 (m,1H), 1.84-1.92 (m,2H), 0.88 (t,3H,J= 7.35Hz).

[0046]Example 3: dissolving in 0.1 M acetic acid buffer solution (pH 5.5, 2000 ml), and the synthesis pullulan 200 (g [20], Tokyo Chemicals, and molecular weight 200K) of carboxymethyl pullulan polyalcohol Gly-Gly-Phe-Gly-NH-A', The aqueous solution (2000 ml) of sodium periodate (44 g) was added. After agitating for ten days at 4 degrees C, shading, ethylene glycol (14.0 ml) was added and it agitated overnight. Reaction mixture was adjusted to pH 6.5 using 8 M sodium hydroxide aqueous solution. It agitated overnight, after adding sodium borohydride (19 g) and dissolving. After acetic acid's having adjusted reaction mixture to pH 5.5 and agitating at 4 degrees C for 1 hour, it adjusted to pH 7.5 using 8 M sodium hydroxide aqueous solution. It is bio-Max 30 about the obtained aqueous solution. The ultrafiltration using a film was given and the low molecule fraction was removed. It is the ultrafiltration membrane 1000K (made by a fill TRON company) about the residual solution which does not pass a film. After making it pass, it freeze-dried and pullulan polyalcohol (7 g) was obtained. The molecular weight (gel filtration, pullulan standard) of this substance was 35K.

[0047]In addition to the aqueous solution produced by melting sodium hydroxide (8.4 g) in water (60 ml), this pullulan polyalcohol (2 g) was dissolved at the room temperature. After adding monochloroacetic acid (12 g) to this solution and making it dissolve in it under ice-cooling, it was made to react at a room temperature overnight. Bio-Max 50 after adjusting this reaction mixture the pH to 10 with acetic acid It desalted with the ultrafiltration method using a film. The residual solution which does not pass a

film was freeze-dried and the sodium salt (2.2g) of carboxymethyl pullulan polyalcohol was obtained. The molecular weight (gel filtration, pullulan standard) of this substance was 83K, and the degree of carboxymethyl-izing was 0.5. The sodium salt (1.0 g) of this carboxymethyl pullulan polyalcohol is dissolved in water, and it is Bio-Rad AG 50 W-X2. It put on the column (200-400 a mesh and Et_3NH^+ type), and eluted with water. This eluate was freeze-dried and the triethylammonium salt (1.0 g) of carboxymethyl pullulan polyalcohol was obtained.

[0048]The triethylammonium salt (200 mg) of this carboxymethyl pullulan polyalcohol was dissolved in N.N-dimethylformamide (12 ml). The N.N-dimethylformamide (5 ml) solution of trifluoroacetate (42 mg) of 3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A, and triethylamine (0.014 ml) obtained in Example 2 in this solution, 1-carboethoxy-2- It was made to react, adding ethoxy-1,2-dihydroxyquinoline (200 mg) sequentially, shading, and agitating at a room temperature overnight. Water (300 ml) is added to this reaction mixture, and it is the ultrafiltration membrane 10K (made by a fill TRON company). The ultrafiltration was used and carried out. The residual solution which does not pass a film was set to pH 10 in the 0.1N sodium hydroxide aqueous solution, and the filtration membrane (0.16 micrometer, fill TRON company make) was passed. It is bio-Max 50 about the passed solution. After desalting with the ultrafiltration method using a film and filtering with a Millipore filter (0.22 micrometer) subsequently, it freeze-dried and the mark compound (210 mg) was obtained.

[0049]GPC (column: -- TOSOH TSKGel PW-4000 XL) after dissolving this compound in 0.1M sodium chloride aqueous solution Solvent: The ultraviolet absorption spectrum (0.1 M tris-buffers, pH 9.0, and 0.1 mg/ml) of this compound as a result of analyzing by 0.1M NaCl and flow rate:0.8 ml/min is shown in Fig.1 and Fig.2, respectively.When the content of the pharmaceutical compound residue of this compound was quantified based on the absorbance in 362 nm in the inside of 0.1 M tris buffers (pH 9.0), it was 6.2% (W/W).

[0050]Example 4: the antitumor action mouse fibrosarcoma Meth A cell $1x10^6$ individual of the drug conjugate of the present invention was transplanted to the right groin hypodermic of the male mouse (7 week-old) of a BALB/c system, and the Meth A cancer-bearing mouse was created. 7 Single-dose administration of the drug conjugate of Example 3 which dissolved in distilled water for injection was carried out to the Japanese eye into the caudal vein of a Meth A cancer-bearing mouse. A tumor is extracted 21 days after transplantation, weight is measured, and it is a following formula:tumor growth inhibition rate (%) about a tumor growth inhibition rate. = it computed by [1-(average tumor weight of average tumor weight / control group of sample administration group)] x100. As a result, the drug conjugate of Example 3 showed enhancement of anticancer efficacy, and expansion of the effective dosage region compared with the pharmaceutical compound itself.

[0051]

[Table 2]

被検化合物	投与量(mg/kg)[1]	抑制率(%)
医薬化合物自体	60	77
	20	59
例3の化合物	10	99
	5	96
	2.5	57

[1] pharmaceutical compound equivalent unit [0052]

[Effect of the Invention]A drug conjugate of the present invention which introduced an antitumor agent

as a pharmaceutical compound is excellent in tumor site selectivity.
While being able to exert high antitumor action, it has the characteristics that a toxic manifestation is also reduced.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]
[Drawing 1]It is a figure showing the GPC chart of the drug conjugate (Example 3) of the present invention.
[Drawing 2]It is a figure showing the ultraviolet absorption spectrum of the drug conjugate (Example 3) of the present invention.

(19)日本国特許庁（ＪＰ）　(12)公開特許公報（Ａ）　(11)特許出願公開番号

特開平11－92405

(43)公開日　平成11年(1999)４月６日

(51)Int.Cl.[6]	識別記号	ＦＩ	
Ａ６１Ｋ　47/48		Ａ６１Ｋ　47/48	Ｚ
// Ｃ０７Ｋ　5/103		Ｃ０７Ｋ　5/103	

審査請求　未請求　請求項の数26　ＯＬ　（全 12 頁）

(21)出願番号　特願平9－254780

(22)出願日　平成９年(1997)９月19日

(71)出願人　000002831
第一製薬株式会社
東京都中央区日本橋３丁目14番10号
(71)出願人　390031462
株式会社ディ・ディ・エス研究所
東京都中央区京橋二丁目４番16号
(72)発明者　井上　和弘
東京都江戸川区北葛西１丁目16番13号　第一製薬株式会社東京研究開発センター内
(72)発明者　洲崎　浩
東京都江戸川区北葛西１丁目16番13号　第一製薬株式会社東京研究開発センター内
(74)代理人　弁理士　今村　正純　（外１名）

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　薬物複合体

(57)【要約】
【解決手段】　例えば実質的に完全にポリアルコール化可能な条件下でプルランを処理して得られたプルランポリアルコールと、例えばドキソルビシンなどの医薬化合物の残基とが１個のアミノ酸からなるスペーサー又はペプチド結合した２ないし８個のアミノ酸からなるスペーサーを介して結合していることを特徴とする薬物複合体。
【効果】　腫瘍部位選択性に優れており、高い抗腫瘍作用を発揮できるとともに毒性の発現も軽減されているという特徴を有する。

【特許請求の範囲】

【請求項１】　１個のアミノ酸からなるスペーサー又はペプチド結合した２ないし８個のアミノ酸からなるスペーサーを介してカルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールと医薬化合物の残基とが結合していることを特徴とする薬物複合体。

【請求項２】　カルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールを構成するプルランポリアルコールが、実質的に完全にポリアルコール化可能な条件下でプルランを処理して得られたプルランポリアルコールであることを特徴とする請求項１に記載の薬物複合体。

【請求項３】　カルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールがカルボキシメチルプルランポリアルコールである請求項１または２に記載の薬物複合体。

【請求項４】　医薬化合物が抗腫瘍剤又は抗炎症剤である請求項１ないし３のいずれか１項に記載の薬物複合体。

【請求項５】　医薬化合物が濃度依存型の抗腫瘍作用を発現する抗腫瘍剤である請求項４に記載の薬物複合体。

【請求項６】　医薬化合物が時間に依存した抗腫瘍作用を発現する抗腫瘍剤である請求項４に記載の薬物複合体。

【請求項７】　抗腫瘍剤がドキソルビシン又は（1S,9S)-1- アミノ-9- エチル-5- フルオロ-2,3- ジヒドロ-9- ハイドロキシ-4- メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7] インドリジノ[1,2-b] キノリン-10,13(9H,15H)- ジオンである請求項４に記載の薬物複合体。

【請求項８】　スペーサーが -X-Z-で表されるジペプチド（-X-Z- は疎水性アミノ酸(X) と親水性アミノ酸(Z) とがそれぞれN末端側及びC末端側となってペプチド結合して形成されるジペプチドのN末端のアミノ基及びC末端のカルボキシル基から、それぞれ１個の水素原子及び１個の水酸基を除いた残基を示す）であるか、又は該ジペプチドを部分ペプチド配列として含むスペーサーである請求項５ないし７のいずれか１項に記載の薬物複合体。

【請求項９】　疎水性アミノ酸がフェニルアラニンであり、親水性アミノ酸がグリシンである請求項８に記載の薬物複合体。

【請求項１０】　スペーサーが (N 末端)-Gly-Gly-Phe-Gly-である請求項９に記載の薬物複合体。

【請求項１１】　抗腫瘍剤の残基の導入量が 1～15重量% の範囲である請求項５ないし10のいずれか１項に記載の薬物複合体。

【請求項１２】　抗腫瘍剤の残基の導入量が 3～10重量% の範囲である請求項５ないし10のいずれか１項に記載の薬物複合体。

【請求項１３】　抗腫瘍剤の残基の導入量が 4～7 重量% の範囲である請求項５ないし10のいずれか１項に記載の薬物複合体。

【請求項１４】　H_2N-Gly-Gly-Phe-Gly-COOHで示されるペプチドのN末端がカルボキシメチルプルランポリアルコールのカルボキシル基に酸アミド結合しており、該ペプチドのC末端が (1S,9S)-1- アミノ-9- エチル-5- フルオロ-2,3- ジヒドロ-9- ハイドロキシ-4- メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7] インドリジノ[1,2-b] キノリン-10,13(9H,15H)- ジオンの1-アミノ基と酸アミド結合した請求項１に記載の薬物複合体。

【請求項１５】　(1S,9S)-1- アミノ-9- エチル-5- フルオロ-2,3- ジヒドロ-9- ハイドロキシ-4- メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7] インドリジノ[1,2-b] キノリン-10,13(9H,15H)- ジオン残基の導入量が 2～10重量% の範囲である請求項14に記載の薬物複合体。

【請求項１６】　カルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールが分子量 5,000ないし 500,000の範囲のカルボキシメチルプルランポリアルコールであり、カルボキシメチル化度が 0.01 ～2.66の範囲である請求項14又は15に記載の薬物複合体。

【請求項１７】　カルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールが分子量 10,000 ～350,000 の範囲のカルボキシメチルプルランポリアルコールであり、カルボキシメチル化度が 0.1～1.0 の範囲である請求項14又は15に記載の薬物複合体。

【請求項１８】　カルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールが分子量 50,000 ～200,000 の範囲のカルボキシメチルプルランポリアルコールであり、カルボキシメチル化度が 0.3～0.6 の範囲である請求項14又は15に記載の薬物複合体。

【請求項１９】　(1S,9S)-1- アミノ-9- エチル-5- フルオロ-2,3- ジヒドロ-9- ハイドロキシ-4- メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7] インドリジノ[1,2-b] キノリン-10,13(9H,15H)- ジオン残基の導入量が 5～7 重量% の範囲であり、カルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールの分子量が約 83,000 であり、カルボキシメチル化度が約 0.5である請求項14に記載の薬物複合体。

【請求項２０】　医薬化合物を結合するための薬物送達のキャリアーであって、カルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールからなる薬物送達のキャリアー。

【請求項２１】　カルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールの分子量が 5,000～500,000 の範囲であり、カルボキシC_{1-4}アルキル化度が0.01～2.66の範囲である請求項20に記載の薬物送達のキャリアー。

【請求項２２】　カルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールの分子量が 10,000 ～350,000 の範囲であり、カルボキシC_{1-4}アルキル化度が 0.1～1.0 の範囲である請求項20に記載の薬物送達のキャリアー。

【請求項２３】　カルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールの分子量が 50,000 ～200,000 の範囲であり、カルボキシC_{1-4}アルキル化度が 0.3～0.6 の範囲で

ある請求項20に記載の薬物送達のキャリアー。

【請求項２４】　カルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールがカルボキシメチルプルランポリアルコールである請求項20ないし23のいずれか１項に記載の薬物送達のキャリアー。

【請求項２５】　医薬化合物の残基と結合したカルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールを含む薬物複合体の製造のためのカルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールの使用。

【請求項２６】　医薬化合物の残基とカルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールとがスペーサーを介して、又はスペーサーを介さずに結合した薬物複合体の製造のためのカルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールの使用。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【発明の属する技術分野】本発明は医薬として有用な薬物複合体に関するものである。さらに具体的にいうと、本発明は、多糖誘導体であるカルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールと抗腫瘍剤や抗炎症剤等の医薬化合物とをスペーサーを介して結合させた薬物複合体に関するものである。

【０００２】

【従来の技術】肺癌や消化器癌などの固形癌や白血病などの血液癌の治療に際して用いられる抗腫瘍剤は、静脈内投与や経口投与などの投与経路により全身的に投与された後、特定の腫瘍部位に移行して癌細胞の増殖を阻害ないし抑制することにより治療効果を発揮する。しかしながら、全身投与された抗腫瘍剤は、血中から肝臓・網内系臓器に速やかに取り込まれたり、あるいは速やかに尿中排泄されるために、血中濃度が低下して腫瘍部位への移行が十分でない場合がある。また、通常の抗腫瘍剤自体では腫瘍部位への移行選択性（腫瘍選択性）が低いために、抗腫瘍剤が全身の様々な細胞や組織に満遍なく分布してしまい、正常な細胞や組織に対しても細胞毒として作用するので、嘔吐、発熱、あるいは脱毛などの副作用を極めて高率に発生させるという問題がある。従って、抗腫瘍剤を効率的かつ選択的に腫瘍部位に移行させる手段の開発が求められている。

【０００３】このような手段の一つとして、多糖高分子に抗腫瘍剤を結合させて、抗腫瘍剤の血中からの消失を遅延させ、かつ、癌組織への指向性を高める方法が提案されている。例えば、特公平7-84481 号公報には、カルボキシメチル化されたマンノグルカン誘導体にシッフ塩基や酸アミド結合を介してダウノルビシン、ドキソルビシン、マイトマイシンＣ、又はブレオマイシンなどを導入した薬物複合体が開示されている。この発明におけるマンノグルカン誘導体としては、カルボキシメチル化されたマンノグルカン・ポリアルコールも用いられている。しかしながら、マンノグルカン誘導体は枝分かれが多いので構造が複雑であり、医薬品の製造に適する均一な品質のものを入手することが困難であった。

【０００４】また、国際公開 WO94/19376 号には、カルボキシル基を有する多糖のカルボキシル基にペプチド鎖（アミノ酸数 1～8)が結合されており、さらにこのペプチド鎖を介してドキソルビシン、ダウノルビシン、マイトマイシンＣ、又はブレオマイシンなどを結合した薬物複合体が開示されている。カルボキシル基を有する多糖としては、本来的にその構造中にカルボキシル基を有する多糖（例えば、ヒアルロン酸等）のほか、本来的にその構造中にカルボキシル基を有しない多糖（例えば、プルラン、デキストラン、キチン等）の水酸基にカルボキシC_{1-4}アルキル基を導入するか、あるいはマロン酸やコハク酸などの多塩基性酸をエステル結合させてカルボキシル基を導入した多糖類などが例示されている。この薬物複合体は、ドキソルビシンなどの薬剤と上記多糖部分とがスペーサーを介して結合していることを構造上の特徴としており、ドキソルビシンより優れた抗腫瘍効果が得られるとともに、毒性・副作用が軽減されている。

【０００５】その他、ポリアルコール化多糖誘導体を薬物の送達キャリアーとして用いた薬物複合体に関する技術について、「多糖－ペプチド－ドキソルビシン複合体に関する研究・多糖キャリアーの血中安定性と抗腫瘍効果の関係」（第10回日本ＤＤＳ学会講演要旨集，279，1994）；「多糖－ペプチド－ドキソルビシン複合体に関する研究・体内動態と抗腫瘍効果」（第９回日本薬物動態学会年会講演要旨集,292，1994）；第19回研究開発動向セミナー（医薬品機構主催）要旨集，0-9，1995 ；及び「多糖キャリアーによる腫瘍への薬物送達に関する研究」（第12回コロイド・界面技術シンポジウム，日本化学会，講演要旨集，51，1995）などの報告がある。

【０００６】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、抗腫瘍剤や抗炎症剤などの有効成分を腫瘍部位などに対して部位選択的に移行させることができる薬物複合体を提供することにある。より具体的には、抗腫瘍剤や抗炎症剤などの医薬化合物を部分構造として含む薬物複合体であって、血中に長時間滞留することができ、かつ、腫瘍部位や炎症部位に対して部位選択的に該医薬化合物を送り込むことができる薬物複合体を提供することが本発明の課題である。また、本発明の別の課題は、上記の特徴を有する薬物複合体の製造方法を提供することにある。

【０００７】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記の課題を解決すべく国際公開 WO94/19376 号に開示された薬物複合体の改良を試みた結果、カルボキシル基を有する多糖類に替えて、デキストランをポリアルコール化したデキストラン誘導体をカルボキシC_{1-4}アルキル化したものを多糖部分として用いると、投与後の医薬が長時間にわたって高濃度で維持されるとともに、腫瘍部位や炎症部

位に対する部位選択性を大幅に改善できることを見い出した。また、このような化合物では抗腫瘍効果などの主薬効が顕著に増強されている一方、毒性は低減されていることを見いだした（PCT/JP97/01914）。本発明者はさらに研究を進めた結果、カルボキシアルキルプルランポリアルコールを多糖部分として含む薬物複合体が、カルボキシアルキルデキストランポリアルコールを含む上記の薬物複合体と同様の性質を有していることを見出した。本発明はこれらの知見を基にして完成されたものである。

【０００８】すなわち本発明は、１個のアミノ酸からなるスペーサー又はペプチド結合した２ないし８個のアミノ酸からなるスペーサーを介してカルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールと医薬化合物の残基とが結合していることを特徴とする薬物複合体を提供するものである。また本発明の別の態様により、上記の薬物複合体からなる医薬；及び上記の薬物複合体を有効成分として含む医薬組成物、例えばバイアルに充填された凍結乾燥品の形態の注射用若しくは点滴用の製剤などが提供される。さらに本発明の別の態様によれば、上記の薬物複合体の製造方法が提供される。

【０００９】上記の発明の好ましい態様として、カルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールを構成するプルランポリアルコールが、実質的に完全にポリアルコール化可能な条件下でプルランを処理して得られたプルランポリアルコールであることを特徴とする上記薬物複合体；カルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールがカルボキシメチルプルランポリアルコールである上記薬物複合体；医薬化合物が抗腫瘍剤又は抗炎症剤である上記薬物複合体；医薬化合物が濃度に依存した抗腫瘍作用を発現する抗腫瘍剤（より高い濃度でより強い抗腫瘍作用を発現する抗腫瘍剤：本明細書において濃度依存型の抗腫瘍剤という場合がある）である上記薬物複合体；医薬化合物が時間に依存した抗腫瘍作用を発現する抗腫瘍剤（より長い作用時間でより強い抗腫瘍作用を発現する抗腫瘍剤：本明細書において時間依存型の抗腫瘍剤という場合がある）である上記薬物複合体；並びに、抗腫瘍剤がドキソルビシン又は（1S,9S)-1- アミノ-9- エチル-5- フルオロ-2,3- ジヒドロ-9- ハイドロキシ-4- メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7] インドリジノ[1,2-b] キノリン-10,13(9H,15H)- ジオンである上記薬物複合体が提供される。

【００１０】また、同様に好ましい態様として、スペーサーが -X-Z-で表されるジペプチド（-X-Z- は疎水性アミノ酸(X) と親水性アミノ酸(Z) とがそれぞれN末端側及びC末端側となってペプチド結合して形成されるジペプチドのN末端のアミノ基及びC末端のカルボキシル基から、それぞれ１個の水素原子及び１個の水酸基を除いた残基を意味する）であるか、又は該ジペプチドを部分ペプチド配列として含むスペーサーである上記薬物複合体；疎水性アミノ酸がフェニルアラニンであり、親水性アミノ酸がグリシンである上記薬物複合体；スペーサーが（N 末端)-Gly-Gly-Phe-Gly-である上記薬物複合体；並びに、抗腫瘍剤の残基の導入量が 1～15重量% 、好ましくは 3～10重量% 、さらに好ましくは 4～7 重量% の範囲である上記薬物複合体が提供される。

【００１１】本発明の特に好ましい態様として、H_2N-Gly-Gly-Phe-Gly-COOHで示されるペプチドのN末端がカルボキシメチルプルランポリアルコールのカルボキシル基に酸アミド結合しており、該ペプチドのC末端が（1S,9S)-1- アミノ-9- エチル-5-フルオロ-2,3- ジヒドロ-9- ハイドロキシ-4- メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7] インドリジノ[1,2-b] キノリン-10,13(9H,15H)- ジオンの1-アミノ基と酸アミド結合した上記薬物複合体；（1S,9S)-1- アミノ-9- エチル-5- フルオロ-2,3- ジヒドロ-9- ハイドロキシ-4- メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7] インドリジノ[1,2-b] キノリン-10,13(9H,15H)- ジオン残基の導入量が2～10重量% の範囲である上記薬物複合体；並びに、カルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールが、分子量 5,000～500,000 の範囲、好ましくは 10,000～350,000 の範囲、より好ましくは 50,000 ～200,000 の範囲のカルボキシメチルプルランポリアルコールであり、カルボキシメチル化度が構成糖残基あたり0.01～2.66の範囲、好ましくは 0.1～1.0 の範囲、より好ましくは 0.3～0.6 の範囲である上記薬物複合体が提供される。

【００１２】本発明の別の態様によれば、カルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールからなる薬物送達のキャリアーが提供される。この発明の好ましい態様では、カルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールの分子量が 5,000～500,000 の範囲、好ましくは 10,000～350,000 の範囲、より好ましくは 50,000 ～200,000 の範囲であり、カルボキシC_{1-4}アルキル化度が構成糖残基あたり0.01～2.66の範囲、好ましくは 0.1～1.0 の範囲、より好ましくは 0.3～0.6 の範囲である。カルボキシメチルプルランポリアルコールが最も好ましいキャリアーとして提供される。この発明の別の観点からは、医薬化合物の残基と結合したカルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールを含む薬物複合体の製造のためのカルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールの使用が提供される。

【００１３】この発明の好ましい態様として、医薬化合物の残基とカルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールとがスペーサーを介して結合した薬物複合体の製造のためのカルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールの使用；並びに１個のアミノ酸からなるスペーサー又はペプチド結合した 2～8 個のアミノ酸からなるスペーサーを介してカルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールと医薬化合物の残基とが結合していることを特徴とする薬物複合体の製造のためのカルボキシC_{1-4}アルキ

ルプルランポリアルコールの使用が提供される。

【００１４】

【発明の実施の形態】本発明の薬物複合体は、１個のアミノ酸からなるスペーサー又はペプチド結合した２～８個のアミノ酸からなるスペーサーを介してカルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールと医薬化合物の残基とが結合していることを特徴としている。

【００１５】本発明の薬物複合体に含まれる医薬化合物の残基は、例えば、抗腫瘍剤、抗炎症剤、抗菌剤などの医薬としてヒトを含む哺乳類の病気の治療及び／又は予防に用いられる医薬化合物に由来し、その部分構造により構成される。もっとも、該残基が由来する医薬化合物は上記のものに限定されることはない。また、医薬化合物としてはスペーサーとの結合に関与できる１又は２以上の反応性官能基（例えば、アミノ基、カルボキシル基、水酸基、メルカプト基、エステル基など）を有するものであればいかなるものを用いてもよい。本明細書において医薬化合物という場合には、それ自体が医薬作用を有する化合物の主要構造をその部分構造として含み生体内で該化合物を再生することができるプロドラッグ化合物も含まれる。

【００１６】より具体的には、本明細書において医薬化合物の残基とは、スペーサーと医薬化合物残基との結合が医薬化合物中の反応性官能基とスペーサー中の反応性官能基との反応（例えば脱水縮合など）により形成されたと仮定した場合において、結合後の化合物中に存在する医薬化合物に由来する部分構造を意味している。例えば、医薬化合物が D-NH_2, D-COOH, D-COOR, D-OH, D-SH, D-$CONH_2$, D-NH-COOR(R は低級アルキル基等）で表される場合、医薬化合物の残基はそれぞれ D-NH-(D-NH-CO-Q など), D-CO- (D-CO-NH-Q, D-CO-O-Q, D-CO-S-Q など), D-CO- (D-CO-NH-Q, D-CO-O-Q, D-CO-S-Q など), D-O- (D-O-CO-Q, D-O-Qなど), D-S- (D-S-CO-Q, D-S-Qなど), D-CONH- (D-CO-NH-CO-Qなど), D-NH-CO- (D-NH-CO-O-Q, D-NH-CO-NH-Qなど) で表される（カッコ内はスペーサーと医薬化合物残基との結合を示し、Q はスペーサーから反応性官能基を除いた残りの部分構造を示す）。もっとも、スペーサーと医薬化合物残基との結合の種類は上記のものに限定されることはない。医薬化合物の残基は、スペーサーのＮ末端アミノ基又はＣ末端カルボキシル基のほか、スペーサーを構成するアミノ酸に存在する反応性官能基に結合していてもよい。

【００１７】医薬化合物の残基としては、例えば、ドキソルビシン、ダウノルビシン、マイトマイシンＣ、ブレオマイシン、シクロシチジン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、メトトレキセート、白金系抗腫瘍剤（シスプラチン若しくはその誘導体）、タキソール若しくはその誘導体、カンプトテシン若しくはその誘導体（特開平6-87746 号公報に記載された抗腫瘍剤、好ましくは請求項２に記載された（1S,9S)-1- アミノ-9- エチル-5- フルオロ-2,3- ジヒドロ-9- ハイドロキシ-4- メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7] インドリジノ[1,2-b] キノリン-10,13(9H,15H)- ジオン等）などの抗腫瘍剤の残基を好適に用いることができる。また、例えば、コハク酸ヒドロコルチゾン、コハク酸プレドニゾロンなどのステロイド系抗炎症剤、又はメフェナム酸、フルフェナム酸、ジクロフェナク、イブプロフェン、チノリジンなどの非ステロイド系抗炎症薬の残基も好適である。

【００１８】医薬化合物の残基と結合するスペーサーとしては、１個のアミノ酸からなるスペーサー又はペプチド結合した２～８個のアミノ酸からなるスペーサーを用いることができる。より具体的には、スペーサーは、１個のアミノ酸の残基（アミノ酸のアミノ基及びカルボキシル基からそれぞれ１個の水素原子及び１個の水酸基を除いた残基を意味する）、又はペプチド結合した２ないし８個のアミノ酸からなるオリゴペプチドの残基（Ｎ末端のアミノ基及びＣ末端のカルボキシル基からそれぞれ１個の水素原子及び１個の水酸基を除いた残基を意味する）の形態を有している。

【００１９】好ましいスペーサーは２～６個のアミノ酸からなるオリゴペプチドの残基である。スペーサーを構成するアミノ酸の種類は特に限定されないが、例えば、L-又はD-アミノ酸、好ましくはL-アミノ酸を用いることができ、α－アミノ酸のほか、β－アラニン、ε－アミノカプロン酸、γ－アミノ酪酸などを用いてもよい。このようなα－アミノ酸以外のアミノ酸は、多糖誘導体に近接した位置に配置されることが好ましい。

【００２０】スペーサーの結合方向は特に限定されないが、一般的には、カルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールのカルボキシル基にスペーサーのＮ末端を酸アミド結合によって結合し、医薬化合物のアミノ基にスペーサーのＣ末端を結合することができる。また、例えば、ペプチドスペーサの構成単位としてリジン残基を含めておき、リジン残基のα－アミノ基及びε－アミノ基をそれぞれ他のアミノ酸のカルボキシル基と酸アミド結合させると、ペプチドスペーサーの両末端がＮ末端になるので、医薬化合物のカルボキシル基を結合することが可能になる。さらに、スペーサー中に１個又は２個以上のジアミン化合物またはジカルボン酸化合物の残基（例えばエチレンジアミンなどのジアミンの残基やコハク酸などのジカルボン酸の残基）を構成単位として含めておき、それぞれ両末端がＮ末端のスペーサー及び両末端がＣ末端のスペーサーを利用してもよい。

【００２１】スペーサーのアミノ酸配列は特に限定されないが、例えば、スペーサーが -X-Z- で表されるジペプチドの残基（X は疎水性アミノ酸の残基を示し、Z は親水性アミノ酸の残基を示し、-X-Z- は疎水性アミノ酸(X) と親水性アミノ酸(Z) とがそれぞれＮ末端側及びＣ末端側となってペプチド結合したジペプチドのＮ末端のアミノ基及びＣ末端のカルボキシル基からそれぞれ１個

の水素原子及び１個の水酸基を除いた残基を意味する）であるか、又は該ジペプチドの残基を部分ペプチド配列として含むスペーサーを好適に用いることができる。疎水性アミノ酸としては、例えば、フェニルアラニン、チロシン、ロイシンなどを用いることができ、親水性アミノ酸としては、例えば、グリシン、アラニンなどを用いることができる。スペーサーがこのようなジペプチド残基の繰り返し配列（例えば-X-Z-X-Z-，-X-Z-X-Z-X-Z-など）を有していてもよい。

【００２２】このようなジペプチド構造を含むスペーサーを用いると、スペーサーがペプチダーゼが豊富であると考えられる腫瘍部位や炎症部位で加水分解され、当該部位において医薬化合物が高濃度に遊離する。上記ジペプチドを含むスペーサーと医薬化合物とが結合して形成される部分構造は本発明の薬物複合体の好ましい部分構造である。医薬化合物の残基として、例えば、濃度依存型の抗腫瘍剤（例えば、ドキソルビシン）などを用いる場合には、-X-Z- で示される上記のジペプチド残基からなるスペーサー又は該ジペプチド残基を部分ペプチド配列として含むスペーサーを用いることが特に好ましい。

【００２３】また、医薬化合物の残基として、一定の濃度以上で作用時間の持続を必要とする時間依存型の抗腫瘍剤を用いる場合にも、上記のスペーサーを用いることによって高い抗腫瘍効果を達成できる場合がある。このような抗腫瘍剤として、例えば、特開平6-87746号公報に記載された抗腫瘍剤、好ましくは請求項２に記載された抗腫瘍剤が挙げられる。一般的には、上記のスペーサーに限定されることなく、抗腫瘍剤の作用機作、体内動態や毒性発現の特徴、体内での抗腫瘍剤の遊離性などの観点から好ましいスペーサーを選択する必要がある。なお、一般的に、増殖の速い癌種に対しては、短時間に高濃度の医薬化合物を遊離することができる上記のスペーサーを選択することが好ましい。

【００２４】スペーサーの具体例を以下の表に示すが、本発明の薬物複合体に用いられるスペーサーは以下のものに限定されることはなく、医薬化合物の至適な遊離速度を与えるように当業者が適宜選択可能であることはいうまでもない。表中、ペプチド配列は左側がN末端であり、C末端側に医薬化合物の残基が結合する。D-PheはD-フェニルアラニン残基を示し、その他のアミノ酸はL-アミノ酸を示す。なお、遊離速度の大小はドキソルビシンを結合した薬物複合体の Walker 256 担癌ラットに対する薬効の発現の程度、または Walker 256 担癌ラットの腫瘍部位における遊離ドキソルビシン濃度によって判定したものである。これらのスペーサーのうち、ドキソルビシンに対しては（N 末端）-Gly-Gly-Phe-Gly-等の短時間に高濃度の医薬化合物を遊離することができるスペーサーを用いることが好ましい。

【００２５】

【表１】

(a) 遊離速度が大きいスペーサー
-Leu-Gly-
-Tyr-Gly-
-Phe-Gly-
-Gly-Phe-Gly-
-Gly-Gly-Phe-Gly-
-Gly-Phe-Gly-Gly-
-Phe-Gly-Gly-Gly-
-Phe-Phe-Gly-Gly-
-Gly-Gly-Gly-Phe-Gly-
(b) 遊離速度が比較的大きいスペーサー
-Gly-Gly-Phe-Phe-
-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-
(c) 遊離速度が比較的小さいスペーサー
-Phe-Phe-
-Ala-Gly-
-Pro-Gly-
-Gly-Gly-Gly-Phe-
(d) 遊離速度が小さいスペーサー
-Gly-
-D-Phe-Gly-
-Gly-Phe-
-Ser-Gly-
-Gly-Gly-
-Gly-Gly-Gly-
-Gly-Gly-Gly-Gly-

【００２６】プルランはマルトトリオース残基がα１→６結合で連なった水溶性のα－グルカンであり、一般的には Aureobasidium pullulansによってスクロースなどから細胞外多糖として生産されたものを市販品として入手することができるが、本発明の薬物複合体の製造に用いるためのプルランの由来は上記のものに限定されることはない。プルランの分子量は特に限定されないが、例えば、分子量が 10,000 程度から 2,000,000程度のもの、好ましくは 100,000程度から1,000,000 程度のものを用いることができる。

【００２７】本発明の薬物複合体の多糖誘導体部分を構成するカルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールのポリアルコール化度は特に限定されないが、カルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールを構成するプルランポリアルコールが、実質的に完全にポリアルコール化可能な条件下においてプルランを処理して得られたものであることが好ましい。例えば、プルランに大過剰の過ヨウ素酸ナトリウムと水素化ホウ素ナトリウムとを順次作用させてプルランを実質的に完全にポリアルコール化したプルランポリアルコールは、本発明の薬物複合体の原料化合物として好適である。もっとも、プルランのポリアルコール化の方法は上記のものに限定されることはなく、当業者に利用可能なものであればいかなる方法

を採用してもよい。

【００２８】カルボキシC_{1-4}アルキル基を構成するC_{1-4}アルキルとしては、直鎖又は分枝鎖のC_{1-4}アルキル、具体的にはメチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、sec-ブチル基などを用いることができるが、好ましくはメチル基を用いることができる。カルボキシC_{1-4}アルキル化は、例えば、プルランポリアルコールの水酸基に対してクロル酢酸、ブロム酢酸、α－クロルプロピオン酸、α－メチル－α－クロルプロピオン酸、β－クロルプロピオン酸、α－メチル－β－クロルプロピオン酸、α－クロル酪酸、β－クロル酪酸、γ－クロル酪酸などのハロゲン化C_{1-4}アルキルカルボン酸、好ましくはクロル酢酸を反応させて水酸基を部分的又は完全にカルボキシC_{1-4}アルキル化することにより行うことができる。

【００２９】例えば、プルランポリアルコールを反応に関与しない不活性溶媒（例えば、水、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド等）に溶解し、塩基（例えば、水酸化ナトリウムや水酸化カリウム等）の存在下にハロゲン化C_{1-4}アルキルカルボン酸またはその塩を添加し、氷冷下ないし100 ℃程度の温度範囲で数分ないし数日間反応させればよい。カルボキシC_{1-4}アルキル基の導入の程度は、例えば、カルボキシC_{1-4}アルキル化の反応温度や試薬として用いるハロゲン化C_{1-4}アルキルカルボン酸及び塩基の量を適宜選択することにより容易に調節可能であり、そのような手段は当業者に周知である。プルランポリアルコールの水酸基に対するカルボキシC_{1-4}アルキル化の程度は特に限定されないが、例えば、構成糖残基あたり0.01～2.66の範囲、好ましくは0.1～1.0 、より好ましくは 0.3～0.6の範囲である。カルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールの分子量は、ゲル ろ過法で測定した場合に 5,000から 500,000程度、好ましくは 10,000 ～350,000 程度、より好ましくは 50,000 ～200,000 程度である。

【００３０】上記のカルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールは、薬物送達のキャリアーとして有用である。医薬化合物とカルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールとを結合させた薬物複合体は、例えば、腫瘍選択性などの優れた選択性を有しており、また高い血中濃度を長時間維持できるという特徴がある。医薬化合物とカルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールとの結合としては、例えば、エステル結合などで両者を直接結合させる方法、上記に説明したスペーサーなどの適宜のスペーサーを介して両者を結合させる方法などを採用することができる。

【００３１】スペーサーを介して結合する薬物複合体に関しては、上記のようにして得られるカルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールのカルボキシル基に対して、医薬化合物の残基と結合させたスペーサーを結合することにより本発明の薬物複合体を製造することができる。スペーサーとカルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールのカルボキシル基との結合は、一般的には、スペーサーのN末端アミノ基とカルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールのカルボキシル基とを酸アミド結合により結合させることにより形成できる。もっとも、スペーサーとカルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールのカルボキシル基との結合は上記のものに限定されることはなく、他の化学結合や１又は２以上のスペーサーを利用した結合であってもよい。例えば、スペーサーのC末端カルボキシル基とカルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールのカルボキシル基とにより酸無水物を形成させてもよく、また、エチレンジアミン等のジアミン化合物をスペーサーとして用いてそれぞれのカルボキシル基をジアミンの各アミノ基に酸アミド結合させてもよい。

【００３２】スペーサーのN末端アミノ基とカルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールのカルボキシル基とを酸アミド結合により結合させる場合には、ペプチド鎖の合成に用いる通常の脱水縮合剤、例えば、 N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC) のような N,N'-ジシクロアルキルカルボジイミド類、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド(EDAPC) 等のカルボジイミド誘導体、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT)のようなベンゾトリアゾール誘導体のほか、1-エトキシカルボニル-2- エトキシ-1,2- ジヒドロキシキノリン(EEDQ)などを用いることができる。また、活性エステル法や酸ハライド法などにより反応を行ってもよい。

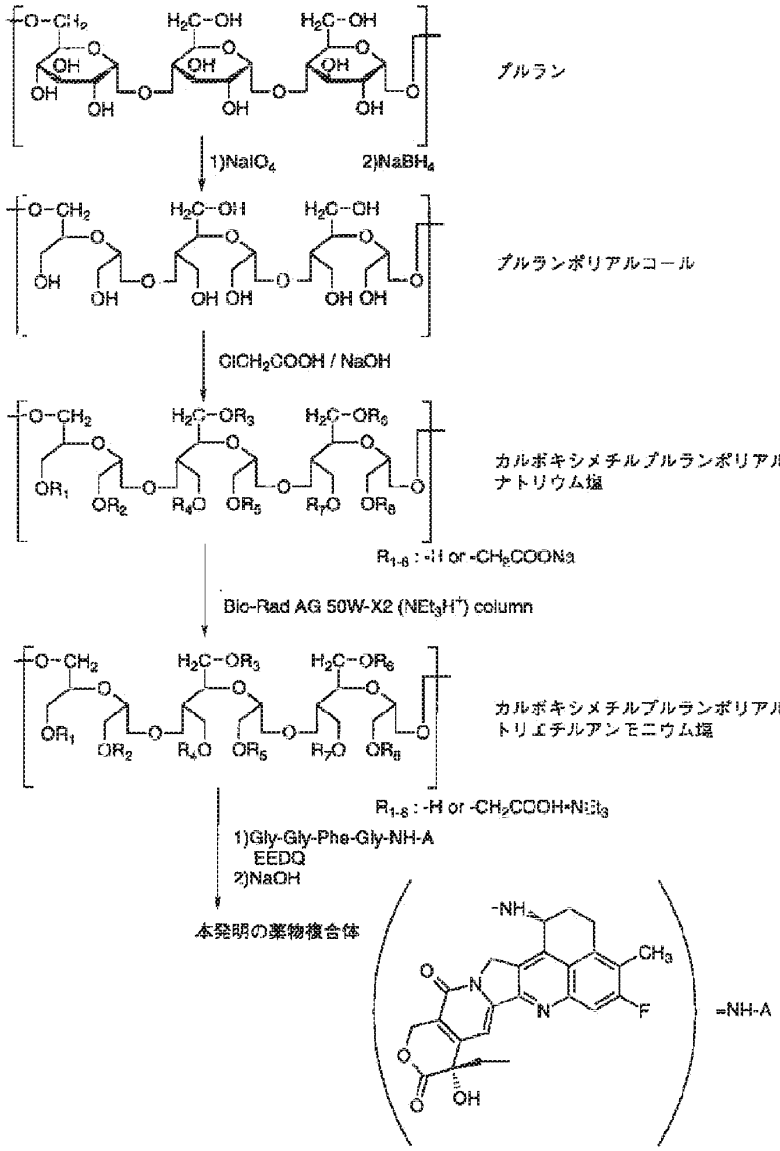
【００３３】カルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールに導入する医薬化合物残基の量は特に限定されないが、医薬化合物残基の物理化学的性質、並びに本発明の薬物複合体の体内動態、薬効、及び毒性などの観点から適宜選択すべきである。一般的には、0.1 ～30重量％、好ましくは 1～15重量％、さらに好ましくは 3～10重量％、特に好ましくは 4～7 重量％程度の範囲を選択することができる。カルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールに導入された医薬化合物残基の割合は、例えば、吸光度分析などにより容易に決定することが可能である。

【００３４】本発明の薬物複合体の製造方法の一例として、特開平6-87746 号公報の請求項２に記載された抗腫瘍剤である医薬化合物の残基を導入する場合について、製造方法を以下のスキームに示すが、本発明の薬物複合体及びその製造方法はこのスキームに示されたものに限定されることはない。下記スキームにおいて、医薬化合物残基の導入量は、例えば 1～15重量％、好ましくは 2～10重量％程度である。また、下記スキーム中には、ポリアルコール類の構成単位のうち１個又は２個のカルボキシメチル基が導入された構成単位のみを例示的に記載したが、本発明の薬物複合体の多糖誘導体部分は上記構成単位の繰り返しによって構成されるものではないこと

を理解すべきである。

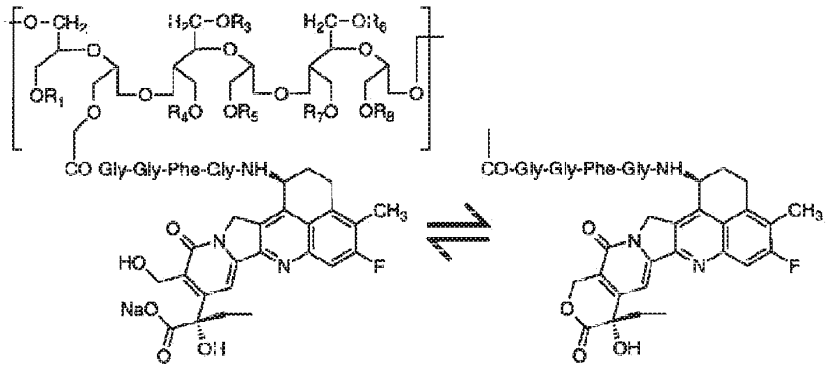
【００３５】

【化１】



【００３６】

本発明の薬物複合体



【００３７】上記の医薬化合物は、酸性水性媒体中（例えばpH 3程度）ではラクトン環を形成した化合物（閉環体）に平衡が偏り、一方、塩基性水性媒体中（例えばpH 10程度）ではラクトン環が開環した化合物（開環体）に平衡が偏ることが知られているが、このような閉環体及び開環体に対応する残基を導入した薬物複合体は同等の抗腫瘍効果を有しており、いずれも本発明の範囲に包含されることはいうまでもない。なお、反応系中にラクトン環の開環した反応種が存在すると、ラクトン環に由来するカルボキシル基とスペーサー由来のアミノ基との間で縮合反応が進行して著しく反応収率が低下するだけでなく、目的とする均一な薬物複合体が得られない場合がある。このような副反応は反応種として選択的に閉環体を用いることによって回避することができる。

【００３８】すなわち、カルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールのナトリウム塩をトリエチルアンモニウム塩に変換した後、非水系（水を含まない有機溶媒中）でカルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールのカルボキシル基に対して、上記の医薬化合物の残基を結合させたスペーサーのN末端アミノ基を縮合させることにより、副反応を抑制することができ、効率的に目的物を製造することが可能になる。有機溶媒に溶解可能なカルボキシC_{1-4}アルキルプルランポリアルコールの塩としては、例えば、トリエチルアンモニウム塩やトリメチルアンモニウム塩などのトリアルキルアンモニウム塩のほか、N-メチルピロリジン、N-メチルモルホリン、ジメチルアミノピリジン（DMAP）などの有機塩基の塩を用いることが可能である。有機溶媒としては、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシドなどを用いることができる。

【００３９】本発明の薬物複合体は、医薬化合物の残基の種類（例えば、抗腫瘍剤または抗炎症剤などの医薬化合物の残基）に応じて、所望の医薬活性を腫瘍部位や炎症部位などの局所において特異的に発現させることができ、かつ、医薬化合物自体の有する毒性を低減できるという特徴を有する。いかなる特定の理論に拘泥するわけではないが、本発明の薬物複合体の多糖誘導体部分（例えばカルボキシメチルプルランポリアルコール）は極めて優れた血中滞留性及び腫瘍・炎症部位への集積性を有するので薬物送達のキャリアーとして有用であり、本発明の薬物複合体は腫瘍選択性及び炎症部位選択性を有している。また、腫瘍部位や炎症部位ではプロテアーゼ（ペプチダーゼ）が発現されていると考えられるので、本発明の薬物複合体のスペーサーは容易に加水分解され、遊離した医薬化合物が薬効を発揮する。

【００４０】本発明の薬物複合体を含む医薬は、通常、凍結乾燥品などの形態でバイアル等に充填することができ、用時溶解型の注射用または点滴用製剤等の非経口投与用製剤として臨床に提供されるが、本発明の医薬の製剤形態は上記態様に限定されることはない。上記製剤の製造には、例えば、溶解補助剤、pH調節剤、安定化剤など当業界で利用可能な製剤用添加物を用いることができる。本発明の医薬の投与量は特に限定されないが、通常は、医薬化合物残基を構成する医薬化合物の投与量、本発明の薬物複合体中に導入された医薬化合物の残基の量、患者の状態や疾患の種類などを勘案して決定すべきである。例えば、特開平6-87746 号公報の請求項２に記載された抗腫瘍剤の残基が約６重量% 程度の割合で導入された本発明の薬物複合体を非経口投与する場合には、一般に一日あたり体表面積 1 m^2 につき約 1～500 mg程度、好ましくは約10～100 mgの範囲で一回投与し、 3～4 週毎に繰り返すことが好ましい。

【００４１】

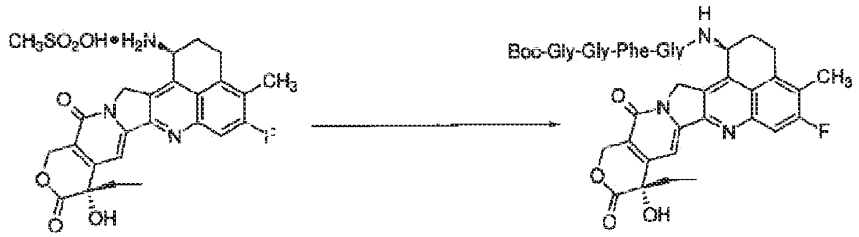
【実施例】以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。実施例中、「A-NH- 」は、特開平6-87746 号公報の請求項２に記載された医薬化合物（実施例中、「DX-8951 」という。）において、ラクトン環が閉環した医薬化合物を A-NH_2で表した場合の医薬化合物残基を表す（上記のスキーム中にA-NH- で示した基：ラクトン環を形成したもの）。A'-NH-は、A-NH- で表される医薬化合物残基中のラクトン環が閉環型若しくは開環型のいずれか又はそれらの混合形態であることを示す。

【００４２】また、カルボキシメチルプルランポリアル

コールのカルボキシメチル化度（構成糖残基あたりのカルボキシメチル基の置換度）は、カルボキシメチルプルランポリアルコールのナトリウム塩を遊離酸型に変換した後、0.1N 水酸化ナトリウム水溶液に溶解して 0.1N 塩酸で滴定することにより求めた。カルボキシメチルプルランポリアルコールのナトリウム塩の水溶液を Bio-Rad AG50W-x 2(H^+) カラムに付して通過液を凍結乾燥して試料として用いた。この試料を所定過剰量の0.1N 水酸化ナトリウム水溶液に溶解し、フェノールフタレンを指示薬として 0.1N 塩酸で滴定した。試料の採取量を s (mg)、0.1N 水酸化ナトリウム水溶液の所定過剰量を a (ml)、0.1N 塩酸の滴定量を b(ml)とし、カルボキシメチル化度を 15.4(a-b)/{s-5.8(a-b)} の式により求めた。また、薬物の導入量（重量%）は、薬物の特性吸収を利用した吸光度分析（362 nm付近）から求めた。さらに、ゲル沪過法は次の条件に従って行った（カラム：TSK gel G4000 PW_{XL}、溶離液：0.1M NaCl、流速：0.8 ml/min、カラム温度：40℃）。

【００４３】例１：3'-N-(Boc-Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A

【化３】



Boc-Gly-Gly-Phe-Gly (600 mg)および N- ヒドロキシスクシンイミド (160 mg) を N,N- ジメチルホルムアミド (20 ml)に溶解し、4℃に冷却した後、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (280 mg) を添加した。この溶液にDX-8951 のメタンスルホン酸塩 (600 mg: 特開平6-87746 号公報の実施例50に記載された化合物) とトリエチルアミン (0.16 ml)を溶解したN,N-ジメチルホルムアミド (30ml)溶液を加えて、遮光下に室温で16時間撹拌しながら反応させた。この反応液を減圧乾固し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶出液：0.5%酢酸を含むジクロロメタン：メタノール = 10:1 溶液）で精製して標記化合物 (1.0g)を得た。

【００４４】^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 8.40 (d,1H,J=8.3 Hz), 8.10-8.17 (m,2H), 7.91-8.01 (m,1H), 7.78 (d,1H,J=10.75 Hz), 7.32 (s,1H), 6.94-6.96 (m,1H), 6.50 (s,1H), 5.57 (t,1H,J= 4.5Hz), 5.43 (s,2H), 5.23 (s,2H), 3.77 (dd,2H,J= 5.85Hz,J= 8.80Hz), 3.70 (d,2H,J= 4.40Hz), 3.65 (d,2H,J= 5.35Hz), 3.56 (d,2H,J=5.85), 3.15-3.25 (m,2H), 2.40 (s,3H), 2.05-2.25 (m,1H), 1.86 (m,2H), 1.35 (s,9H), 0.88 (t,3H,J= 7.35).

Mass (FAB); m/e 854 (M+1)

【００４５】例２：3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A トリフルオロ酢酸塩の合成

例１で得た3'-N-(Boc-Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A (79 mg) をトリフルオロ酢酸 (3 ml) に溶かし、１時間放置した。溶媒を留去し、メタノール (30 ml)で共沸を２回、エタノール (30 ml)で共沸を２回行った後、残渣をエーテルで洗浄して、標記化合物 (80 mg)を得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 8.53 (d,1H,J= 8.3Hz), 8.40-8.48 (m,2H), 8.28 (d,1H,J= 8.3Hz), 7.95-8.07 (br,3H), 7.81 (d,1H,J= 10.2Hz), 7.30-7.37 (m,2H), 7.15-7.30 (m,5H), 6.50-6.55 (br,1H), 5.50-5.57 (m,1H), 5.41 (d,2H,J= 7.82Hz), 5.25 (s,2H), 4.55-4.62 (m,1H), 3.55-3.92 (m,6H), 3.15-3.25 (br,2H),2.98-3.03 (m,1H), 2.73-2.82 (m,1H), 2.40 (s,3H), 2.05-2.25 (m,1H), 1.84-1.92 (m,2H), 0.88 (t,3H,J= 7.35Hz).

【００４６】例３：カルボキシメチルプルランポリアルコール－Gly-Gly-Phe-Gly-NH-A' の合成

プルラン200 (20 g, 東京化成, 分子量 200K)を0.1 M 酢酸緩衝液 (pH5.5, 2000 ml) に溶解し、過ヨウ素酸ナトリウム(44 g)の水溶液(2000 ml) を加えた。遮光しながら4℃で10日間撹拌した後、エチレングリコール(14.0 ml) を加え、一晩撹拌した。反応液を8 M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH 6.5 に調整した。水素化ホウ素ナトリウム (19 g) を加えて溶解した後、一晩撹拌した。反応液を酢酸で pH 5.5 に調整して4℃で１時間撹拌した後、8 M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH 7.5 に調整した。得られた水溶液をバイオマックス-30 膜を用いた限外沪過に付して低分子画分の除去を行なった。膜を通過しない残留溶液を限外沪過膜 100K (フィルトロン社製) を通過させた後、凍結乾燥してプルランポリアルコール (7 g)を得た。この物質の分子量（ゲル沪過、プルラン標準）は 35Kであった。

【００４７】このプルランポリアルコール(2 g) を、水酸化ナトリウム (8.4 g)を水 (60 ml)に溶かして得られる水溶液に加え、室温で溶解させた。この溶液に氷冷下でモノクロル酢酸 (12 g) を加えて溶解させた後、室温で一晩反応させた。この反応液を酢酸でpH10に調整した後、バイオマックス-50 膜を用いた限外沪過法により脱塩した。膜を通過しない残留溶液を凍結乾燥してカルボキシメチルプルランポリアルコールのナトリウム塩(2.2 g) を得た。この物質の分子量（ゲル沪過、プルラン標準）は 83Kであり、カルボキシメチル化度は0.5 であっ

た。このカルボキシメチルプルランポリアルコールのナトリウム塩(1.0 g) を水に溶解し、Bio-Rad AG 50W-X2 (200-400 メッシュ、 Et_3NH^+ 型) カラムにのせ、水で溶出した。この溶出液を凍結乾燥してカルボキシメチルプルランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩 (1.0 g)を得た。

【００４８】このカルボキシメチルプルランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩(200 mg)をN,N-ジメチルホルムアミド(12 ml) に溶解させた。この溶液に、例２で得た 3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-Aのトリフルオロ酢酸塩 (42 mg)とトリエチルアミン (0.014 ml) のN,N-ジメチルホルムアミド(5 ml)溶液、1-エトキシカルボニル-2- エトキシ-1,2- ジヒドロキシキノリン(200 mg)を順次加え、遮光して室温で一晩撹拌しながら反応させた。この反応液に水(300 ml) を加え、限外沪過膜 10K (フィルトロン社製) を用いて限外沪過した。膜を通過しない残留溶液を0.1N 水酸化ナトリウム水溶液で pH10 とし、沪過膜 (0.16μm, フィルトロン社製) を通過させた。通過した溶液をバイオマックス-50 膜を用いた限外沪過法により脱塩し、ついでミリポアフィルター (0.22 μm)で沪過した後、凍結乾燥して標記化合物(210 mg)を得た。

【００４９】本化合物を 0.1M 塩化ナトリウム水溶液に溶解後、GPC(カラム：東ソー TSK Gel PW-4000XL、溶媒： 0.1M NaCl、流速：0.8 ml/min) で分析した結果、及び本化合物の紫外線吸収スペクトル (0.1 M トリス緩衝液、pH 9.0、0.1 mg/ml)をそれぞれ図１及び図２に示す。本化合物の医薬化合物残基の含量を0.1 M トリス緩衝液 (pH 9.0) 中での 362 nm における吸光度に基づいて定量したところ 6.2%(W/W) であった。

【００５０】例４：本発明の薬物複合体の抗腫瘍作用
マウス線維肉腫 Meth A 細胞 1×10^6 個を BALB/c 系の雄マウス（7 週齢）の右鼠蹊部皮下に移植して Meth A 担癌マウスを作成した。7 日目に注射用蒸留水に溶解した例３の薬物複合体を Meth A 担癌マウスの尾静脈内に単回投与した。移植後21日目に腫瘍を摘出して重量を測定し、腫瘍増殖抑制率を次式：腫瘍増殖抑制率(%) ＝{1-(検体投与群の平均腫瘍重量／コントロール群の平均腫瘍重量)}×100 により算出した。その結果、例３の薬物複合体は医薬化合物自体に比べて抗腫瘍効果の増強と有効用量域の拡大を示した。

【００５１】

【表２】

被検化合物	投与量(mg/kg)[1)]	抑制率(%)
医薬化合物自体	60	77
	20	59
例３の化合物	10	99
	5	96
	2.5	57

1) 医薬化合物換算量

【００５２】

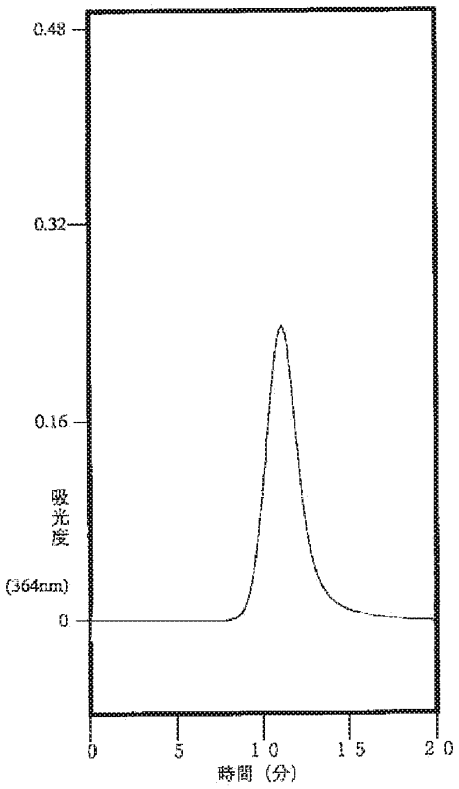
【発明の効果】医薬化合物として抗腫瘍剤を導入した本発明の薬物複合体は、腫瘍部位選択性に優れており、高い抗腫瘍作用を発揮できるとともに、毒性の発現も軽減されているという特徴を有している。

【図面の簡単な説明】

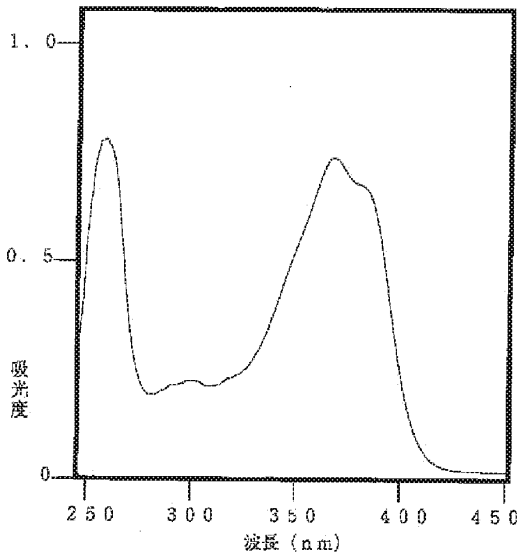
【図１】　本発明の薬物複合体（例３）のGPC チャートを示す図である。

【図２】　本発明の薬物複合体（例３）の紫外線吸収スペクトルを示す図である。

【図１】



【図２】



フロントページの続き

(72)発明者　池田　政浩
東京都江戸川区北葛西１丁目16番13号　第一製薬株式会社東京研究開発センター内

Espacenet

Bibliographic data: JPH1171280 (A) — 1999-03-16

MEDICINE COMPOSITION

Inventor(s): TSUJIHARA KENJI; KAWAGUCHI TAKAYUKI; OKUNO SATORU; YANO TOSHIRO ± (TSUJIHARA KENJI, ; KAWAGUCHI TAKAYUKI, ; OKUNO SATORU, ; YANO TOSHIRO)

Applicant(s): TANABE SEIYAKU CO ± (TANABE SEIYAKU CO LTD)

Classification: **- international:** ***A61K31/435; A61K31/47; A61K31/495; A61K45/00; A61K47/48; A61P35/00; A61P35/02; C07D491/22;*** (IPC1-7): A61K31/435; A61K31/47; A61K31/495; A61K45/00; A61K47/48; C07D491/22

- cooperative:

Application number: JP19980175240 19980623

Priority number(s): JP19980175240 19980623 ; JP19970169746 19970626

Abstract of JPH1171280 (A)

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a medicine composition using a drug delivery system, excellent in antitumor action, reduced in adverse effects, useful as a therapeutic agent for solid tumors, by including a specific camptothecin as an active ingredient. SOLUTION: This composition comprises a camptothecin derivative in which R<6> of a camptothecin of formula I (R<1> to R<5> have a combination in which adjoining two groups of R<1> to R<5> form an alkylene or are two hydrogen atoms, one of the residue is Xn -alkylm -R<6> and the residual two groups are H, etc.; X is O or the like; Alkyl is an alkylene; R<6> is NH2 or the like; (m) and (n) are each 0 or 1) is bonded through an amino acid or a peptide to a carboxyl group- containing polysaccharide or its pharmacologically permissible salt [e.g. a compound of the formula (CM-Dextra.Na is carboxymethyldextran.sodium salt; Gly is glycyl; Phe is phenylalanine)] as an active ingredient. Preferably the objective composition is parenterally administered.

Patent Translate
Powered by EPO and Google

Notice

This translation is machine-generated. It cannot be guaranteed that it is intelligible, accurate, complete, reliable or fit for specific purposes. Critical decisions, such as commercially relevant or financial decisions, should not be based on machine-translation output.

DESCRIPTION JPH1171280

[0001]
TECHNICAL FIELD The present invention relates to a pharmaceutical composition comprising a novel camptothecin derivative exhibiting an enhanced antitumor activity as an active ingredient. More specifically, the present invention relates to a pharmaceutical composition comprising, as an active ingredient, a novel camptothecin derivative comprising a camptothecin compound or the like having an aminoalkoxy group or a hydroxyalkoxy group linked to a polysaccharide having a carboxyl group via an amino acid or peptide. About. The camptothecin derivative, which is the active ingredient of the present invention, can be delivered in large amounts and selectively to the target site of action, and can exert a desired pharmacological action at that site, and the antitumor action of the camptothecin compound is Is significantly enhanced, its side effects are alleviated, and it is extremely useful as a pharmaceutical.

[0002]
[0002] Camptothecin is a kind of plant alkaloid and has the following chemical structural formula:

[0003]

It is known to have anti-leukemic and anti-tumor activity, and its derivative irinotecan hydrochloride (CPT-11) has already been commercially available.

However, while this compound exhibits strong antitumor activity in the clinic, it has the same side effects as other antitumor agents etc. and is limited in its use [Cancer and Chemotherapy, Vol. 21, p. 709 (1994) Year)].

[0004]
In addition, various camptothecin compounds have been synthesized, and it has also been reported that they have antitumor activity (JP-A-1-279891, JP-A-5-222048, JP-A-6-87746, JP-A-6-228141). No., JP-A-4-503505, JP-A-4-502017, etc.).

[0005]

On the other hand, so-called drug delivery systems (Drug Delivery System), in recent years, deliver only the necessary amount of drug to the necessary tissues in order to increase the antitumor activity and minimize the side effects of drugs with strong side effects. Technology has been studied.

In particular, in cancer chemotherapy, there is a problem that sufficient differences in anticancer drug sensitivity can not be obtained between tumor cells and normal cells, and a targeting drug delivery system that selectively delivers anticancer drugs to cancerous lesions. For example, doxorubicin-polysaccharide complex (WO 94/19376), doxorubicin-encapsulated liposome [effect enhancement and targeting therapy for anticancer agent (issued by Science Forum, Inc.), page 227 (1987)] Year), dextran-conjugated mitomycin [effect enhancement of anti-cancer drugs and targeting therapy (issued by Science Forum Co., Ltd.), page 278 (1987)], etc. are known.

[0006]

As described above, while camptothecin compounds have excellent antitumor activity and are extremely useful as pharmaceuticals, they have the problem that their use is severely restricted due to their strong side effects. is there. The present invention provides a pharmaceutical composition comprising, as an active ingredient, a novel camptothecin derivative in which the occurrence of undesirable side effects is suppressed while retaining the excellent drug activity.

[0007]
The present invention relates to a pharmaceutical composition comprising, as an active

ingredient, a camptothecin derivative in which a camptothecin compound having a reactive group is linked to a polysaccharide having a carboxyl group via an amino acid or a peptide.

[0008]
That is, the following general formula having an aminoalkoxy group, a hydroxyalkoxy group etc.

[0009]
[Wherein, in R 1 to R 5, two adjacent ones of (A) R 1 to R 5 are bonded to each other to form an alkylene group, or both of them are hydrogen atoms, and the remaining R 1 to R 5 One of them is -Xn-Alkm-R6, and the other two are hydrogen atoms, or two of (B) R1 to R5 adjacent to each other are bonded to each other to form an alkylene group; Represents that any carbon atom is substituted by -Xn-Alkm-R6, and the remaining three of R1 to R5 are a hydrogen atom, an alkyl group or a halogen atom, and the alkylene group in (A) and (B) In which one or two methylene groups may be replaced by -O-, -S- or -NH-, X is -O- or -NH-, Alk is an alkylene group, and R6 is -NH2,

[0010]
Or R 6 of a camptothecin compound [I], wherein m and n are both 0 or 1 or m is 1 and n is 0, and a polysaccharide having a carboxyl group is It has been found that camptothecin derivatives which are linked via amino acids or peptides have remarkably strong antitumor activity and low toxicity.

[0011]
An object of the present invention is to provide a pharmaceutical composition comprising as an active ingredient a novel camptothecin derivative comprising a camptothecin compound represented by the formula [I] and a polysaccharide having a carboxyl group linked via an amino acid or a peptide. It is.

[0012]

BEST MODE FOR CARRYING OUT THE INVENTION Examples of the camptothecin derivative which is an active ingredient of the present invention include those in which a camptothecin compound [I] and a polysaccharide having a carboxyl group are linked via an amino acid or a peptide.

As a specific example, an acid amide bond of a part or all of carboxyl group of polysaccharide and an amino group of amino acid or peptide is formed, and all or a part of carboxyl group in the amino acid or peptide and R6 of compound [I] Compounds having acid amide bonds or ester bonds can be mentioned, and more specifically, some or all of carboxyl groups of polysaccharides and N-terminal amino groups of amino acids or peptides form acid amide bonds, and the amino acids or peptides The compound etc. which the acid amido bond or ester bond of the C terminal carboxyl group of, and R6 of compound [I] can be mentioned.

[0013]
Each substituent in the compound represented by the formula [I] contains the following groups.

[0014]
Alkylene groups (one or two methylene groups may be replaced by -O-, -S- or -NH-) formed by two adjacent R 1 to R 5 in (A) being bonded to each other As the general formula [I], linear or branched alkylene having 2 to 6 carbon atoms which is formed at positions 7 and 9, 9 and 10, 10 and 11 or 11 and 12 And groups such as ethylene group, trimethylene group, tetramethylene group, pentamethylene group, hexamethylene group, methylmethylene group, methylethylene group and methyltrimethylene group.

[0015]

As an alkylene group in which one methylene group in the alkylene group is replaced by -O-, -S- or -NH-, a terminal methylene group and one methylene group other than the terminal are -O-, -S The alkylene group substituted by-or -NH- is mentioned, and, specifically, a formula -O-Alk'- (Here, "Alk '" means an alkylene group.

An alkyleneoxy group (for example, a methyleneoxy group, an ethyleneoxy group, a trimethyleneoxy group, a tetramethyleneoxy group, a methylethyleneoxy group) represented by the following, and an alkyleneamino group represented by the formula —NH-Alk’ — For example, a methyleneamino group, an ethyleneamino group, a trimethyleneamino group, a tetramethyleneamino group, a methylethyleneamino group); an alkylenethio group represented by the formula -S-Alk'- (for example, a methylenethio group, an ethylenethio group, a trimethylene Thio group, tetramethylenethio group, methylethylenethio group); Formula -Alk'-O-Alk ''-(wherein "Alk" "means an alkylene group which is the same as or different from Alk '.

And the same applies hereinafter) (for example, methyleneoxymethyl group, ethyleneoxymethyl group, trimethyleneoxymethyl group, methylethyleneoxymethyl group) represented by the formula -Alk'-NH-Alk ''- An alkyleneaminoalkyl group (eg, methyleneaminomethyl group, ethyleneaminomethyl group, trimethyleneaminomethyl group, methylethyleneaminomethyl group); an alkylenethioalkyl group represented by the formula -Alk'-S-Alk ''-(eg, And methylenethiomethyl group, ethylenethiomethyl group, trimethylenethiomethyl group, methylethylenethiomethyl group) and the like.

[0016]
Further, as the alkylene group in which two methylene groups of the alkylene group are replaced by -O-, -S- or -NH-, the terminal methylene group and the two methylene groups other than the terminal are -O-, -S And alkylene groups substituted with-or -NH-, specifically, an alkylenedioxy group represented by the formula -O-Alk'-O- (for example, methylenedioxy group, ethylenedioxy group, tri- Methylenedioxy group, tetramethylenedioxy group, methylethylenedioxy group); an alkylenediamino group represented by the formula -NH-Alk'-NH- (for example, methylene diamino group, ethylene diamino group, trimethylene diamino group, tetra Methylene diamino group, methyl ethylene diamino group); alkylene dithio group represented by the formula -S-Alk'-S- (for example, methylene Thio, ethylenedithio group, trimethylene dithio group, tetramethylene dithio group, methyl ethylene dithio group).

[0017]
As Alk in the group represented by the formula -Xn-Alkm-R6, a linear or branched alkylene group having a carbon number of 1 to 6 (for example, methylene group, ethylene group, trimethylene group, tetramethylene group, pentamethylene group, And hexamethylene, methylethylene and methyltrimethylene), and specific examples of the group represented by -Xn-Alkm-R6 include aminoalkyloxy (eg, aminoethyloxy, aminopropyloxy).), Piperazinylalkyloxy (for example, piperazinylethyloxy, piperazinylpropyloxy, piperazinylbutyloxy, piperazinylpentyloxy), hydroxyalkyloxy (for example, hydroxyethyloxy) Group, hydroxypropyloxy group, hydroxybutyloxy group, hydroxyl group Pentyloxy group), aminoalkylamino group (for example, aminoethylamino group, aminopropylamino group, aminobutylamino group, aminopentylamino group), piperazinylalkylamino group (for example, piperazinylethylamino group, pipepe) Razinylpropylamino, piperazinylbutylamino, piperazinylpentylamino), hydroxyalkylamino (eg, hydroxyethylamino, hydroxypropylamino, hydroxybutylamino, hydroxypentylamino), amino Alkyl group (eg, aminomethyl group, aminoethyl group, aminopropyl group, aminobutyl group, aminopentyl group), piperazinylalkyl group (eg, piperazinylmethyl group, piperazinylethyl group, piperazinylpropyl) Group, pipet Dinyl butyl group, piperazinyl pentyl group), hydroxyalkyl group (eg, hydroxymethyl group, hydroxyethyl group, hydroxypropyl group, hydroxybutyl group, hydroxypentyl group), amino group, piperazino group, hydroxy group and the like. .

[0018]

Also, an alkylene group formed by bonding two adjacent ones of R1 to R5 in (B) to each other (even if one or two methylene groups are replaced by -O-, -S- or -NH- As the group in which any carbon atom of the alkylene group is substituted by -Xn-Alkm-R6, 7 and 9 positions, 9 and 10 positions, and the like in the general formula [I] A linear or branched alkylene group having 2 to 6 carbon atoms, which is formed between the 10- and 11-positions or the 11- and 12-positions (for example, ethylene group, trimethylene group, tetramethylene group, pentamethylene group, hexamethylene group) , Methylethylene group, methyltrimethylene group), and one alkylene group in which one methylene group is replaced by —O—, —S— or —NH— and two methylene groups are O -, - Specific examples of the alkylene group is replaced by S- or -NH-, both include the same meanings as defined above.

In addition, -Xn-Alkm-R6 substituted to one of these carbon atoms is also exemplified as described above.

[0019]
Further, as the alkyl group in the remaining groups other than the above R 1 to R 5 adjacent to to form an alkylene group, a linear or branched alkyl group having 1 to 6 carbon atoms (eg, methyl group, ethyl group, and n-propyl group, isopropyl group, n-butyl group, isobutyl group, sec-butyl group, pentyl group and hexyl group), and examples of the halogen atom include fluorine, chlorine, bromine and iodine.

[0020]
Further, as specific camptothecin compounds [I], specific examples of partial structures of ring A and ring B in (A) include the following.

[0021]
[Wherein, X, Alk, R 6, m and n are as defined above]. Further, specific examples of the partial structure of ring A and ring B in (B) include the following.

[0022]
[Wherein, R 11, R 21, R 31, R 41 and R 51 represent an alkyl group, a halogen atom or a

hydrogen atom, and X, Alk, R 6, m and n are as defined above]. Preferred combinations of R 1 to R 5 (1) R1 and R2 are bonded to form a trimethylene group, R3 is 3-aminopropyloxy group, R4 and R5 are hydrogen atoms, and (2) R1 is a piperazinomethyl group, R2 and R5 are hydrogen atoms, and R3 and R4 are bonded The ethylenedioxy group (3) R1 is an aminomethyl group, R2 and R5 are hydrogen atoms, R3 and R4 are bonded, and the ethylenedioxy group (4) R1, R2, R4 and R5 is a hydrogen atom, R3 is 3 -Aminopropyloxy group (5) R1 and R2 combine to form an amino-substituted trimethylene group, R3 is a methyl group, R4 is a fluorine atom, R5 is a hydrogen atom (6) R1, R3, R4 and R5 are hydrogen atoms, R2 is Being an amino group In particular, (1) R1 and R2 are combined to form a trimethylene group, R3 is a 3-aminopropyloxy group, R4 and R5 are hydrogen atoms, (2) R1 is a piperazinomethyl group, R2 and R5 are hydrogen An atom, R3 and R4 are bonded and an ethylenedioxy group (3) R1 and R2 are bonded to form an amino substituted trimethylene group, R3 is a methyl group, R4 is a fluorine atom, R5 is a hydrogen atom (4) R1, R3, R4 And R5 is preferably a hydrogen atom, and R2 is an amino group.

[0023]

In the present invention, the " polysaccharide having a carboxyl group" linked to the camptothecin compound [I] via an amino acid or a peptide includes the same substances as those disclosed in the above-mentioned WO 94/19376 and is inherently And polysaccharides having a carboxyl group in their structure (eg, hyaluronic acid, pectic acid, alginic acid, chondroitin, heparin etc.) and polysaccharides not having a carboxyl group inherently (eg, pullulan, dextran, mannan, chitin) , Mannoglucan, chitosan etc.) introduced with a carboxyl group.

Among them, dextran is particularly preferable as the polysaccharide, and the average molecular weight thereof is 20,000 to 400,000, particularly 50,000 to 150,000 [gel permeation chromatography (GPC) method, New Chemistry Laboratory Lecture Volume 20] It is preferable that it is the range of 7 pages].

What introduced carboxyl group to polysaccharide which does not have carboxyl group originally is that the hydrogen atom of the hydroxyl group of a part or all of the polysaccharide which does not have the carboxyl group is carboxy-C1-4 alkyl group Means something that has been replaced.

[0024]
Further, in the " polysaccharide having a carboxyl group" in the present invention, after

treating the polysaccharide having no carboxyl group originally with a reducing agent, the hydrogen atoms of some or all of the hydroxyl groups are carboxy-C 1-4 Those substituted with alkyl groups are also included.

[0025]

The alkyl moiety of the carboxy-C1-4 alkyl group substituted with the hydrogen atom of the hydroxyl group of the polysaccharide may be either linear or branched.

Preferred examples of the carboxy-C1-4 alkyl group include: carboxymethyl group, 1-carboxyethyl group, 3-carboxypropyl group, 1-methyl-3-carboxypropyl group, 2-methyl-3-carboxypropyl group, 4 -Carboxybutyl group etc. are mentioned, and especially carboxymethyl group and 1-carboxyethyl group are preferable.

[0026]
In the present invention, it is preferable that the polysaccharide having a carboxyl group is carboxymethylated dextran or pullulan.

[0027]

In addition, when introduce | transducing said carboxyalkyl group, the extent of the introduction | transduction can be represented by the "degree of substitution" defined as the number of carboxyalkyl groups per sugar residue.

すなわち、

[0028]

It can be expressed as:

Hereinafter, this degree of substitution is referred to as "degree of carboxymethyl (CM)

conversion" when the carboxyalkyl group is a carboxymethyl group.

[0029]
When the polysaccharide is pullulan, dextran or mannoglucan, when all the hydroxyl groups are substituted, the degree of substitution is 3, preferably 0.3 or more and 0.8 or less.

[0030]
When the polysaccharide is chitin, when all the hydroxyl groups are substituted, the degree of substitution is 2, preferably 0.3 or more and 0.8 or less.

[0031]

In addition, it is necessary that at least one carboxyalkyl group is present in the polysaccharide molecule, except in the case where the polysaccharide originally has a carboxyl group.

Thus, compounds having a degree of substitution of 0 in this sense are excluded from the polysaccharides of the invention.

[0032]
The polysaccharides having these carboxyl groups can be produced by the method described in WO 94/19376.

[0033]

The amino acids to be mediated upon the binding of the camptothecin compound [I] to the polysaccharide having a carboxyl group include both natural amino acids and synthetic amino acids (including D-amino acids, L-amino acids, and mixtures thereof), The amino acid may be any of basic amino acids and acidic amino acids.

Furthermore, not only α -amino acids but also β -amino acids, γ -amino acids, ε -amino acids and the like are included.

Specific examples include glycine, α -alanine, β -alanine, valine, leucine, isoleucine, serine, threonine, cysteine, methionine, aspartic acid, glutamic acid, lysine, arginine, phenylalanine, tyrosine, histidine, tryptophan, proline, oxyproline , Γ -aminobutyric acid, ε -aminocaproic acid and the like.

[0034]

In addition to the peptides derived from the above amino acids, examples of the peptide also include the case where a part of the chain contains a compound other than an amino acid.

For example, dicarboxylic acids such as succinic acid, diamines such as ethylene diamine or diols such as ethylene glycol may be present in or at the end of the peptide chain.

In addition, the binding direction of the peptide chain is usually linked from the N-terminus to the carboxyl group of the polysaccharide via an acid amide bond, but when a basic amino acid (eg, lysine) in the peptide chain is present The binding direction of the peptide chain may be reversed by combining the ε -amino group with the carboxyl group of the polysaccharide and combining the α -amino group with the C-terminal carboxyl group of the peptide chain.

[0035]

Such peptides are peptide bonds of two or more amino acids, that is, two or more peptide chains, and preferably, peptide chains 2 to 5.

Examples of specific peptide chains are, for example, glycyl-glycyl-L or D-phenylalanyl-glycine, glycyl-glycine, glycyl-glycyl-glycine, glycyl-glycyl-glycyl-glycine, glycyl-glycyl-glycyl Glycyl-glycine, L or D-phenylalanyl-glycine, L or D-tyrosyl-glycine or L or D-leucyl-glycine and peptide chains which contain this sequence in the chain (wherein these peptides and The N-terminal side of the peptide chain containing these sequences is linked to the carboxyl group of the polysaccharide).

[0036]

Among these peptides, glycyl-glycyl-L or D-phenylalanyl-glycine, glycyl-glycine, glycyl-glycyl-glycine, glycyl-glycyl-glycyl-glycine, glycyl-glycyl-glycyl-glycyl-glycine, L or D It is more preferable that it is -phenylalanyl-glycine, L or D-leucyl-glycine, and glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-glycine, glycyl-glycine, glycyl-glycyl-glycine, glycyl-glycyl-glycyl-glycine , L or D-phenylalanyl-glycine are particularly preferred.

[0037]
Among the compounds [I], (1) R1 and R2 are combined to form a trimethylene group, R3 is a 3-aminopropyloxy group, R4 and R5 are a hydrogen atom, and (2) R1 is an amino. A methyl group, R2 and R5 are hydrogen atoms, R3 and R4 are bonded to form an ethylenedioxy group, (3) R1 and R2 are bonded to form an amino substituted trimethylene group, R3 is a methyl group, R4 is a fluorine atom, and R5 is hydrogen Or a compound wherein R1, R3, R4 and R5 are a hydrogen atom and R2 is an amino group, and (4) carboxymethylated dextran or pullulan are glycyl-glycyl-L or D-phenylalanyl-glycine, glycyl -Glycine, glycyl-glycyl-glycine, glycyl-glycyl-glycyl-glycine, glycyl-glycyl-glycyl-glycyl-glycine Others L or D- phenylalanyl - can be exemplified formed by bonding through a glycine compound.

[0038]

The camptothecin derivative which is the active ingredient of the present invention can be lead to its pharmacologically acceptable salt, if desired.

Such salts include sodium salts, potassium salts, salts of alkali metals or alkaline earth metals such as calcium salts, arginine salts, amino acid salts such as lysine salts, and the like.

[0039]
The camptothecin derivative or the pharmaceutically acceptable salt thereof which is an active ingredient of the present invention includes any of its inner salt, addition salt, solvate, hydrate and the like.

[0040]
The camptothecin derivative or the pharmaceutically acceptable salt thereof which is the active ingredient of the present invention is preferably administered parenterally (for example, intravenous injection), and usually, a liquid drug (for example, solution, suspension, emulsion) Used as

[0041]
The dosage form of the pharmaceutical composition of the present invention is preferably, for example, injection or drip infusion using distilled water for injection, physiological saline, and aqueous glucose solution.

[0042]
Although the dose of the camptothecin derivative or the pharmaceutically acceptable salt thereof which is an active ingredient of the present invention varies depending on the administration method, the age, body weight, condition and the like of the patient, usually, the camptothecin compound [I Hydrochloride salt when R 6 is the formula: —NH 2, Formula:

[0043]
When it is, it is preferable to administer in the range of 0.02 to 50 mg / kg, particularly 0.1 to 10 mg / kg, in terms of hydrochloride or dihydrochloride.

[0044]

The pharmaceutical composition of the present invention can be suitably used especially as an antitumor agent.

That is, the camptothecin derivative which is the active ingredient of the present invention or a pharmaceutically acceptable salt thereof has excellent antitumor activity.

For example, the camptothecin derivative which is the active ingredient of the present invention or a pharmaceutically acceptable salt thereof exhibits excellent antitumor action in nude mice to which human breast cancer MX-1 cells have been subcutaneously transplanted.

[0045]
Therefore, the pharmaceutical composition of the present invention is a solid tumor [e.g., lung cancer, uterine cancer, ovarian cancer, breast cancer, digestive organ cancer (large intestine cancer, gastric cancer, pancreatic cancer etc.), liver cancer, kidney cancer, prostate cancer, pelvic cancer Head cancer, malignant lymphoma, etc.], liquid tumors (eg, leukemia, etc.).

[0046]
In order to produce a camptothecin derivative which is an active ingredient of the present invention, generally, a method of binding an amino acid or a peptide to a compound represented by the formula [I] and then reacting it with a polysaccharide having a carboxyl group to bind thereto is used. Will be adopted.

[0047]

By reaction of compound [I] with an amino acid or peptide, when R 6 in formula [I] is a formula: —NH 2 or a piperazino group, an acid amide bond is formed between the amino acid or the C-terminal carboxyl group of the amino acid or peptide; When it is -OH, it is ester bond.

At this time, it is preferable to protect other functional groups in the amino acid or peptide which is not involved in the acid amide bond or ester bond, such as N-terminal amino group or other carboxyl group according to a conventional method.

Such a protecting group is not particularly limited as long as it is generally used for protecting amino acids, but, for example, as a protecting group for amino group, t-butoxycarbonyl group, p-methoxybenzyloxycarbonyl group and the like, and carboxyl group As the protecting group of the group, lower alkyl (for example, t-butyl), benzyl and the like can be mentioned.

[0048]
The formation of the acid amide bond and the ester bond can be carried out in a conventional manner, for example, in a suitable solvent (eg, dimethylformamide, tetrahydrofuran, acetonitrile etc.), a condensing agent (eg, dicyclohexylcarbodiimide, 1- (3-) It can be carried out in the presence of dimethylaminopropyl) -3-ethylcarbodiimide hydrochloride and the like.

[0049]

When the amino group or carboxyl group is protected, the camptothecin compound to which the amino acid or peptide obtained as described above is bound has a carboxyl group after the protecting group is removed by a conventional method as necessary. Camptothecin derivatives

are produced by reacting polysaccharides.

By this reaction, an acid amide bond is formed between some or all of the carboxyl groups of the polysaccharide and the N-terminal amino group of the amino acid or peptide bound to the above-mentioned camptothecin compound [I].

[0050]
The reaction of the camptothecin compound [I] with an amino acid or peptide bound thereto and the polysaccharide having a carboxyl group can be carried out according to a conventional method, for example, a suitable solvent (eg, water, ethanol, dimethylformamide or the like, or In the mixture thereof, in the presence of a condensing agent (eg, 1- (3-dimethylaminopropyl) -3-ethylcarbodiimide hydrochloride, 2-ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydroquinone, etc.) It can be carried out.

[0051]
In the camptothecin derivative which is the active ingredient of the present invention, the binding ratio between the polysaccharide and the active ingredient camptothecin compound [I] is appropriately selected according to the type of polysaccharide, but generally the content of camptothecin compound [I] is It is preferable to set it as the following ratio.

[0052]
When the polysaccharide is pullulan, dextran, chitin, mannoglucan and N-acetyl-de-N-sulfated heparin, 0.1 to 20% by weight is preferable, and 2 to 10% by weight is particularly preferable.

[0053]
In the present invention, when the polysaccharide is dextran, the average molecular weight (measured by GPC method) of the camptothecin derivative as the active ingredient is, for example, 30,000 to 500,000, preferably 60,000 to 200,000. is there.

[0054]
The camptothecin compound [I], which is an active ingredient of the present invention, contains known compounds (for example, JP-A-1-279891, JP-A-5-22048, JP-A-6-87746, JP-A-6-228141, and the like) It is manufactured by a publicly known method described in EP-A 4-503505, JP-A-5-502017, etc., for example, manufactured by a method shown in the following reaction formula 1.

[0055]

[Wherein, R 1, R 2, R 3, R 4 and R 5 are as defined above, and R 1 ′ , R 2 ′ , R 3 ′ , R 4 ′ and R 5 ′ are substituents contained in any of them; The same as R 1, R 2, R 3, R 4 and R 5, respectively, except that the amino group, piperazino group or hydroxy group in R 6 is protected], that is, the aminocarbonyl compound (1) is (2) (see EP-0220601-A) and a method known as Friedlander condensation (Organic Reactions 28, pp 37-202, John Wiley & Sons.

Inc.

The compound is condensed according to New York (1982), and then the protecting group is removed to give camptothecin compound [I].

[0056]

In the above process, the formula: -Xn-Alkm-R6 group contained in any of R1 'to R5' should be introduced after the Friedlander condensation reaction when m is 1 and n is 1. You can also.

That is, in place of the starting compound (1), a compound in which the corresponding group in the compound (1) is a hydroxyl group (HO-) or an amino group (H2N-) is used for the Friedlander condensation reaction with the compound (2) And the resulting condensation product is then protected as shown by the formula: R 6 ′ -Alkm-OH (R 6 ′ is a protected amino, piperazino or hydroxy group, Alk and m are as defined above) The desired compound [I] is obtained by the action of an aminoalkanol or hydroxyalkanol or a reactive derivative thereof (eg, a protected aminoalkyl halide, a protected hydroxyalkyl halide) and then removal of the protecting group.

[0057]
The starting compound (1) used in the above method is produced, for example, by the method shown in the following Reaction scheme 2.

[0058]

[Wherein, R1 ′ , R2 ′ , R3 ′ , R4 ′ and R5 ′ are the same as above], that is, the hydroxy compound (a) is treated with an oxidizing agent such as pyridinium dichromate to obtain a ketone compound (b), which is then catalytically reduced in the presence of a suitable catalyst such as, for example, palladium-carbon (Pd-C) to give compound (1).

[0059]
Further, in the above hydroxy compound (a), -Xn-Alkm-R6 contained in any one of R1 ′ , R2 ′ , R3 ′ , R4 ′ and R5 ′ is a corresponding one when m is 1 and n is 1. Compounds having a hydroxyl group (HO-) or an amino group (H2N-) and the general formula:

[0060]
[Wherein, Alk and R6 are as defined above] or a reactive derivative thereof (eg, a substituted alkyl halide) to produce the compound.

[0061]

Experimental Example 1 [Action against human breast cancer MX-1 cells] A tumor is excised from passaged MX-1 tumor-bearing nude mice and minced, and a tumor tissue piece of about 3 mm square is prepared, and the abdomen of 8-week-old male nude mice Transplant subcutaneously on the side.

The major and minor axes of the tumor are measured, and when the estimated tumor volume determined according to the following equation (1) has grown to a range of 100 to 300 mm 3 (11 days after transplantation), treatment is performed in groups of 5 animals.

The administration sample is dissolved in physiological saline, converted to the corresponding hydrochloride salt when the corresponding camptothecin compound [I] [R6 is the formula: -NH2, and administered in a single intravenous dose.

The major and minor axes of the tumor are measured over the course of 31 days after sample administration, and the estimated tumor volume is calculated for each mouse according to the following equation (1).

Calculate the relative tumor volume ratio of each measurement day (tumor volume ratio of each measurement day to the tumor volume of administration start day) for each mouse, and calculate the average relative tumor volume ratio of each group over time, and the experimental period The growth inhibition rate of the medium tumor is calculated according to the following formula (2).

The maximum growth inhibition rate% of each administration sample (the maximum growth inhibition rate calculated during the experimental period in each administration sample) is as described in Table 1 below.

[0062]
Synthesis of camptothecin derivative represented by the following formula

[0063]

[Hereinafter, "CM-Dextran · Na" represents carboxymethyl dextran sodium salt.

(1) Synthesis of 3- (t-butoxycarbonylamino) propanol 6.0 g of 3-aminopropanol is dissolved in 50 ml of methylene chloride, and 18.3 g of di-t-butyl dicarbonate is dropped under ice-cooling and stirring. Do.

After stirring at room temperature for 12 hours, the reaction mixture is concentrated and separated and purified by silica gel column chromatography to obtain 13.98 g of the title compound as a colorless oil.

[0064]

Yield: 99.9% IR (neat):? Max cm-1 = 3380, 1790 Mass: m / z = 176 ([M + H] +) NMR (300 MHz, CDCl3): δ TMS = 1.45 (9 H, s), 1 .62-1.72 (2H, m), 3.0 (1 H, brs), 3.29 (2 H, dd, J = 12 Hz and 6 Hz), 3.66 (2 H, dd, J = 12 Hz and 6 Hz) , 4.80 (1H, brs) (2) Synthesis of 3- (t-butoxycarbonylamino) propyl tosylate 10.0 g of 3- (t-butoxycarbonylamino) propanol is dissolved in 100 ml of methylene chloride and stirred under ice cooling 8.66 g of triethylamine and 16.3 g of tosyl chloride are added and the reaction mixture is stirred overnight at room temperature.

The reaction mixture is concentrated, and the residue is dissolved in water-ethyl acetate, and the organic layer is separated, washed with saturated brine, and dried over sodium sulfate.

After distilling off the solvent, the residue is separated and purified by silica gel column chromatography to obtain 15.37 g of the title compound as a pale yellow oil.

[0065]

Yield: 82% IR (neat):? Max cm-1 = 3400, 3340, 1700 Mass: m / z = 352 ([M + Na] +) NMR (300 MHz, CDCl3): δ TMS = 1.42 (9 H, s), 1 .78-1.90 (2H, m), 2.45 (3H, s), 3.11-3.22 (2H, m), 4.09 (2H, t, J = 6 Hz), 4.5 -4.65 (1 H, m), 7.36 (2 H, d, J = 8 Hz), 7.77-7.83 (2 H, m) (3) 5- [3 '-(t-butoxycarbonylamino])) Synthesis of propyloxy] -1-hydroxy-8-nitro-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene 2.0 g of 1,5-dihydroxy-8-nitro-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene (J .Med.

Chem. , 1973, 16 (3), 254) is dissolved in 80 ml of dry dimethylformamide, and 2 equivalents of potassium carbonate, 1.4 equivalents of sodium iodide and 1.4 equivalents of 3- (t-butoxycarbonylamino) propyl tosylate are added.

The reaction mixture is stirred at 50 ° C. for 24 hours, ethyl acetate is added, and the mixture is washed with saturated brine and dried over sodium sulfate.

The residue is separated and purified by silica gel column chromatography to obtain 3.05 g of the title compound as pale yellow amorphous powder.

[0066]

Yield: 87% IR (Melt):? Max cm-1 = 3360, 1695 Mass: m / z = 384 ([M + NH4] +) NMR (300 MHz, CDCl3):? TMS = 1.36 (9 H, s), 1.57 -1.90 (6 H, m), 2.52-2.71 (2 H, m), 3.11 (2 H, q, J = 6 Hz), 4.07 (2 H, t, J = 6 Hz), 5 .12-5.17 (2H, m), 6.89 (1H, t, J = 5.5 Hz), 6.96 (1 H, d, J = 9 Hz), 7.68 (1 H, d, J = 9 Hz) (4) Synthesis of 5- [3 ′ -(t-butoxycarbonylamino) propyloxy] -8-nitro-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-one 5- [3 ′ -(t -Butoxycarbonylamino) propyloxy] -1-hydroxy-8-nitro-

1,2,3,4 Tetrahydronaphthalene 2.46g was dissolved in dry methylene chloride 110 ml, molecular sieves 3A (molecular shieves 3A) 6.73g and pyridinium dichlorochromate 1.5 equivalents was added and heated to reflux.

After completion of the reaction, the reaction mixture is diluted with ether, the insolubles are removed by filtration through Celite, and the filtrate is concentrated and separated and purified by silica gel column chromatography to obtain 1.87 g of the title compound as a colorless powder.

[0067]

Melting point: 76-77 ° C. IR (Melt): max max cm -1 = 3550, 1700 Mass: m / z = 382 ([M + NH 4] +) NMR (300 MHz, CDCl 3): δ TMS = 1.44 (9 H, s), 02-2.20 (4H, m), 2.68-2.73 (2H, m), 2.92 (2H, t, J = 6 Hz), 3.36 (2 H, q, J = 6.5 Hz), 4.12 (2H, t, J = 6 Hz), 4.78 (1 H, brs), 6.95 (1 H, d, J = 9 Hz), 7.39 (1 H, d, J = 9 Hz) (5) Synthesis of 8-amino-5- [3 ' -(t-butoxycarbonylamino) propyloxy] -1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-one 5- [3 ' -(t-butoxycarbonyl Amino) propyloxy] -8-nitro-1,2,3,4-tetrahydrona The array type-1-one 3.55g were dissolved in ethanol 160 ml, a 10% Pd-C420mg added, under hydrogen atmosphere and stirred for 1.5 hours.

The catalyst is filtered off, the filtrate is concentrated and the residue is separated and purified by silica gel chromatography to give 3.56 g of crude product as a yellow oil.

[0068]
The crude product is purified to give 2.70 g of the title compound as a yellow powder.

[0069]

Melting point: 112-115 ° C. IR (Nujol): max max cm -1 = 3440, 3340, 1700, 1650 Mass: m / z = 335 ([M + H] +) NMR (300 MHz, CDCl 3): δ TMS = 1.45 (9 H, s), 1.92-2.67 (4H, m), 2.61 (2H, t, J = 6 Hz), 2.87 (2H, t, J = 6 Hz), 3.35 (2H, q, J) = 6.5 Hz), 3.94 (2 H, t, J = 6 Hz), 4. 85 (1 H, brs), 6. 10 (2 H, brs), 6.48 (1 H, d, J = 9 Hz), 6.94 (1 H, d, J = 9 Hz) (6) Synthesis of 10- [3 '-(t-butoxycarbonylamino) propyloxy] -7,9-trimethylene- (20S) -camptothecin 8-amino-5 -[3 '-(t-butoxycarbonylamino) propyl Dissolve 2.03 g of oxy] -1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-one in 85 ml of ethanol, (4S) -7,8-dihydro-4-ethyl-4-hydroxy-1H-pyrano [3 , 4-f] Indolizine-3,6,10 (4H) -

trione 800 mg and 58 mg p-toluenesulfonic acid are added and heated to reflux for 17 hours.

After completion of the reaction, the solvent is distilled off, and the resulting residue is separated and purified by silica gel column chromatography to obtain 850 mg of the title compound as a pale yellow powder.

[0070]

Melting point: 225 to 227 ° C. (decomposition) IR (Nujol): max max cm − 1 = 3440, 3325, 1750, 1740, 1655, 1620 Mass: m / z = 562 ([M + H] +) NMR (300 MHz, CDCl3): δ TMS = 1.03 (3 H, t, J = 7.5 Hz), 1.45 (9 H, s), 1.82-2.18 (6 H, m), 3.06-3. 13 (4 H, m) , 3.41 (2H, q, J = 6 Hz), 3.79 (1 H, s), 4.24 (2 H, t, J = 6 Hz), 4.9 (1 H, br), 5.16 (2 H) , S), 5.30 (1 H, d, J = 16 Hz), 5.75 (1 H, d, J = 16 Hz), 7.51 (1 H, d, J = 9 Hz), 7.61 (1 H, s)), 8.06 (1 H, d, J = 9 Hz) (7) 10- (3'-aminopropyloxy) -7,9-to Synthesis of Limethylene- (20S) -Camptothecin Hydrochloride 10- [3 '-(t-Butoxycarbonylamino) propyloxy] -7,9-trimethylene- (20S) -Camptothecin 836 mg is suspended in 30 ml of dioxane under ice cooling While stirring, 15 ml of 18% hydrochloric acid-dioxane is added dropwise. The reaction mixture is stirred at room temperature, and after completion of the reaction, isopropyl ether is added and stirred. The precipitated powder is collected by filtration, washed with ether and dried under reduced pressure. The obtained yellow powder is dissolved in water and lyophilized to obtain 620 mg of the title compound as a yellow powder.

[0071]

Melting point: 194 ° C. or higher (decomposition) IR (Nujol): max max cm -1 = 1740, 1655 Mass: m / z = 462 ([M-Cl] +) NMR (300 MHz, d 6 -DMSO): δ TMS = 0.88 3H, t, J = 7.5 Hz), 1.81-1.94 (2H, m), 1.97-2.15 (4H, m), 3.01-3.14 (6H, m), 4.28 (2 H, t, J = 6 Hz), 5.23 (2 H, s), 5.43 (2 H, s), 7. 28 (1 H, s), 7.71 (1 H, d, J = 9.5 Hz), 7.95 to 8.08 (3 H, brs), 8.03 (1 H, d, J = 9.5 Hz) (8) 10- [3 '-(t-butoxycarbonylglycylglycyl- L-phenylalanylglycylamino) propyloxy] -7,9-trimethylene- (20S) -camptothecin Synthesis 10- (3'-aminopropyloxy) -7,9-trimethylene- (20S) -camptothecin hydrochloride 158 mg and diisopropylethylamine 49 mg are dissolved in 5 ml of dimethylformamide with stirring, in which t-butoxycarbonyl-glycylglycyl- A solution of 278 mg of L-phenylalanylglycine and 143 mg of N-hydroxysuccinimide in 8 ml of dry dimethylformamide is added, and 183 mg of 1- (3-dimethylaminopropyl) -3-ethylcarbodiimide hydrochloride is further added with stirring under ice cooling. Is added and stirred at room temperature for 16 hours. After completion of the reaction, the solvent is distilled off, and the obtained residue is separated and purified by silica gel column chromatography to obtain 285 mg of the title compound as a

pale yellow powder.

[0072]

Yield: Quantitative yield IR (Nujol):? Max cm-1 = 3290, 1660 Mass: m / z = 880 ([M + H] +) NMR (300 MHz, CDCl3): δ TMS = 1.02 (3 H, t, J = 7.5 Hz), 1.43 (9 H, s), 1.85 to 1.94 (2 H, m), 2.02 to 2. 10 (4 H, m), 2.97 to 3.05 (5 H, 5 H) m), 3.23 (1 H, dd, J = 14 Hz and 5 Hz), 3.49 (2 H, q, J = 6.5 Hz), 3.60-3.80 (6 H, m), 4.20 (4) 1H, t, J = 6 Hz), 4.50-4.56 (1 H, m), 5.11 (2 H, s), 5. 29 (1 H, d, J = 16.5 Hz), 5.71 (1 H, d, J = 16.5 Hz), 5.85 (1 H, brt), 7.08 (1 H, m), 7.18-7. 27 (5 H, m), 7 .45 (1 H, d, J = 7 Hz), 7.52 (1 H, d, J = 9.5 Hz), 7.58 (1 H, s), 7.71 (1 H, m), 7.99 (1 H) , D, J = 9.5 Hz) (9) Synthesis of 10- [3 '-(glycylglycyl-L-phenylalanylglycylamino) propyloxy] -7,9-trimethylene- (20S) -camptothecin hydrochloride 10- [3 ′ -(t-Butoxycarbonylglycylglycyl-L-phenylalanylglycylamino) propyloxy] -7,9-trimethylene- (20S) -camptothecin 273 mg is dissolved in 10 ml of dioxane and stirred under ice cooling 15 ml of 18% hydrochloric acid-dioxane are added dropwise. The reaction mixture is stirred at room temperature, and after completion of the reaction, isopropyl ether is added, and stirring, the precipitated powder is collected by filtration. The obtained powder is washed with ether and then dried under reduced pressure, and the obtained yellow powder is dissolved in water and then lyophilized to obtain 210 mg of the title compound as a yellow powder.

[0073]

Melting point: 174 ° C. or higher (decomposition) IR (Nujol): max max cm -1 = 3190, 1745, 1650 Mass: m / z = 780 ([M-Cl] +) NMR (300 MHz, d 6 -DMSO): δ TMS = 0. 89 (3 H, t, J = 7 Hz), 1.26-1.32 (2 H, m), 1.86-2.04 (6 H, m), 2.79 (1 H, dd, J = 14 Hz and 10 Hz), 2.98-3.05 (5H, m), 3.28-3.36 (2H, m), 3.54-3.88 (6H, m), 4.20 (2H, t, J) = 4. 6 Hz), 4.45-4.54 (1 H, m), 5.19 (2 H, s), 5.43 (2 H, s), 7.1 1-7. 27 (5 H, m), 7. 35 (1 H, s), 7.71 (1 H, t, J = 9.5 Hz), 7.97 (1 H, t, J = 5.5 Hz), 8.03 (1 H) , D, J = 9.5 Hz), 8.19 (3 H, br), 8. 35 (1 H, t, J = 6 Hz), 8.43 (1 H, d, J = 8 Hz), 8.65 (1 H , T, J = 5.5 Hz) to obtain a camptothecin derivative by condensing a camptothecin compound having an amino group with a polysaccharide having a carboxyl group such as carboxymethyl dextran (hereinafter, CM-dextran) Can. The condensation reaction is carried out in the presence of a condensing agent such as water-soluble carbodiimide (1- (3-dimethylaminopropyl) -3-ethylcarbodiimide hydrochloride, 2-ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydroquinoline) Or it can carry out in a water-organic solvent mixed solvent.

[0074]

(10) Preparation of camptothecin derivative 500 mg of CM-dextran sodium salt (CM conversion degree = 0.5) is dissolved in 20 ml of water, and 10- [3 '-(glycyl glycyl-L-) while stirring at 10 ° C. or less. 50 mg of phenylalanylglycylamino) propyloxy] -7,9-trimethylene- (20S) -camptothecin hydrochloride are added. 1.5 g of 1- (3-dimethylaminopropyl) -3-ethylcarbodiimide hydrochloride is added, while maintaining the pH of the reaction solution at 6.5-7.0 with 0.1 N hydrochloric acid. After reacting for 2 hours with stirring at 10 ° C. or less, the pH is adjusted to 9 with 0.1 N sodium hydroxide. The reaction mixture is purified by ion exchange column chromatography (BioRad AGMP-50, 30 ml, Na type), 1.2 ml of 3 M saline is added to 30 ml of the fraction containing the desired substance, and poured into 150 ml of ethanol. The precipitate is centrifuged, 20 ml of water is added and filtered. The filtrate is added with 0.4 ml of 3 M saline and added to 80 ml of ethanol with stirring to precipitate. The precipitate is collected by centrifugation, washed with a solvent, and dried under reduced pressure to obtain 415 mg of the camptothecin derivative represented by the above formula (13). Drug (compound obtained with 1- (7); 10- (3'-aminopropyloxy) -7,9-trimethylene- (20S) -camptothecin hydrochloride) content determined by absorption at 380 nm is 4.4% is there. As a result of analysis by gel permeation column chromatography (GPC), the average molecular weight to be determined is 160,000, and the polydispersity Mw / Mn is 1.57 (GPC analysis conditions: G4000SWXL (manufactured by Tosoh Corporation), 0.2 M phosphorus) Acid buffer (pH 7.0)).

[0075]
Production Example 2 Synthesis of camptothecin derivative represented by the following formula

[0076]
(1) Synthesis of 7- (4 '-(t-butoxycarbonylglycylglycyl-L-phenylalanylglycyl) piperazino) methyl-10,11-ethylenedioxy- (20S) -camptothecin Preparation Example 1 In the same manner as in (8), 450 mg of 7-piperazinomethyl-10,11-ethylenedioxy- (20S) -camptothecin hydrochloride and 2 equivalents of t-butoxycarbonyl-glycylglycyl-L-phenylalanylglycine give a yellowish powdery title. 518 mg of compound are obtained.

[0077]
Yield: 74% IR (Nujol):? Max cm-1 = 3280, 1750, 1655 Mass: m / z = 923 ([M + H] +) NMR (300 MHz, d6-DMSO): δ TMS = 0.89 (3H, t, 3) J = 7.5 Hz), 1.37 (9 H, s), 1.85-2.1 (2 H, m), 2.3-2.6 (4 H, m), 2. 75 (1 H, dd, 1) J = 14 Hz and 10 Hz), 3.05 (1 H, dd, J = 14 Hz and 4.5 Hz), 3.3-3.6 (6 H, m), 3.58 (1 H, dd, J = 21 Hz and 5) .5 Hz), 3.74 (1 H, dd, J = 17 Hz and 5.5 Hz), 3.9-4.1 (4 H, m), 4. 44 (4 H, s), 4.58 (1 H, m)), 5.24 (2H, s), 5.42 (2H, s), 6.50 (1 H, s), 6.97 (1 H, t) , J = 6 Hz), 7.1-

7.3 (6H, m), 7.55 (1 H, s), 7.77 (1 H, s), 7.8-7.9 (1 H, br), 8.05-8.2 (2H, m) (2) 7- (4 '-(glycylglycyl-L-phenylalanylglycyl) piperazino) methyl-10,11-ethylenedioxy- (20S) -camptothecin hydrochloride In the same manner as in Production Example 1- (9), 7- (4 '-(t-butoxycarbonylglycylglycyl-L-phenylalanylglycyl) piperazino) methyl-10,11-ethylenedioxy- (20S))-From 478 mg of camptothecin is obtained 409 mg of the title compound in the form of a yellow powder.

[0078]

Melting point: 237-239 ° C. (decomposition) IR (Nujol): max max cm -1 = 3250, 1745, 1655 Mass: m / z = 823 ([M-Cl] +) NMR (300 MHz, d6-DMSO): δ TMS = 0 .88 (3 H, t, J = 7 Hz), 1.8-1.99 (2 H, m), 2.79 (1 H, dd, J = 14 Hz and 10 Hz), 3.07 (1 H, dd, J = 14 Hz and 4 Hz), 3.1 to 4.3 (16 H, m), 4.47 (4 H, s), 4.55 to 4. 70 (1 H, m), 5. 44 (2 H, s), 5 .67 (2H, s), 7.15 to 7. 32 (6H, m), 7.65 (1 H, s), 8.05 (1 H, s), 8.05 to 8.20 (3 H, br)), 8.29 (1H, br), 8.39 (1H, d, J = 8.5 Hz), 8.57 (1 H, t, J = 5.5) Hz) (3) Preparation of camptothecin derivative In the same manner as in Preparation Example 1- (10), 1.2 g of CM-dextran sodium salt (CM conversion degree = 0.5) and 7- (4 '-(glycylglycyl-L) -Phenylalanylglycyl) piperazino) methyl-10,11-ethylenedioxy- (20S) -camptothecin hydrochloride From 798 mg of the camptothecin derivative of the above-mentioned formula 14 is obtained as a pale yellow powder.

The drug (7-piperazinomethyl-10,11-ethylenedioxy- (20S) -camptothecin hydrochloride) content determined by absorption at 380 nm is 1.1%.

The average molecular weight determined as a result of analysis by gel permeation column chromatography (GPC) is 169,000, and the polydispersity Mw / Mn is 1.32 (GPC analysis conditions: G4000SWXL (manufactured by Tosoh Corporation), 0.2 M phosphorus) Acid buffer (pH 7.0)).

[0079]
Production Example 3 Synthesis of camptothecin derivative represented by the following formula

[0080]
(1) Synthesis of 7-N- (t-butoxycarbonylglycylglycyl-L-phenylalanylglycyl) aminomethyl-10,11-ethylenedioxy- (20S) -camptothecin Preparation Example 1- (8) And 7-aminomethyl-10,11-

ethylenedioxy- (20S) -camptothecin hydrochloride 222 mg and t-butoxycarbonylglycylglycyl-L-phenylalanylglycine 2 equivalents of the title compound as a yellow powder Get 232 mg.

[0081]

Yield: 58% IR (Nujol):? Max cm-1 = 3285, 1750, 1650 Mass: m / z = 854 ([M + H] +) NMR (300 MHz, d6-DMSO): δ TMS = 0.88 (3 H, t, 3H, t, J = 7.5 Hz), 1.35 (9 H, s), 1.78-1.94 (2 H, m), 2. 74 (1 H, dd, J = 14 Hz and 10 Hz), 2.99 (1 H, dd, J = 14 Hz and 4.5 Hz), 3.4-3.8 (4H, m), 4.34-4.50 (1 H, m), 4.42 (4 H, s), 4.66- 4.82 (2H, m), 5.42 (4H, brs), 6.50 (1 H, s), 6.98 (1 H, t, J = 6 Hz), 7.12-7.28 (5 H, 5 H, m), 7.26 (1 H, s), 7.56 (1 H, s), 7. 80 (1 H, s), 7. 91 (1 H, br), 8.14 (1 H, d, J = 7.5 Hz), 8.32 (2 H, t, J = 7.5 Hz), 8.58 (1 H, m) (2) 7-N- (glycyl glycyl-L-) Synthesis of phenylalanylglycyl) aminomethyl-10,11-ethylenedioxy- (20S) -camptothecin hydrochloride In the same manner as in Preparation Example 1- (9), 7-N- (t-butoxycarbonylglycylglycyl- L-phenylalanylglycyl) aminomethyl-10,11-ethylenedioxy- (20S) -camptothecin 203 mg gives the title compound 164 mg as a yellow powder.

[0082]

Melting point:> 211 ° C. (decomposition) IR (Nujol): max max cm -1 = 3220, 1745, 1655 Mass: m / z = 754 ([M-Cl] +) NMR (300 MHz, d 6 -DMSO): δ TMS = 0. 88 (3H, t, J = 7 Hz), 1.80-1.93 (2H, m), 2.77 (1 H, dd, J = 14 Hz and 10 Hz), 3.00 (1 H, dd, J = 14 Hz And 4 Hz), 3.6-4.55 (7 H, m), 4.42 (4 H, s), 4.65-4. 85 (2 H, m), 5.42 (2 H, s), 5. 45 (2H, s), 7.13-7.26 (5H, m), 7.27 (1 H, s), 7.57 (1 H, s), 7.83 (1 H, s), 8.03 -8.16 (3H, br), 8.34-8.40 (2H, m), 8.54 (1H, br), 8.73 (2H, b) r) (3) Preparation of camptothecin derivative 772 mg of CM-dextran sodium salt (CM degree = 0.5) is dissolved in 50 ml of water, and 25 ml of dimethylformamide is added.

Stir under ice cooling, and 7- (N- (glycylglycyl-L-phenylalanylglycyl) aminomethyl) -10,11-ethylenedioxy- (20S) -camptothecin hydrochloride 106 mg and 2-ethoxy-1-ethoxycarbonyl Add 1.57 g of 1,2-dihydroquinone.

After the overnight reaction, the reaction mixture is added to 450 ml of ethanol for precipitation, and treated in the same manner as in Preparation Example 1- (10) to give 545 mg of a camptothecin derivative represented by the formula 15 as a pale yellow powder.

The drug (7-aminomethyl-10,11-ethylenedioxy- (20S) -camptothecin hydrochloride) content determined by absorption at 375 nm is 5.5%.

As a result of analysis by gel permeation column chromatography (GPC), the average molecular weight determined is 165,000, and the polydispersity Mw / Mn is 1.40 (GPC analysis conditions: G4000SWXL (manufactured by Tosoh Corporation), 0.2 M phosphorus) Acid buffer (pH 7.0)).

[0083]

Preparation Example 410 Synthesis of 4- (3’ -aminopropyloxy)-(20S) -camptothecin hydrochloride (1) Synthesis of 5- [3 ’ -(t-butoxycarbonylamino) propyloxy] -2-nitrobenzaldehyde dimethyl acetal 3.0 g of 5-hydroxy-2-nitrobenzaldehyde dimethyl acetal is dissolved in 50 ml of dry dimethylformamide, 3.15 g of sodium iodide and 1.93 g of potassium carbonate and 6.95 g of 3- (t-butoxycarbonylamino) propyl tosylate Add. After stirring at 50 ° C. for 3 hours, the temperature is returned to room temperature and ethyl acetate is added. The extract is washed with saturated brine and dried over sodium sulfate. After distilling off the solvent, the residue is separated and purified by silica gel column chromatography to quantitatively obtain 5.22 g of the title compound as a pale yellow oil.

[0084]

IR (Neat):? Max cm-1 = 3360, 1710 Mass: m / z = 393 ([M + Na] +) NMR (300 MHz, CDCl3):? TMS = 1.44 (9 H, s), 2.02 (2 H, quint. , J = 6 Hz), 3.33 (2 H, dd, J = 13 Hz and 6 Hz), 3.44 (6 H, s), 4.11 (2 H, t, J = 6 Hz), 4.7 (1 H, brs)), 6.01 (1 H, s), 6.90 (1 H, dd, J = 9 Hz and 3 Hz), 7.29 (1 H, d, J = 3 Hz), 7.97 (1 H, d, J = 9 Hz)) (2) Synthesis of 10- [3 '-(t-butoxycarbonylamino) propyloxy]-(20S) -camptothecin 5- [3'-(t-butoxycarbonylamino) propyloxy] -2-nitrobenzaldehyde dimethyl Acetal It was dissolved 270mg of ethanol 20 ml, 10% palladium - added carbon 120 mg, stirred for 1.5 hours under hydrogen atmosphere. The catalyst is filtered off from the reaction mixture and the filtrate is (4S) -7,8-dihydro-4-ethyl-4-hydroxy-1H-pyrano [3,4-f] indolizine-3,6,10 (4H).)-Trione 300 mg and p-toluenesulfonic acid 22 mg are added and stirred overnight at room temperature. The solvent is distilled off from the reaction mixture, and the residue is separated and purified by silica gel column chromatography to obtain 204 mg of the title compound as a pale yellow powder.

[0085]

Melting point: 223-224 DEG C. (decomposition) IR (Nujol): .nu.max cm @ -1 = 3360, 1750, 1690 Mass: m / z = 522 ([M + H] +) NMR (300 MHz, CDCl3): .DELTA.TMS = 1.03 (3H , T, J = 7.5 Hz), 1.46 (9 H, s), 1.8-2.0 (2 H, m), 2.08 (1 H, dd, J = 12.5 Hz and 6.5 Hz) , 2.10 (1 H, dd, J = 12.5 Hz and 6 Hz), 3.40 (2 H, q, J = 6.5 Hz), 4.18 (2 H, t, J = 6 Hz), 4.82 (2. 1 H, brs), 5. 24 (2 H, s), 5. 29 (1 H, d, J = 16 Hz), 5. 73 (1 H, d, J = 16 Hz), 7.12 (1 H, d, J = 3 Hz), 7.43 (1 H, dd, J = 9 Hz and 3 Hz), 7.61 (1 H, s), 8.0 9 (1 H, d, J = 9 Hz), 8.20 (1 H, d, J = 9 Hz) (3) Synthesis of 10- (3'-aminopropyloxy)-(20S) -camptothecin hydrochloride 10- [3 352 mg of '-(t-butoxycarbonylamino) propyloxy]-(20S) -camptothecin is dissolved in dry dioxane-ethanol (7 ml-1 ml) and 5 ml of 19% hydrochloric acid-dioxane is added to this solution under ice-cooling and stirring. The reaction mixture is stirred at room temperature, 10 ml of isopropyl ether is further added, and the precipitated powder is collected by filtration and washed to give 339 mg of the title compound as a yellow powder.

[0086]

Melting point: 214-218 ° C. (decomposition) IR (Nujol): max max cm -1 = 3470, 3280, 1745 Mass: m / z = 422 ([M-Cl] +) NMR (300 MHz, d 6 -DMSO): δ TMS = 0 .89 (3H, t, J = 7.5 Hz), 1.80-1.95 (2H, m), 2.10-2.22 (2H, m), 2.96-3.10 (2H, 2H, m). m), 4.27 (2 H, t, J = 6 Hz), 5.25 (2 H, s), 5.42 (2 H, s), 7. 29 (1 H, s), 7.49-7.55 (2H, m), 8.08 (1 H, d, J = 10 Hz), 8.19 (3 H, brs), 8.54 (1 H, s) 10- [3 '-(glycyl-glycyl-L-phenyl] Synthesis of Alanyl-glycylamino) propyloxy]-(20S) -camptothecin hydrochloride (1) 10- [3 ' Synthesis of-(t-butoxycarbonyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanylglycylamino) propyloxy]-(20S) -camptothecin 325 mg of 10- (3'-aminopropyloxy)-(20S) -camptothecin hydrochloride It is dissolved in 10 ml of dry dimethylformamide and under ice cooling with stirring, 4 equivalents of N-hydroxysuccinimide, 2 equivalents of diisopropylethylamine, 2 equivalents of N-tert-butoxycarbonyl-glycyl-glycyl-L-phenylara are added to this solution. Nylglycine and 4 equivalents of 1- (3-dimethylaminopropyl) -3-ethylcarbodiimide hydrochloride are added. The reaction mixture is stirred overnight at room temperature and the solvent is distilled off. The residue is separated and purified by silica gel column chromatography to quantitatively obtain 597 mg of the title compound as a yellow powder.

[0087]

IR (Nujol):? Max cm-1 = 3280, 1750, 1660 Mass: m / z = 840 ([M + H] +) NMR (300 MHz, d6-DMSO): δ TMS = 0.88 (3 H, t, J = 7 Hz), 1.36 (9 H, s), 1.8-2.04 (4 H, m), 2.72-2.84 (1 H, m), 3.00-3. 12 (1 H, m), 3. 24-3.36 (2H, m), 3.50-3.80 (6H, m), 4.18 (2H, t, J = 6 Hz), 4.44-4.54 (1 H, m), 5.24 (2 H, s), 5.42 (2 H, s), 6. 50 (1 H, s), 6.99 (1 H, t, J = 6 Hz), 7.12-7.27 (5 H, m), 7.28 (1 H, s), 7.48-7.55 (1 H, m), 7. 50 (1 H, s), 7.88-7.96 (1 H, m), 8.07 (1H, d, J = 9 Hz), 8.12-8.36 (2H, m), 8.51 (1H, s) (2) 10- [3 '-(glycyl-glycyl-L-phenylalanylgly] Synthesis of silamino) propyloxy]-(20S) -

camptothecin hydrochloride 10- (3 '-(t-butoxycarbonyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanylglycylamino) propyloxy)-(20S) -camptothecin 580 mg The same procedure as in Production Example 4- (3) was carried out to give 438 mg of the title compound as a yellow powder.

[0088]
Yield: 82% Melting point: 194 DEG-199 DEG C. (decomposition) IR (Nujol): .nu.max cm @-1 = 3190, 1745, 1650 Mass: m / z = 740 ([M-Cl] +) NMR (300 MHz, d6-DMSO)): Δ TMS = 0.88 (3 H, t, J = 7 Hz), 1.80-2.03 (4 H, m), 2.79 (1 H, dd, J = 14 Hz and 10 Hz), 3.05 (1 H) , Dd, J = 14 Hz and 5 Hz), 3.2-3.5 (2 H, m), 3.52-3.62 (2 H, m), 3.62-3.83 (4 H, m), 4 .19 (2H, t, J = 6 Hz), 4.48-4.58 (1 H, m), 5.25 (2 H, s), 5.42 (2 H, s), 6.5 (1 H, brs) , 7.13-7.26 (5H, m), 7.28 (1 H, s), 7.49-7.55 (1 H, m), 7. 50 (1 H, s, J = 9.5 Hz), 7.93 (1 H, t, J = 6 Hz), 8.0-8.14 (4 H, m), 8.32-8.41 (2 H, m), 8.51 (1 H, s), 8.56 (1 H, t, J = 5.5 Hz) Synthesis of camptothecin derivative represented by the following formula

[0089]

10- [3 '-(Glycyl-glycyl-L-phenyl) is dissolved in 50 ml of water by dissolving 513 mg of CM-dextran sodium salt (CM conversion degree = 0.5) and keeping the internal temperature at 10 ° C. or less. Alanyl-glycylamino) propyloxy]-(20S) -camptothecin hydrochloride 77 mg and 1.54 g 1- (3-dimethylaminopropyl) -3-ethylcarbodiimide hydrochloride are added.

The mixture is stirred for 2 hours while maintaining the internal temperature at 10 ° C. or less and the pH at 6.0 to 6.5 using 0.2 N hydrochloric acid.

The reaction mixture is purified by ion exchange column chromatography (BioRad AGMP-50, 30 ml, Na type), the fraction containing the desired substance is filtered, ethanol is added to the filtrate, the precipitate is separated, washed and then dried under reduced pressure Thus, 492 mg of pale yellow powdery complex is obtained. The drug (10- (3'-aminopropyloxy)-(20S) -camptothecin hydrochloride) content determined by absorption at 380 nm is 2.8%. As a result of analysis by gel filtration column chromatography (GPC), the average molecular weight determined is 179,000, and the polydispersity Mw / Mn is 1.42 (GPC analysis conditions: G4000SWXL (manufactured by Tosoh Corporation), 0.2 M phosphorus) Acid buffer (pH = 7.0)).

[0090]
Production Example 7 Synthesis of camptothecin derivative represented by the following formula

[0091]
(1) (9S) -1- (t-butoxycarbonylglycylglycyl-L-phenylalanylglucylamino) -9-ethyl-5-fluoro-2,3-dihydro-9-hydroxy-4- Synthesis of methyl-1H, 12H-benzo [de] pyrano [3 ′ , 4 ′ : 6,7] indolizino [1,2-b] quinoline-10,13 (9H, 15H) -dione Preparation Example 1- (8 (9S) -1-amino-9-ethyl-5-fluoro-2,3-dihydro-9-hydroxy-4-methyl-1H, 12H-benzo [de] pyrano [3 ′ , 4 ': 6, 7' from indolizino [1,2-b] quinoline-10, 13 (9H, 15H) -dione hydrochloride and 2 equivalents of t-butoxycarbonylglycylglycyl-L-phenylalanylglycine Of the title compound 247mg as a yellow amorphous solid.

[0092]
Yield: 82% IR (Nujol):? Max cm-1 = 3290, 1710, 1655 Mass: m / z = 854 ([M + H] +) NMR (300 MHz, d6-DMSO): δ TMS = 0.87 (3 H, t, 3H, t, J = 7 Hz), 1.37 (9 H, s), 1.8-1. 95 (2 H, m), 2.05-2.3 (1 H, m), 2.42 (3 H, s), 2 .5-2.85 (2H, m), 2.9-3.1 (1 H, m), 3. 15-3.4 (2 H, m), 3.5-3.8 (6 H, m) , 4.4-4.55 (1 H, m), 5. 26 (2 H, s), 5.42 (2 H, s), 5.55-5. 65 (1 H, m), 6.53 (1 H) , S), 6.99 (1 H, t, J = 5 Hz), 7.1-7.3 (5 H, m), 7.32 (1 H, s), 7.81 (1 H, d, J = 11 Hz)), 7.8-7.9 5 (1 H, m), 8.1-8.2 (1 H, m), 8.3-8.4 (1 H, m), 8.4-8.5 (1 H, m) (2) (9 S) -1- (Glycylglycyl-L-phenylalanylglucylamino) -9-ethyl-5-fluoro-2,3-dihydro-9-hydroxy-4-methyl-1H, 12H-benzo [de] pyrano [3 ′] , 4 ': 6, 7] Synthesis of indolizino [1,2-b] quinoline-10, 13 (9H, 15H) -dione In the same manner as in Preparation Example 1- (9), 220 mg of the compound obtained in the above (1) This gives 193 mg of the title compound as a pale yellow powder.

[0093]

Melting point:> 165 ° C. (decomposition) IR (Nujol): max max cm -1 = 3350, 1745, 1660, 1615 Mass: m / z = 754 ([M-Cl + H] +) NMR (300 MHz, d6-DMSO): δ TMS = 0.87 (3H, t, J = 7 Hz), 1.80 to 1.94 (2H, m), 2.08 to 2.27 (2H, m), 2.41 (3H, s), 77 (1 H, dd, J = 13 Hz, 9 Hz), 3.01 (1 H, dd, J = 13 Hz, 5 Hz), 3.15-3.28 (2 H, m), 3.5-3.91 (6 H) , M), 4.45 to 4.56 (1 H, m), 5.25 (2 H, s), 5.41 (1 H, d, J = 13 Hz), 5.42 (1 H, d, J = 13 Hz)), 5.57 (1 H, m), 7.12-7.30 (5 H, m), 7.32 (1 H, s), 7.80 (1 H, d, J = 11 Hz), 8.0-8.2 (3 H, br), 8.32 (1 H, d, J = 7 Hz), 8.43 (1 H, t, J = 5.5 Hz), 8.50-8.62 (2H, m) (3) Preparation of camptothecin derivative Production example using 2000 mg of CM-dextran sodium salt (CM conversion degree = 0.65) and 170 mg of the compound obtained in the above (2) The same treatment as in 3- (3) is carried out to obtain 1803 mg of desired camptothecin derivative as pale yellow powder.

Drug ((9S) -1-amino-9-ethyl-5-fluoro-2,3-dihydro-9-hydroxy-4-methyl-1H, 12H-benzo [de] pyrano [3 ′] determined by absorption at 376 nm , 4 ': 6, 7] Indolizino [1,2-b] quinoline-10, 13 [9H, 15H] -dione hydrochloride) content is 3.0%.

As a result of analysis by gel filtration column chromatography (GPC), the average molecular weight determined is 187,000, and the polydispersity Mw / Mn is 1.54 (GPC analysis conditions: G4000SWXL (manufactured by Tosoh Corporation), 0.2 M phosphorus) Acid buffer (pH = 7.0)).

[0094]
Production Examples 8 to 24 The compounds listed in Table 2 below are obtained in the same manner as in Production Examples 1 to 7 above.

[0095]

[Hereinafter, "CM-Pullulan · Na" represents carboxymethyl pullulan sodium salt.

Production Examples 25 to 41 The compounds listed in Table 3 below are obtained in the same manner as in Production Examples 1 to 7 above.

[0096]
Production Examples 42 to 59 The compounds listed in Table 4 below are obtained in the same manner as in Production Examples 1 to 7 above.

[0097]
Production Examples 60 to 76 The compounds listed in the following Table 5 are obtained in the same manner as in Production Examples 1 to 7 above.

[0098]
Production Examples 77 to 93 The compounds listed in Table 6 below are obtained in the same manner as in Production Examples 1 to 7 above.

[0099]

Production Examples 94 to 110 The compounds listed in Table 7 below are obtained in the same manner as in Production Examples 1 to 7 above.

[0100]

Reference Example 1 (1) Dextran (manufactured by Pharmacia, Dextran T-110, average molecular weight: 100,000 (GPC method)) 29 g of water is dissolved in 290 ml of water.

To this solution is added 1.45 g of sodium borohydride at 0-5 ° C and stirred overnight at 5 ° C.

Acetic acid is added dropwise to the reaction mixture to pH 5 and stirred for a further 3 hours at room temperature.

The pH is adjusted to 7 with 2N sodium hydroxide and 1.2 liters of ethanol are added with vigorous stirring.

After standing to precipitate insolubles, the supernatant is removed by decantation and the residue is centrifuged.

The residue is dissolved in 0.5 l of water and lyophilized to give 26.3 g of a white powder.

[0101]

(2) 50 g of the white powder obtained in the above (1) is dissolved in 500 ml of water, 200 g of sodium hydroxide is added to this solution under ice cooling, and the mixture is stirred for 30 minutes. After the reaction mixture is returned to room temperature, a solution of monochloroacetic acid (110 g) in water (150 ml) is added dropwise and stirred at 40 ° C. for 18 hours. The reaction mixture is cooled to below 10 ° C. and adjusted to pH 8-9 with acetic acid. While vigorously stirring the reaction mixture, 8 liters of methanol is added to precipitate insolubles. The insolubles are collected by filtration, dissolved in 5 liters of pure water and desalted by ultrafiltration. The solution obtained is concentrated under reduced pressure, the

concentrate is filtered, ethanol is added, and the precipitate is collected by filtration, washed with aqueous ethanol and acetone, and dried under reduced pressure at room temperature and 50 ° C. to give carboxymethyl dextran. (CM-dextran) sodium salt [carboxymethylation degree (neutralization titration method): 0.5] 50.2 g is obtained.

[0102]
Reference Example 2 By changing the amount of monochloroacetic acid used and carried out in the same manner as in Reference Example 1, a CM-dextran sodium salt having a carboxymethylation degree of 0.65 is obtained.

[0103]

[Effect of the invention] The camptothecin derivative which is the active ingredient of the present invention is delivered abundantly and selectively to a target site of action by utilizing a drug delivery system, and exerts a desired pharmacological action at that site It is something that can be done.

That is, the camptothecin derivative, which is the active ingredient of the present invention, is extremely useful as a pharmaceutical having a significantly enhanced antitumor activity and reduced side effects as compared with the parent compound, camptothecin compound.

[0104]
Therefore, the pharmaceutical composition of the present invention is a solid tumor [e.g., lung cancer, uterine cancer, ovarian cancer, breast cancer, digestive organ cancer (large intestine cancer, gastric cancer, pancreatic cancer etc.), liver cancer, kidney cancer, prostate cancer, pelvic cancer Head cancer, malignant lymphoma, etc.], liquid tumors (eg, leukemia, etc.).

Patent Translate
Powered by EPO and Google

Notice

This translation is machine-generated. It cannot be guaranteed that it is intelligible, accurate, complete, reliable or fit for specific purposes. Critical decisions, such as commercially relevant or financial decisions, should not be based on machine-translation output.

CLAIMS JPH1171280

1.

In the general formula [wherein, R 1 to R 5 each represent a group in which two adjacent ones of R 1 to R 5 are bonded to each other to form an alkylene group, or two of them are hydrogen atoms; One is -Xn-Alkm-R6 and the other two are hydrogen atoms, or two adjacent (B) R1 to R5 are bonded to each other to form an alkylene group, and any of the alkylene groups Represents that the carbon atom is substituted by -Xn-Alkm-R6, and the remaining three of R1 to R5 are a hydrogen atom, an alkyl group or a halogen atom; in the alkylene group in (A) and (B) And one or two methylene groups may be replaced by -O-, -S- or -NH-, X is -O- or -NH-, Alk is an alkylene group, and R6 is- NH2,

2.

Or -OH, m and n are both 0 or 1, or m is 1 and n is 0.], R 6 of the camptothecin compound [I] and a polysaccharide having a carboxyl group are amino acids or peptides A pharmaceutical composition comprising as an active ingredient a camptothecin derivative or a pharmacologically acceptable salt thereof, which is linked via 2. An acid amide bond of part or all of carboxyl group of polysaccharide and amino group of amino acid or peptide is formed, and all or part of carboxyl group of this amino acid or peptide and R6 of compound [I] are acid The pharmaceutical composition according to claim 1, which is formed by amide bond or ester bond.

3.

An acid amide bond is formed between part or all of the carboxyl group of the polysaccharide and the N-terminal amino group of the amino acid or peptide, and the C-terminal carboxyl group of this amino acid or peptide and R6 of compound [I] are acid amide bond or ester bond The pharmaceutical composition according to claim 2, The pharmaceutical composition according to claim 3, wherein the polysaccharide having a carboxyl group is carboxymethylated dextran or pullulan, and the two components are linked via a peptide.

4.
R6 of the compound [I] has the formula: -NH2 or

5.
(1) R1 and R2 are combined to form a trimethylene group, R3 is 3-aminopropyloxy group, R4 and R5 are hydrogen atoms, (2) R1 is a piperazinomethyl group, R2 and R5 are hydrogen atoms, and R3 and R4 are combined to each other Ethylenedioxy group, (3) R1 is aminomethyl group, R2 and R5 are hydrogen atoms, R3 and R4 are bonded to form an ethylenedioxy group, (4) R1, R2, R4 and R5 are hydrogen atoms, R3 is 3-aminopropyloxy group, (5) R1 and R2 combine to form an amino-substituted trimethylene group, R3 is a methyl group, R4 is a fluorine atom, R5 is a hydrogen atom, or (6) R1, R3, R4 and R5 are hydrogen The pharmaceutical composition according to claim 4, wherein the atom R2 is an amino group.

6.
(1) R1 and R2 combine to form a trimethylene group, R3 to 3-aminopropyloxy group, R4 and R5 to a hydrogen atom, (2) R1 to aminomethyl group, R2 and R5 to a hydrogen atom, R3 and R4 to a bond And an ethylenedioxy group, (3) R1 and R2 combine to form an amino substituted trimethylene group, R3 is a methyl group, R4 is a fluorine atom, R5 is a hydrogen atom, or (4) R1, R3, R4 and R5 are hydrogen The pharmaceutical composition according to claim 4, wherein the atom R2 is an amino group.

7.
The peptide is glycyl-glycyl-L or D-phenylalanyl-glycine, glycyl-glycine, glycyl-glycyl-glycine, glycyl-glycyl-glycyl-glycine, glycyl-glycyl-glycyl-glycyl-glycine, L or D-phenyl The pharmaceutical composition according to claim 5 or 6, which is alanyl-glycine or L or D-leucyl-glycine.

8.
The pharmaceutical composition according to claim 7, wherein said peptide is glycyl-glycyl-L-

phenylalanyl-glycine.

9.
The pharmaceutical composition according to claim 7, wherein said peptide is glycyl-glycine.

10.
The pharmaceutical composition according to claim 7, wherein said peptide is glycyl-glycyl-glycine.

11.
A pharmaceutical composition according to claim 7, wherein said peptide is glycyl-glycyl-glycyl-glycine.

12.
A pharmaceutical composition according to claim 7, wherein said peptide is L or D-phenylalanyl-glycine.

13.
The pharmaceutical composition according to claim 8, 9, 10, 11 or 12, wherein the degree of carboxymethylation of the polysaccharide is 0.3 or more and 0.8 or less.

14.
The pharmaceutical composition according to any one of claims 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, or 13 which is an antitumor agent.

15.
A therapeutic agent for lung cancer, uterine cancer, ovarian cancer, breast cancer, digestive tract cancer (colorectal cancer, gastric cancer, pancreatic cancer etc.), liver cancer, renal cancer, prostate cancer, head and neck cancer, malignant lymphoma, leukemia, etc. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 or 14.

(19)日本国特許庁（ＪＰ）　(12)公開特許公報（Ａ）　(11)特許出願公開番号

特開平11－71280

(43)公開日　平成11年(1999)３月16日

(51)Int.Cl.[6]	識別記号	ＦＩ		
Ａ６１Ｋ 31/435		Ａ６１Ｋ 31/435		
31/47	ＡＤＵ	31/47	ＡＤＵ	
31/495	ＡＤＶ	31/495	ＡＤＶ	
45/00		45/00		
47/48		47/48		Ｚ

審査請求　未請求　請求項の数15　ＯＬ　（全 25 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平10－175240

(22)出願日　平成10年(1998)６月23日

(31)優先権主張番号　特願平9－169746

(32)優先日　平９(1997)６月26日

(33)優先権主張国　日本（ＪＰ）

(71)出願人　000002956
田辺製薬株式会社
大阪府大阪市中央区道修町３丁目２番10号

(72)発明者　辻原　健二
埼玉県浦和市大字大牧1149番地133

(72)発明者　川口　隆行
東京都豊島区巣鴨１丁目15番２－406号

(72)発明者　奥野　哲
埼玉県三郷市早稲田８－５－18

(72)発明者　矢野　敏朗
埼玉県浦和市上木崎１－２－20　セルテーヌ上木崎502

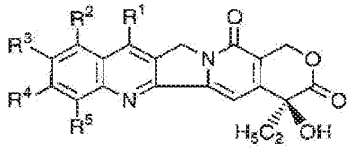
(74)代理人　弁理士　箕浦　繁夫

(54)【発明の名称】　医薬組成物

(57)【要約】
【課題】　副作用の少なく、かつ、著しく増強された抗腫瘍作用を有するカンプトテシン誘導体を有効成分としてなる医薬組成物を提供する。
【解決手段】　７位～１２位の隣接位の置換基が環を形成すると共に、アミノアルコキシ基、ヒドロキシアルコキシ基等を有するカンプトテシン化合物を、アミノ酸またはペプチドを介して、カルボキシル基を含有する多糖類と結合させて、本発明の所望の有効成分であるカンプトテシン誘導体に導く。

OnCusp
Ex. 1002

【特許請求の範囲】
【請求項１】　一般式
【化１】

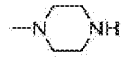


[I]

［式中、R^1～R^5は（Ａ）R^1～R^5のうち、隣接する２つが互いに結合してアルキレン基を形成しているかまたは２つとも水素原子であり、残りのR^1～R^5のうち１つが$-X_n-Alk_a-R^6$であり、他の２つが水素原子であるか、あるいは（Ｂ）R^1～R^5のうち、隣接する２つが互いに結合してアルキレン基を形成し、そのアルキレン基のいずれかの炭素原子に$-X_n-Alk_a-R^6$が置換しており、R^1～R^5の残りの３つが水素原子、アルキル基またはハロゲン原子であることを表し、（Ａ）および（Ｂ）におけるアルキレン基中の１つまたは２つのメチレン基は－Ｏ－、－Ｓ－または－ＮＨ－で置き換えられていてもよく、Ｘは－Ｏ－または－ＮＨ－であり、Ａｌｋはアルキレン基であり、R^6は$-NH_2$、
【化２】



または－ＯＨであり、ｍおよびｎは共に０または１であるか、ｍが１、ｎが０である］で示されるカンプトテシン化合物［Ｉ］のR^6とカルボキシル基を有する多糖類とがアミノ酸またはペプチドを介して結合してなるカンプトテシン誘導体またはその薬理学的に許容しうる塩を有効成分としてなる医薬組成物。
【請求項２】　多糖類のカルボキシル基の一部または全部とアミノ酸またはペプチドのアミノ基が酸アミド結合し、このアミノ酸またはペプチドのカルボキシル基の全部または一部と化合物［Ｉ］のR^6とが酸アミド結合またはエステル結合してなる請求項１記載の医薬組成物。
【請求項３】　多糖類のカルボキシル基の一部または全部とアミノ酸またはペプチドのＮ末端アミノ基とが酸アミド結合し、このアミノ酸またはペプチドのＣ末端カルボキシル基と化合物［Ｉ］のR^6とが酸アミド結合またはエステル結合してなる請求項２記載の医薬組成物。
【請求項４】　化合物［Ｉ］のR^5が式：$-NH_2$または
【化３】



であり、カルボキシル基を有する多糖類がカルボキシメチル化されたデキストランまたはプルランであり、両成分がペプチドを介して結合してなる請求項３記載の医薬組成物。
【請求項５】　（１）R^1及びR^2が結合してトリメチレン基、R^3が３－アミノプロピルオキシ基、R^4及びR^5が水素原子、（２）R^1がピペラジノメチル基、R^2及びR^5が水素原子、R^3及びR^4が結合してエチレンジオキシ基、（３）R^1がアミノメチル基、R^2及びR^5が水素原子、R^3及びR^4が結合してエチレンジオキシ基、（４）R^1、R^2、R^4及びR^5が水素原子、R^3が３－アミノプロピルオキシ基、（５）R^1及びR^2が結合してアミノ置換トリメチレン基、R^3がメチル基、R^4がフッ素原子、R^5が水素原子、または（６）R^1、R^3、R^4及びR^5が水素原子、R^2がアミノ基である請求項４記載の医薬組成物。
【請求項６】　（１）R^1及びR^2が結合してトリメチレン基、R^3が３－アミノプロピルオキシ基、R^4及びR^5が水素原子、（２）R^1がアミノメチル基、R^2及びR^5が水素原子、R^3及びR^4が結合してエチレンジオキシ基、（３）R^1及びR^2が結合してアミノ置換トリメチレン基、R^3がメチル基、R^4がフッ素原子、R^5が水素原子、または（４）R^1、R^3、R^4及びR^5が水素原子、R^2がアミノ基である請求項４記載の医薬組成物。
【請求項７】　該ペプチドがグリシル－グリシル－ＬまたはＤ－フェニルアラニル－グリシン、グリシル－グリシル－グリシン、グリシル－グリシル－グリシル－グリシン、グリシル－グリシル－グリシル－グリシル－グリシン、グリシル－グリシル－グリシル－グリシル－グリシン、ＬまたはＤ－フェニルアラニル－グリシンまたはＬまたはＤ－ロイシル－グリシンである請求項５または６記載の医薬組成物。
【請求項８】　該ペプチドがグリシル－グリシル－Ｌ－フェニルアラニル－グリシンである請求項７記載の医薬組成物。
【請求項９】　該ペプチドがグリシル－グリシンである請求項７記載の医薬組成物。
【請求項１０】　該ペプチドがグリシル－グリシル－グリシンである請求項７記載の医薬組成物。
【請求項１１】　該ペプチドがグリシル－グリシル－グリシル－グリシンである請求項７記載の医薬組成物。
【請求項１２】　該ペプチドがＬまたはＤ－フェニルアラニル－グリシンである請求項７記載の医薬組成物。
【請求項１３】　多糖類のカルボキシメチル化度が０．３以上０．８以下である請求項８、９、１０、１１または１２記載の医薬組成物。
【請求項１４】　抗腫瘍薬である請求項１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２または１３記載の医薬組成物。
【請求項１５】　肺癌、子宮癌、卵巣癌、乳癌、消化器癌（大腸癌、胃癌、すい癌等）、肝癌、腎癌、前立腺癌、頭けい部癌、悪性リンパ腫、白血病の治療薬である請求項１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３または１４記載の医薬組成物。
【発明の詳細な説明】
【０００１】

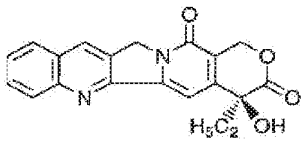
【発明の属する技術分野】本発明は、増強された抗腫瘍作用を示す新規なカンプトテシン誘導体を有効成分としてなる医薬組成物に関する。さらに詳しくは、本発明は、アミノアルコキシ基またはヒドロキシアルコキシ基を有するカンプトテシン化合物等をアミノ酸またはペプチドを介してカルボキシル基を有する多糖類に結合させてなる新規なカンプトテシン誘導体を有効成分としてなる医薬組成物に関する。本発明の有効成分であるカンプトテシン誘導体は、標的作用部位に多量かつ選択的に送達され、その部位で所望の薬理学的作用を発揮することができるものであって、カンプトテシン化合物の有する抗腫瘍作用が著しく増強されると共に、その副作用が軽減され、医薬品として極めて有用なものである。

【０００２】

【従来の技術】カンプトテシンは植物アルカロイドの一種であって、下記の化学構造式：

【０００３】

【化４】



【０００４】を有し、抗白血病作用および抗腫瘍作用を有することが知られており、その誘導体であるイリノテカン塩酸塩（ＣＰＴ－１１）はすでに市販にも供されている。しかしながら、この化合物は、臨床において強い抗腫瘍活性を示す反面、他の抗腫瘍剤等と同様に副作用が強く、その使用に制限を受けている［癌と化学療法、２１巻、７０９頁（１９９４年）］。

【０００５】また、種々のカンプトテシン化合物が合成され、それらが抗腫瘍活性を有することも報告されている（特開平１－２７９８９１号、特開平５－２２２０４８号、特開平６－８７７４６号、特開平６－２２８１４１号、特表平４－５０３５０５号、特表平４－５０２０１７号等）。

【０００６】一方、この種の副作用の強い薬物について抗腫瘍活性を増大させると共にその副作用をできるだけ抑えるために、近年、薬物を必要な組織に必要な量だけ送達する、いわゆるドラッグ・デリバリー・システム（Ｄｒｕｇ　ＤｅｌｉｖｅｒｙＳｙｓｔｅｍ）の技術が研究されている。特に、癌化学療法においては、腫瘍細胞と正常細胞との間で抗癌剤感受性に十分な差異が得られないことが問題であり、抗癌剤を癌病巣へ選択的に送達するターゲッティング型ドラッグ・デリバリー・システムの研究が盛んに行われており、例えば、ドキソルビシン－多糖類複合体（ＷＯ　９４／１９３７６号）、ドキソルビシン封入リポソーム［抗癌剤の効果増強とターゲッティング療法（サイエンス・フォーラム株式会社発行）、２２７頁（１９８７年）］、デキストラン結合マイトマイシン［抗癌剤の効果増強とターゲッティング療法（サイエンス・フォーラム株式会社発行）、２７８頁（１９８７年）］等が知られている。

【０００７】

【発明が解決しようとする課題】カンプトテシン化合物は、上述の如く、優れた抗腫瘍作用を有し、医薬として極めて有用である反面、その強い副作用のためにその使用が著しく制限されるという問題がある。本発明は、その優れた薬物活性を保持しつつ、好ましくない副作用の発現を抑えた新しいカンプトテシン誘導体を有効成分としてなる医薬組成物を提供するものである。

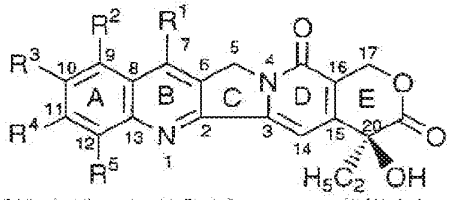
【０００８】

【課題を解決するための手段】本発明は、反応性基を有するカンプトテシン化合物に、アミノ酸またはペプチドを介してカルボキシル基を有する多糖類を結合させたカンプトテシン誘導体を有効成分としてなる医薬組成物に関する。

【０００９】すなわち、アミノアルコキシ基、ヒドロキシアルコキシ基等を有する、下記の一般式

【００１０】

【化５】



[I]

【００１１】［式中、R^1～R^5は（Ａ）R^1～R^5のうち、隣接する２つが互いに結合してアルキレン基を形成しているかまたは２つとも水素原子であり、残りのR^1～R^5のうち１つが$-X_n-A1k_a-R^6$であり、他の２つが水素原子であるか、あるいは（Ｂ）R^1～R^5のうち、隣接する２つが互いに結合してアルキレン基を形成し、そのアルキレン基のいずれかの炭素原子に$-X_n-A1k_a-R^6$が置換しており、R^1～R^5の残りの３つが水素原子、アルキル基またはハロゲン原子であることを表し、（Ａ）および（Ｂ）におけるアルキレン基中の１つまたは２つのメチレン基は－Ｏ－、－Ｓ－または－ＮＨ－で置き換えられていてもよく、Ｘは－Ｏ－または－ＮＨ－であり、Ａ１ｋはアルキレン基であり、R^6は－NH_2、

【００１２】

【化６】



【００１３】または－ＯＨであり、ｍおよびｎは共に０または１であるか、ｍが１、ｎが０である］で示されるカンプトテシン化合物［Ｉ］のR⁶とカルボキシル基を有する多糖類とがアミノ酸またはペプチドを介して結合してなるカンプトテシン誘導体が、著しく強い抗腫瘍作用を有すると共に毒性が低いことが判明した。

【００１４】本発明の目的は、式［Ｉ］で示されるカンプトテシン化合物とカルボキシル基を有する多糖類とをアミノ酸またはペプチドを介して結合させてなる新規なカンプトテシン誘導体を有効成分としてなる医薬組成物を提供するものである。

【００１５】

【発明の実施の形態】本発明の有効成分であるカンプトテシン誘導体としては、カンプトテシン化合物［Ｉ］とカルボキシル基を有する多糖類とがアミノ酸またはペプチドを介して結合してなるものをあげることができる。その具体例としては、多糖類のカルボキシル基の一部または全部とアミノ酸またはペプチドのアミノ基が酸アミド結合し、そのアミノ酸またはペプチドにおけるカルボキシル基の全部または一部と化合物［Ｉ］のR⁶とが酸アミド結合またはエステル結合している化合物をあげることができ、より具体的には多糖類のカルボキシル基の一部または全部とアミノ酸またはペプチドのＮ末端アミノ基が酸アミド結合し、そのアミノ酸またはペプチドのＣ末端カルボキシル基と化合物［Ｉ］のR⁶とが酸アミド結合またはエステル結合している化合物等をあげることができる。

【００１６】式［Ｉ］で示される化合物における各置換基はつぎの基を含む。

【００１７】（Ａ）におけるR¹～R⁵のうち隣接する２つが互いに結合して形成されるアルキレン基（１つまたは２つのメチレン基が－Ｏ－、－Ｓ－または－ＮＨ－で置き換えられていてもよい）としては、一般式［Ｉ］において７位と９位、９位と１０位、１０位と１１位、または１１位と１２位で形成され、炭素数２～６個の直鎖または分岐鎖アルキレン基（例えば、エチレン基、トリメチレン基、テトラメチレン基、ペンタメチレン基、ヘキサメチレン基、メチルメチレン基、メチルエチレン基、メチルトリメチレン基）が挙げられる。

【００１８】該アルキレン基のうち１つのメチレン基が、－Ｏ－、－Ｓ－または－ＮＨ－で置き換えられたアルキレン基としては、末端のメチレン基、末端以外の１つのメチレン基が－Ｏ－、－Ｓ－または－ＮＨ－で置き換えられたアルキレン基が挙げられ、具体的には、式－Ｏ－Ａｌｋ’－（ここで、「Ａｌｋ’」はアルキレン基を意味する。以下同様）で示されるアルキレンオキシ基（例えば、メチレンオキシ基、エチレンオキシ基、トリメチレンオキシ基、テトラメチレンオキシ基、メチルエチレンオキシ基）；式－ＮＨ－Ａｌｋ’－で示されるアルキレンアミノ基（例えば、メチレンアミノ基、エチレンアミノ基、トリメチレンアミノ基、テトラメチレンアミノ基、メチルエチレンアミノ基）；式－Ｓ－Ａｌｋ’－で示されるアルキレンチオ基（例えば、メチレンチオ基、エチレンチオ基、トリメチレンチオ基、テトラメチレンチオ基、メチルエチレンチオ基）；式－Ａｌｋ’－Ｏ－Ａｌｋ’’－（ここで、「Ａｌｋ’’」はＡｌｋ’と同一のまたは異なるアルキレン基を意味する。以下同様）で示されるアルキレンオキシアルキル基（例えば、メチレンオキシメチル基、エチレンオキシメチル基、トリメチレンオキシメチル基、メチルエチレンオキシメチル基）；式－Ａｌｋ’－ＮＨ－Ａｌｋ’’－で示されるアルキレンアミノアルキル基（例えば、メチレンアミノメチル基、エチレンアミノメチル基、トリメチレンアミノメチル基、メチルエチレンアミノメチル基）；式－Ａｌｋ’－Ｓ－Ａｌｋ’’－で示されるアルキレンチオアルキル基（例えば、メチレンチオメチル基、エチレンチオメチル基、トリメチレンチオメチル基、メチルエチレンチオメチル基）等が挙げられる。

【００１９】また該アルキレン基のうち２つのメチレン基が－Ｏ－、－Ｓ－または－ＮＨ－で置き換えられたアルキレン基としては、末端のメチレン基、末端以外の２つのメチレン基が－Ｏ－、－Ｓ－または－ＮＨ－で置き換えられたアルキレン基が挙げられ、具体的には、式－Ｏ－Ａｌｋ’－Ｏ－で示されるアルキレンジオキシ基（例えば、メチレンジオキシ基、エチレンジオキシ基、トリメチレンジオキシ基、テトラメチレンジオキシ基、メチルエチレンジオキシ基）；式－ＮＨ－Ａｌｋ’－ＮＨ－で示されるアルキレンジアミノ基（例えば、メチレンジアミノ基、エチレンジアミノ基、トリメチレンジアミノ基、テトラメチレンジアミノ基、メチルエチレンジアミノ基）；式－Ｓ－Ａｌｋ’－Ｓ－で示されるアルキレンジチオ基（例えば、メチレンジチオ基、エチレンジチオ基、トリメチレンジチオ基、テトラメチレンジチオ基、メチルエチレンジチオ基）等が挙げられる。

【００２０】式－X_n－Alk_m－R⁶で示される基におけるＡｌｋとしては、炭素数１～６個の直鎖または分岐鎖アルキレン基（例えば、メチレン基、エチレン基、トリメチレン基、テトラメチレン基、ペンタメチレン基、ヘキサメチレン基、メチルエチレン基、メチルトリメチレン基）が挙げられ、該－X_n－Alk_m－R⁶で示される基の具体例としては、アミノアルキルオキシ基（例えば、アミノエチルオキシ基、アミノプロピルオキシ基）、ピペラジニルアルキルオキシ基（例えば、ピペラジニルエチルオキシ基、ピペラジニルプロピルオキシ基、ピペラジニルブチルオキシ基、ピペラジニルペンチルオキシ基）、ヒドロキシアルキルオキシ基（例えば、ヒドロキシエチルオキシ基、ヒドロキシプロピルオキシ基、ヒドロキシブチルオキシ基、ヒドロキシペンチルオ

キシ基）、アミノアルキルアミノ基（例えば、アミノエチルアミノ基、アミノプロピルアミノ基、アミノブチルアミノ基、アミノペンチルアミノ基）、ピペラジニルアルキルアミノ基（例えば、ピペラジニルエチルアミノ基、ピペラジニルプロピルアミノ基、ピペラジニルブチルアミノ基、ピペラジニルペンチルアミノ基）、ヒドロキシアルキルアミノ基（例えば、ヒドロキシエチルアミノ基、ヒドロキシプロピルアミノ基、ヒドロキシブチルアミノ基、ヒドロキシペンチルアミノ基）、アミノアルキル基（例えば、アミノメチル基、アミノエチル基、アミノプロピル基、アミノブチル基、アミノペンチル基）、ピペラジニルアルキル基（例えば、ピペラジニルメチル基、ピペラジニルエチル基、ピペラジニルプロピル基、ピペラジニルブチル基、ピペラジニルペンチル基）、ヒドロキシアルキル基（例えば、ヒドロキシメチル基、ヒドロキシエチル基、ヒドロキシプロピル基、ヒドロキシブチル基、ヒドロキシペンチル基）、アミノ基、ピペラジノ基、およびヒドロキシ基等が挙げられる。

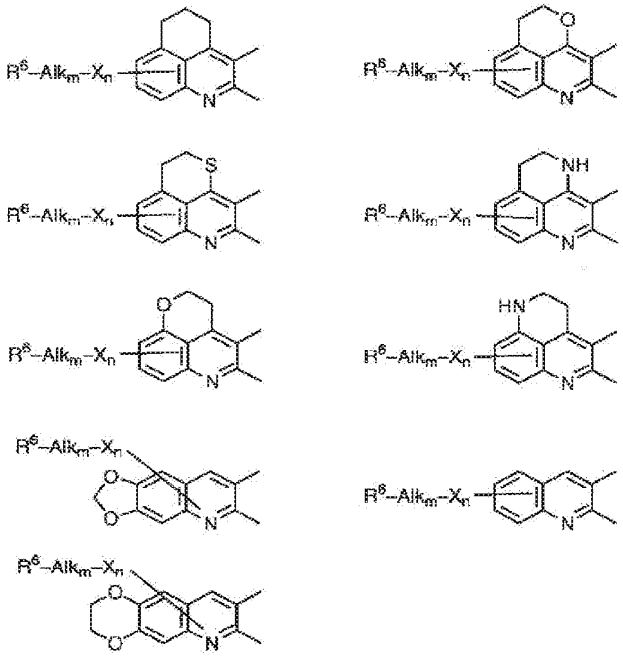
【００２１】また、（Ｂ）におけるR^1～R^5のうち隣接する２つが互いに結合して形成されるアルキレン基（１つまたは２つのメチレン基が－Ｏ－、－Ｓ－または－ＮＨ－で置き換えられていてもよい）であって、そのアルキレン基のいずれかの炭素原子に$-X_n-Alk_m-R^6$が置換している基としては、一般式［Ｉ］において、７位と９位、９位と１０位、１０位と１１位または１１位と１２位間で形成され、炭素数２～６個の直鎖または分岐鎖アルキレン基（例えば、エチレン基、トリメチレン基、テトラメチレン基、ペンタメチレン基、ヘキサメチレン基、メチルエチレン基、メチルトリメチレン基）が挙げられ、そのアルキレン基のうち１つのメチレン基が－Ｏ－、－Ｓ－または－ＮＨ－で置き換えられたアルキレン基および２つのメチレン基が－Ｏ－、－Ｓ－または－ＮＨ－で置き換えられたアルキレン基の具体例としては、いずれも前記と同じものが挙げられる。また、これらのうちの１つの炭素原子に置換している$-X_n-Alk_m-R^6$も上記と同じものが例示される。

【００２２】また、上記R^1～R^5のうち隣接してアルキレン基を形成する以外の残りの基におけるアルキル基としては、炭素数１～６個の直鎖または分岐鎖アルキル基（例えば、メチル基、エチル基、ｎ－プロピル基、イソプロピル基、ｎ－ブチル基、イソブチル基、ｓｅｃ－ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基）が挙げられ、またハロゲン原子としてはフッ素、塩素、臭素およびヨウ素が挙げられる。

【００２３】さらに、具体的なカンプトテシン化合物［Ｉ］として、（Ａ）における環Ａ・環Ｂ部分の部分構造の具体例としては、次のものが挙げられる。

【００２４】

【化７】



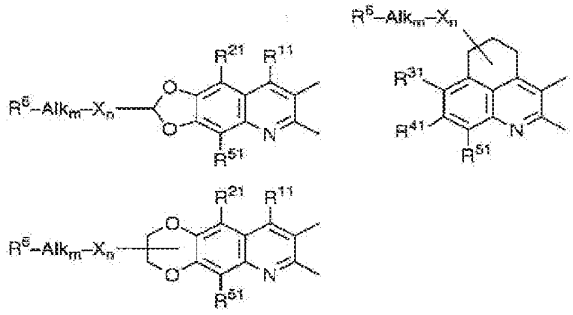
【００２５】［式中、Ｘ、Ａｌｋ、R^6、ｍおよびｎは前記に同じ］

また、（Ｂ）における環Ａ・環Ｂ部分の部分構造の具体例としては、次のものが挙げられる。

【００２６】

【化８】

OnCusp
Ex. 1002



【００２７】［式中、R^{11}、R^{21}、R^{31}、R^{41}およびR^{51}はアルキル基、ハロゲン原子、または水素原子を意味し、Ｘ、Ａｌｋ、R^6、ｍおよびｎは前記に同じ］
R^1～R^5の好ましい組み合わせとして、
（１）R^1及びR^2が結合してトリメチレン基、R^3が３－アミノプロピルオキシ基、R^4及びR^5が水素原子
（２）R^1がピペラジノメチル基、R^2及びR^5が水素原子、R^3及びR^4が結合してエチレンジオキシ基
（３）R^1がアミノメチル基、R^2及びR^5が水素原子、R^3及びR^4が結合してエチレンジオキシ基
（４）R^1、R^2、R^4及びR^5が水素原子、R^3が３－アミノプロピルオキシ基
（５）R^1及びR^2が結合してアミノ置換トリメチレン基、R^3がメチル基、R^4がフッ素原子、R^5が水素原子
（６）R^1、R^3、R^4及びR^5が水素原子、R^2がアミノ基
であるものを挙げることができるが、とりわけ、
（１）R^1及びR^2が結合してトリメチレン基、R^3が３－アミノプロピルオキシ基、R^4及びR^5が水素原子
（２）R^1がピペラジノメチル基、R^2及びR^5が水素原子、R^3及びR^4が結合してエチレンジオキシ基
（３）R^1及びR^2が結合してアミノ置換トリメチレン基、R^3がメチル基、R^4がフッ素原子、R^5が水素原子
（４）R^1、R^3、R^4及びR^5が水素原子、R^2がアミノ基
であるものが好ましい。
【００２８】本発明における、カンプトテシン化合物［Ｉ］とアミノ酸またはペプチドを介して結合される「カルボキシル基を有する多糖類」とは、前記ＷＯ　９４／１９３７６号に開示されている物質と同じものを含み、本来的にその構造中にカルボキシル基を有する多糖類（例えば、ヒアルロン酸、ペクチン酸、アルギン酸、コンドロイチン、ヘパリンなど）と、本来的にカルボキシル基を有さない多糖類（例えば、プルラン、デキストラン、マンナン、キチン、マンノグルカン、キトサンなど）にカルボキシル基を導入したものを含む。このうち、多糖類としてはデキストランが特に好ましく、その平均分子量は２０，０００～４００，０００、とりわけ５０，０００～１５０，０００［ゲル浸透クロマトグラフィー（ＧＰＣ）法、新生化学実験講座第２０巻第７頁］の範囲であるのが好ましい。本来的にカルボキシル基を有さない多糖類にカルボキシル基を導入したものとは、そのカルボキシル基を有さない多糖類の、一部もしくは全部の水酸基の水素原子がカルボキシ－C_{1-4}アルキル基で置換されているものを意味する。
【００２９】また、本発明における「カルボキシル基を有する多糖類」には、本来的にカルボキシル基を有さない多糖類をいったん還元剤で処理後、一部または全部の水酸基の水素原子をカルボキシ－C_{1-4}アルキル基で置換したものも含まれる。
【００３０】上記多糖類の水酸基の水素原子と置換されるカルボキシ－C_{1-4}アルキル基のアルキル部分は直鎖または分岐鎖のいずれであってもよい。カルボキシ－C_{1-4}アルキル基の好ましい例としては、カルボキシメチル基、１－カルボキシエチル基、３－カルボキシプロピル基、１－メチル－３－カルボキシプロピル基、２－メチル－３－カルボキシプロピル基、４－カルボキシブチル基などが挙げられ、特にカルボキシメチル基、１－カルボキシエチル基が好ましい。
【００３１】本発明においては、カルボキシル基を有する多糖類がカルボキシメチル化されたデキストランまたはプルランであるものが好ましい。
【００３２】なお、上記のカルボキシアルキル基を導入する場合、その導入の程度は、糖残基一つあたりのカルボキシアルキル基の数として定義される「置換度」によって表すことができる。すなわち、
【００３３】
【数１】

$$\text{置換度} = \frac{\text{分子中のカルボキシアルキル基の数}}{\text{分子中の糖残基の総数}}$$

【００３４】と表すことができる。なお、以下この置換度を、カルボキシアルキル基がカルボキシメチル基である場合には「カルボキシメチル（ＣＭ）化度」という。
【００３５】多糖類がプルラン、デキストランまたはマンノグルカンの場合、全ての水酸基が置換された場合には置換度は３であり、０．３以上０．８以下が好ましい。
【００３６】多糖類がキチンである場合、全ての水酸基が置換された場合には置換度は２であり、０．３以上０．８以下が好ましい。
【００３７】なお、多糖類が元来カルボキシル基を有するものである場合を除き、多糖類分子中に少なくとも１つのカルボキシアルキル基が存在していることが必要である。従って、この意味で置換度が０である化合物は本

発明の多糖類から除かれる。

【００３８】これらのカルボキシル基を有する多糖類は、ＷＯ　９４／１９３７６号に記載の方法によって製造されうる。

【００３９】カンプトテシン化合物［Ｉ］とカルボキシル基を有する多糖類との結合に際して介在させるべきアミノ酸としては、天然アミノ酸および合成アミノ酸（Ｄ－アミノ酸、Ｌ－アミノ酸、これらの混合物を含む）のいずれも含み、また中性アミノ酸、塩基性アミノ酸および酸性アミノ酸のいずれであってもよい。さらにα－アミノ酸に限らず、β－アミノ酸、γ－アミノ酸、ε－アミノ酸等も含まれる。具体例としては、グリシン、α－アラニン、β－アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、スレオニン、システイン、メチオニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、リシン、アルギニン、フェニルアラニン、チロシン、ヒスチジン、トリアトファン、プロリン、オキシプロリン、γ－アミノ酪酸、ε－アミノカプロン酸等が挙げられる。

【００４０】またペプチドとしては、上記アミノ酸から導かれるペプチドのほか、鎖中の一部にアミノ酸以外の化合物を含む場合も包含する。例えば、コハク酸のようなジカルボン酸、エチレンジアミンの様なジアミンあるいはエチレングリコールの様なジオールがペプチド鎖の中にまたは末端に存在していてもよい。また、ペプチド鎖の結合方向は、多糖類のカルボキシル基にＮ末端から酸アミド結合によって結合しているのが通常であるが、ペプチド鎖中塩基性アミノ酸（例えば、リシン）が存在する場合にはそのε－アミノ基を多糖類のカルボキシル基と結合させ、α－アミノ基をペプチド鎖のＣ末端カルボキシル基と結合させることによってペプチド鎖の結合方向を逆転させてもよい。

【００４１】このようなペプチドは２以上のアミノ酸がペプチド結合したもの、すなわちペプチド鎖２以上のものであって、好ましくは、ペプチド鎖２～５のものである。その具体的なペプチド鎖の例としては、例えば、グリシル－グリシル－ＬまたはＤ－フェニルアラニル－グリシン、グリシル－グリシン、グリシル－グリシル－グリシン、グリシル－グリシル－グリシル－グリシン、グリシル－グリシル－グリシル－グリシル－グリシン、ＬまたはＤ－フェニルアラニル－グリシン、ＬまたはＤ－チロシル－グリシンまたはＬまたはＤ－ロイシル－グリシンおよび鎖中にこの配列を含むペプチド鎖が挙げられる（ここで、これらペプチドおよびこれら配列を含むペプチド鎖のＮ末端側が多糖類のカルボキシル基と結合する）。

【００４２】これらペプチドのうち、グリシル－グリシル－ＬまたはＤ－フェニルアラニル－グリシン、グリシル－グリシン、グリシル－グリシル－グリシン、グリシル－グリシル－グリシル－グリシン、グリシル－グリシル－グリシル－グリシル－グリシン、ＬまたはＤ－フェニルアラニル－グリシン、ＬまたはＤ－ロイシル－グリシンであるものがより好ましく、グリシル－グリシル－Ｌ－フェニルアラニル－グリシン、グリシル－グリシン、グリシル－グリシル－グリシン、グリシル－グリシル－グリシル－グリシン、ＬまたはＤ－フェニルアラニル－グリシンがとりわけ好ましい。

【００４３】薬効上好ましいカンプトテシン誘導体としては、化合物［Ｉ］のうち、（１）R^1及びR^2が結合してトリメチレン基、R^3が３－アミノプロピルオキシ基、R^4及びR^5が水素原子、（２）R^1がアミノメチル基、R^2及びR^5が水素原子、R^3及びR^4が結合してエチレンジオキシ基、（３）R^1及びR^2が結合してアミノ置換トリメチレン基、R^3がメチル基、R^4がフッ素原子、R^5が水素原子、または（４）R^1、R^3、R^4及びR^5が水素原子、R^2がアミノ基である化合物とカルボキシメチル化されたデキストランまたはプルランとがグリシル－グリシル－ＬまたはＤ－フェニルアラニル－グリシン、グリシル－グリシン、グリシル－グリシル－グリシン、グリシル－グリシル－グリシル－グリシン、グリシル－グリシル－グリシル－グリシル－グリシンまたはＬまたはＤ－フェニルアラニル－グリシンを介して結合してなる化合物をあげることができる。

【００４４】本発明の有効成分であるカンプトテシン誘導体は、所望により、その薬理学的に許容される塩に導くことができる。そのような塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩のようなアルカリ金属またはアルカリ土類金属の塩、アルギニン塩、リシン塩のようなアミノ酸塩などが挙げられる。

【００４５】本発明の有効成分であるカンプトテシン誘導体またはその薬理的に許容しうる塩は、その分子内塩、付加塩、溶媒和物あるいは水和物などをいずれも含む。

【００４６】本発明の有効成分であるカンプトテシン誘導体またはその薬理的に許容しうる塩は、非経口的（例えば、静脈注射）に投与するのが好ましく、通常、液剤（例えば、溶液、懸濁液、エマルジョン）として用いられる。

【００４７】本発明の医薬組成物の剤形は、例えば、注射用蒸留水、生理的食塩水、ブドウ糖水溶液を用いて注射剤や点滴注射剤とするのが好ましい。

【００４８】本発明の有効成分であるカンプトテシン誘導体またはその薬理的に許容しうる塩の投与量は、投与方法、患者の年令、体重、状態等によっても異なるが、通常、１回あたり、カンプトテシン化合物［Ｉ］［R^5が式：$-NH_2$である場合には塩酸塩、式：

【００４９】

【化９】



【００５０】である場合には塩酸塩または二塩酸塩］に

換算して、０．０２～５０ｍｇ／ｋｇ、とりわけ０．１～１０ｍｇ／ｋｇとなるような範囲で投与するのが好ましい。

【００５１】本発明の医薬組成物は、とりわけ抗腫瘍薬として好適に用いることができる。すなわち、本発明の有効成分であるカンプトテシン誘導体またはその薬理的に許容しうる塩は、優れた抗腫瘍活性を有する。例えば、本発明の有効成分であるカンプトテシン誘導体またはその薬理的に許容しうる塩は、ヒト乳癌ＭＸ－１細胞を皮下移植したヌードマウスにおいて優れた抗腫瘍作用を奏する。

【００５２】このため、本発明の医薬組成物は、固形腫瘍［例えば、肺癌、子宮癌、卵巣癌、乳癌、消化器癌（大腸癌、胃癌、すい癌等）、肝癌、腎癌、前立腺癌、頭けい部癌、悪性リンパ腫等］、液性腫瘍（例えば、白血病等）の治療薬に適用することができる。

【００５３】本発明の有効成分であるカンプトテシン誘導体を製造するには、通常、式［Ｉ］で示される化合物にアミノ酸またはペプチドを結合させ、ついでこれにカルボキシル基を有する多糖類を反応させて結合させる方法が採用される。

【００５４】化合物［Ｉ］とアミノ酸またはペプチドとの反応により、式［Ｉ］中R^6が式：$-NH_2$またはピペラジノ基のときはアミノ酸またはペプチドのＣ末端カルボキシル基との間で酸アミド結合され、またR^6が－ＯＨのときはエステル結合される。この際、該酸アミド結合またはエステル結合にあずからないアミノ酸またはペプチド中の他の官能基、例えばＮ末端アミノ基また他のカルボキシル基等は常法により保護しておくのが好ましい。そのような保護基は一般にアミノ酸の保護に用いられているものであればとくに制限されないが、例えばアミノ基の保護基としてはｔ－ブトキシカルボニル基、ｐ－メトキシベンジルオキシカルボニル基などが、またカルボキシル基の保護基としては低級アルキル基（例えばｔ－ブチル基）、ベンジル基などを挙げることができる。

【００５５】上記酸アミド結合およびエステル結合の形成は、常法に従って行うことができ、例えば、適当な溶媒（例えば、ジメチルホルムアミド、テトラヒドロフラン、アセトニトリル等）中、縮合剤（例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド、１－（３－ジメチルアミノプロピル）－３－エチルカルボジイミド塩酸塩等）の存在下で行うことができる。

【００５６】上記のようにして得られるアミノ酸またはペプチドが結合したカンプトテシン化合物を、アミノ基またはカルボキシル基が保護されている場合は、必要に応じて、その保護基を常法により除去したのち、カルボキシル基を有する多糖類を反応させることによりカンプトテシン誘導体が製造される。この反応により、多糖類のカルボキシル基の一部または全部と、上記カンプトテシン化合物［Ｉ］に結合したアミノ酸またはペプチドのＮ末端アミノ基とが酸アミド結合する。

【００５７】カンプトテシン化合物［Ｉ］にアミノ酸またはペプチドが結合したものとカルボキシル基を有する多糖類との反応は、常法に従って行うことができ、例えば、適当な溶媒（例えば、水、エタノール、ジメチルホルムアミド等、またはこれらの混合液）中、縮合剤（例えば、１－（３－ジメチルアミノプロピル）－３－エチルカルボジイミド塩酸塩、２－エトキシ－１－エトキシカルボニル－１，２－ジヒドロキノン等）の存在下で行うことができる。

【００５８】本発明の有効成分であるカンプトテシン誘導体において、多糖類と薬効成分たるカンプトテシン化合物［Ｉ］との結合割合は多糖類の種類によって適宜選択されるが、一般的にカンプトテシン化合物［Ｉ］の含有率は以下の割合とするのが好ましい。

【００５９】多糖類がプルラン、デキストラン、キチン、マンノグルカンおよびＮ－アセチル－脱Ｎ－硫酸ヘパリンの場合には０．１～２０重量％が好ましく、２～１０重量％が特に好ましい。

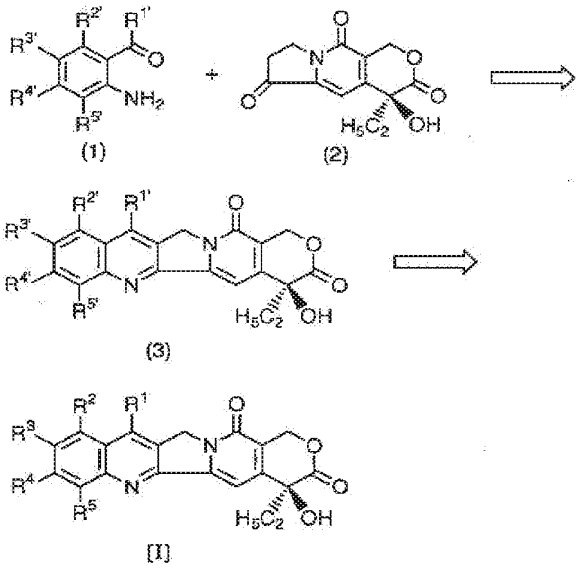
【００６０】本発明において、有効成分であるカンプトテシン誘導体の平均分子量（ＧＰＣ法で測定）は、多糖類がデキストランである場合は、例えば、３０，０００～５００，０００、好ましくは６０，０００～２００，０００である。

【００６１】本発明の有効成分であるカンプトテシン化合物［Ｉ］は、公知化合物を含み（例えば、特開平１－２７９８９１号、特開平５－２２２０４８号、特開平６－８７７４６号、特開平６－２２８１４１号、特表平４－５０３５０５号、特表平５－５０２０１７号等に記載）、公知の方法で製造され、例えば、下記反応式１で示す方法で製造される。

【００６２】

【化１０】

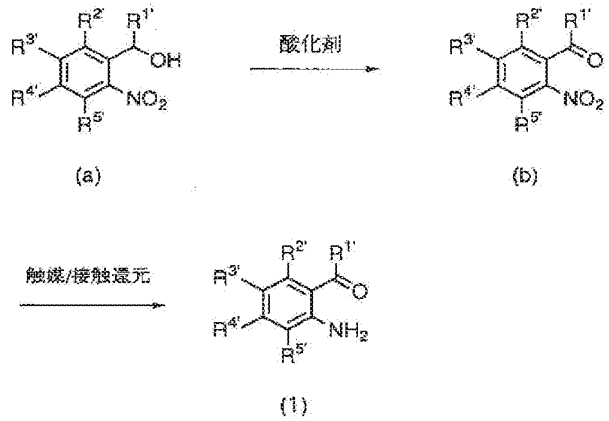
反応式１



【００６３】［式中、R^1、R^2、R^3、R^4およびR^5は前記に同じ、$R^{1'}$、$R^{2'}$、$R^{3'}$、$R^{4'}$および$R^{5'}$はそれらのいずれかに含まれる置換基$-X_n-Alk_m-R^6$中のアミノ基、ピペラジノ基またはヒドロキシ基が保護されている以外は、それぞれR^1、R^2、R^3、R^4およびR^5と同じである］
すなわち、アミノカルボニル化合物（１）を公知物質のピラノインドリジン（２）（ＥＰ－０２２０６０１－Ａを参照）とフリードランダー縮合反応として知られている方法（オルガニック・リアクションズ（Ｏｒｇａｎｉｃ　Ｒｅａｃｔｉｏｎｓ）２８，ｐｐ３７～２０２，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．　Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ（１９８２）を参照）によって縮合させ、ついで保護基を除去することによりカンプトテシン化合物［Ｉ］を得る。
【００６４】なお、上記の製法において、$R^{1'}$～$R^{5'}$のいずれかに含まれる式：$-X_n-Alk_m-R^6$基は、ｍが１、ｎが１の場合には、該フリードランダー縮合反応後に導入することもできる。すなわち、出発化合物（１）の代わりに、該化合物（１）において対応する基が水酸基（ＨＯ－）またはアミノ基（H_2N－）である化合物を用い、それを化合物（２）とフリードランダー縮合反応に付し、ついで得られた縮合生成物に、式：$R^{6'}-Alk_m-OH$（$R^{6'}$は保護されたアミノ基、ピペラジノ基またはヒドロキシ基、Ａｌｋおよびｍは前記に同じ）で示される保護されたアミノアルカノールまたはヒドロキシアルカノールまたはそれらの反応性誘導体（例えば、保護されたアミノアルキルハライド、保護されたヒドロキシアルキルハライド）を作用させ、ついで保護基を除去することにより所望の化合物［Ｉ］を得る。
【００６５】上記の方法において用いられる出発化合物（１）は、例えば、下記反応式２に示される方法で製造される。
【００６６】
【化１１】

OnCusp
Ex. 1002

反応式　２



【００６７】［式中、$R^{1'}$、$R^{2'}$、$R^{3'}$、$R^{4'}$および$R^{5'}$は前記に同じ］
すなわち、ヒドロキシ化合物（ａ）を酸化剤、例えば、ピリジニウムジクロメートで処理して、ケトン化合物（ｂ）とし、ついでこれを適当な触媒、例えば、パラジウム－炭素（Ｐｄ－Ｃ）の存在下に接触還元することにより、化合物（１）を得る。
【００６８】また、上記ヒドロキシ化合物（ａ）において、$R^{1'}$、$R^{2'}$、$R^{3'}$、$R^{4'}$および$R^{5'}$のいずれかに含まれる$-X_n-Alk_m-R^6$はmが１、ｎが１の場合には、対応する基が水酸基（ＨＯ－）またはアミノ基（H_2N－）である化合物と一般式：
【００６９】
【化１２】

$$HO-Alk-R^6$$

【００７０】［式中、ＡｌｋおよびR⁶は前記に同じ］で示される化合物またはその反応性誘導体（例えば、置換アルキルハライド）と反応させることにより、製造することができる。
【００７１】
【実験例】
実験例１〔ヒト乳癌ＭＸ－１細胞に対する作用〕
継代ＭＸ－１担癌ヌードマウスから腫瘍を摘出後細切し、約３ｍｍ角の腫瘍組織片を作製し、８週齢雄性ヌードマウスの腹側部皮下に移植する。腫瘍の長径及び短径を計測し、下式（１）に従って求めた推定腫瘍体積が１００－３００mm^3の範囲に増殖した時点（移植後１１日目）で一群５匹とし、治療開始する。投与検体は、対応するカンプトテシン化合物［１］［R⁶が式：$-NH_2$である場合には、塩酸塩］に換算して、生理食塩水に溶解し、単回で静脈内投与する。検体投与後３１日まで経日的に腫瘍の長径及び短径を測定し、下式（１）に従い、マウス１匹毎に推定腫瘍体積を計算する。マウス１匹毎に各計測日の相対腫瘍体積比（投与開始日の腫瘍体積に対する各計測日の腫瘍体積比）を計算し、経日的に各群の平均相対腫瘍体積比を求め、実験期間中の腫瘍の増殖抑制率を下式（２）に従い、算出する。各投与検体の最大増殖抑制率％（実験期間中に算出した該増殖抑制率のうち各投与検体において最大となったもの）は、下記第１表記載の通りである。
【００７２】
【数２】

$$\text{腫瘍体積} = \frac{\text{腫瘍の長径} \times (\text{腫瘍の短径})^2}{2} \quad (1)$$

【００７３】
【数３】

$$\text{増殖抑制率 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{投与群の平均相対腫瘍体積比}}{\text{無処置群の平均相対腫瘍体積比}}\right) \times 100 \quad (2)$$

【００７４】
【表１】

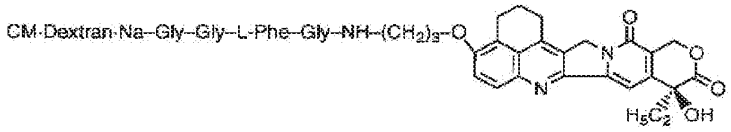
OnCusp
Ex. 1002

表1

製造例番号	投与量（mg／kg）	最大増殖抑制率（%）
1	7．5	90．5
3	7．5	100*
3	2．0	99．7*
6	7．5	98．6*
7	2．0	99．8*

*：投与開始後62日目（最終測定日の2倍の日数）において、完治例のあるもの

【0075】
【製造例】
製造例1
下記式で表されるカンプトテシン誘導体の合成
【0076】
【化13】



【0077】［以下、「CM－Dextran・Na」はカルボキシメチルデキストラン・ナトリウム塩を表す。］
（1）3－（t－ブトキシカルボニルアミノ）プロパノールの合成
3－アミノプロパノール6．0gを塩化メチレン50mlに溶解し、氷冷撹拌下にて、ジ－t－ブチルジカルボネート18．3gを滴下する。室温下12時間撹拌後、反応混合物を濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分離精製して、無色油状の標記化合物13．98gを得る。
【0078】収率：99．9%
IR（neat）：$\nu_{max}^{cm^{-1}}$＝3380，1790
Mass：m／z＝176（［M+H］$^+$）
NMR（300MHz，$CDCl_3$）：δ^{TMS}＝1．45（9H，s），1．62－1．72（2H，m），3．0（1H，brs），3．29（2H，dd，J＝12Hzおよび6Hz），3．66（2H，dd，J＝12Hzおよび6Hz），4．80（1H，brs）
（2）3－（t－ブトキシカルボニルアミノ）プロピルトシレートの合成
3－（t－ブトキシカルボニルアミノ）プロパノール10．0gを塩化メチレン100mlに溶解し、氷冷撹拌下にてトリエチルアミン8．66gおよびトシルクロリド16．3gを加え、反応混合物を室温下一晩撹拌する。反応混合物を濃縮し、残渣を水－酢酸エチルに溶解後、有機層を分離し、飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥する。溶媒を留去後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分離精製して、淡黄色油状の標記化合物15．37gを得る。
【0079】収率：82%
IR（neat）：$\nu_{max}^{cm^{-1}}$＝3400，3340，1700
Mass：m／z＝352（［M+Na］$^+$）
NMR（300MHz，$CDCl_3$）：δ^{TMS}＝1．42（9H，s），1．78－1．90（2H，m），2．45（3H，s），3．11－3．22（2H，m），4．09（2H，t，J＝6Hz），4．5－4．65（1H，m），7．36（2H，d，J＝8Hz），7．77－7．83（2H，m）
（3）5－［3’－（t－ブトキシカルボニルアミノ）プロピルオキシ］－1－ヒドロキシ－8－ニトロ－1，2，3，4－テトラヒドロナフタレンの合成
1，5－ジヒドロキシ－8－ニトロ－1，2，3，4－テトラヒドロナフタレン2．0g（J．Med．Chem．，1973，16（3），254）を乾燥ジメチルホルムアミド80mlに溶解し、炭酸カリウム2当量、ヨウ化ナトリウム1．4当量および3－（t－ブトキシカルボニルアミノ）プロピル　トシレート1．4当量を加える。反応混合物を50℃にて24時間撹拌後、酢酸エチルを加え、飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウム上で乾燥する。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離精製して、淡黄色無定型粉末状の標記化合物3．05gを得る。
【0080】収率：87%
IR（Melt）：$\nu_{max}^{cm^{-1}}$＝3360，1695
Mass：m／z＝384（［M+NH_4］$^+$）
NMR（300MHz，$CDCl_3$）：δ^{TMS}＝1．36

OnCusp
Ex. 1002

（９Ｈ，ｓ），１．５７－１．９０（６Ｈ，ｍ），２．５２－２．７１（２Ｈ，ｍ），３．１１（２Ｈ，ｑ，Ｊ＝６Ｈｚ），４．０７（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝６Ｈｚ），５．１２－５．１７（２Ｈ，ｍ），６．８９（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），６．９６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝９Ｈｚ），７．６８（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝９Ｈｚ）

（４）５－［３’－（ｔ－ブトキシカルボニルアミノ）プロピルオキシ］－８－ニトロ－１，２，３，４－テトラヒドロナフタレン－１－オンの合成

５－［３’－（ｔ－ブトキシカルボニルアミノ）プロピルオキシ］－１－ヒドロキシ－８－ニトロ－１，２，３，４－テトラヒドロナフタレン２．４６ｇを乾燥塩化メチレン１１０ｍｌに溶解し、モレキュラーシーブス３Ａ（ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ｓｈｉｅｖｅｓ　３Ａ）６．７３ｇおよびピリジニウムジクロロクロメート１．５当量を加え、加熱還流する。反応終了後、反応混合物にエーテルを加えて希釈し、不溶物をセライトで沪過して除き、沪液を濃縮、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分離精製して無色粉末状の標記化合物１．８７ｇを得る。

【００８１】融点：７６～７７℃

収率：７６％

ＩＲ（Ｍｅｌｔ）：$\nu_{max}^{cm^{-1}}$＝３５５０，１７００

Ｍａｓｓ：ｍ／ｚ＝３８２（［Ｍ＋NH_4］$^+$）

ＮＭＲ（３００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）：δ^{TMS}＝１．４４（９Ｈ，ｓ），２．０２－２．２０（４Ｈ，ｍ），２．６８－２．７３（２Ｈ，ｍ），２．９２（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝６Ｈｚ），３．３６（２Ｈ，ｑ，Ｊ＝６．５Ｈｚ），４．１２（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝６Ｈｚ），４．７８（１Ｈ，ｂｒｓ），６．９５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝９Ｈｚ），７．３９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝９Ｈｚ）

（５）８－アミノ－５－［３’－（ｔ－ブトキシカルボニルアミノ）プロピルオキシ］－１，２，３，４－テトラヒドロナフタレン－１－オンの合成

５－［３’－（ｔ－ブトキシカルボニルアミノ）プロピルオキシ］－８－ニトロ－１，２，３，４－テトラヒドロナフタレン－１－オン３．５５ｇをエタノール１６０ｍｌに溶解し、１０％Ｐｄ－Ｃ４２０ｍｇを加え、水素雰囲気下、１．５時間撹拌する。触媒を沪過して除き、沪液を濃縮し、残渣をシリカゲルガラムクロマトグラフィーにより分離精製して黄色油状の粗生成物３．５６ｇを得る。

【００８２】該粗生成物を精製して黄色粉末状の標記化合物２．７０ｇを得る。

【００８３】融点：１１２～１１５℃

収率：８３％

ＩＲ（Ｎｕｊｏｌ）：$\nu_{max}^{cm^{-1}}$＝３４４０，３３４０，１７００，１６５０

Ｍａｓｓ：ｍ／ｚ＝３３５（［Ｍ＋Ｈ］$^+$）

ＮＭＲ（３００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）：δ^{TMS}＝１．４５（９Ｈ，ｓ），１．９２－２．６７（４Ｈ，ｍ），２．６１（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝６Ｈｚ），２．８７（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝６Ｈｚ），３．３５（２Ｈ，ｑ，Ｊ＝６．５Ｈｚ），３．９４（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝６Ｈｚ），４．８５（１Ｈ，ｂｒｓ），６．１０（２Ｈ，ｂｒｓ），６．４８（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝９Ｈｚ），６．９４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝９Ｈｚ）

（６）１０－［３’－（ｔ－ブトキシカルボニルアミノ）プロピルオキシ］－７，９－トリメチレン－（２０Ｓ）－カンプトテシンの合成

８－アミノ－５－［３’－（ｔ－ブトキシカルボニルアミノ）プロピルオキシ］－１，２，３，４－テトラヒドロナフタレン－１－オン２．０３ｇをエタノール８５ｍｌに溶解し、（４Ｓ）－７，８－ジヒドロ－４－エチル－４－ヒドロキシ－１Ｈ－ピラノ［３，４－ｆ］インドリジン－３，６，１０（４Ｈ）－トリオン８００ｍｇおよびｐ－トルエンスルホン酸５８ｍｇを加え、１７時間加熱還流する。反応終了後、溶媒を留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分離精製して淡黄色粉末状の標記化合物８５０ｍｇを得る。

【００８４】融点：２２５～２２７℃（分解）

収率：５０％

ＩＲ（Ｎｕｊｏｌ）：$\nu_{max}^{cm^{-1}}$＝３４４０，３３２５，１７５０，１７４０，１６５５，１６２０

Ｍａｓｓ：ｍ／ｚ＝５６２（［Ｍ＋Ｈ］$^+$）

ＮＭＲ（３００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）：δ^{TMS}＝１．０３（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ），１．４５（９Ｈ，ｓ），１．８２－２．１８（６Ｈ，ｍ），３．０６－３．１３（４Ｈ，ｍ），３．４１（２Ｈ，ｑ，Ｊ＝６Ｈｚ），３．７９（１Ｈ，ｓ），４．２４（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝６Ｈｚ），４．９（１Ｈ，ｂｒ），５．１６（２Ｈ，ｓ），５．３０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１６Ｈｚ），５．７５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１６Ｈｚ），７．５１（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝９Ｈｚ），７．６１（１Ｈ，ｓ），８．０６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝９Ｈｚ）

（７）１０－（３’－アミノプロピルオキシ）－７，９－トリメチレン－（２０Ｓ）－カンプトテシン塩酸塩の合成

１０－［３’－（ｔ－ブトキシカルボニルアミノ）プロピルオキシ］－７，９－トリメチレン－（２０Ｓ）－カンプトテシン８３６ｍｇをジオキサン３０ｍｌに懸濁し、氷冷下撹拌しながら１８％塩酸－ジオキサン１５ｍｌを滴下する。反応混合物を室温下撹拌し、反応終了後、イソプロピルエーテルを加え、撹拌する。析出する粉末を沪取し、エーテル洗浄後、減圧乾燥し得られた黄色粉末を水に溶解し、凍結乾燥して黄色粉末状の標記化合物６２０ｍｇを得る。

【００８５】融点：１９４℃以上（分解）

収率：８４％

ＩＲ（Ｎｕｊｏｌ）：$\nu_{max}^{cm^{-1}}$＝１７４０，１６５５

Ｍａｓｓ：ｍ／ｚ＝４６２（［Ｍ－Ｃｌ］＋）
ＮＭＲ（３００ＭＨｚ，d_6－ＤＭＳＯ）：δ^{TMS}＝０．８８（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ），１．８１－１．９４（２Ｈ，ｍ），１．９７－２．１５（４Ｈ，ｍ），３．０１－３．１４（６Ｈ，ｍ），４．２８（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝６Ｈｚ），５．２３（２Ｈ，ｓ），５．４３（２Ｈ，ｓ），７．２８（１Ｈ，ｓ），７．７１（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝９．５Ｈｚ），７．９５－８．０８（３Ｈ，ｂｒｓ），８．０３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝９．５Ｈｚ）
（８）１０－［３’－（ｔ－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ルアミノ）プロピルオキシ］－７，９－トリメチレン－（２０Ｓ）－カンプトテシンの合成
１０－（３’－アミノプロピルオキシ）－７，９－トリメチレン－（２０Ｓ）－カンプトテシン塩酸塩１５８ｍｇとジイソプロピルエチルアミン４９ｍｇを撹拌下、ジメチルホルムアミド５ｍｌに溶解し、これにｔ－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２７８ｍｇおよびＮ－ヒドロキシスクシンイミド１４３ｍｇを乾燥ジメチルホルムアミド８ｍｌに溶解した溶液を加えて、さらに氷冷下撹拌しながら１－（３－ジメチルアミノプロピル）－３－エチルカルボジイミド塩酸塩１８３ｍｇを加え、１６時間室温下撹拌する。反応終了後、溶媒を留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分離精製して、淡黄色粉末状の標記化合物２８５ｍｇを得る。
【００８６】収率：定量的収率
ＩＲ（Ｎｕｊｏｌ）：$\nu_{max}^{cm^{-1}}$＝３２９０，１６６０
Ｍａｓｓ：ｍ／ｚ＝８８０（［Ｍ＋Ｈ］＋）
ＮＭＲ（３００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）：δ^{TMS}＝１．０２（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ），１．４３（９Ｈ，ｓ），１．８５－１．９４（２Ｈ，ｍ），２．０２－２．１０（４Ｈ，ｍ），２．９７－３．０５（５Ｈ，ｍ），３．２３（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１４Ｈｚおよび５Ｈｚ），３．４９（２Ｈ，ｑ，Ｊ＝６．５Ｈｚ），３．６０－３．８０（６Ｈ，ｍ），４．２０（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６Ｈｚ），４．５０－４．５６（１Ｈ，ｍ），５．１１（２Ｈ，ｓ），５．２９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１６．５Ｈｚ），５．７１（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１６．５Ｈｚ），５．８５（１Ｈ，ｂｒｔ），７．０８（１Ｈ，ｍ），７．１８－７．２７（５Ｈ，ｍ），７．４５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７Ｈｚ），７．５２（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝９．５Ｈｚ），７．５８（１Ｈ，ｓ），７．７１（１Ｈ，ｍ），７．９９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝９．５Ｈｚ）
（９）１０－［３’－（グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニルグリシルアミノ）プロピルオキシ］－７，９－トリメチレン－（２０Ｓ）－カンプトテシン塩酸塩の合成
１０－［３’－（ｔ－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ルアミノ）プロピルオキシ］－７，９－トリメチレン－（２０Ｓ）－カンプトテシン２７３ｍｇをジオキサン１０ｍｌに溶解し、氷冷下撹拌しながら１８％塩酸－ジオキサン１５ｍｌを滴下する。反応混合物を室温下撹拌し、反応終了後イソプロピルエーテルを加え、撹拌、析出する粉末を沪取する。得られた粉末をエーテル洗浄後、減圧乾燥し、得られた黄色粉末を水に溶解後、凍結乾燥して黄色粉末状の標記化合物２１０ｍｇを得る。
【００８７】融点：１７４℃以上（分解）
収率：８３％
ＩＲ（Ｎｕｊｏｌ）：$\nu_{max}^{cm^{-1}}$＝３１９０，１７４５，１６５０
Ｍａｓｓ：ｍ／ｚ＝７８０（［Ｍ－Ｃｌ］＋）
ＮＭＲ（３００ＭＨｚ，d_6－ＤＭＳＯ）：δ^{TMS}＝０．８９（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７Ｈｚ），１．２６－１．３２（２Ｈ，ｍ），１．８６－２．０４（６Ｈ，ｍ），２．７９（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１４Ｈｚおよび１０Ｈｚ），２．９８－３．０５（５Ｈ，ｍ），３．２８－３．３６（２Ｈ，ｍ），３．５４－３．８８（６Ｈ，ｍ），４．２０（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝６Ｈｚ），４．４５－４．５４（１Ｈ，ｍ），５．１９（２Ｈ，ｓ），５．４３（２Ｈ，ｓ），７．１１－７．２７（５Ｈ，ｍ），７．３５（１Ｈ，ｓ），７．７１（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝９．５Ｈｚ），７．９７（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），８．０３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝９．５Ｈｚ），８．１９（３Ｈ，ｂｒ），８．３５（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６Ｈｚ），８．４３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８Ｈｚ），８．６５（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ）
以上の合成により得た、アミノ基を有するカンプトテシン化合物をカルボキシメチルデキストラン（以下、ＣＭ－デキストラン）などカルボキシル基を持つ多糖類と縮合することによりカンプトテシン誘導体へ導くことができる。縮合反応は水溶性カルボジイミド（１－（３－ジメチルアミノプロピル）－３－エチルカルボジイミド塩酸塩、２－エトキシ－１－エトキシカルボニル－１，２－ジヒドロキノリン）等の縮合剤の存在下にて水または水－有機溶媒混合溶媒中にて行うことができる。
【００８８】（１０）カンプトテシン誘導体の調製
ＣＭ－デキストラン・ナトリウム塩５００ｍｇ（ＣＭ化度＝０．５）を水２０ｍｌに溶解し、１０℃以下にて撹拌しながら１０－［３’－（グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニルグリシルアミノ）プロピルオキシ］－７，９－トリメチレン－（２０Ｓ）－カンプトテシン塩酸塩５０ｍｇを加える。１－（３－ジメチルアミノプロピル）－３－エチルカルボジイミド塩酸塩１．５ｇを加え、その間反応液のｐＨを０．１Ｎ塩酸を用いて６．５～７．０に保つ。１０℃以下にて撹拌しながら２時間反応後、０．１Ｎ水酸化ナトリウムを用いてｐＨを９に調整する。反応混合物をイオン交換カラムクロマトグラフィー（ＢｉｏＲａｄＡＧＭＰ－５０、３０ｍｌ、Ｎａ

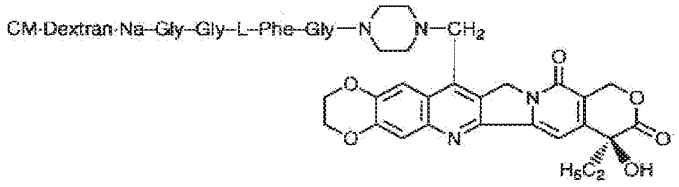
型）で精製し、目的物を含む分画３０ｍｌに３Ｍ食塩水１．２ｍｌを加え、エタノール１５０ｍｌ中に注ぐ。沈殿を遠心分離し、水２０ｍｌを加え沪過する。沪液に３Ｍ食塩水０．４ｍｌを加え、エタノール８０ｍｌに撹拌下加えて、沈殿生成させる。沈殿を遠心分離して集め、溶媒洗浄後、減圧乾燥して前記化１３で示されるカンプトテシン誘導体４１５ｍｇを得る。３８０ｎｍにおける吸収により求めた薬物（１－（７）で得られる化合物；１０－（３’－アミノプロピルオキシ）－７，９－トリメチレン－（２０Ｓ）－カンプトテシン塩酸塩）含量は４．４％である。ゲル浸透カラムクロマトグラフィー（ＧＰＣ）による分析の結果、求められる平均分子量は１６０，０００、多分散度Ｍｗ／Ｍｎは１．５７である（ＧＰＣ分析条件：Ｇ４０００ＳＷＸＬ（東ソー社製）、０．２Ｍリン酸緩衝液（ｐＨ７．０））。

【００８９】製造例２

下記式で表されるカンプトテシン誘導体の合成

【００９０】

【化１４】



【００９１】（１）７－（４’－（ｔ－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ル）ピペラジノ）メチル－１０，１１－エチレンジオキシ－（２０Ｓ）－カンプトテシンの合成

製造例１－（８）と同様にして７－ピペラジノメチル－１０，１１－エチレンジオキシ－（２０Ｓ）－カンプトテシン塩酸塩４５０ｍｇとｔ－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２当量より黄色粉末状の標記化合物５１８ｍｇを得る。

【００９２】収率：７４％

ＩＲ（Ｎｕｊｏｌ）：$\nu_{max}^{cm^{-1}}$＝３２８０，１７５０，１６５５

Ｍａｓｓ：ｍ／ｚ＝９２３（［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$）

ＮＭＲ（３００ＭＨｚ，d_6－ＤＭＳＯ）：δ^{TMS}＝０．８９（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ），１．３７（９Ｈ，ｓ），１．８５－２．１（２Ｈ，ｍ），２．３－２．６（４Ｈ，ｍ），２．７５（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１４Ｈｚおよび１０Ｈｚ），３．０５（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１４Ｈｚおよび４．５Ｈｚ），３．３－３．６（６Ｈ，ｍ），３．５８（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝２１Ｈｚおよび５．５Ｈｚ），３．７４（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１７Ｈｚおよび５．５Ｈｚ），３．９－４．１（４Ｈ，ｍ），４．４４（４Ｈ，ｓ），４．５８（１Ｈ，ｍ），５．２４（２Ｈ，ｓ），５．４２（２Ｈ，ｓ），６．５０（１Ｈ，ｓ），６．９７（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６Ｈｚ），７．１－７．３（６Ｈ，ｍ），７．５５（１Ｈ，ｓ），７．７７（１Ｈ，ｓ），７．８－７．９（１Ｈ，ｂｒ），８．０５－８．２（２Ｈ，ｍ）

（２）７－（４’－（グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニルグリシル）ピペラジノ）メチル－１０，１１－エチレンジオキシ－（２０Ｓ）－カンプトテシン塩酸塩の合成

製造例１－（９）と同様にして、７－（４’－（ｔ－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ル）ピペラジノ）メチル－１０，１１－エチレンジオキシ－（２０Ｓ）－カンプトテシン４７８ｍｇより黄色粉末状の標記化合物４０９ｍｇを得る。

【００９３】融点：２３７－２３９℃（分解）

ＩＲ（Ｎｕｊｏｌ）：$\nu_{max}^{cm^{-1}}$＝３２５０，１７４５，１６５５

Ｍａｓｓ：ｍ／ｚ＝８２３（［Ｍ－Ｃｌ］$^{+}$）

ＮＭＲ（３００ＭＨｚ，d_6－ＤＭＳＯ）：δ^{TMS}＝０．８８（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７Ｈｚ），１．８－１．９９（２Ｈ，ｍ），２．７９（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１４Ｈｚおよび１０Ｈｚ），３．０７（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１４Ｈｚおよび４Ｈｚ），３．１－４．３（１６Ｈ，ｍ），４．４７（４Ｈ，ｓ），４．５５－４．７０（１Ｈ，ｍ），５．４４（２Ｈ，ｓ），５．６７（２Ｈ，ｓ），７．１５－７．３２（６Ｈ，ｍ），７．６５（１Ｈ，ｓ），８．０５（１Ｈ，ｓ），８．０５－８．２０（３Ｈ，ｂｒ），８．２９（１Ｈ，ｂｒ），８．３９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ），８．５７（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ）

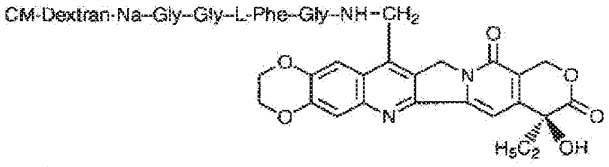
（３）カンプトテシン誘導体の調製

製造例１－（１０）と同様にして、ＣＭ－デキストラン・ナトリウム塩（ＣＭ化度＝０．５）１．２ｇと７－（４’－（グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニルグリシル）ピペラジノ）メチル－１０，１１－エチレンジオキシ－（２０Ｓ）－カンプトテシン塩酸塩１６８ｍｇより淡黄色粉末状の前記化１４で示されるカンプトテシン誘導体７９８ｍｇを得る。３８０ｎｍにおける吸収により求めた薬物（７－ピペラジノメチル－１０，１１－エチレンジオキシ－（２０Ｓ）－カンプトテシン塩酸塩）含量は１．１％である。ゲル浸透カラムクロマトグラフィー（ＧＰＣ）により分析の結果、求められる平均分子量は１６９，０００、多分散度Ｍｗ／Ｍｎは１．３２である（ＧＰＣ分析条件：Ｇ４０００ＳＷＸＬ（東ソー社製）、０．２Ｍリン酸緩衝液（ｐＨ７．０））。

【００９４】製造例３

下記式で表されるカンプトテシン誘導体の合成　　【化１５】

【００９５】



【００９６】（１）７－Ｎ－（ｔ－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ル）アミノメチル－１０，１１－エチレンジオキシ－（２０Ｓ）－カンプトテシンの合成

製造例１－（８）と同様にして７－アミノメチル－１０，１１－エチレンジオキシ－（２０Ｓ）－カンプトテシン塩酸塩２２２ｍｇとｔ－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２当量より黄色粉末状の標記化合物２３２ｍｇを得る。

【００９７】収率：５８％

ＩＲ（Ｎｕｊｏｌ）：$\nu_{max}^{cm^{-1}}$＝３２８５，１７５０，１６５０

Ｍａｓｓ：ｍ／ｚ＝８５４（［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$）

ＮＭＲ（３００ＭＨｚ，d_6－ＤＭＳＯ）：δ^{TMS}＝０．８８（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ），１．３５（９Ｈ，ｓ），１．７８－１．９４（２Ｈ，ｍ），２．７４（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１４Ｈｚおよび１０Ｈｚ），２．９９（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１４Ｈｚおよび４．５Ｈｚ），３．４－３．８（４Ｈ，ｍ），４．３４－４．５０（１Ｈ，ｍ），４．４２（４Ｈ，ｓ），４．６６－４．８２（２Ｈ，ｍ），５．４２（４Ｈ，ｂｒｓ），６．５０（１Ｈ，ｓ），６．９８（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６Ｈｚ），７．１２－７．２８（５Ｈ，ｍ），７．２６（１Ｈ，ｓ），７．５６（１Ｈ，ｓ），７．８０（１Ｈ，ｓ），７．９１（１Ｈ，ｂｒ），８．１４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．５Ｈｚ），８．３２（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ），８．５８（１Ｈ，ｍ）

（２）７－Ｎ－（グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニルグリシル）アミノメチル－１０，１１－エチレンジオキシ－（２０Ｓ）－カンプトテシン塩酸塩の合成

製造例１－（９）と同様にして、７－Ｎ－（ｔ－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ル）アミノメチル－１０，１１－エチレンジオキシ－（２０Ｓ）－カンプトテシン２０３ｍｇより黄色粉末状の標記化合物１６４ｍｇを得る。

【００９８】融点：＞２１１℃（分解）

ＩＲ（Ｎｕｊｏｌ）：$\nu_{max}^{cm^{-1}}$＝３２２０，１７４５，１６５５

Ｍａｓｓ：ｍ／ｚ＝７５４（［Ｍ－Ｃｌ］＋）

ＮＭＲ（３００ＭＨｚ，ｄ６－ＤＭＳＯ）：δ^{TMS}＝０．８８（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７Ｈｚ），１．８０－１．９３（２Ｈ，ｍ），２．７７（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１４Ｈｚおよび１０Ｈｚ），３．００（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１４Ｈｚおよび４Ｈｚ），３．６－４．５５（７Ｈ，ｍ），４．４２（４Ｈ，ｓ），４．６５－４．８５（２Ｈ，ｍ），５．４２（２Ｈ，ｓ），５．４５（２Ｈ，ｓ），７．１３－７．２６（５Ｈ，ｍ），７．２７（１Ｈ，ｓ），７．５７（１Ｈ，ｓ），７．８３（１Ｈ，ｓ），８．０３－８．１６（３Ｈ，ｂｒ），８．３４－８．４０（２Ｈ，ｍ），８．５４（１Ｈ，ｂｒ），８．７３（２Ｈ，ｂｒ）

（３）カンプトテシン誘導体の調製

ＣＭ－デキストラン・ナトリウム塩（ＣＭ化度＝０．５）７７２ｍｇを水５０ｍｌに溶解し、ジメチルホルムアミド２５ｍｌを加える。氷冷下撹拌し、７－（Ｎ－（グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニルグリシル）アミノメチル）－１０，１１－エチレンジオキシ－（２０Ｓ）－カンプトテシン塩酸塩１０６ｍｇおよび２－エトキシ－１－エトキシカルボニル－１，２－ジヒドロキノン１．５７ｇを加える。一夜反応後、反応混合物をエタノール４５０ｍｌに加えて沈殿生成し、製造例１－（１０）と同様に処理して、淡黄色粉末状の前記化１５で示されるカンプトテシン誘導体５４５ｍｇを得る。３７５ｎｍにおける吸収により求めた薬物（７－アミノメチル－１０，１１－エチレンジオキシ－（２０Ｓ）－カンプトテシン塩酸塩）含量は５．５％である。ゲル浸透カラムクロマトグラフィー（ＧＰＣ）により分析の結果、求められる平均分子量は１６５，０００、多分散度Ｍｗ／Ｍｎは１．４０である（ＧＰＣ分析条件：Ｇ４０００ＳＷＸＬ（東ソー社製）、０．２Ｍリン酸緩衝液（ｐＨ７．０））。

【００９９】製造例４

１０－（３’－アミノプロピルオキシ）－（２０Ｓ）－カンプトテシン塩酸塩の合成

（１）５－［３’－（ｔ－ブトキシカルボニルアミノ）プロピルオキシ］－２－ニトロベンズアルデヒド　ジメチルアセタールの合成

５－ヒドロキシ－２－ニトロベンズアルデヒド　ジメチルアセタール３．０ｇを乾燥ジメチルホルムアミド５０ｍｌに溶解し、ヨウ化ナトリウム３．１５ｇおよび炭酸カリウム１．９３ｇ並びに３－（ｔ－ブトキシカルボニルアミノ）プロピル　トシレート６．９５ｇを加える。５０℃にて３時間撹拌後、室温に戻して酢酸エチルを加える。抽出液を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウム上

で乾燥する。溶媒を留去後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離精製して、淡黄色油状の標記化合物5．22gを定量的に得る。

【0100】IR（Neat）：ν_{max}^{KBr}cm^{-1}=3360，1710

Mass：m／z＝393（［M+Na］+）

NMR（300MHz，CDCl3）：δ^{TMS}=1．44（9H，s），2．02（2H，quint．，J＝6Hz），3．33（2H，dd，J＝13Hzおよび6Hz），3．44（6H，s），4．11（2H，t，J＝6Hz），4．7（1H，brs），6．01（1H，s），6．90（1H，dd，J＝9Hzおよび3Hz），7．29（1H，d，J＝3Hz），7．97（1H，d，J＝9Hz）

（2）10－［3’－（t－ブトキシカルボニルアミノ）プロピルオキシ］－（20S）－カンプトテシンの合成

5－［3’－（t－ブトキシカルボニルアミノ）プロピルオキシ］－2－ニトロベンズアルデヒド　ジメチルアセタール1270mgをエタノール20mlに溶解し、10%パラジウム－炭素120mgを加えて、水素雰囲気下で1．5時間撹拌する。反応混合物から触媒を沪過して除き、沪液に（4S）－7，8－ジヒドロ－4－エチル－4－ヒドロキシ－1H－ピラノ［3，4－f］インドリジン－3，6，10（4H）－トリオン300mgおよびp－トルエンスルホン酸22mgを加えて一夜室温にて撹拌する。反応混合物から溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離精製して、淡黄色粉末状の標記化合物204mgを得る。

【0101】融点：223－224℃（分解）

収率：34%

IR（Nujol）：ν_{max}^{KBr}cm^{-1}=3360，1750，1690

Mass：m／z＝522（［M+H］+）

NMR（300MHz，CDCl3）：δ^{TMS}=1．03（3H，t，J＝7．5Hz），1．46（9H，s），1．8－2．0（2H，m），2．08（1H，dd，J＝12．5Hzおよび6．5Hz），2．10（1H，dd，J＝12．5Hzおよび6Hz），3．40（2H，q，J＝6．5Hz），4．18（2H，t，J＝6Hz），4．82（1H，brs），5．24（2H，s），5．29（1H，d，J＝16Hz），5．73（1H，d，J＝16Hz），7．12（1H，d，J＝3Hz），7．43（1H，dd，J＝9Hzおよび3Hz），7．61（1H，s），8．09（1H，d，J＝9Hz），8．20（1H，d，J＝9Hz）

（3）10－（3’－アミノプロピルオキシ）－（20S）－カンプトテシン塩酸塩の合成

10－［3’－（t－ブトキシカルボニルアミノ）プロピルオキシ］－（20S）－カンプトテシン352mgを乾燥ジオキサン－エタノール（7ml－1ml）に溶解し、氷冷撹拌下、この溶液に19%塩酸－ジオキサン5mlを加える。反応混合物を室温で撹拌後、さらにイソプロピルエーテル10mlを加え、析出する粉末を沪取後、洗浄して、黄色粉末状の標記化合物339mgを得る。

【0102】融点：214－218℃（分解）

IR（Nujol）：ν_{max}^{KBr}cm^{-1}=3470，3280，1745

Mass：m／z＝422（［M－Cl］+）

NMR（300MHz，d6－DMSO）：δ^{TMS}=0．89（3H，t，J＝7．5Hz），1．80－1．95（2H，m），2．10－2．22（2H，m），2．96－3．10（2H，m），4．27（2H，t，J＝6Hz），5．25（2H，s），5．42（2H，s），7．29（1H，s），7．49－7．55（2H，m），8．08（1H，d，J＝10Hz），8．19（3H，brs），8．54（1H，s）

製造例5

10－［3’－（グリシル－グリシル－L－フェニルアラニル－グリシルアミノ）プロピルオキシ］－（20S）－カンプトテシン塩酸塩の合成

（1）10－［3’－（t－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ルアミノ）プロピルオキシ］－（20S）－カンプトテシンの合成

10－（3’－アミノプロピルオキシ）－（20S）－カンプトテシン塩酸塩325mgを乾燥ジメチルホルムアミド10mlに溶解し、氷冷撹拌下、この溶液に4当量のN－ヒドロキシコハク酸イミド、2当量のジイソプロピルエチルアミン、2当量のN－t－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および4当量の1－（3－ジメチルアミノプロピル）－3－エチルカルボジイミド塩酸塩を加える。反応混合物を室温で一晩撹拌後溶媒を留去する。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離精製して、黄色粉末状の標記化合物597mgを定量的に得る。

【0103】IR（Nujol）：ν_{max}^{KBr}cm^{-1}=3280，1750，1660

Mass：m／z＝840（［M+H］+）

NMR（300MHz，d6－DMSO）：δ^{TMS}=0．88（3H，t，J＝7Hz），1．36（9H，s），1．8－2．04（4H，m），2．72－2．84（1H，m），3．00－3．12（1H，m），3．24－3．36（2H，m），3．50－3．80（6H，m），4．18（2H，t，J＝6Hz），4．44－4．54（1H，m），5．24（2H，s），5．42（2H，s），6．50（1H，s），

6．99（1H，t，J＝6Hz），7．12－7．27（5H，m），7．28（1H，s），7．48－7．55（1H，m），7．50（1H，s），7．88－7．96（1H，m），8．07（1H，d，J＝9Hz），8．12－8．36（2H，m），8．51（1H，s）

（2）10－［3’－（グリシル－グリシル－L－フェニルアラニルグリシルアミノ）プロピルオキシ］－（20S）－カンプトテシン塩酸塩の合成

10－（3’－（t－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ルアミノ）プロピルオキシ）－（20S）－カンプトテシン580mgより製造例4－（3）と同様に処理して、黄色粉末状の標記化合物438mgを得る。

【0104】収率：82%

融点：194－199℃（分解）

IR（Nujol）：ν_{max}^{KCl} 1＝3190，1745，1650

Mass：m／z＝740（［M－Cl］+）

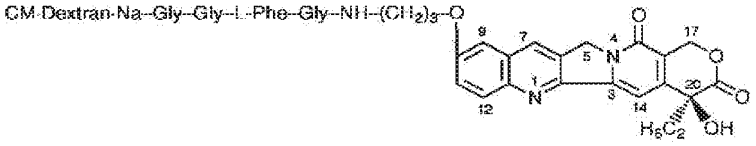
NMR（300MHz，d6－DMSO）：δ^{TMS}＝0．88（3H，t，J＝7Hz），1．80－2．03（4H，m），2．79（1H，dd，J＝14Hzおよび10Hz），3．05（1H，dd，J＝14Hzおよび5Hz），3．2－3．5（2H，m），3．52－3．62（2H，m），3．62－3．83（4H，m），4．19（2H，t，J＝6Hz），4．48－4．58（1H，m），5．25（2H，s），5．42（2H，s），6．5（1H，brs），7．13－7．26（5H，m），7．28（1H，s），7．49－7．55（1H，m），7．50（1H，s，J＝9．5Hz），7．93（1H，t，J＝6Hz），8．0－8．14（4H，m），8．32－8．41（2H，m），8．51（1H，s），8．56（1H，t，J＝5．5Hz）

製造例6

下記式で表されるカンプトテシン誘導体の合成

【0105】

【化16】



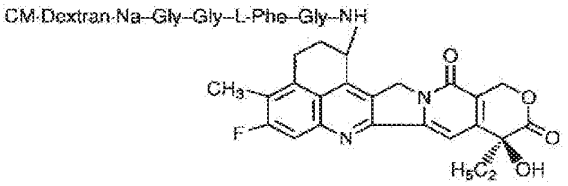
【0106】CM－デキストラン・ナトリウム塩（CM化度＝0．5）513mgを水50mlに溶解し、内温10℃以下に保ちながら、10－［3’－（グリシル－グリシル－L－フェニルアラニル－グリシルアミノ）プロピルオキシ］－（20S）－カンプトテシン塩酸塩77mgおよび1－（3－ジメチルアミノプロピル）－3－エチルカルボジイミド塩酸塩1．54gを加える。内温10℃以下、pHを0．2N塩酸を用いて6．0～6．5に保ちながら、2時間撹拌する。反応混合物をイオン交換カラムクロマトグラフィー（BioRadAG MP－50、30ml、Na型）で精製して、目的物を含む分画を沪過後、沪液にエタノールを加えて沈澱を分取し、洗浄後、減圧乾燥して淡黄色粉末状複合体492mgを得る。380nmにおける吸収により求めた薬物（10－（3’－アミノプロピルオキシ）－（20S）－カンプトテシン塩酸塩）含量は2．8%である。ゲル沪過カラムクロマトグラフィー（GPC）による分析の結果、求められる平均分子量は179，000、多分散度Mw／Mnは1．42である（GPC分析条件：G4000SWXL（東ソー社製）、0．2Mリン酸緩衝液（pH＝7．0））。

【0107】製造例7

下記式で表されるカンプトテシン誘導体の合成

【0108】

【化17】



【0109】（1）（9S）－1－（t－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ルシルアミノ）－9－エチル－5－フルオロ－2，3－ジヒドロ－9－ヒドロキシ－4－メチル－1H，12H－ベンゾ［de］ピラノ［3’，4’：6，7］インドリジノ［1，2－b］キノリン－10，13（9H，15H）－ジオンの合成

製造例1－（8）と同様にして、（9S）－1－アミノ－9－エチル－5－フルオロ－2，3－ジヒドロ－9－ヒドロキシ－4－メチル－1H，12H－ベンゾ［de］ピラノ［3’，4’：6，7］インドリジノ［1，2－b］キノリン－10，13（9H，15H）－ジオン塩酸塩166mgと、2当量のt－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より淡黄色不定形固体の標記化合物247mgを得る。

【0110】収率：82%

IR（Nujol）：ν_{max}^{KCl} 1＝3290，1710，1655

Mass：m／z＝854（［M＋H］+）

NMR（300MHz，d6－DMSO）：δ^{TMS}＝0．

OnCusp
Ex. 1002

８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７Ｈｚ），１．３７（９Ｈ，ｓ），１．８－１．９５（２Ｈ，ｍ），２．０５－２．３（１Ｈ，ｍ），２．４２（３Ｈ，ｓ），２．５－２．８５（２Ｈ，ｍ），２．９－３．１（１Ｈ，ｍ），３．１５－３．４（２Ｈ，ｍ），３．５－３．８（６Ｈ，ｍ），４．４－４．５５（１Ｈ，ｍ），５．２６（２Ｈ，ｓ），５．４２（２Ｈ，ｓ），５．５５－５．６５（１Ｈ，ｍ），６．５３（１Ｈ，ｓ），６．９９（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５Ｈｚ），７．１－７．３（５Ｈ，ｍ），７．３２（１Ｈ，ｓ），７．８１（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１Ｈｚ），７．８－７．９５（１Ｈ，ｍ），８．１－８．２（１Ｈ，ｍ），８．３－８．４（１Ｈ，ｍ），８．４－８．５（１Ｈ，ｍ）

（２）（９Ｓ）－１－（グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニルグルシルアミノ）－９－エチル－５－フルオロ－２，３－ジヒドロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１０，１３（９Ｈ，１５Ｈ）－ジオンの合成

製造例１－（９）と同様にして、上記（１）で得る化合物２２０ｍｇより、淡黄色粉末状の標記化合物１９３ｍｇを得る。

【０１１１】融点：＞１６５℃（分解）

ＩＲ（Ｎｕｊｏｌ）：ν_{max}^{KBr} cm^{-1}＝３３５０，１７４５，１６６０，１６１５Ｍａｓｓ：ｍ／ｚ＝７５４（［Ｍ－Ｃｌ＋Ｈ］＋）

ＮＭＲ（３００ＭＨｚ，ｄ６－ＤＭＳＯ）：δ^{TMS}＝０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７Ｈｚ），１．８０－１．９４（２Ｈ，ｍ），２．０８－２．２７（２Ｈ，ｍ），２．４１（３Ｈ，ｓ），２．７７（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３Ｈｚ，９Ｈｚ），３．０１（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３Ｈｚ，５Ｈｚ），３．１５－３．２８（２Ｈ，ｍ），３．５－３．９１（６Ｈ，ｍ），４．４５－４．５６（１Ｈ，ｍ），５．２５（２Ｈ，ｓ），５．４１（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１３Ｈｚ），５．４２（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１３Ｈｚ），５．５７（１Ｈ，ｍ），７．１２－７．３０（５Ｈ，ｍ），７．３２（１Ｈ，ｓ），７．８０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１Ｈｚ），８．０－８．２（３Ｈ，ｂｒ），８．３２（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７Ｈｚ），８．４３（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），８．５０－８．６２（２Ｈ，ｍ）

（３）カンプトテシン誘導体の調製

ＣＭ－デキストラン・ナトリウム塩（ＣＭ化度＝０．６５）２０００ｍｇと上記（２）で得る化合物１７０ｍｇを用いて、製造例３－（３）と同様に処理し、淡黄色粉末状の所望のカンプトテシン誘導体１８０３ｍｇを得る。３７６ｎｍにおける吸収により求めた薬物（（９Ｓ）－１－アミノ－９－エチル－５－フルオロ－２，３－ジヒドロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１０，１３［９Ｈ，１５Ｈ］－ジオン塩酸塩）含量は３．０％である。ゲル沪過カラムクロマトグラフィー（ＧＰＣ）による分析の結果、求められる平均分子量は１８７，０００、多分散度Ｍｗ／Ｍｎは１．５４である（ＧＰＣ分析条件：Ｇ４０００ＳＷＸＬ（東ソー社製）、０．２Ｍリン酸緩衝液（ｐＨ＝７．０））。

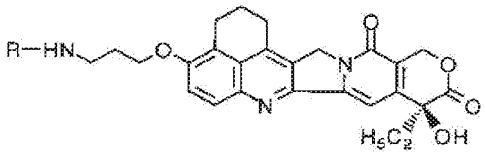
【０１１２】製造例８～２４

前記製造例１～７のいずれかと同様にして下記表２記載の化合物を得る。

【０１１３】

【表２】

表　２



製造例番号	R	製造例番号	R
8	CM-Dextran-Na–L-Phe–	１６	CM-Pullulan-Na–L-Phe–
9	CM-Dextran-Na–Gly–Gly–	１７	CM-Pullulan-Na–Gly–Gly–
１０	CM-Dextran-Na–L-Leu–Gly–	１８	CM-Pullulan-Na–L-Leu–Gly–
１１	CM-Dextran-Na–L-Phe–Gly–	１９	CM-Pullulan-Na–L-Phe–Gly–
１２	CM-Dextran-Na–L-Tyr–Gly–	２０	CM-Pullulan-Na–L-Tyr–Gly–
		２１	CM-Pullulan-Na–Gly–Gly–L-Phe–Gly–
１３	CM-Dextran-Na–Gly–Gly–Gly–	２２	CM-Pullulan-Na–Gly–Gly–Gly–
１４	CM-Dextran-Na–Gly–Gly–Gly–Gly–	２３	CM-Pullulan-Na–Gly–Gly–Gly–Gly–
１５	CM-Dextran-Na–Gly–Gly–Gly–Gly–Gly–Gly–	２４	CM-Pullulan-Na–Gly–Gly–Gly–Gly–Gly–

表中、CM-Dextran-Naとは、カルボキシメチルデキストラン・ナトリウム塩を、CM-Pullulan-Naとは、カルボキシメチルプルラン・ナトリウム塩を意味する。以下、同様。

【０１１４】［以下、「ＣＭ－Ｐｕｌｌｕｌａｎ・Ｎａ」はカルボキシメチルプルラン・ナトリウム塩を表す。］

製造例２５～４１

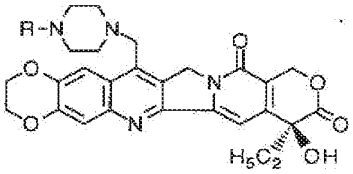
前記製造例１～７のいづれかと同様にして下記表３記載の化合物を得る。

【０１１５】

【表３】

OnCusp
Ex. 1002

表　３

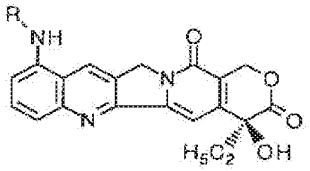


製造例番号	R	製造例番号	R
２５	CM-Dextran-Na-L-Phe-	３３	CM-Pullulan-Na-L-Phe-
２６	CM-Dextran-Na-Gly-Gly-	３４	CM-Pullulan-Na-Gly-Gly-
２７	CM-Dextran-Na-L-Leu-Gly-	３５	CM-Pullulan-Na-L-Leu-Gly-
２８	CM-Dextran-Na-L-Phe-Gly-	３６	CM-Pullulan-Na-L-Phe-Gly-
２９	CM-Dextran-Na-L-Tyr-Gly-	３７	CM-Pullulan-Na-L-Tyr-Gly-
		３８	CM-Pullulan-Na-Gly-Gly-L-Phe-Gly-
３０	CM-Dextran-Na-Gly-Gly-Gly-	３９	CM-Pullulan-Na-Gly-Gly-Gly-
３１	CM-Dextran-Na-Gly-Gly-Gly-Gly-	４０	CM-Pullulan-Na-Gly-Gly-Gly-Gly-
３２	CM-Dextran-Na-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-	４１	CM-Pullulan-Na-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-

【０１１６】製造例４２～５９
前記製造例１～７のいずれかと同様にして下記表４記載の化合物を得る。

【０１１７】
【表４】

表　４



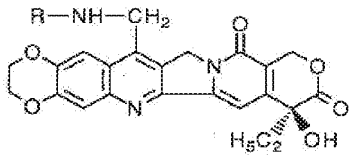
製造例番号	R	製造例番号	R
４２	CM-Dextran-Na-L-Phe-	５１	CM-Pullulan-Na-L-Phe-
４３	CM-Dextran-Na-Gly-Gly-	５２	CM-Pullulan-Na-Gly-Gly-
４４	CM-Dextran-Na-L-Leu-Gly-	５３	CM-Pullulan-Na-L-Leu-Gly-
４５	CM-Dextran-Na-L-Phe-Gly-	５４	CM-Pullulan-Na-L-Phe-Gly-
４６	CM-Dextran-Na-L-Tyr-Gly-	５５	CM-Pullulan-Na-L-Tyr-Gly-
４７	CM-Dextran-Na-Gly-Gly-L-Phe-Gly-	５６	CM-Pullulan-Na-Gly-Gly-L-Phe-Gly-
４８	CM-Dextran-Na-Gly-Gly-Gly-	５７	CM-Pullulan-Na-Gly-Gly-Gly-
４９	CM-Dextran-Na-Gly-Gly-Gly-Gly-	５８	CM-Pullulan-Na-Gly-Gly-Gly-Gly-
５０	CM-Dextran-Na-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-	５９	CM-Pullulan-Na-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-

【０１１８】製造例６０～７６
前記製造例１～７のいづれかと同様にして下記表５記載の化合物を得る。

【０１１９】
【表５】

OnCusp
Ex. 1002

表　５

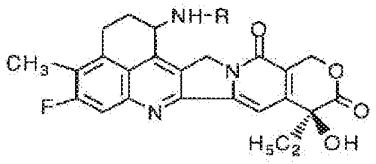


製造例番号	R	製造例番号	R
６０	CM-Dextran-Na--L-Phe--	６８	CM-Pullulan-Na--L-Phe--
６１	CM-Dextran-Na--Gly--Gly--	６９	CM-Pullulan-Na--Gly--Gly--
６２	CM-Dextran-Na--L-Leu--Gly--	７０	CM-Pullulan-Na--L-Leu--Gly--
６３	CM-Dextran-Na--L-Phe--Gly--	７１	CM-Pullulan-Na--L-Phe--Gly--
６４	CM-Dextran-Na--L-Tyr--Gly--	７２	CM-Pullulan-Na--L-Tyr--Gly--
		７３	CM-Pullulan-Na--Gly--Gly--L-Phe--Gly--
６５	CM-Dextran-Na--Gly--Gly--Gly--	７４	CM-Pullulan-Na--Gly--Gly--Gly--
６６	CM-Dextran-Na--Gly--Gly--Gly--Gly--	７５	CM-Pullulan-Na--Gly--Gly--Gly--Gly--
６７	CM-Dextran-Na--Gly--Gly--Gly--Gly--Gly--	７６	CM-Pullulan-Na--Gly--Gly--Gly--Gly--Gly--

【０１２０】製造例７７～９３
前記製造例１～７のいづれかと同様にして下記表６記載の化合物を得る。

【０１２１】
【表６】

表　６

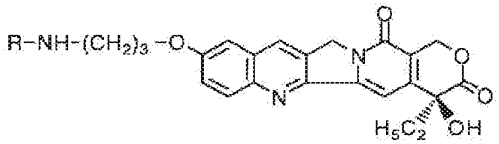


製造例番号	R	製造例番号	R
７７	CM-Dextran-Na--L-Phe--	８５	CM-Pullulan-Na--L-Phe--
７８	CM-Dextran-Na--Gly--Gly--	８６	CM-Pullulan-Na--Gly--Gly--
７９	CM-Dextran-Na--L-Leu--Gly--	８７	CM-Pullulan-Na--L-Leu--Gly--
８０	CM-Dextran-Na--L-Phe--Gly--	８８	CM-Pullulan-Na--L-Phe--Gly--
８１	CM-Dextran-Na--L-Tyr--Gly--	８９	CM-Pullulan-Na--L-Tyr--Gly--
		９０	CM-Pullulan-Na--Gly--Gly--L-Phe--Gly--
８２	CM-Dextran-Na--Gly--Gly--Gly--	９１	CM-Pullulan-Na--Gly--Gly--Gly--
８３	CM-Dextran-Na--Gly--Gly--Gly--Gly--	９２	CM-Pullulan-Na--Gly--Gly--Gly--Gly--
８４	CM-Dextran-Na--Gly--Gly--Gly--Gly--Gly--	９３	CM-Pullulan-Na--Gly--Gly--Gly--Gly--Gly--

【０１２２】製造例９４～１１０
前記製造例１～７のいずれかと同様にして下記表７記載の化合物を得る。

【０１２３】
【表７】

表　７



製造例番号	R	製造例番号	R
９４	CM-Dextran-Na-L-Phe-	１０２	CM-Pullulan-Na-L-Phe-
９５	CM-Dextran-Na-Gly-Gly-	１０３	CM-Pullulan-Na-Gly-Gly-
９６	CM-Dextran-Na-L-Leu-Gly-	１０４	CM-Pullulan-Na-L-Leu-Gly-
９７	CM-Dextran-Na-L-Phe-Gly-	１０５	CM-Pullulan-Na-L-Phe-Gly-
９８	CM-Dextran-Na-L-Tyr-Gly-	１０６	CM-Pullulan-Na-L-Tyr-Gly-
		１０７	CM-Pullulan-Na-Gly-Gly-L-Phe-Gly-
９９	CM-Dextran-Na-Gly-Gly-Gly-	１０８	CM-Pullulan-Na-Gly-Gly-Gly-
１００	CM-Dextran-Na-Gly-Gly-Gly-Gly-	１０９	CM-Pullulan-Na-Gly-Gly-Gly-Gly-
１０１	CM-Dextran-Na-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-	１１０	CM-Pullulan-Na-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-

【０１２４】参考例１
（１）デキストラン［ファルマシア社製、Ｄｅｘｔｒａｎ　Ｔ－１１０、平均分子量：１００，０００（ＧＰＣ）法］２９ｇを水２９０ｍｌに溶解する。この溶液に０～５℃で水素化ホウ素ナトリウム１．４５ｇを加え、５℃で１夜撹拌する。反応混合物に酢酸を滴下してｐＨ５とし、室温で更に３時間撹拌する。２Ｎ水酸化ナトリウムでｐＨ７に調整し、激しく撹拌しながら、エタノール１．２リットルを加える。静置して不溶物を沈殿させたのち、デカンテーションにより上澄みを除去し、残渣を遠心分離する。残渣を水０．５リットルに溶解して凍結乾燥し、白色粉末２６．３ｇを得る。
【０１２５】（２）上記（１）で得られる白色粉末５０ｇを水５００ｍｌに溶解し、この溶液に氷冷下で水酸化ナトリウム２００ｇを加え、３０分間撹拌する。反応混合物を室温に戻した後、モノクロロ酢酸（１１０ｇ）の水（１５０ｍｌ）溶液を滴下し、４０℃で１８時間撹拌する。反応混合物を１０℃以下に冷却し、酢酸でｐＨ８～９に調整する。反応混合物を激しく撹拌しながら、メタノール８リットルを加え、不溶物を沈殿させる。不溶物を沪取し、純水５リットルに溶解し、限外沪過で脱塩する。得られた溶液を減圧濃縮し、濃縮液を沪過後、エタノールを加え、析出沈殿物を沪取し、水性エタノール、アセトンで洗浄後、室温および５０℃で減圧乾燥することにより、カルボキシメチルデキストラン（ＣＭ－デキストラン）ナトリウム塩［カルボキシメチル化度（中和滴定法）：０．５］５０．２ｇを得る。
【０１２６】参考例２
モノクロロ酢酸の使用量を変え、参考例１と同様に実施することにより、カルボキシメチル化度が０．６５のＣＭ－デキストラン・ナトリウム塩を得る。
【０１２７】
【発明の効果】本発明の有効成分であるカンプトテシン誘導体は、ドラッグ・デリバリー・システムを利用することにより、標的作用部位に多量かつ選択的に送達され、その部位で所望の薬理学的作用を発揮することができるものである。すなわち、本発明の有効成分であるカンプトテシン誘導体は、その親化合物であるカンプトテシン化合物に比べ、抗腫瘍作用が著しく増強されると共に、その副作用が軽減された医薬品として極めて有用なものである。
【０１２８】このため、本発明の医薬組成物は、固形腫瘍［例えば、肺癌、子宮癌、卵巣癌、乳癌、消化器癌（大腸癌、胃癌、すい癌等）、肝癌、腎癌、前立腺癌、頭けい部癌、悪性リンパ腫等］、液性腫瘍（例えば、白血病等）の治療薬に適用することができる。

OnCusp
Ex. 1002

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[6]	識別記号	ＦＩ
// Ｃ０７Ｄ 491/22		Ｃ０７Ｄ 491/22

15965J

********** Cover Page **********

Delivery Information

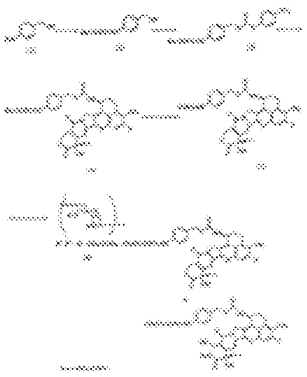
Time of Request: Friday, October 05, 2018 22:19:31
Client ID/Project Name: 097165-0139
Number of Lines: 41
Job Number: 1826:653226094

Research Information

Source: KR
Search Terms: (pub-id(KR1020110044808A or KR1020010052385A))

2 of 2 DOCUMENTS

KR1020010052385A 2001-06-25 **DRUG COMPOSITES** (en)



Inventors: SUSAKI HIROSHI, 일본국도쿄도134-8630에도가와쿠키타카사이1쵸메16-13다이이찌세이야쿠가부시키가이샤도쿄알앤디센터내, Japan;
INOUE KAZUHIRO, 일본국도쿄도134-8630에도가와쿠키타카사이1쵸메16-13다이이찌세이야쿠가부시키가이샤도쿄알앤디센터내, Japan;
KUGA HIROSHI, 일본국도쿄도134-8630에도가와쿠키타카사이1쵸메16-13다이이찌세이야쿠가부시키가이샤도쿄알앤디센터내, Japan

Applicants/Assignees: DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD., 일본국 도꾜도 주오구 니혼바시 3죠메 14반 10고, 000-000, Japan

Classifications: IPC[7]: 7A61K47/48A 7A61K47#48A 7A61K47/48A
IPC[8]: A61K47/48 (2006-01-01; A, F, I, 2001-04-23; B, H, KR)

Priority Number and Date: JP10140915 1998-05-22

English Abstract:

Drug composites useful as DDS compounds, which are represented by the general formula: A-R-NH-Y-CH 2 -O-CO-Q (wherein A is a polymer serving as a carrier for a drug; R is a spacer

comprising one amino acid molecule or one comprising 2 to 8 amino acid molecules bound to each other through peptide linkage; Y is optionally substituted phenylene; and Q is a residue of a drug compound such as an antitumor agent). The composites permit the speedy and regioselective release of drug compounds such as antitumor or anti- inflammatory agents, thus exhibiting expected drug effects without fail.

© KIPO & WIPO 2007

15965J

********** Print Completed **********

Time of Request: Friday, October 05, 2018 22:19:31

Print Number: 1826:653226094
Number of Lines: 41
Number of Pages: 1

Send To: Adamo, Jeneen
FOLEY & LARDNER

15965J

********** Cover Page **********

Delivery Information

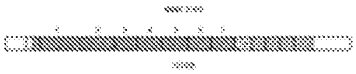
Time of Request: Friday, October 05, 2018 22:15:30
Client ID/Project Name: 097165-0139
Number of Lines: 40
Job Number: 2826:653226035

Research Information

Source: KR
Search Terms: (pub-id(KR1020110044808A or KR1020010052385A))

1 of 2 DOCUMENTS

KR1020110044808A 2011-04-29 **ANTIBODIES AND IMMUNOCONJUGATES AND USES THEREFOR** (en)





Inventors: EBENS ALLEN J JR, United States of America;
GRAY ALANE M, United States of America;
LIANG WEI CHING, People's Republic of China;
WU YAN, United States of America;
YU SHANG FAN, People's Republic of China

Applicants/Assignees: GENENTECH INC, United States of America

Classifications: CPC: C07K16/3061 (2013-01-01; I 2014-05-08; B, H, EP)
CPC: A61K39/39558 (2013-01-01; I 2014-05-08; B, H, EP)
CPC: A61K45/06 (2013-01-01; I 2014-05-08; B, H, EP)
CPC: A61K47/6803 (2017-08-01; I 2017-08-02; B, H, EP)
CPC: A61K47/6849 (2017-08-01; I 2017-08-02; B, H, EP)
CPC: A61K47/6855 (2017-08-01; I 2017-08-02; B, H, EP)
CPC: C07K16/2803 (2013-01-01; I 2015-03-05; B, H, EP)
CPC: C07K16/2896 (2013-01-01; I 2014-05-09; B, H, EP)
CPC: C07K2317/24 (2013-01-01; A 2015-03-05; B, H, EP)
CPC: C07K2317/56 (2013-01-01; A 2015-03-05; B, H, EP)
CPC: C07K2317/77 (2013-01-01; A 2015-03-05; B, H, EP)
CPC: C07K2317/92 (2013-01-01; A 2015-03-05; B, H, EP)
CPC: C07K16/28 (2013-01-01; I 2016-09-01; B, H, KR)
CPC: A61K39/395 (2013-01-01; I 2017-08-19; B, H, KR)
CPC: A61K47/50 (2017-08-01; I 2017-08-19; B, H, KR)
ECLA: C07K16/28A; A61K47/48T2C; A61K47/48T4B28; A61K47/48T4B30B
IPC[8]: C07K16/28 (2006-01-01; A, F, I, 2011-04-26; B, H, KR)

IPC[8]: A61K39/395 (2006-01-01; A, L, I, 2011-04-26; B, H, KR)
IPC[8]: A61K47/48 (2006-01-01; A, L, I, 2011-04-26; B, H, KR)
IPC[8]: A61P35/00 (2006-01-01; A, L, I, 2011-04-26; B, H, KR)
ICO: M07K317/240
ICO: M07K317/560
ICO: M07K317/920
ICO: M07K317/770

Priority Number and Date: US60809328 2006-05-30; US60908941 2007-03-29; US60911829 2007-04-13

English Abstract:

Anti-CD22 antibodies and immunoconjugates thereof are provided. Methods of using anti-CD22 antibodies and immunoconjugates thereof are provided.

15965J

********** Print Completed **********

Time of Request: Friday, October 05, 2018 22:15:30

Print Number: 2826:653226035
Number of Lines: 40
Number of Pages: 1

Espacenet

Bibliographic data: RU2006147264 (A) — 2008-07-20

CONJUGATES ANTIBODY-MEDICINAL AGENT AND METHODS

Inventor(s): ЭБЕНС Мл Аллен Дж. (US), ; ЯКОБСОН Фредерик С. (US), ; ПОЛАКИС Пол (US), ; СКВОЛ Ральф Х. (US), ; СЛИВКОВСКИ Марк Кс (US), ; СПЕНСЕР Сюзан Д. (US), ; ЭБЕНС мл. Аллен Дж. (US), ; СЛИВКОВСКИ Марк Кс. (US)

Applicant(s): ДЖЕНЕНТЕК, ; ИНК. (US), ; DZHENENTEK, INK, ; ДЖЕНЕНТЕК, ИНК.

Classification: - **international:** ***A61K39/395; A61K47/48; A61P35/00; C07D491/14; C07D498/18; C07K16/10; C07K16/28; C07K16/30; C07K16/32; C07K16/46; G01N33/574***
- **cooperative:** **A61K47/6803**; **A61K47/6875**; **C07D498/18**; **C07K16/1063**; **C07K16/28**; **C07K16/2803**; **C07K16/283**; **C07K16/2866**; **C07K16/2896**; **C07K16/3046**; **C07K16/3069**; **C07K16/32**; A61K2039/505; C07K2317/24

Application number: RU20060147264 20050531

Priority number(s): US20040576517P 20040601 ; US20040616098P 20041005 ; WO2005US18829 20050531

Also published as: AU2005249490 (A1) AU2005249490 (B2) BRPI0510883 (A) CA2567520 (A1) CN102973947 (A) more

Abstract of RU2404810 (C2)

FIELD: medicine. ^ SUBSTANCE: invention refers to medicine, namely to oncology. The compound- conjugate antibody-medicinal agent is proposed with formula I: Ab-(L-D)p, where one or more molecules of maytanazoid medicinal agents (D) are covalently binded by L to the antibody huMAb4D5-8 (Trastuzumab) (Ab), which binds to the HER2 receptor and inhibits tumor cell growth, overexpressing HER2 receptor. ^ EFFECT: also a pharmaceutical composition is proposed which contains the specified compound, and a method of treating malignant tumor using this composition. ^ 20 cl, 8 tbl, 10 ex, 17 dwg

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 404 810** (13) **C9**

(51) МПК
A61K 47/48 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: действует (последнее изменение статуса: 28.05.2018)
Пошлина: учтена за 14 год с 01.06.2018 по 31.05.2019

(21)(22) Заявка: 2006147264/15, **31.05.2005**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
31.05.2005

Приоритет(ы):
(30) Конвенционный приоритет:;
01.06.2004 US 60/576,517;
05.10.2004 US 60/616,098

(43) Дата публикации заявки: **20.07.2008** Бюл. № **20**

(45) Опубликовано: 27.11.2010

(15) Информация о коррекции:
Версия коррекции №1 (W1 C2)

(48) Коррекция опубликована:
20.06.2015 Бюл. № 17

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **WO 0100244, 04.01.2001. EP 0425235, 31.05.2001. WO 0124763, 18.09.2003. WO 2005037992, 28.04.2005. WO 2004016225, 26.02.2004. WO 03000113, 03.01.2003. WO 03024392, 27.03.2003. WO 0216429, 28.02.2002. WO 03022995, 20.03.2003. WO 2004005470, 15.01.2004. WO 03072036, 04.09.2003. WO 0074718, 14.12.2000. WO 03027135, 03.04.2003. WO 0138490, 31.05.2001.**

WO 03075855, 18.09.2003. US 5416064, 16.05.1995. WO 2005049075, 02.06.2005. WO 2005101017, 27.10.2005. CHARI R V J ET AL: "IMMUNOCONJUGATES CONTAINING NOVEL MAYTANSINOIDS: PROMISING ANTICANCER DRUGS" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol.52, no.1, January 1992 (1992-01), pages 127-131. TRAIL P A ET AL: "EFFECT OF LINKER VARIATION ON THE STABILITY, POTENCY, AND EFFICACY OF CARCINOMAREACTIVE BR64-DOXORUBICIN IMMUNOCONJUGATES" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol.57, 1 January 1997 (1997-01-01), pages 100-105. HU XIU FENG ET AL: "Discovery and validation of new molecular targets for ovarian cancer." CURRENT

(72) Автор(ы):
ЭБЕНС мл. Аллен Дж. (US),
ЯКОБСОН Фредерик С. (US),
НОЛАКИС Пол (US),
СКВОЛ Ральф Х. (US),
СЛИВКОВСКИ Марк Кс. (US),
СПЕНСЕР Сюзан Д. (US)

(73) Патентообладатель(и):
ДЖЕНЕНТЕК, ИНК. (US)

OPINION IN MOLECULAR THERAPEUTICS. DEC 2003, vol.5, no.6, December 2003 (2003-12), pages 625-630, XP009059821 ISSN: 1464-8431. CHU P G ET AL: "CD79: a review." APPLIED IMMUNOHISTOCHEMISTRY & MOLECULAR MORPHOLOGY: AIMM / OFFICIAL PUBLICATION OF THE SOCIETY FOR APPLIED IMMUNOHISTOCHEMISTRY. JUN 2001, vol.9, no.2 June 2001 (2001-06), pages 97-106.

(85) Дата начала рассмотрения заявки PCT на национальной фазе: **09.01.2007**

(86) Заявка PCT:
US 2005/018829 (31.05.2005)

(87) Публикация заявки PCT:
WO 2005/117986 (15.12.2005)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул.Б.Спасская, 25, стр.3, ООО "Юридическая фирма Городисский и Партнеры", пат.пов. А.В.Мицу, рег.№ 364

(54) **КОНЪЮГАТЫ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО И СПОСОБЫ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины, а именно онкологии. Предложено соединение-конъюгат антитело-лекарственное средство формулы I:



где одно или несколько молекул майтаназоидных лекарственных средств (D) ковалентно связаны посредством L с антителом huMAb4D5-8 (трастузумаб) (Ab), которое связывается с рецептором HER2 и ингибирует рост опухолевых клеток, сверхэкспрессирующих рецептор HER2. Предложена также фармацевтическая композиция, содержащая данное соединение, и способ лечения злокачественной опухоли при помощи данной композиции. 5 н. и 15 з.п. ф-лы, 8 табл., 17 ил.

На основании 35 USC § 119(e) по настоящей заявке, которая не является предварительной и которая была подана на основании 37 CFR § 1.53(b), испрашивается приоритет предварительной заявки США № 60/576517, поданной 1 июня 2004 года, и предварительной заявки США № 60/616098, поданной 5 октября 2004 года, каждая из которых приведена в настоящем описании в качестве ссылки в полном объеме.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение в основном относится к соединениям с противоопухолевой активностью, и, более конкретно, к антителам, конъюгированным с химиотерапевтическими майтанзиноидными лекарственными средствами или токсинами. Изобретение также относится к способам применения соединений-конъюгатов антитело-лекарственное средство для *in vitro*, *in situ* и *in vivo* диагностики или обработки клеток млекопитающих или связанных с ними патологических состояний.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Лечение антителами было разработано для направленного лечения пациентов со злокачественными опухолями, иммунологическими и ангиогенными нарушениями. Применение конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC), то есть иммуноконъюгатов, для локальной доставки цитотоксических или цитостатических средств, то есть лекарственных средств, для уничтожения или ингибирования опухолевых клеток при лечении злокачественной опухоли (Payne, G. (2003) Cancer Cell 3:207-212; Trail et al. (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337; Syrigos and Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) Adv. Drug Del. Rev. 26:151-172; патент США № 4975278) теоретически обеспечивает направленную доставку лекарственного вещества к опухолям и их накопление внутри клеток, в тех случаях, когда системное введение этих неконъюгированных лекарственных средств может привести к нежелательным условиям токсичности не только в опухолевых клетках, подлежащих уничтожению, но и в здоровых клетках (Baldwin et al., (1986) Lancet pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) «Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review,» in Monoclonal Antibodies

'84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera et al. (eds), pp. 475-506). Таким образом, необходимо получить максимальную эффективность при минимальной токсичности. Попытки создания и усовершенствования ADC были сфокусированы на селективности моноклональных антител (mAb), а также на свойствах связывания лекарственных средств и высвобождения лекарственных средств. В качестве подходящих для этих стратегий были указаны и поликлональные антитела, и моноклональные антитела (Rowland et al., (1986) Cancer Immunol. Immunother. 21:183-87). Используемые в этих способах лекарственные средства включают дауномицин, доксорубицин, метотрексат, митомицин, неокарциностатин (Takahashi et al. (1988) Cancer 61:881-888) и виндезин (Rowland et al., (1986), *supra*). Токсины, используемые в конъюгатах антитело-токсин, включают бактериальные токсины, такие как дифтерийный токсин, токсины растений, такие как рицин (патент США № 4753894; патент США № 5629197; патент США № 4958009; патент США № 4956453), низкомолекулярные токсины, такие как гелданамицин (Mandler et al. (2000) J. of the из Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581; Mandler et al. (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028; Mandler et al. (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791), майтанзиноиды (EP 1391213; Liu et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623), и калихимицин (Lode et al. (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman et al. (1993) Cancer Res. 53:3336-3342). Токсины могут осуществлять свои цитотоксические и цитостатические эффекты посредством механизмов, в том числе связывания тубулина, связывания ДНК или ингибирование топоизомеразы. Некоторые цитотоксические лекарственные средства при конъюгации с большими антителами или белковыми лигандами рецепторов, как правило, становятся неактивными или менее активными.

ЗЕВАЛИН (ZEVALIN®) (ибритумомаб тиоксетан, Biogen/Idec), одобренный для применения конъюгат антитело-радиоактивный изотоп, состоящий из моноклонального антитела IgG1 каппа мыши против антигена CD20 и радиоактивного изотопа ^{111}In или ^{90}Y, связанных посредством тиокарбамидного линкера-хелатора (Wiseman et al. (2000) Eur. J. Nucl. Med. 27(7):766-77; Wiseman et al. (2002) Blood 99(12):4336-42; Witzig et al. (2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63; Witzig et al. (2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69). В 2000 году был одобрен МИЛОТАРГ (MYLOTARG™) (гемтузумаб озогамицин, Wyeth Pharmaceuticals), конъюгат антитело-лекарственное средство, состоящий из гуманизированного антитела к CD33, связанного с калихимицином, для лечения острого миелоидного лейкоза посредством инъекции (Drugs of the Future (2000) 25(7):686; патент США № 4970198; патент США № 5079233; патент США № 5585089; патент США № 5606040; патент США № 5693762; патент США № 5739116; патент США № 5767285; патент США № 5773001). Кантузумаб мертанзин (Immunogen, Inc.), конъюгат антитело-лекарственное средство, состоящий из антитела huC242, связанного посредством дисульфидного линкера SPP, связанного с майтаназоидным лекарственным веществом, DM1 (Xie et al. (2004) J. of Pharm. and Exp. Ther. 308(3):1073-1082; Tolcher et al. (2003) J. Clin. Oncology 21(2):211-222; патент США № 5208020), проходит I фазу испытаний для лечения злокачественных опухолей, экспрессирующих CanAg, таких как рак толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак желудка и другие. В процессе разработки находится MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologies, Immunogen Inc.), который представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство, состоящий из моноклонального антитела к специфичному для предстательной железы мембранному антигену, связанного с майтаназоидным лекарственным веществом, DM1, и который предполагают использовать для лечения опухолей предстательной железы. То же майтаназоидное лекарственное вещество, DM1, связывали с мышиным моноклональным антителом, TA.1, посредством не являющегося дисульфидным линкера, SMCC (Chari et al. (1992) Cancer Research 52:127-131). Сообщалось, что такой конъюгат в 200 раз менее эффективен, чем соответствующий конъюгат с дисульфидным линкером. Было сделано предположение, что линкер SMCC является «нерасщепляемым» (также см. патент США № 4981979). Был описан ГЕРЦЕПТИН® (HERCEPTIN®) (трастузумаб), связанный посредством SMCC с DM1 (WO 2005/037992).

С целью обнаружения эффективных клеточных мишеней для диагностики и лечения злокачественных опухолей исследователями были сделаны попытки идентифицировать трансмембранные или другим образом ассоциированные с опухолями полипептиды, которые специфически экспрессированы на поверхности одного или нескольких конкретных типов клеток злокачественных опухолей по сравнению с одной или несколькими здоровыми незлокачественными клетками. Как правило, такие ассоциированные с опухолями полипептиды экспрессируются в большом количестве на поверхности клеток злокачественной опухоли по сравнению с экспрессией на поверхности незлокачественных клеток. Идентификация таких

OnCusp
Ex. 1002

антигенных полипептидов клеточной поверхности, ассоциированных с опухолью, то есть ассоциированных с опухолями антигенов (TAA), давала возможность специфического воздействия на клетки злокачественной опухоли для их разрушения посредством терапии антителами.

Терапия моноклональными антителами была разработана для направленного лечения больных раком, иммунологическими и ангиогенными заболеваниями. Примером успешной терапии антителами является терапия ГЕРЦЕПТИНом® (HERCEPTIN®) (трастузумаб), рекомбинантным гуманизированным моноклональным антителом, полученным из ДНК, который обладает высокоаффинной селективностью связывания в клеточном анализе (Kd=5нМ) с внеклеточным доменом белка рецептора 2 эпидермального фактора роста человека, HER2 (ErbB2) (патент США № 5821337; патент США № 6054297; патент США № 6407213; патент США № 6639055; Coussens L, et al. (1985) Science 230:1132-9; Slamon DJ, et al. (1989) Science 244:707-12). Трастузумаб представляет собой антитело IgG1 каппа, содержащее каркасные области человека с участками, определяющими антитела мыши (4D5), связывающееся с HER2. Трастузумаб связывается с антигеном HER2 и, таким образом, ингибирует рост злокачественных клеток. Так как трастузумаб является гуманизированным антителом, то он предельно уменьшает любой ответ HAMA у пациентов. Гуманизированное антитело против HER2 получают в суспензионной культуре клеток млекопитающих (яичника китайского хомячка, CHO). Протоонкоген HER2 (или c-erbB2) кодирует трансмембранный рецепторный белок массой 185 кДа, сходный по структуре с рецептором эпидермального фактора роста. Сверхэкспрессия белка HER2 обнаруживается в 25% -30% случаев первичного рака молочной железы и ее можно определить, используя иммуногистохимические способы оценки фиксированных образцов опухолей (Press MF, et al. (1993) Cancer Res 53:4960-70). Как в анализах *in vitro*, так и моделях животных было показано, что трастузумаб ингибирует пролиферацию человеческих опухолевых клеток, у которых сверхэкспрессирован HER2 (Hudziak RM, et al. (1989) Mol Cell Biol 9:1165-72; Lewis GD, et al. (1993) Cancer Immunol Immunother; 37:255-63; Baselga J, et al. (1998) Cancer Res. 58:2825-2831). Трастузумаб представляет собой медиатор антителозависимой клеточной цитотоксичности, ADCC (Hotaling TE, et al. (1996) [реферат]. Proc. Annual Meeting Am Assoc Cancer Res; 37:471; Pegram MD, et al. (1997) [реферат]. Proc. Am Assoc Cancer Res; 38:602; Sliwkowski et al. (1999) Seminars in Oncology 26(4), Suppl. 12:60-70; Yarden Y. и Sliwkowski, M. (2001) Nature Reviews: Molecular Cell Biology, Macmillan Magazines, Ltd., Vol. 2:127-137). ГЕРЦЕПТИН® клинически эффективен у пациентов со сверхэкспрессирующим ErbB2 метастазирующим раком молочной железы, которые продолжительно получали предварительное противоопухолевое лечение (Baselga et al. (1996) J. Clin. Oncol. 14:737-744). Хотя открытие герцептина является прорывом в лечении больных со сверхэкспрессирующими ErbB2 формами рака молочной железы, которые получали продолжительное предварительное противоопухолевое лечение, у большинства пациентов этой группы лечение герцептином не эффективно или слабо эффективно. Таким образом, существует значительная клиническая необходимость в разработке дополнительных способов лечения злокачественных опухолей, направленных на HER2, у пациентов со сверхэкспрессирующими HER2 опухолями или другими заболеваниями, ассоциированными с экспрессией HER2, у которых лечение герцептином не эффективно или слабо эффективно. Кроме HER2, при направленных способах лечения существует возможность использовать другие ассоциированные с опухолями антигены.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к новым соединениям, обладающим биологической активностью против клеток злокачественных опухолей. Соединения могут ингибировать рост опухолей у млекопитающих и могут использоваться для лечения людей, больных раком.

Настоящее изобретение относится к доставке, транспорту в клетки, накоплению и задержке в клетках терапевтических соединений-конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC). Изобретение, в частности, относится к получению высоких концентраций молекул активных метаболитов в клетках злокачественных опухолей. Внутриклеточное нацеливание может быть достигнуто способами и соединениями, делающими возможным накопление и удержание биологически активных средств внутри клеток. Такое эффективное нацеливание может использоваться в целом ряде терапевтических композиций и процедур.

Было сделано неожиданное открытие, что конъюгаты антитело-лекарственное средство со стабильными линкерными группами, не являющимися дисульфидными, связывающими майтанзоидное лекарственное вещество с антителом, обуславливают увеличенную активность *in vitro* и эффективность *in vivo*. Кроме того, было показано,

что конъюгаты антитело-лекарственное средство обладают неожиданным результатом, заключающимся в большей безопасности *in vivo* относительно известных конъюгатов с дисульфидными линкерами.

Соединения-конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) содержат антитело, ковалентно связанное линкером с одним или несколькими майтаназоидными лекарственными веществами. ADC можно представить в виде формулы I:

$$Ab-(L-D)_p \qquad I$$

где одно или несколько майтаназоидных лекарственных веществ (D) ковалентно связаны с помощью L антителом (Ab). Ab представляет собой антитело, связывающееся с рецептором ErbB или связывающееся с одним или несколькими ассоциированными с опухолями антигенами или рецепторами на клеточной поверхности. Линкер L может быть стабильным вне клетки, то есть внеклеточно. Линкер L, майтаназоидное лекарственное средство D или линкер и майтаназоидное лекарственное средство, взятые вместе (L-D), не содержат дисульфидной группы.

В одном из вариантов осуществления существенное количество лекарственного вещества не отщепляется от антитела до тех пор, пока конъюгат антитело-лекарственное средство не попадет в клетку через рецептор на клеточной поверхности, специфичный для данного антитела конъюгата антитело-лекарственное средство, и когда конъюгат антитело-лекарственное средство попадает в клетку, лекарственное вещество отщепляется от антитела.

В другом варианте осуществления ADC специфически связывается с рецептором, кодируемым геном ErbB, таким как EGFR, HER2, HER3 и HER4. ADC может специфически связываться с внеклеточным доменом рецептора HER2. ADC может ингибировать рост опухолевых клеток со сверхэкспрессией рецептора HER2.

В другом варианте осуществления, антитело (Ab) формулы **I** представляет собой гуманизированное антитело, такое как huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 или huMAb4D5-8 (трастузумаб).

В другом аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы **I** или ее фармацевтически приемлемые соль или сольват и фармацевтически приемлемые разбавитель, носитель или эксципиент.

Другой аспект относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы **I** и второе соединение с противоопухолевыми свойствами или другими терапевтическими эффектами.

Еще один аспект относится к диагностическим и терапевтическим применениям соединений и композиций, описанных в данном документе.

Другой аспект относится к способу уничтожения или ингибирования пролиферации опухолевых клеток или клеток злокачественных опухолей, включающему обработку клеток таким количеством конъюгата антитело-лекарственное средство, или его фармацевтически приемлемых соли или сольвата, которое эффективно для уничтожения или ингибирования пролиферации опухолевых клеток или раковых клеток.

Другой аспект относится к способам лечения рака, включающим введение пациенту композиции соединения формулы **I**. Один из способов предназначен для лечения рака у млекопитающего, где рак отличается сверхэкспрессией рецептора ErbB. Лечение неконъюгированным антителом против ErbB у млекопитающего, необязательно, может быть не эффективно или слабо эффективно. Способ включает введение млекопитающему терапевтически эффективного количества соединения-конъюгата антитело-лекарственное средство.

Другой аспект относится к способу ингибирования роста опухолевых клеток, сверхэкспрессирующих рецептор фактора роста, выбранный из группы, состоящей из рецептора HER2 и рецептора EGF, где способ включает введение пациенту соединения-конъюгата антитело-лекарственное средство, специфически связывающегося с указанным рецептором фактора роста и химиотерапевтического средства, где указанный конъюгат антитело-лекарственное средство и указанное химиотерапевтическое средство вводят в количестве, эффективном для ингибирования роста опухолевых клеток у пациента.

Другой аспект относится к способу лечения человека, восприимчивого к заболеванию, отличительным признаком которого является сверхэкспрессия рецептора ErbB2, или у которого диагностировано такое заболевание, включающему введение сочетания соединения-конъюгата антитело-лекарственное средство формулы **I** и химиотерапевтического средства.

Другой аспект относится к способу обнаружения раковых клеток, включающему воздействие на клетки соединением-конъюгатом антитело-лекарственное средство и определение степени связывания соединения-конъюгата антитело-лекарственное средство с клетками.

Другой аспект относится к способам скрининга вероятных лекарственных средств ADC для лечения заболевания или нарушения, отличительным признаком заболевания или нарушения является сверхэкспрессия HER2.

Другой аспект относится к готовым изделиям, то есть наборам, содержащим конъюгат антитело-лекарственное средство, контейнер и листовку-вкладыш или этикетку с информацией о лечении.

Другой аспект относится к способам лечения заболевания или нарушения, отличительным признаком которого является сверхэкспрессия HER2, у пациента соединениями-конъюгатами антитело-лекарственное средство.

Другой аспект относится к способам получения, способам изготовления, способам синтеза, способам конъюгации и способам очистки соединений-конъюгатов антитело-лекарственное средство и промежуточных соединений для изготовления, синтеза и конъюгации соединений-конъюгатов антитело-лекарственное средство.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На фиг.1 показан анализ пролиферации клеток *in vitro* на клетках SK-BR-3, обработанных конъюгатами антитело-лекарственное средство: - □-трастузумаб-SPP-DM1, -Δ-трастузумаб-SPDP-DM1 и -о-трастузумаб-SMCC-DM1.

На фиг.2 показан анализ пролиферации клеток *in vitro* на клетках BT-474, обработанных конъюгатами антитело-лекарственное средство: -□-трастузумаб-SPP-DM1, -Δ-трастузумаб-SPDP-DM1 и -о-трастузумаб-SMCC-DM1.

На фиг.3 показан анализ пролиферации клеток *in vitro* на клетках MCF7, обработанных конъюгатами антитело-лекарственное средство: -□-трастузумаб-SPP-DM1, -Δ-трастузумаб-SPDP-DM1 и -о-трастузумаб-SMCC-DM1.

На фиг.4 показан анализ пролиферации клеток *in vitro* на клетках MDA-MB-468, обработанных конъюгатами антитело-лекарственное средство: -□-трастузумаб-SPP-DM1, -Δ-трастузумаб-SPDP-DM1 и -о-трастузумаб-SMCC-DM1.

На фиг.5 показан сывороточный клиренс трастузумаба-SMCC-DM1 по сравнению с трастузумабом-SPP-DM1 у «голых» мышей с врожденным отсутствием NK-клеток, путем измерения сывороточной концентрации конъюгата и общей сывороточной концентрации антител в шести временных точках (5 минут, 1 час, 6 часов, 24 часа, 72, 168 часов после введения дозы) в течение 7 суток.

На фиг.6 показана стабильность конъюгатов: трастузумаб-SPDP-DM1, трастузумаб-SPP-DM1, трастузумаб-SPP-DM3, трастузумаб-SPP-DM4 и трастузумаб-SMCC-DM1, в динамике по времени у «голых» мышей без опухолей путем измерения сывороточной концентрации в шести временных точках (5 минут, 1 час, 6 часов, 24 часа, 72, 168 часов после введения дозы) в течение 7 суток.

На фиг.7 показаны размеры сывороточных концентраций общего трастузумаба/трастузумаба-SMCC-DM1 и общего трастузумаба/трастузумаба-SPP-DM1 у мышей с опухолями и без через 7 суток после введения.

На фиг.8 представлен анализ клиренса плазматической концентрации после введения 10 мг/кг трастузумаба-SPP-DM1 4 особям крыс. Измеряли общую концентрацию антител и концентрацию трастузумаба-SPP-DM1 (tr=трастузумаб).

На фиг.9 представлен анализ клиренса плазматической концентрации после введения 10 мг/кг трастузумаба-SMCC-DM1 4 особям крыс. Измеряли общую концентрацию антител и концентрацию трастузумаба-SMCC-DM1.

На фиг.10 показано среднее изменение размера опухоли в динамике по времени у мышей при введении дозы: носителя (PBS, pH 6,5), трастузумаба-SPP-DM1 (370 мкг DM1/м^2) и трастузумаба-SMCC-DM1 (330 мкг DM1/м^2), где доза является дозой вводимого DM1.

На фиг.11 показано среднее изменение размера опухоли в динамике по времени у бестимусных «голых» мышей с аллотрансплантатами опухоли Fo5 при введении на 0 день дозы: носителя (PBS, pH 6,5), 10 мг/кг трастузумаба-SIAB-DM1 (3,4 DM1/Ab; 168 мкг DM1/кг) и 10 мг/кг трастузумаба-SMCC-DM1 (3,2 DM1/Ab; 158 мкг DM1/кг), где дозой является доза вводимого конъюгата антитело-лекарственное средство.

На фиг.12 показано среднее изменение размера опухоли в динамике по времени у «голых» мышей с врожденным отсутствием NK-клеток MMTV-Her2 Fo 5 (по семь в каждой группе, все с опухолями, Ti=7) при однократной инъекции носителя (PBS, pH 6,5), 10 мг/кг трастузумаба-SPP-DM1, 10 мг/кг трастузумаба-SPP-DM4, 10 мг/кг трастузумаба-SPP-DM3 и 10 мг/кг трастузумаба-SMCC-DM1.

На фиг.13 показано время до удвоения объема опухоли и log-анализ клеточной гибели для носителя (PBS, pH 6,5), трастузумаба-SPP-DM1, трастузумаба-SPP-DM4, трастузумаба-SPP-DM3 и трастузумаба-SMCC-DM1 в опухолях HER2-Fo5.

На фиг.14 показано изменение массы тела крыс в динамике по времени при введении дозы: носителя (10 мМ сукцинат натрия, 100 мг/мл сахароза, 0,1% Tween 20, pH 5,0), трастузумаба-SPP-DM1 (1860 мкг DM1/м^2), трастузумаба-SMCC-DM1 (1860 мкг DM1/м^2), трастузумаба-SMCC-DM1 (3260 мкг DM1/м^2) и свободного DM1 (650 мкг/м^2).

На фиг.15 показан функциональный анализ печени в единицах AST на литр в динамике по времени на модели крысы при введении дозы: носителя (10 мМ сукцинат натрия, 100 мг/мл сахароза, 0,1% Tween 20, pH 5,0), трастузумаба-SPP-DM1 (22,3 мг/кг), трастузумаба-SMCC-DM1 (10 мг/кг), трастузумаба-SMCC-DM1 (25 мг/кг), трастузумаба-SMCC-DM1 (50 мг/кг) и свободного DM1.

На фиг.16 показаны показатели безопасности в единицах PLT в клетках на литр в динамике по времени на модели крысы с введением дозы: носителя (10 мМ сукцинат натрия, 100 мг/мл сахароза, 0,1% Tween 20, pH 5,0), трастузумаба-SPP-DM1 (22,3 мг/кг), трастузумаба-SMCC-DM1 (10 мг/кг), трастузумаба-SMCC-DM1 (25 мг/кг), трастузумаба-SMCC-DM1 (50 мг/кг) и свободного DM1.

На фиг.17 показан анализ пролиферации клеток *in vitro* на клетках HT1080EphB2 (C8), обработанных конъюгатами антитело-лекарственное средство: -▲- antiEphB2R 2H9-SPP-DM1 и -▼- antiEphB2R 2H9-SMCC-DM1.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Теперь будет сделано подробное указание на конкретные варианты осуществления изобретения, примеры которых проиллюстрированы сопровождающимися структурами и формулами. Хотя изобретение будет описано в отношении перечисленных вариантов осуществления, понятно, что эти варианты осуществления не ограничивают настоящее изобретение. Напротив, изобретение включает все альтернативы, модификации и эквиваленты, которые можно включить в объем настоящего изобретения, определенный формулой изобретения.

Специалисту в данной области известно множество способов и веществ, сходных или эквивалентных описанным в настоящем документе способам и веществам, которые можно использовать в практике настоящего изобретения. Настоящее изобретение абсолютно не ограничено описанными способами и веществами.

Если не определено иначе, технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют те же значения, известные специалисту в области, к которой принадлежит настоящее изобретение, и согласуются с Singleton *et al.*, (1994) *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2nd Ed.*, J. Wiley & Sons, New York, NY и Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) *Immuno Biology, 5th Ed.*, Garland Publishing, New York.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Если не указано иначе, следующие термины и фразы, используемые в данном документе, имеют следующие значения:

Если в данном документе используют товарные знаки, то заявители независимо охватывают композицию товарного знака, основное лекарственное средство и активный фармацевтический(-ие) ингредиент(ы) продукта товарного знака.

Термин «антитело» в данном документе используют в широком смысле, и, конкретно, он охватывает моноклональные антитела, поликлональные антитела, димеры, мультимеры, полиспецифичные антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител, при условии, что они проявляют желательную биологическую активность (Miller et al. (2003) Jour. of Immunology 170:4854-4861). Антитела могут быть мышиными, человеческими, гуманизированными, химерными или полученными из других видов. Антитело представляет собой белок, вырабатываемый иммунной системой, способный распознать и связывать специфический антиген (Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) *Immuno Biology, 5th Ed.*, Garland Publishing, New York). Как правило, мишеневый антиген несет множество сайтов связывания, также называемых эпитопами, распознаваемых CDR различных антител. Каждое антитело, специфически связывающееся с различным эпитопом, отличается своей структурой. Таким образом, у одного антигена может быть более одного соответствующего антитела. Антитело включает полноразмерную молекулу иммуноглобулина или иммунологически активную часть полноразмерной молекулы иммуноглобулина, то есть молекулу, которая содержит антигенсвязывающий сайт, иммуноспецифически связывающийся с мишеневым антигеном или его частью, где такие мишени включают в качестве неограничивающих примеров раковые клетки или клетки, продуцирующие аутоиммунные антитела, ассоциированные с аутоиммунным заболеванием. Описанный в данном документе иммуноглобулин может быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD и IgA), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса молекул иммуноглобулинов. Иммуноглобулины можно

получать из любых видов. Однако в одном из аспектов иммуноглобулины являются человеческого, мышиного или кроличьего происхождения.

«Фрагменты антител» содержат часть полноразмерного антитела, как правило, его антигенсвязывающую или вариабельную область. Примеры фрагментов антител включают фрагменты Fab, Fab', $F(ab')_2$, и Fv; димерные антитела; линейные антитела; фрагменты, получаемые с помощью экспрессионной библиотеки Fab, антиидиотипические (анти-Id) антитела, CDR (определяющая комплементарность область) и фрагменты, связывающие эпитопы, любого из указанного выше, которые специфически связываются с антигенами раковых клеток, вирусными антигенами или антигенами микроорганизмов, молекулы одноцепочечных антител; полиспецифические антитела, образуемые из фрагментов антител.

Как используется в данном документе термин «моноклональное антитело» относится к антителу, полученному из популяции, по существу, гомогенных антител, то есть к отдельным антителам, составляющим популяцию, которые идентичны, за исключением возможных природных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела высокоспецифичны и направлены к одному антигенному сайту. Кроме того, в отличие от препаратов поликлональных антител, включающих в себя различные антитела, направленные к различным детерминантам (эпитопам), каждое моноклональное антитело направлено к одной детерминанте антигена. Кроме их специфичности, преимуществом моноклональных антител является возможность их синтеза без загрязнения другими антителами. Определение «моноклональное» означает свойство антитела как полученного, по существу, из гомогенной популяции антител и не предназначено как указание на конкретный способ получения антитела. Например, моноклональные антитела для применения по настоящему изобретению можно получить способом гибридом, впервые описанном Kohler et al. (1975) *Nature* 256:495, или их можно получить способами рекомбинантных ДНК (см. патент США № 4816567). Моноклональные антитела также можно выделять из фаговых библиотек антител, используя способы, описанные, например, Clackson et al. (1991) Nature, 352:624-628; Marks et al. (1991) J. Mol. Biol., 222:581-597.

В частности, моноклональные антитела в данном документе включают «химерные» антитела, у которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям антител, полученных из конкретного вида или принадлежащих конкретному классу или подклассу антител, тогда как остаток цепи(-ей) идентичен или гомологичен соответствующим последовательностям антител, полученных из другого вида или принадлежащих другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител, если они обладают желаемой биологической активностью (патент США № 4816567; и Morrison et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855). В данном документе интересующие химерные антитела включают «приматизированные» антитела, содержащие антигенсвязывающие последовательности вариабельного домена, полученного из примата, не являющегося человеком (например, старосветская мартышка или человекообразная обезьяна), и последовательности константной области человека.

В данном документе «интактное антитело» представляет собой антитело, содержащее домены VL и VH, а также константный домен легкой цепи (CL) и константные домены тяжелых цепей, CH1, CH2 и CH3. Константные домены могут быть константными доменами с природной последовательностью (например, константные домены человека с природной последовательностью) или вариантами их аминокислотной последовательности. Интактное антитело может обладать одной или несколькими «эффекторными функциями», которые относятся к видам биологической активности, присущей Fc-области (Fc-область с природной последовательностью или вариант аминокислотной последовательности Fc-области) антитела. Примеры эффекторных функций антител включают связывание C1q; комплемент-зависимую цитотоксичность; связывание Fc-рецептора; антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз и отрицательную регуляцию рецепторов клеточной поверхности, таких как рецептор B-клеток и BCR.

В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена своих тяжелых цепей интактные антитела можно отнести к различным «классам». Существует пять основных классов интактных антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, а некоторые из них можно дополнительно разделить на «подклассы» (изотипы), например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA и IgA2. Константные домены тяжелых цепей, которые соответствуют различным классам антител, обозначают α, δ, ε, γ и μ соответственно. Структура субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны.

«Рецептор ErbB» представляет собой рецепторный белок тирозинкиназу, принадлежащий семейству рецепторов ErbB, являющихся важными медиаторами клеточного роста, дифференцировки и выживаемости. Семейство рецепторов ErbB включает четыре отличных друг от друга представителя, включая рецептор эпидермального фактора роста (EGFR, ErbB1, HER1), HER2 (ErbB2 или p185^{neu}), HER3 (ErbB3) и HER4 (ErbB4 или tyro2). Группа антител против ErbB2 охарактеризована с помощью линии опухолевых клеток рака молочной железы человека SKBR3 (Hudziak et al. (1989) Mol. Cell. Biol. 9(3): 1165-1172). Максимальное ингибирование наблюдали у антитела, обозначенного как 4D5, которое ингибировало 56% клеточной пролиферации. Другие антитела в группе снижали клеточную пролиферацию в этом анализе в меньшей степени. Кроме того, было обнаружено, что антитело 4D5 повышает чувствительность линии опухолевых клеток рака молочной железы, сверхэкспрессирующих ErbB2, к цитотоксическим эффектам TNF-α (патент США № 5677171). Антитела против ErbB2, описанные Hudziak et al., дополнительно охарактеризованы Fendly et al. (1990) Cancer Research 50:1550-1558; Kotts et al. (1990) *In Vitro* 26(3):59A; Sarup et al. (1991) Growth Regulation 1:72-82; Shepard et al. (1991) J. Clin. Immunol. 11(3):117-127; Kumar et al. (1991) Mol. Cell. Biol. 11(2):979-986; Lewis et al. (1993) Cancer Immunol. Immunother. 37:255-263; Pietras et al. (1994) Oncogene 9:1829-1838; Vitetta et al. (1994) Cancer Research 54:5301-5309; Sliwkowski et al. (1994) J. Biol. Chem. 269(20):14661-14665; Scott et al. (1991) J. Biol. Chem. 266:14300-5; D'souza et al. Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91:7202-7206; Lewis et al. (1996) Cancer Research 56:1457-1465; и Schaefer et al. (1997) Oncogene 15:1385-1394.

Другие антитела против ErbB2 с различными свойствами описаны Franklin et al. (2004) Cancer Cell 5:317-328; Tagliabue et al. (1991) Int. J. Cancer 47:933-937; McKenzie et al. (1989) Oncogene 4:543-548; Maier et al. (1991) Cancer Res. 51:5361-5369; Bacus et al. (1990) Molecular Carcinogenesis 3:350-362; Stancovski et al. (1991) PNAS (USA) 88:8691-8695; Bacus et al. (1992) Cancer Research 52:2580-2589; Xu et al. (1993) Int. J. Cancer 53:401-408; WO 94/00136; Kasprzyk et al. (1992) Cancer Research 52:2771-2776; Hancock et al. (1991) Cancer Res. 51:4575-4580; Shawver et al. (1994) Cancer Res. 54:1367-1373; Arteaga et al. (1994) Cancer Res. 54:3758-3765; Harwerth et al. (1992) J. Biol. Chem. 267:15160-15167; патент США № 5783186; и Klapper et al. (1997) Oncogene 14:2099-2109.

Скрининг идентичности последовательностей привел к идентификации двух других представителей семейства рецепторов ErbB; ErbB3 (патент США № 5183884; патент США № 5480968; Kraus et al. (1989) PNAS (USA) 86:9193-9197) и ErbB4 (EP 599274; Plowman et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:1746-1750; и Plowman et al. (1993) Nature 366:473-475). Оба этих рецептора проявляли повышенную экспрессию по меньшей мере в некоторых линиях опухолевых клеток рака молочной железы.

Как правило, рецептор ErbB содержит внеклеточный домен, который может связываться с лигандом ErbB; липофильный трансмембранный домен; консервативный внутриклеточный тирозинкиназный домен и С-концевой сигнальный домен, несущий несколько тирозиновых остатков, которые могут быть фосфорилированы. Рецептор ErbB может представлять собой рецептор ErbB с «природной последовательностью» или его «вариант аминокислотной последовательности». Рецептор ErbB может представлять собой природную последовательность рецептора ErbB человека. Таким образом, «представителем семейства рецепторов ErbB» является EGFR (ErbB1), ErbB2, ErbB3, ErbB4 или любой другой рецептор ErbB, известный в настоящее время или который будет идентифицирован в будущем.

Термины «ErbB1», «рецептор эпидермального фактора роста», «EGFR» и «HER1» в данном документе применяются взаимозаменяемо и относятся к EGFR, как описано, например, у Carpenter et al. (1987) Ann. Rev. BioChem. 56:881-914, включая природные мутантные формы (например, делеционный мутант EGFR, как у Humphrey et al., (1990) PNAS (USA), 87:4207-4211). Термин erbB1 относится к гену, кодирующему белковый продукт EGFR. Антитела против HER1 описаны, например, Murthy et al. (1987) Arch. BioChem. Biophys., 252:549-560 и в WO 95/25167.

Термин «ERRP», «белок рецептора EGF», «EGFR белок» и «белок рецептора эпидермального фактора роста белок» в данном документе используются взаимозаменяемо и относятся к ERRP, как описано, например, в патенте США № 6399743 и патенте США № 2003/0096373.

Выражения «ErbB2» и «HER2» в данном документе используются взаимозаменяемо и относятся к белку HER2 человека, описанному, например, Semba et al. (1985) PNAS (USA), 82:6497-6501 и Yamamoto et al. (1986) Nature, 319:230-234 (инвентарный номер Genbank X03363). Термин «erbB2» относится к гену,

кодирующему ErbB2 человека, а «neu» относится к гену, кодирующему p185neu крысы.

«ErbB3» и «HER3» относятся к рецепторному полипептиду, описанному, например, в патенте США № 5183884; патенте США № 5480968; Kraus et al. (1989) PNAS (USA) 86:9193-9197. Антитела против ErbB3 известны в данной области (патент США № 5183884; патент США № 5480968; WO 97/35885).

Термины «ErbB4» и «HER4» в данном документе относятся к рецепторному полипептиду, описанному, например, в Европейской патентной заявке № 599274; Plowman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:1746-1750 (1993) и Plowman et al., Nature, 366:473-475 (1993), включая их изоформы, например, описанные в WO 99/19488. Антитела против HER4 описаны, например, в WO 02/18444.

Антитела против рецепторов ErbB коммерчески доступны из ряда источников, в том числе, например, Santa Cruz Biotechnology, Inc., California, USA.

Под «лигандом ErbB» понимают белок, который связывается и/или активирует рецептор ErbB. Лиганд ErbB может представлять собой природную последовательность лиганда ErbB человека, такого как эпидермальный фактор роста (EGF) (Savage et al. (1972) J. Biol. Chem., 247:7612-7621); трансформирующий фактор роста альфа (TGF-α) (Marquardt et al. (1984) Science 223:1079-1082); амфирегулин, также известный как аутокринный фактор роста шванном или кератиноцитов (Shoyab et al. (1989) Science 243:1074-1076; Kimura et al. (1990) Nature 348:257-260; и Cook et al. (1991) Mol. Cell. Biol., 11:2547-2557); бетацеллюлин (Shing et al. (1993) Science 259:1604-1607 и Sasada et al. (1993) BioChem. Biophys. Res. Commun. 190:1173); гепаринсвязывающий эпидермальный фактор роста (HB-EGF) (Higashiyama et al. (1991) Science 251:936-939); эпирегулин (Toyoda et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:7495-7500 и Komurasaki et al. (1997) Oncogene 15:2841-2848); херегулин (смотри ниже); нейрегулин-2 (NRG-2) (Carraway et al., Nature, 387:512-516 (1997)); нейрегулин-3 (NRG-3) (Zhang et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci., 94:9562-9567); нейрегулин-4 (NRG-4) (Harari et al. (1999) Oncogene, 18:2681-89) или крипто (CR-1) (Kannan et al. (1997) J. Biol. Chem., 272(6):3330-3335). Лиганды ErbB, связывающие EGFR, включают EGF, TGF-α, амфирегулин, бетацеллюлин, HB-EGF и эпирегулин. Лиганды ErbB, связывающие ErbB3, включают херегулины. Лиганды ErbB, способные связывать ErbB4, включают бетацеллюлин, эпирегулин, HB-EGF, NRG-2, NRG-3, NRG-4 и херегулины. Лиганд ErbB также может быть синтетическим лигандом ErbB. Синтетический лиганд может быть специфичным к конкретному рецептору ErbB или может распознавать конкретные рецепторные комплексы ErbB. Пример синтетического лиганда представляет собой синтетический химерный бирегулин херегулин/EGF (см., например, Jones et al. (1999) FEBS Letters, 447:227-231, приведенный в данном документе в качестве ссылки).

«Херегулин» (HRG) относится к полипептидному продукту, кодируемому геном херегулина, как описано в патенте США № 5641869 или Marchionni et al. (1993) Nature 362:312-318. Примеры херегулинов включают херегулин-α, херегулин-β1, херегулин-β2 и херегулин-β3 (Holmes et al. (1992) Science 256:1205-1210 и патент США № 5641869); фактор дифференцировки neu (NDF) (Peles et al. (1992) Cell 69: 205-216); индуктор активности ацетилхолинового рецептора (ARIA) (Falls et al. (1993) Cell 72:801-815); глиальные факторы роста (GGF) (Marchionni et al. (1993) Nature, 362:312-318); фактор, полученный из чувствительных и двигательных нейронов (SMDF) (Ho et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:14523-14532); γ-херегулин (Schaefer et al. (1997) Oncogene, 15:1385-1394). Термин включает биологически активные фрагменты и/или варианты аминокислотной последовательности природной последовательности полипептида HRG, такие как фрагмент их EGF-подобный домена (например, HRGβ177-244).

«Гетероолигомер ErbB» представляет собой нековалентно связанный олигомер, содержащий по меньшей мере два различных рецептора ErbB. «Димер ErbB» представляет собой нековалентно связанный олигомер, содержащий два различных рецептора ErbB. Такие комплексы могут образовываться при воздействии на клетку, экспрессирующую два или более рецепторов ErbB, лиганда ErbB. Олигомеры ErbB, такие как димеры ErbB, можно выделять с помощью иммунопреципитации и анализировать с помощью SDS-PAGE, например, как описано у Sliwkowski et al. (1994) J. Biol. Chem., 269(20):14661-14665. Примеры таких гетероолигомеров ErbB включают комплексы EGFR-ErbB2 (также называемый HER1/HER2), ErbB2-ErbB3 (HER2/HER3) и ErbB3-ErbB4 (HER3/HER4). Кроме того, гетероолигомер ErbB может содержать два или более рецепторов ErbB2 в сочетании с другим рецептором ErbB, таким как ErbB3, ErbB4 или EGFR (ErbB1). В гетеродимер могут быть включены другие белки, такие как субъединица цитокинового рецептора (например, gp130).

Под «активацией рецептора ErbB лигандом» понимают передачу сигнала (например, вызванную внутриклеточным киназным доменом рецептора ErbB с

фосфорилированием тирозиновых остатков рецептора ErbB или полипептидного субстрата), опосредованную связыванием лиганда ErbB с гетероолигомером ErbB, содержащим представляющий интерес рецептор ErbB. Как правило, к ней относится связывание лиганда ErbB с гетероолигомером ErbB, который активирует киназный домен одного или нескольких рецепторов ErbB в гетероолигомере и тем самым приводит к фосфорилированию тирозиновых остатков на одном или нескольких рецепторах ErbB и/или фосфорилированию тирозиновых остатков дополнительного полипептидного субстрата(ов). Активацию рецептора ErbB можно определить количественно с помощью различных анализов фосфорилирования тирозина.

Полипептид с «природной последовательностью» представляет собой полипептид с той же аминокислотной последовательностью, что и полипептид (например, рецептор ErbB или лиганд ErbB), полученный из природных условий. Такие полипептиды с природной последовательностью можно выделять из природных условий или получать рекомбинантными или синтетическими способами. Таким образом, полипептид с природной последовательностью может обладать аминокислотной последовательностью природного полипептида человека, полипептида мыши или полипептида другого вида млекопитающих.

Термин «вариант аминокислотной последовательности» относится к полипептидам с аминокислотными последовательностями, отличающимися от полипептида с природной последовательностью. Обычно последовательности вариантов аминокислотных последовательностей по меньшей мере приблизительно на 70% идентичны по меньшей мере одному рецептор-связывающему домену природного лиганда ErbB, или по меньшей мере одному лиганд-связывающему домену природного рецептора ErbB, или по меньшей мере приблизительно на 80% или по меньшей мере приблизительно на 90% гомологичны таким рецептор-связывающим или лиганд-связывающим доменам. Варианты аминокислотных последовательностей в определенных положениях аминокислотной последовательности природной аминокислотной последовательности несут замены, делеции и/или вставки.

«Идентичность последовательности» определяют как процент остатков в варианте аминокислотной последовательности, которые идентичны после выравнивания последовательностей и внесения, если необходимо, пропусков для достижения максимального процента идентичности последовательности. Способы и компьютерные программы для выравнивания хорошо известны в данной области. Одной из таких компьютерных программ является «Align 2», созданная Genentech, Inc., которая зарегистрирована вместе с документацией для пользователя в United States Copyright Office, Washington, DC 20559, 10 декабря 1991 года.

«Антителозависимая клеточная цитотоксичность» и «ADCC» относится к клеточной реакции, при которой неспецифические цитотоксические клетки, экспрессирующие Fc-рецепторы (FcRs) (например, природные клетки-киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги), распознают связавшееся на клетке-мишени антитело и затем вызывают лизис клетки-мишени. Основные клетки, опосредующие ADCC, NK-клетки, экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия FcR на гематопоэтических клетках приведена в табл.3 на странице 464 Ravetch and Kinet, (1991) Annu. Rev. Immunol, 9:457-92. Для оценки активности ADCC представляющей интерес молекулы можно провести анализ ADCC *in vitro* (патент США № 55003621; патент США № 5821337). Эффективные для таких анализов эффекторные клетки включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и природные клетки киллеры (NK). Альтернативно или дополнительно активность ADCC представляющей интерес молекулы можно оценить *in vivo*, например, на модели животных, например, так, как описано Clynes et al. (1998) PNAS (USA), 95:652-656.

«Лекарственная группа майтаназина» обозначает субструктуру конъюгата антитело-лекарственное средство, которая имеет структуру соединения майтаназина. Майтаназин был впервые выделен из восточноафриканского кустарника *Maytenus serrata* (патент США № 3896111). Затем было обнаружено, что определенные микроорганизмы также продуцируют майтанзиноиды, такие как майтаназинол и С-3 майтаназиноловые сложные эфиры (патент США № 4151042). Были описаны синтетические майтаназинол и аналоги майтаназинола. См. патенты США №№ 4137230; 4248870; 4256746; 4260608; 4265814; 4294757; 4307016; 4308268; 4308269; 4309428; 4313946; 4315929; 4317821; 4322348; 4331598; 4361650; 4364866; 4424219; 4450254; 4362663 и 4371533 и Kawai et al. (1984) Chem. Pharm. Bull. 3441-3451), каждый из которых приведен в данном документе в качестве ссылки в полном объеме.

Термины «Fc-рецептор» или «FcR» применяют для обозначения рецептора, связывающего Fc-область антитела, например природной последовательности FcR человека. FcR может связывать антитело IgG (гамма-рецептор) и включает рецепторы

подклассов FcγRI, FcγRII и FcγRIII, включая аллельные варианты и формы альтернативного сплайсинга этих рецепторов. Рецепторы FcγRII включают FcγRIIA («активирующий рецептор») и FcγRIIB («ингибирующий рецептор») со сходными аминокислотными последовательностями, которые отличаются в основном своими цитоплазматическими доменами. Активирующий рецептор FcγRIIA содержит в своем цитоплазматическом домене иммунорецепторный активационный мотив на основе тирозина (ITAM). Ингибирующий рецептор FcγRIIB содержит в своем цитоплазматическом домене иммунорецепторный ингибирующий мотив на основе тирозина (ITIM). (Смотри обзор M. in Daëron, Annu. Rev. Immunol., 15:203-234 (1997)). FcR рассмотрены Ravetch и Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9:457-92 (1991); Capel et al. (1994) Immunomethods, 4:25-34 и de Haas et al. (1995) J. Lab. Clin. Med., 126:330-41. В настоящем описании термин "FcR" охватывает другие FcR, включая те, которые будут идентифицированы в будущем. Термин также включает неонатальный рецептор, FcRn, отвечающий за перенос материнских IgG плоду (Guyer et al. (1976) J. Immunol. 117:587 и Kim et al. (1994) J. Immunol., 24:249).

«Комплемент-зависимая цитотоксичность», или «CDC», относится к способности молекулы лизировать мишень в присутствие комплемента. Путь активации комплемента инициируется связыванием первого компонента системы комплемента (C1q) с молекулой (например, антитела), образующей комплекс с распознаваемым антигеном. Для оценки активации комплемента можно проводить анализ CDC, например, как описано Gazzano-Santoro et al. (1996) J. Immunol. Methods, 202:163.

«Природные антитела», как правило, представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины массой приблизительно 150000 Дальтон, состоящие из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Каждая легкая цепь связана с тяжелой цепью одной ковалентной дисульфидной связью, тогда как количество дисульфидных связей между тяжелыми цепями у различных изотипов иммуноглобулинов варьирует. Каждая тяжелая и легкая цепь также несет расположенные с одинаковыми интервалами дисульфидные связи. Каждая тяжелая цепь на одном из концов несет вариабельный домен (VH), за которым следует ряд константных доменов. Каждая легкая цепь на одном конце несет вариабельный домен (VL), а на другом конце несет константный домен. Константный домен легкой цепи выровнен с первым константным доменом тяжелой цепи, а вариабельный домен легкой цепи выровнен с вариабельным доменом тяжелой цепи. Полагают, что конкретные аминокислотные остатки образуют взаимодействие между вариабельными доменами легкой цепи и тяжелой цепи.

Термин «вариабельный» обозначает, что определенные части вариабельных доменов антител значительно отличаются по последовательности и используются для связывания и специфического узнавания каждого конкретного антитела своего конкретного антигена. Однако вариабельность неравномерно распределена в вариабельных доменах антител. Она концентрируется в трех сегментах вариабельных доменов легких цепей и тяжелых цепей, называемых гипервариабельными областями. Наиболее высококонсервативные части вариабельных доменов называют каркасными областями (FR). Каждый из вариабельных доменов природных тяжелых и легких цепей содержит четыре FR, в основном принимающих конфигурацию β-слоя, соединенные тремя гипервариабельными областями, образующими петли, соединяющие, а в некоторых случаях образующие, части структуры β-слоя. Гипервариабельные области каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости благодаря FR, и вместе с гипервариабельными областями другой цепи вносят вклад в образование антигенсвязывающего участка антител (смотри Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD). Константные домены напрямую не вовлечены в связывание антитела с антигеном, но выполняют различные эффекторные функции, например участие антитела в антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC).

В данном документе термин «гипервариабельная область» относится к аминокислотным остаткам антитела, ответственным за связывание антигена. Гипервариабельная область, как правило, содержит аминокислотные остатки «участка, определяющего комплементарность», или «CDR» (например, остатки 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3), в вариабельном домене легкой цепи и 31-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) в вариабельном домене тяжелой цепи; Kabat et al. выше) и/или остатки «гипервариабельной петли» (например, остатки 26-32 (L1), 50-52 (L2) и 91-96 (L3) в вариабельном домене легкой цепи и 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) в вариабельном домене тяжелой цепи; Chothia и Lesk (1987) J. Mol. Biol., 196:901-917). Остатки «каркасной области» или «FR» представляют собой остатки вариабельного домена, отличающиеся от остатков гипервариабельных областей, как определено в данном документе.

Расщепление антител папаином приводит к получению двух идентичных антигенсвязывающих фрагментов, называемых «Fab»-фрагментами, каждый из которых обладает одним антигенсвязывающим участком, и осадочного «Fc»-фрагмента, название которого отражает его способность легко кристаллизоваться. Обработка пепсином приводит к образованию фрагмента F(ab')2 с двумя антигенсвязывающими участками и способного к перекрестному связыванию антигена.

«Fv» представляет собой минимальный фрагмент антитела, содержащий полный антигенраспознающий и антигенсвязывающий участок. Эта область состоит из димера одной тяжелой цепи и одного вариабельного домена легкой цепи в тесной нековалентной связи. Именно в этой конфигурации три гипервариабельные области каждого вариабельного домена взаимодействуют с образованием антигенсвязывающего участка на поверхности димера VH-VL. Все вместе шесть гипервариабельных областей обуславливают специфичность связывания антигена с антителом. Однако даже один вариабельный домен (или половина Fv, содержащая только три гипервариабельные области, специфичные для антигена) обладает способностью распознавать и связывать антиген, хотя и с меньшей аффинностью, чем целый участок связывания.

Fab-фрагмент также содержит константный домен легкой цепи и первый константный домен (CH1) тяжелой цепи. Fab'-фрагменты отличаются от Fab-фрагментов несколькими дополнительными остатками на С-конце CH1-домена тяжелой цепи, включающих в себя один или несколько цистеинов шарнирной области антитела. В данном документе Fab'-SH обозначает Fab', в котором цистеиновый остаток(ки) константных доменов несет по меньшей мере одну свободную тиольную группу. Фрагменты антител F(ab')2 исходно образуются как пары Fab'-фрагментов, которые связаны между собой шарнирными цистеинами. Также известны другие способы химического связывания фрагментов антител.

«Легкие цепи» антител любого вида позвоночных на основе аминокислотных последовательностей их константных доменов можно отнести к одному из двух четко различимых типов, обозначаемых каппа (κ) и лямбда (λ).

«Одноцепочечный Fv» или «scFv» означают одноцепочечные фрагменты вариабельной области антитела, содержащие домены антитела VH и VL, где эти домены находятся на одной полипептидной цепи. Полипептид Fv между доменами VH и VL может дополнительно содержать полипептидный линкер, позволяющий scFv образовать желательную структуру для связывания антигена (Plückthun in *The Pharmacology Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994). Фрагменты scFv антител против ErbB2 описаны в WO 93/16185; патенте США № 5571894; патенте США № 5587458.

Термин «димерные антитела» относится к небольшим фрагментам антител с двумя антигенсвязывающими участками, где эти фрагменты содержат вариабельный домен тяжелой цепи (VH), связанный с вариабельным доменом легкой цепи (VL) на одной полипептидной цепи (VH-VL). С помощью линкера, который слишком короткий, чтобы обеспечить спаривание двух доменов одной и той же цепи, домены невольно спариваются с комплементарными доменами другой цепи и образуют два антигенсвязывающих участка. Димерные антитела подробно описаны, например, в EP 404097; WO 93/11161 и Hollinger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448.

«Гуманизированные» формы антител, не являющихся антителами человека (например, антитела крыс), представляют собой химерные антитела, содержащие минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина, не являющегося иммуноглобулином человека. В большей части гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека (реципиентное антитело), в которых остатки, образующие гипервариабельную область реципиента, заменены остатками гипервариабельной области вида, не являющегося человеком (донорное антитело), например мыши, крысы, кролика или примата, не являющегося человеком, обладающими желательной специфичностью, аффинностью и способностью. В некоторых случаях остатки каркасной области (FR) иммуноглобулина человека замещают соответствующими остатками, не являющимися человеческими. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, отсутствующие в реципиентном антителе или донорном антителе. Эти модификации производят для дополнительного улучшения характеристик антитела. Как правило, гуманизированное антитело, по существу, содержит все по меньшей мере из одного, а обычно из двух вариабельных доменов, в которых все или по существу все гипервариабельные петли соответствуют гипервариабельным петлям иммуноглобулина, не являющегося иммуноглобулином человека, и все или по существу все FR представляют собой FR последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело, необязательно, содержит по меньшей мере

часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, иммуноглобулина человека. Более подробное описание смотри Jones et al. (1986) Nature, 321:522-525; Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-329; и Presta, (1992) Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596.

Гуманизированные антитела против ErbB2 включают huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 и huMAb4D5-8 (ГЕРЦЕПТИН®, трастузумаб), как описано в табл.3 патента США № 5821337, приведенного в данный документ в качестве ссылки в полном объеме; гуманизированные антитела 520C9 (WO 93/21319) и 2C4.

«Выделенное» антитело представляет собой антитело, идентифицированное и выделенное и/или восстановленное из компонентов природного окружения. Загрязняющие компоненты природного окружения представляют собой вещества, препятствующие диагностическому или терапевтическому применению антитела и могут включать в себя ферменты, гормоны и другие белковые и небелковые растворенные вещества. Антитела можно очищать (1) до более чем 95% мас. антитела, например, по методу Лоури, или более чем 99% мас. (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности, используя белковый секвестер с вращающимися чашками, или (3) до гомогенности, используя SDS-PAGE в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях с окрашиванием Кумаси синим или серебром. К выделенному антителу относится антитело *in situ* в рекомбинантных клетках, так как отсутствует по меньшей мере один компонент природного окружения антитела. Однако обычно выделенное антитело получают посредством по меньшей мере одной стадии очистки.

Антитело «связывающее» представляющий интерес антиген, например, антиген ErbB2, представляет собой антитело, способное связывать этот антиген с достаточной аффинностью так, чтобы это антитело можно было использовать для выявления клетки, экспрессирующей антиген. Когда антитело представляет собой антитело, связывающее ErbB2, то, как правило, оно предпочтительно связывает ErbB2, в отличие от других рецепторов ErbB, и может быть антителом, у которого отсутствует значительная перекрестная реактивность с другими белками, такими как EGFR, ErbB3 или ErbB4. В таких вариантах осуществления степень связывания антитела с белками, не являющимися ErbB2 (например, связывание клеточной поверхности с эндогенным рецептором), составляет меньше 10%, как, например, определяют анализом сортировки активированных флуоресценцией клеток (FACS) или радиоиммунопреципитацией (RIA). Иногда антитело против ErbB2 не обладает значительной перекрестной реактивностью с белком крысы neu, например, как описано Schecter et al. (1984) Nature 312:513 и Drebin et al. (1984) Nature, 312:545-548.

Антитело, которое «блокирует» активацию рецептора ErbB лигандом, снижает или предотвращает такую активацию, где антитело способно блокировать активацию рецептора ErbB лигандом значительно более эффективно, чем моноклональное антитело 4D5, например, приблизительно так же эффективно, как моноклональные антитела 7F3 или 2C4 или их Fab-фрагменты. Например, антитело, которое блокирует активацию рецептора ErbB лигандом, может представлять собой антитело, которое приблизительно на 50-100% более эффективно, блокирует формирование гетероолигомера, чем 4D5. Блокирование активации рецептора ErbB лигандом может происходить любыми способами, например, влияя на связывание лиганда с рецептором ErbB, образование комплекса ErbB, на тирозинкиназную активность рецептора ErbB в комплексе ErbB и/или на фосфорилирование тирозинкиназного остатка(ов) в рецепторе ErbB или рецептором ErbB.

Антитело с «биологическим свойством» указанного антитела, такого как моноклональное антитело, обозначенное 2C4 (Omnitarg, Genentech, Inc.), представляет собой антитело, обладающее одним или несколькими биологическими свойствами этого антитела, которые отличают его от других антител, которые связывают тот же антиген (например, ErbB2). Например, антитело с биологическим свойством 2C4 может блокировать активацию HRG гетероолигомера ErbB, содержащего ErbB2 и ErbB3, ErbB1 или ErbB4; блокировать EGF, TGF-α, HB-EGF, эпирегулиновую и/или амфирегулиновую активацию рецептора ErbB, содержащего EGFR и ErbB2; блокировать опосредованную EGF, TGF-α и/или HRG активацию MAPK; и/или связывать на внеклеточном домене ErbB2 тот же эпитоп, который связывает 2C4 (например, которое блокирует связывание моноклонального антитела 2C4 с ErbB2).

Если не указано иначе, выражение «моноклональное антитело 2C4» относится к антителу, несущему антигенсвязывающие остатки антитела 2C4 мыши или антигенсвязывающие остатки, полученные из антитела 2C4 мыши, из примеров ниже. Например, моноклональное антитело 2C4 может представлять собой мышиное

моноклональное антитело 2C4 или его вариант, такое как гуманизированное антитело 2C4, несущее антигенсвязывающие аминокислотные остатки моноклонального антитела 2C4 мыши (WO 01/00245). Если не указано иначе, выражение «rhuMAb 2C4», используемое в настоящем документе, относится к антителу, содержащему последовательности вариабельного домена легкой цепи (VL) и вариабельного домена тяжелой цепи (VH) SEQ ID NO:3 и 4, соответственно, слитого с последовательностями константных областей тяжелых и легких цепей IgG1 человека (аллотип не-A), необязательно, экспрессируемых клетками яичника китайского хомяка (CHO) (WO 01/00245).

Если не указано иначе, термин «моноклональное антитело 4D5» относится к антителу, несущему антигенсвязывающие остатки антитела 4D5 мыши (ATCC CRL 10463). Например, моноклональное антитело 4D5 может представлять собой моноклональное антитело 4D5 мыши или его вариант, такой как гуманизированное антитело 4D5, несущее антигенсвязывающие аминокислотные остатки моноклонального антитела 4D5 мыши. Иллюстративные гуманизированные антитела 4D5 включают huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 и huMAb4D5-8 (ГЕРЦЕПТИН®), как, например, в патенте США № 5821337.

«Ингибирующее рост средство» относится к соединению или композиции, ингибирующему рост клетки, например раковых клеток, экспрессирующих ErbB, *in vitro* или *in vivo*. Таким образом, ингибирующее рост средство может представлять собой средство, значительно снижающее долю клеток, экспрессирующих ErbB, в S-фазе. Примеры ингибирующих рост средств включают средства, блокирующие прохождение клеточного цикла (на любой стадии, кроме S-фазы), такие как средства, индуцирующие остановку клеточного цикла в G1 и в M-фазе (The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., глава 1, озаглавленная «Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs» под редакцией Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), особенно стр. 13). Примеры «ингибирующих рост» антител представляют собой антитела, связывающиеся с ErbB2 и ингибирующие рост раковых клеток, сверхэкспрессирующих ErbB2. Ингибирующие рост антитела против ErbB2 могут ингибировать рост клеток опухоли молочной железы SK-BR-3 в клеточной культуре более чем на 20% или более чем на 50% (например, приблизительно от 50% до приблизительно 100%) при концентрации антитела приблизительно от 0,5 до 30 мкг/мл, где ингибирование роста определяют через шесть суток после воздействия антитела на клетки SK-BR-3 (патент США № 5677171).

Антитело, которое «индуцирует клеточную гибель», представляет собой антитело, являющееся причиной того, что жизнеспособные клетки становятся нежизнеспособными. Клетка, как правило, представляет собой клетку, экспрессирующую рецептор ErbB2, особенно клетку, сверхэкспрессирующую рецептор ErbB2. Клетка может представлять собой раковую клетку, например опухолевую клетку рака молочной железы, яичника, желудка, эндометрия, слюнной железы, легкого, почки, толстой кишки, щитовидной железы, поджелудочной железы или мочевого пузыря. *In vitro* клетка может представлять собой клетку SK-BR-3, BT474, Calu 3, MDA-MB-453, MDA-MB-361 или SKOV3. Клеточную гибель *in vitro* можно определять в отсутствие комплемента и эффекторных иммунных клеток для отличия гибели клеток, вызванной антитело-зависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC) от гибели клеток, вызванной цитотоксичностью комплемента (CDC). Таким образом, анализ на клеточную гибель можно проводить с применением инактивированной нагреванием сыворотки (то есть в отсутствие комплемента) и в отсутствие эффекторных иммунных клеток. Для определения того, способно ли антитело индуцировать клеточную гибель можно оценивать нарушение целостности мембраны по захвату йодида пропидия (PI), трипанового синего (см. Moore et al. (1995) Cytotechnology, 17:1-11) или 7AAD по сравнению с необработанными клетками. Антитела, индуцирующие клеточную гибель, представляют собой антитела, которые индуцируют захват PI в анализе захвата PI клетками BT474 (см. ниже).

Антитело, «индуцирующее апоптоз», представляет собой антитело, индуцирующее программированную клеточную гибель, что определяют по связыванию аннексина V, фрагментации ДНК, сморщиванию клетки, расширению эндоплазматического ретикулума, фрагментации клетки и/или образованию мембранных везикул (называемых апоптозными тельцами). Как правило, клетка представляет собой клетку, сверхэкспрессирующую рецептор ErbB2, включая опухолевую клетку, например, молочной железы, яичника, желудка, эндометрия, слюнной железы, легкого, почки, толстой кишки, щитовидной железы, поджелудочной железы или

OnCusp
Ex. 1002

мочевого пузыря. *In vitro* клетка может представлять собой клетку SK-BR-3, BT474, Calu 3, MDA-MB-453, MDA-MB-361 или SKOV3.

Термины «лечить» или «лечение» относятся как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам, где у индивидуума необходимо предотвратить или замедлить (уменьшить) нежелательное физиологическое изменение или нарушение, такое как развитие или распространение злокачественной опухоли. Для целей настоящего изобретения благоприятные или желательные клинические результаты включают в качестве неограничивающих примеров частичное снижение симптомов, уменьшение распространения заболевания, стабилизирование (то есть отсутствие ухудшения) состояния заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, улучшение или облегчение состояния заболевания и ремиссию (частичную или полную). «Лечение» также может означать увеличение продолжительности жизни по сравнению с ожидаемой продолжительностью жизни в отсутствие лечения. Индивидуумы, нуждающиеся в лечении, включают тех больных с соответствующим состоянием или нарушением, а также индивидуумов, которые предрасположены к возникновению состояния или нарушения, или индивидуумов, у которых требуется профилактика соответствующего состояния или нарушения.

«Нарушение» представляет собой любое состояние, для которого было бы эффективно лечение по настоящему изобретению. Нарушение включает хронические и острые нарушения или заболевания, включающие в себя патологические состояния, которые предрасполагают млекопитающих к рассматриваемому заболеванию. Неограничивающие примеры нарушений, для которых в данном случае лечение могло бы иметь эффект, включают доброкачественные и злокачественные опухоли; лейкемические и лимфоидные злокачественные заболевания; в частности, рак молочной железы, яичника, желудка, эндометрия, слюнной железы, легкого, почки, толстой кишки, щитовидной железы, поджелудочной железы, предстательной железы или мочевого пузыря; нейрональные, глиальные, астроцитарные, гипоталамические нарушения и нарушения, связанные с другими железами, макрофагальные, эпителиальные, стромальные и бластные нарушения; и воспалительные, ангиогенные и иммунологические нарушения. Пример нарушения, для которого эффективно лечение по настоящему изобретению, представляет собой солидную злокачественную опухоль.

Термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству лекарственного средства, эффективному для лечения заболевания или нарушения у млекопитающего. В случае рака терапевтически эффективное количество лекарственного средства может: (i) уменьшать число раковых клеток; (ii) уменьшать размер опухоли, (iii) ингибировать, тормозить, до некоторой степени замедлять и предпочтительно останавливать, инфильтрацию раковых клеток в периферические органы; (iv) ингибировать (то есть до некоторой степени замедлять и предпочтительно останавливать) метастазирование опухоли; (v) ингибировать рост опухоли и/или (vi) до некоторой степени ослаблять один или несколько симптомов, связанных с раком. По степени предотвращения роста клеток и/или уничтожения существующих клеток лекарственное средство может быть цитостатическим и/или цитотоксическим. В моделях на животных эффективность можно оценивать физическими измерениями опухоли в период введения ADC и определением частичной или полной ремиссии опухоли. Для терапии рака эффективность можно измерять, например, оценкой времени прогрессирования заболевания (TTP) и/или определением процента отклика (RR).

Термин «биодоступность» относится к системной доступности (то есть уровням в крови/плазме) данного количества лекарственного средства, вводимого пациенту. Биодоступность представляет собой безусловный термин, означающий измерение времени (скорости) и общего количества (объема), которое лекарственное средство достигает в общей циркуляции при вводимой лекарственной форме.

Термины «рак» и «раковый» относятся к или ими обозначают физиологическое состояние млекопитающих, которое, как правило, характеризуется как нерегулярным клеточным ростом. «Опухоль» содержит одну или несколько злокачественных клеток. Неограничивающие примеры рака включают карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкемические или лимфоидные злокачественные заболевания. Более конкретные примеры таких злокачественных опухолей включают плоскоклеточный рак (например, эпителиальный плоскоклеточный рак), рак легких, включая мелкоклеточный рак легких, немелкоклеточный рак легких («NSCLC»), аденокарциному легких и плоскоклеточную карциному легкого, рак брюшины, гепатоцеллюлярный рак, рак желудка, включая рак желудочно-кишечного тракта, стромальную опухоль желудочно-кишечного тракта (GIST), рак поджелудочной железы, глиобластому, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, рак мочевого