

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年10月10日(10.10.2024)



(10) 国際公開番号

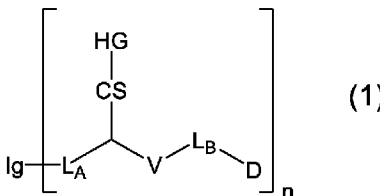
WO 2024/210154 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 16/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2024/013787
- (22) 国際出願日: 2024年4月3日(03.04.2024)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
63/494,102 2023年4月4日(04.04.2023) US
- (71) 出願人: 味の素株式会社 (AJINOMOTO CO., INC.) [JP/JP]; 〒1048315 東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 松田 豊 (MATSUDA, Yutaka); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 渡部 友博 (WATANABE, Tomohiro); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社

内 Kanagawa (JP). 藤井 友博 (FUJII, Tomohiro); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). スンヨン ショーン チェ (SEUNGYONG, Sean Choi); 08540 ニュージャージー州プリンストンカーターロード 350 NJ バイオフィーマシューティカル LLC 内 New Jersey (US). アッピ レディ マンダパティ (APPI, Reddy Mandhapati); 08540 ニュージャージー州プリンストンカーターロード 350 NJ バイオフィーマシューティカル LLC 内 New Jersey (US). ディーパック バッタライ (DEEPAK, Bhattarai); 08540 ニュージャージー州プリンストンカーターロード 350 NJ バイオフィーマシューティカル LLC 内 New Jersey (US). トーマス マルコタン (THOMAS, Markotan); 08540 ニュージャージー州プリンストンカーターロード 350 NJ バイオフィーマシューティカル LLC 内 New Jersey (US). ジェリー マクファーレン (GERY,

(54) Title: ANTIBODY-FUNCTIONAL SUBSTANCE CONJUGATE, ANTIBODY DERIVATIVE, AND COMPOUND, OR SALTS THEREOF

(54) 発明の名称: 抗体および機能性物質のコンジュゲート、抗体誘導体ならびに化合物、またはそれらの塩



(57) Abstract: The present invention provides an antibody-functional substance conjugate, or salt thereof, having excellent desired properties. More specifically, the present invention provides an antibody-functional substance conjugate comprising a structural unit represented by formula (1): [In the formula, Ig represents an immunoglobulin unit containing two heavy chains and two light chains, and is bonded to the L_A adjacent to the Ig via a functional group in a side chain of a specific amino acid residue in the Ig; HG represents a hydrophilic group or a monovalent group containing a hydrophilic group; CS represents a divalent group comprising a cleavable site; V represents an oxygen atom, a sulfur atom, or an amino group (NH); L_A and L_B each independently represent a divalent group; D represents a functional substance; and the average number n of the aforementioned bonds per immunoglobulin unit is at least 1.5.], or a salt of this conjugate, and provides substances related thereto.

(57) 要約: 本発明は、所望の性質に優れた抗体および機能性物質のコンジュゲートまたはその塩を提供する。より具体的には、本発明は、下記式(1): [式中、Igは、2個の重鎖および2個の軽鎖を含むイムノグロブリン単位を示し、かつ、Ig中の特定アミノ酸残基の側鎖中の官能基を介して、Igに隣接するL_Aと結合しており、HGは、親水性基、または親水性基を含む1個の基を示し、CSは、切断性部位を含む2個の基を示し、Vは、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基(NH)を示し、L_A、およびL_Bは、それぞれ独立して、2個の基を示し、Dは、機能性物質を示し、前記イムノグロブリン単位あたりの前記結合の平均数nは、1.5以上である。]で表される構造単位を含む、抗体および機能性物質のコンジュゲートまたはその塩、ならびにその関連物質を提供する。

Mcfarlane); 08540 ニュージャージー州プリン
ストン カーターロード 350 NJ バイオフィ
ーマシューティカル LLC 内 New Jersey (US).

(74) 代理人: 弁理士法人秀和特許事務所 (IP
FIRM SHUWA); 〒1050001 東京都港区虎ノ
門五丁目 1 1 番 2 号 オランダヒルズ森
タワー 1 4 階 Tokyo (JP).

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

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

添付公開書類:

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

明 細 書

発明の名称：

抗体および機能性物質のコンジュゲート、抗体誘導体ならびに化合物、またはそれらの塩

技術分野

[0001] 本発明は、抗体および機能性物質のコンジュゲートまたはその塩、ならびにその製造に用いられる抗体誘導体および化合物またはそれらの塩などに関する。

背景技術

[0002] 近年、抗体薬物複合体（Antibody Drug Conjugate：ADC）の研究開発が盛んに行われている。ADCはその名の通り、抗体に薬物（例、抗癌剤）をコンジュゲーションした薬剤であり、癌細胞などに対して直接的な殺細胞活性を有する。代表的なADCとしては、Immunogene社およびRoche社が共同開発したT-DM1（商品名：カドサイラ（登録商標））がある。

[0003] ADCは、抗体中に存在する特定のアミノ酸残基の側鎖中の官能基を薬物に結合することにより作製されている。ADCの作製に利用されるこのような官能基の例は、抗体中に存在するリジン残基の側鎖中のアミノ基である。抗体中のリジン基（例、246／248位、288／290位、または317位のリジン残基）を修飾する技術として、幾つかの技術が報告されている（例、特許文献1～4）。

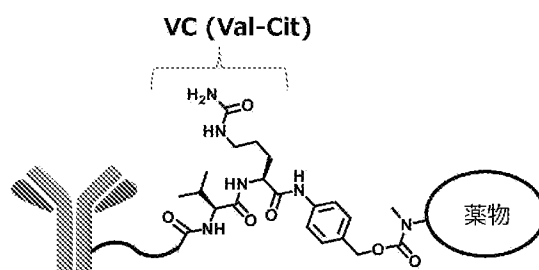
[0004] また、ADCの作製に利用されるこのような官能基の別の例は、チオール基である。抗体は、重鎖間および重鎖・軽鎖間がジスルフィド結合により連結されているため、ジスルフィド基を有する。例えば、2個の重鎖と2個の軽鎖から構成されるIgG抗体は、重鎖間および重鎖・軽鎖間が4個のジスルフィド結合により連結されているため、4個のジスルフィド基を有する。このようなジスルフィド結合は、還元剤により切断することができる。例え

ば、 1 g G における4個のジスルフィド結合が全て切断された場合、8個のチオール基を有する 1 g G 抗体が生成される。4つの鎖間ジスルフィド結合の全てが切断された場合であっても、抗体の重鎖および軽鎖は解離しない。これは、各鎖が非共有結合により抗体の高次構造を維持できるためである。この非共有結合により、抗体特性（標的に対する結合能）も維持される。例えば、エンハーツ（登録商標）として知られるトラスツズマブ・デルクスステカン（特許文献5）は、4個の鎖間ジスルフィド結合全てを切断（還元）した後に薬物を結合させた薬物抗体比（ DAR ）＝8のADCである。このようなADCは、その抗体特性の維持により、抗原特異的な薬剤として働くことが知られている。

[0005] ADCでは、リンカーを介して抗体および薬物が連結されている。ADCにおけるリンカーとしては、種々のものが存在する。例えば、抗癌剤として用いられるADCでは、ヒト血漿中で安定であり、かつ、癌細胞内で薬物を放出するために特定酵素で切断可能な構造を有するリンカーとして、バリナーシトルリンからなるジペプチド（ Val-Cit ：VC構造）を含むリンカーが存在する。このようなジペプチドを含むリンカーは、下記（A）に示されるように、ヒト血漿中では安定であるものの、下記（B）に示されるように、ヒト癌細胞内のリソソーム中のカテプシン（ cathepsin ）BによりVC構造が認識されて、シトルリンのカルボキシ末端側に存在するアミド結合が切断される。したがって、このようなジペプチドを含むリンカーを有するADCは、ヒト癌細胞内で薬物を放出して薬効を発現することができる。

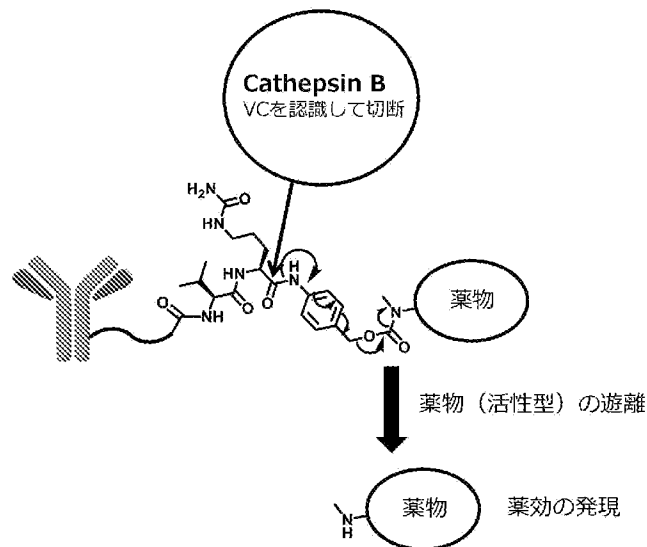
[0006] [化1]

(A) ヒト血漿中で安定



[0007] [化2]

(B) ヒト癌細胞内のリソソーム中で切断

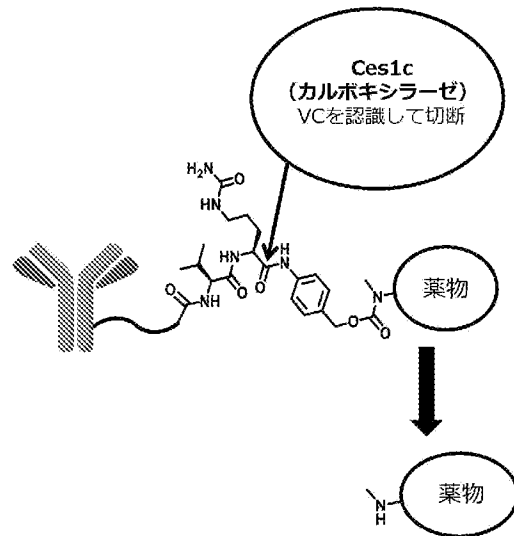


[0008] しかし、上記のようなジペプチドを含むリンカーを有するADCは、マウス血漿中では不安定である（非特許文献1および2）。これは、マウス血漿中には、VC構造を認識して、シトルリンのカルボキシ末端側に存在するアミド結合を切断するカルボキシラーゼであるCes1cが存在することから、上記のようなジペプチドを含むリンカーがCes1cにより血漿中で切断されてしまうためである。したがって、上記のようなジペプチドを含むリンカーを有するADCについては、マウスとヒトでは体内動態が大きく異なる。そのため、マウスでは、ヒトにおける薬効を評価し難いという問題がある。

[0009]

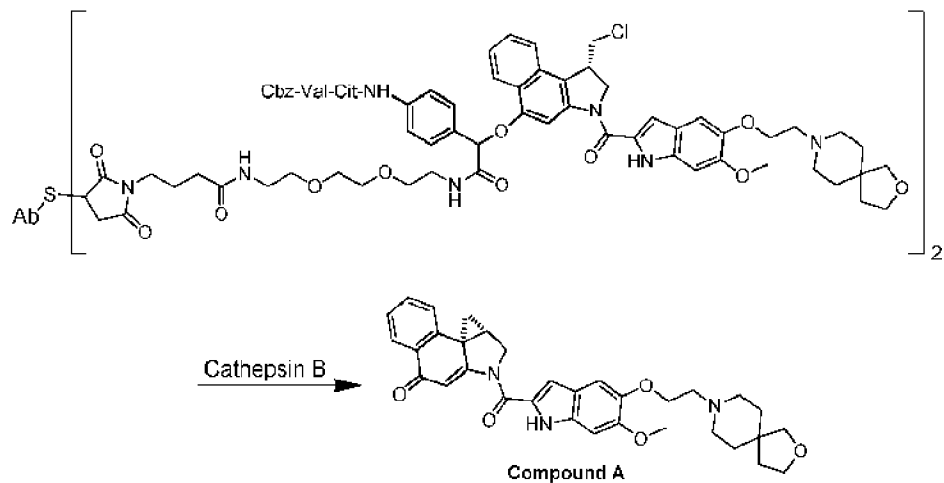
[化3]

(C) マウス血漿中の所望されない反応



[0010] 上述のように「抗体－スペーサー－VC構造－スペーサー－薬物」という構造を有するADCについてマウス血漿中での不安定性を改善するため、リンカー（すなわち、スペーサー－VC構造－スペーサー）の改変によるADCの安定化が試みられており、このような観点から、上記リンカーを介して抗体および薬物またはそのミミック（mimic）を連結しているADCが報告されている。例えば、上記リンカーを、抗体および薬物またはそのミミックを連結している主鎖中ではなく、その主鎖の側鎖中に含むADCとして、以下が報告されている（特許文献6）。

[0011] [化4]



A b : 抗体

C b z : ベンジルオキシカルボニル

V a l : バリン残基

C i t : シトルリン残基

[0012] ところで、非特許文献3には、ADCの疎水度が高ければ高い程、血漿クリアランスが早くなること、およびADCの疎水度はH I C (H y d r o p h o b i c I n t e r a c t i o n C h r o m a t o g r a p h y) – H P L Cで評価可能なことが記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0013] 特許文献1：国際公開第2018／199337号

特許文献2：国際公開第2019／240288号

特許文献3：国際公開第2019／240287号

特許文献4：国際公開第2020／090979号

特許文献5：国際公開第2014／057687号

特許文献6：国際公開第2015／038426号

非特許文献

[0014] 非特許文献1：D o r y w a l s k a e t a l . , B i o c o n j u g a t e C h e m . , 2 0 1 5 , 2 6 (4) , 6 5 0 – 6 5 9

非特許文献2：D o r y w a l s k a e t a l . , M o l C a n c e r T h e r . , 2 0 1 6 , 1 5 (5) , 9 5 8 – 7 0

非特許文献3：L y o n e t a l . , N a t B i o t e c h n o l . , 2 0 1 5 , 3 3 (7) , 7 3 3 – 5

発明の概要

発明が解決しようとする課題

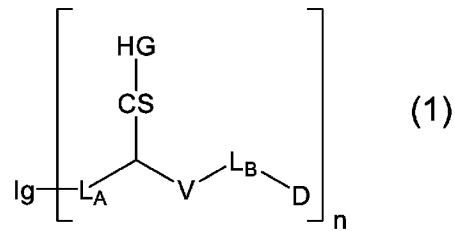
[0015] 本発明の目的は、所望の性質に優れた抗体および機能性物質のコンジュゲートまたはその塩を提供することである。

課題を解決するための手段

- [0016] 本発明者らは、鋭意検討した結果、抗体および薬物（または薬物ミミック）を連結している主鎖の側鎖中に親水性基および切断性部位の双方を含む特定構造のリンカーを含み、かつ、当該リンカーが、抗体（イムノグロブリン単位）に連結されているコンジュゲートが、優れた性質を有することを見出した。例えば、このようなコンジュゲートまたはその塩は、優れたクリアランス（長い体内滞留時間）、および低い凝集率（高いモノマー比率）を有することができる。また、上記のような特定構造のリンカーの好適例の使用により、切断後に親水性基を抗体に保持させることができる。すなわち、切断前は、薬物は、抗体とのコンジュゲートの形態において親水性基と連結されているため、薬物の疎水性を抑制することができ（親水性基によるマスキング）、切断後は、薬物から親水性基が解離するため、薬物は、薬物本来の疎水性を発揮することができる。したがって、例えば、コンジュゲートに含まれる薬物が細胞透過性（いわゆるバイスタンダー効果）を期待できる疎水性化合物である場合、上記のようなリンカーを使用する本発明は、薬物の細胞透過性を発揮させ易いという利点がある。本明細書では、このようなリンカーを有するADCをエキソ型ADCと称することがある。
- [0017] 本発明者らはまた、このようなコンジュゲートの作製に有用な抗体誘導体および化合物を開発することに成功した。式（1）～（7）のような構造で表される本発明のコンジュゲート、抗体誘導体、および化合物は、式（5）で表される構造単位のうちXおよびYを除く部分構造単位を共有するという技術的特徴を有する。本発明者らは、このような技術的特徴を有する一連の発明を開発することに成功し、本発明を完成するに至った。先行技術は、本発明のコンジュゲートの化学構造、およびこのような化学構造と上述のような優れた性質との関係性を記載も示唆もしていない。先行技術はまた、このようなコンジュゲートの作製に利用することができる本発明の抗体誘導体および化合物を記載も示唆もしていない。
- [0018] すなわち、本発明は、以下のとおりである。

[0019] 第1の実施形態では、本発明は、下記式(1)：

[化5]



[式中、

lgは、2個の重鎖および2個の軽鎖を含むイムノグロブリン単位を示し、かつ、lg中の特定アミノ酸残基の側鎖中の官能基を介して、lgに隣接する L_A と結合しており、

HGは、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

CSは、切断性部位を含む2価の基を示し、

Vは、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基(NH)を示し、

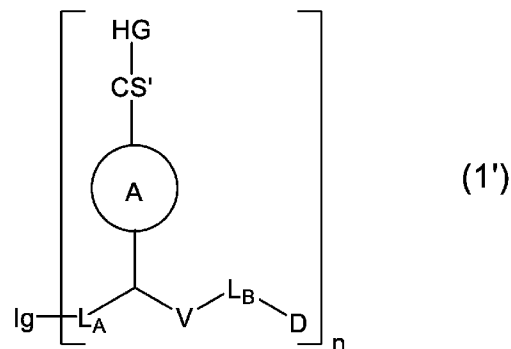
L_A 、および L_B は、それぞれ独立して、2価の基を示し、

Dは、機能性物質を示し、

前記イムノグロブリン単位あたりの前記結合の平均数nは、1.5以上である。]で表される構造単位を含む、抗体および機能性物質のコンジュゲートまたはその塩を提供する。

[0020] 特定の実施形態では、式(1)で表される構造単位は、下記式(1')：

[化6]



[式中、

lgは、2個の重鎖および2個の軽鎖を含むイムノグロブリン単位を示し

、かつ、 Ig 中の特定アミノ酸残基の側鎖中の官能基を介して、 Ig に隣接する L_A と結合しており、

HG は、親水性基、または親水性基を含む 1 価の基を示し、

CS' は、切断性部位を含む 2 価の基を示し、

環 A は、置換基を有していてもよい 2 価の芳香族環基（ここで、2 価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

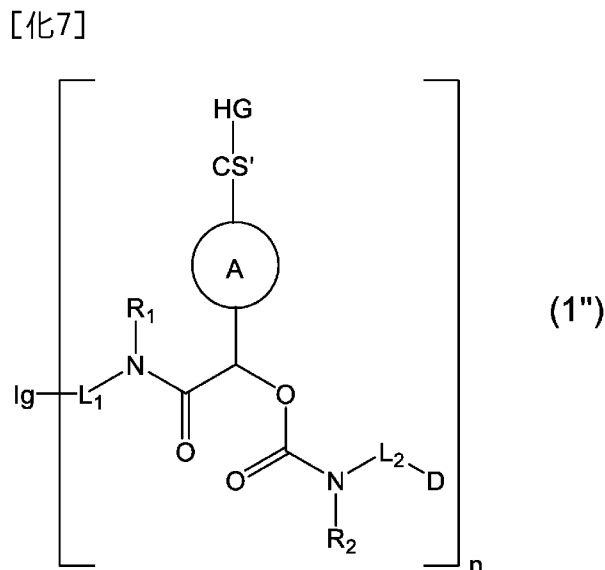
V は、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基 (NH) を示し、

L_A 、および L_B は、それぞれ独立して、2 価の基を示し、

D は、機能性物質を示し、

前記イムノグロブリン単位あたりの前記結合の平均数 n は、1.5 以上である。〕で表される構造単位であってもよい。

[0021] 特定の実施形態では、式 (1') で表される構造単位は、下記式 (1'')



〔式中、

Ig は、2 個の重鎖および 2 個の軽鎖を含むイムノグロブリン単位を示し、かつ、 Ig 中の特定アミノ酸残基の側鎖中の官能基を介して、 Ig に隣接する L_A と結合しており、

HG は、親水性基、または親水性基を含む 1 価の基を示し、

CS' は、切断性部位を含む 2 価の基を示し、

環Aは、置換基を有していてもよい2価の芳香族環基（ここで、2価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

R_1 、および R_2 は、それぞれ独立して、水素原子、または1価の基を示し、

L_1 、および L_2 は、それぞれ独立して、2価の基を示し、

Dは、機能性物質を示し、

前記イムノグロブリン単位あたりの前記結合の平均数 n は、1.5以上である。〕で表される構造単位であってもよい。

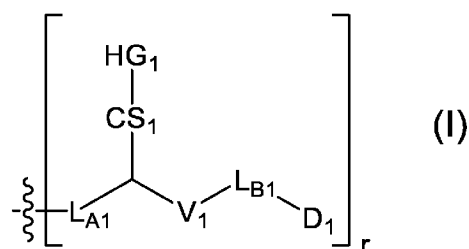
[0022] 好ましい実施形態では、上記コンジュゲートは、サイズ排除クロマトグラフィーにより分析したときに、2.6%以下の凝集率を示すものであってもよい。

[0023] 特定の実施形態では、前記特定アミノ酸残基の側鎖中の官能基は、リジン残基の側鎖中のアミノ基であり、かつ、 n が、1.5～2.5であってもよい。この場合、 L_A がカルボニル基を有し、結合が、リジン残基の側鎖中のアミノ基、および L_A 中のカルボニル基の結合によるアミド結合により達成されていてもよい。

[0024] 好ましい実施形態では、リジン残基は、Eu numberingに従う246/248位、288/290位、または317位に存在するものであってもよい。

[0025] 好ましい実施形態では、前記構造単位は、下記式（I）：

[化8]



〔式中、

波線付きのハイフン（—）は、Eu numberingに従う246/248位、288/290位、または317位に存在するリジン残基（こ

で、当該リジン残基は、式（１）における L_A が結合しているアミノ基を有するリジン残基とは異なる）の側鎖中のアミノ基と結合しており、

HG_1 は、親水性基、または親水性基を含む１価の基を示し、

CS_1 は、切断性部位を含む２価の基を示し、

V_1 は、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基（ NH ）を示し、

L_{A1} 、および L_{B1} は、それぞれ独立して、２価の基を示し、

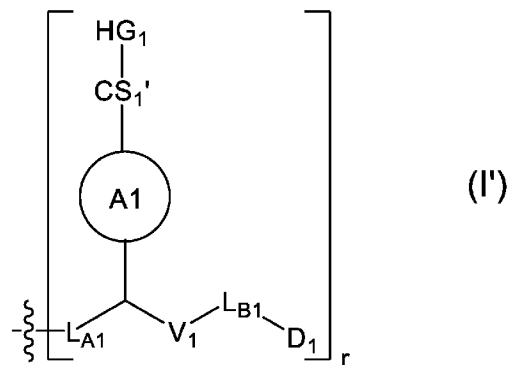
D_1 は、機能性物質を示し、

前記イムノグロブリン単位あたりの前記結合の平均数 r は、 $1.5 \sim 2.5$ である。）で表される修飾部分をさらに含んでもよい。

[0026] 好ましい実施形態では、式（１）で表される修飾部分は、下記式（１'）

:

[化9]



〔式中、

波線付きのハイフン（—）は、Eu numberingに従う246／248位、288／290位、または317位に存在するリジン残基（ここで、当該リジン残基は、式（１）における L_A が結合しているアミノ基を有するリジン残基とは異なる）の側鎖中のアミノ基と結合しており、

HG_1 は、親水性基、または親水性基を含む１価の基を示し、

CS_1' は、切断性部位を含む２価の基を示し、

環 A_1 は、置換基を有していてもよい２価の芳香族環基（ここで、２価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

V_1 は、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基（ NH ）を示し、

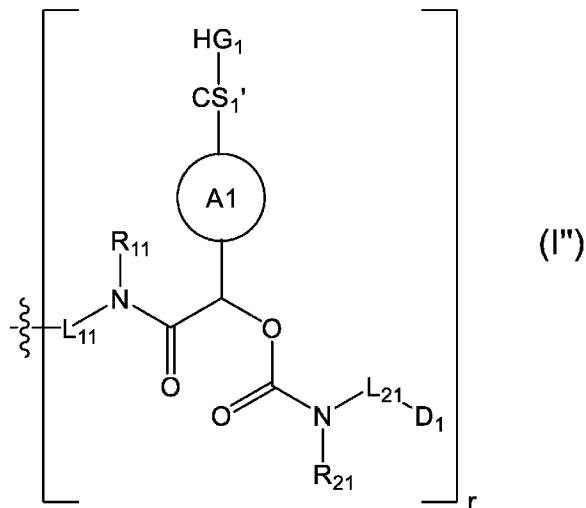
L_{A1} 、および L_{B1} は、それぞれ独立して、2価の基を示し、

D_1 は、機能性物質を示し、

前記イムノグロブリン単位あたりの前記結合の平均数 r は、1.5～2.5である。〕で表される修飾部分であってもよい。

[0027] 好ましい実施形態では、式(1')で表される修飾部分は、下記式(1'') :

[化10]



〔式中、

波線付きのハイフン(—)は、Eu numberingに従う246／248位、288／290位、または317位に存在するリジン残基(ここで、当該リジン残基は、式(1)における L_A が結合しているアミノ基を有するリジン残基とは異なる)の側鎖中のアミノ基と結合しており、

HG_1 は、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

$CS_{1'}$ は、切断性部位を含む2価の基を示し、

環 A_1 は、置換基を有していてもよい2価の芳香族環基(ここで、2価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している)を示し、

R_{11} 、および R_{21} は、それぞれ独立して、水素原子、または1価の基を示し、

L_{11} 、および L_{21} は、それぞれ独立して、2価の基を示し、

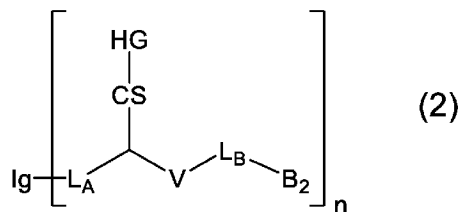
D_1 は、機能性物質を示し、

前記イムノグロブリン単位あたりの前記結合の平均数 r は、 $1.5 \sim 2.5$ である。〕で表される修飾部分であってもよい。

[0028] 特定の実施形態では、前記特定アミノ酸残基の側鎖中の官能基は、システイン残基の側鎖中のチオール基であり、かつ、 n が、 $2.0 \sim 8.0$ であってもよい。 n は、好ましくは $6.0 \sim 8.0$ 、より好ましくは $7.0 \sim 8.0$ であってもよい。

[0029] 第2の実施形態では、本発明は、下記式 (2) :

[化11]



〔式中、

Ig は、2 個の重鎖および 2 個の軽鎖を含むイムノグロブリン単位を示し、かつ、 Ig 中の特定アミノ酸残基の側鎖中の官能基を介して、 Ig に隣接する L_A と結合しており、

HG は、親水性基、または親水性基を含む 1 価の基を示し、

CS は、切断性部位を含む 2 価の基を示し、

V は、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基 (NH) を示し、

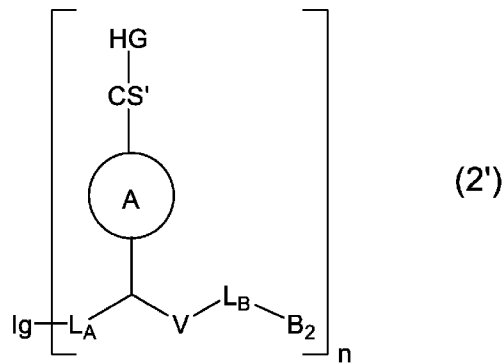
L_A 、および L_B は、それぞれ独立して、2 価の基を示し、

B_2 は、生体直交性官能基を示し、

前記イムノグロブリン単位あたりの前記結合の平均数 n は、 1.5 以上である。〕で表される構造単位を含む、生体直交性官能基を有する抗体誘導体またはその塩を提供する。

[0030] 特定の実施形態では、式 (2) で表される構造単位は、下記式 (2') :

[化12]



〔式中、

lg は、2 個の重鎖および 2 個の軽鎖を含むイムノグロブリン単位を示し、かつ、lg 中の特定アミノ酸残基の側鎖中の官能基を介して、lg に隣接する L_A と結合しており、

HG は、親水性基、または親水性基を含む 1 価の基を示し、

CS' は、切断性部位を含む 2 価の基を示し、

環 A は、置換基を有していてもよい 2 価の芳香族環基（ここで、2 価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

V は、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基（NH）を示し、

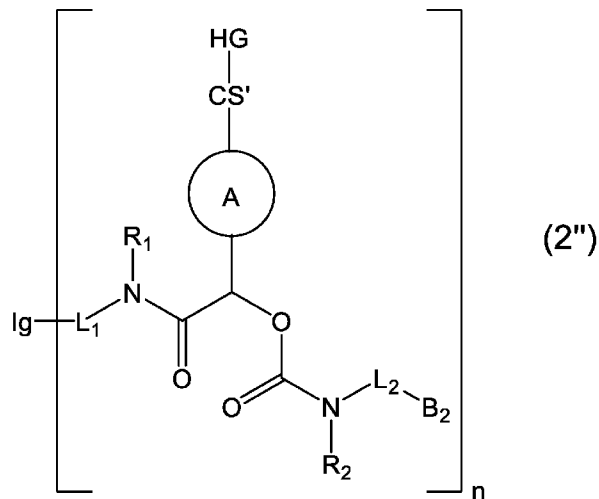
L_A 、および L_B は、それぞれ独立して、2 価の基を示し、

B_2 は、生体直交性官能基を示し、

前記イムノグロブリン単位あたりの前記結合の平均数 n は、1.5 以上である。〕で表される構造単位であってもよい。

[0031] 特定の実施形態では、式 (2') で表される構造単位は、下記式 (2'')

[化13]



〔式中、

Ig は、2 個の重鎖および 2 個の軽鎖を含むイムノグロブリン単位を示し、かつ、 Ig 中の特定アミノ酸残基の側鎖中の官能基を介して、 Ig に隣接する L_A と結合しており、

HG は、親水性基、または親水性基を含む 1 価の基を示し、

CS' は、切断性部位を含む 2 価の基を示し、

環 A は、置換基を有していてもよい 2 価の芳香族環基（ここで、2 価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

R_1 、および R_2 は、それぞれ独立して、水素原子、または 1 価の基を示し、

L_1 、および L_2 は、それぞれ独立して、2 価の基を示し、

B_2 は、生体直交性官能基を示し、

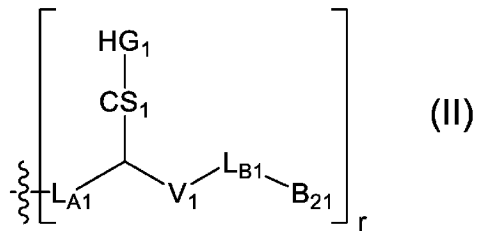
前記イムノグロブリン単位あたりの前記結合の平均数 n は、1.5 以上である。〕で表される構造単位であってもよい。

[0032] 特定の実施形態では、前記特定アミノ酸残基の側鎖中の官能基は、リジン残基の側鎖中のアミノ基であり、かつ、 n が、1.5～2.5 であってもよい。この場合、 L_A がカルボニル基を有し、結合が、リジン残基の側鎖中のアミノ基、および L_A 中のカルボニル基の結合によるアミド結合により達成されていてもよい。

[0033] 好ましい実施形態では、リジン残基は、Eu numberingに従う246／248位、288／290位、または317位に存在するものであってもよい。

[0034] 好ましい実施形態では、前記構造単位は、下記式（II）：

[化14]



〔式中、

波線付きのハイフン（—）は、Eu numberingに従う246／248位、288／290位、または317位に存在するリジン残基（ここで、当該リジン残基は、式（1）における L_A が結合しているアミノ基を有するリジン残基とは異なる）の側鎖中のアミノ基と結合しており、

HG_1 は、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

CS_1 は、切断性部位を含む2価の基を示し、

V_1 は、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基（NH）を示し、

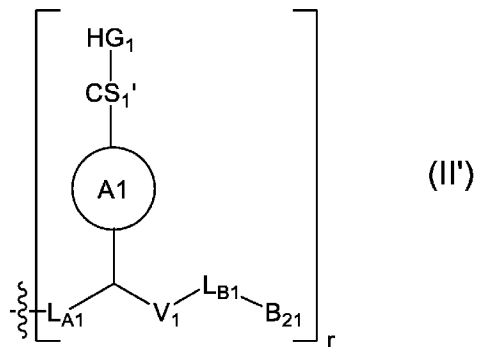
L_{A1} 、および L_{B1} は、それぞれ独立して、2価の基を示し、

B_{21} は、生体直交性官能基を示し、

前記イムノグロブリン単位あたりの前記結合の平均数 r は、1.5～2.5である。〕で表される修飾部分をさらに含んでもよい。

[0035] 好ましい実施形態では、式（II）で表される修飾部分は、下記式（II'）：

[化15]



〔式中、

波線付きのハイフン（－）は、Eu n u m b e r i n gに従う246／248位、288／290位、または317位に存在するリジン残基（ここで、当該リジン残基は、式（1）における L_A が結合しているアミノ基を有するリジン残基とは異なる）の側鎖中のアミノ基と結合しており、

HG_1 は、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

CS_1' は、切断性部位を含む2価の基を示し、

環A1は、置換基を有していてもよい2価の芳香族環基（ここで、2価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

V_1 は、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基（NH）を示し、

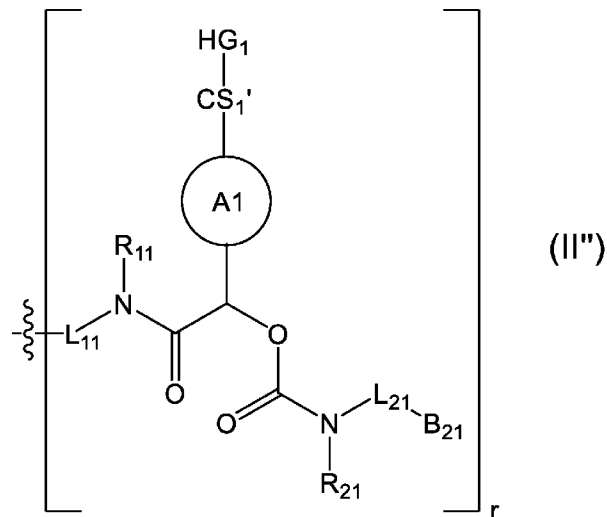
L_{A1} 、および L_{B1} は、それぞれ独立して、2価の基を示し、

B_{21} は、生体直交性官能基を示し、

前記イムノグロブリン単位あたりの前記結合の平均数 r は、1.5～2.5である。〕で表される修飾部分であってもよい。

[0036] 好ましい実施形態では、式（I I'）で表される修飾部分は、下記式（I I' '）：

[化16]



〔式中、

波線付きのハイフン (—) は、Eu numberingに従う246／248位、288／290位、または317位に存在するリジン残基（ここで、当該リジン残基は、式（1）における L_A が結合しているアミノ基を有するリジン残基とは異なる）の側鎖中のアミノ基と結合しており、

HG_1 は、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

CS_1' は、切断性部位を含む2価の基を示し、

環A1は、置換基を有していてもよい2価の芳香族環基（ここで、2価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

R_{11} 、および R_{21} は、それぞれ独立して、水素原子、または1価の基を示し、

L_{11} 、および L_{21} は、それぞれ独立して、2価の基を示し、

B_{21} は、生体直交性官能基を示し、

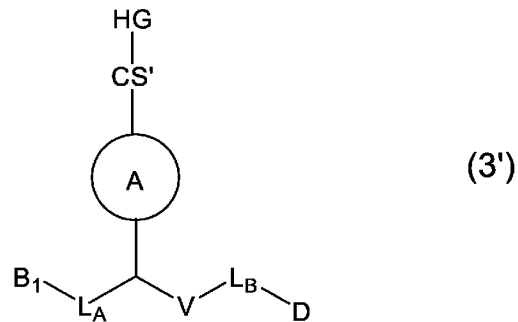
前記イムノグロブリン単位あたりの前記結合の平均数 r は、1.5～2.5である。〕で表される修飾部分であってもよい。

[0037] 特定の実施形態では、前記特定アミノ酸残基の側鎖中の官能基は、システイン残基の側鎖中のチオール基であり、かつ、 n が、2.0～8.0であってもよい。 n は、好ましくは6.0～8.0、より好ましくは7.0～8.0、

0であってもよい。

[0038] 第3の実施形態では、本発明は、下記式（3'）：

[化17]



〔式中、

HGは、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

CS'は、切断性部位を含む2価の基を示し、

環Aは、置換基を有していてもよい2価の芳香族環基（ここで、2価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

Vは、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基（NH）を示し、

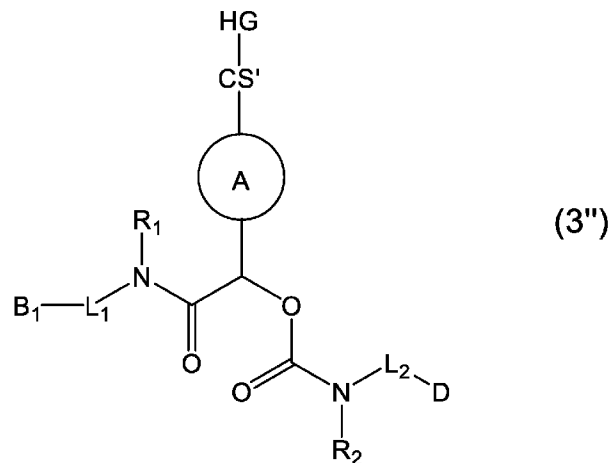
LA、およびLBは、それぞれ独立して、2価の基を示し、

B1は、生体直交性官能基を示し、

Dは、機能性物質を示す。〕で表される、生体直交性官能基および機能性物質を有する化合物またはその塩を提供する。

[0039] 特定の実施形態では、式（3'）で表される構造単位が、下記式（3''）：

[化18]



〔式中、

HGは、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

CS'は、切断性部位を含む2価の基を示し、

環Aは、置換基を有していてもよい2価の芳香族環基（ここで、2価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

R₁、およびR₂は、それぞれ独立して、水素原子、または1価の基を示し

、

L₁、およびL₂は、それぞれ独立して、2価の基を示し、

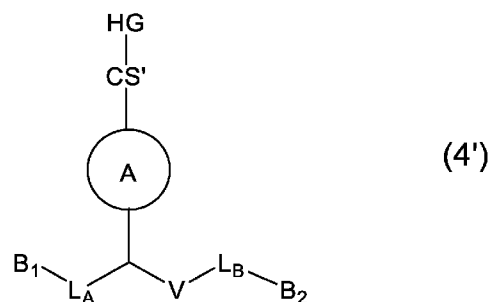
B₁は、生体直交性官能基を示し、

Dは、機能性物質を示す。〕で表されるものであってもよい。

[0040] 本発明はまた、上記式（3'）またはその下位概念の式で表される化合物またはその塩を含む、抗体の誘導体化試薬を提供する。

[0041] 第4の実施形態では、本発明は、下記式（4'）：

[化19]



〔式中、

HGは、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

CS'は、切断性部位を含む2価の基を示し、

環Aは、置換基を有していてもよい2価の芳香族環基（ここで、2価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

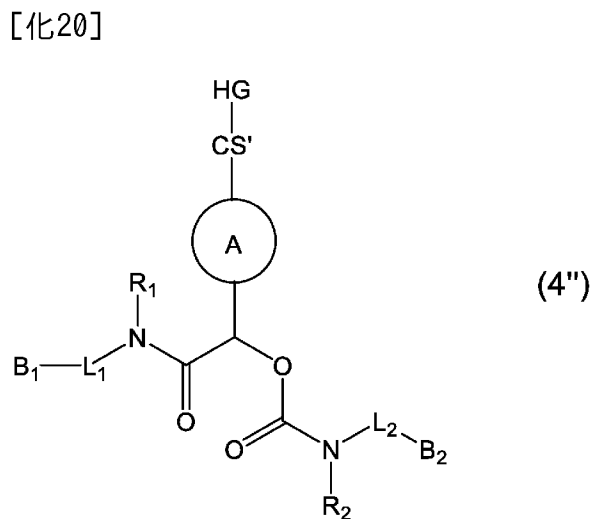
Vは、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基（NH）を示し、

L_A、およびL_Bは、それぞれ独立して、2価の基を示し、

B₁は、第1生体直交性官能基を示し、

B₂は、第2生体直交性官能基を示す。〕で表される、第1生体直交性官能基および第2生体直交性官能基を有する化合物またはその塩を提供する。

[0042] 特定の実施形態では、式（4'）で表される構造単位が、下記式（4''）：



〔式中、

HGは、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

CS'は、切断性部位を含む2価の基を示し、

環Aは、置換基を有していてもよい2価の芳香族環基（ここで、2価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

R₁、およびR₂は、それぞれ独立して、水素原子、または1価の基を示し、

L₁、およびL₂は、それぞれ独立して、2価の基を示し、

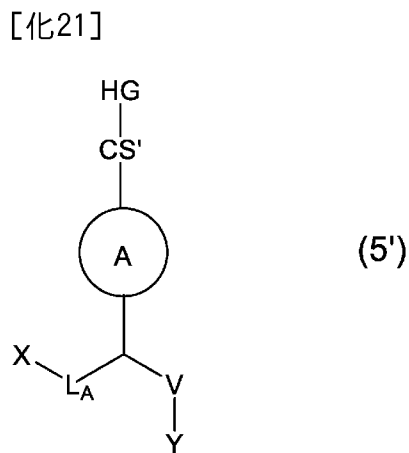
B₁は、第1生体直交性官能基を示し、

B₂は、第2生体直交性官能基を示す。〕で表されるものであってもよい。

[0043] 本発明はまた、上記式(4')またはその下位概念の式で表される化合物またはその塩を含む、抗体または機能性物質の誘導体化試薬を提供する。

[0044] 第5の実施形態では、本発明は、下記(1')、(11')、または(111')の化合物またはその塩を提供する：

(1') 下記式(5')：



〔式中、

HGは、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

CS'は、切断性部位を含む2価の基を示し、

環Aは、置換基を有していてもよい2価の芳香族環基（ここで、2価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

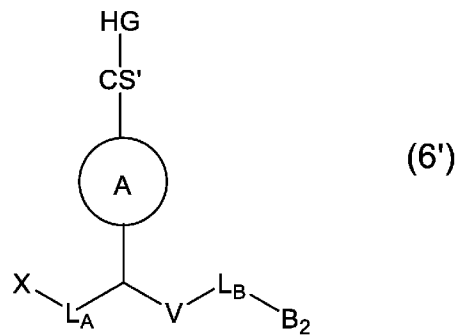
Vは、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基(NH)を示し、

L_Aは、2価の基を示し、

XおよびYは、それぞれ独立して、1価の基を示す。〕で表される、化合物またはその塩；

(11') 下記式(6')：

[化22]



〔式中、

HGは、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

CS'は、切断性部位を含む2価の基を示し、

環Aは、置換基を有していてもよい2価の芳香族環基（ここで、2価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

Vは、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基（NH）を示し、

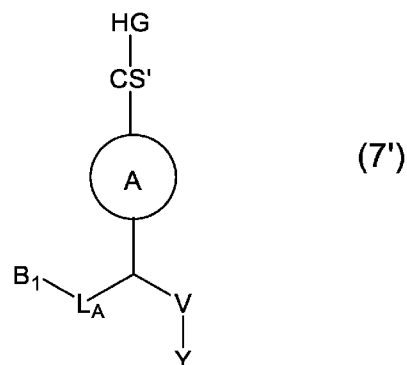
 L_A 、および L_B は、それぞれ独立して、2価の基を示し、

Xは、1価の基を示し、

B_2 は、生体直交性官能基を示す。〕で表される、化合物またはその塩；あるいは

(I I I') 下記式 (7') :

[化23]



〔式中、

HGは、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

CS'は、切断性部位を含む2価の基を示し、

環 A は、置換基を有していてもよい 2 価の芳香族環基（ここで、2 価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

V は、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基（NH）を示し、

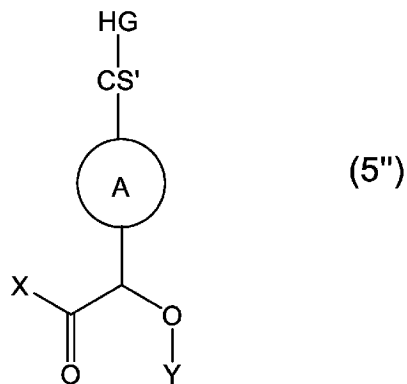
L_A は、2 価の基を示し、

B_1 は、生体直交性官能基を示し、

Y は、1 価の基を示す。）で表される、化合物またはその塩。

[0045] 特定の実施形態では、前記 (1')、(11')、または (111') の化合物は、それぞれ、下記 (1'')、(11'')、または (111'') の化合物であってもよい。

(1'') 下記式 (5'') :



〔式中、

HG は、親水性基、または親水性基を含む 1 価の基を示し、

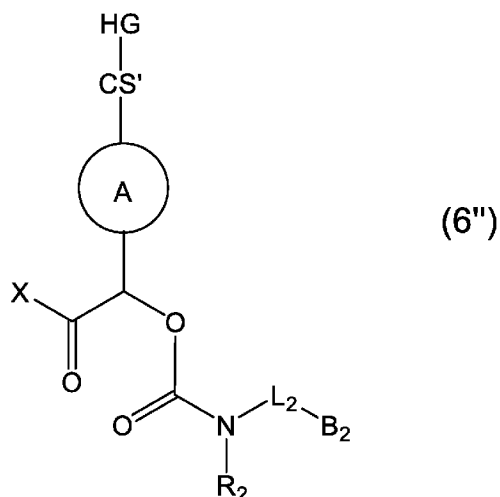
CS' は、切断性部位を含む 2 価の基を示し、

環 A は、置換基を有していてもよい 2 価の芳香族環基（ここで、2 価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

X および Y は、それぞれ独立して、1 価の基を示す。）で表される、化合物またはその塩；

(11'') 下記式 (6'') :

[化25]



〔式中、

HGは、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

CS'は、切断性部位を含む2価の基を示し、

環Aは、置換基を有していてもよい2価の芳香族環基（ここで、2価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

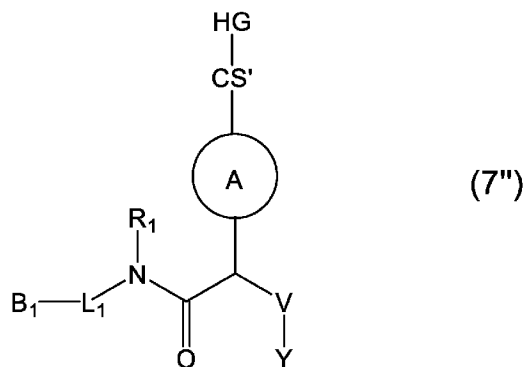
R₂は、水素原子、または1価の基を示し、L₂は、2価の基を示し、

Xは、1価の基を示し、

B₂は、生体直交性官能基を示す。〕で表される、化合物またはその塩；あるいは

(I I I ' ') 下記式 (7 ' ') :

[化26]



〔式中、

HGは、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

CS'は、切断性部位を含む2価の基を示し、

環Aは、置換基を有していてもよい2価の芳香族環基（ここで、2価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

Vは、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基（NH）を示し、

R₁は、水素原子、または1価の基を示し、

L₁は、2価の基を示し、

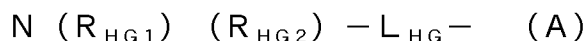
B₁は、生体直交性官能基を示し、

Yは、1価の基を示す。〕で表される、化合物またはその塩。

[0046] 好ましい実施形態では、イムノグロブリン単位は、ヒトイムノグロブリン単位であってもよい。

[0047] 好ましい実施形態では、ヒトイムノグロブリン単位は、ヒトIgG抗体であってもよい。

[0048] 好ましい実施形態では、親水性基を含む1価の基（HG-）は、下記式（A）：



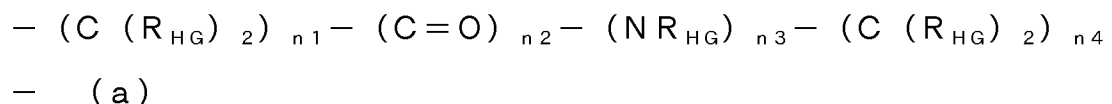
〔式中、

L_{HG}は、結合、または親水性基を含んでもよい2価の基を示し、

R_{HG1}、およびR_{HG2}は、それぞれ独立して、水素原子、親水性基、または親水性基を含んでもよい1価の基を示し、

少なくとも1つの親水性基が、L_{HG}、R_{HG1}、およびR_{HG2}からなる群より選ばれる1以上の部位において含まれる。〕で表される1価の基であってもよい。

[0049] 好ましい実施形態では、親水性基を含んでもよい2価の基（-L_{HG}-）は、下記式（a）：



〔式中、

複数の R_{HG} は、それぞれ独立して、水素原子、親水性基、または親水性基を含んでいてもよい 1 価の基を示し、

n_1 は、0～3 の整数であり、

n_2 は、0 または 1 の整数であり、

n_3 は、0 または 1 の整数であり、

n_4 は、0～3 の整数である。〕で表される 2 価の基である、請求項 6 記載の位置選択的なコンジュゲートまたはその塩であってもよい。

[0050] 好ましい実施形態では、式 (a) で表される 2 価の基は、下記式 (a 1)

、(a 2)、または (a 3) :

(a 1) $-(C(R_{HG})_2)-$;

(a 2) $-(C(R_{HG})_2)-(C=O)-(NR_{HG})-(C(R_{HG})_2)-$; または

(a 3) $-(C=O)-(C(R_{HG})_2)_2-$;

〔式中、

複数の R_{HG} は、それぞれ独立して、水素原子、親水性基、または親水性基を含む炭素原子数 1～6 のアルキル基を示す。〕で表される 2 価の基であってもよい。

[0051] 好ましい実施形態では、親水性基は、カルボン酸基、スルホン酸基、スルファミド基、水酸基、ポリエチレングリコール基、ポリサルコシン基、および糖部分からなる群より選ばれる 1 以上の基であってもよい。

[0052] 好ましい実施形態では、親水性基は、スルホン酸基、スルファミド基、水酸基、ポリエチレングリコール基、ポリサルコシン基、および糖部分からなる群より選ばれる 1 以上の基であってもよい。

[0053] 好ましい実施形態では、切断性部位は、酵素による切断性部位であってもよい。

[0054] 好ましい実施形態では、酵素は、カテプシン B、プラスミン、レグマイン、およびカスパーゼからなる群より選ばれる 1 以上の酵素であってもよい。

- [0055] 好ましい実施形態では、酵素は、プラスミン、レグマイン、およびカスパーゼからなる群より選ばれる1以上の酵素であってもよい。
- [0056] 好ましい実施形態では、酵素による切断性部位は、VC、VA、AA、GGFG（配列番号2）、FK、VK、AK、GC、VLK、NN、またはDDVD（配列番号3）を含んでいてもよい。
- [0057] 好ましい実施形態では、酵素による切断性部位は、AA、GGFG（配列番号2）、FK、VK、AK、GC、VLK、NN、またはDDVD（配列番号3）を含んでいてもよい。
- [0058] 好ましい実施形態では、親水性基を含む1価の基は、カルボン酸基を側鎖中に含む1以上のアミノ酸残基を含んでいてもよい。
- [0059] 好ましい実施形態では、HG-CSからなる構成単位は、カルボン酸基を側鎖中に含む1以上のアミノ酸残基および酵素による切断性部位を含むペプチド部分を含んでいてもよい。
- [0060] 好ましい実施形態では、前記ペプチド部分は、EVC、EEVC（配列番号4）、EEEEVC（配列番号5）、DVC、EVA、EAA、EGGFG（配列番号6）、EFK、EEFK（配列番号7）、EEVK（配列番号8）、EAK（配列番号9）、EGC、EEVLK（配列番号10）、ENN、EDVD（配列番号11）、 β -Ala-VC、EGC、またはEEGC（配列番号12）を含んでいてもよい。
- [0061] 好ましい実施形態では、前記ペプチド部分は、EAA、EGGFG（配列番号6）、EFK、EEFK（配列番号7）、EEVK（配列番号8）、EAK（配列番号9）、EGC、EEVLK（配列番号10）、ENN、EDVD（配列番号11）、 β -Ala-VC、またはEEGC（配列番号12）を含んでいてもよい。
- [0062] 好ましい実施形態では、切断性部位は、酸性条件下、または還元条件下での切断性部位であってもよい。
- [0063] 好ましい実施形態では、切断性部位は、ジスルフィド結合であってもよい。

[0064] 好ましい実施形態では、 L_A は、親水性基または機能性物質を含む側鎖を有する2価の基であってもよい。

[0065] 好ましい実施形態では、機能性物質は、医薬、標識物質、または安定化剤であってもよい。

[0066] 好ましい実施形態では、生体直交性官能基は、マレイミド残基、チオール残基、フラン残基、ハロカルボニル残基、アルケン残基、アルキン残基、アジド残基、またはテトラジン残基であってもよい。

[0067] 好ましい実施形態では、環Aおよび／または環A1は、置換基を有していてもよいフェニレン基であってもよい。

発明の効果

[0068] 本発明のコンジュゲートまたはその塩は、長い体内滞留時間、および高いモノマー比率（低い凝集率）等の優れた性質を有することができる。

本発明の抗体誘導体および化合物またはそれらの塩、および試薬は、例えば、上記コンジュゲートの製造における合成中間体として有用である。

図面の簡単な説明

[0069] [図1]図1は、切断性部位の切断および π 電子共鳴系の連動による、薬物（抗体による立体障害が解消された活性型薬物）の遊離の一例を示す図である。

一実施形態では、本発明のコンジュゲート、抗体誘導体および化合物は、このような遊離を可能にするように設計することができる（背景技術も適宜参照のこと）。抗体は、切断後であっても親水性基を保持することができる。すなわち、切断前は、薬物は、抗体とのコンジュゲートの形態において親水性基と連結されているため、薬物の疎水性を抑制することができ（親水性基によるマスキング）、切断後は、薬物から親水性基が解離するため、薬物は、薬物本来の疎水性を発揮することができる。

[図2]図2は、式（1）で表される本発明のコンジュゲート、式（2）で表される本発明の抗体誘導体、ならびに式（3）～（7）で表される本発明の化合物の相互関係を示す図である。これらの物質は、式（5）で表される構造単位のうちXおよびYを除く部分構造単位を共有する。また、これらの物質

は、図2中に示したスキームにより合成することができる。したがって、本発明は、合成中間体および最終合成物の関係にある一連の発明を提供する。

[図3]図3は、式(1)で表される本発明のコンジュゲート、式(2)で表される本発明の抗体誘導体、ならびに式(3)および(4)で表される本発明の化合物の合成概要を示す図である。

[図4]図4は、式(4)～(7)で表される化合物の合成概要の一例を示す図である。

[図5]図5は、式(4)～(7)で表される化合物の好ましい例である式(4'')～(7'')で表される化合物の合成概要の一例を示す図である。DIPEA : N, N-ジイソプロピルエチルアミン ; DMF : N, N-ジメチルホルムアミド

発明を実施するための形態

[0070] 1. 一般的な用語の定義

本発明において、用語「抗体」は、以下のとおりである。また、用語「イムノグロブリン単位」は、このような抗体の基本構成要素である2価の単量体単位に対応するものであり、2個の重鎖および2個の軽鎖を含む単位である。したがって、イムノグロブリン単位について、その由来、種類（ポリクローナルもしくはモノクローナル、アイソタイプ、および全長抗体もしくは抗体断片）、抗原、およびシステイン残基の位置の定義、例、および好ましい例は、以下に説明する抗体のものと同様である。

[0071] 抗体の由来は、特に限定されず、例えば、哺乳動物、鳥類（例、ニワトリ）等の動物に由来するものであってもよい。好ましくは、イムノグロブリン単位は、哺乳動物に由来する。このような哺乳動物としては、例えば、霊長類（例、ヒト、サル、チンパンジー）、齧歯類（例、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ）、愛玩動物（例、イヌ、ネコ）、家畜（例、ウシ、ブタ、ヤギ）、使役動物（例、ウマ、ヒツジ）が挙げられ、好ましくは霊長類または齧歯類であり、より好ましくはヒトである。

[0072] 抗体の種類は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であっても

よい。抗体はまた、2価の抗体（例、IgG、IgD、IgE）、または4価以上の抗体（例、IgA抗体、IgM抗体）であってもよい。好ましくは、抗体は、モノクローナル抗体である。モノクローナル抗体としては、例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、所定の糖鎖が付加された抗体（例、N型糖鎖結合コンセンサス配列等の糖鎖結合コンセンサス配列を有するように改変された抗体）、二重特異性抗体、Fc領域タンパク質、Fc融合タンパク質が挙げられる。モノクローナル抗体のアイソタイプとしては、例えば、IgG（例、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）、IgM、IgA、IgD、IgE、およびIgYが挙げられる。本発明では、モノクローナル抗体として、全長抗体、または可変領域ならびにCH1ドメインおよびCH2ドメインを含む抗体断片を利用できるが、全長抗体が好ましい。抗体は、好ましくはヒトIgGモノクローナル抗体であり、より好ましくはヒトIgG全長モノクローナル抗体である。

[0073] 抗体の抗原としては、任意の抗原を用いることができる。例えば、このような抗原としては、タンパク質〔オリゴペプチド、ポリペプチドを含む。糖等の生体分子で修飾されたタンパク質（例、糖タンパク質）であってもよい〕、糖鎖、核酸、低分子化合物が挙げられる。好ましくは、抗体は、タンパク質を抗原とする抗体であってもよい。タンパク質としては、例えば、細胞膜受容体、細胞膜受容体以外の細胞膜タンパク質（例、細胞外基質タンパク質）、リガンド、可溶性受容体が挙げられる。

[0074] より具体的には、抗体の抗原であるタンパク質は、疾患標的タンパク質であってもよい。疾患標的タンパク質としては、例えば、以下が挙げられる。

[0075] (1) 癌領域

PD-L1、GD2、PDGFR α （血小板由来成長因子受容体）、CD22、HER2、ホスファチジルセリン（PS）、EpCAM、フィブロネクチン、PD-1、VEGFR-2、CD33、HGF、gpNMB、CD27、DEC-205、葉酸受容体、CD37、CD19、Trop2、CEACAM5、S1P、HER3、IGF-1R、DLL4、TNT-1／

B、CPAAs、PSMA、CD20、CD105 (エンドグリン)、ICAM-1、CD30、CD16A、CD38、MUC1、EGFR、KIR2DL1、2、NKG2A、tenascin-C、IGF (Insulin-like growth factor)、CTLA-4、mesothelin、CD138、c-Met、Ang2、VEGF-A、CD79b、ENPD3、葉酸受容体 α 、TEM-1、GM2、グリピカン3、macrophage inhibitory factor、CD74、Notch1、Notch2、Notch3、CD37、TLR-2、CD3、CSF-1R、FGFR2b、HLA-DR、GM-CSF、EphA3、B7-H3、CD123、gpA33、Frizzled7受容体、DLL4、VEGF、RSPO、LIV-1、SLITRK6、Nectin-4、CD70、CD40、CD19、SEMA4D (CD100)、CD25、MET、Tissue Factor、IL-8、EGFR、cMet、KIR3DL2、Bst1 (CD157)、P-カドヘリン、CEA、GITR、TAM (tumor associated macrophage)、CEA、DLL4、Ang2、CD73、FGFR2、CXCR4、LAG-3、GITR、Fucosyl GM1、IGF-1、Angiopoietin 2、CSF-1R、FGFR3、OX40、BCMA、ErbB3、CD137 (4-1BB)、PTK7、EFNA4、FAP、DR5、CEA、Ly6E、CA6、CEACAM5、LAMP1、tissue factor、EPHA2、DR5、B7-H3、FGFR4、FGFR2、 α 2-PI、A33、GDF15、CAIX、CD166、ROR1、GITR、BCMA、TBA、LAG-3、EphA2、TIM-3、CD-200、EGFRvIII、CD16A、CD32B、PIGF、Ax1、MICA/B、Thomsen-Friedenreich、CD39、CD37、CD73、CLEC12A、Lgr3、トランスフェリン受容体、TGF β 、IL-17、5T4、RTK、Immune Suppressor Protein、NaPi2b、ルイス血液型B抗原、A34

、Lysil-Oxidase、DLK-1、TROP-2、 $\alpha 9$ インテグリン、TAG-72 (CA72-4)、CD70

[0076] (2) 自己免疫疾患・炎症性疾患

IL-17、IL-6R、IL-17R、INF- α 、IL-5R、IL-13、IL-23、IL-6、ActRIIB、 $\beta 7$ -Integrin、IL-4 α R、HAS、Eotaxin-1、CD3、CD19、TNF- α 、IL-15、CD3 ϵ 、Fibronectin、IL-1 β 、IL-1 α 、IL-17、TSLP (Thymic Stromal Lymphopoietin)、LAMP (Alpha4 Beta 7 Integrin)、IL-23、GM-CSFR、TSLP、CD28、CD40、TLR-3、BAFF-R、MAdCAM、IL-31R、IL-33、CD74、CD32B、CD79B、IgE (免疫グロブリンE)、IL-17A、IL-17F、C5、FcRn、CD28、TLR4、MCAM、B7RP1、CXCR1, 2 Ligands、IL-21、Cadherin-11、CX3CL1、CCL20、IL-36R、IL-10R、CD86、TNF- α 、IL-7R、Kv1. 3、 $\alpha 9$ インテグリン、LIFHT

[0077] (3) 脳神経疾患

CGRP、CD20、 β アミロイド、 β アミロイドプロトフィブリン、Calcitonin Gene-Related Peptide Receptor、LINGO (Ig Domain Containing1)、 α シヌクレイン、細胞外tau、CD52、インスリン受容体、tauタンパク、TDP-43、SOD1、TauC3、JCウイルス

[0078] (4) 感染症

Clostridium Difficile toxin B、サイトメガロウイルス、RSウイルス、LPS、S. Aureus Alpha-toxin、M2eタンパク、Psl、PcrV、S. Aureus toxin、インフルエンザA、Alginate、黄色ブドウ球菌、PD-L

1、インフルエンザB、アシネトバクター、F-protein、Env、CD3、病原性大腸菌、クレブシエラ、肺炎球菌

[0079] (5) 遺伝性・希少疾患

アミロイドAL、SEMA4D (CD100)、インスリン受容体、ANGPTL3、IL4、IL13、FGF23、副腎皮質刺激ホルモン、トランスサイレチン、ハンチンチン

[0080] (6) 眼疾患

Factor D、IGF-1R、PGDFR、Ang2、VEGF-A、CD-105 (Endoglin)、IGF-1R、 β アミロイド

[0081] (7) 骨・整形外科領域

Sclerostin、Myostatin、Dickkopf-1、GDF8、RANKL、HAS、Siglec-15

[0082] (8) 血液疾患

vWF、Factor IXa、Factor X、IFN γ 、C5、BMP-6、Ferroportin、TFPI

[0083] (9) その他の疾患

BAFF (B cell activating factor)、IL-1 β 、PCSK9、NGF、CD45、TLR-2、GLP-1、TNFR1、C5、CD40、LPA、プロラクチン受容体、VEGFR-1、CB1、Endoglin、PTH1R、CXCL1、CXCL8、IL-1 β 、AT2-R、IAPP

[0084] モノクローナル抗体の具体例としては、特定のキメラ抗体（例、リツキシマブ、バシリキシマブ、インフリキシマブ、セツキシマブ、シルツキシマブ、ディヌツキシマブ、オルタトキサシマブ）、特定のヒト化抗体（例、ダクリズマブ、パリビズマブ、トラスツズマブ、アレクツズマブ、オマリズマブ、エファリズマブ、ベバシズマブ、ナタリズマブ (IgG4)、トシリズマブ、エクリズマブ (IgG2)、モガムリズマブ、ベルツズマブ、オビヌツズマブ、ベドリズマブ、ペンプロリズマブ (IgG4)、メポリズマブ、エ

ロツツマブ、ダラツマブ、イケセキツマブ（IgG4）、レスリツマブ（IgG4）、アテゾリツマブ）、特定のヒト抗体（例、アダリムマブ（IgG1）、パニツマブ、ゴリムマブ、ウステキヌマブ、カナキヌマブ、オフアツマブ、デノスマブ（IgG2）、イピリムマブ、ベリムマブ、ラキシバクマブ、ラムシルマブ、ニボルマブ、デュピルマブ（IgG4）、セクキヌマブ、エボロクマブ（IgG2）、アリロクマブ、ネシツマブ、ブロダルマブ（IgG2）、オララツマブ）が挙げられる（IgGサブタイプに言及していない場合、IgG1であることを示す）。

[0085] 2個の重鎖と2個の軽鎖から構成されるイムノグロブリン単位（例、IgG等の2価の抗体）は、重鎖間および重鎖・軽鎖間が4個のジスルフィド結合により連結されているため、4個のジスルフィド結合を有する。このようなイムノグロブリン単位に対して、還元剤を十分に作用させると、4個のジスルフィド結合から8個のチオール基が生成する。還元剤としては、ジスルフィド結合を開裂させてチオール基を生成できる任意の還元剤を使用することができ、例えば、トリカルボキシルエチルホスフィン（TCEP）、システイン、ジチオトレイトール、還元型グルタチオン、 β -メルカプトエタノールが挙げられる。ちなみに、4個のジスルフィド結合全てが還元された場合であっても、抗体の重鎖および軽鎖は解離しない。これは、各鎖の非共有結合により抗体の高次構造を維持できるためである。この非共有結合により、抗体特性（標的および結合力）も維持される。例えば、エンハーツ（登録商標）として知られるトラスツズマブ・デルクスステカン[®]は、4個の鎖間ジスルフィド結合全てを還元（切断）して生成したチオール基に対して薬物を結合させたDAR=8のADCである。このようなADCは、その抗体特性の維持により、抗原特異的な薬剤として働くことが知られている。

[0086] 本発明によれば、抗体を構成するイムノグロブリン単位中の重鎖における特定のリジン残基（例、246／248位、288／290位、または317位のリジン残基）を位置選択的に修飾することができる（例、国際公開第2018／199337号、国際公開第2019／240288号、国際公

開第2019／240287号、および国際公開第2020／090979号を参照)。本明細書において、「位置選択的」または「位置選択性」とは、抗体において特定のアミノ酸残基が特定の領域に偏在していないにもかかわらず、抗体中の特定のアミノ酸残基と結合できる所定の構造単位が、抗体中の特定の領域に偏在することをいう。したがって、「位置選択的に有する」、「位置選択的な結合」、「位置選択性での結合」等の位置選択性に関連する表現は、1個以上の特定のアミノ酸残基を含む標的領域における所定の構造単位の保有率または結合率が、標的領域における当該特定のアミノ酸残基と同種である複数個のアミノ酸残基を含む非標的領域における当該構造単位の保有率または結合率よりも有意なレベルで高いことを意味する。このような位置選択性は、50%以上であり、好ましくは60%以上、より好ましくは70%以上、さらにより好ましくは80%以上、特に好ましくは90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、99.5%以上、または100%であってもよい。

[0087] また、本発明では、2個の重鎖および2個の軽鎖を含むイムノグロブリン単位は、当該イムノグロブリン単位に対して還元剤を作用させて生成する複数のシステイン残基（イムノグロブリン単位に含まれる2個の重鎖および2個の軽鎖における複数のシステイン残基）の側鎖中のチオール基を介して、Igに隣接する修飾基（例、後述するLA、L1）と結合することができる。上記複数に対応する個数は、例えば2個以上（例、2～8個）、好ましくは3個以上（例、3～8個）、より好ましくは4個以上（例、4～8個）、さらにより好ましくは5個以上（例、5～8個）、特に好ましくは6個以上（例、6～8個）、7個以上（例、7～8個）または8個である。

[0088] さらに、本発明では、イムノグロブリン単位または抗体における上記のようなリジン残基および／またはシステイン残基が修飾されている限り、他の位置の特定のアミノ酸残基がさらに位置選択的に修飾されていてもよい。例えば、イムノグロブリン単位または抗体における所定の位置の特定のアミノ酸残基を位置選択的に修飾する種々の方法が知られている。このような特定

のアミノ酸残基としては、修飾し易い側鎖（例、アミノ基、カルボキシ基、アミド基、ヒドロキシ基）を有するアミノ酸残基（例、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、スレオニン残基、セリン残基、チロシン残基）を利用できるが、好ましくは、ヒドロキシ基を含む側鎖を有するチロシン残基、セリン残基、およびスレオニン残基を利用することができる。

[0089] （ハロゲン原子）

ハロゲン原子としては、例えば、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子が挙げられる。

[0090] （1価の基）

1価の基としては、例えば、1価の炭化水素基、および1価の複素環基が挙げられる。

[0091] 1価の基は、1個以上（例えば1～10個、好ましくは1～8個、より好ましくは1～6個、さらにより好ましくは1～5個、特に好ましくは1～3個）の後述する置換基により置換されていてもよい。

[0092] （1価の炭化水素基、およびそれに関連する用語）

1価の炭化水素基としては、例えば、1価の鎖状炭化水素基、1価の脂環式炭化水素基、および1価の芳香族炭化水素基が挙げられる。

[0093] 1価の鎖状炭化水素基とは、鎖状構造のみで構成された炭化水素基を意味し、主鎖に環状構造を含まない。ただし、鎖状構造は直鎖状であっても分岐状であってもよい。1価の鎖状炭化水素基としては、例えば、アルキル、アルケニル、アルキニルが挙げられる。アルキル、アルケニル、およびアルキニルは、直鎖状、または分岐状のいずれであってもよい。

[0094] アルキルとしては、炭素原子数1～12のアルキルが好ましく、炭素原子数1～6のアルキルがより好ましく、炭素原子数1～4のアルキルがさらに好ましい。アルキルが置換基を有する場合、上記炭素原子数に置換基の炭素原子数は含まれない。炭素原子数1～12のアルキルとしては、例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、*i*-プロピル、*n*-ブチル、*s*-ブチル、イ

ソブチル、t-ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、ドデシルが挙げられる。

[0095] アルケニルとしては、炭素原子数 2～12 のアルケニルが好ましく、炭素原子数 2～6 のアルケニルがより好ましく、炭素原子数 2～4 のアルケニルがさらに好ましい。アルケニルが置換基を有する場合、上記炭素原子数に置換基の炭素原子数は含まれない。炭素原子数 2～12 のアルケニルとしては、例えば、ビニル、プロペニル、n-ブテニルが挙げられる。

[0096] アルキニルとしては、炭素原子数 2～12 のアルキニルが好ましく、炭素原子数 2～6 のアルキニルがより好ましく、炭素原子数 2～4 のアルキニルがさらに好ましい。アルキニルが置換基を有する場合、上記炭素原子数に置換基の炭素原子数は含まれない。炭素原子数 2～12 のアルキニルとしては、例えば、エチニル、プロピニル、n-ブチニルが挙げられる。

[0097] 1 価の鎖状炭化水素基としては、アルキルが好ましい。

[0098] 1 価の脂環式炭化水素基とは、環構造として脂環式炭化水素のみを含み、芳香族環を含まない炭化水素基を意味し、脂環式炭化水素は単環、多環のいずれであってもよい。ただし、脂環式炭化水素のみで構成されている必要はなく、その一部に鎖状構造を含んでいてもよい。1 価の脂環式炭化水素基としては、例えば、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニルが挙げられ、これらは、単環、多環のいずれであってもよい。

[0099] シクロアルキルとしては、炭素原子数 3～12 のシクロアルキルが好ましく、炭素原子数 3～6 のシクロアルキルがより好ましく、炭素原子数 5～6 のシクロアルキルがさらに好ましい。シクロアルキルが置換基を有する場合、上記炭素原子数に置換基の炭素原子数は含まれない。炭素原子数 3～12 のシクロアルキルとしては、例えば、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシルが挙げられる。

[0100] シクロアルケニルとしては、炭素原子数 3～12 のシクロアルケニルが好ましく、炭素原子数 3～6 のシクロアルケニルがより好ましく、炭素原子数 5～6 のシクロアルケニルがさらに好ましい。シクロアルケニルが置換基を

有する場合、上記炭素原子数に置換基の炭素原子数は含まれない。炭素原子数3～12のシクロアルケニルとしては、例えば、シクロプロペニル、シクロブテニル、シクロペンテニル、シクロヘキセニルが挙げられる。

[0101] シクロアルキニルとしては、炭素原子数3～12のシクロアルキニルが好ましく、炭素原子数3～6のシクロアルキニルがより好ましく、炭素原子数5～6のシクロアルキニルがさらに好ましい。シクロアルキニルが置換基を有する場合、上記炭素原子数に置換基の炭素原子数は含まれない。炭素原子数3～12のシクロアルキニルとしては、例えば、シクロプロピニル、シクロブチニル、シクロペンチニル、シクロヘキシニルが挙げられる。

[0102] 1価の脂環式炭化水素基としては、シクロアルキルが好ましい。

[0103] 1価の芳香族炭化水素基とは、芳香族環構造を含む炭化水素基を意味する。ただし、芳香族環のみで構成されている必要はなく、その一部に鎖状構造や脂環式炭化水素を含んでいてもよく、芳香族環は単環、多環のいずれであってもよい。1価の芳香族炭化水素基としては、炭素原子数6～12のアリールが好ましく、炭素原子数6～10のアリールがより好ましく、炭素原子数6のアリールがさらに好ましい。1価の芳香族炭化水素基が置換基を有する場合、上記炭素原子数に置換基の炭素原子数は含まれない。炭素原子数6～12のアリールとしては、例えば、フェニル、ナフチルが挙げられる。

[0104] 1価の芳香族炭化水素基としては、フェニルが好ましい。

[0105] これらの中でも、1価の炭化水素基としては、アルキル、シクロアルキル、アリールが好ましい。

[0106] (1価の複素環基およびそれに関連する用語)

1価の複素環基とは、複素環式化合物の複素環から水素原子1個を除いた基をいう。1価の複素環基は、1価の芳香族複素環基、または1価の非芳香族複素環基である。複素環基を構成するヘテロ原子として、酸素原子、硫黄原子、窒素原子、リン原子、ホウ素原子及びケイ素原子からなる群から選択される1種以上を含むことが好ましく、酸素原子、硫黄原子及び窒素原子からなる群から選択される1種以上を含むことがより好ましい。

[0107] 1価の芳香族複素環基としては、炭素原子数1～15の芳香族複素環基が好ましく、炭素原子数1～9の芳香族複素環基がより好ましく、炭素原子数1～6の芳香族複素環基がさらに好ましい。1価の芳香族複素環基が置換基を有する場合、上記炭素原子数に置換基の炭素原子数は含まれない。1価の芳香族複素環基としては、例えば、ピロリル、フラニル、チオフェニル、ピリジニル、ピリダジニル、ピリミジニル、ピラジニル、トリアジニル、ピラゾリル、イミダゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、インドリル、プリニル、アントラキノリル、カルバゾニル、フルオレニル、キノリニル、イソキノリニル、キナゾリニル、及びフタラジニルが挙げられる。

[0108] 1価の非芳香族複素環基としては、炭素原子数2～15の非芳香族複素環基が好ましく、炭素原子数2～9の非芳香族複素環基がより好ましく、炭素原子数2～6の非芳香族複素環基がさらに好ましい。1価の非芳香族複素環基が置換基を有する場合、上記炭素原子数に置換基の炭素原子数は含まれない。1価の非芳香族複素環基としては、例えば、オキシラニル、アジリジニル、アゼチジニル、オキセタニル、チエタニル、ピロリジニル、ジヒドロフラニル、テトラヒドロフラニル、ジオキサラニル、テトラヒドロチオフェニル、ピロリニル、イミダゾリジニル、オキサゾリジニル、ピペリジニル、ジヒドロピラニル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロチオピラニル、モルホリニル、チオモルホリニル、ピペラジニル、ジヒドロオキサジニル、テトラヒドロオキサジニル、ジヒドロピリミジニル、及びテトラヒドロピリミジニルが挙げられる。

[0109] これらの中でも、1価の複素環基としては、5員または6員の複素環基が好ましい。

[0110] (2価の基)

2価の基は、2価の直鎖炭化水素基、2価の環状炭化水素基、2価の複素環基、 $-C(=O)-$ 、 $-C(=S)-$ 、 $-NR_7-$ 、 $-C(=O)-NR_7-$ 、 $-NR_7-C(=O)-$ 、 $-C(=S)-NR_7-$ 、 $-NR_7-C(=S)-$

—、—O—、—S—、—(O—R₈)_m—、および—(S—R₈)_{m1}—からなる群より選ばれる1個の基、またはこれらの2個以上（例えば2～10個、好ましくは2～8個、より好ましくは2～6個、さらにより好ましくは2～5個、特に好ましくは2または3個）の基を含む主鎖構造を有する基である。R₇は、水素原子、または後述する置換基を示す。R₈は、2価の直鎖炭化水素基、2価の環状炭化水素基、または2価の複素環基を示す。m1は、1～10の整数であり、好ましくは1～8の整数であり、より好ましくは1～6の整数であり、さらにより好ましくは1～5の整数であり、特に好ましくは1～3の整数である。

[0111] 2価の直鎖炭化水素基は、直鎖アルキレン、直鎖アルケニレン、または直鎖アルキニレンである。

直鎖アルキレンは、炭素原子数1～6の直鎖アルキレンであり、炭素原子数1～4の直鎖アルキレンが好ましい。直鎖アルキレンとしては、例えば、メチレン、エチレン、n-プロピレン、n-ブチレン、n-ペンチレン、n-ヘキシレンが挙げられる。

直鎖アルケニレンは、炭素原子数2～6の直鎖アルケニレンであり、炭素原子数2～4の直鎖アルケニレンが好ましい。直鎖アルケニレンとしては、例えば、エチレニレン、n-プロピニレン、n-ブテニレン、n-ペンテニレン、n-ヘキセニレンが挙げられる。

直鎖アルキニレンは、炭素原子数2～6の直鎖アルキニレンであり、炭素原子数2～4の直鎖アルキニレンが好ましい。直鎖アルキニレンとしては、例えば、エチニレン、n-プロピニレン、n-ブチニレン、n-ペンチニレン、n-ヘキシニレンが挙げられる。

2価の直鎖炭化水素基としては、直鎖アルキレンが好ましい。

[0112] 2価の環状炭化水素基は、アリーレン、または2価の非芳香族環状炭化水素基である。

アリーレンとしては、炭素原子数6～14のアリーレンが好ましく、炭素原子数6～10のアリーレンがより好ましく、炭素原子数6のアリーレンが

特に好ましい。アリーレンとしては、例えば、フェニレン、ナフチレン、アントラセニレンが挙げられる。

2価の非芳香族環状炭化水素基としては、炭素原子数3～12の単環式または多環式である2価の非芳香族環状炭化水素基が好ましく、炭素原子数4～10の単環式または多環式である2価の非芳香族環状炭化水素基がより好ましく、炭素原子数5～8の単環式である2価の非芳香族環状炭化水素基が特に好ましい。2価の非芳香族環状炭化水素基としては、例えば、シクロプロピレン、シクロブチレン、シクロペンチレン、シクロヘキシレン、シクロヘプチレン、シクロオクチレンが挙げられる。

2価の環状炭化水素基としては、アリーレンが好ましい。

[0113] 2価の複素環基は、2価の芳香族複素環基、または2価の非芳香族複素環基である。複素環を構成するヘテロ原子として、酸素原子、硫黄原子、窒素原子、リン原子、ホウ素原子およびケイ素原子からなる群から選択される1種以上を含むことが好ましく、酸素原子、硫黄原子および窒素原子からなる群から選択される1種以上を含むことがより好ましい。

2価の芳香族複素環基としては、炭素原子数3～15の2価の芳香族複素環基が好ましく、炭素原子数3～9の2価の芳香族複素環基がより好ましく、炭素原子数3～6の2価の芳香族複素環基が特に好ましい。2価の芳香族複素環基としては、例えば、ピロールジイル、フランジイル、チオフェンジイル、ピリジンジイル、ピリダジンジイル、ピリミジンジイル、ピラジンジイル、トリアジンジイル、ピラゾールジイル、イミダゾールジイル、チアゾールジイル、イソチアゾールジイル、オキサゾールジイル、イソオキサゾールジイル、トリアゾールジイル、テトラゾールジイル、インドールジイル、プリンジイル、アントラキノンジイル、カルバゾールジイル、フルオレンジイル、キノリンジイル、イソキノリンジイル、キナゾリンジイル、およびフタラジンジイルが挙げられる。

2価の非芳香族複素環基としては、炭素原子数3～15の非芳香族複素環基が好ましく、炭素原子数3～9の非芳香族複素環基がより好ましく、炭素

原子数 3～6 の非芳香族複素環基が特に好ましい。2 価の非芳香族複素環基としては、例えば、ピロールジオンジイル、ピロリンジジオンジイル、オキシランジイル、アジリジンジイル、アゼチジンジイル、オキセタンジイル、チエタンジイル、ピロリジンジイル、ジヒドロフランジイル、テトラヒドロフランジイル、ジオキソランジイル、テトラヒドロチオフェンジイル、ピロリンジイル、イミダゾリジンジイル、オキサゾリジンジイル、ピペリジンジイル、ジヒドロピランジイル、テトラヒドロピランジイル、テトラヒドロチオピランジイル、モルホリンジイル、チオモルホリンジイル、ピペラジンジイル、ジヒドロオキサジンジイル、テトラヒドロオキサジンジイル、ジヒドロピリミジンジイル、およびテトラヒドロピリミジンジイルが挙げられる。

2 価の複素環基としては、2 価の芳香族複素環基が好ましい。

[0114] 好ましくは、2 価の基は、アルキレン、アリーレン、 $-C(=O)-$ 、 $-NR_7-$ 、 $-C(=O)-NR_7-$ 、 $-NR_7-C(=O)-$ 、 $-O-$ 、および $-(O-R_8)_m-$ からなる群より選ばれる 1 個の基を含む主鎖構造を有する 2 価の基であるか、または、

アルキレン、アリーレン、 $-C(=O)-$ 、 $-NR_7-$ 、 $-C(=O)-NR_7-$ 、 $-NR_7-C(=O)-$ 、 $-O-$ 、および $-(O-R_8)_{m1}-$ からなる群より選ばれる 2 個以上の基を含む主鎖構造を有する 2 価の基であり、

R_7 が、水素原子またはアルキルであり、

R_8 が、アルキレンまたはアリーレンであり、

$m1$ が、1～5 の整数（すなわち、1、2、3、4、または 5）であってもよい。

アルキレン、アリーレン、アルキルは、上述したものと同様である。

[0115] 2 価の基における主鎖構造は、1 個以上（例えば 1～10 個、好ましくは 1～8 個、より好ましくは 1～6 個、さらにより好ましくは 1～5 個、特に好ましくは 1～3 個）の後述する置換基により置換されていてもよい。

[0116] （置換基）

置換基としては、以下が挙げられる：

- (i) ハロゲン原子；
- (ii) 1価の炭化水素基；
- (iii) 1価の複素環基；
- (iv) アラルキル；
- (v) R_a-O- 、 $R_a-C(=O)-$ 、 $R_a-O-C(=O)-$ 、もしくは $R_a-C(=O)-O-$ (R_a は、水素原子、もしくは1価の炭化水素基を示す。)；または
- (vi) NR_bR_c- 、 $NR_bR_c-C(=O)-$ 、 $NR_bR_c-C(=O)-O-$ 、もしくは $R_b-C(=O)-NR_c-$ (R_b および R_c は、同一もしくは異なって、水素原子、もしくは1価の炭化水素基を示す。)；
- (vii) ニトロ基、硫酸基、スルホン酸基、シアノ基、およびカルボキシル基。

[0117] 上記置換基におけるハロゲン原子、1価の炭化水素基、および1価の複素環基の定義、例、および好ましい例は、それぞれ、上述したものと同様である。

[0118] アラルキルとは、アリールアルキルをいう。アリールアルキルにおけるアリールおよびアルキルの定義、例および好ましい例は、上述したとおりである。アラルキルとしては、炭素原子数3～15のアラルキルが好ましい。このようなアラルキルとしては、例えば、ベンゾイル、フェネチル、ナフチルメチル、ナフチルエチルが挙げられる。

[0119] 好ましくは、置換基は、以下であってもよい：

- (i) ハロゲン原子；
- (ii) 炭素原子数1～12のアルキル、フェニル、もしくはナフチル；
- (iii) 炭素原子数3～15のアラルキル；
- (iv) 5員または6員の複素環；
- (v) R_a-O- 、 $R_a-C(=O)-$ 、 $R_a-O-C(=O)-$ 、もしくは $R_a-C(=O)-O-$ (R_a は、水素原子、もしくは炭素原子数1～12のアルキルを示す。)；
- (vi) NR_bR_c- 、 $NR_bR_c-C(=O)-$ 、 $NR_bR_c-C(=O)-O-$ 、もしくは $R_b-C(=O)-NR_c-$ (R_b および R_c は、同一もしくは異なって、水素原子、もしくは炭素原子数1～12のアルキルを示す。)；

$c-C(=O)-O-$ 、もしくは $R_b-C(=O)-NR_c-$ (R_b および R_c は、同一もしくは異なって、水素原子、もしくは炭素原子数 1～12 のアルキルを示す。) ; または

(v i i) 上記 (v i i) で列挙したものと同一基。

[0120] より好ましくは、置換基は、以下であってもよい :

(i) ハロゲン原子 ;

(i i) 炭素原子数 1～12 のアルキル ;

(i i i) R_a-O- 、 $R_a-C(=O)-$ 、 $R_a-O-C(=O)-$ 、もしくは $R_a-C(=O)-O-$ (R_a は、水素原子、もしくは炭素原子数 1～12 のアルキルを示す。) ;

(i v) NR_bR_c- 、 $NR_bR_c-C(=O)-$ 、 $NR_bR_c-C(=O)-O-$ 、もしくは $R_b-C(=O)-NR_c-$ (R_b および R_c は、同一もしくは異なって、水素原子、もしくは炭素原子数 1～12 のアルキルを示す。) ; または

(v) 上記 (v i i) で列挙したものと同一基。

[0121] さらに好ましくは、置換基は、以下であってもよい :

(i) ハロゲン原子 ;

(i i) 炭素原子数 1～6 のアルキル ;

(i i i) R_a-O- 、 $R_a-C(=O)-$ 、 $R_a-O-C(=O)-$ 、もしくは $R_a-C(=O)-O-$ (R_a は、水素原子、もしくは炭素原子数 1～6 のアルキルを示す。) ;

(i v) NR_bR_c- 、 $NR_bR_c-C(=O)-$ 、 $NR_bR_c-C(=O)-O-$ 、もしくは $R_b-C(=O)-NR_c-$ (R_b および R_c は、同一もしくは異なって、水素原子、もしくは炭素原子数 1～6 のアルキルを示す。) ; または

(v) 上記 (v i i) で列挙したものと同一基。

[0122] 特に好ましくは、置換基は、以下であってもよい :

(i) ハロゲン原子 ;

(i i) 炭素原子数 1 ～ 4 のアルキル；

(i i i) R_a-O- 、 $R_a-C(=O)-$ 、 $R_a-O-C(=O)-$ 、もしくは $R_a-C(=O)-O-$ (R_a は、水素原子、もしくは炭素原子数 1 ～ 4 のアルキルを示す。)；

(i v) NR_bR_c- 、 $NR_bR_c-C(=O)-$ 、 $NR_bR_c-C(=O)-O-$ 、もしくは $R_b-C(=O)-NR_c-$ (R_b および R_c は、同一もしくは異なって、水素原子、もしくは炭素原子数 1 ～ 4 のアルキルを示す。)；または

(v) 上記 (v i i) で列挙したものと同一基。

[0123] (親水性基)

親水性基は、式 (1) ～ (7) またはその下位概念の式で表される構造単位を、より親水性にすることができる基である。親水性基を、当該構造単位中の所定の部位に有することにより、コンジュゲートの性質をより向上させることができる。このような親水性基としては、例えば、カルボン酸基、スルホン酸基、スルファミド基、水酸基、ポリエチレングリコール基、ポリサルコシン基、糖部分が挙げられる。親水性基は、コンジュゲート中に 1 個以上 (例、1 個、2 個、3 個、4 個、または 5 個) 含まれていてもよい。

[0124] ポリエチレングリコール (P E G) 基は、 $-(CH_2-CH_2-O-)_k-$ で表される 2 価の基である。コンジュゲートがポリエチレングリコール基を有する場合、コンジュゲートは、ポリエチレングリコール基の一方の結合手が水素原子、または 1 価の基 (例、1 価の炭化水素基) と結合した 1 価の基を有していてもよい。 k は、例えば 3 以上の整数、好ましくは 4 以上の整数、より好ましくは 5 以上の整数、さらにより好ましくは 6 以上の整数であってもよい。 k はまた、15 以下の整数、好ましくは 12 以下の整数、より好ましくは 10 以下の整数、さらにより好ましくは 9 個以下の整数であってもよい。より具体的には、 k は、3 ～ 15 の整数、好ましくは 4 ～ 12 の整数、より好ましくは 5 ～ 10 の整数、さらにより好ましくは 4 ～ 9 の整数であってもよい。

[0125] ポリサルコシン基は、 $-(NCH_3-CH_2-CO-)_k-$ で表される2価の基である。ポリサルコシン基は、PEGの代替物として使用することができる。kは、例えば3以上の整数、好ましくは4以上の整数、より好ましくは5以上の整数、さらにより好ましくは6以上の整数であってもよい。kはまた、15以下の整数、好ましくは12以下の整数、より好ましくは10以下の整数、さらにより好ましくは9個以下の整数であってもよい。より具体的には、kは、3～15の整数、好ましくは4～12の整数、より好ましくは5～10の整数、さらにより好ましくは4～9の整数であってもよい。

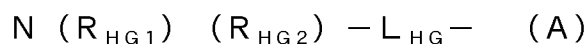
[0126] 糖部分は、単糖、オリゴ糖（例、二糖、三糖、四糖、五糖）、または多糖である。糖部分は、アルドースもしくはケトース、またはそれらの組合せを含むことができる。糖部分は、リボース、デオキシリボース、キシロース、アラビノース、グルコース、マンノース、ガラクトース、もしくはフルクトース、またはアミノ糖（例、グルコサミン）等の単糖、あるいはこのような単糖を含むオリゴ糖または多糖であってもよい。

[0127] 特定の実施形態では、糖部分は、低分子量の親水性基であってもよい。低分子親水性基とは、分子量1500以下の親水性基をいう。低分子親水性基の分子量は、好ましくは1200以下、1000以下、800以下、700以下、600以下、500以下、400以下、300以下、200以下、または100以下であってもよい。低分子親水性基としては、カルボン酸基、スルホン酸基、水酸基、ならびに上記分子量を満たすポリエチレングリコール基、ポリサルコシン基、糖部分（例、単糖、オリゴ糖）が挙げられる。

[0128] （親水性基を含む1価の基）

親水性基を含む1価の基は、上述したような親水性基を含む1価の基である。1価の基は、上述したとおりである。

[0129] 好ましくは、親水性基を含む1価の基は、下記式（A）：



〔式中、

L_{HG} は、結合、または親水性基を含んでいてもよい2価の基を示し、

R_{HG1} 、および R_{HG2} は、それぞれ独立して、水素原子、親水性基、または親水性基を含んでいてもよい1価の基を示し、

少なくとも1つの親水性基が、 L_{HG} 、 R_{HG1} 、および R_{HG2} からなる群より選ばれる1以上の部位において含まれる。)で表される1価の基であってもよい。式(A)において右末端に配置されたハイフン(—)は結合手を示す。

[0130] L_{HG} は、結合、または親水性基を含んでいてもよい2価の基を示す。 R_{HG1} 、および R_{HG2} が、それぞれ独立して、水素原子、または親水性基を含まない1価の基である場合、 L_{HG} は、親水性基を含む2価の基である。 R_{HG1} 、および R_{HG2} の少なくとも一方が、親水性基、または親水性基を含む1価の基である場合、 L_{HG} は、親水性基を含んでいてもよい2価の基であってもよいが、親水性基を含まない2価の基であることも好ましい。

[0131] R_{HG1} 、および R_{HG2} は、それぞれ独立して、水素原子、親水性基、または親水性基を含んでいてもよい1価の基を示す。親水性基、および1価の基は、上述したとおりである。

[0132] 特定の実施形態では、 R_{HG1} 、および R_{HG2} で示される親水性基を含んでいてもよい1価の基は、アミノ基の保護基であってもよい。また、 R_{HG1} 、および R_{HG2} の一方が、水素原子であり、他方が、アミノ基の保護基であってもよい。アミノ基の保護基としては、例えば、アルキルカルボニル基(アシル基)(例、アセチル基、プロポキシ基、tert-ブトキシカルボニル基等のブトキシカルボニル基)、アルキルオキシカルボニル基(例、フルオレニルメトキシカルボニル基)、アリールオキシカルボニル基、アリールアルキル(アラルキル)オキシカルボニル基(例、ベンジルオキシカルボニル基)が挙げられる。

[0133] あるいは、 R_{HG1} 、および R_{HG2} の一方が、水素原子であり、他方が、親水性基を含む1価の基であってもよい。親水性基を含む1価の基としては、例えば、親水性基を含むアルキル基、親水性基を含むカルボキシル基、親水性

基を含むアルキルカルボニル基、親水性基を含むアルキルオキシカルボニル基、親水性基を含むオキシカルボニル基が挙げられる。

[0134] 式 (A) において、少なくとも 1 つの親水性基が、 L_{HG} 、 R_{HG1} 、および R_{HG2} からなる群より選ばれる 1 以上の部位において含まれる。少なくとも 1 つの親水性基が含まれる部位およびその組み合わせとしては、例えば、以下が挙げられる：

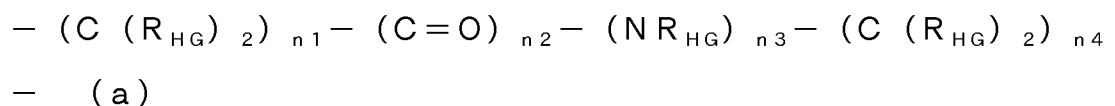
- (i) L_{HG} 単独；
- (i i) R_{HG1} 単独；
- (i i i) R_{HG2} 単独；
- (i v) L_{HG} および L_{HG1} の組み合わせ；
- (v) L_{HG} および L_{HG2} の組み合わせ；
- (v i) L_{HG1} および L_{HG2} の組み合わせ；ならびに
- (v i i) L_{HG} 、 L_{HG1} および L_{HG2} の組み合わせ。

これらの L_{HG} 部位、 R_{HG1} 部位、 R_{HG2} 部位の各々に 1 つの親水性基が含まれていてもよく、2 つ以上の親水性基が含まれていてもよい。

[0135] (親水性基を含んでいてもよい 2 価の基)

親水性基を含んでいてもよい 2 価の基は、上述したような親水性基を含んでいてもよい 2 価の基である。2 価の基は、上述したとおりである。

[0136] 好ましくは、親水性基を含んでいてもよい 2 価の基は、下記式 (a)：



[式中、

複数の R_{HG} は、それぞれ独立して、水素原子、親水性基、または親水性基を含んでいてもよい 1 価の基を示し、

$n1$ は、0～3 の整数であり、

$n2$ は、0 または 1 の整数であり、

$n3$ は、0 または 1 の整数であり、

$n4$ は、0～3 の整数である。] で表される 2 価の基であってもよい。式

(a) において両末端に配置されたハイフン (—) は結合手を示す。

[0137] 式 (a) において、複数の R_{HG} は、それぞれ独立して、水素原子、親水性基、または親水性基を含んでいてもよい 1 価の基を示す。親水性基および 1 価の基は、上述したとおりである。

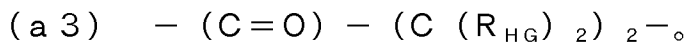
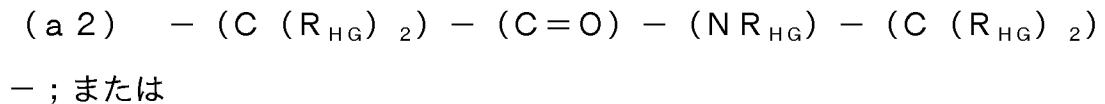
[0138] n_1 は、0～3 の整数であり、好ましくは 0～2 の整数であり、より好ましくは 0 または 1 の整数である。

[0139] n_2 は、0 または 1 の整数である。

[0140] n_3 は、0 または 1 の整数である。

[0141] n_4 は、0～3 の整数であり、好ましくは 0～2 の整数であり、より好ましくは 0 または 1 の整数である。

[0142] より好ましくは、親水性基を含んでいてもよい 2 価の基は、下記式 (a 1)、(a 2)、または (a 3) で表される 2 価の基であってもよい：



[0143] 式 (a 1)、(a 2)、または (a 3) において、複数の R_{HG} は、それぞれ独立して、水素原子、親水性基、または親水性基を含む炭素原子数 1～6 のアルキル基を示す。親水性基、および炭素原子数 1～6 のアルキル基は、上述したとおりである。

[0144] (切断性部位)

切断性部位は、適切な環境（例、細胞内または細胞外）において切断可能な部位である。切断性部位としては、例えば、酵素による切断性部位（例、米国特許第 6, 214, 345 号；Dubowchik et al., Pharm. Therapeutics 83: 67-123 (1999)；The FEBS Journal 287: 1936-1969 (2020)）、酸性条件下での切断性部位（生体内に存在する局所酸性部位で切断可能な部位）（例、米国特許第 5, 622, 929 号、同第 5, 122, 3

68号；同第5，824，805号；The FEBS Journal 287：1936－1969（2020））、還元条件下での切断性部位（例、Protein&Cell 9，33－46（2018））、血中グルタチオンによる切断性部位（例、；The FEBS Journal 287：1936－1969（2020））が挙げられる。切断性部位は、自壊的（self-immolative）であってもよい（例、国際公開第02／083180号、国際公開第04／043493号、国際公開第05／112919号）。

[0145] 切断性部位は、ペプチドを含む切断性部位であってもよい。ペプチドを含む切断性部位は、酵素により切断される切断性ペプチドからなる切断性部位であってもよい。ペプチドを含む切断性部位はまた、酵素により切断される切断性ペプチドに加えて、切断に関与しないペプチドをさらに含んでもよい。ペプチドを含む切断性部位は、切断に関与しないペプチドをさらに含む場合であっても、酵素により切断される切断性ペプチドを含む限り、切断されることができる。

[0146] 切断性部位におけるペプチドを構成するアミノ酸残基は、任意のアミノ酸残基であってもよい。このような任意のアミノ酸残基としては、例えば、 α -アミノ酸残基、 β -アミノ酸残基、および γ -アミノ酸残基が挙げられ、 α -アミノ酸残基が好ましい。 α -アミノ酸残基としては、例えば、アラニン残基、アスパラギン残基、システイン残基、グルタミン残基、グリシン残基、イソロイシン残基、ロイシン残基、メチオニン残基、フェニルアラニン残基、プロリン残基、セリン残基、スレオニン残基、トリプトファン残基、チロシン残基、バリン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、リジン残基、およびシトルリン残基が挙げられる。このような任意のアミノ酸残基はまた、L-アミノ酸残基、D-アミノ酸残基であってもよく、L-アミノ酸残基が好ましい。好ましくは、任意のアミノ酸残基は、L- α -アミノ酸残基（例、上述の特定 α -アミノ酸残基のL体）、またはグリシン残基であってもよい。

- [0147] 特定の実施形態では、ペプチドを含む切断性部位は、バリン残基、フェニルアラニン残基、スレオニン残基、ロイシン残基、シトルリン残基、アラニン残基、グルタミン酸残基、グルタミン残基、リジン残基、アルギニン残基、およびメチオニン残基、ならびにそれらの組み合わせからなる群より選ばれるアミノ酸残基から構成される切断性ペプチドを含んでいてもよい。
- [0148] 切断性部位におけるペプチドを構成するアミノ酸残基数は、2以上、3以上、4以上、5以上、または6以上であってもよい。切断性部位におけるペプチドを構成するアミノ酸残基数はまた、20以下、15以下、12以下、10以下、8以下、6以下、または4以下であってもよい。より具体的には、ペプチドを構成するアミノ酸残基数は、2～20、2～15、2～12、2～10、2～8、2～6、または2～4であってもよく、3～20、3～15、3～12、3～10、3～8、3～6、または3～4であってもよく、4～20、4～15、4～12、4～10、4～8、または4～6であってもよい。
- [0149] 特定の実施形態では、切断性部位におけるペプチドを構成するアミノ酸残基数は、2であってもよい。切断性部位におけるペプチドを構成するアミノ酸残基数はまた、3または4であってもよい。あるいは、切断性ペプチドを構成するアミノ酸残基数は、2であってもよい。切断性ペプチドを構成するアミノ酸残基数はまた、3または4であってもよい。
- [0150] 好ましい実施形態では、切断性部位は、酵素による切断性部位であってもよい。酵素による切断性部位としては、例えば、細胞内プロテアーゼ（例、リソソーム、またはエンドソーム中に存在するプロテアーゼ）、細胞外プロテアーゼ（例、分泌性プロテアーゼ）による切断性部位（典型的には、切断性ペプチド部位が挙げられる。より好ましくは、切断性部位は、細胞内プロテアーゼ（例、リソソーム、またはエンドソーム中に存在するプロテアーゼ）による切断性部位である。さらにより好ましくは、切断性部位は、リソソーム中に存在するプロテアーゼによる切断性部位である。特に好ましくは、切断性部位は、カテプシンB、プラスミン、レグマイン、およびカスパーゼ

による切断性部位である。

[0151] より具体的には、カテプシンB、プラスミン、レグマイン、およびカスパーゼによる切断性部位は、VC、VA、AA、GGFG（配列番号2）、FK、VK、AK、GC、VLK、NN、またはDDVD（配列番号3）を含む切断性部位であってもよい。VC、VA、AA、GGFG（配列番号2）、FK、VK、AK、およびGCのペプチド部位は、カテプシンBにより切断できる。VLKのペプチド部位は間質のプラスミン（Plasmin）により切断されることが知られている。NNのペプチド部位はレグマイン（Legumain）により切断されることが知られている。DDVDのペプチド部位はカスパーゼ（Caspase）により切断されることが知られている。このような切断性部位としては、例えば、EVC、EEVC（配列番号4）、EEEEVC（配列番号5）、DVC、EVA、EAA、EGGFG（配列番号6）、EFK、EEFK（配列番号7）、EEVK（配列番号8）、EEAK（配列番号9）、EGC、EEVLK（配列番号10）、ENN、EDDVD（配列番号11）、 β -Ala-VC、EGC、およびEEGC（配列番号12）が挙げられる。

[0152] 別の好ましい実施形態では、切断性部位は、酸性条件下、または還元条件下での切断性部位であってもよい。酸性条件下での切断性部位としては、例えば、アルキルオキシアリールアルキル残基、三級アルキルオキシカルバメート残基、アセタール残基、シラン残基、イミン残基、ビニルエーテル残基、 β -チオプロピオネート残基、トリチル残基、ヒドラゾン残基、アコニチル残基、オルトエステル残基、カルバモイル残基、2-（ジフェニルホスフィノ）ベンゾエート残基が挙げられる。還元条件下での切断性部位としては、例えば、ジスルフィド残基、アルコキシアルキル残基、アゾ残基が挙げられる。

[0153] 特定の実施形態では、切断性部位を含む2価の基は、置換基を有していてもよい2価の芳香族環基（例、環A、環A1）に隣接する場合、下記（i）～（iii）の条件を満たすものであってもよい：

(i) 切断性部位が、 $-CO-W-$ （ここで、ハイフン（ $-$ ）は、結合手を示し、 W は、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基（ NH ）であり、かつ上記2価の芳香族環基と結合している。）である；

(ii) CO と W との間の結合が切断を受ける部位である；

(iii) 上記2価の芳香族環基が、 W と π 電子共役系を構成している。

カテプシンBによる切断性部位を含む2価の基が上記(i)～(iii)の条件を満たす場合、 CO と W との間の結合の切断が、環Aにおける2価の芳香族環基（ここで、2価の芳香族環基は、上記切断性部位と π 電子共役系を構成している）における π 電子共役系および V と連動することにより、環Aに連絡されている3級炭素原子と V との間の結合を効率良く切断することができる（図1）。 W は、好ましくは、酸素原子、またはアミノ基（ NH ）であり、より好ましくは、アミノ基（ NH ）である。したがって、切断性部位は、好ましくは、アミド結合部位である。

[0154] 特定の実施形態では、 CS で示される、切断性部位を含む2価の基は、 $-L_{CSa}-CS_a-W_{csa}-$ 〔ここで、ハイフン（ $-$ ）は、結合手を示し、 L_{CSa} は、結合、または2価の基を示し、 CS_a は、切断性部位を示し、 W_{cs} は、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基（ NH ）を示す。〕であってもよい。 L_{CSa} で示される2価の基の定義、例および好ましい例は、上述の2価の基と同様である。 CS_a で示される切断性部位の定義、例および好ましい例は、上述の切断性部位と同様である。 W_{csa} は、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基（ NH ）を示し、好ましくは、酸素原子、またはアミノ基（ NH ）を示し、より好ましくはアミノ基（ NH ）を示す。

[0155] 別の特定の実施形態では、 CS で示される、切断性部位を含む2価の基は、 $-L_{CSb}-CS_b-W_{csb}-$ 〔ここで、ハイフン（ $-$ ）は、結合手を示し、 L_{CSb} は、結合、または2価の基を示し、 CS_b は、切断性部位を示し、 W_{cs} は、結合、または2価の基を示す。〕であってもよい。 L_{CSb} および W_{csb} で示される2価の基の定義、例および好ましい例は、上述の2価の基と同様である。 CS_b で示される切断性部位の定義、例および好ましい例は、上述の

切断性部位と同様である。好ましくは、本実施形態では、 CS_b としてジスルフィド結合が好ましく、 $W_{c.s.a}$ の2価の基としてアルキレン（例、メチレン）が好ましい。

[0156] （生体直交性官能基）

生体直交性官能基は、生体構成成分（例、アミノ酸、タンパク質、核酸、脂質、糖、リン酸）とは反応しない、もしくは生体構成成分に対する反応の速度が遅いが、生体構成成分以外の成分に対して選択的に反応する基をいう。生体直交性官能基は、当該技術分野において周知である（例、Sharpless K. B. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 40, 2004 (2015); Bertozzi C. R. et al., *Science* 291, 2357 (2001); Bertozzi C. R. et al., *Nature Chemical Biology* 1, 13 (2005) を参照）。

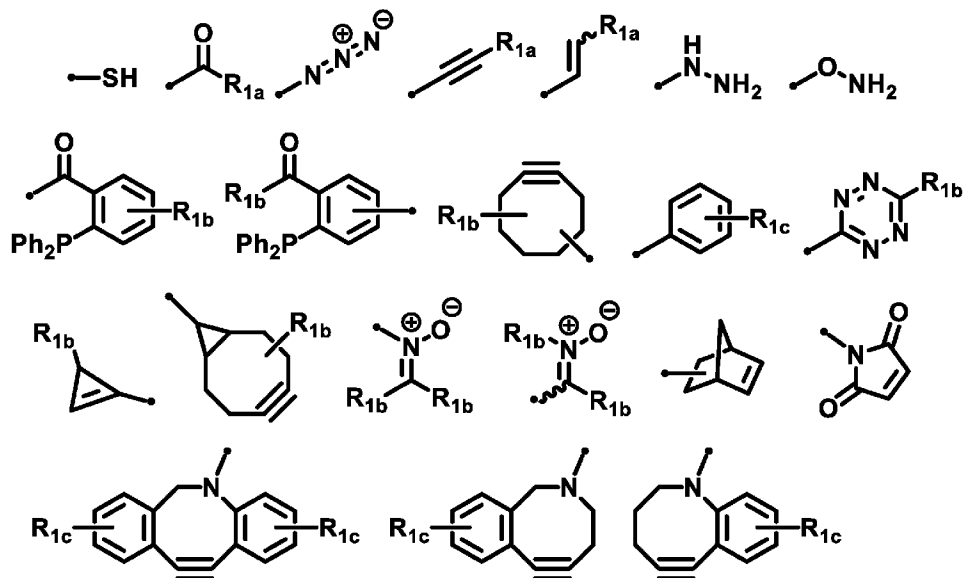
[0157] 本発明では、生体直交性官能基として、タンパク質に対する生体直交性官能基が用いられる。本発明の試薬により誘導体化されるべき抗体は、タンパク質であるためである。タンパク質に対する生体直交性官能基は、タンパク質を構成する天然の20種のアミノ酸残基の側鎖と反応しない、もしくは当該側鎖に対する反応の速度が遅いが、目的の官能基と反応する基である。タンパク質を構成する天然の20種のアミノ酸は、アラニン（A）、アスパラギン（N）、システイン（C）、グルタミン（Q）、グリシン（G）、イソロイシン（I）、ロイシン（L）、メチオニン（M）、フェニルアラニン（F）、プロリン（P）、セリン（S）、スレオニン（T）、トリプトファン（W）、チロシン（Y）、バリン（V）、アスパラギン酸（D）、グルタミン酸（E）、アルギニン（R）、ヒスチジン（H）、およびリジン（K）である。これらの天然の20種のアミノ酸のうち、側鎖がない（すなわち、水素原子である）グリシン、ならびに側鎖が炭化水素基である（すなわち、硫黄原子、窒素原子、および酸素原子からなる群より選ばれるヘテロ原子を側鎖に含まない）アラニン、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニン、お

よびバリンは、通常の反応に対して不活性である。したがって、タンパク質に対する生体直交性官能基は、通常の反応に対して不活性である側鎖を有するこれらのアミノ酸の側鎖に加えて、アスパラギン、グルタミン、メチオニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン、ヒスチジン、およびリジンの側鎖に対して反応しない、または反応の速度が遅いが、目的の官能基と反応する基である。

[0158] このような生体直交性官能基としては、例えば、アジド残基、アルデヒド残基、チオール残基、アルケン残基（換言すれば、炭素原子間二重結合を有する最小単位であるビニレン（エテニレン）部分を有していればよい。以下同様）、アルキン残基（換言すれば、炭素原子間三重結合を有する最小単位であるエチニレン部分を有していればよい。以下同様）、ハロゲン残基、テトラジン残基、ニトロ残基、ヒドロキシルアミン残基、ニトリル残基、ヒドラジン残基、ケトン残基、ボロン酸残基、シアノベンゾチアゾール残基、アリル残基、ホスフィン残基、マレイミド残基、ジスルフィド残基、チオエステル残基、 α -ハロカルボニル残基（例、 α 位にフッ素原子、塩素原子、臭素原子またはヨウ素原子を有するカルボニル残基。以下同様）、イソニトリル残基、シドノン残基、セレン残基が挙げられる。

[0159] より具体的には、生体直交性官能基は、下記からなる群より選ばれるいずれか一つの化学構造に対応していてもよい。

[化27]



「ここで、

R_{1a} 、単一もしくは複数の R_{1b} 、および単一もしくは複数の R_{1c} は、同一もしくは異なって、上述の置換基、または電子吸引基であり、

・は、結合手である。]

[0160] 電子吸引基としては、例えば、ハロゲン原子、ハロゲン原子で置換されたアルキル（例、トリフルオロメチル）、ボロン酸残基、メシル、トシル、トリフレート、ニトロ、シアノ、フェニル基、ケト基（例、アシル）が挙げられ、ハロゲン原子、ボロン酸残基、メシル、トシル、トリフレートが好ましい。

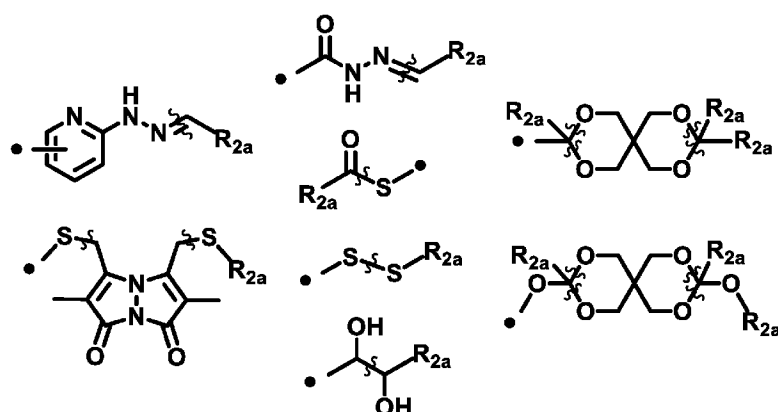
[0161] 特定の実施形態では、生体直交性官能基は、保護されていてもよい。保護されていてもよい生体直交性官能基とは、未保護の生体直交性官能基、または保護された生体直交性官能基をいう。未保護の生体直交性官能基は、上述の生体直交性官能基に該当する。保護された生体直交性官能基は、保護基の切断により生体直交性官能基を生成する基である。保護基の切断は、タンパク質の変性・分解（例、アミド結合の切断）を引き起こし得ない条件（温和な条件）下での特定の処理により行うことができる。このような特定の処理としては、例えば、（a）酸性物質、塩基性物質、還元剤、酸化剤、酵素が

らなる群より選ばれる１種以上の物質による処理、（ｂ）光からなる群より選ばれる物理化学的刺激による処理、または（ｃ）自己分解性の切断性部分を含む切断性リンカーを用いた場合の放置が挙げられる。このような保護基およびその切断条件は、当該分野における技術常識である（例、G. L e r i c h e, L. C h i s h o l m, A. W a g n e r, B i o o r g a n i c & M e d i c i n a l C h e m i s t r y. 20, 571 (2012) ; F e n g P. e t a l., J o u r n a l o f A m e r i c a n C h e m i c a l S o c i e t y. 132, 1500 (2010) . ; B e s s o d e s M. e t a l., J o u r n a l o f C o n t r o l l e d R e l e a s e, 99, 423 (2004) . ; D e S i m o n e, J. M., J o u r n a l o f A m e r i c a n C h e m i c a l S o c i e t y. 132, 17928 (2010) ; T h o m p s o n, D. H., J o u r n a l o f C o n t r o l l e d R e l e a s e, 91, 187 (2003) ; S c h o e n m a r k s, R. G., J o u r n a l o f C o n t r o l l e d R e l e a s e, 95, 291 (2004)) 。

[0162] 保護された生体直交性官能基としては、例えば、ジスルフィド残基、エステル残基、アセタール残基、ケタール残基、イミン残基、ビシナルジオール残基が挙げられる。

[0163] より具体的には、保護された生体直交性官能基は、以下からなる群より選ばれるいずれか一つの化学構造に対応していてもよい。

[化28]



〔ここで、結合に直交する波線は、切断部位を示し、

単一もしくは複数の R_{2a} は、同一または異なって、水素原子、または上述の置換基からなる群より選ばれ、

・ は、結合手である。〕

[0164] 好ましくは、保護されていてもよい生体直交性官能基は、未保護の生体直交性官能基である。

[0165] (機能性物質)

機能性物質は、抗体に任意の機能を付与する物質である限り特に限定されず、例えば、薬物、標識物質、安定化剤が挙げられるが、好ましくは薬物または標識物質である。機能性物質はまた、単一の機能性物質であってもよく、または2以上の機能性物質が連結された物質であってもよい。

[0166] 薬物としては、任意の疾患に対する薬物であってもよい。このような疾患としては、例えば、癌（例、肺癌、胃癌、大腸癌、膵臓癌、腎臓癌、肝臓癌、甲状腺癌、前立腺癌、膀胱癌、卵巣癌、子宮癌、骨癌、皮膚癌、脳腫瘍、黒色腫）、自己免疫疾患・炎症性疾患（例、アレルギー疾患、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス）、脳神経疾患（例、脳梗塞、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症）、感染症（例、細菌感染症、ウイルス感染症）、遺伝性・希少疾患（例、遺伝性球状赤血球症、非ジストロフィー筋緊張症）、眼疾患（例、加齢黄斑変性症、糖尿病網膜症、網膜色素変性症）、骨・整形外科領域の疾患（例、変形性関節症）、血液疾患（例、白血病、紫斑病）、その他の疾患（例、糖尿病、高脂血症等の代謝異常症、肝臓疾患、腎疾患、肺疾患、循環器系疾患、消化器官系疾患）が挙げられる。薬物は、疾患の予防または治療薬、副作用の緩和薬であってもよい。

[0167] より具体的には、薬物は、抗癌剤であってもよい。抗癌剤としては、例えば、化学療法剤、毒素、放射性同位体またはそれを含む物質が挙げられる。化学療法剤としては、例えば、DNA損傷剤、代謝拮抗薬、酵素阻害剤、DNAインターカレート剤、DNA切断剤、トポイソメラーゼ阻害剤、DNA結合阻害剤、チューブリン結合阻害剤、細胞傷害性ヌクレオシド、白金化合

物が挙げられる。毒素としては、例えば、細菌毒素（例、ジフテリア毒素）、植物毒素（例、リシン）が挙げられる。放射性同位体としては、例えば、水素原子の放射性同位体（例、 ^3H ）、炭素原子の放射性同位体（例、 ^{14}C ）、リン原子の放射性同位体（例、 ^{32}P ）、硫黄原子の放射性同位体（例、 ^{35}S ）、イットリウム⁹⁰の放射性同位体（例、 ^{90}Y ）、テクネチウム^{99m}の放射性同位体（例、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ）、インジウム¹¹¹の放射性同位体（例、 ^{111}In ）、ヨウ素¹²³の放射性同位体（例、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{129}I 、 ^{131}I ）、サマリウム¹⁵³の放射性同位体（例、 ^{153}Sm ）、レニウム¹⁸⁶の放射性同位体（例、 ^{186}Re ）、アスタチン²¹¹の放射性同位体（例、 ^{211}At ）、ビスマスの放射性同位体（例、 ^{212}Bi ）が挙げられる。更に具体的には、薬物として、オーリスタチン（MMAE、MMAF）、メイタンシン（DM1、DM4）、PBD（ピロロベンゾジアゼピン）、IGN、カンプトテシン類縁体、カリケアミシン、デュオカルミシン、エリブリン、アントラサイクリン、dmDNA31、ツブリシン、エキサテカンが挙げられる。

[0168] 標識物質は、標的（例、組織、細胞、物質）の検出を可能にする物質である。標識物質としては、例えば、酵素（例、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼ、 β ガラクトシダーゼ）、親和性物質（例、ストレプトアビジン、ビオチン、ジゴキシゲニン、アプタマー）、蛍光物質（例、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、緑色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質）、発光物質（例、ルシフェリン、エクオリン、アクリジニウムエステル、トリス（2，2'-ビピリジル）ルテニウム、ルミノール）、放射性同位体（例、上述したもの）、またはそれを含む物質が挙げられる。

[0169] 安定化剤は、抗体の安定化を可能にする物質である。安定化剤としては、例えば、ジオール類、グリセリン、非イオン界面活性剤、陰イオン界面活性剤、天然系界面活性剤、サッカリド、およびポリオール類が挙げられる。

[0170] 機能性物質はまた、ペプチド、タンパク質、核酸、低分子有機化合物、糖鎖、脂質、高分子ポリマー、金属（例、金）、キレーターであってもよい。

ペプチドとしては、例えば、細胞膜透過ペプチド、血液脳関門透過性ペプチド、ペプチド医薬品が挙げられる。タンパク質としては、例えば、酵素、サイトカイン、フラグメント抗体、レクチン、インターフェロン、血清アルブミン、抗体が挙げられる。核酸としては、例えば、DNA、RNA、人工核酸が挙げられる。核酸としてはまた、例えば、RNA干渉誘導性核酸（例、siRNA）、アプタマー、アンチセンスが挙げられる。低分子有機化合物としては、例えば、タンパク質分解誘導キメラ分子、色素、光分解性化合物が挙げられる。

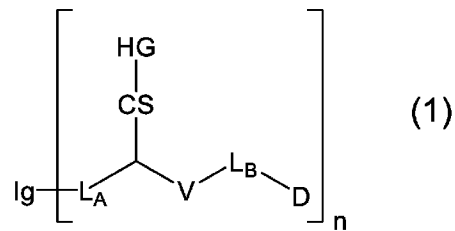
[0171] (塩)

本発明において、用語「塩」としては、例えば、無機酸との塩、有機酸との塩、無機塩基との塩、有機塩基との塩、およびアミノ酸との塩が挙げられる。無機酸との塩としては、例えば、塩化水素、臭化水素、リン酸、硫酸、硝酸との塩が挙げられる。有機酸との塩としては、例えば、ギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、乳酸、酒石酸、フマル酸、シュウ酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸との塩が挙げられる。無機塩基との塩としては、例えば、アルカリ金属（例、ナトリウム、カリウム）、アルカリ土類金属（例、カルシウム、マグネシウム）、および亜鉛、アルミニウム等の他の金属、ならびにアンモニウムとの塩が挙げられる。有機塩基との塩としては、例えば、トリメチルアミン、トリエチルアミン、プロピレンジアミン、エチレンジアミン、ピリジン、エタノールアミン、モノアルキルエタノールアミン、ジアルキルエタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミンとの塩が挙げられる。アミノ酸との塩としては、例えば、塩基性アミノ酸（例、アルギニン、ヒスチジン、リジン、オルニチン）、および酸性アミノ酸（例、アスパラギン酸、グルタミン酸）との塩が挙げられる。塩は、好ましくは、無機酸（例、塩化水素）との塩、または有機酸（例、トリフルオロ酢酸）との塩である。

[0172] 2. コンジュゲートまたはその塩

本発明は、下記式（1）：

[化29]



〔式中、

l g は、2 個の重鎖および 2 個の軽鎖を含むイムノグロブリン単位を示し、かつ、l g 中の特定アミノ酸残基の側鎖中の官能基を介して、l g に隣接する L_A と結合しており、

HG は、親水性基、または親水性基を含む 1 価の基を示し、

CS は、切断性部位を含む 2 価の基を示し、

V は、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基（NH）を示し、

L_A、および L_B は、それぞれ独立して、2 価の基を示し、

D は、機能性物質を示し、

前記イムノグロブリン単位あたりの前記結合の平均数 n は、1.5 以上である。〕で表される構造単位を含む、抗体および機能性物質のコンジュゲートまたはその塩を提供する。

[0173] 本発明に関連して提示される式（1）および他の式において、－（ハイフン）は、その両側に存在する 2 つの単位（例、原子、基）が共有結合していることを示す。－（ハイフン）の片側に単位が存在しない場合、その－（ハイフン）は、結合手であることを示す。

[0174] 抗体は、上述したようなイムノグロブリン単位を含む。このような抗体としては、例えば、2 個の重鎖および 2 個の軽鎖を含み、かつ重鎖間および重鎖と軽鎖との間にジスルフィド結合を有するイムノグロブリン単位を 1 個含む l g G 抗体、l g D 抗体および l g E 抗体、上記イムノグロブリン単位を 2 個含む l g A 抗体、上記イムノグロブリン単位を 4 個含む l g M 抗体が挙げられ、l g G 抗体（例、l g G 1、l g G 2、l g G 3、l g G 4）が好ましい。抗体は、好ましくはヒト l g G モノクローナル抗体であり、より好

ましくはヒト IgG 全長モノクローナル抗体である。

[0175] 抗体とリンカー部位 (L_A) との結合は、Ig 中の特定アミノ酸残基の側鎖中の官能基を介して達成することができる。Ig 中の特定アミノ酸残基の側鎖中の官能基としては、例えば、Ig 中のリジン残基の側鎖中のアミノ基、および Ig 中のシステイン残基の側鎖中のチオール基が挙げられる。Ig 中の特定アミノ酸残基の側鎖中の官能基がリジン残基の側鎖中のアミノ基である場合、上記結合は、リジン残基の側鎖中のアミノ基と、それに結合可能な原子または基（例、カルボニル基）との間の結合により達成することができる。Ig 中の特定アミノ酸残基の側鎖中の官能基がシステイン残基の側鎖中のチオール基である場合、上記結合は、システイン残基の側鎖中のチオール基と、それと結合可能な原子または基（例、マレイミド残基、カルボニル基、チオール基）との間の結合により達成することができる。

[0176] 式 (1) において、HG は、親水性基、または親水性基を含む 1 価の基を示す。親水性基、および 1 価の基は、上述したとおりである。好ましくは、HG は、親水性基を含む 1 価の基を示していてもよい。

[0177] CS は、切断性部位を含む 2 価の基を示す。切断性部位および 2 価の基は、上述のとおりである。

[0178] V は、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基 (NH) を示す。V は、好ましくは、酸素原子または硫黄原子であり、より好ましくは、酸素原子である。

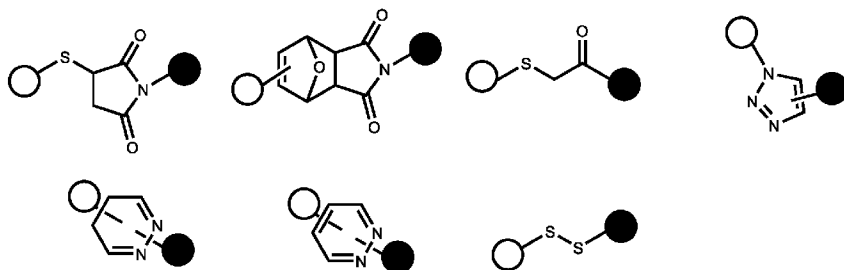
[0179] L_A で示される 2 価の基は、Ig、および環 A に隣接する炭素原子を連結できる 2 価の基である。 L_B で示される 2 価の基は、D および V を連結できる 2 価の基である。

[0180] 特定の実施形態では、 L_A 、および L_B で示される 2 価の基は、それぞれ、互いに反応可能な 2 つの生体直交性官能基の反応により生成する部分を含んでいてもよい。互いに反応可能な 2 つの生体直交性官能基の組合せは周知であるため、当業者は、このような組合せを適宜選択して、互いに反応可能な 2 つの生体直交性官能基の反応により生成する部分を含む 2 価の基を適宜設

定することができる。互いに反応可能な生体直交性官能基の組合せとしては、例えば、チオール残基とマレイミド残基の組み合わせ、フラン残基とマレイミド残基の組み合わせ、チオール残基とハロカルボニル残基の組み合わせ（置換反応により、ハロゲンがチオールに置換される）、アルキン残基（好ましくは、上述したような置換基により置換されていてもよい、炭素原子間3重結合を有する環基）とアジド残基の組み合わせ、テトラジン残基とアルケン残基の組み合わせ、テトラジン残基とアルキン残基の組み合わせ、チオール残基と別のチオール残基の組み合わせ（ジスルフィド結合）が挙げられる。したがって、上記部分は、チオール残基とマレイミド残基の反応により生成する基、フラン残基とマレイミド残基の反応により生成する基、チオール残基とハロカルボニル残基の反応により生成する基、アルキン残基とアジド残基の反応により生成する基、またはテトラジン残基とアルケン残基の反応により生成する基、チオール残基と別のチオール残基の組み合わせにより生成するジスルフィド基であってもよい。

[0181] 特定の実施形態では、上記部分は、下記構造式のうちのいずれか一つの構造式により表される2価の基であってもよい。

[化30]



〔ここで、白丸および黒丸は結合手を示す。〕

[0182] L_A では、白丸の結合手が1g結合部側に存在する原子に結合している場合、黒丸の結合手が環Aに隣接する炭素原子側に存在する原子に結合している場合、

白丸の結合手が環Aに隣接する炭素原子側に存在する原子に結合している場合、黒丸の結合手が1g結合部側に存在する原子に結合している場合、

- [0183] L_B では、白丸の結合手がV側に存在する原子に結合している場合、黒丸の結合手が機能性物質(D)結合部側に存在する原子に結合していてもよく、白丸の結合手が機能性物質(D)結合部側に存在する原子に結合している場合、黒丸の結合手がV側に存在する原子に結合していてもよい。
- [0184] 好ましい実施形態では、 L_A で示される2価の基は、 $-L_1-N(-R_1)-CO-$ であってもよい。ここで、 L_1 は、2価の基を示し、 R_1 は、水素原子、または1価の基を示し、 L_1 の左側に存在するハイフン、およびCOの右側に存在するハイフンは結合手を示す。好ましくは、 L_1 の結合手は、I gと結合しており、COの結合手は、環Aに隣接する炭素原子と結合している。
- [0185] 別の好ましい実施形態では、 L_B で示される2価の基は、 $-L_2-N(-R_2)-CO-$ であってもよい。ここで、 L_2 は、2価の基を示し、 R_2 は、水素原子、または1価の基を示し、 L_2 の左側に存在するハイフン、およびCOの右側に存在するハイフンは結合手を示す。好ましくは、 L_2 の結合手は、機能性物質(D)と結合しており、COの結合手は、Vと結合している。
- [0186] 特定の実施形態では、 L_1 、および L_2 で示される2価の基は、それぞれ、互いに反応可能な2つの生体直交性官能基の反応により生成する部分を含んでいてもよい。 L_1 、および L_2 で示される2価の基が含んでいてもよい、互いに反応可能な2つの生体直交性官能基の反応により生成する部分は、 L_A 、および L_B で示される2価の基が含んでいてもよい、上述したような互いに反応可能な2つの生体直交性官能基の反応により生成する部分と同様である。
- [0187] R_1 、および R_2 は、それぞれ独立して、水素原子、または1価の基を示す。1価の基は、上述したとおりである。 R_1 、および R_2 における1価の基は、置換基を有していてもよい1価の炭化水素基が好ましく、置換基を有していてもよいアルキルがより好ましく、アルキルがさらにより好ましい。アルキルとしては、上述したものが好ましい。
- [0188] 特定の実施形態では、 R_1 、および R_2 で示される1価の基は、アミノ基の保護基であってもよい。このような保護基としては、例えば、アルキルカルボニル基(アシル基)(例、アセチル基、プロポキシ基、tert-ブトキ

シカルボニル基等のブトキシカルボニル基)、アルキルオキシカルボニル基(例、フルオレニルメトキシカルボニル基)、アリールオキシカルボニル基、アリールアルキル(アラルキル)オキシカルボニル基(例、ベンジルオキシカルボニル基)が挙げられる。

[0189] 好ましい実施形態では、 R_1 、および R_2 は、それぞれ独立して、水素原子、またはアミノ基の保護基を示す。好ましくは、 R_1 、および R_2 は、それぞれ、水素原子であってもよい。

[0190] Dで示される機能性物質は、上述したとおりである。

[0191] n は、2個の重鎖および2個の軽鎖を含むイムノグロブリン単位あたりの上記結合の平均数を示し、1.5以上である。

[0192] 一実施形態では、1g中の特定アミノ酸残基の側鎖中の官能基がリジン残基の側鎖中のアミノ基である場合、このような平均数は、1.6以上、好ましくは1.7以上、より好ましくは1.8以上、さらにより好ましくは1.9以上であってもよい。このような平均数はまた、2.4以下、好ましくは2.3以下、より好ましくは2.2以下、さらにより好ましくは2.1以下であってもよい。特に好ましくは、このような平均数は、2.0であってもよい。

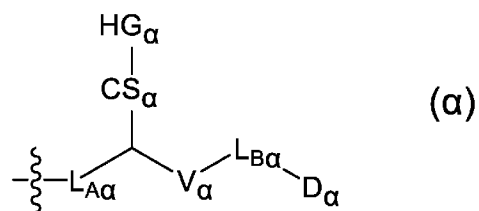
[0193] 別の実施形態では、1g中の特定アミノ酸残基の側鎖中の官能基がシステイン残基の側鎖中のチオール基である場合、このような平均数は、例えば2.0以上、好ましくは4.0以上、より好ましくは6.0以上、さらにより好ましくは7.0以上、特に好ましくは7.5以上、または7.8以上であってもよい。このような平均数はまた、8.0以下であってもよい。より具体的には、このような平均数は、好ましくは2.0~8.0、より好ましくは4.0~8.0、さらにより好ましくは6.0~8.0、特に好ましくは7.0~8.0、7.5~8.0、7.8~8.0、または8.0であってもよい。

[0194] 特定の実施形態では、 L_A は、親水性基または機能性物質を含む側鎖を有する2価の基であってもよい。親水性基または機能性物質を含む側鎖は、親水

性基および機能性物質を含む側鎖であってもよい。親水性基および機能性物質を含む側鎖は、(i) 親水性基、および (i i) 機能性物質、ならびに (i i i) 親水性基と機能性物質との間に切断性部位を含む側鎖であってもよい。2 価の基に含まれるこのような側鎖の数は、特に限定されず、例えば、1 ~ 4 個、1 ~ 3 個、1 個もしくは 2 個、または 1 個であってもよい。

[0195] 特定の実施形態では、(i) 親水性基、および (i i) 機能性物質、ならびに (i i i) 親水性基と機能性物質との間に切断性部位を含む側鎖は、下記式 (α) :

[化31]



[式中、

波線の付されたハイフン (—) は、式 (1) における I_g と炭素原子とを連結する L_A 中の主鎖への結合手を示し、

HG_{α} は、親水性基、または親水性基を含む 1 価の基を示し、

CS_{α} は、切断性部位を含む 2 価の基を示し、

V_{α} は、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基 (NH) を示し、

$\text{L}_{\text{A}\alpha}$ 、および $\text{L}_{\text{B}\alpha}$ は、それぞれ独立して、2 価の基を示し、

D_{α} は、機能性物質を示す。] により表されるものであってもよい。

[0196] HG_{α} は、親水性基、または親水性基を含む 1 価の基を示す。親水性基、および 1 価の基は、上述したとおりである。 HG_{α} により示される親水性基、または親水性基を含む 1 価の基は、HG により示される親水性基、または親水性基を含む 1 価の基と同じであっても異なってもよい。

[0197] CS_{α} は、切断性部位を含む 2 価の基を示す。切断性部位および 2 価の基は、上述のとおりである。 CS_{α} により示される切断性部位を含む 2 価の基は、CS により示される切断性部位を含む 2 価の基と同じであっても異なってもよい。

てもよい。

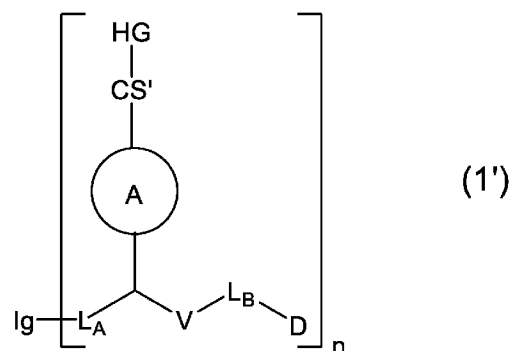
[0198] V_{α} は、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基（NH）を示す。 V_{α} の種類は、 V の種類と同じであっても異なってもよい。したがって、 V が酸素原子である場合、 V_{α} は、硫黄原子、またはアミノ基（NH）であってもよい。 V_{α} は、好ましくは、酸素原子または硫黄原子であり、より好ましくは、酸素原子である。

[0199] $L_{A\alpha}$ で示される2価の基は、 Ig と炭素原子とを連結する L_A 中の主鎖への結合手を有する2価の基である。 $L_{A\alpha}$ で示される2価の基は、 L_A で示される2価の基と同じであっても異なってもよい。 $L_{B\alpha}$ で示される2価の基は、 D_{α} および V_{α} を連結できる2価の基である。 $L_{B\alpha}$ で示される2価の基は、 L_B で示される2価の基と同じであっても異なってもよい。したがって、特定の実施形態では、 $L_{A\alpha}$ 、および $L_{B\alpha}$ で示される2価の基は、それぞれ、 L_A 、および L_B で示される2価の基と同様に、互いに反応可能な2つの生体直交性官能基の反応により生成する部分を含んでもよい。

[0200] D_{α} は、機能性物質を示す。機能性物質は、上述したとおりである。 D_{α} により示される機能性物質は、 D により示される機能性物質と同じであっても異なってもよい。

[0201] 本発明はまた、下記式（1'）：

[化32]



〔式中、

Ig は、2個の重鎖および2個の軽鎖を含むイムノグロブリン単位を示し、かつ、 Ig 中の特定アミノ酸残基の側鎖中の官能基を介して、 Ig に隣接

する L_A と結合しており、

HGは、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

CS'は、切断性部位を含む2価の基を示し、

環Aは、置換基を有していてもよい2価の芳香族環基（ここで、2価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

Vは、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基（NH）を示し、

L_A 、および L_B は、それぞれ独立して、2価の基を示し、

Dは、機能性物質を示し、

前記イムノグロブリン単位あたりの前記結合の平均数 n は、1.5以上である。〕で表される構造単位を含む、抗体および機能性物質のコンジュゲートまたはその塩を提供する。

[0202] 式(1')における I_g 、HG、V、 L_A 、 L_B 、D、および n は、それぞれ、式(1)で示されるものと同じである。

[0203] CS'は、切断性部位を含む2価の基を示す。切断性部位および2価の基は、上述のとおりである。

[0204] 環Aは、置換基を有していてもよい2価の芳香族環基（ここで、2価の芳香族環基は、上記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示す。2価の芳香族環基は、上述したアリーレンまたは2価の芳香族複素環である。2つの隣接原子（炭素原子およびCS'中の隣接原子）が結合している2価の芳香族環基の位置は、切断性部位が切断される場合、 π 電子の共役によりVとそれに隣接する炭素原子との間で開裂が生じる限り、特に限定されない（図1を参照）。このような位置は、当該分野における技術常識であり、切断性部位および2価の芳香族環基の種類等の因子に応じて、当業者であれば容易に決定することができる。

[0205] 好ましくは、環Aは、置換基を有していてもよい2価の単環式芳香族環基であってもよい。2価の芳香族環基は、フェニレン基、または2価の単環式芳香族複素環基である。

[0206] より好ましくは、環Aは、2価の6員環式芳香族環基であってもよい。6

員環式芳香族環基としては、例えば、上述した種々の基が挙げられる。この場合、2つの隣接原子が結合している2価の6員環式芳香族環基の位置は、オルト位、またはパラ位であり、好ましくはパラ位である。

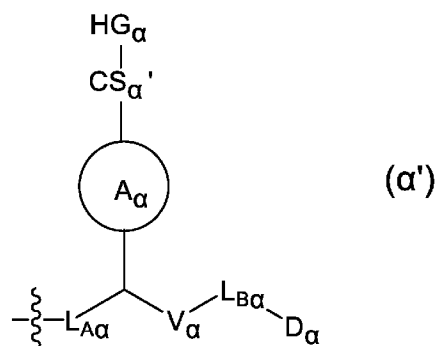
[0207] さらに好ましくは、環Aは、置換基を有していてもよいフェニレン基であってもよい。この場合、2つの隣接原子が結合しているフェニレン基の位置は、オルト位、またはパラ位であり、好ましくはパラ位である。

[0208] 置換基を有していてもよい2価の芳香族環基における置換基は、上述したとおりである。このような置換基は、上述したような電子吸引基であってもよい。

[0209] 特定の実施形態では、 L_A は、親水性基または機能性物質を含む側鎖を有する2価の基であってもよい。親水性基または機能性物質を含む側鎖は、親水性基および機能性物質を含む側鎖であってもよい。親水性基および機能性物質を含む側鎖は、(i) 親水性基、および(ii) 機能性物質、ならびに(iii) 親水性基と機能性物質との間に切断性部位を含む側鎖であってもよい。2価の基に含まれるこのような側鎖の数は、特に限定されず、例えば、1～4個、1～3個、1個もしくは2個、または1個であってもよい。

[0210] 特定の実施形態では、(i) 親水性基、および(ii) 機能性物質、ならびに(iii) 親水性基と機能性物質との間に切断性部位を含む側鎖は、下記式(α')：

[化33]



[式中、

波線の付されたハイフン(—)は、式(1')におけるlgと炭素原子と

を連結する L_A 中の主鎖への結合手を示し、

HG_α は、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

CS'_α は、切断性部位を含む2価の基を示し、

環 A_α は、置換基を有していてもよい2価の芳香族環基（ここで、2価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

V_α は、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基（NH）を示し、

$L_{A\alpha}$ 、および $L_{B\alpha}$ は、それぞれ独立して、2価の基を示し、

D_α は、機能性物質を示す。）により表されるものであってもよい。

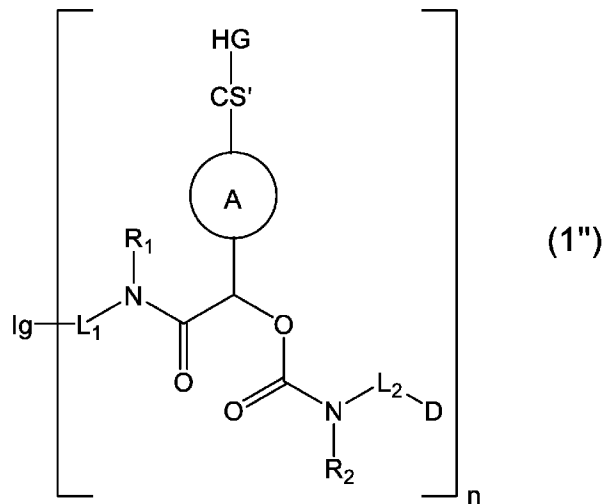
[0211] 式（ α' ）における HG_α 、 V_α 、 $L_{A\alpha}$ 、 $L_{B\alpha}$ 、および D_α は、それぞれ、式（ α ）で示されるものと同じである。

[0212] CS'_α は、切断性部位を含む2価の基を示す。切断性部位および2価の基は、上述のとおりである。 CS'_α により示される切断性部位を含む2価の基は、 CS' により示される切断性部位を含む2価の基と同じであっても異なってもよい。

[0213] 環 A_α は、置換基を有していてもよい2価の芳香族環基（ここで、2価の芳香族環基は、上記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示す。置換基を有していてもよい2価の芳香族環基は、上述のとおりである。環 A_α により示される置換基を有していてもよい2価の芳香族環基は、環 A により示される置換基を有していてもよい2価の芳香族環基と同じであっても異なってもよい。

[0214] 本発明はまた、下記式（1'）：

[化34]



〔式中、

l g は、2 個の重鎖および 2 個の軽鎖を含むイムノグロブリン単位を示し、かつ、l g 中の特定アミノ酸残基の側鎖中の官能基を介して、l g に隣接する L_A と結合しており、

HG は、親水性基、または親水性基を含む 1 価の基を示し、

CS' は、切断性部位を含む 2 価の基を示し、

環 A は、置換基を有していてもよい 2 価の芳香族環基（ここで、2 価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

R₁、および R₂ は、それぞれ独立して、水素原子、または 1 価の基を示し、

L₁、および L₂ は、それぞれ独立して、2 価の基を示し、

D は、機能性物質を示し、

前記イムノグロブリン単位あたりの前記結合の平均数 n は、1.5 以上である。〕で表される構造単位を含む、抗体および機能性物質のコンジュゲートまたはその塩を提供する。

[0215] 式 (1'') における l g、HG、D、および n は、それぞれ、式 (1) で示されるものと同じである。式 (1'') における CS'、および環 A は、それぞれ、式 (1') で示されるものと同じである。

[0216] R₁、および R₂ は、それぞれ独立して、水素原子、または 1 価の基を示す

。1価の基は、上述したとおりである。R₁、およびR₂における1価の基は、置換基を有していてもよい1価の炭化水素基が好ましく、置換基を有していてもよいアルキルがより好ましく、アルキルがさらにより好ましい。アルキルとしては、上述したものが好ましい。

[0217] 特定の実施形態では、R₁、およびR₂で示される1価の基は、アミノ基の保護基であってもよい。このような保護基としては、例えば、アルキルカルボニル基（アシル基）（例、アセチル基、プロポキシ基、tert-ブトキシカルボニル基等のブトキシカルボニル基）、アルキルオキシカルボニル基（例、フルオレニルメトキシカルボニル基）、アリールオキシカルボニル基、アリールアルキル（アラルキル）オキシカルボニル基（例、ベンジルオキシカルボニル基）が挙げられる。

[0218] 好ましい実施形態では、R₁、およびR₂は、それぞれ独立して、水素原子、またはアミノ基の保護基を示す。好ましくは、R₁、およびR₂は、それぞれ、水素原子であってもよい。

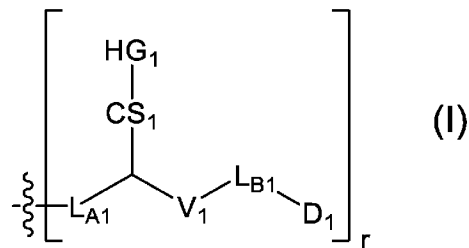
[0219] L₁で示される2価の基は、I_gおよび窒素原子を連結できる2価の基である。L₂で示される2価の基は、Dおよび窒素原子を連結できる2価の基である。L₁、およびL₂で示される2価の基は、それぞれ、互いに反応可能な2つの生体直交性官能基の反応により生成する部分を含んでいてもよい。L₁、およびL₂で示される2価の基が含んでいてもよい、互いに反応可能な2つの生体直交性官能基の反応により生成する部分は、L_A、およびL_Bで示される2価の基が含んでいてもよい、上述したような互いに反応可能な2つの生体直交性官能基の反応により生成する部分と同様である。

[0220] 特定の実施形態では、抗体および機能性物質のコンジュゲートまたはその塩は、抗体のリジン残基が修飾されたものであってもよい。したがって、上記特定アミノ酸残基の側鎖中の官能基は、リジン残基の側鎖中のアミノ基であり、かつ、nが、1.5～2.5であってもよい。この場合、上記式（1）、（1'）および（1''）において、L_Aがカルボニル基を有し、上記結合が、リジン残基の側鎖中のアミノ基、およびL_A中のカルボニル基の結合に

よるアミド結合により達成されることが好ましい。修飾されるリジン残基は、Eu numberingに従う246/248位、288/290位、または317位に存在するリジン残基であり、好ましくは、Eu numberingに従う246/248位、または288/290位に存在するリジン残基である。

[0221] 抗体および機能性物質のコンジュゲートまたはその塩において、抗体のリジン残基が修飾されたものである場合、上記式(1)で表される構造単位は、下記式(I)：

[化35]



[式中、

波線付きのハイフン(—)は、Eu numberingに従う246/248位、288/290位、または317位に存在するリジン残基(ここで、当該リジン残基は、式(1)における L_A が結合しているアミノ基を有するリジン残基とは異なる)の側鎖中のアミノ基と結合しており、

HG_1 は、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

CS_1 は、切断性部位を含む2価の基を示し、

V_1 は、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基(NH)を示し、

L_{A1} 、および L_{B1} は、それぞれ独立して、2価の基を示し、

D_1 は、機能性物質を示し、

前記イムノグロブリン単位あたりの前記結合の平均数 r は、1.5～2.5である。]で表される修飾部分をさらに含んでもよい。

[0222] 式(I)において、波線付きのハイフン(—)は、Eu numberingに従う246/248位、288/290位、または317位に存在するリジン残基(ここで、当該リジン残基は、式(1)における L_A が結合して

いるアミノ基を有するリジン残基とは異なる)の側鎖中のアミノ基と結合している。好ましくは、波線付きのハイフン(—)は、E u n u m b e r i n gに従う246/248位、または288/290位に存在するリジン残基(ここで、当該リジン残基は、式(1)における L_A が結合しているアミノ基を有するリジン残基とは異なる)の側鎖中のアミノ基と結合している。

[0223] HG_1 は、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示す。親水性基、または親水性基を含む1価の基は、上述のとおりである。 HG_1 により示される、親水性基、または親水性基を含む1価の基は、上記式(1)における HG により示される、親水性基、または親水性基を含む1価の基と同じであっても異なってもよい。

[0224] CS_1 は、切断性部位を含む2価の基を示す。切断性部位を含む2価の基は、上述のとおりである。 CS_1 により示される、切断性部位を含む2価の基は、上記式(1)における CS により示される、切断性部位を含む2価の基と同じであっても異なってもよい。

[0225] V_1 は、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基(NH)を示す。 V_1 の種類は、 V の種類と同じであっても異なってもよい。したがって、 V が酸素原子である場合、 V_1 は、硫黄原子、またはアミノ基(NH)であってもよい。 V_1 は、好ましくは、酸素原子または硫黄原子であり、より好ましくは、酸素原子である。

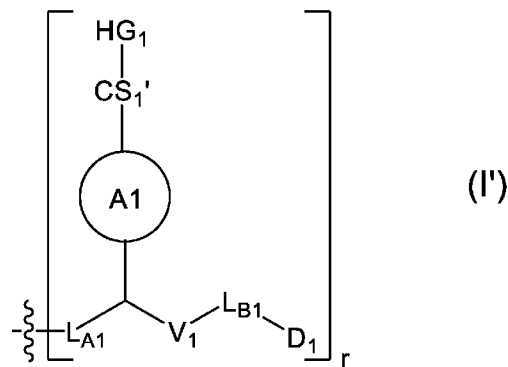
[0226] L_{A1} 、および L_{B1} は、それぞれ独立して、2価の基を示す。 L_{A1} 、および L_{B1} で示される2価の基は、それぞれ、 L_A 、および L_B で示される2価の基と同じであっても異なってもよい。したがって、特定の実施形態では、 L_{A1} 、および L_{B1} で示される2価の基は、それぞれ、 L_A 、および L_B で示される2価の基と同様に、互いに反応可能な2つの生体直交性官能基の反応により生成する部分を含んでもよい。

[0227] D_1 は、機能性物質を示す。機能性物質は、上述のとおりである。 D_1 により示される機能性物質は、上記式(1)における D により示される機能性物質と同じであっても異なってもよい。

[0228] 上記イムノグロブリン単位あたりの前記結合の平均数 r は、2 個の重鎖および 2 個の軽鎖を含むイムノグロブリン単位あたりの上記結合の平均数を示し、1.5 ～ 2.5 である。このような平均数は、1.6 以上、1.7 以上、1.8 以上、または 1.9 以上であってもよい。このような平均数はまた、2.4 以下、2.3 以下、2.2 以下、または 2.1 以下であってもよい。特に好ましくは、このような平均数は、2.0 であってもよい。

[0229] 抗体および機能性物質のコンジュゲートまたはその塩において、抗体のリジン残基が修飾されたものである場合、上記式 (1') で表される構造単位は、下記式 (I') :

[化36]



[式中、

波線付きのハイフン (—) は、Eu numbering に従う 246 / 248 位、288 / 290 位、または 317 位に存在するリジン残基（ここで、当該リジン残基は、式 (1) における L_A が結合しているアミノ基を有するリジン残基とは異なる）の側鎖中のアミノ基と結合しており、

HG_1 は、親水性基、または親水性基を含む 1 価の基を示し、

CS_1' は、切断性部位を含む 2 価の基を示し、

環 A_1 は、置換基を有していてもよい 2 価の芳香族環基（ここで、2 価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

V_1 は、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基 (NH) を示し、

L_{A1} 、および L_{B1} は、それぞれ独立して、2 価の基を示し、

D_1 は、機能性物質を示し、

前記イムノグロブリン単位あたりの前記結合の平均数 r は、 $1.5 \sim 2.5$ である。〕で表される修飾部分をさらに含んでもよい。

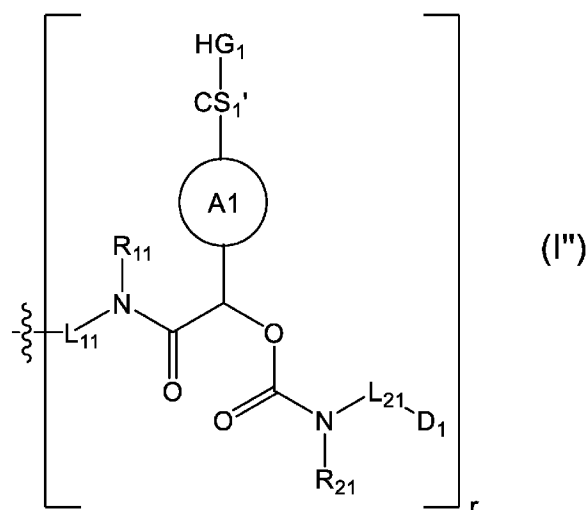
[0230] 式 (I') における波線付きのハイフン (—)、 HG_1 、 V_1 、 L_{A1} 、 L_{B1} 、 D_1 、および r は、それぞれ、式 (I) で示されるものと同じである。

[0231] CS_1' は、切断性部位を含む 2 価の基を示す。切断性部位および 2 価の基は、上述のとおりである。 D_1 により示される機能性物質は、上記式 (I') における D により示される機能性物質と同じであっても異なってもよい。

[0232] 環 $A1$ は、置換基を有していてもよい 2 価の芳香族環基（ここで、2 価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示す。置換基を有していてもよい 2 価の芳香族環基は、上述のとおりである。環 $A1$ により示される置換基を有していてもよい 2 価の芳香族環基は、上記式 (I') における環 A により示される置換基を有していてもよい 2 価の芳香族環基と同じであっても異なってもよい。

[0233] 抗体および機能性物質のコンジュゲートまたはその塩において、抗体のリジン残基が修飾されたものである場合、上記式 (I'') で表される構造単位は、下記式 (I'') :

[化37]



〔式中、

波線付きのハイフン (—) は、Eu n u m b e r i n g に従う 2 4 6 /

248位、288／290位、または317位に存在するリジン残基（ここで、当該リジン残基は、式（1）における L_A が結合しているアミノ基を有するリジン残基とは異なる）の側鎖中のアミノ基と結合しており、

HG_1 は、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

CS_1' は、切断性部位を含む2価の基を示し、

環A1は、置換基を有していてもよい2価の芳香族環基（ここで、2価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

R_{11} 、および R_{21} は、それぞれ独立して、水素原子、または1価の基を示し、

L_{11} 、および L_{21} は、それぞれ独立して、2価の基を示し、

D_1 は、機能性物質を示し、

前記イムノグロブリン単位あたりの前記結合の平均数 r は、1.5～2.5である。〕で表される修飾部分をさらに含んでもよい。

[0234] 式（1'）における波線付きのハイフン（—）、 HG_1 、 V_1 、 L_{A1} 、 L_{B1} 、 D_1 、および r は、それぞれ、式（1）で示されるものと同じである。式（1'）における CS_1' 、および環A1は、それぞれ、式（1'）で示されるものと同じである。

[0235] R_{11} 、および R_{21} は、それぞれ独立して、水素原子、または1価の基を示す。1価の基は、上述のとおりである。 R_{11} 、および R_{21} により示される水素原子、または1価の基は、上記式（1'）における R_1 、および R_2 により示されるものと同じであっても異なってもよい。

[0236] L_{11} 、および L_{21} は、それぞれ独立して、2価の基を示す。2価の基は、上述のとおりである。 L_{11} 、および L_{21} により示される2価の基は、上記式（1'）における L_1 、および L_2 により示されるものと同じであっても異なってもよい。

[0237] 特定の実施形態では、抗体および機能性物質のコンジュゲートまたはその塩は、抗体のシステイン残基（通常、イムノグロブリン単位は、8個のシステイン残基を含む）が修飾されたものであってもよい。したがって、上記特

定アミノ酸残基の側鎖中の官能基は、システイン残基の側鎖中のチオール基であり、かつ、 n が、2.0～8.0であってもよい。 n は、好ましくは3.0以上、3.5以上、4.0以上、4.5以上、5.0以上、5.5以上、6.0以上、6.5以上、7.0以上、または7.5以上であってもよい。

[0238] 本発明のコンジュゲートまたはその塩は、凝集し難いという所望の性質を有するため、凝集率によって特徴付けすることができる。より具体的には、本発明のコンジュゲートまたはその塩の凝集率は、5%以下であってもよい。本発明によれば、抗体の凝集を回避し易いためである。凝集率は、好ましくは4.8%以下、より好ましくは4.6%以下、さらにより好ましくは4.4%以下、特に好ましくは4.2%以下、4.0%以下、3.8%以下、3.6%以下、3.4%以下、3.2%以下、3.0%以下、2.8%以下、または2.6%以下である。抗体の凝集率は、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）-HPLCにより測定することができる（実施例およびChemistry Select, 2020, 5, 8435-8439を参照）。

[0239] 好ましい実施形態では、本発明のコンジュゲートまたはその塩は、2.6%以下の凝集率であってもよい。凝集率はまた、2.4%以下、2.2%以下、2.0%以下、1.8%以下、1.6%以下、1.4%以下、1.2%以下、1.0%以下、または0.8%以下であってもよい。

[0240] 本発明のコンジュゲートまたはその塩は、例えば、医薬、または試薬（例、診断薬、研究用試薬）として有用である。

[0241] 本発明のコンジュゲートまたはその塩は、医薬組成物の形態において提供されてもよい。このような医薬組成物は、本発明のコンジュゲートまたはその塩に加えて、医薬上許容され得る担体を含んでいてもよい。医薬上許容され得る担体としては、例えば、ショ糖、デンプン、マンニット、ソルビット、乳糖、グルコース、セルロース、タルク、リン酸カルシウム、炭酸カルシウム等の賦形剤、セルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセル

ロース、ポリプロピルピロリドン、ゼラチン、アラビアゴム、ポリエチレングリコール、ショ糖、デンプン等の結合剤、デンプン、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルスターチ、炭酸水素ナトリウム、リン酸カルシウム、クエン酸カルシウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、エアロジル、タルク、ラウリル硫酸ナトリウム等の滑剤、クエン酸、メントール、グリシルリシン・アンモニウム塩、グリシン、オレンジ粉等の芳香剤、安息香酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、メチルパラベン、プロピルパラベン等の保存剤、クエン酸、クエン酸ナトリウム、酢酸等の安定剤、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ステアリン酸アルミニウム等の懸濁剤、界面活性剤等の分散剤、水、生理食塩水、オレンジジュース等の希釈剤、カカオ脂、ポリエチレングリコール、白灯油等のベースワックスなどが挙げられるが、それらに限定されるものではない。本発明のコンジュゲートまたはその塩はまた、安定性を実現する任意の修飾（例、PEG化）を有していてもよい。

[0242] 経口投与に好適な製剤は、水、生理食塩水、オレンジジュースのような希釈液に有効量のリガンドを溶解させた液剤、有効量のリガンドを固体や顆粒として含んでいるカプセル剤、サッシェ剤または錠剤、適当な分散媒中に有効量の有効成分を懸濁させた懸濁液剤、有効量の有効成分を溶解させた溶液を適当な分散媒中に分散させ乳化させた乳剤等である。

[0243] 医薬組成物は、非経口的な投与（例、静脈内注射、皮下注射、筋肉注射、局所注入、腹腔内投与）に好適である。このような非経口的な投与に好適な医薬組成物としては、水性および非水性の等張な無菌の注射液剤があり、これには抗酸化剤、緩衝液、制菌剤、等張化剤等が含まれていてもよい。また、水性および非水性の無菌の懸濁液剤が挙げられ、これには懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定化剤、防腐剤等が含まれていてもよい。

[0244] 医薬組成物の投与量は、有効成分の種類・活性、病気の重篤度、投与対象となる動物種、投与対象の薬物受容性、体重、年齢等によって異なるが、適宜設定することができる。

[0245] 一実施形態では、本発明のコンジュゲートまたはその塩は、生体直交性官能基を有する抗体誘導体またはその塩を、機能性物質と反応させることにより製造することができる（図3）。このような反応は、抗体誘導体中の生体直交性官能基と機能性物質との間の反応により進行させることができる。

[0246] 機能性物質が、生体直交性官能基と反応し易い官能基を有する場合、機能性物質の当該官能基と、抗体誘導体中の生体直交性官能基とを適宜反応させることができる。生体直交性官能基と反応し易い官能基は、生体直交性官能基の具体的な種類によっても異なり得る。当業者であれば、適切な官能基を、生体直交性官能基と反応し易い官能基として適宜選択することができる（例、Boutureira et al., Chem. Rev., 2015, 115, 2174–2195）。生体直交性官能基と反応し易い官能基としては、例えば、生体直交性官能基がアジド残基の場合はアルキン残基が挙げられ、生体直交性官能基がチオール残基の場合はマレイミド残基およびジスルフィド残基が挙げられ、生体直交性官能基がアルデヒド残基またはケトン残基の場合はヒドラジン残基が挙げられ、生体直交性官能基がノルボルネン残基の場合はアジド残基が挙げられ、生体直交性官能基がテトラジン残基の場合はアルキン残基が挙げられるが、これらに限定されない。勿論、生体直交性官能基およびそれと反応し易い官能基の上記組み合わせでは、組み合わせを入れ代えることも可能である。したがって、上記組み合わせにおける最初の例を入れ替えた場合には、生体直交性官能基としてアルキン残基、および生体直交性官能基と反応し易い官能基としてアジド残基の組み合わせを用いることができる。

[0247] 機能性物質が、抗体誘導体中の生体直交性官能基と反応し易い官能基を有しない場合、薬物は、このような官能基を有するように誘導体化されてもよい。誘導体化は、当該分野における技術常識である（例、国際公開第2004/010957号、米国特許出願公開第2006/0074008号明細書、米国特許出願公開第2005/0238649号明細書）。例えば、誘導体化は、任意の架橋剤を用いて行われてもよい。あるいは、誘導体化は、

所望の官能基を有する特定のリンカーを用いて行われてもよい。本発明では、誘導体化された機能性物質も、機能性物質の一種にすぎないことから、単に「機能性物質」と呼称される。

[0248] 上記反応は、タンパク質の変性・分解（例、アミド結合の切断）を引き起こし得ない条件（温和な条件）下で適宜行うことができる。例えば、このような反応は、適切な反応系、例えば緩衝液中において、室温（例、約15～30℃）で行うことができる。緩衝液のpHは、例えば5～9であり、好ましくは5.5～8.5であり、より好ましくは6.0～8.0である。緩衝液は、適切な触媒を含んでいてもよい。反応時間は、例えば1分～20時間、好ましくは10分～15時間、より好ましくは20分～10時間、さらにより好ましくは30分～8時間である。このような反応の詳細については、例えば、G. J. L. Bernardes et al., Chem. Rev., 115, 2174 (2015); G. J. L. Bernardes et al., Chem. Asian. J., 4, 630 (2009); B. G. Davies et al., Nat. Commun., 5, 4740 (2014); A. Wagner et al., Bioconjugate Chem., 25, 825 (2014)を参照のこと。

[0249] 別の実施形態では、本発明のコンジュゲートまたはその塩は、生体直交性官能基および機能性物質を有する化合物またはその塩を、Ig（イムノグロブリン単位）を有する原料抗体と反応させることにより製造することができる（図3）。抗体および機能性物質のコンジュゲートまたはその塩が抗体のリジン残基が修飾されたものである場合、原料抗体として、Ig（イムノグロブリン単位）を有する抗体を使用することができる。抗体および機能性物質のコンジュゲートまたはその塩が抗体のシステイン残基が修飾されたものである場合、原料抗体として、2個の重鎖と2個の軽鎖から構成されるイムノグロブリン単位（4個のジスルフィド結合を含む）を含む抗体を、還元剤と接触させて、チオール基を含む抗体を生成することにより、調製することができる。還元剤としては、ジスルフィド結合を開裂させてチオール基を生

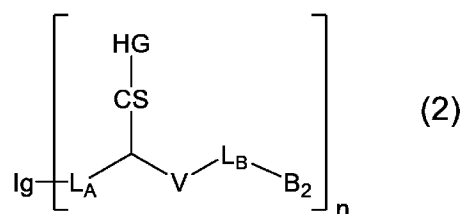
成できる任意の還元剤を使用することができ、例えば、トリカルボキシルエチルホスフィン（TCEP）、システイン、ジチオトレイトール、還元型グルタチオン、 β -メルカプトエタノールが挙げられる。本実施形態では、化合物が有する生体直交性官能基は、チオール基と効率良く反応できる基（例、マレイミド残基、ハロカルボニル基、チオール基）が好ましい。生体直交性官能基および機能性物質を有する化合物またはその塩と上記原料抗体との反応は、タンパク質の変性・分解（例、アミド結合の切断）を引き起こし得ない上述の条件（温和な条件）下で適宜行うことができる。

[0250] コンジュゲートまたはその塩の生成の確認は、その具体的な原料および生成物の分子量にもよるが、例えば、還元条件下の逆相HPLC、または質量分析により行うことができる。コンジュゲートまたはその塩は、クロマトグラフィー（例、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、逆相カラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー）等の任意の精製方法により適宜精製することができる。

[0251] 3. 抗体誘導体またはその塩

本発明はまた、下記式（2）：

[化38]



〔式中、

I g は、2 個の重鎖および 2 個の軽鎖を含むイムノグロブリン単位を示し、かつ、I g 中の特定アミノ酸残基の側鎖中の官能基を介して、I g に隣接する L_A と結合しており、

H G は、親水性基、または親水性基を含む 1 価の基を示し、

C S は、切断性部位を含む 2 価の基を示し、

Vは、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基（NH）を示し、

L_A、およびL_Bは、それぞれ独立して、2価の基を示し、

B₂は、生体直交性官能基を示し、

前記イムノグロブリン単位あたりの前記結合の平均数nは、1.5以上である。〕で表される構造単位を含む、生体直交性官能基を有する抗体誘導体またはその塩を提供する。

[0252] 式（2）において、I_g、H_G、C_S、V、L_A、L_B、およびnは、それぞれ、式（1）で示されるものと同じである。したがって、これらの要素および当該要素に関連する他の要素の定義、例および好ましい例は、上述したものと同一である。

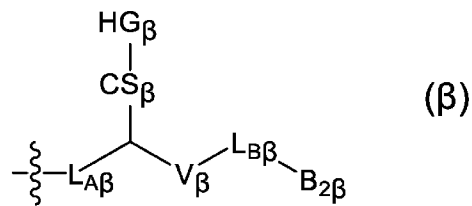
[0253] B₂で示される生体直交性官能基は、上述したとおりである。

[0254] 特定の実施形態では、B₂で示される生体直交性官能基は、マレイミド残基、チオール残基、フラン残基、ハロカルボニル残基、アルケン残基、アルキン残基、アジド残基、またはテトラジン残基であってもよい。あるいは、B₂で示される生体直交性官能基は、マレイミド残基、チオール残基、フラン残基、ハロカルボニル残基、アルケン残基、アルキン残基、アジド残基、またはテトラジン残基であってもよい。これらの生体直交性官能基は、反応効率に優れ、汎用性が高いため好ましい。

[0255] 特定の実施形態では、L_Aは、親水性基または機能性物質を含む側鎖を有する2価の基であってもよい。親水性基または機能性物質を含む側鎖は、親水性基および機能性物質を含む側鎖であってもよい。親水性基および機能性物質を含む側鎖は、（i）親水性基、および（i i）機能性物質、ならびに（i i i）親水性基と機能性物質との間に切断性部位を含む側鎖であってもよい。2価の基に含まれるこのような側鎖の数は、特に限定されず、例えば、1～4個、1～3個、1個もしくは2個、または1個であってもよい。

[0256] 特定の実施形態では、（i）親水性基、および（i i）機能性物質、ならびに（i i i）親水性基と機能性物質との間に切断性部位を含む側鎖は、下記式（β）：

[化39]



〔式中、

波線の付されたハイフン（—）は、式（1）における I g と炭素原子とを連結する L_A 中の主鎖への結合手を示し、

HG_{β} は、親水性基、または親水性基を含む 1 価の基を示し、

CS_{β} は、切断性部位を含む 2 価の基を示し、

V_{β} は、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基（NH）を示し、

$\text{L}_{A\beta}$ 、および $\text{L}_{B\beta}$ は、それぞれ独立して、2 価の基を示し、

$\text{B}_{2\beta}$ は、生体直交性官能基を示す。〕により表されるものであってもよい。

[0257] HG_{β} は、親水性基、または親水性基を含む 1 価の基を示す。親水性基、および 1 価の基は、上述したとおりである。 HG_{β} により示される親水性基、または親水性基を含む 1 価の基は、HG により示される親水性基、または親水性基を含む 1 価の基と同じであっても異なってもよい。

[0258] CS_{β} は、切断性部位を含む 2 価の基を示す。切断性部位および 2 価の基は、上述のとおりである。 CS_{β} により示される切断性部位を含む 2 価の基は、CS により示される切断性部位を含む 2 価の基と同じであっても異なってもよい。

[0259] V_{β} は、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基（NH）を示す。 V_{β} の種類は、V の種類と同じであっても異なってもよい。したがって、V が酸素原子である場合、 V_{β} は、硫黄原子、またはアミノ基（NH）であってもよい。 V_{β} は、好ましくは、酸素原子または硫黄原子であり、より好ましくは、酸素原子である。

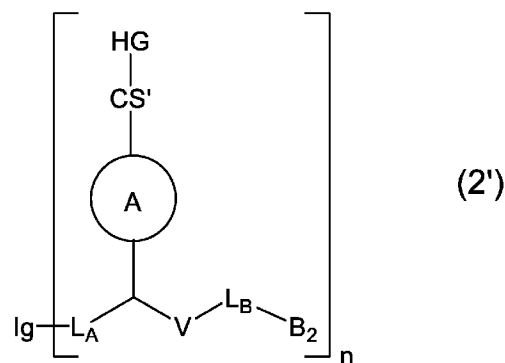
[0260] $\text{L}_{A\beta}$ で示される 2 価の基は、 I g と炭素原子とを連結する L_A 中の主鎖への

結合手を有する2価の基である。 $L_{A\beta}$ で示される2価の基は、 L_A で示される2価の基と同じであっても異なってもよい。 $L_{B\beta}$ で示される2価の基は、 D_β および V_β を連結できる2価の基である。 $L_{B\beta}$ で示される2価の基は、 L_B で示される2価の基と同じであっても異なってもよい。したがって、特定の実施形態では、 $L_{A\beta}$ 、および $L_{B\alpha}$ で示される2価の基は、それぞれ、 L_A 、および L_B で示される2価の基と同様に、互いに反応可能な2つの生体直交性官能基の反応により生成する部分を含んでもよい。

[0261] $B_{2\beta}$ は、機能性物質を示す。機能性物質は、上述したとおりである。 D_β により示される機能性物質は、 D により示される機能性物質と同じであっても異なってもよい。

[0262] 本発明はまた、下記式(2')：

[化40]



[式中、

lg は、2個の重鎖および2個の軽鎖を含むイムノグロブリン単位を示し、かつ、 lg 中の特定アミノ酸残基の側鎖中の官能基を介して、 lg に隣接する L_A と結合しており、

HG は、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

CS' は、切断性部位を含む2価の基を示し、

環 A は、置換基を有していてもよい2価の芳香族環基（ここで、2価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

V は、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基(NH)を示し、

L_A 、および L_B は、それぞれ独立して、2価の基を示し、

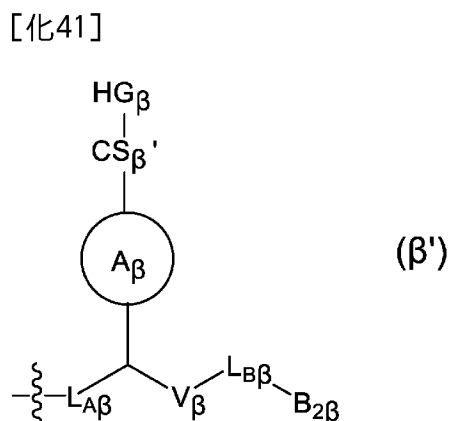
B_2 は、生体直交性官能基を示し、

前記イムノグロブリン単位あたりの前記結合の平均数 n は、1.5 以上である。〕で表される構造単位を含む、生体直交性官能基を有する抗体誘導体またはその塩を提供する。

[0263] 式(2')における I_g 、 HG 、 V 、 L_A 、 L_B 、 B_2 、および n は、それぞれ、式(1)で示されるものと同じである。式(2')における CS' 、および環 A は、それぞれ、式(1')で示されるものと同じである。したがって、これらの要素および当該要素に関連する他の要素の定義、例および好ましい例は、上述したものと同じである。

[0264] 特定の実施形態では、 L_A は、親水性基または機能性物質を含む側鎖を有する2価の基であってもよい。親水性基または機能性物質を含む側鎖は、親水性基および機能性物質を含む側鎖であってもよい。親水性基および機能性物質を含む側鎖は、(i) 親水性基、および(ii) 機能性物質、ならびに(iii) 親水性基と機能性物質との間に切断性部位を含む側鎖であってもよい。2価の基に含まれるこのような側鎖の数は、特に限定されず、例えば、1~4個、1~3個、1個もしくは2個、または1個であってもよい。

[0265] 特定の実施形態では、(i) 親水性基、および(ii) 機能性物質、ならびに(iii) 親水性基と機能性物質との間に切断性部位を含む側鎖は、下記式(β')：



〔式中、

波線の付されたハイフン(—)は、式(1')における I_g と炭素原子と

を連結する L_A 中の主鎖への結合手を示し、

HG_β は、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

CS'_β は、切断性部位を含む2価の基を示し、

環 A_β は、置換基を有していてもよい2価の芳香族環基（ここで、2価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

V_β は、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基（NH）を示し、

$L_{A\beta}$ 、および $L_{B\beta}$ は、それぞれ独立して、2価の基を示し、

$B_{2\beta}$ は、生体直交性官能基を示す。）により表されるものであってもよい。

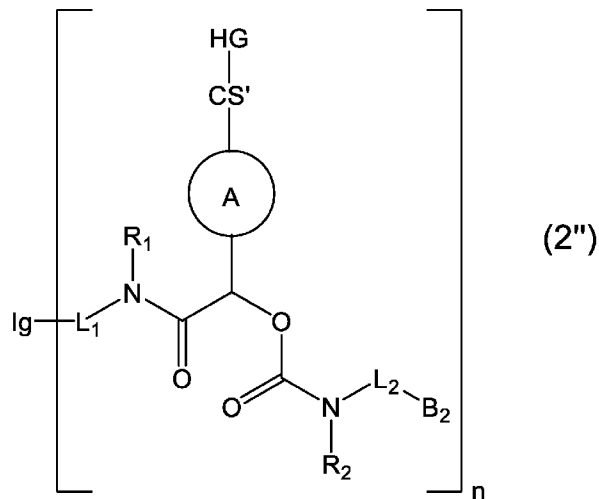
[0266] 式（ β' ）における HG_β 、 V_β 、 $L_{A\beta}$ 、 $L_{B\beta}$ 、および $B_{2\beta}$ は、それぞれ、式（ β ）で示されるものと同じである。

[0267] CS'_β は、切断性部位を含む2価の基を示す。切断性部位および2価の基は、上述のとおりである。 CS'_β により示される切断性部位を含む2価の基は、 CS' により示される切断性部位を含む2価の基と同じであっても異なってもよい。

[0268] 環 A_β は、置換基を有していてもよい2価の芳香族環基（ここで、2価の芳香族環基は、上記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示す。置換基を有していてもよい2価の芳香族環基は、上述のとおりである。環 A_β により示される置換基を有していてもよい2価の芳香族環基は、環Aにより示される置換基を有していてもよい2価の芳香族環基と同じであっても異なってもよい。

[0269] 本発明はまた、下記式（2'）：

[化42]



〔式中、

l g は、2 個の重鎖および 2 個の軽鎖を含むイムノグロブリン単位を示し、かつ、l g 中の特定アミノ酸残基の側鎖中の官能基を介して、l g に隣接する L_A と結合しており、

HG は、親水性基、または親水性基を含む 1 価の基を示し、

CS' は、切断性部位を含む 2 価の基を示し、

環 A は、置換基を有していてもよい 2 価の芳香族環基（ここで、2 価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

R₁、および R₂ は、それぞれ独立して、水素原子、または 1 価の基を示し、

L₁、および L₂ は、それぞれ独立して、2 価の基を示し、

B₂ は、生体直交性官能基を示し、

前記イムノグロブリン単位あたりの前記結合の平均数 n は、1.5 以上である。〕で表される構造単位を含む、生体直交性官能基を有する抗体誘導体またはその塩を提供する。

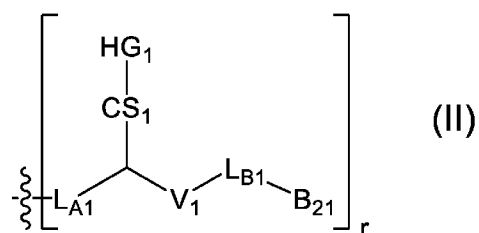
[0270] 式 (2'') における l g、HG、B₂、および n は、それぞれ、式 (1) で示されるものと同じである。式 (2'') における CS'、および環 A は、それぞれ、式 (1') で示されるものと同じである。式 (2'') における R₁、R₂、L₁、および L₂ は、それぞれ、式 (1'') で示されるものと

同じである。したがって、これらの要素および当該要素に関連する他の要素の定義、例および好ましい例は、上述したものと同一である。

[0271] 特定の実施形態では、抗体誘導体またはその塩は、抗体のリジン残基が修飾されたものであってもよい。したがって、上記特定アミノ酸残基の側鎖中の官能基は、リジン残基の側鎖中のアミノ基であり、かつ、 n が、1、5～2、5であってもよい。この場合、上記式(2)、(2')および(2'')において、 L_A がカルボニル基を有し、上記結合が、リジン残基の側鎖中のアミノ基、および L_A 中のカルボニル基の結合によるアミド結合により達成されることが好ましい。修飾されるリジン残基は、Eu numberingに従う246/248位、288/290位、または317位に存在するリジン残基であり、好ましくは、Eu numberingに従う246/248位、または288/290位に存在するリジン残基である。

[0272] 抗体誘導体またはその塩において、抗体のリジン残基が修飾されたものである場合、上記式(2)で表される構造単位は、下記式(II)：

[化43]



〔式中、

波線付きのハイフン(—)は、Eu numberingに従う246/248位、288/290位、または317位に存在するリジン残基（ここで、当該リジン残基は、式(1)における L_A が結合しているアミノ基を有するリジン残基とは異なる）の側鎖中のアミノ基と結合しており、

HG_1 は、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

CS_1 は、切断性部位を含む2価の基を示し、

V_1 は、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基(NH)を示し、

L_{A1} 、および L_{B1} は、それぞれ独立して、2価の基を示し、

B_{21} は、生体直交性官能基を示し、

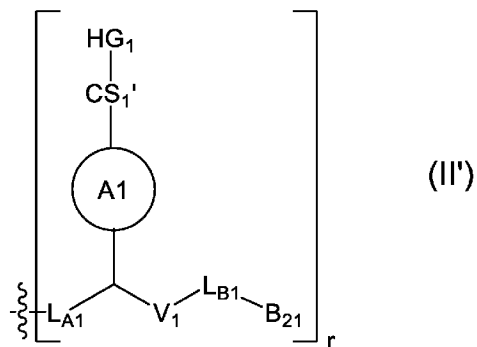
前記イムノグロブリン単位あたりの前記結合の平均数 r は、 $1.5 \sim 2.5$ である。〕で表される修飾部分をさらに含んでもよい。

[0273] 式 (I I) における波線付きのハイフン (—)、 HG_1 、 CS_1 、 V_1 、 L_{A1} 、 L_{B1} 、および r は、それぞれ、式 (I) で示されるものと同じである。

[0274] B_{21} は、生体直交性官能基を示す。生体直交性官能基は、上述のとおりである。 B_{21} により示される生体直交性官能基は、上記式 (2) における B_{21} により示される生体直交性官能基と同じであっても異なってもよい。

[0275] 抗体および機能性物質のコンジュゲートまたはその塩において、抗体のリジン残基が修飾されたものである場合、上記式 (2') で表される構造単位は、下記式 (I I') :

[化44]



[式中、

波線付きのハイフン (—) は、E u n u m b e r i n g に従う 246 / 248 位、288 / 290 位、または 317 位に存在するリジン残基（ここで、当該リジン残基は、式 (1) における L_A が結合しているアミノ基を有するリジン残基とは異なる）の側鎖中のアミノ基と結合しており、

HG_1 は、親水性基、または親水性基を含む 1 価の基を示し、

CS_1' は、切断性部位を含む 2 価の基を示し、

環 A_1 は、置換基を有していてもよい 2 価の芳香族環基（ここで、2 価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

V_1 は、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基 (NH) を示し、

L_{A1} 、および L_{B1} は、それぞれ独立して、2価の基を示し、

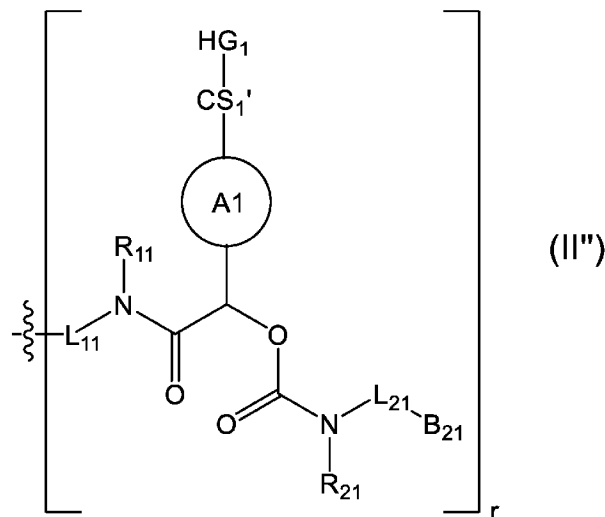
B_{21} は、生体直交性官能基を示し、

前記イムノグロブリン単位あたりの前記結合の平均数 r は、1.5～2.5である。〕で表される修飾部分をさらに含んでもよい。

[0276] 式 (I I') における波線付きのハイフン (—)、 HG_1 、 CS_1' 、環 A_1 、 V_1 、 L_{A1} 、 L_{B1} 、および r は、それぞれ、式 (I') で示されるものと同じである。式 (I I') における B_{21} は、式 (I I) で示されるものと同じである。

[0277] 抗体および機能性物質のコンジュゲートまたはその塩において、抗体のリジン残基が修飾されたものである場合、上記式 (2'') で表される構造単位は、下記式 (I I'') :

[化45]



〔式中、

波線付きのハイフン (—) は、Eu numberingに従う246／248位、288／290位、または317位に存在するリジン残基（ここで、当該リジン残基は、式 (1) における L_A が結合しているアミノ基を有するリジン残基とは異なる）の側鎖中のアミノ基と結合しており、

HG_1 は、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

CS_1' は、切断性部位を含む2価の基を示し、

環 A₁ は、置換基を有していてもよい 2 価の芳香族環基（ここで、2 価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

R₁₁、および R₂₁ は、それぞれ独立して、水素原子、または 1 価の基を示し、

L₁₁、および L₂₁ は、それぞれ独立して、2 価の基を示し、

B₂₁ は、生体直交性官能基を示し、

前記イムノグロブリン単位あたりの前記結合の平均数 r は、1.5～2.5 である。〕で表される修飾部分をさらに含んでいてもよい。

[0278] 式 (I I'') における波線付きのハイフン (—)、H G₁、C S₁'、環 A₁、R₁₁、R₂₁、L₁₁、L₂₁、および r は、それぞれ、式 (I'') で示されるものと同じである。式 (I I') における B₂₁ は、式 (I I) で示されるものと同じである。

[0279] 本発明の抗体誘導体またはその塩は、例えば、本発明のコンジュゲートまたはその塩の作製のための中間体として有用である。

[0280] 本発明の抗体誘導体またはその塩は、例えば、第 1 生体直交性官能基および第 2 生体直交性官能基を有する化合物またはその塩を、I g（イムノグロブリン単位）を有する原料抗体と反応させることにより製造することができる（図 3）。原料抗体は、上述したものと同じである。

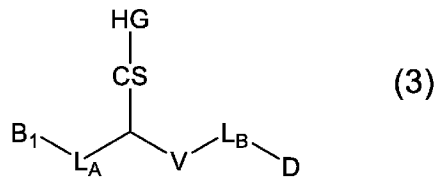
[0281] 第 1 生体直交性官能基および第 2 生体直交性官能基を有する化合物またはその塩と上記原料抗体との反応は、タンパク質の変性・分解（例、アミド結合の切断）を引き起こし得ない上述の条件（温和な条件）下で適宜行うことができる。

[0282] 抗体誘導体またはその塩の生成の確認は、本発明のコンジュゲートについて述べた方法と同様にして行うことができる。抗体誘導体またはその塩は、本発明のコンジュゲートについて述べたような任意の精製方法により適宜精製することができる。

[0283] 4. 生体直交性官能基および機能性物質を有する化合物またはその塩

本発明はまた、下記式 (3)：

[化46]



〔式中、

HGは、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

CSは、切断性部位を含む2価の基を示し、

Vは、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基（NH）を示し、

LA、およびLBは、それぞれ独立して、2価の基を示し、

B1は、生体直交性官能基を示し、

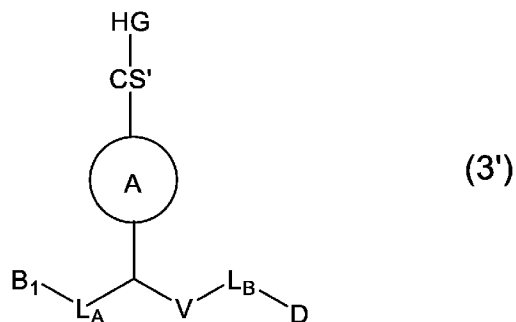
Dは、機能性物質を示す。〕で表される、生体直交性官能基および機能性物質を有する化合物またはその塩を提供する。

[0284] 式（3）において、HG、CS、V、LA、LB、およびDは、式（1）において上述したとおりである。したがって、これらの要素および当該要素に関連する他の要素の定義、例および好ましい例は、式（1）において上述したものと同一である。

[0285] B1は、生体直交性官能基を示す。生体直交性官能基は、上述したとおりである。

[0286] 本発明はまた、下記式（3'）：

[化47]



〔式中、

HGは、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

C S' は、切断性部位を含む 2 価の基を示し、

環 A は、置換基を有していてもよい 2 価の芳香族環基（ここで、2 価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

V は、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基（NH）を示し、

L_A、および L_B は、それぞれ独立して、2 価の基を示し、

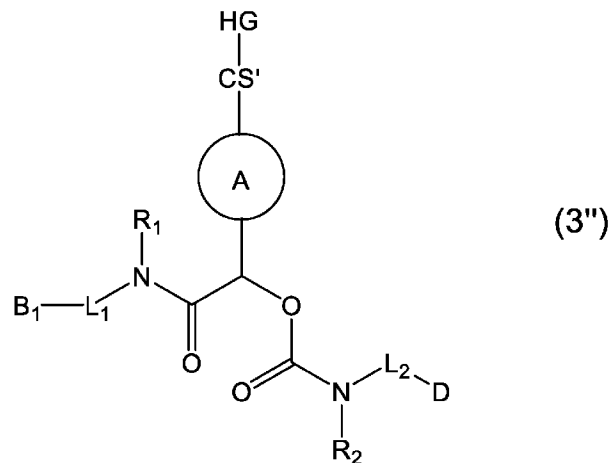
B₁ は、生体直交性官能基を示し、

D は、機能性物質を示す。〕で表される、生体直交性官能基および機能性物質を有する化合物またはその塩を提供する。

[0287] 式（3'）において、HG、C S'、環 A、V、L_A、L_B、および D は、式（1'）において上述したとおりである。式（3'）において、B₁ は、式（3）において上述したとおりである。

[0288] 本発明はまた、下記式（3' '）：

[化48]



〔式中、

HG は、親水性基、または親水性基を含む 1 価の基を示し、

C S' は、切断性部位を含む 2 価の基を示し、

環 A は、置換基を有していてもよい 2 価の芳香族環基（ここで、2 価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

R₁、および R₂ は、それぞれ独立して、水素原子、または 1 価の基を示し、

、

L_1 、および L_2 は、それぞれ独立して、2価の基を示し、

B_1 は、生体直交性官能基を示し、

D は、機能性物質を示す。)で表される、生体直交性官能基および機能性物質を有する化合物またはその塩を提供する。

[0289] 式(3')において、 HG 、 CS' 、環 A 、 R_1 、 R_2 、 L_1 、 L_1 、および D は、式(1')において上述したとおりである。式(3')において、 B_1 は、式(3)において上述したとおりである。

[0290] 式(3)、式(3')、および式(3')で表される化合物またはその塩は、例えば、本発明のコンジュゲートの作製のための中間体として有用である。式(3)、式(3')、および式(3')で表される化合物またはその塩はまた、例えば、生体分子(例、抗体等のタンパク質、糖類、核酸、脂質)等の任意の物質の誘導体化に有用である。

[0291] 生体直交性官能基および機能性物質を有する化合物またはその塩は、例えば、第1生体直交性官能基および第2生体直交性官能基を有する化合物またはその塩を、機能性物質と反応させることにより製造することができる(図3)。機能性物質の詳細は、上述したとおりである。

[0292] 第1生体直交性官能基および第2生体直交性官能基を有する化合物またはその塩と機能性物質との反応は、適切な反応系、例えば有機溶媒系または水溶液(例、緩衝液)系において、適温(例、約15~200℃)で行うことができる。反応系は、適切な触媒を含んでいてもよい。反応時間は、例えば1分~20時間、好ましくは10分~15時間、より好ましくは20分~10時間、さらにより好ましくは30分~8時間である。勿論、このような反応は、上述の温和な条件下で行うこともできる。

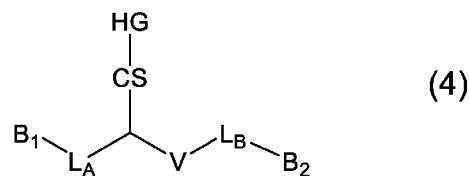
[0293] 生体直交性官能基および機能性物質を有する化合物またはその塩の生成の確認は、その具体的な原料および生成物の分子量にもよるが、例えば、NMR、HPLC、または質量分析により行うことができる。このような化合物またはその塩は、クロマトグラフィー(例、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、逆相カラムクロマトグラフィー、高速液体

クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー)等の任意の精製方法により適宜精製することができる。

[0294] 5. 第1生体直交性官能基および第2生体直交性官能基を有する化合物またはその塩

本発明はまた、下記式(4)：

[化49]



[式中、

HGは、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

CSは、切断性部位を含む2価の基を示し、

Vは、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基(NH)を示し、

L_A、およびL_Bは、それぞれ独立して、2価の基を示し、

B₁は、第1生体直交性官能基を示し、

B₂は、第2生体直交性官能基を示す。]で表される、第1生体直交性官能基および第2生体直交性官能基を有する化合物またはその塩を提供する。

[0295] 式(4)において、HG、CS、V、L_A、L_B、およびB₂は、式(2)において上述したとおりである。したがって、これらの要素および当該要素に関連する他の要素の定義、例および好ましい例は、式(2)において上述したものと同一である。

[0296] B₁は、第1生体直交性官能基を示す。第1生体直交性官能基は、生体直交性官能基について上述したものと同一である。好ましくは、生体直交性官能基は、アミノ基と一緒にアミド結合を形成できる基(すなわち、アミド結合におけるカルボニル基部分のドナーとなる基)、チオール基と効率良く反応できる基(例、マレイミド残基、ハロカルボニル基、チオール基)である。

[0297] B₂は、第2生体直交性官能基を示す。第2生体直交性官能基は、生体直交

性官能基について上述したものと同一である。

[0298] 特定の実施形態では、 B_2 で示される生体直交性官能基は、マレイミド残基、チオール残基、フラン残基、ハロカルボニル残基、アルケン残基、アルキン残基、アジド残基、またはテトラジン残基であってもよい。あるいは、 B_2 で示される生体直交性官能基は、マレイミド残基、チオール残基、フラン残基、ハロカルボニル残基、アルケン残基、アルキン残基、アジド残基、またはテトラジン残基であってもよい。これらの生体直交性官能基は、反応効率に優れ、汎用性が高いため好ましい。

[0299] 好ましくは、第2生体直交性官能基は、第1生体直交性官能基と反応しない、または第1生体直交性官能基に対する反応性が低い生体直交性官能基であってもよい。この場合、式(4)で表される化合物またはその塩の分子間反応を抑制することができる。したがって、第1および第2生体直交性官能基は、互いに反応しない、または互いの反応性が低い組み合わせで利用することができる。生体直交性官能基のこのような組み合わせは、当該分野において周知である。例えば、好ましい生体直交性官能基であるマレイミド残基、チオール残基、フラン残基、ハロカルボニル残基、アルケン残基、アルキン残基、アジド残基、およびテトラジン残基について、このような組み合わせの例は、以下のとおりである。

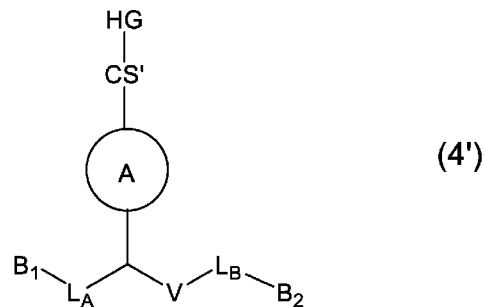
[0300] [表A]

表A. 互いに反応しない、または互いの反応性が低い第1および第2生体直交性官能基の組み合わせの例

第1生体直交性官能基	第2生体直交性官能基
マレイミド残基	ハロカルボニル残基、アルケン残基、またはアルキン残基
チオール残基	フラン残基、アルケン残基、アルキン残基、アジド残基、またはテトラジン残基
フラン残基	チオール残基、またはハロカルボニル残基
ハロカルボニル残基	マレイミド残基、フラン残基、アルケン残基、アルキン残基、アジド残基、またはテトラジン残基
アルケン残基	マレイミド残基、チオール残基、ハロカルボニル残基、またはアルキン残基
アルキン残基	マレイミド残基、チオール残基、ハロカルボニル残基、またはアルケン残基
アジド残基	チオール残基、またはハロカルボニル残基、
テトラジン残基	チオール残基、またはハロカルボニル残基、

[0301] 本発明はまた、下記式（4'）：

[化50]



〔式中、

HGは、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

CS'は、切断性部位を含む2価の基を示し、

環Aは、置換基を有していてもよい2価の芳香族環基（ここで、2価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

Vは、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基（NH）を示し、

LA、およびLBは、それぞれ独立して、2価の基を示し、

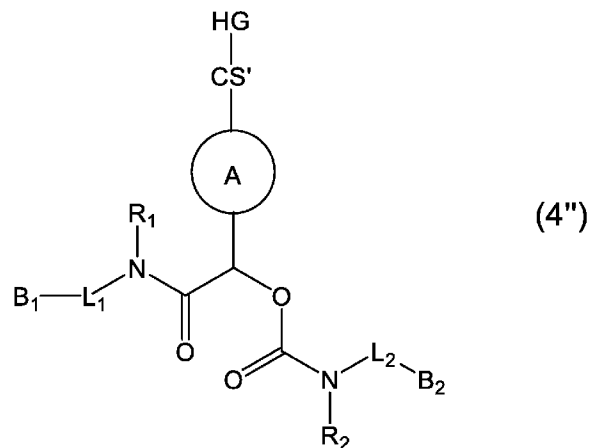
B1は、第1生体直交性官能基を示し、

B2は、第2生体直交性官能基を示す。〕で表される、第1生体直交性官能基および第2生体直交性官能基を有する化合物またはその塩を提供する。

[0302] 式（4'）において、HG、CS'、環A、V、LA、LB、およびB2は、式（2'）において上述したとおりである。式（4'）において、B1は、式（4）において上述したとおりである。

[0303] 本発明はまた、下記式（4''）：

[化51]



〔式中、

HGは、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

CS'は、切断性部位を含む2価の基を示し、

環Aは、置換基を有していてもよい2価の芳香族環基（ここで、2価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

R₁、およびR₂は、それぞれ独立して、水素原子、または1価の基を示し

、

L₁、およびL₂は、それぞれ独立して、2価の基を示し、

B₁は、第1生体直交性官能基を示し、

B₂は、第2生体直交性官能基を示す。〕で表される、第1生体直交性官能基および第2生体直交性官能基を有する化合物またはその塩を提供する。

[0304] 式(4'')において、HG、CS'、環A、R₁、R₂、L_{A1}、L_{B1}、およびB₂は、式(2'')において上述したとおりである。式(4'')において、B₁は、式(4)において上述したとおりである。

[0305] 式(4)、(4')および(4'')で表される化合物またはその塩は、例えば、本発明の抗体誘導体、および式(3)、(3')および(3'')で表される化合物の作製のための中間体として有用である。式(4)、(4')および(4'')で表される化合物またはその塩はまた、例えば、生体分子（例、抗体等のタンパク質、糖類、核酸、脂質）、および機能性物質等の任意の物質の誘導体化に有用である。

[0306] 一実施形態では、第1生体直交性官能基および第2生体直交性官能基を有する化合物またはその塩は、生体直交性官能基を有する式(6)の化合物またはその塩を、 B_1 を有する適切な化合物(例、 $B_1-L_1-NH-R_1$ で表される化合物)と反応させることにより製造することができる(図4、5)。 B_1 、 L_1 、および R_1 の定義、例、および好ましい例は、上述したとおりである。

[0307] 別の実施形態では、第1生体直交性官能基および第2生体直交性官能基を有する化合物またはその塩は、生体直交性官能基を有する式(7)の化合物またはその塩を、 L_B-B_2 を有する適切な化合物と反応させることにより(例えば、炭酸ビス(4-ニトリフェニル)、およびN,N-ジイソプロピルエチルアミン(DIPEA)と反応させ、次いで、 $B_2-L_2-NH-R_2$ で表される化合物と反応させることにより)製造することができる(図4、5)。 B_2 、 L_B 、および R_2 の定義、例、および好ましい例は、上述したとおりである。

[0308] 上記反応は、適切な反応系、例えば有機溶媒系または水溶液(例、緩衝液)系において、適温(例、約15~200℃)で行うことができる。反応系は、適切な触媒を含んでいてもよい。反応時間は、例えば1分~20時間、好ましくは10分~15時間、より好ましくは20分~10時間、さらにより好ましくは30分~8時間である。勿論、このような反応は、上述の温和な条件下で行うこともできる。

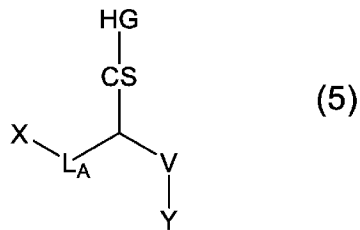
[0309] 第1生体直交性官能基および第2生体直交性官能基を有する化合物またはその塩の生成の確認は、その具体的な原料および生成物の分子量にもよるが、例えば、NMR、HPLC、または質量分析により行うことができる。このような化合物またはその塩は、クロマトグラフィー(例、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、逆相カラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー)等の任意の精製方法により適宜精製することができる。

[0310] 6. 一連の化合物またはその塩

(1) 化合物またはその塩

本発明はまた、下記式 (5) :

[化52]



[式中、

HGは、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

CSは、切断性部位を含む2価の基を示し、

Vは、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基 (NH) を示し、

L_Aは、それぞれ独立して、2価の基を示し、

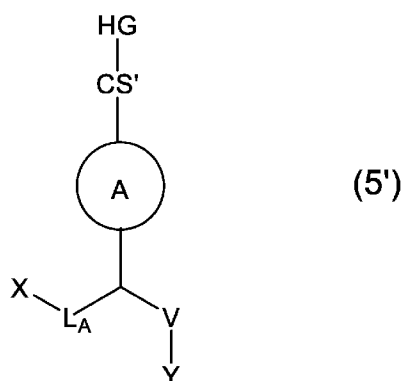
XおよびYは、それぞれ独立して、1価の基を示す。] で表される化合物またはその塩を提供する。

[0311] 式 (5) において、HG、CS、V、およびL_Aは、式 (1) において上述したとおりである。したがって、これらの要素および当該要素に関連する他の要素の定義、例および好ましい例は、式 (1) において上述したものと同じである。

[0312] XおよびYは、それぞれ独立して、1価の基を示す。1価の基は、上述したとおりである。

[0313] 本発明はまた、下記式 (5') :

[化53]



〔式中、

HGは、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

CS'は、切断性部位を含む2価の基を示し、

環Aは、置換基を有していてもよい2価の芳香族環基（ここで、2価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

Vは、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基（NH）を示し、

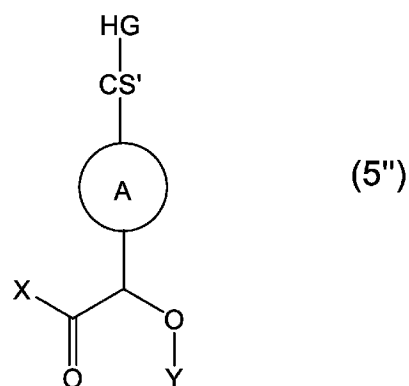
L_Aは、それぞれ独立して、2価の基を示し、

XおよびYは、それぞれ独立して、1価の基を示す。〕で表される、化合物またはその塩を提供する。

[0314] 式（5'）において、HG、CS'、環A、V、およびL_Aは、式（1'）において上述したとおりである。式（5'）において、XおよびYは、式（5）に示したものと同一である。

[0315] 本発明はまた、下記式（5''）：

[化54]



〔式中、

HGは、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

CS'は、切断性部位を含む2価の基を示し、

環Aは、置換基を有していてもよい2価の芳香族環基（ここで、2価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

XおよびYは、それぞれ独立して、1価の基を示す。〕で表される、化合物またはその塩を提供する。

[0316] 式（5''）において、HG、CS'、および環Aは、式（1''）にお

いて上述したとおりである。式（5' '）において、XおよびYは、式（5）に示したものと同一である。

[0317] 式（5）、（5'）、および（5' '）で表される化合物またはその塩は、例えば、本発明のコンジュゲート、抗体誘導体、および本発明の他の化合物の合成中間体として有用である。

[0318] 式（5）、（5'）、および（5' '）で表される化合物またはその塩の合成例として、式（5'）で表される化合物またはその塩の合成例を説明する。式（5'）で表される化合物またはその塩は、例えば、下記式（5-1）：

[化55]



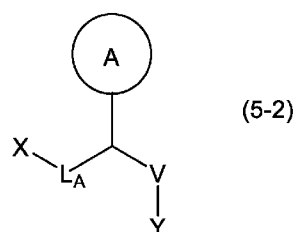
〔式中、

HGは、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

CS'は、切断性部位を含む反応性の2価の基を示す。〕で表される化合物またはその塩を、

下記式（5-2）：

[化56]



〔式中、

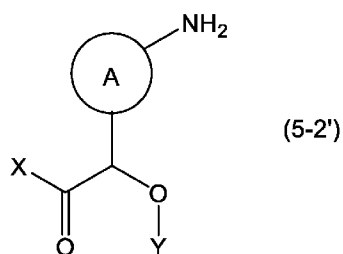
環Aは、CS'と反応可能である、置換基を有していてもよい2価の芳香族環基を示し、

XおよびYは、それぞれ独立して、1価の基を示す。〕で表される化合物またはその塩と反応させることにより製造することができる。式（5-1）におけるHG、ならびにCS'における切断性部位および2価の基、ならび

に式（５－２）における環Ａ、 L_A 、 V 、 X 、および Y の定義、例、および好ましい例は、上述したとおりである。このような反応は、第１生体直交性官能基および第２生体直交性官能基を有する化合物またはその塩の製造について上述した反応条件と同様の条件下で行うことができる。

[0319] 好ましくは、式（５－２）で表される化合物は、下記式（５’－２）：

[化57]



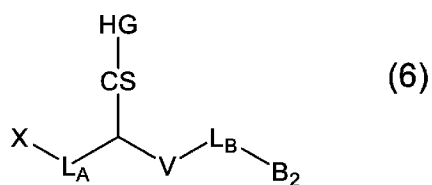
〔式中、

環Ａは、置換基を有していてもよい２価の芳香族環基を示し、

X および Y は、それぞれ独立して、１価の基を示す。〕で表されてもよい。

[0320] （２）式（６）で表される生体直交性官能基を有する化合物またはその塩
本発明はまた、下記式（６）：

[化58]



〔式中、

HG は、親水性基、または親水性基を含む１価の基を示し、

CS は、切断性部位を含む２価の基を示し、

V は、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基（ NH ）を示し、

L_A 、および L_B は、それぞれ独立して、２価の基を示し、

X は、１価の基を示し、

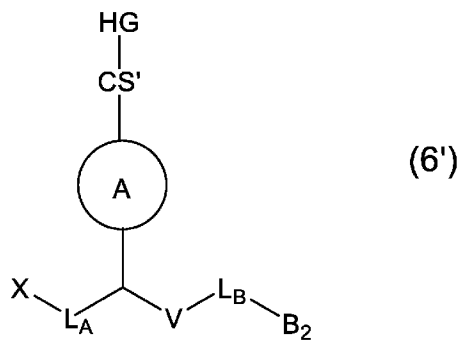
B_2 は、生体直交性官能基を示す。〕で表される、生体直交性官能基を有す

る化合物またはその塩を提供する。

[0321] 式(6)において、HG、CS、V、 L_A 、 L_B 、および B_2 は、式(2)において上述したとおりである。式(6)において、Xは、式(5)において上述したものと同一である。

[0322] 本発明はまた、下記式(6') :

[化59]



[式中、

HGは、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

CS'は、切断性部位を含む2価の基を示し、

環Aは、置換基を有していてもよい2価の芳香族環基（ここで、2価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

Vは、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基(NH)を示し、

L_A 、および L_B は、それぞれ独立して、2価の基を示し、

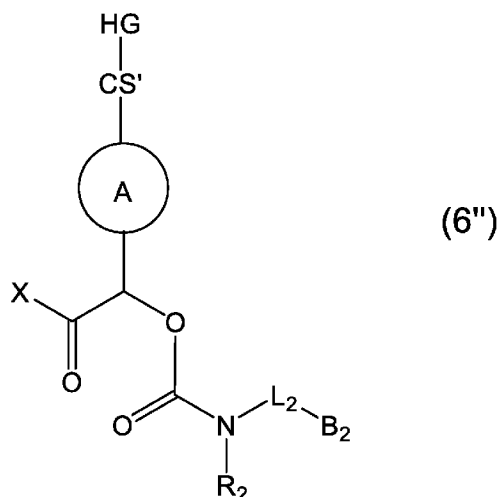
Xは、1価の基を示し、

B_2 は、生体直交性官能基を示す。]で表される、生体直交性官能基を有する化合物またはその塩を提供する。

[0323] 式(6')において、HG、CS'、環A、V、 L_A 、 L_B 、および B_2 は、式(2')において上述したとおりである。式(6')において、Xは、式(5)において上述したものと同一である。

[0324] 本発明はまた、下記式(6'') :

[化60]



〔式中、

HGは、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

CS'は、切断性部位を含む2価の基を示し、

環Aは、置換基を有していてもよい2価の芳香族環基（ここで、2価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

R₂は、水素原子、または1価の基を示し、

L₂は、2価の基を示し、

Xは、1価の基を示し、

B₂は、生体直交性官能基を示す。〕で表される、生体直交性官能基を有する化合物またはその塩を提供する。

[0325] 式(6'')において、HG、CS'、環A、R₂、L₂、およびB₂は、式(2'')において上述したとおりである。式(6'')において、Xは、式(5)に示したものと同一である。

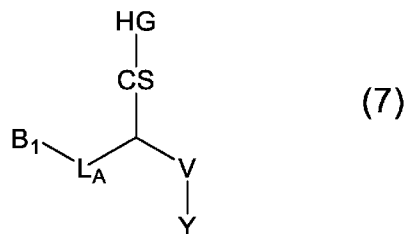
[0326] 式(6)、(6')、および(6'')で表される化合物またはその塩は、例えば、本発明のコンジュゲート、抗体誘導体、および本発明の所定の化合物の合成中間体として有用である。このような化合物またはその塩はまた、例えば、機能性物質の誘導体化に有用である。

[0327] 式(6)、(6')、および(6'')で表される化合物またはその塩は、例えば、式(5)、(5')、および(5'')で表される化合物または

その塩を、 L_B-B_2 を有する適切な化合物と反応させることにより（例えば、炭酸ビス（４－ニトリフェニル）、およびN，N－ジイソプロピルエチルアミン（D I P E A）と反応させ、次いで、 $B_2-L_2-NH-R_2$ で表される化合物と反応させることにより）製造することができる（図4、5）。 B_2 、 L_2 、および R_2 の定義、例、および好ましい例は、上述したとおりである。このような反応は、第1生体直交性官能基および第2生体直交性官能基を有する化合物またはその塩の製造について上述した反応条件と同様の条件下で行うことができる。

[0328] （3）式（7）で表される生体直交性官能基を有する化合物またはその塩
本発明はまた、下記式（7）：

[化61]



[式中、

HGは、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

CSは、切断性部位を含む2価の基を示し、

Vは、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基（NH）を示し、

L_A は、それぞれ独立して、2価の基を示し、

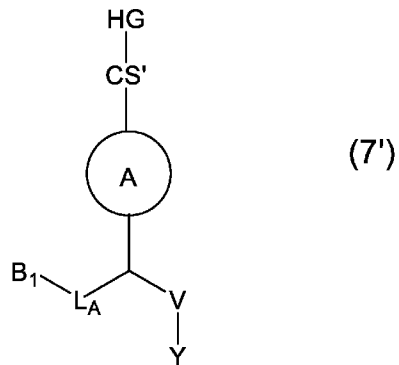
B_1 は、生体直交性官能基を示し、

Yは、1価の基を示す。] で表される、生体直交性官能基を有する化合物またはその塩を提供する。

[0329] 式（7）において、HG、CS、V、 L_A 、および B_1 は、式（3）において上述したとおりである。式（7）において、Yは、式（5）において上述したとおりである。

[0330] 本発明はまた、下記式（7'）：

[化62]



〔式中、

HGは、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

CS'は、切断性部位を含む2価の基を示し、

環Aは、置換基を有していてもよい2価の芳香族環基（ここで、2価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

Vは、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基（NH）を示し、

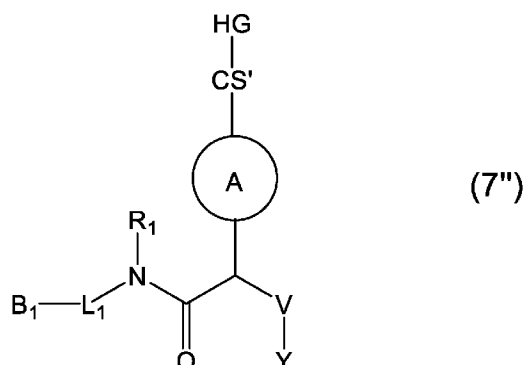
 L_A は、2価の基を示し、 B_1 は、生体直交性官能基を示し、

Yは、1価の基を示す。〕で表される、生体直交性官能基を有する化合物またはその塩を提供する。

[0331] 式（7'）において、HG、CS'、環A、V、 L_A 、および B_1 は、式（3'）において上述したとおりである。式（7'）において、Yは、式（5）において上述したのと同じである。

[0332] 本発明はまた、下記式（7''）：

[化63]



〔式中、

HGは、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

CS'は、切断性部位を含む2価の基を示し、

環Aは、置換基を有していてもよい2価の芳香族環基（ここで、2価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

Vは、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基（NH）を示し、

R₁は、水素原子、または1価の基を示し、

L₁は、2価の基を示し、

B₁は、生体直交性官能基を示し、

Yは、1価の基を示す。〕で表される、生体直交性官能基を有する化合物またはその塩を提供する。

[0333] 式（7' '）において、HG、CS'、環A、R₁、L₁、およびB₁は、式（3' '）において上述したとおりである。式（7' '）において、Yは、式（5）に示したものと同一である。

[0334] 式（7）、（7'）、および（7' '）で表される化合物またはその塩は、例えば、本発明のコンジュゲート、抗体誘導体、および本発明の所定の化合物の合成中間体として有用である。このような化合物またはその塩はまた、例えば、生体分子（例、抗体等のタンパク質、糖類、核酸、脂質）等の任意の物質の誘導体化に有用である。

[0335] 式（7）、（7'）、および（7' '）で表される化合物またはその塩は、例えば、式（5）、（5'）、および（5' '）で表される化合物またはその塩を、B₁を有する適切な化合物（例、B₁-L₁-NH-R₁で表される化合物）と反応させることにより製造することができる（図4、5）。B₁、L₁、およびR₁の定義、例、および好ましい例は、上述したとおりである。このような反応は、第1生体直交性官能基および第2生体直交性官能基を有する化合物またはその塩の製造について上述した反応条件と同様の条件下で行うことができる。

[0336] 式（5）、（5'）、および（5' '）、（6）、（6'）、および（6

’ ’)、ならびに (7)、(7’)、および (7’ ’) で表される化合物またはその塩の生成の確認は、その具体的な原料および生成物の分子量にもよるが、例えば、NMR、HPLC、または質量分析により行うことができる。このような化合物またはその塩は、クロマトグラフィー（例、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、逆相カラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー）等の任意の精製方法により適宜精製することができる。

実施例

[0337] 次に実施例を示して本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0338] 実施例1における以下ペプチド、Ac-Glu(OtBu)-Val-Cit-OH、Z-Glu(OtBu)-Val-Cit-OH、Ac-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Val-Cit-OH、SCA(OtBu)-Glu(OtBu)-Val-Cit-OHは、すべて同様の方法で調製した。なお、SCA(OtBu)はコハク酸モノ-tert-ブチル(mono-tert-butyl succinate)、SCAはコハク酸(succinic acid)の略である。

Fmoc法によるCI-TCP(CI) ProTide Resin(CEM社)を用いたペプチド固相合成によって、N末端をアセチル基でキャッピングしたもの、N末端をコハク酸でキャッピングしたものを調製し、20%HFIP/ジクロロメタンの溶液にて終夜攪拌することで、アミノ酸側鎖を保護したまま樹脂からの切り出しを行った。樹脂をフィルトレーションにより除去し、溶液を濃縮後、これを分取HPLCにて精製し、生成物であるペプチドを得た。

[0339] Ac-Glu(OtBu)-Val-Cit-OH

[0340] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.50 (brs, 1H), 8.22 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 8.05 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.69 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 5.95–5.9

3 (m, 1H), 5.38 (brs, 2H), 4.33–4.27 (m, 1H), 4.22–4.18 (m, 1H), 4.15–4.10 (m, 1H), 2.96–2.95 (m, 2H), 2.25–2.19 (m, 2H), 2.00–1.93 (m, 1H), 1.89–1.80 (m, 4H), 1.73–1.66 (m, 2H), 1.61–1.51 (m, 1H), 1.46–1.34 (m, 11H), 0.86 (d, $J=6.8\text{ Hz}$, 3H), 0.83 (d, $J=6.8\text{ Hz}$, 3H).

[0341] MS (ESI) m/z : 502.30 $[M+H]^+$

[0342] Z-Glu(OtBu)-Val-Cit-OH

[0343] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.50 (brs, 1H), 7.93–7.37 (m, 8H), 6.05–6.00 (m, 1H), 5.44 (brs, 2H), 5.08 (s, 2H), 4.17–3.81 (m, 3H), 3.00–2.90 (m, 2H), 2.31–2.27 (m, 2H), 2.10–1.34 (m, 16H), 0.89–0.83 (m, 6H).

[0344] MS (ESI) m/z : 594.30 $[M+H]^+$

[0345] Ac-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Val-Cit-OH

[0346] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.50 (brs, 1H), 8.21 (d, $J=7.2\text{ Hz}$, 1H), 8.08 (d, $J=8.0\text{ Hz}$, 1H), 8.04 (d, $J=8.0\text{ Hz}$, 1H), 7.68 (d, $J=8.0\text{ Hz}$, 1H), 5.95 (brs, 1H), 5.37 (brs, 2H), 4.32–4.19 (m, 3H), 4.16–4.11 (m, 1H), 2.98–2.94 (m, 2H), 2.27–2.13 (m, 4H), 2.00–1.79 (m, 5H), 1.76–1.52 (m, 5H), 1.42–1.36 (m, 20H), 0.86 (d, $J=6.8\text{ Hz}$, 3H), 0.82 (d, $J=6.8\text{ Hz}$, 3H).

[0347] MS (ESI) m/z : 687.35 $[M+H]^+$

[0348] SCA(OtBu)-Glu(OtBu)-Val-Cit-OH

[0349] ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 12.70 (b r s, 1 H), 8.21 (d, $J=7.2\text{ Hz}$, 1 H), 8.05 (d, $J=8.0\text{ Hz}$, 1 H), 7.68 (d, $J=8.8\text{ Hz}$, 1 H), 5.96 (b r s, 1 H), 5.25 (b r s, 2 H), 4.35–4.30 (m, 1 H), 4.21–4.18 (m, 1 H), 4.15–4.10 (m, 1 H), 2.98–2.94 (m, 2 H), 2.40–2.28 (m, 4 H), 2.24–2.18 (m, 2 H), 2.01–1.93 (m, 1 H), 1.90–1.81 (m, 1 H), 1.73–1.63 (m, 2 H), 1.61–1.51 (m, 1 H), 1.40–1.31 (m, 20 H), 0.86 (d, $J=6.8\text{ Hz}$, 3 H), 0.83 (d, $J=6.8\text{ Hz}$, 3 H).

[0350] MS (ESI) m/z : 616.30 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0351] Ac-Glu(OtBu)-Val-Ala-OH

[0352] ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 12.50 (b r s, 1 H), 8.25 (d, $J=6.8\text{ Hz}$, 1 H), 8.03 (d, $J=8.0\text{ Hz}$, 1 H), 7.68 (d, $J=9.2\text{ Hz}$, 1 H), 4.33–4.27 (m, 1 H), 4.22–4.16 (m, 2 H), 2.23–2.18 (m, 2 H), 1.99–1.94 (m, 1 H), 1.89–1.80 (m, 4 H), 1.73–1.65 (m, 1 H), 1.39 (s, 9 H), 1.27 (d, $J=7.2\text{ Hz}$, 3 H), 0.87 (d, $J=6.8\text{ Hz}$, 3 H), 0.83 (d, $J=6.8\text{ Hz}$, 3 H).

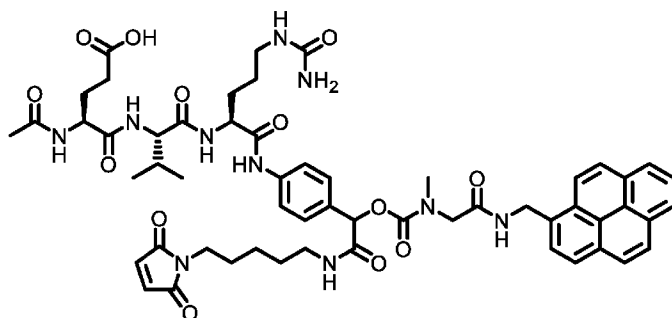
[0353] MS (ESI) m/z : 416.20 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0354] 実施例1: Linker-payload mimicの合成

(1-1) Linker-payload mimic (1)の合成

Linker-payload mimic (1)は下記のように合成した。

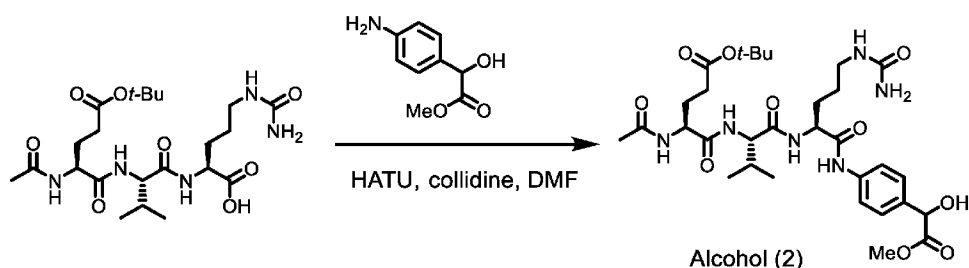
[化64]



Linker-payload mimic (1)

[0355] (1-1-1) アルコール (2) の合成

[化65]



Alcohol (2)

[0356] Ac-Glu(OtBu)-Val-Cit-OH (19.9 mg, 39.7 μmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (400 μL) に溶解させ、1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1,2,3, トリアゾロ[4,5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロホスファート (18.1 mg, 47.6 μmol)、2,4,6-トリメチルピリジン (6.27 μL , 47.6 μmol) を加え、室温にて10分間撹拌した。続いて、4-アミノマンデル酸メチル (8.63 mg, 47.6 μmol) を加えて室温にて21.5時間撹拌した後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記アルコール (2) (28.5 mg, quant) を得た。

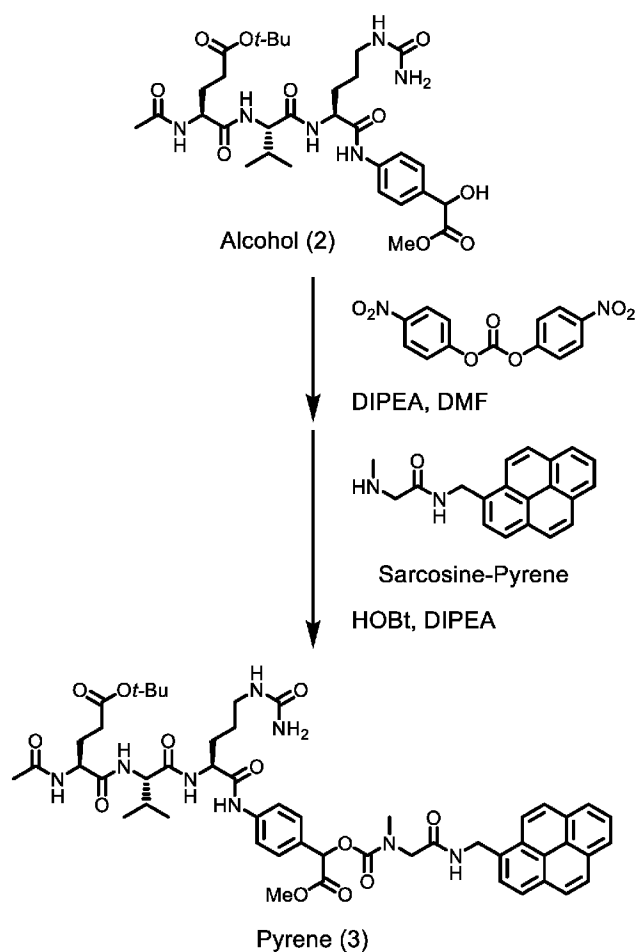
[0357] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.95 (s, 1H), 8.07 (d, $J=7.4$ Hz, 1H), 7.99 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.66 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.50 (d, J

= 8.4 Hz, 2H), 7.25 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 5.92 (brs, 1H), 5.36 (brs, 2H), 5.01 (s, 1H), 4.34–4.29 (m, 1H), 4.26–4.20 (m, 1H), 4.14–4.10 (m, 1H), 3.53 (s, 3H), 3.00–2.83 (m, 2H), 2.18–2.13 (m, 2H), 1.94–1.89 (m, 2H), 1.84–1.23 (m, 17H), 0.79 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.75 (d, J = 6.8 Hz, 3H).

[0358] MS (ESI) m/z : 665.30 $[M+H]^+$

[0359] (1-1-2) ピレン (3) の合成

[化66]



[0360] (1-1-1) で得られたアルコール (2) (28.5 mg) を N, N-ジメチルホルムアミド (430 μ L) に溶解させ、氷冷下5分間攪拌した後、炭酸ビス (4-ニトロフェニル) (26.6 mg, 85.7 μ mol)、

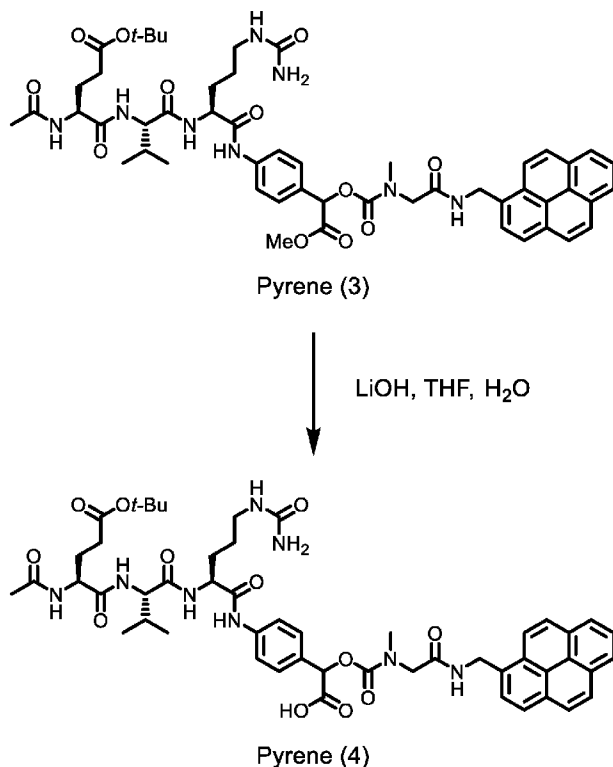
N, N-ジイソプロピルエチルアミン (11.1 μ L, 64.4 μ mol) を加え、室温にて1.5時間攪拌した。LCMSで反応を追跡したところ原料の残存が見られたため、炭酸ビス(4-ニトロフェニル) (13.3 mg, 42.9 μ mol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (5.54 μ L, 32.2 μ mol) を追加し、室温にて5時間攪拌した。その後、氷冷し、Sarcosine-Pyrene (64.9 mg, 215 μ mol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (8.7 mg, 64 μ mol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (57.2 μ L, 333 μ mol) を加え、室温にて16時間攪拌した。反応後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記ピレン(3) (26.1 mg, 26.3 μ mol) を得た。

[0361] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.09–10.07 (m, 1H), 8.63–8.60 (m, 1H), 8.33–7.65 (m, 13H), 7.60–7.57 (m, 2H), 7.37–7.32 (m, 2H), 5.94–5.91 (m, 1H), 5.72–5.70 (m, 1H), 5.37 (brs, 2H), 4.98–4.96 (m, 1H), 4.93–4.00 (m, 4H), 3.85–3.75 (m, 1H), 3.56–3.55 (m, 3H), 2.97–2.87 (m, 5H), 2.17–2.13 (m, 2H), 1.93–1.17 (m, 19H), 0.80–0.73 (m, 6H).

[0362] MS (ESI) m/z : 993.40 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0363] (1-1-3) ピレン(4) の合成

[化67]



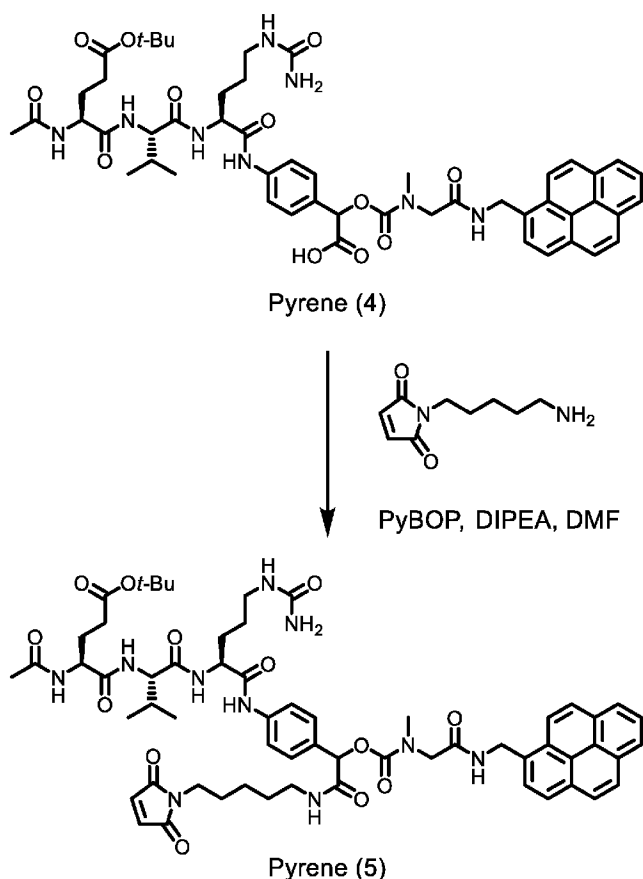
[0364] ピレン (3) (10.8 mg, 10.9 μmol) をテトラヒドロフラン (700 μL)、水 (400 μL) に溶解させ、氷冷下5分間攪拌した後、1 M水酸化リチウム水溶液 (109 μL , 109 μmol) を加え、室温にて1時間攪拌した。反応終了後、0.1 M塩酸を用いて約pH6に調整し、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記ピレン (4) (4.5 mg, 4.6 μmol) を得た。

[0365] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13.05 (b r s, 1 H), 10.08–10.05 (m, 1 H), 8.62–8.59 (m, 1 H), 8.33–7.56 (m, 15 H), 7.37–7.35 (m, 2 H), 5.92 (b r s, 1 H), 5.61–5.60 (m, 1 H), 5.36 (b r s, 2 H), 4.98–4.03 (m, 5 H), 3.88–3.74 (m, 1 H), 2.99–2.83 (m, 5 H), 2.15–2.13 (m, 2 H), 1.93–1.14 (m, 19 H), 0.84–0.73 (m, 6 H) .

[0366] MS (ESI) m/z : 979.40 $[M+H]^+$

[0367] (1-1-4) ピレン (5) の合成

[化68]



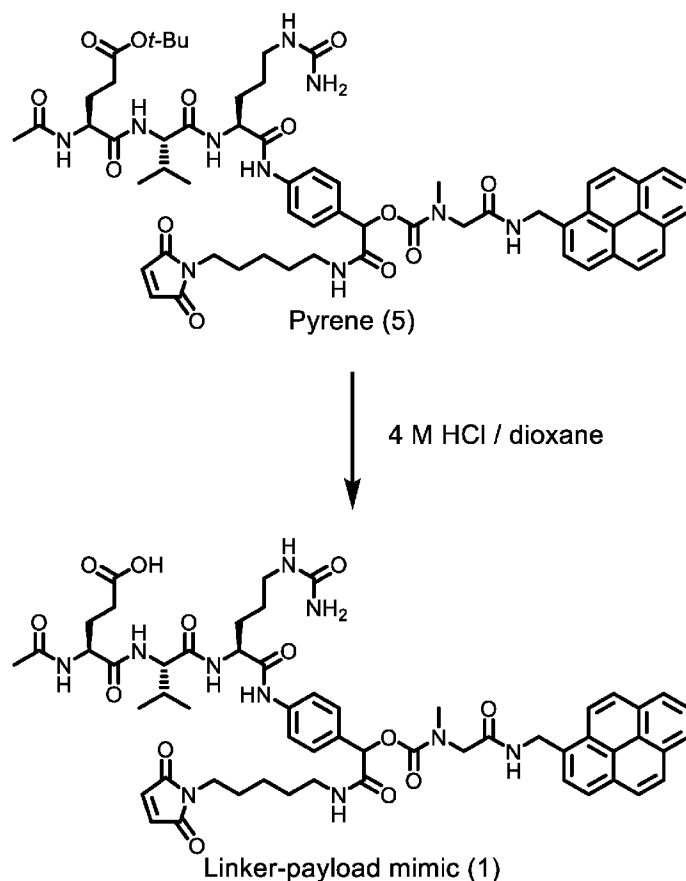
[0368] ピレン (4) (3.7 mg, 3.8 μmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (400 μL) に溶解させたのち氷冷し、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (1.9 μL , 11 μmol)、1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート (2.9 mg, 5.6 μmol) を加えた。次に N-(5-アミノペンチル)マレイミド塩酸塩 (1.3 mg, 5.7 μmol) を加えて室温に戻し 2 時間攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、ピレン (5) (1.3 mg, 1.1 μmol) を得た。

[0369] ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.02–9.99 (

m, 1 H), 8.85–7.88 (m, 14 H), 7.67–7.65 (m, 1 H), 7.60–7.51 (m, 2 H), 7.33–7.27 (m, 2 H), 6.91–6.87 (m, 2 H), 5.92–5.91 (m, 1 H), 5.63–5.62 (m, 1 H), 5.36 (brs, 2 H), 5.07–4.92 (m, 2 H), 4.35–3.76 (m, 5 H), 3.18–3.14 (m, 1 H), 2.99–2.83 (m, 7 H), 2.17–2.13 (m, 2 H), 1.95–1.89 (m, 1 H), 1.85–1.72 (m, 4 H), 1.66–1.45 (m, 3 H), 1.40–1.17 (m, 15 H), 1.05–1.01 (m, 2 H), 0.83–0.73 (m, 6 H).

[0370] MS (ESI) m/z : 1143.45 $[M+H]^+$

[0371] (1-1-5) Linker-payload mimic (1) の合成
[化69]



[0372] ピレン (5) (2.2 mg, 1.9 μ mol) に 1,4-ジオキサン (3

80 μ L)、4 M塩化水素／ジオキサン溶液 (95 μ L, 380 μ mol) を順次加え、室温で4時間攪拌した。氷冷後、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (71.8 μ L, 418 μ mol) を加え、室温で10分間攪拌した。反応液を逆相分取クロマトグラフィーにて精製し、生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、Linker-payload mimic (1) (2.1 mg, 1.9 μ mol) を得た。

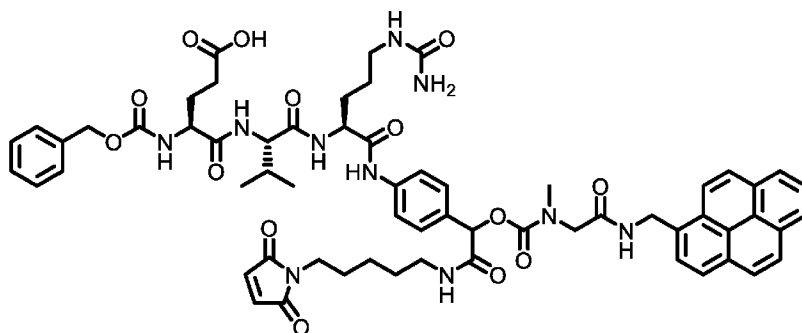
[0373] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.06 (brs, 1H), 10.03–10.00 (m, 1H), 8.84–7.88 (m, 14H), 7.67–7.64 (m, 1H), 7.56–7.51 (m, 2H), 7.33–7.27 (m, 2H), 6.90–6.87 (m, 2H), 5.92–5.90 (m, 1H), 5.63–5.61 (m, 1H), 5.36 (brs, 2H), 5.08–4.96 (m, 2H), 4.35–3.76 (m, 5H), 3.18–3.14 (m, 1H), 2.97–2.83 (m, 7H), 2.20–2.16 (m, 2H), 1.93–1.88 (m, 1H), 1.81–1.78 (m, 4H), 1.69–1.53 (m, 3H), 1.35–1.17 (m, 6H), 1.08–1.01 (m, 2H), 0.81–0.73 (m, 6H).

[0374] MS (ESI) m/z : 1087.45 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0375] (1–2) Linker-payload mimic (6) の合成

Linker-payload mimic (6) は下記のように合成した。

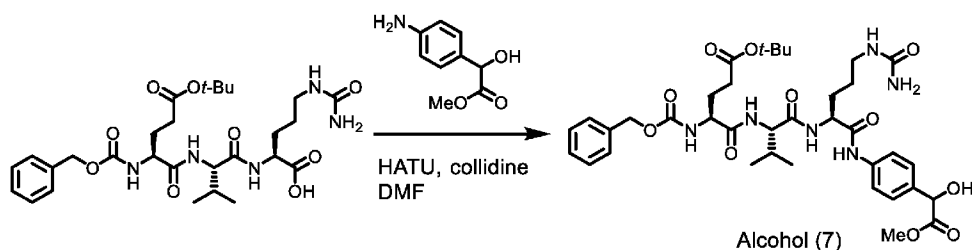
[化70]



Linker-payload mimic (6)

[0376] (1-2-1) アルコール (7) の合成

[化71]



Alcohol (7)

[0377] Z-Glu(t-Bu)-Val-Cit-OH (50.0 mg, 84.3 μmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (1.5 mL) に溶解させ、1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1,2,3, トリアゾロ[4,5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロホスファート (38.4 mg, 101 μmol)、2,4,6-トリメチルピリジン (13.3 μL , 101 μmol) を加え、室温にて10分間撹拌した。続いて、4-アミノマンデル酸メチル (18.3 mg, 101 μmol) を加えて室温にて16時間撹拌した後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記アルコール (7) (49.1 mg, 64.9 μmol) を得た。

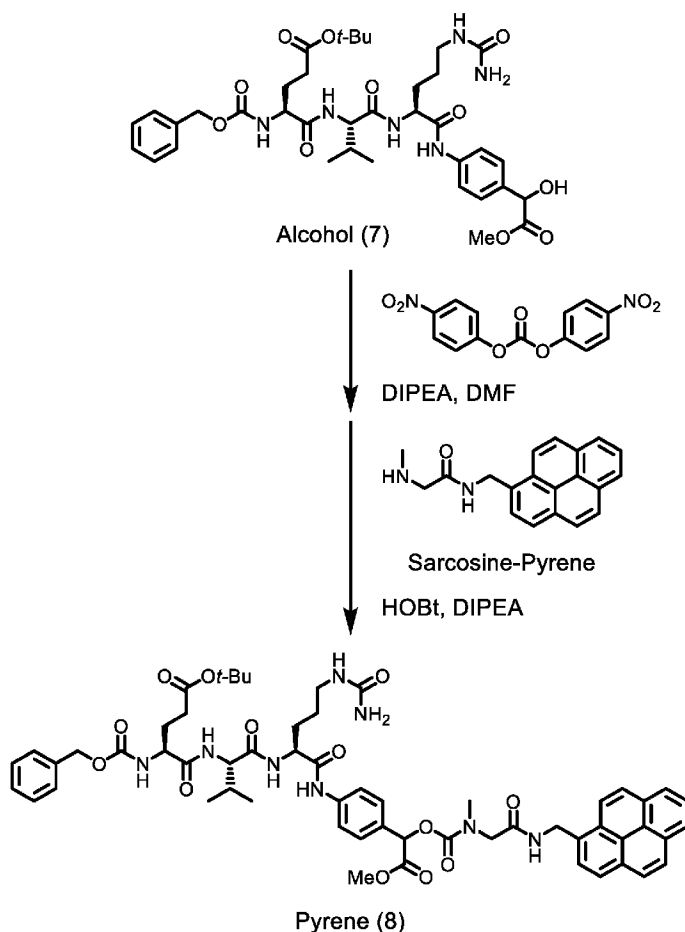
[0378] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.04–9.95 (m, 1H), 8.40–7.28 (m, 12H), 6.00–5.97 (m, 1H), 5.43 (brs, 2H), 5.08–4.97 (m, 3H),

4.43–4.37 (m, 1H), 4.24–4.20 (m, 1H), 4.16–4.05 (m, 1H), 3.60–3.59 (m, 3H), 3.04–2.91 (m, 2H), 2.26–2.20 (m, 2H), 2.03–1.22 (m, 16H), 0.88–0.78 (m, 6H).

[0379] MS (ESI) m/z : 757.30 $[M+H]^+$

[0380] (1–2–2) ピレン (8) の合成

[化72]



[0381] アルコール (7) (44.6 mg, 58.9 μmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (650 μL) に溶解させ、氷冷下5分間攪拌した後、炭酸ビス(4-ニトロフェニル) (53.8 mg, 177 μmol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (22.5 μL , 133 μmol) を加え、室温にて4時間攪拌した。その後、氷冷し、Sarcosine-Pyrene (89.1 mg, 295 μmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール

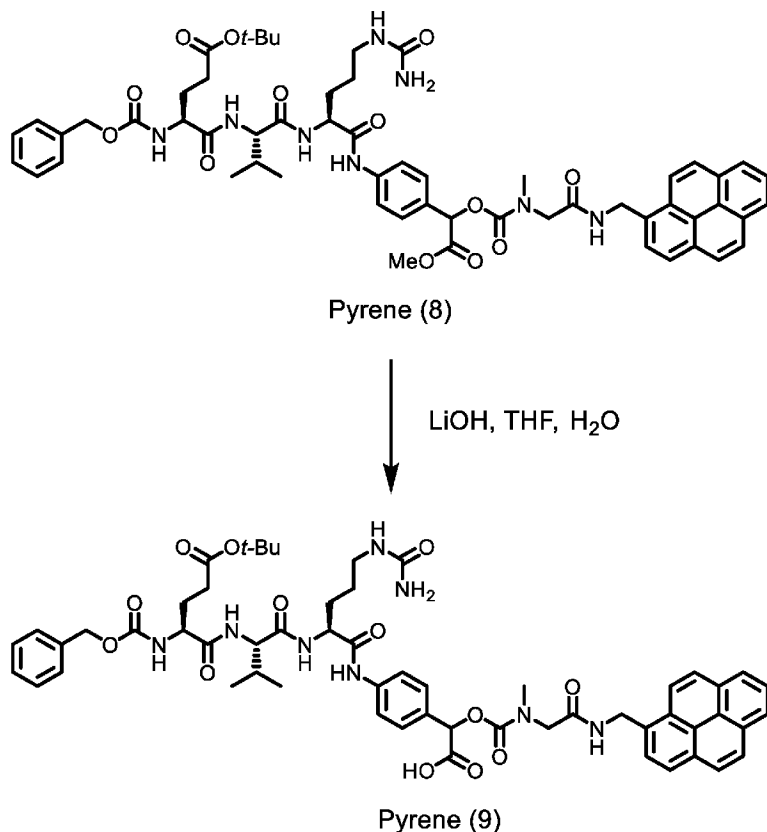
(11.9 mg, 88.4 μmol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (77.7 μL , 457 μmol) を加え、室温にて18時間攪拌した。反応後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記ピレン (8) (49.2 mg, 45.3 μmol) を得た。

[0382] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.11–9.97 (m, 1H), 8.64–8.60 (m, 1H), 8.36–7.95 (m, 1H), 7.82–7.74 (m, 1H), 7.65–7.57 (m, 2H), 7.49–7.19 (m, 8H), 5.91–5.90 (m, 1H), 5.72–5.70 (m, 1H), 5.36 (brs, 2H), 4.98–4.86 (m, 4H), 4.41–4.00 (m, 3H), 3.85–3.75 (m, 1H), 3.56–3.54 (m, 3H), 3.00–2.82 (m, 5H), 2.19–2.12 (m, 2H), 1.92–1.17 (m, 16H), 0.80–0.73 (m, 6H) .

[0383] MS (ESI) m/z : 1085.45 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0384] (1–2–3) ピレン (9) の合成

[化73]



[0385] ピレン (8) (44.8 mg, 41.3 μmol) をテトラヒドロフラン (3.75 mL)、水 (1.25 mL) に溶解させ、氷冷下5分間攪拌した後、水酸化リチウム水和物 (8.7 mg, 210 μmol) を加え、室温にて4時間攪拌した。反応終了後、0.1 M塩酸を用いて約pH 6に調整し、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記ピレン (9) (18.4 mg, 17.2 μmol) を得た。

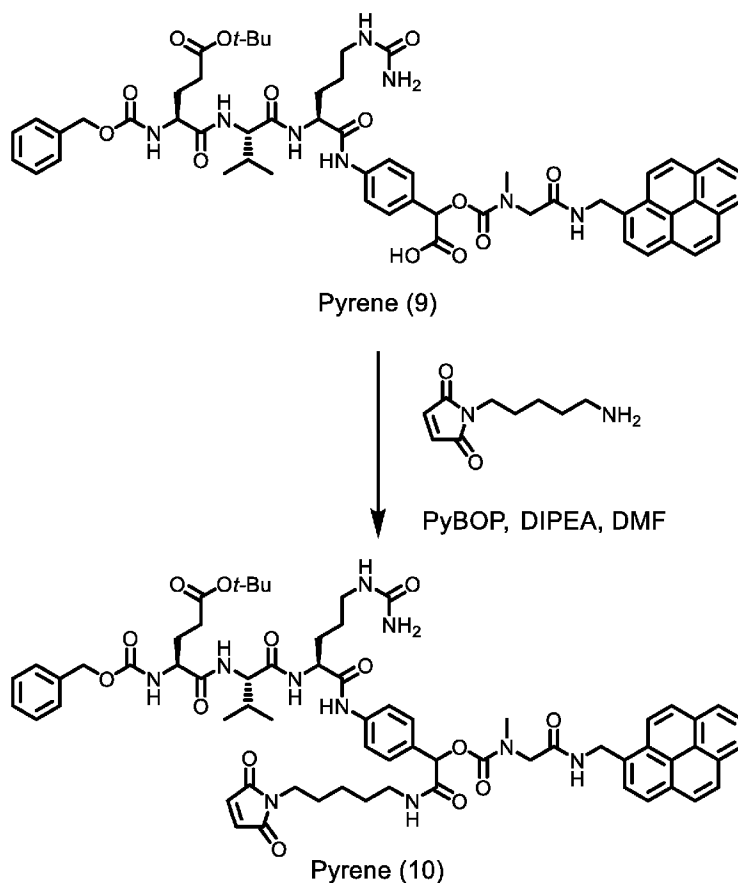
[0386] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13.02 (b r s, 1 H), 10.09–9.97 (m, 1 H), 8.62–8.59 (m, 1 H), 8.32–7.78 (m, 12 H), 7.63–7.44 (m, 3 H), 7.37–7.35 (m, 2 H), 7.29–7.20 (m, 5 H), 5.91 (b r s, 1 H), 5.61–5.60 (m, 1 H), 5.36 (b r s, 2 H), 4.98–4.86 (m, 4 H), 4.45–4.30 (m

, 1 H), 4.24–4.15 (m, 1 H), 4.07–4.02 (m, 1 H), 3.84–3.74 (m, 1 H), 2.97–2.82 (m, 5 H), 2.19–2.12 (m, 2 H), 1.93–1.11 (m, 16 H), 0.80–0.72 (m, 6 H).

[0387] MS (ESI) m/z : 1071.45 $[M+H]^+$

[0388] (1–2–4) ピレン (10) の合成

[化74]



[0389] ピレン (9) (15.6 mg, 14.6 μmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (1.0 mL) に溶解させたのち氷冷し、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (5.0 μL , 29 μmol)、1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート (11.4 mg, 21.9 μmol) を加えた。次に N-(5-アミノペンチル)マレイミド塩酸塩 (4.8 mg, 22 μmol) を加えて室温に戻し 3 時間攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。

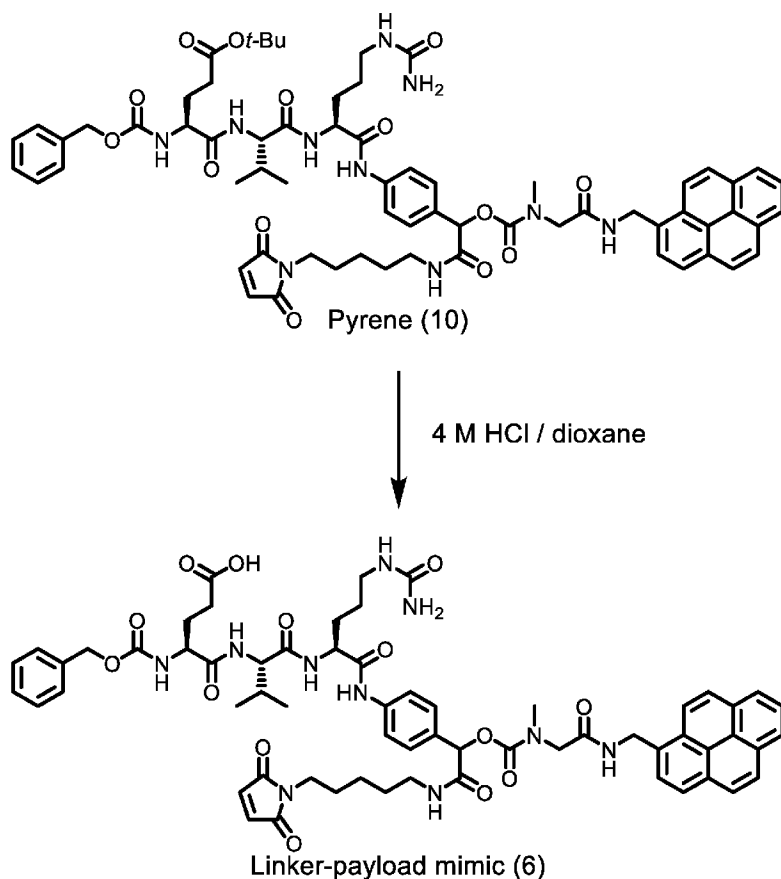
生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、ピレン（10）（15.4 mg, 12.5 μmol ）を得た。

[0390] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.11–10.01 (m, 1H), 8.91–8.63 (m, 1H), 8.40–7.96 (m, 12H), 7.72–7.27 (m, 11H), 6.97–6.94 (m, 2H), 5.99 (brs, 1H), 5.71–5.69 (m, 1H), 5.43 (brs, 2H), 5.14–4.96 (m, 4H), 4.49–4.40 (m, 1H), 4.30–4.23 (m, 1H), 4.16–3.83 (m, 3H), 3.25–3.22 (m, 1H), 3.02–2.90 (m, 7H), 2.26–2.22 (m, 2H), 2.01–1.98 (m, 1H), 1.92–1.84 (m, 1H), 1.77–1.66 (m, 2H), 1.65–1.04 (m, 16H), 1.12–1.04 (m, 2H), 0.88–0.80 (m, 6H).

[0391] MS (ESI) m/z : 1235.50 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0392] (1–2–5) Linker-payload mimic (6) の合成

[化75]



[0393] ピレン (10) (12.1 mg, 9.79 μmol) に1,4-ジオキサン (2.0 mL)、4 M塩化水素／ジオキサン溶液 (490 μL , 1.96 mmol) を順次加え、室温で4時間攪拌した。氷冷後、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (366 μL , 2.15 mmol) を加え、室温で10分間攪拌した。反応液を逆相分取クロマトグラフィーにて精製し、生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、Linker-payload mimic (6) (6.0 mg, 5.1 μmol) を得た。

[0394] ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 12.05 (brs, 1H), 10.04–9.94 (m, 1H), 8.84–8.57 (m, 1H), 8.32–7.89 (m, 12H), 7.72–7.20 (m, 11H), 6.90–6.86 (m, 2H), 5.90 (brs, 1H), 5.64–5.62 (m, 1H), 5.36 (brs, 2H), 5.07–4.8

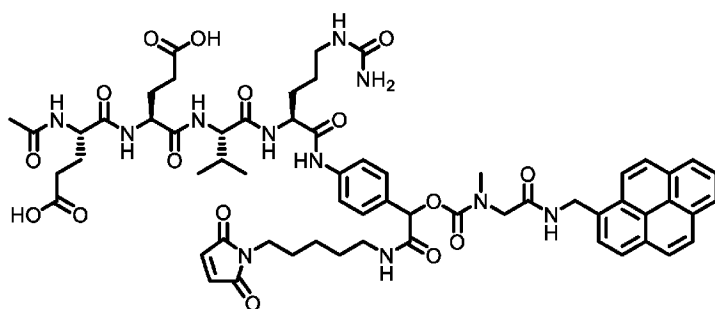
8 (m, 4 H), 4.42–4.29 (m, 1 H), 4.21–4.15 (m, 1 H), 4.08–3.76 (m, 3 H), 3.18–3.14 (m, 1 H), 2.95–2.82 (m, 7 H), 2.21–2.16 (m, 2 H), 1.92–0.97 (m, 13 H), 0.82–0.74 (m, 6 H).

[0395] MS (ESI) m/z : 1179.50 $[M+H]^+$

[0396] (1-3) Linker-payload mimic (11) の合成

Linker-payload mimic (11) は下記のように合成した。

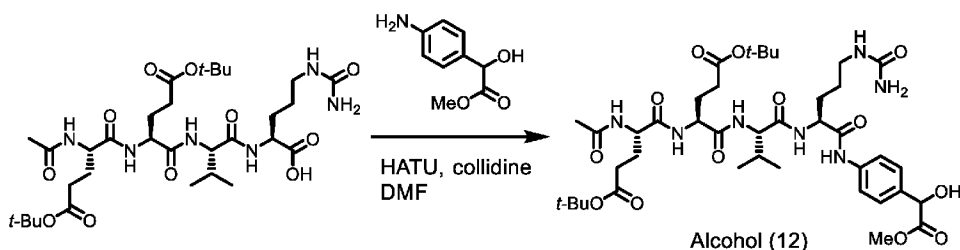
[化76]



Linker-payload mimic (11)

[0397] (1-3-1) アルコール (12) の合成

[化77]



[0398] Ac-Glu(t-Bu)-Glu(t-Bu)-Val-Cit-OH (50.0 mg, 72.8 μmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (800 μL) に溶解させ、1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1, 2, 3, トリアゾロ[4, 5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロホスファート (33.2 mg, 87.4 μmol)、2, 4, 6-トリメチルピリジン (11.5 μL , 87.4 μmol) を加え、室温にて1

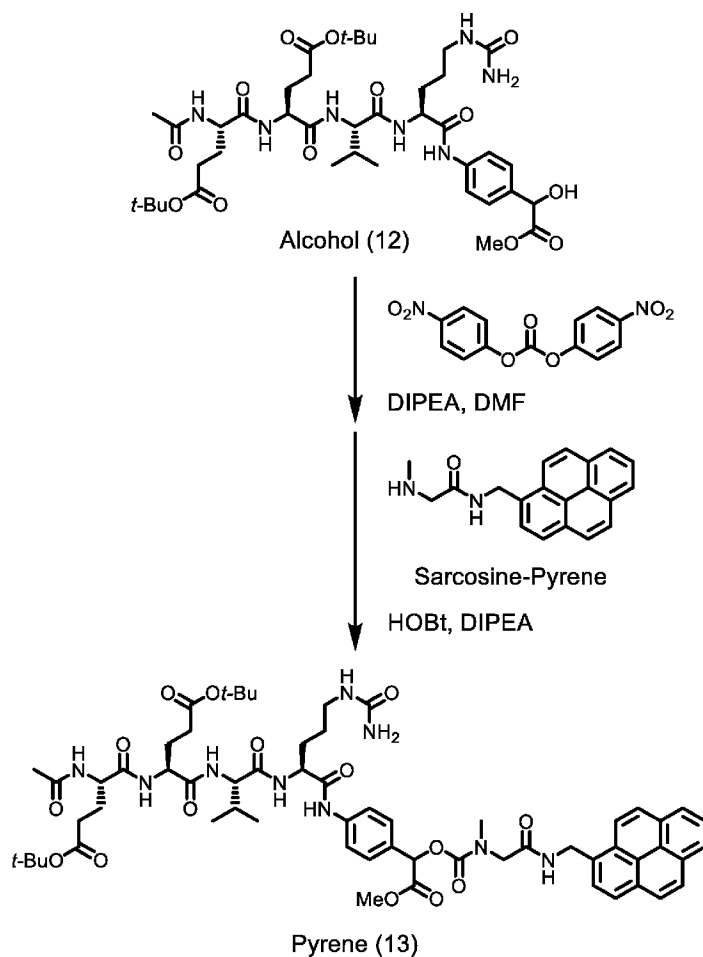
0分間攪拌した。続いて、4-アミノマンデル酸メチル（15.8mg, 87.4 μmol ）を加えて室温にて16時間攪拌した後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記アルコール（12）（54.0mg, 63.5 μmol ）を得た。

[0399] ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.00 (s, 1H), 8.26–7.88 (m, 3H), 7.68–7.60 (m, 1H), 7.57 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.32 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 6.00–5.97 (m, 1H), 5.43 (br s, 2H), 5.08 (s, 1H), 4.40–4.37 (m, 1H), 4.32–4.19 (m, 3H), 3.60 (s, 3H), 3.09–2.90 (m, 2H), 2.25–2.18 (m, 4H), 2.03–1.53 (m, 10H), 1.46–1.36 (m, 20H), 0.86 (d, $J=6.8$ Hz, 3H), 0.82 (d, $J=6.8$ Hz, 3H).

[0400] MS (ESI) m/z : 850.40 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0401] (1-3-2) ピレン (13) の合成

[化78]



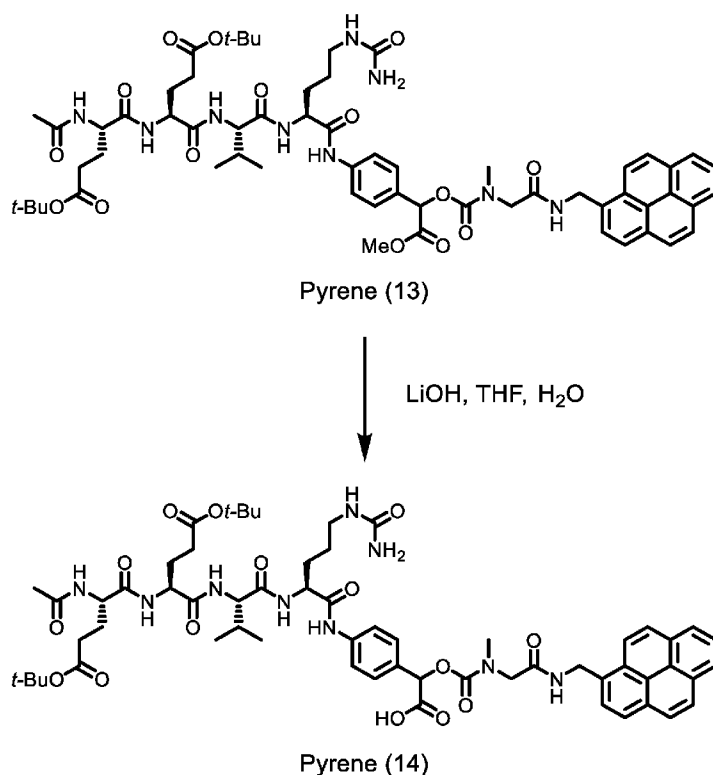
[0402] アルコール (12) (50.3 mg, 59.2 μmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (650 μL) に溶解させ、氷冷下5分間攪拌した後、炭酸ビス(4-ニトロフェニル) (54.0 mg, 178 μmol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (22.7 μL , 133 μmol) を加え、室温にて5時間攪拌した。その後、氷冷し、Sarcosine-Pyrene (89.5 mg, 296 μmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (12.0 mg, 88.8 μmol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (78.1 μL , 459 μmol) を加え、室温にて18時間攪拌した。反応後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記ピレン (13) (34.0 mg, 28.9 μmol) を得た。

[0403] ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.14–10.12 (m, 1H), 8.69–8.67 (m, 1H), 8.40–7.82 (m, 13H), 7.76–7.72 (m, 1H), 7.68–7.65 (m, 2H), 7.44–7.39 (m, 2H), 5.99 (brs, 1H), 5.79 (d, $J=6.4\text{ Hz}$, 1H), 5.44 (brs, 2H), 5.05–4.97 (m, 2H), 4.44–4.08 (m, 4H), 3.93–3.80 (m, 1H), 3.63–3.62 (m, 3H), 3.05–2.92 (m, 5H), 2.25–2.14 (m, 4H), 2.00–1.28 (m, 30H), 0.87–0.80 (m, 6H).

[0404] MS (ESI) m/z : 1178.50 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0405] (1–3–3) ピレン (14) の合成

[化79]



[0406] ピレン (13) (30.7 mg, 26.1 μmol) をテトラヒドロフラン (2.25 mL)、水 (0.75 mL) に溶解させ、氷冷下5分間攪拌した後、水酸化リチウム水和物 (5.5 mg, 0.13 mmol) を加え、

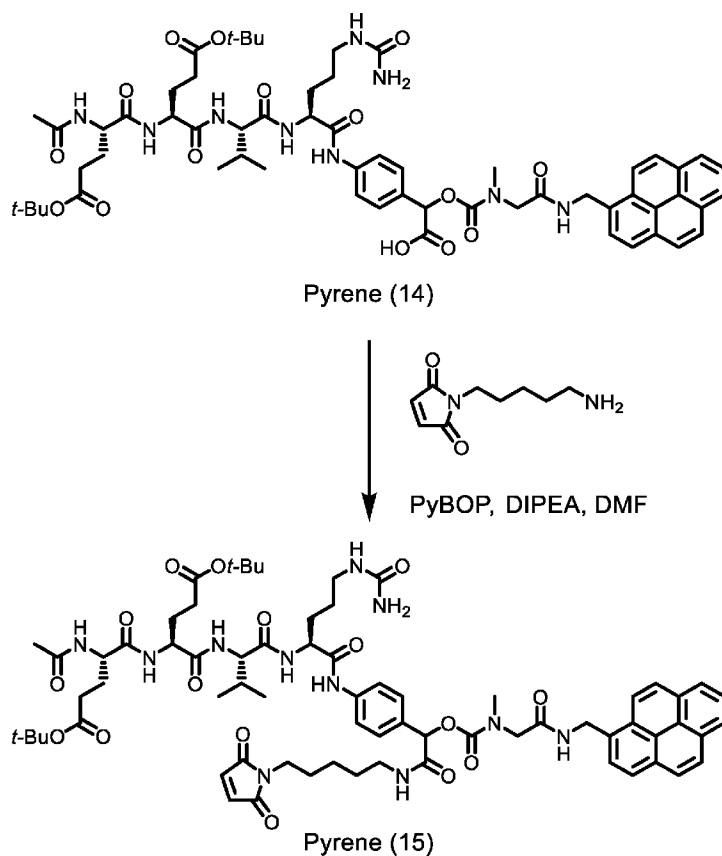
室温にて4時間攪拌した。反応終了後、0.1 M塩酸を用いて約pH 6に調整し、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記ピレン(14)(17.2 mg, 14.8 μ mol)を得た。

[0407] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13.06 (brs, 1H), 10.13–10.10 (m, 1H), 8.69–8.66 (m, 1H), 8.40–7.85 (m, 13H), 7.77–7.73 (m, 1H), 7.67–7.64 (m, 2H), 7.44–7.42 (m, 2H), 5.99 (brs, 1H), 5.68–5.67 (m, 1H), 5.44 (brs, 2H), 5.05–4.96 (m, 2H), 4.46–4.10 (m, 4H), 3.92–3.81 (m, 1H), 3.05–2.90 (m, 5H), 2.25–2.14 (m, 4H), 2.03–1.29 (m, 30H), 0.88–0.80 (m, 6H).

[0408] MS (ESI) m/z : 1164.55 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0409] (1–3–4)ピレン(15)の合成

[化80]



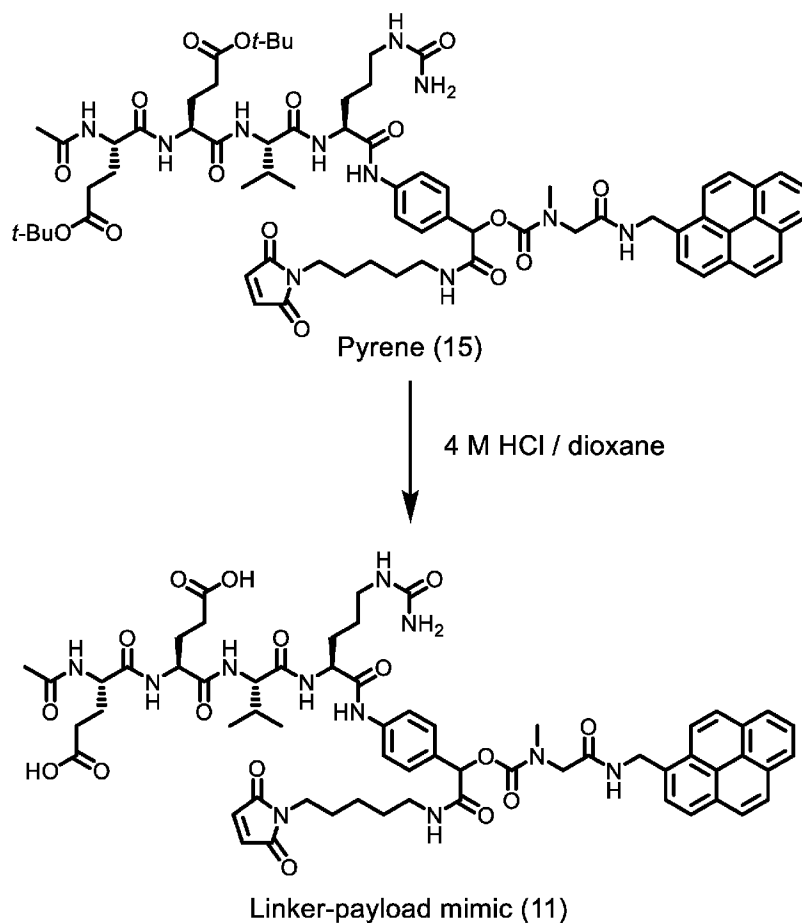
[0410] ピレン (14) (14.7 mg, 12.6 μmol) をN, N-ジメチルホルムアミド (1.0 mL) に溶解させたのち氷冷し、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (4.29 μL , 25.2 μmol)、1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート (9.8 mg, 19 μmol) を加えた。次にN-(5-アミノペンチル)マレイミド塩酸塩 (4.1 mg, 19 μmol) を加えて室温に戻し3.5時間攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、ピレン (15) (7.0 mg, 9.2 μmol) を得た。

[0411] ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.08–10.05 (m, 1H), 8.92–7.95 (m, 15H), 7.75–7.73 (m, 1H), 7.63–7.59 (m, 2H), 7.40–7.34 (m,

2 H), 6.97–6.94 (m, 2 H), 6.00–5.98 (m, 1 H), 5.70–5.69 (m, 1 H), 5.43 (brs, 2 H), 5.14–5.01 (m, 2 H), 4.45–4.38 (m, 1 H), 4.32–3.83 (m, 5 H), 3.25–3.20 (m, 1 H), 3.10–2.90 (m, 7 H), 2.25–2.18 (m, 4 H), 2.08–1.24 (m, 34 H), 1.12–1.04 (m, 2 H), 0.88–0.81 (m, 6 H).

[0412] MS (ESI) m/z : 1328.60 $[M+H]^+$

[0413] (1–3–5) Linker-payload mimic (11) の合成
[化81]



[0414] ピレン (15) (6.1 mg, 4.6 μmol) に 1,4-ジオキサン (920 μL)、4 M 塩化水素／ジオキサン溶液 (230 μL , 918 μmol) を順次加え、室温で4時間攪拌した。氷冷後、N,N-ジイソプロピル

エチルアミン (172 μ L, 1.10 mmol) を加え、室温で10分間攪拌した。反応液を逆相分取クロマトグラフィーにて精製し、生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、Linker-payload mimic (11) (3.7 mg, 3.0 μ mol) を得た。

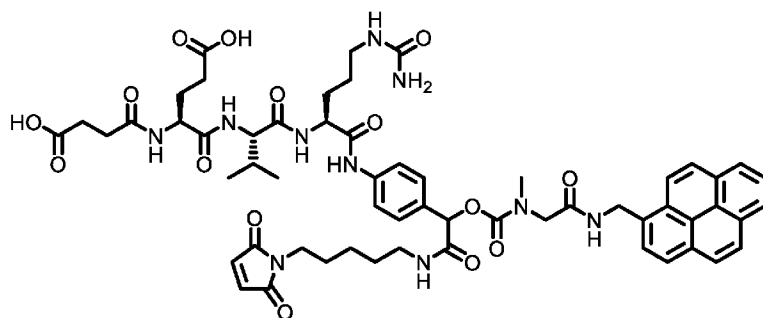
[0415] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.04 (brs, 2H), 10.01–9.98 (m, 1H), 8.83–7.89 (m, 15H), 7.71–7.69 (m, 1H), 7.56–7.51 (m, 2H), 7.33–7.26 (m, 2H), 6.90–6.87 (m, 2H), 5.91–5.90 (m, 1H), 5.64–5.62 (m, 1H), 5.36 (brs, 2H), 5.08–4.92 (m, 2H), 4.35–4.32 (m, 1H), 4.25–3.76 (m, 5H), 3.18–3.14 (m, 1H), 2.99–2.82 (m, 7H), 2.21–2.15 (m, 4H), 1.93–1.17 (m, 16H), 1.05–1.01 (m, 2H), 0.82–0.74 (m, 6H).

[0416] MS (ESI) m/z : 1216.45 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0417] (1–4) Linker-payload mimic (16) の合成

Linker-payload mimic (16) は下記のように合成した。

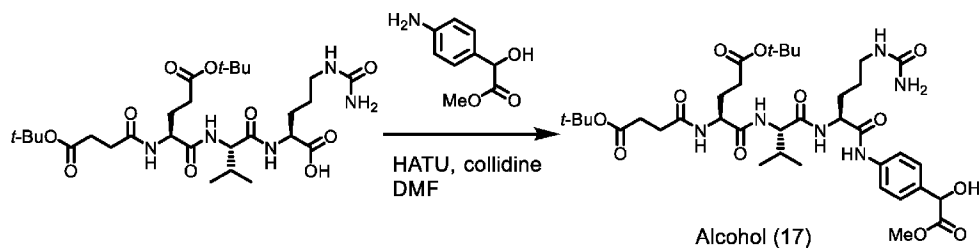
[化82]



Linker-payload mimic (16)

[0418] (1–4–1) アルコール (17) の合成

[化83]



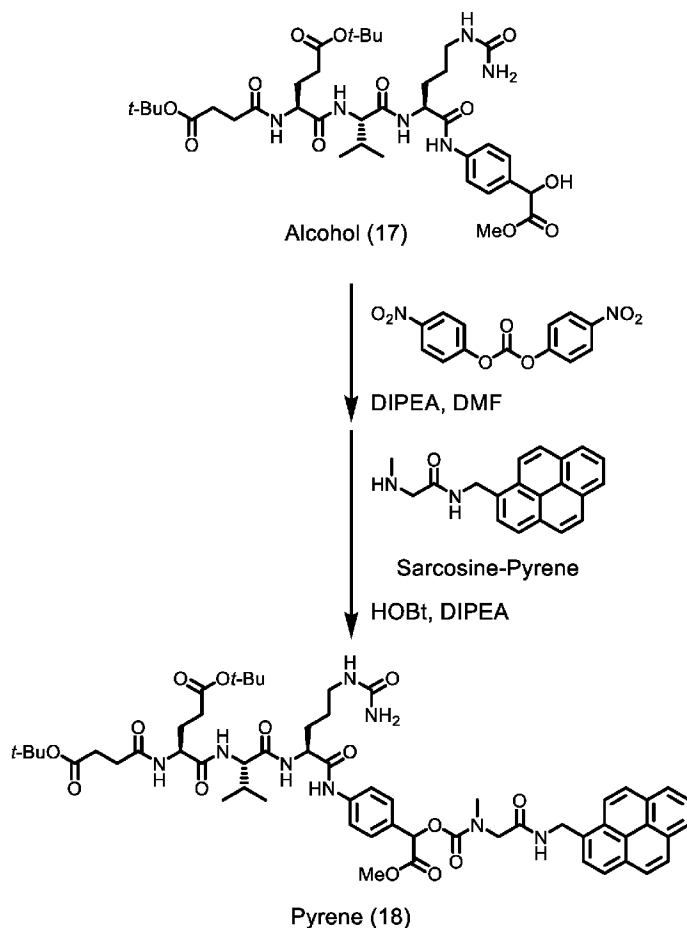
[0419] SCA (t-Bu)-Glu (t-Bu)-Val-Cit-OH (50.0 mg, 81.2 μmol) をN, N-ジメチルホルムアミド (890 μL) に溶解させ、1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1,2,3, トリアゾロ[4,5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロホスファート (37.0 mg, 97.4 μmol)、2,4,6-トリメチルピリジン (12.8 μL , 97.4 μmol) を加え、室温にて10分間攪拌した。続いて、4-アミノマンデル酸メチル (17.6 mg, 97.4 μmol) を加えて室温にて16時間攪拌した後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記アルコール (17) (60.4 mg, 77.5 μmol) を得た。

[0420] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.01 (s, 1H), 8.13 (d, $J=7.2\text{ Hz}$, 1H), 8.07 (d, $J=8.4\text{ Hz}$, 1H), 7.73 (d, $J=8.8\text{ Hz}$, 1H), 7.57 (d, $J=8.4\text{ Hz}$, 2H), 7.32 (d, $J=8.4\text{ Hz}$, 2H), 5.99 (brs, 1H), 5.43 (brs, 2H), 5.08 (s, 1H), 4.41-4.30 (m, 2H), 4.21-4.17 (m, 1H), 3.60 (s, 3H), 3.04-2.95 (m, 2H), 2.44-2.15 (m, 6H), 2.03-1.95 (m, 1H), 1.92-1.83 (m, 1H), 1.74-1.58 (m, 3H), 1.46-1.34 (m, 20H), 0.86 (d, $J=6.8\text{ Hz}$, 3H), 0.83 (d, $J=6.8\text{ Hz}$, 3H).

[0421] MS (ESI) m/z : 779.40 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0422] (1-4-2) ピレン (18) の合成

[化84]



[0423] アルコール (17) (58.0 mg, 74.5 μmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (820 μL) に溶解させ、氷冷下 5 分間攪拌した後、炭酸ビス (4-ニトロフェニル) (68.0 mg, 223 μmol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (28.5 μL , 168 μmol) を加え、室温にて 6 時間攪拌した。その後、氷冷し、Sarcosine-Pyrene (113 mg, 373 μmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (15.1 mg, 112 μmol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (98.3 μL , 578 μmol) を加え、室温にて 17 時間攪拌した。反応後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記ピレン (18) (37.1 mg, 33.5 μmol)

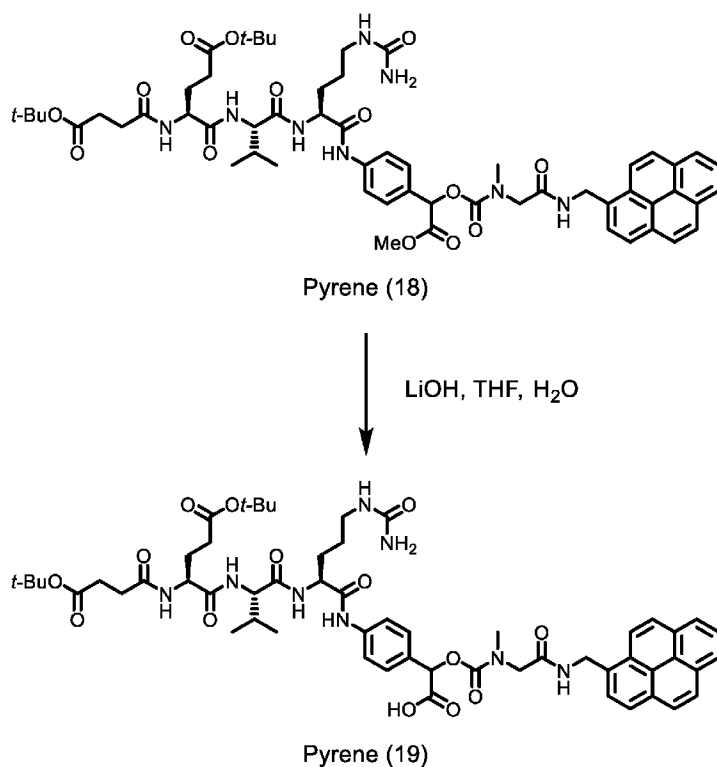
)を得た。

[0424] ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.15–10.13 (m, 1H), 8.70–8.67 (m, 1H), 8.40–8.03 (m, 11H), 7.90–7.86 (m, 1H), 7.75–7.72 (m, 1H), 7.68–7.64 (m, 2H), 7.44–7.39 (m, 2H), 5.99 (brs, 1H), 5.79 (d, $J=6.8\text{Hz}$, 1H), 5.44 (brs, 2H), 5.05–4.98 (m, 2H), 4.40–4.08 (m, 3H), 3.93–3.80 (m, 1H), 3.63–3.62 (m, 3H), 3.05–2.90 (m, 5H), 2.44–2.15 (m, 6H), 2.02–1.98 (m, 1H), 1.91–1.85 (m, 1H), 1.75–1.55 (m, 3H), 1.50–1.30 (m, 20H), 0.88–0.80 (m, 6H).

[0425] MS (ESI) m/z : 1107.55 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0426] (1-4-3) ピレン (19) の合成

[化85]



[0427] ピレン (18) (17.4mg, 15.7 μmol) をテトラヒドロフラ

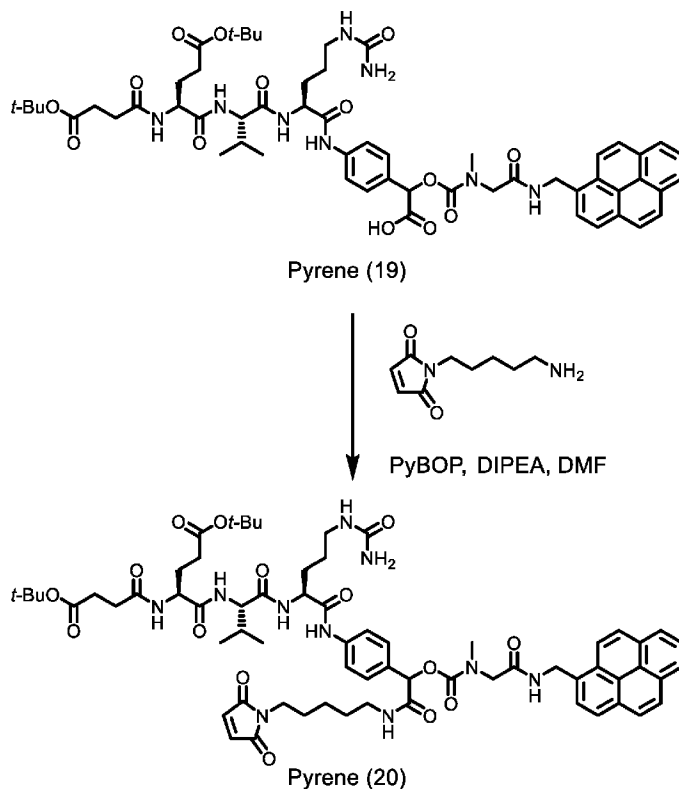
ン (675 μ L)、水 (225 μ L) に溶解させ、氷冷下5分間攪拌した後、1 M水酸化リチウム水溶液 (86.4 μ L, 86.4 μ mol) を加え、氷冷下で5時間攪拌した。反応終了後、0.1 M塩酸を用いて約pH6に調整し、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記ピレン (19) (17.2 mg, 15.7 μ mol) を得た。

[0428] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13.06 (brs, 1H), 10.14–10.11 (m, 1H), 8.68–8.66 (m, 1H), 8.40–8.01 (m, 11H), 7.89–7.85 (m, 1H), 7.75–7.72 (m, 1H), 7.67–7.64 (m, 2H), 7.44–7.41 (m, 2H), 5.99 (brs, 1H), 5.68–5.67 (m, 1H), 5.44 (brs, 2H), 5.05–4.93 (m, 2H), 4.44–4.10 (m, 3H), 3.92–3.81 (m, 1H), 3.05–2.94 (m, 5H), 2.43–2.15 (m, 6H), 2.02–1.97 (m, 1H), 1.88–1.85 (m, 1H), 1.77–1.66 (m, 3H), 1.61–1.30 (m, 20H), 0.88–0.80 (m, 6H).

[0429] MS (ESI) m/z : 1093.50 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0430] (1–4–4) ピレン (20) の合成

[化86]



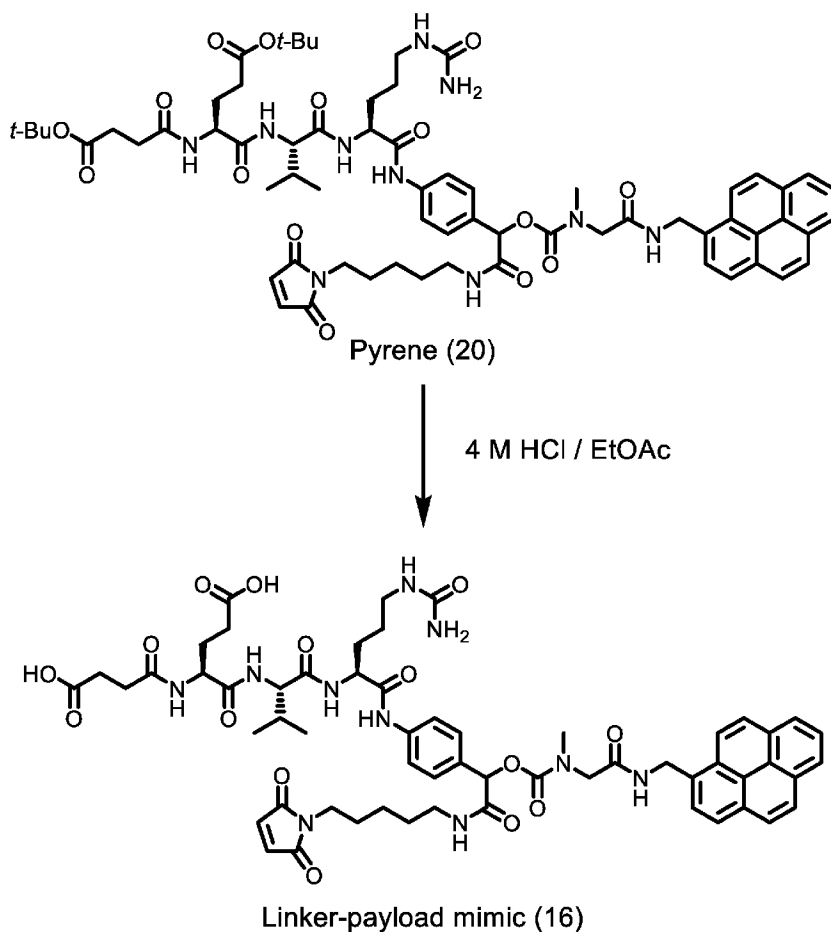
[0431] ピレン (19) (16.3 mg, 14.9 μmol) をN, N-ジメチルホルムアミド (1.0 mL) に溶解させたのち氷冷し、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (5.1 μL , 30 μmol)、1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート (11.7 mg, 22.4 μmol) を加えた。次にN-(5-アミノペンチル) マレイミド塩酸塩 (4.9 mg, 22 μmol) を加えて室温に戻し3時間攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、ピレン (20) (12.1 mg, 9.6 μmol) を得た。

[0432] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.01–9.98 (m, 1H), 8.85–7.88 (m, 14H), 7.68–7.65 (m, 1H), 7.56–7.51 (m, 2H), 7.33–7.27 (m, 2H), 6.90–6.87 (m, 2H), 5.92–5.90 (m, 1H)

, 5.63–5.62 (m, 1H), 5.36 (brs, 2H), 5.08–4.92 (m, 2H), 4.36–3.76 (m, 5H), 3.18–3.14 (m, 1H), 3.00–2.83 (m, 7H), 2.36–2.08 (m, 6H), 1.95–1.89 (m, 1H), 1.84–1.78 (m, 1H), 1.68–1.50 (m, 3H), 1.42–1.17 (m, 24H), 1.07–0.97 (m, 2H), 0.81–0.74 (m, 6H).

[0433] MS (ESI) m/z : 1257.55 $[M+H]^+$

[0434] (1–4–5) Linker-payload mimic (16) の合成
[化87]



[0435] ピレン (20) (10.5 mg, 8.35 μmol) に酢酸エチル (1.7 mL)、4 M塩化水素／酢酸エチル (2.09 mL, 8.36 mmol) を順次加え、室温で4.5時間攪拌した。氷冷後、N,N-ジイソプロピル

エチルアミン (781 μ L, 4.59 mmol) を加え、室温で10分間攪拌した。反応液を逆相分取クロマトグラフィーにて精製し、生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、Linker-payload mimic (16) (7.5 mg, 6.6 μ mol) を得た。

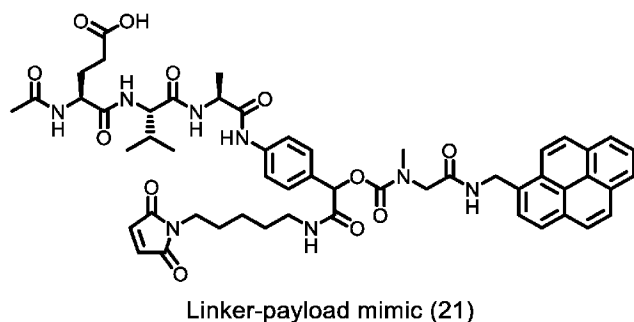
[0436] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.02 (brs, 2H), 10.04–9.98 (m, 1H), 8.85–7.89 (m, 14H), 7.65–7.62 (m, 1H), 7.56–7.52 (m, 2H), 7.33–7.27 (m, 2H), 6.90–6.87 (m, 2H), 5.92 (brs, 1H), 5.63–5.62 (m, 1H), 5.37 (brs, 2H), 5.08–4.93 (m, 2H), 4.36–3.76 (m, 5H), 3.18–3.14 (m, 1H), 3.02–2.80 (m, 7H), 2.38–2.16 (m, 6H), 1.96–1.77 (m, 2H), 1.70–1.17 (m, 9H), 1.06–0.98 (m, 2H), 0.81–0.74 (m, 6H).

[0437] MS (ESI) m/z : 1145.45 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0438] (1–5) Linker-payload mimic (21) の合成

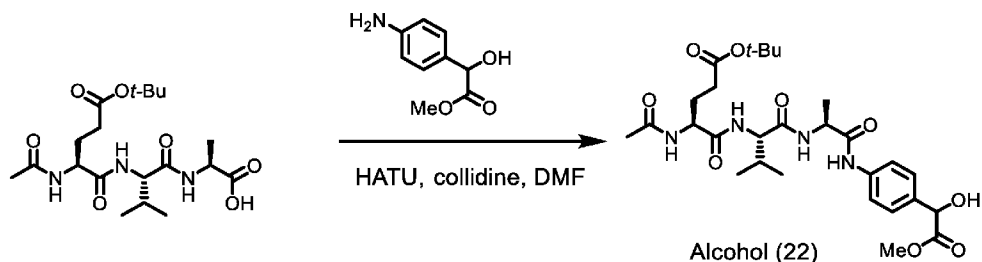
Linker-payload mimic (21) は下記のように合成した。

[化88]



[0439] (1–5–1) アルコール (22) の合成

[化89]



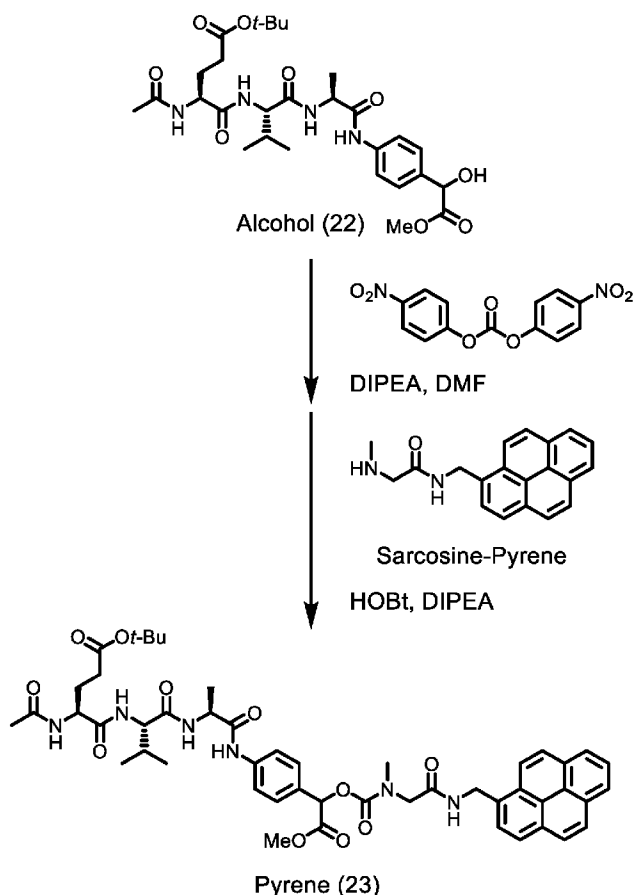
[0440] Ac-Glu(OtBu)-Val-Ala-OH (20.9 mg, 50.3 μmol) をN, N-ジメチルホルムアミド (700 μL) に溶解させ、1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1, 2, 3, トリアゾロ[4, 5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロホスファート (29.0 mg, 76.3 μmol)、2, 4, 6-トリメチルピリジン (10.1 μL , 76.7 μmol) を加え、室温にて12分間攪拌した。続いて、4-アミノマンデル酸メチル (11.0 mg, 60.7 μmol) を加えて室温にて18時間攪拌した後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記アルコール(22) (20.3 mg, 35.1 μmol) を得た。

[0441] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.98–9.89 (m, 1H), 8.32–8.18 (m, 1H), 8.07–7.85 (m, 1H), 7.73–7.59 (m, 1H), 7.55 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.32 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 5.08 (s, 1H), 4.45–4.34 (m, 1H), 4.32–4.27 (m, 1H), 4.20–4.09 (m, 1H), 3.59 (s, 3H), 2.24–2.20 (m, 2H), 2.01–1.96 (m, 1H), 1.90–1.80 (m, 4H), 1.72–1.67 (m, 1H), 1.39–1.36 (m, 9H), 1.30 (d, $J=7.2$ Hz, 3H), 0.86 (d, $J=6.8$ Hz, 3H), 0.82 (d, $J=6.8$ Hz, 3H) .

[0442] MS (ESI) m/z : 579.30 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0443] (1-5-2) ピレン (23) の合成

[化90]



[0444] アルコール (22) (17.5 mg, 30.2 μmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (174 μL) に溶解させ、氷冷下5分間攪拌した後、炭酸ビス (4-ニトロフェニル) (18.9 mg, 60.8 μmol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (7.80 μL , 45.4 μmol) を加え、室温にて30分間攪拌した。LCMSを確認したところ原料が残っていたため、炭酸ビス (4-ニトロフェニル) (9.5 mg, 31 μmol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (3.90 μL , 22.7 μmol) を加え、室温にて1時間攪拌した。その後、氷冷し、Sarcosine-Pyrene (36.2 mg, 120 μmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (6.3 mg, 47 μmol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (40.3 μL , 235 μmol) を加え、室温にて1時間攪拌した。反応後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフ

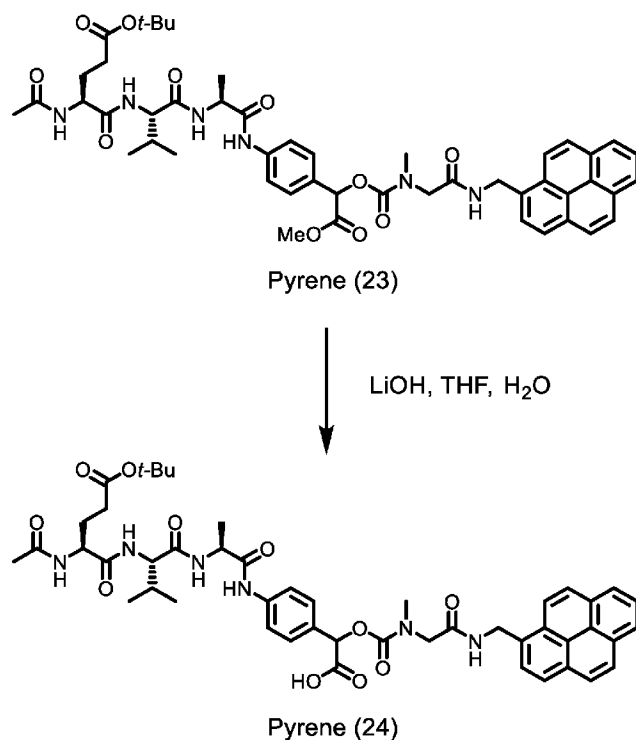
ラクシオンを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記ピレン (23) (12.9 mg, 14.2 μ mol) を得た。

[0445] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.05–10.02 (m, 1H), 8.61–8.60 (m, 1H), 8.30–7.78 (m, 12H), 7.67–7.64 (m, 1H), 7.57 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.37–7.33 (m, 2H), 5.72–5.70 (m, 1H), 4.98–4.89 (m, 2H), 4.34–4.00 (m, 3H), 3.85–3.75 (m, 1H), 3.56–3.55 (m, 3H), 2.93–2.87 (m, 3H), 2.17–2.13 (m, 2H), 1.94–1.91 (m, 1H), 1.85–1.75 (m, 4H), 1.65–1.61 (m, 1H), 1.31–1.23 (m, 12H), 0.80–0.73 (m, 6H).

[0446] MS (ESI) m/z : 907.35 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0447] (1–5–3) ピレン (24) の合成

[化91]



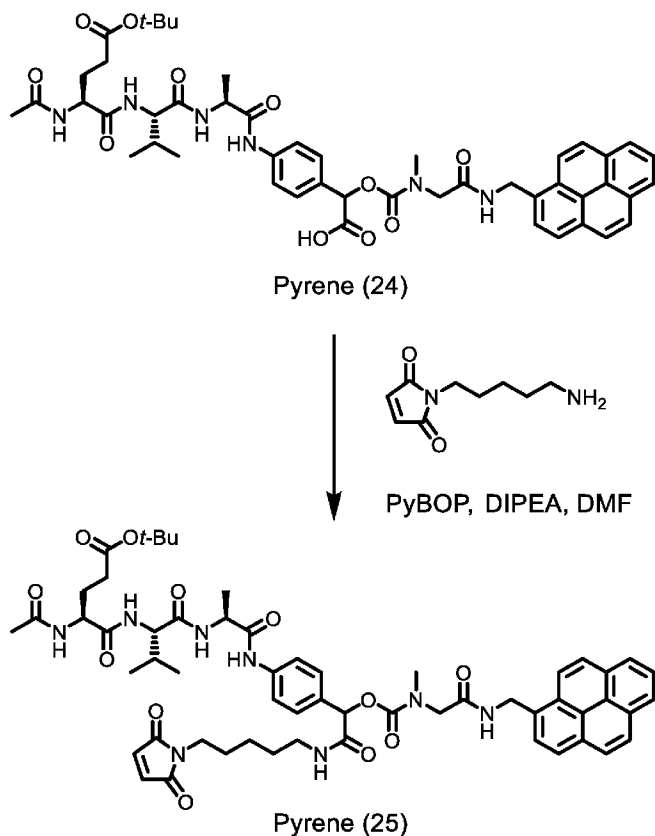
[0448] ピレン (23) (11.8 mg, 13.0 μmol) をテトラヒドロフラン (800 μL)、水 (400 μL) に溶解したのち氷冷し、1 M水酸化リチウム水溶液 (65 μL , 65 μmol) を加え、30分間攪拌した。反応終了後、0.1 M塩酸を用いて約 pH 6 に調整し、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記ピレン (24) (8.9 mg, 10.0 μmol) を得た。

[0449] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13.05 (brs, 1H), 10.04–9.91 (m, 1H), 8.63–8.60 (m, 1H), 8.33–7.77 (m, 12H), 7.69–7.55 (m, 3H), 7.37–7.35 (m, 2H), 5.61–5.60 (m, 1H), 4.98–4.86 (m, 2H), 4.26–4.03 (m, 3H), 3.84–3.74 (m, 1H), 2.93–2.87 (m, 3H), 2.18–2.13 (m, 2H), 1.95–1.92 (m, 1H), 1.85–1.77 (m, 4H), 1.67–1.62 (m, 1H), 1.31–1.24 (m, 12H), 0.81–0.75 (m, 6H).

[0450] MS (ESI) m/z : 893.35 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0451] (1–5–4) ピレン (25) の合成

[化92]



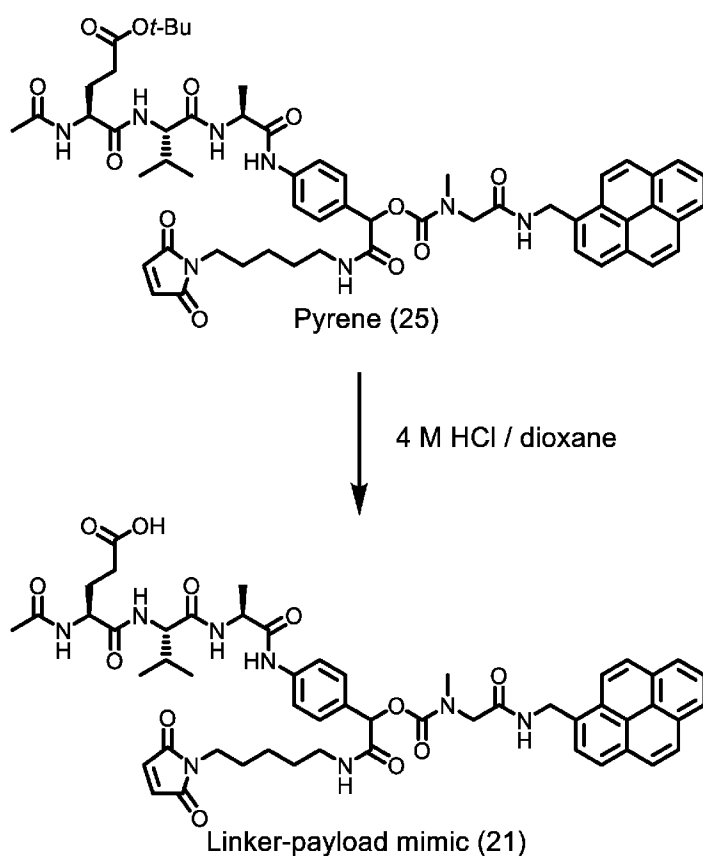
[0452] ピレン (24) (6.7 mg, 7.5 μmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (400 μL) に溶解させたのち氷冷し、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (3.9 μL , 22 μmol)、1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート (5.9 mg, 11 μmol) を加えた。次に N-(5-アミノペンチル)マレイミド塩酸塩 (2.4 mg, 11 μmol) を加えて室温に戻し1時間攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、ピレン (25) (4.1 mg, 3.9 μmol) を得た。

[0453] ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.98–9.95 (m, 1H), 8.83–7.77 (m, 14H), 7.67–7.65 (m, 1H), 7.56–7.50 (m, 2H), 7.34–7.27 (m, 2H), 6.89–6.86 (m, 2H), 5.63–5.61 (m, 1H),

5.06–4.93 (m, 2H), 4.37–3.76 (m, 5H), 3.17–3.14 (m, 1H), 2.95–2.83 (m, 5H), 2.17–2.10 (m, 2H), 1.95–1.89 (m, 1H), 1.85–1.75 (m, 4H), 1.65–1.62 (m, 1H), 1.31–1.17 (m, 16H), 1.02–1.00 (m, 2H), 0.81–0.74 (m, 6H).

[0454] MS (ESI) m/z : 1057.45 $[M+H]^+$

[0455] (1–5–5) Linker-payload mimic (21) の合成
[化93]



[0456] ピレン (25) (2.4 mg, 2.3 μmol) に 1,4-ジオキサン (454 μL)、4 M 塩化水素／ジオキサン溶液 (568 μL , 2.27 mmol) を順次加え、室温で 4 時間攪拌した。N,N-ジメチルホルムアミド (300 μL) を加えたのち、氷冷下、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (214 μL , 1.25 mmol) を加え、室温で 10 分間攪拌した。反

応液を逆相分取クロマトグラフィーにて精製し、生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、Linker-payload mimic (21) (1.1 mg, 1.1 μ mol) を得た。

[0457] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.99 (brs, 1H), 9.98–9.96 (m, 1H), 8.84–7.88 (m, 14H), 7.66–7.63 (m, 1H), 7.54–7.50 (m, 2H), 7.34–7.27 (m, 2H), 6.90–6.87 (m, 2H), 5.63–5.61 (m, 1H), 5.07–4.93 (m, 2H), 4.36–3.76 (m, 5H), 3.17–3.14 (m, 1H), 2.95–2.83 (m, 5H), 2.20–2.16 (m, 2H), 1.95–1.90 (m, 1H), 1.88–1.76 (m, 4H), 1.67–1.62 (m, 1H), 1.32–1.17 (m, 7H), 1.02–1.01 (m, 2H), 0.81–0.74 (m, 6H).

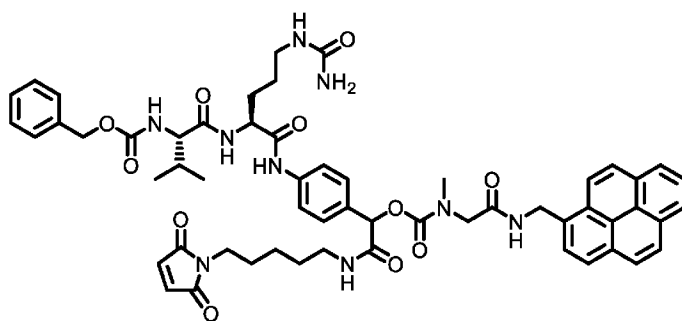
[0458] MS (ESI) m/z : 999.35 [M-H] $^-$

[0459] 比較例1: Linker-payloadの合成

(1-1) Linker-Payload (26) の合成

Linker-Payload (26) は下記のように合成した。

[化94]

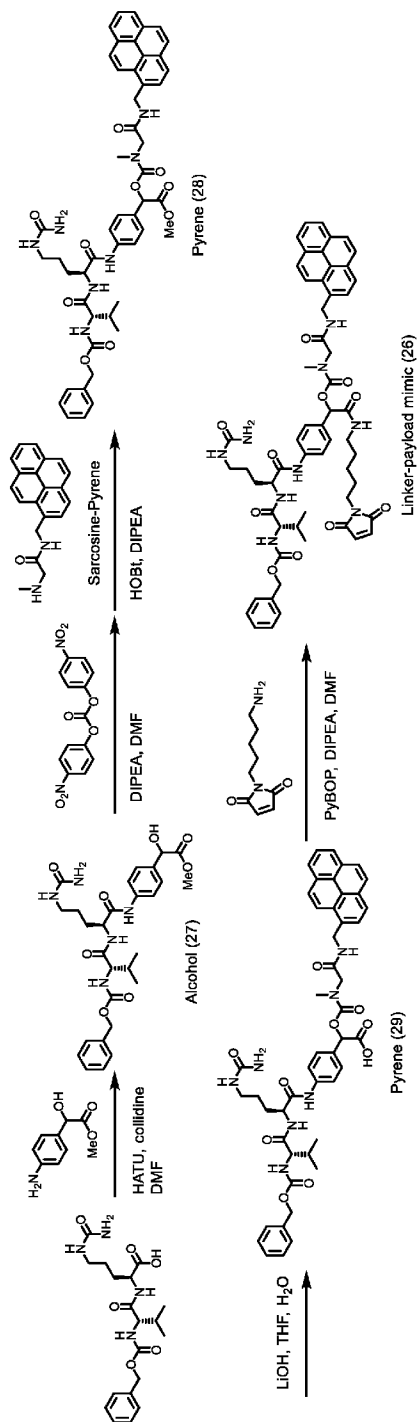


Linker-payload mimic (26)

[0460] Linker-Payload (26) は下記のスキームに従い合成した。

。

[化95]



[0461] Linker-Payload (26) のMS分析結果は下記の通りであった。

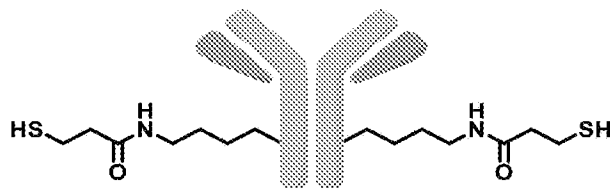
[0462] MS (ESI) m/z : 1050.55 $[M+H]^+$

[0463] 実施例2 : ADC mimicの合成

(2-1) ADC mimicの合成

以降の比較例および実施例では、チオール基導入抗体として、国際公開第2019/240287号(WO2019/240287A1)の実施例81-7に記載される抗体誘導体(チオール基導入トラスツズマブ)を用いた。この抗体誘導体は、抗体重鎖の246位または248位のリジン残基の側鎖のアミノ基を介して、トラスツズマブ(ヒト化IgG1抗体)にチオール基が位置選択的に導入されている下記構造を有する(リジン残基の位置はE U n u m b e r i n gに従う)。

[化96]



(上記構造において、抗体重鎖から伸びている $\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ は、リジン残基の側鎖に対応し、このリジン残基の側鎖中のアミノ基に対してチオール含有基である $\text{HS}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})$ が付加されている。本抗体は、ペプチドマッピング法で他のリジン残基での修飾が検出されなかったことから、抗体重鎖の246位または248位での位置選択性が100%であると解される。)

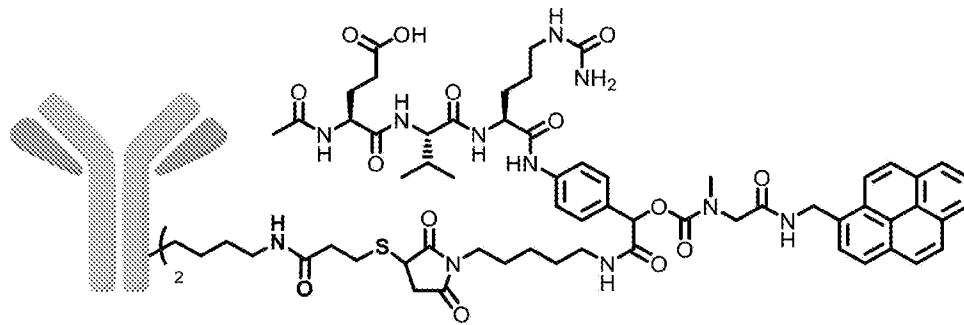
[0464] チオール基導入抗体のbuffer (pH7.4 PBSバッファー) 溶液(20 μM)に実施例1で合成したLinker-payload mimicのDMF溶液(10 mM)を10当量加え、室温にて2時間静置後、NAP-5 Columns (GEヘルスケア社製)を用いて精製してADC mimicを得た。

[0465] 実施例2-1-1: ADC mimic 1の合成

実施例1-1で合成したLinker-payload mimic (1)とチオール含有抗体より、下記構造のADC mimic 1を合成した。ESI-TOFMS分析を行い、反応生成物はLinker-payload mimic (1)が2個導入された150350にピークが確認され

た。

[化97]

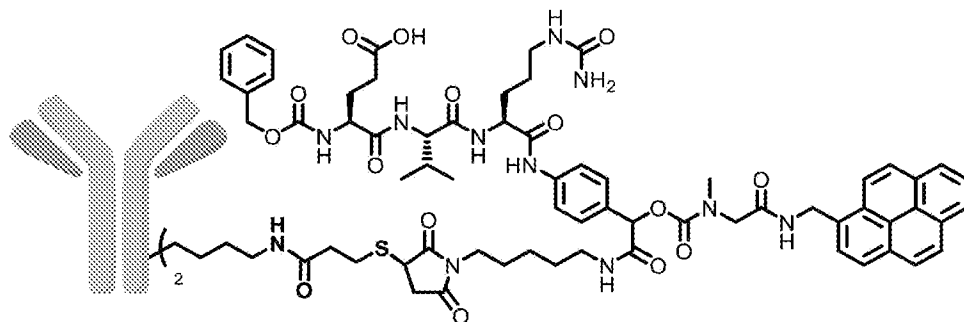


ADC mimic 1

[0466] 実施例 2-1-2 : ADC mimic 2 の合成

同様に実施例 1-2 の Linker-payload mimic (6) とチオール含有抗体より、下記構造の ADC mimic 2 を合成した。ESI-TOFMS 分析を行い、反応生成物は Linker-payload mimic (6) が 2 個導入された 150535 にピークが確認された。

[化98]

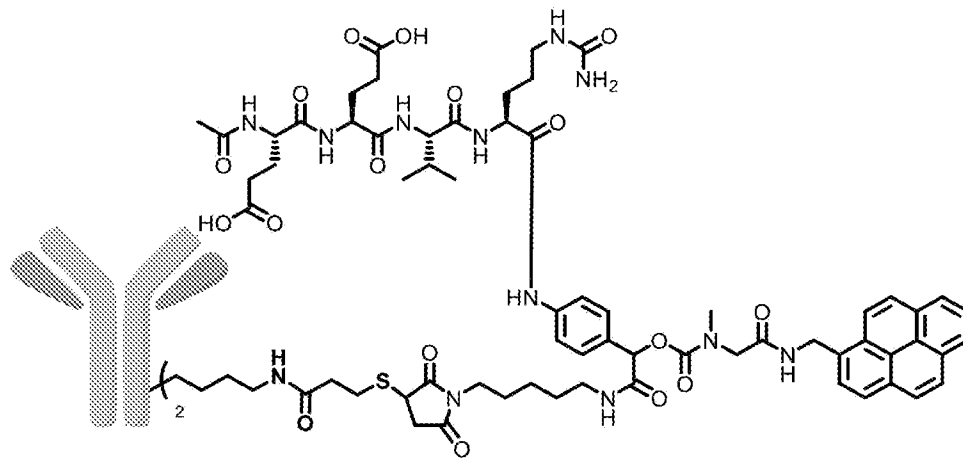


ADC mimic 2

[0467] 実施例 2-1-3 : ADC mimic 3 の合成

同様に実施例 1-3 の Linker-payload mimic (11) とチオール含有抗体より、下記構造の ADC mimic 3 を合成した。ESI-TOFMS 分析を行い、反応生成物は Linker-payload mimic (11) が 2 個導入された 150609 にピークが確認された。

[化99]

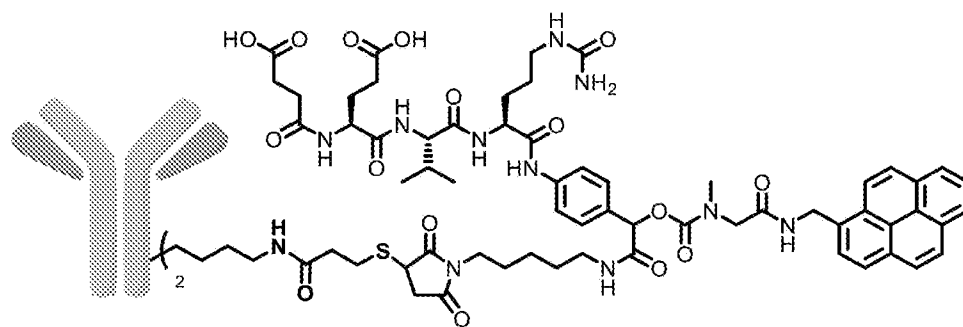


ADC mimic 3

[0468] 実施例 2-1-4 : ADC mimic 4 の合成

同様に実施例 1-4 の Linker-payload mimic (16) とチオール含有抗体より、下記構造の ADC mimic 4 を合成した。ESI-TOFMS 分析を行い、反応生成物は Linker-payload mimic (16) が 2 個導入された 150466 にピークが確認された。

[化100]



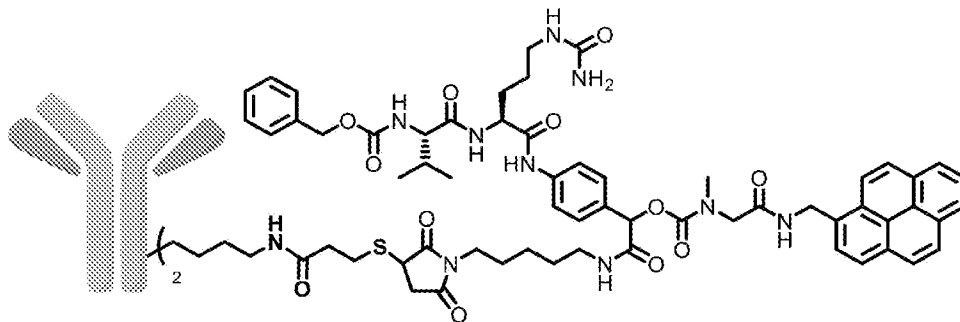
ADC mimic 4

[0469] 比較例 2-1-5 : ADC mimic 5 の合成

同様に比較例 1 の Linker-payload mimic (26) とチオール含有抗体より、下記構造の ADC mimic 5 を合成した。ESI-TOFMS 分析を行い、反応生成物は Linker-payload mimic (26) が 2 個導入された 150276 にピークが確認された。

。

[化101]



ADC mimic 5

[0470] (2-2) ADC mimicのDAR解析

実施例2-1で合成したADC mimicのESI-TOFMS分析は既報(WO2019/240287A1)に従って行い、DARは2であることを確認した。

[0471] [表1]

表1. ADC mimicのDAR

	Linker-payload mimic	実施例/比較例	DAR
ADC mimic 1	Linker-payload mimic (1)	実施例2-1-1	2
ADC mimic 2	Linker-payload mimic (6)	実施例2-1-2	2
ADC mimic 3	Linker-payload mimic (11)	実施例2-1-3	2
ADC mimic 4	Linker-payload mimic (16)	実施例2-1-4	2
ADC mimic 5	Linker-payload mimic (26)	比較例2-1-5	2

[0472] 実施例3：疎水性カラムクロマトグラフィー(HIC-HPLC)による、ADCおよびADC mimicの疎水性度の評価

既報(Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)に従い、HIC-HPLC分析を行った。測定は下記の条件を用いて行った。HICクロマトグラムにおける、ADCのリテンションタイムによってADCの疎水性度を評価することができる。

[0473] 測定システム: Chromaster (登録商標) (日立社製)

カラム: 東ソーバイオサイエンス社製 Tosoh Biobutyl NP R 2.5 μ m 4.6 $\times$ 35 mmカラム

グラジエント: 溶離液A/Bの線形グラジエント

流速：0.8 mL／分

溶離液A：1.1 M (NH₄)₂SO₄, 25 mM Na₂HPO₄／NaH₂PO₄ (pH 6.0)

溶離液B：25 mM Na₂HPO₄／NaH₂PO₄ (pH 6.0、25 v／v % イソプロパノール添加)

検出器：UV (280 nm)

[0474] [表2]

表2. HIC-HPLCを用いたADCおよびADC mimicの疎水性度の評価

	Linker-payload mimic もしくはLinker-payload	実施例/比較例	リテンションタイム
ADC mimic 1	Linker-payload mimic (1)	実施例2-1-1	11.0分
ADC mimic 2	Linker-payload mimic (6)	実施例2-1-2	12.9分
ADC mimic 3	Linker-payload mimic (11)	実施例2-1-3	10.5分
ADC mimic 4	Linker-payload mimic (16)	実施例2-1-4	11.0分
ADC mimic 5	Linker-payload mimic (26)	比較例2-1-5	13.6分

[0475] その結果、実施例2-1-1～2-1-4で合成したADC mimic はリテンションタイムが早い傾向であることが確認され、親水性度が高いことがわかる。よって、実施例2-1-1～2-1-4で合成したADC mimic は、血漿クリアランスが遅く、体内に留まる時間が長いと考えられることから、好ましいADCであることが確認された。

[0476] 実施例4：サイズ排除クロマトグラフィー (SEC-HPLC) による、ADCおよびADC mimicの凝集率の評価

既報 (Chemistry Select, 2020, 5, 8435-8439) に従い、SEC-HPLC分析を行った。測定は下記の条件を用いて行った。

[0477] 測定システム：1260 HPLC system (Agilent社製)

カラム：Agilent社製AdvanceBio SEC 300 Å 2.7 μm, 4.6 mm×150 mm

流速：0.25 mL／分

溶離液：100 mMリン酸二水素ナトリウム／リン酸水素ナトリウム, 250 mM塩化ナトリウムの水溶液 (pH 6.8), 10% v／v イソプロパノール

ール

検出器：UV（280nm）

[0478] [表3]

表3. SEC-HPLCを用いたADCおよびADC mimicの凝集率の評価

	Linker-payload mimic もしくはLinker-payload	実施例/比較例	凝集率
ADC mimic 1	Linker-payload mimic (1)	実施例2-1-1	1.6%
ADC mimic 2	Linker-payload mimic (6)	実施例2-1-2	2.7%
ADC mimic 3	Linker-payload mimic (11)	実施例2-1-3	1.5%
ADC mimic 4	Linker-payload mimic (16)	実施例2-1-4	2.4%
ADC mimic 5	Linker-payload mimic (26)	比較例2-1-5	2.7%

[0479] 実施例5：酵素カテプシンBを用いた、ADC mimicの評価

各種ADC mimicのカテプシンBによる切断能は下記のように、ADC mimicから脱落した蛍光分子の量を解析することで評価した。

[0480] (5-1) カテプシンB切断性試験

既報（Nature Communications 2018, 9, 2512）に従って下記の通り実施した。MES buffer（10mM MES, 40μM DTT, pH5.0）180μLに対し、1mg/mLの濃度になるようにADC mimicを加えたのち、6本のエッペンチューブに30μLずつ分注した。6本のサンプルのうち3本は、0℃にて即座にアセトニトリルを100μLずつ加えてボルテックスで攪拌したのち遠心分離を行うことで、沈殿物を得た。生じた上澄み溶液を回収し、HPLC分析を行った。残りの3本は37℃で6時間インキュベーションした。各サンプルにアセトニトリルを100μLずつ加えてボルテックスで攪拌したのち遠心分離を行うことで、沈殿物を得た。生じた上澄み溶液を回収し、HPLC分析を行った。

[0481] (5-2) HPLC分析を用いた、脱落した蛍光分子の量の解析

測定は、液体クロマトグラフィー／蛍光検出法を用いて、ADC mimicから脱落した蛍光分子量を測定した。実施例7-1で0℃にて即座にアセトニトリルを加えた3本のサンプルを0時間のものとし、実施例7-1に記載されるように37℃で6時間インキュベーションした3本のサンプルを

6時間のものとし、6時間サンプルと0時間サンプルの蛍光強度の差分を解析した。

[0482] 別途Pyreneを用いて、HPLCによる蛍光強度のエリア面積と、濃度の相関を算出した。その算出式を用いて上記各ADC mimicの蛍光強度の差分を濃度に変換した。0時間の濃度を100%としたときの、前述の蛍光強度の差分の割合を脱落率として算出した。

[0483] [表4]

表4. ADC mimicのカテプシンB切断能の評価

	Linker-payload mimic造	実施例/比較例	6時間における蛍光分子の脱落率
ADC mimic 1	Linker-payload mimic (1)	実施例2-1-1	200%
ADC mimic 2	Linker-payload mimic (6)	実施例2-1-2	200%
ADC mimic 3	Linker-payload mimic (11)	実施例2-1-3	200%
ADC mimic 4	Linker-payload mimic (16)	実施例2-1-4	79%
ADC mimic 5	Linker-payload mimic (26)	比較例2-1-5	200%

[0484] 表4に示した通り、合成したADC mimicは十分なカテプシンB切断を有していることが分かった。

[0485] 実施例6：マウス血漿を用いた、ADC mimicの評価

(6-1) ADC mimicの血漿中安定性試験

マウス血漿(Charles River社製)500 μ Lに対し、0.1mg/mLの濃度になるようにADC mimicを加えたのち滅菌ろ過を行った。この溶液を6本のエッペンチューブに50 μ Lずつ分注した。6本のサンプルのうち3本は、37 $^{\circ}$ Cに設定したインキュベーターで4日間保管した。残りの3本は-80 $^{\circ}$ Cの冷凍庫の中で同様に4日間保管した。各サンプルにアセトニトリルを100 μ Lずつ加えてボルテックスで攪拌したのち遠心分離を行うことで、沈殿物を得た。生じた上澄み溶液を回収し、HPLC分析を行った。

[0486] (6-2) HPLC分析を用いた、脱落した蛍光分子の量の解析

測定は、液体クロマトグラフィー／蛍光検出法を用いて、ADC mimicから脱落した蛍光分子量を測定した。実施例9-1で冷凍庫保管した3本のサンプルをDay=0のものとし、実施例9-1で37 $^{\circ}$ C保管した3本

のサンプルをDay = 4のものとし、Day = 4とDay = 0の蛍光強度の差分を解析した。

[0487] 蛍光分子の脱落率の算出は、実施例5-2に従って実施した。

結果は下記の表の通り蛍光分子の脱落率を評価した。

[0488] [表5]

表5. ADC mimicを用いた血漿中安定性試験結果

	Linker-payload mimic	実施例/比較例	Day=4におけるpayloadの脱落率
ADC mimic 1	Linker-payload mimic (1)	実施例2-1-1	7%
ADC mimic 2	Linker-payload mimic (6)	実施例2-1-2	15%
ADC mimic 3	Linker-payload mimic (11)	実施例2-1-3	5%
ADC mimic 4	Linker-payload mimic (16)	実施例2-1-4	3%
ADC mimic 5	Linker-payload mimic (26)	比較例2-1-5	52%

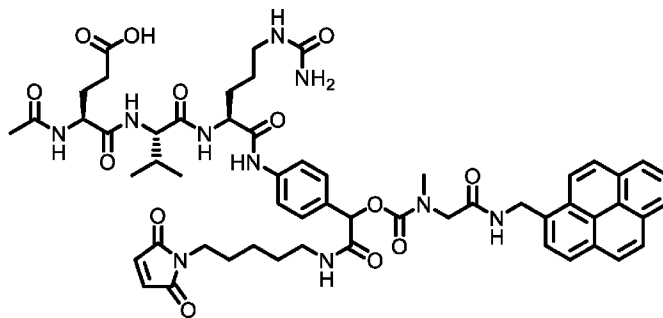
[0489] その結果、比較例1で合成したADC mimicに対し、実施例2-1-1, 2-1-2で合成したADC mimicは3倍以上の安定性を示し、実施例2-1-3, 2-1-4で合成したADC mimicは10倍以上もの安定性を示した。

[0490] 実施例7: ADC mimicの合成

実施例7-1: ADC mimic 6の合成

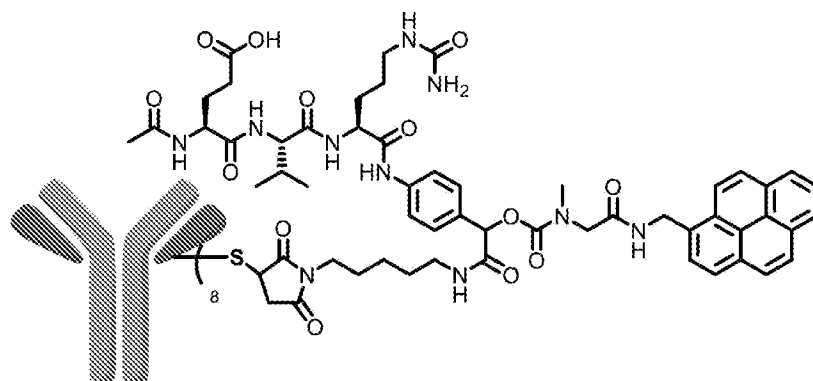
抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ（中外製薬）3mg/mL PBSE緩衝液（50mM phosphate buffered saline（PBS）、10mM EDTA、pH=7.4）に対して、還元剤（TCEP）のPBSE溶液（2mM）を抗体に対して8当量加え、37℃で1時間インキュベーションさせた。得られた反応混合物にジメチルアセトアミド（DMA）（6% v/v）および各種Linker-payload mimic（1）の10mM DMA溶液（抗体に対して20当量）を順次添加し、20℃で1時間穏やかに攪拌した。反応混合物に過剰量のN-アセチルシステインを加え、25℃で20分間攪拌した。最終混合物を、NAP-5脱塩カラム（GEヘルスケア社製）を用いて精製し、formulation buffer（20mM histidine、5wt%トレハロース添加、pH5.2）で溶出し、ADC mimic 6を得た。

[化102]



Linker-payload mimic (1)

[化103]



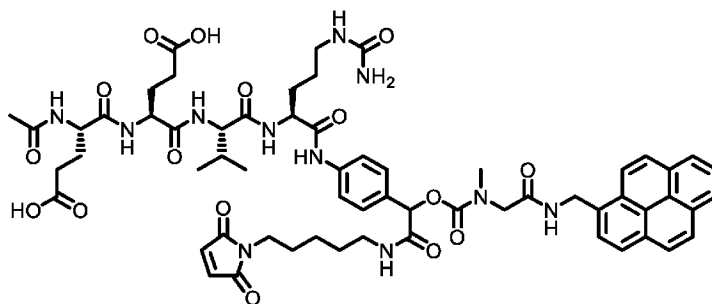
Trastuzumab

ADC mimic 6

[0491] 実施例7-2: ADC mimic 7の合成

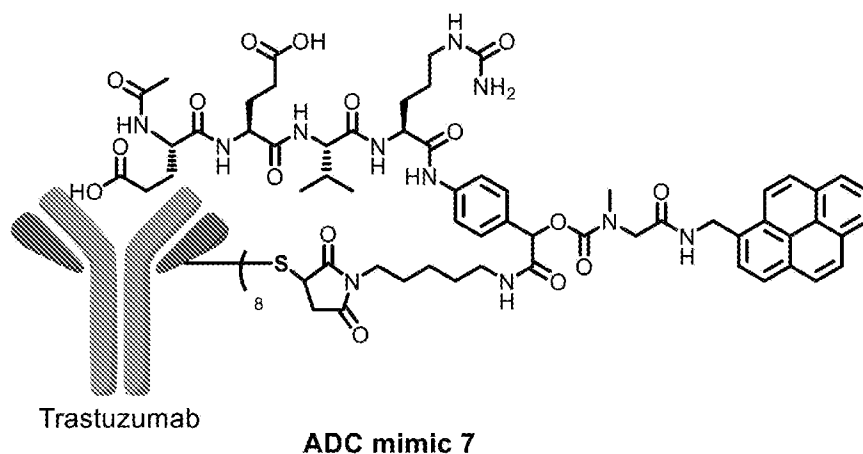
実施例7-1に従って、Linker-payload mimic (1) よりADC mimic 7を得た。

[化104]



Linker-payload mimic (11)

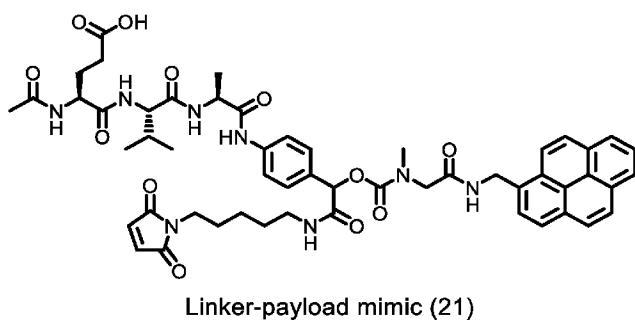
[化105]



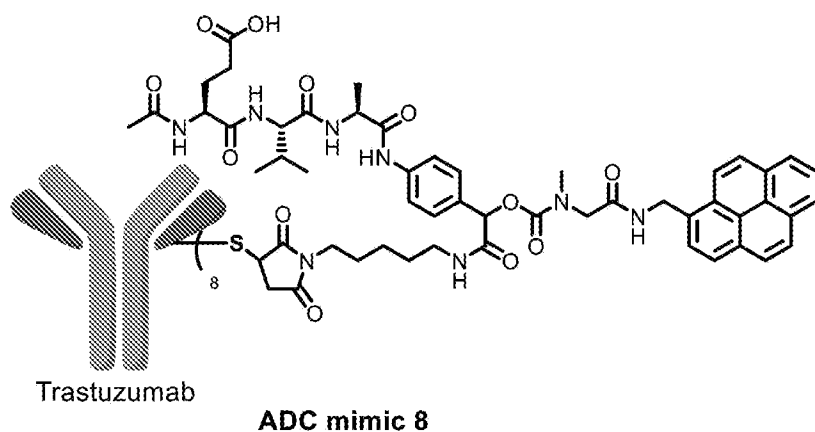
[0492] 実施例 7-3 : A D C m i m i c 8 の合成

実施例 7-1 に従って、Linker-payload mimic (21) より ADC mimic 8 を得た。

[化106]



[化107]

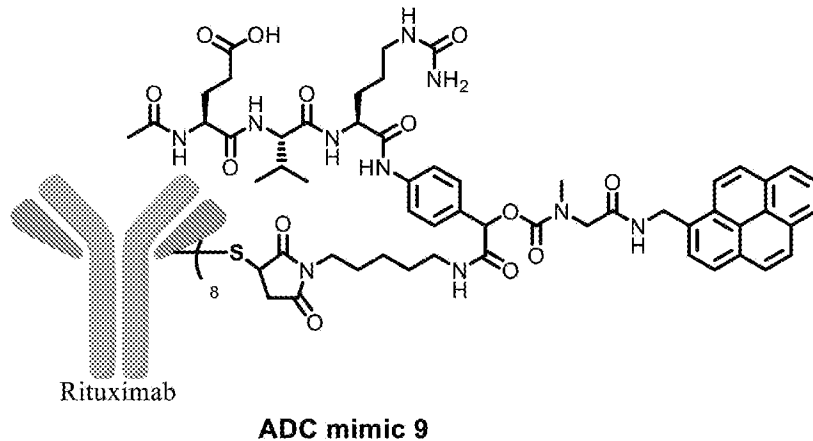


[0493] 実施例 7-4 : A D C m i m i c 9 の合成

実施例 7-1 に従って、抗 CD20 IgG 抗体リツキシマブ（ロッシュ

社) に対して、Linker-payload mimic (1) を反応させ、ADC mimic 9を得た。

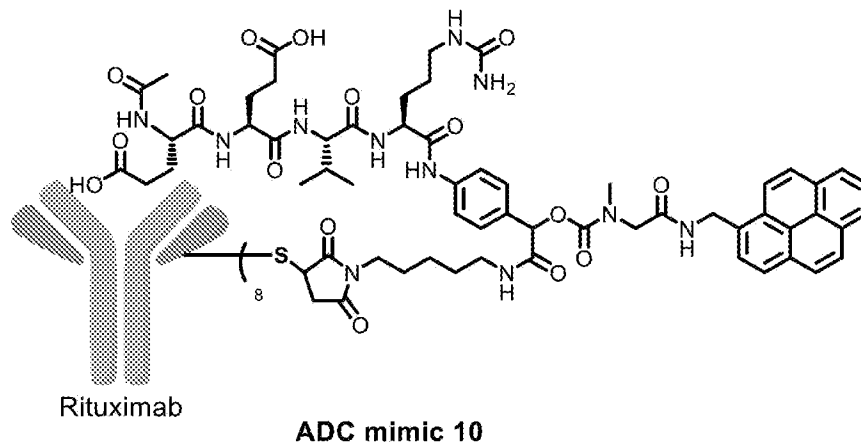
[化108]



[0494] 実施例 7-5 : ADC mimic 10の合成

実施例 7-1 に従って、抗CD20 IgG抗体リツキシマブ（ロシュ社）に対して、Linker-payload mimic (11) を反応させ、ADC mimic 10を得た。

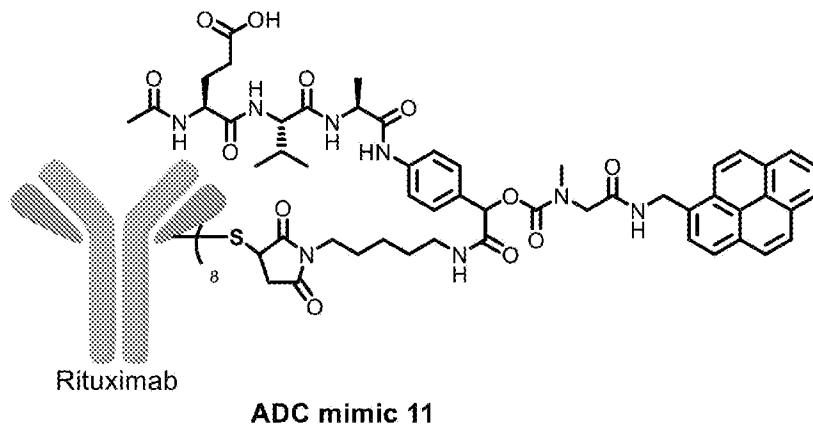
[化109]



[0495] 実施例 7-6 : ADC mimic 11の合成

実施例 7-1 に従って、抗CD20 IgG抗体リツキシマブ（ロシュ社）に対して、Linker-payload mimic (21) を反応させ、ADC mimic 11を得た。

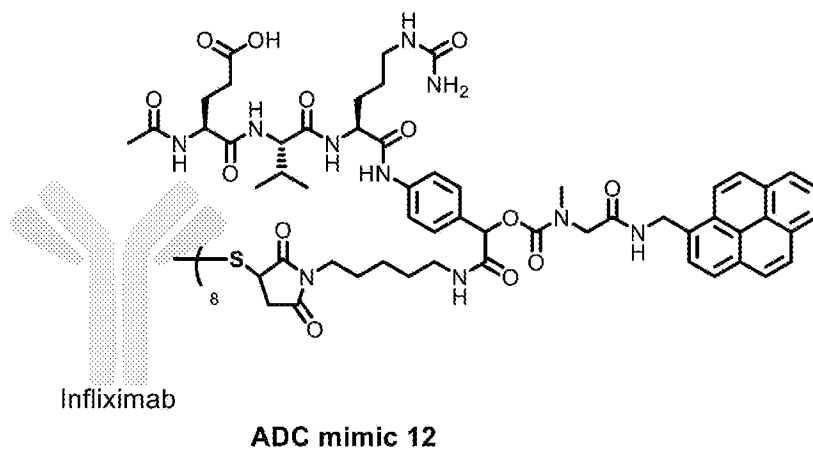
[化110]



[0496] 実施例 7-7 : ADC mimic 12 の合成

実施例 7-1 に従って、抗 TNF- α IgG 抗体インフリキシマブ（セントコア社）に対して Linker-payload mimic (1) を反応させ、ADC mimic 12 を得た。

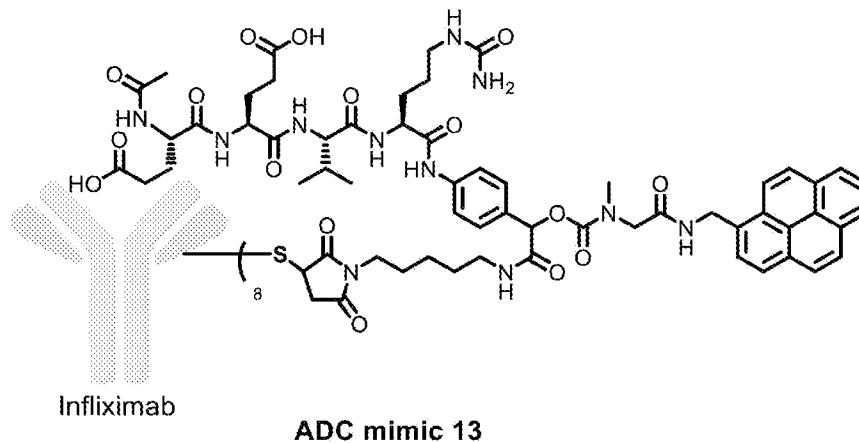
[化111]



[0497] 実施例 7-8 : ADC mimic 13 の合成

実施例 7-1 に従って、抗 TNF- α IgG 抗体インフリキシマブ（セントコア社）に対して、Linker-payload mimic (11) を反応させ、ADC mimic 13 を得た。

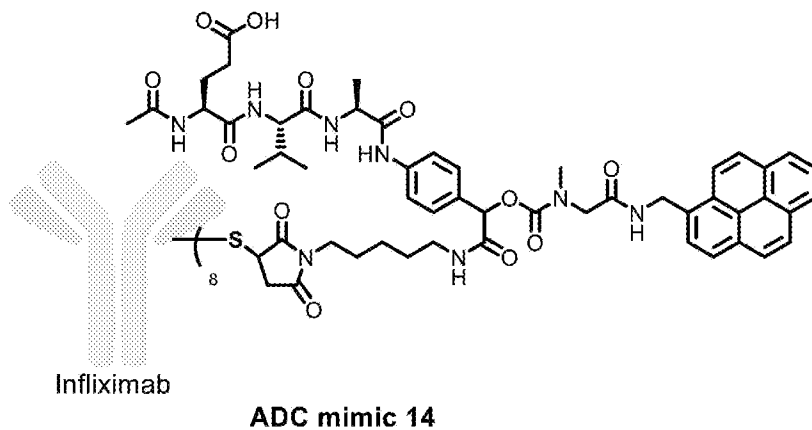
[化112]



[0498] 実施例 7-9 : ADC mimic 14 の合成

実施例 7-1 に従って、抗 TNF- α IgG 抗体インフリキシマブ（セントコア社）に対して、Linker-payload mimic (21) を反応させ、ADC mimic 14 を得た。

[化113]

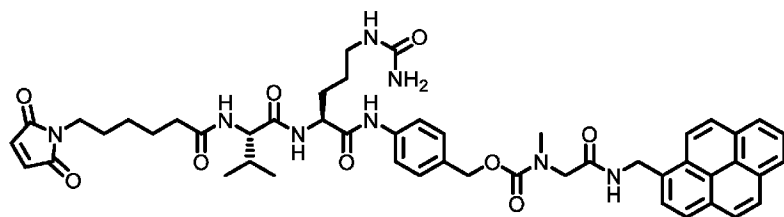


[0499] 比較例 2 : ADC mimic の合成

比較例 2-1 : Linker-payload mimic (30) の合成

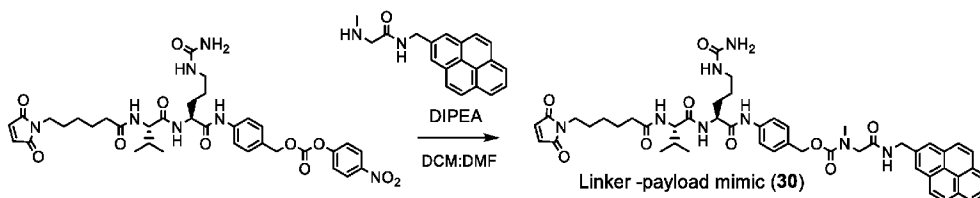
Linker-payload mimic (30) は下記のように合成した。市販の MC-VC-PAB-PNP (CAS No: 159857-81-5) と既知の Sarcosine-pyrene (WO2018218004A1) より 1 工程で合成した。

[化114]



Linker-payload mimic (30)

[化115]



Linker-payload mimic (30)

[0500] 市販のMC-VC-PAB-PNP (CAS No: 159857-81-5) (15.5 mg, 0.021 mmol) をジクロロメタン (1 mL) に溶解させ、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (0.025 mL, 0.142 mmol)、既知のSarcosine-pyrene (WO2018218004A1) (7.6 mg, 0.025 mmol)、のジメチルホルムアミド溶液 (0.5 mL) を加え、17時間攪拌した。逆相分取クロマトグラフィーにて精製した後、生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥を行うことにより、Linker-payload mimic (30) (7.3 mg, 0.008 mmol) を得た。

[0501] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.98 (s, 1H), 8.34 (d, $J=9.2$ Hz, 2H), 8.32–8.23 (m, 4H), 8.16 (s, 2H), 8.10–8.00 (m, 4H), 7.80 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 7.59 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.31 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 6.99 (s, 2H), 5.96 (m, 1H), 5.40 (s, 2H), 5.01 (s, 2H), 4.95 (d, $J=6.0$ Hz, 2H), 4.38 (m, 1H), 4.19 (m, 1H), 3.03–2.92 (m, 3H), 2.67 (m, 1H), 2.33 (m,

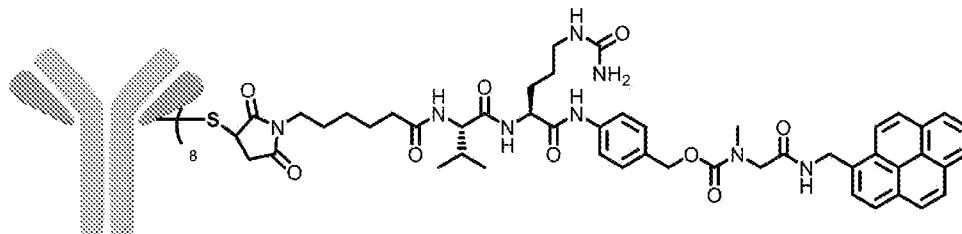
1 H), 2.20–2.07 (m, 2H), 1.97 (m, 1H), 1.67 (m, 1H), 1.59 (m, 1H), 1.51–1.45 (m, 6H), 1.26–1.15 (m, 3H), 0.83 (dd, $J=12.8, 6.8$ Hz, 6H)

[0502] MS (ESI) m/z : 901.45 $[M+H]^+$

[0503] 比較例 2–2: ADC mimic 15~17 の合成

実施例 7–1 に従って、Linker-payload mimic (30) を反応させ、トラスツズマブより ADC mimic 15、リツキシマブより ADC mimic 16、インフリキシマブより ADC mimic 17 を得た。

[化116]



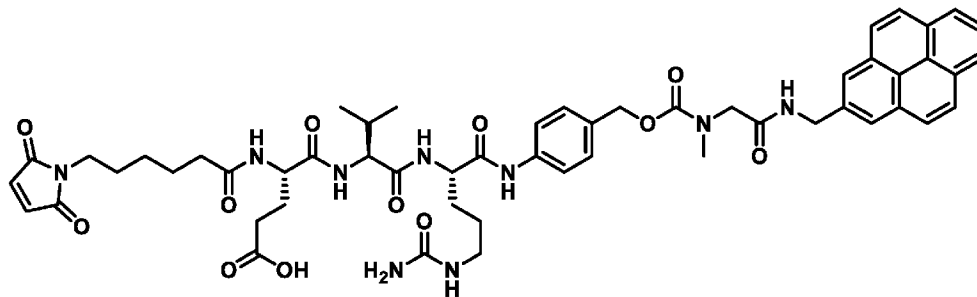
ADC mimic 15 from trastuzumab

ADC mimic 16 from rituximab

ADC mimic 17 from infliximab

[0504] 比較例 2–3: Linker-payload mimic (31) の合成

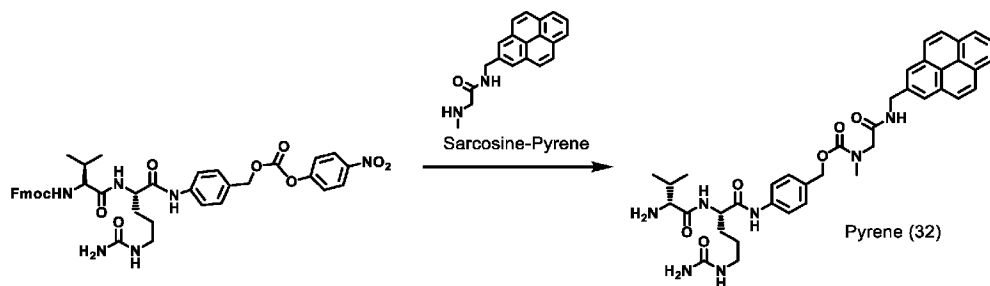
[化117]



Linker-payload mimic (31)

[0505] 比較例 2–3–1: ピレン (32) の合成

[化118]



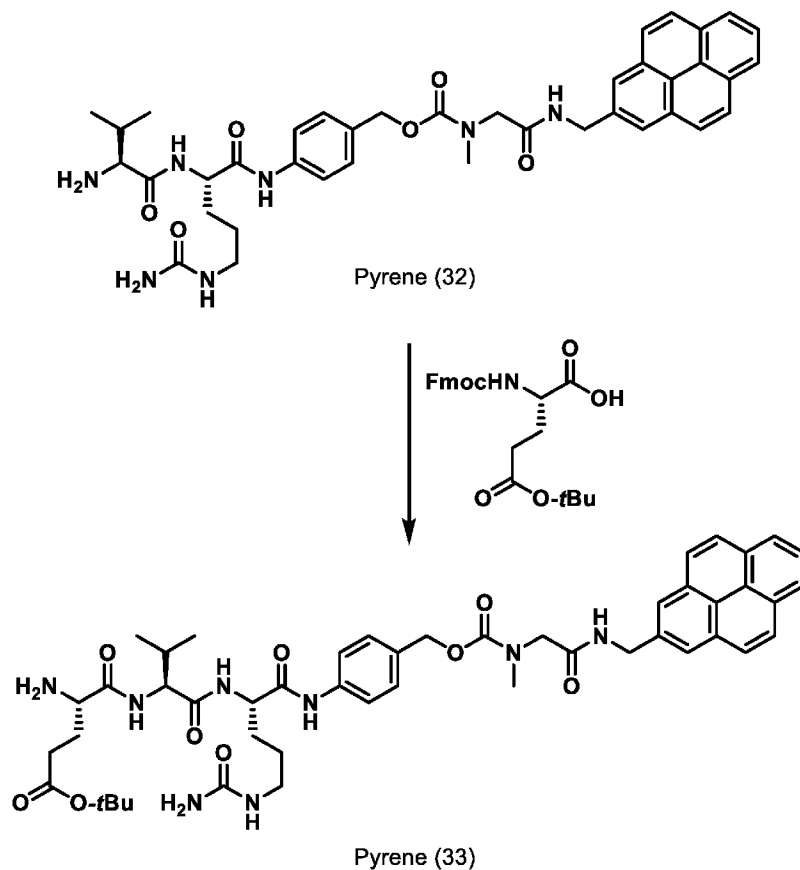
[0506] Fmoc-Val-Cit-PAB-PNP (CAS No: 863971-53-2, 121.2 mg, 0.15 mmol) をN, N-ジメチルホルムアミド (5 mL) に溶解させ、既知 (WO2018218004A1 記載) の sarcosine-pyrene (59.2 mg, 0.196 mmol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (39 μ L, 0.227 mmol)、4-ジメチルアミノピリジン (3.7 mg, 0.03 mmol) を加え、室温にて2時間攪拌した後、ジエチルアミン (2 mL, 18.95 mmol) を加えて室温にて1.5時間攪拌した。減圧下濃縮した後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥を行うことにより、上記ピレン (32) (73.7 mg, 0.104 mmol) を得た。

[0507] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.21 (s, 1H), 8.68 (s, 1H), 8.43–7.93 (m, 12H), 7.60 (t, $J=7.1$ Hz, 2H), 7.31 (m, 2H), 6.04 (s, 1H), 5.48 (s, 2H), 5.02 (d, $J=16.1$ Hz, 4H), 4.54 (s, 1H), 3.96 (s, 2H), 3.66 (s, 2H), 2.92 (d, $J=6.1$ Hz, 3H), 2.08 (q, $J=6.6$ Hz, 1H), 1.80–1.56 (m, 2H), 1.46 (s, 2H), 1.21–1.13 (m, 1H), 0.94 (dt, $J=6.8, 3.0$ Hz, 6H) .

[0508] MS (ESI) m/z : 708.80 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0509] 比較例2-3-2 : ピレン (33) の合成

[化119]



[0510] Fmoc-His(OTBu)-OH · H₂O (11.1 mg, 0.025 mmol) をジメチルホルムアミド (1 mL) に溶解させ、ピレン (32) (17.3 mg, 0.024 mmol)、1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール (5.1 mg, 0.037 mmol)、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 (7.3 mg, 0.038 mmol)、トリエチルアミン (7.1 μL, 0.51 mmol) を加え室温にて2.5時間攪拌した後、ジエチルアミン (0.2 mL, 1.91 mmol) を加えて室温にて1.5時間攪拌した。減圧下濃縮した後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥を行うことにより、ピレン (33) (15.6 mg, 0.017 mmol) を得た。

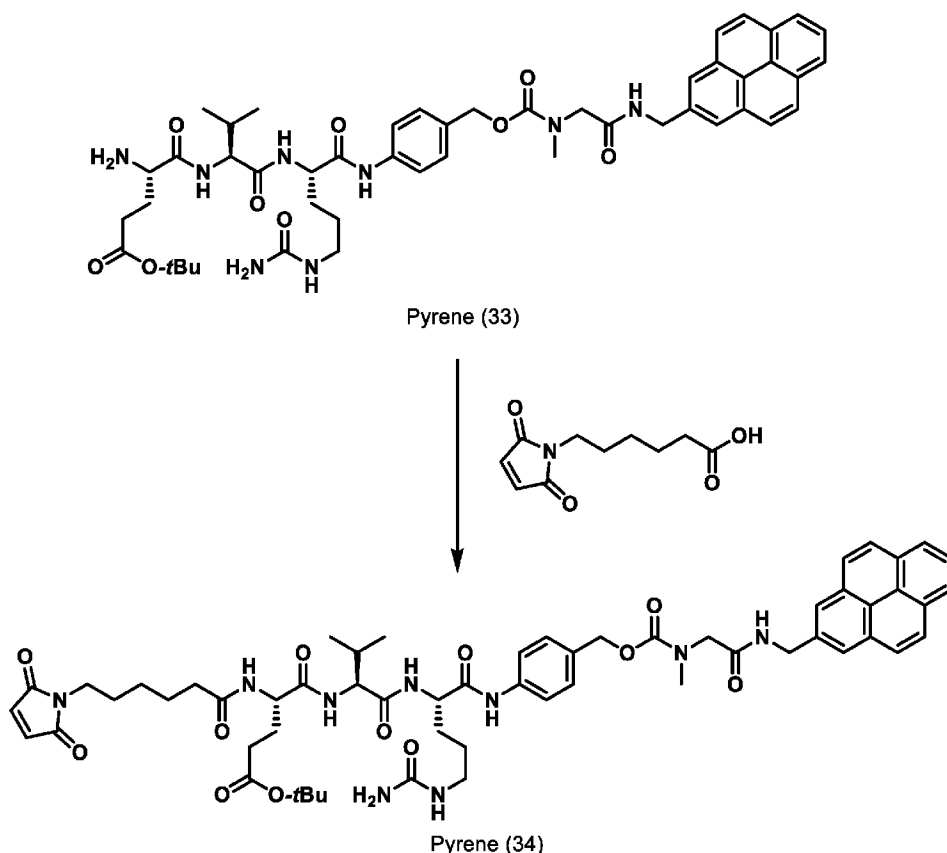
[0511] ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 10.87 (s, 1H), 8.68 (m, 1H), 8.41–7.97 (m, 13H), 7

. 60–7. 58 (m, 2H), 7. 30 (m, 2H), 6. 00 (t, $J = 6. 2 \text{ Hz}$, 1H), 5. 45 (s, 2H), 5. 05–4. 99 (m, 4H), 4. 46 (m, 1H), 4. 26 (m, 1H), 3. 96 (s, 2H), 3. 88 (m, 1H), 3. 07 (m, 1H), 2. 96 (m, 1H), 2. 93 (d, $J = 5. 6 \text{ Hz}$, 3H), 2. 68 (t, $J = 1. 8 \text{ Hz}$, 1H), 2. 34–2. 30 (m, 3H), 2. 03 (m, 1H), 1. 93–1. 90 (m, 2H), 1. 30 (s, 9H), 1. 15 (s, 1H), 0. 92–0. 86 (m, 6H).

[0512] MS (ESI) m/z : 893. 45 $[M+H]^+$

[0513] 比較例 2–3–3 : ピレン (34) の合成

[化120]



[0514] ピレン (33) (15. 6 mg, 0. 017 mmol) をジメチルホルムアミド (1. 5 mL) に溶解させ、6-マレイミドヘキサン酸 (3. 7 mg, 0. 018 mmol)、1-ヒドロキシー-7-アザベンゾトリアゾール (

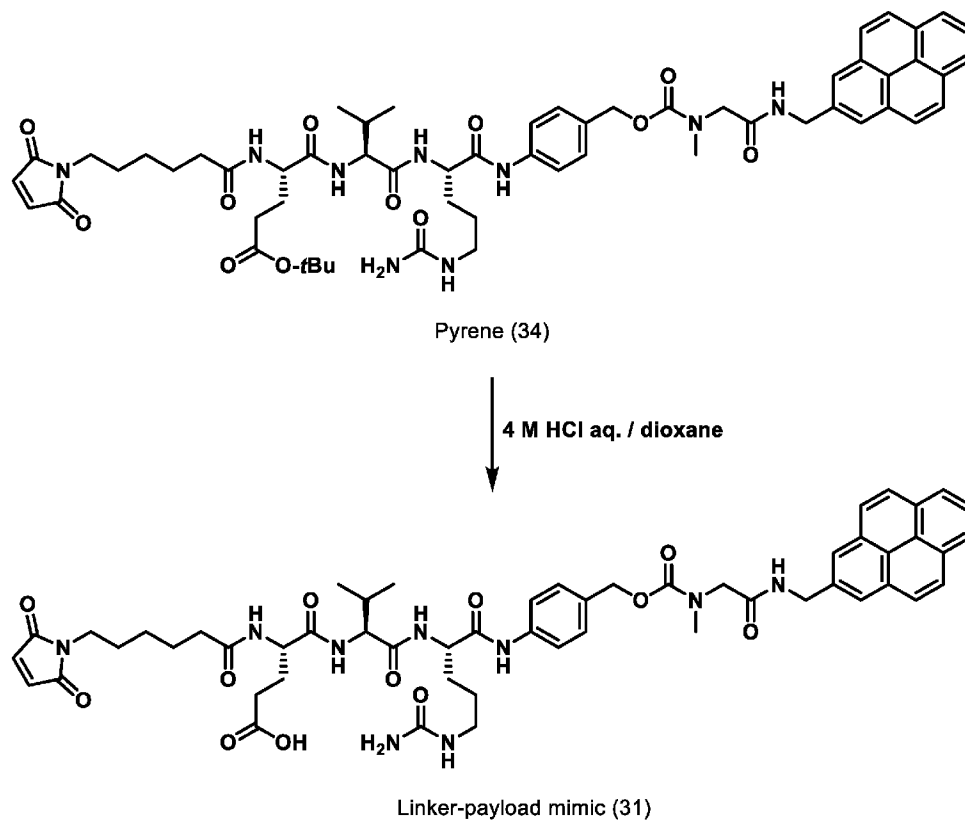
3. 5 mg, 0.025 mmol)、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (4. 8 mg, 0.025 mmol)、トリエチルアミン (4. 8 μ L, 0.34 mmol) を加え室温にて3時間攪拌した後、6-マレイミドヘキサン酸 (1. 8 mg, 0.009 mmol)、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (2. 3 mg, 0.012 mmol)、トリエチルアミン (2. 4 μ L, 0.17 mmol) を加えて室温にて1. 5時間攪拌した。その後、4-ジメチルアミノピリジン (0. 5 mg, 0.004 mmol) を加え、さらに2. 5時間攪拌した。減圧下濃縮した後、カラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン: メタノール=9: 1) にて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することにより、上記ピレン (34) (8. 0 mg, 0.007 mmol) を得た。

[0515] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.02 (s, 1H), 8.65 (m, 1H), 8.40–7.96 (m, 9H), 7.69–7.53 (m, 3H), 7.28 (m, 2H), 7.00–6.98 (m, 2H), 5.97 (m, 1H), 5.41 (s, 2H), 5.04–4.98 (m, 4H), 4.56 (t, 5.4 Hz, 1H), 4.41–4.27 (m, 2H), 4.21–4.15 (m, 2H), 3.95 (s, 2H), 2.91 (d, $J=5.6$ Hz, 3H), 2.22–2.15 (m, 2H), 2.10–2.07 (m, 2H), 1.69 (m, 1H), 1.59 (m, 1H), 1.50–1.44 (m, 6H), 1.46 (d, $J=2.0$ Hz, 9H), 1.35–1.15 (m, 4H), 0.82 (dd, $J=14.8$, 6.8 Hz, 6H)

[0516] MS (ESI) m/z : 1086.60 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0517] 比較例2-3-4: Linker-payload mimic (31) の合成

[化121]



[0518] ピレン (4) (9.7 mg, 0.0089 mmol) を 1,4-ジオキササン (1 mL)、塩化水素・1,4-ジオキササン溶液 (1 mL) に溶解させ、氷水浴にて 2 時間攪拌した。ジメチルホルムアミド (1 mL) 加え、室温に上昇させた後、減圧下濃縮した。その後逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥を行うことにより、Linker-payload mimic (31) (2.0 mg, 0.002 mmol) を得た。

[0519] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.03 (s, 1H), 8.67 (m, 1H), 8.40–7.96 (m, 9H), 7.69–7.57 (m, 3H), 7.28 (m, 2H), 6.98 (s, 2H), 5.98 (m, 1H), 5.87 (m, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.05–4.97 (m, 4H), 4.4 (m, 1H), 4.29 (m, 1H), 4.19 (m, 1H), 3.95 (s, 2H), 2.90 (d, $J=5.2$ H

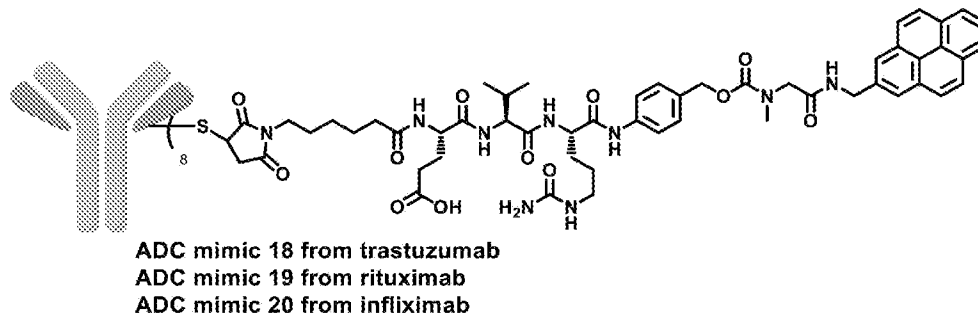
z, 3H), 2.22–2.17 (m, 2H), 2.11–2.09 (m, 2H), 1.71–1.59 (m, 3H), 1.49–1.44 (m, 6H), 1.30–1.15 (m, 4H), 0.82 (dd, J=15.0, 6.6 Hz, 6H)

[0520] MS (ESI) m/z : 1030.50 [M+H]⁺

[0521] 比較例2–4 : ADC mimic 18~20の合成

実施例7–1に従って、Linker–payload mimic (31)を反応させ、トラスツズマブよりADC mimic 18、リツキシマブよりADC mimic 19、インフリキシマブよりADC mimic 20を得た。

[化122]



[0522] 実施例8 : ADC mimicのDAR解析

実施例7および、比較例2で合成したADC mimicのDAR分析は既報 (Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724–12732) に従い、HIC–HPLC分析を行った。測定は下記の条件を用いて行った。

[0523] 測定システム : Chromaster (登録商標) (日立社製)

カラム : 東ソーバイオサイエンス社製 Tosoh Biobutyl NP R 2.5 μm 4.6×35 mmカラム

グラジエント : 溶離液A/Bの線形グラジエント

流速 : 0.8 mL/分

溶離液A : 1.1 M (NH₄)₂SO₄, 25 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (pH 6.0)

溶離液B：25 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 6.0、25 v/v % イソプロパノール添加)

検出器：UV (280 nm)

[0524] [表6]

表6. ADC mimic のDAR

	Linker-payload mimic	実施例/比較例	DAR
ADC mimic 6	Linker-payload mimic (1)	実施例7-1	8
ADC mimic 7	Linker-payload mimic (11)	実施例7-2	8
ADC mimic 8	Linker-payload mimic (21)	実施例7-3	8
ADC mimic 9	Linker-payload mimic (1)	実施例7-4	8
ADC mimic 10	Linker-payload mimic (11)	実施例7-5	8
ADC mimic 11	Linker-payload mimic (21)	実施例7-6	8
ADC mimic 12	Linker-payload mimic (1)	実施例7-7	8
ADC mimic 13	Linker-payload mimic (11)	実施例7-8	8
ADC mimic 14	Linker-payload mimic (21)	実施例7-9	8
ADC mimic 15	Linker-payload mimic (30)	比較例2-2	8
ADC mimic 16	Linker-payload mimic (30)	比較例2-2	8
ADC mimic 17	Linker-payload mimic (30)	比較例2-2	8
ADC mimic 18	Linker-payload mimic (31)	比較例2-4	8
ADC mimic 19	Linker-payload mimic (31)	比較例2-4	8
ADC mimic 20	Linker-payload mimic (31)	比較例2-4	8

[0525] 実施例9：疎水性カラムクロマトグラフィー (HIC-HPLC) による、ADC mimic の疎水性度の評価

実施例8の条件を用いて、HIC-HPLC分析を行った。測定は下記の条件を用いて行った。HICクロマトグラムにおける、ADCのリテンションタイムによってADC mimic の疎水性度を評価することができる。

[0526] [表7]

表7. HIC-HPLCを用いたトラスツズマブベースのADC mimic の疎水性度の評価

	Linker-payload mimic	実施例/比較例	リテンションタイム
ADC mimic 6	Linker-payload mimic (1)	実施例7-1	11.6分
ADC mimic 7	Linker-payload mimic (11)	実施例7-2	10.9分
ADC mimic 8	Linker-payload mimic (21)	実施例7-3	11.9分
ADC mimic 15	Linker-payload mimic (30)	比較例2-1	16.5分
ADC mimic 18	Linker-payload mimic (31)	比較例2-4	16.2分

[0527] 直鎖型のADCであるADC mimic 15およびADC mimic 18に比べ、エキソ型ADCであるADC mimic 6, 7, 8は、HICクロマトグラムにおけるリテンションタイムが早くなり、より親水

性のADC mimicであることが分かる。

[0528] [表8]

表8. HIC-HPLCを用いたリツキシマブベースのADC mimicの疎水性度の評価

	Linker-payload mimic	実施例/比較例	リテンションタイム
ADC mimic 6	Linker-payload mimic (1)	実施例7-4	11.6分
ADC mimic 7	Linker-payload mimic (11)	実施例7-5	11.3分
ADC mimic 8	Linker-payload mimic (21)	実施例7-6	11.6分
ADC mimic 15	Linker-payload mimic (30)	比較例2-1	16.4分
ADC mimic 18	Linker-payload mimic (31)	比較例2-4	16.0分

[0529] 直鎖型のADCであるADC mimic 16およびADC mimic 19に比べ、エキソ型ADCであるADC mimic 9, 10, 11はHICクロマトグラムにおけるリテンションタイムが早くなり、より親水性のADC mimicであることが分かる。

[0530] [表9]

表9. HIC-HPLCを用いたインフリキシマブベースのADC mimicの疎水性度の評価

	Linker-payload mimic	実施例/比較例	リテンションタイム
ADC mimic 12	Linker-payload mimic (1)	実施例7-7	11.9分
ADC mimic 13	Linker-payload mimic (11)	実施例7-8	11.3分
ADC mimic 14	Linker-payload mimic (21)	実施例7-9	11.8分
ADC mimic 17	Linker-payload mimic (30)	比較例2-1	16.4分
ADC mimic 20	Linker-payload mimic (31)	比較例2-4	16.2分

[0531] 直鎖型のADCであるADC mimic 17およびADC mimic 20に比べ、エキソ型ADCであるADC mimic 12, 13, 14は、HICクロマトグラムにおけるリテンションタイムが早くなり、より親水性のADC mimicであることが分かる。

[0532] この結果、実施例7-1, 7-2, 7-3, 7-4, 7-5, 7-6, 7-7, 7-8, 7-9で合成したADC mimicは、リテンションタイムが早い傾向であることが確認され、親水性度が高いことがわかる。よって、実施例7-1, 7-2, 7-3, 7-4, 7-5, 7-6, 7-7, 7-8, 7-9で合成したADC mimicは、血漿クリアランスが遅く、体内に留まる時間が長いと考えられることから、好ましいADCであることが確認された。

[0533] 実施例10：サイズ排除クロマトグラフィー（SEC-HPLC）による、ADCおよびADC mimicの凝集率の評価

既報（Chemistry Select, 2020, 5, 8435-8439）に従い、SEC-HPLC分析を行った。測定は下記の条件を用いて行った。

[0534] 測定システム：1260 HPLC system（Agilent社製）
カラム：Agilent社製AdvanceBio SEC 300Å 2.7μm, 4.6mm×150mm
流速：0.25mL/分
溶離液：100mMリン酸二水素ナトリウム／リン酸水素ナトリウム, 250mM塩化ナトリウムの水溶液（pH6.8）, 10%v/vイソプロパノール
検出器：UV（280nm）

[0535] [表10]

表10. SEC-HPLCを用いたトラスツズマブベースのADC mimicの凝集率の評価

	Linker-payload mimic	実施例/比較例	凝集率
ADC mimic 6	Linker-payload mimic (1)	実施例7-1	0.7%
ADC mimic 7	Linker-payload mimic (11)	実施例7-2	0.8%
ADC mimic 8	Linker-payload mimic (21)	実施例7-3	0.4%
ADC mimic 15	Linker-payload mimic (30)	比較例2-1	100%
ADC mimic 18	Linker-payload mimic (31)	比較例2-4	20%

[0536] [表11]

表11. SEC-HPLCを用いたリツキシマブベースのADC mimicの凝集率の評価

	Linker-payload mimic	実施例/比較例	凝集率
ADC mimic 9	Linker-payload mimic (1)	実施例7-4	0.6%
ADC mimic 10	Linker-payload mimic (11)	実施例7-5	1.1%
ADC mimic 11	Linker-payload mimic (21)	実施例7-6	1.4%
ADC mimic 16	Linker-payload mimic (30)	比較例2-1	100%
ADC mimic 19	Linker-payload mimic (31)	比較例2-4	12%

[0537]

[表12]

表12. SEC-HPLCを用いたインフリキシマブマブベースのADC mimicの凝集率の評価

	Linker-payload mimic	実施例/比較例	凝集率
ADC mimic 12	Linker-payload mimic (1)	実施例7-7	2.1%
ADC mimic 13	Linker-payload mimic (11)	実施例7-8	1.9%
ADC mimic 14	Linker-payload mimic (21)	実施例7-9	0.3%
ADC mimic 17	Linker-payload mimic (30)	比較例2-1	100%
ADC mimic 20	Linker-payload mimic (31)	比較例2-4	16%

[0538] この結果、実施例7-1, 7-2, 7-3, 7-4, 7-5, 7-6, 7-7, 7-8, 7-9で合成したADC mimicは、凝集率が低い傾向であることが確認され、より安定性が高いことがわかる。よって、実施例7-1, 7-2, 7-3, 7-4, 7-5, 7-6, 7-7, 7-8, 7-9で合成したADC mimicは、好ましいADCであることが確認された。

[0539] 実施例11: 酵素カテプシンBを用いた、ADC mimicの評価

各種ADC mimicのカテプシンBによる切断能は下記のように、ADC mimicから脱落した蛍光分子の量を解析することで評価した。

[0540] 実施例11-1: カテプシンB切断性試験

既報 (Nature Communications 2018, 9, 2512) に従って下記の通り実施した。MES buffer (10mM MES, 40μM DTT, pH5.0) 180μLに対し、1mg/mLの濃度になるようにADC mimic 7を加えたのち、6本のエッペンチューブに30μLずつ分注した。6本のサンプルのうち3本は、0℃にて即座にアセトニトリルを100μLずつ加えてボルテックスで攪拌したのち遠心分離を行うことで、沈殿物を得た。生じた上澄み溶液を回収し、HPLC分析を行った。残りの3本は37℃で6時間インキュベーションした。各サンプルにアセトニトリルを100μLずつ加えてボルテックスで攪拌したのち遠心分離を行うことで、沈殿物を得た。生じた上澄み溶液を回収し、HPLC分析を行った。

[0541] 実施例11-2: HPLC分析を用いた、脱落した蛍光分子の量の解析

測定は、液体クロマトグラフィー／蛍光検出法を用いて、ADC mimic 7 から脱落した蛍光分子量を測定した。実施例 11-1 で 0℃ にて即座にアセトニトリルを加えた 3 本のサンプルを 0 時間のものとし、実施例 11-1 に記載されるように 37℃ で 6 時間インキュベーションした 3 本のサンプルを 6 時間のものとし、6 時間サンプルと 0 時間サンプルの蛍光強度の差分を解析した。

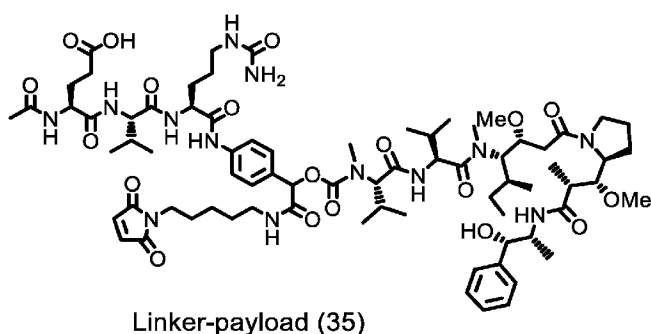
[0542] 別途 Pyrene を用いて、HPLC による蛍光強度のエリア面積と、濃度の相関を算出した。その算出式を用いて上記各 ADC mimic の蛍光強度の差分を濃度に変換した。0 時間の濃度を 100% としたときの、前述の蛍光強度の差分の割合を脱落率として算出した。6 時間における ADC mimic 7 からの蛍光分子の脱落率は、400% となり、ADC mimic 7 は十分なカテプシン B 切断を有していることが分かった。

[0543] 実施例 12: Linker-payload の合成

(12-1) Linker-payload (35) の合成

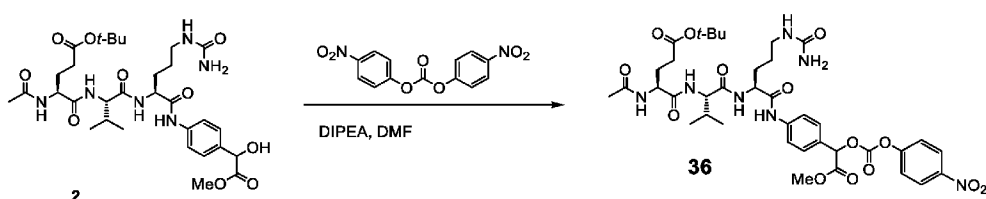
Linker-payload (35) は下記のように合成した。

[化123]



[0544] (12-1-1) カーボネート (36) の合成

[化124]



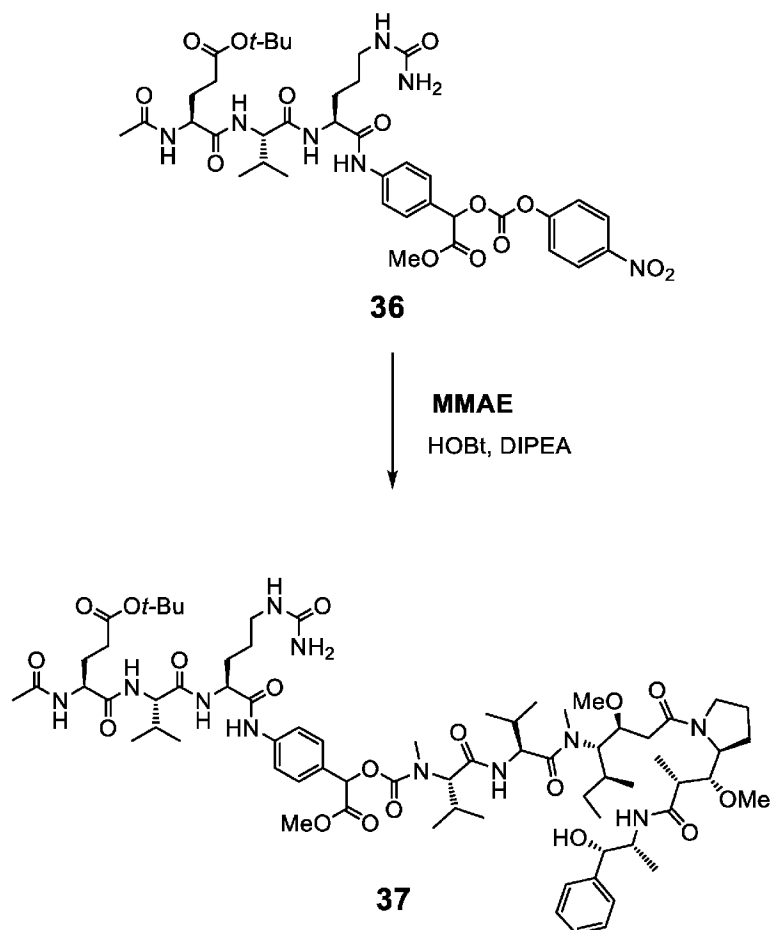
[0545] (1-1-1) で得られたアルコール (2) (105 mg, 0.158 mmol)

mol) をN, N-ジメチルホルムアミド (2 mL) に溶解させ、氷冷下5分間攪拌した後、炭酸ビス(4-ニトロフェニル) (100 mg, 0.329 mmol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (83 μ L, 0.48 mmol) を加え、窒素雰囲気下、室温にて19.5時間攪拌した。エバポレーターでN, N-ジメチルホルムアミドを除去した後、得られた粗生成物に酢酸エチル (3 mL) を加えて溶解させたのち、ジエチルエーテル (3 mL) を加えた。得られた溶液をフィルトレーションにより残渣を除去したのち、真空ポンプによって有機溶媒を除去し、カーボネート (36) (102 mg, 0.123 mmol) を得た。

[0546] MS (ESI) m/z : 830.1 $[M+H]^+$, 852.1 $[M+Na]^+$

[0547] (12-1-2) 化合物 (37) の合成

[化125]

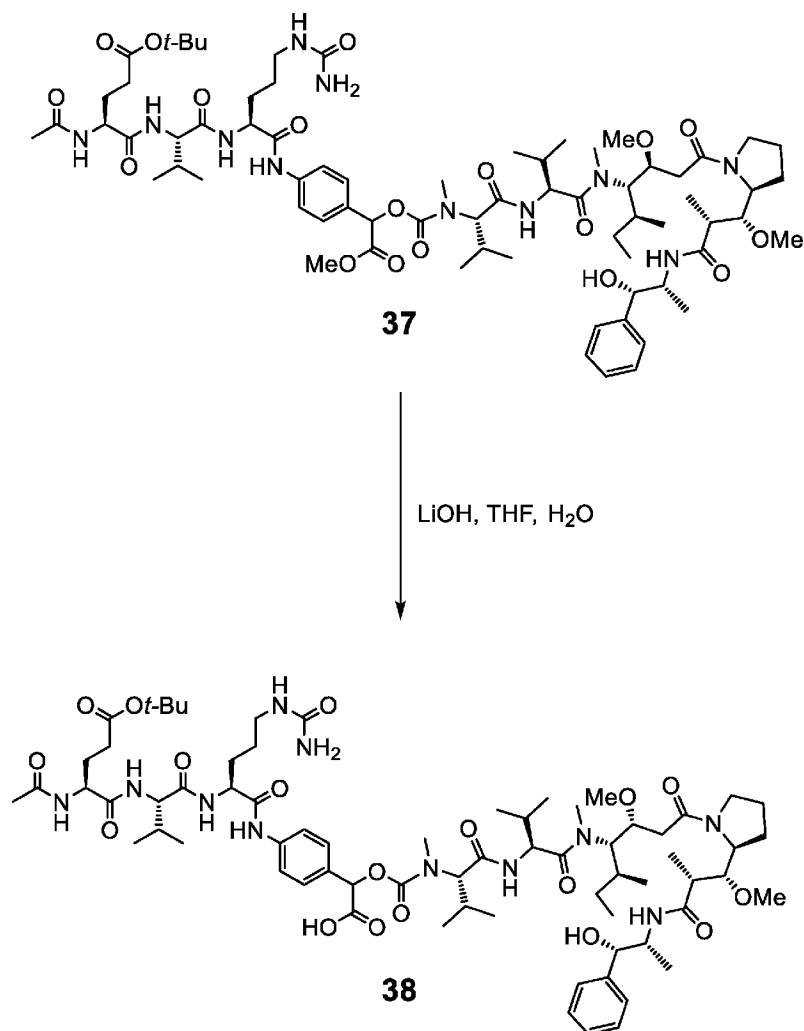


[0548] (12-1-1) で得られた化合物 (36) (69 mg, 0.083 mmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (3.5 mL) に溶解させ、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (16 mg, 0.10 mmol)、市販の monomethylauristatin E (MMAE, 61 mg, 0.085 mmol) を室温にて加えた。続いて、ジイソプロピルエチルアミン (29 μ L, 0.17 mmol) を加えたのち、室温、窒素雰囲気下 22.5 時間攪拌した。エバポレーターにて有機溶媒を除去したのち、アセトニトリル：水 = 1 : 1 の溶液を加え、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥を行うことにより、化合物 37 (79 mg, 0.056 mmol) を得た。

[0549] MS (ESI) m/z : 1408.9 [M+H]⁺

[0550] (12-1-3) 化合物 (38) の合成

[化126]

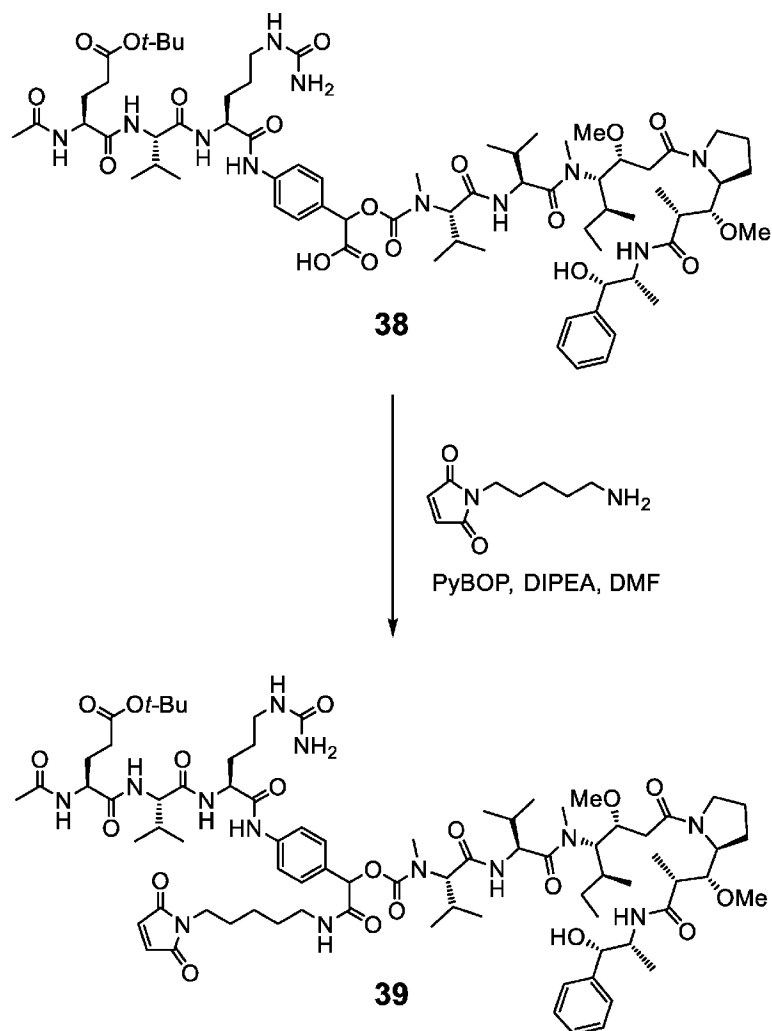


[0551] (12-1-2) で得られた化合物 (37) (97 mg, 0.069 mmol) をテトラヒドロフラン (7 mL)、水 (2 mL) に溶解させ、水酸化リチウム (1.0 M、1.4 mL, 1.4 mmol) を氷冷下に加え、そのまま 1 時間攪拌した。反応溶液に塩酸を加え、pH 6 に調製した後、アセトニトリル : 水 = 1 : 1 を加え、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥を行うことにより、化合物 38 (70 mg, 0.050 mmol) を得た。

[0552] MS (ESI) m/z : 1394.7 $[M+H]^+$

[0553] (12-1-4) 化合物 (39) の合成

[化127]

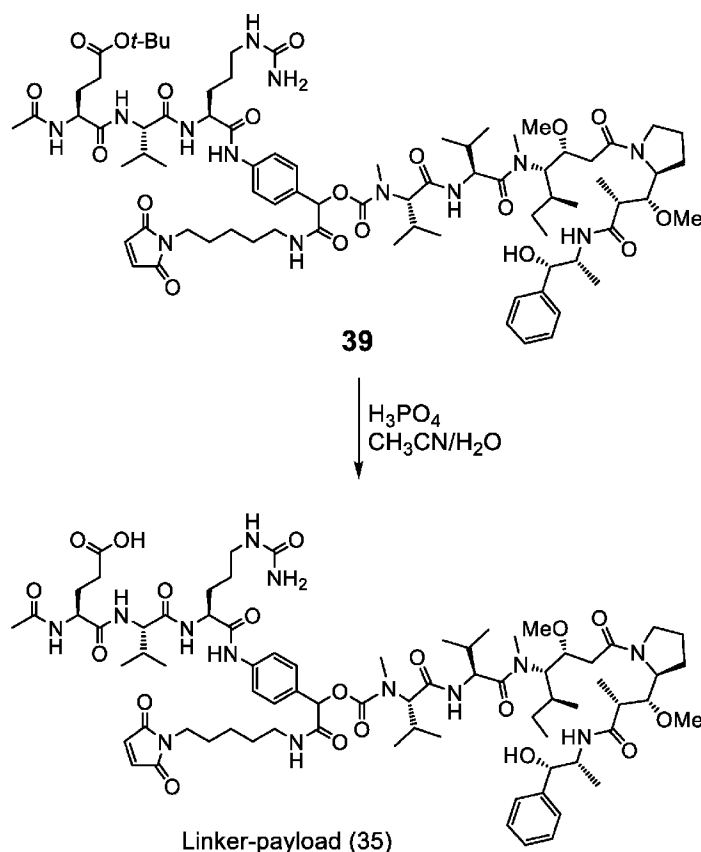


[0554] (12-1-3) で得られた化合物 (38) (34 mg, 0.024 mmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (3 mL) に溶解させたのち氷冷し、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (25 μ L, 0.14 mmol)、1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート (20 mg, 0.038 mmol) を加えた。次に N-(5-アミノペンチル) マレイミド塩酸塩 (8.7 mg, 0.040 mmol) を加えて室温に戻し 20 時間攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、化合物 (39) (29 mg, 0.019 mmol) を得た。

[0555] MS (ESI) m/z : 1558.9 [M+H]⁺

[0556] (12-1-5) Linker-payload (35) の合成

[化128]



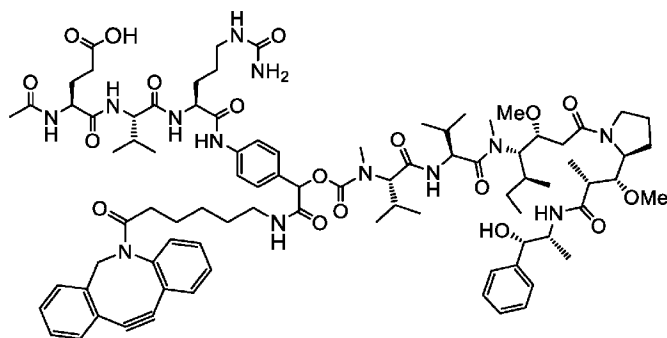
[0557] (12-1-4) で得られた化合物 (39) (29 mg, 0.019 mmol) にアセトニトリル (500 μL)、85 wt % リン酸水溶液 (0.50 mL, 7.3 mmol) を順次加え、室温で3時間攪拌した。反応完結後、水 (2 mL) を加え、反応液を逆相分取クロマトグラフィーにて精製し、生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、Linker-payload (35) (18 mg, 0.012 mmol) を得た。

[0558] MS (ESI) m/z : 1502.9 [M+H]⁺

[0559] (12-2) Linker-payload (40) の合成

Linker-payload (40) は下記のように合成した。

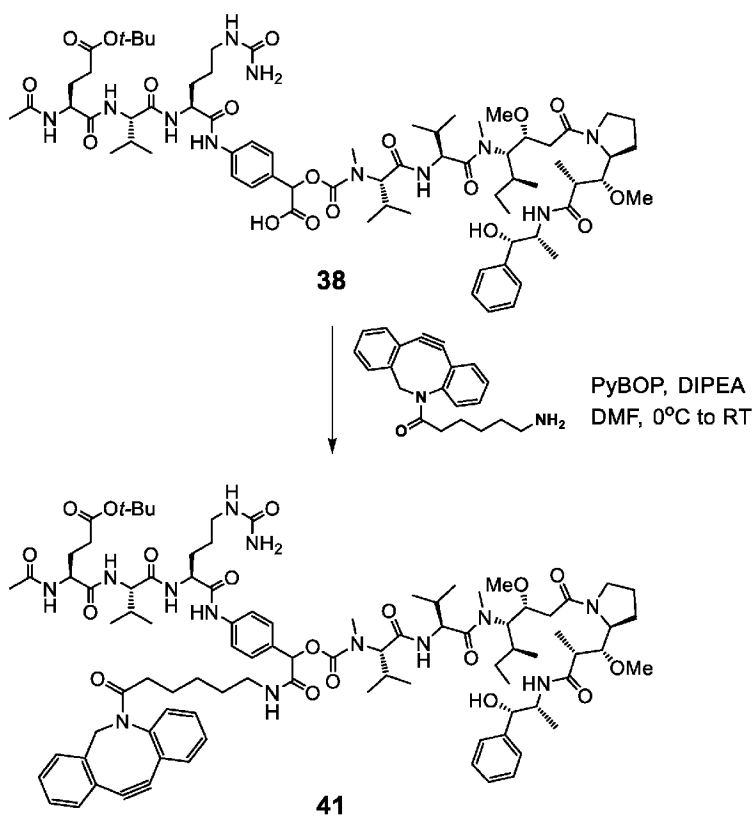
[化129]



Linker-payload (40)

[0560] (12-2-1) 化合物(41)の合成

[化130]



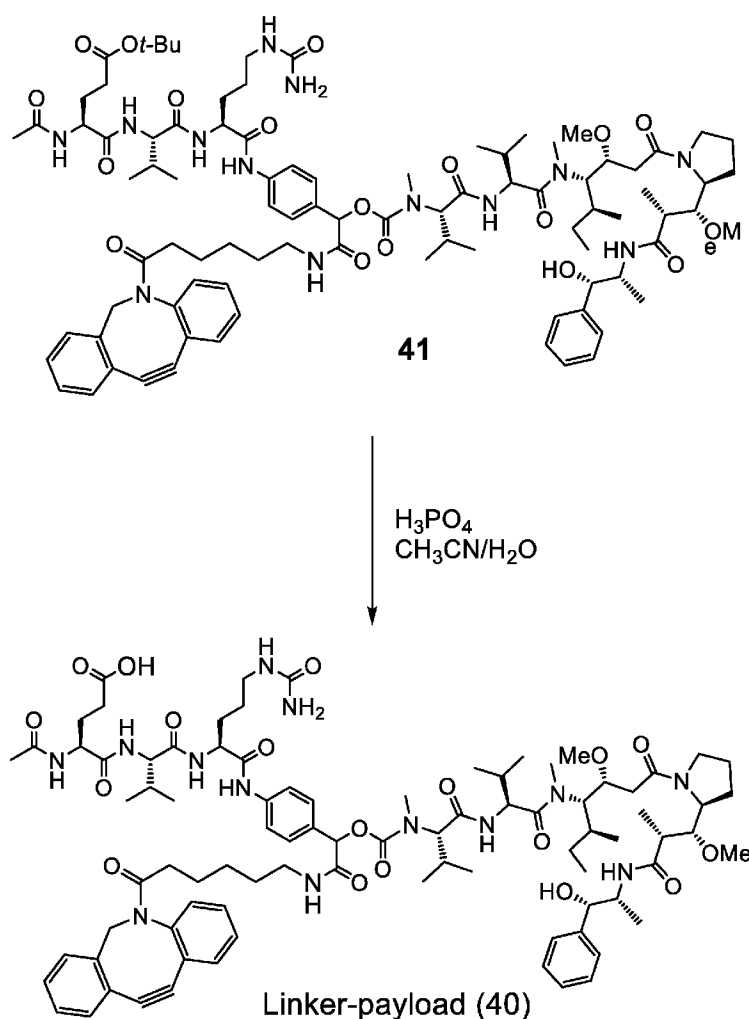
[0561] (12-1-3) で得られた化合物(38) (10 mg, 0.0072 mmol) をN, N-ジメチルホルムアミド(1 mL) に溶解させたのち氷冷し、N, N-ジイソプロピルエチルアミン(10 μ L, 0.057 mmol)、1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート(7.0 mg, 0.013 mmol)を加え

た。次にDBCO-ヘキシルアミン（4.7 mg, 0.015 mmol）のN, N-ジメチルホルムアミド（0.5 mL）溶液を加えて室温に戻し20時間攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、化合物（41）（5.8 mg, 0.0034 mmol）を得た。

[0562] MS (ESI) m/z : 1696.0 $[M+H]^+$

[0563] (12-2-2) Linker-payload (40) の合成

[化131]



[0564] (12-2-1) で得られた化合物（41）（13 mg, 0.0077 mmol）にアセトニトリル（500 μ L）、85 wt %リン酸水溶液（0.50 mL, 7.3 mmol）を順次加え、室温で4時間攪拌した。反応完結

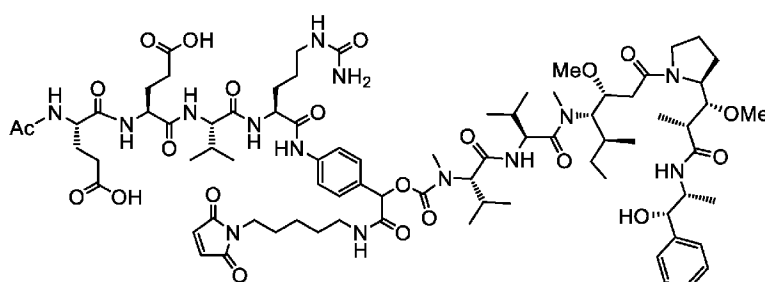
後、水（2 mL）を加え、反応液を逆相分取クロマトグラフィーにて精製し、生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、Linker-payload（40）（7.4 mg, 0.0045 mmol）を得た。

[0565] MS (ESI) m/z : 1638.9 $[M+H]^+$

[0566] (12-3) Linker-payload（42）の合成

Linker-payload（42）は下記のように合成した。

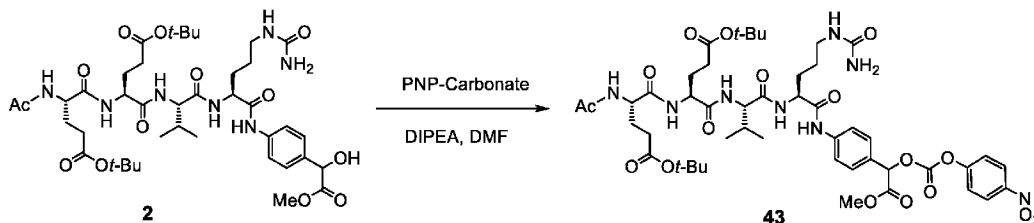
[化132]



Linker-Payload (42)

[0567] (12-3-1) カーボネート（43）の合成

[化133]



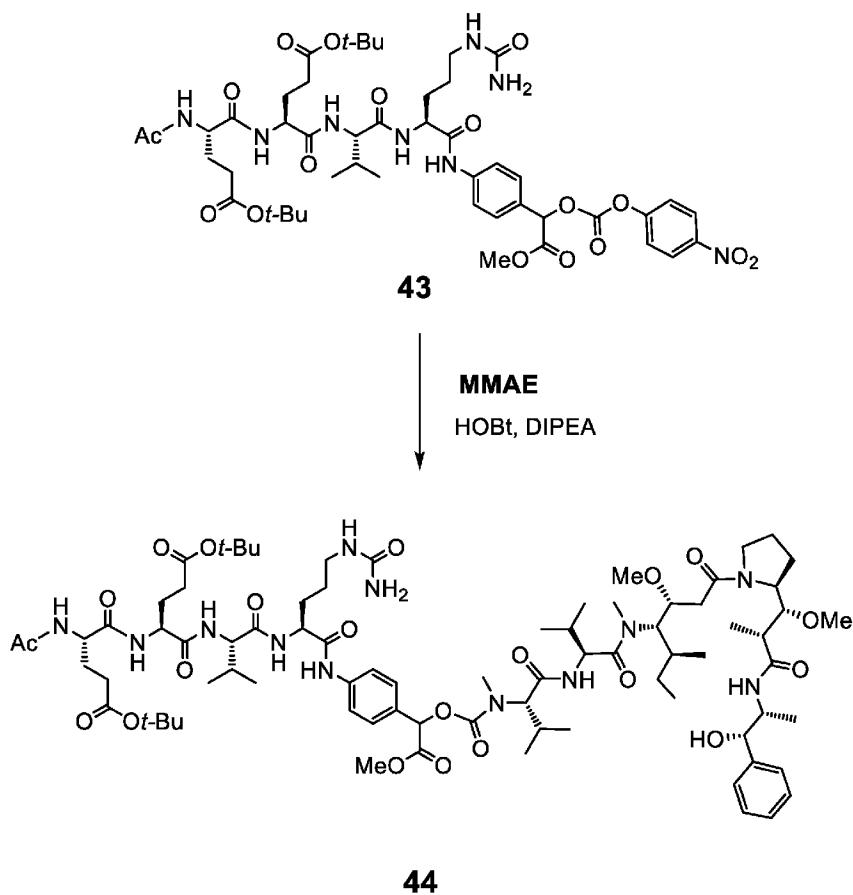
[0568] (1-1-1) で得られたアルコール（2）（140 mg, 0.165 mmol）をN, N-ジメチルホルムアミド（4 mL）に溶解させ、氷冷下5分間攪拌した後、炭酸ビス（4-ニトロフェニル）（108 mg, 0.355 mmol）、N, N-ジイソプロピルエチルアミン（100 μ L, 0.574 mmol）を加え、窒素雰囲気下、室温にて18時間攪拌した。エバポレーターにて有機溶媒を除去したのち、アセトニトリル：水＝1：1の溶液を加え、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結

乾燥を行うことにより、化合物43（130mg，0.128mmol）を得た。

[0569] MS (ESI) m/z : 1015.6 $[M+H]^+$

[0570] (12-3-2) 化合物(44)の合成

[化134]



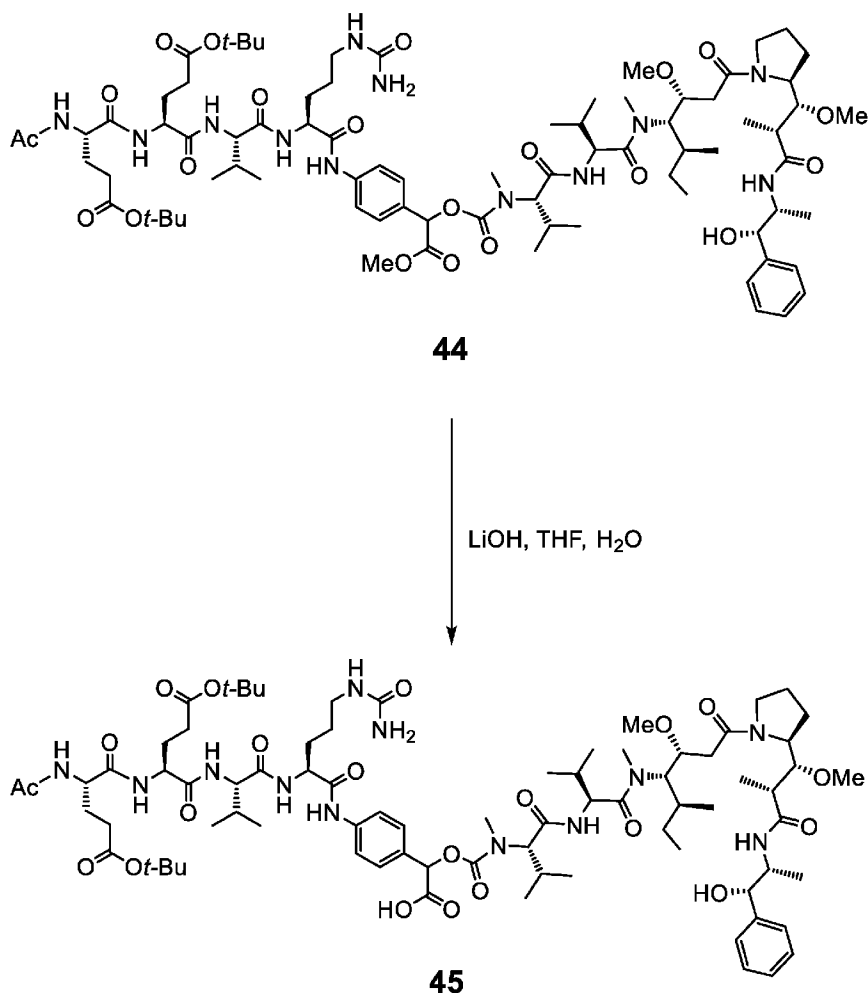
[0571] (12-3-1) で得られた化合物(43)（85mg，0.084mmol）をN，N-ジメチルホルムアミド（2mL）に溶解させ、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール（20mg，0.13mmol）、市販のmonomethylauristatin E（MMAE，63mg，0.088mmol）を室温にて加えた。続いて、ジイソプロピルエチルアミン（75 μ L，0.43mmol）を加えたのち、室温、窒素雰囲気下23時間攪拌した。エバポレーターにて有機溶媒を除去したのち、アセトニトリル：水＝1：1の溶液を加え、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを

除去し、凍結乾燥を行うことにより、化合物 44 (94 mg, 0.059 mmol) を得た。

[0572] MS (ESI) m/z : 1593.6 $[M+H]^+$

[0573] (12-3-3) 化合物 (45) の合成

[化135]



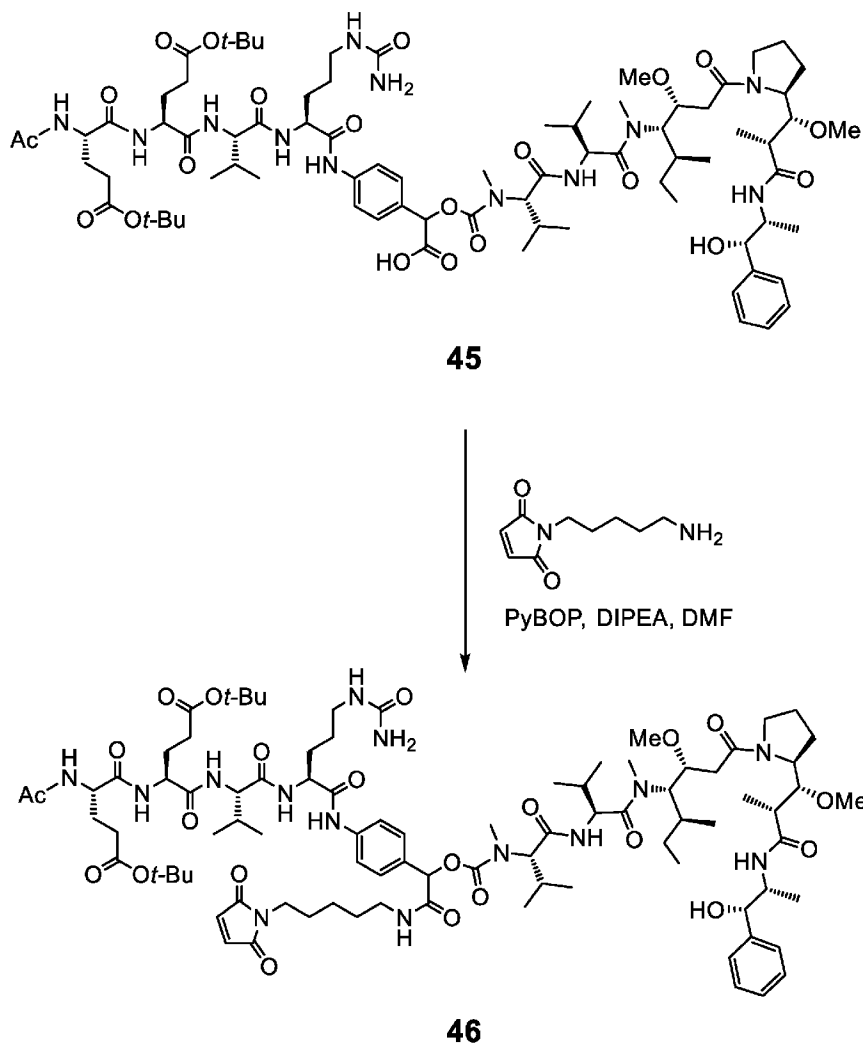
[0574] (12-3-2) で得られた化合物 (44) (94 mg, 0.059 mmol) をテトラヒドロフラン (5 mL)、水 (2 mL) に溶解させ、水酸化リチウム (1.0 M、0.6 mL, 0.6 mmol) を氷冷下に加え、そのまま 1 時間攪拌した。反応溶液に塩酸を加え、pH 5 に調製した後、アセトニトリル : 水 = 1 : 1 を加え、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥を行うことにより、化合物 45 (77 mg, 0.

0.049 mmol) を得た。

[0575] MS (ESI) m/z : 1579.7 $[M+H]^+$

[0576] (12-3-4) 化合物 (46) の合成

[化136]



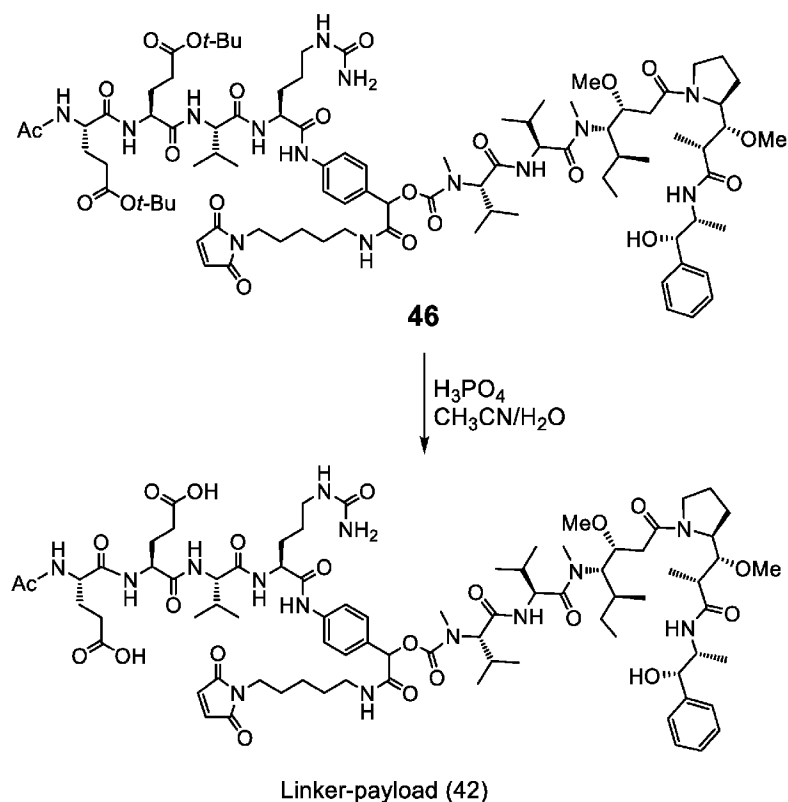
[0577] (12-3-3) で得られた化合物 (45) (77 mg, 0.049 mmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (3 mL) に溶解させたのち氷冷し、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (50 μ L, 0.29 mmol)、1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート (87 mg, 0.17 mmol) を加えた。次に N-(5-アミノペンチル) マレイミド塩酸塩 (35 mg, 0.16 mmol) を加えて室温に戻し 20 時間攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマト

グラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、化合物 (46) (65 mg, 0.037 mmol) を得た。

[0578] MS (ESI) m/z : 1744.7 $[M+H]^+$

[0579] (12-3-5) Linker-payload (42) の合成

[化137]



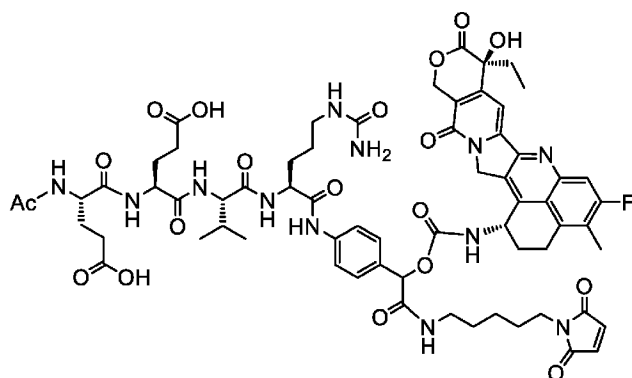
[0580] (12-3-4) で得られた化合物 (46) (65 mg, 0.037 mmol) にアセトニトリル (2 mL)、85 wt %リン酸水溶液 (1.00 mL, 14.6 mmol) を順次加え、室温で6時間攪拌した。反応完結後、水 (2 mL) を加え、反応液を逆相分取クロマトグラフィーにて精製し、生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、Linker-payload (42) (49 mg, 0.030 mmol) を得た。

[0581] MS (ESI) m/z : 1631.6 $[M+H]^+$

[0582] (12-4) Linker-payload (47) の合成

Linker-payload (47) は下記のように合成した。

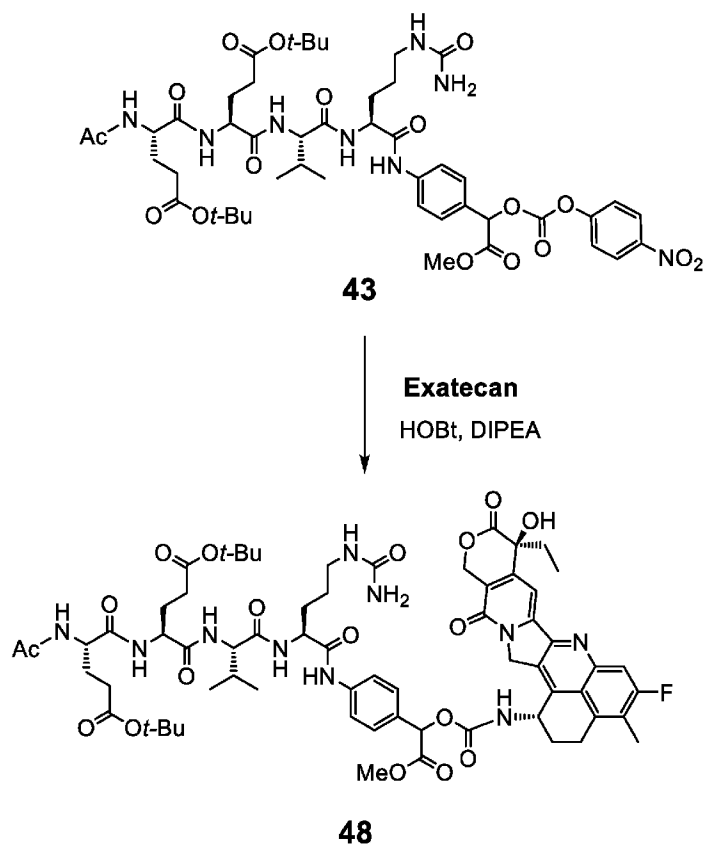
[化138]



Linker-payload (47)

[0583] (12-4-1) 化合物 (48) の合成

[化139]



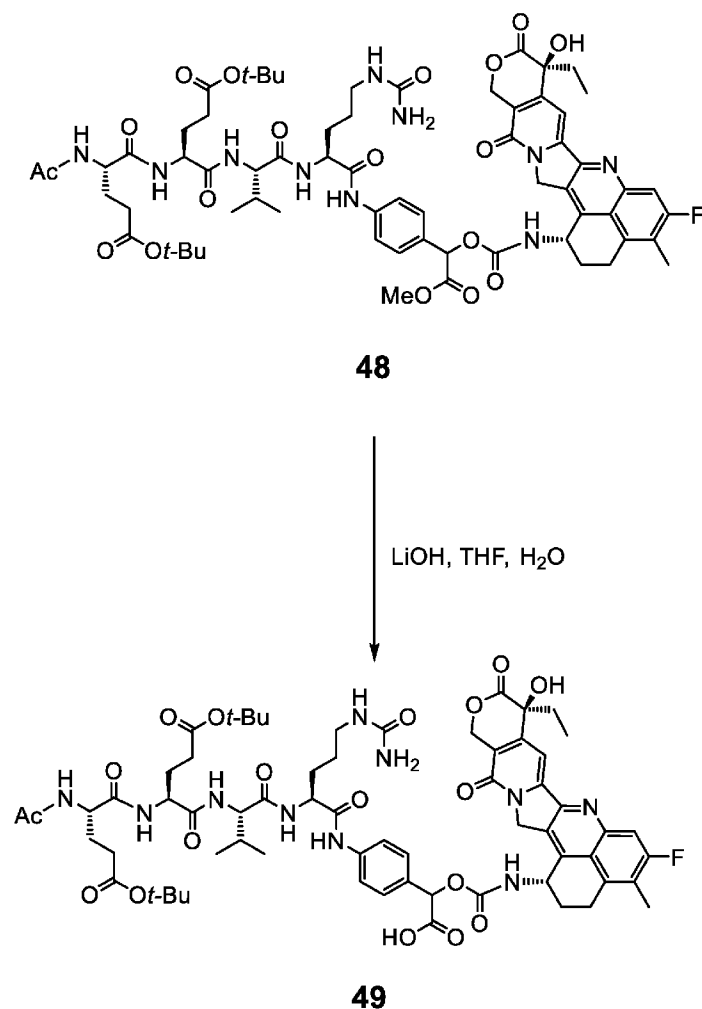
[0584] (12-3-1) で得られた化合物 (43) (67 mg, 0.066 mmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (2 mL) に溶解させ、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (17 mg, 0.11 mmol)、市販の Exatecan

ecan mesylate (CAS : 169869-90-3, 35 mg, 0.066 mmol) を室温にて加えた。続いて、ジイソプロピルエチルアミン (50 μ L, 0.29 mmol) を加えたのち、室温、窒素雰囲気下 4 時間攪拌した。エバポレーターにて有機溶媒を除去したのち、アセトニトリル : 水 = 1 : 1 の溶液を加え、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥を行うことにより、化合物 48 (57 mg, 0.043 mmol) を得た。

[0585] MS (ESI) m/z : 1311.7 $[M+H]^+$

[0586] (12-4-2) 化合物 (49) の合成

[化140]



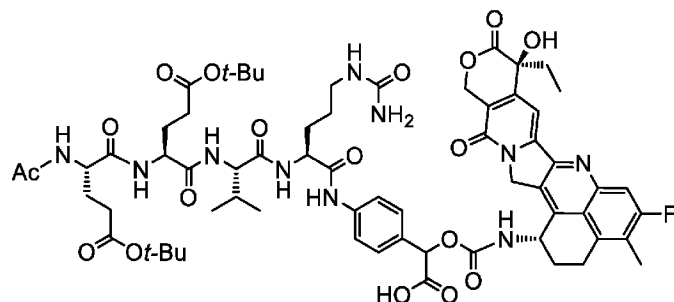
[0587] (12-4-1) で得られた化合物 (48) (57 mg, 0.043 mmol)

o l) をテトラヒドロフラン (3 mL)、水 (1.5 mL) に溶解させ、水酸化リチウム (1.0 M、0.5 mL、0.5 mmol) を氷冷下に加え、そのまま 1 時間攪拌した。反応溶液に塩酸を加え、pH 5 に調製した後、アセトニトリル : 水 = 1 : 1 を加え、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥を行うことにより、化合物 49 (45 mg, 0.035 mmol) を得た。

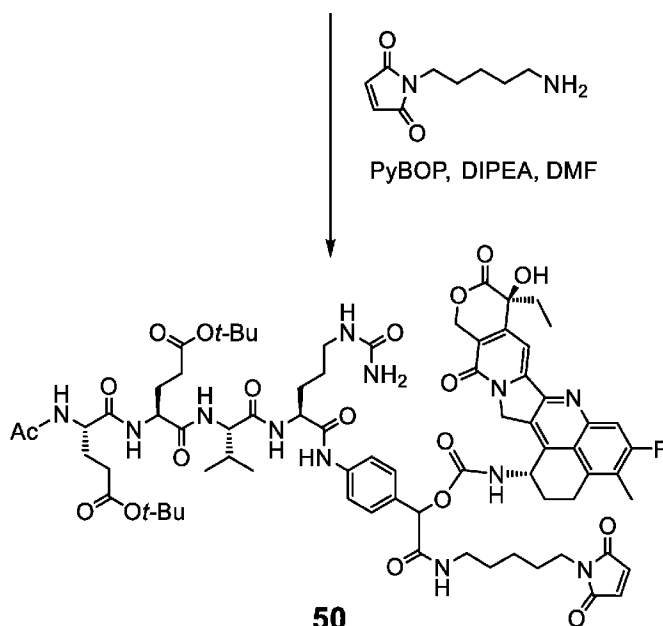
[0588] MS (ESI) m/z : 1297.6 $[M+H]^+$

[0589] (12-4-3) 化合物 (50) の合成

[化141]



49



50

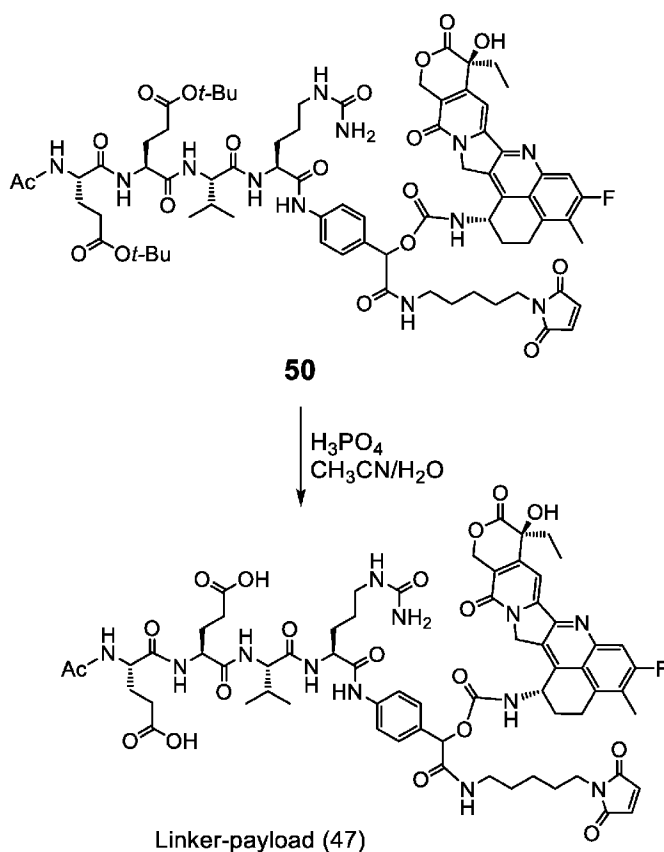
[0590] (12-4-2) で得られた化合物 (49) (45 mg, 0.035 mmol)

o l) をN, N-ジメチルホルムアミド (3 mL) に溶解させたのち氷冷し、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (30 μ L, 0.17 mmol)、1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート (55 mg, 0.11 mmol) を加えた。次にN-(5-アミノペンチル) マレイミド塩酸塩 (22 mg, 0.10 mmol) を加えて室温に戻し18時間攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、化合物 (50) (22 mg, 0.015 mmol) を得た。

[0591] MS (ESI) m/z : 1462.7 [M+H]⁺

[0592] (12-3-5) Linker-payload (47) の合成

[化142]



[0593] (12-4-3) で得られた化合物 (50) (22 mg, 0.015 mmol) にアセトニトリル (1 mL)、85 wt %リン酸水溶液 (1.0 mL

, 14.6 mmol) を順次加え、室温で1.5時間攪拌した。反応完結後、水(1 mL)を加え、反応液を逆相分取クロマトグラフィーにて精製し、生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、Linker-payload (47) (18.8 mg, 0.0139 mmol) を得た。

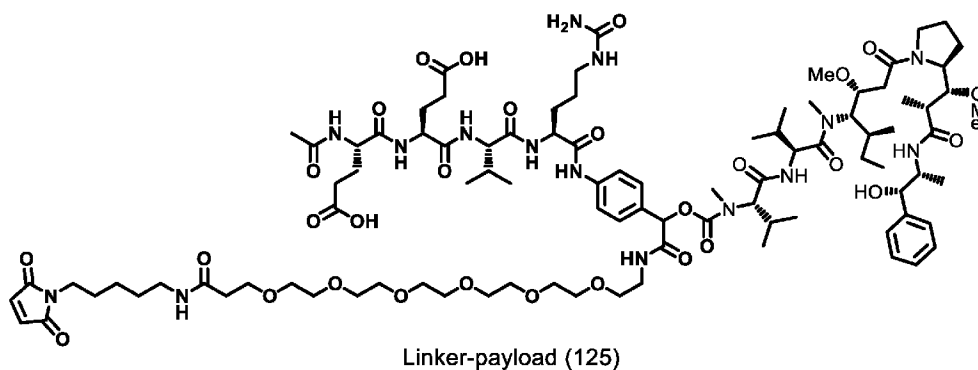
[0594] ^1H NMR (300 MHz; DMSO- d_6) δ 10.04 (s, 1H), 8.10–8.05 (m, 4H), 7.80–7.77 (m, 2H), 7.59–7.55 (m, 2H), 7.35–7.30 (m, 3H), 6.99 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 6.54–6.53 (m, 1H), 6.01 (brs, 1H), 5.74 (d, $J=9.0$ Hz, 1H), 5.43 (brs, 4H), 5.33–5.28 (m, 2H), 4.29–4.15 (m, 4H), 3.19–2.98 (m, 5H), 2.43–2.38 (m, 5H), 2.27–2.20 (m, 7H), 1.95–1.83 (m, 8H), 1.73–1.62 (m, 4H), 1.42–1.30 (m, 7H), 1.23–1.13 (m, 3H), 0.84 (m, 9H).

[0595] MS (ESI) m/z : 1349.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0596] (12–5) Linker-payload (125) の合成

下記に示すLinker-payload (125) は、Linker-payload mimetic (120) の合成において、sarcosine-pyreneの代わりにMMAEを用い、同様の方法で合成した。

[化143]

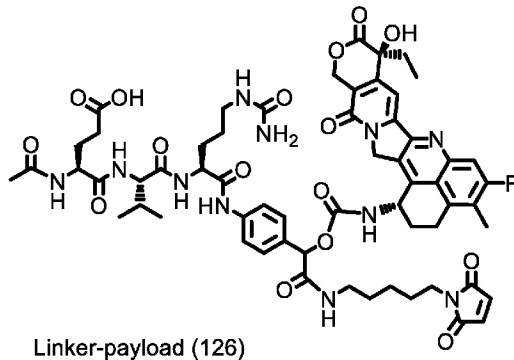


[0597] MS (ESI) m/z : 1968.14 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0598] (12-6) Linker-payload (126) の合成

下記に示すLinker-payload (126) は、Linker-payload mimetic (35) の合成において、MMAEの代わりにExatecan mesylateを用い、同様の方法で合成した。

[化144]



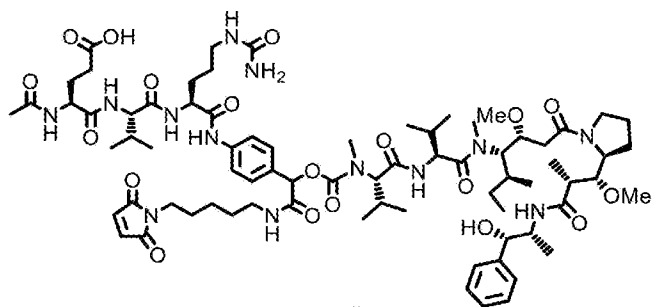
[0599] MS (ESI) m/z : 1220.50 $[M+H]^+$

[0600] 実施例13: ADC の合成

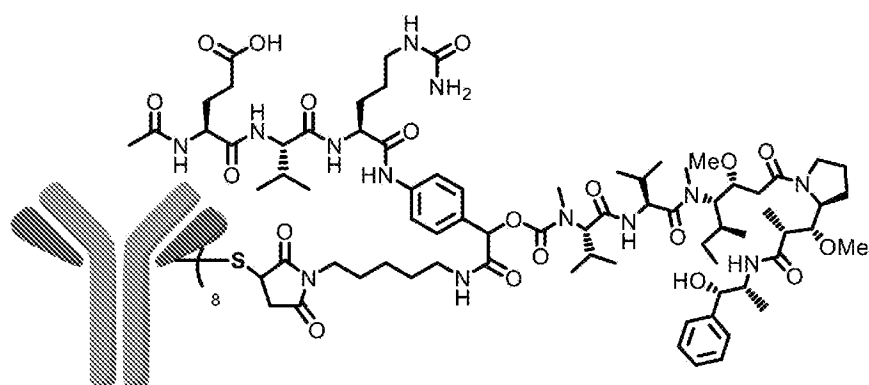
実施例13-1: ADC 1の合成

抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ（中外製薬）3mg/mL PBSE緩衝液（50mM phosphate buffered saline (PBS)、10mM EDTA、pH=7.4）に対して、還元剤（TCEP）のPBSE溶液（2mM）を抗体に対して8当量加え、37℃で1時間インキュベーションさせた。得られた反応混合物にジメチルアセトアミド（DMA）（6% v/v）および各種Linker-payload (35) の10mM DMA溶液（抗体に対して20当量）を順次添加し、20℃で1時間穏やかに攪拌した。反応混合物に過剰量のN-アセチルシステインを加え、25℃で20分間攪拌した。最終混合物を、NAP-5脱塩カラム（GEヘルスケア社製）を用いて精製し、formulation buffer（20mM histidine、5wt%トレハロース添加、pH5.2）で溶出し、ADC mimetic 1を得た。

[化145]



Linker-payload (35)



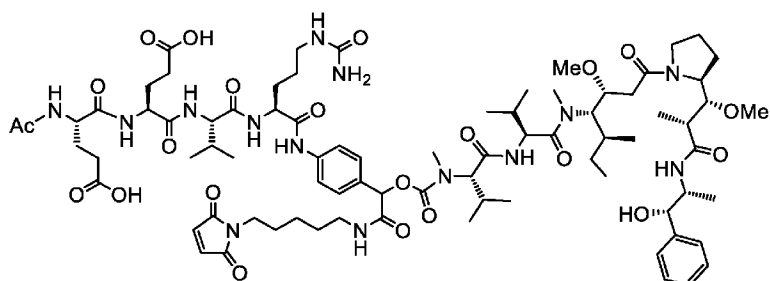
Trastuzumab

ADC 1

[0601] 実施例 1 3-2 : ADC 2 の合成

[0602] 実施例 1 3-1 に従って、Linker-payload (42) より ADC 2 を得た。

[化146]

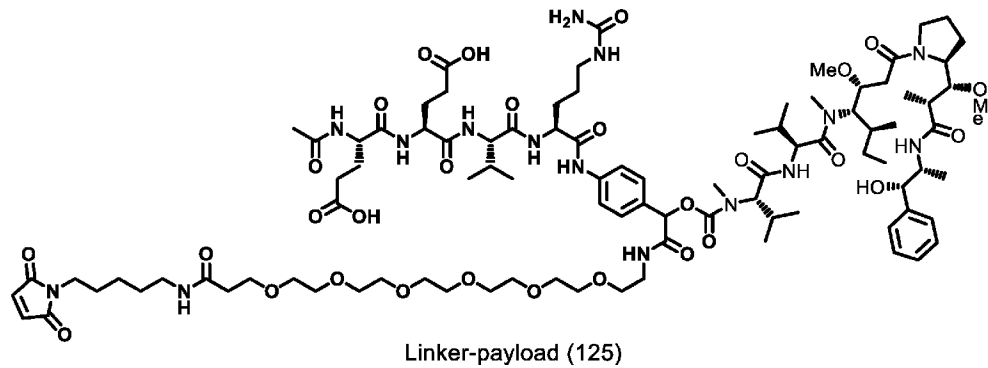


Linker-Payload (42)

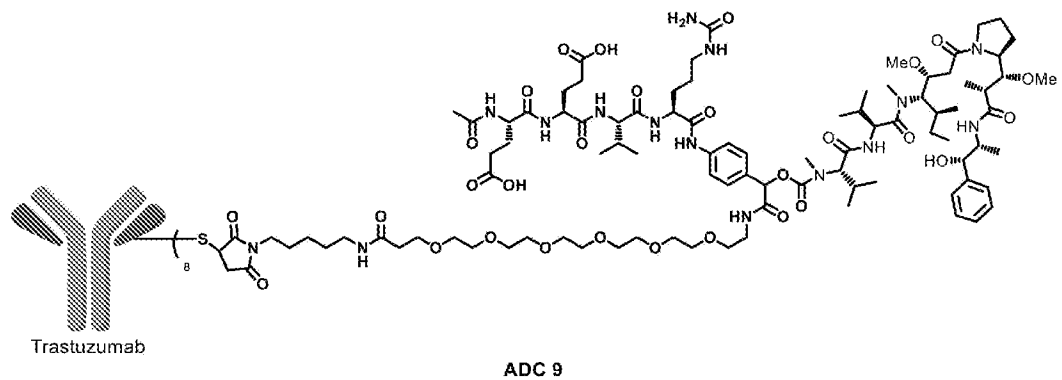
[0604] 実施例 13-4 : ADC 9 の合成

実施例 13-1 に従って、Linker-payload (125) より ADC 9 を得た。

[化150]



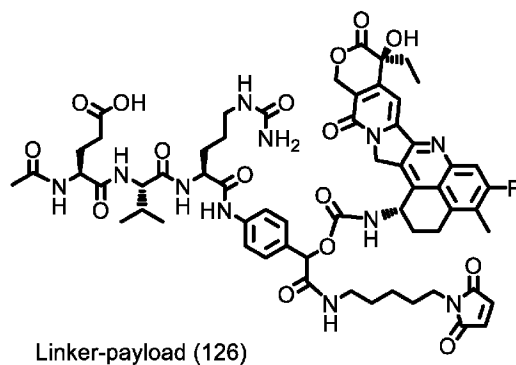
[化151]



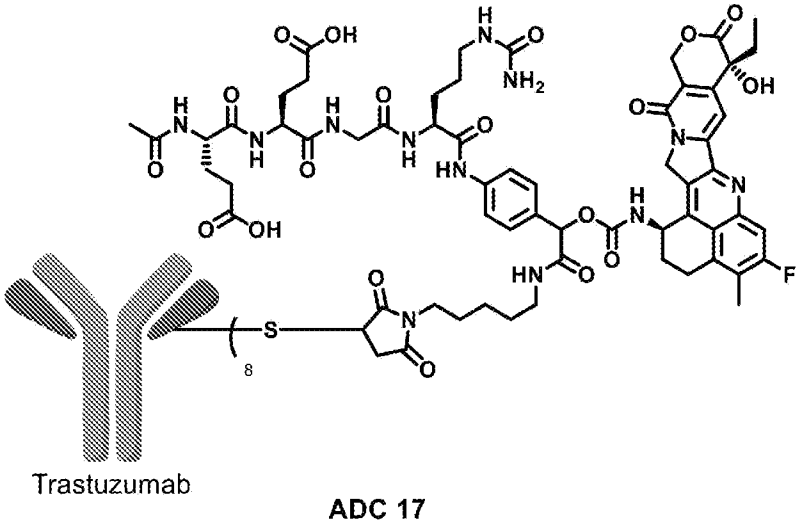
[0605] 実施例 13-5 : ADC 10 の合成

実施例 13-1 に従って、Linker-payload (126) より ADC 10 を得た。

[化152]



[化155]



[0607] 実施例 1 4 : ADC の H I C - H P L C 分析

実施例 8 の条件を用いて、H I C - H P L C 分析を行った。

[表13]

表 1 3 . ADC の D A R

	Linker-payload	実施例	DAR
ADC 1	Linker-payload (3 5)	実施例 1 3 - 1	8
ADC 2	Linker-payload (4 2)	実施例 1 3 - 2	8
ADC 3	Linker-payload (4 7)	実施例 1 3 - 3	8
ADC 9	Linker-payload (1 2 5)	実施例 1 3 - 4	8
ADC 10	Linker-payload (1 2 6)	実施例 1 3 - 5	8
ADC 17	Linker-payload (1 4 6)	実施例 1 3 - 6	8

[0608] 続いて、H I C - H P L C を用いて ADC の疎水性評価を行った。測定は実施例 9 に従って行った。H I C クロマトグラムにおける、ADC のリテンションタイムによって ADC の疎水性度を評価することができる。比較対象に原料抗体であり Trastuzumab を用いた。

[表14]

表 1 4 . H I C - H P L C を用いたトラスツズマブベースの ADC の疎水性度の評価

	Linker-payload	実施例	リテンションタイム
ADC 1	Linker-payload (3 5)	実施例 1 3 - 1	1 2 . 3 分
ADC 2	Linker-payload (4 2)	実施例 1 3 - 2	1 1 . 1 分
ADC 3	Linker-payload (4 7)	実施例 1 3 - 3	9 . 1 分
ADC 10	Linker-payload (1 2 6)	実施例 1 3 - 5	9 . 3 分
ADC 17	Linker-payload (1 4 6)	実施例 1 3 - 6	9 . 0 分
Trastuzumab	なし	なし	8 . 2 分

[0609] エキソ型ADCであるADC 1, 2, 3は、HICクロマトグラムにおけるリテンションタイムが原料抗体と遜色なく、より親水性のADCであることが分かる。

[0610] 実施例15：サイズ排除クロマトグラフィー（SEC-HPLC）による、ADCの凝集率の評価

実施例10に従い、SEC-HPLC分析を行った。

[表15]

表15. SEC-HPLCを用いたトラスツズマブベースのADCの凝集率の評価

	Linker-payload	実施例	凝集率
ADC 1	Linker-payload (3 5)	実施例13-1	0.8%
ADC 2	Linker-payload (4 2)	実施例13-2	0.6%
ADC 3	Linker-payload (4 7)	実施例13-3	0.5%
ADC 10	Linker-payload (1 2 6)	実施例13-5	0.1%
ADC 17	Linker-payload (1 4 6)	実施例13-6	0.4%
Trastuzumab	なし	なし	0.5%

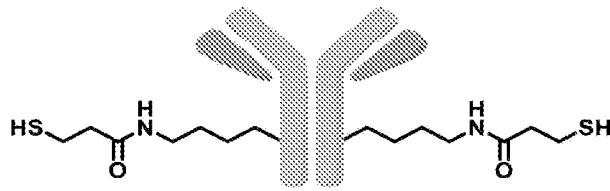
[0611] この結果、実施例13-1, 2, 3で合成したADCは、凝集率が低い傾向であることが確認され、より安定性が高いことがわかる。よって、実施例13-1, 2, 3で合成したADCは、好ましいADCであることが確認された。

[0612] 実施例16：ADCの合成

(16-1) ADC 4の合成

以降の比較例および実施例では、チオール基導入抗体として、国際公開第2019/240287号（WO2019/240287A1）の実施例81-7に記載される抗体誘導体（チオール基導入トラスツズマブ）を用いた。この抗体誘導体は、抗体重鎖の246位または248位のリジン残基の側鎖のアミノ基を介して、トラスツズマブ（ヒト化IgG1抗体）にチオール基が位置選択的に導入されている下記構造を有する（リジン残基の位置はE U n u m b e r i n gに従う）。

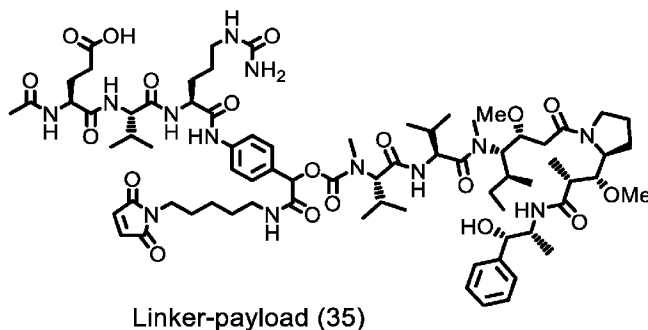
[化156]



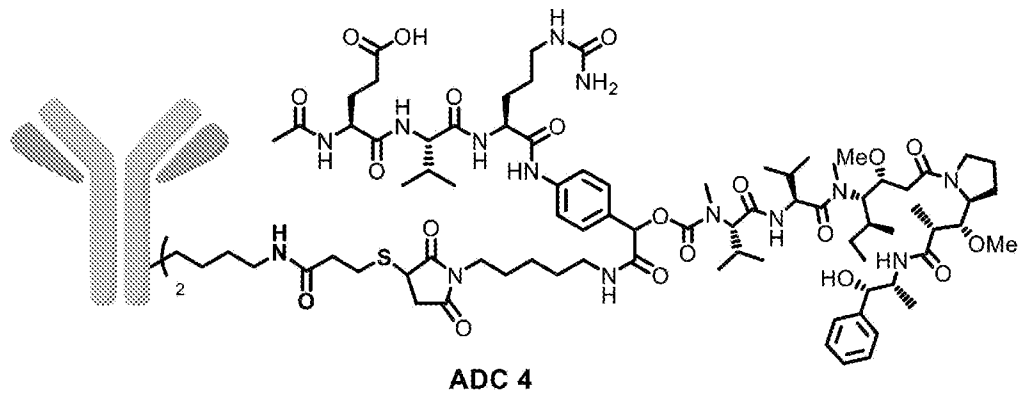
(上記構造において、抗体重鎖から伸びている $\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$ は、リジン残基の側鎖に対応し、このリジン残基の側鎖中のアミノ基に対してチオール含有基である $\text{HS}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})$ が付加されている。本抗体は、ペプチドマッピング法で他のリジン残基での修飾が検出されなかったことから、抗体重鎖の246位または248位での位置選択性が100%であると解される。)

[0613] チオール基導入抗体のbuffer (pH7.4 PBSバッファー) 溶液 (20 μM) に実施例13-1で合成したLinker-payload (35) のDMF溶液 (10 mM) を10当量加え、室温にて2時間静置後、NAP-5 Columns (GEヘルスケア社製) を用いて精製してADC 4を得た。ESI-TOFMS分析を行い、反応生成物はLinker-payload (35) が2個導入された151414にピークが確認された。

[化157]



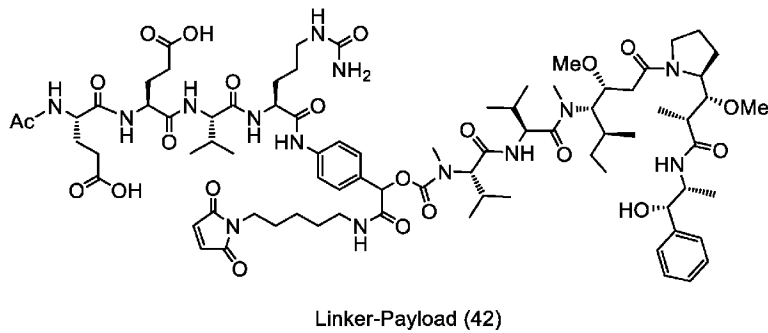
[化158]



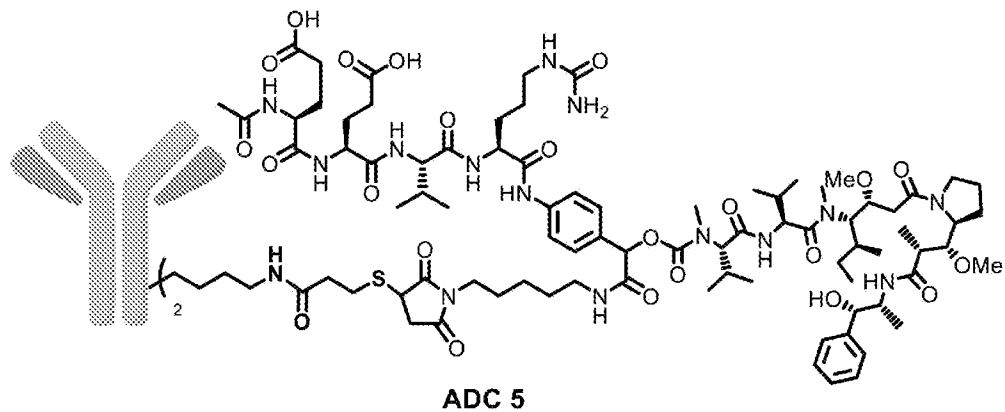
[0614] 実施例 16-2 : ADC 5 の合成

実施例 16-1 に従って、Linker-payload (42) より ADC 5 を得た。ESI-TOFMS 分析を行い、反応生成物は Linker-payload (42) が 2 個導入された 151673 にピークが確認された。

[化159]



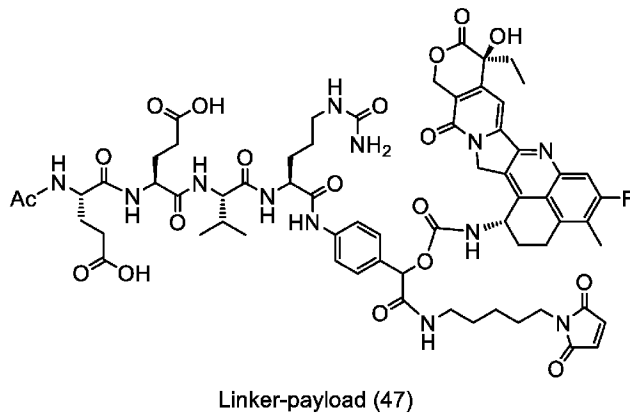
[化160]



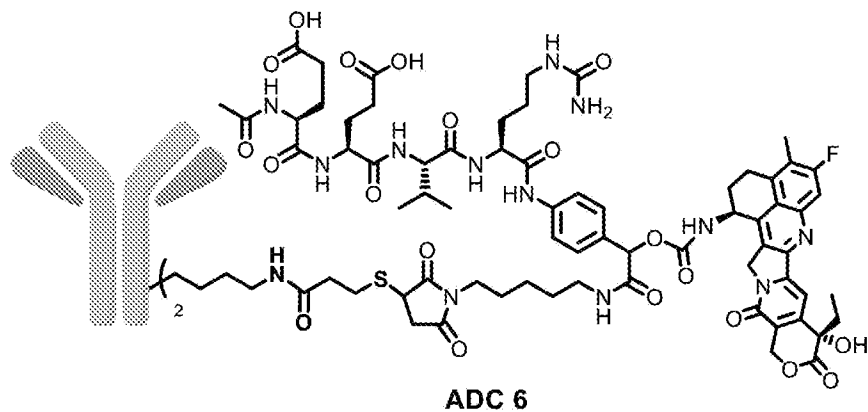
[0615] 実施例 16-3 : ADC 6 の合成

実施例16-1に従って、Linker-payload (47) よりADC 6を得た。ESI-TOFMS分析を行い、反応生成物はLinker-payload (47) が2個導入された151109にピークが確認された。

[化161]



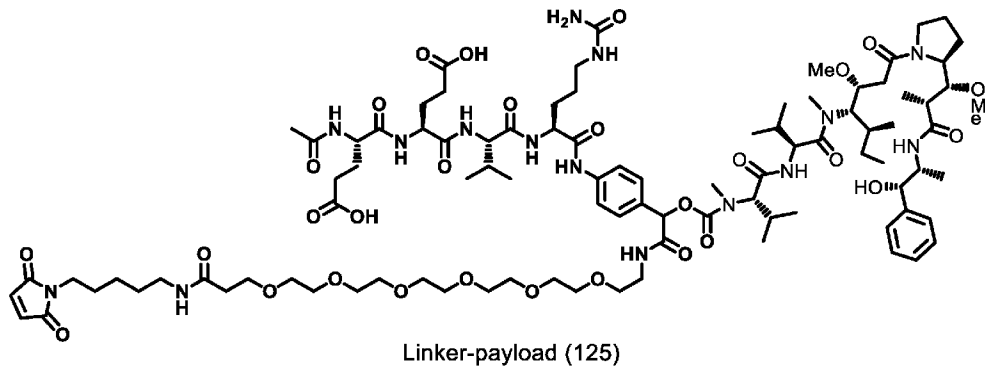
[化162]



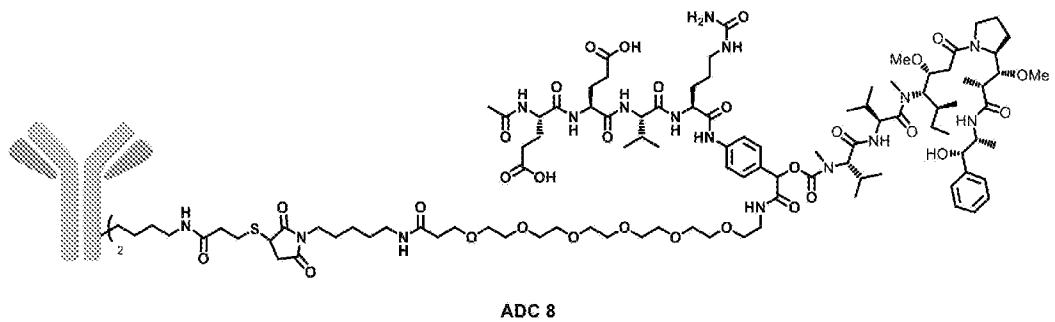
[0616] 実施例16-4：ADC 6の合成

実施例16-1に従って、Linker-payload (125) よりADC 8を得た。ESI-TOFMS分析を行い、反応生成物はLinker-payload (125) が2個導入された150524にピークが確認された。

[化163]



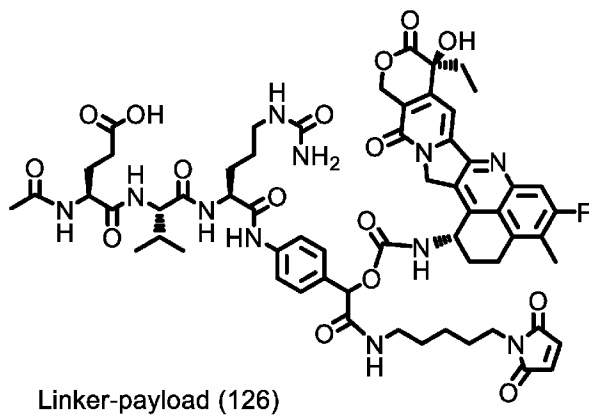
[化164]



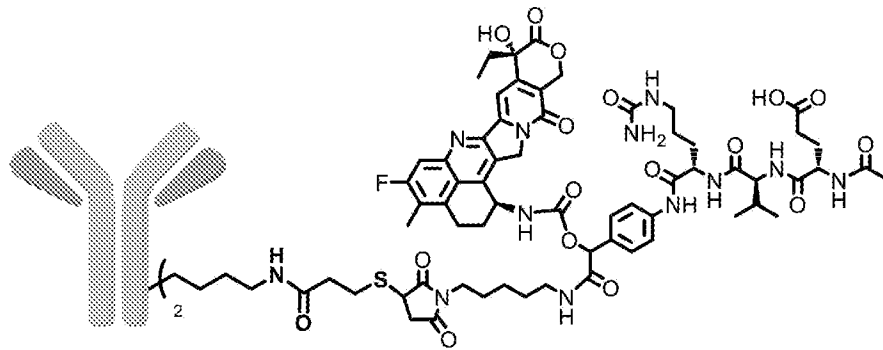
[0617] 実施例 16-5 : ADC 11 の合成

実施例 16-1 に従って、Linker-payload (126) より ADC 11 を得た。ESI-TOFMS 分析を行い、反応生成物は Linker-payload (126) が 2 個導入された 150615 にピークが確認された。

[化165]



[化166]

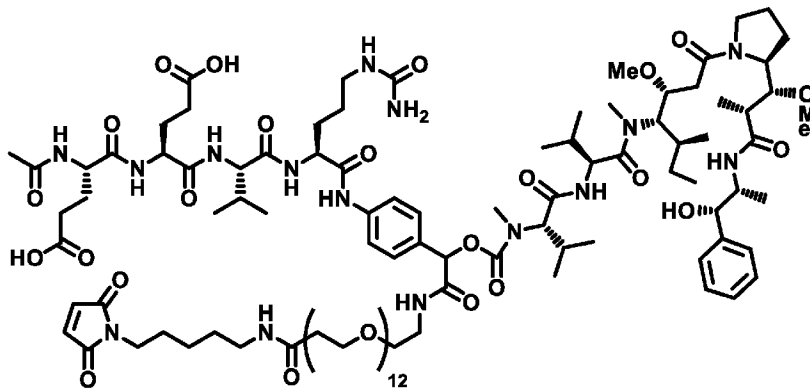


ADC 11

[0618] 実施例 16-6 : ADC 12 の合成

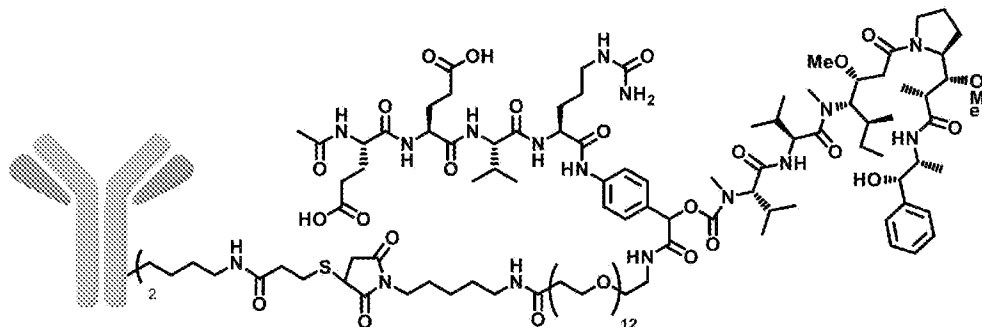
実施例 16-1 に従って、Linker-payload (130) より ADC 12 を得た。ESI-TOFMS 分析を行い、反応生成物は Linker-payload (130) が 2 個導入された 152861 にピークが確認された。

[化167]



Linker-payload (130)

[化168]

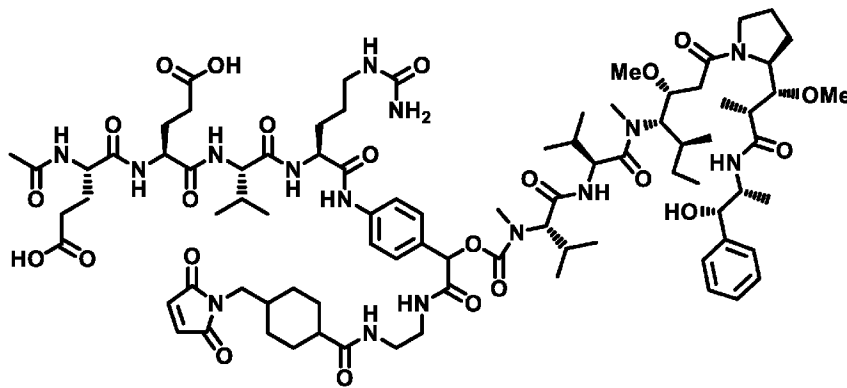


ADC 12

[0619] 実施例 16-7 : ADC 13 の合成

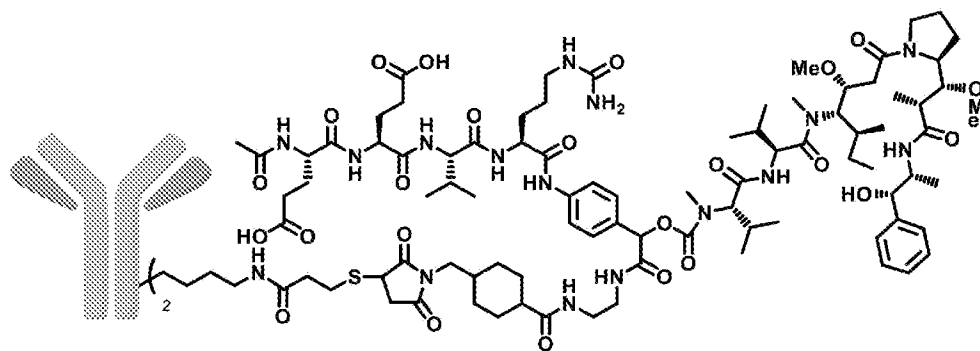
実施例 16-1 に従って、Linker-payload (132) より ADC 13 を得た。ESI-TOFMS 分析を行い、反応生成物は Linker-payload (132) が 2 個導入された 151632 にピークが確認された。

[化169]



Linker-payload (132)

[化170]

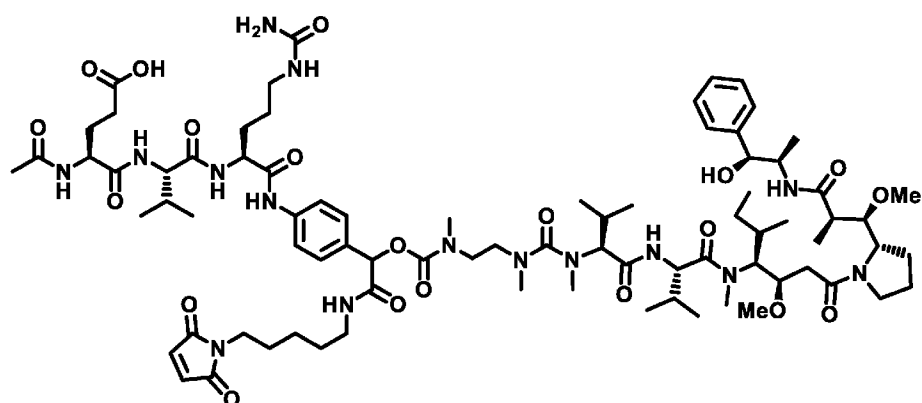


ADC 13

[0620] 実施例 16-8 : ADC 14 の合成

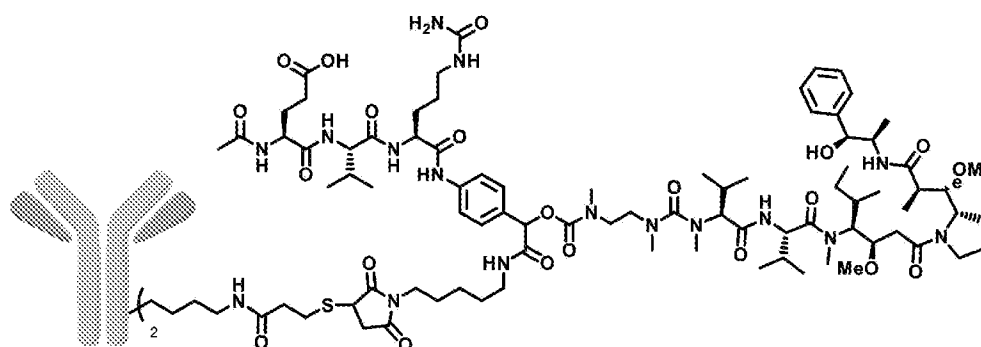
実施例 16-1 に従って、Linker-payload (134) より ADC 14 を得た。ESI-TOFMS 分析を行い、反応生成物は Linker-payload (134) が 2 個導入された 151409 にピークが確認された。

[化171]



Linker-payload (134)

[化172]

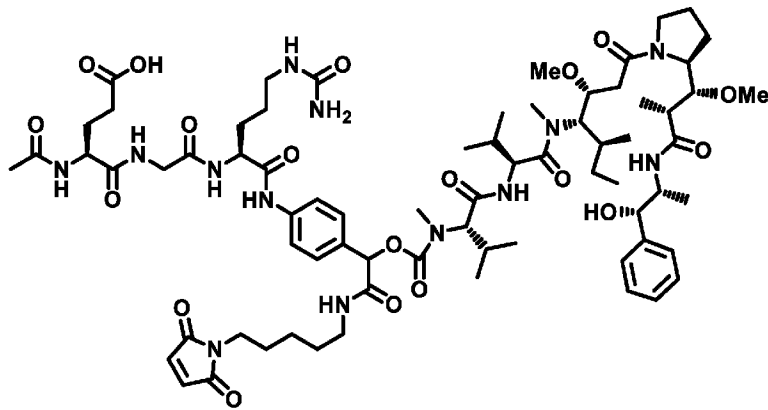


ADC 14

[0621] 実施例16-9: ADC 15の合成

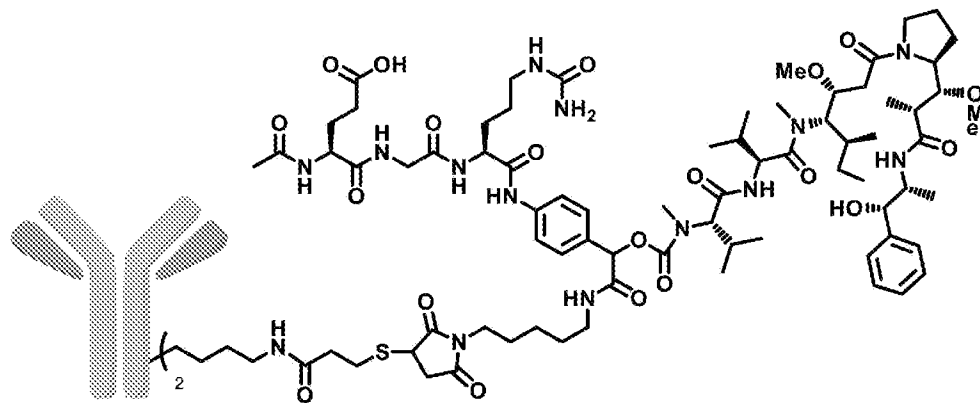
実施例16-1に従って、Linker-payload (141) より ADC 15を得た。ESI-TOFMS分析を行い、反応生成物はLinker-payload (141) が2個導入された151095にピークが確認された。

[化173]



Linker-payload (141)

[化174]



ADC 15

[0622] 実施例16-10: ADC 16の合成

実施例16-1に従って、Linker-payload (146) より ADC 16を得た。ESI-TOFMS分析を行い、反応生成物はLinker-payload (146) が2個導入された150789にピークが確認された。

ションタイムによってADCの疎水性度を評価することができる。比較対象に原料抗体でありTrastuzumabを用いた。

[表17]

表17. HIC-HPLCを用いたトラスツズマブベースのADCの疎水性度の評価

	Linker-payload	実施例	リテンションタイム
ADC 4	Linker-payload (35)	実施例16-1	11.2分
ADC 5	Linker-payload (42)	実施例16-2	10.7分
ADC 6	Linker-payload (47)	実施例16-3	10.4分
ADC 12	Linker-payload (130)	実施例16-6	9.8分
ADC 13	Linker-payload (132)	実施例16-7	9.6分
ADC 14	Linker-payload (134)	実施例16-8	9.7分
ADC 15	Linker-payload (141)	実施例16-9	10.9分
ADC 16	Linker-payload (146)	実施例16-10	10.4分
Trastuzumab	なし	なし	8.2分

[0625] エキソ型ADCであるADC 4, 5, 6, 12, 13, 14, 15, 16は、HICクロマトグラムにおけるリテンションタイムが原料抗体と遜色なく、より親水性のADCであることが分かる。

[0626] 実施例18: サイズ排除クロマトグラフィー (SEC-HPLC) による、ADCの凝集率の評価

実施例10に従い、SEC-HPLC分析を行った。

[表18]

表18. SEC-HPLCを用いたトラスツズマブベースのADCの凝集率の評価

	Linker-payload	実施例	凝集率
ADC 4	Linker-payload (35)	実施例16-1	0.6%
ADC 5	Linker-payload (42)	実施例16-2	0.8%
ADC 6	Linker-payload (47)	実施例16-3	0.5%
ADC 12	Linker-payload (130)	実施例16-6	1.3%
ADC 13	Linker-payload (132)	実施例16-7	1.2%
ADC 14	Linker-payload (134)	実施例16-8	1.3%
ADC 15	Linker-payload (141)	実施例16-9	1.5%
ADC 16	Linker-payload (146)	実施例16-10	1.5%
ADC 18	Linker-payload (42)	実施例26-5	1.4%
ADC 19	Linker-payload (42)	実施例26-6-3	1.0%
Trastuzumab	なし	なし	0.5%

[0627] この結果、実施例16-1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 実施例26-5, 26-6-3で合成したADCは、凝集率が低い傾向であることが確認され、より安定性が高いことがわかる。よって、実施例16-1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 実施例26-5, 26-6-3で合成したADC

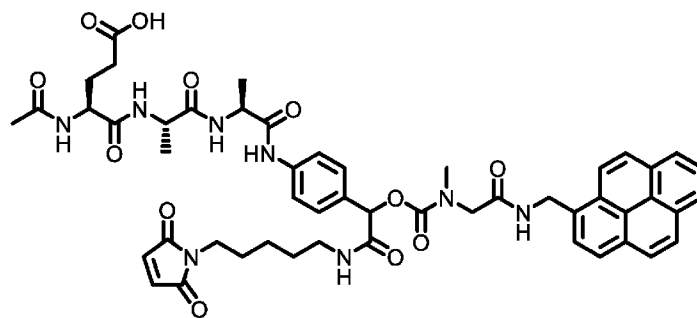
は、好ましいADCであることが確認された。

[0628] 実施例19: Linker-payload mimicの合成

(19-1) Linker-payload mimic (51) の合成

Linker-payload mimic (51) は下記のように合成した。

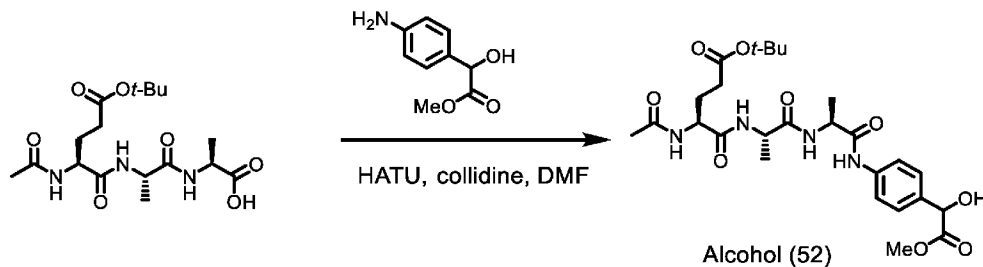
[化177]



Linker-payload mimic (51)

[0629] (19-1-1) アルコール (52) の合成

[化178]



Alcohol (52)

[0630] Ac-Glu(OtBu)-Ala-Ala-OH (51.0 mg, 132 μmol) をN, N-ジメチルホルムアミド (660 μL) に溶解させ、1-[[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1,2,3, トリアゾロ[4,5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロホスファート (60.1 mg, 158 μmol)、2,4,6-トリメチルピリジン (20.8 μL , 158 μmol) を加え、室温にて10分間攪拌した。続いて、4-アミノマンデル酸メチル (28.6 mg, 158 μmol) を加えて室温にて18.5時間攪拌した後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニト

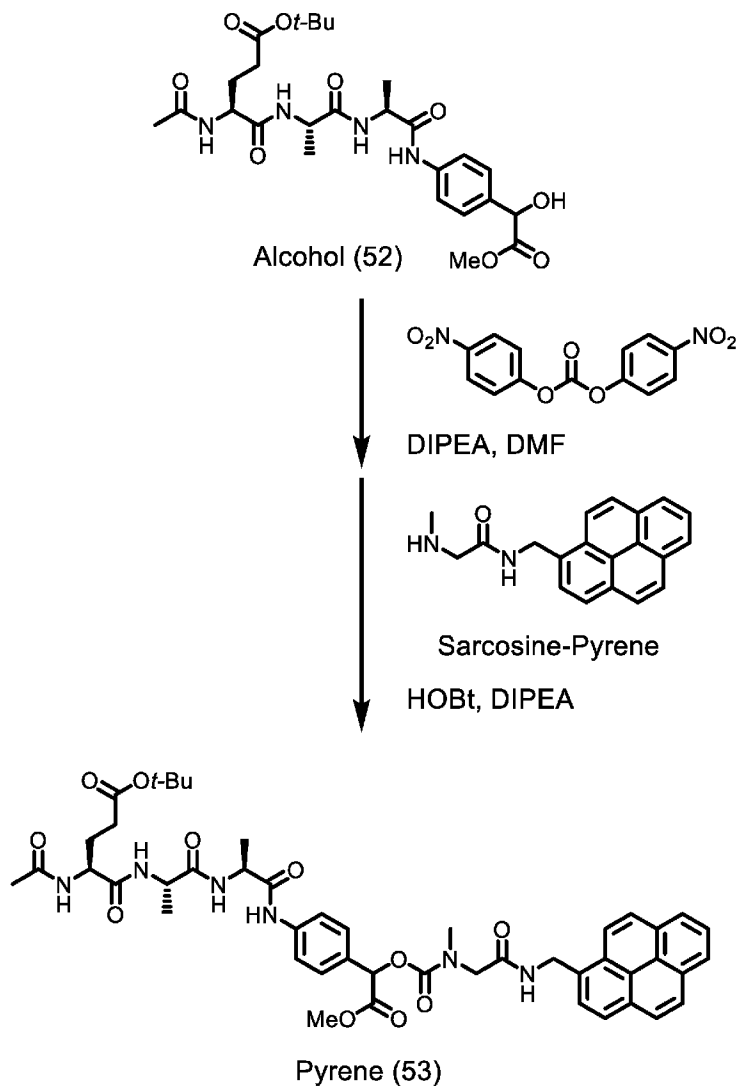
リルを除去し、凍結乾燥することにより、上記アルコール (52) (62.8 mg, 114 μ mol) を得た。

[0631] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.91 (s, 1H), 8.08–8.02 (m, 3H), 7.56 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.32 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 5.08 (s, 1H), 4.39–4.32 (m, 1H), 4.28–4.20 (m, 2H), 3.59 (s, 3H), 2.23 (t, $J=8.0$ Hz, 2H), 1.90–1.81 (m, 4H), 1.74–1.67 (m, 1H), 1.38 (s, 9H), 1.30 (d, $J=7.2$ Hz, 3H), 1.22 (d, $J=7.2$ Hz, 3H).

[0632] MS (ESI) m/z : 551.25 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0633] (19–1–2) ピレン (53) の合成

[化179]



[0634] (19-1-1) で得られたアルコール (52) (62.8 mg, 114 μmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (570 μL) に溶解させ、氷冷下 5 分間攪拌した後、炭酸ビス (4-ニトロフェニル) (104 mg, 342 μmol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (43.6 μL , 256 μmol) を加え、室温にて 4 時間攪拌した。その後、氷冷し、Sarcosine-Pyrene (172 mg, 570 μmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (23.1 mg, 171 μmol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (150 μL , 883 μmol) を加え、室温にて 20 時間攪拌した。反応後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリ

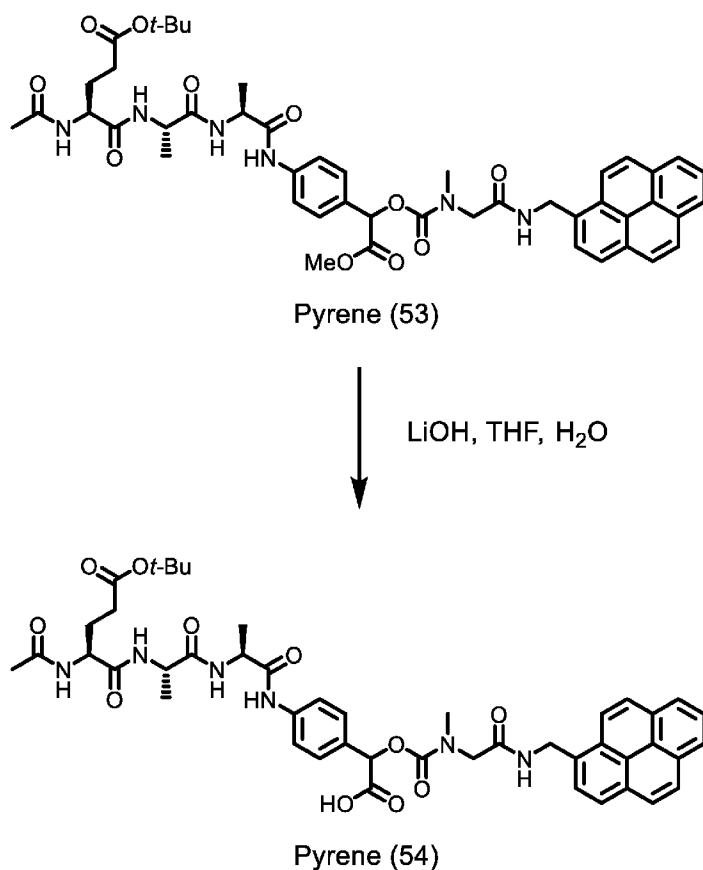
ルを除去し、凍結乾燥することにより、上記ピレン (53) (80.2 mg, 91.2 μmol) を得た。

[0635] ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.04–10.01 (m, 1H), 8.69–8.64 (m, 1H), 8.39–8.24 (m, 4H), 8.18–8.01 (m, 8H), 7.88–7.85 (m, 1H), 7.66–7.64 (m, 2H), 7.44–7.40 (m, 2H), 5.79–5.77 (m, 1H), 5.04–4.97 (m, 2H), 4.43–4.23 (m, 3H), 4.11–4.07 (m, 1H), 3.91–3.82 (m, 1H), 3.62–3.61 (m, 3H), 2.99–2.93 (m, 3H), 2.23 (t, $J=8.0\text{ Hz}$, 2H), 1.88–1.82 (m, 4H), 1.75–1.65 (m, 1H), 1.37–1.30 (m, 12H), 1.25–1.21 (m, 3H).

[0636] MS (ESI) m/z : 879.35 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0637] (19–1–3) ピレン (54) の合成

[化180]



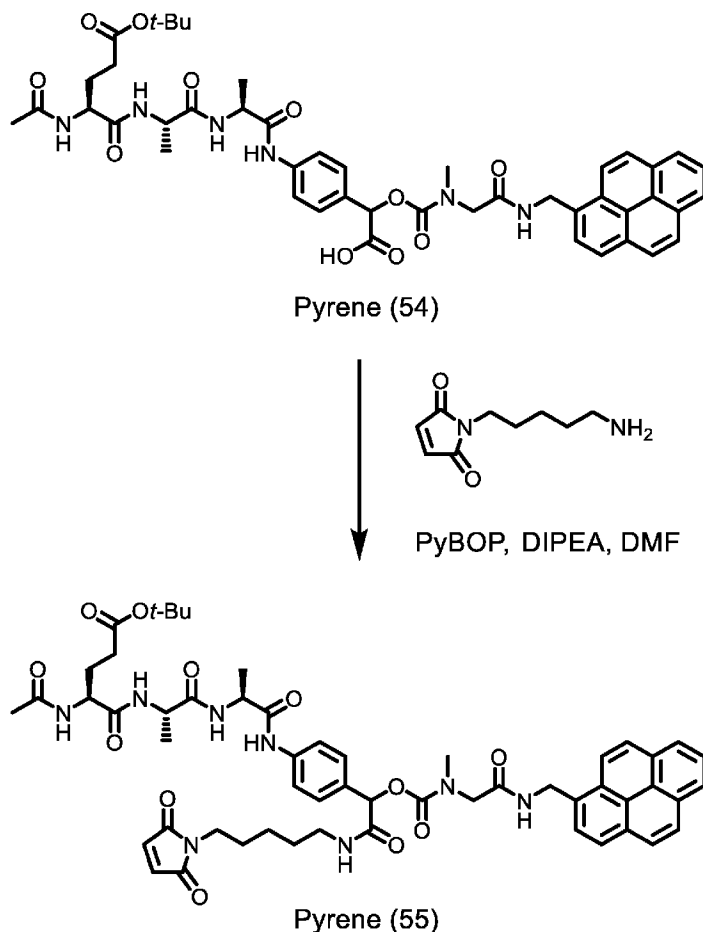
[0638] ピレン (53) (28.5 mg, 32.4 μmol) をテトラヒドロフラン (2.55 mL)、水 (0.85 mL) に溶解させ、氷冷下5分間攪拌した後、水酸化リチウム水和物 (6.8 mg, 162 μmol) を加え、室温にて1時間攪拌した。反応終了後、1 M塩酸を用いて約 pH 6 に調整し、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記ピレン (54) (15.2 mg, 17.6 μmol) を得た。

[0639] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13.05 (br s, 1 H), 10.04–10.00 (m, 1 H), 8.68–8.65 (m, 1 H), 8.39–8.22 (m, 4 H), 8.19–8.00 (m, 8 H), 7.87–7.84 (m, 1 H), 7.67–7.63 (m, 2 H), 7.44–7.42 (m, 2 H), 5.67 (s, 1 H), 5.04–4.96 (m, 2 H), 4.44–4.20 (m, 3 H), 4.13–4.09 (m, 1 H), 3.90–3.80 (m, 1 H), 2.99–2.92 (m, 3 H), 2.24 (t, $J=8.0\text{ Hz}$, 2 H), 1.88–1.82 (m, 4 H), 1.75–1.65 (m, 1 H), 1.37–1.30 (m, 12 H), 1.25–1.22 (m, 3 H).

[0640] MS (ESI) m/z : 865.30 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0641] (19-1-4) ピレン (55) の合成

[化181]



[0642] ピレン (54) (14.2 mg, 16.4 μmol) をN, N-ジメチルホルムアミド (330 μL) に溶解させたのち氷冷し、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (5.6 μL , 32.8 μmol)、1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート (12.8 mg, 24.6 μmol) を加えた。次にN-(5-アミノペンチル)マレイミド塩酸塩 (5.4 mg, 24.6 μmol) を加えて室温に戻し1時間攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、ピレン (55) (11.7 mg, 11.4 μmol) を得た。

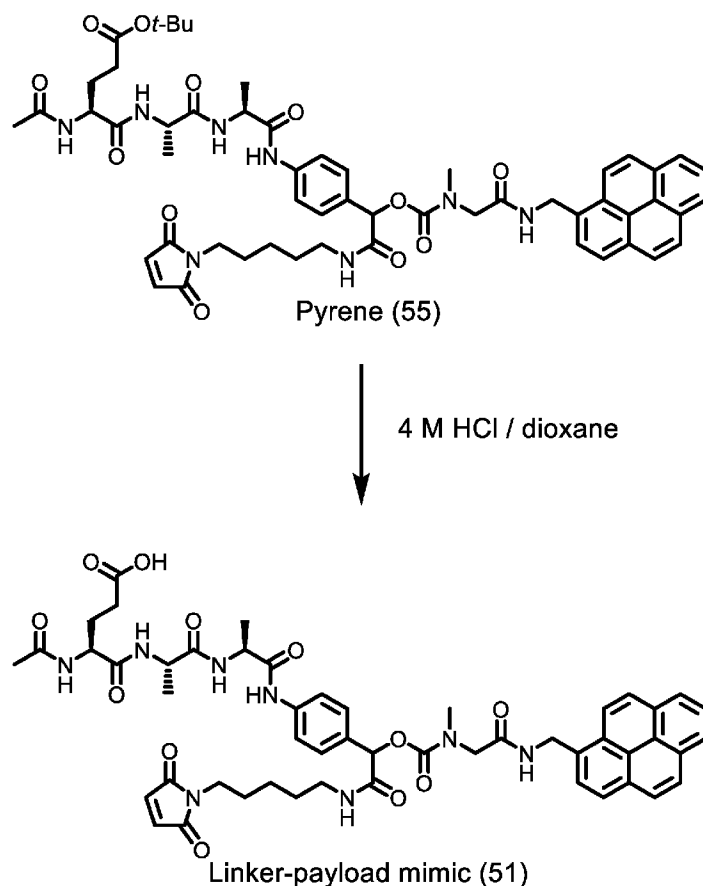
[0643] ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.99–9.95 (m, 1H), 8.89–7.7.94 (m, 14H), 7.62–7.58 (

m, 2H), 7.40–7.34 (m, 2H), 6.99–6.94 (m, 2H), 5.70–5.68 (m, 1H), 5.10–4.99 (m, 2H), 4.44–4.23 (m, 2H), 4.14–3.82 (m, 2H), 3.30–3.21 (m, 1H), 3.01–2.88 (m, 5H), 2.23 (t, J=8.0 Hz, 2H), 1.88–1.67 (m, 5H), 1.14–1.08 (m, 22H).

[0644] MS (ESI) m/z : 1029.45 [M+H]⁺

[0645] (19-1-5) Linker-payload mimic (51) の合成

[化182]



[0646] ピレン (55) (9.69 mg, 9.42 μmol) に1,4-ジオキササン (1.90 mL)、4 M塩酸／ジオキササン溶液 (2.36 mL, 9.42 mmol) を順次加え、室温で5時間攪拌した。氷冷後、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (1.76 mL, 10.4 mmol) を加え、室温で1

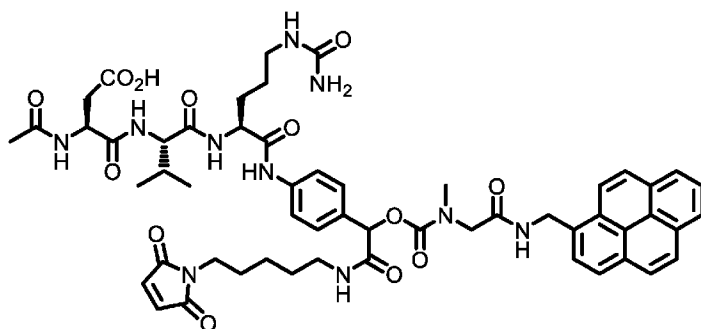
0分間攪拌した。反応液を逆相分取クロマトグラフィーにて精製し、生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、Linker-payload mimic (51) (4.03 mg, 4.14 μ mol) を得た。

[0647] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.07 (brs, 1H), 9.99–9.96 (m, 1H), 8.89–7.7.94 (m, 14H), 7.62–7.58 (m, 2H), 7.40–7.34 (m, 2H), 6.96–6.94 (m, 2H), 5.70–5.68 (m, 1H), 5.14–4.99 (m, 2H), 4.42–4.23 (m, 2H), 4.14–3.82 (m, 2H), 3.31–3.21 (m, 1H), 3.01–2.89 (m, 5H), 2.28–2.24 (m, 2H), 1.89–1.69 (m, 5H), 1.41–1.03 (m, 13H).

[0648] MS (ESI) m/z : 973.40 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0649] (19–2) Linker-payload mimic (56) の合成
Linker-payload mimic (56) は下記のように合成した。

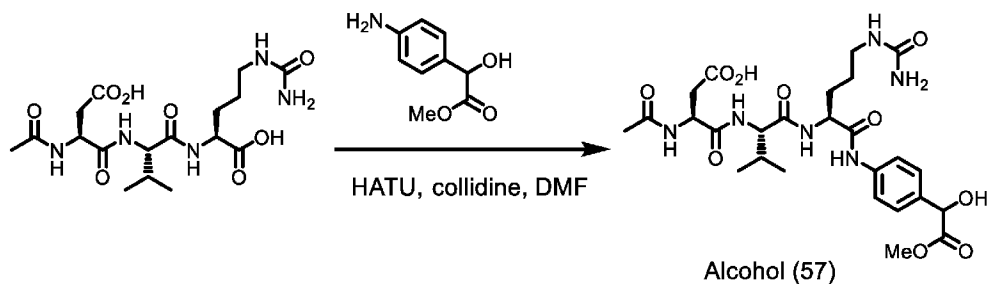
[化183]



Linker-payload mimic (56)

[0650] (19–2–1) アルコール (57) の合成

[化184]



[0651] Ac-Asp(OtBu)-Val-Cit-OH (51.7 mg, 103 μmol) をN, N-ジメチルホルムアミド (520 μL) に溶解させ、1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1,2,3, トリアゾロ[4,5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロホスファート (46.9 mg, 123 μmol)、2,4,6-トリメチルピリジン (15.9 μL , 123 μmol) を加え、室温にて10分間攪拌した。続いて、4-アミノマンデル酸メチル (22.3 mg, 123 μmol) を加えて室温にて19時間攪拌した後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記アルコール (57) (56.3 mg, 86.5 μmol) を得た。

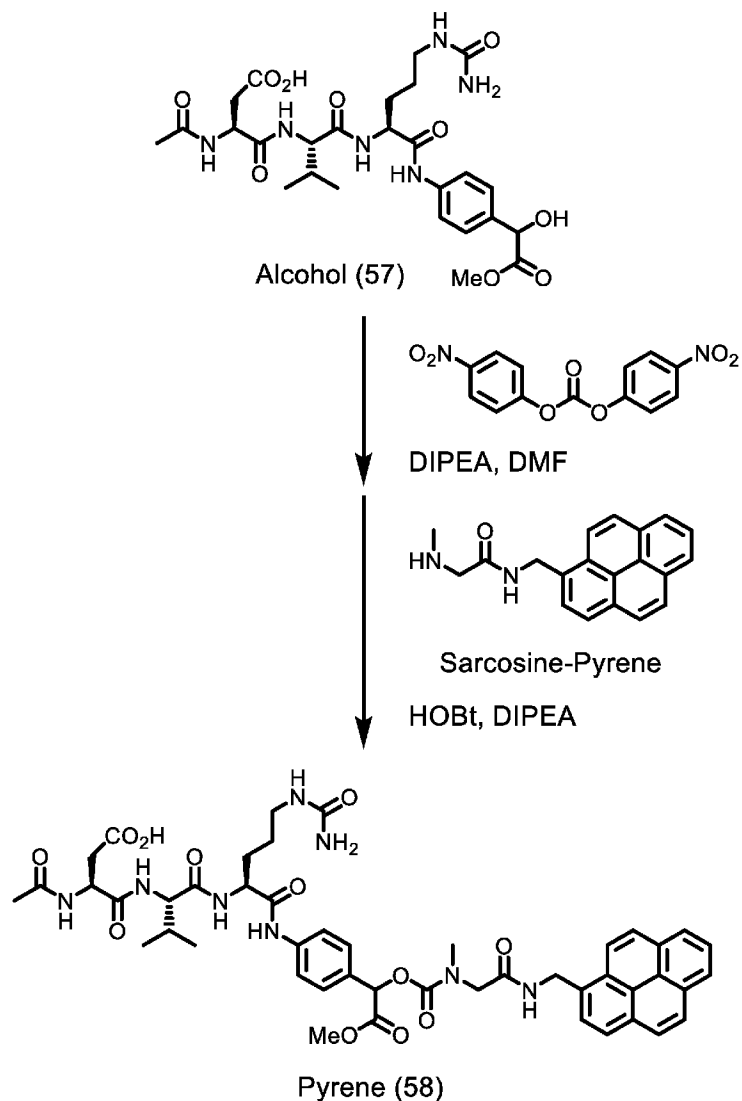
[0652] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.99 (s, 1H), 8.27 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 8.17 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.59 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 7.56 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.31 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 5.98 (brs, 1H), 5.41 (brs, 2H), 5.08 (s, 1H), 4.64-4.59 (m, 1H), 4.39-4.34 (m, 1H), 4.22-4.18 (m, 1H), 3.59 (s, 3H), 3.01-2.94 (m, 2H), 2.69-2.63 (m, 1H), 2.44-2.38 (m, 1H), 2.00-1.95 (m, 1H), 1.83 (s, 3H), 1.69-1.66 (m, 1H), 1.62-1.53 (m, 1H), 1.43-1.34 (m, 11H), 0.84 (d, $J=6.8$ Hz, 3H), 0.79 (d

, $J = 6.8 \text{ Hz}$, 3 H).

[0653] MS (ESI) m/z : 651.35 $[\text{M} + \text{H}]^+$

[0654] (19-2-2) ピレン (58) の合成

[化185]



[0655] アルコール (57) (55.0 mg, 84.5 μmol) を N,N -ジメチルホルムアミド (423 μL) に溶解させ、氷冷下5分間攪拌した後、炭酸ビス(4-ニトロフェニル) (77.1 mg, 254 μmol)、 N,N -ジイソプロピルエチルアミン (32.3 μL , 190 μmol) を加え、室温にて2時間攪拌した。その後、氷冷し、Sarcosine-Pyrene (76.7 mg, 254 μmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール

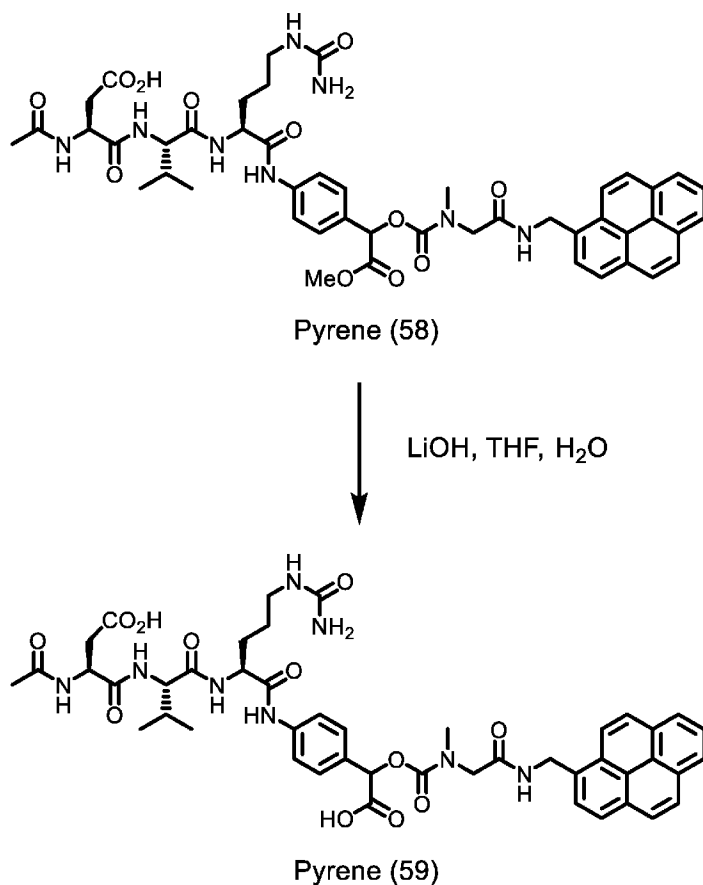
(17.1 mg, 127 μmol)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (53.9 μL , 317 μmol) を加え、室温にて1.5時間攪拌した。反応後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記ピレン (58) (60.9 mg, 62.2 μmol) を得た。

[0656] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.14–10.11 (m, 1H), 8.68–8.66 (m, 1H), 8.39–8.01 (m, 10H), 7.89–7.85 (m, 1H), 7.67–7.58 (m, 3H), 7.44–7.39 (m, 2H), 5.98 (brs, 1H), 5.79–5.77 (m, 1H), 5.42 (brs, 2H), 5.04–4.97 (m, 2H), 4.65–4.59 (m, 1H), 4.39–4.36 (m, 1H), 4.28–4.07 (m, 2H), 3.92–3.82 (m, 1H), 3.62–3.61 (m, 3H), 2.99–2.91 (m, 5H), 2.69–2.63 (m, 1H), 2.44–2.38 (m, 1H), 2.01–1.97 (m, 1H), 1.83 (s, 3H), 1.70–1.60 (m, 2H), 1.44–1.30 (m, 11H), 0.86–0.77 (m, 6H).

[0657] MS (ESI) m/z : 979.45 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0658] (19–2–3) ピレン (59) の合成

[化186]



[0659] ピレン (58) (24.9 mg, 25.4 μmol) をテトラヒドロフラン (1.88 mL)、水 (625 μL) に溶解させ、氷冷下5分間攪拌した後、1 M水酸化リチウム水溶液 (30.5 μL , 30.5 μmol) を加え、室温にて50分間攪拌した。反応終了後、0.1 M塩酸を用いて約pH6に調整し、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記ピレン (59) (8.3 mg, 8.6 μmol) を得た。

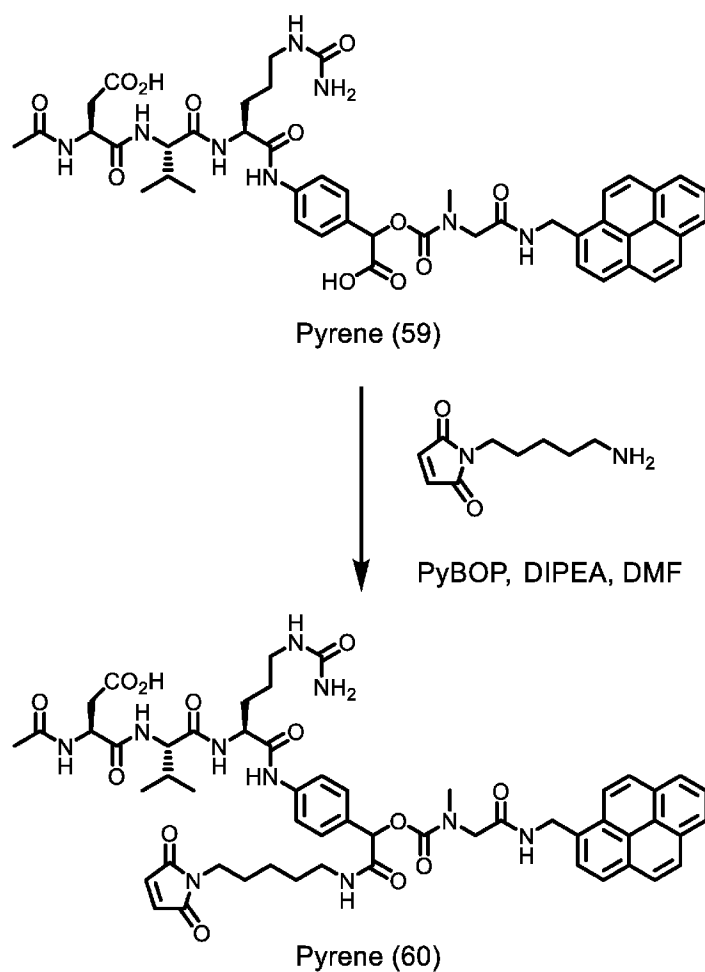
[0660] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13.06 (b r s, 1 H), 10.13–10.09 (m, 1 H), 8.68–8.65 (m, 1 H), 8.39–8.00 (m, 10 H), 7.88–7.84 (m, 1 H), 7.67–7.59 (m, 3 H), 7.44–7.41 (m, 2 H), 5.98 (b r s, 1 H), 5.68–5.67 (m, 1 H), 5.42 (

b r s, 2 H), 5. 0 4–4. 9 3 (m, 2 H), 4. 6 4–4. 6 1 (m, 1 H), 4. 4 1–4. 3 5 (m, 1 H), 4. 3 2–4. 0 9 (m, 2 H), 3. 9 1–3. 8 0 (m, 1 H), 2. 9 9–2. 9 1 (m, 5 H), 2. 7 0–2. 6 4 (m, 1 H), 2. 4 4–2. 3 8 (m, 1 H), 2. 0 1–1. 9 8 (m, 1 H), 1. 8 3 (s, 3 H), 1. 7 0–1. 5 7 (m, 2 H), 1. 4 5–1. 3 0 (m, 1 1 H), 0. 8 6–0. 7 7 (m, 6 H).

[0661] MS (ESI) m/z : 965.45 $[M+H]^+$

[0662] (19–2–4) ピレン (60) の合成

[化187]



[0663] ピレン (59) (7.2 mg, 7.5 μ mol) を N, N-ジメチルホルムアミド (150 μ L) に溶解させたのち氷冷し、N, N-ジイソプロピル

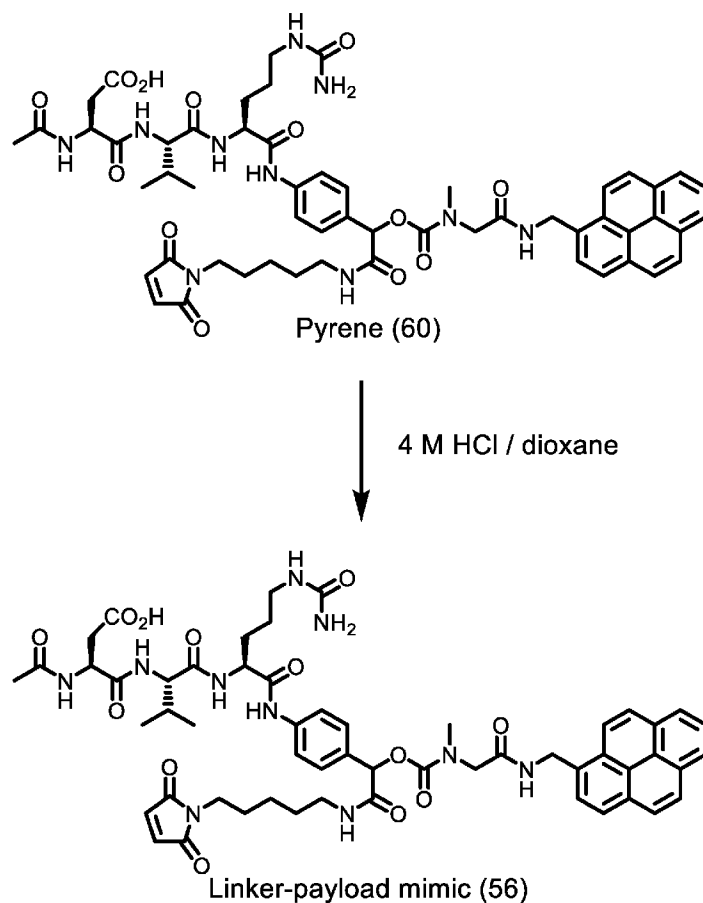
エチルアミン (2.5 μ L, 14.9 μ mol)、1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート (5.8 mg, 11.2 μ mol) を加えた。次にN-(5-アミノペンチル)マレイミド塩酸塩 (2.4 mg, 11.2 μ mol) を加えて室温に戻し1時間攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、ピレン (60) (5.7 mg, 5.1 μ mol) を得た。

[0664] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.07–10.04 (m, 1H), 8.91–8.88 (m, 1H), 8.65–7.95 (m, 12H), 7.62–7.58 (m, 3H), 7.40–7.36 (m, 2H), 6.96–6.94 (m, 2H), 5.97 (brs, 1H), 5.70–5.68 (m, 1H), 5.41 (brs, 2H), 5.14–5.00 (m, 2H), 4.65–4.61 (m, 1H), 4.42–4.37 (m, 1H), 4.25–4.19 (m, 1H), 4.15–3.82 (m, 2H), 3.30–3.21 (m, 2H), 3.04–2.89 (m, 7H), 2.70–2.64 (m, 1H), 2.44–2.38 (m, 1H), 2.01–1.97 (m, 1H), 1.83 (s, 3H), 1.75–1.60 (m, 2H), 1.48–1.24 (m, 15H), 1.12–1.03 (m, 2H), 0.86–0.78 (m, 6H).

[0665] MS (ESI) m/z : 1129.50 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0666] (19-2-5) Linker-payload mimic (56) の合成

[化188]



4 M HCl / dioxane

Linker-payload mimic (56)

[0667] ピレン (60) (4.7 mg, 4.2 μ mol) にアセトニトリル (208 μ L) を加え、氷冷下で85%リン酸溶液 (72.4 μ L, 1.25 mmol) を加え、室温で3時間攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、Linker-payload mimic (56) (3.1 mg, 2.9 μ mol) を得た。

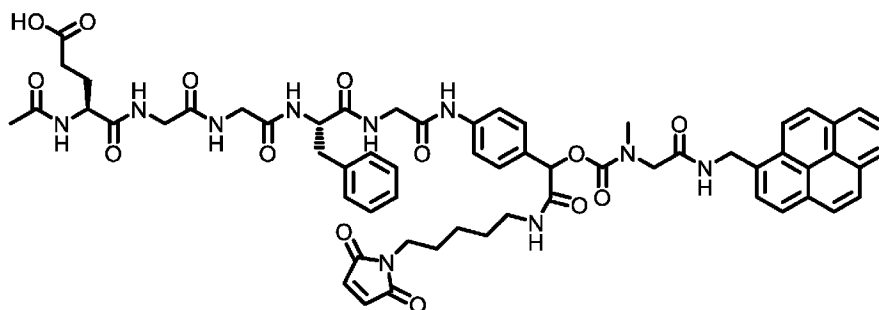
[0668] ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 12.38 (brs, 1 H), 10.05–10.01 (m, 1 H), 8.91–8.88 (m, 1 H), 8.65–7.94 (m, 12 H), 7.63–7.58 (m, 3 H), 7.40–7.34 (m, 2 H), 6.96–6.93 (m, 2 H), 6.00 (brs, 1 H), 5.70–5.68 (m, 1 H), 5.44 (brs, 2 H), 5.15–4.99 (m, 2 H), 4.64–4.60 (

m, 1 H), 4.43–4.37 (m, 1 H), 4.25–4.22 (m, 1 H), 4.15–3.82 (m, 2 H), 3.30–3.21 (m, 2 H), 3.04–2.89 (m, 7 H), 2.73–2.69 (m, 1 H), 2.46–2.44 (m, 1 H), 2.04–1.96 (m, 1 H), 1.84–1.83 (m, 3 H), 1.77–1.59 (m, 2 H), 1.44–1.04 (m, 8 H), 0.86–0.77 (m, 6 H).

[0669] MS (ESI) m/z : 1073.50 $[M+H]^+$

[0670] (19–3) Linker-payload mimic (61) の合成
Linker-payload mimic (1) は下記のように合成した。

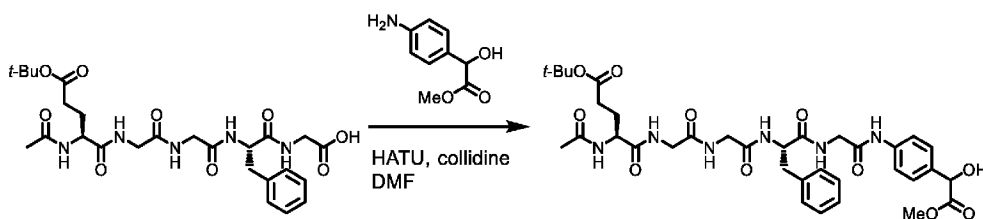
[化189]



Linker-payload mimic (61)

[0671] (19–3–1) アルコール (62) の合成

[化190]



Alcohol (62)

[0672] Ac-Glu(OtBu)-Gly-Gly-Phe-Gly-OH (52.6 mg, 88.7 μmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (650 μL) に溶解させ、1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1,2,3, トリアゾロ[4,5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオ

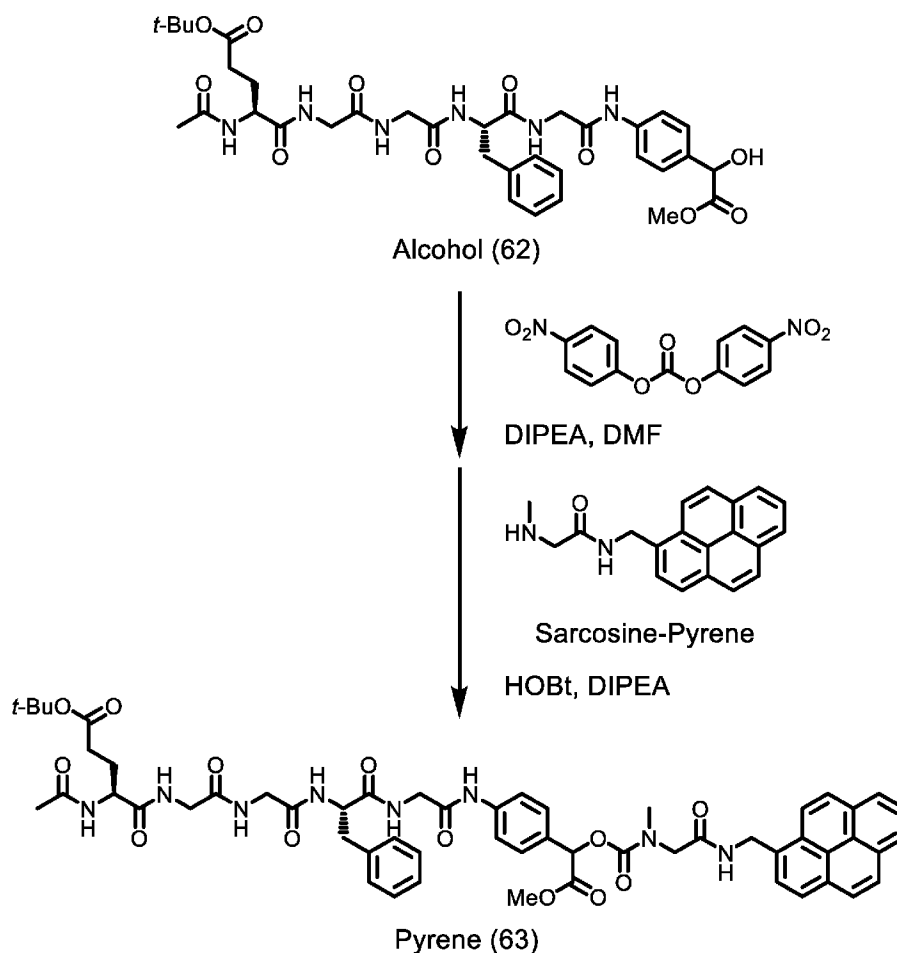
ロホスファート (40.5 mg, 106 μmol)、2, 4, 6-トリメチルピリジン (14.0 μL , 106 μmol) を加え、室温にて10分間攪拌した。続いて、4-アミノマンデル酸メチル (19.3 mg, 106 μmol) を加えて室温にて20時間攪拌した後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記アルコール (62) (36.1 mg, 49.7 μmol) を得た。

[0673] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.85 (s, 1H), 8.42–8.39 (m, 1H), 8.19–8.14 (m, 2H), 8.07–8.02 (m, 2H), 7.57 (d, $J=8.8\text{ Hz}$, 2H), 7.33 (d, $J=8.8\text{ Hz}$, 2H), 7.27 (d, $J=8.0\text{ Hz}$, 4H), 7.21–7.16 (m, 1H), 5.08 (s, 1H), 4.54–4.48 (m, 1H), 4.25–4.20 (m, 1H), 3.94–3.82 (m, 1H), 3.79–3.61 (m, 4H), 3.60 (s, 3H), 3.09–3.04 (m, 1H), 2.85–2.79 (m, 1H), 2.23 (t, $J=8.0\text{ Hz}$, 2H), 1.92–1.83 (m, 4H), 1.75–1.68 (m, 1H), 1.38 (s, 9H).

[0674] MS (ESI) m/z : 727.30 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0675] (19-3-2) ピレン (63) の合成

[化191]



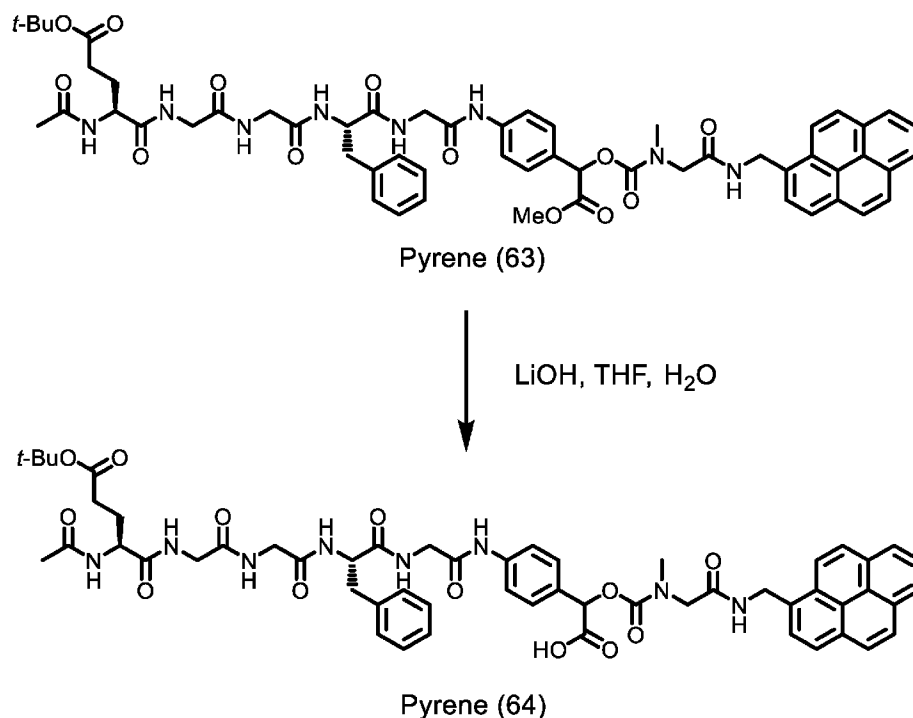
[0676] (1-1-1) で得られたアルコール (62) (35.0 mg, 48.2 μmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (360 μL) に溶解させ、氷冷下 5 分間攪拌した後、炭酸ビス (4-ニトロフェニル) (44.0 mg, 144 μmol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (18.4 μL , 108 μmol) を加え、室温にて 2 時間攪拌した。その後、氷冷し、Sarcosine-Pyrene (43.7 mg, 144 μmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (9.8 mg, 72.3 μmol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (30.7 μL , 181 μmol) を加え、室温にて 2 時間攪拌した。反応後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記ピレン (63) (34.9 mg, 33.0 μmol) を得た。

[0677] ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.99–9.96 (m, 1H), 8.67–8.66 (m, 1H), 8.45–7.87 (m, 14H), 7.67–7.63 (m, 2H), 7.45–7.41 (m, 2H), 7.26–7.23 (m, 4H), 7.20–7.17 (m, 1H), 5.80–5.78 (m, 1H), 5.04–4.97 (m, 2H), 4.55–4.52 (m, 1H), 4.28–4.07 (m, 2H), 3.94–3.62 (m, 10H), 3.12–3.04 (m, 1H), 3.00–2.93 (m, 3H), 2.87–2.79 (m, 1H), 2.24–2.20 (m, 2H), 1.92–1.84 (m, 4H), 1.75–1.66 (m, 1H), 1.37–1.36 (m, 9H).

[0678] MS (ESI) m/z : 1055.40 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0679] (19–3–3) ピレン (64) の合成

[化192]



[0680] ピレン (63) (18.2 mg, 17.2 μmol) をテトラヒドロフラン (1.27 mL)、水 (0.43 mL) に溶解させ、氷冷下5分間攪拌した後、1 M水酸化リチウム水溶液 (24.1 μL , 24.1 μmol) を加

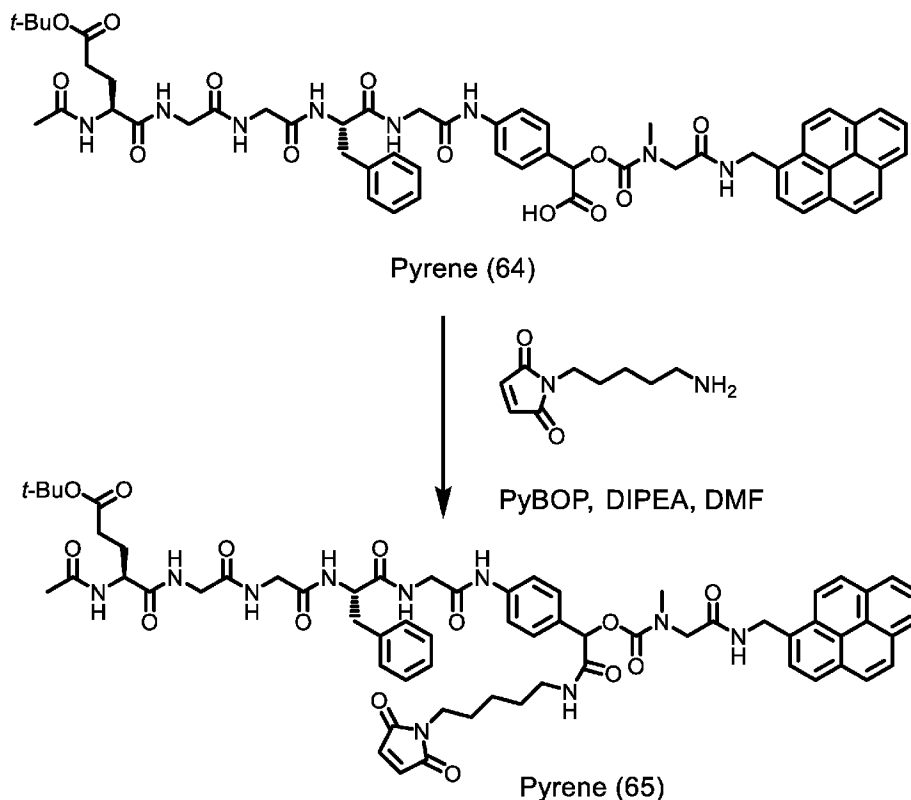
え、室温にて2.5時間攪拌した。反応終了後、1M塩酸を用いて約pH6に調整し、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記ピレン(64)(14.2mg, 13.6 μ mol)を得た。

[0681] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13.04 (brs, 1H), 9.99–9.96 (m, 1H), 8.68–8.66 (m, 1H), 8.47–7.86 (m, 14H), 7.66–7.64 (m, 2H), 7.45–7.42 (m, 2H), 7.26–7.23 (m, 4H), 7.19–7.17 (m, 1H), 5.69–5.68 (m, 1H), 5.04–4.96 (m, 2H), 4.54–4.52 (m, 1H), 4.32–4.09 (m, 2H), 3.94–3.58 (m, 7H), 3.12–3.05 (m, 1H), 3.00–2.93 (m, 3H), 2.87–2.79 (m, 1H), 2.24–2.20 (m, 2H), 1.92–1.84 (m, 4H), 1.78–1.66 (m, 1H), 1.37–1.36 (m, 9H).

[0682] MS (ESI) m/z : 1041.45 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0683] (19–3–4) ピレン(65)の合成

[化193]



[0684] ピレン (64) (12.4 mg, 11.9 μmol) をN, N-ジメチルホルムアミド (240 μL) に溶解させたのち氷冷し、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (4.0 μL , 23.8 μmol)、1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート (9.3 mg, 17.9 μmol) を加えた。次にN-(5-アミノペンチル)マレイミド塩酸塩 (3.9 mg, 17.9 μmol) を加えて室温に戻し1時間攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、ピレン (65) (8.4 mg, 7.0 μmol) を得た。

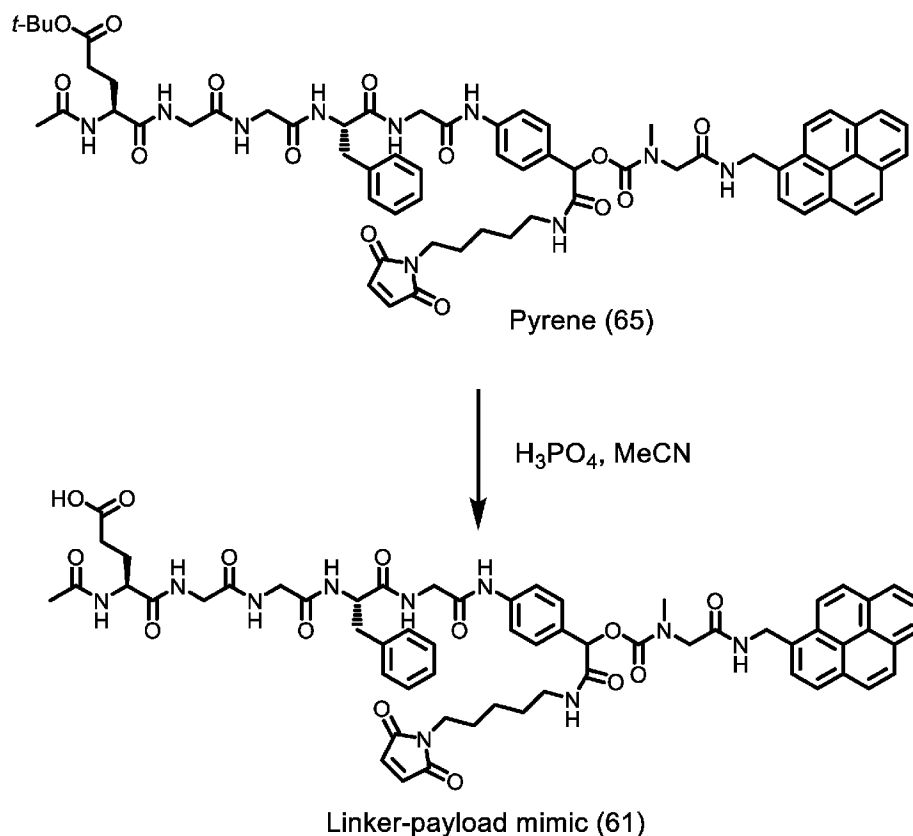
[0685] ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.94–9.91 (m, 1H), 8.91–8.88 (m, 1H), 8.63–7.95 (m, 15H), 7.62–7.59 (m, 2H), 7.42–7.35 (m, 2H), 7.27–7.23 (m, 4H), 7.20–7.16 (m, 1H),

6.96–6.93 (m, 2H), 5.71–5.69 (m, 1H), 5.14–4.99 (m, 2H), 4.58–4.52 (m, 1H), 4.25–3.60 (m, 9H), 3.30–3.20 (m, 2H), 3.12–2.79 (m, 7H), 2.24–2.20 (m, 2H), 1.92–1.84 (m, 4H), 1.75–1.66 (m, 1H), 1.41–1.24 (m, 13H), 1.11–1.03 (m, 2H).

[0686] MS (ESI) m/z : 1205.50 $[M+H]^+$

[0687] (19–3–5) Linker-payload mimic (61) の合成

[化194]



[0688] ピレン (65) (8.3 mg, 6.89 μmol) にアセトニトリル (345 μL) を加え、氷冷下で85%リン酸溶液 (120 μL , 2.07 mmol) を加え、室温で3時間攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、Linker-pa

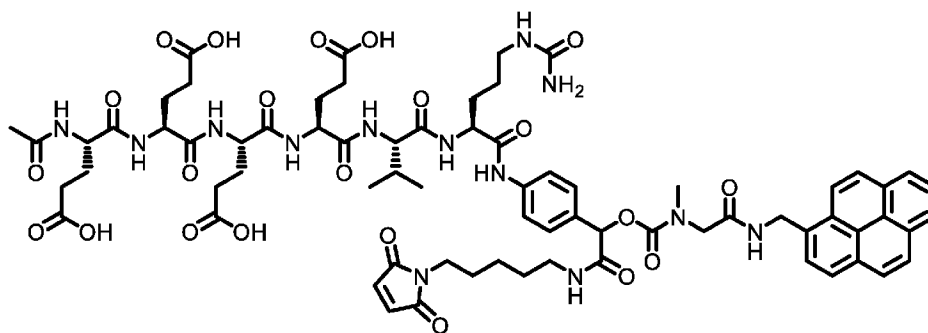
payload mimic (61) (4.0 mg, 3.48 μ mol) を得た。

[0689] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.12 (brs, 1H), 9.94–9.91 (m, 1H), 8.91–8.88 (m, 1H), 8.65–7.96 (m, 15H), 7.62–7.59 (m, 2H), 7.42–7.35 (m, 2H), 7.27–7.23 (m, 4H), 7.20–7.16 (m, 1H), 6.96–6.93 (m, 2H), 5.71–5.69 (m, 1H), 5.14–4.99 (m, 2H), 4.58–4.52 (m, 1H), 4.26–3.61 (m, 9H), 3.30–3.20 (m, 2H), 3.12–2.79 (m, 7H), 2.27–2.23 (m, 2H), 1.94–1.84 (m, 4H), 1.77–1.67 (m, 1H), 1.41–1.30 (m, 4H), 1.11–1.03 (m, 2H)。

[0690] MS (ESI) m/z : 1149.45 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0691] (19-4) Linker-payload mimic (66) の合成
Linker-payload mimic (66) は下記のように合成した。

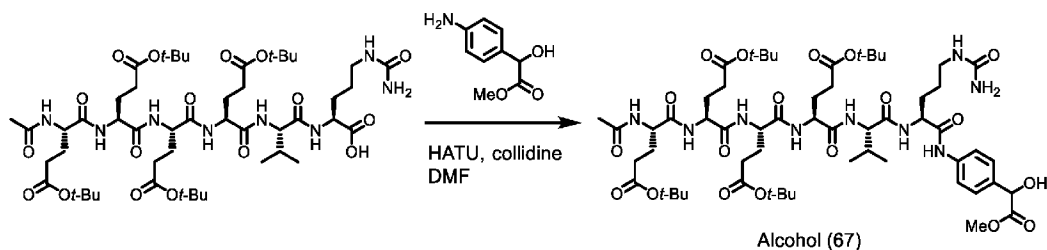
[化195]



Linker-payload mimic (66)

[0692] (19-4-1) アルコール (67) の合成

[化196]

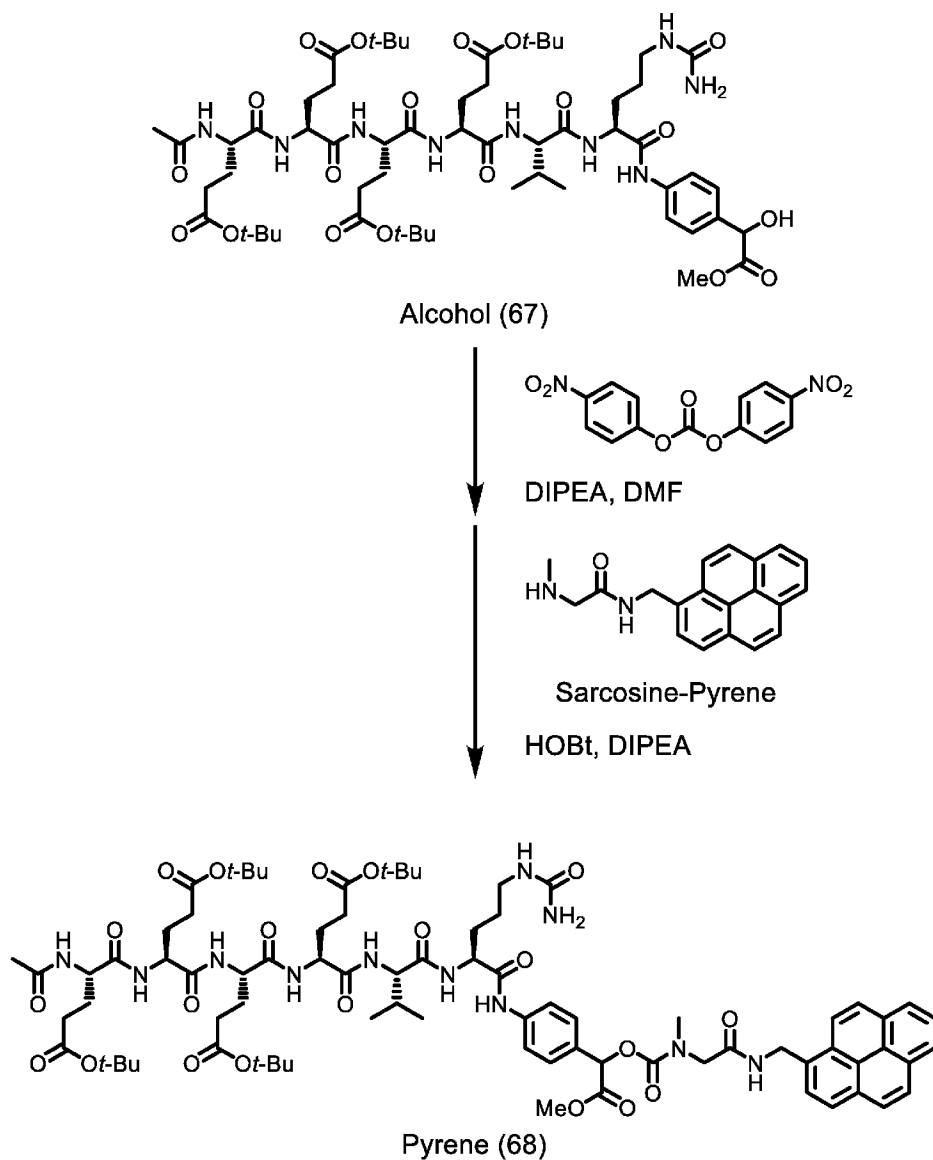


[0693] Ac-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Phe-Glu(OtBu)-OH (50.2 mg, 47.3 μmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (237 μL) に溶解させ、1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1,2,3, トリアゾロ[4,5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロホスファート (21.6 mg, 56.8 μmol)、2,4,6-トリメチルピリジン (7.48 μL , 56.8 μmol) を加え、室温にて10分間攪拌した。続いて、4-アミノマンデル酸メチル (10.3 mg, 56.8 μmol) を加えて室温にて20時間攪拌した後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記アルコール(67) (47.7 mg, 39.1 μmol) を得た。

[0694] MS (ESI) m/z : 1220.65 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0695] (19-4-2) ピレン(68) の合成

[化197]



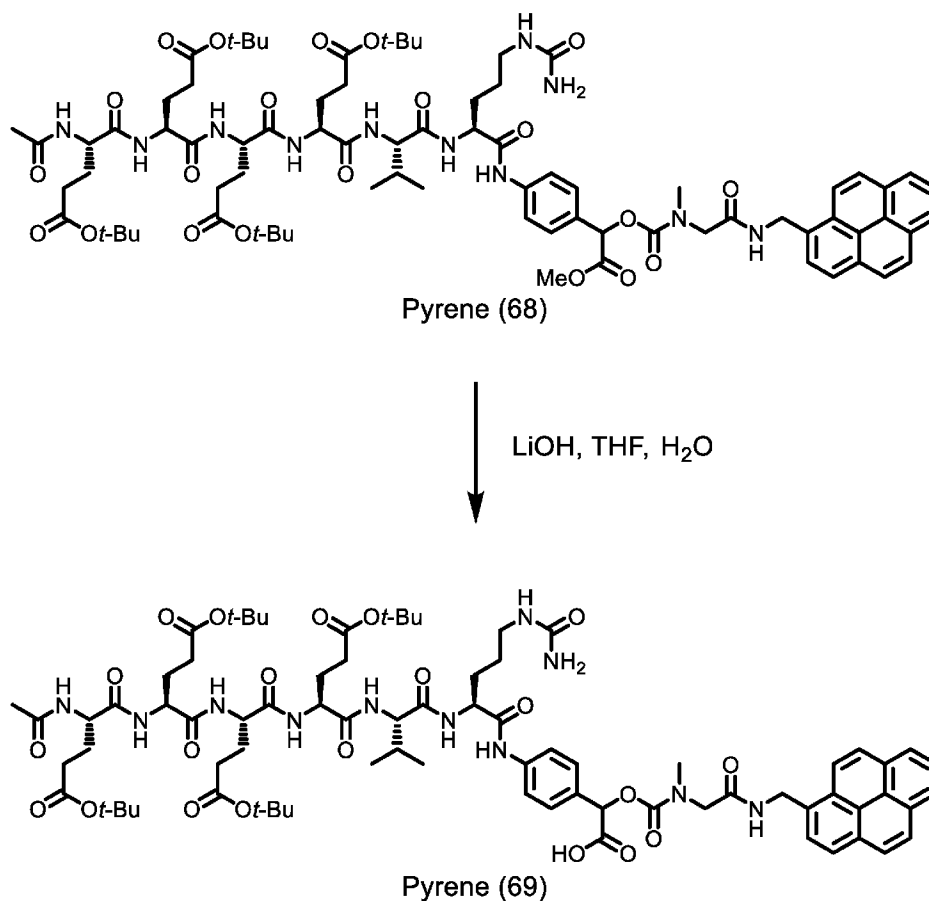
[0696] (1-1-1) で得られたアルコール (67) (46.3 mg, 37.9 μmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (380 μL) に溶解させ、氷冷下5分間攪拌した後、炭酸ビス(4-ニトロフェニル) (34.6 mg, 114 μmol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (14.5 μL , 85.3 μmol) を加え、室温にて2時間攪拌した。その後、氷冷し、Sarcosine-Pyrene (34.5 mg, 114 μmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (7.7 mg, 56.9 μmol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (24.2 μL , 142 μmol) を加え、室

温にて2時間攪拌した。反応後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記ピレン(68)(37.1 mg, 24.0 μmol)を得た。

[0697] MS (ESI) m/z : 775.30 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0698] (19-4-3) ピレン(69)の合成

[化198]



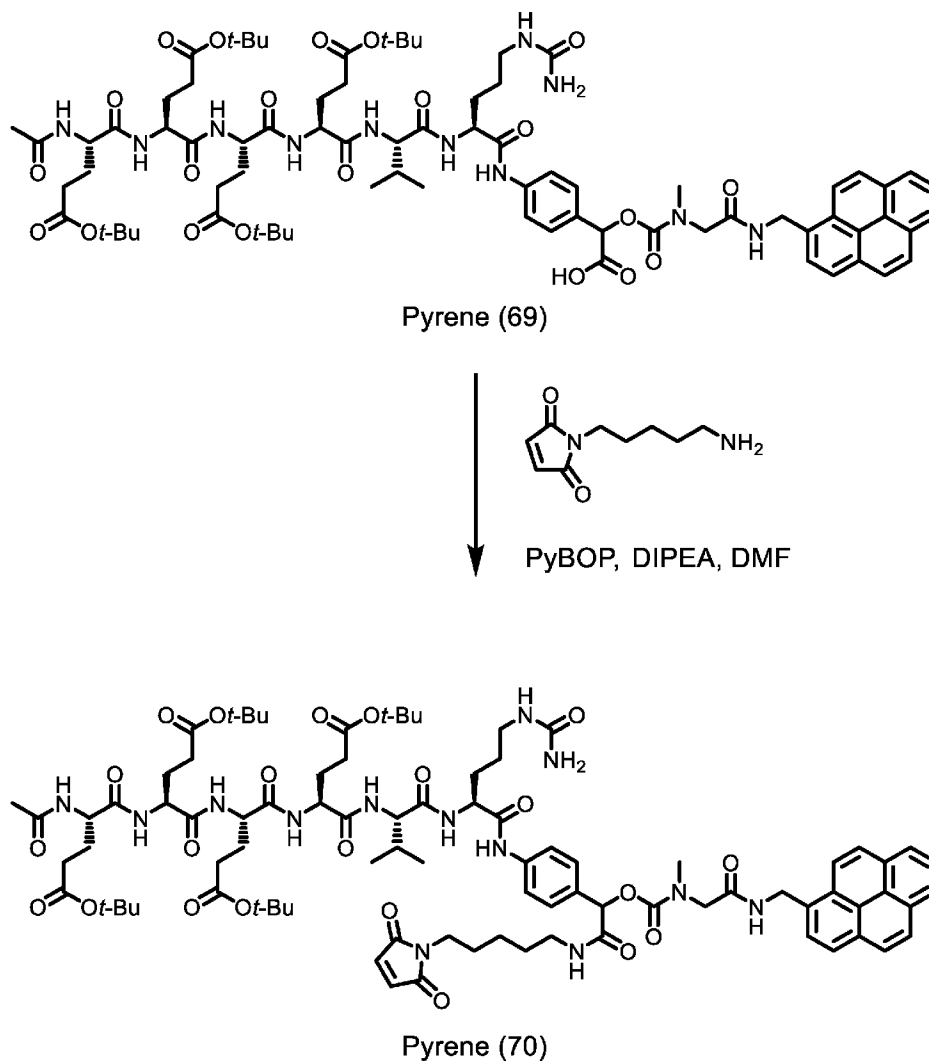
[0699] ピレン(68)(20.3 mg, 13.1 μmol)をテトラヒドロフラン(983 μL)、水(327 μL)に溶解させ、氷冷下5時間攪拌した後、1 M水酸化リチウム水溶液(31.4 μL , 31.4 μmol)を加え、室温にて2.5時間攪拌した。反応終了後、1 M塩酸を用いて約pH 6に調整し、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記ピレン(69)(16.7 mg, 10.9 μmol)

)を得た。

[0700] MS (ESI) m/z : 1534.85 $[M+H]^+$

[0701] (19-4-4) ピレン (70) の合成

[化199]



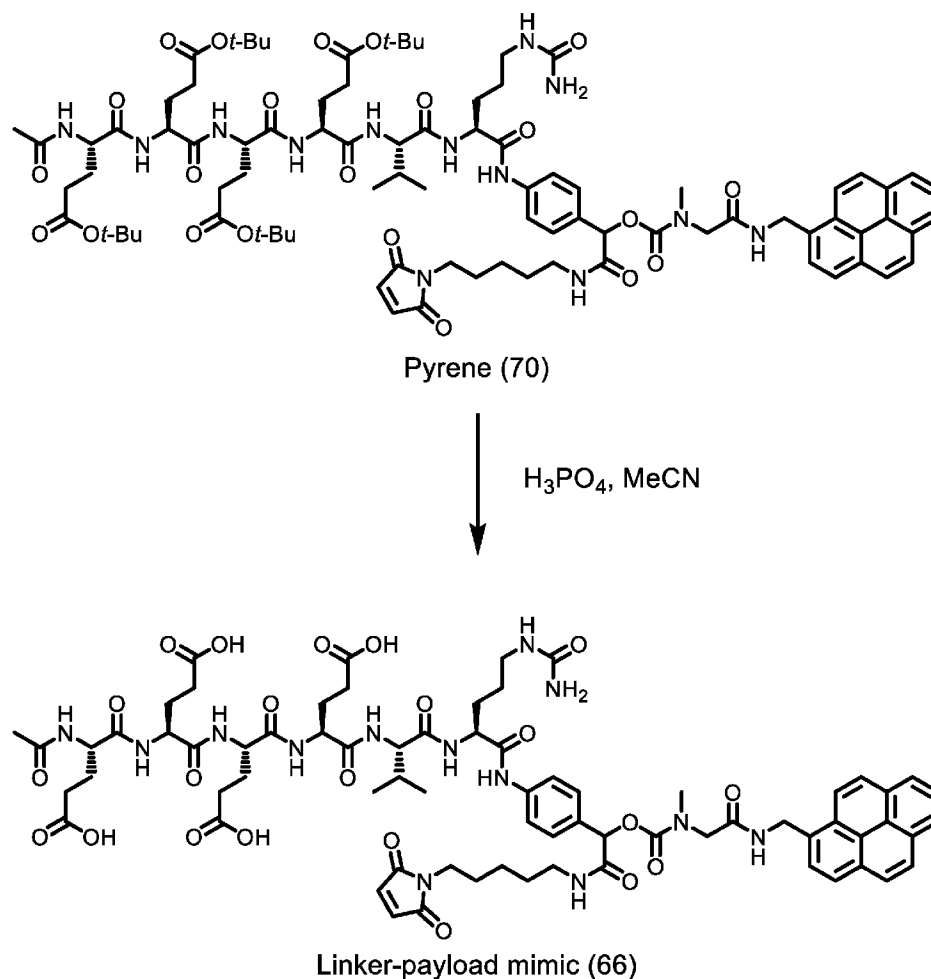
[0702] ピレン (69) (14.9 mg, 9.71 μmol) を、*N,N*-ジメチルホルムアミド (486 μL) に溶解させたのち氷冷し、*N,N*-ジイソプロピルエチルアミン (3.3 μL , 19.4 μmol)、1*H*-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート (7.6 mg, 14.6 μmol) を加えた。次に *N*-(5-アミノペンチル)マレイミド塩酸塩 (3.2 mg, 14.6 μmol) を加えて室温に戻し1時間攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精

製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、ピレン（70）（13.1 mg, 7.71 μmol ）を得た。

[0703] MS (ESI) m/z : 1698.90 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0704] (19-4-5) Linker-payload mimic (66) の合成

[化200]



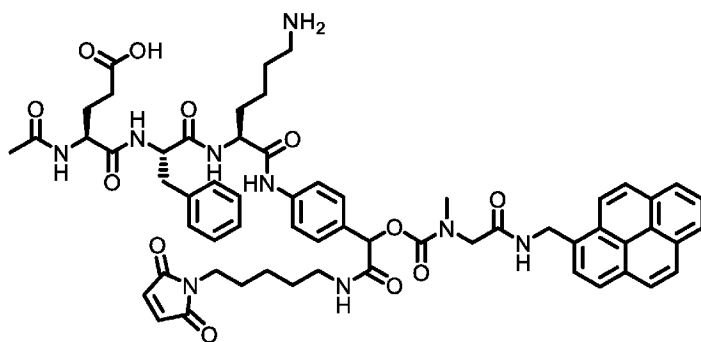
[0705] ピレン（70）（5.25 mg, 3.09 μmol ）にアセトニトリル（309 μL ）を加え、氷冷下で85%リン酸溶液（53.8 μL , 927 μmol ）を加え、室温で25時間攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、Linker-

payload mimic (66) (3.7 mg, 2.51 μmol) を得た。

[0706] MS (ESI) m/z : 1474.00 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0707] (19-5) Linker-payload mimic (71) の合成
Linker-payload mimic (71) は下記のように合成した。

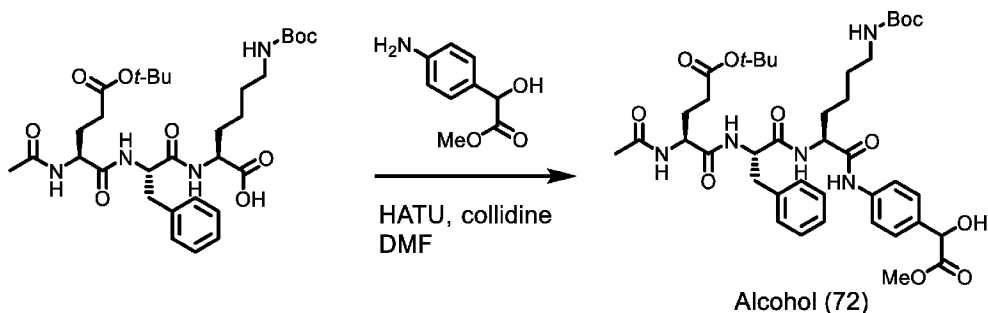
[化201]



Linker-payload mimic (71)

[0708] (19-5-1) アルコール (72) の合成

[化202]



Alcohol (72)

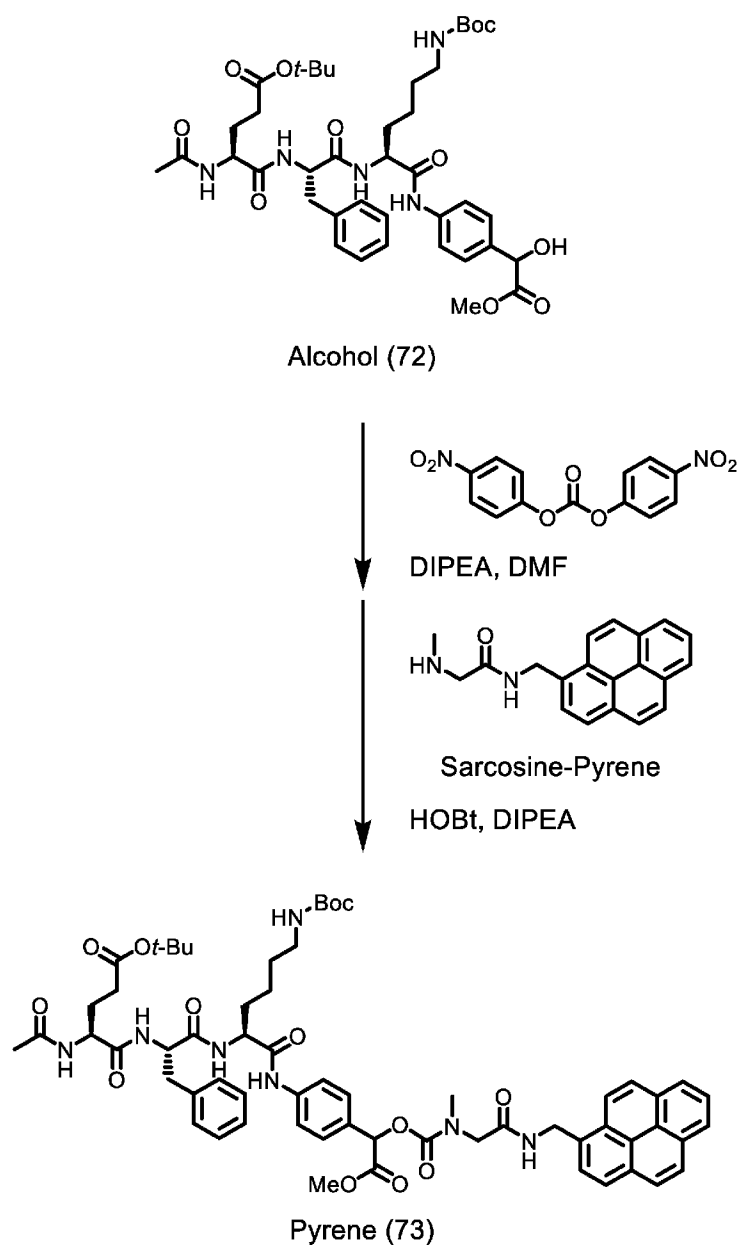
[0709] Ac-Glu(OtBu)-Phe-Lys-OH (200 mg, 322 μmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (1.61 mL) に溶解させ、1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1,2,3,トリアゾロ[4,5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロホスファート (147 mg, 387 μmol)、2,4,6-トリメチルピリジン (51.0 μL , 387 μmol) を加え、室温にて10分間攪拌した。続いて、4-アミノマンデル酸メチル (70.1 mg, 387 μmol) を加えて室温に

て25時間攪拌した後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記アルコール(72)(196mg, 250 μ mol)を得た。

[0710] MS (ESI) m/z : 784.35 $[M+H]^+$

[0711] (19-5-2) ピレン(73)の合成

[化203]



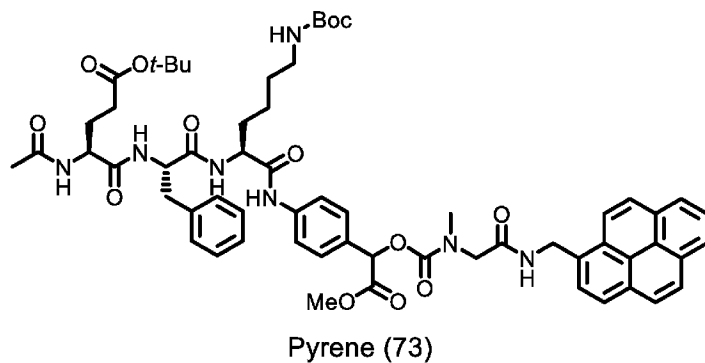
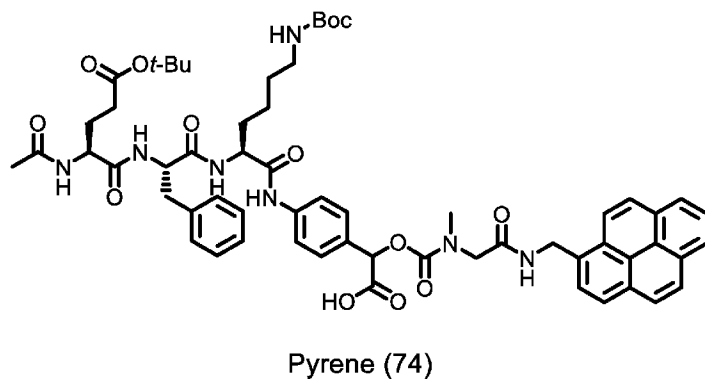
[0712] アルコール(72)(40.1mg, 51.2 μ mol)をN,N-ジメチ

ルホルムアミド (512 μL) に溶解させ、氷冷下5分間攪拌した後、炭酸ビス(4-ニトロフェニル) (46.7 mg, 153 μmol)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (22.0 μL , 115 μmol) を加え、室温にて2時間20分攪拌した。その後、氷冷し、Sarcosin-Pyrene (46.4 mg, 153 μmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (10.4 mg, 76.7 μmol)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (33.0 μL , 192 μmol) を加え、室温にて3時間攪拌した。反応後、順相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりジクロロメタン、メタノールを除去し、上記ピレン (73) (52.1 mg, 46.8 μmol) を得た。

[0713] MS (ESI) m/z : 1112.55 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0714] (19-5-3) ピレン (74) の合成

[化204]

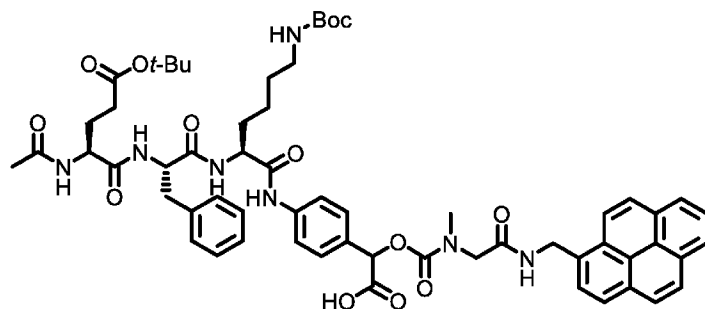
LiOH, THF, H₂O

[0715] ピレン (73) (51.0 mg, 45.9 μmol) をテトラヒドロフラン (3.45 mL)、水 (1.15 mL) に溶解させ、氷冷下5分間攪拌した後、1 M水酸化リチウム水溶液 (110 μL , 110 μmol) を加え、室温にて2時間攪拌した。反応終了後、1 M塩酸を用いて約pH 6に調整し、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記ピレン (74) (30.4 mg, 27.7 μmol) を得た。

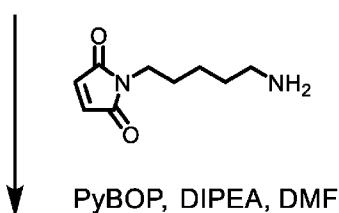
[0716] MS (ESI) m/z : 1098.55 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0717] (19-5-4) ピレン (75) の合成

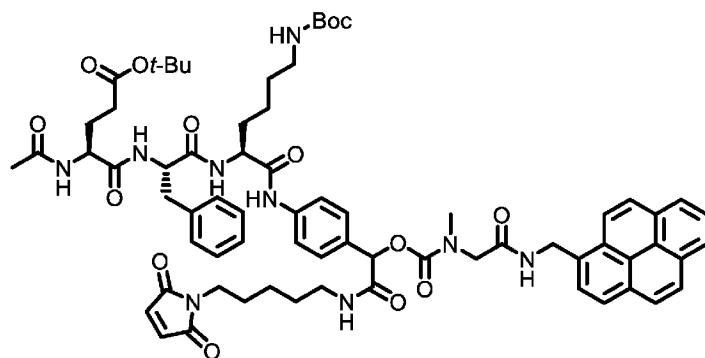
[化205]



Pyrene (74)



PyBOP, DIPEA, DMF



Pyrene (75)

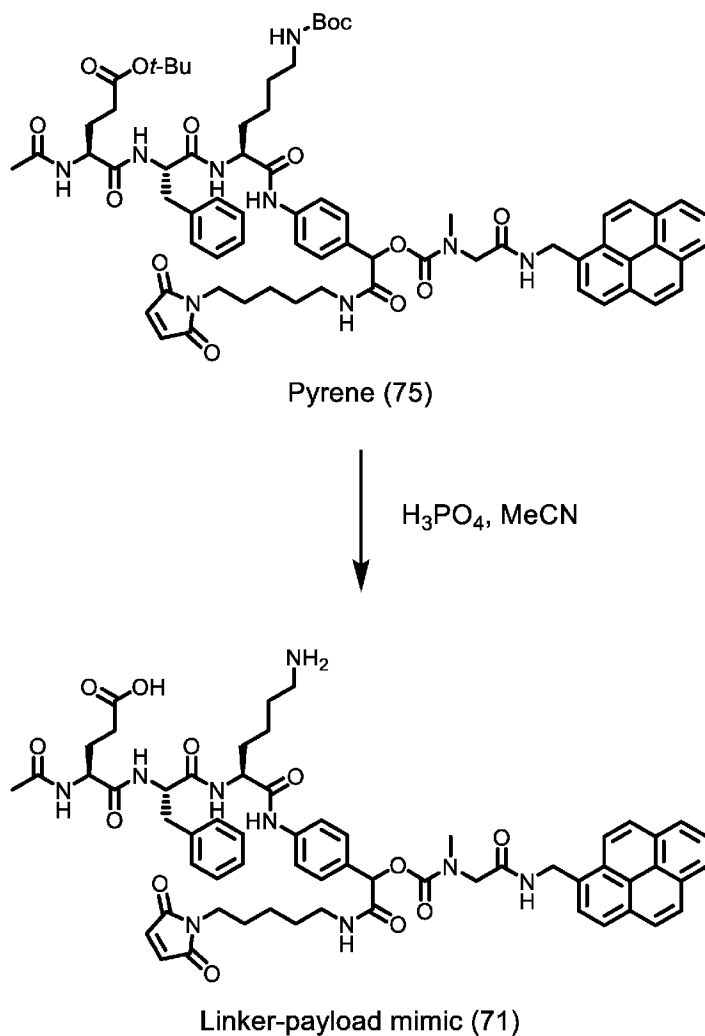
[0718] ピレン (74) (23.0 mg, 20.9 μmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (1.05 mL) に溶解させたのち氷冷し、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (7.1 μL , 41.9 μmol)、1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート (16.3 mg, 31.4 μmol) を加えた。次に N-(5-アミノペンチル) マレイミド塩酸塩 (6.87 mg, 31.4 μmol) を加えて室温に戻し3時間攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、ピレン (75) (1.4 m

g, 1.11 μmol) を得た。

[0719] MS (ESI) m/z : 1265.80 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0720] (19-5-5) Linker-payload mimic (71) の合成

[化206]



[0721] ピレン (75) (1.40 mg, 1.11 μmol) にアセトニトリル (55.4 μL) を加え、氷冷下で85%リン酸溶液 (333 μL , 22.7 μmol) を加え、室温で25時間攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、Linker-payload mimic (71) (0.6 mg, 0.54 μmol)

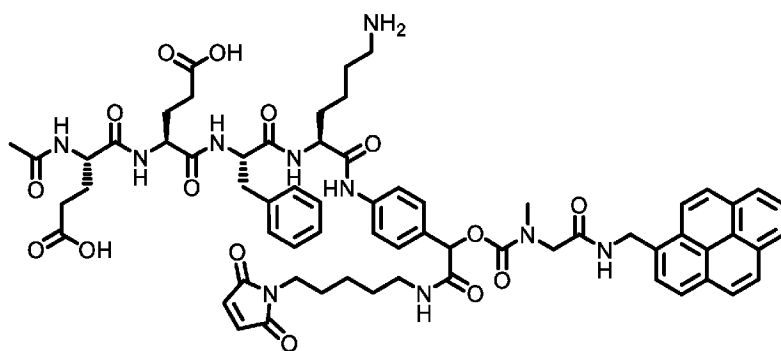
を得た。

[0722] MS (ESI) m/z : 1106.60 $M+H$ $^{+}$

[0723] (19-6) Linker-payload mimic (76) の合成

Linker-payload mimic (76) は下記のように合成した。

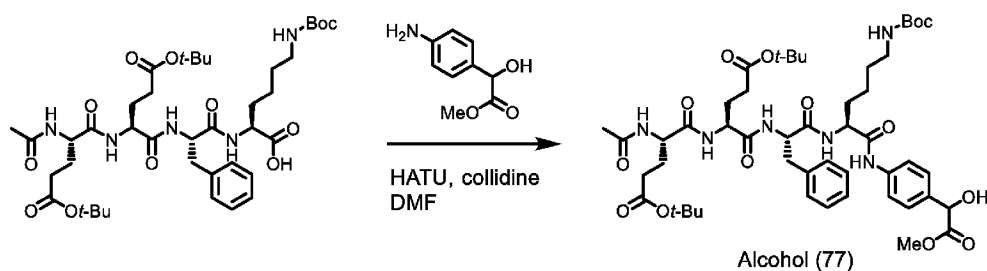
[化207]



Linker-payload mimic (76)

[0724] (19-6-1) アルコール (77) の合成

[化208]



Alcohol (77)

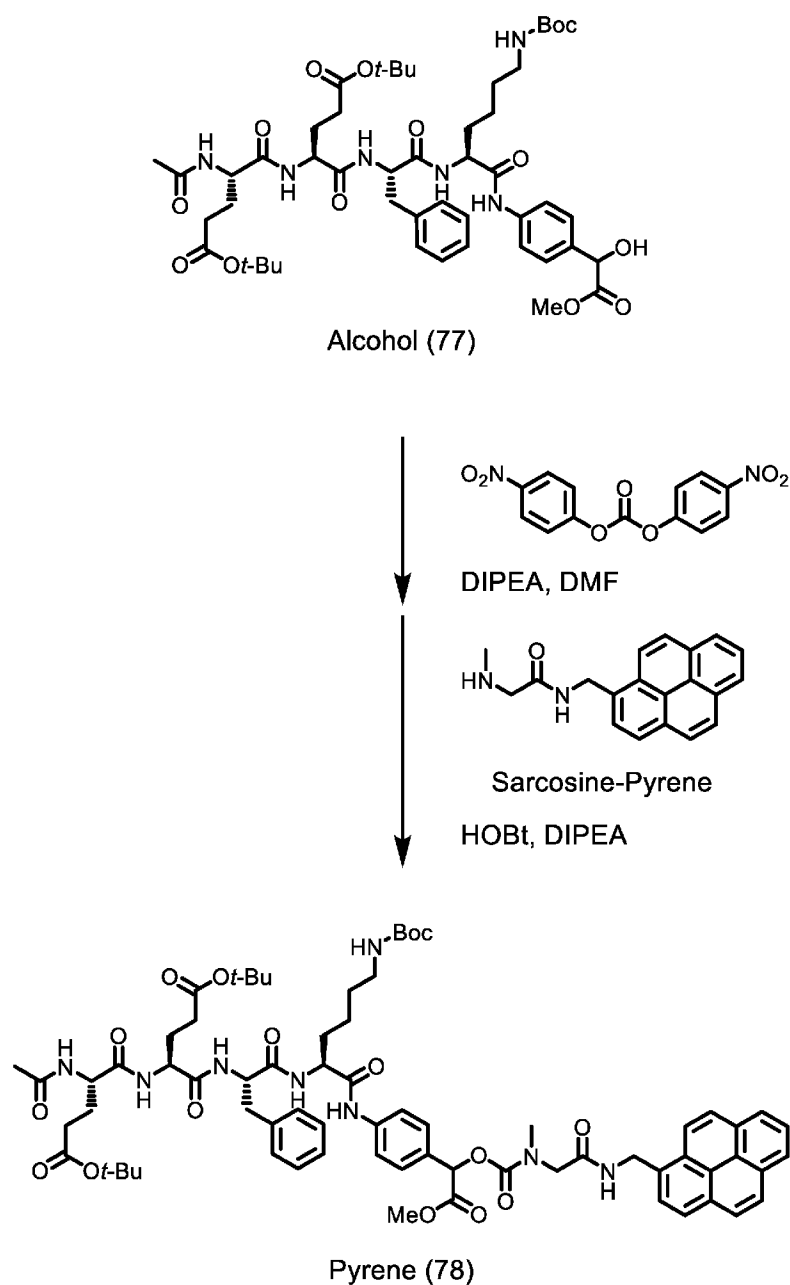
[0725] Ac-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Phe-Lys-OH (52.1 mg, 64.6 μmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (323 μL) に溶解させ、1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1, 2, 3, トリアゾロ[4, 5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロホスファート (29.5 mg, 77.6 μmol)、2, 4, 6-トリメチルピリジン (10.2 μL , 77.6 μmol) を加え、室温にて10分間攪拌した。続いて、4-アミノマンデル酸メチル (13.9 mg, 77.6 μmol) を加えて室温にて25時間攪拌した後、逆相分取クロマト

グラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記アルコール (77) (53.6 mg, 55.3 μmol) を得た。

[0726] MS (ESI) m/z : 969.55 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0727] (19-6-2) ピレン (78) の合成

[化209]



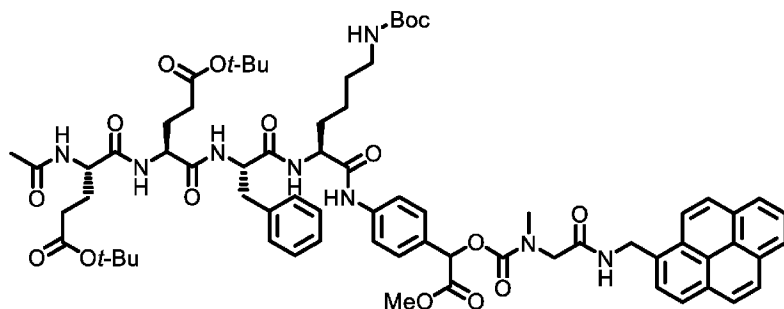
[0728] アルコール (77) (52.3 mg, 54.0 μmol) を N,N -ジメチルホルムアミド (540 μL) に溶解させ、氷冷下5分間攪拌した後、炭

酸ビス（４－ニトロフェニル）（４９．２ｍｇ，１６２μｍｏｌ）、Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（２０．７μＬ，１２２μｍｏｌ）を加え、室温にて３時間攪拌した。その後、氷冷し、Sarcosin-Pyrene（９８．０ｍｇ，３２４μｍｏｌ）、１－ヒドロキシベンゾトリアゾール（１０．９ｍｇ，８１．０μｍｏｌ）、Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（８９．５μＬ，５２４μｍｏｌ）を加え、室温にて１時間半攪拌した。反応後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記ピレン（７８）（５１．３ｍｇ，３９．５μｍｏｌ）を得た。

[0729] MS (ESI) m/z : 1297.65 [M+H]⁺

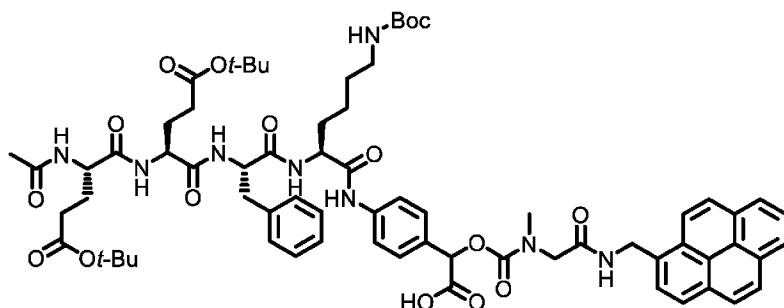
[0730] (19-6-3) ピレン（７９）の合成

[化210]



Pyrene (78)

↓
LiOH, THF, H₂O



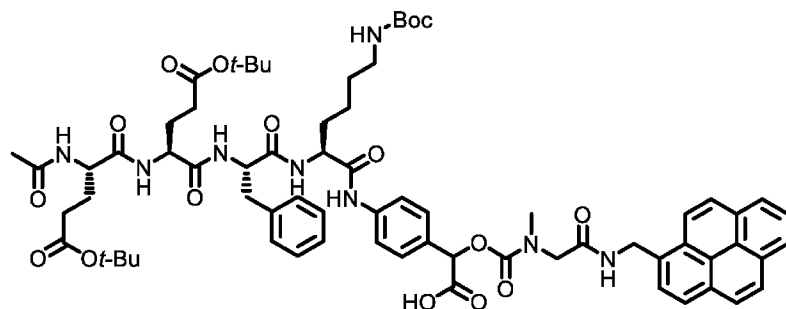
Pyrene (79)

[0731] ピレン (78) (28.5 mg, 22.0 μmol) をテトラヒドロフラン (1.65 mL)、水 (550 μL) に溶解させ、氷冷下5分間攪拌した後、1 M水酸化リチウム水溶液 (52.8 μL , 52.8 μmol) を加え、室温にて4時間攪拌した。反応終了後、1 M塩酸を用いて約pH 6に調整し、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記ピレン (79) (22.6 mg, 17.6 μmol) を得た。

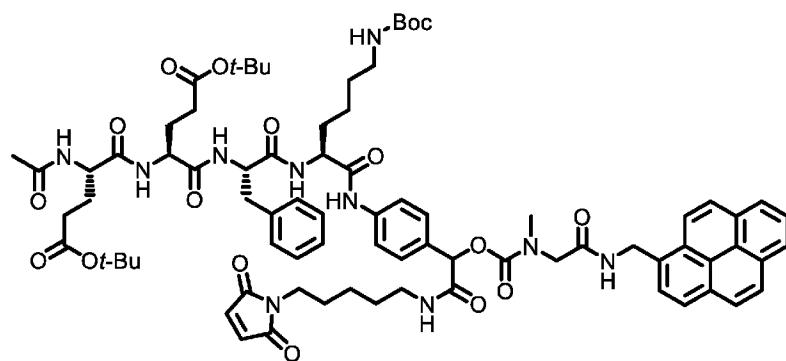
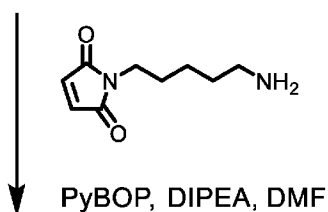
[0732] MS (ESI) m/z : 1283.60 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0733] (19-6-4) ピレン (80) の合成

[化211]



Pyrene (79)



Pyrene (80)

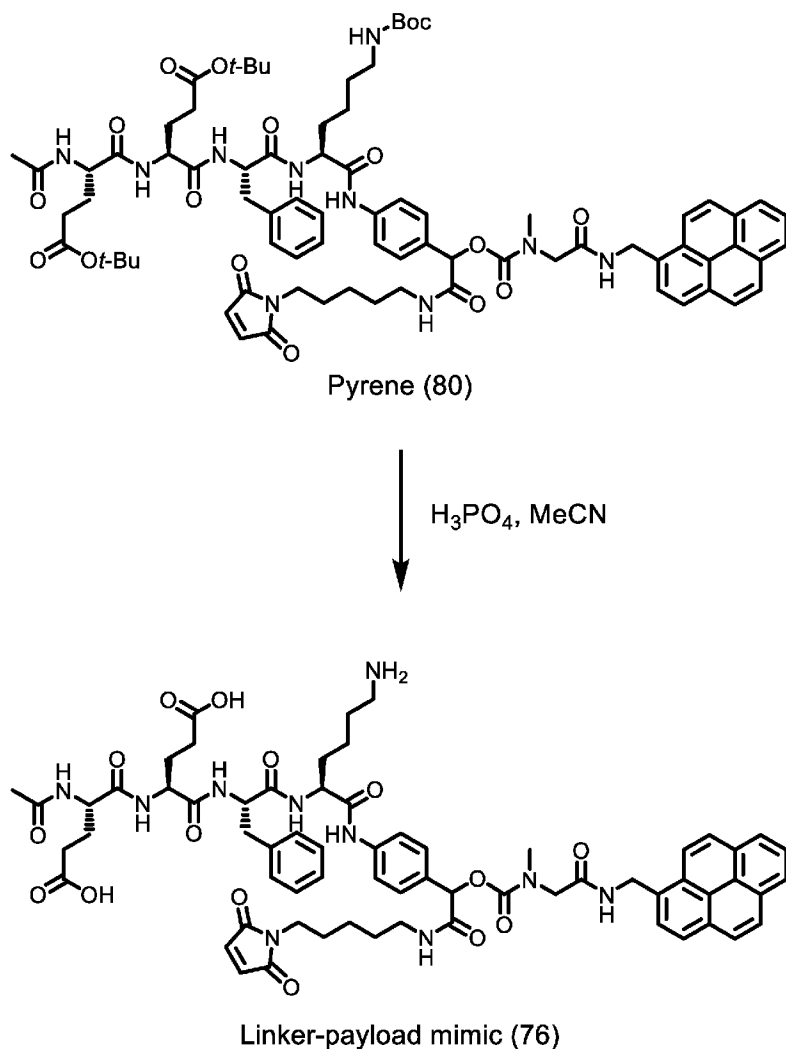
[0734] ピレン (79) (12.4 mg, 9.66 μmol) をN, N-ジメチルホルムアミド (326 μL) に溶解させたのち氷冷し、2, 4, 6-トリメチルピリジン (4.0 μL , 30.3 μmol)、1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1, 2, 3, トリアゾロ[4, 5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロホスファート (5.5 mg, 14.5 μmol) を加えた。次にN-(5-アミノペンチル)マレイミド塩酸塩 (3.1 mg, 14.1 μmol) を加えて室温に戻し2時間攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥すること

より、ピレン (80) (6.3 mg, 4.35 μmol) を得た。

[0735] MS (ESI) m/z : 1448.65 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0736] (19-6-5) Linker-payload mimic (76) の合成

[化212]



[0737] ピレン (80) (5.3 mg, 3.60 μmol) にアセトニトリル (370 μL) を加え、氷冷下で85%リン酸溶液 (125 μL , 180 μmol) を加え、室温で25時間攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、Linker-payload mimic (76) (4.2 mg, 3.39 μmol) を得た。

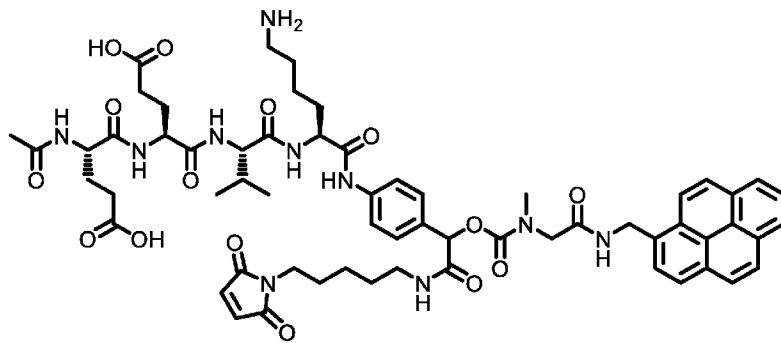
。

[0738] MS (ESI) m/z : 1235.55 $[M+H]^+$

[0739] (19-7) Linker-payload mimic (81) の合成

Linker-payload mimic (81) は下記のように合成した。

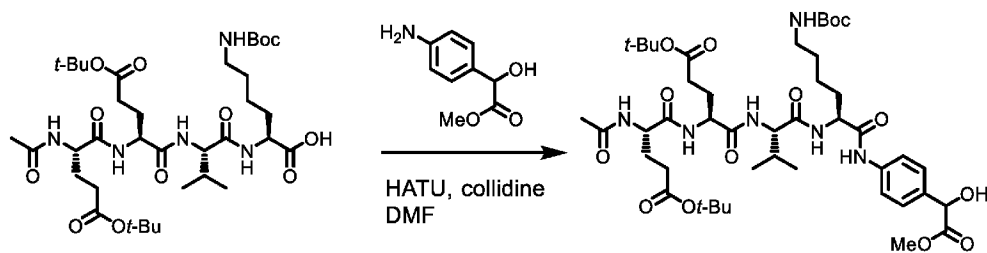
[化213]



Linker-payload mimic (81)

[0740] (19-6-1) アルコール (82) の合成

[化214]



Alcohol (82)

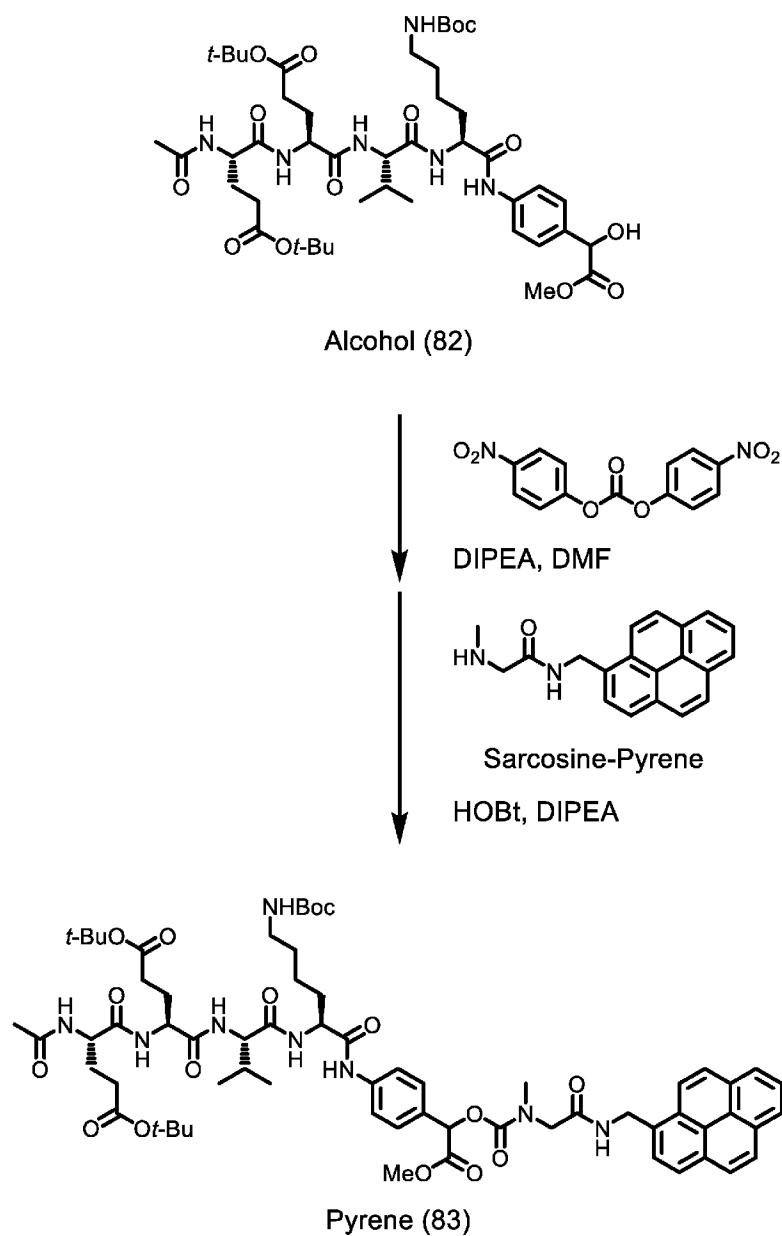
[0741] Ac-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Val-Lys-OH (41.0 mg, 54.1 μmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (270 μL) に溶解させ、1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1, 2, 3, トリアゾロ[4, 5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロホスファート (24.7 mg, 64.9 μmol)、2, 4, 6-トリメチルピリジン (8.5 μL , 64.9 μmol) を加え、室温にて10分間攪拌した。続いて、4-アミノマンデル酸メチル (11.8 mg, 64.9 μmol) を加えて室温にて25時間攪拌した後、逆相分取クロマトグ

ラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記アルコール (82) (43.9 mg, 47.7 μmol) を得た。

[0742] MS (ESI) m/z : 921.55 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0743] (19-7-2) ピレン (83) の合成

[化215]



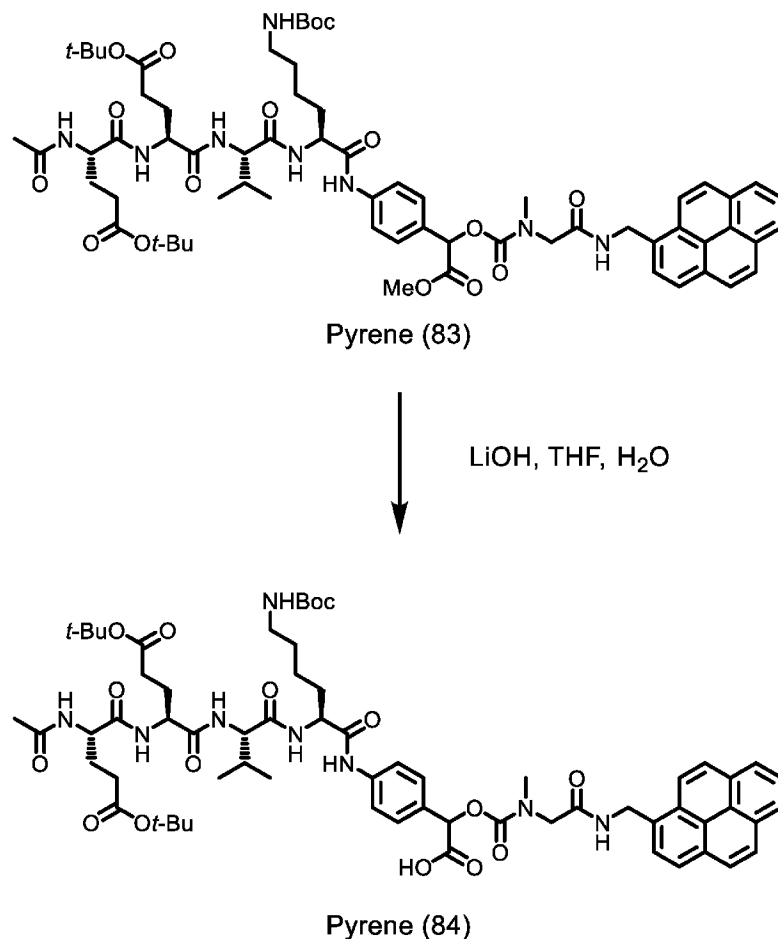
[0744] アルコール (82) (42.1 mg, 45.7 μmol) を *N,N*-ジメチルホルムアミド (457 μL) に溶解させ、氷冷下5分間攪拌した後、炭酸

ビス(4-ニトロフェニル) (41.7 mg, 137 μmol)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (17.5 μL , 103 μmol) を加え、室温にて1時間10分攪拌した。その後、氷冷し、Sarcosin-Pyrene (41.5 mg, 137 μmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (9.3 mg, 68.6 μmol)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (29.1 μL , 171 μmol) を加え、室温にて2時間攪拌した。反応後、順相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記ピレン (83) (54.8 mg, 43.9 μmol) を得た。

[0745] MS (ESI) m/z : 1249.65 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0746] (19-7-3) ピレン (84) の合成

[化216]

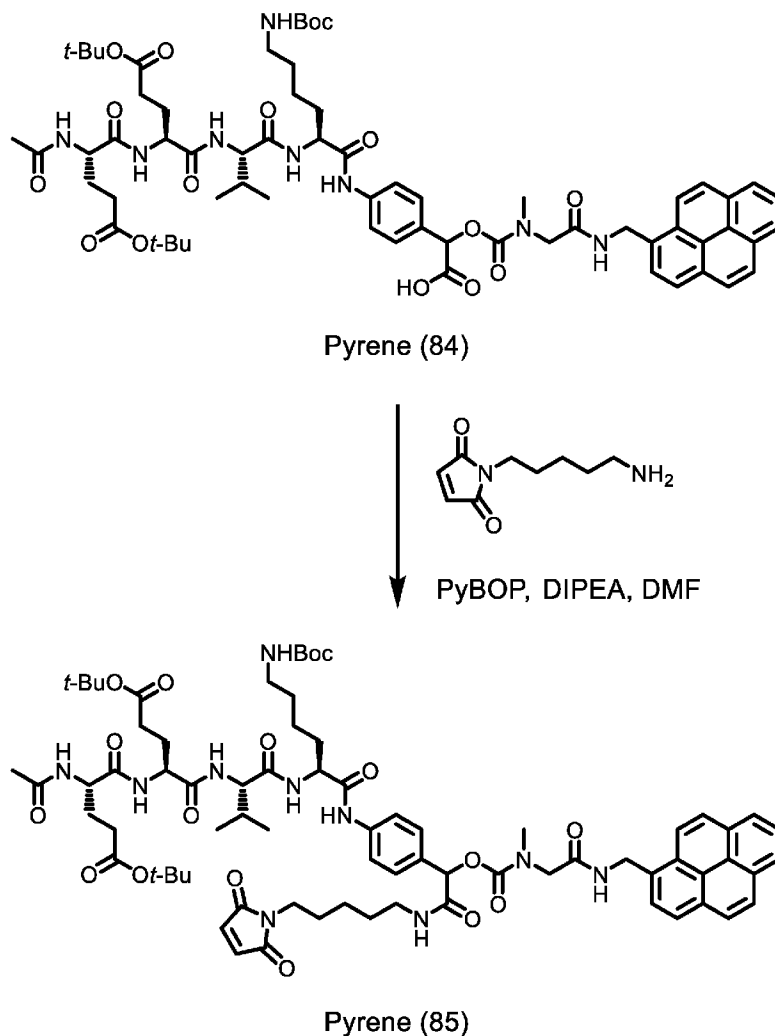


[0747] ピレン (83) (30.0 mg, 24.0 μmol) をテトラヒドロフラン (1.8 mL)、水 (0.6 mL) に溶解させ、氷冷下5分間攪拌した後、1 M水酸化リチウム水溶液 (57.6 μL , 57.6 μmol) を加え、室温にて2時間攪拌した。反応終了後、1 M塩酸を用いて約 pH 6 に調整し、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記ピレン (84) (21.4 mg, 17.3 μmol) を得た。

[0748] MS (ESI) m/z : 1235.65 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0749] (19-7-4) ピレン (95) の合成

[化217]

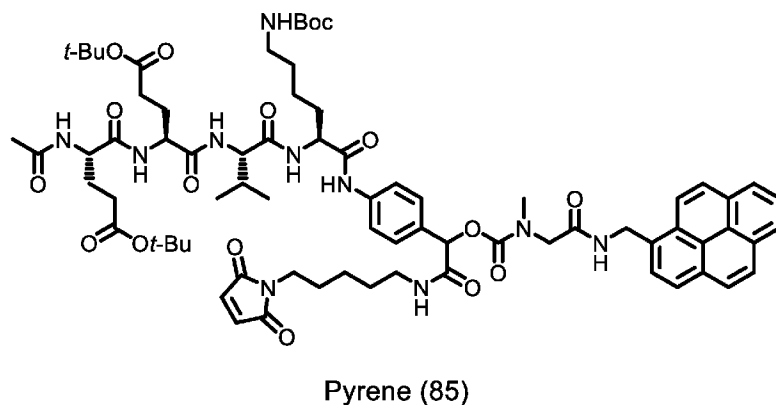


[0750] ピレン (94) (20.6 mg, 16.7 μmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (835 μL) に溶解させたのち氷冷し、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (5.7 μL , 33.4 μmol)、1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート (13.0 mg, 25.0 μmol) を加えた。次に N-(5-アミノペンチル) マレイミド塩酸塩 (5.47 mg, 25.0 μmol) を加えて室温に戻し1時間半攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、ピレン (95) (16.7 mg, 1.19 μmol) を得た。

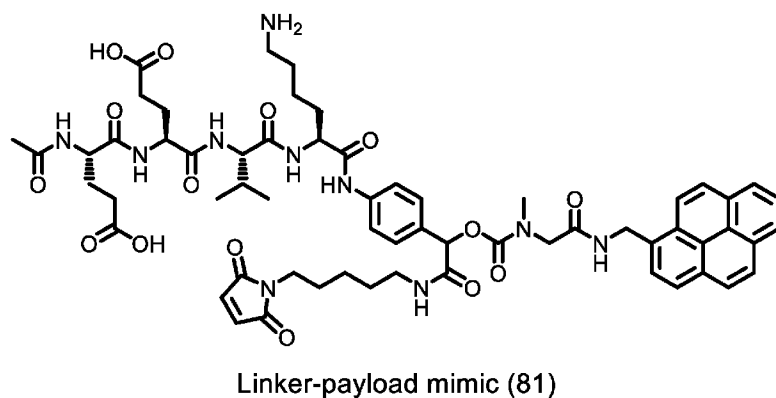
[0751] MS (ESI) m/z : 1399.80 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0752] (19-7-5) Linker-payload mimic (81) の合成

[化218]



↓
H₃PO₄, MeCN

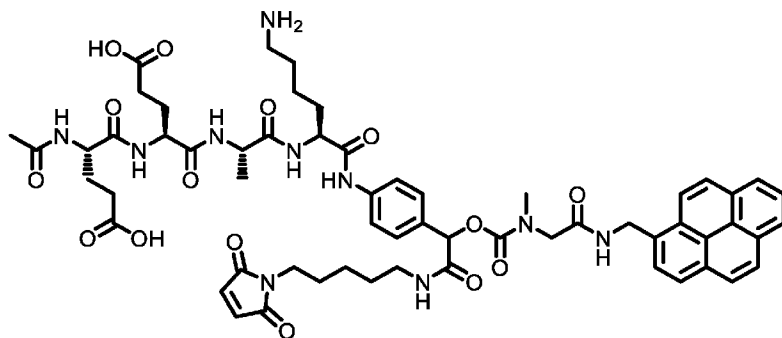


[0753] ピレン (85) (6.9 mg, 4.93 μ mol) にアセトニトリル (490 μ L) を加え、氷冷下で85%リン酸溶液 (168 μ L, 2.90 mmol) を加え、室温で25時間攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、Linker-payload mimic (81) (4.1 mg, 3.45 μ mol) を得た。

[0754] MS (ESI) m/z : 1187.55 [M+H]⁺

[0755] (19-8) Linker-payload mimic (86) の合成
Linker-payload mimic (86) は下記のように合成した。

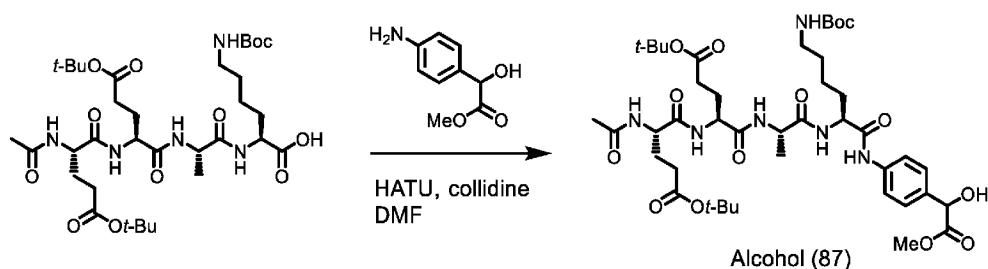
[化219]



Linker-payload mimic (86)

[0756] (19-8-1) アルコール (87) の合成

[化220]



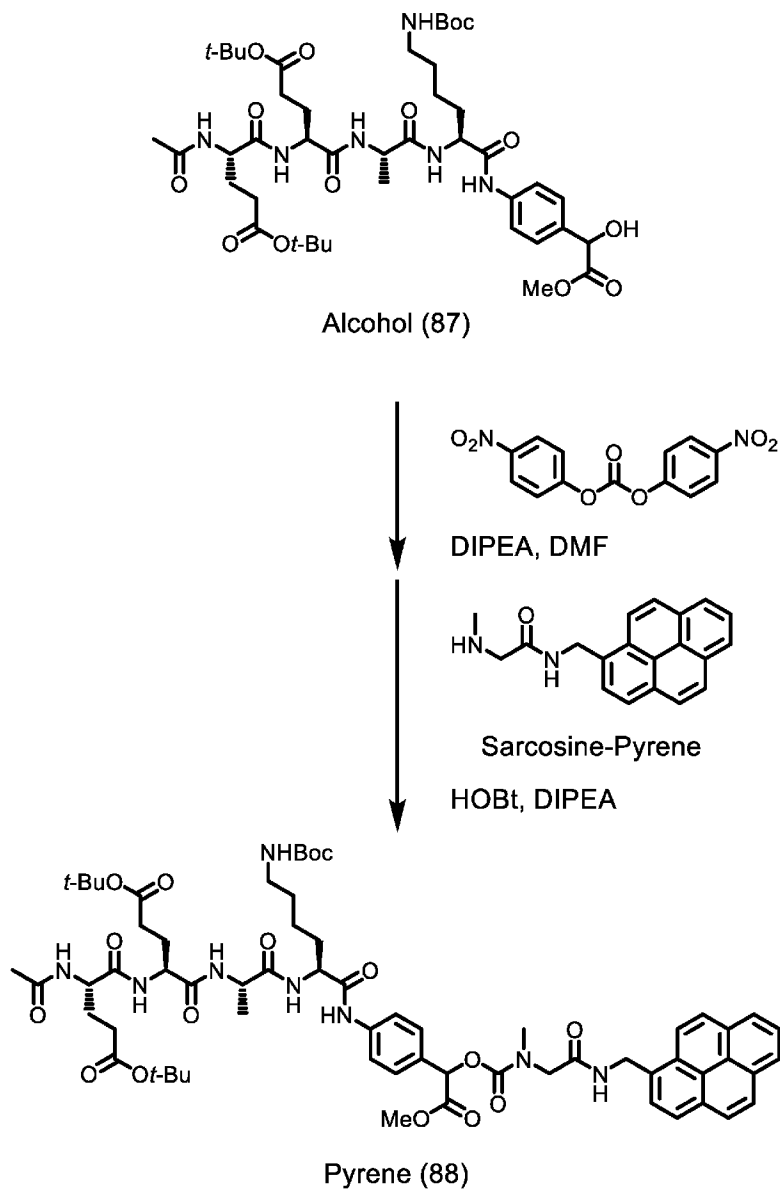
Alcohol (87)

[0757] Ac-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Ala-Lys-OH (40.7 mg, 55.8 μmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (280 μL) に溶解させ、1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1, 2, 3, トリアゾロ[4, 5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロホスファート (25.4 mg, 66.9 μmol)、2, 4, 6-トリメチルピリジン (8.8 μL , 66.9 μmol) を加え、室温にて10分間攪拌した。続いて、4-アミノマンデル酸メチル (12.1 mg, 66.9 μmol) を加えて室温にて25時間攪拌した後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記アルコール (87) (41.3 mg, 46.2 μmol) を得た。

[0758] MS (ESI) m/z : 893.50 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0759] (19-8-2) ピレン (88) の合成

[化221]



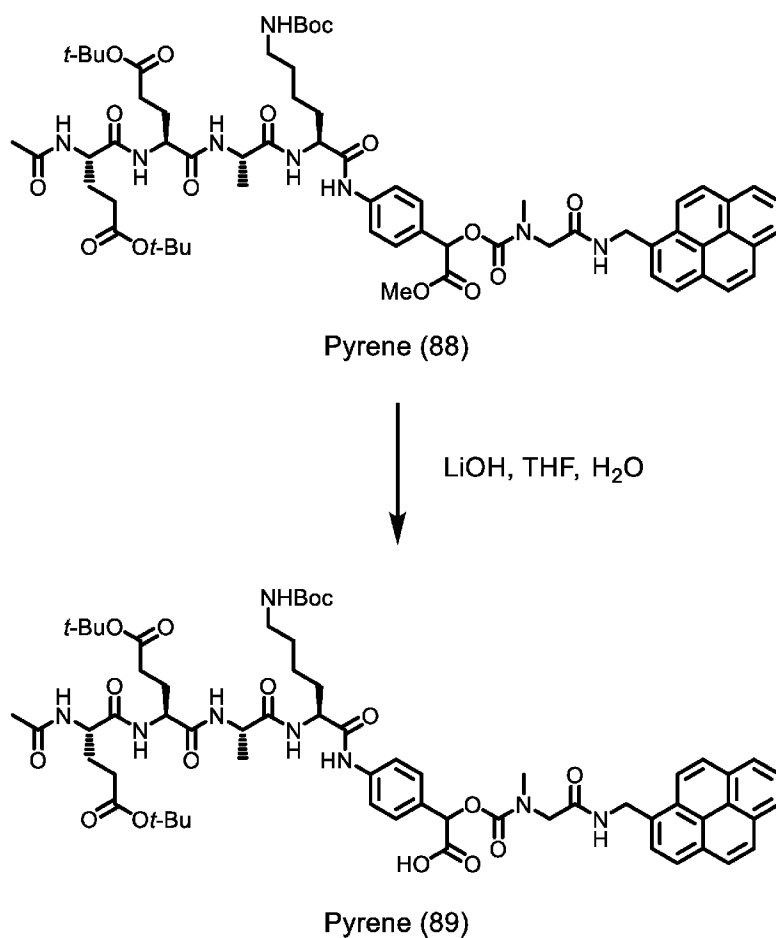
[0760] アルコール (87) (40.3 mg, 45.1 μmol) をN, N-ジメチルホルムアミド (451 μL) に溶解させ、氷冷下5分間攪拌した後、酸ビス(4-ニトロフェニル) (41.2 mg, 135 μmol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (17.3 μL , 101 μmol) を加え、室温にて2時間10分攪拌した。その後、氷冷し、Sarcosine-Pyrene (40.9 mg, 135 μmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (9.1 mg, 67.7 μmol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (28.8 μL , 169 μmol) を加え、室温にて2時間攪拌した。

反応後、順相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記ピレン (88) (51.7 mg, 42.3 μmol) を得た。

[0761] MS (ESI) m/z : 1221.60 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0762] (19-8-3) ピレン (89) の合成

[化222]



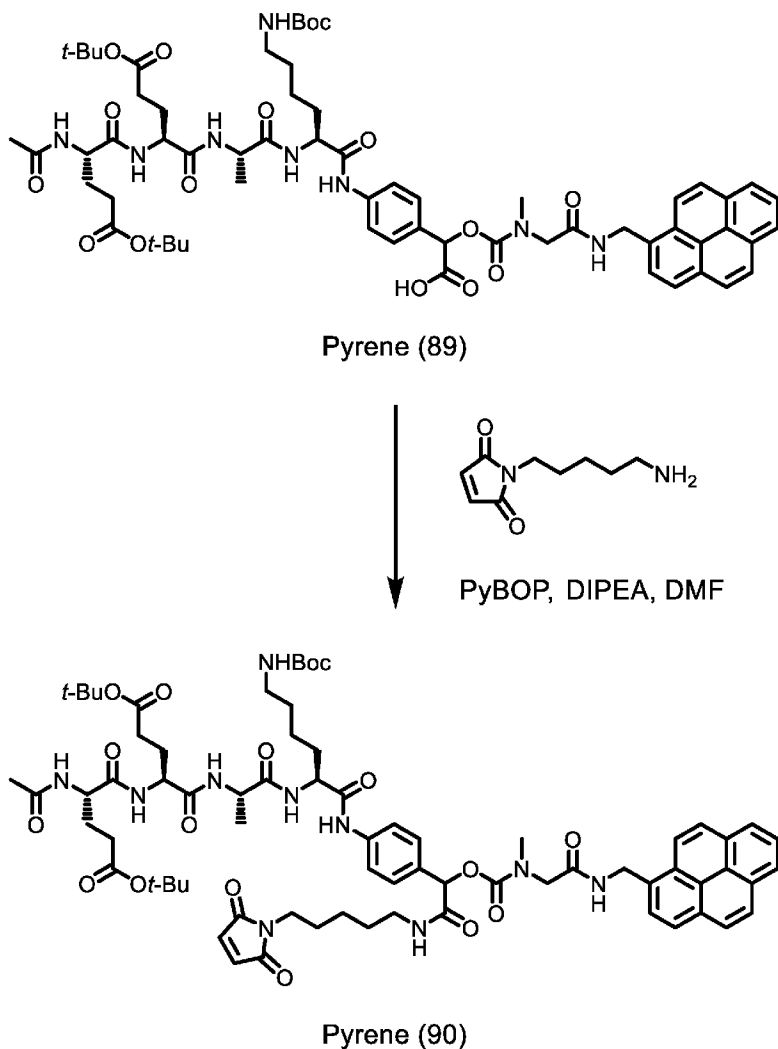
[0763] ピレン (88) (26.1 mg, 21.4 μmol) をテトラヒドロフラン (1.60 mL)、水 (0.53 mL) に溶解させ、氷冷下5分間攪拌した後、1 M水酸化リチウム水溶液 (57.6 μL , 57.6 μmol) を加え、室温にて4時間攪拌した。反応終了後、1 M塩酸を用いて約 pH 6 に調整し、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾

燥することにより、上記ピレン（８９）（１８．１ｍｇ，１５．０μｍｏｌ）を得た。

[0764] MS（ESI） m/z ：１２０７．６０ $[M+H]^+$

[0765] （１９－８－４）ピレン（９０）の合成

[化223]



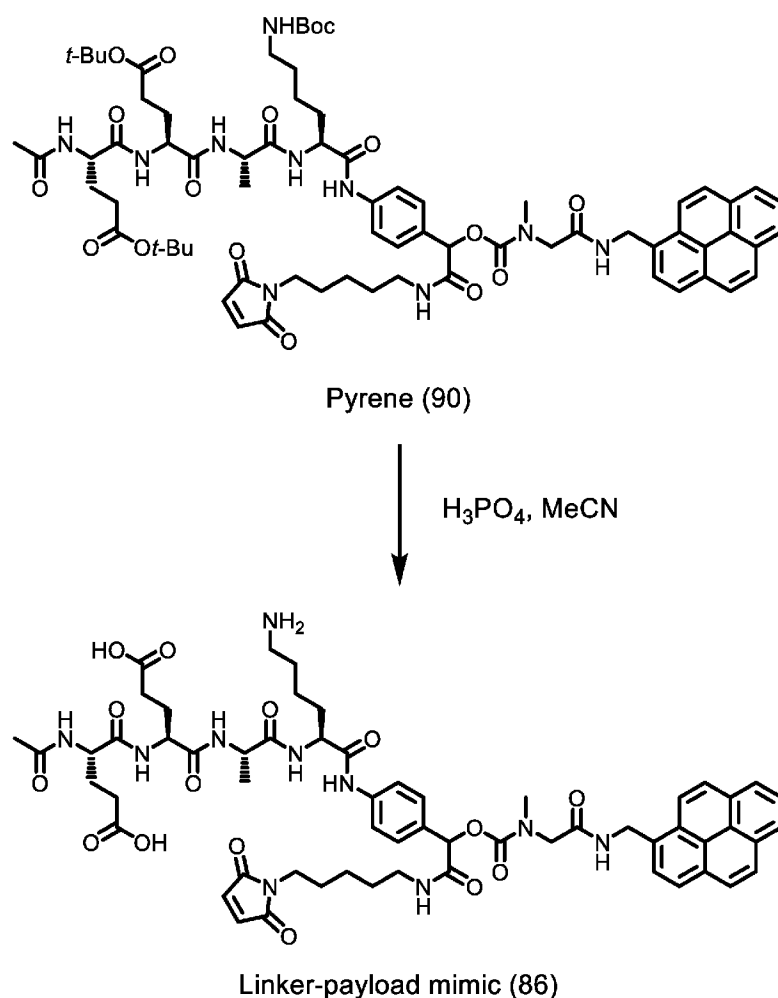
[0766] ピレン（８９）（１７．３ｍｇ，１４．３μｍｏｌ）を N,N -ジメチルホルムアミド（７１５μＬ）に溶解させたのち氷冷し、 N,N -ジイソプロピルエチルアミン（４．９μＬ，２８．６μｍｏｌ）、１ H -ベンゾトリアゾール-１-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート（１１．２ｍｇ，２１．５μｍｏｌ）を加えた。次に N -(５-アミノペンチル)マレイミド塩酸塩（４．７ｍｇ、２１．５μｍｏｌ）を加えて

室温に戻3時間攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、ピレン（90）（8.4 mg, 6.12 μmol ）を得た。

[0767] MS (ESI) m/z : 1371.70 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0768] (19-8-5) Linker-payload mimic (86) の合成

[化224]



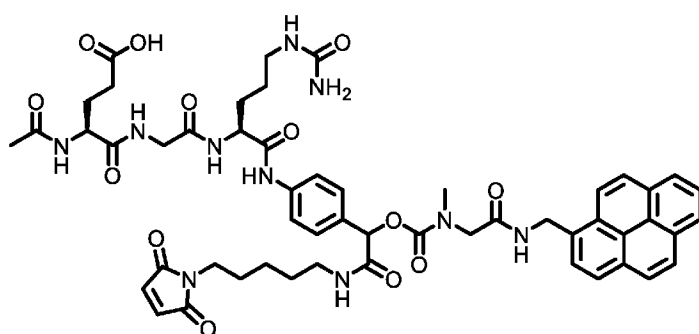
[0769] ピレン（90）（5.7 mg, 4.16 μmol ）にアセトニトリル（420 μL ）を加え、氷冷下で85%リン酸溶液（142 μL , 2.45 mmol ）を加え、室温で25時間攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮し

アセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、Linker-payload mimic (86) (3.2 mg, 2.76 μ mol) を得た。

[0770] MS (ESI) m/z : 1159.55 [M+H]⁺

[0771] (19-9) Linker-payload mimic (91) の合成
Linker-payload mimic (91) は下記のように合成した。

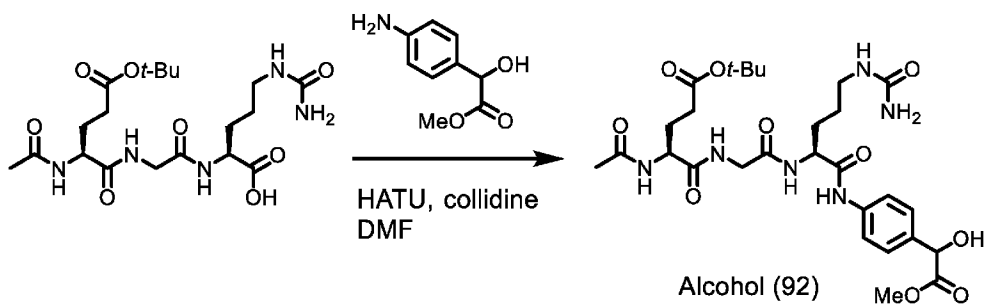
[化225]



Linker-payload mimic (91)

[0772] (19-9-1) アルコール (92) の合成

[化226]



Alcohol (92)

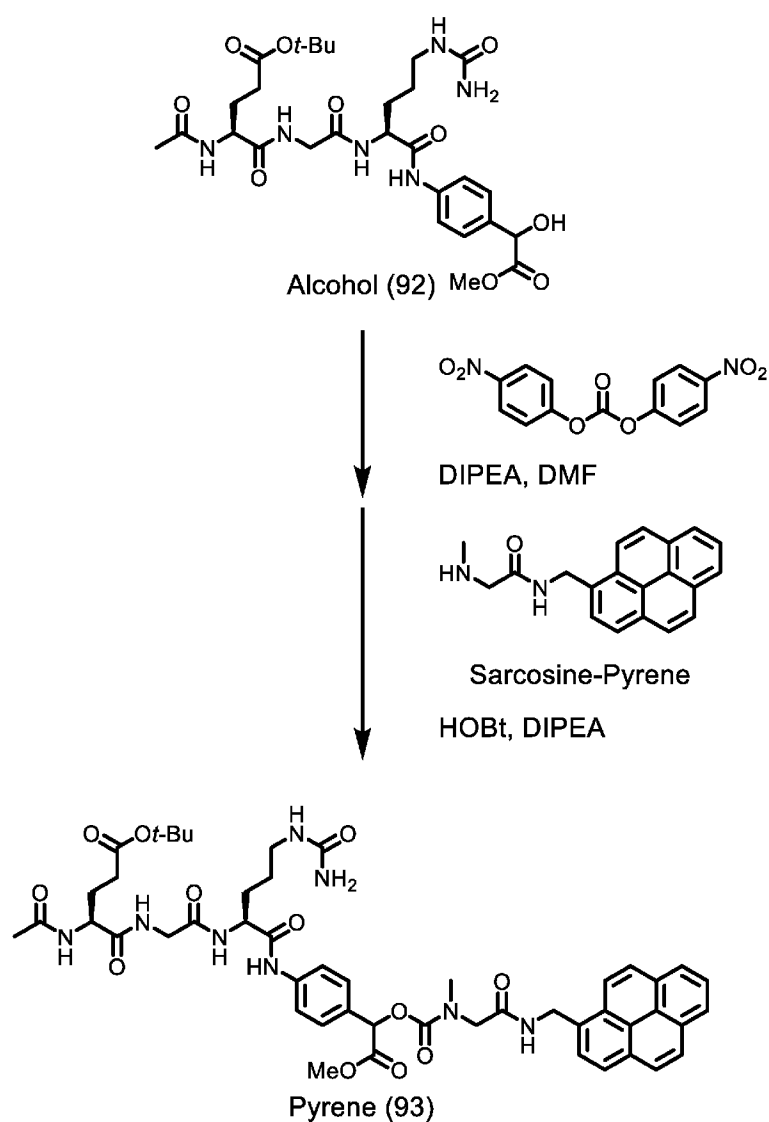
[0773] Ac-Glu(OtBu)-Gly-Cit-OH (50.4 mg, 110 μ mol) をN, N-ジメチルホルムアミド (548 μ L) に溶解させ、1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1,2,3,4,5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロホスファート (50.0 mg, 132 μ mol)、2,4,6-トリメチルピリジン (17.0 μ L, 132 μ mol) を加え、室温にて10分間攪拌した。続いて、4-

アミノマンデル酸メチル（23.8 mg, 132 μmol ）を加えて室温にて21時間攪拌した後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記アルコール（92）（44.0 mg, 70.7 μmol ）を得た。

[0774] MS (ESI) m/z : 623.35 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0775] (19-9-2) ピレン（93）の合成

[化227]



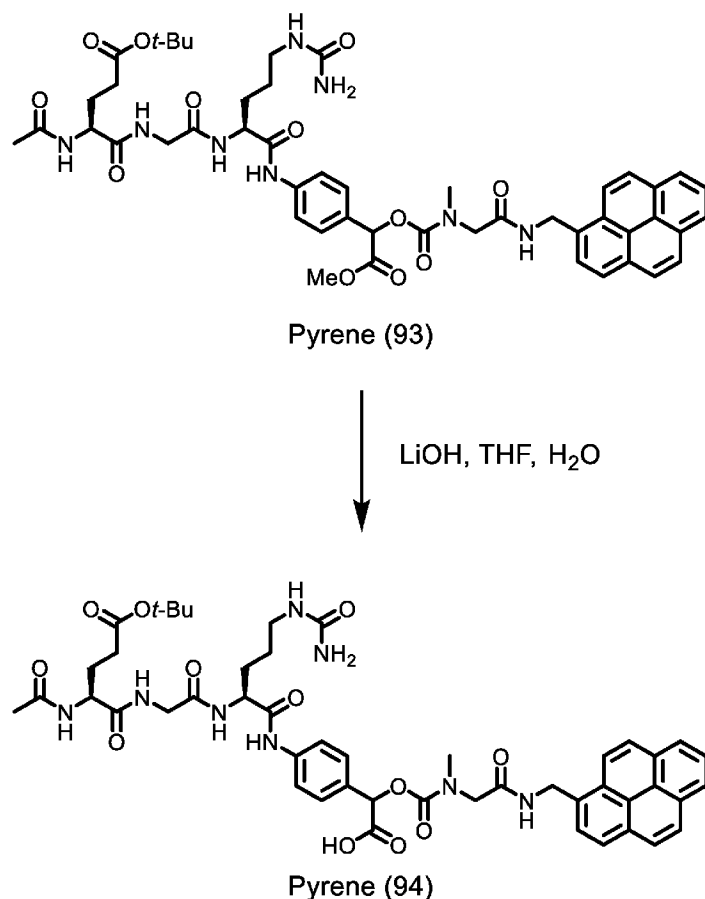
[0776] アルコール（92）（15.3 mg, 24.6 μmol ）をN,N-ジメチルホルムアミド（246 μL ）に溶解させ、氷冷下5分間攪拌した後、炭酸

ビス(4-ニトロフェニル) (22.4 mg, 73.7 μmol)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (9.4 μL , 55.3 μmol) を加え、室温にて2時間20分攪拌した。その後、氷冷し、Sarcosin-Pyrene (22.3 mg, 73.7 μmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (5.02 mg, 36.9 μmol)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (16.0 μL , 92.1 μmol) を加え、室温にて4時間攪拌した。反応後、順相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記ピレン (93) (17.5 mg, 18.4 μmol) を得た。

[0777] MS (ESI) m/z : 951.45 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0778] (19-9-3) ピレン (94) の合成

[化228]



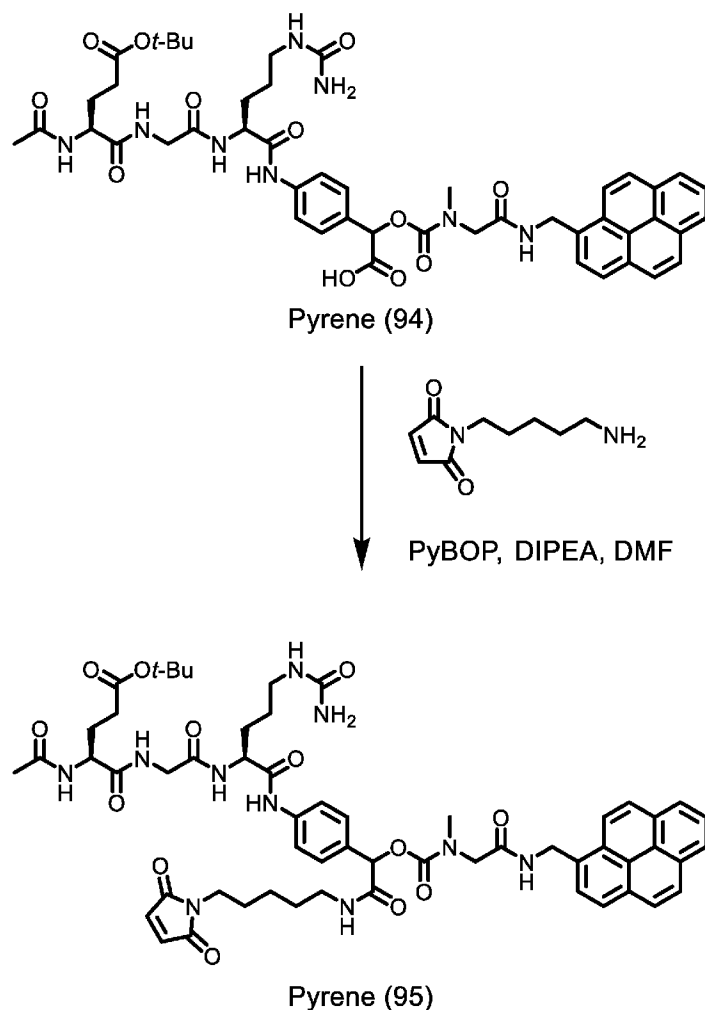
[0779] ピレン (93) (21.5 mg, 22.6 μmol) をテトラヒドロフラ

ン（１．７０ｍＬ）、水（５６５μＬ）に溶解させ、氷冷下５分間攪拌した後、１Ｍ水酸化リチウム水溶液（５４．３μＬ，５４．３μｍｏｌ）を加え、室温にて２時間攪拌した。反応終了後、１Ｍ塩酸を用いて約ｐＨ６に調整し、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記ピレン（９４）（１１．５ｍｇ，１２．３μｍｏｌ）を得た。

[0780] MS (ESI) m/z : 937.40 $[M+H]^+$

[0781] (19-9-4) ピレン（９５）の合成

[化229]



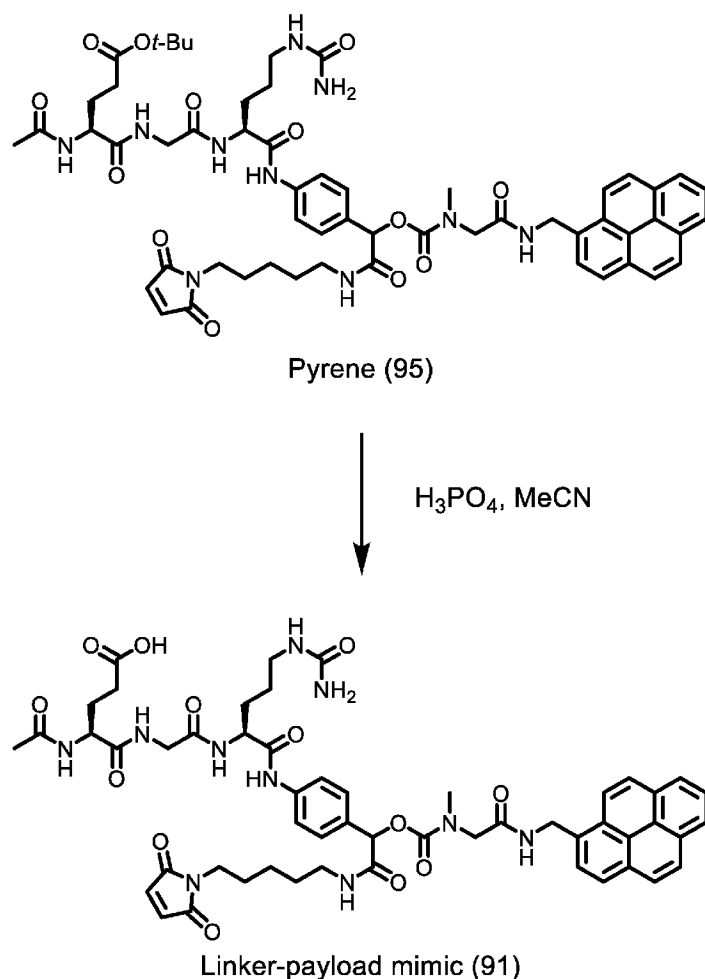
[0782] ピレン（９４）（１１．５ｍｇ，１２．３μｍｏｌ）をＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（１．０５ｍＬ）に溶解させたのち氷冷し、Ｎ，Ｎ－ジイソプ

ロピルエチルアミン (4.2 μ L, 24.5 μ mol)、1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート (9.58 mg, 18.4 μ mol) を加えた。次にN-(5-アミノペンチル)マレイミド塩酸塩 (4.03 mg, 18.4 μ mol) を加えて室温に戻し3時間攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、ピレン (95) (9.00 mg, 8.20 μ mol) を得た。

[0783] MS (ESI) m/z : 1101.50 $[M+H]^+$

[0784] (19-9-5) Linker-payload mimic (91) の合成

[化230]



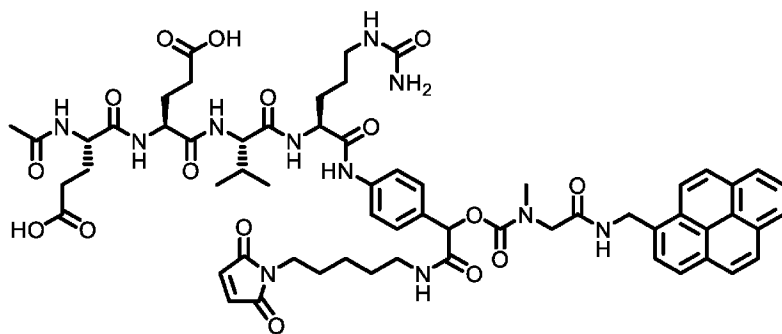
[0785] ピレン (95) (8.00 mg, 7.26 μmol) にアセトニトリル (363 μL) を加え、氷冷下で85%リン酸溶液 (149 μL , 2.18 μmol) を加え、室温で25時間攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、Linker-payload mimic (91) (5.60 mg, 53.6 μmol) を得た。

[0786] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6)

[0787] MS (ESI) m/z : 1045.50 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0788] (19-10) Linker-payload mimic (11) の合成
Linker-payload mimic (11) は下記のように (1-3) とは異なる経路でも合成した。

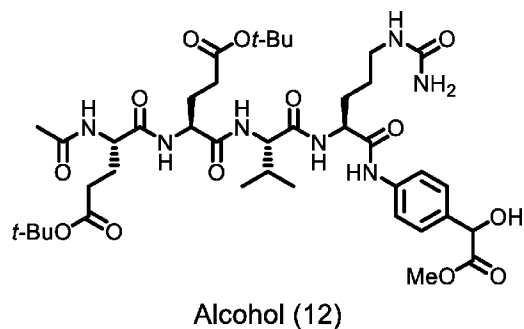
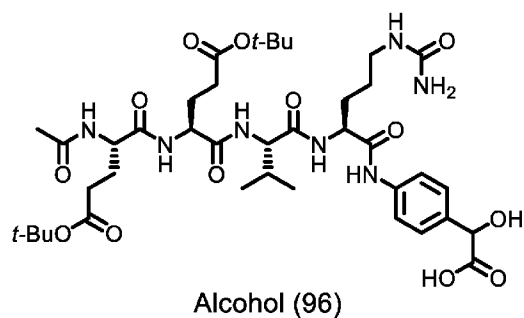
[化231]



Linker-payload mimic (11)

[0789] (19-10-1) アルコール (96) の合成

[化232]

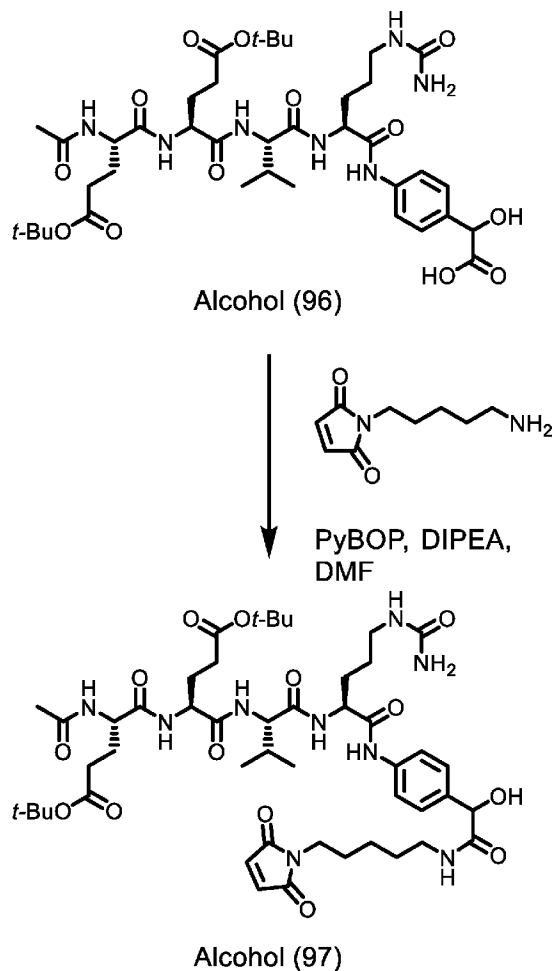
LiOH, THF, H₂O

[0790] 実施例（１－３－１）で得られたアルコール（１２）（８０．０ｍｇ，９４．１μｍｏｌ）をテトラヒドロフラン（７．０ｍＬ）、水（２．３５ｍＬ）に溶解させ、氷冷下５分間攪拌した後、１Ｍ水酸化リチウム水溶液（２２６μＬ，２２６μｍｏｌ）を加え、室温にて２時間攪拌した。反応終了後、１Ｍ塩酸を用いて約ｐＨ６に調整し、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記アルコール（９６）（６１．５ｍｇ，７３．６μｍｏｌ）を得た。

[0791] MS（ESI）*m/z*：８３６．４０ [M+H]⁺

[0792] （１９－１０－２）アルコール（９７）の合成

[化233]

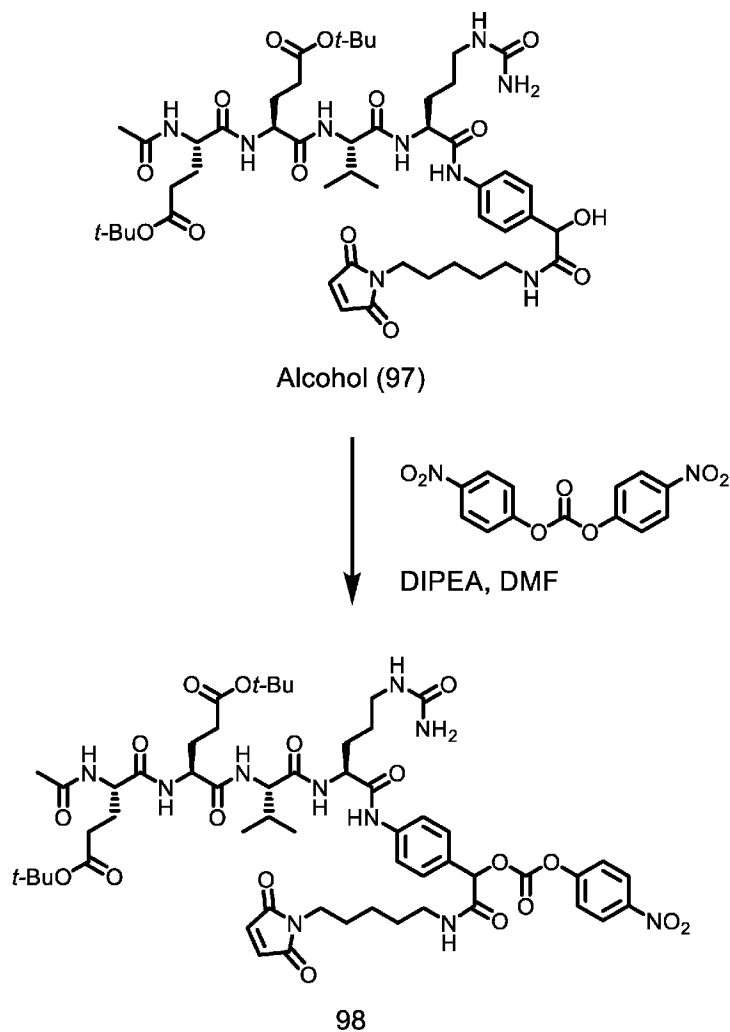


[0793] アルコール (96) (60.5 mg, 72.4 μmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (3.6 mL) に溶解させたのち氷冷し、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (25 μL , 145 μmol)、1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート (56.5 mg, 109 μmol) を加えた。次に N-(5-アミノペンチル) マレイミド塩酸塩 (23.7 mg, 109 μmol) を加えて室温に戻し3時間攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、アルコール (97) (68.0 mg, 72.4 μmol) を得た。

[0794] MS (ESI) m/z : 1000.50 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0795] (19-10-3) 化合物 (98) の合成

[化234]

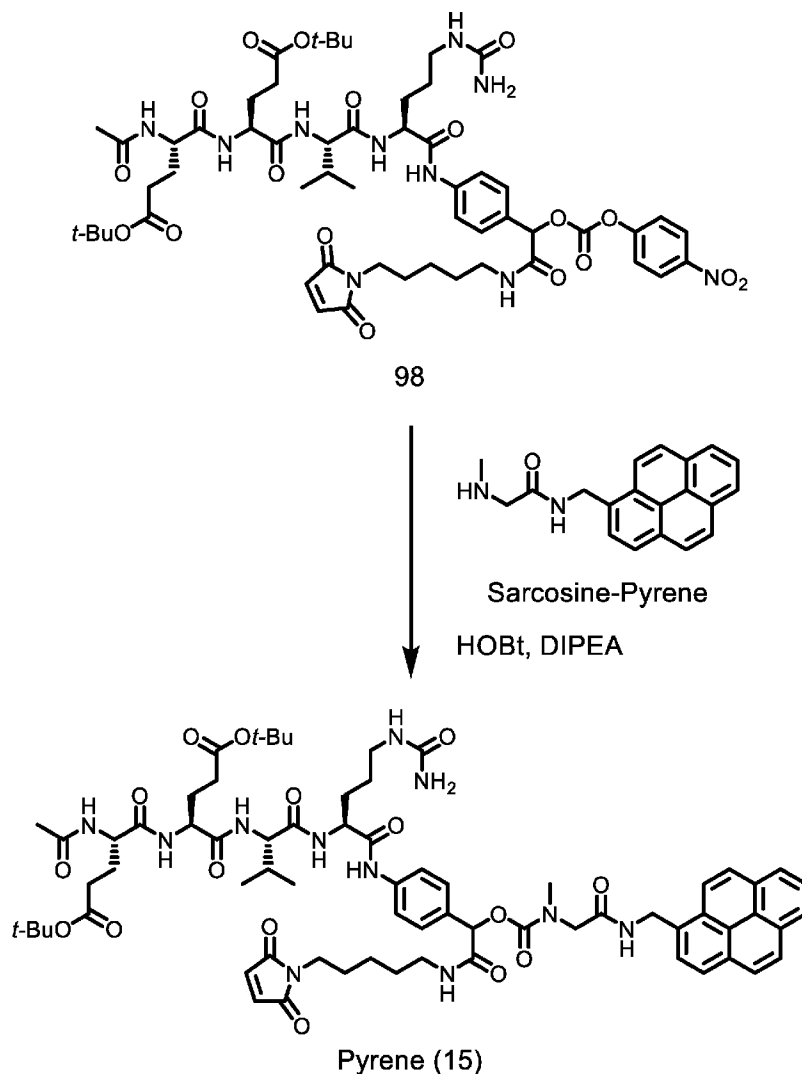


[0796] アルコール (97) (10.0 mg, 10.0 μmol) をN, N-ジメチルホルムアミド (0.1 mL) に溶解させたのち氷冷し、炭酸ビス(4-ニトロフェニル) (30.4 mg, 100 μmol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (3.8 μL , 22.5 μmol) を加え、室温にて3時間攪拌した。反応後、順相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記化合物 (98) (5.6 mg, 4.8 μmol) を得た。

[0797] MS (ESI) m/z : 1163.50 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0798] (19-10-4) ピレン (15) の合成

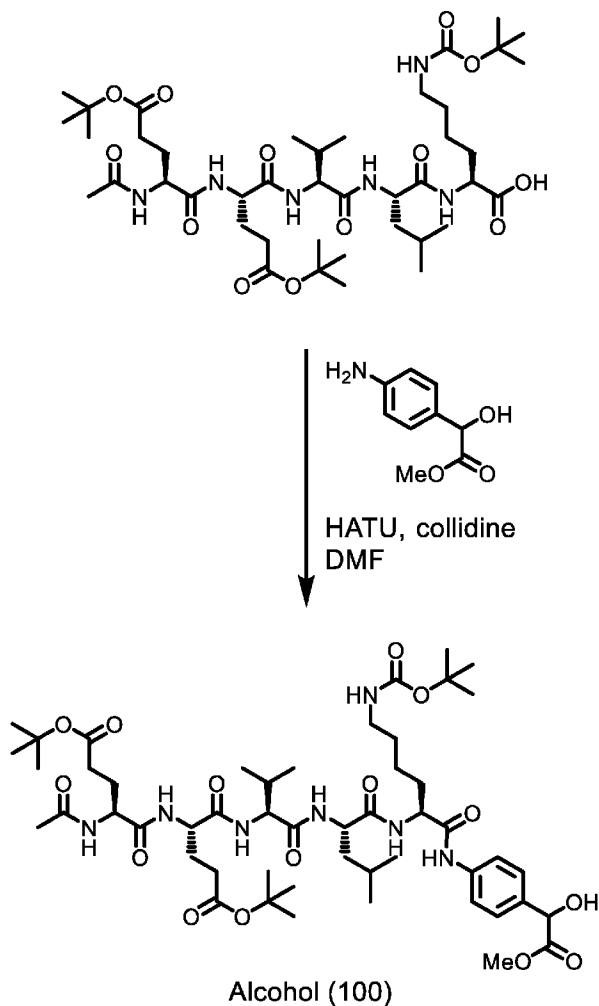
[化235]



[0799] 化合物 (98) (10.0 mg, 8.6 μmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (86 μL) に溶解させたのち氷冷し、Sarcosine-Pyrene (2.2 mg, 7.2 μmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (1.5 mg, 11 μmol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (1.8 μL , 11 μmol) を加え、室温にて4時間攪拌した。反応後、順相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記ピレン (15) (3.0 mg, 2.3 μmol) を得た。

[0800] MS (ESI) m/z : 1328.60 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[化237]



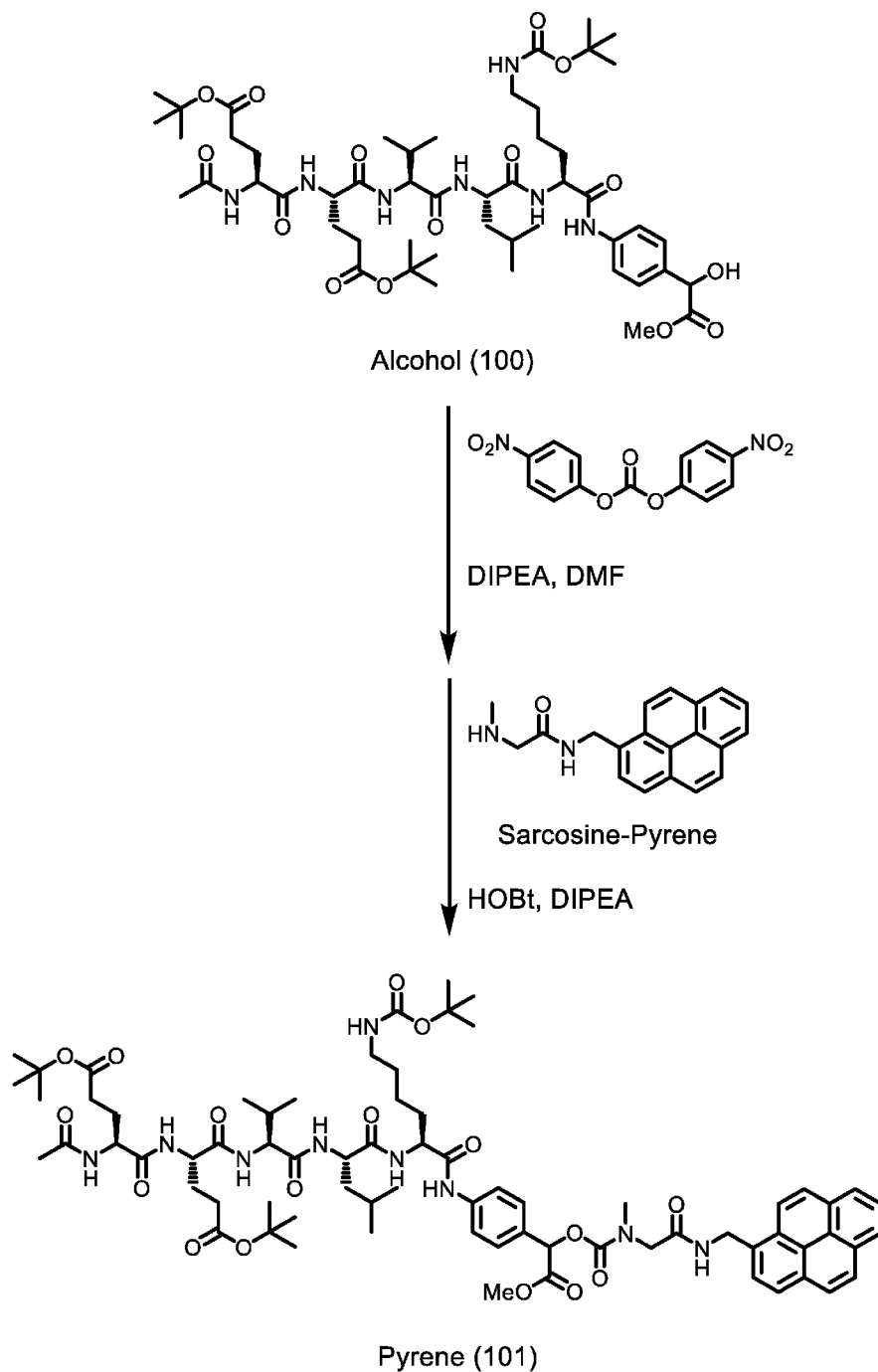
[0804] Ac-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Val-Leu-Lys-OH (47.2 mg, 54.2 μmol) をN, N-ジメチルホルムアミド (0.54 mL) に溶解させ、1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1,2,3,トリアゾロ[4,5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロホスファート (31.3 mg, 82.3 μmol)、2,4,6-トリメチルピリジン (10.9 μL , 81.8 μmol) を加え、室温にて10分間攪拌した。続いて、4-アミノマンデル酸メチル (11.8 mg, 65.1 μmol) を加えて室温にて68時間攪拌した後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記アルコール(100) (31.9 mg, 30.8 μmol) を得

た。

[0805] MS (ESI) m/z : 1034.60 $[M+H]^+$

[0806] (19-11-2) ピレン (101) の合成

[化238]



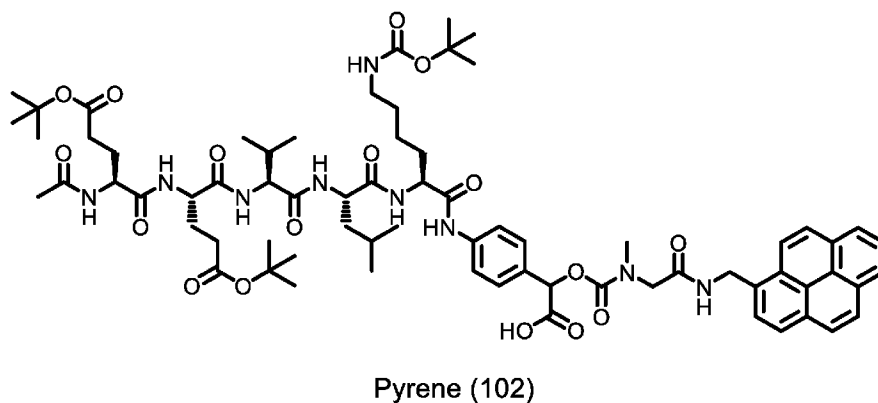
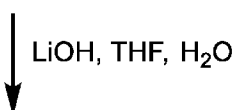
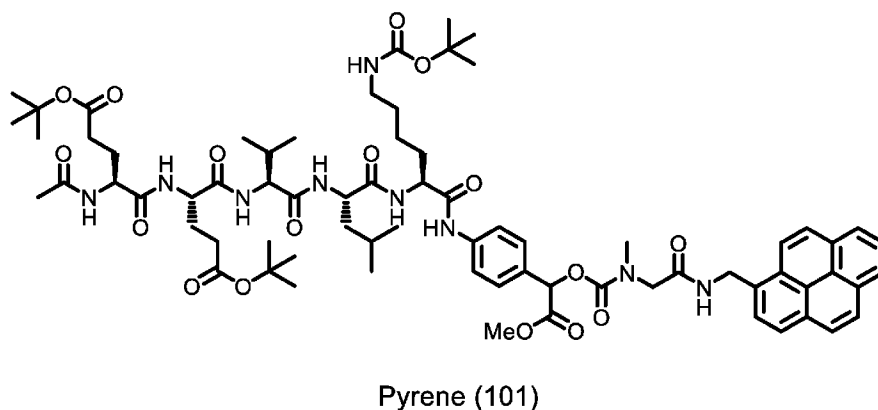
[0807] アルコール (100) (30.5 mg, 29.5 μmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (169 μL) に溶解させ、氷冷下 5 分間攪拌した後、

炭酸ビス(4-ニトロフェニル) (27.4 mg, 90.1 μmol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (11.4 μL , 66.3 μmol) を加え、室温にて2時間攪拌した。その後、氷冷し、Sarcosin-Pyrene (17.7 mg, 51.6 μmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (6.0 mg, 44.2 μmol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (39.3 μL , 228 μmol) を加え、室温にて21時間攪拌した。反応後、シリカゲルカラムにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりジクロロメタン、メタノールを除去し、上記ピレン (101) (20.2 mg, 14.8 μmol) を得た。

[0808] MS (ESI) m/z : 1362.75 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0809] (19-11-3) ピレン (102) の合成

[化239]

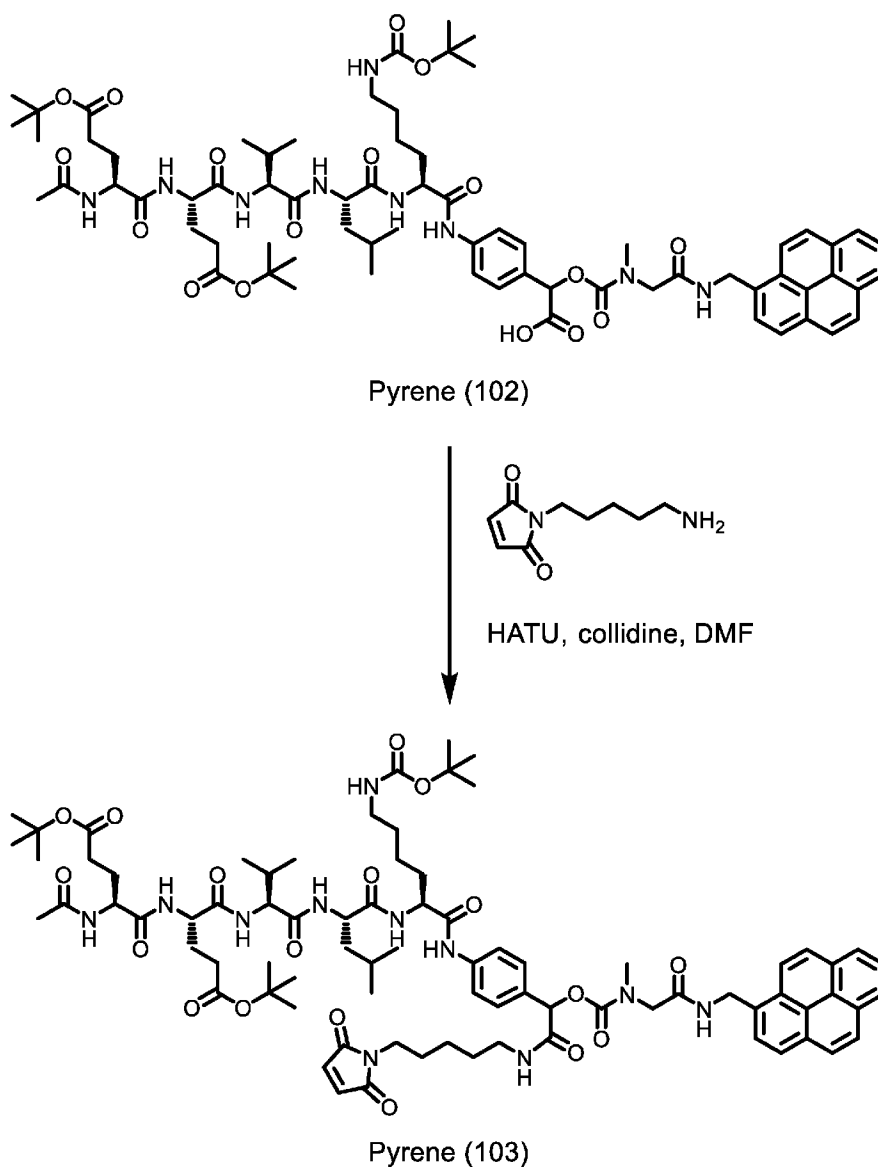


[0810] ピレン (101) (20.5 mg, 15.0 μmol) をテトラヒドロフラン (1.0 mL)、水 (0.5 mL) に溶解させ、氷冷下5分間攪拌した後、1 M水酸化リチウム水溶液 (75.0 μL , 75.0 μmol) を加え、室温にて5時間攪拌した。反応終了後、分液にて抽出、減圧濃縮することにより、上記ピレン (102) (18.8 mg, 13.9 μmol) を得た。

[0811] MS (ESI) m/z : 1348.90 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0812] (19-11-4) ピレン (103) の合成

[化240]

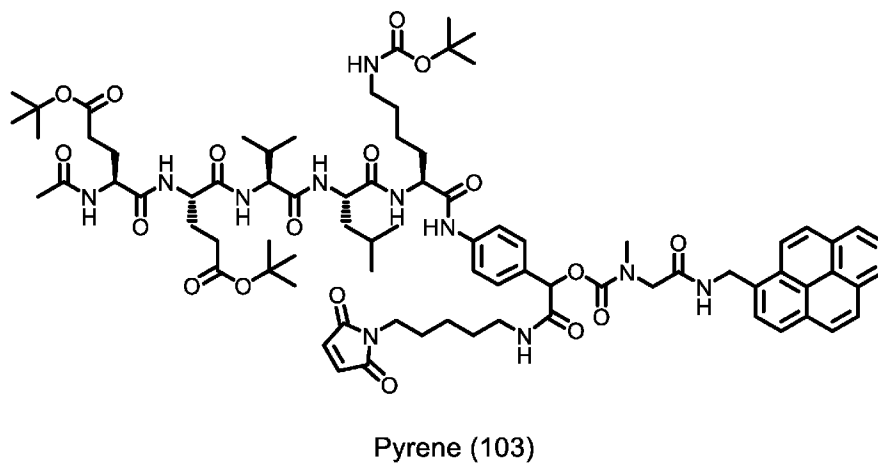


[0813] ピレン (102) (11.9 mg, 8.82 μmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (441 μL) に溶解させたのち氷冷し、2, 4, 6-トリメチルピリジン (3.6 μL , 26.8 μmol)、1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1, 2, 3, トリアゾロ[4, 5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロホスファート (5.0 mg, 13.2 μmol) を加えた。次に N-(5-アミノペンチル)マレイミド塩酸塩 (2.8 mg, 12.3 μmol) を加えて室温に戻し2時間半攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、ピレン (103) (5.2 mg, 3.43 μmol) を得た。

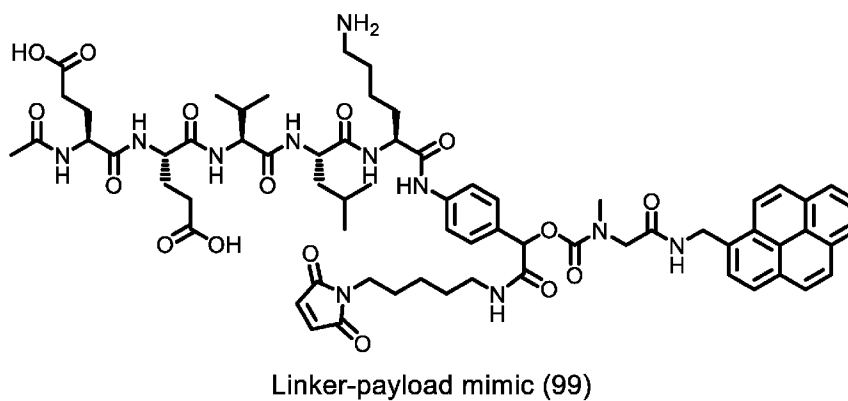
[0814] MS (ESI) m/z : 1513.75 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0815] (19-11-5) Linker-payload mimic (99) の合成

[化241]



H_3PO_4 , MeCN



[0816] ピレン (103) (4.5 mg, 2.97 μmol) にアセトニトリル (300 μL) を加え、氷冷下で85%リン酸溶液 (102 μL , 1.48 mmol) を加え、室温で25時間攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、Linker-payload mimic (99) (2.1 mg, 1.61 μmol) を得た。

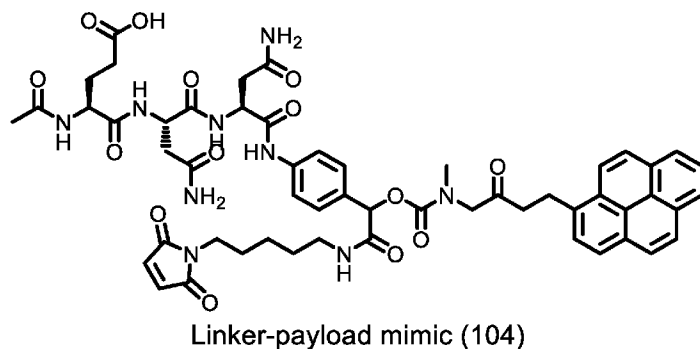
[0817] MS (ESI) m/z : 1300.60 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0818] (19-12) Linker-payload mimic (104) の合

成

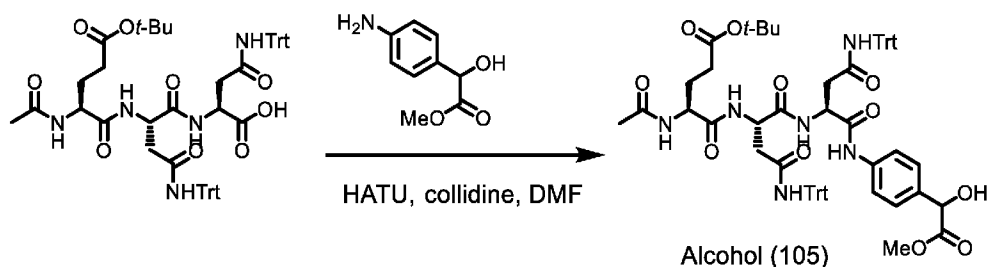
Linker-payload mimic (104) は下記のように合成した。

[化242]



[0819] (19-12-1) アルコール (105) の合成

[化243]

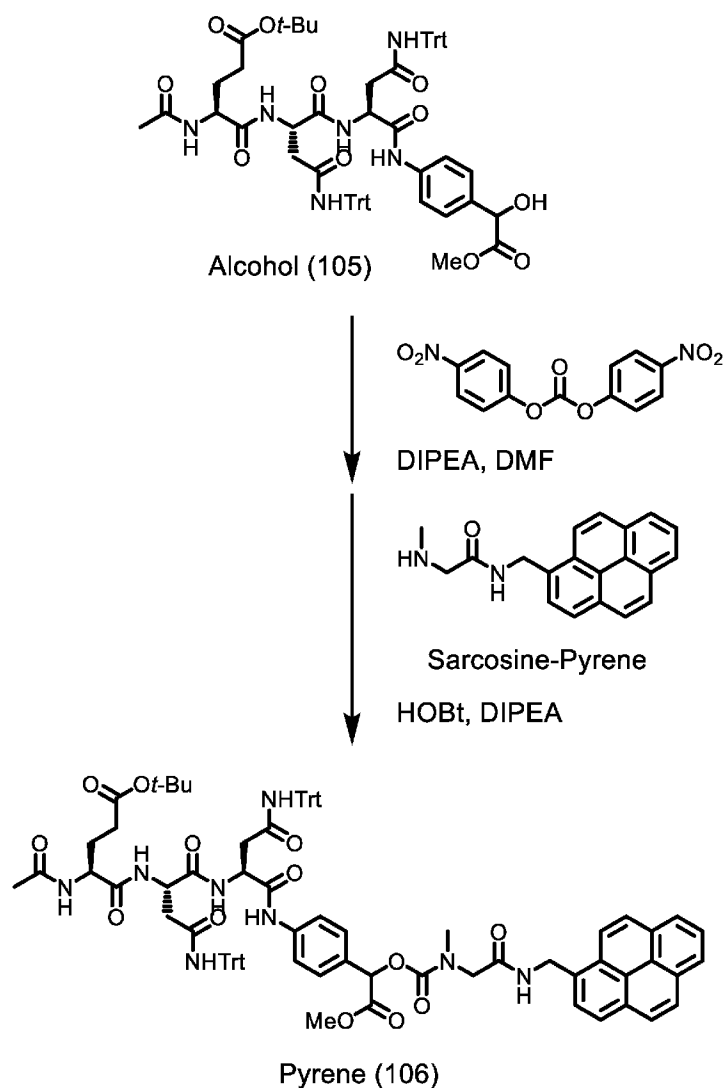


[0820] Ac-Glu(OtBu)-Asn(NHTrt)-Asn(NHTrt)-OH (100 mg, 104 μmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (520 μL) に溶解させ、1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1, 2, 3, トリアゾロ[4, 5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロホスファート (47.5 mg, 125 μmol)、2, 4, 6-トリメチルピリジン (16.5 μL , 125 μmol) を加え、室温にて10分間攪拌した。続いて、4-アミノマンデル酸メチル (22.6 mg, 125 μmol) を加えて室温にて16.5時間攪拌した後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記アルコール (105) (110 mg, 98.5 μmol) を得た。

[0821] MS (ESI) m/z : 1121.50 $[M+H]^+$

[0822] (19-12-2) ピレン (106) の合成

[化244]



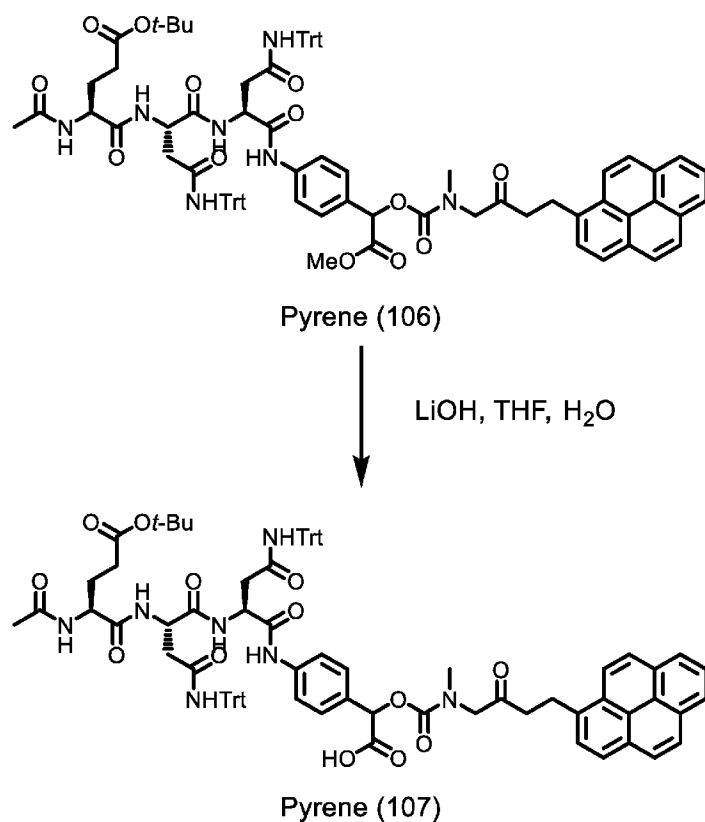
[0823] アルコール (105) (92.6 mg, 82.6 μmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (413 μL) に溶解させ、氷冷下 5 分間攪拌した後、炭酸ビス (4-ニトロフェニル) (75.4 mg, 248 μmol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (31.6 μL , 186 μmol) を加え、室温にて 1 時間攪拌した。その後、氷冷し、Sarcosine-Pyrene (74.9 mg, 248 μmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (16.7 mg, 124 μmol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (52.7 μL , 310 μmol) を加え、室温にて 2 時間攪拌した。反

応後、順相クロマトグラフィー（ジクロロメタン：メタノール）にて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することにより、上記ピレン（106）（58.0 mg, 40.0 μmol ）を得た。

[0824] MS (ESI) m/z : 1449.65 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0825] (19-12-3) ピレン（107）の合成

[化245]

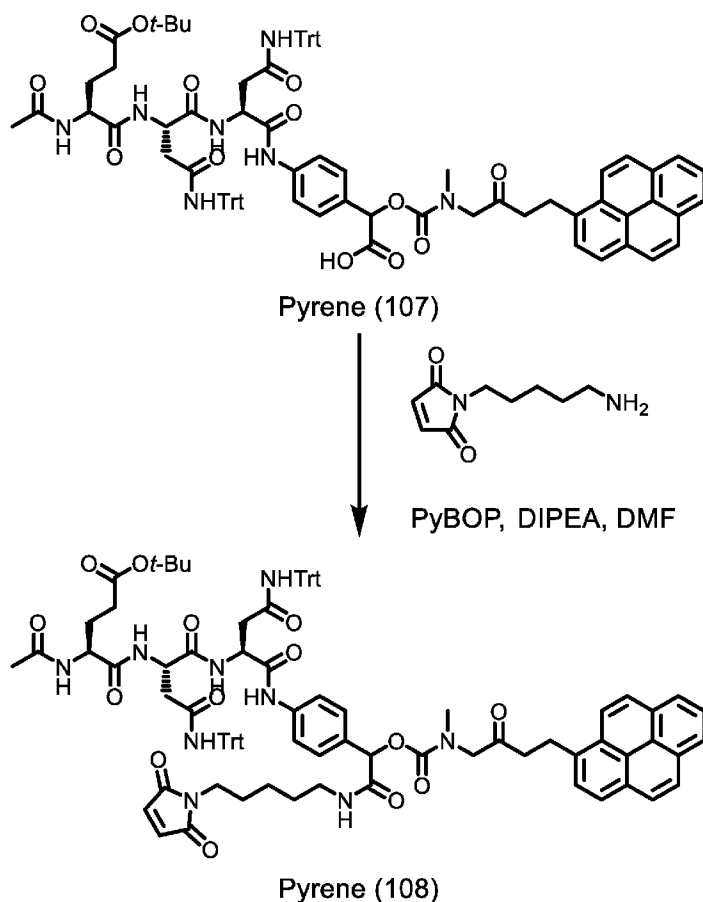


[0826] ピレン（106）（30.0 mg, 20.7 μmol ）をテトラヒドロフラン（1.58 mL）、水（525 μL ）に溶解させ、氷冷下5分間攪拌した後、1 M水酸化リチウム水溶液（49.7 μL , 49.7 μmol ）を加え、室温にて2.5時間攪拌した。反応終了後、1 M塩酸を用いて約pH 6に調整し、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記ピレン（107）（15.3 mg, 10.7 μmol ）を得た。

[0827] MS (ESI) m/z : 1435.60 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0828] (19-12-4) ピレン (108) の合成

[化246]



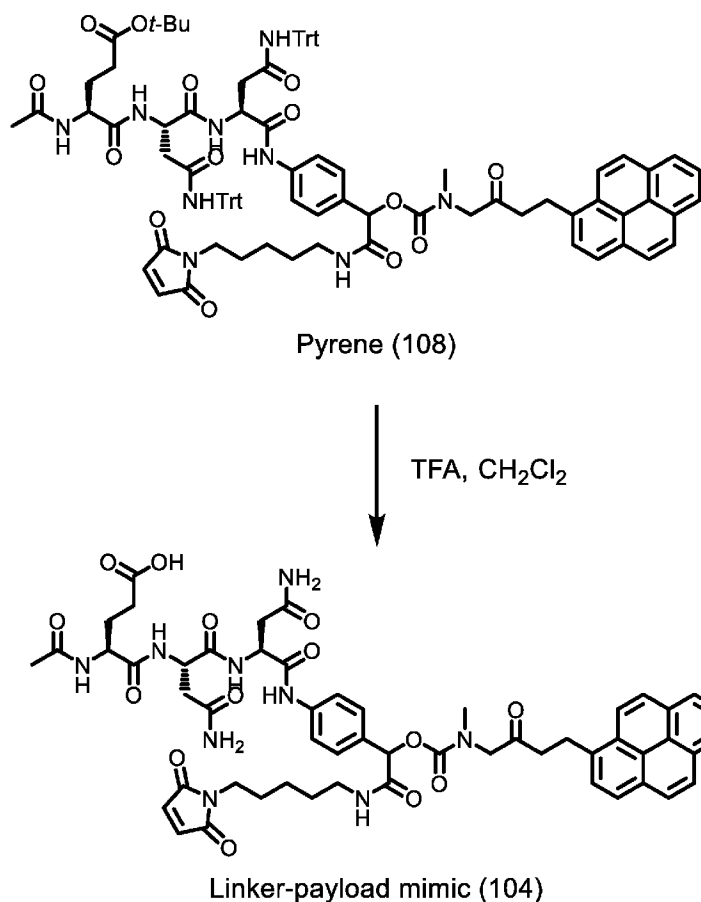
[0829] ピレン (107) (14.2 mg, 9.9 μmol) を、N,N-ジメチルホルムアミド (400 μL) に溶解させたのち氷冷し、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (3.4 μL , 19.8 μmol)、1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート (7.7 mg, 14.8 μmol) を加えた。次にN-(5-アミノペンチル)マレイミド塩酸塩 (3.2 mg, 14.8 μmol) を加えて室温に戻し1時間攪拌した。反応終了後、順相分取クロマトグラフィー (ジクロロメタン：メタノール) にて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮し、ピレン (108) (11.7 mg, 7.3 μmol) を得た。

[0830] MS (ESI) m/z : 1599.80 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0831] (19-12-5) Linker-payload mimic (104)

の合成

[化247]



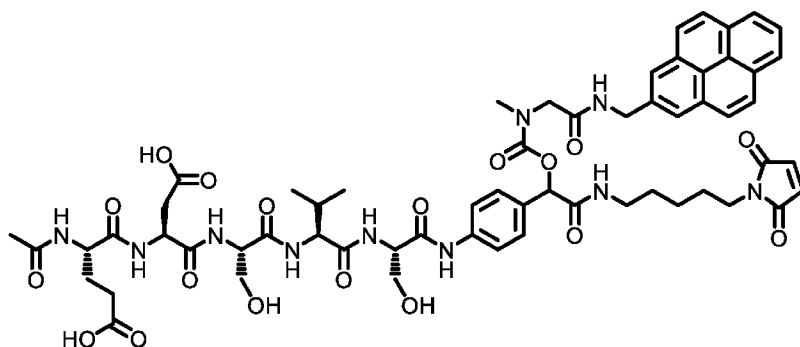
[0832] ピレン (108) (5.0 mg, 3.1 μ mol) にジクロロメタン (282 μ L) 溶解させたのち氷冷し、トリフルオロ酢酸 (31.3 μ L, 409 μ mol) を加え、室温で2.5時間攪拌した。反応液を逆相分取クロマトグラフィーにて精製し、生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、Linker-payload mimic (104) (2.3 mg, 2.2 μ mol) を得た。

[0833] MS (ESI) m/z : 1059.50 [M+H]⁺

[0834] (19-13) Linker-payload mimic (109) の合成

Linker-payload mimic (109) は下記のように合成した。

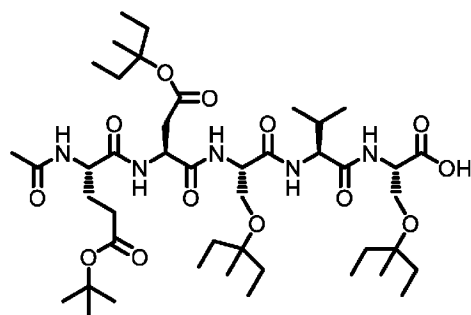
[化248]



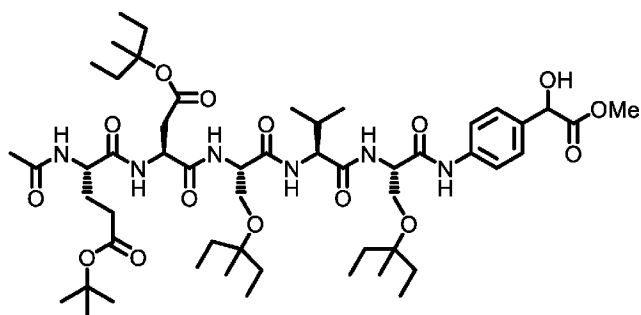
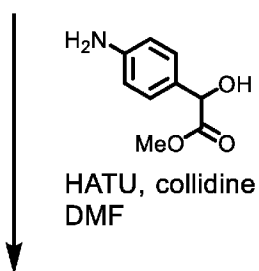
Linker-payload mimic (109)

[0835] (19-13-1) アルコール (111) の合成

[化249]



110



Alcohol (111)

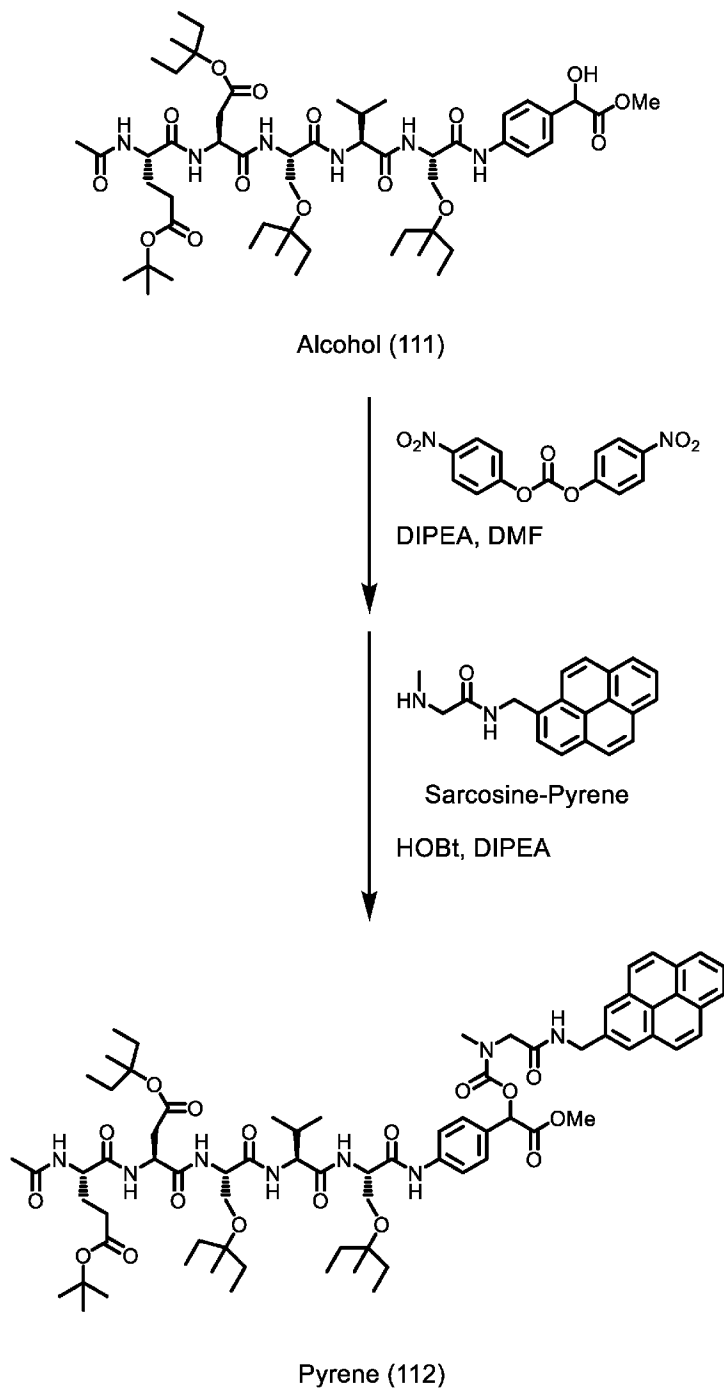
[0836] 化合物 (110) (50.7 mg, 53.3 μmol) をN, N-ジメチ

ルホルムアミド (266 μL) に溶解させ、1- [ビス (ジメチルアミノ) メチレン] -1H-1, 2, 3, トリアゾロ [4, 5-b] ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロホスファート (24.3 mg, 63.9 μmol)、2, 4, 6-トリメチルピリジン (8.4 μL , 63.9 μmol) を加え、室温にて10分間攪拌した。続いて、4-アミノマンデル酸メチル (11.6 mg, 63.9 μmol) を加えて室温にて25時間攪拌した後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記アルコール (111) (48.4 mg, 43.8 μmol) を得た。

[0837] MS (ESI) m/z : 1105.65 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0838] (19-13-2) ピレン (112) の合成

[化250]



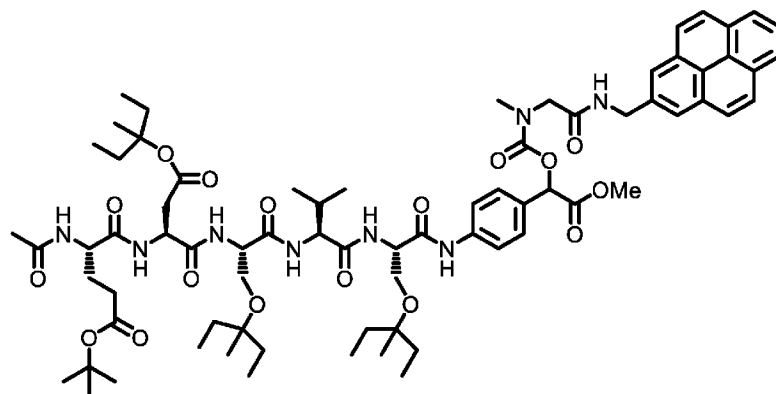
[0839] アルコール (111) (48.4 mg, 43.8 μmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (156 μL) に溶解させ、氷冷下5分間攪拌した後、炭酸ビス(4-ニトロフェニル) (21.6 mg, 69.6 μmol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (8.8 μL , 51.2 μmol) を加え、室温にて2時間10分攪拌した。その後、氷冷し、Sarcosine-

Pyrene (16.3 mg, 48.0 μmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (55.0 mg, 41.0 μmol)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (18.8 μL , 109 μmol) を加え、室温にて2時間攪拌した。反応後、順相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記ピレン (112) (22.1 mg, 15.4 μmol) を得た。

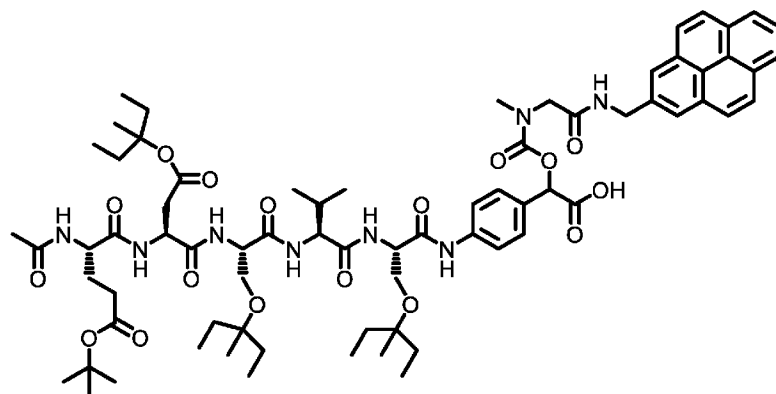
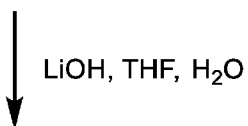
[0840] MS (ESI) m/z : 1433.95 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0841] (19-13-3) ピレン (113) の合成

[化251]



Pyrene (112)



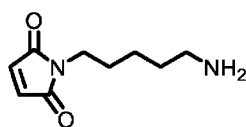
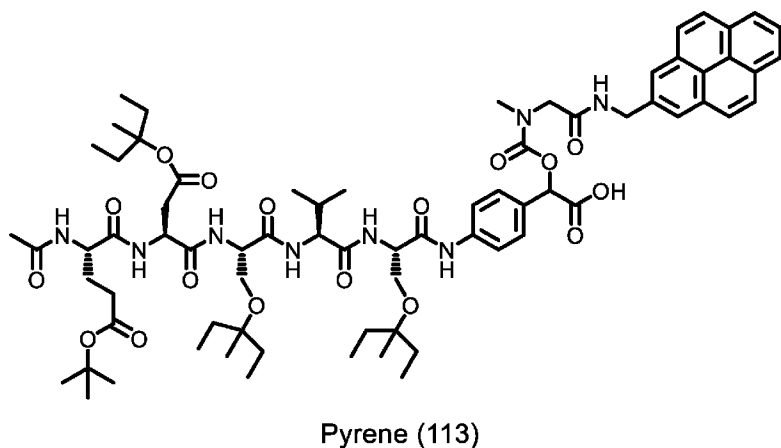
Pyrene (113)

[0842] ピレン (112) (20.8 mg, 14.5 μmol) をテトラヒドロフラン (1.08 mL)、水 (0.36 mL) に溶解させ、氷冷下5分間攪拌した後、1 M水酸化リチウム水溶液 (34.8 μL , 34.8 μmol) を加え、室温にて1時間攪拌した。反応終了後、酢酸を用いて約 pH 6 に調整し、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記ピレン (113) (2.3 mg, 1.6 μmol) を得た。

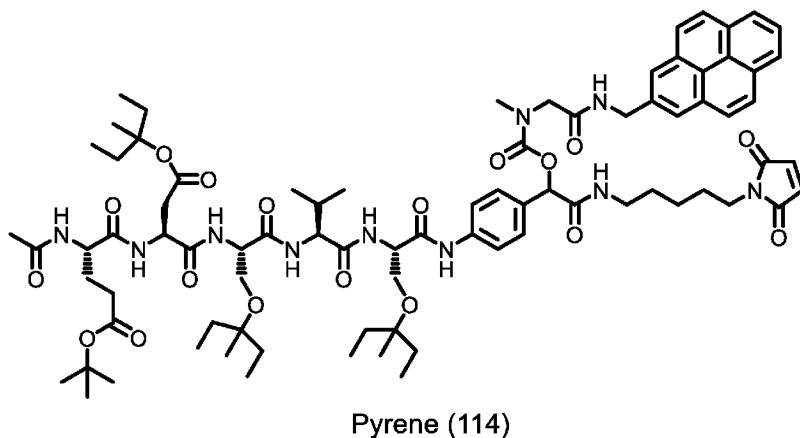
[0843] MS (ESI) m/z : 1420.80 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0844] (19-13-4) ピレン (114) の合成

[化252]



HATU, collidine, DMF



[0845] ピレン (113) (2.3 mg, 1.6 μmol) を 2, 4, 6-トリメチルピリジン (200 μL) に溶解させたのち氷冷し、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (0.56 μL , 3.3 μmol)、1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1, 2, 3, トリアゾロ[4, 5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロホスファート (1.19 mg, 3.13 μmol) を加えた。次にN-(5-アミノペンチル)マレイミド塩酸塩 (0.58 mg, 2.5 μmol) を加えて室温に戻り3時間攪拌した。反応

終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、ピレン（114）（2.9 mg, 1.8 μmol ）を得た。

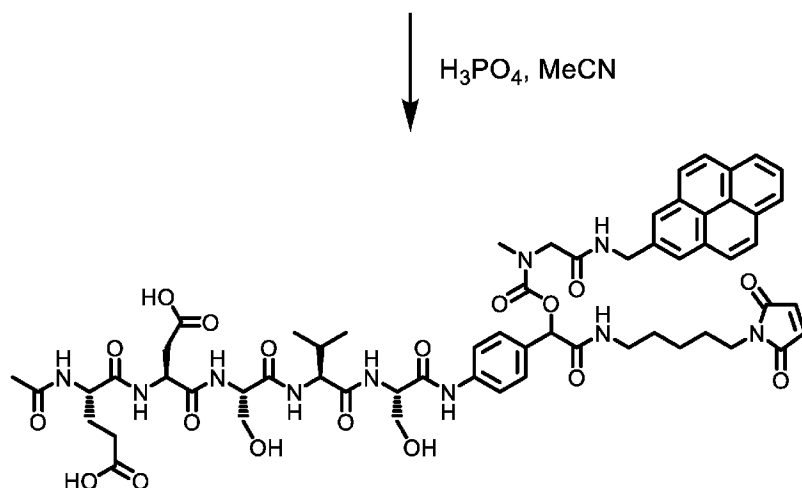
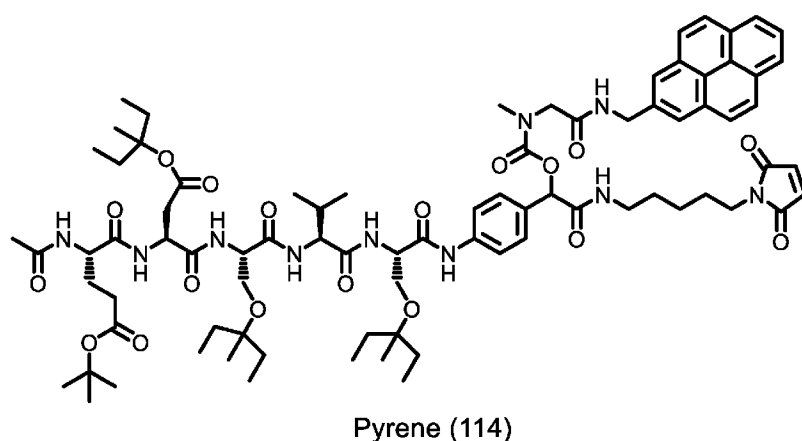
[0846] ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

[0847] MS (ESI) m/z : 1606.15 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

[0848] (19-13-5) Linker-payload mimic (109)

の合成

[化253]



[0849] ピレン（114）（2.2 mg, 1.4 μmol ）にアセトニトリル（278 μL ）を加え、氷冷下で85%リン酸溶液（71.3 μL , 1.04 mmol ）を加え、室温で23時間攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマト

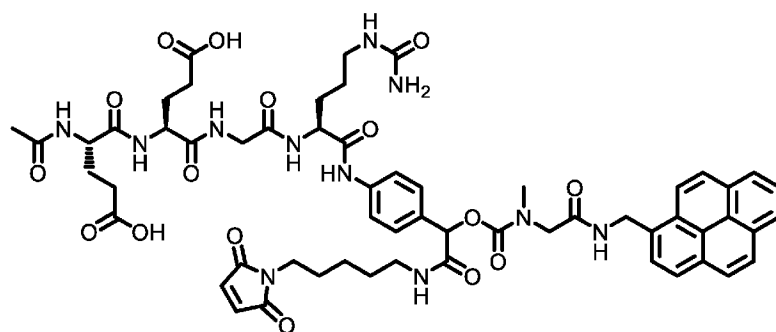
グラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、Linker-payload mimic (109) (0.7 mg, 0.5 μ mol) を得た。

[0850] MS (ESI) m/z : 1275.70 $[M+H]^+$

[0851] (19-14) Linker-payload mimic (115) の合成

Linker-payload mimic (115) は下記のように合成した。

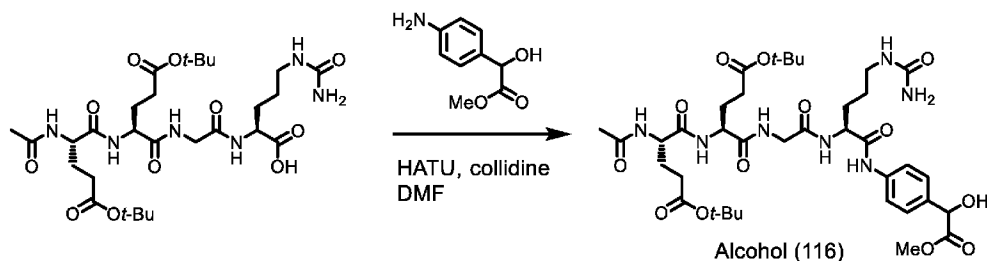
[化254]



Linker-payload mimic (115)

[0852] (19-14-1) アルコール (116) の合成

[化255]



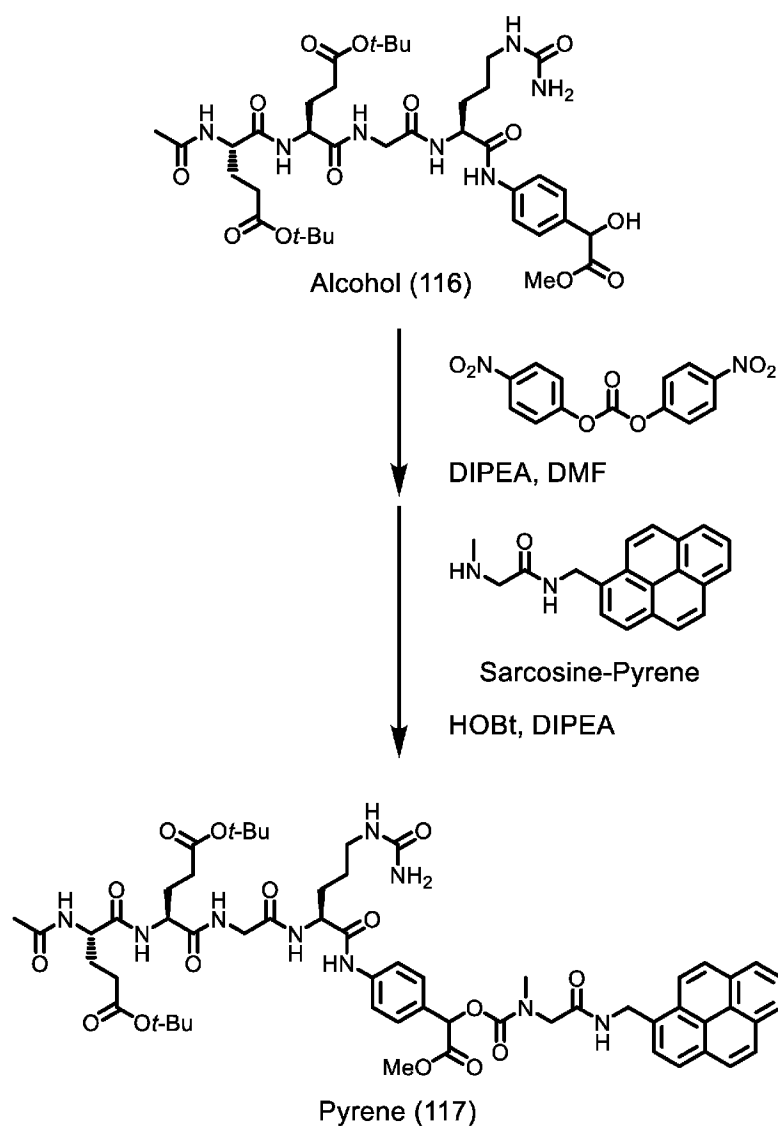
[0853] Ac-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Gly-Cit-OH (50.0 mg, 77.6 μ mol) をN, N-ジメチルホルムアミド (388 μ L) に溶解させ、1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1, 2, 3, トリアゾロ[4, 5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロホスファート (35.3 mg, 93.1 μ mol)、2, 4, 6-トリ

メチルピリジン (12.0 μ L, 93.1 μ mol) を加え、室温にて10分間攪拌した。続いて、4-アミノマンデル酸メチル (16.8 mg, 93.1 μ mol) を加えて室温にて21時間攪拌した後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記アルコール (116) (53.3 mg, 66.0 μ mol) を得た。

[0854] MS (ESI) m/z : 808.50 $[M+H]^+$

[0855] (19-14-2) ピレン (117) の合成

[化256]



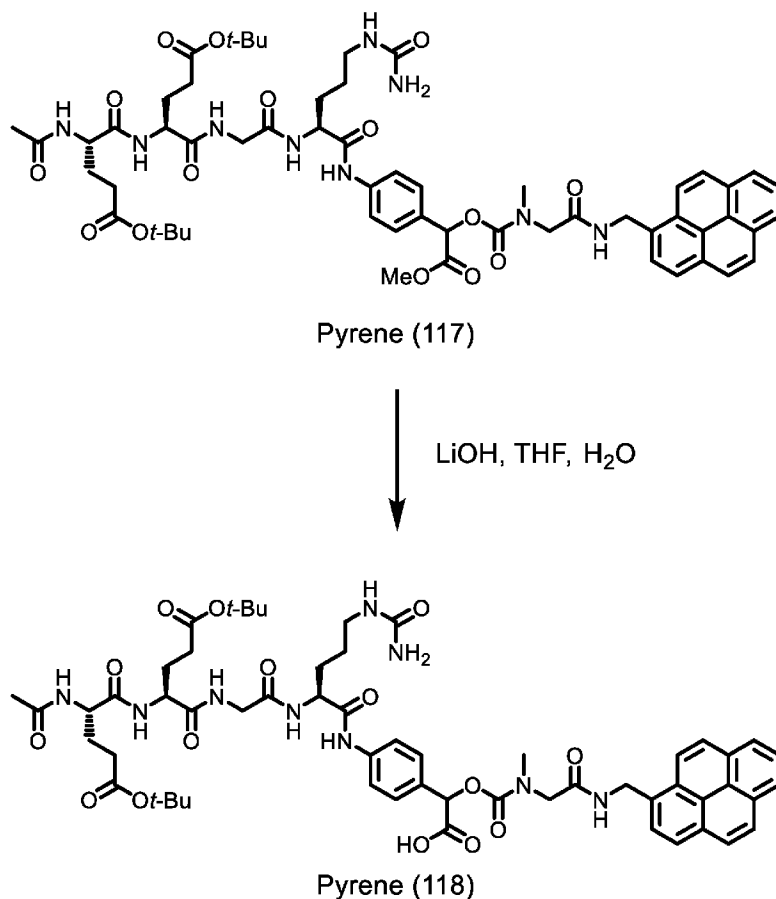
[0856] アルコール (116) (25.0 mg, 30.9 μ mol) をN, N-ジ

メチルホルムアミド (309 μ L) に溶解させ、氷冷下5分間攪拌した後、炭酸ビス(4-ニトロフェニル) (28.2 mg, 92.7 μ mol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (11.8 μ L, 69.5 μ mol) を加え、室温にて2時間攪拌した。その後、氷冷し、Sarcosin-Pyrene (28.0 mg, 92.7 μ mol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (6.3 mg, 46.4 μ mol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (20.1 μ L, 116 μ mol) を加え、室温にて4時間攪拌した。反応後、順相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記ピレン (117) (25.3 mg, 22.2 μ mol) を得た。

[0857] MS (ESI) m/z : 1136.50 $[M+H]^+$

[0858] (19-14-3) ピレン (118) の合成

[化257]

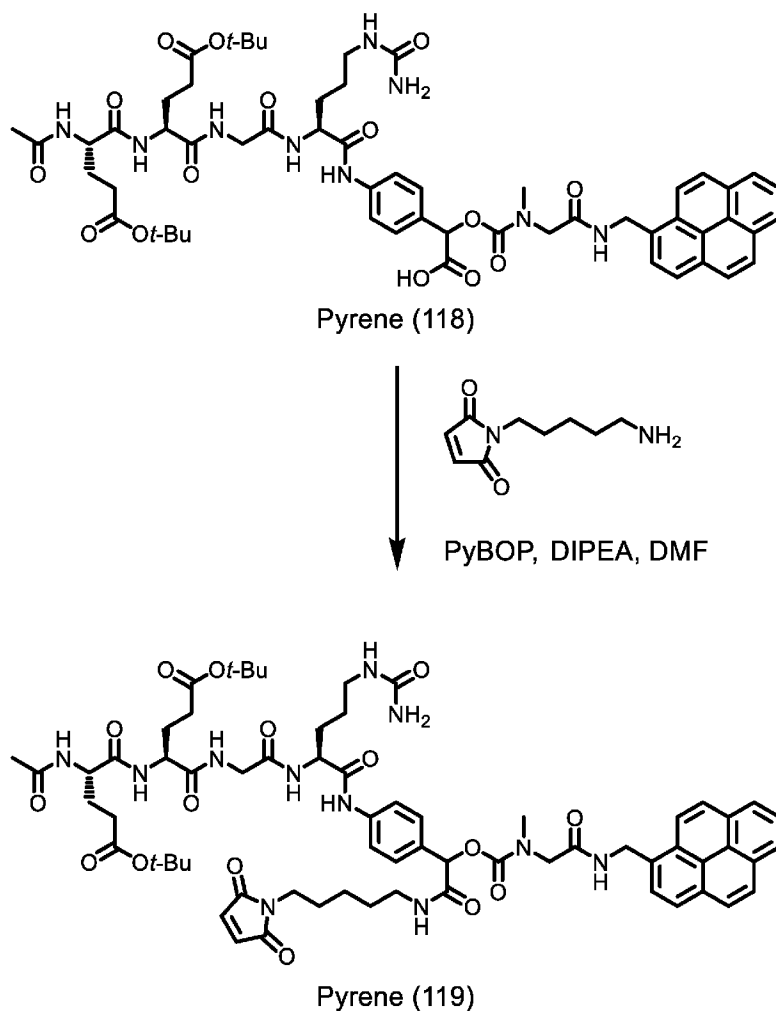


[0859] ピレン (117) (15.0 mg, 13.2 μmol) をテトラヒドロフラン (1.32 mL)、水 (330 μL) に溶解させ、氷冷下5分間攪拌した後、1 M水酸化リチウム水溶液 (31.7 μL , 31.7 μmol) を加え、室温にて3時間攪拌した。反応終了後、1 M塩酸を用いて約 pH 6 に調整し、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記ピレン (118) (9.3 mg, 8.32 μmol) を得た。

[0860] MS (ESI) m/z : 1122.50 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0861] (19-14-4) ピレン (119) の合成

[化258]



[0862] ピレン (118) (8.8 mg, 7.8 μmol) をN, N-ジメチルホ

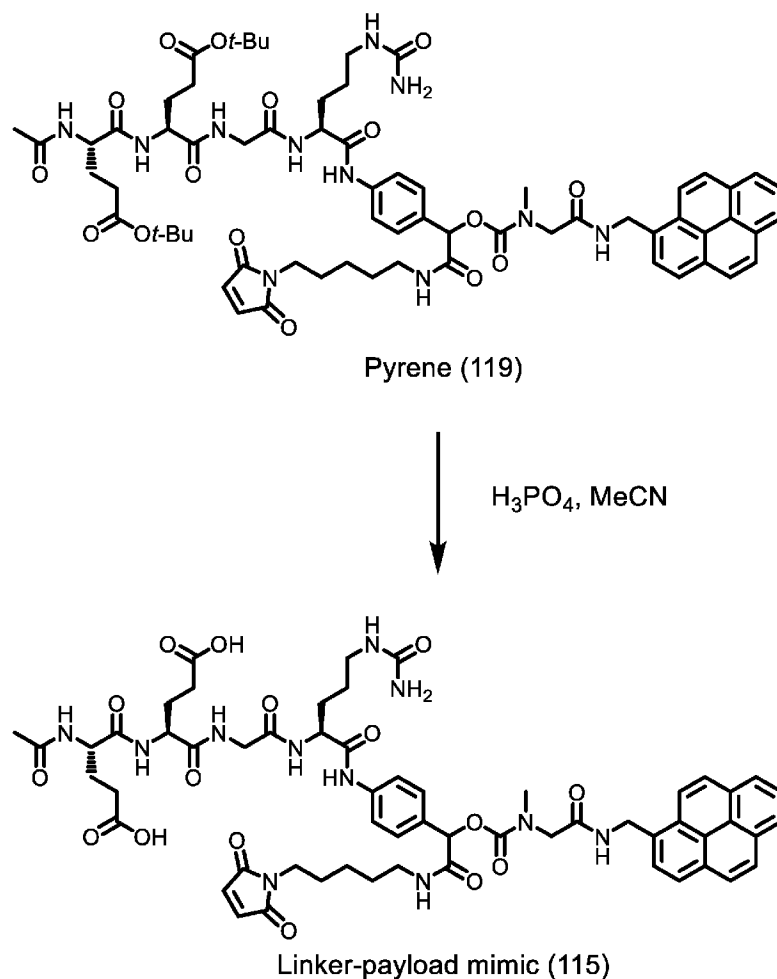
ルムアミド（784 μL ）に溶解させたのち氷冷し、N，N-ジイソプロピルエチルアミン（2.67 μL ，15.6 μmol ）、1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート（6.10 mg，11.7 μmol ）を加えた。次にN-（5-アミノペンチル）マレイミド塩酸塩（2.6 mg，12 μmol ）を加えて室温に戻し3時間攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、ピレン（119）（8.1 mg，6.3 μmol ）を得た。

[0863] MS (ESI) m/z : 1286.80 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0864] (19-14-5) Linker-payload mimic (115)

の合成

[化259]



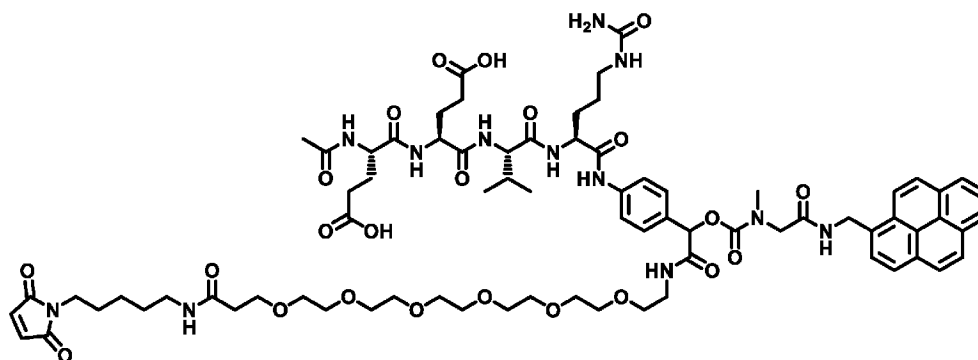
[0865] ピレン (119) (7.3 mg, 5.7 μ mol) にアセトニトリル (284 μ L) を加え、氷冷下で85%リン酸溶液 (117 μ L, 1.72 mmol) を加え、室温で17時間攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、Linker-payload mimic (115) (5.4 mg, 4.6 μ mol) を得た。

[0866] MS (ESI) m/z : 1174.50 $[M+H]^+$

[0867] (19-15) Linker-payload mimic (120) の合
成

Linker-payload mimic (120) は下記のように合成した。

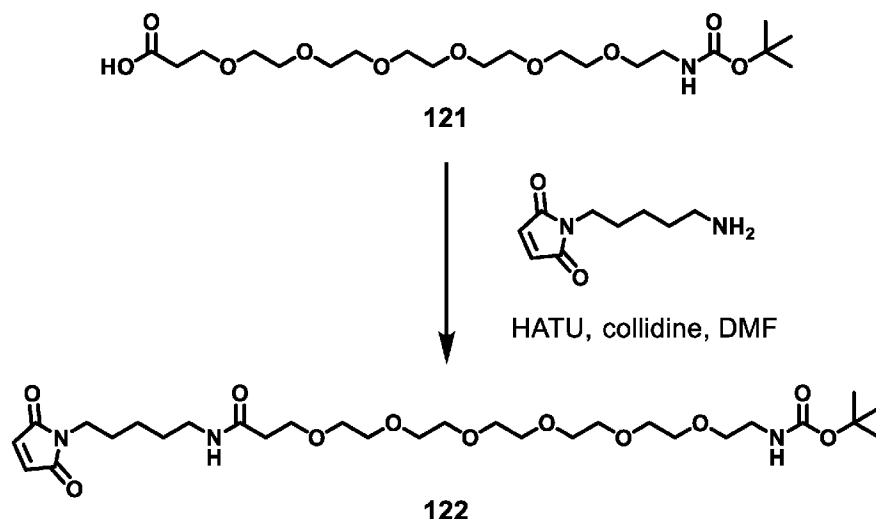
[化260]



Linker-payload mimic (120)

[0868] (19-15-1) 化合物 (122) の合成

[化261]

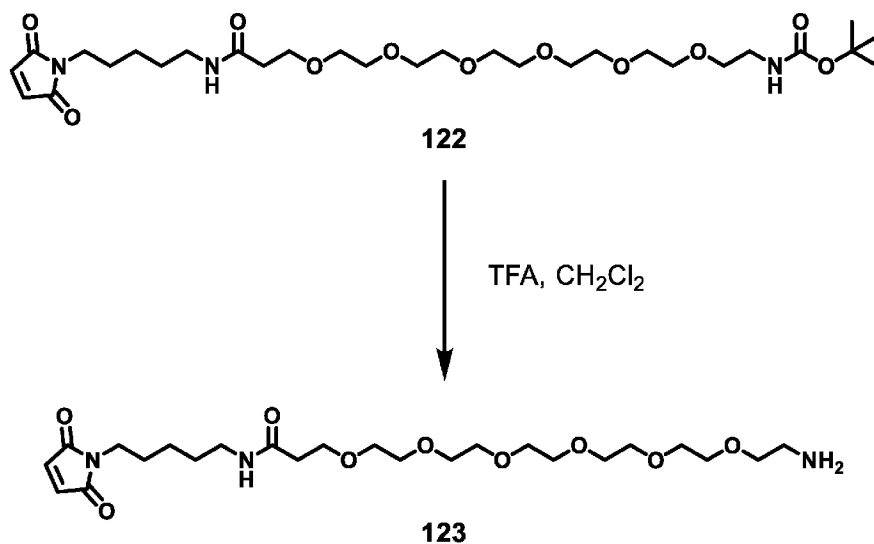


[0869] 21-[(tert-ブトキシカルボニル)アミノ]-4,7,10,13,16,19-ヘキサオキサヘンエイコサン酸(121)(70.0mg, 154 μmol)をN,N-ジメチルホルムアミド(7.72mL)に溶解させたのち氷冷し、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(52.0 μL , 309 μmol)、1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート(120mg, 232 μmol)を加えた。次にN-(5-アミノペンチル)マレイミド塩酸塩(50.6mg, 232 μmol)を加えて室温に戻し4時間攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、化合物(122)(83.4mg, 135 μmol)を得た。

[0870] MS (ESI) m/z : 618.50 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0871] (19-15-2) 化合物(123)の合成

[化262]

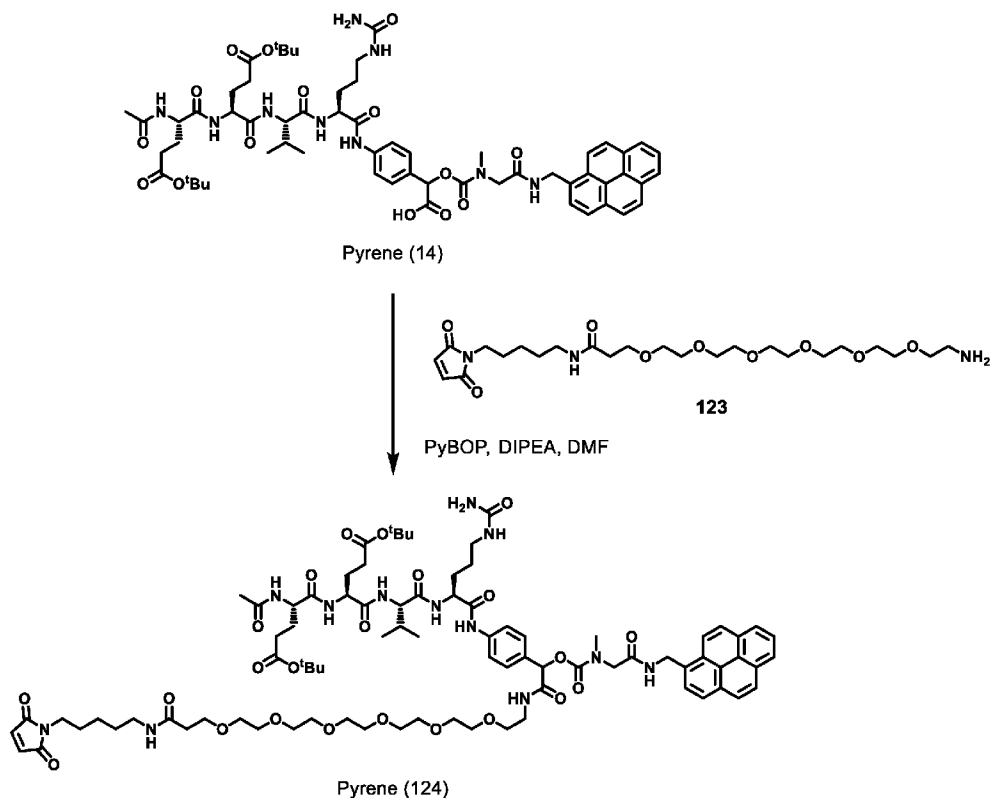


[0872] 化合物（122）（82.0mg, 133 μ mol）をジクロロメタン（13.3mL）、トリフルオロ酢酸（6.64mL）に溶解させ、室温にて30分間攪拌した。反応終了後、減圧濃縮によってジクロロメタンおよびトリフルオロ酢酸を除去し、上記化合物（123）（71.8mg, quant）を得た。

[0873] MS（ESI）m/z：518.40 [M+H]⁺

[0874] （19-15-3）ピレン（124）の合成

[化263]

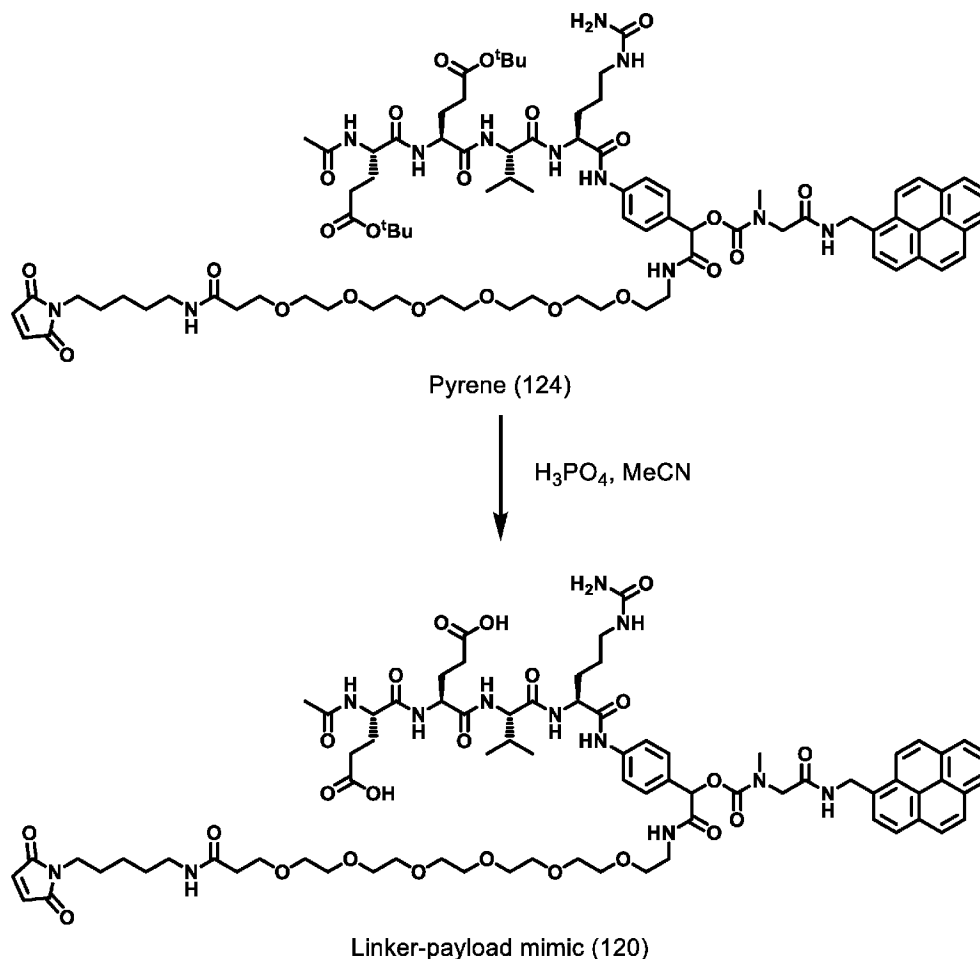


[0875] ピレン (14) (16.0 mg, 14.0 μmol) をN, N-ジメチルホルムアミド (690 μL) に溶解させたのち氷冷し、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (9.3 μL , 55.0 μmol)、1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート (11 mg, 21.0 μmol) を加えた。次にPEG6 (11.0 mg, 21.0 μmol) を加えて室温に戻し2時間半攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、ピレン (124) (11.2 mg, 6.73 μmol) を得た。

[0876] MS (ESI) m/z : 1664.80 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0877] (19-15-4) Linker-payload mimic (120) の合成

[化264]



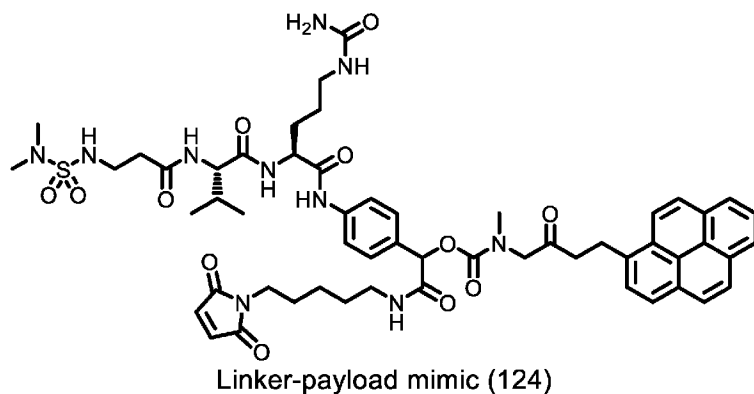
[0878] ピレン (124) (5.0 mg, 3.0 μ mol) にアセトニトリル (200 μ L) を加え、氷冷下で85%リン酸溶液 (60.0 μ L, 880 μ mol) を加え、室温で25時間攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、Linker-payload mimic (120) (2.4 mg, 1.5 μ mol) を得た。

[0879] MS (ESI) m/z : 1552.65 [M+H]⁺

[0880] (19-16) Linker-payload mimic (124) の合成

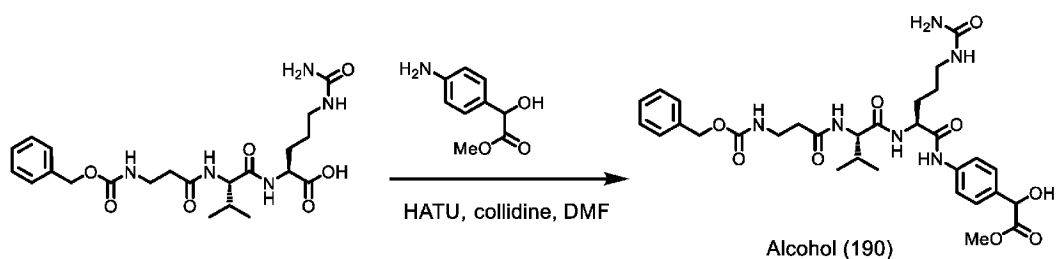
Linker-payload mimic (124) は下記のように合成した。

[化265]



[0881] (19-16-1) アルコール (190) の合成

[化266]

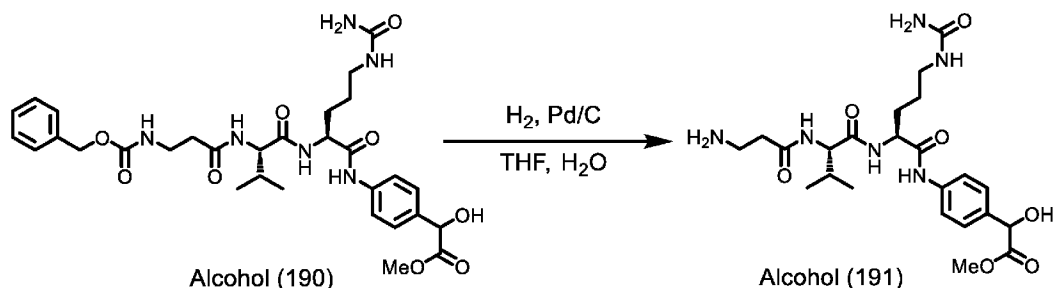


[0882] Cbz-βAla-Val-Cit-OH (30.8 mg, 64.2 μmol) をN, N-ジメチルホルムアミド (313 μL) に溶解させ、1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1,2,3, トリアゾロ[4,5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロホスファート (29.3 mg, 77.1 μmol)、2,4,6-トリメチルピリジン (10.2 μL, 77.1 μmol) を加え、室温にて10分間攪拌した。続いて、4-アミノマンデル酸メチル (14.0 mg, 77.1 μmol) を加えて室温にて17.5時間攪拌した後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記アルコール (190) (32.0 mg, 49.8 μmol) を得た。

[0883] MS (ESI) m/z : 643.30 [M+H]⁺

[0884] (19-16-2) アルコール (191) の合成

[化267]

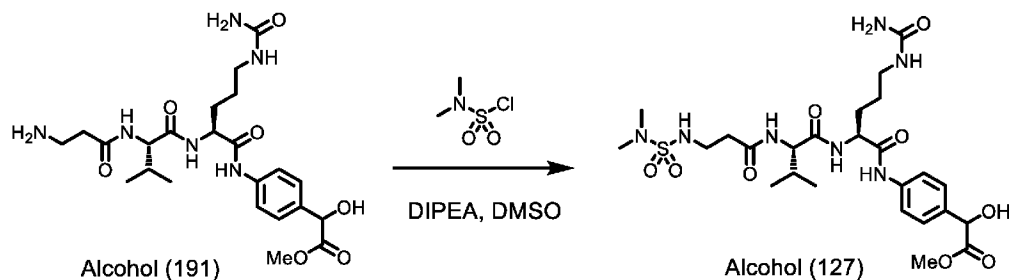


[0885] アルコール (190) (135.7 mg, 211 μmol) を THF (5.3 mL)、水 (5.3 mL) に溶解させ、5%パラジウム炭素 (9.6 mg, 2.1 μmol) を加え、水素置換後、室温にて5時間攪拌した。反応後、濾過して個体を取り除き、水で洗い凍結乾燥することにより、アルコール (191) (105.5 mg, 207 μmol) を得た。

[0886] MS (ESI) m/z : 509.25 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0887] (19-16-3) アルコール (127) の合成

[化268]

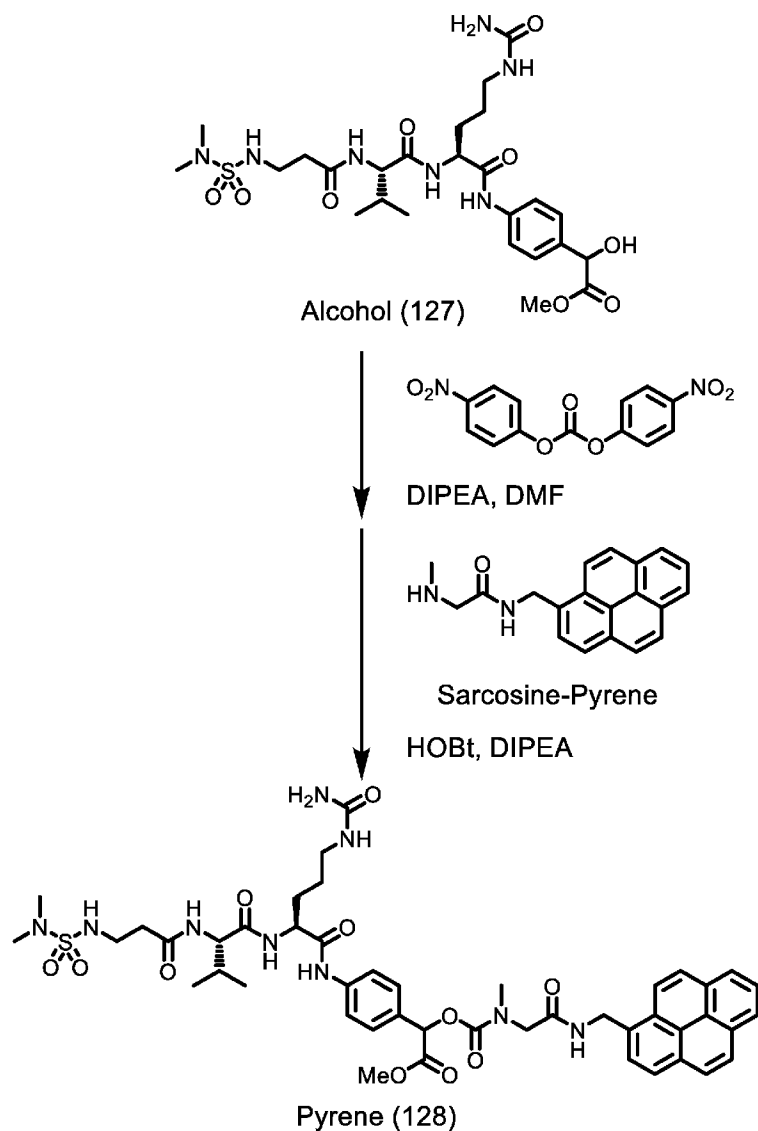


[0888] アルコール (191) (104.3 mg, 205 μmol) をジメチルスルホキシド (2.05 mL) に溶解させ、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (105 μL , 615 μmol)、ジメチルスルファモイルクロリド (32.7 μL , 308 μmol) を加え、室温にて1時間攪拌した。反応後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、アルコール (127) (76.4 mg, 124 μmol) を得た。

[0889] MS (ESI) m/z : 616.40 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0890] (19-16-4) ピレン (128) の合成

[化269]



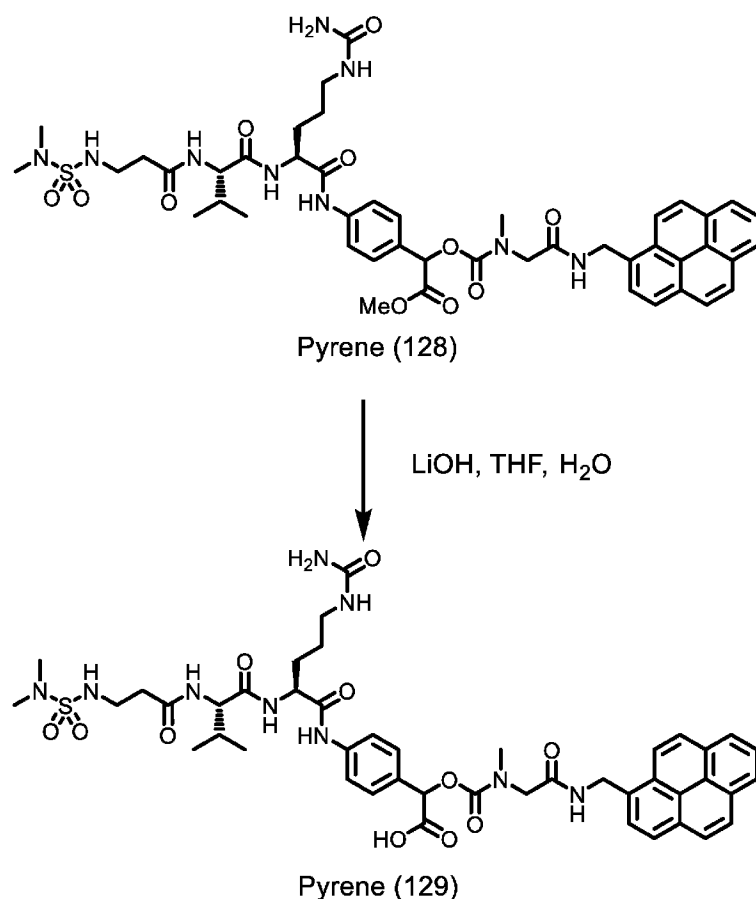
[0891] アルコール (127) (7.2 mg, 11.7 μmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (117 μL) に溶解させ、氷冷下5分間攪拌した後、炭酸ビス(4-ニトロフェニル) (10.7 mg, 35.1 μmol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (4.5 μL , 26.3 μmol) を加え、室温にて1時間攪拌した。その後、氷冷し、Sarcosine-Pyrene (10.6 mg, 35.1 μmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (2.4 mg, 17.6 μmol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (7.5 μL , 43.9 μmol) を加え、室温にて1時間攪拌した。

反応後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、ピレン (128) (7.5 mg, 7.9 μmol) を得た。

[0892] MS (ESI) m/z : 944.60 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0893] (19-16-5) ピレン (129) の合成

[化270]



[0894] ピレン (128) (29.0 mg, 30.7 μmol) をテトラヒドロフラン (2.33 mL)、水 (775 μL) に溶解させ、氷冷下5分間攪拌した後、1 M水酸化リチウム水溶液 (73.7 μL , 73.7 μmol) を加え、室温にて2.5時間攪拌した。反応終了後、1 M塩酸を用いて約 pH 6 に調整し、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、ピレン (129) (26.1 mg, 28.1 μmol)

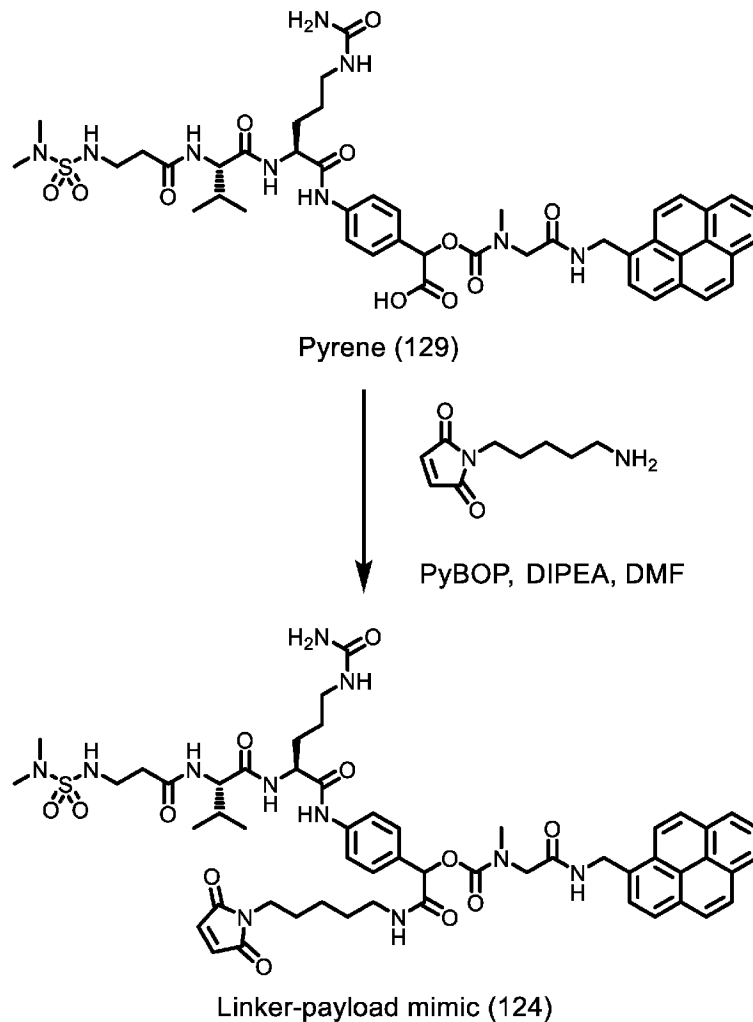
1) を得た。

[0895] MS (ESI) m/z : 930.40 $[M+H]^+$

[0896] (19-16-6) Linker-payload mimic (124)

の合成

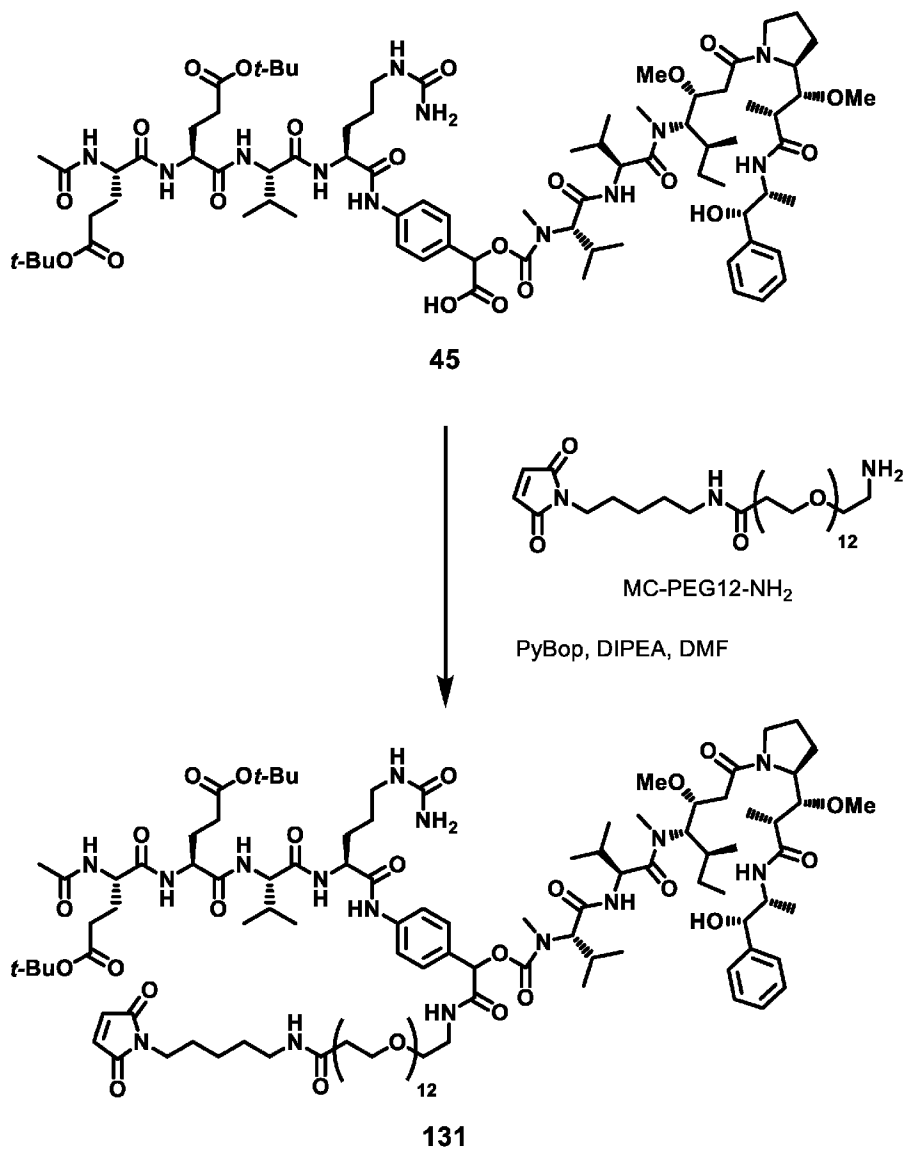
[化271]



[0897] ピレン (129) (12.9 mg, 13.9 μmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (278 μL) に溶解させたのち氷冷し、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (4.7 μL , 27.8 μmol)、1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート (10.8 mg, 20.8 μmol) を加えた。次に N-(5-アミノペンチル) マレイミド塩酸塩 (4.5 mg, 20.8 μmol) を加えて室温に戻し2時間攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーに

[0899] (19-17-1) 化合物 (131) の合成

[化273]

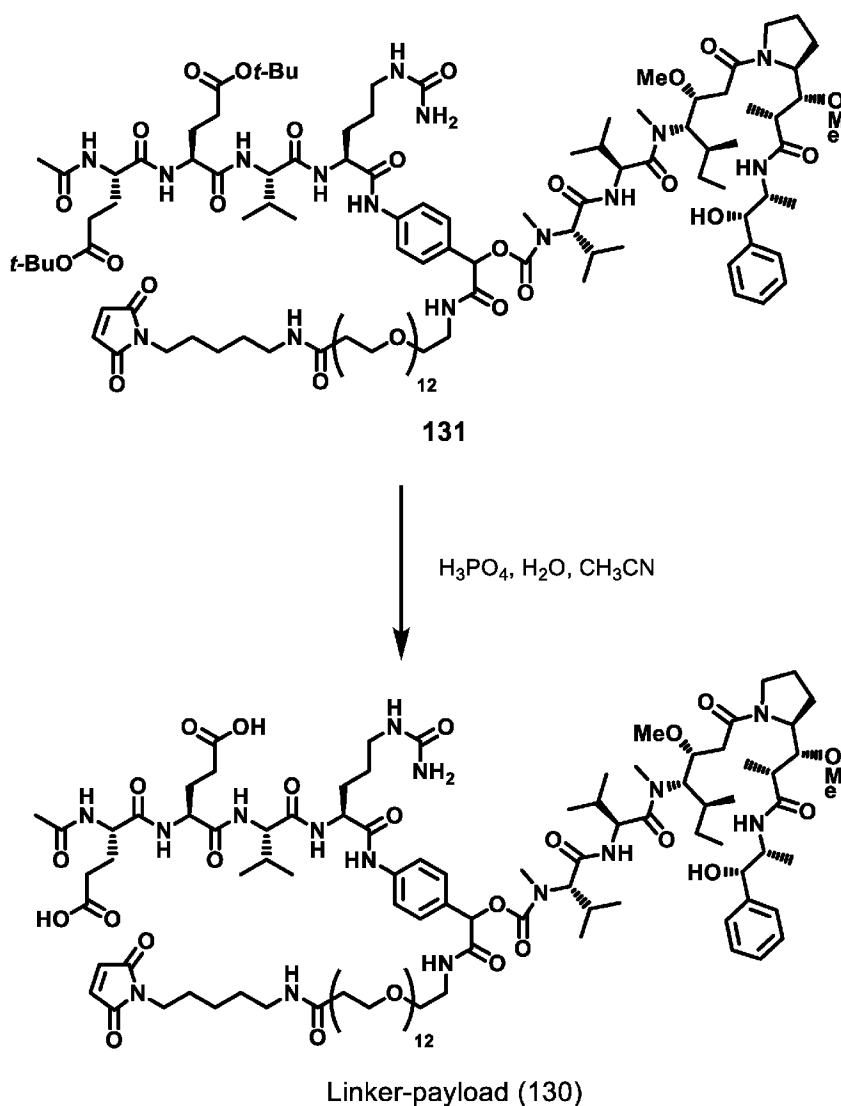


[0900] 化合物(45)(50.0mg, 31.6 μ mol)をN,N-ジメチルホルムアミド(1000 μ L)に溶解させ、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(28mg, 160 μ mol)、1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート(32.9mg, 63 μ mol)を加えた。次にMC-PEG12-NH₂(56.0mg, 63 μ mol)を加えて室温で終夜攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、化合物(131)(51.0mg, 21.8 μ mol)を得た。

[0901] MS (ESI) m/z : 2344.43 $[M+H]^+$

[0902] (19-17-2) Linker-payload (130) の合成

[化274]



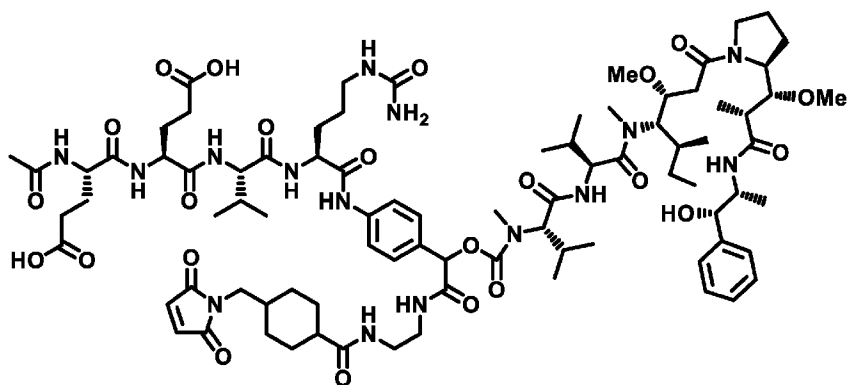
[0903] 化合物 (131) (51.0 mg, 21.8 μmol) にアセトニトリル (1000 μL) を加え、氷冷下で85%リン酸溶液 (1000 μL) を加え、室温で終夜攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、Linker-payload (130) (29.0 mg, 13.0 μmol) を得た。

[0904] MS (ESI) m/z : 2231.35 $[M+H]^+$

(19-18) Linker-payload (132) の合成

Linker-payload (132) は下記のように合成した。

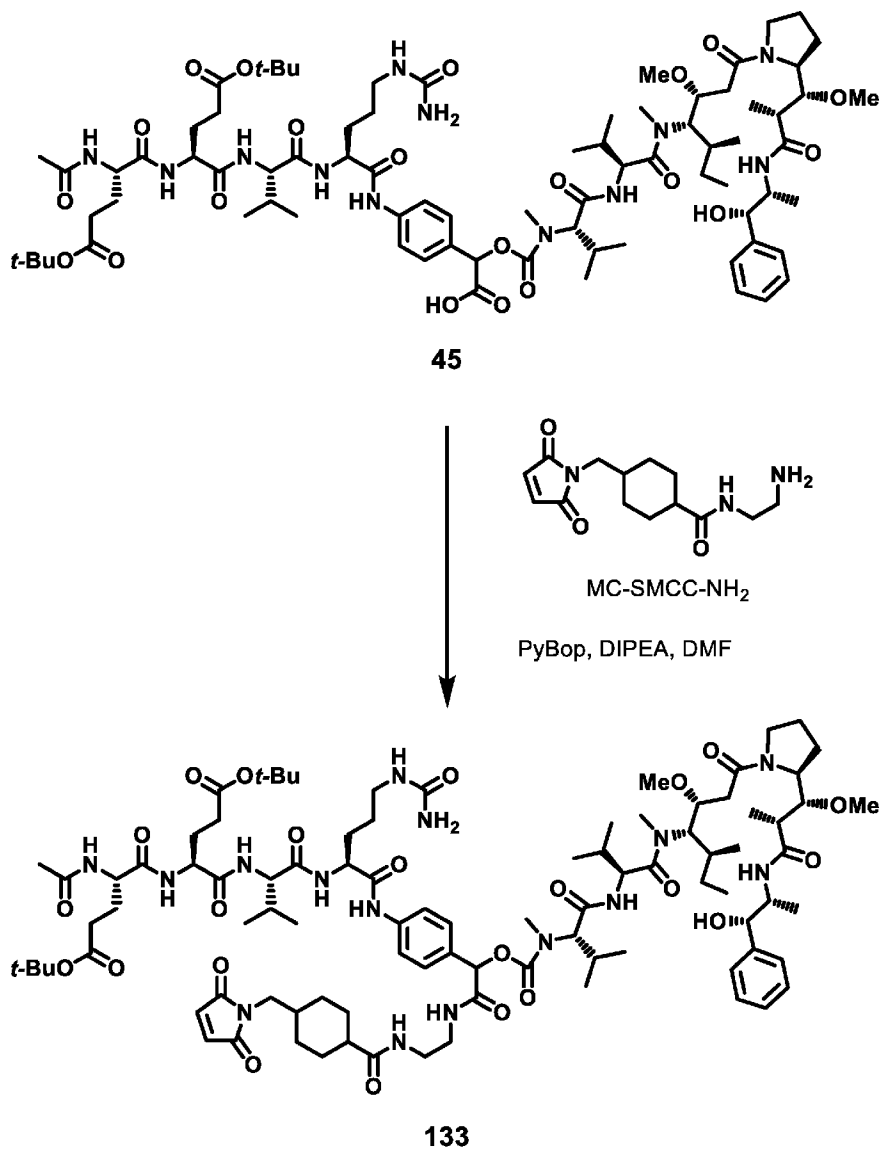
[化275]



Linker-payload (132)

[0905] (19-18-1) 化合物 (133) の合成

[化276]

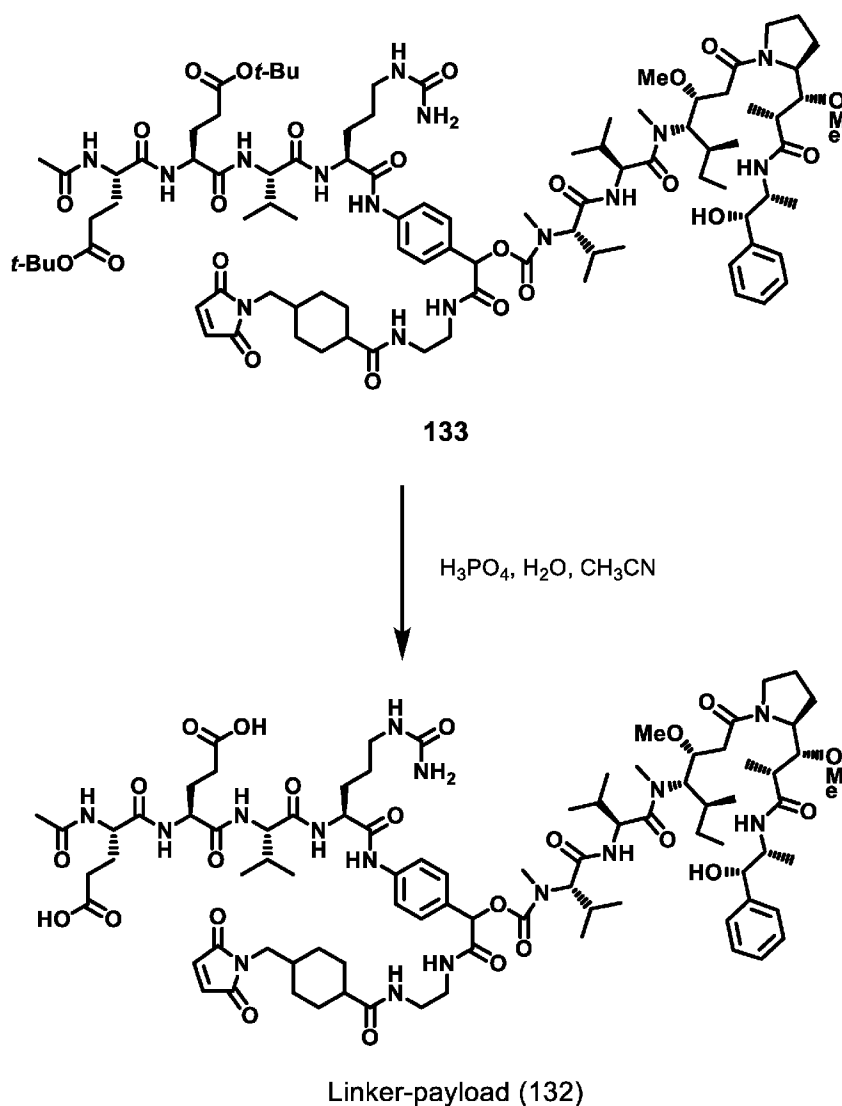


[0906] 化合物 (45) (50.0 mg, 31.6 μmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (1000 μL) に溶解させ、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (29 μL , 160 μmol)、1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート (32.8 mg, 63 μmol) を加えた。次に MC-SMCC-NH₂ (35.3 mg, 63 μmol) を加えて室温で終夜攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、化合物 (133) (23.0 mg, 12.5 μmol) を得た。

[0907] MS (ESI) m/z : 1841.98 $[M+H]^+$

[0908] (19-18-2) Linker-payload (132) の合成

[化277]



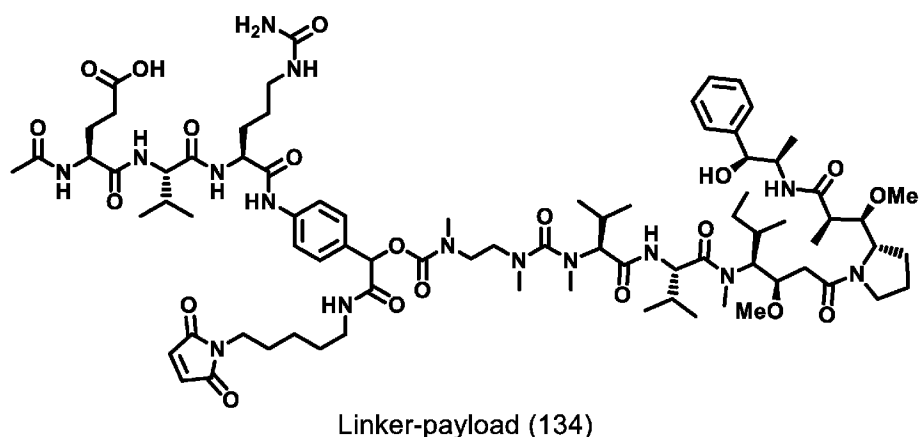
[0909] 化合物 (133) (23.0 mg, 12.5 μ mol) にアセトニトリル (1000 μ L) を加え、氷冷下で85%リン酸溶液 (1000 μ L) を加え、室温で終夜攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、Linker-payload (132) (15.0 mg, 8.7 μ mol) を得た。

[0910] MS (ESI) m/z : 1729.02 $[M+H]^+$

(19-19) Linker-payload (134) の合成

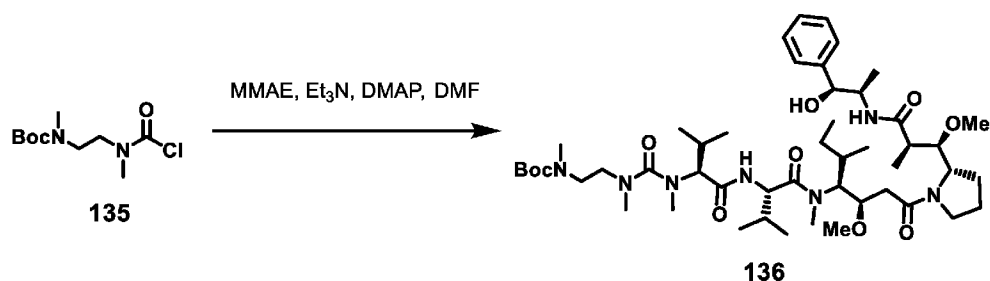
Linker-payload (134) は下記のように合成した。

[化278]



[0911] (19-19-1) 化合物 (136) の合成

[化279]

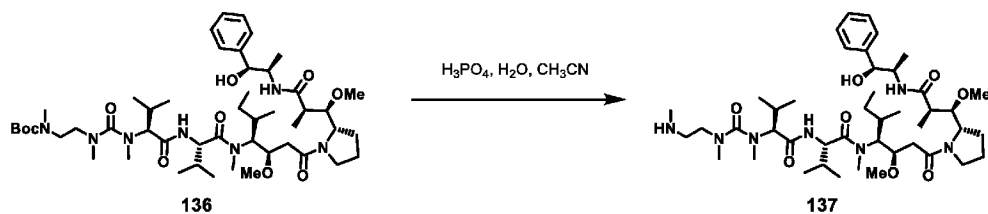


[0912] MMAE (106 mg, 0.084 mmol)、DMAP (2.0 mg, 0.016 mmol) をN, N-ジメチルホルムアミド (1 mL) に溶解させたのち、トリエチルアミン (75 mg, 0.742 mmol) を室温で加えた。次に化合物 (135) (74 mg, 0.285 mmol) を加え、室温で終夜撹拌した。続いて、化合物 (135) (74 mg, 0.285 mmol) を24時間後に加え、さらに化合物 (135) (74 mg, 0.285 mmol) を24時間後に加えた。反応溶液を減圧濃縮し、残渣を逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、化合物 (136) (26.0 mg, 27.9 μmol) を得た。

[0913] MS (ESI) m/z : 932.73 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0914] (19-19-2) 化合物 (137) の合成

[化280]

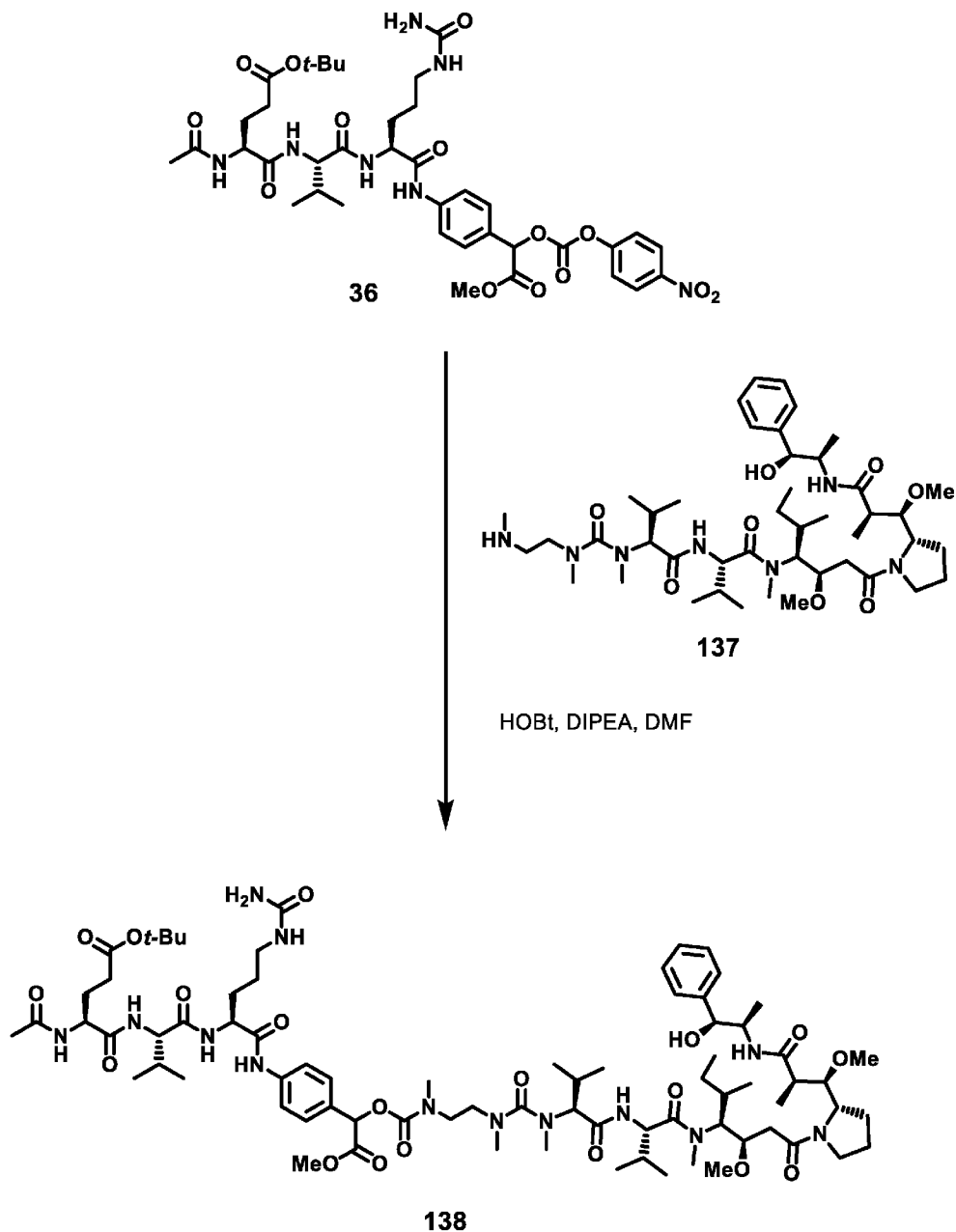


化合物(136)(32.5mg, 35μmol)にアセトニトリル(1000μL)を加え、氷冷下で85%リン酸溶液(1000μL, 880μmol)を加え、室温で2時間攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、化合物(137)(22.0mg, 26.5μmol)を得た。

[0915] MS (ESI) m/z : 832.39 $[M+H]^+$

[0916] (19-19-3) 化合物 (138) の合成

[化281]

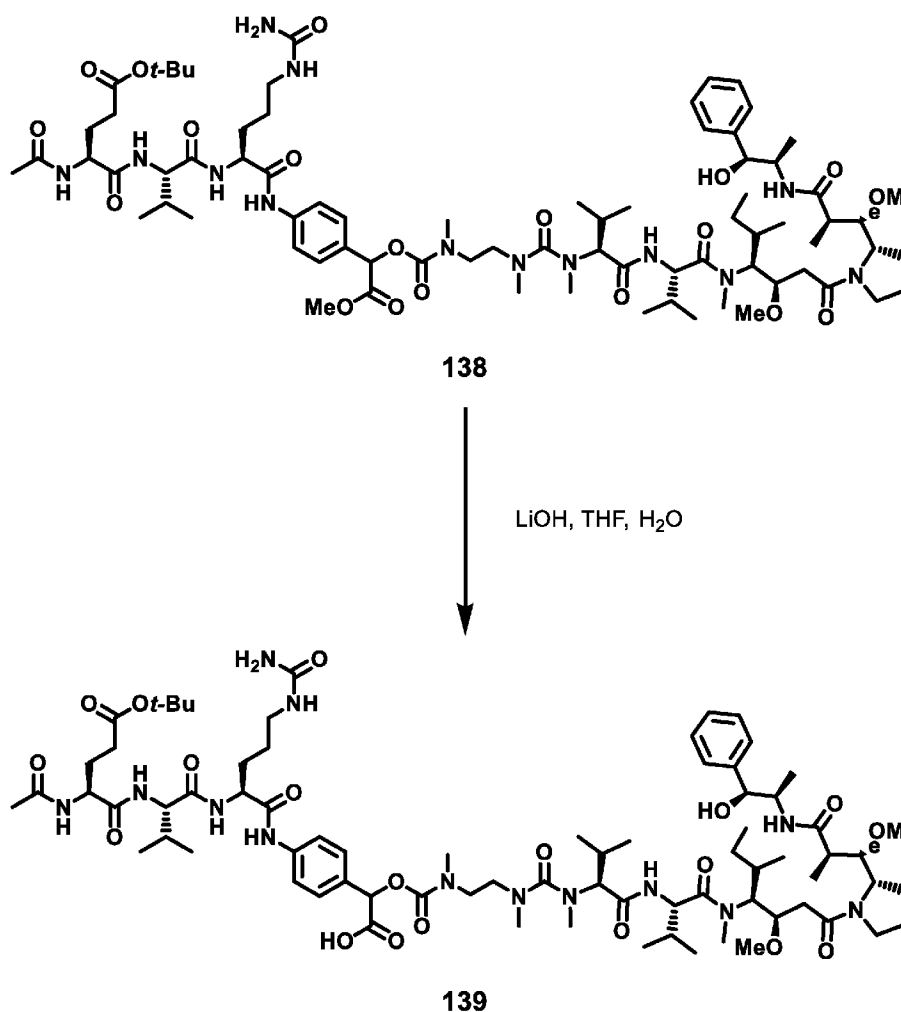


[0917] 化合物 (36) (18.0 mg, 22 μ mol)、化合物 (137) (16.0 mg, 18 μ mol)、HOBt (4.0 mg, 27 μ mol) を DMF (1 mL) に室温で溶解させた。反応液に DIPEA (12.0 mg, 93 μ mol) を加え、室温で1時間攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、化合物 (138) (22.0 mg, 14.4 μ mol) を得た。

[0918] MS (ESI) m/z : 1523.60 $[M+H]^+$

[0919] (19-19-4) 化合物 (139) の合成

[化282]

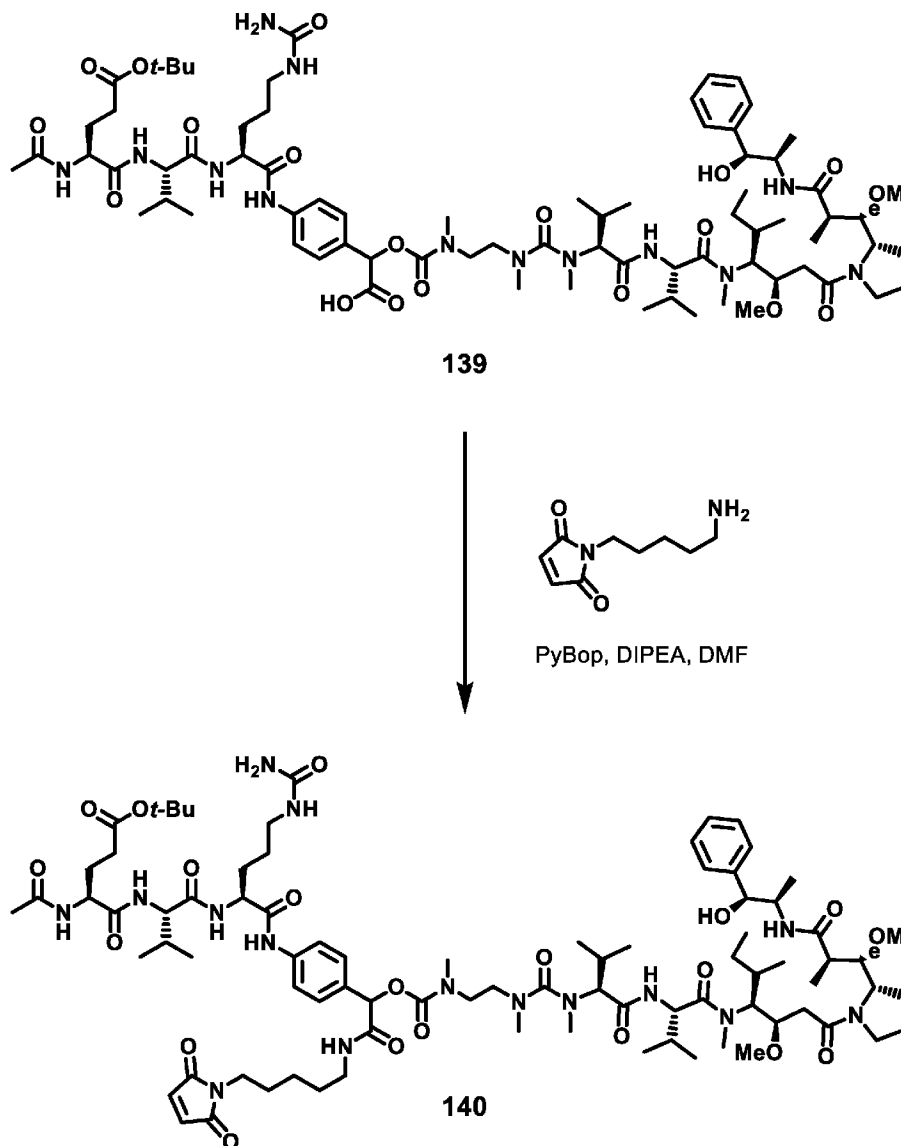


[0920] 化合物 (138) (22 mg, 14 μmol) をテトラヒドロフラン (1.6 mL)、水 (0.4 mL) に溶解させ、氷冷下 10 分間攪拌した後、水酸化リチウム (0.35 mg, 14 μmol) を加え、室温にて 10 時間攪拌した。反応終了後、ギ酸を用いて約 pH 7 に調整し、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、化合物 (139) (14.5 mg, 9.6 μmol) を得た。

[0921] MS (ESI) m/z : 1508.47 $[M+H]^+$

[0922] (19-19-5) 化合物 (140) の合成

[化283]

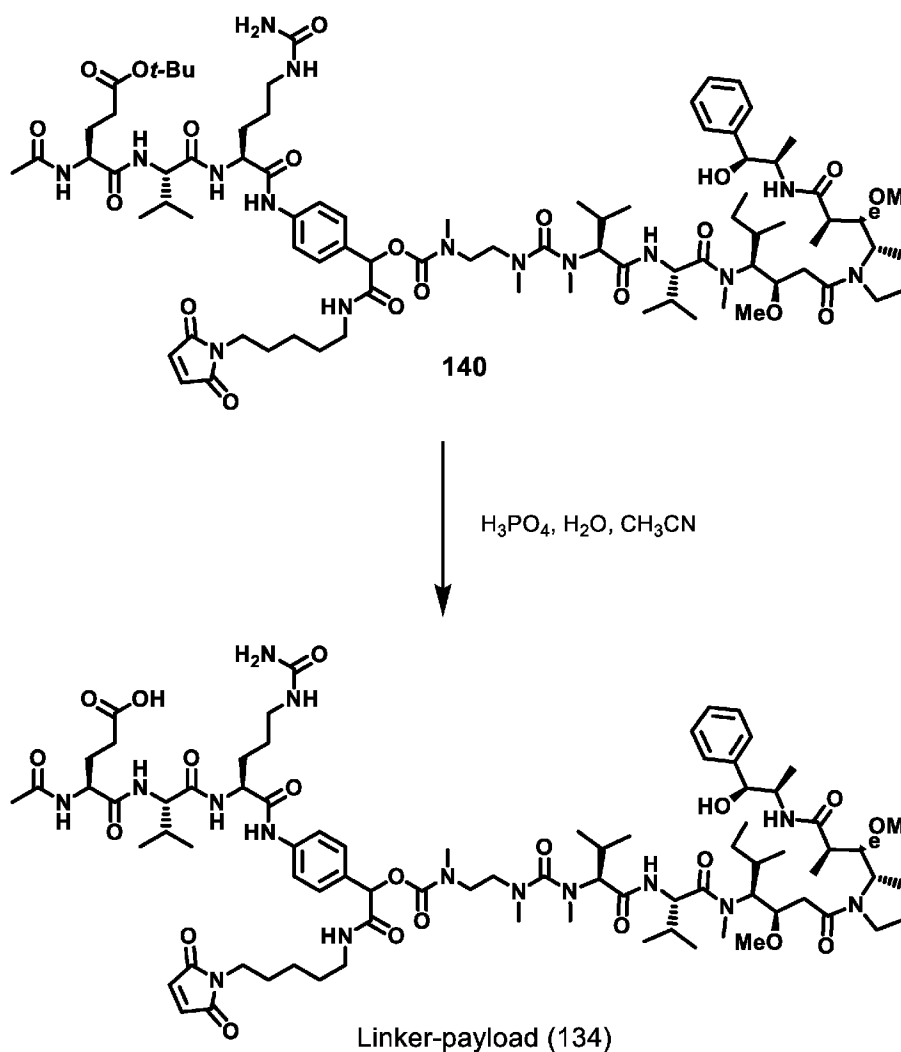


[0923] 化合物（139）（14.5 mg, 9.6 μmol ）をN, N-ジメチルホルムアミド（1 mL）に溶解させ、N, N-ジイソプロピルエチルアミン（7.0 μL , 38 μmol ）、1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート（10.0 mg, 19 μmol ）を加えた。次にN-（5-アミノペンチル）マレイミド塩酸塩（4.2 mg, 19 μmol ）を加えて室温で1時間攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、化合物（140）（15.0 mg, 9.0 μmol ）を得た。

[0924] MS (ESI) m/z : 1673.74 $[M+H]^+$

[0925] (19-19-6) Linker-payload (134) の合成

[化284]



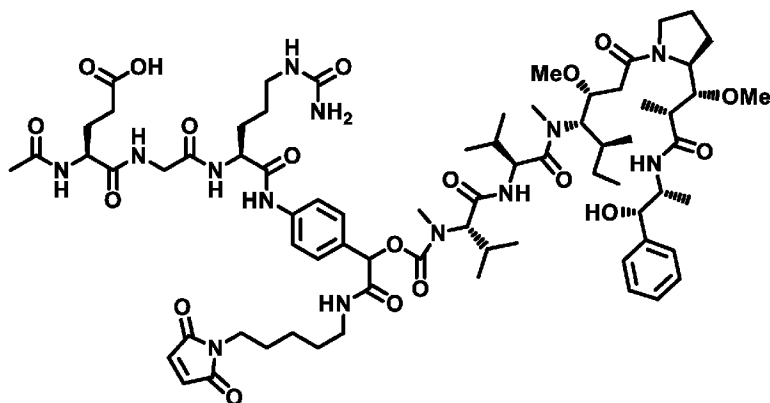
[0926] 化合物 (140) (15.0 mg, 9.0 μmol) にアセトニトリル (0.4 mL) を加え、氷冷下で85%リン酸溶液 (0.4 mL) を加え、室温で3時間攪拌した。そののち反応液を逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、Linker-payload (134) (1.7 mg, 1.1 μmol) を得た。

[0927] MS (ESI) m/z : 1617.58 $[M+H]^+$

[0928] (19-20) Linker-payload (141) の合成

Linker-payload (141) は下記のように合成した。

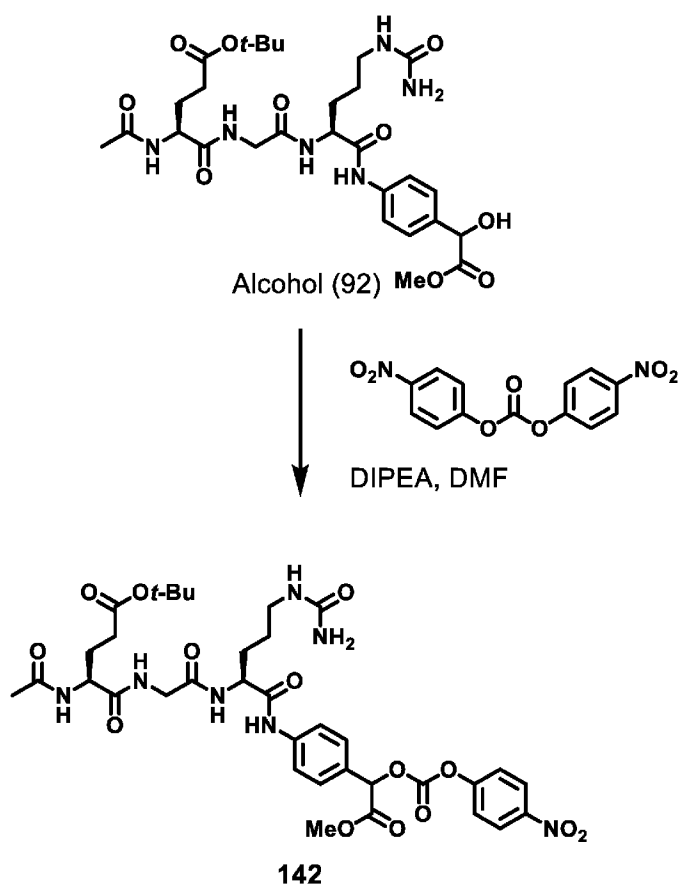
[化285]



Linker-payload (141)

[0929] (19-20-1) 化合物 (142) の合成

[化286]



[0930] アルコール (92) (95 mg, 150 μ mol)、炭酸ビス(4-ニトロフェニル) (116 mg, 380 μ mol)、N,N-ジイソプロピルエ

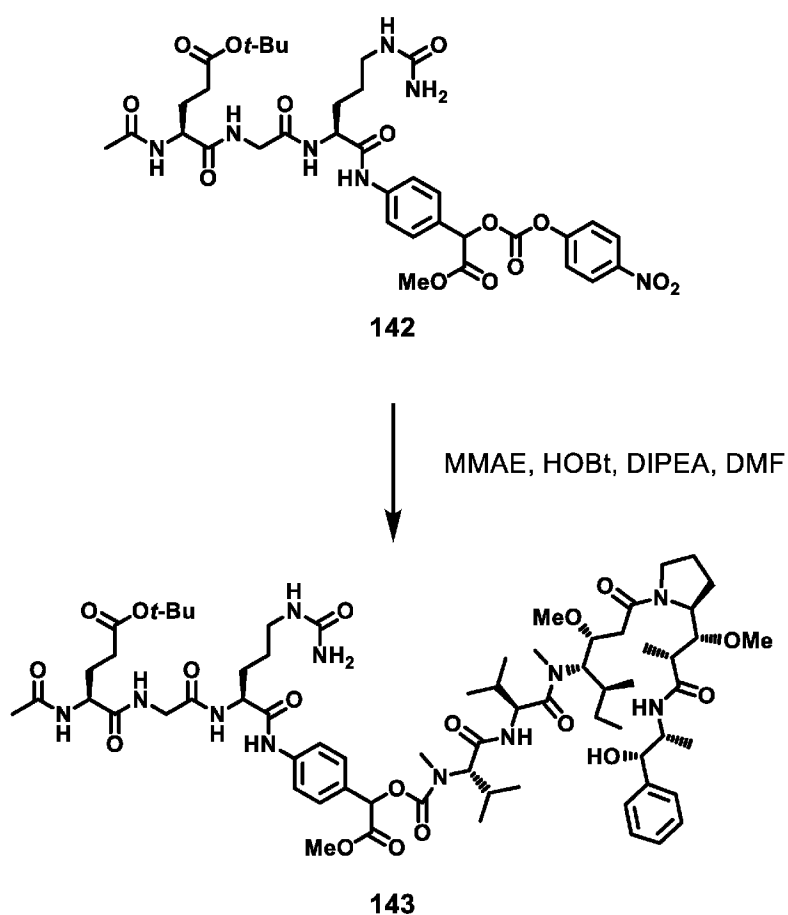
チルアミン (93 μ L, 530 μ mol) をN, N-ジメチルホルムアミド (2 mL) に溶解させ、室温にて終夜攪拌した。

反応終了後、順相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することにより、上記化合物 (142) (67 mg, 85 μ mol) を得た。

[0931] MS (ESI) m/z : 788.27 $[M+H]^+$

[0932] (19-20-2) 化合物 (143) の合成

[化287]



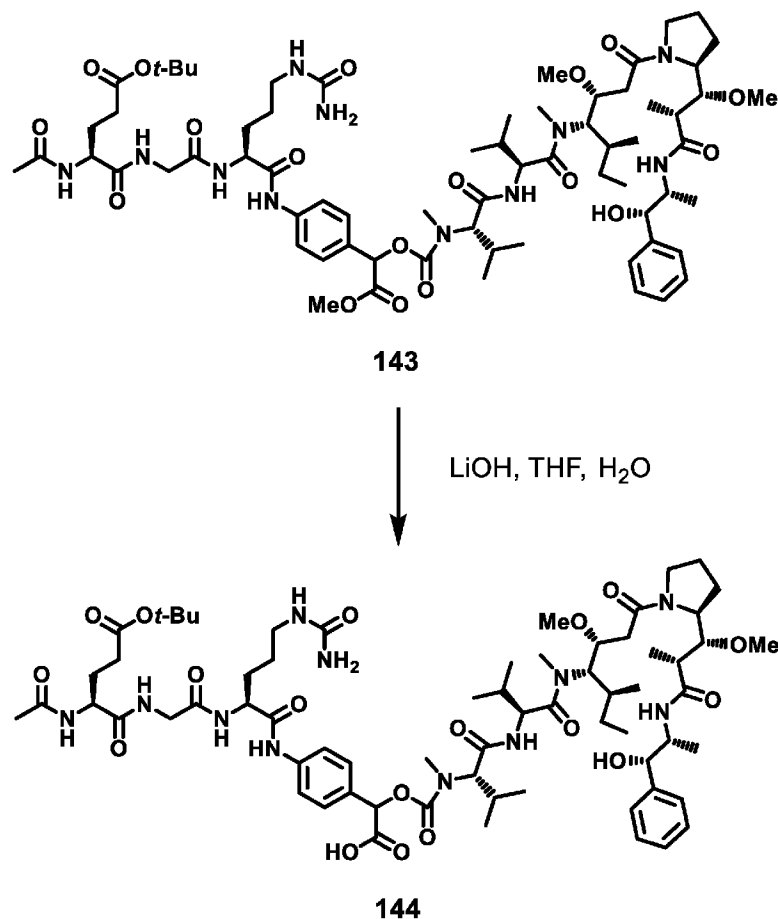
[0933] 化合物 (142) (70 mg, 80 μ mol)、MMAE (67 mg, 93 μ mol)、HOBt (18 mg, 132 μ mol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (77 μ L, 440 μ mol) をN, N-ジメチルホルムアミド (2 mL) に溶解させ、室温にて終夜攪拌した。反応終了後、順相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回

収し、減圧濃縮することにより、上記化合物（143）（96 mg, 70 μ mol）を得た。

[0934] MS (ESI) m/z : 1367.61 $[M+H]^+$

[0935] (19-20-3) 化合物（144）の合成

[化288]

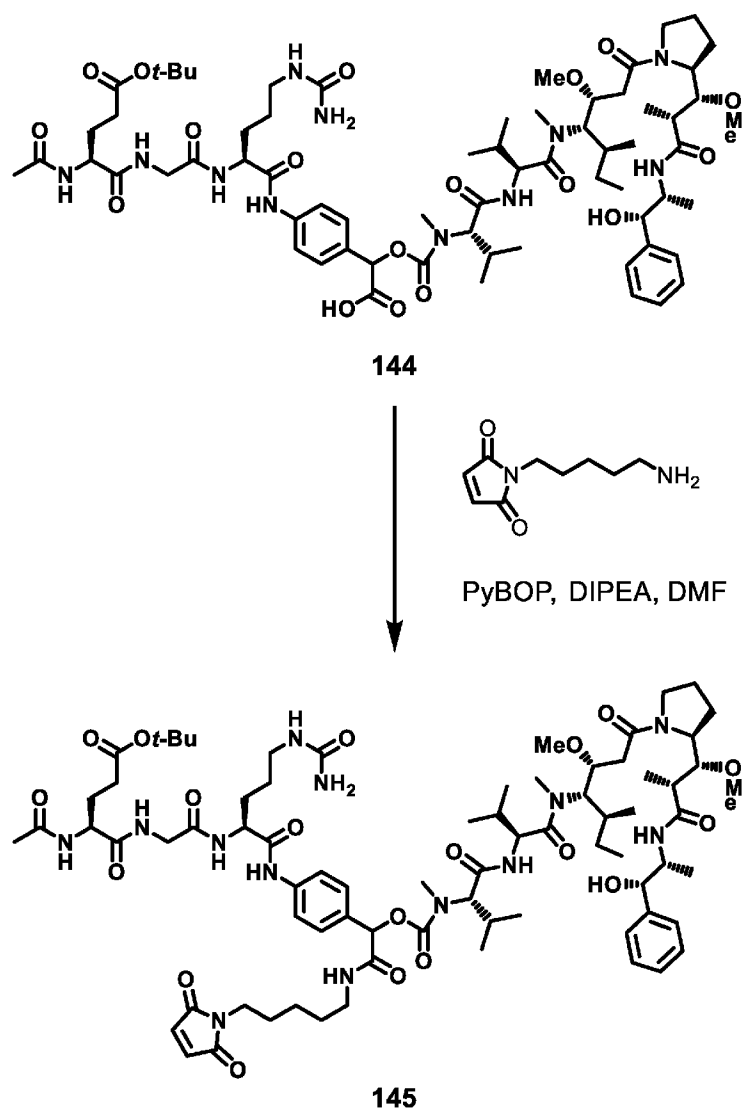


[0936] 化合物（143）（96 mg, 70 μ mol）をテトラヒドロフラン（1.0 mL）、水（0.3 mL）に溶解させ、氷冷下5分間攪拌した後、1 M水酸化リチウム水溶液（70 μ L, 70 μ mol）を加え、室温にて1時間攪拌した。1 M水酸化リチウム水溶液（35 μ L, 35 μ mol）をさらに加え、室温にて30分間攪拌した。反応終了後、ギ酸を用いて約pH 7に調整し、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、化合物（144）（57 mg, 42 μ mol）を得た。

[0937] MS (ESI) m/z : 1352.76 $[M+H]^+$

[0938] (19-20-4) 化合物 (145) の合成

[化289]



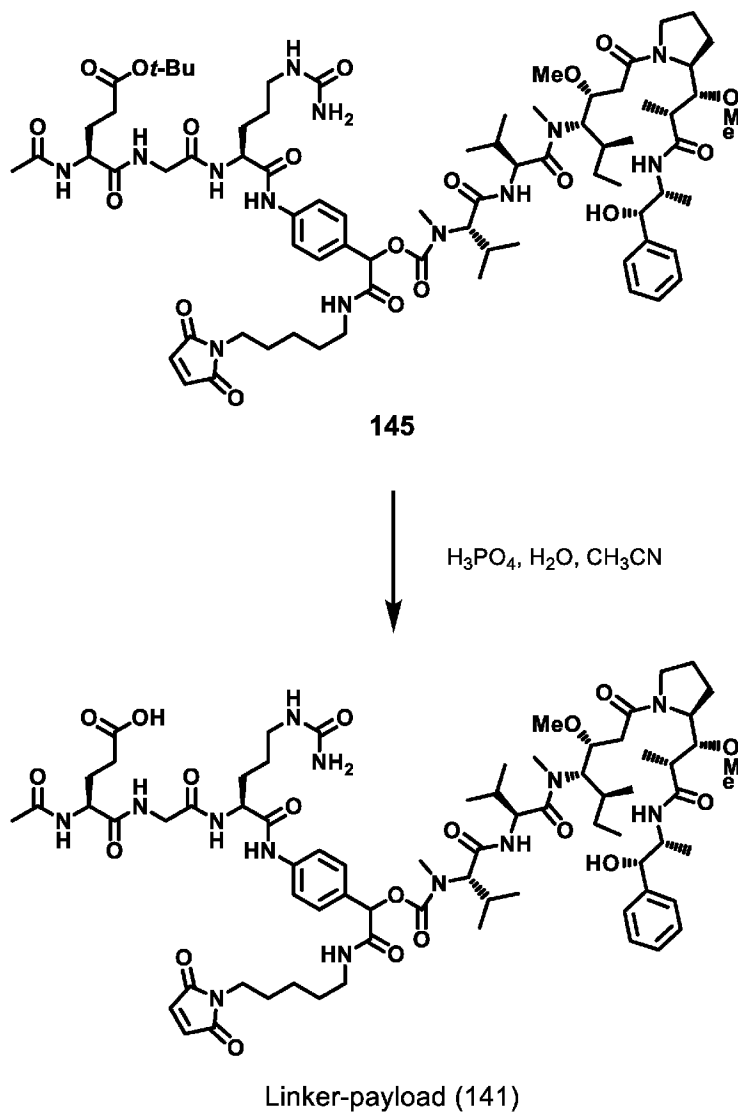
[0939] 化合物 (144) (57 mg, 42 μmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (1 mL) に溶解させたのち氷冷し、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (37 μL , 210 μmol)、1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート (44 mg, 84 μmol) を加えた。次に N-(5-アミノペンチル) マレイミド塩酸塩 (18.5 mg, 84 μmol) を加えて室温に戻し終夜攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれる

フラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、化合物 (145) (43 mg, 28 μ mol) を得た。

[0940] MS (ESI) m/z : 1516.65 [M+H]⁺

[0941] (19-20-5) Linker-payload (141) の合成

[化290]



[0942] 化合物 (145) (43 mg, 28 μ mol) にアセトニトリル (1 mL) を加え、氷冷下で85%リン酸溶液 (1 mL) を加え、室温で終夜撹拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、Linker-payload (141) (26 mg,

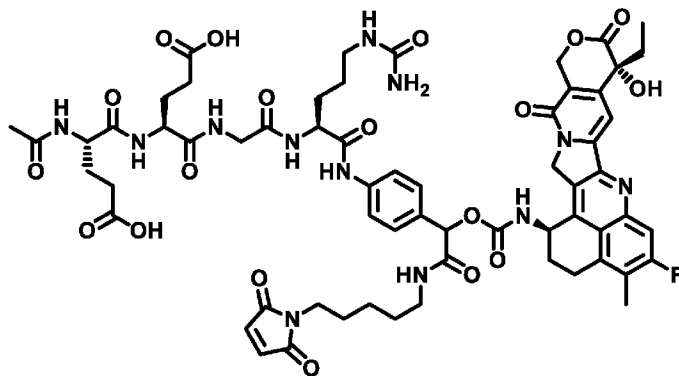
18 μmol)を得た。

[0943] MS (ESI) m/z : 1460.47 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0944] (19-21) Linker-payload (146) の合成

Linker-payload (146) は下記のように合成した。

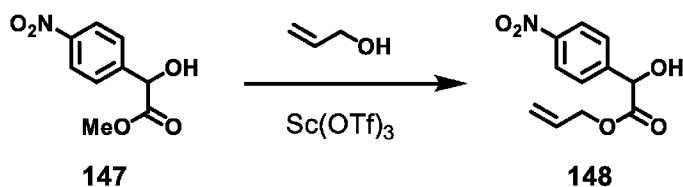
[化291]



Linker-payload (146)

[0945] (19-21-1) 化合物 (148) の合成

[化292]

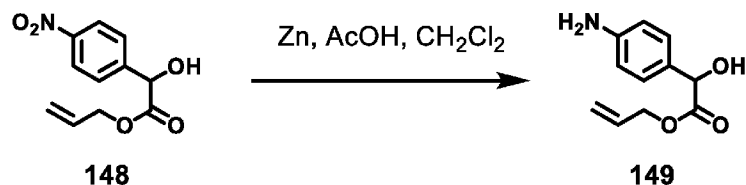


[0946] 化合物 (147) (CAS: 13305-09-4, 1.00 g, 4.74 mmol) をアリルアルコール (50 mL) に溶解させ、 $\text{Sc}(\text{OTf})_3$ (233 mg, 0.474 mmol) を加えた。反応溶液を120℃で3時間攪拌したのち、室温まで冷却し、シリカゲルでろ過を行った。ろ液を減圧濃縮し、残渣を順相分取クロマトグラフィー (ヘキサン: 酢酸エチル=4:1) にて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮し、化合物 (148) (793 mg, 3.34 mmol) を得た。

[0947] MS (ESI) m/z : 238.10 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0948] (19-21-2) 化合物 (149) の合成

[化293]

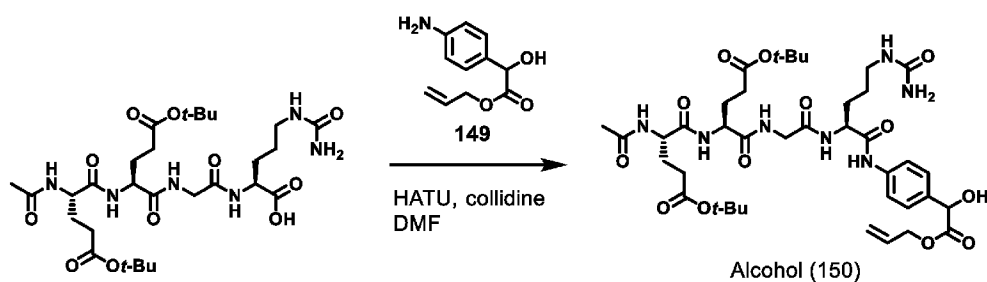


[0949] 化合物 (148) (793 mg, 3.34 mmol)、酢酸 (670 μ L, 11.7 mmol) にジクロロメタン (16.7 mL) を室温で加えたのち、亜鉛 (4.37 g, 66.9 mmol) を加え2時間攪拌した。反応溶液に水 (50 mL) を加え、ジエチルエーテルで抽出を行った。得られた有機層を飽和重曹水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥した。硫酸マグネシウムをろ取り、ろ液を減圧濃縮し、残渣を順相分取クロマトグラフィーにて精製した (ヘキサン : 酢酸エチル = 90 : 10 $\rightarrow$ 67 : 33 $\rightarrow$ 50 : 50)。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮することにより、化合物 (149) (546 mg, 2.63 mmol) を得た。

[0950] MS (ESI) m/z : 208.10 $[M+H]^+$

[0951] (19-21-3) 化合物 (150) の合成

[化294]



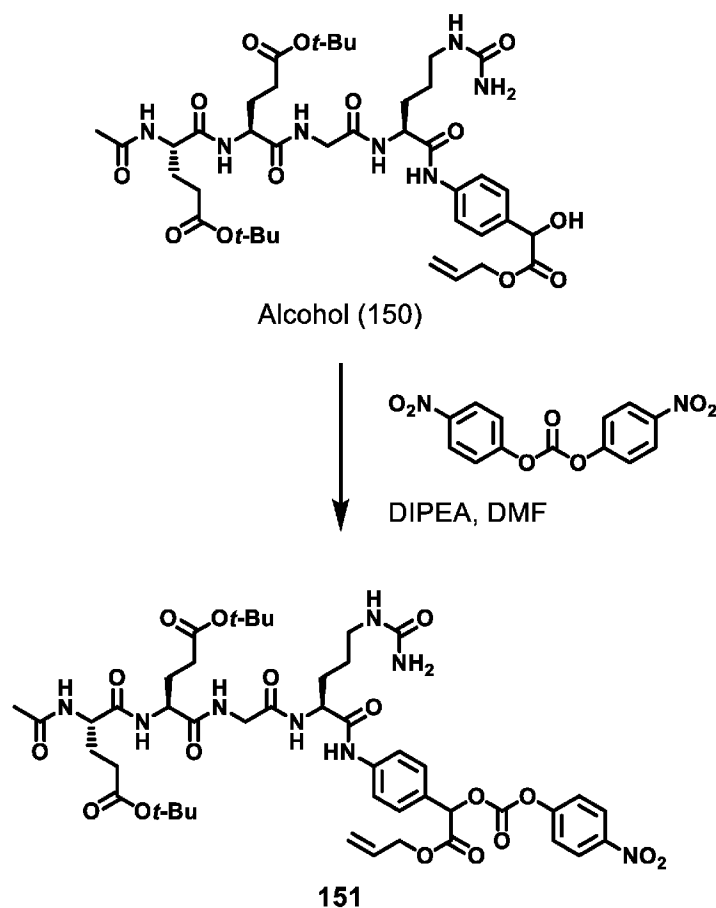
[0952] Ac-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Gly-Cit-OH (200 mg, 310 μ mol)、化合物 (149) (154 mg, 745 μ mol) をN, N-ジメチルホルムアミド (1.55 mL) に溶解させた。1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1,2,3,トリアゾロ[4,5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロホスファート (142 mg, 372 μ mol)、2,4,6-トリメチルピリジン (49 μ L, 372 μ mol) を加え室温で17時間攪拌したのち、逆相分取クロマ

トグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、アルコール (150) (133 mg, 159 μmol) を得た。

[0953] MS (ESI) m/z : 834.45 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0954] (19-21-4) 化合物 (151) の合成

[化295]

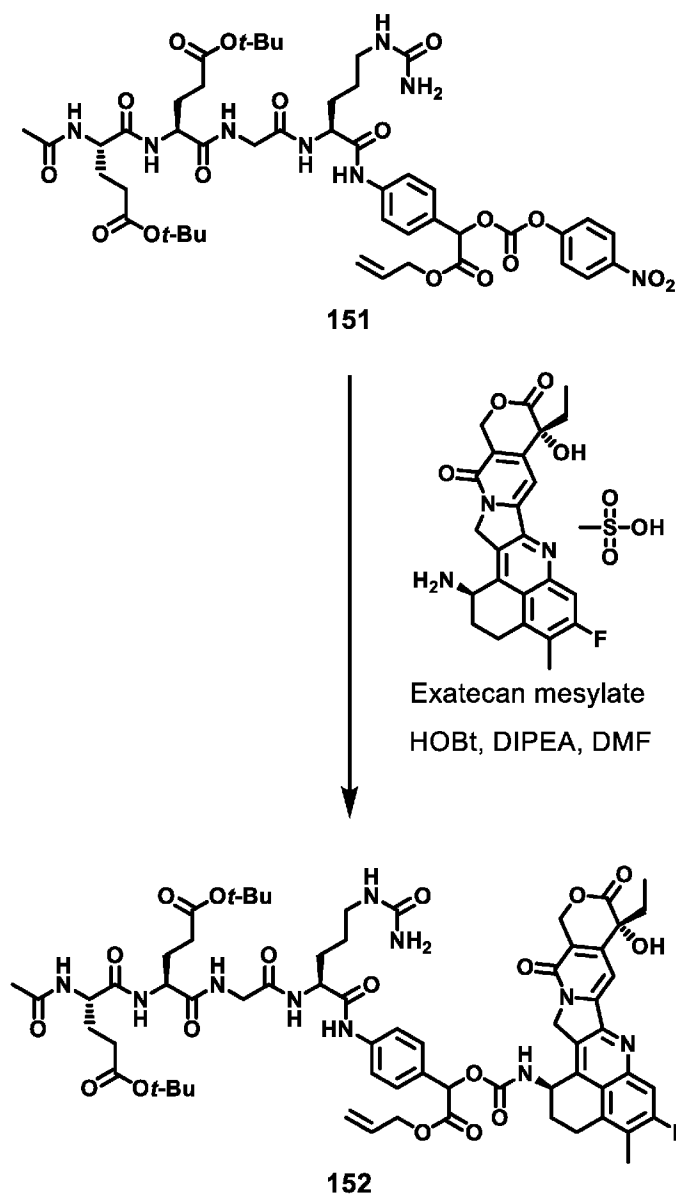


[0955] アルコール (150) (100 mg, 120 μmol)、炭酸ビス (4-ニトロフェニル) (78.5 mg, 258 μmol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (73 μL , 420 μmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (3.5 mL) に溶解させ、室温にて終夜攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、化合物 (151) (70.2 mg, 70.2 μmol) を得た。

[0956] MS (ESI) m/z : 999.49 $[M+H]^+$

[0957] (19-21-5) 化合物 (152) の合成

[化296]



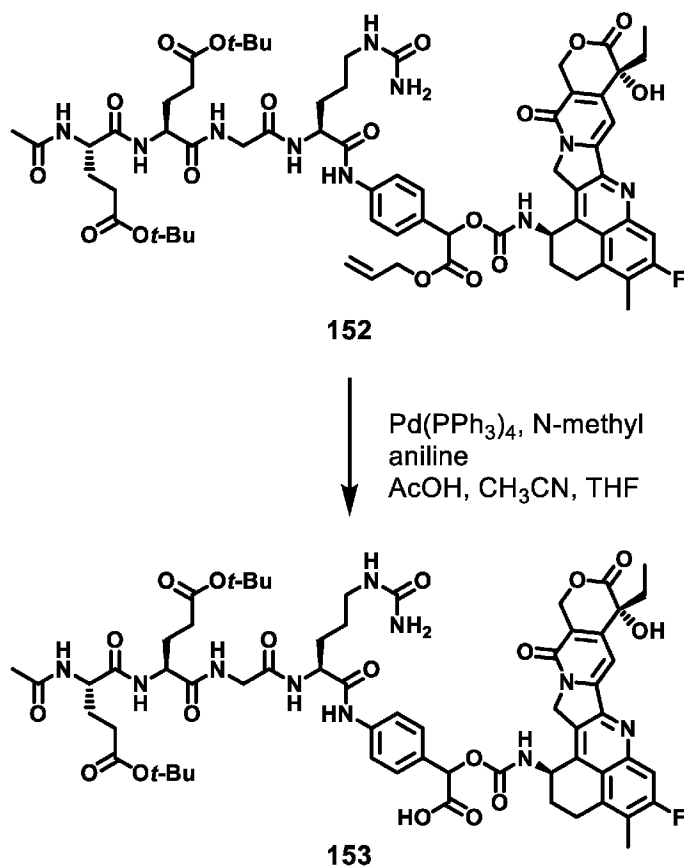
[0958] 化合物 (151) (70 mg, 80 μmol)、エキサテカンメシル酸塩 (39 mg, 74 μmol)、HOBt (16 mg, 120 μmol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (54 μL , 310 μmol) をN, N-ジメチルホルムアミド (2.5 mL) に溶解させ、室温にて2.5時間攪拌した。反応終了後、順相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することにより、上記化合物 (1

52) (80 mg, 62 μ mol) を得た。

[0959] MS (ESI) m/z : 1295.43 [M+H]⁺

[0960] (19-21-6) 化合物 (153) の合成

[化297]

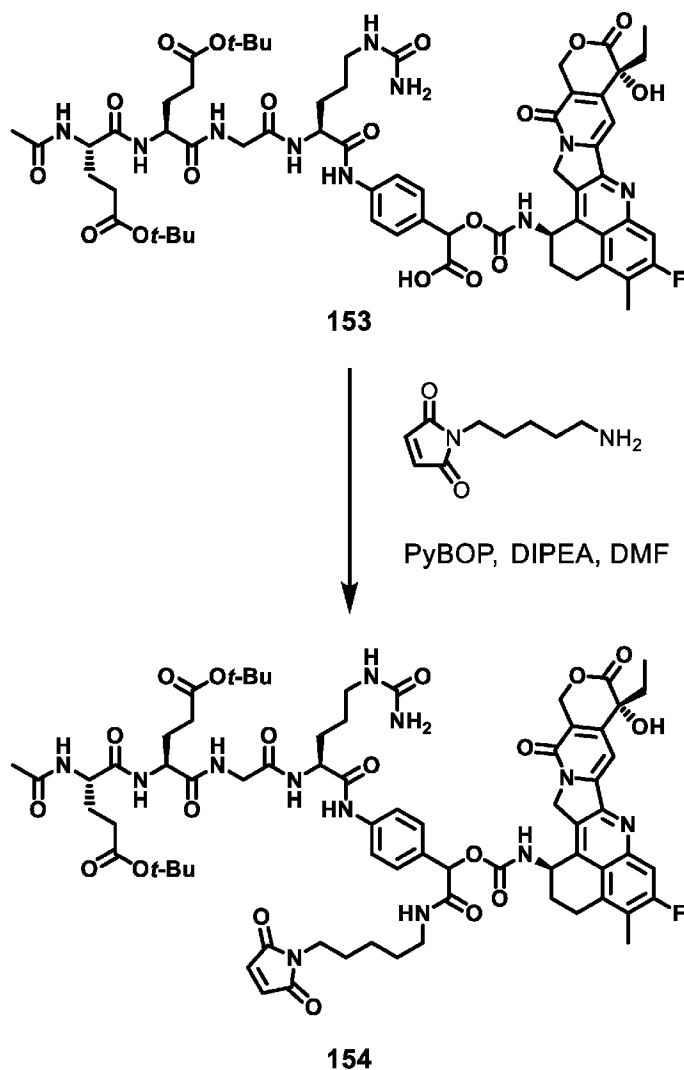


[0961] 化合物 (152) (80 mg, 62 μ mol) をテトラヒドロフラン (1.5 mL)、アセトニトリル (1.5 mL) に溶解させ、室温で10分間撹拌した。反応溶液に酢酸 (70 μ L, 620 μ mol)、N-メチルアニリン (106 μ L, 1.85 mmol)、Pd (PPh₃)₄ (3.6 mg, 3.1 μ mol) を加え、室温で25時間撹拌した。反応終了後、ギ酸を用いて約 pH 7 に調整し、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、化合物 (153) (54 mg, 43 μ mol) を得た。

[0962] MS (ESI) m/z : 1255.50 [M+H]⁺

[0963] (19-21-7) 化合物 (154) の合成

[化298]

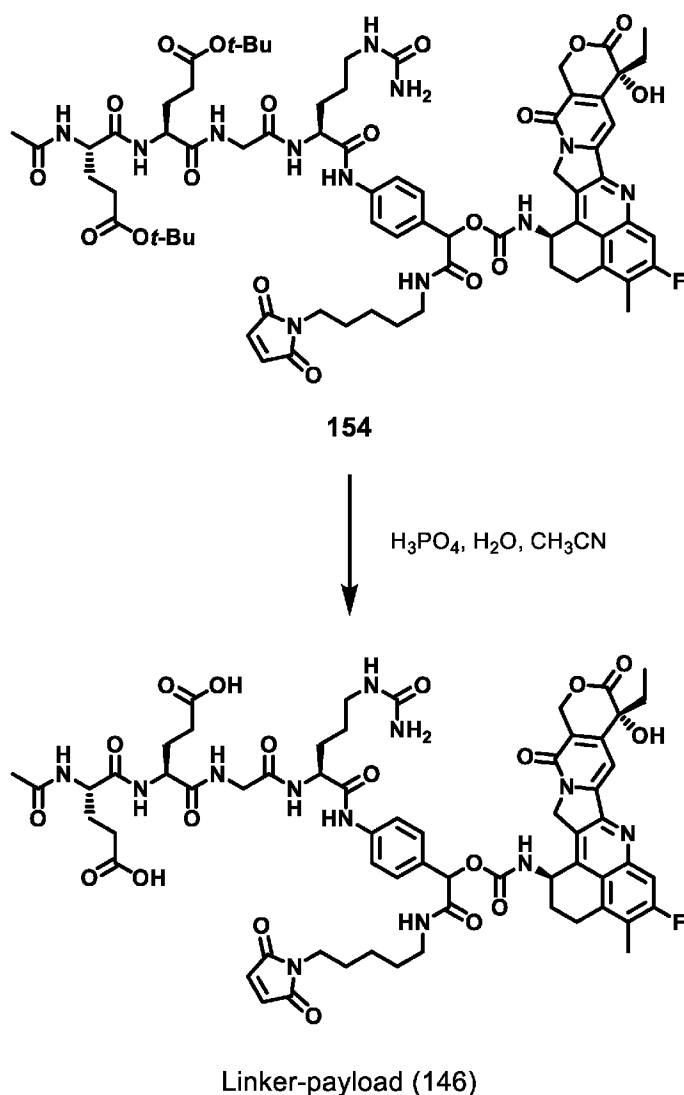


[0964] 化合物 (153) (54 mg, 43 μmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (2.5 mL) に溶解させたのち氷冷し、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (31 μL , 172 μmol)、1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート (45 mg, 86 μmol) を加えた。次に N-(5-アミノペンチル) マレイミド塩酸塩 (19 mg, 86 μmol) を加えて室温に戻し 1 時間攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、化合物 (154) (33 mg, 23 μmol) を得た。

[0965] MS (ESI) m/z : 1419.50 $[M+H]^+$

[0966] (19-21-8) Linker-payload (146) の合成

[化299]



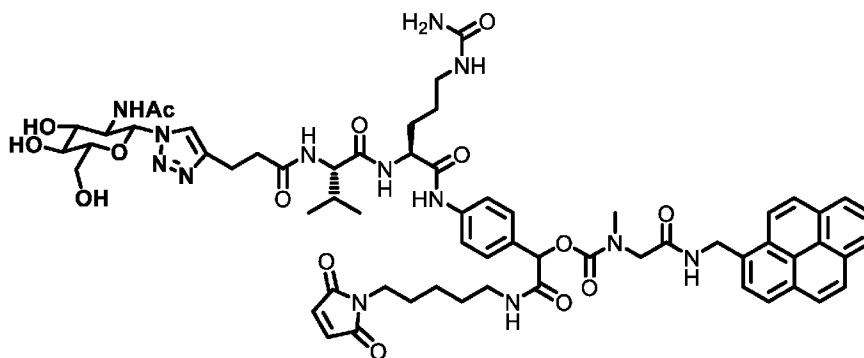
[0967] 化合物 (154) (33 mg, 23 μ mol) にアセトニトリル (0.7 mL) を加え、氷冷下で85%リン酸溶液 (0.7 mL) を加え、室温で6時間攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、Linker-payload (146) (20 mg, 15 μ mol) を得た。

[0968] MS (ESI) m/z : 1307.39 $[M+H]^+$

[0969] (19-22) Linker-payload mimic (155) の合成

Linker-payload mimic (155) は下記のように合成した。

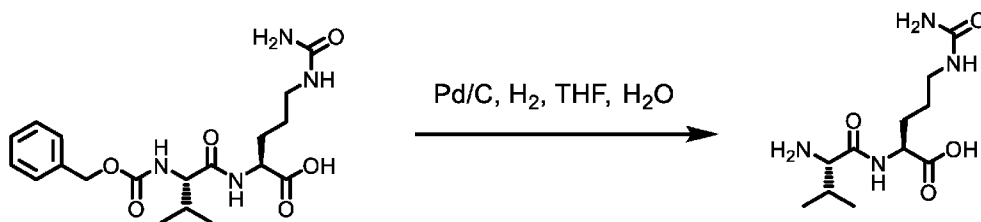
[化300]



Linker-payload mimic (155)

[0970] (19-22-1) H-Val-Cit-OHの合成

[化301]

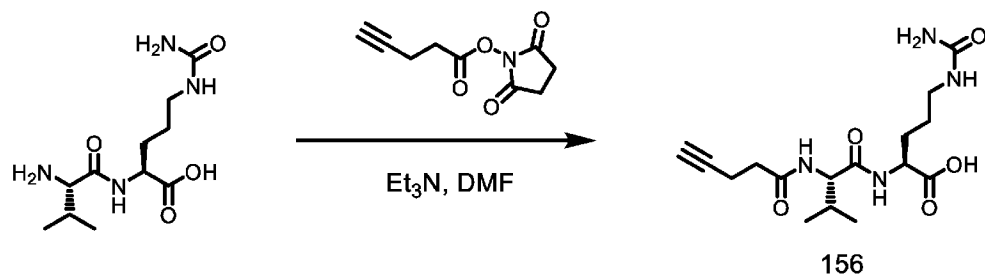


[0971] Z-Val-Cit-OH (50.0 mg, 122 μmol) を酢酸エチル (875 μL)、精製水 (750 μL)、メタノール (730 μL) に溶解させた後、パラジウム炭素触媒 (0.72 mg, 6.73 μmol) を加え、水素置換した。室温にて26時間攪拌した。反応後、セライトろ過し、ろ液を減圧濃縮することにより酢酸エチル、メタノールを除去し、凍結乾燥することにより、上記H-Val-Cit-OH (35.0 mg, 12.8 μmol) を得た。

[0972] MS (ESI) m/z : 275.00 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0973] (19-22-2) 化合物 (156) の合成

[化302]

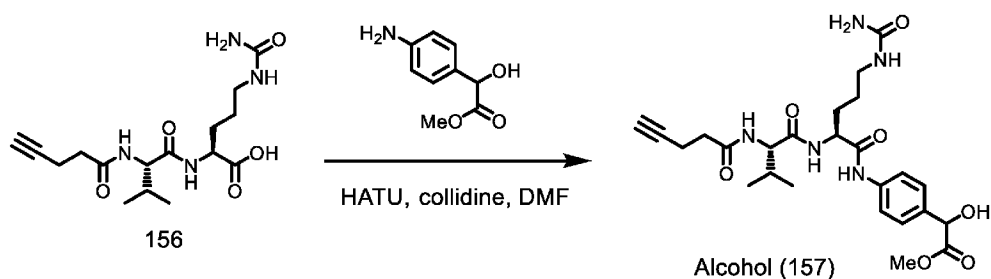


[0974] H-Val-Cit-OH (62.0 mg, 226 μmol) をN, N-ジメチルホルムアミド (1.13 mL) に溶解させ、2, 5-ジオキソピロリジン-1-イル=ペント-4-イノエート (CAS No. 132178-37-1) (52.9 mg, 271 μmol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (34.0 μL , 249 μmol) を加え、室温にて2時間半攪拌した後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記化合物 (156) (71.0 mg, 200 μmol) を得た。

[0975] MS (ESI) m/z : 355.10 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0976] (19-22-3) アルコール (157) の合成

[化303]



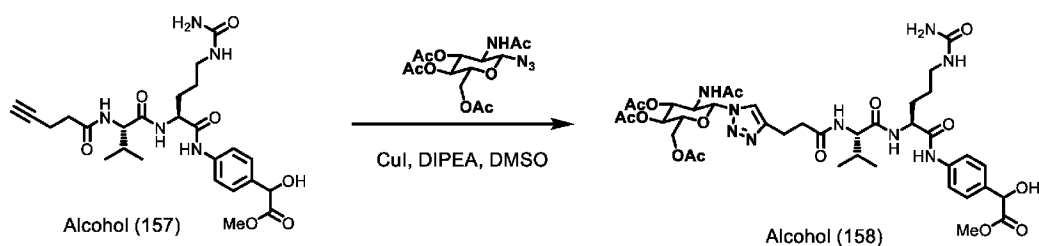
[0977] 化合物 (156) (30.5 mg, 86.1 μmol) をN, N-ジメチルホルムアミド (430 μL) に溶解させ、1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1, 2, 3, トリアゾロ[4, 5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロホスファート (39.3 mg, 103 μmol)、2, 4, 6-トリメチルピリジン (14.0 μL , 103 μmol) を加

え、室温にて10分間攪拌した。続いて、4-アミノマンデル酸メチル（18.7 mg, 103 μ mol）を加えて室温にて1.5時間攪拌した後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記アルコール（157）（30.0 mg, 58.0 μ mol）を得た。

[0978] MS (ESI) m/z : 518.25 $[M+H]^+$

[0979] (19-22-4) アルコール (158) の合成

[化304]

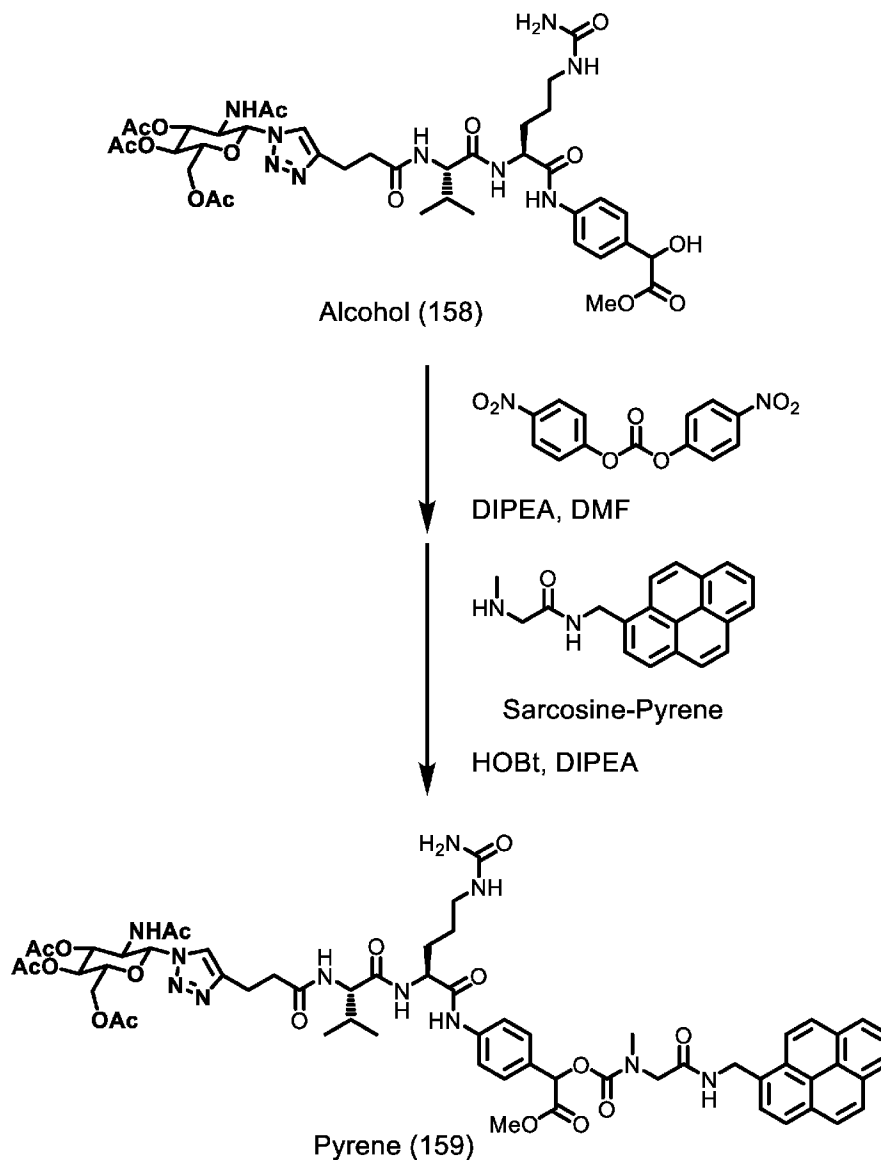


[0980] アルコール (157) (17.0 mg, 32.8 μ mol)、2-アセト
アミド-3, 4, 6-トリ-O-アセチル-2-デオキシ- β -D-グルコ
ピラノシルアジド (CAS No. 6205-69-2) (12.2 mg,
32.8 μ mol) を DMSO (164 μ L) に溶解させ、N, N-ジイソ
プロピルエチルアミン (9.8 μ L, 57.5 μ mol)、沃化銅 (1.2
5 mg, 6.57 μ mol) を加え、室温にて1時間攪拌した。反応終了後
、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクショ
ンを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することによ
り、アルコール (158) (12.0 mg, 13.5 μ mol) を得た。

[0981] MS (ESI) m/z : 890.40 $[M+H]^+$

[0982] (19-22-5) ピレン (159) の合成

[化305]



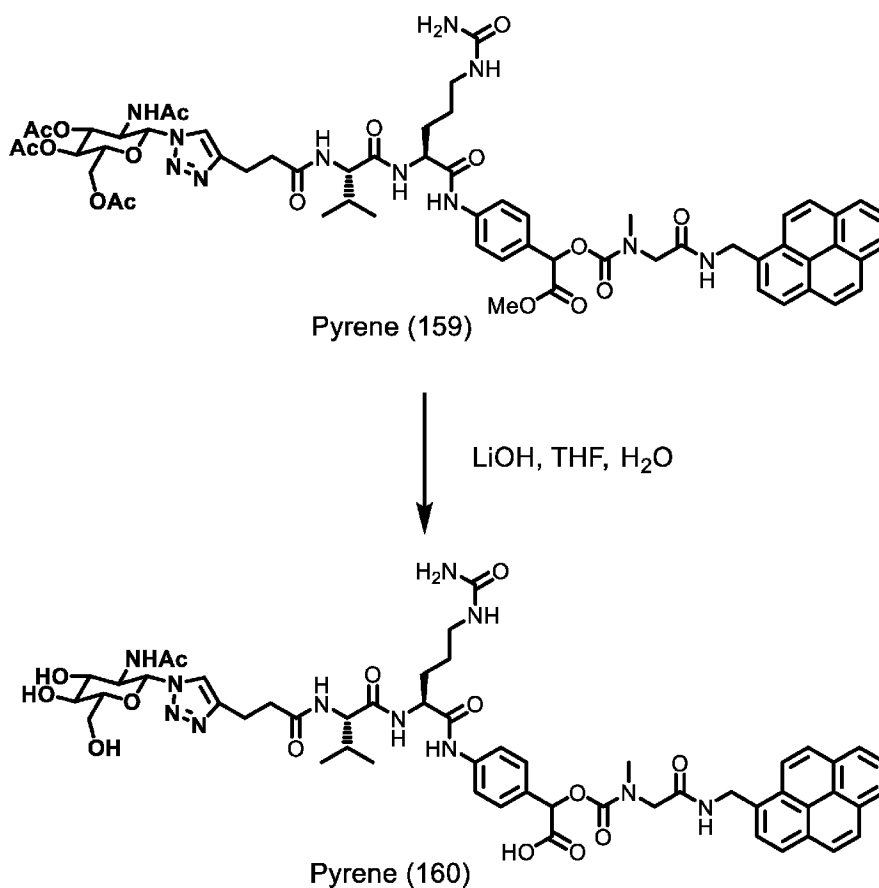
[0983] アルコール (158) (11.0 mg, 12.4 μ mol) をN, N-ジメチルホルムアミド (124 μ L) に溶解させ、氷冷下5分間攪拌した後、炭酸ビス(4-ニトロフェニル) (11.3 mg, 37.1 μ mol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (4.70 μ L, 27.8 μ mol) を加え、室温にて2時間攪拌した。その後、氷冷し、Sarcosine-Pyrene (11.2 mg, 37.1 μ mol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (2.52 mg, 18.5 μ mol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (7.90 μ L, 46.4 μ mol) を加え、室温にて1時間攪

拌した。反応後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記ピレン (159) (9.5 mg, 7.8 μmol) を得た。

[0984] MS (ESI) m/z : 1218.60 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0985] (19-22-6) ピレン (160) の合成

[化306]



[0986] ピレン (159) (8.5 mg, 7.0 μmol) をテトラヒドロフラン (450 μL)、水 (150 μL) に溶解させ、氷冷下5分間攪拌した後、1 M水酸化リチウム水溶液 (16.7 μL , 16.7 μmol) を加え、室温にて2時間攪拌した。反応終了後、1 M塩酸を用いて約pH 6に調整し、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記ピレン (160) (5.2 mg, 4.8 μmol) を得た。

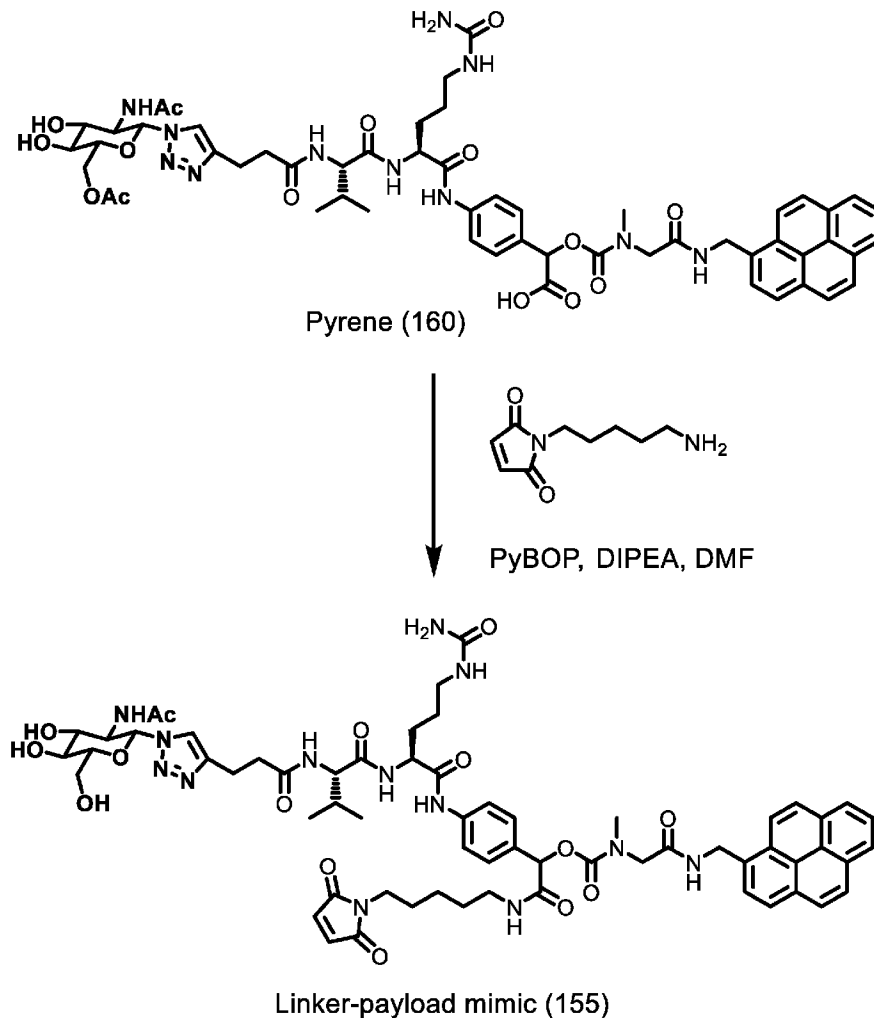
。

[0987] MS (ESI) m/z : 1078.45 $[M+H]^+$

[0988] (19-22-7) Linker-payload mimic (155)

の合成

[化307]



[0989] ピレン (160) (4.2 mg, 3.9 μmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (100 μL) に溶解させたのち氷冷し、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (0.99 μL , 5.84 μmol)、1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート (781 μg , 4.29 μmol) を加えた。次に N-(5-アミノペンチル) マレイミド塩酸塩 (3.0 mg, 5.8 μmol) を加えて室温に戻し 3 時間攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製

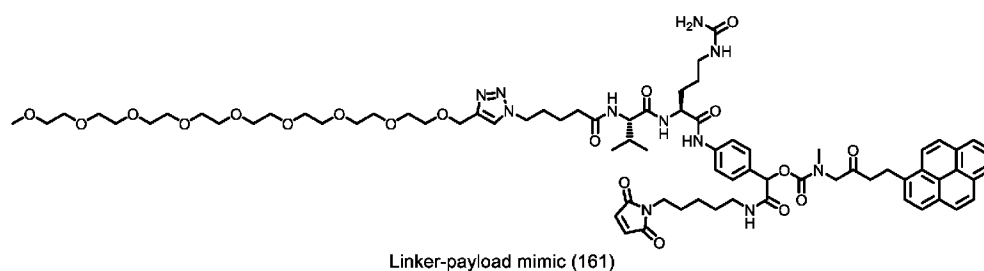
した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、Linker-payload mimic (155) (3.2 mg, 2.6 μ mol) を得た。

[0990] MS (ESI) m/z : 1242.65 $[M+H]^+$

[0991] (19-23) Linker-payload mimic (161) の合成

Linker-payload mimic (161) は下記のように合成した。

[化308]



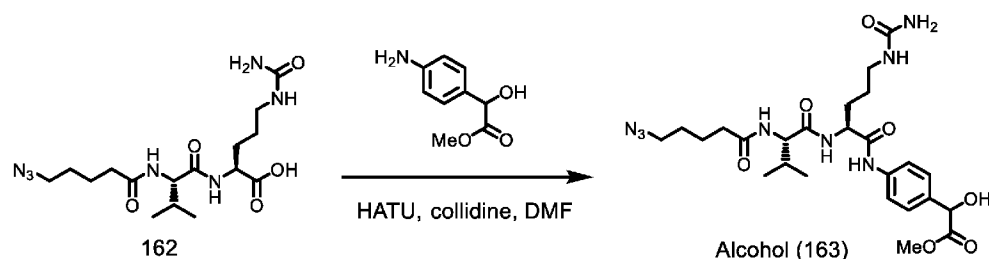
[0992] (19-23-1) 化合物 (162) の合成

[0993] Fmoc法によるC1-TCP (C1) ProTide Resin (CEM社) を用いたペプチド固相合成によって、N末端を5-アゾペンタン酸でキャッピングしたものを調製し、20% HFIP / ジクロロメタンの溶液にて終夜攪拌することで、アミノ酸側鎖を保護したまま樹脂からの切り出しを行った。樹脂をフィルトレーションにより除去し、溶液を濃縮後、これを分取HPLCにて精製し、化合物 (162) を得た。

[0994] MS (ESI) m/z : 400.55 $[M+H]^+$

[0995] (19-23-2) アルコール (163) の合成

[化309]

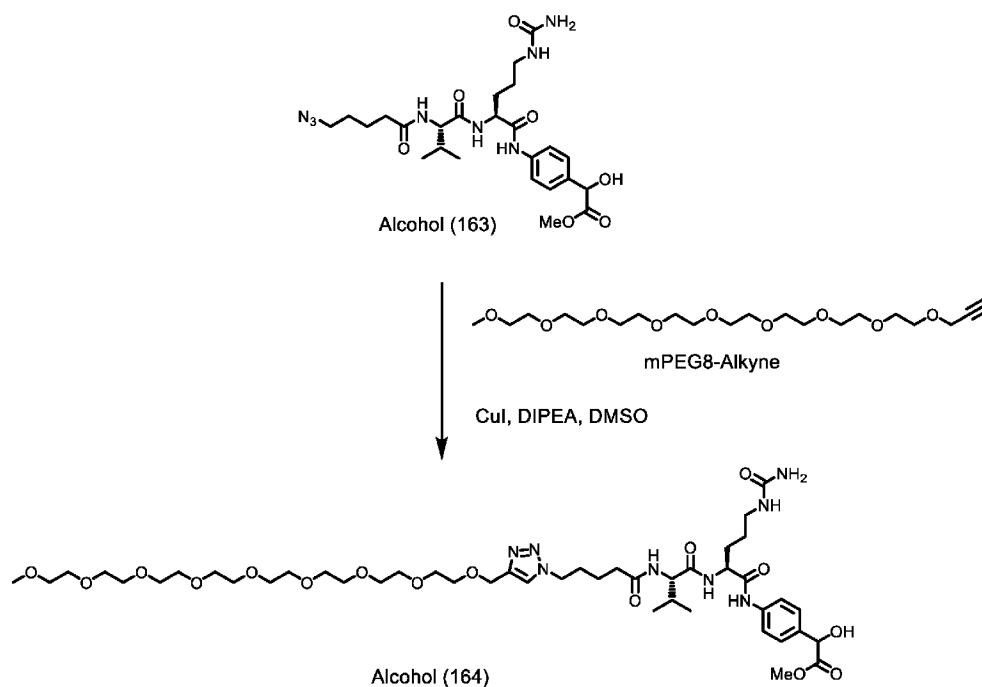


[0996] 化合物 (162) (50.0 mg, 125 μ mol) を N, N-ジメチルホルムアミド (626 μ L) に溶解させ、1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1, 2, 3, トリアゾロ[4, 5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロホスファート (57.1 mg, 150 μ mol)、2, 4, 6-トリメチルピリジン (20.0 μ L, 150 μ mol) を加え、室温にて10分間攪拌した。続いて、4-アミノマンデル酸メチル (27.2 mg, 150 μ mol) を加えて室温にて25時間攪拌した後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記アルコール (163) (57.8 mg, 103 μ mol) を得た。

[0997] MS (ESI) m/z : 563.30 [M+H]⁺

[0998] (19-23-3) アルコール (164) の合成

[化310]



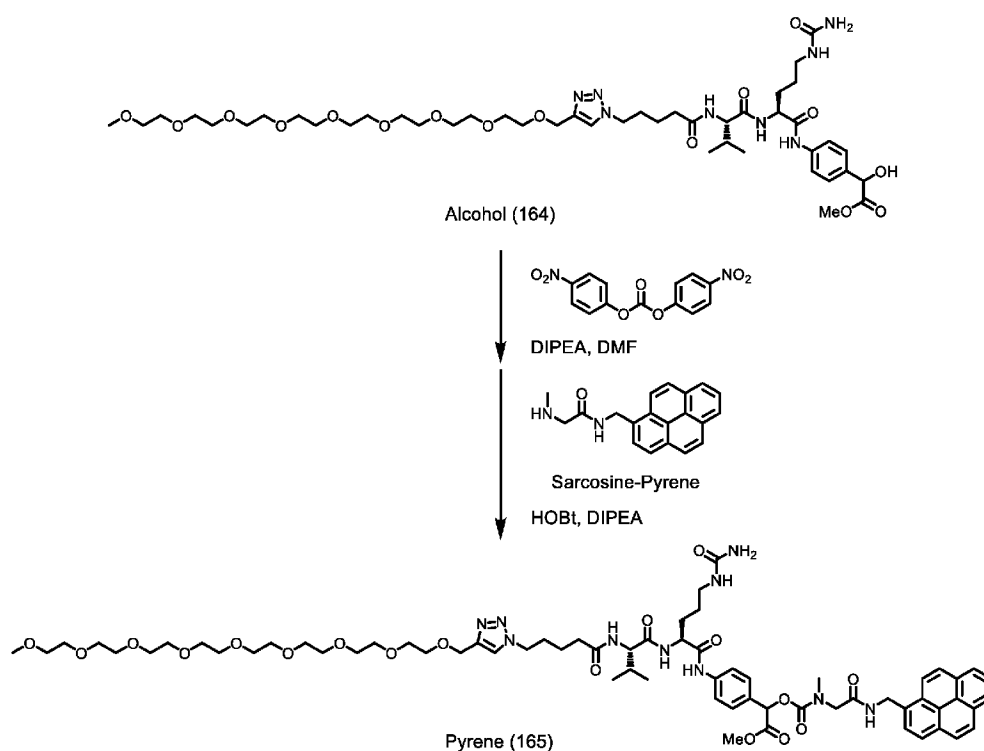
[0999] アルコール (163) (46.0 mg, 81.8 μ mol)、mPEG8-アルキン (34.5 mg, 81.8 μ mol) を DMSO (409 μ L) に溶解させ、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (24 μ L, 143 μ m

o l)、沃化銅 (7.79 mg, 40.9 μ mol) を加え、室温にて1時間攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することによりアルコール (164) (31.0 mg, 31.0 μ mol) を得た。

[1000] MS (ESI) m/z : 985.55 $[M+H]^+$

[1001] (19-23-4) ピレン (165) の合成

[化311]



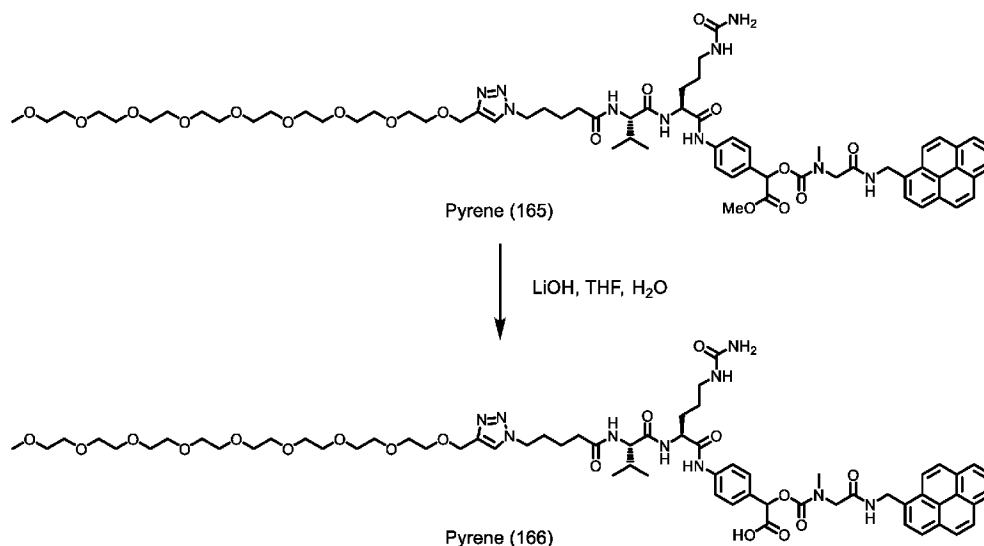
[1002] アルコール (164) (31.0 mg, 31.5 μ mol) をN, N-ジメチルホルムアミド (315 μ L) に溶解させ、氷冷下5分間攪拌した後、炭酸ビス (4-ニトロフェニル) (28.7 mg, 94.4 μ mol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (12.0 μ L, 70.8 μ mol) を加え、室温にて2時間攪拌した。その後、氷冷し、Sarcosine-Pyrene (28.5 mg, 94.4 μ mol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (6.42 mg, 47.2 μ mol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (20.0 μ L, 118 μ mol) を加え、室温にて1時間攪拌

した。反応後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記ピレン (165) (29.0 mg, 22.1 μmol) を得た。

[1003] MS (ESI) m/z : 1313.80 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[1004] (19-23-5) ピレン (166) の合成

[化312]

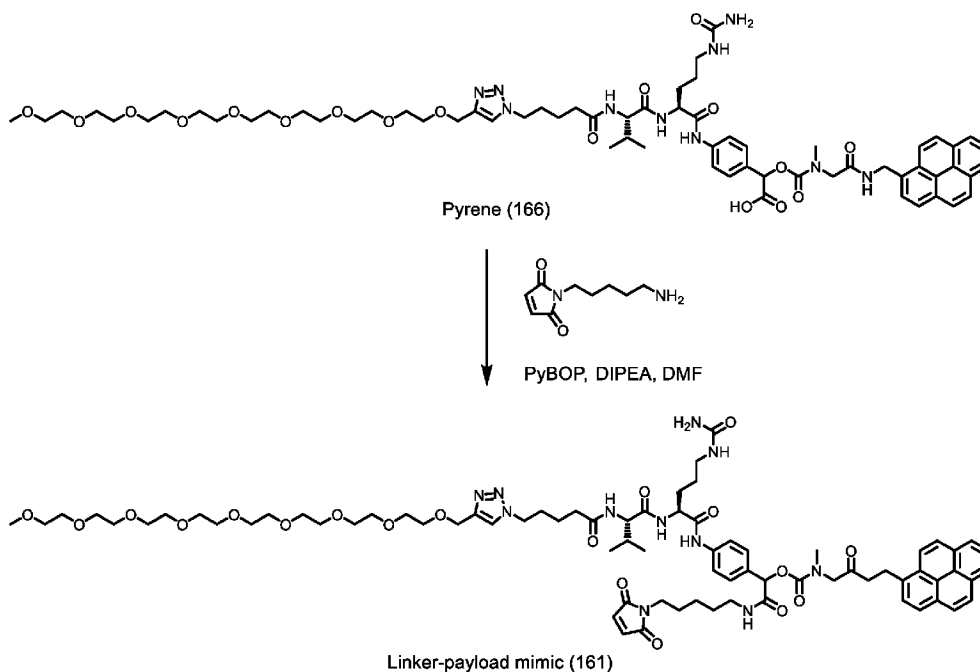


[1005] ピレン (165) (29.0 mg, 22.1 μmol) をテトラヒドロフラン (1.55 mL)、水 (0.55 mL) に溶解させ、氷冷下5分間攪拌した後、1 M水酸化リチウム水溶液 (53.0 μL , 53.0 μmol) を加え、室温にて1時間攪拌した。反応終了後、酢酸を用いて約 pH 6 に調整し、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記ピレン (166) (24.0 mg, 18.5 μmol) を得た。

[1006] MS (ESI) m/z : 1299.75 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[1007] (19-23-6) Linker-payload mimic (161) の合成

[化313]



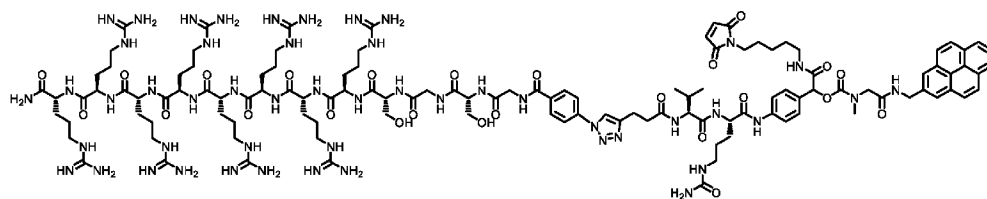
[1008] ピレン (166) (23.0 mg, 17.7 μmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (200 μL) に溶解させたのち氷冷し、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (6.0 μL , 4.58 μmol)、1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1, 2, 3, トリアゾロ[4, 5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロホスファート (18.4 mg, 35.4 μmol) を加えた。次に N-(5-アミノペンチル)マレイミド塩酸塩 (4.84 mg, 35.4 μmol) を加えて室温に戻し1時間攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収、減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、Linker-payload mimic (161) (16.0 mg, 17.7 μmol) を得た。

[1009] MS (ESI) m/z : 1463.90 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[1010] (19-24) Linker-payload mimic (167) の合成

Linker-payload mimic (167) は下記のように合成した。

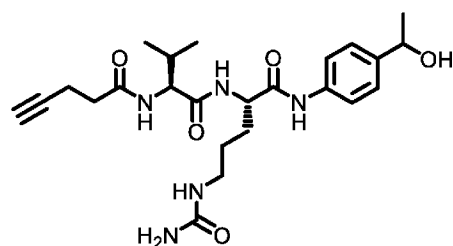
[化314]



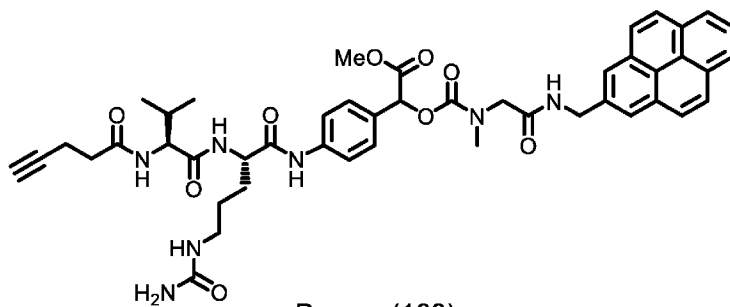
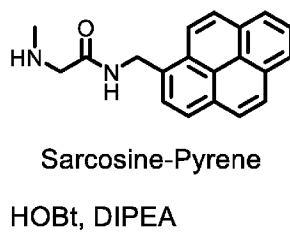
Linker-payload mimic (167)

[1011] (19-24-1) ピレン (168) の合成

[化315]



Alcohol (157)



Pyrene (168)

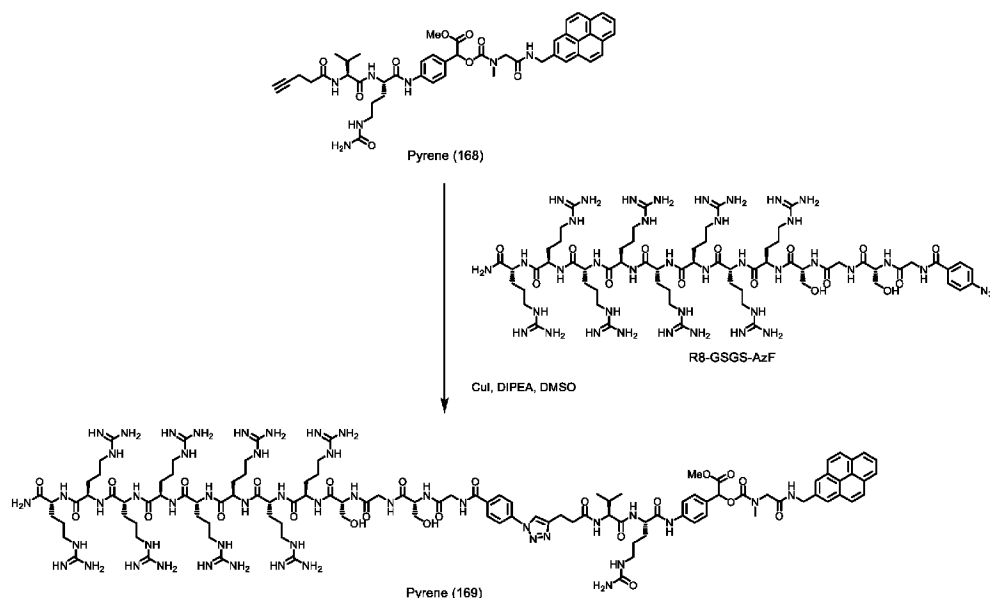
[1012] アルコール (157) (26.0 mg, 50.2 μmol) をN, N-ジ

メチルホルムアミド（ $502\ \mu\text{L}$ ）に溶解させ、氷冷下5分間攪拌した後、炭酸ビス（4-ニトロフェニル）（ $45.8\ \text{mg}$ ， $151\ \mu\text{mol}$ ）、N，N-ジイソプロピルエチルアミン（ $19.0\ \mu\text{L}$ ， $113\ \mu\text{mol}$ ）を加え、室温にて2時間攪拌した。その後、氷冷し、Sarcosin-Pyrene（ $45.6\ \text{mg}$ ， $151\ \mu\text{mol}$ ）、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール（ $10.3\ \text{mg}$ ， $75.4\ \mu\text{mol}$ ）、N，N-ジイソプロピルエチルアミン（ $32.0\ \mu\text{L}$ ， $188\ \mu\text{mol}$ ）を加え、室温にて1時間攪拌した。反応後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記ピレン（168）（ $22\ \text{mg}$ ， $26\ \mu\text{mol}$ ）を得た。

[1013] MS (ESI) m/z : 846.40 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[1014] (19-24-2) ピレン（169）の合成

[化316]



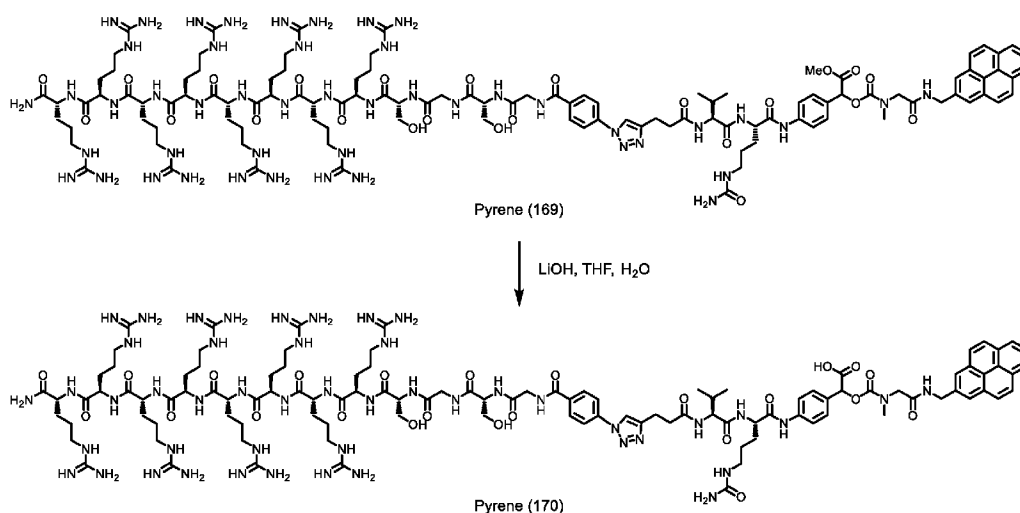
[1015] ピレン（168）（ $10.0\ \text{mg}$ ， $11.8\ \mu\text{mol}$ ）、R8-GSGS-AzF（ $20.1\ \text{mg}$ ， $11.8\ \mu\text{mol}$ ）をDMSO（ $118\ \mu\text{L}$ ）に溶解させ、N，N-ジイソプロピルエチルアミン（ $3.5\ \mu\text{L}$ ， $21\ \mu\text{mol}$ ）、沃化銅（ $0.45\ \text{mg}$ ， $2.4\ \mu\text{mol}$ ）を加え、室温にて1時間攪

拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することによりピレン（１６９）（１９．２ｍｇ，７．５４μｍｏｌ）を得た。

[1016] MS (ESI) m/z : 1273.65 $[M+2H]^{2+}$, 849.55 $[M+3H]^{3+}$, 637.45 $[M+4H]^{4+}$, 510.10 $[M+5H]^{5+}$

[1017] (19-24-3) ピレン（１７０）の合成

[化317]

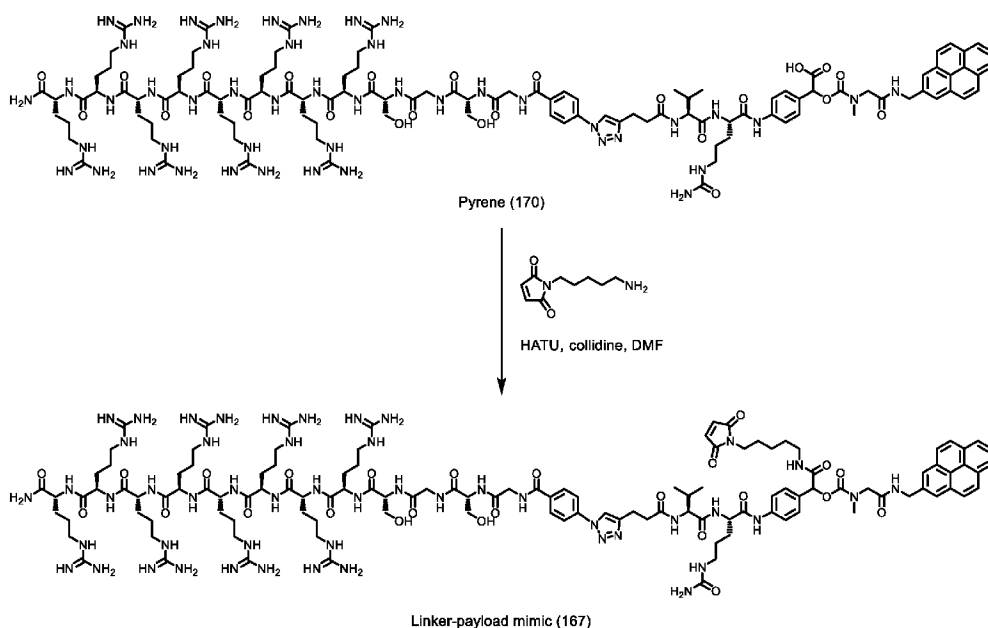


[1018] ピレン（１６９）（１５．６ｍｇ，６．１３μｍｏｌ）をテトラヒドロフラン（２３４μＬ）、水（１１０μＬ）に溶解させ、氷冷下５分間攪拌した後、１Ｍ水酸化リチウム水溶液（１４．７μＬ，１４．７μｍｏｌ）を加え、室温にて１時間攪拌した。反応終了後、酢酸を用いて約ｐＨ６に調整し、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することによりアセトニトリルを除去し、凍結乾燥することにより、上記ピレン（１７０）（８．８ｍｇ，３．５μｍｏｌ）を得た。

[1019] MS (ESI) m/z : 1266.70 $[M+2H]^{2+}$, 844.90 $[M+3H]^{3+}$, 633.90 $[M+4H]^{4+}$, 507.30 $[M+5H]^{5+}$

[1020] (19-24-4) Linker-payload mimic (167) の合成

[化318]



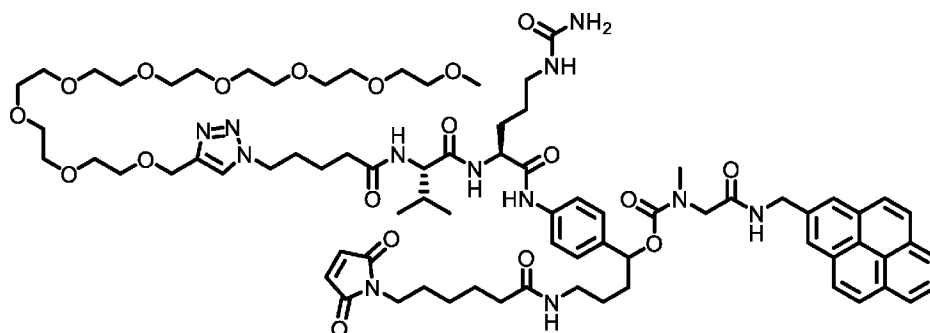
[1021] ピレン (170) (8 mg, 3 μmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (30 μL) に溶解させたのち氷冷し、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (1 μL , 6 μmol)、1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1, 2, 3, トリアゾロ[4, 5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロホスファート (2 mg, 5 μmol) を加えた。次に N-(5-アミノペンチル)マレイミド塩酸塩 (1 mg, 5 μmol) を加えて室温に戻し1時間攪拌した。反応終了後、逆相分取クロマトグラフィーにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収、減圧濃縮しアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより、Linker-payload mimic (167) (4.1 mg, 1.5 μmol) を得た。

[1022] MS (ESI) m/z : 899.65 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$, 675.00 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$, 540.20 $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$

[1023] (19-25) Linker-payload mimic (171) の合成

Linker-payload mimic (171) は下記のように合成した。

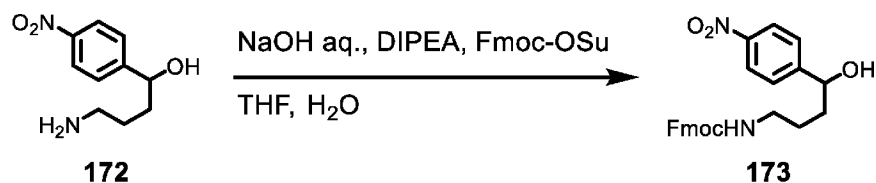
[化319]



Linker-payload mimic (171)

[1024] (19-25-1) 化合物 (173) の合成

[化320]

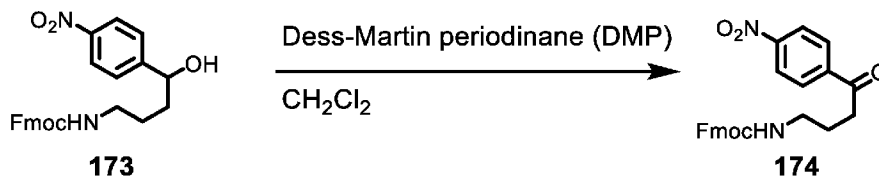


[1025] 化合物 (172) (97.0 mg, 461 μmol) をテトラヒドロフラン (4.25 mL) と水 (4.02 mL) に溶解した。氷冷下、2 N 水酸化ナトリウム水溶液 (233 μL , 466 μmol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (103 μL , 600.0 μmol)、N-(Fmoc-オキシ) スクシンイミド (203 mg, 601 μmol) を加えた。室温に戻して1時間後に反応液を減圧濃縮してテトラヒドロフランを除去した。残渣に酢酸エチル (20 mL)、飽和食塩水 (2 mL) を加えて抽出し、水層を酢酸エチル (10 mL) で再抽出した。有機層を合わせて飽和食塩水 (5 mL) で洗浄後、減圧濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラム (ヘキサン: 酢酸エチル) で精製し、目的物を含むフラクションを濃縮乾固することにより化合物 (173) (178 mg, 412 μmol) を得た。

[1026] MS (ESI) m/z : 455.1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

[1027] (19-25-2) 化合物 (174) の合成

[化321]

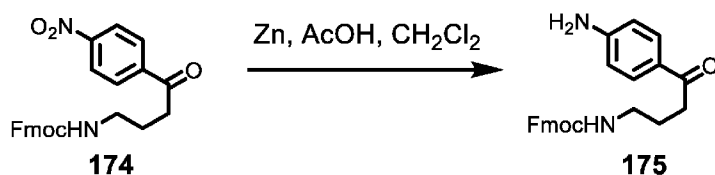


[1028] 化合物(173) (91.9 mg, 212 μmol) をジクロロメタン (1.6 mL) に溶解し、氷冷下 DMP (133 mg, 297 μmol) を加えた。室温に戻して攪拌し、TLCにて原料の消失を確認した後、反応液を減圧濃縮してジクロロメタンを除去した。残渣に酢酸エチル (15 mL)、水 (3 mL)、10%炭酸水素ナトリウム水溶液 (2 mL)、飽和食塩水 (1 mL) を加えて抽出し、水層を酢酸エチル (10 mL) で再抽出した。有機層を合わせて飽和食塩水 (10 mL) で洗浄後、濃縮乾固することにより化合物(174) (91.2 mg, 212 μmol) を得た。

[1029] MS (ESI) m/z : 453.1 [M+Na]⁺

[1030] (19-25-3) 化合物(175) の合成

[化322]



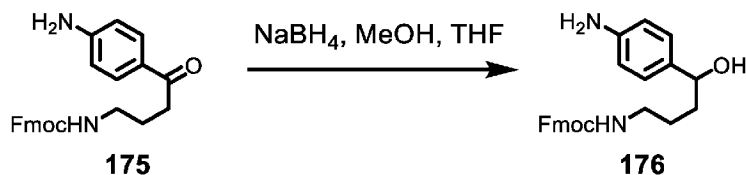
[1031] 化合物(174) (90.2 mg, 210 μmol) をジクロロメタン (46 mL) に溶解し、酢酸 (84.0 μL, 1.467 mmol) と亜鉛粉末 (139 mg, 2.12 mmol) を加えた。ヒートブロックを用いて 40℃ に加熱し、1 時間後に LCMS 分析を行うと原料が残っていた。そこで酢酸 (42.0 μL, 0.727 mmol) と亜鉛粉末 (68.6 mg, 1.05 mmol) を追加したが、まだ原料が残っていたため、酢酸 (21.0 μL, 0.367 mmol)、亜鉛粉末 (35.0 mg, 0.535 mmol) を再度加えた。原料の消失を確認した後、反応液を冷却して水 (10 mL) を加えて減圧濃縮し、ジクロロメタンを除去した。残渣に水 (10 mL) を追加し、10%炭酸水素ナトリウム水溶液 (4.0 mL) を加えて約

pH = 9 に調整した。酢酸エチル (30 mL)、飽和食塩水 (1 mL) を加えて抽出し、水層を酢酸エチル (15 mL) で2回再抽出した。有機層を合わせて飽和食塩水 (10 mL)、10%炭酸水素ナトリウム水溶液 (1.0 mL) で洗浄後、減圧濃縮した。得られた残渣を酢酸エチルで希釈、溶解し、シリカゲルカラム (ヘキサン : 酢酸エチル) で精製した。目的物を含むフラクションを濃縮乾固することにより化合物 (175) (69.7 mg, 174 μmol) を得た。

[1032] MS (ESI) m/z : 401.1 $[\text{M} + \text{H}]^+$

[1033] (19-25-4) 化合物 (176) の合成

[化323]

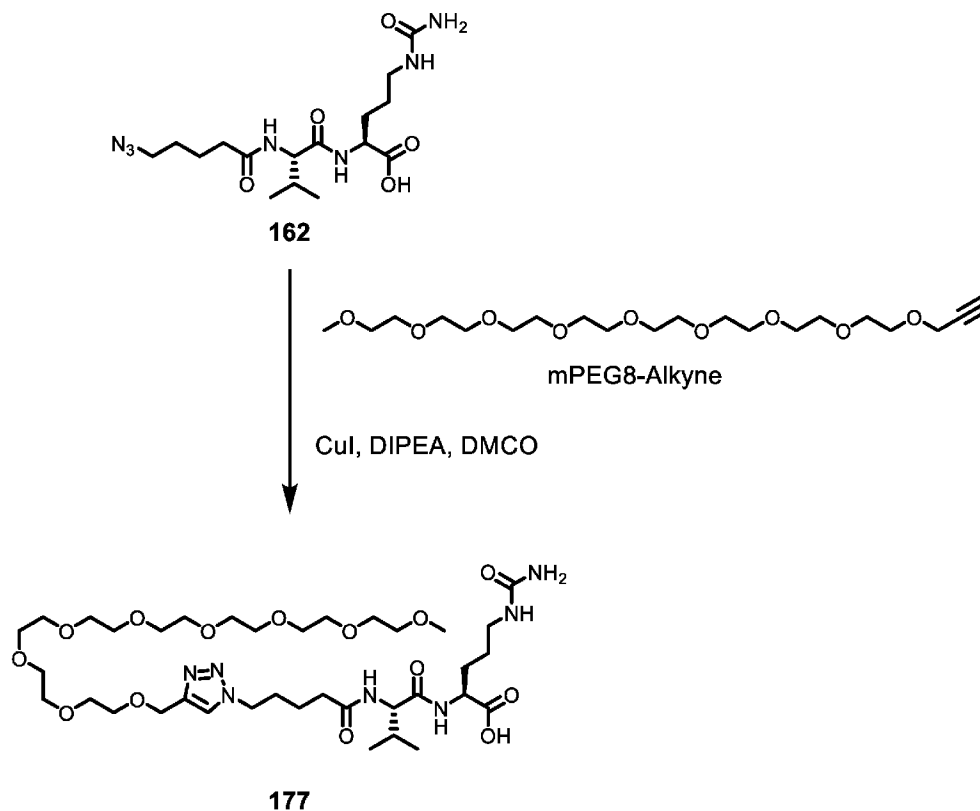


[1034] 化合物 (175) (67.7 mg, 169 μmol) をテトラヒドロフラン (8.1 mL)、メタノール (2.7 mL) に溶解した。氷冷下、水素化ホウ素ナトリウム (61.3 mg, 1.63 mmol) を加えた。15分後にLCMS分析を行うと原料が残っていた。そこで原料が消失するまで同量程度の水素化ホウ素ナトリウムを3回追加した (合わせて275 mg, 6.69 mmol)。原料の消失を確認後、反応液に水 (15 mL) を加えて室温に戻し、減圧濃縮して有機溶媒を除去した。得られた溶液に酢酸エチル (50 mL)、飽和食塩水 (5 mL) を加えて抽出し、有機層を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラム (ヘキサン : 酢酸エチル) で精製し、目的物を含むフラクションを濃縮乾固することにより、化合物 (176) (47.3 mg, 118 μmol) を得た。

[1035] MS (ESI) m/z : 426.1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

[1036] (19-25-5) 化合物 (177) の合成

[化324]

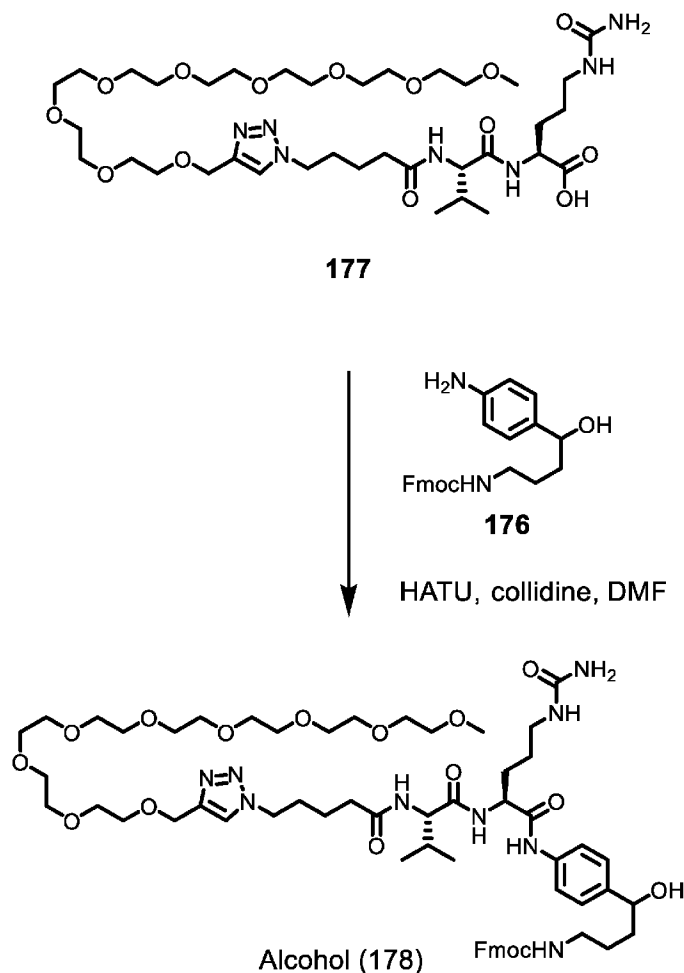


[1037] mPEG8-Alkyne (65.0 mg, 154 μmol) をジメチルスルホキシド (768 μL) に溶解し、化合物 (162) (61.4 mg, 154 μmol)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (46.2 μL , 270 μmol)、ヨウ化銅 (6.2 mg, 33.0 μmol) を加えた。LCMS 分析にて原料の消失を確認後、アセトニトリル (384 μL) と 50% アセトニトリル水溶液 (384 μL) を加えて希釈した。フィルターろ過した溶液を分取 HPLC 精製し、目的物を含むフラクションを回収した。減圧濃縮してアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することにより化合物 (177) (90.4 mg, 110 μmol) を得た。

[1038] MS (ESI) m/z : 822.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[1039] (19-25-6) アルコール (178) の合成

[化325]

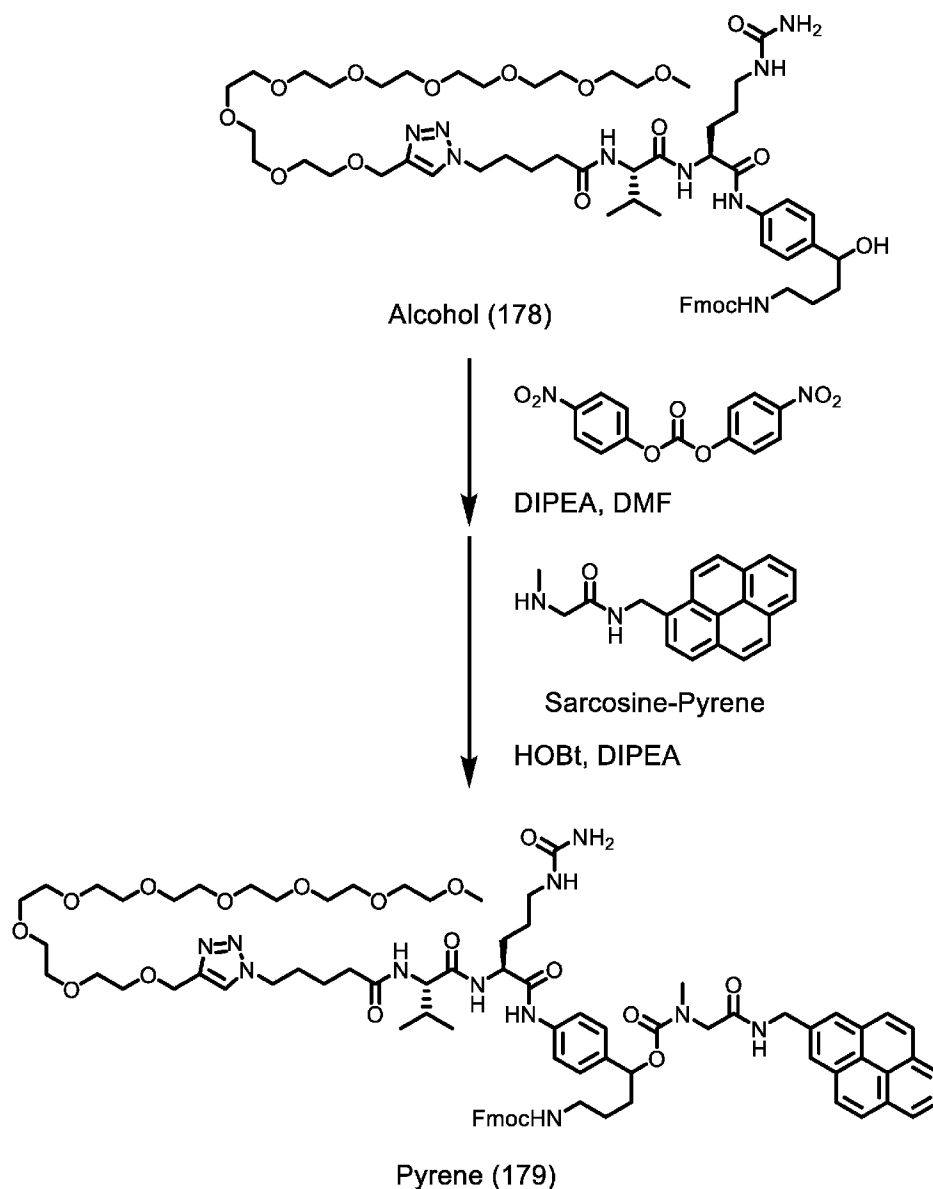


[1040] 化合物(177)(63.5mg, 77.3 μ mol)をN,N-ジメチルホルムアミド(400 μ L)に溶解した。HATU(35.8mg, 94.2 μ mol)、2,4,6-トリメチルピリジン(12.9 μ L, 96.0 μ mol)を加え室温で10分攪拌した。化合物(176)(23.1mg, 57.4 μ mol)をN,N-ジメチルホルムアミド(300 μ L)に溶解して加え、1時間反応させた。LCMS分析にて原料の消失を確認後、アセトニトリル(700 μ L)を加えて希釈した。フィルターろ過した溶液を分取HPLC精製し、目的物を含むフラクションを回収した。減圧濃縮してアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することによりアルコール(178)(51.2mg, 57.4 μ mol)を得た。

[1041] MS(ESI) m/z: 1206.8 [M+H]⁺

[1042] (19-25-7) ピレン (179) の合成

[化326]



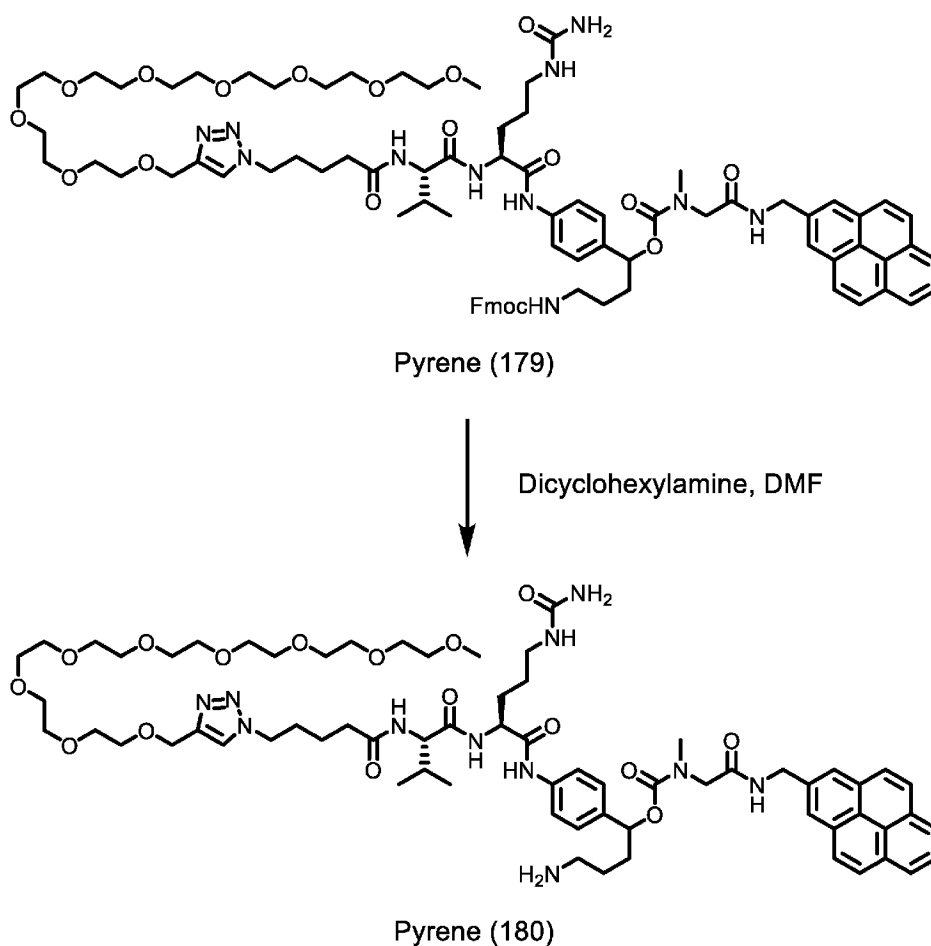
[1043] アルコール (178) (36.7 mg, 30.4 μmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (174 μL) に溶解し、bis (4-ニトロフェニル) カーボネート (23.5 mg, 75.7 μmol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (10.4 μL , 60.5 μmol) を加えた。LCMS 分析にて原料が残っていたため、bis (4-ニトロフェニル) カーボネート (24.0 mg, 77.3 μmol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (10.4 μL , 60.5 μmol) を追加した。1 時間後、2- (メ

チルアミノ) -N-(ピレン-2-イルメチル) アセトアミド (16.3 mg, 53.9 μmol)、HOBt (6.2 mg, 46.0 μmol)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (20.9 μL , 121.6 μmol) を加え反応を続けた。約45分後に2-(メチルアミノ)-N-(ピレン-2-イルメチル) アセトアミド (7.7 mg, 25.4 μmol) を追加した。アセトニトリル (348 μL) を加えて反応液を希釈後、フィルターろ過した溶液を分取HPLC精製し、目的物を含むフラクションを回収した。減圧濃縮してアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することによりピレン (179) (3.8 mg, 2.5 μmol) を得た。

[1044] MS (ESI) m/z : 1536.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[1045] (19-25-8) ピレン (180) の合成

[化327]



[1046] ピレン (179) (3.5 mg, 2.3 μmol) をN,N-ジメチルホ

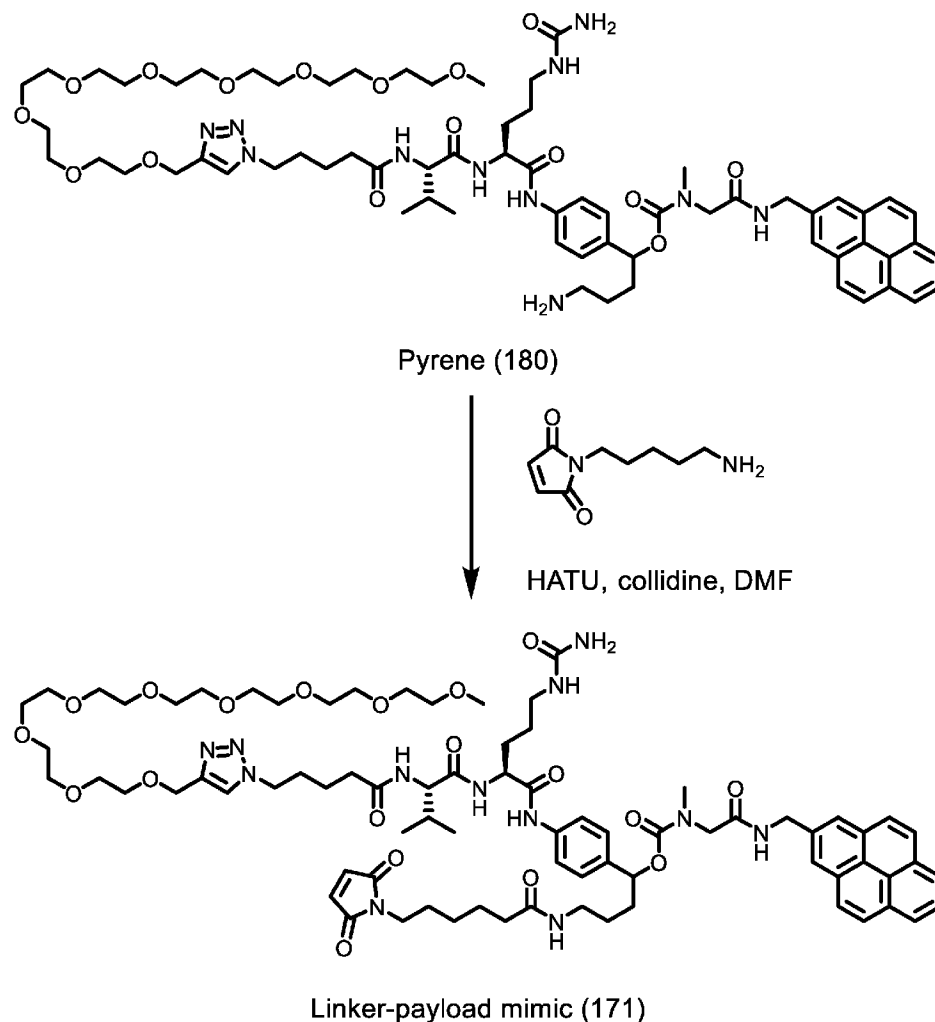
ルムアミド (200 μ L) に溶解し、ジシクロヘキシルアミン (40 μ L) を加えて室温で攪拌した。LCMS分析で原料が残っていたらジシクロヘキシルアミンを追加し、最終的にはジシクロヘキシルアミン (120 μ L) を使用した。反応液にアセトニトリル (200 μ L) を加えて希釈した後、フィルターろ過した溶液を分取HPLCで精製した。目的物を含むフラクションを回収し、減圧濃縮してアセトニトリルを除去した後、水溶液を凍結乾燥することによりピレン (180) (3.0 mg, 2.3 μ mol) を得た。

[1047] MS (ESI) m/z : 1310.8 [M-H]⁻

[1048] (19-25-9) Linker-payload mimic (171)

の合成

[化328]



[1049] 6-マレイミドヘキサン酸 (0.93 mg, 4.31 μ mol) をN, N

ージメチルホルムアミド (110 μ L) に溶解し、HATU (1.71 mg, 4.50 μ mol)、2, 4, 6-トリメチルピリジン (0.65 μ L, 4.8 μ mol) を加えて室温で12分攪拌した。ピレン (180) (3.0 mg, 2.3 μ mol) をN, N-ジメチルホルムアミド (220 μ L) に溶解して加えた。30分後に6-マレイミドヘキサ酸 (0.25 mg, 1.16 μ mol) を追加した。LCMS分析にて原料の消失を確認後、アセトニトリル (330 μ L) を加えて反応液を希釈し、フィルターろ過した溶液を分取HPLCにて精製した。目的物を含むフラクションを回収し減圧濃縮してアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥することによりLinker-payload mimic (171) (2.9 mg, 1.9 μ mol) を得た。

[1050] MS (ESI) m/z : 1506.1 [M+H]⁺

[1051] 実施例20: ADC mimicの合成および解析

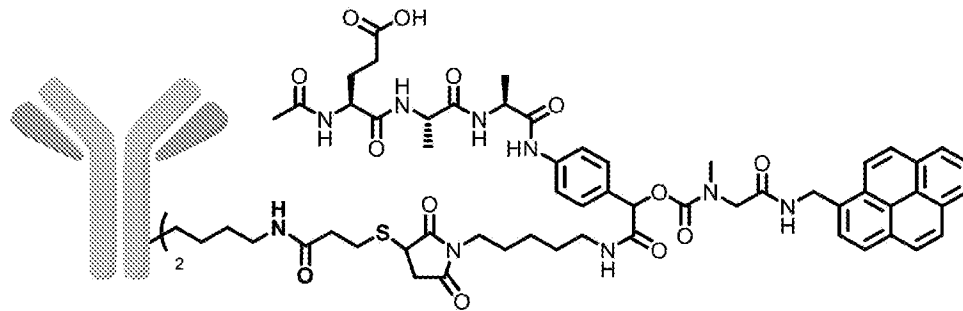
(20-1) ADC mimicの合成

以降の実施例では、実施例2と同様の方法でADC mimicの調製を行った。

[1052] (20-1-1) ADC mimic 21の合成

実施例19-1で合成したLinker-payload mimic (51) とチオール含有抗体より、下記構造のADC mimic 21を合成した。ESI-TOFMS分析を行い、反応生成物はLinker-payload mimic (51) が2個導入された150122にピークが確認された。

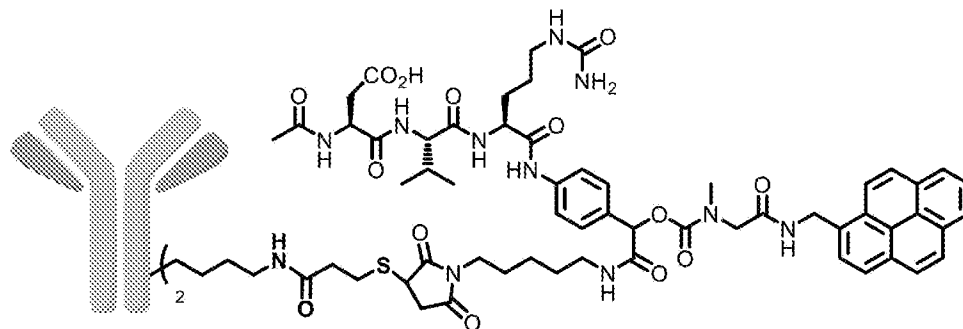
[化329]

**ADC mimic 21**

[1053] (20-1-2) ADC mimic 22の合成

同様に実施例19-2のLinker-payload mimic (56) とチオール含有抗体より、下記構造のADC mimic 22を合成した。ESI-TOFMS分析を行い、反応生成物はLinker-payload mimic (56) が2個導入された150322にピークが確認された。

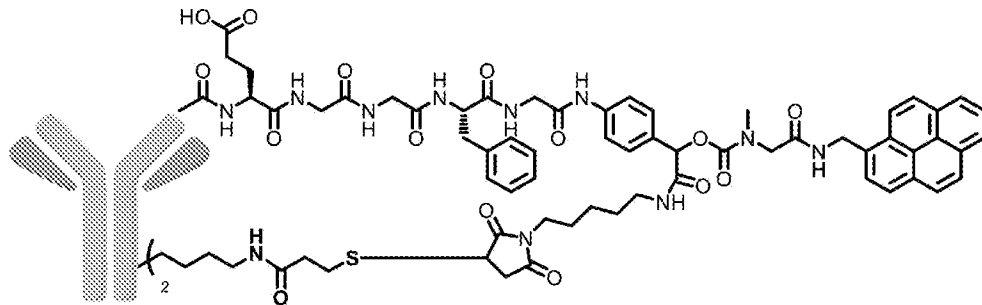
[化330]

**ADC mimic 22**

[1054] (20-1-3) ADC mimic 23の合成

同様に実施例19-3のLinker-payload mimic (61) とチオール含有抗体より、下記構造のADC mimic 23を合成した。ESI-TOFMS分析を行い、反応生成物はLinker-payload mimic (61) が2個導入された150474にピークが確認された。

[化331]

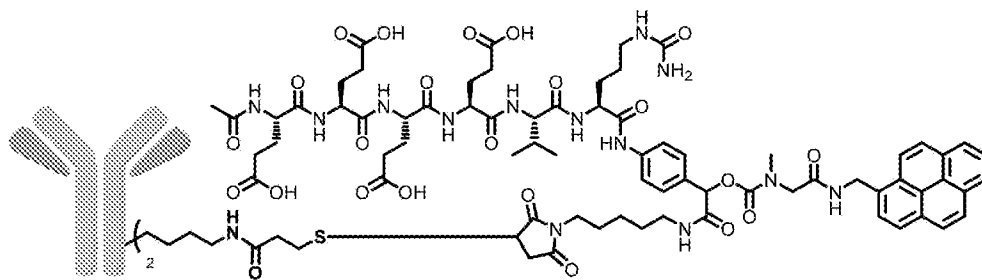


ADC mimic 23

[1055] (20-1-4) ADC mimic 24の合成

同様に実施例19-4のLinker-payload mimic (66)とチオール含有抗体より、下記構造のADC mimic 24を合成した。ESI-TOFMS分析を行い、反応生成物はLinker-payload mimic (66)が2個導入された151125にピークが確認された。

[化332]

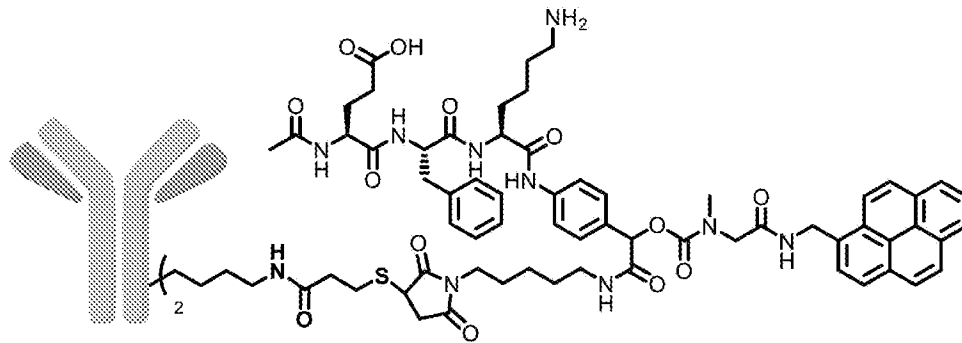


ADC mimic 24

[1056] (20-1-5) ADC mimic 25の合成

同様に実施例19-5のLinker-payload mimic (71)とチオール含有抗体より、下記構造のADC mimic 25を合成した。ESI-TOFMS分析を行い、反応生成物はLinker-payload mimic (71)が2個導入された150389にピークが確認された。

[化333]

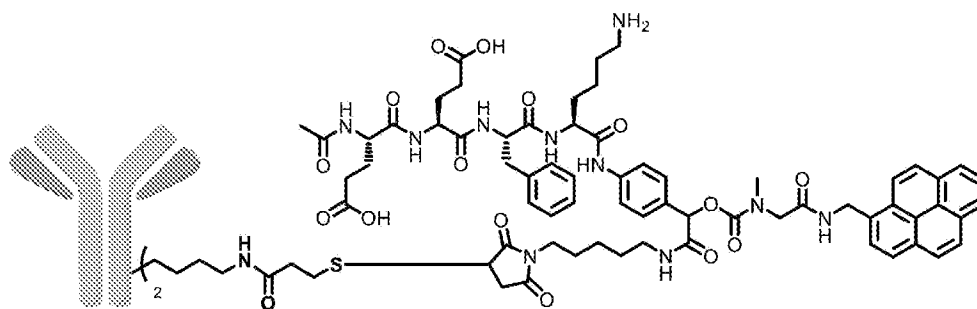


ADC mimic 25

[1057] (20-1-6) ADC mimic 26の合成

同様に実施例19-6のLinker-payload mimic (76)とチオール含有抗体より、下記構造のADC mimic 26を合成した。ESI-TOFMS分析を行い、反応生成物はLinker-payload mimic (76)が2個導入された150647にピークが確認された。

[化334]

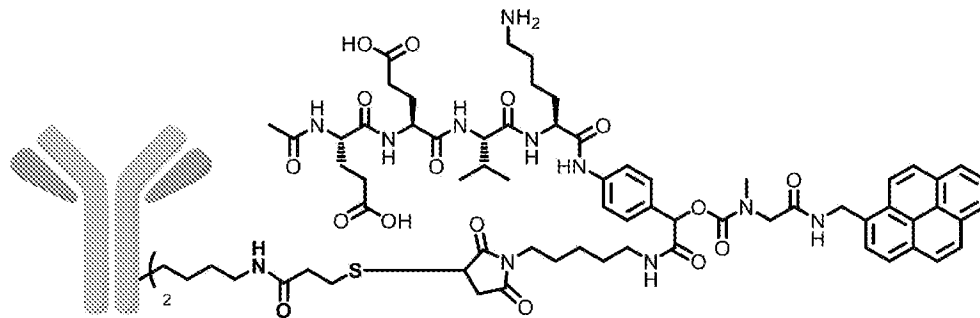


ADC mimic 26

[1058] (20-1-7) ADC mimic 27の合成

同様に実施例19-7のLinker-payload mimic (81)とチオール含有抗体より、下記構造のADC mimic 27を合成した。ESI-TOFMS分析を行い、反応生成物はLinker-payload mimic (81)が2個導入された150551にピークが確認された。

[化335]

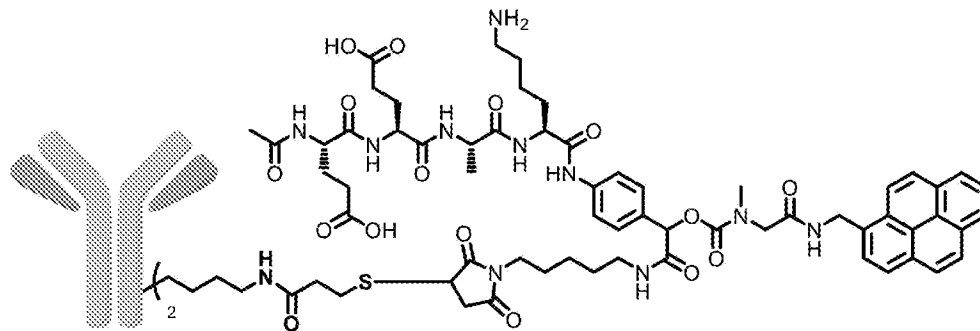


ADC mimic 27

[1059] (20-1-8) ADC mimic 28の合成

同様に実施例19-8のLinker-payload mimic (86)とチオール含有抗体より、下記構造のADC mimic 28を合成した。ESI-TOFMS分析を行い、反応生成物はLinker-payload mimic (86)が2個導入された150495にピークが確認された。

[化336]

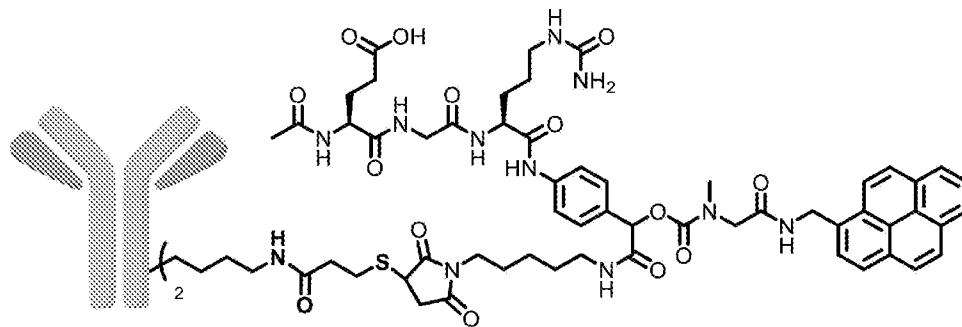


ADC mimic 28

[1060] (20-1-9) ADC mimic 29の合成

同様に実施例19-9のLinker-payload mimic (91)とチオール含有抗体より、下記構造のADC mimic 29を合成した。ESI-TOFMS分析を行い、反応生成物はLinker-payload mimic (91)が2個導入された150208にピークが確認された。

[化337]

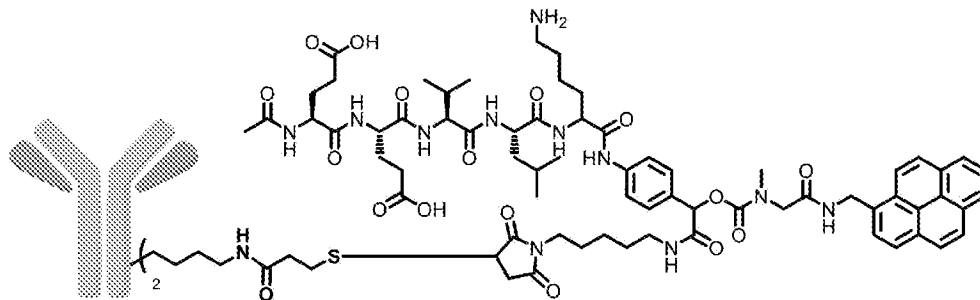


ADC mimic 29

[1061] (20-1-10) ADC mimic 30の合成

同様に実施例19-11のLinker-payload mimic (99)とチオール含有抗体より、下記構造のADC mimic 30を合成した。ESI-TOFMS分析を行い、反応生成物はLinker-payload mimic (99)が2個導入された150776にピークが確認された。

[化338]

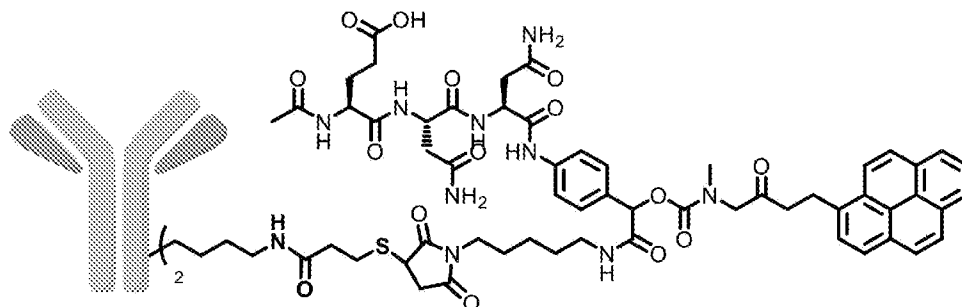


ADC mimic 30

[1062] (20-1-11) ADC mimic 31の合成

同様に実施例19-12のLinker-payload mimic (104)とチオール含有抗体より、下記構造のADC mimic 31を合成した。ESI-TOFMS分析を行い、反応生成物はLinker-payload mimic (104)が2個導入された150292にピークが確認された。

[化339]

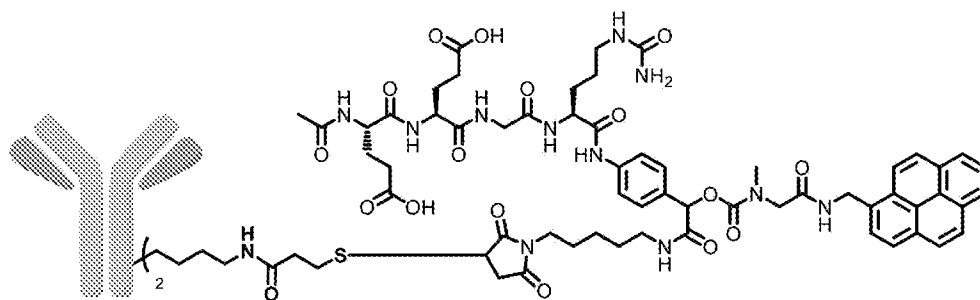


ADC mimic 31

[1063] (20-1-12) ADC mimic 32の合成

同様に実施例19-14のLinker-payload mimic (115) とチオール含有抗体より、下記構造のADC mimic 32を合成した。ESI-TOFMS分析を行い、反応生成物はLinker-payload mimic (115) が2個導入された150524にピークが確認された。

[化340]

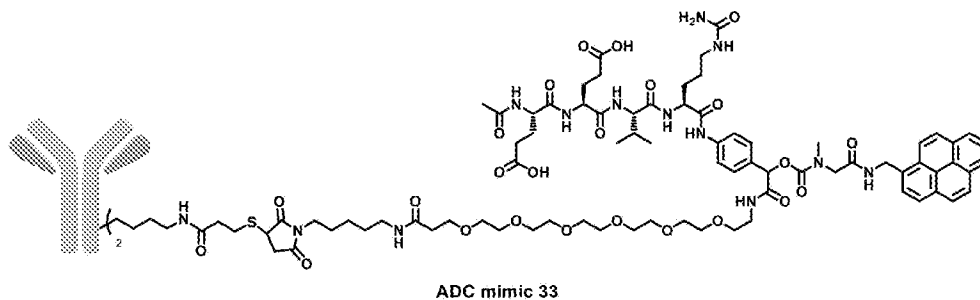


ADC mimic 32

[1064] (20-1-13) ADC mimic 33の合成

同様に実施例19-15のLinker-payload mimic (120) とチオール含有抗体より、下記構造のADC mimic 33を合成した。ESI-TOFMS分析を行い、反応生成物はLinker-payload mimic (120) が2個導入された151279にピークが確認された。

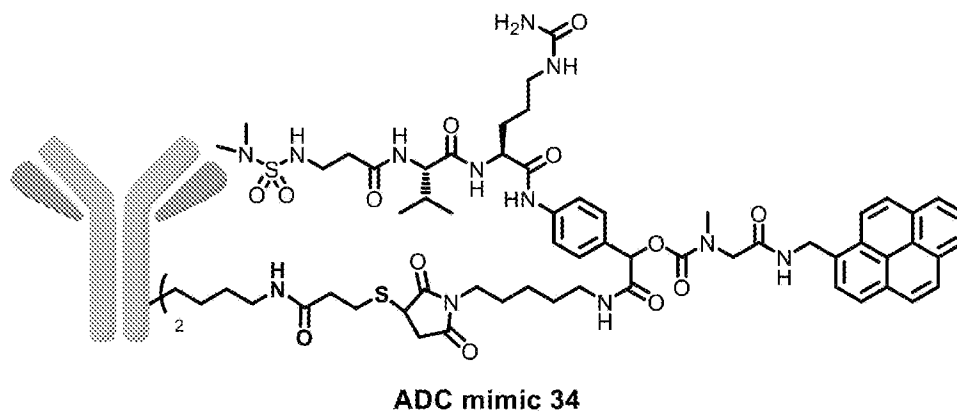
[化341]



[1065] (20-1-14) ADC mimic 34の合成

同様に実施例19-16のLinker-payload mimic (124)とチオール含有抗体より、下記構造のADC mimic 34を合成した。ESI-TOFMS分析を行い、反応生成物はLinker-payload mimic (124)が2個導入された150365にピークが確認された。

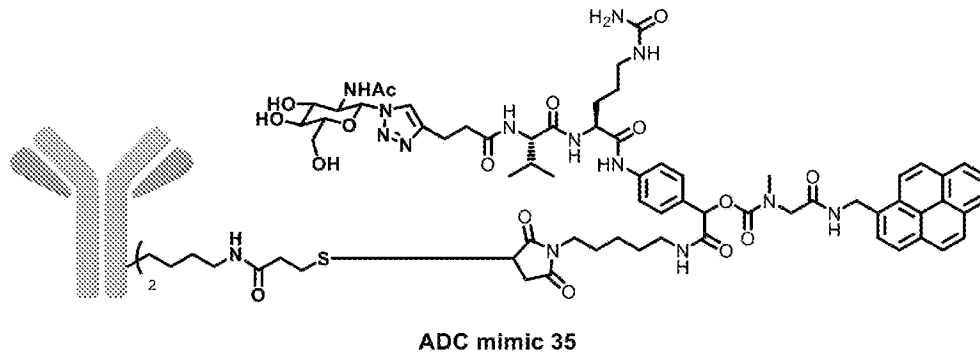
[化342]



[1066] (20-1-15) ADC mimic 35の合成

実施例19-22で合成したLinker-payload mimic (155)とチオール含有抗体より、下記構造のADC mimic 35を合成した。ESI-TOFMS分析を行い、反応生成物はLinker-payload mimic (155)が2個導入された150661にピークが確認された。

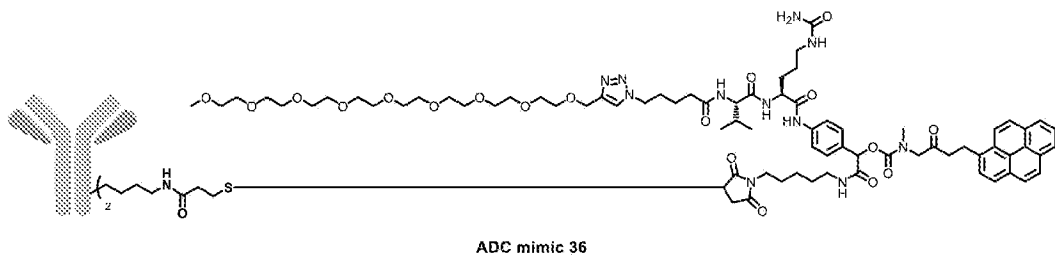
[化343]



[1067] (20-1-16) ADC mimic 36の合成

実施例19-23で合成したLinker-payload mimic (161)とチオール含有抗体より、下記構造のADC mimic 36を合成した。ESI-TOFMS分析を行い、反応生成物はLinker-payload mimic (161)が2個導入された151102にピークが確認された。

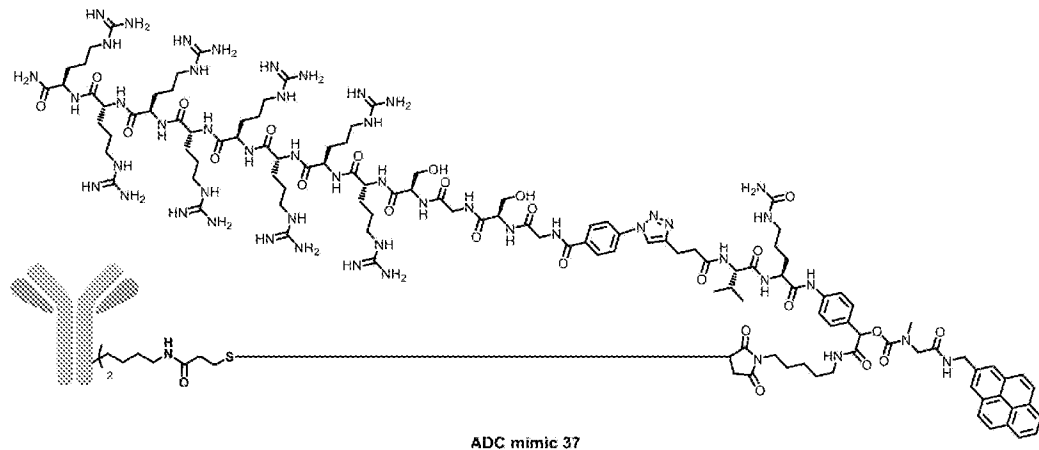
[化344]



[1068] (20-1-17) ADC mimic 37の合成

実施例19-24で合成したLinker-payload mimic (167)とチオール含有抗体より、下記構造のADC mimic 37を合成した。ESI-TOFMS分析を行い、反応生成物はLinker-payload mimic (167)が2個導入された153568にピークが確認された。

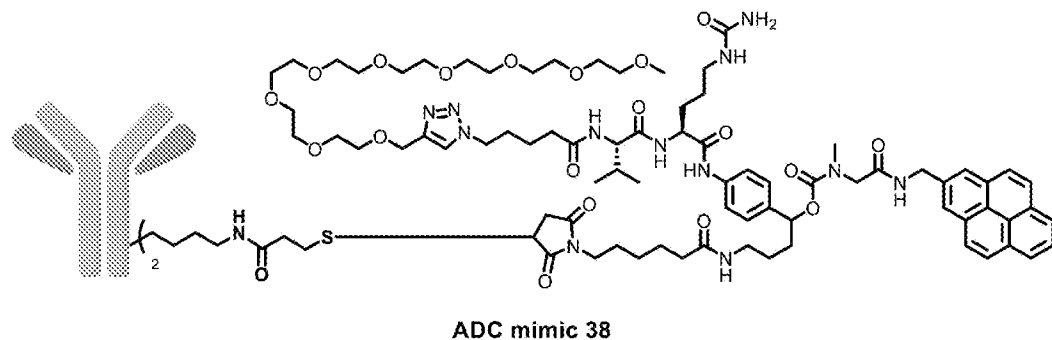
[化345]



[1069] (20-1-18) ADC mimic 38の合成

実施例19-25で合成したLinker-payload mimic (171)とチオール含有抗体より、下記構造のADC mimic 38を合成した。ESI-TOFMS分析を行い、反応生成物はLinker-payload mimic (171)が2個導入された151188にピークが確認された。

[化346]



[1070] (20-2) ADC mimicのDAR解析

実施例20-1で合成したADC mimicのESI-TOFMS分析は既報(WO2019/240287A1)に従って行い、DARは2であることを確認した。

[1071]

[表19]

表19. ADC mimic のDAR

	Linker-payload mimic	実施例/比較例	DAR
ADC mimic 21	Linker-payload mimic (51)	実施例20-1-1	2
ADC mimic 22	Linker-payload mimic (56)	実施例20-1-2	2
ADC mimic 23	Linker-payload mimic (61)	実施例20-1-3	2
ADC mimic 24	Linker-payload mimic (66)	実施例20-1-4	2
ADC mimic 25	Linker-payload mimic (76)	実施例20-1-5	2
ADC mimic 26	Linker-payload mimic (76)	実施例20-1-6	2
ADC mimic 27	Linker-payload mimic (81)	実施例20-1-7	2
ADC mimic 28	Linker-payload mimic (86)	実施例20-1-8	2
ADC mimic 29	Linker-payload mimic (91)	実施例20-1-9	2
ADC mimic 30	Linker-payload mimic (99)	実施例20-1-10	2
ADC mimic 31	Linker-payload mimic (104)	実施例20-1-11	2
ADC mimic 32	Linker-payload mimic (115)	実施例20-1-12	2
ADC mimic 33	Linker-payload mimic (120)	実施例20-1-13	2
ADC mimic 34	Linker-payload mimic (124)	実施例20-1-14	2
ADC mimic 35	Linker-payload mimic (155)	実施例20-1-15	2
ADC mimic 36	Linker-payload mimic (161)	実施例20-1-16	2
ADC mimic 37	Linker-payload mimic (167)	実施例20-1-17	2
ADC mimic 38	Linker-payload mimic (171)	実施例20-1-18	2
ADC mimic 5	Linker-payload mimic (26)	比較例1	2

[1072] 実施例21：疎水性カラムクロマトグラフィー（HIC-HPLC）による、ADCおよびADC mimicの疎水性度の評価

既報（Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732）に従い、HIC-HPLC分析を行った。測定は下記の条件を用いて行った。HICクロマトグラムにおける、ADCのリテンションタイムによってADCの疎水性度を評価することができる。

[1073] 測定システム：Chromaster（登録商標）（日立社製）

カラム：東ソーバイオサイエンス社製Tosoh Biobutyl NP-R 2.5 μ m 4.6 $\times$ 35 mmカラム

グラジエント：溶離液A/Bの線形グラジエント

流速：0.8 mL/分

溶離液A：1.1 M (NH₄)₂SO₄, 25 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (pH 6.0)

溶離液B：25 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (pH 6.0、25 v/v % イソプロパノール添加)

検出器：UV（280nm）

[1074] [表20]

表20. HIC-HPLCを用いたADCおよびADC mimicの疎水性度の評価

	Linker-payload mimic もしくはLinker-payload	実施例/比較例	リテンションタイム
ADC mimic 21	Linker-payload mimic (51)	実施例20-1-1	10.5分
ADC mimic 22	Linker-payload mimic (56)	実施例20-1-2	10.8分
ADC mimic 23	Linker-payload mimic (61)	実施例20-1-3	11.5分
ADC mimic 24	Linker-payload mimic (66)	実施例20-1-4	9.9分
ADC mimic 25	Linker-payload mimic (71)	実施例20-1-5	10.5分
ADC mimic 26	Linker-payload mimic (76)	実施例20-1-6	10.5分
ADC mimic 27	Linker-payload mimic (81)	実施例20-1-7	9.9分
ADC mimic 28	Linker-payload mimic (86)	実施例20-1-8	9.7分
ADC mimic 29	Linker-payload mimic (91)	実施例20-1-9	10.3分
ADC mimic 30	Linker-payload mimic (99)	実施例20-1-10	10.5分
ADC mimic 31	Linker-payload mimic (104)	実施例20-1-11	9.9分
ADC mimic 33	Linker-payload mimic (120)	実施例20-1-13	9.2分
ADC mimic 34	Linker-payload mimic (124)	実施例20-1-14	11.5分
ADC mimic 35	Linker-payload mimic (155)	実施例20-1-15	10.8分
ADC mimic 36	Linker-payload mimic (161)	実施例20-1-16	11.2分
ADC mimic 37	Linker-payload mimic (167)	実施例20-1-17	8.9分
ADC mimic 38	Linker-payload mimic (171)	実施例20-1-18	11.6分
ADC mimic 5	Linker-payload mimic (26)	比較例1	13.6分

[1075] その結果、実施例20-1-1～20-1-18で合成したADC mimicはリテンションタイムが早い傾向であることが確認され、親水性度が高いことがわかる。よって、実施例20-1-1～20-1-18で合成したADC mimicは、血漿クリアランスが遅く、体内に留まる時間が長いと考えられることから、好ましいADCであることが確認された。

[1076] 実施例22：サイズ排除クロマトグラフィー（SEC-HPLC）による、ADCおよびADC mimicの凝集率の評価

既報（Chemistry Select, 2020, 5, 8435-8439）に従い、SEC-HPLC分析を行った。測定は下記の条件を用いて行った。

[1077] 測定システム：1260 HPLC system（Agilent社製）
 カラム：Agilent社製AdvanceBio SEC 300Å 2.7μm, 4.6mm×150mm
 流速：0.25mL/分

溶離液：１００ｍＭリン酸二水素ナトリウム／リン酸水素ナトリウム，２５
０ｍＭ塩化ナトリウムの水溶液（ｐＨ６．８），１０％ｖ／ｖイソプロパノ
ール

検出器：ＵＶ（２８０ｎｍ）

[1078] [表21]

表 2 1 . S E C - H P L C を用いた A D C および A D C m i m i c の凝集率の評価

	Linker-payload mimic もしくはLinker-payload	実施例/比較例	凝集率
ADC mimic 21	Linker-payload mimic (51)	実施例20-1-1	2.7%
ADC mimic 22	Linker-payload mimic (56)	実施例20-1-2	1.7%
ADC mimic 23	Linker-payload mimic (61)	実施例20-1-3	2.0%
ADC mimic 24	Linker-payload mimic (66)	実施例20-1-4	1.2%
ADC mimic 25	Linker-payload mimic (71)	実施例20-1-5	1.7%
ADC mimic 26	Linker-payload mimic (76)	実施例20-1-6	2.0%
ADC mimic 27	Linker-payload mimic (81)	実施例20-1-7	2.2%
ADC mimic 28	Linker-payload mimic (86)	実施例20-1-8	2.2%
ADC mimic 29	Linker-payload mimic (91)	実施例20-1-9	2.1%
ADC mimic 30	Linker-payload mimic (99)	実施例20-1-10	1.4%
ADC mimic 31	Linker-payload mimic (104)	実施例20-1-11	2.0%
ADC mimic 33	Linker-payload mimic (120)	実施例20-1-13	1.3%
ADC mimic 34	Linker-payload mimic (124)	実施例20-1-14	2.4%
ADC mimic 35	Linker-payload mimic (155)	実施例20-1-15	0.9%
ADC mimic 36	Linker-payload mimic (161)	実施例20-1-16	0.9%
ADC mimic 37	Linker-payload mimic (167)	実施例20-1-17	0.1%
ADC mimic 38	Linker-payload mimic (171)	実施例20-1-18	0.5%
ADC mimic 5	Linker-payload mimic (26)	比較例1	2.7%

[1079] 実施例 2 3 : 酵素カテプシン B を用いた、A D C m i m i c の評価

各種 A D C m i m i c のカテプシン B による切断能は下記のように、A
D C m i m i c から脱落した蛍光分子の量を解析することで評価した。

[1080] （ 2 3 - 1 ） カテプシン B 切断性試験

実施例 5 と同様の方法で試験を行った。

[1081] （ 2 3 - 2 ） H P L C 分析を用いた、脱落した蛍光分子の量の解析

実施例 5 と同様の方法で分析、解析を行った。

[1082]

[表22]

表 2 2 . A D C m i m i c のカテプシンB 切断能の評価

	Linker-payload mimic造	実施例/比較例	6時間における蛍光分子の脱落率
ADC mimic 21	Linker-payload mimic (51)	実施例20-1-1	41%
ADC mimic 22	Linker-payload mimic (56)	実施例20-1-2	180%
ADC mimic 23	Linker-payload mimic (61)	実施例20-1-3	200%
ADC mimic 24	Linker-payload mimic (66)	実施例20-1-4	163%
ADC mimic 25	Linker-payload mimic (71)	実施例20-1-5	89%
ADC mimic 26	Linker-payload mimic (76)	実施例20-1-6	200%
ADC mimic 28	Linker-payload mimic (86)	実施例20-1-8	124%
ADC mimic 33	Linker-payload mimic (120)	実施例20-1-13	200%
ADC mimic 34	Linker-payload mimic (124)	実施例20-1-14	200%
ADC mimic 5	Linker-payload mimic (26)	比較例1	200%

[1083] 表 2 2 に示した通り、合成したADC m i m i c は十分なカテプシンB 切断を有していることが分かった。

[1084] 実施例 2 4 : マウス血漿を用いた、ADC m i m i c の評価

(2 4 - 1) ADC m i m i c の血漿中安定性試験

実施例 6 と同様の方法で試験を行った。

[1085] (2 4 - 2) H P L C 分析を用いた、脱落した蛍光分子の量の解析

実施例 6 と同様の方法で分析、解析を行った。

[1086] [表23]

表 2 3 . A D C m i m i c を用いた血漿中安定性試験結果

	Linker-payload mimic	実施例/比較例	Day=4におけるpa yloadの脱落率
ADC mimic 21	Linker-payload mimic (51)	実施例20-1-1	3%
ADC mimic 22	Linker-payload mimic (56)	実施例20-1-2	3%
ADC mimic 23	Linker-payload mimic (61)	実施例20-1-3	8%
ADC mimic 24	Linker-payload mimic (66)	実施例20-1-4	4%
ADC mimic 25	Linker-payload mimic (71)	実施例20-1-5	22%
ADC mimic 26	Linker-payload mimic (76)	実施例20-1-6	3%
ADC mimic 28	Linker-payload mimic (86)	実施例20-1-8	4%
ADC mimic 31	Linker-payload mimic (104)	実施例20-1-13	10%
ADC mimic 33	Linker-payload mimic (120)	実施例20-1-14	12%
ADC mimic 34	Linker-payload mimic (124)	実施例20-1-14	2%
ADC mimic 5	Linker-payload mimic (26)	比較例1	52%

[1087] その結果、比較例 1 で合成したADC m i m i c に対し、実施例 2 0 - 1 - 5、2 0 - 1 - 1 4 で合成したADC m i m i c は 2 倍以上の安定性を示し、実施例 2 0 - 1 - 3、2 0 - 1 - 1 3 で合成したADC m i m i

cは5倍以上の安定性を示し、実施例20-1-1-, 20-1-2, 20-1-4, 20-1-6, 20-1-8, 20-1-14で合成したADC mimicは10倍以上の安定性を示した。

[1088] 実施例25: Linker-payloadの合成

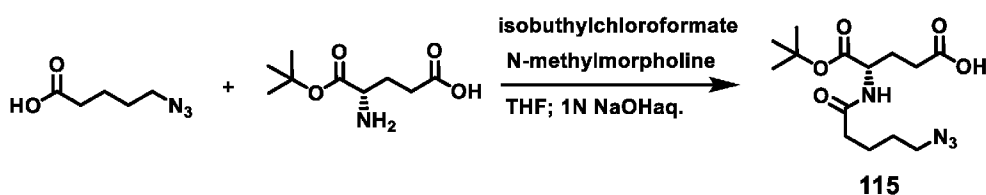
実施例(12-3-5)で合成したLinker-payload (42)のNMRスペクトルデータは次の通りであった。

[1089] ^1H NMR (300 MHz; DMSO- d_6) δ 12.06 (brs, 2H), 10.05–10.07 (m, 1H), 8.47–8.28 (m, 1H), 8.29–8.19 (m, 1H), 8.13–8.04 (m, 3H), 7.91–7.56 (m, 5H), 7.39–7.17 (m, 7H), 6.99 (s, 2H), 5.99 (s, 1H), 5.86–5.67 (m, 1H), 5.43–5.35 (m, 3H), 4.77–4.16 (m, 6H), 4.00–3.98 (m, 2H), 3.80–3.76 (m, 1H), 3.52–3.18 (m, 12H), 3.01–2.73 (m, 9H), 2.26–2.14 (m, 6H), 2.12–2.09 (m, 2H), 1.97–1.90 (m, 2H), 1.84 (s, 6H), 1.76–1.69 (m, 5H), 1.43–1.35 (m, 10H), 1.23–1.14 (m, 3H), 1.01–0.96 (m, 7H), 0.83–0.68 (m, 24H).

[1090] 実施例26: ADCの合成

(26-1-1) リンカー中間体(115)の合成

[1091] [化347]



[1092] 5-アジドペンタン酸(800 mg, 5.59 mmol)をTHF(14 mL)に溶解させ、クロロギ酸イソブチル(808 μL , 6.15 mmol)、N-メチルモルホリン(873 μL , 8.39 mmol)を加え0℃に

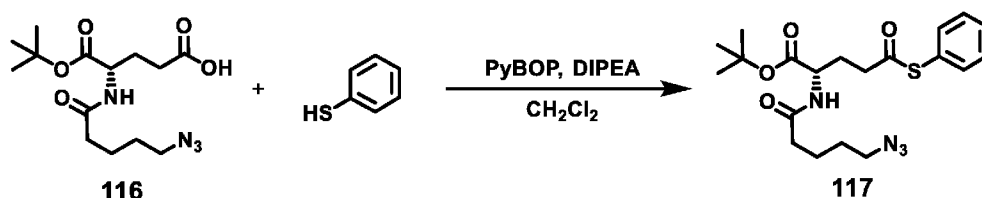
て30分攪拌した後、1 M NaOH水溶液（4 mL）に溶解したヒドラジン水和物（1.36 g, 6.71 mmol）を加えて室温にて3時間攪拌した。減圧下濃縮した後、1 M NaOH水溶液を加え、系内のpHをpH 10に調整し、酢酸エチルで洗浄後、水層に1 M HCl水溶液を加え、系内のpHを3.0に調整し、酢酸エチルを加えて洗浄し、得られた酢酸エチル溶液に硫酸ナトリウムを加えた。フィルトレーションにより硫酸ナトリウムを取り除き、減圧下濃縮カラムクロマトグラフィー（ジクロロメタン：メタノール＝10：1）にて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することにより、リンカー中間体（115）を得た。

[1093] ^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 6.29 (d, $J=7.7$ Hz, 1H), 4.56 (td, $J=8.0, 4.9$ Hz, 1H), 3.32 (t, $J=6.6$ Hz, 2H), 2.53–2.38 (m, 3H), 2.36–2.16 (m, 3H), 2.12 (s, 2H), 1.96 (dq, $J=14.7, 7.6$ Hz, 1H), 1.84–1.59 (m, 4H), 1.50 (s, 9H).

[1094] MS (ESI) m/z : 329 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[1095] (26-1-2) リンカー中間体（117）の合成

[1096] [化348]



[1097] リンカー中間体（116）（2.41 g, 5.59 mmol）をジクロロメタン（28 mL）に溶解させ、チオフェノール（627 μL , 6.15 mmol）、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ（3.49 g, 6.71 mmol）、DIPEA（1.42 mL, 8.39 mmol）を加え、室温にて2時間攪拌した。その後、減圧下濃縮し、カラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル＝4：1）にて精製した。生成物が含まれるフラクシヨ

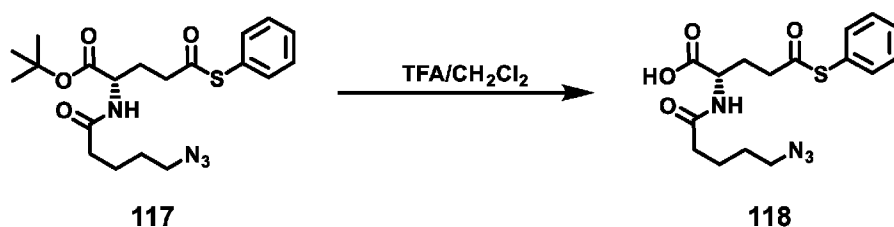
ンを回収し、減圧下濃縮することにより、リンカー中間体 (117) を得た (2.20 g, 5.23 mmol)。

[1098] ^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.43 (s, 5H), 6.10 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 4.55 (td, $J=7.7, 4.9$ Hz, 1H), 3.31 (t, $J=6.7$ Hz, 2H), 2.87–2.63 (m, 2H), 2.28 (dd, $J=8.7, 5.9$ Hz, 2H), 2.16–1.98 (m, 1H), 1.83–1.58 (m, 4H), 1.50 (s, 9H), 1.37–1.22 (m, 2H), 0.91 (t, $J=6.7$ Hz, 1H)。

[1099] MS (ESI) m/z : 421 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[1100] (26-1-3) リンカー中間体 (118) の合成

[1101] [化349]



[1102] リンカー中間体 (117) (2.20 g, 5.23 mmol) をジクロロメタン (10 mL) に溶解させ、トリフルオロ酢酸 (10 mL) を加えて、室温にて1時間攪拌した後、減圧下濃縮しジクロロメタンを除去し、水を加えて凍結乾燥することにより、リンカー中間体 (118) を得た (1.98 g, 5.43 mmol)。

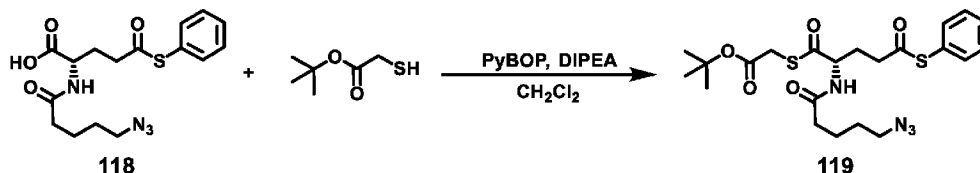
[1103] ^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.44 (s, $J=6.3, 4.6, 2.4$ Hz, 5H), 6.76 (s, 1H), 4.62 (td, $J=7.5, 4.9$ Hz, 1H), 3.31 (t, $J=6.6$ Hz, 2H), 2.88 (qt, $J=16.8, 6.8$ Hz, 2H), 2.33 (dt, $J=12.4, 6.8$ Hz, 3H), 2.18 (dq, $J=14.4, 7.4$ Hz, 1H), 1.74 (dq, $J=11.8, 7.5, 6.9$ Hz, 2H), 1.63 (ddd, $J=17.7, 10.5, 4.8$ Hz

, 2 H) .

[1104] MS (ESI) m/z : 365 [M+H]⁺

[1105] (26-1-4) リンカー中間体 (119) の合成

[1106] [化350]



[1107] リンカー中間体 (118) (100 mg, 0.274 mmol) をジクロロメタン (3 mL) に溶解させ、(40.6 μ L, 0.280 mmol)、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ (150 mg, 0.288 mmol)、DIPEA (70.1 μ L, 0.412 mmol) を加え、室温にて2時間攪拌した。1 M HCl 水溶液を加えて系内を pH 3 に調整し、ジクロロメタンを加えて希釈し、水、食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムを加えた。フィルトレーションにより、硫酸ナトリウムを除去した後、減圧下濃縮し、カラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 4 : 1) にて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することにより、リンカー中間体 (119) を得た (84.7 mg, 0.171 mmol)。

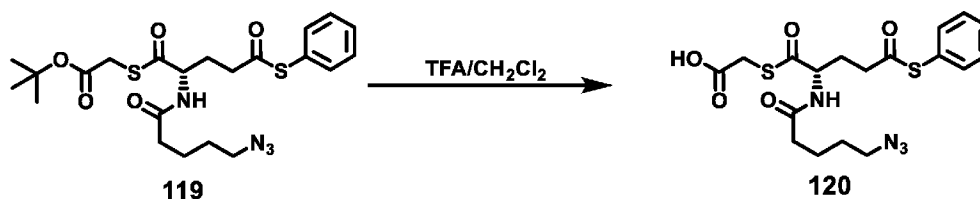
[1108] ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 7.50–7.38 (m, 5H), 6.33 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 4.78 (td, J = 7.8, 4.6, 3.0 Hz, 1H), 3.70–3.54 (m, 2H), 3.32 (dt, J = 9.1, 6.7 Hz, 2H), 2.96–2.67 (m, 2H), 2.30 (pd, J = 7.1, 4.5 Hz, 2H), 1.85–1.60 (m, 6H), 1.49 (d, J = 2.8 Hz, 9H) .

[1109] MS (ESI) m/z : 495 [M+H]⁺

[1110] (26-1-5) リンカー中間体 (120) の合成

[1111]

[化351]



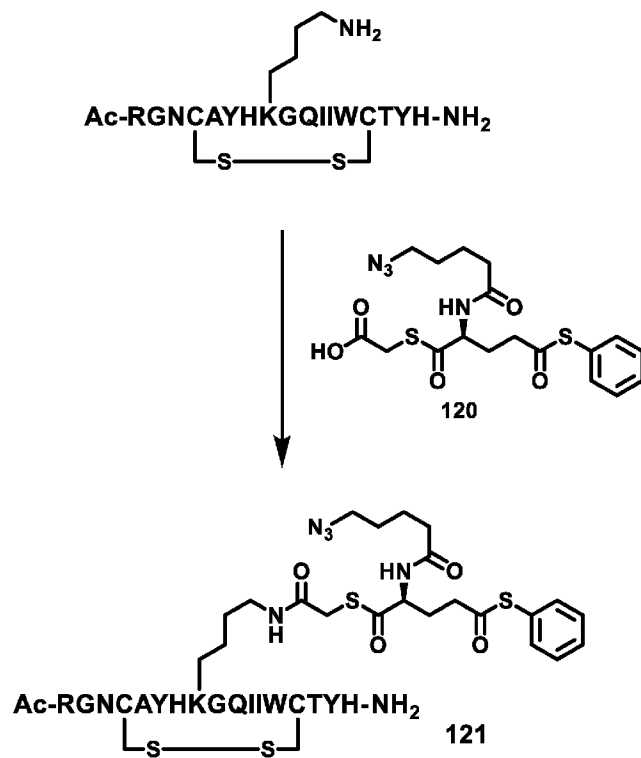
[1112] リンカー中間体（119）（84.7 mg, 0.171 mmol）をジクロロメタン（5 mL）に溶解させ、トリフルオロ酢酸（5 mL）を加えて、室温にて1時間攪拌した後、減圧下濃縮しジクロロメタンを除去し、水を加えて凍結乾燥した後、カラムクロマトグラフィー（ジクロロメタン：メタノール＝10：1）にて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりリンカー中間体（120）を得た（46.8 mg, 0.107 mmol）。

[1113] ^1H NMR（400 MHz, Me t h a n o l - d ₄） δ 7.44（dq, $J=2.3, 1.5$ Hz, 5H）, 4.69–4.57（m, 1H）, 3.79–3.67（m, 2H）, 3.40–3.30（m, 2H）, 2.89–2.71（m, 2H）, 2.44–2.23（m, 4H）, 2.08–1.95（m, 1H）, 1.82–1.61（m, 4H）。

[1114] MS（ESI） m/z ：439 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[1115] （26-2）アジド基を有する親和性試薬（18）の調製

[化352]

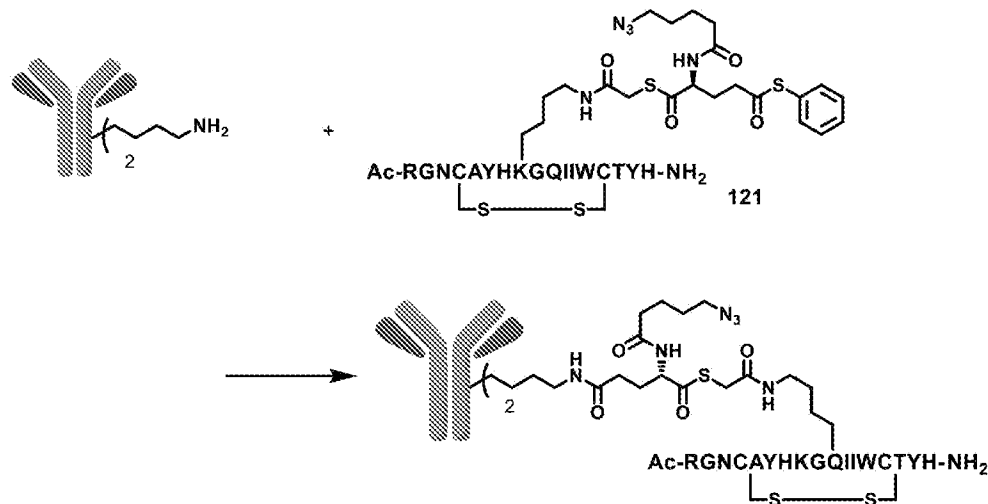


(上記アミノ酸配列は、配列番号1のアミノ酸配列である。)

[1116] 既報 (WO 2019/240287 A1) 記載の Ac-RGNCA YHKGQIIWCTYH-NH₂ (配列番号1、30.9 mg, 14.9 μmol、ただし、4番目と14番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合している。) をジメチルホルムアミド (468 μL) に溶解し、実施例6-1-5で合成したリンカー中間体 (120) 46.8 mg, 0.107 mmol)、WSC・HCl (29.7 mg, 0.155 mmol) を加え、室温にて5時間攪拌した後、逆相分取クロマトグラフィーにより、溶出した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記修飾試薬 (121) を得た (15.1 mg, 6.02 μmol)。

[1117] (26-3) 2分子のペプチド試薬の Trastuzumab への導入

[化353]

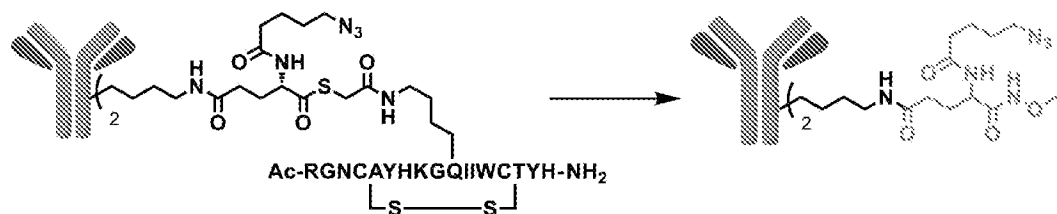


(上記アミノ酸配列は、配列番号 1 のアミノ酸配列である。)

[1118] 続いて、実施例 26-2 で調製したペプチド試薬 (121) を用いて、トラスツズマブに対して既報 (WO 2019/240287 A1) の手法に従い、コンジュゲーションを実施した。結果、修飾試薬 (121) が導入された抗体を得た。ペプチド試薬 (121) が導入された抗体の D A R 分析は既報 (Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732) に従い、H I C-H P L C 分析を行い、2 つのペプチド試薬が導入されたことを確認した。

[1119] (26-4) アジド基が導入されたトラスツズマブ (T-1) の合成

[化354]



(上記アミノ酸配列は、配列番号 1 のアミノ酸配列である。)

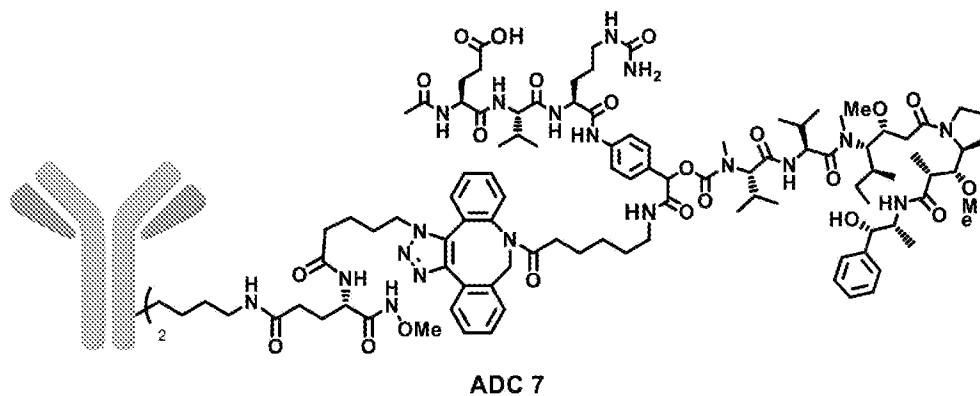
[1120] 実施例 26-3 で得た修飾試薬 (121) が導入された抗体に対して、既報 (WO 2019/240287 A1) の手法を参考に、メトキシアミン溶液を加え、室温で 3 時間振盪することで、切断反応を実施した。結果、アジド基が導入された抗体を得た。分析は既報 (Anal. Chem., 201

9, 91, 20, 12724-12732) に従い、HIC-HPLC分析を行い、アジド基が導入されていることを確認した。

[1121] (26-4) ADC 7の合成

上記アジド導入抗体に対して、Linker-payload (40) を加え、ADC (7) を得た。ESI-TOFMS分析を行い、反応生成物は Linker-payload (40) が2個導入された151276にピークが確認された。また、ESI-TOFMS分析を既報 (WO2019/240287A1) に従って行い、DARは2であることを確認した。

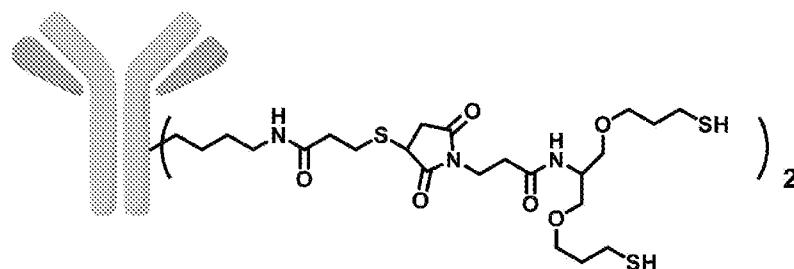
[化355]



[1122] (26-5) ADC 18の合成

実施例16に記載の方法で調製した抗体重鎖の246位または248位のリジン残基の側鎖のアミノ基を介して、トラスツズマブ（ヒト化IgG1抗体）にチオール基が位置選択的に導入されている化合物に対し、国際公開第2022/154127号 (WO2022/154127A1) の実施例19-6に記載の手法で下記抗体中間体を得た。

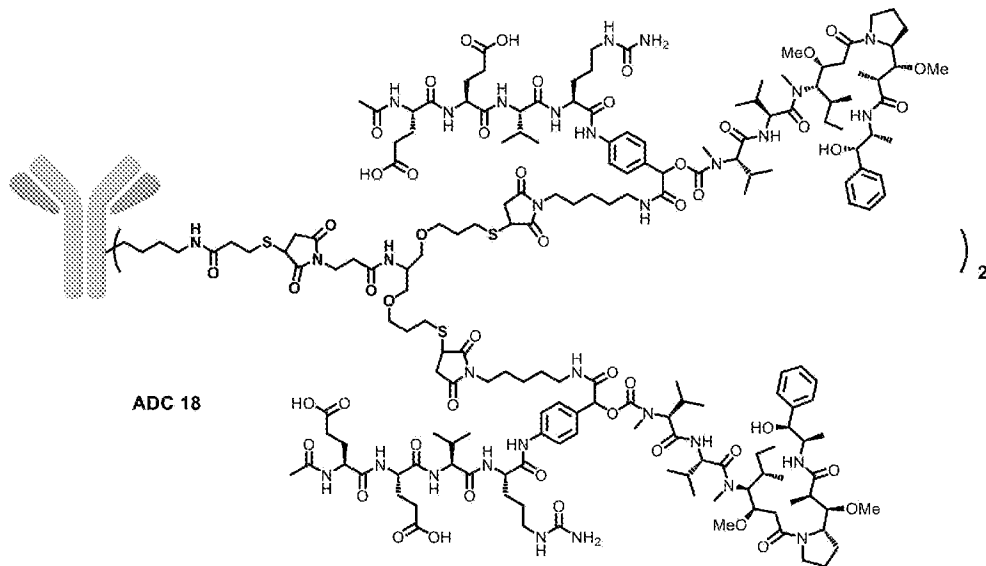
[化356]



[1123] 上記抗体中間体に対して、Linker-payload (42) を加え

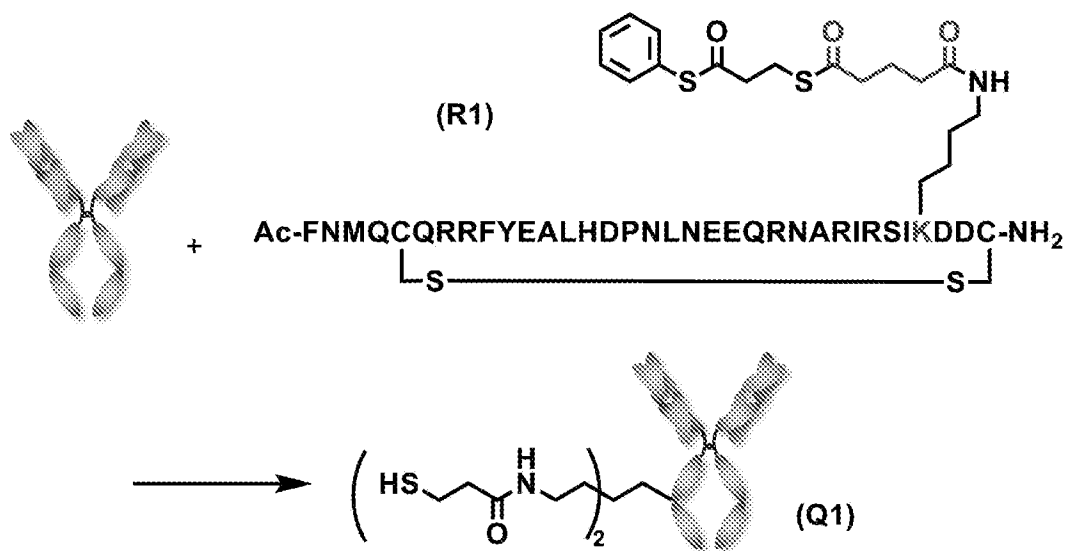
、ADC (18) を得た。ESI-TOFMS 分析を行い、反応生成物は Linker-payload (42) が4個導入された155485にピークが確認された。また、ESI-TOFMS 分析を既報 (WO2019/240287A1) に従って行い、DARは4であることを確認した。

[化357]



[1124] (26-6-1) 抗体のLys 288にチオール基を2分子結合させた抗体 (Q1) の合成

[化358]

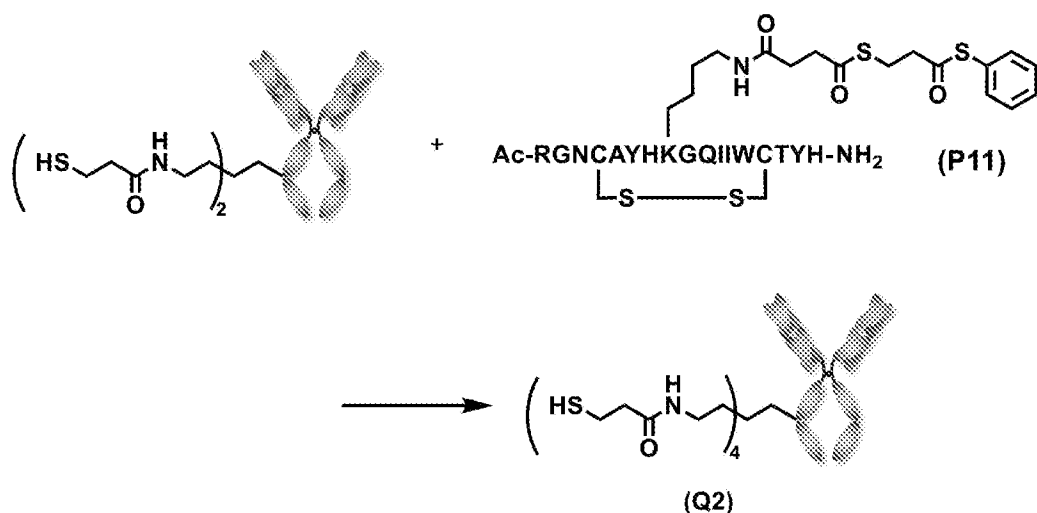


(上記アミノ酸配列の配列番号は、配列番号13である)

[1125] 抗ヒトHER2モノクローナル抗体Trastuzumab（中外製薬）と既報（WO2022/154116A1）記載のペプチド試薬（R1）を用いて、既報（WO2022/154116A1）記載の手法に従うことで2分子のチオール基を導入した抗体を取得した。既報（Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732）に従い、HIC-HPLC分析を行い、2分子のチオール基が導入されたことを確認した。

[1126] (26-6-2) 抗体のLys248にチオール基を2分子結合させた抗体(Q2)の合成

[化359]



(上記アミノ酸配列の配列番号は、配列番号1である)

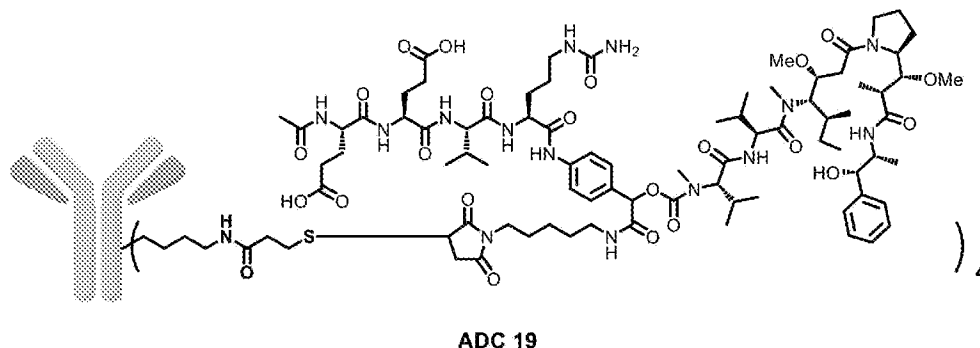
[1127] 実施例 26-7-1 で合成した 2 分子のチオール基が結合した抗体 (Q1) と既報 (WO2019/240287A1) 記載のペプチド試薬 (P11) を用いて、既報 (WO2019/240287A1) 記載の手法に従うことで 4 分子のチオール基を導入した抗体を取得した。既報 (Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732) に従い、HIC-HPLC 分析を行い、4 分子のチオール基が導入されたことを確認した。

[1128] (2 6-6-3) ADC 19の合成

上記4分子のチオール基が結合した抗体（Q2）に対して、Linker-payload（42）を加え、ADC（19）を得た。ESI-TOF MS分析を行い、反応生成物はLinker-payload（42）が4

個導入された154880にピークが確認された。また、ESI-TOFMS分析を既報（WO2019/240287A1）に従って行い、DARは4であることを確認した。

[化360]



[1129] 実施例27：マウス血漿を用いた、ADCの評価

(27-1) ADCの血漿中安定性試験

マウス血漿（Charles River社製）500 μ Lに対し、0.1 mg/mLの濃度になるようにADCを加えたのち滅菌ろ過を行った。この溶液を6本のエッペンチューブに50 μ Lずつ分注した。6本のサンプルのうち3本は、37℃に設定したインキュベーターで4日間保管した。残りの3本は-80℃の冷凍庫の中で同様に4日間保管した。各サンプルにアセトニトリルを100 μ Lずつ加えてボルテックスで攪拌したのち遠心分離を行うことで、沈殿物を得た。生じた上澄み溶液を回収し、HPLC分析を行った。

[1130] (27-2) HPLC分析を用いた、脱落したpayloadの量の解析

測定は、液体クロマトグラフィー質量分析法（タンデム質量分析法を含む）を用いて、ADCから脱落したペイロード量を測定した。実施例27-1で-80℃の冷凍庫の中で同様に4日間保管したサンプルを0日目のものとし、実施例27-1にて37℃で4日間インキュベーションした3本のサンプルを4日目のものとし、4日目サンプルと0日目サンプルから検出されたペイロードのMS強度を抽出イオンクロマトグラムによってそれぞれ算出し、それらの差分を解析した。

[1131] 別途MMAEを用いて、HPLCによるTICのエリア面積と、濃度の相関を算出した。その算出式を用いて上記各ADCの蛍光強度のTICを濃度に変換した。Day 0の濃度を100%としたときの、前述のイオンクロマトグラムの差分の割合を脱落率として算出した。

[1132] [表24]

表24. ADCを用いた血漿中安定性試験結果

	Linker-payload	実施例/比較例	Day=4におけるpayloadの脱落率
ADC 4	Linker-payload (35)	実施例16-1	5%
ADC 5	Linker-payload (42)	実施例16-2	0%
ADC 7	Linker-payload (40)	実施例26-4	2%
ADC 12	Linker-payload (130)	実施例16-6	0%
ADC 13	Linker-payload (132)	実施例16-7	0%
ADC 15	Linker-payload (141)	実施例16-9	1%
ADC 18	Linker-payload (42)	実施例26-5	1%
ADC 19	Linker-payload (42)	実施例26-6-3	1%

[1133] その結果、実施例16-1, 16-2, 26-4, 16-6, 16-7, 16-9, 26-5, 26-6-3で合成したADCは高い安定性を持つことが分かった。

[1134] 実施例28: マウス血漿を用いた、ADCの評価

(28-1) ADCの血漿中安定性試験

マウス血漿 (Charles River社製) 500 μ L に対し、0.1 mg/mL の濃度になるようにADCを加えたのち滅菌ろ過を行った。この溶液を6本のエッペンチューブに50 μ L ずつ分注した。6本のサンプルのうち3本は、37°Cに設定したインキュベーターで4日間保管した。残りの3本は-80°Cの冷凍庫の中で同様に4日間保管した。各サンプルにアセトニトリルを100 μ L ずつ加えてボルテックスで攪拌したのち遠心分離を行うことで、沈殿物を得た。生じた上澄み溶液を回収し、HPLC分析を行った。

[1135] (28-2) HPLC分析を用いた、脱落したpayloadの量の解析

測定は、液体クロマトグラフィー質量分析法 (タンデム質量分析法を含む) を用いて、ADCから脱落したペイロード量を測定した。実施例28-1

で -80°C の冷凍庫の中で同様に4日間保管したサンプルを0日目のものとし、実施例28-1にて 37°C で4日間インキュベーションした3本のサンプルを4日目のものとし、4日目サンプルと0日目サンプルから検出されたペイロードのMS強度を抽出イオンクロマトグラムによってそれぞれ算出し、それらの差分を解析した。ペイロードの脱落率の算出は、実施例27-2に従って実施した。

[1136] [表25]

表25. ADCを用いた血漿中安定性試験結果

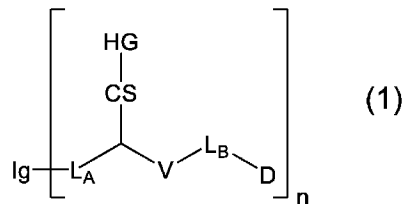
	Linker-payload mimic	実施例/比較例	Day=4におけるpayloadの脱落率
ADC 2	Linker-payload (42)	実施例13-2	7%
ADC 9	Linker-payload (125)	実施例13-4	14%

[1137] その結果、実施例13-2、13-4で合成したADCは高い安定性を持つことが分かった。

請求の範囲

[請求項1] 下記式（1）：

[化1]



[式中、

l g は、2 個の重鎖および2 個の軽鎖を含むイムノグロブリン単位を示し、かつ、l g 中の特定アミノ酸残基の側鎖中の官能基を介して、l g に隣接するL_Aと結合しており、

H G は、親水性基、または親水性基を含む1 価の基を示し、

C S は、切断性部位を含む2 価の基を示し、

V は、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基（N H）を示し、

L_A、およびL_Bは、それぞれ独立して、2 価の基を示し、

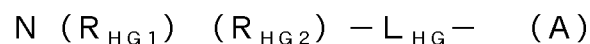
D は、機能性物質を示し、

前記イムノグロブリン単位あたりの前記結合の平均数nは、1. 5 以上である。〕で表される構造単位を含む、抗体および機能性物質のコンジュゲートまたはその塩。

[請求項2] イムノグロブリン単位がヒトイムノグロブリン単位である、請求項1 記載のコンジュゲートまたはその塩。

[請求項3] ヒトイムノグロブリン単位がヒトl g G抗体である、請求項2 記載のコンジュゲートまたはその塩。

[請求項4] 親水性基を含む1 価の基（H G－）が、下記式（A）：



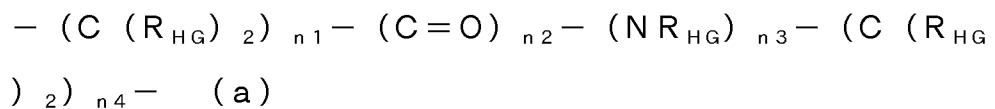
[式中、

L_{HG}は、結合、または親水性基を含んでいてもよい2 価の基を示し、

R_{HG1} 、および R_{HG2} は、それぞれ独立して、水素原子、親水性基、または親水性基を含んでいてもよい 1 価の基を示し、

少なくとも 1 つの親水性基が、 L_{HG} 、 R_{HG1} 、および R_{HG2} からなる群より選ばれる 1 以上の部位において含まれる。) で表される 1 価の基である、請求項 1 記載のコンジュゲートまたはその塩。

[請求項5] 親水性基を含んでいてもよい 2 価の基 ($-L_{HG}-$) が、下記式 (a) :



[式中、

複数の R_{HG} は、それぞれ独立して、水素原子、親水性基、または親水性基を含んでいてもよい 1 価の基を示し、

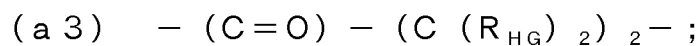
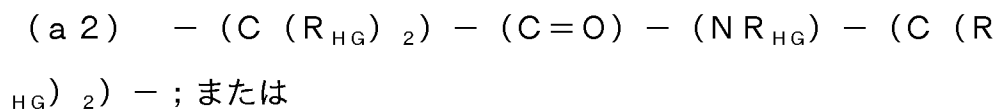
$n1$ は、0～3 の整数であり、

$n2$ は、0 または 1 の整数であり、

$n3$ は、0 または 1 の整数であり、

$n4$ は、0～3 の整数である。) で表される 2 価の基である、請求項 4 記載の位置選択的なコンジュゲートまたはその塩。

[請求項6] 式 (a) で表される 2 価の基が、下記式 (a1)、(a2)、または (a3) :



[式中、

複数の R_{HG} は、それぞれ独立して、水素原子、親水性基、または親水性基を含む炭素原子数 1～6 のアルキル基を示す。) で表される 2 価の基である、請求項 5 記載のコンジュゲートまたはその塩。

[請求項7] 親水性基が、カルボン酸基、スルホン酸基、スルファミド基、水酸

基、ポリエチレングリコール基、ポリサルコシン基、および糖部分からなる群より選ばれる1以上の基である、請求項1記載のコンジュゲートまたはその塩。

[請求項8] 親水性基が、スルホン酸基、スルファミド基、水酸基、ポリエチレングリコール基、ポリサルコシン基、および糖部分からなる群より選ばれる1以上の基である、請求項1記載のコンジュゲートまたはその塩。

[請求項9] 切断性部位が、酵素による切断性部位である、請求項1記載のコンジュゲートまたはその塩。

[請求項10] 酵素が、カテプシンB、プラスミン、レグマイン、およびカスパーゼからなる群より選ばれる1以上の酵素である、請求項9記載のコンジュゲートまたはその塩。

[請求項11] 酵素が、プラスミン、レグマイン、およびカスパーゼからなる群より選ばれる1以上の酵素である、請求項10記載のコンジュゲートまたはその塩。

[請求項12] 酵素による切断性部位が、VC、VA、AA、GGFG（配列番号2）、FK、VK、AK、GC、VLK、NN、またはDDVD（配列番号3）を含む、請求項9記載のコンジュゲートまたはその塩。

[請求項13] 酵素による切断性部位が、AA、GGFG（配列番号2）、FK、VK、AK、GC、VLK、NN、またはDDVD（配列番号3）を含む、請求項9記載のコンジュゲートまたはその塩。

[請求項14] 親水性基を含む1価の基が、カルボン酸基を側鎖中に含む1以上のアミノ酸残基を含む、請求項1記載のコンジュゲートまたはその塩。

[請求項15] HGCSからなる構成単位が、カルボン酸基を側鎖中に含む1以上のアミノ酸残基および酵素による切断性部位を含むペプチド部分を含む、請求項1記載のコンジュゲートまたはその塩。

[請求項16] 前記ペプチド部分が、EVC、EEVC（配列番号4）、EEEEVC（配列番号5）、DVC、EVA、EAA、EGGFG（配列番

号6)、E F K、E E F K (配列番号7)、E E V K (配列番号8)、E E A K (配列番号9)、E G C、E E V L K (配列番号10)、E N N、E D D V D (配列番号11)、 β -A l a-V C、またはE E G C (配列番号12)を含む、請求項15記載のコンジュゲートまたはその塩。

[請求項17] 前記ペプチド部分が、E A A、E G G F G (配列番号6)、E F K、E E F K (配列番号7)、E E V K (配列番号8)、E E A K (配列番号9)、E G C、E E V L K (配列番号10)、E N N、E D D V D (配列番号11)、 β -A l a-V C、またはE E G C (配列番号12)を含む、請求項15記載のコンジュゲートまたはその塩。

[請求項18] 切断性部位が、酸性条件下、または還元条件下での切断性部位である、請求項1記載のコンジュゲートまたはその塩。

[請求項19] 切断性部位が、ジスルフィド結合である、請求項1記載のコンジュゲートまたはその塩。

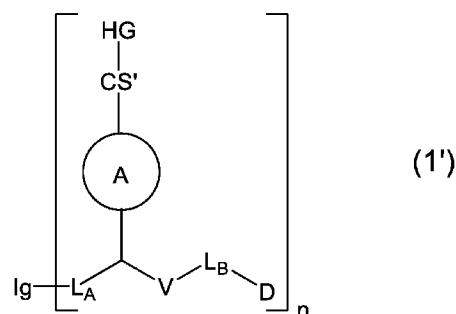
[請求項20] L_A が、親水性基または機能性物質を含む側鎖を有する2価の基である、請求項1記載のコンジュゲートまたはその塩。

[請求項21] 機能性物質が、医薬、標識物質、または安定化剤である、請求項1記載のコンジュゲートまたはその塩。

[請求項22] 前記コンジュゲートは、サイズ排除クロマトグラフィーにより分析したときに、2.6%以下の凝集率を示す、請求項1記載のコンジュゲートまたはその塩。

[請求項23] 式(1)で表される構造単位が、下記式(1')：

[化2]



〔式中、

I g は、2 個の重鎖および2 個の軽鎖を含むイムノグロブリン単位を示し、かつ、I g 中の特定アミノ酸残基の側鎖中の官能基を介して、I g に隣接するL_Aと結合しており、

HG は、親水性基、または親水性基を含む1 価の基を示し、

CS' は、切断性部位を含む2 価の基を示し、

環A は、置換基を有していてもよい2 価の芳香族環基（ここで、2 価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

V は、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基（NH）を示し、

L_A、およびL_Bは、それぞれ独立して、2 価の基を示し、

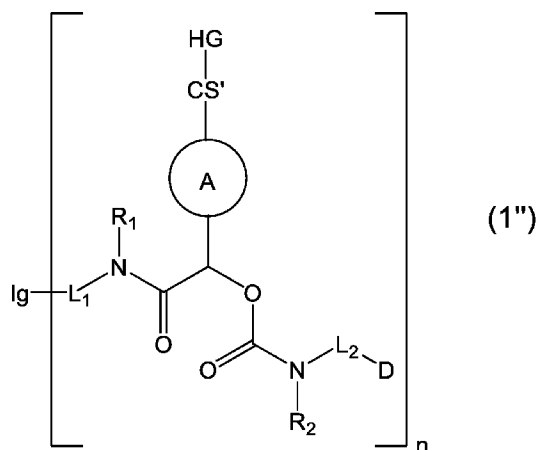
D は、機能性物質を示し、

前記イムノグロブリン単位あたりの前記結合の平均数n は、1.5 以上である。〕で表される構造単位である、請求項1 記載のコンジュゲートまたはその塩。

〔請求項24〕 環A が、置換基を有していてもよいフェニレン基である、請求項2 3 記載のコンジュゲートまたはその塩。

〔請求項25〕 式（1'）で表される構造単位が、下記式（1''）：

〔化3〕



〔式中、

I g は、2 個の重鎖および2 個の軽鎖を含むイムノグロブリン単位

を示し、かつ、 I_g 中の特定アミノ酸残基の側鎖中の官能基を介して、 I_g に隣接する L_A と結合しており、

HG は、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

CS' は、切断性部位を含む2価の基を示し、

環 A は、置換基を有していてもよい2価の芳香族環基（ここで、2価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

R_1 、および R_2 は、それぞれ独立して、水素原子、または1価の基を示し、

L_1 、および L_2 は、それぞれ独立して、2価の基を示し、

D は、機能性物質を示し、

前記イムノグロブリン単位あたりの前記結合の平均数 n は、1.5以上である。〕で表される構造単位である、請求項23記載のコンジュゲートまたはその塩。

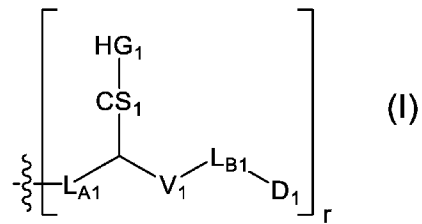
[請求項26] 前記特定アミノ酸残基の側鎖中の官能基が、リジン残基の側鎖中のアミノ基であり、かつ、 n が、1.5～2.5である、請求項1～25のいずれか一項記載のコンジュゲートまたはその塩。

[請求項27] L_A がカルボニル基を有し、
結合が、リジン残基の側鎖中のアミノ基、および L_A 中のカルボニル基の結合によるアミド結合により達成される、請求項26記載のコンジュゲートまたはその塩。

[請求項28] リジン残基が、E u n u m b e r i n gに従う246／248位、288／290位、または317位に存在する、請求項26記載のコンジュゲートまたはその塩。

[請求項29] 前記構造単位が、下記式（I）：

[化4]



〔式中、

波線付きのハイフン（－）は、E u n u m b e r i n gに従う246／248位、288／290位、または317位に存在するリジン残基（ここで、当該リジン残基は、式（1）における L_A が結合しているアミノ基を有するリジン残基とは異なる）の側鎖中のアミノ基と結合しており、

HG_1 は、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

CS_1 は、切断性部位を含む2価の基を示し、

V_1 は、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基（NH）を示し、

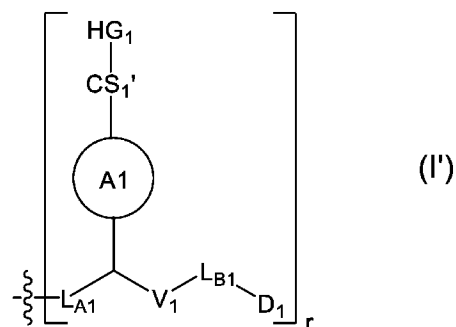
L_{A1} 、および L_{B1} は、それぞれ独立して、2価の基を示し、

D_1 は、機能性物質を示し、

前記イムノグロブリン単位あたりの前記結合の平均数 r は、1.5～2.5である。〕で表される修飾部分をさらに含む、請求項25記載のコンジュゲートまたはその塩。

[請求項30] 式（1）で表される修飾部分が、下記式（1'）：

[化5]



〔式中、

波線付きのハイフン (—) は、E u n u m b e r i n g に従う 2 4 6 / 2 4 8 位、2 8 8 / 2 9 0 位、または 3 1 7 位に存在するリジン残基（ここで、当該リジン残基は、式 (1) における L_A が結合しているアミノ基を有するリジン残基とは異なる）の側鎖中のアミノ基と結合しており、

HG_1 は、親水性基、または親水性基を含む 1 価の基を示し、

CS_1' は、切断性部位を含む 2 価の基を示し、

環 A 1 は、置換基を有していてもよい 2 価の芳香族環基（ここで、2 価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

V_1 は、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基 (NH) を示し、

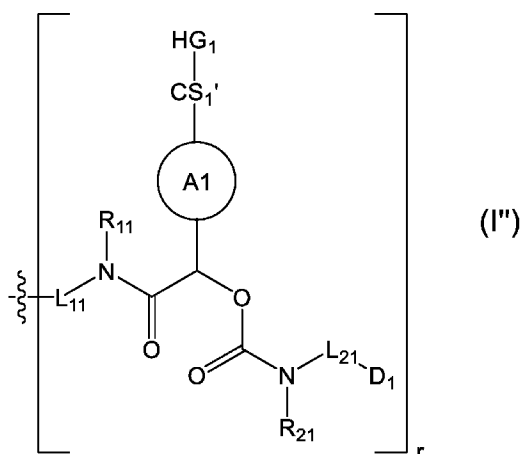
L_{A1} 、および L_{B1} は、それぞれ独立して、2 価の基を示し、

D_1 は、機能性物質を示し、

前記イムノグロブリン単位あたりの前記結合の平均数 r は、1.5 ~ 2.5 である。] で表される修飾部分である、請求項 29 記載のコンジュゲートまたはその塩。

[請求項 31] 式 (1') で表される修飾部分が、下記式 (1'') :

[化 6]



[式中、

波線付きのハイフン (—) は、E u n u m b e r i n g に従う 2

46／248位、288／290位、または317位に存在するリジン残基（ここで、当該リジン残基は、式（1）における L_A が結合しているアミノ基を有するリジン残基とは異なる）の側鎖中のアミノ基と結合しており、

HG_1 は、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

CS_1' は、切断性部位を含む2価の基を示し、

環A1は、置換基を有していてもよい2価の芳香族環基（ここで、2価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

R_{11} 、および R_{21} は、それぞれ独立して、水素原子、または1価の基を示し、

L_{11} 、および L_{21} は、それぞれ独立して、2価の基を示し、

D_1 は、機能性物質を示し、

前記イムノグロブリン単位あたりの前記結合の平均数 r は、1.5～2.5である。］で表される修飾部分である、請求項29記載のコンジュゲートまたはその塩。

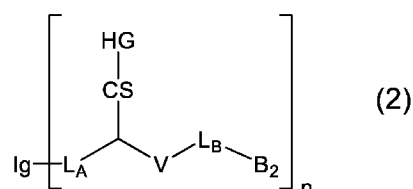
[請求項32] 前記特定アミノ酸残基の側鎖中の官能基が、システイン残基の側鎖中のチオール基であり、かつ、 n が、2.0～8.0である、請求項1～25のいずれか一項記載のコンジュゲートまたはその塩。

[請求項33] n が、6.0～8.0である、請求項32記載のコンジュゲートまたはその塩。

[請求項34] n が、7.0～8.0である、請求項33記載のコンジュゲートまたはその塩。

[請求項35] 下記式（2）：

[化7]



〔式中、

I g は、2 個の重鎖および2 個の軽鎖を含むイムノグロブリン単位を示し、かつ、I g 中の特定アミノ酸残基の側鎖中の官能基を介して、I g に隣接するL_Aと結合しており、

H G は、親水性基、または親水性基を含む1 価の基を示し、

C S は、切断性部位を含む2 価の基を示し、

V は、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基（NH）を示し、

L_A、およびL_Bは、それぞれ独立して、2 価の基を示し、

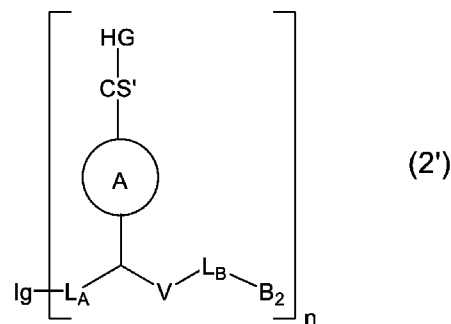
B₂は、生体直交性官能基を示し、

前記イムノグロブリン単位あたりの前記結合の平均数nは、1.5 以上である。〕で表される構造単位を含む、生体直交性官能基を有する抗体誘導体またはその塩。

〔請求項36〕 生体直交性官能基が、マレイミド残基、チオール残基、フラン残基、ハロカルボニル残基、アルケン残基、アルキン残基、アジド残基、またはテトラジン残基である、請求項35記載の抗体誘導体またはその塩。

〔請求項37〕 式（2）で表される構造単位が、下記式（2'）：

〔化8〕



〔式中、

I g は、2 個の重鎖および2 個の軽鎖を含むイムノグロブリン単位を示し、かつ、I g 中の特定アミノ酸残基の側鎖中の官能基を介して、I g に隣接するL_Aと結合しており、

H G は、親水性基、または親水性基を含む1 価の基を示し、

CS' は、切断性部位を含む2価の基を示し、

環Aは、置換基を有していてもよい2価の芳香族環基（ここで、2価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

Vは、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基（NH）を示し、

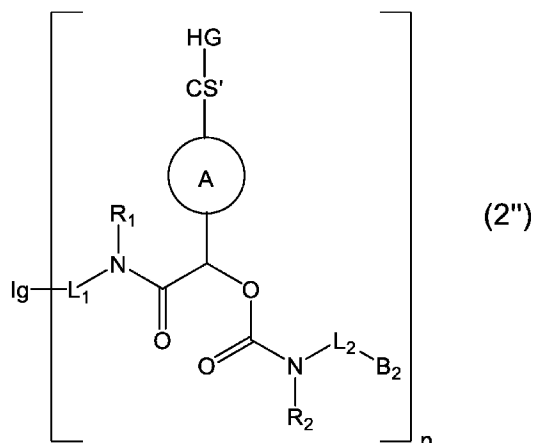
L_A、およびL_Bは、それぞれ独立して、2価の基を示し、

B₂は、生体直交性官能基を示し、

前記イムノグロブリン単位あたりの前記結合の平均数nは、1.5以上である。〕で表される構造単位である、請求項35記載の抗体誘導体またはその塩。

[請求項38] 式(2')で表される構造単位が、下記式(2'') :

[化9]



[式中、

Igは、2個の重鎖および2個の軽鎖を含むイムノグロブリン単位を示し、かつ、Ig中の特定アミノ酸残基の側鎖中の官能基を介して、Igに隣接するL_Aと結合しており、

HGは、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

CS' は、切断性部位を含む2価の基を示し、

環Aは、置換基を有していてもよい2価の芳香族環基（ここで、2価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

R_1 、および R_2 は、それぞれ独立して、水素原子、または1価の基を示し、

L_1 、および L_2 は、それぞれ独立して、2価の基を示し、

B_2 は、生体直交性官能基を示し、

前記イムノグロブリン単位あたりの前記結合の平均数 n は、1.5以上である。]で表される構造単位である、請求項37記載の抗体誘導体またはその塩。

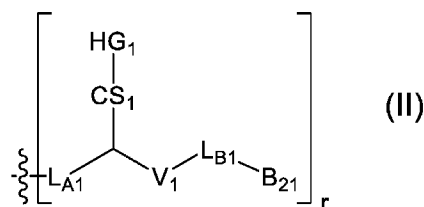
[請求項39] 前記特定アミノ酸残基の側鎖中の官能基が、リジン残基の側鎖中のアミノ基であり、かつ、 n が、1.5～2.5である、請求項35～38のいずれか一項記載の抗体誘導体またはその塩。

[請求項40] L_A がカルボニル基を有し、
結合が、リジン残基の側鎖中のアミノ基、および L_A 中のカルボニル基の結合によるアミド結合により達成される、請求項39記載の抗体誘導体またはその塩。

[請求項41] リジン残基が、Eu numberingに従う246/248位、288/290位、または317位に存在する、請求項39記載の抗体誘導体またはその塩。

[請求項42] 前記構造単位が、下記式(II)：

[化10]



[式中、

波線付きのハイフン(—)は、Eu numberingに従う246/248位、288/290位、または317位に存在するリジン残基(ここで、当該リジン残基は、式(1)における L_A が結合しているアミノ基を有するリジン残基とは異なる)の側鎖中のアミノ基

と結合しており、

HG_1 は、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

CS_1 は、切断性部位を含む2価の基を示し、

V_1 は、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基(NH)を示し、

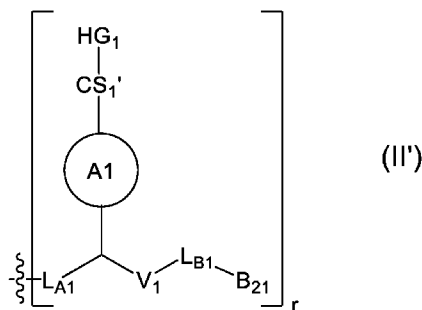
L_{A1} 、および L_{B1} は、それぞれ独立して、2価の基を示し、

B_{21} は、生体直交性官能基を示し、

前記イムノグロブリン単位あたりの前記結合の平均数 r は、1.5～2.5である。]で表される修飾部分をさらに含む、請求項39記載のコンジュゲートまたはその塩。

[請求項43] 式(II)で表される修飾部分が、下記式(II'):

[化11]



[式中、

波線付きのハイフン(—)は、E u n u m b e r i n gに従う246/248位、288/290位、または317位に存在するリジン残基(ここで、当該リジン残基は、式(1)における L_A が結合しているアミノ基を有するリジン残基とは異なる)の側鎖中のアミノ基と結合しており、

HG_1 は、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

CS_1' は、切断性部位を含む2価の基を示し、

環A1は、置換基を有していてもよい2価の芳香族環基(ここで、2価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している)を示し、

V_1 は、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基(NH)を示し、

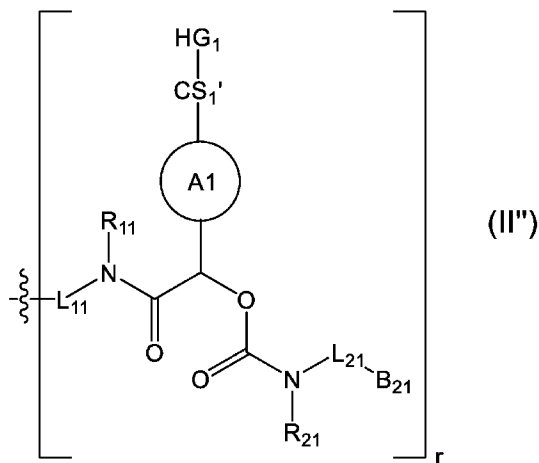
L_{A1} 、および L_{B1} は、それぞれ独立して、2価の基を示し、

B_{21} は、生体直交性官能基を示し、

前記イムノグロブリン単位あたりの前記結合の平均数 r は、1.5～2.5である。]で表される修飾部分である、請求項42記載の抗体誘導体またはその塩。

[請求項44] 式(11')で表される修飾部分が、下記式(11''):

[化12]



[式中、

波線付きのハイフン(—)は、Eu numberingに従う246/248位、288/290位、または317位に存在するリジン残基(ここで、当該リジン残基は、式(1)における L_A が結合しているアミノ基を有するリジン残基とは異なる)の側鎖中のアミノ基と結合しており、

HG_1 は、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

$CS_{1'}$ は、切断性部位を含む2価の基を示し、

環 A_1 は、置換基を有していてもよい2価の芳香族環基(ここで、2価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している)を示し、

R_{11} 、および R_{21} は、それぞれ独立して、水素原子、または1価の基を示し、

L_{11} 、および L_{21} は、それぞれ独立して、2価の基を示し、

B_{21} は、生体直交性官能基を示し、

前記イムノグロブリン単位あたりの前記結合の平均数 r は、1.5～2.5である。]で表される修飾部分である、請求項43記載の抗体誘導体またはその塩。

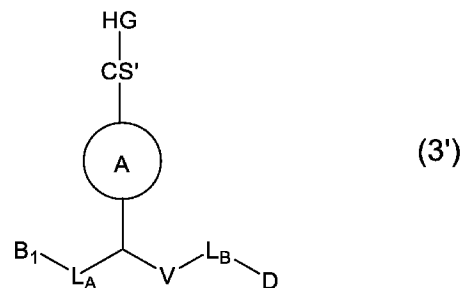
[請求項45] 前記特定アミノ酸残基の側鎖中の官能基が、システイン残基の側鎖中のチオール基であり、かつ、 n が、2.0～8.0である、請求項35～38のいずれか一項記載の抗体誘導体またはその塩。

[請求項46] n が、6.0～8.0である、請求項45記載の抗体誘導体またはその塩。

[請求項47] n が、7.0～8.0である、請求項46記載の抗体誘導体またはその塩。

[請求項48] 下記式(3')：

[化13]



[式中、

HGは、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

CS'は、切断性部位を含む2価の基を示し、

環Aは、置換基を有していてもよい2価の芳香族環基（ここで、2価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

Vは、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基(NH)を示し、

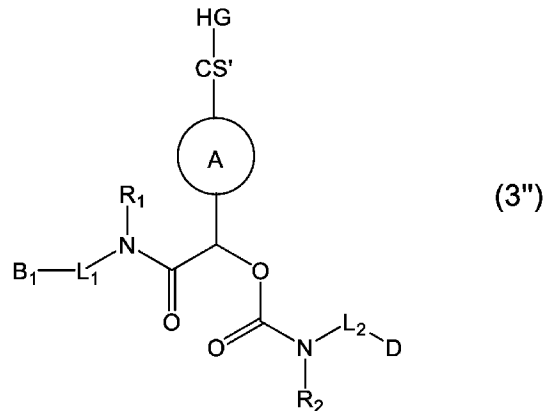
L_A 、および L_B は、それぞれ独立して、2価の基を示し、

B_1 は、生体直交性官能基を示し、

Dは、機能性物質を示す。〕で表される、生体直交性官能基および機能性物質を有する化合物またはその塩。

[請求項49] 式(3')で表される構造単位が、下記式(3'') :

[化14]



[式中、

HGは、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

CS'は、切断性部位を含む2価の基を示し、

環Aは、置換基を有していてもよい2価の芳香族環基（ここで、2価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

R₁、およびR₂は、それぞれ独立して、水素原子、または1価の基を示し、

L₁、およびL₂は、それぞれ独立して、2価の基を示し、

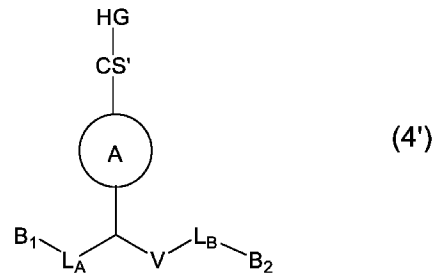
B₁は、生体直交性官能基を示し、

Dは、機能性物質を示す。〕で表される、請求項48記載の化合物またはその塩。

[請求項50] 請求項48または49記載の化合物またはその塩を含む、抗体の誘導体化試薬。

[請求項51] 下記式(4') :

[化15]



〔式中、

HGは、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

CS'は、切断性部位を含む2価の基を示し、

環Aは、置換基を有していてもよい2価の芳香族環基（ここで、2価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

Vは、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基（NH）を示し、

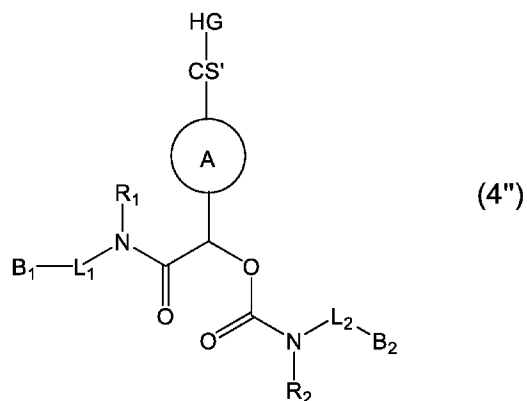
 L_A 、および L_B は、それぞれ独立して、2価の基を示し、 B_1 は、第1生体直交性官能基を示し、

B_2 は、第2生体直交性官能基を示す。〕で表される、第1生体直交性官能基および第2生体直交性官能基を有する化合物またはその塩

。

〔請求項52〕 式（4'）で表される化合物が、下記式（4''）：

[化16]



〔式中、

HGは、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

CS' は、切断性部位を含む 2 価の基を示し、

環 A は、置換基を有していてもよい 2 価の芳香族環基（ここで、2 価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

R₁、および R₂ は、それぞれ独立して、水素原子、または 1 価の基を示し、

L₁、および L₂ は、それぞれ独立して、2 価の基を示し、

B₁ は、第 1 生体直交性官能基を示し、

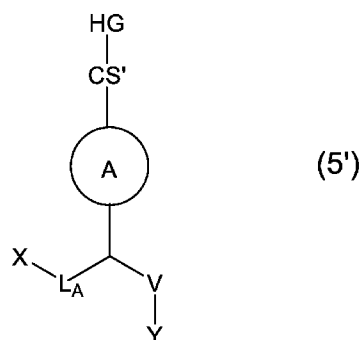
B₂ は、第 2 生体直交性官能基を示す。）で表される、請求項 51 記載の化合物またはその塩。

[請求項 53] 請求項 51 または 52 記載の化合物またはその塩を含む、抗体または機能性物質の誘導体化試薬。

[請求項 54] 下記 (I')、(II')、または (III') の化合物またはその塩：

(I') 下記式 (5')：

[化 17]



〔式中、

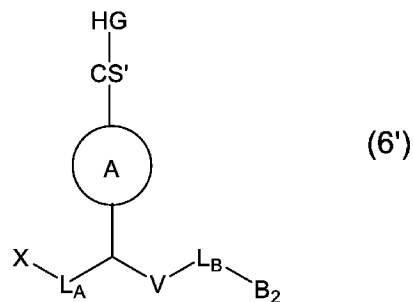
HG は、親水性基、または親水性基を含む 1 価の基を示し、

CS' は、切断性部位を含む 2 価の基を示し、

環 A は、置換基を有していてもよい 2 価の芳香族環基（ここで、2 価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

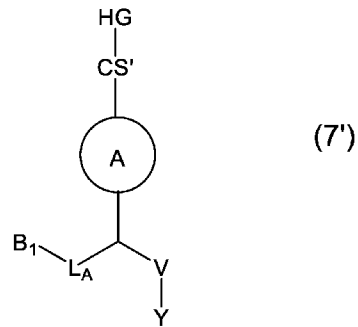
Vは、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基（NH）を示し、
 L_A は、2価の基を示し、
 XおよびYは、それぞれ独立して、1価の基を示す。）で表される
 、化合物またはその塩；
 （I I'）下記式（6'）：

[化18]



〔式中、
 HGは、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、
 CS'は、切断性部位を含む2価の基を示し、
 環Aは、置換基を有していてもよい2価の芳香族環基（ここで、2
 価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）
 を示し、
 Vは、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基（NH）を示し、
 L_A 、および L_B は、それぞれ独立して、2価の基を示し、
 Xは、1価の基を示し、
 B_2 は、生体直交性官能基を示す。）で表される、化合物またはそ
 の塩；あるいは
 （I I I'）下記式（7'）：

[化19]



〔式中、

H Gは、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

C S' は、切断性部位を含む2価の基を示し、

環Aは、置換基を有していてもよい2価の芳香族環基（ここで、2
 価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）
 を示し、

Vは、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基（NH）を示し、

 L_A は、2価の基を示し、 B_1 は、生体直交性官能基を示し、

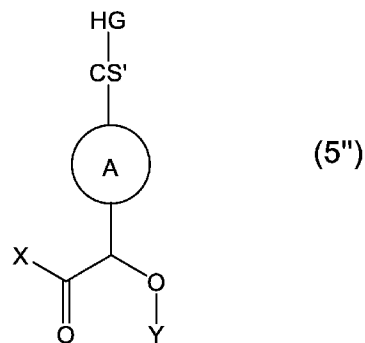
Yは、1価の基を示す。〕で表される、化合物またはその塩。

[請求項55]

前記（I'）、（II'）、または（III'）の化合物が、それ
 ぞれ、下記（I''）、（II''）、または（III''）の化合
 物である、請求項53記載の化合物またはその塩：

（I''）下記式（5''）：

[化20]



〔式中、

HGは、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

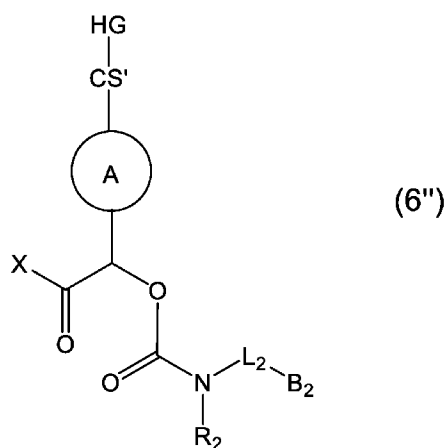
CS'は、切断性部位を含む2価の基を示し、

環Aは、置換基を有していてもよい2価の芳香族環基（ここで、2価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

XおよびYは、それぞれ独立して、1価の基を示す。〕で表される、化合物またはその塩；

(I I' ') 下記式 (6' ') :

[化21]



[式中、

HGは、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

CS'は、切断性部位を含む2価の基を示し、

環Aは、置換基を有していてもよい2価の芳香族環基（ここで、2価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）を示し、

R₂は、水素原子、または1価の基を示し、

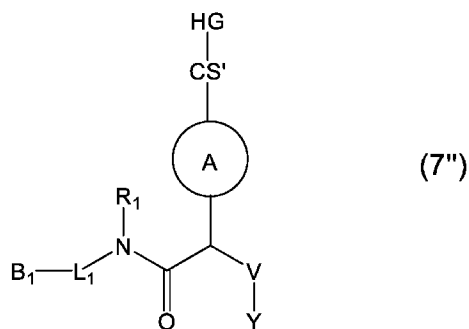
L₂は、2価の基を示し、

Xは、1価の基を示し、

B₂は、生体直交性官能基を示す。〕で表される、化合物またはその塩；あるいは

(I I I' ') 下記式 (7' ') :

[化22]



〔式中、

H Gは、親水性基、または親水性基を含む1価の基を示し、

C S' は、切断性部位を含む2価の基を示し、

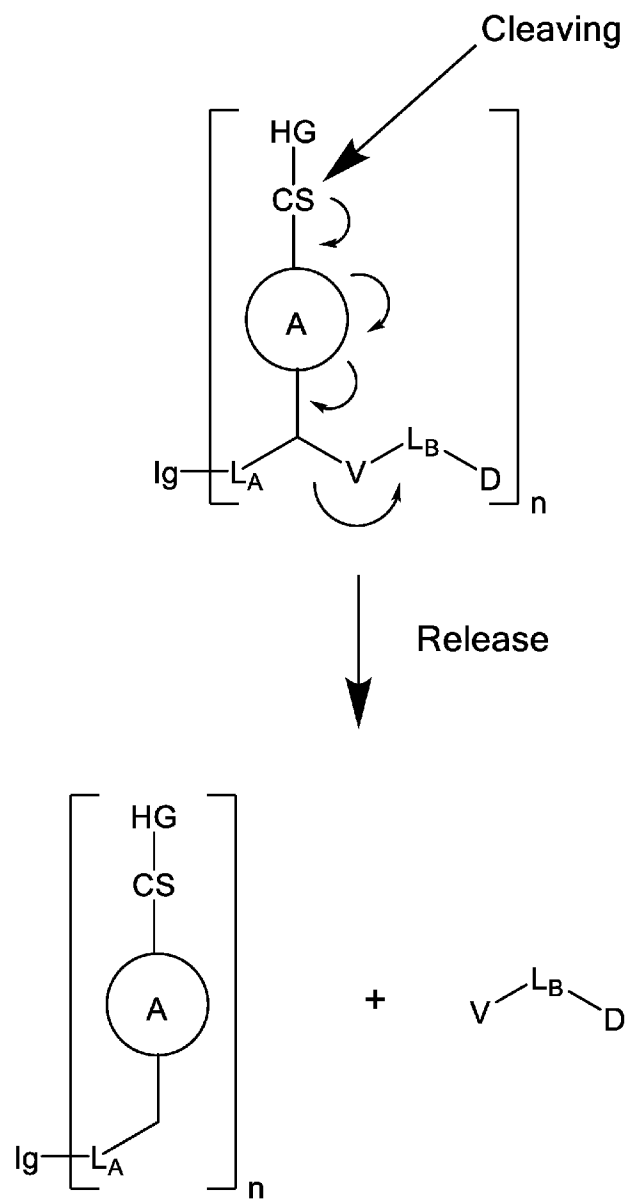
環Aは、置換基を有していてもよい2価の芳香族環基（ここで、2
価の芳香族環基は、前記切断性部位と π 電子共役系を構成している）
を示し、

Vは、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基（NH）を示し、

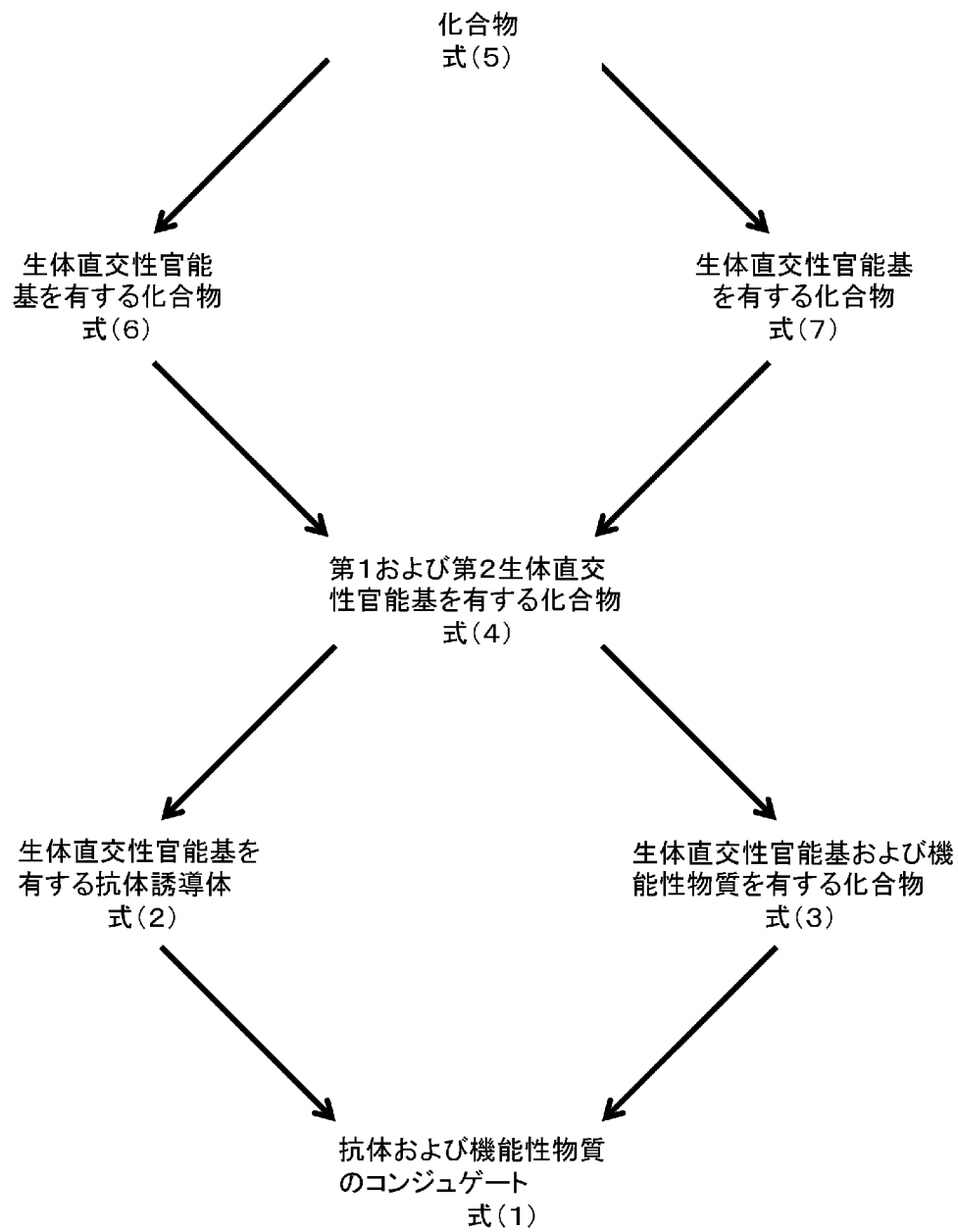
R₁は、水素原子、または1価の基を示し、L₁は、2価の基を示し、B₁は、生体直交性官能基を示し、

Yは、1価の基を示す。〕で表される、化合物またはその塩。

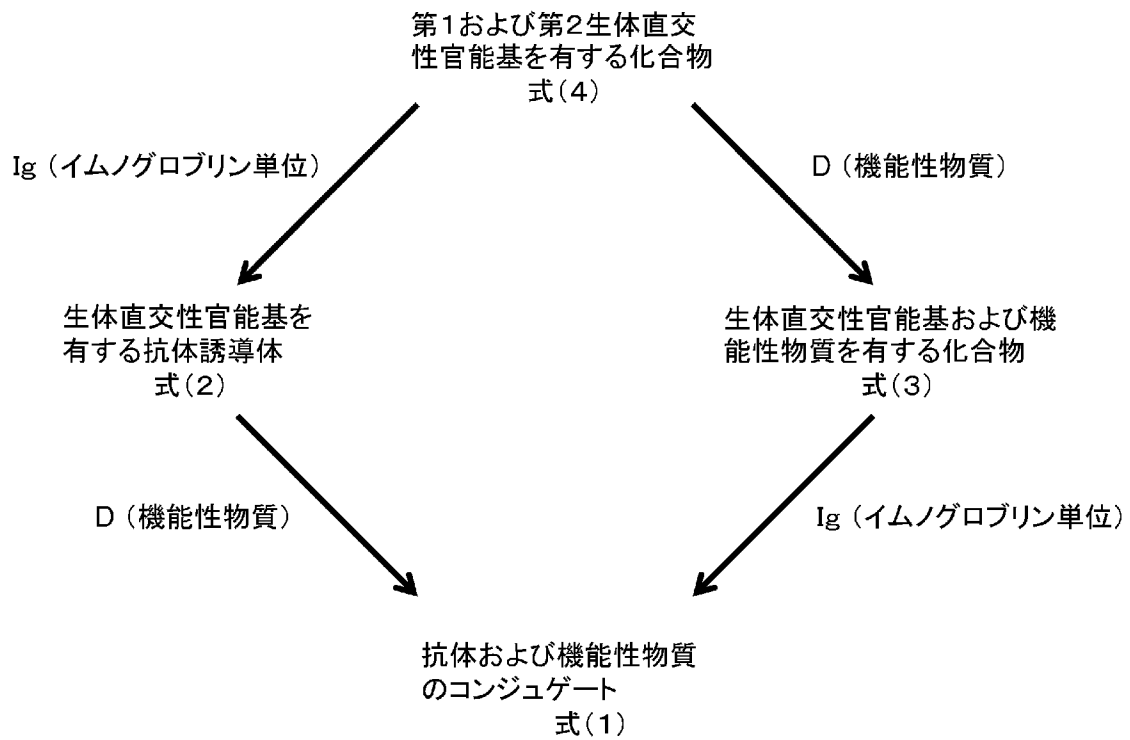
[図1]



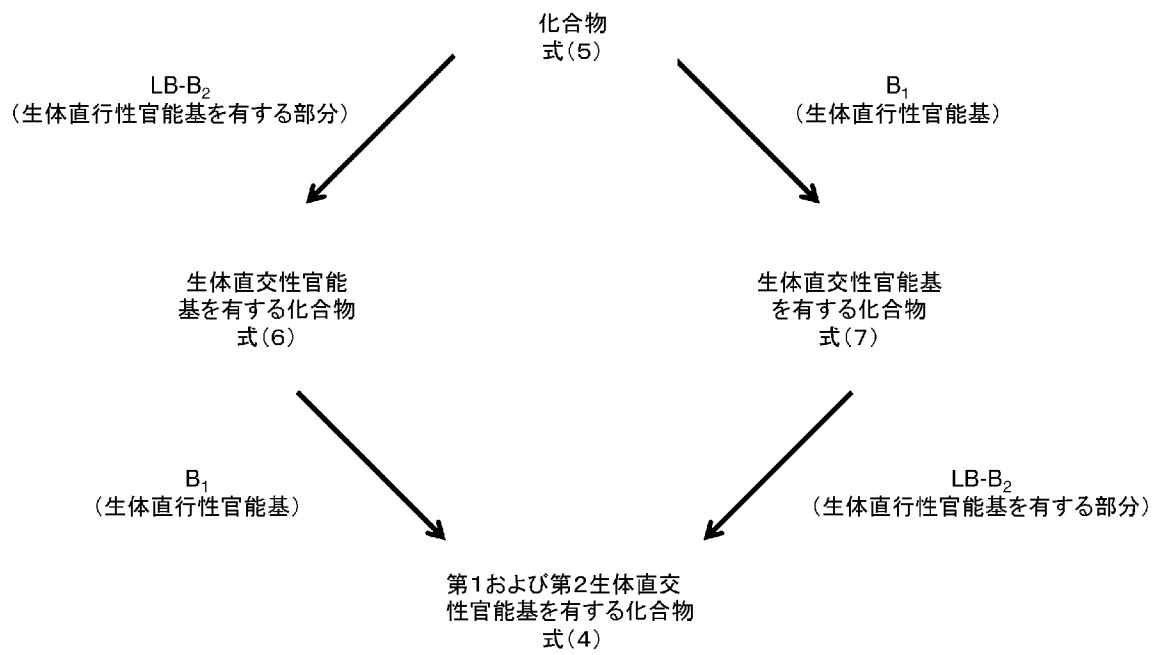
[図2]



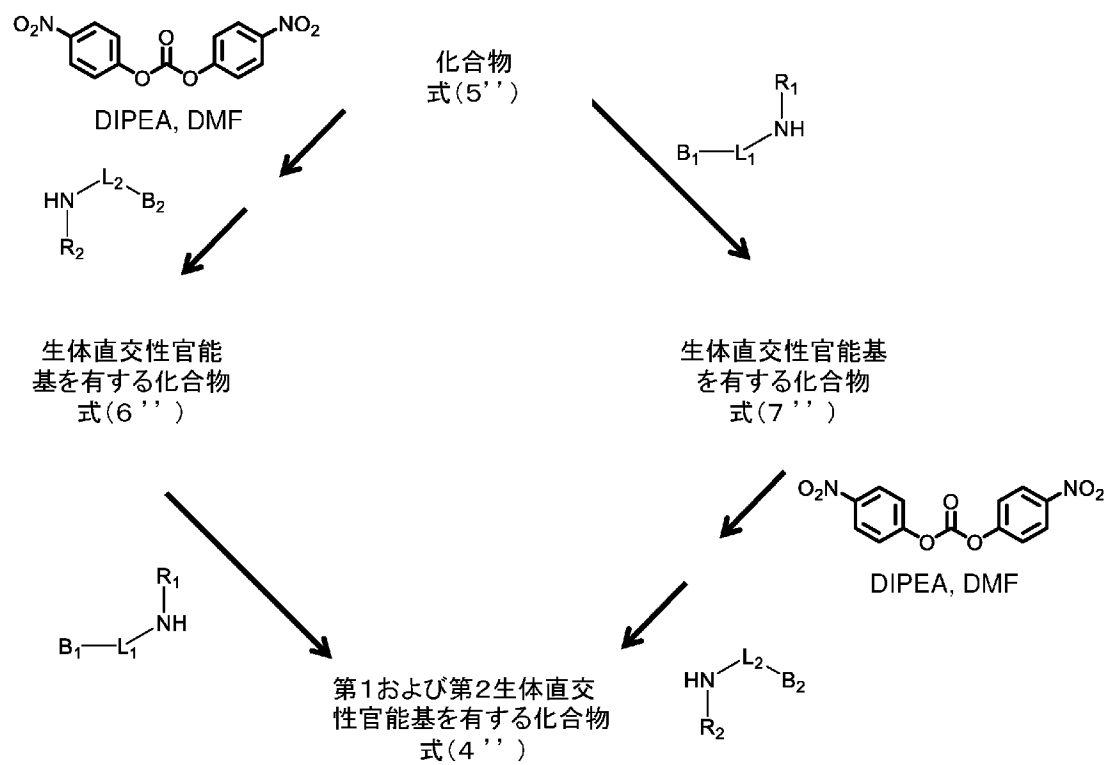
[図3]



[図4]



[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/013787

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K 16/00 (2006.01)i FI: C07K16/00 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) C07K16/00 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2015/038426 A1 (ASANA BIOSCIENCES, LLC) 19 March 2015 (2015-03-19) claims, pp. 81-84, examples	1-10, 12, 18, 20-55
Y	claims, pp. 81-84, examples	1-55
Y	ANAMI, Yasuaki et al. Glutamic acid-valine-citrulline linkers ensure stability and efficacy of antibody-drug conjugates in mice. NATURE COMMUNICATIONS. 2018, vol. 9, 2512 (pp. 1-9), DOI:10.1038/s41467-018-04982-3 in particular, abstract, drawings	1-55
Y	WANG, Yanming et al. Development and Properties of Valine-Alanine based Antibody-Drug Conjugates with Monomethyl Auristatin E as the Potent Payload. Int. J. Mol. Sci. 2017, vol. 18, 1860 (pp. 1-19), doi:10.3390/ijms18091860 in particular, abstract	1-55
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “D” document cited by the applicant in the international application “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed “T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art “&” document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 07 June 2024		Date of mailing of the international search report 18 June 2024
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SALOMON, Paulin L. et al. Optimizing Lysosomal Activation of Antibody-Drug Conjugates (ADCs) by Incorporation of Novel Cleavable Dipeptide Linkers. Mol. Pharmaceutics. 14 October 2019, vol. 16, pp. 4817-4825, DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.9b00696 in particular, abstract	1-55
A	DORYWALSKA, Magdalena et al. Molecular Basis of Valine-Citrulline-PABC Linker Instability in Site-Specific ADCs and Its Mitigation by Linker Design. Mol. Cancer Ther. May 2016, vol. 15, no. 5, pp. 958-970, doi:10.1158/1535-7163.MCT-15-1004 in particular, abstract, drawings	1-55
A	JP 2020-525404 A (GLYKOS FINLAND OY) 27 August 2020 (2020-08-27) claims	1-55
A	JP 2020-534030 A (PAUL SCHERRER INSTITUT) 26 November 2020 (2020-11-26) claims, paragraph [0090]	1-55

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/013787

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2024/013787

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2015/038426	A1	19 March 2015	(Family: none)	
JP	2020-525404	A	27 August 2020	WO	2018/234636 A1
JP	2020-534030	A	26 November 2020	US	2021/0128743 A1
				claims, paragraphs [0147]-[0159]	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

C07K 16/00(2006.01)i
FI: C07K16/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））
C07K16/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの
日本国実用新案公報 1922 - 1996年
日本国公開実用新案公報 1971 - 2024年
日本国実用新案登録公報 1996 - 2024年
日本国登録実用新案公報 1994 - 2024年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	WO 2015/038426 A1 (ASANA BIOSCIENCES, LLC) 19.03.2015 (2015 - 03 - 19) 特許請求の範囲, 第81-84頁, 実施例	1-10, 12, 18, 20-55
Y	特許請求の範囲, 第81-84頁, 実施例	1-55
Y	ANAMI, Yasuaki et al., Glutamic acid-valine-citrulline linkers ensure stability and efficacy of antibody-drug conjugates in mice, NATURE COMMUNICATIONS, 2018, Vol.9, 2512 (pp.1-9), DOI:10.1038/s41467-018-04982-3 特に要旨, 図	1-55
Y	WANG, Yanming et al., Development and Properties of Valine-Alanine based Antibody-Drug Conjugates with Monomethyl Auristatin E as the Potent Payload, Int. J. Mol. Sci., 2017, Vol.18, 1860 (pp.1-19), doi:10.3390/ijms18091860 特に要旨	1-55

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの

“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献

“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.06.2024

国際調査報告の発送日

18.06.2024

名称及びあて先

日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員（特許庁審査官）

田ノ上 拓自 41 6115

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

様式 PCT/ISA/210（第2ページ）（2022年7月）

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	SALOMON, Paulin L. et al., Optimizing Lysosomal Activation of Antibody-Drug Conjugates (ADCs) by Incorporation of Novel Cleavable Dipeptide Linkers, Mol. Pharmaceutics, 2019.10.14, Vol.16, pp.4817-4825, DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.9b00696 特に要旨	1-55
A	DORYWALSKA, Magdalena et al., Molecular Basis of Valine-Citrulline-PABC Linker Instability in Site-Specific ADCs and Its Mitigation by Linker Design, Mol. Cancer Ther., 2016.05, Vol.15, No.5, pp.958-970, doi:10.1158/1535-7163.MCT-15-1004 特に要旨, 図	1-55
A	JP 2020-525404 A (グリコス・フィンランド・オーワイ) 27.08.2020 (2020 - 08 - 27) 特許請求の範囲	1-55
A	JP 2020-534030 A (パウル・シェラー・インスティトゥート) 26.11.2020 (2020 - 11 - 26) 特許請求の範囲, 段落[0090]	1-55

第 I 欄 スクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたスクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- b. ☐ 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（PCT規則13の3.1(a)）
☐ 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。

2. ☐ この国際出願で開示されたスクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。

3. 補足意見：

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2024/013787

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO	2015/038426	A1	19.03.2015	(ファミリーなし)	
JP	2020-525404	A	27.08.2020	WO	2018/234636 A1
				特許請求の範囲	
JP	2020-534030	A	26.11.2020	US	2021/0128743 A1
				特許請求の範囲，段落 [0147]-[0159]	