

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6875371号
(P6875371)

(45) 発行日 令和3年5月26日 (2021.5.26)

(24) 登録日 令和3年4月26日 (2021.4.26)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 C 243/28	(2006.01)	C O 7 C 243/28	C S P
C O 7 C 243/34	(2006.01)	C O 7 C 243/34	
C O 7 D 339/04	(2006.01)	C O 7 D 339/04	
A 6 1 K 47/34	(2017.01)	A 6 1 K 47/34	
A 6 1 K 47/02	(2006.01)	A 6 1 K 47/02	

請求項の数 33 (全 68 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-502821 (P2018-502821)
(86) (22) 出願日	平成28年7月21日 (2016.7.21)
(65) 公表番号	特表2018-524389 (P2018-524389A)
(43) 公表日	平成30年8月30日 (2018.8.30)
(86) 国際出願番号	PCT/CN2016/090893
(87) 国際公開番号	W02017/012568
(87) 国際公開日	平成29年1月26日 (2017.1.26)
審査請求日	平成30年10月26日 (2018.10.26)
(31) 優先権主張番号	62/195,654
(32) 優先日	平成27年7月22日 (2015.7.22)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)

(73) 特許権者	515195565 ジーエヌティー バイオテック アンド メディカルズ コーポレーション 台湾 114 タイペイ シティ, ネイ フー ディストリクト, ルイグアン ロ ード, レーン 258, ナンバー 5 2, 1エフ
(74) 代理人	110000729 特許業務法人 ユニアス国際特許事務所
(72) 発明者	リャオ、ユイーチュン 台湾 114、タイペイ シティ、ネイフ ー ディストリクト、ルイコアン ロード 、レーン 258、ナンバー52、1フロ ア

最終頁に続く

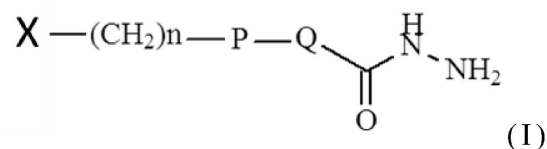
(54) 【発明の名称】 治療薬を送達させるためのpH感受性リンカー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の式 (I) :

【化1】



(式中、Xは、

【化2】

、-SH、-NH₂、Boc-NH-、Fmoc-NH-、-COOHであり；

nは1～6であり；

Pは-C(O)NH-または-C(O)O-であり；

Qは、 $-R(CH_2CH_2O)_m-$ 、または $-R[-C(O)CH_2CH_2-C(O)NH-(CH_2CH_2O)_m]Y$ であり；

Rは結合、 $-C_{1\sim 12}$ アルキル、または $C_{1\sim 10}$ アルコキシであり；

mは1～12であり；

zは1～4であり；

Yは1～12である）

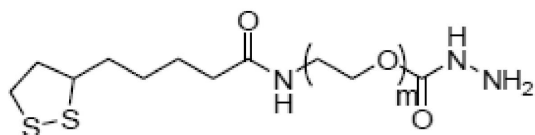
を有するpH感受性リンカー。

【請求項2】

以下の式：

【化3】

10



(リンカーI-アミド)

(式中、mは1～12である)

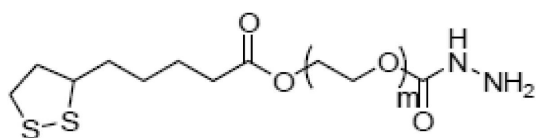
を有する、請求項1に記載のpH感受性リンカー。

【請求項3】

以下の式：

【化4】

20



(リンカーI-C(O)O；リンカーIII)

(式中、mは1～12である)

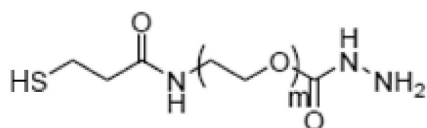
を有する、請求項1に記載のpH感受性リンカー。

【請求項4】

以下の式：

【化5】

30



(SH-C₂-リンカー-I)

(式中、mは1～12である)

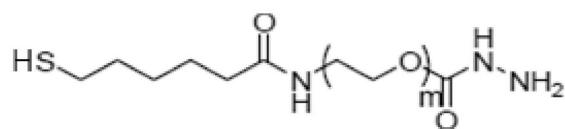
を有する、請求項1に記載のpH感受性リンカー。

【請求項5】

以下の式：

【化6】

40



(SH-C₅-リンカー-I-アミド)

(式中、mは1～12である)

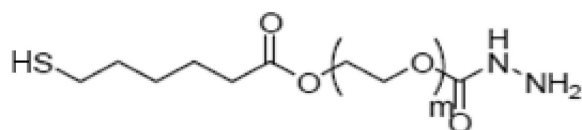
50

を有する、請求項 1 に記載の pH 感受性リンカー。

【請求項 6】

以下の式：

【化 7】



(SH-C₅-リンカー-I-C(O)O-; HS-C₅-リンカー-II-II)

10

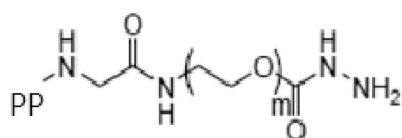
(式中、m は 1 ～ 12 である)

を有する、請求項 1 に記載の pH 感受性リンカー。

【請求項 7】

以下の式：

【化 8】



20

(ppNH-C₁-リンカー-I-アミド)

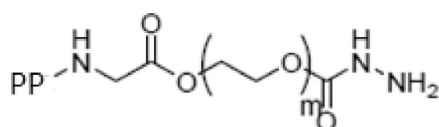
(式中、pp は Boc または Fmoc であり；m は 1 ～ 12 である)

を有する、請求項 1 に記載の pH 感受性リンカー。

【請求項 8】

以下の式：

【化 9】



30

(ppNH-C₁-リンカー-I-C(O)O-; NH₂-C₁-リンカー-III-III-C(O)O-)

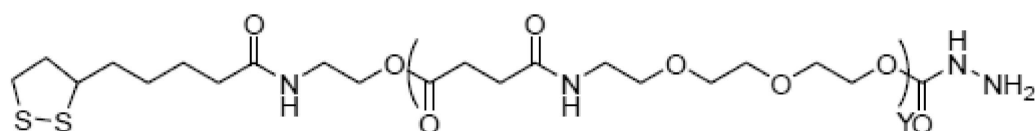
(式中、pp は Boc または Fmoc であり；m は 1 ～ 12 である)

を有する、請求項 1 に記載の pH 感受性リンカー。

【請求項 9】

以下の式：

【化 10】



40

(リンカー IV-アミド)

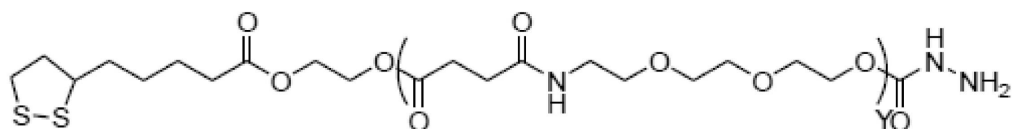
(式中、Y は 1 ～ 12 である)

を有する、請求項 1 に記載の pH 感受性リンカー。

【請求項 10】

以下の式：

【化 1 1】



(リンカー I V - C (O) O -)

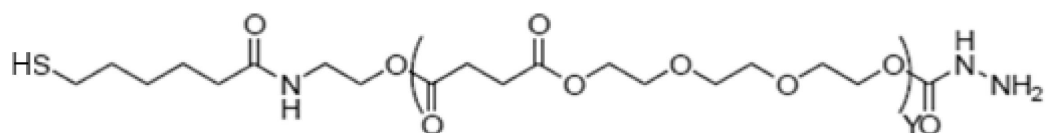
(式中、Y は 1 ~ 1 2 である)

を有する、請求項 1 に記載の pH 感受性リンカー。

【請求項 1 1】

以下の式：

【化 1 2】

(S H - C₅ - リンカー - I V - アミド)

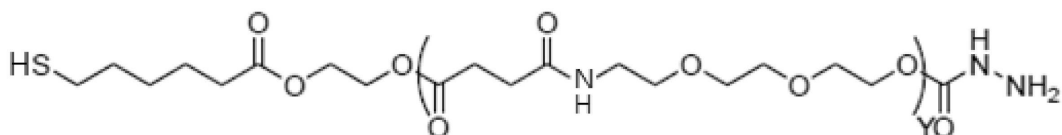
(式中、Y は 1 ~ 1 2 である)

を有する、請求項 1 に記載の pH 感受性リンカー。

【請求項 1 2】

以下の式：

【化 1 3】

(S H - C₅ - リンカー - I V - C (O) O -)

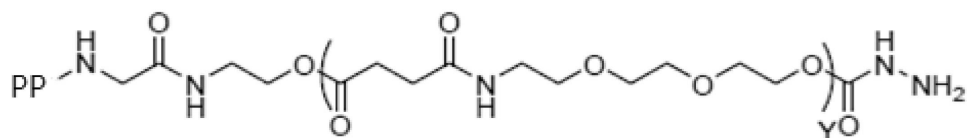
(式中、Y は 1 ~ 1 2 である)

を有する、請求項 1 に記載の pH 感受性リンカー。

【請求項 1 3】

以下の式：

【化 1 4】

(p p N H - C₁ - リンカー - I V - アミド)

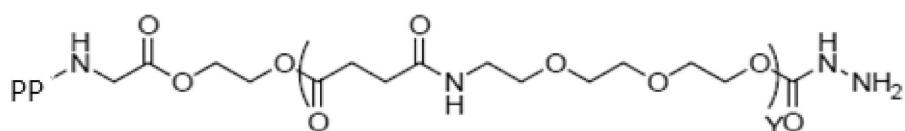
(式中、p p は B o c または F m o c であり；Y は 1 ~ 1 2 である)

を有する、請求項 1 に記載の pH 感受性リンカー。

【請求項 1 4】

以下の式：

【化 1 5】



10

20

30

40

50

(ppNH-C₁-リンカー-IV-C(O)O-)

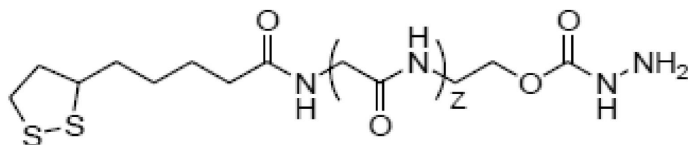
(式中、ppはBocまたはFmocであり；Yは1～12である)

を有する、請求項1に記載のpH感受性リンカー。

【請求項15】

以下の式：

【化16】



10

(リンカー-II-アミド)

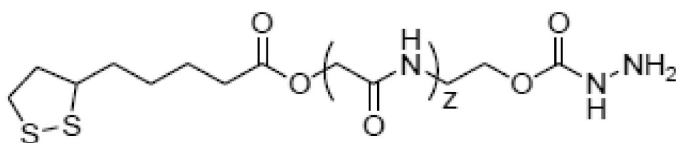
(式中、nは1～4である)

を有する、pH感受性リンカー。

【請求項16】

以下の式：

【化17】



20

(リンカー-II-C(O)O-)

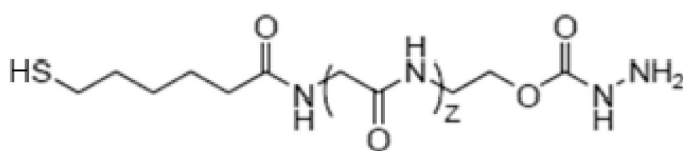
(式中、zは1～4である)

を有する、pH感受性リンカー。

【請求項17】

以下の式：

【化18】



30

(SH-C₅-リンカー-II-アミド)

(式中、zは1～4である)

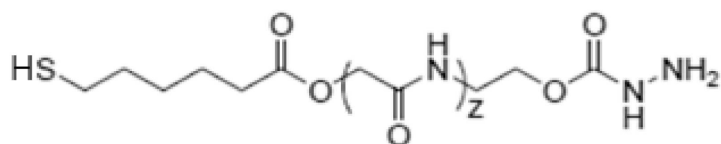
を有する、pH感受性リンカー。

【請求項18】

以下の式：

40

【化 19】



(SH-C₅-リンカー-I I-C(O)O-)

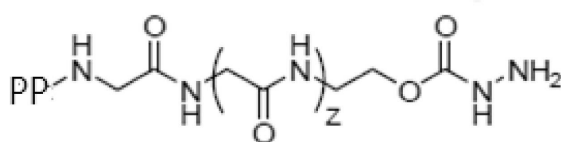
(式中、z は 1～4 である)

を有する、pH感受性リンカー。

【請求項 19】

以下の式：

【化 20】



(ppNH-C₁-リンカー-I I-アミド)

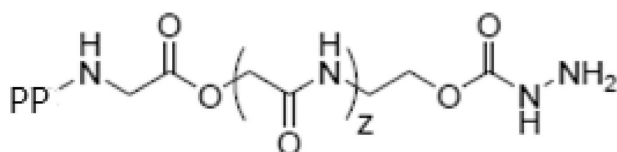
(式中、pp は Boc 又は Fmoc であり、z は 1～4 である)

を有する、pH感受性リンカー。

【請求項 20】

以下の式：

【化 21】



(ppNH-C₁-リンカー-I I-C(O)O-)

(式中、pp は Boc 又は Fmoc であり、z は 1～4 である)

を有する、pH感受性リンカー。

【請求項 21】

任意選択的に 1 つまたは複数の PEG と複合体を形成した、1 つまたは複数の請求項 1～20 のいずれか 1 項に記載のリンカーと複合体を形成した金属ナノ粒子を含む金属ナノ粒子複合体。

【請求項 22】

前記金属ナノ粒子が、金ナノ粒子、パラジウムナノ粒子、白金ナノ粒子、または銀ナノ粒子である、請求項 21 に記載の金属ナノ粒子複合体。

【請求項 23】

前記複数のリンカーが同一であるか異なる、請求項 22 に記載の金属ナノ粒子複合体。

【請求項 24】

前記金属ナノ粒子複合体が、異なる分子長を有する複数のリンカーを含む、請求項 21 に記載の金属ナノ粒子複合体。

【請求項 25】

10

20

30

40

50

本発明で使用される前記 PEG の分子量が約 2000～20,000 Da の範囲である、請求項 21 に記載の金属ナノ粒子複合体。

【請求項 26】

前記金属ナノ粒子のサイズが約 80 nm 未満である、請求項 21 に記載の金属ナノ粒子複合体。

【請求項 27】

前記金属ナノ粒子複合体が、1 つまたは複数の同一の異なる治療薬または診断薬とさらに連結している、請求項 21 に記載の金属ナノ粒子複合体。

【請求項 28】

前記治療薬が抗腫瘍薬または抗体であり；好ましくは、前記抗体が腫瘍細胞などの特定の細胞を標的にする抗体または抗腫瘍抗体である、請求項 27 に記載の金属ナノ粒子複合体。

10

【請求項 29】

前記抗腫瘍薬が抗癌薬である、請求項 28 に記載の金属ナノ粒子複合体。

【請求項 30】

前記抗癌薬が、アルキル化剤、スルホン酸アルキル、アジリジン、プリンアナログ、ピリミジンアナログ、カンプトセシン、またはドキソルビシン、シスプラチンである、請求項 29 に記載の金属ナノ粒子複合体。

【請求項 31】

前記抗癌物質の量が前記金属ナノ粒子複合体の約 1%～約 50%（重量／重量）を占める、請求項 29 に記載の金属ナノ粒子複合体。

20

【請求項 32】

1 つまたは複数の同一の異なる治療薬または診断薬および薬学的に許容され得るキャリアと連結している請求項 21～31 のいずれか 1 項に記載の 1 つまたは複数の金属ナノ粒子複合体を含む薬学的組成物。

【請求項 33】

治療薬または診断薬を被験体に送達させるための薬剤であって、請求項 27 に記載の金属ナノ粒子複合体を含む、薬剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

（発明の分野）

本発明は、薬剤とナノ粒子を連結することができるリンカーに関する。特に、本発明のリンカーは、pH 感受性であり、ナノ粒子と同種または異なる種の薬剤を同時に結合することができる。

【背景技術】

【0002】

（発明の背景）

治療化合物および診断化合物を細胞、特にサイトゾルに特異的且つ効率的に送達させることは、多くの製薬会社の主な目的である。特異性および取り込みを増大させるために多くの異なるアプローチが利用されてきた。例えば、薬物送達および癌治療のための新規の戦略の開発においてナノテクノロジーが広く使用されている。薬物放出が酸性腫瘍環境によって特異的に誘発される pH 感受性ナノシステムが開発されており、かかるシステムは、癌処置の効率を改善することができる。Feng Wnang らは、ポリ（エチレングリコール）空間を使用して酸不安定性連結を介して AuNP 表面上にドキソルビシンを係留することによる薬物送達系を開発している（American Chemical Society, 2011, Vol. 5, No. 5, pp. 3679–3692）。Tian-Meng Sun らは、ヒドラゾン結合を介して金ナノ粒子に抱合したドキソルビシンを使用したがん幹細胞治療を開示している（Biomaterials 35, 2014, pp. 836–845）。米国特許出願公開第 2013/0331764 号

40

50

は、癌細胞を区別するための pH 感受性金属ナノ粒子に抗癌薬を結合することによって抗癌薬を癌細胞内に送達させる方法に関する。WO 2013/139942 号は、金属ナノ粒子および少なくとも 1 つのリンカーを含むナノ粒子を提供している。

【0003】

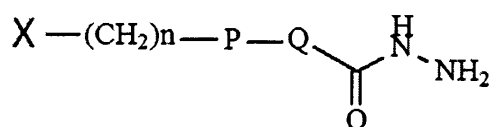
しかし、より効率の高い pH 感受性送達系の開発が依然として必要とされている。

【発明の概要】

【0004】

以下の式 (I)

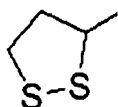
【化 1】



(I)

(式中、X は、

【化 2】



、 $-SH$ 、 $-NH_2$ (Boc-NH-; Fmoc-NH-)、 $-COOH$ であり；
n は 1～6 であり；

P は $-C(O)NH-$ または $-C(O)O-$ であり；

Q は、 $-R(CH_2CH_2O)_m-$ 、 $R(-C(O)NH-)_z$ 、または $-R[-C(O)CH_2CH_2-C(O)NH-(CH_2CH_2O)_m]Y$ であり；

R は結合、 $-C_{1\sim 12}$ アルキル、または $C_{1\sim 10}$ アルコキシであり；

m は 1～12 であり；

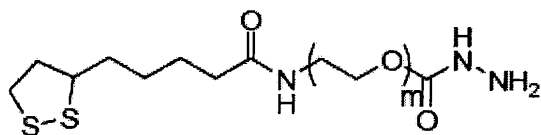
z は 1～4 であり；

Y は 1～12 である) を有する pH 感受性リンカーを提供する。

【0005】

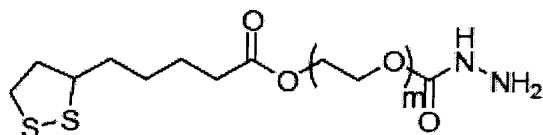
いくつかの実施形態では、リンカーは、以下の式：

【化 3】



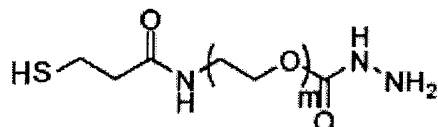
(リンカー I-アミド)；

【化 4】



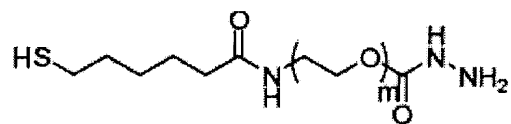
(リンカー I-C(O)O；リンカー I I I)；

【化 5】

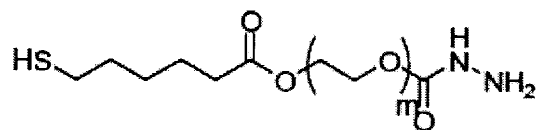


(HS-C₂-リンカー-I)；

【化 6】

(SH-C₅-リンカー-I-アミド) ;

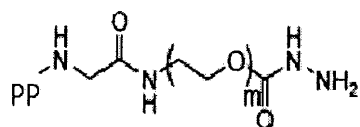
【化 7】



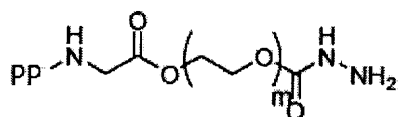
10

(SH-C₅-リンカー-I-C(O)O-; HS-C₅-リンカー-III ;

【化 8】

(ppNH-C₁-リンカー-I-アミド)

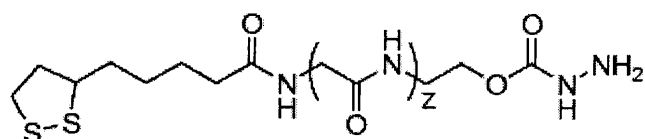
【化 9】



20

(ppNH-C₁-リンカー-I-C(O)O-; NH₂-C₁-リンカー-III-C(O)O-; NH₂-C₁-リンカー-III-C(O)O- ;

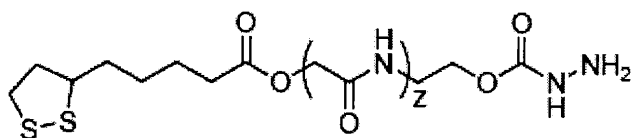
【化 10】



30

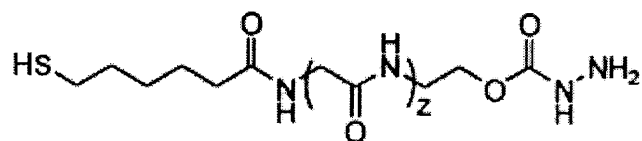
(リンカー-III-アミド) ;

【化 11】



(リンカー-III-C(O)O- ;

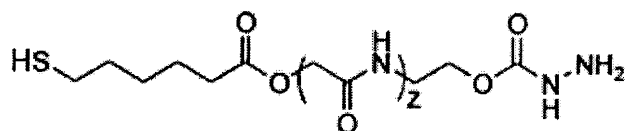
【化 12】



40

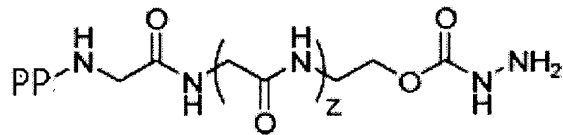
(SH-C₅-リンカー-III-アミド) ;

【化 13】

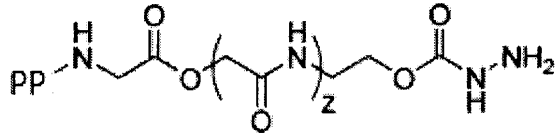


50

(SH-C₅-リンカー-I I-C(O)O-) ;
【化14】

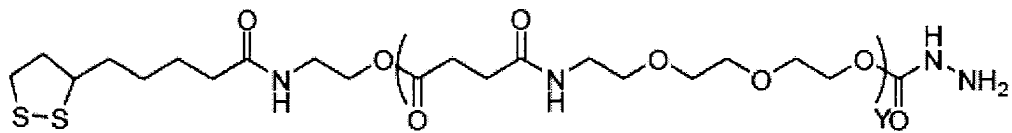


(ppNH-C₁-リンカー-I I-アミド) ;
【化15】



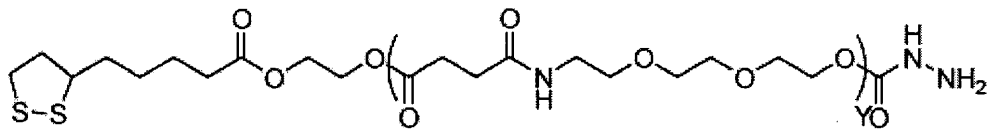
10

(ppNH-C₁-リンカー-I I-C(O)O-) ;
【化16】

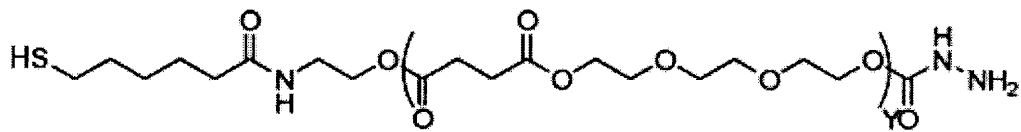


20

(リンカーI V-アミド) ;
【化17】

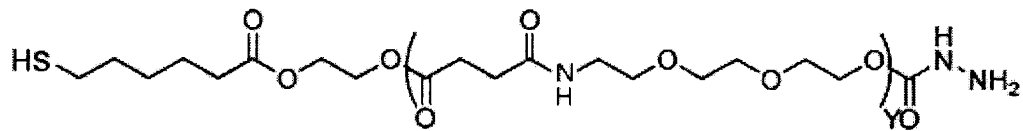


(リンカーI V-C(O)O-) ;
【化18】



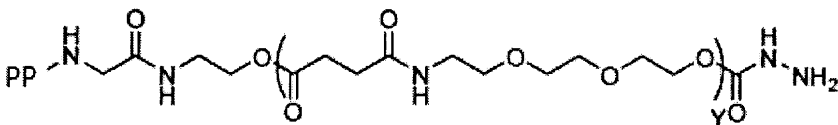
30

(SH-C₅-リンカー-I V-アミド) ;
【化19】

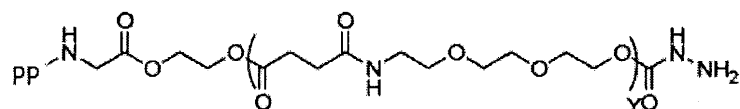


(SH-C₅-リンカー-I V-C(O)O-) ;
【化20】

40



(ppNH-C₁-リンカー-I V-アミド) ; または
【化21】



50

(p p NH-C₁-リンカー-IV-C(O)O-)
を有する。

【0006】

本発明はまた、任意選択的に1つまたは複数のPEGと複合体を形成した、1つまたは複数の本発明のリンカーと複合体を形成した金属ナノ粒子を含む金属ナノ粒子複合体を提供する。1つの実施形態では、金属ナノ粒子は、金ナノ粒子、パラジウムナノ粒子、白金ナノ粒子、または銀ナノ粒子である。1つの実施形態では、リンカーは同一であるか異なる。より好ましくは、金属ナノ粒子複合体は、異なる分子長を有する複数のリンカーを含む。

【0007】

本発明はまた、1つまたは複数の同一の異なる治療薬または診断薬および薬学的に許容され得るキャリアと連結した1つまたは複数の金属ナノ粒子複合体を含む組成物を提供する。

【0008】

本発明はまた、1つまたは複数の同一の異なる治療薬または診断薬に連結した1つまたは複数の金属ナノ粒子複合体を含む薬物送達系を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1A-C】図1(A)～(C)は、金ナノ粒子上に抱合した抗HIV-1 p24抗体(mAb3)(Au/LKI-1/mAb-p24)が依然として結合親和性を示したことを示す。(A)Au/LKI-1/mAb-p24複合体およびAuの吸収スペクトル。Au/LKI-1/mAb-p24複合体は、プラズモンピークにおいて2nmのレッドシフトを示す。(B)Au/LKI-1/mAb-p24複合体は、アレクサフルオル568二次抗体を使用して検出される蛍光を示した。(C)ELISAアッセイを使用してAu/LKI-1/mAb-p24複合体の形成を証明し、p24抗原の結合活性をmAb-p24の結合活性と比較した。

【0010】

【図2A-B】図2(A)～(B)は、金ナノ粒子上に抱合したEGFR(上皮成長因子受容体)抗体(Au/LKI-1/Ab-EGFRおよびAu/LKI-5/Ab-EGFR)およびAuの吸収スペクトルを示す。(A)Au/LKI-1/Ab-EGFR複合体は、プラズモンピークにおいて1nmのレッドシフトを示す。(B)Au/LKI-5/Ab-EGFR複合体は、プラズモンピークにおいて1nmのレッドシフトを示す。

【0011】

【図3】図3は、金ナノ粒子上に抱合したトラスツズマブ(Tras)抗体(Au/LKI-1/Tras)およびAuの吸収スペクトルを示す。Au/LKI-1/Tras複合体は、プラズモンピークにおいて8nmのレッドシフトを示す。

【0012】

【図4A-C】図4(A)～(C)は、金ナノ粒子上に抱合したエタネルセプト(Etanecept)(ETA)(Au/LKI-1/ETA)が依然として結合親和性を示したことを示す。(A)Au/LKI-1/ETA複合体およびAuの吸収スペクトル。Au/LKI-1/ETA複合体は、プラズモンピークにおいて2nmのレッドシフトを示す。(B)Au/LKI-1/ETA複合体は、アレクサフルオル568二次抗体を使用して検出される蛍光を示した。(C)Au表面上に存在するETAへ1～5nm金標識抗ヒトIgG二次抗体が結合したAu/LKI-1/ETA複合体のTEM画像が認められた。

【0013】

【図5】図5は、Au/LKI-1/Dox複合体およびAuの吸収スペクトルを示す。UV/visデータ(波長)は、Au/LKI-1/Dox複合体の3nmのレッドシフトを示す。

【0014】

【図6A-D】図6(A)～(D)は、MDA-MB-231乳房腫瘍の処置を示す。(A)処置中の動物体重(g)の正味の変化。データから、ヌードマウス(N=3)においてドキソルビシンおよびAu/LKI-1/Doxにより、それぞれ20%および3%を超える体重減少が認められた。これは、Au/LKI-1/Dox複合体がドキソルビシンと比較してヌードマウスにおける毒性が非常に低かったことを意味する。(B)MDA-MD-231乳房腫瘍成長の阻害(N=3):Dox>Au/LKI-1/Dox>Au/PEG=PBS。(C)Au/LKI-1/Dox複合体で処置したMDA-MB-231乳房腫瘍細胞のTEM画像により、異種移植片モデルにおける腫瘍中のAu/LKI-1/Dox複合体が容易に判断された。(D)腫瘍検体の免疫組織化学。乳房腫瘍検体をマウスから採取し、パラフィンに包埋させ、ヘマトキシリンエオシンで染色した。Au/LKI-1/Dox複合体で処置したマウス由来の腫瘍よりもドキソルビシンで処置したマウス由来の腫瘍においてより多くの壊死が認められた。

10

【発明の詳細な説明】

【0015】

本発明は、少なくとも、金属ナノ粒子および種々の分子サイズを有する1つまたは複数の薬剤を同時に結合することができるpH感受性リンカーの発見に基づく。本発明のリンカーは、薬剤が疾患過程に関与する細胞を選択的に標的にして影響を及ぼすことができるようにこれらの細胞内またはこれらの細胞付近に薬剤を送達させることができる。本発明のリンカーによってもたらさせる標的送達を、例えば、疾患の検知、画像化、薬物送達、および治療のために使用することができる。

20

【0016】

別段の定めがない限り、本明細書中で使用した全ての技術用語および科学用語は、当業者が一般的に理解する意味を有する。別段の記載がない限り、本明細書中に言及された全ての特許、出願、公開出願、および他の刊行物は、その全体が本明細書中で参考として援用される。別段の記載がない限り、本明細書中の用語に複数の定義が存在する場合、本項の定義を優先する。

【0017】

用語「抗体」を最も広い意味で使用し、用語「抗体」には、モノクローナル抗体(例えば、全長またはインタクトなモノクローナル抗体)、ポリクローナル抗体、一価抗体、多価抗体、多重特異性抗体(例えば、所望の生物学的活性を示す限り、二重特異性抗体)が含まれ、一定の抗体フラグメント(本明細書中により詳細に記載)も含まれ得る。抗体は、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、および/または親和性成熟抗体であり得る。

30

【0018】

用語「腫瘍」は、本明細書中で使用する場合、悪性や良性を問わない全ての新生物細胞の成長および増殖ならびに全ての前癌性および癌性の細胞および組織を指す。用語「癌」、「癌性」、「細胞増殖性障害」、「増殖性障害」、および「腫瘍」は、本明細書中に言及されるように、相互に排反されない。

【0019】

用語「癌」は、本明細書中で使用する場合、典型的には無制御な細胞成長/増殖によって特徴付けられる哺乳動物における生理学的容態を指す。癌の例には、癌腫、リンパ腫(例えば、ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫)、芽腫、肉腫、および白血病、扁平上皮癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、腹膜癌、肝細胞癌、消化管癌、膵臓癌、膠芽細胞腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、ヘパトーム、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌または子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、肝臓癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝癌、白血病および他のリンパ球増殖性疾患、ならびに種々のタイプの頭頸部癌が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0020】

本明細書中で使用する場合、用語「処置(treating)」、「処置(treatment)」、「治療(therapeutic)」、または「治療」は、必ずしも疾患または容態の完全な治癒や消滅を意味しない。疾患または容態の任意の望ましくない徴

50

候または症状のある程度までの任意の緩和を、処置および／または治療と見なすことができる。さらに、処置には、患者の全体的な幸福感または様子を悪化させ得る行動を含み得る。

【0021】

「有効量」は、所望の治療結果または予防結果を達成するために必要な投薬量および期間で有効な量を指す。

【0022】

本発明の物質／分子の「治療有効量」は、個体の病状、年齢、性別、および体重、ならびに物質／分子が個体に所望の応答を誘発する能力などの要因に応じて変動し得る。治療有効量はまた、物質／分子の任意の有毒作用または有害作用を治療上有益な作用が上回る量である。「予防有効量」は、所望の予防結果を達成するために必要な投薬量および期間で有効な量を指す。典型的には（しかし、必ずしもそうではない）、予防用量は疾患前または疾患のより早い段階で被験体に使用されるので、予防有効量は治療有効量未満であろう。

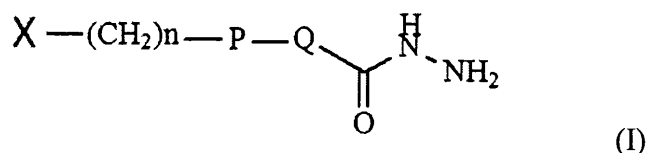
【0023】

用語「薬学的に許容され得る塩」は、投与される生物に対して有意な刺激作用を生じず、且つ化合物の生物学的な活性および性質を抑止しない化合物の塩を指す。

【0024】

1つの態様では、本発明は、以下の式（I）：

【化22】



（式中、Xは、

【化23】



、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{NH}_2$ （ $\text{Boc}-\text{NH}-$ ； $\text{Fmoc}-\text{NH}-$ ）、 $-\text{COOH}$ であり；
nは1～6であり；

Pは $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ または $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ であり；

Qは、 $-\text{R}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-$ 、 $\text{R}(-\text{C}(\text{O})\text{NH}-)_z$ 、または $-\text{R}[-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m]\text{Y}$ であり；

Rは結合、 $-\text{C}_{1\sim 12}$ アルキル、または $\text{C}_{1\sim 10}$ アルコキシであり；

mは1～12であり；

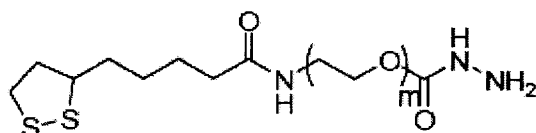
zは1～4であり；

Yは1～12である）を有するpH感受性リンカーを提供する。

【0025】

いくつかの実施形態では、本発明のリンカーは、以下の式：

【化24】



（リンカーIーアミド）

（式中、mは1～12である）を有する。

リンカーIーアミドは、式（I）（式中、Xは

【化 2 5】



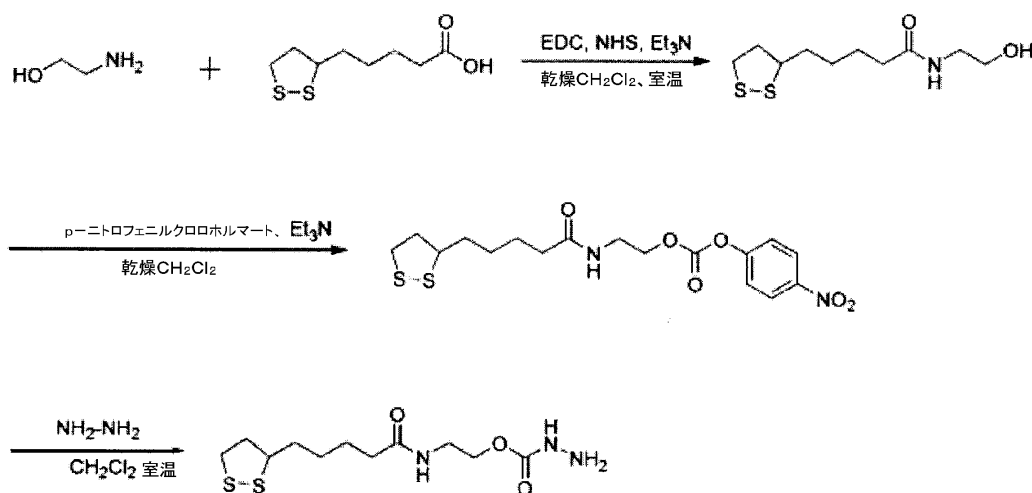
であり、 n は4であり、 P は $C(O)NH$ であり、 R は結合であり、 Q は $-R(CH_2CH_2O)_m-$ である)を有する。好ましくは、 m は1～6の整数である。より好ましくは、 m は整数2である。

【0026】

本発明のリンカーIーアミドのリンカーを、本開示を考慮して当業者に公知の方法を使用して調製することができる。例えば、本発明の好ましいリンカーを、以下のスキームに示すように調製することができる。

10

【化 2 6】

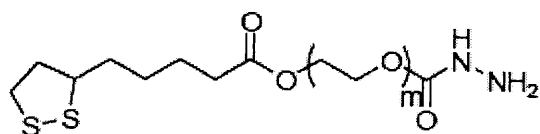


20

【0027】

いくつかの実施形態では、本発明のリンカーは、以下の式：

【化 2 7】



30

(リンカーIー $C(O)O$ ；リンカーI I I)

(式中、 m は1～12である)を有する。

【0028】

リンカーIー $C(O)O$ (リンカーI I I)は、式(I)(式中、 X は

【化 2 8】



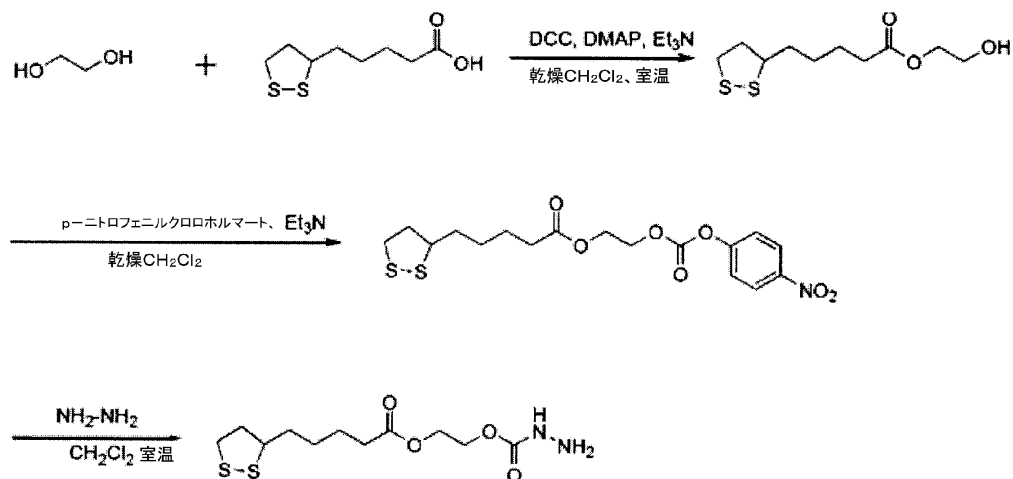
40

であり、 n は4であり、 P は $-C(O)O-$ であり、 R は結合であり、 Q は $-R(CH_2CH_2O)_m-$ であり、 m は1～12である)を有する。より好ましくは、 m は整数2である。

【0029】

本発明のリンカーIー $C(O)O$ (リンカーI I I)のリンカーを、本開示を考慮して当業者に公知の方法を使用して調製することができる。例えば、本発明の好ましいリンカーを、以下のスキームに示すように調製することができる。

【化 2 9】

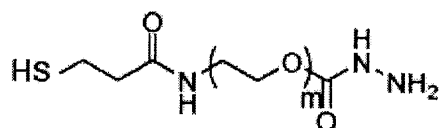


10

【0030】

いくつかの実施形態では、本発明のリンカーは、以下の式：

【化 3 0】



20

(SH-C₂-リンカー-I)

(式中、mは1～12である)を有する。

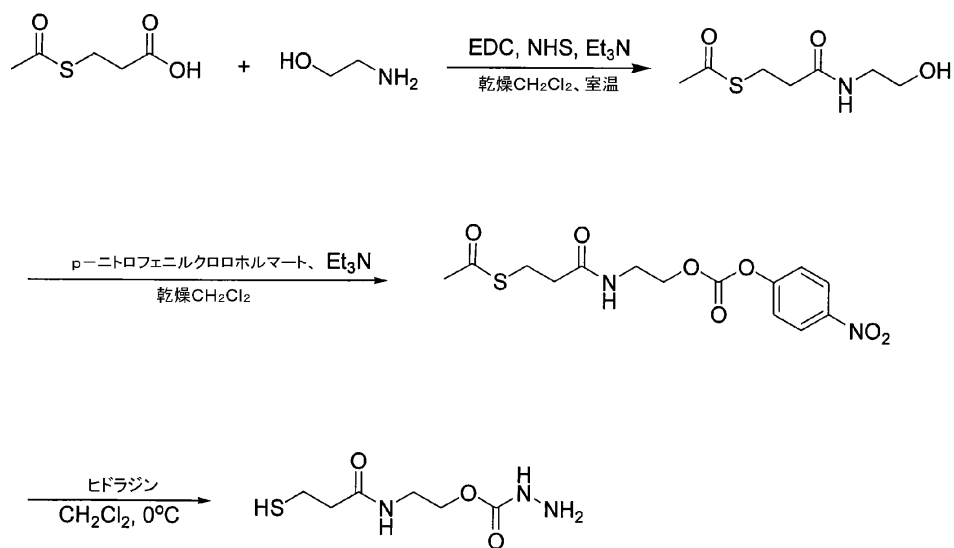
リンカーSH-C₂-リンカー-Iは、式(I) (式中、Xは-SHであり、nは2であり、Pは-C(O)NH-であり、Rは結合であり、Qは-R(CH₂CH₂O)_m-であり、mは1～12である)を有する。より好ましくは、mは整数2である。

【0031】

本発明のSH-C₂-リンカー-Iのリンカーを、本開示を考慮して当業者に公知の方法を使用して調製することができる。例えば、本発明の好ましいリンカーを、以下のスキームに示すように調製することができる。

30

【化 3 1】



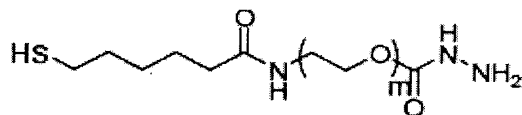
40

【0032】

いくつかの実施形態では、本発明のリンカーは、以下の式：

50

【化 3 2】



(SH-C₅-リンカー-I-アミド)
(式中、mは1～12である)を有する。

【0033】

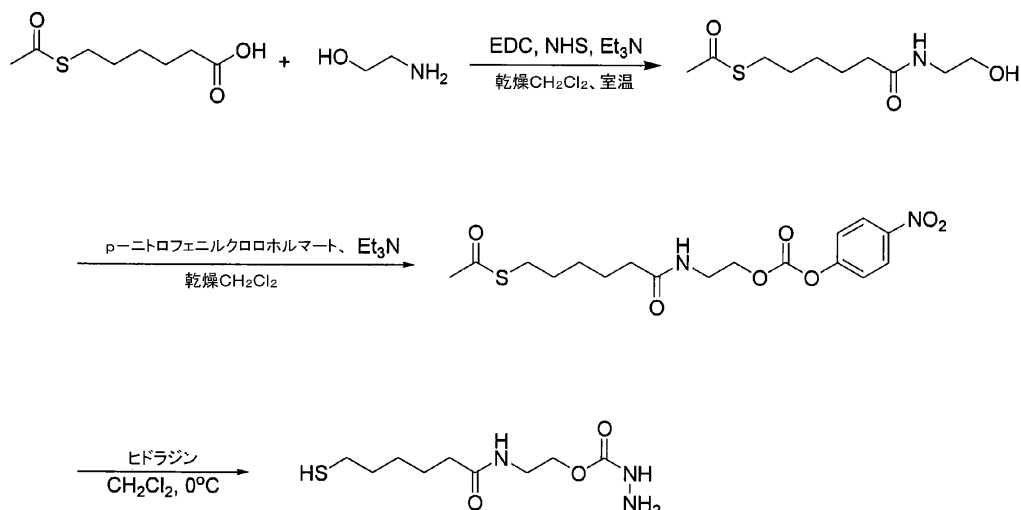
リンカーSH-C₅-リンカー-I-アミドは、式(I) (式中、Xは-SHであり、nは5であり、Pは-C(O)NH-であり、Rは結合であり、Qは-R(CH₂CH₂O)_m-であり、mは1～12である)を有する。より好ましくは、mは整数2である。

10

【0034】

本発明のSH-C₅-リンカー-I-アミドのリンカーを、本開示を考慮して当業者に公知の方法を使用して調製することができる。例えば、本発明の好ましいリンカーを、以下のスキームに示すように調製することができる。

【化 3 3】



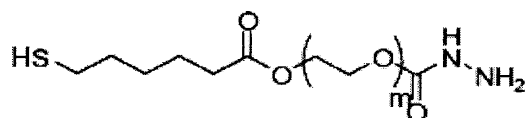
20

30

【0035】

いくつかの実施形態では、本発明のリンカーは、以下の式：

【化 3 4】



(SH-C₅-リンカー-I-C(O)O-; SH-C₅-リンカー-II I)
(式中、mは1～12である)を有する。

【0036】

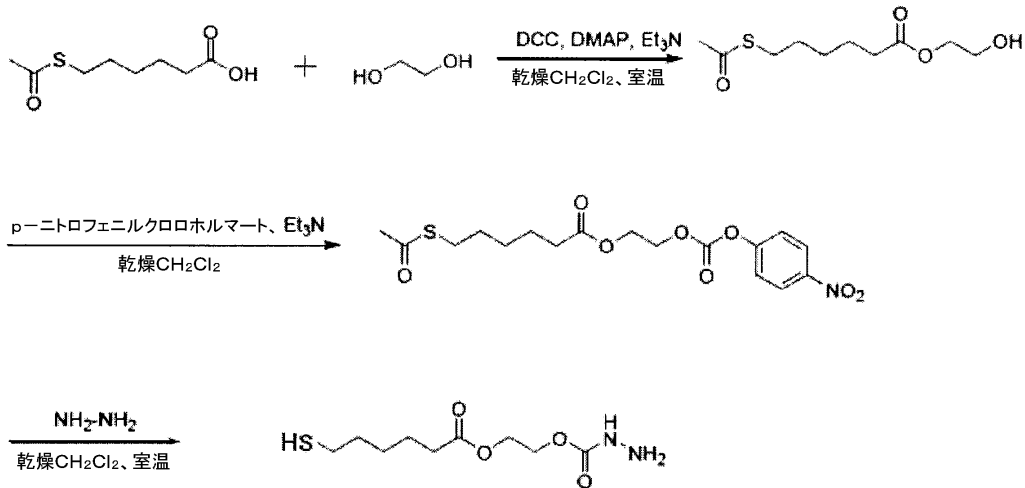
SH-C₅-リンカー-I-C(O)O-(SH-C₅-リンカー-II I)は、式(I) (式中、Xは-SHであり、nは5であり、Pは-C(O)O-であり、Rは結合であり、Qは-R(CH₂CH₂O)_m-であり、mは1～12である)を有する。好ましくは、mは1～6の整数である。より好ましくは、mは整数2である。

40

【0037】

本発明のSH-C₅-リンカー-I-C(O)O-(SH-C₅-リンカー-II I)のリンカーを、本開示を考慮して当業者に公知の方法を使用して調製することができる。例えば、本発明の好ましいリンカーを、以下のスキームに示すように調製することができる。

【化 3 5】

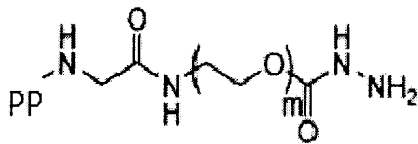


10

【0038】

いくつかの実施形態では、本発明のリンカーは、以下の式：

【化 3 6】



20

(ppNH-C₁-リンカー-I-アミド)

(式中、ppは保護基 (BocまたはFmocなど) であり；mは1～12である) を有する。

【0039】

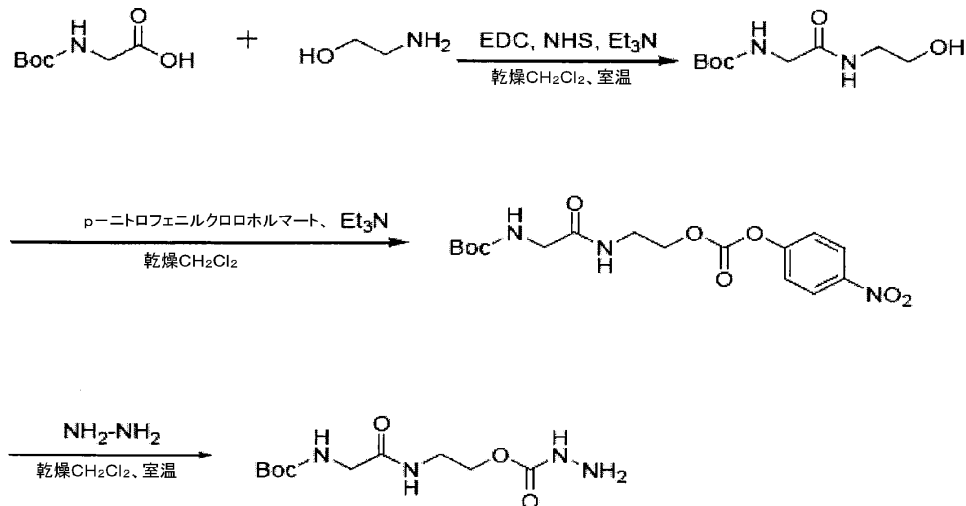
NH₂-C₁-リンカー-I-アミドは、式 (I) (式中、Xはpp-NH-であり；ppは保護基 (BocまたはFmocなど) であり、nは1であり、Pは-C(O)NH-であり、Rは結合であり、Qは-R(CH₂CH₂O)_m-であり、mは1～12である) を有する。好ましくは、mは1～6の整数である。より好ましくは、mは整数2である。

30

【0040】

本発明のNH₂-C₁-リンカー-I-アミドのリンカーを、本開示を考慮して当業者に公知の方法を使用して調製することができる。例えば、本発明の好ましいリンカーを、以下のスキームに示すように調製することができる。

【化 3 7】

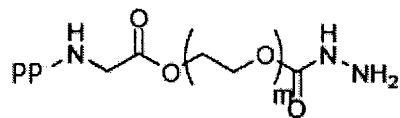


10

【0041】

いくつかの実施形態では、本発明のリンカーは、以下の式：

【化 3 8】



20

(ppNH-C₁-リンカー-I-C(O)O-; NH₂-C₁-リンカー-II-I-C(O)O-)

(式中、

PPは保護基 (BocまたはFmocなど) であり；

mは1～12である)を有する。

【0042】

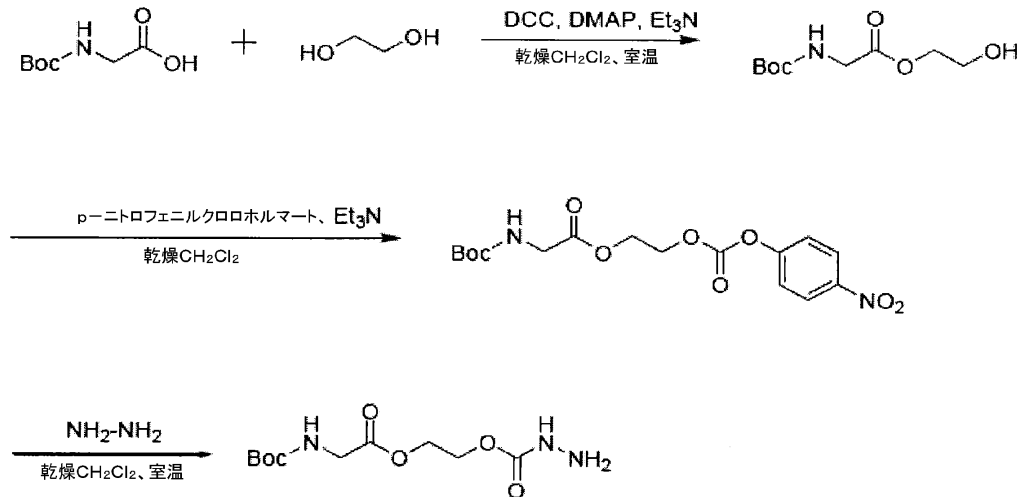
ppNH-C₁-リンカー-I-C(O)O-(ppNH-C₁-リンカー-II-I-C(O)O-)は、式(I) (式中、Xは、pp-NH-(ppは、BocまたはFmocなどの保護基である)であり、nは1であり、Pは-C(O)O-であり、Rは結合であり、Qは-R(CH₂CH₂O)_m-であり、mは1～12である)を有する。好ましくは、mは1～6の整数である。より好ましくは、mは整数2である。

30

【0043】

本発明のppNH-C₁-リンカー-I-C(O)O-(ppNH-C₁-リンカー-II-I-C(O)O-)のリンカーを、本開示を考慮して当業者に公知の方法を使用して調製することができる。例えば、本発明の好ましいリンカーを、以下のスキームに示すように調製することができる。

【化 3 9】

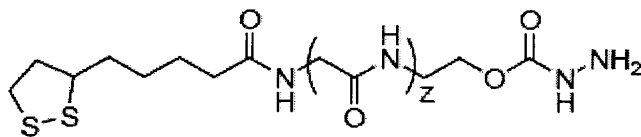


10

【0044】

いくつかの実施形態では、本発明のリンカーは、以下の式：

【化 4 0】



20

(リンカー I I - アミド)

(式中、z は 1 ～ 4 である) を有する。

【0045】

リンカー I I - アミドは、式 (I) (式中、X は

【化 4 1】



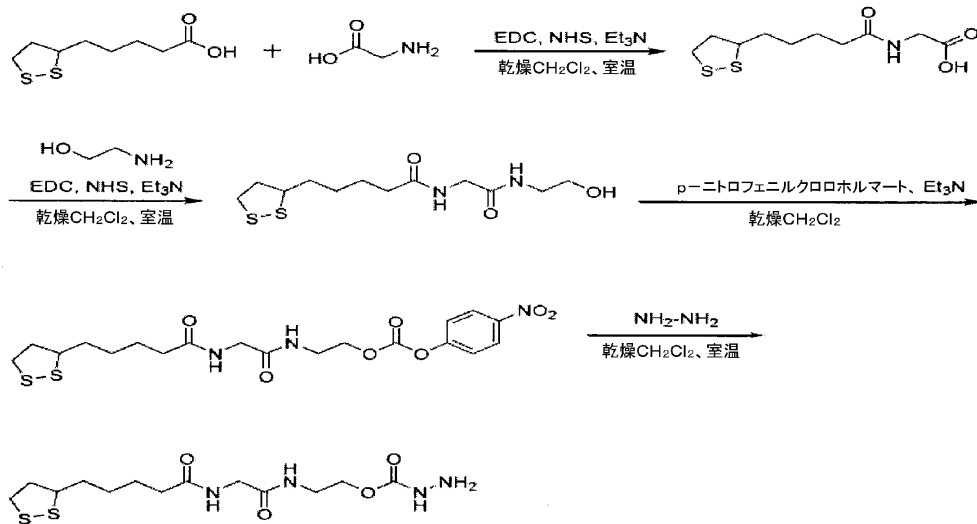
30

であり、n は 4 であり、P は $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ であり、R は結合であり、Q は $\text{R}(-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}-)_z$ であり、z は 1 ～ 4 である) を有する。より好ましくは、z は整数 3 である。

【0046】

本発明のリンカー I I - アミドのリンカーを、本開示を考慮して当業者に公知の方法を使用して調製することができる。例えば、本発明の好ましいリンカーを、以下のスキームに示すように調製することができる。

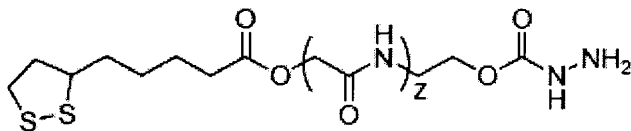
【化 4 2】



【 0 0 4 7 】

いくつかの実施形態では、本発明のリンカーは、以下の式：

【化 4 3】



(リンカー I I - C (O) O -)

(式中、 z は $1 \sim 4$ である) を有する。

【 0 0 4 8 】

リンカー I I - C (O) O - は、式 (I) (式中、X は

【化 4 4】

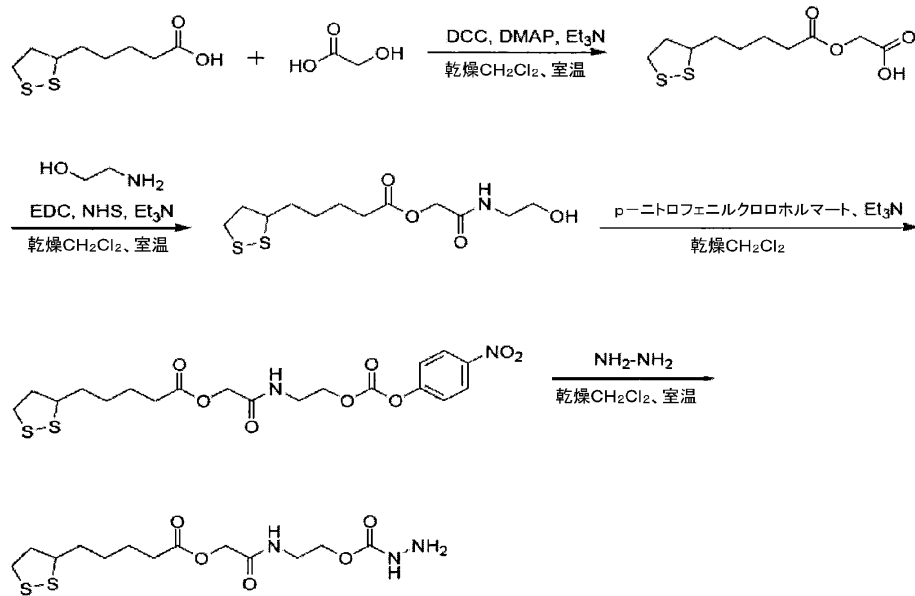


であり、nは4であり、Pは $-C(O)O-$ であり、Rは結合であり、Qは $R(-CH_2C(O)NH-)_z$ であり、zは1～4である)を有する。より好ましくは、zは整数3である。

【 0 0 4 9 】

本発明のリンカー I I - C (O) O-のリンカーを、本開示を考慮して当業者に公知の方法を使用して調製することができる。例えば、本発明の好ましいリンカーを、以下のスキームに示すように調製することができる。

【化 4 5】



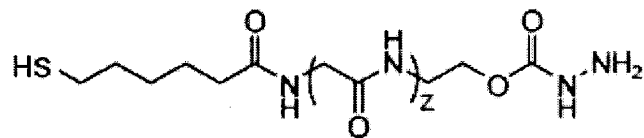
10

【0050】

いくつかの実施形態では、本発明のリンカーは、以下の式：

20

【化 4 6】



(SH-C₅-リンカー-II-アミド)

(式中、z は 1～4 である) を有する。

【0051】

SH-C₅-リンカー-II-アミドは、式 (I) (式中、X は -SH であり、n は 5 であり、P は -C(O)NH- であり、R は結合であり、Q は R(-CH₂C(O)NH-) z であり、z は 1～4 である) を有する。より好ましくは、z は整数 3 である。

30

【0052】

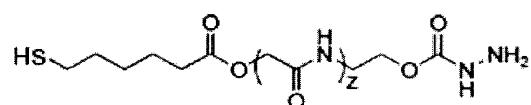
他の実施形態では、n は 2 である。本発明の SH-C_{2～5}-リンカー-II-アミドのリンカーを、本開示を考慮して当業者に公知の方法を使用して調製することができる。例えば、本発明の好ましいリンカーを、以下のスキームに示すように調製することができる。

$$\begin{array}{c}
 \text{CH}_3\text{CO-S-(CH}_2\text{)}_6\text{COOH} + \text{HOOC-CH}_2\text{NH}_2 \xrightarrow[\text{乾燥CH}_2\text{Cl}_2、\text{室温}]{\text{EDC, NHS, Et}_3\text{N}} \text{CH}_3\text{CO-S-(CH}_2\text{)}_6\text{CONH-CH}_2\text{COOH} \\
 \\
 \xrightarrow[\text{乾燥CH}_2\text{Cl}_2、\text{室温}]{\text{EDC, NHS, Et}_3\text{N, HOCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2} \text{CH}_3\text{CO-S-(CH}_2\text{)}_6\text{CONH-CH}_2\text{CONH-CH}_2\text{CH}_2\text{OH} \xrightarrow[\text{乾燥CH}_2\text{Cl}_2]{\text{p-ニトロフェニルクロロホルマート、Et}_3\text{N}} \\
 \text{CH}_3\text{CO-S-(CH}_2\text{)}_6\text{CONH-CH}_2\text{CONH-CH}_2\text{CH}_2\text{OCOC(=O)C}_6\text{H}_4\text{NO}_2 \xrightarrow[\text{乾燥CH}_2\text{Cl}_2、\text{室温}]{\text{NH}_2\text{-NH}_2} \\
 \text{HS-(CH}_2\text{)}_6\text{CONH-CH}_2\text{CONH-CH}_2\text{CH}_2\text{OC(=O)NH}_2
 \end{array}$$

10

20

【化 4 8】



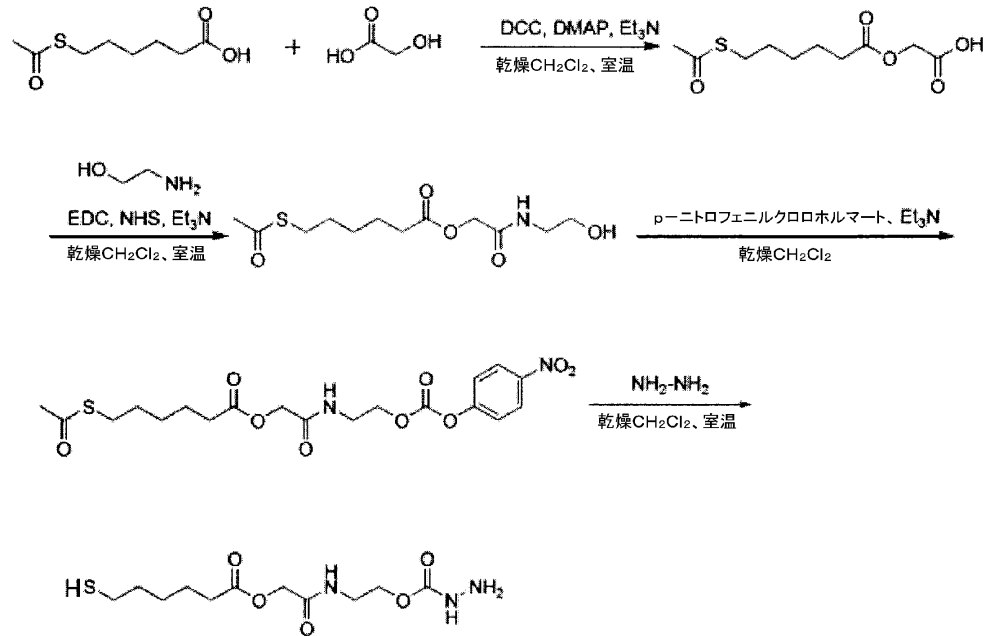
(式中、 z は $1 \sim 4$ である) を有する。

30

SH-C₅-リンカー-I I-C(O)O-は、式(I) (式中、XはCH₃C(O)S-であり、nは5であり、Pは-C(O)O-であり、Rは結合であり、QはR(-CH₂C(O)NH-)zであり、zは1~4である)を有する。より好ましくは、zは整数3である。

他の実施形態では、 n は2である。本発明のSH-C₂～₅-リンカー-I I-C(O)O-のリンカーを、本開示を考慮して当業者に公知の方法を使用して調製することができる。例えば、本発明の好ましいリンカーを、以下のスキームに示すように調製することができる。

【化 4 9】

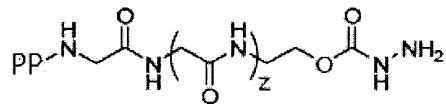


10

【0056】

いくつかの実施形態では、本発明のリンカーは、以下の式：

【化 5 0】



(ppNH-C₁-リンカー-I I-アミド)

(式中、ppは保護基 (BocまたはFmocなど) であり；

zは1～4である)を有する。

【0057】

ppNH-C₁-リンカー-I I-アミドは、式 (I) (式中、Xはpp-NH-であり；ppは保護基 (BocまたはFmocなど) であり、nは1であり、Pは-C(O)NH-であり、Rは結合であり、QはR(-C(O)NH-)zであり、zは1～4である)を有する。より好ましくは、zは整数3である。

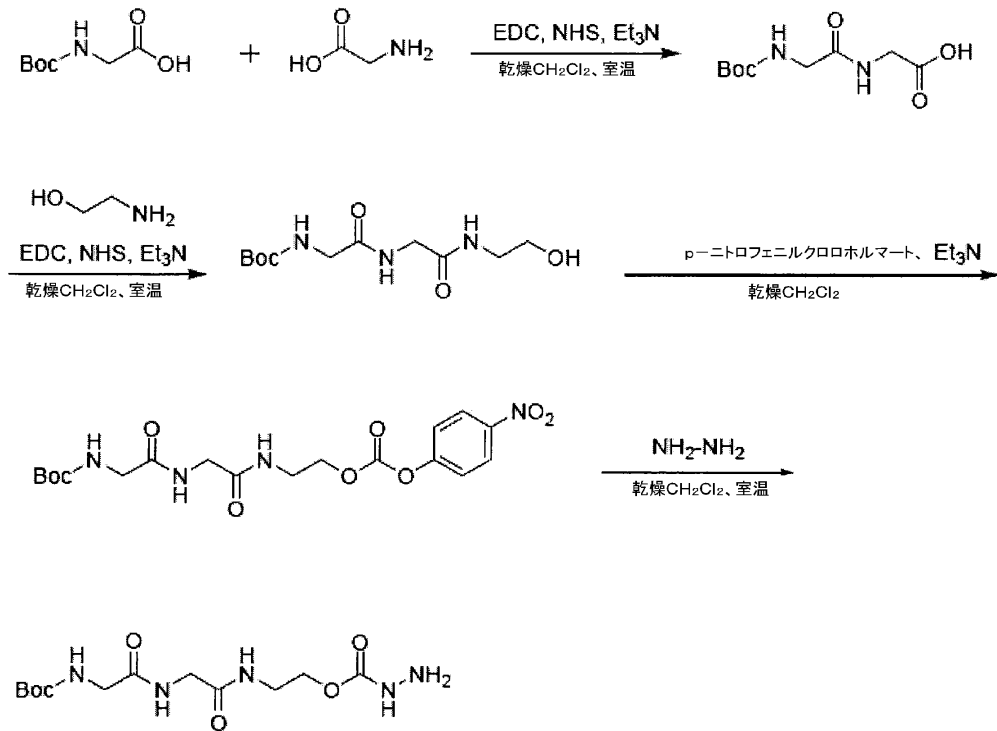
【0058】

本発明のppNH-C₁-リンカー-I I-アミドのリンカーを、本開示を考慮して当業者に公知の方法を使用して調製することができる。例えば、本発明の好ましいリンカーを、以下のスキームに示すように調製することができる。

20

30

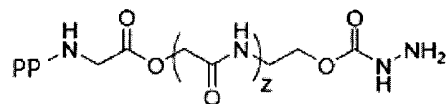
【化 5 1】



【0059】

いくつかの実施形態では、本発明のリンカーは、以下の式：

【化 5 2】



(ppNH-C₁-リンカー-I I-C(O)O-)

(式中、ppは保護基(BocまたはFmocなど)であり；

zは1～4である)を有する。

【0060】

ppNH-C₁-リンカー-I I-C(O)O-は、式(I)(式中、Xはpp-NH-であり；ppは保護基(BocまたはFmocなど)であり、nは1であり、Pは-C(O)O-であり、Rは結合であり、QはR(-C(O)NH-)zであり、zは1～4である)を有する。より好ましくは、zは整数3である。

【0061】

本発明のppNH-C₁-リンカー-I I-C(O)O-のリンカーを、本開示を考慮して当業者に公知の方法を使用して調製することができる。例えば、本発明の好ましいリンカーを、以下のスキームに示すように調製することができる。

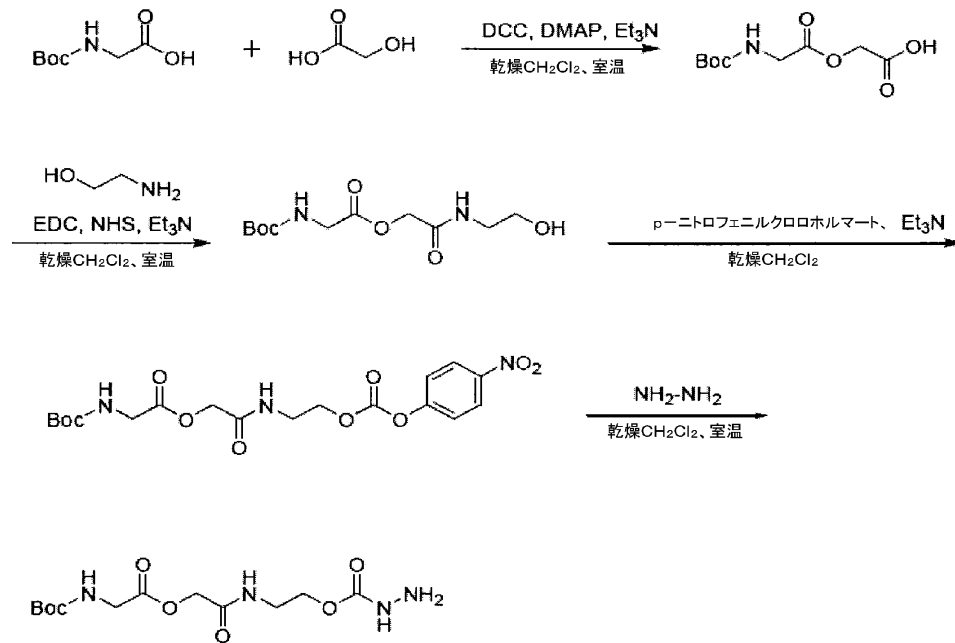
10

20

30

40

【化 5 3】

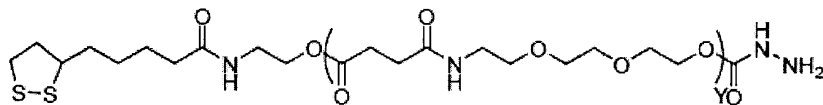


10

【0062】

いくつかの実施形態では、本発明のリンカーは、以下の式：

【化 5 4】



(リンカー I V-アミド)

(式中、Yは1～12である)を有する。

【0063】

リンカー I V-アミドは、式 (I) (式中、Xは

【化 5 5】



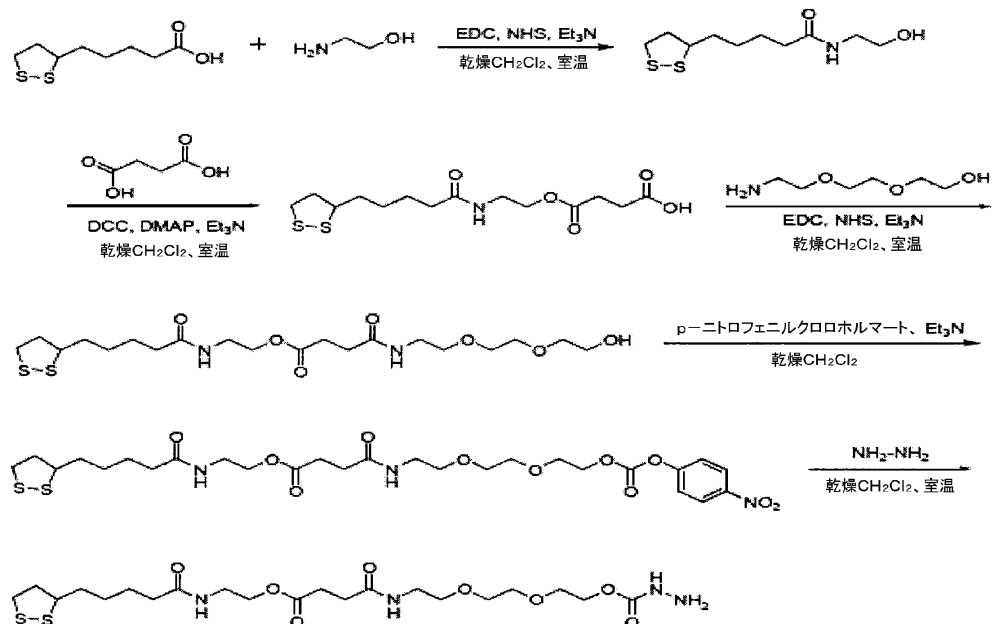
であり、nは4であり、Pは-C(O)NH-であり、Rは-CH₂CH₂O-であり、Qは-R[-C(O)CH₂CH₂-C(O)NH-(CH₂CH₂O)_m]_Yであり、mは3であり、Yは1～12である)を有する。好ましくは、mは2であり、Yは2である。

【0064】

他の実施形態では、mは1～12である。本発明のリンカー I V-アミドのリンカーを、本開示を考慮して当業者に公知の方法を使用して調製することができる。例えば、本発明の好ましいリンカーを、以下のスキームに示すように調製することができる。

40

【化 5 6】



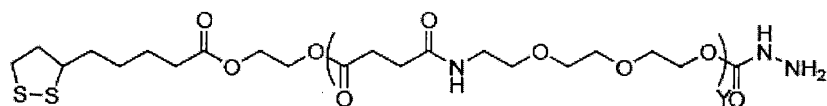
10

【0065】

いくつかの実施形態では、本発明のリンカーは、以下の式：

20

【化 5 7】



(リンカー I V-C(O)O-)

(式中、Yは1～12である)を有する。

【0066】

リンカー I V-C(O)O-は、式 (I) (式中、Xは

【化 5 8】



であり、nは4であり、Pは-C(O)O-であり、Rは-CH₂CH₂O-であり、Qは-R[-C(O)CH₂CH₂-C(O)NH-(CH₂CH₂O)_m]_Yであり、mは3であり、Yは1～12である)を有する。より好ましくは、Yは整数2である。

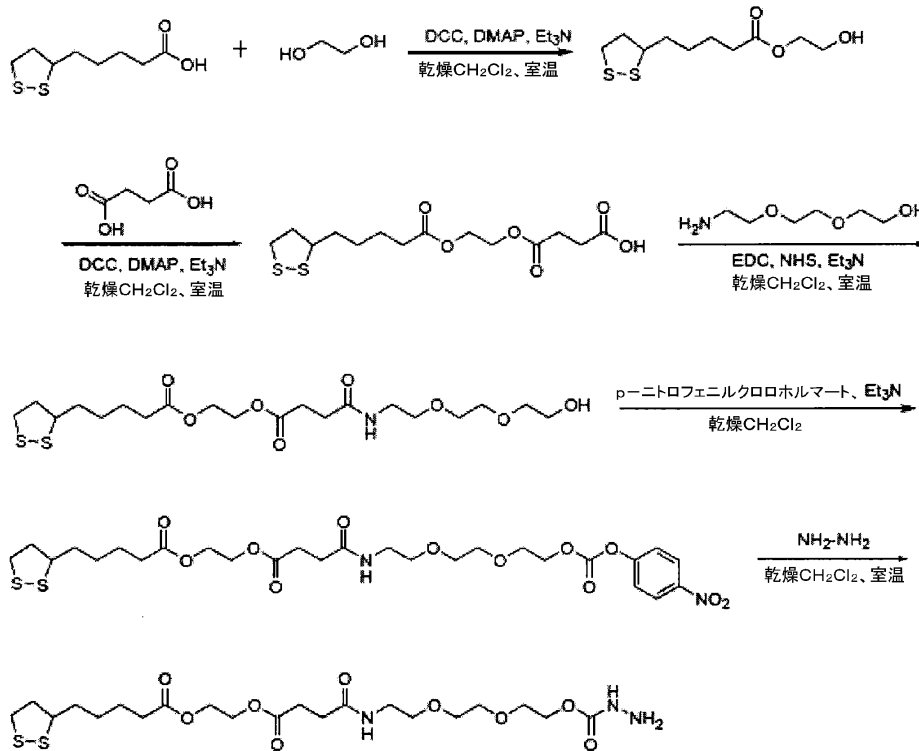
【0067】

他の実施形態では、mは1～12である。本発明のリンカー I V-C(O)O-のリンカーを、本開示を考慮して当業者に公知の方法を使用して調製することができる。例えば、本発明の好ましいリンカーを、以下のスキームに示すように調製することができる。

30

40

【化 5 9】



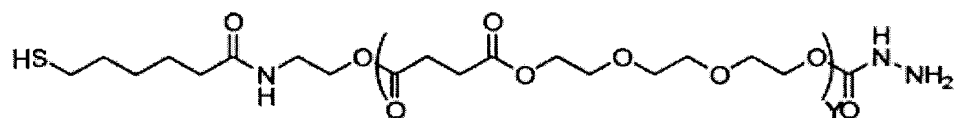
10

20

【0068】

いくつかの実施形態では、本発明のリンカーは、以下の式：

【化 6 0】



($\text{SH}-\text{C}_5$ -リンカー-IV-アミド)

(式中、Yは1～12である)を有する。

【0069】

$\text{SH}-\text{C}_5$ -リンカー-IV-アミドは、式(I) (式中、Xは $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{S}-$ であり、nは5であり、Pは $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ であり、Rは $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ であり、Qは $-\text{R}[-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m]$ Yであり、mは3であり、Yは1～12である)を有する。より好ましくは、Yは整数2である。

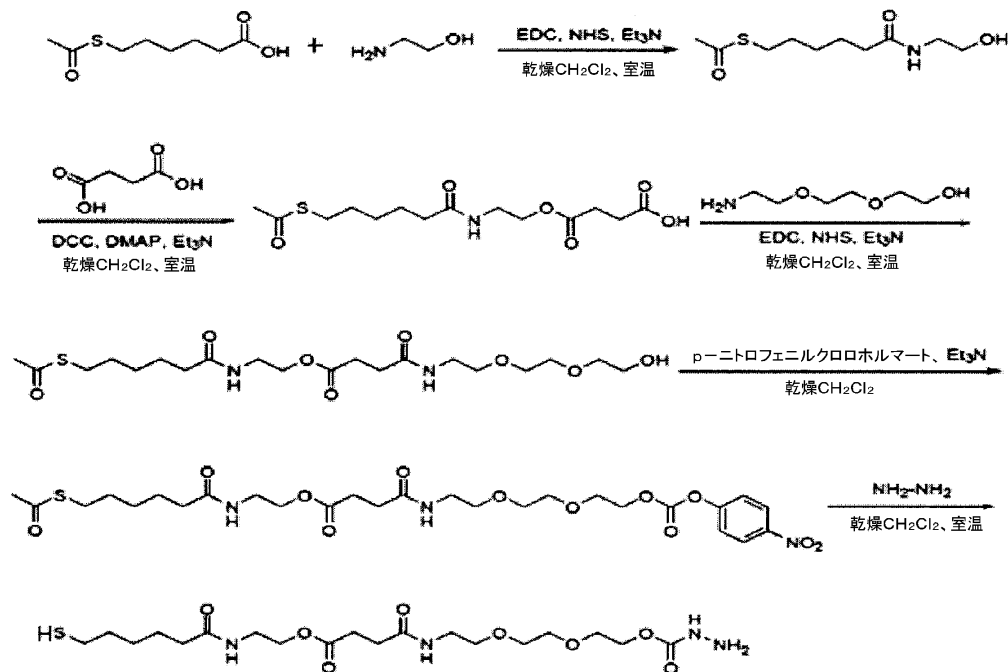
【0070】

他の実施形態では、nは2または5であり、mは1～12である。本発明のリンカー $\text{SH}-\text{C}_{2\sim 5}$ -リンカー-IV-アミドのリンカーを、本開示を考慮して当業者に公知の方法を使用して調製することができる。例えば、本発明の好ましいリンカーを、以下のスキームに示すように調製することができる。

30

40

【化 6 1】



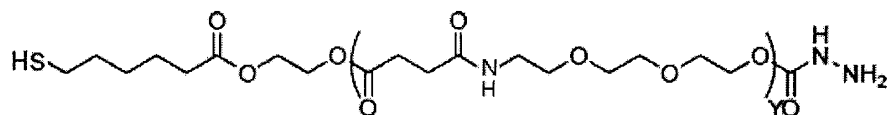
10

20

【0071】

いくつかの実施形態では、本発明のリンカーは、以下の式：

【化 6 2】



(SH-C₅-リンカー-IV-C(O)O-)

(式中、Yは1～12である)を有する。

【0072】

SH-C₅-リンカー-IV-C(O)O-は、式(I) (式中、XはCH₃C(O)S-であり、nは5であり、Pは-C(O)O-であり、Rは-CH₂CH₂O-であり、Qは-R[-C(O)CH₂CH₂-C(O)NH-(CH₂CH₂O)_m]_Yであり、mは3であり、Yは1～12である)を有する。好ましくは、Yは1～6の整数である。より好ましくは、Yは整数2である。

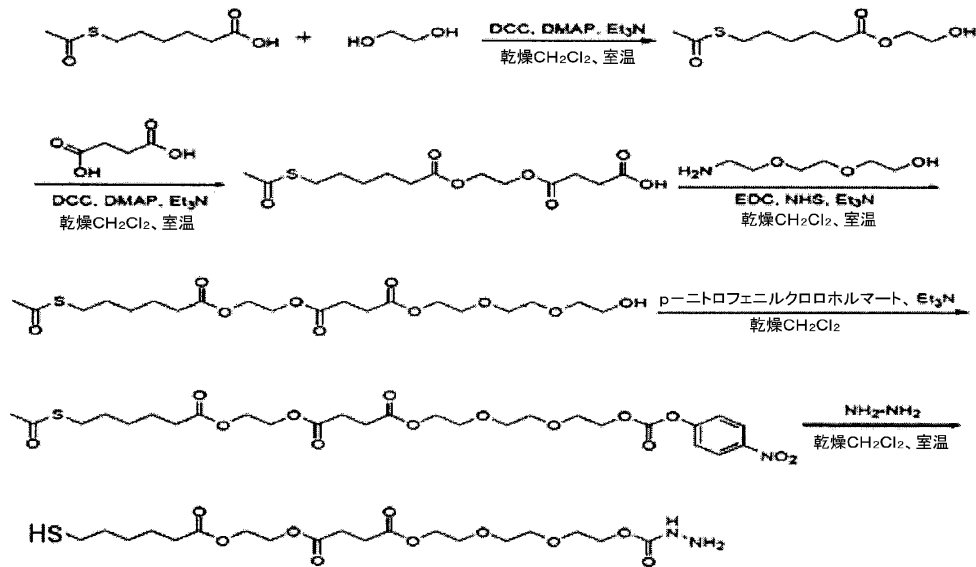
【0073】

他の実施形態では、nは2または5であり、mは1～12である。本発明のHS-C₂～₅-リンカー-IV-C(O)O-のリンカーを、本開示を考慮して当業者に公知の方法を使用して調製することができる。例えば、本発明の好ましいリンカーを、以下のスキームに示すように調製することができる。

30

40

【化 6 3】

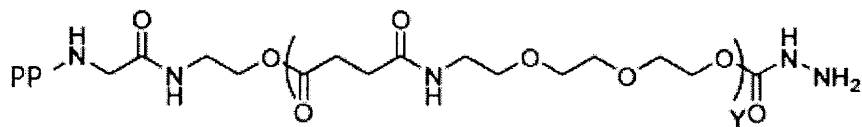


10

【0074】

いくつかの実施形態では、本発明のリンカーは、以下の式：

【化 6 4】



20

(ppNH-C₁-リンカー-IV-アミド)

(式中、ppは保護基(BocまたはFmocなど)であり；Yは1～12である)を有する。

【0075】

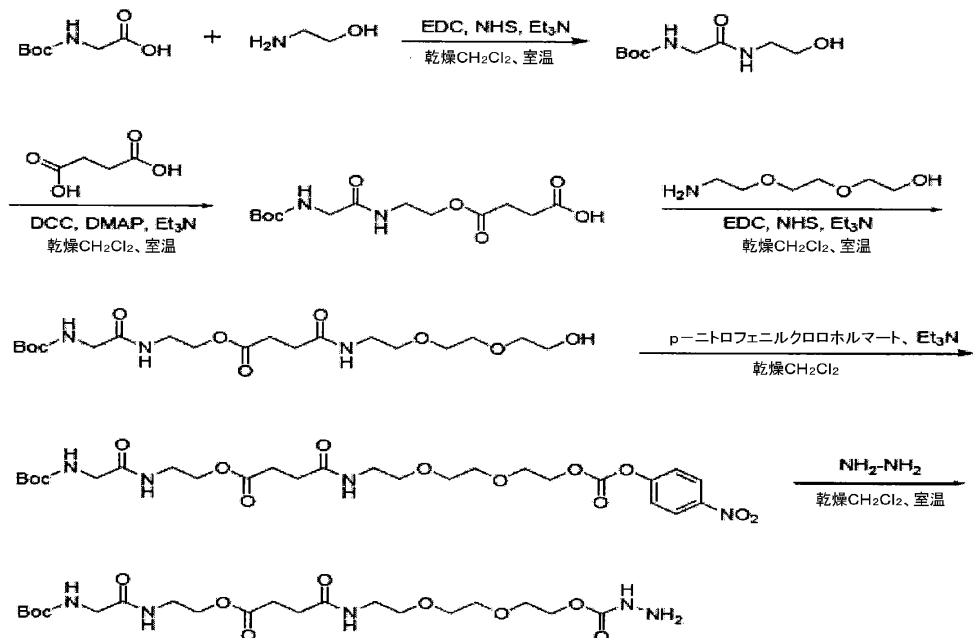
ppNH-C₁-リンカー-IV-アミドは、式(I) (式中、Xはpp-NH-であり；ppは保護基(BocまたはFmocなど)であり、nは1であり、Pは-C(O)NH-であり、Rは-CH₂CH₂O-であり、Qは-R[-C(O)CH₂CH₂-C(O)NH-(CH₂CH₂O)_m]_Yであり、mは3であり、Yは1～12である)を有する。より好ましくは、Yは整数2である。

30

【0076】

他の実施形態では、mは1～12である。本発明のppNH-C₁-リンカー-IV-アミドのリンカーを、本開示を考慮して当業者に公知の方法を使用して調製することができる。例えば、本発明の好ましいリンカーを、以下のスキームに示すように調製することができる。

【化 6 5】

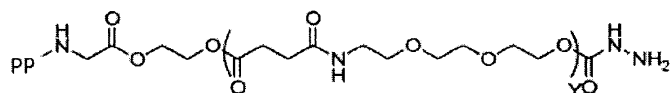


10

【0077】

いくつかの実施形態では、本発明のリンカーは、以下の式：

【化 6 6】



(ppNH-C₁-リンカー-IV-C(O)O-)

(式中、ppは保護基(BocまたはFmocなど)であり；Yは1～12である)を有する。

【0078】

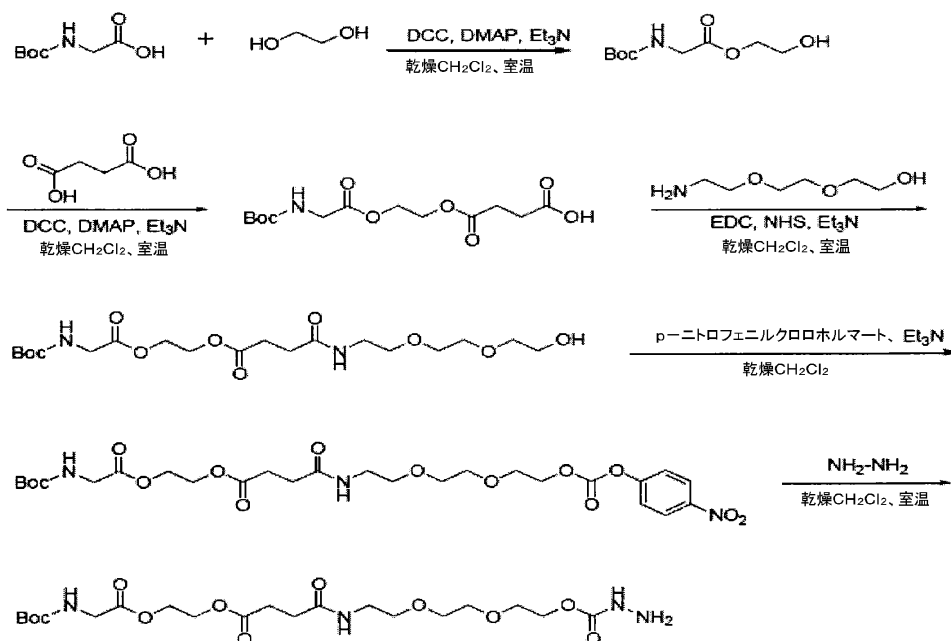
ppNH-C₁-リンカー-IV-C(O)O-は、式(I) (式中、Xはpp-NH-であり；ppは保護基(BocまたはFmocなど)であり、nは1であり、Pは-C(O)O-であり、Rは-CH₂CH₂O-であり、Qは-R[-C(O)CH₂CH₂-C(O)NH-(CH₂CH₂O)_m]_Yであり、mは3であり、Yは1～12である)を有する。より好ましくは、Yは整数2である。

【0079】

他の実施形態では、mは1～12である。本発明のppNH-C₁-リンカー-IV-C(O)O-のリンカーを、本開示を考慮して当業者に公知の方法を使用して調製することができる。例えば、本発明の好ましいリンカーを、以下のスキームに示すように調製することができる。

30

【化 67】



10

【0080】

20

別の態様では、本発明は、任意選択的に1つまたは複数のPEGと複合体を形成した、1つまたは複数の本発明のリンカーと複合体を形成した金属ナノ粒子を含む金属ナノ粒子複合体を提供する。

【0081】

1つの実施形態では、金属ナノ粒子は、金ナノ粒子、パラジウムナノ粒子、白金ナノ粒子、または銀ナノ粒子である。

【0082】

1つの実施形態では、リンカーは同一であるか異なる。より好ましくは、金属ナノ粒子複合体は、異なる分子長を有する複数のリンカーを含む。異なる分子長を有するリンカーは、治療または診断すべき標的細胞または標的疾患における要件に応じて異なる治療薬または診断薬に結合することができる。リンカーは、リンカー中の1, 2-ジチオラン基または-SH基の硫黄原子を介して金属ナノ粒子に連結する。

30

【0083】

1つの実施形態では、本発明で使用されるPEGの分子量は、約2000~20,000Da；好ましくは、2000~5000Daの範囲である。いくつかの場合、例えば、リンカーまたはナノ粒子の表面上に、生物学的部分との相互作用からポリマーを遮断することができる親水性膜を作製することによってリンカーまたはナノ粒子と生物学的部分との間の電荷相互作用を減少させるためのPEG化も使用することができる。いくつかの場合、ポリ(エチレングリコール)反復単位の付加により、例えば、細胞による移入/取り込み効率を減少させながら食細胞系によるポリマー-抱合体の取り込みを減少させることによってポリマー-抱合体の血漿半減期を増加させることができる。当業者は、例えば、以下の実施例に考察するように開環重合技術(ROMP)などによって、EDC(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩)およびNHS(N-ヒドロキシスクシンイミド)を使用して末端にアミンを含有するPEG基とポリマーを反応させることによってポリマーをPEG化する方法および技術を承知しているであろう。

40

【0084】

別の1つの実施形態では、金属ナノ粒子のサイズは、約100nm未満、好ましくは、80nm未満である。

【0085】

いくつかの実施形態では、金属ナノ粒子複合体は、1つまたは複数の同一の異なる治療

50

薬または診断薬とさらに連結する。好ましくは、治療薬は抗腫瘍薬または抗体である。好ましくは、抗体は、腫瘍細胞などの細胞の表面での抗原特異的発現を標的にする抗体であり；より好ましくは、抗体は、腫瘍細胞を標的にし、認識する、抗腫瘍細胞抗体が含まれる。

【0086】

いくつかの実施形態では、抗腫瘍薬は、癌処置で有用な抗癌薬または抗癌抗体である。抗癌薬の例には、アルキル化剤（チオテパおよびシクロホスファミド（cyclophosphamide）など）；スルホン酸アルキル（ブスルファン、インプロスルファン、およびピボスルファンなど）；アジリジン（ベンゾドーパ、カルボコン、メツレドーパ、およびウレドーパなど）；エチレンイミンおよびメチルメラミン（methylamine）（アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド（triethylenephosphoramidate）、トリエチレンチオホスホラミド（triethylenethiophosphoramidate）、およびトリメチロールメラミン（trimethylolomelamine）が含まれる）；アセトゲニン（特に、ブタラシンおよびブタラシノン）； δ -9-テトラヒドロカンナビノール（ドロナビノール、）； β -ラパコン；ラパコール；コルヒチン；ベツリン酸；カンプトセシン（合成アナログであるトポテカン、CPT-11（イリノテカン）、アセチルカンプトセシン、スコポレチン（scopolactin）、および9-アミノカンプトセシンが含まれる）；ブリオスタチン；カリスタチン；CC-1065（そのアドゼレシン、カルゼレシン、およびビゼレシンの合成アナログが含まれる）；ポドフィロトキシン；ポドフィリン酸；テニポシド；クリプトフィシン（特に、クリプトフィシン1およびクリプトフィシン8）；ドラスタチン；デュオカルマイシン（合成アナログのKW-2189およびCB1-TM1が含まれる）；エロイテロピン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポンギスタチン；ナイトロジェンマスタード（クロラムブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イフォスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノブエンビキン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタードなど）；ニトロソ尿素（nitrosurea）（カルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、およびラニムスチン（ranimnustine）など）；抗生物質（エンジイン抗生物質（例えば、カリチアマイシン、特に、カリチアマイシン γ IIおよびカリチアマイシン ω II（例えば、Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183-186（1994）を参照のこと）など）；ジネミシン（ジネミシンAが含まれる）；エスペラミシン；ならびにネオカルチノスタチン発色団および関連色素タンパク質エンジイン抗生物質発色団）、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アウスラマイシン、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン、カミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシニス、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキソルビシン（モルホリノードキソルビシン、シアノモルホリノードキソルビシン、2-ピロリノードキソルビシン、およびデオキシドキソルビシンが含まれる）、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシン（マイトマイシンCなど）、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、クエラマイシン、ロドルビシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシンなど）；代謝拮抗物質（メトトレキサートおよび5-フルオロウラシル（5-FU）など）；葉酸アナログ（デノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトレキサートなど）；プリンアナログ（フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンなど）；ピリミジンアナログ（アンシタピン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン、フロクスウリジンなど）；アンドロゲン（カルステロン、ドロモスタノロンプロピオナート、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトンなど）；抗アドレナル（アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンなど）；葉酸補給

10

20

30

40

50

剤（フォリン酸（frolinic acid）など）；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；エニルウラシル；アムサクリン；ベストラブシル；ビスアントレン；エダトレキサート（edatraxate）；デフォファミン；デメコルシン；ジアジクオン；エルフォミチン；エリプチニウムアセタート；エポチロン；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダイニン；マイタンシノイド（マイタンシンおよびアンサミトシンなど）；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダンモール；ニトラエリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルビシン；ロソキサントロン；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；ポリサッカリド複合体（JHS Natural Products, Eugene, Oreg.）；ラゾキサン；リゾキシン；シゾフラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；2, 2', 2''-トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン（特に、T-2毒素、ベラクリンA、ロリジンA、およびアングイジン）；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピポブロマン；ガシトシン；アラビノシド（「Ara-C」）；チオテパ；タキソイド（例えば、パクリタキセル（Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N. J.）、パクリタキセルのクレモフォル非含有アルブミン操作ナノ粒子製剤（American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill.）、およびドセタキセル（doxorubicin）（Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France））；クロラムブシル（chlorambucil）；ゲムシタビン；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；白金アナログ（シスプラチンおよびカルボプラチンなど）；ビンブラスチン；白金；エトポシド（VP-16）；イフォスファミド；ミトキサントロン；ピンクリスチン；オキサリプラチン；ロイコボリン（leucovorin）；ビノレルビン；ノバントロン；エダトレキサート；ダウノマイシン；アミノプテリン；イバンドロネート；トポイソメラーゼインヒビターRFS2000；ジフルオロメチルオルニチン（DMFO）；レチノイド（レチノイン酸など）；カペシタビン；上記のいずれかの薬学的に許容され得る塩、酸、または誘導体；ならびに上記のうちの2つまたはそれを超える物質の組み合わせCHOP（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ピンクリスチン、およびプレドニゾロンの併用療法の略語）およびFOLFEX（5-FUおよびロイコボリン（leucovorin）と組み合わせたオキサリプラチンを使用した処置レジメンの略語など）が含まれる。

【0087】

ナノ粒子中の抗癌薬の存在量は、広い範囲にわたって変動し得る。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、ナノ粒子に対する抗癌薬の質量比に基づいて、約1%～約50%（重量/重量）の範囲の量の抗癌薬を含むことができる。他の実施形態では、ナノ粒子は、ナノ粒子に対する抗癌薬の質量比に基づいて、約5%～約40%（重量/重量）の範囲の量の抗癌薬を含むことができる。さらに他の実施形態では、ナノ粒子は、約10%～約30%（重量/重量）の範囲の量の抗癌薬を含むことができる。さらに他の実施形態では、ナノ粒子は、ナノ粒子に対する抗癌薬の質量比に基づいて、約1%～約10%（重量/重量）、約1%～約5%（重量/重量）、約5%～約10%（重量/重量）、約10%～約20%（重量/重量）、約15%～約35%（重量/重量）、約30%～約40%（重量/重量）などの範囲の量の抗癌薬を含むことができる。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、ナノ粒子に対する抗癌薬の質量比に基づいて、約20%（重量/重量）の量の抗癌薬を含むことができる。他の実施形態では、ナノ粒子は、ナノ粒子に対する抗癌薬の質量比に基づいて、5%（重量/重量）、約10%（重量/重量）15%（重量/重量）、約25%（重量/重量）、約30%（重量/重量）などの量の抗癌薬を含むことができる。

【0088】

本明細書中に記載のいくつかの実施形態は、1つまたは複数の同一の異なる治療薬または診断薬および薬学的に許容され得るキャリアに連結した1つまたは複数の金属ナノ粒子複合体を含むことができる組成物に関する。薬学的組成物は、1つまたは複数の同一の異なる治療薬または診断薬を連結した金属ナノ粒子複合体の生物への投与が容易である。化

合物の投与技術は当該分野で複数存在し、経口投与、注射による投与、エアロゾル投与、非経口投与、および局所投与が含まれるが、これらに限定されない。

【0089】

本明細書中に記載のいくつかの実施形態は、1つまたは複数の同一の異なる治療薬または診断薬と連結した1つまたは複数の金属ナノ粒子複合体を含む薬物送達系に関する。

【0090】

1つまたは複数の同一の異なる治療薬または診断薬を連結した金属ナノ粒子複合体の投与技術は当該分野で複数存在し、経口送達、直腸送達、局所送達、エアロゾル送達、注射による送達、および非経口送達（筋肉内注射、皮下注射、静脈内注射、髄内注射、髄腔内注射、直接脳室内注射、腹腔内注射、鼻腔内注射、および眼内注射が含まれる）が含まれるが、これらに限定されない。

10

【実施例】

【0091】

実施例1 リンカーIーアミドの調製

工程1。エタノールアミン（1.28g、1.05当量）およびリポ酸（4.13g、1.0当量）を80mL DCMに溶解し、EDC・HCl（4.98g、1.3当量）、ヒドロキシスクシンイミド（NHS）（2.30g、1.0当量）、およびトリエチルアミン（6.4mL、2.3当量）をゆっくり添加した。室温で少なくとも5時間反応させ、反応をTLCで追跡した。その後、混合物をddH₂Oの添加によってクエンチし、DCMで2～3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、MgSO₄で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、DCM：MeOH＝9.8：0.2を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。収率：4.04g；81.0%。

20

【0092】

工程2。4-ニトロフェニルクロロホルマート（3.35g、1.15当量）を二口ボトルに入れた。真空下で1時間、三方弁を窒素デバイスに回し、60mL DCMをシリンジで添加した。秤量した工程1の生成物1を10～15mL DCMで溶解し、シリンジで反応フラスコに注入し、次いで、トリエチルアミン（4.5mL、2.3当量）をゆっくり添加した。氷浴中で約1時間反応させ、次いで、室温に一晩戻した。反応完了後、混合物をddH₂Oの添加によってクエンチし、DCMで3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、MgSO₄で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、EtOAc：Hex：MeOH＝1：1：0.2を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。精製後の収率：51.6%。

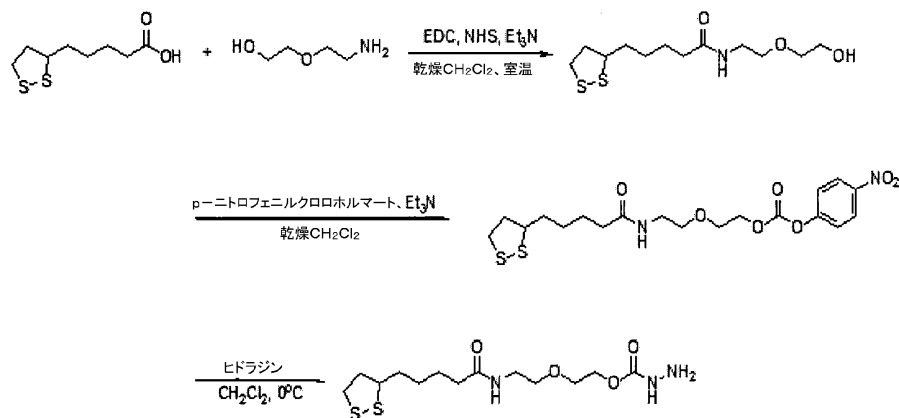
30

【0093】

工程3。秤量した工程2の生成物2（3.5g、1.0当量）を120mL DCMに溶解し、次いで、ヒドラジン水和物（6.5mL、10.0当量）をゆっくり添加した。室温で約24時間反応させた。溶液は、淡黄色から橙色に変化した。反応完了後、混合物をddH₂Oの添加によってクエンチし、DCMで2～3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、MgSO₄で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、DCM：MeOH＝9.5：0.5を使用したカラムで精製した。この工程で、生成物がカラム中に固着し、MeOHを5%まで増加させて最終生成物を溶出させることができる。生成物は淡黄色の粘着性固体であった。精製後の収率：19.5%。

40

【化 6 8】



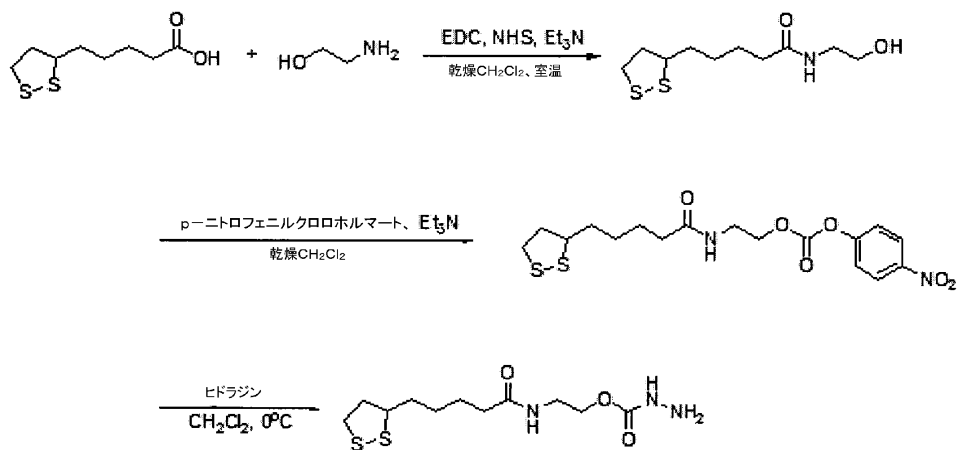
10

【0094】

リンカーI-1 (リンカーI-アミド、 $m=2$)。 ^1H (400 MHz) δ 1.23–1.31 (2H, m), 1.40–1.51 (3H, m), 1.57–1.64 (1H, m), 1.78–1.86 (1H, m), 2.05 (2H, t), 2.32–2.39 (1H, m), 3.01–3.18 (4H, m), 3.39 (2H, t), 3.52–3.57 (3H, m), 4.03–4.19 (4H, m), 7.94 (1H, s), 8.14 (1H, s). ^{13}C (100 MHz) δ 25.9, 29.0, 34.8, 36.1, 38.9, 39.5, 40.9, 57.2, 64.7, 69.3, 69.6, 159.5, 174.9 ppm. H-Mass (m/z): (M+Na) = 374.1171

20

【化 6 9】

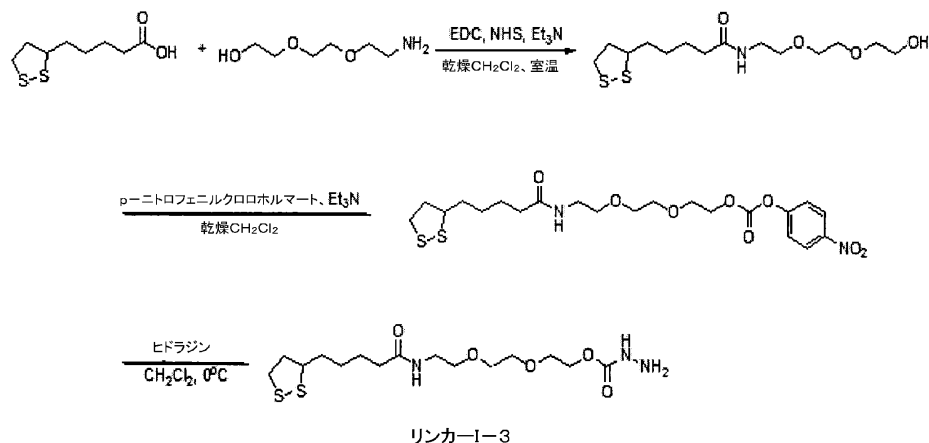


30

リンカーI-2 (リンカーI-アミド、 $m=1$)。 ^1H (300 MHz) δ 1.30–1.38 (2H, m), 1.45–1.57 (3H, m), 1.60–1.72 (1H, m), 1.80–1.92 (1H, m), 2.06 (2H, s), 2.36–2.46 (1H, m), 3.07–3.24 (4H, m), 3.56–3.65 (1H, m), 3.95 (2H, t), 4.02 (2H, s), 7.88 (1H, t), 8.11 (1H, s). ^{13}C (100 MHz) δ 25.6, 28.8, 34.6, 35.9, 38.8, 39.4, 40.7, 56.9, 63.7, 163.8, 174.3 ppm. H-Mass (m/z): (M+Na) = 330.0894.

40

【化 7 0】



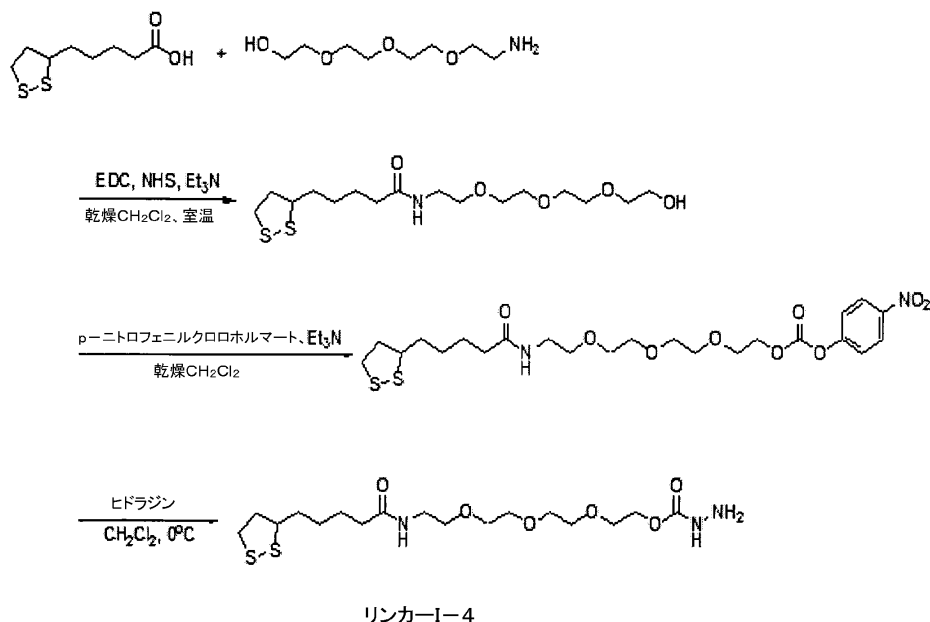
10

【0095】

リンカーI-3 (リンカーI-アミド、 $m=3$)。 ^1H (300 MHz) δ 1.30–1.37 (2H, m), 1.45–1.57 (3H, m), 1.60–1.72 (1H, m), 1.80–1.91 (1H, m), 2.06 (2H, t), 2.35–2.46 (1H, m), 3.07–3.23 (4H, m), 3.39 (2H, t), 3.47–3.65 (7H, m), 4.02 (2H, s), 4.05–4.08 (2H, m), 7.84 (1H, t), 8.18 (1H, s). ^{13}C (100 MHz) δ 25.7, 28.9, 34.7, 35.9, 38.8, 39.4, 40.7, 60.0, 64.4, 69.4, 69.6, 70.1, 70.3, 159.2, 174.2 ppm. H-Mass (m/z): (M+Na) = 418.1466.

20

【化 7 1】



30

【0096】

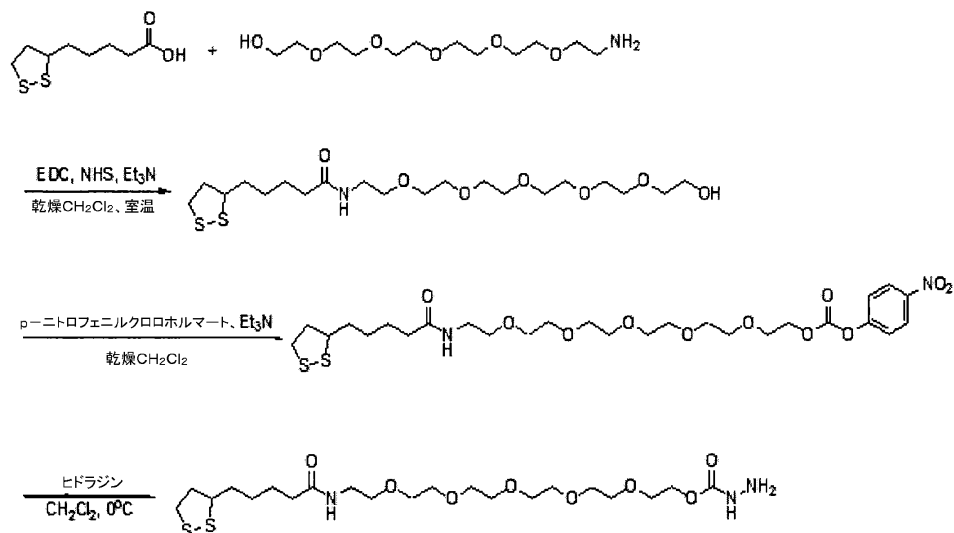
リンカーI-4 (リンカーI-アミド、 $m=4$)。 ^1H (300 MHz) δ 1.30–1.38 (2H, m), 1.45–1.57 (3H, m), 1.60–1.72 (1H, m), 1.80–1.91 (1H, m), 2.06 (2H, t), 2.36–2.46 (1H, m), 3.07–3.23 (4H, m), 3.39 (2H, t), 3.49–3.65 (11H, m), 4.02 (2H, s), 4.05–4.08 (2H, m), 7.83 (1H, t), 8.18 (1H, s). ^{13}C (100 MHz) δ 25.7, 28.9, 34.7, 35.9, 38.8, 39.4, 40.7, 56.9, 64.4, 69.4

40

50

, 69.6, 70.2, 70.3, 70.4, 159.2, 174.1 ppm. H-Mass (m/z) : (M+Na) = 440.1875.

【化72】



リンカーI-5

【0097】

リンカーI-5 (リンカーI-アミド、m=5)。¹H (300 MHz) δ 1.30–1.38 (2H, m), 1.45–1.57 (3H, m), 1.60–1.69 (1H, m), 1.80–1.91 (1H, m), 2.06 (2H, t), 2.36–2.46 (1H, m), 3.07–3.23 (4H, m), 3.39 (2H, t), 3.51–3.62 (19H, m), 4.02 (2H, s), 4.05–4.08 (2H, m), 4.83 (1H, t), 8.18 (1H, s). ¹³C (100 MHz) δ 25.9, 29.0, 34.8, 36.1, 39.0, 39.4, 40.9, 57.2, 64.8, 69.5, 69.7, 70.3, 70.4, 70.5, 159.5, 174.8 ppm. H-Mass (m/z) : (M+Na) = 550.2234

【0098】

実施例2 リンカーI-C(O)Oの調製

工程1。エチレングリコール (1.30 g、1.05当量) およびリポ酸 (4.13 g、1.0当量) を80 mL DCMに溶解し、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) (5.36 g、1.3当量)、4-(ジメチルアミノ)ピリジン (DMA P) (0.24 g、0.1当量)、およびトリエチルアミン (6.4 mL、2.3当量) をゆっくり添加した。室温で少なくとも5時間反応させ、反応をTLCで追跡した。その後、混合物をdd H₂Oの添加によってクエンチし、DCMで2~3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、MgSO₄で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、DCM:MOH=9.8:0.2を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。収率: 4.00 g; 80.5%。

【0099】

工程2。4-ニトロフェニルクロロホルマート (3.35 g、1.15当量) を二口ボトルに入れた。真空下で1時間、三方弁を窒素デバイスに回し、60 mL DCMをシリンジで添加した。秤量した工程1の生成物1を10~15 mL DCMで溶解し、シリンジで反応フラスコに注入し、次いで、トリエチルアミン (4.5 mL、2.3当量) をゆっくり添加した。氷浴中で約1時間反応させ、次いで、室温に一晩戻した。反応完了後、混合物をdd H₂Oの添加によってクエンチし、DCMで2~3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、MgSO₄で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、EtOAc:Hex:MeOH=1:1:0.2を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。精製後の収率: 50.6%。

【0100】

工程3。秤量した工程2の生成物2（3.5g、1.0当量）を120mL DCMに溶解し、次いで、ヒドラジン水和物（6.5mL、10.0当量）をゆっくり添加した。室温で約24時間反応させた。溶液は、淡黄色から橙色に変化した。反応完了後、混合物を ddH_2O の添加によってクエンチし、DCMで2～3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、 MgSO_4 で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、DCM： MeOH ＝9.5：0.5を使用したカラムで精製した。この工程で、生成物がカラム中に固着し、 MeOH を5%まで増加させて最終生成物を溶出させることができる。生成物は淡黄色の粘着性固体であった。精製後の収率：18.5%。

【0101】

実施例3 HS-C₂-リンカー-I-アミドの調製

工程1。エタノールアミン（1.28g、1.05当量）および3-（アセチルチオ）プロピオン酸（2.96g、1.0当量）を80mL DCMに溶解し、EDC・HCl（4.98g、1.3当量）、ヒドロキシスクシンイミド（NHS）（2.30g、1.0当量）、およびトリエチルアミン（6.4mL、2.3当量）をゆっくり添加した。室温で少なくとも5時間反応させ、反応をTLCで追跡した。その後に、混合物を ddH_2O の添加によってクエンチし、DCMで2～3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、 MgSO_4 で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、DCM： MeOH ＝9.8：0.2を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。収率：4.10g；70.0%。

【0102】

工程2。4-ニトロフェニルクロロホルマート（3.35g、1.15当量）を二口ボトルに入れた。真空下で1時間、三方弁を窒素デバイスに回し、60mL DCMをシリンジで添加した。秤量した工程1の生成物1を10～15mL DCMで溶解し、シリンジで反応フラスコに注入し、次いで、トリエチルアミン（4.5mL、2.3当量）をゆっくり添加した。氷浴中で約1時間反応させ、次いで、室温に一晩戻した。反応完了後、混合物を ddH_2O の添加によってクエンチし、DCMで2～3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、 MgSO_4 で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、EtOAc： Hex ： MeOH ＝1：1：0.2を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。精製後の収率：48.6%。

【0103】

工程3。秤量した工程2の生成物2（3.5g、1.0当量）を120mL DCMに溶解し、次いで、ヒドラジン水和物（6.5mL、10.0当量）をゆっくり添加した。室温で約24時間反応させた。溶液は、淡黄色から橙色に変化した。反応完了後、混合物を ddH_2O の添加によってクエンチし、DCMで2～3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、 MgSO_4 で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、DCM： MeOH ＝9.5：0.5を使用したカラムで精製した。この工程で、生成物がカラム中に固着し、 MeOH を5%まで増加させて最終生成物を溶出させることができる。生成物は淡黄色の粘着性固体であった。精製後の収率：19.0%。

【0104】

実施例4 HS-C₅-リンカー-I-アミドの調製

工程1。エタノールアミン（1.28g、1.05当量）および6-アセチルチオヘキサン酸（3.81g、1.0当量）を80mL DCMに溶解し、EDC・HCl（4.98g、1.3当量）、ヒドロキシスクシンイミド（NHS）（2.30g、1.0当量）、およびトリエチルアミン（6.4mL、2.3当量）をゆっくり添加した。室温で少なくとも5時間反応させ、反応をTLCで追跡した。その後に、混合物を ddH_2O の添加によってクエンチし、DCMで2～3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、 MgSO_4 で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、DCM： MOH ＝9.8：0.2を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。収率：3.85g；78.0%。

【0105】

工程2。4-ニトロフェニルクロロホルマート（3.35 g、1.15当量）を二口ボトルに入れた。真空下で1時間、三方弁を窒素デバイスに回し、60 mL DCMをシリンジで添加した。秤量した工程1の生成物1を10～15 mL DCMで溶解し、シリンジで反応フラスコに注入し、次いで、トリエチルアミン（4.5 mL、2.3当量）をゆっくり添加した。氷浴中で約1時間反応させ、次いで、室温に一晩戻した。反応完了後、混合物をdd H₂Oの添加によってクエンチし、DCMで2～3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、MgSO₄で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、EtOAc：Hex：MeOH＝1：1：0.2を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。精製後の収率：48.6%。

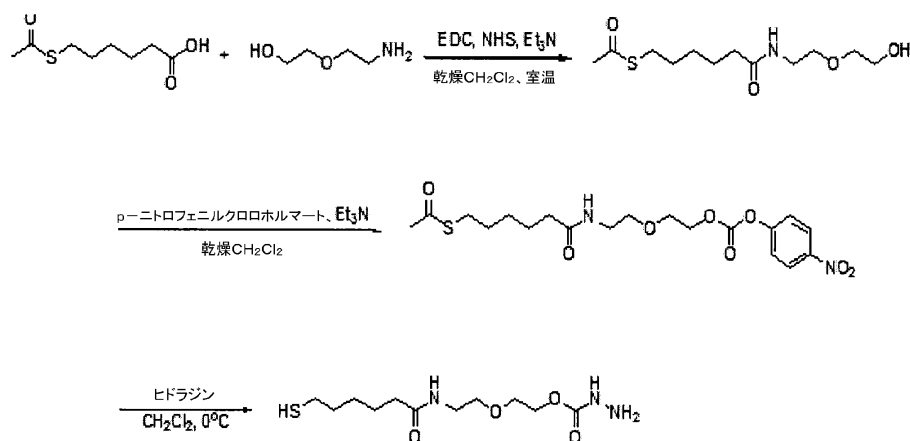
10

【0106】

工程3。秤量した工程2の生成物2（3.5 g、1.0当量）を120 mL DCMに溶解し、次いで、ヒドラジン水和物（6.5 mL、10.0当量）をゆっくり添加した。室温で約24時間反応させた。溶液は、淡黄色から橙色に変化した。反応完了後、混合物をdd H₂Oの添加によってクエンチし、DCMで2～3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、MgSO₄で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、DCM：MeOH＝9.5：0.5を使用したカラムで精製した。この工程で、生成物がカラム中に固着し、MeOHを5%まで増加させて最終生成物を溶出させることができる。生成物は淡黄色の粘着性固体であった。精製後の収率：17.0%。

【化73】

20



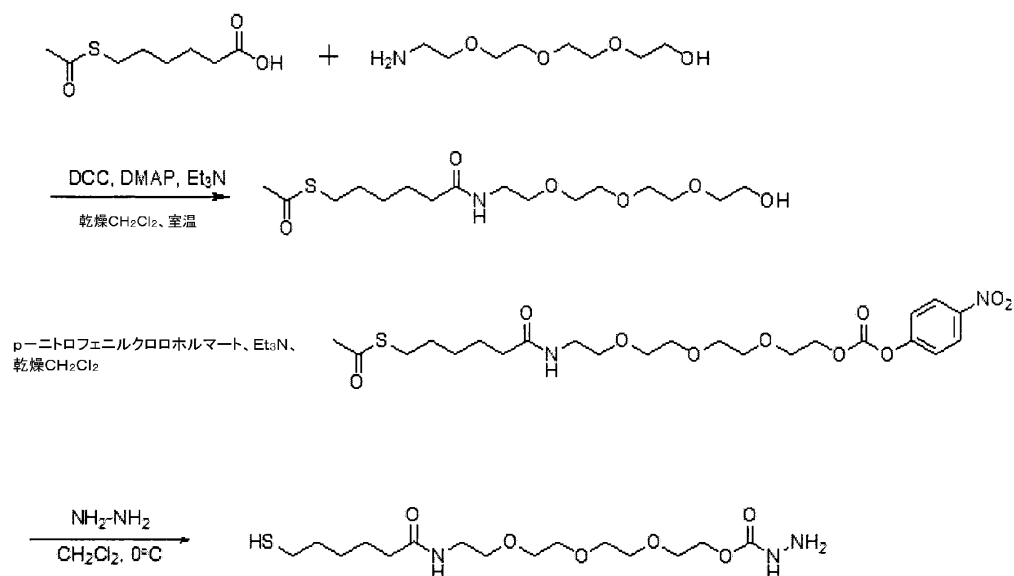
HS-C5-リンカーI-1

30

SH-C5-リンカーI-1（SH-C5-リンカー-1-アミド、mは2である）：
¹H（400 MHz）δ 1.26–1.33（2H, m），1.43–1.55（4H, m），2.05（2H, t），2.22（1H, s），2.45（2H, t），3.15–3.19（2H, m），3.37（2H, t），3.54（2H, t），4.03–4.08（4H, m），7.85（1H, t），8.19（1H, s）；¹³C（100 MHz）δ 23.7，24.7，27.4，33.1，35.2，38.4，63.3，68.6，69.1，158.3，172.2。H-Mass（m/z）：（M+N a）＝316.1336

40

【化 7 4】



SH-C5-リンカーI-4

SH-C5-リンカー-I-4 (SH-C5-リンカー-1-アミド、mは4である) : 20
¹H (400MHz) δ 1.26-1.34 (2H, m), 1.43-1.56 (4H, m), 2.05 (2H, t), 2.22 (1H, t), 2.43-2.48 (2H, m), 3.16-3.20 (3H, m), 3.39 (2H, t), 3.48-3.50 (7H, m), 3.56 (2H, m), 4.03-4.08 (4H, m), 7.84 (1H, m), 8.20 (1H, s); ¹³C (100MHz) δ 23.7, 24.8, 27.4, 33.1, 35.2, 38.5, 63.4, 68.9, 69.2, 69.6, 69.8, 158.3, 172.2. H-Mass (m/z): (M+Na)=404.1843

【 0 1 0 7 】

実施例5 SH-C₅-リンカー-I-C(O)O-の調製

工程 1。エチレングリコール（1.30 g、1.05 当量）および 6-アセチルチオヘキサノ酸（3.81 g、1.0 当量）を 80 mL DCM に溶解し、N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）（5.36 g、1.3 当量）、4-（ジメチルアミノ）ピリジン（DMA P）（0.24 g、0.1 当量）、およびトリエチルアミン（6.4 mL、2.3 当量）をゆっくり添加した。室温で少なくとも 5 時間反応させ、反応を TLC で追跡した。その後、混合物を ddH₂O の添加によってクエンチし、DCM で 2 ~ 3 回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、MgSO₄ で濾過し、次いで、DCM を除去した。抽出物を、DCM : MeOH = 9.8 : 0.2 を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。収率：3.88 g ; 79.8 %。

【 0 1 0 8 】

工程 2。4-ニトロフェニルクロロホルマート (4-nitrophenyl chl
oroformat) (3.35 g、1.15 当量) を二口ボトルに入れた。真空下で 1
時間、三方弁を窒素デバイスに回し、60 mL DCM をシリンジで添加した。秤量した
工程 1 の生成物 1 を 10 ~ 15 mL DCM で溶解し、シリンジで反応フラスコに注入し
、次いで、トリエチルアミン (4.5 mL、2.3 当量) をゆっくり添加した。氷浴中で
約 1 時間反応させ、次いで、室温に一晩戻した。反応完了後、混合物を ddH₂O の添加
によってクエンチし、DCM で 2 ~ 3 回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウ
ムで乾燥させ、MgSO₄ で濾過し、次いで、DCM を除去した。抽出物を、EA:Hex
:MeOH = 1:1:0.2 を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であ
った。精製後の収率: 51.6 %。

【 0 1 0 9 】

工程 3。秤量した工程 2 の生成物 2 (3.5 g、1.0 当量) を 120 mL DCM に溶解し、次いで、ヒドラジン水和物 (6.5 mL、10.0 当量) をゆっくり添加した。室温で約 24 時間反応させた。溶液は、淡黄色から橙色に変化した。反応完了後、混合物を ddH₂O の添加によってクエンチし、DCM で 2~3 回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、MgSO₄ で濾過し、次いで、DCM を除去した。抽出物を、DCM:MeOH=9.5:0.5 を使用したカラムで精製した。この工程で、生成物がカラム中に固着し、MeOH を 5% まで増加させて最終生成物を溶出させることができる。生成物は淡黄色の粘着性固体であった。精製後の収率:19.4%。

【0110】

実施例 6 NH₂-C₁-リンカー-I-アミドの調製

10

工程 1。エタノールアミン (1.28 g、1.05 当量) および Boc-グリシン (3.50 g、1.0 当量) を 80 mL DCM に溶解し、EDC·HCl (4.98 g、1.3 当量)、ヒドロキシスクシンイミド (NHS) (2.30 g、1.0 当量)、およびトリエチルアミン (6.4 mL、2.3 当量) をゆっくり添加した。室温で少なくとも 5 時間反応させ、反応を TLC で追跡した。その後に、混合物を ddH₂O の添加によってクエンチし、DCM で 2~3 回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、MgSO₄ で濾過し、次いで、DCM を除去した。抽出物を、DCM:MeOH=9.8:0.2 を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。収率:4.10 g; 81.5%。

【0111】

20

工程 2。4-ニトロフェニルクロロホルマート (4-nitrophenyl chloroformat) (3.35 g、1.15 当量) を二口ボトルに入れた。真空下で 1 時間、三方弁を窒素デバイスに回し、60 mL DCM をシリンジで添加した。秤量した工程 1 の生成物 1 を 10~15 mL DCM で溶解し、シリンジで反応フラスコに注入し、次いで、トリエチルアミン (4.5 mL、2.3 当量) をゆっくり添加した。氷浴中で約 1 時間反応させ、次いで、室温に一晩戻した。反応完了後、混合物を ddH₂O の添加によってクエンチし、DCM で 2~3 回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、MgSO₄ で濾過し、次いで、DCM を除去した。抽出物を、EtOAc:Hex:MeOH=1:1:0.2 を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。精製後の収率:51.6%。

30

【0112】

工程 3。秤量した工程 2 の生成物 2 (3.5 g、1.0 当量) を 120 mL DCM に溶解し、次いで、ヒドラジン水和物 (6.5 mL、10.0 当量) をゆっくり添加した。室温で約 24 時間反応させた。溶液は、淡黄色から橙色に変化した。反応完了後、混合物を ddH₂O の添加によってクエンチし、DCM で 2~3 回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、MgSO₄ で濾過し、次いで、DCM を除去した。抽出物を、DCM:MeOH=9.5:0.5 を使用したカラムで精製した。この工程で、生成物がカラム中に固着し、MeOH を 5% まで増加させて最終生成物を溶出させることができる。生成物は淡黄色の粘着性固体であった。精製後の収率:17.9%。

【0113】

40

実施例 7 NH₂-C₁-リンカー-I-C(O)O-の調製

工程 1。エチレングリコール (1.30 g、1.05 当量) および Boc-グリシン (3.50 g、1.0 当量) を 80 mL DCM に溶解し、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) (5.36 g、1.3 当量)、4-(ジメチルアミノ)ピリジン (DMAP) (0.24 g、0.1 当量)、およびトリエチルアミン (6.4 mL、2.3 当量) をゆっくり添加した。室温で少なくとも 5 時間反応させ、反応を TLC で追跡した。その後に、混合物を ddH₂O の添加によってクエンチし、DCM で 2~3 回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、MgSO₄ で濾過し、次いで、DCM を除去した。抽出物を、DCM:MeOH=9.8:0.2 を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。収率:3.60 g; 78.0%。

50

【0114】

工程2。4-ニトロフェニルクロロホルマート（3.35 g、1.15当量）を二口ボトルに入れた。真空下で1時間、三方弁を窒素デバイスに回し、60 mL DCMをシリンジで添加した。秤量した工程1の生成物1を10～15 mL DCMで溶解し、シリンジで反応フラスコに注入し、次いで、トリエチルアミン（4.5 mL、2.3当量）をゆっくり添加した。氷浴中で約1時間反応させ、次いで、室温に一晩戻した。反応完了後、混合物をddH₂Oの添加によってクエンチし、DCMで2～3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、MgSO₄で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、EA:Hex:MeOH=1:1:0.2を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。精製後の収率：49.7%。

10

【0115】

工程3。秤量した工程2の生成物2（3.5 g、1.0当量）を120 mL DCMに溶解し、次いで、ヒドラジン水和物（6.5 mL、10.0当量）をゆっくり添加した。室温で約24時間反応させた。溶液は、淡黄色から橙色に変化した。反応完了後、混合物をddH₂Oの添加によってクエンチし、DCMで2～3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、MgSO₄で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、DCM:MeOH=9.5:0.5を使用したカラムで精製した。この工程で、生成物がカラム中に固着し、MeOHを5%まで増加させて最終生成物を溶出させることができる。生成物は淡黄色の粘着性固体であった。精製後の収率：20.0%。

20

【0116】

実施例8 リンカーII-アミドの調製

工程1。グリシン（2.36 g、1.05当量）およびリポ酸（6.19 g、1.0当量）を80 mL DCMに溶解し、EDC·HCl（7.47 g、1.3当量）、ヒドロキシスクシンイミド（NHS）（3.45 g、1.0当量）、およびトリエチルアミン（9.6 mL、2.3当量）をゆっくり添加した。室温で少なくとも5時間反応させ、反応をTLCで追跡した。その後に、混合物をddH₂Oの添加によってクエンチし、DCMで2～3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、MgSO₄で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、DCM:MeOH=9.5:0.5を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。収率：70.0%。

30

【0117】

工程2。工程1の生成物（5.26 g、1.0当量）およびエタノールアミン（1.28 g、1.05当量）を80 mL DCMに溶解し、EDC·HCl（4.98 g、1.3当量）、ヒドロキシスクシンイミド（NHS）（2.30 g、1.0当量）、およびトリエチルアミン（6.4 mL、2.3当量）をゆっくり添加した。室温で少なくとも5時間反応させ、反応をTLCで追跡した。その後に、混合物をddH₂Oの添加によってクエンチし、DCMで2～3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、MgSO₄で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、DCM:MeOH=9.8:0.2を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。収率：81.0%。

40

【0118】

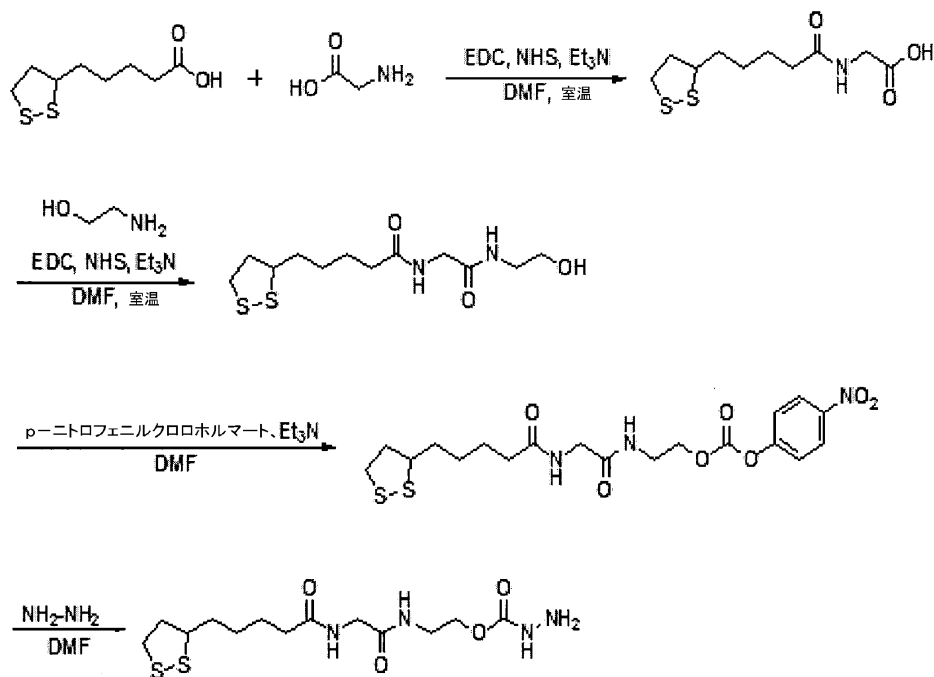
工程3。4-ニトロフェニルクロロホルマート（4-nitrophenyl chloroformat）（3.35 g、1.15当量）を二口ボトルに入れた。真空下で1時間、三方弁を窒素デバイスに回し、60 mL DCMをシリンジで添加した。秤量した工程1の生成物1を10～15 mL DCMで溶解し、シリンジで反応フラスコに注入し、次いで、トリエチルアミン（4.5 mL、2.3当量）をゆっくり添加した。氷浴中で約1時間反応させ、次いで、室温に一晩戻した。反応完了後、混合物をddH₂Oの添加によってクエンチし、DCMで2～3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、MgSO₄で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、EtOAc:Hex:MeOH=1:2:0.2を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。精製後の収率：51.6%。

50

【0119】

工程4。秤量した工程2の生成物2（3.5g、1.0当量）を120mL DCMに溶解し、次いで、ヒドラジン水和物（6.5mL、10.0当量）をゆっくり添加した。室温で約24時間反応させた。溶液は、淡黄色から橙色に変化した。反応完了後、混合物をddH₂Oの添加によってクエンチし、DCMで2～3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、MgSO₄で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、DCM：MeOH＝9.5：0.5を使用したカラムで精製した。この工程で、生成物がカラム中に固着し、MeOHを5%まで増加させて最終生成物を溶出させることができる。生成物は淡黄色の粘着性固体であった。精製後の収率：30.0%。

【化75】

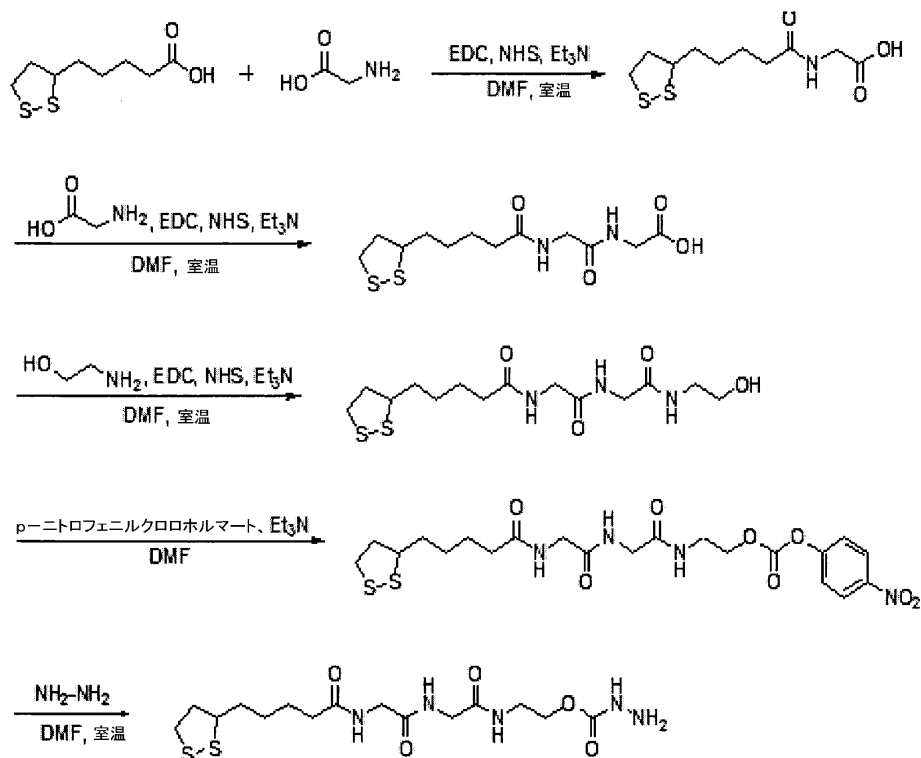


リンカーII-1

【0120】

リンカーII-1（リンカーII-アミド、 $z=1$ ）。¹H（400MHz） δ 1.32–1.39（2H, m）, 1.46–1.57（2H, m）, 1.63–1.69（1H, m）, 1.83–1.91（1H, m）, 2.08（1H, s）, 2.13（2H, t）, 2.36–2.46（1H, m）, 3.07–3.19（2H, m）, 3.22–3.28（2H, m）, 3.62–3.65（3H, m）, 3.95（3H, t）, 7.01（1H, s）, 7.91（1H, t）, 8.01（1H, t）, 8.14（1H, s）。¹³C（100MHz） δ 25.2, 28.8, 34.6, 35.4, 38.6, 38.7, 39.5, 42.4, 56.60, 62.85, 135.63, 169.72, 172.83 ppm。H-Mass（m/z）：（M+Na）＝387.1102

【化 7 6】



10

20

リンカーII-2

【0 1 2 1】

リンカーII-2 (リンカーII-アミド、 $z=2$)。 ^1H (300 MHz) δ 1.32–1.39 (2H, m), 1.47–1.57 (3H, m), 1.61–1.73 (1H, m), 1.81–1.92 (1H, m), 2.14 (2H, t), 2.35–2.46 (2H, m), 3.09–3.21 (3H, m), 3.23–3.31 (3H, m), 3.65–3.71 (4H, m), 3.97 (2H, t), 7.78 (1H, t), 7.89 (1H, t), 8.12 (2H, t). ^{13}C (100 MHz) δ 25.3, 28.8, 34.6, 35.4, 38.6, 38.7, 39.5, 42.4, 42.6, 56.6, 60.2, 62.8, 169.4, 169.9, 173.1 ppm. H-Mass (m/z): (M+Na) = 444.1345

30

リンカーII-3

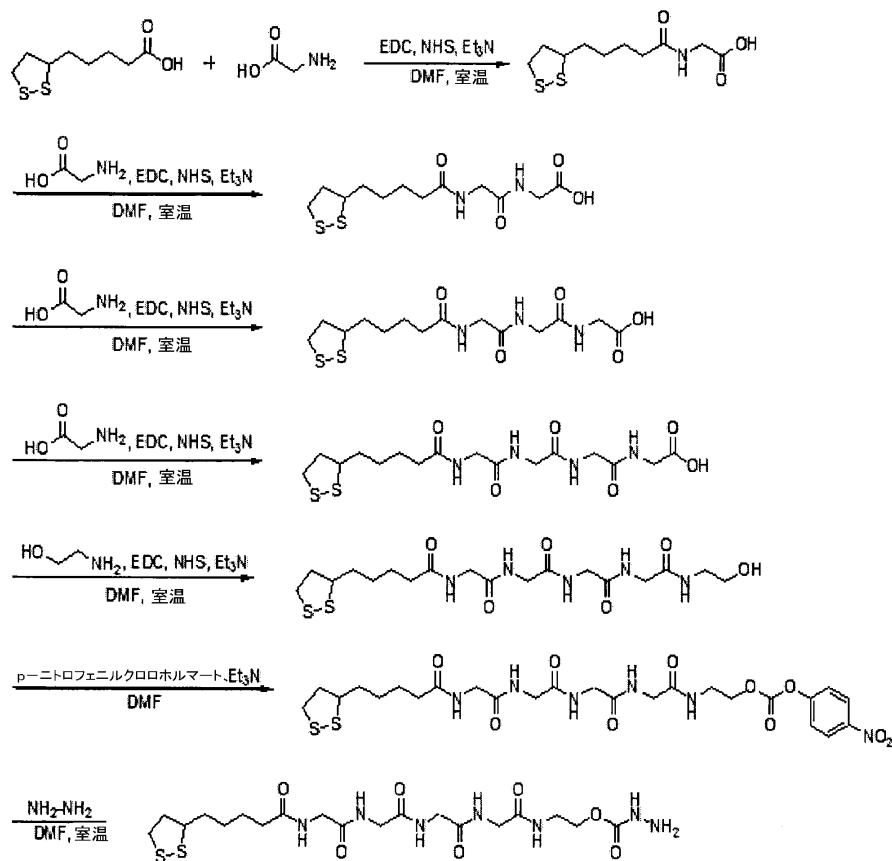
リンカー I I - 3 (リンカー I I - アミド、z = 3)。¹H (300 MHz) δ 1. 23 (1H, s), 1. 32 - 1. 40 (2H, m), 1. 46 - 1. 57 (4H, m), 1. 63 - 1. 70 (1H, m), 1. 80 - 1. 92 (2H, t), 1. 96 (1H, s), 2. 04 (1H, s), 2. 14 (3H, t), 3. 07 - 3. 19 (3H, m), 3. 58 - 3. 66 (3H, m), 3. 72 (3H, t), 3. 96 (1H, t), 4. 05 (1H, s), 7. 86 (1H, s), 8. 10 (3H, s)。¹³C (100 MHz) δ 25. 3, 28. 8, 34. 6, 35. 4, 38. 6, 39. 5, 39. 7, 40. 5, 42. 4, 42. 6, 56. 6, 60. 2, 62. 8, 169. 4, 169. 6, 170. 1, 173. 1 ppm。H - M a s s (m/z) : (M + N a) = 501. 1606

10

20

30

【化 7 8】



リンカーII-4

【0123】

リンカーII-4 (リンカーII-アミド、 $z=4$)。 ^1H (300 MHz) δ 1.26 (3H, s), 1.35–1.42 (2H, m), 1.47–1.70 (4H, m), 1.82–1.94 (2H, m), 2.03–2.20 (8H, m), 2.26–2.33 (2H, m), 3.66–3.81 (7H, m), 3.95–4.01 (1H, m), 7.86–7.94 (1H, m), 8.80–8.22 (3H, m). ^{13}C (100 MHz) δ 25.3, 28.8, 29.4, 31.2, 34.6, 35.4, 38.5, 38.6, 42.4, 42.6, 56.6, 66.0, 125.8, 128.7, 129.4, 169.4, 169.8, 170.0, 173.1 ppm. H-Mass (m/z): (M+Na) = 558.1768

【0124】

実施例9 リンカーII-C(O)O-の調製

工程1. グリコール酸 (2.40 g、1.05当量) およびリボ酸 (6.19 g、1.0当量) を 80 mL DCM に溶解し、N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCI) (8.05 g、1.3当量)、4-(ジメチルアミノ)ピリジン (DMAP) (0.37 g、0.1当量)、およびトリエチルアミン (9.6 mL、2.3当量) をゆっくり添加した。室温で少なくとも5時間反応させ、反応をTLCで追跡した。その後、混合物を dH_2O の添加によってクエンチし、DCMで2~3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、 MgSO_4 で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、DCM:MeOH=9.5:0.5を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。収率: 85%。

【0125】

工程2. 工程1の生成物 (5.26 g、1.0当量) およびエタノールアミン (1.28 g、1.05当量) を 80 mL DCM に溶解し、EDC·HCl (4.98 g、1.

10

20

30

40

50

3当量)、ヒドロキシスクシンイミド(NHS)(2.30g、1.0当量)、およびトリエチルアミン(6.4mL、2.3当量)をゆっくり添加した。室温で少なくとも5時間反応させ、反応をTLCで追跡した。その後に、混合物をddH₂Oの添加によってクエンチし、DCMで2~3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、MgSO₄で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、DCM:MeOH=9.8:0.2を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。収率:80.5%。

【0126】

工程3。4-ニトロフェニルクロロホルマート(3.35g、1.15当量)を二口ボトルに入れた。真空下で1時間、三方弁を窒素デバイスに回し、60mL DCMをシリ10
ンジで添加した。秤量した工程1の生成物1を10~15mL DCMで溶解し、シリ
ンジで反応フラスコに注入し、次いで、トリエチルアミン(4.5mL、2.3当量)をゆ
っくり添加した。氷浴中で約1時間反応させ、次いで、室温に一晩戻した。反応完了後、
混合物をddH₂Oの添加によってクエンチし、DCMで2~3回抽出した。有機層を回
収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、MgSO₄で濾過し、次いで、DCMを除去し
た。抽出物を、EtOAc:Hex:MeOH=1:2:0.2を使用したカラムで精製
する。生成物は淡黄色の液体であった。精製後の収率:47.8%。

【0127】

工程4。秤量した工程2の生成物2(3.5g、1.0当量)を120mL DCMに20
溶解し、次いで、ヒドラジン水和物(6.5mL、10.0当量)をゆっくり添加した。
室温で約24時間反応させた。溶液は、淡黄色から橙色に変化した。反応完了後、混合物
をddH₂Oの添加によってクエンチし、DCMで2~3回抽出した。有機層を回収し、
無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、MgSO₄で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽
出物を、DCM:MeOH=9.5:0.5を使用したカラムで精製した。この工程で、
生成物がカラム中に固着し、MeOHを5%まで増加させて最終生成物を溶出させること
ができる。生成物は淡黄色の粘着性固体であった。精製後の収率:19.3%。

【0128】

実施例10 リンカーSH-C₅-リンカー-I I-アミドの調製

工程1。6-アセチルチオヘキサン酸(5.71g、1.0当量)およびグリシン(230
.36g、1.05当量)を80mL DCMに溶解し、EDC·HCl(7.47g、
1.3当量)、ヒドロキシスクシンイミド(NHS)(3.45g、1.0当量)、およ
びトリエチルアミン(9.6mL、2.3当量)をゆっくり添加した。室温で少なくとも
5時間反応させ、反応をTLCで追跡した。その後に、混合物をddH₂Oの添加によ
ってクエンチし、DCMで2~3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾
燥させ、MgSO₄で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、DCM:MeOH
=9.5:0.5を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。収率:
68.8%。

【0129】

工程2。工程1の生成物(5.26g、1.0当量)およびエタノールアミン(1.28
g、1.05当量)を80mL DCMに溶解し、EDC·HCl(4.98g、1.30
当量)、ヒドロキシスクシンイミド(NHS)(2.30g、1.0当量)、およびト
リエチルアミン(6.4mL、2.3当量)をゆっくり添加した。室温で少なくとも5時
間反応させ、反応をTLCで追跡した。その後に、混合物をddH₂Oの添加によ
ってクエンチし、DCMで2~3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥
させ、MgSO₄で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、DCM:MeOH=9
.8:0.2を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。収率:80
.5%。

【0130】

工程3。4-ニトロフェニルクロロホルマート(4-nitrophenyl chl
oroformat)(3.35g、1.15当量)を二口ボトルに入れた。真空下で150

時間、三方弁を窒素デバイスに回し、60 mL DCMをシリンジで添加した。秤量した工程1の生成物1を10~15 mL DCMで溶解し、シリンジで反応フラスコに注入し、次いで、トリエチルアミン(4.5 mL、2.3当量)をゆっくり添加した。氷浴中で約1時間反応させ、次いで、室温に一晩戻した。反応完了後、混合物をddH₂Oの添加によってクエンチし、DCMで2~3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、MgSO₄で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、EtOAc:Hex:MeOH=1:2:0.2を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。精製後の収率:50.6%。

【0131】

工程4。秤量した工程2の生成物2(3.5 g、1.0当量)を120 mL DCMに溶解し、次いで、ヒドラジン水和物(6.5 mL、10.0当量)をゆっくり添加した。室温で約24時間反応させた。溶液は、淡黄色から橙色に変化した。反応完了後、混合物をddH₂Oの添加によってクエンチし、DCMで2~3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、MgSO₄で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、DCM:MeOH=9.5:0.5を使用したカラムで精製した。この工程で、生成物がカラム中に固着し、MeOHを5%まで増加させて最終生成物を溶出させることができる。生成物は淡黄色の粘着性固体であった。精製後の収率:18.3%。

【0132】

実施例11 リンカーSH-C₅-リンカー-I I-C(O)O-の調製

工程1。6-アセチルチオヘキサン酸(5.71 g、1.0当量)およびグリコール酸(2.40 g、1.05当量)を80 mL DCMに溶解し、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)(8.05 g、1.3当量)、4-(ジメチルアミノ)ピリジン(DMAP)(0.37 g、0.1当量)、およびトリエチルアミン(9.6 mL、2.3当量)をゆっくり添加した。室温で少なくとも5時間反応させ、反応をTLCで追跡した。その後に、混合物をddH₂Oの添加によってクエンチし、DCMで2~3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、MgSO₄で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、DCM:MeOH=9.5:0.5を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。収率:78%。

【0133】

工程2。工程1の生成物(5.26 g、1.0当量)およびエタノールアミン(1.28 g、1.05当量)を80 mL DCMに溶解し、EDC·HCl(4.98 g、1.3当量)、ヒドロキシスクシンイミド(NHS)(2.30 g、1.0当量)、およびトリエチルアミン(6.4 mL、2.3当量)をゆっくり添加した。室温で少なくとも5時間反応させ、反応をTLCで追跡した。その後に、混合物をddH₂Oの添加によってクエンチし、DCMで2~3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、MgSO₄で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、DCM:MeOH=9.8:0.2を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。収率:80.5%。

【0134】

工程3。4-ニトロフェニルクロロホルマート(4-nitrophenyl chloroformat)(3.35 g、1.15当量)を二口ボトルに入れた。真空下で1時間、三方弁を窒素デバイスに回し、60 mL DCMをシリンジで添加した。秤量した工程1の生成物1を10~15 mL DCMで溶解し、シリンジで反応フラスコに注入し、次いで、トリエチルアミン(4.5 mL、2.3当量)をゆっくり添加した。氷浴中で約1時間反応させ、次いで、室温に一晩戻した。反応完了後、混合物をddH₂Oの添加によってクエンチし、DCMで2~3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、MgSO₄で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、EtOAc:Hex:MeOH=1:2:0.2を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。精製後の収率:51.6%。

【0135】

工程4。秤量した工程2の生成物2（3.5g、1.0当量）を120mL DCMに溶解し、次いで、ヒドラジン水和物（6.5mL、10.0当量）をゆっくり添加した。室温で約24時間反応させた。溶液は、淡黄色から橙色に変化した。反応完了後、混合物をddH₂Oの添加によってクエンチし、DCMで2～3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、MgSO₄で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、DCM：MeOH＝9.5：0.5を使用したカラムで精製した。この工程で、生成物がカラム中に固着し、MeOHを5%まで増加させて最終生成物を溶出させることができる。生成物は淡黄色の粘着性固体であった。精製後の収率：19.0%。

【0136】

実施例12 リンカー-NH₂-C₁-リンカー-I I-アミドの調製

10

工程1。Boc-グリシン（5.26g、1.0当量）およびグリシン（2.36g、1.05当量）を80mL DCMに溶解し、EDC・HCl（7.47g、1.3当量）、ヒドロキスクシンイミド（NHS）（3.45g、1.0当量）、およびトリエチルアミン（9.6mL、2.3当量）をゆっくり添加した。室温で少なくとも5時間反応させ、反応をTLCで追跡した。その後に、混合物をddH₂Oの添加によってクエンチし、DCMで2～3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、MgSO₄で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、DCM：MeOH＝9.5：0.5を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。収率：70%。

【0137】

工程2。工程1の生成物（5.26g、1.0当量）およびエタノールアミン（1.28g、1.05当量）を80mL DCMに溶解し、EDC・HCl（4.98g、1.3当量）、ヒドロキスクシンイミド（NHS）（2.30g、1.0当量）、およびトリエチルアミン（6.4mL、2.3当量）をゆっくり添加した。室温で少なくとも5時間反応させ、反応をTLCで追跡した。その後に、混合物をddH₂Oの添加によってクエンチし、DCMで2～3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、MgSO₄で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、DCM：MeOH＝9.8：0.2を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。収率：77.8%。

20

【0138】

工程3。4-ニトロフェニルクロロホルマート（4-nitrophenyl chloroformat）（3.35g、1.15当量）を二口ボトルに入れた。真空下で1時間、三方弁を窒素デバイスに回し、60mL DCMをシリンジで添加した。秤量した工程1の生成物1を10～15mL DCMで溶解し、シリンジで反応フラスコに注入し、次いで、トリエチルアミン（4.5mL、2.3当量）をゆっくり添加した。氷浴中で約1時間反応させ、次いで、室温に一晩戻した。反応完了後、混合物をddH₂Oの添加によってクエンチし、DCMで2～3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、MgSO₄で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、EtOAc：Hex：MeOH＝1：2：0.2を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。精製後の収率：51.6%。

30

【0139】

工程4。秤量した工程2の生成物2（3.5g、1.0当量）を120mL DCMに溶解し、次いで、ヒドラジン水和物（6.5mL、10.0当量）をゆっくり添加した。室温で約24時間反応させた。溶液は、淡黄色から橙色に変化した。反応完了後、混合物をddH₂Oの添加によってクエンチし、DCMで2～3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、MgSO₄で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、DCM：MeOH＝9.5：0.5を使用したカラムで精製した。この工程で、生成物がカラム中に固着し、MeOHを5%まで増加させて最終生成物を溶出させることができる。生成物は淡黄色の粘着性固体であった。精製後の収率：18.8%。

40

【0140】

実施例13 NH₂-C₁-リンカー-I I-C(O)O-の調製

50

工程 1。Boc-グリシン（5.26 g、1.0 当量）およびグリコール酸（2.40 g、1.05 当量）を 80 mL DCM に溶解し、N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）（8.05 g、1.3 当量）、4-（ジメチルアミノ）ピリジン（DMAP）（0.37 g、0.1 当量）、およびトリエチルアミン（9.6 mL、2.3 当量）をゆっくり添加した。室温で少なくとも 5 時間反応させ、反応を TLC で追跡した。その後に、混合物を ddH₂O の添加によってクエンチし、DCM で 2～3 回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、MgSO₄ で濾過し、次いで、DCM を除去した。抽出物を、DCM:MeOH=9.5:0.5 を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。収率：82.0%。

【0141】

10

工程 2。工程 1 の生成物（5.26 g、1.0 当量）およびエタノールアミン（1.28 g、1.05 当量）を 80 mL DCM に溶解し、EDC·HCl（4.98 g、1.3 当量）、ヒドロキシスクシンイミド（NHS）（2.30 g、1.0 当量）、およびトリエチルアミン（6.4 mL、2.3 当量）をゆっくり添加した。室温で少なくとも 5 時間反応させ、反応を TLC で追跡した。その後に、混合物を ddH₂O の添加によってクエンチし、DCM で 2～3 回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、MgSO₄ で濾過し、次いで、DCM を除去した。抽出物を、DCM:MeOH=9.8:0.2 を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。収率：78.5%。

【0142】

20

工程 3。4-ニトロフェニルクロロホルマート（3.35 g、1.15 当量）を二口ボトルに入れた。真空下で 1 時間、三方弁を窒素デバイスに回し、60 mL DCM をシリンジで添加した。秤量した工程 1 の生成物 1 を 10～15 mL DCM で溶解し、シリンジで反応フラスコに注入し、次いで、トリエチルアミン（4.5 mL、2.3 当量）をゆっくり添加した。氷浴中で約 1 時間反応させ、次いで、室温に一晩戻した。反応完了後、混合物を ddH₂O の添加によってクエンチし、DCM で 2～3 回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、MgSO₄ で濾過し、次いで、DCM を除去した。抽出物を、EtOAc:Hex:MeOH=1:2:0.2 を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。精製後の収率：51.0%。

【0143】

30

工程 4。秤量した工程 2 の生成物（3.5 g、1.0 当量）を 120 mL DCM に溶解し、次いで、ヒドラジン水和物（6.5 mL、10.0 当量）をゆっくり添加した。室温で約 24 時間反応させた。溶液は、淡黄色から橙色に変化した。反応完了後、混合物を ddH₂O の添加によってクエンチし、DCM で 2～3 回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、MgSO₄ で濾過し、次いで、DCM を除去した。抽出物を、DCM:MeOH=9.5:0.5 を使用したカラムで精製した。この工程で、生成物がカラム中に固着し、MeOH を 5% まで増加させて最終生成物を溶出させることができる。生成物は淡黄色の粘着性固体であった。精製後の収率：19.5%。

【0144】

実施例 14 リンカー IV-アミドの調製

40

【化 7 9】



10

20

リンカーIV-2

工程 1。エタノールアミン（1.92 g、1.05 当量）およびリポ酸（6.19 g、1.0 当量）を 80 mL DCM に溶解し、EDC・HCl（7.47 g、1.3 当量）、ヒドロキシスクシンイミド（NHS）（3.45 g、1.0 当量）、およびトリエチルアミン（9.6 mL、2.3 当量）をゆっくり添加した。室温で少なくとも 5 時間反応させ、反応を TLC で追跡した。その後に、混合物を ddH_2O の添加によってクエンチし、DCM で 2～3 回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、 MgSO_4 で濾過し、次いで、DCM を除去した。抽出物を、DCM： MeOH ＝9.8：0.2 を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。収率：66.0%。

30

【0145】

工程 2。工程 1 の生成物（4.98 g、1.0 当量）およびコハク酸（2.48 g、1.05 当量）を 80 mL DCM に溶解し、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）（5.36 g、1.3 当量）、4-（ジメチルアミノ）ピリジン（DMAP）（0.24 g、0.1 当量）、およびトリエチルアミン（6.4 mL、2.3 当量）をゆっくり添加した。室温で少なくとも 5 時間反応させ、反応を TLC で追跡した。その後に、混合物を ddH_2O の添加によってクエンチし、DCM で 2～3 回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、 MgSO_4 で濾過し、次いで、DCM を除去した。抽出物を、DCM： MeOH ＝9.5：0.5 を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。収率：80.7%。

40

【0146】

工程 3。工程 2 の生成物（3.49 g、1.0 当量）および 2-[2-(2-アミノエトキシ)エトキシ]エタノール（1.57 g、1.05 当量）を 80 mL DCM に溶解し、EDC・HCl（2.49 g、1.3 当量）、ヒドロキシスクシンイミド（NHS）（1.15 g、1.0 当量）、およびトリエチルアミン（3.2 mL、2.3 当量）をゆっくり添加した。室温で少なくとも 5 時間反応させ、反応を TLC で追跡した。その後に、混合物を ddH_2O の添加によってクエンチし、DCM で 2～3 回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、 MgSO_4 で濾過し、次いで、DCM を除去した。抽出物を、DCM： MeOH ＝9.8：0.2 を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。収率：81.2%。

50

【0147】

工程4。4-ニトロフェニルクロロホルマート（3.35 g、1.15当量）を二口ボトルに入れた。真空下で1時間、三方弁を窒素デバイスに回し、60 mL DCMをシリンジで添加した。秤量した工程3の生成物を10～15 mL DCMで溶解し、シリンジで反応フラスコに注入し、次いで、トリエチルアミン（4.5 mL、2.3当量）をゆっくり添加した。氷浴中で約1時間反応させ、次いで、室温に一晩戻した。反応完了後、混合物をddH₂Oの添加によってクエンチし、DCMで2～3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、MgSO₄で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、EtOAc:Hex:MeOH=1:2:0.2を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。精製後の収率：48.6%。

10

【0148】

工程5。秤量した工程4の生成物（3.5 g、1.0当量）を120 mL DCMに溶解し、次いで、ヒドラジン水和物（6.5 mL、10.0当量）をゆっくり添加した。室温で約24時間反応させた。溶液は、淡黄色から橙色に変化した。反応完了後、混合物をddH₂Oの添加によってクエンチし、DCMで2～3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、MgSO₄で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、DCM:MeOH=9.5:0.5を使用したカラムで精製した。この工程で、生成物がカラム中に固着し、MeOHを5%まで増加させて最終生成物を溶出させることができる。生成物（リンカーIV-2）は淡黄色の粘性性固体であった。精製後の収率：30.0%。

20

¹H (300 MHz) δ 1.30–1.34 (2H, m), 1.47–1.56 (3H, m), 1.60–1.67 (1H, m), 1.82–1.87 (1H, m), 2.23 (2H, t), 2.54–2.56 (4H, m), 2.63–2.2.66 (4H, m), 3.07–3.25 (2H, m), 3.33–3.39 (3H, m), 3.40–3.43 (2H, m), 3.46–3.50 (5H, m), 3.54–3.58 (5H, m), 4.03–4.05 (2H, m), 4.07–4.10 (2H, m), 4.13–4.15 (2H, m)

¹³C (100 MHz) δ 24.5, 24.6, 27.5, 33.7, 34.7, 38.1, 41.0, 55.7, 55.8, 59.6, 59.7, 59.8, 65.7, 65.8, 65.9, 71.5, 71.7, 171.7, 171.9, 172.0, 177.1, 177.2, 177.3

30

【0149】

実施例15 リンカーIV-C(O)O-の調製

工程1。エチレングリコール（1.96 g、1.05当量）およびリポ酸（6.19 g、1.0当量）を80 mL DCMに溶解し、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）（8.04 g、1.3当量）、4-（ジメチルアミノ）ピリジン（DMA P）（0.37 g、0.1当量）、およびトリエチルアミン（9.6 mL、2.3当量）をゆっくり添加した。室温で少なくとも5時間反応させ、反応をTLCで追跡した。その後に、混合物をddH₂Oの添加によってクエンチし、DCMで2～3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、MgSO₄で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、DCM:MeOH=9.8:0.2を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。収率：66.0%。

40

【0150】

工程2。工程1の生成物（4.98 g、1.0当量）およびコハク酸（2.48 g、1.05当量）を80 mL DCMに溶解し、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）（5.36 g、1.3当量）、4-（ジメチルアミノ）ピリジン（DMA P）（0.24 g、0.1当量）、およびトリエチルアミン（6.4 mL、2.3当量）をゆっくり添加した。室温で少なくとも5時間反応させ、反応をTLCで追跡した。その後に、混合物をddH₂Oの添加によってクエンチし、DCMで2～3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、MgSO₄で濾過し、次いで、DCMを除去

50

した。抽出物を、DCM:MeOH=9.5:0.5を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。収率:81.2%。

【0151】

工程3。工程2の生成物(3.49g、1.0当量)および2-[2-(2-アミノエトキシ)エトキシ]エタノール(1.57g、1.05当量)を80mL DCMに溶解し、EDC·HCl(2.49g、1.3当量)、ヒドロキシスクシンイミド(NHS)(1.15g、1.0当量)、およびトリエチルアミン(3.2mL、2.3当量)をゆっくり添加した。室温で少なくとも5時間反応させ、反応をTLCで追跡した。その後に、混合物をddH₂Oの添加によってクエンチし、DCMで2~3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、MgSO₄で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、DCM:MeOH=9.8:0.2を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。収率:80.5%。

10

【0152】

工程4。4-ニトロフェニルクロロホルマート(4-nitrophenyl chloroformat)(3.35g、1.15当量)を二口ボトルに入れた。真空下で1時間、三方弁を窒素デバイスに回し、60mL DCMをシリンジで添加した。秤量した工程3の生成物を10~15mL DCMで溶解し、シリンジで反応フラスコに注入し、次いで、トリエチルアミン(4.5mL、2.3当量)をゆっくり添加した。氷浴中で約1時間反応させ、次いで、室温に一晩戻した。反応完了後、混合物をddH₂Oの添加によってクエンチし、DCMで2~3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、MgSO₄で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、EtOAc:Hex:MeOH=1:2:0.2を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。精製後の収率:50.3%。

20

【0153】

工程5。秤量した工程4の生成物(3.5g、1.0当量)を120mL DCMに溶解し、次いで、ヒドラジン水和物(6.5mL、10.0当量)をゆっくり添加した。室温で約24時間反応させた。溶液は、淡黄色から橙色に変化した。反応完了後、混合物をddH₂Oの添加によってクエンチし、DCMで2~3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、MgSO₄で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、DCM:MeOH=9.5:0.5を使用したカラムで精製した。この工程で、生成物がカラム中に固着し、MeOHを5%まで増加させて最終生成物を溶出させることができる。生成物は淡黄色の粘着性固体であった。精製後の収率:31.0%。

30

【0154】

実施例16 SH-C₅-リンカー-IV-アミドの調製

工程1。エタノールアミン(1.92g、1.05当量)および6-アセチルチオヘキサン酸(5.71g、1.0当量)を80mL DCMに溶解し、EDC·HCl(7.47g、1.3当量)、ヒドロキシスクシンイミド(NHS)(3.45g、1.0当量)、およびトリエチルアミン(9.6mL、2.3当量)をゆっくり添加した。室温で少なくとも5時間反応させ、反応をTLCで追跡した。その後に、混合物をddH₂Oの添加によってクエンチし、DCMで2~3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、MgSO₄で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、DCM:MeOH=9.8:0.2を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。収率:74.0%。

40

【0155】

工程2。工程1の生成物(4.98g、1.0当量)およびコハク酸(2.48g、1.05当量)を80mL DCMに溶解し、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)(5.36g、1.3当量)、4-(ジメチルアミノ)ピリジン(DMAP)(0.24g、0.1当量)、およびトリエチルアミン(6.4mL、2.3当量)をゆっくり添加した。室温で少なくとも5時間反応させ、反応をTLCで追跡した。その後に、混合物をddH₂Oの添加によってクエンチし、DCMで2~3回抽出した。有機層を

50

回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、 MgSO_4 で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、 $\text{DCM}:\text{MeOH}=9.5:0.5$ を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。収率：80.2%。

【0156】

工程3。工程2の生成物(3.49g、1.0当量)および2-[2-(2-アミノエトキシ)エトキシ]エタノール(1.57g、1.05当量)を80mL DCMに溶解し、EDC·HCl(2.49g、1.3当量)、ヒドロキシスクシンイミド(NHS)(1.15g、1.0当量)、およびトリエチルアミン(3.2mL、2.3当量)をゆっくり添加した。室温で少なくとも5時間反応させ、反応をTLCで追跡した。その後、混合物をddH₂Oの添加によってクエンチし、DCMで2~3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、 MgSO_4 で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、 $\text{DCM}:\text{MeOH}=9.8:0.2$ を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。収率：80.0%。

【0157】

工程4。4-ニトロフェニルクロロホルマート(3.35g、1.15当量)を二口ボトルに入れた。真空下で1時間、三方弁を窒素デバイスに回し、60mL DCMをシリンジで添加した。秤量した工程3の生成物を10~15mL DCMで溶解し、シリンジで反応フラスコに注入し、次いで、トリエチルアミン(4.5mL、2.3当量)をゆっくり添加した。氷浴中で約1時間反応させ、次いで、室温に一晩戻した。反応完了後、混合物をddH₂Oの添加によってクエンチし、DCMで2~3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、 MgSO_4 で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、 $\text{EtOAc}:\text{Hex}:\text{MeOH}=1:2:0.2$ を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。精製後の収率：51.1%。

【0158】

工程5。秤量した工程4の生成物(3.5g、1.0当量)を120mL DCMに溶解し、次いで、ヒドラジン水和物(6.5mL、10.0当量)をゆっくり添加した。室温で約24時間反応させた。溶液は、淡黄色から橙色に変化した。反応完了後、混合物をddH₂Oの添加によってクエンチし、DCMで2~3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、 MgSO_4 で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、 $\text{DCM}:\text{MeOH}=9.5:0.5$ を使用したカラムで精製した。この工程で、生成物がカラム中に固着し、MeOHを5%まで増加させて最終生成物を溶出させることができる。生成物は淡黄色の粘着性固体であった。精製後の収率：28.0%。

【0159】

実施例17 SH-C₅-リンカー-IV-C(O)O-の調製

工程1。エチレングリコール(1.96g、1.05当量)および6-アセチルチオヘキサン酸(5.71g、1.0当量)を80mL DCMに溶解し、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)(8.04g、1.3当量)、4-(ジメチルアミノ)ピリジン(DMAP)(0.37g、0.1当量)、およびトリエチルアミン(9.6mL、2.3当量)をゆっくり添加した。室温で少なくとも5時間反応させ、反応をTLCで追跡した。その後、混合物をddH₂Oの添加によってクエンチし、DCMで2~3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、 MgSO_4 で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、 $\text{DCM}:\text{MeOH}=9.8:0.2$ を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。収率：71.5%。

【0160】

工程2。工程1の生成物(4.98g、1.0当量)およびコハク酸(2.48g、1.05当量)を80mL DCMに溶解し、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)(5.36g、1.3当量)、4-(ジメチルアミノ)ピリジン(DMAP)(0.24g、0.1当量)、およびトリエチルアミン(6.4mL、2.3当量)をゆっくり添加した。室温で少なくとも5時間反応させ、反応をTLCで追跡した。その後、混合物をddH₂Oの添加によってクエンチし、DCMで2~3回抽出した。有機層を

回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、 MgSO_4 で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、 $\text{DCM}:\text{MeOH}=9.5:0.5$ を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。収率：81.4%。

【0161】

工程3。工程2の生成物(3.49g、1.0当量)および2-[2-(2-アミノエトキシ)エトキシ]エタノール(1.57g、1.05当量)を80mL DCMに溶解し、EDC·HCl(2.49g、1.3当量)、ヒドロキシスクシンイミド(NHS)(1.15g、1.0当量)、およびトリエチルアミン(3.2mL、2.3当量)をゆっくり添加した。室温で少なくとも5時間反応させ、反応をTLCで追跡した。その後、混合物をddH₂Oの添加によってクエンチし、DCMで2~3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、 MgSO_4 で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、 $\text{DCM}:\text{MeOH}=9.8:0.2$ を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。収率：78.8%。

【0162】

工程4。4-ニトロフェニルクロロホルマート(3.35g、1.15当量)を二口ボトルに入れた。真空下で1時間、三方弁を窒素デバイスに回し、60mL DCMをシリンジで添加した。秤量した工程3の生成物を10~15mL DCMで溶解し、シリンジで反応フラスコに注入し、次いで、トリエチルアミン(4.5mL、2.3当量)をゆっくり添加した。氷浴中で約1時間反応させ、次いで、室温に一晩戻した。反応完了後、混合物をddH₂Oの添加によってクエンチし、DCMで2~3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、 MgSO_4 で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、 $\text{EtOAc}:\text{Hex}:\text{MeOH}=1:2:0.2$ を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。精製後の収率：51.1%。

【0163】

工程5。秤量した工程4の生成物(3.5g、1.0当量)を120mL DCMに溶解し、次いで、ヒドラジン水和物(6.5mL、10.0当量)をゆっくり添加した。室温で約24時間反応させた。溶液は、淡黄色から橙色に変化した。反応完了後、混合物をddH₂Oの添加によってクエンチし、DCMで2~3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、 MgSO_4 で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、 $\text{DCM}:\text{MeOH}=9.5:0.5$ を使用したカラムで精製した。この工程で、生成物がカラム中に固着し、MeOHを5%まで増加させて最終生成物を溶出させることができる。生成物は淡黄色の粘着性固体であった。精製後の収率：27.8%。

【0164】

実施例18 NH_2-C_1 -リンカー-IV-アミドの調製

工程1。エタノールアミン(1.92g、1.05当量)およびBoc-グリシン(5.26g、1.0当量)を80mL DCMに溶解し、EDC·HCl(7.47g、1.3当量)、ヒドロキシスクシンイミド(NHS)(3.45g、1.0当量)、およびトリエチルアミン(9.6mL、2.3当量)をゆっくり添加した。室温で少なくとも5時間反応させ、反応をTLCで追跡した。その後、混合物をddH₂Oの添加によってクエンチし、DCMで2~3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、 MgSO_4 で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、 $\text{DCM}:\text{MeOH}=9.8:0.2$ を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。収率：62.0%。

【0165】

工程2。工程1の生成物(4.98g、1.0当量)およびコハク酸(2.48g、1.05当量)を80mL DCMに溶解し、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)(5.36g、1.3当量)、4-(ジメチルアミノ)ピリジン(DMAP)(0.24g、0.1当量)、およびトリエチルアミン(6.4mL、2.3当量)をゆっくり添加した。室温で少なくとも5時間反応させ、反応をTLCで追跡した。その後、混合物をddH₂Oの添加によってクエンチし、DCMで2~3回抽出した。有機層を

回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、 MgSO_4 で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、 $\text{DCM}:\text{MeOH}=9.5:0.5$ を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。収率：80.4%。

【0166】

工程3。工程2の生成物(3.49g、1.0当量)および2-[2-(2-アミノエトキシ)エトキシ]エタノール(1.57g、1.05当量)を80mL DCMに溶解し、EDC·HCl(2.49g、1.3当量)、ヒドロキシスクシンイミド(NHS)(1.15g、1.0当量)、およびトリエチルアミン(3.2mL、2.3当量)をゆっくり添加した。室温で少なくとも5時間反応させ、反応をTLCで追跡した。その後、混合物を ddH_2O の添加によってクエンチし、DCMで2~3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、 MgSO_4 で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、 $\text{DCM}:\text{MeOH}=9.8:0.2$ を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。収率：71.0%。

【0167】

工程4。4-ニトロフェニルクロロホルマート(4-nitrophenyl chloroformat)(3.35g、1.15当量)を二口ボトルに入れた。真空下で1時間、三方弁を窒素デバイスに回し、60mL DCMをシリンジで添加した。秤量した工程3の生成物を10~15mL DCMで溶解し、シリンジで反応フラスコに注入し、次いで、トリエチルアミン(4.5mL、2.3当量)をゆっくり添加した。氷浴中で約1時間反応させ、次いで、室温に一晩戻した。反応完了後、混合物を ddH_2O の添加によってクエンチし、DCMで2~3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、 MgSO_4 で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、 $\text{EtOAc}:\text{Hex}:\text{MeOH}=1:2:0.2$ を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。精製後の収率：51.9%。

【0168】

工程5。秤量した工程4の生成物(3.5g、1.0当量)を120mL DCMに溶解し、次いで、ヒドラジン水和物(6.5mL、10.0当量)をゆっくり添加した。室温で約24時間反応させた。溶液は、淡黄色から橙色に変化した。反応完了後、混合物を ddH_2O の添加によってクエンチし、DCMで2~3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、 MgSO_4 で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、 $\text{DCM}:\text{MeOH}=9.5:0.5$ を使用したカラムで精製した。この工程で、生成物がカラム中に固着し、MeOHを5%まで増加させて最終生成物を溶出させることができる。生成物は淡黄色の粘着性固体であった。精製後の収率：29.0%。

【0169】

実施例19 $\text{NH}_2-\text{C}_{11}$ -リンカー-IV-C(O)O-の調製

工程1。エチレングリコール(1.96g、1.05当量)およびBoc-グリシン(5.26g、1.0当量)を80mL DCMに溶解し、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)(8.04g、1.3当量)、4-(ジメチルアミノ)ピリジン(DMAP)(0.37g、0.1当量)、およびトリエチルアミン(9.6mL、2.3当量)をゆっくり添加した。室温で少なくとも5時間反応させ、反応をTLCで追跡した。その後、混合物を ddH_2O の添加によってクエンチし、DCMで2~3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、 MgSO_4 で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、 $\text{DCM}:\text{MeOH}=9.8:0.2$ を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。収率：75.0%。

【0170】

工程2。工程1の生成物(4.98g、1.0当量)およびコハク酸(2.48g、1.05当量)を80mL DCMに溶解し、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)(5.36g、1.3当量)、4-(ジメチルアミノ)ピリジン(DMAP)(0.24g、0.1当量)、およびトリエチルアミン(6.4mL、2.3当量)をゆっくり添加した。室温で少なくとも5時間反応させ、反応をTLCで追跡した。その後、

、混合物を ddH_2O の添加によってクエンチし、DCMで2～3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、 MgSO_4 で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、DCM:MeOH=9.5:0.5を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。収率:80.5%。

【0171】

工程3。工程2の生成物(3.49g、1.0当量)および2-[2-(2-アミノエトキシ)エトキシ]エタノール(1.57g、1.05当量)を80mL DCMに溶解し、EDC·HCl(2.49g、1.3当量)、ヒドロキシスクシンイミド(NHS)(1.15g、1.0当量)、およびトリエチルアミン(3.2mL、2.3当量)をゆっくり添加した。室温で少なくとも5時間反応させ、反応をTLCで追跡した。その後、混合物を ddH_2O の添加によってクエンチし、DCMで2～3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、 MgSO_4 で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、DCM:MeOH=9.8:0.2を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。収率:81.0%。

【0172】

工程4。4-ニトロフェニルクロロホルマート(4-nitrophenyl chloroformat)(3.35g、1.15当量)を二口ボトルに入れた。真空下で1時間、三方弁を窒素デバイスに回し、60mL DCMをシリンジで添加した。秤量した工程3の生成物を10～15mL DCMで溶解し、シリンジで反応フラスコに注入し、次いで、トリエチルアミン(4.5mL、2.3当量)をゆっくり添加した。氷浴中で約1時間反応させ、次いで、室温に一晩戻した。反応完了後、混合物を ddH_2O の添加によってクエンチし、DCMで2～3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、 MgSO_4 で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、EtOAc:Hex:MeOH=1:2:0.2を使用したカラムで精製する。生成物は淡黄色の液体であった。精製後の収率:50.6%。

【0173】

工程5。秤量した工程4の生成物(3.5g、1.0当量)を120mL DCMに溶解し、次いで、ヒドラジン水和物(6.5mL、10.0当量)をゆっくり添加した。室温で約24時間反応させた。溶液は、淡黄色から橙色に変化した。反応完了後、混合物を ddH_2O の添加によってクエンチし、DCMで2～3回抽出した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、 MgSO_4 で濾過し、次いで、DCMを除去した。抽出物を、DCM:MeOH=9.5:0.5を使用したカラムで精製した。この工程で、生成物がカラム中に固着し、MeOHを5%まで増加させて最終生成物を溶出させることができる。生成物は淡黄色の粘着性固体であった。精製後の収率:31.2%。

【0174】

実施例20 本発明のリンカーの細胞傷害性アッセイ

本発明者らは、9種のリンカーの細胞傷害性を試験し、各リンカーの IC_{50} 値を計算した。ヒト乳癌(breast adenocarcinoma)MCF7、MDA-MB-453、およびMDA-MB-231ならびにヒト乳房上皮細胞H184B5F5/M10を、細胞傷害性試験のために選択した。細胞を6ウェルプレートに播種し、リンカーI-1(リンカーI-アミド、 $m=2$)、リンカーI-2(リンカーI-アミド、 $m=1$)、リンカーI-3(リンカーI-アミド、 $m=3$)、リンカーI-4(リンカーI-アミド、 $m=4$)、リンカーI-5(リンカーI-アミド、 $m=5$)、リンカーII-1(リンカーII-アミド、 $z=1$)、リンカーII-2(リンカーII-アミド、 $z=2$)、リンカーII-3(リンカーII-アミド、 $z=3$)、およびリンカーII-4(リンカーII-アミド、 $z=4$)で処置し、37℃で72時間さらにインキュベートした。写真撮影後、血球計算器を使用して細胞を計数した。成長阻害を無処置対照と比較してリンカーの50%成長阻害濃度(IC_{50})を見出した。 IC_{50} のまとめを表1に示す。リンカーI-1～リンカーI-5およびリンカーII-1における IC_{50} 値は300～700 μM であった。リンカーII-2～II-4の IC_{50} 値は800 μM を超える

。これらのデータは、薬物送達のために薬物と金ナノ粒子を抱合するためのリンカーとしての細胞毒性が低いことを示唆している。

【表 1】

表 1 ヒト乳癌腺癌 (brast adenocarcinoma) MCF7、MDA-MB-453、およびMDA-MB-231ならびにヒト乳房上皮細胞H184B5F5/M10における72時間にわたるリンカー細胞傷害性のIC₅₀値のまとめ

リンカー細胞傷害性についてのIC ₅₀ 値 (μM)	MCF7	MDA-MB-231	M10	MDA-MB-453
リンカーI-1	692.0±51.9	528.9±52.1	584.4±62.7	298.6±23
リンカーI-2	730±36.7	535.6±21.6	685.7±105.5	432.5±96.6
リンカーI-3	538.2±39.6	453.7±141.7	555±33.5	332.9±9.8
リンカーI-4	569.2±14.1	575.6±81.9	560±45.1	342.3±11
リンカーI-5	418.9±23.8	484.3±64.6	569.3±54.7	460±87.9
リンカーII-1	500.8	474.3	500.4	>800
リンカーII-2	>800	>800	>800	>800
リンカーII-3	>800	428.3±116.2	585.3±132.2	>800
リンカーII-4	>800	>800	>800	>800
リンカーIV-2	>800	655.5	>800	708.4±35.3
リンカーSHI-1	>800	558.9±23.3	>800	128.3±15.1
リンカーSHI-4	>800	532.7±63.9	>800	129.7±13.4

【0175】

実施例 21 金ナノ粒子、リンカー、および抗癌薬、ならびに／または抗体の複合体の調製

1. Au/LKI-1/mAb-p24 複合体

Au/LKI-1/mAb-p24 複合体の調製

【0176】

抗体を金ナノ粒子上に抱合するために、抗HIV-1 p24 (HIV-1 p24) (GeneTex, GTX41595) 抗体を、10 kDa MWCO遠心濾過器 (Millipore, UFC501024) を使用して濃縮し、100 mM Na₂HPO₄ (pH 7.4 緩衝液) に1 mg/mLで溶解した。次いで、5 μLの100 mM NaIO₄ 水溶液を50 μLの抗体溶液に添加し、混合物を暗所で30分間インキュベートした。反応物を、250 μLの1×PBSを添加してクエンチした。この時点で、抗体のFc部分上の炭水化物部分はアルデヒド基に酸化された。次いで、リンカーI-1 (リンカーI-アミド、m=2) を抗体溶液に添加した。リンカーは、分子の反対側にヒドラジド基およびジチオール基を有する。ヒドラジド部分は、修飾された抗体分子のFc部分のアルデヒド基と相互作用する。反応混合物を室温で2時間インキュベートし、次いで、遠心濾過器を使用してチオール化抗体を回収し、0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) に再懸濁した。100マイクロリットルの濃度0.1 mg/mLのチオール化抗体を0.5 mLの金ナノ粒子と混合し、懸濁液を室温で1時間インキュベートした。その後の使用のために抗体-金ナノ粒子複合体を4℃に維持して保存した。

【0177】

Au/LKI-1/mAb-p24 複合体の特徴付け

【0178】

Au/LKI-1/mAb-p24複合体の製剤を、UV-Vis分光光度計(Beckman, DU 800)で分析した。記録された表面プラズモン共鳴スペクトルは、抗体抱合金ナノ粒子のプラズモンピーク(λ_{max})の2nmレッドシフトを示した(図1A)。Alexa Fluor 568二次抗体標識Au/LKI-1/mAb-p24複合体の赤色蛍光画像を、倒立顕微鏡(Nikon, TE2000-U)を使用して測定した。各金ナノ粒子が赤色蛍光を示したことにより、各金ナノ粒子がその表面上で抗HIV-1 P24抗体と抱合したことを示唆している(図1B)。さらに、本発明者らは、金ナノ粒子上の抗HIV-1 P24抗体の結合親和性を調査した。ELISAから、本発明者らは、抗HIV-1 P24タンパク質へのAu/LKI-1/mAb-p24複合体の結合親和性を確認することができた(図1C)。

10

【0179】

2. Au/LKI-1/Ab-EGFR複合体またはLKI-5/Ab-EGFR複合体

Au/LKI-1/Ab-EGFR複合体またはLKI-5/Ab-EGFR複合体の調製

【0180】

抗体を金ナノ粒子上に抱合するために、抗ヒトEGFRクローンH11(Thermo, MA1-12693)を、10kDa MWCO遠心濾過器(Millipore, UFC501024)を使用して濃縮し、100mM Na_2HPO_4 (pH 7.4緩衝液)に1mg/mLで溶解した。次いで、5 μL の100mM NaIO_4 水溶液を50 μL の抗体溶液に添加し、混合物を暗所で30分間インキュベートした。反応物を、250 μL の1 $\times$ PBSを添加してクエンチした。この時点で、抗体のFc部分上の炭水化物部分はアルデヒド基に酸化された。次いで、リンカーI-1(リンカーI-アミド、 $m=2$)またはリンカーI-5(リンカーI-アミド、 $m=5$)を抗体溶液に添加した。リンカーは、分子の反対側にヒドラジド基およびジチオール基を有する。ヒドラジド部分は、修飾された抗体分子のFc部分のアルデヒド基と相互作用する。反応混合物を室温で2時間インキュベートし、次いで、遠心濾過器を使用してチオール化抗体を回収し、0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.4)に再懸濁した。100マイクロリットルの濃度0.1mg/mLのチオール化抗体を0.5mLの金ナノ粒子と混合し、懸濁液を室温で1時間インキュベートした。その後の使用のために抗体-金ナノ粒子複合体を4 $^{\circ}\text{C}$ に維持して保存した。

20

30

【0181】

Au/LKI-1/Ab-EGFR複合体またはLKI-5/Ab-EGFR複合体の特徴付け

【0182】

Au/LKI-1/Ab-EGFR複合体またはAu/LKI-5/Ab-EGFR複合体の製剤を、UV-Vis分光光度計(Beckman, DU 800)で分析した。記録された表面プラズモン共鳴スペクトルは、抗体抱合金ナノ粒子のプラズモンピーク(λ_{max})の2nmレッドシフトを示した(図2)。本発明者らは、2つのリンカー(リンカーI-1(リンカーI-アミド($m=2$))およびリンカーI-5(リンカーI-アミド($m=5$)))を、EGFR抗体および金ナノ粒子の抱合について試験した。Au/LKI-1/Ab-EGFR複合体およびAu/LKI-5/Ab-EGFR複合体のフローサイトメトリー分析により、ヒト乳がん細胞MC F-7細胞に対する標的親和性が証明された。Au/LKI-1/Ab-EGFR複合体およびAu/LKI-5/Ab-EGFR複体の両方は、EGFR抗体と比較して類似の標的能を示した(表2)。これらのデータは、リンカーが抗体および金ナノ粒子の抱合に適切であり、且つ抗体の結合親和性を保持していることを示唆していた。

40

【表 2】

表 2 MCF-7 乳房腫瘍細胞の表面の EGFR に及ぼす Ab-EGFR、Au/LKI-1/Ab-EGFR 複合体、および Au/LKI-5/Ab-EGFR 複合体の標的効果についてのフローサイトメトリー分析

	Ab-EGFR	Au/LKI-1/Ab-EGFR 複合体	Au/LKI-5/Ab-EGFR 複合体
細胞表面上の EGFR の 標的率 (細胞株: MCF-7)	71.5	68	67

10

【0183】

3. Au/LKI-1/トラスツズマブ (Tras) 複合体

【0184】

Au/LKI-1/Tras 複合体の調製

【0185】

抗体を金ナノ粒子上に抱合するために、Tras (JHL biotech, JHL1188) 抗体を、10 kDa MWCO 遠心濾過器 (Millipore, UFC501024) を使用して濃縮し、100 mM Na_2HPO_4 (pH 7.4 緩衝液) に 1 mg/mL で溶解した。次いで、5 μL の 100 mM NaIO_4 水溶液を 50 μL の抗体溶液に添加し、混合物を暗所で 30 分間インキュベートした。反応物を、250 μL の 1×PBS を添加してクエンチした。この時点で、抗体の Fc 部分上の炭水化物部分はアルデヒド基に酸化された。次いで、リンカー I-1 (リンカー I-アミド (m=2)) を抗体溶液に添加した。リンカーは、分子の反対側にヒドラジド基およびジチオール基を有する。ヒドラジド部分は、修飾された抗体分子の Fc 部分のアルデヒド基と相互作用する。反応混合物を室温で 2 時間インキュベートし、次いで、遠心濾過器を使用してチオール化抗体を回収し、0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) に再懸濁した。100 マイクロリットルの濃度 0.1 mg/mL のチオール化抗体を 0.5 mL の金ナノ粒子と混合し、懸濁液を室温で 1 時間インキュベートした。その後の使用のために Au/LKI-1/Tras 複合体を 4℃ に維持して保存した。

20

30

【0186】

Au/LKI-1/Tras 複合体の特徴付け

Au/LKI-1/Tras 複合体の製剤を、UV-Vis 分光光度計 (Beckman, DU 800) で分析した。記録された表面プラズモン共鳴スペクトルは、抗体抱合金ナノ粒子のプラズモンピーク (λ_{max}) の 8 nm レッドシフトを示した (図 3)。本発明者らは、Au/LKI-1/Tras 複合体を試験した。Au/LKI-1/Tras 複合体のフローサイトメトリー分析により、ヒト乳腺腺癌細胞に対する標的親和性が証明された。Au/LKI-1/Tras 複合体は、トラスツズマブと比較して類似の標的能を示した (表 3)。

【表 3】

表 3. MDA-MB-453 乳房腫瘍細胞における表面の Her2/neu に及ぼす Tras および Au/LKI-1/Tras 複合体の標的効果についてのフローサイトメトリー分析

	Ab-EGFR	Au/LKI-1/Ab-EGFR 複合体
細胞表面上の Her2/neu に対する トラスツズマブの比率 (細胞株: MDA-MB-453)	99.89	99.98

40

50

【0187】

4. Au/LKI-1/エタネルセプト (ETA) 複合体

【0188】

Au/LKI-1/ETA複体の調製

【0189】

抗体を金ナノ粒子上に抱合するために、エタネルセプト (ETA) (Mycenax biotech, TuNEX) を、10 kDa MWCO 遠心濾過器 (Millipore, UFC501024) を使用して濃縮し、100 mM Na_2HPO_4 (pH 7.4 緩衝液) に1 mg/mLで溶解した。次いで、5 μL の100 mM NaIO_4 水溶液を50 μL の抗体溶液に添加し、混合物を暗所で30分間インキュベートした。反応物を、250 μL の1×PBSを添加してクエンチした。この時点で、抗体のFc部分上の炭水化物部分はアルデヒド基に酸化された。次いで、リンカーI-1を抗体溶液に添加した。リンカーは、分子の反対側にヒドラジド基およびジチオール基を有する。ヒドラジド部分は、修飾された抗体分子のFc部分のアルデヒド基と相互作用する。反応混合物を室温で2時間インキュベートし、次いで、遠心濾過器を使用してチオール化抗体を回収し、0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) に再懸濁した。100マイクロリットルの濃度0.1 mg/mLのチオール化抗体を0.5 mLの金ナノ粒子と混合し、懸濁液を室温で1時間インキュベートした。その後の使用のためにAu/LKI-1/ETA複合体を4°Cに維持して保存した。

10

【0190】

Au/LKI-1/ETA複体の特徴付け

20

【0191】

Au/LKI-1/ETA複体の製剤を、UV-Vis分光光度計 (Beckman, DU 800) で分析した。記録された表面プラズモン共鳴スペクトルは、Au/LKI-1/ETAのプラズモンピーク (λ_{max}) の2 nmレッドシフトを示した (図4A)。Alex Fluor 568二次抗体標識Au/LKI-1/ETA複体の赤色蛍光画像を、倒立顕微鏡 (Nikon, TE2000-U) を使用して測定した。各金ナノ粒子が赤色蛍光を示したことにより、各金ナノ粒子がその表面上でETA抗体と抱合したことを示唆している (図4B)。本発明者らは、さらに、1~5 nmのAuNPを抱合した二次抗体との結合によってAu/LKI-1/ETA複合体を試験した。Au/LKI-1/ETA複体のTEM画像では、1~5 nmの金標識抗ヒトIgG二次抗体のAuNP表面上に存在するETAへの結合が認められた (図4C)。本発明者らは、さらに、ETAおよびAu/LKI-1/ETAのTNF α 遮断能を調査した。MCF-7細胞 (5×10^5) を、12.5 ng/mLのTNF α と62.5、125、250、500 ng/mLのETAまたはAu/LKI-1/ETA複合体との混合物でそれぞれ2時間処置した。処置した細胞を、37°Cで72時間インキュベートし、次いで、細胞数を、MTS [(3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-5-(3-カルボキシメトキシフェニル)-2-(4-スルホフェニル)-2H-テトラゾリウム)] アッセイによってカウントした。TNF α 遮断能は、ETAのみおよびAu/LKI-1/ETA複合体の両方で認められた。ETAおよびAu/LKI-1/ETA複合体を使用して、TNF α 誘導性MCF-7細胞アポトーシスの遮断能を試験した (表4)。Au/LKI-1/ETA複合体は、ETAと比較して類似のTNF α 遮断能を示した。

30

40

【表 4】

表 4. Au/LKI-1/ETA 複合体の TNF α 誘導性 MCF-7 細胞アポトーシス遮断能

TNF α 12.5 ng/mL	相対細胞生存率	
	ETA	Au/LKI-1/ETA 複合体
用量 (ng/mL)		
62.5	36.7 $\pm$ 1.4	35.6 $\pm$ 4.9
125	68.5 $\pm$ 2.3	54.9 $\pm$ 3.1
250	82.1 $\pm$ 6.5	67.2 $\pm$ 2.2
500	103.3 $\pm$ 0.9	100.9 $\pm$ 5.4

【0192】

5. Au/LKI-1/ドキシソルビシン (Dox) 複合体

【0193】

Au/LKI-1/Dox 複合体の調製

【0194】

1 当量のドキシソルビシンおよび 2 当量のリンカー I-1 (リンカー I-アミド (m=2)) を乾燥 MeOH に添加し、室温で混合した。得られた混合物に TFA (1.3 当量) を添加し、一晩反応させた。得られた混合物を濾過して透明な溶液を得た。透明な溶液を、ドロPPER によって 50 mL EtOAc を含むフラスコに添加し、20 分間攪拌し、濾過して Dox-リンカー-1 固体を得た。得られた固体を EtOAc で洗浄し、次いで、乾燥させた。400 μ L の Dox/LKI-1 (2000 ppm) および 2 μ L の NaOH を 1 mL の AuNPs (50 ppm) に添加し、次いで、21 時間混合した。混合物を 1400 rpm で 20 分間遠心分離した。得られた沈殿物を DI 水で洗浄し、得られた沈殿物を DI 水に再懸濁した。PEG (2K、2000 Da) を懸濁液に添加し、一晩混合して Au/LKI-1/Dox 複合体を得た。

【0195】

Au/LKI-1/Dox 複合体の特徴付け

【0196】

Au/LKI-1/DOX 複合体を、UV-Vis 分光光度計 (Beckman, DU 800) で分析した。記録された表面プラズモン共鳴スペクトルは、Au/LKI-1/Dox 複合体のプラズモンピーク (λ_{max}) の 3 nm レッドシフトを示した (図 5)。

【0197】

前述の過程にしたがって、他のリンカー I-2、I-3、I-4、I-5、II-1、II-2、II-3、II-4、IV-2、SHI-1、および SHI-4 を使用して DOX および金ナノ粒子を抱合して種々の複合体を得た。

実施例 22 Au/リンカー (LK)/Dox 複合体の細胞傷害性アッセイ

本発明者らは、Au/LKs/Dox 複合体の細胞傷害性を試験し、IC₅₀ 値を計算した。ヒト乳腺癌 (brast adenocarcinoma) MCF7、MDA-MB-453、および MDA-MB-231、ならびにヒト乳房上皮細胞 H184B5F5/M10 を、細胞傷害性試験のために選択した。細胞を 96 ウェルプレートに播種し、2 μ M のドキシソルビシン (Dox)、以下の表中に示した種々のリンカーを使用してドキシソルビシンと抱合し、SH-PEG でキャップした 20~50 nm の金ナノ粒子 (Au/LK/Dox、2 μ M ドキシソルビシン含有) で処置し、37 °C で 72 時間さらにインキュベートした。Cell Titer 96 (登録商標) Aqueous One Solution 細胞増殖アッセイ (MTS) 試薬を Promega (Madison, WI, USA) から購入し、製造者の説明書にしたがってアッセイを行なった。マイクロプレートリーダー (Bio-tek, Powerwave X340, Winooski, VT, USA) を使用して 490 nm の吸光度を測定した。成長阻害を無処置対照と比較して Au/LKs/Dox 複合体の 50% 成長阻害濃度 (IC₅₀) を見出した。

10

20

30

40

【表 5】

表 5 ヒト乳腺腺癌 (brast adenocarcinoma) MCF7、MDA-MB-453、およびMDA-MB-231、ならびにヒト乳房上皮細胞H184B5F5/M10における72時間のAu/LKs/Dox複合体の細胞傷害性のIC₅₀値のまとめ

複合体の細胞傷害性の IC ₅₀ 値 (μM)	MCF7	MDA-MB-231	MDA-MB-453	M10
Au/リンカーI-1/Dox	0.54±0.03	0.5±0.082	1.93±0.2	0.49±0.0138
Au/リンカーI-2/Dox	0.7±0.0096	0.86±0.056	0.7±0.05	0.46±0.058
Au/リンカーI-3/Dox	>2.0	>2.0	>2.0	>2.0
Au/リンカーI-4/Dox	>2.0	>2.0	>2.0	>2.0
Au/リンカーI-5/Dox	>2.0	>2.0	>2.0	>2.0
Au/リンカーII-1/Dox	0.65±0.037	0.83±0.027	0.69±0.026	0.56±0.015
Au/リンカーII-2/Dox	>2.0	0.98±0.26	>2.0	0.67±0.1
Au/リンカーII-3/Dox	0.76±0.03	0.46±0.035	0.85±0.319	0.19±0.03
Au/リンカーII-4/Dox	>2.0	>2.0	1.9±0.12	0.7±0.137
Au/リンカーIV-2/Dox	0.77±0.02	0.57±0.048	0.73±0.073	0.49±0.031
Au/リンカーSHI-1/Dox	0.82±0.09	>2.0	>2.0	>2.0
Au/リンカーSHI-4/Dox	0.75±0.15	>2.0	>2.0	>2.0
Dox	0.41±0.055	0.67±0.088	0.65±0.072	0.14±0.034

【0198】

実施例23 Au/LKI-1/Dox複合体のpH感受性LKI-1放出試験

1mLのAu/LKI-1/Dox複合体溶液を、14000rpmで20分間遠心分離した。上清を破棄し、pH5.5の緩衝液またはpH7.4の緩衝液を添加した。異なる時点で、複合体溶液を14000rpmで20分間遠心分離し、次いで、上清を取り出して557.6nmでの蛍光スキャン(F-4500FL分光光度計)に供してOD値を得た。複合体からのDoxの放出量を、Dox検量線からの内挿によって得ることができる(X時間Dox放出量)。

【0199】

1mLのAu/LKI-1/Dox複合体溶液を、14000rpmで20分間遠心分離した。上清を破棄し、pH1.0の緩衝液を添加した。1時間後、複合体溶液を14000rpmで20分間遠心分離し、次いで、上清を取り出して557.6nmでの蛍光スキャン(F-4500FL分光光度計)に供してOD値を得た。Dox検量線からの内挿によってDoxの100%放出を得ることができる(pH=1で1時間のインキュベーション後のDox放出量)。Dox累積放出率を、以下の式にしたがって計算する。

・Dox累積放出率=(X時間Dox放出量/pH=1で1時間のインキュベーション後のDox放出量)*100%

【表 6】

表 6 Au/LKI-1/Dox 複合体の pH 感受性 LKI-1 放出試験

インキュベーション時間 (時間)	Au/LKI-1/Dox の Dox 放出 (%)	
	pH = 5.5	pH = 7.4
1	23.40	6.12
3	27.87	7.30
5	27.80	7.39
7	32.11	7.54
12	37.16	7.51
24	46.01	7.91
48	55.39	8.96
72	70.45	8.88

10

【0200】

データは、LKI-1 が pH 7.4 よりも pH 5.5 でより多くの Dox を放出することができることを示す。Au/LKI-1/Dox では、時間依存性にさらに多くの Dox が放出された。

【0201】

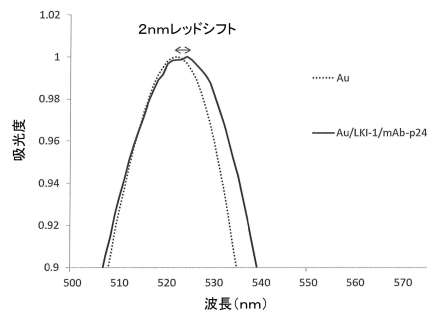
実施例 24 有効性研究デザイン

20

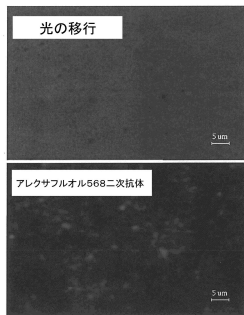
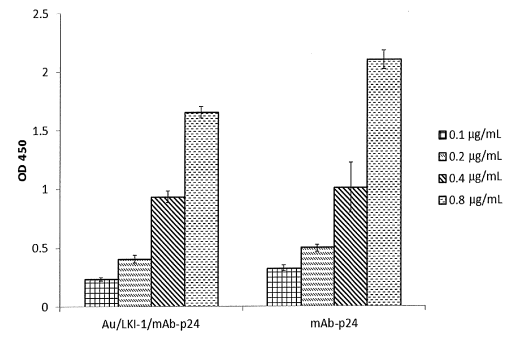
BALB/c-nu/nu マウスを、BioLASCO Taiwan から購入した。8 週齢の雄マウスに、 1.0×10^7 個の MDA-MB-231 乳房腫瘍細胞を含む 200 μ L の 50:50 Matrigel/Leibovitz's (L-15) を、皮下注射によって背側の片側に注射した。(1) ビヒクル-PBS (ネガティブコントロール)、(2) ドキソルビシン (ポジティブコントロール) (5 mg/kg)、(3) Au/PEG、(4) Au/LKI-1/Dox 複合体 (Dox は 5 mg/kg)。臨床症状によって屠殺を必要とするまで処置を継続した。マウスの体重を最低 2 回/週測定し、臨床症状によって屠殺を必要とするまで腫瘍サイズをモニタリングした (図 6 A、6 B を参照のこと)。異種移植片モデルにおける Au/LKI-1/Dox 複合体で処置した MDA-MB-231 乳房腫瘍細胞の TEM 画像。図中の矢印は、Au/LKI-1/Dox 複合体が MDA-MB-231 乳房腫瘍細胞内に存在することを示す (図 6 C を参照のこと)。異種移植片モデルにおける Au/LKI-1/Dox 複合体で処置した MDA-MB-231 腫瘍細胞の H&E 染色 (図 6 D を参照のこと)。

30

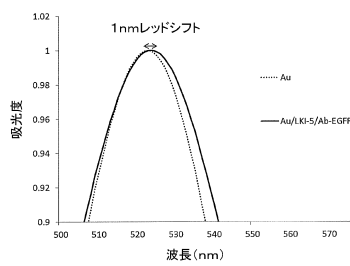
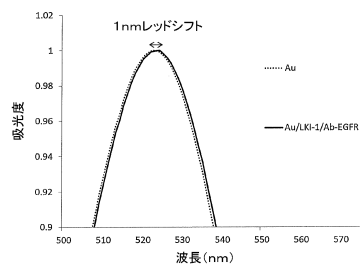
【図 1 A - B】



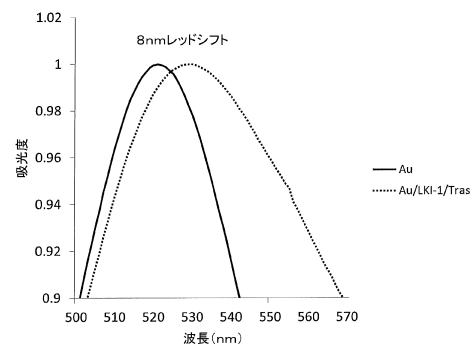
【図 1 C】



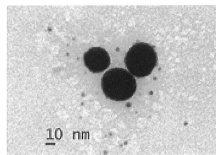
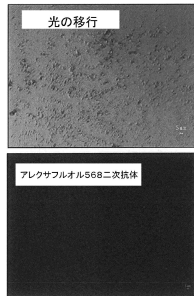
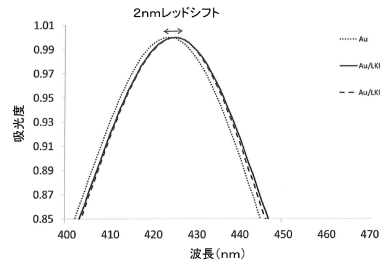
【図 2 A - B】



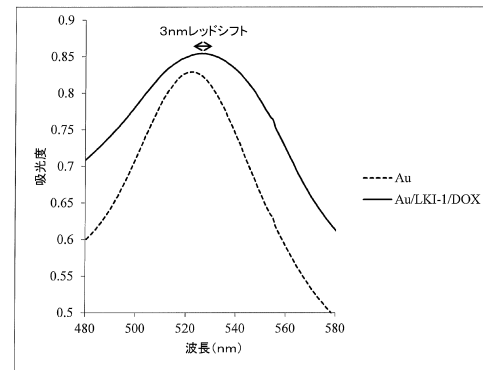
【図 3】



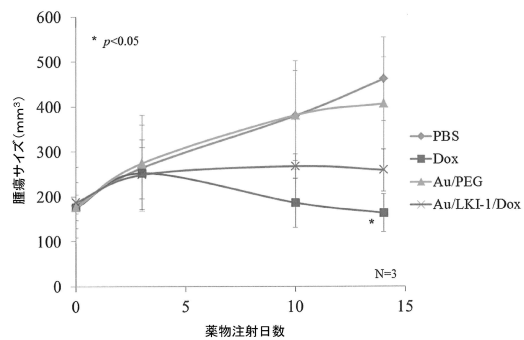
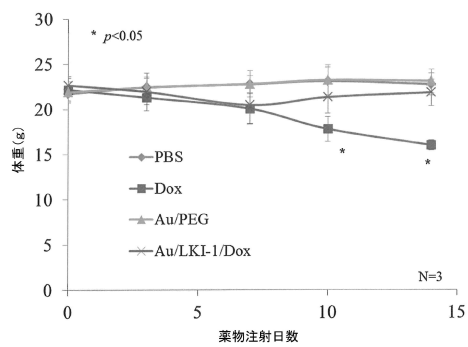
【図 4 A - C】



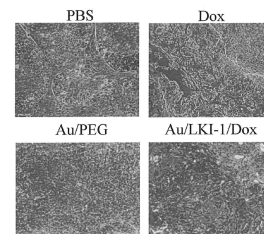
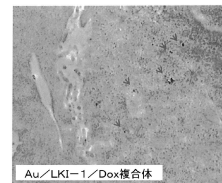
【図 5】



【図 6 A - B】



【図 6 C - D】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	47/52	(2017.01)	A 6 1 K 47/52
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 K	31/4745	(2006.01)	A 6 1 K 31/4745
A 6 1 K	31/704	(2006.01)	A 6 1 K 31/704
A 6 1 K	33/24	(2019.01)	A 6 1 K 33/24
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 T

- (72)発明者 ホアン、ウェーチャン
台湾 114、タイペイ シティ、ネイフー ディストリクト、ルイコアン ロード、レーン 2
58、ナンバー52、1フロア
- (72)発明者 チェン、チアーナン
台湾 114、タイペイ シティ、ネイフー ディストリクト、ルイコアン ロード、レーン 2
58、ナンバー52、1フロア
- (72)発明者 リン、ホアンユーイ
台湾 114、タイペイ シティ、ネイフー ディストリクト、ルイコアン ロード、レーン 2
58、ナンバー52、1フロア
- (72)発明者 リン、チンイー
台湾 114、タイペイ シティ、ネイフー ディストリクト、ルイコアン ロード、レーン 2
58、ナンバー52、1フロア
- (72)発明者 ツァイ、モンチュイ
台湾 114、タイペイ シティ、ネイフー ディストリクト、ルイコアン ロード、レーン 2
58、ナンバー52、1フロア
- (72)発明者 スー、ワンイー
台湾 114、タイペイ シティ、ネイフー ディストリクト、ルイコアン ロード、レーン 2
58、ナンバー52、1フロア
- (72)発明者 チー、リーリン
台湾 114、タイペイ シティ、ネイフー ディストリクト、ルイコアン ロード、レーン 2
58、ナンバー52、1フロア
- (72)発明者 チャオ、イェースー
台湾 114、タイペイ シティ、ネイフー ディストリクト、ルイコアン ロード、レーン 2
58、ナンバー52、1フロア
- (72)発明者 ウー、イーホン
台湾 114、タイペイ シティ、ネイフー ディストリクト、ルイコアン ロード、レーン 2
58、ナンバー52、1フロア

審査官 榎本 佳予子

- (56)参考文献 特表2013-523877 (JP, A)
米国特許出願公開第2011/0286107 (US, A1)
Biomaterials, 2014年, Vol.35, No.10, pp.3480-3487
ACS NANO, 2011年, Vol.5, No.5, p.3679-3692
Biomaterials, 2014年, Vol.35, No.2, pp.836-845
Bioconjugate Chemistry, 2003年, Vol.14, No.6, pp.1122-1132

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 0 7 C 2 4 3 / 2 8
C 0 7 D 2 4 3 / 3 4

C07D 339/04

A61K 31/00-33/44

A61K 39/395

A61K 45/00

A61K 47/00-47/69

CAplus/REGISTRY (STN)