(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 112543771 B
(45)授权公告日 2023.04.11

(21)申请号 201980049765.5
(22)申请日 2019.09.25
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112543771 A
(43)申请公布日 2021.03.23
(66)本国优先权数据
201811156667.5 2018.09.30 CN
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.01.26
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2019/107852 2019.09.25
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/063673 ZH 2020.04.02
(73)专利权人 江苏豪森药业集团有限公司
地址 222047 江苏省连云港市经济技术开发区
(72)发明人 应华 张玲 张婷 张蕾 许建烟 陶维康
(74)专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314
专利代理师 程伟
(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61K 31/4745(2006.01)
A61K 31/48(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
(56)对比文件
CN 104755494 A,2015.07.01
CN 109963591 A,2019.07.02
CN 110090306 A,2019.08.06
CN 109562189 A,2019.04.02
CN 109106951 A,2019.01.01
CN 106188293 A,2016.12.07
审查员 李岚

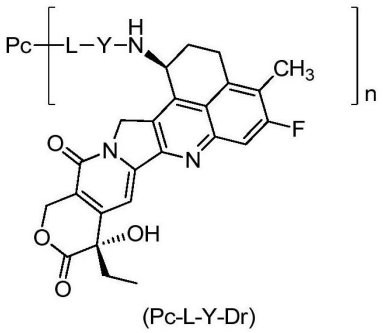
权利要求书7页 说明书50页
序列表14页 附图6页

(54)发明名称

抗B7H3抗体-依喜替康类似物偶联物及其医药用途

(57)摘要

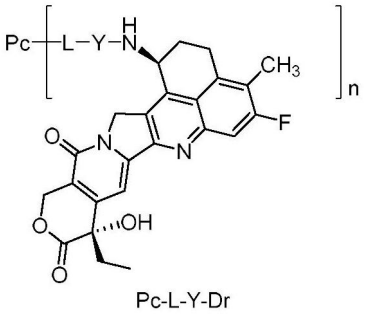
本发明披露了抗B7H3抗体-依喜替康类似物偶联物、其制备方法，以及其抗肿瘤的医药用途。



(Pc-L-Y-Dr)

CN 112543771 B

1.一种通式Pc-L-Y-Dr所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐：



Pc-L-Y-Dr

其中：

Y为-O-(CR^{a}R^b)$_m$-CR^{1}R^2-C(O)-；

R^{a}和R^{b}相同或不同，且各自独立地选自氢原子、氘原子、卤素或C$_{1-6}$烷基；

R^{1}为卤代C$_{1-6}$烷基或C$_{3-6}$环烷基；

R^{2}选自氢原子、卤代C$_{1-6}$烷基或C$_{3-6}$环烷基；

或者，R^{1}和R^{2}与其相连接的碳原子一起形成C$_{3-6}$环烷基；

m为0或1；

n为1至10；

L为接头单元；

Pc为抗B7H3抗体或其抗原结合片段，包含：

如SEQ ID NO:8、9和10氨基酸序列所示的重链HCDR1、HCDR2、HCDR3；和

如SEQ ID NO:11、12和13氨基酸序列所示的轻链LCDR1、LCDR2和LCDR3。

2.根据权利要求1所述的通式Pc-L-Y-Dr所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述抗B7H3抗体或其抗原结合片段的轻链可变区上的轻链FR区来源于人种系轻链序列或其突变序列，和/或重链可变区上的重链FR区来源于人种系重链序列或其突变序列。

3.根据权利要求1所述的通式Pc-L-Y-Dr所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述抗B7H3抗体或其抗原结合片段包含选自如下所示的重链可变区和/或轻链可变区：

其中所述重链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示，所述轻链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示。

4.根据权利要求1所述的通式Pc-L-Y-Dr所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述抗B7H3抗体或其抗原结合片段包含抗体恒定区；所述抗体恒定区的重链恒定区来源于人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4，所述抗体恒定区的轻链恒定区来源于人抗体κ、λ链。

5.根据权利要求4所述的通式Pc-L-Y-Dr所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述抗B7H3抗体或其抗原结合片段包含抗体恒定区；所述抗体恒定区的重链恒定区来源于人IgG1。

6.根据权利要求1所述的通式Pc-L-Y-Dr所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述Pc为全长抗体，其中所述的全长抗体选自：

由SEQ ID NO:14所示的重链序列和SEQ ID NO:15所示的轻链序列组成的h1702抗体，和

由SEQ ID NO:14所示的重链序列和SEQ ID NO:16所示的轻链序列组成的h1702DS抗

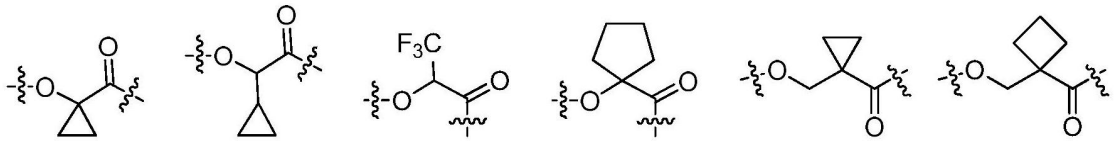
体。

7.根据权利要求1所述的通式Pc-L-Y-Dr所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述抗原结合片段选自Fab、Fab'、F(ab')2、单链抗体(scFv)、二聚化的V区(双抗体)、二硫键稳定化的V区(dsFv)和包含CDR的肽的抗原结合片段。

8.根据权利要求1所述的通式Pc-L-Y-Dr所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中n为2至8。

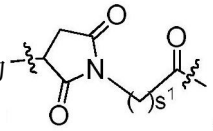
9.根据权利要求8所述的通式Pc-L-Y-Dr所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中n为5至9。

10.根据权利要求1所述的通式Pc-L-Y-Dr所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中Y选自：



和 。

11.根据权利要求1所述的通式Pc-L-Y-Dr所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中接头单元-L-为-L^1-L^2-L^3-L^4-，

L^1为  ，s^1为2至8的整数；

L^2为化学键；

L^3为四肽残基；

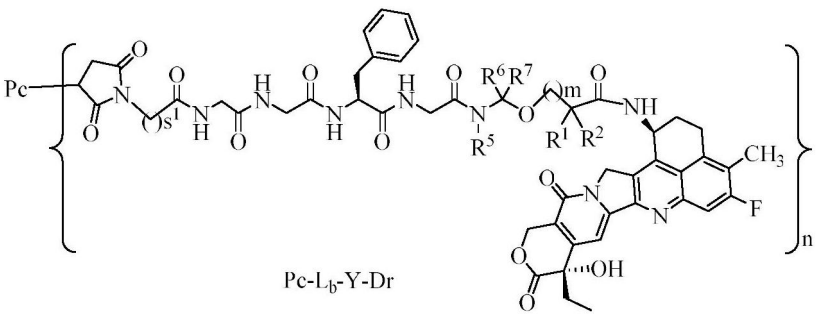
L^4为-$NR^5(CR^6R^7)t$-，R^5、R^6或R^7相同或不同，且各自独立地为氢原子或C_{1-6}烷基，t为1或2；

其中所述的L^1端与Pc相连，L^4端与Y相连。

12.根据权利要求11所述的通式Pc-L-Y-Dr所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述的L^3的四肽残基为选自苯丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、赖氨酸、瓜氨酸、丝氨酸、谷氨酸、天冬氨酸中的氨基酸形成的氨基酸残基。

13.根据权利要求12所述的通式Pc-L-Y-Dr所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述的L^3的四肽残基为四肽残基GGFG。

14.根据权利要求13所述的通式Pc-L-Y-Dr所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其为通式Pc-L_b-Y-Dr所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐：



Pc-L_b-Y-Dr

其中：

s^1为2至8的整数；

R^1为卤代C_{1-6}烷基或C_{3-6}环烷基；

R^2选自氢原子、卤代C_{1-6}烷基或C_{3-6}环烷基；

或者，R^1和R^2与其相连接的碳原子一起形成C_{3-6}环烷基；

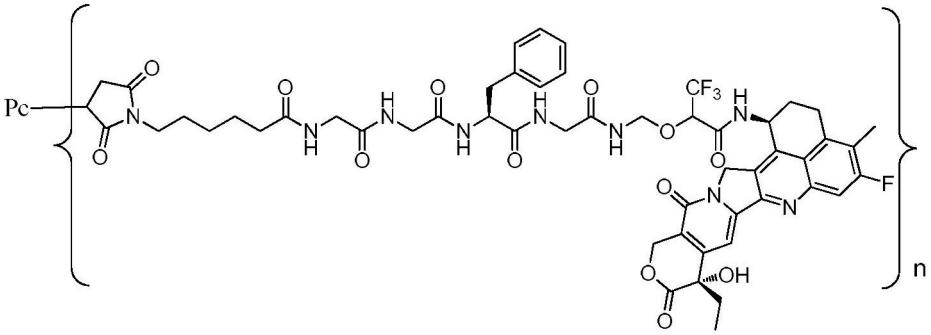
m为0或1；

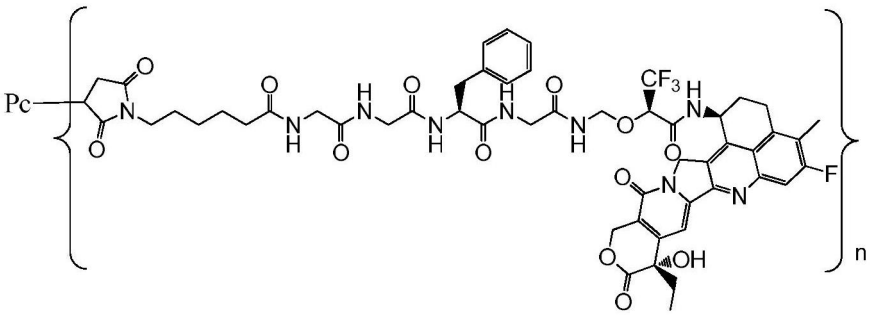
n为1至10；

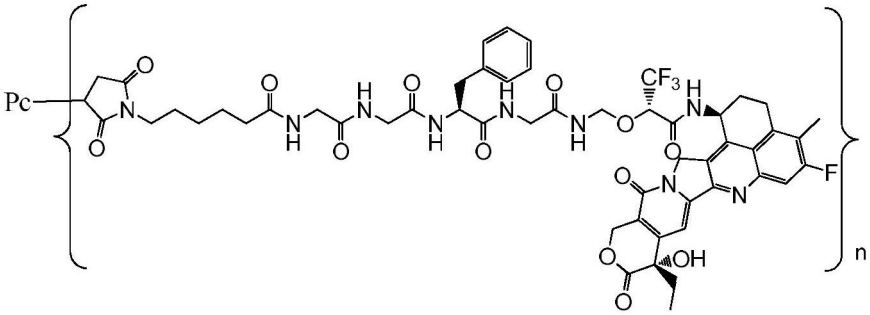
R^5、R^6或R^7相同或不同，且各自独立地为氢原子或C_{1-6}烷基；

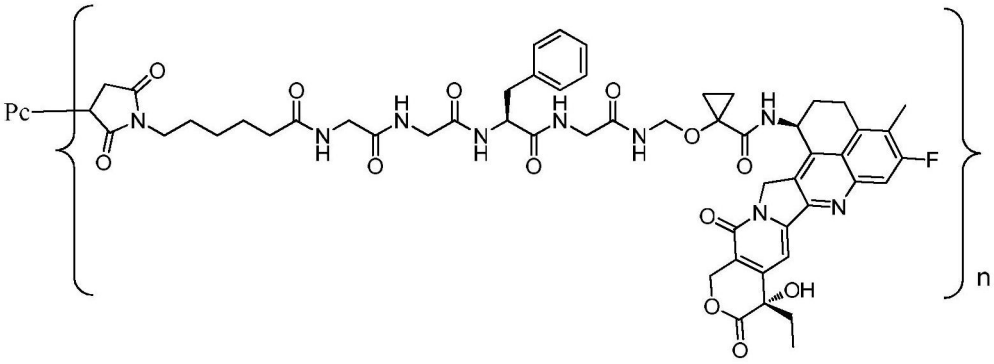
Pc如权利要求1中所定义。

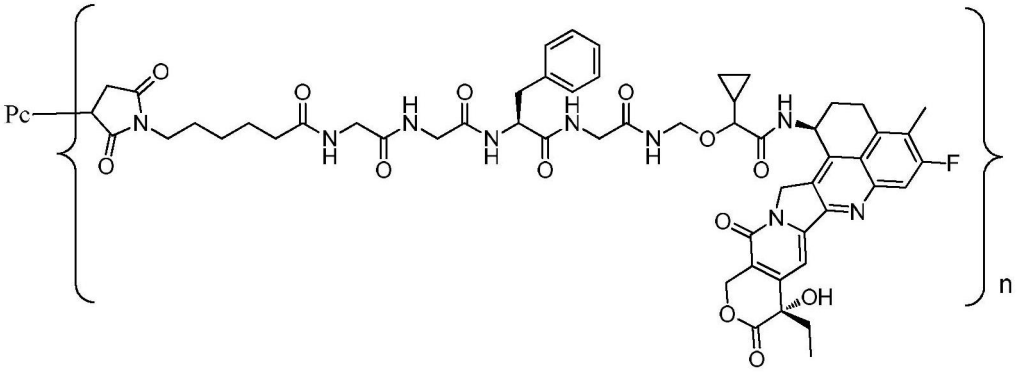
15.根据权利要求1所述的通式Pc-L-Y-Dr所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，选自：

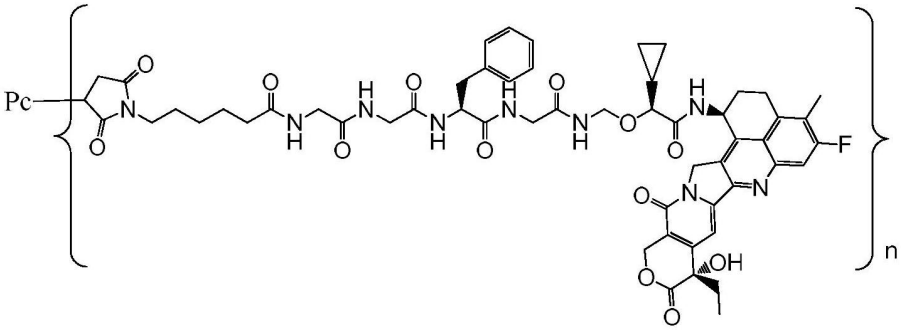

Pc
CF3
F
OH
n

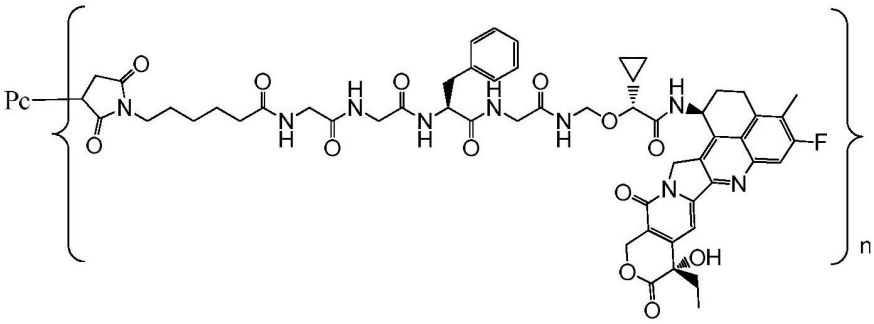

Pc
CF3
F
OH
n

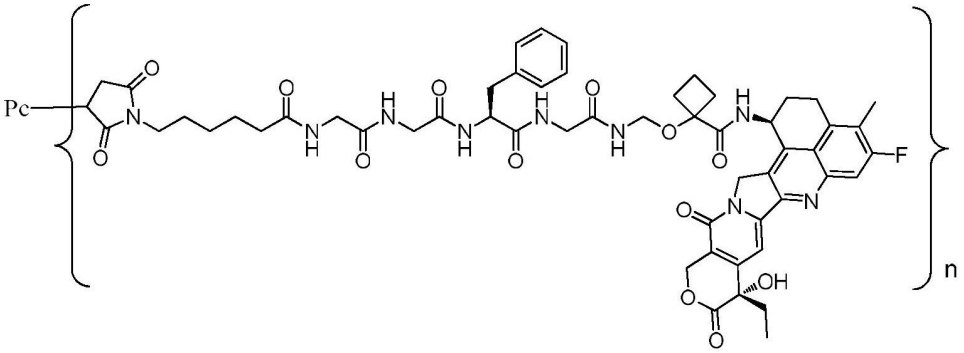

Pc
CF3
F
OH
n

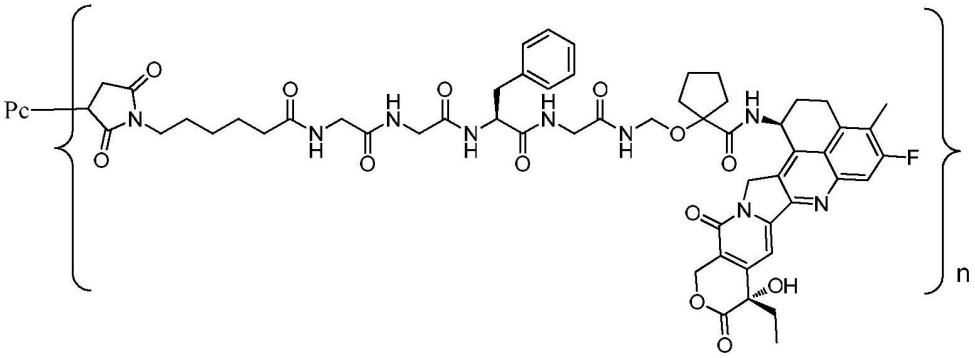

Pc
F
OH
n

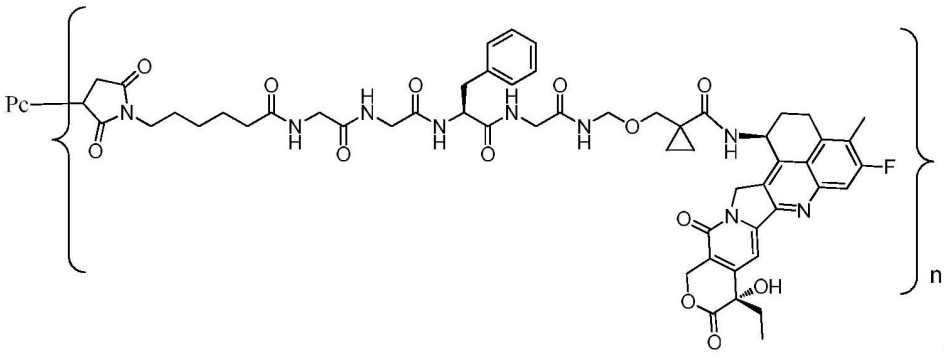

Pc
F
OH
n



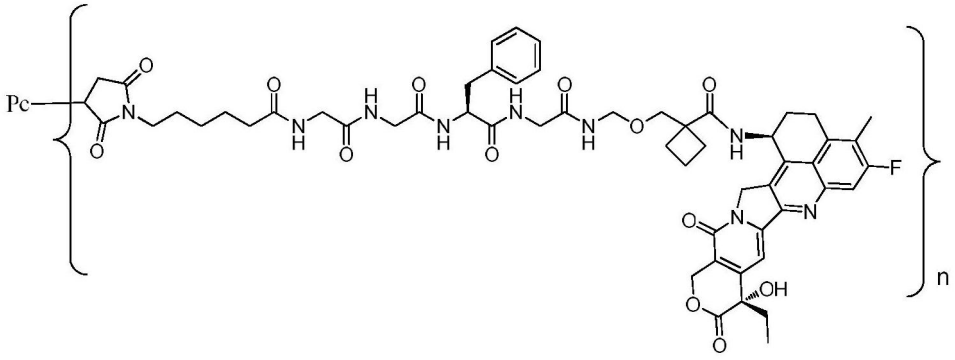






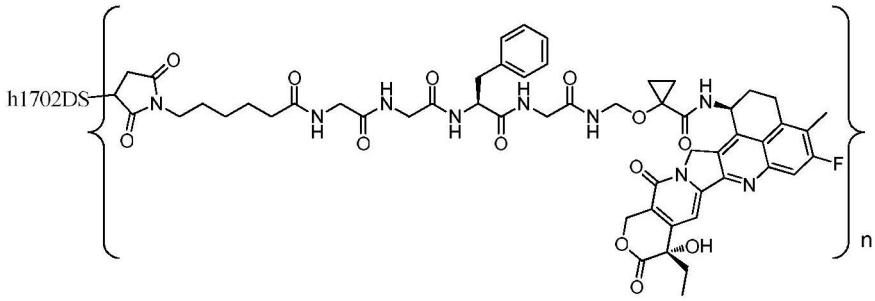


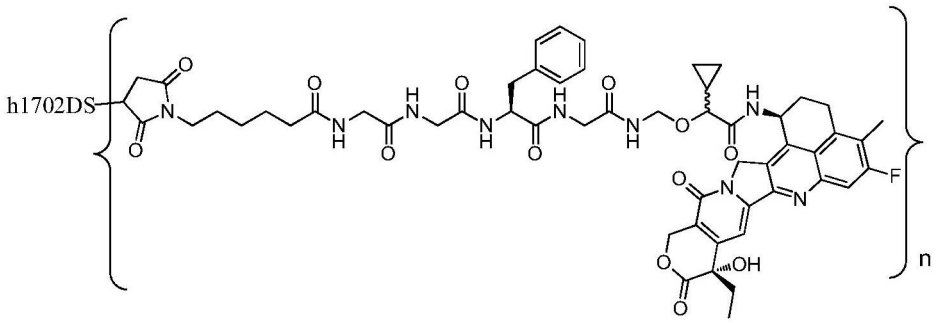
和

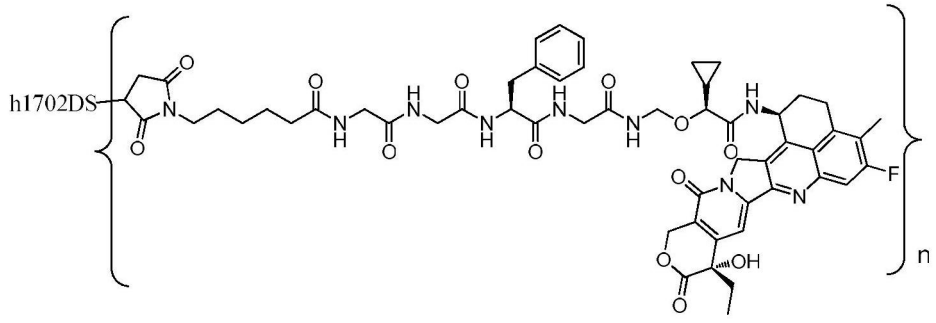


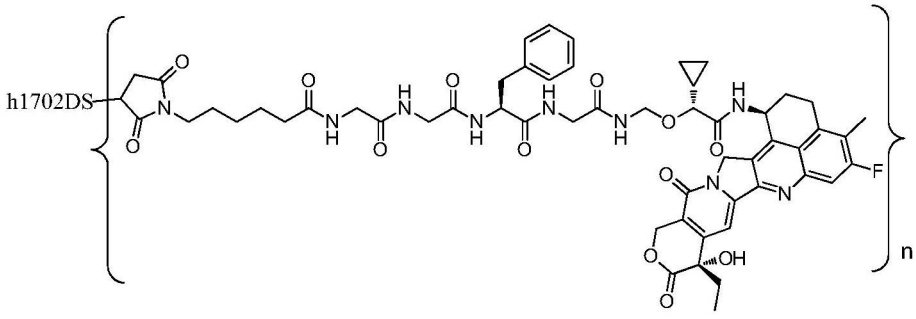
其中Pc和n如权利要求1中所定义。

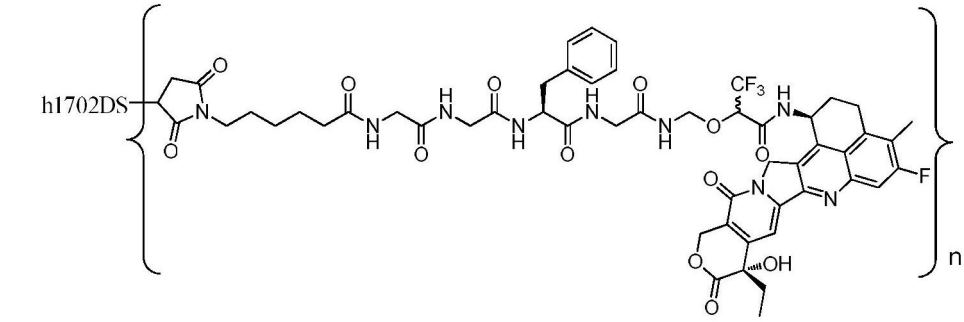
16.根据权利要求1所述的通式Pc-L-Y-Dr所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐,选自:

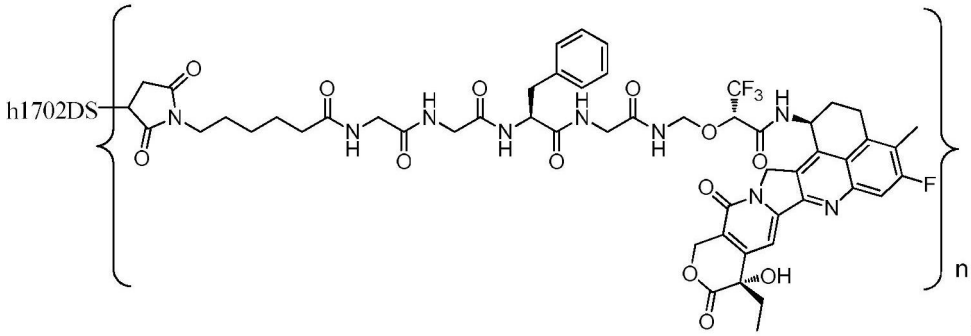




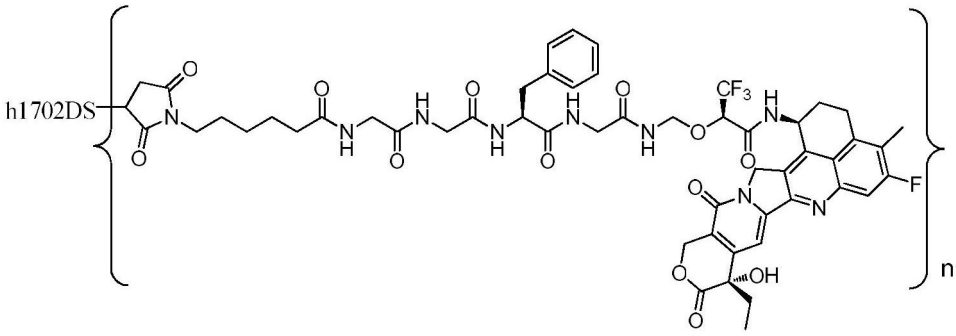








和



其中，n如权利要求1所定义。

17.一种药物组合物，其包含根据权利要求1至16中任一项所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，以及一种或多种药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。

18.根据权利要求1至16中任一项所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或根据权利要求17所述的药物组合物在制备用于治疗B7H3高表达癌症的药物中的用途。

19.根据权利要求1至16中任一项所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或根据权利要求17所述的药物组合物在制备治疗癌症的药物中的用途，其中所述癌症选自乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、肺癌、子宫癌、前列腺癌、肾癌、尿道癌、膀胱癌、肝癌、胃癌、唾液腺癌、食道癌、黑色素瘤、神经胶质瘤、神经母细胞瘤、肉瘤、咽头癌、结直肠癌、白血病、骨癌、皮肤癌、甲状腺癌、胰腺癌和淋巴瘤。

20.根据权利要求19所述的用途，其中所述子宫癌选自子宫内膜癌，结直肠癌选自结肠癌或直肠癌。

抗B7H3抗体-依喜替康类似物偶联物及其医药用途

技术领域

[0001] 本公开涉及抗B7H3抗体-依喜替康类似物偶联物,其制备方法,包含其的药物组合物,以及其用于制备治疗B7H3介导的疾病或病症的药物中的用途;尤其在用于制备抗癌药物中的用途。

背景技术

[0002] T细胞介导的免疫反应在机体抗肿瘤过程中发挥着极其重要的作用,而T细胞的活化和增殖不仅需要TCR识别抗原信号,还需要共刺激分子提供的第二信号。B7家族分子属于共刺激分子免疫球蛋白超家族,越来越多的研究表明,该家族分子在机体正常免疫功能和病理状态下均发挥了重要的调节作用。

[0003] B7H3是B7家族的成员之一,属于I型跨膜蛋白,包含氨基端的一个信号肽,一个细胞外的免疫球蛋白样可变区(IgV)和恒定区(IgC),一个跨膜区和一个含有45个氨基酸的胞质尾区(Tissue Antigens.2007 Aug;70(2):96-104)。目前,B7H3主要存在2种剪切体,B7H3a和B7H3b。B7H3a胞外段由IgV-IgC 2个免疫球蛋白结构域组成,又称为2IgB7H3,而B7H3b胞外段由IgV-IgC-IgV-IgC 4个免疫球蛋白结构域组成,又称为4IgB7H3。

[0004] B7H3蛋白在正常组织、细胞中不表达或极低表达,却高表达于多种肿瘤组织,并与肿瘤的进展、患者的生存及预后密切相关。临床上已经报道,B7H3在许多癌症中,特别是在非小细胞肺癌、肾癌、泌尿道上皮癌、结直肠癌、前列腺癌、多形性胶质母细胞瘤、卵巢癌和胰腺癌中过表达(Lung Cancer.2009 Nov;66(2):245-249;Clin Cancer Res.2008 Aug 15;14(16):5150-5157)。此外,也有文献报道,在前列腺癌中,B7H3的表达强度与临床病理学恶性(诸如肿瘤体积、前列腺外侵袭或Gleason评分)正相关,且也与癌症进展相关(Cancer Res.2007 Aug 15;67(16):7893-7900)。类似地,在多形性胶质母细胞瘤中,B7H3的表达与无事件存活负相关,且在胰腺癌中,B7H3的表达与淋巴结转移和病理学进展相关。因此,B7H3被认为是一种新的肿瘤标志物和潜在的治疗靶点。

[0005] 目前,已有针对B7H3靶点的治疗策略用于临床前研究,如靶向小鼠B7H3的抗体会增强瘤内的浸润性的CD8-阳性的T细胞和抑制肿瘤生长(Mod Pathol.2010 Aug;23(8):1104-1112)。此外,WO 2008/066691显示,识别B7H3变体B7H3a的抗体会对腺癌表现出体内抗肿瘤作用。在临床研究中,一种鼠源的B7H3抗体与放射性I^{131}的偶联药物可显著抑制患者成神经母细胞瘤的生长[J Neufooocol 97(3):409-18(2010)]。但目前在研的项目都是鼠源抗体经人源化改造的人源化抗体,而人源化抗体在免疫时存在免疫原性相对较高的问题,在人体应用时是一个不利的因素。

[0006] 噬菌体展示技术(phage display technology)是将外源蛋白质或多肽与噬菌体外壳蛋白融合表达,从而将外源蛋白表达在噬菌体的表面。噬菌体抗体库是将噬菌体展示技术、PCR扩增技术、蛋白表达技术相结合的一项运用综合技术手段所建立起来的抗体库。

[0007] 噬菌体抗体库最大的优点是不经体内免疫,模拟体内抗体生成的三个过程而制备出全人源的抗体。除此之外,噬菌体抗体库还具有以下优势:①实现了基因型与表型的统

一;此外,实验方法简单、快速,传统的通过杂交瘤技术抗体产生方法需历经数月,而抗体库技术只需短短几周的时间;②表达的是完全人抗体,且分子量小,主要以活性片段Fab、scFv的形式表达,与完整抗体相比在组织穿透力方面都有明显优势;③筛选容量大,杂交瘤技术是在上千个克隆内筛选,抗体库技术可以在百万甚至亿万个分子中进行选择,筛选到的抗体种类多;④用途广泛,采用了原核表达系统,当大规模生产时优势更加明显(Curr Opin Biotechnol.2002 Dec;13(6):598-602;Immunotechnology,2013,48(13)48(13):63-73)。

[0008] 抗体-药物偶联物(antibody drug conjugate,ADC)将单克隆抗体或者抗体片段通过稳定的化学接头化合物与具有生物活性的细胞毒素相连,充分利用了抗体对正常细胞和肿瘤细胞表面抗原结合的特异性和细胞毒性物质的高效性,同时又避免了前者疗效偏低和后者毒副作用过大等缺陷。这也就意味着,与以往传统的化疗药物相比,抗体-药物偶联物能更精准地结合肿瘤细胞并降低将对正常细胞的影响。

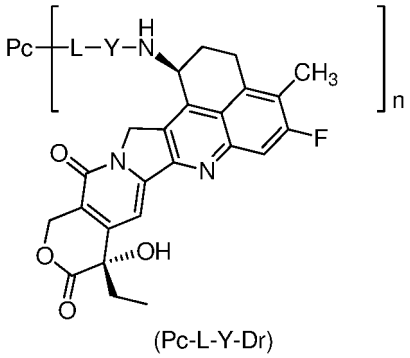
[0009] 目前已有多种ADC药物被用于临床或临床研究,如Kadcyla,是靶向Her2的曲妥珠单抗与DM1形成的ADC药物。同时,也有靶向B7H3的抗体及ADC药物的专利报道,如WO2008100934、WO2012147713、WO2014061277、WO2015184203、WO2016044383。

[0010] 用于抗体药物偶联物的具有细胞毒性的小分子有几类;其中有一类是喜树碱衍生物,它们通过抑制拓卜异构酶I而具有抗肿瘤作用的。报道喜树碱衍生物依沙替康(化学名:(1S,9S)-1-氨基-9-乙基-5-氟-2,3-二氢-9-羟基-4-甲基-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]咪唑并[1,2-b]喹啉-10,13(9H,15H)-二酮)应用于抗体偶联药物(ADC)的文献有WO2014057687;Clinical Cancer Research(2016)22(20):5097-5108;Cancer Sci(2016)107:1039-1046。但仍需进一步开发疗效更好的ADC药物。

发明内容

[0011] 本公开涉及抗B7H3抗体的ADC及其用途,其中提供与B7H3的胞外区的氨基酸序列或三维结构结合的单克隆抗体或抗原结合片段与细胞毒性物质依喜替康类似物偶联的ADC药物。

[0012] 因此,本公开的目的为提供一种通式(Pc-L-Y-Dr)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物:

[0013] 

(Pc-L-Y-Dr)

[0014] 其中:

[0015] Y选自-O-$(CR^aR^b)_m$-CR^1R^2-C(O)-、-O-CR^1R^2-$(CR^aR^b)_m$-、-O-CR^1R^2-、-NH-$(CR^aR^b)_m$-CR^1R^2-C(O)-或-S-$(CR^aR^b)_m$-CR^1R^2-C(O)-;

[0016] R^a和R^b相同或不同,且各自独立地选自氢原子、氘原子、卤素、烷基、卤代烷基、氘代

烷基、烷氧基、羟基、氨基、氰基、硝基、羟烷基、环烷基或杂环基；

[0017] 或者，R^a和R^b与其相连接的碳原子一起形成环烷基或杂环基；

[0018] R^1选自卤素、卤代烷基、氘代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基或杂芳基；

[0019] R^2选自氢原子、卤素、卤代烷基、氘代烷基、环烷基、环烷基烷基、烷氧基烷基、杂环基、芳基或杂芳基；

[0020] 或者，R^1和R^2与其相连接的碳原子一起形成环烷基或杂环基；

[0021] 或者，R^a和R^2与其相连的碳原子一起形成环烷基或杂环基；

[0022] m为0至4的整数；

[0023] n为1至10，任选自约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10；可以为整数，也可以为小数；

[0024] L为接头单元；

[0025] Pc为抗B7H3抗体或其抗原结合片段。

[0026] 本公开的一些实施方案中，提供的通式(Pc-L-Y-Dr)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中所述抗B7H3抗体或其抗原结合片段包含：

[0027] 分别如SEQ ID NO:8、9和10氨基酸序列所示的重链HCDR1、HCDR2、HCDR3，或与SEQ ID NO:8、9和10所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3分别具有3、2或1个氨基酸差异的HCDR变体；和

[0028] 分别如SEQ ID NO:11、12和13氨基酸序列所示的轻链LCDR1、LCDR2和LCDR3，或与SEQ ID NO:11、12和13所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3分别具有3、2或1个氨基酸差异的LCDR变体。

[0029] 本公开的一些实施方案中，通式(Pc-L-Y-Dr)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中所述抗B7H3抗体或其抗体结合片段的轻链可变区上的轻链FR区来源于人种系轻链序列或其突变序列，和/或重链可变区上的重链FR区来源于人种系重链序列或其突变序列。

[0030] 本公开的一些实施方案中，通式(Pc-L-Y-Dr)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中所述抗B7H3抗体或其抗原结合片段包含选自如下所示的重链可变区和/或轻链可变区：

[0031] 其中所述重链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示或与其具有至少95％序列同一性，所述轻链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示或与其具有至少95％序列同一性。

[0032] 本公开的一些实施方案中，通式(Pc-L-Y-Dr)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中所述抗B7H3抗体或其抗原结合片段包含抗体恒定区；所述抗体恒定区的重链恒定区来源于人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4或与其具有至少95％序列同一性，所述抗体恒定区的轻链恒定区来源于人抗体κ、λ链或与其具有至少95％序列同一性；优选地，所述重链恒定区的氨基酸序列源于人IgG1或与其具有至少95％序列同一性。

[0033] 本公开的一些实施方案中，通式(Pc-L-Y-Dr)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中所述Pc为全长抗体；其中所述的全长抗体选自：

[0034] 由SEQ ID NO:14所示的重链序列和SEQ ID NO:15所示的轻链序列组成的h1702抗体，和

[0035] 由SEQ ID NO:14所示的重链序列和SEQ ID NO:16所示的轻链序列组成的h1702DS抗体。

[0036] 本公开的一些实施方案中，通式(Pc-L-Y-Dr)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中所述抗原结合片段选自Fab、Fab′、F(ab′)2、单链抗体(scFv)、二聚化的V区(双抗体)、二硫键稳定化的V区(dsFv)和包含CDR的肽的抗原结合片段。

[0037] 本公开的一些实施方案中，通式(Pc-L-Y-Dr)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中，R^1为卤代烷基或C_{3-6}环烷基。

[0038] 本公开的一些实施方案中，通式(Pc-L-Y-Dr)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中，R^2为氢原子。

[0039] 本公开的一些实施方案中，通式(Pc-L-Y-Dr)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中，R^1为C_{3-6}环烷基；R^2为氢原子。

[0040] 本公开的一些实施方案中，通式(Pc-L-Y-Dr)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，

[0041] 其中：

[0042] Y为$-O-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$；

[0043] R^a和R^b相同或不同，且各自独立地选自氢原子、氘原子、卤素或烷基；

[0044] R^1为卤代烷基或C_{3-6}环烷基；

[0045] R^2选自氢原子、卤代烷基或C_{3-6}环烷基；

[0046] 或者，R^1和R^2与其相连接的碳原子一起形成C_{3-6}环烷基；

[0047] m为0或1。

[0048] 本公开的一些实施方案中，通式(Pc-L-Y-Dr)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，

[0049] 其中：

[0050] Y为$-O-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$；

[0051] R^a和R^b相同或不同，且各自独立地选自氢原子、氘原子、卤素或烷基；

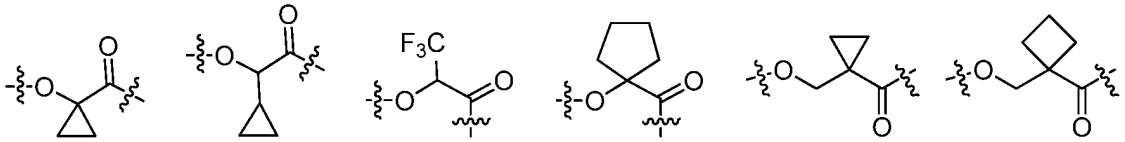
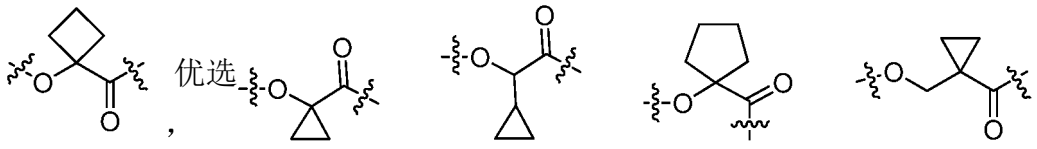
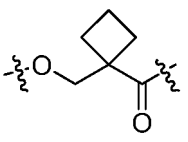
[0052] R^1为C_{3-6}环烷基；

[0053] R^2选自氢原子；

[0054] 或者，R^1和R^2与其相连接的碳原子一起形成C_{3-6}环烷基；

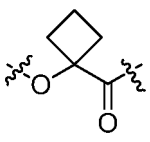
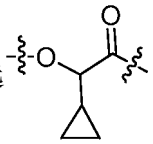
[0055] m为0。

[0056] 本公开的一些实施方案中，通式(Pc-L-Y-Dr)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中Y选自：

[0057] 


优选

和

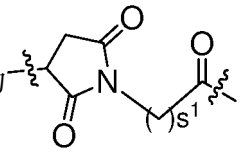
，

和

最优选

。

[0058] 本公开的一些实施方案中，通式(Pc-L-Y-Dr)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中Y的O端与接头单元L相连。

[0059] 本公开的一些实施方案中，通式(Pc-L-Y-Dr)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中n为2至8，优选为5至9，最优选为7.5；非限制性实施例包括3、4、5、6、7.2、7.5、8、8.5、9。

[0060] 本公开的一些实施方案中，通式(Pc-L-Y-Dr)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中接头单元-L-为$-L^1-L^2-L^3-L^4-$，

[0061] L^1为  ，s^1为2至8的整数；

[0062] L^2为化学键；

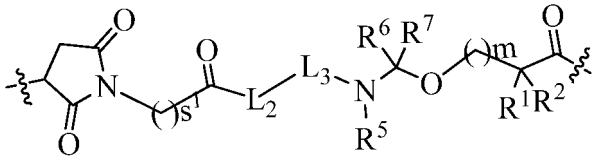
[0063] L^3为四肽残基；

[0064] L^4为$-NR^5(CR^6R^7)t-$，R^5、R^6或R^7相同或不同，且各自独立地为氢原子或烷基，t为1或2。

[0065] 本公开的一些实施方案中，通式(Pc-L-Y-Dr)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中所述的接头单元-L-，其L^1端与配体相连，L^4端与Y相连。

[0066] 本公开的一些实施方案中，通式(Pc-L-Y-Dr)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中所述的L^3的四肽残基为由两个或多个选自苯丙氨酸(E)、甘氨酸(G)、缬氨酸(V)、赖氨酸(K)、瓜氨酸、丝氨酸(S)、谷氨酸(E)、天冬氨酸(N)中的氨基酸形成的氨基酸残基；优选为GGFG(甘氨酸-甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸)的四肽残基。

[0067] 本公开的一些实施方案中，通式(Pc-L-Y-Dr)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中所述-L-Y-为以下结构：

[0068] 

[0069] L^2为化学键；

[0070] L^3为GGFG的四肽残基；

[0071] R^1为卤代烷基或C_{3-6}环烷基；

[0072] R^2选自氢原子、卤代烷基或C_{3-6}环烷基；

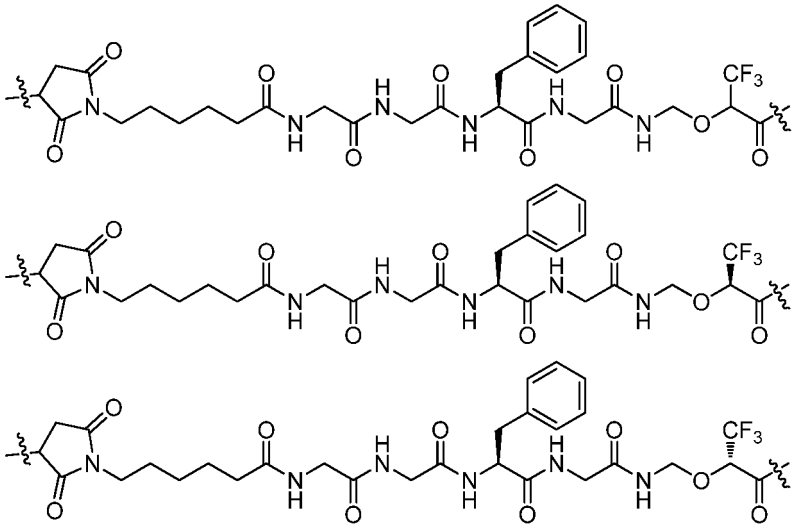
[0073] 或者，R^1和R^2与其相连接的碳原子一起形成C_{3-6}环烷基；

[0074] R^5、R^6或R^7相同或不同，且各自独立地为氢原子或烷基；

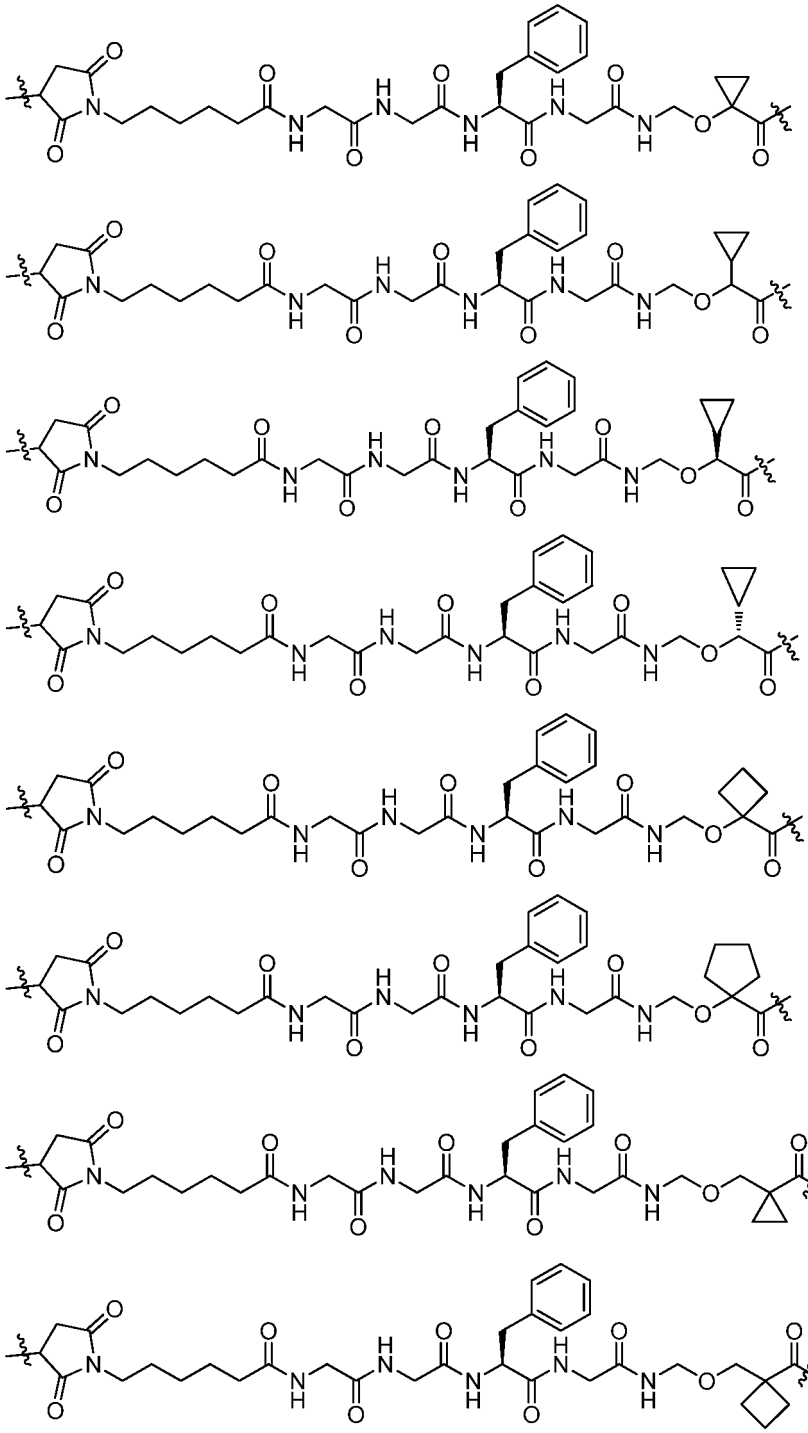
[0075] s^1为2至8的整数；

[0076] m为0至4的整数。

[0077] 本公开的一些实施方案中，通式(Pc-L-Y-Dr)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中-L-Y-选自：

[0078] 

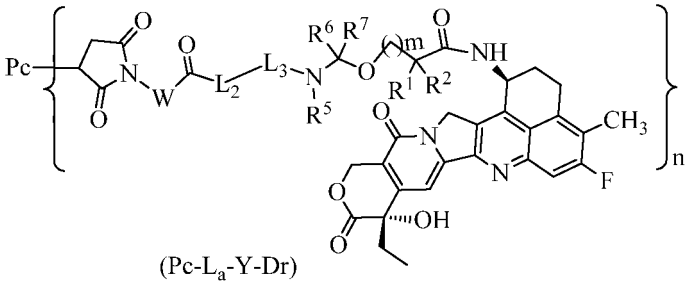
[0079]



和

。

[0080] 本公开的一些实施方案中，通式(Pc-L-Y-Dr)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其为通式(Pc-L_a-Y-Dr)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物：

[0081] 

(Pc-L_a-Y-Dr)

[0082] 其中：

[0083] W选自C_{1-8}烷基、C_{1-8}烷基-环烷基或1至8个原子的直链杂烷基，所述杂烷基包含1至3个选自N、O或S的杂原子，其中所述的C_{1-8}烷基、环烷基和直链杂烷基各自独立地任选进一步被选自卤素、羟基、氰基、氨基、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和环烷基的一个或多个取代基所取代；

[0084] L^2选自$-NR^4(CH_2CH_2O)_{p1}CH_2CH_2C(O)-$、$-NR^4(CH_2CH_2O)_{p1}CH_2C(O)-$、$-S(CH_2)_{p1}C(O)-$或化学键，$p^1$为1至20的整数，优选1-6；

[0085] L^3为由2至7个氨基酸构成的肽残基，氨基酸可以是取代的或非取代的，当被取代时，取代基可以在任何可使用的连接点上被取代，所述取代基为一个或多个独立地选自卤素、羟基、氰基、氨基、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和环烷基；

[0086] R^1选自卤素、卤代烷基、氘代烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基；

[0087] R^2选自氢原子、卤素、卤代烷基、氘代烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基；

[0088] 或者，R^1和R^2与其相连接的碳原子一起形成环烷基或杂环基；

[0089] R^4和R^5相同或不同，且各自独立地选自氢原子、烷基、卤代烷基、氘代烷基和羟烷基；

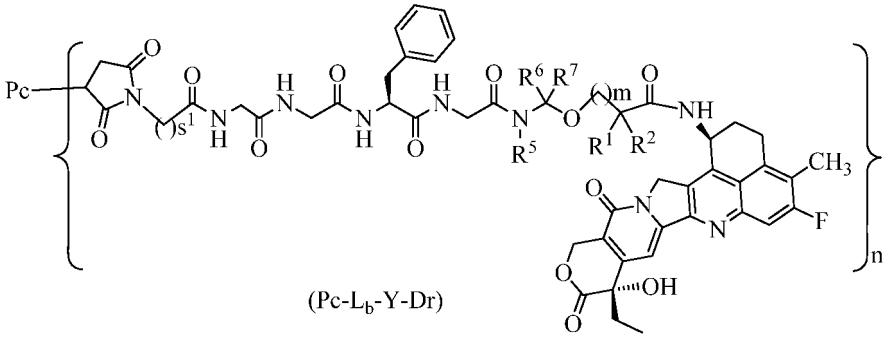
[0090] R^6和R^7相同或不同，且各自独立地选自氢原子、卤素、烷基、卤代烷基、氘代烷基和羟烷基；

[0091] m为0至4的整数；

[0092] n为1至10，可以为整数，也可以为小数；

[0093] Pc为抗B7H3抗体或其抗原结合片段。

[0094] 本公开的一些实施方案中，通式(Pc-L-Y-Dr)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其为通式(Pc-L_b-Y-Dr)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物：

[0095] 

(Pc-L_b-Y-Dr)

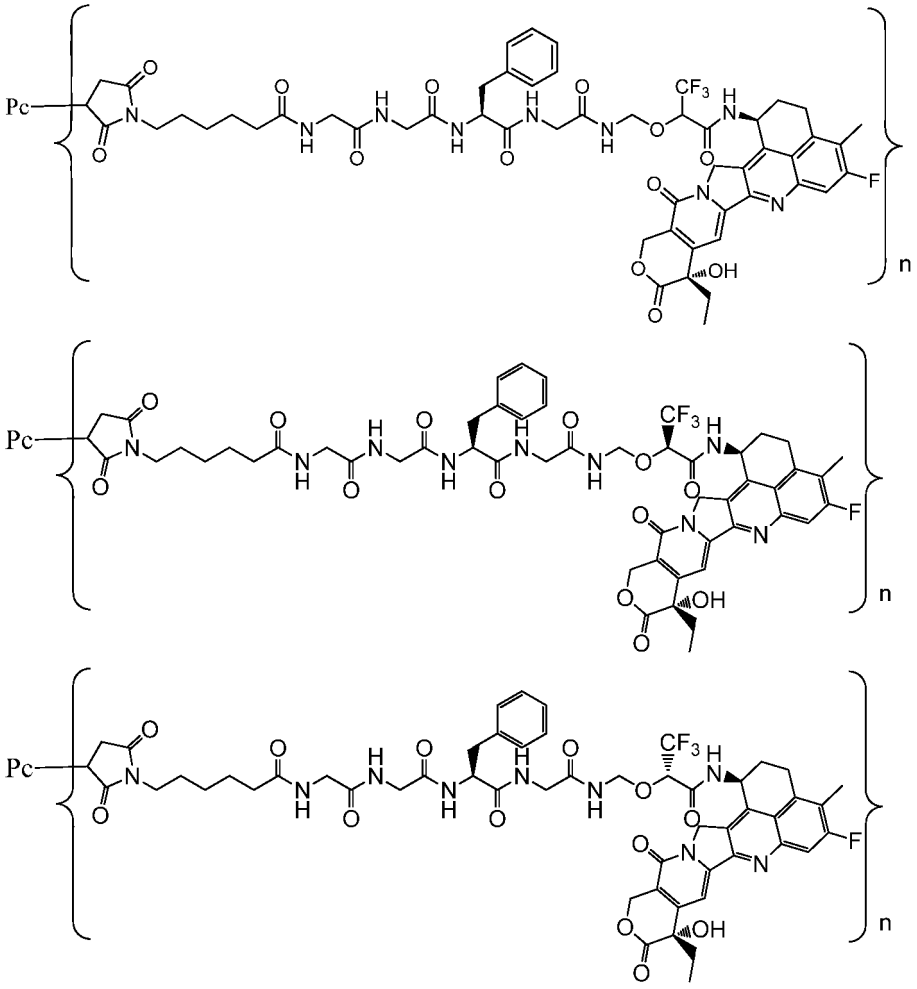
[0096] 其中：

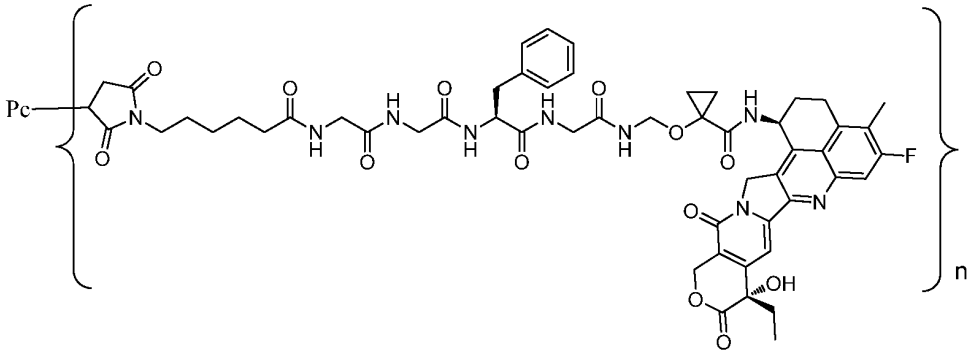
[0097] s^1为2至8的整数；优选5；

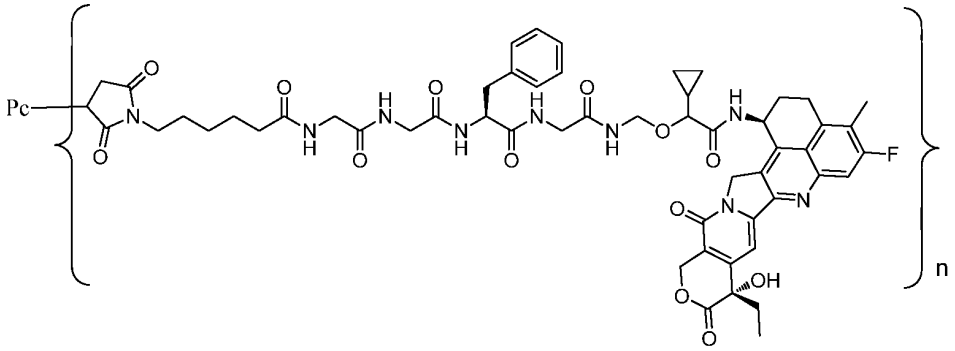
[0098] R^1、R^2、R^5～R^7、m和n如通式(Pc-L_a-Y-Dr)中所定义。

[0099] 本公开的一些实施方案中,通式(Pc-L-Y-Dr)所示的的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物,所述配体-药物偶联物选自:

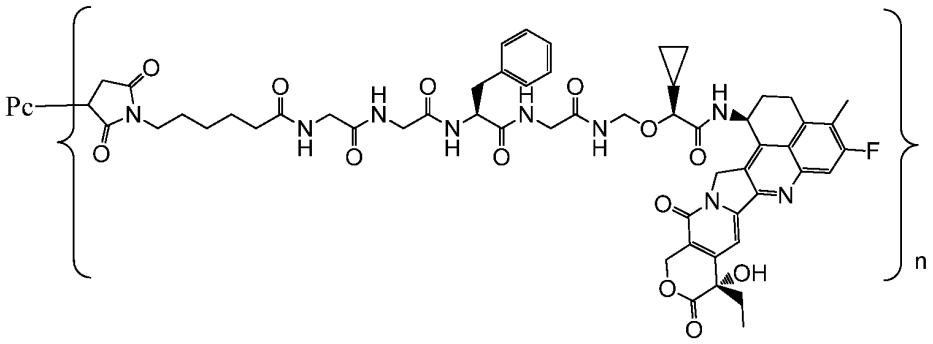
[0100]

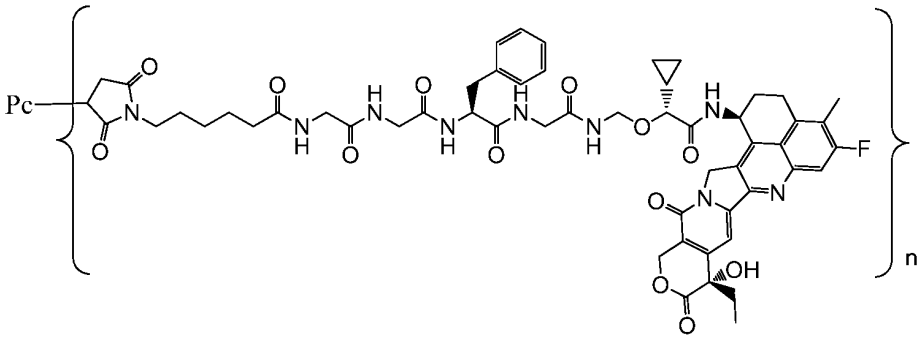


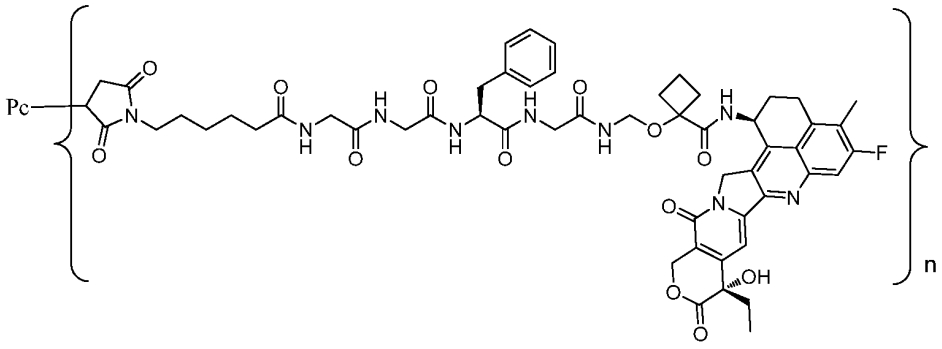


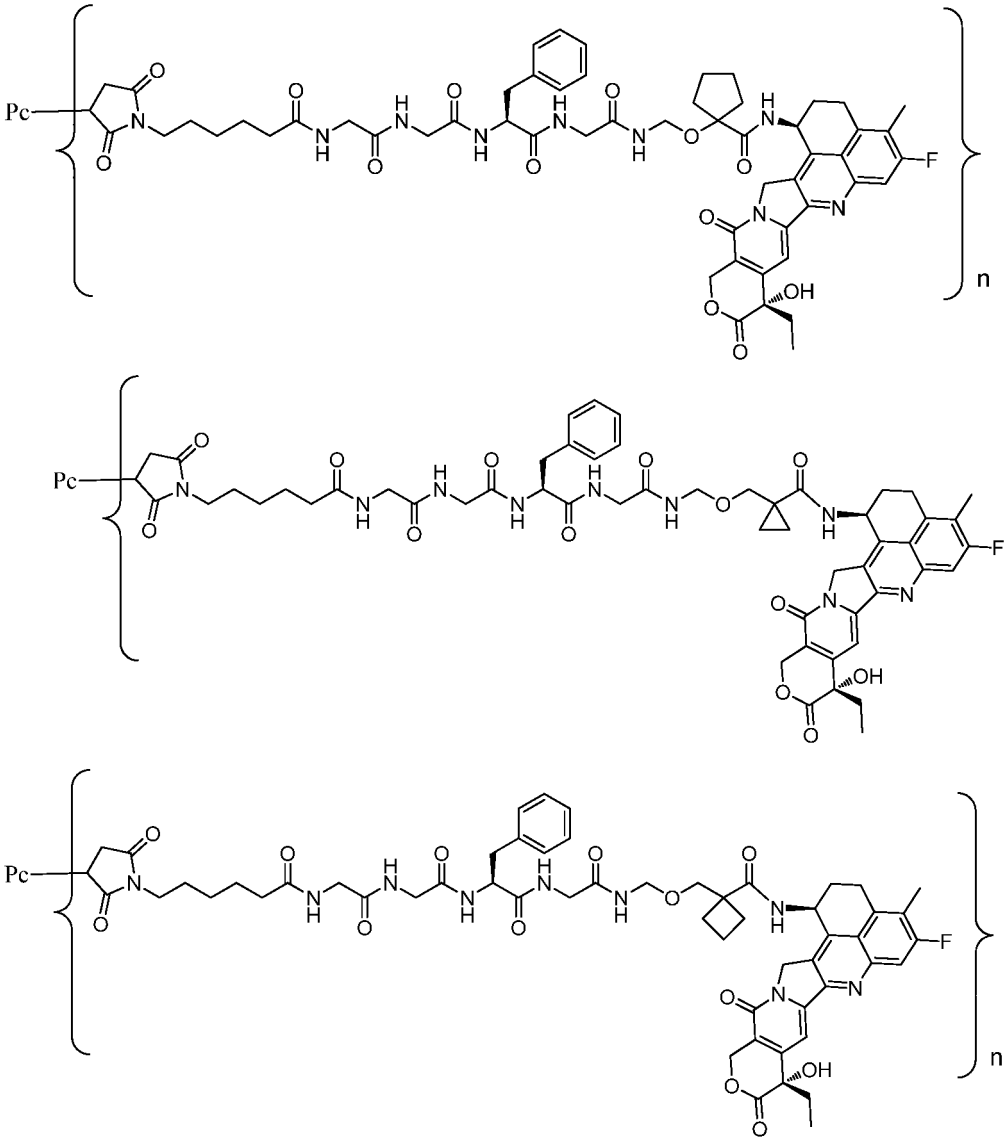


[0101]







[0102] 

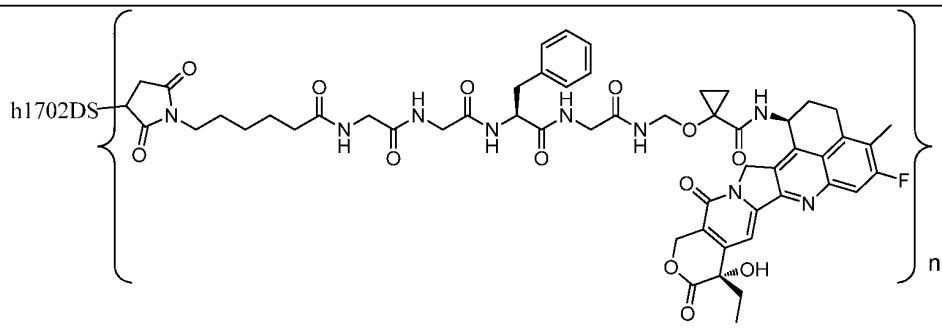
和

；

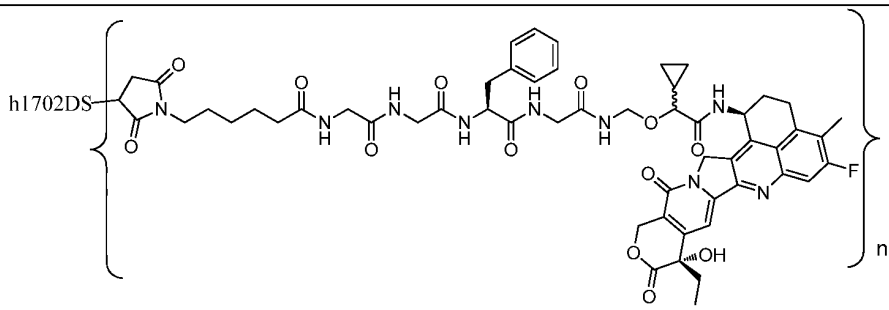
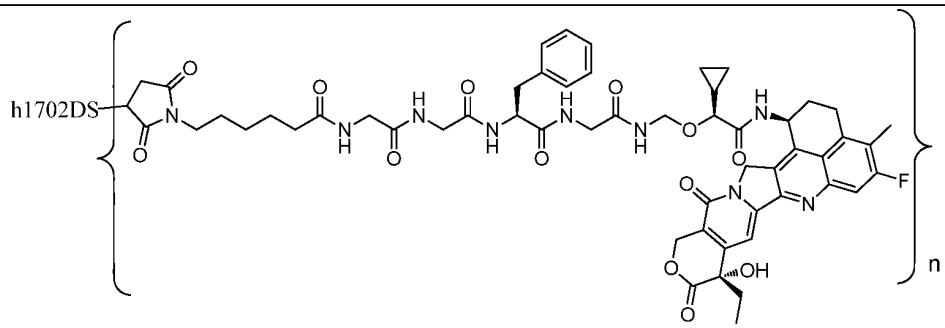
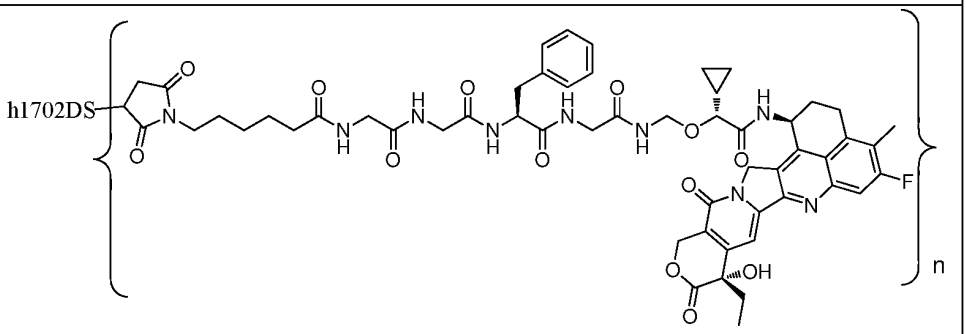
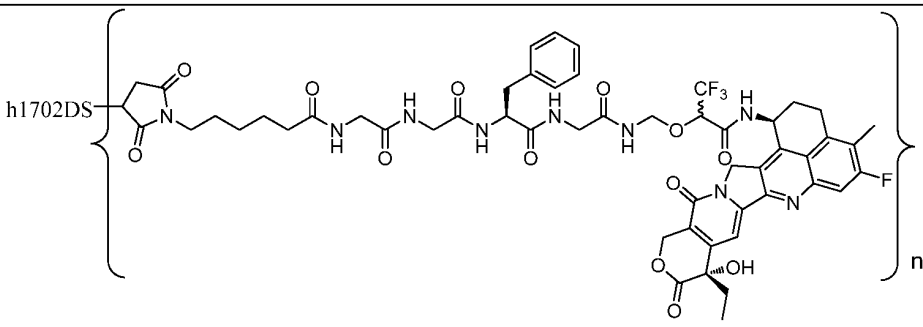
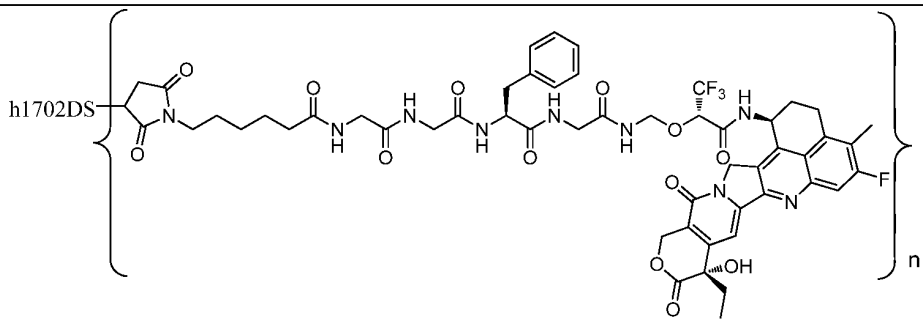
[0103] 其中Pc和n如通式(Pc-L-Y-Dr)中所定义。

[0104] 本公开典型的通式(Pc-L-Y-Dr)所示的配体-药物偶联物包括，但不限于：

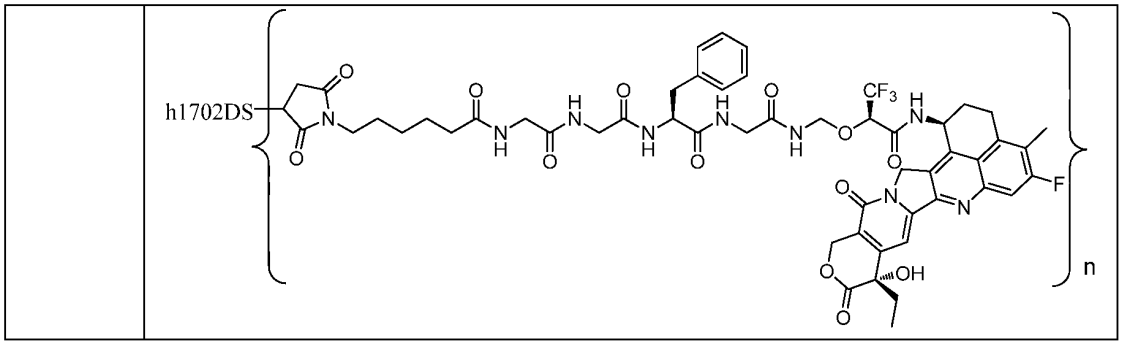
[0105]

实施例编号	ADC 结构通式
ADC-1	

[0106]

	
	
ADC-2	
ADC-3	
	

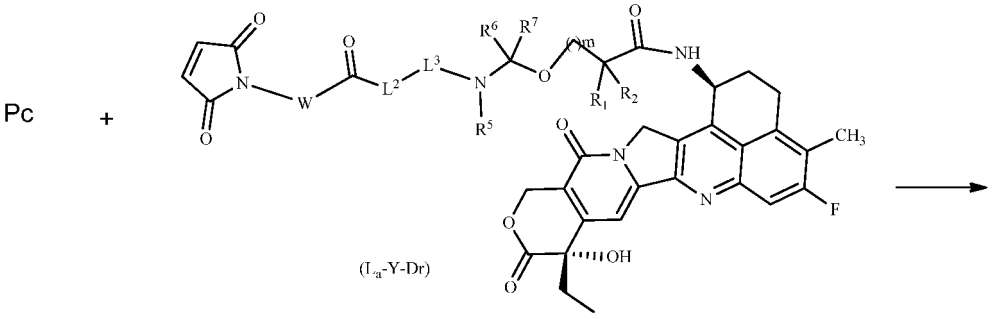
[0107]



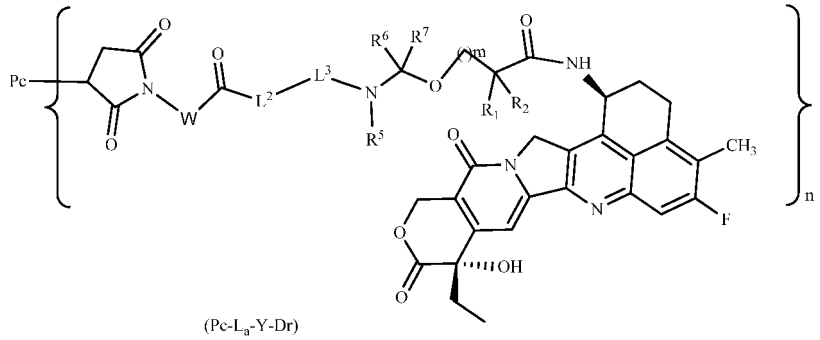
[0108] 或其药学上可接受的盐或溶剂化物；

[0109] 其中n可以为0至10的非零整数或小数，优选为1-10之间的整数或小数；更优选为2至8，可以为整数，也可以为小数；最优选为3至8，可以为整数，也可以为小数。

[0110] 本公开进一步提供一种制备如通式(Pc-L_a-Y-Dr)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物的方法，其包括以下步骤：



[0111]



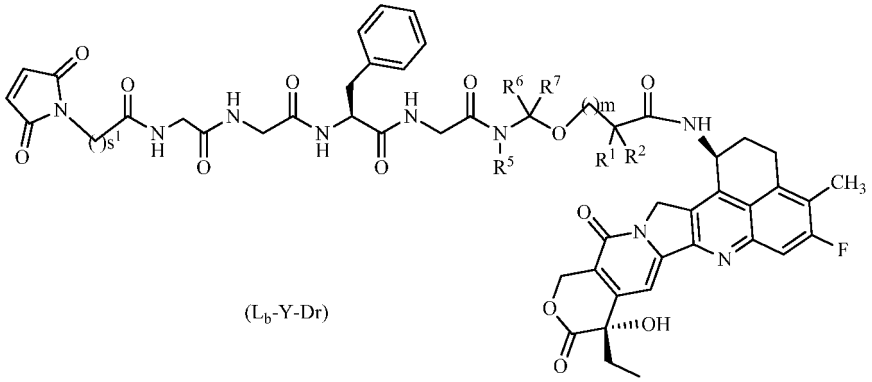
[0112] Pc还原后，与通式(L_a-Y-Dr)偶联反应，得到通式(Pc-L_a-Y-Dr)所示的化合物；所述的还原剂优选TCEP；

[0113] 其中：

[0114] Pc为抗B7H3抗体或其抗原结合片段；

[0115] W、L^2、L^3、R^1、R^2、R^5～R^7、m和n如通式(Pc-L_a-Y-Dr)中所定义。

[0116] 在另一个实施方式中，提供另一种方法，其中所述的通式L_a-Y-Dr为通式L_b-Y-Dr所示的化合物：

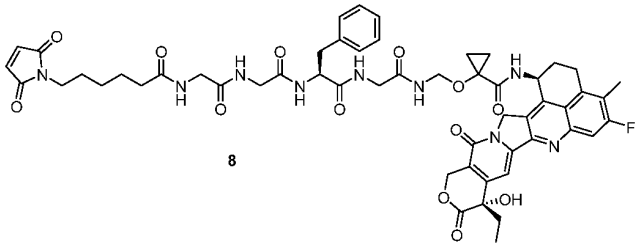
[0117] 

(L_b-Y-Dr)

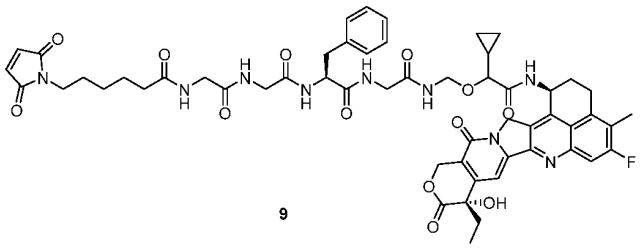
[0118] 或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、或其混合物形式，或其可药用的盐，

[0119] 其中R^1、R^2、R^5～R^7、s^1和m如通式Pc-L_b-Y-Dr中所定义。

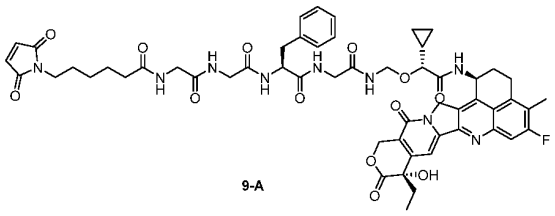
[0120] 在本公开的一个优选的实施方案中，根据本公开所述的通式(Pc-L_a-Y-Dr)或通式(Pc-L_b-Y-Dr)所示的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物的方法，其中通式(L_a-Y-Dr)所示的化合物或通式(L_b-Y-Dr)所示的化合物选自：



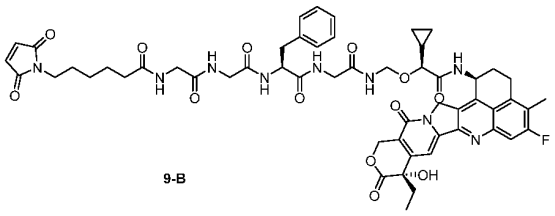
8



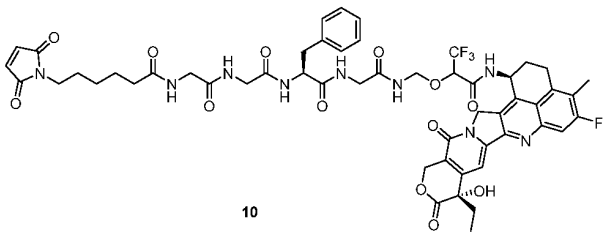
9

[0121] 

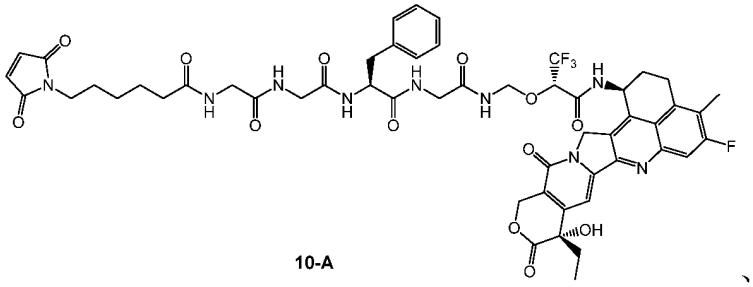
9-A



9-B



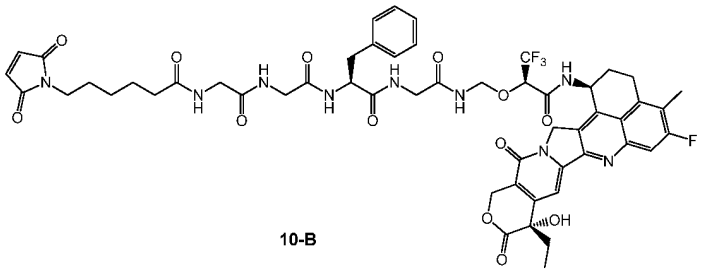
10



10-A

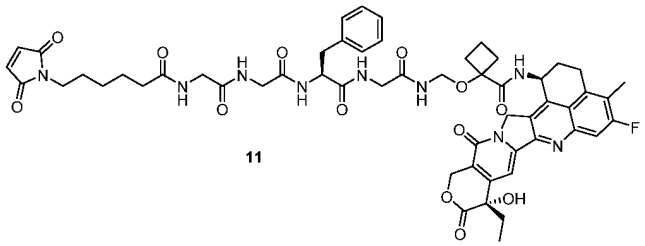
、

[0122]



10-B

和



11

。

[0123] 另一方面，本公开提供一种药物组合物，其包含根据本公开所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，以及一种或多种可药用的赋形剂、稀释剂或载体。

[0124] 另一方面，本公开提供根据本公开所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物或包含其的药物组合物在制备用于治疗B7H3介导的疾病或病症的药物中的用途。其中所述B7H3介导的疾病或病症为B7H3高表达癌症。

[0125] 另一方面，本公开提供根据本公开所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物或包含其的药物组合物在制备用于治疗或预防肿瘤的药物中的用途；其中所述癌症优选选自乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、肺癌、子宫癌、前列腺癌、肾癌、尿道癌、膀胱癌、卵巢癌、肝癌、胃癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、食道癌、黑色素瘤、神经胶质瘤、神经母细胞瘤、肉瘤、咽头癌、肺癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、白血病、骨癌、皮肤癌、甲状腺癌、胰腺癌或淋巴瘤。

[0126] 另一方面，本公开进一步涉及一种用于治疗和/或预防肿瘤的方法，该方法包括向需要其的患者施用治疗有效剂量的根据本公开所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物或包含其的药物组合物；优选其中所述的肿瘤为与B7H3高表达相关的癌症。

[0127] 另一方面，本公开进一步涉及一种用于治疗或预防癌症的方法，该方法包括向需要其的患者施用治疗有效剂量的根据本公开所述的配体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物或包含其的药物组合物；其中所述癌症优选选自乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、肺癌、子宫癌、前列腺癌、肾癌、尿道癌、膀胱癌、卵巢癌、肝癌、胃癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、食道癌、黑色素瘤、神经胶质瘤、神经母细胞瘤、肉瘤、咽头癌、肺癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、白血病、骨癌、皮肤癌、甲状腺癌、胰腺癌或淋巴瘤。

[0128] 可将活性化合物制成适合于通过任何适当途径给药的形式，活性化合物优选是以单位剂量的方式，或者是以患者可以以单剂自我给药的方式。本公开化合物或组合物的单位剂量的表达方式可以是片剂、胶囊、扁囊剂、瓶装药水、药粉、颗粒剂、锭剂、栓剂、再生药粉或液体制剂。

[0129] 本公开治疗方法中所用化合物或组合物的剂量通常将随疾病的严重性、患者的体重和化合物的相对功效而改变。不过，作为一般性指导，合适的单位剂量可以是0.1～1000mg。

[0130] 本公开的药物组合物除活性化合物外，可含有一种或多种辅料，所述辅料选自以下成分：填充剂(稀释剂)、粘合剂、润湿剂、崩解剂或赋形剂等。根据给药方法的不同，组合物可含有0.1至99重量％的活性化合物。

附图说明

[0131] 图1：B7H3抗体在U87MG细胞上的内吞效果。

[0132] 图2A-图2F：本公开ADC对不同肿瘤细胞的增殖抑制结果。图2A为不同ADC在A498细胞上的增殖抑制实验结果；图2B为不同ADC在Calu-6细胞上的增殖抑制实验结果；图2C为不同ADC在U87细胞上的增殖抑制实验结果；图2D为不同ADC在A375细胞上的增殖抑制实验结果；图2E为不同ADC在Detroit562细胞上的增殖抑制实验结果，图2F为不同ADC在CHOK1细胞上的增殖抑制实验结果。

[0133] 图3：测试例7中腹腔注射本公开ADC-8(1mpk，3mpk)和ADC-5(1mpk，3mpk)对U87MG裸小鼠移植瘤的抑制作用。

[0134] 图4：测试例8中腹腔注射本公开ADC-2(1mpk，3mpk)和ADC-1(1mpk，3mpk)对Detroit 562裸小鼠移植瘤的抑制作用。

[0135] 图5A：测试例9中本公开ADC-4、ADC-6和ADC-7在Detroit562细胞上的增殖抑制率。

[0136] 图5B：测试例9中本公开ADC-4、ADC-6和ADC-7在Calu-6细胞上的增殖抑制率。

[0137] 图5C：测试例9中本公开ADC-4、ADC-6和ADC-7在CHOK12细胞上的增殖抑制率。

[0138] 图6：测试例10中本公开ADC-4的血浆稳定性结果。

具体实施方式

[0139] 发明详述

[0140] 一、术语

[0141] 除非另有限定，本文所用的所有技术和科学术语均与本公开所属领域普通技术人员的通常理解一致。虽然也可采用与本文所述相似或等同的任何方法和材料实施或测试本公开，但本文描述了优选的方法和材料。描述和要求保护本公开时，依据以下定义使用下列术语。

[0142] 当本公开中使用商品名时，申请人旨在包括该商品名产品的制剂、该商品名产品的非专利药和活性药物部分。

[0143] 除非有相反陈述，在说明书和权利要求书中使用的术语具有下述含义。

[0144] 术语“药物”是指细胞毒性药物，药物表示为Dr，能在肿瘤细胞内具有较强破坏其正常生长的化学分子。细胞毒性药物原则上在足够高的浓度下都可以杀死肿瘤细胞，但是

由于缺乏特异性，在杀伤肿瘤细胞的同时，也会导致正常细胞的凋亡，导致严重的副作用。该术语包括毒素，如细菌、真菌、植物或动物来源的小分子毒素或酶活性毒素，放射性同位素(例如At^{211}、I^{131}、I^{125}、Y^{90}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Bi^{212}、P^{32}和Lu的放射性同位素)，毒性药物，化疗药物，抗生素和核溶酶，优选为毒性药物。

[0145] 术语“接头单元(或连接片段)”是指一端与配体连接而另一端与药物相连的化学结构片段或键，也可以连接其他接头后再与药物相连。本公开的优选方案表示为L和L^1至L^4，其中L^1端与配体相连，L^4端与结构单元Y相连后与药物(Dr)相连。

[0146] 接头，包括延伸物、间隔物和氨基酸单元，可以通过本领域已知方法合成，诸如US2005-0238649A1中所记载的。接头可以是便于在细胞中释放药物的“可切割接头”。例如，可使用酸不稳定接头(例如腙)、蛋白酶敏感(例如肽酶敏感)接头、光不稳定接头、二甲基接头、或含二硫化物接头(Chari等，Cancer Research 52:127-131(1992)；美国专利No.5,208,020)。

[0147] 术语“配体-药物偶联物”指配体通过稳定的连接单元与具有生物活性的药物相连。在本公开中“配体-药物偶联物”优选为抗体-药物偶联物(antibody drug conjugate，ADC)，指将单克隆抗体或者抗体片段通过稳定的连接单元与具有生物活性的毒性药物相连。

[0148] 本公开所用氨基酸三字母代码和单字母代码如J.biol.chem,243,p3558(1968)中所述。

[0149] 术语“抗体”指免疫球蛋白，是由两条相同的重链和两条相同的轻链通过链间二硫键连接而成的四肽链结构。免疫球蛋白重链恒定区的氨基酸组成和排列顺序不同，故其抗原性也不同。据此，可将免疫球蛋白分为五类，或称为免疫球蛋白的同种型，即IgM、IgD、IgG、IgA和IgE，其相应的重链分别为μ链、δ链、γ链、α链、和ε链。同一类Ig根据其铰链区氨基酸组成和重链二硫键的数目和位置的差别，又可分为不同的亚类，如IgG可分为IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。轻链通过恒定区的不同分为κ链或λ链。五类Ig中每类Ig都可以有κ链或λ链。

[0150] 抗体重链和轻链靠近N端的约110个氨基酸的序列变化很大，为可变区(Fv区)；靠近C端的其余氨基酸序列相对稳定，为恒定区。可变区包括3个高变区(HVR)和4个序列相对保守的骨架区(FR)。3个高变区决定抗体的特异性，又称为互补性决定区(CDR)。每条轻链可变区(LCVR)和重链可变区(HCVR)由3个CDR区4个FR区组成，从氨基端到羧基端依次排列的顺序为:FR1,CDR1,FR2,CDR2,FR3,CDR3,FR4。轻链的3个CDR区指LCDR1、LCDR2、和LCDR3;重链的3个CDR区指HCDR1、HCDR2和HCDR3。本公开所述的抗体或抗原结合片段的LCVR区和HCVR区的CDR氨基酸残基在数量和位置符合已知的Kabat编号规则(LCDR1-3,HCDR2-3)，或者符合kabat和chothia的编号规则(HCDR1)。

[0151] 术语“完全人源抗体”或“全人抗体”，也称“全人源单克隆抗体”，其抗体的可变区和恒定区都是人源的，去除免疫原性和毒副作用。单克隆抗体的发展经历了四个阶段，分别为:鼠源性单克隆抗体、嵌合性单克隆抗体、人源化单克隆抗体和全人源单克隆抗体。全人源抗体制备的相关技术主要有:人杂交瘤技术、EBV转化B淋巴细胞技术、噬菌体显示技术(phage display)、转基因小鼠抗体制备技术(transgenic mouse)和单个B细胞抗体制备技术等。本公开中的“完全人抗体”采用噬菌体展示技术获得。噬菌体展示技术，从人PBMC、脾

脏、淋巴结组织分离B细胞，构建天然单链噬菌体人抗体库，或者通过免疫可表达人抗体轻重链的转基因小鼠，筛选获得的抗体。

[0152] 术语“抗原结合片段”是指抗体的保持特异性结合抗原的能力的一个或多个片段。已显示可利用全长抗体的片段来进行抗体的抗原结合功能。“抗原结合片段”中包含的结合片段的实例包括(i)Fab片段，由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段；(ii)$F(ab')_2$片段，包含通过铰链区上的二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段；(iii)由VH和CH1结构域组成的Fd片段；(iv)由抗体的单臂的VH和VL结构域组成的Fv片段；(v)单结构域或dAb片段(Ward等人，(1989)Nature341:544-546)，其由VH结构域组成；和(vi)分离的互补决定区(CDR)或(vii)可任选地通过合成的接头连接的两个或更多个分离的CDR的组合。此外，虽然Fv片段的两个结构域VL和VH由分开的基因编码，但可使用重组方法，通过合成的接头连接它们，从而使得其能够产生为其中VL和VH区配对形成单价分子的单个蛋白质链(称为单链Fv(scFv)；参见，例如，Bird等人(1988)Science242:423-426；和Huston等人(1988)Proc.Natl.Acad.Sci USA85:5879-5883)。此类单链抗体也意欲包括在术语抗体的“抗原结合片段”中。使用本领域技术人员已知的常规技术获得此类抗体片段，并且以与对于完整抗体的方式相同的方式就功用性筛选片段。可通过重组DNA技术或通过酶促或化学断裂完整免疫球蛋白来产生抗原结合部分。抗体可以是不同同种型的抗体，例如，IgG(例如，IgG1，IgG2，IgG3或IgG4亚型)，IgA1，IgA2，IgD，IgE或IgM抗体。

[0153] Fab是通过用蛋白酶木瓜蛋白酶(切割H链的224位的氨基酸残基)处理IgG抗体分子所获得的片段中的具有约50,000的分子量并具有抗原结合活性的抗体片段，其中H链N端侧的约一半和整个L链通过二硫键结合在一起。

[0154] F(ab')2是通过用酶胃蛋白酶消化IgG铰链区中两个二硫键的下方部分而获得的分子量为约100,000并具有抗原结合活性并包含在铰链位置相连的两个Fab区的抗体片段。

[0155] Fab'是通过切割上述F(ab')2的铰链区的二硫键而获得的分子量为约50,000并具有抗原结合活性的抗体片段。

[0156] 此外，可以通过将编码抗体的Fab'片段的DNA插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中并将载体导入到原核生物或真核生物中以表达Fab'来生产所述Fab'。

[0157] 术语“单链抗体”、“单链Fv”或“scFv”意指包含通过接头连接的抗体重链可变结构域(或区域；VH)和抗体轻链可变结构域(或区域；VL)的分子。此类scFv分子可具有一般结构：NH2-VL-接头-VH-COOH或NH2-VH-接头-VL-COOH。合适的现有技术接头由重复的GGGGS氨基酸序列或其变体组成，例如使用1-4个重复的变体(Holliger等人(1993)，Proc.Natl.Acad.Sci.USA90:6444-6448)。可用于本公开的其他接头由Alfthan等人(1995)，Protein Eng.8:725-731，Choi等人(2001)，Eur.J.Immuno l.3 1:94-106，Hu等人(1996)，Cancer Res.56:3055-3061，Kipriyanov等人(1999)，J.Mol.Biol.293:41-56和Roovers等人(2001)，Cancer Immunol.描述。

[0158] 术语“CDR”是指抗体的可变结构域内主要促成抗原结合的6个高变区之一。所述6个CDR的最常用的定义之一由Kabat E.A.等人，(1991)Sequences of proteins of immunological interest.NIH Publication91-3242)提供。如本文中使用的，CDR的Kabat定义只应用于轻链可变结构域的CDR1、CDR2和CDR3(CDR L1、CDR L2、CDR L3或L1、L2、L3)，以及重链可变结构域的CDR2和CDR3(CDR H2、CDR H3或H2、H3)。

[0159] 术语“抗体框架”,是指可变结构域VL或VH的一部分,其用作该可变结构域的抗原结合环(CDR)的支架。从本质上讲,其是不具有CDR的可变结构域。

[0160] 术语“表位”或“抗原决定簇”是指抗原上免疫球蛋白或抗体特异性结合的部位。表位通常以独特的空间构象包括至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个连续或非连续的氨基酸。参见,例如,Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology,第66卷,G.E.Morris,Ed.(1996)。

[0161] 术语“特异性结合”、“选择性结合”、“选择性地结合”和“特异性地结合”是指抗体对预先确定的抗原上的表位的结合。通常,抗体以大约小于10^{-7}M,例如大约小于10^{-8}M、10^{-9}M或10^{-10}M或更小的亲和力(KD)结合。

[0162] 术语“核酸分子”是指DNA分子和RNA分子。核酸分子可以是单链或双链的,但优选是双链DNA。当将核酸与另一个核酸序列置于功能关系中时,核酸是“有效连接的”。例如,如果启动子或增强子影响编码序列的转录,那么启动子或增强子有效地连接至所述编码序列。

[0163] 术语“表达载体”是指能够运输已与其连接的另一个核酸的核酸分子。在一个实施方案中,载体是“质粒”,其是指可将另外的DNA区段连接至其中的环状双链DNA环。在另一个实施方案中,载体是病毒载体,其中可将另外的DNA区段连接至病毒基因组中。本文中公开的载体能够在已引入它们的宿主细胞中自主复制(例如,具有细菌的复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)或可在引入宿主细胞后整合入宿主细胞的基因组,从而随宿主基因组一起复制(例如,非附加型哺乳动物载体)。

[0164] 现有技术中熟知生产和纯化抗体和抗原结合片段的方法,如冷泉港的抗体实验技术指南,5-8章和15章。抗原结合片段同样可以用常规方法制备。发明所述的抗体或抗原结合片段用基因工程方法在非人源的CDR区加上一个或多个人源FR区。人FR种系序列可以通过比对IMGT人类抗体可变区种系基因数据库和MOE软件,从ImMunoGeneTics(IMGT)的网站http://imgt.cines.fr得到,或者从免疫球蛋白杂志,2001ISBN012441351上获得。

[0165] 术语“宿主细胞”是指已向其中引入了表达载体的细胞。宿主细胞可包括细菌、微生物、植物或动物细胞。易于转化的细菌包括肠杆菌科(enterobacteriaceae)的成员,例如大肠杆菌(Escherichia coli)或沙门氏菌(Salmonella)的菌株;芽孢杆菌科(Bacillaceae)例如枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis);肺炎球菌(Pneumococcus);链球菌(Streptococcus)和流感嗜血菌(Haemophilus influenzae)。适当的微生物包括酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)和毕赤酵母(Pichia pastoris)。适当的动物宿主细胞系包括CHO(中国仓鼠卵巢细胞系)和NSO细胞。

[0166] 本公开工程化的抗体或抗原结合片段可用常规方法制备和纯化。比如,编码重链和轻链的cDNA序列,可以克隆并重组至GS表达载体。重组的免疫球蛋白表达载体可以稳定地转染CHO细胞。作为一种更推荐的现有技术,哺乳动物类表达系统会导致抗体的糖基化,特别是在Fc区的高度保守N端位点。阳性的克隆在生物反应器的无血清培养基中扩大培养以生产抗体。分泌了抗体的培养液可以用常规技术纯化。比如,用含调整过的缓冲液的A或G Sepharose FF柱进行纯化。洗去非特异性结合的组分。再用PH梯度法洗脱结合的抗体,用SDS-PAGE检测抗体片段,收集。抗体可用常规方法进行过滤浓缩。可溶的混合物和多聚体,也可以用常规方法去除,比如分子筛、离子交换。得到的产物需立即冷冻,如-70℃,或者冻

干。

[0167] 术语“肽”是指介于氨基酸和蛋白质之间的化合物片段，由2个或2个以上氨基酸分子通过肽键相互连接而成，是蛋白质的结构与功能片段，如激素、酶类等本质上都是肽。

[0168] 术语“糖”是指由C、H、O三种元素组成的生物大分子，可分为单糖、二糖和多糖等。

[0169] 术语“荧光探针”是指在紫外-可见-近红外区有特征荧光，并且其荧光性质(激发和发射波长、强度、寿命和偏振等)可随所处环境的性质，如极性、折射率、粘度等改变而灵敏地改变的一类荧光性分子，其与核酸(DNA或RNA)、蛋白质或其他大分子结构非共价相互作用而使一种或几种荧光性质发生改变，可用于研究大分子物质的性质和行为。

[0170] 术语“毒性药物”是指抑制或防止细胞的功能和/或引起细胞死亡或破坏的物质。包括毒素和其他能用于肿瘤治疗的化合物。

[0171] 术语“烷基”指饱和脂肪族烃基团，其为包含1至20个碳原子的直链或支链基团，优选含有1至12个碳原子的烷基，更优选含有1至10个碳原子的烷基，最优选含有1至6个碳原子(包含1个、2个、3个、4个、5个或6个碳原子)的烷基。非限制性实例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、仲丁基、正戊基、1,1-二甲基丙基、1,2-二甲基丙基、2,2-二甲基丙基、1-乙基丙基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、正己基、1-乙基-2-甲基丙基、1,1,2-三甲基丙基、1,1-二甲基丁基、1,2-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、1,3-二甲基丁基、2-乙基丁基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、4-甲基戊基、2,3-二甲基丁基、正庚基、2-甲基己基、3-甲基己基、4-甲基己基、5-甲基己基、2,3-二甲基戊基、2,4-二甲基戊基、2,2-二甲基戊基、3,3-二甲基戊基、2-乙基戊基、3-乙基戊基、正辛基、2,3-二甲基己基、2,4-二甲基己基、2,5-二甲基己基、2,2-二甲基己基、3,3-二甲基己基、4,4-二甲基己基、2-乙基己基、3-乙基己基、4-乙基己基、2-甲基-2-乙基戊基、2-甲基-3-乙基戊基、正壬基、2-甲基-2-乙基己基、2-甲基-3-乙基己基、2,2-二乙基戊基、正癸基、3,3-二乙基己基、2,2-二乙基己基，及其各种支链异构体等。更优选的是含有1至6个碳原子的低级烷基，非限制性实施例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、仲丁基、正戊基、1,1-二甲基丙基、1,2-二甲基丙基、2,2-二甲基丙基、1-乙基丙基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、正己基、1-乙基-2-甲基丙基、1,1,2-三甲基丙基、1,1-二甲基丁基、1,2-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、1,3-二甲基丁基、2-乙基丁基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、4-甲基戊基、2,3-二甲基丁基等。烷基可以是取代的或非取代的，当被取代时，取代基可以在任何可使用的连接点上被取代，所述取代基优选为一个或多个以下基团，其独立地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基、氧代基。

[0172] 术语“杂烷基”指含有一个或多个选自N、O或S的杂原子的烷基，其中烷基如上所定义。

[0173] 术语“亚烷基”指饱和的直链或支链脂肪族烃基，其具有2个从母体烷的相同碳原子或两个不同的碳原子上除去两个氢原子所衍生的残基，其为包含1至20个碳原子的直链或支链基团，优选含有1至12个碳原子，更优选含有1至6个碳原子(包含1个、2个、3个、4个、5个或6个碳原子)的亚烷基。亚烷基的非限制性实例包括但不限于亚甲基(-CH_2-)、1,1-亚乙基(-CH(CH_3)-)、1,2-亚乙基(-CH_2CH_2)-、1,1-亚丙基(-CH(CH_2CH_3)-)、1,2-亚丙基(-CH_2CH(CH_3)-)、1,3-亚丙基(-$CH_2CH_2CH_2$-)、1,4-亚丁基(-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-)和1,5-亚丁基(-

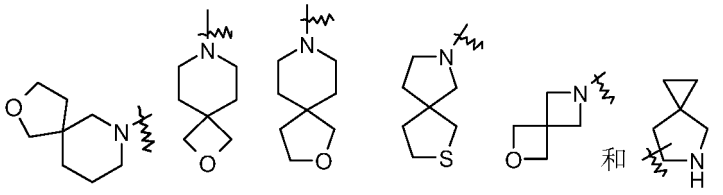
$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-)等。亚烷基可以是取代的或非取代的，当被取代时，取代基可以在任何可使用的连接点上被取代，所述取代基优选独立地任选选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基和氧代基中的一个或多个取代基所取代。

[0174] 术语“烷氧基”指-O-(烷基)和-O-(非取代的环烷基)，其中烷基或环烷基的定义如上所述。烷氧基的非限制性实例包括：甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基、环丙氧基、环丁氧基、环戊氧基、环己氧基。烷氧基可以是任选取代的或非取代的，当被取代时，取代基优选为一个或多个以下基团，其独立地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基。

[0175] 术语“环烷基”指饱和或部分不饱和单环或多环环状烃取代基，环烷基环包含3至20个碳原子，优选包含3至12个碳原子，更优选包含3至10个碳原子，最优选包含3至8个碳原子(包含3个、4个、5个、6个、7个或8个碳原子)。单环环烷基的非限制性实例包括环丙基、环丁基、环戊基、环戊烯基、环己基、环己烯基、环己二烯基、环庚基、环庚三烯基、环辛基等；多环环烷基包括螺环、稠环和桥环的环烷基。

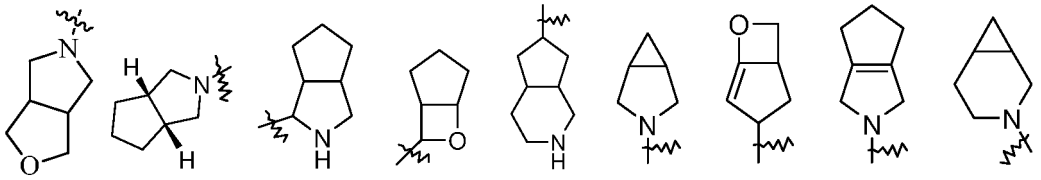
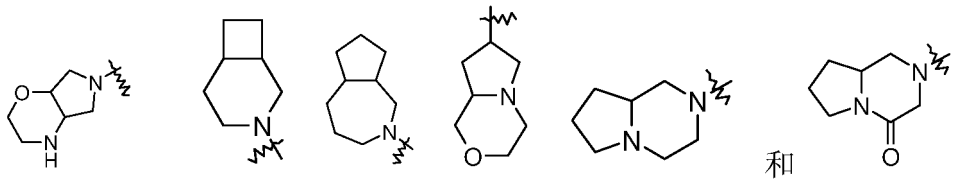
[0176] 术语“杂环基”指饱和或部分不饱和单环或多环环状烃取代基，其包含3至20个环原子，其中一个或多个环原子为选自氮、氧或$S(O)_m$(其中m是整数0、1或2)的杂原子，但不包括-O-O-、-O-S-或-S-S-的环部分，其余环原子为碳。优选包含3至12个环原子，其中1～4个是杂原子(1个、2个、3个或4个杂原子)；更优选环烷基环包含3至10个环原子(包含3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个环原子)。单环杂环基的非限制性实例包括吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、吗啉基、硫代吗啉基、高哌嗪基等。多环杂环基包括螺环、稠环和桥环的杂环基。

[0177] 术语“螺杂环基”指5至20元的单环之间共用一个原子(称螺原子)的多环杂环基团，其中一个或多个环原子为选自氮、氧或$S(O)_m$(其中m是整数0至2)的杂原子，其余环原子为碳。其可以含有一个或多个双键，但没有一个环具有完全共轭的π电子系统。优选为6至14元，更优选为7至10元。根据环与环之间共用螺原子的数目将螺杂环基分为单螺杂环基、双螺杂环基或多螺杂环基，优选为单螺杂环基和双螺杂环基。更优选为4元/4元、4元/5元、4元/6元、5元/5元或5元/6元单螺杂环基。螺杂环基的非限制性实例包括：

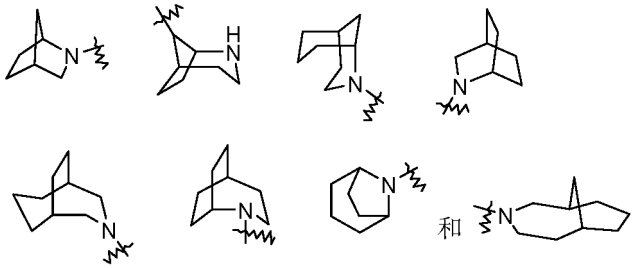
[0178] 

。

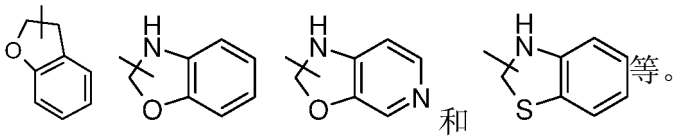
[0179] 术语“稠杂环基”指5至20元，系统中的每个环与体系中的其他环共享毗邻的一对原子的多环杂环基团，一个或多个环可以含有一个或多个双键，但没有一个环具有完全共轭的π电子系统，其中一个或多个环原子为选自氮、氧或$S(O)_m$(其中m是整数0、1或2)的杂原子，其余环原子为碳。优选为6至14元，更优选为7至10元(7元、8元、9元或10元环)。根据组成环的数目可以分为双环、三环、四环或多环稠杂环基，优选为双环或三环，更优选为5元/5元或5元/6元双环稠杂环基。稠杂环基的非限制性实例包括：

[0180]   和 。

[0181] 术语“桥杂环基”指5至14元，任意两个环共用两个不直接连接的原子的多环杂环基团，其可以含有一个或多个双键，但没有一个环具有完全共轭的π电子系统，其中一个或多个环原子为选自氮、氧或S(O)$_m$(其中m是整数0、1或2)的杂原子，其余环原子为碳。优选为6至14元，更优选为7至10元(7元、8元、9元或10元环)。根据组成环的数目可以分为双环、三环、四环或多环桥杂环基，优选为双环、三环或四环，更优选为双环或三环。桥杂环基的非限制性实例包括：

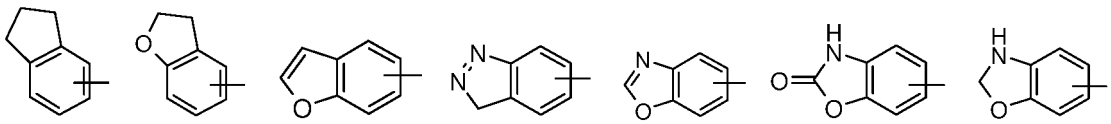
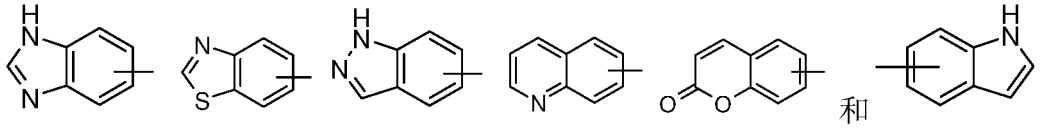
[0182]  和 。

[0183] 所述杂环基环可以稠合于芳基、杂芳基或环烷基环上，其中与母体结构连接在一起的环为杂环基，其非限制性实例包括：

[0184]  和 等。

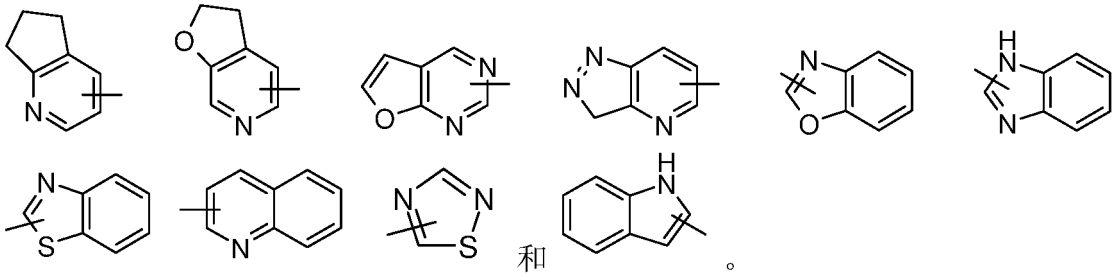
[0185] 杂环基可以是任选取代的或非取代的，当被取代时，取代基优选为一个或多个以下基团，其独立地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基、氧代基。

[0186] 术语“芳基”指具有共轭的π电子体系的6至14元全碳单环或稠合多环(也就是共享毗邻碳原子对的环)基团，优选为6至10元(6元、7元、8元、9元或10元)，例如苯基和萘基，优选苯基。所述芳基环可以稠合于杂芳基、杂环基或环烷基环上，其中与母体结构连接在一起的环为芳基环，其非限制性实例包括：

[0187]   和 。

[0188] 芳基可以是取代的或非取代的，当被取代时，取代基优选为一个或多个以下基团，其独立地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基。

[0189] 术语“杂芳基”指包含1至4个杂原子(1个、2个、3个或4个杂原子)、5至14个环原子的杂芳族体系，其中杂原子选自氧、硫和氮。杂芳基优选为5至10元(5元、6元、7元、8元、9元或10元杂芳基)，更优选为5元或6元，例如呋喃基、噻吩基、吡啶基、吡咯基、N-烷基吡咯基、嘧啶基、吡嗪基、咪唑基、四唑基等。所述杂芳基环可以稠合于芳基、杂环基或环烷基环上，其中与母体结构连接在一起的环为杂芳基环，其非限制性实例包括：

[0190] 

和 。

[0191] 杂芳基可以是任选取代的或非取代的，当被取代时，取代基优选为一个或多个以下基团，其独立地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基。

[0192] 术语“氨基保护基”是为了使分子其它部位进行反应时氨基保持不变，用易于脱去的基团对氨基进行保护。非限制性实施例包含9-芴甲氧羰基、叔丁氧羰基、乙酰基、苄基、烯丙基和对甲氧苄基等。这些基团可任选地被选自卤素、烷氧基或硝基中的1-3个取代基(1个、2个或3个取代基)所取代。所述氨基保护基优选为9-芴甲氧羰基。

[0193] 术语“卤代烷基”指烷基被一个或多个卤素取代，其中烷基如上所定义。

[0194] 术语“氘代烷基”指烷基被一个或多个氘原子取代，其中烷基如上所定义。

[0195] 术语“羟烷基”指烷基被一个或多个羟基取代，其中烷基如上所定义。

[0196] 术语“羟基”指-OH基团。

[0197] 术语“卤素”指氟、氯、溴或碘。

[0198] 术语“氨基”指-NH_2。

[0199] 术语“硝基”指-NO_2。

[0200] 术语“氰基”指-CN。

[0201] 术语“酰氨基”指-C(O)N(烷基)或(环烷基)，其中烷基、环烷基如上所定义。

[0202] 术语“羧酸酯基”指-C(O)O(烷基)或(环烷基)，其中烷基、环烷基如上所定义。

[0203] 本公开还包括各种氘化形式的式(I)化合物。与碳原子连接的各个可用的氢原子可独立地被氘原子替换。本领域技术人员能够参考相关文献合成氘化形式的式(I)化合物。在制备氘代形式的式(I)化合物时可使用市售的氘代起始物质，或它们可使用常规技术采用氘代试剂合成，氘代试剂包括但不限于氘代硼烷、三氘代硼烷四氢呋喃溶液、氘代氢化锂铝、氘代碘乙烷和氘代碘甲烷等。

[0204] “任选”或“任选地”意味着随后所描述的事件或环境可以但不必发生，该说明包括该事件或环境发生或不发生地场合。例如，“任选被烷基取代的杂环基团”意味着烷基可以但不必须存在，该说明包括杂环基团被烷基取代的情形和杂环基团不被烷基取代的情形。

[0205] “取代的”指基团中的一个或多个氢原子，优选为最多5个，更优选为1个、2个或3个氢原子彼此独立地被相应数目的取代基取代。不言而喻，取代基仅处在它们的可能的化学位置，本领域技术人员能够在不付出过多努力的情况下确定(通过实验或理论)可能或不可能的取代。例如，具有游离氢的氨基或羟基与具有不饱和(如烯属)键的碳原子结合时可能是不稳定的。

[0206] 术语“药物组合物”表示含有一种或多种本文所述化合物或其生理学上/可药用的盐或前体药物与其他化学组分的混合物，以及其他组分例如生理学/可药用的载体和赋形剂。药物组合物的目的是促进对生物体的给药，利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。

[0207] 术语“药学上可接受的盐”或“可药用盐”是指本公开配体-药物偶联物的盐，或本公开中所述的化合物的盐，这类盐用于哺乳动物体内时具有安全性和有效性，且具有应有的生物活性，本公开配体药物偶联物至少含有一个氨基，因此可以与酸形成盐，可药用盐的非限制性实例包括：盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、柠檬酸盐、乙酸盐、琥珀酸盐、抗坏血酸盐、草酸盐、硝酸盐、梨酸盐、磷酸氢盐、磷酸二氢盐、水杨酸盐、柠檬酸氢盐、酒石酸盐、马来酸盐、富马酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐。

[0208] 术语“溶剂合物”指本公开的配体-药物偶联物与一种或多种溶剂分子形成可药用的溶剂化物，溶剂分子的非限制性实例包括水、乙醇、乙腈、异丙醇、DMSO、乙酸乙酯。

[0209] 术语“载药量”是指式(I)分子中每个配体上加载的细胞毒性药物平均数量，也可以表示为药物量和抗体量的比值，药物载量的范围可以是每个配体(Pc)连接0-12个，优选1-10个细胞毒性药物(D)。在本公开的实施方案中，载药量表示为n，也可称为DAR值，示例性的为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10的均值。可用常规方法如UV/可见光光谱法、质谱、ELISA试验和HPLC特征鉴定偶联反应后每个ADC分子的药物品均数量。

[0210] 本公开的一个实施方式中，细胞毒性药物通过连接单元偶联在配体的N端氨基和/或赖氨酸残基的ε-氨基上，一般地，偶联反应中能与抗体偶联的药物分子数将小于理论上的最大值。

[0211] 可以用以下非限制性方法控制配体细胞毒性药物偶联物的载量，包括：

[0212] (1)控制连接试剂和单抗的摩尔比，

[0213] (2)控制反应时间和温度，

[0214] (3)选择不同的反应试剂。

[0215] 常规的药物组合物的制备见中国药典。

[0216] 术语“载体”用于本公开的药物，是指能改变药物进入人体的方式和在体内的分布、控制药物的释放速度并将药物输送到靶向器官的体系。药物载体释放和靶向系统能够减少药物降解及损失，降低副作用，提高生物利用度。如可作为载体的高分子表面活性剂由于其独特的两亲性结构，可以进行自组装，形成各种形式的聚集体，优选的实例如胶束、微乳液、凝胶、液晶、囊泡等。这些聚集体具有包载药物分子的能力，同时又对膜有良好的渗透性，可以作为优良的药物载体。

[0217] 术语“赋形剂”是在药物制剂中除主药以外的附加物，也可称为辅料。如片剂中的粘合剂、填充剂、崩解剂、润滑剂；半固体制剂软膏剂、霜剂中的基质部分；液体制剂中的防腐剂、抗氧剂、矫味剂、芳香剂、助溶剂、乳化剂、增溶剂、渗透压调节剂、着色剂等均可称为

赋形剂。

[0218] 术语“稀释剂”又称填充剂，其主要用途是增加片剂的重量和体积。稀释剂的加入不仅保证一定的体积大小，而且减少主要成分的剂量偏差，改善药物的压缩成型性等。当片剂的药物含有油性组分时，需加入吸收剂吸收油性物，使保持“干燥”状态，以利于制成片剂。如淀粉、乳糖、钙的无机盐、微晶纤维素等。

[0219] 药物组合物可以是无菌注射水溶液形式。可在使用的可接受的溶媒和溶剂中有水、林格氏液和等渗氯化钠溶液。无菌注射制剂可以是其中活性成分溶于油相的无菌注射水包油微乳。例如将活性成分溶于大豆油和卵磷脂的混合物中。然后将油溶液加入水和甘油的混合物中处理形成微乳。可通过局部大量注射，将注射液或微乳注入患者的血流中。或者，最好按可保持本公开化合物恒定循环浓度的方式给予溶液和微乳。为保持这种恒定浓度，可使用连续静脉内递药装置。这种装置的实例是Deltec CADD-PLUS.TM.5400型静脉注射泵。

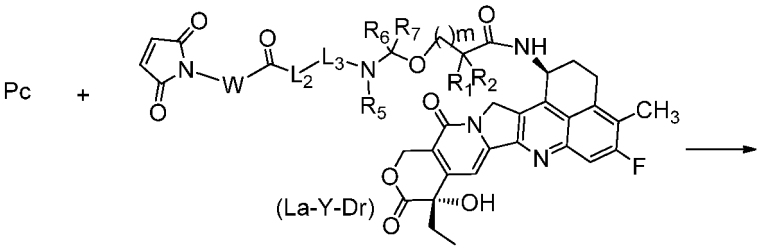
[0220] 药物组合物可以是用于肌内和皮下给药的无菌注射水或油混悬液的形式。可按已知技术，用上述那些适宜的分散剂或湿润剂和悬浮剂配制该混悬液。无菌注射制剂也可以是在无毒肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中制备的无菌注射溶液或混悬液，例如1,3-丁二醇中制备的溶液。此外，可方便地用无菌固定油作为溶剂或悬浮介质。为此目的，可使用包括合成甘油单或二酯在内的任何调和固定油。此外，脂肪酸例如油酸也可以制备注射剂。

[0221] 本公开涉及一类可裂解的特定结构的连接臂和特定结构的活性物，及由连接臂、活性物与抗体组成的抗体药物偶联物(ADC)。此类ADC是经由间隔物将一种毒性物质连于抗体而形成的复合物。该抗体偶联药物(ADC)在体内经降解而释放出活性分子，从而起到抗肿瘤的作用。

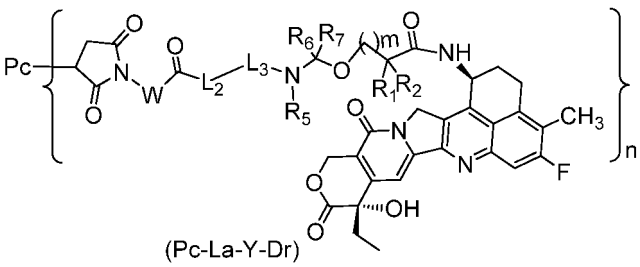
[0222] 二、合成方法

[0223] 为了完成合成目的，采用如下的合成技术方案：

[0224] 通式(Pc-L_a-Y-Dr)所示的化合物的制备方法，其包括如下步骤：



[0225]



[0226] Pc还原后，与通式(L_a-Y-Dr)偶联反应，得到通式(Pc-L_a-Y-Dr)所示的化合物；还原剂优选TCEP，特别地，优选还原抗体上的二硫键；

[0227] 其中：

[0228] Pc、W、L^2、L^3、R^1、R^2、R^5～R^7、m和n如通式(Pc-L_a-Y-Dr)中所定义。

[0229] 在以上说明书中提出了本公开一种或多种实施方案的细节。虽然可使用与本文所述类似或相同的任何方法和材料来实施或测试本公开，但是以下描述优选的方法和材料。通过说明书和权利要求书，本公开的其他特点、目的和优点将是显而易见的。在说明书和权利要求书中，除非上下文中有清楚的另外指明，单数形式包括复数指代物的情况。除非另有定义，本文使用的所有技术和科学术语都具有本公开所属领域普通技术人员所理解的一般含义。说明书中引用的所有专利和出版物都通过引用纳入。提出以下实施例是为了更全面地说明本公开的优选实施方案。这些实施例不应以任何方式理解为限制本公开的范围，本公开的范围由权利要求书限定。

[0230] 本公开实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。未注明具体来源的试剂，为市场购买的常规试剂。

[0231] 化合物的结构是通过核磁共振(NMR)或质谱(MS)来确定的。NMR的测定是用Bruker AVANCE-400核磁仪，测定溶剂为氘代二甲基亚砜(DMSO-d6)、氘代氯仿($CDCl_3$)、氘代甲醇(CD_3OD)，内标为四甲基硅烷(TMS)，化学位移是以10^{-6}(ppm)作为单位给出。

[0232] MS的测定用FINNIGAN LCQAd(ESI)质谱仪(生产商:Thermo，型号:Finnigan LCQ advantage MAX)。

[0233] UPLC的测定用Waters Acquity UPLC SQD液质联用仪。

[0234] HPLC的测定使用安捷伦1200DAD高压液相色谱仪(Sunfire C18 150×4.6mm色谱柱)和Waters 2695-2996高压液相色谱仪(Gimini C18 150×4.6mm色谱柱)。

[0235] UV-HPLC的测定使用Thermo nanodrop2000紫外分光光度计。

[0236] 增殖抑制率及IC_{50}值的测定用PHERA starFS酶标仪(德国BMG公司)。

[0237] 薄层层析硅胶板使用烟台黄海HSGF254或青岛GF254硅胶板，薄层色谱法(TLC)使用的硅胶板采用的规格是0.15mm～0.2mm，薄层层析分离纯化产品采用的规格是0.4mm～0.5mm硅胶板。

[0238] 柱层析一般使用烟台黄海200～300目硅胶为载体。

[0239] 本公开的已知的起始原料可以采用或按照本领域已知的方法来合成，或可购买自ABCR GmbH&Co.KG，Acros Organnics，Aldrich Chemical Company，韶远化学科技(Accela ChemBio Inc)、达瑞化学品等公司。

[0240] 实施例中如无特殊说明，反应均在氩气氛或氮气氛下进行。

[0241] 氩气氛或氮气氛是指反应瓶连接一个约1L容积的氩气或氮气气球。

[0242] 氢气氛是指反应瓶连接一个约1L容积的氢气气球。

[0243] 加压氢化反应使用Parr 3916EKX型氢化仪和清蓝QL-500型氢气发生器或HC2-SS型氢化仪。

[0244] 氢化反应通常抽真空，充入氢气，反复操作3次。

[0245] 微波反应使用CEM Discover-S 908860型微波反应器。

[0246] 实施例中如无特殊说明，反应中的溶液是指水溶液。

[0247] 实施例中如无特殊说明，反应的温度为室温。

[0248] 室温为最适宜的反应温度，温度范围是20℃～30℃。

[0249] 实施例中pH＝6.5的PBS缓冲液的配制:取KH_2PO_4 8.5g，$K_2HPO_4.3H_2O$ 8.56g，NaCl

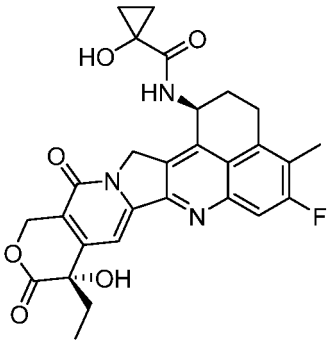
5.85g,EDTA 1.5g置于瓶中,定容至2L,超声波使其全部溶解,摇匀即得。

[0250] 纯化化合物采用的柱层析的洗脱剂的体系和薄层色谱法的展开剂的体系包括:A:二氯甲烷和异丙醇体系,B:二氯甲烷和甲醇体系,C:石油醚和乙酸乙酯体系,溶剂的体积比根据化合物的极性不同而进行调节,也可以加入少量的三乙胺和酸性或碱性试剂等进行调节。

[0251] 本公开部分化合物是通过Q-TOF LC/MS来表征的。Q-TOF LC/MS使用安捷伦6530精确质量数四级杆-飞行时间质谱仪和安捷伦1290-Infinity超高效液相色谱仪(安捷伦Poroshell 300SB-C8 5μm,2.1×75mm色谱柱)。

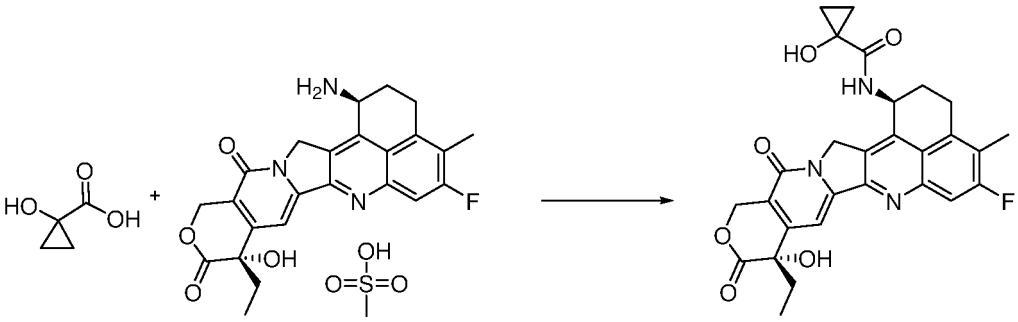
[0252] 实施例1

[0253] N-((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3′,4′:6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)-1-羟基环丙烷-1-甲酰胺1



1

[0254]



1a 1b 1

[0255] 向依喜替康甲磺酸盐1b(2.0mg,3.76μmol,采用专利申请"EP0737686A1"公开的方法制备而得)中添加1mL N,N-二甲基甲酰胺,冰水浴冷却至0-5℃,滴加一滴三乙胺,搅拌至反应液变澄清。向反应液中依次加入1-羟基环丙基甲酸1a(1.4mg,3.7μmol,采用公知的方法"Tetrahedron Letters,25(12),1269-72;1984"制备而得)和4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基氯化吗啉盐(3.8mg,13.7μmol),加毕,在0-5℃搅拌反应2小时。向反应液中加入5mL水淬灭反应,用乙酸乙酯(8mL×3)萃取反应液,合并有机相,用饱和氯化钠溶液(5mL×2)洗涤,有机相用无水硫酸钠干燥,过滤,将滤液减压浓缩,用薄层层析以展开剂体系B纯化所得残余物,得到标题产物1(1.6mg,产率:82.1%)。

[0256] MS m/z(ESI):520.2[M+1]。

[0257] ^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ7.90-7.84(m,1H),7.80-7.68(m,1H),5.80-5.70(m,1H),5.62-5.54(m,2H),5.44-5.32(m,2H),5.28-5.10(m,2H),3.40-3.15(m,3H),2.44(s,3H),

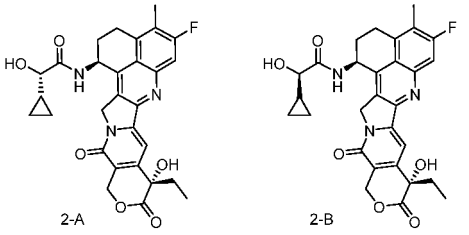
2.23(t,1H),2.06-1.75(m,2H),1.68-1.56(m,1H),1.22-1.18(m,2H),1.04-0.98(m,2H),0.89(t,3H)。

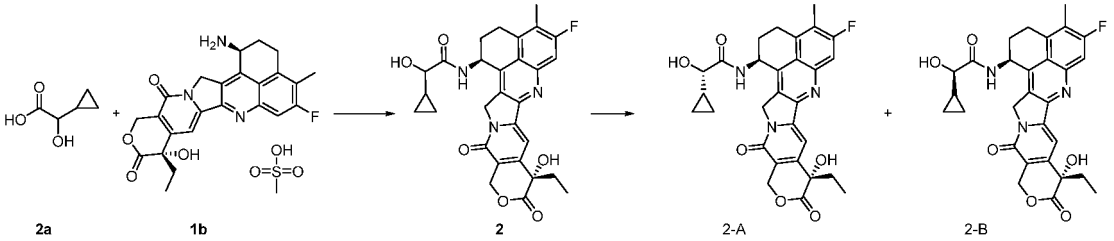
[0258] 实施例2

[0259] (S)-2-环丙基-N-((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-1,2,3,9,10,12,13,15-八氢苯并[de]吡喃并[3′,4′:6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)-2-羟基乙酰胺2-A

[0260] (R)-2-环丙基-N-((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-1,2,3,9,10,12,13,15-八氢苯并[de]吡喃并[3′,4′:6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)-2-羟基乙酰胺2-B

[0261]





[0262] 向1b(4mg,7.53μmol)中加入2mL乙醇和0.4mL N,N-二甲基甲酰胺,氩气置换三次,冰水浴冷却至0-5℃,滴加0.3mL N-甲基吗啉,搅拌至反应液变澄清。向反应液中依次加入2-环丙基-2-羟基乙酸2a(2.3mg,19.8μmol,采用专利申请“WO2013106717”公开的方法制备而得)、1-羟基苯并三唑(3mg,22.4μmol)和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(4.3mg,22.4μmol),加毕,在0-5℃搅拌反应1小时。撤去冰水浴,加热至30℃搅拌2小时。反应液减压浓缩,所得到的粗品化合物2用高效液相色谱法纯化(分离条件:色谱柱:XBridge Prep C18 OBD 5um19*250mm;流动相:A-水(10mmol NH_4OAc),B-乙腈,梯度洗脱,流速:18mL/min),收集其相应组分,减压浓缩,得到标题产物(1.5mg,1.5mg)。

[0263] MS m/z(ESI):534.0[M+1]。

[0264] 单一构型化合物2-B(较短保留时间)

[0265] UPLC分析:保留时间1.06分钟,纯度:88%(色谱柱:ACQUITY UPLC BEHC18 1.7um 2.1*50mm,流动相:A-水(5mmol NH_4OAc),B-乙腈)。

[0266] ^1H NMR(400MHz,DMSO-d_6):δ8.37(d,1H),7.76(d,1H),7.30(s,1H),6.51(s,1H),5.58-5.56(m,1H),5.48(d,1H),5.41(s,2H),5.32-5.29(m,1H),3.60(t,1H),3.19-3.13(m,2H),2.38(s,3H),2.20-2.14(m,1H),1.98(q,2H),1.87-1.83(m,1H),1.50-1.40(m,1H),1.34-1.28(m,1H),0.86(t,3H),0.50-0.39(m,4H)。

[0267] 单一构型化合物2-A(较长保留时间)

[0268] UPLC分析:保留时间1.10分钟,纯度:86%(色谱柱:ACQUITY UPLC BEHC18 1.7um 2.1*50mm,流动相:A-水(5mmol NH_4OAc),B-乙腈)。

[0269] ^1H NMR(400MHz,DMSO-d_6):δ8.35(d,1H),7.78(d,1H),7.31(s,1H),6.52(s,1H),

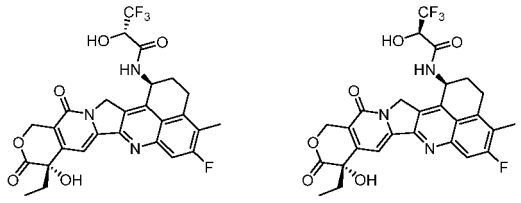
5.58-5.53(m,1H),5.42(s,2H),5.37(d,1H),5.32(t,1H),3.62(t,1H),3.20-3.15(m,2H),2.40(s,3H),2.25-2.16(m,1H),1.98(q,2H),1.87-1.82(m,1H),1.50-1.40(m,1H),1.21-1.14(m,1H),0.87(t,3H),0.47-0.35(m,4H)。

[0270] 实施例3

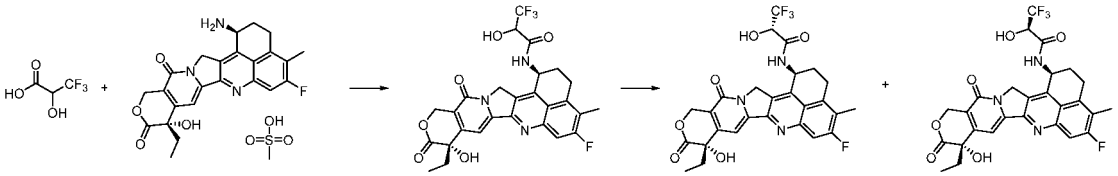
[0271] (S)-N-((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-1,2,3,9,10,12,13,15-八氢苯并[de]吡喃并[3′,4′:6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)-3,3,3-三氟-2-羟基丙酰胺3-A

[0272] (R)-N-((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-1,2,3,9,10,12,13,15-八氢苯并[de]吡喃并[3′,4′:6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)-3,3,3-三氟-2-羟基丙酰胺3-B

[0273]



3-A 3-B



3a 1b 3 3-A 3-B

[0274] 向1b(5.0mg,9.41μmol)中添加2mL乙醇和0.4mL N,N-二甲基甲酰胺,冰水浴冷却至0-5℃,滴加0.3mL N-甲基吗啡啉,搅拌至反应液变澄清。向反应液中依次加入3,3,3-三氟-2-羟基丙酸3a(4.1mg,28.4μmol,供应商Alfa)、1-羟基苯并三唑(3.8mg,28.1μmol)和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(5.4mg,28.2μmol),加毕,在0-5℃搅拌反应10分钟。撤去冰水浴,加热至30℃搅拌8小时。反应液减压浓缩,所得到的粗品化合物3用高效液相色谱法纯化(分离条件:色谱柱:XBridge Prep C18 OBD 5um 19*250mm;流动相:A-水(10mmol NH_4OAc):B-乙腈,梯度洗脱,流速:18mL/min),收集其相应组分,减压浓缩,得到标题产物(1.5mg,1.5mg)。

[0275] MS m/z(ESI):561.9[M+1]。

[0276] 单一构型化合物(较短保留时间)

[0277] UPLC分析:保留时间1.11分钟,纯度:88%(色谱柱:ACQUITY UPLC BEHC18 1.7um 2.1*50mm,流动相:A-水(5mmol NH_4OAc),B-乙腈)。

[0278] ^1H NMR(400MHz,DMSO-d_6):δ8.94(d,1H),7.80(d,1H),7.32(s,1H),7.20(d,1H),6.53(s,1H),5.61-5.55(m,1H),5.45-5.23(m,3H),5.15-5.06(m,1H),4.66-4.57(m,1H),3.18-3.12(m,1H),2.40(s,3H),2.26-2.20(m,1H),2.16-2.08(m,1H),2.02-1.94(m,1H),1.89-1.82(m,1H),1.50-1.40(m,1H),0.87(t,3H)。

[0279] 单一构型化合物(较长保留时间)

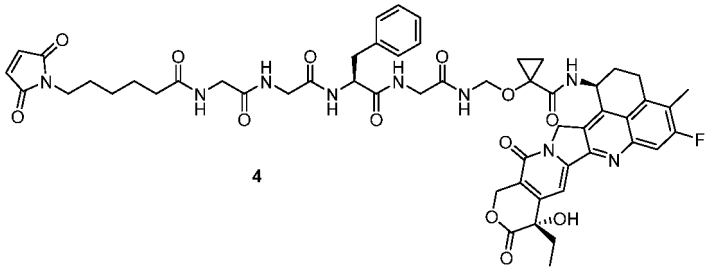
[0280] UPLC分析:保留时间1.19分钟,纯度:90%(色谱柱:ACQUITY UPLC BEHC18 1.7um 2.1*50mm,流动相:A-水(5mmol NH_4OAc),B-乙腈)。

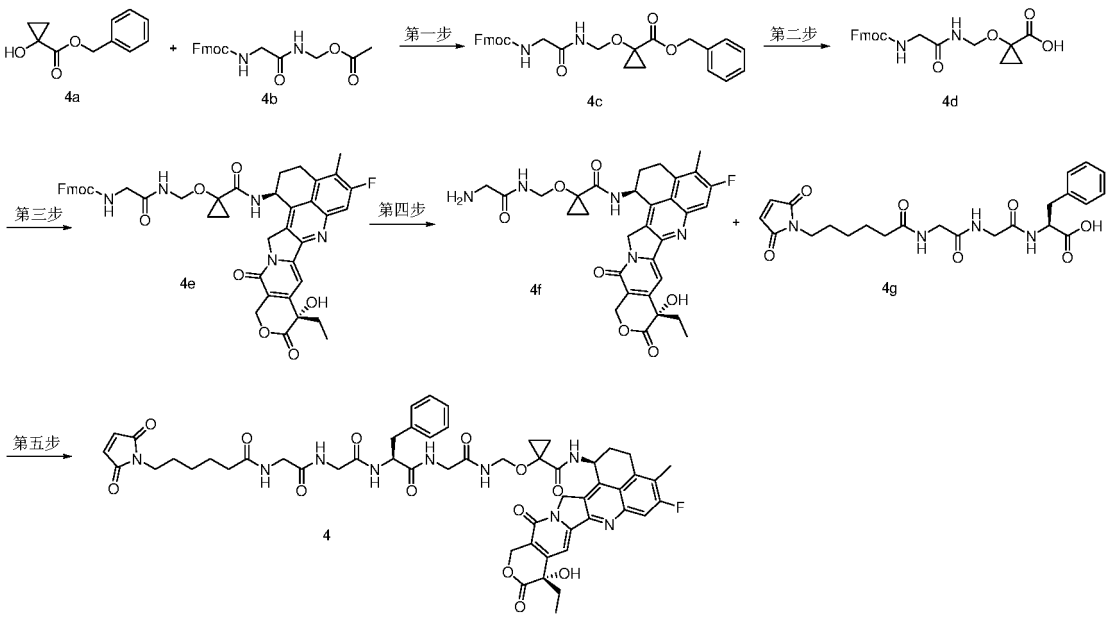
[0281] ^1H NMR(400MHz,DMSO-d_6):δ8.97(d,1H),7.80(d,1H),7.31(s,1H),7.16(d,1H),

6.53(s,1H),5.63-5.55(m,1H),5.45-5.20(m,3H),5.16-5.07(m,1H),4.66-4.57(m,1H),3.18-3.12(m,1H),2.40(s,3H),2.22-2.14(m,1H),2.04-1.95(m,2H),1.89-1.82(m,1H),1.50-1.40(m,1H),0.87(t,3H)。

[0282] 实施例4

[0283] 1-(((S)-7-苄基-20-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-3,6,9,12,15-五氧代-2,5,8,11,14-五氮杂二十烷基)氧基)-N-((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3′,4′:6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)环丙烷-1-甲酰胺4

[0284] 

[0285] 

[0286] 第一步

[0287] 1-((2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)乙酰氨基)甲氧基)环丙烷-1-羧酸苄酯4c

[0288] 将1-羟基环丙烷-1-羧酸苄酯4a(104mg,0.54mmol;采用专利申请“US2005/20645”公开的方法制备而得)和2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)乙酰氨基)甲基乙酸酯4b(100mg,0.27mmol;采用专利申请“CN105829346A”公开的方法制备而得)加入反应瓶,加入5mL四氢呋喃,氩气置换三次,冰水浴降温至0-5℃,加入叔丁醇钾(61mg,0.54mmol),撤去冰浴,升至室温搅拌10分钟,加入20mL冰水,用乙酸乙酯(5mL×2)和氯仿(5mL×5)萃取,合并有机相并浓缩。所得残余物溶于3mL 1,4-二氧六环中,加入0.6mL水,加入碳酸氢钠(27mg,0.32mmol)和氯甲酸-9-芴甲酯(70mg,0.27mmol),室温搅拌1小时。加入20mL水,用乙酸乙酯(8mL×3)萃取,有机相用饱和氯化钠溶液(20mL)洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,滤液减压浓缩,用硅胶柱色谱法以展开剂体系B纯化所得残余物,得到标题产物4c(100mg,产率:

73.6%)。

[0289] MS m/z(ESI):501.0[M+1]。

[0290] 第二步

[0291] 1-((2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)乙酰氨基)甲氧基)环丙烷-1-羧酸4d

[0292] 将4c(50mg,0.10mmol)溶于3mL四氢呋喃和乙酸乙酯(V:V=2:1)混合溶剂中,加入钯碳(25mg,含量10%),氢气置换三次,室温搅拌反应1小时。反应液用硅藻土过滤,滤饼用四氢呋喃淋洗,滤液浓缩,得到标题产物4d(41mg,产率:100%)。

[0293] MS m/z(ESI):411.0[M+1]。

[0294] 第三步

[0295] (9H-芴-9-基)甲基(2-(((1-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3′,4′:6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基羰基)环丙氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)氨基甲酸酯4e

[0296] 将1b(7mg,0.013mmol)加入反应瓶,加入1mL N,N-二甲基甲酰胺,氩气置换三次,冰水浴降温至0-5℃,滴加一滴三乙胺,加入4d(7mg,0.017mmol)的0.5mL N,N-二甲基甲酰胺溶液,加入4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基氯化吗啉盐(7mg,0.026mmol),冰浴搅拌反应35分钟。加入10mL水,用乙酸乙酯(5mL×3)萃取,有机相用饱和氯化钠溶液(10mL)洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,滤液减压浓缩,用薄层层析以展开剂体系B纯化所得残余物,得到标题产物4e(8.5mg,产率78.0%)。

[0297] MS m/z(ESI):828.0[M+1]。

[0298] 第四步

[0299] 1-((2-氨基乙酰氨基)甲氧基)-N-((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3′,4′:6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)环丙烷-1-甲酰胺4f

[0300] 将4e(4mg,4.84μmol)溶于0.2mL二氯甲烷中,加入0.1mL二乙胺,室温搅拌2小时。反应液减压浓缩,加入2mL甲苯减压浓缩,重复两次,加入3mL正己烷打浆,倾倒出上层正己烷,重复三次,减压浓缩得到粗品标题产物4f(2.9mg),产品不经纯化直接用于下一步反应。

[0301] MS m/z(ESI):606.0[M+1]。

[0302] 第五步

[0303] 1-(((S)-7-苄基-20-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-3,6,9,12,15-五氧代-2,5,8,11,14-五氮杂二十烷基)氧基)-N-((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3′,4′:6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)环丙烷-1-甲酰胺4

[0304] 将粗品4f(2.9mg,4.84μmol)溶于0.5mL N,N-二甲基甲酰胺,氩气置换三次,冰水浴降温至0-5℃,加入(S)-2(-2-(-2-(6-(2,5-二氧代-1H-吡咯-1-基)己酰氨基)乙酰氨基)乙酰氨基)-3-苯基丙酸4g(2.7mg,5.80μmol,采用专利申请"EP2907824"公开的方法制备而得)的0.3mL N,N-二甲基甲酰胺溶液,加入4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基氯化吗啉盐(2.7mg,9.67μmol),冰浴搅拌反应30分钟,撤去冰浴,升至室温搅拌15分钟。反应液进行高效液相色谱法纯化(分离条件:色谱柱:XBridge Prep C18 OBD 5um 19*250mm;流动相:A-水(10mmol NH_4OAc):B-乙腈,梯度洗脱,流速:18mL/min),收集其相应组分,减压浓

缩得到标题产物4(2mg,产率:39.0%)。

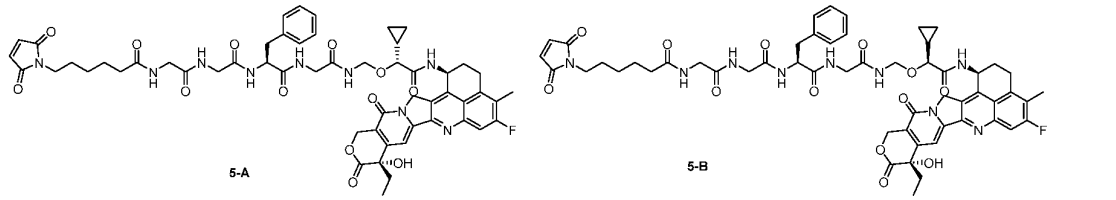
[0305] MS m/z(ESI):1060.0[M+1]。

[0306] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6):δ9.01(d,1H),8.77(t,1H),8.21(t,1H),8.08-7.92(m,2H),7.73(d,1H),7.28(s,1H),7.24-7.07(m,4H),6.98(s,1H),6.50(s,1H),5.61(q,1H),5.40(s,2H),5.32(t,1H),5.12(q,2H),4.62(t,1H),4.52(t,1H),4.40-4.32(m,1H),3.73-3.47(m,8H),3.16-3.04(m,2H),2.89(dd,1H),2.69-2.55(m,2H),2.37-2.23(m,4H),2.12-1.93(m,4H),1.90-1.74(m,2H),1.52-1.38(m,4H),1.33-1.11(m,5H),0.91-0.81(m,4H)。

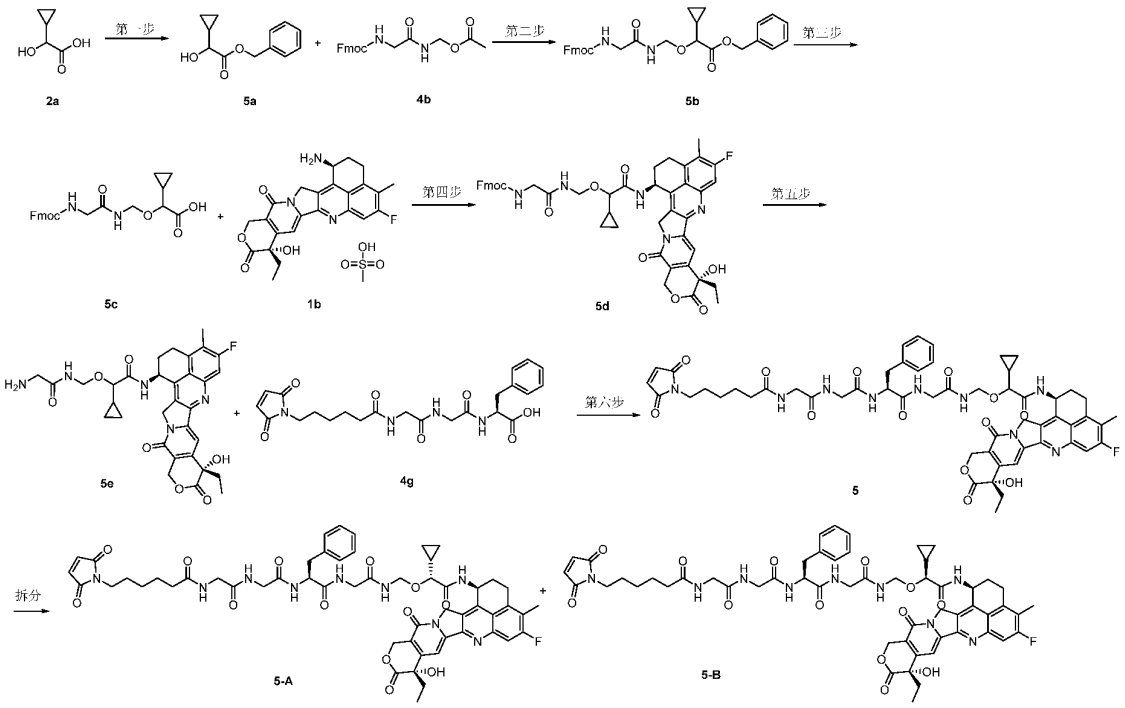
[0307] 实施例5

[0308] N-((2R,10S)-10-苄基-2-环丙基-1-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3′,4′:6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-1,6,9,12,15-五氧代-3-氧杂-5,8,11,14-四氮杂十六-16-基)-6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺5-A

[0309] N-((2S,10S)-10-苄基-2-环丙基-1-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3′,4′:6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-1,6,9,12,15-五氧代-3-氧杂-5,8,11,14-四氮杂十六-16-基)-6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺5-B



[0310]



[0311] 第一步

[0312] 2-环丙基-2-羟基乙酸苄酯5a

[0313] 将2a(1.3g,11.2mmol;采用专利申请“WO2013/106717”公开的方法制备而得)溶于

50mL乙腈中，依次加入碳酸钾(6.18g，44.8mmol)、溴化苄(1.33mL，11.2mmol)和四丁基碘化铵(413mg，1.1mmol)。将反应液室温搅拌48小时，通过硅藻土过滤，滤饼用乙酸乙酯(10ml)淋洗，合并滤液减压浓缩，用硅胶柱色谱法以展开剂体系C纯化所得残余物，得到标题产物5a(2g，产率：86.9％)。

[0314] 第二步

[0315] 10-环丙基-1-(9H-芴-9-基)-3,6-二氧代-2,9-二氧杂-4,7-二氮杂十一-11-酸苄酯5b

[0316] 将5a(120.9mg，0.586mmol)和4b(180mg，0.489mmol)加入反应瓶，加入4mL四氢呋喃，氩气置换三次，冰水浴降温至0-5℃，加入叔丁醇钾(109mg，0.98mmol)，撤去冰浴，升至室温搅拌40分钟，加入10mL冰水，用乙酸乙酯(20mL×2)和氯仿(10mL×5)萃取，合并有机相并浓缩。所得残余物溶于4mL二氧六环中，加入2mL水，加入碳酸氢钠(49.2mg，0.586mmol)和氯甲酸-9-芴甲酯(126mg，0.49mmol)，室温搅拌2小时。加入20mL水，用乙酸乙酯(10mL×3)萃取，有机相用饱和氯化钠溶液(20mL)洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩。用硅胶柱色谱法以展开剂体系C纯化所得残余物，得到标题产物5b(48mg，产率：19％)。

[0317] MS m/z(ESI)：515.0[M+1]。

[0318] 第三步

[0319] 10-环丙基-1-(9H-芴-9-基)-3,6-二氧代-2,9-二氧杂-4,7-二氮杂十一-11-酸5c

[0320] 将5b(20mg，0.038mmol)溶于4.5mL四氢呋喃和乙酸乙酯(V:V＝2:1)混合溶剂中，加入钯碳(12mg，含量10％，干型)，氢气置换三次，室温搅拌反应1小时。反应液用硅藻土过滤，滤饼用乙酸乙酯淋洗，滤液浓缩，得到粗品标题产物5c(13mg)，产品不经纯化直接进行下一步反应。

[0321] MS m/z(ESI)：424.9[M+1]。

[0322] 第四步

[0323] (9H-芴-9-基)甲基(2-(((1-环丙基-2-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3′,4′:6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-2-氧代乙氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)氨基甲酸酯5d

[0324] 将1b(10mg，18.8μmol)加入反应瓶，加入1mL N,N-二甲基甲酰胺，氩气置换三次，冰水浴降温至0-5℃，滴加一滴三乙胺，加入粗品5c(13mg，30.6μmol)，加入4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基氯化吗啉盐(16.9mg，61.2μmol)，冰浴搅拌反应40分钟。加入10mL水，用乙酸乙酯(10mL×3)萃取，合并有机相。有机相用饱和氯化钠溶液(10mL×2)洗涤，用无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩。用薄层层析以展开剂体系B纯化所得残余物，得到标题产物5d(19mg，产率：73.6％)。

[0325] MS m/z(ESI)：842.1[M+1]。

[0326] 第五步

[0327] 2-((2-氨基乙酰氨基)甲氧基)-2-环丙基-N-((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3′,4′:6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)乙酰胺5e

[0328] 将5d(19mg，22.6μmol)溶于2mL二氯甲烷中，加入1mL二乙胺，室温搅拌2小时。反应液减压浓缩，加入1mL甲苯并减压浓缩，重复两次。向残余物中加入3mL正己烷打浆，静置后

倾倒出上层清液，保留固体。将固体残余物减压浓缩，油泵拉干得到粗品标题产物5e(17mg)，产品不经纯化直接用于下一步反应。

[0329] MS m/z(ESI)：638.0[M+18]。

[0330] 第六步

[0331] N-((2R,10S)-10-苄基-2-环丙基-1-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3′,4′:6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-1,6,9,12,15-五氧代-3-氧杂-5,8,11,14-四氮杂十六-16-基)-6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺5-A

[0332] N-((2S,10S)-10-苄基-2-环丙基-1-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3′,4′:6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-1,6,9,12,15-五氧代-3-氧杂-5,8,11,14-四氮杂十六-16-基)-6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺5-B

[0333] 将粗品5e(13.9mg,22.4μmol)溶于0.6mL N,N-二甲基甲酰胺，氩气置换三次，冰水浴降温至0-5℃，加入4g(21.2mg,44.8μmol)的0.3mL N,N-二甲基甲酰胺溶液，加入4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基氯化吗啉盐(18.5mg,67.3μmol)，冰浴搅拌反应10分钟，撤去冰浴，升至室温搅拌1小时，反应生成化合物5。反应液进行高效液相色谱法纯化(分离条件：色谱柱：XBridge Prep C18 OBD 5um 19*250mm；流动相：A-水(10mmol NH_4OAc)：B-乙腈，梯度洗脱，流速：18mL/min)，收集其相应组分，减压浓缩，得到标题产物(2.4mg，1.7mg)。

[0334] MS m/z(ESI)：1074.4[M+1]。

[0335] 单一构型化合物5-A(较短保留时间)：

[0336] UPLC分析：保留时间1.14分钟，纯度：85％(色谱柱：ACQUITY UPLC BEHC18 1.7um 2.1*50mm，流动相：A-水(5mmol NH_4OAc)，B-乙腈)。

[0337] ^1H NMR(400MHz，DMSO-d_6)：δ8.60(t,1H)，8.51-8.49(d,1H)，8.32-8.24(m,1H)，8.13-8.02(m,2H)，8.02-7.96(m,1H)，7.82-7.75(m,1H)，7.31(s,1H)，7.26-7.15(m,4H)，6.99(s,1H)，6.55-6.48(m,1H)，5.65-5.54(m,1H)，5.41(s,2H)，5.35-5.15(m,3H)，4.74-4.62(m,2H)，4.54-4.40(m,2H)，3.76-3.64(m,4H)，3.62-3.48(m,2H)，3.20-3.07(m,2H)，3.04-2.94(m,2H)，2.80-2.62(m,2H)，2.45-2.30(m,3H)，2.25-2.15(m,2H)，2.15-2.04(m,2H)，1.93-1.78(m,2H)，1.52-1.39(m,3H)，1.34-1.12(m,5H)，0.87(t,3H)，0.64-0.38(m,4H)。

[0338] 单一构型化合物5-B(较长保留时间)：

[0339] UPLC分析：保留时间1.16分钟，纯度：89％(色谱柱：ACQUITY UPLC BEHC18 1.7um 2.1*50mm，流动相：A-水(5mmol NH_4OAc)，B-乙腈)。

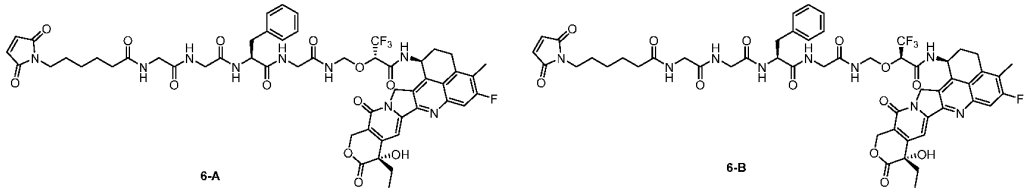
[0340] ^1H NMR(400MHz，DMSO-d_6)：δ8.68-8.60(m,1H)，8.58-8.50(m,1H)，8.32-8.24(m,1H)，8.13-8.02(m,2H)，8.02-7.94(m,1H)，7.82-7.75(m,1H)，7.31(s,1H)，7.26-7.13(m,4H)，6.99(s,1H)，6.55-6.48(m,1H)，5.60-5.50(m,1H)，5.41(s,2H)，5.35-5.15(m,3H)，4.78-4.68(m,1H)，4.60-4.40(m,2H)，3.76-3.58(m,4H)，3.58-3.48(m,1H)，3.20-3.10(m,2H)，3.08-2.97(m,2H)，2.80-2.72(m,2H)，2.45-2.30(m,3H)，2.25-2.13(m,2H)，2.13-2.04(m,2H)，2.03-1.94(m,2H)，1.91-1.78(m,2H)，1.52-1.39(m,3H)，1.34-1.12(m,5H)，0.91-

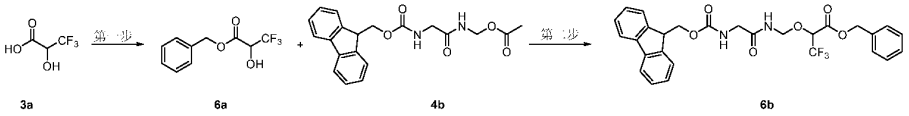
0.79(m,3H),0.53-0.34(m,4H)。

[0341] 实施例6

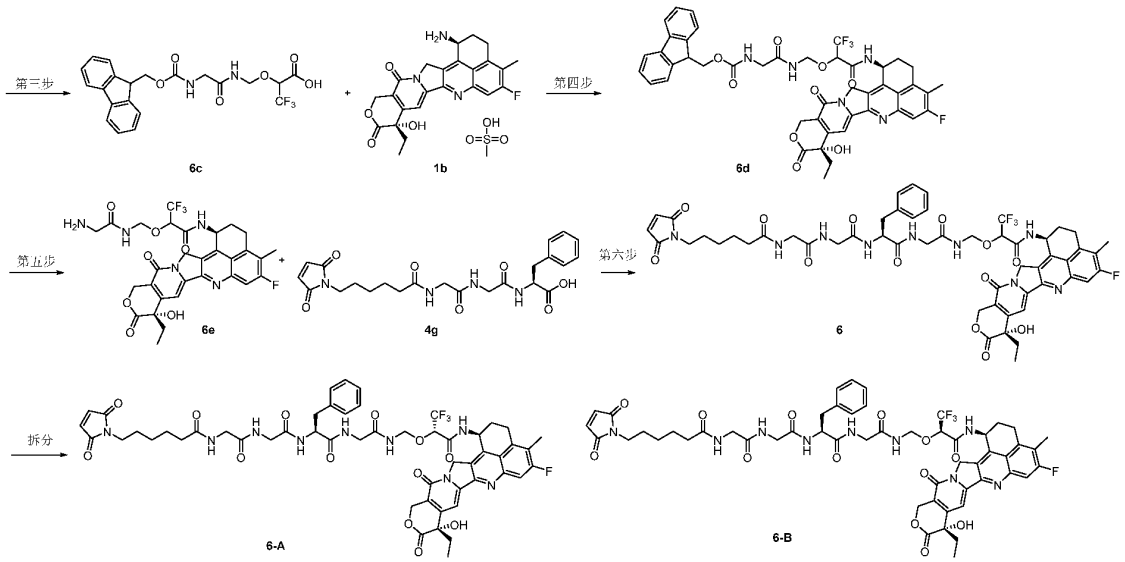
[0342] N-((2S,10S)-10-苄基-2-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3′,4′:6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基羰基)-1,1,1-三氟-6,9,12,15-四氧代-3-氧杂-5,8,11,14-四氮杂十六-16-基)-6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺6-A

[0343] N-((2R,10S)-10-苄基-2-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3′,4′:6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基羰基)-1,1,1-三氟-6,9,12,15-四氧代-3-氧杂-5,8,11,14-四氮杂十六-16-基)-6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺6-B





[0344]



[0345] 第一步

[0346] 3,3,3-三氟-2-羟基丙酸苄酯6a

[0347] 将3a(1.80g,12.5mmol)溶于100mL乙腈中,依次加入碳酸钾(5.17g,37.5mmol)、溴化苄(4.48mL,37.5mmol)和四丁基碘化铵(231mg,0.63mmol)。将反应液加热至60℃搅拌5小时。将反应液冷却至室温,过滤,滤液减压浓缩,用硅胶柱色谱法以展开剂体系C纯化所得残余物,得到标题产物6a(980mg,产率:33.5%)。

[0348] ^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ7.43-7.36(m,5H),5.34(s,2H),4.53(s,1H),3.44(s,1H)。

[0349] 第二步

[0350] 1-(9H-芴-9-基)-3,6-二氧代-10-(三氟甲基)-2,9-二氧杂-4,7-二氮杂十一-11-酸苄酯6b

[0351] 将4b(63mg,0.17mmol)和6a(80mg,0.34mmol)加入反应瓶,加入3mL四氢呋喃,氩气置换三次,冰水浴降温至0-5℃,加入叔丁醇钾(38mg,0.34mmol),撤去冰浴,升至室温搅拌20分钟,加入10mL冰水,用乙酸乙酯(20mL×2)和氯仿(10mL×5)萃取,合并有机相并浓缩,所得残余物溶于2mL二氧六环中,加入0.4mL水,加入碳酸氢钠(19mg,0.23mmol)和氯甲酸-9-芴甲酯(49mg,0.19mmol),室温搅拌1小时。加入20mL水,用乙酸乙酯(10mL×3)萃取,有机相用饱和氯化钠溶液(20mL)洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,滤液减压浓缩,用硅胶柱色谱法以展开剂体系C纯化所得残余物,得到标题产物6b(51mg,产率:55.3%)。

[0352] MS m/z(ESI):559.9[M+18]。

[0353] 第三步

[0354] 1-(9H-芴-9-基)-3,6-二氧代-10-(三氟甲基)-2,9-二氧杂-4,7-二氮杂十一-11-酸6c

[0355] 将6b(15mg,0.28mmol)溶于3mL四氢呋喃和乙酸乙酯(V:V=2:1)混合溶剂中,加入钯碳(15mg,含量10%),氢气置换三次,室温搅拌反应1小时。反应液用硅藻土过滤,滤饼用四氢呋喃淋洗,滤液浓缩,得到粗品标题产物6c(13mg)。

[0356] MS m/z(ESI):452.9[M+1]。

[0357] 第四步

[0358] (9H-芴-9-基)甲基(2-((((3-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3′,4′:6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-1,1,1-三氟-3-氧代丙-2-基)氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)氨基甲酸酯6d

[0359] 将1b(10mg,18.8μmol)加入反应瓶,加入1mL N,N-二甲基甲酰胺,氩气置换三次,冰水浴降温至0-5℃,滴加一滴三乙胺,加入6c(13mg,28.7μmol)的0.5mL N,N-二甲基甲酰胺溶液,加入4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基氯化吗啉盐(11mg,39.7μmol),冰浴搅拌反应30分钟。加入10mL水,用乙酸乙酯(10mL×3)萃取,合并有机相,有机相用饱和氯化钠溶液(10mL×2)洗涤,用无水硫酸钠干燥,过滤,滤液减压浓缩,用薄层层析以展开剂体系B纯化所得残余物,得到标题产物6d(16mg,产率97.8%)。

[0360] MS m/z(ESI):870.0[M+1]。

[0361] 第五步

[0362] 2-((2-氨基乙酰氨基)甲氧基)-N-((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3′,4′:6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)-3,3,3-三氟丙酰胺6e

[0363] 将6d(16mg,18.4μmol)溶于0.6mL二氯甲烷中,加入0.3mL二乙胺,室温搅拌2小时。反应液减压浓缩,加入2mL甲苯并减压浓缩,重复两次。向残余物中加入3mL正己烷打浆,静置后倾倒出上层清液,保留固体;重复三次。将固体残余物减压浓缩,油泵拉干得到粗品标题产物6e(12mg),产品不经纯化直接用于下一步反应。

[0364] MS m/z(ESI):647.9[M+1]。

[0365] 第六步

[0366] N-((2S,10S)-10-苄基-2-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧

代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3′,4′:6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基羰基)-1,1,1-三氟-6,9,12,15-四氧代-3-氧杂-5,8,11,14-四氮杂十六-16-基)-6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺6-A

[0367] N-((2R,10S)-10-苄基-2-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3′,4′:6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基羰基)-1,1,1-三氟-6,9,12,15-四氧代-3-氧杂-5,8,11,14-四氮杂十六-16-基)-6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺6-B

[0368] 将粗品6e(12mg,18.5μmol)溶于1.0mL N,N-二甲基甲酰胺,氩气置换三次,冰水浴降温至0-5℃,加入4g(14mg,29.6μmol)的0.3mL N,N-二甲基甲酰胺溶液,加入4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基氯化吗啉盐(15mg,54.2μmol),冰浴搅拌反应30分钟,撤去冰浴,升至室温搅拌1小时,反应生成化合物6。反应液进行高效液相色谱法纯化(分离条件:色谱柱:XBridge Prep C18 OBD 5um19*250mm;流动相:A-水(10mmol NH_4OAc)B-乙腈,梯度洗脱,流速:18mL/min),收集其相应组分,减压浓缩,得到标题产物(2.7mg,2.6mg)。

[0369] MS m/z(ESI):1102.0[M+1]。

[0370] 单一构型化合物(较短保留时间):

[0371] UPLC分析:保留时间1.18分钟,纯度:91%(色谱柱:ACQUITY UPLC BEHC18 1.7um 2.1*50mm,流动相:A-水(5mmol NH_4OAc),B-乙腈)。

[0372] ^1H NMR(400MHz,DMSO-d_6):δ8.97(d,1H),8.85-8.76(m,1H),8.37-8.27(m,1H),8.12-8.02(m,1H),8.02-7.95(m,1H),7.80(d,1H),7.31(s,1H),7.26-7.10(m,4H),6.99(s,1H),6.66(s,1H),6.52(s,1H),5.65-5.54(m,1H),5.41(s,1H),5.37-5.25(m,3H),5.23-5.13(m,1H),4.81-4.68(m,2H),4.51-4.41(m,1H),3.78-3.45(m,6H),3.21-3.13(m,1H),3.02-2.93(m,1H),2.77-2.63(m,2H),2.45-2.29(m,3H),2.24-2.05(m,3H),2.04-1.93(m,5H),1.90-1.75(m,2H),1.52-1.38(m,4H),0.90-0.78(m,5H)。

[0373] 单一构型化合物(较长保留时间):

[0374] UPLC分析:保留时间1.23分钟,纯度:90%(色谱柱:ACQUITY UPLC BEHC18 1.7um 2.1*50mm,流动相:A-水(5mmol NH_4OAc),B-乙腈)。

[0375] ^1H NMR(400MHz,DMSO-d_6):δ9.05(d,1H),8.97-8.88(m,1H),8.35-8.27(m,1H),8.11-8.03(m,1H),8.02-7.95(m,1H),7.80(d,1H),7.34(s,1H),7.29-7.13(m,4H),6.99(s,1H),6.66(s,1H),6.54(s,1H),5.64-5.55(m,1H),5.43(s,1H),5.36-5.20(m,3H),4.92-4.85(m,1H),4.82-4.72(m,2H),4.52-4.42(m,1H),3.77-3.48(m,6H),3.21-3.14(m,1H),3.03-2.95(m,1H),2.79-2.65(m,2H),2.47-2.28(m,3H),2.25-2.05(m,3H),2.05-1.94(m,5H),1.91-1.76(m,2H),1.52-1.37(m,4H),0.92-0.77(m,5H)。

[0376] 实施例7相关抗体及其检测蛋白的制备

[0377] 实施例7-1.B7H3抗原及检测用蛋白

[0378] 以SEQ ID NO:1所示人B7H3作为本公开B7H3的模板,设计本公开涉及的抗原及检测用蛋白的氨基酸序列。以下B7H3抗原未特殊说明的均指人B7H3。

[0379] 1.1人B7H3全长氨基酸序列:B7H3(SEQ ID NO:1):

[0380] MLRRRGSPGMGVHVGAALGALWFCLTGALEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGQDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYQGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSILRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHSSVTITPQRSPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYRGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTITGQPMTFPPEALWVTVGLSVCLIALLVALAFV*CWRKIKQSCEEENAGAEDQDGEGEGSKTALQPLKHSDSKEDDGQEIA*

[0381] 注释：

[0382] 双横线部分为信号肽(Signal peptide:1-28)；

[0383] 划横线部分为B7H3胞外区(Extracellular domain:29-466)，其中29-139为Ig-样V-型1结构域，145-238为Ig-样C2-型1结构域；243-357为Ig-样V-型2结构域，363-456为Ig-样C2-型2结构域；

[0384] 点划线部分为跨膜区部分(Transmembrane domain:467-487)；

[0385] 斜体部分为胞内区(Cytoplasmic domain:488-534)。

[0386] 1.2鼠B7H3全长氨基酸序列(SEQ ID NO:2)

[0387] MLRGWGGPSVGVCVRTALGVLCLCLTGAVEVQVSEDPVVALVDTDATLRCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYSNRTALFPDLLVQGNASLRLQRVRVTDEGSYTCFVSIQDFDSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGNMVTITCSSYQGYPEAEVFWKDGQGVPLTGNVTTSQMANERGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTITGQPLTFPPEALWVTVGLSVCLVVLLVALAFV*CWRKIKQSCEEENAGAEDQDGDGEGSKTALRPLKPSENKEDDGQEIA*

[0388] 注释：

[0389] 双横线部分为信号肽(Signal peptide:1-28)；

[0390] 划横线部分为B7H3胞外区(Extracellular domain:29-248)，其中29-139为Ig-样V-型结构域，145-238为Ig-样C2-型结构域；

[0391] 点划线部分为跨膜区部分(Transmembrane domain:249-269)；

[0392] 斜体部分为胞内区(Cytoplasmic domain:270-316)。

[0393] 1.3筛选及检测用人B7H3抗原(SEQ ID NO:3)

[0394] 为商业化产品(R&D cat#1949-B3-050/CF，简称2Ig-B7H3)，序列如下：

[0395] LEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGQDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYQGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSILRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHSSVTITPQRSPTG-*HHHHHH*

[0396] 注释：

[0397] 划横线部分为B7H3胞外区；

[0398] 斜体部分为His-tag标记。

[0399] 1.4检测用人B7H3抗原(SEQ ID NO:4)

[0400] 为商业化产品(SinoBiological cat#11188-H08H,简称4Ig-B7H3),序列如下：
LEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEG
QDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVS
LQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYQGYPEAEVFWQDGQGVPLTG
NVTTSQMANEQGLFDVHSILRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHSSVTITPQR

[0401] SPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVH
SFTEGRDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSIRDFGS
AAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYRGYPEAEVFWQDGQGV
PLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTI
TGQPMT-*HHHHHH*

[0402] 注释:划横线部分为B7H3胞外区；

[0403] 斜体部分为His-tag标记。

[0404] 1.5筛选及检测用鼠B7H3抗原(SEQ ID NO:5)

[0405] 为商业化产品(R&D cat#1397-B3-050/CF),序列如下：
VEVQVSEDPVVALVDTDATLRCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEG
RDQGSAYSNRTALFPDLLVQGNASLRLQRVRVTDEGSYTCFVSIQDFDSAAVSL

[0406] QVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGNMVTITCSSYQGYPEAEVFWKDGQGVPLTGN
VTTSQMANERGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTITGQPL
TF-*HHHHHH*

[0407] 注释:划横线部分为B7H3胞外区；

[0408] 斜体部分为His-tag标记。

[0409] 实施例7-2.完全人源抗体的制备

[0410] 2.1阳性序列的筛选

[0411] 利用人PBMC、脾脏、淋巴结组织分离B细胞,并提取RNA,构建天然单链噬菌体抗体库(库容3.2×10^{10})。将构建的天然单链噬菌体文库经过包装形成噬菌体颗粒后,采用液相法进行淘筛,噬菌体与生物素化的B7H3液相结合,再采用链霉亲和素磁珠分离。为了获得可分别与人B7H3(R&D cat#1949-B3-050/CF)和鼠B7H3(R&D cat#1397-B3-050/CF)交叉结合的阳性序列,分别采用生物素化的人B7H3和生物素化的鼠B7H3进行交替淘筛,首轮采用2μg/ml生物素化的人B7H3进行淘筛,第二轮采用2μg/ml生物素化的鼠B7H3进行淘筛,第三轮采用0.5μg/ml生物素化的人B7H3进行淘筛,经三轮淘筛后,挑取500个单克隆包装成噬菌体,用于噬菌体ELISA测试。分别测试单克隆噬菌体与人B7H3(R&D cat#1949-B3-050/CF)和鼠B7H3(R&D cat#1397-B3-050/CF)的结合活性:ELISA板上分别包被1μg/ml人B7H3或鼠B7H3以及1％BSA,加入1:1封闭缓冲液稀释的噬菌体上清,最后用anti-M13HRP检测。将ELISA测试到的OD450值大于0.5,以及结合人和鼠B7H3的ELISA OD450值除以结合1％BSA的ELISA OD450值的两个比值均大于2.0的克隆进行测序,得到特异性序列1702(在本公开中也称h1702,本公开所称抗体h1702和h1702DS与申请PCT/CN2018/081249的h1702和h1702-1相同,将申请PCT/CN2018/081249中的所有内容引入本公开)。

[0412] 2.2完整单克隆抗体的构建

[0413] 噬菌体库筛选得到特异性序列1702,构建其完整单克隆抗体的过程如下：

[0414] 根据测序得到的单链抗体序列，设计引物PCR搭建各单链抗体序列的VH/VK/VL基因片段。获得1702的重轻链可变区。

[0415] ＞1702重链可变区序列

[0416] *QVQLVQSGGGVVQPGTSLRLSCAAS*GFIFSSSA*MHWVRQAPGKGLEWVAV*ISYDGSNK*YYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC*ARSARLYASFDY*WGQGALVTVSS*

SEQ ID NO：6

[0417] ＞1702轻链可变区序列

[0418] *QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLS*SGSVSTSHY*PSWYQQTPGQAPRMLIY*NTN*TRSSGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYC*AIHVDRDIWV*FGGGTKLTVL*

SEQ ID NO：7

[0419] 注：顺序为FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4，序列中斜体为FR序列，下划线为CDR序列。

[0420] 其中各抗体轻重链中CDR序列如表1所示。

[0421] 表1各重链及轻链CDR区序列

[0422]

抗体	重链		轻链	
1702	HCDR1	GFIFSSSA	LCDR1	SGSVSTSHY

[0423]

		SEQ ID NO：8		SEQ ID NO：11
	HCDR2	ISYDGSNK SEQ ID NO：9	LCDR2	NTN SEQ ID NO：12
	HCDR3	ARSARLYASFDY SEQ ID NO：10	LCDR3	AIHVDRDIWV SEQ ID NO：13

[0424] 抗体可变区再与恒定区基因(CH1-FC/CL)片段进行同源重组，构建完整抗体VH-CH1-FC/VK-CL/VL-CL。

[0425] 构建的完整全长抗体1702序列如下：

[0426] 1702重链(IgG1)氨基酸序列：(SEQ ID NO:14)

[0427] QVQLVQSGGGVVQPGTSLRLSCAASGFIFSSSAMHWVRQAPGKGLEWVAV
ISYDGSNKYYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSARLYA
SFDYWGQGALVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0428] 1702轻链氨基酸序列：Lamada(SEQ ID NO:15)

QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSHYPSWYQQTPGQAPRMLIY NTNTRSSGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCAIHVDRDIWVFGGGT

[0429] KLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVK AGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTE CS

[0430] 为进一步提高抗体的稳定性,对1702的轻链序列进行氨基酸突变,具体突变为轻链(SEQ ID NO:15)N端第一个氨基酸残基Q替代为D,缺失突变C端第一个氨基酸残基S,以获得更加稳定和均一的单克隆抗体1702DS(在本公开中也称h1702DS)。

[0431] 突变修饰后的1702DS的重链序列为SEQ ID NO:14,轻链氨基酸序列如下:(SEQ ID NO:16)。

DTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSHYPSWYQQTPGQAPRMLIY NTNTRSSGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCAIHVDRDIWVFGGGT

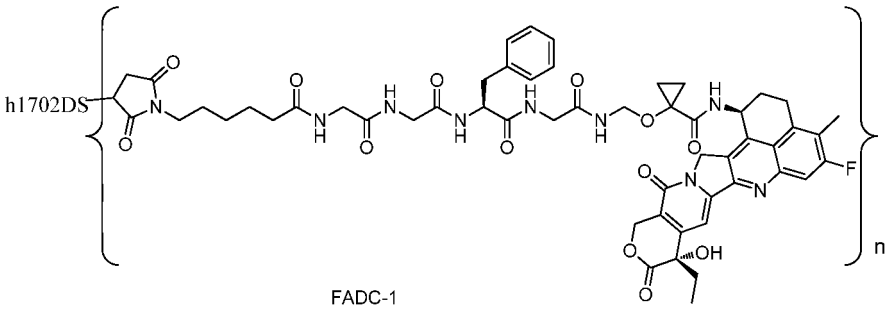
[0432] KLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVK AGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTE C

[0433] 2.3全人抗体的表达与纯化

[0434] 分别表达抗体轻重链的质粒以1.5:1的比例转染HEK293E细胞,6天后收集表达上清,高速离心去除杂质,用Protein A柱进行纯化。用PBS冲洗柱子,至A280读数降至基线。用pH3.0-pH3.5的酸性洗脱液洗脱目的蛋白,用1M Tris-HCl,pH8.0-9.0中和。洗脱样品适当浓缩后,利用PBS平衡好的凝胶层析Superdex200(GE)进一步纯化,以去除聚体,收集单体峰,分装备用。

[0435] B7H3抗体-药物偶联物制备实施例

[0436] 实施例8 ADC-1

[0437] 

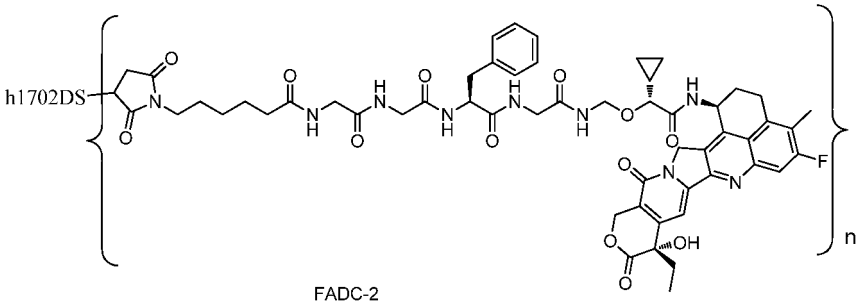
FADC-1

[0438] 在37℃条件下,向抗体1702DS的PBS缓冲水溶液(pH=6.5的0.05M的PBS缓冲水溶液;7.3ml,13.8mg/ml,0.681μmol)加入配置好的三(2-羧乙基)膦的水溶液(10mM,0.347mL,3.47μmol),置于水浴振荡器,于37℃振荡反应3小时,停止反应;将反应液用水浴降温至25℃,稀释至14.0ml,并取出3.3ml溶液往下反应。

[0439] 将化合物4(3.0mg,2.75μmol)溶解于0.15mL DMSO中,加入到上述3.3ml溶液中,置于水浴振荡器,于25℃下振荡反应3小时,停止反应。将反应液用Sephadex G25凝胶柱脱盐纯化(洗脱相:pH为6.5的0.05M的PBS缓冲水溶液,含0.001M的EDTA),得到FADC-1通式的示例性产物ADC-1的PBS缓冲液(1.35mg/mL,13mL),于4℃冷冻储存。

[0440] UV-HPLC计算平均值:n=7.50。

[0441] 实施例9 ADC-2

[0442] 

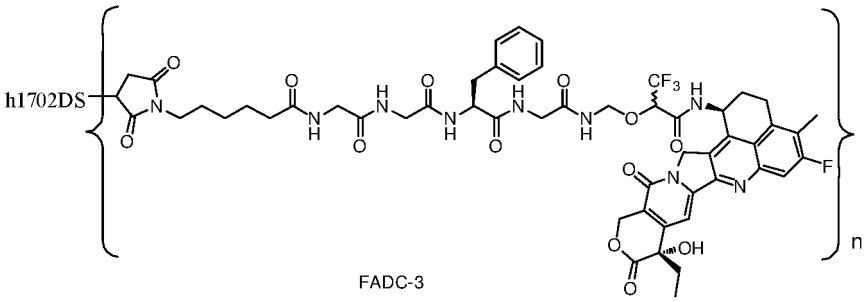
FADC-2

[0443] 在37℃条件下,向抗体1702DS的PBS缓冲水溶液(pH＝6.5的0.05M的PBS缓冲水溶液;1.0ml,13.8mg/ml,0.093μmol)加入配置好的三(2-羧乙基)膦的水溶液(10mM,0.050mL,0.50μmol),置于水浴振荡器,于37℃振荡反应3小时,停止反应;将反应液用水浴降温至25℃,稀释至2.0ml,并取出115ml溶液往下反应。

[0444] 将化合物5-较短保留时间化合物5-A(1.29mg,1.02μmol)溶解于0.10mL DMSO中,加入到上述1.15ml溶液中,置于水浴振荡器,于25℃振荡反应3小时,停止反应。将反应液用Sephadex G25凝胶柱脱盐纯化(洗脱相:pH为6.5的0.05M的PBS缓冲水溶液,含0.001M的EDTA),得到FADC-2通式的示例性产物ADC-2的PBS缓冲液(2.63mg/mL,2.4mL),于4℃冷冻储存。

[0445] UV-HPLC计算平均值:n＝7.24。

[0446] 实施例10 ADC-3

[0447] 

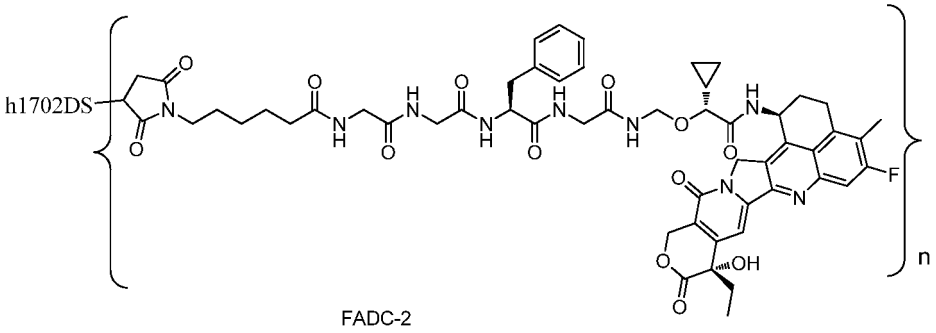
FADC-3

[0448] 在37℃条件下,向抗体1702DS的PBS缓冲水溶液(pH＝6.5的0.05M的PBS缓冲水溶液;7.3ml,13.8mg/ml,0.681μmol)加入配置好的三(2-羧乙基)膦的水溶液(10mM,0.347mL,3.47μmol),置于水浴振荡器,于37℃下振荡反应3小时,停止反应;将反应液用水浴降温至25℃,稀释至14.0ml,并取出3.3ml溶液往下反应。

[0449] 将化合物6-较长保留时间化合物(3.0mg,2.75μmol)溶解于0.15mL DMSO中,加入到上述3.3ml溶液中,置于水浴振荡器,于25℃振荡反应3小时,停止反应。将反应液用Sephadex G25凝胶柱脱盐纯化(洗脱相:pH为6.5的0.05M的PBS缓冲水溶液,含0.001M的EDTA),得到FADC-3通式的示例性产物ADC-3的PBS缓冲液(1.28mg/mL,13mL),于4℃冷冻储存。

[0450] UV-HPLC计算平均值:n＝7.58。

[0451] 实施例11 ADC-4

[0452] 

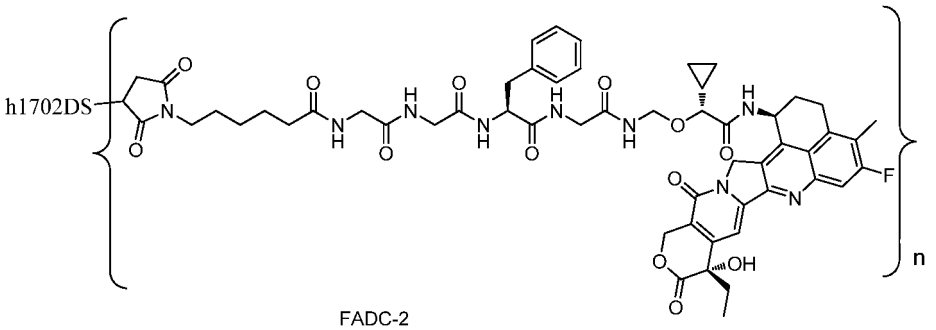
FADC-2

[0453] 在37℃条件下,向抗体1702DS的PBS缓冲水溶液(pH=6.5的0.05M的PBS缓冲水溶液;10.0mg/ml,2.14mL,144.60nmol)加入配置好的的三(2-羧乙基)膦(TCEP)的水溶液(10mM,73.7uL,740nmol),置于水浴振荡器,于37℃振荡反应3小时,停止反应。将反应液用水浴降温至25℃。

[0454] 将化合物5-较短保留时间化合物5-A(3.0mg,2793nmol)溶解于150ul DMSO中,加入到上述反应液中,置于水浴振荡器,于25℃振荡反应3小时,停止反应。将反应液用Sephadex G25凝胶柱脱盐纯化(洗脱相:pH为6.5的0.05M的PBS缓冲水溶液,含0.001M的EDTA),得到FADC-2通式的示例性产物ADC-4的PBS缓冲液(1.28mg/mL,13.0mL),于4℃冷冻储存。

[0455] UV-Vis计算平均值:n=6.87。

[0456] 实施例12 ADC-5

[0457] 

FADC-2

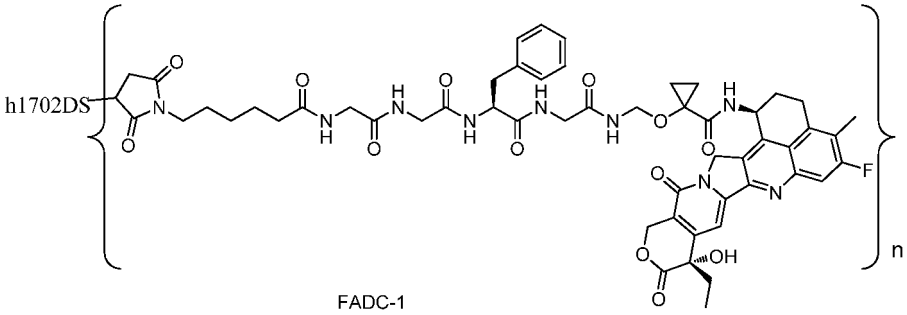
[0458] 在37℃条件下,向抗体1702DS的PBS缓冲水溶液(pH=6.5的0.05M的PBS缓冲水溶液;10.0mg/ml,0.89mL,60.14nmol)加入配置好的三(2-羧乙基)膦(TCEP)的水溶液(10mM,30.1uL,300nmol),置于水浴振荡器,于37℃振荡反应3小时,停止反应。将反应液用水浴降温至25℃。

[0459] 将化合物5-较短保留时间化合物5-A(1.02mg,950nmol)溶解于100ul DMSO中,加入到上述反应液中,置于水浴振荡器,于25℃振荡反应3小时,停止反应。将反应液用Sephadex G25凝胶柱脱盐纯化(洗脱相:pH为6.5的0.05M的PBS缓冲水溶液,含0.001M的EDTA),得到FADC-2通式的示例性产物ADC-5的PBS缓冲液(1.94mg/mL,3.5mL),于4℃冷冻储存。

[0460] UV-Vis计算平均值:n=6.11。

[0461] 参考以上反应步骤,按本领域的常规技术手段调整反应条件,得到n值分别为2.97、4.8的FADC-2通式的示例性产物:ADC-6(n=2.97);ADC-7(n=4.8)。

[0462] 实施例13 ADC-8

[0463] 

FADC-1

[0464] 在37℃条件下,向抗体1702DS的PBS缓冲水溶液(pH＝6.5的0.05M的PBS缓冲水溶液;10.0mg/ml,0.89mL,60.14nmol)加入配置好的的三(2-羧乙基)膦(TCEP)的水溶液(10mM,30.1uL,300nmol),置于水浴振荡器,于37℃振荡反应3小时,停止反应。将反应液用水浴降温至25℃。

[0465] 将化合物4(1.0mg,943nmol)溶解于100ul DMSO中,加入到上述反应液中,置于水浴振荡器,于25℃振荡反应3小时,停止反应。将反应液用Sephadex G25凝胶柱脱盐纯化(洗脱相:pH为6.5的0.05M的PBS缓冲水溶液,含0.001M的EDTA),得到FADC-1通式的示例性产物ADC-8的PBS缓冲液(1.47mg/mL,4.5mL),于4℃冷冻储存。

[0466] UV-Vis计算平均值:n＝6.33。

[0467] 生物学评价

[0468] 测试例1.Biacore抗体亲和力实验

[0469] 用Biacore,GE仪器测定抗B7H3抗体,及B7H3-ADC和人2Ig-B7H3抗原,人4Ig-B7H3抗原之间的反应亲和力。

[0470] 用生物传感芯片Protein A(Cat.#29127556,GE)亲和捕获一定量的待测抗体/待测ADC,然后于芯片表面流经一系列浓度梯度下的人2Ig-B7H3抗原(Cat.#1949-B3-050/CF,R&D)、人4Ig-B7H3抗原(Cat.#11188-H08H,Sino Biological),利用Biacore仪器(Biacore T200,GE)实时检测反应信号从而获得结合和解离曲线。在每个循环解离完成后,用甘氨酸-盐酸再生溶液(pH 1.5)(Cat.#BR-1003-54,GE)将生物芯片洗净再生。实验中用到的缓冲液为HBS-EP缓冲溶液(pH 7.4)(Cat.#BR-1001-88,GE)。

[0471] 实验得到的数据用BIAevaluation version 4.1,GE软件以(1:1)Langmuir模型进行拟合,从而得出亲和力数值。实验结果见表2。

[0472] 表2.h1702抗体和各种抗原之间的反应亲和力(单位:M)

[0473]

抗体	人2Ig-B7H3	人4Ig-B7H3
h1702	7.97E-7	8.55E-9
ADC-2		7.55E-9

[0474] 结论:h1702抗体与抗原具有很强的亲和力。同时,针对与人2Ig-B7H3、人4Ig-B7H3在Biacore实验上的亲和力测试表明,ADC与裸抗的亲和力相似。

[0475] 测试例2.体外细胞内吞实验

[0476] 本实验通过检测细胞内抗体的荧光信号,根据荧光信号强弱来评价抗体的内吞效果。将B7-H3抗体和APC anti-human IgG Fc(Biolegend,409306)以1:2的摩尔比例混合在冰上孵育15分钟。将抗体混合物与2×10^5个U87MG细胞(人脑星形胶质母细胞瘤,中科院细胞库,Catalog#TCHu138)在冰上孵育30分钟后洗掉多余的抗体,然后将细胞转入预温37℃

的培养基中，在37℃分别孵育0、15、30、60和120分钟。离心细胞并将细胞重悬在抗体洗脱液(0.05M甘氨酸，0.1M NaCl，PH2.45)中室温孵育7分钟，洗掉抗体洗脱液，使用BD Verse读取细胞内荧光信号(结果见图1)。结果表明h1702与U87MG细胞系结合后，均能有效地被内吞入细胞。

[0477] 测试例3.SD大鼠$T_{1/2}$评价

[0478] SD大鼠(购自杰思捷实验动物有限公司)4只，雌雄各半，12/12小时光/暗调节，温度24±3℃恒温，湿度50-60％，自由进食饮水。实验当天对SD大鼠分别尾静脉注射受试药物B7H3抗体/ADC，给药剂量为3mg/kg，注射体积5ml/kg。

[0479] 取血时间点为：第1天给药后5分钟、8时、24时(第2天)、第3天、第5天、第8天、第11天、第15天，于大鼠眼底静脉取血，每次200μL(相当于取血清100μL)；收集的血样在室温放置半小时至凝集，然后于4℃10000×g离心10分钟。收集上清，立即放置-80℃贮存。

[0480] 用ELISA检测血清中的B7H3抗体浓度，进行PK分析，结果见表3。

[0481] 表3.B7H3抗体在SD大鼠中的$T_{1/2}$

[0482]

受试药物	给药方式	$T_{1/2}$(平均值±SD，小时)
h1702	IV(3mg/kg)	185±17

[0483] 结果表明，本公开h1702在大鼠体内的半衰期约为185h(7.7天)。

[0484] 测试例4.B7H3抗体的化学稳定性

[0485] 抗体制备后化学修饰是导致产品稳定性的常见问题之一，尤其是CDR区域的部分氨基酸高度脱酰胺、氧化或者异构化修饰，一般选择尽量避免或者突变降低。取500μg待测抗体溶于500μl pH 7.4的PBS中，40℃水浴；分别于0、10、20天取样，用于酶解实验。将100μg不同时间点取样的样品溶于100μl 0.2M His-HCl(组氨酸盐酸缓冲液)和8M Gua-HCl(瓜氨酸盐酸缓冲液)，pH 6.0溶液中，加3μl 0.1g/mL DTT(二硫苏糖醇)，50℃水浴1小时后用0.02M His-HCl，pH 6.0的溶液超滤两次，加入3μL 0.25mg/mL的胰蛋白酶(invitrogen，CAT#25200-072)，37℃水浴酶解过夜。Agilent 6530 Q-TOF进行LC-MS检测分析，对潜在的修饰位点进行质谱分析(结果见表4)。结果显示本公开中涉及的B7H3抗体h1702均无明显的脱酰胺、氧化或者异构化加剧趋势，提示良好的理化稳定性。

[0486] 表4.不同抗体的化学稳定性

[0487]

样品	轻链/重链	位点/修饰	0 天	10 天	20 天
h1702	LC	M48/氧化	2.82%	2.9%	2.83%
	HC	M34/氧化	3.52%	3.46%	3.38%
		M83/氧化	0.98%	1.01%	0.01%

[0488] 测试例5.h1702DS抗体的稳定性

[0489] 通过SEC、非还原CE-SDS分析检测方法(pH 9.0)和IEX分析检测方法，对h1702和h1702DS进行稳定性检测。

[0490] SEC检测：使用Waters e2695色谱仪，Xbridge BEH 200A SEC色谱柱，上样50μg抗体，PBS流动相等度洗脱。

[0491] CE-SDS NR方法：

[0492] 使用Beckman SDS-MW Analysis Kit试剂盒处理样品。100μg蛋白中加入缓冲液，

加热变性。使用PA800毛细管电泳仪采集数据。

[0493] IEX方法：

[0494] 使用Waters Acquity H-Class色谱仪，Thermo MAbPac SCX-10色谱柱，CX-1pH Gradient Buffer Kit作为流动相，上样50μg抗体，线性梯度，采集280nm波长的紫外信号。

[0495] 表5 h1702和h1702DS稳定性比较

[0496]

	SEC	CE-SDS(pH9.0)	IEX
h1702	100%	71.21%	40.5%
h1702DS	100%	94.67%	86.21%

[0497] 测试例6：体外细胞增殖实验

[0498] 本实验通过检测细胞内ATP含量，根据IC_{50}大小评价B7H3-ADC对细胞增殖的抑制效果。

[0499] U87MG细胞(人脑星形胶质母细胞瘤，中科院细胞库，Catalog#TCHu138)、Calu-6细胞(肺癌细胞，ATCC，Catalog#ATCC®HTB-56™)、Detroit562细胞(人咽头癌细胞ATCC，Catalog#ATCC®CCL-138™)、A498细胞(肾癌细胞，ATCC，Catalog#ATCC®HTB-44™)培养在含10%FBS的EMEM培养基中，一周传代2-3次，传代比例1:3或1:6。EMEM培养基配置：MEM培养基(GE，CAT#SH30024.01)，NEAA(sigma，CAT#M7145-100ML)，丙酮酸钠溶液(Sodium pyruvate solution，sigma，CAT#S8636-100ML)。

[0500] A-375(黑色素瘤细胞，ATCC，Catalog#ATCC®CRL-1619™)培养在含10%FBS的DMEM(GE，SH30243.01)培养基中，一周传代2-3次，传代比例1:3或1:6。

[0501] CHO-K1(不表达人B7H3，ATCC，Catalog#ATCC®CCL-61™)培养在含10%FBS的F12(Gibco，11765-054)培养基中，一周传代2-3次，传代比例1:4或1:6。

[0502] 传代时，吸掉培养基，用5ml 0.25%的胰酶冲洗细胞层，然后吸掉胰酶，将细胞放在培养箱中消化3～5分钟，加入新鲜培养基重悬细胞，计数，将细胞悬液配制为相应密度(U87MG细胞500个细胞/孔；A-498细胞500个细胞/孔；A-375细胞300个细胞/孔；Calu-6细胞800个细胞/孔；detroit562细胞2000个细胞/孔；CHO-K1细胞500个细胞/孔)。

[0503] 在96孔细胞培养板中加入180μL的细胞悬液，96孔板外围只加入200ul培养基。将培养板在培养箱中培养24小时(37℃，5%CO_2)。

[0504] 将待测样品用PBS或DMSO以3倍的倍比依次稀释成9个浓度(各ADC起始浓度500nM)。将样品加入培养板中，将培养板在培养箱孵育6天(37℃，5%CO_2)。在96孔细胞培养板中，每孔加入90μl CellTiter-Glo试剂，室温避光放置10分钟，在Victor3中读取化学发光信号值，数据使用GraphPad软件处理。测得的IC_{50}值见表6及图2A至图2F。

[0505] 表6.本公开ADC对细胞增殖的抑制效果

[0506]

	A498	Calu-6	U87	A375	Detroit562	CHOK1
ADC-2	418.9*	70.6	49.1	33.3	31.6	＞500
ADC-3	13.1	1.91	3.78	1.51	1.89	36.8
ADC-1	196.6	26.54	29	23.72	26.9	＞500

[0507] *数值单位为nM

[0508] 测试例7：本公开ADC对人脑星形胶质母细胞瘤U87MG裸小鼠移植瘤的疗效评价

[0509] 一、试验目的

[0510] 本实验以BALB/cA-nude裸小鼠为受试动物，评价本公开ADC化合物对人脑星形胶质母细胞瘤U87MG裸小鼠移植瘤的的疗效。

[0511] 二、受试药物及材料

[0512] 1、受试药物

[0513] ADC-5(1mpk，3mpk)

[0514] ADC-8(1mpk，3mpk)

[0515] 空白组(blank)：PH7.4的PBS缓冲液

[0516] 2、配制方法：PH7.4的PBS缓冲液。

[0517] 3、试验动物

[0518] BALB/cA-nude裸小鼠：SPF，雌性，购自上海杰思捷实验动物有限责任公司。

[0519] 三、试验方法

[0520] 实验用BALB/cA-nude裸小鼠，雌性，6-7周，皮下接种人脑星形胶质母细胞瘤U87MG细胞(同上)。接种细胞后第十天，将动物随机分组(D0)，每组8只，开始腹腔注射给药1次/周，共给药3次，每周测2-3次瘤体积和体重，记录数据。肿瘤体积(V)计算公式为：

[0521] $V=1/2\times a\times b^2$

[0522] 其中：

[0523] a、b分别表示长、宽。

[0524] 相对体积(RTV)＝V_T/V_0

[0525] 抑瘤率(%)＝$(C_{RTV}-T_{RTV})/C_{RTV}$(%)

[0526] 其中V_0、V_T分别为实验开始时及实验结束时的肿瘤体积。C_{RTV}、T_{RTV}分别为实验结束时的对照组(空白组)及实验组的相对肿瘤体积。

[0527] 四、试验结果

[0528] 腹腔注射(i.p.)给药每周1次，共给药3次，观察至第18天时，ADC-8 1mpk的抑瘤率达到39.22%(P＜0.01)；ADC-8 3mpk的抑瘤率达到80.24%(P＜0.0001)；ADC-5 1mpk的抑瘤率达到27.53%(P＜0.05)；ADC-5 3mpk的抑瘤率达到55.88%(P＜0.0001)。观察至22天(D22)时，各给药组的抑瘤率均进一步提高，ADC-8 1mpk的抑瘤率达到47.7%(P＜0.0001)；ADC-8 3mpk的抑瘤率达到89.8%(P＜0.0001)；ADC-5 1mpk的抑瘤率达到40.6%(P＜0.0001)；ADC-5 3mpk的抑瘤率达到63.3%(P＜0.0001)。

[0529] 给药过程中各组动物体重正常，提示ADC无明显毒副作用。检测结果如表7和图3所示。所检测抗体能够有效抑制荷瘤裸鼠中U87MG移植瘤的生长，并且呈现出剂量依赖性。

[0530] 表7.本公开ADC对荷瘤裸鼠U87MG移植瘤的疗效(D22)

[0531]

分组	平均肿瘤体积（mm^3）						相对肿瘤体积				抑瘤率（%）	
	D0	SEM	D18	SEM	D22	SEM	D18	SEM	D22	SEM	D18	D22
空白对照	167	18	2041	288	2907	328	12.01	0.97	17.76	1.63	-	-
ADC-8 1mpk	168	18	1264	222	1599	271	7.30	0.91	9.19	0.99	39.22**	47.7***
ADC-8 3mpk	168	17	409	73	448	89	2.37	0.32	2.55	0.37	80.24***	89.8***
ADC-5 1mpk	168	16	1397	81	1795	111	8.71	0.70	11.25	1.02	27.53*	40.6***
ADC-5 3mpk	168	16	842	42	1172	80	5.30	0.42	7.55	0.95	55.88***	63.3***

[0532] vs空白:*p＜0.05,**p＜0.01,***p＜0.001

[0533] 测试例8:本公开ADC对人咽头癌胸水转移细胞Detroit 562裸小鼠移植瘤的疗效评价

[0534] 一、试验目的

[0535] 本实验以BALB/cA-nude裸小鼠为受试动物,评价本公开ADC化合物对人咽头癌胸水转移细胞Detroit 562裸小鼠移植瘤的疗效。

[0536] 二、受试药物及材料

[0537] 1、受试药物

[0538] ADC-1(1mpk,3mpk)

[0539] ADC-2(1mpk,3mpk)

[0540] 阴性对照ADC(3mpk):非B7H3靶点与参比化合物(专利“CN104755494A”中实施例58)偶联形成的配体毒素偶联物

[0541] 2、配制方法:均用PBS稀释配制。

[0542] 3、试验动物

[0543] BALB/cA-nude裸小鼠:购自常州卡文斯实验动物有限责任公司。

[0544] 三、试验方法

[0545] 实验用BALB/cA-nude裸小鼠,雌性,6-7周,皮下接种人咽头癌胸水转移细胞Detroit 562细胞。接种细胞后第十天,将动物随机分组(D0),每组8只,开始腹腔注射给药1次/周,共给药3次,每周测2-3次瘤体积和体重,记录数据。肿瘤体积(V)计算公式为:

[0546] $V=1/2\times a\times b^2$

[0547] 其中:

[0548] a、b分别表示长、宽。

[0549] 相对体积(RTV)＝V_T/V_0

[0550] 抑瘤率(%)＝$(C_{RTV}-T_{RTV})/C_{RTV}$(%)

[0551] 其中V_0、V_T分别为实验开始时及实验结束时的肿瘤体积。C_{RTV}、T_{RTV}分别为实验结束时的对照组(阴性对照)及实验组的相对肿瘤体积。

[0552] 四、试验结果

[0553] 腹腔注射给药每周1次,共给药3次,观察至D28时,受试ADC抑瘤率分别是:ADC-1 1mg/kg(1mpk)的抑瘤率达到40.85%;ADC-1 3mg/kg(3mpk)的抑瘤率达到62.55%(P＜

0.05)；ADC-21mg/kg(1mpk)的抑瘤率达到44.26％；ADC-23mg/kg(3mpk)的抑瘤率达到72.27％(P＜0.01)。

[0554] 给药过程中各组动物体重正常，提示ADC无明显毒副作用。检测结果如表8和图4所示。所检测抗体能够有效抑制荷瘤裸鼠中Detroit 562移植瘤的生长，并且呈现出剂量依赖性。

[0555] 表8.本公开ADC对荷瘤裸鼠Detroit 562移植瘤的疗效(D28)

[0556]

分组	平均肿瘤体积（mm^3）		平均肿瘤体积（mm^3）		相对肿瘤体积		抑瘤率（％）第28天
	第0天	SEM	第28天	SEM	第28天	SEM	
阴性对照	182.70	6.79	1317.99	223.20	7.47	1.46	-
ADC-1 1mpk	182.46	6.45	784.30	136.27	4.42	0.80	40.85
ADC-1 3mpk	182.60	6.38	501.07	123.58	2.80	0.68	62.55*

[0557]

ADC-2 1mpk	182.65	6.53	738.73	152.08	4.16	0.87	44.26
ADC-2 3mpk	182.59	6.50	381.48	105.76	2.07	0.58	72.27**

[0558] 测试例9：不同载药量的ADC的体外细胞增殖

[0559] 对具有FADC-2结构式的ADC化合物ADC-4(N＝6.87)、ADC-6(n＝2.97)、ADC-7(n＝4.8)，检测其在体外细胞增殖实验的疗效，实验操作流程与测试例6相同。

[0560] 测得的IC_{50}值和最大抑制率见表9及图5A、5B和5C。结果显示，不同DAR值的FADC-2均显示出抑制细胞增殖的疗效，且抑制效果与DAR值正相关，而裸抗无细胞增殖抑制的效果。

[0561] 表9

[0562]

ADC	Detroit562		Calu-6（同上）		CHOK1（同上）	
	IC50 (nM)	最大抑制率 (%)	IC50 (nM)	最大抑制率 (%)	IC50 (nM)	最大抑制率 (%)
ADC-6	80.4	81.59	321.5	64.60	>500	2.15
ADC-7	38.9	87.45	148.1	77.62	>500	-2.05
ADC-4	15.9	94.64	53.6	84.44	>500	9.09
h1702DS	>500	-2.77	>500	0.99	>500	12.62

[0563] 测试例10：血浆稳定性

[0564] 将ADC-4样品，以100μg/ml的终浓度，分别与人血浆、猴血浆(上海美迪西生物医药股份有限公司)、和1％BSA(Sigma)PBS(上海生工)溶液混合均匀后，过滤除菌后置于37℃水浴锅内孵育，将孵育当天记为第0天，随后分别在第7天、14天和21天取出样品，进行游离毒素的检测。

[0565] 不同时间点的样品取出后放至室温，涡旋混匀；取25时间样品至96孔板中；加入50中；内标工作液(100ng/mL喜树碱乙腈溶液)及150μl乙腈；涡旋混合5分钟，离心10分钟(4000rpm)，取上清液5取上清进行LC/MS/MS分析(美国应用生物系统公司)。

[0566] 结果如图6所示，ADC-4在人和猴血浆，以及1％BSA PBS溶液中均相当稳定，游离毒素的释放率最高不超过2％，且在第14天趋于稳定。

[0001] 序列表

[0002] <110> 江苏豪森药业集团有限公司

[0003] <120> 抗B7H3抗体-依喜替康类似物偶联物及其医药用途

[0004] <140> CN201980049765.5

[0005] <141> 2019-09-25

[0006] <150> CN201811156667.5

[0007] <151> 2018-09-30

[0008] <160> 16

[0009] <170> SIPOSequenceListing 1.0

[0010] <210> 1

[0011] <211> 534

[0012] <212> PRT

[0013] <213> Homo sapiens

[0014] <400> 1

[0015] Met Leu Arg Arg Arg Gly Ser Pro Gly Met Gly Val His Val Gly Ala

[0016] 1 5 10 15

[0017] Ala Leu Gly Ala Leu Trp Phe Cys Leu Thr Gly Ala Leu Glu Val Gln

[0018] 20 25 30

[0019] Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu

[0020] 35 40 45

[0021] Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn

[0022] 50 55 60

[0023] Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Ala

[0024] 65 70 75 80

[0025] Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe

[0026] 85 90 95

[0027] Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val

[0028] 100 105 110

[0029] Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp

[0030] 115 120 125

[0031] Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys

[0032] 130 135 140

[0033] Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr

[0034] 145 150 155 160

[0035] Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Gln Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val

[0036] 165 170 175

[0037] Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr

[0038] 180 185 190

[0039] Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Ile Leu
[0040] 195 200 205
[0041] Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn
[0042] 210 215 220
[0043] Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Ser Ser Val Thr Ile Thr Pro Gln
[0044] 225 230 235 240
[0045] Arg Ser Pro Thr Gly Ala Val Glu Val Gln Val Pro Glu Asp Pro Val
[0046] 245 250 255
[0047] Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu Arg Cys Ser Phe Ser Pro
[0048] 260 265 270
[0049] Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr
[0050] 275 280 285
[0051] Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Thr Glu Gly Arg Asp Gln Gly
[0052] 290 295 300
[0053] Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe Pro Asp Leu Leu Ala Gln
[0054] 305 310 315 320
[0055] Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val Arg Val Ala Asp Glu Gly
[0056] 325 330 335
[0057] Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp Phe Gly Ser Ala Ala Val
[0058] 340 345 350
[0059] Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu
[0060] 355 360 365
[0061] Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Ser
[0062] 370 375 380
[0063] Ser Tyr Arg Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val Phe Trp Gln Asp Gly Gln
[0064] 385 390 395 400
[0065] Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu
[0066] 405 410 415
[0067] Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu Arg Val Val Leu Gly Ala
[0068] 420 425 430
[0069] Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp
[0070] 435 440 445
[0071] Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln Pro Met Thr Phe Pro Pro
[0072] 450 455 460
[0073] Glu Ala Leu Trp Val Thr Val Gly Leu Ser Val Cys Leu Ile Ala Leu
[0074] 465 470 475 480
[0075] Leu Val Ala Leu Ala Phe Val Cys Trp Arg Lys Ile Lys Gln Ser Cys
[0076] 485 490 495
[0077] Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala Glu Asp Gln Asp Gly Glu Gly Glu Gly

[0078] 500 505 510

[0079] Ser Lys Thr Ala Leu Gln Pro Leu Lys His Ser Asp Ser Lys Glu Asp

[0080] 515 520 525

[0081] Asp Gly Gln Glu Ile Ala

[0082] 530

[0083] <210> 2

[0084] <211> 316

[0085] <212> PRT

[0086] <213> Artificial Sequence

[0087] <220>

[0088] <221> DOMAIN

[0089] <222> (1)..(316)

[0090] <223> 鼠B7H3

[0091] <400> 2

[0092] Met Leu Arg Gly Trp Gly Gly Pro Ser Val Gly Val Cys Val Arg Thr

[0093] 1 5 10 15

[0094] Ala Leu Gly Val Leu Cys Leu Cys Leu Thr Gly Ala Val Glu Val Gln

[0095] 20 25 30

[0096] Val Ser Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Asp Thr Asp Ala Thr Leu

[0097] 35 40 45

[0098] Arg Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn

[0099] 50 55 60

[0100] Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Thr

[0101] 65 70 75 80

[0102] Glu Gly Arg Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ser Asn Arg Thr Ala Leu Phe

[0103] 85 90 95

[0104] Pro Asp Leu Leu Val Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val

[0105] 100 105 110

[0106] Arg Val Thr Asp Glu Gly Ser Tyr Thr Cys Phe Val Ser Ile Gln Asp

[0107] 115 120 125

[0108] Phe Asp Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys

[0109] 130 135 140

[0110] Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asn Met

[0111] 145 150 155 160

[0112] Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Gln Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val

[0113] 165 170 175

[0114] Phe Trp Lys Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr

[0115] 180 185 190

[0116] Ser Gln Met Ala Asn Glu Arg Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu

[0117] 195 200 205

[0118] Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn

[0119] 210 215 220

[0120] Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln

[0121] 225 230 235 240

[0122] Pro Leu Thr Phe Pro Pro Glu Ala Leu Trp Val Thr Val Gly Leu Ser

[0123] 245 250 255

[0124] Val Cys Leu Val Val Leu Leu Val Ala Leu Ala Phe Val Cys Trp Arg

[0125] 260 265 270

[0126] Lys Ile Lys Gln Ser Cys Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala Glu Asp Gln

[0127] 275 280 285

[0128] Asp Gly Asp Gly Glu Gly Ser Lys Thr Ala Leu Arg Pro Leu Lys Pro

[0129] 290 295 300

[0130] Ser Glu Asn Lys Glu Asp Asp Gly Gln Glu Ile Ala

[0131] 305 310 315

[0132] <210> 3

[0133] <211> 223

[0134] <212> PRT

[0135] <213> Artificial Sequence

[0136] <220>

[0137] <221> DOMAIN

[0138] <222> (1)..(223)

[0139] <223> 人B7H3抗原

[0140] <400> 3

[0141] Leu Glu Val Gln Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr

[0142] 1 5 10 15

[0143] Asp Ala Thr Leu Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu

[0144] 20 25 30

[0145] Ala Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val

[0146] 35 40 45

[0147] His Ser Phe Ala Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg

[0148] 50 55 60

[0149] Thr Ala Leu Phe Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg

[0150] 65 70 75 80

[0151] Leu Gln Arg Val Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val

[0152] 85 90 95

[0153] Ser Ile Arg Asp Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala

[0154] 100 105 110

[0155] Pro Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg

[0156] 115 120 125

[0157] Pro Gly Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Gln Gly Tyr Pro

[0158] 130 135 140

[0159] Glu Ala Glu Val Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly

[0160] 145 150 155 160

[0161] Asn Val Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp Val

[0162] 165 170 175

[0163] His Ser Ile Leu Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys

[0164] 180 185 190

[0165] Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Ser Ser Val Thr

[0166] 195 200 205

[0167] Ile Thr Pro Gln Arg Ser Pro Thr Gly His His His His His His

[0168] 210 215 220

[0169] <210> 4

[0170] <211> 439

[0171] <212> PRT

[0172] <213> Artificial Sequence

[0173] <220>

[0174] <221> DOMAIN

[0175] <222> (1)..(439)

[0176] <223> 人B7H3抗原

[0177] <400> 4

[0178] Leu Glu Val Gln Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr

[0179] 1 5 10 15

[0180] Asp Ala Thr Leu Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu

[0181] 20 25 30

[0182] Ala Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val

[0183] 35 40 45

[0184] His Ser Phe Ala Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg

[0185] 50 55 60

[0186] Thr Ala Leu Phe Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg

[0187] 65 70 75 80

[0188] Leu Gln Arg Val Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val

[0189] 85 90 95

[0190] Ser Ile Arg Asp Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala

[0191] 100 105 110

[0192] Pro Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg

[0193] 115 120 125

[0194] Pro Gly Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Gln Gly Tyr Pro

[0195] 130 135 140

[0196] Glu Ala Glu Val Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly

[0197] 145 150 155 160

[0198] Asn Val Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp Val

[0199] 165 170 175

[0200] His Ser Ile Leu Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys

[0201] 180 185 190

[0202] Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Ser Ser Val Thr

[0203] 195 200 205

[0204] Ile Thr Pro Gln Arg Ser Pro Thr Gly Ala Val Glu Val Gln Val Pro

[0205] 210 215 220

[0206] Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu Arg Cys

[0207] 225 230 235 240

[0208] Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn Leu Ile

[0209] 245 250 255

[0210] Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Thr Glu Gly

[0211] 260 265 270

[0212] Arg Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe Pro Asp

[0213] 275 280 285

[0214] Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val Arg Val

[0215] 290 295 300

[0216] Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp Phe Gly

[0217] 305 310 315 320

[0218] Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys Pro Ser

[0219] 325 330 335

[0220] Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr Val Thr

[0221] 340 345 350

[0222] Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Arg Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val Phe Trp

[0223] 355 360 365

[0224] Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr Ser Gln

[0225] 370 375 380

[0226] Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu Arg Val

[0227] 385 390 395 400

[0228] Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn Pro Val

[0229] 405 410 415

[0230] Leu Gln Gln Asp Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln Pro Met

[0231] 420 425 430

[0232] Thr His His His His His His

[0233] 435

[0234] <210> 5

[0235] <211> 222

[0236] <212> PRT

[0237] <213> Artificial Sequence

[0238] <220>

[0239] <221> DOMAIN

[0240] <222> (1)..(222)

[0241] <223> 鼠B7H3抗原

[0242] <400> 5

[0243] Val Glu Val Gln Val Ser Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Asp Thr

[0244] 1 5 10 15

[0245] Asp Ala Thr Leu Arg Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu

[0246] 20 25 30

[0247] Ala Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val

[0248] 35 40 45

[0249] His Ser Phe Thr Glu Gly Arg Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ser Asn Arg

[0250] 50 55 60

[0251] Thr Ala Leu Phe Pro Asp Leu Leu Val Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg

[0252] 65 70 75 80

[0253] Leu Gln Arg Val Arg Val Thr Asp Glu Gly Ser Tyr Thr Cys Phe Val

[0254] 85 90 95

[0255] Ser Ile Gln Asp Phe Asp Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala

[0256] 100 105 110

[0257] Pro Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg

[0258] 115 120 125

[0259] Pro Gly Asn Met Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Gln Gly Tyr Pro

[0260] 130 135 140

[0261] Glu Ala Glu Val Phe Trp Lys Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly

[0262] 145 150 155 160

[0263] Asn Val Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu Arg Gly Leu Phe Asp Val

[0264] 165 170 175

[0265] His Ser Val Leu Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys

[0266] 180 185 190

[0267] Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Gly Ser Val Thr

[0268] 195 200 205

[0269] Ile Thr Gly Gln Pro Leu Thr Phe His His His His His His

[0270] 210 215 220

[0271] <210> 6

[0272] <211> 119

[0273] <212> PRT

[0274] <213> Artificial Sequence

[0275] <220>

[0276] <221> DOMAIN

[0277] <222> (1)..(119)

[0278] <223> 1702重链可变区

[0279] <400> 6

[0280] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Thr

[0281] 1 5 10 15

[0282] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Ser

[0283] 20 25 30

[0284] Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[0285] 35 40 45

[0286] Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val

[0287] 50 55 60

[0288] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

[0289] 65 70 75 80

[0290] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0291] 85 90 95

[0292] Ala Arg Ser Ala Arg Leu Tyr Ala Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

[0293] 100 105 110

[0294] Ala Leu Val Thr Val Ser Ser

[0295] 115

[0296] <210> 7

[0297] <211> 110

[0298] <212> PRT

[0299] <213> Artificial Sequence

[0300] <220>

[0301] <221> DOMAIN

[0302] <222> (1)..(110)

[0303] <223> 1702轻链可变区

[0304] <400> 7

[0305] Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly

[0306] 1 5 10 15

[0307] Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Leu Ser Ser Gly Ser Val Ser Thr Ser

[0308] 20 25 30

[0309] His Tyr Pro Ser Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Met

[0310] 35 40 45

[0311] Leu Ile Tyr Asn Thr Asn Thr Arg Ser Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe

[0312] 50 55 60

[0313] Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala

[0314] 65 70 75 80

[0315] Gln Ala Asp Asp Glu Ser Asp Tyr Tyr Cys Ala Ile His Val Asp Arg

[0316] 85 90 95

[0317] Asp Ile Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

[0318] 100 105 110

[0319] <210> 8

[0320] <211> 8

[0321] <212> PRT

[0322] <213> Artificial Sequence

[0323] <220>

[0324] <221> DOMAIN

[0325] <222> (1)..(8)

[0326] <223> HCDR1

[0327] <400> 8

[0328] Gly Phe Ile Phe Ser Ser Ser Ala

[0329] 1 5

[0330] <210> 9

[0331] <211> 8

[0332] <212> PRT

[0333] <213> Artificial Sequence

[0334] <220>

[0335] <221> DOMAIN

[0336] <222> (1)..(8)

[0337] <223> HCDR2

[0338] <400> 9

[0339] Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys

[0340] 1 5

[0341] <210> 10

[0342] <211> 12

[0343] <212> PRT

[0344] <213> Artificial Sequence

[0345] <220>

[0346] <221> DOMAIN

[0347] <222> (1)..(12)

[0348] <223> HCDR3

[0349] <400> 10

[0350] Ala Arg Ser Ala Arg Leu Tyr Ala Ser Phe Asp Tyr

[0351] 1 5 10

[0352] <210> 11

[0353] <211> 9

[0354] <212> PRT

[0355] <213> Artificial Sequence

[0356] <220>

[0357] <221> DOMAIN

[0358] <222> (1)..(9)

[0359] <223> LCDR1

[0360] <400> 11

[0361] Ser Gly Ser Val Ser Thr Ser His Tyr

[0362] 1 5

[0363] <210> 12

[0364] <211> 3

[0365] <212> PRT

[0366] <213> Artificial Sequence

[0367] <220>

[0368] <221> DOMAIN

[0369] <222> (1)..(3)

[0370] <223> LCDR2

[0371] <400> 12

[0372] Asn Thr Asn

[0373] 1

[0374] <210> 13

[0375] <211> 10

[0376] <212> PRT

[0377] <213> Artificial Sequence

[0378] <220>

[0379] <221> DOMAIN

[0380] <222> (1)..(10)

[0381] <223> LCDR3

[0382] <400> 13

[0383] Ala Ile His Val Asp Arg Asp Ile Trp Val

[0384] 1 5 10

[0385] <210> 14

[0386] <211> 449

[0387] <212> PRT

[0388] <213> Artificial Sequence

[0389] <220>

[0390] <221> CHAIN

[0391] <222> (1)..(449)

[0392] <223> 1702重链

[0393] <400> 14

[0394] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Thr

[0395] 1 5 10 15

[0396] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Ser

[0397] 20 25 30

[0398] Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[0399] 35 40 45

[0400] Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val

[0401] 50 55 60

[0402] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

[0403] 65 70 75 80

[0404] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0405] 85 90 95

[0406] Ala Arg Ser Ala Arg Leu Tyr Ala Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

[0407] 100 105 110

[0408] Ala Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

[0409] 115 120 125

[0410] Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

[0411] 130 135 140

[0412] Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

[0413] 145 150 155 160

[0414] Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

[0415] 165 170 175

[0416] Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

[0417] 180 185 190

[0418] Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro

[0419] 195 200 205

[0420] Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys

[0421] 210 215 220

[0422] Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro

[0423] 225 230 235 240

[0424] Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

[0425] 245 250 255

[0426] Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp

[0427] 260 265 270

[0428] Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

[0429] 275 280 285

[0430] Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val

[0431] 290 295 300

[0432] Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

[0433] 305 310 315 320

[0434] Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys

[0435] 325 330 335

[0436] Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

[0437] 340 345 350

[0438] Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

[0439] 355 360 365

[0440] Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu

[0441] 370 375 380

[0442] Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

[0443] 385 390 395 400

[0444] Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys

[0445] 405 410 415

[0446] Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

[0447] 420 425 430

[0448] Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

[0449] 435 440 445

[0450] Lys

[0451] <210> 15

[0452] <211> 216

[0453] <212> PRT

[0454] <213> Artificial Sequence

[0455] <220>

[0456] <221> CHAIN

[0457] <222> (1)..(216)

[0458] <223> 1702轻链

[0459] <400> 15

[0460] Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly

[0461] 1 5 10 15

[0462] Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Leu Ser Ser Gly Ser Val Ser Thr Ser

[0463] 20 25 30

[0464] His Tyr Pro Ser Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Met

[0465] 35 40 45

[0466] Leu Ile Tyr Asn Thr Asn Thr Arg Ser Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe

[0467] 50 55 60

[0468] Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
[0469] 65 70 75 80
[0470] Gln Ala Asp Asp Glu Ser Asp Tyr Tyr Cys Ala Ile His Val Asp Arg
[0471] 85 90 95
[0472] Asp Ile Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
[0473] 100 105 110
[0474] Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
[0475] 115 120 125
[0476] Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
[0477] 130 135 140
[0478] Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys
[0479] 145 150 155 160
[0480] Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
[0481] 165 170 175
[0482] Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
[0483] 180 185 190
[0484] Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
[0485] 195 200 205
[0486] Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
[0487] 210 215
[0488] <210> 16
[0489] <211> 215
[0490] <212> PRT
[0491] <213> Artificial Sequence
[0492] <220>
[0493] <221> CHAIN
[0494] <222> (1)..(215)
[0495] <223> 1702DS轻链
[0496] <400> 16
[0497] Asp Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly
[0498] 1 5 10 15
[0499] Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Leu Ser Ser Gly Ser Val Ser Thr Ser
[0500] 20 25 30
[0501] His Tyr Pro Ser Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Met
[0502] 35 40 45
[0503] Leu Ile Tyr Asn Thr Asn Thr Arg Ser Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
[0504] 50 55 60
[0505] Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
[0506] 65 70 75 80

[0507] Gln Ala Asp Asp Glu Ser Asp Tyr Tyr Cys Ala Ile His Val Asp Arg
[0508] 85 90 95
[0509] Asp Ile Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
[0510] 100 105 110
[0511] Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
[0512] 115 120 125
[0513] Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
[0514] 130 135 140
[0515] Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys
[0516] 145 150 155 160
[0517] Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
[0518] 165 170 175
[0519] Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
[0520] 180 185 190
[0521] Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
[0522] 195 200 205
[0523] Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys
[0524] 210 215

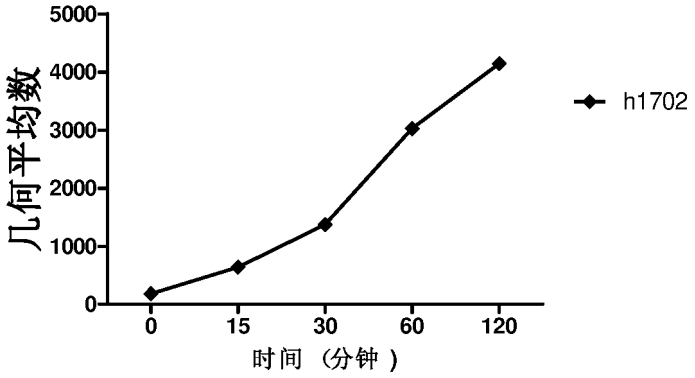

几何平均数
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
15
30
60
120
时间（分钟）
h1702

图1

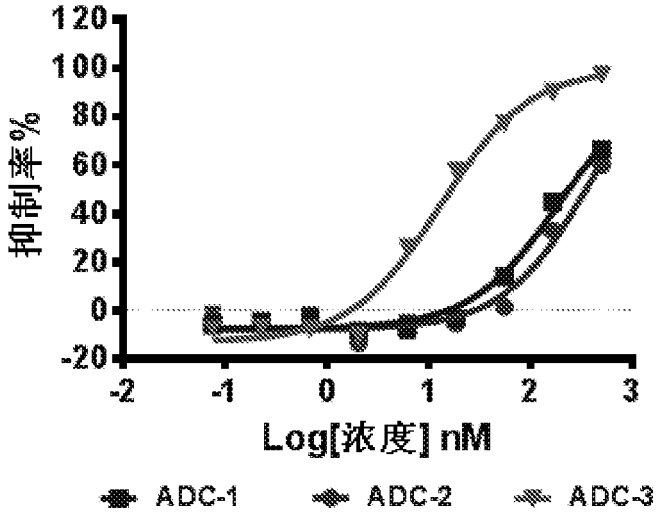

抑制率%
120
100
80
60
40
20
0
-20
-2
-1
0
1
2
3
Log[浓度] nM
ADC-1
ADC-2
ADC-3

图2A

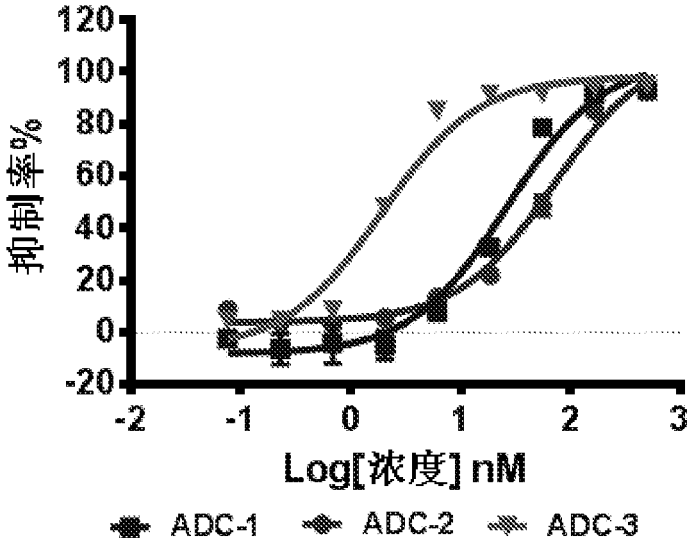

抑制率%
120
100
80
60
40
20
0
-20
-2
-1
0
1
2
3
Log[浓度] nM
ADC-1
ADC-2
ADC-3

图2B

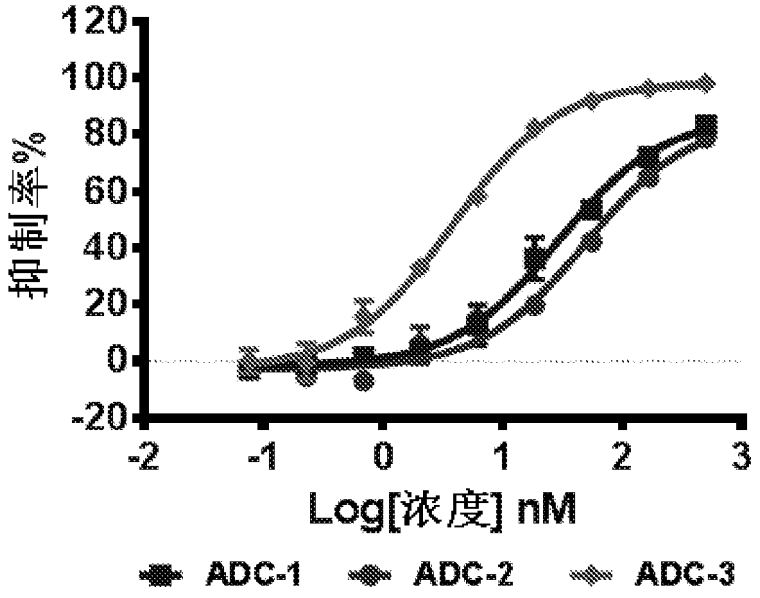

120
100
80
60
40
20
0
-20
抑制率%
-2
-1
0
1
2
3
Log[浓度] nM
ADC-1
ADC-2
ADC-3

图2C

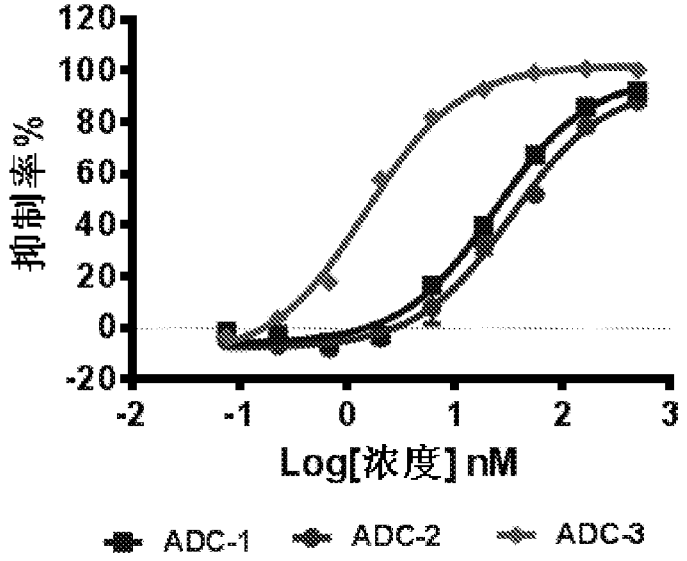

120
100
80
60
40
20
0
-20
抑制率%
-2
-1
0
1
2
3
Log[浓度] nM
ADC-1
ADC-2
ADC-3

图2D

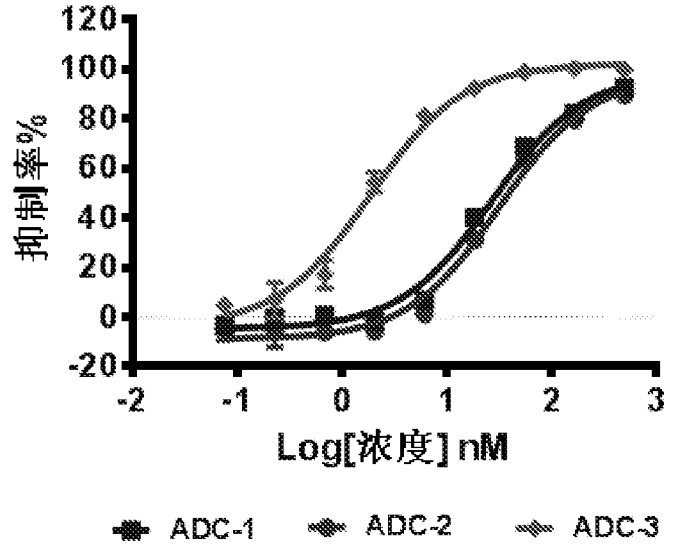

120
100
80
60
40
20
0
-20
抑制率%
-2
-1
0
1
2
3
Log[浓度] nM
ADC-1
ADC-2
ADC-3

图2E

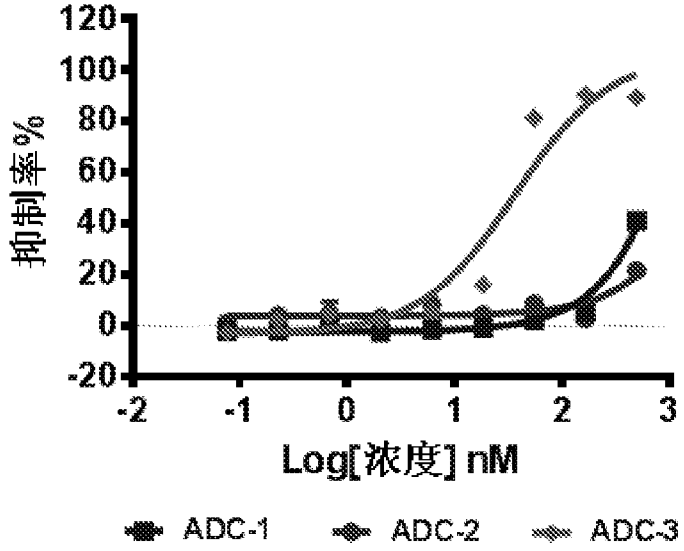

120
100
80
60
40
20
0
-20
抑制率%
-2
-1
0
1
2
3
Log[浓度] nM
ADC-1
ADC-2
ADC-3

图2F

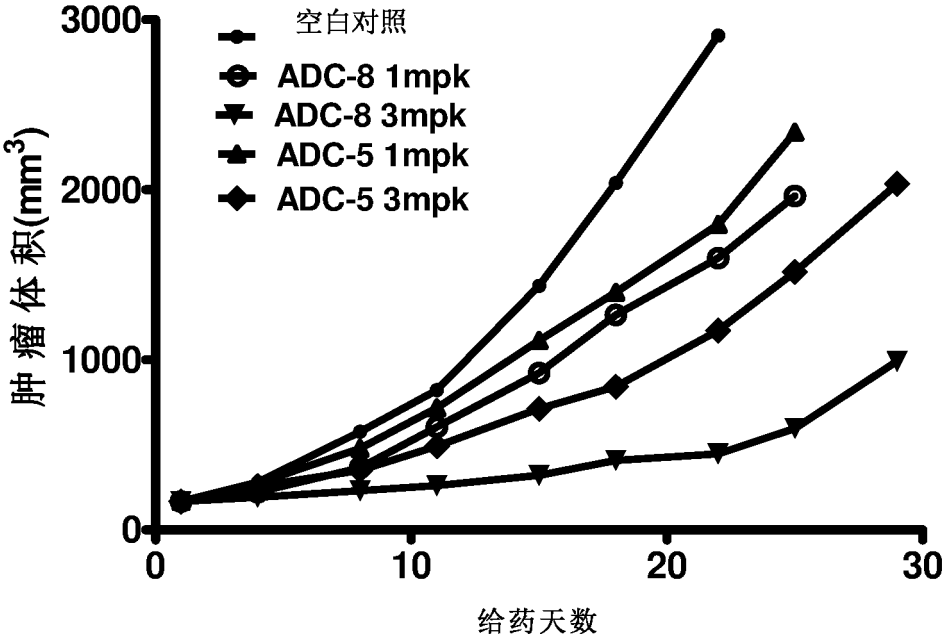

空白对照
ADC-8 1mpk
ADC-8 3mpk
ADC-5 1mpk
ADC-5 3mpk
肿瘤体积(mm3)
3000
2000
1000
0
0
10
20
30
给药天数

图3

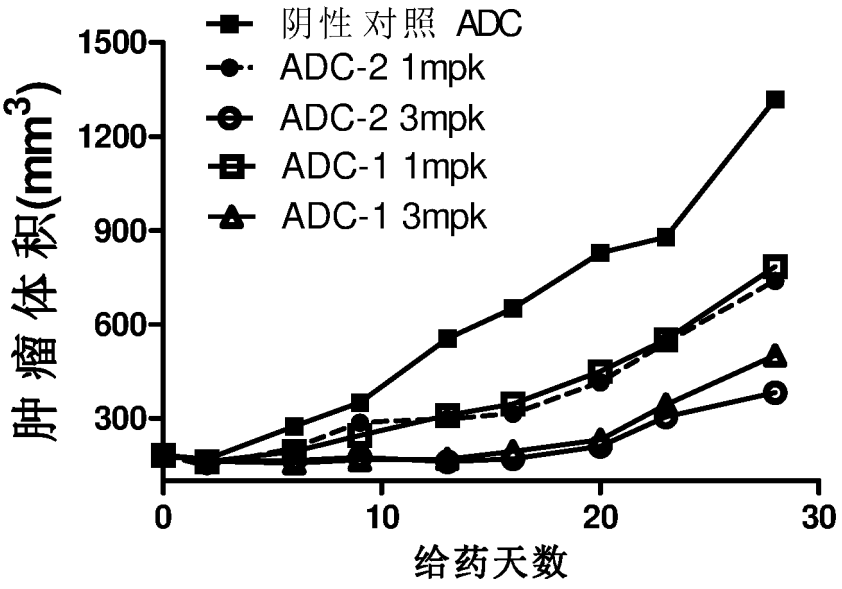

阴性对照 ADC
ADC-2 1mpk
ADC-2 3mpk
ADC-1 1mpk
ADC-1 3mpk
肿瘤体积(mm3)
1500
1200
900
600
300
0
10
20
30
给药天数

图4

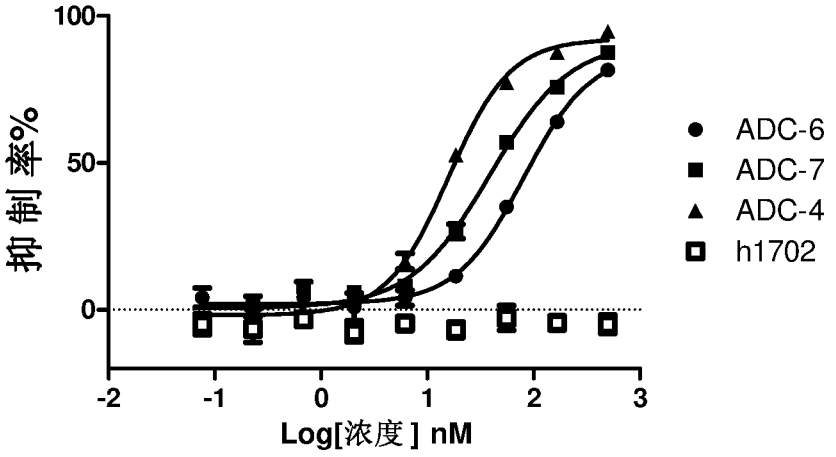

100
50
0
抑制率%
-2
-1
0
1
2
3
Log[浓度] nM
ADC-6
ADC-7
ADC-4
h1702

图5A

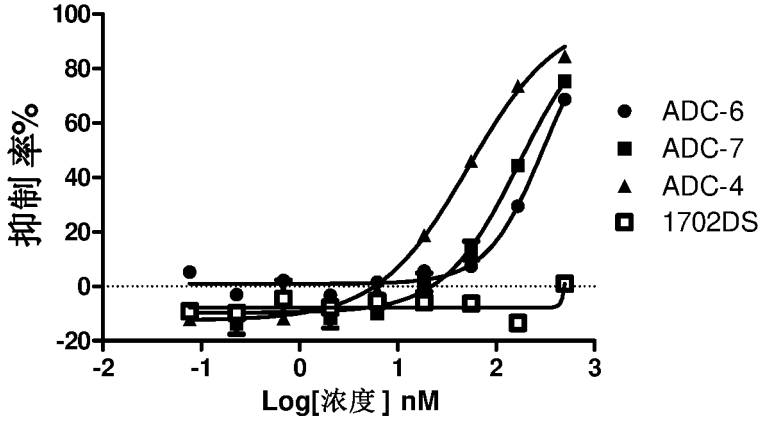

100
80
60
40
20
0
-20
抑制率%
-2
-1
0
1
2
3
Log[浓度] nM
ADC-6
ADC-7
ADC-4
1702DS

图5B

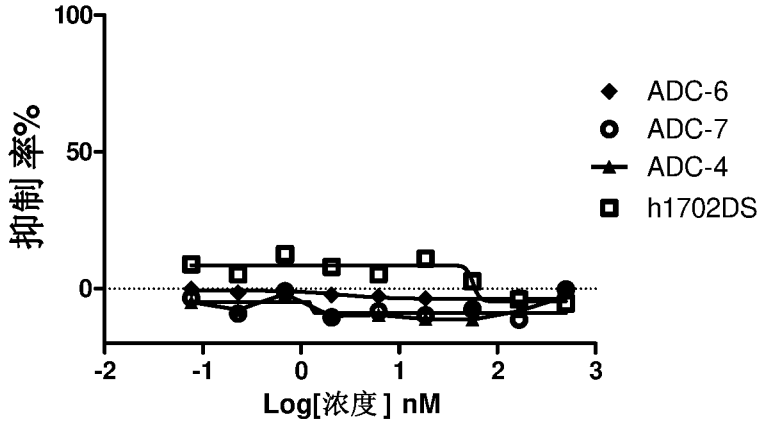

100
50
0
抑制率%
-2
-1
0
1
2
3
Log[浓度] nM
ADC-6
ADC-7
ADC-4
h1702DS

图5C

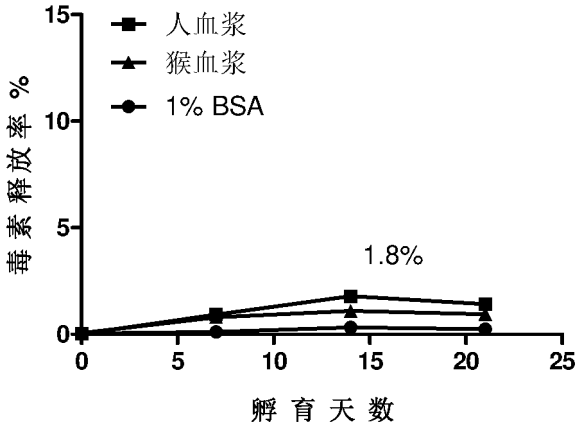


图6