



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I757740 B

(45)公告日：中華民國 111 (2022) 年 03 月 11 日

(21)申請案號：109116005

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 10 月 11 日

(51)Int. Cl. : C07D207/452(2006.01)

C07D221/18 (2006.01)

C07C13/567 (2006.01)

C07C235/22 (2006.01)

(30)優先權：2012/10/11 日本

2012-225887

(71)申請人：日商第一三共股份有限公司 (日本) DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED
(JP)

日本

(72)發明人：益田剛 MASUDA, TAKESHI (JP)；內藤博之 NAITO, HIROYUKI (JP)；中田隆
NAKADA, TAKASHI (JP)；吉田昌生 YOSHIDA, MASAO (JP)；蘆田真二
ASHIDA, SHINJI (JP)；宮崎秀樹 MIYAZAKI, HIDEKI (JP)；粕谷裕司 KASUYA,
YUJI (JP)；森田浩司 MORITA, KOJI (JP)；阿部有生 ABE, YUKI (JP)；扇谷祐
輔 OGITANI, YUSUKE (JP)

(74)代理人：黃政誠；丁國隆

(56)參考文獻：

TW 200817434A

審查人員：江盈盈

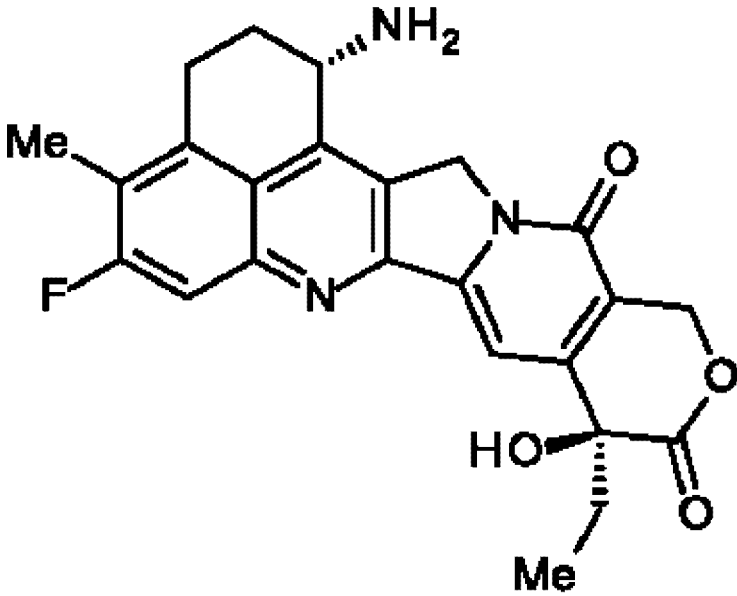
申請專利範圍項數：13 項 圖式數：22 共 389 頁

(54)名稱

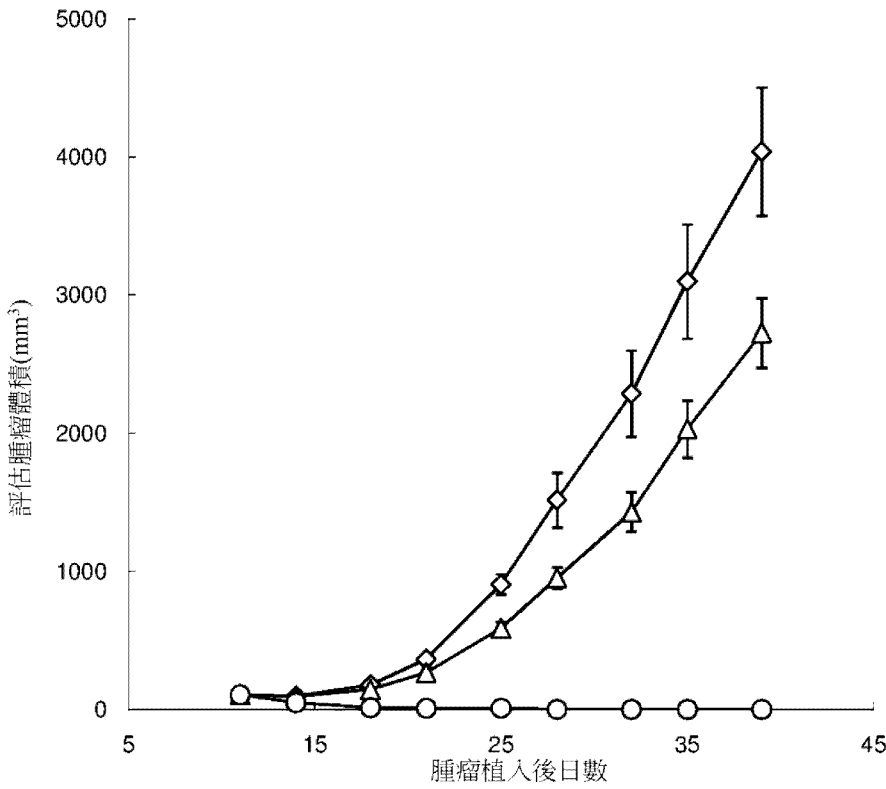
甘胺酸醯胺化合物及其製造方法

(57)摘要

本發明係提供一種抗體-藥物複合體，作為為抗腫瘤效果與安全性面優異的抗腫瘤藥，其特徵為透過下式： $-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)_n-L^a-L^b-L^c-$ 所示的構造之連結物，使下式所示的抗腫瘤性化合物與抗體結合(抗體係於 L^1 之末端結合，抗腫瘤性化合物係以第 1 位之胺基之氮原子作為結合部位，於 L^c 之末端結合)。



指定代表圖：

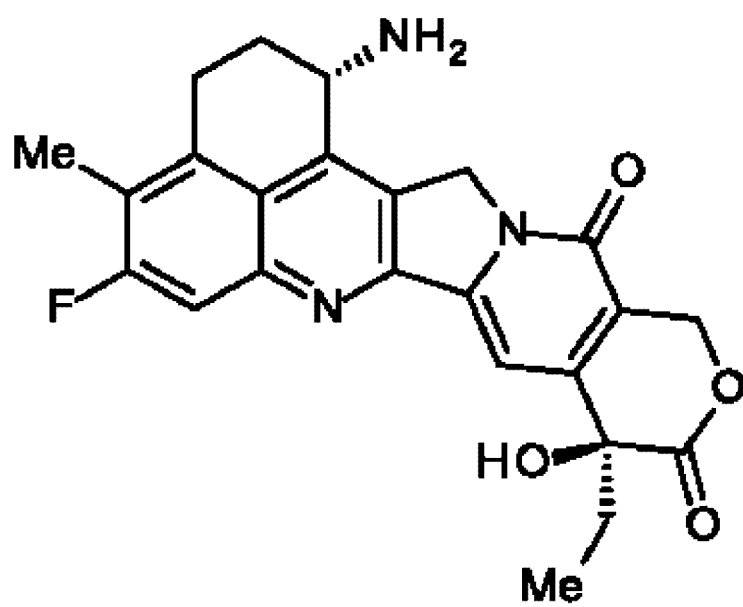


【第 17 圖】

特徵化學式：

I757740

TW I757740 B





I757740

【發明摘要】

【中文發明名稱】

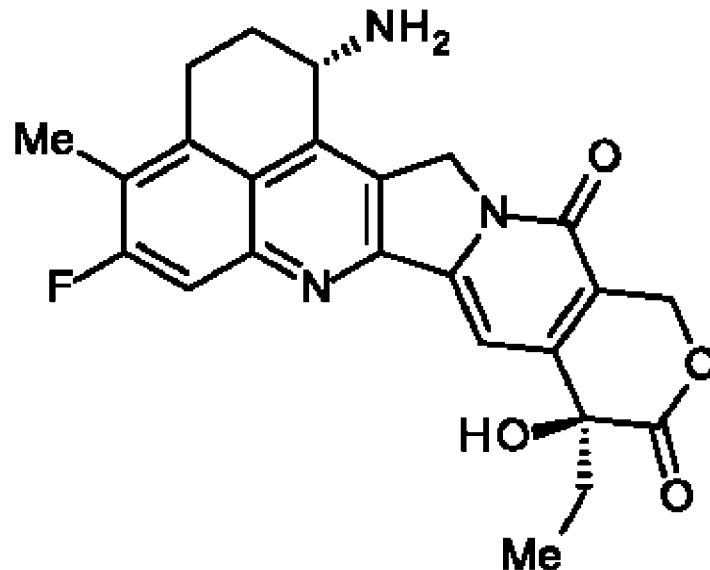
甘胺酸醯胺化合物及其製造方法

【英文發明名稱】

METHOD FOR PRODUCING A GLYCINAMIDE COMPOUND

【中文】

本發明係提供一種抗體-藥物複合體，作為為抗腫瘤效果與安全性面優異的抗腫瘤藥，其特徵為透過下式： $-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)_{n^1}-L^a-L^b-L^c-$ 所示的構造之連結物，使下式所示的抗腫瘤性化合物與抗體結合(抗體係於 L^1 之末端結合，抗腫瘤性化合物係以第 1 位之胺基之氮原子作為結合部位，於 L^c 之末端結合)。



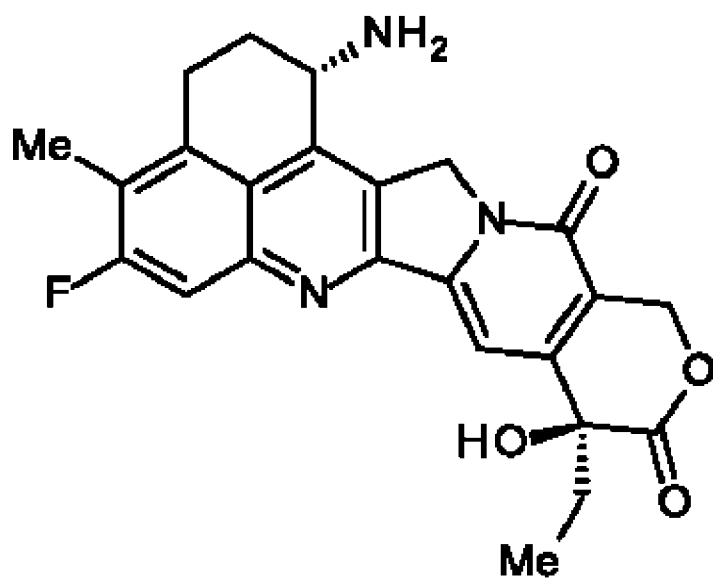
【指定代表圖】

第 17 圖

【代表圖之符號簡單說明】

無。

【特徵化學式】



【發明說明書】

【中文發明名稱】

甘胺酸醯胺化合物及其製造方法

【英文發明名稱】

METHOD FOR PRODUCING A GLYCINAMIDE COMPOUND

【技術領域】

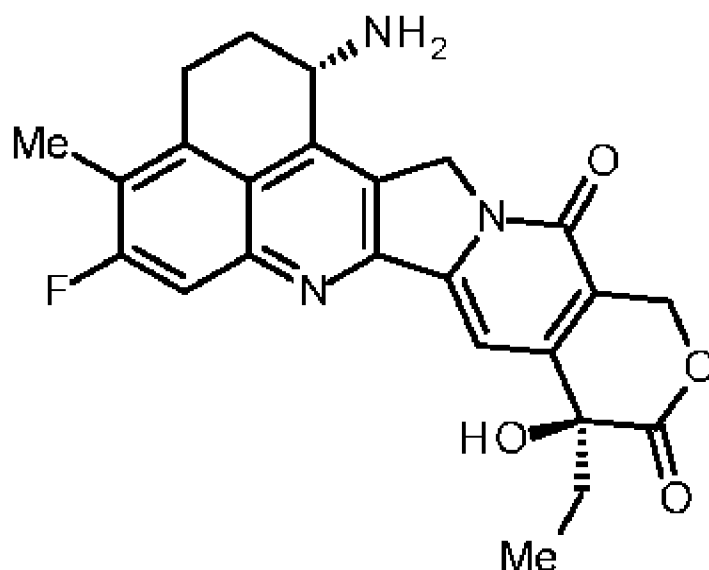
【0001】本發明係關於有用於作為抗腫瘤藥之抗體-藥物複合體，其透過連結物構造部分而使可將腫瘤細胞作為標的之抗體與抗腫瘤性藥物結合。

【先前技術】

【0002】使具細胞毒性的某藥物結合抗體之抗體-藥物複合體 (Antibody-Drug Conjugate; ADC)(該抗體係結合在癌細胞表面上表現、且可細胞內在化的抗原)，藉由可將藥物選擇性地送至癌細胞，可期待使癌細胞內蓄積藥物，且使癌細胞死亡(參照非專利文獻 1~3)。就 ADC 而言，例如，已認可使抗 CD33 抗體與卡奇黴素(calicheamicin)結合的 Mylotarg(吉妥單抗-奧佐米星(Gemtuzumab ozogamicin))作為急性骨髓性白血病之治療藥。又，使抗 CD30 抗體與奧利它汀 E(auristatin E)結合的 Adcetris(貝倫妥單抗-維多汀(brentuximab vedotin))最近被認可作為何傑金淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)與未分化大細胞淋巴瘤之治療藥(參照非專利文獻 4)。迄今被認可的 ADC 中所含有的藥物係以 DNA、或微管蛋白作為標的。

【0003】作為抗腫瘤性之低分子化合物之抑制拓撲異構酶 I(topoisomerase I)而表現抗腫瘤作用的化合物喜樹鹼(camptothecin)衍生物為已知。其中，下式所示抗腫瘤性化合物

【0004】



【0005】(依喜替康(exatecan)，化學名：(1S,9S)-1-胺基-9-乙基-5-氟-2,3-二氫-9-羥基-4-甲基-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-10,13(9H,15H)-二酮)係水溶性之喜樹鹼衍生物(專利文獻 1、2)。與現在臨床使用的愛萊諾迪肯(irinotecan)不同，不需要經由酵素的活性化。又，較愛萊諾迪肯之藥效本體 SN-38、或相同於臨床使用的托泊替康之拓撲異構酶 I 抑制活性為強，活體外對各種癌細胞，具有更強的殺細胞活性。尤其，藉由 P-醣蛋白之表現而對 SN-38 等顯示耐性的癌細胞亦顯示效果。又，於小鼠之人類腫瘤皮下移植模式亦顯示強的抗腫瘤效果，雖已進行了臨床試驗，但尚未上市(參照非專利文獻 5~10)。關於依喜替康有效地作為 ADC 之作用則未明瞭。

【0006】DE-310 係使依喜替康透過 GGFG 胜肽間隔物而與生物分解性之羧基甲基葡聚糖多元醇聚合物結合的複合體(專利文獻 3)。藉由將依喜替康作高分子前藥化，使保持高血中滯留

性，又利用腫瘤新生血管之透過性的亢進與腫瘤組織滯留性，被動地提高對腫瘤部位之定向性。DE-310 係藉由酵素切斷胜肽間隔物，活性本體的依喜替康及甘胺酸與胺基結合的依喜替康被持續地游離。其結果，藥物動態被改善，於非臨床試驗中的各腫瘤之評價模式，雖然 DE-310 之依喜替康投與量較依喜替康單劑之投與時更為減少，但較依喜替康單劑之投與時顯示更高的有效性。關於 DE-310，已有臨床試驗實施、於人類之有效例被確認、活性本體較正常組織更集聚於腫瘤被確認的報告，另一方面，亦有對人類中的腫瘤之 DE-310 及活性本體之集聚與對正常組織之集聚無顯著不同，於人類未見到被動的目標導向的報告(參照非專利文獻 11~14)。結果為 DE-310 尚未上市，關於依喜替康作為如此指向標的的藥物的機能是否有效則不清楚。

作為 DE-310 之關連化合物，將-NH(CH₂)₄C(=O)-所示的構造部分插入-GGFG-間隔物與依喜替康之間，將-GGFG-NH(CH₂)₄C(=O)-作為間隔物構造的複合體亦為已知(專利文獻 4)，但關於相同複合體之抗腫瘤效果則完全未知。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

【0007】

專利文獻 1 日本特開平 5-59061 號公報

專利文獻 2 日本特開平 8-337584 號公報

專利文獻 3 國際公開 WO1997/46260 小冊

專利文獻 4 國際公開 WO2000/25825 小冊

[非專利文獻]

【0008】

非專利文獻 1 Ducry, L., et al. *Bioconjugate Chem.* (2010) 21, 5-13.; Antibody-Drug Conjugates: Linking cytotoxic payloads to monoclonal antibodies.

非專利文獻 2 Alley, S. C., et al. *Current Opinion in Chemical Biology* (2010) 14, 529-537.; Antibody-drug conjugates: targeted drug delivery for cancer.

非專利文獻 3 Damle N.K. *Expert Opin. Biol. Ther.* (2004) 4, 1445-1452.; Tumour-targeted chemotherapy with immunoconjugates of calicheamicin.

非專利文獻 4 Senter P. D., et al. *Nature Biotechnology* (2012) 30, 631-637.; The discovery and development of brentuximab vedotin for use in relapsed Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma.

非專利文獻 5 Kumazawa, E., Tohgo, A., *Exp. Opin. Invest. Drugs* (1998) 7, 625-632.; Antitumour activity of DX-8951f: a new camptothecin derivative.

非專利文獻 6 Mitsui, I., Kumazawa, E., Hirota, Y., et al. *Jpn J. Cancer Res.* (1995) 86, 776-786.; A new water-soluble camptothecin derivative, DX-8951f, exhibits potent antitumor activity against human tumors in vitro and in vivo.

非專利文獻 7 Takiguchi, S., Tohgo, A., et al. *Jpn J. Cancer Res.* (1997) 88, 760-769.; Antitumor effect of DX-

8951, a novel camptothecin analog, on human pancreatic tumor cells and their CPT-11-resistant variants cultured in vitro and xenografted into nude mice.

非專利文獻 8 Joto, N. et al. *Int J Cancer* (1997) 72, 680-686.; DX-8951f, a water-soluble camptothecin analog, exhibits potent antitumor activity against a human lung cancer cell line and its SN-38-resistant variant.

非專利文獻 9 Kumazawa, E. et al. *Cancer Chemother. Pharmacol.* (1998) 42, 210-220.; Potent and broad antitumor effects of DX-8951f, a water-soluble camptothecin derivative, against various human tumors xenografted in nude mice.

非專利文獻 10 De Jager, R., et al. *Ann N Y Acad Sci* (2000) 922, 260-273.; DX-8951f: summary of phase I clinical trials.

非專利文獻 11 Inoue, K. et al. *Polymer Drugs in the Clinical Stage*, Edited by Maeda et al. (2003), 145-153.; CM-dextran-polyalcohol-camptothecin conjugate, DE-310 with a novel carrier system and its preclinical data.

非專利文獻 12 Kumazawa, E. et al. *Cancer Sci* (2004) 95, 168-175.; DE-310, a novel macromolecular carrier system for the camptothecin analog DX-8951f: Potent antitumor activities in various murine tumor models.

非專利文獻 13 Soepenbergh, O. et al. *Clinical Cancer Research*, (2005) 11, 703-711.; Phase I and pharmacokinetic study of DE-310 in Patients with Advanced Solid Tumors.

非專利文獻 14 Wente M. N. et al. Investigational New Drugs (2005) 23, 339-347.; DE-310, a macromolecular prodrug of the topoisomerase-I-inhibitor exatecan (DX-8951), in patients with operable solid tumors.

【發明內容】

[發明欲解決之課題]

【0009】於藉由抗體之腫瘤治療，即使抗體辨識抗原而與腫瘤細胞結合，亦有觀察到抗腫瘤效果並不充分的情形，而有更高效效果的抗腫瘤抗體為必要的情形。又，於抗腫瘤性之低分子化合物，即使抗腫瘤效果為優異，亦大多有副作用或毒性面等之安全性上的問題，關於低分子抗腫瘤化合物，更提高安全性而獲得更優異的治療效果者亦為一課題。即，本發明之課題係提供於抗腫瘤效果與安全性面為優異、獲得具有優異治療效果的抗腫瘤藥。

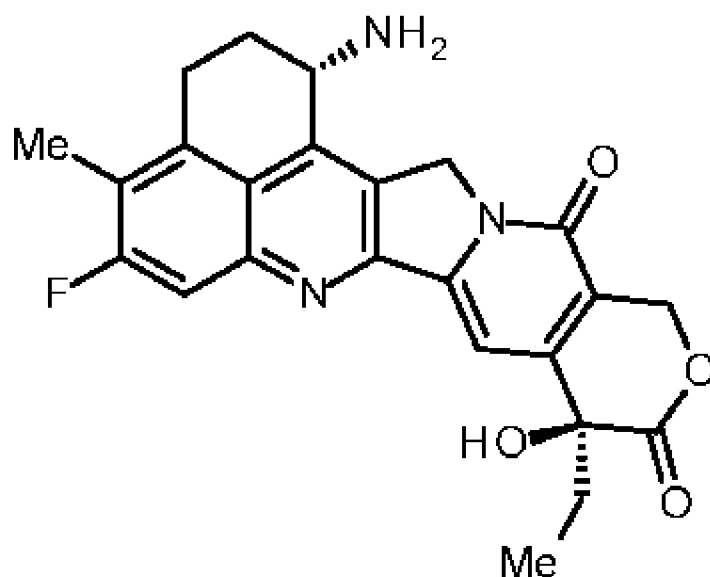
[解決課題之手段]

【0010】本發明者認為以下為可能的：將抗腫瘤性化合物依喜替康變換為透過連結物構造部分而與可標的腫瘤細胞的抗體結合之化合物的抗體-藥物複合體，該抗體即為具備可認識腫瘤細胞的特性、可與腫瘤細胞結合的特性、可於腫瘤細胞內在化的特性、或者對腫瘤細胞具有細胞障礙性的特性之任一者或其以上之特性的抗體，若為對腫瘤細胞具有細胞障礙性的抗體，其細胞障礙性之增強可達成，又使抗腫瘤性化合物更確實地移動至腫瘤細胞而可使該化合物之抗腫瘤效果於腫瘤細胞特異性地發揮，據此抗腫瘤效果之確實發揮的同時，可達成抗腫瘤性化合物之投與量較該化合物之單體投與時更為減少的高安全性。

因此，本發明者們創造出特定構造之連結物，藉由此連結物而成功獲得抗體與依喜替康結合的抗體-藥物複合體，而且發現此化合物發揮優異的抗腫瘤效果，遂而完成本發明。

【0011】即，本發明係關於：

[1]一種抗體-藥物複合體，其特徵為使下式所示之抗腫瘤性化合物



與抗體，藉由下式：

$-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)_{n^1}-L^a-L^b-L^c-$ 所示構造之連結物結合。

【0012】其中，抗體係於 L^1 之末端結合，抗腫瘤性化合物係以第 1 位之胺基的氮原子作為結合部位，而於 L^c 之末端結合，

式中，

n^1 表示 0 至 6 之整數，

L^1 表示 $-(\text{琥珀醯亞胺}-3\text{-基}-N)-(CH_2)_{n^2}-C(=O)-$ 、 $-CH_2-C(=O)-NH-(CH_2)_{n^3}-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N\text{-基}-3\text{-琥珀醯亞胺})-$ 、或 $-C(=O)-(CH_2)_{n^4}-C(=O)-$ ，

其中， n^2 表示 2 至 8 之整數， n^3 表示 1 至 8 之整數， n^4 表示 1 至 8 之整數，

L^2 表示 $-\text{NH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})n^5-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{S}-(\text{CH}_2)n^6-\text{C}(=\text{O})-$ 、或單鍵，

其中， n^5 表示 1 至 6 之整數， n^6 表示 1 至 6 之整數，

L^P 表示以 2 至 7 個胺基酸構成的胜肽殘基，

L^a 表示 $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ 、 $-\text{NR}^1-(\text{CH}_2)n^7-$ 、 $-\text{O}-$ 、或單鍵，

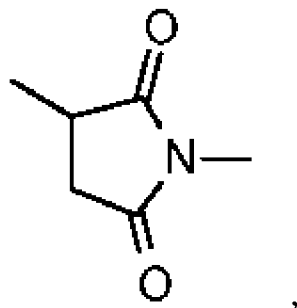
其中， n^7 表示 1 至 6 之整數， R^1 表示氫原子、碳數 1 至 6 之烷基、 $-(\text{CH}_2)n^8-\text{COOH}$ 、或 $-(\text{CH}_2)n^9-\text{OH}$ ，但 n^8 表示整數之 1 至 4， n^9 表示 1 至 6 之整數，

L^b 表示 $-\text{CR}^2(-\text{R}^3)-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{NR}^4-$ 、或單鍵，

其中， R^2 及 R^3 各自獨立表示氫原子、碳數 1 至 6 之烷基、 $-(\text{CH}_2)n^a-\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)n^b-\text{COOH}$ 、或 $-(\text{CH}_2)n^c-\text{OH}$ ， R^4 表示氫原子或碳數 1 至 6 之烷基， n^a 表示 0 至 6 之整數， n^b 表示整數之 1 至 4， n^c 表示整數之 1 至 4，但 n^a 為 0 時， R^2 及 R^3 並不相同，

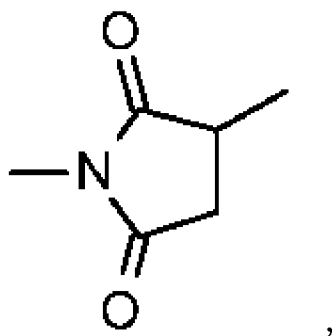
L^c 表示 $-\text{CH}_2-$ 或 $-\text{C}(=\text{O})-$ ，

$-(\text{琥珀醯亞胺-3-基-N})-$ 係下式所示構造：



其第 3 位與抗體結合，第 1 位之氮原子上與含其的連結物構造內之亞甲基結合，

-(N-基-3-琥珀醯亞胺)-係下式所示構造：



其於第 3 位與 L^2 結合，於第 1 位之氮原子上與含此構造的連結物構造內之亞甲基結合，

cyc.Hex(1,4)係表示 1,4-伸環己基，

L^2 係-S-(CH₂)_n⁶-C(=O)-時， L^1 成為-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH₂-(N-基-3-琥珀醯亞胺)-。

【0013】再者，本發明亦關於以下各者。

[2]如[1]記載之抗體-藥物複合體，其中 L^c 為-C(=O)-。

[3]如[1]或[2]記載之抗體-藥物複合體，其中抗體與 L^1 之結合係：

於抗體之鉸鏈部存在的雙硫鍵部分形成的硫醚鍵、

於抗體之鉸鏈部存在的雙硫鍵部分形成的雙硫鍵、或

於構成抗體的胺基酸之側鏈上存在的胺基或末端之胺基所形成的醯胺鍵。

[4]如[1]至[3]中任一項記載之抗體-藥物複合體，其中 L^P 之胜肽殘基係選自苯丙胺酸、甘胺酸、纈胺酸、離胺酸、瓜胺酸(citrulline)、絲胺酸、麩胺酸、天冬胺酸的胺基酸而成的胺基酸殘基。

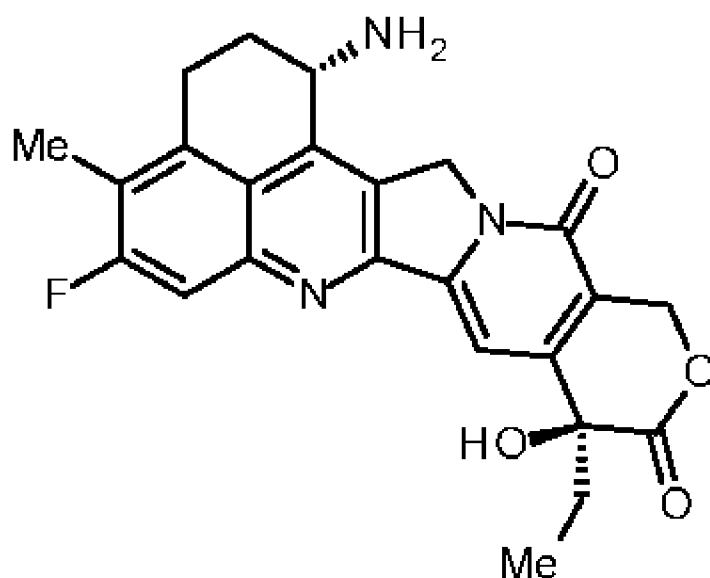
[5]如[1]至[3]中任一項記載之抗體-藥物複合體，其中 L^P 為以 4 個胺基酸構成的胜肽殘基。

[6]如[1]至[3]中任一項記載之抗體-藥物複合體，其中 L^P 為-GGFG-。

【0014】[7]一種抗體-藥物複合體，其特徵為其係透過著下列式所示的構造之連結物：



使下列式所示的抗腫瘤性化合物與抗體結合



【0015】其中，抗體係於 L^1 之末端結合，抗腫瘤性化合物係以第 1 位之胺基之氮原子作為結合部位，而於 L^c 之末端結合，式中，

n^1 表示 0 至 6 之整數，

L^1 表示-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-(CH₂) _{n^2} -C(=O)-、-CH₂-C(=O)-NH-(CH₂) _{n^3} -C(=O)-、-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH₂-(N-基-3-琥珀醯亞胺)-、或-C(=O)-(CH₂) _{n^4} -C(=O)-，

其中， n^2 表示 2 至 8 之整數， n^3 表示 1 至 8 之整數， n^4 表示 1 至 8 之整數，

L^2 表示-NH-(CH₂-CH₂-O) _{n^5} -CH₂-CH₂-C(=O)-、-S-(CH₂) _{n^6} -C(=O)-、或單鍵，

其中， n^5 表示 1 至 6 之整數， n^6 表示 1 至 6 之整數，

L^P 表示 GGFG 之四胜肽殘基，

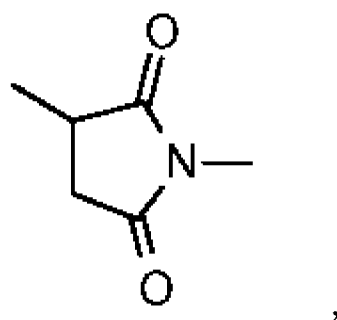
L^a 表示 -O- 或單鍵，

L^b 表示 $-CR^2(-R^3)-$ 或單鍵，

其中， R^2 及 R^3 表示氫原子，

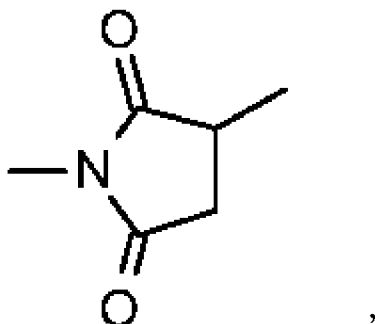
L^c 表示 $-C(=O)-$ ，

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-係下列式所示構造：



其於第 3 位與抗體結合，於第 1 位之氮原子上與含此的連結物構造內之亞甲基結合，

-(N-基-3-琥珀醯亞胺)-係下列式所示構造：



其第 3 位與 L^2 結合，第 1 位之氮原子上與含此構造的連結物構造內之亞甲基結合，

cyc.Hex(1,4)表示 1,4-伸環己基，

L^2 為 $-S-(CH_2)n^6-C(=O)-$ 時， L^1 成為 $-C(=O)-$ cyc.Hex(1,4)- $CH_2-(N-基-3-琥珀醯亞胺)-$ 。

【0016】[8]如[1]至[7]中任一項記載之抗體-藥物複合體，其中 L^1 為-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-(CH₂)^{n²}-C(=O)-或-CH₂-C(=O)-NH-(CH₂)^{n³}-C(=O)-。

[9]如[1]至[7]中任一項記載之抗體-藥物複合體，其中 L^1 為-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-(CH₂)^{n²}-C(=O)-。

[10]如[1]至[7]中任一項記載之抗體-藥物複合體，其中 L^1 為-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH₂-(N-基-3-琥珀醯亞胺)-或-C(=O)-(CH₂)^{n⁴}-C(=O)-。

[11]如[1]至[9]中任一項記載之抗體-藥物複合體，其中 n^2 為 2 至 5 之整數， L^2 為單鍵。

[12]如[1]至[9]中任一項記載之抗體-藥物複合體，其中 n^2 為 2 至 5 之整數， L^2 為-NH-(CH₂CH₂O)^{n⁵}-CH₂-CH₂-C(=O)-， n^5 為 2 或 4。

[13]如[1]至[12]中任一項記載之抗體-藥物複合體，其中-NH-(CH₂)^{n¹}-L^a-L^b-L^c-為具有 4 至 7 個原子之鍵長的部分構造。

[14]如[1]至[12]中任一項記載之抗體-藥物複合體，其中-NH-(CH₂)^{n¹}-L^a-L^b-L^c-係具有 5 或 6 個原子之鍵長的部分構造。

[15]如[1]至[14]中任一項記載之抗體-藥物複合體，其中-NH-(CH₂)^{n¹}-L^a-L^b-L^c-係

-NH-(CH₂)₃-C(=O)-、

-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-、或

-NH-(CH₂)₂-O-CH₂-C(=O)-。

【0017】[16]如[1]至[15]中任一項記載之抗體-藥物複合體，其中藥物-連結物構造部分係選自下列藥物-連結物構造之群組的1種之藥物-連結物構造：

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

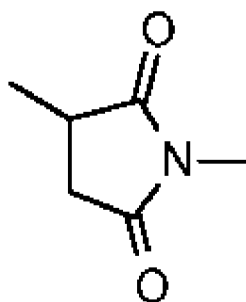
-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-
NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH₂-(N-基-3-琥珀醯亞胺)-S-
CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

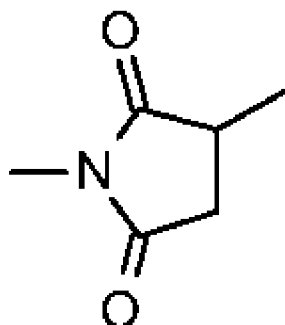
【0018】其中，-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-係下列式所示構造：



,

於其第 3 位與抗體結合，第 1 位之氮原子上與含有此的連結
物構造內之亞甲基結合，

-(N-基-3-琥珀醯亞胺)-係下列式所示構造：

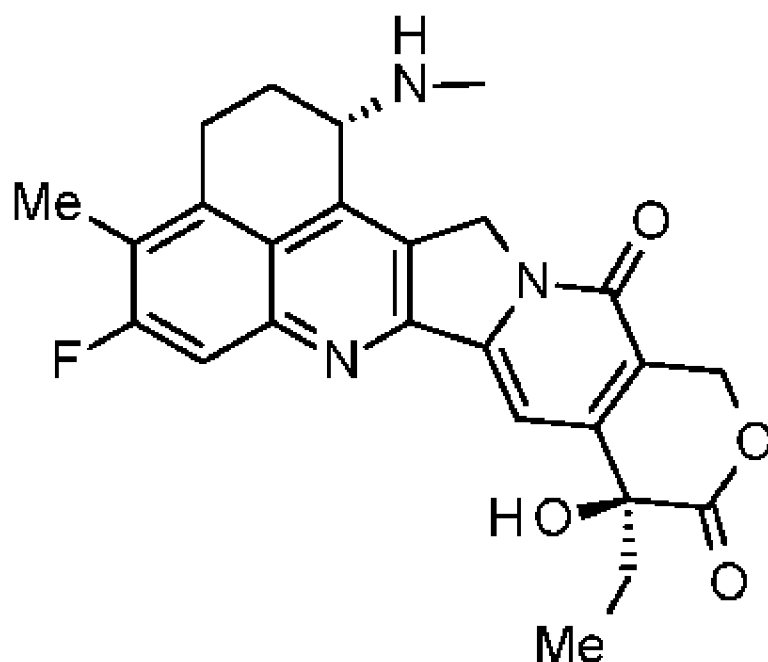


,

於其第 3 位與 L² 結合，於第 1 位之氮原子上與含此構造的
連結物構造內之亞甲基結合，

cyc.Hex(1,4)表示 1,4-伸環己基，

-(NH-DX)表示下列式：



所示之第 1 位之胺基之氮原子成為結合部位的基，

-GGFG-表示-Gly-Gly-Phe-Gly-之胜肽殘基。

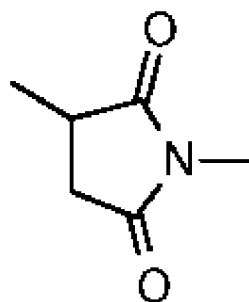
【0019】[17]如[1]至[9]及[11]至[14]中任一項記載之抗體-藥物複合體，其中使藥物結合- L^1 - L^2 - L^P -NH-(CH₂)_n¹- L^a - L^b - L^c -的藥物-連結物構造部分係選自下列群組的 1 種之藥物-連結物構造：

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

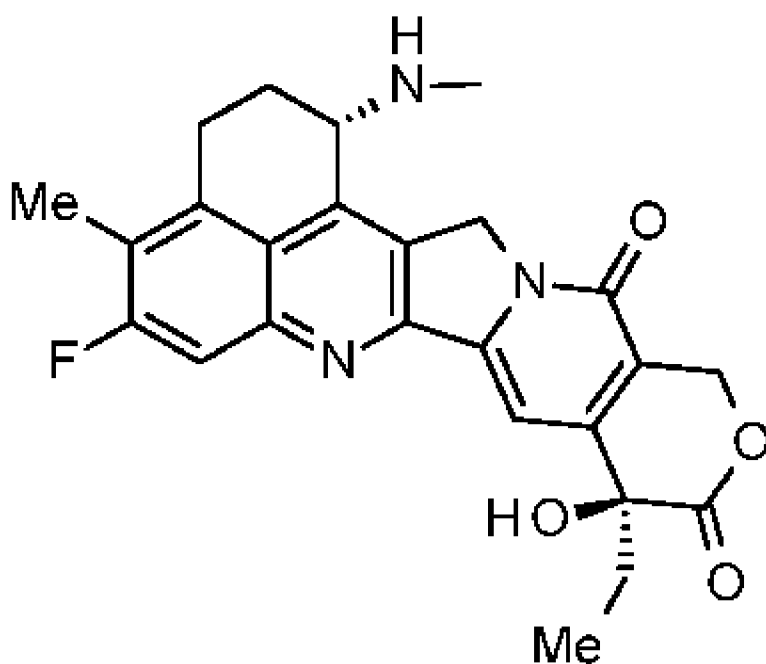
-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)。

【0020】其中，-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-係下列式所示構造：



於其第 3 位與抗體結合，於第 1 位之氮原子上與含此的連結物構造內之亞甲基結合，

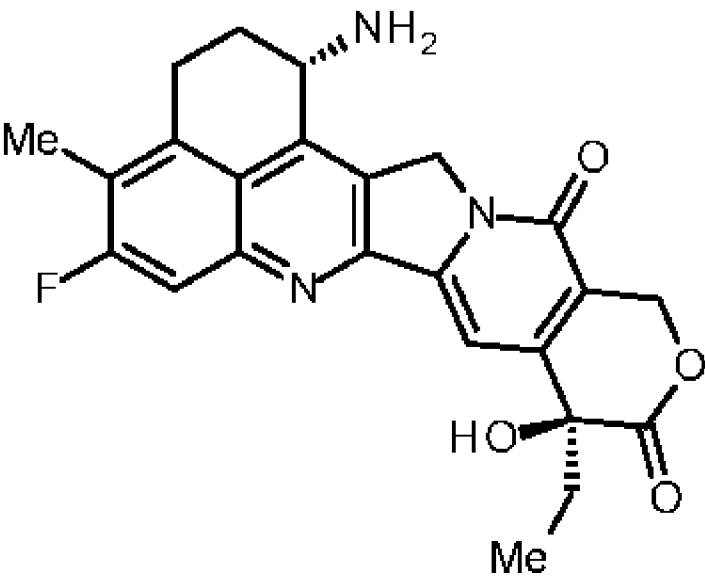
-(NH-DX)係表示下列式所示之第 1 位之胺基之氮原子成為結合部位的基：



【0021】[18]一種抗體-藥物複合體，其特徵為透過下列式所示構造之連結物：



而使下列式所示抗腫瘤性化合物與抗體結合



其中，抗體係於 L¹ 之末端結合，抗腫瘤性化合物係於 L^c 之末端結合，

式中，

n¹ 表示 0 至 6 之整數，

L¹ 表示-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-(CH₂)_{n²}-C(=O)-，於抗體之鉸鏈部存在的雙硫鍵部分，透過形成的硫醚鍵而與抗體結合，

其中，n² 表示 2 至 8 之整數，

L² 表示-NH-(CH₂-CH₂-O)_{n⁵}-CH₂-CH₂-C(=O)-或單鍵，

其中，n⁵ 表示 1 至 6 之整數，

L^P 表示 GGFG 之四胜肽殘基，

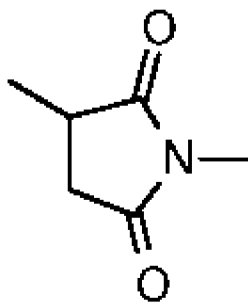
L^a 表示-O-或單鍵，

L^b 表示-CR²(-R³)-或單鍵，

其中，R² 及 R³ 表示氫原子，

L^c 表示-C(=O)-，

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-係下列式所示構造：



於其第 3 位與抗體結合，於第 1 位之氮原子上與含此的連結物構造內之亞甲基結合。

【0022】[19]如[18]記載之抗體-藥物複合體，其中 n^2 為 2， L^2 為 $-\text{NH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})^{n^5}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ ， n^5 為 2， n^1 為 3， L^a 及 L^b 係皆為單鍵，

n^2 為 5， L^2 為單鍵， n^1 為 1， L^a 為 $-\text{O}-$ ， L^b 為 $-\text{CR}^2(-\text{R}^3)-$ ，或

n^2 為 5， L^2 為單鍵， n^1 為 2， L^a 為 $-\text{O}-$ ， L^b 為 $-\text{CR}^2(-\text{R}^3)-$ 。

[20]如[18]或[19]中任一項記載之抗體-藥物複合體，其中 n^2 為 2 至 5 之整數， L^2 為單鍵。

[21]如[18]或[19]記載之抗體-藥物複合體，其中 n^2 為 2 至 5 之整數， L^2 為 $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})^{n^5}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ ， n^5 為 2 或 4。

[22]如[18]至[21]中任一項記載之抗體-藥物複合體，其中 $-\text{NH}-(\text{CH}_2)^{n^1}-L^a-L^b-L^c-$ 為

$-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{C}(=\text{O})-$ 、

$-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 、或

$-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 。

【0023】[23]如[18]至[22]中任一項記載之抗體-藥物複合體，其中藥物-連結物構造部分係選自下列藥物-連結物構造之群組的 1 種之藥物-連結物構造：

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

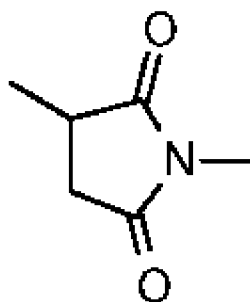
-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

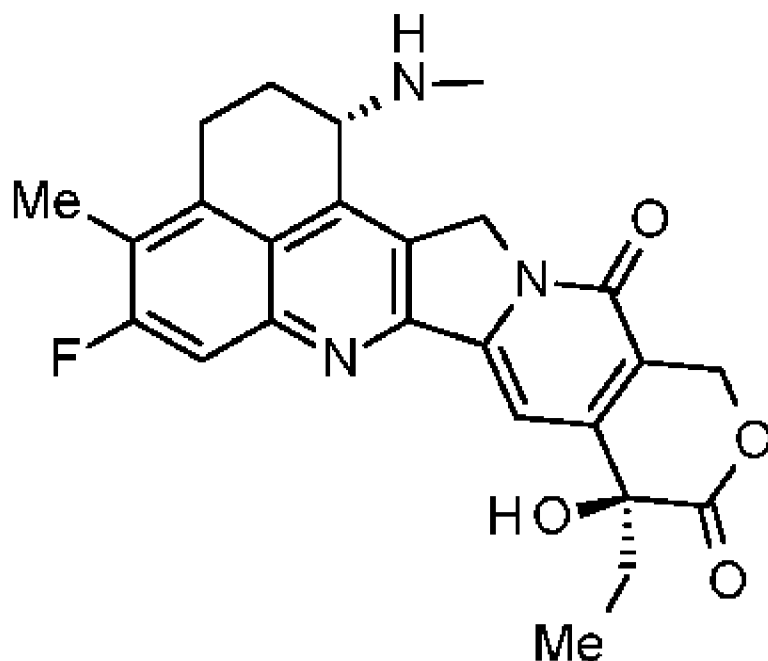
-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

其中，-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-係下列式所示構造：



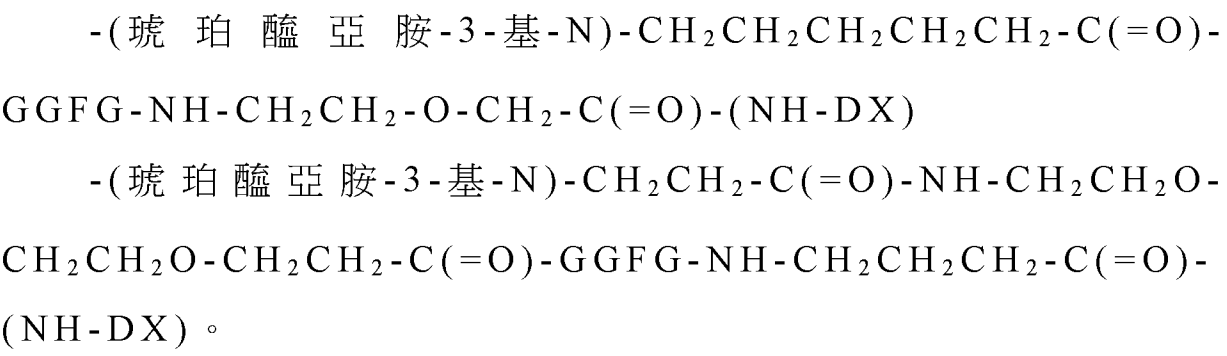
於其第 3 位與抗體結合，於第 1 位之氮原子上與含此的連結物構造內之亞甲基結合，

-(NH-DX)係表示下列式所示之第 1 位之胺基之氮原子成為結合部位的基：

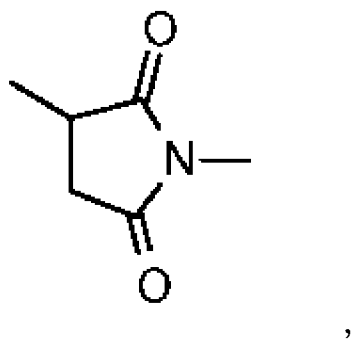


【0024】[24]如[23]記載之抗體-藥物複合體，其中使藥物結合- L^1 - L^2 - L^P -NH-(CH₂)_{n¹}-L^a-L^b-L^c-的藥物-連結物構造部分係選自下列群組之 1 種之藥物-連結物構造：

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

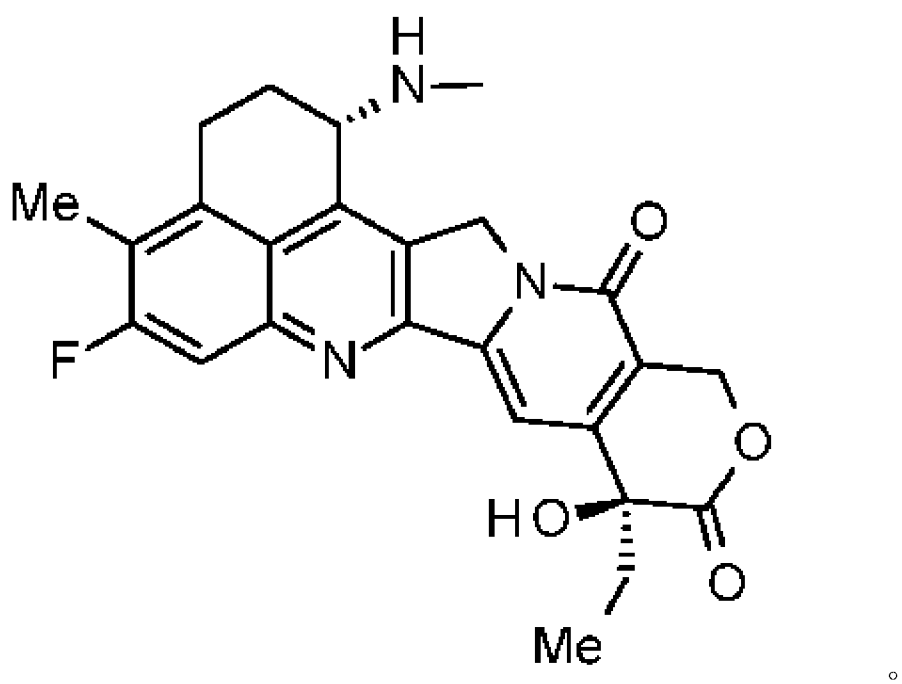


其中， $-(\text{琥珀醯亞胺-3-基-N})-$ 係下列式所示構造：



於其第 3 位與抗體結合，於第 1 位之氮原子上與含此的連結物構造內之亞甲基結合，

$-(\text{NH-DX})$ 表示下列式所示之第 1 位之胺基之氮原子成為結合部位的基：



【0025】[25]如[1]至[24]中任一項記載之抗體-藥物複合體，其中選擇的 1 種之藥物-連結物構造的每 1 抗體之平均結合數係 1 至 10 個之範圍。

[26]如[1]至[24]中任一項記載之抗體-藥物複合體，其中選擇的 1 種之藥物-連結物構造的每 1 抗體之平均結合數係 2 至 8 個之範圍。

[27]如[1]至[24]中任一項記載之抗體-藥物複合體，其中選擇的 1 種之藥物-連結物構造的每 1 抗體之平均結合數係 3 至 8 個之範圍。

[28]如[1]至[27]中任一項記載之抗體-藥物複合體，其中抗體係具備可辨識標的細胞的特性、可與標的細胞結合的特性、可於標的細胞內在化的特性、傷害標的細胞的特性之一個以上的特性的抗體。

[29]如[1]至[27]中任一項記載之抗體-藥物複合體，其中抗體-藥物複合體的標的細胞為腫瘤細胞。

[30]如[1]至[27]中任一項記載之抗體-藥物複合體，其中抗體為抗 A33 抗體、抗 B7-H3 抗體、抗 CanAg 抗體、抗 CD20 抗體、抗 CD22 抗體、抗 CD30 抗體、抗 CD33 抗體、抗 CD56 抗體、抗 CD70 抗體、抗 CEA 抗體、抗 Cripto 抗體、抗 EphA2 抗體、抗 G250 抗體、抗 MUC1 抗體、抗 GPNMB 抗體、抗整合蛋白(Integrin)抗體、抗 PSMA 抗體、抗肌腱蛋白 C(Tenascin-C)抗體、抗 SLC44A4 抗體、或抗間皮素(Mesothelin)抗體。

[31]如[1]至[27]中任一項記載之抗體-藥物複合體，其中抗體為抗 B7-H3 抗體、抗 CD30 抗體、抗 CD33 抗體、或抗 CD70 抗體。

[32]如[1]至[27]中任一項記載之抗體-藥物複合體，其中抗體為抗 B7-H3 抗體。

【0026】[33]一種醫藥，其含有如[1]至[32]中任一項記載之抗體-藥物複合體、其鹽、或彼等之水合物。

[34]一種抗腫瘤藥及/或抗癌藥，其含有如[1]至[32]中任一項記載之抗體-藥物複合體、其鹽、或彼等之水合物。

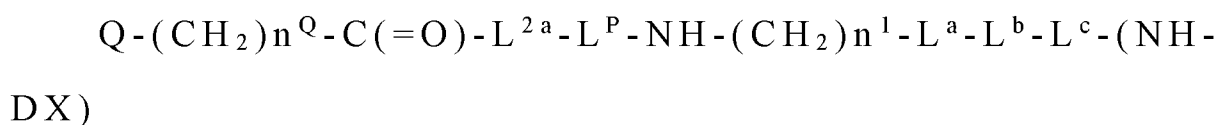
[35]如[34]記載之抗腫瘤藥及/或抗癌藥，其係用以適用於肺癌、腎癌、尿路上皮癌、大腸癌、前列腺癌、多形神經膠母細胞瘤、卵巢癌、胰癌、乳癌、黑色素瘤、肝癌、膀胱癌、胃癌、或食道癌。

[36]一種醫藥組成物，其含有如[1]至[32]中任一項記載之抗體-藥物複合體、其鹽、或彼等之水合物作為活性成分，及藥學上可容許的製劑成分。

[37]如[36]記載之醫藥組成物，其係用以適用於肺癌、腎癌、尿路上皮癌、大腸癌、前列腺癌、多形神經膠母細胞瘤、卵巢癌、胰癌、乳癌、黑色素瘤、肝癌、膀胱癌、胃癌、或食道癌。

[38]一種腫瘤及/或癌之治療方法，其特徵為投與如[1]至[32]中任一項記載之抗體-藥物複合體、其鹽、或彼等之水合物。

【0027】[39]一種下列式所示藥物-連結物中間體化合物：



【0028】式中，Q 表示(順丁烯二醯亞胺-N-基)-、HS-、X-CH₂-C(=O)-NH-、或(吡咯啉-2,5-二酮-N-基)-O-C(=O)-，

X 表示溴原子或碘原子，

n^Q 表示整數 2 至 8，

L^{2a} 表示 $-\text{NH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})n^5-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 、或單鍵，

其中， n^5 表示 1 至 6 之整數，

L^P 表示以選自苯丙胺酸、甘胺酸、纈胺酸、離胺酸、瓜胺酸、絲胺酸、麩胺酸、天冬胺酸的 2 至 7 個胺基酸構成的胜肽殘基，

n^1 表示 0 至 6 之整數，

L^a 表示 $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ 、 $-\text{NR}^1-(\text{CH}_2)n^7-$ 、 $-\text{O}-$ 、或單鍵，

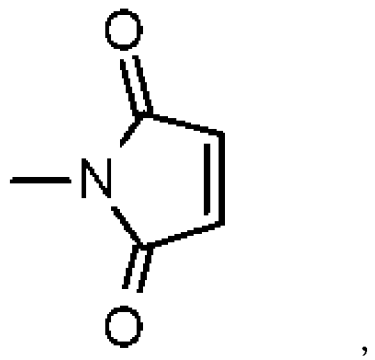
其中， n^7 表示 1 至 6 之整數， R^1 表示氫原子、碳數 1 至 6 之烷基、 $-(\text{CH}_2)n^8-\text{COOH}$ 、或 $-(\text{CH}_2)n^9-\text{OH}$ ，但 n^8 表示整數之 1 至 4， n^9 表示 1 至 6 之整數，

L^b 表示 $-\text{CR}^2(-\text{R}^3)-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{NR}^4-$ 、或單鍵，

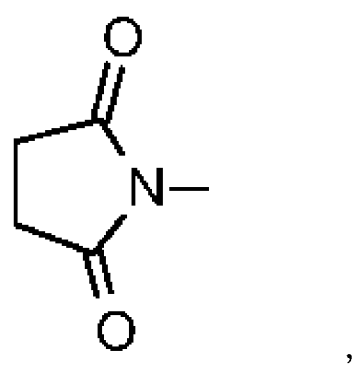
其中， R^2 及 R^3 各自獨立表示氫原子、碳數 1 至 6 之烷基、 $-(\text{CH}_2)n^a-\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)n^b-\text{COOH}$ 、或 $-(\text{CH}_2)n^c-\text{OH}$ ， R^4 表示氫原子或碳數 1 至 6 之烷基， n^a 表示 0 至 6 之整數， n^b 表示 1 至 4 之整數， n^c 表示整數之 1 至 4，但 n^a 為 0 時， R^2 及 R^3 不成為相同，

L^c 表示 $-\text{CH}_2-$ 或 $-\text{C}(=\text{O})-$ ，

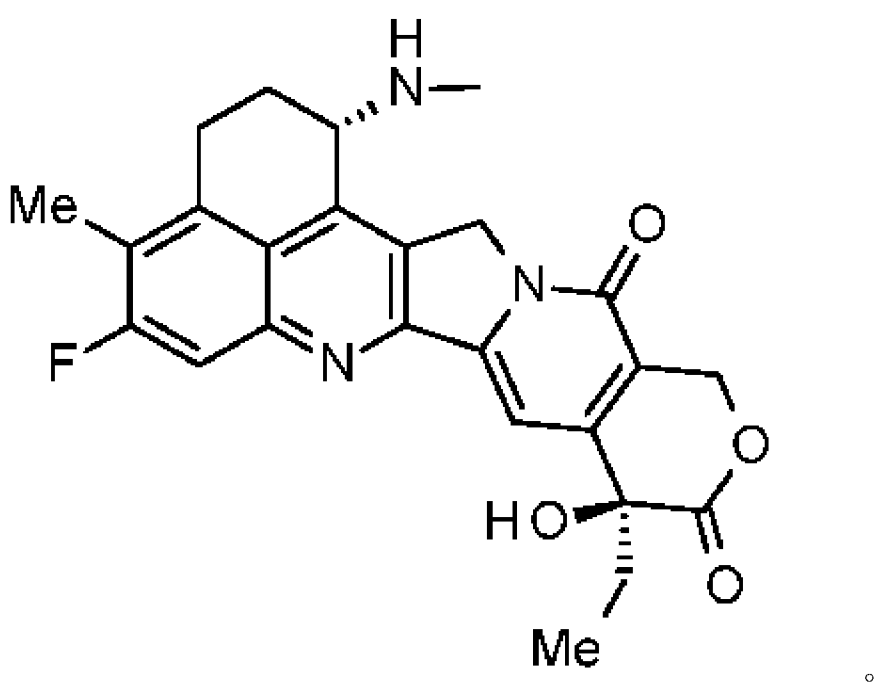
(順丁烯二醯亞胺-N-基)-係下列式所示之氮原子為結合部位的基



(吡咯啉-2,5-二酮-N-基)係下列式所示的氮原子為結合部位的基



-(NH-DX)係下列式所示之第 1 位之胺基之氮原子成為結合部位的基



【0029】[40]如[39]記載之藥物-連結物中間體化合物，其中 L^c 為 $-C(=O)-$ 。

[41]如[39]或[40]記載之藥物-連結物中間體化合物，其中 L^P 為由 4 個胺基酸構成的胜肽殘基。

[42]如[39]至[41]中任一項記載之藥物-連結物中間體化合物，其中 L^P 為 $-GGFG-$ 。

[43]如[39]至[42]中任一項記載之藥物-連結物中間體化合物，其中 $-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-$ 為

$-NH-CH_2CH_2-$ 、
 $-NH-CH_2CH_2CH_2-$ 、
 $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 、
 $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 、
 $-NH-CH_2-O-CH_2-$ 、或
 $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$ 。

[44]如[39]至[42]中任一項記載之藥物-連結物中間體化合物，其中 $-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-$ 為

$-NH-CH_2CH_2CH_2-$ 、
 $-NH-CH_2-O-CH_2-$ 、或
 $-NH-(CH_2)_2-O-CH_2-$ 。

[45]如[39]至[44]中任一項記載之藥物-連結物中間體化合物，其中 n^Q 為整數 2 至 6。

[46]如[43]記載之藥物-連結物中間體化合物，其中 Q 為 (順丁烯二醯亞胺-N-基)-， n^Q 為整數 2 至 5， L^{2a} 為單鍵。

[47]如[44]記載之藥物-連結物中間體化合物，其中 Q 為 (順丁烯二醯亞胺-N-基)-， n^Q 為整數 2 至 5， L^{2a} 為單鍵。

[48]如[39]至[42]中任一項記載之藥物-連結物中間體化合物，其中 Q 為(順丁烯二醯亞胺-N-基)-，

n^Q 為整數 2 至 5，

L^{2a} 為 $-\text{NH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})n^5-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ ，

n^5 為整數 2 至 4，

$-\text{NH}-(\text{CH}_2)n^1-L^a-L^b-$ 為

$-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、

$-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、

$-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、

$-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、

$-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ 、或

$-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ 。

[49]如[48]記載之藥物-連結物中間體化合物，其中 n^5 為整數 2 或 4，

$-\text{NH}-(\text{CH}_2)n^1-L^a-L^b-$ 為

$-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、

$-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ 、或

$-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ 。

【0030】[50]一種下列之化合物：

(順丁烯二醯亞胺-N-基)- $\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$

(順丁烯二醯亞胺-N-基)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$

(順丁烯二醯亞胺-N-基)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-
NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-
(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-
CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-
NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-
C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-
O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-
NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

$X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$HS-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$HS-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$HS-CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$HS-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

HS-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
(NH-DX)

HS-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-
C(=O)-(NH-DX)

HS-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-
C(=O)-(NH-DX)

HS-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-
(NH-DX)

HS-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-
C(=O)-(NH-DX)

HS-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-
C(=O)-(NH-DX)

HS-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-
CH₂-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-
C(=O)-(NH-DX)

HS-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-
C(=O)-(NH-DX)

HS-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-
CH₂-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-
O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-
C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-
(NH-DX)

HS-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-
C(=O)-(NH-DX)

HS-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-
C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
(NH-DX)

HS-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-
C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-
(NH-DX)

HS-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-
CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(吡 咯 啉-2,5-二 酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-
GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(吡 咯 啉-2,5-二 酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(吡 咯 啉-2,5-二 酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂-
C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(吡 咯 啉-2,5-二 酮-N-基)-O-C(=O)-
CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-
(NH-DX)

(吡 咯 啉-2,5-二 酮-N-基)-O-C(=O)-
CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-
C(=O)-(NH-DX)

(吡 咯 啉-2,5-二 酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-
GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(吡 咯 啉-2,5-二 酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(吡 咯 啉-2,5-二 酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂-
C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(吡 咯 啉-2,5-二 酮-N-基)-O-C(=O)-
CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-
C(=O)-(NH-DX)

(吡 咯 啉-2,5-二 酮-N-基)-O-C(=O)-
CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-
C(=O)-(NH-DX)

(吡 咯 啉-2,5-二 酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-
GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(吡 咯 啉-2,5-二 酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(吡 咯 啉-2,5-二 酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂-
C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(吡 咯 啉-2,5-二 酮-N-基)-O-C(=O)-
CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-
C(=O)-(NH-DX)

(吡 咯 啉-2,5-二 酮-N-基)-O-C(=O)-
CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-
C(=O)-(NH-DX)

(吡 咯 啉-2,5-二 酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-
GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(吡 咯 啉-2,5-二 酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(吡 咯 啉-2,5-二 酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂-
C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(吡 咯 啉-2,5-二 酮-N-基)-O-C(=O)-
CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-
C(=O)-(NH-DX)

(吡 咯 啉-2,5-二 酮-N-基)-O-C(=O)-
CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-
CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(吡咯啉-2,5-二酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(吡咯啉-2,5-二酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(吡咯啉-2,5-二酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(吡咯啉-2,5-二酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(吡咯啉-2,5-二酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(吡咯啉-2,5-二酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(吡咯啉-2,5-二酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(吡咯啉-2,5-二酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

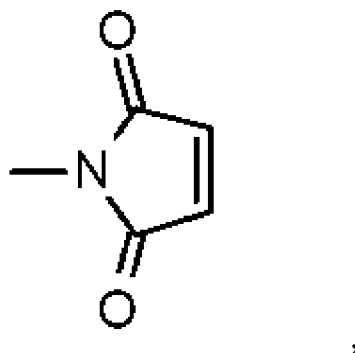
(吡咯啉-2,5-二酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(吡咯啉-2,5-二酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(吡咯啉-2,5-二酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)、或

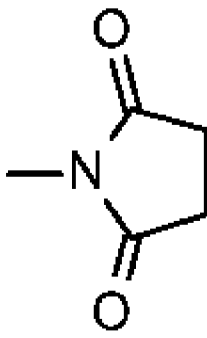
(吡咯啉-2,5-二酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

【0031】其中，(順丁烯二醯亞胺-N-基)-係下列式所示之氮原子為結合部位的基

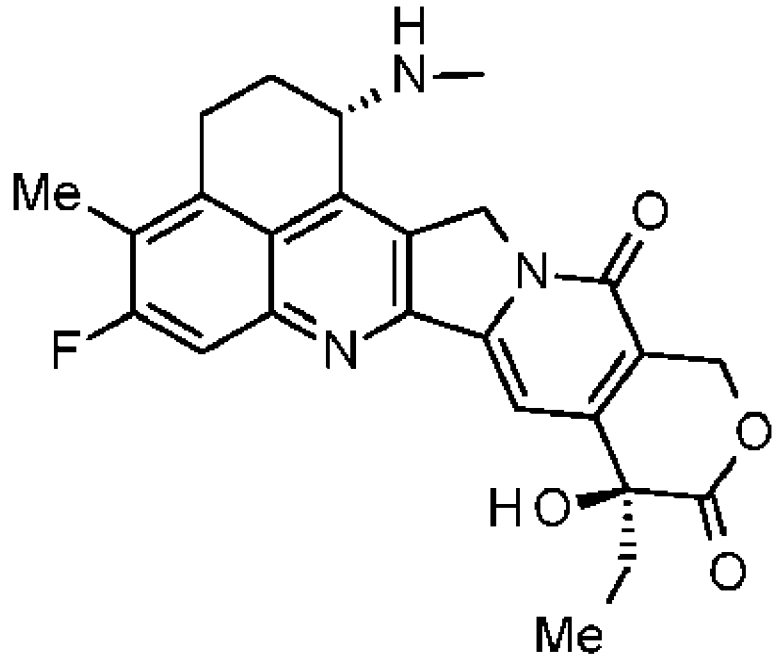


X 表示鹵素原子，

(吡咯啉-2,5-二酮-N-基)-係下列式所示之氮原子為結合部位的基



-(NH-DX)係下列式所示之第 1 位之胺基之氮原子成為結合部位的基



- 【0032】[51]一種下列之化合物：
- (順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 - (順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 - (順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 - (順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-

$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-$
 $\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$

(順丁烯二醯亞胺-N-基)- $\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$
 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$
 $(\text{NH}-\text{DX})$

(順丁烯二醯亞胺-N-基)- $\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$
 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-$
 $\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$

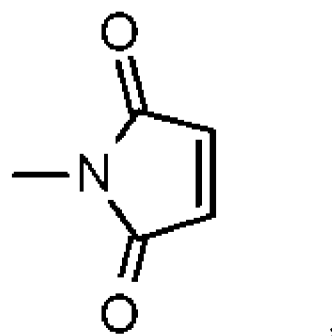
(順丁烯二醯亞胺-N-基)- $\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$
 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-$
 $\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$

(順丁烯二醯亞胺-N-基)- $\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$
 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$
 $\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$

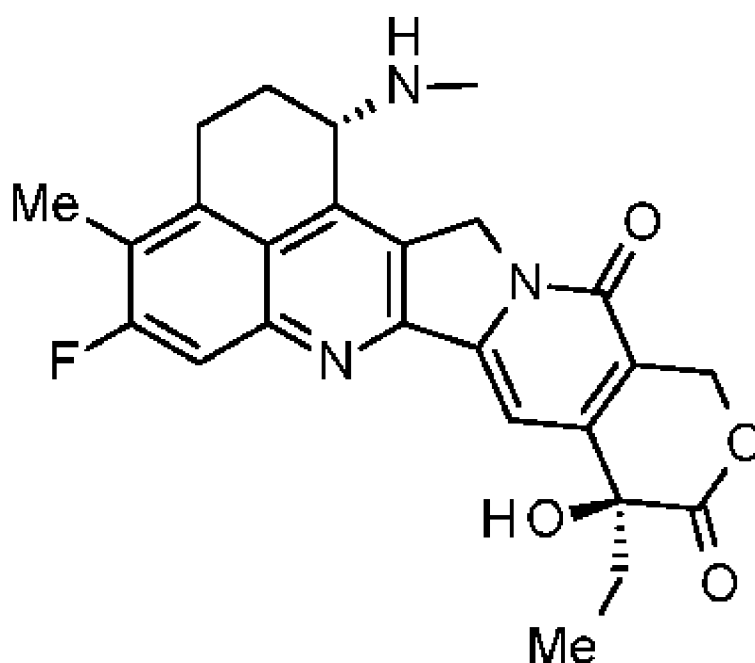
(順丁烯二醯亞胺-N-基)- $\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$
 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$
 $\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ 、或

(順丁烯二醯亞胺-N-基)- $\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$
 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-$
 $\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$

【0033】其中，(順丁烯二醯亞胺-N-基)-係下列式所示之氮
 原子為結合部位的基



-(NH-DX)係下列式所示之第 1 位之胺基之氮原子成為結合部位的基



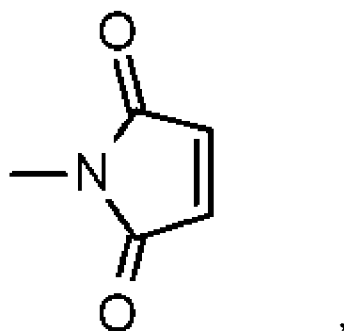
【0034】[52]一種下列之化合物：

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)、

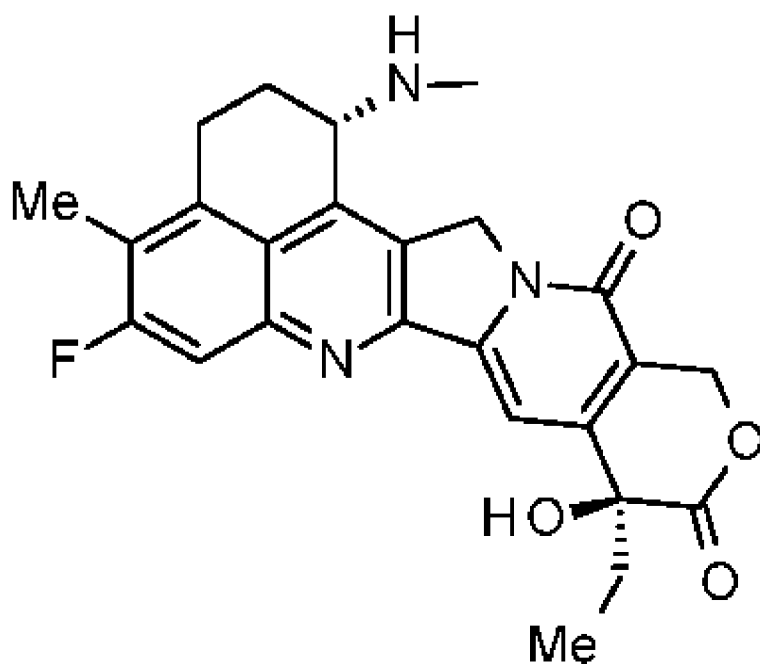
(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)或

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)。

【0035】其中，(順丁烯二醯亞胺-N-基)-係下列式所示之氮原子為結合部位的基



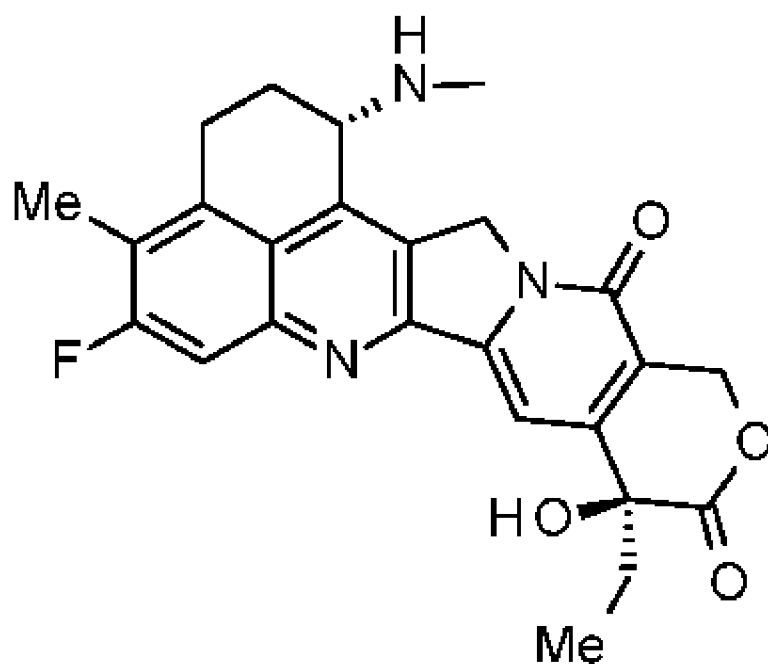
-(NH-DX)係下列式所示之第 1 位之胺基之氮原子成為結合部位的基



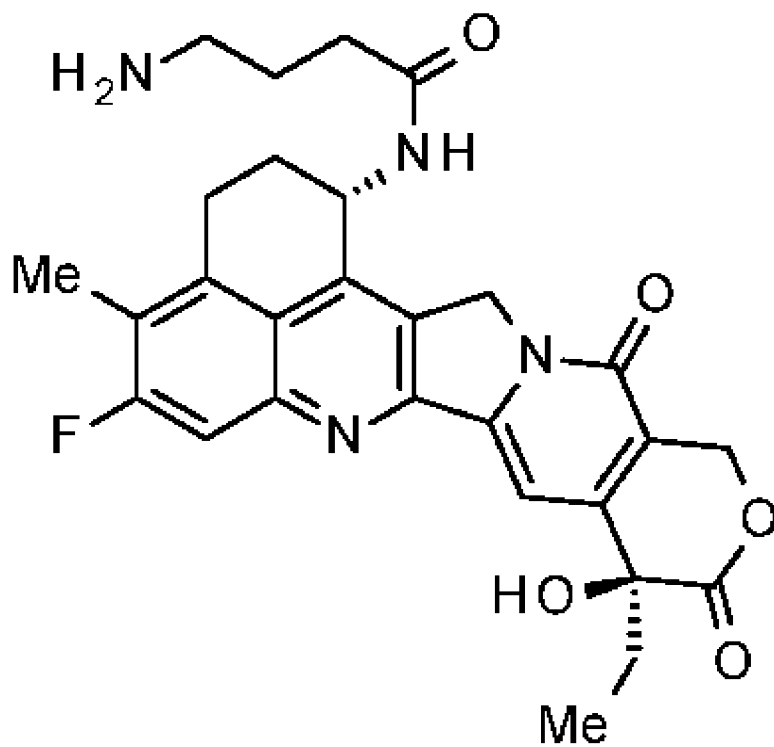
【0036】[53]一種選自下列群組之化合物：

$\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ 、
 $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ 、
 $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ 、
 $\text{NH}_2\text{-CHCH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ 、及
 $\text{HO-CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$

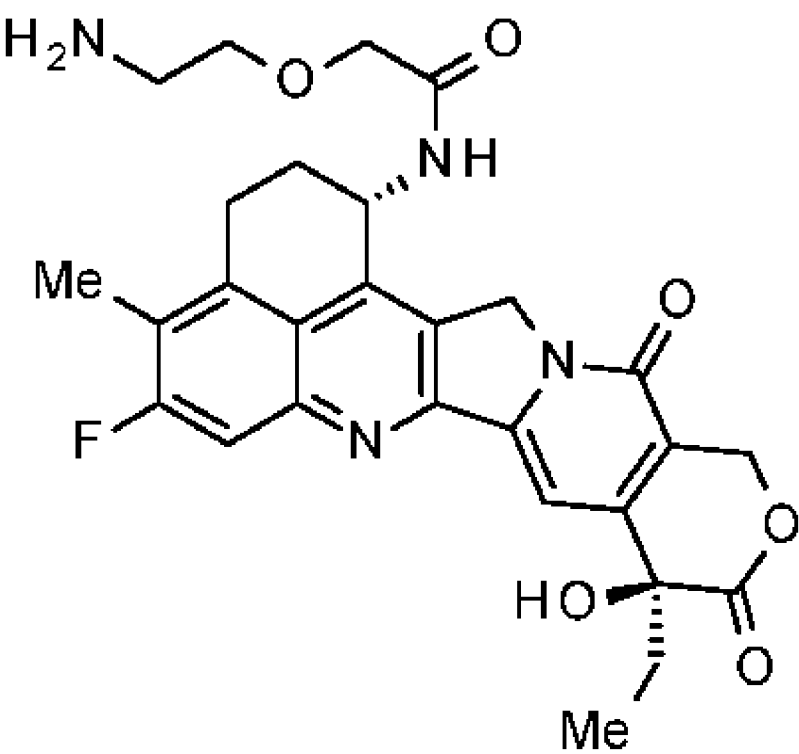
式中，-(NH-DX)係下列式所示之第 1 位之胺基之氮原子成為結合部位的基



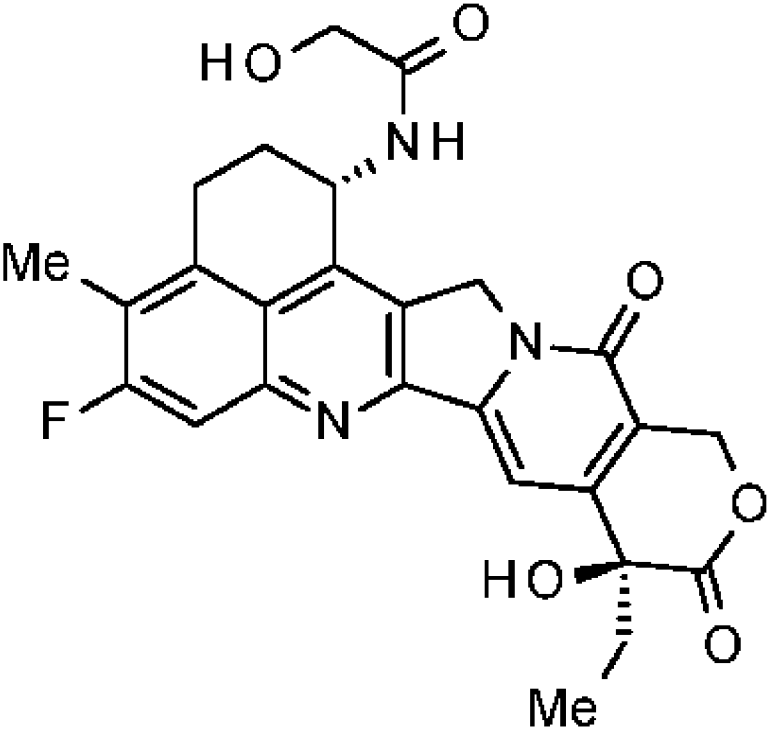
【0037】[54]一種下列式所示之化合物，



【0038】[55]一種下列式所示之化合物：



【0039】 [56]一種下列式所示之化合物，



【0040】 [57]一種抗體-藥物複合體之製造方法，其特徵為藉由使下列式所示化合物：

$Q-(CH_2)_{n^Q}-C(=O)-L^{2a}-L^P-NH-(CH_2)_{n^1}-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)$

與抗體或其反應性衍生物反應，

於抗體之鉸鏈部存在的雙硫鍵部分，使硫醚鍵形成的方法、或

藉由於構成抗體的胺基酸之側鍵上存在的胺基或末端之胺基使醯胺鍵形成的方法，

而使藥物-連結物部分與抗體結合。

【0041】式中，Q 表示(順丁烯二醯亞胺-N-基)-、HS-、X-CH₂-C(=O)-NH-、或

(吡咯啉-2,5-二酮-N-基)-O-C(=O)-，

X 表示溴原子或碘原子，

n^Q 表示整數 2 至 8，

L^{2a} 表示-NH-(CH₂-CH₂-O) n^5 -CH₂-CH₂-C(=O)-、或單鍵，

其中， n^5 表示 1 至 6 之整數，

L^P 表示以選自苯丙胺酸、甘胺酸、纈胺酸、離胺酸、瓜胺酸、絲胺酸、麩胺酸、天冬胺酸之 2 至 7 個胺基酸構成的胜肽殘基，

n^1 表示 0 至 6 之整數，

L^a 表示-C(=O)-NH-、-NR¹-(CH₂) n^7 -、-O-、或單鍵，

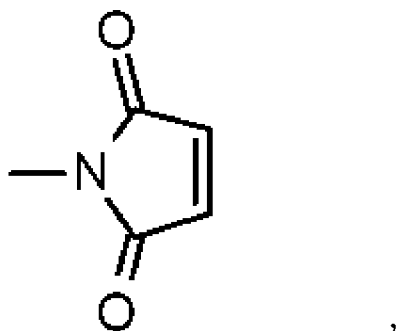
其中， n^7 表示 1 至 6 之整數，R¹ 表示氫原子、碳數 1 至 6 之烷基、-(CH₂) n^8 -COOH、或-(CH₂) n^9 -OH，但 n^8 表示 1 至 4 之整數， n^9 表示 1 至 6 之整數，

L^b 表示 $-CR^2(-R^3)-$ 、 $-O-$ 、 $-NR^4-$ 、或單鍵，

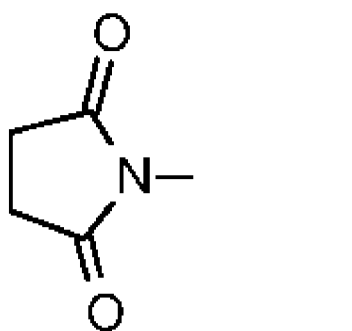
其中， R^2 及 R^3 各自獨立表示氫原子、碳數 1 至 6 之烷基、 $-(CH_2)^{n^a}-NH_2$ 、 $-(CH_2)^{n^b}-COOH$ 、或 $-(CH_2)^{n^c}-OH$ ， R^4 表示氫原子或碳數 1 至 6 之烷基， n^a 表示 0 至 6 之整數， n^b 表示 1 至 4 之整數， n^c 表示整數 1 至 4，但 n^a 為 0 時， R^2 及 R^3 不成為相同，

L^c 表示 $-CH_2-$ 或 $-C(=O)-$ ，

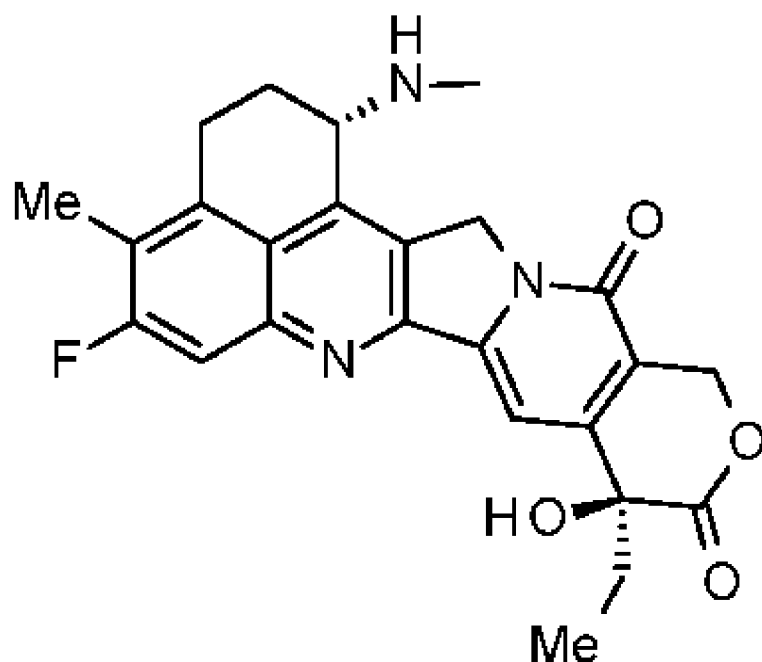
(順丁烯二醯亞胺-N-基)-係下列式所示之氮原子為結合部位的基



(吡咯啉-2,5-二酮-N-基)係下列式所示氮原子為結合部位的基



$-(NH-DX)$ 係下列式所示之第 1 位之胺基之氮原子成為結合部位的基



【0042】[58]如[57]記載之製造方法，其中使藥物-連結物部分與抗體結合的方法係以下任一者：

還原處理抗體後，使 Q 為順丁烯二醯亞胺基或 $X-CH_2-C(=O)-NH-$ 的化合物反應而形成硫醚鍵的方法；

使抗體與 Q 為(吡咯啉-2,5-二酮-N-基)-O-C(=O)-的化合物反應而形成醯胺鍵的方法；或

使抗體與式 $Q^1-L^{1a}-Q^2$ 所示化合物反應後，

[式中， Q^1 表示(吡咯啉-2,5-二酮-N-基)-O-C(=O)-、(3-磺酸基-吡咯啉-2,5-二酮-N-基)-O-C(=O)-、 $R^Q-O-C(=N)-$ 、或 $O=C=N-$ ，

L^{1a} -表示-cyc.Hex(1,4)- CH_2- 、碳數 1 至 10 之伸烷基、伸苯基、 $-(CH_2)_{n^4}-C(=O)-$ 、 $-(CH_2)_{n^{4a}}-NH-C(=O)-(CH_2)_{n^{4b}}-$ 、或 $-(CH_2)_{n^{4a}}-NH-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-$ ，

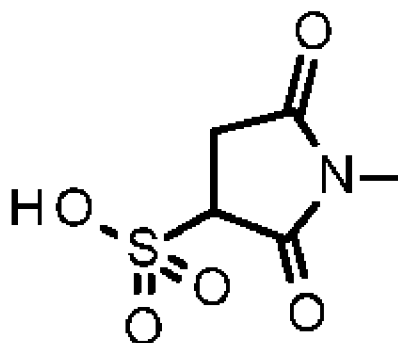
Q^2 表示(順丁烯二醯亞胺-N-基)、鹵素原子、或-S-S-(2-吡啶基)，

R^Q 表示碳數 1 至 6 之烷基、 n^4 表示 1 至 8 之整數，

n^{4a} 表示 0 至 6 之整數、 n^{4b} 表示 1 至 6 之整數，

(3-磺酸基-吡咯啉-2,5-二酮-N-基)-係下列式所示氮原子為結合部位的基，

【0043】



【0044】此磺酸可形成鋰鹽、鈉鹽、鉀鹽，

cyc.Hex(1,4)表示 1,4-伸環己基，

(2-吡啶基)表示 2-吡啶基]，

使 Q 為 SH 的化合物反應而藉由醯胺鍵形成藥物-連結物構造的方法。

【0045】[59]如[57]或[58]記載之製造方法，其中選擇的 1 種之藥物-連結物構造之每 1 抗體的平均結合數為 1 至 10 個之範圍。

[60]如[57]或[58]記載之製造方法，其中選擇的 1 種之藥物-連結物構造之每 1 抗體的平均結合數為 2 至 8 個之範圍。

[61]如[57]或[58]記載之製造方法，其中選擇的 1 種之藥物-連結物構造之每 1 抗體的平均結合數為 3 至 8 個之範圍。

[62]如[57]至[61]中任一項記載之製造方法，其中抗體-藥物複合體之標的細胞為腫瘤細胞。

[63]如[57]至[61]中任一項記載之製造方法，其中抗體為抗 A33 抗體、抗 B7-H3 抗體、抗 CanAg 抗體、抗 CD20 抗體、抗 CD22 抗體、抗 CD30 抗體、抗 CD33 抗體、抗 CD56 抗體、抗 CD70 抗體、抗 CEA 抗體、抗 Cripto 抗體、抗 EphA2 抗體、抗 G250 抗體、抗 MUC1 抗體、抗 GPNMB 抗體、抗整合蛋白抗體、抗體 PSMA 抗體、抗肌腱蛋白 C(Tenascin-C)抗體、抗 SLC44A4 抗體、或抗間皮素(Mesothelin)抗體。

[64]如[57]至[61]中任一項記載之製造方法，其中抗體為抗 B7-H3 抗體、抗 CD30 抗體、抗 CD33 抗體、或抗 CD70 抗體。

[65]如[57]至[61]中任一項記載之製造方法，其中抗體為抗 B7-H3 抗體。

[66]一種抗體-藥物複合體，其係由如[57]至[65]中任一項之製造方法而獲得。

【0046】[67]一種於抗體之鉸鏈部的硫鍵部分使硫醚鍵形成而獲得的抗體-藥物複合體，其特徵為將抗體於還原條件下處理後，與選自以下之化合物群組的化合物反應：

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

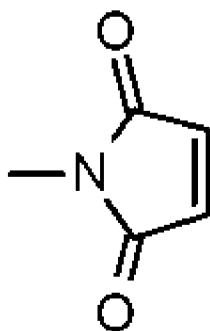
(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

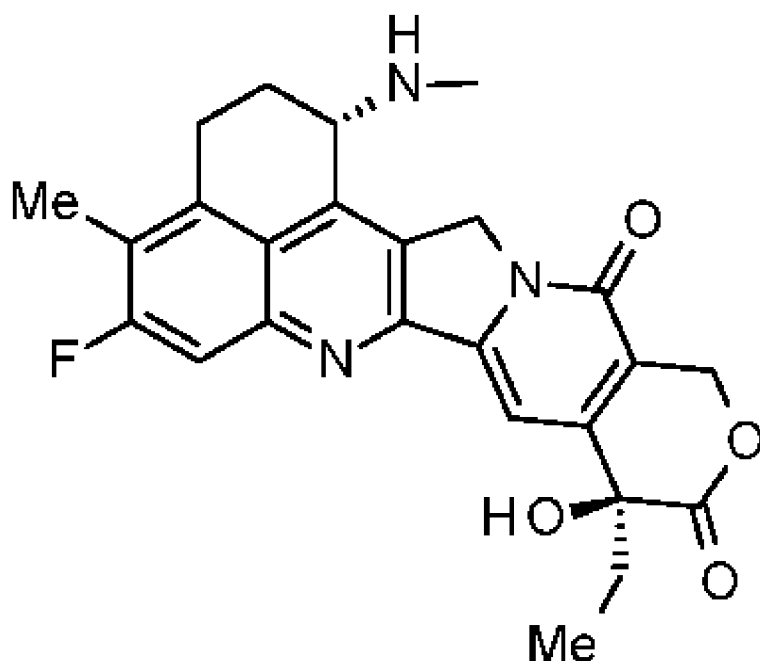
(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)、或

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)。

【0047】其中，(順丁烯二醯亞胺-N-基)-係下列式所示之氮原子為結合部位的基



-(NH-DX)係下列式所示之第 1 位之胺基之氮原子成為結合部位的基



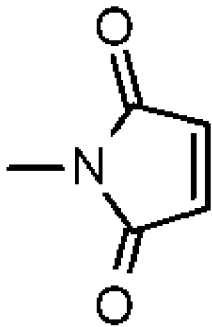
【0048】[68]一種於抗體之鉸鏈部的硫鍵部分使硫醚鍵形成而獲得的抗體-藥物複合體，其特徵為將抗體於還原條件處理後，使與選自以下之化合物群組的化合物反應：

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)、

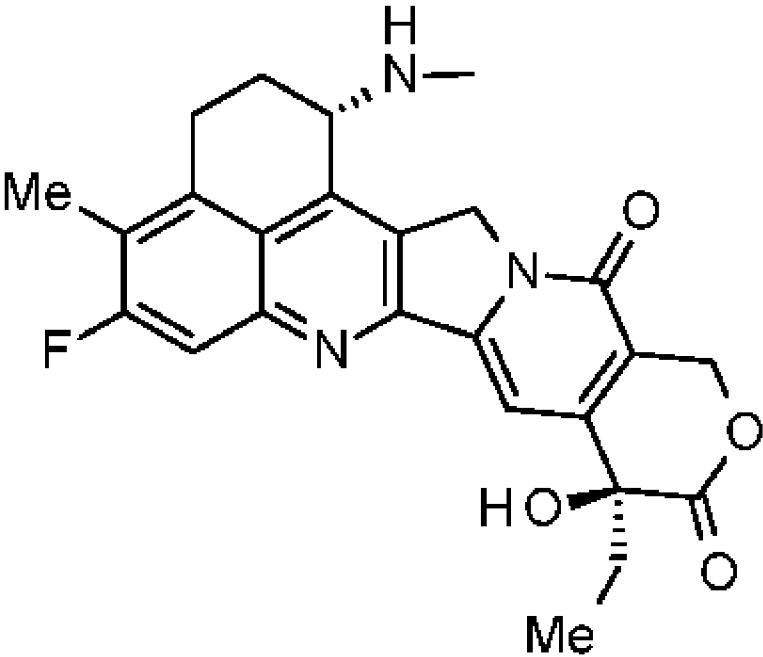
(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)、或

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)。

其中，(順丁烯二醯亞胺-N-基)-係下列式所示之氮原子為結合部位的基



-(NH-DX)係下列式所示之第 1 位之胺基之氮原子成為結合部位的基



【0049】[69]如[67]或[68]記載之抗體-藥物複合體，其選擇的 1 種之藥物-連結物構造之每 1 抗體的平均結合數為 1 至 10 個之範圍。

[70]如[67]或[68]記載之抗體-藥物複合體，其選擇的 1 種之藥物-連結物構造之每 1 抗體的平均結合數為 2 至 8 個之範圍。

[71]如[67]或[68]記載之抗體-藥物複合體，其選擇的 1 種之藥物-連結物構造之每 1 抗體的平均結合數為 3 至 8 個之範圍。

[72]如[67]至[71]中任一項記載之抗體-藥物複合體，其中抗體-藥物複合體之標的細胞為腫瘤細胞。

[73]如[67]至[71]中任一項記載之抗體-藥物複合體，其中抗體為抗 A33 抗體、抗 B7-H3 抗體、抗 CanAg 抗體、抗 CD20 抗體、抗 CD22 抗體、抗 CD30 抗體、抗 CD33 抗體、抗 CD56 抗體、抗 CD70 抗體、抗 CEA 抗體、抗 Cripto 抗體、抗 EphA2 抗體、抗 G250 抗體、抗 MUC1 抗體、抗 GPNMB 抗體、抗整合蛋白抗體、抗體 PSMA 抗體、抗肌腱蛋白 C(Tenascin-C)抗體、抗 SLC44A4 抗體、或抗間皮素(Mesothelin)抗體。

[74]如[67]至[71]中任一項記載之抗體-藥物複合體，其中抗體為抗 B7-H3 抗體、抗 CD30 抗體、抗 CD33 抗體、或抗 CD70 抗體。

[75]如[67]至[71]中任一項記載之抗體-藥物複合體，其中抗體為抗 B7-H3 抗體。

【0050】[76]一種下列式所示之連結物，其係用以透過連結物而獲得使藥物與抗體結合的抗體-藥物複合體，



其中， L^1 係對抗體之結合部位， L^c 係對抗腫瘤性化合物之結合部位，

式中，

n^1 表示 0 至 6 之整數，

L^1 表示 $-(\text{琥珀醯亞胺}-3\text{-基}-N)-(\text{CH}_2)n^2-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)n^3-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{cyc.Hex}(1,4)-\text{CH}_2-(N\text{-基}-3\text{-琥珀醯亞胺})-$ 、或 $-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)n^4-\text{C}(=\text{O})-$ ，

其中， n^2 表示 2 至 8 之整數， n^3 表示 1 至 8 之整數， n^4 表示 1 至 8 之整數，

L^2 表示 $-\text{NH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})n^5-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{S}-(\text{CH}_2)n^6-\text{C}(=\text{O})-$ 、或單鍵，

其中， n^5 表示 1 至 6 之整數， n^6 表示 1 至 6 之整數，

L^P 表示由 2 至 7 個胺基酸構成的胜肽殘基，

L^a 表示 $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ 、 $-\text{NR}^1-(\text{CH}_2)n^7-$ 、 $-\text{O}-$ 、或單鍵，

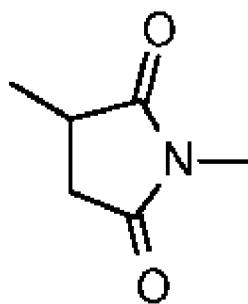
其中， n^7 表示 1 至 6 之整數， R^1 表示氫原子、碳數 1 至 6 之烷基、 $-(\text{CH}_2)n^8-\text{COOH}$ 、或 $-(\text{CH}_2)n^9-\text{OH}$ ，但 n^8 表示 1 至 4 之整數， n^9 表示 1 至 6 之整數，

L^b 表示 $-\text{CR}^2(-\text{R}^3)-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{NR}^4-$ 、或單鍵，

其中， R^2 及 R^3 各自獨立表示氫原子、碳數 1 至 6 之烷基、 $-(\text{CH}_2)n^a-\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)n^b-\text{COOH}$ 、或 $-(\text{CH}_2)n^c-\text{OH}$ ， R^4 表示氫原子或碳數 1 至 6 之烷基， n^a 表示 0 至 6 之整數， n^b 表示 1 至 4 之整數， n^c 表示整數 1 至 4，但 n^a 為 0 時， R^2 及 R^3 不成為相同，

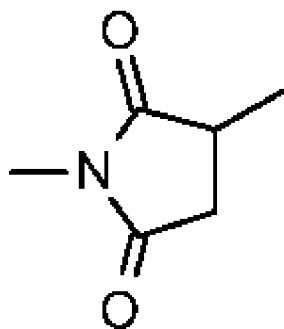
L^c 表示 $-\text{CH}_2-$ 或 $-\text{C}(=\text{O})-$ ，

$-(\text{琥珀醯亞胺}-3\text{-基}-N)-$ 係下列式所示構造：



於其第 3 位與抗體結合，於第 1 位之氮原子上與含此的連結物構造內之亞甲基結合，

-(N-基-3-琥珀醯亞胺)-係下列式所示構造：



於其第 3 位與 L^2 結合，於第 1 位之氮原子上與含此構造的連結物構造內之亞甲基結合，

cyc.Hex(1,4)表示 1,4-伸環己基，

L^2 表示-S-(CH₂)_n⁶-C(=O)-時， L^1 成為-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH₂-(N-基-3-琥珀醯亞胺)-。

【0051】[77]如[76]記載之連結物，其選自下列之群組，惟，左端係與抗體的結合部位，右端係與抗腫瘤性化合物的結合部位，

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-
NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-
CH₂-C(=O)-

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-
NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-
C(=O)-

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-
O-CH₂-C(=O)-

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-
NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-
C(=O)-

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-
CH₂-C(=O)-

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-
O-CH₂-C(=O)-

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
CH₂CH₂-C(=O)-

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-
O-CH₂-C(=O)-

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
CH₂CH₂-C(=O)-

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
CH₂-O-CH₂-C(=O)-

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-
NH-CH₂CH₂-C(=O)-

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-
NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-
NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-
NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-
C(=O)-

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-
NH-CH₂CH₂-C(=O)-

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-
NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-
CH₂-C(=O)-

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-
NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-
C(=O)-

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-
O-CH₂-C(=O)-

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-
NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-

-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-
-C(=O)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-
C(=O)-

-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-
C(=O)-

-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
CH₂CH₂-C(=O)-

-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
CH₂CH₂-C(=O)-

-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-
C(=O)-

-C(=O)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-

$\text{C}(=\text{O})-$
 $\quad -\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-$
 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$
 $\quad -\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-$
 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$
 $\quad -\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-$
 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$
 $\quad -\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$
 $\text{C}(=\text{O})-$
 $\quad -\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$
 $\text{C}(=\text{O})-$
 $\quad -\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-$
 $\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$
 $\quad -\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2-$
 $\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$
 $\quad -\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-$
 $\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$
 $\quad -\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$
 $\text{C}(=\text{O})-$
 $\quad -\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-$
 $\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$
 $\quad -\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$
 $\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$
 $\quad -\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-$
 $\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$
 $\quad -\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-$

$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-}$
 $\text{-C(=O)-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{O-}$
 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$
 $\text{-C(=O)-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{O-}$
 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$
 $\text{-C(=O)-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{O-}$
 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-}$
 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$
 $\text{-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH}_2\text{-(N-基-3-琥 珀 醯 亞 胺)-S-}$
 $\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$
 $\text{-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH}_2\text{-(N-基-3-琥 珀 醯 亞 胺)-S-}$
 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$
 $\text{-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH}_2\text{-(N-基-3-琥 珀 醯 亞 胺)-S-}$
 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$
 $\text{-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH}_2\text{-(N-基-3-琥 珀 醯 亞 胺)-S-}$
 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$
 $\text{-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH}_2\text{-(N-基-3-琥 珀 醯 亞 胺)-S-}$
 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-}$
 C(=O)-
 $\text{-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH}_2\text{-(N-基-3-琥 珀 醯 亞 胺)-S-}$
 $\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$
 $\text{-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH}_2\text{-(N-基-3-琥 珀 醯 亞 胺)-S-}$

CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
 -C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH₂-(N-基-3-琥 珀 醯 亞 胺)-S-
 CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
 -C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH₂-(N-基-3-琥 珀 醯 亞 胺)-S-
 CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
 -C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH₂-(N-基-3-琥 珀 醯 亞 胺)-S-
 CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-
 C(=O)-
 -C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH₂-(N-基-3-琥 珀 醯 亞 胺)-S-
 CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-
 C(=O)-

[78]如[76]記載之連結物，其選自下列之群組，惟，左端係與抗體的結合部位，右端係與抗腫瘤性化合物的結合部位，

-(琥 珀 醯 亞 胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
 CH₂CH₂-C(=O)-
 -(琥 珀 醯 亞 胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
 CH₂CH₂-C(=O)-
 -(琥 珀 醯 亞 胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-
 NH-CH₂CH₂-C(=O)-
 -(琥 珀 醯 亞 胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
 GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-
 -(琥 珀 醯 亞 胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
 CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
 -(琥 珀 醯 亞 胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-

$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$

$-(\text{琥珀醯亞胺-3-基-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-$

$\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$

$-(\text{琥珀醯亞胺-3-基-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$

$\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$

$-(\text{琥珀醯亞胺-3-基-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-$

$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$

$-(\text{琥珀醯亞胺-3-基-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-$

$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$

$-(\text{琥珀醯亞胺-3-基-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-$

$\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$

$-(\text{琥珀醯亞胺-3-基-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$

$\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$

$-(\text{琥珀醯亞胺-3-基-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2-$

$\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$

$-(\text{琥珀醯亞胺-3-基-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-$

$\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$

$-(\text{琥珀醯亞胺-3-基-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-$

$\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$

$-(\text{琥珀醯亞胺-3-基-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$

$\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$

$-(\text{琥珀醯亞胺-3-基-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-$

$\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$

$-(\text{琥珀醯亞胺-3-基-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-$

$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-}$

$\text{-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-}$

$\text{NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-}$

$\text{-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$

$\text{GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-}$

$\text{-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{O-}$

$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$

$\text{-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{O-}$

$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-}$

$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$

$\text{-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{O-}$

$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-}$

$\text{NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$

[79]如[76]記載之連結物，其選自下列之群組，惟，左端係與抗體的結合部位，右端係與抗腫瘤性化合物的結合部位，

$\text{-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$

$\text{-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$

$\text{-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$

$\text{-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$

$\text{-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$

GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-

CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-

CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-

CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-

NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-

CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-

CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-

CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

[80]如[76]記載之連結物，其選自下列之群組，惟，左端係與抗體的結合部位，右端係與抗腫瘤性化合物的結合部位，

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-

$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$
[發明之效果]

【0052】藉由透過特定構造之連結物而使抗腫瘤性化合物依喜替康結合的抗體-藥物複合體而可達成優異的抗腫瘤效果及安全性。

【圖式簡單說明】

【0053】

第 1 圖表示 B7-H3 變異體 1 之胺基酸序列(序列識別號 1)。

第 2 圖表示 B7-H3 變異體 2 之胺基酸序列(序列識別號 2)。

第 3 圖表示 M30-H1 型重鏈之胺基酸序列(序列識別號 9)。

第 4 圖表示 M30-H2 型重鏈之胺基酸序列(序列識別號 10)。

第 5 圖表示 M30-H3 型重鏈之胺基酸序列(序列識別號 11)。

第 6 圖表示 M30-H4 型重鏈之胺基酸序列(序列識別號 12)。

第 7 圖表示 M30-L1 型輕鏈之胺基酸序列(序列識別號 13)。

第 8 圖表示 M30-L2 型輕鏈之胺基酸序列(序列識別號 14)。

第 9 圖表示 M30-L3 型輕鏈之胺基酸序列(序列識別號 15)。

第 10 圖表示 M30-L4 型輕鏈之胺基酸序列(序列識別號 16)。

第 11 圖表示 M30-L5 型輕鏈之胺基酸序列(序列識別號

17)。

第 12 圖表示 M30-L6 型輕鏈之胺基酸序列(序列識別號 18)。

第 13 圖表示 M30-L7 型輕鏈之胺基酸序列(序列識別號 19)。

第 14 圖表示 M30 抗體重鏈之胺基酸序列(序列識別號 20)。

第 15 圖表示 M30 抗體輕鏈之胺基酸序列(序列識別號 21)。

第 16 圖表示 B7-H3 變異體 1 之核苷酸序列(序列識別號 26)。

第 17 圖表示抗體-藥物複合體(2)對皮下移植的人類黑色素瘤株 A375 細胞之效果。圖中之白菱形線表示無處置之腫瘤、白三角線表示 M30-H1-L4P 抗體、白圓形線表示抗體-藥物複合體(2)之效果。

第 18 圖表示抗體-藥物複合體(2)對皮下移植的人類黑色素瘤株 A375 細胞之效果。白菱形線表示無處置之腫瘤、黑四角形線表示抗體-藥物複合體(2)0.1mg/kg 投與時、線-X-表示 0.3mg/kg 投與時、黑三角線表示 1mg/kg 投與時、白圓形線表示 3mg/kg 投與時之效果。

第 19 圖表示抗體-藥物複合體(2)對皮下移植的人類非小細胞肺癌株 Calu-6 細胞之效果。白菱形線表示無處置之腫瘤、白三角線表示 M30-H1-L4P 抗體、白圓形線表示抗體-藥物複合體(2)之效果。

第 20 圖表示抗體-藥物複合體(1)、(13)、(41)、(55)對皮下移植的人類黑色素瘤株 A375 細胞之效果。圖中之白菱形線表示無處置之腫瘤、白圓形線表示抗體-藥物複合體(1)、白三角線表示抗體-藥物複合體(13)、線-X-表示抗體-藥物複合體

(41)、白四角形線表示抗體-藥物複合體(55)之效果。

第 21 圖表示抗體-藥物複合體(13)、(41)、(55)對皮下移植的人類非小細胞肺癌株 Calu-6 細胞之效果。白菱形線表示無處置之腫瘤、白圓形線表示 DE-310、白三角線表示抗體-藥物複合體(13)、線-X-表示抗體-藥物複合體(41)、白四角形線表示抗體-藥物複合體(55)之效果。

第 22 圖表示抗體-藥物複合體(17)、(18)、(19)、(59)、(60)、(61)對皮下移植的人類黑色素瘤株 A375 細胞之效果。圖黑菱形線表示無處置之腫瘤、黑四角形線表示抗體-藥物複合體(17)、白四角形線表示抗體-藥物複合體(18)、白圓形線表示抗體-藥物複合體(19)、黑三角線表示抗體-藥物複合體(59)、白三角線表示抗體-藥物複合體(60)、線-X-表示抗體-藥物複合體(61)之效果。

【實施方式】

[實施發明之形態]

【0054】本發明之抗體-藥物複合體係於透過連結物構造部分使抗腫瘤性抗體與抗腫瘤性化合物結合的抗腫瘤性藥物，以下詳細地說明。

【0055】

[抗體]

本發明之抗體-藥物複合體所使用的抗體意指免疫球蛋白，為含有與抗原為免疫特異性地結合的抗原結合部位的分子。作為本發明之抗體，可為 IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 及 IgY 之任一群，但 IgG 為較佳。又，作為亞群，可為 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 及 IgA2 之任一者，但 IgG1 及 IgG2 為較

佳。抗體係可來自任一物種，但較佳可例示人類、大鼠、小鼠及兔。來自人類以外的物種的情形，使用周知技術，加以嵌合化或人類化為較佳。本發明之抗體可為多株抗體，亦可為單株抗體，但單株抗體為較佳。

本發明之抗體係可以腫瘤細胞為標的的抗體為宜。即，因將具有抗腫瘤活性的藥物透過連結物而結合，就抗體而言，具備可辨識腫瘤細胞的特性、可與腫瘤細胞結合的特性、可併入腫瘤細胞內而內在化的特性、又傷害腫瘤細胞的特性之一個以上的特性為較佳。

抗體對腫瘤細胞之結合性可使用流式細胞測量術(flow cytometry)來確認。抗體併入腫瘤細胞內係可使用(1)使用結合治療抗體的二次抗體(螢光標識)而於螢光顯微鏡中將併入細胞內的抗體可視化的試驗(Cell Death and Differentiation (2008) 15, 751-761)、(2)使用結合治療抗體的二次抗體(螢光標識)而測定細胞內併入的螢光量的試驗(Molecular Biology of the Cell Vol. 15, 5268-5282, December 2004)或(3)使用結合治療抗體的免疫毒素，而併入細胞內時，毒素被釋放而細胞增殖被抑制的 Mab-ZAP 試驗(BioTechniques 28:162-165, January 2000)來確認。

抗體之抗腫瘤活性係指對腫瘤細胞之細胞傷害活性、殺細胞效果，於活體外，以細胞之增殖之抑制活性來測定而可確認。例如，培養過度表現抗體之標的蛋白質的癌細胞株，於培養系統中添加各種濃度之抗體，可測定抗焦點形成、群落形成及球狀體增殖的抑制活性。於活體內，例如，對移植高度表現標的蛋白質的腫瘤細胞株的裸鼠投與抗體，藉由測定癌細胞的

變化，可確認抗腫瘤活性。又，抗體-藥物複合體係與發揮抗腫瘤效果的藥物結合的緣故，抗體本身具有腫瘤效果者並非必須，但具有抗腫瘤效果者為更佳。由抗腫瘤效果之發揮的點，具有抗體內在化而移行至腫瘤細胞內的性質者，藉由藥物提供對腫瘤細胞賦予特異性、選擇性的傷害的點係重要的，而為較佳。

就如此抗體而言，可例示抗 A33 抗體、抗 B7-H3 抗體、抗 CanAg 抗體、抗 CD20 抗體、抗 CD22 抗體、抗 CD30 抗體、抗 CD33 抗體、抗 CD56 抗體、抗 CD70 抗體、抗 CEA 抗體、抗 Cripto 抗體、抗 EphA2 抗體、抗 G250 抗體、抗 MUC1 抗體、抗 GPNMB 抗體、抗整合蛋白抗體、抗體 PSMA 抗體、抗肌腱蛋白 C(Tenascin-C)抗體、抗 SLC44A4 抗體、抗間皮素(Mesothelin)抗體，但未限於此等。

本發明之抗體較佳為抗 CD30 抗體、抗 CD33 抗體、抗 CD70 抗體及抗 B7-H3 抗體，更佳為抗 B7-H3 抗體。

【0056】本發明之抗體係可使用此領域通常實施的方法，將成為抗原的多勝肽免疫動物，藉由採取、純化活體內產生的抗體而獲得。抗原之來源並未限定於人類，亦可將來自小鼠、大鼠等之人類以外的動物的抗原來免疫動物。此情形，藉由試驗結合取得的異種抗原的抗體與人類抗原之交叉性，可選出可適用於人類疾病的抗體。

又，依據周知方法(例如，Kohler and Milstein, Nature (1975)256,p.495-497、Kennet, R.ed., Monoclonal Antibodies, p.365-367, Plenum Press, N.Y.(1980))，藉由使產生抗抗原的抗體的抗體產生細胞與骨髓瘤細胞融合而建立融合瘤，亦可獲得

單株抗體。

又，抗原係可將編碼抗原蛋白質的基因藉由基因操作而使於宿主細胞中產生而獲得。具體而言，製作可表現抗原基因的載體，將其導入宿主細胞而使該基因表現，純化表現的抗原為宜。

抗 CD30 抗體、抗 CD33 抗體、抗 CD70 抗體各自基於 WO2002/043661、美國專利第 5,773,001 號、WO2006/113909，藉由周知手段可取得。

【0057】就於本發明所使用的 B7-H3 抗體而言，具有以下特性的抗體為所欲的。

(1)一種抗體，其特徵為具有以下特性；

(a)特異性結合 B7-H3，

(b)具有抗體依存性細胞媒介吞噬作用(ADCP)活性，

(c)於活體內具有抗腫瘤活性。

(2)如上述(1)記載之抗體或該抗體，其中 B7-H3 係為由序列識別號 1 或 2 記載之胺基酸序列而成的分子。

(3)如上述(1)或(2)記載之抗體，其具有序列識別號 3 記載之胺基酸序列而成的 CDRH1、序列識別號 4 記載之胺基酸序列而成的 CDRH2 及序列識別號 5 記載之胺基酸序列而成的 CDRH3 作為重鏈中的互補決定區，以及具有序列識別號 6 記載之胺基酸序列而成的 CDRL1、序列識別號 7 記載之胺基酸序列而成的 CDRL2 及序列識別號 8 記載之胺基酸序列而成的 CDRL3 作為輕鏈中的互補決定區。

(4)如上述(1)至(3)中任一項記載之抗體，其恆定區域為來

自人類的恆定區域。

(5)如上述(1)至(4)中任一項記載之抗體，其經人類化。

(6)如上述(5)記載之抗體，其具有選自下列群組的胺基酸序列而成的重鏈之可變區：

(a)於序列識別號 9 之胺基酸編號 20 至 141 記載之胺基酸序列、(b)於序列識別號 10 之胺基酸編號 20 至 141 記載之胺基酸序列、(c)於序列識別號 11 之胺基酸編號 20 至 141 記載之胺基酸序列、(d)於序列識別號 12 之胺基酸編號 20 至 141 記載之胺基酸序列、(e)對於(a)至(d)之序列具有至少 95%以上之相同性的胺基酸序列、及(f)於(a)至(d)之序列中 1 或數個胺基酸被刪除、取代或添加的胺基酸序列；以及

具有選自下列群組的胺基酸序列而成的輕鏈之可變區：

(g)於序列識別號 13 之胺基酸編號 21 至 128 記載之胺基酸序列、(h)於序列識別號 14 之胺基酸編號 21 至 128 記載之胺基酸序列、(i)於序列識別號 15 之胺基酸編號 21 至 128 記載之胺基酸序列、(j)於序列識別號 16 之胺基酸編號 21 至 128 記載之胺基酸序列、(k)於序列識別號 17 之胺基酸編號 21 至 128 記載之胺基酸序列、(l)於序列識別號 18 之胺基酸編號 21 至 128 記載之胺基酸序列、(m)於序列識別號 19 之胺基酸編號 21 至 128 記載之胺基酸序列、(n)對(g)至(m)之序列具有至少 95%以上之相同性的胺基酸序列、及(o)於(g)至(m)之序列中 1 或數個胺基酸被刪除、取代或添加的胺基酸序列。

(7)如上述(6)記載之抗體，其具有選自下列組成之群組的重鏈可變區及輕鏈可變區，

於序列識別號 9 之胺基酸編號 20 至 141 記載之胺基酸序列

而成的重鏈可變區及於序列識別號 13 之胺基酸編號 21 至 128 記載之胺基酸序列而成的輕鏈可變區、於序列識別號 9 之胺基酸編號 20 至 141 記載之胺基酸序列而成的重鏈可變區及於序列識別號 14 之胺基酸編號 21 至 128 記載之胺基酸序列而成的輕鏈可變區、於序列識別號 9 之胺基酸編號 20 至 141 記載之胺基酸序列而成的重鏈可變區及於序列識別號 15 之胺基酸編號 21 至 128 記載之胺基酸序列而成的輕鏈可變區、於序列識別號 9 之胺基酸編號 20 至 141 記載之胺基酸序列而成的重鏈可變區及於序列識別號 16 之胺基酸編號 21 至 128 記載之胺基酸序列而成的輕鏈可變區、於序列識別號 9 之胺基酸編號 20 至 141 記載之胺基酸序列而成的重鏈可變區及於序列識別號 17 之胺基酸編號 21 至 128 記載之胺基酸序列而成的輕鏈可變區、於序列識別號 9 之胺基酸編號 20 至 141 記載之胺基酸序列而成的重鏈可變區及於序列識別號 18 之胺基酸編號 21 至 128 記載之胺基酸序列而成的輕鏈可變區、於序列識別號 9 之胺基酸編號 20 至 141 記載之胺基酸序列而成的重鏈可變區及於序列識別號 19 之胺基酸編號 21 至 128 記載之胺基酸序列而成的輕鏈可變區、於序列識別號 12 之胺基酸編號 20 至 141 記載之胺基酸序列而成的重鏈可變區及於序列識別號 13 之胺基酸編號 21 至 128 記載之胺基酸序列而成的輕鏈可變區、於序列識別號 12 之胺基酸編號 20 至 141 記載之胺基酸序列而成的重鏈可變區及於序列識別號 14 之胺基酸編號 21 至 128 記載之胺基酸序列而成的輕鏈可變區、於序列識別號 12 之胺基酸編號 20 至 141 記載之胺基酸序列而成的重鏈可變區及於序列識別號 15 之胺基酸編號 21 至 128 記載之胺基酸序列而成的輕鏈可變區、以及於序列識別號 12 之胺基

酸編號 20 至 141 記載之胺基酸序列而成的重鏈可變區及於序列識別號 16 之胺基酸編號 21 至 128 記載之胺基酸序列而成的輕鏈可變區。

(8)如上述(6)或(7)記載之抗體，其係由選自下列組成之群組的重鏈及輕鏈而成，

於序列識別號 9 之胺基酸編號 20 至 471 記載之胺基酸序列而成的重鏈及於序列識別號 13 之胺基酸編號 21 至 233 記載之胺基酸序列而成的輕鏈、於序列識別號 9 之胺基酸編號 20 至 471 記載之胺基酸序列而成的重鏈及於序列識別號 14 之胺基酸編號 21 至 233 記載之胺基酸序列而成的輕鏈、於序列識別號 9 之胺基酸編號 20 至 471 記載之胺基酸序列而成的重鏈及於序列識別號 15 之胺基酸編號 21 至 233 記載之胺基酸序列而成的輕鏈、於序列識別號 9 之胺基酸編號 20 至 471 記載之胺基酸序列而成的重鏈及於序列識別號 16 之胺基酸編號 21 至 233 記載之胺基酸序列而成的輕鏈、於序列識別號 9 之胺基酸編號 20 至 471 記載之胺基酸序列而成的重鏈及於序列識別號 17 之胺基酸編號 21 至 233 記載之胺基酸序列而成的輕鏈、於序列識別號 9 之胺基酸編號 20 至 471 記載之胺基酸序列而成的重鏈及於序列識別號 18 之胺基酸編號 21 至 233 記載之胺基酸序列而成的輕鏈、於序列識別號 9 之胺基酸編號 20 至 471 記載之胺基酸序列而成的重鏈及於序列識別號 19 之胺基酸編號 21 至 233 記載之胺基酸序列而成的輕鏈、於序列識別號 12 之胺基酸編號 20 至 471 記載之胺基酸序列而成的重鏈及於序列識別號 13 之胺基酸編號 21 至 233 記載之胺基酸序列而成的輕鏈、於序列識別號 12 之胺基酸編號 20 至 471 記載之胺基酸序列而成的重鏈及於序列

識別號 14 之胺基酸編號 21 至 233 記載之胺基酸序列而成的輕鏈、於序列識別號 12 之胺基酸編號 20 至 471 記載之胺基酸序列而成的重鏈及於序列識別號 15 之胺基酸編號 21 至 233 記載之胺基酸序列而成的輕鏈、以及於序列識別號 12 之胺基酸編號 20 至 471 記載之胺基酸序列而成的重鏈及於序列識別號 16 之胺基酸編號 21 至 233 記載之胺基酸序列而成的輕鏈。

(9)如上述(14)至(16)中任一項記載之抗體，其係由選自下列組成之群組的重鏈及輕鏈而成，

序列識別號 9 記載之胺基酸序列而成的重鏈及序列識別號 13 記載之胺基酸序列而成的輕鏈、序列識別號 9 記載之胺基酸序列而成的重鏈及序列識別號 14 記載之胺基酸序列而成的輕鏈、序列識別號 9 記載之胺基酸序列而成的重鏈及序列識別號 15 記載之胺基酸序列而成的輕鏈、序列識別號 9 記載之胺基酸序列而成的重鏈及序列識別號 16 記載之胺基酸序列而成的輕鏈、序列識別號 9 記載之胺基酸序列而成的重鏈及序列識別號 17 記載之胺基酸序列而成的輕鏈、序列識別號 9 記載之胺基酸序列而成的重鏈及序列識別號 18 記載之胺基酸序列而成的輕鏈、序列識別號 9 記載之胺基酸序列而成的重鏈及序列識別號 19 記載之胺基酸序列而成的輕鏈、序列識別號 12 記載之胺基酸序列而成的重鏈及序列識別號 13 記載之胺基酸序列而成的輕鏈、序列識別號 12 記載之胺基酸序列而成的重鏈及序列識別號 14 記載之胺基酸序列而成的輕鏈、序列識別號 12 記載之胺基酸序列而成的重鏈及序列識別號 15 記載之胺基酸序列而成的輕鏈、以及序列識別號 12 記載之胺基酸序列而成的重鏈及序列識

別號 16 記載之胺基酸序列而成的輕鏈。

(10)如上述(8)或(9)記載之抗體，其中重鏈係於序列識別號 9 或 12 記載之胺基酸序列中的羧基末端的胺基酸刪除的重鏈。

(11)一種抗體，其係藉由下列抗體之製造方法而獲得，該方法包含培養藉由含有編碼上述(1)至(10)中任一項記載之抗體的多核苷酸的表現載體而被轉形的宿主細胞的步驟，及由該步驟獲得的培養物採取目的抗體的步驟。

(12)如上述(1)至(11)中任一項記載之抗體，為了使抗體依存性細胞傷害活性增強，而調節糖鍵修飾。

【0058】以下，說明本發明所使用的 B7-H3 抗體。

於本說明書中，「癌」與「腫瘤」係以相同意義使用。

於本說明書中，所謂「基因」的用語不僅包含 DNA，亦包含其 mRNA、cDNA 及其 cRNA。

於本說明書中，所謂「多核苷酸」的用語係以與核酸相同的意義來使用，亦包含 DNA、RNA、探針、寡核苷酸、及引子。

於本說明書中，「多胜肽」與「蛋白質」並未區別來使用。

於本說明書中，「細胞」亦包含動物個體內之細胞、培養細胞。

於本說明書中，「B7-H3」係與 B7-H3 蛋白質相同意義使用，又，意指 B7-H3 變異體 1 及/或 B7-H3 變異體 2。

本說明書中的「CDR」係指互補決定區(CDR：Complementarity deterring region)。抗體分子之重鏈及輕鏈

中各自有 3 處的 CDR 為已知。CDR 亦稱為超可變區(hypervariable domain)，位於抗體之重鏈及輕鏈可變區內，為一次構造之變異性特高的部位，於重鏈及輕鏈之多胜肽鏈之一次構造上，於各自 3 處所分離。於本說明書中，關於抗體之 CDR，重鏈之 CDR 由重鏈胺基酸序列之胺基末端側記述為 CDRH1、CDRH2、CDRH3，輕鏈之 CDR 由輕鏈胺基酸序列之胺基末端側記述為 CDRL1、CDRL2、CDRL3。此等之部位於立體構造上相互近接，決定對結合的抗原的特異性。

於本發明，「嚴格條件下雜交」係指於市售雜交溶液 ExpressHyb Hybridization Solution(Clontech 公司製)中，於 68℃雜交，或使用固定 DNA 的過濾器，於 0.7-1.0M 之 NaCl 存在下於 68℃進行雜交後，使用 0.1-2 倍濃度之 SSC 溶液(1 倍濃度 SSC 係由 150mM NaCl、15mM 檸檬酸鈉而成)，於 68℃洗淨而可鑑定的條件或與其同等之條件下來雜交。

【0059】

1.B7-H3

B7-H3 係對抗原提示細胞表現作為輔助刺激分子的 B7 家族之一者，一般認為對 T 細胞上之受體作用而促進或抑制免疫作用。

B7-H3 係具有 1 次膜貫通構造的蛋白質，但於 B7-H3 之 N 末端側細胞外區域存有 2 個變異體。B7-H3 變異體 1(4Ig-B7-H3)中存有各 2 個處所之 V 或 C 樣 Ig 功能域，B7-H3 變異體 2(2Ig-B7-H3)中存有各 1 個處所之 V 或 C 樣 Ig 功能域。

本發明使用的 B7-H3 係由人類、非人類哺乳動物(大鼠、小鼠等)之 B7-H3 表現細胞直接純化來使用，或者可調製該細胞之

細胞膜劃分來使用，又，B7-H3 於活體外合成，或者藉由基因操作可使於宿主細胞中產生而獲得。具體而言，基因操作係將 B7-H3 cDNA 併入可表現的載體後，於含有轉錄及轉譯必要的酵素、基質及能量物質的溶液中合成，或者藉由將其他原核生物、或真核生物之宿主細胞轉形而使 B7-H3 表現，可獲得該蛋白質。

人類 B7-H3 變異體 1 基因之開放讀碼區(ORF)之胺基酸序列係被記載為序列表之序列識別號 1。又，序列識別號 1 之序列被記載於第 1 圖。

人類 B7-H3 變異體 2 基因之 ORF 之胺基酸序列被記載於序列表之序列識別號 2。又，序列識別號 2 之序列被記載於第 2 圖。

又，於上述各 B7-H3 之胺基酸序列中，1 或數個胺基酸被取代、刪除及/或添加的胺基酸序列而成之具有與該蛋白質同等生物活性的蛋白質亦包含於 B7-H3。

訊號序列被去除的成熟人類 B7-H3 變異體 1 相當於序列識別號 1 所示的胺基酸序列之第 27 號至第 534 號之胺基酸殘基而成的胺基酸序列。又，訊號序列被去除的成熟人類 B7-H3 變異體 2 相當於序列識別號 2 所示的胺基酸序列之第 27 號至第 316 號之胺基酸殘基而成的胺基酸序列。

【0060】

2. 抗 B7-H3 抗體之製造

本發明之抗 B7-H3 抗體係使用常法，以 B7-H3 或由 B7-H3 之胺基酸序列選擇的任意多胜肽將動物免疫，藉由採取、純化於活體內產生的抗體而可獲得。成為抗原的 B7-H3 之生物種

並未限定於人類，亦可以來自小鼠、大鼠等之人類以外之動物的 B7-H3 免疫動物。於此情形，藉由試驗結合取得的異種 B7-H3 的抗體與人類 B7-H3 之交叉性，可選別可適用人類疾病的抗體。

又，依據周知方法(例如，Kohler and Milstein，Nature(1975)256，p.495-497、Kennet，R.ed.，Monoclonal Antibodies，p.365-367，Plenum Press，N.Y.(1980))，藉由使產生抗 B7-H3 抗體的抗體產生細胞與骨髓瘤細胞融合而建立融合瘤，亦可獲得單株抗體。

又，成為抗原的 B7-H3 係藉由基因操作使 B7-H3 基因於宿主細胞中表現而可獲得。

具體而言，製作可表現 B7-H3 基因的載體，將其導入宿主細胞而使該基因表現，而純化表現的 B7-H3 為宜。以下，具體說明抗 B7-H3 抗體之取得方法。

【0061】

(1)抗原之調製

就用以製作抗 B7-H3 抗體的抗原而言，可舉例 B7-H3 或其至少 6 個連續部分胺基酸序列而成的多胜肽、或者於此等添加任意之胺基酸序列或載體的衍生物。

B7-H3 可由人類之腫瘤組織或者腫瘤細胞直接純化來使用，又，B7-H3 於活體外合成、或者藉由基因操作而使於宿主細胞產生而可獲得。

具體而言，基因操作係將 B7-H3 之 cDNA 併入可表現的載體後，於含有轉錄及轉譯上必要的酵素、基質及能量物質的溶液中合成，或者藉由使其他原核生物、或真核生物之宿主細胞

轉形，而使 B7-H3 表現，可獲得抗原。

又，藉由將膜蛋白質的 B7-H3 之細胞外區域與抗體之恆定區域連結的融合蛋白質於適合的宿主・載體系統中表現，亦可獲得呈分泌蛋白質的抗原。

B7-H3 之 cDNA 係例如，將表現 B7-H3 之 cDNA 的 cDNA 庫作為模版，使用特異地增幅 B7-H3 cDNA 的引子而進行聚合酶鏈反應(以下稱為「PCR」)(參照 Saiki, R. K., et al. Science(1988)239, p.487-489)，可藉由所謂的 PCR 法而取得。

就多胜肽之活體外(in vitro)合成而言，例如可舉例 Roche Diagnostics K.K.公司製之快速轉譯系統(RTS)，但未限定於此。

就原核細胞之宿主而言，例如，可舉例大腸菌(Escherichia coli)或枯草菌(Bacillus subtilis)等。將目的基因於此等宿主細胞內轉形，以宿主與來自可適合的種之複製子(replicon)即複製起點、調節序列的質體載體使宿主細胞轉形。又，就載體而言，於轉形細胞具有可賦與表現形質(表現型)的選擇性的序列者為較佳。

真核細胞之宿主細胞包含脊椎動物、昆蟲、酵母等之細胞，就脊椎動物細胞而言，例如，猴細胞 COS 細胞(Gluzman, Y. Cell(1981)23, p.175-182、ATCC CRL-1650)、小鼠纖維母細胞 NIH3T3(ATCC No.CRL-1658)或中國倉鼠卵巢細胞(CHO 細胞、ATCC CCL-61)之二氫葉酸還原酵素缺損株(Urlaub, G. and Chasin, L.A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1980)77, p.4126-4220)等被

經常使用，但並未限定於此。

如上述獲得的轉形體可依據常法來培養，藉由該培養使於細胞內、或細胞外產生目的多胜肽。

就用於該培養的培養基而言，因應採用的宿主細胞可適宜選擇慣用的各種培養基，若為大腸菌，例如，可於 LB 培養基因應必要添加氨比西林(ampicillin)等抗生物質或 IPMG 來使用。

藉由上述培養，轉形體之細胞內或細胞外產生的重組蛋白質係可藉由利用該蛋白質之物理性質或化學性質等的各種周知的分離操作法而加以分離・純化。

作為該方法，具體而言，例如，可舉例藉由通常之蛋白質沉澱劑的處理、超過濾、分子篩選層析(凝膠過濾)、吸附層析、離子交換層析、親和性層析等之各種液體層析、透析法、此等之組合等。

又，藉由於表現的重組蛋白質上連繫 6 個殘基而成的組胺酸標籤，可於鎳親和性管柱有效率地純化。或者，藉由於表現的重組蛋白質上連繫 IgG 之 Fc 區域，於蛋白質 A 管柱可有效率地純化。

藉由組合上述方法，可容易地於高產率、高純度下大量製造目的之多胜肽。

【0062】

(2) 抗 B7-H3 單株抗體之製造

就與 B7-H3 特異性結合的抗體之例而言，可舉例與 B7-H3 特異性結合的單株抗體，但其取得方法係如以下記載。

於單株抗體之製造，一般而言，如下述的作業步驟係必要的。

即，

(a)作為抗原使用的活體高分子之純化、

(b)藉由將抗原注射至動物而免疫後，採取血液而檢定其抗體力價，決定脾臟摘出之時期後，調製抗體產生細胞的步驟、

(c)骨髓瘤細胞(以下稱為「骨髓瘤」)之調製、

(d)抗體產生細胞與骨髓瘤之細胞融合、

(e)產生目的抗體的融合瘤群之選別、

(f)單一細胞株之分割(選殖)、

(g)依情況，用以大量製造單株抗體的融合瘤之培養、或移植融合瘤的動物之飼育、

(h)如此製造的單株抗體之生理活性、及其結合特異性的檢討、或者作為標識試藥之特性之檢定等。

以下，單株抗體之製作法係依據上述步驟而詳述，但該抗體之製作法並未限定於此，例如亦可使用脾細胞以外之抗體產生細胞及骨髓瘤。

【0063】

(a)抗原之純化

就抗原而言，可使用以如前述方法調製的 B7-H3 或其一部分。

又，亦可使用藉由 B7-H3 表現重組體細胞所調製的膜劃份、或 B7-H3 表現重組體細胞本身，又使用本項技術領域者周知之方法，將化學合成的本發明蛋白質之部分胜肽作為抗原來使用。

【0064】

(b) 抗體產生細胞之調製

混合步驟(a)獲得的抗原、費氏(Freund)之完全或不完全佐劑、或鉀明礬之類的助劑，作為免疫原對實驗動物免疫。實驗動物係可使用不妨礙用於周知融合瘤製作法所使用的動物。具體而言，例如可使用小鼠、大鼠、山羊、綿羊、牛、馬等。惟，由與摘出的抗體產生細胞融合的骨髓瘤細胞的取得容易性等之觀點，以小鼠或大鼠作為被免疫動物為較佳。

又，實際使用的小鼠及大鼠之系統並未特別限制，於小鼠的情形，例如，各系統 A、AKR、BALB/c、BDP、BA、CE、C3H、57BL、C57BL、C57L、DBA、FL、HTH、HT1、LP、NZB、NZW、RF、R III、SJL、SWR、WB、129 等，又於大鼠的情形，例如，可使用 Wistar、Low、Lewis、Sprague、Dawley、ACI、BN、Fischer 等。

此等小鼠及大鼠例如可獲自日本 CLEA、日本 Charles River 等實驗動物飼育販賣業者。

其中，如果考慮與後述之骨髓瘤細胞融合適合性的話，於小鼠以 BALB/c 系統、於大鼠以 Wistar 及 Low 系統作為被免疫動物為特佳。

又，考慮抗原之人類與小鼠之相同性，使用去除自體抗體之使活體機構降低的小鼠，即自體免疫疾病小鼠亦為較佳。

又，此等小鼠或大鼠之免疫時之週齡較佳為 5~12 週齡，更佳為 6~8 週齡。

以 B7-H3 或其重組體來免疫動物係例如，可使用詳細記載於 Weir, D.M., Handbook of Experimental Immunology Vol.I.II.III., Blackwell Scientific Publications, Oxford

(1987)、Kabat,E.A.and Mayer,M.M.,Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher Springfield,Illinois(1964)等之周知方法。

此等之免疫法中，具體呈示本發明之較佳方法，例如如下所載。

即，首先，將抗原的膜蛋白質劃份、或表現抗原的細胞投與動物之皮內或腹腔內。

惟，為了提高免疫效率，併用兩者為較佳，前半段進行皮內投與、後半段或僅最終次進行腹腔內投與時，可特別地提高免疫效率。

抗原之投與日程依被免疫動物之種類、個體差等而異，一般而言，抗原投與次數 3～6 次、投與間隔 2～6 週為較佳，投與次數 3～4 次、投與間隔 2～4 週為更佳。

又，抗原之投與量依動物種類、個體差等而異，但一般而言為 0.05～5mg，較佳為 0.1～0.5mg 左右。

追加免疫係如以上之抗原投與之 1～6 週後，較佳為 2～4 週後，更佳為 2～3 週後進行。

又，進行追加免疫之際之抗原投與量，依動物種類、大小等而異，一般而言，例如於小鼠的情形係 0.05～5mg，較佳為 0.1～0.5mg，更佳為 0.1～0.2mg 左右。

上述追加免疫後 1～10 日，較佳為 2～5 日後，更佳為 2～3 日後，自被免疫動物無菌取出含抗體產生細胞的脾臟細胞或淋巴球。此時測定抗體力價，若將抗體力價變的非常高的動物作為抗體產生細胞之供給源來使用，可提高之後的操作效率。

就本文使用的抗體力價之測定法而言，例如，可舉例 RIA

法或 ELISA 法，但並不限於此等方法。

本發明中的抗體力價的測定，例如若根據 ELISA 法，可如下記載一樣的順序進行。

首先，使純化或部分純化的抗原吸附於 ELISA 用 96 孔盤等之固相表面，再將未吸附抗原的固相表面覆蓋與抗原無關係的蛋白質，例如牛血清白蛋白(以下稱為「BSA」)，將該表面洗淨後，使與作為第一抗體作階段稀釋的試料(例如小鼠血清)接觸，於上述抗原與試料中之抗體結合。

再添加作為第二抗體之抗酵素標識的小鼠抗體的抗體而使與小鼠抗體結合，洗淨後添加該酵素之基質，藉由測定基於基質分解而顯色的吸光度變化，算出抗體力價。

由被免疫動物之脾臟細胞或淋巴球之抗體產生細胞之分離，可依據周知方法(例如，Kohler et al., Nature (1975)256,p.495,; Kohler et al., Eur.J.Immunol.(1977)6, p.511,; Milstein et al., Nature(1977),266,p.550,; Walsh, Nature,(1977)266,p.495)來進行。例如，於脾臟細胞的情形，可採用將脾臟細切而細胞以不鏽鋼網過濾後，游離於 Eagle 最小必須培養基(MEM)而分離抗體產生細胞的一般方法。

【0065】

(c)骨髓瘤細胞(以下，稱為「骨髓瘤」)之調製

細胞融合所使用的骨髓瘤細胞並未特別限制，可由周知細胞株適宜選擇來使用。惟，考慮由融合細胞選擇融合瘤之際之便利性，使用其選擇手續已確立的 HGPRT(黃嘌呤-鳥嘌呤磷酸核苷轉移酶(Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl

transferase))缺損株為較佳。

即，來自小鼠之 X63-Ag8(X63)、NS1-ANS/1(NS1)、P3X63-Ag8.U1(P3U1)、X63-Ag8.653(X63.653)、SP2/0-Ag14(SP2/0)、MPC11-45.6TG1.7(45.6TG)、FO、S149/5XXO、BU.1 等；來自大鼠之 210.RSY3.Ag.1.2.3(Y3)等；來自人類之 U266AR(SKO-007)、GM1500·GTG-A12 (GM1500)、UC729-6、LICR-LOW-HMy2(HMy2)、8226AR/NIP4-1(NP41)等。此等之 HGPRT 缺損株，例如，可自 American Type Culture Collection (ATCC)等取得。

此等細胞株係於適當培養基，例如以 8-氮鳥嘌呤培養基[於 RPMI-1640 培養基中添加麩醯胺酸、2-氫硫基乙醇、慶大黴素(gentamicin)、及胎牛血清(以下稱為「FBS」)的培養基中添加 8-氮鳥嘌呤的培養基]、伊思考夫改良杜爾貝可培養基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium；以下稱為「IMDM」)、或達爾伯克改良伊芳格爾培養基(Dulbecco's Modified Eagle Medium；以下稱為「DMEM」)繼代培養，但細胞融合之 3 至 4 日前以正常培養基[例如，含 10% FCS 的 ASF104 培養基(味之素(股)製)]繼代培養，使融合當日確保有 2×10^7 個以上之細胞數。

【0066】

(d)細胞融合

抗體產生細胞與骨髓瘤細胞之融合，依據周知方法(Weir,D.M.,Handbook of Experimental Immunology Vol.I.II.III.,Blackwell Scientific Publications,Oxford (1987)、Kabat,E.A.and Mayer,M.M.,Experimental

Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964) 等), 可於使細胞生存率未極度降低的程度的條件下適宜實施。

如此方法, 例如, 可使用於聚乙二醇等之高濃度聚合物溶液中將抗體產生細胞與骨髓瘤細胞混合的化學方法、利用電刺激的物理方法等。其中, 若呈示上述化學方法之具體例則如下所述。

即, 使用為高濃度聚合物溶液的聚乙二醇的情形, 於分子量 1500~6000, 較佳為 2000~4000 之聚乙二醇溶液中, 於 30~40℃, 較佳為 35~38℃之溫度下, 將抗體產生細胞與骨髓瘤細胞混合 1~10 分鐘, 較佳為 5~8 分鐘。

【0067】

(e) 融合瘤群之選擇

藉由上述細胞融合所獲得的融合瘤之選擇方法並未特別限制, 但通常使用 HAT(次黃嘌呤-胺基蝶呤-胸苷)選擇法 (Kohler et al., Nature (1975) 256, p.495; Milstein et al., Nature (1977) 266, p.550)。

此方法係使用於胺基蝶呤無法生存的 HGPRT 缺欠株之骨髓瘤細胞而獲得融合瘤的情形為有效的。

即, 藉由將未融合細胞及融合瘤於 HAT 培養基中培養, 選擇性殘存僅對胺基蝶呤具耐性的融合瘤, 且可使增殖。

【0068】

(f) 單一細胞株之分割(選殖)

就融合瘤之選殖法而言, 例如可使用甲基纖維素法、軟洋菜法、有限稀釋法等之周知方法(例如參照 Barbara, B.M. and

Stanley, M. S.: Selected Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman and Company, San Francisco (1980)). 此等方法中，尤其甲基纖維素法等之三次元培養法為較佳。例如，將藉由細胞融合所形成的融合瘤群懸浮於 ClonaCell-HY Selection Medium D (StemCell Technologies 公司製 #03804) 等之甲基纖維素培養基而培養，回收形成的融合瘤株而單株融合瘤之取得為可能的。培養回收的各融合瘤株，將於獲得的融合瘤培養上清液中為安定而抗體力價被認可者選擇作為 B7-H3 單株抗體產生融合瘤株。

【0069】就如此建立的融合瘤株之例而言，可舉例 B7-H3 融合瘤 M30。又，於本說明書中，將 B7-H3 融合瘤 M30 產生的抗體記載為「M30 抗體」或僅記載為「M30」。

M30 抗體之重鏈具有序列表之序列識別號 20 所示的胺基酸序列。又，M30 抗體之輕鏈具有序列表之序列識別號 21 所示的胺基酸序列。又，序列表之序列識別號 20 所示的重鏈胺基酸序列中，第 1 至 19 號之胺基酸殘基而成的胺基酸序列係訊號序列，第 20 至 141 號之胺基酸殘基而成的胺基酸序列係可變區，第 142 至 471 號之胺基酸殘基而成的胺基酸序列係恆定區域。又，序列表之序列識別號 21 所示的輕鏈胺基酸序列中，第 1 至 22 號之胺基酸殘基而成的胺基酸序列係訊號序列，第 23 至 130 號之胺基酸殘基而成的胺基酸序列係可變區，第 131 至 235 號之胺基酸殘基而成的胺基酸序列係恆定區域。

【0070】

(g) 由融合瘤培養之單株抗體之調製

如此選擇的融合瘤係藉由將其培養，可效率佳地獲得單株抗體，但在培養之前，篩選產生目的單株抗體的融合瘤係所欲

的。

此篩選可採用目前既知之方法。

本發明中的抗體力價的測定可依據例如上述(b)之項目中說明的 ELISA 法來進行。

依據以上方法所獲得的融合瘤，可於液態氮中或-80℃以下之冷凍庫中以凍結狀態下保存。

結束選殖的融合瘤係將培養基由 HT 培養基換成正常培養基來培養。

大量培養係於使用大型培養瓶的回轉培養、或者旋轉器培養來進行。由此大量培養中的上清液，藉由凝膠過濾等使用本項技術領域中具通常知識周知之方法來純化，可獲得與本發明之蛋白質特異性結合的單株抗體。

又，於同系統之小鼠(例如，上述之 BALB/c)、或 Nu/Nu 小鼠之腹腔內注射融合瘤，藉由使該融合瘤增殖，可獲得含大量本發明單株抗體的腹水。

投與腹腔內的情形，事前(3~7 日前)投與 2,6,10,14-四甲基十五烷(2,6,10,14-tetramethyl pentadecane)(姥鯨烷(pristane))等之礦物油時，可獲得更多量之腹水。

例如，預先於與融合瘤同系統之小鼠腹腔內注射免疫抑制劑，將 T 細胞不活性化後，20 日後使 $10^6 \sim 10^7$ 個之融合瘤・株細胞浮游於不含血清的培養基中(0.5ml)而投與腹腔內，通常腹部會膨滿，積存腹水時自小鼠採取腹水。藉由此方法，與培養液中相比，可獲得約 100 倍以上濃度之單株抗體。

依據上述方法獲得的單株抗體，可以例如 Weir, D.M.: Handbook of Experimental Immunology, Vol.I, II, III, Blackwell Scientific Publications, Oxford(1978)記載的方

法來純化。

如此獲得的單株抗體對 B7-H3 具有高抗原特異性。

【0071】

(h)單株抗體之檢定

如此獲得的單株抗體之異型及亞群之決定可如以下方式進行。

首先，作為鑑定法可舉例歐氏(Ouchterlony)法、ELISA 法、或 RIA 法。

歐氏法雖簡便，但於單株抗體濃度低的情形，濃縮操作為必要的。

另一方面，使用 ELISA 法或 RIA 法的情形，培養上清液直接與抗原吸附固相反應，再使用作為第二次抗體之對應各種免疫球蛋白異型、亞群的抗體，鑑定單株抗體之異型、亞群者為可能的。

又，作為更簡便的方法而言，亦可利用市售之鑑定用套組(例如，小鼠分型套組；Bio-Rad 公司製)等。

再者，蛋白質之定量係可藉由斐林-洛瑞法(Folin Lowry assay)、及 280nm 中的吸光度 $[1.4(OD_{280})=\text{免疫球蛋白 } 1\text{mg/ml}]$ 而算出的方法來進行。

再者，再度實施(2)之(a)至(h)的步驟而由另外方式獨立取得單株抗體的情形，亦可取得具有與 M30 抗體同等之細胞傷害活性的抗體。就如此抗體之一例而言，可舉例與 M30 抗體相同之抗原決定位結合的抗體。M30 係辨識 B7-H3 之細胞外區域中的功能域 IgC1 功能域或 IgC2 功能域中的抗原決定位，結合 IgC1 功能域或 IgC2 功能域或結合兩者，就該抗原決定位而

言，特別可舉例存在於 B7-H3 之 IgC1 功能域或 IgC2 功能域的抗原決定位。新製作的單株抗體若結合 M30 抗體之結合的部分胜肽或部分立體構造，可判定該單株抗體結合與 M30 抗體相同之抗原決定位。又，藉由判定相對於 M30 抗體之對 B7-H3 的結合，該單株抗體為競合(即，該單株抗體會妨礙 M30 抗體與 B7-H3 之結合)，即使具體的抗原決定位之序列或構造未被決定，可判定該單株抗體結合與 M30 抗體相同之抗原決定位。抗原決定位相同被確認的情形，該單株抗體具有與 M30 抗體同等之細胞傷害活性被強烈期待。

【0072】

(3)其他抗體

本發明之抗體除了上述抗 B7-H3 之單株抗體之外，以使對人類的異種抗原性降低等為目的，亦包含人為改變的基因重組型抗體，例如，嵌合(Chimeric)抗體、人類化(Humanized)抗體、人類抗體等。此等抗體可使用已知方法來製造。

就嵌合抗體而言，可舉例抗體之可變區與恆定區域彼此為異種的抗體，例如將來自小鼠或大鼠的抗體之可變區與來自人類的恆定區域接合的嵌合抗體(參照 Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,81,6851-6855,(1984))。

就人類化抗體而言，可舉例僅將互補決定區(CDR；complementarity determining region)併入來自人類的抗體的抗體(參照 Nature(1986)321,p.522-525)、藉由 CDR 移植法而於 CDR 之序列加上一部分框架的胺基酸殘基亦移植至人類抗體的抗體(國際公開小冊 WO90/07861)。

惟，就來自 M30 抗體之人類化抗體而言，只要保持 M30 抗

體之 6 種全部的 CDR 序列，具有抗腫瘤活性即可，並未限定於特定之人類化抗體。又，M30 抗體之重鏈可變區係保有序列表之序列識別號 3 所示的胺基酸序列而成的 CDRH1(NYVMH)、序列識別號 4 所示的胺基酸序列而成的 CDRH2(YINPYNDDVKYNEKFKG)、及序列識別號 5 所示的胺基酸序列而成的 CDRH3(WGYYGSPLYYFDY)。又，M30 抗體之輕鏈可變區係保有序列表之序列識別號 6 所示的胺基酸序列而成的 CDRL1(RASSRLIYMH)、序列識別號 7 所示的胺基酸序列而成的 CDRL2(ATSNLAS)、及序列識別號 8 所示的胺基酸序列而成的 CDRL3 (QQWNSNPPT)。

【0073】就小鼠抗體 M30 之人類化抗體之實例而言，可舉例包含(1)序列表之序列識別號 9、10、11 或 12 之第 20 至 141 號之胺基酸殘基而成的胺基酸序列、(2)相對於上述(1)之胺基酸序列至少具有 95%以上之相同性的胺基酸序列、及(3)於上述(1)之胺基酸序列中 1 或數個胺基酸被刪除、取代或添加的胺基酸序列之任一者而成的重鏈可變區的重鏈、以及包含(4)序列識別號 13、14、15、16、17、18 或 19 之第 21 至 128 號之胺基酸殘基而成的胺基酸序列、(5)相對於上述(4)之胺基酸序列至少具有 95%以上之相同性的胺基酸序列、及(6)於上述(4)之胺基酸序列中 1 或數個胺基酸被刪除、取代或添加的胺基酸序列之任一者而成的輕鏈可變區的輕鏈之任意組合。

又，本說明書中的「數個」係指 1 至 10 個、1 至 9 個、1 至 8 個、1 至 7 個、1 至 6 個、1 至 5 個、1 至 4 個、1 至 3 個、或 1 至 2 個。

【0074】又，就本說明書中的胺基酸之取代而言，以保存的

胺基酸取代為較佳。保存的胺基酸取代係指於胺基酸側鏈上有關連的某胺基酸基內所產生的取代。較佳的胺基酸基如以下所示：酸性基團=天冬胺酸、麩胺酸；鹼性基團=離胺酸、精胺酸、組胺酸；非極性基團=丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸、色胺酸；及非帶電極性家族=甘胺酸、天冬醯胺酸、麩醯胺酸、半胱胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸。其他較佳胺基酸基團如下所示：脂肪族羥基團=絲胺酸及蘇胺酸；含有醯胺之基團=天冬醯胺酸及麩醯胺酸；脂肪族基團=丙胺酸、纈胺酸、白胺酸及異白胺酸；以及芳香族基團=苯丙胺酸、色胺酸及酪胺酸。該胺基酸取代係於不使原來具有的胺基酸序列的物質之特性降低的範圍內進行者為較佳。

就上述重鏈及輕鏈之較佳組合的抗體而言，可舉例具有序列識別號 9 之胺基酸編號 20 至 141 記載之胺基酸序列而成的重鏈可變區的重鏈及具有序列識別號 13 之胺基酸編號 21 至 128 記載之胺基酸序列而成的輕鏈可變區的重鏈而形成的抗體、具有序列識別號 9 之胺基酸編號 20 至 141 記載之胺基酸序列而成的重鏈可變區的重鏈及具有序列識別號 14 之胺基酸編號 21 至 128 記載之胺基酸序列而成的輕鏈可變區的重鏈而形成的抗體、具有序列識別號 9 之胺基酸編號 20 至 141 記載之胺基酸序列而成的重鏈可變區的重鏈及具有序列識別號 15 之胺基酸編號 21 至 128 記載之胺基酸序列而成的輕鏈可變區的重鏈而形成的抗體、具有序列識別號 9 之胺基酸編號 20 至 141 記載之胺基酸序列而成的重鏈可變區的重鏈及具有序列識別號 16 之胺基酸編號 21 至 128 記載之胺基酸序列而成的輕鏈可變區的重鏈而形成的抗體、具有序列識別號 9 之胺基酸編號 20 至 141 記載之胺基酸序列而成的

重鏈可變區的重鏈及具有序列識別號 17 之胺基酸編號 21 至 128 記載之胺基酸序列而成的輕鏈可變區的輕鏈而成的抗體、具有序列識別號 9 之胺基酸編號 20 至 141 記載之胺基酸序列而成的重鏈可變區的重鏈及具有序列識別號 18 之胺基酸編號 21 至 128 記載之胺基酸序列而成的輕鏈可變區的輕鏈而成的抗體、具有序列識別號 9 之胺基酸編號 20 至 141 記載之胺基酸序列而成的重鏈可變區的重鏈及具有序列識別號 19 之胺基酸編號 21 至 128 記載之胺基酸序列而成的輕鏈可變區的輕鏈而成的抗體、具有序列識別號 12 之胺基酸編號 20 至 141 記載之胺基酸序列而成的重鏈可變區的重鏈及具有序列識別號 13 之胺基酸編號 21 至 128 記載之胺基酸序列而成的輕鏈可變區的輕鏈而成的抗體、具有序列識別號 12 之胺基酸編號 20 至 141 記載之胺基酸序列而成的重鏈可變區的重鏈及具有序列識別號 14 之胺基酸編號 21 至 128 記載之胺基酸序列而成的輕鏈可變區的輕鏈而成的抗體、具有序列識別號 12 之胺基酸編號 20 至 141 記載之胺基酸序列而成的重鏈可變區的重鏈及具有序列識別號 15 之胺基酸編號 21 至 128 記載之胺基酸序列而成的輕鏈可變區的輕鏈而成的抗體、以及具有序列識別號 12 之胺基酸編號 20 至 141 記載之胺基酸序列而成的重鏈可變區的重鏈及具有序列識別號 16 之胺基酸編號 21 至 128 記載之胺基酸序列而成的輕鏈可變區的輕鏈而成的抗體。

【0075】就更佳組合之抗體而言，可舉例序列識別號 9 之胺基酸編號 20 至 471 記載之胺基酸序列而成的重鏈及序列識別號 13 之胺基酸編號 21 至 233 記載之胺基酸序列而成的輕鏈而成的抗體、序列識別號 9 之胺基酸編號 20 至 471 記載之胺基酸序

列而成的重鏈及序列識別號 14 之胺基酸編號 21 至 233 記載之胺基酸序列而成的輕鏈而成的抗體、序列識別號 9 之胺基酸編號 20 至 471 記載之胺基酸序列而成的重鏈及序列識別號 15 之胺基酸編號 21 至 233 記載之胺基酸序列而成的輕鏈而成的抗體、序列識別號 9 之胺基酸編號 20 至 471 記載之胺基酸序列而成的重鏈及序列識別號 16 之胺基酸編號 21 至 233 記載之胺基酸序列而成的輕鏈而成的抗體、序列識別號 9 之胺基酸編號 20 至 471 記載之胺基酸序列而成的重鏈及序列識別號 17 之胺基酸編號 21 至 233 記載之胺基酸序列而成的輕鏈而成的抗體、序列識別號 9 之胺基酸編號 20 至 471 記載之胺基酸序列而成的重鏈及序列識別號 18 之胺基酸編號 21 至 233 記載之胺基酸序列而成的輕鏈而成的抗體、序列識別號 9 之胺基酸編號 20 至 471 記載之胺基酸序列而成的重鏈及序列識別號 19 之胺基酸編號 21 至 233 記載之胺基酸序列而成的輕鏈而成的抗體、序列識別號 12 之胺基酸編號 20 至 471 記載之胺基酸序列而成的重鏈及序列識別號 13 之胺基酸編號 21 至 233 之胺基酸序列而成的輕鏈而成的抗體、序列識別號 12 之胺基酸編號 20 至 471 記載之胺基酸序列而成的重鏈及序列識別號 14 之胺基酸編號 21 至 233 之胺基酸序列而成的輕鏈而成的抗體、序列識別號 12 之胺基酸編號 20 至 471 記載之胺基酸序列而成的重鏈及序列識別號 15 之胺基酸編號 21 至 233 記載之胺基酸序列而成的輕鏈而成的抗體、以及序列識別號 12 之胺基酸編號 20 至 471 記載之胺基酸序列而成的重鏈及序列識別號 16 之胺基酸編號 21 至 233 記載之胺基酸序列而成的輕鏈而成的抗體。

【0076】又，就其他較佳組合而言，可舉例序列識別號 9 記

載之胺基酸序列而成的重鏈及序列識別號 13 記載之胺基酸序列而成的輕鏈而成的抗體、序列識別號 9 記載之胺基酸序列而成的重鏈及序列識別號 14 記載之胺基酸序列而成的輕鏈而成的抗體、序列識別號 9 記載之胺基酸序列而成的重鏈及序列識別號 15 記載之胺基酸序列而成的輕鏈而成的抗體、序列識別號 9 記載之胺基酸序列而成的重鏈及序列識別號 16 記載之胺基酸序列而成的輕鏈而成的抗體、序列識別號 9 記載之胺基酸序列而成的重鏈及序列識別號 17 記載之胺基酸序列而成的輕鏈而成的抗體、序列識別號 9 記載之胺基酸序列而成的重鏈及序列識別號 18 記載之胺基酸序列而成的輕鏈而成的抗體、序列識別號 9 記載之胺基酸序列而成的重鏈及序列識別號 19 記載之胺基酸序列而成的輕鏈而成的抗體、序列識別號 12 記載之胺基酸序列而成的重鏈及序列識別號 13 記載之胺基酸序列而成的輕鏈而成的抗體、序列識別號 12 記載之胺基酸序列而成的重鏈及序列識別號 14 記載之胺基酸序列而成的輕鏈而成的抗體、序列識別號 12 記載之胺基酸序列而成的重鏈及序列識別號 15 記載之胺基酸序列而成的輕鏈而成的抗體、以及序列識別號 12 記載之胺基酸序列而成的重鏈及序列識別號 16 記載之胺基酸序列而成的輕鏈而成的抗體。

【0077】藉由組合顯示與上述重鏈胺基酸序列及輕鏈胺基酸序列有高相同性的序列，選擇具有與上述各抗體相同細胞傷害性活性的抗體為可能的。如此之相同性，一般而言為 80% 以上之相同性，較佳為 90% 以上之相同性，更佳為 95% 以上之相同性，最佳為 99% 以上之相同性。又，藉由組合於重鏈或輕鏈之胺基酸序列之 1 至數個胺基酸殘基被取代、刪除或添加的胺基酸序列，亦可能選擇具有與上述各抗體相同等細胞傷害性活性的

抗體。

【0078】二種類之胺基酸序列間之相同性可藉由使用 Blast 演算版本 2.2.2(Altschul, Stephen F., Thomas L.Madden, Alejandro A.Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J.Lipman(1997), 「Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs」, Nucleic Acids Res.25: 3389-3402)之默認參數(default parameter)來決定。Blast 演算亦可藉由利用網際網路 www.ncbi.nlm.nih.gov/blast 來使用。

【0079】又，序列表之序列識別號 9、10、11 或 12 所示的重鏈胺基酸序列中，第 1 至 19 號之胺基酸殘基而成的胺基酸序列係訊號序列，第 20 至 141 號之胺基酸殘基而成的胺基酸序列係可變區，第 142 至 471 號之胺基酸殘基而成的胺基酸序列係恆定區域。各自將序列識別號 9 之序列記載於第 3 圖、序列識別號 10 之序列記載於第 4 圖、序列識別號 11 之序列記載於第 5 圖、序列識別號 12 之序列記載於第 6 圖。

又，序列表之序列識別號 13、14、15、16、17、18 或 19 所示的輕鏈胺基酸序列中，第 1 至 20 號之胺基酸殘基而成的胺基酸序列係訊號序列，第 21 至 128 號之胺基酸殘基而成的胺基酸序列係可變區，第 129 至 233 號之胺基酸殘基而成的胺基酸序列係恆定區域。各自將序列識別號 13 之序列記載於第 7 圖、序列識別號 14 之序列記載於第 8 圖、序列識別號 15 之序列記載於第 9 圖、序列識別號 16 之序列記載於第 10 圖、序列識別號 17 之序列記載於第 11 圖、序列識別號 18 之序列記載於第 12

圖、序列識別號 19 之序列記載於第 13 圖。

【0080】就本發明之抗體而言，又可舉例與 M30 抗體相同抗原決定位結合的人類抗體。抗 B7-H3 人類抗體係意指僅具有來自人類染色體之抗體之基因序列的人類抗體。抗 B7-H3 人類抗體係可藉由使用具有含人類抗體之重鏈與輕鏈之基因的人類染色體斷片的人類抗體產生小鼠的方法(參照 Tomizuka,K.et al., Nature Genetics (1997) 16, p.133-143,; Kuroiwa, Y.et.al., Nucl.Acids Res. (1998)26, p.3447-3448; Yoshida, H.et.al., Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects vol.10,p.69-73 (Kitagawa,Y., Matsuda,T.and Iijima,S.eds.), Kluwer Academic Publishers, 1999.; Tomizuka, K.et.al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA (2000)97,p.722-727 等)而取得。

【0081】如此人類抗體產生小鼠，具體而言，藉由內在性免疫球蛋白重鏈及輕鏈之基因座被破壞，將用以替代之藉由酵母人工染色體(Yeast artificial chromosome, YAC)載體等導入人類免疫球蛋白重鏈及輕鏈之基因座的基因重組動物，藉由基因剔除動物及轉基因動物之製作、及藉由將此等動物彼此雜交而可作出。

又，藉由基因重組技術，藉由各別編碼如此人類抗體之重鏈及輕鏈的 cDNA，較佳為含該 cDNA 的載體，將真核細胞轉形，藉由培養產生基因重組人類單株抗體的轉形細胞，亦可由培養上清液中獲得此抗體。

其中，作為宿主可使用例如真核細胞，較佳為 CHO 細胞、淋巴球或骨髓瘤等之哺乳動物細胞。

【0082】又，亦已知取得來自由人類抗體庫選出的噬菌體展

示群的人類抗體的方法(參照 Wormstone, I.M.et. al, Investigative Ophthalmology & Visual Science.(2002) 43(7),p.2301-2308;Carmen,S.et.al.,Briefings in Functional Genomics and Proteomics(2002), 1(2), p.189-203; Siriwardena,D.et.al., Ophthalmology(2002)109(3), p.427-431 等)。

例如，人類抗體之可變區可使用一條鍵抗體(scFv)於噬菌體表面表現，選擇與抗原結合的噬菌體的噬菌體展示群法(Nature Biotechnology(2005),23,(9),p.1105- 1116)。

與抗原結合下，藉由解析選擇的噬菌體之基因，可決定編碼與抗原結合的人類抗體之可變區的 DNA 序列。

若清楚結合抗原的 scFv 之 DNA 序列，可藉由製作具有該序列的表現載體，導入適當宿主而使表現，取得人類抗體(WO92/01047、WO92/20791、WO93/06213、WO93/11236、WO93/19172、WO95/01438、WO95/15388、Annu.Rev.Immunol (1994)12，p.433-455、Nature Biotechnology (2005) 23(9)，p.1105-1116)。

新製作的人類抗體若結合 M30 抗體之結合的部分胜肽或部分立體構造，可判定該人類抗體結合與 M30 抗體相同之抗原決定位。又，藉由確認相對於 M30 抗體之對 B7-H3 的結合，該人類抗體為競合(即，該人類抗體會妨礙 M30 抗體與 B7-H3 之結合)，即使未確定具體的抗原決定位之序列或構造，亦可判定該人類抗體結合與 M30 抗體相同之抗原決定位。確認抗原決定位為相同的情形，強烈期待該人類抗體具有與 M30 抗體同等之細

胞傷害活性。

藉由以上方法獲得地嵌合抗體、人類化抗體、或人類抗體，藉由周知方法等評價對抗原的結合性，可選拔適合的抗體。

【0083】就比較抗體性質之際之另一指標的一例而言，可舉例抗體之安定性。差示掃描量熱法(DSC)係可飛快又正確測量成為蛋白之相對的構造安定性佳的指標的熱變性中點(T_m)的裝置。使用 DSC 來測定 T_m 值，藉由比較其值，可比較熱安定性的差異。已知抗體之保存安定性與抗體之熱安定性有某程度相關(Lori Burton, et.al., *Pharmaceutical Development and Technology*(2007)12, p.265-273)，以熱安定性作為指標，可選拔適合的抗體。作為用以選擇抗體的其他指標，可舉例適切的宿主細胞中的產量高、及水溶液中之凝集性低者。例如因不限於產量最高的抗體顯示最高熱安定性，基於以上所述指標而綜合地判斷，有必要選擇最適合對人類投與的抗體。

【0084】本發明之抗體亦包含抗體之修飾體。該修飾體係指對本發明之抗體施予化學的或生物學的修飾者。化學的修飾體包含對胺基酸骨架的化學部分的結合、N-鍵結或 O-鍵結碳水化合物鍵的化學修飾體等。生物學的修飾體包含轉譯後修飾(例如，對 N-鍵結或 O-鍵結之糖鍵加成、N 末端或 C 末端之加工、脫醯胺化、天冬胺酸之異性化、甲硫胺酸之氧化)，使用原核生物宿主細胞而使表現而於 N 末端加成甲硫胺酸殘基等。又，為了使本發明之抗體或抗原之檢出或單離成為可能，經標識者，例如，酵素標識體、螢光標識體、親和性標識體亦包含於該修飾體的意義。如此本發明之抗體之修飾體有用於原本之本發明之抗體的安定性及血中滯留性的改善、抗原性的減少、該抗體或

抗原之檢出或單離等。

【0085】又，藉由調節與本發明之抗體鍵結的糖鍵修飾(糖基化、脫岩藻醣化等)，增強抗體依存性細胞傷害活性係可能的。就抗體之糖鍵修飾之調節技術而言，已知 WO99/54342、WO00/61739、WO02/31140 等，但未限定於此等。本發明之抗體亦包含被調節該糖鍵修飾的抗體。

一旦單離抗體基因後，導入適當宿主而製作抗體的情形，可使用適當宿主與表現載體之組合。就抗體基因之具體例而言，可舉例組合編碼本說明書記載的抗體重鏈序列的基因、及編碼輕鏈序列的基因者。轉形宿主細胞之際，重鏈序列基因與輕鏈序列基因被插入相同表現載體中為可能的，又亦可被插入各別的表現載體中。

將真核細胞作為宿主使用的情形，可使用動物細胞、植物細胞、真核微生物。尤其是作為動物細胞，可舉例哺乳類細胞、例如，猴細胞的 COS 細胞(Gluzman, Y.Cell(1981)23, p.175-182、ATCC CRL-1650)、小鼠纖維母細胞 NIH3T3(ATCC No.CRL-1658)或中國倉鼠卵巢細胞(CHO 細胞、ATCC CCL-61)之二氫葉酸還原酵素缺損株(Urlaub, G.and Chasin, L.A.Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. (1980)77,p.4126-4220)。

使用原核細胞的情形，例如，可舉例大腸菌、枯草菌。

藉由轉形於此等細胞中導入目的之抗體基因，藉由於活體外培養經轉形的細胞而獲得抗體。於該培養，有因抗體之序列而產量為不同的情形，由具有同等結合活性的抗體中以產量作為指標來選擇作為醫藥之生產為容易者係可能的。據此，本發明

之抗體亦包含藉由特徵為包含培養上述轉形的宿主細胞的步驟、及自以該步驟獲得的培養物採取目的抗體或該抗體之機能性斷片的步驟之該抗體之製造方法而獲得的抗體。

【0086】又，哺乳類培養細胞所生產的抗體之重鏈之羧基末端的離胺酸殘基缺失為已知(*Journal of Chromatography A*, 705:129-134(1995))，又，相同重鏈羧基末端之甘胺酸、離胺酸之2胺基酸殘基缺失、位於新的羧基末端的脯胺酸殘基經醯胺化為已知(*Analytical Biochemistry*, 360:75-83(2007))。然而，此等之重鏈序列的缺失及修飾，並未影響抗體之抗原結合能及效應子機能(補體的活性化或抗體依存性細胞障害作用等)。因而，本發明可舉例受該修飾的抗體及該抗體之機能性斷片亦包含之重鏈羧基末端的1或2個胺基酸被刪除的刪除體、及經醯胺化的該刪除體(例如，羧基末端部位之脯胺酸殘基經醯胺化的重鏈)等。惟，只要保持抗原結合能及效應子機能，本發明之抗體之重鏈羧基末端的刪除體並不限於上述種類。構成本發明之抗體的2條重鏈可為完全長度及選自上述刪除體組成之群組的重鏈之任一種，亦可為組合任二種者。各刪除體之量比可受到產生本發明之抗體的哺乳類培養細胞之種類及培養條件的影響，作為本發明之抗體之主成分，可舉例2條重鏈雙方於羧基末端之1個胺基酸殘基刪除的情形。

【0087】就本發明之抗體之異型而言，例如可舉例 IgG (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)等，較佳可舉例 IgG1 或 IgG2。

【0088】就抗體之機能而言，一般而言，可舉例抗原結合活性、中和抗原活性的活性、增強抗原活性的活性、抗體依存性細胞傷害(ADCC)活性及補體依存性細胞傷害(CDC)活性，本

發明之抗體具有的機能係對 B7-H3 的結合活性，較佳為抗體依存性細胞吞噬作用(ADCP)活性，更佳為藉由抗腫瘤細胞的 ADCP 活性的細胞傷害活性(抗腫瘤活性)。再者，本發明之抗體除了 ADCP 活性外，可一併具有 ADCC 活性及/或 CDC 活性。

【0089】獲得的抗體可純化至均一。抗體之分離、純化可使用通常蛋白質所使用的分離、純化方法。例如若適宜選擇、組管柱層析、過濾器過濾、超過濾、鹽析、透析、調製用聚丙烯醯胺電泳、等電點電泳等，可將抗體分離、純化(Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshak et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press(1996); Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory(1988))，但未限定於此等。

就層析而言，可舉例親和性層析、離子交換層析、疏水性層析、凝膠過濾層析、逆相層析、吸附層析等。

此等層析可使用 HPLC 或 FPLC 等之液體層析來進行。

就親和性層析所使用的管柱而言，可舉例蛋白質 A 管柱、蛋白質 G 管柱。例如就使用的蛋白質 A 管柱而言，可舉例 Hyper D，POROS，Sepharose F.F.(Pharmacia)等。

又使用將抗原固定化的載體，利用對抗原的結合性亦可純化抗體。

【0090】

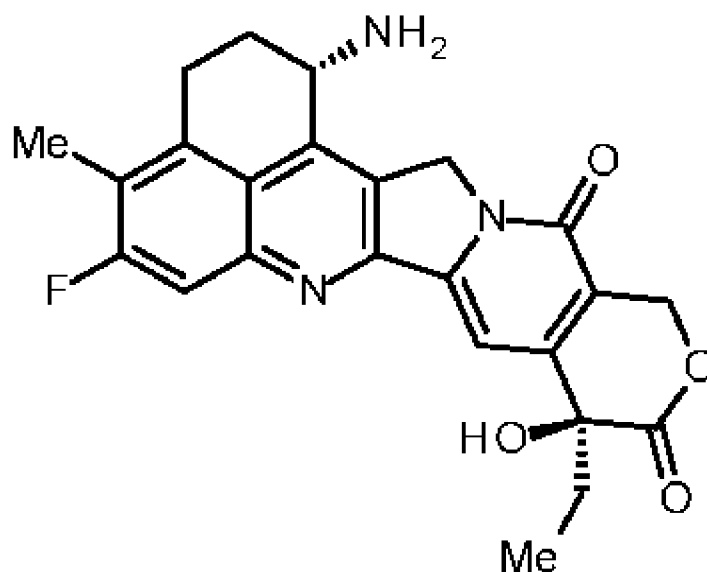
[抗腫瘤性化合物]

陳述關於結合本發明之抗體-藥物複合體的抗腫瘤性化合

物。就抗腫瘤性化合物而言，只要為具有抗腫瘤效果的化合物，具有可與連結物構造結合的取代基、部分構造者即可，並未特別限制。抗腫瘤性化合物於腫瘤細胞內中連結物之一部或全部被切斷而抗腫瘤性化合物部分游離而表現抗腫瘤效果。連結物與藥物之結合部分若被切斷，抗腫瘤性化合物於原本構造下被游離，而發揮其原本之抗腫瘤效果。

就抗腫瘤性化合物而言，例如，阿黴素(doxorubicin)、柔紅黴素(daunorubicin)、絲裂黴素C、博來黴素(bleomycin)、環胞苷(cyclocytidine)、長春新鹼(vincristine)、長春鹼(vinblastine)、甲氨蝶呤(methotrexate)、白金系抗腫瘤劑(順鉑(cisplatin)或其衍生物)、塔克素(Taxol)或其衍生物、喜樹鹼或其衍生物(日本特開平 6-87746 號公報記載的抗腫瘤劑)等。關於本發明之抗體-藥物複合體，可較佳使用喜樹鹼衍生物的依喜替康((1S,9S)-1-胺基-9-乙基-5-氟-2,3-二氫-9-羥基-4-甲基-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-10,13(9H,15H)-二酮；下列式：)

【0091】



【0092】此依喜替康雖具有優異的抗腫瘤活性，但尚未作為抗腫瘤藥被販售。相同化合物可以周知方法容易地取得，較佳可使用第1位之胺基作為對連結物構造的結合部位。又，依喜替康亦有與連結物之一部結合的狀態下於腫瘤細胞內游離的情形，即使為此態樣的狀態，亦為優異的抗腫瘤效果被發揮的優異化合物。

於抗體-藥物複合體，藥物對抗體1分子之結合數，為影響其有效性、安全性的重要因子。抗體-藥物複合體之製造係以藥物之結合數成為一定數的方式，規定反應的原料・試藥之使用量等之反應條件而實施，但與低分子化合物之化學反應不同，獲得呈相異數目的藥物結合的混合物係通常的。對抗體1分子之藥物之結合數係平均值，即，被特定、記載為平均藥物結合數。原則上本發明只要未指明，除去於具相異的藥物結合數的抗體-藥物複合體混合物中所含的具特定藥物結合數的抗體-藥物複合體的情形，藥物之結合數意指平均值。依喜替康對抗體分子之結合數係可控制的，就每1個抗體之藥物平均結合數而言，可結

合 1 至 10 個左右的依喜替康，較佳為 2 至 8 個，更佳為 3 至 8 個。又，只要為本項技術領域中具通常知識者即可由本案之實施例記載，設計使與抗體結合的必要數目的藥物的反應，可取得控制依喜替康之結合數的抗體。

依喜替康因具有喜樹鹼構造的緣故，於酸性水性媒體中(例如 pH3 左右)，平衡會偏向內脂環形成的構造(閉環體)，另一方面，於鹼性水性媒體中(例如 pH10 左右)，平衡會偏向內脂環為開環的構造(開環體)係已知的。導入對應如此閉環構造及開環構造的依喜替康殘基的藥物複合體亦被期待有同等之抗腫瘤效果，任一者皆包含於本發明之範圍係不言而喻的。

【0093】

[連結物構造]

說明於本發明之抗體-藥物複合體中抗體結合抗腫瘤性藥物的連結物構造。該連結物係具有下列式之構造：



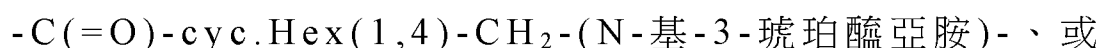
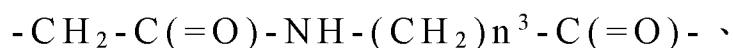
抗體於 L^1 末端結合、為 L^2 結合的反對側之末端，抗腫瘤性藥物結合於 L^c 之末端、為於 L^b 結合的反對側之末端結合。

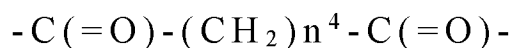
n^1 表示 0 至 6 之整數，但較佳為 1 至 5 之整數，更佳為 1 至 3。

【0094】

1. L^1

L^1 係

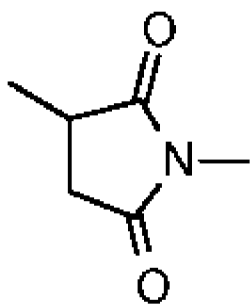




之各構造所示構造之連結物。其中， n^2 為 2 至 8 之整數， n^3 表示 1 至 8 之整數， n^4 表示 1 至 8 之整數。

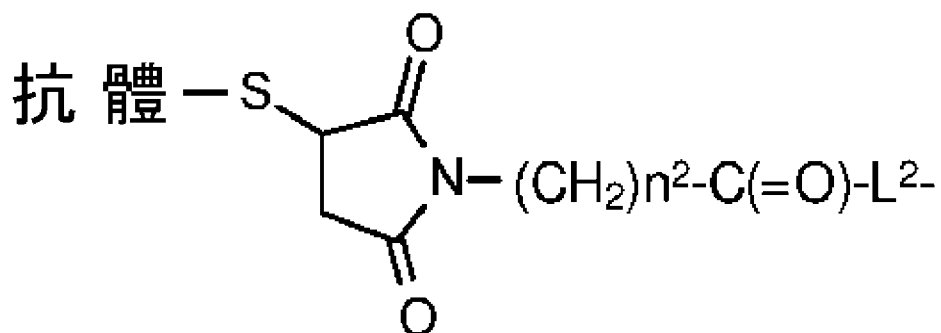
【0095】連結物 L^1 中之 $-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-(CH_2)n^2-C(=O)-$ 所示構造之連結物，『 $-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-$ 』係具有下列式所示的構造

【0096】



【0097】此部分構造中的第 3 位為對抗體的結合部位。再者，此第 3 位與抗體之結合係以形成硫醚而結合為特徵。另一方面，此構造部分之第 1 位之氮原子係與此構造所含的連結物內存在的亞甲基之碳原子結合。即， $-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-(CH_2)n^2-C(=O)-L^2-$ 係下列式所示構造(其中，「抗體-S-」係來自抗體)。

【0098】



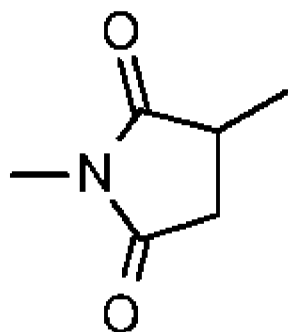
【0099】式中， n^2 係 2 至 8 之整數，但較佳為 2 至 5。

【0100】於 L^1 中之 $-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_n^3-\text{C}(=\text{O})-$ 所示的構造之連結物， n^3 係 1 至 8 之整數，較佳為 2 至 6。此連結物係與抗體於末端之亞甲基之碳原子上結合，和前面相同地形成硫醚而結合之具有下列構造(其中，「抗體-S-」係來自抗體)：

抗體-S- $\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_n^3-\text{C}(=\text{O})-L^2$ 。

【0101】 L^1 中之 $-\text{C}(=\text{O})-\text{cyc.Hex}(1,4)-\text{CH}_2-(\text{N-基-3-琥珀醯亞胺})-$ 所示構造之連結物，其中『-(N-基-3-琥珀醯亞胺)-』具有下列式所示構造：

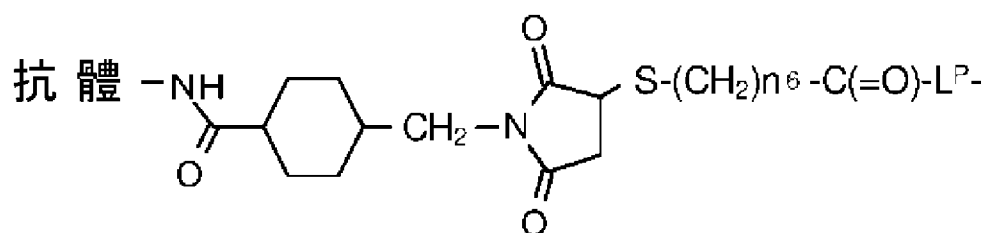
【0102】



。

【0103】於此構造部分，第 1 位之氮原子係與包含同構造的連結物內存在的亞甲基碳原子結合。第 3 位之碳原子係與連結物 L^2 中之 $-\text{S}-(\text{CH}_2)_n^6-\text{C}(=\text{O})-$ ，於其末端之硫結合。又，此 L^2 之連結物的 $-\text{S}-(\text{CH}_2)_n^6-\text{C}(=\text{O})-$ 係形成與 L^1 連結物中之 $-\text{C}(=\text{O})-\text{cyc.Hex}(1,4)-\text{CH}_2-(\text{N-基-3-琥珀醯亞胺})-$ 組合的連結物構造。其中，連結物所含的『-cyc.Hex(1,4)-』表示 1,4-伸環己基。連結物 $-\text{C}(=\text{O})-\text{cyc.Hex}(1,4)-\text{CH}_2-(\text{N-基-3-琥珀醯亞胺})-$ 係與抗體以末端之羰基碳形成醯胺鍵而結合(下列式；其中，「抗體-NH-」係來自抗體)。

【0104】



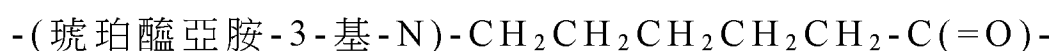
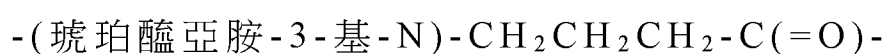
【0105】就形成此醯胺鍵的抗體之胺基而言，可為抗體之離胺酸殘基之側鏈的末端胺基、或者為抗體 N 末端之胺基。又，該構造之連結物係醯胺鍵，亦可與抗體之胺基酸之羥基形成酯鍵來結合。

又，該連結物所含的『-cyc.Hex(1,4)-』構造部分係 1,4-伸環己基之外，可為除此之外的 2 價飽和環狀伸烷基之伸環丁基、伸環戊基、伸環庚基、伸環辛基等之 2 價環狀飽和烴基，亦可為伸苯基、伸萘基等之 2 價芳香族烴基，又，可為 5 員環、6 員環之飽和、部分飽和、或芳香族之含 1 或 2 個雜原子的 2 價雜環基。再者，可為碳數 1 至 4 之 2 價伸烷基。又，對 2 價基之結合可為鄰接位置，亦可為分離的位置。

【0106】於連結物 L^1 中之 $-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_{n^4}-\text{C}(=\text{O})-$ 所示的構造之連結物， n^4 為 1 至 8 之整數，但較佳為 2 至 6。此連結物亦與上述連結物同樣地，於末端之羰基與抗體之胺基形成醯胺鍵而結合(下列式；於該構造，「抗體-NH-」係來自抗體)。



【0107】就連結物 L^1 之具體例而言，可舉例



- CH₂C(=O)NH-CH₂-C(=O)-、
- CH₂C(=O)NH-CH₂CH₂-C(=O)-
- CH₂C(=O)NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
- CH₂C(=O)NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
- CH₂C(=O)NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
- C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH₂-(N-基-3-琥珀醯亞胺)-
- C(=O)-芳基-CH₂-(N-基-3-琥珀醯亞胺)-
- C(=O)-cyc.Het-CH₂-(N-基-3-琥珀醯亞胺)-
- C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-
- C(=O)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
- C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
- C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
- C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-等

(芳基表示 2 價之芳香族烴基，cyc.Het 表示 2 價之環狀雜環基)。

【0108】

2.L²

連結物 L² 係

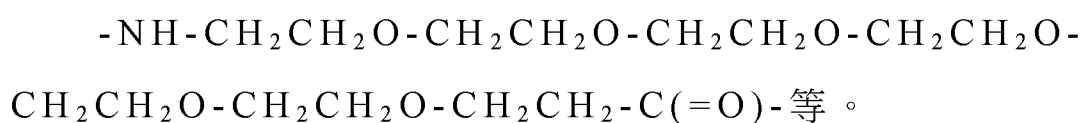
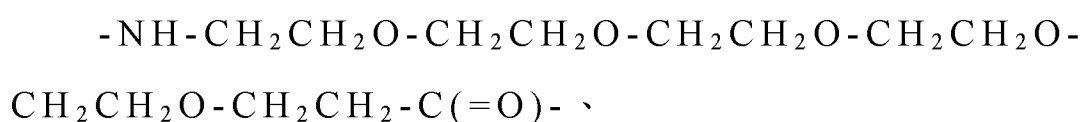
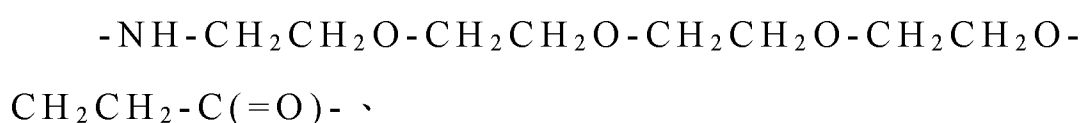
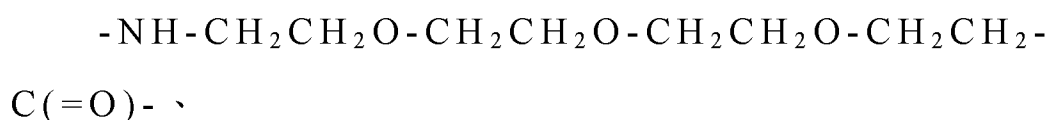
- NH-(CH₂CH₂O)^{n⁵}-CH₂-CH₂-C(=O)-、或
- S-(CH₂)^{n⁶}-C(=O)-、

所示構造之連結物，但連結物 L² 可不存在，此情形 L² 成為單鍵。又，n⁵ 係 1 至 6 之整數，n⁶ 係 1 至 6 之整數。

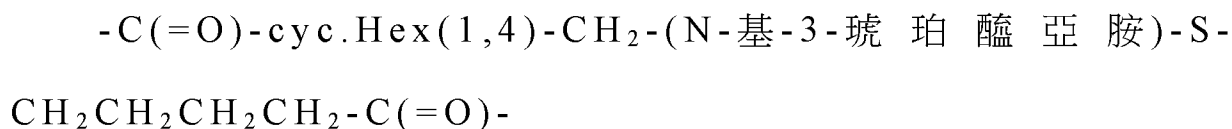
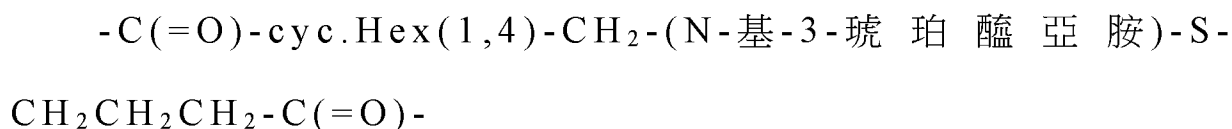
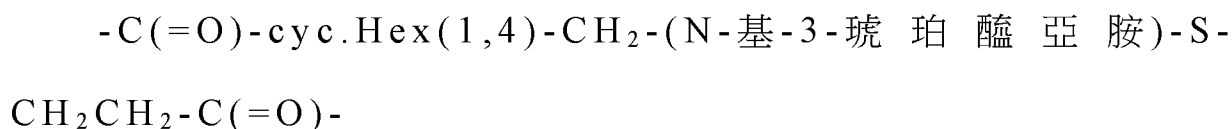
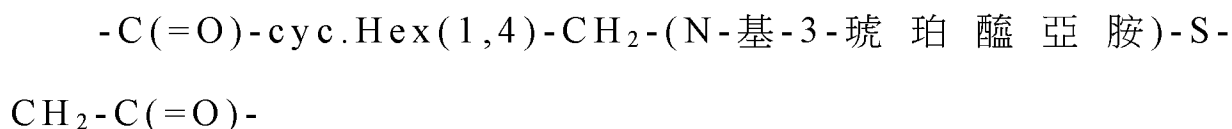
【0109】於連結物 L² 中之-NH-(CH₂CH₂O)^{n⁵}-CH₂-CH₂-C(=O)-所示構造之連結物，n⁵ 係 1 至 6 之整數，較佳為 2 至 4。該連結物係以末端胺基與連結物 L¹ 結合，以相對之末端的羰基與連結物 L^P 結合。

【0110】於連結物 L^2 中之 $-S-(CH_2)n^6-C(=O)-$ ， n^6 係 1 至 6 之整數，但較佳為 2 至 4。

【0111】就連結物 L^2 之具體例而言，可舉例



【0112】再者，連結物 L^2 為 $-S-(CH_2)n^6-C(=O)-$ 之情形，組合的連結物 L^1 係 $-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-基-3-琥珀醯亞胺)-$ ，就 $-L^1-L^2$ -連結物之具體例而言，可舉例



-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH₂-(N-基-3-琥 珀 醯 亞 胺)-S-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH₂-(N-基-3-琥 珀 醯 亞 胺)-S-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-等。

【0113】

3.L^P

連結物 L^P 係 2 至 7 個胺基酸所構成的胜肽殘基。即，2 至 6 個胺基酸藉由胜肽結合的寡胜肽之殘基而構成。連結物 L^P 係於 N 末端結合連結物 L²，於 C 末端與連結物之-NH-(CH₂)_n¹-L^a-L^b-L^c-部分的胺基結合。構成連結物 L^P 的胺基酸並未特別限定，例如，L-或 D-胺基酸，較佳為 L-胺基酸。又，α-胺基酸之外，可為 β-丙胺酸、ε-胺基己酸、γ-胺基丁酸等之構造的胺基酸，又可例如為 N-甲基化的胺基酸等之非天然型之胺基酸。

【0114】連結物 L^P 之胺基酸序列並未特別限定，就構成的胺基酸而言，可舉例苯丙胺酸(Phe；F)、酪胺酸(Tyr；Y)、白胺酸(Leu；L)，甘胺酸(Gly；G)、丙胺酸(Ala；A)、纈胺酸(Val；V)、離胺酸(Lys；K)、瓜胺酸(Cit)、絲胺酸(Ser；S)、麩胺酸(Glu；E)、天冬胺酸(Asp；D)等。此等中較佳可舉例苯丙胺酸、甘胺酸、纈胺酸、離胺酸、瓜胺酸、絲胺酸、麩胺酸、天冬胺酸。依胺基酸之種類，可控制藥物游離的樣式。胺基酸之數目可為 2 至 7 個。

【0115】就連結物 L^P 之具體例而言，可舉例

-GGF-

-DGGF-

-(D-)D-GGF-

-E G G F -
 -G G F G -
 -S G G F -
 -K G G F -
 -D G G F G -
 -G G F G G -
 -D D G G F G -
 -K D G G F G -
 -G G F G G G F -

[上述之『(D-)D』意指 D-天冬胺酸]。就本發明抗體-藥物複合體之特佳連結物 L^P 而言，可舉例-G G F G -。

【0116】連結物之-NH-(CH₂) n^1 -所示構造部分， n^1 係 0 至 6 之整數，但較佳為 1 至 5 之整數，更佳為 1 至 3。此部分之胺基部分與連結物 L^P 之 C 末端結合。

【0117】

4. L^a

連結物之 L^a 係-C(=O)-NH-、-NR¹-(CH₂) n^7 -、-O-之各構造的任一者，或單鍵， n^7 係 1 至 6 之整數，R¹ 係氫原子、碳數 1 至 6 之烷基、-(CH₂) n^8 -COOH、或-(CH₂) n^9 -OH， n^8 係整數 1 至 4， n^9 係 1 至 6 之整數。

連結物之 L^a 中之醯胺構造-C(=O)-NH-係氮原子側與 L^b 結合。連結物之 L^a 中之-NR¹-(CH₂) n^7 -的構造部分， n^7 係 1 至 6 之整數，較佳為 1 至 3。該部分係亞甲基側結合 L^b 。R¹ 係氫原子或碳數 1 至 6 之烷基，但碳數 1 至 6 之烷基的情形，可為直鍵狀亦可為分枝鍵狀。例如，可舉例甲基、乙基、丙基、異丙

基、丁基、異丁基、*sec*-丁基、*tert*-丁基、戊基、異戊基、2-甲基丁基、新戊基、1-乙基丙基、己基、異己基、4-甲基戊基、3-甲基戊基、2-甲基戊基、1-甲基戊基、3,3-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、1,1-二甲基丁基、1,2-二甲基丁基、1,3-二甲基丁基、2,3-二甲基丁基及 2-乙基丁基等。此等中較佳為甲基或乙基。 R^1 係 $-(CH_2)n^8-COOH$ 所示構造時， n^8 為整數 1 至 4，較佳為 1 或 2。 R^1 為 $-(CH_2)n^9-OH$ 所示構造時， n^9 係 1 至 6 之整數，但較佳為 1 或 2。就 R^1 而言，氫原子、甲基、乙基、 $-CH_2COOH$ 、 $-CH_2CH_2-COOH$ 、或 $-CH_2CH_2-OH$ 為較佳，更佳為氫原子、甲基、 $-CH_2COOH$ 。更佳為氫原子。又，連結物之 L^a 部分可為 $-O-$ 、或單鍵。

【0118】

5. L^b

連結物之 L^b 係 $-CR^2(-R^3)-$ 、 $-O-$ 、 $-NR^4-$ 之各構造任一者，或為單鍵， R^2 及 R^3 各自獨立表示氫原子、碳數 1 至 6 之烷基、 $-(CH_2)n^a-NH_2$ 、 $-(CH_2)n^b-COOH$ 、或 $-(CH_2)n^c-OH$ ， R^4 係氫原子或碳數 1 至 6 之烷基， n^a 係 0 至 6 之整數， n^b 係整數 1 至 4， n^c 係整數 0 至 4，但 n^a 或 n^c 為 0 時， R^2 及 R^3 不成為相同。

R^2 及 R^3 為烷基時，此烷基係與 R^1 中的烷基同樣地被解釋的烷基。 R^2 及 R^3 為 $-(CH_2)n^a-NH_2$ 之構造時， n^a 係 0 至 6 之整數，但較佳為 0，或者為 3 至 5。又， n^a 為 0 時， R^2 及 R^3 不成為相同。 R^2 及 R^3 為 $-(CH_2)n^b-COOH$ 之構造時， n^b 係整數 1 至 4，但較佳為 1 或 2。 R^2 及 R^3 為 $-(CH_2)n^c-OH$ 之構造時， n^c 係整數 0 至 4，但較佳為 1 或 2。

就 R^2 及 R^3 而言，較佳為氫原子、甲基、乙基、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{COOH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-COOH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 、或 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-OH}$ 為較佳，更佳為氫原子、甲基、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{COOH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-COOH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 、或 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-OH}$ 。更佳為氫原子。

R^4 為碳數 1 至 6 之烷基，此烷基係與 R^1 中的烷基被同樣地解釋的烷基。就 R^4 而言，氫原子或甲基為較佳，更佳為氫原子。

【0119】就連結物之 $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_n^1\text{-L}^a\text{-L}^b\text{-}$ 所示的構造之具體例而言，可舉例

- $-\text{NH-CH}_2\text{-}$
- $-\text{NH-CH}(\text{-Me})\text{-}$
- $-\text{NH-C}(\text{-Me})_2\text{-}$
- $-\text{NH-CH}_2\text{-CHMe-}$
- $-\text{NH-CH}(\text{-CH}_2\text{OH})\text{-}$
- $-\text{NH-CH}(\text{-CH}_2\text{COOH})\text{-}$
- $-\text{NH-CH}(\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{-}$
- $-\text{NH-CH}(\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)\text{-}$
- $-\text{NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-}$
- $-\text{NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-}$
- $-\text{NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-}$
- $-\text{NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-}$
- $-\text{NH-CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{-Me})_2\text{-}$
- $-\text{NH-CH}_2\text{CH}_2\text{NH-}$

-NH-CH₂CH₂NH-CH₂-
 -NH-CH₂CH₂NMe-CH₂-
 -NH-CH₂CH₂NH-CH₂CH₂-
 -NH-CH₂CH₂NMe-CH₂CH₂-
 -NH-CH₂CH₂N(-CH₂COOH)-CH₂-
 -NH-CH₂CH₂N(-CH₂CH₂OH)-CH₂-
 -NH-CH₂CH₂N(-CH₂CH₂OH)-CH₂CH₂-
 -NH-CH₂CH₂CH₂C(=O)-NHCH(-CH₂OH)-
 -NH-CH₂CH₂CH₂C(=O)-NHCH(-CH₂COOH)-
 -NH-CH₂CH₂CH₂C(=O)-NHCH(-
 CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂)-
 -NH-CH₂CH₂CH₂-
 -NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-
 -NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-
 -NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH(NH₂)-等。

【0120】此等中較佳可舉例

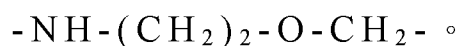
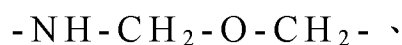
-NH-CH₂-
 -NH-CH₂-CH(Me)-
 -NH-CH(-CH₂OH)-
 -NH-CH(-CH₂CH₂COOH)-
 -NH-CH₂CH₂-
 -NH-CH₂-O-CH₂-
 -NH-CH₂CH₂-O-
 -NH-CH₂CH₂-O-CH₂-
 -NH-CH₂CH₂C(-Me)₂-

-NH-CH₂CH₂NH-
 -NH-CH₂CH₂NH-CH₂-
 -NH-CH₂CH₂NMe-CH₂-
 -NH-CH₂CH₂NMe-CH₂CH₂-
 -NH-CH₂CH₂N(-CH₂COOH)-CH₂-
 -NH-CH₂CH₂N(-CH₂CH₂OH)-CH₂-
 -NH-CH₂CH₂N(-CH₂CH₂OH)-CH₂CH₂-
 -NH-CH₂CH₂CH₂C(=O)-NHCH(-CH₂OH)-
 -NH-CH₂CH₂CH₂C(=O)-NHCH(-CH₂COOH)-
 -NH-CH₂CH₂CH₂-
 -NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-
 -NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-等。

【0121】更佳可舉例

-NH-CH₂-
 -NH-CH₂CH₂-
 -NH-CH₂-O-CH₂-
 -NH-CH₂CH₂-O-
 -NH-CH₂CH₂-O-CH₂-
 -NH-CH₂CH₂NH-
 -NH-CH₂CH₂NH-CH₂-
 -NH-CH₂CH₂N(-CH₂COOH)-CH₂-
 -NH-CH₂CH₂N(-CH₂CH₂OH)-CH₂CH₂-
 -NH-CH₂CH₂CH₂C(=O)-NHCH(-CH₂COOH)-
 -NH-CH₂CH₂CH₂-
 -NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-
 -NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-。

【0122】更佳為



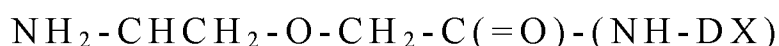
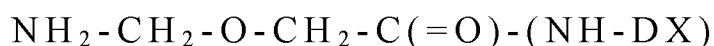
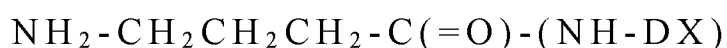
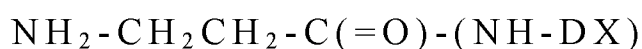
【0123】

6. L^c

連結物之 L^c 為 $-\text{CH}_2-$ 或 $-\text{C}(=\text{O})-$ 。於該連結物與抗腫瘤性化合物結合。就連結物之 L^c 而言， $-\text{C}(=\text{O})-$ 為更佳。

【0124】連結物之 $-\text{NH}-(\text{CH}_2)^{n^1}-\text{L}^a-\text{L}^b-\text{L}^c$ 係鍵長為 4 至 7 原子的鍵長為較佳，更佳為具有 5 或 6 個原子之鍵長。

【0125】本發明之抗體-藥物複合體係移動至腫瘤細胞內後連結物部分被切斷， $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)^{n^1}-\text{L}^a-\text{L}^b-\text{L}^c-$ (NH-DX) 所示的構造之藥物衍生物游離而表現抗腫瘤作用。就自本發明之抗體-藥物複合體游離的表現抗腫瘤效果的抗腫瘤性衍生物而言，可舉例先前例示的連結物之 $-\text{NH}-(\text{CH}_2)^{n^1}-\text{L}^a-\text{L}^b-$ 所示構造上與 L^c 結合，具有末端成為胺基的構造部分的抗腫瘤性衍生物，特佳者如下：



又， $\text{NH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ 之情形，因同分子內的胺縮醛(aminal)構造為不安定，進一步自己分解而有游離 $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ 係被確認。此等化合物可較佳使用作為本發明之抗體-藥物複合體之製造中間體。

【0126】於依喜替康作為藥物的本發明之抗體-藥物複合體，使下述構造之藥物-連結物構造部分 $[-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)_n^1-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)]$ 與抗體結合者為較佳。此等藥物-連結物構造部分係每 1 抗體的平均結合數，若使 1 至 10 個結合為宜，較佳為 2 至 8，更佳為 3 至 8。

$-(\text{琥珀醯亞胺-3-基-N})-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$-(\text{琥珀醯亞胺-3-基-N})-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$-(\text{琥珀醯亞胺-3-基-N})-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$-(\text{琥珀醯亞胺-3-基-N})-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$-(\text{琥珀醯亞胺-3-基-N})-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$-(\text{琥珀醯亞胺-3-基-N})-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$-(\text{琥珀醯亞胺-3-基-N})-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$-(\text{琥珀醯亞胺-3-基-N})-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$-(\text{琥珀醯亞胺-3-基-N})-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-
NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-
NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH₂-(N-基-3-琥珀醯亞胺)-S-
CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

此等中更佳如下。

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
(NH-DX)

$-(\text{琥珀醯亞胺-3-基-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$
 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-$
 $\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$
 $-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-$
 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$
 $-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-$
 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$
 $-\text{C}(=\text{O})-\text{cyc.Hex}(1,4)-\text{CH}_2-(\text{N-基-3-琥珀醯亞胺})-\text{S}-$
 $\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-}$
 $\text{DX})$ 。

又，較佳為如下者。

$-(\text{琥珀醯亞胺-3-基-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$
 $\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$
 $-(\text{琥珀醯亞胺-3-基-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$
 $\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$
 $-(\text{琥珀醯亞胺-3-基-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$
 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$
 (NH-DX) 。

【0127】於本案之抗體-藥物複合體，結合抗體與藥物之連結物構造，係結合於描述至此的連結物各部中所示的較佳構造下可構築較佳連結物。就如此連結物構造而言，可較佳使用以下構造者。又構造之左端為與抗體之結合部位，右端為與藥物之結合部位。

$-(\text{琥珀醯亞胺-3-基-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-$
 $\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$

-(琥 珀 醯 亞 胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-(琥 珀 醯 亞 胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-

-(琥 珀 醯 亞 胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-(琥 珀 醯 亞 胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-(琥 珀 醯 亞 胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-

-(琥 珀 醯 亞 胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-

-(琥 珀 醯 亞 胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-(琥 珀 醯 亞 胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-

-(琥 珀 醯 亞 胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-
NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-(琥 珀 醯 亞 胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-
NH-CH₂CH₂-C(=O)-

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH₂-(N-基-3-琥 珀 醯 亞 胺)-S-
CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

此等中更佳如下。

-(琥 珀 醯 亞 胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-(琥 珀 醯 亞 胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-(琥 珀 醯 亞 胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-

-(琥 珀 醯 亞 胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-

-(琥 珀 醯 亞 胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-(琥 珀 醯 亞 胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-
NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH₂-(N-基-3-琥 珀 醯 亞 胺)-S-
CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-。

又較佳可舉例以下各者。

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-

-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-
C(=O)-。

【0128】

[製造方法]

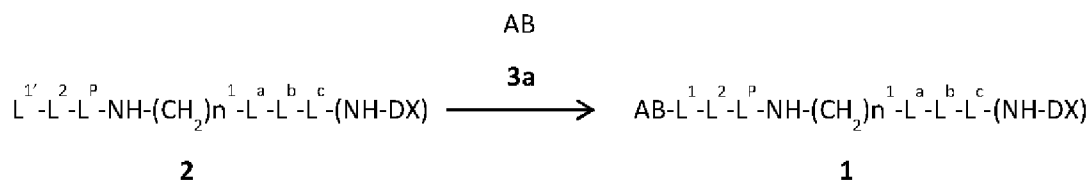
其次，說明本發明之抗體-藥物複合體或其製造中間體之代表性的製造方法。又，於以下，為了表示化合物，使用各反應式中所示的化合物的編號。即，稱為『式(1)之化合物』、『化合物(1)』等。又除此以外編號的化合物亦同樣地記載。

【0129】

1. 製造方法 1

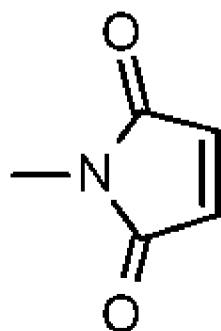
式(1)所示抗體-藥物複合體中，透過硫醚而抗體與連結物構造結合者係可藉由例如下述之方法來製造。

【0130】



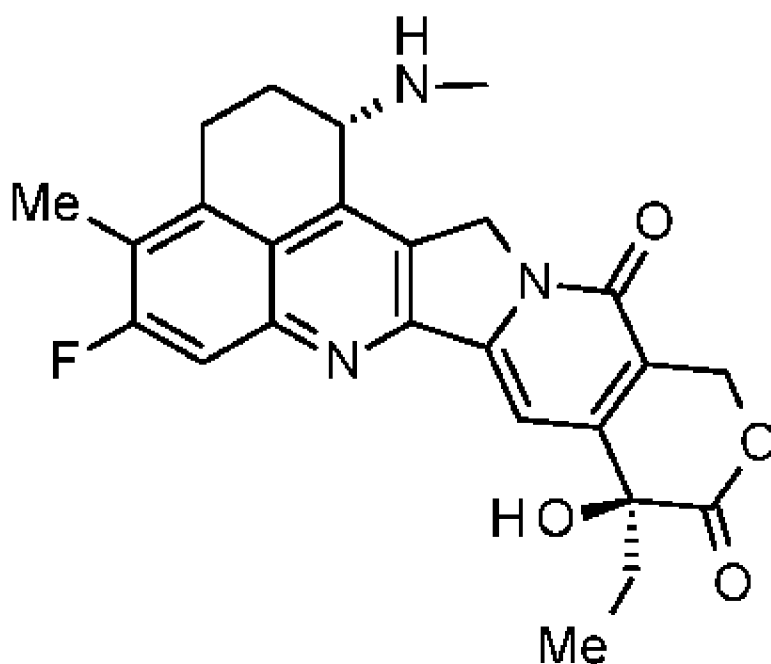
【0131】[式中，AB 表示具有氫硫基的抗體，L^{1'}係於 L¹ 所示連結物構造，表示連結物末端成為順丁烯二醯亞胺基(下列式)的構造

【0132】



【0133】(其中，氮原子為結合部位)、或末端成為鹵素的構造的連結物，但 L^1 中之-(琥珀醯亞胺-3-基-N)- $(CH_2)n^2$ -C(=O)-，-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-部分成為順丁烯二醯亞胺基的基，或 L^1 中的- $CH_2C(=O)NH-(CH_2)n^3$ -C(=O)-之末端的亞甲基經鹵素化而成為鹵乙醯胺之鹵素- $CH_2C(=O)NH-(CH_2)n^3$ -C(=O)-基。又，-(NH-DX)係下列式所示構造：

【0134】



【0135】依喜替康之第 1 位的胺基之氫原子 1 個被去除而生成的基。又，於上述之反應式，式(1)之化合物中，被記載由藥物至連結物末端的構造部分 1 個對 1 個抗體結合的構造，但此係

為了說明而方便的記載，實際上該構造部分對抗體分子大多為複數個結合的情形。此狀況於以下之製造方法之說明亦為同樣的]。

【0136】即，藉由使後述方法獲得的化合物(2)、與具有氫硫基的抗體(3a)反應，可製造抗體-藥物複合體(1)。

具有氫硫基的抗體(3a)可以本項技術領域中具通常知識者周知之方法獲得(Hermanson, G.T、Bioconjugate Techniques、pp.56-136、pp.456-493、Academic Press (1996))。例如，可舉例使 Traut's 試藥作用於抗體之胺基；N-琥珀醯亞胺基 S-乙醯基硫烷酸酯類作用於抗體之胺基後，使羥基胺作用；使 N-琥珀醯亞胺基 3-(吡啶基二硫)丙酸酯作用後，使還原劑作用；使二硫蘇糖醇、2-氫硫基乙醇、參(2-羧基乙基)膦鹽酸鹽(TCEP)等之還原劑與抗體作用而將抗體內鉸鏈部之雙硫鍵還原而使氫硫基生成等等之方法，但並不限於此等例。

具體而言，將作為還原劑之 TCEP，相對於抗體內鉸鏈部每一個二硫化物，使用 0.3 至 3 莫耳當量，於含螯合劑的緩衝液中，使與抗體反應，可獲得抗體內鉸鏈部雙硫鍵被部分或完全還原的抗體。就螯合劑而言，例如可舉例伸乙基二胺四乙酸(EDTA)或二伸乙基三胺 5 乙酸(DTPA)等。此等使用 1mM 至 20mM 之濃度為宜。就緩衝液而言，可使用磷酸鈉或硼酸鈉、乙酸鈉溶液等。於具體例，抗體於 4℃至 37℃使與 TCEP 反應 1 至 4 小時，可獲得具有部分或完全被還原的氫硫基的抗體(3a)。

又，其中藉由實施使氫硫基附加於藥物-連結物部分的反應，可藉由硫醚結合藥物-連結物部分。

其次，每 1 個具有氫硫基的抗體(3a)，使用 2 至 20 莫耳當量之化合物(2)，可製造每 1 個抗體結合 2 個至 8 個藥物的抗體-藥物複合體(1)。具體而言，含具有氫硫基的抗體(3a)的緩衝液中，添加使化合物(2)溶解的溶液而使反應為宜。其中，就緩衝液而言，使用乙酸鈉溶液、磷酸鈉或硼酸鈉、等為宜。反應時之 pH 為 5 至 9，更佳為 pH7 附近下反應為宜。就使化合物(2)溶解的溶媒而言，可使用二甲基亞砷(DMSO)、二甲基甲醯胺(DMF)、二甲基乙醯胺(DMA)、N-甲基-2-吡啶酮(NMP)等之有機溶媒。使溶解化合物(2)的有機溶媒溶液添加於含具氫硫基的抗體(3a)的緩衝液中 1 至 20%v/v 而使反應為宜。反應溫度係 0 至 37°C，更佳為 10 至 25°C，反應時間係 0.5 至 2 小時。反應係可將未反應之化合物(2)的反應性藉由含硫醇的試藥而使失活來結束。含硫醇的試藥例如，半胱胺酸或 N-乙醯基-L-半胱胺酸(NAC)。更具體而言，NAC，相對於使用的化合物(2)，添加 1 至 2 莫耳當量，於室溫經培育 10 至 30 分鐘而結束反應。

製造的抗體-藥物複合體(1)藉由以下共通操作進行濃縮、緩衝液交換、純化、抗體濃度及每一個抗體分子之藥物平均結合數的測定，可進行抗體-藥物複合體(1)的鑑定。

【0137】

共通操作 A：抗體或抗體-藥物複合體水溶液之濃縮

於 Amicon Ultra(50,000 MWCO，Millipore Corporation)之容器內置入抗體或抗體-藥物複合體溶液，使用離心機(Allegra X-15R，Beckman Coulter，Inc.)的離心操作(於

2000G 至 3800G 離心 5 至 20 分鐘)，濃縮抗體或抗體-藥物複合體溶液。

共通操作 B：抗體之濃度測定

使用 UV 測定器(Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific Inc.)，依據製造商規定的方法，進行抗體濃度的測定。此時，於各抗體使用相異的 280nm 吸光係數($1.3\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 至 $1.8\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$)。

共通操作 C-1：抗體之緩衝液交換

使用 Sephadex G-25 載體的 NAP-25 管柱(Cat.No.17-0852-02, GE Healthcare Japan Corporation)，依據製造商說明書之方法，以含氯化鈉(137mM)及伸乙基二胺四乙酸(EDTA, 5mM)的磷酸緩衝液(10mM, pH6.0)(本說明書中稱為 PBS6.0/EDTA)使其平衡化。於此 NAP-25 管柱每一根，負載抗體水溶液 2.5mL 後，以 PBS6.0/EDTA3.5mL 分取溶出的劃份(3.5mL)。此劃份依共通操作 A 加以濃縮，使用共通操作 B 進行抗體濃度的測定後，使用 PBS6.0/EDTA 而調整抗體濃度為 10mg/mL。

共通操作 C-2：抗體之緩衝液交換

使用 Sephadex G-25 載體的 NAP-25 管柱(Cat.No.17-0852-02, GE Healthcare Japan Corporation)，依據製造商規定之方法，以含氯化鈉(50mM)及 EDTA(2mM)的磷酸緩衝液(50mM, pH6.5)(本說明書中稱為 PBS6.5/EDTA)平衡化。於此 NAP-25 管柱每一根中，使負載抗體水溶液 2.5mL 後，以 PBS6.5/EDTA3.5mL 分取溶出的劃份(3.5mL)。此劃份藉由共通操作 A 濃縮，使用共通操作 B 來進行抗體濃度之測定後，使用 PBS6.5/EDTA 調整抗體濃度為 20mg/mL。

共通操作 D-1：抗體-藥物複合體之純化

以市售之磷酸緩衝液(PBS7.4，Cat.No.10010-023，Invitrogen)、含氯化鈉(137mM)的磷酸鈉緩衝液(10mM，pH6.0；本說明書中稱為 PBS6.0)或含山梨糖醇(5%)的乙酸緩衝液(10mM，pH5.5；本說明書中稱為 ABS)之任一緩衝液，使 NAP-25 管柱平衡化。於此 NAP-25 管柱中，使負載抗體-藥物複合體反應水溶液(約 1.5mL)，以製造商規定量的緩衝液溶出，而分取抗體劃份。使此分取劃份再次於負載緩衝液的 NAP-25 管柱中溶出的凝膠過濾純化操作共計重複 2 至 3 次，獲得去除未結合的藥物連結物或低分子化合物(參(2-羧基乙基)膦鹽酸鹽(TCEP)，N-乙醯基-L-半胱胺酸(NAC)，二甲基亞砷)的抗體-藥物複合體。

共通操作 E：抗體-藥物複合體中的抗體濃度及抗體每一分子之藥物平均結合數之測定

抗體-藥物複合體中的結合藥物濃度係測定抗體-藥物複合體水溶液之 280nm 及 370nm 二波長中的 UV 吸光度後進行下述之計算，可加以算出。

因某波長中的全吸光度係相等於系統內存在的全部吸收化學種的吸光度的和[吸光度的加成性]，於抗體與藥物的結合前後，暫定抗體及藥物之莫耳吸光係數未變化時，抗體-藥物複合體中的抗體濃度及藥物濃度係以下述關係式表示。

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

$$A_{370} = A_{D,370} + A_{A,370} = \epsilon_{D,370} C_D + \epsilon_{A,370} C_A \quad \text{式(2)}$$

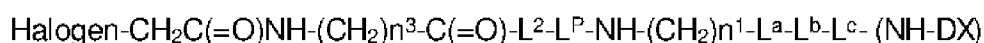
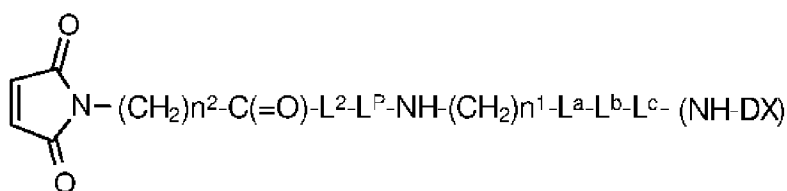
其中， A_{280} 表示 280nm 中的抗體-藥物複合體水溶液之吸光度， A_{370} 表示 370nm 中的抗體-藥物複合體水溶液之吸光

度， $A_{A,280}$ 表示 280nm 中的抗體之吸光度， $A_{A,370}$ 表示 370nm 中的抗體之吸光度， $A_{D,280}$ 表示 280nm 中的複合體前驅物之吸光度， $A_{D,370}$ 表示 370nm 中的複合體前驅物之吸光度， $\epsilon_{A,280}$ 表示 280nm 中的抗體之莫耳吸光係數， $\epsilon_{A,370}$ 表示 370nm 中的抗體之莫耳吸光係數， $\epsilon_{D,280}$ 表示 280nm 中的複合體前驅物之莫耳吸光係數， $\epsilon_{D,370}$ 表示 370nm 中的複合體前驅物之莫耳吸光係數， C_A 表示抗體-藥物複合體中的抗體濃度， C_D 表示抗體-藥物複合體中的藥物濃度。

其中， $\epsilon_{A,280}$ 、 $\epsilon_{A,370}$ 、 $\epsilon_{D,280}$ 、 $\epsilon_{D,370}$ 係使用事前準備的值(計算推定值或由化合物之 UV 測定獲得的實測值)。例如， $\epsilon_{A,280}$ 可藉由自抗體之胺基酸序列，經已知計算方法(Protein Science, 1995, vol.4, 2411-2423)加以推定。 $\epsilon_{A,370}$ 係通常為零。 $\epsilon_{D,280}$ 及 $\epsilon_{D,370}$ 可藉由使用的複合體前驅物測定溶解於某莫耳濃度的溶液之吸光度，藉由比爾-朗伯定律(Lambert-Beer law)(吸光度=莫耳濃度×莫耳吸光係數×吸光室光路長)而獲得。測定抗體-藥物複合體水溶液之 A_{280} 及 A_{370} ，將此等值代入式(1)及(2)而解出聯立方程式，可求得 C_A 及 C_D 。再者，用 C_A 除 C_D 可求得每 1 抗體之藥物平均結合數。

【0138】製造方法 1 中的式(2)所示的化合物係下列式之任一者。

【0139】



【0140】上述式中， n^1 、 n^2 、 n^3 、 L^2 、 L^P 、 L^a 、 L^b 及 L^c 如已定義者， L^c 係成為與藥物之結合部位。

【0141】作為如此本發明化合物製造上有用的中間體，較佳者係 n^2 為整數 2 至 5， L^2 係 $-NH-(CH_2CH_2O)n^5-CH_2CH_2-C(=O)-$ 或單鍵， n^5 係 2 至 4， L^P 係 GGFG， $-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-$ 係 $-NH-CH_2CH_2-C(=O)-$ 、 $NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$ 、 $-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-$ 、或 $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-$ 之部分構造為較佳。又就鹵素而言，溴或碘為較佳。關於此等化合物，具體而言可例示以下各者[其中，(順丁烯二醯亞胺-N-基)係意指順丁烯二醯亞胺基(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-基)]。

(順丁烯二醯亞胺-N-基)- $CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

(順丁烯二醯亞胺-N-基)- $CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

(順丁烯二醯亞胺-N-基)- $CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

(順丁烯二醯亞胺-N-基)- $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

(順丁烯二醯亞胺-N-基)- $CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

(順丁烯二醯亞胺-N-基)- $CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

(順丁烯二醯亞胺-N-基)- $CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

$X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

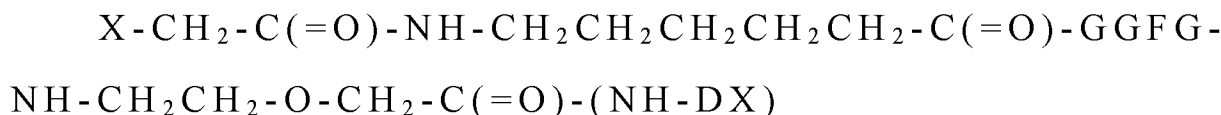
$X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$



其中，式中之 X 表示溴原子或碘原子。此等溴化合物及碘化合物任一者皆可適合使用作為製造中間體。

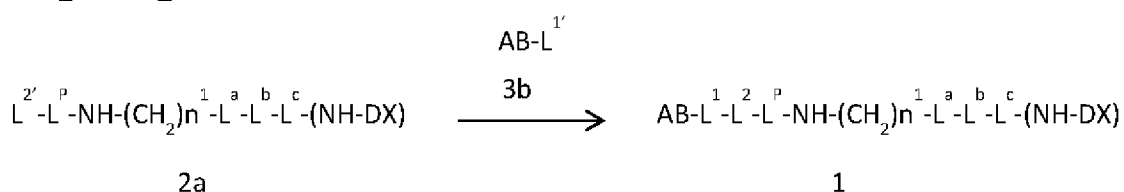
又，為了確保複合體之量，混合同樣條件下製作而獲得的平均藥物數為同程度的複數複合體(例如 ± 1 左右)而可作成新的批次。於此情形，平均藥物數滿足於混合前之平均藥物數之間。

【0142】

2.製造方法 2

式(1)所示的抗體-藥物複合體中，與抗體之結合為醯胺基，係於連結物內具有硫醚鍵的連結物，具體而言， $-L^1-L^2-$ 係 $-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-基-3-琥珀醯亞胺)-S-(CH_2)n^6-C(=O)-$ 之構造者，可藉由下述方法來製造。

【0143】



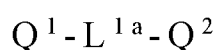
【0144】[式中， $AB-L^{1'}$ 表示抗體與連結物 L^1 結合，又 L^1 之末端變換為 N-順丁烯二醯亞胺基的基，具體而言，於 $AB-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-基-3-琥珀醯亞胺)-$ ， $-(N-基-3-琥珀醯亞胺)-$ 被變換為順丁烯二醯亞胺基的構造。 $L^{2'}$ 表示末端成為氫硫基的 $HS-(CH_2)n^6-C(=O)-$ 基，AB 表示抗體]。

【0145】即，藉由使後述方法取得的化合物(2a)、與具有順丁烯二醯亞胺基的連結物結合的抗體(3b)反應，可製造抗體-藥物複合體(1)。

具有順丁烯二醯亞胺基的抗體(3b)亦可以本項技術領域中具通常知識者周知之方法獲得(Hermanson, G.T, Bioconjugate Techniques, pp.56-136, pp.456-493, Academic Press(1996))。例如可舉例具有具與胺基、羥基之結合性的順丁烯二醯亞胺基的琥珀醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯(SMCC)等之二官能性連結物與連結物的胺基作用而導入順丁烯二醯亞胺基等之方法，但未限定於此等。

例如，若為將對胺基之反應性部分、與對硫醇基之反應性部分以連結物結合的化合物可較佳使用。其中對胺基之反應性部分係活性酯、醯亞胺酯等為宜，又硫醇反應性部分係順丁烯二醯亞胺基、鹵素化乙醯基、鹵素化烷基、又二硫吡啶基等為宜。

就於構成抗體的胺基酸之胺基或羥基，尤其是胺基，藉由醯胺鍵而用以構築連結物的方法而言，首先與抗體反應的化合物，若為下列式表示的化合物為宜：



[式中， Q^1 表示(吡咯啉-2,5-二酮-N-基)-O-C(=O)-、(3-磺酸基-吡咯啉-2,5-二酮-N-基)-O-C(=O)-、 R^Q -O-C(=N)-、或 $O=C=N-$ ，

L^{1a} -表示-cyc.Hex(1,4)-CH₂-、碳數 1 至 10 之伸烷基、伸苯基、-(CH₂)_{n⁴}-C(=O)-、-(CH₂)_{n^{4a}}-NH-C(=O)-(CH₂)_{n^{4b}}-、或-(CH₂)_{n^{4a}}-NH-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH₂-，

Q^2 表示(順丁烯二醯亞胺-N-基)、鹵素原子、或-S-S-(2-吡啶基)，

R^Q 表示碳數 1 至 6 之烷基、 n^4 表示 1 至 8 之整數， n^{4a} 表示 0 至 6 之整數、 n^{4b} 表示 1 至 6 之整數]。

其中， R^Q 係碳數 1 至 6 之烷基為宜，更佳為甲基或乙基。

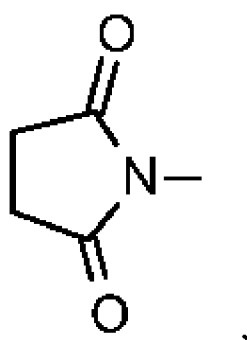
就 L^{1a} 中的伸烷基而言，碳數 1 至 10 者為宜。就伸苯基而言，可為鄰位、間位、對位任一者，但對位、或間位為更佳。

作為 L^{1a} ，較佳可列舉-cyc.Hex(1,4)-CH₂-、-(CH₂)₅-NH-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH₂-、-(CH₂)₂-NH-C(=O)-CH₂-、-(CH₂)₅-NH-C(=O)-(CH₂)₂-、-CH₂-、-(CH₂)₂-、-(CH₂)₃-、-(CH₂)₅-、-(CH₂)₁₀-、-(對-Ph)-、-(間-Ph)-、-(對-Ph)-CH(-CH₃)-、-(CH₂)₃-(間-Ph)-、或-(間-Ph)-NH-C(=O)-CH₂-。

作為 Q^1 ，較佳為(吡咯啉-2,5-二酮-N-基)-O-C(=O)-， Q^2 係(順丁烯二醯亞胺-N-基)為較佳，但使雙硫鍵形成時係使用-S-S-(2-吡啶基)為宜。

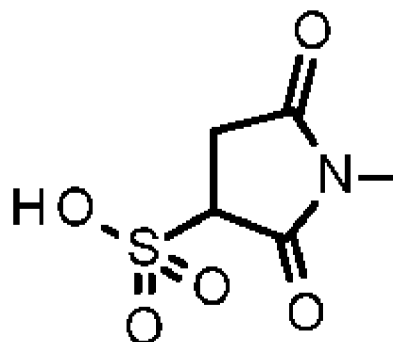
其中，(吡咯啉-2,5-二酮-N-基)-係下列式所示氮原子為結合部位的基

【0146】



【0147】(3-磺酸基-吡咯啉-2,5-二酮-N-基)-係下列式所示氮原子為結合部位的基

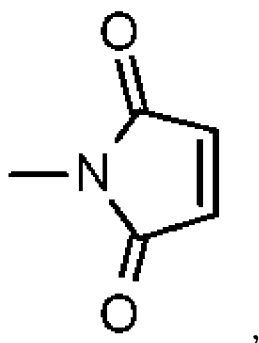
【0148】



【0149】其磺酸可形成鋰鹽、鈉鹽、鉀鹽，較佳為鈉鹽，
cyc.Hex(1,4)表示 1,4-伸環己基，

(順丁烯二醯亞胺-N-基)係下列式所示之氮原子為結合部位
的基

【0150】



【0151】(2-吡啶基)表示 2-吡啶基，(對-Ph)表示對伸苯
基，(間-Ph)表示間伸苯基。

作為如此的化合物，例如，磺酸基琥珀醯亞胺基-4-(N-順
丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯(sulfo-SMCC)、N-琥珀
醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)-環己烷-1-羧基-(6-胺
基己酸酯)(LC-SMCC)、κ-順丁烯二醯亞胺基十一酸 N-琥珀醯
亞胺基酯(KMUA)、γ-順丁烯二醯亞胺基丁酸 N-琥珀醯亞胺基
酯(GMBS)、ε-順丁烯二醯亞胺基己酸 N-羥基琥珀醯亞胺酯
(EMCS)、m-順丁烯二醯亞胺基苯甲醯基-N-羥基琥珀醯亞胺酯

(MBS)、N-(α -順丁烯二醯亞胺基乙醯氧基)-琥珀醯亞胺酯(AMAS)、琥珀醯亞胺基-6-(β -順丁烯二醯亞胺基丙醯胺基)己酸酯(SMPH)、N-琥珀醯亞胺基 4-(p-順丁烯二醯亞胺基苯基)-丁酸酯(SMPB)、N-(p-順丁烯二醯亞胺基苯基)異氰酸酯(PMPI)、N-琥珀醯亞胺基-4-(碘乙醯基)-胺基苯甲酸酯(SIAB)、N-琥珀醯亞胺基碘乙酸酯(SIA)、N-琥珀醯亞胺基溴乙酸酯(SBA)N-琥珀醯亞胺基 3-(溴乙醯胺)丙酸酯(SBAP)、N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶二硫基)丙酸酯(SPDP)、及琥珀醯亞胺基氧基羰基- α -甲基- α -(2-吡啶二硫基)甲苯(SMPT)等之化合物。

具體而言，例如，對抗體(3)，將 2 至 6 當量之 SMCC 於 pH6 至 7 之磷酸緩衝液中，使於室溫反應 1 至 6 小時，SMCC 之活性酯與抗體反應而可獲得具有順丁烯二醯亞胺基的抗體(3b)。獲得的抗體(3b)係藉由下述共通操作 D-2 加以純化，可用於與以下化合物(2a)之反應。

共通操作 D-2：琥珀醯亞胺基 4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)-環己烷-1-甲酸酯(SMCC)衍生物化抗體之純化

以 PBS6.5/EDTA 使 NAP-25 管柱平衡化。於此 NAP-25 管柱中，負載含琥珀醯亞胺基 4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)-環己烷-1-甲酸酯(於本說明書中稱為 SMCC)衍生物化抗體的反應液(約 0.5 mL)，以製造商規定量之緩衝液而使溶出，分取抗體劃份，而進行純化。

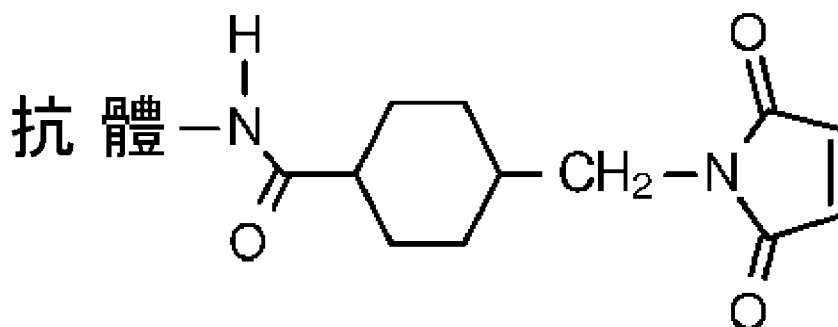
供給與連結物結合的抗體之胺基只要具有 N 末端胺基及/或離胺酸殘基的胺基即可，並未限定於此等。再者，亦可利用絲胺酸殘基具有的羥基而使酯鍵形成而與連結物結合。

化合物(2a)、與具有順丁烯二醯亞胺基的連結物結合的抗體(3b)之反應係以製造方法 1 所述，可與化合物(2)、及具有氫硫基的抗體(3a)之反應方法的情形同樣地進行。

製造的抗體-藥物複合體(1)中的濃縮、緩衝液交換、純化、抗體濃度及抗體每一分子之藥物平均結合數的測定而致之抗體-藥物複合體(1)之鑑定，可與製造方法 1 同樣地進行。

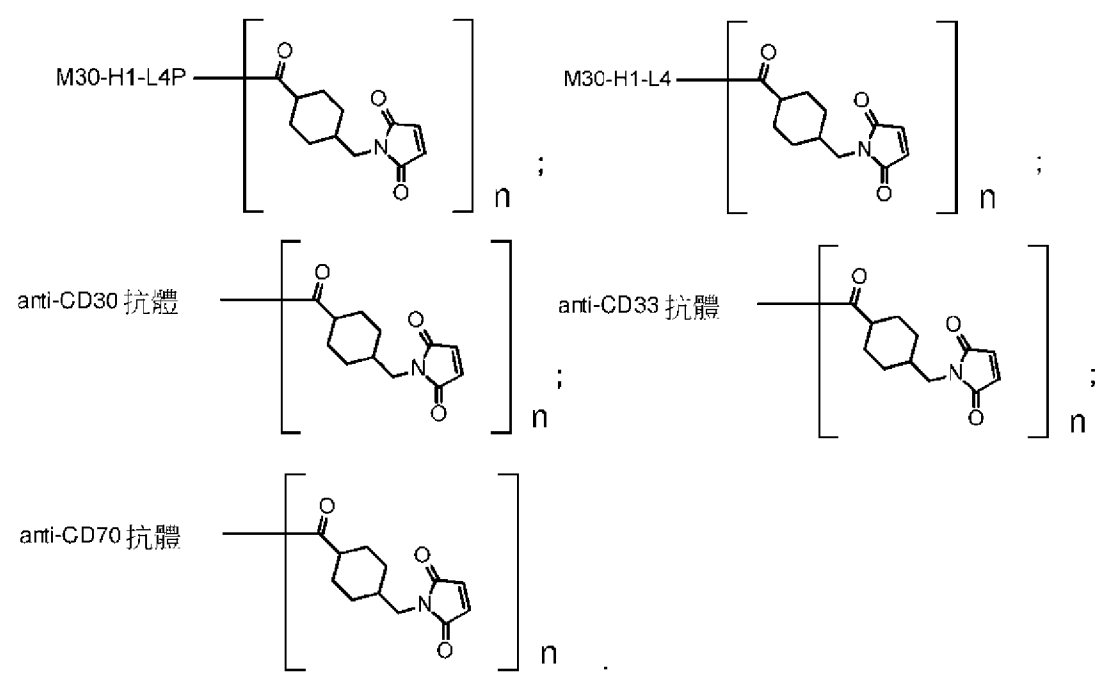
於製造方法 2，式(3b)所示化合物係具有下列構造(下列式；於該構造，「抗體-NH-」係來自抗體)。

【0152】

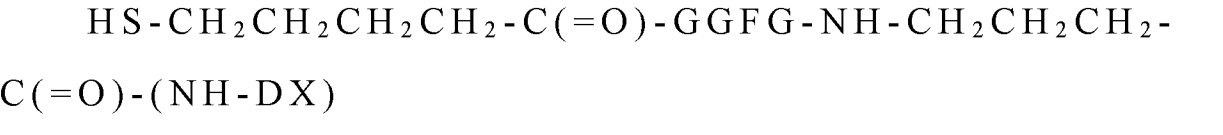
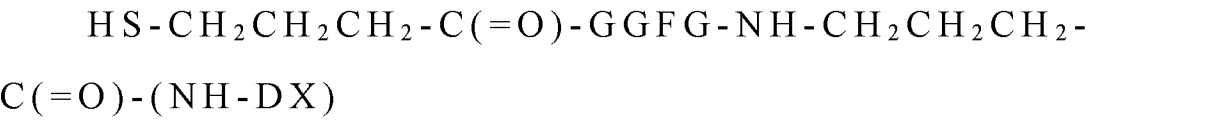
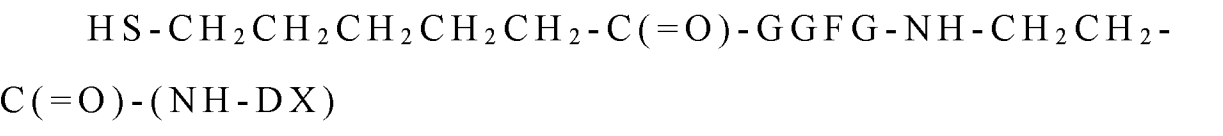
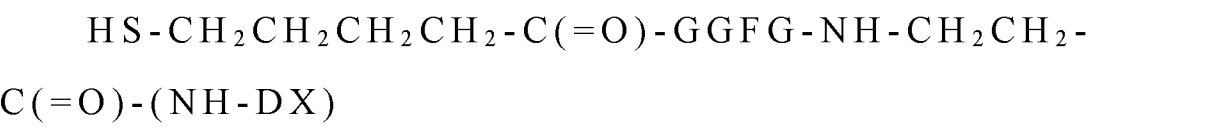
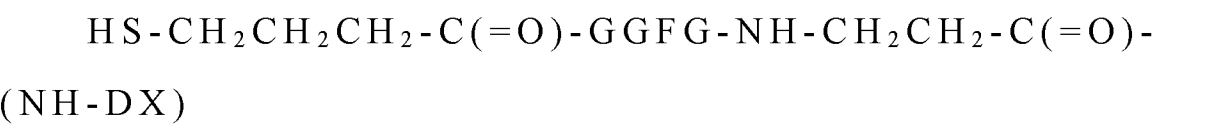
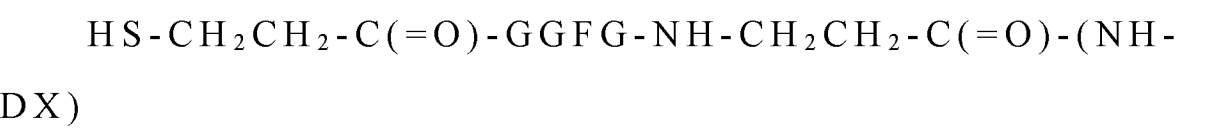


【0153】用以製造本發明之抗體-藥物複合體之中間體，具有上述構造的化合物係如下式(式中，n 表示 1 至 10 之整數，但較佳為 2 至 8，更佳為 3 至 8)。

【0154】



【0155】 又就末端成為氫硫基的本發明之化合物而言，可舉例以下各者。



HS-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-
(NH-DX)

HS-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-
C(=O)-(NH-DX)

HS-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-
C(=O)-(NH-DX)

HS-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-
CH₂-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-
C(=O)-(NH-DX)

HS-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-
C(=O)-(NH-DX)

HS-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-
CH₂-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-
O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-
C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
(NH-DX)

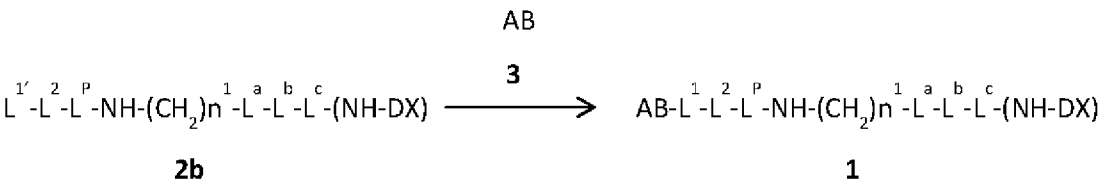
HS-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂
O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
O)-(NH-DX)

【0156】

3.製造方法 3

式(1)所示抗體-藥物複合體，藉由醯胺鍵而藥物連結物部分與抗體結合者，可以下列方法製造。例如 L^1 為 $-C(=O)-(CH_2)_n^4-C(=O)-$ ，其成為活性酯的 $L^{1'}$ ，例如(吡咯啉-2,5-二酮-N-基)-O-C(=O)-(CH₂)_n⁴-C(=O)-可較佳地使用。又 L^2 為單鍵的情形，例如可藉由下述方法來製造。

【0157】



【0158】即，藉由使以後述方法可取得的化合物(2b)、與抗體(3)反應，可製造抗體-藥物複合體(1)。

化合物(2b)係具有與抗體之胺基、羥基之結合性。抗體之胺基、羥基係如製造方法 2 記載，各自表示例如抗體之具有的 N 末端胺基及/或離胺酸殘基具有的胺基、絲胺酸殘基具有的羥基，但未限定於此等。

化合物(2b)係由 N-羥基琥珀醯亞胺基酯基而成的活性酯，但亦可使用其他活性酯，例如磺酸基琥珀醯亞胺基酯基、N-羥基酞醯亞胺基酯、N-羥基磺酸基酞醯亞胺基酯、鄰-硝基苯基酯、對-硝基苯基酯、2,4-二硝基苯基酯、3-磺醯基-4-硝基苯基酯、3-羧基-4-硝基苯基酯、五氟苯基酯等。

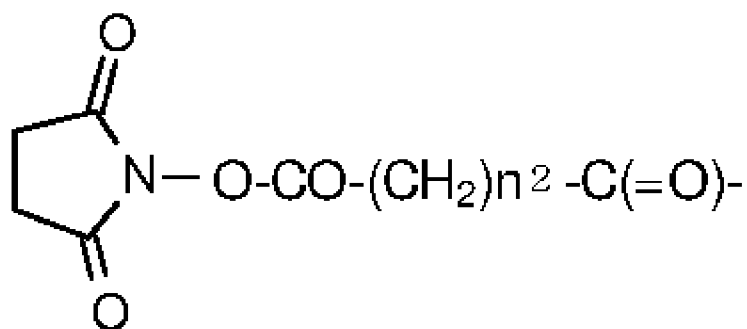
化合物(2b)與抗體(3)之反應係每 1 個抗體(3)使用 2 至 20 莫耳當量之化合物(2b)，可製造每 1 個抗體與 1 個至 10 個藥物結合的抗體—藥物複合體(1)。具體而言，於含抗體(3)的緩衝

液，藉由添加使化合物(2b)溶解的溶液而使反應，可製造抗體-藥物複合體(1)。其中，作為緩衝液，可使用乙酸鈉溶液、磷酸鈉或硼酸鈉等。反應時之 pH 係 5 至 9 為宜，更佳為 pH7 左右下使反應為宜。就使化合物(2b)溶解的溶媒而言，可使用二甲基亞砷(DMSO)、二甲基甲醯胺(DMF)、二甲基乙醯胺(DMA)、N-甲基-2-吡啶酮(NMP)等之有機溶媒。將使化合物(2b)溶解的有機溶媒溶液，加至含抗體(3)的緩衝液中為 1 至 20% v/v，而使反應為宜。反應溫度係 0 至 37°C，更佳為 10 至 25°C，反應時間係 0.5 至 20 小時。

製造的抗體-藥物複合體(1)中的濃縮、緩衝液交換、純化、抗體濃度及抗體每一分子之藥物平均結合數之測定所致的抗體-藥物複合體(1)之鑑定，可與製造方法 1 同樣地進行。

於製造方法 3，(吡咯啉-2,5-二酮-N-基)-O-C(=O)-(CH₂)_n-C(=O)-係具有下列構造。

【0159】



【0160】就具有上述部分構造的本發明之化合物而言，可舉例以下各者。

(吡咯啉-2,5-二酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(吡咯啉-2,5-二酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(吡 咯 啉-2,5-二 酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂-
C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(吡 咯 啉-2,5-二 酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂
-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(吡 咯 啉-2,5-二 酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂
CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(吡 咯 啉-2,5-二 酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-
GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(吡 咯 啉-2,5-二 酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(吡 咯 啉-2,5-二 酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂-
C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(吡 咯 啉-2,5-二 酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂
-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(吡 咯 啉-2,5-二 酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂
CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(吡 咯 啉-2,5-二 酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-
GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(吡 咯 啉-2,5-二 酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(吡 咯 啉-2,5-二 酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂-
C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(吡 咯 啉-2,5-二 酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂
-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(吡咯啉-2,5-二酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂
CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(吡咯啉-2,5-二酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-
GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(吡咯啉-2,5-二酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(吡咯啉-2,5-二酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂-
C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(吡咯啉-2,5-二酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂
-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(吡咯啉-2,5-二酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂
CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(吡咯啉-2,5-二酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

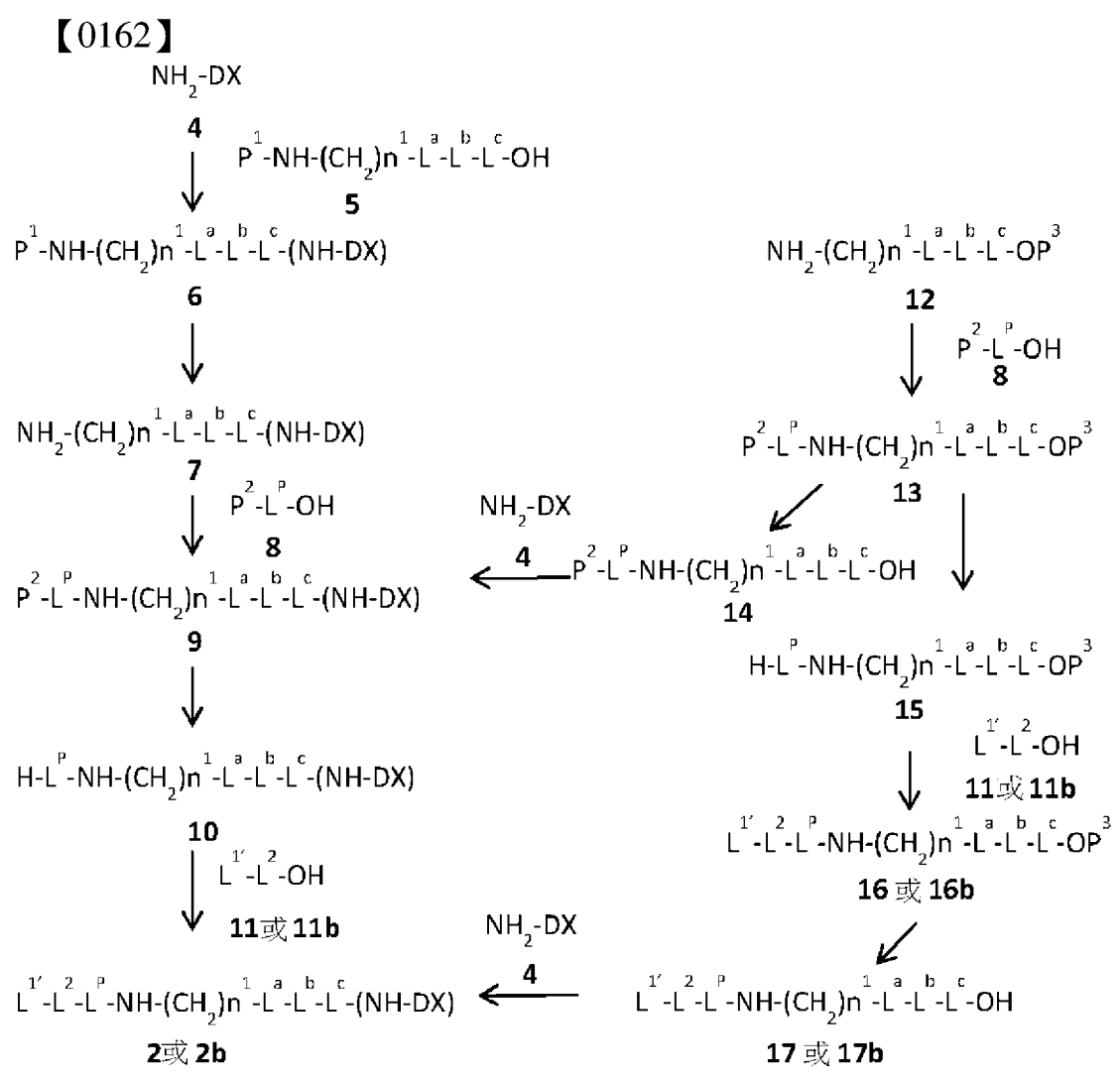
(吡咯啉-2,5-二酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-
NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(吡咯啉-2,5-二酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-
GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

【0161】

4. 製造方法 4

以先前的製造方法中使用的中間體式(2)或(2b)所示化合物
及彼等之藥理上可容許的鹽，係可藉由例如下述方法來製造。



【0163】 [式中，L^c 為-C(=O)-，與-(NH-DX)之結合係形成醯胺鍵，L^{1'}表示末端順丁烯二醯亞胺基、或末端鹵乙醯基、或變換為(吡咯啉-2,5-二酮-N-基)-O-C(=O)-(C H₂)_n⁴-C(=O)-的構造之 L¹，P¹、P² 及 P³ 表示保護基]。

【0164】 將羧酸(5)誘導為活性酯、混合酸酐、或酸鹵素化物等，於鹼存在下，藉由使與 NH₂-DX[表示依喜替康；化學名：(1S,9S)-1-胺基-9-乙基-5-氟-2,3-二氫-9-羥基-4-甲基-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]喹啉并[1,2-b]喹啉-10,13(9H,15H)-二酮](4)或其藥理上可容許的鹽反應，可製造化合物(6)。

此反應係援用胜肽合成通常使用的反應試藥或條件即可。活性酯係有各種之物，例如若將 p-硝基酚等之酚類、N-羥基苯并三唑或者 N-羥基琥珀醯亞胺等與羧酸(5)，使用 N,N'-二環己基碳化二亞胺或者 1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳化二亞胺・鹽酸鹽等之縮合劑而使反應，則可製造。又，活性酯亦可藉由羧酸(5)與五氟苯基三氟乙酸酯等之反應；羧酸(5)與 1-苯并三唑基氧基三吡咯啶鎘六氟亞磷酸酯之反應；羧酸(5)與氰基磷酸二乙基酯之反應(鹽入法)；羧酸(5)與三苯基磷及 2,2'-二吡啶基二硫化物之反應(向山法)；羧酸(5)與氯化 4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三吡啶-2-基)-4-甲基咪唑鎘(DMTMM)之類的三吡啶衍生物之反應等來製造。又，羧酸(5)於鹼存在下以氯化亞硫醯、草醯氯等之酸鹵素化物處理可製造的酸鹵化物法等亦可進行反應。如上述獲得的羧酸(5)之活性酯、混合酸酐、或酸鹵素化物於化合物(4)與適當鹼存在下，於惰性溶媒中，藉由於-78℃~150℃反應，可製造化合物(6)(又，「惰性溶媒」係指其溶媒被採用的反應中不會阻礙實施的反應的溶媒)。

【0165】就上述各步驟所使用之具體的鹼而言，例如，可舉例碳酸鈉、碳酸鉀、乙醇鈉、丁醇鉀、氫氧化鈉、氫氧化鉀、氫化鈉、氫化鉀之類的鹼金屬或鹼土類金屬之碳酸鹽、鹼金屬烷氧化物、鹼金屬氫氧化物或氫化物、或 n-丁基鋰之類的烷基鋰、鋰二異丙基醯胺之類的二烷基胺基鋰所代表的有機金屬鹼；鋰雙(三甲基矽烷基)醯胺之類的雙矽烷基胺的有機金屬鹼；或吡啶、2,6-二甲基吡啶、2,4,6-三甲基吡啶、4-二甲基胺基吡啶、三乙基胺、N-甲基咪唑、二異丙基乙基胺、二吡雙環[5.4.0]十一-7-烯(DBU)之類的有機鹼等。

【0166】就本反應所使用的惰性溶媒而言，可舉例二氯甲烷、氯仿、四氯化碳等之鹵素化烴系溶媒；四氫呋喃、1,2-二甲氧基乙烷、二噁烷等之醚系溶媒；苯、甲苯等之芳香族烴系溶媒；N,N-二甲基甲醯胺、N,N-二甲基乙醯胺、N-甲基吡咯啉-2-酮等之醯胺系溶媒，除了此等之外，依情形亦可使用二甲基亞砷、環丁砷等之亞砷系溶媒；丙酮、甲基乙基酮等之酮系溶媒等。

【0167】化合物(6)之 L^a 及 L^b 係如後述，其羥基、羧基、胺基等係可以有機化合物之合成上通常使用的保護基加以保護。具體而言，就羥基之保護基而言，可舉例甲氧基甲基等之烷氧基甲基；苯甲基、4-甲氧基苯甲基、三苯基甲基等之芳基甲基；乙醯基等之烷醯基；苯甲醯基等之芳醯基；*tert*-丁基二苯基矽烷基等之矽烷基等。羧基可呈甲基、乙基、*tert*-丁基等之烷基、烯丙基、或苯甲基等之芳基甲基之酯等而保護。胺基可藉由 *tert*-丁基氧基羰基、甲氧基羰基、乙氧基羰基等之烷氧基羰基；烯丙基氧基羰基、9-芡基甲基氧基羰基、苯甲基氧基羰基、對甲氧基苯甲基氧基羰基、對(或鄰)硝基苯甲基氧基羰基等之芳基甲基；之外，可藉由乙醯基等之烷醯基；苯甲基、三苯基甲基等之芳基甲基；苯甲醯基等之芳醯基；或 2,4-二硝基苯磺醯基、鄰硝基苯磺醯基等之芳基磺醯基等之胜肽合成上通常使用的胺基保護基而加以保護。上述之保護基之附著或脫落係依據通常實施的方法來進行即可。

【0168】就化合物(6)之末端胺基之保護基 P^1 而言，可使用 *tert*-丁基氧基羰基或 9-芡基甲基氧基羰基、苯甲基氧基羰基等之胜肽合成通常使用的胺基之保護基。就其他胺基之保護基而

言，可舉例乙醯基等之烷醯基；甲氧基羰基、乙氧基羰基等之烷氧基羰基；對甲氧基苯甲基氧基羰基、對(或鄰)硝基苯甲基氧基羰基等之芳基甲氧基羰基；苯甲基、三苯基甲基等之芳基甲基；苯甲醯基等之芳醯基；或 2,4-二硝基苯磺醯基、鄰硝基苯磺醯基等之芳基磺醯基。保護基 P^1 可因應保護胺基的化合物之性質等加以取捨選擇。

藉由使獲得的化合物(6)之末端胺基之保護基 P^1 脫保護，可製造化合物(7)。選擇因應其保護基的試藥或條件即可。

將 N 末端以 P^2 保護的胜肽羧酸(8)誘導為活性酯、混合酸酐，藉由與獲得的化合物(7)反應，可製造化合物(9)。胜肽羧酸(8)與化合物(7)之形成胜肽鍵的反應條件或試藥、及鹼、惰性溶媒由化合物(6)之合成中所述者加以適宜選擇來使用即可。保護基 P^2 係由化合物(6)之保護基所述者加以適宜選擇來使用即可，因應保護胺基的化合物之性質等加以取捨選擇即可。又，以胜肽合成上通常使用的方式，將構成胜肽羧酸(8)的胺基酸或胜肽順次反應及重複脫保護，亦可使延伸而製造化合物(9)。

藉由將獲得的化合物(9)之胺基之保護基 P^2 脫保護，可製造化合物(10)。選擇因應其保護基的試藥或條件即可。

將羧酸(11)及(11b)誘導為活性酯、混合酸酐、或酸鹵素化合物等，藉由與獲得的化合物(10)反應，可製造化合物(2)或(2b)。羧酸(11)或(11b)與化合物(10)之形成胜肽鍵的反應條件或試藥、及鹼、惰性溶媒係由化合物(6)之合成中所述者加以適宜選擇來使用即可。

【0169】 化合物(9)亦可以例如下述之方法來製造。

將 N 末端以 P^2 保護的胜肽羧酸(8)誘導為活性酯、混合酸酐等，鹼存在下，藉由與羧基以 P^3 保護的胺化合物(12)反應，可製造化合物(13)。胜肽羧酸(8)與化合物(12)之形成胜肽鍵的反應條件或試藥、及鹼、惰性的溶媒係由化合物(6)之合成中所述者加以適宜選擇來使用即可。化合物(13)之胺基之保護基 P^2 係由化合物(6)之保護基中所述者加以適宜選擇來使用即可。就羧基之保護基 P^3 而言，使用有機合成化學中於胜肽合成上通常使用作為羧基之保護基的保護基即可，具體而言，甲基、乙基、*tert*-丁基等之烷基酯、烯丙基酯、苯甲基酯等之由化合物(6)之保護基所述者加以適宜選擇來使用即可。於此情形，有必要為胺基之保護基與羧基之保護基以相異方法或條件可去除。例如可舉例 P^2 為 *tert*-丁基氧基羰基， P^3 為苯甲基的組合等作為代表性者。此等之保護基係因應保護胺基與羧基的化合物之性質等而由上述者加以取捨選擇即可，彼等之保護基之切斷之際，因應其保護基選擇試藥或條件即可。

藉由使獲得的化合物(13)之羧基之保護基 P^3 脫保護，可製造化合物(14)。選擇因應其保護基的試藥或條件即可。

獲得的化合物(14)誘導為活性酯、混合酸酐、或酸鹵素化合物等，鹼存在下，經由與化合物(4)反應，可製造化合物(9)。此反應係援用胜肽合成上通常使用的反應試藥或條件即可，反應條件或試藥、及鹼或惰性溶媒係由化合物(6)之合成中所述者加以適宜選擇來使用即可。

【0170】化合物(2)或(2b)係例如亦可以下述方法來製造。

藉由使化合物(13)之胺基之保護基 P^2 脫保護，可製造化合物(15)。選擇因應其保護基的試藥或條件即可。

將羧酸衍生物(11)或(11b)誘導為活性酯、混合酸酐、或酸鹵素化物等，鹼存在下，藉由使與獲得的化合物(15)反應，可製造化合物(16)或(16b)。胜肽羧酸(11)或(11b)與化合物(15)之形成醯胺鍵的反應條件或試藥、及鹼、惰性溶媒係由化合物(6)之合成中所述者加以適宜選擇來使用即可。

藉由使獲得的化合物(16)或(16b)之羧基之保護基脫保護，可製造化合物(17)或(17b)。可與化合物(14)之製造中的羧基之脫保護同樣地進行。

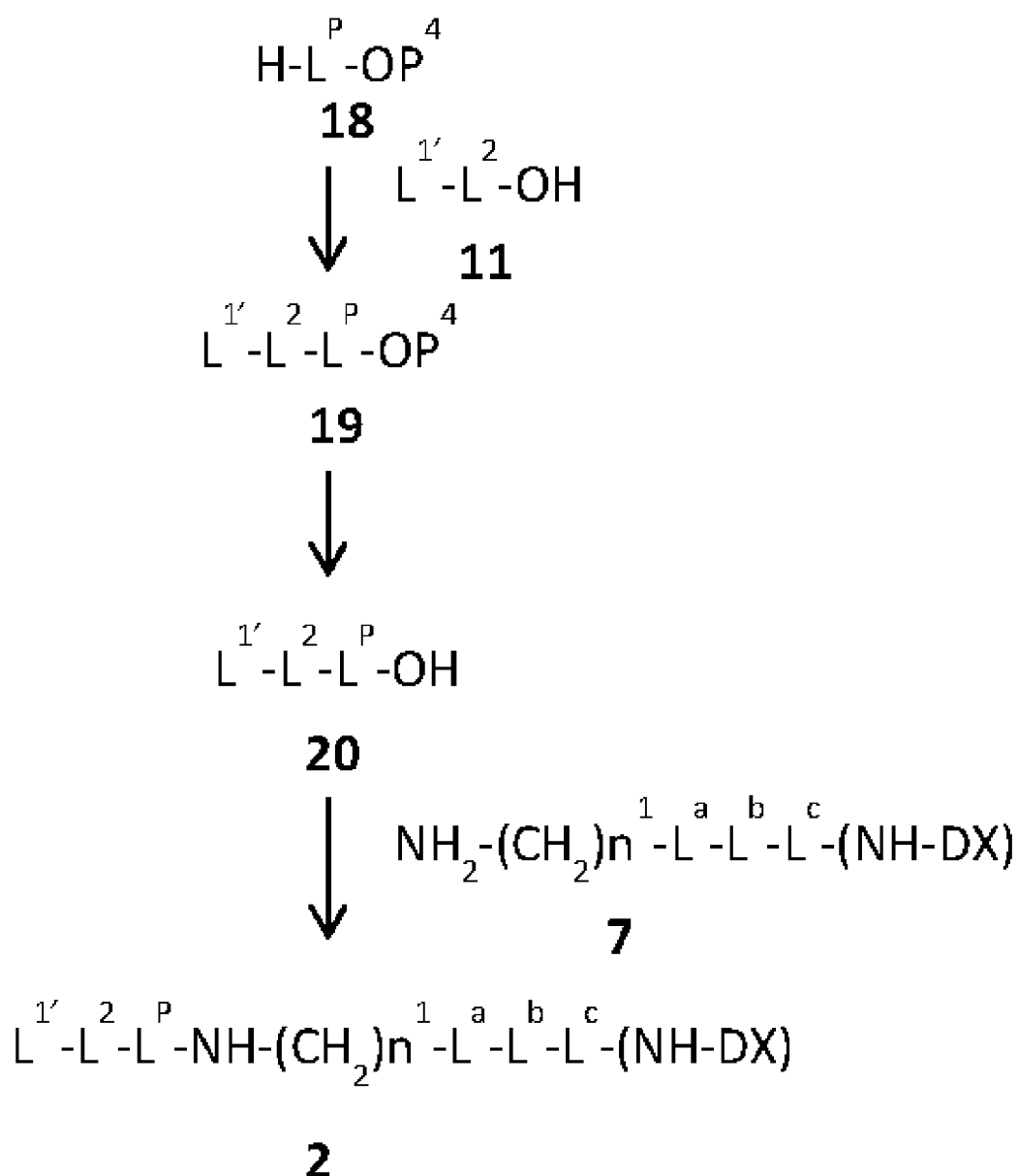
將化合物(17)或(17b)誘導為活性酯、混合酸酐、或酸鹵素化物等，藉由於鹼存在下，使與化合物(4)反應而可製造化合物(2)或(2b)。此反應係援用胜肽合成上通常使用的反應試藥或條件即可，反應條件或試藥、及鹼或惰性溶媒係由化合物(6)之合成中所述者加以適宜選擇來使用即可。

【0171】

5. 製造方法 5

中間體之式(2)所示的化合物亦可藉由下述方法來製造。

【0172】



【0173】[式中， $\text{L}^{1'}$ 係末端為順丁烯二醯亞胺基、或變換為鹵乙醯基的構造之 L^1 ， P^4 表示保護基]。

【0174】將化合物(11)誘導為活性酯、混合酸酐等，鹼存在下，藉由與C末端經 P^4 保護的胜肽羧酸(18)反應，可製造化合物(19)。胜肽羧酸(18)與化合物(11)之形成胜肽鍵的反應條件或試藥、及鹼、惰性溶媒係由化合物(6)之合成中所述者加以適宜選擇來使用即可。化合物(18)之羧基之保護基 P^4 係由化合物(6)之保護基中所述者加以適宜選擇來使用即可。

藉由使獲得的化合物(19)之羧基之保護基脫保護而可製造化合物(20)。可與化合物(14)之製造中的羧基之脫保護同樣地進行。

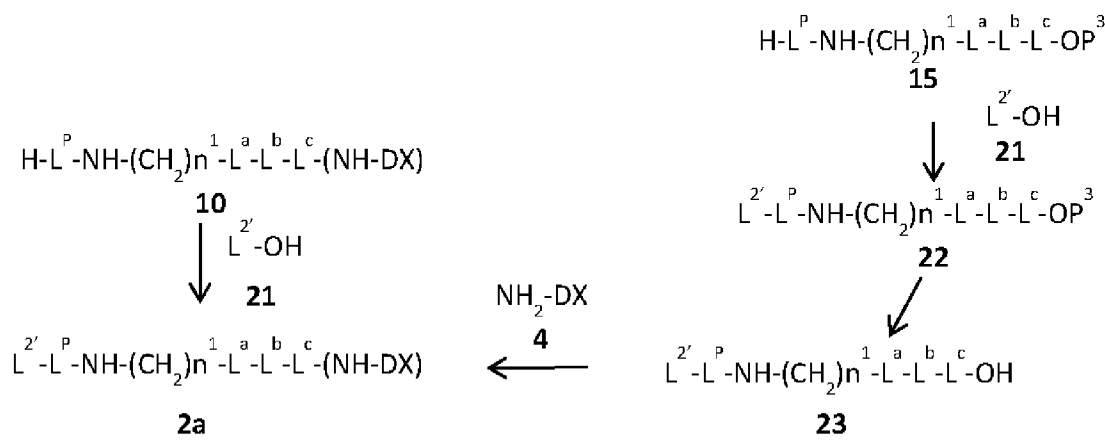
藉由將獲得的化合物(20)誘導為活性酯、或混合酸酐等，使與化合物(7)反應，可製造化合物(2)。此反應係援用胜肽合成上通常使用的反應試藥或條件即可，反應條件或試藥、及鹼或惰性溶媒係由化合物(6)之合成中所述者加以適宜選擇來使用即可。

【0175】

6.製造方法 6

為製造方法 2 記載之製造中間體(2a)， $L^{2'}$ 變換為末端氫硫基烷醯基的構造之 L^2 的化合物，係可藉由下述方法來製造。

【0176】



又，藉由將化合物(21)誘導為活性酯、混合酸酐、或酸鹵素化物等，使與化合物(15)反應，藉由將獲得的化合物(22)之羧基之保護基脫保護，可製造化合物(23)。

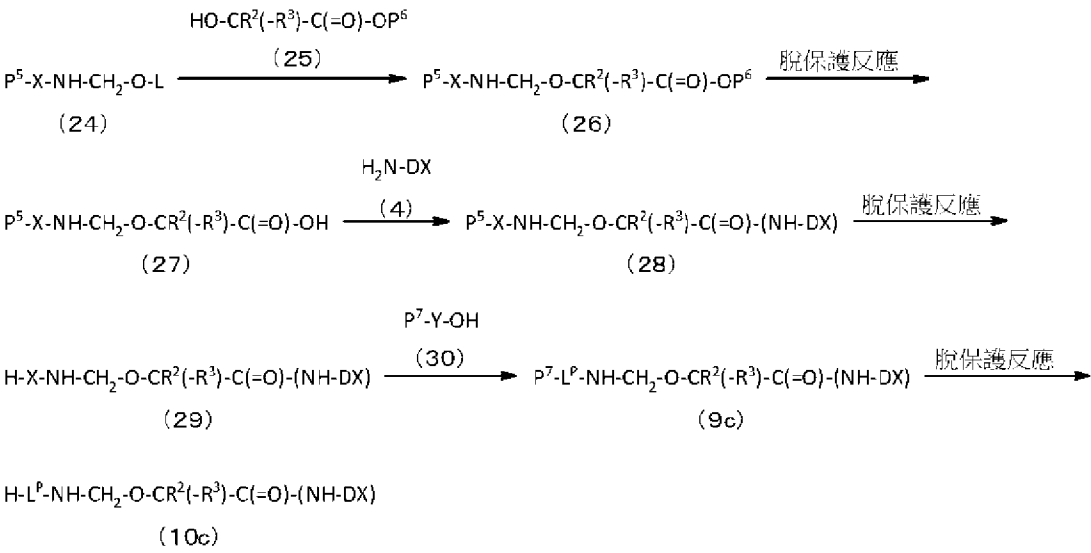
藉由將化合物(23)誘導為活性酯、混合酸酐、或酸鹵素化物等，鹼存在下，使與化合物(4)反應，可製造化合物(2a)。此反應係援用胜肽合成上通常使用的反應試藥或條件即可，反應條件或試藥、及鹼或惰性溶媒係由化合物(6)之合成中所述者加以適宜選擇來使用即可。

【0178】

7.製造方法 7

以下，詳述製造方法 4 記載之製造中間體(10)中， $n^1=1$ 、 $L^a=O$ 、及 $L^b=CR^2(-R^3)$ 之化合物(10c)之製造方法。式(10c)所示的化合物、其鹽或彼等之溶媒合物，例如可以下述方法來製造。

【0179】



【0180】[式中， L^P 、 R^2 、及 R^3 表示與前述同意義， L 表示乙醯基或氫原子等， X 及 Y 表示 1 至 3 個胺基酸而成的寡胜肽， P^5 及 P^7 表示胺基之保護基， P^6 表示羧基之保護基]。

【0181】式(24)所示的化合物係藉由日本特開 2002-60351 號公報記載的手法或文獻(J.Org.Chem., 51 卷, 3196 頁, 1986 年)記載之方法、或應用其之方法, 因應必要進行保護基之去除或官能基變換, 而可加以製造。或, 藉由以醛或酮處理末端胺基經保護的胺基酸或胺基經保護的寡胜肽之酸醯胺, 而可獲得。

化合物(24)於惰性溶媒中、酸或鹼存在下, 於冷卻下~室溫下, 與具有羥基的化合物(25)反應, 可製造化合物(26)。就使用的酸而言, 例如, 可舉例氟化氫酸、鹽酸、硫酸、硝酸、磷酸、硼酸等之無機酸、乙酸、檸檬酸、對甲苯磺酸、甲烷磺酸等之有機酸、四氟硼酸酯、氯化鋅、氯化錫、氯化鋁、氯化鐵等之路易士酸等。尤其係對甲苯磺酸為較佳。就使用的鹼而言, 由前述鹼中加以適宜選擇來使用即可, 尤其, *tert*-丁醇鉀等之鹼金屬烷氧化物、氫氧化鈉、氫氧化鉀等之鹼金屬氫氧化物、氫化鈉、氫化鉀等之鹼金屬氫化物、鋰二異丙基醯胺等之二烷基胺基鋰代表的有機金屬鹼、鋰雙(三甲基矽烷基)醯胺等之雙矽烷基胺之有機金屬鹼等為較佳。就反應使用的溶媒而言, 可使用四氫呋喃、1,4-二噁烷等之醚系溶媒; 苯、甲苯等之芳香族烴系溶媒等。上述之溶媒可為與水之混合物。又, 就 P^5 中例示的胺基之保護基而言, 只要為通常胺基之保護所使用的基即可, 並未特別限制, 就代表性者而言, 可舉例製造方法 4 記載的胺基之保護基, 但於本反應中, P^5 中例示的胺基之保護基有被切斷的情形。於此情形, 因應必要有使與適當胺基之保護試藥反應的必要。

化合物(27)係可藉由將化合物(26)之保護基 P^6 去除來製造。其中，就 P^6 所例示的羧基之保護基而言，代表性者記載於製造方法 4，但於此情形，胺基之保護基 P^5 與羧基之保護基 P^6 以相異方法或條件可去除的保護基係所欲的。例如，可舉例 P^5 為 9-苄基甲基氧基羰基， P^6 為苯甲基的組合等作為代表者。彼等之保護基係因應保護胺基及羧基的化合物之性質等加以取捨選擇即可，彼等之保護基之去除之際，亦可選擇因應其保護基的試藥或條件。

將羧酸(27)誘導為活性酯、混合酸酐、或酸鹵素化物等，藉由於鹼存在下、使與化合物(4)及彼等之藥理上可容許的鹽反應，可製造化合物(28)，藉由去除獲得的化合物(28)之保護基 P^5 ，可製造化合物(29)。化合物(4)之羧酸(27)之反應及去除保護基 P^6 的反應，係使用與製造方法 4 中所述試藥或反應條件相同者即可。

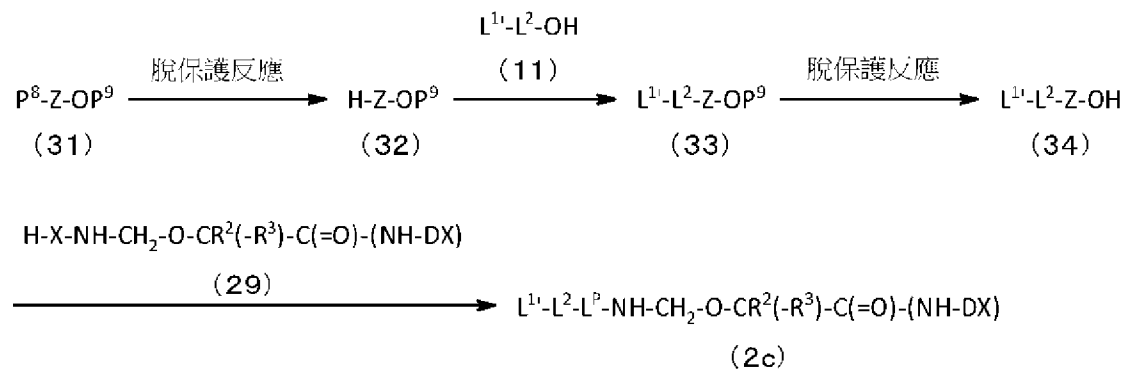
藉由使化合物(29)與末端胺基經保護的胺基酸或胺基經保護的寡胜肽(30)反應，可製造化合物(9c)，藉由去除獲得的化合物(9c)之保護基 P^7 ，可製造化合物(10c)。就 P^7 中例示的胺基之保護基而言，只要為通常胺基之保護所使用的基即可，並未特別限制，作為代表性者可舉例製造方法 4 中記載的胺基之保護基，此保護基之去除之際，選擇因應保護基的試藥或條件即可。化合物(29)與化合物(30)之反應，援用胜肽合成上通常使用的反應試藥或條件即可。上述之方法所製造的化合物(10c)可依據上述製造方法導向本發明化合物(1)。

【0182】

8. 製造方法 8

以下，詳述製造方法 4 記載之製造中間體(2)中， $n^1=1$ 、 $L^a=O$ 、及 $L^b=CR^2(-R^3)$ 之化合物(2c)之製造方法。式(2c)所示的化合物、其鹽或彼等之溶媒合物可以例如下述之方法製造。

【0183】



【0184】[式中， L^1 、 L^2 、 L^P 、 R^2 、及 R^3 表示與前述同意義，Z 表示 1 至 3 個之胺基酸而成的寡胜肽， P^8 表示胺基之保護基， P^9 表示羧基之保護基]。

【0185】藉由去除末端胺基及羧基為經保護的胺基酸或寡胜肽(31)之保護基 P^8 ，可製造化合物(32)，藉由使獲得的胺體(32)與化合物(11)反應，可製造化合物(33)。就 P^8 例示的胺基之保護基而言，只要為通常胺基之保護所使用的基即可，並未特別限制，就代表性者，可舉例製造方法 4 記載的胺基之保護基。又，保護基 P^8 之去除之際亦選擇因應其保護基的試藥或條件即可。化合物(32)與羧酸(11)之反應，使用與製造方法 4 所述試藥或反應條件相同者即可。

藉由去除化合物(33)之保護基 P^9 可製造化合物(34)，藉由使獲得的羧酸(34)與化合物(29)反應，可製造中間體(2c)。就作為 P^8 之例示的羧基之保護基而言，代表性者使用製造方法 4 記載、其脫保護反應使用與製造方法 4 所述試藥或反應條件相同

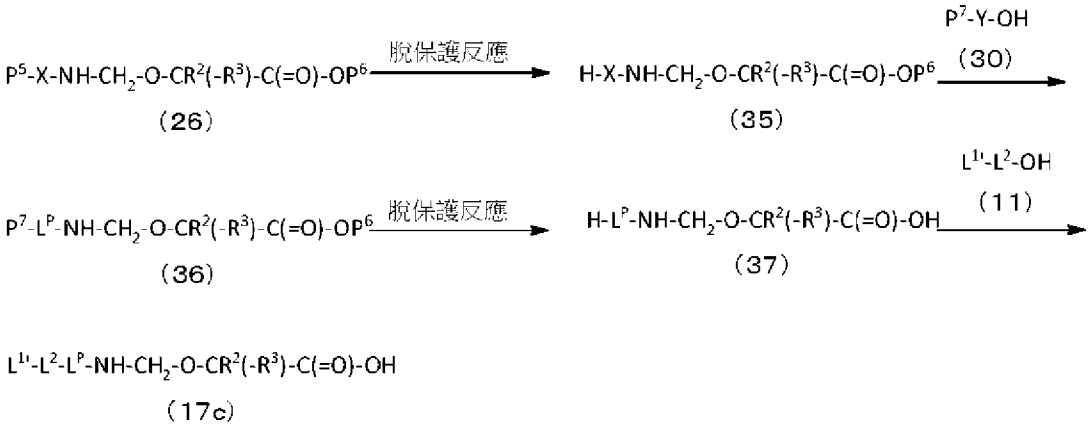
者即可。又，化合物(29)與羧酸(34)之反應，援用胜肽合成上通常使用的反應試藥或條件即可。上述方法所製造的化合物(2c)，可依據上述製造方法導向本發明化合物(1)。

【0186】

9.製造方法 9

以下，詳述製造方法 4 記載之製造中間體(17)中， $n^1=1$ 、 $L^a=O$ 、及 $L^b=CR^2(-R^3)$ 之化合物(17c)之製造方法。式(17c)所示的化合物、其鹽或彼等之溶媒合物亦可藉由例如下述之方法來製造。

【0187】



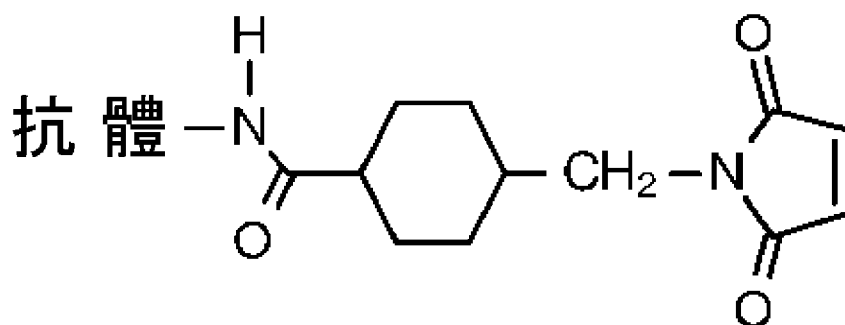
羧基之保護基及 P^7 例示的胺基之保護基而言，代表性者可舉例製造方法 4 中記載的羧基及胺基之保護基，但羧基之保護基 P^6 與胺基之保護基 P^7 係以相同方法或條件下可去除的保護基為所欲的。例如 P^6 為苯甲基酯基， P^7 為苯甲基氧基羰基的組合等可舉例作為代表。

化合物(37)可藉由去除化合物(36)之羧基之保護基 P^6 與胺基之保護基 P^7 而製造。藉由將羧基之保護基 P^6 與胺基之保護基 P^7 各自依序去除亦可製造化合物(37)，若 P^6 與 P^7 為以相同方法或條件下可去除的保護基，兩者可以一步驟去除而製造化合物(37)。

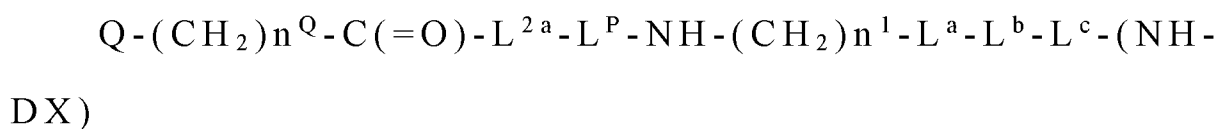
藉由使獲得的化合物(37)與化合物(11)反應而可製造化合物(17c)。化合物(37)與化合物(11)之反應，使用於製造方法 4 中所述試藥或反應條件相同者即可。

【0190】於本發明之抗體-藥物複合體之製造，作為有用的製造中間體，先說明下列式所示的化合物：

【0191】



【0192】但此外，下列式：



所示的一群組之化合物亦為本發明之抗體-藥物複合體之製造中成為有用的製造中間體的化合物。

即，於上述式，Q 為(順丁烯二醯亞胺-N-基)-、HS-、X-CH₂-C(=O)-NH-、或(吡咯啉-2,5-二酮-N-基)-O-C(=O)-，

X 為溴原子或碘原子，

n^Q 為整數 2 至 8，

L^{2a} 表示-NH-(CH₂-CH₂-O)^{n⁵}-CH₂-CH₂-C(=O)-、或單鍵，

其中，n⁵ 表示 1 至 6 之整數，

L^P 表示由 2 至 7 個胺基酸構成的胜肽殘基，

n¹ 表示 0 至 6 之整數，

L^a 表示-C(=O)-NH-、-NR¹-(CH₂)^{n⁷}-、-O-、或單鍵，

其中，n⁷ 表示 1 至 6 之整數，R¹ 表示氫原子、碳數 1 至 6 之烷基、-(CH₂)^{n⁸}-COOH、或-(CH₂)^{n⁹}-OH，但 n⁸ 表示 1 至 4 之整數，n⁹ 表示 1 至 6 之整數，

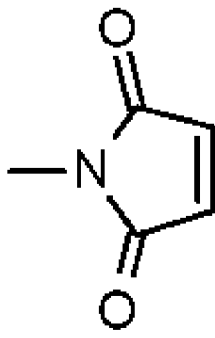
L^b 表示-CR²(-R³)-、-O-、-NR⁴-、或單鍵，

其中，R² 及 R³ 各自獨立表示氫原子、碳數 1 至 6 之烷基、-(CH₂)^{n^a}-NH₂、-(CH₂)^{n^b}-COOH、或-(CH₂)^{n^c}-OH，R⁴ 表示氫原子或碳數 1 至 6 之烷基，n^a 表示 0 至 6 之整數，n^b 表示 1 至 4 之整數，n^c 表示整數 1 至 4，但 n^a 為 0 時，R² 及 R³ 不成為相同，

L^c 表示-CH₂-或-C(=O)-，

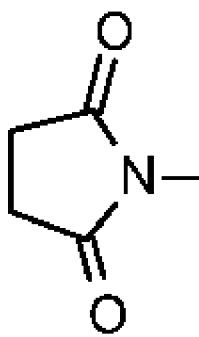
(順丁烯二醯亞胺-N-基)-係下列式所示的構造之基(氮原子為結合部位)

【0193】



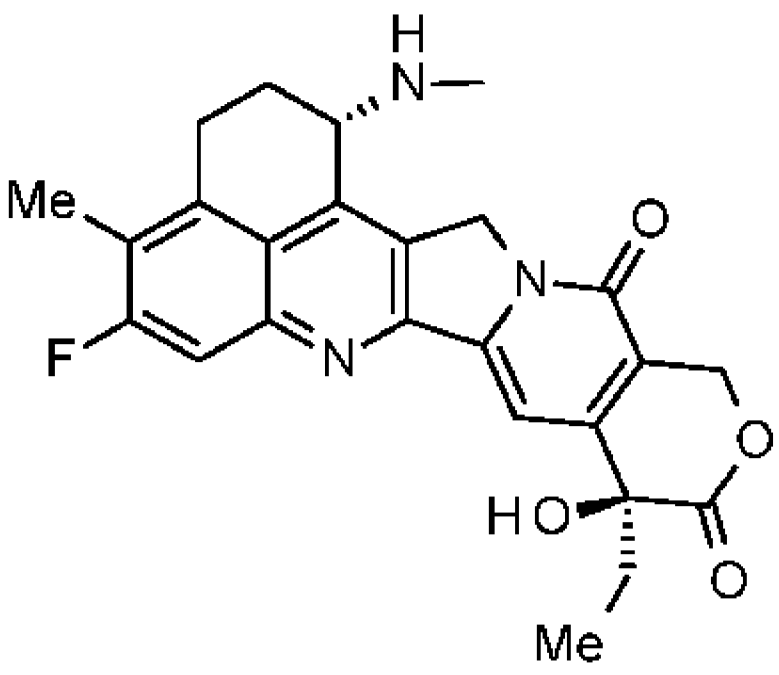
【0194】(吡咯啉-2,5-二酮-N-基)-係下列式所示的構造之基
(氮原子為結合部位)

【0195】



【0196】-(NH-DX)係下列式所示的構造之基

【0197】



【0198】(1 位之胺基之氮原子為結合部位)。

【0199】就製造中間體而言， L^c 係 $-C(=O)-$ 的化合物為較佳。

又，就 L^P 之胜肽殘基而言，選自苯丙胺酸、甘胺酸、纈胺酸、離胺酸、瓜胺酸、絲胺酸、麩胺酸、天冬胺酸的胺基酸而成的胺基酸殘基的化合物作為製造中間體為較佳。如此胜肽殘基中， L^P 係 4 個胺基酸所構成的胜肽殘基的化合物作為製造中間體為較佳。更具體而言， L^P 係 $-GGFG-$ 的化合物作為製造中間體為較佳。

再者，就 $-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-$ 而言， $-NH-CH_2CH_2-$ 、 $-NH-CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-NH-CH_2-O-CH_2-$ 、 $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$ 的化合物作為製造中間體為較佳，更佳為 $-NH-CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-NH-CH_2-O-CH_2-$ 、或 $-NH-(CH_2)_2-O-CH_2-C(=O)-$ 的化合物。

就 n^Q 而言，整數 2 至 6 的化合物作為製造中間體為較佳。

L^{2a} 係單鍵、 n^5 為整數 2 至 4 之化合物作為製造中間體為較佳。

【0200】又， Q 為(順丁烯二醯亞胺-N-基)-的情形， n^Q 為整數 2 至 5， L^{2a} 為單鍵， $-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-$ 為 $-NH-CH_2CH_2-$ 、 $-NH-CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-NH-CH_2-O-CH_2-$ 、或 $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$ 的化合物作為製造中間體為較佳。更佳為 $-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-$ 為 $-NH-CH_2CH_2-$ 、 $-NH-CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-NH-CH_2-O-CH_2-$ 、或 $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$ 的化合物。再者， n^Q 為整數 2 或 5 的化合物為較佳。

【0201】再者，Q 為(順丁烯二醯亞胺-N-基)-的情形， n^Q 為整數 2 至 5， L^{2a} 為 $-\text{NH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{n^5}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ ， n^5 為整數 2 至 4， $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n^1}-L^a-L^b-$ 為 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ 、或 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ 的化合物作為製造中間體為較佳。更佳為 n^5 為整數 2 或 4 之化合物。再者， $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n^1}-L^a-L^b-$ 為 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ 、或 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ 的化合物為較佳。

【0202】Q 為 HS-的情形， n^Q 為整數 2 至 5， L^{2a} 為單鍵， $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n^1}-L^a-L^b-$ 為 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ 、或 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ 的化合物作為製造中間體為較佳。更佳為 $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n^1}-L^a-L^b-$ 為 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ 、或 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ 的化合物。

【0203】Q 為 $\text{X}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ 的情形，就 X 而言，溴原子的化合物作為製造中間體為較佳的化合物。 n^Q 係整數 2 至 8 的化合物為較佳， L^{2a} 為單鍵化合物為較佳， $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n^1}-L^a-L^b-$ 係 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ 、或 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ 的化合物作為製造中間體為較佳。

【0204】Q 為(吡咯啉-2,5-二酮-N-基)- $\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$ 的情形， n^Q 為整數 2 至 5， L^{2a} 為單鍵， $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n^1}-L^a-L^b-$ 為 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ 、或 $-\text{NH}-$

CH₂CH₂-O-CH₂-的化合物作為製造中間體為較佳。更佳為-NH-(CH₂)ⁿ¹-L^a-L^b-係-NH-CH₂CH₂CH₂-、-NH-CH₂-O-CH₂-、或-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-的化合物。

【0205】更具體而言，以下化合物為製造中間體之較佳化合物。

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(順丁烯二醯亞胺-N-基)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

Br-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(吡咯啉-2,5-二酮-N-基)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

【0206】又，本發明之抗體-藥物複合體放置於大氣中、或經再結晶，有吸收水分、帶吸附水、成為水合物的情形，含如此水的化合物及鹽亦包含於本發明。

又，本發明亦包含以各種放射性或非放射性同位素標示的化合物。構成本發明之抗體-藥物複合體的原子之 1 個以上，亦可含有原子同位素之非天然比率。就原子同位素而言，例如，可舉例氘(²H)、氚(³H)、碘-125(¹²⁵I)或碳-14(¹⁴C)等。又，本發明化合物可以例如，氚(³H)、碘-125(¹²⁵I)或碳-14(¹⁴C)之類的放射性同位素被放射性標識。經放射性標識的化合物作為治療或預防劑、研究試藥、例如，分析試藥、及診斷劑，例如，活體內影像診斷劑為有用的。本發明之抗體-藥物複合體之全部的同位素變異體無論是否為放射性，皆包含於本發明之範圍。

【0207】

<醫藥>

因本發明之抗體-藥物複合體對癌細胞顯示細胞傷害活性，故可使用作為醫藥，尤其是作為對癌症的治療劑及/或預防劑。

【0208】就本發明之抗體-藥物複合體適用的癌症種類而言，可舉例肺癌、腎癌、尿路上皮癌、大腸癌、前列腺癌、多形神經膠母細胞瘤、卵巢癌、胰癌、乳癌、黑色素瘤、肝癌、膀胱癌、胃癌、食道癌等，但關於成為治療對象的癌細胞，只要表現抗體-藥物複合體中之抗體可辨識的蛋白質的癌細胞即可，並未限定於此等。

【0209】本發明之抗體-藥物複合體可適合投與哺乳動物，但較佳為人類。

【0210】就於含本發明之抗體-藥物複合體的醫藥組成物中使用的物質而言，於投與量或投與濃度，可由此領域通常使用的製劑添加物之外適宜選擇而適用。

【0211】本發明之抗體-藥物複合體係可呈含有 1 種以上之藥學上適合性的成分的藥學的組成物而被投與。例如，上述藥學組成物含有，代表性地，為 1 種以上之藥學載劑(例如，包含滅菌液體(例如，水及油(石油、動物、植物、或合成起源的油(例如，花生油、大豆油、礦物油、胡麻油等)))。水係於上述藥學的組成物為靜脈內投與的情形中較為代表性的載劑。又食鹽水溶液、以及右旋糖水溶液及甘油水溶液，亦可使用作為液體載劑，尤其使用於注射用溶液。適當的藥學的賦形劑係於本項領域中周知。又上述組成物，只要是期望的，可含有微量濕潤劑或乳化劑、或 pH 緩衝化劑。適當的藥學的載劑之例記載於 E.W.Martin 之「Remington's Pharmaceutical Sciences」。其處方係對應投與之態樣。

【0212】各種送達系統為周知，可使用於投與本發明之抗體-藥物複合體。就導入方法而言，可舉例皮內、肌肉內、腹腔內、靜脈內、及皮下的路徑，但未限定於此等。投與係可經由例如，注入或團式(bolus)注射。於特定之較佳實施形態，上述連結物藥物結合體之投與係經注入者。非經口的投與為較佳投與路徑。

【0213】關於代表的實施形態，上述藥學的組成物作為對人類之靜脈內投與適合的藥學的組成物，可依據慣用的順序而被調配。代表性地，靜脈內投與用之組成物係滅菌之等張性之水性緩衝液中的溶液。必要的情形，上述醫藥亦可含有可溶化劑及緩和注射部位的疼痛的局部麻醉劑(例如，利多卡因(lignocaine))。一般而言，上述成分係呈下列任一者被供給，例如，密封呈現活性劑的量的安瓿或小袋等之封存的容器中之乾燥冷凍乾燥粉末或呈無水之濃縮物，各別地，或於單位劑型中一起混合。預定上述醫藥經注入而被投與的情形，其可例如，以含滅菌之製藥等級的水或食鹽水的注入瓶被投藥。上述醫藥經注射而被投與的情形，注射用滅菌水或食鹽水之安瓿，例如，上述成分可於投與前被混合而被提供。

【0214】本發明之醫藥組成物可為僅含本案之抗體-藥物複合體的醫藥組成物，亦可為含有抗體-藥物複合體及至少一個此以外之癌治療劑的醫藥組成物。本發明之抗體-藥物複合體亦可與其他癌治療劑共同投與，藉此可使抗癌效果增強。如此目的下使用的其他抗癌劑，可與抗體-藥物複合體同時、各別、或者連續投與個體，亦可變換各自之投與間隔而投與。就如此癌治療

劑而言，可舉例阿布拉庫(abraxane)、卡鉑(carboplatin)、順鉑(cisplatin)、吉西他濱(gemcitabine)、愛萊諾迪(irinotecan)(CPT-11)、太平洋紫杉醇(paclitaxel)、培美曲塞(pemetrexed)、索拉非尼(sorafenib)、長春鹼(vinblastin)或國際公開第 WO2003/038043 號小冊記載之藥劑，又 LH-RH 同族體(亮丙瑞林(leuporelin)、戈舍瑞林(goserelin)等)、磷酸雌莫司汀(estramustine phosphate)、雌激素拮抗藥(它莫西芬(tamoxifen)、雷洛西芬(raloxifene)等)、芳香酶(aromatase)阻礙劑(阿那曲唑(anastrozole)、來曲唑(letrozole)、依西美坦(exemestane)等)等，但只要具有抗腫瘤活性的藥劑即可，並未限定。

【0215】如此醫藥組成物係呈具有選擇的組成及必要的純度的製劑，可呈冷凍乾燥製劑或者液狀製劑加以製劑化。作為冷凍乾燥製劑而製劑化之際，可為含有於此領域使用的適當製劑添加物的製劑。又於液劑亦同樣地，可呈含有此領域使用的各種製劑添加物的液狀製劑而加以製劑化。

【0216】醫藥組成物之組成及濃度亦依投與方法而變化，本發明之醫藥組成物所含的抗體-藥物複合體於抗體-藥物複合體之對抗原地親和性，即，於對抗原之解離常數(K_d 值)的點，親和性越高(K_d 值低)，即使少量之投與量亦可發揮藥效。據此，於抗體-藥物複合體之投與量的決定，亦可基於抗體-藥物複合體與抗原之親和性的狀況而設定投與量。本發明之抗體-藥物複合體對人類投與之際，例如，可將約 0.001~100mg/kg 以 1 次投與或者於 1~180 日之間隔投與複數次。

[實施例]

【0217】藉由以下所示實施例以具體說明本發明，但本發明並未限定於此等。又，此等並未於任何意義下被限定解釋。又，於本說明書，未特別記載的試藥、溶媒及起始材料可由市售供給源而容易取得。

【0218】

參考例 1 M30-H1-L4 抗體

抗 B7-H3 抗體之人類化抗體中，藉由周知方法製造序列識別號 9 之胺基酸編號 20 至 471 記載之胺基酸序列而成的重鏈及序列識別號 16 之胺基酸編號 21 至 233 記載之胺基酸序列而成的輕鏈而成的抗體，獲得的人類化抗 B7-H3 抗體為 M30-H1-L4 抗體(或僅記載為「M30-H1-L4」)。

【0219】

參考例 2 M30-H1-L4P 抗體

結合上述獲得的 M30-H1-L4 抗體的糖鍵修飾係藉由周知方法加以脫岩藻醣化來調節，獲得的糖鍵修飾被調節的抗體為 M30-H1-L4P 抗體(或僅記載為「M30-H1-L4P」)。

【0220】

參考例 3 抗 CD30 抗體

抗 CD30 抗體係參照日本特表 2005-506035 來製作。其序列示於序列識別號 27、28。

【0221】

參考例 4 抗 CD33 抗體

抗 CD33 抗體係參照日本特開平 8-48637 號來製作。其序列示於序列識別號 29、30。

【0222】

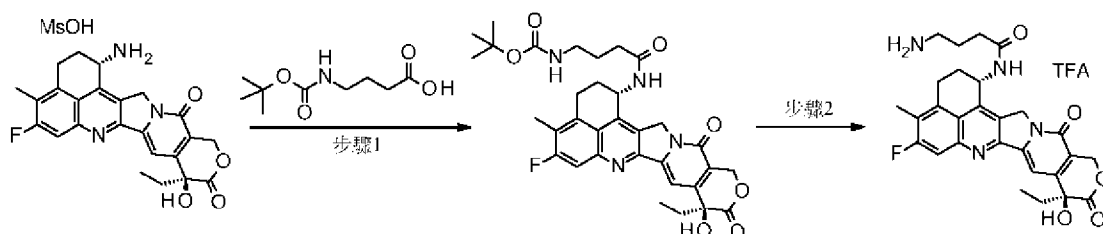
參考例 5 抗 CD70 抗體

抗 CD70 抗體係參照日本特表 2008-538292 來製作。其序列示於序列識別號 31、32。

【0223】

實施例 1 4-胺基-N-[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基]丁醯胺

【0224】



【0225】步驟 1：tert-丁基(4-{[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-4-側氧基丁基)胺基甲酸酯

將 4-(tert-丁氧基羰基胺基)丁酸(0.237g、1.13mmol)溶解於二氯甲烷(10mL)，添加 N-羥基琥珀醯亞胺(0.130g、1.13mmol)及 1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳化二亞胺鹽酸鹽(0.216g、1.13mmol)並攪拌 1 小時。將其反應溶液滴加到添加化合物(4)之甲磺酸鹽(0.500g、0.94mmol)及三乙基胺(0.157mL、1.13mmol)的 N,N-二甲基甲醯胺溶液(10mL)，於室溫攪拌一日。減壓餾除溶媒，獲得的殘留物以矽膠管柱層析[氯仿～氯仿：甲醇=8：2(v/v)]純化，獲得標題化合物(0.595g、定量)。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ : 0.87(3H, t, $J=7.2\text{Hz}$), 1.31(9H, s), 1.58(1H, t, $J=7.2\text{Hz}$), 1.66(2H, t, $J=7.2\text{Hz}$), 1.82-1.89(2H, m), 2.12-2.21(3H, m), 2.39(3H, s), 2.92(2H, t, $J=6.5\text{Hz}$), 3.17(2H, s), 5.16(1H, d, $J=18.8\text{Hz}$), 5.24(1H, d, $J=18.8\text{Hz}$), 5.42(2H, s), 5.59-5.55(1H, m), 6.53(1H, s), 6.78(1H, t, $J=6.3\text{Hz}$), 7.30(1H, s), 7.79(1H, d, $J=11.0\text{Hz}$), 8.40(1H, d, $J=8.6\text{Hz}$).

MS(APCI) m/z : 621($M+H$) $^+$

【0226】步驟 2: 4-胺基-N-[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-1-基]丁醯胺

將上述步驟 1 獲得的化合物(0.388g、0.61mmol)溶解於二氯甲烷(9mL)。添加三氟乙酸(9mL)並攪拌 4 小時。減壓餾除溶媒，獲得的殘留物以矽膠管柱層析[氯仿~氯仿: 甲醇: 水=7:3:1(v/v/v)之分配有機層]純化，獲得標題化合物之三氟乙酸鹽(0.343g、定量)。將抗體-藥物複合體(13)、(14)投與坦癌小鼠之際，此化合物於腫瘤中被確認。

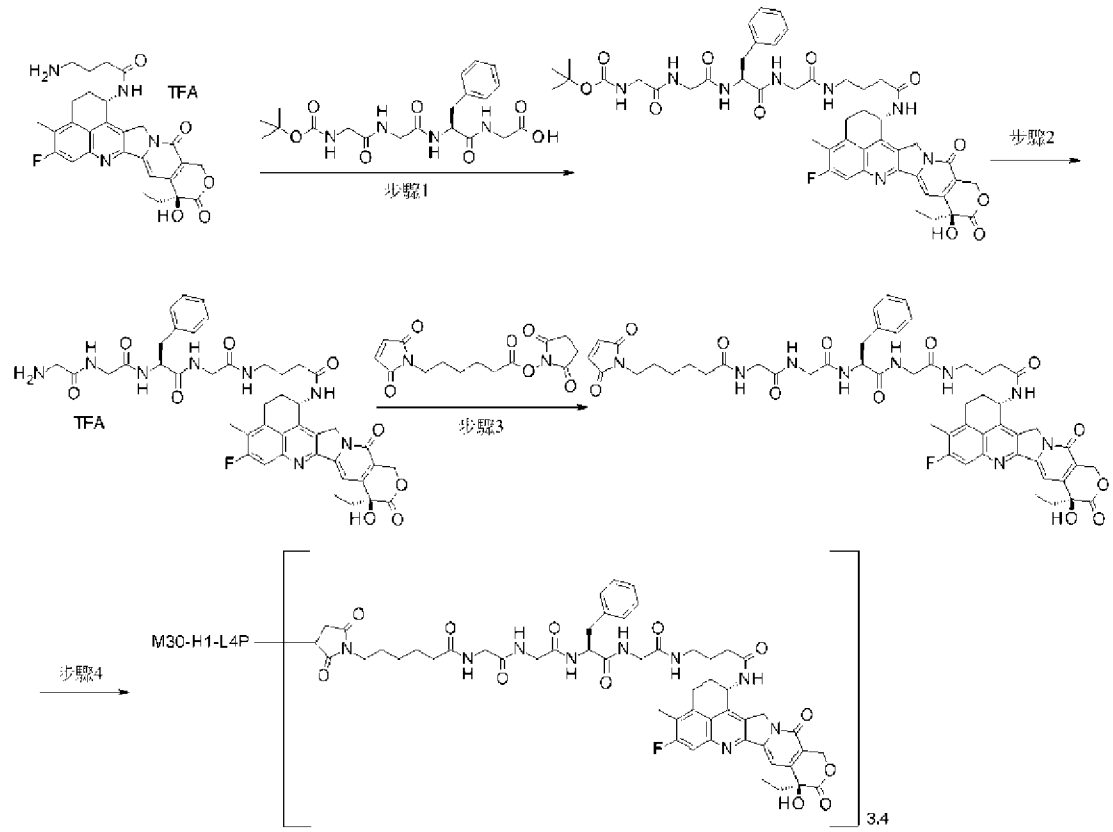
$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ : 0.87(3H, t, $J=7.2\text{Hz}$), 1.79-1.92(4H, m), 2.10-2.17(2H, m), 2.27(2H, t, $J=7.0\text{Hz}$), 2.40(3H, s), 2.80-2.86(2H, m), 3.15-3.20(2H, m), 5.15(1H, d, $J=18.8\text{Hz}$), 5.26(1H, d, $J=18.8\text{Hz}$), 5.42(2H, s), 5.54-5.61(1H, m), 6.55(1H, s), 7.32(1H, s), 7.72(3H, brs), 7.82(1H, d, $J=11.0\text{Hz}$), 8.54(1H, d, $J=8.6\text{Hz}$).

MS(APCI) m/z : 521($M+H$) $^+$

【0227】

實施例 2 抗體-藥物複合體(1)

【0228】



【0229】步驟 1：N-(tert-丁氧基羰基)甘胺醯基甘胺醯基-L-苯基丙胺醯基-N-(4-{[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-4-側氧基丁基)甘胺酸醯胺

將 N-(tert-丁氧基羰基)甘胺醯基甘胺醯基-L-苯基丙胺醯基甘胺酸(0.081g、0.19mmol)溶解於二氯甲烷(3mL)，添加 N-羥基琥珀醯亞胺(0.021g、0.19mmol)及 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳化二亞胺鹽酸鹽(0.036g、0.19mmol)，並攪拌 3.5 小時。將此反應溶液滴加至添加實施例 1 之化合物

(0.080 g、0.15 mmol)的 N,N-二甲基甲醯胺溶液(1.5 mL)，於室溫攪拌 4 小時。減壓餾除溶媒，獲得的殘留物以矽膠管柱層析[氯仿～氯仿：甲醇=8：2(v/v)]純化，獲得標題化合物(0.106 g、73%)。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 0.87(3H, t, $J=7.4$ Hz), 1.36(9H, s), 1.71(2H, m), 1.86(2H, t, $J=7.8$ Hz), 2.15-2.19(4H, m), 2.40(3H, s), 2.77(1H, dd, $J=12.7$, 8.8 Hz), 3.02(1H, dd, $J=14.1$, 4.7 Hz), 3.08-3.11(2H, m), 3.16-3.19(2H, m), 3.54(2H, d, $J=5.9$ Hz), 3.57-3.77(4H, m), 4.46-4.48(1H, m), 5.16(1H, d, $J=19.2$ Hz), 5.25(1H, d, $J=18.8$ Hz), 5.42(2H, s), 5.55-5.60(1H, m), 6.53(1H, s), 7.00(1H, t, $J=6.3$ Hz), 7.17-7.26(5H, m), 7.31(1H, s), 7.71(1H, t, $J=5.7$ Hz), 7.80(1H, d, $J=11.0$ Hz), 7.92(1H, t, $J=5.7$ Hz), 8.15(1H, d, $J=8.2$ Hz), 8.27(1H, t, $J=5.5$ Hz), 8.46(1H, d, $J=8.2$ Hz).

MS(APCI) m/z : 939($M+H$) $^+$

【0230】步驟 2：甘胺醯基甘胺醯基-L-苯基丙胺醯基-N-(4-[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基)-4-側氧基丁基)甘胺酸醯胺三氟乙酸鹽

將上述步驟 1 獲得的化合物(1.97 g、2.10 mmol)溶解於二氯甲烷(7 mL)。添加三氟乙酸(7 mL)並攪拌 1 小時。減壓餾除溶媒，添加甲苯而使共沸，獲得的殘留物以矽膠管柱層析[氯仿～氯仿：甲醇：水=7：3：1(v/v/v)之分配有機層]純化，獲得標題化合物(1.97 g、99%)。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ : 0.87(3H, t, $J=7.4\text{Hz}$), 1.71-1.73(2H, m), 1.82-1.90(2H, m), 2.12-2.20(4H, m), 2.40(3H, s), 2.75(1H, dd, $J=13.7, 9.4\text{Hz}$), 3.03-3.09(3H, m), 3.18-3.19(2H, m), 3.58-3.60(2H, m), 3.64(1H, d, $J=5.9\text{Hz}$), 3.69(1H, d, $J=5.9\text{Hz}$), 3.72(1H, d, $J=5.5\text{Hz}$), 3.87(1H, dd, $J=16.8, 5.9\text{Hz}$), 4.50-4.56(1H, m), 5.16(1H, d, $J=19.2\text{Hz}$), 5.25(1H, d, $J=18.8\text{Hz}$), 5.42(2H, s), 5.55-5.60(1H, m), 7.17-7.27(5H, m), 7.32(1H, s), 7.78-7.81(2H, m), 7.95-7.97(3H, m), 8.33-8.35(2H, m), 8.48-8.51(2H, m).

MS(APCI) m/z : 839($M+H$) $^+$

【0231】步驟 3: N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]甘胺醯基甘胺醯基-L-苯基丙胺醯基-N-(4-[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]呔啉并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基)-4-側氧基丁基)甘胺酸醯胺

於上述步驟 2 獲得的化合物(337mg, 0.353mmol)之 N,N-二甲基甲醯胺(1.2mL)溶液中, 添加三乙基胺(44.3mL, 0.318mmol)、6-順丁烯二醯亞胺己酸 N-琥珀醯亞胺基酯(119.7mg, 0.388mmol), 並於室溫攪拌 1 小時。減壓餾除溶媒, 獲得的殘留物以矽膠管柱層析[氯仿~氯仿: 甲醇=5: 1(v/v)]純化, 獲得呈淡黃色固體之標題化合物(278.0mg, 76%)。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ : 0.87(3H, t, $J=7.3\text{Hz}$), 1.12-1.22(2H, m), 1.40-1.51(4H, m), 1.66-1.76(2H,

m), 1.80-1.91(2H, m), 2.05-2.21(6H, m), 2.39(3H, s), 2.79(1H, dd, $J=14.0, 9.8\text{Hz}$), 2.98-3.21(5H, m), 3.55-3.77(8H, m), 4.41-4.48(1H, m), 5.15(1H, d, $J=18.9\text{Hz}$), 5.24(1H, d, $J=18.9\text{Hz}$), 5.40(1H, d, $J=17.1\text{Hz}$), 5.44(1H, d, $J=17.1\text{Hz}$), 5.54-5.60(1H, m), 6.53(1H, s), 6.99(2H, s), 7.20-7.27(5H, m), 7.30(1H, s), 7.70(1H, t, $J=5.5\text{Hz}$), 7.80(1H, d, $J=11.0\text{Hz}$), 8.03(1H, t, $J=5.8\text{Hz}$), 8.08(1H, t, $J=5.5\text{Hz}$), 8.14(1H, d, $J=7.9\text{Hz}$), 8.25(1H, t, $J=6.1\text{Hz}$), 8.46(1H, d, $J=8.5\text{Hz}$).

MS(APCI)m/z: 1032(M+H)⁺

【0232】步驟 4：抗體-藥物複合體(1)

抗體之還原：將參考例 2 製作的 M30-H1-L4P 抗體，使用製造方法 1 記載的共通操作 C-1 及 B(使用 $1.61\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 作為 280nm 吸光係數)，媒體取代為 PBS6.0/EDTA，調製為 10mg/mL 之抗體濃度。將本溶液(1.25mL)置入 1.5mL 聚丙烯製試管，於其中添加 10mM TCEP(東京化成工業股份有限公司)水溶液(0.025mL ；相對於抗體一分子為 3.0 當量)及 1M 磷酸氫二鉀水溶液(Nacalai Tesque, Inc.; 0.0625mL)。確認本溶液之 pH 為 7.4 ± 0.1 內後，於 37°C 培育 1 小時下，使抗體內銹鏈部之雙硫鍵還原。

抗體與藥物連結物之結合：室溫下於上述溶液中添加含二甲基亞砷(Sigma-Aldrich Co.LLC; 0.109mL)及上述步驟 3 獲得的化合物 10mM 的二甲基亞砷溶液(0.039mL ；相對於抗體一分子為 4.6 當量)，使用試管迴轉器(MTR-103, AS ONE 股份有限公司)而於室溫下攪拌 40 分鐘，使藥物連結物對抗體結合。

其次，添加 100mM NAC(Sigma-Aldrich Co.LLC)水溶液 (0.008mL)，再於室溫下攪拌 20 分鐘，使藥物連結物的反應停止。

純化：上述溶液，進行使用製造方法 1 記載的共通操作 D-1(使用 ABS 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 6mL 後，使用共通操作 A，而濃縮溶液。

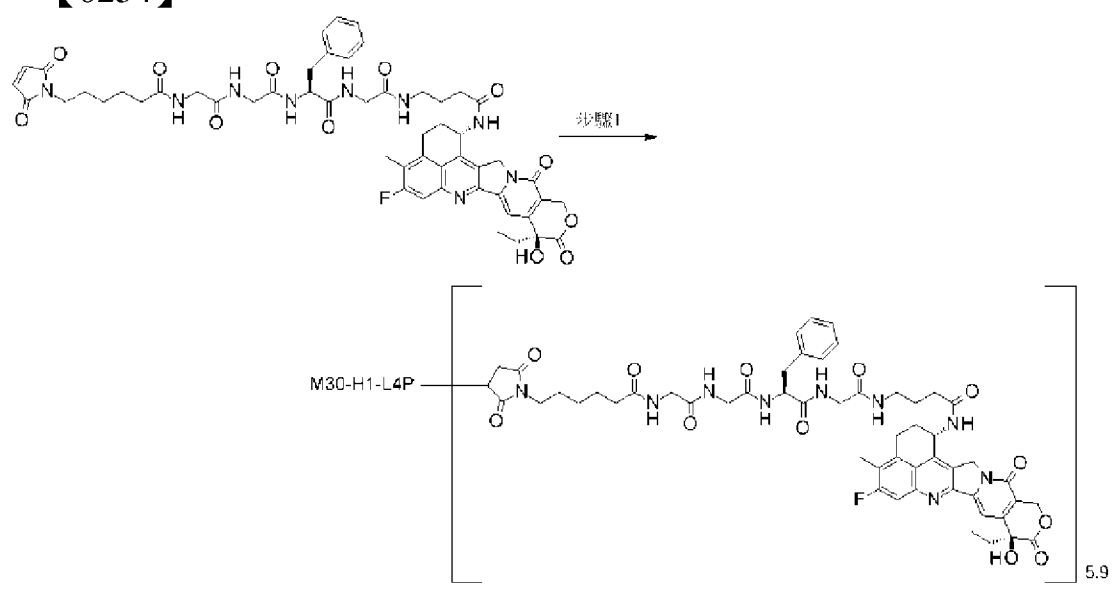
特性評價：使用製造方法 1 記載的共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\epsilon_{A,280}=235300$ (計算推定值)・ $\epsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)・ $\epsilon_{D,280}=5000$ (實測平均值)・ $\epsilon_{D,370}=19000$ (實測平均值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：13.02mg/mL，抗體產量：9.1mg(73%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：3.4

【0233】

實施例 3 抗體-藥物複合體(2)

【0234】



【0235】步驟 1：抗體-藥物複合體(2)

抗體之還原：參考例 2 製作的 M30-H1-L4P 抗體，使用製造方法 1 記載的共通操作 B(使用 $1.61\text{ mL mg}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ 作為 280 nm 吸光係數)及 C-1，於 PBS6.0/EDTA 調製為 10 mg/mL 。於 15 mL 試管中採取本溶液(4.0 mL)，添加 10 mM TCEP(東京化成工業股份有限公司)水溶液(0.118 mL ；相對於抗體一分子為 4.6 當量)及 1 M 磷酸氫二鉀水溶液(Nacalai Tesque, Inc.; 0.200 mL)。確認本溶液之 pH 為 7.4 ± 0.1 內後，藉由於 37°C 培育 1 小時，使抗體內鉸鏈部之雙硫鍵還原。

抗體與藥物連結物之結合：上述溶液於 22°C 培育 10 分鐘後，添加含實施例 2 之步驟 3 獲得的化合物 10 mM 的二甲基亞砷溶液(0.236 mL ；相對於抗體一分子為 9.2 當量)，於 22°C 培育 40 分鐘，使藥物連結物對抗體結合。其次，添加 100 mM NAC(Sigma-Aldrich Co.LLC)水溶液(0.00471 mL)，再於 22°C 培育 20 分鐘，使藥物連結物的反應停止。

純化：上述溶液，進行使用製造方法 1 記載的共通操作 D-1(使用 ABS 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 17.5 mL 。

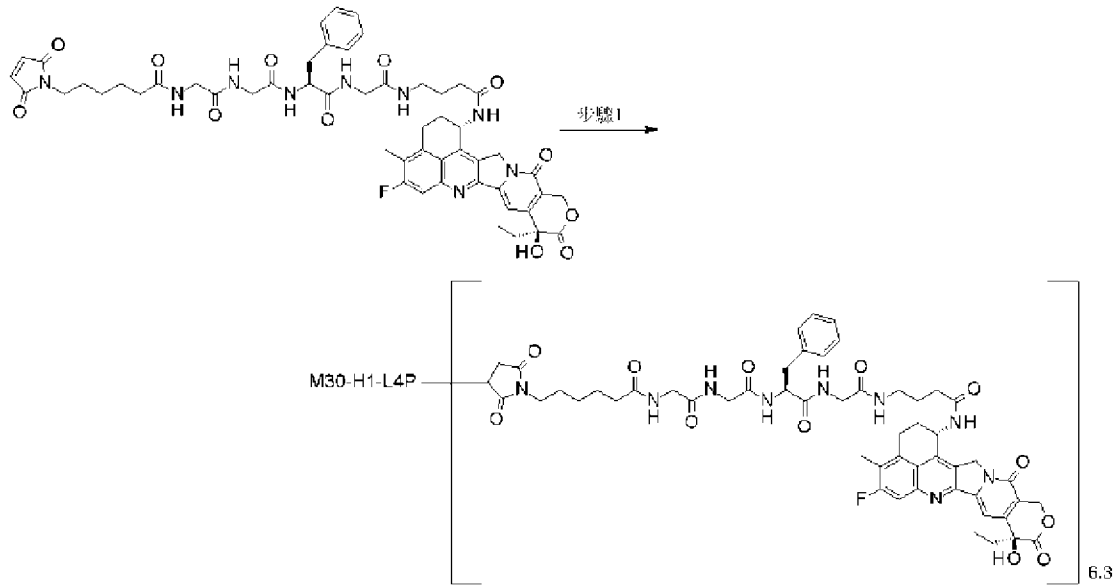
特性評價：使用製造方法 1 記載的共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\varepsilon_{A,280}=235300$ (計算推定值)、 $\varepsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)、 $\varepsilon_{D,280}=5000$ (實測平均值)、 $\varepsilon_{D,370}=19000$ (實測平均值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度： 1.80 mg/mL ，抗體產量： 26.1 mg (65%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：5.9

【0236】

實施例 4 抗體-藥物複合體(3)

【0237】



【0238】 步驟 1：抗體-藥物複合體(3)

抗體之還原：將參考例 2 製作的 M30-H1-L4P 抗體，使用製造方法 1 記載的共通操作 C-1 及 B(使用 $1.61\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 作為 280nm 吸光係數)，將媒體取代為 PBS6.0/EDTA，調製為 10mg/mL 之抗體濃度。將本溶液(1.25mL)置入 1.5mL 聚丙烯製試管中，於其中添加 10mM TCEP(東京化成工業股份有限公司)水溶液 0.051mL (相對於抗體一分子為 6.0 當量)及 1M 磷酸氫二鉀水溶液(Nacalai Tesque, Inc.; 0.0625mL)。確認本溶液之 pH 為 7.4 ± 0.1 內後，於 37°C 培育 1 小時下，使抗體內銕鏈部之雙硫鍵還原。

抗體與藥物連結物之結合：對上述溶液，於室溫下添加含二甲基亞砷(Sigma-Aldrich Co.LLC; 0.067mL)及實施例 2 之步驟 3 獲得的化合物 10mM 的二甲基亞砷溶液(0.085mL ; 相對於抗體一分子為 10.0 當量)，並使用試管迴轉器(MTR-103, AS ONE 股份有限公司)而於室溫下攪拌 60 分鐘，使藥物連結物對抗體結合。其次，添加 100mM NAC(Sigma-Aldrich

Co.LLC)水溶液(0.013mL)，再於室溫下攪拌 20 分鐘，使藥物連結物的反應停止。

純化：上述溶液，進行使用製造方法 1 記載的共通操作 D-1(使用 ABS 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 6mL。

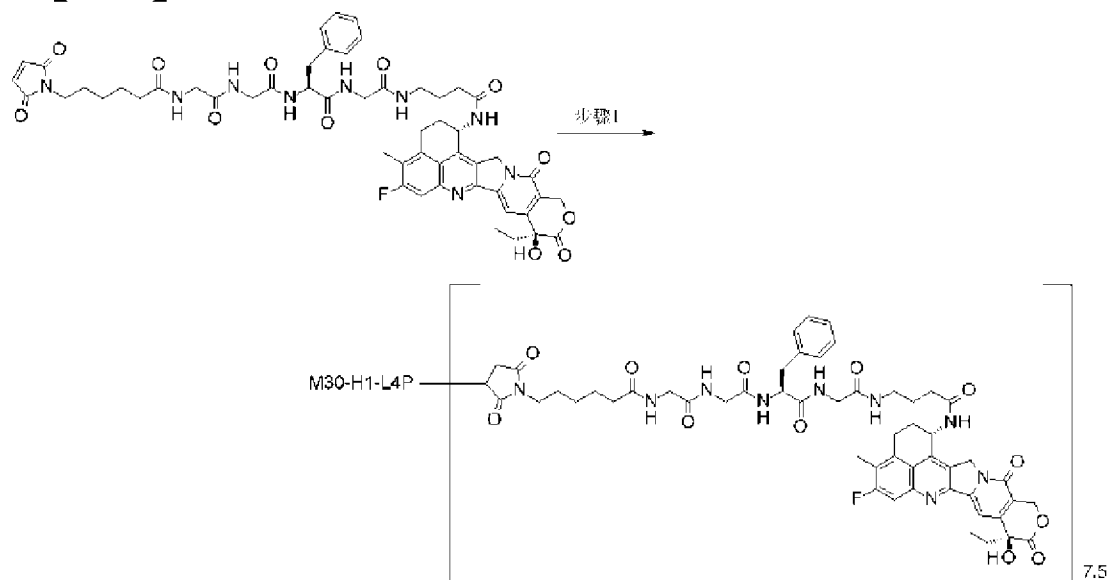
特性評價：使用製造方法 1 記載的共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\epsilon_{A,280}=235300$ (計算推定值)、 $\epsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)、 $\epsilon_{D,280}=5000$ (實測平均值)、 $\epsilon_{D,370}=19000$ (實測平均值))，而獲得下述之特性值。

抗體濃度：1.67mg/mL，抗體產量：10.02mg(80%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：6.3

【0239】

實施例 5 抗體-藥物複合體(4)

【0240】



【0241】步驟 1：抗體-藥物複合體(4)

抗體之還原：將參考例 2 製作的 M30-H1-L4P 抗體，使用製造方法 1 記載的共通操作 C-1 及 B(使用 $1.61\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 作

為 280nm 吸光係數)，將媒體取代為 PBS6.0/EDTA，調製為 10mg/mL 之抗體濃度。將本溶液(1.25mL)置入 1.5mL 聚丙烯製試管中，於其中添加 10mM TCEP(東京化成工業股份有限公司)水溶液(0.051mL；相對於抗體一分子為 6.0 當量)及 1M 磷酸氫二鉀水溶液(Nacalai Tesque, Inc.; 0.0625mL)。確認本溶液之 pH 為 7.4 ± 0.1 內後，於 37°C 培育 1 小時下，使抗體內銹鏈部之雙硫鍵還原。

抗體與藥物連結物之結合：對上述溶液，室溫下添加含二甲基亞砷(Sigma-Aldrich Co.LLC; 0.025mL)與實施例 2 之步驟 3 獲得的化合物 10mM 的二甲基亞砷溶液(0.127mL；相對於抗體一分子為 15.0 當量)，使用試管迴轉器(MTR-103, AS ONE 股份有限公司)，於室溫下攪拌 60 分鐘，使藥物連結物對抗體結合。其次，添加 100mM NAC(Sigma-Aldrich Co.LLC)水溶液(0.019mL)，再於室溫下攪拌 20 分鐘，使藥物連結物的反應停止。

純化：上述溶液，進行使用製造方法 1 記載的共通操作 D-1(使用 ABS 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 6mL 後，使用共通操作 A，而濃縮溶液。

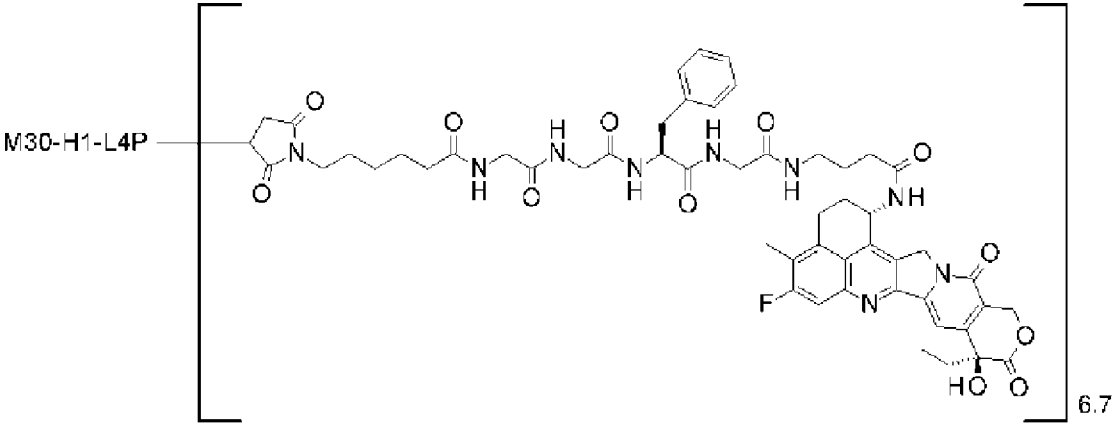
特性評價：使用製造方法 1 記載的共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\epsilon_{A,280}=235300$ (計算推定值)、 $\epsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)、 $\epsilon_{D,280}=5000$ (實測平均值)、 $\epsilon_{D,370}=19000$ (實測平均值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：1.19mg/mL，抗體產量：7.14mg(57%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：7.5

【0242】

實施例 6 抗體-藥物複合體(5)

【0243】



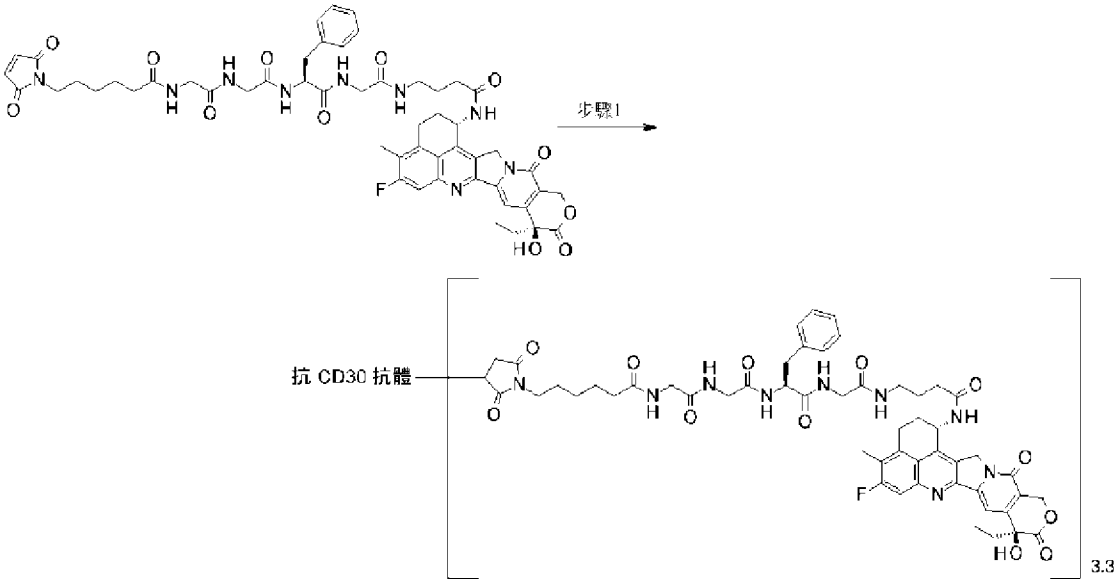
【0244】將約略全量的實施例 4 與實施例 5 之抗體-藥物複合體混合，使用共通操作 A 而濃縮溶液，獲得標題抗體-藥物複合體。

抗體濃度：10.0mg/mL，抗體產量：15.37mg，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：6.7

【0245】

實施例 7 抗體-藥物複合體(6)

【0246】



【0247】步驟 1：抗體-藥物複合體(6)

抗體之還原：將參考例 3 製作的抗 CD30 抗體，使用製造方法 1 記載的共通操作 B(使用 1.75 作為 280nm 吸光係數)及 C-1，以 PBS6.0/EDTA 調製 10mg/mL。於 2mL 試管中採取本溶液(1.0mL)，添加 10mM TCEP(東京化成工業股份有限公司)水溶液 0.0297mL(相對於抗體一分子為 4.6 當量)及 1M 磷酸氫二鉀水溶液(Nacalai Tesque, Inc.; 0.050mL)。確認本溶液之 pH 為 7.4 ± 0.1 內後，藉由於 37°C 培育 1 小時，使抗體內銹鏈部之雙硫鍵還原。

抗體與藥物連結物之結合：上述溶液於 22°C 培育 10 分鐘後，添加實施例 2 之步驟 3 獲得的化合物 10mM 二甲基亞砷溶液(0.0593mL；相對於抗體一分子為 9.2 當量)，並於 22°C 培育 40 分鐘，使藥物連結物對抗體結合。其次，添加 100mM NAC(Sigma-Aldrich Co.LLC)水溶液(0.0119mL；相對於抗體一分子為 18.4 當量)，再於 22°C 培育 20 分鐘，使藥物連結物的反應停止。

純化：上述溶液，進行使用製造方法 1 記載的共通操作 D-1(使用 ABS 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 6mL。

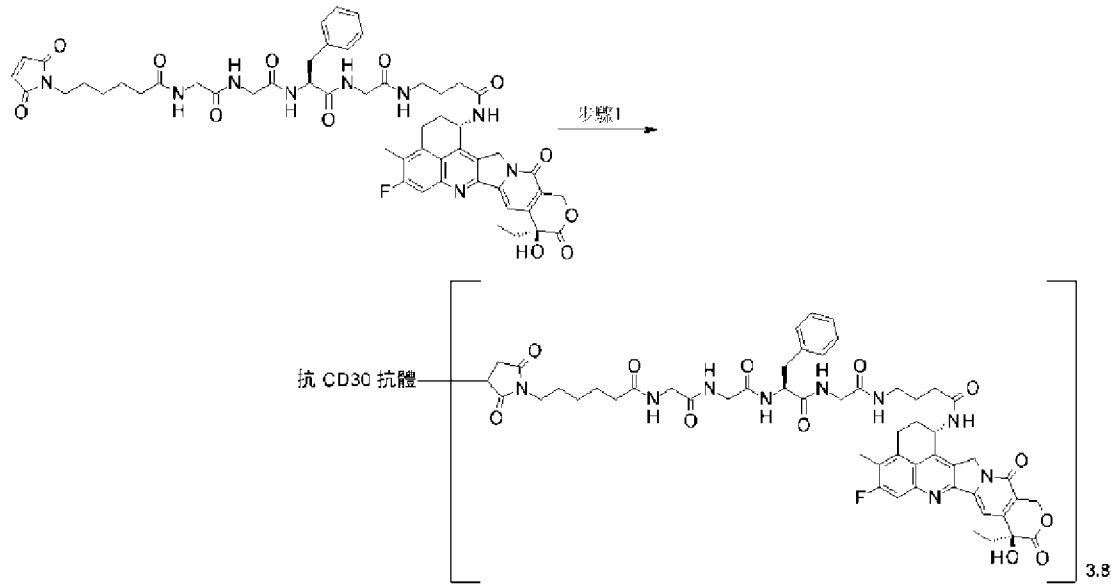
特性評價：使用製造方法 1 記載的共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\epsilon_{A,280}=270400$ (計算推定值)、 $\epsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)、 $\epsilon_{D,280}=5000$ (實測平均值)、 $\epsilon_{D,370}=19000$ (實測平均值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：0.99mg/mL，抗體產量：5.94mg(59%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：3.3

【0248】

實施例 8 抗體-藥物複合體(7)

【0249】



【0250】步驟 1：抗體-藥物複合體(7)

抗體之還原：參考例 3 製作的抗 CD30 抗體，使用製造方法 1 記載的共通操作 B(使用 1.75 作為吸光係數)及 C-1，以 PBS6.0/EDTA 調製 10mg/mL。於 2mL 試管中採取本溶液(1.0mL)，添加 30mM TCEP(東京化成工業股份有限公司)水溶液(0.0148mL；相對於抗體一分子為 6.9 當量)及 1M 磷酸氫二鉀水溶液(Nacalai Tesque, Inc.; 0.050mL)。確認本溶液之 pH 為 7.4±0.1 內後，藉由於 37℃培育 1 小時，使抗體內鉸鏈部之雙硫鍵還原。

抗體與藥物連結物之結合：上述溶液於 22℃培育 10 分鐘後，添加實施例 2 之步驟 3 獲得的化合物 30mM 二甲基亞砷溶液(0.0297mL；相對於抗體一分子為 13.8 當量)，並於 22℃培育 40 分鐘，使藥物連結物對抗體結合。其次，添加 100mM NAC(Sigma-Aldrich Co.LLC)水溶液(0.0178mL；相對於抗

體一分子為 27.6 當量)，再於 22℃ 培育 20 分鐘，使藥物連結物的反應停止。

純化：上述溶液，進行使用製造方法 1 記載的共通操作 D-1(使用 ABS 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 6mL。

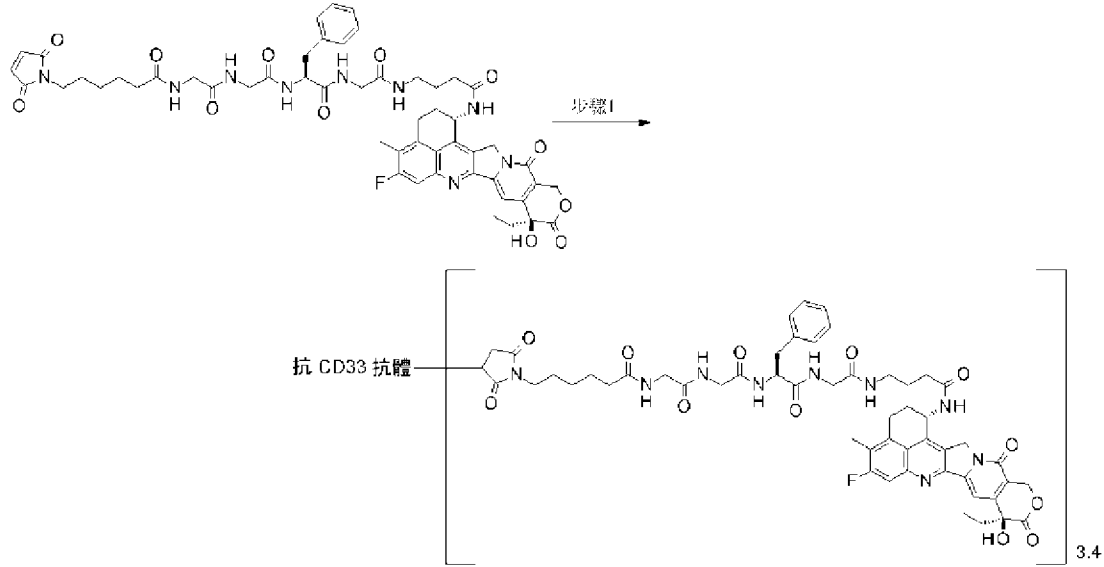
特性評價：使用製造方法 1 記載的共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\epsilon_{A,280}=270400$ (計算推定值)、 $\epsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)、 $\epsilon_{D,280}=5000$ (實測平均值)、 $\epsilon_{D,370}=19000$ (實測平均值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：0.99mg/mL，抗體產量：5.94mg(59%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：3.8

【0251】

實施例 9 抗體-藥物複合體(8)

【0252】



【0253】步驟 1：抗體-藥物複合體(8)

抗體之還原：將參考例 4 製作的抗 CD33 抗體，使用製造方法 1 記載的共通操作 B(使用 1.66 作為 280nm 吸光係數，)及

C-1，以 PBS6.0/EDTA 調製 10mg/mL。於 2mL 試管中採取本溶液(1.0mL)，添加 10mM TCEP(東京化成工業股份有限公司)水溶液(0.0297mL；相對於抗體一分子為 4.6 當量)及 1M 磷酸氫二鉀水溶液(Nacalai Tesque, Inc.; 0.050mL)。確認本溶液之 pH 為 7.4 ± 0.1 內後，藉由於 37°C 培育 1 小時，使抗體內銹鏈部之雙硫鍵還原。

抗體與藥物連結物之結合：於上述溶液於 22°C 培育 10 分鐘後添加實施例 2 之步驟 3 獲得的化合物 10mM 二甲基亞砷溶液(0.0593mL；相對於抗體一分子為 9.2 當量)，於 22°C 培育 40 分鐘，使藥物連結物對抗體結合。其次，添加 100mM NAC(Sigma-Aldrich Co.LLC)水溶液(0.0119mL；相對於抗體一分子為 18.4 當量)，再於 22°C 培育 20 分鐘，使藥物連結物的反應停止。

純化：上述溶液，進行使用製造方法 1 記載的共通操作 D-1(使用 ABS 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 6mL。

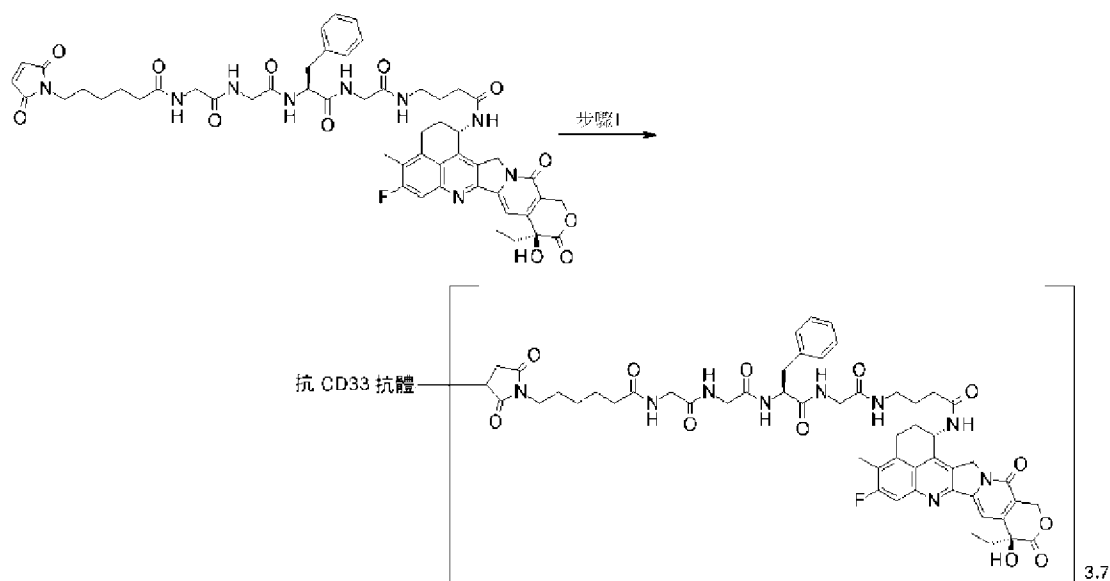
特性評價：使用製造方法 1 記載的共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\epsilon_{A,280}=256400$ (計算推定值)、 $\epsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)、 $\epsilon_{D,280}=5000$ (實測平均值)、 $\epsilon_{D,370}=19000$ (實測平均值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：1.06mg/mL，抗體產量：6.36mg(64%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：3.4

【0254】

實施例 10 抗體-藥物複合體(9)

【0255】



【0256】步驟 1：抗體-藥物複合體(9)

使用抗體之還原：將參考例 4 製作的抗 CD33 抗體，製造方法 1 記載的共通操作 B(使用 1.66 作為 280nm 吸光係數)及 C-1，以 PBS6.0/EDTA 調製 10mg/mL。於 2mL 試管中採取本溶液(1.0mL)，添加 30mM TCEP(東京化成工業股份有限公司)水溶液(0.0148mL；相對於抗體一分子為 6.9 當量)及 1M 磷酸氫二鉀水溶液(Nacalai Tesque, Inc.; 0.050mL)。確認本溶液之 pH 為 7.4 ± 0.1 內後，藉由於 37°C 培育 1 小時，使抗體內鉸鏈部之雙硫鍵還原。

抗體與藥物連結物之結合：上述溶液於 22°C 培育 10 分鐘後添加實施例 2 之步驟 3 獲得的化合物 30mM 二甲基亞砷溶液(0.0297mL；相對於抗體一分子為 13.8 當量)，於 22°C 培育 40 分鐘，使藥物連結物對抗體結合。其次，添加 100mM NAC(Sigma-Aldrich Co.LLC)水溶液(0.0178mL；相對於抗體一分子為 27.6 當量)，再於 22°C 培育 20 分鐘，使藥物連結物的反應停止。

純化：上述溶液，進行使用製造方法 1 記載的共通操作 D-1(使用 ABS 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 6mL。

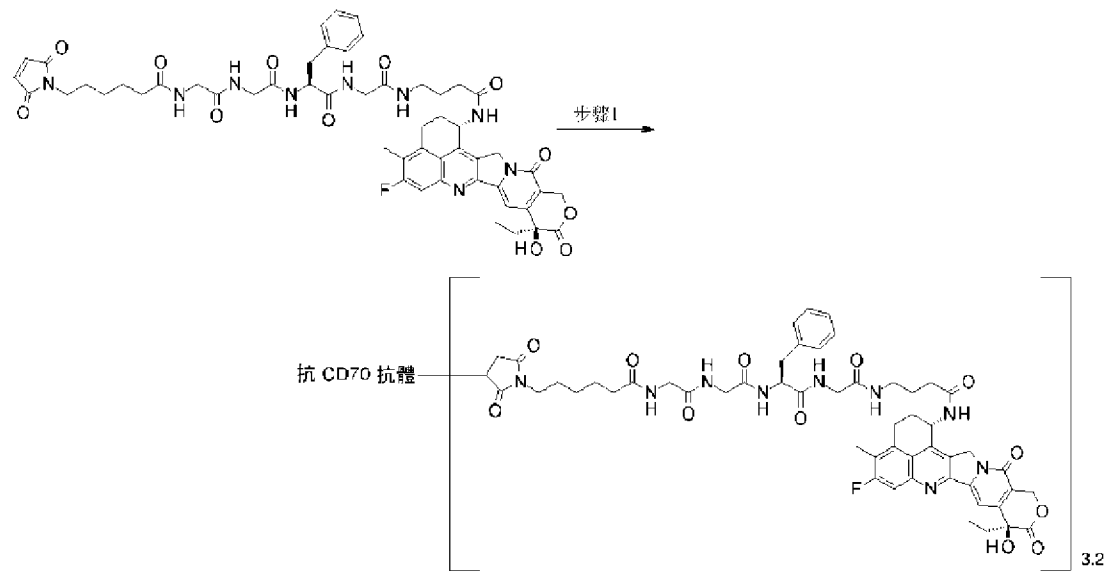
特性評價：使用製造方法 1 記載的共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\epsilon_{A,280}=256400$ (計算推定值)、 $\epsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)、 $\epsilon_{D,280}=5000$ (實測平均值)、 $\epsilon_{D,370}=19000$ (實測平均值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：0.95mg/mL，抗體產量：5.70mg(57%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：3.7

【0257】

實施例 11 抗體-藥物複合體(10)

【0258】



【0259】步驟 1：抗體-藥物複合體(10)

抗體之還原：將參考例 5 製作的抗 CD70 抗體，使用製造方法 1 記載的共通操作 B(作為 280nm 吸光係數，使用 1.69)及 C-1，以 PBS6.0/EDTA 調製 10mg/mL。於 2mL 試管中採取本溶液(1.0mL)，添加 10mM TCEP(東京化成工業股份有限公司)

水溶液(0.0297mL；相對於抗體一分子為 4.6 當量)及 1M 磷酸氫二鉀水溶液(Nacalai Tesque, Inc.; 0.050mL)。確認本溶液之 pH 為 7.4 ± 0.1 內後，藉由於 37°C 培育 1 小時，使抗體內鉸鏈部之雙硫鍵還原。

抗體與藥物連結物之結合：上述溶液於 22°C 培育 10 分鐘後添加實施例 2 之步驟 3 獲得的化合物 10mM 二甲基亞砷溶液(0.0593mL；相對於抗體一分子為 9.2 當量)，於 22°C 培育 40 分鐘，使藥物連結物對抗體結合。其次，添加 100mM NAC(Sigma-Aldrich Co.LLC)水溶液(0.0119mL；相對於抗體一分子為 18.4 當量)，再於 22°C 培育 20 分鐘，使藥物連結物的反應停止。

純化：上述溶液，進行使用製造方法 1 記載的共通操作 D-1(使用 ABS 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 6mL。

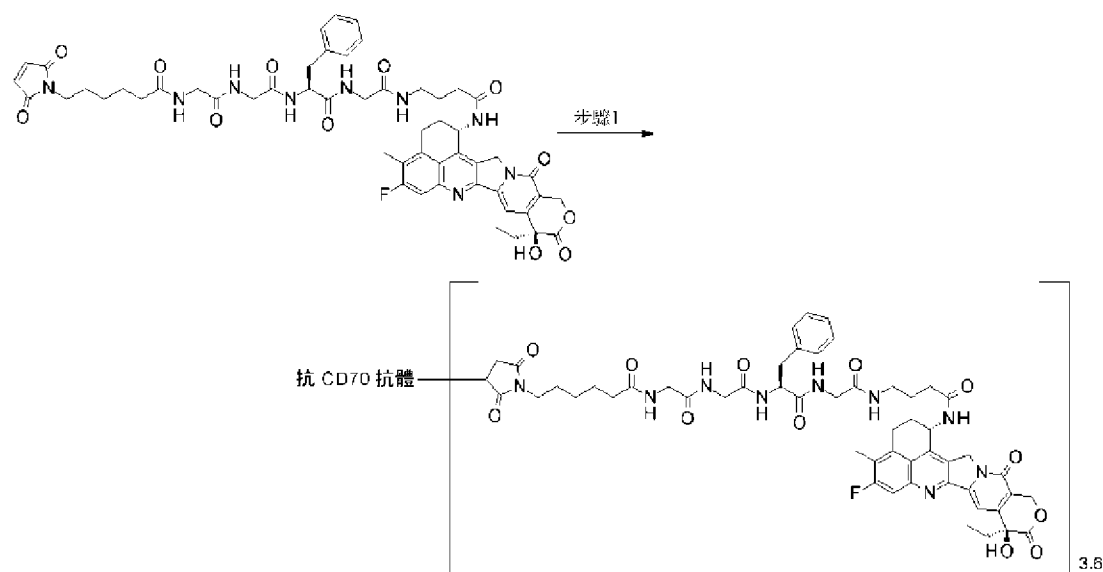
特性評價：使用製造方法 1 記載的共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\epsilon_{A,280}=262400$ (計算推定值)、 $\epsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)、 $\epsilon_{D,280}=5000$ (實測平均值)、 $\epsilon_{D,370}=19000$ (實測平均值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：1.00mg/mL，抗體產量：6.00mg(60%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：3.2

【0260】

實施例 12 抗體-藥物複合體(11)

【0261】



【0262】步驟 1：抗體-藥物複合體(11)

抗體之還原：將參考例 5 製作的抗 CD70 抗體，使用製造方法 1 記載的共通操作 B(作為 280nm 吸光係數，使用 1.69)及 C-1，以 PBS6.0/EDTA 調製 10mg/mL。於 2mL 試管中採取本溶液(1.0mL)，添加 30mM TCEP(東京化成工業股份有限公司)水溶液(0.0148mL；相對於抗體一分子為 6.9 當量)及 1M 磷酸氫二鉀水溶液(Nacalai Tesque, Inc.; 0.050mL)。確認本溶液之 pH 為 7.4 ± 0.1 內後，藉由於 37°C 培育 1 小時，使抗體內銕鏈部之雙硫鍵還原。

抗體與藥物連結物之結合：上述溶液於 22°C 培育 10 分鐘後添加實施例 2 之步驟 3 獲得的化合物 30mM 二甲基亞砷溶液(0.0297mL；相對於抗體一分子為 13.8 當量)，並於 22°C 培育 40 分鐘，使藥物連結物對抗體結合。其次，添加 100mM NAC(Sigma-Aldrich Co.LLC)水溶液(0.0178mL；相對於抗體一分子為 27.6 當量)，再於 22°C 培育 20 分鐘，使藥物連結物的反應停止。

純化：上述溶液，進行使用製造方法 1 記載的共通操作 D-1(使用 ABS 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 6mL。

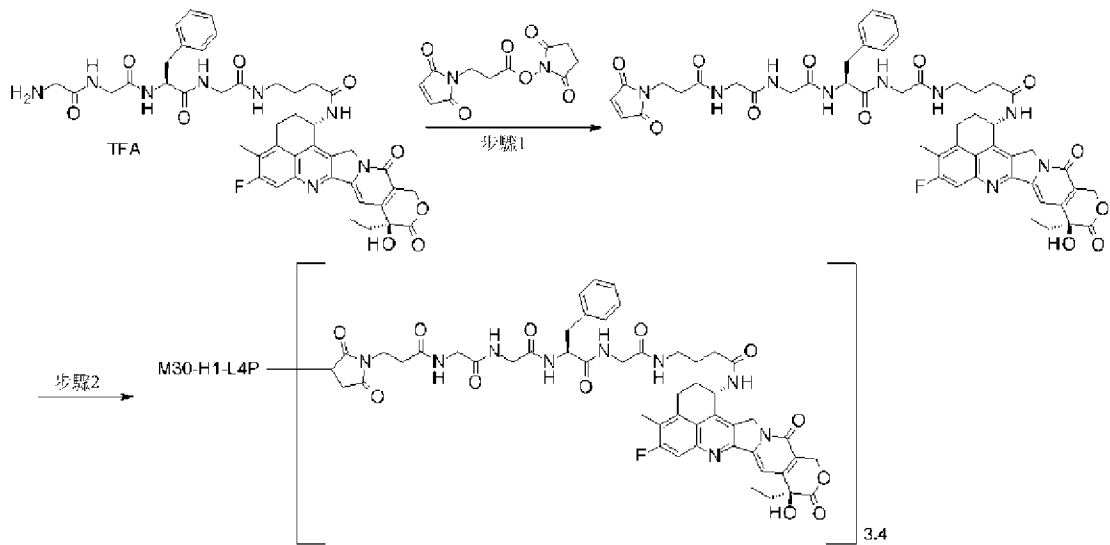
特性評價：使用製造方法 1 記載的共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\epsilon_{A,280}=262400$ (計算推定值)・ $\epsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)・ $\epsilon_{D,280}=5000$ (實測平均值)・ $\epsilon_{D,370}=19000$ (實測平均值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：0.96mg/mL，抗體產量：5.76mg(58%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：3.6

【0263】

實施例 13 抗體-藥物複合體(12)

【0264】



【0265】步驟 1：N-[3-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)丙醯基]甘胺醯基甘胺醯基-L-苯基丙胺醯基-N-(4-{[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-4-側氧基丁基)甘胺酸醯胺

將實施例 2 之步驟 2 獲得的化合物(80mg, 0.084mmol), 使用 3-順丁烯二醯亞胺丙酸 N-琥珀醯亞胺基酯(24.6mg, 0.0924mmol)替代 6-順丁烯二醯亞胺己酸 N-琥珀醯亞胺基酯, 與實施例 2 之步驟 3 相同地反應, 獲得呈淡黃色固體之標題化合物(60.0mg, 73%)。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ : 0.89(3H, t, $J=7.3\text{Hz}$), 1.70-1.78(2H, m), 1.81-1.94(2H, m), 2.12-2.23(4H, m), 2.42(3H, s), 2.81(1H, dd, $J=13.7, 9.8\text{Hz}$), 3.01-3.15(3H, m), 3.16-3.23(2H, m), 3.30-3.35(1H, m), 3.58-3.71(6H, m), 3.71-3.79(1H, m), 4.44-4.51(1H, m), 5.19(1H, d, $J=19.0\text{Hz}$), 5.27(1H, d, $J=19.0\text{Hz}$), 5.43(1H, d, $J=17.6\text{Hz}$), 5.47(1H, d, $J=17.6\text{Hz}$), 5.57-5.63(1H, m), 6.56(1H, s), 7.02(2H, s), 7.17-7.22(1H, m), 7.22-7.30(5H, m), 7.34(1H, s), 7.73(1H, t, $J=5.6\text{Hz}$), 7.83(1H, d, $J=10.7\text{Hz}$), 8.08(1H, t, $J=5.6\text{Hz}$), 8.15(1H, d, $J=7.8\text{Hz}$), 8.30(2H, dt, $J=18.7, 5.7\text{Hz}$), 8.49(1H, d, $J=8.8\text{Hz}$).

MS(APCI) m/z : 990($M+H$) $^+$

【0266】步驟 2：抗體-藥物複合體(12)

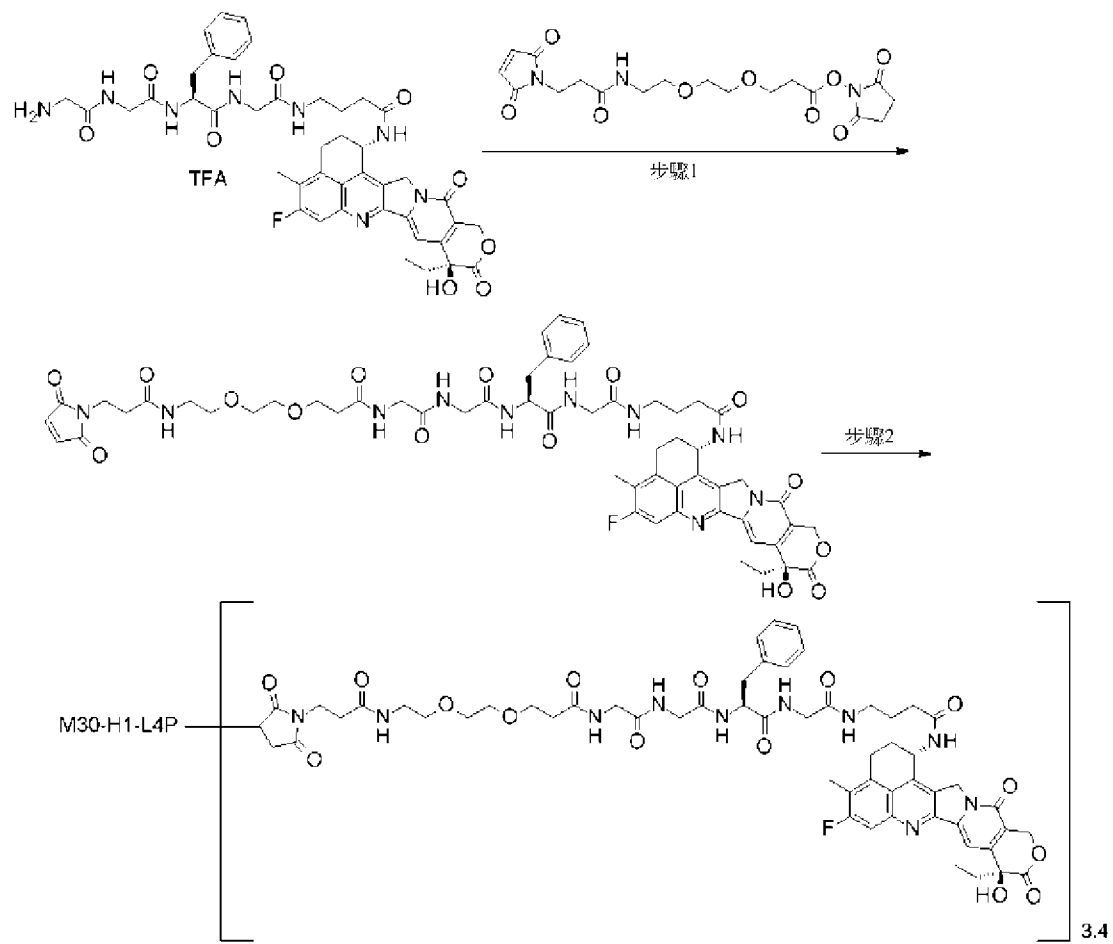
使用參考例 2 製作的 M30-H1-L4P 抗體及上述步驟 1 獲得的化合物, 藉由與實施例 2 之步驟 4 相同之方法, 獲得標題抗體-藥物複合體。

抗體濃度 : 12.16mg/mL, 抗體產量 : 8.5mg(68%), 抗體每一分子之藥物平均結合數(n) : 3.4

【0267】

實施例 14 抗體-藥物複合體(13)

【0268】



【0269】 步驟 1：N-{3-[2-(2-{[3-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)丙醯基]胺基}乙氧基)乙氧基]丙醯基}甘胺醯基甘胺醯基-L-苯基丙胺醯基-N-(4-{[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]呋喃并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-4-側氧基丁基)甘胺酸醯胺

將 實 施 例 2 之 步 驟 2 獲 得 的 化 合 物(100mg，0.119mmoL)，使用二異丙基乙基胺(20.8μL，0.119mmoL)替代三乙基胺，使用 3-(2-(2-(3-順丁烯二醯亞胺丙醯胺)乙氧基)

乙氧基)丙酸 N-琥珀醯亞胺基酯(50.7mg, 0.119mmol)替代 6-順丁烯二醯亞胺己酸 N-琥珀醯亞胺基酯, 使與實施例 2 之步驟 3 相同地反應, 獲得呈淡黃色固體之標題化合物(66.5mg, 48%)。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ : 0.85(3H, t, $J=7.4\text{Hz}$), 1.65-1.74(2H, m), 1.77-1.90(2H, m), 2.07-2.19(4H, m), 2.30(2H, t, $J=7.2\text{Hz}$), 2.33-2.36(2H, m), 2.38(3H, s), 2.76(1H, dd, $J=13.7, 9.8\text{Hz}$), 2.96-3.18(9H, m), 3.42-3.44(4H, m), 3.53-3.76(10H, m), 4.43(1H, td, $J=8.6, 4.7\text{Hz}$), 5.14(1H, d, $J=18.8\text{Hz}$), 5.23(1H, d, $J=18.8\text{Hz}$), 5.38(1H, d, $J=17.2\text{Hz}$), 5.42(1H, d, $J=17.2\text{Hz}$), 5.52-5.58(1H, m), 6.52(1H, s), 6.98(2H, s), 7.12-7.17(1H, m), 7.18-7.25(4H, m), 7.29(1H, s), 7.69(1H, t, $J=5.5\text{Hz}$), 7.78(1H, d, $J=11.3\text{Hz}$), 7.98-8.03(2H, m), 8.11(1H, d, $J=7.8\text{Hz}$), 8.16(1H, t, $J=5.7\text{Hz}$), 8.23(1H, t, $J=5.9\text{Hz}$), 8.44(1H, d, $J=9.0\text{Hz}$).

MS(APCI)m/z: 1149($\text{M}+\text{H}$) $^+$

【0270】步驟 2: 抗體-藥物複合體(13)

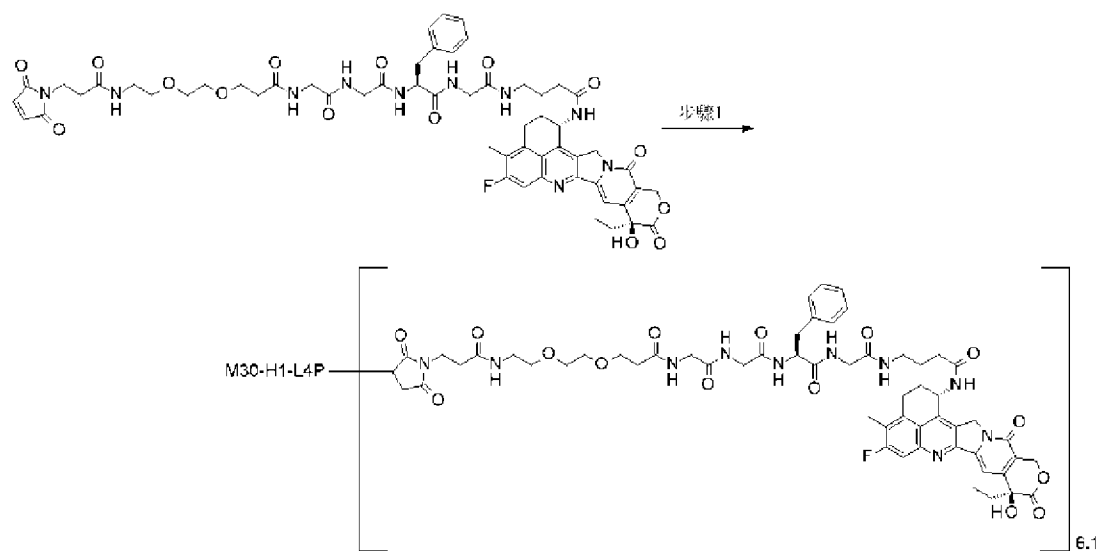
使用參考例 2 製作的 M30-H1-L4P 抗體及上述步驟 1 獲得的化合物, 藉由與實施例 2 之步驟 4 相同之方法, 獲得標題抗體-藥物複合體。

抗體濃度: 12.76mg/mL, 抗體產量: 8.9mg(71%), 抗體每一分子之藥物平均結合數(n): 3.4

【0271】

實施例 15 抗體-藥物複合體(14)

【0272】



【0273】步驟 1：抗體-藥物複合體(14)

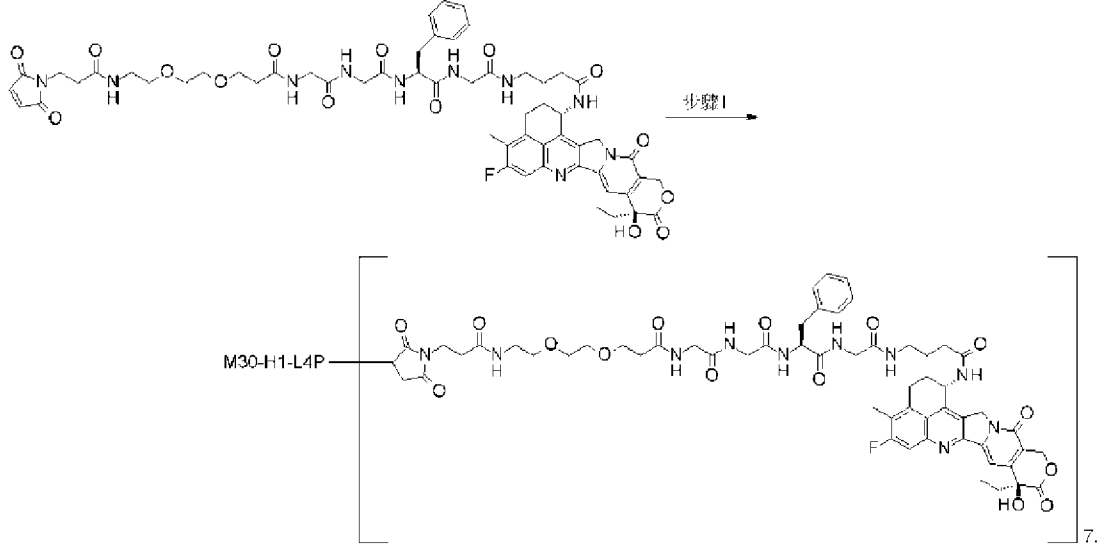
使用參考例 2 製作的 M30-H1-L4P 抗體及實施例 14 之步驟 1 獲得的化合物，藉由與實施例 4 之步驟 1 相同之方法、獲得標題抗體-藥物複合體。

抗體濃度：1.60mg/mL，抗體產量：9.60mg(77%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：6.1

【0274】

實施例 16 抗體-藥物複合體(15)

【0275】



【0276】步驟 1：抗體-藥物複合體(15)

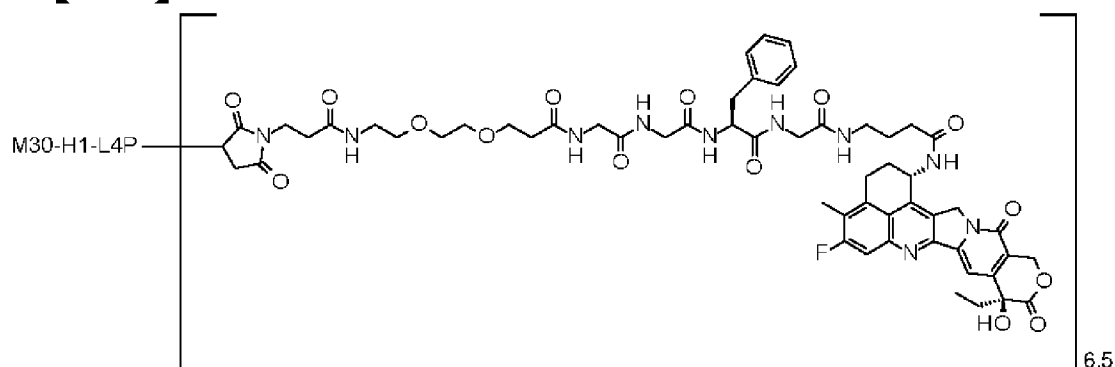
使用參考例 2 製作的 M30-H1-L4P 抗體及實施例 14 之步驟 1 獲得的化合物，藉由與實施例 5 之步驟 1 相同之方法，獲得標題抗體-藥物複合體。

抗體濃度：1.64mg/mL，抗體產量：9.84mg(79%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：7.1

【0277】

實施例 17 抗體-藥物複合體(16)

【0278】



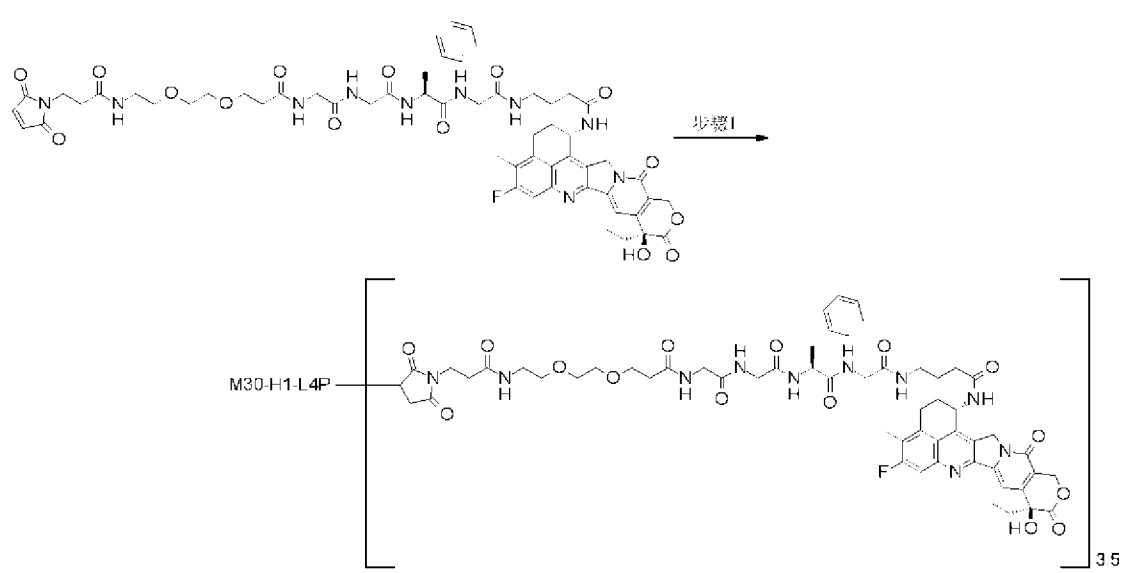
【0279】將約略全量之實施例 15 與實施例 16 之抗體-藥物複合體混合，使用共通操作 A 而濃縮溶液，獲得標題抗體-藥物複合體。

抗體濃度：10.0mg/mL，抗體產量：17.30mg，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：6.5

【0280】

實施例 18 抗體-藥物複合體(17)

【0281】



【0282】步驟 1：抗體-藥物複合體(17)

抗體之還原：將參考例 1 製作的 M30-H1-L4P 抗體，使用製造方法 1 記載的共通操作 B(作為 280nm 吸光係數，使用 $1.61\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$)及 C-1，以 PBS6.5/EDTA 調製為 10mg/mL 。將本溶液(100mL 、抗體 1g)置入 250mL 燒瓶中，添加 10mM TCEP(東京化成工業股份有限公司)水溶液(2.43mL ；相對於抗體一分子為 3.6 當量)，再添加 1M 磷酸氫二鉀水溶液(5mL)。以 pH 值測量器確認本溶液之 pH 為 7.4 附近後，藉由於 37°C 培育 1 小時，使抗體內鉸鏈部之雙硫鍵還原。

抗體與藥物連結物之結合：對上述溶液，室溫下添加含實施例 14 之步驟 1 獲得的化合物 10mM 的二甲基亞砷溶液(3.51mL ；相對於抗體一分子為 5.2 當量)及二甲基亞砷(2.14mL)，於 15°C 水浴中以攪拌子攪拌 130 分鐘，使藥物連結物對抗體結合。其次，添加 100mM NAC 水溶液(0.547mL)，再於室溫培育 20 分鐘，使藥物連結物的反應停止。

純化：對上述溶液，使用以超過濾膜(Merck 股份有限公司，Pellicon XL Cassette、Biomax 50KDa)、試管泵(美國 Cole-Parmer 公司 MASTERFLEX 泵型 77521-40，泵壓頭型 7518-00)及試管(美國 Cole-Parmer 公司 MASTERFLEX 試管 L/S16)構成的超過濾裝置，進行超過濾純化。即，一邊於反應液中滴加作為純化緩衝液之 ABS(計 800mL)，一邊進行超過濾純化，去除未結合之藥物連結物及其他低分子量試藥的同時，將緩衝液取代為 ABS，再進行至濃縮，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液約 70mL。

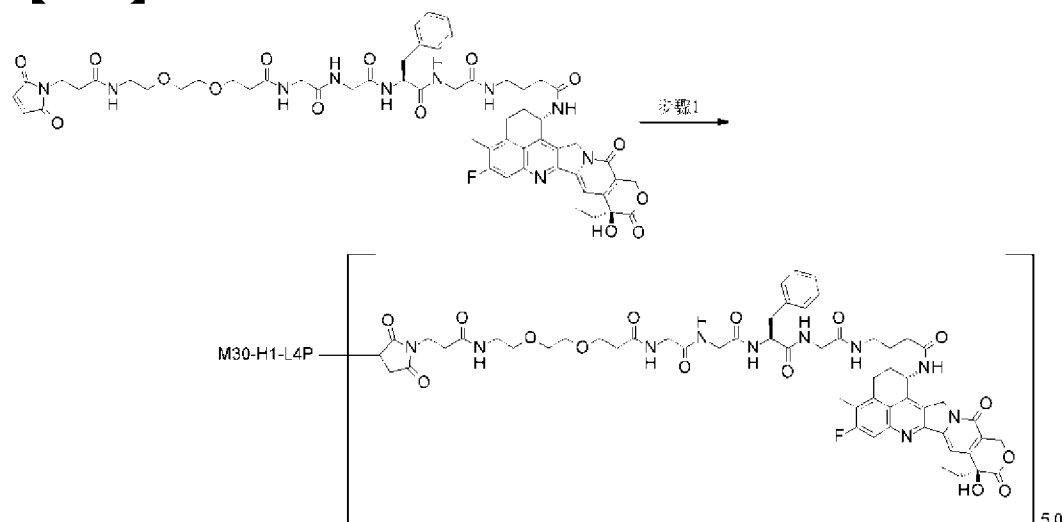
特性評價：使用製造方法 1 記載的共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\epsilon_{A,280}=235300$ (計算推定值)· $\epsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)· $\epsilon_{D,280}=4964$ (實測值)· $\epsilon_{D,370}=18982$ (實測值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：14.5mg/mL，抗體產量：1.0g(約 100%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：3.5

【0283】

實施例 19 抗體-藥物複合體(18)

【0284】



【0285】步驟 1：抗體-藥物複合體(18)

抗體之還原：將參考例 1 製作的 M30-H1-L4P 抗體，使用製造方法 1 記載的共通操作 B(作為 280nm 吸光係數，使用 $1.61\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$)及 C-1，以 PBS6.5/EDTA 調製為 10mg/mL 。將本溶液(5mL 、抗體 50mg)置入 15mL 試管，添加 10mM TCEP(東京化成工業股份有限公司)水溶液(0.135mL ；相對於抗體一分子為 4 當量)。以 pH 值測量器確認本溶液之 pH 為 7.4 附近後，藉由於 37°C 培育 1 小時，使抗體內鉸鏈部之雙硫鍵還原。

抗體與藥物連結物之結合：對上述溶液，添加含實施例 14 之步驟 1 獲得的化合物 10mM 的二甲基亞砷溶液(0.219mL ；相對於抗體一分子為 6.5 當量)及二甲基亞砷(0.064mL)，並於 15°C 水浴中培育 90 分鐘，使藥物連結物對抗體結合。其次，添加 100mM NAC 水溶液(0.033mL ；相對於抗體一分子為 9.8 當量)，再於室溫培育 20 分鐘，使藥物連結物的反應停止。

純化：上述溶液，進行使用製造方法 1 記載的共通操作 D-1(使用 ABS 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 19mL 。

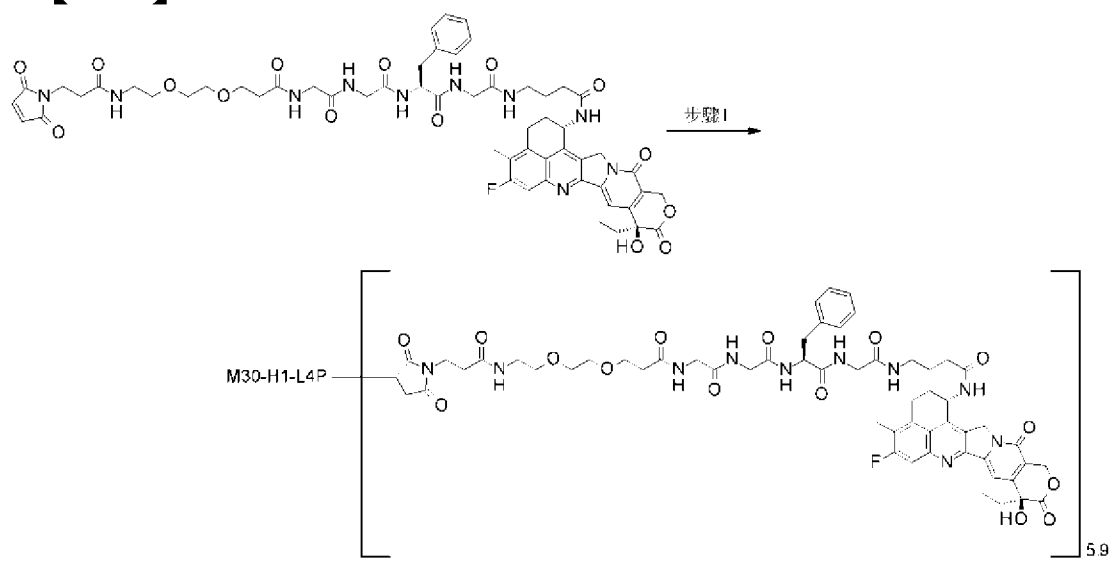
特性評價：使用製造方法 1 記載的共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\epsilon_{A,280}=235300$ (計算推定值)、 $\epsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)、 $\epsilon_{D,280}=4964$ (實測值)、 $\epsilon_{D,370}=18982$ (實測值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度： 2.17mg/mL ，抗體產量： 41mg (82%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：5.0

【0286】

實施例 20 抗體-藥物複合體(19)

【0287】



【0288】步驟 1：抗體-藥物複合體(19)

抗體之還原：將參考例 1 製作的 M30-H1-L4P 抗體，使用製造方法 1 記載的共通操作 B(作為 280nm 吸光係數，使用 $1.61\text{ mL mg}^{-1}\text{ cm}^{-1}$)及 C-1，以 PBS6.5/EDTA 調製為 10 mg/mL 。將本溶液(4 mL 、抗體 40 mg)置入 15 mL 試管，添加 10 mM TCEP(東京化成工業股份有限公司)水溶液(0.140 mL ；相對於抗體一分子為 5.2 當量)。以 pH 值測量器確認本溶液之 pH 為 7.4 附近後，藉由於 37°C 培育 1 小時，使抗體內鉸鏈部之雙硫鍵還原。

抗體與藥物連結物之結合：對上述溶液，添加含實施例 14 之步驟 1 獲得的化合物 10 mM 的二甲基亞砷溶液(0.232 mL ；相對於抗體一分子為 8.6 當量)，於 15°C 水浴中培育 90 分鐘，使藥物連結物對抗體結合。其次，添加 100 mM NAC 水溶液(0.035 mL ；相對於抗體一分子為 12.9 當量)，再於室溫培育 20 分鐘，使藥物連結物的反應停止。

純化：上述溶液，進行使用製造方法 1 記載的共通操作 D-1(使用 ABS 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 13mL。

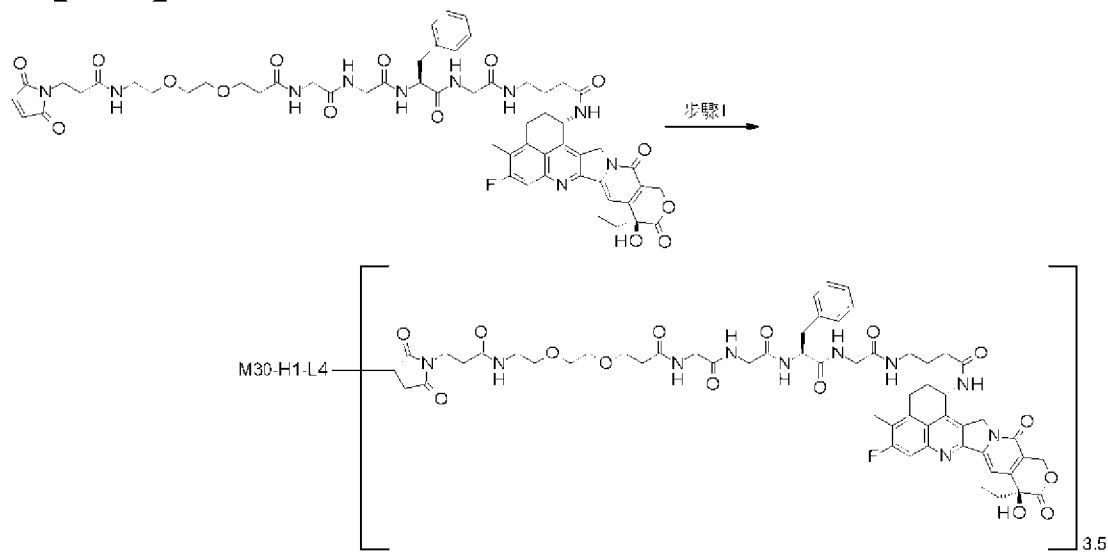
特性評價：使用製造方法 1 記載的共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\epsilon_{A,280}=235300$ (計算推定值)・ $\epsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)・ $\epsilon_{D,280}=4964$ (實測值)・ $\epsilon_{D,370}=18982$ (實測值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：2.36mg/mL，抗體產量：31mg(77%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：5.9

【0289】

實施例 21 抗體-藥物複合體(20)

【0290】



【0291】步驟 1：抗體-藥物複合體(20)

抗體之還原：將參考例 1 製作的 M30-H1-L4 抗體，使用製造方法 1 記載的共通操作 B(作為 280nm 吸光係數，使用 $1.61\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$)及 C-1，以 PBS6.5/EDTA 調製為 10mg/mL。將本溶液(1.25mL、抗體 12.5mg)置入 1.5mL 試

管，添加 10mM TCEP(東京化成工業股份有限公司)水溶液(0.0287mL；相對於抗體一分子為 3.4 當量)及 1M 磷酸氫二鉀水溶液(Nacalai Tesque, Inc.; 0.0625mL)。確認本溶液之 pH 為 7.4 ± 0.1 內後，藉由於 37°C 培育 1 小時，使抗體內鉸鏈部之雙硫鍵還原。

抗體與藥物連結物之結合：對上述溶液，於室溫下添加含實施例 14 之步驟 1 獲得的化合物 10mM 的二甲基亞砷溶液(0.0439mL；相對於抗體一分子為 5.2 當量)及二甲基亞砷(0.0267mL)，於 15°C 之水浴中培育 1 小時，使藥物連結物對抗體結合。其次，添加 100mM NAC (Sigma-Aldrich Co.LLC) 水溶液(0.0066mL)，再於室溫培育 20 分鐘，使藥物連結物的反應停止。

純化：上述溶液，進行使用製造方法 1 記載的共通操作 D-1(使用 ABS 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 6mL 後，使用共通操作 A，而濃縮溶液。

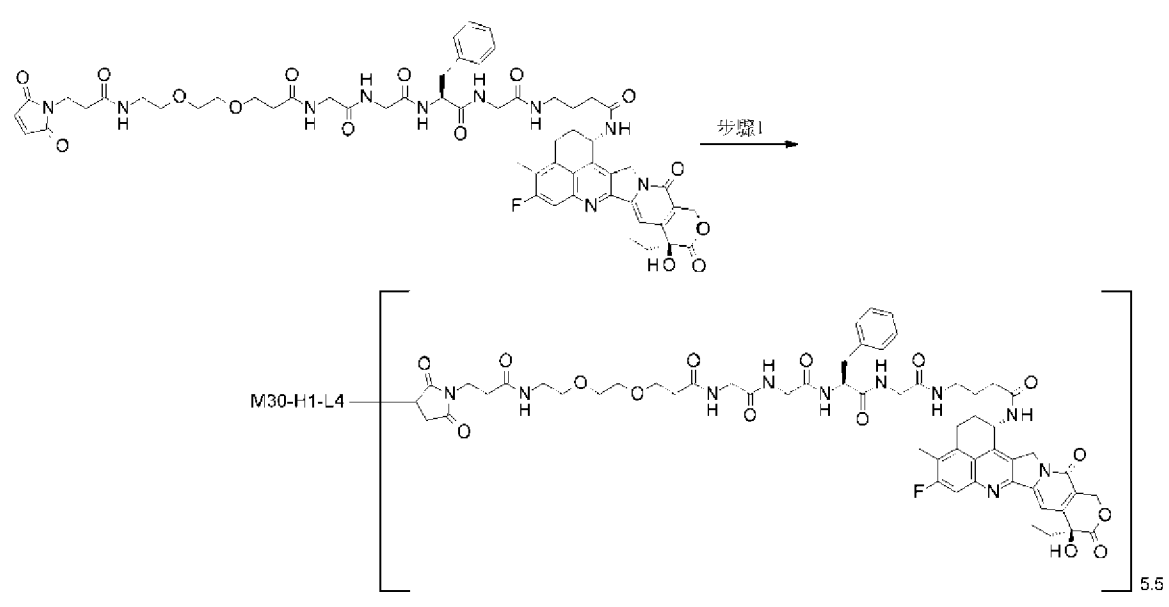
特性評價：使用製造方法 1 記載的共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\varepsilon_{A,280}=235300$ (計算推定值)、 $\varepsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)、 $\varepsilon_{D,280}=4964$ (實測值)、 $\varepsilon_{D,370}=18982$ (實測值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：10.0mg/mL，抗體產量：8.7mg(70%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：3.5

【0292】

實施例 22 抗體-藥物複合體(21)

【0293】



【0294】步驟 1：抗體-藥物複合體(21)

抗體之還原：將參考例 1 製作的 M30-H1-L4 抗體，使用製造方法 1 記載的共通操作 B(作為 280nm 吸光係數，使用 $1.61\text{ mL mg}^{-1}\text{ cm}^{-1}$)及 C-1，以 PBS6.5/EDTA 調製為 10 mg/mL 。將本溶液(1.25 mL 、抗體 12.5 mg)置入 1.5 mL 試管，添加 10 mM TCEP(東京化成工業股份有限公司)水溶液(0.0439 mL ；相對於抗體一分子為 5.2 當量)(0.0287 mL ；相對於抗體一分子為 3.4 當量)及 1 M 磷酸氫二鉀水溶液(Nacalai Tesque, Inc.; 0.0625 mL)。確認本溶液之 pH 為 7.4 ± 0.1 內後，藉由於 37°C 培育 1 小時，使抗體內鉸鏈部之雙硫鍵還原。

抗體與藥物連結物之結合：對上述溶液，室溫下添加含實施例 14 之步驟 1 獲得的化合物 10 mM 的二甲基亞砷溶液(0.0726 mL ；相對於抗體一分子為 8.6 當量)，於 15°C 之水浴中培育 1 小時，使藥物連結物對抗體結合。其次，添加 100 mM NAC(Sigma-Aldrich Co.LLC)水溶液(0.011 mL)，再於室溫培育 20 分鐘，使藥物連結物的反應停止。

純化：上述溶液，進行使用製造方法 1 記載的共通操作 D-1(使用 ABS 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 6mL 後，使用共通操作 A，而濃縮溶液。

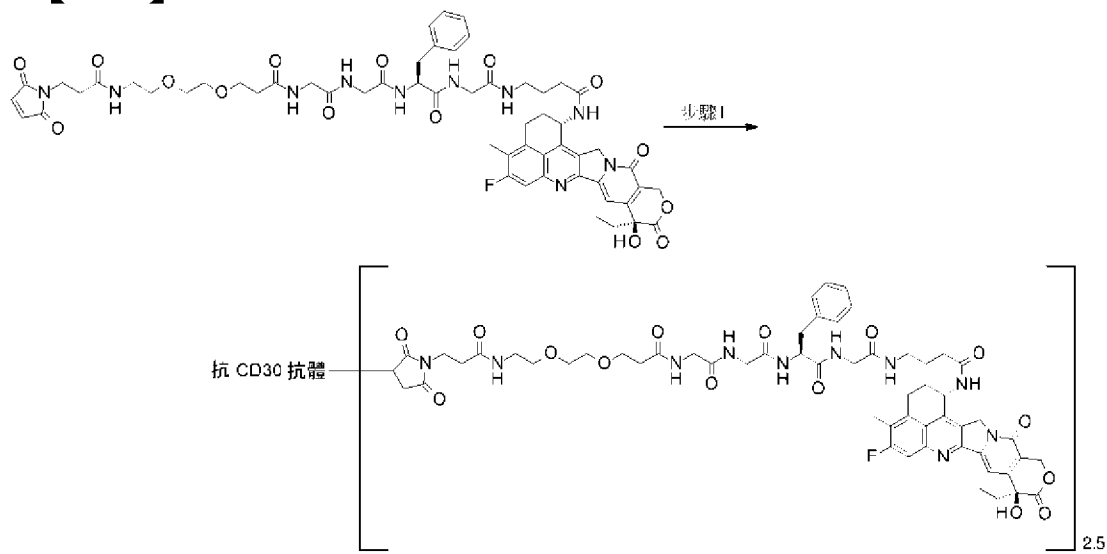
特性評價：使用製造方法 1 記載的共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\epsilon_{A,280}=235300$ (計算推定值)・ $\epsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)・ $\epsilon_{D,280}=4964$ (實測值)・ $\epsilon_{D,370}=18982$ (實測值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：10.0mg/mL，抗體產量：8.3mg(66%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：5.5

【0295】

實施例 23 抗體-藥物複合體(22)

【0296】



【0297】步驟 1：抗體-藥物複合體(22)

抗體之還原：將參考例 3 製作的抗 CD30 抗體，使用製造方法 1 記載的共通操作 B(作為 280nm 吸光係數，使用 $1.75\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$)及 C-1，以 PBS6.5/EDTA 調製為 10mg/mL。將本溶液(0.4mL、抗體 4mg)置入 1.5mL 試管，添

加 10mM TCEP(東京化成工業股份有限公司)水溶液(0.0065mL；相對於抗體一分子為 2.5 當量)，並藉由於 37℃培育 1 小時，使抗體內鉸鏈部之雙硫鍵還原。

抗體與藥物連結物之結合：對上述溶液，室溫下添加含實施例 14 之步驟 1 獲得的化合物 10mM 的二甲基亞砷溶液(0.0116mL；相對於抗體一分子為 4.5 當量)及二甲基亞砷(0.0098mL)，使用試管迴轉器(MTR-103，AS ONE 股份有限公司)，室溫下攪拌 1 小時，使藥物連結物對抗體結合。其次，添加 100mM NAC(Sigma-Aldrich Co.LLC)水溶液(0.0017mL)，再於室溫培育 20 分鐘，使藥物連結物的反應停止。

純化：上述溶液，進行使用製造方法 1 記載的共通操作 D-1(使用 ABS 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 2.5mL。

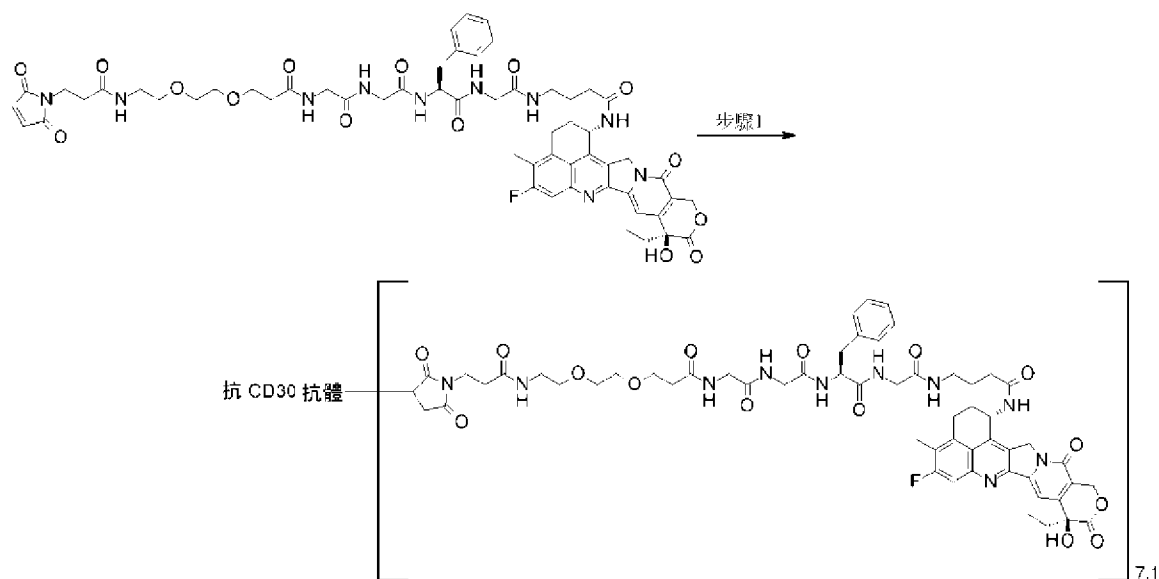
特性評價：使用製造方法 1 記載的共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\epsilon_{A,280}=270400$ (計算推定值)・ $\epsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)・ $\epsilon_{D,280}=4964$ (實測值)・ $\epsilon_{D,370}=18982$ (實測值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：0.86mg/mL，抗體產量：2.2mg(54%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：2.5

【0298】

實施例 24 抗體-藥物複合體(23)

【0299】



【0300】步驟 1：抗體-藥物複合體(23)

抗體之還原：將參考例 3 製作的抗 CD30 抗體，使用製造方法 1 記載的共通操作 B(作為 280nm 吸光係數，使用 $1.75\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$)及 C-1，以 PBS6.5/EDTA 調製為 10mg/mL 。將本溶液(0.35mL 、抗體 3.5mg)置入 1.5mL 試管，添加 10mM TCEP(東京化成工業股份有限公司)水溶液(0.0113mL ；相對於抗體一分子為 5 當量)，藉由於 37°C 培育 1 小時，使抗體內銹鏈部之雙硫鍵還原。

抗體與藥物連結物之結合：對上述溶液，室溫下添加含實施例 14 之步驟 1 獲得的化合物 10mM 的二甲基亞砷溶液(0.0204mL ；相對於抗體一分子為 9 當量)及丙二醇(關東化學股份有限公司、 0.18mL)，使用試管迴轉器(MTR-103，AS ONE 股份有限公司)而於室溫下攪拌 1 小時，使藥物連結物對抗體結合。其次，添加 100mM NAC(Sigma-Aldrich Co.LLC)水溶液(0.0031mL)，再於室溫培育 20 分鐘，使藥物連結物的反應停止。

純化：上述溶液，進行使用製造方法 1 記載的共通操作 D-1(使用 ABS 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 2.5 mL。

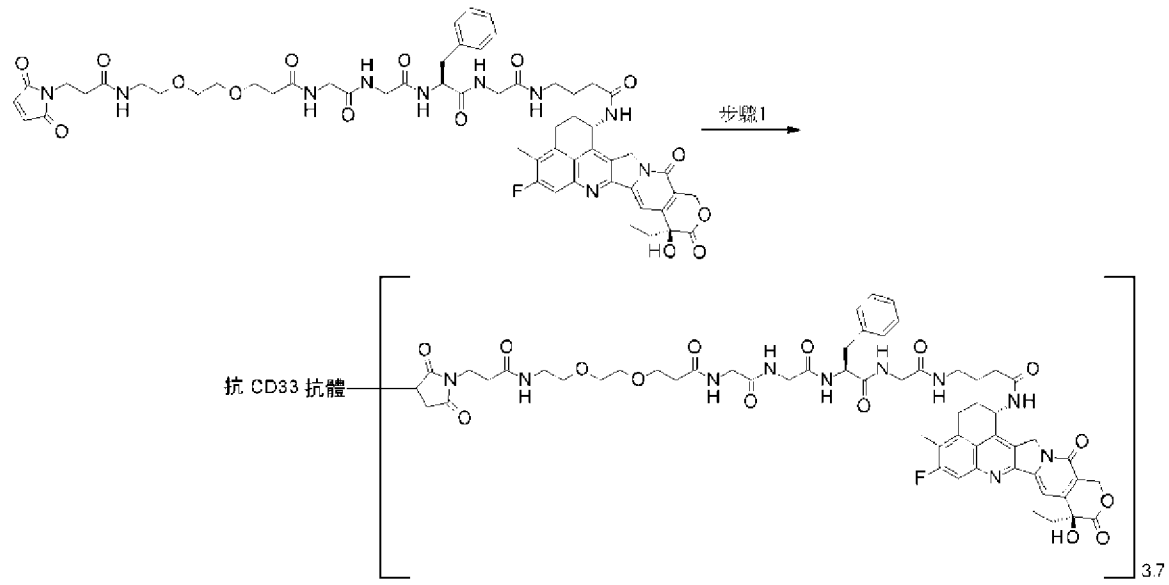
特性評價：使用製造方法 1 記載的共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\epsilon_{A,280}=270400$ (計算推定值)・ $\epsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)・ $\epsilon_{D,280}=4964$ (實測值)・ $\epsilon_{D,370}=18982$ (實測值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：0.41mg/mL，抗體產量：1.0mg(29%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：7.1

【0301】

實施例 25 抗體-藥物複合體(24)

【0302】



【0303】步驟 1：抗體-藥物複合體(24)

抗體之還原：將參考例 4 製作的抗 CD33 抗體，使用製造方法 1 記載的共通操作 B(作為 280nm 吸光係數，使用 $1.66\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$)及 C-1，以 PBS6.5/EDTA 調製為 10mg/mL。將本溶液(0.4mL、抗體 4mg)置入 1.5mL 試管，添

加 10mM TCEP(東京化成工業股份有限公司)水溶液(0.0065mL；相對於抗體一分子為 2.5 當量)及 1M 磷酸氫二鉀水溶液(Nacalai Tesque, Inc.; 0.0058mL)。確認本溶液之 pH 為 7.0 ± 0.1 內後，於 37°C 培育 1 小時下，使抗體內銹鏈部之雙硫鍵還原。

抗體與藥物連結物之結合：對上述溶液，室溫下添加含實施例 14 之步驟 1 獲得的化合物 10mM 的二甲基亞砷溶液(0.0116mL；相對於抗體一分子為 4.5 當量)及二甲基亞砷(0.0101mL)，使用試管迴轉器(MTR-103, AS ONE 股份有限公司)而於室溫下攪拌 1 小時，使藥物連結物對抗體結合。其次，添加 100mM NAC(Sigma-Aldrich Co.LLC)水溶液(0.0017mL)，再於室溫培育 20 分鐘，使藥物連結物的反應停止。

純化：上述溶液，進行使用製造方法 1 記載的共通操作 D-1(使用 ABS 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 2.5mL。

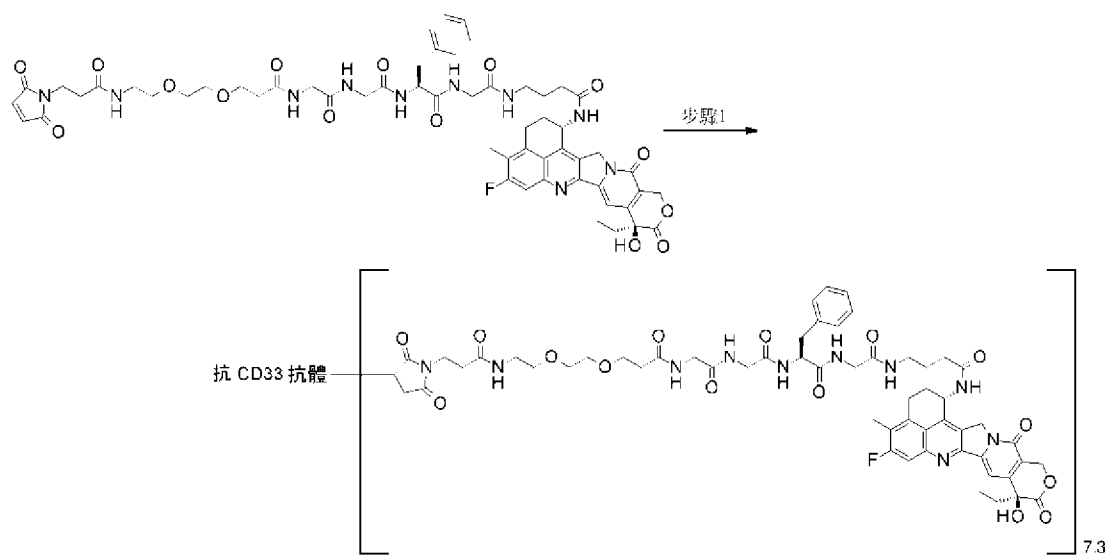
特性評價：使用製造方法 1 記載的共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\epsilon_{A,280}=256400$ (計算推定值)、 $\epsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)、 $\epsilon_{D,280}=4964$ (實測值)、 $\epsilon_{D,370}=18982$ (實測值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：1.25mg/mL，抗體產量：3.1mg(78%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：3.7

【0304】

實施例 26 抗體-藥物複合體(25)

【0305】



【0306】步驟 1：抗體-藥物複合體(25)

抗體之還原：將參考例 4 製作的抗 CD33 抗體，使用製造方法 1 記載的共通操作 B(作為 280nm 吸光係數，使用 $1.66\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$)及 C-1，以 PBS6.5/EDTA 調製為 10mg/mL 。將本溶液(0.4mL 、抗體 4mg)置入 1.5mL 試管，添加 10mM TCEP(東京化成工業股份有限公司)水溶液(0.0129mL ；相對於抗體一分子為 5 當量)及 1M 磷酸氫二鉀水溶液(Nacalai Tesque, Inc.; 0.006mL)。確認本溶液之 pH 為 7.0 ± 0.1 內後，於 37°C 培育 1 小時下，使抗體內鉸鏈部之雙硫鍵還原。

抗體與藥物連結物之結合：對上述溶液，室溫下添加含實施例 14 之步驟 1 獲得的化合物 10mM 的二甲基亞砷溶液(0.0233mL ；相對於抗體一分子為 9 當量)，使用試管迴轉器(MTR-103, AS ONE 股份有限公司)而於室溫下攪拌 1 小時，使藥物連結物對抗體結合。其次，添加 100mM NAC(Sigma-Aldrich Co.LLC)水溶液(0.0035mL)，再於室溫培育 20 分鐘，使藥物連結物的反應停止。

純化：上述溶液，進行使用製造方法 1 記載的共通操作 D-1(使用 ABS 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 2.5 mL。

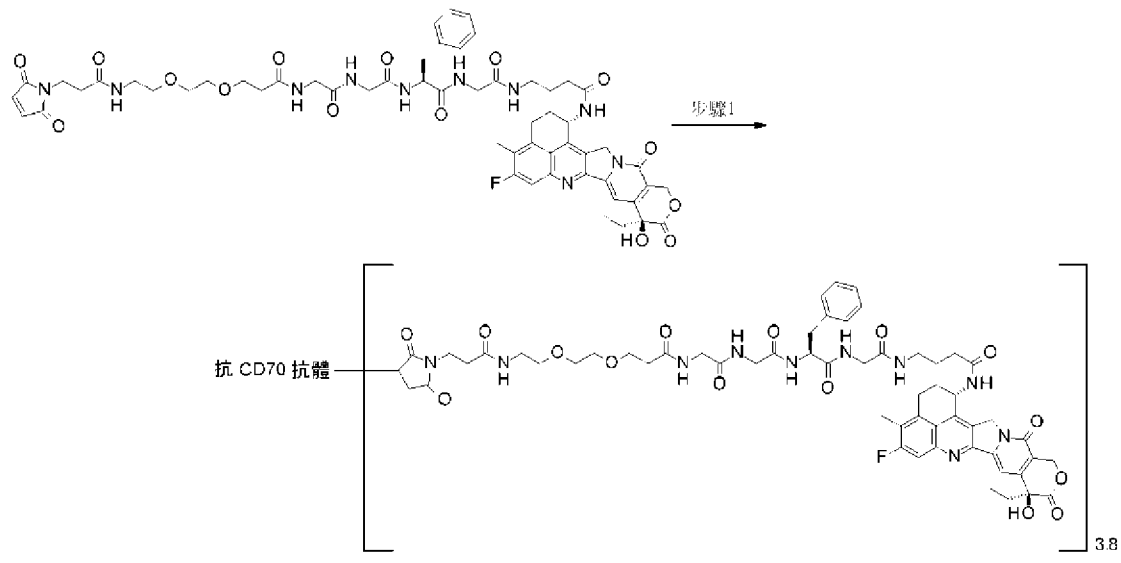
特性評價：使用製造方法 1 記載的共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\epsilon_{A,280}=256400$ (計算推定值)・ $\epsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)・ $\epsilon_{D,280}=4964$ (實測值)・ $\epsilon_{D,370}=18982$ (實測值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：1.17 mg/mL，抗體產量：2.9 mg(73%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：7.3

【0307】

實施例 27 抗體-藥物複合體(26)

【0308】



【0309】步驟 1：抗體-藥物複合體(26)

抗體之還原：將參考例 5 製作的抗 CD70 抗體，使用製造方法 1 記載的共通操作 B(作為 280nm 吸光係數，使用 $1.69\text{ mL mg}^{-1}\text{ cm}^{-1}$)及 C-1，以 PBS6.5/EDTA 調製為 10 mg/mL。將本溶液(0.4 mL、抗體 4 mg)置入 1.5 mL 試管，添

加 10mM TCEP(東京化成工業股份有限公司)水溶液(0.0065mL；相對於抗體一分子為 2.5 當量)及 1M 磷酸氫二鉀水溶液(Nacalai Tesque, Inc.; 0.0058mL)。確認本溶液之 pH 為 7.0 ± 0.1 內後，於 37°C 培育 1 小時下，使抗體內銹鏈部之雙硫鍵還原。

抗體與藥物連結物之結合：對上述溶液，室溫下添加含實施例 14 之步驟 1 獲得的化合物 10mM 的二甲基亞砷溶液(0.0116mL；相對於抗體一分子為 4.5 當量)及二甲基亞砷(0.0101mL)，使用試管迴轉器(MTR-103, AS ONE 股份有限公司)而於室溫下攪拌 1 小時，使藥物連結物對抗體結合。其次，添加 100mM NAC(Sigma-Aldrich Co.LLC)水溶液(0.0017mL)，再於室溫培育 20 分鐘，使藥物連結物的反應停止。

純化：上述溶液，進行使用製造方法 1 記載的共通操作 D-1(使用 ABS 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 2.5mL。

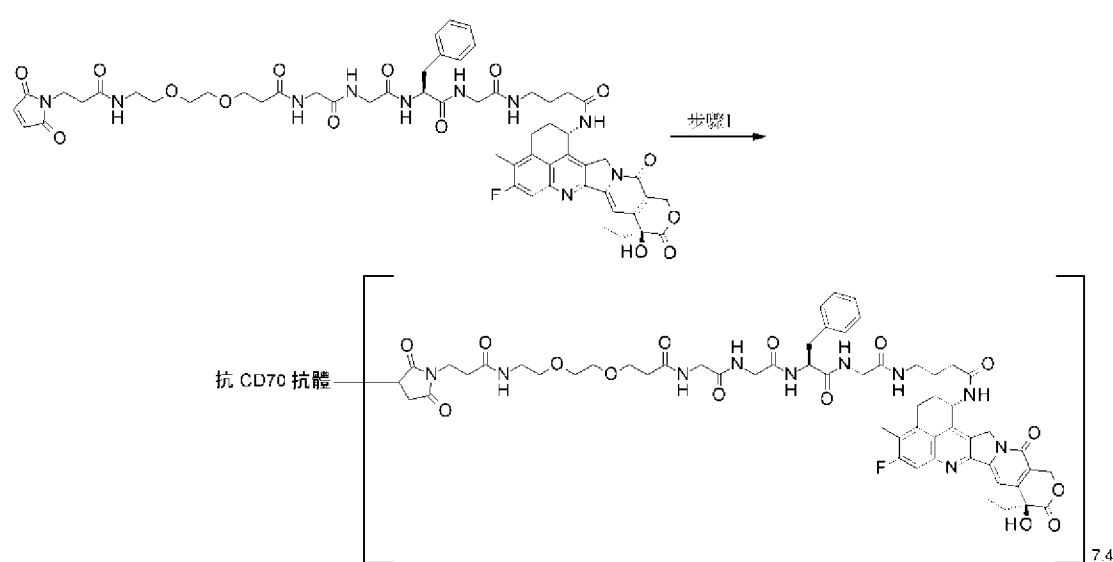
特性評價：使用製造方法 1 記載的共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\epsilon_{A,280}=262400$ (計算推定值)、 $\epsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)、 $\epsilon_{D,280}=4964$ (實測值)、 $\epsilon_{D,370}=18982$ (實測值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：1.14mg/mL，抗體產量：2.9mg(71%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：3.8

【0310】

實施例 28 抗體-藥物複合體(27)

【0311】



【0312】步驟 1：抗體-藥物複合體(27)

抗體之還原：將參考例 5 製作的抗 CD70 抗體，使用製造方法 1 記載的共通操作 B(作為 280nm 吸光係數，使用 $1.69\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$)及 C-1，以 PBS6.5/EDTA 調製為 10mg/mL 。將本溶液(0.4mL 、抗體 4mg)置入 1.5mL 試管，添加 10mM TCEP(東京化成工業股份有限公司)水溶液(0.0129mL ；相對於抗體一分子為 5 當量)及 1M 磷酸氫二鉀水溶液(Nacalai Tesque, Inc.; 0.006mL)。確認本溶液之 pH 為 7.0 ± 0.1 內後，於 37°C 培育 1 小時下，使抗體內鉸鏈部之雙硫鍵還原。

抗體與藥物連結物之結合：對上述溶液，室溫下添加含實施例 14 之步驟 1 獲得的化合物 10mM 的二甲基亞砷溶液(0.0233mL ；相對於抗體一分子為 9 當量)，使用試管迴轉器(MTR-103, AS ONE 股份有限公司)而於室溫下攪拌 1 小時，使藥物連結物對抗體結合。其次，添加 100mM NAC(Sigma-Aldrich Co.LLC)水溶液(0.0035mL)，再於室溫培育 20 分鐘，使藥物連結物的反應停止。

純化：上述溶液，進行使用製造方法 1 記載的共通操作 D-1(使用 ABS 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 2.5 mL。

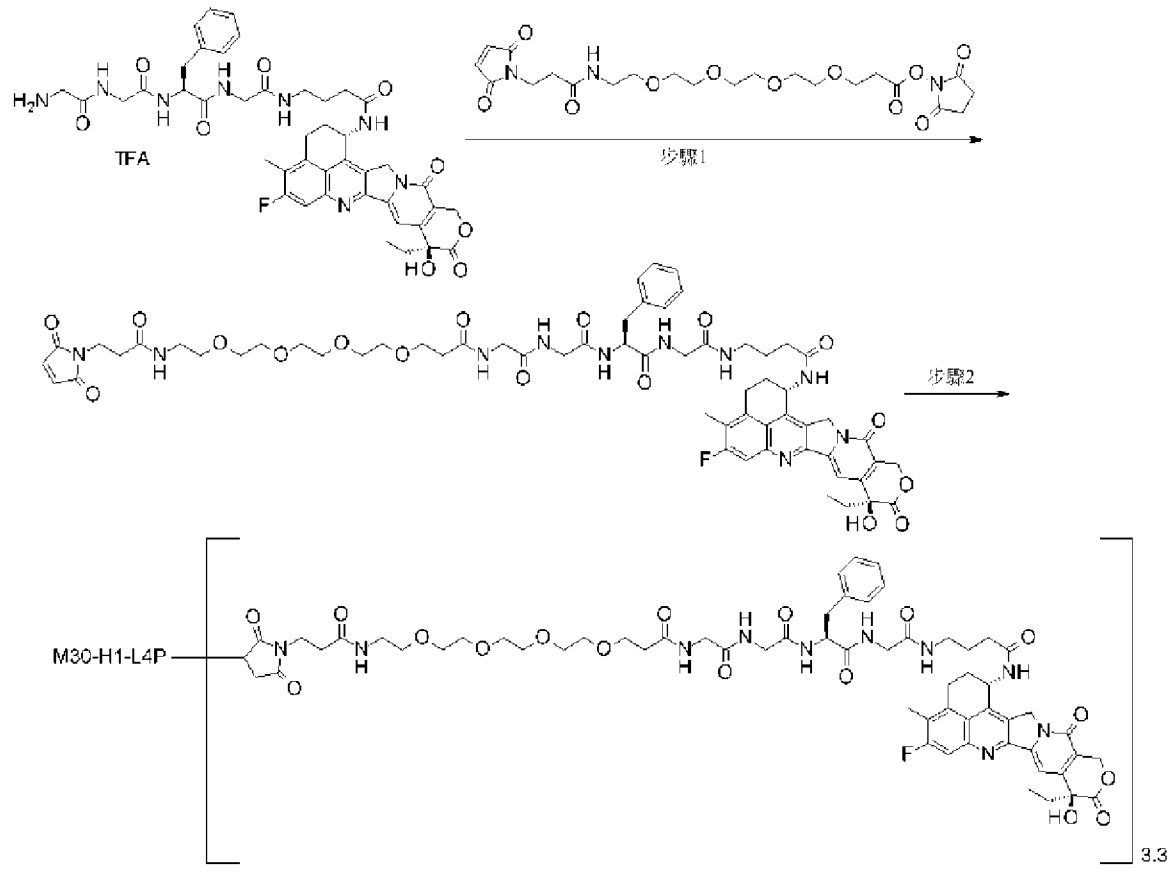
特性評價：使用製造方法 1 記載的共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\epsilon_{A,280}=262400$ (計算推定值)・ $\epsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)・ $\epsilon_{D,280}=4964$ (實測值)・ $\epsilon_{D,370}=18982$ (實測值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：1.13mg/mL，抗體產量：2.8mg(71%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：7.4

【0313】

實施例 29 抗體-藥物複合體(28)

【0314】



【0315】步驟 1：N-[19-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-17-側氧基-4,7,10,13-四側氧基-16-氮十一-1-醯基]甘胺醯基甘胺醯基-L-苯基丙胺醯基-N-(4-{[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-4-側氧基丁基)甘胺酸醯胺

將實施例 2 之步驟 2 獲得的化合物(90mg, 0.107mmol)，使用二異丙基乙基胺(18.7 μ L, 0.107mmol)替代三乙基胺，使用 1-順丁烯二醯亞胺-3-側氧基-7,10,13,16-四氧-4-氮十一-19-酸 N-琥珀醯亞胺基酯(55.1mg, 0.107mmol)替代 6-順丁烯二醯亞胺己酸 N-琥珀醯亞胺基酯，藉由與實施例 2 之步驟 3 相同地反應，獲得呈淡黃色固體之標題化合物(50mg, 37%)。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ : 0.85(3H, t, $J=7.2\text{Hz}$), 1.64-1.74(2H, m), 1.77-1.90(2H, m), 2.06-2.19(4H, m), 2.27-2.32(2H, m), 2.33-2.37(2H, m), 2.38(3H, s), 2.72-2.80(3H, m), 2.96-3.19(6H, m), 3.39-3.48(10H, m), 3.52-3.75(10H, m), 4.39-4.48(1H, m), 5.14(1H, d, $J=18.8\text{Hz}$), 5.23(1H, d, $J=18.8\text{Hz}$), 5.38(1H, d, $J=17.0\text{Hz}$), 5.42(1H, d, $J=17.0\text{Hz}$), 5.52-5.58(1H, m), 6.52(1H, s), 6.98(1H, s), 7.13-7.24(5H, m), 7.29(1H, s), 7.69(1H, t, $J=5.5\text{Hz}$), 7.78(1H, d, $J=10.9\text{Hz}$), 7.98-8.03(2H, m), 8.10(1H, d, $J=7.8\text{Hz}$), 8.16(1H, t, $J=5.7\text{Hz}$), 8.23(1H, t, $J=5.7\text{Hz}$), 8.44(1H, d, $J=8.6\text{Hz}$).

MS(APCI)m/z : 1237($M+H$) $^+$

【0316】步驟 2：抗體-藥物複合體(28)

抗體之還原：將參考例 2 製作的 M30-H1-L4P 抗體，使用製造方法 1 記載的共通操作 C-1 及 B(作為 280nm 吸光係數，使用 $1.61\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$)，將媒體取代為 PBS6.0/EDTA，調製為 10mg/mL 之抗體濃度。將本溶液(1.25mL)置入 1.5mL 聚丙烯製試管中，於其中添加 10mM TCEP(東京化成工業股份有限公司)水溶液(0.025mL ；相對於抗體一分子為 3.0 當量)及 1M 磷酸氫二鉀水溶液(Nacalai Tesque, Inc.; 0.0625mL)。確認本溶液之 pH 為 7.4 ± 0.1 內後，於 37°C 培育 1 小時下，使抗體內鉸鏈部之雙硫鍵還原。

抗體與藥物連結物之結合：對上述溶液，室溫下添加含二甲基亞砷(Sigma-Aldrich Co.LLC; 0.102mL)與上述步驟 1 獲得的化合物 10mM 的二甲基亞砷溶液(0.047mL ；相對於抗體一分子為 5.5 當量)，使用試管迴轉器(MTR-103, AS ONE 股份有限公司)而於室溫下攪拌 40 分鐘，使藥物連結物對抗體結合。其次，添加 100mM NAC(Sigma-Aldrich Co.LLC)水溶液(0.009mL)，再於室溫下攪拌 20 分鐘，使藥物連結物的反應停止。

純化：上述溶液，進行使用製造方法 1 記載的共通操作 D-1(使用 ABS 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 6mL 後，使用共通操作 A，而濃縮溶液。

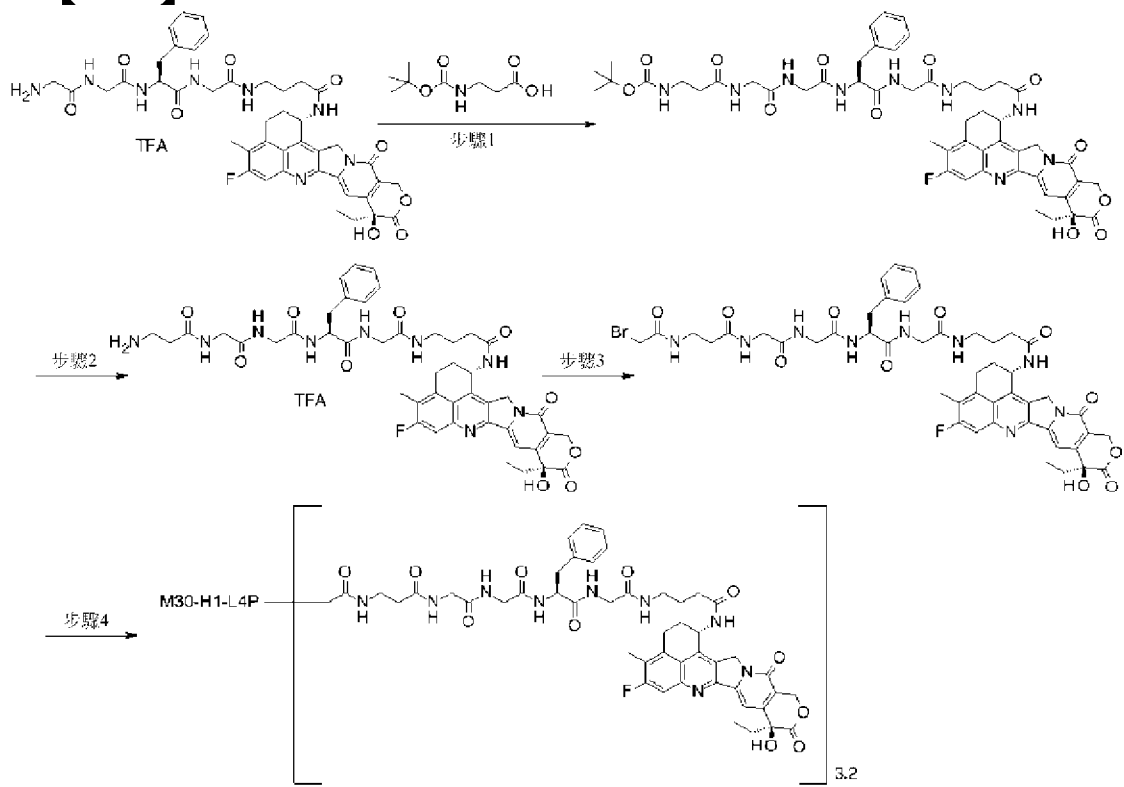
特性評價：使用製造方法 1 記載的共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\varepsilon_{A,280}=235300$ (計算推定值)、 $\varepsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)、 $\varepsilon_{D,280}=5000$ (實測平均值)、 $\varepsilon_{D,370}=19000$ (實測平均值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：13.60mg/mL，抗體產量：9.5mg(76%)，抗體
每一分子之藥物平均結合數(n)：3.3

【0317】

實施例 30 抗體-藥物複合體(29)

【0318】



【0319】步驟 1：N-(tert-丁氧基羰基)-β-丙胺醯基甘胺醯基
甘胺醯基-L-苯基丙胺醯基-N-(4-{[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥
基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯
并[de]哌喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-4-側
氧基丁基)甘胺酸醯胺

將實施例 2 之步驟 2 獲得的化合物(0.839g，1.00mmol)，
使用 N-(tert-丁氧基羰基)-β-丙胺酸替代 4-(tert-丁氧基羰基胺
基)丁酸，藉由與實施例 1 之步驟 1 相同地反應，未純化獲得的
粗生成物而使用於下一步驟。

【0320】步驟 2：β-丙胺鹽基甘胺鹽基甘胺鹽基-L-苯基丙胺鹽基-N-(4-{[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-4-側氧基丁基)甘胺酸鹽胺

將上述步驟 1 獲得的粗生成物，與實施例 2 之步驟 2 相同地反應，獲得呈淡黃色固體之標題化合物(0.610 g，67%)。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz，DMSO- d_6) δ ：0.87(3H，t， $J=7.4\text{ Hz}$)，1.67-1.77(2H，m)，1.79-1.92(2H，m)，2.09-2.22(4H，m)，2.40(3H，s)，2.46-2.55(2H，m)，2.82-2.73(1H，m)，2.95-3.13(5H，m)，3.14-3.21(2H，m)，3.55-3.80(6H，m)，4.44-4.52(1H，m)，5.20(2H，dd， $J=35.0$ ， 19.0 Hz)，5.42(2H，s)，5.53-5.60(1H，m)，6.54(1H，s)，7.14-7.28(5H，m)，7.31(1H，s)，7.67(2H，brs)，7.72-7.78(1H，m)，7.80(1H，d， $J=11.0\text{ Hz}$)，8.10-8.17(2H，m)，8.29(1H，t， $J=5.9\text{ Hz}$)，8.42(1H，t， $J=5.7\text{ Hz}$)，8.47(1H，d， $J=8.6\text{ Hz}$)。

【0321】步驟 3：N-(溴乙鹽基)-β-丙胺鹽基甘胺鹽基甘胺鹽基-L-苯基丙胺鹽基-N-(4-{[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-4-側氧基丁基)甘胺酸鹽胺

對 2-溴乙酸(96.3 mg，0.693 mmol)之二氯甲烷(4.5 mL)溶液，添加 N-羥基琥珀鹽亞胺(79.7 mg，0.693 mmol)、1,3-二異丙基碳化二亞胺(0.107 mL，0.693 mmol)並於室溫下攪

拌。將反應溶液於 0℃加到上述步驟 2 獲得的化合物(473mg, 0.462mmol)、三乙基胺(0.154mL, 1.11mmol)之 N,N-二甲基甲醯胺(4.5mL)溶液，並於室溫下攪拌 1 小時。反應溶液以矽膠管柱層析[溶出溶媒：氯仿～氯仿：甲醇=85：15(v/v)]純化，獲得的固體以氯仿：甲醇：二乙基醚混合溶媒洗淨，獲得呈淡黃色固體之標題化合物(191mg, 40%)。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ : 0.87(3H, t, $J=7.4\text{Hz}$), 1.67-1.77(2H, m), 1.79-1.92(2H, m), 2.08-2.22(4H, m), 2.33(2H, t, $J=7.0\text{Hz}$), 2.40(3H, s), 2.74-2.83(1H, m), 2.99-3.12(3H, m), 3.14-3.21(2H, m), 3.24-3.30(2H, m), 3.56-3.77(6H, m), 3.82(2H, s), 4.41-4.51(1H, m), 5.20(2H, q, $J=18.9\text{Hz}$), 5.42(2H, s), 5.54-5.60(1H, m), 6.54(1H, s), 7.15-7.27(5H, m), 7.31(1H, s), 7.69-7.74(1H, m), 7.80(1H, d, $J=10.9\text{Hz}$), 8.06(1H, t, $J=5.7\text{Hz}$), 8.13(1H, d, $J=7.8\text{Hz}$), 8.21-8.34(3H, m), 8.46(1H, d, $J=8.6\text{Hz}$).

MS(ESI) m/z : 1030, 1032($M+H$) $^+$

【0322】步驟 4：抗體-藥物複合體(29)

抗體之還原：參考例 2 製作的 M30-H1-L4P 抗體，使用製造方法 1 記載的共通操作 C-1 及 B(作為 280nm 吸光係數，使用 $1.61\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$)，將媒體取代為 PBS6.0/EDTA，調製為 10mg/mL 之抗體濃度。將本溶液(1.25mL)置入 1.5mL 聚丙烯製試管中，於其中添加 10mM TCEP(東京化成工業股份有限公司)水溶液(0.025mL；相對於抗體一分子為 3.0 當量)及 1M 磷酸氫二鉀水溶液(Nacalai Tesque, Inc.; 0.0625mL)。確認本

溶液之 pH 為 7.4 ± 0.1 內後，於 37°C 培育 1 小時下，使抗體內鉸鏈部之雙硫鍵還原。

抗體與藥物連結物之結合：對上述溶液，室溫下添加含二甲基亞砷(Sigma-Aldrich Co.LLC；0.09mL)與上述步驟 3 獲得的化合物 10mM 的二甲基亞砷溶液(0.059mL；相對於抗體一分子為 7.0 當量)，使用試管迴轉器(MTR-103，AS ONE 股份有限公司)，室溫下攪拌 40 分鐘，使藥物連結物對抗體結合。其次，添加 100mM NAC(Sigma-Aldrich Co.LLC)水溶液(0.009mL)，再於室溫下攪拌 20 分鐘，使藥物連結物的反應停止。

純化：上述溶液，進行使用製造方法 1 記載的共通操作 D-1(使用 ABS 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 6mL 後，使用共通操作 A，而濃縮溶液。

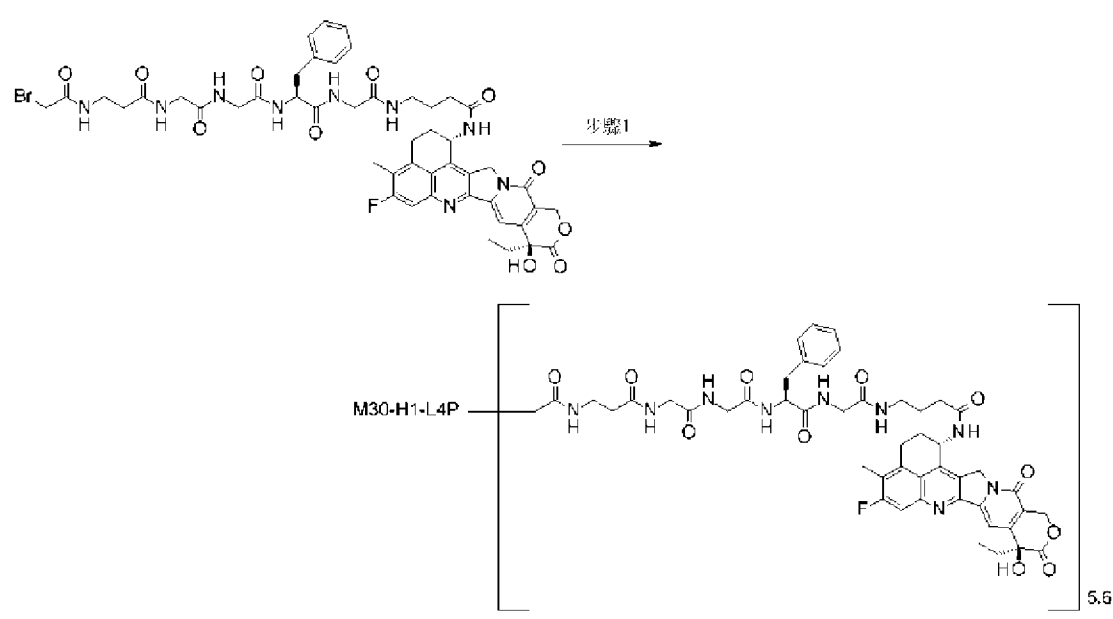
特性評價：使用製造方法 1 記載的共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\epsilon_{A,280}=235300$ (計算推定值)、 $\epsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)、 $\epsilon_{D,280}=5000$ (實測平均值)、 $\epsilon_{D,370}=19000$ (實測平均值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：13.9mg/mL，抗體產量：9.7mg(78%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：3.2

【0323】

實施例 31 抗體-藥物複合體(30)

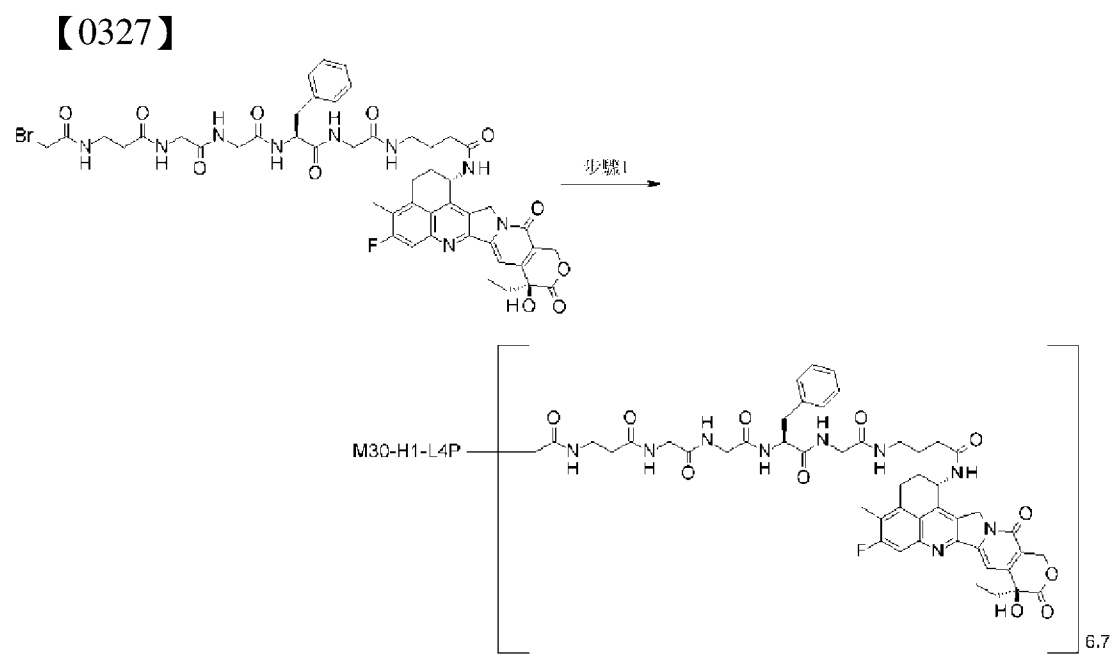
【0324】



【0325】使用參考例 2 製作的 M30-H1-L4P 抗體及實施例 30 之步驟 3 獲得的化合物，藉由與實施例 4 之步驟 1 相同之方法，獲得標題抗體-藥物複合體。

抗體濃度：1.94mg/mL，抗體產量：11.64mg(93%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：5.6

【0326】
實施例 32 抗體-藥物複合體(31)



【0328】步驟 1：抗體-藥物複合體(31)

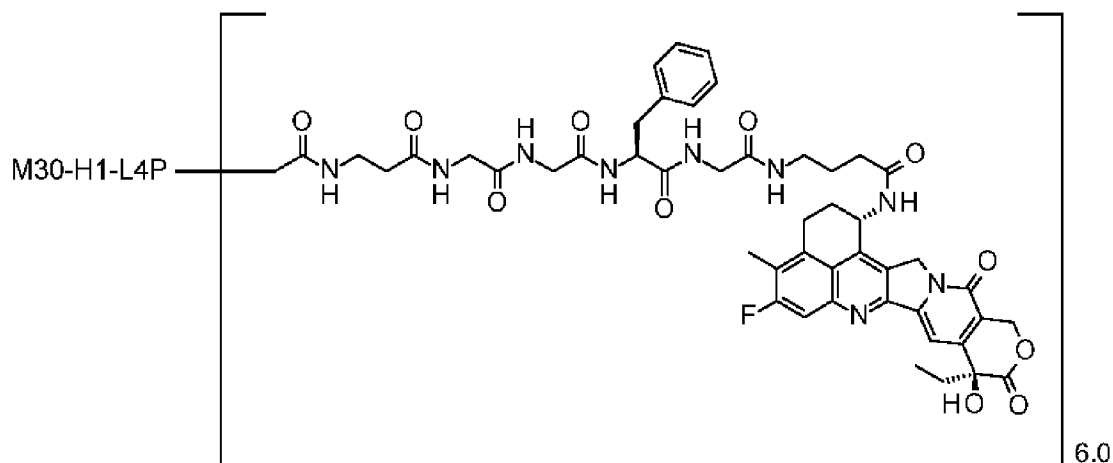
使用參考例 2 製作的 M30-H1-L4P 抗體及實施例 30 之步驟 3 獲得的化合物，藉由與實施例 5 之步驟 1 相同之方法，獲得標題抗體-藥物複合體。

抗體濃度：1.90mg/mL，抗體產量：11.40mg(91%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：6.7

【0329】

實施例 33 抗體-藥物複合體(32)

【0330】



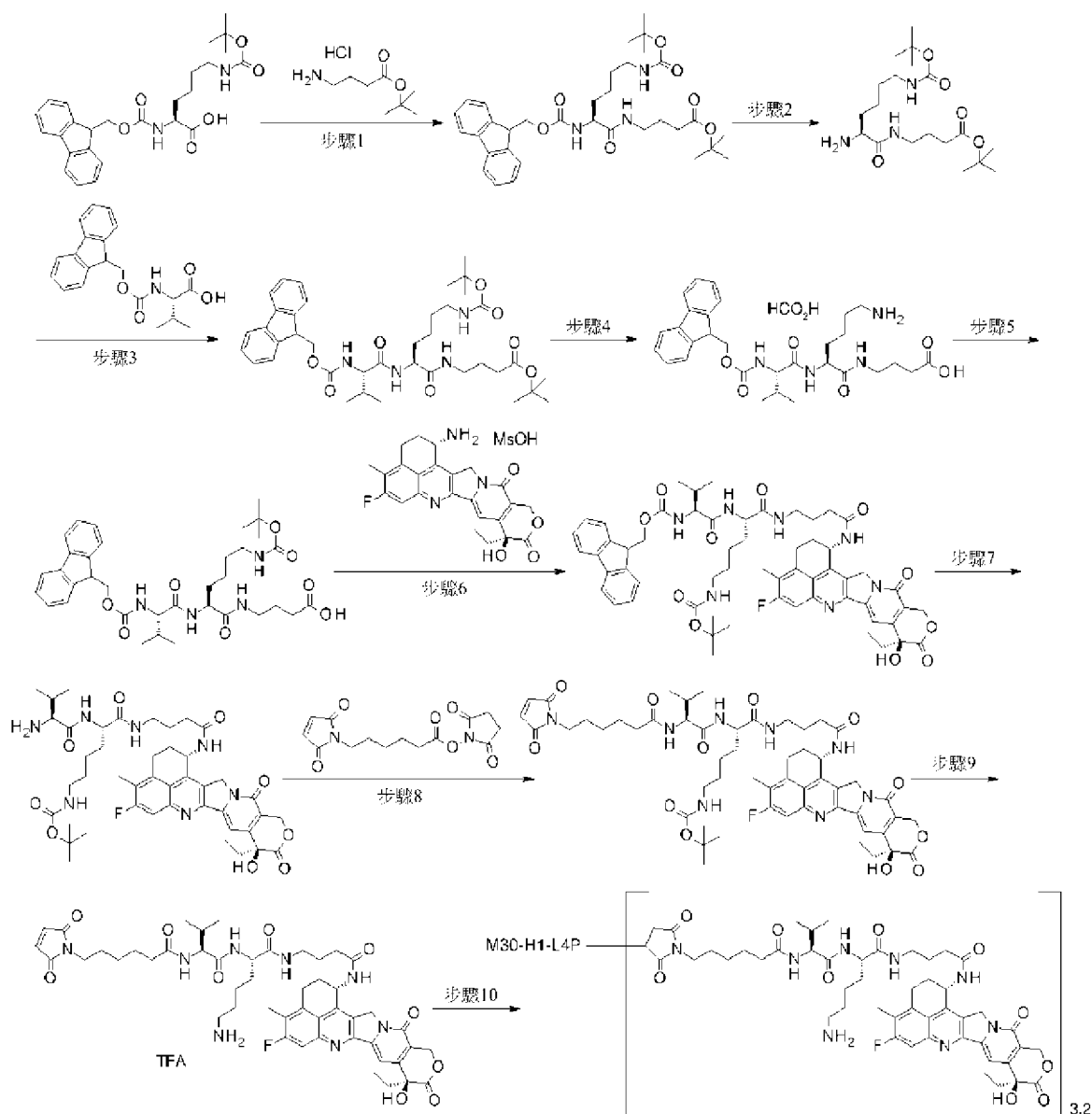
【0331】將約略全量的實施例 31 與實施例 32 之抗體-藥物複合體混合，使用共通操作 A 而濃縮溶液，獲得標題抗體-藥物複合體。

抗體濃度：10.0mg/mL，抗體產量：21.06mg，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：6.0

【0332】

實施例 34 抗體-藥物複合體(33)

【0333】



【0334】步驟 1：tert-丁基 4-({N⁶-(tert-丁氧基羰基)-N²-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]-L-離胺鹽基}胺基)丁酸酯

於 N^ε-(tert-丁氧基羰基)-N^α-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]-L-離胺酸(1.00g, 2.14mmol)、N-羥基琥珀鹽亞胺(0.370g, 3.20mmol)、及 tert-丁基 4-胺基丁酸酯鹽酸鹽(0.830g, 4.27mmol)之 N,N-二甲基甲醯胺(10.0mL)溶液中，添加 1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳化二亞胺鹽酸鹽(0.610g, 3.20mmol)及 N,N-二異丙基乙基胺(0.410ml, 2.35mmol)，並於室溫攪拌 3 日。反應液以乙酸乙酯稀釋，以 10%檸檬酸水

溶液、飽和碳酸氫鈉水溶液、及飽和食鹽水洗淨後，有機層以無水硫酸鎂乾燥。減壓下餾除溶媒，獲得呈無色固體之標題化合物(1.35 g，定量)。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz，DMSO- d_6) δ ：1.14-1.42(4H，m)，1.36(9H，s)，1.37(9H，s)，1.48-1.67(4H，m)，2.18(2H，t， $J=7.6\text{ Hz}$)，2.84-2.93(2H，m)，2.99-3.11(2H，m)，3.84-3.94(1H，m)，4.18-4.30(3H，m)，6.76(1H，t， $J=5.4\text{ Hz}$)，7.33(2H，t， $J=7.3\text{ Hz}$)，7.39-7.45(3H，m)，7.73(2H，dd， $J=7.3$ ， 2.7 Hz)，7.85-7.92(3H，m)。

【0335】步驟 2：tert-丁基 4-{[N⁶-(tert-丁氧基羰基)-L-離胺醯基]胺基}丁酸酯

於上述步驟 1 獲得的化合物(1.35 g，2.22 mmol)之 N,N-二甲基甲醯胺(8.00 mL)溶液中，添加哌啶(2.00 mL)，並於室溫攪拌 1.5 小時。減壓餾除溶媒，獲得含標題化合物的混合物。本混合物未進行進一步的純化而使用於下一反應。

【0336】步驟 3：N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]-L-纈胺醯基-N⁶-(tert-丁氧基羰基)-N-(4-tert-丁氧基-4-側氧基丁基)-L-離胺酸醯胺

於上述步驟 2 獲得的混合物(2.22 mmol)之 N,N-二甲基甲醯胺(30.0 mL)溶液中，添加 N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]-L-纈胺酸(1.13 g，3.32 mmol)、N-羥基琥珀醯亞胺(0.310 g，2.66 mmol)、及 1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳化二亞胺鹽酸鹽(0.550 g，2.88 mmol)，並於室溫攪拌 18 小時。反應液以乙酸乙酯稀釋，以飽和碳酸氫鈉水溶液及飽和食鹽水洗淨後，

有機層以無水硫酸鎂乾燥。減壓下餾除溶媒，獲得的殘留物以矽膠管柱層析[氯仿～氯仿：甲醇=9：1(v/v)]純化，獲得呈無色固體(0.363 g，23%)。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz，DMSO- d_6) δ ：0.84(6H，t， $J=6.0$ Hz)，1.12-1.64(8H，m)，1.34(9H，s)，1.38(9H，s)，1.90-2.04(1H，m)，2.17(2H，t， $J=7.3$ Hz)，2.79-2.90(2H，m)，2.99-3.09(2H，m)，3.83-3.91(1H，m)，4.08-4.44(4H，m)，6.71(1H，t， $J=5.4$ Hz)，7.32(2H，t， $J=7.3$ Hz)，7.42(3H，t， $J=7.3$ Hz)，7.74(2H，t， $J=7.0$ Hz)，7.85-7.91(4H，m)。

MS(ESI) m/z ：709($M+H$) $^+$

【0337】步驟4：N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]-L-纈胺鹽基-N-(3-羧基丙基)-L-離胺酸鹽胺甲酸鹽

於上述步驟3獲得的化合物(0.363 mg，0.512 mmol)中添加甲酸(10.0 ml)，並於室溫下攪拌4小時。減壓下餾除溶媒，獲得標題化合物。本化合物未進行進一步的純化而使用於下一反應。

【0338】步驟5：N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]-L-纈胺鹽基-N⁶-(tert-丁氧基羰基)-N-(3-羧基丙基)-L-離胺酸鹽胺

於上述步驟4獲得的化合物(0.512 mmol)之1,4-二噁烷(5.00 mL)懸浮液中，添加飽和碳酸氫鈉水溶液(20.0 ml)及二碳酸二-tert-丁基酯(0.178 ml，0.769 mmol)，於室溫攪拌3小時。反應液以乙酸乙酯稀釋，以10%檸檬酸水溶液及飽和食鹽水洗淨後，有機層以無水硫酸鎂乾燥。減壓下餾除溶媒，獲得呈無色固體之標題化合物(0.295 g，88%)。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ : 0.84(6H, t, $J=6.7$ Hz), 1.13-1.39(4H, m), 1.35(9H, s), 1.48-1.62(4H, m), 1.91-2.04(1H, m), 2.20(2H, t, $J=7.3$ Hz), 2.80-2.89(2H, m), 2.99-3.11(2H, m), 3.87(1H, dd, $J=8.5, 6.7$ Hz), 4.06-4.35(4H, m), 6.71(1H, t, $J=6.0$ Hz), 7.32(2H, t, $J=7.6$ Hz), 7.39-7.46(3H, m), 7.74(2H, t, $J=7.6$ Hz), 7.83-7.94(4H, m).

MS(ESI) m/z : 653($M+H$) $^+$

【0339】步驟 6：N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]-L-纈胺鹽基-N ^{6} -(tert-丁氧基羰基)-N-(4-{[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-4-側氧基丁基)-L-離胺酸鹽胺

將化合物(4)之甲磺酸鹽(0.240g、0.452mmol)，使用上述步驟 5 獲得的化合物(0.295g, 0.452mmol)替代 4-(tert-丁氧基羰基胺基)丁酸，藉由與實施例 1 之步驟 1 相同地反應，獲得呈淡橙色固體之標題化合物(0.208g, 43%)。

MS(ESI) m/z : 1071($M+H$) $^+$

【0340】步驟 7：L-纈胺鹽基-N ^{6} -(tert-丁氧基羰基)-N-(4-{[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-4-側氧基丁基)-L-離胺酸鹽胺

將上述步驟 6 獲得的化合物(0.208g, 0.194mmol)，使與上述步驟 2 相同地反應，獲得含標題化合物的混合物。本混合物未進行進一步的純化而使用於下一反應。

【0341】步驟 8：N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]-L-纈胺醯基-N⁶-(tert-丁氧基羰基)-N-(4-{[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吡喃并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-4-側氧基丁基)-L-離胺酸醯胺

將上述步驟 7 獲得的混合物(0.194mmol)，藉由與實施例 2 之步驟 3 相同地反應，獲得呈淡黃色固體之標題化合物(0.133g，56%)。

¹H-NMR(400MHz，DMSO-d₆)δ：0.77(6H，t，J=5.7Hz)，0.87(3H，t，J=7.3Hz)，1.14-1.71(10H，m)，1.35(9H，s)，1.77-1.95(3H，m)，2.02-2.23(7H，m)，2.40(3H，s)，2.84(3H，q，J=6.4Hz)，3.05(2H，d，J=6.7Hz)，3.17(2H，s)，3.26-3.39(3H，m)，4.01-4.16(2H，m)，5.15(1H，d，J=18.7Hz)，5.24(1H，d，J=18.7Hz)，5.36-5.48(2H，m)，5.51-5.60(1H，m)，6.52(1H，s)，6.72(1H，t，J=6.0Hz)，6.99(2H，s)，7.31(1H，s)，7.71-7.85(5H，m)，8.41(1H，d，J=9.1Hz)。

MS(ESI)m/z：1041(M+H)⁺

【0342】步驟 9：N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]-L-纈胺醯基-N-(4-{[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吡喃并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-4-側氧基丁基)-L-離胺酸醯胺三氟乙酸鹽

於上述步驟 8 獲得的化合物(0.110mg，0.106mmol)之二氯甲烷(10.0ml)溶液中，添加三氟乙酸(4.00ml)，並於室溫下

攪拌 5 小時。減壓下餾除溶媒，獲得呈淡黃色固體之標題化合物 (70.0mg, 64%)。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ : 0.76-0.81(6H, m), 0.87(3H, t, $J=7.3\text{Hz}$), 1.12-1.31(4H, m), 1.39-1.56(8H, m), 1.57-1.74(3H, m), 1.79-1.96(3H, m), 2.06-2.18(7H, m), 2.40(3H, s), 2.70-2.80(2H, m), 3.01-3.10(2H, m), 3.13-3.22(2H, m), 4.04(1H, t, $J=7.6\text{Hz}$), 4.10-4.20(1H, m), 5.15(1H, d, $J=18.7\text{Hz}$), 5.24(1H, d, $J=18.7\text{Hz}$), 5.36-5.47(2H, m), 5.52-5.60(1H, m), 6.53(1H, s), 7.00(2H, s), 7.32(1H, s), 7.61(3H, brs), 7.75-7.88(4H, m), 8.43(1H, d, $J=8.5\text{Hz}$).

MS(ESI)m/z : 941(M+H) $^+$

【0343】步驟 10：抗體-藥物複合體(33)

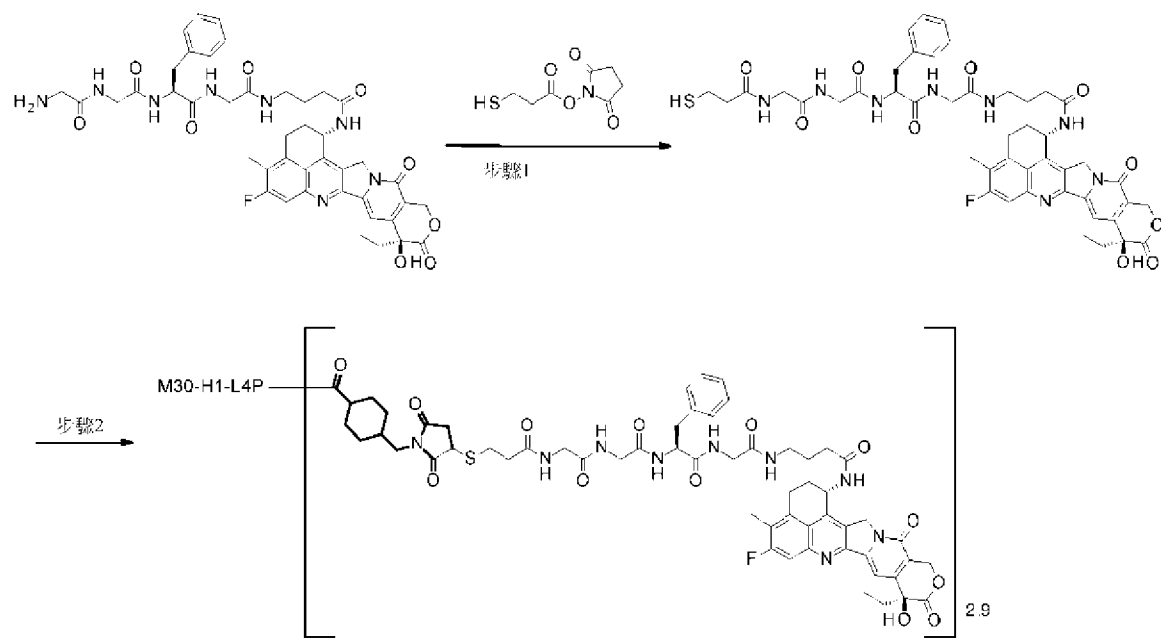
使用參考例 2 製作的 M30-H1-L4P 抗體及上述步驟 9 獲得的化合物，藉由與實施例 29 之步驟 2 相同之方法，獲得標題抗體-藥物複合體。

抗體濃度：12.0mg/mL，抗體產量：8.4mg(67%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：3.2

【0344】

實施例 35 抗體-藥物複合體(34)

【0345】



【0346】步驟 1：*N*-(3-硫基丙醯基)甘胺醯基甘胺醯基-*L*-苯基丙胺醯基-*N*-(4-{[(1*S*,9*S*)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1*H*,12*H*-苯并[*de*]哌喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-*b*]喹啉-1-基]胺基}-4-側氧基丁基)甘胺酸醯胺

將實施例 2 之步驟 2 獲得的化合物(84.0mg，0.100mmol)，使用 3-氫硫基丙酸 *N*-琥珀醯亞胺基酯替代 6-順丁烯二醯亞胺己酸 *N*-琥珀醯亞胺基酯，藉由與實施例 2 之步驟 3 相同地反應，獲得呈淡黃色固體之標題化合物(61.2mg，66%)。

¹H-NMR(DMSO-*D*₆)δ：0.87(3H，t，*J*=7.4Hz)，1.77-1.66(2H，m)，1.79-1.92(2H，m)，2.07-2.24(4H，m)，2.31-2.47(3H，m)，2.40(3H，s)，2.59-2.69(2H，m)，2.78(1H，dd，*J*=13.7，9.8Hz)，2.98-3.13(3H，m)，3.14-3.23(2H，m)，3.54-3.79(6H，m)，4.40-4.50(1H，m)，5.20(2H，dd，*J*=36.8，19.2Hz)，5.36-5.47(2H，m)，5.52-5.63

(1H, m), 6.54(1H, s), 7.14-7.28(5H, m), 7.31(1H, s), 7.68-7.74(1H, m), 7.80(1H, d, $J=10.9\text{Hz}$), 8.03-8.09(1H, m), 8.13(1H, d, $J=7.8\text{Hz}$), 8.19-8.29(2H, m), 8.46(1H, d, $J=8.6\text{Hz}$).

MS(ESI) m/z : 927($M+H$)⁺

【0347】步驟 2：抗體-藥物複合體(34)

抗體之 SMCC 衍生物化：將參考例 2 製作的 M30-H1-L4P 抗體，使用共通操作 C-2 及 B(作為 280nm 吸光係數，使用 $1.61\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$)，將媒體取代為 PBS6.5/EDTA，調製為 20mg/mL 之抗體濃度。將本溶液(0.25mL)置入 1.5mL 試管中，於其中室溫下添加含琥珀醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯(SMCC, Thermo Fisher Scientific Inc.)27.6mM 的 DMSO 溶液(0.0063mL；相對於抗體一分子相對於約 2.55 當量)，室溫下使反應 2 小時。此反應液進行使用共通操作 D-2 的純化，獲得含經 SMCC 衍生物化的抗體約 5mg 的溶液 0.7mL。

抗體與藥物連結物之結合：對上述溶液，室溫下添加 DMSO(0.045mL)與含上述步驟 1 獲得的化合物 10mM 的 DMSO 溶液(0.015mL；相對於抗體一分子相當於約 2.4 當量)，使用試管迴轉器(MTR-103, AS ONE 股份有限公司)，室溫下攪拌 16 小時，使藥物連結物對抗體結合。

純化：上述溶液，進行使用共通操作 D-1(使用 ABS 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 3.5mL 後，使用共通操作 A，而濃縮溶液。

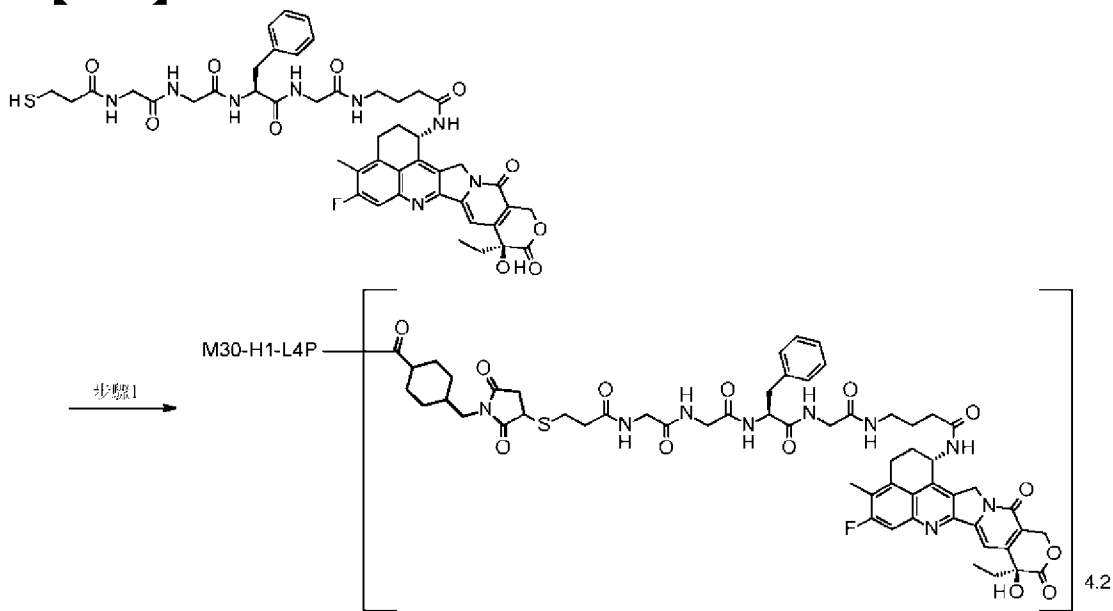
特性評價：使用共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\epsilon_{A,280}=235300$ (計算推定值)、 $\epsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)、 $\epsilon_{D,280}=5000$ (實測平均值)、 $\epsilon_{D,370}=19000$ (實測平均值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：3.85mg/mL，抗體產量：0.8mg(16%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：2.9

【0348】

實施例 36 抗體-藥物複合體(35)

【0349】



【0350】步驟 1：抗體-藥物複合體(35)

抗體之 SMCC 衍生物化：將參考例 2 製作的 M30-H1-L4P 抗體，使用共通操作 C-2 及 B(作為 280nm 吸光係數，使用 $1.61\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$)，將媒體取代為 PBS6.5/EDTA，調製為 20mg/mL 之抗體濃度。將本溶液(0.25mL)置入 1.5mL 試管中，於其中室溫下添加含琥珀醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯(SMCC，Thermo Fisher Scientific

Inc.) 27.6mM 的 DMSO 溶液(0.0125mL；相對於抗體一分子相當於約 5.1 當量)，並於室溫使反應 2 小時。此反應液進行使用共通操作 D-2 的純化，獲得含經 SMCC 衍生物的抗體約 5mg 的溶液 0.7mL。

抗體與藥物連結物之結合：對上述溶液，室溫下添加含 DMSO(0.03mL)與實施例 35 之步驟 1 獲得的化合物 10mM 的 DMSO 溶液(0.03mL；相對於抗體一分子相當於約 4.8 當量)，使用試管迴轉器(MTR-103，AS ONE 股份有限公司)而於室溫下攪拌 16 小時，使藥物連結物對抗體結合。

純化：上述溶液，進行使用共通操作 D-1(使用 ABS 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 3.5mL 後，使用共通操作 A，而濃縮溶液。

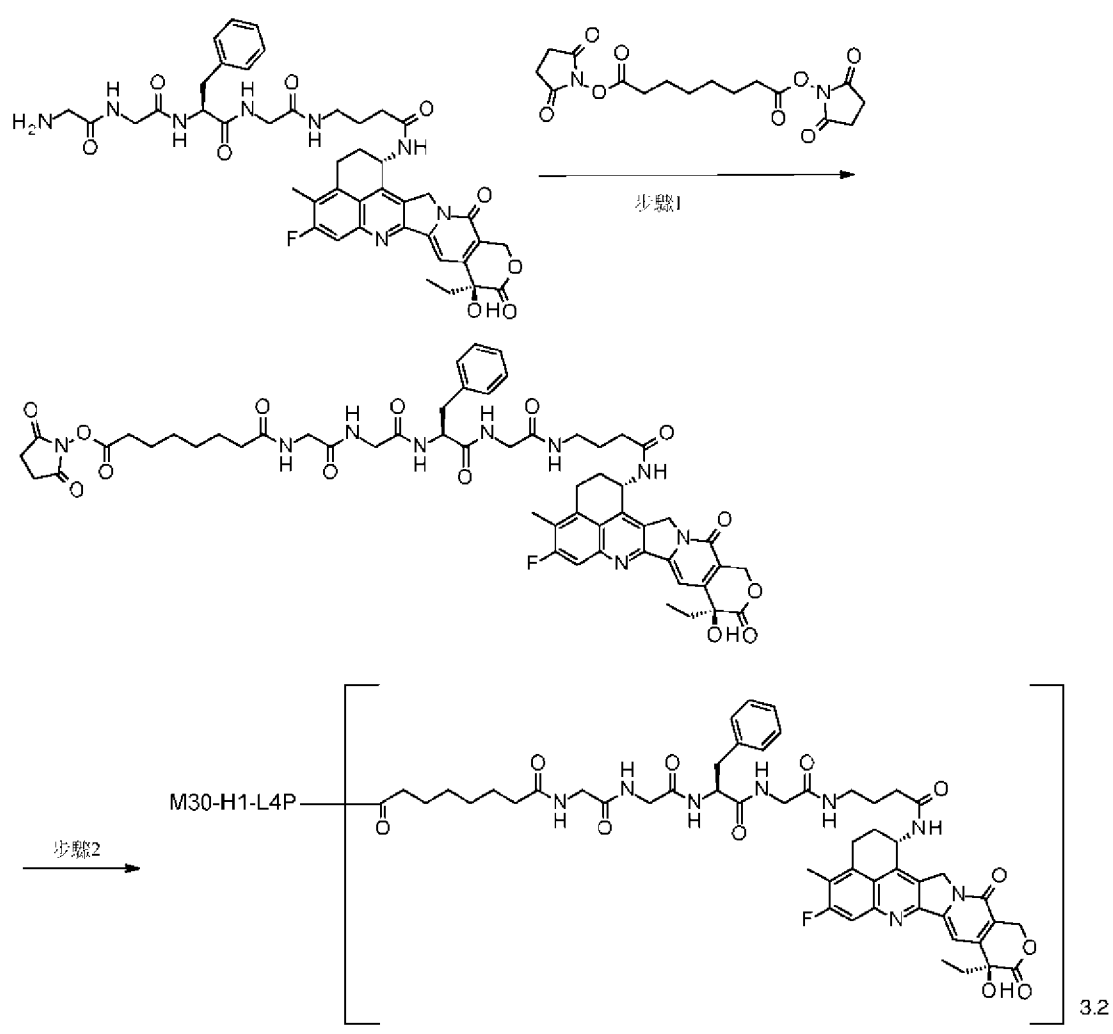
特性評價：使用共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\epsilon_{A,280}=235300$ (計算推定值)· $\epsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)· $\epsilon_{D,280}=5000$ (實測平均值)· $\epsilon_{D,370}=19000$ (實測平均值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：2.43mg/mL，抗體產量：0.5mg(10%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：4.2

【0351】

實施例 37 抗體-藥物複合體(36)

【0352】



【0353】 步驟 1：*N*-{8-[(2,5-二側氧基吡咯啉-1-基)氧基]-8-側氧基辛醯基}甘胺醯基甘胺醯基-*L*-苯基丙胺醯基-*N*-(4-{[(1*S*,9*S*)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1*H*,12*H*-苯并[*de*]哌喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-*b*]喹啉-1-基]胺基}-4-側氧基丁基)甘胺酸醯胺

將實施例 2 之步驟 2 獲得的化合物(84.0mg，0.100mmol)，使用辛二酸二(*N*-琥珀醯亞胺基)替代 6-順丁烯二醯亞胺己酸 *N*-琥珀醯亞胺基酯，藉由與實施例 2 之步驟 3 相同地反應，獲得呈淡黃色固體之標題化合物(77.1mg，71%)。

¹H-NMR(DMSO-*D*₆)δ：0.87(3H，t，*J*=7.2Hz)，1.21-1.38(4H，m)，1.43-1.50(2H，m)，1.55-1.63(2H，m)，

1.68-1.76(2H, m), 1.80-1.91(2H, m), 2.07-2.22(6H, m), 2.40(3H, s), 2.60-2.67(2H, m), 2.76-2.84(5H, m), 2.97-3.22(5H, m), 3.56-3.76(6H, m), 4.40-4.50(1H, m), 5.20(2H, q, $J=18.8\text{Hz}$), 5.37-5.48(2H, m), 5.53-5.62(1H, m), 6.54(1H, s), 7.15-7.28(5H, m), 7.31(1H, s), 7.71(1H, t, $J=5.5\text{Hz}$), 7.80(1H, d, $J=10.9\text{Hz}$), 8.04(1H, t, $J=5.9\text{Hz}$), 8.09(1H, t, $J=5.9\text{Hz}$), 8.14(1H, d, $J=7.8\text{Hz}$), 8.26(1H, t, $J=5.9\text{Hz}$), 8.47(1H, d, $J=8.6\text{Hz}$).

MS(ESI) m/z : 1092($M+H$)⁺

【0354】步驟 2：抗體-藥物複合體(36)

抗體與藥物連結物之結合：將參考例 2 製作的 M30-H1-L4P 抗體，使用共通操作 C-2 及 B(作為 280nm 吸光係數，使用 $1.61\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$)，將媒體取代為 PBS6.5/EDTA，調製為 20mg/mL 之抗體濃度。將本溶液(0.25mL)置入 1.5mL 試管中，室溫下於其中添加含上述步驟 1 獲得的化合物 10mM 的 DMSO 溶液 0.025mL (相對於抗體一分子相當於約 3.7 當量)，使用試管迴轉器(MTR-103, AS ONE 股份有限公司)，室溫下攪拌 16 小時，使藥物連結物對抗體結合。

純化：上述溶液，進行使用共通操作 D-1(使用 ABS 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 3.5mL 後，使用共通操作 A，而濃縮溶液。

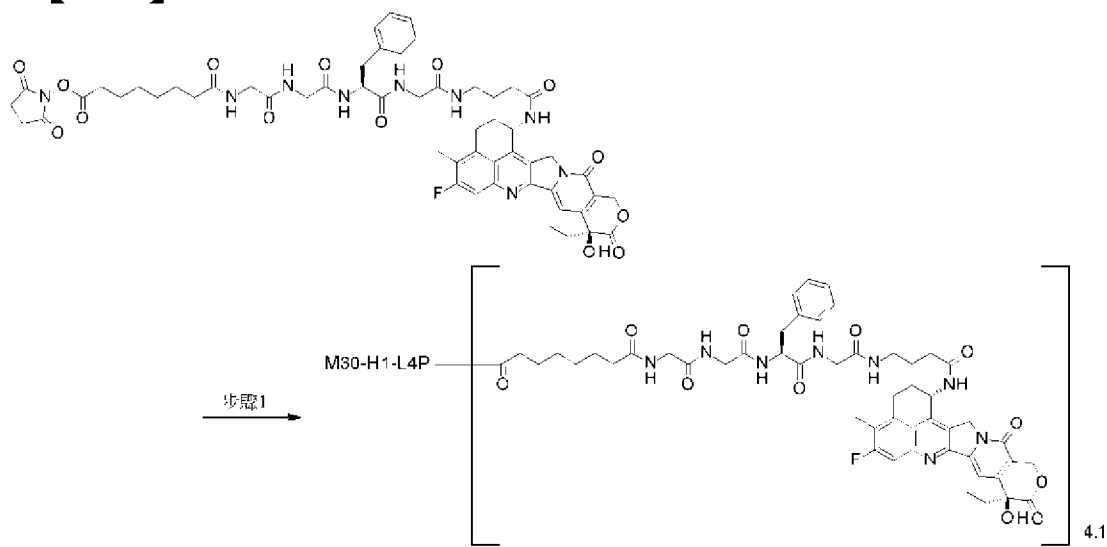
特性評價：使用共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\varepsilon_{A,280}=235300$ (計算推定值)· $\varepsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)· $\varepsilon_{D,280}=5000$ (實測平均值)· $\varepsilon_{D,370}=19000$ (實測平均值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：6.25mg/mL，抗體產量：1.3mg(26%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：3.2

【0355】

實施例 38 抗體-藥物複合體(37)

【0356】



【0357】步驟 1：抗體-藥物複合體(37)

抗體與藥物連結物之結合：將參考例 2 製作的 M30-H1-L4P 抗體，使用共通操作 C-2 及 B(作為 280nm 吸光係數，使用 1.61mLmg⁻¹cm⁻¹)，將媒體取代為 PBS6.5/EDTA，調製為 20mg/mL 之抗體濃度。將本溶液(0.5mL)置入 1.5mL 試管後，室溫下於其中添加含 DMSO(0.025mL)與實施例 37 之步驟 1 獲得的化合物 10mM 的 DMSO 溶液(0.025mL；相對於抗體一分子相當於為約 7.4 當量)，使用試管迴轉器(MTR-103，AS ONE 股份有限公司)，室溫下攪拌 16 小時，使藥物連結物對抗體結合。

純化：將上述溶液，進行使用共通操作 D-1(使用 ABS 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 3.5mL 後，使用共通操作 A，而濃縮溶液。

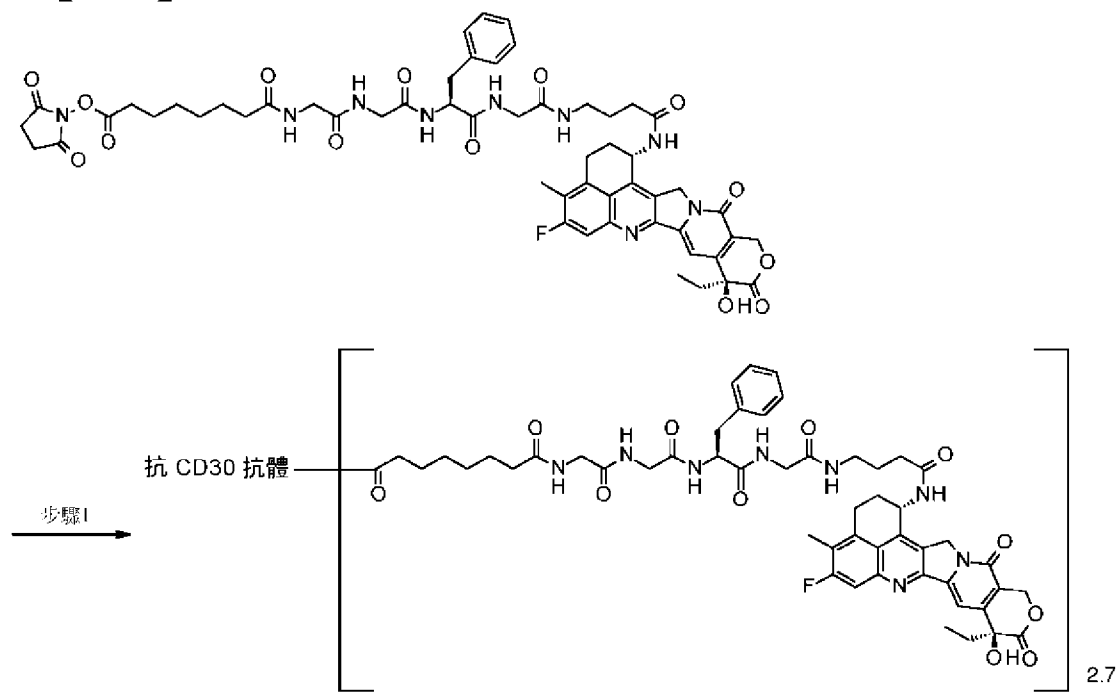
特性評價：使用共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\epsilon_{A,280}=235300$ (計算推定值)、 $\epsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)、 $\epsilon_{D,280}=5000$ (實測平均值)、 $\epsilon_{D,370}=19000$ (實測平均值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：4.36mg/mL，抗體產量：0.9mg(18%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：4.1

【0358】

實施例 39 抗體-藥物複合體(38)

【0359】



【0360】步驟 1：抗體-藥物複合體(38)

抗體與藥物連結物之結合：將參考例 3 製作的抗 CD30 抗體，使用共通操作 C-2 及 B(作為 280nm 吸光係數，使用 $1.75\text{ mL mg}^{-1}\text{ cm}^{-1}$)，將媒體取代為 PBS6.5/EDTA，調製為 10mg/mL 之抗體濃度。將本溶液(0.4mL、抗體 4mg)置入 1.5mL 試管後，室溫下於其中添加含 DMSO(0.017mL)與實施

例 37 之步驟 1 獲得的化合物 10mM 的 DMSO 溶液(0.023mL；相對於抗體一分子相當於 9 當量)，併使用試管迴轉器(MTR-103，AS ONE 股份有限公司)，室溫下攪拌 4 小時，使藥物連結物對抗體結合。

純化：將上述溶液，進行使用共通操作 D-1(使用 ABS 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 2.5mL。

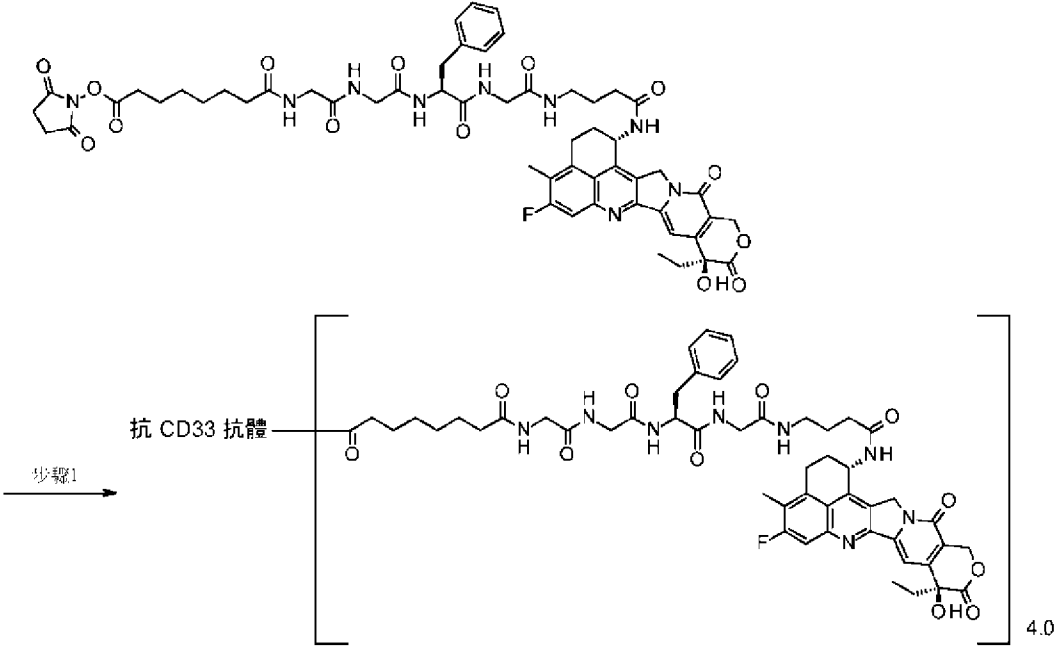
特性評價：使用共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\epsilon_{A,280}=270400$ (計算推定值)・ $\epsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)・ $\epsilon_{D,280}=2670$ (實測值)・ $\epsilon_{D,370}=15820$ (實測值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：0.55mg/mL，抗體產量：1.4mg(34%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：2.7

【0361】

實施例 40 抗體-藥物複合體(39)

【0362】



【0363】步驟 1：抗體-藥物複合體(39)

抗體與藥物連結物之結合：將參考例 4 製作的抗 CD33 抗體，使用共通操作 C-2 及 B(作為 280nm 吸光係數，使用 $1.66\text{ mL mg}^{-1}\text{ cm}^{-1}$)，將媒體取代為 PBS6.5/EDTA，調製為 10 mg/mL 之抗體濃度。將本溶液(0.4 mL 、抗體 4 mg)置入 1.5 mL 試管後，室溫下於其中添加含 DMSO(0.017 mL)與實施例 37 之步驟 1 獲得的化合物 10 mM 的 DMSO 溶液(0.023 mL ；相對於抗體一分子相當於 9 當量)，使用試管迴轉器(MTR-103，AS ONE 股份有限公司)於室溫下攪拌 4 小時，使藥物連結物對抗體結合。

純化：將上述溶液，進行使用共通操作 D-1(使用 ABS 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 2.5 mL 。

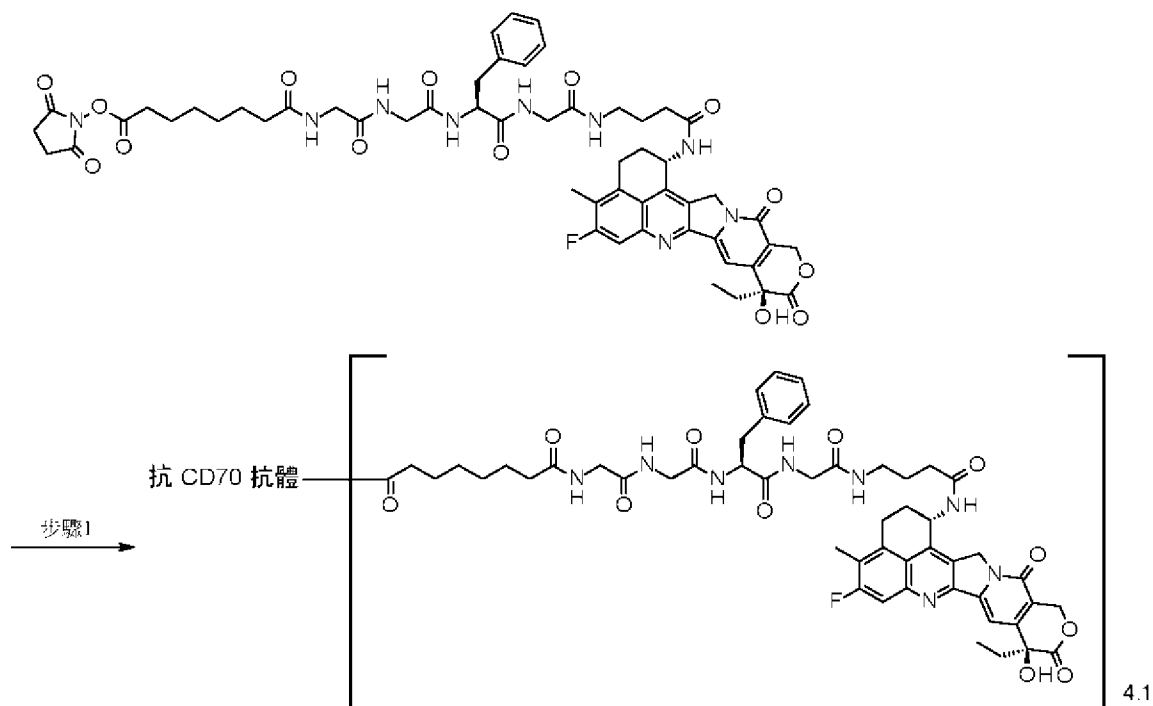
特性評價：使用共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\varepsilon_{A,280}=256400$ (計算推定值)、 $\varepsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)、 $\varepsilon_{D,280}=2670$ (實測值)、 $\varepsilon_{D,370}=15820$ (實測值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度： 0.93 mg/mL ，抗體產量： 2.3 mg (58%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：4.0

【0364】

實施例 41 抗體-藥物複合體(40)

【0365】



【0366】步驟 1：抗體-藥物複合體(40)

抗體與藥物連結物之結合：將參考例 5 製作的抗 CD70 抗體，使用共通操作 C-2 及 B(作為 280nm 吸光係數，使用 $1.69\text{ mL mg}^{-1}\text{ cm}^{-1}$)，將媒體取代為 PBS6.5/EDTA，調製為 10 mg/mL 之抗體濃度。將本溶液(0.4 mL 、抗體 4 mg)置入 1.5 mL 試管後，室溫下於其中添加 DMSO(0.017 mL)與含實施例 37 之步驟 1 獲得的化合物 10 mM 的 DMSO 溶液(0.023 mL ；相對於抗體一分子相當於 9 當量)，使用試管迴轉器(MTR-103，AS ONE 股份有限公司)而於室溫下攪拌 4 小時，使藥物連結物對抗體結合。

純化：將上述溶液，進行使用共通操作 D-1(使用 ABS 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 2.5 mL 。

特性評價：使用共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\epsilon_{A,280}=262400$ (計算推定值)、 $\epsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)、

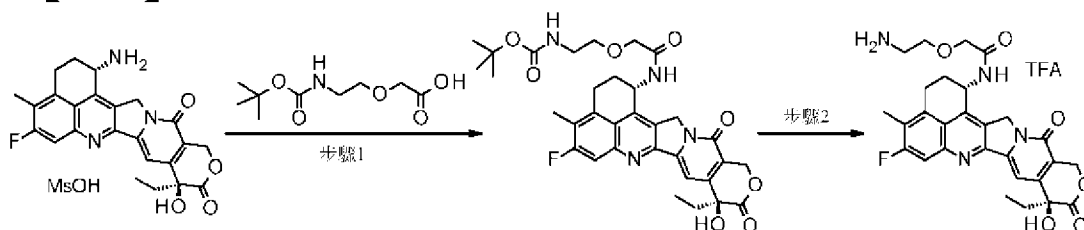
$\epsilon_{D,280}=2670$ (實測值)、 $\epsilon_{D,370}=15820$ (實測值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：1.04mg/mL，抗體產量：2.6mg(65%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：4.1

【0367】

實施例 42 2-(2-胺基乙氧基)-N-[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-1-基]乙醯胺

【0368】



【0369】步驟 1：tert-丁基[2-(2-{[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-2-側氧基乙氧基)乙基]胺基甲酸酯

將化合物(4)之甲磺酸鹽(3.10g、5.47mmol)，使用{2-[(tert-丁氧基羰基)胺基]乙氧基}乙酸(J.Med.Chem.，1992年，35卷，2928項)(1.55g，6.01mmol)替代4-(tert-丁氧基羰基胺基)丁酸，藉由與實施例1之步驟1相同地反應，獲得呈淡黃色固體之標題化合物(2.56g，73%)。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz，DMSO- d_6) δ ：0.87(3H，t，J=7.3Hz)，1.26(9H，s)，1.81-1.91(2H，m)，2.13-2.22(2H，m)，2.40(3H，s)，3.08-3.26(4H，m)，3.43-3.53(2H，

m), 4.00(1H, d, J=15.1Hz), 4.05(1H, d, J=15.1Hz), 5.14(1H, d, J=18.7Hz), 5.22(1H, d, J=18.7Hz), 5.40(1H, d, J=16.6Hz), 5.44(1H, d, J=16.6Hz), 5.59-5.66(1H, m), 6.53(1H, s), 6.86(1H, t, J=5.4Hz), 7.31(1H, s), 7.79(1H, d, J=10.9Hz), 8.49(1H, d, J=9.1Hz).

MS(APCI)m/z : 637(M+H)⁺

【0370】步驟 2：2-(2-胺基乙氧基)-N-[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-1-基]乙醯胺

將上述步驟 1 獲得的化合物(1.50g, 2.36mol), 使與實施例 1 之步驟 2 同樣地反應, 獲得呈淡黃色固體之標題化合物之三氟鹽酸鹽(1.50g, 定量)。投與抗體-藥物複合體(41)於担癌小鼠之際, 此化合物於腫瘤中被確認。

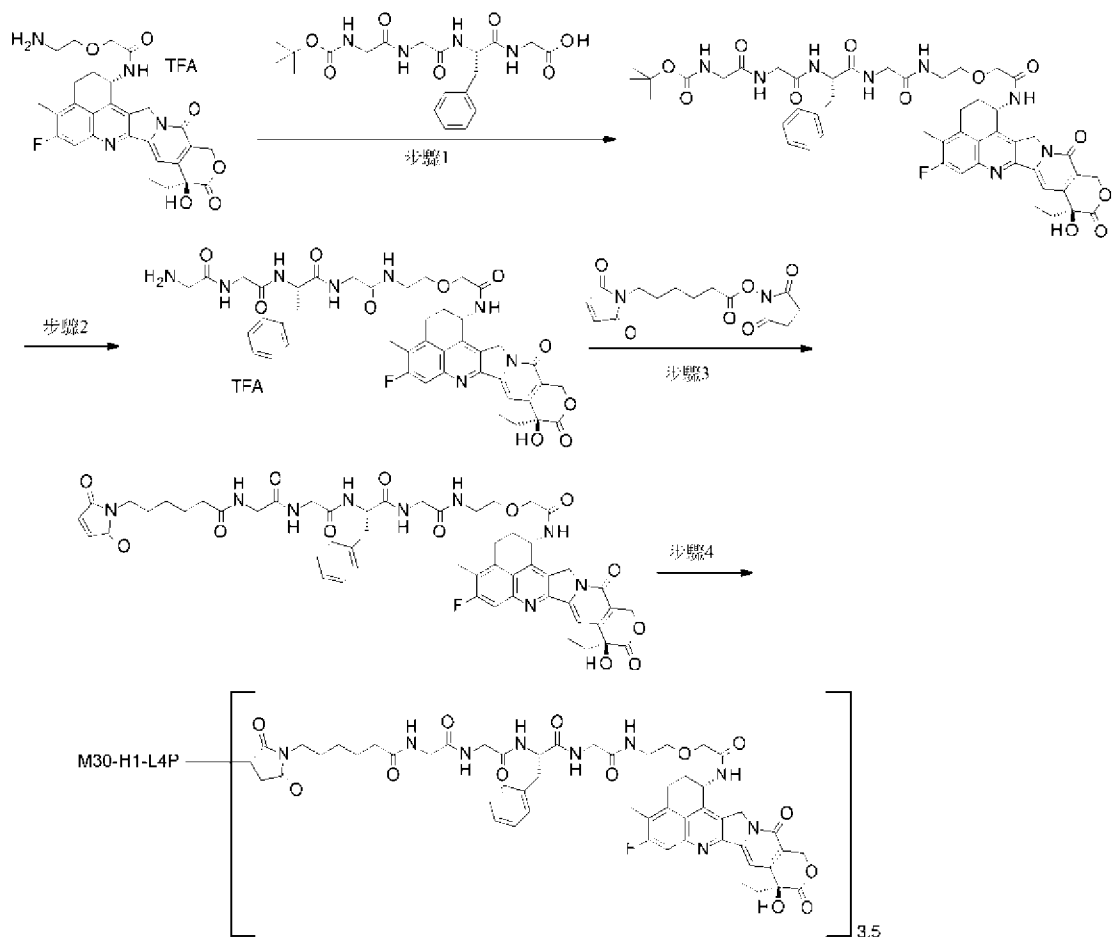
¹H-NMR(400MHz, DMSO-d₆)δ : 0.87(3H, t, J=7.5Hz), 1.81-1.92(2H, m), 2.15-2.23(2H, m), 2.41(3H, s), 3.05(2H, t, J=5.1Hz), 3.15-3.23(2H, m), 3.71(2H, t, J=5.1Hz), 4.10(2H, s), 5.19(1H, d, J=18.7Hz), 5.24(1H, d, J=18.7Hz), 5.43(2H, s), 5.58-5.66(1H, m), 6.55(1H, s), 7.33(1H, s), 7.73-7.84(4H, m), 8.55(1H, d, J=9.1Hz).

MS(APCI)m/z : 537(M+H)⁺

【0371】

實施例 43 抗體-藥物複合體(41)

【0372】



【0373】步驟 1：N-(tert-丁氧基羰基)甘胺醯基甘胺醯基-L-苯基丙胺醯基-N-[2-(2-{[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-2-側氧基乙氧基)乙基]甘胺酸醯胺

使實施例 42 之化合物(554mg, 0.85mmol)，與實施例 2 之步驟 1 相同地反應，獲得標題化合物(775mg, 95%)。

$$^1\text{H-NMR}(400\text{MHz}, \text{DMSO-}d_6)\delta : 0.85(3\text{H}, t, J=7.3\text{Hz}), 1.36(9\text{H}, s), 1.78-1.89(2\text{H}, m), 2.13-2.22(2\text{H}, m), 2.39(3\text{H}, s), 2.71(1\text{H}, dd, J=13.4, 9.8\text{Hz}), 2.95(1\text{H}, dd, J=13.4, 4.3\text{Hz}), 3.09-3.23(1\text{H}, m), 3.23-3.32(2\text{H}, m), 3.40-3.62(8\text{H}, m), 3.73(1\text{H}, dd, J=16.5, 5.5\text{Hz})$$

z), 4.03(2H, s), 4.39-4.47(1H, m), 5.17(1H, d, J=18.9Hz), 5.25(1H, d, J=18.9Hz), 5.41(1H, d, J=16.8Hz), 5.45(1H, d, J=16.8Hz), 5.57-5.64(1H, m), 6.54(1H, s), 6.99(1H, t, J=5.8Hz), 7.13-7.26(5H, m), 7.31(1H, s), 7.76-7.82(2H, m), 7.90(1H, t, J=5.2Hz), 8.13(1H, d, J=7.9Hz), 8.27(1H, t, J=5.8Hz), 8.49(1H, d, J=8.5Hz).

MS(APCI)m/z : 955(M+H)⁺

【0374】步驟 2：甘胺鹽基甘胺鹽基-L-苯基丙胺鹽基-N-[2-(2-{[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-2-側氧基乙氧基)乙基]甘胺酸鹽胺三氟乙酸鹽

使上述步驟 1 獲得的化合物(630mg, 0.659mmol), 與實施例 2 之步驟 2 相同地反應, 獲得標題化合物(588mg, 92%)。

¹H-NMR(400MHz, DMSO-d₆)δ : 0.86(3H, t, J=7.3Hz), 1.79-1.90(2H, m), 2.13-2.22(2H, m), 2.39(3H, s), 2.71(1H, dd, J=13.4, 10.1Hz), 2.99(1H, dd, J=13.4, 4.3Hz), 3.09-3.23(1H, m), 3.24-3.32(3H, m), 3.41-3.71(7H, m), 3.86(1H, dd, J=16.8, 5.8Hz), 4.04(2H, s), 4.52(1H, td, J=9.0, 4.1Hz), 5.17(1H, d, J=18.9Hz), 5.25(1H, d, J=18.9Hz), 5.41(1H, d, J=16.5Hz), 5.45(1H, d, J=16.5Hz), 5.56-5.65(1H, m), 6.55(1H, s), 7.13-7.26(5H, m), 7.32(1H, s), 7.80(1H, d, J=11.0Hz), 7.87-8.01(4H, m), 8.29-8.36(2H, m), 8.46-8.55(2H, m).

MS(APCI)m/z : 855(M+H)⁺

【0375】步驟 3：N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]甘胺醯基甘胺醯基-L-苯基丙胺醯基-N-[2-(2-[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]呋喃并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-2-側氧基乙氧基)乙基]甘胺酸醯胺

使上述步驟 2 獲得的化合物(240mg, 0.247mmol), 藉由與實施例 2 之步驟 3 相同地反應, 獲得標題化合物(162mg, 62%)。

¹H-NMR(400MHz, DMSO-d₆)δ : 0.86(3H, t, J=7.6Hz), 1.13-1.22(2H, m), 1.40-1.51(4H, m), 1.78-1.90(2H, m), 2.09(2H, t, J=7.6Hz), 2.14-2.21(2H, m), 2.39(3H, s), 2.74(1H, dd, J=13.6, 9.7Hz), 2.96(1H, dd, J=13.6, 4.5Hz), 3.08-3.24(1H, m), 3.24-3.30(1H, m), 3.33-3.40(4H, m), 3.47-3.68(7H, m), 3.72(1H, dd, J=16.6, 5.7Hz), 4.03(2H, s), 4.42(1H, td, J=8.6, 4.2Hz), 5.17(1H, d, J=18.7Hz), 5.25(1H, d, J=18.7Hz), 5.40(1H, d, J=17.2Hz), 5.44(1H, d, J=17.2Hz), 5.57-5.64(1H, m), 6.52(1H, s), 6.99(2H, s), 7.13-7.25(5H, m), 7.31(1H, s), 7.74-7.81(2H, m), 7.99(1H, t, J=5.7Hz), 8.03-8.11(2H, m), 8.22(1H, t, J=5.7Hz), 8.47(1H, d, J=9.1Hz).

MS(APCI)m/z : 1048(M+H)⁺

【0376】步驟 4：抗體-藥物複合體(41)

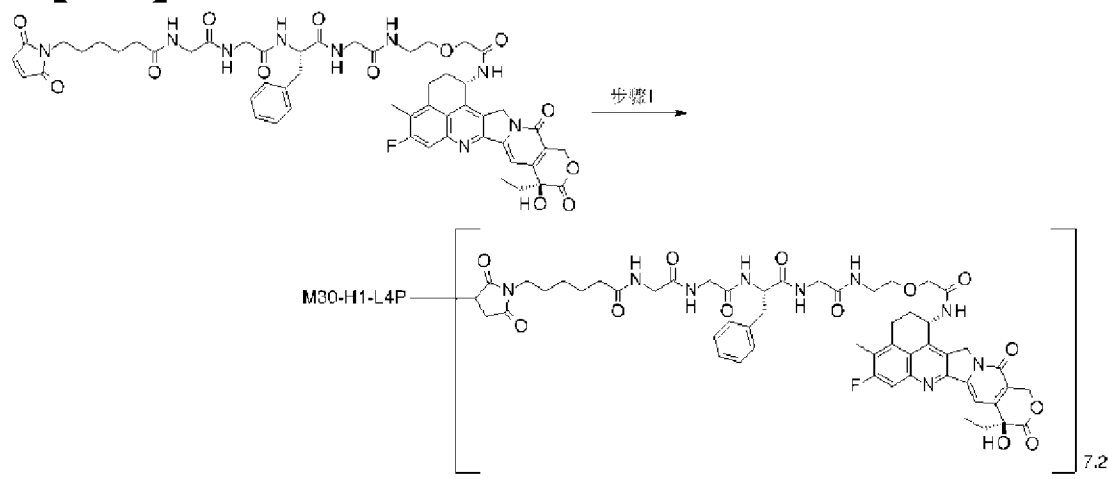
使用參考例 2 製作的 M30-H1-L4P 抗體及上述步驟 3 獲得的化合物，藉由與實施例 29 之步驟 2 相同之方法，獲得標題抗體-藥物複合體。

抗體濃度：12.0mg/mL，抗體產量：8.4mg(67%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：3.5

【0377】

實施例 44 抗體-藥物複合體(42)

【0378】



【0379】步驟 1：抗體-藥物複合體(42)

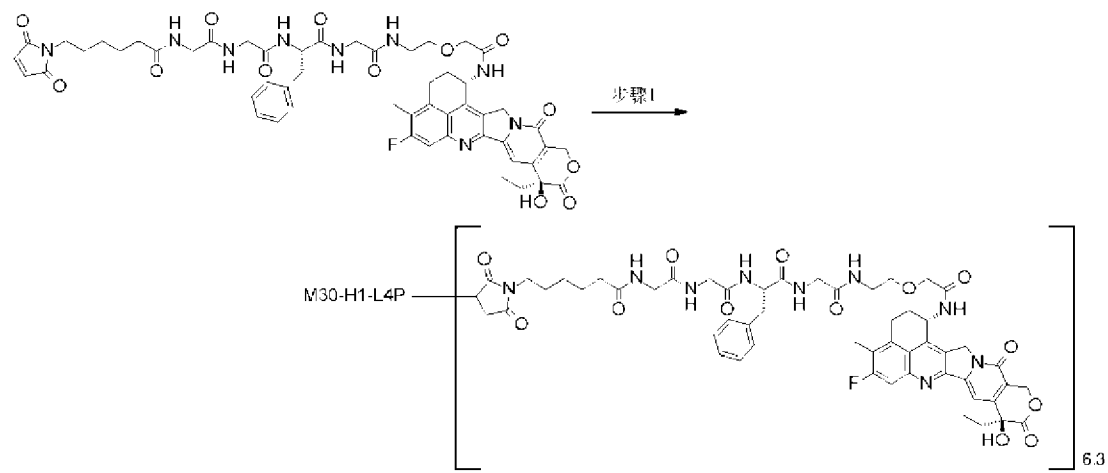
使用參考例 2 製作的 M30-H1-L4P 抗體及實施例 43 之步驟 3 獲得的化合物，藉由與實施例 5 之步驟 1 相同之方法，獲得標題抗體-藥物複合體。

抗體濃度：0.83mg/mL，抗體產量：4.98mg(40%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：7.2

【0380】

實施例 45 抗體-藥物複合體(43)

【0381】



【0382】 步驟 1：抗體-藥物複合體(43)

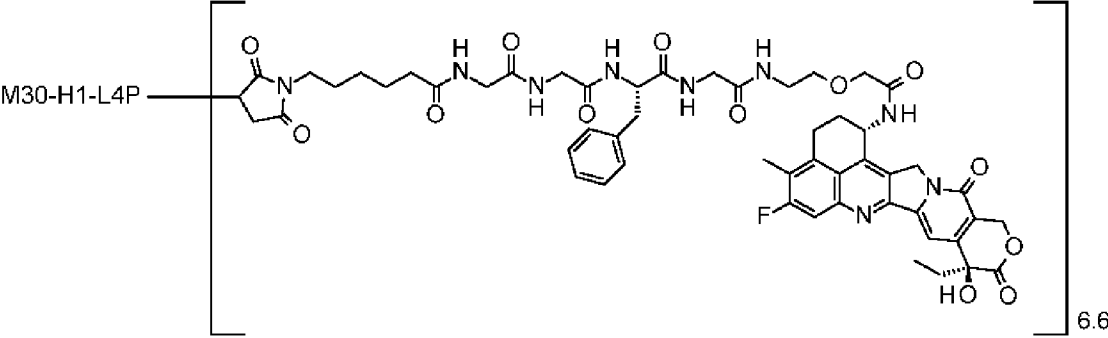
使用參考例 2 製作的 M30-H1-L4P 抗體及實施例 43 之步驟 3 獲得的化合物，藉由與實施例 4 之步驟 1 相同之方法，獲得標題抗體-藥物複合體。

抗體濃度：1.06mg/mL，抗體產量：6.36mg(51%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：6.3

【0383】

實施例 46 抗體-藥物複合體(44)

【0384】



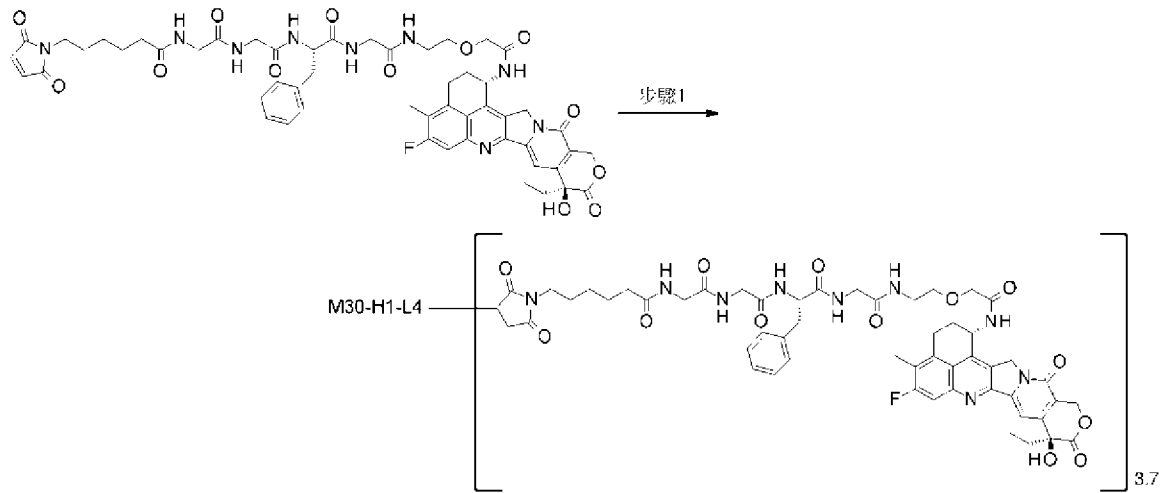
【0385】將約略全量的實施例 44 與實施例 45 之抗體-藥物複合體混合，使用共通操作 A 而濃縮溶液，獲得標題抗體-藥物複合體。

抗體濃度：10.0mg/mL，抗體產量：10.21mg，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：6.6

【0386】

實施例 47 抗體-藥物複合體(45)

【0387】



【0388】步驟 1：抗體-藥物複合體(45)

抗體之還原：將參考例 1 製作的 M30-H1-L4 抗體，使用製造方法 1 記載的共通操作 B(作為 280nm 吸光係數，使用 $1.61\text{ mL mg}^{-1}\text{ cm}^{-1}$)及 C-1，以 PBS6.5/EDTA 調製為 10 mg/mL 。將本溶液(1.25 mL 、抗體 12.5 mg)置入 1.5 mL 試管，添加 10 mM TCEP(東京化成工業股份有限公司)水溶液(0.0287 mL ；相對於抗體一分子為 3.4 當量)及 1 M 磷酸氫二鉀水溶液(Nacalai Tesque, Inc.; 0.0625 mL)。確認本溶液之 pH 為 7.4 ± 0.1 內後，藉由於 37°C 培育 1 小時，使抗體內鉸鏈部之雙硫鍵還原。

抗體與藥物連結物之結合：對上述溶液，室溫下添加含實施例 43 之步驟 3 獲得的化合物 10 mM 的二甲基亞砷溶液(0.0439 mL ；相對於抗體一分子為 5.2 當量)及二甲基亞砷(0.0267 mL)，於 15°C 之水浴中培育 1 小時，使藥物連結物對抗體結合。其次，添加 100 mM NAC(Sigma-Aldrich Co.LLC)

水溶液(0.0066mL)，再於室溫培育 20 分鐘，使藥物連結物的反應停止。

純化：上述溶液，進行使用製造方法 1 記載的共通操作 D-1(使用 ABS 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 6mL 後，使用共通操作 A，而濃縮溶液。

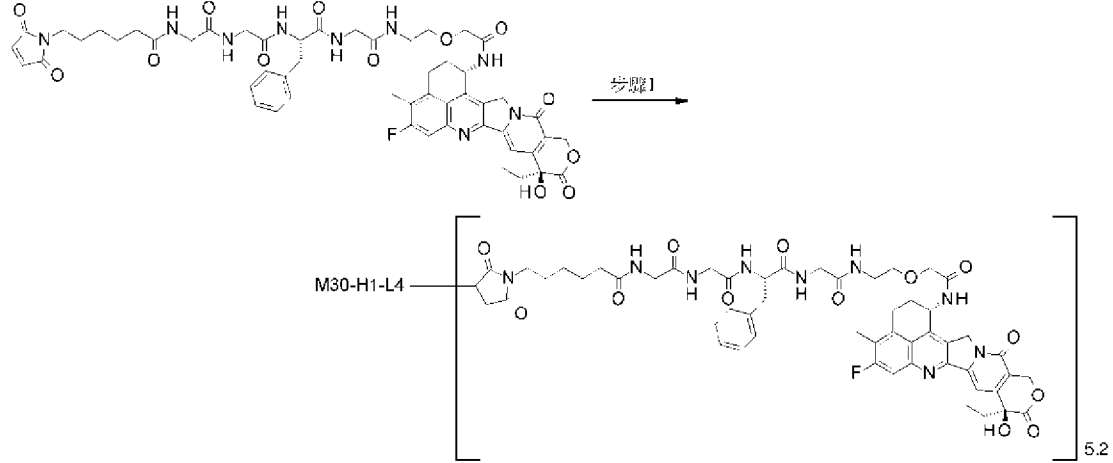
特性評價：使用製造方法 1 記載的共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\epsilon_{A,280}=235300$ (計算推定值)、 $\epsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)、 $\epsilon_{D,280}=5193$ (實測值)、 $\epsilon_{D,370}=20347$ (實測值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：10.0mg/mL，抗體產量：9.3mg(74%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：3.7

【0389】

實施例 48 抗體-藥物複合體(46)

【0390】



【0391】步驟 1：抗體-藥物複合體(46)

抗體之還原：將參考例 1 製作的 M30-H1-L4 抗體，使用製造方法 1 記載的共通操作 B(作為 280nm 吸光係數，使用 $1.61\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$)及 C-1，以 PBS6.5/EDTA 調製為

10 mg/mL。將本溶液(1.25 mL、抗體 12.5 mg)置入 1.5 mL 試管，添加 10 mM TCEP(東京化成工業股份有限公司)水溶液(0.0439 mL；相對於抗體一分子為 5.2 當量)(0.0287 mL；相對於抗體一分子為 3.4 當量)及 1 M 磷酸氫二鉀水溶液(Nacalai Tesque, Inc.; 0.0625 mL)。確認本溶液之 pH 為 7.4 ± 0.1 內後，藉由於 37°C 培育 1 小時，使抗體內鉸鏈部之雙硫鍵還原。

抗體與藥物連結物之結合：對上述溶液，室溫下添加含實施例 43 之步驟 3 獲得的化合物 10 mM 的二甲基亞砷溶液(0.0726 mL；相對於抗體一分子為 8.6 當量)，於 15°C 之水浴中培育 1 小時，使藥物連結物對抗體結合。其次，添加 100 mM NAC(Sigma-Aldrich Co.LLC)水溶液(0.011 mL)，再於室溫培育 20 分鐘，使藥物連結物的反應停止。

純化：上述溶液，進行使用製造方法 1 記載的共通操作 D-1(使用 ABS 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 6 mL 後，使用共通操作 A，而濃縮溶液。

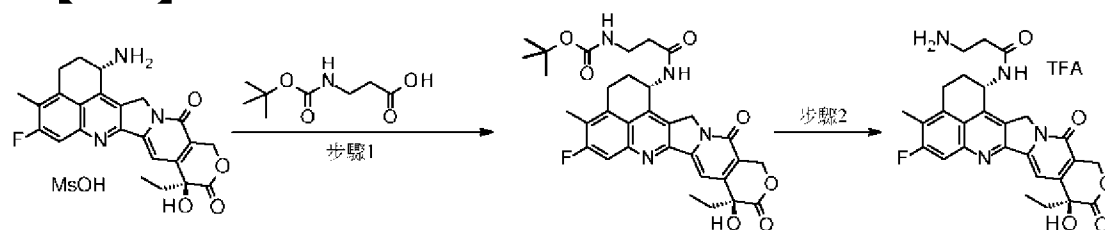
特性評價：使用製造方法 1 記載的共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\epsilon_{A,280}=235300$ (計算推定值)、 $\epsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)、 $\epsilon_{D,280}=5193$ (實測值)、 $\epsilon_{D,370}=20347$ (實測值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：10.0 mg/mL，抗體產量：7.8 mg(62%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：5.2

【0392】

實施例 49 N-[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-1-基]-β-丙胺酸鹽胺

【0393】



【0394】步驟 1：tert-丁基 (3-[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基)-3-側氧基丙基)胺基甲酸酯

將化合物(4)之甲磺酸鹽(500mg、0.941mmol)，使用 N-(tert-丁氧基羰基)-β-丙胺酸替代 4-(tert-丁氧基羰基胺基)丁酸，藉由與實施例 1 之步驟 1 相同地反應，獲得呈黃茶色固體之標題化合物(616mg、定量)。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ : 0.87(3H, t, $J=7.2\text{Hz}$), 1.29(9H, s), 1.86(2H, dt, $J=15.1, 7.3\text{Hz}$), 2.04-2.22(2H, m), 2.31(2H, t, $J=6.8\text{Hz}$), 2.40(3H, s), 3.10-3.26(4H, m), 5.15(1H, d, $J=18.8\text{Hz}$), 5.26(1H, d, $J=19.2\text{Hz}$), 5.42(2H, dd, $J=18.8, 16.4\text{Hz}$), 5.57(1H, dt, $J=8.5, 4.2\text{Hz}$), 6.53(1H, s), 6.78(1H, t, $J=5.5\text{Hz}$), 7.30(1H, s), 7.80(1H, d, $J=11.0\text{Hz}$), 8.46(1H, d, $J=8.6\text{Hz}$).

MS(ESI) m/z : 607($M+H$) $^+$

【0395】步驟 2：N-[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-1-基]-β-丙胺酸醯胺

將上述步驟 1 獲得的化合物，與實施例 1 之步驟 2 相同地反應，獲得呈黃色固體之標題化合物(499mg、86%)之三氟乙酸鹽。

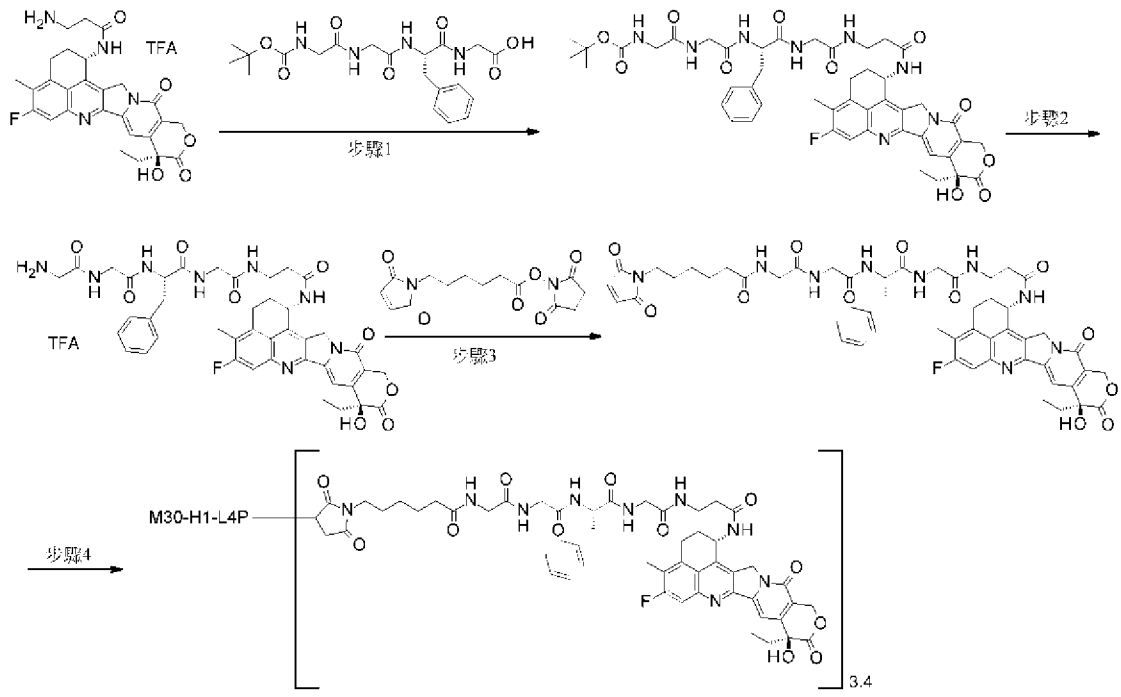
¹H-NMR(400MHz，DMSO-d₆)δ：0.87(3H，t，J=7.2Hz)，1.86(2H，dquin，J=14.6，7.2，7.2，7.2，7.2Hz)，2.06-2.27(1H，m)，2.41(3H，s)，2.46-2.57(2H，m)，3.08(2H，t，J=6.8Hz)，3.14-3.24(2H，m)，5.22(1H，d，J=18.8Hz)，5.29(1H，d，J=18.8Hz)，5.43(2H，s)，5.58(1H，dt，J=8.5，4.5Hz)，6.55(1H，s)，7.32(1H，s)，7.74(3H，brs)，7.82(1H，d，J=11.0Hz)，8.67(1H，d，J=8.6Hz)。

MS(ESI)m/z：507(M+H)⁺

【0396】

實施例 50 抗體-藥物複合體(47)

【0397】



【0398】步驟 1：N-(tert-丁氧基羰基)甘胺醯基甘胺醯基-L-苯基丙胺醯基甘胺醯基-N-[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-1-基]-β-丙胺酸醯胺

使實施例 49 之化合物(484mg、0.780mmol)，與實施例 2 之步驟 1 相同地反應，獲得呈淡黃色固體之標題化合物(626mg、87%)。

¹H-NMR(400MHz, DMSO-d₆)δ：0.87(3H, t, J=7.4Hz), 1.27-1.42(9H, m), 1.77-1.93(2H, m), 2.06-2.22(2H, m), 2.36(2H, t, J=7.2Hz), 2.40(3H, d, J=1.6Hz), 2.44-2.54(2H, m), 2.76(1H, dd, J=14.5, 10.2Hz), 3.02(1H, dd, J=13.9, 4.5Hz), 3.12-3.22(2H, m), 3.52(6H, d, J=6.3Hz), 4.42-4.54(1H, m), 5.19(1H, d, J=19.2Hz), 5.26(1H, d, J=18.4Hz), 5.42(1H, dd, J=18.4, 16.4Hz), 5.57(1H, dt, J=8.7, 4.4Hz), 6.53(1H, s), 6.98(1H, t, J=5.9Hz), 7.14-7.28(5H, m), 7.31(1H, s), 7.77-7.84(1H, m), 7.91(1H, t, J=5.5Hz), 8.16(1H, d, J=7.8Hz), 8.27(1H, t, J=5.1Hz), 8.52(1H, d, J=9.0Hz).

【0399】步驟 2：甘胺醯基甘胺醯基-L-苯基丙胺醯基甘胺醯基-N-[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-1-基]-β-丙胺酸醯胺三氟乙酸鹽

使上述步驟 1 獲得的化合物(624mg、0.675mmol)，與實施例 2 之步驟 2 相同地反應，獲得呈黃色固體之標題化合物(626mg、92%)。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ : 0.87(3H, t, $J=7.4\text{ Hz}$), 1.86(2H, tt, $J=14.5, 7.2\text{ Hz}$), 2.07-2.22(2H, m), 2.36(2H, t, $J=7.2\text{ Hz}$), 2.40(3H, s), 2.44-2.54(2H, m), 2.75(1H, dd, $J=13.7, 9.8\text{ Hz}$), 3.04(1H, dd, $J=13.7, 4.3\text{ Hz}$), 3.12-3.22(2H, m), 3.58(2H, d, $J=4.7\text{ Hz}$), 3.69(3H, td, $J=11.2, 5.7\text{ Hz}$), 3.87(1H, dd, $J=17.0, 5.7\text{ Hz}$), 4.54(1H, m, $J=17.8, 4.5\text{ Hz}$), 5.19(1H, d, $J=19.2\text{ Hz}$), 5.26(1H, d, $J=18.8\text{ Hz}$), 5.43(2H, s), 5.51-5.60(1H, m), 6.55(1H, s), 7.14-7.29(5H, m), 7.32(1H, s), 7.81(1H, d, $J=10.9\text{ Hz}$), 7.88(1H, t, $J=5.7\text{ Hz}$), 7.97(3H, brs), 8.29-8.38(2H, m), 8.50(1H, t, $J=5.7\text{ Hz}$), 8.55(1H, d, $J=8.6\text{ Hz}$).

MS(ESI) m/z : 825($M+H$) $^+$

【0400】步驟 3：N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]甘胺醯基甘胺醯基-L-苯基丙胺醯基甘胺醯基-N-[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基]- β -丙胺酸醯胺

將上述步驟 2 獲得的化合物(60.0mg、0.0646mmol)，藉由與實施例 2 之步驟 3 相同地反應，獲得呈固體之標題化合物(14.0mg、21%)。

^1H -NMR(400MHz, DMSO- d_6) δ : 0.86(3H, t, $J=7.2\text{ Hz}$), 1.12-1.22(2H, m), 1.39-1.51(4H, m), 1.79-1.91(2H, m), 2.02-2.20(2H, m), 2.07(2H, t, $J=7.4\text{ Hz}$), 2.30-2.42(4H, m), 2.40(3H, s), 2.78(1H, dd, $J=14.1, 9.4\text{ Hz}$), 3.02(1H, dd, $J=14.7, 4.9\text{ Hz}$), 3.12-3.21(2H, m), 3.26-3.42(2H, m), 3.50-3.80(6H, m), 4.40-4.51(1H, m), 5.19(1H, d, $J=19.6\text{ Hz}$), 5.26(1H, d, $J=19.2\text{ Hz}$), 5.42(2H, brs), 5.51-5.62(1H, m), 6.53(1H, s), 6.99(2H, s), 7.13-7.28(5H, m), 7.31(1H, s), 7.74-7.84(2H, m), 8.01(1H, t, $J=5.3\text{ Hz}$), 8.06(1H, t, $J=5.7\text{ Hz}$), 8.14(1H, d, $J=8.2\text{ Hz}$), 8.25(1H, t, $J=5.7\text{ Hz}$), 8.53(1H, d, $J=8.6\text{ Hz}$).

MS(ESI) m/z : 1018($M+H$) $^+$

【0401】步驟 4：抗體-藥物複合體(47)

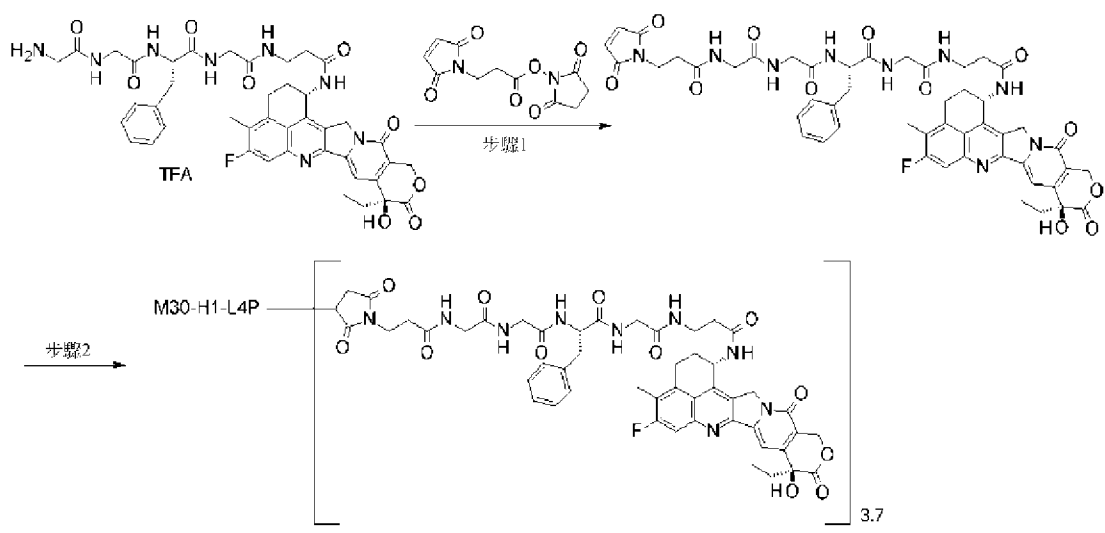
使用參考例 2 製作的 M30-H1-L4P 抗體及上述步驟 3 獲得的化合物，藉由與實施例 2 之步驟 4 相同之方法，獲得標題抗體-藥物複合體。

抗體濃度：12.27mg/mL，抗體產量：8.6mg(69%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：3.4

【0402】

實施例 51 抗體-藥物複合體(48)

【0403】



【0404】步驟 1：N-[3-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)丙醯基]甘胺醯基甘胺醯基-L-苯基丙胺醯基甘胺醯基-N-[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]呔啉并[1,2-b]喹啉-1-基]-β-丙胺酸醯胺

將實施例 50 之步驟 2 獲得的化合物(60.0mg、0.0646mmol)，使用 3-順丁烯二醯亞胺丙酸 N-琥珀醯亞胺基酯替代 6-順丁烯二醯亞胺己酸 N-琥珀醯亞胺基酯，藉由與實施例 2 之步驟 3 相同地反應，獲得呈淡黃色固體之標題化合物(36.0mg、57%)。

¹H-NMR(400MHz, DMSO-d₆)δ：0.86(3H, t, J=7.4Hz), 1.85(2H, dt, J=14.4, 7.5Hz), 2.05-2.22(2H, m), 2.40(3H, s), 2.30-2.44(5H, m), 2.73-2.84(1H, m), 3.02(1H, dd, J=13.9, 4.5Hz), 3.17(3H, d, J=5.1Hz), 3.26-3.40(2H, m), 3.41-3.81(6H, m), 4.40-4.51(1H, m), 5.19(1H, d, J=19.2Hz), 5.26(1H, d, J=18.8Hz), 5.42(2H, brs), 5.52-5.61(1H, m), 6.53(1H, s), 6.99(2H, s), 7.13-7.28(5H, m), 7.31(1H, s), 7.80(2H, d, J=10.

-1H-吡咯-1-基)丙醯基]胺基})乙氧基]丙醯基}甘胺醯基甘胺醯基-L-苯基丙胺醯基甘胺醯基-N-[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-1-基]-β-丙胺酸醯胺

將實施例 50 之步驟 2 獲得的化合物(60.0mg、0.0646mmol)，使用 3-(2-(2-(3-順丁烯二醯亞胺丙醯胺)乙氧基)乙氧基)丙酸 N-琥珀醯亞胺基酯替代 6-順丁烯二醯亞胺己酸 N-琥珀醯亞胺基酯，藉由與實施例 2 之步驟 3 相同地反應，獲得呈固體之標題化合物(23.0mg、31%)。

¹H-NMR(400MHz, DMSO-d₆)δ : 0.86(3H, t, J=7.4Hz), 1.77-1.92(2H, m), 2.07-2.21(2H, m), 2.27-2.42(6H, m), 2.40(3H, s), 2.74-2.84(1H, m), 2.97-3.06(1H, m), 3.09-3.21(4H, m), 3.25-3.39(6H, m), 3.45(4H, s), 3.50-3.80(8H, m), 4.41-4.51(1H, m), 5.19(1H, d, J=18.4Hz), 5.26(1H, m, J=18.4Hz), 5.42(2H, brs), 5.51-5.61(1H, m), 6.54(1H, s), 7.00(2H, s), 7.13-7.28(5H, m), 7.31(1H, s), 7.74-7.87(2H, m), 7.93-8.07(2H, m), 8.09-8.21(2H, m), 8.26(1H, brs), 8.54(1H, d, J=8.6Hz).

MS(ESI)m/z : 1135(M+H)⁺

【0409】步驟 2：抗體-藥物複合體(49)

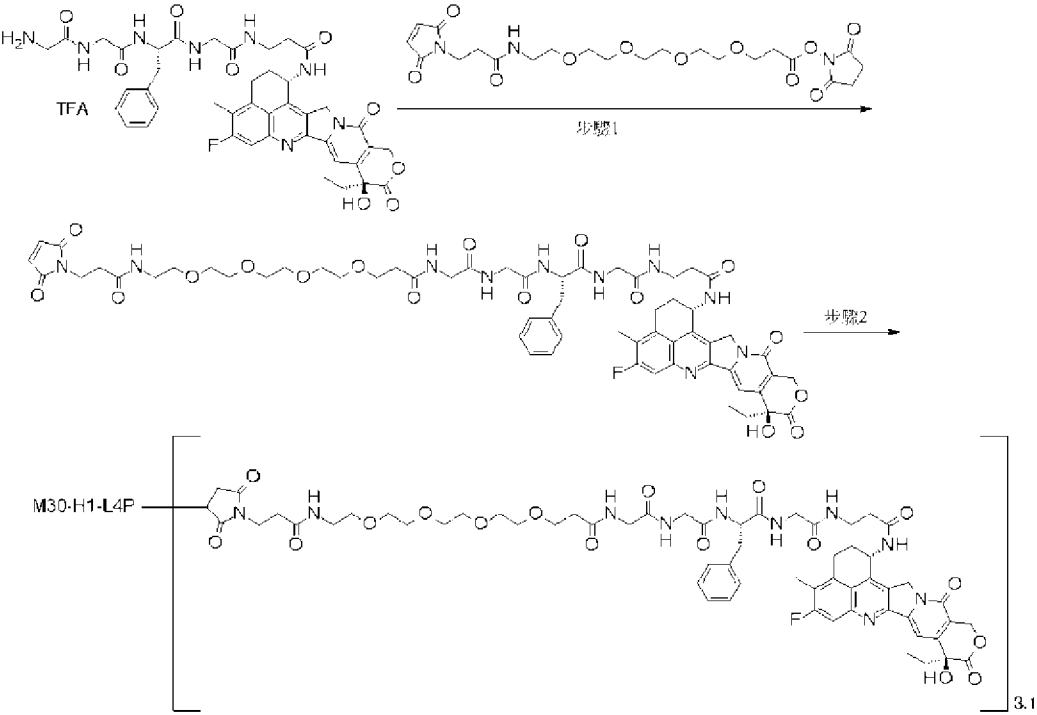
使用參考例 2 製作的 M30-H1-L4P 抗體及上述步驟 1 獲得的化合物，藉由與實施例 29 之步驟 2 相同之方法，獲得標題抗體-藥物複合體。

抗體濃度：14.50mg/mL，抗體產量：10.2mg(82%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：3.8

【0410】

實施例 53 抗體-藥物複合體(50)

【0411】



【0412】步驟 1：N-[19-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-17-側氧基-4,7,10,13-四氧-16-氮十九-1-醯基]甘胺醯基甘胺醯基-L-苯基丙胺醯基甘胺醯基-N-[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基]-β-丙胺酸醯胺

將實施例 50 之步驟 2 獲得的化合物(60.0mg、0.0646mmol)，使用 1-順丁烯二醯亞胺-3-側氧基-7,10,13,16-四氧-4-氮十九酸 N-琥珀醯亞胺基酯替代 6-順丁烯二醯亞胺己酸 N-琥珀醯亞胺基酯，藉由與實施例 2 之步驟 3 相同地反應，獲得呈固體之標題化合物(23.0mg、29%)。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ : 0.86(3H, t, $J=7.0\text{ Hz}$), 1.85(2H, tt, $J=14.6, 7.1\text{ Hz}$), 2.06-2.22(2H, m), 2.40(3H, s), 2.28-2.43(6H, m), 2.78(1H, dd, $J=13.7, 9.4\text{ Hz}$), 3.02(1H, dd, $J=14.1, 3.9\text{ Hz}$), 3.09-3.22(4H, m), 3.27-3.41(4H, m), 3.47(12H, d, $J=8.6\text{ Hz}$), 3.53-3.81(10H, m), 4.41-4.51(1H, m), 5.19(1H, d, $J=19.2\text{ Hz}$), 5.26(1H, d, $J=18.8\text{ Hz}$), 5.42(2H, brs), 5.53-5.61(1H, m), 6.54(1H, s), 7.00(2H, s), 7.12-7.29(5H, m), 7.31(1H, s), 7.74-7.85(2H, m), 8.03(2H, d, $J=6.6\text{ Hz}$), 8.11-8.21(2H, m), 8.27(1H, t, $J=5.9\text{ Hz}$), 8.54(1H, d, $J=8.6\text{ Hz}$).

MS(ESI) m/z : 1224($\text{M}+\text{H}$) $^+$

【0413】 步驟 2：抗體-藥物複合體(50)

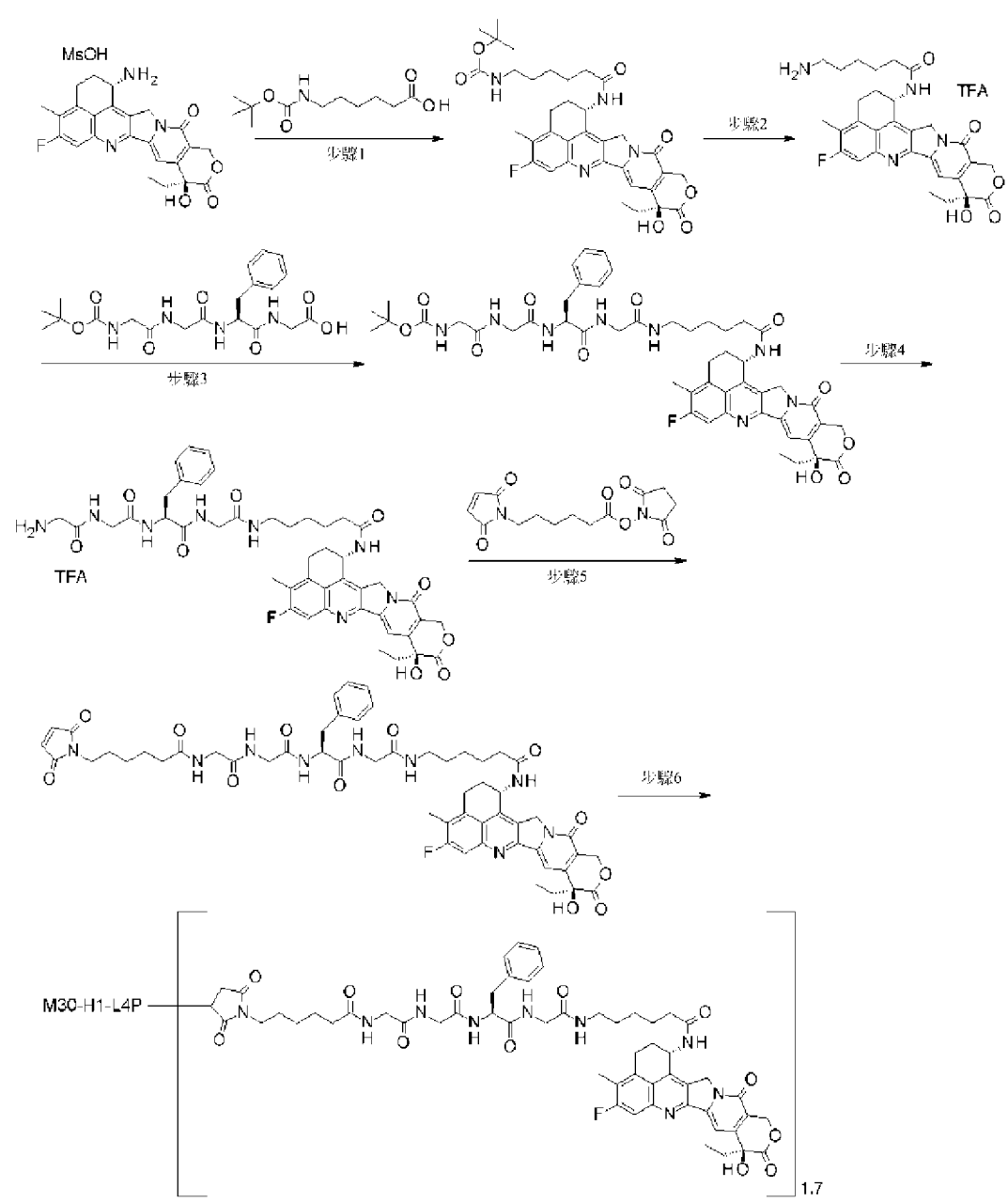
使用參考例 2 製作的 M30-H1-L4P 抗體及上述步驟 1 獲得的化合物，藉由與實施例 2 之步驟 4 相同之方法，獲得標題抗體-藥物複合體。

抗體濃度：13.47mg/mL，抗體產量：9.4mg(75%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：3.1

【0414】

實施例 54 抗體-藥物複合體(51)

【0415】



【0416】步驟 1：tert-丁基 (6-{[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-
羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-
苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-6-
側氧基己基)胺基甲酸酯

將化合物(4)之甲磺酸鹽(0.500g，0.882mmol)，使用 6-
(tert-丁氧基羰基胺基)己酸替代 4-(tert-丁氧基羰基胺基)丁
酸，藉由與實施例 1 之步驟 1 相同地反應，獲得標題化合物
(0.620g，定量)。

$^1\text{H-NMR}(\text{DMSO}-d_6)\delta$: 0.83(3H, t, $J=7.8\text{Hz}$), 1.14-1.28(2H, m), 1.31(9H, s), 1.47-1.61(2H, m), 1.75-1.89(2H, m), 2.04-2.17(4H, m), 2.35(3H, s), 2.81-2.88(2H, m), 3.09-3.16(2H, m), 5.10(1H, d, $J=19.4\text{Hz}$), 5.16(1H, d, $J=19.4\text{Hz}$), 5.39(2H, s), 5.48-5.55(1H, m), 6.50(1H, s), 6.73-6.78(1H, m), 7.26(1H, s), 7.74(1H, d, $J=10.9\text{Hz}$), 8.39(1H, d, $J=9.0\text{Hz}$).

【0417】步驟 2：6-胺基-N-[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基]己醯胺三氟乙酸鹽

將上述步驟 1 獲得的化合物(0.397g, 0.611mmol)，藉由與實施例 1 之步驟 2 同樣地反應，獲得標題化合物(0.342g, 84%)。

$^1\text{H-NMR}(\text{DMSO}-d_6)\delta$: 0.88(3H, t, $J=7.2\text{Hz}$), 1.31-1.41(2H, m), 1.52-1.70(4H, m), 1.80-1.94(2H, m), 2.05-2.18(2H, m), 2.21(2H, t, $J=7.4\text{Hz}$), 2.40(3H, s), 2.81(2H, t, $J=7.4\text{Hz}$), 3.10-3.25(2H, m), 3.33(2H, br s), 5.18(1H, d, $J=19.8\text{Hz}$), 5.22(1H, d, $J=19.8\text{Hz}$), 5.41(2H, d, $J=16.6\text{Hz}$), 5.45(2H, d, $J=16.6\text{Hz}$), 5.53-5.60(1H, m), 6.55(1H, s), 7.32(1H, s), 7.80(1H, d, $J=10.9\text{Hz}$), 8.49(1H, d, $J=9.2\text{Hz}$).

【0418】步驟 3：N-(tert-丁氧基羰基)甘胺醯基甘胺醯基-L-苯基丙胺醯基-N-(6-{[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌

喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-6-側氧基己基)甘胺酸醯胺

將上述步驟 2 獲得的化合物(0.170 g, 0.516 mmol), 與實施例 2 之步驟 1 相同地反應, 獲得標題化合物(0.225 g, 91%)。

$^1\text{H-NMR}(\text{DMSO}-d_6)\delta$: 0.88(3H, t, $J=7.4\text{Hz}$), 1.43-1.70(6H, m), 1.87(2H, td, $J=15.0, 7.4\text{Hz}$), 2.10-2.22(3H, m), 2.28-2.37(1H, m), 2.42(3H, s), 2.78-2.85(1H, m), 3.01-3.10(3H, m), 3.15-3.22(2H, m), 3.54-3.61(5H, m), 3.62-3.69(1H, m), 4.44-4.53(1H, m), 5.17(1H, d, $J=19.2\text{Hz}$), 5.25(1H, d, $J=19.2\text{Hz}$), 5.45(2H, s), 5.54-5.61(1H, m), 6.55(1H, s), 7.02(1H, t, $J=6.1\text{Hz}$), 7.11-7.28(5H, m), 7.33(1H, s), 7.63-7.69(1H, m), 7.82(1H, d, $J=11.0\text{Hz}$), 7.90-7.96(1H, m), 8.17(1H, d, $J=7.8\text{Hz}$), 8.28(1H, t, $J=5.5\text{Hz}$), 8.46(1H, d, $J=9.0\text{Hz}$).

【0419】步驟 4: 甘胺醯基甘胺醯基-L-苯基丙胺醯基-N-({[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-6-側氧基己基)甘胺酸醯胺

將上述步驟 3 獲得的化合物(0.105 g, 0.108 mmol), 與實施例 2 之步驟 2 相同地反應, 獲得標題化合物(0.068 mg, 65%)。

$^1\text{H-NMR}(\text{DMSO}-d_6)\delta$: 0.89(3H, t, $J=7.4\text{Hz}$), 1.15-1.67(6H, m), 1.79-1.97(2H, m), 2.08-2.24(4H, m), 2.42(3H, s), 2.76-2.82(1H, m), 3.00-3.10(5H, m), 3.19

(1H, s), 3.50-3.63(2H, m), 3.64-3.76(3H, m), 3.84-3.92(1H, m), 4.51-4.59(1H, m), 5.17(1H, d, J=19.4 Hz), 5.24(1H, d, J=19.4 Hz), 5.44(2H, s), 5.53-5.61(1H, m), 6.55(1H, brs), 7.15-7.29(5H, m), 7.33(1H, s), 7.72-7.78(1H, m), 7.82(1H, d, J=11.0 Hz), 7.96-8.08(2H, m), 8.30-8.38(2H, m), 8.46-8.56(2H, m).

【0420】步驟 5：N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]甘胺醯基甘胺醯基-L-苯基丙胺醯基-N-(6-[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基)-6-側氧基己基)甘胺酸醯胺

將上述步驟 4 獲得的化合物(58mg, 0.060mmol), 藉由與實施例 2 之步驟 3 相同地反應, 獲得標題化合物(39mg, 62%)。

¹H-NMR(CD₃OD)δ : 0.99(3H, t, J=7.4 Hz), 1.27(2H, td, J=11.6, 6.1 Hz), 1.38-1.44(2H, m), 1.50-1.63(6H, m), 1.65-1.80(2H, m), 1.89-1.98(2H, m), 2.17-2.25(3H, m), 2.26-2.36(3H, m), 2.40(3H, s), 2.95(1H, dd, J=14.3, 9.2 Hz), 3.12(1H, dd, J=13.7, 5.7 Hz), 3.15-3.25(4H, m), 3.44(2H, t, J=7.2 Hz), 3.65(1H, d, J=17.2 Hz), 3.76(1H, d, J=17.2 Hz), 3.79-3.86(4H, m), 4.43(1H, dd, J=8.9, 6.0 Hz), 5.10(1H, d, J=18.9 Hz), 5.25(1H, d, J=18.9 Hz), 5.35(1H, d, J=16.6 Hz), 5.56(1H, d, J=16.0 Hz), 5.60-5.64(1H, m), 6.76(2H, s), 7.12-7.24(6H, m), 7.58(1H, s), 7.60(1H, d, J=10.9 Hz), 7.68(1H, t, J=5.7 Hz).

MS(ESI)m/z : 1060(M+H)⁺

【0421】步驟 6：抗體-藥物複合體(51)

抗體之還原：將參考例 2 製作的 M30-H1-L4P 抗體，使用製造方法 1 記載的共通操作 B(作為 280nm 吸光係數，使用 1.61)及 C-1，以 PBS6.0/EDTA 調製 10mg/mL。於 1.5mL 試管中採取本溶液(1.0mL)，添加 10mM TCEP(東京化成工業股份有限公司)水溶液(0.0147mL；相對於抗體一分子為 2.3 當量)及 1M 磷酸氫二鉀水溶液(Nacalai Tesque, Inc.; 0.050mL)。確認本溶液之 pH 為 7.4±0.1 內後，藉由於 37℃培育 1 小時，使抗體內鉸鏈部之雙硫鍵還原。

抗體與藥物連結物之結合：上述溶液於 22℃培育 10 分鐘後，添加含上述步驟 5 獲得的化合物 10mM 的二甲基亞砷溶液(0.0295mL；相對於抗體一分子為 4.6 當量)，於 22℃培育 40 分鐘，使藥物連結物對抗體結合。其次，添加 100mM NAC(Sigma-Aldrich Co.LLC)水溶液(0.00590mL；相對於抗體一分子為 9.2 當量)，再於 22℃培育 20 分鐘，使藥物連結物的反應停止。

純化：將上述溶液，進行使用製造方法 1 記載的共通操作 D-1(使用 PBS7.4 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 6mL。

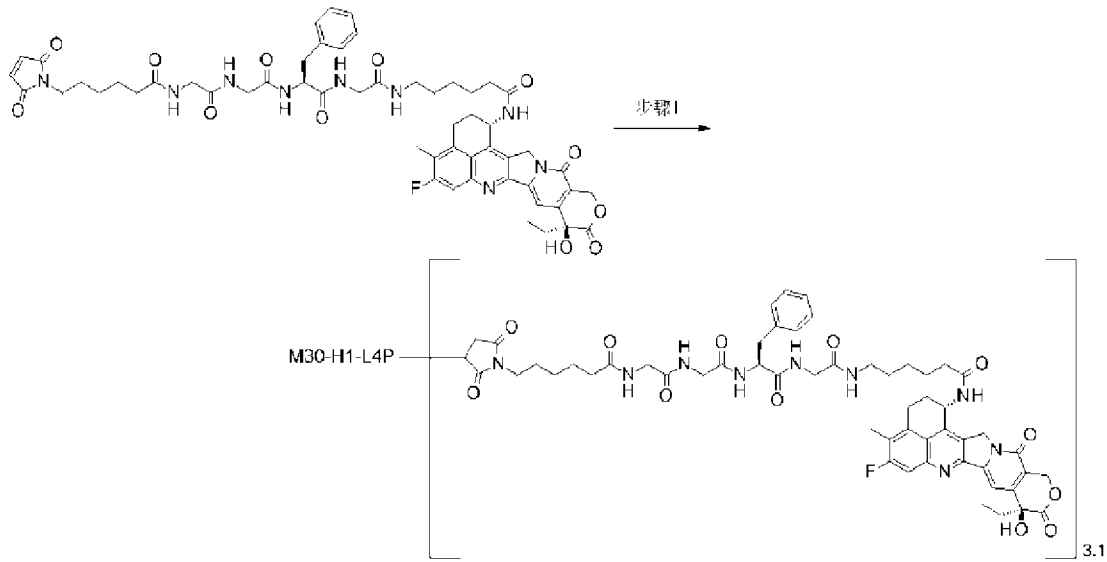
特性評價：使用製造方法 1 記載的共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\varepsilon_{A,280}=235300$ (計算推定值)、 $\varepsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)、 $\varepsilon_{D,280}=5000$ (實測平均值)、 $\varepsilon_{D,370}=19000$ (實測平均值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：0.97mg/mL，抗體產量：5.82mg(58%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：1.7

【0422】

實施例 55 抗體-藥物複合體(52)

【0423】



【0424】步驟 1：抗體-藥物複合體(52)

抗體之還原：將參考例 2 製作的 M30-H1-L4P 抗體，使用製造方法 1 記載的共通操作 B(作為 280nm 吸光係數，使用 1.61)及 C-1，以 PBS6.0/EDTA 調製 10mg/mL。於 1.5mL 試管中採取本溶液(1.0mL)，添加 10mM TCEP(東京化成工業股份有限公司)水溶液(0.0295mL；相對於抗體一分子為 4.6 當量)及 1M 磷酸氫二鉀水溶液(Nacalai Tesque, Inc.；0.050mL)。確認本溶液之 pH 為 7.4±0.1 內後，藉由於 37℃培育 1 小時，使抗體內鉸鏈部之雙硫鍵還原。

抗體與藥物連結物之結合：上述溶液於 22℃培育 10 分鐘後，添加含實施例 54 之步驟 5 獲得的化合物 10mM 的二甲基亞砷溶液(0.0590mL；相對於抗體一分子為 9.2 當量)，於 22℃培

育 40 分鐘，使藥物連結物對抗體結合。其次，添加 100mM NAC(Sigma-Aldrich Co.LLC)水溶液(0.0118mL；相對於抗體一分子為 18.4 當量)，再於 22℃培育 20 分鐘，使藥物連結物的反應停止。

純化：上述溶液，進行使用製造方法 1 記載的共通操作 D-1(使用 PBS7.4 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 6mL。

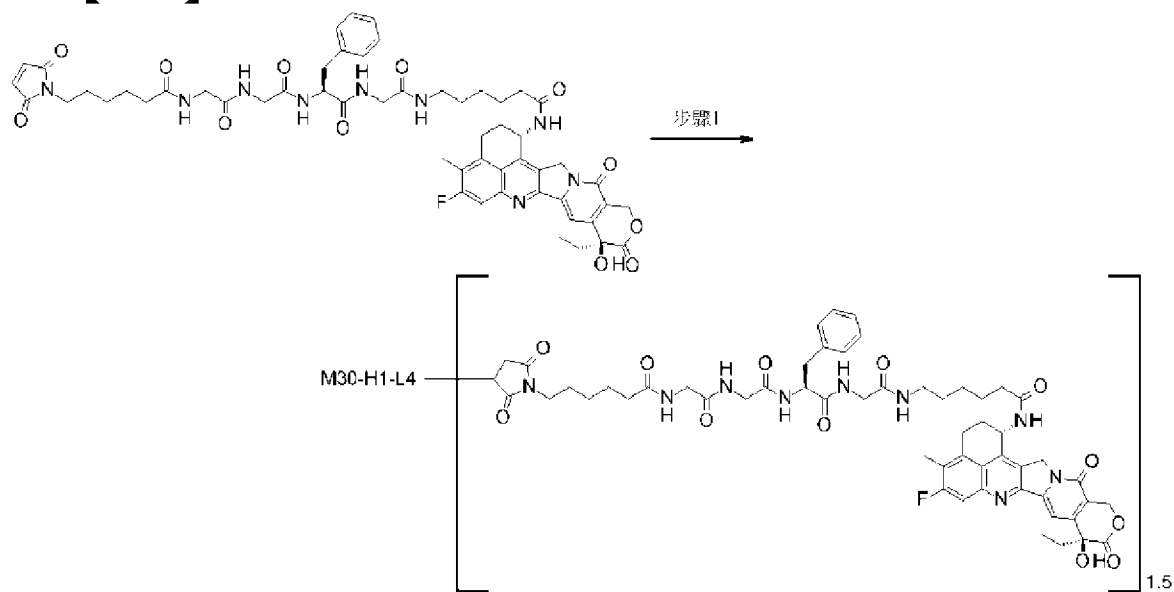
特性評價：使用製造方法 1 記載的共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\epsilon_{A,280}=235300$ (計算推定值)・ $\epsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)・ $\epsilon_{D,280}=5000$ (實測平均值)・ $\epsilon_{D,370}=19000$ (實測平均值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：0.94mg/mL，抗體產量：5.64mg(56%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：3.1

【0425】

實施例 56 抗體-藥物複合體(53)

【0426】



【0427】步驟 1：抗體-藥物複合體(53)

抗體之還原：將參考例 1 製作的 M30-H1-L4 抗體，使用製造方法 1 記載的共通操作 B(作為 280nm 吸光係數，使用 1.61)及 C-1，以 PBS6.0/EDTA 調製 10mg/mL。於 1.5mL 試管中採取本溶液(1.0mL)，添加 10mM TCEP(東京化成工業股份有限公司)水溶液(0.0147mL；相對於抗體一分子為 2.3 當量)及 1M 磷酸氫二鉀水溶液(Nacalai Tesque, Inc.; 0.050mL)。確認本溶液之 pH 為 7.4 ± 0.1 內後，藉由於 37°C 培育 1 小時，使抗體內鉸鏈部之雙硫鍵還原。

抗體與藥物連結物之結合：上述溶液於 22°C 培育 10 分鐘後，添加含實施例 54 之步驟 5 獲得的化合物 10mM 的二甲基亞砷溶液(0.0295mL；相對於抗體一分子為 4.6 當量)，並於 22°C 培育 40 分鐘，使藥物連結物對抗體結合。其次，添加 100mM NAC(Sigma-Aldrich Co.LLC)水溶液(0.00590mL；相對於抗體一分子為 9.2 當量)，再於 22°C 培育 20 分鐘，使藥物連結物的反應停止。

純化：將上述溶液，進行使用製造方法 1 記載的共通操作 D-1(使用 PBS7.4 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 6mL。

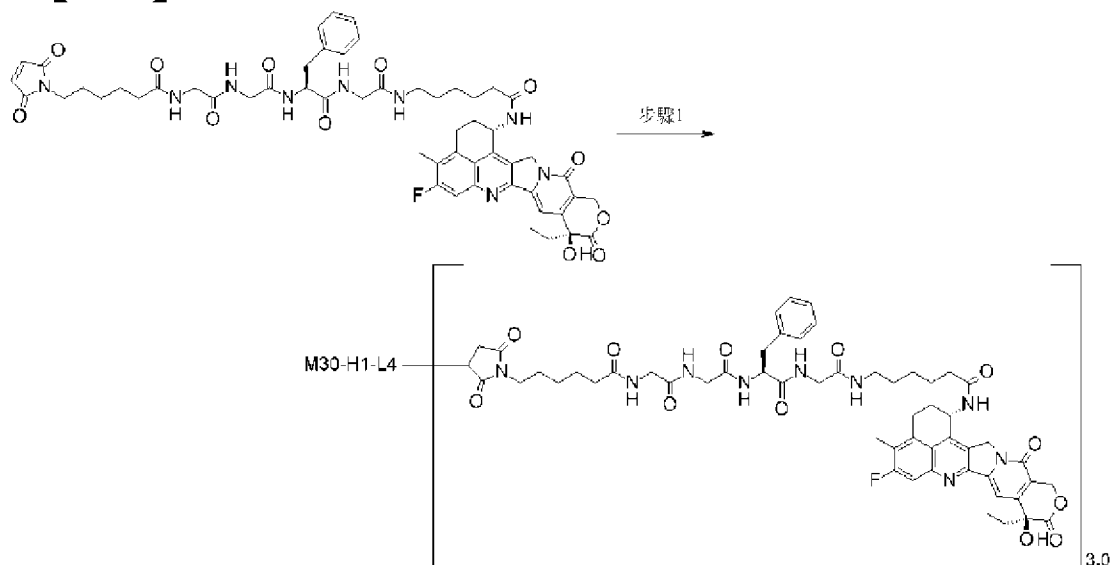
特性評價：使用製造方法 1 記載的共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\epsilon_{A,280}=235300$ (計算推定值)、 $\epsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)、 $\epsilon_{D,280}=5000$ (實測平均值)、 $\epsilon_{D,370}=19000$ (實測平均值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：1.22mg/mL，抗體產量：7.32mg(73%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：1.5

【0428】

實施例 57 抗體-藥物複合體(54)

【0429】



【0430】步驟 1：抗體-藥物複合體(54)

抗體之還原：將參考例 1 製作的 M30-H1-L4 抗體，使用製造方法 1 記載的共通操作 B(作為 280nm 吸光係數，使用 1.61)及 C-1，以 PBS6.0/EDTA 調製 10mg/mL。於 1.5mL 試管中採取本溶液(1.0mL)，添加 10mM TCEP(東京化成工業股份有限公司)水溶液(0.0295mL；相對於抗體一分子為 4.6 當量)及 1M 磷酸氫二鉀水溶液(Nacalai Tesque, Inc.; 0.050mL)。確認本溶液之 pH 為 7.4 ± 0.1 內後，藉由於 37°C 培育 1 小時，使抗體內銹鏈部之雙硫鍵還原。

抗體與藥物連結物之結合：上述溶液於 22°C 培育 10 分鐘後，添加含實施例 54 之步驟 5 獲得的化合物 10mM 的二甲基亞砷溶液(0.0590mL；相對於抗體一分子為 9.2 當量)，並於 22°C 培育 40 分鐘，使藥物連結物對抗體結合。其次，添加 100mM NAC(Sigma-Aldrich Co.LLC)水溶液(0.0118mL；相對於抗

體一分子為 18.4 當量)，再於 22℃ 培育 20 分鐘，使藥物連結物的反應停止。

純化：將上述溶液，進行使用製造方法 1 記載的共通操作 D-1(使用 PBS7.4 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 6mL。

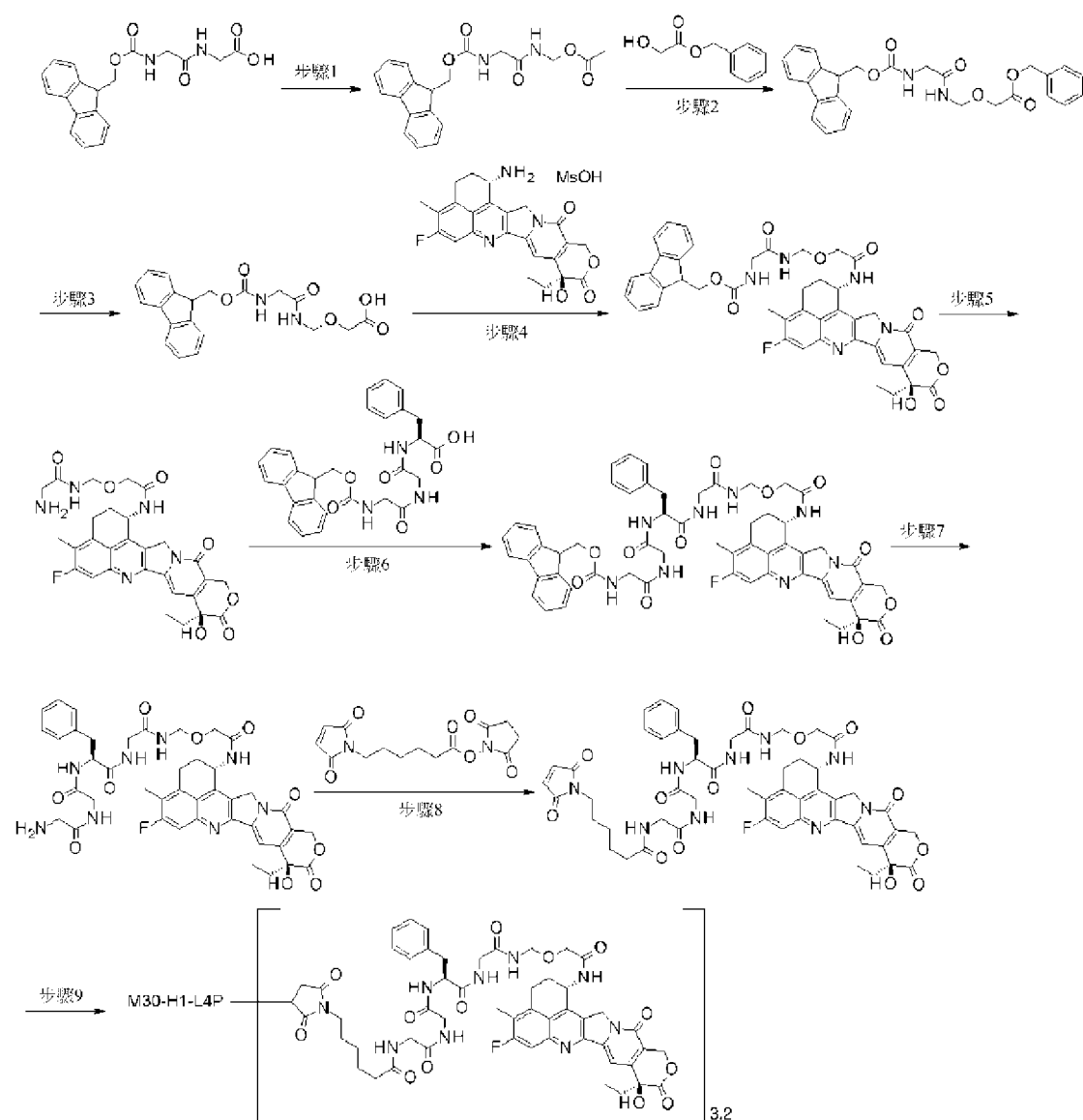
特性評價：使用製造方法 1 記載的共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\epsilon_{A,280}=235300$ (計算推定值)、 $\epsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)、 $\epsilon_{D,280}=5000$ (實測平均值)、 $\epsilon_{D,370}=19000$ (實測平均值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：1.06mg/mL，抗體產量：6.36mg(64%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：3.0

【0431】

實施例 58 抗體-藥物複合體(55)

【0432】



【0433】步驟 1：乙酸({N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]甘胺鹽基}胺基)甲酯

於包含 N-9-芴基甲氧基羰基甘胺鹽基甘胺酸(4.33 g, 12.2 mmol)、四氫呋喃(120 ml)、及甲苯(40.0 ml)的混合物中，添加吡啶(1.16 ml, 14.7 mmol)及四乙酸鉛(6.84 g, 14.7 mmol)，並加熱回流 5 小時。將反應液冷卻至室溫後，藉由矽藻土過濾而去除不溶物，減壓下濃縮。將獲得的殘留物溶解於乙酸乙酯，以水及飽和食鹽水洗淨後，有機層以無水硫酸鎂乾燥。減壓下餾除溶媒後，獲得的殘留物以矽膠管柱層析[己

烷：乙酸乙酯=9：1(v/v)~乙酸乙酯]純化，獲得呈無色固體之標題化合物(3.00 g，67%)。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz， CDCl_3) δ ：2.07(3H，s)，3.90(2H，d， $J=5.1\text{Hz}$)，4.23(1H，t， $J=7.0\text{Hz}$)，4.46(2H，d， $J=6.6\text{Hz}$)，5.26(2H，d， $J=7.0\text{Hz}$)，5.32(1H，brs)，6.96(1H，brs)，7.32(2H，t， $J=7.3\text{Hz}$)，7.41(2H，t， $J=7.3\text{Hz}$)，7.59(2H，d， $J=7.3\text{Hz}$)，7.77(2H，d， $J=7.3\text{Hz}$)。

【0434】步驟 2：苯甲基 [(N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]甘胺鹽基}胺基)甲氧基]乙酸酯

於上述步驟 1 獲得的化合物(3.68 g，10.0 mmol)及乙醇酸苯甲酯(4.99 g，30.0 mmol)之四氫呋喃(40.0 mL)溶液中，於 0°C 添加 tert-丁醇鉀(2.24 g，20.0 mmol)，並於室溫攪拌 15 分鐘。於 0°C 下反應溶液中添加乙酸乙酯、水，以乙酸乙酯、氯仿萃取，獲得的有機層以硫酸鈉乾燥，並過濾。減壓餾除溶媒，將獲得的殘留物溶解於二噁烷(40.0 mL)、水(10.0 mL)，添加碳酸氫鈉(1.01 g，12.0 mmol)、氯甲酸 9-芴基甲基酯(2.59 g，10.0 mmol)，於室溫攪拌 2 小時。於反應溶液中添加水，以乙酸乙酯萃取，獲得的有機層以硫酸鈉乾燥，並過濾。減壓餾除溶媒，獲得的殘留物以矽膠管柱層析[己烷：乙酸乙酯=100：0(v/v)~0：100]純化，獲得無色油狀之標題化合物(1.88 g，40%)。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz， CDCl_3) δ ：3.84(2H，d， $J=5.5\text{Hz}$)，4.24(3H，t， $J=6.5\text{Hz}$)，4.49(2H，d， $J=6.7\text{Hz}$)，4.88(2H，d， $J=6.7\text{Hz}$)，5.15-5.27(1H，m)，5.19(2H，s)，6.74(1H，brs)，7.31-7.39(7H，m)，7.43(2H，t， $J=7.4\text{Hz}$)，7.61(2H，d， $J=7.4\text{Hz}$)，7.79(2H，d， $J=7.4\text{Hz}$)。

【0435】步驟 3：[(N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]甘胺醯基)胺基)甲氧基]乙酸

將上述步驟 2 獲得的化合物(1.88g、3.96mmol)溶解於乙醇(40.0mL)、乙酸乙酯(20.0mL)。添加鈀碳觸媒(376mg)，並於氫氣環境下，於室溫攪拌 2 小時。藉由矽藻土過濾而去除不溶物，減壓餾除溶媒，獲得呈無色固體之標題化合物(1.52g、定量)。

¹H-NMR(400MHz, DMSO-d₆)δ：3.62(2H, d, J=6.3Hz), 3.97(2H, s), 4.18-4.32(3H, m), 4.60(2H, d, J=6.7Hz), 7.29-7.46(4H, m), 7.58(1H, t, J=5.9Hz), 7.72(2H, d, J=7.4Hz), 7.90(2H, d, J=7.4Hz), 8.71(1H, t, J=6.5Hz).

【0436】步驟 4：9H-芴-9-基甲基(2-{[(2-{[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-2-側氧基乙氧基)甲基]胺基}-2-側氧基乙基)胺基甲酸酯

冰冷下，於化合物(4)之甲磺酸鹽(0.283g, 0.533mmol)、N-羥基琥珀醯亞胺(61.4mg, 0.533mmol)、及上述步驟 3 獲得的化合物(0.205g, 0.533mmol)之 N,N-二甲基甲醯胺(10.0mL)溶液中，添加 N,N-二異丙基乙基胺(92.9μL, 0.533mmol)及 N,N'-二環己基碳化二亞胺(0.143g, 0.693mmol)，並於室溫攪拌 3 日。減壓餾除溶媒，獲得的殘留物以矽膠管柱層析[氯仿～氯仿：甲醇：水=7：3：1(v/v/v)之分配有機層]純化，獲得呈淡茶色固體之標題化合物(0.352g, 82%)。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ : 0.81(3H, t, $J=7.4\text{Hz}$), 1.73-1.87(2H, m), 2.06-2.20(2H, m), 2.34(3H, s), 3.01-3.23(2H, m), 3.58(2H, d, $J=6.7\text{Hz}$), 3.98(2H, s), 4.13-4.25(3H, m), 4.60(2H, d, $J=6.7\text{Hz}$), 5.09-5.22(2H, m), 5.32-5.42(2H, m), 5.50-5.59(1H, m), 6.49(1H, s), 7.24-7.30(3H, m), 7.36(2H, t, $J=7.4\text{Hz}$), 7.53(1H, t, $J=6.3\text{Hz}$), 7.66(2H, d, $J=7.4\text{Hz}$), 7.75(1H, d, $J=11.0\text{Hz}$), 7.84(2H, d, $J=7.4\text{Hz}$), 8.47(1H, d, $J=8.6\text{Hz}$), 8.77(1H, t, $J=6.7\text{Hz}$).

MS(ESI) m/z : 802($M+H$) $^+$

【0437】步驟 5：N-[(2-{[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-2-側氧基乙氧基)甲基]甘胺酸醯胺

於上述步驟 4 獲得的化合物(0.881g, 1.10mmol)之 N,N-二甲基甲醯胺(11.0mL)溶液中，添加哌啶(1.1mL)，並於室溫攪拌 2 小時。減壓餾除溶媒，獲得含標題化合物的混合物。本混合物未進行進一步的純化而使用於下一反應。

【0438】步驟 6：N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]甘胺醯基甘胺醯基-L-苯基丙胺醯基-N-[(2-{[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-2-側氧基乙氧基)甲基]甘胺酸醯胺

冰冷下，於上述步驟 5 獲得的混合物(0.439mmol)、N-羥基琥珀醯亞胺(0.101g, 0.878mmol)、及 N-[(9H-芴-9-基甲

氧基)羰基]甘胺鹽基甘胺鹽基-L-苯丙胺酸(日本特開 2002-60351 號公報記載的化合物)(0.440g, 0.878mmol)之 N,N-二甲基甲醯胺(50.0mL)溶液中, 添加 N,N'-二環己基碳化二亞胺(0.181g, 0.878mmol), 並於室溫攪拌 4 日。減壓餾除溶媒, 獲得的殘留物以矽膠管柱層析[氯仿~氯仿: 甲醇=9:1(v/v)]純化, 獲得呈淡橙色固體之標題化合物(0.269g, 58%)。

MS(ESI)m/z: 1063(M+H)⁺

【0439】步驟 7: 甘胺鹽基甘胺鹽基-L-苯基丙胺鹽基-N-[(2-{[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-2-側氧基乙氧基)甲基]甘胺酸鹽基

於上述步驟 6 獲得的化合物(0.269g, 0.253mmol)之 N,N-二甲基甲醯胺(4.00mL)溶液中, 添加哌啶(0.251mL, 2.53mmol), 並於室溫攪拌 2 小時。減壓餾除溶媒, 獲得含標題化合物的混合物。本混合物未進行進一步的純化而使用於下一反應。

【0440】步驟 8: N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]甘胺鹽基甘胺鹽基-L-苯基丙胺鹽基-N-[(2-{[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-2-側氧基乙氧基)甲基]甘胺酸鹽基

於上述步驟 7 獲得的化合物(0.253mmol)之 N,N-二甲基甲醯胺(10.0mL)溶液中, 添加 6-順丁烯二醯亞胺己酸 N-琥珀鹽

亞胺基酯(0.156 g, 0.506 mmol), 於室溫下攪拌 3 日。減壓餾除溶媒, 獲得的殘留物以矽膠管柱層析[氯仿~氯仿: 甲醇=9: 1(v/v)]純化, 獲得呈淡黃色固體之標題化合物(0.100 g, 38%)。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 0.83(3H, t, $J=7.2\text{ Hz}$), 1.09-1.21(2H, m), 1.33-1.47(4H, m), 1.75-1.90(2H, m), 2.00-2.23(4H, m), 2.36(3H, s), 2.69-2.81(1H, m), 2.94-3.03(1H, m), 3.06-3.22(2H, m), 3.23-3.74(8H, m), 3.98(2H, s), 4.39-4.50(1H, m), 4.60(2H, d, $J=6.7\text{ Hz}$), 5.17(2H, s), 5.39(2H, s), 5.53-5.61(1H, m), 6.50(1H, s), 6.96(2H, s), 7.11-7.24(5H, m), 7.28(1H, s), 7.75(1H, d, $J=11.0\text{ Hz}$), 7.97(1H, t, $J=5.7\text{ Hz}$), 8.03(1H, t, $J=5.9\text{ Hz}$), 8.09(1H, d, $J=7.8\text{ Hz}$), 8.27(1H, t, $J=6.5\text{ Hz}$), 8.48(1H, d, $J=9.0\text{ Hz}$), 8.60(1H, t, $J=6.5\text{ Hz}$).

$\text{MS}(\text{ESI})m/z$: 1034($\text{M}+\text{H}$) $^+$

【0441】步驟 9: 抗體-藥物複合體(55)

抗體之還原: 將參考例 2 製作的 M30-H1-L4P 抗體, 使用製造方法 1 記載的共通操作 C-1 及 B(作為 280nm 吸光係數, 使用 $1.61\text{ mL mg}^{-1}\text{ cm}^{-1}$), 將媒體取代為 PBS6.0/EDTA, 調製為 10 mg/mL 之抗體濃度。將本溶液(1.25 mL)置入 1.5 mL 聚丙烯製試管中, 於其中添加 10 mM TCEP(東京化成工業股份有限公司)水溶液(0.025 mL ; 相對於抗體一分子為 3.0 當量)及 1 M 磷酸氫二鉀水溶液(Nacalai Tesque, Inc.; 0.0625 mL)。確認本溶液之 pH 為 7.4 ± 0.1 內後, 於 37°C 培育 1 小時下, 使抗體內銹鏈部之雙硫鍵還原。

抗體與藥物連結物之結合：對上述溶液，室溫下添加含二甲基亞砷(Sigma-Aldrich Co.LLC)0.109mL 與上述步驟 8 獲得的化合物 10mM 的二甲基亞砷溶液(0.039mL；相對於抗體一分子為 4.6 當量)，使用試管迴轉器(MTR-103，AS ONE 股份有限公司)，於室溫下攪拌 40 分鐘，使藥物連結物對抗體結合。其次，添加 100mM NAC(Sigma-Aldrich Co.LLC)水溶液(0.008mL)，再於室溫下攪拌 20 分鐘，使藥物連結物的反應停止。

純化：上述溶液，進行使用製造方法 1 記載的共通操作 D-1(使用 ABS 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 6mL 後，使用製造方法 1 記載的共通操作 A，而濃縮溶液。

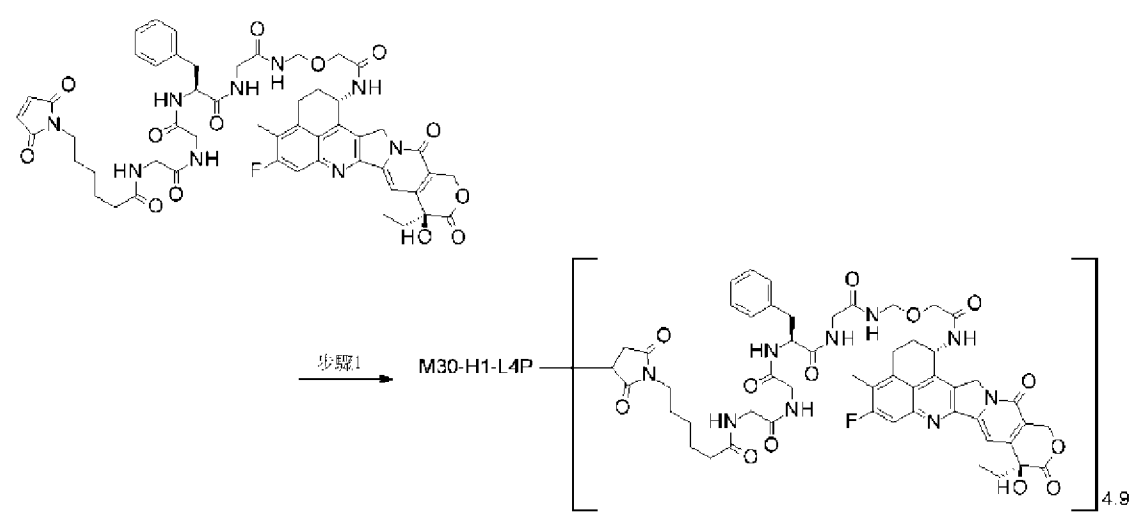
特性評價：使用製造方法 1 記載的共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\epsilon_{A,280}=235300$ (計算推定值)、 $\epsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)、 $\epsilon_{D,280}=5000$ (實測平均值)、 $\epsilon_{D,370}=19000$ (實測平均值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：12.57mg/mL，抗體產量：8.8mg(70%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：3.2

【0442】

實施例 59 抗體-藥物複合體(56)

【0443】



【0444】步驟 1：抗體-藥物複合體(56)

抗體之還原：將參考例 2 製作的 M30-H1-L4P 抗體，使用製造方法 1 記載的共通操作 C-1 及 B(作為 280nm 吸光係數，使用 $1.61\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$)，將媒體取代為 PBS6.0/EDTA，調製為 10mg/mL 之抗體濃度。將本溶液(1.25mL)置入 1.5mL 聚丙烯製試管中，於其中添加 10mM TCEP(東京化成工業股份有限公司)水溶液(0.051mL ；相對於抗體一分子為 6.0 當量)及 1M 磷酸氫二鉀水溶液(Nacalai Tesque, Inc.; 0.0625mL)。確認本溶液之 pH 為 7.4 ± 0.1 內後，於 37°C 培育 1 小時下，使抗體內鉸鏈部之雙硫鍵還原。

抗體與藥物連結物之結合：對上述溶液，於室溫下添加含二甲基亞砷(Sigma-Aldrich Co.LLC; 0.067mL)與實施例 58 之步驟 8 獲得的化合物 10mM 的二甲基亞砷溶液(0.085mL ；相對於抗體一分子為 10.0 當量)，使用試管迴轉器(MTR-103, AS ONE 股份有限公司)，於室溫下攪拌 60 分鐘，使藥物連結物對抗體結合。其次，添加 100mM NAC(Sigma-Aldrich Co.LLC)水溶液(0.013mL)，再於室溫下攪拌 20 分鐘，使藥物連結物的反應停止。

純化：上述溶液，進行使用製造方法 1 記載的共通操作 D-1(使用 ABS 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 6mL。

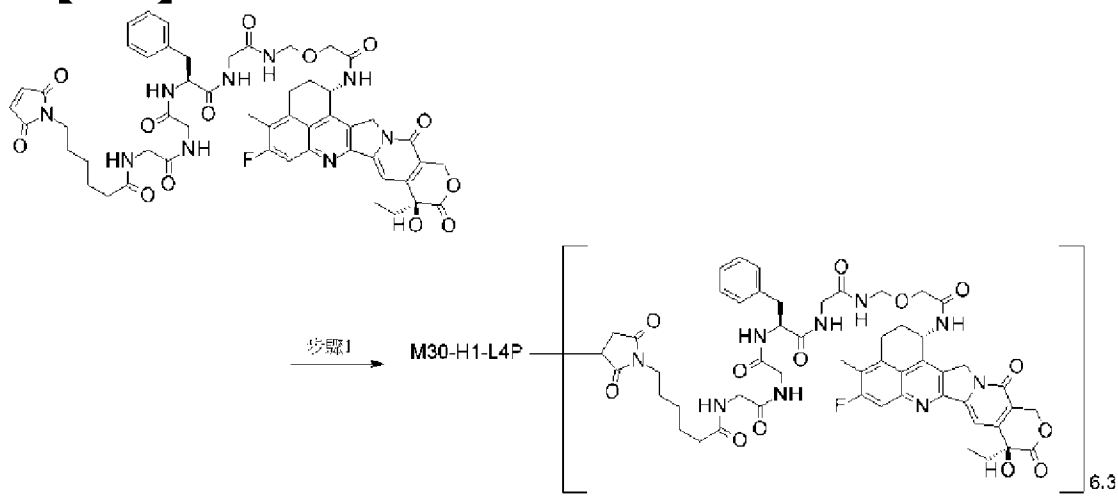
特性評價：使用製造方法 1 記載的共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\epsilon_{A,280}=235300$ (計算推定值)・ $\epsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)・ $\epsilon_{D,280}=5000$ (實測平均值)・ $\epsilon_{D,370}=19000$ (實測平均值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：1.33mg/mL，抗體產量：7.98mg(64%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：4.9

【0445】

實施例 60 抗體-藥物複合體(57)

【0446】



【0447】步驟 1：抗體-藥物複合體(57)

將抗體之還原：參考例 2 製作的 M30-H1-L4P 抗體，使用製造方法 1 記載的共通操作 C-1 及 B(作為 280nm 吸光係數，使用 $1.61\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$)，將媒體取代為 PBS6.0/EDTA，調製為 10mg/mL 之抗體濃度。將本溶液(1.25mL)置入 1.5mL 聚丙烯製試管中，於其中添加 10mM TCEP(東京化成工業股份有限

公司)水溶液(0.051mL；相對於抗體一分子為 6.0 當量)及 1M 磷酸氫二鉀水溶液(Nacalai Tesque, Inc.; 0.0625mL)。確認本溶液之 pH 為 7.4 ± 0.1 內後，於 37°C 培育 1 小時下，使抗體內鉸鏈部之雙硫鍵還原。

抗體與藥物連結物之結合：對上述溶液，於室溫下添加含二甲基亞砷(Sigma-Aldrich Co.LLC; 0.025mL)與實施例 58 步驟 8 獲得的化合物 10mM 的二甲基亞砷溶液(0.127mL；相對於抗體一分子為 15.0 當量)，使用試管迴轉器(MTR-103, AS ONE 股份有限公司)，於室溫下攪拌 60 分鐘，使藥物連結物對抗體結合。其次，添加 100mM NAC(Sigma-Aldrich Co.LLC)水溶液(0.019mL)，再於室溫下攪拌 20 分鐘，使藥物連結物的反應停止。

純化：上述溶液，進行使用製造方法 1 記載的共通操作 D-1(使用 ABS 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 6mL 後，使用製造方法 1 記載的共通操作 A，而濃縮溶液。

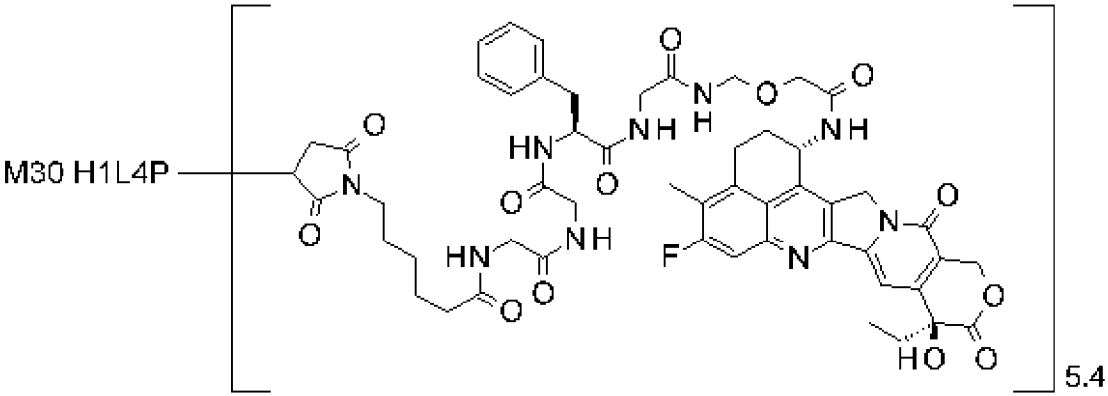
特性評價：使用製造方法 1 記載的共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\epsilon_{A,280}=235300$ (計算推定值)、 $\epsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)、 $\epsilon_{D,280}=5000$ (實測平均值)、 $\epsilon_{D,370}=19000$ (實測平均值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：0.91mg/mL，抗體產量：5.46mg(44%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：6.3

【0448】

實施例 61 抗體-藥物複合體(58)

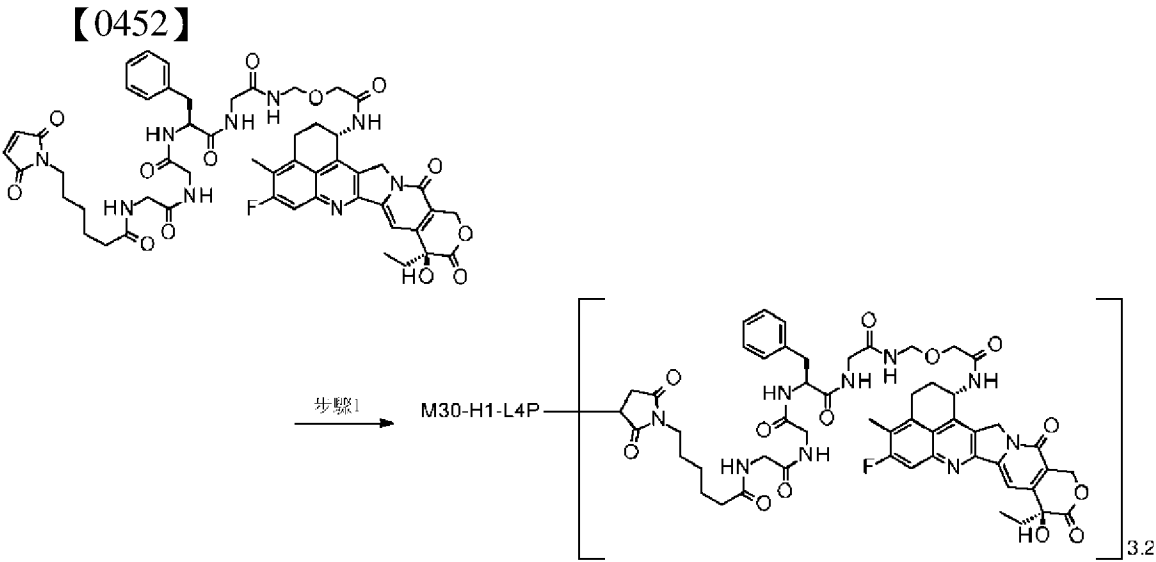
【0449】



【0450】混合約略全量之實施例 59 與實施例 60 之抗體-藥物複合體，使用製造方法 1 記載的共通操作 A 而濃縮溶液，獲得標題抗體-藥物複合體。

抗體濃度：10.0mg/mL，抗體產量：12.30mg，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：5.4

【0451】
實施例 62 抗體-藥物複合體(59)



【0453】步驟 1：抗體-藥物複合體(59)

抗體之還原：將參考例 1 製作的 M30-H1-L4P 抗體，使用製造方法 1 記載的共通操作 B(作為 280nm 吸光係數，使用 1.61mLmg⁻¹cm⁻¹)及 C-1，以 PBS6.5/EDTA 調製為

10mg/mL。將本溶液(100mL、抗體 1g)置入 250mL 燒瓶中，添加 10mM TCEP(東京化成工業股份有限公司)水溶液(2.43mL；相對於抗體一分子為 3.6 當量)，再添加 1M 磷酸氫二鉀水溶液(5mL)。以 pH 值測量器確認本溶液之 pH 為 7.4 附近後，藉由於 37°C 培育 1 小時，使抗體內鉸鏈部之雙硫鍵還原。

抗體與藥物連結物之結合：對上述溶液，於室溫下添加含實施例 58 之步驟 8 獲得的化合物 10mM 的二甲基亞砷溶液(3.51mL；相對於抗體一分子為 5.2 當量)及二甲基亞砷(2.14mL)，於 15°C 水浴中以攪拌器攪拌 130 分鐘，使藥物連結物對抗體結合。其次，添加 100mM NAC 水溶液(0.547mL)，再於室溫培育 20 分鐘，使藥物連結物的反應停止。

純化：對上述溶液，使用以超過濾膜(Merck 股份有限公司、Pellicon XL Cassette、Biomax 50KDa)、試管泵(美國 Cole-Parmer 公司 MASTERFLEX Pump model 77521-40、Pump head model 7518-00)及試管(美國 Cole-Parmer 公司 MASTERFLEX 試管 L/S16)構成的超過濾裝置，進行超過濾純化。即，於反應液中一邊滴加作為純化緩衝液之 ABS(計 800mL)，一邊進行超過濾純化，去除未結合之藥物連結物及其他低分子量試藥的同時，將緩衝液取代為 ABS，再進行至濃縮，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液約 70mL。

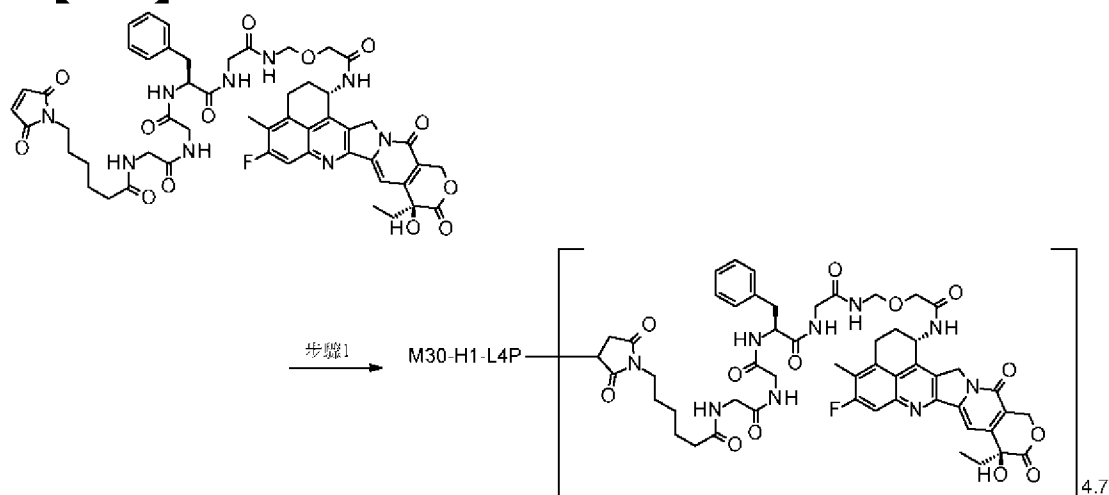
特性評價：使用製造方法 1 記載的共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\epsilon_{A,280}=235300$ (計算推定值)、 $\epsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)、 $\epsilon_{D,280}=5178$ (實測值)、 $\epsilon_{D,370}=20217$ (實測值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：14.2mg/mL，抗體產量：1.0g(約 100%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：3.2

【0454】

實施例 63 抗體-藥物複合體(60)

【0455】



【0456】步驟 1：抗體-藥物複合體(60)

抗體之還原：將參考例 1 製作的 M30-H1-L4P 抗體，使用製造方法 1 記載的共通操作 B(作為 280nm 吸光係數，使用 $1.61\text{ mL mg}^{-1}\text{ cm}^{-1}$)及 C-1，以 PBS6.5/EDTA 調製為 10mg/mL。將本溶液(5mL、抗體 50mg)置入 15mL 試管，添加 10mM TCEP(東京化成工業股份有限公司)水溶液(0.075mL；相對於抗體一分子為 4 當量)。以 pH 測量器確定本溶液之 pH 為 7.0 附近後，藉由於 37°C 培育 1 小時，使抗體內鉸鏈部之雙硫鍵還原。

抗體與藥物連結物之結合：對上述溶液，添加含實施例 58 之步驟 8 獲得的化合物 10mM 的二甲基亞砷溶液(0.219mL；相對於抗體一分子為 6.5 當量)及二甲基亞砷(0.064mL)，於 15°C 水浴中培預 90 分鐘，使藥物連結物對抗體結合。其次，添加

100mM NAC 水溶液(0.033mL；相對於抗體一分子為 9.8 當量)，再於室溫培育 20 分鐘，使藥物連結物的反應停止。

純化：上述溶液，進行使用製造方法 1 記載的共通操作 D-1(使用 ABS 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 19mL。

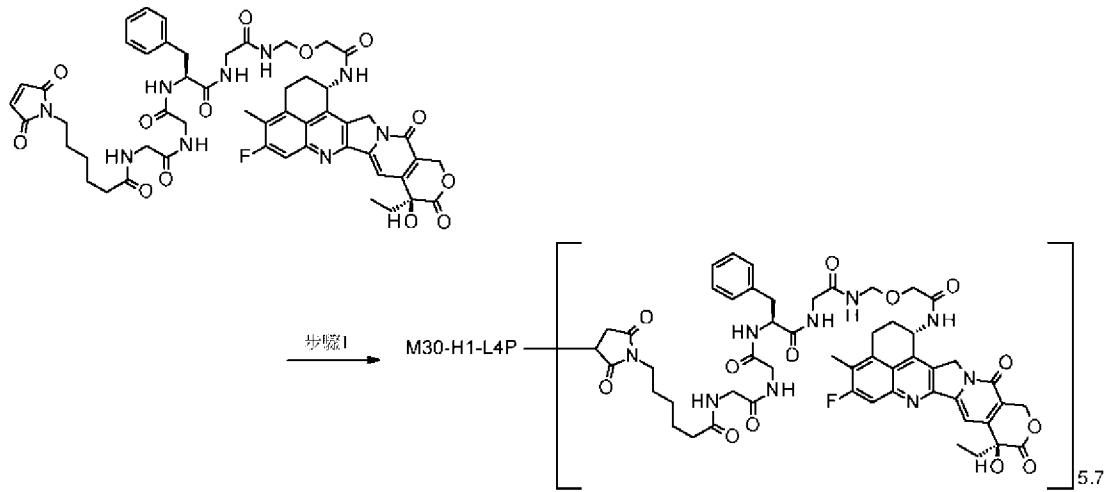
特性評價：使用製造方法 1 記載的共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\epsilon_{A,280}=235300$ (計算推定值)、 $\epsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)、 $\epsilon_{D,280}=5178$ (實測值)、 $\epsilon_{D,370}=20217$ (實測值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：2.19mg/mL，抗體產量：42mg(83%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：4.7

【0457】

實施例 64 抗體-藥物複合體(61)

【0458】



【0459】步驟 1：抗體-藥物複合體(61)

抗體之還原：將參考例 1 製作的 M30-H1-L4P 抗體，使用製造方法 1 記載的共通操作 B(作為 280nm 吸光係數，使用 $1.61\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$)及 C-1，以 PBS6.5/EDTA 調製為

10 mg/mL。將本溶液(4 mL、抗體 40 mg)置入 15 mL 試管，添加 10 mM TCEP(東京化成工業股份有限公司)水溶液(0.14 mL；相對於抗體一分子為 5.2 當量)。以 pH 測量器確認本溶液之 pH 為 7.0 附近後，藉由於 37°C 培育 1 小時，使抗體內鉸鏈部之雙硫鍵還原。

抗體與藥物連結物之結合：對上述溶液，添加含實施例 58 之步驟 8 獲得的化合物 10 mM 的二甲基亞砷溶液(0.232 mL；相對於抗體一分子為 8.6 當量)，於 15°C 水浴中培育 60 分鐘，使藥物連結物對抗體結合。其次，添加 100 mM NAC 水溶液(0.035 mL；相對於抗體一分子為 12.9 當量)，再於室溫培育 20 分鐘，使藥物連結物的反應停止。

純化：上述溶液，進行使用製造方法 1 記載的共通操作 D-1(使用 ABS 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 13 mL。

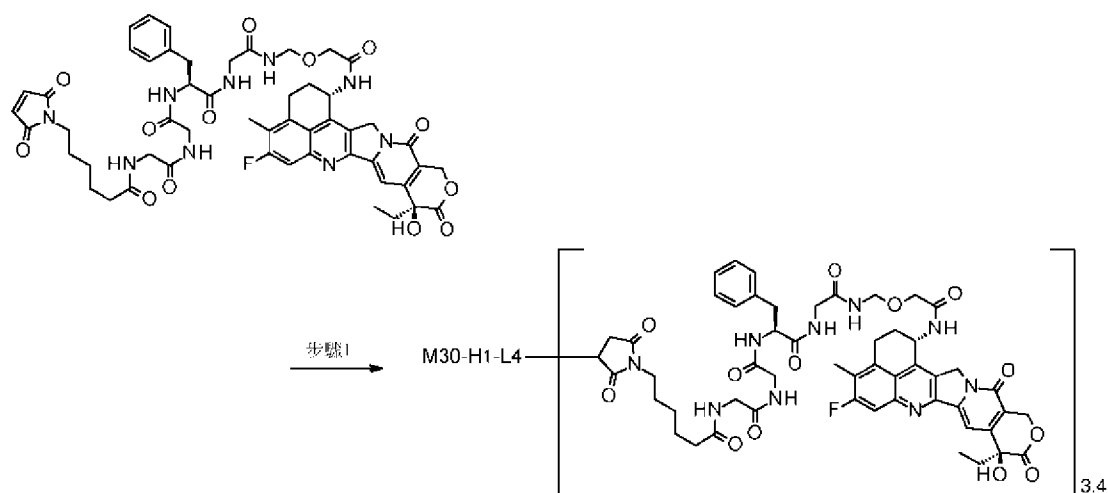
特性評價：使用製造方法 1 記載的共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\epsilon_{A,280}=235300$ (計算推定值)、 $\epsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)、 $\epsilon_{D,280}=5178$ (實測值)、 $\epsilon_{D,370}=20217$ (實測值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：2.03 mg/mL，抗體產量：26 mg(66%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：5.7

【0460】

實施例 65 抗體-藥物複合體(62)

【0461】



【0462】步驟 1：抗體-藥物複合體(62)

抗體之還原：將參考例 1 製作的 M30-H1-L4 抗體，使用製造方法 1 記載的共通操作 B(作為 280nm 吸光係數，使用 $1.61\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$)及 C-1，以 PBS6.5/EDTA 調製為 10mg/mL 。將本溶液(1.25mL 、抗體 12.5mg)置入 1.5mL 試管，添加 10mM TCEP(東京化成工業股份有限公司)水溶液(0.0287mL ；相對於抗體一分子為 3.4 當量)及 1M 磷酸氫二鉀水溶液(Nacalai Tesque, Inc.; 0.0625mL)。確認本溶液之 pH 為 7.4 ± 0.1 內後，藉由於 37°C 培育 1 小時，使抗體內鉸鏈部之雙硫鍵還原。

抗體與藥物連結物之結合：對上述溶液，室溫下添加含實施例 58 之步驟 8 獲得的化合物 10mM 的二甲基亞砷溶液(0.0439mL ；相對於抗體一分子為 5.2 當量)及二甲基亞砷(0.0267mL)，於 15°C 之水浴中培育 1 小時，使藥物連結物對抗體結合。其次，添加 100mM NAC(Sigma-Aldrich Co.LLC)水溶液(0.0066mL)，再於室溫培育 20 分鐘，使藥物連結物的反應停止。

純化：上述溶液，進行使用製造方法 1 記載的共通操作 D-1(使用 ABS 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 6mL 後，使用共通操作 A，而濃縮溶液。

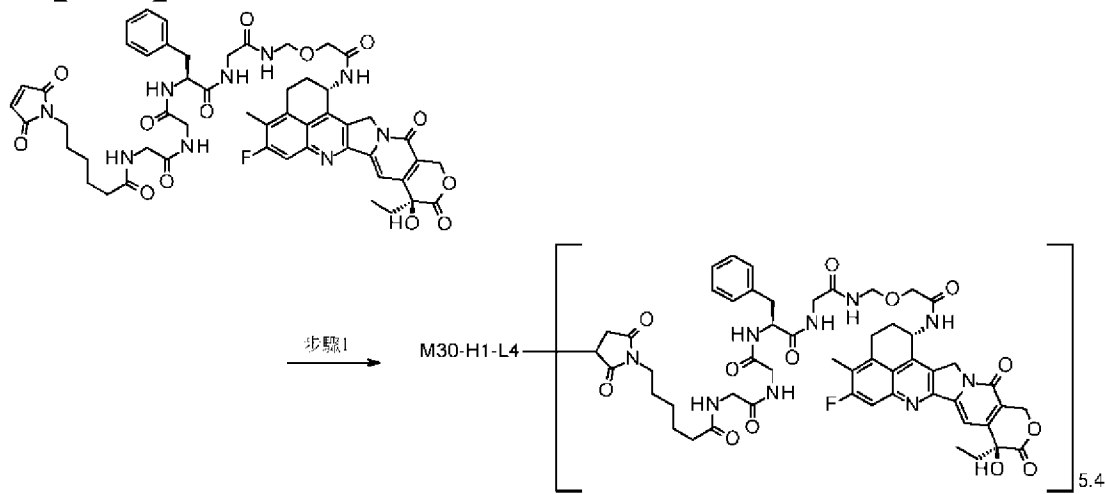
特性評價：使用製造方法 1 記載的共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\epsilon_{A,280}=235300$ (計算推定值)・ $\epsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)・ $\epsilon_{D,280}=5178$ (實測值)・ $\epsilon_{D,370}=20217$ (實測值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：10.0mg/mL，抗體產量：7.8mg(62%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：3.4

【0463】

實施例 66 抗體-藥物複合體(63)

【0464】



【0465】步驟 1：抗體-藥物複合體(63)

抗體之還原：將參考例 1 製作的 M30-H1-L4 抗體，使用製造方法 1 記載的共通操作 B(作為 280nm 吸光係數，使用 $1.61\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$)及 C-1，以 PBS6.5/EDTA 調製為 10mg/mL。將本溶液(1.25mL、抗體 12.5mg)置入 1.5mL 試管，添加 10mM TCEP(東京化成工業股份有限公司)水溶液

(0.0439mL；相對於抗體一分子為 5.2 當量)(0.0287mL；相對於抗體一分子為 3.4 當量)及 1M 磷酸氫二鉀水溶液(Nacalai Tesque, Inc.; 0.0625mL)。確認本溶液之 pH 為 7.4 ± 0.1 內後，藉由於 37°C 培育 1 小時，使抗體內鉸鏈部之雙硫鍵還原。

抗體與藥物連結物之結合：對上述溶液，室溫下添加含實施例 58 之步驟 8 獲得的化合物 10mM 的二甲基亞砷溶液(0.0726mL；相對於抗體一分子為 8.6 當量)，於 15°C 之水浴中培育 1 小時，使藥物連結物對抗體結合。其次，添加 100mM NAC(Sigma-Aldrich Co.LLC)水溶液(0.011mL)，再於室溫培育 20 分鐘，使藥物連結物的反應停止。

純化：上述溶液，進行使用製造方法 1 記載的共通操作 D-1(使用 ABS 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 6mL 後，使用共通操作 A，而濃縮溶液。

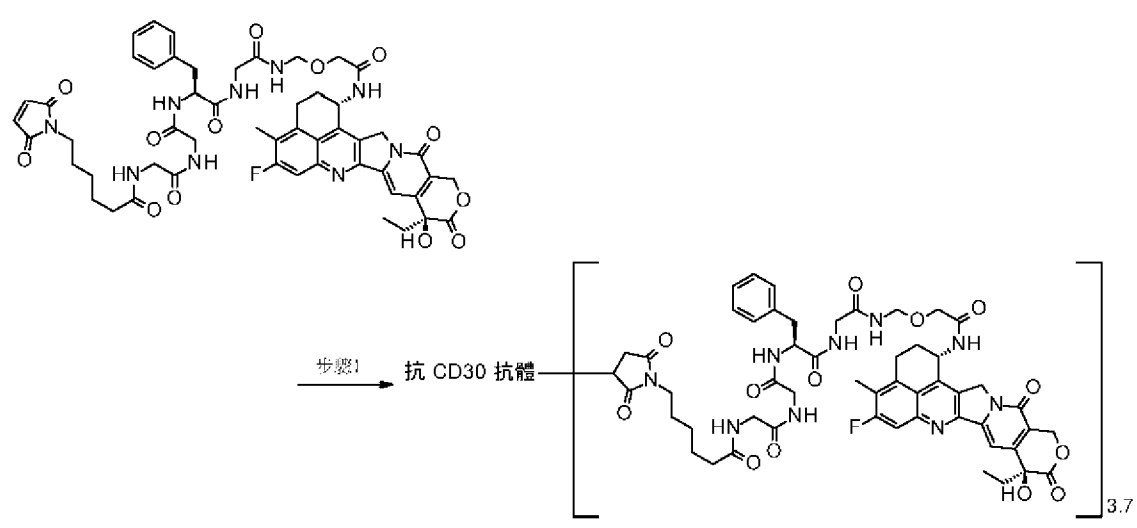
特性評價：使用製造方法 1 記載的共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\varepsilon_{A,280}=235300$ (計算推定值)、 $\varepsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)、 $\varepsilon_{D,280}=5178$ (實測值)、 $\varepsilon_{D,370}=20217$ (實測值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：10.0mg/mL，抗體產量：7.3mg(58%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：5.4

【0466】

實施例 67 抗體-藥物複合體(64)

【0467】



【0468】步驟 1：抗體-藥物複合體(64)

抗體之還原：將參考例 3 製作的抗 CD30 抗體，使用製造方法 1 記載的共通操作 B(作為 280nm 吸光係數，使用 $1.75\text{ mL mg}^{-1}\text{ cm}^{-1}$)及 C-1，以 PBS6.5/EDTA 調製為 10 mg/mL 將本溶液(0.4 mL 、抗體 4 mg)置入 1.5 mL 試管，添加 10 mM TCEP(東京化成工業股份有限公司)水溶液(0.0065 mL ；相對於抗體一分子為 2.5 當量)及 1 M 磷酸氫二鉀水溶液(Nacalai Tesque, Inc.; 0.0058 mL)。確認本溶液之 pH 為 7.0 ± 0.1 內後，於 37°C 培育 1 小時下，使抗體內銹鏈部之雙硫鍵還原。

抗體與藥物連結物之結合：對上述溶液，室溫下添加含實施例 58 之步驟 8 獲得的化合物 10 mM 的二甲基亞砷溶液(0.0116 mL ；相對於抗體一分子為 4.5 當量)及二甲基亞砷(0.0101 mL)，使用試管迴轉器(MTR-103，AS ONE 股份有限公司)，室溫下攪拌 1 小時，使藥物連結物對抗體結合。其次，添加 100 mM NAC(Sigma-Aldrich Co.LLC)水溶液(0.0017 mL)，再於室溫培育 20 分鐘，使藥物連結物的反應停止。

純化：上述溶液，進行使用製造方法 1 記載的共通操作 D-1(使用 ABS 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 2.5 mL。

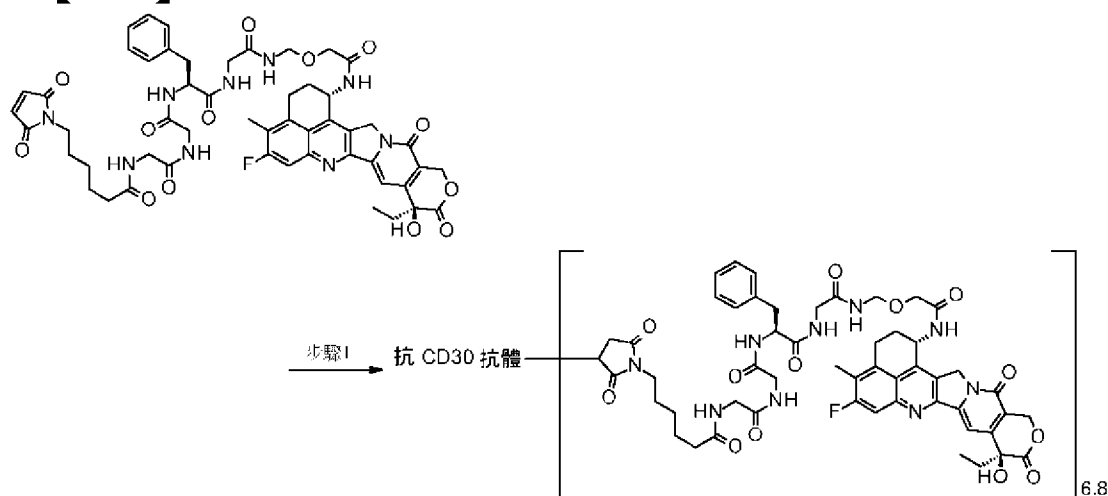
特性評價：使用製造方法 1 記載的共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\epsilon_{A,280}=270400$ (計算推定值)· $\epsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)· $\epsilon_{D,280}=5178$ (實測值)· $\epsilon_{D,370}=20217$ (實測值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：0.96 mg/mL，抗體產量：2.4 mg(60%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：3.7

【0469】

實施例 68 抗體-藥物複合體(65)

【0470】



【0471】步驟 1：抗體-藥物複合體(65)

抗體之還原：將參考例 3 製作的抗 CD30 抗體，製造方法 1 記載的共通操作 B(作為 280 nm 吸光係數，使用 $1.75 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)及 C-1，以 PBS6.5/EDTA 調製為 10 mg/mL。將本溶液(0.4 mL、抗體 4 mg)置入 1.5 mL 試管，添加 10 mM TCEP(東京化成工業股份有限公司)水溶液(0.0129 mL；相對於抗體一分子

為 5 當量)及 1M 磷酸氫二鉀水溶液(Nacalai Tesque, Inc.; 0.006mL)。確認本溶液之 pH 為 7.0 ± 0.1 內後，於 37°C 培育 1 小時下，使抗體內鉸鏈部之雙硫鍵還原。

抗體與藥物連結物之結合：對上述溶液，室溫下添加含實施例 58 之步驟 8 獲得的化合物 10mM 的二甲基亞砷溶液(0.0233mL；相對於抗體一分子為 9 當量)，使用試管迴轉器(MTR-103, AS ONE 股份有限公司)於室溫下攪拌 1 小時，使藥物連結物對抗體結合。其次，添加 100mM NAC(Sigma-Aldrich Co.LLC)水溶液(0.0035mL)，再於室溫培育 20 分鐘，使藥物連結物的反應停止。

純化：上述溶液，進行使用製造方法 1 記載的共通操作 D-1(使用 ABS 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 2.5mL。

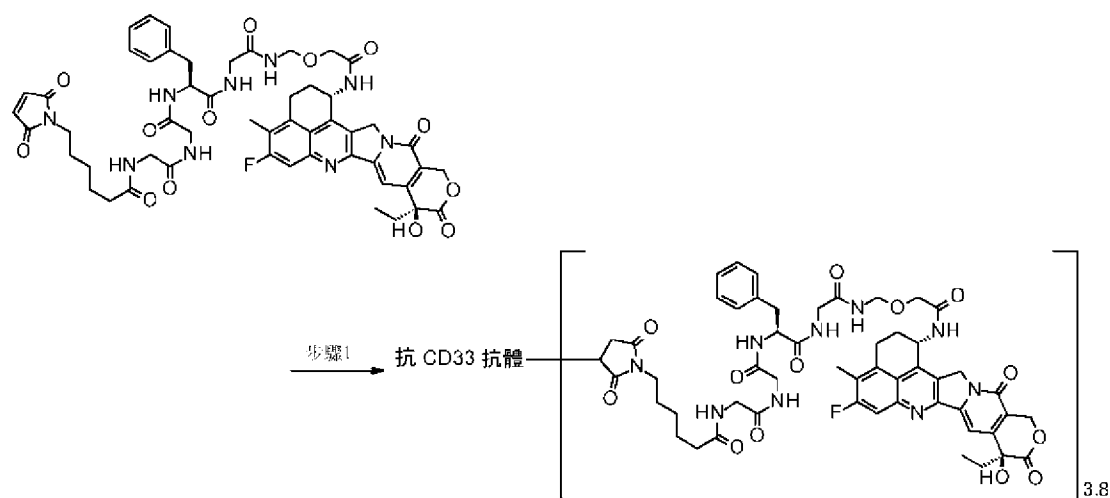
特性評價：使用製造方法 1 記載的共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\epsilon_{A,280}=270400$ (計算推定值)、 $\epsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)、 $\epsilon_{D,280}=5178$ (實測值)、 $\epsilon_{D,370}=20217$ (實測值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：0.39mg/mL，抗體產量：1.0mg(24%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：6.8

【0472】

實施例 69 抗體-藥物複合體(66)

【0473】



【0474】步驟 1：抗體-藥物複合體(66)

抗體之還原：將參考例 4 製作的抗 CD33 抗體，使用製造方法 1 記載的共通操作 B(作為 280nm 吸光係數，使用 $1.66\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$)及 C-1，以 PBS6.5/EDTA 調製為 10mg/mL 。將本溶液(0.4mL 、抗體 4mg)置入 1.5mL 試管，添加 10mM TCEP(東京化成工業股份有限公司)水溶液(0.0065mL ；相對於抗體一分子為 2.5 當量)及 1M 磷酸氫二鉀水溶液(Nacalai Tesque, Inc.; 0.0058mL)。確認本溶液之 pH 為 7.0 ± 0.1 內後，於 37°C 培育 1 小時下，使抗體內銕鏈部之雙硫鍵還原。

抗體與藥物連結物之結合：對上述溶液，室溫下添加含實施例 58 之步驟 8 獲得的化合物 10mM 的二甲基亞砷溶液(0.0116mL ；相對於抗體一分子為 4.5 當量)及二甲基亞砷(0.0101mL)，使用試管迴轉器(MTR-103, AS ONE 股份有限公司)，於室溫下攪拌 1 小時，使藥物連結物對抗體結合。其次，添加 100mM NAC(Sigma-Aldrich Co.LLC)水溶液(0.0017mL)，再於室溫培育 20 分鐘，使藥物連結物的反應停止。

純化：上述溶液，進行使用製造方法 1 記載的共通操作 D-1(使用 ABS 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 2.5 mL。

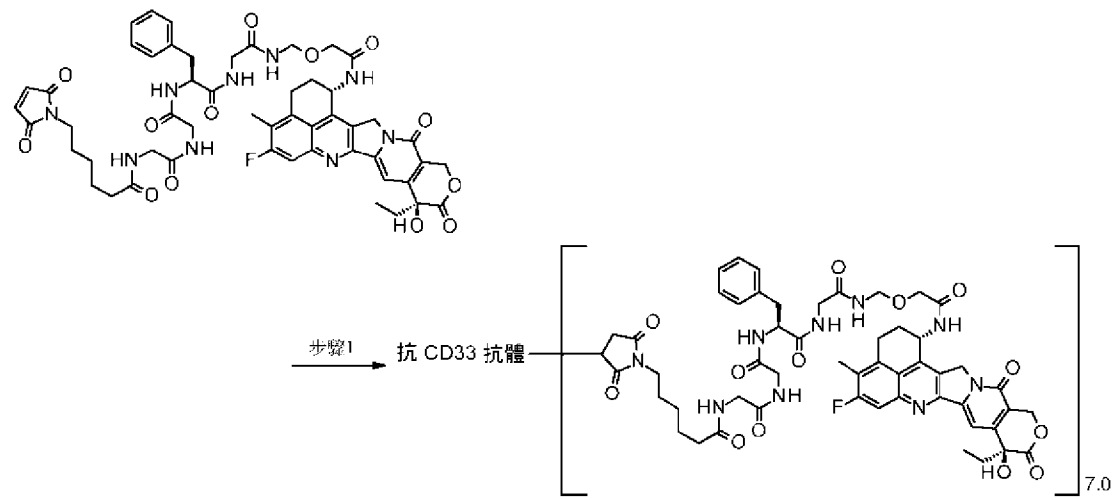
特性評價：使用製造方法 1 記載的共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\epsilon_{A,280}=256400$ (計算推定值)・ $\epsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)・ $\epsilon_{D,280}=5178$ (實測值)・ $\epsilon_{D,370}=20217$ (實測值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：1.19 mg/mL，抗體產量：3.0 mg(74%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：3.8

【0475】

實施例 70 抗體-藥物複合體(67)

【0476】



【0477】步驟 1：抗體-藥物複合體(67)

抗體之還原：將參考例 4 製作的抗 CD33 抗體，使用製造方法 1 記載的共通操作 B(作為 280nm 吸光係數，使用 $1.66\text{ mL mg}^{-1}\text{ cm}^{-1}$)及 C-1，以 PBS6.5/EDTA 調製為 10 mg/mL。將本溶液(0.4 mL、抗體 4 mg)置入 1.5 mL 試管，添加 10 mM TCEP(東京化成工業股份有限公司)水溶液

(0.0129mL；相對於抗體一分子為 5 當量)及 1M 磷酸氫二鉀水溶液(Nacalai Tesque, Inc.; 0.006mL)。確認本溶液之 pH 為 7.0 ± 0.1 內後，於 37°C 培育 1 小時下，使抗體內鉸鏈部之雙硫鍵還原。

抗體與藥物連結物之結合：對上述溶液，室溫下添加含實施例 58 之步驟 8 獲得的化合物 10mM 的二甲基亞砷溶液(0.0233mL；相對於抗體一分子為 9 當量)，使用試管迴轉器(MTR-103, AS ONE 股份有限公司)於室溫下攪拌 1 小時，使藥物連結物對抗體結合。其次，添加 100mM NAC(Sigma-Aldrich Co.LLC)水溶液(0.0035mL)，再於室溫培育 20 分鐘，使藥物連結物的反應停止。

純化：上述溶液，進行使用製造方法 1 記載的共通操作 D-1(使用 ABS 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 2.5mL。

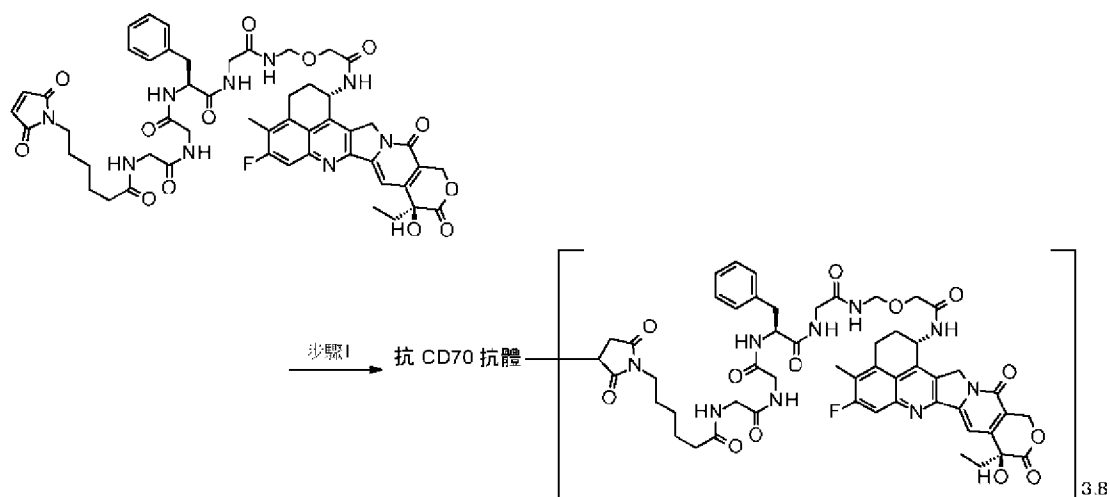
特性評價：使用製造方法 1 記載的共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\epsilon_{A,280}=256400$ (計算推定值)、 $\epsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)、 $\epsilon_{D,280}=5178$ (實測值)、 $\epsilon_{D,370}=20217$ (實測值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：1.24mg/mL，抗體產量：3.1mg(78%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：7.0

【0478】

實施例 71 抗體-藥物複合體(68)

【0479】



【0480】步驟 1：抗體-藥物複合體(68)

抗體之還原：將參考例 5 製作的抗 CD70 抗體，使用製造方法 1 記載的共通操作 B(作為 280nm 吸光係數，使用 $1.69\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$)及 C-1，以 PBS6.5/EDTA 調製為 10mg/mL 。將本溶液(0.4mL 、抗體 4mg)置入 1.5mL 試管，添加 10mM TCEP(東京化成工業股份有限公司)水溶液(0.0065mL ；相對於抗體一分子為 2.5 當量)及 1M 磷酸氫二鉀水溶液(Nacalai Tesque, Inc.; 0.0058mL)。確認本溶液之 pH 為 7.0 ± 0.1 內後，於 37°C 培育 1 小時下，使抗體內銕鏈部之雙硫鍵還原。

抗體與藥物連結物之結合：對上述溶液，室溫下添加含實施例 58 之步驟 8 獲得的化合物 10mM 的二甲基亞砷溶液(0.0116mL ；相對於抗體一分子為 4.5 當量)及二甲基亞砷(0.0101mL)，使用試管迴轉器(MTR-103, AS ONE 股份有限公司)於室溫下攪拌 1 小時，使藥物連結物對抗體結合。其次，添加 100mM NAC(Sigma-Aldrich Co.LLC)水溶液(0.0017mL)，再於室溫培育 20 分鐘，使藥物連結物的反應停止。

純化：上述溶液，進行使用製造方法 1 記載的共通操作 D-1(使用 ABS 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 2.5mL。

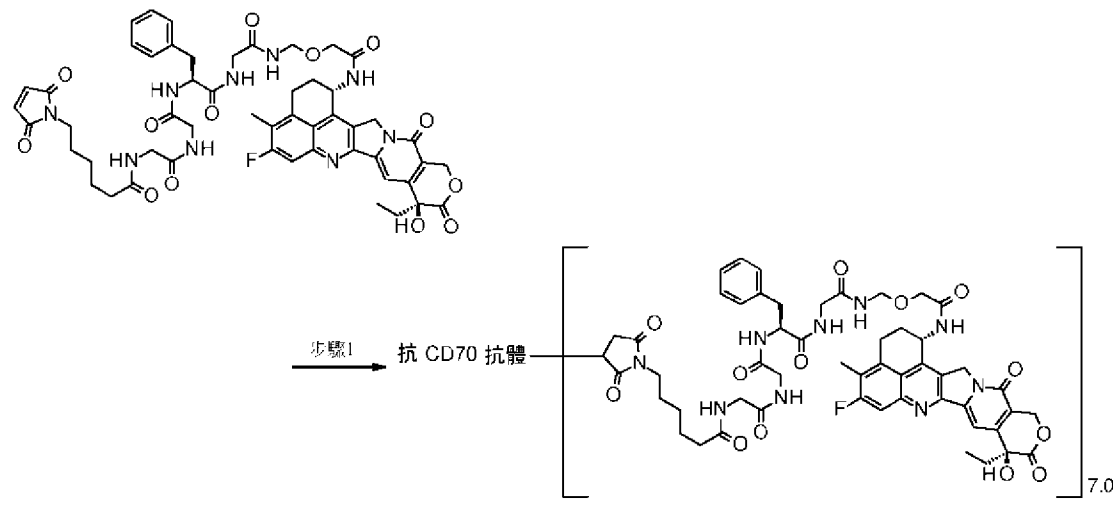
特性評價：使用製造方法 1 記載的共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\epsilon_{A,280}=262400$ (計算推定值)・ $\epsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)・ $\epsilon_{D,280}=5178$ (實測值)・ $\epsilon_{D,370}=20217$ (實測值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：1.10mg/mL，抗體產量：2.8mg(69%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：3.8

【0481】

實施例 72 抗體-藥物複合體(69)

【0482】



【0483】步驟 1：抗體-藥物複合體(69)

抗體之還原：將參考例 5 製作的抗 CD70 抗體，使用製造方法 1 記載的共通操作 B(作為 280nm 吸光係數，使用 $1.69\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$)及 C-1，以 PBS6.5/EDTA 調製為 10mg/mL。將本溶液(0.4mL、抗體 4mg)置入 1.5mL 試管，添加 10mM TCEP(東京化成工業股份有限公司)水溶液

(0.0129mL；相對於抗體一分子為 5 當量)及 1M 磷酸氫二鉀水溶液(Nacalai Tesque, Inc.; 0.006mL)。確認本溶液之 pH 為 7.0 ± 0.1 內後，於 37°C 培育 1 小時下，使抗體內鉸鏈部之雙硫鍵還原。

抗體與藥物連結物之結合：對上述溶液，室溫下添加含實施例 58 之步驟 8 獲得的化合物 10mM 的二甲基亞砷溶液(0.0233mL；相對於抗體一分子為 9 當量)，使用試管迴轉器(MTR-103, AS ONE 股份有限公司)而於室溫下攪拌 1 小時，使藥物連結物對抗體結合。其次，添加 100mM NAC(Sigma-Aldrich Co.LLC)水溶液(0.0035mL)，再於室溫培育 20 分鐘，使藥物連結物的反應停止。

純化：上述溶液，進行使用製造方法 1 記載的共通操作 D-1(使用 ABS 作為緩衝液)的純化，獲得含有標題抗體-藥物複合體的溶液 2.5mL。

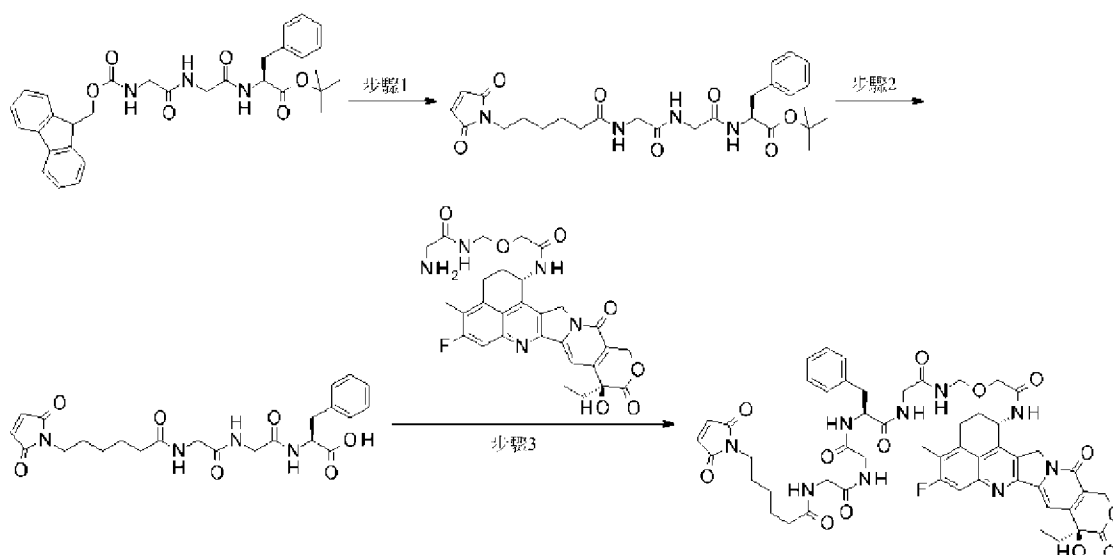
特性評價：使用製造方法 1 記載的共通操作 E(作為莫耳吸光係數，使用 $\epsilon_{A,280}=262400$ (計算推定值)、 $\epsilon_{A,370}=0$ (計算推定值)、 $\epsilon_{D,280}=5178$ (實測值)、 $\epsilon_{D,370}=20217$ (實測值))，獲得下述之特性值。

抗體濃度：1.16mg/mL，抗體產量：2.9mg(73%)，抗體每一分子之藥物平均結合數(n)：7.0

【0484】

實施例 73(實施例 58 之步驟 8 之化合物另外合成法)

【0485】



【0486】步驟 1：tert-丁基 N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]甘胺醯基甘胺醯基-L-苯基丙胺酸酯

冰冷下，於 tert-丁基 N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]甘胺醯基甘胺醯基-L-苯基丙胺酸酯(J.Pept.Res.，1999 年，53 卷，393 項)(0.400g，0.717mmol)之 THF(12.0ml)溶液中，添加 1,8-二氮雙環[5.4.0]-7-十一碳烯(0.400ml)而於室溫攪拌 4 日後，再添加 6-順丁烯二醯亞胺己酸 N-琥珀醯亞胺基酯(0.221g，0.717mmol)，並攪拌 3 小時。反應液以乙酸乙酯稀釋，以 10%檸檬酸水溶液、飽和碳酸氫鈉水溶液、及飽和食鹽水洗淨後，有機層以無水硫酸鎂乾燥。減壓下餾除溶媒後，獲得的殘留物以矽膠管柱層析[氯仿~氯仿：甲醇=9：1(v/v)]純化，獲得呈淡黃色固體之標題化合物(0.295g，78%)。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz， CDCl_3) δ ：1.28-1.36(2H，m)，1.41(9H，s)，1.57-1.71(4H，m)，2.23(2H，t， $J=7.6\text{Hz}$)，3.09(2H，d， $J=6.0\text{Hz}$)，3.51(2H，t， $J=7.6\text{Hz}$)，3.85-4.02(4H，m)，4.69-4.78(1H，m)，6.15(1H，t， $J=4.6\text{Hz}$)，6.33(1H，d， $J=7.3\text{Hz}$)，6.60(1H，t， $J=5.0\text{Hz}$)，6.68(2H，s)，7.10-7.16(2H，m)，7.22-7.31(3H，m)。

MS(ESI) m/z : 529($M+H$)⁺

【0487】步驟 2：N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]甘胺醯基甘胺醯基-L-苯丙胺酸

於上述步驟 1 獲得的化合物(0.295 g, 0.558 mmol)之二氯甲烷(8.00 mL)溶液中，添加三氟乙酸(4.00 mL)，並於室溫攪拌 18 小時。減壓餾除溶媒，獲得呈淡黃色固體之標題化合物(0.240 g, 91%)。

¹H-NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.15-1.23(2H, m), 1.40-1.53(4H, m), 2.10(2H, t, $J=7.6$ Hz), 2.88(1H, dd, $J=13.7, 8.9$ Hz), 3.04(1H, dd, $J=13.7, 5.0$ Hz), 3.35-3.43(2H, m), 3.58-3.77(4H, m), 4.41(1H, td, $J=7.8, 5.0$ Hz), 7.00(2H, s), 7.16-7.31(5H, m), 8.00(1H, t, $J=5.7$ Hz), 8.06(1H, t, $J=5.7$ Hz), 8.13(1H, d, $J=7.8$ Hz).

【0488】步驟 3：N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]甘胺醯基甘胺醯基-L-苯基丙胺醯基-N-[(2-{[(1*S*,9*S*)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-*b*]喹啉-1-基]胺基}-2-側氧基乙氧基)甲基]甘胺酸醯胺

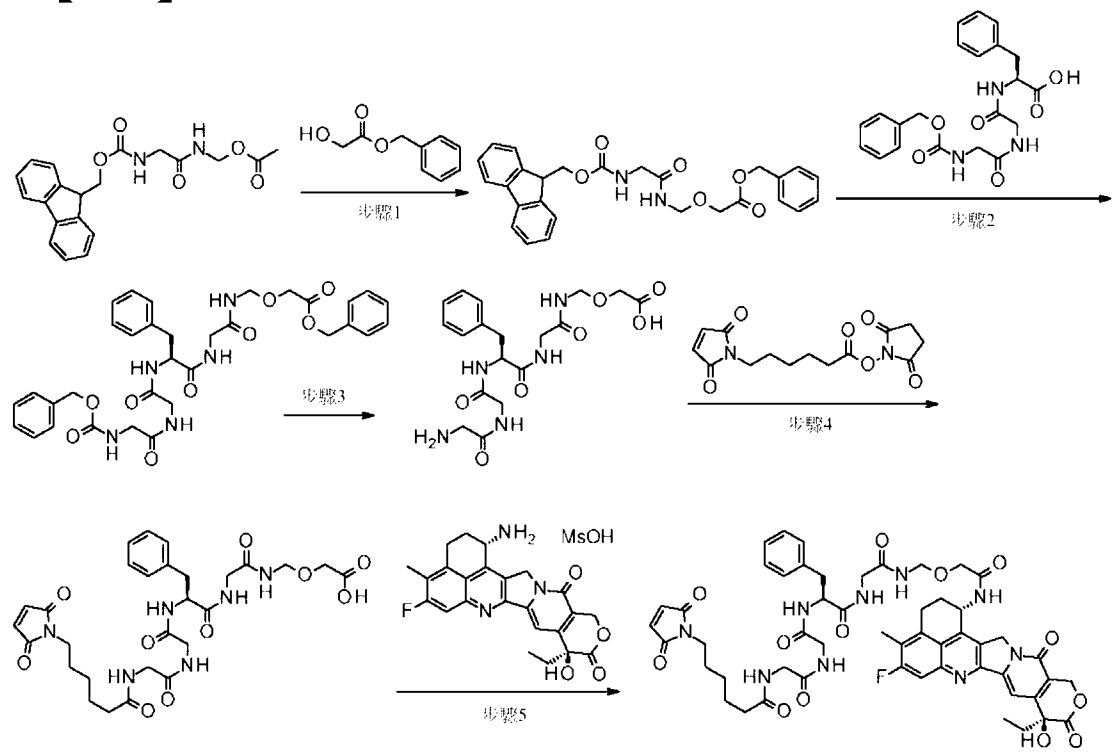
將上述步驟 2 獲得的化合物(0.572 g, 1.21 mmol)溶解於二氯甲烷(12.0 mL)，添加 N-羥基琥珀醯亞胺(0.152 g, 1.32 mmol)及 1-(3-二甲基胺基丙基)-3-乙基碳化二亞胺鹽酸鹽(0.253 g, 1.32 mmol)並攪拌 1 小時。將反應溶液添加到實施例 58 之步驟 5 獲得的混合物(1.10 mmol)之 N,N-二甲基甲醯胺(22.0 mL)溶液中，並於室溫攪拌 3 小時。於反應溶液中添加

10%檸檬酸水溶液，以氯仿萃取，獲得的有機層以硫酸鈉乾燥，並過濾。減壓餾除溶媒，獲得的殘留物以矽膠管柱層析[氯仿～氯仿：甲醇=8：2(v/v)]純化，獲得呈淡黃色固體之標題化合物(0.351g，31%)。機器資料與實施例 58 之步驟 8 之化合物相同。

【0489】

實施例 74(實施例 58 之步驟 8 之化合物之另外合成法)

【0490】



【0491】步驟 1：苯甲基[({N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]甘胺鹽基}胺基)甲氧基]乙酸酯

於實施例 58 之步驟 1 獲得的化合物(7.37g，20.0mmol)之四氫呋喃(200ml)溶液中，於 0℃添加乙醇酸苯甲酯(6.65g，40.0mmol)、及 p-甲苯磺酸一水合物(0.381g，2.00mmol)，於室溫攪拌 2 小時 30 分鐘。於反應溶液中添加飽和碳酸氫鈉水溶液，以乙酸乙酯萃取，獲得的有機層以硫酸鈉乾燥，並過

濾。減壓餾除溶媒，獲得的殘留物以矽膠管柱層析[己烷：乙酸乙酯=100：0(v/v)~0：100]純化，獲得呈無色固體之標題化合物(6.75 g，71%)。機器資料係與實施例 58 之步驟 2 之化合物相同。

【0492】 步驟 2：N-[(苯甲基氧基)羰基]甘胺醯基甘胺醯基-L-苯丙胺酸-N-{[(2-(苯甲基氧基)-2-側氧基乙氧基]甲基}甘胺酸醯胺

於上述步驟 1 獲得的化合物(6.60 g，13.9 mmol)之 N,N-二甲基甲醯胺(140 mL)溶液中，於 0 °C 添加 1,8-二氮雙環[5.4.0]十一-7-烯(2.22 g，14.6 mmol)，並於室溫攪拌 15 分鐘。於反應溶液中添加預先於室溫攪拌 1 小時之 N-[(苯甲基氧基)羰基]甘胺醯基甘胺醯基-L-苯丙胺酸(6.33 g，15.3 mmol)、N-羥基琥珀醯亞胺(1.92 g，16.7 mmol)及 1-(3-二甲基胺基丙基)-3-乙基碳化二亞胺鹽酸鹽(3.20 g，16.7 mmol)之 N,N-二甲基甲醯胺(140 mL)溶液，並於室溫攪拌 4 小時。於反應溶液中添加 0.1N 鹽酸，並以氯仿萃取，獲得的有機層以硫酸鈉乾燥，並過濾。減壓餾除溶媒，獲得的殘留物以矽膠管柱層析[氯仿~氯仿：甲醇=8：2(v/v)]純化，獲得呈無色固體之標題化合物(7.10 g，79%)。

¹H-NMR(DMSO-D₆)δ : 2.78(1H，dd，J=13.9，9.6 Hz)，3.05(1H，dd，J=13.9，4.5 Hz)，3.56-3.80(6H，m)，4.15(2H，s)，4.47-4.55(1H，m)，4.63(2H，d，J=6.6 Hz)，5.03(2H，s)，5.15(2H，s)，7.16-7.38(15H，m)，7.52(1H，t，J=5.9 Hz)，8.03(1H，t，J=5.5 Hz)，8.17(1H，d，J=8.2 Hz)，8.36(1H，t，J=5.7 Hz)，8.61(1H，t，J=6.6 Hz)。

【0493】步驟 3：甘胺鹽基甘胺鹽基-L-苯基丙胺鹽基-N-[(羧基甲氧基)甲基]甘胺酸鹽胺

於上述步驟 2 獲得的化合物(7.00 g, 10.8 mmol)之 N,N-二甲基甲醯胺(216 mL)溶液中，添加鈀碳觸媒(7.00 g)，氫氣環境下，於室溫攪拌 24 小時。不溶物藉由矽藻土過濾而去除，減壓餾除溶媒。將獲得的殘留物溶解於水中，不溶物藉由矽藻土過濾而去除，重複 2 次減壓餾除溶媒的操作，獲得呈無色固體之標題化合物(3.77 g, 82%)。

$^1\text{H-NMR}(\text{DMSO-}D_6)\delta$: 2.84(1H, dd, $J=13.7, 9.8\text{ Hz}$), 3.08(1H, dd, $J=13.7, 4.7\text{ Hz}$), 3.50-3.72(4H, m), 3.77-3.86(2H, m), 3.87(2H, s), 4.52-4.43(1H, m), 4.61(2H, d, $J=6.6\text{ Hz}$), 7.12-7.30(5H, m), 8.43(1H, t, $J=5.9\text{ Hz}$), 8.54(1H, d, $J=7.8\text{ Hz}$), 8.70(1H, t, $J=6.3\text{ Hz}$), 8.79(1H, t, $J=5.5\text{ Hz}$).

【0494】步驟 4：N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)己醯基]甘胺鹽基甘胺鹽基-L-苯基丙胺鹽基-N-[(羧基甲氧基)甲基]甘胺酸鹽胺

於上述步驟 3 獲得的化合物(3.59 g, 8.48 mmol)之 N,N-二甲基甲醯胺(85.0 mL)溶液中，添加 6-順丁烯二醯亞胺己酸 N-琥珀醯亞胺基酯(2.88 g, 9.33 mmol)、及三乙基胺(0.858 g, 8.48 mmol)，並於室溫攪拌 1 小時。於反應溶液中添加 0.1 N 鹽酸，並以氯仿、及氯仿與甲醇之混合溶媒[氯仿：甲醇=4：1(v/v)]純化，獲得的有機層以硫酸鈉乾燥，並過濾。減壓餾除溶媒，獲得的殘留物以矽膠管柱層析[氯仿～氯仿：甲醇：水=7：3：1(v/v/v)]之分配有機層]純化，獲得呈無色固體之標題化合物(3.70 g, 71%)。

$^1\text{H-NMR}(\text{DMSO-}D_6)\delta$: 1.13-1.24(2H, m), 1.42-1.53(4H, m), 2.11(2H, t, $J=7.4\text{Hz}$), 2.80(1H, dd, $J=13.7, 9.8\text{Hz}$), 3.06(1H, dd, $J=13.9, 4.5\text{Hz}$), 3.37(2H, t, $J=7.2\text{Hz}$), 3.56-3.78(6H, m), 3.97(2H, s), 4.46-4.53(1H, m), 4.61(2H, d, $J=6.3\text{Hz}$), 7.00(2H, s), 7.15-7.29(5H, m), 8.03-8.20(3H, m), 8.32(1H, t, $J=5.9\text{Hz}$), 8.60(1H, t, $J=6.7\text{Hz}$).

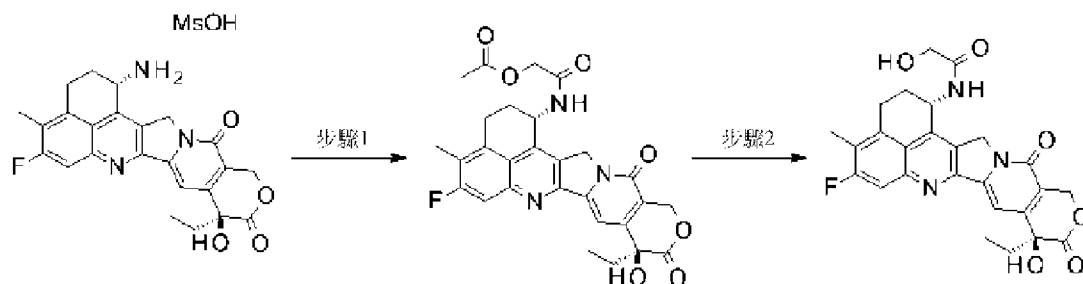
【0495】步驟 5：N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]甘胺醯基甘胺醯基-L-苯基丙胺醯基-N-[(2-{[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-2-側氧基乙氧基)甲基]甘胺酸醯胺

於化合物(4)之甲磺酸鹽(1.14g, 2.00mmol)之 N,N-二甲基甲醯胺(40.0mL)溶液中，於 0°C 添加三乙基胺(0.202g, 2.00mmol)、上述步驟 4 獲得的化合物(1.48g, 2.40mmol)、及含 16.4% 水之氯化 4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三吡-2-基)-4-甲基咪啉鎂(0.993g, 3.00mmol)，於室溫攪拌 1 小時。減壓餾除溶媒，獲得的殘留物以矽膠管柱層析[氯仿~氯仿：甲醇=8：2(v/v)]純化，獲得呈淡黃色固體之標題化合物(1.69g, 82%)。機器資料係與實施例 58 之步驟 8 之化合物相同。

【0496】

實施例 75 N-[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基]-2-羥基乙醯胺

【0497】



【0498】步驟 1：2- $\{[(1S,9S)$ -9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基 $\}$ -2-側氧基乙基乙酸酯

冰冷下，於化合物(4)之甲磺酸鹽(0.500g，0.941mmol)之 N,N-二甲基甲醯胺(20.0mL)懸浮液中，添加 N,N-二異丙基乙基胺(0.492mL，2.82mmol)及氯化乙醯氧基乙醯(0.121ml，1.13mmol)，並於室溫攪拌 1 小時。減壓餾除溶媒，獲得的殘留物以矽膠管柱層析[氯仿~氯仿：甲醇：水=7：3：1(v/v/v)之分配有機層]純化，獲得呈淡黃色固體之標題化合物(0.505g，定量)。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz，DMSO- d_6) δ ：0.87(3H，t， $J=7.4\text{Hz}$)，1.81-1.92(2H，m)，2.08(3H，s)，2.08-2.22(2H，m)，2.41(3H，s)，3.14-3.21(2H，m)，4.51(2H，dd， $J=19.4$ ，14.7Hz)，5.22(2H，dd， $J=40.1$ ，19.0Hz)，5.43(2H，s)，5.56-5.61(1H，m)，6.53(1H，s)，7.31(1H，s)，7.81(1H，d， $J=11.0\text{Hz}$)，8.67(1H，d， $J=8.6\text{Hz}$)。

MS(ESI) m/z ：536($M+H$) $^+$

【0499】步驟 2：N- $[(1S,9S)$ -9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-1-基]-2-羥基乙醯胺

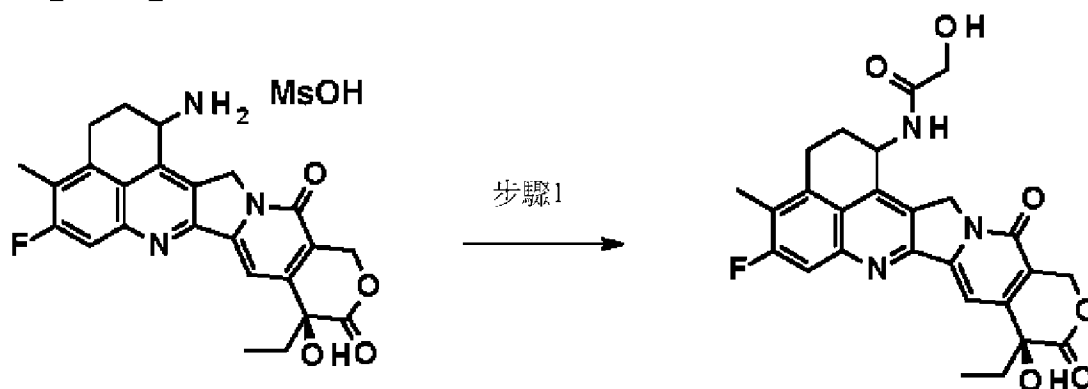
於上述步驟 1 獲得的化合物(0.504 g, 0.941 mmol)之甲醇(50.0 mL)懸浮液中，添加四氫呋喃(20.0 mL)及 1N 氫氧化鈉水溶液(4.00 mL, 4.00 mmol)，並於室溫攪拌 1 小時。添加 1N 鹽酸(5.00 mL, 5.00 mmol)而停止反應，減壓餾除溶媒。獲得的殘留物以矽膠管柱層析[氯仿～氯仿：甲醇：水=7：3：1(v/v/v)之分配有機層]純化，獲得呈淡黃色固體之標題化合物(0.412 g, 89%)。將抗體-藥物複合體(55)、(56)投與担癌小鼠之際，此化合物於腫瘤中被確認。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 0.87(3H, t, $J=7.3$ Hz), 1.78-1.95(2H, m), 2.09-2.28(2H, m), 2.39(3H, s), 3.07-3.27(2H, m), 3.96(2H, d, $J=6.0$ Hz), 5.11-5.26(2H, m), 5.42(2H, s), 5.46-5.54(1H, m), 5.55-5.63(1H, m), 6.52(1H, s), 7.30(1H, s), 7.78(1H, d, $J=10.9$ Hz), 8.41(1H, d, $J=9.1$ Hz). MS(ESI) m/z : 494($M+H$) $^+$

【0500】

實施例 76(實施例 75 之化合物之另外合成法)

【0501】



步驟 1 : N-[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-1-基]-2-羥基乙醯胺

將乙二醇酸(0.0201g, 0.27mmol)溶解於 N,N-二甲基甲醯胺(1.0mL), 添加 N-羥基琥珀醯亞胺(0.0302g, 0.27mmol)及 1-(3-二甲基胺基丙基)-3-乙基碳化二亞胺鹽酸鹽(0.0508g, 0.27mmol)並攪拌 1 小時。將此反應溶液添加於化合物(4)之甲磺酸鹽(0.1g, 0.176mmol)之 N,N-二甲基甲醯胺(1.0mL)懸浮液中, 並添加三乙胺(0.025mL, 0.18mmol), 於室溫攪拌 24 小時。減壓餾除溶媒, 獲得的殘留物以矽膠管柱層析[氯仿~氯仿: 甲醇=10: 1(v/v)]純化, 獲得呈淡黃色固體之標題化合物(0.080g, 92%)。機器資料係與實施例 75 之步驟 2 獲得的化合物相同。

【0502】

(試驗例 1)全長人類 B7-H3 變異體 1 表現載體之製作

由 LNCaP 細胞(American Type Culture Collection : ATCC)總 RNA 所合成的 cDNA 作為模板而使用引子組 :

引子 1 :

5'-ctatagggagacccaagctggctagcatgctgcgtcggcggggcag-3'(序列識別號 22), 及

引子 2 :

5'-aacggggccctctagactcgagcggccgctcaggctatttcttgtccatcatcttctttgctgtcag-3'(序列識別號 23)

進行 PCR 反應, 增幅編碼人類 B7-H3 變異體 1 的 cDNA。

其次, 獲得的 PCR 產物以 MagExtractor PCR & Gel cleanup(TOYOBO 公司)純化。此外, 以限制酶(NheI/NotI)消化後, 以 MagExtractor PCR & Gel cleanup(TOYOBO 公司)純化。pcDNA3.1(+)質體 DNA(Life Technologies 公司)以相

同限制酶(NheI/NotI)消化後，以 MagExtractor PCR & Gel cleanup(TOYOBO 公司)純化。

將上述純化 DNA 溶液混合，再添加 Ligation high(TOYOBO 公司)，於 16℃培育 8 小時，加以連結。

將上述反應物加到大腸菌 DH5 α 勝任細胞(competent cell)(Life Technologies 公司)，並轉形。

於上述獲得的株，以 PCR 引子與 BGH 反向引子進行菌落直接 PCR(Colony Direct PCR)，選擇候補株。

獲得的候補株以液體培養基(LB/Amp)培養，以 MagExtractor-Plasmid-(TOYOBO 公司)萃取質體 DNA。

將獲得的質體 DNA 作為模板，進行引子 3(CMV 啟動子引子)：

5'-cgcaaatgggcggtaggcgtg-3'(序列識別號 24)，及引子 4(BGH 反向引子)：

5'-tagaaggcacagtcgagg-3'(序列識別號 25)

之間的序列解析，將取得株與提供 CDS 序列比較。

確認序列後，獲得的株以 200mL 之 LB/Amp 培養基培養，使用 VioGene 公司 Plasmid Midi V-100 套組，進行質體 DNA 之萃取。

將本載體命名為 pcDNA3.1-B7-H3。本載體經選殖的 B7-H3 變異體 1 基因之 ORF 部分之序列示於序列表之序列識別號 26(第 16 圖)之核苷酸編號 1 至 1602。又，B7-H3 變異體 1 之胺基酸序列示於序列表之序列識別號 1。

【0503】

(試驗例 2)B7-H3 變異體 1 基因安定表現 CCRF-CEM 細胞之調製

將試驗例 1 製作的 pcDNA3.1-B7-H3，對 CCRF-CEM 細胞(ATCC)使用 Nucleofector II(Lonza 公司製)而以電穿孔法加以轉染。之後，於含有 10%胎牛血清(FBS)的 RPMI1640 培養基(Life Technologies 公司)(以下為 10% FBS-RPMI1640)中，於 37°C、5%CO₂ 之條件下再培養 2 晚。

培養 2 日後，為了選擇 pcDNA3.1-B7-H3 安定地併入之 CCRF-CEM 細胞，以含有 750μg/mL G418(Life Technologies 公司)之 10%FBS-RPMI1640 開始培養。

培養 1 個月後，進行使用用以獲得單一細胞株之限界稀釋法進行選擇。具體而言，將具有抗 G418 的耐性的細胞稀釋為 10 個細胞/mL 而以 100μL/穴之濃度接種於 96 孔盤，培養，由各別穴回收增殖的細胞。

為了確認經回收的各株之 B7-H3 表現，使用流式細胞測量術法。具體而言，回收的各株以含有 5%FBS 的 PBS 洗淨 2 次後，添加含有 10μg/mL M30 的 5%FBS 的 PBS 並懸浮，於 4°C 靜置 30 分鐘。以含有 5%FBS 的 PBS 洗淨 2 次後，添加以含有 5%FBS 的 PBS 稀釋 1000 倍的共軛螢光素的山羊 IgG 份對小鼠 IgG(全部分子)(ICN Pharmaceuticals 公司製 #55493)而懸浮，於 4°C 靜置 30 分鐘。以含有 5%FBS 的 PBS 洗淨 2 次後，以含有 5%FBS 的 PBS 再懸浮，以流式細胞儀(FC500：BeckmanCoulter 公司)進行檢測。

藉由本操作將獲得的 B7-H3 變異體 1 基因安定表現 CCRF-CEM 細胞命名為 CEM_V1_3.1_2 細胞。親株 CCRF-CEM 細胞作為 B7-H3 非表現細胞株來使用。

【0504】

(試驗例 3) 抗體-藥物複合體之細胞傷害性試驗(1)

試驗例 2 製作的 CEM_V1_3.1_2 細胞、CCRF-CEM 細胞(ATCC)係以含 10%胎牛血清(MOREGATE)的 RPMI1640(GIBCO)(以下，培養基)培養。CEM_V1_3.1_2 細胞、CCRF-CEM 細胞以培養基調製為 8×10^4 個細胞/mL，於置入 65 μ L 之培養基的 96 穴細胞培養用微量盤中各添加 25 μ L 而培養一晚。翌日，將以培養基稀釋為 1000nM、200nM、40nM、8nM、1.6nM、0.32nM、0.064nM 的 M30-H1-L4 抗體、M30-H1-L4P 抗體及抗體-藥物複合體，各添加 10 μ L 於微量盤。被驗物質非添加穴中各添加培養基 10 μ L。37 度、5%CO₂ 下培養 3 日。培養後，培育微量盤後取出於室溫下靜置 30 分鐘。添加與培養液等量之 CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega)並攪拌。於室溫靜置 10 分鐘後，並以平盤讀數機(PerkinElmer)計測發光量。IC₅₀ 值以下列式算出。

$$IC_{50}(nM) = \text{antilog}((50-d) \times (\text{LOG}_{10}b - \text{LOG}_{10}a) \div (d-c) + \text{LOG}_{10}b)$$

a：被驗物質之濃度 a

b：被驗物質之濃度 b

c：添加濃度 a 之被驗物質時之活細胞率

d：添加濃度 b 之被驗物質時之活細胞率

a、b 係高於活細胞率 50%的濃度下， $a > b$

各濃度中的細胞生存率係以下列式算出。

$$\text{細胞生存率}(\%) = a \div b \times 100$$

a：被驗物質添加穴之發光量之平均值($n=2$)

b：被驗物質非添加穴之發光量之平均值($n=10$)

對 CEM_V1_3.1_2 細胞，抗體-藥物複合體(5)、(16)、(21)、(32)、(44)、(45)、(46)、(52)、(54)呈現 $IC_{50} < 0.1$ (nM)之細胞傷害活性。抗體-藥物複合體(1)、(12)、(13)、(20)、(28)、(29)、(35)、(36)、(37)、(41)、(49)、(53)係呈現 $0.1 < IC_{50} < 1$ (nM)之細胞傷害活性。抗體-藥物複合體(33)、(34)、(47)、(48)、(50)、(51)係呈現 $1 < IC_{50} < 100$ (nM)之細胞傷害活性。另一方面，對 CCRF-CEM 細胞，上述任一者之抗體-藥物複合體皆未呈現細胞傷害活性(> 100 (nM))。M30-H1-L4 抗體及 M30-H1-L4P 抗體對任一細胞，亦未呈現細胞傷害活性(> 100 (nM))。

【0505】

(試驗例 4)抗體-藥物複合體之細胞傷害性試驗(2)

抗原陽性細胞之 SR 細胞(ATCC)、抗原陰性細胞之 Daudi 細胞(ATCC)係以含 10%之胎牛血清(MOREGATE)的 RPMI1640(GIBCO)(以下，培養基)培養。SR 細胞、Daudi 細胞以培養基調製為 2.8×10^4 個細胞/mL，於 96 穴細胞培養用微量盤中各添加 90 μ L。2 小時後，將以培養基稀釋為 40 nM、8 nM、1.6 nM、320 pM、64 pM、12.8 pM、2.6 pM 的抗 CD30 抗體及抗體-藥物複合體(6)、(7)各添加 10 μ L 於微量盤。被驗物質非添加穴中各添加 10 μ L 培養基。37 度、5%CO₂ 下培養 3 日。培養後，將微量盤自培育箱取出並於室溫下靜置 30 分鐘。添加培養液與等量之 CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay(Promega)並攪拌。於室溫下靜置 10 分鐘後，

以平盤讀數機(PerkinElmer)計測發光量。IC₅₀ 值以下列式算出。

$$IC_{50}(nM) = \text{antilog}((50-d) \times (\text{LOG}_{10} b - \text{LOG}_{10} a) \div (d - c) + \text{LOG}_{10} b)$$

a：被驗物質之濃度 a

b：被驗物質之濃度 b

c：添加濃度 a 之被驗物質時之活細胞率

d：添加濃度 b 之被驗物質時之活細胞率

a、b 係高於活細胞率 50% 的濃度下， $a > b$

各濃度中的細胞生存率係以下列式算出。

$$\text{細胞生存率}(\%) = a \div b \times 100$$

a：被驗物質添加穴之發光量之平均值(n=2)

b：被驗物質非添加穴之發光量之平均值(n=12)

抗體-藥物複合體(6)、(7)係對 SR 細胞，呈現 IC₅₀ < 0.01(nM)之細胞傷害活性。另一方面，對 Daudi 細胞，抗體-藥物複合體(6)、(7)皆未呈現細胞傷害活性(> 4.0(nM))。又，抗 CD30 抗體係對任一細胞皆未呈現細胞傷害活性(> 4.0(nM))。

【0506】

(試驗例 5)抗體-藥物複合體之細胞傷害性試驗(3)

抗原陽性細胞之 SR 細胞(ATCC)係以含 10%之胎牛血清(MOREGATE)的 RPMI1640(GIBCO)(以下，培養基)培養。SR 細胞以培養基調製成為 2.8×10^4 個細胞/mL，於 96 穴細胞培養用微量盤中各添加 90 μ L。2 小時後，將以培養基稀釋為 1000nM、100nM、10nM、1nM、100pM、10pM、1pM 的抗

CD30 抗體及抗體-藥物複合體(22)、(23)、(38)、(64)、(65)各添加 10 μ L 於微量盤。被驗物質非添加穴係各添加 10 μ L 之培養基。37 度、5%CO₂ 下培養 6 日。培養後，將微量盤自培育箱中取出並於室溫下靜置 30 分鐘。添加培養液與等量之 CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay(Promega)並攪拌。於室溫靜置 10 分鐘後，以平盤讀數機(PerkinElmer)計測發光量。IC₅₀ 值係以下列式算出。

$$IC_{50}(nM) = \text{antilog}((50-d) \times (\text{LOG}_{10}b - \text{LOG}_{10}a) \div (d-c) + \text{LOG}_{10}b)$$

a：被驗物質之濃度 a

b：被驗物質之濃度 b

c：添加濃度 a 之被驗物質時之活細胞率

d：添加濃度 b 之被驗物質時之活細胞率

a、b 係高於活細胞率 50% 的濃度下， $a > b$

各濃度中的細胞生存率係以下列式算出。

$$\text{細胞生存率}(\%) = a \div b \times 100$$

a：被驗物質添加穴之發光量之平均值(n=2)

b：被驗物質非添加穴之發光量之平均值(n=12)

抗體-藥物複合體(23)、(38)、(64)、(65)係對 SR 細胞呈現 IC₅₀ < 0.01(nM)之細胞傷害活性。抗體-藥物複合體(22)係對 SR 細胞呈現 IC₅₀ < 0.1(nM)之細胞傷害活性。又，抗 CD30 抗體係未對 SR 細胞顯示細胞傷害活性(> 4.0(nM))。

【0507】

(試驗例 6)抗體-藥物複合體之細胞傷害性試驗(4)

抗原陽性細胞之 HL-60 細胞(ATCC)、抗原陰性細胞之 Raji 細胞(ATCC)係以含 10%之胎牛血清(MOREGATE)的 RPMI1640(GIBCO)(以下，培養基)培養。HL-60 細胞、Raji 細胞以培養基調製成為 8×10^4 個細胞/mL，於置入 65 μ L 之培養基的 96 穴細胞培養用微量盤中各添加 25 μ L。於微量盤中各添加 10 μ L 以培養基稀釋為 1000nM、200nM、40nM、8nM、1.6nM、0.32nM、0.064nM 的抗 CD33 抗體及抗體-藥物複合體(8)、(9)。被驗物質非添加穴中各添加 10 μ L 培養基。37 度、5%CO₂ 下培養 3 日。培養後，將微量盤自培育箱中取出並於室溫下靜置 30 分鐘。添加培養液與等量之 CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay(Promega)並攪拌。於室溫靜置 10 分鐘後，以平盤讀數機(PerkinElmer)計測發光量。IC₅₀ 值係以下列式算出。

$$IC_{50}(nM) = \text{antilog}((50-d) \times (\text{LOG}_{10}b - \text{LOG}_{10}a) \div (d - c) + \text{LOG}_{10}b)$$

a：被驗物質之濃度 a

b：被驗物質之濃度 b

c：添加濃度 a 之被驗物質時之活細胞率

d：添加濃度 b 之被驗物質時之活細胞率

a、b 係高於活細胞率 50%的濃度下， $a > b$

各濃度中的細胞生存率係以下列式算出。

$$\text{細胞生存率}(\%) = a \div b \times 100$$

a：被驗物質添加穴之發光量之平均值(n=2)

b：被驗物質非添加穴之發光量之平均值(n=5)

抗體-藥物複合體(8)、(9)係對 HL-60 細胞呈現 $IC_{50} < 0.1(nM)$ 之細胞傷害活性。另一方面，對 Raji 細胞，抗體-藥物複合體(8)、(9)並未呈現細胞傷害活性($> 100(nM)$)。又，抗 CD33 抗體係對任一細胞皆未呈現細胞傷害活性($> 100(nM)$)。

【0508】

(試驗例 7)抗體-藥物複合體之細胞傷害性試驗(5)

抗原陽性細胞之 NOMO-1 細胞(HSRRB)係以含 10%之胎牛血清(MOREGATE)的 RPMI1640(GIBCO)(以下，培養基)培養。NOMO-1 細胞以培養基調製成為 2.8×10^4 個細胞/mL，各添加 90 μ L 於 96 穴細胞培養用微量盤。2 小時後，於微量盤中各添加 10 μ L 以培養基稀釋為 1000nM、200nM、40nM、8nM、1.6nM、0.32nM、0.064nM 的抗 CD33 抗體及抗體-藥物複合體(24)、(25)、(67)。被驗物質非添加穴中各添加 10 μ L 培養基。37 度、5%CO₂ 下培養 6 日。培養後，將微量盤自培育箱中取出並於室溫下靜置 30 分鐘。添加培養液與等量之 CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay(Promega)並攪拌。於室溫靜置 10 分鐘後，以平盤讀數機(PerkinElmer)計測發光量。 IC_{50} 值係以下列式算出。

$$IC_{50}(nM) = \text{antilog}((50-d) \times (\text{LOG}_{10}b - \text{LOG}_{10}a) \div (d-c) + \text{LOG}_{10}b)$$

a：被驗物質之濃度 a

b：被驗物質之濃度 b

c：添加濃度 a 之被驗物質時之活細胞率

d：添加濃度 b 之被驗物質時之活細胞率

a、b 係高於活細胞率 50%的濃度下， $a > b$

各濃度中的細胞生存率係以下列式算出。

$$\text{細胞生存率(\%)} = a \div b \times 100$$

a：被驗物質添加穴之發光量之平均值(n=2)

b：被驗物質非添加穴之發光量之平均值(n=5)

對 NOMO-1 細胞，抗體-藥物複合體(25)呈現 $IC_{50} < 0.1$ (nM)之細胞傷害活性。抗體-藥物複合體(24)、(67)係呈現 $1 < IC_{50} < 100$ (nM)之細胞傷害活性。又，抗 CD33 抗體對 NOMO-1 細胞未呈現細胞傷害活性(> 100 (nM))。

【0509】

(試驗例 8)抗體-藥物複合體之細胞傷害性試驗(6)

抗原陽性細胞之 U251 細胞(ATCC)、抗原陰性細胞之 MCF-7 細胞(ATCC)係以含 10%之胎牛血清(MOREGATE)的 RPMI1640(GIBCO)(以下，培養基)培養。U251 細胞、MCF-7 細胞以培養基調製成為 2.8×10^4 個細胞/mL，於 96 穴細胞培養用微量盤中各添加 90 μ L 並培養一晚。翌日，於微量盤中各添加 10 μ L 之以各培養基稀釋為 1000nM、200nM、40nM、8nM、1.6nM、0.32nM、0.064nM 的抗 CD70 抗體及抗體-藥物複合體(10)、(11)。被驗物質非添加穴中各添加 10 μ L 培養基。37 度、5%CO₂ 下培養 6 日。培養後，將微量盤自培育箱中取出並於室溫下靜置 30 分鐘。添加培養液與等量之 CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay(Promega)並攪拌。於室溫靜置 10 分鐘後，以平盤讀數機(PerkinElmer)計測發光量。 IC_{50} 值係以下列式算出。

$$IC_{50}(\text{nM}) = \text{antilog}((50-d) \times (\text{LOG}_{10}b - \text{LOG}_{10}a) \div (d-c) + \text{LOG}_{10}b)$$

a：被驗物質之濃度 a

b：被驗物質之濃度 b

c：添加濃度 a 之被驗物質時之活細胞率

d：添加濃度 b 之被驗物質時之活細胞率

a、b 係高於活細胞率 50% 的濃度下， $a > b$

各濃度中的細胞生存率係以下列式算出。

細胞生存率(%) = $a \div b \times 100$

a：被驗物質添加穴之發光量之平均值(n=2)

b：被驗物質非添加穴之發光量之平均值(n=12)

抗體-藥物複合體(10)、(11)係對 U251 細胞呈現 $IC_{50} < 1(nM)$ 之細胞傷害活性。另一方面，對 MCF-7 細胞，抗體-藥物複合體(10)、(11)並未呈現細胞傷害活性($\geq 90(nM)$)。又，抗 CD70 抗體對任一細胞皆未顯示細胞傷害活性($> 100(nM)$)。

【0510】

(試驗例 9) 抗體-藥物複合體之細胞傷害性試驗(7)

抗原陽性細胞之 U251 細胞(ATCC)係以含 10% 之胎牛血清(MOREGATE)的 RPMI1640(GIBCO)(以下，培養基)培養。U251 細胞以培養基調製成為 2.8×10^4 個細胞/mL，各添加 90 μ L 於 96 穴細胞培養用微量盤。2 小時後，於微量盤中各添加 10 μ L 以培養基稀釋為 1000nM、200nM、40nM、8nM、1.6nM、0.32nM、0.064nM 的抗 CD70 抗體及抗體-藥物複合體(26)、(27)、(40)、(68)、(69)。被驗物質非添加穴中各添加 10 μ L 培養基。37 度、5%CO₂ 下培養 6 日。培養後，將微量盤自培育箱中取出並於室溫下靜置 30 分鐘。添加培養液與等量之 CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay

(Promega)並攪拌。於室溫靜置 10 分鐘後，以平盤讀數機 (PerkinElmer)計測發光量。IC₅₀ 值係以下列式算出。

$$IC_{50}(nM) = \text{antilog}((50-d) \times (\text{LOG}_{10}b - \text{LOG}_{10}a) \div (d - c) + \text{LOG}_{10}b)$$

a：被驗物質之濃度 a

b：被驗物質之濃度 b

c：添加濃度 a 之被驗物質時之活細胞率

d：添加濃度 b 之被驗物質時之活細胞率

a、b 係高於活細胞率 50%的濃度下， $a > b$

各濃度中的細胞生存率係以下列式算出。

$$\text{細胞生存率}(\%) = a \div b \times 100$$

a：被驗物質添加穴之發光量之平均值(n=2)

b：被驗物質非添加穴之發光量之平均值(n=12)

抗體-藥物複合體(26)、(27)、(40)、(69)係對 U251 細胞呈現 $1 < IC_{50} < 10(nM)$ 之細胞傷害活性。抗體-藥物複合體(68)係呈現 $10 < IC_{50} < 100(nM)$ 之細胞傷害活性。又，抗 CD70 抗體係對 U251 細胞未呈現細胞傷害活性($> 100(nM)$)。

【0511】

(試驗例 10)游離藥物之細胞傷害性試驗(8)

A375 細胞(ATCC)係以含 10%之胎牛血清(MOREGATE)的 DMEM(GIBCO)(以下，培養基)培養。A375 細胞以培養基調製成為 4×10^4 個細胞/mL，各添加 25 μ L 於已置入 65 μ L 培養基的 96 穴細胞培養用微量盤(CORNING)並培養一晚。翌日，於微量盤中各添加 0.5 μ L 之以 DMSO 稀釋為 1000nM、200nM、40nM、8nM、1.6nM、0.32nM、0.064nM 的被驗物

質。於被驗物質非添加穴中各添加 $0.5\mu\text{L}$ 之 DMSO。於全部之穴中各添加 $10\mu\text{L}$ 培養基，將培養基之液量作成 $100\mu\text{L}$ ，於 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 下培養 6 日。培養後，將微量盤自培育箱中取出並於室溫下靜置 30 分鐘。添加培養液與等量之 CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay(Promega)並攪拌。於室溫靜置 10 分鐘後，以平盤讀數機計測發光量。 IC_{50} 值係以下列式算出。

$$\text{IC}_{50}(\text{nM}) = \text{antilog}((50-d) \times (\text{LOG}_{10}b - \text{LOG}_{10}a) \div (d-c) + \text{LOG}_{10}b)$$

a：被驗物質之濃度 a

b：被驗物質之濃度 b

c：添加濃度 a 之被驗物質時之活細胞率

d：添加濃度 b 之被驗物質時之活細胞率

a、b 係高於活細胞率 50% 的濃度下， $a > b$

細胞生存率係以下列式算出。

$$\text{細胞生存率}(\%) = a \div b \times 100$$

a：被驗物質添加穴之發光量之平均值($n=2$)

b：被驗物質非添加穴之發光量之平均值($n=10$)

實施例(75)之化合物、及依喜替康對 A375 細胞呈現 $0.1 < \text{IC}_{50} < 1(\text{nM})$ 之細胞傷害活性。實施例(42)之化合物呈現 $1 < \text{IC}_{50} < 10(\text{nM})$ 之細胞傷害活性。實施例(1)之化合物呈現 $10 < \text{IC}_{50} < 100(\text{nM})$ 之細胞傷害活性。

【0512】

(試驗例 11) 抗腫瘤試驗(1)

小鼠：將 5-6 週齡之雌 BALB/c 裸鼠(日本 Charles River 公司)於實驗使用前，以 SPF 條件化馴化 4-7 日。對小鼠給餌經滅菌的固形飼料(FR-2，Funabashi Farms Co.，Ltd)，給予經滅菌的自來水(添加 5-15ppm 次氯酸鈉溶液而調製)。

測定、計算式：於全部之研究，腫瘤之長徑及短徑以電子式數位卡尺(CD-15C，Mitutoyo Corp.)於每 1 週測量 2 次，計算腫瘤體積(mm³)。計算式係如以下所示。

$$\text{腫瘤體積(mm}^3\text{)}=1/2\times\text{長徑(mm)}\times[\text{短徑(mm)}]^2$$

抗體-藥物複合體係全部以生理食鹽水(大塚製藥工場)稀釋，將 10mL/kg 之液量於尾靜脈內投與。人類黑色素瘤株 A375 細胞購自 ATCC(American Type Culture Collection)。將懸浮於生理食鹽水的 8×10^6 個細胞皮下移植於雌裸鼠之右側腹部(第 0 日)，第 11 日實施任意之分組。M30-H1-L4P 抗體及抗體-藥物複合體(2)於第 11、18、25 日全部以 10mg/kg 之用量於尾靜脈內投與。

結果示於第 17 圖。圖中之白菱形線表示無處置之腫瘤、白三角線表示 M30-H1-L4P 抗體、白圓形線表示抗體-藥物複合體(2)之效果。

藉由抗體-藥物複合體(2)之投與而腫瘤體積顯著地減少，呈現最終投與後未見腫瘤進一步增殖。另一方面，M30-H1-L4P 抗體投與係腫瘤的增殖為進行的。

又，投與抗體-藥物複合體(2)的小鼠中，沒有體重減少等等之特別突出可見，認為抗體-藥物複合體(2)係毒性弱、又安全性亦高。

【0513】

(試驗例 12)抗腫瘤試驗(2)

人類黑色素瘤株 A375 細胞由 ATCC(American Type Culture Collection)購入。將懸浮於生理食鹽水的 6×10^6 個細胞皮下移植至雌裸鼠之右側腹部(第 0 日)，第 18 日實施任意之分組。抗體-藥物複合體(2)(0.1, 0.3, 1, 3mg/kg)於第 18、25、32 日以各用量 qw $\times$ 3 之計劃於尾靜脈內投與。

結果示於第 18 圖。圖中之白菱形線係呈現無處置之腫瘤、黑四角形線係呈現抗體-藥物複合體(2)0.1mg/kg 投與時、線-X-係呈現 0.3mg/kg 投與時、黑三角線係呈現 1mg/kg 投與時、白圓形線係呈現 3mg/kg 投與時之效果。抗體-藥物複合體(2)發揮用量依存性地腫瘤縮小效果。

【0514】

(試驗例 13)抗腫瘤試驗(3)

人類非小細胞肺癌株 Calu-6 細胞由 ATCC(American Type Culture Collection)購入。將懸浮於生理食鹽水的 5×10^6 個細胞皮下移植至雌裸鼠之右側腹部(第 0 日)，第 11 日實施任意之分組。M30-H1-L4P 抗體及抗體-藥物複合體(2)於第 11、18、25 日以 qw $\times$ 3 之計劃全部以 10mg/kg 之用量由尾靜脈內投與。

結果示於第 19 圖。圖中之白菱形線係呈現無處置之腫瘤、白三角線係呈現 M30-H1-L4P 抗體、白圓形線係呈現抗體-藥物複合體(2)之效果。藉由抗體-藥物複合體(2)之投與而腫瘤體積顯著減少，最終投與後更看不到腫瘤增殖。另一方面，M30-H1-L4P 抗體投與係腫瘤的增殖進行著。

又，投與抗體-藥物複合體(2)的小鼠中，沒有體重減少等等之特別突出可見，認為抗體-藥物複合體(2)係毒性弱、又安全性亦高。

【0515】

(試驗例 14)抗腫瘤試驗(4)

人類黑色素瘤株 A375 細胞由 ATCC(American Type Culture Collection)購入。將懸浮於生理食鹽水的 8×10^6 個細胞皮下移植至雌裸鼠之右側腹部(第 0 日)，第 21 日實施任意之分組。抗體-藥物複合體(1)、(13)、(41)、(55)於第 21 日全部以 10mg/kg 之用量由尾靜脈內投與。

結果示於第 20 圖。圖中之白菱形線係呈現無處置之腫瘤、白圓形線係呈現抗體-藥物複合體(1)投與時、白三角線係呈現抗體-藥物複合體(13)投與時、線-X-係呈現抗體-藥物複合體(41)投與時、白四角形線係呈現抗體-藥物複合體(55)投與時之效果。藉由抗體-藥物複合體(1)、(13)、(41)、(55)之投與，腫瘤體積顯著減少，任一者皆發揮腫瘤增殖抑制效果。

又，投與抗體-藥物複合體(1)、(13)、(41)、(55)的小鼠中，沒有體重減少等等之特別突出可見，認為抗體-藥物複合體(1)、(13)、(41)、(55)係毒性弱、又安全性亦高。

【0516】

(試驗例 15)抗腫瘤試驗(5)

人類非小細胞肺癌株 Calu-6 細胞由 ATCC(American Type Culture Collection)購入。將懸浮於生理食鹽水的 5×10^6 個細胞皮下移植至雌裸鼠之右側腹部(第 0 日)，第 12 日實施任意之分組。抗體-藥物複合體(13)、(41)、(55)於第 12

日全部以 10mg/kg 之用量由尾靜脈內投與。又作為比較對照，DE-310 於第 12 日以 0.1mg/kg 之用量於尾靜脈內投與。其中，投與量之記述於抗體-藥物複合體係基於抗體之投與量的值，DE-310 係基於含有藥物之投與量的值的緣故，抗體-藥物複合體與 DE-310 之含有藥物量係約為 1：100，藉由上述投與，成為投與同等量之含有藥劑。

結果示於第 21 圖。圖中之白菱形線係呈現無處置之腫瘤、白圓形線係呈現 DE-310、白三角線係呈現抗體-藥物複合體(13)、線-X-係呈現抗體-藥物複合體(41)、白四角形線係呈現抗體-藥物複合體(55)之效果。藉由抗體-藥物複合體(13)、(41)、(55)之投與，腫瘤體積顯著減少。另一方面，DE-310 之投與不認為腫瘤體積減少。

又，投與抗體-藥物複合體(13)、(41)、(55)的小鼠中，沒有體重減少等等之特別突出可見，認為此等抗體-藥物複合體係毒性弱、又安全性亦高。

【0517】

(試驗例 16)抗腫瘤試驗(6)

人類黑色素瘤株 A375 細胞由 ATCC(American Type Culture Collection)購入。將懸浮於生理食鹽水的 1×10^7 個細胞皮下移植至雌裸鼠之右側腹部(第 0 日)，第 11 日實施任意之分組。抗體-藥物複合體(17)、(18)、(19)、(59)、(60)、(61)於第 11、18 日以 $qw \times 2$ 之計劃全部以 3mg/kg 之用量於尾靜脈內投與。

結果示於第 22 圖。圖中之黑菱形線係呈現無處置之腫瘤、黑四角形線係呈現抗體-藥物複合體(17)投與時、白三角線係呈

現抗體-藥物複合體(18)投與時、白圓形線係呈現抗體-藥物複合體(19)投與時、黑三角線係呈現抗體-藥物複合體(59)投與時、白四角形線係呈現抗體-藥物複合體(60)投與時、線-X-係呈現抗體-藥物複合體(61)投與時之效果。

藉由抗體-藥物複合體(17)、(18)、(19)、(59)、(60)、(61)之投與，腫瘤體積顯著減少，任一者皆發揮腫瘤增殖抑制效果。

又，投與抗體-藥物複合體(17)、(18)、(19)、(59)、(60)、(61)的小鼠中，沒有體重減少等等之特別突出可見，認為此等之抗體-藥物複合體係毒性弱、又安全性亦高。

[序列表自由輸入欄位]

【0518】

序列識別號 1-B7-H3 變異體 1 之胺基酸序列

序列識別號 2-B7-H3 變異體 2 之胺基酸序列

序列識別號 3-M30 抗體之 CDRH1 之胺基酸序列

序列識別號 4-M30 抗體之 CDRH2 之胺基酸序列

序列識別號 5-M30 抗體之 CDRH3 之胺基酸序列

序列識別號 6-M30 抗體之 CDRL1 之胺基酸序列

序列識別號 7-M30 抗體之 CDRL2 之胺基酸序列

序列識別號 8-M30 抗體之 CDRL3 之胺基酸序列

序列識別號 9-M30-H1 型重鏈之胺基酸序列

序列識別號 10-M30-H2 型重鏈之胺基酸序列

序列識別號 11-M30-H3 型重鏈之胺基酸序列

序列識別號 12-M30-H4 型重鏈之胺基酸序列

序列識別號 13-M30-L1 型輕鏈之胺基酸序列

序列識別號 14-M30-L2 型輕鏈之胺基酸序列

序列識別號 15-M30-L3 型輕鏈之胺基酸序列

序列識別號 16-M30-L4 型輕鏈之胺基酸序列

序列識別號 17-M30-L5 型輕鏈之胺基酸序列

序列識別號 18-M30-L6 型輕鏈之胺基酸序列

序列識別號 19-M30-L7 型輕鏈之胺基酸序列

序列識別號 20-M30 抗體重鏈之胺基酸序列

序列識別號 21-M30 抗體輕鏈之胺基酸序列

序列識別號 22-PCR 引子 1

序列識別號 23-PCR 引子 2

序列識別號 24-CMV 啟動子引子：引子 3

序列識別號 25-BGH 反向引子：引子 4

序列識別號 26-B7-H3 變異體 1 之核苷酸序列

序列識別號 27-抗 CD30 抗體重鏈之胺基酸序列

序列識別號 28-抗 CD30 抗體輕鏈之胺基酸序列

序列識別號 29-抗 CD33 抗體重鏈之胺基酸序列

序列識別號 30-抗 CD33 抗體輕鏈之胺基酸序列

序列識別號 31-抗 CD70 抗體重鏈之胺基酸序列

序列識別號 32-抗 CD70 抗體輕鏈之胺基酸序列

【符號說明】

無。

序列表

<110> 第一三共股份有限公司
<120> 抗體 - 藥物複合體
<130> PD20-9003W0
<150> JP2012-225887
<151> 2012-10-11
<160> 32
<170> PatentIn 版本 3.5
<210> 1
<211> 534
<212> PRT
<213> 人類
<400> 1

Met Leu Arg Arg Arg Gly Ser Pro Gly Met Gly Val His Val Gly Ala
1 5 10 15

Ala Leu Gly Ala Leu Trp Phe Cys Leu Thr Gly Ala Leu Glu Val Gln
20 25 30

Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu
35 40 45

Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn
50 55 60

Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Ala
65 70 75 80

Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe
85 90 95

Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val
100 105 110

Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp
115 120 125

Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys
130 135 140

Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr

145		150		155		160
Val Thr Ile Thr	Cys 165	Ser Ser Tyr Gln	Gly 170	Tyr Pro Glu Ala	Glu 175	Val
Phe Trp Gln Asp	Gly 180	Gln Gly Val	Pro 185	Leu Thr Gly Asn	Val 190	Thr Thr
Ser Gln Met	Ala 195	Asn Glu Gln	Gly 200	Leu Phe Asp Val	His 205	Ser Ile Leu
Arg Val Val	Leu 210	Gly Ala Asn	Gly 215	Thr Tyr Ser	Cys 220	Leu Val Arg Asn
Pro Val Leu	Gln 225	Gln Asp Ala	His Ser Ser	Val 235	Thr Ile Thr	Pro Gln 240
Arg Ser Pro	Thr 245	Gly Ala Val	Glu Val	Gln 250	Val Pro Glu Asp	Pro Val 255
Val Ala Leu	Val 260	Gly Thr Asp	Ala Thr 265	Leu Arg Cys Ser	Phe 270	Ser Pro
Glu Pro Gly	Phe 275	Ser Leu Ala	Gln 280	Leu Asn Leu Ile	Trp 285	Gln Leu Thr
Asp Thr Lys	Gln 290	Leu Val	His 295	Ser Phe Thr	Glu 300	Gly Arg Asp Gln Gly
Ser Ala Tyr	Ala 305	Asn Arg	Thr 310	Ala Leu Phe	Pro 315	Asp Leu Leu Ala Gln 320
Gly Asn Ala	Ser 325	Leu Arg Leu	Gln Arg	Val 330	Arg Val Ala Asp	Glu Gly 335
Ser Phe Thr	Cys 340	Phe Val Ser	Ile Arg 345	Asp Phe Gly Ser	Ala 350	Ala Val
Ser Leu Gln	Val 355	Ala Ala Pro	Tyr 360	Ser Lys Pro Ser	Met 365	Thr Leu Glu
Pro Asn Lys	Asp 370	Leu Arg Pro	Gly 375	Asp Thr Val	Thr 380	Ile Thr Cys Ser

Ser Tyr Arg Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val Phe Trp Gln Asp Gly Gln
385 390 395 400

Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu
405 410 415

Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu Arg Val Val Leu Gly Ala
420 425 430

Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp
435 440 445

Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln Pro Met Thr Phe Pro Pro
450 455 460

Glu Ala Leu Trp Val Thr Val Gly Leu Ser Val Cys Leu Ile Ala Leu
465 470 475 480

Leu Val Ala Leu Ala Phe Val Cys Trp Arg Lys Ile Lys Gln Ser Cys
485 490 495

Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala Glu Asp Gln Asp Gly Glu Gly Glu Gly
500 505 510

Ser Lys Thr Ala Leu Gln Pro Leu Lys His Ser Asp Ser Lys Glu Asp
515 520 525

Asp Gly Gln Glu Ile Ala
530

<210> 2
<211> 316
<212> PRT
<213> 人類

<400> 2

Met Leu Arg Arg Arg Gly Ser Pro Gly Met Gly Val His Val Gly Ala
1 5 10 15

Ala Leu Gly Ala Leu Trp Phe Cys Leu Thr Gly Ala Leu Glu Val Gln
20 25 30

Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu
35 40 45

Cys	Cys	Ser	Phe	Ser	Pro	Glu	Pro	Gly	Phe	Ser	Leu	Ala	Gln	Leu	Asn
	50					55					60				
Leu	Ile	Trp	Gln	Leu	Thr	Asp	Thr	Lys	Gln	Leu	Val	His	Ser	Phe	Ala
65					70					75					80
Glu	Gly	Gln	Asp	Gln	Gly	Ser	Ala	Tyr	Ala	Asn	Arg	Thr	Ala	Leu	Phe
				85					90					95	
Pro	Asp	Leu	Leu	Ala	Gln	Gly	Asn	Ala	Ser	Leu	Arg	Leu	Gln	Arg	Val
			100					105					110		
Arg	Val	Ala	Asp	Glu	Gly	Ser	Phe	Thr	Cys	Phe	Val	Ser	Ile	Arg	Asp
		115					120					125			
Phe	Gly	Ser	Ala	Ala	Val	Ser	Leu	Gln	Val	Ala	Ala	Pro	Tyr	Ser	Lys
	130					135					140				
Pro	Ser	Met	Thr	Leu	Glu	Pro	Asn	Lys	Asp	Leu	Arg	Pro	Gly	Asp	Thr
145					150					155					160
Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	Ser	Tyr	Arg	Gly	Tyr	Pro	Glu	Ala	Glu	Val
				165					170					175	
Phe	Trp	Gln	Asp	Gly	Gln	Gly	Val	Pro	Leu	Thr	Gly	Asn	Val	Thr	Thr
			180					185					190		
Ser	Gln	Met	Ala	Asn	Glu	Gln	Gly	Leu	Phe	Asp	Val	His	Ser	Val	Leu
		195					200					205			
Arg	Val	Val	Leu	Gly	Ala	Asn	Gly	Thr	Tyr	Ser	Cys	Leu	Val	Arg	Asn
	210					215					220				
Pro	Val	Leu	Gln	Gln	Asp	Ala	His	Gly	Ser	Val	Thr	Ile	Thr	Gly	Gln
225					230					235					240
Pro	Met	Thr	Phe	Pro	Pro	Glu	Ala	Leu	Trp	Val	Thr	Val	Gly	Leu	Ser
				245					250					255	
Val	Cys	Leu	Ile	Ala	Leu	Leu	Val	Ala	Leu	Ala	Phe	Val	Cys	Trp	Arg
			260					265					270		
Lys	Ile	Lys	Gln	Ser	Cys	Glu	Glu	Glu	Asn	Ala	Gly	Ala	Glu	Asp	Gln
		275					280					285			

Asp Gly Glu Gly Glu Gly Ser Lys Thr Ala Leu Gln Pro Leu Lys His
290 295 300

Ser Asp Ser Lys Glu Asp Asp Gly Gln Glu Ile Ala
305 310 315

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 3

Asn Tyr Val Met His
1 5

<210> 4
<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 4

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Val Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 5
<211> 13
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 5

Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Pro Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 6

Arg Ala Ser Ser Arg Leu Ile Tyr Met His
1 5 10

<210> 7
<211> 7

<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 7

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 8

Gln Gln Trp Asn Ser Asn Pro Pro Thr
1 5

<210> 9
<211> 471
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> M30 之人化重鏈

<400> 9

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Asn Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Met Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Val Lys Tyr Asn
65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Pro Leu Tyr Tyr Phe

115					120					125					
Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr
	130					135					140				
Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser
145					150					155					160
Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu
				165					170					175	
Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His
			180					185					190		
Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser
		195					200					205			
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys
	210					215					220				
Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu
225					230					235					240
Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
				245					250					255	
Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys
			260					265					270		
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val
		275					280					285			
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp
	290					295					300				
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr
305					310					315					320
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp
				325					330					335	
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu
			340					345					350		

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
370 375 380

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
385 390 395 400

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 10
<211> 471
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> M30 之人化重鏈

<400> 10

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Asn Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Val Lys Tyr Asn

65					70					75					80
Glu	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser
				85					90					95	
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val
			100					105					110		
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Trp	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Pro	Leu	Tyr	Tyr	Phe
		115					120					125			
Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr
	130					135					140				
Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser
145					150					155					160
Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu
				165					170					175	
Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His
			180					185					190		
Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser
		195					200					205			
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys
	210					215					220				
Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu
225					230					235					240
Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
				245					250					255	
Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys
			260					265					270		
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val
		275					280					285			
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp
	290					295					300				

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
340 345 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
370 375 380

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
385 390 395 400

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 11
<211> 471
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> M30 之人化重鏈

<400> 11

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

20					25					30					
Pro	Gly	Ser	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe
		35					40					45			
Thr	Asn	Tyr	Val	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu
	50					55					60				
Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Tyr	Asn	Asp	Asp	Val	Lys	Tyr	Asn
65					70					75					80
Glu	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser
				85					90					95	
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val
			100					105					110		
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Trp	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Pro	Leu	Tyr	Tyr	Phe
		115					120					125			
Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr
	130					135					140				
Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser
145					150					155					160
Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu
				165					170					175	
Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His
			180					185					190		
Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser
		195					200					205			
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys
	210					215					220				
Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu
225					230					235					240
Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
				245					250					255	

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
260 265 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
275 280 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
290 295 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
340 345 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
370 375 380

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
385 390 395 400

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 12
<211> 471
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> M30 之人化重鏈

<400> 12

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Asn Tyr Val Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Val Lys Tyr Asn
65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Gln Thr Ser Asp Lys Ser Thr Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Pro Leu Tyr Tyr Phe
115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
195 200 205

Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys
	210					215					220				
Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu
225					230					235					240
Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
				245					250					255	
Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys
			260					265					270		
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val
		275					280					285			
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp
	290					295					300				
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr
305					310					315					320
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp
				325					330					335	
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu
			340					345					350		
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg
		355					360					365			
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys
	370					375					380				
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp
385					390					395					400
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys
				405					410					415	
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser
			420					425					430		
Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
		435					440					445			

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 13
<211> 233
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> M30 之人化輕鏈

<400> 13

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Arg
35 40 45

Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
50 55 60

Leu Leu Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
85 90 95

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser
100 105 110

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 14
<211> 233
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> M30 之人化輕鏈

<400> 14

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Arg
35 40 45

Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
50 55 60

Leu Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Arg
85 90 95

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser
100 105 110

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr

115

120

125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130135140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145150155160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165170175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
180185190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
195200205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
210215220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225230

<210> 15
<211> 233
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> M30 之人化輕鏈

<400> 15

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
151015

Gly Ala Tyr Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
202530

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Thr Cys Arg Ala Ser Ser Arg
354045

Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ala Pro Lys
505560

Leu Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg
65707580

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Arg
85 90 95

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser
100 105 110

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 16
<211> 233
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> M30 之人化輕鏈

<400> 16

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Arg
35 40 45

Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
50 55 60

Pro Leu Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
85 90 95

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser
100 105 110

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 17
<211> 233
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> M30 之人化輕鏈

<400> 17

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Thr Cys Arg Ala Ser Ser Arg
35 40 45

Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ala Pro Lys
50 55 60

Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Arg
85 90 95

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser
100 105 110

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 18
<211> 233
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> M30 之人化輕鏈

<400> 18

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Arg
35 40 45

Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
50 55 60

Pro Leu Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
85 90 95

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser
100 105 110

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 19
<211> 233
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> M30 之人化輕鏈

<400> 19

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Arg
35 40 45

Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
50 55 60

Pro Leu Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Arg
85 90 95

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser
100 105 110

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu

130

135

140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 20
<211> 471
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 20

Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Asn Tyr Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Val Lys Tyr Asn
65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Gln Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val

100					105					110					
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Trp	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Pro	Leu	Tyr	Tyr	Phe
		115					120					125			
Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr
	130					135					140				
Thr	Ala	Pro	Ser	Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	Val	Cys	Gly	Asp	Thr	Thr
145					150					155					160
Gly	Ser	Ser	Val	Thr	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu
				165					170					175	
Pro	Val	Thr	Leu	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Gly	Val	His
			180					185					190		
Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Asp	Leu	Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser	Ser
		195					200					205			
Val	Thr	Val	Thr	Ser	Ser	Thr	Trp	Pro	Ser	Gln	Ser	Ile	Thr	Cys	Asn
	210					215					220				
Val	Ala	His	Pro	Ala	Ser	Ser	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ile	Glu	Pro
225					230					235					240
Arg	Gly	Pro	Thr	Ile	Lys	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Lys	Cys	Pro	Ala	Pro
				245					250					255	
Asn	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Ile	Lys
			260					265					270		
Asp	Val	Leu	Met	Ile	Ser	Leu	Ser	Pro	Ile	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val
		275					280					285			
Asp	Val	Ser	Glu	Asp	Asp	Pro	Asp	Val	Gln	Ile	Ser	Trp	Phe	Val	Asn
	290					295					300				
Asn	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Thr	His	Arg	Glu	Asp	Tyr
305					310					315					320
Asn	Ser	Thr	Leu	Arg	Val	Val	Ser	Ala	Leu	Pro	Ile	Gln	His	Gln	Asp
				325					330					335	

Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu
340 345 350

Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg
355 360 365

Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys
370 375 380

Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp
385 390 395 400

Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys
405 410 415

Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser
420 425 430

Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser
435 440 445

Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser
450 455 460

Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
465 470

<210> 21
<211> 235
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 21

Met Asp Phe Leu Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Thr Ile
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Ser Arg Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
50 55 60

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100 105 110

Asn Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
130 135 140

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
145 150 155 160

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
165 170 175

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
180 185 190

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
195 200 205

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
210 215 220

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
225 230 235

<210> 22
<211> 46
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR 引子

<400> 22
ctatagggag acccaagctg gctagcatgc tgcgtcggcg gggcag

46

<210> 23
<211> 66
<212> DNA

<213>	人工序列	
<220>		
<223>	PCR 引子	
<400>	23	
aacggggccct ctagactcga gcggccgctc aggctatttc ttgtccatca tcttctttgc		60
tgtcag		66
<210>	24	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	PCR 引子	
<400>	24	
cgcaaattggg cggtaggcgt g		21
<210>	25	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	PCR 引子	
<400>	25	
tagaaggcac agtcgagg		18
<210>	26	
<211>	1815	
<212>	DNA	
<213>	人類	
<400>	26	
atgctgcgtc ggcggggcag ccctggcatg ggtgtgcatg tgggtgcagc cctgggagca		60
ctgtggttct gcctcacagg agccctggag gtccaggctc ctgaagacc agtggtggca		120
ctgggtgggca ccgatgccac cctgtgctgc tccttctccc ctgagcctgg cttcagcctg		180
gcacagctca acctcatctg gcagctgaca gataccaaac agctggtgca cagctttgct		240
gagggccagg accagggcag cgcctatgcc aaccgcacgg ccctcttccc ggacctgctg		300
gcacagggca acgcatccct gaggctgcag cgcgtgcgtg tggcggacga gggcagcttc		360
acctgcttcg tgagcatccg ggatttcggc agcgtgccg tcagcctgca ggtggccgct		420
ccctactcga agcccagcat gaccctggag cccaacaagg acctgcggcc aggggacacg		480
gtgaccatca cgtgctccag ctaccagggc taccctgagg ctgaggtgtt ctggcaggat		540

gggcagggtg tgcccctgac tggcaacgtg accacgtcgc agatggccaa cgagcagggc 600
ttgtttgatg tgcacagcat cctgcgggtg gtgctgggtg caaatggcac ctacagctgc 660
ctggtgcgca accccgtgct gcagcaggat gcgcacagct ctgtcaccat cacaccccag 720
agaagcccca caggagccgt ggaggtccag gtccctgagg acccggtggt ggccctagtg 780
ggcaccgatg ccaccctgcg ctgctccttc tccccgagc ctggcttcag cctggcacag 840
ctcaacctca tctggcagct gacagacacc aaacagctgg tgcacagttt caccgaaggc 900
cgggaccagg gcagcgccta tgccaaccgc acggccctct tcccggaact gctggcacia 960
ggcaatgcat ccctgaggct gcagcgcgtg cgtgtggcgg acgagggcag cttcacctgc 1020
ttcgtgagca tccgggattt cggcagcgtg gccgtcagcc tgcaggtggc cgctccctac 1080
tcgaagccca gcatgaccct ggagcccaac aaggacctgc ggccagggga cacggtgacc 1140
atcacgtgct ccagctaccg gggctaccct gaggctgagg tgttctggca ggatgggcag 1200
ggtgtgcccc tgactggcaa cgtgaccacg tcgcagatgg ccaacgagca gggcttgttt 1260
gatgtgcaca gcgtcctgcg ggtggtgctg ggtgcgaatg gcacctacag ctgcctggtg 1320
cgcaaccccg tgctgcagca ggatgcgcac ggctctgtca ccatcacagg gcagcctatg 1380
acattcccc cagaggccct gtgggtgacc gtggggctgt ctgtctgtct cattgcactg 1440
ctggtggccc tggctttcgt gtgctggaga aagatcaaac agagctgtga ggaggagaat 1500
gcaggagctg aggaccagga tggggaggga gaaggctcca agacagccct gcagcctctg 1560
aaacactctg acagcaaaga agatgatgga caagaaatag cctgagcggc cgccactgtg 1620
ctggatatct gcagaattcc accacactgg actagtggat ccgagctcgg taccaagctt 1680
aagtttaaac cgctgatcag cctcgactgt gccttctagt tgccagccat ctgttgtttg 1740
ccctccccc gtgccttcct tgaccctgga aggtgccact cccactgtcc tttcctaata 1800
aaatgaggaa attgc 1815

<210> 27
<211> 466
<212> PRT
<213>

<220>
<223>

<400> 27

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Val Val Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Asp Tyr Tyr Ile Thr Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn
65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Phe Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Asn Tyr Gly Asn Tyr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
115 120 125

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
130 135 140

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
145 150 155 160

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
165 170 175

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
180 185 190

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
195 200 205

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
210 215 220

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
225 230 235 240

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
245 250 255

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
260 265 270

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
275 280 285

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
290 295 300

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
305 310 315 320

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
325 330 335

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
340 345 350

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
355 360 365

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
370 375 380

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
385 390 395 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
405 410 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450 455 460

Gly Lys
465

<210> 28
<211> 238

<212> PRT
<213>

<220>
<223>

<400> 28

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15
Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
20 25 30
Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser
35 40 45
Val Asp Phe Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60
Gly Gln Pro Pro Lys Val Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
65 70 75 80
Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95
Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110
Gln Gln Ser Asn Gln Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115 120 125
Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
130 135 140
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145 150 155 160
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
165 170 175
Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
180 185 190
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 29
<211> 465
<212> PRT
<213>

<220>
<223>

<400> 29

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Ile
35 40 45

Thr Asp Ser Asn Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ser Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Asp Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Asn Pro Thr Asn
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Phe
100 105 110

Tyr Tyr Cys Val Asn Gly Asn Pro Trp Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
115 120 125

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
130 135 140

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
145 150 155 160

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
165 170 175

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
180 185 190

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
195 200 205

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
210 215 220

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
225 230 235 240

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
245 250 255

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
260 265 270

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
275 280 285

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
290 295 300

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
305 310 315 320

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
325 330 335

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
340 345 350

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
355 360 365

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
370 375 380

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
385 390 395 400

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
405 410 415

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
420 425 430

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
435 440 445

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450 455 460

Lys
465

<210> 30
<211> 238
<212> PRT
<213>

<220>
<223>

<400> 30

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Asp Asn Tyr Gly Ile Arg Phe Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Met Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
85 90 95

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110

Gln Gln Thr Lys Glu Val Pro Trp Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
115 120 125

Glu Val Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
130 135 140

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 31
<211> 467
<212> PRT
<213>

<220>
<223>

<400> 31

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala

65					70					75					80
Asp	Ala	Phe	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser
				85					90					95	
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val
			100					105					110		
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Tyr	Gly	Asp	Tyr	Gly	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly
		115					120					125			
Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser
	130					135					140				
Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala
145					150					155					160
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val
				165					170					175	
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala
			180					185					190		
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val
		195					200					205			
Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His
	210					215					220				
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys
225					230					235					240
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly
				245					250					255	
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
			260					265					270		
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His
		275					280					285			
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
	290					295					300				

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
450 455 460

Pro Gly Lys
465

<210> 32
<211> 238
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 32

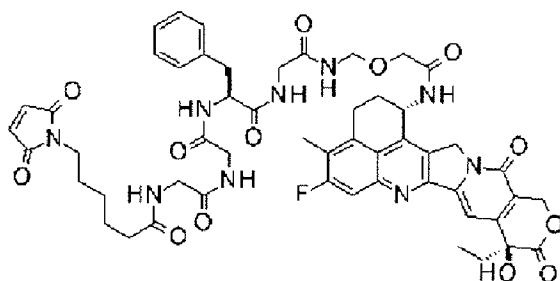
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala

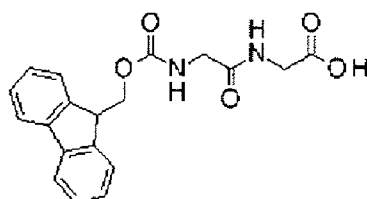
20					25					30					
Val	Ser	Leu	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Arg	Ala	Ser	Lys	Ser
		35					40					45			
Val	Ser	Thr	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro
	50					55					60				
Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser
65					70					75					80
Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr
				85					90					95	
Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			100					105					110		
Gln	His	Ser	Arg	Glu	Val	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val
		115					120					125			
Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro
	130					135					140				
Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu
145					150					155					160
Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn
				165					170					175	
Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser
			180					185					190		
Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala
		195					200					205			
Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly
	210					215					220				
Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys		
225					230					235					

【發明申請專利範圍】

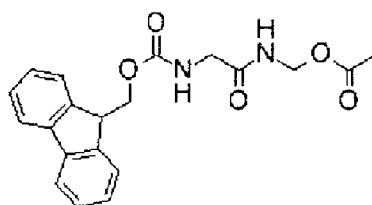
【請求項 1】一種下式所示之 N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]甘胺醯基甘胺醯基-L-苯基丙胺醯基-N-[(2-{[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-2-側氧基乙氧基)甲基]甘胺酸醯胺的製造方法，



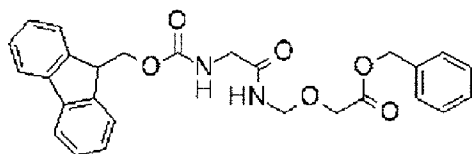
其包含：使下式所示之 N-9-萸基甲氧基羰基甘胺醯基甘胺酸與四乙酸鉛反應，



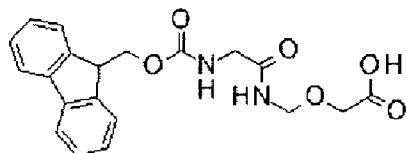
以獲得下式所示之乙酸({N-[(9H-萸-9-基甲氧基)羰基]甘胺醯基}胺基)甲酯的步驟；



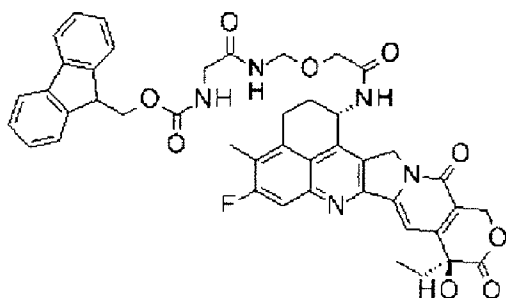
使乙酸({N-[(9H-萸-9-基甲氧基)羰基]甘胺醯基}胺基)甲酯與乙醇酸苯甲酯反應，以獲得下式所示之苯甲基[({N-[(9H-萸-9-基甲氧基)羰基]甘胺醯基}胺基)甲氧基]乙酸酯的步驟；



將苯甲基[(N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]甘胺醯基}胺基)甲氧基]乙酸酯進行氫化，以獲得下式所示之[(N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]甘胺醯基}胺基)甲氧基]乙酸的步驟；

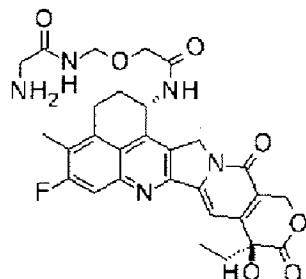


使[(N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]甘胺醯基}胺基)甲氧基]乙酸與(1S,9S)-1-胺基-9-乙基-5-氟-2,3-二氫-9-羥基-4-甲基-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-10,13(9H,15H)-二酮之甲磺酸鹽反應，以獲得下式所示之 9H-芴-9-基甲基(2-{[(2-{[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-2-側氧基乙氧基)甲基]胺基}-2-側氧基乙基)胺基甲酸酯的步驟；

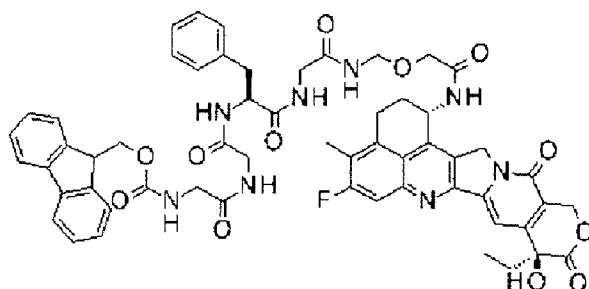


使 9H-芴-9-基甲基(2-{[(2-{[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-2-側氧基乙氧基)甲基]胺基}-2-側氧基乙基)胺基甲酸酯與哌啶反應，以獲得下式所示之 N-[(2-{[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-

4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-2-側氧基乙氧基)甲基]甘胺酸醯胺的步驟；

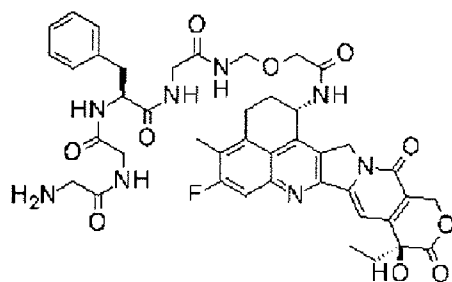


使 N-[(2-{[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-2-側氧基乙氧基)甲基]甘胺酸醯胺與 N-[(9H-蒽-9-基甲氧基)羰基]甘胺醯基甘胺醯基-L-苯丙胺酸反應，以獲得下式所示之 N-[(9H-蒽-9-基甲氧基)羰基]甘胺醯基甘胺醯基-L-苯基丙胺醯基-N-[(2-{[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-2-側氧基乙氧基)甲基]甘胺酸醯胺的步驟；



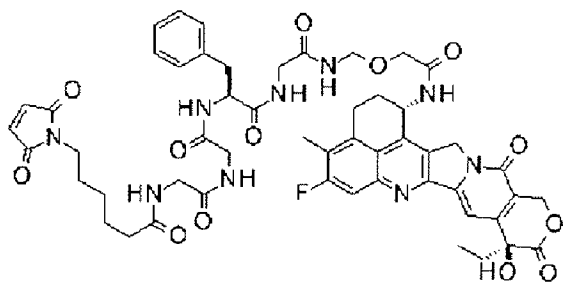
使 N-[(9H-蒽-9-基甲氧基)羰基]甘胺醯基甘胺醯基-L-苯基丙胺醯基-N-[(2-{[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-2-側氧基乙氧基)甲基]甘胺酸醯胺的步驟；

基)甲基]甘胺酸鹽胺與哌啶反應，以獲得下式所示之甘胺鹽基
甘胺鹽基-L-苯基丙胺鹽基-N-[(2-{[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-
羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-
苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-2-
側氧基乙氧基)甲基]甘胺酸鹽胺的步驟；



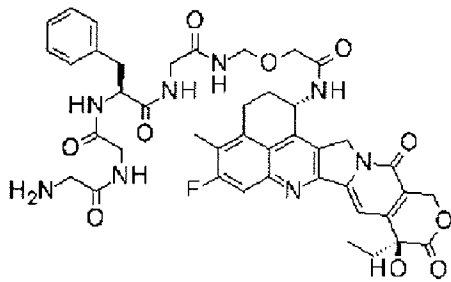
以及，使甘胺鹽基甘胺鹽基-L-苯基丙胺鹽基-N-[(2-
{[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-
2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吡
啶并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-2-側氧基乙氧基)甲基]甘胺酸鹽
胺與6-順丁烯二鹽亞胺己酸N-琥珀鹽亞胺基酯反應，以獲得N-
[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己鹽基]甘胺鹽基甘
胺鹽基-L-苯基丙胺鹽基-N-[(2-{[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥
基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯
并[de]哌喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-2-側
氧基乙氧基)甲基]甘胺酸鹽胺的步驟。

【請求項 2】一種下式所示之 N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-
1H-吡咯-1-基)己鹽基]甘胺鹽基甘胺鹽基-L-苯基丙胺鹽基-N-
[(2-{[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-
2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吡
啶并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-2-側氧基乙氧基)甲基]甘胺酸鹽
胺的製造方法，



其包含使甘胺醯基甘胺醯基-L-苯基丙胺醯基-N-[(2-
{[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-
2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吡
啉并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-2-側氧基乙氧基)甲基]甘胺酸醯
胺與 6-順丁烯二醯亞胺己酸 N-琥珀醯亞胺基酯反應的步驟。

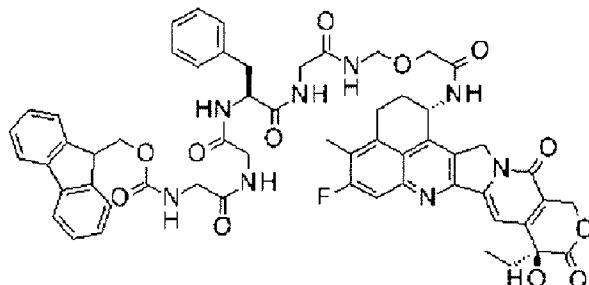
【請求項 3】一種下式所示之甘胺醯基甘胺醯基-L-苯基丙胺醯
基-N-[(2- $\{[(1S,9S)$ -9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二
側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':
6,7]吡啉并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-2-側氧基乙氧基)甲基]甘
胺酸醯胺的製造方法，



其包含使 N-[(9H-萸-9-基甲氧基)羰基]甘胺醯基甘胺醯基-L-
苯基丙胺醯基-N-[(2- $\{[(1S,9S)$ -9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲
基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]
哌喃并[3',4':6,7]吡啉并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-2-側氧基
乙氧基)甲基]甘胺酸醯胺與哌啶反應的步驟。

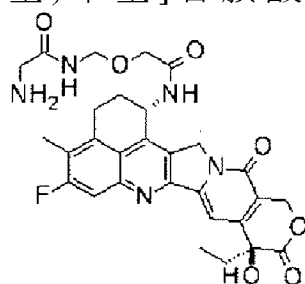
【請求項 4】一種下式所示之 N-[(9H-萸-9-基甲氧基)羰基]甘
胺醯基甘胺醯基-L-苯基丙胺醯基-N-[(2- $\{[(1S,9S)$ -9-乙基-5-

氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-2-側氧基乙氧基)甲基]甘胺酸醯胺的製造方法，



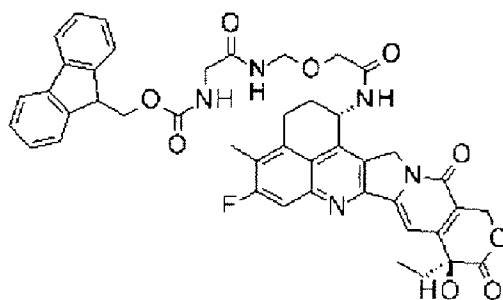
其包含使 N-[(2-({[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-2-側氧基乙氧基)甲基]甘胺酸醯胺與 N-[(9H-萸-9-基甲氧基)羰基]甘胺醯基甘胺醯基-L-苯丙胺酸反應的步驟。

【請求項 5】一種下式所示之 N-[(2-({[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-2-側氧基乙氧基)甲基]甘胺酸醯胺的製造方法，



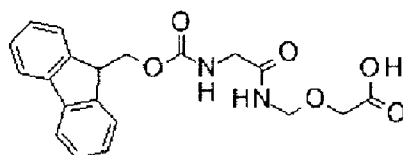
其包含使 9H-萸-9-基甲基(2-({[(2-({[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-2-側氧基乙氧基)甲基]胺基}-2-側氧基乙基)胺基甲酸酯與哌啶反應的步驟。

【請求項 6】一種下式所示之 9H-芴-9-基甲基(2-{{[(2-{{[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-2-側氧基乙氧基)甲基]胺基}-2-側氧基乙基)胺基甲酸酯的製造方法，



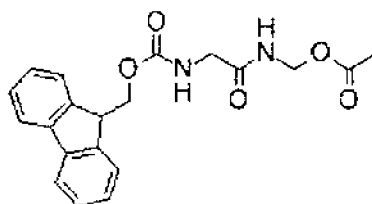
其包含使[({N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]甘胺鹽基}胺基)甲氧基]乙酸與(1S,9S)-1-胺基-9-乙基-5-氟-2,3-二氫-9-羥基-4-甲基-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-10,13(9H,15H)-二酮之甲磺酸鹽反應的步驟。

【請求項 7】一種下式所示之[({N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]甘胺鹽基}胺基)甲氧基]乙酸的製造方法，



其包含將苯甲基[({N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]甘胺鹽基}胺基)甲氧基]乙酸酯進行氫化的步驟。

【請求項 8】一種下式所示之乙酸({N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]甘胺鹽基}胺基)甲酯的製造方法，



其包含使 N-9-萸基甲氧基羰基甘胺醯基甘胺酸與四乙酸鉛反應的步驟。

【請求項 9】一種甘胺醯基甘胺醯基-L-苯基丙胺醯基-N-[(2-{[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-2-側氧基乙氧基)甲基]甘胺酸醯胺。

【請求項 10】一種 N-[(9H-萸-9-基甲氧基)羰基]甘胺醯基甘胺醯基-L-苯基丙胺醯基-N-[(2-{[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-2-側氧基乙氧基)甲基]甘胺酸醯。

【請求項 11】一種 N-[(2-{[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-2-側氧基乙氧基)甲基]甘胺酸醯胺。

【請求項 12】一種 9H-萸-9-基甲基(2-{[(2-{[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-2-側氧基乙氧基)甲基]胺基}-2-側氧基乙基)胺基甲酸酯。

【請求項 13】一種[({N-[(9H-萸-9-基甲氧基)羰基]甘胺醯基}胺基)甲氧基]乙酸。

【發明圖式】

B7-H3變異體1之胺基酸序列(序列識別號1)

MLRRRGSPGMGVHVGAALGALWFCLTGALEVQVPEDPVVALVGTD
ATLCCSFSPPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGQDQGSAYA
NRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSI RDFGSAAVS
LQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDVTITCSSYQGYPEAEVFWQD
GQGVPLTGNTTTSQMANEQGLFDVHSILRVVLGANGTYSCLVRNP
VLQQDAHSSVTITPQRSPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCSF
SPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRTALFP
DLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSI RDFGSAAVSLQVAAPY
SKPSMTLEPNKDLRPGDVTITCSSYRGYPEAEVFWQDGGQGVPLT
GNVTTSQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAH
GSVTITGQPMTFPPEALWVTVGLSVCLIALLLVALAFVCWRKIKQS
CEEENAGAEDQDGE GEGSKTALQPLKIISDSKEDDGQEIA

【第 1 圖】

B7-H3變異體2之胺基酸序列(序列識別號2)

MLRRRGSPGMGVHVGAALGALWFCLTGALEVQVPEDPVVALVGTD
ATLCCSFSPPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGQDQGSAYA
NRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSI RDFGSAAVS
LQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDVTITCSSYRGYPEAEVFWQD
GQGVPLTGNTTTSQMANEQGLFDVIISVLRVVLGANGTYSCLVRNP
VLQQDAHGSVTITGQPMTFPPEALWVTVGLSVCLIALLLVALAFVC
WRKIKQSC EEENAGAEDQDGE GEGSKTALQPLKHSDSKEDDGQEIA

【第 2 圖】

M30-H1型重鏈之胺基酸序列(序列識別號9)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG
YTFTNYVMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDDVKYNEKFKGRVTIT
ADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGYYGSPLYYFDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【第 3 圖】

M30-H2型重鏈之胺基酸序列(序列識別號10)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG
YTFTNYVMHWVRQAPGQGLEWIGYINPYNDDVKYNEKFKGRVTIT
ADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGYYGSPLYYFDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【第 4 圖】

M30-H3型重鏈之胺基酸序列(序列識別號11)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG
YTFTNYVMHWVKQAPGQGLEWIGYINPYNDDVKYNEKFKGKATIT
ADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWGYYGSPLY YFDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【第 5 圖】

M30-H4型重鏈之胺基酸序列(序列識別號12)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG
YTFTNYVMHWVKQAPGQGLEWIGYINPYNDDVKYNEKFKGKATQT
SDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWGYYGSPLY YFDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【第 6 圖】

M30-L1型輕鏈之胺基酸序列(序列識別號13)

MVLQTQVFISLLLVISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA
SSRLIYMHVYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDF
TLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

【第 7 圖】

M30-L2型輕鏈之胺基酸序列(序列識別號14)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA
SSRLIYMHWYQQKPGQAPRLWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDY
TLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

【第 8 圖】

M30-L3型輕鏈之胺基酸序列(序列識別號15)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGQIVLSQSPATLSLSPGERATLTCRA
SSRLIYMHWYQQKPGSAPKLWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTSY
TLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

【第 9 圖】

M30-L4型輕鏈之胺基酸序列(序列識別號16)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA
SSRLIYMHWYQQKPGQAPRPLIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDF
TLTISSLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

【第 10 圖】

M30-L5型輕鏈之胺基酸序列(序列識別號17)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGQIVLSQSPATLSLSPGERATLTCRA
SSRLIYMHWYQQKPGSAPKPWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTSY
TLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

【第 11 圖】

M30-L6型輕鏈之胺基酸序列(序列識別號18)

MVLQTQVFISLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA
SSRLIYMHWYQQKPGQAPRPLIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDF
TLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

【第 12 圖】

M30-L7型輕鏈之胺基酸序列(序列識別號19)

MVLQTQVFISLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA
SSRLIYMHWYQQKPGQAPRPLIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDY
TLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

【第 13 圖】

M30抗體重鏈之胺基酸序列(序列識別號20)

MEWSWIFLFLLSGTAGVHSEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASG
YTFTNYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDDVKYNEKFKGKATQT
SDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARWGYGSPLYYFDYWGGGT
TLTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTL
TWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNV
AHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFFPK
IKDVLMISSLPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQT
HREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTI
SKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCTMVTDFMPEDIYVEW
TNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCS
VVHEGLHNHHTTKSFSTRTPGK

【第 14 圖】

M30抗體輕鏈之胺基酸序列(序列識別號21)

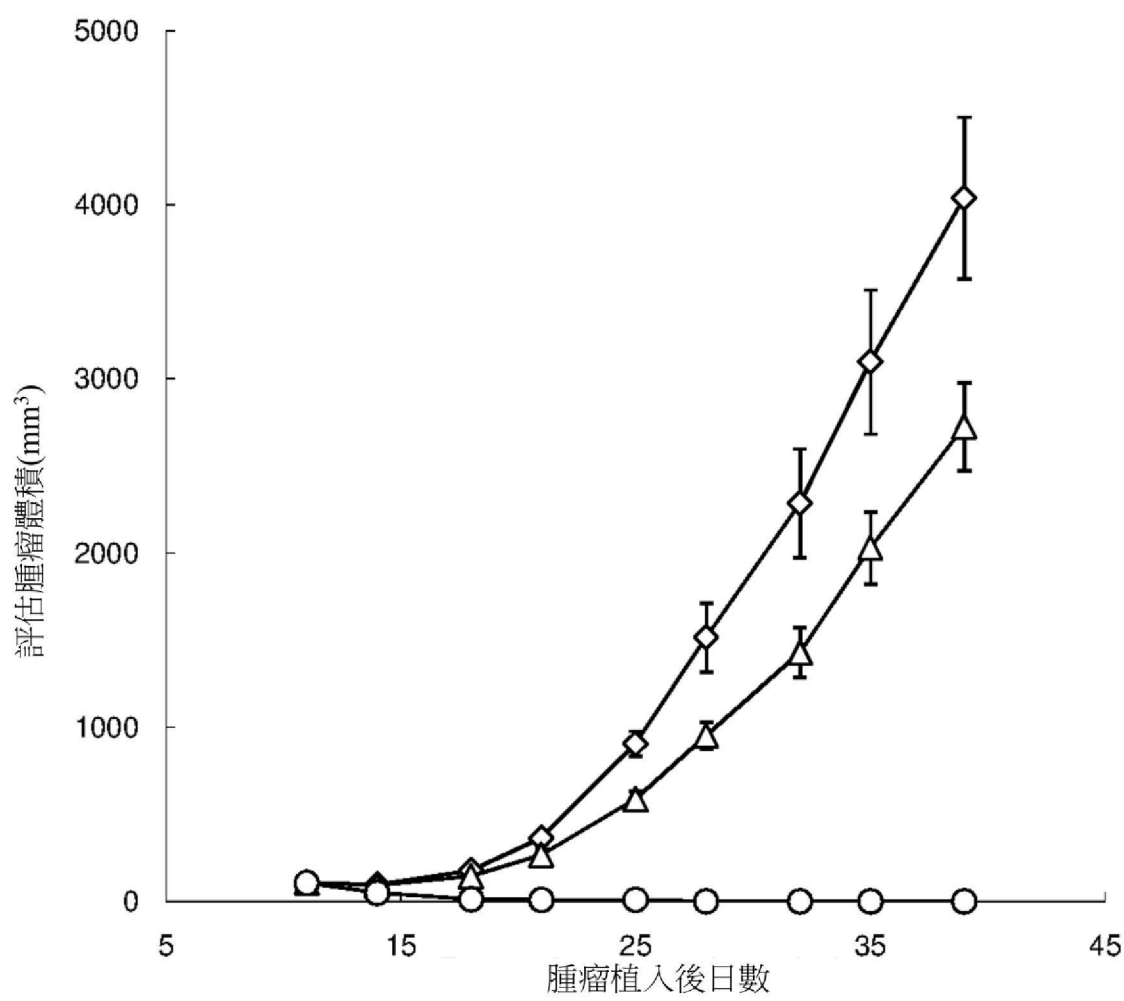
MDFLVQIFSFLLISASVIMSRGQIVLSQSPTILSASPGEKVTMTC
RASSRLIYMHWYQQKPGSSPKPWIIYATSNLASGVPARFSGSGSGT
SYSLTISRVEAEDAATYYCQQWNSNPPTFGTGTKLELKRADAAPT
VSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNFPKDINVKKIDGSERQNGV
LNSWTDQDSKDSSTYSMSSTLTLTKEDEYERHNSYTCEATHKTSTSP
IVKSFNRNEC

【第 15 圖】

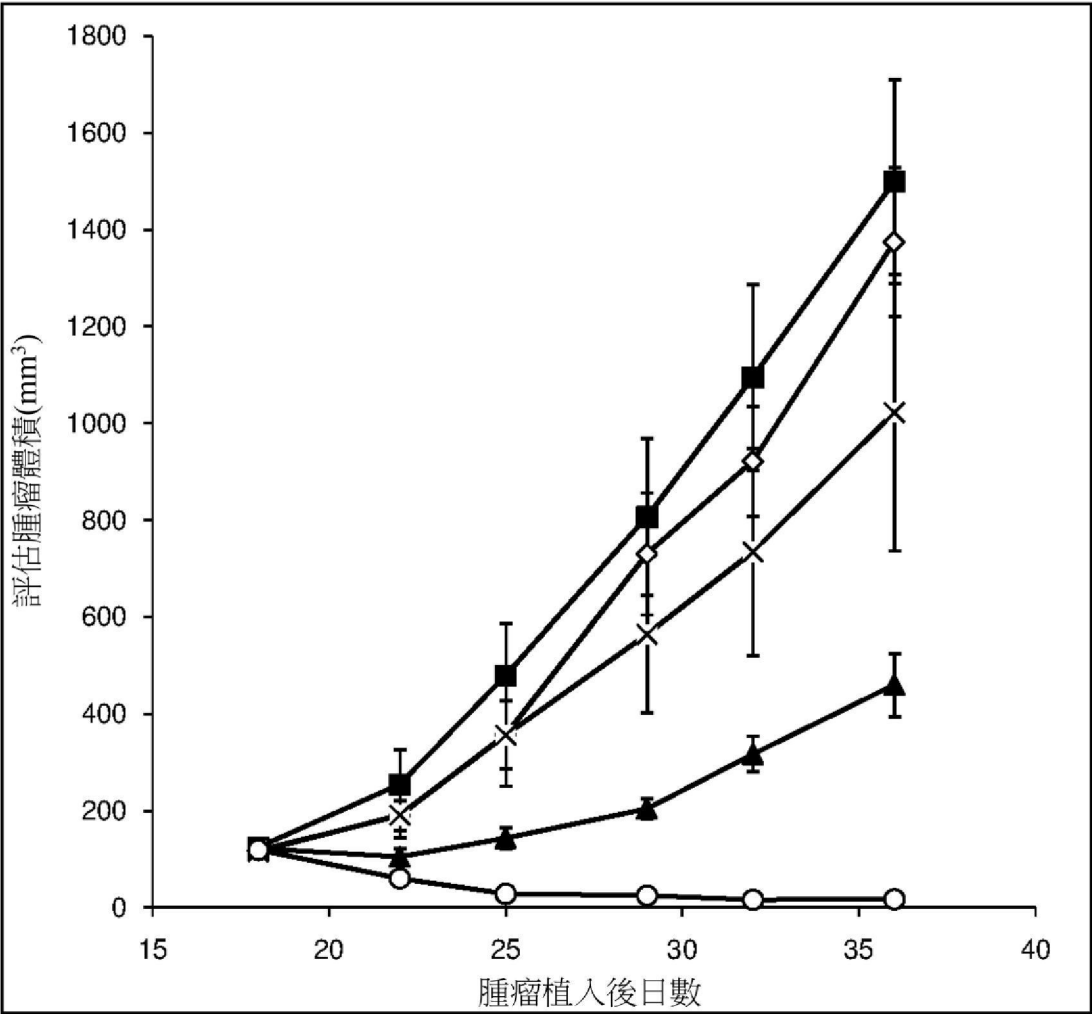
B7-H3變異體1之核苷酸序列(序列識別號26)

a t g c t g c g t c g g c g g g g c a g c c c t g g c a t g g g t g t g c a t g t g g g t
g c a g c c c t g g g a g c a c t g t g g t t c t g c c t c a c a g g a g c c c t g g a g
g t c c a g g t c c c t g a a g a c c c a g t g g t g g c a c t g g t g g g c a c c g a t
g c c a c c c t g t g c t g c t c c t t c t c c c c t g a g c c t g g c t t c a g c c t g
g c a c a g c t c a a c c t c a t c t g g c a g c t g a c a g a t a c c a a a c a g c t g
g t g c a c a g c t t t g c t g a g g g c c a g g a c c a g g g c a g c g c c t a t g c c
a a c c g c a c g g c c c t c t t c c c g g a c c t g c t g g c a c a g g g c a a c g c a
t c c c t g a g g c t g c a g c g c g t g c g t g t g g c g g a c g a g g g c a g c t t c
a c c t g c t t c g t g a g c a t c c g g g a t t t c g g c a g c g c t g c c g t c a g c
c t g c a g g t g g c c g c t c c c t a c t c g a a g c c c a g c a t g a c c c t g g a g
c c c a a c a a g g a c c t g c g g c c a g g g g a c a c g g t g a c c a t c a c g t g c
t c c a g c t a c c a g g g c t a c c c t g a g g c t g a g g t g t t c t g g c a g g a t
g g g c a g g g t g t g c c c c t g a c t g g c a a c g t g a c c a c g t c g c a g a t g
g c c a a c g a g c a g g g c t t g t t t g a t g t g c a c a g c a t c c t g c g g g t g
g t g c t g g g t g c a a a t g g c a c c t a c a g c t g c c t g g t g c g c a a c c c c
g t g c t g c a g c a g g a t g c g c a c a g c t c t g t c a c c a t c a c a c c c c a g
a g a a g c c c c a c a g g a g c c g t g g a g g t c c a g g t c c c t g a g g a c c c g
g t g g t g g c c c t a g t g g g c a c c g a t g c c a c c c t g c g c t g c t c c t t c
t c c c c c g a g c c t g g c t t c a g c c t g g c a c a g c t c a a c c t c a t c t g g
c a g c t g a c a g a c a c c a a a c a g c t g g t g c a c a g t t t c a c c g a a g g c
c g g g a c c a g g g c a g c g c c t a t g c c a a c c g c a c g g c c c t c t t c c c g
g a c c t g c t g g c a c a a g g c a a t g c a t c c c t g a g g c t g c a g c g c g t g
c g t g t g g c g g a c g a g g g c a g c t t c a c c t g c t t c g t g a g c a t c c g g
g a t t t c g g c a g c g c t g c c g t c a g c c t g c a g g t g g c c g c t c c c t a c
t c g a a g c c c a g c a t g a c c c t g g a g c c c a a c a a g g a c c t g c g g c c a
g g g g a c a c g g t g a c c a t c a c g t g c t c c a g c t a c c g g g g c t a c c c t
g a g g c t g a g g t g t t c t g g c a g g a t g g g c a g g g t g t g c c c c t g a c t
g g c a a c g t g a c c a c g t c g c a g a t g g c c a a c g a g c a g g g c t t g t t t
g a t g t g c a c a g c g t c c t g c g g g t g g t g c t g g g t g c g a a t g g c a c c
t a c a g c t g c c t g g t g c g c a a c c c c g t g c t g c a g c a g g a t g c g c a c
g g c t c t g t c a c c a t c a c a g g g c a g c c t a t g a c a t t c c c c c c a g a g
g c c c t g t g g g t g a c c g t g g g g c t g t c t g t c t g t c t c a t t g c a c t g
c t g g t g g c c c t g g c t t t c g t g t g c t g g a g a a a g a t c a a a c a g a g c
t g t g a g g a g g a g a a t g c a g g a g c t g a g g a c c a g g a t g g g g a g g g a
g a a g g c t c c a a g a c a g c c c t g c a g c c t c t g a a a c a c t c t g a c a g c
a a a g a a g a t g a t g g a c a a g a a a t a g c c t g a g c g g c c g c c a c t g t g
c t g g a t a t c t g c a g a a t t c c a c c a c a c t g g a c t a g t g g a t c c g a g
c t c g g t a c c a a g c t t a a g t t t a a a c c g c t g a t c a g c c t c g a c t g t
g c c t t c t a g t t g c c a g c c a t c t g t t g t t t g c c c c t c c c c c g t g c c
t t c c t t g a c c c t g g a a g g t g c c a c t c c c a c t g t c c t t t c c t a a t a
a a a t g a g g a a a t t g c

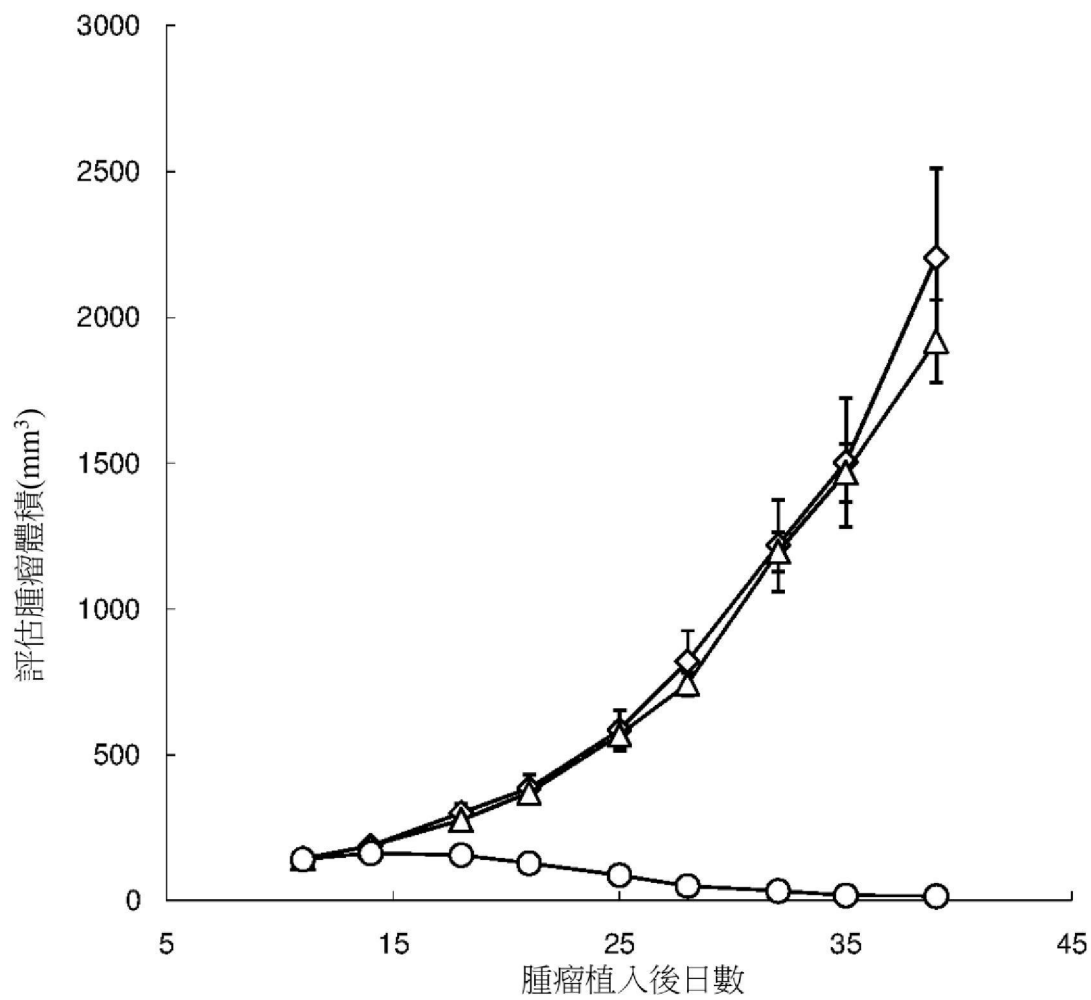
【第 16 圖】



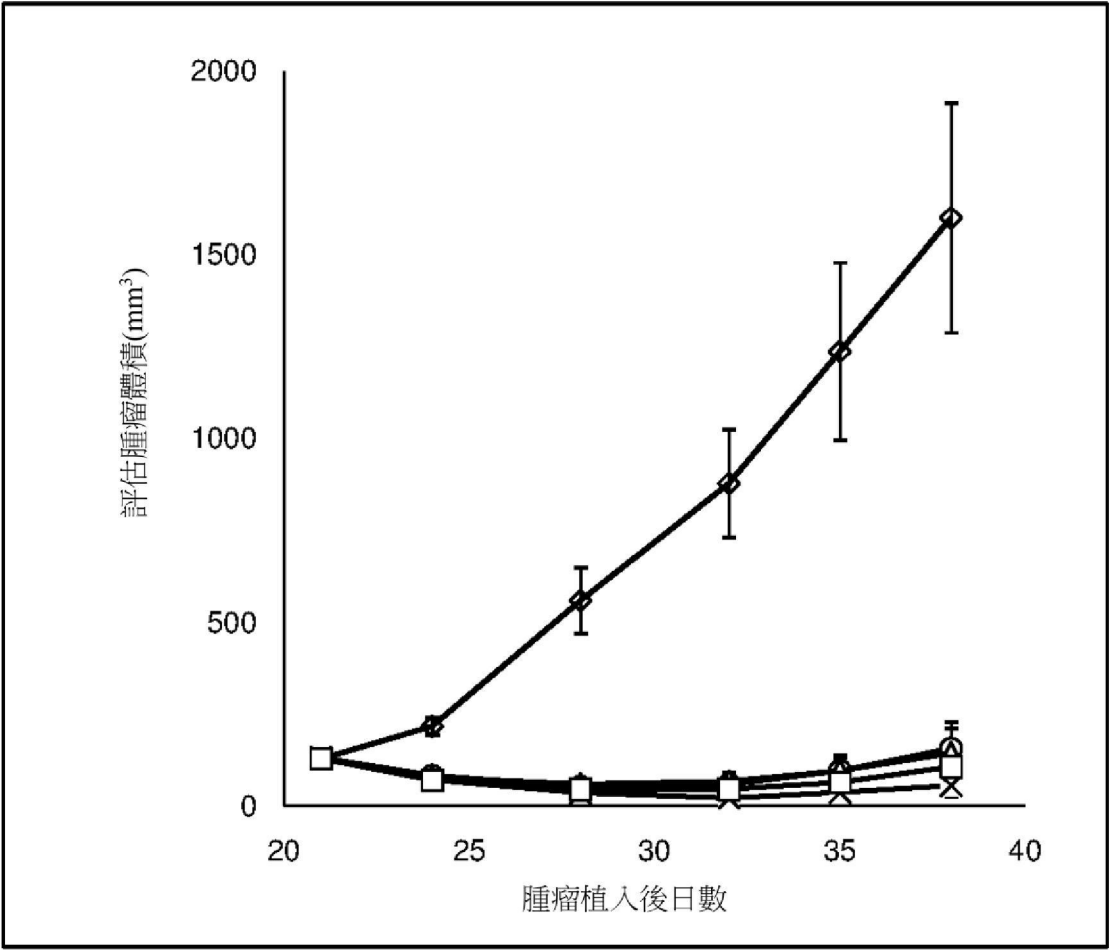
【第 17 圖】



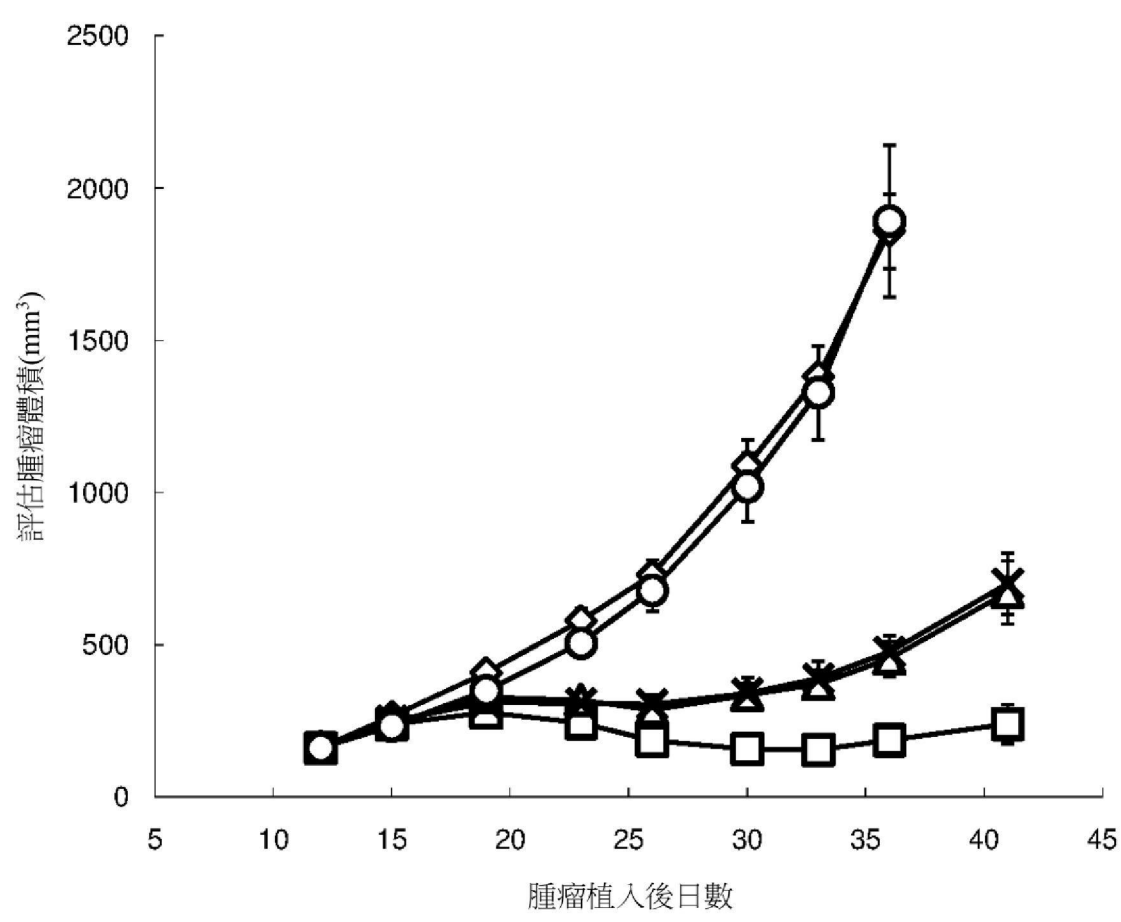
【第 18 圖】



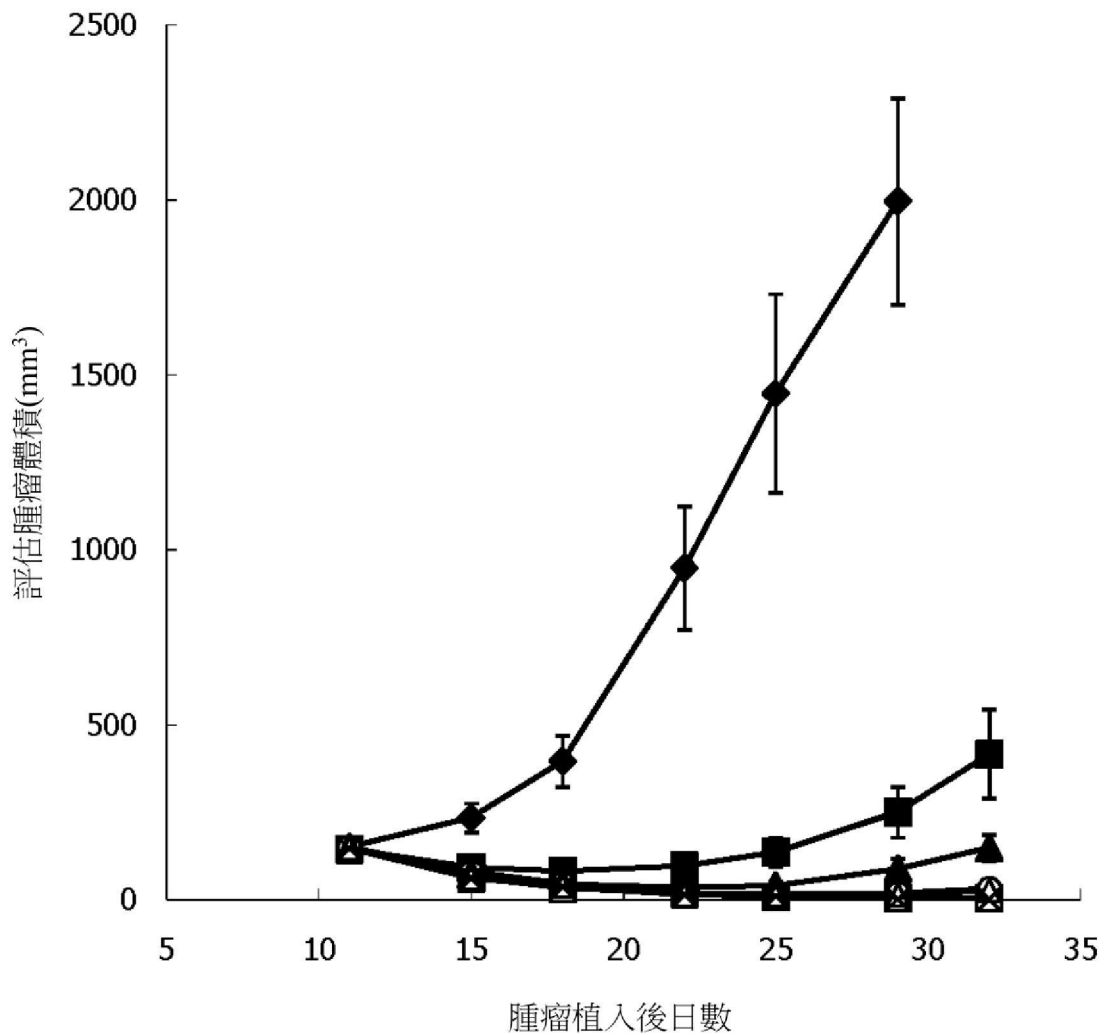
【第 19 圖】



【第 20 圖】



【第 21 圖】



【第 22 圖】