(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 111065621 B
(45)授权公告日 2024.01.26

(21)申请号 201880056289.5

(22)申请日 2018.08.30

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111065621 A

(43)申请公布日 2020.04.24

(30)优先权数据
2017-167690 2017.08.31 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.02.28

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2018/032055 2018.08.30

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/044946 JA 2019.03.07

(73)专利权人 第一三共株式会社
地址 日本东京都

(72)发明人 仁士良雄 坂西航平 野口滋 武田齐大

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 王媛媛 梅黎

(51)Int.Cl.
C07C 231/12(2006.01)
A61K 31/4745(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61K 47/68(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
C07C 233/15(2006.01)
C07C 233/33(2006.01)
C07C 233/54(2006.01)
C07D 491/22(2006.01)
C07K 7/06(2006.01)
C07K 16/00(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
C07B 61/00(2006.01)

(56)对比文件
US 2016333112 A1,2016.11.17
US 2012302562 A1,2012.11.29
CN 1322195 A,2001.11.14
AU 6103399 A,2000.05.01
JP 2008115165 A,2008.05.22
Masamichi Sugimori等.Synthesis and Antitumor Activity of Ring A- and F-Modified HexacyclicCamptothecin Analogues.《J. Med. Chem.》.1998,第41卷(第13期),第2308-2318页.
Masamichi Sugimori等.Synthesis and Antitumor Activity of Ring A- and F-Modified HexacyclicCamptothecin Analogues.《J. Med. Chem.》.1998,第41卷(第13期),第2308-2318页.

审查员 覃楠芳

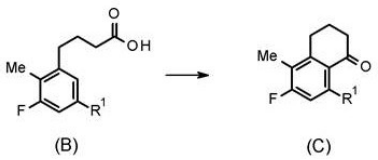
权利要求书8页 说明书58页
序列表14页 附图5页

(54)发明名称

制备抗体-药物缀合物的新方法

(57)摘要

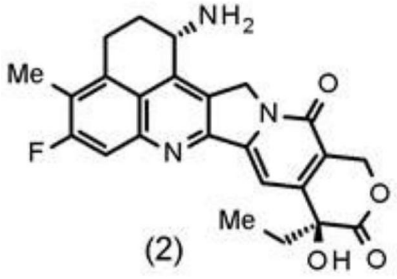
式(C)表示的化合物的制备方法,其中R^1表示被保护基团保护的氨基,所述方法包括使式(B)表示的化合物进行分子内环化以将该化合物转化为式(C)表示的化合物的步骤,其中R^1表示与上述相同的含义。



(B) (C)

CN 111065621 B

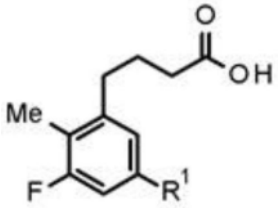
1.式(2)表示的化合物的制备方法：



(2)

所述方法包括以下步骤：

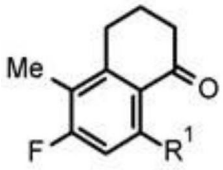
使式(B)表示的化合物：



(B)

其中R^1是被乙酰基、甲氧基乙酰基、三氟乙酰基、三氯乙酰基、新戊酰基、甲酰基或苯甲酰基保护的氨基，

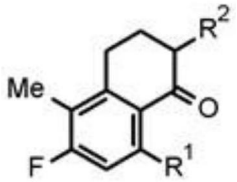
进行分子内环化以将式(B)表示的化合物转化为式(C)表示的化合物：



(C)

其中R^1表示与上述相同的含义，

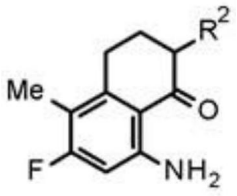
亚硝化或肟化式(C)表示的化合物的羰基的α-位，将保护基团引入衍生自亚硝基或肟基的氮原子并还原以形成式(F)表示的化合物：



(F)

其中R^1表示与上述相同的含义，且R^2是被乙酰基、甲氧基乙酰基、三氟乙酰基、三氯乙酰基、新戊酰基、甲酰基或苯甲酰基保护的氨基；然后

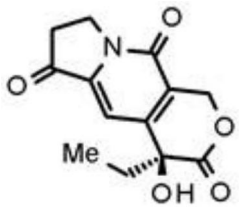
将式(F)表示的化合物中R^1的保护基选择性地脱保护以形成式(G)表示的化合物：



(G)

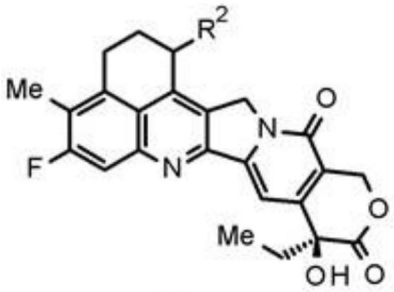
其中R^2表示与上述相同的含义;然后

使式(G)表示的化合物与式(1)表示的化合物缩合



(1)

以将式(G)表示的化合物转化为式(H)表示的化合物:



(H)

其中R^2表示与上述相同的含义;然后

将式(H)表示的化合物中R^2的保护基脱保护以将该化合物转化为式(2)表示的化合物。

2.根据权利要求1的制备方法,其中R^2是被乙酰基或三氟乙酰基保护的氨基。

3.根据权利要求1的制备方法,其中R^2是被乙酰基保护的氨基。

4.根据权利要求1的制备方法,其中所述将式(C)表示的化合物转化为式(F)表示的化合物的步骤包括以下子步骤:(i)使式(C)表示的化合物与亚硝酸酯在碱存在下反应以引入亚硝基;(ii)将保护基团引入衍生自亚硝基的氮原子;和(iii)在铂碳催化剂的存在下用氢还原式(C)表示的化合物。

5.根据权利要求1的制备方法,其中所述将式(F)表示的化合物转化为式(G)表示的化合物的步骤在包含盐酸/乙醇的溶剂中进行。

6.根据权利要求1的制备方法,其中所述使式(G)表示的化合物与式(1)表示的化合物缩合以将式(G)表示的化合物转化为式(H)表示的化合物的步骤在包含邻甲酚的溶剂中进行。

7.根据权利要求1的制备方法,其中所述将式(H)表示的化合物转化为式(2)表示的化合物的步骤在包含甲磺酸的溶剂中进行。

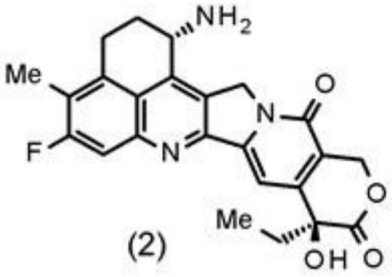
8.根据权利要求1的制备方法,其中所述式(2)表示的化合物为甲磺酸盐形式。

9.根据权利要求1的制备方法,其中所述式(2)表示的化合物为甲磺酸盐m-水合物的形

式,其中m的范围为0至3。

10.根据权利要求1的制备方法,其中所述式(2)表示的化合物为甲磺酸盐二水合物的形式。

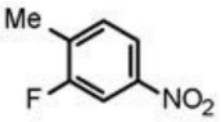
11.式(2)表示的化合物的制备方法:



(2)

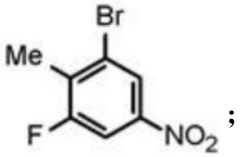
其中所述方法包括以下步骤:

将式(3)表示的化合物:



(3)

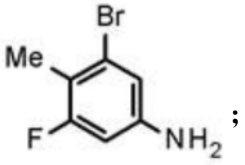
溴化为式(4)表示的化合物:



(4)

然后

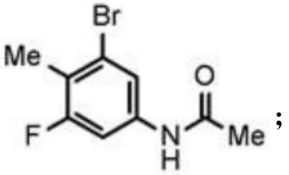
将式(4)表示的化合物的硝基还原为氨基以将该化合物转化为式(5)表示的化合物:



(5)

然后

将式(5)表示的化合物的氨基乙酰化以将该化合物转化为式(6)表示的化合物:

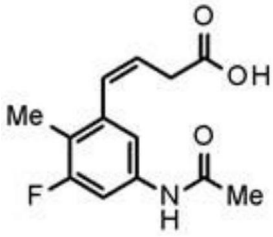


(6)

然后

使式(6)表示的化合物与3-丁烯酸偶联以将式(6)表示的化合物转化为式(7)表示的化

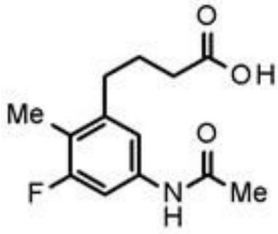
合物：



(7)

然后

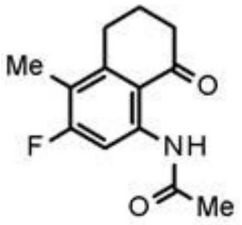
将式(7)表示的化合物还原以将该化合物转化为式(8)表示的化合物：



(8)

然后

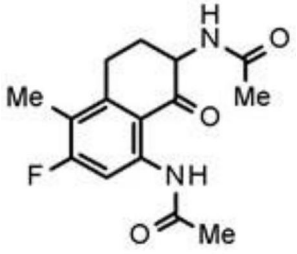
使式(8)表示的化合物进行分子内环化以将式(8)表示的化合物转化为式(9)表示的化合物：



(9)

然后

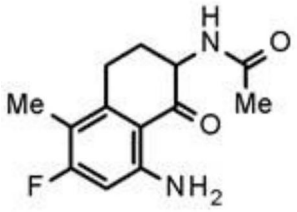
亚硝化或肟化式(9)表示的化合物的羰基的α-位，将保护基团引入衍生自亚硝基或肟基的氮原子并还原以形成式(10)表示的化合物：



(10)

然后

将式(10)表示的化合物的芳族氨基的保护基选择性地脱保护以将该化合物转化为式(11)表示的化合物：

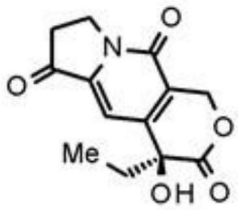


;

(11)

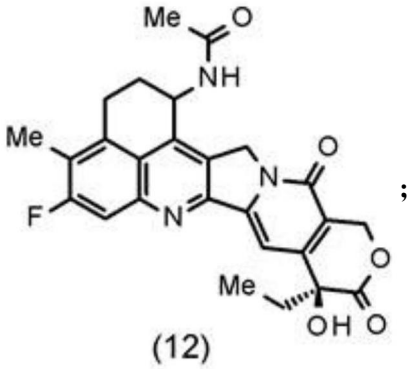
然后

使式(11)表示的化合物与式(1)表示的化合物缩合：



(1)

以将式(11)表示的化合物转化为式(12)表示的化合物：



;

(12)

然后

将式(12)表示的化合物的氨基的保护基脱保护以将该化合物转化为式(2)表示的化合物。

12.根据权利要求11的制备方法,其中所述使式(6)表示的化合物与3-丁烯酸偶联以将式(6)表示的化合物转化为式(7)表示的化合物的步骤在由乙酸钯(II)和三(邻甲苯基)膦制备的钯配合物的存在下进行。

13.根据权利要求11的制备方法,包括以下步骤:将式(7)表示的化合物溶解在碱性水溶液中以用第一有机溶剂洗涤式(7)表示的化合物并分离溶剂;然后将酸加入到碱性水溶液中以用第二有机溶剂萃取式(7)表示的化合物并分离溶剂。

14.根据权利要求13的制备方法,其中所述第一有机溶剂是2-甲基四氢呋喃。

15.根据权利要求13的制备方法,其中所述第二有机溶剂是2-甲基四氢呋喃。

16.根据权利要求13的制备方法,其中所述碱性水溶液是氢氧化钠水溶液。

17.根据权利要求11的制备方法,其中所述使式(8)表示的化合物进行分子内环化以将式(8)表示的化合物转化为式(9)表示的化合物的步骤通过包括使式(8)表示的化合物与三氟乙酸酐反应的方法来进行。

18.根据权利要求17的制备方法,其中所述分子内环化在包含三氟乙酸的溶剂中进行。

19.根据权利要求11的制备方法,其中所述将式(9)表示的化合物转化为式(10)表示的化合物的步骤包括以下子步骤:(i)使式(9)表示的化合物与亚硝酸酯在碱存在下反应以引入亚硝基;然后(ii)将保护基团引入衍生自亚硝基的氮原子;和(iii)在铂碳催化剂的存在下用氢还原式(9)表示的化合物。

20.根据权利要求11的制备方法,其中所述将式(10)表示的化合物转化为式(11)表示的化合物的步骤在包含盐酸/乙醇的溶剂中进行。

21.根据权利要求11的制备方法,其中所述使式(11)表示的化合物与式(1)表示的化合物缩合以将式(11)表示的化合物转化为式(12)表示的化合物的步骤在包含邻甲酚的溶剂中进行。

22.根据权利要求11的制备方法,其中所述将式(12)表示的化合物转化为式(2)表示的化合物的步骤在包含甲磺酸的溶剂中进行。

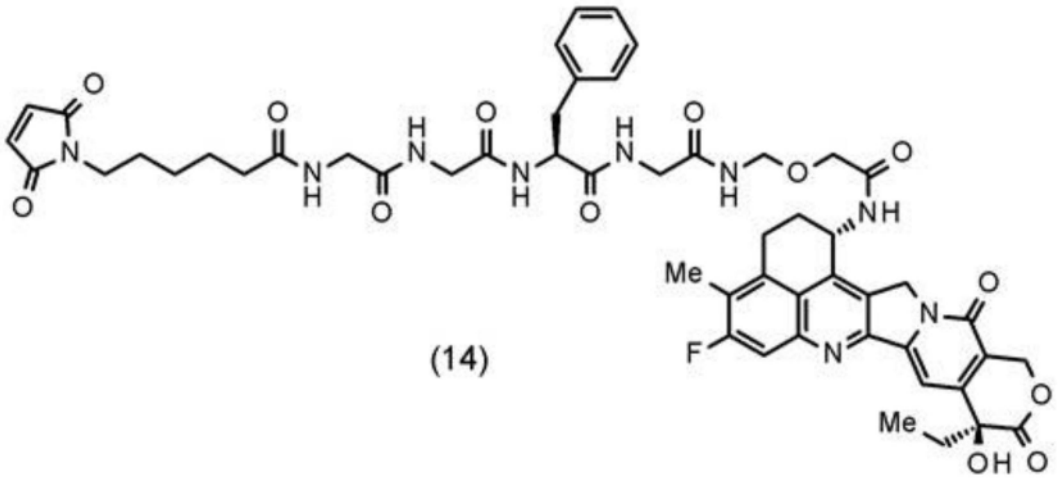
23.根据权利要求11的制备方法,其中所述式(2)表示的化合物为甲磺酸盐的形式。

24.根据权利要求11的制备方法,其中所述式(2)表示的化合物为甲磺酸盐m-水合物的形式,其中m的范围为0至3。

25.根据权利要求11的制备方法,其中所述式(2)表示的化合物为甲磺酸盐二水合物的形式。

26.根据权利要求1的制备方法,其中不使用色谱法。

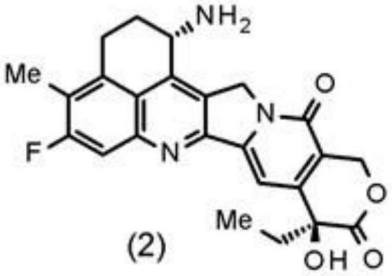
27.式(14)表示的化合物的制备方法:



(14)

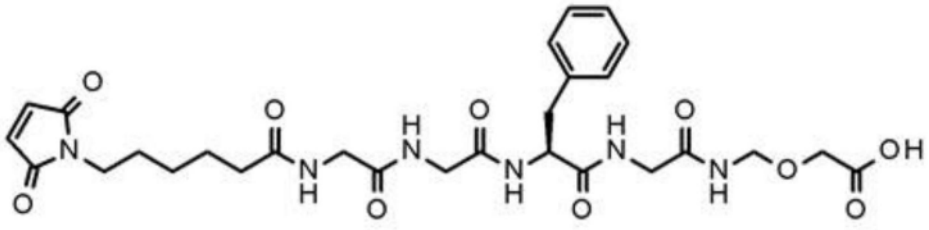
所述方法包括以下步骤:

使用权利要求1至26中任一项的方法制备式(2)表示的化合物:



(2)

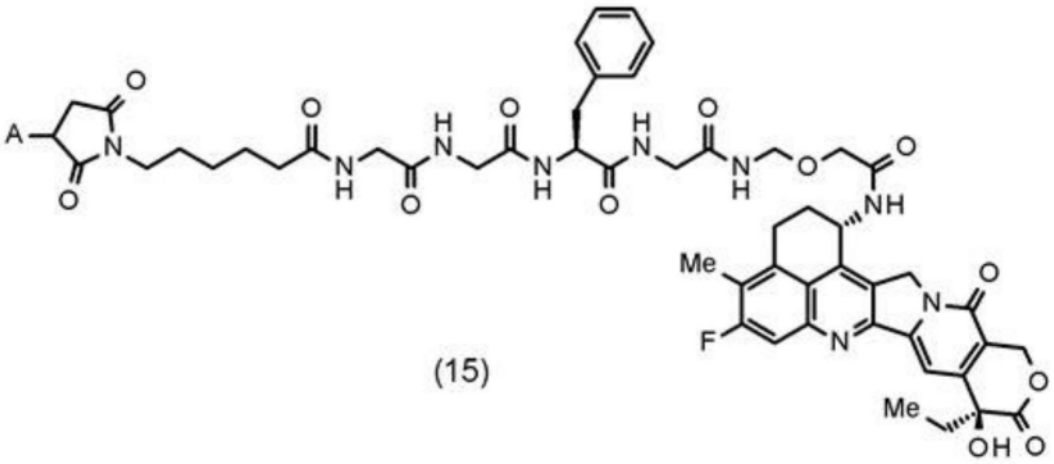
使式(2)表示的化合物与式(13)表示的化合物缩合



(13)

以将式(2)表示的化合物转化为式(14)表示的化合物。

28.抗体-药物缀合物的制备方法,其中式(15)表示的药物-接头



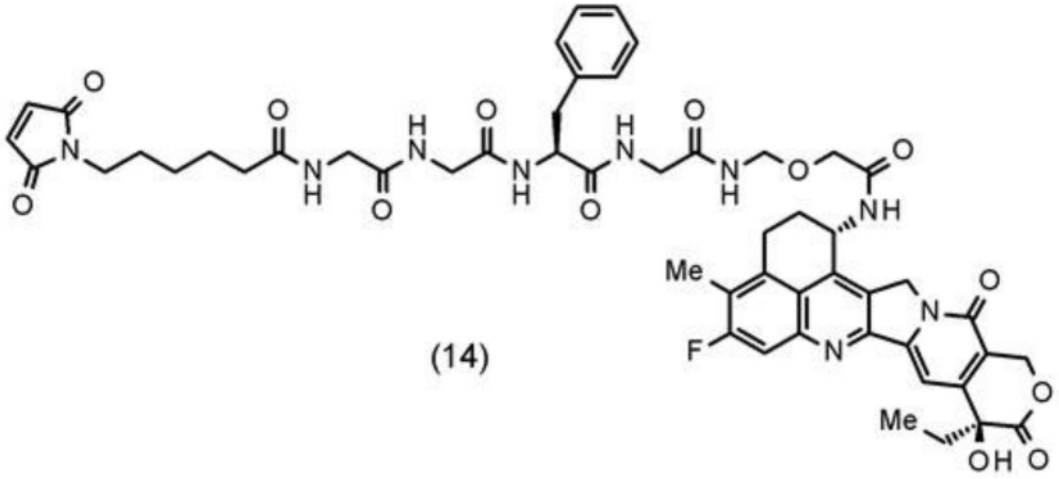
(15)

其中A表示与抗体的连接位置;

经由硫醚键与抗体缀合,

所述方法包括以下步骤:

(i)使用根据权利要求27的方法制备式(14)表示的化合物:



(14)

(ii)还原抗体;然后

(iii)使式(14)表示的化合物与还原抗体反应。

29.根据权利要求28的制备方法,其中所述抗体是抗-HER2抗体、抗-HER3抗体、抗-TROP2抗体、抗-B7-H3抗体或抗-GPR20抗体。

30.根据权利要求29的制备方法,其中所述抗体是抗-HER2抗体。

31.根据权利要求29的制备方法,其中所述抗体是抗-HER3抗体。

32.根据权利要求29的制备方法,其中所述抗体是抗-TROP2抗体。

33.根据权利要求29的制备方法,其中所述抗体是抗-B7-H3抗体。

34.根据权利要求29的制备方法,其中所述抗体是抗-GPR20抗体。

制备抗体-药物缀合物的新方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种制备依喜替康(其是抗体-药物缀合物的组分)的新方法,以及一种制备抗体-药物缀合物的新方法,其中使用了上述方法。

背景技术

[0002] 因此预期具有与抗体(其抗原在癌细胞表面上表达,并且还与能够细胞内化的抗原结合,并且因此可以将药物选择性地递送至癌细胞)缀合的具有细胞毒性的药物的抗体-药物缀合物(ADC)会引起药物在癌细胞内蓄积并杀死癌细胞(非专利文献1至5)。

[0003] 作为一种这样的抗体-药物缀合物,已知包含抗体和依喜替康(其为拓扑异构酶I抑制剂)作为其组分的抗体-药物缀合物(专利文献1-8和非专利文献6和7)。由于这些抗体-药物缀合物发挥了特别优异的抗肿瘤作用和安全性,因此它们目前正在临床研究中。

[0004] 已知专利文献9-11中描述的方法是用于制备依喜替康的方法。

[0005] 引用列表

[0006] 专利文献

[0007] 专利文献1: 国际公开第WO 2014/057687号

[0008] 专利文献2: 国际公开第WO 2014/061277号

[0009] 专利文献3: 国际公开第WO 2015/098099号

[0010] 专利文献4: 国际公开第WO 2015/115091号

[0011] 专利文献5: 国际公开第WO 2015/146132号

[0012] 专利文献6: 国际公开第WO 2015/155976号

[0013] 专利文献7: 国际公开第WO 2015/155998号

[0014] 专利文献8: 国际公开第WO 2018/135501号

[0015] 专利文献9: 日本专利特开平第5-59061号

[0016] 专利文献10: 日本专利特开平第8-337584号

[0017] 专利文献11: 国际公开第WO 96/26181号

[0018] 非专利文献

[0019] 非专利文献1: Ducry, L.等人, Bioconjugate Chem. (2010) 21, 5-13.

[0020] 非专利文献2: Alley, S. C.等人, Current Opinion in Chemical Biology (2010) 14, 529-537.

[0021] 非专利文献3: Damle N. K. Expert Opin. Biol. Ther. (2004) 4, 1445-1452.

[0022] 非专利文献4: Senter P. D.等人, Nature Biotechnology (2012) 30, 631-637.

[0023] 非专利文献5: Howard A.等人, J Clin Oncol 29: 398-405.

[0024] 非专利文献6: Ogitani Y.等人, Clinical Cancer Research (2016) 22(20), 5097-5108.

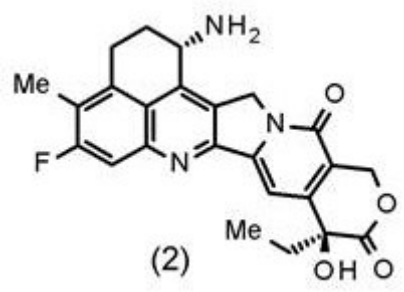
[0025] 非专利文献7: Ogitani Y.等人, Cancer Science (2016) 107, 1039-1046。

发明内容

[0026] 技术问题

[0027] 依喜替康是式(2)表示的化合物:

[0028] [化1]

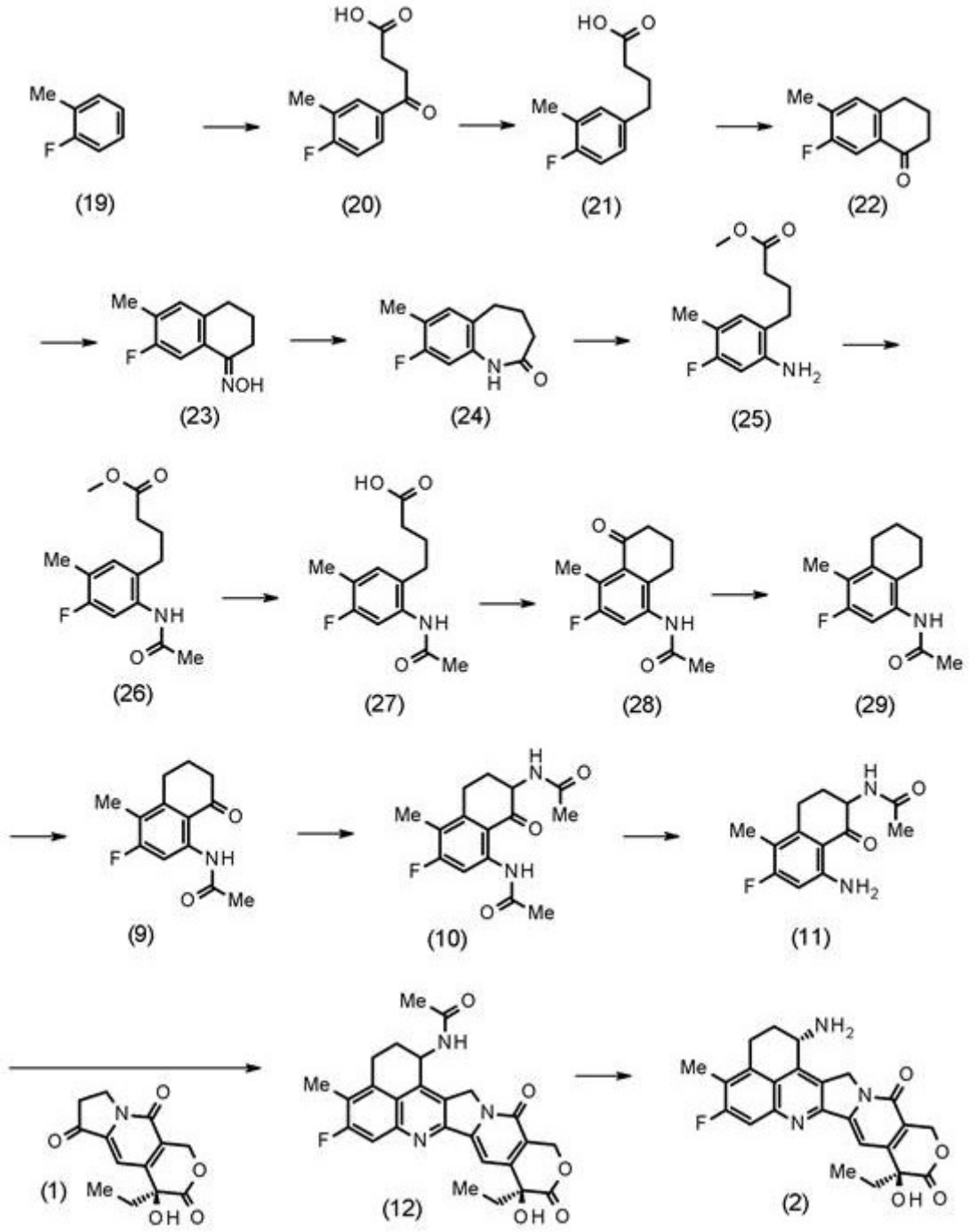
[0029] 

(2)

[0030] 并且是充当根据本发明的抗体-药物缀合物的组分的化合物。

[0031] 已知专利文献9-11中描述的方法是用于制备依喜替康的方法。这样的制备方法可以描述如下。也就是说,这样的制备方法包括使式(19)表示的化合物与琥珀酸酐反应以将该化合物转化为式(20)表示的化合物,还原该化合物以将该化合物转化为式(21)表示的化合物,通过分子内环化反应将该化合物转化为式(22)表示的化合物,通过肟化将该化合物转化为式(23)表示的化合物,通过贝克曼重排将该化合物转化为式(24)表示的化合物,通过开环反应将该化合物转化为式(25)表示的化合物,保护氨基以将该化合物转化为式(26)表示的化合物,将该化合物水解以将该化合物转化为式(27)表示的化合物,通过分子内环化反应将该化合物转化为式(28)表示的化合物,通过还原将该化合物转化为式(29)表示的化合物,通过氧化将该化合物转化为式(9)表示的化合物,然后引入氮原子以将该化合物转化为式(10)表示的化合物,通过选择性脱保护将该化合物转化为式(11)表示的化合物,通过与式(1)表示的化合物的Friedlander反应将该化合物转化为式(12)表示的化合物,最后,将乙酰基脱保护以产生式(2)表示的化合物,即依喜替康。然而,在该制备方法中,开环和闭环反应以及氧化和还原反应必须重复进行,因此步骤数多,并且需要复杂的操作。因此,期望开发工业上优异的制备方法。

[0032] [化2]

[0033] 

[0034] 本发明的目的是找到一种新的工业上优异的制备依喜替康的方法,其中步骤数少。此外,本发明的另一个目的是开发一种用于制备抗体-药物缀合物的新方法,其中使用了上述方法。

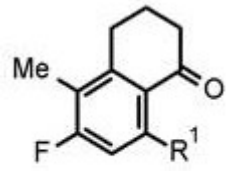
[0035] 问题的解决方案

[0036] 作为对依喜替康的制备方法进行认真研究的结果,本发明人发现了新的工业上优异的制备依喜替康的方法,其中步骤数少。此外,本发明人开发了一种用于制备抗体-药物缀合物的新方法,其中使用了通过上述制备方法制备的依喜替康。

[0037] 具体地,本发明涉及下列。

[0038] [1] 式(C)表示的化合物的制备方法:

[0039] [化4]

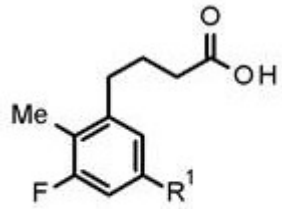
[0040] 

(C)

[0041] 其中R^1表示被保护基团保护的氨基，

[0042] 所述方法包括使式(B)表示的化合物：

[0043] [化3]

[0044] 

(B)

[0045] 其中R^1表示与上述相同的含义，

[0046] 进行分子内环化以将式(B)表示的化合物转化为式(C)表示的化合物的步骤。

[0047] [2] 根据[1]的制备方法，其中R^1是被乙酰基、甲氧基乙酰基、三氟乙酰基、三氯乙酰基、新戊酰基、甲酰基或苯甲酰基保护的氨基。

[0048] [3] 根据[1]的制备方法，其中R^1是被乙酰基或三氟乙酰基保护的氨基。

[0049] [4] 根据[1]的制备方法，其中R^1是被乙酰基保护的氨基。

[0050] [5] 根据[1]至[4]中任一项的制备方法，其中所述分子内环化通过包括使式(B)表示的化合物与三氟乙酸酐反应的方法来进行。

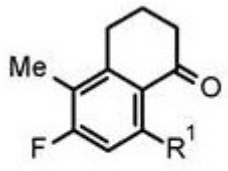
[0051] [6] 根据[5]的制备方法，其中所述分子内环化在包含三氟乙酸的溶剂中进行。

[0052] [7] 根据[1]至[4]中任一项的制备方法，其中所述分子内环化通过包括使式(B)表示的化合物与亚硫酰氯反应的方法来进行。

[0053] [8] 根据[7]的制备方法，其中所述分子内环化在氯化铝的存在下进行。

[0054] [9] 式(C)表示的化合物的制备方法：

[0055] [化6]

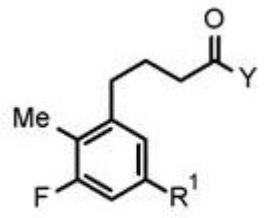
[0056] 

(C)

[0057] 其中R^1表示被保护基团保护的氨基，

[0058] 所述方法包括使式(J)表示的化合物：

[0059] [化5]

[0060] 

(J)

[0061] 其中Y表示离去基团,且R^1表示与上述相同的含义,

[0062] 进行分子内环化以将式(J)表示的化合物转化为式(C)表示的化合物的步骤。

[0063] [10] 根据[9]的制备方法,其中R^1是被乙酰基、甲氧基乙酰基、三氟乙酰基、三氯乙酰基、新戊酰基、甲酰基或苯甲酰基保护的氨基。

[0064] [11] 根据[9]的制备方法,其中R^1是被乙酰基或三氟乙酰基保护的氨基。

[0065] [12] 根据[9]的制备方法,其中R^1是被乙酰基保护的氨基。

[0066] [13] 根据[9]至[12]中任一项的制备方法,其中Y是氯基。

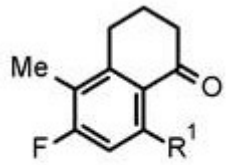
[0067] [14] 根据[9]至[12]中任一项的制备方法,其中Y是三氟乙酰氧基。

[0068] [15] 根据[13]的制备方法,其中所述分子内环化在氯化铝的存在下进行。

[0069] [16] 根据[14]的制备方法,其中所述分子内环化在包含三氟乙酸的溶剂中进行。

[0070] [17] 一种式(C)表示的化合物的制备方法:

[0071] [化10]

[0072] 

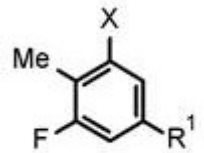
(C)

[0073] 其中R^1表示被保护基团保护的氨基,

[0074] 所述方法包括以下步骤:

[0075] 使式(D)表示的化合物:

[0076] [化7]

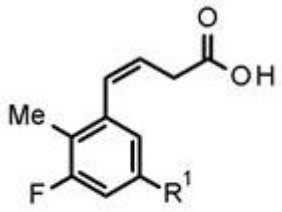
[0077] 

(D)

[0078] 其中X表示离去基团,且R^1表示与上述相同的含义,

[0079] 与3-丁烯酸偶联以将式(D)表示的化合物转化为式(E)表示的化合物:

[0080] [化8]

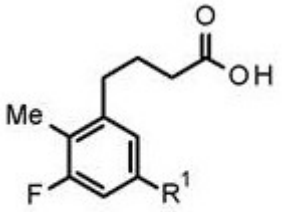
[0081] 

(E)

[0082] 其中R^1表示与上述相同的含义;然后

[0083] 还原式(E)表示的化合物以将式(E)表示的化合物转化为式(B)表示的化合物:

[0084] [化9]

[0085] 

(B)

[0086] 其中R^1表示与上述相同的含义;然后

[0087] 使式(B)表示的化合物进行分子内环化以将式(B)表示的化合物转化为式(C)表示的化合物。

[0088] [18] 根据[17]的制备方法,其中X是溴基、碘基、三氟甲磺酰氧基或芳基磺酰氧基。

[0089] [19] 根据[17]的制备方法,其中X是溴基。

[0090] [20] 根据[17]的制备方法,其中X是碘基。

[0091] [21] 根据[17]至[20]中任一项的制备方法,其中R^1是被乙酰基、甲氧基乙酰基、三氟乙酰基、三氯乙酰基、新戊酰基、甲酰基或苯甲酰基保护的氨基。

[0092] [22] 根据[7]至[10]中任一项的制备方法,其中R^1是被乙酰基或三氟乙酰基保护的氨基。

[0093] [23] 根据[17]至[20]中任一项的制备方法,其中R^1是被乙酰基保护的氨基。

[0094] [24] 根据[17]至[23]中任一项的制备方法,其中使式(D)表示的化合物与3-丁烯酸偶联以将式(D)表示的化合物转化为式(E)表示的化合物的步骤在由乙酸钯(II)和三(邻甲苯基)膦制备的钯配合物的存在下进行。

[0095] [25] 根据[17]至[24]中任一项的制备方法,包括以下步骤:将式(E)表示的化合物溶解在碱性水溶液中以用第一有机溶剂洗涤式(E)表示的化合物并分离溶剂;然后将酸加入到碱性水溶液中以用第二有机溶剂萃取式(E)表示的化合物并分离溶剂。

[0096] [26] 根据[25]的制备方法,其中所述第一有机溶剂是2-甲基四氢呋喃。

[0097] [27] 根据[25]或[26]的制备方法,其中所述第二有机溶剂是2-甲基四氢呋喃。

[0098] [28] 根据[25]至[27]中任一项的制备方法,其中所述碱性水溶液是氢氧化钠水溶液。

[0099] [29] 根据[17]至[28]中任一项的制备方法,其中还原式(E)表示的化合物以将式(E)表示的化合物转化为式(B)表示的化合物的步骤通过包括使式(E)表示的化合物与氢在溶剂中在钯炭催化剂存在下反应的方法来进行。

[0100] [30] 根据[17]至[29]中任一项的制备方法,其中使式(B)表示的化合物进行分子内环化以将式(B)表示的化合物转化为式(C)表示的化合物的步骤通过包括使式(B)表示的化合物与三氟乙酸酐反应的方法来进行。

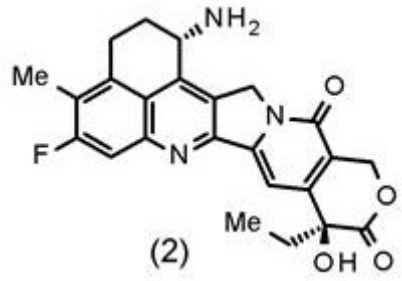
[0101] [31] 根据[30]的制备方法,其中所述分子内环化在包含三氟乙酸的溶剂中进行。

[0102] [32] 根据[17]至[29]中任一项的制备方法,其中使式(B)表示的化合物进行分子内环化以将式(B)表示的化合物转化为式(C)表示的化合物的步骤通过包括使式(B)表示的化合物与亚硫酰氯反应的方法来进行。

[0103] [33] 根据[32]的制备方法,其中所述分子内环化在氯化铝的存在下进行。

[0104] [34] 式(2)表示的化合物的制备方法:

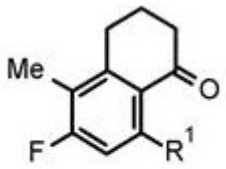
[0105] [化16]

[0106] 

(2)

[0107] 其中通过根据[1]至[33]中任一项的方法制备的式(C)表示的化合物:

[0108] [化11]

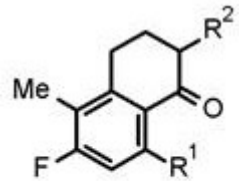
[0109] 

(C)

[0110] 用作起始材料,所述方法包括以下步骤:

[0111] 将式(C)表示的化合物转化为式(F)表示的化合物:

[0112] [化12]

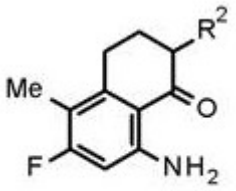
[0113] 

(F)

[0114] 其中R^1表示与权利要求1至33中任一项限定的相同的含义,且R^2表示被保护基团保护的氨基;然后

[0115] 将式(F)表示的化合物转化为式(G)表示的化合物:

[0116] [化13]

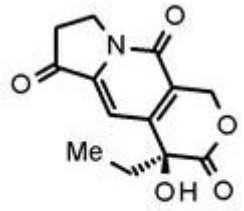
[0117] 

(G)

[0118] 其中R^2表示与上述相同的含义;然后

[0119] 使式(G)表示的化合物与式(1)表示的化合物缩合

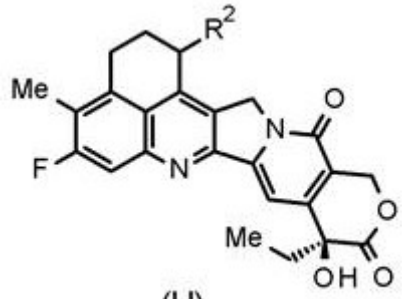
[0120] [化14]

[0121] 

(1)

[0122] 以将式(G)表示的化合物转化为式(H)表示的化合物:

[0123] [化15]

[0124] 

(H)

[0125] 其中R^2表示与上述相同的含义;然后

[0126] 将式(H)表示的化合物转化为式(2)表示的化合物。

[0127] [35] 根据[34]的制备方法,其中R^2是被乙酰基、甲氧基乙酰基、三氟乙酰基、三氯乙酰基、新戊酰基、甲酰基或苯甲酰基保护的氨基。

[0128] [36] 根据[34]的制备方法,其中R^2是被乙酰基或三氟乙酰基保护的氨基。

[0129] [37] 根据[34]的制备方法,其中R^2是被乙酰基保护的氨基。

[0130] [38] 根据[34]至[37]中任一项的制备方法,其中将式(C)表示的化合物转化为式(F)表示的化合物的步骤包括以下子步骤:(i)使式(C)表示的化合物与亚硝酸酯在碱存在下反应以引入亚硝基;(ii)将保护基团引入衍生自亚硝基的氮原子;和(iii)在铂炭催化剂的存在下用氢还原式(C)表示的化合物。

[0131] [39] 根据权利要求[34]至[38]中任一项的制备方法,其中将式(F)表示的化合物转化为式(G)表示的化合物的步骤在包含盐酸/乙醇的溶剂中进行。

[0132] [40] 根据权利要求[34]至[39]中任一项的制备方法,其中使式(G)表示的化合物

与式(1)表示的化合物缩合以将式(G)表示的化合物转化为式(H)表示的化合物的步骤在包含邻甲酚的溶剂中进行。

[0133] [41] 根据[34]至[40]中任一项的制备方法,其中将式(H)表示的化合物转化为式(2)表示的化合物的步骤在包含甲磺酸的溶剂中进行。

[0134] [42] 根据[34]至[41]中任一项的制备方法,其中所述式(2)表示的化合物为甲磺酸盐形式。

[0135] [43] 根据[34]至[41]中任一项的制备方法,其中所述式(2)表示的化合物为甲磺酸盐m-水合物的形式,其中m的范围为0至3。

[0136] [44] 根据[34]至[41]中任一项的制备方法,其中所述式(2)表示的化合物为甲磺酸盐无水物的形式。

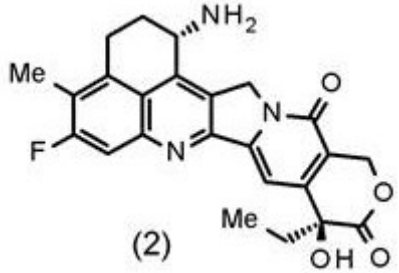
[0137] [45] 根据[34]至[41]中任一项的制备方法,其中所述式(2)表示的化合物为甲磺酸盐一水合物的形式。

[0138] [46] 根据[34]至[41]中任一项的制备方法,其中所述式(2)表示的化合物为甲磺酸盐二水合物的形式。

[0139] [47] 根据[34]至[41]中任一项的制备方法,其中所述式(2)表示的化合物为甲磺酸盐三水合物的形式。

[0140] [48] 式(2)表示的化合物的制备方法:

[0141] [化28]

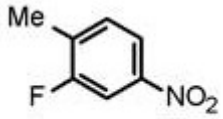
[0142] 

(2)

[0143] 其中所述方法包括以下步骤:

[0144] 将式(3)表示的化合物:

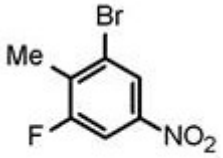
[0145] [化17]

[0146] 

(3)

[0147] 转化为式(4)表示的化合物:

[0148] [化18]

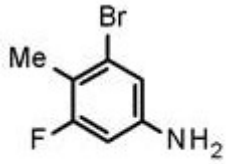
[0149] 

(4)

[0150] ;然后

[0151] 将式(4)表示的化合物转化为式(5)表示的化合物：

[0152] [化19]

[0153] 

;

(5)

[0154] 然后

[0155] 将式(5)表示的化合物转化为式(6)表示的化合物：

[0156] [化20]

[0157] 

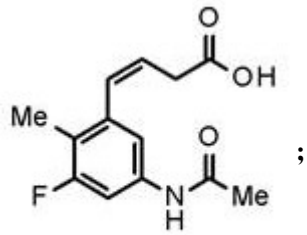
;

(6)

[0158] 然后

[0159] 使式(6)表示的化合物与3-丁烯酸偶联以将式(6)表示的化合物转化为式(7)表示的化合物：

[0160] [化21]

[0161] 

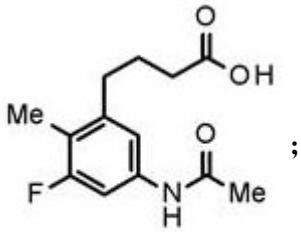
;

(7)

[0162] 然后

[0163] 将式(7)表示的化合物转化为式(8)表示的化合物：

[0164] [化22]

[0165] 

;

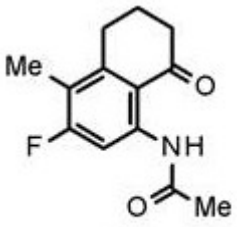
(8)

[0166] 然后

[0167] 使式(8)表示的化合物进行分子内环化以将式(8)表示的化合物转化为式(9)表示

的化合物：

[0168] [化23]

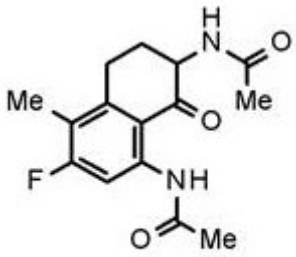
[0169]  ；

(9)

[0170] 然后

[0171] 将式(9)表示的化合物转化为式(10)表示的化合物：

[0172] [化24]

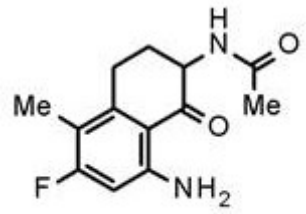
[0173]  ；

(10)

[0174] 然后

[0175] 将式(10)表示的化合物转化为式(11)表示的化合物：

[0176] [化25]

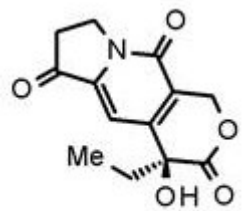
[0177]  ；

(11)

[0178] 然后

[0179] 使式(11)表示的化合物与式(1)表示的化合物缩合：

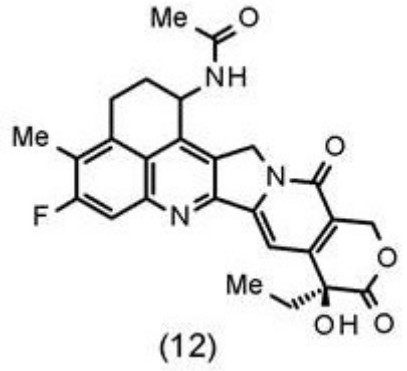
[0180] [化26]

[0181] 

(1)

[0182] 以将式(11)表示的化合物转化为式(12)表示的化合物：

[0183] [化27]

[0184] 

(12) ;

[0185] 然后

[0186] 将式(12)表示的化合物转化为式(2)表示的化合物。

[0187] [49] 根据[48]的制备方法,其中使式(6)表示的化合物与3-丁烯酸偶联以将式(6)表示的化合物转化为式(7)表示的化合物的步骤在由乙酸钯(II)和三(邻甲苯基)膦制备的钯配合物的存在下进行。

[0188] [50] 根据[48]或[49]的制备方法,包括以下步骤:将式(7)表示的化合物溶解在碱性水溶液中以用第一有机溶剂洗涤式(7)表示的化合物并分离溶剂;然后将酸加入到碱性水溶液中以用第二有机溶剂萃取式(7)表示的化合物并分离溶剂。

[0189] [51] 根据[50]的制备方法,其中所述第一有机溶剂是2-甲基四氢呋喃。

[0190] [52] 根据[50]或[51]的制备方法,其中所述第二有机溶剂是2-甲基四氢呋喃。

[0191] [53] 根据[50]至[52]中任一项的制备方法,其中所述碱性水溶液是氢氧化钠水溶液。

[0192] [54] 根据[48]至[53]中任一项的制备方法,其中使式(8)表示的化合物进行分子内环化以将式(8)表示的化合物转化为式(9)表示的化合物的步骤通过包括使式(8)表示的化合物与三氟乙酸酐反应的方法来进行。

[0193] [55] 根据[54]的制备方法,其中所述分子内环化在包含三氟乙酸的溶剂中进行。

[0194] [56] 根据[48]至[55]中任一项的制备方法,其中将式(9)表示的化合物转化为式(10)表示的化合物的步骤包括以下子步骤:(i)使式(9)表示的化合物与亚硝酸酯在碱存在下反应以引入亚硝基;然后(ii)将保护基团引入衍生自亚硝基的氮原子;和(iii)在铂炭催化剂的存在下用氢还原式(9)表示的化合物。

[0195] [57] 根据[48]至[56]中任一项的制备方法,其中将式(10)表示的化合物转化为式(11)表示的化合物的步骤在包含盐酸/乙醇的溶剂中进行。

[0196] [58] 根据[48]至[57]中任一项的制备方法,其中使式(11)表示的化合物与式(1)表示的化合物缩合以将式(11)表示的化合物转化为式(12)表示的化合物的步骤在包含邻甲酚的溶剂中进行。

[0197] [59] 根据[48]至[58]中任一项的制备方法,其中将式(12)表示的化合物转化为式(2)表示的化合物的步骤在包含甲磺酸的溶剂中进行。

[0198] [60] 根据[48]至[59]中任一项的制备方法,其中所述式(2)表示的化合物为甲磺酸盐的形式。

[0199] [61] 根据[48]至[59]中任一项的制备方法,其中所述式(2)表示的化合物为甲磺酸盐m-水合物的形式,其中m的范围为0至3。

[0200] [62] 根据[48]至[59]中任一项的制备方法,其中所述式(2)表示的化合物为甲磺酸盐无水物的形式。

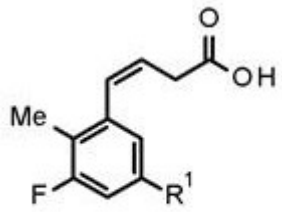
[0201] [63] 根据[48]至[59]中任一项的制备方法,其中所述式(2)表示的化合物为甲磺酸盐一水合物的形式。

[0202] [64] 根据[48]至[59]中任一项的制备方法,其中所述式(2)表示的化合物为甲磺酸盐二水合物的形式。

[0203] [65] 根据[48]至[59]中任一项的制备方法,其中所述式(2)表示的化合物为甲磺酸盐三水合物的形式。

[0204] [66] 式(E)表示的化合物的制备方法:

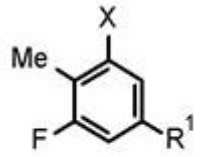
[0205] [化30]

[0206] 

(E)

[0207] 其中R^1表示被保护基团保护的氨基,所述方法包括使式(D)表示的化合物:

[0208] [化29]

[0209] 

(D)

[0210] 其中X表示离去基团,且R^1表示与上述相同的含义,

[0211] 与3-丁烯酸偶联以将式(D)表示的化合物转化为式(E)表示的化合物。

[0212] [67] 根据[66]的制备方法,其中X是溴基、碘基、三氟甲磺酰氧基或芳基磺酰氧基。

[0213] [68] 根据[66]的制备方法,其中X是溴基。

[0214] [69] 根据[66]的制备方法,其中X是碘基。

[0215] [70] 根据[66]至[69]中任一项的制备方法,其中R^1是被乙酰基、甲氧基乙酰基、三氟乙酰基、三氯乙酰基、新戊酰基、甲酰基或苯甲酰基保护的氨基。

[0216] [71] 根据[66]至[69]中任一项的制备方法,其中R^1是被乙酰基或三氟乙酰基保护的氨基。

[0217] [72] 根据[66]至[69]中任一项的制备方法,其中R^1是被乙酰基保护的氨基。

[0218] [73] 根据[66]至[72]中任一项的制备方法,其在由乙酸钯(II)和三(邻甲苯基)膦制备的钯配合物的存在下进行。

[0219] [74] 根据[66]至[73]中任一项的制备方法,包括以下步骤:将式(E)表示的化合

物溶解在碱性水溶液中以用第一有机溶剂洗涤式(E)表示的化合物并分离溶剂;然后将酸加入到碱性水溶液中以用第二有机溶剂萃取式(E)表示的化合物并分离溶剂。

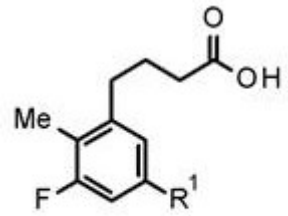
[0220] [75] 根据[74]的制备方法,其中所述第一有机溶剂是2-甲基四氢呋喃。

[0221] [76] 根据[74]或[75]的制备方法,其中所述第二有机溶剂是2-甲基四氢呋喃。

[0222] [77] 根据[74]至[76]中任一项的制备方法,其中所述碱性水溶液是氢氧化钠水溶液。

[0223] [78] 式(B)表示的化合物的制备方法:

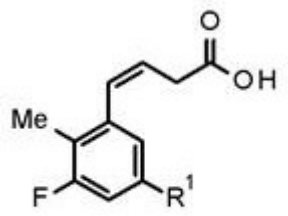
[0224] [化32]

[0225] 

(B)

[0226] 其中R^1表示被保护基团保护的氨基,所述方法包括还原式(E)表示的化合物:

[0227] [化31]

[0228] 

(E)

[0229] 其中R^1表示与上述相同的含义,

[0230] 以将式(E)表示的化合物转化为式(B)表示的化合物的步骤。

[0231] [79] 根据[78]的制备方法,其中R^1是被乙酰基、甲氧基乙酰基、三氟乙酰基、三氯乙酰基、新戊酰基、甲酰基或苯甲酰基保护的氨基。

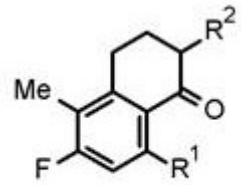
[0232] [80] 根据[78]的制备方法,其中R^1是被乙酰基或三氟乙酰基保护的氨基。

[0233] [81] 根据[78]的制备方法,其中R^1是被乙酰基保护的氨基。

[0234] [82] 根据[78]至[81]中任一项的制备方法,其通过包括使式(E)表示的化合物与氢在溶剂中在钯炭催化剂存在下反应的方法来进行。

[0235] [83] 式(F)表示的化合物的制备方法:

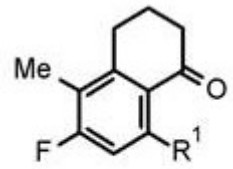
[0236] [化34]

[0237] 

(F)

[0238] 其中R^1表示被保护基团保护的氨基,R^2表示被保护基团保护的氨基,所述方法包括将式(C)表示的化合物:

[0239] [化33]

[0240] 

(C)

[0241] 其中R^1表示与上述相同的含义,

[0242] 转化为式(F)表示的化合物的步骤,其中所述步骤包括以下子步骤:(i)使式(C)表示的化合物与亚硝酸酯在碱存在下反应以引入亚硝基;(ii)将保护基团引入衍生自亚硝基的氮原子;和(iii)在铂炭催化剂的存在下用氢还原式(C)表示的化合物。

[0243] [84] 根据[83]的制备方法,其中R^1是被乙酰基、甲氧基乙酰基、三氟乙酰基、三氯乙酰基、新戊酰基、甲酰基或苯甲酰基保护的氨基。

[0244] [85] 根据[83]的制备方法,其中R^1是被乙酰基或三氟乙酰基保护的氨基。

[0245] [86] 根据[83]的制备方法,其中R^1是被乙酰基保护的氨基。

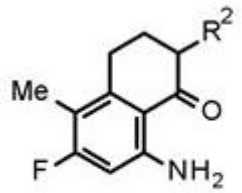
[0246] [87] 根据[83]至[86]中任一项的制备方法,其中R^2是被乙酰基、甲氧基乙酰基、三氟乙酰基、三氯乙酰基、新戊酰基、甲酰基或苯甲酰基保护的氨基。

[0247] [88] 根据[83]至[86]中任一项的制备方法,其中R^2是被乙酰基或三氟乙酰基保护的氨基。

[0248] [89] 根据[83]至[86]中任一项的制备方法,其中R^2是被乙酰基保护的氨基。

[0249] [90] 式(G)表示的化合物的制备方法:

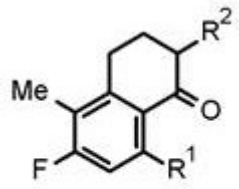
[0250] [化36]

[0251] 

(G)

[0252] 其中R^2表示被保护基团保护的氨基,所述方法包括在包含盐酸/乙醇的溶剂中将式(F)表示的化合物:

[0253] [化35]

[0254] 

(F)

[0255] 其中R^1表示被保护基团保护的氨基且R^2表示与上述相同的含义，

[0256] 转化为式(G)表示的化合物的步骤。

[0257] [91] 根据[90]的制备方法，其中R^1是被乙酰基、甲氧基乙酰基、三氟乙酰基、三氯乙酰基、新戊酰基、甲酰基或苯甲酰基保护的氨基。

[0258] [92] 根据[90]的制备方法，其中R^1是被乙酰基或三氟乙酰基保护的氨基。

[0259] [93] 根据[90]的制备方法，其中R^1是被乙酰基保护的氨基。

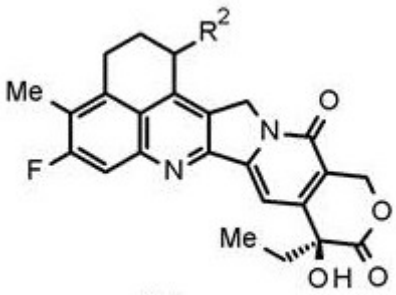
[0260] [94] 根据[90]至[93]中任一项的制备方法，其中R^2是被乙酰基、甲氧基乙酰基、三氟乙酰基、三氯乙酰基、新戊酰基、甲酰基或苯甲酰基保护的氨基。

[0261] [95] 根据[90]至[93]中任一项的制备方法，其中R^2是被乙酰基或三氟乙酰基保护的氨基。

[0262] [96] 根据[90]至[93]中任一项的制备方法，其中R^2是被乙酰基保护的氨基。

[0263] [97] 式(H)表示的化合物的制备方法：

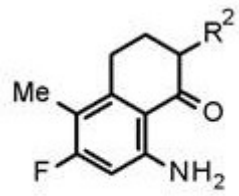
[0264] [化39]

[0265] 

(H)

[0266] 其中R^2表示被保护基团保护的氨基，所述方法包括使式(G)表示的化合物：

[0267] [化37]

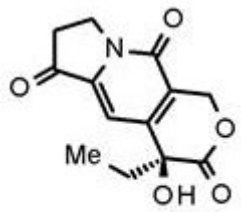
[0268] 

(G)

[0269] 其中R^2表示与上述相同的含义，

[0270] 与式(1)表示的化合物：

[0271] [化38]

[0272] 

(1)

[0273] 在包含邻甲酚的溶剂中缩合以将式(G)表示的化合物转化为式(H)表示的化合物的步骤。

[0274] [98] 根据[97]的制备方法,其中R^2是被乙酰基、甲氧基乙酰基、三氟乙酰基、三氯乙酰基、新戊酰基、甲酰基或苯甲酰基保护的氨基。

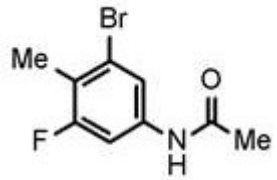
[0275] [99] 根据[97]的制备方法,其中R^2是被乙酰基或三氟乙酰基保护的氨基。

[0276] [100] 根据[97]的制备方法,其中R^2是被乙酰基保护的氨基。

[0277] [101] 根据[1]至[100]中任一项的制备方法,其中不使用色谱法。

[0278] [102] 式(6)表示的化合物

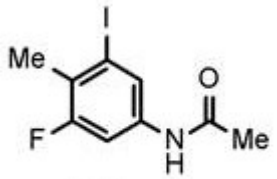
[0279] [化40]

[0280]  。

(6)

[0281] [103] 式(34)表示的化合物

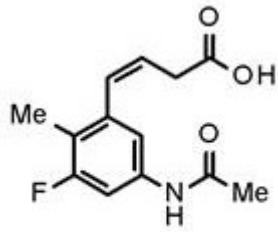
[0282] [化41]

[0283]  。

(34)

[0284] [104] 式(7)表示的化合物

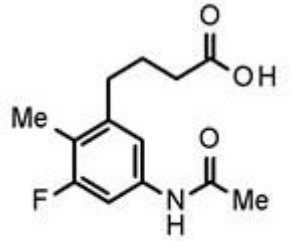
[0285] [化42]

[0286]  。

(7)

[0287] [105] 式(8)表示的化合物

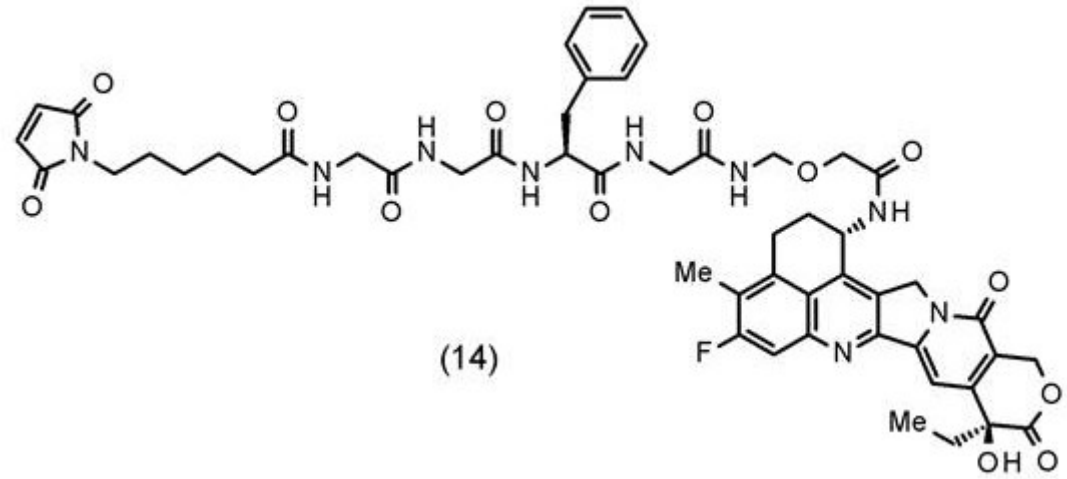
[0288] [化43]

[0289] 

(8)。

[0290] [106] 式(14)表示的化合物的制备方法：

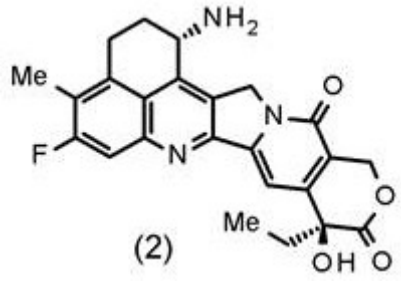
[0291] [化46]

[0292] 

(14)

[0293] 其中通过根据[34]至[65]中任一项的方法制备的式(2)表示的化合物用作起始材料：

[0294] [化44]

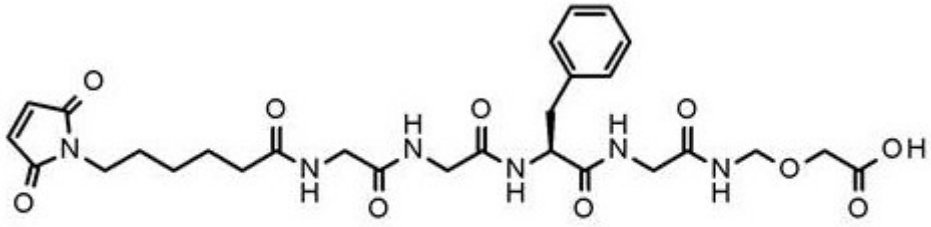
[0295] 

(2)

[0296] 所述方法包括以下步骤：

[0297] 使式(2)表示的化合物与式(13)表示的化合物缩合：

[0298] [化45]

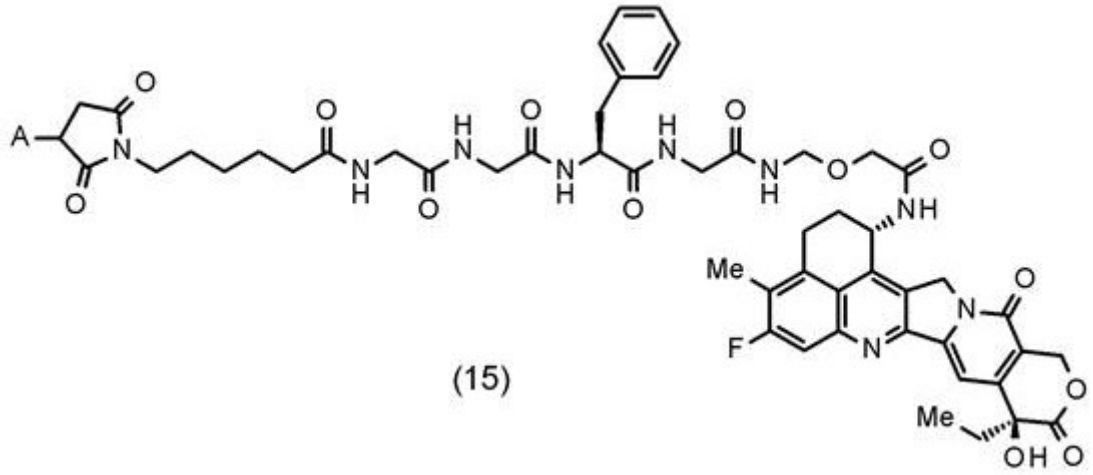
[0299] 

(13)

[0300] 以将式(2)表示的化合物转化为式(14)表示的化合物。

[0301] [107] 抗体-药物缀合物的制备方法,其中式(15)表示的药物-接头经由硫醚键与抗体缀合:

[0302] [化48]

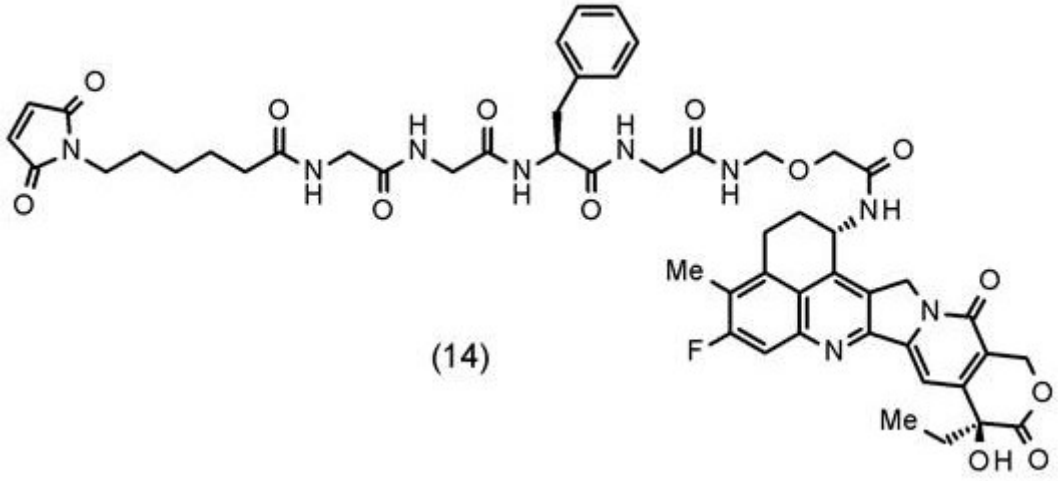
[0303] 

(15)

[0304] 其中A表示与抗体的连接位置;

[0305] 其中通过根据[106]的方法制备的式(14)表示的化合物用作起始材料,

[0306] [化47]

[0307] 

(14)

[0308] 所述方法包括以下步骤:

[0309] (i) 还原抗体;然后

[0310] (ii) 使通过所述方法制备的式(14)表示的化合物与还原的抗体反应。

[0311] [108] 根据[107]的制备方法,其中所述抗体是抗-HER2抗体、抗-HER3抗体、抗-TROP2抗体、抗-B7-H3抗体或抗-GPR20抗体。

[0312] [109] 根据[108]的制备方法,其中所述抗体是抗-HER2抗体。

[0313] [110] 根据[109]的制备方法,其中所述抗-HER2抗体是包含由SEQ ID NO:1的氨基酸残基1至449组成的氨基酸序列组成的重链和由SEQ ID NO:2的氨基酸残基1至214组成的氨基酸序列组成的轻链的抗体;或包含由SEQ ID NO:1表示的氨基酸序列组成的重链和由SEQ ID NO:2表示的氨基酸序列组成的轻链的抗体。

[0314] [111] 根据[109]或[110]的制备方法,其中所述抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数范围为7至8。

[0315] [112] 根据[108]的制备方法,其中所述抗体是抗-HER3抗体。

[0316] [113] 根据[112]的制备方法,其中所述抗-HER3抗体是包含由SEQ ID NO:3表示的氨基酸序列组成的重链和由SEQ ID NO:4表示的氨基酸序列组成的轻链的抗体,或其中重链羧基末端的赖氨酸残基缺失的抗体变体。

[0317] [114] 根据[112]或[113]的制备方法,其中所述抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数范围为7至8。

[0318] [115] 根据[108]的制备方法,其中所述抗体是抗-TROP2抗体。

[0319] [116] 根据[115]的制备方法,其中所述抗-TROP2抗体是包含由SEQ ID NO:5的氨基酸残基20至470组成的氨基酸序列组成的重链和由SEQ ID NO:6的氨基酸残基21至234组成的氨基酸序列组成的轻链的抗体,或其中重链羧基末端的赖氨酸残基缺失的抗体变体。

[0320] [117] 根据[115]或[116]的制备方法,其中所述抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数范围为3至5。

[0321] [118] 根据[108]的制备方法,其中所述抗体是抗-B7-H3抗体。

[0322] [119] 根据[118]的制备方法,其中所述抗-B7-H3抗体是包含由SEQ ID NO:7的氨基酸残基20至471组成的氨基酸序列组成的重链和由SEQ ID NO:8的氨基酸残基21至233组成的氨基酸序列组成的轻链的抗体,或其中重链羧基末端的赖氨酸残基缺失的抗体变体。

[0323] [120] 根据[118]或[119]的制备方法,其中所述抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数范围为3至5。

[0324] [121] 根据[108]的制备方法,其中所述抗体是抗-GPR20抗体。

[0325] [122] 根据[121]的制备方法,其中所述抗-GPR20抗体是包含由SEQ ID NO:9的氨基酸残基20至472组成的氨基酸序列组成的重链和由SEQ ID NO:10的氨基酸残基21至234组成的氨基酸序列组成的轻链的抗体,或其中重链羧基末端的赖氨酸残基缺失的抗体变体。

[0326] [123] 根据[121]或[122]的制备方法,其中所述抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数范围为7至8。

[0327] 本发明的有利作用

[0328] 本发明可以提供一种新的、工业上优异的用于制备依喜替康的方法,其中步骤数少。此外,本发明可以提供一种用于制备抗体-药物缀合物的新方法,其中使用了上述方法。

[0329] 附图简述

[0330] [图1] 图 1显示抗-HER2抗体的重链氨基酸序列(SEQ ID NO: 1)。

[0331] [图 2] 图 2显示抗-HER2抗体的轻链氨基酸序列(SEQ ID NO: 2)。

[0332] [图 3] 图 3显示抗-HER3抗体的重链氨基酸序列(SEQ ID NO: 3)。

[0333] [图 4] 图 4显示抗-HER3抗体的轻链氨基酸序列(SEQ ID NO: 4)。

[0334] [图 5] 图 5显示抗-TROP2抗体的重链氨基酸序列(SEQ ID NO: 5)。

[0335] [图 6] 图 6显示抗-TROP2抗体的轻链氨基酸序列(SEQ ID NO: 6)。

[0336] [图 7] 图 7显示抗-B7-H3抗体的重链氨基酸序列(SEQ ID NO: 7)。

[0337] [图 8] 图 8显示抗-B7-H3抗体的轻链氨基酸序列(SEQ ID NO: 8)。

[0338] [图 9] 图 9显示抗-GPR20抗体的重链氨基酸序列(SEQ ID NO: 9)。

[0339] [图 10] 图 10显示抗-GPR20抗体的轻链氨基酸序列(SEQ ID NO:10)。

具体实施方式

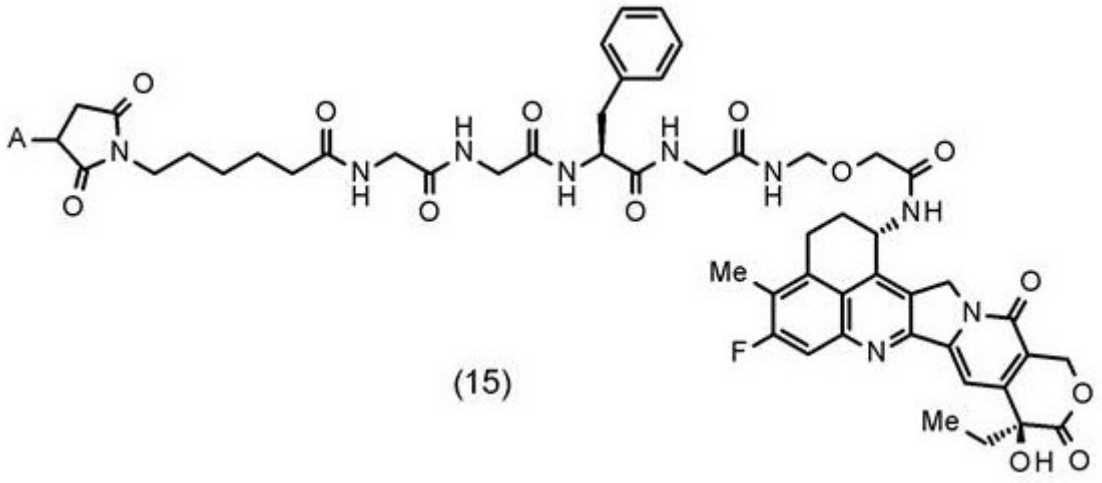
[0340] 在下文中,描述了用于实施本发明的优选方式。给出下面描述的实施方案仅用于说明本发明的典型实施方案的一个实例,而无意于限制本发明的范围。

[0341] [抗体-药物缀合物]

[0342] 通过本发明制备的抗体-药物缀合物优选是这样的抗体-药物缀合物,其中式(15)表示的药物-接头经由硫醚键与所述抗体缀合:

[0343] [化49]

[0344]



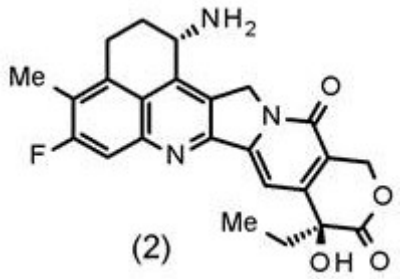
(15)

[0345] 其中A表示与抗体的连接位置。

[0346] 在本发明中,抗体-药物缀合物中的由接头和药物组成的部分结构称为“药物-接头”。药物-接头与在抗体中链间二硫键位点(重链之间的两个位点,以及重链和轻链之间的两个位点)处形成的巯基(换句话说,半胱氨酸残基的硫原子)相连。

[0347] 本发明的药物-接头包括依喜替康(其为拓扑异构酶I抑制剂)作为组分。依喜替康是式(2)表示的化合物:

[0348] [化50]

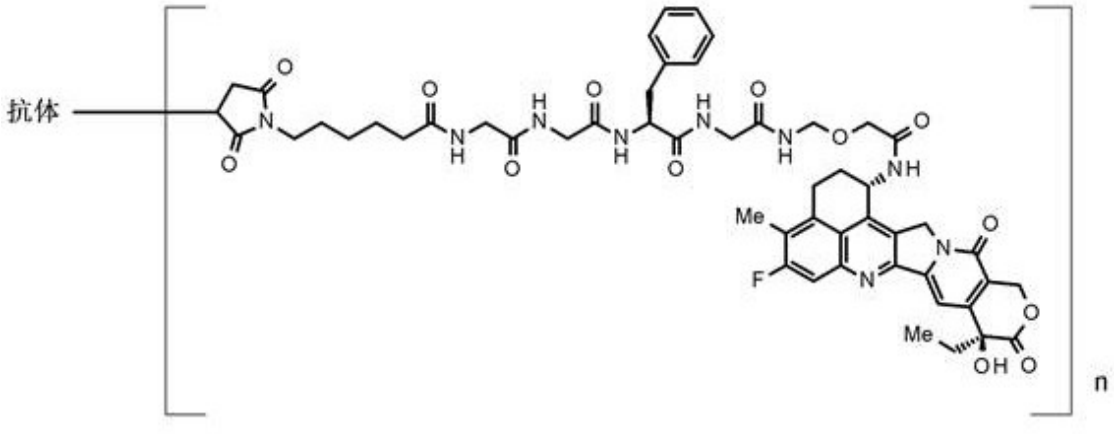
[0349] 

(2)

[0350] 并且是具有抗肿瘤作用的喜树碱衍生物。

[0351] 本发明中所用的抗体-药物缀合物也可以由式(16)表示：

[0352] [化51]

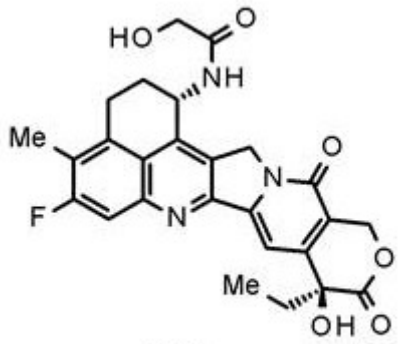
[0353] 

(16)

[0354] 其中所述药物-接头经由硫醚键与抗体缀合。n的含义与所谓的缀合药物分子平均数(DAR;药物与抗体的比率)相同,并且表示每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数。

[0355] 迁移到癌细胞中后,用于本发明的抗体-药物缀合物释放出式(18)表示的化合物：

[0356] [化52]

[0357] 

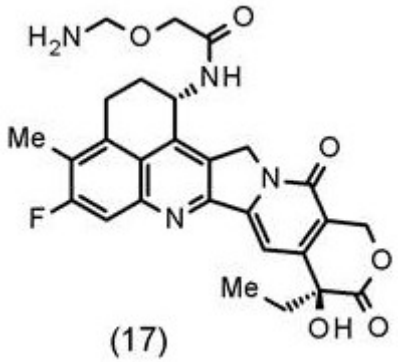
(18)

[0358] 并由此发挥抗肿瘤作用。

[0359] 推断式(18)表示的化合物是通过本发明制备的抗体-药物缀合物的抗肿瘤活性的原始来源,并且已经证实具有拓扑异构酶I抑制作用(Ogitani Y.等人, Clinical Cancer Research, 2016, Oct 15; 22(20):5097-5108, Epub 2016 Mar 29)。

[0360] 推断式(18)表示的化合物是通过分解式(17)表示的化合物的缩醛胺结构而形成的：

[0361] [化53]

[0362] 

(17)

[0363] 推断式(17)表示的化合物是通过在本发明制备的抗体-药物缀合物的接头部分处裂解而形成的。

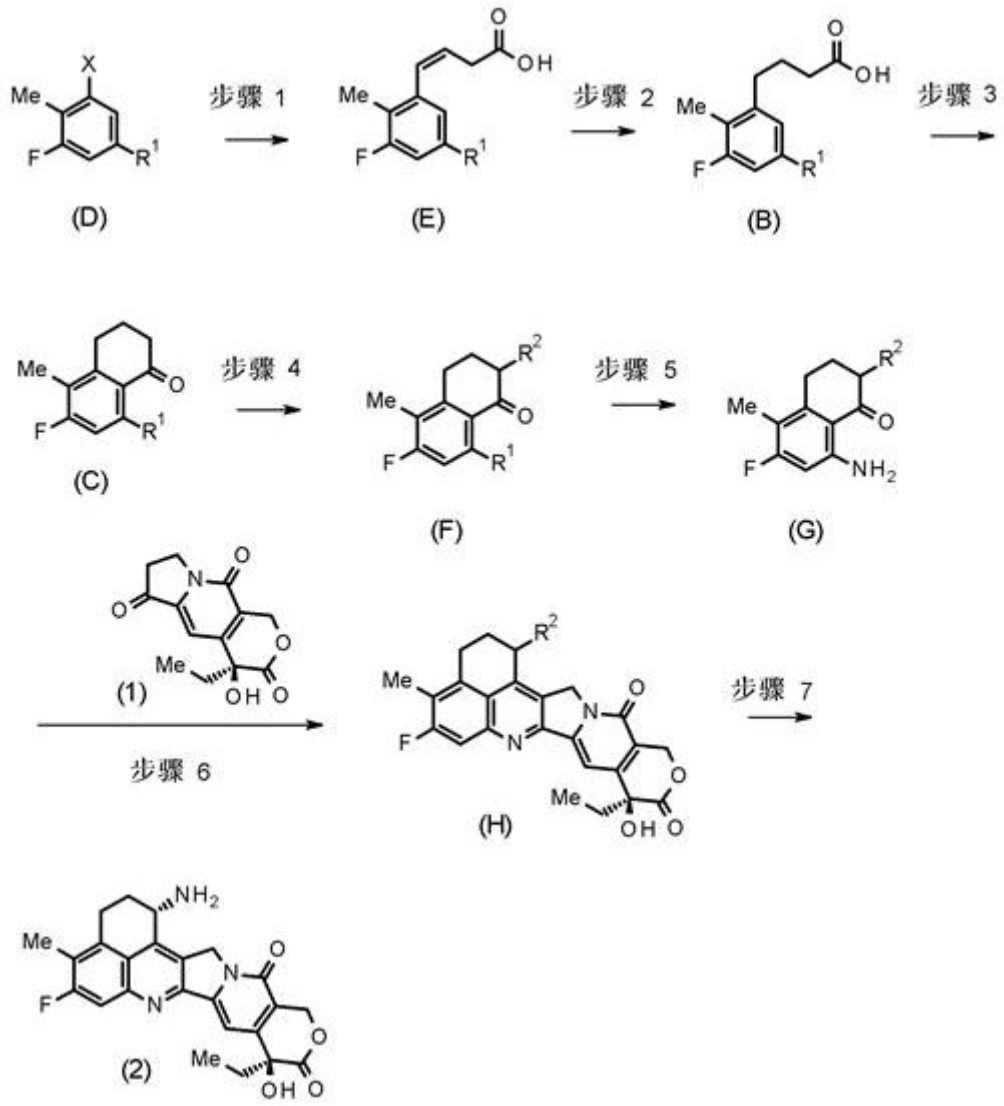
[0364] 已知通过本发明制备的抗体-药物缀合物具有旁观者效应(Ogitani Y.等人,Cancer Science (2016) 107, 1039-1046)。

[0365] 通过以下过程发挥旁观者效应:其中本发明制备的抗体-药物缀合物在表达靶标的癌细胞中内化,然后释放的式(18)表示的化合物也对附近存在的而未表达靶标的癌细胞发挥抗肿瘤作用。

[0366] [依喜替康的制备]

[0367] 根据本发明的依喜替康的制备可通过以下方法进行:

[0368] [化54]

[0369] 

[0370] 在该方案中,X表示离去基团,优选表示溴基、碘基、三氟甲磺酰氧基或芳基磺酰氧基,更优选表示溴基或碘基,并且甚至更优选表示溴基;R^1表示被保护基团保护的氨基,优选表示被乙酰基、甲氧基乙酰基、三氟乙酰基、三氯乙酰基、新戊酰基、甲酰基或苯甲酰基保护的氨基,更优选表示被乙酰基或三氟乙酰基保护的氨基,并且甚至更优选表示被乙酰基保护的氨基;且R^2表示被保护的氨基,优选表示被乙酰基、甲氧基乙酰基、三氟乙酰基、三氯乙酰基、新戊酰基、甲酰基或苯甲酰基保护的氨基,更优选表示被乙酰基或三氟乙酰基保护的氨基,并且甚至更优选表示被乙酰基保护的氨基。

[0371] 步骤1:

[0372] 该步骤是使式(D)表示的化合物与3-丁烯酸偶联以将该化合物转化为式(E)表示的化合物的步骤。式(D)表示的化合物可以参照已知方法来制备。该步骤中使用的3-丁烯酸的量没有限制,只要反应进行即可,并且基于式(D)表示的化合物,优选为1-1.5当量。

[0373] 偶联反应可以在过渡金属催化剂的存在下,优选在钯催化剂的存在下进行。该步骤中使用的钯催化剂没有特别限制,只要反应进行即可,并且例如可以使用二价钯盐如乙酸钯(II)、三氟乙酸钯(II)、氯化钯(II)、溴化钯(II)、碘化钯(II)和双(三苯基膦)二氯化钯(II)、它们的配合物,零价钯金属如钯黑、钯炭、四三苯基膦钯(0)、双(二亚苄基丙酮)钯

(0)、以及它们的配合物,并且可优选使用乙酸钯(II)。该步骤中使用的钯催化剂的量没有限制,只要反应进行即可,并且基于式(D)表示的化合物,优选为0.003-0.03当量。

[0374] 此外,在该步骤中,除了上述钯催化剂之外,可优选使用在反应体系中形成钯配合物的配体。可用于该步骤的配体的实例包括三苯基膦、三(邻甲苯基)膦、三(3-甲氧基苯基)膦、三(4-氯苯基)膦、三(2-呋喃基)膦、三(2-噻吩基)膦、1,2-双(二苯基膦基)乙烷和Buchwald配体(例如2-二环己基膦基-2',6'-二甲氧基联苯(SPhos)和2-二环己基膦基-2',4',6'-三异丙基联苯 (XPhos)),并且可优选使用三(邻甲苯基)膦。该步骤中使用的配体的量没有限制,只要反应进行即可,并且基于式(D)表示的化合物,优选为0.006-0.06当量。

[0375] 该步骤可以在碱的存在下适当地进行。本步骤中使用的碱没有特别限制,只要反应进行即可,并且实例包括有机碱,例如三乙胺、三丁胺、二异丙基乙胺、N-甲基吗啉、N-甲基吡咯烷、N-甲基哌啶、吡啶、2-甲基吡啶、2,6-二甲基吡啶、4-二甲基氨基吡啶、1,4-二氮杂双环[2.2.2]辛烷、1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯和1,5-二氮杂双环[4.3.0]十一碳-7-烯,以及无机碱,例如碳酸钾、氢氧化钾、碳酸氢钾、碳酸钠、氢氧化钠、碳酸氢钠、乙酸钠、乙酸钾、甲醇钠、乙醇钠和叔丁醇钾;优选包括三乙胺、三丁胺、二异丙基乙胺、碳酸钾、氢氧化钾、碳酸氢钾、碳酸钠、氢氧化钠、碳酸氢钠、乙酸钠和乙酸钾;并且更优选包括二异丙基乙胺。该步骤中使用的碱的量没有限制,只要反应进行即可,并且基于式(D)表示的化合物,优选为2-3当量。

[0376] 该步骤中使用的溶剂没有特别限制,只要其不抑制反应即可,并且例如可以使用乙腈、二氯甲烷、氯仿、甲醇、乙醇、乙醚、1,2-二甲氧基乙烷、四氢呋喃、2-甲基四氢呋喃、1,4-二氧杂环己烷、乙酸乙酯、己烷、戊烷、庚烷、环己烷、乙基环己烷、苯、甲苯、氯苯、丙酮、2-丁酮、N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、1-甲基-2-吡咯烷酮、二甲基亚砜和水及其混合溶剂,优选四氢呋喃。

[0377] 该步骤的反应温度没有限制,只要反应进行即可,并且优选为45-85℃,并且更优选为使四氢呋喃热回流的温度。该步骤的反应时间没有限制,只要反应进行即可,并且优选为2.5-10小时。

[0378] 式(E)表示的化合物优选可通过进行以下步骤来纯化:将式(E)表示的化合物溶解在碱性水溶液中以用第一有机溶剂洗涤式(E)表示的化合物并分离溶剂,然后将酸加入到碱性水溶液中以用第二有机溶剂萃取式(E)表示的化合物并分离溶剂。第一有机溶剂优选为2-甲基四氢呋喃。第二有机溶剂优选为2-甲基四氢呋喃。碱性水溶液优选是氢氧化钠水溶液。

[0379] 式(E)表示的化合物的E和Z形式以几何异构体形式存在,并且两者都包括在式(E)表示的化合物内,因此也包括在本发明的范围内。本发明的式(E)表示的化合物可以是E和Z形式的混合物,并且该混合物可以直接用于下一步。

[0380] 在该步骤中,也可以使用3-丁烯酸酯代替3-丁烯酸。在这种情况下,可以水解通过使式(D)表示的化合物与3-丁烯酸酯偶联而获得的产物,以将该化合物转化为式(E)表示的化合物。

[0381] 步骤2:

[0382] 该步骤是还原式(E)表示的化合物以将该化合物转化为式(B)表示的化合物的步骤。

[0383] 该步骤中的还原没有限制,只要反应进行即可,并且可优选在氢气气氛下(优选在0.05-0.6 MPa的氢气流中)使用钯催化剂、铂催化剂、镍催化剂、钌催化剂或铑催化剂进行,更优选可使用钯催化剂进行,甚至更优选可使用钯炭进行,并且仍更优选可使用5%钯炭进行。该步骤中使用的5%钯炭的量没有限制,只要反应进行即可,并且基于步骤1中使用的式(D)表示的化合物,优选为5-80重量%。

[0384] 该步骤中使用的溶剂没有特别限制,只要其不抑制反应即可,并且实例包括乙腈、二氯甲烷、氯仿、甲醇、乙醇、乙醚、1,2-二甲氧基乙烷、四氢呋喃、2-甲基四氢呋喃、1,4-二氧杂环己烷、乙酸乙酯、己烷、戊烷、庚烷、环己烷、乙基环己烷、苯、甲苯、氯苯、丙酮、2-丁酮、N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、1-甲基-2-吡咯烷酮、二甲基亚砜和水及其混合溶剂,并且优选2-甲基四氢呋喃。

[0385] 该步骤的反应温度没有限制,只要反应进行即可,并且优选为20-60℃。该步骤的反应时间没有限制,只要反应进行即可,并且优选为0.5-2小时。

[0386] 步骤3:

[0387] 该步骤是使式(B)表示的化合物进行分子内环化以将该化合物转化为式(C)表示的化合物的步骤。分子内环化可优选通过分子内Friedel-Crafts酰化反应进行。关于该步骤中的分子内Friedel-Crafts酰化反应,对于方法没有限制,只要反应进行即可,并且优选的实例包括涉及三氟乙酸酐的方法和涉及亚硫酰氯、硫酰氯、草酰氯、三氯氧磷、三氯化磷或五氯化磷的方法,更优选涉及三氟乙酸酐或亚硫酰氯的方法,并且甚至更优选涉及三氟乙酸酐的方法。该步骤中使用的三氟乙酸酐的量没有限制,只要反应进行即可,并且基于式(B)表示的化合物,优选为1至3当量。该步骤中使用的亚硫酰氯的量没有限制,只要反应进行即可,并且基于式(B)表示的化合物,优选为1至3当量。

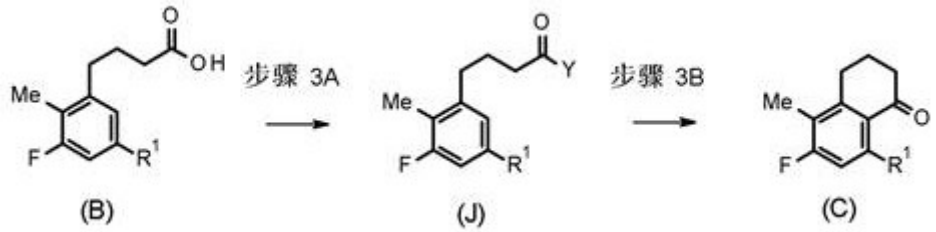
[0388] 在涉及三氟乙酸酐的方法的情况下,该步骤优选在酸的存在下进行,并且更优选在三氟乙酸的存在下进行。在涉及亚硫酰氯、硫酰氯、草酰氯、三氯氧磷、三氯化磷或五氯化磷的方法的情况下,该步骤优选在氯化铝的存在下进行。该步骤中使用的氯化铝的量没有限制,只要反应进行即可,并且基于式(B)表示的化合物,优选为1-5当量。

[0389] 该步骤中使用的溶剂没有特别限制,只要其不抑制反应即可,并且实例包括二氯甲烷、氯仿、乙醚、1,2-二甲氧基乙烷、己烷、戊烷、庚烷、环己烷、乙基环己烷、苯、甲苯、氯苯及其混合溶剂,并且优选二氯甲烷。在涉及三氟乙酸的方法的情况下,可以优选包括三氟乙酸作为溶剂。

[0390] 该步骤的反应温度没有限制,只要反应进行即可,并且在涉及三氟乙酸酐的方法的情况下,反应温度优选为-10℃至20℃,在涉及亚硫酰氯的方法的情况下,反应温度优选为10℃至40℃。该步骤的反应时间没有限制,只要反应进行即可,并且在涉及三氟乙酸酐的方法的情况下,反应时间优选为2小时至8小时,在涉及亚硫酰氯的方法的情况下,反应时间优选为1小时至4小时。

[0391] 该步骤也可分为以下两个子步骤:

[0392] [化55]

[0393] 

[0394] 在该方案中,Y表示离去基团,优选表示氯基、溴基、碘基、氟基或三氟乙酰氧基,并且更优选表示氯基或三氟乙酰氧基;且R^1表示被保护基团保护的氨基,优选表示被乙酰基、甲氧基乙酰基、三氟乙酰基、三氯乙酰基、新戊酰基、甲酰基或苯甲酰基保护的氨基,更优选表示被乙酰基或三氟乙酰基保护的氨基,并且甚至更优选表示被乙酰基保护的氨基。

[0395] 步骤3A是将式(B)表示的化合物转化为式(J)表示的化合物的步骤。

[0396] 当Y为氯基时,该步骤可优选通过涉及亚硫酰氯、硫酰氯、草酰氯、三氯氧磷、三氯化磷或五氯化磷的方法进行,并且该步骤可更优选通过涉及亚硫酰氯的方法进行。该步骤中使用的亚硫酰氯的量没有限制,只要反应进行即可,并且基于式(B)表示的化合物,优选为1至3当量。当Y为三氟乙酰氧基时,该步骤可优选通过涉及三氟乙酸酐的方法进行。该步骤中使用的三氟乙酸酐的量没有限制,只要反应进行即可,并且基于式(B)表示的化合物,优选为1至3当量。该步骤中使用的溶剂没有特别限制,只要其不抑制反应即可,并且实例包括二氯甲烷、氯仿、乙醚、1,2-二甲氧基乙烷、己烷、戊烷、庚烷、环己烷、乙基环己烷、苯、甲苯、氯苯、三氟乙酸及其混合溶剂,在涉及亚硫酰氯的方法的情况下优选为二氯甲烷,并且在涉及三氟乙酸酐的方法的情况下优选为三氟乙酸。

[0397] 步骤3B是将式(J)表示的化合物转化为式(C)表示的化合物的步骤。在涉及亚硫酰氯的方法的情况下,该步骤可以优选在氯化铝的存在下进行。该步骤中使用的氯化铝的量没有限制,只要反应进行即可,并且基于式(B)表示的化合物,优选为1至5当量。在涉及三氟乙酸酐的方法的情况下,该步骤可以优选在酸的存在下进行,并且该步骤可以更优选在三氟乙酸的存在下进行。

[0398] 步骤3A和步骤3B的反应温度没有限制,只要反应进行即可,并且在涉及亚硫酰氯的方法的情况下,反应温度优选为10℃-40℃,在涉及三氟乙酸酐的方法的情况下,反应温度优选为-10℃至20℃。步骤3A和步骤3B的总反应时间没有限制,只要反应进行即可,并且在涉及亚硫酰氯的方法的情况下,总反应时间优选为1小时至4小时,在涉及三氟乙酸酐的方法的情况下,总反应时间优选为2小时至8小时。

[0399] 步骤4:

[0400] 步骤4是将式(C)表示的化合物转化为式(F)表示的化合物的步骤。该步骤可优选通过以下子步骤进行:(i)亚硝化(或肟化)羰基的α-位,(ii)将保护基团引入衍生自亚硝基(或肟基)的氮原子,以及(iii)还原。子步骤(ii)和(iii)可以相反的顺序进行,或者可以同时进行。

[0401] 子步骤(i)中使用的亚硝化剂(或肟化剂)没有特别限制,只要可以将式(C)表示的化合物的羰基的α-位进行亚硝化(或肟化)即可,并且可以优选使用亚硝酸酯,可以更优选使用亚硝酸戊酯、亚硝酸正丁酯和亚硝酸叔丁酯,并且甚至更优选使用亚硝酸戊酯。子步骤(i)中使用的亚硝酸戊酯的量没有限制,只要反应进行即可,并且基于式(C)表示的化合物,

优选为1-1.6当量。

[0402] 优选在子步骤(i)中使用碱。子步骤(i)中使用的碱没有特别限制,只要其适用于式(C)表示的化合物的羰基的α-位的亚硝化(或肟化)即可,并且可以优选使用叔丁醇钾。子步骤(i)中使用的叔丁醇钾的量没有限制,只要反应进行即可,并且基于式(C)表示的化合物,优选为1至1.5当量。

[0403] 子步骤(i)中使用的溶剂没有特别限制,只要其不抑制反应即可,并且实例包括乙醚、1,2-二甲氧基乙烷、四氢呋喃、2-甲基四氢呋喃、1,4-二氧杂环己烷、己烷、戊烷、庚烷、环己烷、乙基环己烷、苯、甲苯、氯苯、二甲基亚砜及其混合溶剂,并且优选四氢呋喃。

[0404] 子步骤(i)的反应温度没有限制,只要反应进行即可,并且优选为-10至20℃。该子步骤的反应时间没有限制,只要反应进行即可,并且优选为1.5至30小时。

[0405] 子步骤(ii)的反应条件可以根据氨基R^2的保护基团的种类适当设定。当R^2是被乙酰基保护的氨基时,在子步骤(ii)中可优选使用乙酸中的乙酸酐。

[0406] 子步骤(iii)可以在氢气气氛下(优选在0.15至1.2MPa的氢气流中)使用例如铂炭催化剂或锌粉进行,可以优选使用铂炭催化剂进行,并且可以更优选使用2%或5%的铂炭催化剂进行。所述2%或5%的铂炭催化剂的量没有限制,只要反应进行即可,并且基于式(C)表示的化合物,优选为5-60重量%。在子步骤(iii)中,可以使用在子步骤(ii)中使用的溶剂。

[0407] 子步骤(ii)和(iii)的反应温度没有限制,只要反应进行即可,并且优选为0至40℃。子步骤(ii)和(iii)的总反应时间没有限制,只要反应进行即可,并且优选为2至8小时。

[0408] 步骤5:

[0409] 该步骤是将式(F)表示的化合物的芳族氨基的保护基选择性地脱保护以将该化合物转化为式(G)表示的化合物的步骤。该步骤的反应条件可以根据氨基R^1和R^2的保护基团的种类适当设定。当R^1和R^2为被乙酰基保护的氨基时,该步骤可以优选使用盐酸进行,并且可以更优选使用2N盐酸/乙醇进行。

[0410] 该步骤的反应温度没有限制,只要反应进行即可,并且优选为40至60℃。该步骤的反应时间没有限制,只要反应进行即可,并且优选为2至14小时。

[0411] 步骤6:

[0412] 该步骤是使式(G)表示的化合物与式(1)表示的化合物缩合以将该化合物转化为式(H)表示的化合物的步骤。式(1)表示的化合物可以参照美国专利第4778891号等中的描述来制备,或者可以使用可商购的化合物。用于该步骤的式(1)表示的化合物的量没有限制,只要反应进行即可,并且基于式(G)表示的化合物,优选为0.8至1.2当量。

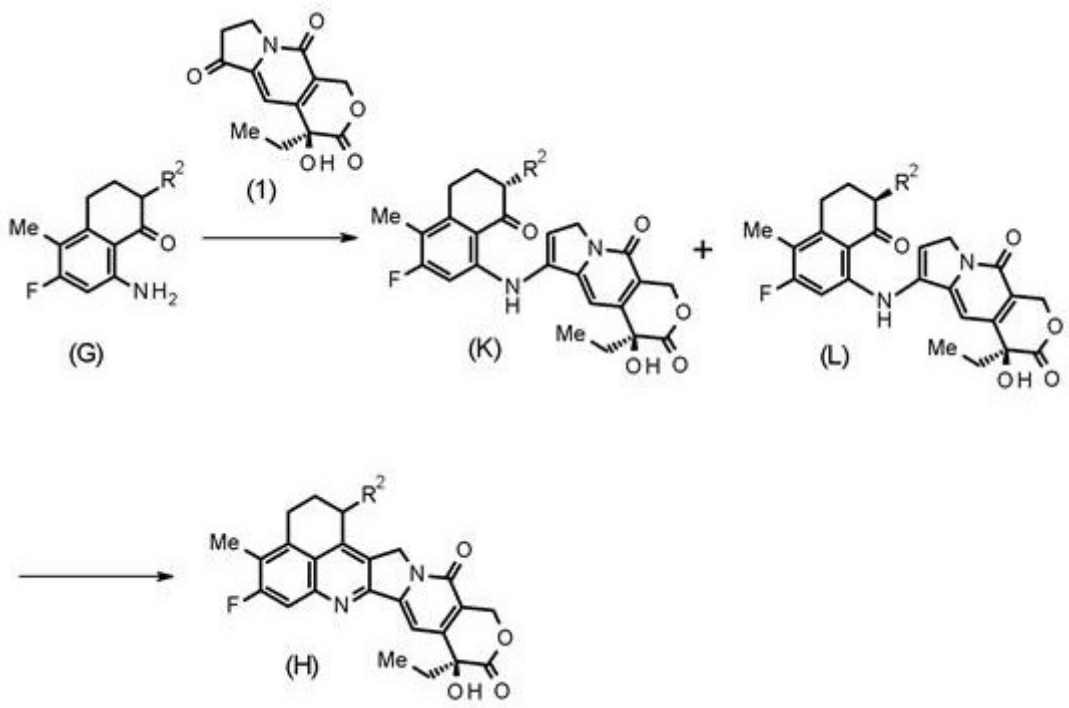
[0413] 该步骤在酸催化剂的存在下进行。在该步骤中使用的酸催化剂的优选实例可以是对甲苯磺酸吡啶鎓。该步骤中使用的酸催化剂的量没有限制,只要反应进行即可,并且基于式(G)表示的化合物,优选为0.03-0.3当量。

[0414] 该步骤优选在含有甲酚或苯酚的溶剂中进行,并且更优选在含有邻甲酚的甲苯中进行。由于邻甲酚或苯酚的存在,式(H)表示的化合物以改善的方式沉淀,并且可以观察到效果如改善的收率和缩短的反应时间。

[0415] 该步骤的反应温度没有限制,只要反应进行即可,并且优选为90-130℃,更优选为使甲苯热回流的温度。该步骤的反应时间没有限制,只要反应进行即可,并且优选为16-64小时。

[0416] 认为该步骤通过式(K)表示的化合物和式(L)表示的化合物作为反应中间体进行。

[0417] [化56]

[0418] 

[0419] 步骤7:

[0420] 该步骤是将式(H)表示的化合物转化为式(2)表示的化合物的步骤。式(2)表示的化合物可以是盐或甚至是水合物,并且两者均包含在本发明的“式(2)表示的化合物”的范围内。

[0421] 该步骤可以优选在酸的存在下进行,并且更优选在甲磺酸和水的存在下进行。

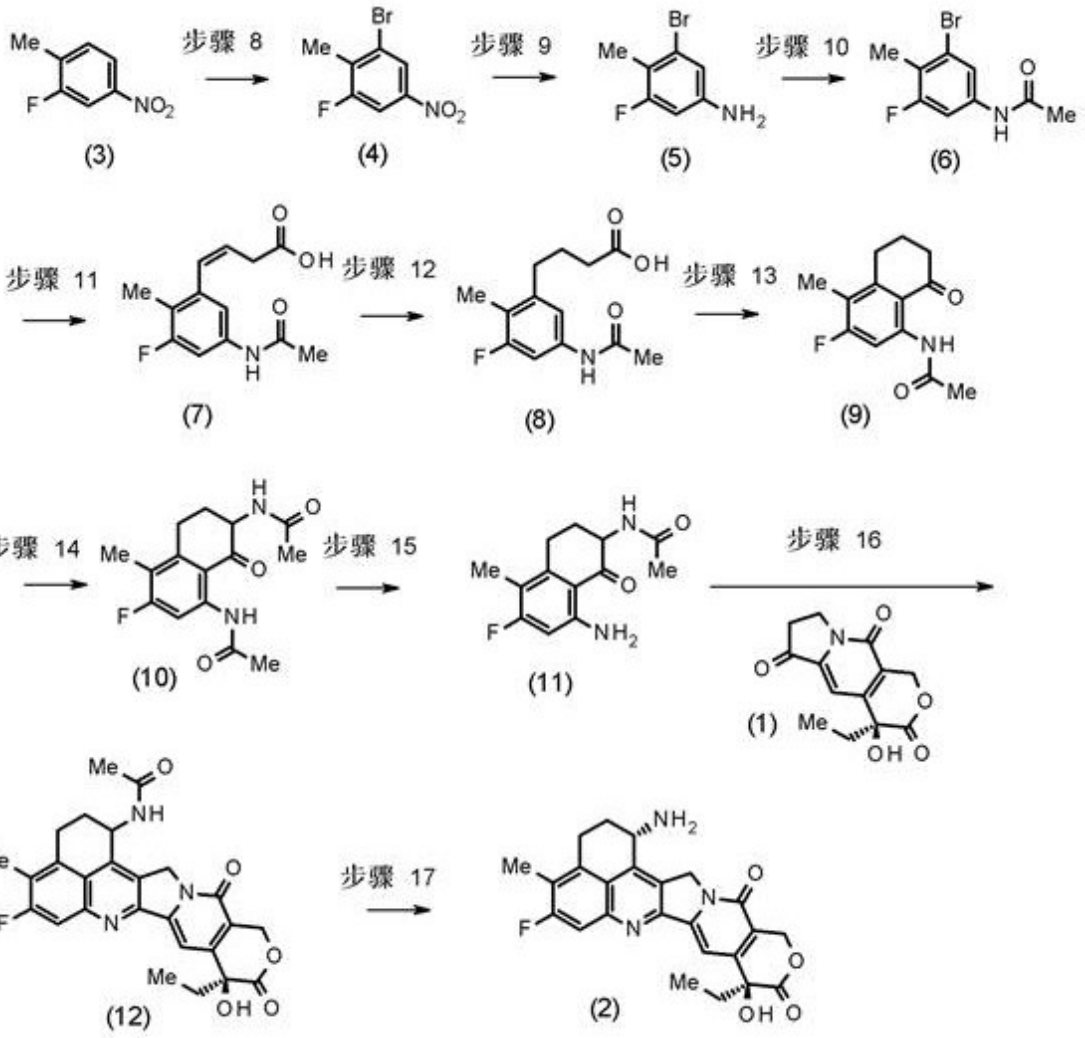
[0422] 该步骤中使用的溶剂没有特别限制,只要其不抑制反应即可,可以优选使用含有2-甲氧基乙醇和乙基环己烷的溶剂,此外,在包括上述酸为溶剂的情况下,可以更优选使用甲磺酸、水、2-甲氧基乙醇和乙基环己烷的混合溶剂。

[0423] 该步骤没有限制,只要反应进行即可,并且可优选在80-160℃下进行,可更优选在使甲磺酸、水、2-甲氧基乙醇和乙基环己烷的混合溶剂热回流的温度下进行。该步骤的反应时间没有限制,只要反应进行即可,并且优选为4-16小时。

[0424] 式(2)表示的化合物可以优选以甲磺酸盐的形式获得,可以更优选以其中m为0至3的甲磺酸m-水合物的形式获得,可以甚至更优选以甲磺酸盐无水物、甲磺酸盐一水合物、甲磺酸盐二水合物或甲磺酸盐三水合物的形式获得,并且可以仍更优选以甲磺酸二水合物的形式获得,它们中的任何一种均可用于本发明的制备方法。水合物中水分子的数量可以通过调节获得和干燥晶体时可得的湿度来控制。

[0425] 式(2)表示的化合物可以更优选地根据以下方法制备。

[0426] [化57]



[0427]

[0428] 步骤8:

[0429] 该步骤是溴化式(3)表示的化合物以将该化合物转化为式(4)表示的化合物的步骤。作为式(3)表示的化合物,可以使用通过已知方法制备的化合物或可商购的化合物。

[0430] 该步骤中使用的溴化剂没有限制,只要反应进行即可,并且实例包括溴和N-溴代琥珀酰亚胺,优选N-溴代琥珀酰亚胺。该步骤中使用的N-溴代琥珀酰亚胺的量没有限制,只要反应进行即可,并且基于式(3)表示的化合物,优选为1-1.5当量。该步骤可以优选在硫酸和其他溶剂的混合溶剂中进行。

[0431] 其他溶剂没有特别限制,只要其不抑制反应即可,并且实例包括二氯甲烷、氯仿、乙醚、1,2-二甲氧基乙烷、己烷、戊烷、庚烷、环己烷、乙基环己烷、苯、甲苯、氯苯及其混合溶剂,优选庚烷。

[0432] 该步骤的反应温度没有限制,只要反应进行即可,并且优选为50-70℃。该步骤的反应时间没有限制,只要反应进行即可,并且优选为0.5-2小时。

[0433] 步骤9:

[0434] 该步骤是将式(4)表示的化合物的硝基还原成氨基以将该化合物转化为式(5)表示的化合物的步骤。该步骤中使用的还原剂没有限制,只要其不允许进行脱溴作用并且能够选择性地仅还原硝基即可,优选可以在氢存在下(优选在0.05-0.2MPa的氢气流中)使用

铂炭催化剂,更优选可以使用1%的铂炭催化剂。该步骤中使用的铂炭催化剂的量没有限制,只要反应进行即可,并且基于步骤8中使用的式(3)表示的化合物,优选为5至40重量%。该步骤中使用的溶剂没有特别限制,只要其不抑制反应即可,并且实例包括甲醇、乙醇、1,2-二甲氧基乙烷、四氢呋喃、2-甲基四氢呋喃、1,4-二氧杂环己烷、乙酸乙酯和水及其混合溶剂,优选乙酸乙酯。该步骤的反应温度没有限制,只要反应进行即可,并且优选为50-70℃。该步骤的反应时间没有限制,只要反应进行即可,并且优选为2-8小时。

[0435] 步骤10:

[0436] 该步骤是乙酰化式(5)表示的化合物的氨基以将该化合物转化为式(6)表示的化合物的步骤。在该步骤中使用的乙酰化剂的实例包括乙酸酐和乙酰氯,并且优选乙酸酐。该步骤中使用的乙酸酐的量没有限制,只要反应进行即可,并且基于步骤8中使用的式(3)表示的化合物,优选为0.5-1当量。在该步骤中可以优选使用碱。碱没有限制,只要反应进行即可,并且优选为三乙胺。碱的量没有限制,只要反应进行即可,并且基于步骤8中使用的式(3)表示的化合物,优选为0.75至1.5当量。该步骤中使用的溶剂没有特别限制,只要其不抑制反应即可,并且实例包括乙腈、二氯甲烷、氯仿、甲醇、乙醇、乙醚、1,2-二甲氧基乙烷、四氢呋喃、2-甲基四氢呋喃、1,4-二氧杂环己烷、乙酸乙酯、己烷、戊烷、庚烷、环己烷、乙基环己烷、苯、甲苯、氯苯、丙酮、2-丁酮、N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、1-甲基-2-吡咯烷酮、二甲基亚砜和水及其混合溶剂,优选乙酸乙酯。该步骤的反应温度没有限制,只要反应进行即可,并且优选为10至40℃。该步骤的反应时间没有限制,只要反应进行即可,并且优选为3至12小时。

[0437] 步骤11:

[0438] 该步骤是使式(6)表示的化合物与3-丁烯酸偶联以将该化合物转化为式(7)表示的化合物的步骤。可以以与步骤1中所述方法相同的方式进行该步骤。

[0439] 式(7)表示的化合物的E和Z形式以几何异构体形式存在,并且两者都包括在式(7)表示的化合物内,因此包括在本发明的范围内。本发明的式(7)表示的化合物可以是E和Z形式的混合物,并且该混合物可以直接用于下一步。

[0440] 步骤12:

[0441] 该步骤是还原式(7)表示的化合物以将该化合物转化为式(8)表示的化合物的步骤。

[0442] 该步骤中的还原没有限制,只要反应进行即可,并且可以优选在氢气气氛下(优选在0.05-0.2MPa的氢气流中)使用钯催化剂、铂催化剂、镍催化剂、钌催化剂或铑催化剂进行,可更优选使用钯催化剂进行,可甚至更优选使用钯炭进行,并且可仍更优选使用5%钯炭。该步骤中使用的5%钯炭的量没有限制,只要反应进行即可,并且基于步骤11中使用的式(7)表示的化合物,优选为5-40重量%。

[0443] 该步骤中所用的溶剂没有特别限制,只要其不抑制反应即可,并且实例包括乙腈、二氯甲烷、氯仿、甲醇、乙醇、乙醚、1,2-二甲氧基乙烷、四氢呋喃、2-甲基四氢呋喃、1,4-二氧杂环己烷、乙酸乙酯、己烷、戊烷、庚烷、环己烷、乙基环己烷、苯、甲苯、氯苯、丙酮、2-丁酮、N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、1-甲基-2-吡咯烷酮、二甲基亚砜和水及其混合溶剂,优选2-甲基四氢呋喃。

[0444] 该步骤的反应温度没有限制,只要反应进行即可,并且优选为20至60℃。该步骤的

反应时间没有限制,只要反应进行即可,并且优选为0.5-2小时。

[0445] 步骤13:

[0446] 该步骤是使式(8)表示的化合物进行分子内环化以将该化合物转化为式(9)表示的化合物的步骤。可以以与步骤3中所述方法相同的方式进行该步骤。

[0447] 步骤14:

[0448] 该步骤是将式(9)表示的化合物转化为式(10)表示的化合物的步骤。可以以与步骤4中所述方法相同的方式进行该步骤。

[0449] 步骤15:

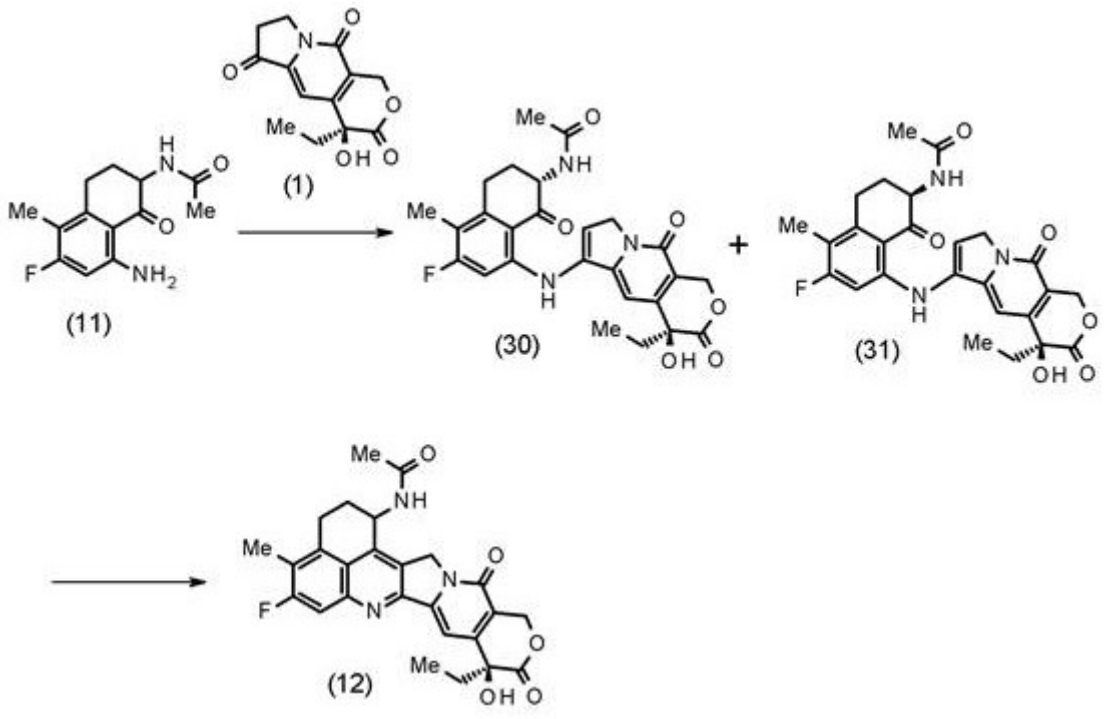
[0450] 该步骤是将式(10)表示的化合物的芳族氨基的保护基团选择性地脱保护以将该化合物转化为式(11)表示的化合物的步骤。可以以与步骤5中所述方法相同的方式进行该步骤。

[0451] 步骤16:

[0452] 该步骤是使式(11)表示的化合物与式(1)表示的化合物缩合以将该化合物转化为式(12)表示的化合物的步骤。可以以与步骤6中所述方法相同的方式进行该步骤。

[0453] 认为该步骤通过式(30)表示的化合物和/或式(31)表示的化合物作为反应中间体进行。

[0454] [化58]

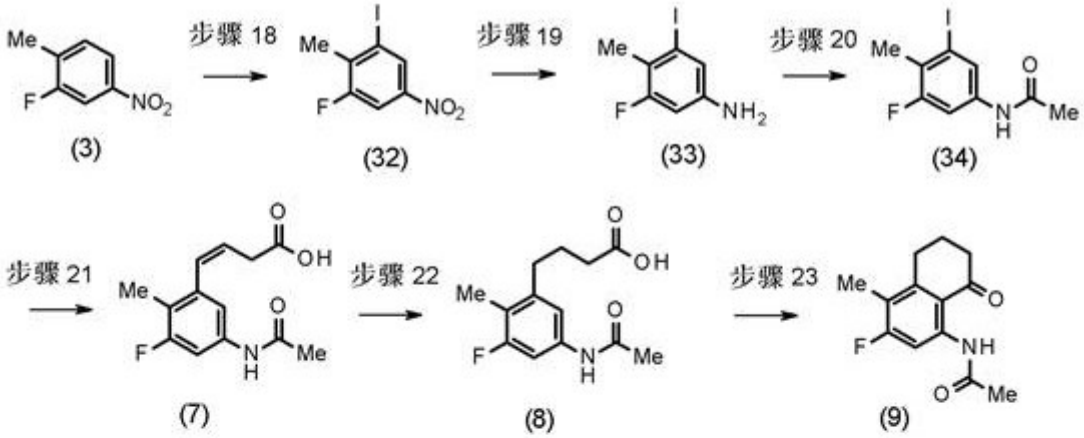
[0455] 

[0456] 步骤17:

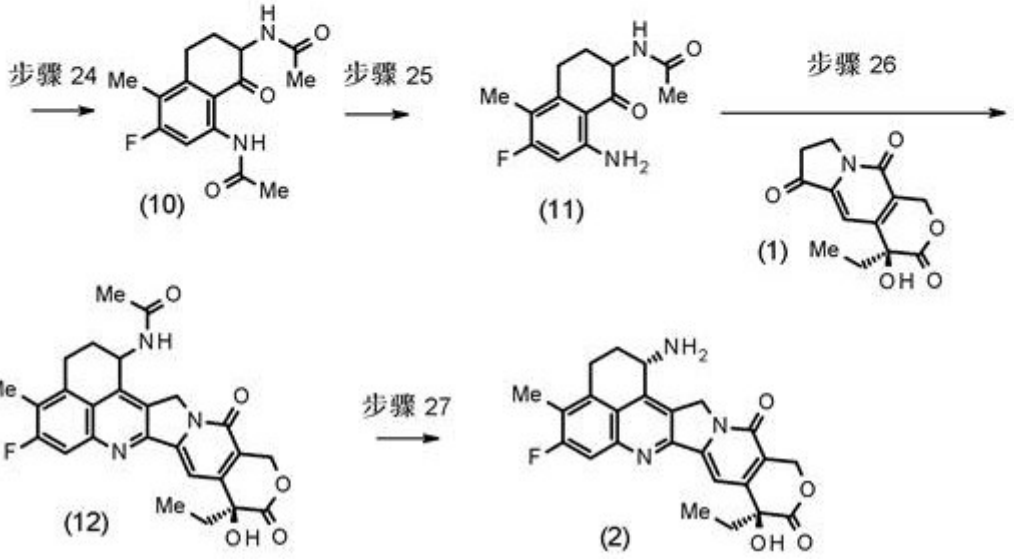
[0457] 该步骤是将式(12)表示的化合物转化为式(2)表示的化合物的步骤。可以以与步骤7中描述的方法相同的方式进行该步骤。

[0458] 式(2)表示的化合物也可根据以下方法制备。

[0459] [化59]



[0460]



[0461] 步骤18:

[0462] 该步骤是碘化式(3)表示的化合物以将该化合物转化为式(32)表示的化合物的步骤。作为式(3)表示的化合物,可以使用通过已知方法制备的化合物或可商购的化合物。

[0463] 该步骤中使用的碘化剂没有限制,只要反应进行即可,并且实例包括碘和N-碘代琥珀酰亚胺,优选N-碘代琥珀酰亚胺。该步骤中使用的N-碘代琥珀酰亚胺的量没有限制,只要反应进行即可,并且基于式(3)表示的化合物,优选为1-2当量。该步骤可以优选在硫酸和其他溶剂的混合溶剂中进行。

[0464] 其他溶剂没有特别限制,只要其不抑制反应即可,并且实例包括二氯甲烷、氯仿、乙醚、1,2-二甲氧基乙烷、己烷、戊烷、庚烷、环己烷、乙基环己烷、苯、甲苯、氯苯及其混合溶剂,优选庚烷。

[0465] 该步骤的反应温度没有限制,只要反应进行即可,并且优选为-10至10℃。该步骤的反应时间没有限制,只要反应进行即可,并且优选为1-4小时。

[0466] 步骤19:

[0467] 该步骤是将式(32)表示的化合物的硝基还原为氨基以将该化合物转化为式(33)表示的化合物的步骤。该步骤中使用的还原剂没有限制,只要其不允许进行脱碘化并且能够选择性地仅还原硝基即可,并且可优选在氢存在下(优选在0.05至0.2MPa的氢气流中)使用铂炭催化剂。该步骤中使用的铂炭催化剂的量没有限制,只要反应进行即可,并且基于步

骤18中使用的式(3)表示的化合物,优选为5-40重量%。该步骤中使用的溶剂没有特别限制,只要其不抑制反应即可,并且实例包括甲醇、乙醇、1,2-二甲氧基乙烷、四氢呋喃、2-甲基四氢呋喃、1,4-二氧杂环己烷、乙酸乙酯和水及其混合溶剂,优选乙酸乙酯。该步骤的反应温度没有限制,只要反应进行即可,并且优选为50-70℃。该步骤的反应时间没有限制,只要反应进行即可,并且优选为2-8小时。

[0468] 步骤20:

[0469] 该步骤是乙酰化式(33)表示的化合物的氨基以将该化合物转化为式(34)表示的化合物的步骤。在该步骤中使用的乙酰化剂的实例包括乙酸酐和乙酰氯,并且优选乙酸酐。该步骤中使用的乙酸酐的量没有限制,只要反应进行即可,并且基于步骤18中使用的式(3)表示的化合物,优选为0.5至1当量。在该步骤中可以优选使用碱。碱没有限制,只要反应进行即可,并且优选为三乙胺。碱的量没有限制,只要反应进行即可,并且基于步骤18中使用的式(3)表示的化合物,优选为0.75至1.5当量。该步骤中使用的溶剂没有特别限制,只要其不抑制反应即可,并且实例包括乙腈、二氯甲烷、氯仿、甲醇、乙醇、乙醚、1,2-二甲氧基乙烷、四氢呋喃、2-甲基四氢呋喃、1,4-二氧杂环己烷、乙酸乙酯、己烷、戊烷、庚烷、环己烷、乙基环己烷、苯、甲苯、氯苯、丙酮、2-丁酮、N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、1-甲基-2-吡咯烷酮、二甲基亚砜和水及其混合溶剂,优选乙酸乙酯。该步骤的反应温度没有限制,只要反应进行即可,并且优选为10至40℃。该步骤的反应时间没有限制,只要反应进行即可,并且优选为3至12小时。

[0470] 步骤21:

[0471] 该步骤是使式(34)表示的化合物与3-丁烯酸偶联以将该化合物转化为式(7)表示的化合物的步骤。可以以与步骤1中所述方法相同的方式进行该步骤。

[0472] 步骤22:

[0473] 该步骤是还原式(7)表示的化合物以将该化合物转化为式(8)表示的化合物的步骤。

[0474] 该步骤可以以与步骤12相同的方式进行,但是由于残留碘离子可能损害催化剂的活性,因此该步骤优选使用比步骤12中的那些更大量的催化剂和更高的氢压进行。

[0475] 该步骤中的还原没有限制,只要反应进行即可,并且可以优选在氢气气氛下(优选在0.15-0.6MPa的氢气流中)使用钯催化剂、铂催化剂、镍催化剂、钌催化剂或铑催化剂进行,可更优选使用钯催化剂进行,可甚至更优选使用钯炭进行,并且可仍更优选使用5%钯炭。该步骤中使用的5%钯炭的量没有限制,只要反应进行即可,并且基于步骤21中使用的式(34)表示的化合物,优选为20-160重量%。

[0476] 该步骤中使用的溶剂没有特别限制,只要其不抑制反应即可,并且实例包括乙腈、二氯甲烷、氯仿、甲醇、乙醇、乙醚、1,2-二甲氧基乙烷、四氢呋喃、2-甲基四氢呋喃、1,4-二氧杂环己烷、乙酸乙酯、己烷、戊烷、庚烷、环己烷、乙基环己烷、苯、甲苯、氯苯、丙酮、2-丁酮、N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、1-甲基-2-吡咯烷酮、二甲基亚砜和水及其混合溶剂,优选2-甲基四氢呋喃。

[0477] 该步骤的反应温度没有限制,只要反应进行即可,并且优选为20至60℃。该步骤的反应时间没有限制,只要反应进行即可,并且优选为4-16小时。

[0478] 步骤23:

[0479] 该步骤是使式(8)表示的化合物进行分子内环化以将该化合物转化为式(9)表示的化合物的步骤。可以以与步骤3中所述方法相同的方式进行该步骤。

[0480] 步骤24:

[0481] 该步骤是将式(9)表示的化合物转化为式(10)表示的化合物的步骤。可以以与步骤4中所述方法相同的方式进行该步骤。

[0482] 步骤25:

[0483] 该步骤是将式(10)表示的化合物的芳族氨基的保护基团选择性地脱保护以将该化合物转化为式(11)表示的化合物的步骤。可以以与步骤5中所述方法相同的方式进行该步骤。

[0484] 步骤26:

[0485] 该步骤是使式(11)表示的化合物与式(1)表示的化合物缩合以将该化合物转化为式(12)表示的化合物的步骤。可以以与步骤16中所述方法相同的方式进行该步骤。

[0486] 步骤27:

[0487] 该步骤是将式(12)表示的化合物转化为式(2)表示的化合物的步骤。可以以与步骤7中所述方法相同的方式进行该步骤。

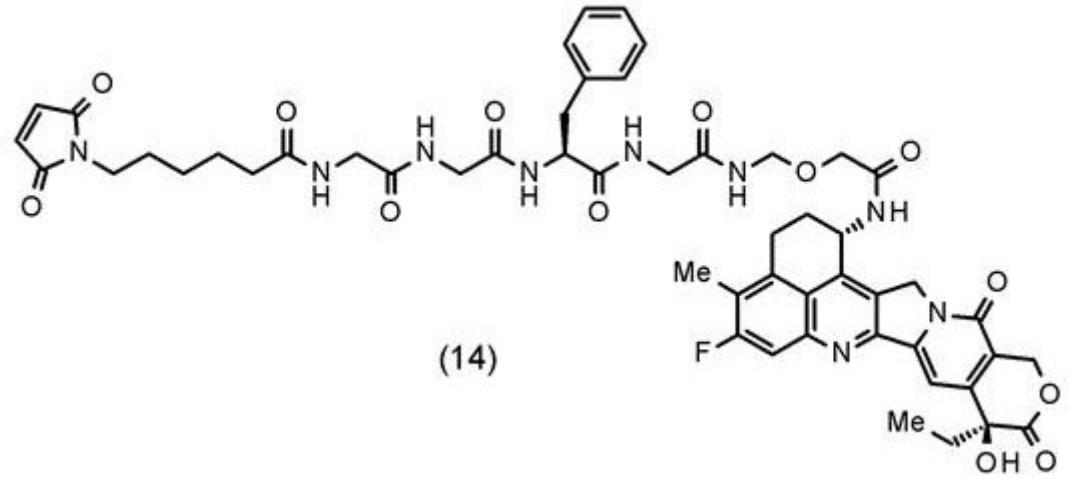
[0488] 在上述各步骤的反应中,反应结束后,可以根据有机化学领域中公知的方法从反应混合物中分离各步骤的目标化合物。可以例如通过以下方式获得目标化合物:(i)必要时过滤掉不溶性物质例如催化剂,(ii)向反应混合物中加入水和与水不混溶的溶剂(例如二氯甲烷、乙醚、乙酸乙酯或2-甲基四氢呋喃)以萃取目标化合物,(iii)用水洗涤有机层,并使用干燥剂如无水硫酸镁干燥有机层,和(iv)蒸馏出溶剂。尽管可以根据需要通过有机化学领域中公知的方法(例如重结晶,再沉淀,硅胶柱色谱法或高效液相色谱法)进一步纯化所得目标化合物,但优选不使用色谱法进行本发明的制备方法。

[0489] 通过本发明的制备方法获得的式(2)表示的化合物可优选用于制备抗体-药物缀合物,其中式(15)表示的药物-接头经由硫醚键与抗体缀合,但不限于此,并且式(2)表示的化合物还可以用于制备具有其他化学结构的抗体-药物缀合物以及用于其他应用。

[0490] [药物-接头中间体的制备]

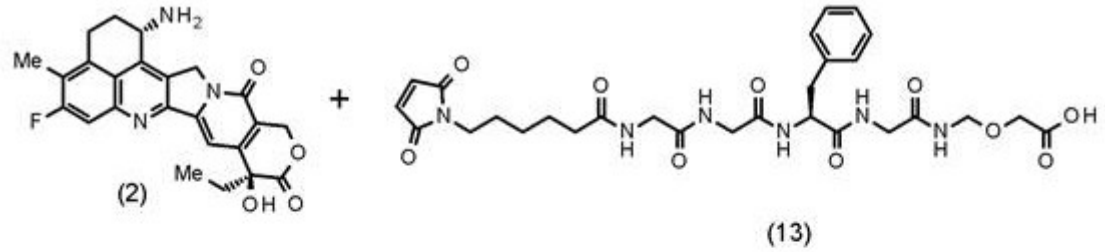
[0491] 优选用于制备本发明的抗体-药物缀合物的药物-接头中间体是式(14)表示的化合物。

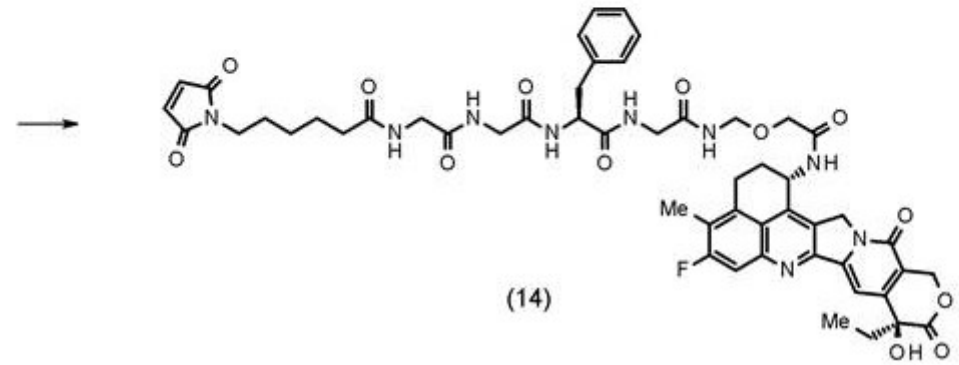
[0492] [化60]

[0493] 

[0494] 式(14)表示的化合物可如下制备。

[0495] [化61]



[0496] 

[0497] 对于式(2)表示的化合物,可以使用通过本发明的制备方法制备的化合物。式(13)表示的化合物可以参考国际公开第WO 2014/057687号、国际公开第WO 2015/098099号、国际公开第WO 2015/115091号和国际公开第WO 2015/155998号中的描述制备。

[0498] 通过将式(13)表示的化合物衍生为活性酯、混合酸酐、酰卤等,并使其优选在碱存在下与式(12)表示的化合物反应,可以进行向式(14)表示的化合物的转化。

[0499] 可以通过例如使式(13)表示的化合物与缩合剂如N,N'-二环已基碳二亚胺(DCC)或1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(WSCD·HCl)和添加剂如1-羟基苯并三唑(HOBt)、1-羟基-7-氮杂苯并三唑(HOAt)、N-羟基琥珀酰亚胺或对硝基苯酚反应来制备活性酯。活性酯也可以通过使式(13)表示的化合物与缩合剂如O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓六氟磷酸盐五氟苯基三氟乙酸盐(HATU)、O-(苯并三唑-1-基)-N,N,N',

N'-四甲基脲鎓六氟磷酸盐(HBTU)、氰基膦酸二乙酯或4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基吗啉鎓氯化物(DMTMM)反应来制备。

[0500] 根据需要,混合酸酐可以通过例如使式(13)表示的化合物与氯甲酸异丁酯在碱的存在下反应来制备。

[0501] 根据需要,酰卤可以通过在碱的存在下用酰卤如亚硫酰氯或草酰氯处理式(13)表示的化合物来制备。

[0502] 该步骤中使用的碱没有特别限制,只要反应进行即可,并且实例包括有机碱,例如三乙胺、三丁胺、二异丙基乙胺、N-甲基吗啉、N-甲基吡咯烷、N-甲基哌啶、吡啶、2-甲基吡啶、2,6-二甲基吡啶、4-二甲基氨基吡啶、1,4-二氮杂双环[2.2.2]辛烷、1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯和1,5-二氮杂双环[4.3.0]十一碳-7-烯,以及无机碱,例如碳酸钾、氢氧化钾、碳酸氢钾、碳酸钠、氢氧化钠、碳酸氢钠、乙酸钠、乙酸钾、甲醇钠、乙醇钠和叔丁醇钾;优选三乙胺、三丁胺、二异丙基乙胺、碳酸钾、氢氧化钾、碳酸氢钾、碳酸钠、氢氧化钠、碳酸氢钠、乙酸钠和乙酸钾;更优选三乙胺、二异丙基乙胺和N-甲基吗啉。

[0503] 该步骤中使用的溶剂没有特别限制,只要其不抑制反应即可,并且实例包括乙腈、二氯甲烷、氯仿、甲醇、乙醇、乙醚、1,2-二甲氧基乙烷、四氢呋喃、2-甲基四氢呋喃、1,4-二氧杂环己烷、乙酸乙酯、己烷、戊烷、庚烷、环己烷、乙基环己烷、苯、甲苯、氯苯、丙酮、2-丁酮、N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、1-甲基-2-吡咯烷酮、二甲基亚砜和水及其混合溶剂,优选乙腈、二氯甲烷、甲醇、四氢呋喃、1,4-二氧杂环己烷、N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、1-甲基-2-吡咯烷酮、二甲基亚砜和水及其混合溶剂。

[0504] [抗体的制备]

[0505] 用于制备本发明的抗体-药物缀合物的抗体可以衍生自任何物种,并且优选地是衍生自人、大鼠、小鼠或兔子的抗体。在抗体衍生自人类物种以外的物种的情况下,优选使用公知的技术将其嵌合或人源化。本发明的抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体,并且优选为单克隆抗体。

[0506] 用于制备本发明的抗体-药物缀合物的抗体是优选具有能够靶向癌细胞的特征的抗体,并且优选是具有例如识别癌细胞的特性、与癌细胞结合的特性、在癌细胞中内化的特性和/或对癌细胞的杀细胞活性的抗体。

[0507] 抗体对癌细胞的结合活性可以使用流式细胞术确认。可以使用以下方法确认抗体在肿瘤细胞中的内化:(1)使用与治疗性抗体结合的二抗(荧光标记的)在荧光显微镜下可视化掺入细胞中的抗体的测定法(Cell Death and Differentiation (2008) 15, 751-761),(2)使用与治疗性抗体结合的二抗(荧光标记的)测量掺入细胞中的荧光强度的测定法(MolecularBiology of the Cell, Vol. 15, 5268-5282, 2004年12月),或(3)使用与治疗性抗体结合的免疫毒素的Mab-ZAP测定法,其中毒素在掺入细胞后释放以抑制细胞生长(Bio Techniques 28: 162-165, 2000年1月)。作为免疫毒素,可以使用白喉毒素催化结构域和蛋白质G的重组复合蛋白。

[0508] 抗体的抗肿瘤活性可以通过确定对细胞生长的抑制活性来在体外确认。例如,培养过表达该抗体的靶蛋白的癌细胞系,并将该抗体以不同的浓度加入到培养体系中以确定对病灶(focus)形成、集落形成和球状体生长的抑制活性。可以通过例如向具有高表达靶蛋白的移植癌细胞系的裸鼠施用抗体并确定癌细胞的变化来在体内确认抗肿瘤活性。

[0509] 由于在抗体-药物缀合物中缀合的化合物发挥抗肿瘤作用,因此抗体本身应具有抗肿瘤作用是优选但非必要的。为了特异性和选择性地发挥抗肿瘤化合物对癌细胞的细胞毒活性,重要的也是优选的是抗体应具有内在迁移到癌细胞的特性。

[0510] 用于制备本发明的抗体-药物缀合物的抗体可以通过本领域已知的程序获得。例如,可以使用本领域通常进行的方法获得本发明的抗体,该方法涉及用抗原性多肽免疫动物并收集和纯化体内产生的抗体。抗原的来源不限于人类,并且可以用源自非人类动物如小鼠、大鼠等的抗原免疫动物。在这种情况下,可以测试与获得的异源抗原结合的抗体与人抗原的交叉反应性,以筛选适用于人类疾病的抗体。

[0511] 或者,根据本领域已知的方法将产生针对抗原的抗体的抗体产生细胞与骨髓瘤细胞融合(例如,Kohler和Milstein, Nature (1975) 256, p. 495-497;和Kennet, R. ed., Monoclonal Antibodies, p.365-367, Plenum Press, N.Y. (1980))以建立杂交瘤,从中又可以得到单克隆抗体。

[0512] 可以通过基因工程化宿主细胞以产生编码抗原蛋白的基因来获得抗原。具体地,制备允许表达抗原基因的载体并将其转移至宿主细胞使得该基因表达。这样表达的抗原可以被纯化。抗体也可以通过用上述基因工程化的抗原表达细胞或表达该抗原的细胞系对动物进行免疫的方法获得。

[0513] 用于制备本发明的抗体-药物缀合物的抗体优选是为了降低对人的异源抗原性而通过人工修饰获得的重组抗体,例如嵌合抗体或人源化抗体,或者优选是仅具有衍生自人的抗体的基因序列的抗体,即,人抗体。这些抗体可以使用已知方法制备。

[0514] 作为嵌合抗体,可以例举其中抗体可变区和恒定区衍生自不同物种的抗体,例如,其中小鼠或大鼠来源的抗体可变区与人来源的抗体恒定区连接的嵌合抗体(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6851-6855, (1984))。

[0515] 作为人源化抗体,可以例举通过仅将异源抗体的互补决定区(CDR)整合到人来源的抗体中而获得的抗体(Nature (1986) 321,pp.522-525),通过CDR-移植法将异源抗体框架的一部分氨基酸残基以及该异源抗体的CDR序列移植到人抗体中而获得的抗体(国际公开第WO 90/07861号),以及使用基因转换诱变策略人源化的抗体(美国专利第5821337号)。

[0516] 作为人抗体,可以例举通过使用具有人染色体片段(包括人抗体的重链和轻链的基因)的人抗体产生小鼠产生的抗体(参见Tomizuka, K.等人, Nature Genetics (1997) 16, p.133-143; Kuroiwa, Y.等人, Nucl. Acids Res. (1998)26, p.3447-3448; Yoshida, H.等人, Animal Cell Technology:Basic and Applied Aspects vol.10, p.69-73 (Kitagawa, Y., Matsuda, T.和Iijima, S.eds.), Kluwer Academic Publishers, 1999; Tomizuka, K.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000) 97, p.722-727等)。或者,可以例举通过噬菌体展示获得的抗体,选自人抗体文库的抗体(参见Wormstone, I.M.等人, Investigative Ophthalmology&Visual Science. (2002)43 (7), p.2301-2308; Carmen, S.等人, Briefings in Functional Genomics and Proteomics(2002), 1(2), p.189-203; Siriwardena, D.等人, Ophthalmology (2002) 109(3), p.427-431等)。

[0517] 在本发明中,还包括用于制备本发明的抗体-药物缀合物的抗体的修饰变体。修饰的变体是指通过对根据本发明的抗体进行化学或生物修饰而获得的变体。化学修饰的变体

的实例包括包含化学部分与氨基酸骨架的连接的变体,包含化学部分与N-连接或O-连接的碳水化合物链的连接的变体等。生物修饰的变体的实例包括通过翻译后修饰(例如,N-连接或O-连接的糖基化,N-或C-末端加工,脱酰胺基,天冬氨酸的异构化或甲硫氨酸的氧化)获得的变体,以及其中通过在原核宿主细胞中表达将甲硫氨酸残基加入到N末端的变体。此外,在修饰变体的含义中还包括被标记以能够检测或分离根据本发明的抗体或抗原的抗体,例如,酶标记的抗体,荧光标记的抗体和亲和力标记的抗体。根据本发明的抗体的这种修饰变体可用于改善抗体的稳定性和血液保留,降低其抗原性,检测或分离抗体或抗原等。

[0518] 此外,通过调节与根据本发明的抗体连接的聚糖的修饰(糖基化,去岩藻糖基化等),可以增强抗体依赖性细胞的细胞毒性活性。作为调节抗体的聚糖修饰的技术,已知国际公开第WO 99/54342号、国际公开第WO 00/61739号、国际公开第 WO 02/31140号等。然而,该技术不限于此。在根据本发明的抗体中,还包括其中调节聚糖修饰的抗体。

[0519] 已知在培养的哺乳动物细胞中产生的抗体的重链的羧基末端的赖氨酸残基缺失(Journal of Chromatography A, 705: 129-134 (1995)),并且还已知在培养的哺乳动物细胞中产生的抗体的重链的羧基末端的两个氨基酸残基(甘氨酸和赖氨酸)缺失,并且新位于羧基末端的脯氨酸残基被酰胺化 (AnalyticalBiochemistry, 360: 75-83 (2007))。然而,重链序列的这种缺失和修饰不影响抗体的抗原结合亲和力和效应子功能(补体的激活,抗体依赖性细胞的细胞毒性等)。因此,在根据本发明的抗体中,还包括进行了这种修饰的抗体和该抗体的功能片段,以及还包括其中在重链的羧基末端缺失了1个或2个氨基酸的缺失变体、通过缺失变体的酰胺化获得的变体(例如,其中羧基末端脯氨酸残基已被酰胺化的重链)等。在根据本发明的抗体的重链羧基末端具有缺失的缺失变体的类型不限于上述变体,只要保留了抗原结合亲和力和效应子功能即可。构成根据本发明的抗体的两条重链可以是选自全长重链和上述缺失变体的一种类型,或者可以是从中选择的两种类型的组合。每种缺失变体的量的比率可受产生根据本发明的抗体的培养的哺乳动物细胞的类型和培养条件的影响;但是,可以优选例举其中羧基末端的一个氨基酸残基在根据本发明的抗体的两条重链中都缺失的抗体。

[0520] 作为根据本发明的抗体的同种型,例如,可以例举IgG (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4),并且可以优选例举IgG1或IgG2。

[0521] 适用于产生本发明的抗体-药物缀合物的抗体的实例可以包括但不特别限于抗-HER2抗体、抗-HER3抗体、抗-TROP2抗体、抗-B7-H3 抗体、抗-CD3抗体、抗-CD30抗体、抗-CD33抗体、抗-CD37抗体、抗-CD56抗体、抗-CD98抗体、抗-DR5抗体、抗-EGFR抗体、抗-EPHA2抗体、抗-FGFR2抗体、抗-FGFR4抗体、抗-FOLR1抗体、抗-VEGF抗体和抗-GPR20抗体,并且可优选例举抗-HER2抗体、抗-HER3抗体、抗-TROP2抗体、抗-B7-H3抗体和抗GPR20抗体。

[0522] 在本发明中,术语“抗-HER2抗体”是指与HER2(人表皮生长因子受体2型; ErbB-2)特异性结合的抗体,并优选具有通过与HER2结合而在HER2表达细胞中内化的活性。

[0523] 抗-HER2抗体的实例包括曲妥珠单抗(美国专利第5821337号)和帕妥珠单抗(国际公开第WO 01/00245号),并且优选例举曲妥珠单抗。

[0524] 在本发明中,术语“曲妥珠单抗”是人源化抗-HER2单克隆抗体,其包含由SEQ ID NO:1的氨基酸残基1至449组成的氨基酸序列组成的重链(图1)和由SEQ ID NO:2的氨基酸残基1至214组成的氨基酸序列组成的轻链(图2)。

[0525] 在本发明中,术语“抗-HER3抗体”是指与HER3(人表皮生长因子受体3型; ErbB-3)特异性结合的抗体,并优选具有通过与HER3表达细胞表面上的HER3结合而在HER3表达细胞中内化的活性。

[0526] 抗-HER3抗体的实例包括patritumab(U3-1287)、U1-59 (国际公开第WO 2007/077028号)、MM-121 (seribantumab)、国际公开第WO 2008/100624号中描述的抗-ERBB3抗体、RG-7116(lumretuzumab)和LJM-716 (elgemtumab),并且可优选例举patritumab和U1-59。

[0527] 在本发明中,术语“抗-TROP2抗体”是指与TROP2(TACSTD2:肿瘤关联钙信号转导因子2; EGP-1)特异性结合的抗体,并优选具有通过与TROP2结合而在TROP2表达细胞中内化的活性。

[0528] 抗-TROP2抗体的实例包括hTINA1-H1L1 (国际公开第WO 2015/098099号)。

[0529] 在本发明中,术语“抗-B7-H3抗体”是指与B7-H3(B细胞抗原＃7同系物3; PD-L3; CD276)特异性结合的抗体,并优选具有通过与B7-H3结合而在B7-H3表达细胞中内化的活性。

[0530] 抗-B7-H3抗体的实例包括M30-H1-L4 (国际公开第WO 2014/057687号)。

[0531] 在本发明中,术语“抗-GPR20抗体”是指与GPR20(G蛋白偶联受体20)特异性结合的抗体,并优选具有通过与GPR20结合而在GPR20表达细胞中内化的活性。

[0532] 抗-GPR20抗体的实例包括h046-H4e/L7(国际公开第WO 2018/135501号)。

[0533] [抗体与药物-接头中间体之间的缀合]

[0534] 根据本发明的抗体-药物缀合物可以通过使药物-接头中间体(优选式(14)表示的化合物)与具有硫醇基(或称为巯基)的抗体反应来制备。

[0535] 具有巯基的抗体可以通过本领域公知的方法获得(Hermanson, G. T, Bioconjugate Techniques, pp. 56-136, pp. 456-493, Academic Press (1996))。例如,通过在抗体内每个链间二硫键使用0.3至3摩尔当量的还原剂例如三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP)并在含有螯合剂例如乙二胺四乙酸(EDTA)的缓冲溶液中与抗体反应,可以获得具有巯基的抗体,该抗体内具有部分或完全还原的链间二硫键。

[0536] 此外,通过每个具有巯基的抗体使用2至20摩尔当量的药物-接头中间体(优选式(14)表示的化合物),可以制备其中每个抗体分子缀合2至8个药物分子的抗体-药物缀合物。

[0537] 所制备的抗体-药物缀合物的每个抗体分子缀合的药物分子的平均数目可以例如通过基于在280 nm和370 nm的两个波长下测量抗体-药物缀合物及其缀合前体的UV吸光度的计算方法(UV方法),或基于通过HPLC测量通过用还原剂处理抗体-药物缀合物获得的片段的定量的计算方法(HPLC方法)来确定。

[0538] 抗体和药物-接头中间体之间的缀合以及抗体-药物缀合物的每个抗体分子缀合的药物分子的平均数目的计算可参考国际公开第WO 2014/057687号、国际公开第 WO 2015/098099号、国际公开第WO 2015/115091号、国际公开第WO 2015/155998号、国际公开第WO 2018/135501号等中的描述进行。

[0539] 在本发明中,术语“抗-HER2抗体-药物缀合物”是指这样的抗体-药物缀合物,其中抗体-药物缀合物中的抗体是抗-HER2抗体。

[0540] 抗-HER2抗体优选为包含由SEQ ID NO:1的氨基酸残基1至449组成的氨基酸序列组成的重链和由SEQ ID NO:2的氨基酸残基1至214组成的氨基酸序列组成的轻链的抗体;或包含由SEQ ID NO:1表示的氨基酸序列组成的重链和由SEQ ID NO:2表示的氨基酸序列组成的轻链的抗体。

[0541] 在本发明制备的抗-HER2抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数优选为2至8,更优选为3至8,甚至更优选为7至8,甚至更优选为 7.5至8,并且甚至更优选为约8。

[0542] 抗-HER2抗体-药物缀合物可以参考国际公开第WO 2015/115091号中的描述通过使用通过本发明的制备方法制备的药物-接头中间体(优选式(14)表示的化合物)来制备。

[0543] 在本发明中,术语“抗-HER3抗体-药物缀合物”是指这样的抗体-药物缀合物,其中抗体-药物缀合物中的抗体是抗-HER3抗体。

[0544] 抗-HER3抗体优选为包含由SEQ ID NO:3表示的氨基酸序列组成的重链和由SEQ ID NO:4表示的氨基酸序列组成的轻链的抗体,或其中重链羧基末端的赖氨酸残基缺失的抗体变体。

[0545] 在本发明制备的抗-HER3抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数优选为2至8,更优选为3至8,甚至更优选为7至8,甚至更优选为 7.5至8,并且甚至更优选为约8。

[0546] 抗-HER3抗体-药物缀合物可以参考国际公开第WO 2015/155998号中的描述通过使用通过本发明的制备方法制备的药物-接头中间体(优选式(14)表示的化合物)来制备。

[0547] 在本发明中,术语“抗-TROP2抗体-药物缀合物”是指这样的抗体-药物缀合物,其中抗体-药物缀合物中的抗体是抗-TROP2抗体。

[0548] 抗-TROP2抗体优选为包含由SEQ ID NO:5的氨基酸残基20至470组成的氨基酸序列组成的重链和由SEQ ID NO:6的氨基酸残基21至234组成的氨基酸序列组成的轻链的抗体,或其中重链羧基末端的赖氨酸残基缺失的抗体变体。

[0549] 在本发明制备的抗-TROP2抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数优选为2至8,更优选为3至5,甚至更优选为3.5至4.5,并且甚至更优选为约4。

[0550] 抗-TROP2抗体-药物缀合物可以参考国际公开第WO 2015/098099号中的描述通过使用通过本发明的制备方法制备的药物-接头中间体(优选式(14)表示的化合物)来制备。

[0551] 在本发明中,术语“抗-B7-H3抗体-药物缀合物”是指这样的抗体-药物缀合物,其中抗体-药物缀合物中的抗体是抗-B7-H3抗体。

[0552] 抗-B7-H3抗体优选为包含由SEQ ID NO:7的氨基酸残基20至471组成的氨基酸序列组成的重链和由SEQ ID NO:8的氨基酸残基21至233组成的氨基酸序列组成的轻链的抗体,或其中重链羧基末端的赖氨酸残基缺失的抗体变体。

[0553] 在本发明制备的抗-B7-H3抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数优选为2至8,更优选为3至5,甚至更优选为3.5至4.5,并且甚至更优选为约4。

[0554] 抗-B7-H3抗体-药物缀合物可以参考国际公开第WO 2014/057687号中的描述通过使用通过本发明的制备方法制备的药物-接头中间体(优选式(14)表示的化合物)来制备。

[0555] 在本发明中,术语“抗-GPR20抗体-药物缀合物”是指这样的抗体-药物缀合物,其中抗体-药物缀合物中的抗体是抗-GPR20抗体。

[0556] 抗-GPR20抗体优选为包含由SEQ ID NO:9的氨基酸残基20至472组成的氨基酸序列组成的重链和由SEQ ID NO:10的氨基酸残基21至234组成的氨基酸序列组成的轻链的抗体,或其中重链羧基末端的赖氨酸残基缺失的抗体变体。

[0557] 在本发明制备的抗-GPR20抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数优选为2至8,更优选为3至8,甚至更优选为7至8,甚至更优选为 7.5至8,并且甚至更优选为约8。

[0558] 抗-GPR20抗体-药物缀合物可以参考国际公开第WO 2018/135501号中的描述通过使用通过本发明的制备方法制备的药物-接头中间体(优选式(14)表示的化合物)来制备。

[0559] [药物组合物]

[0560] 本发明制备的抗体-药物缀合物可以含有至少一种药学上合适的成分并被施用。药学上合适的成分可以根据本发明制备的抗体-药物缀合物的剂量、施用浓度等从本领域通常使用的制剂添加剂等中适当选择并应用。例如,本发明制备的抗体-药物缀合物可以以药物组合物的形式施用,所述药物组合物含有缓冲剂例如组氨酸缓冲剂,赋形剂例如蔗糖或海藻糖,和表面活性剂例如聚山梨酯80或聚山梨酯20。

[0561] 可以预期含有通过本发明制备的抗体-药物缀合物的药物组合物通过作为全身疗法施用于患者并且另外通过局部施用于癌症组织而发挥治疗作用。

[0562] 含有本发明制备的抗体-药物缀合物的药物组合物可以优选用于哺乳动物,并且可以更优选用于人类。

[0563] 含有本发明制备的抗体-药物缀合物的药物组合物可以优选用作注射剂,可以更优选用作水性注射剂或冻干注射剂,并且可以甚至更优选用作冻干注射剂。

[0564] 在含有本发明制备的抗体-药物缀合物的药物组合物是水性注射剂的情况下,优选地可以将其用合适的稀释剂稀释,然后通过滴注静脉内施用。稀释剂的实例包括葡萄糖溶液(优选5%葡萄糖溶液)和生理盐水。

[0565] 在含有本发明制备的抗体-药物缀合物的药物组合物是冻干注射剂的情况下,优选将其溶于注射用水中,然后,可以用适当的稀释剂稀释必要量,然后通过滴注静脉内施用。稀释剂的实例包括葡萄糖溶液(优选5%葡萄糖溶液)和生理盐水。

[0566] 可以用于施用含有本发明制备的抗体-药物缀合物的药物组合物的施用途径的实例可以包括静脉内、皮内、皮下、肌内和腹膜内途径,并且可以优选地例举静脉内途径。

[0567] 本发明制备的抗体-药物缀合物可以以每天一次至每180天一次的间隔施用于人,优选可以以每周一次,每2周一次,每3周一次或每4周一次的间隔施用,并且甚至更优选地可以以每三周一次的间隔施用。同样,本发明制备的抗体-药物缀合物可以以每剂约0.001至100mg/kg的剂量施用,并且优选以每剂0.8至12.4 mg/kg的剂量施用。在本发明制备的抗体-药物缀合物是抗-HER2抗体-药物缀合物的情况下,其可以优选以每剂5.4、6.4或7.4 mg/kg的剂量施用,并且更优选地可以以每剂5.4 mg/kg或6.4 mg/kg的剂量施用。

[0568] 含有本发明制备的抗体-药物缀合物的药物组合物可以用于治疗癌症,并且可以优选地用于治疗选自以下的至少一种癌症类型:乳腺癌、胃癌(也称为胃腺癌)、结直肠癌(也称为结肠和直肠癌,并且包括结肠癌和直肠癌)、肺癌(包括小细胞肺癌和非小细胞肺癌)、食道癌、唾液腺癌、食管胃交界部腺癌、胆管癌、佩吉特病、胰腺癌、卵巢癌、子宫癌肉瘤、尿路上皮癌、前列腺癌、膀胱癌、胃肠道间质瘤、消化道间质瘤、宫颈癌、鳞状细胞癌、腹

膜癌、肝癌、肝细胞癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、子宫癌、肾癌、外阴癌、甲状腺癌、阴茎癌、白血病、恶性淋巴瘤、浆细胞瘤、骨髓瘤、神经上皮肿瘤、神经鞘瘤、头颈癌、皮肤癌、咽喉癌、胆囊癌、胆管癌、间皮瘤和肉瘤。例如,当本发明制备的抗体-药物缀合物是抗-HER2抗体-药物缀合物时,该抗体-药物缀合物可以更优选地用于治疗选自以下的至少一种癌症类型:乳腺癌、胃癌、结直肠癌、非小细胞肺癌、食道癌、唾液腺癌、食管胃交界部腺癌、胆管癌、佩吉特病、胰腺癌、卵巢癌和子宫癌肉瘤,可更优选用于治疗选自以下的至少一种癌症类型:乳腺癌、胃癌、结直肠癌、非小细胞肺癌、食道癌、唾液腺癌、食管胃交界部腺癌、胆管癌和佩吉特病,并且可以甚至更优选用于治疗乳腺癌、胃癌、结直肠癌或非小细胞肺癌。

[0569] 含有本发明制备的抗体-药物缀合物的药物组合物可以选择性地用作药物疗法的药剂,这是治疗癌症的主要方法,结果,可以延迟癌细胞的发展,抑制其生长,并进一步杀死癌细胞。这些效果可以使癌症患者摆脱由癌症引起的症状,或者实现癌症患者的QOL的改善,并且通过维持癌症患者的生命来达到治疗效果。即使本发明的药物组合物和治疗方法没有完成杀死癌细胞,它们也可以通过抑制或控制癌细胞的生长而在实现长期生存的同时实现癌症患者更高的QOL。

[0570] 在这种药物疗法中,含有本发明制备的抗体-药物缀合物的药物组合物可以单独用作药剂,此外,还可以与辅助疗法中的其他疗法组合使用,并且可以与外科手术、放射疗法,激素疗法等组合。此外,该药物组合物还可以用作新辅助疗法中的药物疗法。

[0571] 除了如上所述的治疗用途以外,例如,对于含有本发明制备的抗体-药物缀合物的药物组合物,还可以预期预防作用,例如抑制小的转移性癌细胞的生长并进一步杀死它们。例如,可以预期在转移过程中抑制和杀死体液中的癌细胞的作用,或者例如在植入任何组织后立即抑制和杀死小癌细胞的作用。因此,可以预期抑制癌症转移或预防作用,特别是在外科手术除去癌症之后。

[0572] 含有本发明制备的抗体-药物缀合物的药物组合物可以与其他癌症治疗剂组合施用。可以相应地增强抗癌作用。用于此类目的的其他癌症治疗剂的实例包括5-氟尿嘧啶(5-FU)、帕妥珠单抗、曲妥珠单抗、紫杉醇、卡铂、顺铂、吉西他滨、卡培他滨、伊立替康(CPT-11)、多西他赛、培美曲塞、索拉非尼、长春花碱、长春瑞滨、依维莫司、坦螺旋霉素、贝伐单抗、奥沙利铂、拉帕替尼、曲妥珠单抗-美坦新偶联物(T-DM1)或国际公开第WO 2003/038043号中所述的药剂、LH-RH类似物(亮丙瑞林、戈舍瑞林等)、磷酸雌莫司汀、雌激素拮抗剂(他莫昔芬,雷洛昔芬等)和芳香酶抑制剂(阿那曲唑、来曲唑、依西美坦等),但不受限制,只要它们是具有抗肿瘤活性的药剂即可。

实施例

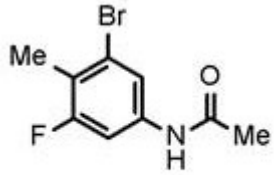
[0573] 下面通过实施例更详细地描述本发明。然而,本发明不限于这些。

[0574] 在实施例中,术语“^{1}H-NMR”和“^{13}C-NMR”是指“核磁共振谱”。在括号内,$CDCl_3$是指为测量溶剂的氘代氯仿,DMSO-d_6是指为测量溶剂的氘代二甲基亚砜,和D_2O是指为测量溶剂的氧化氘。TMS(四甲基硅烷)用作内标。^{1}H-NMR中的多重性的含义是s =单峰,d =二重峰,t =三重峰,q =四重峰,quint =五重峰,m =多重峰和brs =宽单峰。

[0575] (实施例1)

[0576] N-(3-溴-5-氟-4-甲基苯基)乙酰胺

[0577] [化62]

[0578] 

(6)

[0579] 将2-氟-1-甲基-4-硝基苯(10.0 g, 64.5 mmol)于浓硫酸(90%或更高, 50 mL)和庚烷(50 mL)中的溶液加热至约60℃,然后分6份加入N-溴代琥珀酰亚胺(13.8 g, 77.4 mmol)。将混合物在约60℃搅拌1小时,然后冷却至室温。将所得反应溶液加入冷水(50 mL)中。在加入甲苯(50 mL)用于分离后,除去水层。然后,有机层用水(50 mL)、6.5 wt% 碳酸氢钠水溶液(50 mL)和5 wt%亚硫酸钠水溶液(50 mL)洗涤。将水(50 mL)和活性炭(1.0 g)加入所得水层中,将混合物在室温搅拌1小时,然后通过过滤分离不溶物并用甲苯(20 mL)洗涤。从滤液中除去水层后,将有机层在减压下浓缩。将乙酸乙酯(100 mL)加入到浓缩的残留物(约30 mL)中,并将混合物再次在减压下浓缩,得到1-溴-3-氟-2-甲基-5-硝基苯于乙酸乙酯中的溶液(约30 mL)。

[0580] 通过向1-溴-3-氟-2-甲基-5-硝基苯于乙酸乙酯中的溶液(约30 mL)中加入1%的铂炭催化剂(2.0 g)和乙酸乙酯(120 mL)获得悬浮液并用氮气置换气氛,然后用氢气置换。将混合物在氢气流(0.1MPa)中在约60℃下搅拌4小时,并冷却至室温。通过过滤使不溶物与所得悬浮液分离,并将不溶物用乙酸乙酯(30 mL)洗涤。滤液用0.5N盐酸溶液(100 mL)洗涤两次,得到有机层。此时的水层用乙酸乙酯(50 mL)萃取,得到有机层,并将有机层合并。然后,将有机层用6.5 wt%的碳酸氢钠水溶液(50 mL)和5 wt%的盐水(50 mL)洗涤,并将得到的有机层在减压下浓缩。将乙酸乙酯(50 mL)加入到浓缩的残留物(约30 mL)中,并将混合物再次在减压下浓缩,得到3-溴-5-氟-4-甲基苯胺于乙酸乙酯中的溶液(约30 mL)。

[0581] 将三乙胺(7.2 mL,51.8 mmol)和乙酸酐(3.3 mL,34.4 mmol)加入到通过将乙酸乙酯(30 mL)加入到3-溴-5-氟-4-甲基苯胺于乙酸乙酯中的溶液(约29 mL)中而获得的溶液中,并将混合物在室温搅拌6小时。在将10 wt%盐水(50 mL)加至所得反应溶液中以进行分离之后,除去水层。在减压下浓缩得到的有机层,然后加入乙酸乙酯(50 mL),并将混合物再次在减压下浓缩。将乙酸乙酯(80 mL)加入到浓缩的残留物(约30 mL)中,加入4N盐酸/乙酸乙酯溶液(10.9 mL,43.7 mmol),然后将混合物在室温搅拌1小时。通过过滤分离不溶物,并用乙酸乙酯(40 mL)洗涤。向滤液中加入10 wt%的盐水(40 mL)后,加入25 wt%的氢氧化钠水溶液(5.6 g)以将pH调节至约7。除去水层后,将有机层在减压下浓缩。将甲苯(100 mL)加入浓缩的残留物(约30 mL)中,并将在减压下浓缩的浓缩残留物(约30 mL)在50℃下搅拌5小时,然后冷却至室温。将混合物在室温搅拌12小时,然后冷却至3℃,并搅拌2小时。通过过滤收集沉淀的晶体,并用冷甲苯(20 mL)和75%冷乙腈水溶液(20 mL)洗涤。将得到的晶体在40℃下在减压下干燥,得到N-(3-溴-5-氟-4-氟-4-甲基苯基)乙酰胺,为白色晶体(5.7 g,收率37%)。

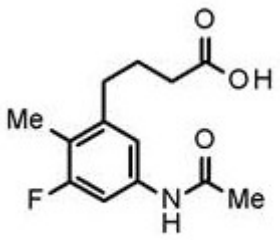
^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.41 (1H, s), 7.39 (1H, d,

[0582] J=9.2 Hz), 7.20 (1H, brs), 2.27 (3H, d, J=2.0 Hz), 2.17 (3H, s)

[0583] (实施例2)

[0584] 4-[5-(乙酰基氨基)-3-氟-2-甲基苯基]丁酸

[0585] [化63]

[0586] 

(8)

[0587] 将N-(3-溴-5-氟-4-甲基苯基)乙酰胺(30.0 g,121.9 mmol)、3-丁烯酸(12.4 mL,146.3 mmol)和二异丙基乙胺(46.0 mL,268.2 mmol)于四氢呋喃(120 mL)和水(30 mL)中的溶液在减压下脱气并用氮气置换气氛,然后加入三(邻甲苯基)膦(1.1 g,3.7 mmol)。再次将混合物在减压下脱气并用氮气置换气氛,然后加入乙酸钯(II)(0.4 g,1.8 mmol),并将混合物在减压下脱气,用氮气置换气氛,然后热回流5小时。将活性炭(3.0 g)加入已冷却至室温的反应溶液中,并将混合物在室温搅拌1小时。通过过滤分离不溶物,并用20%四氢呋喃水溶液(60 mL)洗涤。将2-甲基四氢呋喃(300 mL)和水(300 mL)加至滤液,并加入25wt%的氢氧化钠水溶液(23.4 g,146.3 mmol)。除去有机层,将2-甲基四氢呋喃(300 mL)和浓盐酸(36%,22.2 g,219.4 mmol)加入到水层中,然后加入氯化钠(30 g)。分离后,除去水层,有机层用10wt%盐水(90 mL)洗涤。在减压下浓缩得到的有机层,得到含有几何异构体的4-[5-(乙酰基氨基)-3-氟-2-甲基苯基]-3-丁烯酸于2-甲基四氢呋喃中的溶液(约150 mL)。

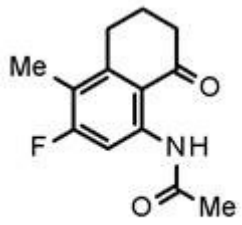
[0588] 通过向含有几何异构体的4-[5-(乙酰基氨基)-3-氟-2-甲基苯基]-3-丁烯酸于2-甲基四氢呋喃中的溶液(约140 mL)中加入2-甲基四氢呋喃(308 mL)和5%钯炭(5.6 g)获得悬浮液并用氮气置换气氛,然后用氢气置换。将混合物在氢气流(0.1 MPa)中于约40℃搅拌1小时,并冷却至室温。通过过滤将不溶物与所得悬浮液分离,并用2-甲基四氢呋喃(112 mL)洗涤。向滤液中加入水(140 mL),并用1N盐酸溶液将pH调节至约2。分离后,除去水层,并将得到的有机层在减压下浓缩。将乙酸乙酯(420 mL)加入到浓缩的残留物中,并将混合物在减压下浓缩。再次,加入乙酸乙酯(420 mL),并将混合物在减压下浓缩,得到浓缩的残留物(约170 mL)。将浓缩的残留物在50℃下搅拌5小时后,加入庚烷(140 mL),并将混合物冷却至室温。通过过滤收集沉淀的晶体,并用乙酸乙酯/庚烷(3/7)(84 mL)洗涤。将得到的晶体在减压下干燥,得到4-[5-(乙酰基氨基)-3-氟-2-甲基苯基]丁酸,为白色晶体(26.1 g,收率91%)。

[0589] ^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 12.08 (1H, brs), 9.97 (1H, s), 7.42 (1H, dd, J=12.5, 2.0 Hz), 7.05 (1H, d, J=1.5 Hz), 2.59-2.54 (2H, m), 2.28 (2H, t, J=7.3 Hz), 2.10 (3H, d, J=2.0 Hz), 2.02 (3H, s), 1.71 (2H, quint, J=7.5 Hz)

[0590] (实施例3-1)

[0591] N-(3-氟-4-甲基-8-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1-基)乙酰胺

[0592] [化64]

[0593] 

(9)

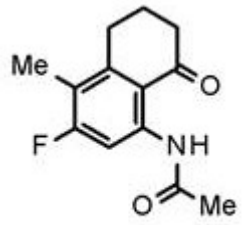
[0594] 将4-[5-(乙酰基氨基)-3-氟-2-甲基苯基]丁酸(12.0 g,47.4 mmol)和三氟乙酸(24 mL)的溶液冷却至4℃后,逐滴加入三氟乙酸酐(13.4 mL,94.8 mmol),并将混合物在约4℃下搅拌4小时。将得到的反应溶液逐滴加入到已冷却至5℃的50%乙腈水溶液(120 mL)中。用25wt%的氢氧化钠水溶液(77.3 g)将pH调节至约7后,加入水(59 mL)。然后,使温度回到室温,通过过滤收集沉淀的晶体,并用水(60 mL)和75%乙腈水溶液(60 mL)洗涤。在减压下干燥得到的晶体,得到N-(3-氟-4-甲基-8-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1-基)乙酰胺,为淡黄白色晶体(10.2 g,收率 92%)。

[0595] ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 12.31 (1H, brs), 8.43 (1H, d, J=12.8 Hz), 2.88 (2H, t, J=12.0 Hz), 2.66 (2H, dd, J=7.2, 6.0 Hz), 2.22 (3H, s), 2.17 (3H, d, J=2.0 Hz), 2.09 (3H, quint, J=6.4 Hz)

[0596] (实施例3-2)

[0597] N-(3-氟-4-甲基-8-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1-基)乙酰胺

[0598] [化65]

[0599] 

(9)

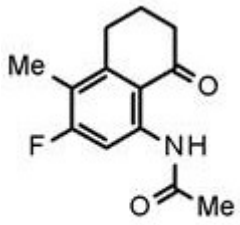
[0600] 将4-[5-(乙酰基氨基)-3-氟-2-甲基苯基]丁酸(5.0 g,19.7 mmol)和三氟乙酸(10 mL)的溶液冷却至2℃后,逐滴加入三氟乙酸酐(5.6 mL,39.5 mmol),并将混合物在约5

℃下搅拌3小时。向反应溶液中逐滴加入50%乙腈水溶液(50 mL)。用25w/v%氢氧化钠水溶液(33 mL)将pH调节至约7后,加入水(17 mL)。然后,使温度回到室温,并通过过滤收集沉淀的晶体,并用水(25 mL)和75%乙腈水溶液(25 mL)洗涤。在减压下干燥得到的晶体,得到N-(3-氟-4-甲基-8-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1-基)乙酰胺,为浅黄白色晶体(4.3 g,收率 92%)。

[0601] (实施例3-3)

[0602] N-(3-氟-4-甲基-8-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1-基)乙酰胺

[0603] [化66]

[0604] 

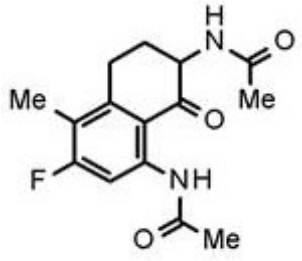
(9)

[0605] 将4-[5-(乙酰基氨基)-3-氟-2-甲基苯基]丁酸(5.0 g,19.7 mmol)和三氟乙酸(10 mL)的溶液冷却至2℃后,逐滴加入三氟乙酸酐(5.6 mL,39.5 mmol),并将混合物在约5℃下搅拌4小时。向反应溶液中逐滴加入17%乙腈水溶液(30 mL),然后逐滴加入水(20 mL)。用25w/v%氢氧化钠水溶液(33 mL)将pH调节至约7后,加入水(17 mL)。然后,使温度回到室温,通过过滤收集沉淀的晶体,并用水(25 mL)和75%乙腈水溶液(25 mL)洗涤。在减压下干燥得到的晶体,得到N-(3-氟-4-甲基-8-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1-基)乙酰胺,为浅黄白色晶体(4.3 g,收率 93%)。

[0606] (实施例4-1)

[0607] N,N'-(3-氟-4-甲基-8-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1,7-二基)二乙酰胺

[0608] [化67]

[0609] 

(10)

[0610] 将N-(3-氟-4-甲基-8-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1-基)乙酰胺(5.0 g,21.3 mmol)于四氢呋喃(75 mL)中的溶液冷却至6℃并加入亚硝酸戊酯(3.7 mL,27.6 mmol)和叔丁醇钾(2.9 g,25.5 mmol)。将混合物在3℃下搅拌17小时后,加入乙酸(25 mL)和乙酸酐(25 mL),然后升高温度。在约20℃下,加入2%的铂炭催化剂(1.5 g),用氮气置换混合物的气氛,然后用氢气置换。将混合物在氢气流(0.3 MPa)中在室温搅拌4小时。通过过滤将不溶物与所得悬浮液分离,并用乙酸乙酯(25 mL)洗涤。将活性炭(0.7 g)加至滤液中,将混合物在室温搅拌1小时,然后通过过滤分离不溶物,并用乙酸乙酯(25 mL)洗涤。将滤液冷却至1℃,并逐滴加入5N氢氧化钠水溶液(50 mL)。除去水层,并再次加入5N氢氧化钠水溶液(50 mL)以除去

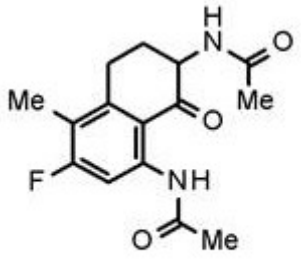
水层。将四氢呋喃(35 mL)和水(25 mL)加至所得有机层后,加入5 N氢氧化钠水溶液(25 mL)以将pH调节至约7。将温度升至室温后,除去水层,并将有机层用10wt%盐水(25 mL)洗涤。在减压下浓缩得到的有机层,得到浓缩的残留物。将乙酸乙酯(50 mL)加入到浓缩的残留物中,并将混合物在减压下浓缩。将经过此操作总共三次的浓缩残留物(约25 mL)在40℃下搅拌5小时,然后冷却至室温,并在2℃下搅拌3小时。通过过滤收集沉淀的晶体,并用冷乙酸乙酯(25 mL)和水(25 mL)洗涤。在减压下干燥得到的晶体,得到N,N'-(3-氟-4-甲基-8-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1,7-二基)二乙酰胺,为白色晶体(3.7 g,收率60%)。

[0611] ^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 11.76 (1H, s), 8.43 (1H, d, J=13.0 Hz), 6.53 (1H, d, J=4.5 Hz), 4.62 (1H, dt, J=14.0, 5.4 Hz), 3.08-2.96 (2H, m), 2.78-2.72 (1H, m), 2.23 (3H, s), 2.15 (3H, d, J=1.5 Hz), 2.11 (3H, s), 1.88-1.77 (1H, m)

[0612] (实施例4-2)

[0613] N,N'-(3-氟-4-甲基-8-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1,7-二基)二乙酰胺

[0614] [化68]

[0615] 

(10)

[0616] 将N-(3-氟-4-甲基-8-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1-基)乙酰胺(35.0 g,148.8 mmol)于四氢呋喃(525 mL)中的溶液冷却至4℃并加入亚硝酸戊酯(25.7 mL,193.4 mmol)和叔丁醇钾(20.0 g,178.6 mmol)。将混合物在1℃下搅拌17小时后,加入乙酸(175 mL)和乙酸酐(175 mL),然后升高温度。在约20℃下,加入2%的铂炭催化剂(11.8 g),用氮气置换混合物的气氛,然后用氢气置换。将混合物在氢气流(0.3 MPa)中在室温搅拌3小时。通过过滤将不溶物与所得悬浮液分离,并将不溶物用乙酸乙酯(175 mL)洗涤。将活性炭(5.3 g)加入到滤液中,将混合物在室温搅拌2小时,然后通过过滤分离不溶物,并用乙酸乙酯(175 mL)洗涤。将滤液冷却至1℃,并逐滴加入5N氢氧化钠水溶液(350 mL)。除去水层,再次加入5N氢氧化钠水溶液(350 mL)以除去水层。向所得有机层中加入四氢呋喃(245 mL)和水(175 mL)之后,加入5 N氢氧化钠水溶液(150 mL)以将pH调节至约7。将温度升至室温后,除去水层,并将有机层用10wt%盐水(175 mL)洗涤。在减压下浓缩得到的有机层,得到浓缩的残留物。将乙酸乙酯(350 mL)加入到浓缩的残留物中,并将混合物在减压下浓缩。将经过此操作总共三次的浓缩残留物(约175 mL)在40℃搅拌5小时,然后冷却至室温,并在2℃搅拌3小时。通过过滤收集沉淀的晶体,并用冷的乙酸乙酯(175 mL)和水(175 mL)洗涤。在减压下干燥得

到的晶体,得到白色晶体(25.1 g)。

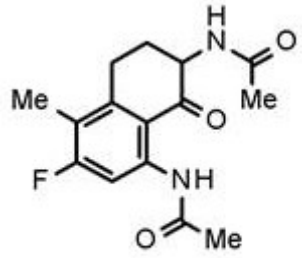
[0617] 将获得的晶体(24.0 g,82.1 mmol)于20%乙醇水溶液(300 mL)中的悬浮液加热至65℃。加入活性炭(4.8 g),将混合物在70℃下搅拌30分钟,然后通过过滤分离不溶物,并用20%乙醇水溶液(72 mL)洗涤。将60℃的水(300 mL)逐滴加入到滤液中后,将混合物退火至2℃并搅拌2小时。通过过滤收集沉淀的晶体,并用冷的60%乙醇水溶液(120 mL)洗涤。在减压下干燥得到的晶体,得到N,N'-(3-氟-4-甲基-8-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1,7-二基)二乙酰胺,为白色晶体(21.6 g,收率52%)。

[0618] ^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 11.76 (1H, s), 8.43 (1H, d, J=13.0 Hz), 6.53 (1H, d, J=4.5 Hz), 4.62 (1H, dt, J=14.0, 5.4 Hz), 3.08-2.96 (2H, m), 2.78-2.72 (1H, m), 2.23 (3H, s), 2.15 (3H, d, J=1.5 Hz), 2.11 (3H, s), 1.88-1.77 (1H, m)

[0619] (实施例4-3)

[0620] N,N'-(3-氟-4-甲基-8-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1,7-二基)二乙酰胺

[0621] [化69]

[0622] 

(10)

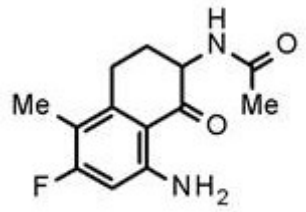
[0623] 将N-(3-氟-4-甲基-8-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1-基)乙酰胺(3.0 g,12.8 mmol)于四氢呋喃(45 mL)中的溶液冷却至0℃并加入亚硝酸戊酯(2.2 mL,16.6 mmol)和叔丁醇钾(1.7 g,15.3 mmol)。将混合物在3℃下搅拌3小时后,加入乙酸(15 mL)和乙酸酐(15 mL),将温度升至20℃,并将混合物搅拌1.5小时。在约3℃下,加入5%铂炭催化剂(0.4 g),用氮气置换混合物的气氛,然后用氢气置换。将混合物在约5℃在氢气流(0.6 MPa)中搅拌3小时。然后,将混合物在约30℃下搅拌1小时,通过过滤分离不溶物,并将不溶物用乙酸乙酯(15 mL)洗涤。将活性炭(0.5 g)加入到滤液中,将混合物在室温搅拌2小时,然后通过过滤分离不溶物,并用乙酸乙酯(15 mL)洗涤。将滤液冷却至约5℃,并逐滴加入5N氢氧化钠水溶液(30 mL)。除去水层,加入四氢呋喃(30 mL)和5N氢氧化钠水溶液(30 mL)以除去水层。向所得有机层中加入水(15 mL)后,加入5 N氢氧化钠水溶液(15 mL)以将pH调节至约7。将温度升至室温后,除去水层,并将有机层用10wt%盐水(15 mL)洗涤。在减压下浓缩得到的有机层,得到浓缩的残留物。将乙酸乙酯(30 mL)加入到浓缩的残留物中,并将混合物在减压下浓缩。将经过此操作总共三次的浓缩残留物(约15 mL)在40℃下搅拌5小时,冷却至室温,并在5℃下搅拌2小时或更长时间。通过过滤收集沉淀的晶体,并用冷乙酸乙酯(15 mL)和水(15 mL)洗涤。在减压下干燥得到的晶体,得到N,N'-(3-氟-4-甲基-8-氧代-5,6,7,8-四氢

萘-1,7-二基)二乙酰胺,为白色晶体(2.3 g,收率62%)。

[0624] (实施例5-1)

[0625] N-(8-氨基-6-氟-5-甲基-1-氧代-1,2,3,4-四氢萘-2-基)乙酰胺

[0626] [化70]

[0627] 

(11)

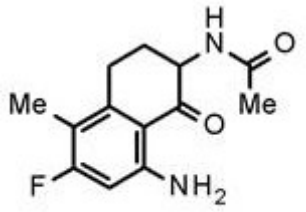
[0628] 将N,N'-(3-氟-4-甲基-8-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1,7-二基)二乙酰胺(3.0 g,10.3 mmol)于2N盐酸/乙醇(30 mL)中的悬浮液在50℃下搅拌7小时。将水(45 mL)加入所得反应溶液中,并将混合物冷却至1℃。在1℃下逐滴加入三乙胺(8.6 mL,61.6 mmol)后,加入亚硫酸钠(26 mg,0.2 mmol)。将混合物在1℃搅拌4小时后,通过过滤收集沉淀的晶体,并用冷的60%乙醇水溶液(30 mL)和水(15 mL)洗涤。将得到的晶体在减压下干燥以获得淡绿色晶体(2.4 g)。将得到的淡绿色晶体(1.8 g)于丙酮(18 mL)中的悬浮液在50℃下搅拌5小时,然后冷却至室温。通过过滤收集沉淀的晶体,并用丙酮(9 mL)洗涤。将所得晶体在40℃在减压下干燥,得到N-(8-氨基-6-氟-5-甲基-1-氧代-1,2,3,4-四氢萘-2-基)乙酰胺,为淡绿色晶体(1.6 g,收率82%)。

[0629] ^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.07 (1H, d, J=8.0 Hz), 7.40 (2H, brs), 6.38 (1H, d, J=13.2 Hz), 4.52-4.43 (1H, m), 2.98-2.88 (1H, m), 2.87-2.76 (1H, m), 2.18-2.10 (1H, m), 1.98 (3H, d, J=1.2 Hz), 1.90 (3H, s), 1.88-1.78 (1H, m)

[0630] (实施例5-2)

[0631] N-(8-氨基-6-氟-5-甲基-1-氧代-1,2,3,4-四氢萘-2-基)乙酰胺

[0632] [化71]

[0633] 

(11)

[0634] 在室温下将N,N'-(3-氟-4-甲基-8-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1,7-二基)二乙酰胺(5.0 g,17.1 mmol)分5份加至2N盐酸/乙醇(75 mL)中,并将混合物在50℃搅拌5小时。将水(113 mL)加至所得反应溶液中,并将混合物冷却至2℃。在2℃下逐滴加入三乙胺(22.5 mL,161.4 mmol)后,加入亚硫酸钠(43 mg,0.3 mmol)。在2℃下搅拌混合物3小时后,通过过滤

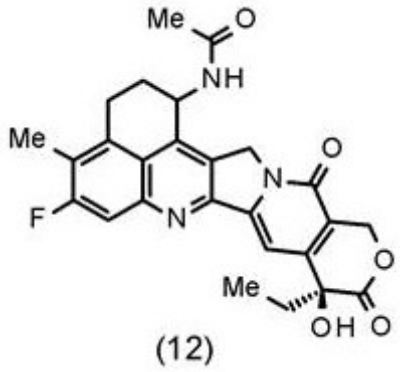
收集沉淀的晶体,并用冷的60%乙醇水溶液(50 mL)和水(25 mL)洗涤。将得到的晶体在减压下干燥以获得淡蓝色晶体(3.9 g)。将得到的晶体(1.8 g)于丙酮(18 mL)中的悬浮液在50℃下搅拌5小时,然后冷却至室温。通过过滤收集沉淀的晶体,并用丙酮(9 mL)洗涤。将所得晶体在40℃在减压下干燥,得到N-(8-氨基-6-氟-5-甲基-1-氧代-1,2,3,4-四氢萘-2-基)乙酰胺,为淡绿色晶体(1.6 g,收率80%)。

[0635] ^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.07 (1H, d, J=8.0 Hz), 7.40 (2H, brs), 6.38 (1H, d, J=13.2 Hz), 4.52-4.43 (1H, m), 2.98-2.88 (1H, m), 2.87-2.76 (1H, m), 2.18-2.10 (1H, m), 1.98 (3H, d, J=1.2 Hz), 1.90 (3H, s), 1.88-1.78 (1H, m)

[0636] (实施例6-1)

[0637] N-[(9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲嗪并[1,2-b]喹啉-1-基]乙酰胺

[0638] [化72]

[0639] 

(12)

[0640] 将邻甲酚(510 mL)和对甲苯磺酸吡啶鎓(25.6 g,102 mmol)加至N-(8-氨基-6-氟-5-甲基-1-氧代-1,2,3,4-四氢萘-2-基)乙酰胺(170.0 g,679 mmol)和(4S)-4-乙基-4-羟基-7,8-二氢-1H-吡喃并[3,4-f]吲嗪-3,6,10(4H)-三酮(196.7 g,747 mmol)于甲苯(8.5 L)中的悬浮液中,并将混合物回流32小时。加入甲苯(500 mL),并将混合物冷却至室温,再搅拌2小时。将沉淀的晶体过滤,并将通过过滤分离的晶体用丙酮(850 mL)洗涤。将所得晶体在40℃在减压下干燥,得到N-[(9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲嗪并[1,2-b]喹啉-1-基]乙酰胺的黄色晶体(312.5 g,收率96%)。

[0641] ^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 0.87 (3H, t, J=7.3 Hz), 1.79-1.88 (2H, m), 1.91 (3H, s), 2.13-2.15 (2H, m), 2.39 (3H, s), 3.13-3.22 (2H, m), 5.20 (2H, dd, J=25.6, 18.9 Hz), 5.42 (2H, s), 5.53-5.57 (1H, m), 6.52 (1H, s), 6.65-6.69 (0.4H, m), 6.75 (0.4H, d, J=7.9 Hz), 6.95-6.99 (0.4H, m), 7.03 (0.4H, d, J=7.3 Hz), 7.13-7.27 (0.4H, m).7.30 (1H, s), 7.79 (1H, d, J=11.0 Hz), 8.46 (1H, d, J=9.2 Hz), 9.19 (0.4H, s).

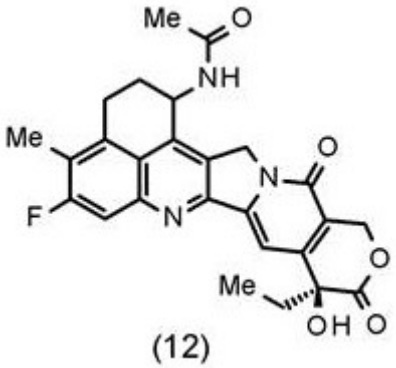
[0642] ^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ 7.7, 10.9, 10.9, 15.9, 22.6, 23.1, 27.7, 30.3, 44.0, 49.5, 65.2, 72.3, 96.6, 109.7, 109.9, 114.5, 118.7, 119.1, 121.4, 123.6, 123.7, 123.7, 125.3, 125.5, 126.6, 128.2, 128.9, 130.5, 136.2, 136.3, 140.4, 145.2, 147.8, 147.9, 149.9, 152.3, 155.3, 156.6, 160.3, 162.8, 169.1, 172.4.

MS (ESI) (m/z): 478 ([M+H]$^{+}$).

[0643] (实施例6-2)

[0644] N-[(9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲嗪并[1,2-b]喹啉-1-基]乙酰胺

[0645] [化73]

[0646] 

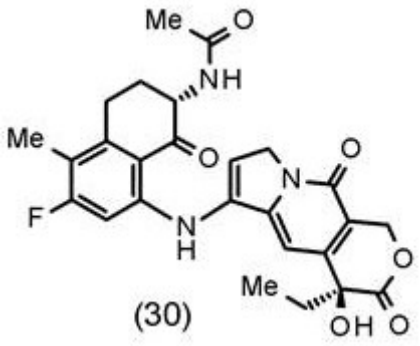
(12)

[0647] 将邻甲酚(7.5 mL)和对甲苯磺酸吡啶鎓(0.75 g,3.00 mmol)加至N-(8-氨基-6-氟-5-甲基-1-氧代-1,2,3,4-四氢萘-2-基)乙酰胺(2.5 g,9.99 mmol)和(4S)-4-乙基-4-羟基-7,8-二氢-1H-吡喃并[3,4-f]吲嗪-3,6,10(4H)-三酮(3.42 g,12.99 mmol)于甲苯(125 mL)中的悬浮液中,将混合物回流19小时(已确认该步骤是通过式(30)表示的化合物和式(31)表示的化合物作为反应中间体进行的)。

[0648] 式(30)表示的化合物:

[0649] N-[(2S)-8-{[(4S)-4-乙基-4-羟基-3,10-二氧代-3,4,8,10-四氢-1H-吡喃并[3,4-f]吲嗪-6-基]氨基}-6-氟-5-甲基-1-氧代-1,2,3,4-四氢萘-2-基]乙酰胺

[0650] [化74]

[0651] 

(30)

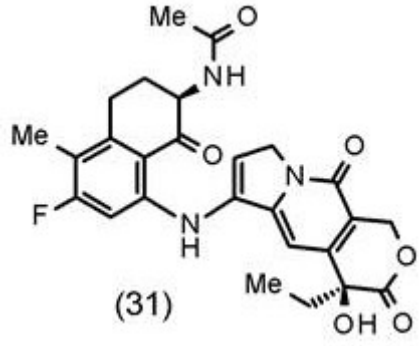
[0652] ^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 1.04 (3H, t, J=7.5 Hz), 1.80-1.93 (2H, m), 2.02-2.18 (8H, m), 3.80-3.85 (1H, m), 4.62-4.68 (1H, m), 4.75-4.85 (m, 2H), 5.20-5.33 (m, 2H), 5.70 (1H, d, J=16.0 Hz), 6.35 (1H, s), 6.67 (1H, d, J=5.5 Hz), 6.88 (1H, s), 6.99 (1H, d, J=12.0 Hz), 11.14 (1H, s).

MS (ESI) (m/z): 496.5 ($[M+H]^+$).

[0653] 式(31)表示的化合物:

[0654] N-[(2R)-8-{[(4S)-4-乙基-4-羟基-3,10-二氧代-3,4,8,10-四氢-1H-吡喃并[3,4-f]吲嗪-6-基]氨基}-6-氟-5-甲基-1-氧代-1,2,3,4-四氢萘-2-基]乙酰胺

[0655] [化75]

[0656] 

(31)

[0657] ^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 1.03 (3H, t, J=7.5 Hz), 1.80-1.92 (2H, m), 2.02-2.18 (8H, m), 3.79 (1H, s), 4.60-4.68 (1H, m), 4.72-4.87 (m, 2H), 5.28 (1H, d, J=16.0 Hz), 5.70 (1H, d, J=16.0 Hz), 6.35 (1H, s), 6.68 (1H, d, J=4.5 Hz), 6.88 (1H, s), 7.00 (1H, d, J=12.0 Hz), 11.10 (1H, s).

MS (ESI) (m/z): 496.6 ($[M+H]^+$).

[0658] 冷却后,用甲苯将液体体积调节至135mL,并将混合物再搅拌2小时。将沉淀的晶体

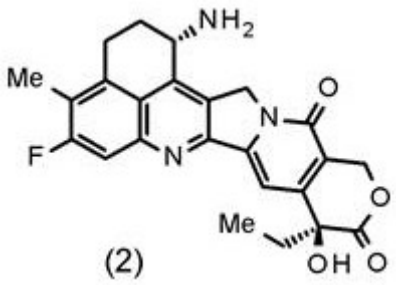
过滤,并将通过过滤分离的晶体用丙酮(12.5 mL)洗涤。将所得晶体在40℃在减压下干燥,得到N-[(9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲嗪并[1,2-b]喹啉-1-基]乙酰胺的黄色晶体(4.58 g,收率96%)。

[0659] 仪器数据与实施例6-1中所述化合物的数据相同。

[0660] (实施例7-1)

[0661] (1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲嗪并[1,2-b]喹啉-1-铵甲磺酸盐二水合物

[0662] [化76]

[0663] 

(2)

[0664] 将甲磺酸(1.5 L)加至N-[(9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲嗪并[1,2-b]喹啉-1-基]乙酰胺(300.0 g,628 mmol)于2-甲氧基乙醇(1.5 L)、水(4.5 L)和乙基环己烷(1.5 L)中的悬浮液中,将混合物回流8小时。将混合物冷却至室温并分离以除去有机层后,将除去的有机层在减压下浓缩至3L。将浓缩物加热至40℃,并历经30分钟逐滴加入甲醇(6 L)。将混合物搅拌2小时后,将沉淀的晶体过滤,并将通过过滤分离的晶体用甲醇(1.5 L)洗涤。

[0665] 将所得晶体溶于水(1.2 L)、甲醇(600 mL)和甲磺酸(1.2 L)中,加入活性炭(15 g),并将混合物搅拌30分钟。加入纤维素粉末(150 g)并将混合物搅拌30分钟后,通过过滤分离不溶物,并用50%的甲磺酸溶液(600 mL)和甲醇(600 mL)洗涤。将滤液加热至40℃,并历经55分钟逐滴加入甲醇(4.8 L)。将混合物搅拌2小时后,将沉淀的晶体过滤,并将通过过滤分离的晶体用甲醇(1.5 L)洗涤。

[0666] 将得到的晶体悬浮在乙醇(6 L)和水(600 mL)中,并将混合物回流1.5小时。将混合物冷却至室温并搅拌30分钟后,将沉淀的晶体过滤并用乙醇(1.5 L)洗涤。将所得晶体在40℃在减压下干燥,然后在具有40% RH的空气中湿润4天,得到(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲嗪并[1,2-b]喹啉-1-铵甲磺酸盐二水合物的无色晶体(152.3 g, 收率43%)。

[0667] ^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6, D_2O) δ 0.89 (3H, t, J=7.3 Hz), 1.90 (2H, q, J=7.3 Hz), 2.35 (3H, s), 2.38-2.47 (1H, m), 2.64 (3H, s), 3.04-3.11 (1H, m), 3.30-3.34 (1H, m), 5.08 (1H, s), 5.34 (2H, dd, J=17.7, 15.9 Hz), 5.50 (2H, dd, J=17.7, 10.4 Hz), 7.41 (1H, s), 7.59 (1H, d, J=11.0 Hz).

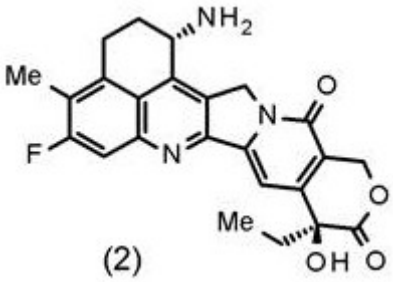
[0668] ^{13}C-NMR (125 MHz, DMSO-d_6) δ 7.7, 10.9, 11.0, 18.5, 20.8, 24.7, 30.2, 39.5, 44.5, 49.4, 55.9, 65.2, 72.2, 95.3, 96.9, 110.1, 100.3, 119.4, 120.5, 124.6, 124.7, 127.5, 134.2, 135.2, 135.2, 144.8, 147.8, 147.9, 149.9, 152.3, 156.6, 160.6, 162.6, 172.3.

MS (ESI) (m/z): 436 ([M+H]$^+$).

[0669] (实施例7-2)

[0670] (1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲嗪并[1,2-b]喹啉-1-铵甲磺酸盐

[0671] [化77]

[0672] 

(2)

[0673] 将甲磺酸(18 mL)加至N-[(9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲嗪并[1,2-b]喹啉-1-基]乙酰胺(3.5 g,7.3 mmol)于纯净水(53 mL)、2-甲氧基乙醇(18 mL)和乙基环己烷(18 mL)中的悬浮液中,然后将混合物的气氛在减压下反复用氮气置换3次(将在50毫巴下在减压下进行搅拌然后在常压下进行氮气置换的操作重复3次)。将悬浮液加热至85℃,然后搅拌11小时,并在确认反应完成后冷却至25℃。将混合物在减压下浓缩至38.5 mL,将浓缩物加热至40℃,并历经15分钟逐滴加入甲醇(18 mL)。将混合物搅拌6小时后,历经2小时逐滴加入甲醇(53 mL),并且将混合物再搅拌2小时后,将沉淀的晶体过滤,并将通过过滤分离的晶体用甲醇(35 mL)洗涤。

[0674] 将所得晶体溶于纯净水(14 mL)和甲磺酸(14 mL)的混合溶液中,将混合物加热至37℃,然后加入甲醇(7 mL)、活性炭(0.35 g)和助滤剂(0.70 g,硅藻土:Celpure C 1000),并在减压下重复进行3次气氛的氮气置换(50毫巴和常压氮气置换3次)。将悬浮液搅拌20分钟后,通过过滤分离不溶物,并用甲磺酸、纯净水和甲醇(7 mL,7 mL,3.5 mL)的混合溶液和甲醇(7 mL)洗涤。将滤液加热至37℃,并历经15分钟逐滴加入甲醇(10.5 mL)。将混合物搅拌6小时后,历经1小时逐滴加入甲醇(42 mL),并且将混合物再搅拌2小时后,将沉淀的晶体过滤,并将通过过滤分离的晶体用甲醇(35 mL)洗涤。

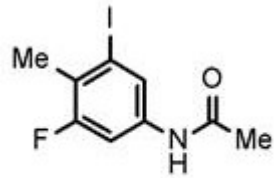
[0675] 将得到的晶体悬浮在乙醇(70 mL)和水(7 mL)中,并在73℃下搅拌2小时。将悬浮液冷却至25℃并搅拌2小时后,将沉淀的晶体过滤并用乙醇(18 mL)洗涤。将所得晶体在40℃在减压下干燥,得到(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲嗪并[1,2-b]喹啉-1-铵甲磺酸盐(1.72 g, 收率44%)。

[0676] 仪器数据与实施例7-1中所述化合物的数据相同。

[0677] (实施例8)

[0678] N-(3-碘-5-氟-4-甲基苯基)乙酰胺

[0679] [化78]

[0680] 

(34)

[0681] 将2-氟-1-甲基-4-硝基苯(5.0 g,32.3 mmol)于浓硫酸(90%或更高,25 mL)和庚烷(25 mL)中的溶液冷却至约1℃,然后分六份加入N-碘代琥珀酰亚胺(10.2 g,45.1 mmol)。将混合物在约2℃下搅拌2小时。将得到的反应溶液加入冷水(25 mL)中。加入甲苯(25 mL)进行分离后,除去水层。然后,将有机层用水(25 mL)、6.5wt%碳酸氢钠水溶液(25 mL)、5wt%亚硫酸钠水溶液(25 mL,3次)、最后用水(25 mL)洗涤。从滤液中除去水层后,将有机层在减压下浓缩。将乙酸乙酯(50 mL)加入到浓缩的残留物(约30mL)中,并将混合物在减压下再次浓缩,得到1-碘-3-氟-2-甲基-5-硝基苯于乙酸乙酯中的溶液(约15 mL)。

[0682] 通过向1-碘-3-氟-2-甲基-5-硝基苯于乙酸乙酯中的溶液(约15 mL)中加入1%铂炭催化剂(1.1 g)和乙酸乙酯(45 mL)获得悬浮液,用氮气置换气氛,然后用氢气置换。将悬浮液在氢气流(0.1 MPa)中在约60℃下搅拌5小时,并冷却至室温。通过过滤将不溶物与所得悬浮液分离,并用乙酸乙酯(15 mL)洗涤。将滤液用0.5N盐酸溶液(50 mL,25 mL)洗涤两次,得到有机层。此时的水层用乙酸乙酯(25 mL)萃取,得到有机层,并将有机层合并。然后,将有机层用6.5wt%的碳酸氢钠水溶液(25 mL)和5wt%的盐水(25 mL)洗涤,并将得到的有机层在减压下浓缩,得到3-碘-5-氟-4-甲基苯胺于乙酸乙酯中的溶液。

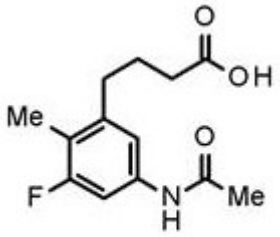
[0683] 将三乙胺(3.7 mL,26.8 mmol)和乙酸酐(1.7 mL,17.7 mmol)加入通过将乙酸乙酯(25 mL)加入3-溴-5-氟-4-甲基苯胺于乙酸乙酯中的溶液(25 mL)中而获得的溶液中,并将混合物在室温搅拌4小时。在将10wt%盐水(25 mL)加入到所得反应溶液中以进行分离之后,除去水层。在减压下浓缩得到的有机层。将乙酸乙酯(50 mL)加入到浓缩的残留物中,加入4N盐酸/乙酸乙酯溶液(5.6 mL,22.6 mmol),然后将混合物在室温搅拌15分钟。通过过滤分离不溶物,并用乙酸乙酯(20 mL)洗涤。在向滤液中加入10 wt%盐水(20 mL)之后,加入25 w/v%氢氧化钠水溶液(2.5 mL)以将pH调节至约7。除去水层后,将有机层在减压下浓缩。将乙腈(38 mL)和水(38 mL)加至浓缩的残留物中,并将浓缩的残留物在25℃下搅拌。通过过滤收集沉淀的晶体,并用50%乙腈水溶液(15 mL)洗涤。将得到的晶体在40℃下在减压下干燥,得到N-(3-碘-5-氟-4-甲基苯基)乙酰胺,为白色晶体(2.8 g,收率29%)。

[0684] ^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.61 (1H, s), 7.47 (1H, d, J=10.8 Hz), 7.10 (1H, brs), 2.30 (3H, d, J=2.3 Hz), 2.16 (3H, s)

[0685] (实施例9)

[0686] 4-[5-(乙酰基氨基)-3-氟-2-甲基苯基]丁酸

[0687] [化79]

[0688] 

(8)

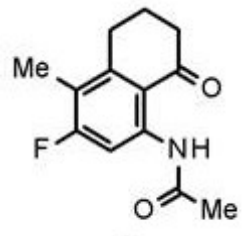
[0689] 将N-(3-碘-5-氟-4-甲基苯基)乙酰胺(2.0 g,6.8 mmol)、3-丁烯酸(0.7 mL,8.2 mmol)和二异丙基乙胺(2.6 mL,15.0 mmol)于四氢呋喃(8 mL)和水(2 mL)中的溶液在减压下脱气并用氮气置换气氛,然后加入三(邻甲苯基)膦(62.3 mg,0.2 mmol)。再次将混合物在减压下脱气并用氮气置换气氛,然后加入乙酸钯(II)(23.0 mg,0.1 mmol),并将混合物在减压下脱气,用氮气置换气氛,然后热回流2小时。将活性炭(0.2 g)、2-甲基四氢呋喃(10 mL)和水(10 mL)加至已冷却至室温的反应溶液中,并将混合物在室温搅拌1小时。通过过滤分离不溶物,并用20%四氢呋喃水溶液(4 mL)洗涤。将2-甲基四氢呋喃(10 mL)和水(10 mL)加至滤液,并加入25w/v%的氢氧化钠水溶液(1.3 mL,8.2 mmol)。除去有机层,将2-甲基四氢呋喃(20 mL)和浓盐酸(36%,1.2 g,12.3 mmol)加入到水层中,然后加入氯化钠(2 g)。分离后,除去水层,有机层用10wt%盐水(6 mL)洗涤。在减压下浓缩得到的有机层,得到含有几何异构体的4-[5-(乙酰基氨基)-3-氟-2-甲基苯基]-3-丁烯酸残留物(1.9 g)。

[0690] 通过将2-甲基四氢呋喃(30 mL)和5%钯炭(1.7 g)加至含有几何异构体的4-[5-(乙酰基氨基)-3-氟-2-甲基苯基]-3-丁烯酸残留物(1.9 g)中得到悬浮液,用氮气置换气氛,然后用氢气置换。将混合物在氢气流(0.3 MPa)中在约40℃下搅拌8小时,并冷却至室温。通过过滤将不溶物与所得悬浮液分离,并用2-甲基四氢呋喃(8 mL)洗涤。将水(10 mL)加至滤液,并用1N盐酸溶液将pH调节至约2。分离后,除去水层,并将得到的有机层在减压下浓缩。将乙酸乙酯(10 mL)加入到浓缩的残留物中,将混合物加热至约50℃,然后加入庚烷(10 mL),并将混合物冷却至室温。通过过滤收集沉淀的晶体,并用乙酸乙酯/庚烷(3/7)(6 mL)洗涤。在减压下干燥得到的晶体,得到4-[5-(乙酰基氨基)-3-氟-2-甲基苯基]丁酸,为白色晶体(1.4 g,收率81%)。

[0691] (实施例10)

[0692] N-(3-氟-4-甲基-8-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1-基)乙酰胺

[0693] [化80]

[0694] 

(9)

[0695] 在室温下在氮气流下将氯化铝(263 mg,1.97 mmol)加至4-[5-(乙酰基氨基)-3-氟-2-甲基苯基]丁酸(200 mg,0.79 mmol)、亚硫酰氯(86 μL,1.18 mmol)和二氯甲烷(4 mL)的溶液中,并将混合物在室温下搅拌2小时。向所得反应溶液中加入1N盐酸水溶液(10 ml)和乙酸乙酯(50 ml)。除去水层,将有机层用水(10 ml)、6.5wt%的碳酸氢钠水溶液(10 ml)和水(10 ml)洗涤,并将得到的有机层经硫酸钠干燥。通过过滤分离不溶物,在减压下蒸馏出溶剂,并将所得残留物通过制备型薄层色谱法(已烷:乙酸乙酯= 2:1)纯化,得到N-(3-氟-4-甲基-8-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1-基)乙酰胺,为淡黄白色晶体(125 mg,收率67%)。

[0696] 仪器数据与实施例3-1中所述化合物的数据相同。

[0697] 序列表的自由文本

[0698] SEQ ID NO: 1 - 抗-HER2抗体的重链氨基酸序列

[0699] SEQ ID NO: 2 - 抗-HER2抗体的轻链氨基酸序列

[0700] SEQ ID NO: 3 - 抗-HER3抗体的重链氨基酸序列

[0701] SEQ ID NO: 4 - 抗-HER3抗体的轻链氨基酸序列

[0702] SEQ ID NO: 5 - 抗-TROP2抗体的重链氨基酸序列

[0703] SEQ ID NO: 6 - 抗-TROP2抗体的轻链氨基酸序列

[0704] SEQ ID NO: 7 - 抗-B7-H3抗体的重链氨基酸序列

[0705] SEQ ID NO: 8 - 抗-B7-H3抗体的轻链氨基酸序列

[0706] SEQ ID NO: 9 - 抗-GPR20抗体的重链氨基酸序列

[0707] SEQ ID NO: 10 - 抗-GPR20抗体的轻链氨基酸序列

[0001] 序列表

[0002] <110> DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED

[0003] <120> 制备抗体-药物缀合物的新方法

[0004] <130> DSPCT-FP1823

[0005] <150> JP2017-167690

[0006] <151> 2017-08-31

[0007] <160> 10

[0008] <170> PatentIn版本3.5

[0009] <210> 1

[0010] <211> 450

[0011] <212> PRT

[0012] <213> 人工序列

[0013] <220>

[0014] <223> 抗-HER2抗体的重链

[0015] <400> 1

[0016] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0017] 1 5 10 15

[0018] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

[0019] 20 25 30

[0020] Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[0021] 35 40 45

[0022] Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val

[0023] 50 55 60

[0024] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

[0025] 65 70 75 80

[0026] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0027] 85 90 95

[0028] Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

[0029] 100 105 110

[0030] Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

[0031] 115 120 125

[0032] Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala

[0033] 130 135 140

[0034] Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

[0035] 145 150 155 160

[0036] Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

[0037] 165 170 175

[0038] Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

[0039] 180 185 190

[0040] Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

[0041] 195 200 205

[0042] Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp

[0043] 210 215 220

[0044] Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly

[0045] 225 230 235 240

[0046] Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

[0047] 245 250 255

[0048] Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

[0049] 260 265 270

[0050] Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

[0051] 275 280 285

[0052] Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

[0053] 290 295 300

[0054] Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

[0055] 305 310 315 320

[0056] Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

[0057] 325 330 335

[0058] Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

[0059] 340 345 350

[0060] Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

[0061] 355 360 365

[0062] Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

[0063] 370 375 380

[0064] Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

[0065] 385 390 395 400

[0066] Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

[0067] 405 410 415

[0068] Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

[0069] 420 425 430

[0070] Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

[0071] 435 440 445

[0072] Gly Lys

[0073] 450

[0074] <210> 2

[0075] <211> 214

[0076] <212> PRT

[0077] <213> 人工序列

[0078] <220>

[0079] <223> 抗-HER2抗体的轻链

[0080] <400> 2

[0081] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

[0082] 1 5 10 15

[0083] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala

[0084] 20 25 30

[0085] Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

[0086] 35 40 45

[0087] Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

[0088] 50 55 60

[0089] Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

[0090] 65 70 75 80

[0091] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro

[0092] 85 90 95

[0093] Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

[0094] 100 105 110

[0095] Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

[0096] 115 120 125

[0097] Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

[0098] 130 135 140

[0099] Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

[0100] 145 150 155 160

[0101] Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

[0102] 165 170 175

[0103] Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

[0104] 180 185 190

[0105] Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

[0106] 195 200 205

[0107] Phe Asn Arg Gly Glu Cys

[0108] 210

[0109] <210> 3

[0110] <211> 447

[0111] <212> PRT

[0112] <213> 人工序列

[0113] <220>

[0114] <223> 抗-HER3抗体的重链

[0115] <400> 3

[0116] Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu

[0117] 1 5 10 15

[0118] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr

[0119] 20 25 30

[0120] Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

[0121] 35 40 45

[0122] Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

[0123] 50 55 60

[0124] Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Glu Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu

[0125] 65 70 75 80

[0126] Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

[0127] 85 90 95

[0128] Arg Asp Lys Trp Thr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu

[0129] 100 105 110

[0130] Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu

[0131] 115 120 125

[0132] Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys

[0133] 130 135 140

[0134] Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser

[0135] 145 150 155 160

[0136] Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser

[0137] 165 170 175

[0138] Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

[0139] 180 185 190

[0140] Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn

[0141] 195 200 205

[0142] Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His

[0143] 210 215 220

[0144] Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val

[0145] 225 230 235 240

[0146] Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

[0147] 245 250 255

[0148] Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu

[0149] 260 265 270

[0150] Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

[0151] 275 280 285

[0152] Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

[0153] 290 295 300

[0154] Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

[0155] 305 310 315 320

[0156] Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
[0157] 325 330 335
[0158] Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
[0159] 340 345 350
[0160] Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
[0161] 355 360 365
[0162] Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
[0163] 370 375 380
[0164] Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
[0165] 385 390 395 400
[0166] Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
[0167] 405 410 415
[0168] Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
[0169] 420 425 430
[0170] His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[0171] 435 440 445
[0172] <210> 4
[0173] <211> 220
[0174] <212> PRT
[0175] <213> 人工序列
[0176] <220>
[0177] <223> 抗-HER3抗体的轻链
[0178] <400> 4
[0179] Asp Ile Glu Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
[0180] 1 5 10 15
[0181] Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
[0182] 20 25 30
[0183] Ser Ser Asn Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Asn Pro Gly Gln
[0184] 35 40 45
[0185] Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
[0186] 50 55 60
[0187] Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
[0188] 65 70 75 80
[0189] Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
[0190] 85 90 95
[0191] Tyr Tyr Ser Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
[0192] 100 105 110
[0193] Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
[0194] 115 120 125

[0195] Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
[0196] 130 135 140
[0197] Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
[0198] 145 150 155 160
[0199] Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
[0200] 165 170 175
[0201] Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
[0202] 180 185 190
[0203] Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
[0204] 195 200 205
[0205] Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[0206] 210 215 220
[0207] <210> 5
[0208] <211> 470
[0209] <212> PRT
[0210] <213> 人工序列
[0211] <220>
[0212] <223> 抗-TROP2抗体的重链
[0213] <400> 5
[0214] Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
[0215] 1 5 10 15
[0216] Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
[0217] 20 25 30
[0218] Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
[0219] 35 40 45
[0220] Thr Thr Ala Gly Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
[0221] 50 55 60
[0222] Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala
[0223] 65 70 75 80
[0224] Glu Asp Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Thr Ser
[0225] 85 90 95
[0226] Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val
[0227] 100 105 110
[0228] Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp
[0229] 115 120 125
[0230] Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
[0231] 130 135 140
[0232] Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
[0233] 145 150 155 160

[0234] Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
[0235] 165 170 175
[0236] Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
[0237] 180 185 190
[0238] Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
[0239] 195 200 205
[0240] Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
[0241] 210 215 220
[0242] Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
[0243] 225 230 235 240
[0244] Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
[0245] 245 250 255
[0246] Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
[0247] 260 265 270
[0248] Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
[0249] 275 280 285
[0250] Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
[0251] 290 295 300
[0252] Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
[0253] 305 310 315 320
[0254] Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
[0255] 325 330 335
[0256] Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
[0257] 340 345 350
[0258] Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
[0259] 355 360 365
[0260] Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
[0261] 370 375 380
[0262] Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
[0263] 385 390 395 400
[0264] Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
[0265] 405 410 415
[0266] Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
[0267] 420 425 430
[0268] Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
[0269] 435 440 445
[0270] Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
[0271] 450 455 460
[0272] Ser Leu Ser Pro Gly Lys

[0273] 465 470

[0274] <210> 6

[0275] <211> 234

[0276] <212> PRT

[0277] <213> 人工序列

[0278] <220>

[0279] <223> 抗-TROP2抗体的轻链

[0280] <400> 6

[0281] Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser

[0282] 1 5 10 15

[0283] Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser

[0284] 20 25 30

[0285] Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp

[0286] 35 40 45

[0287] Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

[0288] 50 55 60

[0289] Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser

[0290] 65 70 75 80

[0291] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

[0292] 85 90 95

[0293] Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr

[0294] 100 105 110

[0295] Ile Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

[0296] 115 120 125

[0297] Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

[0298] 130 135 140

[0299] Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr

[0300] 145 150 155 160

[0301] Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

[0302] 165 170 175

[0303] Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

[0304] 180 185 190

[0305] Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys

[0306] 195 200 205

[0307] His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

[0308] 210 215 220

[0309] Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

[0310] 225 230

[0311] <210> 7

[0312] <211> 471

[0313] <212> PRT

[0314] <213> 人工序列

[0315] <220>

[0316] <223> 抗-B7-H3抗体的重链

[0317] <400> 7

[0318] Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp

[0319] 1 5 10 15

[0320] Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

[0321] 20 25 30

[0322] Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

[0323] 35 40 45

[0324] Thr Asn Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

[0325] 50 55 60

[0326] Glu Trp Met Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Val Lys Tyr Asn

[0327] 65 70 75 80

[0328] Glu Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser

[0329] 85 90 95

[0330] Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val

[0331] 100 105 110

[0332] Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Pro Leu Tyr Tyr Phe

[0333] 115 120 125

[0334] Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr

[0335] 130 135 140

[0336] Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser

[0337] 145 150 155 160

[0338] Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu

[0339] 165 170 175

[0340] Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His

[0341] 180 185 190

[0342] Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser

[0343] 195 200 205

[0344] Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys

[0345] 210 215 220

[0346] Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu

[0347] 225 230 235 240

[0348] Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

[0349] 245 250 255

[0350] Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

[0351] 260 265 270

[0352] Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

[0353] 275 280 285

[0354] Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp

[0355] 290 295 300

[0356] Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr

[0357] 305 310 315 320

[0358] Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

[0359] 325 330 335

[0360] Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu

[0361] 340 345 350

[0362] Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg

[0363] 355 360 365

[0364] Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys

[0365] 370 375 380

[0366] Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

[0367] 385 390 395 400

[0368] Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

[0369] 405 410 415

[0370] Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser

[0371] 420 425 430

[0372] Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser

[0373] 435 440 445

[0374] Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

[0375] 450 455 460

[0376] Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

[0377] 465 470

[0378] <210> 8

[0379] <211> 233

[0380] <212> PRT

[0381] <213> 人工序列

[0382] <220>

[0383] <223> 抗-B7-H3抗体的轻链

[0384] <400> 8

[0385] Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser

[0386] 1 5 10 15

[0387] Gly Ala Tyr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser

[0388] 20 25 30

[0389] Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Arg

[0390] 35 40 45

[0391] Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg

[0392] 50 55 60

[0393] Pro Leu Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg

[0394] 65 70 75 80

[0395] Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser

[0396] 85 90 95

[0397] Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser

[0398] 100 105 110

[0399] Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr

[0400] 115 120 125

[0401] Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu

[0402] 130 135 140

[0403] Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro

[0404] 145 150 155 160

[0405] Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly

[0406] 165 170 175

[0407] Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr

[0408] 180 185 190

[0409] Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His

[0410] 195 200 205

[0411] Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val

[0412] 210 215 220

[0413] Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

[0414] 225 230

[0415] <210> 9

[0416] <211> 472

[0417] <212> PRT

[0418] <213> 人工序列

[0419] <220>

[0420] <223> 抗-GPR20抗体的重链

[0421] <400> 9

[0422] Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp

[0423] 1 5 10 15

[0424] Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

[0425] 20 25 30

[0426] Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

[0427] 35 40 45

[0428] Thr Ser Tyr Tyr Ile Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

[0429] 50 55 60

[0430] Lys Tyr Met Gly Phe Ile Asn Pro Gly Ser Gly His Thr Asn Tyr Asn

[0431] 65 70 75 80

[0432] Glu Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser

[0433] 85 90 95

[0434] Thr Ala Thr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val

[0435] 100 105 110

[0436] Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ala Gly Gly Phe Leu Arg Ile Ile Thr Lys

[0437] 115 120 125

[0438] Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

[0439] 130 135 140

[0440] Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr

[0441] 145 150 155 160

[0442] Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro

[0443] 165 170 175

[0444] Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val

[0445] 180 185 190

[0446] His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser

[0447] 195 200 205

[0448] Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile

[0449] 210 215 220

[0450] Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val

[0451] 225 230 235 240

[0452] Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

[0453] 245 250 255

[0454] Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

[0455] 260 265 270

[0456] Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

[0457] 275 280 285

[0458] Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val

[0459] 290 295 300

[0460] Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

[0461] 305 310 315 320

[0462] Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln

[0463] 325 330 335

[0464] Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala

[0465] 340 345 350

[0466] Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

[0467] 355 360 365

[0468] Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
[0469] 370 375 380
[0470] Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
[0471] 385 390 395 400
[0472] Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
[0473] 405 410 415
[0474] Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
[0475] 420 425 430
[0476] Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
[0477] 435 440 445
[0478] Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
[0479] 450 455 460
[0480] Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[0481] 465 470
[0482] <210> 10
[0483] <211> 234
[0484] <212> PRT
[0485] <213> 人工序列
[0486] <220>
[0487] <223> 抗-GPR20抗体的轻链
[0488] <400> 10
[0489] Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
[0490] 1 5 10 15
[0491] Gly Ala Tyr Gly Asp Thr Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
[0492] 20 25 30
[0493] Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser
[0494] 35 40 45
[0495] Val Ser Thr Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Gln Pro
[0496] 50 55 60
[0497] Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Gly Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
[0498] 65 70 75 80
[0499] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
[0500] 85 90 95
[0501] Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Asn Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn
[0502] 100 105 110
[0503] Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
[0504] 115 120 125
[0505] Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
[0506] 130 135 140

[0507] Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
[0508] 145 150 155 160
[0509] Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
[0510] 165 170 175
[0511] Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
[0512] 180 185 190
[0513] Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
[0514] 195 200 205
[0515] His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
[0516] 210 215 220
[0517] Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[0518] 225 230

SEQ ID NO: 1 - 抗-HER2抗体的重链氨基酸序列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR
QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSK
NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

图 1

SEQ ID NO: 2 - 抗-HER2抗体的轻链氨基酸序列

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQ
KPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTIS
SLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN
ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图 2

SEQ ID NO: 3 - 抗-HER3抗体的重链氨基酸序列

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIR
QPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRVTISVETSKN
QFSLKLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFDLWGRGTLVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

图 3

SEQ ID NO: 4 - 抗-HER3抗体的轻链氨基酸序列

DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSNRNY
LAWYQQNPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD
FTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFGQGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图 4

SEQ ID NO: 5 - 抗-TROP2抗体的重链氨基酸序列

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVK
VSCKASGYTFTTAGMQWVRQAPGQGLEWMGWINTHSGV
PKYAEDFKGRVTISADTSTSTAYLQLSSLKSEDTAVYY
CARSGFGSSYWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA
PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK
PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK

信号序列 (1-19), 可变区 (20-140), 恒定区 (141-470)

图 5

SEQ ID NO: 6 - 抗-TROP2抗体的轻链氨基酸序列

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGDR
VTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYT
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYIT
PLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
FNRGEC

信号序列 (1-20), 可变区 (21-129), 恒定区 (130-234)

图 6

SEQ ID NO: 7 - 抗-B7-H3抗体的重链氨基酸序列

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGSSVK
VSCKASGYTFTNYVMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDD
VKYNEKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYY
CARWGYYGSPLYYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK

信号序列 (1-19), 可变区 (20-141), 恒定区 (142-471)

图 7

SEQ ID NO: 8 - 抗-B7-H3抗体的轻链氨基酸序列

MVLQTQVFISLLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGER
ATLSCRASSRLIYMHWYQQKPGQAPRPLIYATSNLASG
IPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWNSNP
PTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV
CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC

信号序列 (1-20), 可变区 (21-128), 恒定区 (129-233)

图 8

SEQ ID NO: 9 - 抗-GPR20抗体的重链氨基酸序列

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGASVK
VSCKASGYTFTSYYISWIRQAPGQGLKYMGFINPGSGH
TNYNEKFKGRVTITADKSSSTATMELSSLRSEDTAVYY
CARGAGGFLRIITKFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK

信号序列 (1-19), 可变区 (20-142), 恒定区 (143-472)

图 9

SEQ ID NO: 10 - 抗-GPR20抗体的轻链氨基酸序列

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDTQLTQSPSSLSASVGDR
VTITCRASKSVSTYIHWYQQKPGKQPKLLIYSAGNLES
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFANYYCQQINEL
PYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
FNRGEC

信号序列 (1-20), 可变区 (21-129), 恒定区 (130-234)

图 10