(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 111164208 B
(45)授权公告日 2023.08.04

(21)申请号 201880063626.3

(22)申请日 2018.09.28

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111164208 A

(43)申请公布日 2020.05.15

(30)优先权数据
2017-190713 2017.09.29 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.03.27

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2018/036252 2018.09.28

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/065964 JA 2019.04.04

(73)专利权人 第一三共株式会社
地址 日本东京

(72)发明人 户田成洋 太田悠介 土居史尚 目黑正规 早川市郎 芦田真二 益田刚 中田隆 岩本充广 原田直弥 寺内智子 冈岛大祐 中村健介 内田宏昭 滨田洋文

(74)专利代理机构 北京品源专利代理有限公司 11332
专利代理师 吕琳 朴秀玉

(51)Int.Cl.
C12N 15/06(2006.01)
A61K 31/5513(2006.01)
A61K 35/00(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61K 47/68(2006.01)
C07D 487/04(2006.01)
C07K 16/00(2006.01)
C07K 16/30(2006.01)
C12N 5/10(2006.01)
C12P 21/08(2006.01)

(56)对比文件
WO 2017137556 A1,2017.08.17
CN 105142674 A,2015.12.09
US 2007072846 A1,2007.03.29
Carl U等.《Discovery and Optimization of HKT288, a Cadherin-6-Targeting ADC for the Treatment of Ovarian and Renal Cancers》.《cancer discovery》.2017,第7卷(第9期),第1030-1045页.

审查员 王斯奇

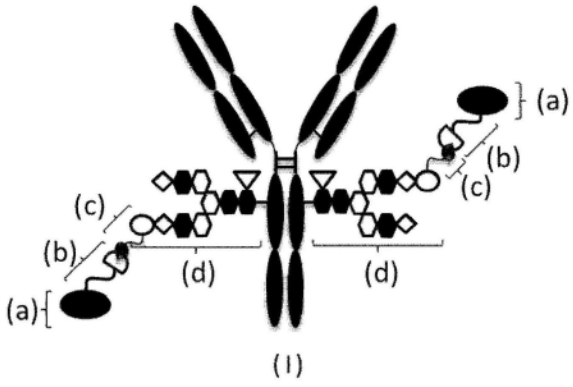
权利要求书20页 说明书304页
序列表52页 附图31页

(54)发明名称

抗体－吡咯并苯并二氮杂卓衍生物偶联物

(57)摘要

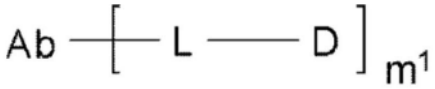
本发明提供一种新的抗体－吡咯并苯并二氮杂卓衍生物及使用其的新的抗体－吡咯并苯并二氮杂卓衍生物偶联物，以及新的CLDN6和/或CLDN9抗体。



(I)

CN 111164208 B

1.一种抗体－药物偶联物,其由下式表示:



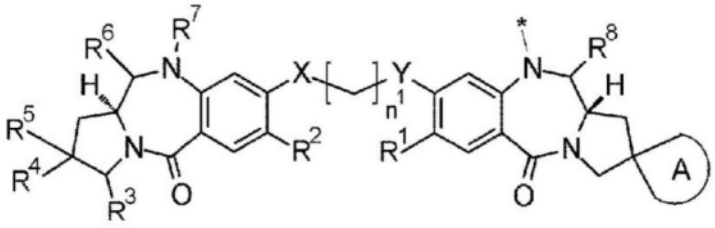
式中,m^1表示整数1～10,

Ab表示抗体或该抗体的功能性片段,该抗体的糖链可被重构,

L表示连接Ab和D的连接子,

Ab可从其氨基酸残基直接与L结合,也可从Ab的糖链或重构的糖链与L结合,

D表示下式所示的药物,



式中,星号表示与L结合,

n^1表示整数2～8,

A表示螺环键合的环丙烷环,

R^1以及R^2分别独立地表示C1～C6烷氧基、C1～C6烷基、氢原子、羟基、硫醇基、C1～C6烷硫基、卤素原子或－NR'R",

在此,R'及R"分别独立地表示氢原子或C1～C6烷基,

R^3、R^4以及R^5选自下述(i)～(iii):

(i)R^3以及R^4一起与各基团所结合的碳原子一起形成双键,

R^5表示可具有选自组1中的1个或多个取代基的芳基或杂芳基,或可具有选自组2中的1个或多个取代基的C1～C6烷基;

(ii)R^3表示氢原子,

R^4及R^5与R^4及R^5所结合的碳原子一起形成3～5元饱和烃环或者3～5元饱和杂环或CH_2＝;

(iii)R^3、R^4及R^5与R^3所结合的碳原子以及R^4及R^5所结合的碳原子一起形成可具有选自组3中的1个或多个取代基的苯环或6元杂环,

R^6以及R^7都表示氢原子,或者R^6以及R^7一起表示亚胺键(C＝N),

R^8为羟基或C1～C3烷氧基,

X以及Y分别独立地表示氧原子、氮原子或硫原子,

组1表示:

a)可被1～3个卤素原子取代的C1～C6烷氧基,

b)可被1～3个选自卤素原子、羟基、－OCOR'、－NR'R"、－C(＝NR')－NR"R"'以及－NHC(＝NR')－NR"R"'中的任意一个取代的C1～C6烷基,

c)卤素原子,

d)C3～C5环烷氧基,

e)C1～C6烷硫基,

f)－NR'R"，

g)－C(＝NR')－NR"R"'，

h)－NHC(＝NR')－NR"R"'，

i)－NHCOR'，或

j)羟基，

在此，R'以及R"如前面定义所述，R"'分别独立地表示氢原子或C1～C6烷基，

组2表示：卤素原子、羟基、或C1～C6烷氧基，并且，

组3表示：卤素原子、或可被1～3个卤素原子取代的C1～C6烷基或者C1～C6烷氧基。

2.根据权利要求1所述的抗体－药物偶联物，其中，

R^1以及R^2分别独立地表示C1～C3烷氧基，

R^3以及R^4一起与各基团所结合的碳原子一起形成双键，

R^5表示可具有选自组4中的1个或多个取代基的芳基或杂芳基，或者可具有选自组5中的1个或多个取代基的C1～C3烷基，

X以及Y为氧原子，

组4表示：

a)可被1～3个卤素原子取代的C1～C3烷氧基，

b)可被1～3个选自卤素原子、羟基、－OCOR"、－C(＝NR')－NR"R"'、以及－NHC(＝NR')－NR"R"'中的任意一个取代的C1～C3烷基，

c)C3～C5环烷氧基，

d)－C(＝NR')－NR"R"'，

e)－NHC(＝NR')－NR"R"'，或

f)羟基，

在此，R'、R"及R"'分别独立地表示氢原子或C1～C3烷基，并且，

组5表示：卤素原子、羟基、或C1～C3烷氧基。

3.根据权利要求1所述的抗体－药物偶联物，其中，

R^1以及R^2分别独立地表示C1～C3烷氧基，

R^3表示氢原子，

R^4以及R^5与R^4以及R^5所结合的碳原子一起形成3～5元饱和烃环或$=CH_2$，并且，

X以及Y为氧原子。

4.根据权利要求1所述的抗体－药物偶联物，其中，

R^1以及R^2分别独立地表示C1～C3烷氧基，

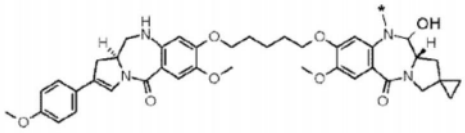
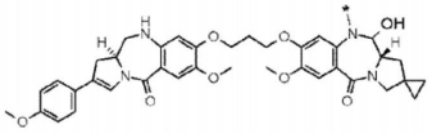
R^3、R^4及R^5与R^3所结合的碳原子以及R^4及R^5所结合的碳原子一起，形成可具有选自组6中的1个或多个取代基的苯环，

X以及Y为氧原子，并且，

组6表示：卤素原子、或可被1～3个卤素原子取代的C1～C3烷基或C1～C3烷氧基。

5.根据权利要求1或2所述的抗体－药物偶联物，其中，

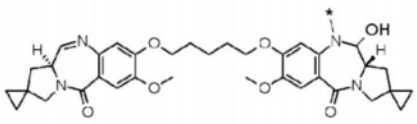
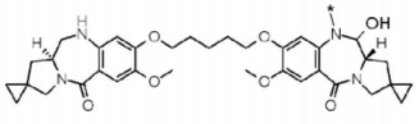
D由以下的2个化学式中的任意一个表示，

式中，星号表示与L结合。

6.根据权利要求1或3所述的抗体－药物偶联物，其中，

D由以下的2个化学式中的任意一个表示，

式中，星号表示与L结合。

7.根据权利要求1～4中任一项所述的抗体－药物偶联物，其中，

L以－Lb－La－Lp－NH－B－CH_2－O(C＝O)－＊表示，

式中，星号表示与D结合，

B表示苯基或杂芳基，

Lp表示在靶细胞中能够切断的由氨基酸序列形成的连接子，

La表示选自以下的组中的任意一个：

－C(＝O)－$(CH_2CH_2)n^2$－C(＝O)－，

－C(＝O)－$(CH_2CH_2)n^2$－C(＝O)－NH－$(CH_2CH_2)n^3$－C(＝O)－，

－C(＝O)－$(CH_2CH_2)n^2$－C(＝O)－NH－$(CH_2CH_2O)n^3$－CH_2－C(＝O)－，

－C(＝O)－$(CH_2CH_2)n^2$－NH－C(＝O)－$(CH_2CH_2O)n^3$－CH_2CH_2－C(＝O)－，以及

－$(CH_2)n^4$－O－C(＝O)－，

n^2表示整数1～3，n^3表示整数1～5，n^4表示整数0～2，

Lb表示将La与Ab的糖链或重构的糖链结合的间隔子。

8.根据权利要求7所述的抗体－药物偶联物，其中，

B为选自1,4－苯基、2,5－吡啶基、3,6－吡啶基、2,5－嘧啶基、2,5－噻吩基中的任意一种。

9.根据权利要求8所述的抗体－药物偶联物，其中，

B为1,4－苯基。

10.根据权利要求7所述的抗体－药物偶联物，其中，

Lp为由2～7个氨基酸形成的氨基酸残基。

11.根据权利要求7所述的抗体－药物偶联物，其中，

Lp为由选自甘氨酸、缬氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、谷氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、瓜氨酸、亮氨酸、丝氨酸、赖氨酸以及天冬氨酸中的氨基酸形成的氨基酸残基。

12.根据权利要求7所述的抗体－药物偶联物，其中，

Lp选自以下的组：

－GGVA－、－GG－(D－)VA－、－VA－、－GGFG－、－GGPI－、－GGVCit－、－GGVK－、－GG(D－)PI－、以及－GGPL－。

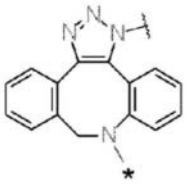
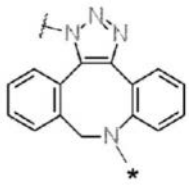
13.根据权利要求7所述的抗体－药物偶联物，其中，

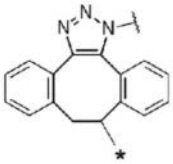
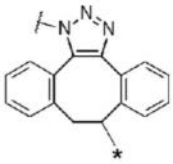
La选自以下的组：

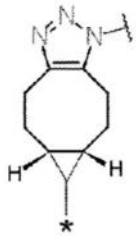
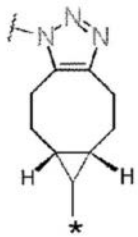
－C(＝O)－CH_2CH_2－C(＝O)－，－C(＝O)－$(CH_2CH_2)_2$－C(＝O)－，
－C(＝O)－CH_2CH_2－C(＝O)－NH－$(CH_2CH_2)_2$－C(＝O)－，
－C(＝O)－CH_2CH_2－C(＝O)－NH－$(CH_2CH_2O)_2$－CH_2－C(＝O)－，
－C(＝O)－CH_2CH_2－NH－C(＝O)－$(CH_2CH_2O)_4$－CH_2CH_2－C(＝O)－，
－CH_2－OC(＝O)－，以及－OC(＝O)－。

14.根据权利要求7所述的抗体－药物偶联物，其中，

Lb由下式表示：


或者

，


或者

或者，


或者

，

在上述所示的Lb的结构式中，星号表示与La结合，波浪线表示与Ab的糖链或重构的糖链结合。

15.根据权利要求7所述的抗体－药物偶联物，其中，

L以－Lb－La－Lp－NH－B－CH_2－O(C＝O)－＊表示，

式中，B为1,4－苯基，

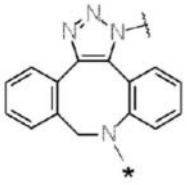
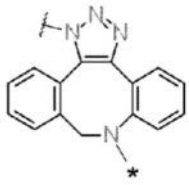
Lp表示选自以下的组中的任意一个：

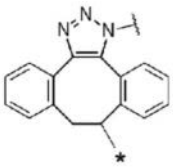
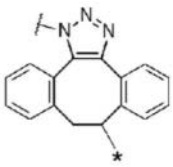
－GGVA－、－GG－(D－)VA－、－VA－、－GGFG－、－GGPI－、－GGVCit－、－GGVK－、以及－GGPL－，

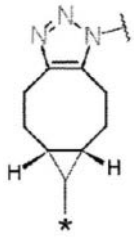
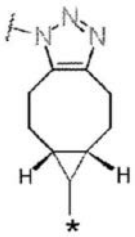
La表示选自以下的组中的任意一个：

－C(＝O)－CH_2CH_2－C(＝O)－、－C(＝O)－$(CH_2CH_2)_2$－C(＝O)－、－C(＝O)－CH_2CH_2－C(＝O)－NH－$(CH_2CH_2)_2$－C(＝O)－、－C(＝O)－CH_2CH_2－C(＝O)－NH－$(CH_2CH_2O)_2$－CH_2－C(＝O)－、－C(＝O)－CH_2CH_2－NH－C(＝O)－$(CH_2CH_2O)_4$－CH_2CH_2－C(＝O)－、－CH_2－OC(＝O)－、以及－OC(＝O)－，并且，

Lb由下式表示：


或者

，


或者

或者，


或者

，

在此，在上述所示的Lb的结构式中，星号表示与La结合，波浪线表示与Ab的糖链或重构的糖链结合。

16.根据权利要求7所述的抗体－药物偶联物，其中，

L选自以下的组：

$-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGVA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$、$-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GG-(D-)VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$、

$-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$、

$-Z^1-C(=O)-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$、

$-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGPI-NH-B-CH_2-OC(=O)-$、

$-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-B-CH_2-OC(=O)-$、

$-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGVCit-NH-B-CH_2-OC(=O)-$、

$-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGVK-NH-B-CH_2-OC(=O)-$、

$-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGPL-NH-B-CH_2-OC(=O)-$、

$-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$、

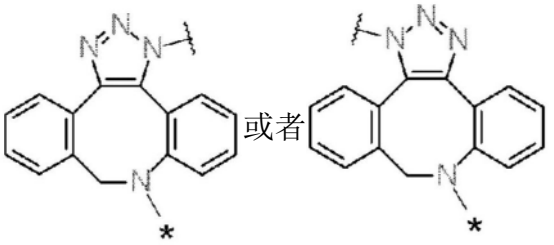
$-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_2-CH_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$、

$-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-NH-C(=O)-(CH_2CH_2O)_4-CH_2CH_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$、

$-Z^2-OC(=O)-GGVA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$、以及

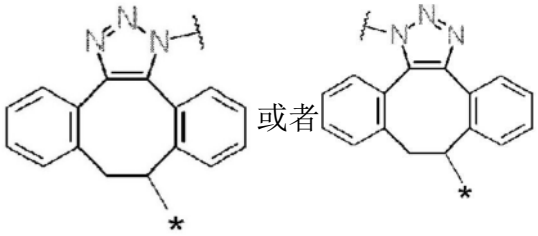
$-Z^3-CH_2-OC(=O)-GGVA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$，

在此，Z^1表示以下的结构式：


或者

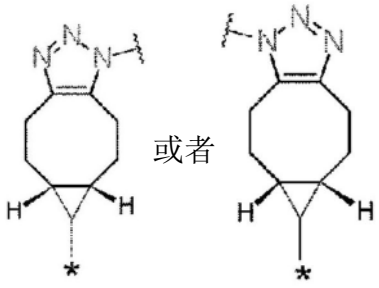
Z^2表示以下的结构式：

，


或者

，

Z^3表示以下的结构式：



，

在此，在Z^1、Z^2以及Z^3的结构式中，星号表示与La结合，波浪线表示与Ab的糖链或重构的糖链结合，并且，

B表示1,4－苯基。

17.根据权利要求16所述的抗体－药物偶联物，其中，

L选自以下的组：

$-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGVA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$，

$-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$，

$-Z^1-C(=O)-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$，

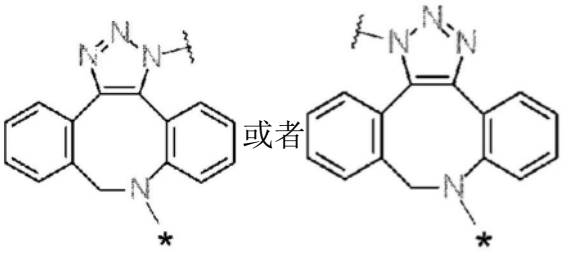
$-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGVCit-NH-B-CH_2-OC(=O)-$，

$-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$，

$-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_2-CH_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$，以及

$-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-NH-C(=O)-(CH_2CH_2O)_4-CH_2CH_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$，

在此，B为1,4－苯基，Z^1表示以下的结构式：



，

在此，在Z^1的结构式中，星号表示与Z^1所邻接的C(=O)结合，波浪线表示与Ab的糖链或重构的糖链结合。

18.根据权利要求1～4中任一项所述的抗体－药物偶联物，其中，

L以$-Lb-La-Lp-NH-B-CH_2-O(C=O)-*$表示，

式中，星号表示与D结合，

B表示1,4－苯基，

Lp表示－GGVA－、或－VA，

La表示$-(CH_2)n^9-C(=O)-$、或$-(CH_2CH_2)n^{10}-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)n^{11}-CH_2CH_2-C(=O)-$，

n^9表示整数2～7，n^{10}表示整数1～3，n^{11}表示整数6～10，

Lb为－(丁二酰亚胺－3－基－N)－。

19.根据权利要求18所述的抗体－药物偶联物,其中,

L表示选自以下的组中的任意一个:

－(丁二酰亚胺－3－基－N)－$(CH_2)_5$－C(=O)－VA－NH－B－CH_2－OC(=O)－、

－(丁二酰亚胺－3－基－N)－$(CH_2)_5$－C(=O)－GGVA－NH－B－CH_2－OC(=O)－、以及

－(丁二酰亚胺－3－基－N)－CH_2CH_2－C(=O)－NH－$(CH_2CH_2O)_8$－CH_2CH_2－C(=O)－VA－NH－B－CH_2－OC(=O)－,

在此,B为1,4－苯基。

20.根据权利要求1～4、8～17、19中任一项所述的抗体－药物偶联物,其中,

抗体为IgG。

21.根据权利要求20所述的抗体－药物偶联物,其中,

抗体为IgG1、IgG2或IgG4。

22.根据权利要求1～4、8～17、19、21中任一项所述的抗体－药物偶联物,其特征在于,

抗体与肿瘤细胞结合且被吞入肿瘤细胞内而内化。

23.根据权利要求22所述的抗体－药物偶联物,其特征在于,

抗体还具有抗肿瘤效果。

24.根据权利要求1～4、8～17、21、23中任一项所述的抗体－药物偶联物,其中,

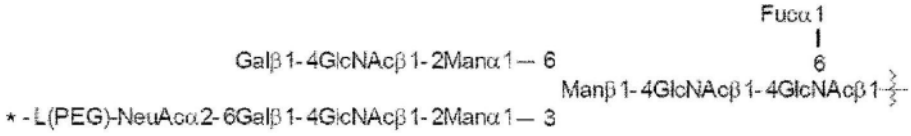
抗体从与抗体的Asn297结合的糖链与L结合,所述糖链为N297糖链。

25.根据权利要求24所述的抗体－药物偶联物,其中,

N297糖链为重构的糖链。

26.根据权利要求24所述的抗体－药物偶联物,其中,

N297糖链为具有下式所示的结构的N297－(Fuc)MSG1、N297－(Fuc)MSG2或它们的混合物、或N297－(Fuc)SG,



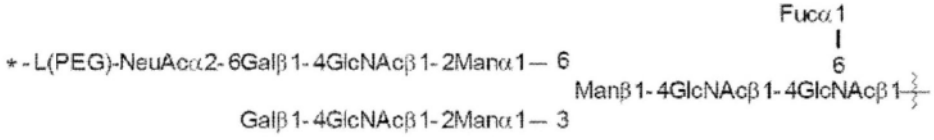
[N297-(Fuc)MSG1]

式中,波浪线表示与抗体的Asn297结合,

L(PEG)表示－$(CH_2CH_2－O)n^5$－CH_2CH_2－NH－,在此,右端的氨基表示与N297糖链的β－Man支链的1－3链侧的非还原末端的唾液酸的2位羧酸进行酰胺键合,

星号表示与所述连接子L结合,并且,

n^5表示整数2～10;



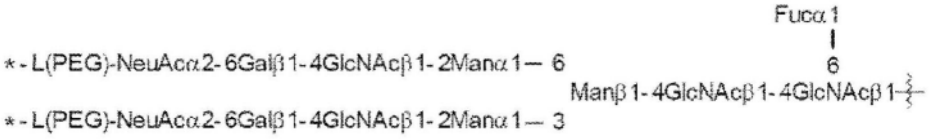
[N297-(Fuc)MSG2]

式中,波浪线表示与抗体的Asn297结合,

L(PEG)表示－$(CH_2CH_2－O)n^5$－CH_2CH_2－NH－,在此,右端的氨基表示与N297糖链的β－Man支链的1－6链侧的非还原末端的唾液酸的2位羧酸进行酰胺键合,

星号表示与所述连接子L结合,并且,

n^5表示整数2～10;以及



[N297-(Fuc)SG]

式中,波浪线表示与抗体的Asn297结合,

L(PEG)表示－$(CH_2CH_2－O)n^5－CH_2CH_2－NH－$,在此,右端的氨基表示与N297糖链的β－Man支链的1－3链侧以及1－6链侧两者的非还原末端的唾液酸的2位羧酸进行酰胺键合,

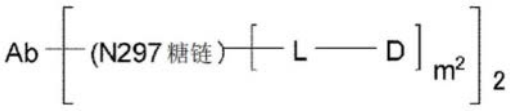
星号表示与所述连接子L结合,并且,

n^5表示整数2～10。

27.根据权利要求26所述的抗体－药物偶联物,其中,

n^5为整数2～5。

28.根据权利要求24所述的抗体－药物偶联物,其由下式表示:



式中,m^2表示整数1或2,

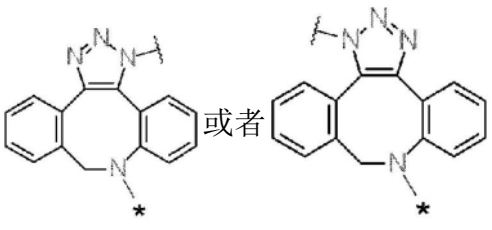
L为连接Ab的N297糖链与D的连接子,其为选自以下的组中的任意一个连接子:

$－Z^1－C(=O)－CH_2CH_2－C(=O)－GGVA－NH－B－CH_2－OC(=O)－$、$－Z^1－C(=O)－CH_2CH_2－C(=O)－VA－NH－B－CH_2－OC(=O)－$、$－Z^1－C(=O)－(CH_2CH_2)_2－C(=O)－VA－NH－B－CH_2－OC(=O)－$、$－Z^1－C(=O)－CH_2CH_2－C(=O)－GGVCit－NH－B－CH_2－OC(=O)－$、$－Z^1－C(=O)－CH_2CH_2－C(=O)－NH－(CH_2CH_2)_2－C(=O)－VA－NH－B－CH_2－OC(=O)－$、

$－Z^1－C(=O)－CH_2CH_2－C(=O)－NH－(CH_2CH_2O)_2－CH_2－C(=O)－VA－NH－B－CH_2－OC(=O)－$、以及

$－Z^1－C(=O)－CH_2CH_2－NH－C(=O)－(CH_2CH_2O)_4－CH_2CH_2－C(=O)－VA－NH－B－CH_2－OC(=O)－$,

在此,B为1,4－苯基,Z^1表示以下的结构式:



,

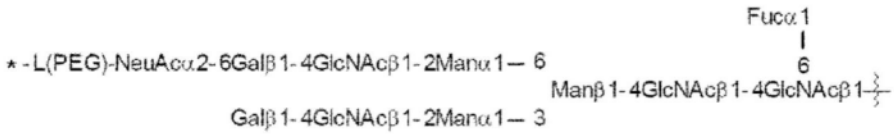
在此,在上述所示的Z^1的结构式中,星号表示与Z^1所邻接的C(=O)结合,波浪线表示与Ab的N297糖链结合,

Ab表示IgG抗体或该抗体的功能性片段,

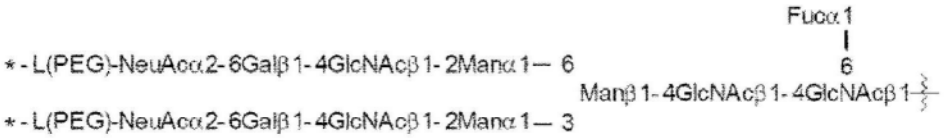
Ab的N297糖链表示具有下式所示结构的N297－(Fuc)MSG1、N297－(Fuc)MSG2或它们的混合物、或N297－(Fuc)SG中的任意一种,



[N297-(Fuc)MSG1]



[N297-(Fuc)MSG2]



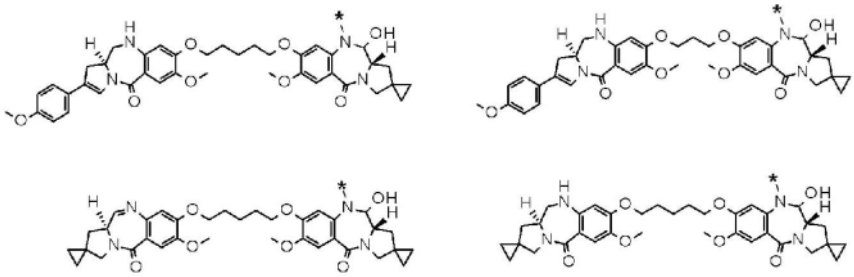
[N297-(Fuc)SG]

上式中，波浪线表示与抗体的Asn297结合，

N297糖链中的L(PEG)表示－NH－CH_2CH_2－(O－CH_2CH_2)n^5－＊，

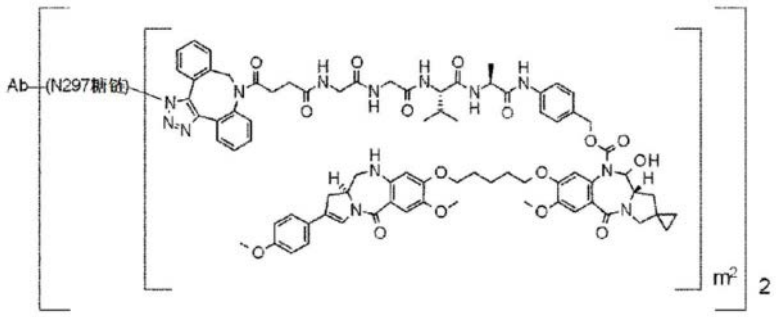
在此，n^5表示整数2～5，左端的氨基表示与N297糖链的β－Man支链的1－3链侧或/和1－6链侧的非还原末端的唾液酸的2位羧酸进行酰胺键合，星号表示与所述连接子L中的Z^1的三唑环上的1位或3位的氮原子结合，

D为选自下述的组中的任意一个：

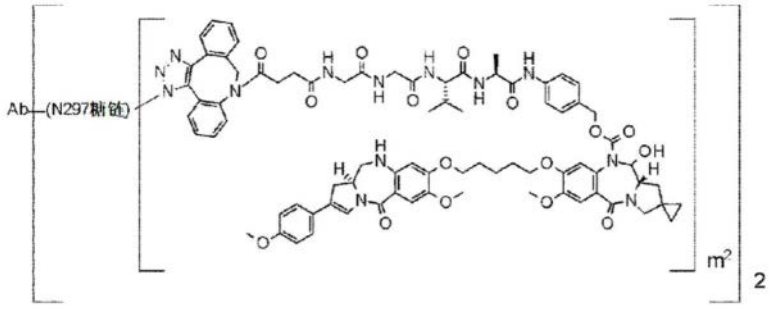


在此，式中，星号表示与L结合。

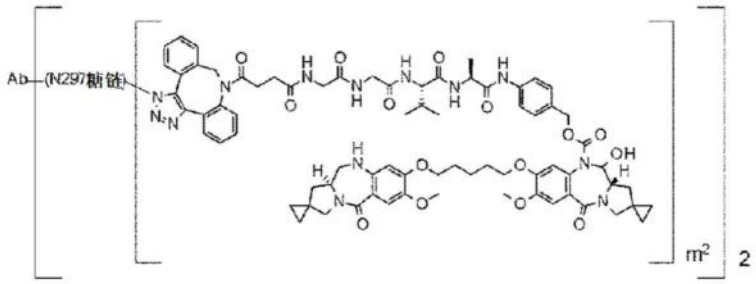
29.一种抗体－药物偶联物，其选自下述的组：



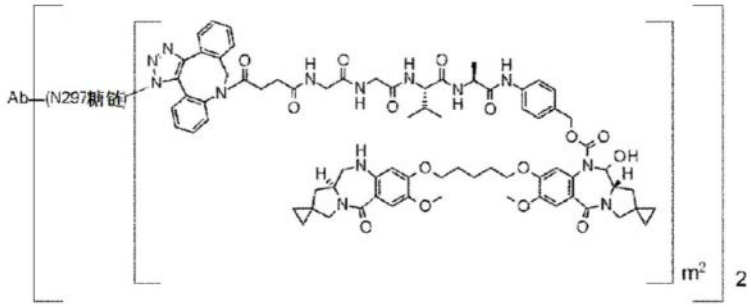
或者


Ab—(N297糖链)
m2
2

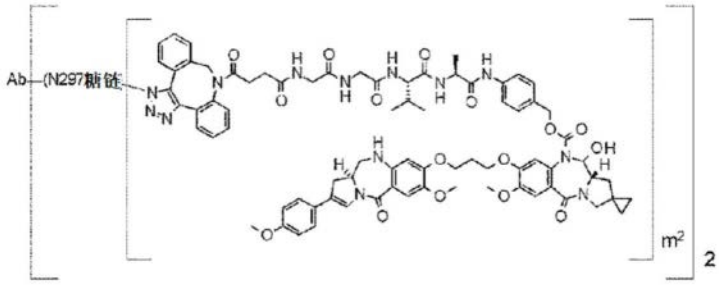
，


Ab—(N297糖链)
m2
2

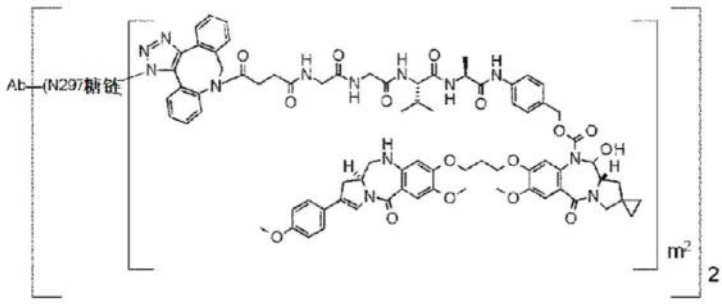
或者


Ab—(N297糖链)
m2
2

，

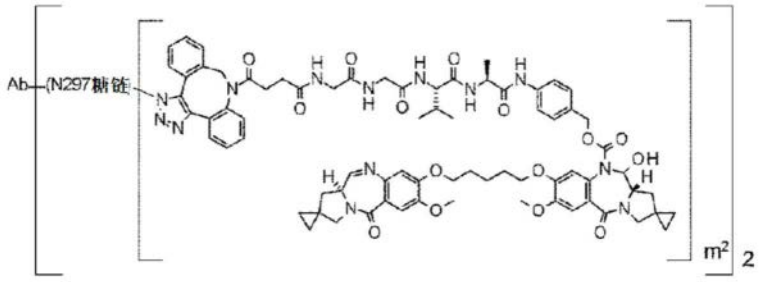

Ab—(N297糖链)
m2
2

或者

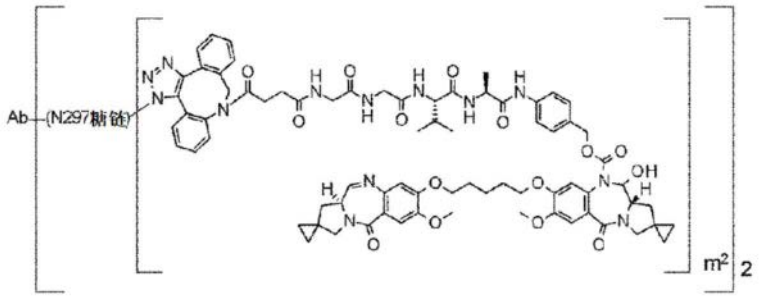

Ab—(N297糖链)
m2
2

或者，

，



或者

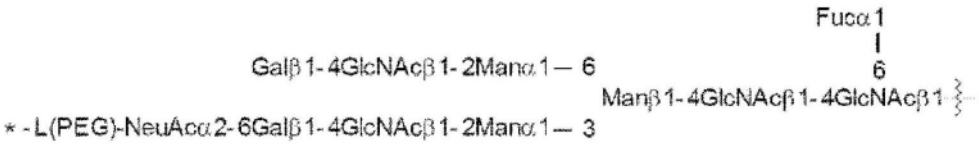


，

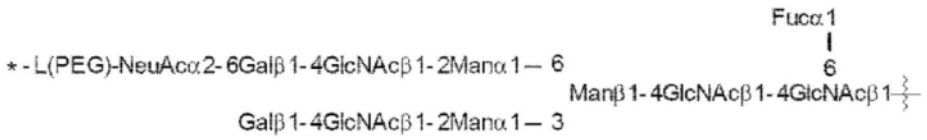
在上述所示的各结构式中，m^2表示整数1或2，

Ab表示IgG抗体或其功能性片段，

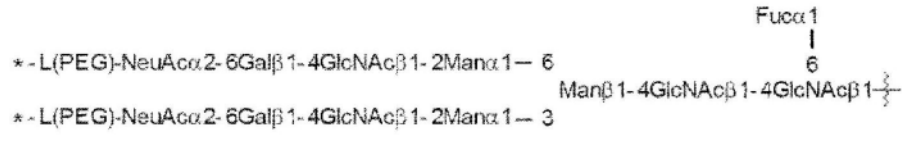
Ab的N297糖链表示具有下式所示的结构的N297－(Fuc)MSG1、N297－(Fuc)MSG2或它们的混合物、或N297－(Fuc)SG中的任意一种，



[N297-(Fuc)MSG1]



[N297-(Fuc)MSG2]



[N297-(Fuc)SG]

式中，波浪线表示与抗体的Asn297结合，

N297糖链中的L(PEG)表示－NH－CH_2CH_2－(O－CH_2CH_2)$_3$－＊，

在此，左端的氨基表示与N297糖链的β－Man支链的1－3链侧或/和1－6链侧的非还原末端的唾液酸的2位羧酸进行酰胺键合，星号表示与各结构式中的三唑环上的1位或3位的氮原子结合。

30.根据权利要求1～4、8～17、19、21、23、25～29中任一项所述的抗体－药物偶联物，

其中，

抗体为抗CLDN6抗体、抗CLDN6/CLDN9抗体、抗HER2抗体、抗A33抗体、抗CanAg抗体、抗CD19抗体、抗CD20抗体、抗CD22抗体、抗CD30抗体、抗CD33抗体、抗CD56抗体、抗CD70抗体、抗CD98抗体、抗TROP2抗体、抗CEA抗体、抗Cripto抗体、抗EphA2抗体、抗G250抗体、抗MUC1抗体、抗GPNMB抗体、抗Integrin抗体、抗PSMA抗体、抗Tenascin－C抗体、抗SLC44A4抗体、抗Mesothelin抗体、抗EGFR抗体、抗DR5抗体。

31.根据权利要求1～4、8～17、19、21、23、25～29中任一项所述的抗体－药物偶联物，其中，

抗体为单克隆抗体。

32.根据权利要求1～4、8～17、19、21、23、25～29中任一项所述的抗体－药物偶联物，其中，

抗体具有抗体依赖性细胞毒ADCC活性和/或补体依赖性细胞毒CDC活性。

33.根据权利要求1～4、8～17、19、21、23、25～29中任一项所述的抗体－药物偶联物，其中，

抗体的重链恒定区为人IgG1的重链恒定区，包含引起ADCC和/或CDC活性降低的变异。

34.根据权利要求33所述的抗体－药物偶联物，其中，

抗体的重链恒定区为人IgG1的重链恒定区，由EUIndex所示的234位以及235位的亮氨酸被丙氨酸取代。

35.根据权利要求1～4、8～17、19、21、23、25～29中任一项所述的抗体－药物偶联物，其中，

抗体为包含由序列号65所述的氨基酸序列形成的重链以及由序列号64所述的氨基酸序列形成的轻链的人源化单克隆抗体。

36.根据权利要求1～4、8～17、19、21、23、25～29、34中任一项所述的抗体－药物偶联物，其中，

抗体为包含由序列号75的第20～469位所述的氨基酸序列形成的重链以及由序列号73的第21～234位所述的氨基酸序列形成的轻链的人源化单克隆抗体。

37.根据权利要求1～4、8～17、19、21、23、25～29、34中任一项所述的抗体－药物偶联物，其中，

抗体的重链羧基末端中缺失1个或2个氨基酸。

38.根据权利要求1～4、8～17、19、21、23、25～29中任一项所述的抗体－药物偶联物，其中，

抗体包含由序列号65的第1～449位所述的氨基酸序列形成的重链以及由序列号64的第1～214位所述的氨基酸序列形成的轻链。

39.根据权利要求1～4、8～17、19、21、23、25～29、34中任一项所述的抗体－药物偶联物，其中，

抗体包含由序列号75的第20～468位所述的氨基酸序列形成的重链以及由序列号73的第21～234位所述的氨基酸序列形成的轻链。

40.根据权利要求1～4、8～17、19、21、23、25～29、34中任一项所述的抗体－药物偶联物，其中，

抗体为由下述该抗体的制造方法得到的抗体，

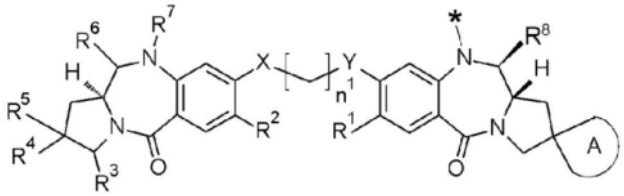
所述制造方法包括：培养用下述表达载体转化后的宿主细胞的工序，所述表达载体包含编码上述权利要求35～39中任一项所述的抗体的多核苷酸；以及从由所述工序得到的培养物中采集目标抗体的工序。

41.根据权利要求1～4、8～17、19、21、23、25～29、34中任一项所述的抗体－药物偶联物，其中，

抗体－药物偶联物中的每一分子抗体的平均药物结合数为1～3或3～5。

42.根据权利要求1～4、8～17、19、21、23、25～29、34中任一项所述的抗体－药物偶联物，其中，

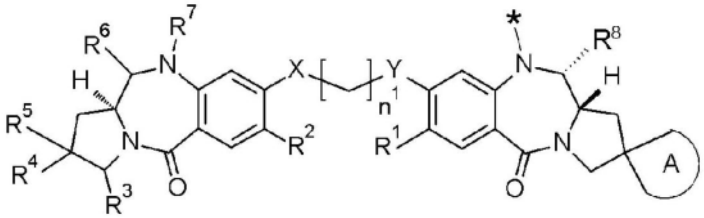
D由下式表示：



。

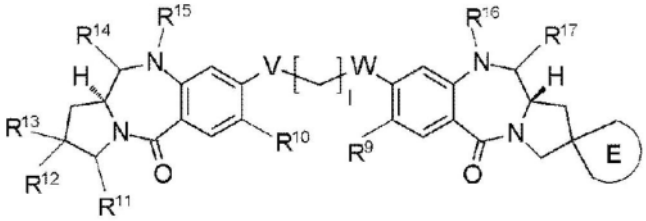
43.根据权利要求1～4、8～17、19、21、23、25～29、34中任一项所述的抗体－药物偶联物，其中，

D由下式表示：



。

44.一种化合物、其盐或者它们的水合物，所述化合物由下式表示：



式中，l表示整数2～8，

E表示螺环键合的环丙烷环，

R^9以及R^{10}分别独立地表示C1～C6烷氧基、C1～C6烷基、氢原子、羟基、硫醇基、C1～C6烷硫基、卤素原子或－NR'R"，

在此，R'以及R"分别独立地表示氢原子或C1～C6烷基，

R^{11}、R^{12}以及R^{13}选自下述(i)～(iii)：

(i)R^{11}以及R^{12}一起与各基团所结合的碳原子一起形成双键，

R^{13}表示可具有选自组7中的1个或多个取代基的芳基或杂芳基、或可具有选自组8中的1个或多个取代基的C1～C6烷基，

(ii)R^{11}表示氢原子，

R^{12}及R^{13}与R^{12}及R^{13}所结合的碳原子一起形成3～5元饱和烃环或者3～5元饱和杂环或CH_2＝、或者

(iii)R^{11}、R^{12}及R^{13}，与R^{11}所结合的碳原子和R^{12}及R^{13}所结合的碳原子一起形成可具有选自组9中的1个或多个取代基的苯环或6元杂环，

R^{13}表示单键，

R^{14}以及R^{15}都表示氢原子，或者R^{14}以及R^{15}一起表示亚胺键(C＝N)，

R^{16}以及R^{17}表示下述(a)或(b)：

(a)R^{16}以及R^{17}一起形成亚胺键(N＝C)，

(b)R^{16}表示J－La'－Lp'－NH－B'－CH_2－O(C＝O)－＊，

式中，星号表示与R^{16}所邻接的氮原子结合，

B'表示苯基或杂芳基，

Lp'表示在靶细胞中能够切断的由氨基酸序列形成的连接子，

La'表示选自以下的组中的任意一种：

－C(＝O)－$(CH_2CH_2)n^6$－C(＝O)－、

－C(＝O)－$(CH_2CH_2)n^6$－C(＝O)－NH－$(CH_2CH_2)n^7$－C(＝O)－、－C(＝O)－$(CH_2CH_2)n^6$－C(＝O)－NH－$(CH_2CH_2O)n^7$－CH_2－C(＝O)－、－C(＝O)－$(CH_2CH_2)n^6$－NH－C(＝O)－$(CH_2CH_2O)n^7$－CH_2CH_2－C(＝O)－、

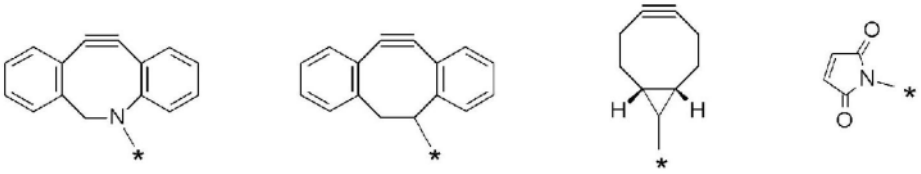
－$(CH_2)n^8$－O－C(＝O)－、

－$(CH_2)n^{12}$－C(＝O)－、以及、

－$(CH_2CH_2)n^{13}$－C(＝O)－NH－$(CH_2CH_2O)n^{14}$－CH_2CH_2－C(＝O)－，

在此，式中，n^6表示整数1～3、n^7表示整数1～5、n^8表示整数0～2、n^{12}表示整数2～7、n^{13}表示整数1～3、n^{14}表示整数6～10，

J表示以下所示的任意一个：



在此，在上述所示的J的结构式中，星号表示与La'结合，

R^{17}表示羟基或C1～C3烷氧基，

V以及W分别独立地为氧原子、氮原子、或硫原子，

组7表示：

a)可被1～3个卤素原子取代的C1～C6烷氧基、

b)可被1～3个选自卤素原子、羟基、－OCOR'、－NR'R"、－C(＝NR')－NR"R"'以及－NHC(＝NR')－NR"R"'中的任意一个取代的C1～C6烷基、

c)卤素原子、

d)C3～C5环烷氧基、

e)C1～C6烷硫基、

f)－NR'R"、

g)－C(＝NR')－NR"R"'、

h)－NHC(＝NR')－NR"R"'、

i)－NHCOR'、或

j)羟基，

在此，R'以及R"如前面定义所述，R"'分别独立地表示氢原子或C1～C6烷基，

组8表示：卤素原子、羟基、或C1～C6烷氧基，并且，

组9表示：卤素原子、或可被1～3个卤素原子取代的C1～C6烷基或C1～C6烷氧基。

45.根据权利要求44所述的化合物、其盐或者它们的水合物，其中，

R^9以及R^{10}分别独立地表示C1～C3烷氧基，

R^{11}以及R^{12}一起与各基团所结合的碳原子一起形成双键，

R^{13}表示可具有选自组10中的1个或多个取代基的芳基或杂芳基、或可具有选自组11中的1个或多个取代基的C1～C3烷基，

V以及W为氧原子，

组10表示：

a)可被1～3个卤素原子取代的C1～C3烷氧基、

b)可被1～3个选自卤素原子、羟基、－OCOR"、－C(＝NR')－NR"R"'、以及－NHC(＝NR')－NR"R"'中的任一种取代的C1～C3烷基、

c)C3～C5环烷氧基、

d)－C(＝NR')－NR"R"'、

e)－NHC(＝NR')－NR"R"'、或

f)羟基，

在此，R'、R"、以及R"'分别独立地表示氢原子或C1～C3烷基，并且，

组11表示：卤素原子、羟基、或C1～C3烷氧基。

46.根据权利要求44所述的化合物、其盐或者它们的水合物，其中，

R^9以及R^{10}分别独立地表示C1～C3烷氧基，

R^{11}表示氢原子，

R^{12}及R^{13}与R^{12}及R^{13}所结合的碳原子一起形成3～5元饱和烃环或CH_2＝，并且，

V以及W为氧原子。

47.根据权利要求44所述的化合物、其盐或者它们的水合物，其中，

R^9以及R^{10}分别独立地表示C1～C3烷氧基，

R^{11}、R^{12}及R^{13}与R^{11}所结合的碳原子和R^{12}及R^{13}所结合的碳原子一起形成可具有选自组12中的1个或多个取代基的苯环，

V以及W为氧原子，并且，

组12表示卤素原子、或可被1～3个卤素原子取代的C1～C3烷基或C1～C3烷氧基。

48.根据权利要求44～47中任一项所述的化合物、其盐或者它们的水合物，其中，

B'为选自1,4－苯基、2,5－吡啶基、3,6－吡啶基、2,5－嘧啶基、2,5－噻吩基中的任意一种。

49.根据权利要求48所述的化合物、其盐或者它们的水合物，其中，

B'为1,4－苯基。

50.根据权利要求44～47、49中任一项所述的化合物、其盐或者它们的水合物，其中，

Lp'为选自以下的组中的氨基酸残基：

－GGVA－、－GG－(D－)VA－、－VA－、－GGFG－、－GGPI－、－GGVCit－、－GGVK－、－GG(D－)P－I－、以及－GGPL－。

51.根据权利要求44～47、49中任一项所述的化合物、其盐或者它们的水合物，其中，

La'选自以下的组：

$-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-$、

$-C(=O)-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-$、

$-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-$、$-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_2-CH_2-C(=O)-$、$-C(=O)-CH_2CH_2-NH-C(=O)-(CH_2CH_2O)_4-CH_2CH_2-C(=O)-$、$-CH_2-OC(=O)-$、$-OC(=O)-$、$-(CH_2)_5-C(=O)-$、$-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_8-CH_2CH_2-C(=O)-$。

52.根据权利要求44～47、49中任一项所述的化合物、其盐或者它们的水合物，其中，

R^{16}以J－La'－Lp'－NH－B'－CH_2－O(C＝O)－＊表示，

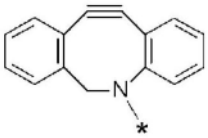
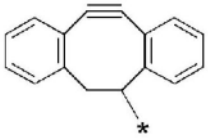
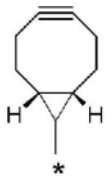
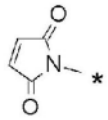
式中，B'为1,4－苯基，

Lp'表示选自以下的组中的任一种：－GGVA－、－GG－(D－)VA－、－VA－、－GGFG－、－GGPI－、－GGVCit－、－GGVK－、以及－GGPL－，

La'表示选自以下的组中的任一种：

$-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-$、$-C(=O)-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-$、$-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-$、$-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_2-CH_2-C(=O)-$、$-C(=O)-CH_2CH_2-NH-C(=O)-(CH_2CH_2O)_4-CH_2CH_2-C(=O)-$、$-CH_2-OC(=O)-$、$-OC(=O)-$、$-(CH_2)_5-C(=O)-$、$-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_8-CH_2CH_2-C(=O)-$，并且，

J表示以下所示的任一种：

在此，在J的结构式中，星号表示与La'结合。

53.根据权利要求44～47、49中任一项所述的化合物、其盐或者它们的水合物，其中，

R^{16}选自以下的组：

$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-$GGVA－NH－B'－$CH_2$－OC(＝O)－、

$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-$GG－(D－)VA－NH－B'－$CH_2$－OC(＝O)－、

$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-$VA－NH－B'－$CH_2$－OC(＝O)－、

$J^1-C(=O)-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-$VA－NH－B'－$CH_2$－OC(＝O)－、

$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-$GGPI－NH－B'－$CH_2$－OC(＝O)－、

$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-$GGFG－NH－B'－$CH_2$－OC(＝O)－、

$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-$GGVCit－NH－B'－$CH_2$－OC(＝O)－、

$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-$GGVK－NH－B'－$CH_2$－OC(＝O)－、

$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-$GGPL－NH－B'－$CH_2$－OC(＝O)－、

J^1－C(＝O)－CH_2CH_2－C(＝O)－NH－$(CH_2CH_2)_2$－C(＝O)－VA－NH－B'－CH_2－OC(＝O)－、

J^1－C(＝O)－CH_2CH_2－C(＝O)－NH－$(CH_2CH_2O)_2$－CH_2－C(＝O)－VA－NH－B'－CH_2－OC(＝O)－、

J^1－C(＝O)－CH_2CH_2－NH－C(＝O)－$(CH_2CH_2O)_4$－CH_2CH_2－C(＝O)－VA－NH－B'－CH_2－OC(＝O)－、

J^2－OC(＝O)－GGVA－NH－B'－CH_2－OC(＝O)－、

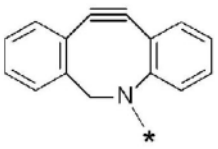
J^3－CH_2－OC(＝O)－GGVA－NH－B'－CH_2－OC(＝O)－、

J^4－$(CH_2)_5$－C(＝O)－GGVA－NH－B'－CH_2－OC(＝O)－、

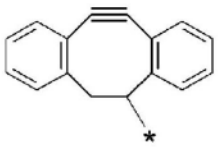
J^4－$(CH_2)_5$－C(＝O)－VA－NH－B'－CH_2－OC(＝O)－、以及

J^4－CH_2CH_2－C(＝O)－NH－$(CH_2CH_2O)_8$－CH_2CH_2－C(＝O)－VA－NH－B'－CH_2－OC(＝O)－，

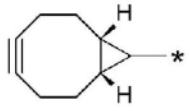
在此，J^1、J^2、J^3、J^4表示以下的结构式：



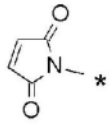
J^1



J^2



J^3



J^4

在此，在J^1、J^2、J^3以及J^4的结构式中，星号表示与邻接的基团结合，并且，

B'为1,4－苯基。

54.根据权利要求44～47、49中任一项所述的化合物、其盐或者它们的水合物，其中，

R^{16}选自以下的组：

J^1－C(＝O)－CH_2CH_2－C(＝O)－GGVA－NH－B'－CH_2－OC(＝O)－、

J^1－C(＝O)－CH_2CH_2－C(＝O)－VA－NH－B'－CH_2－OC(＝O)－、

J^1－C(＝O)－$(CH_2CH_2)_2$－C(＝O)－VA－NH－B'－CH_2－OC(＝O)－、

J^1－C(＝O)－CH_2CH_2－C(＝O)－GGVCit－NH－B'－CH_2－OC(＝O)－、

J^1－C(＝O)－CH_2CH_2－C(＝O)－NH－$(CH_2CH_2)_2$－C(＝O)－VA－NH－B'－CH_2－OC(＝O)－、

J^1－C(＝O)－CH_2CH_2－C(＝O)－NH－$(CH_2CH_2O)_2$－CH_2－C(＝O)－VA－NH－B'－CH_2－OC(＝O)－、

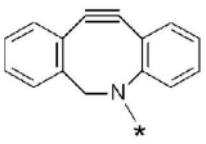
J^1－C(＝O)－CH_2CH_2－NH－C(＝O)－$(CH_2CH_2O)_4$－CH_2CH_2－C(＝O)－VA－NH－B'－CH_2－OC(＝O)－、

J^4－$(CH_2)_5$－C(＝O)－GGVA－NH－B'－CH_2－OC(＝O)－、以及

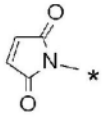
J^4－$(CH_2)_5$－C(＝O)－VA－NH－B'－CH_2－OC(＝O)－，

在此，B'为1,4－苯基，

J^1、J^4表示以下的结构式：



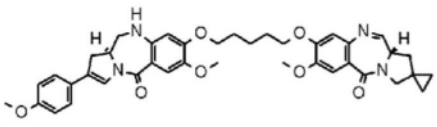
J1

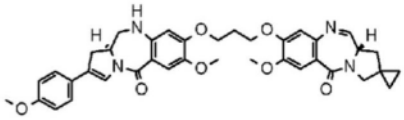


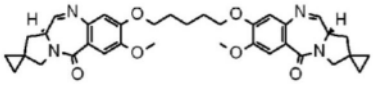
J4

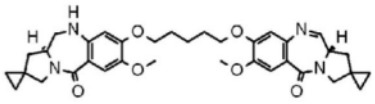
在此，在J^1以及J^4的结构式中，星号表示与邻接的基团结合。

55.一种化合物、其盐或者它们的水合物，其中，所述化合物为下式所示的任意一种：



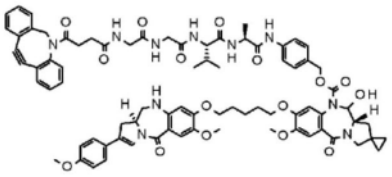


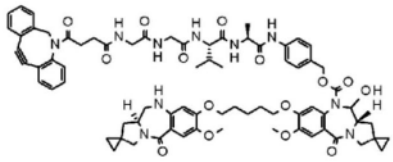


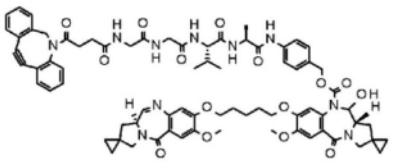


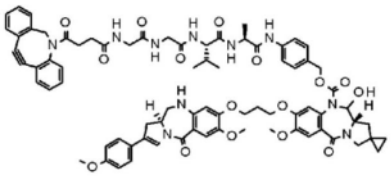
。

56.一种化合物、其盐或者它们的水合物，其中，所述化合物为下式所示的任意一种：





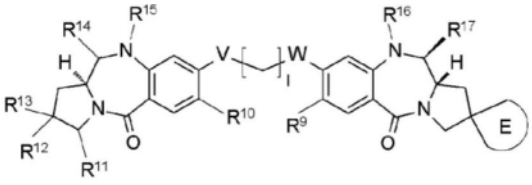




。

57.根据权利要求44～47、49、56中任一项所述的化合物、其盐或者它们的水合物，其中，

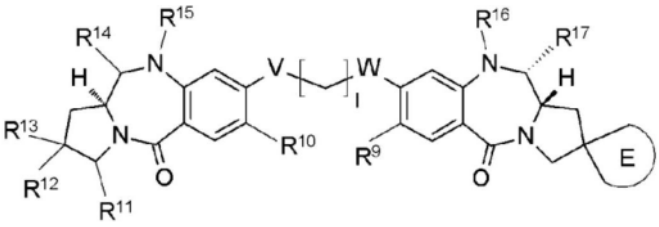
所述化合物由下式表示：



。

58.根据权利要求44～47、49、56中任一项所述的化合物、其盐或者它们的水合物，其中，

所述化合物由下式表示：



。

59.一种药物组合物，其特征在于，所述药物组合物包含选自权利要求1～43中任一项所述的抗体－药物偶联物、其盐或者它们的水合物，以及权利要求44～58中任一项所述的化合物、其盐或者它们的水合物中的任意一种。

60.根据权利要求59所述的药物组合物，其特征在于，所述药物组合物为抗肿瘤药。

61.根据权利要求60所述的药物组合物，其特征在于，肿瘤为CLDN6和/或CLDN9表达的肿瘤。

62.根据权利要求60或61所述的药物组合物，其特征在于，

肿瘤为卵巢癌、肺癌、胃癌、子宫内膜癌、睾丸癌、宫颈癌、胎盘绒毛膜癌、肾癌、尿路上皮癌、大肠癌、前列腺癌、多形性神经胶质母细胞瘤、脑肿瘤、胰腺癌、乳腺癌、黑色素瘤、肝癌、膀胱癌或食道癌，

所述卵巢癌包括表层上皮性肿瘤、间质性肿瘤、生殖细胞肿瘤，

所述肺癌包括非小细胞肺癌、小细胞肺癌，

所述睾丸癌包括精原细胞瘤、非精原细胞瘤。

63.一种物质在制备治疗肿瘤的药物中的应用，其特征在于，

所述物质为选自权利要求1～43中任一项所述的抗体－药物偶联物、其盐或者它们的水合物，以及权利要求44～58中任一项所述的化合物、其盐或者它们的水合物中的任意种。

64.根据权利要求63所述的应用，其特征在于，

肿瘤为CLDN6和/或CLDN9表达的肿瘤。

65.根据权利要求63或64所述的应用，其特征在于，

肿瘤为卵巢癌、肺癌、胃癌、子宫内膜癌、睾丸癌、宫颈癌、胎盘绒毛膜癌、肾癌、尿路上皮癌、大肠癌、前列腺癌、多形性神经胶质母细胞瘤、脑肿瘤、胰腺癌、乳腺癌、黑色素瘤、肝癌、膀胱癌或食道癌，

所述卵巢癌包括表层上皮性肿瘤、间质性肿瘤、生殖细胞肿瘤，

所述肺癌包括非小细胞肺癌、小细胞肺癌，

所述睾丸癌包括精原细胞瘤、非精原细胞瘤。

66.一种药物组合物在制备治疗肿瘤的药物中的应用，其特征在于，

所述药物组合物包含选自权利要求1～43中任一项所述的抗体－药物偶联物、其盐或者它们的水合物，以及权利要求44～58中任一项所述的化合物、其盐或者它们的水合物中的至少一种。

抗体-吡咯并苯并二氮杂卓衍生物偶联物

技术领域

[0001] 本发明涉及一种作为抗肿瘤药而有用的抗体-药物偶联物,其是经由连接子结构部分将能够以肿瘤细胞为靶点的抗体与吡咯并苯并二氮杂卓衍生物结合而成的。

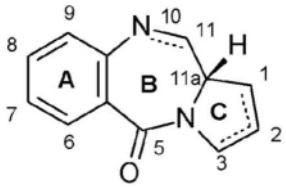
背景技术

[0002] 抗体-药物偶联物(Antibody－Drug Conjugate;ADC)是使抗体与具有细胞毒活性的药物结合而成的,所述抗体与在癌细胞表面表达的抗原结合,且通过该结合能使抗原在细胞中内化。ADC由于能高效地递送药物至癌细胞,由此可期待使癌细胞内蓄积药物,从而杀死癌细胞。

[0003] 作为ADC,例如在抗CD30单克隆抗体上结合单甲基澳瑞他汀E(monomethyl auristatin E)而成的ADCETRIS(商标)(Brentuximab vedotin,本妥昔单抗)已经被作为霍奇金淋巴瘤和未分化大细胞淋巴瘤的治疗药而批准。另外,在抗HER2单克隆抗体上结合美坦新(emtansine)而成的KADCYLA(商标)(曲妥珠单抗美坦新(Trastuzumab emtansine))用于HER2阳性晚期、复发性乳腺癌的治疗中。

[0004] 作为与ADC结合的有效药物之一,可举出吡咯并苯并二氮杂卓(PBD)。PBD通过与DNA小沟的PuGPu序列等结合而显示细胞毒性。作为来自天然的PBD的anthramycin(安曲霉素)在1965年被首次发现,在那之后各种各样的来自天然的PBD或其类似物的PBD被发现(非专利文献1～4)。

[0005] PBD的通式如下式所示。

[0006] 

[0007] 已知PBD在A、C环上的取代基的数量、种类、取代部位均不相同,以及在B、C环上的不饱和度分别不同。

[0008] 已知PBD通过形成二聚物结构可大幅度提高细胞毒性(非专利文献5、6),也有将二聚物PBD进行ADC化的ADC体的各种报告(专利文献1～13)。但是,在C2位具有螺环的PBD或其ADC体是未知的。

[0009] 人CLDN6(Claudin－6、以下记为hCLDN6)是Claudin(CLDN)家族蛋白质的一种,是包含220个氨基酸残基的四次跨膜型膜蛋白质。在这之前有下述启示:hCLDN6在部分癌症中过度表达,是具有吸引力的癌治疗靶点(非专利文献7～9)。另外,还报告了CLDN家族蛋白质因胞吞作用(endocytosis)被吞入细胞内,是代谢回转(turnover)时间短的家族蛋白质(非专利文献10),因此认为适合作为抗体药物复合体(ADC)的靶点。

[0010] 基于这些与癌症有关联性的启示信息,目前为止报道过对hCLDN6特异性识别的单克隆抗体(专利文献14、15),在CLDN6特异性的单克隆抗体上结合微管蛋白聚合抑制药Monomethyl auristatinE(MMAE,单甲基澳瑞他汀E)、Maytansinoid(DM1,美登素)的ADC(非

专利文献11)。

[0011] 另一方面,认为识别多个CLDN家族的抗体可扩大治疗的适应症范围,因而也公开有使识别CLDN6和CLDN9的抗体(专利文献16)与具有强力的杀细胞效果的吡咯并苯并二氮杂卓(PBD)结合的ADC(专利文献17)。

[0012] 然而,它们的活性强度还不够,以hCLDN6作为治疗靶点的医疗需求还有待满足。

[0013] 现有技术文献

[0014] 专利文献

[0015] 专利文献1:国际公开第2013/173496号

[0016] 专利文献2:国际公开第2014/130879号

[0017] 专利文献3:国际公开第2017/004330号

[0018] 专利文献4:国际公开第2017/004025号

[0019] 专利文献5:国际公开第2017/020972号

[0020] 专利文献6:国际公开第2016/036804号

[0021] 专利文献7:国际公开第2015/095124号

[0022] 专利文献8:国际公开第2015/052322号

[0023] 专利文献9:国际公开第2015/052534号

[0024] 专利文献10:国际公开第2016/115191号

[0025] 专利文献11:国际公开第2015/052321号

[0026] 专利文献12:国际公开第2015/031693号

[0027] 专利文献13:国际公开第2011/130613号

[0028] 专利文献14:国际公开第2009/087978号

[0029] 专利文献15:国际公开第2011/057788号

[0030] 专利文献16:国际公开第2015/069794号

[0031] 专利文献17:国际公开第2017/096163号

[0032] 非专利文献

[0033] 非专利文献1:Julia Mantaj,et al.,Angewandte Chemie Internationl Edition 2016,55,2-29

[0034] 非专利文献2:Dyeison Antonow.et al.,Chemical Reviews 2010,111,2815-2864

[0035] 非专利文献3:In Antibiotics III.Springer Verlag,New York,pp.3-11

[0036] 非专利文献4:Accounts of Chemical Research 1986,19,230

[0037] 非专利文献5:Journal of the American Chemical Society 1992,114,4939

[0038] 非专利文献6:Journal of Organic Chemistry 1996,61,8141

[0039] 非专利文献7:BMC Cancer,2006,6,186.

[0040] 非专利文献8:Histopathology,2012,61,1043-1056.

[0041] 非专利文献9:Int J Cancer,2014,135,2206-2214.

[0042] 非专利文献10:J Membrane Biol,2004,199,29-38.

[0043] 非专利文献11:14th Annu Meet Cancer Immunother(CIMT)(May 10-12,Mainz) 2016,Abst 185

发明内容

[0044] 发明所要解决的问题

[0045] 本发明提供一种新的抗体－吡咯并苯并二氮杂卓(PBD)衍生物偶联物以及新的吡咯并苯并二氮杂卓(PBD)衍生物。

[0046] 本发明提供一种新的抗CLDN6抗体。

[0047] 另外，本发明提供一种含有具有抗肿瘤活性的所述抗体－PBD衍生物偶联物、PBD衍生物或抗CLDN6抗体的药物组合物。

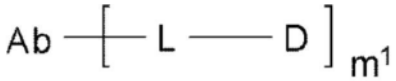
[0048] 本发明还提供一种使用所述抗体－PBD衍生物偶联物、PBD衍生物或抗CLDN6抗体的癌症的治疗方法。

[0049] 用于解决问题的方案

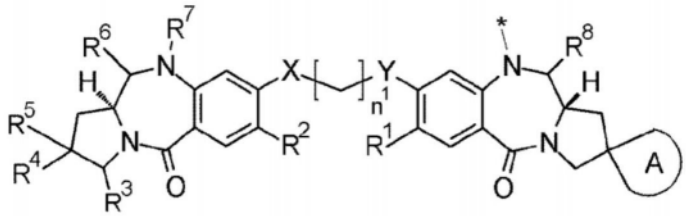
[0050] 本发明人等经过深入研究，结果发现新的抗体－吡咯并苯并二氮杂卓(PBD)衍生物偶联物具有强的抗肿瘤活性，最终完成了本发明。

[0051] 即本发明如下所述。

[0052] [1]一种下式所示的抗体－药物偶联物。

[0053] 

[0054] (式中，m^1表示整数1～10，优选表示整数2～8)，Ab表示抗体或该抗体的功能性片段，该抗体的糖链可被重构(remodeling)，L表示连接Ab和D的连接子，Ab可从其氨基酸残基直接与L结合，也可从Ab的糖链或重构的糖链与L结合，D表示下式所示的药物：

[0055] 

[0056] 式中，星号表示与L结合，n^1表示整数2～8，A表示可被1～4个卤素原子取代的螺环键合的3～5元饱和烃环或3～5元饱和杂环，R^1以及R^2分别独立地表示C1～C6烷氧基、C1～C6烷基、氢原子、羟基、硫醇基、C1～C6烷硫基、卤素原子或－NR'R"，在此，R'及R"分别独立地表示氢原子或C1～C6烷基，R^3、R^4以及R^5选自下述(i)～(iii)：(i)R^3以及R^4一起与各基团所结合的碳原子一起形成双键，R^5表示可具有选自组1中的1个或多个取代基的芳基或杂芳基，或可具有选自组2中的1个或多个取代基的C1～C6烷基；(ii)R^3表示氢原子，R^4及R^5与R^4及R^5所结合的碳原子一起形成3～5元饱和烃环或者3～5元饱和杂环或CH_2＝；(iii)R^3、R^4及R^5与R^3所结合的碳原子以及R^4及R^5所结合的碳原子一起形成可具有选自组3中的1个或多个取代基的苯环或6元杂环，R^6以及R^7都表示氢原子，或者R^6以及R^7一起表示亚胺键(C＝N)，R^8为羟基或C1～C3烷氧基，X以及Y分别独立地表示氧原子、氮原子或硫原子。组1表示：a)可被1～3个卤素原子取代的C1～C6烷氧基，b)可被1～3个选自卤素原子、羟基、－OCOR'，－NR'R"，－C(＝NR')－NR"R"'以及－NHC(＝NR')－NR"R"'中的任意一个取代的C1～C6烷基，c)卤素原子，d)C3～C5环烷氧基，e)C1～C6烷硫基，f)－NR'R"，g)－C(＝NR')－NR"R"'，h)－NHC(＝NR')－NR"R"'，i)－NHCOR'，或j)羟基，在此，R'以及R"如前面定义所述，R"'分别独立地表示氢原子或C1～C6烷基。组2表示：卤素原子、羟基或C1～C6烷氧基。并且，组3表示：

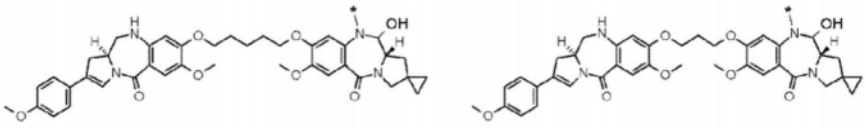
卤素原子、或可被1～3个卤素原子取代的C1～C6烷基或者C1～C6烷氧基。)

[0057] [2]根据[1]所述的抗体－药物偶联物,其中,A表示可被1～2个卤素原子取代的螺环键合的3～5元饱和烃环,R^1以及R^2分别独立地表示C1～C3烷氧基,R^3以及R^4一起与各基团所结合的碳原子一起形成双键,R^5表示可具有选自组4中的1个或多个取代基的芳基或杂芳基,或者可具有选自组5中的1个或多个取代基的C1～C3烷基,X以及Y为氧原子。组4表示:a)可被1～3个卤素原子取代的C1～C3烷氧基,b)可被1～3个选自卤素原子、羟基、－OCOR”、－C(＝NR’)－NR”R”’、以及－NHC(＝NR’)－NR”R”’中的任意一个取代的C1～C3烷基,c)C3～C5环烷氧基,d)－C(＝NR’)－NR”R”’,e)－NHC(＝NR’)－NR”R”’,或f)羟基,在此,R’、R”及R”’分别独立地表示氢原子或C1～C3烷基,并且,组5表示:卤素原子、羟基、或C1～C3烷氧基。

[0058] [3]根据[1]所述的抗体－药物偶联物,其中,A表示可被1～2个卤素原子取代的螺环键合的3～5元饱和烃环,R^1以及R^2分别独立地表示C1～C3烷氧基,R^3表示氢原子,R^4以及R^5与R^4以及R^5所结合的碳原子一起形成3～5元饱和烃环或＝CH_2,X以及Y为氧原子。

[0059] [4]根据[1]所述的抗体－药物偶联物,其中,A表示可被1～2个卤素原子取代的螺环键合的3～5元饱和烃环,R^1以及R^2分别独立地表示C1～C3烷氧基,R^3、R^4及R^5与R^3所结合的碳原子以及R^4及R^5所结合的碳原子一起,形成可具有选自组6中的1个或多个取代基的苯环,X以及Y为氧原子,并且,组6表示:卤素原子、或可被1～3个卤素原子取代的C1～C3烷基或C1～C3烷氧基。

[0060] [5]根据[1]或[2]所述的抗体－药物偶联物,其中,D由以下的2个化学式中的任意一个表示:

[0061] 

[0062] 式中,星号表示与L结合。

[0063] [6]根据[1]或[3]所述的抗体－药物偶联物,其中,D由以下的2个化学式中的任意一个表示:

[0064] 

[0065] 式中,星号表示与L结合。

[0066] [7]根据[1]～[6]中任一项所述的抗体－药物偶联物,其中,L以－Lb－La－Lp－NH－B－CH_2－O(C＝O)－＊表示,式中,星号表示与D结合,B表示苯基或杂芳基,Lp表示在靶细胞中能够切断的由氨基酸序列形成的连接子,La表示选自以下的组中的任意一个:－C(＝O)－$(CH_2CH_2)n^2$－C(＝O)－,－C(＝O)－$(CH_2CH_2)n^2$－C(＝O)－NH－$(CH_2CH_2)n^3$－C(＝O)－,－C(＝O)－$(CH_2CH_2)n^2$－C(＝O)－NH－$(CH_2CH_2O)n^3$－CH_2－C(＝O)－,－C(＝O)－$(CH_2CH_2)n^2$－NH－C(＝O)－$(CH_2CH_2O)n^3$－CH_2CH_2－C(＝O)－,以及－$(CH_2)n^4$－O－C(＝O)－,n^2表示整数1～3,n^3表示整数1～5,n^4表示整数0～2,Lb表示将La与Ab的糖链或重构的糖链结合的间隔子。

[0067] [8]根据[7]所述的抗体-药物偶联物,其中,B为选自1,4-苯基、2,5-吡啶基、3,6-

吡啶基、2,5-嘧啶基、2,5-噻吩基中的任意一种。

[0068] [9]根据[8]所述的抗体-药物偶联物,其中,B为1,4-苯基。

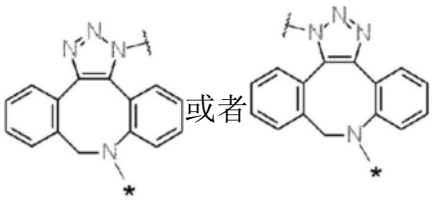
[0069] [10]根据[7]～[9]中任一项所述的抗体-药物偶联物,其中,Lp为由2～7个氨基酸形成的氨基酸残基。

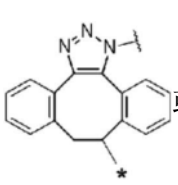
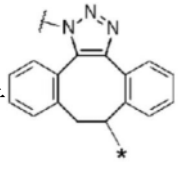
[0070] [11]根据[7]～[10]中任一项所述的抗体-药物偶联物,其中,Lp为由选自甘氨酸、缬氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、谷氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、瓜氨酸、亮氨酸、丝氨酸、赖氨酸以及天冬氨酸构成的组中的氨基酸形成的氨基酸残基。

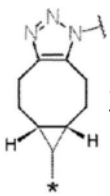
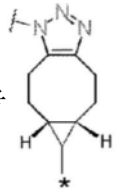
[0071] [12]根据[7]～[11]中任一项所述的抗体-药物偶联物,其中,Lp选自以下的组:-GGVA-、-GG-(D-)VA-、-VA-、-GGFG-、-GGPI-、-GGVCit-、-GGVK-、-GG(D-)PI-、以及-GGPL-。

[0072] [13]根据[7]～[12]中任一项所述的抗体-药物偶联物,其中,La选自以下的组:-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-,-C(=O)-$(CH_2CH_2)_2$-C(=O)-,-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2CH_2)_2$-C(=O)-,-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2CH_2O)_2$-CH_2-C(=O)-,-C(=O)-CH_2CH_2-NH-C(=O)-$(CH_2CH_2O)_4$-CH_2CH_2-C(=O)-,-CH_2-OC(=O)-,以及-OC(=O)-。

[0073] [14]根据[7]～[13]中任一项所述的抗体-药物偶联物,其中,Lb由下式表示:

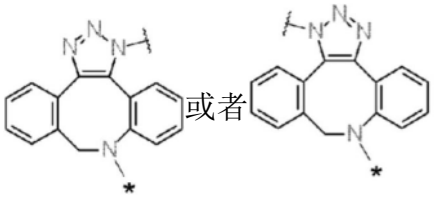
[0074]  或者,

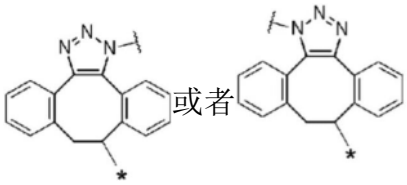
[0075]  或者  或者,

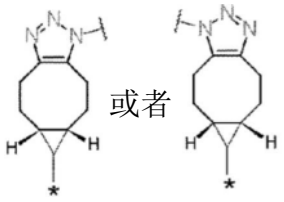
[0076]  或者  ,

[0077] 在上述所示的Lb的结构式中,星号表示与La结合,波浪线表示与Ab的糖链或重构的糖链结合。

[0078] [15]根据[7]～[14]中任一项所述的抗体-药物偶联物,其中,L以-Lb-La-Lp-NH-B-CH_2-O(C=O)-*表示,式中,B为1,4-苯基,Lp表示选自以下的组中的任意一个:-GGVA-、-GG-(D-)VA-、-VA-、-GGFG-、-GGPI-、-GGVCit-、-GGVK-、以及-GGPL-,La表示选自以下的组中的任意一个:-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-、-C(=O)-$(CH_2CH_2)_2$-C(=O)-、-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2CH_2)_2$-C(=O)-、-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2CH_2O)_2$-CH_2-C(=O)-、-C(=O)-CH_2CH_2-NH-C(=O)-$(CH_2CH_2O)_4$-CH_2CH_2-C(=O)-、-CH_2-OC(=O)-、以及-OC(=O)-,并且,Lb由下式表示:

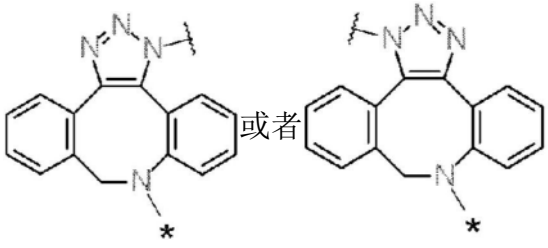
[0079]  ，

[0080]  ，

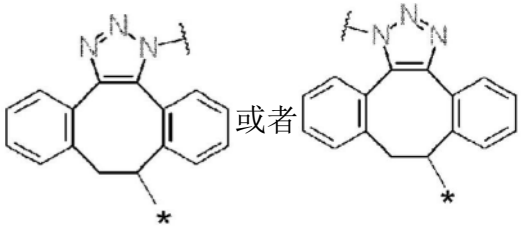
[0081]  ，

[0082] 在此，在上述所示的Lb的结构式中，星号表示与La结合，波浪线表示与Ab的糖链或重构的糖链结合。

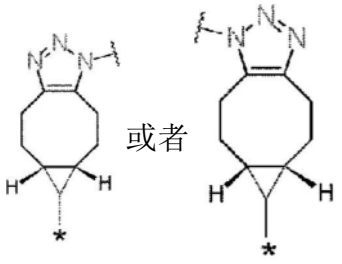
[0083] [16]根据[7]～[15]中任一项所述的抗体-药物偶联物，其中，L选自以下的组：-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGVA-NH-B-CH_2-OC(=O)-、-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GG-(D-)VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-、-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-、-Z^1-C(=O)-$(CH_2CH_2)_2$-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-、-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGPI-NH-B-CH_2-OC(=O)-、-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-B-CH_2-OC(=O)-、-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGVCit-NH-B-CH_2-OC(=O)-、-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGVK-NH-B-CH_2-OC(=O)-、-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGPL-NH-B-CH_2-OC(=O)-、-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2CH_2)_2$-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-、-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-NH-C(=O)一$(CH_2CH_2O)_4$-CH_2CH_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-、-Z^2-OC(=O)-GGVA-NH-B-CH_2-OC(=O)-、以及-Z^3-CH_2-OC(=O)-GGVA-NH-B-CH_2-OC(=O)-。在此，Z^1表示以下的结构式：

[0084]  ，

[0085] Z^2表示以下的结构式：

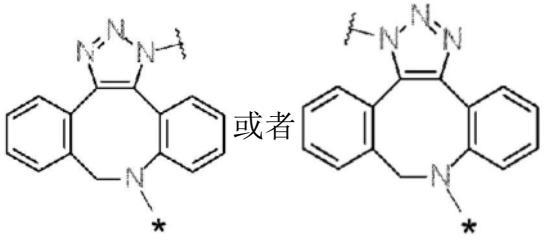
[0086]  ，

[0087] Z^3表示以下的结构式：

[0088]  ，

[0089] 在此，在Z^1、Z^2以及Z^3的结构式中，星号表示与La结合，波浪线表示与Ab的糖链或重构的糖链结合，并且，B表示1,4－苯基。

[0090] [17]根据[16]所述的抗体－药物偶联物，其中，L选自以下的组：$-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGVA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$，$-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$，$-Z^1-C(=O)-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$，$-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGVCit-NH-B-CH_2-OC(=O)-$，$-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$，$-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_2-CH_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$，以及$-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-NH-C(=O)-(CH_2CH_2O)_4-CH_2CH_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$。在此，B为1,4－苯基，$Z^1$表示以下的结构式：

[0091]  ，

[0092] 在此，在Z^1的结构式中，星号表示与Z^1所邻接的C(=O)结合，波浪线表示与Ab的糖链或重构的糖链结合。

[0093] [18]根据[1]～[6]中任一项所述的抗体－药物偶联物，其中，L以$-Lb-La-Lp-NH-B-CH_2-O(C=O)-*$表示，式中，星号表示与D结合，B表示1,4－苯基，Lp表示－GGVA－、或－VA，La表示$-(CH_2)n^9-C(=O)-$、或$-(CH_2CH_2)n^{10}-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)n^{11}-CH_2CH_2-C(=O)-$，$n^9$表示整数2～7，$n^{10}$表示整数1～3，$n^{11}$表示整数6～10，Lb为－(丁二酰亚胺－3－基－N)－。

[0094] [19]根据[18]所述的抗体－药物偶联物，其中，L表示选自以下的组中的任意一个：$-(丁二酰亚胺-3-基-N)-(CH_2)_5-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$、$-(丁二酰亚胺-3-基-N)-(CH_2)_5-C(=O)-GGVA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$、以及$-(丁二酰亚胺-3-基-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_8-CH_2CH_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$，在此，B为1,4－苯基。

[0095] [20]根据[1]～[19]中任一项所述的抗体－药物偶联物，其中，抗体为IgG。

[0096] [21]根据[20]所述的抗体－药物偶联物，其中，抗体为IgG1、IgG2或IgG4。

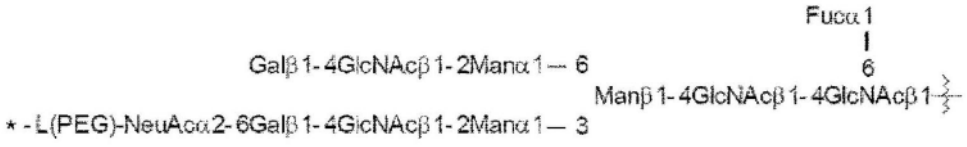
[0097] [22]根据[1]～[21]中任一项所述的抗体－药物偶联物，其特征在于，抗体与肿瘤细胞结合且被吞入肿瘤细胞内而内化。

[0098] [23]根据[22]所述的抗体－药物偶联物，其特征在于，抗体还具有抗肿瘤效果。

[0099] [24]根据[1]～[17]、[20]～[23]中任一项所述的抗体－药物偶联物，其中，抗体从与抗体的Asn297结合的糖链(N297糖链)与L结合。

[0100] [25]根据[24]所述的抗体－药物偶联物，其中，N297糖链为重构的糖链。

[0101] [26]根据[24]或[25]所述的抗体－药物偶联物，其中，N297糖链为具有下式所示的结构的N297－(Fuc)MSG1、N297－(Fuc)MSG2或它们的混合物、或N297－(Fuc)SG：

[0102] 

[N297-(Fuc)MSG1]

[0103] 式中，波浪线表示与抗体的Asn297结合，L(PEG)表示－(CH_2CH_2－O)n^5－CH_2CH_2－NH－，在此，右端的氨基表示与N297糖链的β－Man支链的1－3链侧的非还原末端的唾液酸的2位羧酸进行酰胺键合，星号表示与所述连接子L结合，并且，n^5表示整数2～10。

[0104] 

[N297-(Fuc)MSG2]

[0105] 式中，波浪线表示与抗体的Asn297结合，L(PEG)表示－(CH_2CH_2－O)n^5－CH_2CH_2－NH－，在此，右端的氨基表示与N297糖链的β－Man支链的1－6链侧的非还原末端的唾液酸的2位羧酸进行酰胺键合，星号表示与所述连接子L结合，并且，n^5表示整数2～10。

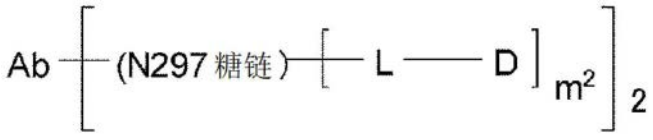
[0106] 

[N297-(Fuc)SG]

[0107] 式中，波浪线表示与抗体的Asn297结合，L(PEG)表示－(CH_2CH_2－O)n^5－CH_2CH_2－NH－，在此，右端的氨基表示与N297糖链的β－Man支链的1－3链侧以及1－6链侧两者的非还原末端的唾液酸的2位羧酸进行酰胺键合，星号表示与所述连接子L结合，并且，n^5表示整数2～10。

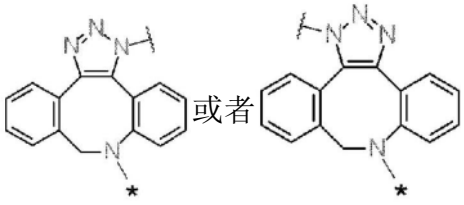
[0108] [27]根据[26]所述的抗体－药物偶联物，其中，n^5为整数2～5。

[0109] [28]根据[24]～[27]中任一项所述的抗体－药物偶联物，其由下式表示：

[0110] 

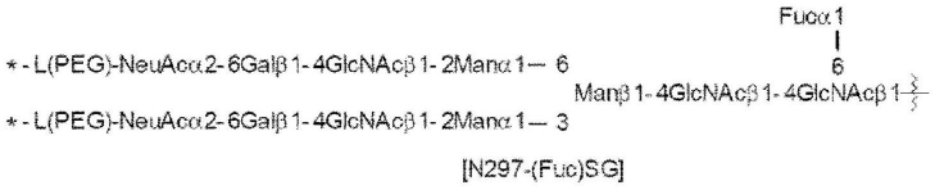
[0111] (式中，m^2表示1或2，L为连接Ab的N297糖链与D的连接子，其为选自以下的组中的任意一个连接子：－Z^1－C(=O)－CH_2CH_2－C(=O)－GGVA－NH－B－CH_2－OC(=O)－、－Z^1－C(=O)－CH_2CH_2－C(=O)－VA－NH－B－CH_2－OC(=O)－、－Z^1－C(=O)－$(CH_2CH_2)_2$－C(=O)－VA－NH－B－CH_2－OC(=O)－、－Z^1－C(=O)－CH_2CH_2－C(=O)－GGVCit－NH－B－CH_2－OC(=O)－、－Z^1－C(=O)－CH_2CH_2－C(=O)－NH－$(CH_2CH_2)_2$－C(=O)－VA－NH－B－

$CH_2-OC(=O)-$、$-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_2-CH_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$、以及$-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-NH-C(=O)-(CH_2CH_2O)_4-CH_2CH_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$，在此，B为1,4-苯基，$Z^1$表示以下的结构式：

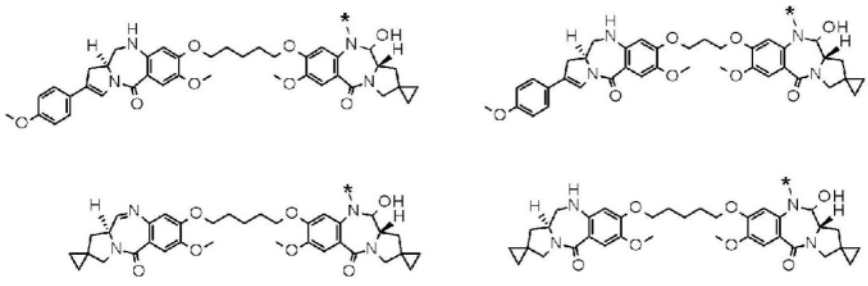
[0112]  ，

[0113] 在此，在上述所示的Z^1的结构式中，星号表示与Z^1所邻接的C(=O)结合，波浪线表示与Ab的N297糖链结合，Ab表示IgG抗体或该抗体的功能性片段，Ab的N297糖链表示具有下式所示的结构的N297-(Fuc)MSG1、N297-(Fuc)MSG2或它们的混合物、或N297-(Fuc)SG中的任意一种：

[0114] 

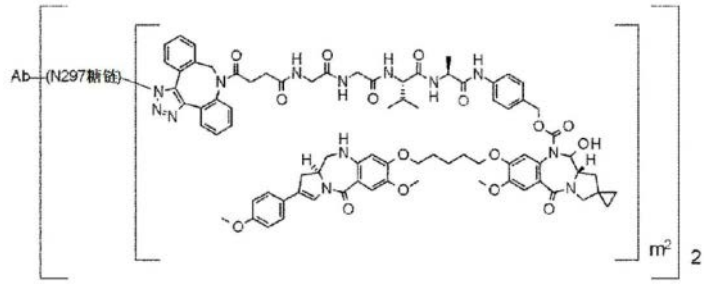
[0115] 

[0116] 上式中，波浪线表示与抗体的Asn297结合，N297糖链中的L(PEG)表示$-NH-CH_2CH_2-(O-CH_2CH_2)n^5-*$，在此，$n^5$表示整数2～5，左端的氨基表示与N297糖链的β-Man支链的1-3链侧或/和1-6链侧的非还原末端的唾液酸的2位羧酸进行酰胺键合，星号表示与所述连接子L中的Z^1的三唑环上的1位或3位的氮原子结合，D为选自下述的组中的任意一个：

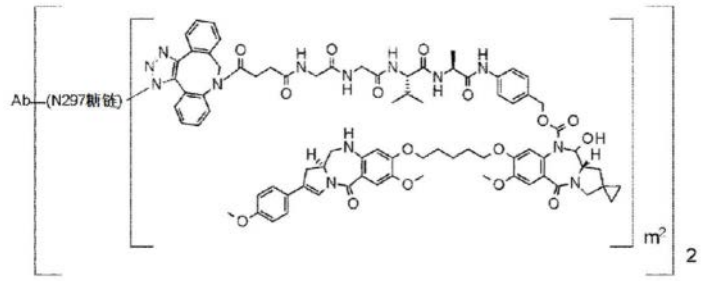
[0117] 

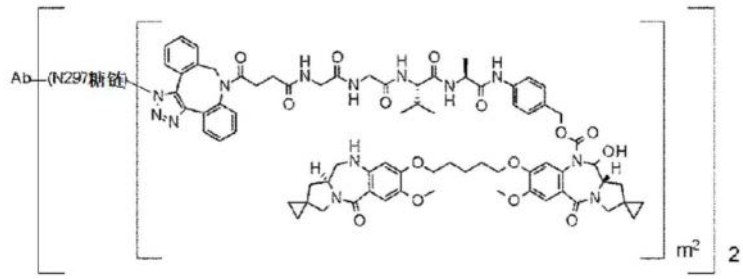
[0118] 在此，式中，星号表示与L结合。)

[0119] [29]一种抗体-药物偶联物，其选自下述的组：

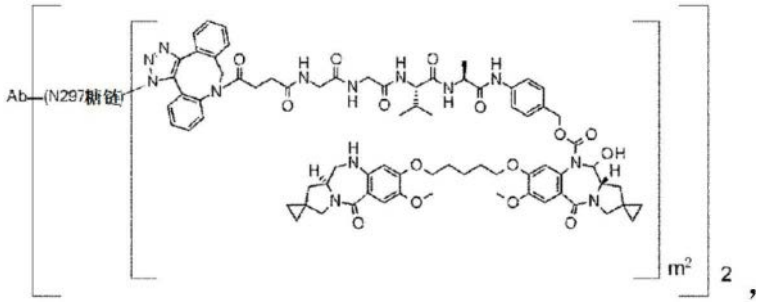
[0120] 

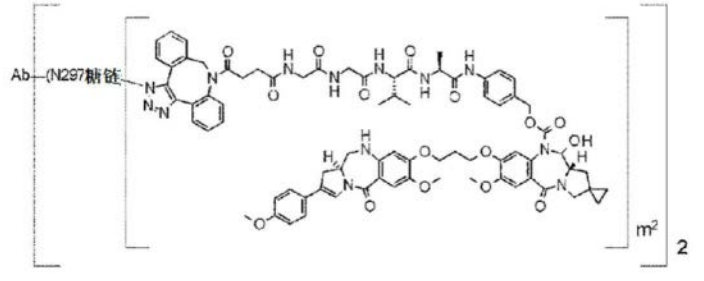
[0121] 或者

[0122] 

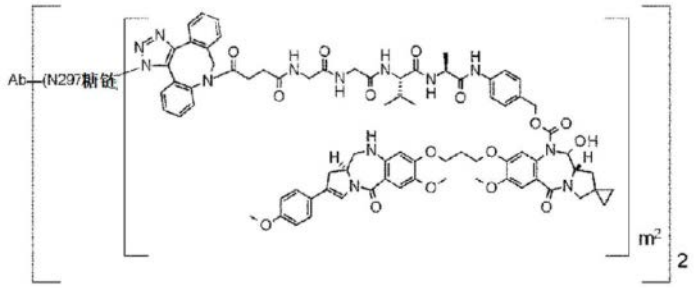
[0123] 

[0124] 或者

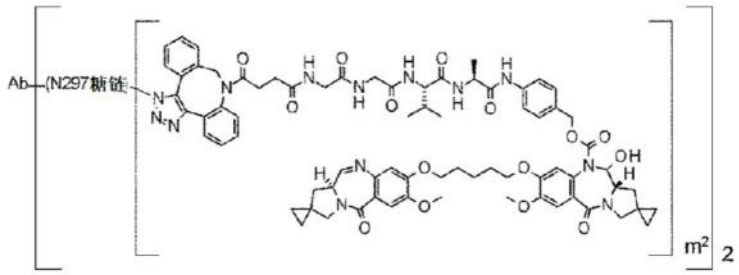
[0125] 

[0126] 

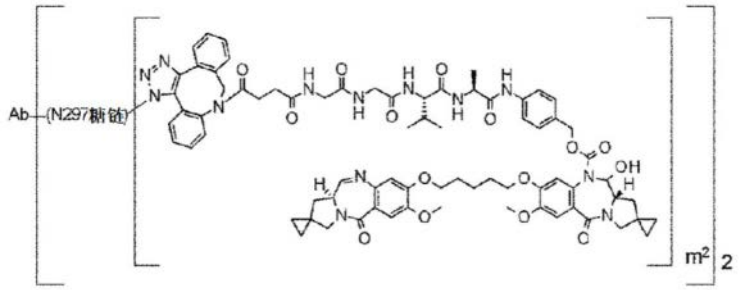
[0127] 或者

[0128] 

或者，

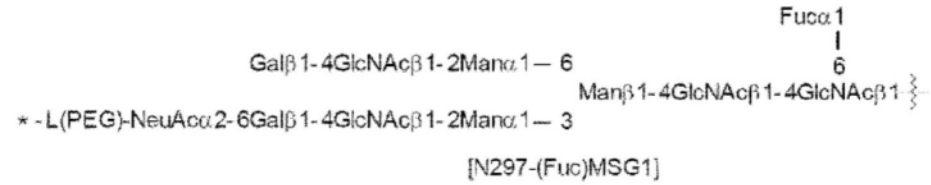
[0129] 

[0130] 或者

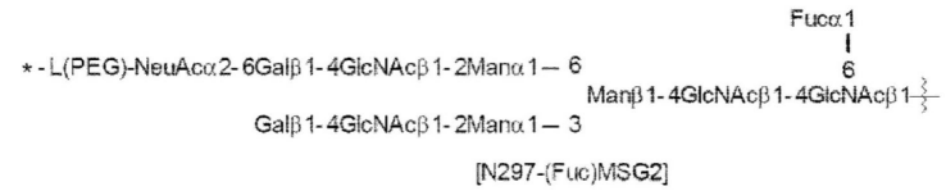
[0131] 

，

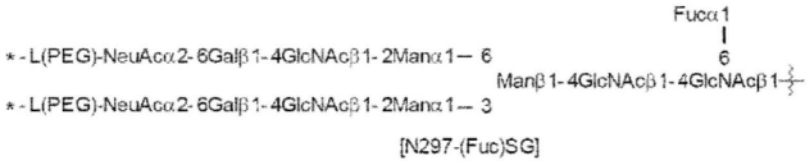
[0132] 在上述所示的各结构式中，m^2表示1或2，Ab表示IgG抗体或其功能性片段，Ab的N297糖链表示具有下式所示的结构的N297－(Fuc)MSG1、N297－(Fuc)MSG2或它们的混合物、或N297－(Fuc)SG中的任意一种：



[N297-(Fuc)MSG1]

[0133] 

[N297-(Fuc)MSG2]



[N297-(Fuc)SG]

[0134] 式中，波浪线表示与抗体的Asn297结合，N297糖链中的L(PEG)表示－NH－CH_2CH_2－$(O－CH_2CH_2)_3$－＊，在此，左端的氨基表示与N297糖链的β－Man支链的1－3链侧或/和1－6链侧的非还原末端的唾液酸的2位羧酸进行酰胺键合，星号表示与各结构式中的三唑环上的1位或3位的氮原子结合。

[0135] [30]一种抗体或该抗体的功能性片段，其与CLDN6和/或CLDN9结合。

[0136] [31]根据[30]所述的抗体或该抗体的功能性片段，其中，CLDN6为由序列号1所述的氨基酸序列形成的分子，CLDN9为由序列号3所述的氨基酸序列形成的分子。

[0137] [32]根据[30]或[31]所述的抗体或该抗体的功能性片段，其包含：含以下的(a)或(b)所述的CDRH1、CDRH2以及CDRH3的重链、以及含CDRL1、CDRL2以及CDRL3的轻链：(a)由序列号9所述的氨基酸序列形成的CDRH1、由序列号10所述的氨基酸序列形成的CDRH2以及由序列号11所述的氨基酸序列形成的CDRH3、以及由序列号5所述的氨基酸序列形成的CDRL1、由序列号6所述的氨基酸序列形成的CDRL2以及由序列号7所述的氨基酸序列或该氨基酸序列中1个或2个氨基酸被取代的氨基酸序列形成的CDRL3；(b)由序列号15所述的氨基酸序列形成的CDRH1、由序列号16所述的氨基酸序列形成的CDRH2以及由序列号17所述的氨基酸序列形成的CDRH3、以及由序列号12所述的氨基酸序列形成的CDRL1、由序列号13所述的氨基酸序列形成的CDRL2以及由序列号14所述的氨基酸序列形成的CDRL3。

[0138] [33]根据[32]所述的抗体或该抗体的功能性片段，其包含：含以下的(a)或(b)所述的CDRH1、CDRH2以及CDRH3的重链、以及含CDRL1、CDRL2以及CDRL3的轻链：(a)由序列号9所述的氨基酸序列形成的CDRH1、由序列号10所述的氨基酸序列形成的CDRH2以及由序列号11所述的氨基酸序列形成的CDRH3、以及由序列号5所述的氨基酸序列形成的CDRL1、由序列号6所述的氨基酸序列形成的CDRL2以及由序列号7所述的氨基酸序列或序列号8所述的氨基酸序列形成的CDRL3；(b)由序列号15所述的氨基酸序列形成的CDRH1、由序列号16所述的氨基酸序列形成的CDRH2以及由序列号17所述的氨基酸序列形成的CDRH3、以及由序列号12所述的氨基酸序列形成的CDRL1、由序列号13所述的氨基酸序列形成的CDRL2以及由序列号14所述的氨基酸序列形成的CDRL3。

[0139] [34]根据[30]～[33]中任一项所述的抗体或该抗体的功能性片段，其包含以下的(a)或(b)所述的重链可变区以及轻链可变区：(a)由序列号21所述的氨基酸序列形成的重链可变区、以及由序列号19所述的氨基酸序列形成的轻链可变区；(b)由序列号25所述的氨基酸序列形成的重链可变区、以及由序列号23所述的氨基酸序列形成的轻链可变区。

[0140] [35]根据[30]～[34]中任一项所述的抗体或该抗体的功能性片段，其包含：由选自由以下的(a)～(e)构成的组中的氨基酸序列形成的重链可变区、以及由选自由(f)～(k)构成的组中的氨基酸序列形成的轻链可变区：(a)序列号54所述的氨基酸序列、(b)序列号58所述的氨基酸序列、(c)序列号62所述的氨基酸序列、(d)相对于(a)～(c)的序列中各CDR序列以外的骨架区的序列具有至少95％以上的同源性的氨基酸序列、(e)(a)～(c)的序列中的各CDR序列以外的骨架区的序列中，缺失1个或几个氨基酸、取代1个或几个氨基酸、或添加1个或几个氨基酸而成的氨基酸序列、(f)序列号38所述的氨基酸序列、(g)序列号42所述的氨基酸序列、(h)序列号46所述的氨基酸序列、(i)序列号50所述的氨基酸序列、(j)相对于(f)～(i)的序列中各CDR序列以外的骨架区的序列具有至少95％以上的同源性的氨基酸序列、以及(k)(f)～(i)的序列中的各CDR序列以外的骨架区的序列中，缺失1个或几个氨

基酸、取代1个或几个氨基酸、或添加1个或几个氨基酸而成的氨基酸序列。

[0141] [36]根据[35]所述的抗体或该抗体的功能性片段，其包含选自由以下的(a)～(e)构成的组中的重链可变区以及轻链可变区：(a)由序列号54所述的氨基酸序列形成的重链可变区以及由序列号38所述的氨基酸序列形成的轻链可变区、(b)由序列号58所述的氨基酸序列形成的重链可变区以及由序列号42所述的氨基酸序列形成的轻链可变区、(c)由序列号54所述的氨基酸序列形成的重链可变区以及由序列号46所述的氨基酸序列形成的轻链可变区、(d)由序列号58所述的氨基酸序列形成的重链可变区以及由序列号50所述的氨基酸序列形成的轻链可变区、以及(e)由序列号62所述的氨基酸序列形成的重链可变区以及由序列号46所述的氨基酸序列形成的轻链可变区。

[0142] [37]根据[30]～[36]中任一项所述的抗体或该抗体的功能性片段，其中，抗体为嵌合抗体。

[0143] [38]根据[30]～[36]中任一项所述的抗体或该抗体的功能性片段，其中，抗体为人源化抗体。

[0144] [39]根据[30]～[38]中任一项所述的抗体或该抗体的功能性片段，其中，抗体包含人IgG1、人IgG2或人IgG4的重链恒定区。

[0145] [40]根据[38]或[39]所述的抗体或该抗体的功能性片段，其包含选自由以下的(a)～(e)构成的组中的重链以及轻链：(a)由序列号52的氨基酸编号20～471所述的氨基酸序列形成的重链以及由序列号36的氨基酸编号21～234所述的氨基酸序列形成的轻链(H1L1)、(b)由序列号56的氨基酸编号20～471所述的氨基酸序列形成的重链以及由序列号40的氨基酸编号21～234所述的氨基酸序列形成的轻链(H2L2)、(c)由序列号52的氨基酸编号20～471所述的氨基酸序列形成的重链以及由序列号44的氨基酸编号21～234所述的氨基酸序列形成的轻链(H1L3)、(d)由序列号56的氨基酸编号20～471所述的氨基酸序列形成的重链以及由序列号48的氨基酸编号21～234所述的氨基酸序列形成的轻链(H2L4)、以及(e)由序列号60的氨基酸编号20～471所述的氨基酸序列形成的重链以及由序列号44的氨基酸编号21～234所述的氨基酸序列形成的轻链(H3L3)。

[0146] [41]根据[30]或[31]所述的抗体或该抗体的功能性片段，其结合于[32]～[36]以及[40]中任一项所述的抗体所识别的抗原上的部位。

[0147] [42]根据[30]或[31]所述的抗体或该抗体的功能性片段，其与[32]～[36]以及[40]中任一项所述的抗体在与CLDN6和/或CLDN9的结合上竞争。

[0148] [43]一种多核苷酸，其编码[30]～[42]中任一项所述的抗体。

[0149] [44]根据[43]所述的多核苷酸，其包含选自由以下的(a)～(j)构成的组中的多核苷酸：(a)编码由序列号54所述的氨基酸序列形成的重链可变区的多核苷酸、以及编码由序列号38所述的氨基酸序列形成的轻链可变区的多核苷酸，(b)编码由序列号58所述的氨基酸序列形成的重链可变区的多核苷酸、以及编码由序列号42所述的氨基酸序列形成的轻链可变区的多核苷酸，(c)编码由序列号54所述的氨基酸序列形成的重链可变区的多核苷酸、以及编码由序列号46所述的氨基酸序列形成的轻链可变区的多核苷酸，(d)编码由序列号58所述的氨基酸序列形成的重链可变区的多核苷酸、以及编码由序列号50所述的氨基酸序列形成的轻链可变区的多核苷酸，(e)编码由序列号62所述的氨基酸序列形成的重链可变区的多核苷酸、以及编码由序列号46所述的氨基酸序列形成的轻链可变区的多核苷酸，(f)

编码由序列号52的氨基酸编号20～471所述的氨基酸序列形成的重链的多核苷酸、以及编码由序列号36的氨基酸编号21～234所述的氨基酸序列形成的轻链的多核苷酸，(g)编码由序列号56的氨基酸编号20～471所述的氨基酸序列形成的重链的多核苷酸、以及编码由序列号40的氨基酸编号21～234所述的氨基酸序列形成的轻链的多核苷酸，(h)编码由序列号52的氨基酸编号20～471所述的氨基酸序列形成的重链的多核苷酸、以及编码由序列号44的氨基酸编号21～234所述的氨基酸序列形成的轻链的多核苷酸，(i)编码由序列号56的氨基酸编号20～471所述的氨基酸序列形成的重链的多核苷酸、以及编码由序列号48的氨基酸编号21～234所述的氨基酸序列形成的轻链的多核苷酸，以及(j)编码由序列号60的氨基酸编号20～471所述的氨基酸序列形成的重链的多核苷酸、以及编码由序列号44的氨基酸编号21～234所述的氨基酸序列形成的轻链的多核苷酸。

[0150] [45]一种表达载体，其含有[43]或[44]中任一项所述的多核苷酸。

[0151] [46]一种宿主细胞，其是利用[45]所述的表达载体进行转化的。

[0152] [47]根据[46]所述的宿主细胞，其中，宿主细胞为真核细胞。

[0153] [48]根据[47]所述的宿主细胞，其中，宿主细胞为动物细胞。

[0154] [49]一种[30]～[42]所述的抗体或该抗体的功能性片段的制造方法，其特征在于，包括：培养[46]～[48]中任一项所述的宿主细胞的工序、以及从在该工序中得到的培养物采集目标抗体的工序。

[0155] [50]一种抗体或该抗体的功能性片段，其特征在于，通过[49]所述的制造方法得到。

[0156] [51]根据[30]～[42]以及[50]中任一项所述的抗体或该抗体的功能性片段，其中，包括选自由N－连接型糖链添加、O－连接型糖链添加、N末端的加工、C末端的加工、脱酰胺化、天冬氨酸的异构化、蛋氨酸的氧化、N末端的蛋氨酸残基的添加、脯氨酸残基的酰胺化、以及重链的羧基末端的1个或2个氨基酸残基的缺失构成的组中的1种或2种以上的修饰。

[0157] [52]根据[51]所述的抗体或该抗体的功能性片段，其中，在重链的羧基末端缺失1个或几个氨基酸残基。

[0158] [53]根据[52]所述的抗体或该抗体的功能性片段，其中，在2条重链双方的羧基末端缺失1个氨基酸残基。

[0159] [54]根据[50]～[53]中任一项所述的抗体或该抗体的功能性片段，其中，重链的羧基末端的脯氨酸残基进一步被酰胺化。

[0160] [55]一种糖链重构抗体的制造方法，其包括以下的工序：i)培养[46]～[48]中任一项所述的宿主细胞，从得到的培养物中采集目标抗体的工序；ii)用水解酶处理在工序i)中得到的抗体，制造(Fucα1,6)GlcNAc－抗体的工序；以及iii)－1在糖基转移酶存在下使(Fucα1,6)GlcNAc－抗体与糖链供体分子进行反应的工序，所述糖链供体分子是在MSG(9)或SG(10)的唾液酸的2位羧酸的羰基导入具有叠氮基的PEG连接子，使还原末端噁唑啉化而得到的；或者iii)－2在糖基转移酶存在下使(Fucα1,6)GlcNAc－抗体与糖链供体分子进行反应的工序，所述糖链供体分子是在α－氨基可被保护的(MSG－)Asn或(SG－)Asn的唾液酸的2位羧酸的羰基以及所述Asn的羧酸的羰基导入具有叠氮基的PEG连接子，使水解酶发挥作用后，使还原末端噁唑啉化而得到的。

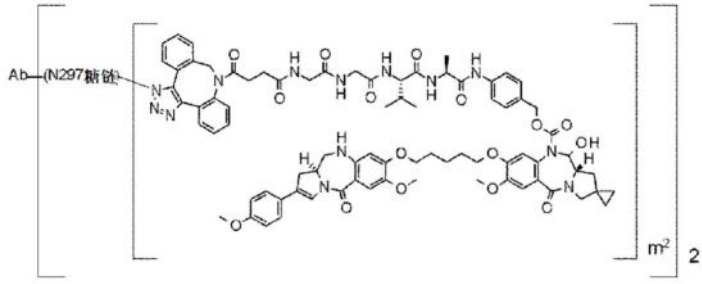
[0161] [56]根据[55]所述的制造方法，其中，还包括：对工序ii)的反应液利用羟基磷灰石柱进行精制从而对(Fucα1,6)GlcNAc－抗体进行精制的工序。

[0162] [57]一种[1]～[29]中任一项所述的抗体－药物偶联物的制造方法，其包括以下工序：i)通过[55]或[56]所述的方法制造糖链重构抗体的工序；以及ii)使具有DBCO的药物连接子(制造中间体)与工序i)中制造的糖链重构抗体的糖链中的叠氮基反应的工序。

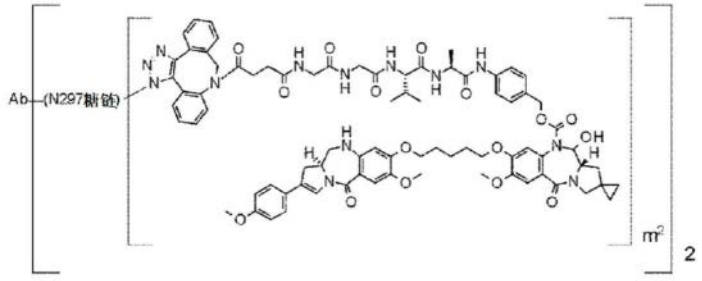
[0163] [58]一种糖链重构抗体，其特征在于，其是通过[55]或[56]所述的制造方法得到的。

[0164] [59]一种抗体－药物偶联物，其特征在于，其是通过[57]所述的制造方法得到的。

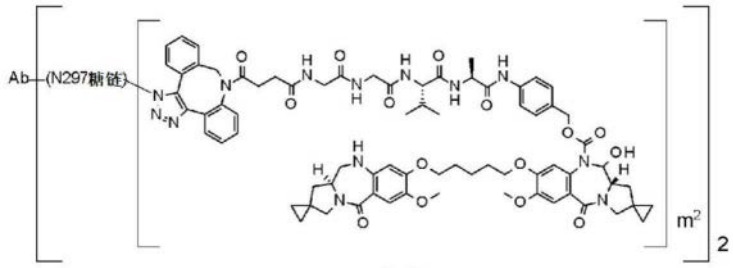
[0165] [60]一种抗体－药物偶联物，其选自以下的组：

[0166] 

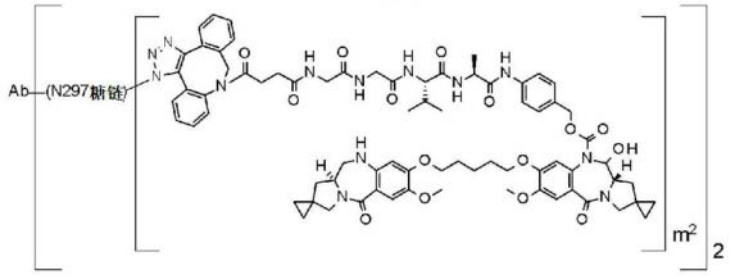
[0167] 或者

[0168] 

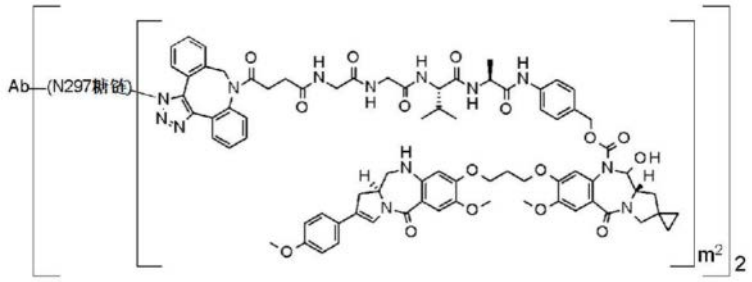
，

[0169] 

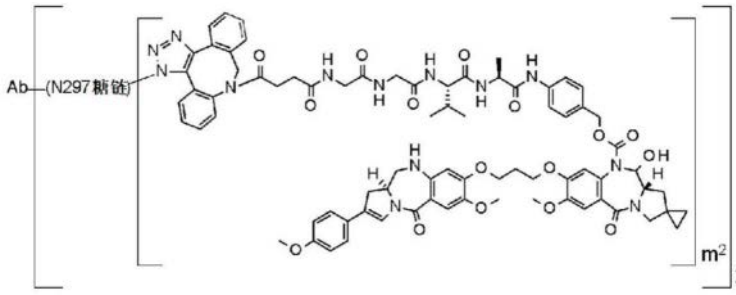
[0170] 或者

[0171] 

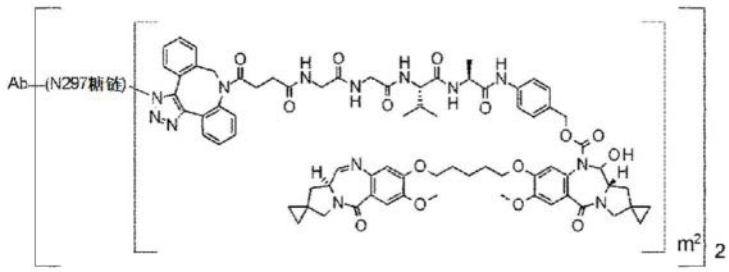
，

[0172] 

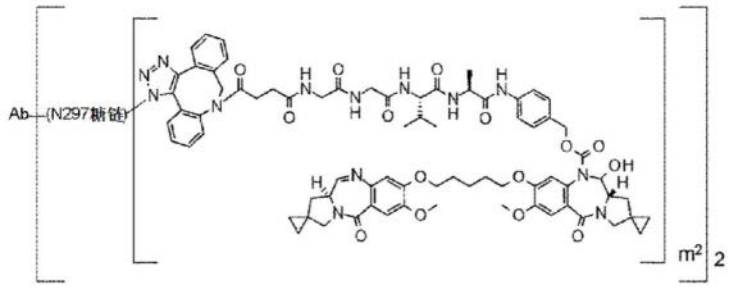
[0173] 或者

[0174] 

或者，

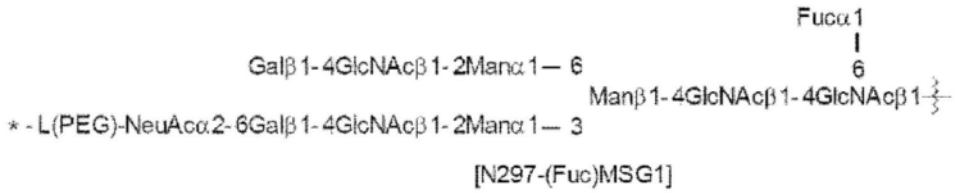
[0175] 

[0176] 或者

[0177] 

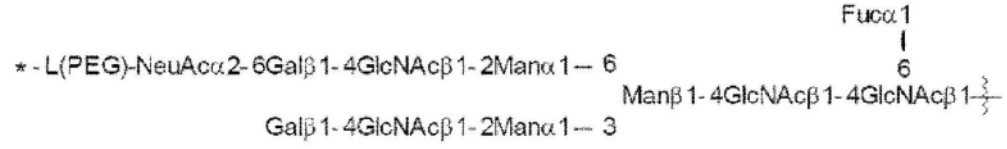
，

[0178] 在上述所示的各结构式中，m^2表示1或2，Ab表示[30]～[42]、[50]～[54]以及[58]中任一项所述的抗体或该抗体的功能性片段或抗HER2抗体，Ab的N297糖链表示具有下式所示的结构的N297－(Fuc)MSG1、N297－(Fuc)MSG2或它们的混合物、或N297－(Fuc)SG中的任意一种：

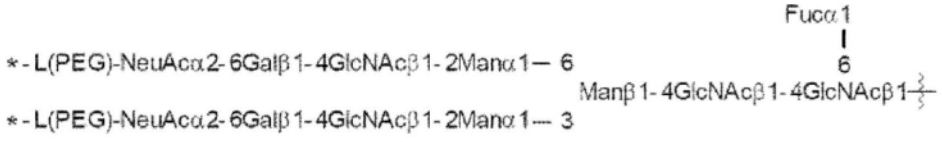


[N297-(Fuc)MSG1]

[0179]



[N297-(Fuc)MSG2]

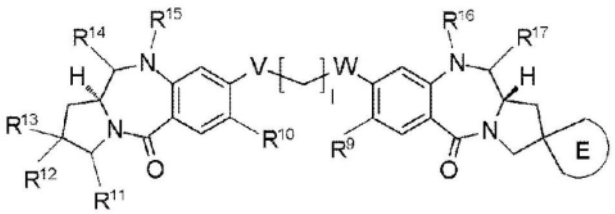


[N297-(Fuc)SG]

[0180] 式中,波浪线表示与抗体的Asn297结合,L(PEG)表示—NH—CH_2CH_2—(O—CH_2CH_2)$_3$—*,在此,左端的氨基表示与N297糖链的β—Man支链的1—3链侧或/和1—6链侧的非还原末端的唾液酸的2位羧酸进行酰胺键合,星号表示与各结构式中的三唑环上的1位或3位的氮原子结合。

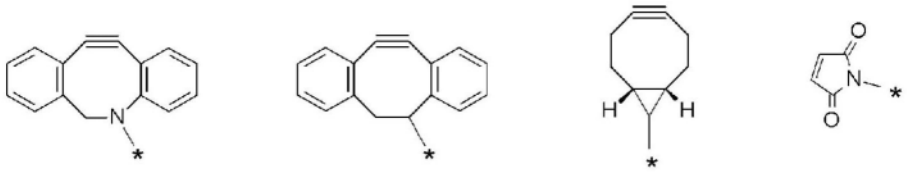
[0181] [61]根据[1]～[29]、[59]～[60]中任一项所述的抗体—药物偶联物,其中,抗体—药物偶联物中的每一分子抗体的平均药物结合数为1～3或3～5。

[0182] [62]一种化合物、其盐或者它们的水合物,所述化合物由下式表示:

[0183] 

[0184] (式中,l表示整数2～8,E表示可被1～4个卤素原子取代的螺环键合的3～5元饱和烃环、或3～5元饱和杂环,R^9以及R^{10}分别独立地表示C1～C6烷氧基、C1～C6烷基、氢原子、羟基、硫醇基、C1～C6烷硫基、卤素原子或—NR'R",在此,R'以及R"分别独立地表示氢原子或C1～C6烷基,R^{11}、R^{12}以及R^{13}选自下述(i)～(iii):(i)R^{11}以及R^{12}一起与各基团所结合的碳原子一起形成双键,R^{13}表示可具有选自组7中的1个或多个取代基的芳基或杂芳基、或可具有选自组8中的1个或多个取代基的C1～C6烷基,(ii)R^{11}表示氢原子,R^{12}以及R^{13}一起形成3～5元饱和烃环或者3～5元饱和杂环或CH_2=、或者(iii)R^{11}以及R^{12}一起形成可具有选自组9中的1个或多个取代基的苯环或6元杂环,R^{13}表示单键,R^{14}以及R^{15}都表示氢原子,或者R^{14}以及R^{15}一起表示亚胺键(C=N),R^{16}以及R^{17}表示下述(a)或(b):(a)R^{16}以及R^{17}一起形成亚胺键(N=C),(b)R^{16}表示J—La'—Lp'—NH—B'—CH_2—O(C=O)—*,式中,星号表示与R^{16}所邻接

的氮原子结合，B’表示苯基或杂芳基，Lp’表示在靶细胞中能够切断的由氨基酸序列形成的连接子，La’表示选自以下的组中的任意一种：－C(=O)－$(CH_2CH_2)n^6$－C(=O)－、－C(=O)－$(CH_2CH_2)n^6$－C(=O)－NH－$(CH_2CH_2)n^7$－C(=O)－、－C(=O)－$(CH_2CH_2)n^6$－C(=O)－NH－$(CH_2CH_2O)n^7$－CH_2－C(=O)－、－C(=O)－$(CH_2CH_2)n^6$－NH－C(=O)－$(CH_2CH_2O)n^7$－CH_2CH_2－C(=O)－、－$(CH_2)n^8$－O－C(=O)－、－$(CH_2)n^{12}$－C(=O)－、以及－$(CH_2CH_2)n^{13}$－C(=O)－NH－$(CH_2CH_2O)n^{14}$－CH_2CH_2－C(=O)－，在此，式中，n^6表示整数1～3、n^7表示整数1～5、n^8表示整数0～2、n^{12}表示整数2～7、n^{13}表示整数1～3、n^{14}表示整数6～10，J表示以下所示的任意一个：

[0185] 

[0186] 在此，在上述所示的J的结构式中，星号表示与La’结合，R^{17}表示羟基或C1～C3烷氧基，V以及W分别独立地表示氧原子、氮原子、或硫原子，组7表示：a)可被1～3个卤素原子取代的C1～C6烷氧基、b)可被1～3个选自卤素原子、羟基、－OCOR’、－NR’R”、－C(=NR’)－NR”R”’以及－NHC(=NR’)－NR”R”’中的任意一个取代的C1～C6烷基、c)卤素原子、d)C3～C5环烷氧基、e)C1～C6烷硫基、f)－NR’R”、g)－C(=NR’)－NR”R”’、h)－NHC(=NR’)－NR”R”’、i)－NHCOR’、或j)羟基，在此，R’以及R”如前面定义所述，R”’分别独立地表示氢原子或C1～C6烷基，组8表示：卤素原子、羟基、或C1～C6烷氧基，并且，组9表示：卤素原子、或可被1～3个卤素原子取代的C1～C6烷基或者C1～C6烷氧基。)

[0187] [63]根据[62]所述的化合物、其盐或者它们的水合物，其中，E表示可被1～2个卤素原子取代的螺环键合的3～5元饱和烃环，R^9以及R^{10}分别独立地表示C1～C3烷氧基，R^{11}以及R^{12}一起与各基团所结合的碳原子一起形成双键，R^{13}表示可具有选自组10中的1个或多个取代基的芳基或杂芳基、或可具有选自组11中的1个或多个取代基的C1～C3烷基，V以及W为氧原子，组10表示：a)可被1～3个卤素原子取代的C1～C3烷氧基、b)可被1～3个选自卤素原子、羟基、－OCOR”、－C(=NR’)－NR”R”’、以及－NHC(=NR’)－NR”R”’中的任一种取代的C1～C3烷基、c)C3～C5环烷氧基、d)－C(=NR’)－NR”R”’、e)－NHC(=NR’)－NR”R”’、或f)羟基、在此，R’、R”、以及R”’分别独立地表示氢原子或C1～C3烷基，并且，组11表示：卤素原子、羟基、或C1～C3烷氧基。

[0188] [64]根据[62]所述的化合物、其盐或者它们的水合物，其中，E表示可被1～2个卤素原子取代的螺环键合的3～5元饱和烃环，R^9以及R^{10}分别独立地表示C1～C3烷氧基，R^{11}表示氢原子，R^{12}及R^{13}与R^{12}及R^{13}所结合的碳原子一起形成3～5元饱和烃环或CH_2＝，并且，V以及W为氧原子。

[0189] [65]根据[62]所述的化合物、其盐或者它们的水合物，其中，E表示可被1～2个卤素原子取代的螺环键合的3～5元饱和烃环，R^9以及R^{10}分别独立地表示C1～C3烷氧基，R^{11}、R^{12}及R^{13}与R^{11}所结合的碳原子和R^{12}及R^{13}所结合的碳原子一起形成可具有选自组12中的1个或多个取代基的苯环，V以及W为氧原子，并且，组12表示：卤素原子、或可被1～3个卤素原子取代的C1～C3烷基或C1～C3烷氧基。

[0190] [66]根据[62]～[65]中任一项所述的化合物、其盐或者它们的水合物，其中，B’为

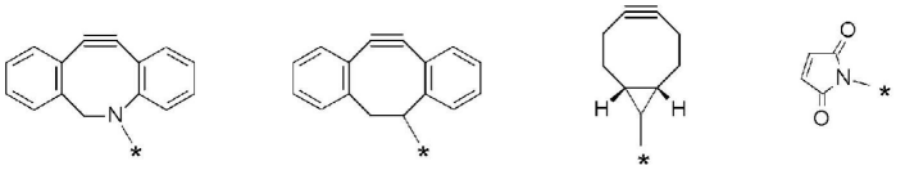
选自1,4－苯基、2,5－吡啶基、3,6－吡啶基、2,5－嘧啶基、2,5－噻吩基中的任意一种。

[0191] [67]根据[66]所述的化合物、其盐或者它们的水合物,其中,B'为1,4－苯基。

[0192] [68]根据[62]～[67]中任一项所述的化合物、其盐或者它们的水合物,其中,Lp'为选自以下的组中的氨基酸残基:－GGVA－、－GG－(D－)VA－、－VA－、－GGFG－、－GGPI－、－GGVCit－、－GGVK－、－GG(D－)P－I－、以及－GGPL－。

[0193] [69]根据[62]～[68]中任一项所述的化合物、其盐或者它们的水合物,其中,La'选自以下的组:$-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-$、$-C(=O)-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-$、$-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-$、$-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_2-CH_2-C(=O)-$、$-C(=O)-CH_2CH_2-NH-C(=O)-(CH_2CH_2O)_4-CH_2CH_2-C(=O)-$、$-CH_2-OC(=O)-$、$-OC(=O)-$、$-(CH_2)_5-C(=O)-$、$-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_8-CH_2CH_2-C(=O)-$。

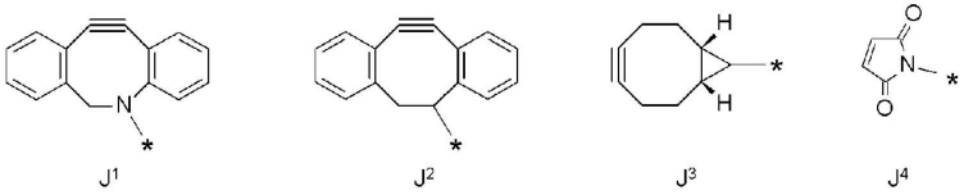
[0194] [70]根据[62]～[69]中任一项所述的化合物、其盐或者它们的水合物,其中,R^{16}以J－La'－Lp'－NH－B'－CH_2－O(C=O)－＊表示,式中,B'为1,4－苯基,Lp'表示选自以下的组中的任一种:－GGVA－、－GG－(D－)VA－、－VA－、－GGFG－、－GGPI－、－GGVCit－、－GGVK－以及－GGPL－,La'表示选自以下的组中的任一种:$-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-$、$-C(=O)-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-$、$-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-$、$-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_2-CH_2-C(=O)-$、$-C(=O)-CH_2CH_2-NH-C(=O)-(CH_2CH_2O)_4-CH_2CH_2-C(=O)-$、$-CH_2-OC(=O)-$、$-OC(=O)-$、$-(CH_2)_5-C(=O)-$、$-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_8-CH_2CH_2-C(=O)-$,并且,J表示以下所示的任一种:

[0195] 

[0196] 在此,在J的结构式中,星号表示与La'结合。

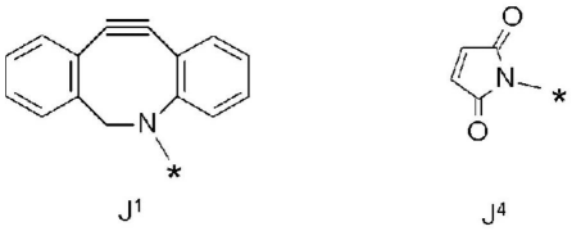
[0197] [71]根据[62]～[70]中任一项所述的化合物、其盐或者它们的水合物,其中,R^{16}选自以下的组:$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-$GGVA－NH－B'－$CH_2$－OC(=O)－、$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-$GG－(D－)VA－NH－B'－$CH_2$－OC(=O)－、$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-$VA－NH－B'－$CH_2$－OC(=O)－、$J^1-C(=O)-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-$VA－NH－B'－$CH_2$－OC(=O)－、$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-$GGPI－NH－B'－$CH_2$－OC(=O)－、$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-$GGFG－NH－B'－$CH_2$－OC(=O)－、$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-$GGVCit－NH－B'－$CH_2$－OC(=O)－、$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-$GGVK－NH－B'－$CH_2$－OC(=O)－、$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-$GGPL－NH－B'－$CH_2$－OC(=O)－、$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-$VA－NH－B'－$CH_2$－OC(=O)－、$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_2-CH_2-C(=O)-$VA－NH－B'－$CH_2$－OC(=O)－、$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-NH-C(=O)-(CH_2CH_2O)_4-CH_2CH_2-C(=O)-$VA－NH－B'－$CH_2$－OC(=O)－、$J^2-OC(=O)-$GGVA－NH－B'－$CH_2$－OC(=O)－、$J^3-CH_2-OC(=O)-$GGVA－NH－B'－$CH_2$－OC(=O)－、$J^4-(CH_2)_5-C(=O)-$GGVA－NH－B'－$CH_2$－OC(=O)－、$J^4-(CH_2)_5-C(=O)-$VA－NH－B'－$CH_2$－OC(=O)－、以及$J^4-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_8-$

CH_2CH_2－C(=O)－VA－NH－B'－CH_2－OC(=O)－，在此，J^1、J^2、J^3、J^4表示以下的结构式：

[0198] 

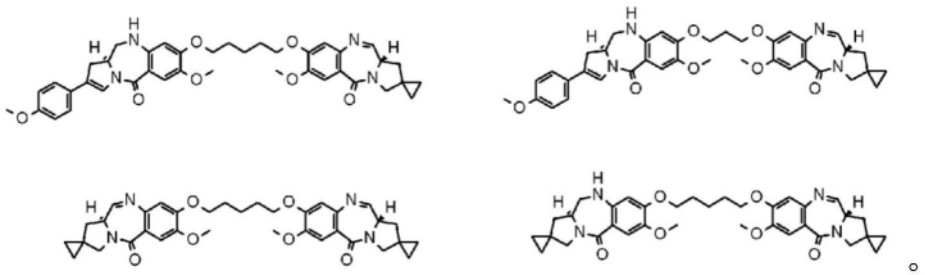
[0199] 在此，在J^1、J^2、J^3以及J^4的结构式中，星号表示与邻接的基团结合，并且，B'为1，4－苯基。

[0200] [72]根据[62]～[71]中任一项所述的化合物、其盐或者它们的水合物，其中，R^{16}选自以下的组：J^1－C(=O)－CH_2CH_2－C(=O)－GGVA－NH－B'－CH_2－OC(=O)－、J^1－C(=O)－CH_2CH_2－C(=O)－VA－NH－B'－CH_2－OC(=O)－、J^1－C(=O)－$(CH_2CH_2)_2$－C(=O)－VA－NH－B'－CH_2－OC(=O)－、J^1－C(=O)－CH_2CH_2－C(=O)－GGVCit－NH－B'－CH_2－OC(=O)－、J^1－C(=O)－CH_2CH_2－C(=O)－NH－$(CH_2CH_2)_2$－C(=O)－VA－NH－B'－CH_2－OC(=O)－、J^1－C(=O)－CH_2CH_2－C(=O)－NH－$(CH_2CH_2O)_2$－CH_2－C(=O)－VA－NH－B'－CH_2－OC(=O)－、J^1－C(=O)－CH_2CH_2－NH－C(=O)－$(CH_2CH_2O)_4$－CH_2CH_2－C(=O)－VA－NH－B'－CH_2－OC(=O)－、J^4－$(CH_2)_5$－C(=O)－GGVA－NH－B'－CH_2－OC(=O)－、以及J^4－$(CH_2)_5$－C(=O)－VA－NH－B'－CH_2－OC(=O)－，在此，B'为1,4－苯基，J^1、J^4表示以下的结构式：

[0201] 

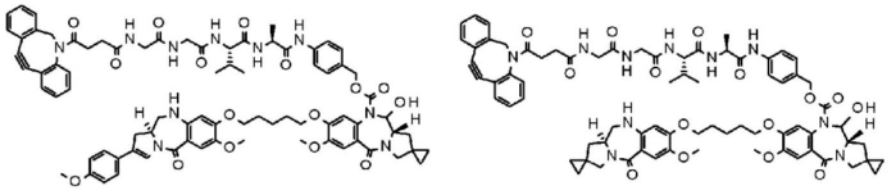
[0202] 在此，在J^1以及J^4的结构式中，星号表示与邻接的基团结合。

[0203] [73]一种化合物、其盐或者它们的水合物，其中，所述化合物为下式所示的任意一种：

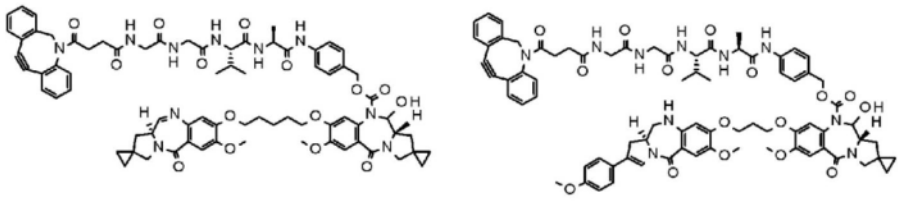
[0204] 

。

[0205] [74]一种化合物、其盐或者它们的水合物，其中，所述化合物为下式所示的任意一种：



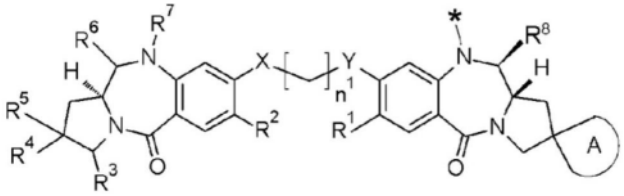
[0206]



。

[0207] [75]根据[1]～[29]及[59]～[61]中任一项所述的抗体－药物联合物，其中，D由下式表示：

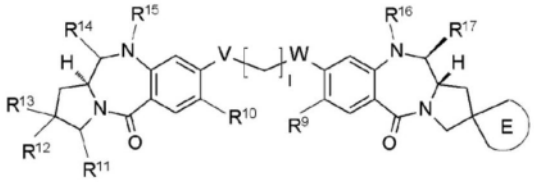
[0208]



。

[0209] [76]根据[62]～[72]及[74]中任一项所述的化合物、其盐或者它们的水合物，其中，所述化合物由下式表示：

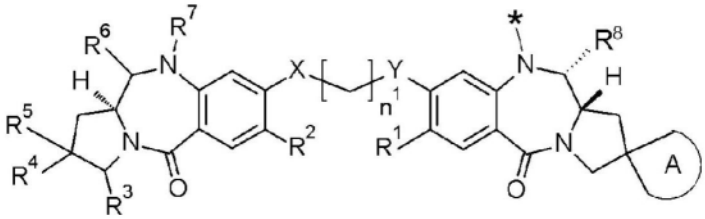
[0210]



。

[0211] [77]根据[1]～[29]及[59]～[61]中任一项所述的抗体－药物偶联物，其中，D由下式表示：

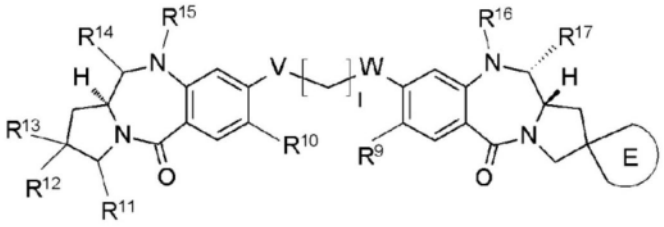
[0212]



。

[0213] [78]根据[62]～[72]及[74]中任一项所述的化合物、其盐或者它们的水合物，其中，所述化合物由下式表示：

[0214]



。

[0215] [79]一种药物组合物，其特征在于，所述药物组合物包含选自[1]～[29]、[59]～[61]、[75]和[77]中任一项所述的抗体－药物偶联物、其盐或者它们的水合物，[30]～[42]、[50]～[54]和[58]中任一项所述的抗体或该抗体的功能性片段，以及[62]～[74]、[76]和[78]中任一项所述的化合物、其盐或者它们的水合物中的任意种。

[0216] [80]根据[79]所述的药物组合物，其特征在于，所述药物组合物为抗肿瘤药。

[0217] [81]根据[80]所述的药物组合物，其特征在于，肿瘤为CLDN6和/或CLDN9表达的肿瘤。

[0218] [82]根据[80]或[81]所述的药物组合物，其特征在于，肿瘤为卵巢癌(表层上皮性肿瘤、间质性肿瘤、生殖细胞肿瘤)、肺癌(非小细胞肺癌、小细胞肺癌)、胃癌、子宫内膜癌、睾丸癌(精原细胞瘤、非精原细胞瘤)、宫颈癌、胎盘绒毛膜癌、肾癌、尿路上皮癌、大肠癌、前列腺癌、多形性神经胶质母细胞瘤、脑肿瘤、胰腺癌、乳腺癌、黑色素瘤、肝癌、膀胱癌或食道癌。

[0219] [83]一种肿瘤的治疗方法，其特征在于，将选自[1]～[29]、[59]～[61]、[75]和[77]中任一项所述的抗体－药物偶联物、其盐或者它们的水合物，[30]～[42]、[50]～[54]和[58]中任一项所述的抗体或该抗体的功能性片段，以及[62]～[74]、[76]和[78]中任一项所述的化合物、其盐或者它们的水合物中的任意种给药于个体。

[0220] [84]根据[83]所述的肿瘤的治疗方法，其特征在于，肿瘤为CLDN6和/或CLDN9表达的肿瘤。

[0221] [85]根据[83]或[84]所述的治疗方法，其特征在于，肿瘤为卵巢癌(表层上皮性肿瘤、间质性肿瘤、生殖细胞肿瘤)、肺癌(非小细胞肺癌、小细胞肺癌)、胃癌、子宫内膜癌、睾丸癌(精原细胞瘤、非精原细胞瘤)、宫颈癌、胎盘绒毛膜癌、肾癌、尿路上皮癌、大肠癌、前列腺癌、多形性神经胶质母细胞瘤、脑肿瘤、胰腺癌、乳腺癌、黑色素瘤、肝癌、膀胱癌或食道癌。

[0222] [86]一种肿瘤的治疗方法，其特征在于，将药物组合物、以及至少一种抗肿瘤药同时、分别或者连续给药于个体，所述药物组合物包含选自[1]～[29]、[59]～[61]、[75]和[77]中任一项所述的抗体－药物偶联物、其盐或者它们的水合物，[30]～[42]、[50]～[54]和[58]中任一项所述的抗体或该抗体的功能性片段，以及[62]～[74]、[76]和[78]中任一项所述的化合物、其盐或者它们的水合物中的至少一种。

[0223] [87]一种化合物，其表现出具有与Table1或Table2记载的峰位置实质上类似的峰位置的质子NMR。

[0224] 发明效果

[0225] 本发明所提供的新的抗体－吡咯并苯并二氮杂卓(PBD)衍生物偶联物具有优良的抗肿瘤活性和安全性，因而作为抗肿瘤剂是有用的。另外，本发明的PBD衍生物具有抗肿瘤活性，作为该偶联物的药物是有用的。进而，本发明的抗体识别肿瘤细胞或与肿瘤细胞结合，因此作为该偶联物的抗体是有用的。

附图说明

[0226] 图1为示意性表示本发明的药物－偶联物((I)的分子)的图。(a)表示药物D，(b)表示连接子L，(c)表示N_3－L(PEG)－，(d)表示N297糖链(其中，白色的椭圆表示NeuAc(Sia)，

白色的六角形表示Man，涂满的六角形表示GlcNAc，白色的菱形表示Gal，白色的倒三角形表示Fuc)。(b)和(c)由于(c)的叠氮基(黑色的泪珠型)与(b)的间隔子(白色的半圆形)中的炔烃结构反应，从而形成三唑环而结合。Y字型表示抗体Ab。另外，本示意图中，为了方便将N297糖链表示为N297－(Fuc)MSG，并且示出了各个N297糖链中仅仅在一侧的支链具有与含有叠氮基的PEG连接子(N_3－L(PEG)－)所结合的唾液酸，另一侧的支链的非还原末端不具有唾液酸的形态，但是也可通过采用N297－(Fuc)SG，在两方的支链的非还原末端具有与含叠氮基的PEG连接子所结合的唾液酸的形态。上述示意方法如果没有特别说明，就适用于整个本发明书。

[0227] 图2是表示作为本发明的药物－偶联物的制造中间体的(Fucα1,6)GlcNAc－抗体(图2的A的(II)的分子)以及MSG型糖链重构抗体(图2的B的(III)的分子)的结构的示意图。两图中，Y字型与图1同样表示抗体Ab。图2的A中，(e)表示仅由在Fuc的1位和6位进行α糖苷键结的GlcNAc构成的N297糖链。图2的B中，(d)与图1同样表示N297糖链，(f)为具有叠氮基的PEG连接子部分的结构，表示用于在末端与连接子L结合的叠氮基。具有叠氮基的PEG连接子的结合方式与图1的说明相同。

[0228] 图3为由动物细胞中产生的抗体制造MSG型糖链重构抗体的工序的示意图。图中的分子(II)、(III)与图2相同，分别表示(Fucα1,6)GlcNAc－抗体以及MSG型糖链重构抗体。(IV)的分子为动物细胞中产生的抗体，为N297糖链不均匀的分子的混合物。图3A表示通过用EndoS之类的水解酶处理(IV)的不均匀的N297糖链而制作均匀的(Fucα1,6)GlcNAc－抗体(II)的工序。图3B表示使用EndoS D233Q/Q303L突变体之类的糖基转移酶对抗体(II)的N297糖链的GlcNAc实施MSG型糖链供体分子的糖链的糖链转移，制作(III)的MSG型糖链重构抗体的工序。在此使用的MSG型糖链供体分子为MSG的非还原末端的唾液酸用具有叠氮基的PEG连接子修饰后的分子，在制作的MSG型N297糖链重构抗体中，如图2B所述，非还原末端的唾液酸接受同样的修饰。图3B中为了方便作为供体分子示出MSG，但是将SG(10)作为糖链供体，由此可合成在N297糖链的两个非还原末端与具有叠氮基的连接子分子结合的糖链重构抗体作为(III)的重构抗体。

[0229] 图4表示抗HER2抗体－药物偶联物ADC26、ADC19、ADC54针对皮下移植的作为人胃癌株的NCI－N87细胞的效果。

[0230] 图5表示抗HER2抗体－药物偶联物ADC49、曲妥珠单抗、抗LPS抗体－药物偶联物ADC53针对皮下移植的作为人胃癌株的NCI－N87细胞的效果。

[0231] 图6表示抗HER2抗体－药物偶联物ADC49、抗LPS抗体－药物偶联物ADC53或曲妥珠单抗－Tesirine(参考例1)对皮下移植的作为人乳腺癌株的KPL－4细胞的效果。

[0232] 图7表示抗HER2抗体－药物偶联物ADC49、或曲妥珠单抗－Tesirine(参考例1)对皮下移植的作为人乳腺癌株的JIMT－1细胞的效果。

[0233] 图8表示抗CLDN6抗体－药物偶联物ADC40、或抗CLDN6抗体(H1L1)－Tesirine(参考例1)对皮下移植的作为人卵巢癌株的OV－90细胞的效果。

[0234] 图9表示抗CLDN6抗体－药物偶联物ADC40、或抗CLDN6抗体(H1L1)－Tesirine(参考例1)对皮下移植的作为人卵巢癌株的NIH:OVCAR－3细胞的效果。

[0235] 图10表示抗体－药物偶联物抗TROP2抗体－药物偶联物ADC50、或抗LPS抗体－药物偶联物ADC53对皮下移植的作为人头颈癌细胞株的FaDu细胞的效果。

[0236] 图11表示人CLDN6的全长氨基酸序列(序列号1)以及全长cDNA的碱基序列(序列号2)。

[0237] 图12表示人CLDN9的全长氨基酸序列(序列号3)以及全长cDNA的碱基序列(序列号4)。

[0238] 图13表示B1抗体轻链的CDRL1～3的氨基酸序列(序列号5～7)。

[0239] 图14表示人源化B1抗体轻链L4的CDRL3的氨基酸序列(序列号8)。

[0240] 图15表示B1抗体重链的CDRH1～3的氨基酸序列(序列号9～11)。

[0241] 图16表示C7抗体轻链的CDRL1～3的氨基酸序列(序列号12～14)。

[0242] 图17表示C7抗体重链的CDRH1～3的氨基酸序列(序列号15～17)。

[0243] 图18表示编码B1抗体轻链的可变区的cDNA的核苷酸序列(序列号18)以及B1抗体轻链的可变区的氨基酸序列(序列号19)。氨基酸序列中的下划线表示CDR序列。

[0244] 图19表示编码B1抗体重链的可变区的cDNA的核苷酸序列(序列号20)以及B1抗体重链的可变区的氨基酸序列(序列号21)。氨基酸序列中的下划线表示CDR序列。

[0245] 图20表示编码C7抗体轻链的可变区的cDNA的核苷酸序列(序列号22)以及C7抗体轻链的可变区的氨基酸序列(序列号23)。氨基酸序列中的下划线表示CDR序列。

[0246] 图21表示编码C7抗体重链的可变区的cDNA的核苷酸序列(序列号24)以及C7抗体重链的可变区的氨基酸序列(序列号25)。氨基酸序列中的下划线表示CDR序列。

[0247] 图22表示chB1轻链的氨基酸序列(序列号28)以及包含编码chB1轻链的氨基酸序列的DNA序列的DNA片段(序列号29)。氨基酸序列中的下划线表示CDR序列。

[0248] 图23表示chB1轻链的可变区的氨基酸序列(序列号30)以及编码chB1轻链可变区的核苷酸序列(序列号31)。氨基酸序列中的下划线表示CDR序列。

[0249] 图24表示chB1重链的氨基酸序列(序列号32)以及编码chB1重链的核苷酸序列(序列号33)。氨基酸序列中的下划线表示CDR序列。

[0250] 图25表示chB1重链的可变区的氨基酸序列(序列号34)以及编码chB1重链的可变区的核苷酸序列(序列号35)。氨基酸序列中的下划线表示CDR序列。

[0251] 图26表示人源化抗体轻链hL1的氨基酸序列(序列号36)以及编码人源化抗体轻链hL1的核苷酸序列(序列号37)。氨基酸序列中的下划线表示CDR序列。

[0252] 图27表示人源化抗体轻链hL1的可变区的氨基酸序列(序列号38)以及编码人源化抗体轻链hL1的可变区的核苷酸序列(序列号39)。氨基酸序列中的下划线表示CDR序列。

[0253] 图28表示人源化抗体轻链hL2的氨基酸序列(序列号40)以及编码人源化抗体轻链hL2的核苷酸序列(序列号41)。氨基酸序列中的下划线表示CDR序列。

[0254] 图29表示人源化抗体轻链hL2的可变区的氨基酸序列(序列号42)以及编码人源化抗体轻链hL2的可变区的核苷酸序列(序列号43)。

[0255] 图30表示人源化抗体轻链hL3的氨基酸序列(序列号44)以及编码人源化抗体轻链hL3的核苷酸序列(序列号45)。氨基酸序列中的下划线表示CDR序列。

[0256] 图31表示人源化抗体轻链hL3的可变区的氨基酸序列(序列号46)以及编码人源化抗体轻链hL3的可变区的核苷酸序列(序列号47)。氨基酸序列中的下划线表示CDR序列。

[0257] 图32表示人源化抗体轻链hL4的氨基酸序列(序列号48)以及编码人源化抗体轻链hL4的核苷酸序列(序列号49)。氨基酸序列中的下划线表示CDR序列。

[0258] 图33表示人源化抗体轻链hL4的可变区的氨基酸序列(序列号50)以及编码人源化抗体轻链hL4的可变区的核苷酸序列(序列号51)。氨基酸序列中的下划线表示CDR序列。

[0259] 图34表示人源化抗体重链hH1的氨基酸序列(序列号52)以及编码人源化抗体重链hH1的核苷酸序列(序列号53)。氨基酸序列中的下划线表示CDR序列。

[0260] 图35表示人源化抗体重链hH1的可变区的氨基酸序列(序列号54)以及编码人源化抗体重链hH1的可变区的核苷酸序列(序列号55)。氨基酸序列中的下划线表示CDR序列。

[0261] 图36表示人源化抗体重链hH2的氨基酸序列(序列号56)以及编码人源化抗体重链hH2的核苷酸序列(序列号57)。氨基酸序列中的下划线表示CDR序列。

[0262] 图37表示人源化抗体重链hH2的可变区的氨基酸序列(序列号58)以及编码人源化抗体重链hH2的可变区的核苷酸序列(序列号59)。

[0263] 图38表示人源化抗体重链hH3的氨基酸序列(序列号60)以及编码人源化抗体重链hH3的核苷酸序列(序列号61)。氨基酸序列中的下划线表示CDR序列。

[0264] 图39表示人源化抗体重链hH3的可变区的氨基酸序列(序列号62)以及编码人源化抗体重链hH3的可变区的核苷酸序列(序列号63)。氨基酸序列中的下划线表示CDR序列。

[0265] 图40表示利用流式细胞仪测定的B1抗体及C7抗体相对于人CLDN6及家族分子CLDN3、CLDN4、CLDN9的结合能力。

[0266] 图41表示B1抗体以及C7抗体的利用Mab－ZAP得到的抗体内化活性能力。

[0267] 图42表示利用流式细胞仪测定的人源化抗CLDN6抗体H1L1、H2L2、H1L3、H2L4以及H3L3相对于CLDN6以及家族分子的结合能力。

[0268] 图43表示曲妥珠单抗轻链的氨基酸序列(序列号64)以及重链的氨基酸序列(序列号65)。

[0269] 图44表示曲妥珠单抗突变体的轻链的氨基酸序列(序列号73)以及重链的氨基酸序列(序列号75)。

[0270] 图45表示作为人嵌合化抗CLDN6抗体chB1的重链的chB1__H与作为人源化抗体重链的hH1、hH2以及hH3的氨基酸序列的比较图。“•”表示与chB1__H同样的氨基酸残基，记载氨基酸残基的部位是取代的氨基酸残基。

[0271] 图46表示作为人嵌合化抗CLDN6抗体chB1的轻链的chB1__L与作为人源化抗体轻链的hL1、hL2、hL3以及hL4的氨基酸序列的比较图。“•”表示与chB1__L同样的氨基酸残基，记载氨基酸残基的部位为取代的氨基酸残基。

[0272] 图47表示抗HER2抗体－药物偶联物ADC49以及ADC55针对皮下移植的作为人乳腺癌株的KPL－4细胞的效果。

[0273] 图48表示抗HER2抗体－药物偶联物ADC55针对皮下移植的作为人乳腺癌株的JIMT－1细胞的效果。

[0274] 图49表示抗HER2抗体－药物偶联物ADC49以及ADC55、抗LPS抗体－药物偶联物ADC53针对皮下移植的作为人胰腺癌株的CFPAC－1细胞的效果。

具体实施方式

[0275] 本发明的抗体－药物偶联物为在能够识别或结合肿瘤细胞的抗体上通过连接子结构部分结合了抗肿瘤性化合物的抗肿瘤性药物。

[0276] 本发明中，作为“卤素原子”，可举出氟原子、氯原子、溴原子、碘原子等。

[0277] 本发明中，“C1～C6烷基”是指碳原子数1～6的直链、支链的烷基。作为“C1～C6烷基”，可举出例如甲基、乙基、n－丙基、i－丙基、n－丁基、i－丁基、s－丁基、t－丁基、n－戊基、n－己基等。

[0278] 本发明中，“C1～C6烷氧基”是指具有碳原子数1～6的直链、支链的烷基的烷氧基。作为“C1～C6烷氧基”，可举出例如甲氧基、乙氧基、n－丙氧基、i－丙氧基、n－丁氧基、i－丁氧基、s－丁氧基、n－戊氧基、n－己氧基等。

[0279] 本发明中，“C1～C6烷硫基”是指具有碳原子数1～6的直链、支链的烷基的烷硫基。作为“C1～C6烷硫基”，可举出例如甲硫基、乙硫基、n－丙硫基、i－丙硫基、n－丁硫基、i－丁硫基、s－丁硫基、t－丁硫基、n－戊硫基、n－己硫基等。

[0280] 本发明中，“3～5元饱和烃环”表示碳原子数3～5的饱和环状烃基。作为“3～5元饱和烃环”，可举出例如环丙基、环丁基、环戊基。

[0281] 本发明中，“C3～C5环烷氧基”是指具有碳原子数3～5的饱和环状烃基的环烷氧基。作为“C3～C5环烷氧基”，可举出例如环丙氧基、环丁氧基、环戊氧基。

[0282] 本发明中，“3～5元饱和杂环”可举出1,3－环氧丙烷、氮杂环丁烷、三亚甲基硫醚、四氢呋喃、吡咯烷等。

[0283] 本发明中，“芳基”可举出苯基、苄基、茚基、萘基、茏基、蒽基和菲基等。

[0284] 本发明中，“杂芳基”可举出噻吩基、吡咯基、吡唑基、三唑基、噁唑基、噁二唑基、噻唑基、吡啶基、嘧啶基、哒嗪基、吡嗪基、喹啉基、喹喔啉基、苯并噻吩基、苯并咪唑基、苯并三唑基、苯并呋喃基等。

[0285] 本发明中，“6元杂环”可举出吡啶环、嘧啶环和哒嗪环等。

[0286] 本发明中，“螺环键合的”如实施例所示，是指A与A所结合的吡咯烷环，或E与E所结合的吡咯烷环形成螺环。

[0287] [抗体－药物偶联物]

[0288] 本发明的抗体－药物偶联物如下式所示。

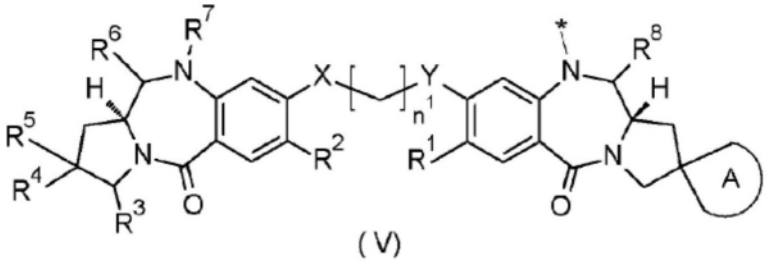
[0289] 

[0290] m^1表示抗体－药物偶联物中每1分子抗体的药物结合数，Ab表示抗体或该抗体的功能性片段，L表示连接Ab与D的连接子，D表示药物。

[0291] ＜药物＞

[0292] 对本发明的抗体－药物偶联物中所结合的药物D进行说明。本发明的药物D优选为抗肿瘤性化合物。对于本抗肿瘤性化合物而言，在肿瘤细胞内连接子的一部分或全部被切断从而抗肿瘤性化合物部分被游离进而体现出抗肿瘤效果。如果在连接子与药物的结合部位切断，则抗肿瘤性化合物以本来的结构游离，可发挥其本来的抗肿瘤效果。

[0293] 本发明的抗体－药物偶联物中的抗肿瘤性化合物是下述通式(V)所示的吡咯并苯并二氮杂卓类衍生物(PBD衍生物)。以下对其进行说明。

[0294] 

(V)

[0295] 星号表示与连接子L结合。

[0296] n^1表示整数2～8,优选整数2～6,更优选整数3～5。

[0297] 上述n^1为整数2～8,优选整数2～6,更优选整数3～5所示的烷基链可含有双键。

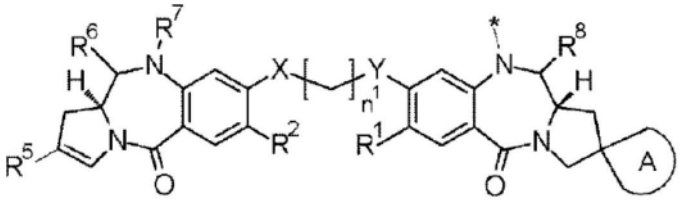
[0298] A表示螺环键合的3～5元饱和烃环或3～5元饱和杂环,优选3～5元饱和烃环(环丙烷、环丁烷、环戊烷),更优选环丙烷、环丁烷,最优选环丙烷。

[0299] 所述螺环键合的3～5元饱和烃环可被1～4个卤素原子取代,优选被1或2个氟原子取代(例如,2,2－二氟环丙烷等)。

[0300] R^1、R^2分别独立地表示C1～C6烷氧基、C1～C6烷基、氢原子、羟基、硫醇基、C1～C6烷硫基、卤素原子或－NR'R",优选C1～C6烷氧基、C1～C6烷基、羟基,更优选C1～C3烷氧基,最优选甲氧基。

[0301] R^3、R^4以及R^5表示下述(i)～(iii)。

[0302] (i)R^3以及R^4一起,如下所示,与各基团所结合的碳原子一起形成双键时,R^5表示可具有选自组1中的1个或多个取代基的芳基或杂芳基,可具有选自组2中的1个或多个取代基的C1～C6烷基,优选上述可具有选自组1中的1个或多个取代基的芳基。

[0303] 

[0304] R^5的"可具有选自组1中的1个或多个取代基的芳基或杂芳基"中的"芳基"优选苯基、萘基,更优选苯基。

[0305] R^5的"可具有选自组1中的1个或多个取代基的芳基或杂芳基"中的"杂芳基"优选噻吩基、吡啶基、嘧啶基、喹啉基、喹喔啉基、苯并噻吩基,更优选2－噻吩基、3－噻吩基、2－吡啶基、3－吡啶基、4－吡啶基,更优选3－吡啶基、3－噻吩基。

[0306] 作为上述R^5的芳基或杂芳基的取代基,以下可举出a)～j):a)可被1～3个卤素原子取代的C1～C6烷氧基,b)可被1～3个选自卤素原子、羟基、－OCOR'、－NR'R"、－C(＝NR')－NR"R"'以及－NHC(＝NR')－NR"R"'中的任一个取代的C1～C6烷基,c)卤素原子,d)C3～C5环烷氧基,e)C1～C6烷硫基,f)－NR'R",g)－C(＝NR')－NR"R"',h)－NHC(＝NR')－NR"R"',i)－NHCOR',j)羟基。

[0307] 在此,b)、f)～i)中的R'、R"以及R"'分别独立地表示氢原子、C1～C6烷基,优选分别独立地表示氢原子或C1～C3烷基。

[0308] a)～j)优选:a)为可被1～3个卤素原子取代的C1～C3烷氧基,更优选为甲氧基、乙氧基、n－丙氧基、i－丙氧基、三氟甲氧基,更优选为甲氧基、乙氧基、三氟甲氧基,最优选甲

氧基。

[0309] b)为可被1～3个卤素原子、羟基、－OCOR'，－C(＝NR')－NR"R"'，－NHC(＝NR')－NR"R"'取代的C1～C3烷基，R'、R"、以及R"'分别独立地表示氢原子或C1～C3烷基，更优选为可被1～3个选自卤素原子、羟基、－OCOR'、－C(＝NR')－NR"R"'、－NHC(＝NR')－NR"R"'中的任一个取代的C1～C3烷基，R'、R"、以及R"'分别独立地表示氢原子、甲基，进一步优选为甲基、乙基、n－丙基、i－丙基、氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、羟甲基、$－CH_2OCOMe$、$－CH_2－NHC(＝NH)－NH_2$，$－CH_2－NHC(＝NMe)－NH_2$。

[0310] c)为卤素原子，优选为氟原子、氯原子。

[0311] d)为C3～C5环烷氧基，更优选为环丙氧基。

[0312] e)为C1～C3烷硫基，更优选为甲硫基、乙硫基。

[0313] f)为－NR'R"，R'及R"分别独立地表示氢原子或C1～C3烷基，更优选为$－NH_2$、$－NHMe$、$－NMe_2$、－NHEt，$－NEt_2$。

[0314] g)为－C(＝NR')－NR"R"'，R'、R"、以及R"'分别独立地表示氢原子或C1～C3烷基，更优选为$－C(＝NH)－NH_2$、$－C(＝NMe)－NH_2$。

[0315] h)为－NHC(＝NR')－NR"R"'，R'、R"以及R"'分别独立地表示氢原子或C1～C3烷基，更优选为$－NHC(＝NH)－NH_2$，$－NHC(＝NMe)－NH_2$。i)为－NHCOR'，R'为氢原子或C1～C3烷基，更优选为－NHCOMe、－NHCOEt。

[0316] j)为羟基。

[0317] R^5的芳基(优选苯基)或杂芳基(优选吡啶基)的取代基的位置任意，取代基为多个时，它们可相同也可不同。

[0318] R^5为芳基时的取代基优选a)、b)、d)、g)、h)、j)，更优选a)、b)、d)、j)。

[0319] R^5为苯基时，取代基的位置可任意，取代基可为多个，优选取代基的位置为3位或/和4位、取代基为1个或2个，更优选取代基的位置为4位、取代基为1个。

[0320] R^5为萘基时，取代基的位置可任意，取代基可为多个，优选取代基的位置为6位、取代基为1个。

[0321] R^5为苯基时，更优选苯基、4－甲氧基苯基、3－甲氧基苯基、4－乙氧基苯基、4－(n－丙氧基)－苯基、4－(i－丙氧基)－苯基、4－环丙氧基苯基、4－三氟甲基苯基、4－羟甲基－苯基、4－乙酰氧基甲基－苯基、4－甲脒基酰胺甲基－苯基，更优选苯基、4－甲氧基苯基、3－甲氧基苯基、4－环丙氧基－苯基、4－羟甲基－苯基、4－乙酰氧基甲基－苯基、4－甲脒基酰胺甲基－苯基、4－三氟甲基苯基。

[0322] R^5为萘基时，更优选萘基、6－甲氧基－2－萘基。

[0323] 最优选4－甲氧基苯基。

[0324] R^5为杂芳基时的取代基优选a)、b)、d)、g)、h)、j)，更优选a)、b)。

[0325] R^5为杂芳基时，取代基的位置可任意，但是R^5为3－吡啶基时，取代基的位置优选6位或/和5位，R^5为2－吡啶基时，取代基的位置优选5位或/和4位，或5位或/和6位，R^5为4－吡啶基时，取代基的位置优选2位或/和6位。

[0326] R^5为杂芳基时的取代基可为多个，优选1个或2个，优选1个。

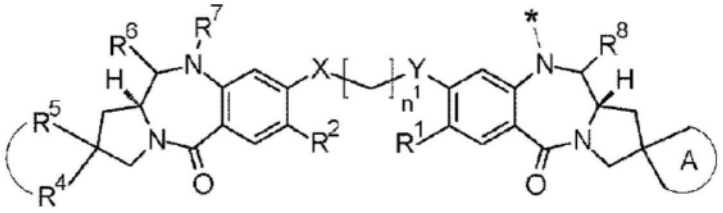
[0327] R^5为吡啶基时，优选6－甲氧基－3－吡啶基，6－甲基－3－吡啶基。

[0328] R^5为3－噻吩基或6－喹喔啉基时，优选未取代。

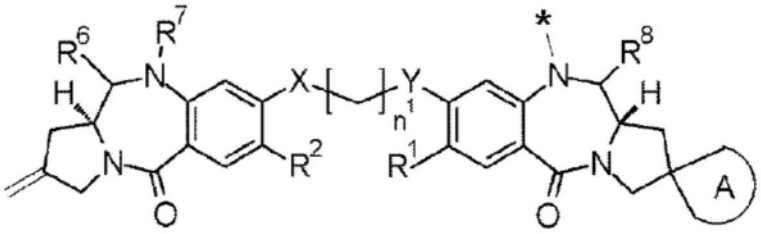
[0329] R^5的“可具有选自组2中的1个或多个取代基的C1～C6烷基”的“C1～C6烷基”优选C1～C3烷基，更优选甲基、乙基。

[0330] R^5的“可具有选自组2中的1个或多个取代基的C1～C6烷基”的取代基为卤素原子、羟基、C1～C6烷氧基(优选C1～C3烷氧基)，优选羟基、甲氧基、乙氧基，更优选羟基。

[0331] (ii)R^3表示氢原子时，R^4及R^5与R^4及R^5所结合的碳原子一起，如下所示形成3～5元饱和烃环或者3～5元饱和杂环或者形成CH_2＝。



[0332] ，或，



[0333] 所述3～5元饱和烃环可被1～4个卤素原子取代，优选可被1或2个氟原子取代。

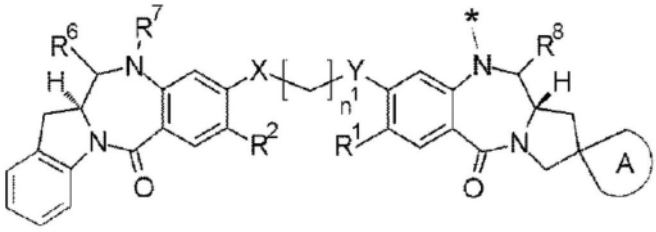
[0334] R^4以及R^5一起形成优选3～5元饱和烃环或CH_2＝，更优选形成环丙烷、环丁烷或CH_2＝(环外亚甲基)，更优选环丙烷。

[0335] R^4以及R^5一起形成3～5元饱和烃环或者3～5元饱和杂环时，与A相同，优选3～5元饱和烃环或者3～5元饱和杂环。更优选A为3～5元饱和烃环，R^4以及R^5一起形成3～5元饱和烃环，更优选A为环丙烷环，R^4以及R^5一起形成环丙烷环。

[0336] (iii)R^3、R^4及R^5与R^3所结合的碳原子以及R^4及R^5所结合的碳原子一起，形成可具有选自组3中的1个或多个取代基的苯环或6元杂环。

[0337] 下式表示R^3以及R^4一起形成可具有1个或多个取代基的苯环的情况。

[0338]



[0339] 所述苯环或杂环的取代基的位置可任意，取代基为多个时，它们可相同也可不同。

[0340] 苯环或杂环的取代基为卤素原子、可被1～3个卤素原子取代的C1～C6烷基或C1～C6烷氧基，优选卤素原子、可被1～3个卤素原子取代的C1～C3烷基或C1～C3烷氧基，更优选卤素原子、甲基、甲氧基。

[0341] “可具有1个或多个取代基的苯环或6元杂环”优选未取代的苯环。

[0342] R^3、R^4以及R^5最优选上述(i)。

[0343] R^6、R^7均表示氢原子或者R^6以及R^7一起表示亚胺键(C＝N)。

[0344] R^8为羟基或C1～C3烷氧基，优选羟基、甲氧基，更优选羟基。R^8可为亚硫酸氢盐加成物(OSO_3M(M为金属阳离子))。

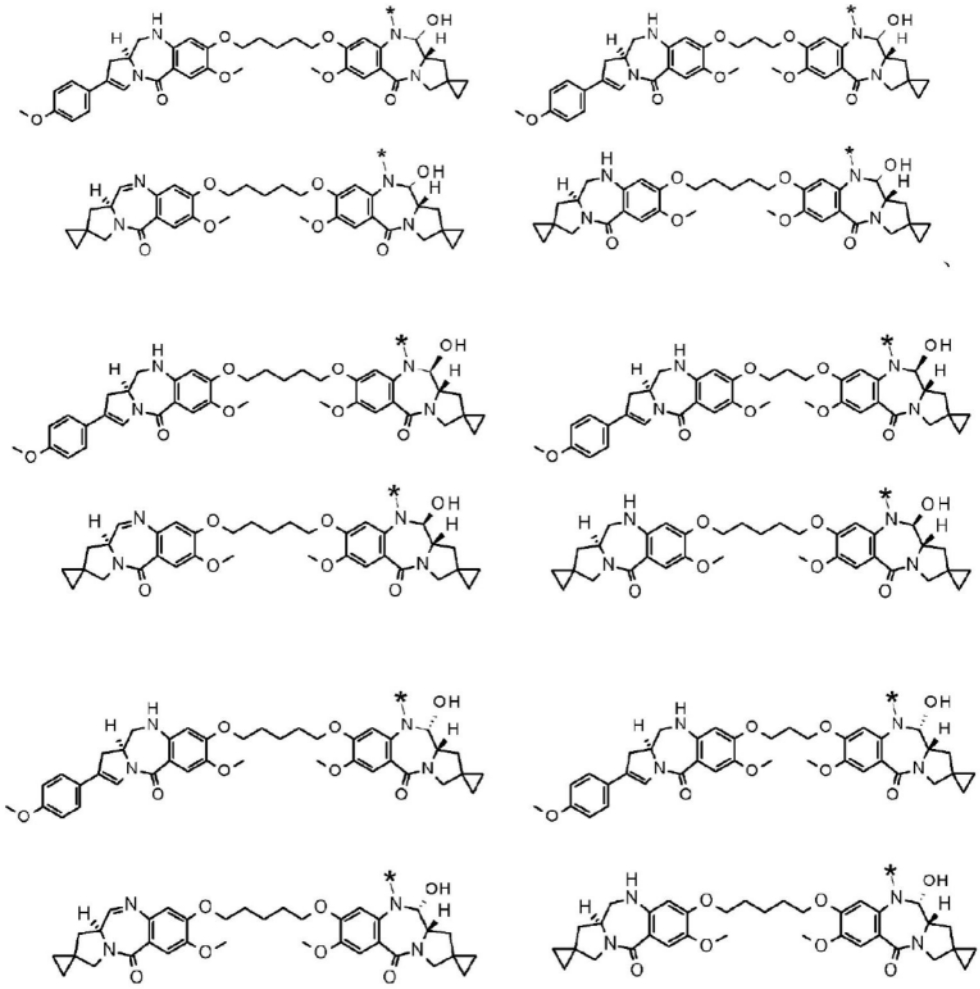
[0345] R^8与不对称碳原子结合，因此具有下述部分结构(Va)或者(Vb)所示的立体结构。波浪线表示与通式(V)的Y结合，星号表示与L结合。

[0346] 

V (a) V (b)

[0347] X、Y分别独立地表示氧原子、氮原子、硫原子，优选氧原子。

[0348] 本发明的药物D优选选自下组的一种化合物。

[0349] 

[0350] ＜连接子结构＞

[0351] 对本发明的抗体－药物偶联物中将抗肿瘤性药物与抗体结合的连接子结构进行说明。

[0352] 所述连接子L如下式所示：－Lb－La－Lp－NH－B－CH_2－O(C＝O)－＊。

[0353] 星号表示与药物D的N10'位的氮原子结合，Lb表示将La与Ab的糖链或重构的糖链结合的间隔子，或将La与抗体Ab的氨基酸残基(例如半胱氨酸、赖氨酸等)的侧链结合的间

隔子。

[0354] B表示苯基或杂芳基，优选1,4－苯基、2,5－吡啶基、3,6－吡啶基、2,5－嘧啶基、2,5－噻吩基，更优选1,4－苯基。

[0355] Lp表示在活体内或靶细胞内能够切断的由氨基酸序列形成的连接子。Lp可通过例如酯酶、肽酶等酶的作用被切断。

[0356] Lp是由2～7个(优选2～4个)氨基酸形成的肽残基。即，由2～7个氨基酸通过肽键结合而成的寡肽残基构成。

[0357] Lp在N末端与Lb－La－中的La的羰基结合，并在C末端与连接子的－NH－B－CH_2－O(C＝O)－部分中的氨基(－NH－)形成酰胺键。Lp的C末端与－NH－之间的键可被所述酯酶等酶切断。

[0358] 构成Lp的氨基酸没有特别限定，例如为L－或D－氨基酸，优选L－氨基酸。另外，除了α－氨基酸之外，可为β－丙氨酸、ε－氨基己酸、γ－氨基丁酸等结构的氨基酸，进而，也可是例如N－甲基化的氨基酸等非天然型的氨基酸。

[0359] Lp的氨基酸序列没有特别限定，作为构成的氨基酸，可举出甘氨酸(Gly;G)、缬氨酸(Val;V)、丙氨酸(Ala;A)、苯丙氨酸(Phe;F)、谷氨酸(Glu;E)、异亮氨酸(Ile;I)、脯氨酸(Pro;P)、瓜氨酸(Cit)、亮氨酸(Leu;L)、丝氨酸(Ser;S)、赖氨酸(Lys;K)以及天冬氨酸(Asp;D)等。其中，优选甘氨酸(Gly;G)、缬氨酸(Val;V)、丙氨酸(Ala;A)、瓜氨酸(Cit)。

[0360] 这些氨基酸可重复并且具有含有任意选择的氨基酸的氨基酸序列。另外，药物游离模式可根据氨基酸的类型来控制。

[0361] 作为连接子Lp的具体例，可举出－GGVA－、－GG－(D－)VA－、－VA－、－GGFG－、－GGPI－、－GGVCit－、－GGVK－、－GG(D－)PI－、－GGPL－、－EGGVA、－PI－、－GGF－、DGGF－、(D－)D－GGF－、－EGGF－、－SGGF－、－KGGF－、－DGGFG－、－GGFGG－、－DDGGFG－、－KDGGFG－、－GGFGGGF－。

[0362] 在此，上述的『(D－)V』表示D－缬氨酸，『(D－)P』表示D－脯氨酸，『(D－)D』表示D－天冬氨酸。

[0363] 连接子Lp优选－GGVA－、－GG－(D－)VA－、－VA－、－GGFG－、－GGPI－、－GGVCit－、－GGVK－、－GG(D－)PI－、－GGPL－。

[0364] 连接子Lp更优选－GGVA－、－GGVCit－、－VA－。

[0365] Lb表示i)将La与抗体Ab的糖链或重构的糖链结合的间隔子，或ii)将La与抗体Ab的氨基酸残基(例如半胱氨酸、赖氨酸等)的侧链结合的间隔子。

[0366] Lb为i)时，La表示选自以下的组中的任意一个：－C(＝O)－$(CH_2CH_2)n^2$－C(＝O)－，－C(＝O)－$(CH_2CH_2)n^2$－C(＝O)－NH－$(CH_2CH_2)n^3$－C(＝O)－，－C(＝O)－$(CH_2CH_2)n^2$－C(＝O)－NH－$(CH_2CH_2O)n^3$－CH_2－C(＝O)－，－C(＝O)－$(CH_2CH_2)n^2$－NH－C(＝O)－$(CH_2CH_2O)n^3$－CH_2CH_2－C(＝O)－，－$(CH_2)n^4$－O－C(＝O)－。

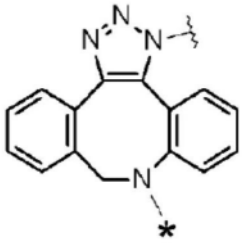
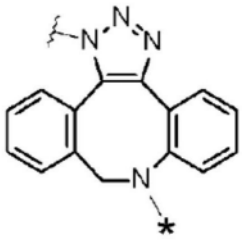
[0367] 在此，式中，n^2为整数1～3(优选1或2)，n^3为整数1～5(优选整数2～4，更优选2或4)，n^4为整数0～2(优选0或1)。

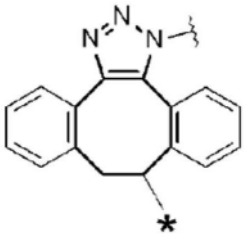
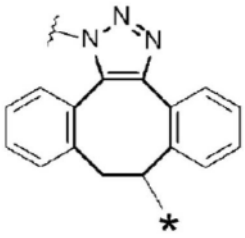
[0368] Lb为i)时，La优选表示选自以下的组中的任意一个：－C(＝O)－CH_2CH_2－C(＝O)－，－C(＝O)－$(CH_2CH_2)_2$－C(＝O)－，－C(＝O)－CH_2CH_2－C(＝O)－NH－$(CH_2CH_2)_2$－C(＝O)－，－C(＝O)－CH_2CH_2－C(＝O)－NH－$(CH_2CH_2O)_2$－CH_2－C(＝O)－，－C(＝O)－CH_2CH_2－

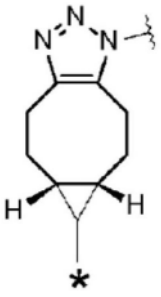
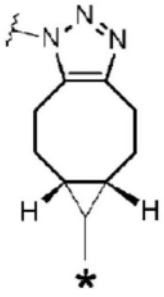
NH－C(＝O)－$(CH_2CH_2O)_4$－CH_2CH_2－C(＝O)－，－CH_2－OC(＝O)－，以及，－OC(＝O)－。

[0369] La更优选为－C(＝O)－CH_2CH_2－C(＝O)－或－C(＝O)－$(CH_2CH_2)_2$－C(＝O)－。

[0370] Lb的间隔子没有特别限定，可举出例如下式所示的间隔子。

[0371] (Lb-1)  或者 

[0372] (Lb-2)  或者 

[0373] (Lb-3)  或者 

[0374] 上述所示的Lb的各结构式中，星号表示与La的左端的－(C＝O)或－$(CH_2)n^4$结合，波浪线表示与Ab的糖链或重构的糖链结合。

[0375] 上述所示的Lb(Lb－1、Lb－2或Lb－3)的各结构式中，通过叠氮基与DBCO的点击反应(click reaction)形成的三唑环部位具有几何异构结构，在1个Lb中，以两种类型结构中的任意一方存在或者以它们的混合物的形式存在。本发明的抗体－药物偶联物的1个分子中存在m^1个『－L－D』，并且m^1个『－L－D』各自中的L中各Lb(Lb－1、Lb－2或Lb－3)以这两种结构中的任意一方，或者两者混合存在。

[0376] Lb为i)时，L优选以－Lb－La－Lp－NH－B－CH_2－O(C＝O)－＊所示，B为1,4－苯基，Lp表示选自下述组中的任意一种：－GGVA－、－GG－(D－)VA－、－VA－、－GGFG－、－GGPI－、－GGVCit－、－GGVK－、－GG(D－)PI－、－GGPL－。

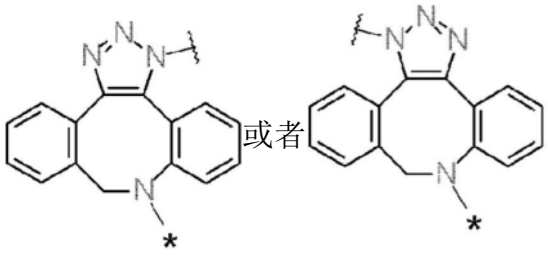
[0377] La表示选自下述组中的任意一种：－C(＝O)－CH_2CH_2－C(＝O)－，－C(＝O)－$(CH_2CH_2)_2$－C(＝O)－，－C(＝O)－CH_2CH_2－C(＝O)－NH－$(CH_2CH_2)_2$－C(＝O)－，－C(＝O)－CH_2CH_2－C(＝O)－NH－$(CH_2CH_2O)_2$－CH_2－C(＝O)－，－C(＝O)－CH_2CH_2－NH－C(＝O)－$(CH_2CH_2O)_4$－CH_2CH_2－C(＝O)－，－CH_2－OC(＝O)－，－OC(＝O)－。

[0378] Lb表示上述所示的Lb中任意一种结构式。

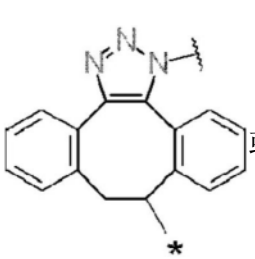
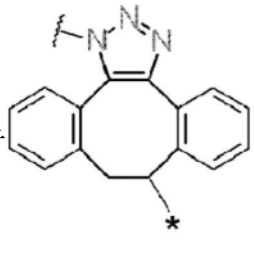
[0379] Lb为i)时，L更优选选自以下的组中的任意一种：－Z^1－C(＝O)－CH_2CH_2－C(＝O)－GGVA－NH－B－CH_2－OC(＝O)－，－Z^1－C(＝O)－CH_2CH_2－C(＝O)－GG－(D－)VA－NH－B－CH_2－OC(＝O)－，－Z^1－C(＝O)－CH_2CH_2－C(＝O)－VA－NH－B－CH_2－OC(＝

0)－,－Z^1－C(=0)－$(CH_2CH_2)_2$－C(=0)－VA－NH-B-CH_2-OC(=0)-,-Z^1-C(=0)-CH_2CH_2-C(=0)-GGPI-NH-B-CH_2-OC(=0)-,-Z^1-C(=0)-CH_2CH_2-C(=0)-GGFG-NH-B-CH_2-OC(=0)-,-Z^1-C(=0)-CH_2CH_2-C(=0)-GGVCit-NH-B-CH_2-OC(=0)-,-Z^1-C(=0)-CH_2CH_2-C(=0)-GGVK-NH-B-CH_2-OC(=0)-,-Z^1-C(=0)-CH_2CH_2-C(=0)-GGPL-NH-B-CH_2-OC(=0)-,-Z^1-C(=0)-CH_2CH_2-C(=0)-NH-$(CH_2CH_2)_2$-C(=0)-VA-NH-B-CH_2-OC(=0)-,-Z^1-C(=0)-CH_2CH_2-C(=0)-NH-$(CH_2CH_2O)_2$-CH_2-C(=0)-VA-NH-B-CH_2-OC(=0)-,-Z^1-C(=0)-CH_2CH_2-NH-C(=0)-$(CH_2CH_2O)_4$-CH_2CH_2-C(=0)-VA-NH-B-CH_2-OC(=0)-,-Z^2-OC(=0)-GGVA-NH-B-CH_2-OC(=0)-,-Z^3-CH_2-OC(=0)-GGVA-NH-B-CH_2-OC(=0)-。

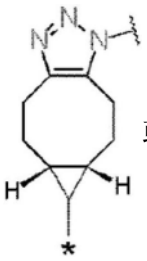
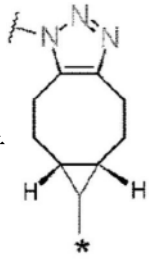
[0380] 在此,Z^1表示上述Lb的以下所示的结构式:

[0381]  或者,

[0382] Z^2表示上述Lb的以下所示的结构式:

[0383]  或者  ,

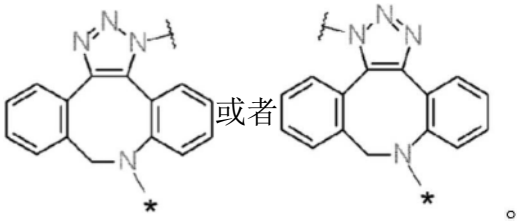
[0384] Z^3表示上述Lb的以下所示的结构式:

[0385]  或者  ,

[0386] B为1,4-苯基。

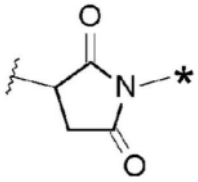
[0387] L最优选以下的任意一种:-Z^1-C(=0)-CH_2CH_2-C(=0)-GGVA-NH-B-CH_2-OC(=0)-,-Z^1-C(=0)-CH_2CH_2-C(=0)-VA-NH-B-CH_2-OC(=0)-,-Z^1-C(=0)-$(CH_2CH_2)_2$-C(=0)-VA-NH-B-CH_2-OC(=0)-,-Z^1-C(=0)-CH_2CH_2-C(=0)-GGVCit-NH-B-CH_2-OC(=0)-,-Z^1-C(=0)-CH_2CH_2-C(=0)-NH-$(CH_2CH_2)_2$-C(=0)-VA-NH-B-CH_2-OC(=0)-,-Z^1-C(=0)-CH_2CH_2-C(=0)-NH-$(CH_2CH_2O)_2$-CH_2-C(=0)-VA-NH-B-CH_2-OC(=0)-,以及-Z^1-C(=0)-CH_2CH_2-NH-C(=0)-$(CH_2CH_2O)_4$-CH_2CH_2-C(=0)-VA-NH-B-CH_2-OC(=0)-。

[0388] 在此,B为1,4-苯基,Z^1为上述Lb的以下所示的结构式:

[0389]  或者。

[0390] Lb为ii)时，该氨基酸残基为半胱氨酸残基时，Lb的间隔子没有特别限定，可举出例如-(丁二酰亚胺-3-基-N)-。

[0391] 『-(丁二酰亚胺-3-基-N)-』具有下式所示的结构：

[0392] 

[0393] 上述所示的结构式中，星号表示与La结合。波浪线表示通过硫醇键与抗体的半胱氨酸残基的硫醇基结合，可是位点特异性(Site specific)的半胱氨酸偶联物(RSC Adv., 2017,7,24828-24832etc)。

[0394] Lb为ii)时，L以－Lb－La－Lp－NH－B－CH_2－O(C＝O)－＊表示，B为1,4－苯基，Lp表示－GGVA－、－GG－(D－)VA－、－VA－、或－GGFG－中的任意一种，La为－$(CH_2)n^9$－C(＝O)－，或－$(CH_2CH_2)n^{10}$－C(＝O)－NH－$(CH_2CH_2O)n^{11}$－CH_2CH_2－C(＝O)－，n^9为整数2～7(优选整数2～5，更优选2或5)，n^{10}为整数1～3(优选为1)，n^{11}为整数6～10(优选8)，Lb表示－(丁二酰亚胺－3－基－N)－。

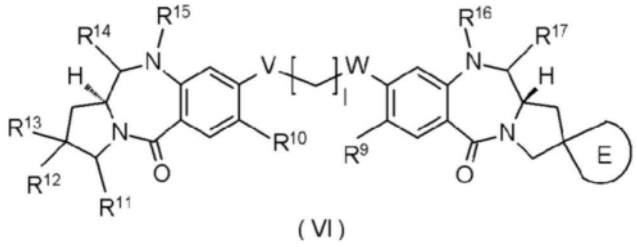
[0395] Lb为ii)时，L优选以下任意一种：－(丁二酰亚胺－3－基－N)－$(CH_2)_5$－C(＝O)－VA－NH－B－CH_2－OC(＝O)－，－(丁二酰亚胺－3－基－N)－$(CH_2)_5$－C(＝O)－GGVA－NH－B－CH_2－OC(＝O)－，或－(丁二酰亚胺－3－基－N)－CH_2CH_2－C(＝O)－NH－$(CH_2CH_2O)_8$－CH_2CH_2－C(＝O)－VA－NH－B－CH_2－OC(＝O)－，其中，B为1,4－苯基。

[0396] 认为若本发明的抗体－药物偶联物在其大部分转移到肿瘤细胞内后，连接子部分(例如Lp)被酶等切断并活化，则药物D部分游离(以下称为游离药物(后述))，发挥出抗肿瘤活性。

[0397] 因此，本发明的抗体－药物偶联物优选在肿瘤细胞外稳定。

[0398] ＜游离药物以及制造中间体＞

[0399] 本发明的抗体－药物偶联物的中间体以及游离药物以下式所示：

[0400] 
(VI)。

[0401] 以下进行说明。

[0402] 本发明的游离药物在转移到肿瘤细胞内后，抗体－药物偶联物中的连接子L部分被切断而产生。可举出例如实施例45～54、150～152的药物1～16。

[0403] 本发明的抗体－药物偶联物可使用本制造中间体来制造。

[0404] 本发明的抗体－药物偶联物的游离药物是(a)对于R^{16}、R^{17}，R^{16}以及R^{17}一起形成亚胺键(N＝C)的情况。

[0405] 本发明的抗体－药物偶联物的制造中间体是(b)R^{16}以J－La'－Lp'－NH－B'－CH_2－O(C＝O)－＊表示的情况。

[0406] 因此，式中，l与所述n^1，E与所述A，R^9与所述R^1，R^{10}与所述R^2，R^{11}与所述R^3，R^{12}与所述R^4，R^{13}与所述R^5，R^{14}与所述R^6，R^{15}与所述R^7，V与所述X，W与所述Y，组7与所述组1，组8与所述组2，组9与所述组3，组10与所述组4，组11与所述组5，组12与所述组6表示同样的含义。

[0407] l表示整数2～8，优选整数2～6，更优选整数3～5。

[0408] 上述l为整数2～8，优选整数2～6，更优选整数3～5所示的烷基链可含有双键。

[0409] E表示螺环键合的3～5元饱和烃环或3～5元饱和杂环，优选3～5元饱和烃环(环丙烷、环丁烷、环戊烷)，更优选环丙烷、环丁烷，最优选环丙烷。

[0410] 所述螺环键合的3～5元饱和烃环可被1～4个卤素原子取代，优选可被1或2个氟原子取代(例如，2，2－二氟环丙烷等)。

[0411] R^9、R^{10}分别独立地表示C1～C6烷氧基、C1～C6烷基、氢原子、羟基、硫醇基、C1～C6烷硫基、卤素原子或－NR'R"，优选为C1～C6烷氧基、C1～C6烷基、羟基，更优选为C1～C3烷氧基，最优选甲氧基。

[0412] R^{11}、R^{12}以及R^{13}表示下述(i)～(iii)。

[0413] (i)R^{11}以及R^{12}一起与各基团所结合的碳原子一起形成双键时，R^{13}表示可具有选自组7中的1个或多个取代基的芳基或杂芳基，可具有选自组8中的1个或多个取代基的C1～C6烷基，优选为可具有选自上述组7中的1个或多个取代基的芳基。

[0414] R^{13}的“可具有选自组7中的1个或多个取代基的芳基或杂芳基”的“芳基”优选苯基、萘基，更优选苯基。

[0415] R^{13}的“可具有选自组7中的1个或多个取代基的芳基或杂芳基”的“杂芳基”优选噻吩基、吡啶基、嘧啶基、喹啉基、喹喔啉基、苯并噻吩基，更优选2－噻吩基、3－噻吩基、2－吡啶基、3－吡啶基、4－吡啶基，进一步优选3－吡啶基、3－噻吩基。

[0416] 作为上述R^{13}的芳基或杂芳基的取代基，可举出以下的a)～j)：a)可被1～3个卤素原子取代的C1～C6烷氧基，b)可被1～3个选自卤素原子、羟基、－OCOR'、－NR'R"、－C(＝NR')－NR"R"'以及－NHC(＝NR')－NR"R"'中的任意一个取代的C1～C6烷基，c)卤素原子，d)C3～C5环烷氧基，e)C1～C6烷硫基，f)－NR'R"，g)－C(＝NR')－NR"R"'，h)－NHC(＝NR')－NR"R"'，i)－NHCOR'，j)羟基。

[0417] 在此，b)、f)～i)中的R'、R"以及R"'分别独立地表示氢原子、C1～C6烷基，优选分别独立地为氢原子或C1～C3烷基。

[0418] a)～j)优选如下所述。

[0419] a)为可被1～3个卤素原子取代的C1～C3烷氧基，更优选甲氧基、乙氧基、n－丙氧基、i－丙氧基、三氟甲氧基，进一步优选甲氧基、乙氧基、三氟甲氧基，最优选甲氧基。

[0420] b)为可被1～3个选自卤素原子、羟基、－OCOR'、－C(＝NR')－NR"R"'、－NHC(＝NR')－NR"R"'中的任意一个取代的C1～C3烷基，R'、R"以及R"'分别独立地表示氢原子或C1～C3烷基，更优选可被1～3个卤素原子、羟基、－OCOR'、－C(＝NR')－NR"R"'、－NHC(＝

NR'）－NR"R"'取代的C1～C3烷基，R'、R"以及R"'分别独立地为氢原子、甲基，进一步优选甲基、乙基、n－丙基、i－丙基、氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、羟甲基、－CH_2OCOMe、－CH_2－NHC(＝NH)－NH_2、－CH_2－NHC(＝NMe)－NH_2。

[0421] c)为卤素原子，优选氟原子、氯原子。

[0422] d)为C3～C5环烷氧基，更优选环丙氧基。

[0423] e)为C1～C3烷硫基，更优选甲硫基、乙硫基。

[0424] f)为－NR'R"，R'以及R"分别独立地为氢原子或C1～C3烷基，更优选－NH_2、－NHMe、－NMe_2、－NHEt、－NEt_2。

[0425] g)为－C(＝NR')－NR"R"'，R'、R"以及R"'分别独立地为氢原子或C1～C3烷基，更优选－C(＝NH)－NH_2、－C(＝NMe)－NH_2。

[0426] h)为－NHC(＝NR')－NR"R"'，R'、R"以及R"'分别独立地为氢原子或C1～C3烷基，更优选－NHC(＝NH)－NH_2、－NHC(＝NMe)－NH_2。

[0427] i)为－NHCOR'，R'为氢原子或C1～C3烷基，更优选－NHCOMe，－NHCOEt。

[0428] j)为羟基。

[0429] R^{13}的芳基(优选苯基)或杂芳基(优选吡啶基)的取代基的位置可任意，在取代基为多个时，它们可相同也可不同。

[0430] R^{13}为芳基时的取代基优选a)、b)、d)、g)、h)、j)，更优选a)、b)、d)、j)。

[0431] R^{13}为苯基时，取代基的位置可任意，取代基可为多个，优选取代基的位置为3位或/和4位、取代基为1个或2个，更优选取代基的位置为4位、取代基为1个。

[0432] R^5为萘基时，取代基的位置可任意，取代基可为多个，优选取代基的位置为6位、取代基为1个。

[0433] R^{13}为苯基时，更优选苯基、4－甲氧基苯基、3－甲氧基苯基、4－乙氧基苯基、4－(n－丙氧基)－苯基、4－(i－丙氧基)－苯基、4－环丙氧基－苯基、4－三氟甲基苯基、4－羟甲基－苯基、4－乙酰氧基甲基－苯基、4－甲脒基酰胺甲基－苯基，进一步优选苯基、4－甲氧基苯基、3－甲氧基苯基、4－环丙氧基－苯基、4－羟甲基－苯基、4－乙酰氧基甲基－苯基、4－甲脒基酰胺甲基－苯基、4－三氟甲基苯基。

[0434] R^{13}为萘基时，更优选萘基、6－甲氧基－2－萘基。

[0435] 最优选4－甲氧基苯基。

[0436] R^{13}为杂芳基时的取代基优选a)、b)、d)、g)、h)、j)，更优选a)、b)。

[0437] R^{13}为杂芳基时，取代基的位置可任意，但是R^{13}为3－吡啶基时，取代基的位置优选6位或/和5位，R^{13}为2－吡啶基时，取代基的位置优选5位或/和4位，或5位或/和6位，R^{13}为4－吡啶基时，取代基的位置优选2位或/和6位。

[0438] R^{13}为杂芳基时的取代基可为多个，优选为1个或2个，优选1个。

[0439] R^{13}为吡啶基时，优选6－甲氧基－3－吡啶基、6－甲基－3－吡啶基。

[0440] R^{13}为3－噻吩基或6－喹喔啉基时，优选未取代。

[0441] R^{13}的“可具有选自组8中的1个或多个取代基的C1～C6烷基”的“C1～C6烷基”优选为C1～C3烷基，更优选为甲基、乙基。

[0442] R^{13}的“可具有选自组8中的1个或多个取代基的C1～C6烷基”的取代基为卤素原子、羟基、C1～C6烷氧基(优选C1～C3烷氧基)，优选羟基、甲氧基、乙氧基，更优选羟基。

[0443] (ii)R^{11}表示氢原子时,R^{12}以及R^{13}与R^{12}以及R^{13}所结合的碳原子一起,形成3～5元饱和烃环或3～5元饱和杂环,或者形成CH_2＝。

[0444] 所述的3～5元饱和烃环可被1～4个卤素原子取代,优选被1或2个氟原子取代。

[0445] R^{12}以及R^{13}一起,优选形成3～5元饱和烃环或CH_2＝,更优选形成环丙烷、环丁烷或CH_2＝(环外亚甲基),进一步优选环丙烷。

[0446] R^{12}以及R^{13}一起形成3～5元饱和烃环或者3～5元饱和杂环时,优选与E相同,为3～5元饱和烃环或者3～5元饱和杂环。更优选E为3～5元饱和烃环、R^{12}以及R^{13}一起形成3～5元饱和烃环,进一步优选E为环丙烷环、R^{12}以及R^{13}一起形成环丙烷环。

[0447] (iii)R^{11}、R^{12}及R^{13}与R^{11}所结合的碳原子以及R^{12}及R^{13}所结合的碳原子一起,形成可具有选自组9中的1个或多个取代基的苯环或6元杂环。

[0448] 所述苯环或杂环的取代基的位置可任意,取代基为多个时,它们可相同也可不同。

[0449] 苯环或杂环的取代基为卤素原子、可被1～3个卤素原子取代的C1～C6烷基或C1～C6烷氧基,优选为卤素原子、可被1～3个卤素原子取代的C1～C3烷基或C1～C3烷氧基,更优选为卤素原子、甲基、甲氧基。

[0450] “可具有1个或多个取代基的苯环或6元杂环”优选未取代的苯环。

[0451] R^{11}、R^{12}以及R^{13}最优选上述(i)。

[0452] R^{14}、R^{15}都表示氢原子,或者R^{14}以及R^{15}一起表示亚胺键(C＝N)。

[0453] V、W分别独立地表示氧原子、氮原子、硫原子,优选氧原子。

[0454] R^{16},R^{17}如下所述:(a)R^{16}以及R^{17}一起形成亚胺键(N＝C),或者(b)R^{16}表示J－La'－Lp'－NH－B'－CH_2－O(C＝O)－＊,R^{17}表示羟基或C1～C3烷氧基。

[0455] 上述(b)R^{16}为J－La'－Lp'－NH－B'－CH_2－O(C＝O)－＊时,式中,星号表示与上式所示的吡咯并苯并二氮杂卓环的N10'位结合。

[0456] B'表示苯基或杂芳基,优选1,4－苯基、2,5－吡啶基、3,6－吡啶基、2,5－嘧啶基、2,5－噻吩基,更优选1,4－苯基。

[0457] Lp'表示在活体内或靶细胞中能够切断的由氨基酸序列形成的连接子。Lp可通过例如酯酶、肽酶等酶的作用被切断。

[0458] 作为连接子Lp'的具体例,可举出－GGVA－、－GG－(D－)VA－、－VA－、－GGFG－、－GGPI－、－GGVCit－、－GGVK－、－GG(D－)PI－、－GGPL－、－EGGVA、－PI－、－GGF－、DGGF－、(D－)D－GGF－、－EGGF－、－SGGF－、－KGGF－、－DGGFG－、－GGFGG－、－DDGGFG－、－KDGGFG－、－GGFGGGF－。

[0459] 在此,上述的『(D－)V』表示D－缬氨酸,『(D－)P』表示D－脯氨酸,『(D－)D』表示D－天冬氨酸。

[0460] 连接子Lp'优选以下:－GGVA－、－GG－(D－)VA－、－VA－、－GGFG－、－GGPI－、－GGVCit－、－GGVK－、－GG(D－)PI－、－GGPL－,更优选可举出－GGVA－、－GGVCit－、－VA－。

[0461] La'表示选自以下的组中的任意一个:－C(＝O)－$(CH_2CH_2)n^6$－C(＝O)－,－C(＝O)－$(CH_2CH_2)n^6$－C(＝O)－NH－$(CH_2CH_2)n^7$－C(＝O)－,－C(＝O)－$(CH_2CH_2)n^6$－C(＝O)－NH－$(CH_2CH_2O)n^7$－CH_2－C(＝O)－,－C(＝O)－$(CH_2CH_2)n^6$－NH－C(＝O)－$(CH_2CH_2O)n^7$－CH_2CH_2－C(＝O)－,－$(CH_2)n^8$－O－C(＝O)－,－$(CH_2)n^{12}$－C(＝O)－,以及－$(CH_2CH_2)n^{13}$－C

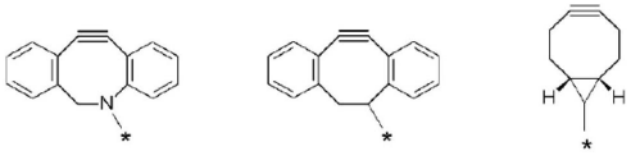
(=O)－NH－$(CH_2CH_2O)n^{14}$－CH_2CH_2－C(=O)－。

[0462] 在此，式中，n^6为整数1～3(优选1或2)，n^7为整数1～5(优选整数2～4，更优选2或4)，n^8为整数0～2(优选0或1)，n^{12}为整数2～7(优选整数2～5，更优选2或5)，n^{13}为整数1～3(优选1)，n^{14}为整数6～10(优选8)。

[0463] La'优选表示选自以下的组中的任意一种：－C(=O)－CH_2CH_2－C(=O)－，－C(=O)－$(CH_2CH_2)_2$－C(=O)－，－C(=O)－CH_2CH_2－C(=O)－NH－$(CH_2CH_2)_2$－C(=O)－，－C(=O)－CH_2CH_2－C(=O)－NH－$(CH_2CH_2O)_2$－CH_2－C(=O)－，－C(=O)－CH_2CH_2－NH－C(=O)－$(CH_2CH_2O)_4$－CH_2CH_2－C(=O)－，－CH_2－OC(=O)－，－OC(=O)－，－$(CH_2)_2$－C(=O)－，－$(CH_2)_5$－C(=O)－，以及－CH_2CH_2－C(=O)－NH－$(CH_2CH_2O)_8$－CH_2CH_2－C(=O)－。

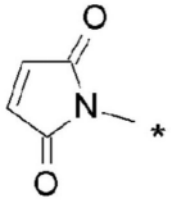
[0464] La'更优选－C(=O)－CH_2CH_2－C(=O)－、－C(=O)－$(CH_2CH_2)_2$－C(=O)－或－$(CH_2)_5$－C(=O)－。

[0465] J只要是具有与叠氮基反应形成1,2,3－三唑环的炔烃结构的环状结构即可，没有特别的限定，例如可举出下式所示的化合物。

[0466] 

[0467] 上述所示的J的各结构式中，星号表示与La'的左端的－(C=O)或－$(CH_2)n^8$结合。

[0468] 或者，J可为与抗体Ab的氨基酸残基(例如半胱氨酸、赖氨酸等)的侧链结合的化合物或卤素原子，例如，可举出下式所示的马来酰亚胺基。

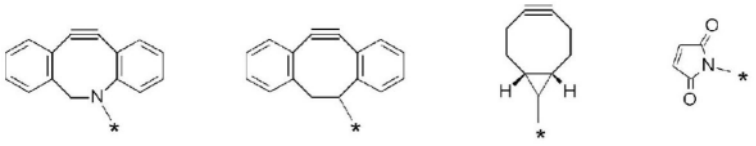
[0469] 

[0470] 上述所示的马来酰亚胺基中，星号表示与La'的左端的－$(CH_2)n^{12}$，或－$(CH_2CH_2)n^{13}$结合。

[0471] R^{16}优选以J－La'－Lp'－NH－B'－CH_2－O(C=O)－＊表示，B'为1,4－苯基，Lp'表示选自下述组中的任意一种：－GGVA－、－GG－(D－)VA－、－VA－、－GGFG－、－GGPI－、－GGVCit－、－GGVK－、－GG(D－)PI－、－GGPL－。

[0472] La'表示选自下述组中的任意一种：－C(=O)－CH_2CH_2－C(=O)－，－C(=O)－$(CH_2CH_2)_2$－C(=O)－，－C(=O)－CH_2CH_2－C(=O)－NH－$(CH_2CH_2)_2$－C(=O)－，－C(=O)－CH_2CH_2－C(=O)－NH－$(CH_2CH_2O)_2$－CH_2－C(=O)－，－C(=O)－CH_2CH_2－NH－C(=O)－$(CH_2CH_2O)_4$－CH_2CH_2－C(=O)－，－OC(=O)－，－CH_2－OC(=O)－，－$(CH_2)_5$－C(=O)－，以及－CH_2CH_2－C(=O)－NH－$(CH_2CH_2O)_8$－CH_2CH_2－C(=O)－。

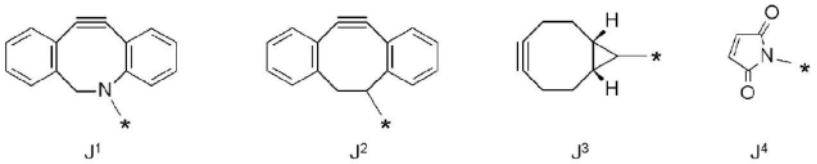
[0473] J表示以下所示的任一种结构式：

[0474] 

[0475] 其中，J的结构式中，星号表示与La'结合。

[0476] R^{16}更优选选自以下的组中的任意一种：$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGVA-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$，$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GG-(D-)VA-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$，$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-VA-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$，$J^1-C(=O)-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-VA-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$，$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGPI-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$，$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$，$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGVCit-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$，$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGVK-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$，$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGPL-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$，$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-VA-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$，$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_2-CH_2-C(=O)-VA-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$，$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-NH-C(=O)-(CH_2CH_2O)_4-CH_2CH_2-C(=O)-VA-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$，$J^2-OC(=O)-GGVA-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$，$J^3-CH_2-OC(=O)-GGVA-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$，$J^4-(CH_2)_5-C(=O)-GGVA-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$，$J^4-(CH_2)_5-C(=O)-VA-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$，以及$J^4-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_8-CH_2CH_2-C(=O)-VA-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$。

[0477] 其中，J^1、J^2、J^3、J^4表示以下所示的结构式：

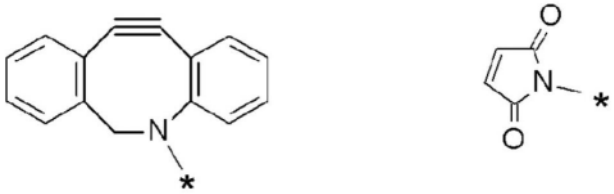
[0478] 

J1 J2 J3 J4

[0479] 其中，J^1、J^2、J^3以及J^4的结构式中，星号表示与J^1、J^2、J^3或J^4所邻接的基团结合，B'为1,4-苯基。

[0480] R^{16}最优选以下的任意一种：$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGVA-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$，$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-VA-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$，$J^1-C(=O)-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-VA-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$，$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGVCit-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$，$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-VA-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$，$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_2-CH_2-C(=O)-VA-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$，$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-NH-C(=O)-(CH_2CH_2O)_4-CH_2CH_2-C(=O)-VA-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$，$J^4-(CH_2)_5-C(=O)-VA-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$。

[0481] 其中，B'为1,4-苯基，J^1、J^4为上述J的以下所示的结构式：

[0482] 

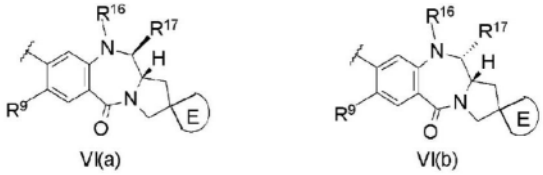
J1 J4

[0483] 其中，J^1以及J^4的结构式中，星号表示与J^1或J^4所邻接的基团结合。

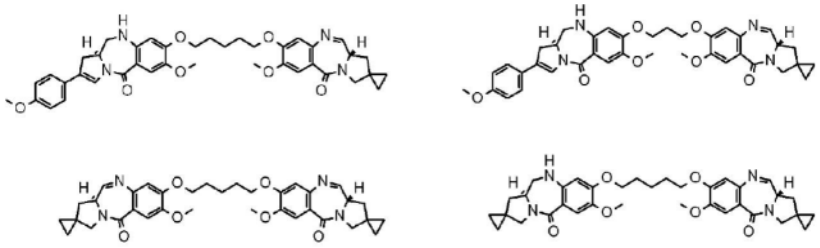
[0484] R^{17}为羟基或C1～C3烷氧基，优选羟基、甲氧基。

[0485] R^{17}可为亚硫酸氢盐加成物(OSO_3M(M为金属阳离子))。

[0486] R^{17}与不对称碳原子结合，因而具有下述部分结构(VIa)或者(VIb)所示的立体配置。波浪线表示与通式(VI)所示的中间体以及游离药物中的W结合。

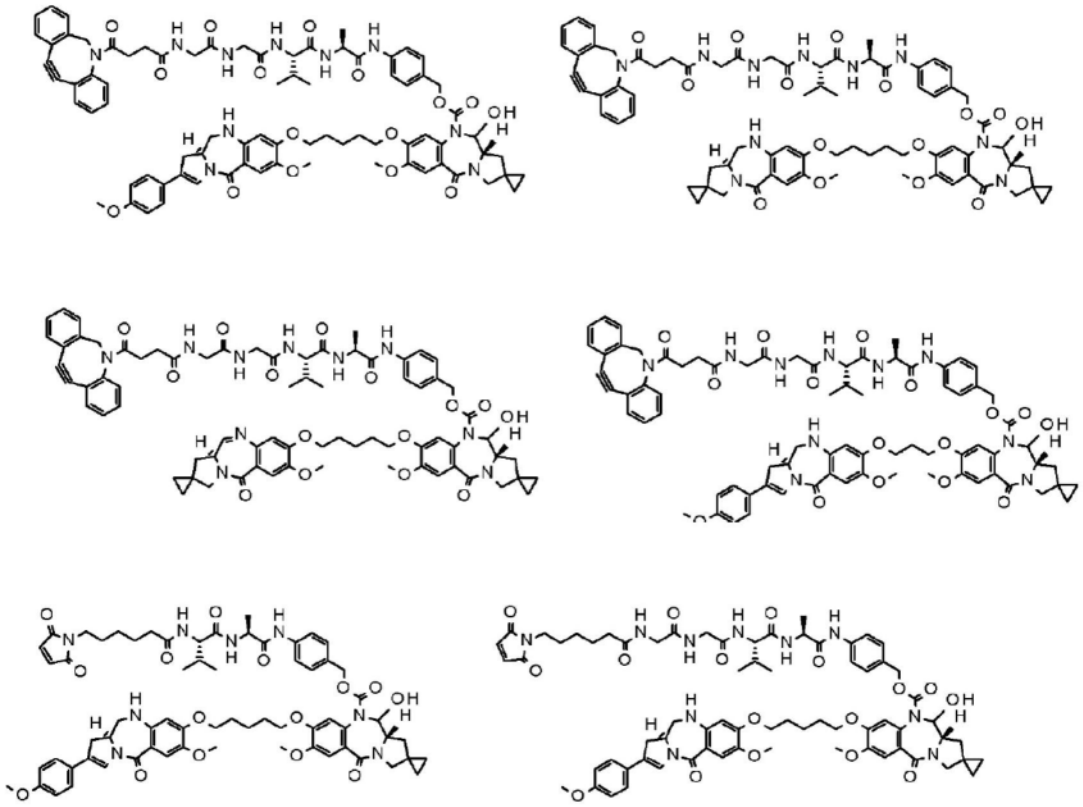
[0487] 

[0488] 游离药物优选为选自以下组中的任意一种化合物。

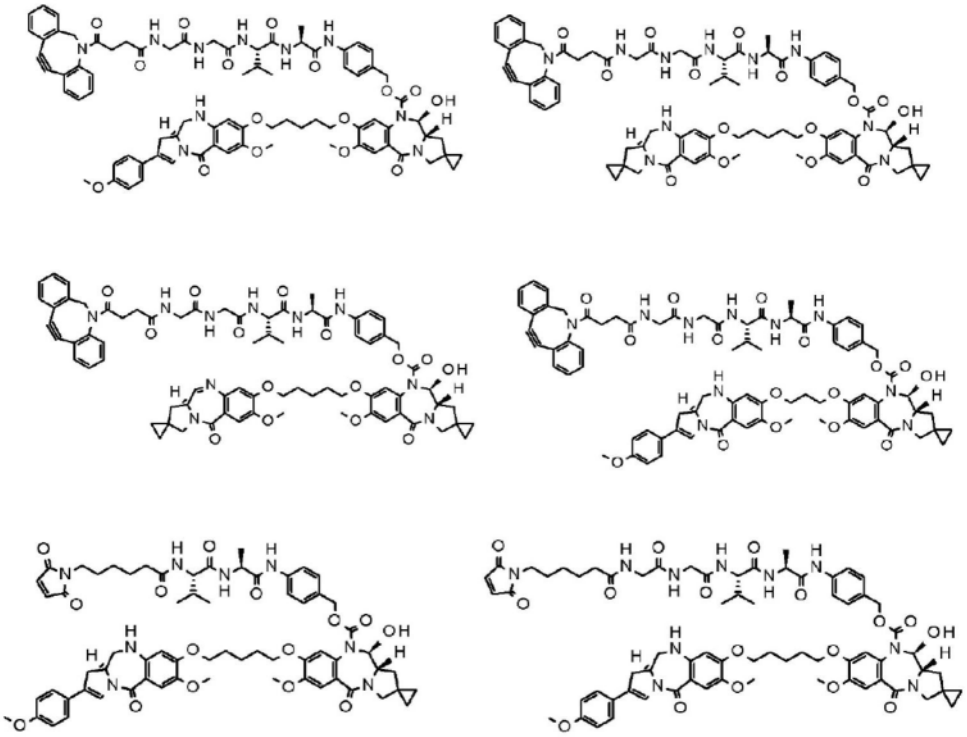
[0489] 

[0490] 本游离药物是如下优异的药物：有时在连接子L的一部分被结合的状态下，本游离药物在肿瘤细胞内游离，但是即使是在这样的状态下，本游离药物也可发挥优异的抗肿瘤效果。本游离药物在转移至肿瘤细胞后，有时进一步被氧化而导致R^{16}、R^{17}脱氢，但即使在这种情况下也可发挥优良的抗肿瘤效果。

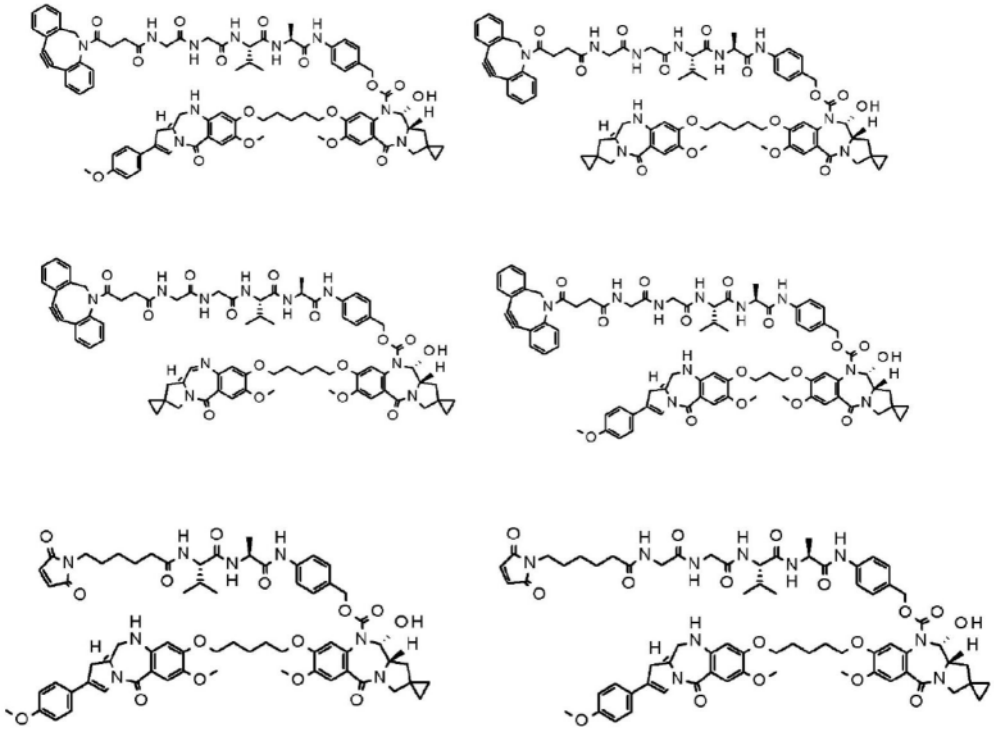
[0491] 制造中间体优选下述组中之一的化合物。

[0492] 

[0493] 制造中间体优选为选自下述组中之一的化合物。



[0494]



[0495] ＜抗体＞

[0496] 本发明中，“癌”与“肿瘤”用作相同的意思。

[0497] 本发明中，“基因”是指包含编码蛋白质的氨基酸的核苷酸序列的核苷酸或者核苷酸序列或其互补链，例如作为包含编码蛋白质的氨基酸的核苷酸序列的核苷酸序列或其互补链的多核苷酸、寡聚核苷酸、DNA、mRNA、cDNA、RNA等都包括在“基因”的含义中。作为本发明的“CLDN6基因”，可举出例如包含编码CLDN6蛋白质的氨基酸序列的核苷酸序列的DNA、

mRNA、cDNA、cRNA等。

[0498] 本发明中，“核苷酸”、“多核苷酸”或“核苷酸序列”与“核酸”含义相同，例如DNA、RNA、探针、寡核苷酸、多核苷酸、引物等也包括在“核苷酸”或“核苷酸序列”的含义中。

[0499] 本发明中，“多肽”、“肽”、“蛋白质”没有区别地使用。

[0500] 本发明中，“CLDN6”以与CLDN6蛋白质相同的含义使用。

[0501] 本发明中，“细胞”中也包括动物个体内的细胞、培养细胞。

[0502] 本发明中，“细胞毒活性”是指以任意形式引起细胞病理改变，并不限于引起直接外伤，还包括引起DNA切断、碱基的二聚物形成、染色体的切断、细胞分裂装置的损伤、各种酶活性降低等所有的细胞结构或功能上的损伤。

[0503] 本发明中，“抗体的功能性片段”也称为“抗体的抗原结合片段”，是指与抗原具有结合活性的抗体的部分片段，包含Fab、$F(ab')_2$、Fv、scFv、diabody(双功能抗体)、线状抗体以及由抗体片段形成的多特异性抗体等。另外，将$F(ab')_2$在还原条件下处理后的抗体的可变区的单价片段即Fab'也包括在抗体的抗原结合片段含义中。不过只要与抗原具有结合能力，并不限定于这些分子。另外，这些抗原结合片段中不仅包括用适当的酶处理全长分子的抗体蛋白质而获得的蛋白质，还包括使用以基因工程改变的抗体基因在适当的宿主细胞中产生的蛋白质。

[0504] 本发明的功能性片段包括保持受到利用IgG重链的Fc区中良好保存的N连接型糖链的修饰的天冬酰胺(Asn297)及其外围的氨基酸，并且具有结合抗原的能力的功能性片段。

[0505] 本发明中，“抗原决定基”是指与特定的抗体(例如抗CLDN6抗体)结合的抗原的部分肽或部分立体结构(例如，CLDN6的部分肽或部分立体结构)。作为所述部分肽(例如CLDN6的部分肽)的抗原决定基可通过免疫测定法等本领域技术人员周知的方法来确定。

[0506] 本发明的“CDR”是指互补性决定区(CDR:Complementarity determining region)。已知抗体分子的重链和轻链分别有3处CDR。CDR也称为高变区(hypervariable region)，是处于抗体的重链以及轻链的可变区内，一级结构变异性特别高的部位，在重链以及轻链的多肽链的一级结构上分别分离于3处。本说明书中，对于抗体的CDR，从重链氨基酸序列的氨基末端侧依次将重链的CDR表示为CDRH1、CDRH2、CDRH3，从轻链氨基酸序列的氨基末端侧依次将轻链的CDR表示为CDRL1、CDRL2、CDRL3。这些部位在立体结构上彼此靠近，并决定要结合的抗原的特异性。

[0507] 本发明中，“在严格的条件下杂交”是指在市售的杂交溶液Express Hyb Hybridization Solution(Clontech公司)中在68℃下杂交;或者在如下条件或与其同等的条件下进行杂交:在使用固定有DNA的过滤器在0.7－1.0M的NaCl存在下、在68℃下进行杂交后，使用0.1－2倍浓度的SSC(saline sodium citrate:柠檬酸钠缓冲液)溶液(1倍浓度的SSC包含150mM NaCl、15mM柠檬酸钠)，在68℃下清洗，由此能够鉴定。

[0508] 本发明中，“1～几个”是指1～10个、1～9个、1～8个、1～7个、1～6个、1～5个、1～4个、1～3个或1～2个。

[0509] 本发明中，有时将识别或结合CLDN6或者CLDN6及CLDN9的抗体分别标记为“抗CLDN6抗体”，“抗CLDN6/CLDN9抗体”。所述抗体中包括嵌合化抗体、人源化抗体、人抗体等。有时将识别或结合CLDN6及CLDN9的抗体标记为“抗CLDN6抗体”。

[0510] 使用于本发明的抗体－药物偶联物的抗体是指免疫球蛋白，是包含与抗原免疫特异性结合的抗原结合部位的分子。作为本发明的抗体，可为IgG、IgE、IgM、IgD、IgA以及IgY中的任一种，优选IgG。另外，作为亚类，可为IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1以及IgA2中的任一种，优选IgG1、IgG2、IgG4。使用IgG1或IgG4时，可通过将恒定区的氨基酸残基的一部分置换来调节效应功能(参照WO88/07089、WO94/28027、WO94/29351)。

[0511] 抗体的来源可为任意物种，优选列举人、大鼠、小鼠和兔子。来自人以外的物种时，优选使用周知的技术进行嵌合化或人源化。本发明的抗体可是多克隆抗体，也可是单克隆抗体，优选单克隆抗体。单克隆抗体包括大鼠抗体、小鼠抗体、兔子抗体等来自非人类动物的单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、它们的功能性片段或它们的修饰体。

[0512] 本发明的抗体优选能够以肿瘤细胞作为靶点的抗体。即，由于抗体与具有抗肿瘤活性的药物通过连接子结合，因此，抗体优选具有能够识别肿瘤细胞的特性、能够与肿瘤细胞结合的特性、被吞入肿瘤细胞内而内化的特性，进而破坏肿瘤细胞的特性中的一种或一种以上的特性。

[0513] 抗体与肿瘤细胞的结合性可使用流式细胞仪确认。抗体向肿瘤细胞内的吞入可使用下述(1)～(3)的方式进行确认：(1)使用与治疗抗体结合的二次抗体(荧光标识)并通过荧光显微镜将吞入细胞内的抗体可视化的分析(Cell Death and Differentiation(2008)15,751-761)，(2)使用与治疗抗体结合的二次抗体(荧光标识)测定吞入细胞内的荧光量的分析(Molecular Biology of the Cell Vol.15,5268-5282,December 2004)，或(3)使用与治疗抗体结合的免疫毒素，当被吞入细胞内时，毒素被释放从而抑制细胞增殖的Mab－ZAP分析(Bio Techniques 28:162-165,January 2000)。作为免疫毒素，也可使用白喉毒素的催化区与蛋白G的重组复合蛋白质。

[0514] 本发明中，“高内化能力”是指添加了该抗体和皂草素标记的抗大鼠或小鼠IgG抗体的靶点抗原表达细胞(例如CLDN6表达细胞)的生存率(以未添加抗体时的细胞生存率为100％而得到的相对比率)优选为70％以下，更优选为60％以下。

[0515] 由于本发明的抗体－药物偶联物结合了发挥抗肿瘤效果的化合物，因此，虽然优选抗体本身具有抗肿瘤效果，但并不是必须的。为了在肿瘤细胞中特异性、选择性地发挥抗肿瘤性化合物的细胞毒活性，重要且优选的是，抗体具有内化并转移到肿瘤细胞内的性质。从发挥抗肿瘤效果的观点来看，抗体具有内化并转移到肿瘤细胞内的特性，对于利用药物对肿瘤细胞进行特异性、选择性伤害是重要且优选的。抗体的抗肿瘤活性是指对肿瘤细胞的细胞毒活性、抗细胞效果。可使用公知的in vitro(体外)或In vivo(体内)的评估系统来确认抗肿瘤活性。

[0516] 作为这样的抗体，可举出针对肿瘤相关抗原的抗体，例如可列举出抗CLDN6抗体、抗CLDN6/CLDN9抗体、抗HER2抗体、抗DLL3(Delta like protein3:δ样蛋白3)抗体、抗A33抗体、抗CanAg抗体、抗CD19抗体、抗CD20抗体、抗CD22抗体、抗CD30抗体、抗CD33抗体、抗CD56抗体、抗CD70抗体、抗CD98抗体、抗TROP2抗体、抗CEA抗体、抗Cripto抗体、抗EphA2抗体、抗FGFR2抗体(WO201315206等)、抗G250抗体、抗MUC1抗体(WO2011012309等)、抗GPNMB抗体、抗Integrin抗体、抗PSMA抗体、抗Tenascin－C抗体、抗SLC44A4抗体、抗Mesothelin(间皮素)抗体、抗EGFR抗体、抗DR5抗体，但并不限定于此。

[0517] 作为本发明的抗体，优选抗CLDN6抗体、抗CLDN6/CLDN9抗体、抗HER2抗体、抗CD98

抗体、抗TROP2抗体，进一步优选抗CLDN6抗体、抗HER2抗体(例如曲妥珠单抗、曲妥珠单抗突变体)。

[0518] 本发明的抗体可通过使用本领域常用的方法，使用作为抗原的多肽对动物进行免疫，并采集和精制活体内产生的抗体来获得。抗原的来源不仅限于人类，还可使用来源于小鼠、大鼠等人类以外的动物的抗原对动物进行免疫。这种情况下，可通过试验与所获得的异种抗原相结合的抗体与人抗原之间的交叉性来分选出适用于人类疾病的抗体。

[0519] 另外，可根据公知的方法(例如，Nature(1975)256,p.495-497,Monoclonal Antibodies,p.365-367,Plenum Press,N.Y.(1980))，使产生针对抗原的抗体的抗体产生细胞与骨髓瘤细胞融合来建立杂交瘤，由此来获得单克隆抗体(后述)。

[0520] 予以说明，可通过基因操作使宿主细胞产生编码抗原蛋白质的基因来获得抗原。

[0521] 本发明的嵌合抗体、人源化抗体可根据公知的方法(例如，Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,81,6851-6855,(1984)、Nature(1986)321,p.522-525、WO90/07861)来获得。

[0522] 抗HER2抗体(美国专利第5,821,337号等)、抗TROP2抗体(WO2003/074566等)、抗CD98抗体(WO2015/146132等)可通过公知的方法来获得。

[0523] 以下，对本发明中使用的抗CLDN6抗体进行说明。予以说明，以下所示的实施方式是本发明的代表性的实施方式的一例，并不是由此来限定解释本发明的范围。

[0524] 1.CLDN6以及CLDN9

[0525] CLDN6为属于Claudin家族的包含220个氨基酸的四次跨膜型蛋白质，在细胞内具有N末端以及C末端。

[0526] 人CLDN6的氨基酸序列以及DNA序列已经在公共数据库中公开，可根据例如NP__067018(序列号1(图11))、NM__021195(序列号2(图11))(均为NCBI)等登录号进行参照。

[0527] 关于人CLDN6蛋白质的氨基酸序列(以下称为“CLDN6氨基酸序列”)，细胞外区包括包含序列表的序列号1的氨基酸编号29～81的细胞外结构域(EC1)和包含氨基酸编号138～160的细胞外结构域(EC2)。

[0528] CLDN9为属于Claudin家族的包含217个氨基酸的四次跨膜型蛋白质，在细胞内具有N末端以及C末端。CLDN9与CLDN6具有高度同源性。

[0529] 人CLDN9的氨基酸序列以及DNA序列已在公共数据库中公开，例如可根据NP__066192(序列号3(图12))、NM__020982(序列号4(图12))(均为NCBI)等登录号进行参照。

[0530] 2.抗CLDN6抗体

[0531] 作为本发明的抗CLDN6抗体的一个例子，可举出识别包含从序列表的序列号1所示的CLDN6的N末端起第29～81号的氨基酸序列，以及第138～160号的氨基酸序列的2个细胞外区的高阶结构，且具有内化活性的抗CLDN6抗体。

[0532] 本发明的抗CLDN6抗体是能以肿瘤细胞作为靶点的抗体，即具有能识别肿瘤细胞的特性、能与肿瘤细胞结合的特性、以及被吞入肿瘤细胞内而内化的特性等。因此，本发明的抗CLDN6抗体与具有抗肿瘤活性的化合物通过连接子而结合，从而能形成抗体－药物偶联物。

[0533] 本发明的抗CLDN6抗体可具有抗肿瘤活性。

[0534] 抗CLDN6抗体可通过使用本领域中通常实施的方法，使用作为抗原的多肽对动物

进行免疫，并收集和精制在活体内产生的抗体来获得。由于CLDN6是四次跨膜型的蛋白质，因此可使用保持三维结构的蛋白质作为抗原，作为这样的方法可举出细胞免疫法。

[0535] 另外，可根据已知的方法，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而建立杂交瘤，由此得到单克隆抗体。

[0536] 以下，对针对CLDN6的抗体的获取方法进行具体说明。

[0537] 1)抗原的制备

[0538] 可直接从人的肿瘤组织或者肿瘤细胞中精制而使用CLDN6，或者制备该细胞的细胞膜组分来使用CLDN6。另外，也可通过在体外(in vitro)合成CLDN6(例如，由Roche Diagnostics公司制造的Rapid Translation System(RTS:快速翻译系统))或通过基因操作在宿主细胞中产生而获得CLDN6。

[0539] 具体而言，在基因操作中，将CLDN6的cDNA整合到可表达的载体中，然后在含有转录和翻译所必需的酶、基质以及能量物质的溶液中合成，或者通过将其它的原核生物或真核生物的宿主细胞基因转换从而表达CLDN6来获得抗原。另外，通过上述基因操作获得的CLDN6表达细胞、或者表达CLDN6的细胞株可用作CLDN6蛋白质。

[0540] 通过在适当的宿主/载体体系中，使连接作为膜蛋白质的CLDN6的细胞外区与抗体的恒定区的融合蛋白质表达，也能以分泌蛋白质的形式获得抗原。

[0541] 也可使用上述的转化体本身作为抗原。

[0542] 进而，可使用表达CLDN6的细胞株作为抗原。作为这样的细胞株，可举出人胰腺癌细胞株NOR－P1细胞、人卵巢癌株NIH:OVCAR－3、OV－90或OAW28、人卵巢畸胎瘤细胞株PA－1、人肝癌株HuH－7、人妊娠性绒毛膜癌株JEG－3以及人恶性多发性畸胎瘤株NTERA－2cloneD1，但是只要表达CLDN6并不限定于这些细胞株。

[0543] 本发明中使用的CLDN9蛋白质也可以同样的方式来制备而使用。

[0544] 2)抗CLDN6单克隆抗体的制造

[0545] 本发明中使用的抗CLDN6抗体没有特别的限定，可以优选使用例如本申请的序列表中所示的氨基酸序列所特定的抗体。作为本发明中使用的抗CLDN6抗体，优选具有以下的特性的抗体。

[0546] (1)一种抗体，其特征在于，具有以下(a)以及(b)的特性。

[0547] (a)识别或结合CLDN家族。

[0548] 本发明的抗体识别CLDN家族。换言之，本发明的抗体与CLDN家族结合。本发明的抗体优选与CLDN6结合，更优选与CLDN6特异性结合。进而，本发明的抗体可识别CLDN9或与CLDN9结合。

[0549] 本发明中，“特异性识别”，即“特异性结合”，是指不是非特异性吸附的结合。作为判定结合是否为特异性的标准，可举出例如解离常数(Dissociation Constant:以下称为“KD”)。本发明的优选抗体对CLDN6和/或CLDN9的KD值为1×10^{-5}M以下、5×10^{-6}M以下、2×10^{-6}M以下或1×10^{-6}M以下，更优选为5×10^{-7}M以下，2×10^{-7}M以下或1×10^{-7}M以下。

[0550] 本发明的抗原与抗体的结合可通过ELISA(enzyme linked immunosorbent assay:酶联免疫吸附测定)法、RIA(Radio immune assay:放射免疫分析)法、Surface Plasmon Resonance(表面等离子体共振，以下称为“SPR”)解析法等来测定或判定。细胞表面上表达的抗原与抗体的结合可通过流式细胞仪等来测定。

[0551] (b)具有通过与CLDN6和/或CLDN9结合而在CLDN6和/或CLDN9表达细胞中内化的活性。

[0552] (2)根据上述(1)所述的抗体,其中,CLDN6和/或CLDN9为人CLDN6和/或人CLDN9。

[0553] 本发明的针对CLDN6的抗体的获得方法通常经过下述的工序,但并不限定于此。

[0554] (使用杂交瘤的方法)

[0555] (a)用作抗原的活体高分子的精制、或抗原表达细胞的制备以及将该活体高分子或抗原表达细胞施用于动物,(b)从已诱发免疫反应的上述动物中收集包含抗体产生细胞的组织(例如淋巴结),(c)骨髓瘤细胞(以下称为“骨髓瘤”)(例如,小鼠骨髓瘤SP2/0－ag14细胞)的制备,(d)抗体产生细胞与骨髓瘤的细胞融合,(e)选择产生目标抗体的杂交瘤组,(f)分裂成单细胞纯系(克隆),(g)在某些情况下,培养杂交瘤以大量制造单克隆抗体,或饲养移植有杂交瘤的动物,(h)由此产生的单克隆抗体的生理活性(内化活性)及其结合特异性的探讨或者用作标记试剂的特性的测定。

[0556] 此处使用的抗体效价的测定方法的实例包括但不限于例如流式细胞仪法或Cell－ELISA法。

[0557] 作为以这种方式获得的单克隆抗CLDN6抗体的实例,可举出小鼠抗CLDN6抗体B1以及C7。予以说明,本发明中,有时将“B1”记为“B1抗体”,将“C7”记为“C7抗体”。

[0558] B1抗体的重链可变区的碱基序列记载于序列表的序列号20(图19),氨基酸序列记载于序列号21(图19)。另外,B1抗体的轻链可变区的碱基序列记载于序列表的序列号18(图18),氨基酸序列记载于序列号19(图18)。

[0559] B1抗体的CDRH1的氨基酸序列记载于序列号9(图15),CDRH2的氨基酸序列记载于序列号10(图15),CDRH3的氨基酸序列记载于序列号11(图15),CDRL1的氨基酸序列记载于序列号5(图13),CDRL2的氨基酸序列记载于序列号6(图13),CDRL3的氨基酸序列记载于序列号7(图13)。

[0560] C7抗体的重链可变区的碱基序列记载于序列表的序列号24(图21),氨基酸序列记载于序列号25(图21)。另外,C7抗体的轻链可变区的碱基序列记载于序列表的序列号22(图20),氨基酸序列记载于序列号23(图20)。

[0561] C7抗体的CDRH1的氨基酸序列记载于序列号15(图17),CDRH2的氨基酸序列记载于序列号16(图17),CDRH3的氨基酸序列记载于序列号17(图17),CDRL1的氨基酸序列记载于序列号12(图16),CDRL2的氨基酸序列记载于序列号13(图16),CDRL3的氨基酸序列记载于序列号14(图16)。

[0562] 此外,再次实施“抗CLDN6抗体的制造”(a)～(h)的工序,并且即便在另行独立地获得单克隆抗体的情况或者通过其他的方法另行获得单克隆抗体的情况下,也可获得具有与B1抗体或C7抗体同等的内化活性的抗体。作为这样的抗体的一例,可举出与B1抗体或C7抗体结合于同一抗原决定基的抗体。如果新制备的单克隆抗体可结合于B1抗体或C7抗体所结合的部分肽或部分立体结构,则可确定该单克隆抗体结合于与B1抗体或C7抗体相同的抗原决定基。另外,通过确认该单克隆抗体在B1抗体或C7抗体与CLDN6的结合中存在竞争(即该单克隆抗体妨碍B1抗体或C7抗体与CLDN6结合),即使未确定具体的抗原决定基的序列或结构,也可判定该单克隆抗体与抗CLDN6抗体结合于相同的抗原决定基。当确认到抗原决定基相同时,就可热切期待该单克隆抗体具有与B1抗体或C7抗体同等的抗原结合能力、生物活

性和/或内化活性。

[0563] 本发明的抗体除了上述针对CLDN6的单克隆抗体之外，还包括经过人工修饰以降低针对人类的异种抗原性等的基因重组型抗体，例如嵌合(Chimeric)抗体、人源化(Humanized)抗体、人抗体等。这些抗体可使用已知的方法来制造。

[0564] (1)嵌合抗体

[0565] 作为嵌合抗体，可举出抗体的可变区和恒定区互为异种的抗体，例如来自小鼠或大鼠的抗体的可变区与来自人的恒定区接合而成的嵌合抗体(参照Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,81,6851-6855,(1984))。

[0566] 作为本发明的嵌合抗体所例示的来自小鼠抗人CLDN6抗体B1抗体的嵌合抗体为包含重链和轻链的抗体，可具有任意来自人的恒定区，所述重链包含由序列号21(图19)所示的氨基酸序列形成的重链可变区，所述轻链包含序列号19(图18)所示的轻链可变区。

[0567] 作为来自小鼠抗人CLDN6抗体B1抗体的嵌合抗体的具体例，可举出来自小鼠抗人CLDN6抗体B1抗体的嵌合抗体chB1抗体(以下也记为“chB1”)。可举出chB1抗体的氨基酸序列包含具有由序列表的序列号32(图24)的第20～471号氨基酸残基形成的氨基酸序列的重链以及具有由序列表的序列号28(图22)的21～234形成的氨基酸序列的轻链的抗体。

[0568] 予以说明，序列表的序列号32(图24)所示的重链序列中，由第1～19号氨基酸残基形成的氨基酸序列为信号序列，由第20～141号氨基酸残基形成的氨基酸序列为重链可变区，由第142～471号氨基酸残基形成的氨基酸序列为重链恒定区。另外，序列表的序列号28(图22)所示的轻链序列中，由第1～20号氨基酸残基形成的氨基酸序列为信号序列，由第21～127号氨基酸残基形成的氨基酸序列为轻链可变区，由第128～234号氨基酸残基形成的氨基酸序列为轻链恒定区。

[0569] chB1抗体的重链以及轻链的可变区的氨基酸序列记载于序列表的序列号34(图25)、序列号30(图23)。

[0570] chB1抗体的重链氨基酸序列由序列表的序列号33(图24)所示的核苷酸序列编码。由序列表的序列号33所示的核苷酸序列的第1～57号核苷酸形成的核苷酸序列编码chB1抗体重链的信号序列，由序列表的序列号33所示的核苷酸序列的第58～423号核苷酸形成的核苷酸序列编码chB1抗体的重链可变区，由序列表的序列号33所示的核苷酸序列的第424～1413号核苷酸形成的核苷酸序列编码chB1抗体的重链恒定区。

[0571] chB1抗体的重链可变区的碱基序列记载于序列表的序列号35(图25)。

[0572] chB1抗体的轻链氨基酸序列由序列表的序列号29(图22)所示的核苷酸序列编码。由序列表的序列号29所示的核苷酸序列的第26～85号核苷酸形成的核苷酸序列编码chB1抗体轻链的信号序列，由序列表的序列号29所示的核苷酸序列的第86～406号核苷酸形成的核苷酸序列编码chB1抗体的轻链可变区，由序列表的序列号29所示的核苷酸序列的第407～727号核苷酸形成的核苷酸序列编码chB1抗体的轻链恒定区。

[0573] chB1抗体的轻链可变区的碱基序列记载于序列表的序列号31(图23)。

[0574] (2)人源化抗体

[0575] 作为人源化抗体，可举出仅仅将互补性决定区(CDR;complementarity determining region)掺入来自人的抗体的抗体(参照Nature(1986)321,p.522-525)；通过CDR移植法将CDR的序列以及一部分骨架的氨基酸残基都移植于人抗体的抗体(WO90/07861

号);以及维持对抗原的结合能力,同时改变了一部分CDR的氨基酸序列的抗体。

[0576] 其中,作为来自B1抗体或C1抗体的人源化抗体,只要保持B1抗体或C1抗体的所有六种CDR序列并具有CLDN6结合活性,则不限定于特定的人源化抗体,另外,只要修饰了1个～几个(优选1～2个、更优选1个)CDR的氨基酸序列的人源化抗体突变体能够识别CLDN6蛋白质或具有该抗体的CLDN6蛋白质结合活性,则并不限定于特定的人源化抗体。

[0577] 作为本发明的抗CLDN6人源化抗体或其功能性片段,可举出例如:包含具有可变区的重链和具有可变区的轻链,识别本发明的CLDN6蛋白质或保持该抗体的CLDN6蛋白质结合活性的抗体或该抗体的功能性片段等,其中,所述重链所具有的可变区含有:由序列表的序列号9(图15)所示的氨基酸序列或该氨基酸序列的1～几个(优选1～2个)氨基酸被取代了的氨基酸序列形成的CDRH1;由序列表的序列号10(图15)所示的氨基酸序列或该氨基酸序列的1～几个(优选1～2个)氨基酸被取代了的氨基酸序列形成的CDRH2;以及由序列表的序列号11(图15)所示的氨基酸序列或该氨基酸序列的1～几个(优选1～2个)氨基酸被取代了的氨基酸序列形成的CDRH3。所述轻链所具有的可变区含有:由序列表的序列号5(图13)所示的氨基酸序列或该氨基酸序列的1～几个(优选1～2个)氨基酸被取代了的氨基酸序列形成的CDRL1;由序列表的序列号6(图13)所示的氨基酸序列或该氨基酸序列的1～几个(优选,1～2个)氨基酸被取代了的氨基酸序列形成的CDRL2;以及由序列表的序列号7(图13)所示的氨基酸序列或该氨基酸序列的1～几个(优选,1～2个)氨基酸被取代了的氨基酸序列形成的CDRL3。

[0578] 作为上述抗CLDN6人源化抗体或其功能性片段的CDR的氨基酸取代的例子,优选举出上述CDRL3的1～几个(优选1～2个)氨基酸被取代,可举出序列表的序列号7的氨基酸编号4号和5号氨基酸被取代了的序列表的序列号8(图14)所示的CDRL3。

[0579] 作为上述具有CDRH的人源化抗体的重链可变区,可列举:序列表的序列号54(图35)所示的氨基酸序列、序列表的序列号58(图37)所示的氨基酸序列以及序列表的序列号62(图39)所示的氨基酸序列;作为上述具有CDRL的人源化抗体的轻链可变区,可列举:序列表的序列号38(图27)所示的氨基酸序列、序列表的序列号42(图29)所示的氨基酸序列、序列表的序列号46(图31)所示的氨基酸序列以及序列表的序列号50(图33)所示的氨基酸序列。

[0580] 作为包含上述重链可变区以及轻链可变区的组合的人源化抗体,优选举出:包含由序列表的序列号54(图35)所示的氨基酸序列形成的重链可变区、以及由序列表的序列号38(图27)所示的氨基酸序列形成的轻链可变区的人源化抗体;包含由序列表的序列号58(图37)所示的氨基酸序列形成的重链可变区、以及由序列表的序列号42(图29)所示的氨基酸序列形成的轻链可变区的人源化抗体;包含由序列表的序列号54(图35)所示的氨基酸序列形成的重链可变区、以及由序列表的序列号46(图31)所示的氨基酸序列形成的轻链可变区的人源化抗体;包含由序列表的序列号58(图37)所示的氨基酸序列形成的重链可变区、以及由序列表的序列号50(图33)所示的氨基酸序列形成的轻链可变区的人源化抗体;包含由序列表的序列号62(图39)所示的氨基酸序列形成的重链可变区、以及由序列表的序列号46(图31)所示的氨基酸序列形成的轻链可变区的人源化抗体。

[0581] 作为包含上述重链可变区以及轻链可变区的组合的人源化抗体的全长序列,可列举:包含由序列表的序列号52(图34)的氨基酸编号20～471所示的氨基酸序列形成的重链

以及由序列表的序列号36(图26)的氨基酸编号21～234所示的氨基酸序列形成的轻链的人源化抗体(H1L1)；包含由序列表的序列号56(图36)的氨基酸编号20～471所示的氨基酸序列形成的重链、以及由序列表的序列号40(图28)的氨基酸编号21～234所示的氨基酸序列形成的轻链的人源化抗体(H2L2)；包含由序列表的序列号52(图34)的氨基酸编号20～471所示的氨基酸序列形成的重链、以及由序列表的序列号44(图30)的氨基酸编号21～234所示的氨基酸序列形成的轻链的人源化抗体(H1L3)；包含由序列表的序列号56(图36)的氨基酸编号20～471所示的氨基酸序列形成的重链、以及由序列表的序列号48(图32)的氨基酸编号21～234所示的氨基酸序列形成的轻链的人源化抗体(H2L4)；或包含由序列表的序列号60(图38)的氨基酸编号20～471所示的氨基酸序列形成的重链、以及由序列表的序列号44(图30)的氨基酸编号21～234所示的氨基酸序列形成的轻链的人源化抗体(H3L3)。

[0582] 予以说明，序列表的序列号52(图34)、56(图36)、或60(图38)所示的重链氨基酸序列中，由第1～19号氨基酸残基形成的氨基酸序列为信号序列，由第20～141号氨基酸残基形成的氨基酸序列为重链可变区，由第142～471号氨基酸残基形成的氨基酸序列为重链恒定区。

[0583] 另外，序列表的序列号36(图26)、40(图28)、44(图30)或48(图32)所示的轻链氨基酸序列中，由第1～20号氨基酸残基形成的氨基酸序列为信号序列，由第21～127号氨基酸残基形成的氨基酸序列为轻链可变区，由第128～234号氨基酸残基形成的氨基酸序列为轻链恒定区。

[0584] 编码上述人源化抗体H1L1的重链氨基酸序列的碱基序列为序列号53(图34)所示的多核苷酸，编码轻链氨基酸序列的碱基序列为序列号37(图26)所示的多核苷酸，编码人源化抗体H2L2的重链氨基酸序列的碱基序列为序列号57(图36)所示的多核苷酸，编码轻链氨基酸序列的碱基序列为序列号41(图28)所示的多核苷酸，编码人源化抗体H1L3的重链氨基酸序列的碱基序列为序列号53(图34)所示的多核苷酸，编码轻链氨基酸序列的碱基序列为序列号45(图30)所示的多核苷酸，编码人源化抗体H2L4的重链氨基酸序列的碱基序列为序列号57(图36)所示的多核苷酸，编码轻链氨基酸序列的碱基序列为序列号49(图32)所示的多核苷酸，编码人源化抗体H3L3的重链氨基酸序列的碱基序列为序列号61(图38)所示的多核苷酸，编码轻链氨基酸序列的碱基序列为序列号45(图30)所示的多核苷酸。

[0585] 编码上述人源化抗体H1L1的重链可变区的氨基酸序列的碱基序列为序列号55(图35)所示的多核苷酸，编码轻链可变区的氨基酸序列的碱基序列为序列号39(图27)所示的多核苷酸，编码人源化抗体H2L2的重链可变区的氨基酸序列的碱基序列为序列号59(图37)所示的多核苷酸，编码轻链可变区的氨基酸序列的碱基序列为序列号43(图29)所示的多核苷酸，编码人源化抗体H1L3的重链可变区的氨基酸序列的碱基序列为序列号55(图35)所示的多核苷酸，编码轻链可变区的氨基酸序列的碱基序列为序列号47(图31)所示的多核苷酸，编码人源化抗体H2L4的重链可变区的氨基酸序列的碱基序列为序列号59(图37)所示的多核苷酸，编码轻链可变区的氨基酸序列的碱基序列为序列号51(图33)所示的多核苷酸，编码人源化抗体H3L3的重链可变区的氨基酸序列的碱基序列为序列号63(图39)所示的多核苷酸，编码轻链可变区的氨基酸序列的碱基序列为序列号47(图31)所示的多核苷酸。

[0586] 予以说明，由序列表的序列号53(图34)、57(图36)、61(图38)所示的各核苷酸序列的第1～57号核苷酸形成的核苷酸序列编码该人源化抗体重链的信号序列，由第58～423号

核苷酸形成的核苷酸序列编码该人源化抗体重链可变区的氨基酸序列，由第424～1413号碱基序列的核苷酸形成的核苷酸序列编码该抗体重链恒定区。

[0587] 另外，由序列表的序列号37(图26)、41(图28)、45(图30)、49(图32)所示的各核苷酸序列的第1～60号核苷酸形成的核苷酸序列编码该人源化抗体轻链的信号序列，由第61～381号核苷酸形成的核苷酸序列编码该人源化抗体轻链可变区的氨基酸序列，由第382～702号核苷酸形成的核苷酸序列编码该抗体轻链恒定区。

[0588] 与包含上述重链可变区以及轻链可变区的组合的抗体，或包含上述重链以及轻链的组合的抗体的氨基酸序列的同一性或同源性为80％以上、优选90％以上、更优选95％以上、进一步优选97％以上、最优选99％以上的抗体只要具有与CLDN6的结合活性，则也包含在本发明的抗体中。

[0589] 另外，与包含上述重链可变区以及轻链可变区的组合的抗体，或具有由与包含上述重链以及轻链的组合的抗体的CDR相同的氨基酸序列构成的CDR，且除去该抗体的CDR的氨基酸序列后的氨基酸序列的同一性或同源性为80％以上、优选90％以上、更优选95％以上、进一步优选97％以上、最优选99％以上的抗体只要具有与CLDN6的结合活性，则也包含在本发明的抗体中。

[0590] 还可选择通过在重链或轻链的氨基酸序列上组合取代、缺失或添加1个～几个氨基酸残基后的氨基酸序列，从而与上述的抗体具有相同生物活性的抗体。另外，作为本说明书中的氨基酸的取代，优选保守的氨基酸取代(WO2013154206)。

[0591] 所谓保守的氨基酸取代是发生在与氨基酸侧链有关联的氨基酸组内的取代。这样的氨基酸取代优选在不降低具有原始氨基酸序列的物质的特性的范围内进行。

[0592] 两种氨基酸序列间的同源性通过Blast算法版本2.2.2(Altschul,Stephen F.,Thomas L.Madden,Alejandro A.Schaaffer,Jinghui Zhang,Zheng Zhang,Webb Miller,and David J.Lipman(1997),“Gapped BLAST and PSI-BLAST:a new generation of protein database search programs”,Nucleic Acids Res.25:3389-3402)的默认参数(default parameter)来确定。Blast算法也可使用在网络上访问www.ncbi.nlm.nih.gov/blast来进行。

[0593] (3)人抗体

[0594] 作为本发明的抗体还可举出与CLDN6和/或CLDN9结合的人抗体。抗CLDN6和/或CLDN9人抗体是指仅具有源自人染色体的抗体的基因序列的人抗体。抗CLDN6人抗体可通过使用产生人抗体的小鼠的方法来获得，所述产生人抗体的小鼠具有包含人抗体的重链和轻链的基因的人染色体片段(参照Nature Genetics(1997)16,p.133-143,;Nucl.Acids Res.(1998)26,p.3447-3448;Animal Cell Technology:Basic and Applied Aspects vol.10,p.69-73,Kluwer AcademicPublishers,1999.;Proc.Natl.Acad.Sci.USA(2000)97,p.722-727等)。

[0595] 具体而言，这种产生人抗体的小鼠可作为内源性免疫球蛋白重链以及轻链的基因座被破坏，取而代之经由酵母人工染色体(Yeast artificial chromosome,YAC)载体等导入了人免疫球蛋白重链以及轻链的基因座的转基因动物，通过制作基因敲除动物和转基因动物并使这些动物彼此交配而生产。

[0596] 另外，通过基因重组技术，利用编码这样的人抗体的每个重链以及轻链的cDNA、优

选利用包含该cDNA的载体来转化真核细胞，培养产生基因重组人单克隆抗体的转化细胞，由此也可从培养上清液中得到该抗体。

[0597] 其中，作为宿主，可使用例如真核细胞，优选使用CHO(Chinese hamsters Ovary：中国仓鼠卵巢)细胞、淋巴细胞或骨髓瘤等哺乳动物细胞。

[0598] 另外，已知有一种获取选自人抗体库的噬菌体展示衍生的人抗体的方法(参照Investigative Ophthalmology&VisualScience.(2002)43(7),p.2301-2308;Briefings in Functional Genomicsand Proteomics(2002),1(2),p.189-203;Ophthalmology(2002)109(3),p.427-431等。)。

[0599] 例如可使用噬菌体展示法：使用人抗体的可变区作为单链抗体(scFv)在噬菌体表面表达，选择与抗原结合的噬菌体(Nature Biotechnology(2005),23,(9),p.1105-1116)。

[0600] 通过分析与抗原结合而选择的噬菌体的基因，可确定编码与抗原结合的人抗体的可变区的DNA序列。

[0601] 如果明确了与抗原结合的scFv的DNA序列，则可通过制作具有该序列的表达载体并将其引入适当的宿主中使其表达，从而获得人抗体(WO92/01047,WO92/20791,WO93/06213,WO93/11236,WO93/19172,WO95/01438,WO95/15388,Annu.Rev.Immunol(1994)12,p.433-455,Nature Biotechnology(2005)23(9),p.1105-1116)。

[0602] 可通过已知方法等评价由上述方法得到的嵌合抗体、人源化抗体、或人抗体等对抗原的结合性，选择合适的抗体。

[0603] 作为比较抗体性质时的其他指标的一例，可举出抗体的稳定性。差示扫描量热计(DSC)是一种可快速且准确地测量蛋白结构相对稳定性良好的指标即热变性中点(Tm)的装置。通过使用DSC测定Tm值并比较该值，可比较热稳定性的差异。已知抗体的保存稳定性与抗体的热稳定性显示出一定程度的相关性(Pharmaceutical Development and Technology(2007)12,p.265-273)，以热稳定性为指标可选拔合适的抗体。作为用于选拔抗体的其他指标，可举出在合适的宿主细胞中产量高，以及在水溶液中的凝聚性低这样的指标。例如，由于产量最高的抗体并不一定表现出最高的热稳定性，因此需要基于上述的指标进行综合判断来选择对人给药时最合适的抗体。

[0604] 本发明的抗体也包括与本发明提供的抗CLDN6抗体在“相同的部位结合的抗体”。即，在本发明的B1或C7所识别的CLDN6蛋白质上的部位结合的抗体也包含在本发明中。

[0605] 本发明的抗体也包括抗体的修饰体。该修饰体是指通过对本发明的抗体进行化学或生物学修饰而获得的产物。化学性修饰体包括化学部分与氨基酸骨架的键合、N－键合或O－键合的碳水化合物链的化学修饰体等。生物学修饰体包括翻译后修饰(例如，N－连接或O－连接型糖链的添加、N末端或C末端的加工、脱酰胺化、天冬氨酸异构化、蛋氨酸氧化)的产物，以及通过使用原核生物宿主细胞来表达，在N末端添加了蛋氨酸残基的修饰体等。另外，可用于检测或分离本发明的抗体或抗原而标识的标识物，例如酶标记体、荧光标记体和亲和标记体等也包括在修饰体的范围内。这些本发明的抗体的修饰体对于改善抗体稳定性及血中滞留性、降低抗原性、检测或分离抗体或抗原等有用。

[0606] 另外，通过调节与本发明的抗体结合的糖链修饰(糖基化、脱岩藻糖化等)可增强抗体依赖性细胞毒活性。作为抗体的糖链修饰的调节技术，已知有WO1999/54342、WO2000/61739、WO2002/31140等，但并不限于这些。本发明的抗体中包括调节了该糖链修饰的抗体。

[0607] 可在抗体或其功能片段的任意位置、或者在期望的位置进行此类修饰，也可在1个或2个以上的位置进行相同或者2种以上的不同修饰。

[0608] 本发明中，“抗体片段的修饰体”也包括“抗体的修饰体的片段”。

[0609] 暂时分离抗体基因后，将其引入合适的宿主中以产生抗体时，可使用合适的宿主与表达载体的组合。作为抗体基因的具体例，可举出编码本说明书中记载的抗体的重链序列等的基因与编码轻链序列等的基因的组合。在将宿主细胞转化时，重链序列基因等和轻链序列基因等可插入同一个表达载体，也可插入不同的表达载体。

[0610] 当真核细胞用作宿主时，可使用动物细胞、植物细胞、真核微生物。特别地，作为动物细胞，可列举哺乳类细胞，例如作为猴子的细胞的COS细胞(Cell(1981)23,p.175-182,ATCC CRL-1650)、小鼠成纤维细胞NIH3T3(ATCC No.CRL-1658)、中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞，ATCC CCL－61)的二氢叶酸还原酶缺陷株(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.(1980)77,p.4126-4220、FreeStyle 293F细胞(Invitrogen社)。

[0611] 使用原核细胞时，可举出大肠杆菌、枯草芽孢杆菌。

[0612] 通过将目标抗体基因通过转化引入这些细胞中，并在体外培养转化后的细胞即可获得抗体。在该培养中，有时产量会根据抗体的序列而不同，可从具有同等结合活性的抗体中，以产量为指标选择容易作为药物生产的抗体。因此，本发明的抗体也包括通过下述的抗体的制造方法得到的抗体，所述制造方法包括：培养上述转化的宿主细胞的工序，以及从由该工序得到的培养物中采集目标抗体或该抗体的功能性片段的工序。

[0613] 上述抗体基因优选为包含以下(a)～(e)中任一项所述的多核苷酸的多核苷酸：(a)编码B1或者C7抗体、chB1抗体以及人源化抗体H1L1、H2L2、H1L3、H2L4、H3L3中的任意一种抗体的重链氨基酸序列的多核苷酸与编码轻链氨基酸序列的多核苷酸的组合，(b)编码包含B1或者C7抗体、chB1抗体、以及人源化抗体H1L1、H2L2、H1L3、H2L4、H3L3中的任意一种抗体的CDRH1～CDRH3的重链氨基酸序列的多核苷酸与编码包含CDRL1～CDRL3的轻链氨基酸序列的多核苷酸的组合，(c)编码包含B1或者C7抗体、chB1抗体、以及人源化抗体H1L1、H2L2、H1L3、H2L4、H3L3中的任意一种抗体的重链可变区的氨基酸序列的重链氨基酸序列的多核苷酸与编码包含轻链可变区的氨基酸序列的轻链氨基酸序列的多核苷酸的组合，(d)与由与(a)～(c)中任一项所述的多核苷酸互补的多核苷酸构成的核苷酸在严格的条件下杂交且编码与CDLN6结合的抗体的氨基酸序列的多核苷酸，以及(e)编码(a)～(c)中任一项所述的多核苷酸中1～50个、1～45个、1～40个、1～35个、1～30个、1～25个、1～20个、1～15个、1～10个、1～8个、1～6个、1～5个、1～4个、1～3个、1或2个或1个氨基酸被取代、缺失、添加或插入形成的多肽的氨基酸序列，且编码与CLDN6结合的抗体的氨基酸序列的多核苷酸。

[0614] 本发明包括编码本发明的抗体或其功能性片段或其修饰体的核苷酸、插入该基因的重组载体以及导入了该基因或该载体的细胞。

[0615] 另外，本发明也包括抗体或其功能性片段或其修饰体的制造方法，所述制造方法包括：培养所述细胞的工序、以及从其培养物中回收抗体或其功能性片段或其修饰体的工序。

[0616] 予以说明，已知在哺乳类培养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))，最近还已知在上述相同的重链羧基末端的甘氨酸、赖氨酸这2个氨基酸残基缺失，新位于羧基末端的脯氨酸残基被酰胺

化(Analytical Biochemistry,360:75-83(2007))。但是,这些重链序列的缺失以及修饰对于抗体的抗原结合能力以及效应功能(补体的活化、抗体依赖性细胞毒性作用等)不产生影响。因此,本发明的抗体还包括受到该修饰的抗体以及该抗体的功能性片段、在重链羧基末端有1个或2个氨基酸缺失的缺失体、以及被酰胺化的该缺失体(例如,羧基末端部位的脯氨酸残基被酰胺化的重链)等。其中,只要保持抗原结合能力以及效应功能,本发明的抗体的重链的羧基末端的缺失体并不受上述种类的限制。构成本发明的抗体的2个重链可是选自由全长和上述缺失体构成的组中的重链的一种,或者是它们中任意两种的组合。各缺失体的量比可能受到产生本发明的抗体的哺乳类培养细胞的种类以及培养条件的影响,但是作为本发明的抗体的主要成分,可列举2条重链两者中羧基末端的1个氨基酸缺失的情况。

[0617] 作为本发明的抗CLDN6抗体的同种型(isotype),可举出例如IgG(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)等,优选举出IgG1、IgG2或IgG4。

[0618] 在使用IgG1作为本发明的抗体的同种型时,可通过部分取代恒定区的氨基酸残基来调整效应功能。作为减少或减弱效应功能的IgG1的突变体,可举出IgG1 LALA(IgG1－L234A、L235A)、IgG1 LAGA(IgG1－L235A、G237A)等,优选IgG1 LALA。予以说明,所述L234A、L235A表示由EU index(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.、Vol.63、No.1(May15、1969)、pp.78-85)确定的234位、235位亮氨酸被丙氨酸取代,G237A表示由EU index确定的237位甘氨酸被丙氨酸取代。

[0619] 作为抗体的生物学活性,一般可举出抗原结合活性、与抗原结合从而在表达抗原的细胞中内化的活性、中和抗原活性的活性、增强抗原活性的活性、抗体依赖性细胞毒(ADCC)活性、补体依赖性细胞毒(CDC)活性以及抗体依赖性细胞介导吞噬作用(ADCP),但本发明的抗体所具有的功能为对CLDN6的结合活性,优选为通过与CLDN6结合而在CLDN6表达细胞中内化的活性。另外,本发明的抗体除了具有细胞内化活性外、也可具有ADCC活性、CDC活性和/或ADCP活性。

[0620] 所得到的抗体可精制至均匀。抗体的分离、精制使用通常的蛋白质中使用的分离、精制方法即可。若适宜选择或组合例如柱色谱法、过滤器过滤、超滤、盐析、透析、制备用聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电聚焦等,则能分离、精制抗体(Strategies for Protein Purificationand Characterization:A Laboratory Course Manual,Daniel R.Marshak etal.eds.,Cold Spring Harbor Laboratory Press(1996);Antibodies:A Laboratory Manual.Ed Harlow and David Lane,Cold Spring Harbor Laboratory(1988)),但并不限定于此。

[0621] 作为色谱法,可举出亲和色谱法、离子交换色谱法、疏水性色谱法、凝胶过滤色谱法、反相色谱法、吸附色谱法等。

[0622] 这些色谱法可使用HPLC、FPLC等液体色谱法进行。

[0623] 作为亲和色谱法中使用的柱,可举出蛋白质A柱、蛋白质G柱。

[0624] 另外,也可使用固定了抗原的载体,利用与抗原的结合性来精制抗体。

[0625] 本发明的抗HER2抗体没有特别的限定,优选例如具有以下的特性。

[0626] (1)一种抗HER2抗体,其特征在于,具有以下特性:

[0627] (a)与HER2特异性结合。

[0628] (b)具有通过与HER2结合而在HER2表达细胞中内化的活性。

[0629] (2)根据上述(1)所述的抗体,其与HER2的细胞外结构域结合。

[0630] (3)根据上述(1)或(2)所述的抗体,所述抗体为单克隆抗体。

[0631] (4)根据上述(1)～(3)中任一项所述的抗体,其具有抗体依赖性细胞毒(ADCC)活性和/或补体依赖性细胞毒(CDC)活性。

[0632] (5)根据上述(1)～(4)中任一项所述的抗体,其为小鼠单克隆抗体、嵌合单克隆抗体或人源化单克隆抗体。

[0633] (6)根据上述(1)～(3)中任一项所述的抗体,其中,重链恒定区为人IgG1的重链恒定区,包含引起ADCC和/或CDC活性降低的变异。

[0634] (7)根据上述(6)所述的抗体,其中,重链恒定区为人IgG1的重链恒定区,由EU Index所示的234位以及235位的亮氨酸被丙氨酸取代。

[0635] (8)根据上述(1)～(4)中任一项所述的抗体,其为包含由序列号65所述的氨基酸序列形成的重链以及由序列号64所述的氨基酸序列形成的轻链的人源化单克隆抗体。

[0636] (9)根据上述(1)～(3)、(6)或(7)中任一项所述的抗体,其为包含由序列号75的氨基酸编号20～469所述的氨基酸序列形成的重链以及由序列号73的氨基酸编号21～234所述的氨基酸序列形成的轻链的人源化单克隆抗体。

[0637] (10)根据上述(1)～(9)中任一项所述的抗体,其中,重链羧基末端中缺失1个或2个氨基酸。

[0638] (11)根据上述(1)～(3)、(8)或(10)中任一项所述的抗体,其包含由序列号65的氨基酸编号1～449所述的氨基酸序列形成的重链以及由序列号64的氨基酸编号1～214所述的氨基酸序列形成的轻链。

[0639] (12)根据上述(1)～(3)、(6)、(7)、(9)或(10)中任一项所述的抗体,其包含由序列号75的氨基酸编号20～468所述的氨基酸序列形成的重链以及由序列号73的氨基酸编号21～234所述的氨基酸序列形成的轻链。

[0640] (13)一种抗体,其由下述该抗体的制造方法得到,所述制造方法包括:培养用下述表达载体转化后的宿主细胞的工序,所述表达载体包含编码上述(1)～(12)中任一项所述的抗体的多核苷酸;以及从由该工序得到的培养物中采集目标抗体的工序。

[0641] ＜糖链重构＞

[0642] 近年来已经报道了通过酶促反应等重构不均匀抗体的糖蛋白质并均匀引入具有官能团的糖链的方法(ACS Chemical Biology2012,7,110,ACS Medicinal Chemistry Letters2016,7,1005)。已经尝试通过使用这种糖链重构技术部位特异性地导入药物,合成均匀的ADC(Bioconjugate Chemistry 2015,26,2233,Angew.Chem.Int.Ed.2016,55,2361-2367,US2016361436)。

[0643] 本发明的糖链的重构首先使用水解酶切除附加到蛋白质(抗体等)中的不均匀的糖链而仅仅留下末端的GlcNAc,制备添加了GlcNAc的均匀蛋白质部分(以下称为“受体”)。接着,准备另行制备的任意的糖链(以下称为“供体”),使用糖基转移酶连结该受体和供体。由此可合成具有任意糖链结构的均匀的糖蛋白。

[0644] 本发明中,“糖链”是指两个以上的单糖通过糖苷键连接的结构单元。具体的单糖或者糖链有时可以缩写形式表示,例如“GlcNAc－”、“MSG－”。结构式中使用这些缩写描述时,除非另有说明,否则还原末端上归属于与其它结构单元的糖苷键的氧原子或氮原子并

不包含在表示该糖链的缩写中。

[0645] 本发明中,除非另有说明,为方便起见,对作为糖链的基本单元的单糖的记载中,将其环结构中与构成环的氧原子结合且与羟基(或归属于糖苷键的氧原子)直接结合的碳原子标记为1位(仅唾液酸中为2位)。实施例化合物的名称以化学结构整体来标记,并不一定适用该规则。

[0646] 本发明中,以符号(例如GLY、SG、MSG、GlcNAc等)来表示糖链时,除非有特别定义,否则连还原末端的碳都包含在符号中,但归属于N－或O－糖苷键中的N或O不包含在该符号中。

[0647] 本发明中,如果没有特别说明,氨基酸的侧链与糖链连接时的部分结构用括号表示侧链部分,例如“(SG－)Asn”这样的表示。

[0648] 本发明的抗体－药物偶联物如下式所示。

[0649] 

[0650] 抗体Ab或其功能性片段可从其氨基酸残基(例如半胱氨酸、赖氨酸等)的侧链直接与L结合,或者可从Ab的糖链或重构的糖链与L结合,优选从Ab的糖链或重构的糖链与L结合,更优选从Ab的重构的糖链与L结合。

[0651] 本发明的Ab的糖链为N连接型糖链或O连接型糖链,优选N连接型糖链。

[0652] N连接型糖链通过N糖苷键与抗体的氨基酸侧链结合,O连接型糖链通过O糖苷键与抗体的氨基酸侧链结合。

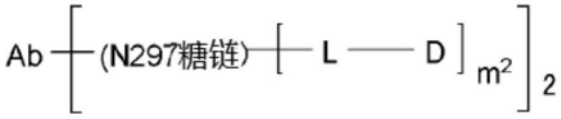
[0653] 本发明的Ab为IgG,优选为IgG1、IgG2或IgG4。

[0654] 已知IgG在其重链的Fc区中的第297号天冬酰胺残基(以下称为“Asn297或N297”)中具有高度保守的N连接型糖链,有助于抗体分子的活性或动态等(Biotechnol.Prog.,2012,28,608-622,Sanglier-Cianferani,S.,Anal.Chem.,2013,85,715-736)。

[0655] IgG恒定区中的氨基酸序列高度保守,在Edelman etal.,(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,Vol.63,No.1(May15,1969),pp.78-85)中,各氨基酸被Eu编号(Eu INDEX)确定。例如,Fc区中N连接型糖链加成的Asn297相当于Eu编号中的297位,即使由于分子片段化或区域缺损而实际的氨基酸位置发生变化,也可通过Eu编号表示而唯一地确定氨基酸。

[0656] 本发明的抗体－药物偶联物中,更优选抗体或其功能性片段从与其Asn297的侧链结合的糖链(以下称为“N297糖链”)与L结合,更优选抗体或其功能性片段从所述N297糖链与L结合,该N297糖链为重构的糖链。

[0657] 下式表示本发明的抗体－药物偶联物中抗体或其功能性片段从所述N297糖链与L结合的情况。

[0658] 

[0659] 予以说明,将具有该重构的糖链的抗体称为糖链重构抗体。

[0660] SGP为Sialyl Glyco Peptide(唾液酸糖肽)的简称,是N连接型复合糖链的代表。可从鸡蛋的蛋黄中根据例如WO2011/0278681所述的方法分离、精制得到SGP。另外,SGP的精

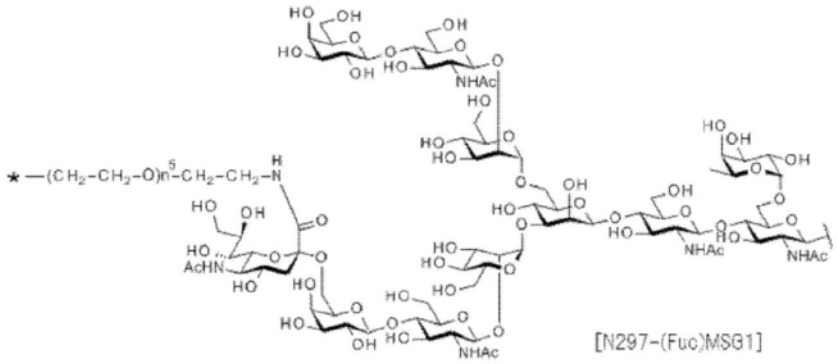
制品有市售(东京化成(株),(株)伏见制药所)可购入。有仅由在SG的糖链部分中缺失了一个还原末端的GlcNAc的糖链(以下称为“SG(10)”)构成的二唾液酸八糖(东京化成(株))等的市售品。

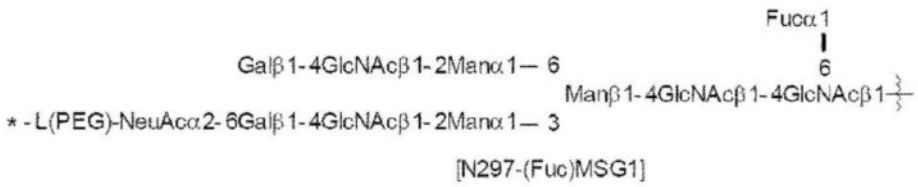
[0661] 本发明中,将仅在SG(10)的β－Man支链中的任意一方缺失了非还原末端的唾液酸的糖链结构称为MSG(9),将仅在支链的1－3糖链具有唾液酸的糖链称为MSG1,将仅在支链的1－6糖链具有唾液酸的糖链称为MSG2。

[0662] 本发明的重构的糖链为N297－(Fuc)MSG1、N297－(Fuc)MSG2或者N297－(Fuc)MSG1与N297－(Fuc)MSG2的混合物、或N297－(Fuc)SG,优选为N297－(Fuc)MSG1、N297－(Fuc)MSG2或N297－(Fuc)SG,更优选为N297－(Fuc)MSG1、N297－(Fuc)MSG2。

[0663] N297－(Fuc)MSG1以下述的结构式或序列式表示。

[0664]



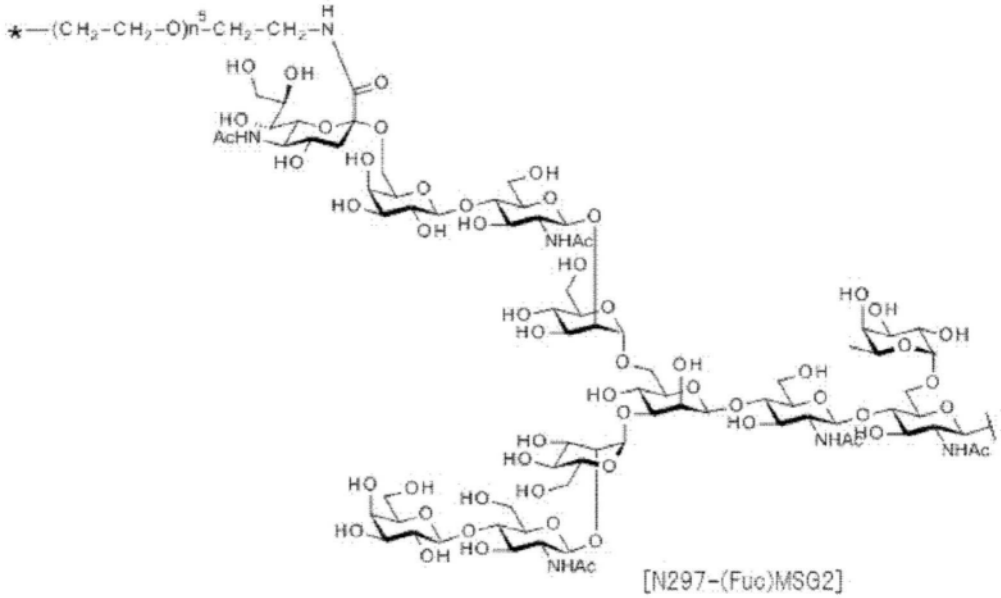


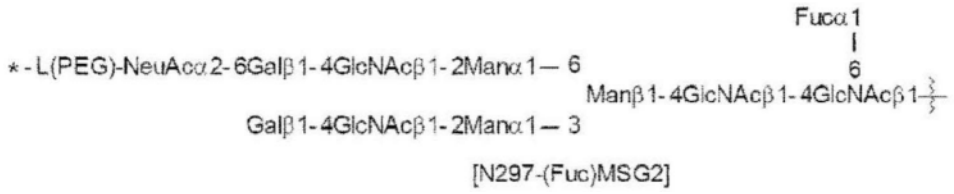
[N297-(Fuc)MSG1]

[0665] 上式中,波浪线表示与抗体的Asn297结合,L(PEG)表示－$(CH_2CH_2－O)n^5－CH_2CH_2－NH$－,右端的氨基表示与N297糖链的β－Man支链的1－3链侧的非还原末端的唾液酸的2位羧酸进行酰胺键合,星号表示与所述连接子L、特别是与连接子L的Lb的1,2,3－三唑环上的1位或3位的氮原子结合,其中,n^5为整数2～10,优选为整数2～5。

[0666] N297－(Fuc)MSG2如以下的结构式或序列式所示。

[0667]



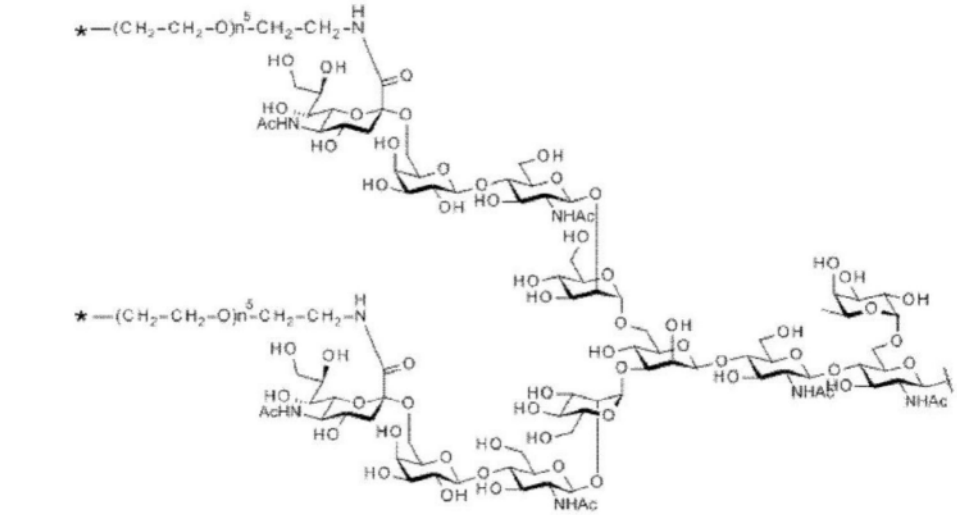


[N297-(Fuc)MSG2]

[0668] 上式中，波浪线表示与抗体的Asn297结合，L(PEG)表示－$(CH_2CH_2-O)n^5-CH_2CH_2-$NH－，右端的氨基表示与N297糖链的β－Man支链的1－6链侧的非还原末端的唾液酸的2位羧酸进行酰胺键合，星号表示与所述连接子L，特别是与连接子L的Lb的1,2,3－三唑环上的1位或3位的氮原子结合，其中，n^5为整数2～10，优选整数2～5。

[0669] N297－(Fuc)SG如以下的结构式或序列式所示。

[0670]





[N297-(Fuc)SG]

[0671] 上式中，波浪线表示与抗体的Asn297结合，L(PEG)表示－$(CH_2CH_2－O)n^5－CH_2CH_2－NH－$，右端的氨基表示与N297糖链的β－Man支链的1－3链侧以及1－6链侧双方的非还原末端的唾液酸的2位羧酸进行酰胺键合，星号表示与所述连接子L、特别是连接子L中的Lb的1，2，3－三唑环上的1位或3位氮原子结合，其中，n^5为整数2～10，优选整数2～5。

[0672] 本发明的抗体－药物偶联物的抗体的N297糖链为N297－(Fuc)MSG1或者N297－(Fuc)MSG2或它们的混合物时，抗体为二聚物，因此，抗体－药物偶联物为结合了2个连接子L以及2个药物D的分子(上述$m^2＝1$)(参照图1)。

[0673] 例如，实施例74中，ADC8是N297糖链为N297－(Fuc)MSG1的情况，实施例67中，ADC1是N297糖链为N297－(Fuc)MSG1以及N297－(Fuc)MSG2的混合物的情况。

[0674] 本发明的抗体－药物偶联物的抗体的N297糖链为N297－(Fuc)SG时，由于抗体为二聚物，因此，抗体－药物偶联物为结合了4个连接子L以及4个药物D的分子(上述$m^2＝2$)。例如，实施例72中，ADC6是N297糖链为N297－(Fuc)SG的情况。

[0675] N297糖链优选为N297－(Fuc)MSG1或者N297－(Fuc)MSG2或N297－(Fuc)SG，更优选为N297－(Fuc)MSG1或者N297－(Fuc)MSG2。

[0676] 本发明的抗体－药物偶联物中的抗体的N297糖链为N297－(Fuc)MSG1或者N297－(Fuc)MSG2或N297－(Fuc)SG时，可获得均匀的ADC。

[0677] 本发明提供包括以下i)～iii)工序的重构抗体或该抗体的功能性片段的制造方法。

[0678] i)培养所述[46]～[48]中任一项所述的宿主细胞(例如动物细胞(CHO细胞等))，从得到的培养物采集目标抗体的工序，ii)用水解酶处理工序i)中得到的抗体，制造N297糖链为(Fucα1，6)GlcNAc的抗体((Fucα1，6)GlcNAc－抗体)的工序(图3A)，更优选还包括：通过包括利用羟基磷灰石柱对该反应液进行精制的工序而对(Fucα1，6)GlcNAc－抗体进行精

制的工序,以及,iii)－1或iii)－2中的任意一个工序(图3B)。

[0679] iii)－1在糖基转移酶存在下使(Fucα1,6)GlcNAc－抗体与糖链供体分子反应,合成在唾液酸导入了叠氮基的糖链重构抗体的工序,所述糖链供体分子是在MSG(9)或SG(10)的唾液酸的2位羧酸的羰基导入具有叠氮基的PEG连接子(N_3－L(PEG)),将还原末端进行噁唑啉化而得的。

[0680] iii)－2在糖基转移酶存在下使(Fucα1,6)GlcNAc－抗体与糖链供体分子反应,合成在唾液酸导入了叠氮基的糖链重构抗体的工序,所述糖链供体分子是在α－氨基可被保护或修饰的(MSG－)Asn或(SG－)Asn的唾液酸的2位羧酸的羰基以及所述Asn的羧酸的羰基导入具有叠氮基的PEG连接子(N_3－L(PEG)),使水解酶作用后,将还原末端进行噁唑啉化而得的。

[0681] 另外,由上述制造方法得到的糖链重构抗体或其功能性片段或它们的修饰体也包含在本发明中。

[0682] 所述本抗体－药物偶联物的制造中间体具有DBCO(Dibenzocyclooctyne:二苯基环辛炔)等与叠氮基反应的炔烃结构。因此,通过使该制造中间体与在所述i)～iii)工序中得到的糖链的唾液酸导入了具有叠氮基的PEG连接子后的MSG1型、MSG2型或SG型糖链重构抗体或该抗体的功能性片段反应,可制造本发明的抗体－药物偶联物。

[0683] 本发明的N297糖链中,还原末端的添加了岩藻糖的GlcNAc(Fucα1,6)GlcNAc)来自动物细胞所产生的抗体,由此,非还原末端侧的糖链优选为重构成与上述MSG(MSG1,MSG2)或SG同样的糖链结构。在任一种情况下,均利用与该非还原末端的唾液酸2位结合的羧酸与L(PEG)结合。

[0684] 这样的具有MSG(MSG1,MSG2)或SG型N297糖链的糖链重构抗体可根据例如WO2013/120066等记载的方法并利用图3所示的方法进行制造。根据公知的方法使用动物细胞作为宿主,以基因重组蛋白的形式产生抗体时(上述工序i),虽然N297糖链具有添加岩藻糖的N连接型糖链结构作为基本结构,但得到的是具有在非还原末端的结构或构成糖被进行了各种修饰后的各种结构所形成的糖链的抗体或其片段的混合物(图3A的IV)。由此,动物细胞所产生的抗体通过EndoS等水解酶进行处理,还原末端的壳二糖结构的GlcNAcβ1－4GlcNAc之间的糖苷键被水解,得到具有仅具有(Fucα1,6)GlcNAc作为N297糖链的单一糖链结构的抗体分子(称为“(Fucα1,6)GlcNAc－抗体”,参照图2的A)(图3A)(上述工序ii))。

[0685] 作为使用于N297糖链的水解反应的酶,可使用EndoS或保持其水解活性的变异酶等。

[0686] 以上述水解反应得到的(Fucα1,6)GlcNAc－抗体作为糖链受体分子,使用EndoS D233Q或EndoS D233Q/Q303L突变体之类的糖基转移酶(WO2017010559等),使其与MSG(MSG1、MSG2)或SG型糖链供体分子反应,由此可得到具有包含上述结构的MSG(MSG1,MSG2)或SG型N297糖链的抗体(参照图2的B)(图3B)(上述工序iii)－1、iii)－2)。

[0687] 抗体－药物偶联物中的每一分子抗体的药物结合数m^2为1时,可采用具有MSG、MSG1或MSG2作为糖链的糖链供体分子。这样的糖链可采用以市售的monosialo－Asn free(1S2G/1G2S－1ONC－Asn,(株)糖链工程研究所,以下“称为(MSG－)Asn”)作为原料,再根据实施例56所述的方法分离(MSG－)Asn1或(MSG2－)Asn后使用,也可不进行分离直接以混合物的形式使用。

[0688] 抗体－药物偶联物中的每一分子抗体的药物结合数m^2为2时，在该糖转移反应中使用具有SG(10)作为糖链的糖链供体分子。此类SG(10)糖链可使用例如由SGP通过水解而得到的糖链，也可使用市售的二唾液酸八糖(东京化成工业(株))之类的SG(10)糖链。

[0689] 供体分子中含有的MSG(MSG1、MSG2)或SG型糖链在其唾液酸的2位具有含有叠氮基的PEG连接子(N_3－L(PEG))。在唾液酸的2位导入具有叠氮基的PEG连接子(N_3－L(PEG))可使用在有机合成科学领域中公知的反应(缩合反应)使MSG(MSG(9))、MSG1或者MSG2或二唾液酸八糖(SG(10))与作为具有叠氮基的PEG连接子(N_3－L(PEG))的N_3－(CH_2CH_2－O)n_5－CH_2CH_2－NH_2(n_5为整数2～10，优选整数2～5。)反应。即，导向唾液酸2位的羧酸与N_3－(CH_2CH_2－O)n_5－CH_2CH_2－NH_2的右末端的氨基通过缩合反应形成酰胺键。

[0690] 另外，MSG(MSG1、MSG2)或SG型糖链可以通过在例如α－氨基可被保护或修饰的(MSG1－)Asn、(MSG2－)Asn或(SG－)Asn(糖链工程研究所)等原料的唾液酸的2位羧酸以及所述Asn的羧酸，利用缩合反应导入具有叠氮基的PEG连接子(N_3－(CH_2CH_2－O)n_5－CH_2CH_2－NH_2)，再使EndoM或EndoRp之类的水解酶作用来获得(上述iii)－2)。作为α－氨基的保护基，可举出乙酰(Ac)基、叔丁氧基羰(Boc)基、苯甲酰基(Bz)、苄基(Bzl)基、苄氧羰基(Carbobenzoxy)(Cbz)基、9－芴基甲氧基羰基(9－Fluorenylmethoxycarbonyl)(Fmoc)基等，但并不限定于此。α－氨基的保护基优选Fmoc基。

[0691] 作为α－氨基的修饰基，可举出羟乙酰基、或具有PEG结构等改善了水溶性的修饰基。

[0692] (MSG1－)Asn、(MSG－2)Asn或(SG－)Asn优选为α－氨基被所述保护基保护。α－氨基被保护基(例如Fmoc基)保护时，可根据需要在导入具有叠氮基的PEG连接子后，在水解酶发挥作用前除去保护基。

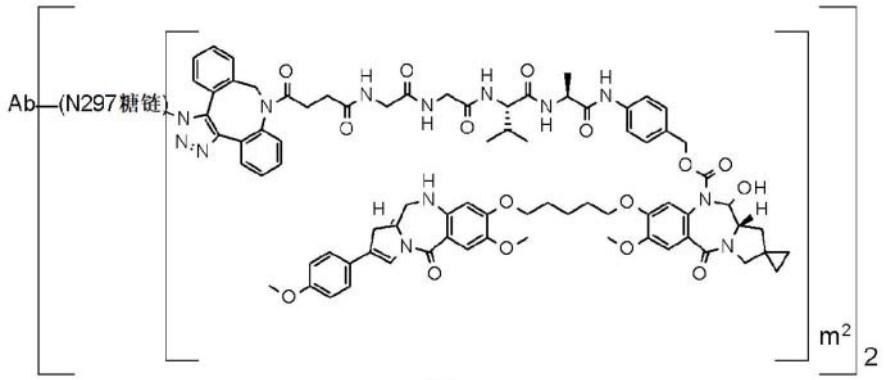
[0693] 分子中含有的MSG(MSG1、MSG2)或SG型糖链的还原末端的GlcNAc优选通过例如用2－氯－1,3－二甲基－1H－苯并咪唑－3－鎓盐酸盐处理而噁唑啉化此类的形式活化后的物质。

[0694] 作为在糖转移反应中使用的酶(糖基转移酶)，只要具有使复合型糖链转移成N297糖链的活性即可使用各种各样的酶，优选将EndoS的第233号Asp取代为Gln从而抑制了水解反应的修饰体EndoS D233Q。使用EndoS D233Q的糖转移反应记载于WO2013/120066等。另外，也可使用对EndoS D233Q进一步施加变异后的EndoS D233Q/Q303L之类的修饰体酶(WO2017010559)。

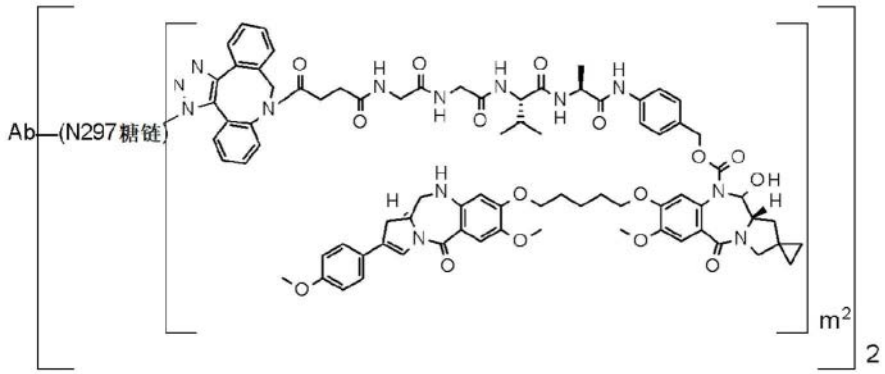
[0695] 抗体的糖链重构(糖水解以及糖链转移反应)后的抗体的精制操作旨在于反应中使用的低分子化合物以及酶的分离，该精制可使用通常的凝胶过滤色谱法、离子交换色谱法、亲和色谱法等，也可进一步使用羟基磷灰石柱进行追加精制。即，本发明提供一种药物－偶联物的制造方法，从抗体的糖水解后的反应液精制中间体的工序中还包括利用羟基磷灰石柱进行的精制工序。根据糖链重构报告例(J.Am.Chem.Soc.2012,134,12308－12318.,Angew.Chem.Int.Ed.2016,55,2361-2367)，用水解酶处理抗体后的反应液仅使用蛋白质A柱(亲和色谱法柱)进行精制，但是判明了这种精制方法不能完全除去水解酶(EndoS等)，由于残留酶的影响会导致对下一个糖转移反应产生影响。在此，研究精制法的结果表明，将利用水解酶处理了抗体的反应液依照蛋白质A柱、羟基磷灰石柱(CHT柱，Bio-Rad Laboratories,Inc.)的顺序进行精制，由此残留酶的影响消失，提高下一次糖链转移

反应的反应效率。

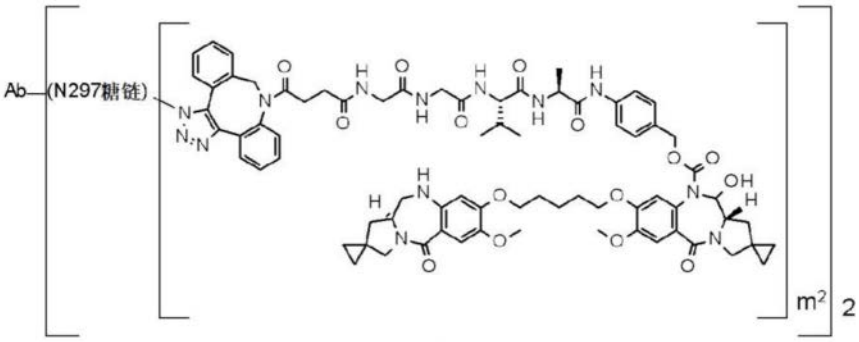
[0696] 本发明的抗体－药物偶联物最优选为选自下述组中的1种抗体－药物偶联物。

[0697] 

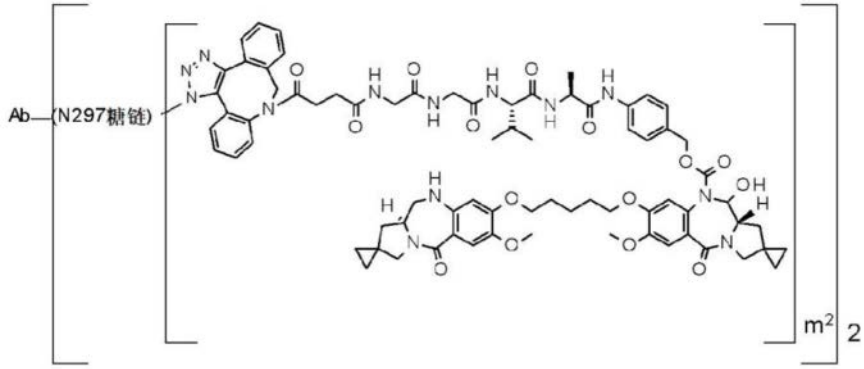
[0698] 或者



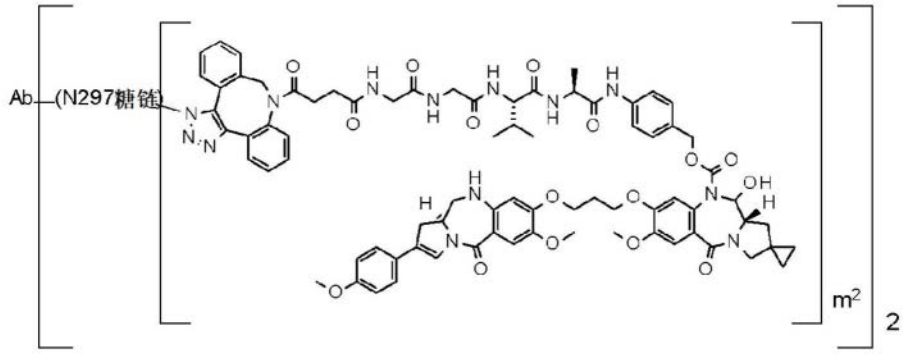
[0699] ，



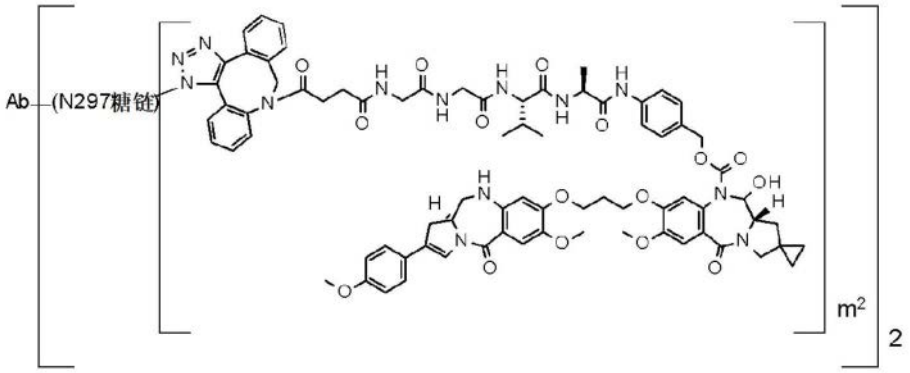
[0700] 或者

[0701] 

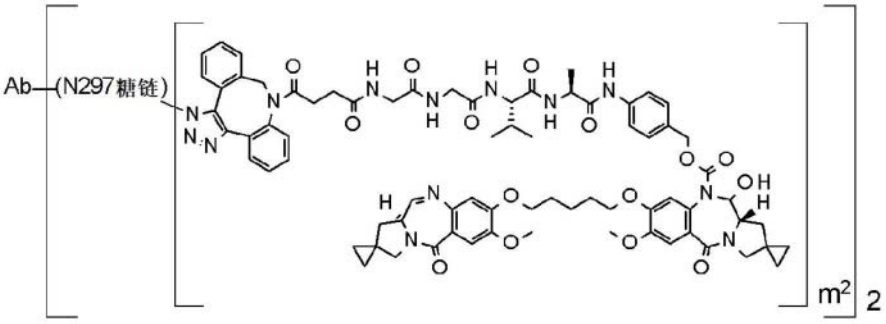
，

[0702] 

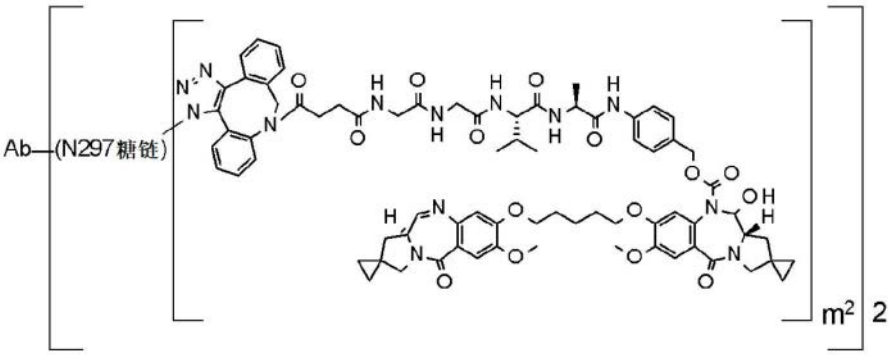
[0703] 或者



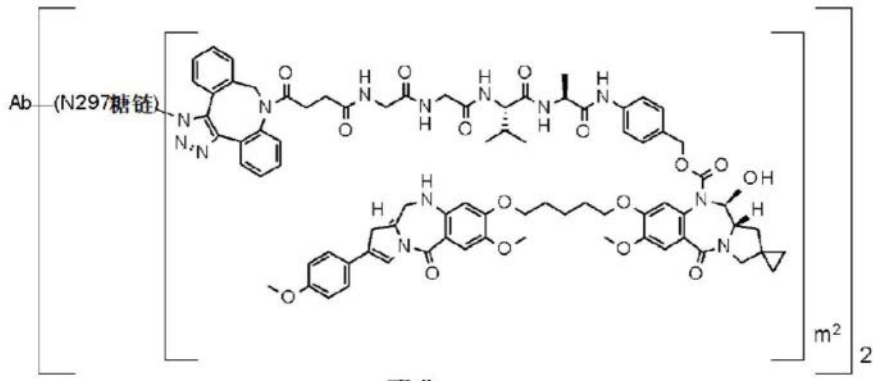
[0704] ，



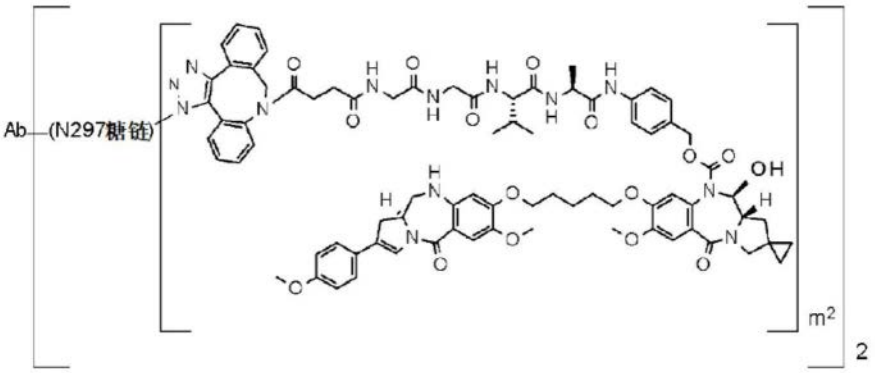
[0705] 或者

[0706] 

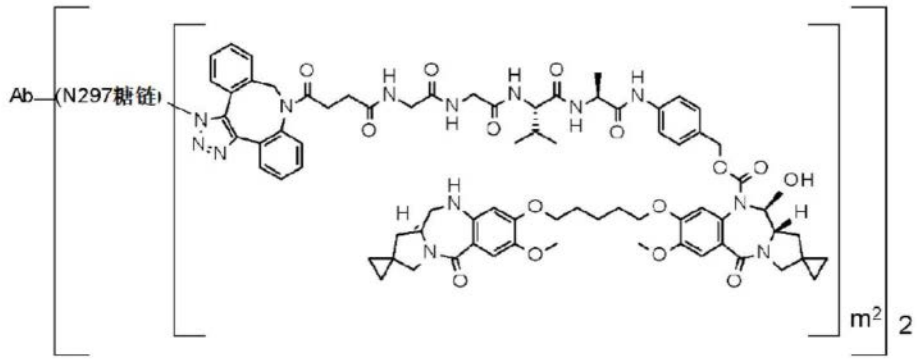
，

[0707] 

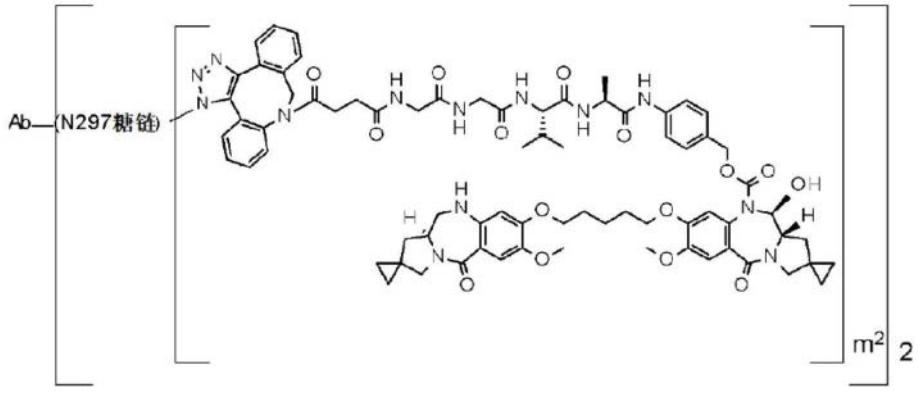
[0708] 或者



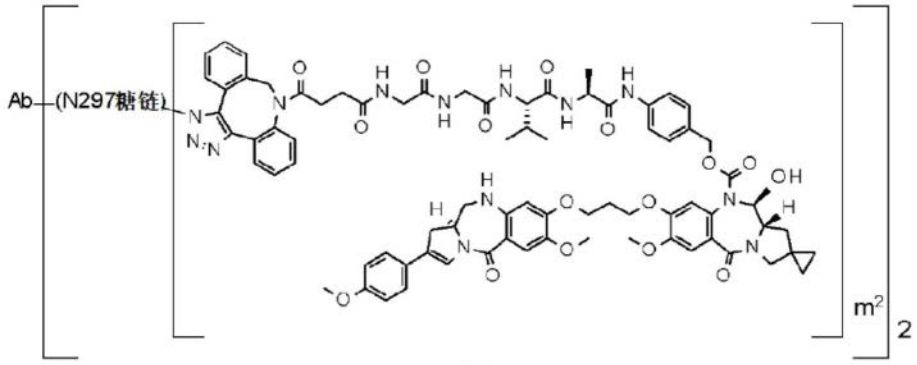
[0709] ，



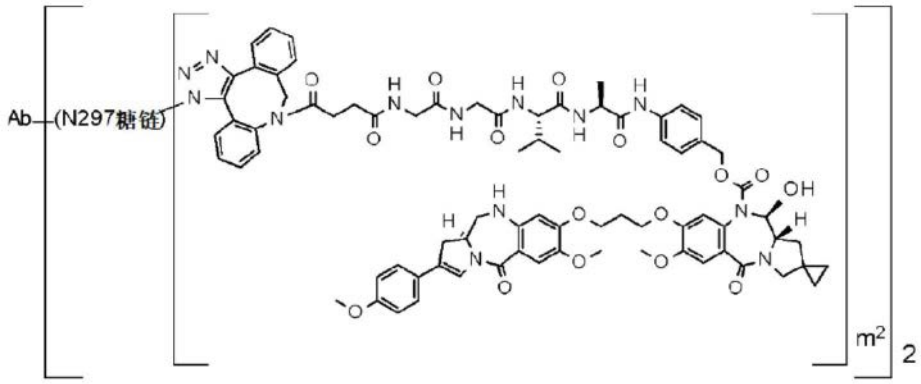
[0710] 或者

[0711] 

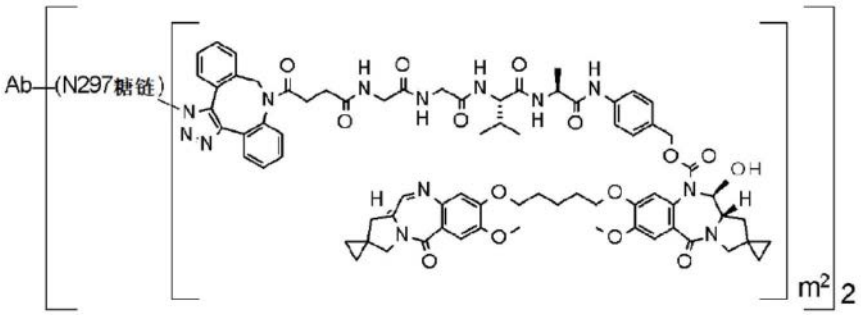
，

[0712] 

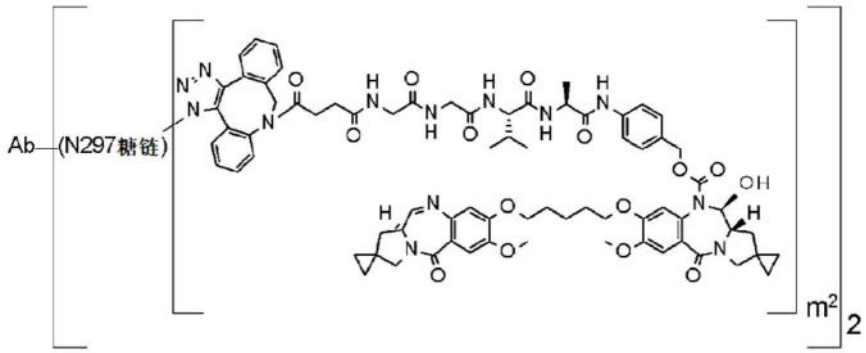
[0713] 或者

[0714] 

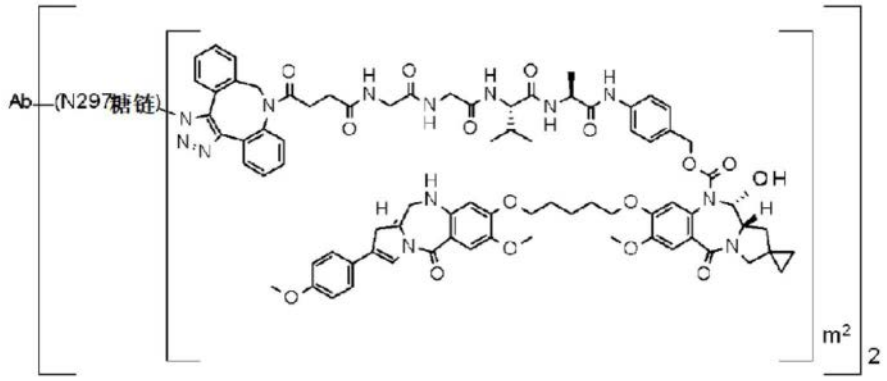
,



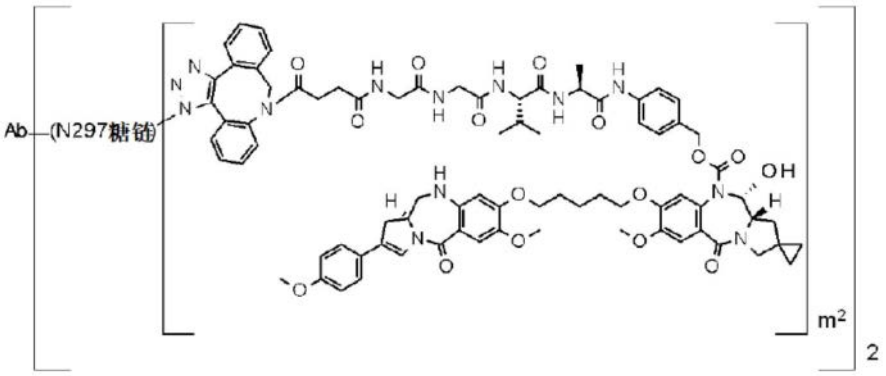
[0715] 或者

[0716] 

,

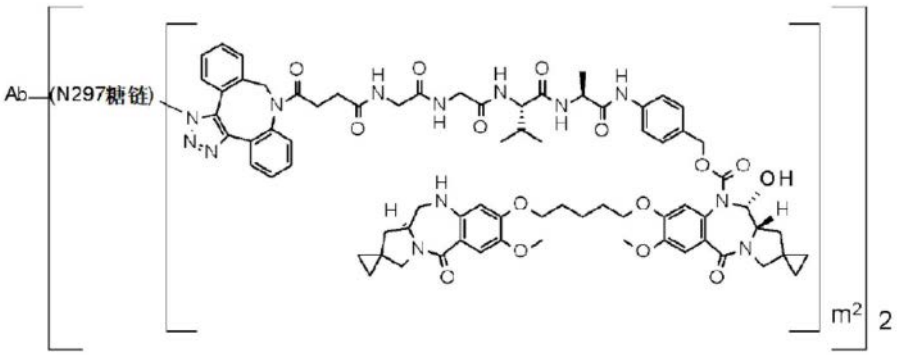
[0717] 

[0718] 或者



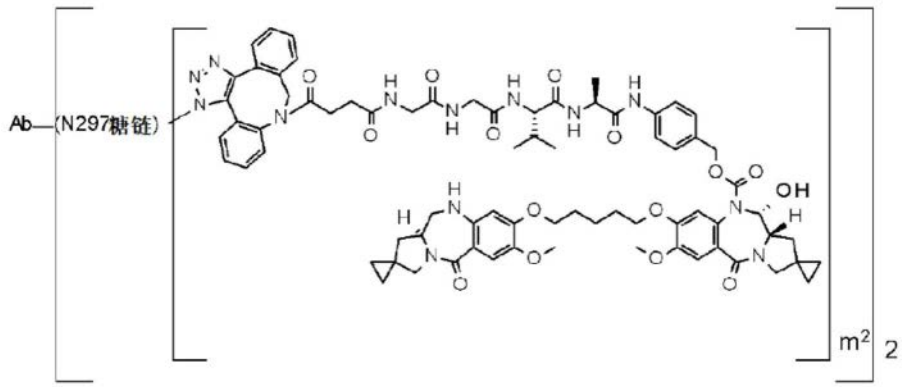
,

[0719]

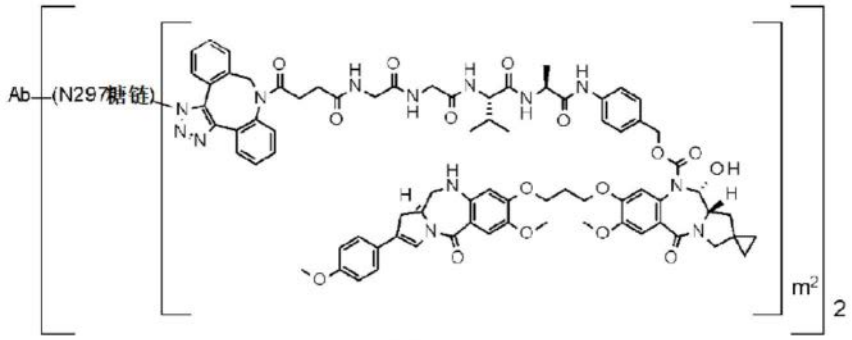


[0720] 或者

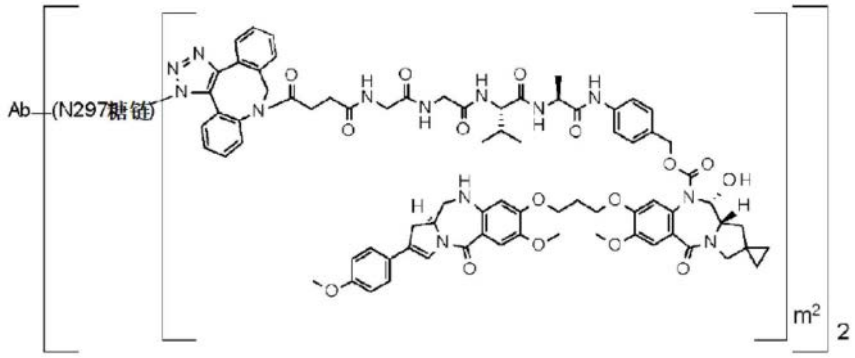
[0721]



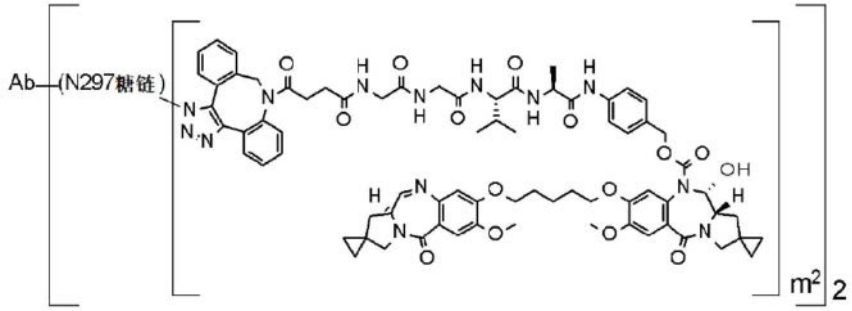
,

[0722] 

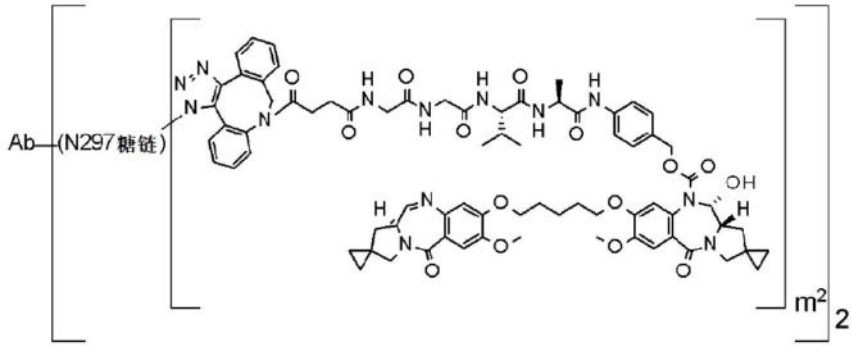
[0723] 或者

[0724] 

或者，

[0725] 

[0726] 或者

[0727] 

[0728] 上述所示的各结构式中，m^2表示1或2(优选m^2为1)。抗体Ab为IgG抗体(优选IgG1、IgG2、IgG4，更优选IgG1)或其功能性片段，N297糖链表示N297－(Fuc)MSG1、N297－(Fuc)MSG2或者它们的混合物或N297－(Fuc)SG(优选N297－(Fuc)MSG1)中的任意一种，L(PEG)表示－NH－CH_2CH_2－(O－CH_2CH_2)$_3$－*，左端的氨基表示与N297糖链的β－Man支链的1－3链侧或/和1－6链侧(优选1－3链侧)的非还原末端的唾液酸的2位羧酸进行酰胺键合，星号表示

与所述连接子L的Lb的三唑环上的1位或3位氮原子结合。

[0729] 为了方便，作为上述最优选的抗体－药物偶联物，记载有在一分子偶联物体中具有2个或4个(m^2＝1或2)“N297糖链与L中的Lb的三唑环上的1位氮原子结合的『－(N297糖链)－L－D』(『(N297糖链)－(N1Lb)L－D』)，或者具有2个或4个(m^2＝1或2)“与3位的氮原子结合的『－(N297糖链)－L－D』(『(N297糖链)－(N3Lb)L－D』)”的结构，但是，也包括在一分子偶联物体中具有『(N297糖链)－(N1Lb)L－D』(m^2＝1时为1个，m^2＝2时为1、2、3个)以及『(N297糖链)－(N3Lb)L－D』(m^2＝1时为1个，m^2＝2时为3、2、1个)这两者的抗体－药物偶联物。即，一分子偶联物体中存在『(N297糖链)－(N1Lb)L－D』或『(N297糖链)－(N3Lb)L－D』中的任意一个或者两者混合存在。

[0730] 进而，Ab优选为抗CLDN6抗体、抗CLDN6/CLDN9抗体、抗HER2抗体、抗DLL3抗体、抗FAP抗体、抗CDH11抗体、抗A33抗体、抗CanAg抗体、抗CD19抗体、抗CD20抗体、抗CD22抗体、抗CD30抗体、抗CD33抗体、抗CD56抗体、抗CD70抗体、抗CD98抗体、抗TROP2抗体、抗CEA抗体、抗Cripto抗体、抗EphA2抗体、抗FGFR2抗体、抗G250抗体、抗MUC1抗体、抗GPNMB抗体、抗Integrin抗体、抗PSMA抗体、抗Tenascin－C抗体、抗SLC44A4抗体、抗Mesothelin抗体、抗EGFR抗体、抗DR5抗体，更优选为抗CLDN6抗体、抗CLDN6/CLDN9抗体、抗HER2抗体、抗CD98抗体、抗TROP2抗体，进一步优选为所述抗CLDN6抗体(例如实施例106、107、108、109)、抗HER2抗体(例如曲妥珠单抗、曲妥珠单抗突变体)。

[0731] 本发明的抗体－药物偶联物以及本发明的抗CLDN6抗体或者抗HER2抗体－药物偶联物显示强的肿瘤活性(in vivo抗肿瘤活性、in vitro抗细胞活性)、良好的体内动态以及物性，且安全性高，因此作为药物是有用的。

[0732] 本发明的抗体－药物偶联物、其游离药物或其制造中间体有时也存在立体异构体或来自不对称碳原子的光学异构体、几何异构体、互变异构体或d体、l体、旋光异构体等光学异构体，这些异构体、光学异构体以及它们的混合物均包含在本发明中。本发明的PBD衍生物(V)或(VI)在11’位存在不对称碳，因此存在光学异构体。本说明书中，这些异构体以及这些异构体的混合物均由单个通式，即通式(V)或(VI)表示。因此，(V)或(VI)包括所有光学异构体以及光学异构体以任意比例混合的混合物。(V)或(VI)的11’位的绝对构型可通过结晶产物或中间体或者它们的衍生物的X射线结晶结构分析或诸如Mosher法等NMR来确定。此时，可使用经具有已知立体构型的不对称中心的试剂衍生而来的结晶产物或中间体来确定绝对立体构型。如果需要，可使用常规的光学拆分法或分离方法分离所合成的本发明的化合物来获得立体异构体。

[0733] 本发明的抗体－药物偶联物中，与1个抗体分子结合的药物结合数是影响其有效性、安全性的重要因素。抗体－药物偶联物的制造是通过规定反应的原料/试剂的使用量等反应条件以使药物的结合数为恒定而实施的，但是与低分子化合物的化学反应不同，通常得到的是不同数目的药物结合而成的混合物。每一分子抗体的药物结合数以平均值，即平均药物结合数(DAR:Drug to Antibody Ratio药物与抗体比率)来确定。吡咯并苯并二氮杂卓类衍生物向抗体分子的结合数可控制，作为每个抗体的药物平均结合数(DAR)可结合1～10个范围的吡咯并苯并二氮杂卓类衍生物，优选1～8个，更优选1～5个。

[0734] 本发明的抗体－药物偶联物中，抗体从抗体的重构后的糖链与L结合时，抗体－药物偶联物的每个抗体分子的药物结合数m^2为1或2的整数。该糖链为N297糖链，糖链为

N297－(Fuc)MSG1、N297－(Fuc)MSG2或N297－(Fuc)MSG1与N297－(Fuc)MSG2的混合物时，m^2为1，DAR为1～3的范围(优选1.0～2.5的范围，更优选1.2～2.2的范围)。N297糖链为N297－(Fuc)SG时，m^2为2，DAR为3～5的范围(优选3.2～4.8的范围，更优选3.5～4.2的范围)。

[0735] 予以说明，本领域技术人员可根据本申请实施例的记载来设计抗体与所需数量的药物结合的反应，从而获得控制了吡咯并苯并二氮杂卓类衍生物的结合数的抗体。

[0736] 予以说明，本发明的抗体－药物偶联物、游离药物或制造中间体放置在大气中或者发生再结晶等，有时会吸收水分、附着有吸附水或者形成水合物，因此，这些含水的化合物和盐也包含在本发明中。

[0737] 本发明的抗体－药物偶联物、游离药物或制造中间体在具有氨基等碱性基时，可根据需要制成药学上允许的盐。作为这些盐，可举出例如盐酸盐、氢碘酸盐等氢卤酸盐；硝酸盐、高氯酸盐、硫酸盐、磷酸盐等无机酸盐；甲磺酸盐、三氟甲磺酸盐、乙磺酸盐等低级链烷磺酸盐；苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐等芳基磺酸盐；甲酸、乙酸、苹果酸、富马酸盐、琥珀酸盐、柠檬酸盐、酒石酸盐、草酸盐、马来酸盐等有机酸盐；以及鸟氨酸盐、谷氨酸盐和天冬氨酸盐等氨基酸盐。

[0738] 本发明的抗体－药物偶联物、游离药物或制造中间体具有羧基等酸性基时，通常可形成碱加成盐。作为药学上允许的盐，可举出例如钠盐、钾盐和锂盐等碱金属盐；钙盐、镁盐等碱土金属盐；铵盐等无机盐；二苄胺盐、吗啉盐、苯基甘氨酸烷基酯盐、乙二胺盐、N－甲基葡萄糖胺盐、二乙胺盐、三乙胺盐、环己胺盐、二环己胺盐、N,N'－二苄基乙二胺盐、二乙醇胺盐、N－苄基－N－(2－苯基乙氧基)胺盐、哌嗪盐、四甲基铵盐、三(羟甲基)氨基甲烷盐等有机胺盐等。

[0739] 本发明的抗体－药物偶联物、游离药物或制造中间体也可通过吸收空气中的水分等以水合物的形式存在。作为本发明的溶剂合物，只要是药物上允许的则没有特别的限定，但具体而言优选水合物、乙醇合物、2－丙醇合物等。另外，本发明的抗体－药物偶联物、游离药物或制造中间体中存在氮原子时，可形成N－氧化物体，这些溶剂合物和N－氧化物体也包含在本发明的范围内。

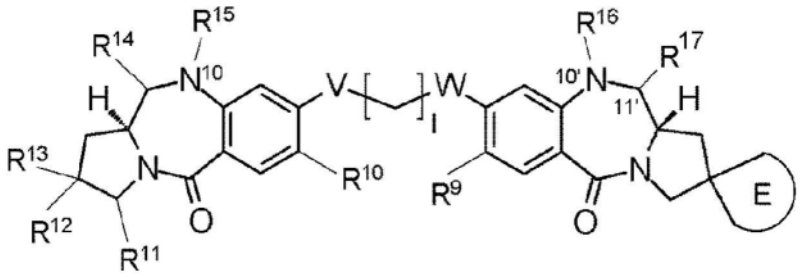
[0740] 另外，本发明也包括被各种放射性或非放射性同位素标记后的化合物。构成本发明的抗体－药物偶联物、游离药物或制造中间体的一个以上的原子也可含有非天然比例的原子同位素。作为原子同位素，例如可举出氘(^{2}H)、氚(^{3}H)、碘－125(^{125}I)或碳－14(^{14}C)等。另外，本发明化合物也可用例如氚(^{3}H)、碘－125(^{125}I)或碳－14(^{14}C)之类的放射性同位素进行放射性标识。放射性标识的化合物可用作治疗或预防剂、研究试剂(例如测定试剂)以及诊断试剂(例如体内诊断显像剂)。本发明的抗体－药物偶联物的所有同位素变体不管是否具有放射性，都包括在本发明的范围内。

[0741] [制造方法]

[0742] 接着，对本发明的抗体－药物偶联物以及游离药物或者它们的制造中间体的代表性制造方法进行说明。予以说明，以下为了表示化合物使用各反应式中所示的化合物序号。即，称为『式(1)的化合物』、『化合物(1)』等。另外，上述以外的序号的化合物也同样记载。

[0743] 1.制造方法1

[0744] 本发明的化合物(1)可根据以下记载的A法～Q法进行制造。

[0745] 

（1）

[0746] A法～M法为本发明的抗体－药物偶联物中的制造中间体的制造方法。

[0747] N法～Q法为本发明的游离药物的制造法。

[0748] 下述A法～Q法的各工序可使用公知的有机化学方法进行所需的反应。

[0749] 下述A法～Q法的各工序的反应中所使用的溶剂只要不阻碍反应，不对反应造成不好的影响，且能够某种程度上溶解起始原料，就没有特别的限定。

[0750] 下述A法～Q法的各工序的反应中，反应温度根据溶剂、起始原料、试剂等而不同，反应时间根据溶剂、起始原料、试剂、反应温度而不同。

[0751] 下述A法～Q法的各工序的反应中，反应结束后，各目标化合物根据常用的方法从反应混合物中获得。例如，适当地中和反应混合物，以及存在不溶物时通过过滤除去后，加入乙酸乙酯之类的与水不混合的有机溶剂后，分离含有目标化合物的有机层，再用水等清洗后，用无水硫酸镁、无水硫酸钠等进行干燥过滤后，蒸馏除去溶剂来得到。所得到的目标化合物必要时可通过常用的方法例如再结晶、再沉淀、色谱法(例如组合使用硅胶、氧化铝、镁－硅胶系的硅酸镁、SO_3H－二氧化硅(Fuji Silysia制造)之类的使用载体的吸附柱色谱法;Sephadex LH－20(Pharmacia公司制造)，Amberlite XAD－11(Rohm and Haas公司制造)、Diaion HP－20(三菱化学公司制造)之类的载体的分配柱色谱法等使用合成吸附剂的方法;使用离子交换色谱法的方法;使用硅胶或者烷基化硅胶的正相/反相柱色谱法(优选高效液相色谱法)进行适宜组合，用合适的洗脱剂进行洗脱)等通常在有机化合物的分离精制中常用的方法适当组合进行分离和精制。对于不溶于溶剂的目标化合物，可用溶剂将得到的固体的粗产物进行清洗来精制。另外，各工序的目标化合物也可不经过精制直接用于接下来的反应中。

[0752] 下述A法～Q法的各工序的反应中，J、La’、Lp’、B’、E、V、W、R^9、R^{10}、R^{11}、R^{12}、R^{13}、R^{14}、R^{15}、R^{16}、R^{17}、l、n^7、n^6、m^1表示与上述相同的含义。(Lp’)’表示－VA－、－FG－、－PI－、－VCit－、－VK－、－(D－)PI－、－PL－、－(D－)VA－、－GF－所示的任意一个二肽残基。(R^{13})’在R^{13}的取代基上含有羟基、氨基时可使用保护基，在没有保护基的情况下表示R^{13}。(R^{17})’表示利用叔丁基二甲基硅烷氧基等保护基保护了羟基后的状态或R^{17}中的任一种。

[0753] PRO^1、PRO^4、PRO^6、PRO^8、PRO^9表示氨基的保护基。优选PRO^1、PRO^4、PRO^8、PRO^9为烯丙氧基羰基、2,2,2－三氯乙氧基羰基、三甲基硅烷基乙氧基甲氧基、苄基氧基羰基或9－芴基甲氧基羰基等。另外，PRO^6优选2－(三甲基硅烷基)乙氧基甲基、甲氧基甲基等。

[0754] 另外，PRO^2、PRO^3、PRO^5、PRO^7、PRO^{10}、PRO^{11}、PRO^{12}表示有机合成化学领域中使用的羟基、酚基或羧基的保护基。优选乙酰基、苄基、叔丁基二甲基硅烷基(TBDMS)或三异丙基硅烷基或叔丁基。

[0755] X^2表示有机合成化学的领域中使用的脱离基。优选氯原子、溴原子、碘原子、甲磺

酰基，对甲苯磺酰基。

[0756] R^a、R^c表示与羧基结合的取代基，优选甲基、乙基、苄基、叔丁基等。

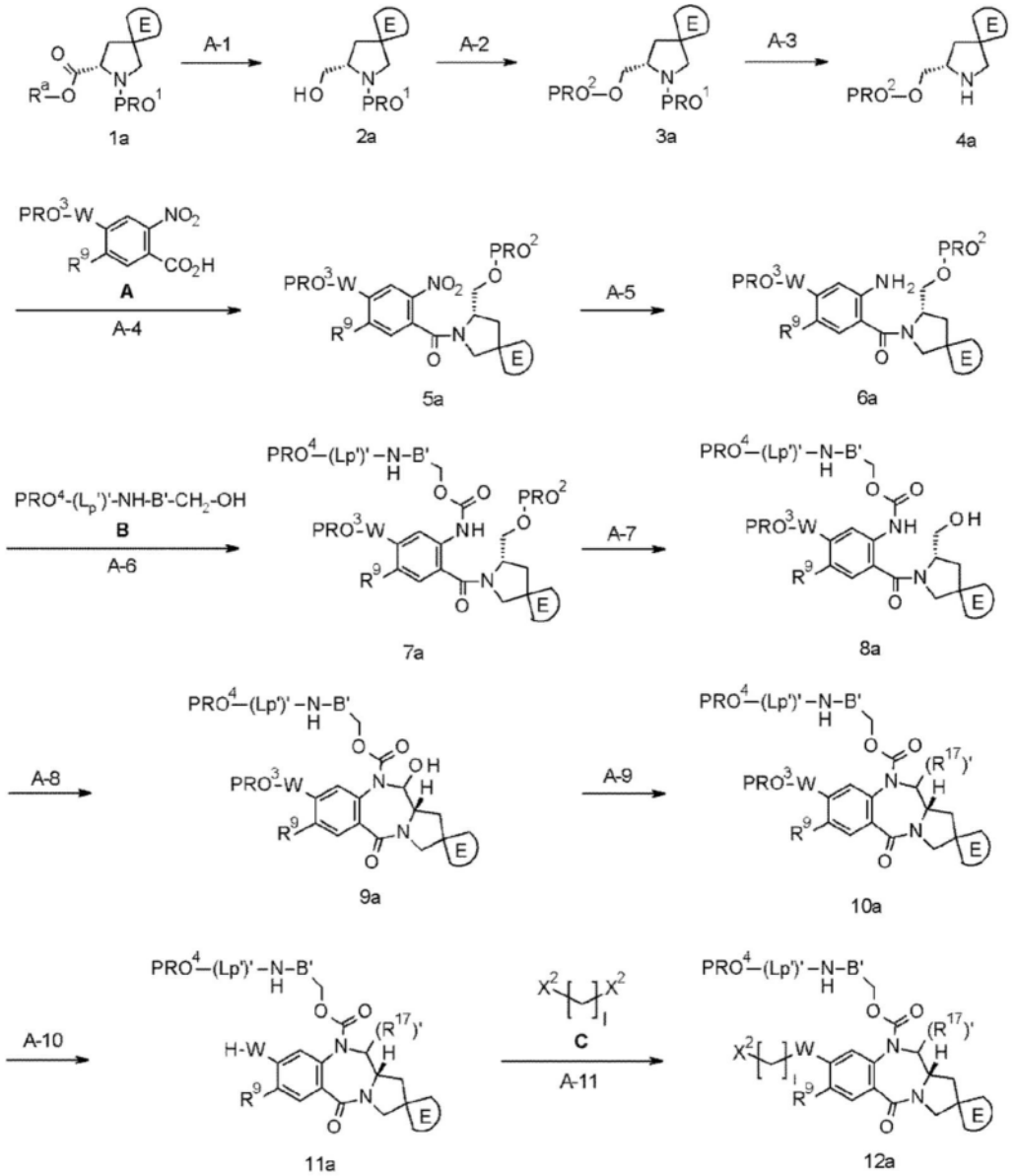
[0757] R^b表示形成烯醇磺酸盐的脱离基，优选三氟甲磺酰基等。

[0758] 另外，A法至Q法中没有明确指定关于保护的氨基、羟基可根据需要使用保护基进行保护。另外，也可根据需要脱保护，也可在保护后进行脱保护并更换另一种保护基。

[0759] A法

[0760] 本制造方法为制造用于制造化合物(1)所需的合成中间体、化合物(12a)的方法。

[0761]



[0762] A－1工序(1a)→(2a)：还原反应

[0763] 在溶剂(二乙醚、四氢呋喃(THF)、二氯甲烷、乙醇等或它们的混合溶剂)中，从－78℃到反应所使用的溶剂的沸点之间，优选在－78℃～50℃的温度下，使用还原剂(氢化铝锂、二硼烷、硼氢化锂、硼氢化钠、硼烷－四氢呋喃配合物或氢化双(2－甲氧基乙氧基)铝钠等)处理化合物(1a)来进行还原反应。还原剂使用相对于化合物(1a)为1摩尔～过量摩尔，优选1～5摩尔。根据需要加入路易斯酸(氯化锂、氯化钙、氯化锡、三氟硼烷醚配合物等)进

行。反应时间为1分钟～60小时，优选5分钟～24小时。

[0764] A－2工序(2a)→(3a)：保护基导入(叔丁基二甲基硅烷基等)

[0765] PRO^2为TBDMS基时，在溶剂(二氯甲烷、乙腈、四氢呋喃、N,N－二甲基甲酰胺(DMF)等或它们的混合溶剂)中，在－20℃～120℃，优选0℃～100℃的温度下，使化合物(2a)与硅烷化试剂(氯化叔丁基二甲基硅烷、三氟甲磺酸叔丁基二甲基硅烷酯等)反应来实施。根据需要加入碱(咪唑、吡啶、2,6－二甲基吡啶、4－二甲基氨基吡啶、氢化钠等)进行。相对于化合物(2a)1摩尔，硅烷化剂使用1摩尔～过量摩尔，优选1～5摩尔，碱使用1摩尔～过量摩尔，优选1～5摩尔。反应时间为1分钟～72小时，优选5分钟～24小时。

[0766] A－3工序(3a)→(4a)：脱保护基化反应

[0767] PRO^1为苄氧基羰基时，在溶剂(乙醇、丙醇、甲醇、乙酸乙酯、THF、1,4－二噁烷等或它们的混合溶剂)中，在过渡金属催化剂(钯碳等)存在下，在0℃到反应所使用的溶剂的沸点之间优选在0℃～50℃的温度下，使化合物(3a)进行催化氢化来实施。通常在氢气氛下进行，但是根据需要可使用环己烯、1,4－环己二烯等作为氢供体。反应时间为10分钟～100小时，优选30分钟～72小时。

[0768] A－4工序(4a)→(5a)：缩合反应

[0769] 在溶剂(苯、甲苯、二乙醚、二氯甲烷、THF、DMF、水等或它们的混合溶剂)中，在－30℃到反应所使用的溶剂的沸点之间，优选在0℃～50℃的温度下，在N,N－二环己基碳二亚胺、1－乙基－3－(3－二甲基氨基丙基)碳二亚胺、O－(7－氮杂苯并三唑－1－基)－N,N,N',N'－四甲基脲鎓六氟硼酸盐、N－乙氧基羰基－2－乙氧基－1,2－二氢喹啉、4－(4,6－二甲氧基－1,3,5－三嗪－2－基)－4－甲基吗啉鎓盐酸盐等缩合剂的存在下，使化合物(4a)与羧酸(化合物(A))反应来进行。关于缩合剂，相对于化合物(4a)1摩尔，羧酸(化合物(A))使用0.3～5摩尔，优选使用0.4～2摩尔，缩合剂使用1摩尔～过量摩尔，优选使用1～5摩尔。另外，根据需要可加入碱(三乙胺、二异丙基乙胺、N－甲基吗啉、4－二甲基氨基吡啶等)以及添加剂(1－羟基苯并三唑、1－羟基－7－氮杂苯并三唑等)进行。碱相对于化合物(4a)1摩尔使用催化量～过量摩尔，优选使用0.2～3摩尔。添加剂相对于化合物(4a)1摩尔使用催化量～过量摩尔，优选使用0.01～3摩尔。反应时间为10分钟～72小时，优选30分钟～24小时。

[0770] 另外，使羧酸(化合物(A))进行缩合反应形成酰卤化物时，在溶剂(苯、甲苯、二乙醚、二氯甲烷、四氢呋喃、二氯甲烷等或它们的混合溶剂)中，在－78℃到反应所使用的溶剂的沸点之间，优选在－50℃～100℃的温度下，在碱(三乙胺、二异丙基乙胺、N－甲基吗啉、4－二甲基氨基吡啶等)的存在下，使化合物(4a)与羧酸(化合物(A))的酰卤化物反应来实施。相对于化合物(4a)1摩尔，酰卤化物使用0.3摩尔～5摩尔，优选使用0.4摩尔～2摩尔，碱使用催化量～过量摩尔，优选使用0.2～5摩尔。反应时间为10分钟～72小时，优选30分钟～24小时。

[0771] 在制备羧酸(化合物(A))的酰卤化物时，将羧酸(化合物(A))在溶剂(苯、甲苯、二氯甲烷、二氯乙烷等或它们的混合溶剂)中，在0℃到反应所使用的溶剂的沸点之间，优选在0℃～100℃的温度下，用草酰氯、亚硫酰氯等进行处理来实施。根据需要加入催化量的N,N－二甲基甲酰胺等进行。相对于羧酸(化合物(A))，草酰氯或亚硫酰氯使用1摩尔～过量摩尔，优选使用1～10摩尔。反应时间为10分钟～72小时，优选30分钟～24小时。

[0772] A－5工序(5a)→(6a)：还原反应

[0773] 在溶剂(乙醇、丙醇、甲醇、乙酸乙酯、THF、1,4－二噁烷、DMF等或它们的混合溶剂)中，在过渡金属催化剂(钯碳、镍等)存在下，在0℃到反应所使用的溶剂的沸点之间，优选在0℃～50℃的温度下，使化合物(5a)进行催化氢化来实施。通常在氢气氛下进行，根据需要可使用环己烯、1,4－环己二烯、肼等作为氢供体。反应时间为10分钟～72小时，优选30分钟～24小时。

[0774] 另外，硝基的还原可在以下的条件进行。

[0775] 在溶剂(乙醇、甲醇、二乙醚、乙酸乙酯、水或它们的混合溶剂)中，在0℃到反应所使用的溶剂的沸点之间，优选在0℃～90℃的温度下，使化合物(5a)与还原剂(铁、锌、氯化锡等)反应来实施。根据需要加入酸(醋酸、甲酸、氯化铵等)进行。相对于化合物(5a)1摩尔，还原剂使用1摩尔～过量摩尔，优选使用1～100摩尔，加入酸1摩尔～过量摩尔来进行。反应时间为10分钟～72小时，优选30分钟～24小时。

[0776] A－6工序(6a)→(7a)：氨基甲酸酯化反应

[0777] 在溶剂(THF、二氯甲烷、DMF等或它们的混合溶剂)中，在－30℃到反应所使用的溶剂的沸点之间，优选在0℃～50℃的温度下，使化合物(6a)与三光气(异氰酸酯化剂)反应，在体系内生成异氰酸酯中间体后，用通式(B)所示的醇进行处理来实施。根据需要加入碱(三乙胺、二异丙基乙胺、碳酸钠、氢氧化钠等)进行。相对于化合物(6a)1摩尔，三光气(异氰酸酯化剂)使用0.3～过量摩尔，优选使用0.35～3摩尔，碱加入0.5～5摩尔来进行。形成异氰酸酯中间体之前的反应时间为10分钟～24小时，优选30分钟～1小时。另外，异氰酸酯中间体与醇(B)的反应时间为10分钟～72小时，优选1小时～24小时。

[0778] 本工序所使用的醇(B)可根据后述的L法进行制造。

[0779] A－7工序(7a)→(8a)：脱保护基化反应

[0780] PRO^2为TBDMS基时，在溶剂(二氯甲烷、氯仿、乙腈、甲醇、乙醇、THF、水等或它们的混合溶剂)中，在－20℃～100℃，优选在0℃～50℃的温度下，使化合物(7a)与酸(醋酸等)或脱硅烷基化试剂(氢氟酸－吡啶，氢氟酸－三乙胺、氢氟酸盐、氢氟酸、氟化四正丁基铵等)及其它们的混合物中的任意一种反应来实施。相对于化合物(7a)1摩尔，酸使用1摩尔～过量摩尔，酸以及脱硅烷基化试剂使用1摩尔～过量摩尔，优选使用1～10摩尔。反应时间为10分钟～72小时，优选30分钟～24小时。

[0781] A－8工序(8a)→(9a)：氧化反应

[0782] 在溶剂(丙酮、二氯甲烷、吡啶等或它们的混合溶剂)中，在－78℃到反应所使用的溶剂的沸点之间，优选在－78℃～30℃的温度下，使化合物(8a)与氧化剂(氯化锍盐、戴斯－马丁试剂、四丁基钌酸铵、氯络酸吡啶鎓、硝基氧自由基氧化催化剂等)反应来实施。根据需要加入碱(三乙胺、二异丙基乙胺、碳酸氢钠、碳酸钠、氢氧化钠等)以及再氧化剂(N－甲基吗啉N－氧化物、碘苯二乙酸酯、次氯酸钠等)、添加剂(四丁基溴化铵、溴化钾等)进行。氧化剂相对于化合物(8a)1摩尔使用0.005～过量摩尔，优选使用0.005～10摩尔。另外，相对于化合物(8a)1摩尔，加入碱或再氧化剂1～10摩尔，添加剂0.02～1摩尔进行。反应时间为10分钟～72小时，优选30分钟～24小时。

[0783] A－9工序(9a)→(10a)：保护基导入

[0784] $(R^{17})'$为叔丁基二甲基硅烷氧基时，根据A－2工序进行制造。

[0785] A－10工序(10a)→(11a)：脱保护基化反应

[0786] PRO^3为三异丙基硅烷基时，在溶剂(DMF、水等或它们的混合物)中，在0℃到反应所使用的溶剂的沸点之间，优选在0℃～50℃的温度下，将化合物(10a)用醋酸锂处理来制造。醋酸锂相对于化合物(10a)1摩尔使用1摩尔～过量摩尔，优选使用1～5摩尔。反应时间为10分钟～72小时，优选30分钟～24小时。

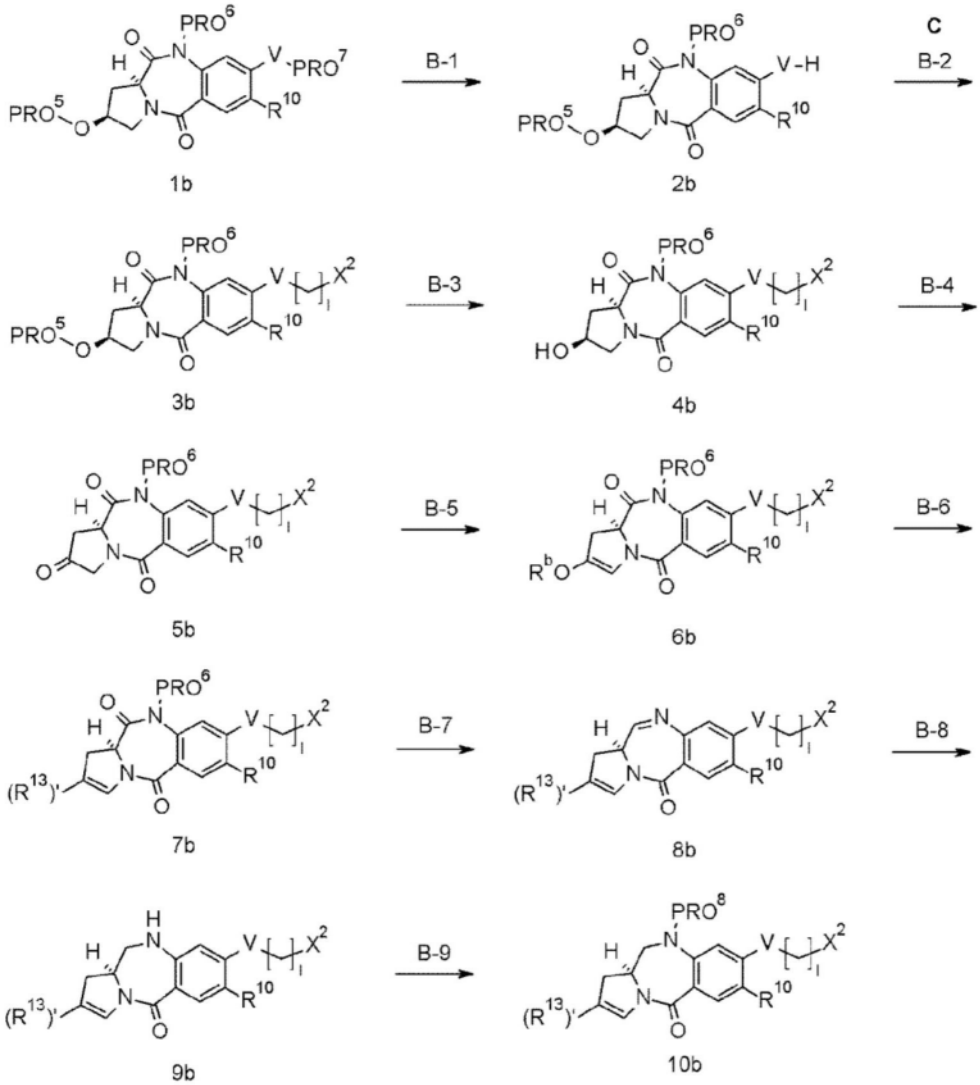
[0787] A－11工序(11a)→(12a)：烷基化反应

[0788] 在溶剂(THF、DMF、N,N－二甲基乙酰胺或它们的混合溶剂)中，在－20℃到反应所使用的溶剂的沸点之间，优选在0℃～沸点的温度下，使化合物(11a)与烷基化剂(C)(1,5－二溴戊烷、1,3－二溴丙烷等)反应来制造。根据需要加入碱(碳酸钾、碳酸铯等)进行。相对于化合物(11a)1摩尔，烷基化剂使用1摩尔～过量摩尔，优选使用1～10摩尔，碱使用0.4～过量摩尔，优选使用0.5～5摩尔。反应时间为1分钟～60小时，优选5分钟～24小时。

[0789] B法

[0790] 本制造方法为制造化合物(1)中R^{11}与R^{12}一起与各基团所结合的碳原子共同形成双键，R^{14}、R^{15}为氢的化合物所需的中间体、化合物(10b)的方法。

[0791]



[0792] B－1工序(1b)→(2b)：脱保护基化反应

[0793] PRO^7为三异丙基硅烷基时，根据A法A－10工序进行制造。

[0794] PRO^7为苄基时，根据A法A－3工序进行制造。

[0795] B－2工序(2b)→(3b)：烷基化反应

[0796] 根据A法A－11工序进行制造。

[0797] B－3工序(3b)→(4b)：脱保护基化反应

[0798] PRO^5为TBDMS基时，根据A法A－7工序进行制造。

[0799] PRO^5为乙酰基时，在溶剂(甲醇、乙醇、THF或水等或它们的混合溶剂)中，在－20℃到反应所使用的溶剂的沸点之间，优选在0℃～50℃的温度下，使化合物(3b)与适当的碱(碳酸钾、甲醇钠或氢氧化钠等)反应来实施。作为碱的量使用催化量～过量摩尔，优选使用0.1～10摩尔。反应时间为10分钟～72小时，优选30分钟～24小时。

[0800] B－4工序(4b)→(5b)：氧化反应

[0801] 根据A法A－8工序来制造。

[0802] B－5工序(5b)→(6b)：烯醇磺酰化反应

[0803] R^b为三氟甲磺酰基时，在溶剂(二氯甲烷等)中，在－78℃到反应所使用的溶剂的沸点之间，优选在－78℃～30℃的温度下，使化合物(5b)与三氟甲磺酸酐等反应来实施。根据需要加入碱(2,6－二甲基吡啶等)来进行。三氟甲磺酸酐相对于化合物(5b)1摩尔使用1摩尔～过量摩尔，优选使用1摩尔～5摩尔。碱使用1摩尔～10摩尔。反应时间为10分钟～24小时，优选30分钟～6小时。

[0804] B－6工序(6b)→(7b)：过渡金属催化剂交叉偶联反应(例如，铃木－宫浦反应等)

[0805] 在溶剂(乙醇、甲苯、1,4－二噁烷、DMF、四氢呋喃、水等或它们的混合溶剂)中，在0℃到反应所使用的溶剂的沸点之间，优选在0℃～120℃的温度下，在过渡金属催化剂(四(三苯基膦)钯、二氯双(苄腈)钯(II)等)的存在下，将化合物(6b)使用有机硼化合物(4－甲氧基苯基硼酸等)进行实施。根据需要加入碱(碳酸钠、碳酸钾、碳酸铯、碳酸氢钠、氢氧化钠等)、添加剂(氧化银，三苯基胂等)来进行。钯催化剂相对于化合物(6b)1摩尔使用0.01摩尔～1摩尔，优选使用0.01摩尔～0.5摩尔。另外，相对于化合物(6b)1摩尔，有机硼化合物使用1摩尔～过量摩尔，优选使用1摩尔～10摩尔，碱使用1摩尔～5摩尔，添加剂使用0.1摩尔～5摩尔。反应时间为10分钟～72小时，优选30分钟～24小时。

[0806] B－7工序(7b)→(8b)：还原反应

[0807] 例如PRO^6为2－(三甲基硅烷基)乙氧基甲基时，在溶剂(二乙醚、THF、二氯甲烷、乙醇等或它们的混合溶剂)中，在－78℃到反应所使用的溶剂的沸点之间，优选在－78℃～50℃的温度下，将化合物(7b)用还原剂(硼氢化锂、硼氢化钠等)处理来进行还原反应。还原剂相对于化合物(7b)1摩尔使用1摩尔～过量摩尔，优选使用1～30摩尔。反应时间为1分钟～24小时，优选5分钟～6小时。在由还原反应得到的粗产物的溶液(二氯甲烷、乙醇、水或它们的混合溶剂)中加入硅胶并进行搅拌处理而制造化合物(8b)。硅胶相对于化合物(7b)过量使用。处理时间为12小时～150小时，优选12小时～100小时。

[0808] B－8工序(8b)→(9b)：亚氨基的还原

[0809] 在溶剂(THF、二氯甲烷、N,N－二甲基甲酰胺等或它们的混合溶剂)中，在－78℃到反应所使用的溶剂的沸点之间，优选在－78℃～50℃的温度下，将化合物(8b)用还原剂(硼氢化钠、氰基氢化硼、三乙酰氧基硼氢化钠、2－甲基吡啶硼烷、吡啶硼烷等)处理来进行。还原剂相对于化合物(8b)1摩尔使用1摩尔～过量摩尔，优选使用1～5摩尔。反应时间为1分钟

～60小时，优选5分钟～24小时。

[0810] B－9工序(9b)→(10b)：保护基的导入

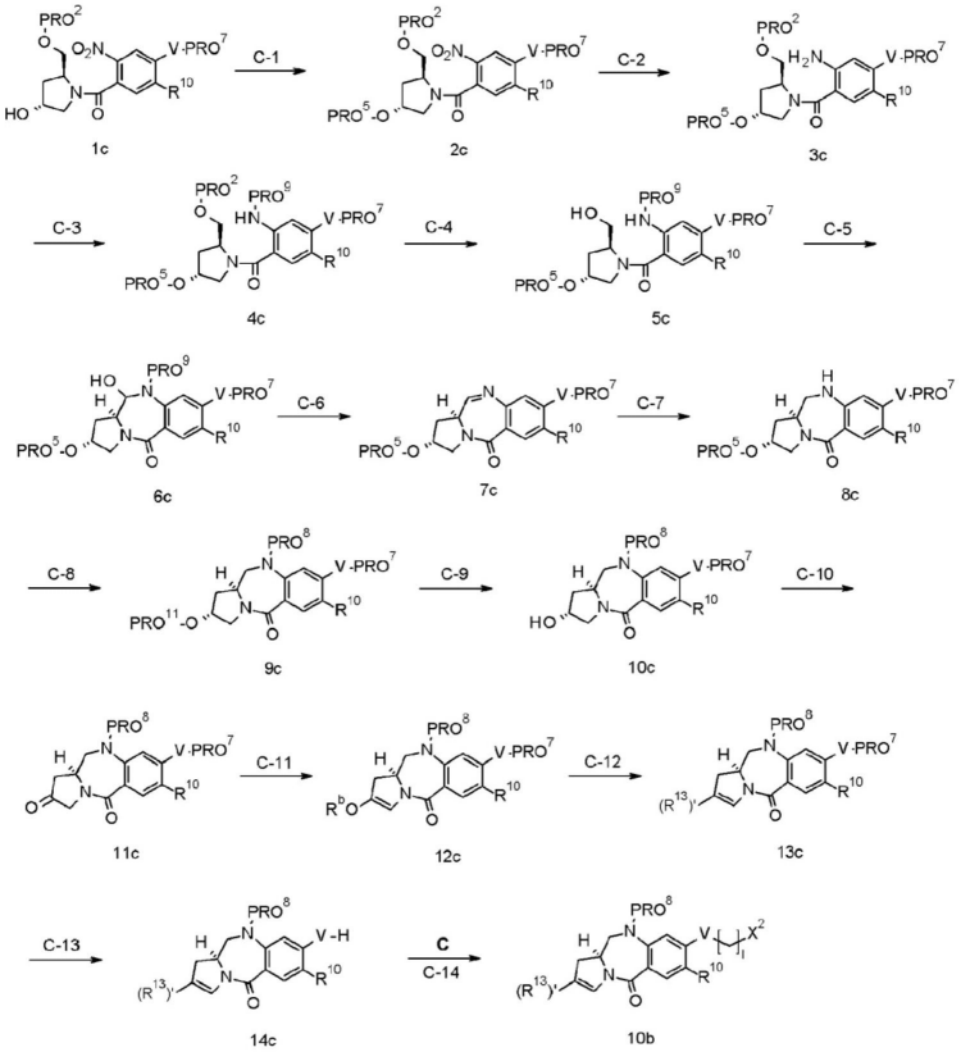
[0811] PRO^8为烯丙氧基羰基时，在溶剂(苯、甲苯、吡啶、二乙醚、二氯甲烷、THF、1,4－二噁烷、水等或它们的混合溶剂)中，在－30℃到反应所使用的溶剂的沸点之间，优选在0℃～50℃的温度下，使化合物(9b)与氯甲酸烯丙酯、二碳酸二烯丙酯等反应来实施。根据需要加入碱(三乙胺、二异丙基乙胺、吡啶、碳酸钠、碳酸钾、氢氧化钠等)进行。相对于化合物(9b)1摩尔，氯甲酸烯丙酯使用1摩尔～过量摩尔，优选使用1摩尔～10摩尔，碱使用1摩尔～过量，优选使用1～10摩尔。反应时间为10分钟～72小时，优选10分钟～48小时。

[0812] PRO^8为2,2,2－三氯乙氧基羰基时，在溶剂(苯、甲苯、吡啶、二乙醚、二氯甲烷、THF、1,4－二噁烷、水等或它们的混合溶剂)中，在－30℃到反应所使用的溶剂的沸点之间，优选在0℃～50℃的温度下，使化合物(9b)与氯甲酸2,2,2－三氯乙酯等反应进行实施。根据需要加入碱(三乙胺、二异丙基乙胺、吡啶、碳酸钠、氢氧化钠等)进行。相对于化合物(9b)1摩尔，氯甲酸2,2,2－三氯乙酯使用1摩尔～过量摩尔，优选使用1摩尔～10摩尔，碱使用1摩尔～过量，优选使用1～10摩尔。反应时间为10分钟～72小时，优选30分钟～48小时。

[0813] C法

[0814] 本制造方法是制造化合物(1)中R^{11}与R^{12}一起与各基团所结合的碳原子一起形成双键，R^{14}、R^{15}为氢的化合物所需的中间体、化合物(14c)的方法。另外，化合物(10b)也可利用本制造方法进行制造。

[0815]



[0816] C－1工序(1c)→(2c)：保护基的导入

[0817] PRO^5为乙酰基时，在溶剂(二氯甲烷、DMF、吡啶、THF、1,4－二噁烷等或它们的混合溶剂)中，在－20℃到反应所使用的溶剂的沸点之间，优选在0℃～100℃的温度下，使化合物(1c)与乙酰化试剂(乙酸酐、乙酰氯等)反应进行实施。根据需要加入碱(三乙胺、二异丙基乙胺、吡啶、4－二甲基氨基吡啶等)进行。相对于化合物(1c)1摩尔，乙酰化剂使用1摩尔～过量摩尔，优选使用1摩尔～20摩尔，碱使用催化量～过量摩尔，优选使用0.1～20摩尔。反应时间为10分钟～72小时，优选30分钟～24小时。

[0818] PRO^5为TBDMS基时，根据A法A－2工序进行制造。

[0819] C－2工序～C－5工序以及C－7工序～C－14工序

[0820] C－2工序根据A法的A－5工序，C－3工序根据B法的B－9工序，C－4工序根据A法A－7工序，C－5工序根据A法A－8工序，C－7工序根据B法B－8工序，C－8工序根据B法的B－9工序，C－9工序根据B法B－3工序，C－10工序根据A法的A－8工序，C－11工序根据B法的B－5工序，C－12工序根据B法的B－6工序，C－13工序根据A法的A－10工序，C－14工序根据A法A－11工序进行制造。

[0821] C－6工序(6c)→(7c)：脱保护基化反应

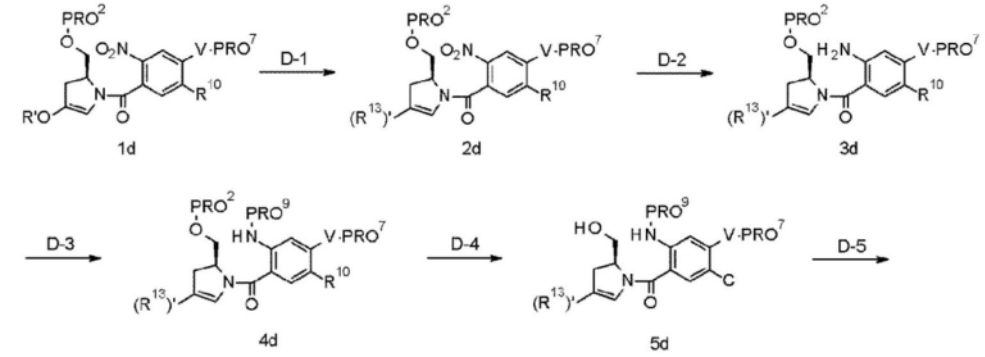
[0822] PRO^9为2,2,2－三氯乙氧基羰基时，在溶剂(THF、醋酸、醋酸铵水溶液、水等或它们

的混合溶剂)中,在－20℃～溶剂的沸点,优选在0℃～40℃的温度下,使化合物(6c)与金属试剂(锌、锌－铅合金、镉、镉铅等)反应来实施。金属试剂相对于化合物(6c)1摩尔使用1摩尔～过量摩尔,优选使用1～10摩尔。反应时间为10分钟～72小时,优选30分钟～24小时。

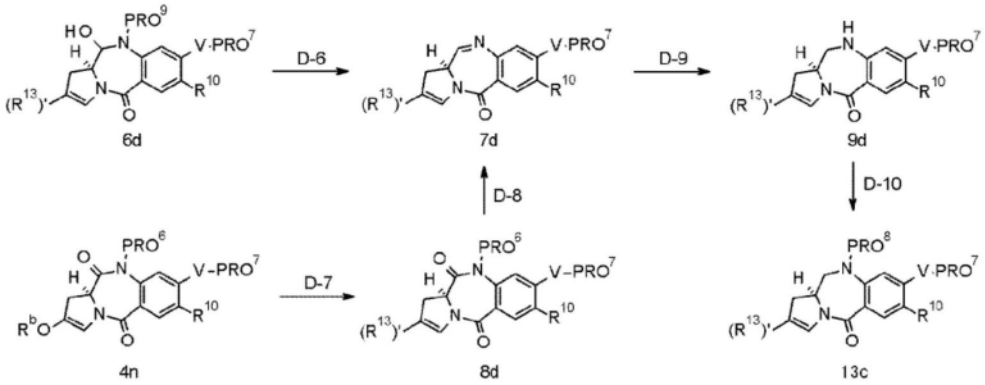
[0823] PRO^9为烯丙氧基羰基时,在溶剂(二氯甲烷、DMF、THF等或它们的混合物)中,在0℃到反应所使用的溶剂的沸点之间,优选在0℃～30℃的温度下,使用钯催化剂(四(三苯基膦)钯等)与烯丙基的捕捉剂(吡咯烷、吗啉、巴比妥酸等)与化合物(6c)进行实施。钯催化剂相对于化合物(6c)1摩尔使用0.005摩尔～1摩尔,优选使用0.005摩尔～0.5摩尔。烯丙基的捕获剂使用1摩尔～过量摩尔,优选使用1摩尔～10摩尔。反应时间为10分钟～72小时,优选30分钟～24小时。

[0824] D法

[0825] 化合物(13c)可根据本制造方法来制造。



[0826]



[0827] D－1工序～D－6工序、D－9工序、D－10工序

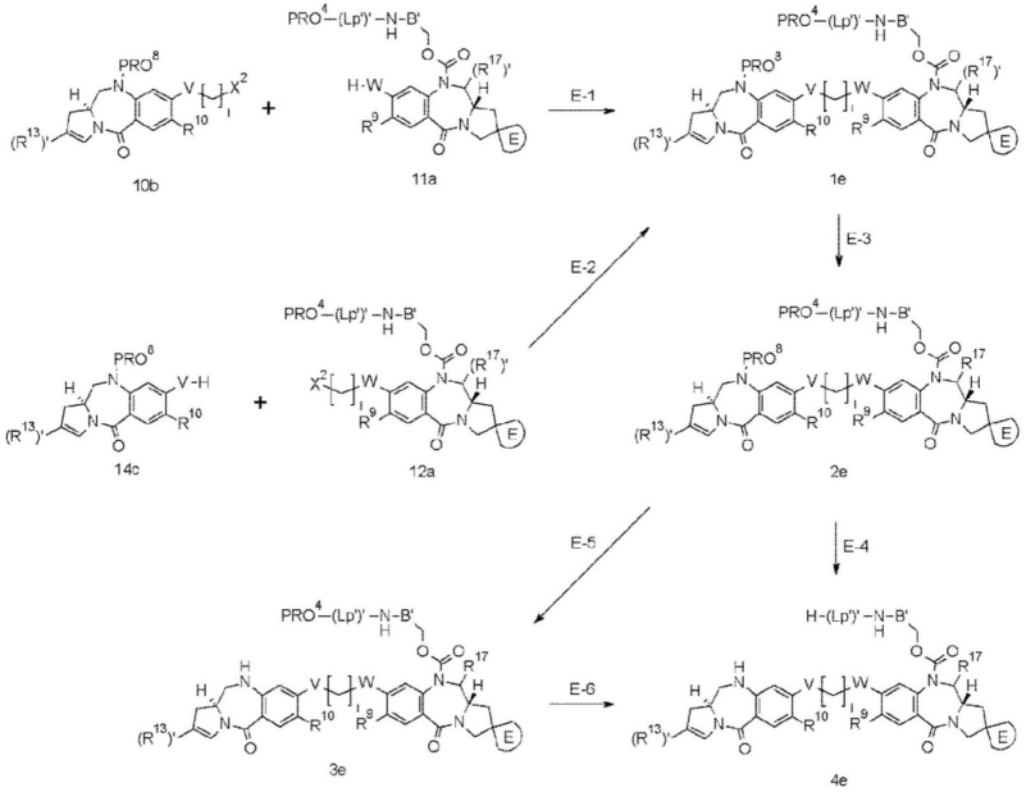
[0828] D－1工序根据B法的B－6工序,D－2工序根据A法的A－5工序,D－3工序根据B法的B－9工序,D－4工序根据A法A－7工序,D－5工序根据A法A－8工序,D－6工序根据C法C－6工序,D－9工序根据B法B－8工序,D－10工序根据B法的B－9工序来制造。

[0829] D－7工序以及D－8工序

[0830] 化合物(7d)可使用与B法B－6工序同样的D－7工序,与B法B－7工序同样的D－8工序进行制造。

[0831] E法

[0832] E法是使通过A法制造的化合物(11a)以及(12a)与通过B法或C法制造的化合物(10b)以及(14c)结合而制造化合物(4e)的方法。

[0833] 

[0834] E－1工序

[0835] 本工序是通过利用A法制造的化合物(11a)与利用B法制造的化合物(10b)的偶联反应来制造化合物(1e)的工序。

[0836] 在溶剂(THF、DMF、N,N－二甲基乙酰胺或它们的混合溶剂)中,在－20℃到反应所使用的溶剂的沸点之间,优选在0℃～50℃的温度下,在碱(碳酸钾、碳酸铯等)存在下,使化合物(11a)与化合物(10b)进行偶联反应来制造。相对于化合物(11a)0.5摩尔,化合物(10b)使用1摩尔～过量摩尔,优选使用0.7～1.5摩尔。碱使用1～5摩尔。反应时间为1分钟～60小时,优选5分钟～24小时。

[0837] E－2工序

[0838] 化合物(1e)可通过对利用A法制造的化合物(12a)与利用C法制造的化合物(14c)以与E－1工序同样的方式进行偶联反应来制造。

[0839] E－3工序

[0840] E－3工序根据A法A－7工序来制造。

[0841] E－4工序

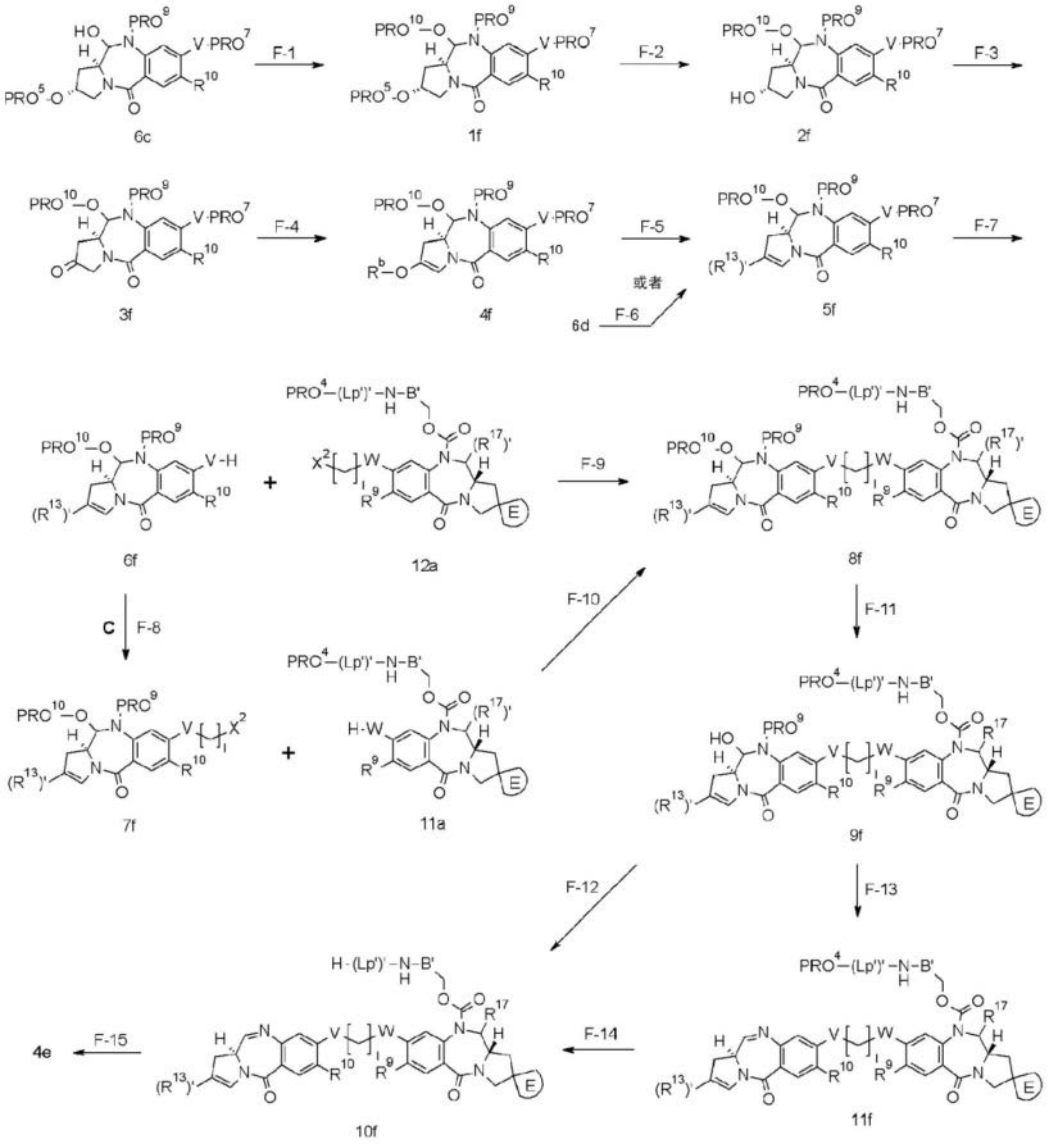
[0842] 本工序是在化合物(2e)中PRO^4与PRO^8为相同的保护基时,进行与C法C－6工序同样的脱保护基化反应来制造化合物(4e)的工序。

[0843] 化合物(2e)的PRO^4与PRO^8为不同的保护基时,化合物(4e)可通过E－5工序以及E－6工序阶段性地进行脱保护化反应来制造。

[0844] E－5工序以及E－6工序根据C法C－6工序来制造。

[0845] F法

[0846] 化合物(4e)也可由本合成法的中间体化合物(10f)来制造。本制造方法表示制造化合物(10f)以及化合物(4e)的方法。

[0847] 

[0848] F－1工序～F－10工序、F－15工序

[0849] F－1工序根据A法A－2工序、F－2工序根据B法B－3工序、F－3工序根据A法的A－8工序、F－4工序根据B法的B－5工序、F－5工序根据B法的B－6工序、F－6工序根据A法A－2工法、F－7工序根据A法的A－10工序、F－8工序根据A法A－11工序、F－9工序根据E法E－1工序、F－10工序根据E法E－1工序、F－15工序根据B法B－8工序来制造。

[0850] F－11工序

[0851] PRO^{10}与$(R^{17})'$的羟基的保护基均为TBDMS基时，根据A法A－7工序来制造。

[0852] F－12工序

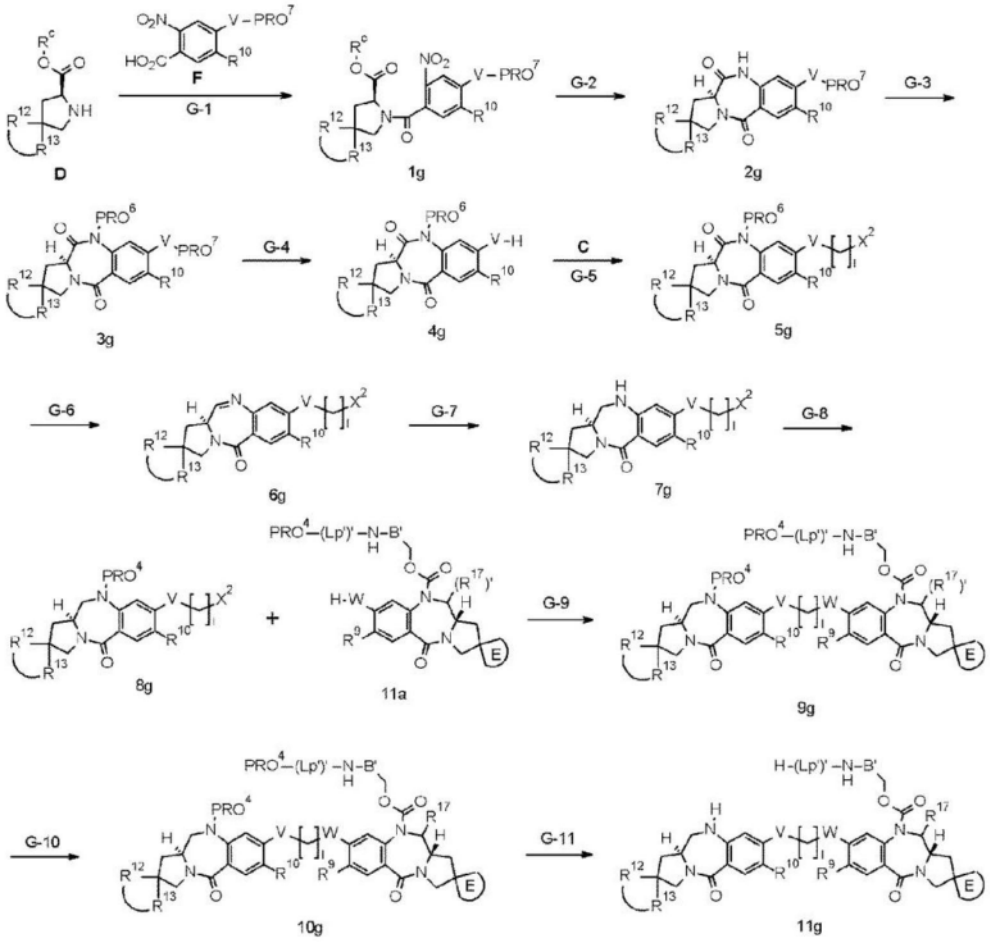
[0853] 本工序是在化合物(9f)中保护基PRO^{4}与PRO^{9}相同时，与C法C－6工序同样地进行脱保护基化反应来制造化合物(10f)的工序。

[0854] F－13工序以及F－14工序

[0855] 化合物(9f)的PRO^{4}与PRO^{9}为不同的保护基时，化合物(10f)可通过经过F－13工序以及F－14工序阶段性地进行脱保护基化反应来制造。F－13工序以及F－14工序根据C法C－6工序进行制造。

[0856] G法

[0857] 本制造方法是制造用于制造化合物(1)中R^{11}表示氢原子,R^{12}以及R^{13}一起形成螺环,R^{14}、R^{15}为氢原子的化合物的中间体、化合物(11g)的方法。

[0858] 

[0859] G－1～G－2工序,G－5～G－11工序,

[0860] G－1工序根据A法的A－4工序,G－2工序根据A法的A－5工序,G－5工序根据A法A－11工序,G－6工序根据B法B－7工序,G－7工序根据B法B－8工序,G－8工序根据B法B－9工序,G－9工序根据E法E－1工序,G－10工序根据A法A－7工序,G－11工序根据C法C－6工序来制造。

[0861] G－3工序:保护基的导入

[0862] 在溶剂(THF、DMF、二噁烷等或它们的混合溶剂)中,在－78℃～溶剂的沸点下,优选在0℃～50℃的温度下,使化合物(2g)与氯甲氧基醚系试剂(2－(氯甲氧基)乙基三甲基硅烷、氯甲基甲基醚、苄基氯甲基醚等)反应来实施。根据需要加入碱(氢化钠、正丁基锂、六甲基二硅氮烷锂)进行。试剂相对于化合物(2g)1摩尔使用1摩尔～过量摩尔,优选使用1～5摩尔。碱相对于化合物(2g)1摩尔使用1摩尔～过量摩尔,优选使用1～5摩尔。反应时间为10分钟～72小时,优选30分钟～24小时。

[0863] G－4工序

[0864] PRO^7为苄基时,根据A法A－3工序来制造。

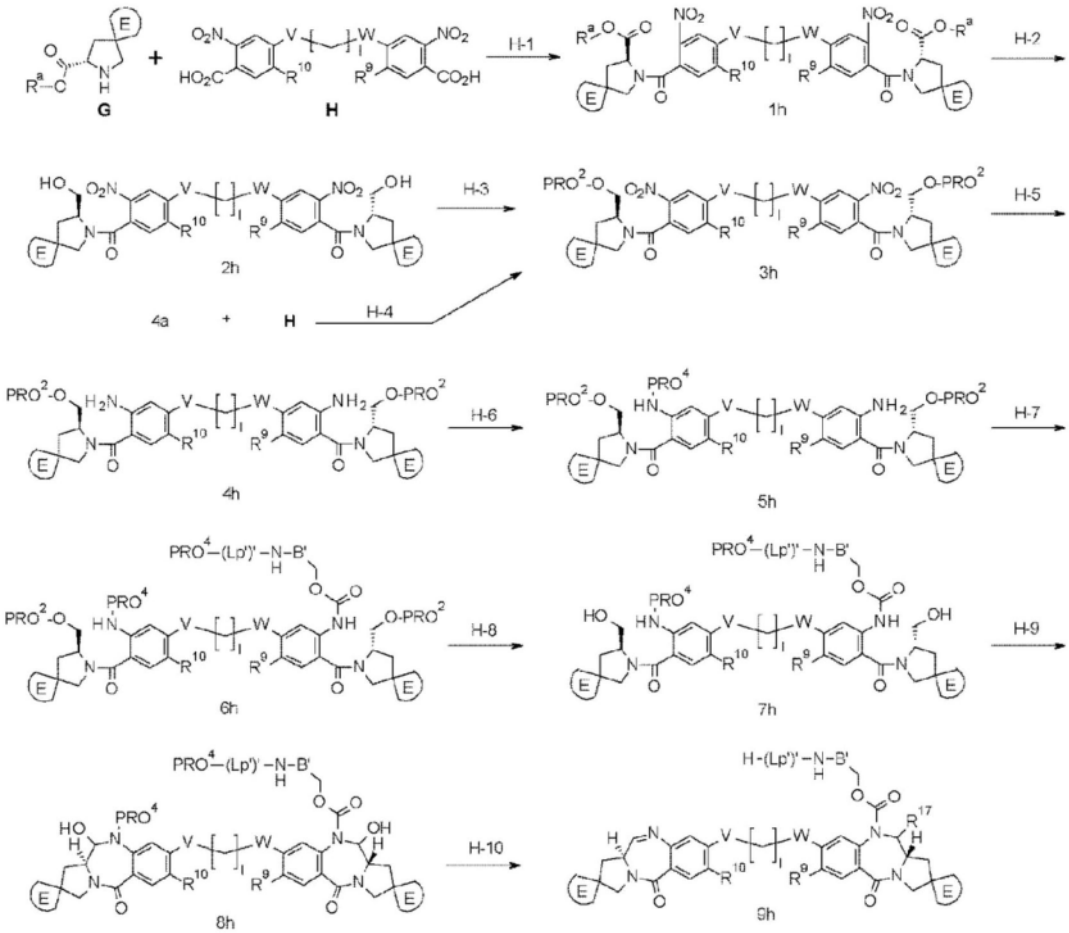
[0865] PRO^7为三异丙基硅烷基时,根据A法A－10工序来制造。

[0866] H法

[0867] 本制造方法是制造用于制造化合物(1)中R^{11}表示氢原子,R^{12}以及R^{13}一起形成螺

环，R^{14}、R^{15}一起为亚胺键(C＝N)的化合物的中间体、化合物(9h)的方法。本制造方法中，由R^{12}以及R^{13}形成的螺环与E表示相同的含义，标记也用E表示。

[0868]

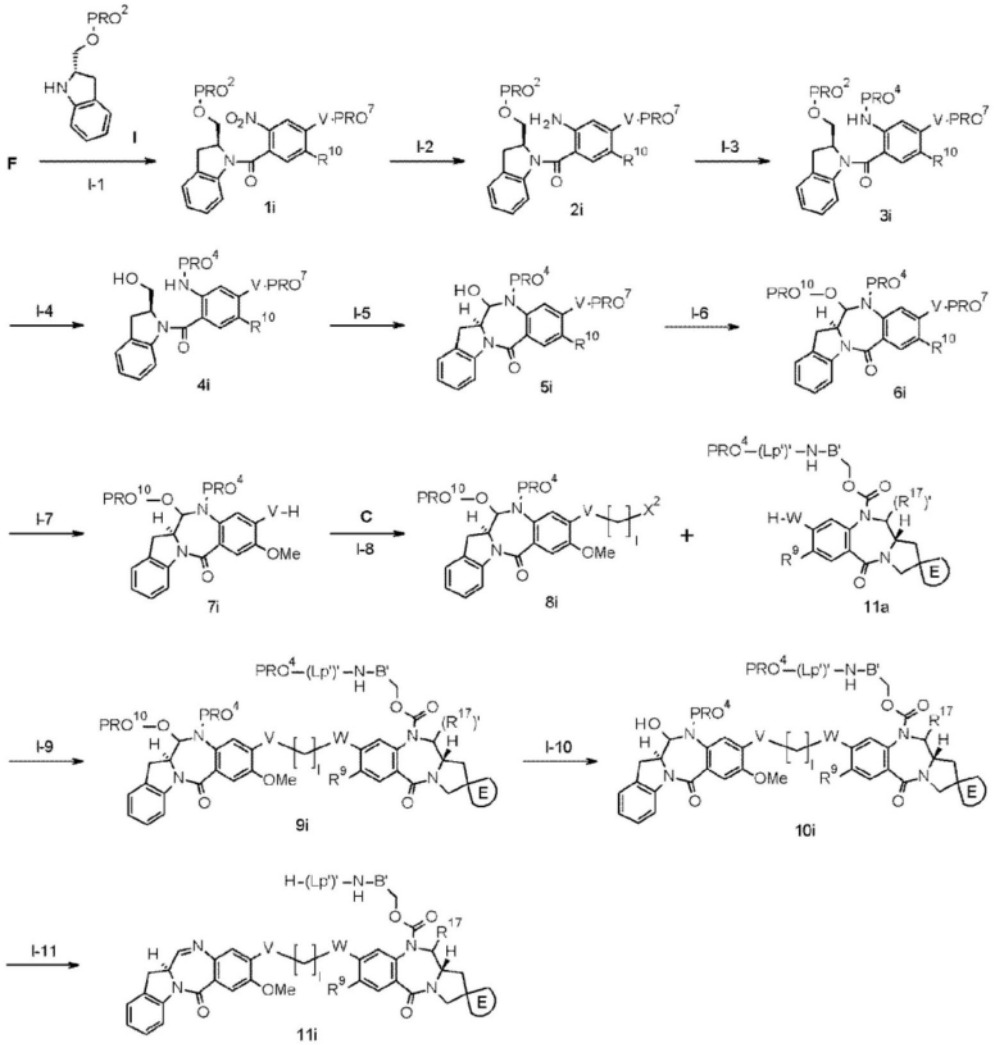


[0869] H－1工序～H－10工序

[0870] H－1工序根据A法的A－4工序，H－2工序根据A法的A－1工序，H－3工序根据C法C－1工序，H－4工序根据A法的A－4工序，H－5工序根据A法的A－5工序，H－6工序根据B法B－9工序，H－7工序根据A法A－6工序，H－8工序根据B法B－3工序，H－9工序根据A法A－8工序，H－10工序根据C法C－6工序来制造。

[0871] I法

[0872] 本制造方法为制造用于制造化合物(1)中R^{11}与R^{12}一起形成苯环，R^{13}为单键，R^{14}、R^{15}一起形成亚胺的化合物的中间体、化合物(11i)的方法。

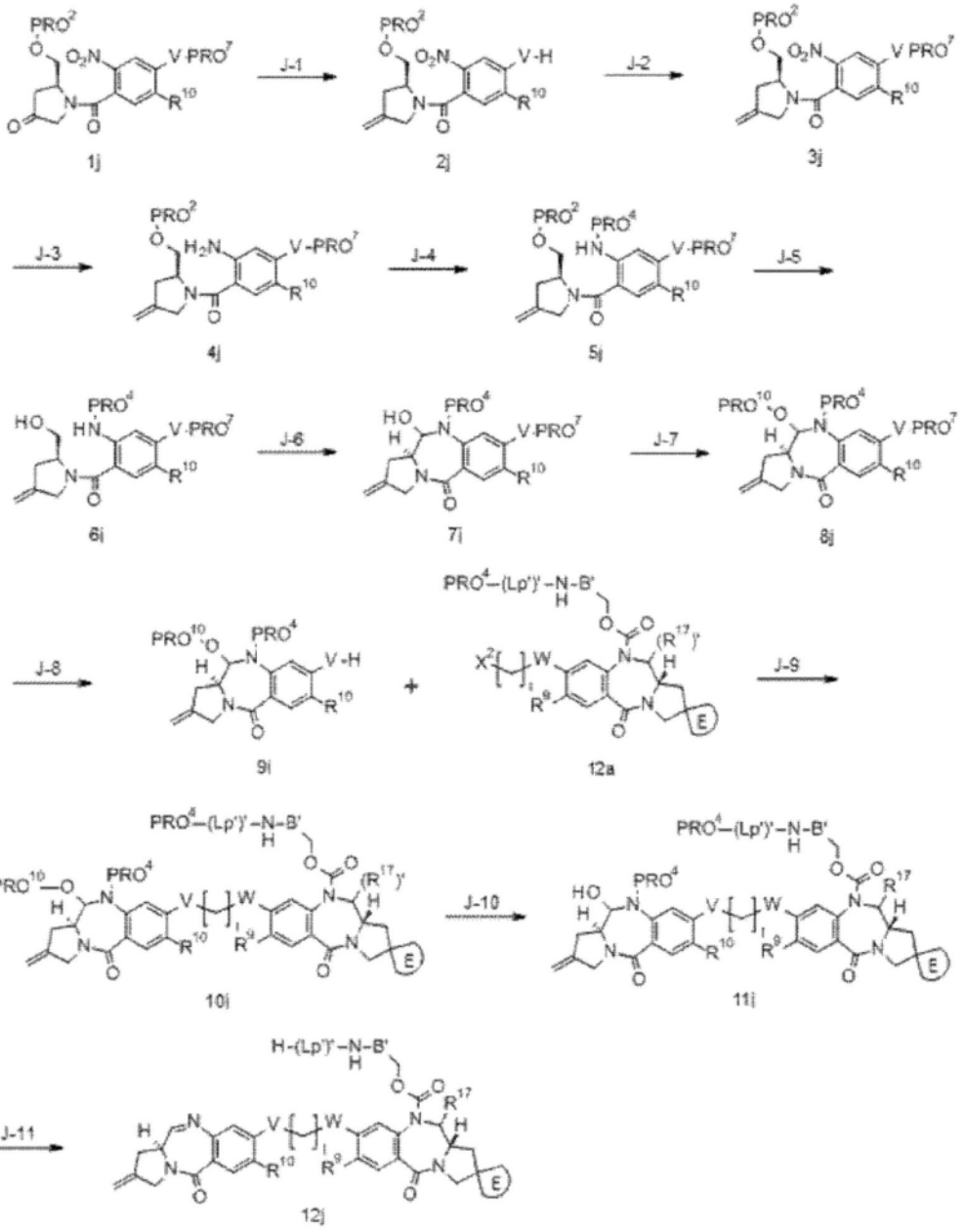
[0873] 

[0874] I－1工序～I－11工序

[0875] I－1工序根据A法的A－4工序，I－2工序根据A法的A－5工序，I－3工序根据B法B－9工序，I－4工序根据A法A－7工序，I－5工序根据A法A－8工序，I－6工序根据A法A－2工序，I－7工序根据A法的A－10工序，I－8工序根据A法的A－11工序，I－9工序根据E法E－1工序，I－10工序根据A法A－7工序，I－11工序根据C法C－6工序来制造。

[0876] J法

[0877] 本制造方法为化合物(1)中R^{12}与R^{13}一起形成CH_2＝，R^{11}为氢，R^{14}、R^{15}一起形成亚胺的化合物的中间体、化合物(12j)的制造方法。



[0878]

[0879] J－1工序

[0880] 本工序为通过对化合物(1j)进行Wittig反应制造化合物(2j)的工序。

[0881] J－2工序:保护基导入

[0882] PRO^7为三异丙基硅烷基时,在溶剂(二氯甲烷、乙腈、THF、DMF等或它们的混合溶剂)中,在－20℃～120℃,优选在0℃～100℃的温度下,使化合物(2j)与硅烷基化试剂(三异丙基氯硅烷、三异丙基硅烷基三氟甲磺酸酯等)反应来实施。根据需要加入碱(咪唑、吡啶、2,6－二甲基吡啶、4－二甲基氨基吡啶、氢化钠等)进行。相对于化合物(2a)1摩尔,硅烷基化剂使用1摩尔～过量摩尔,优选使用1～3摩尔,碱使用1摩尔～过量摩尔,优选使用1～5摩尔。反应时间为10分钟～72小时,优选30分钟～24小时。

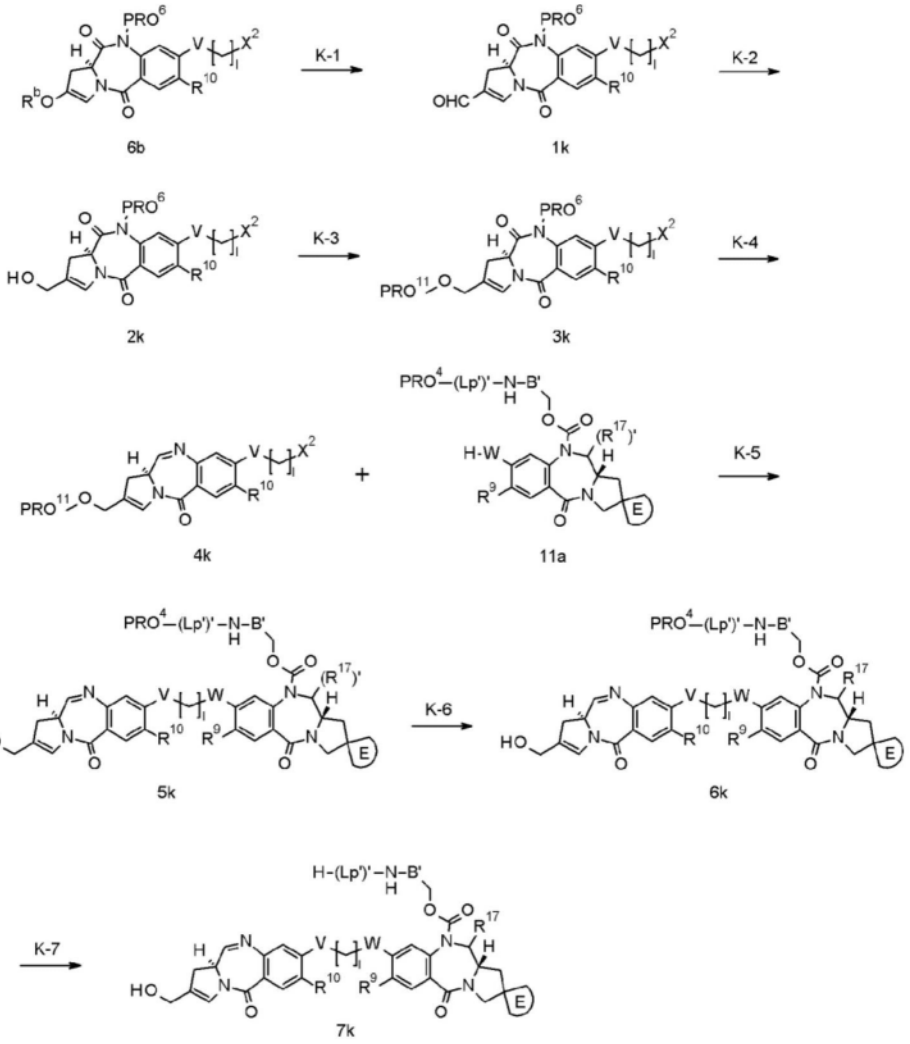
[0883] J－3工序～J－11工序

[0884] J－3工序根据A法的A－5工序,J－4工序根据B法的B－9工序,J－5工序根据A法A－7工序,J－6工序根据A法A－8工序,J－7工序根据A法A－2工序,J－8工序根据A法的A－

10工序，J－9工序根据E法的E－1工序，J－10工序根据A法A－7工序，J－11工序根据C法C－6工序来制造。

[0885] K法

[0886] K法为制造用于制造化合物(1)中R^{11}与R^{12}一起与各基团所结合的碳原子一起形成双键，R^{13}为羟甲基，R^{14}、R^{15}一起形成亚胺的化合物所需的中间体，化合物(7k)的方法。

[0887] 

[0888] K－1工序

[0889] 本工序为对化合物(6b)进行羰基化反应制造化合物(1k)的工序。

[0890] K－2工序

[0891] 本工序是通过对化合物(1k)进行醛选择性还原反应来制造化合物(2k)的工序。

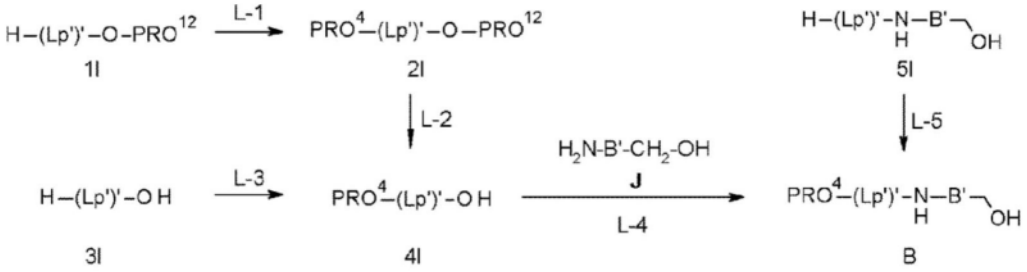
[0892] K－3工序～K－7工序

[0893] K－3工序根据A法A－2工序，K－4工序根据B法B－7工序，K－5工序根据E法E－1工序，K－6工序根据A法A－7工序，K－7工序根据C法C－6工序来制造。

[0894] L法

[0895] L法为化合物(B)的代表性的制造方法。

[0896]



[0897] 通式(Lp')'所示的肽残基通过氨基酸的缩合反应来制造。

[0898] PRO^4保护肽残基(Lp')'的N末端,PRO^{12}保护C末端。

[0899] L－1工序

[0900] L－1工序根据B法B－9工序来制造。

[0901] L－2工序:脱保护基化反应

[0902] PRO^{12}为叔丁基时,在溶剂(二氯甲烷等)中,在0℃到反应所使用的溶剂的沸点之间,优选在0℃～40℃的温度下,使化合物(21)与酸(三氟醋酸、对甲苯磺酸、盐酸、醋酸等)反应来实施。酸相对于化合物(21)1摩尔使用催化量～过量摩尔。反应时间为10分钟～72小时,优选30分钟～24小时。

[0903] L－3工序～L－4工序

[0904] L－3工序根据B法B－9工序,L－4工序根据A法的A－4工序来制造。

[0905] L－5工序

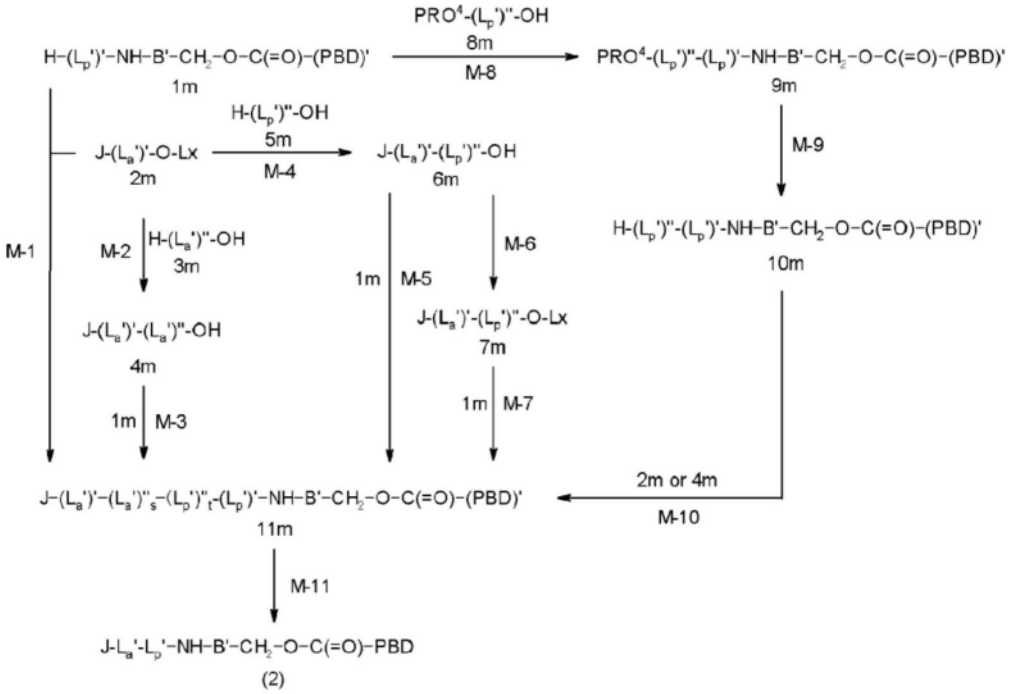
[0906] 化合物(B)可根据B法B－9工序、L－5工序来制造。

[0907] M法

[0908] M法为化合物(2)的制造方法。

[0909] 本制造方法所示的化合物(2)与化合物(1)中本发明的制造中间体的R^{16}为J－La'－Lp'－NH－B'－CH_2－O(C＝O)－＊是同样的含义。

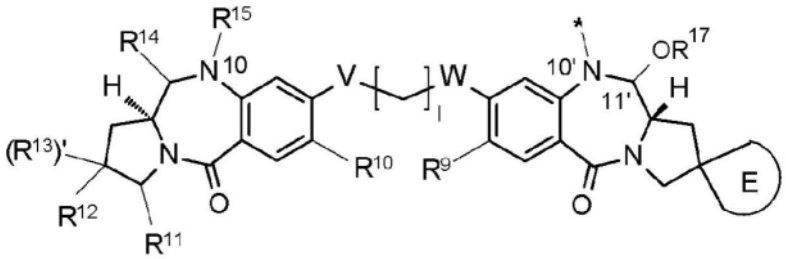
[0910]



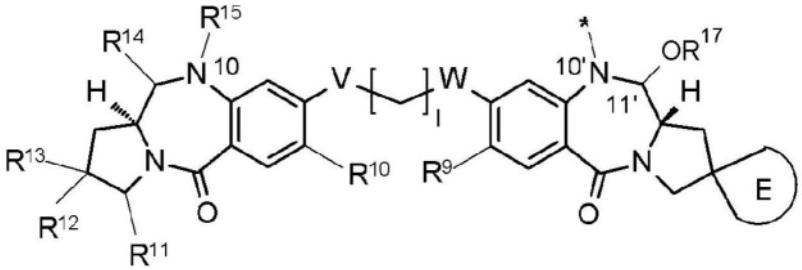
[0911] 上述制造方法所示的化合物(1m)表示利用E～K法制造的化合物(4e)、(4f)、

(11g)、(9h)、(11i)、(12j)、(7k)、(8k)。

[0912] 上述制造方法所示的(PBD)'如下所示：

[0913] 

[0914] PBD如下所示：

[0915] 

[0916] (PBD)'中，PBD中的R^{13}上的取代基(羟基等)也可用保护基进行保护，没有保护基时，与PBD同样的含义(R^{13}＝(R^{13})')。

[0917] 上述制造方法中，(Lp')"t－(Lp')'所示的肽残基中，Lp'所示的氨基酸残基的侧链上官能团(氨基等)可被保护基保护，保护基未被取代时，与Lp'表示同样的含义。

[0918] 其中，(Lp')'表示以下所示的2个氨基酸序列，在侧链有官能团(氨基、羟基)时也可被保护。

[0919] －VA－、(D－)VA－、－FG－、－PI－、－VCit－、－VK－、－PL－、－(D－)P－I－、或－GF－

[0920] (Lp')"表示以下所示的2～4个氨基酸序列，在侧链存在官能团(氨基、羟基)时也可被保护。

[0921] －GG－、－EGG－、－DG－、－(D－)DG－、－EG－、－GGF－、－SG－、－KG－、－DGG－、－GGF－、－DDGG－、－KDGG－、或、－GGFG－

[0922] (La')'表示选自以下的组中的任意一个：－C(＝O)－$(CH_2CH_2)n^6$－C(＝O)，－C(＝O)－$(CH_2CH_2)n^6$－NH－C(＝O)－$(CH_2CH_2O)n^7$－CH_2CH_2－C(＝O)－，－$(CH_2)n^8$－O－C(＝O)－，－$(CH_2)n^{12}$－C(＝O)－，－$(CH_2CH_2)n^{13}$－C(＝O)－NH－$(CH_2CH_2O)n^{14}$－CH_2CH_2－C(＝O)－。

[0923] (La')"表示选自以下的组中的任意一个：－NH－$(CH_2CH_2)n^7$－C(＝O)－，或－NH－$(CH_2CH_2O)n^7$－CH_2－C(＝O)－，s或t分别独立地表示0或1。

[0924] 例如，下述M－1工序中，s及t为0，M－3工序中，s为1、t为0，M－5工序中，s为0、t为1。

[0925] (La')'－(La')"$_s$与La'同义。

[0926] (Lp')"$_t$－(Lp')'具有保护基时，通过脱保护形成Lp'，在没有保护基时与Lp'同义。

[0927] 上述制造方法中所示的Lx表示氢原子或脱离基(羟基琥珀酰亚胺等)。

[0928] 上述制造方法中所示的1m、9m、10m、11m、化合物(2)的PBD或(PBD)’在星号(N10’位)与－O－C(＝O)－右端的C(＝O)－结合。

[0929] M－1工序

[0930] 本工序为进行利用E～K法制造的化合物(1m)与化合物(2m)的缩合反应制造化合物(11m)的方法。

[0931] Lx＝H且化合物(2m)为羧酸时，可根据A法A－4工序制造化合物(2m)。

[0932] Lx为脱离基(羟基琥珀酰亚胺、对硝基苯氧基等)时，在溶剂(苯、甲苯、二乙醚、二氯甲烷、THF、DMF、甲醇、水等或它们的混合溶剂)中，在－30℃到反应所使用的溶剂的沸点之间，优选在0℃～50℃的温度下，使化合物(1m)与化合物(2m)反应来实施。相对于化合物(1m)1摩尔，化合物(2m)使用0.9～过量摩尔，优选使用0.9～2摩尔。另外，根据需要加入碱(三乙胺、N,N－二异丙基乙胺、N－甲基吗啉、4－二甲基氨基吡啶、二氮杂双环十一碳烯等)进行。相对于化合物(1m)1摩尔，碱使用1摩尔～过量，优选使用1～5摩尔。反应时间为10分钟～72小时，优选30分钟～36小时。

[0933] M－2工序～M－5工序以及M－8工序

[0934] M－2工序根据M－1工序，M－3工序根据A法A－4工序，M－4工序根据M－1工序，M－5工序根据A法A－4工序，M－8工序根据A法A－4工序来制造。

[0935] M－6工序

[0936] 本工序是对化合物(6m)进行缩合反应，制造活性酯中间体(7m)的工序。

[0937] 在溶剂(苯、甲苯、二乙醚、二氯甲烷、THF、DMF等或它们的混合溶剂)中，在－30℃到反应所使用的溶剂的沸点之间，优选在0℃～50℃的温度下，在N,N－二环己基碳二亚胺、1－乙基－3－(3－二甲基氨基丙基)碳二亚胺等缩合剂的存在下，使化合物(6m)与羟基琥珀酰亚胺等反应进行实施。缩合剂相对于化合物(6m)1摩尔使用1摩尔～过量摩尔，优选使用1～5摩尔。羟基琥珀酰亚胺相对于化合物(6m)1摩尔使用1摩尔～过量摩尔，优选使用1摩尔～5摩尔。反应时间为10分钟～72小时，优选30分钟～24小时。

[0938] M－7工序

[0939] 本工序为使化合物(1m)与化合物(7m)与M－1工序同样地进行缩合反应制造化合物(11m)的工序。

[0940] M－9工序

[0941] 本工序是对化合物(9m)进行脱保护化反应制造化合物(10m)的工序。PRO^4为9－芴基甲氧基羰基时，在溶剂(THF、二氯甲烷、DMF等或它们的混合溶剂)中，在－20℃～溶剂的沸点下、优选在0℃～40℃的温度下，使化合物(9m)与碱(1,8－二氮杂双环[5.4.0]－7－十一碳烯、哌啶等)反应来实施。相对于化合物(9m)1摩尔，碱使用1摩尔～过量摩尔，优选使用1～10摩尔。反应时间为1分钟～72小时，优选5分钟～24小时。

[0942] M－10工序

[0943] 本工序是使化合物(10m)与化合物(2m)或(4m)进行与A法A－4工序同样的缩合反应，制造化合物(11m)的工序。

[0944] M－11工序

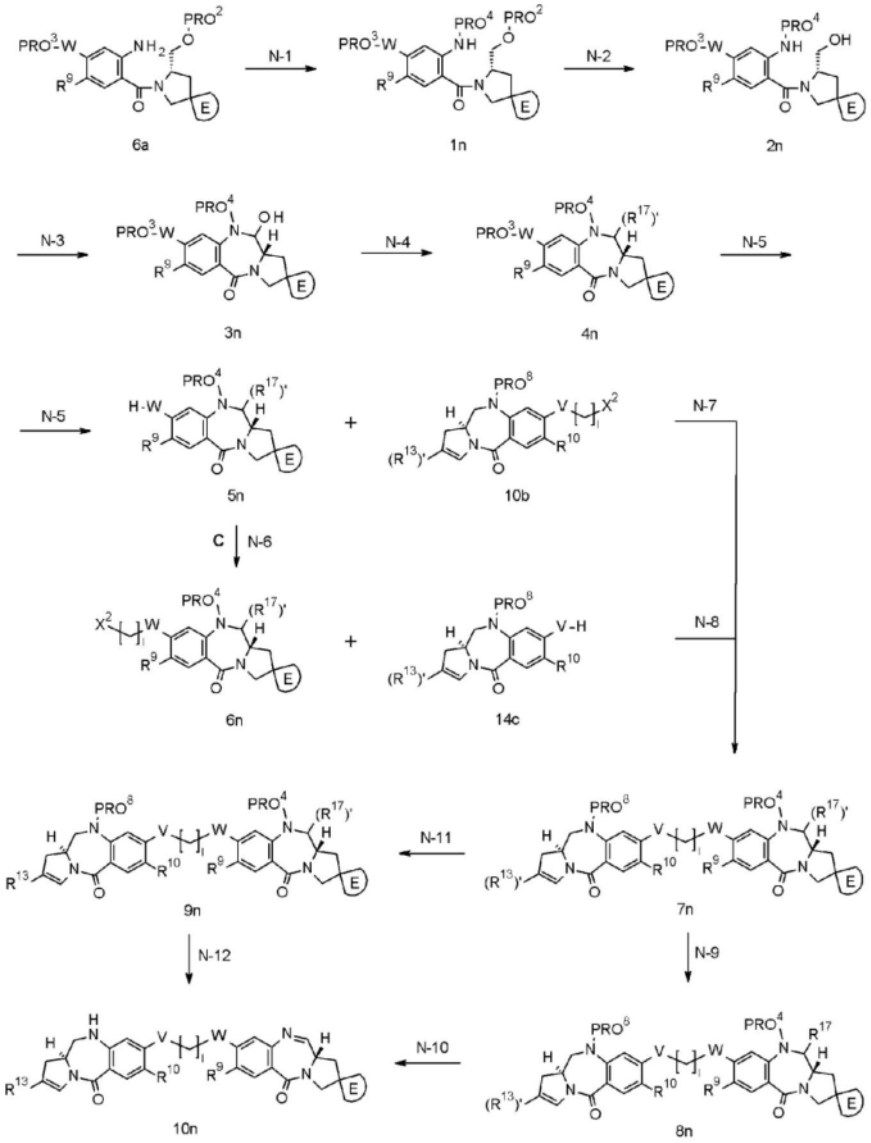
[0945] 本工序是在化合物(11m)中(Lp’)”$_t$－(Lp’)’或PBD’具有保护基时，进行脱保护化，制造化合物(2)的工序。根据B法B－3工序以及C法C－6工序进行制造。

[0946] 另外，(Lp')'或PBD'没有保护基时，M－11工序可省略，此时化合物(11m)与(2)同义。

[0947] N法

[0948] N法表示在(1)所示的游离药物中R^{11}与R^{12}一起与各基团所结合的碳原子一起形成双键，R^{14}、R^{15}为氢，R^{16}与R^{17}一起形成亚胺键的化合物的合成法。

[0949]



[0950] N－1工序～N－8工序

[0951] N－1工序根据B法的B－9工序，N－2工序根据A法A－7工序，N－3工序根据A法A－8工序，N－4工序根据A法A－2工序，N－5工序根据A法A－10工序，N－6工序根据A法A－11工序，N－7工序根据E法E－1工序，N－8工序根据E法E－1工序来制造。

[0952] $(R^{13})'=R^{13}$时，根据以下的N－9工序以及N－10工序进行制造。

[0953] N－9工序

[0954] N－9工序根据A法A－7工序进行制造。

[0955] N－10工序

[0956] PRO^4与PRO^8为相同保护基时，根据E法E－4工序制造。PRO^4与PRO^8为不同保护基时，根据E法E－5以及6工序进行制造。

[0957] $(R^{13})'$具有保护基时，根据以下N－11工序以及N－12工序进行制造。

[0958] N－11工序

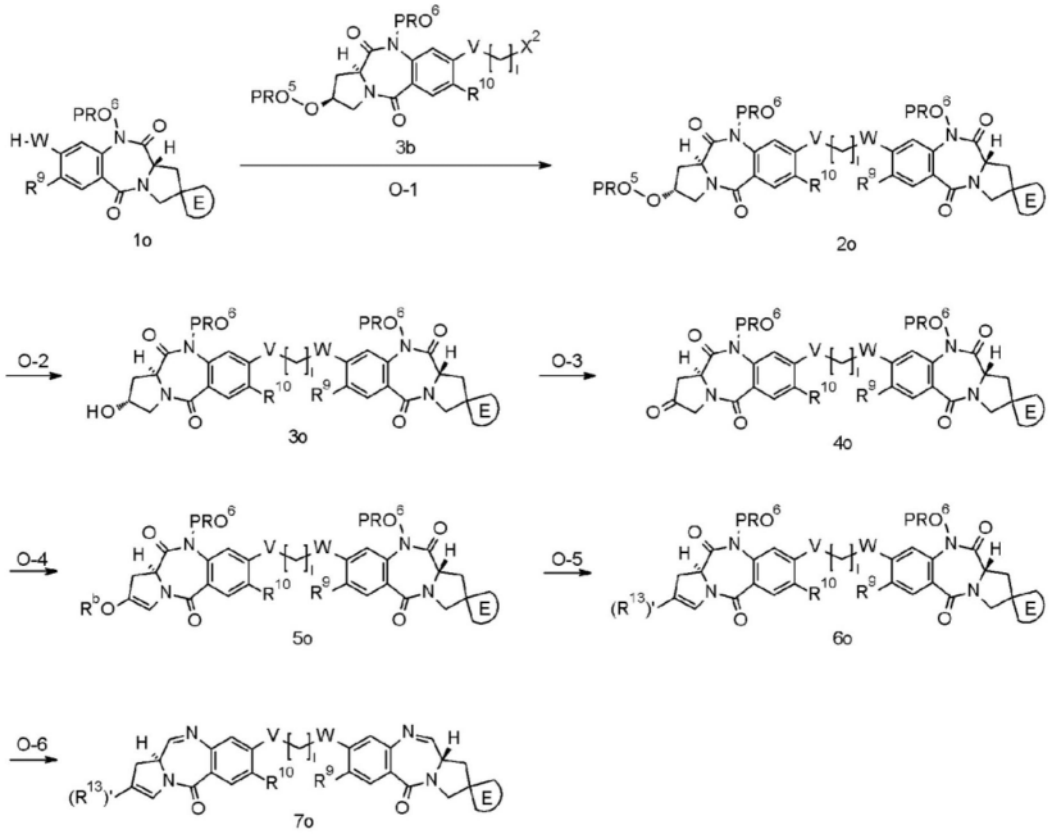
[0959] 根据B法B－3工序进行制造。

[0960] N－12工序

[0961] PRO^4与PRO^8为相同保护基时，根据E法E－3以及4工序进行制造。PRO^4与PRO^8为不同保护基时，根据E法E－3、5以及6工序进行制造。

[0962] O法

[0963] O法是制造(1)所示的游离药物中R^{11}与R^{12}一起与各基团所结合的碳原子一起形成双键，R^{14}与R^{15}、以及R^{16}与R^{17}一起为亚胺键(C＝N)的化合物(6o)的方法。

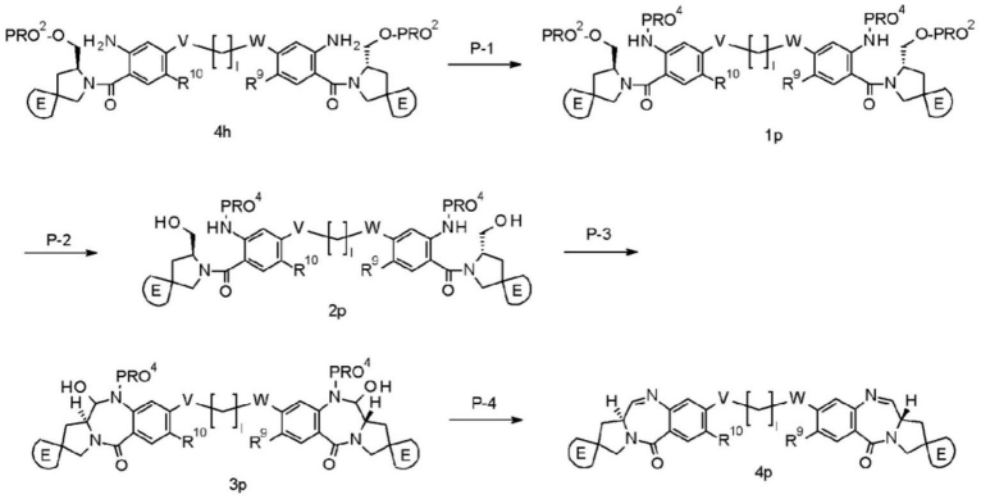
[0964] 

[0965] O－1工序～O－6工序

[0966] O－1工序根据E法E－1工序，O－2工序根据B法B－3工序，O－3工序根据A法的A－8工序，O－4工序根据B法的B－5工序，O－5工序根据B法的B－6工序，O－6工序根据B法B－7工序来制造。

[0967] P法

[0968] 本制造方法是制造在(1)所示的游离药剂中R^{11}表示氢原子、R^{12}以及R^{13}一起形成螺环、R^{14}与R^{15}及R^{16}与R^{17}一起为亚胺键(C＝N)的化合物的方法。本制造方法中，作为起始原料的化合物(4h)所示的R^{12}以及R^{13}所形成的螺环与E同义，因此标记为E。



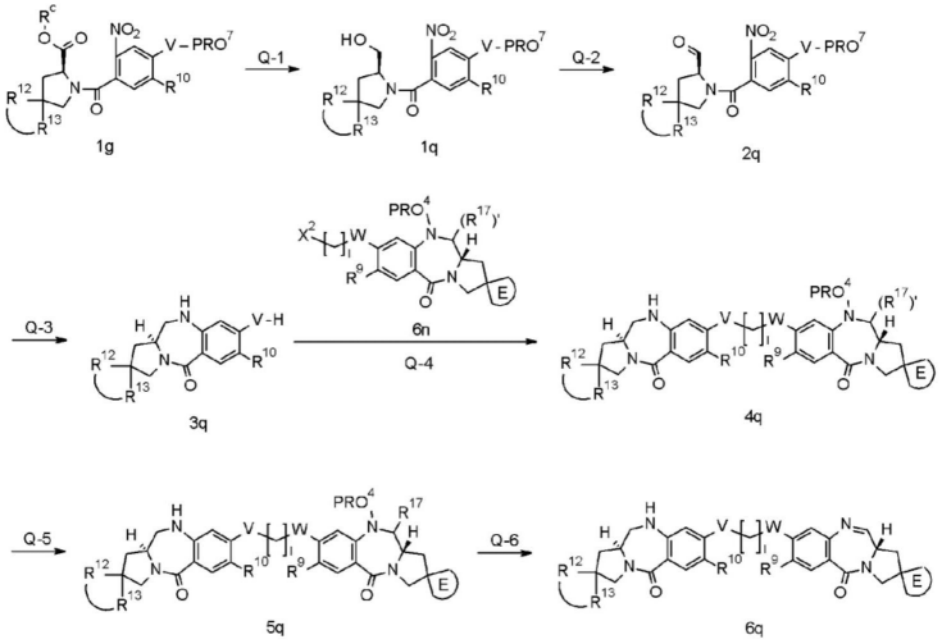
[0969]

[0970] P－1工序～P－4工序

[0971] P－1工序根据B法的B－9工序，P－2工序根据B法B－3工序，P－3工序根据A法A－8工序，P－4工序根据C法C－6工序进行制造。

[0972] Q法

[0973] 本制造方法为制造(1)所示的游离药剂中R^{11}、R^{14}及R^{15}表示氢原子，R^{12}以及R^{13}一起形成螺环，以及R^{16}与R^{17}一起形成亚胺键(C＝N)的化合物的方法。



[0974]

[0975] Q－1工序～Q－6工序

[0976] Q－1工序根据A法的A－1工序，Q－2工序根据A法A－8工序，Q－3工序根据A法A－5工序，Q－4工序根据E法E－1工序，Q－5工序根据A法A－7工序，Q－6工序根据C法C－6工序来制造。

[0977] 上述中，可被保护的氨基、羟基保护基是指能够通过氢解、水解、电解、光解之类的化学方法断裂的保护基，表示在有机合成化学中常用的保护基(参照Protective Groups in Organic Synthesis,3rd Edition,JohnWiley&Sons,Inc.(1999年))。

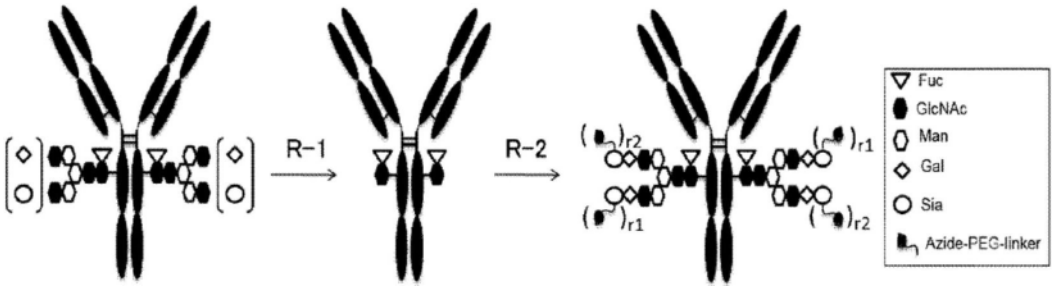
[0978] 上述中，可被保护的羟基的“保护基”(例如，烷基羰基、硅烷基或芳烷基)，可被保

护的羧基的“保护基”(例如,C_1－C_6烷基或芳烷基),可被保护的氨基的“保护基”(例如,烷氧基羰基)只要是在有机合成化学领域中使用的羟基、羧基、氨基的保护基即可,没有特别的限定。

[0979] 需要保护、脱保护的工序可根据已知的方法(例如“Protective Groups in Organic Synthesis”(TheodoraW.Greene,PeterG.M.Wuts著,1999年,Wiley－InterscienceePublication发行)等所述的方法)进行。

[0980] R法:抗体的制备

[0981] 糖链重构抗体可遵照例如WO2013/120066等所述的方法,利用图3所示的方法来制造。

[0982] 

[0983] (r1,r2)＝(1,0),(0,1),(1,1)的任意一个

[0984] R-1工序还原末端的壳二糖结构的GlcNAcβ1-4GlcNAc之间的糖苷键的水解

[0985] 本工序是对目标抗体使用公知的酶反应切断与抗体的氨基酸序列第297号天冬酰胺结合的N连接型糖链(N297结合糖链),制造糖链切断抗体的工序。

[0986] 对目标抗体(20mg/ml)在缓冲溶液(50mM磷酸缓冲溶液等)中,在0℃～40℃的温度下,使用EndoS酶等水解酶实施还原末端的壳二糖结构的GlcNAcβ1与4GlcNAc之间的糖苷键的水解反应。反应时间为10分钟～72小时,优选1小时～6小时。野生型EndoS酶相对于抗体100mg使用0.1～10mg,优选使用0.1～3mg。反应结束后,通过实施后述的亲和色谱法精制和/或羟基磷灰石柱精制,可制造GlcNAcβ1与4GlcNAc之间的糖链被水解的(Fucα1,6)GlcNAc抗体。

[0987] R-2工序糖链转移反应

[0988] 本工序是针对上述(Fucα1,6)GlcNAc抗体,利用酶反应与具有含叠氮基的PEG连接子的MSG(MSG1,MSG2)或SG型糖链噁唑啉体(以下称为“叠氮基糖链噁唑啉体”)结合,制造糖链重构抗体的工序。

[0989] 在缓冲溶液(磷酸缓冲溶液等)中,在0℃～40℃的温度下,在催化量的EndoS(D233Q/Q303L)等糖基转移酶存在下,使上述糖链切断抗体与叠氮基糖链噁唑啉体反应,由此实施糖链转移反应。反应时间为10分钟～72小时,优选1小时～6小时。EndoS酶(D233Q/Q303L)相对于抗体100mg使用1～10mg,优选使用1～3mg,叠氮基糖链噁唑啉体使用2～过量当量,优选使用2～20当量。

[0990] 反应结束后,通过实施亲和色谱法精制和羟基磷灰石柱精制可得到精制的糖链重构抗体。

[0991] 叠氮基糖链噁唑啉体可根据实施例55～57所述的方法制备。在MSG(MSG1、MSG2)或二唾液酸八糖(东京化成工业(株))中利用有机合成科学领域中公知的反应(缩合反应等)导入作为包含叠氮基的PEG连接子(N_3－L(PEG))的N_3－(CH_2CH_2－O)n_5－CH_2CH_2－NH_2。即,导

向唾液酸2位的羧酸与$N_3-(CH_2CH_2-O)n_5-CH_2-NH_2$的右末端的氨基通过缩合反应形成酰胺键。

[0992] 使用缩合反应时,作为缩合剂,可举出N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDCI)、羰基二咪唑(CDI)、2-(2H-苯并三唑-2-基)-4-(1,1,3,3-四甲基丁基)酚(BOP)、1H-苯并三唑-1-基氧基三吡咯烷基鏻六氟磷酸盐(PyBOP)、O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓六氟磷酸盐(HATU)等,作为反应中使用的溶剂,可使用二氯甲烷、DMF、THF、乙酸乙酯等或它们的混合溶剂,但没有特别的限定。

[0993] 反应温度通常为-20℃～100℃或者溶剂的沸点的范围,优选-5℃～50℃的范围。另外,根据需要可添加三乙胺、二异丙基乙胺、N-甲基吗啉或4-二甲基氨基吡啶等有机碱、或碳酸钾、碳酸钠、碳酸氢钾、碳酸氢钠等无机碱。也可加入1-羟基苯并三唑、N-羟基琥珀酰亚胺等作为反应促进剂。

[0994] 予以说明,MSG、MSG1或MSG2可通过将所述(MSG-)Asn或分离精制的(MSG1-)Asn或者(MSG2-)Asn(实施例56)使用EndoM等水解酶进行水解来得到。

[0995] 噁唑啉化可通过由MSG(MSG1、MSG2)或SG型糖链的还原末端的GlcNAc遵照公知的论文(J.Org Chem.,2009,74(5),2210-2212.Helv.Chim.Acta,2012,95,1928-1936.)的记载来制造。

[0996] 上述的糖链重构抗体的制备中,抗体水溶液的浓缩、浓度测定、缓冲液交换根据以下的共通操作A～C进行。

[0997] 共通操作A:抗体水溶液的浓缩

[0998] 在Amicon Ultra(30000～50000MWCO,Millipore Co.)的容器内加入抗体或抗体-药物偶联物溶液,通过使用离心机(Allegra X-15R,Beckman Coulter,Inc.)的离心操作(2000G～4000G下离心5～20分钟),对抗体以及后述的抗体-药物偶联物溶液进行浓缩。

[0999] 共通操作B:抗体的浓度测定

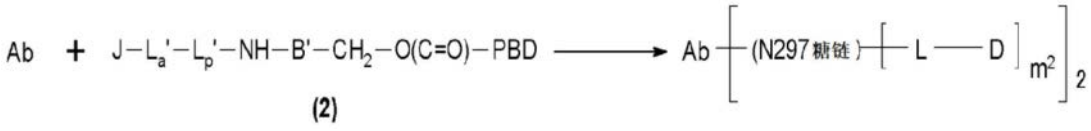
[1000] 使用UV测定器(Nanodrop 1000,Thermo Fisher Scientific Inc.)根据产商规定的方法进行抗体浓度的测定。此时,使用对于每种抗体不同的280nm吸光系数($1.3mLmg^{-1}cm^{-1}$～$1.8mLmg^{-1}cm^{-1}$)。

[1001] 共通操作C:抗体的缓冲液交换

[1002] 对于抗体水溶液,通过加入缓冲溶液(磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)、磷酸缓冲液(pH6.0)等)利用共通操作A来浓缩。数次进行该操作后,利用共通操作B进行抗体浓度的测定,使用缓冲溶液(磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)、磷酸缓冲液(pH6.0)等)调整抗体浓度为10mg/mL。

[1003] S法:偶联

[1004] 本制造方法是通过SPAAC(strain-promoted alkyne azide cycloaddition:J.AM.CHEM.SOC.2004,126,15046-15047)反应使上述糖链重构抗体与制造中间体(2)结合,制造抗体-药物偶联物的方法。式中Ab表示糖链重构抗体。

[1005] 

[1006] 通过将抗体Ab的缓冲溶液(醋酸钠溶液、磷酸钠、硼酸钠溶液等或它们的混合物)与在适当的溶剂(二甲基亚砜(DMSO)、二甲基甲酰胺(DMF)、二甲基乙酰胺(DMA)、N－甲基－2－吡咯烷酮(NMP)、丙二醇(PG)等或它们的混合物)中溶解化合物(2)而形成的溶液混合，进行SPAAC反应。

[1007] 相对于抗体1摩尔，化合物(2)为2摩尔～过量摩尔，优选1摩尔～30摩尔，有机溶剂的比率相对于抗体的缓冲液优选为1～200％v/v。反应温度为0℃～37℃，优选10℃～25℃，反应时间为1～150小时，优选6小时～100小时。反应时的pH优选为5～9。

[1008] 抗体－药物偶联物可通过上述共通操作A～C以及后述的共通操作D～F进行缓冲液交换、精制、抗体浓度以及每一分子抗体的药物平均结合数的测定，进行抗体－药物偶联物化合物(ADC)的鉴定。

[1009] 共通操作D:抗体－药物偶联物的精制

[1010] 使用市售的包含Sorbitol(5％)的醋酸缓冲液(10mM、pH5.5;本说明书称为ABS)中的任意一种缓冲液平衡NAP－25柱。在该NAP－25柱中载入抗体－药物偶联物反应水溶液(约1.5～2.5mL)，用厂商规定量的缓冲液洗脱以分离获得抗体组分。将该组分再一次置于NAP－25柱，使用缓冲液进行洗脱，重复2～3次凝胶过滤精制操作，由此得到除去了未结合的药物连接子、二甲基亚砜、丙二醇的抗体－药物偶联物。根据需要可通过共通操作A以及C来调制抗体－药物偶联物溶液的浓度。

[1011] 共通操作E:抗体－药物偶联物的抗体浓度的测定

[1012] 抗体－药物偶联物的结合药物浓度可根据下述的Lambert－Beer定律(朗伯比尔定律)进行计算。

[1013] 以下表示使用Lambert－Bee定律的式(I)。

[1014] $$\underset{\text{吸光度}}{A_{280}} = \underset{\text{摩尔吸光系数}}{\varepsilon_{280}(L\cdot mol^{-1}\cdot cm^{-1})} \times \underset{\text{摩尔浓度}}{C(mol\cdot L^{-1})} \times \underset{\text{光程长}}{l(cm)} \qquad \text{式(I)}$$

[1015] 其中，A280表示抗体－药物偶联物水溶液在280nm的吸光度，ε280表示抗体－药物偶联物在280nm的摩尔吸光系数，C(mol·L^{-1})表示抗体－药物偶联物的摩尔浓度。

[1016] 根据上述式(I)，抗体－药物偶联物的摩尔浓度C(mol·L^{-1})按照以下的式(II)求得。

[1017] $$C(mol\cdot L^{-1}) = \frac{A_{280}}{\varepsilon_{280}(L\cdot mol^{-1}\cdot cm^{-1})\cdot l(cm)} \qquad \text{式(II)}$$

[1018] 进而，两边乘以抗体－药物偶联物的摩尔质量MW(g·mol^{-1})，求得抗体－药物偶联物的重量浓度C'(mg·mL^{-1})(式(III))。

[1019] $$C'(mg\cdot mL^{-1}) = MW(g\cdot mol^{-1})\cdot C(mol\cdot L^{-1}) = \frac{A_{280}\cdot MW(g\cdot mol^{-1})}{\varepsilon_{280}(L\cdot mol^{-1}\cdot cm^{-1})\cdot l(cm)} \qquad \text{式(III)}$$

[1020] 以下，记载了上式中适用于本实施例的各个值。

[1021] 吸光度A280使用抗体-药物偶联物水溶液在280nm的UV吸光度的实测值。摩尔质量

MW(g·mol^{-1})使用由抗体的氨基酸序列求得的抗体分子量的计算推定值作为抗体-药物偶联物的摩尔质量的近似值。光程长1(cm)在1cm下测定。

[1022] 抗体药物偶联物的摩尔吸光系数ε280按照以下的式子(IV)求出。

[1023] ε_{280}=抗体摩尔吸光系数$\varepsilon_{Ab.280}$+药物摩尔吸光系数$\varepsilon_{DL.280}$×药物结合数 式(IV)

[1024] 其中,$\varepsilon_{Ab、280}$表示280nm下的抗体的摩尔吸光系数,$\varepsilon_{DL、280}$表示280nm下的药物的摩尔吸光系数。

[1025] $\varepsilon_{Ab、280}$可根据抗体的氨基酸序列通过已知的计算方法(Protein Science,1995,vol.4,2411-2423)来推定。实施例中,曲妥珠单抗的摩尔吸光系数使用$\varepsilon_{Ab、280}$=215400(计算推定值)。CLDN6抗体的摩尔吸光系数使用$\varepsilon_{Ab、280}$=221340(计算推定值),TROP2抗体的摩尔吸光系数使用$\varepsilon_{Ab、280}$=226400(计算推定值),CD98抗体的摩尔吸光系数使用$\varepsilon_{Ab、280}$=240400(计算推定值),LPS抗体的摩尔吸光系数使用$\varepsilon_{Ab、280}$=230300(计算推定值),曲妥珠单抗突变体的摩尔吸光系数使用$\varepsilon_{Ab、280}$=215057(计算推定值)。

[1026] $\varepsilon_{DL、280}$使用每次利用UV测定得到的实测值算出的值。即,测定将偶联物前体(药物)溶解成某一摩尔浓度的溶液的吸光度,使用Lambert-Beer定律通过式(I)得到的值。

[1027] 共通操作F:抗体-药物偶联物的每一分子抗体的药物平均结合数的测定

[1028] 抗体-药物偶联物的每一分子抗体的药物平均结合数可通过使用以下方法的高速液相色谱法(HPLC)分析求得。

[1029] [F-1.HPLC分析用样品的制备(抗体-药物偶联物的还原)]

[1030] 将抗体-药物偶联物溶液(约1mg/mL、60μL)与二硫苏糖醇(DTT)水溶液(100mM、15μL)混合。将混合物在37℃下保温30分钟,由此将抗体－药物偶联物的L链以及H链之间的二硫键断裂的样品用于HPLC分析。

[1031] [F－2.HPLC分析]

[1032] 在下述的测定条件下进行HPLC分析。

[1033] HPLC系统:Agilent1 290HPLC系统(Agilent Technologies)

[1034] 检测器:紫外吸光度计(测定波长:280nm、329nm)

[1035] 柱:BEH Phenyl(2.1×50mm、1.7μm、Waters Acquity)

[1036] 柱温:75℃

[1037] 流动相A:0.1%三氟醋酸(TFA)、15%异丙醇水溶液

[1038] 流动相B:0.075%TFA、15%异丙醇乙腈溶液

[1039] 梯度程序:14%－36%(0分钟－15分钟)、36%－80%(15－17分钟)、80%－14%(17分钟－17.1分钟)、14%－14%(17.1分钟－23分钟)

[1040] 样品注入量:5μL

[1041] [F－3.数据解析]

[1042] 〔F－3－1〕相对于未与药物结合的抗体的L链(L_0)以及H链(H_0),与药物结合的L链(与一个药物结合的L链:L_1)以及H链(与一个药物结合的H链:H_1,与2个药物结合的H链:H_2,与3个药物结合的H链:H_3)的疏水性与所结合的药物的数目成比例地增加,保持时间成比例地变大,因此按照L_0、L_1、H_0、H_1、H_2、H_3的顺序洗脱。L_1、H_0的顺序有时会前后颠倒,但是未与药物结合的H_0中,药物没有特征性的329nm的波长吸收。因此,通过确认329nm处的波长吸收可识别L_1、H_0。通过L_0与H_0的保持时间比较,可将检测峰分配给L_0、L_1、H_0、H_1、H_2、H_3中的任何一

个。

[1043] 〔F－3－2〕由于药物连接子有UV吸收，因此，可根据药物连接子的结合数使用L链、H链以及药物连接子的摩尔吸光系数并根据下式进行峰面积值的修正。

[1044] $$\text{L链峰面积修正值}(Li) = \text{峰面积} \times \frac{\text{L链的摩尔吸光系数}}{\text{L链的摩尔吸光系数}+\text{结合药物数}\times\text{药物连接子的摩尔吸光系数}}$$

[1045] $$\text{H链峰面积修正值}(Hi) = \text{峰面积} \times \frac{\text{H链的摩尔吸光系数}}{\text{H链的摩尔吸光系数}+\text{结合药物数}\times\text{药物连接子的摩尔吸光系数}}$$

[1046] 其中，各抗体的L链以及H链的摩尔吸光系数(280nm)可使用通过已知的计算方法(Protein Science,1995,vol.4,2411-2423)由各抗体的L链以及H链的氨基酸序列推算的值。曲妥珠单抗的情况下，根据其氨基酸序列使用26150作为L链的摩尔吸光系数的推定值，使用81290作为H链的摩尔吸光系数的推定值。同样，CLDN6抗体的情况下，使用33140作为L链的摩尔吸光系数，使用77280作为H链的摩尔吸光系数；TROP2抗体的情况下，使用26210作为L链的摩尔吸光系数，使用68990作为H链的摩尔吸光系数；CD98抗体的情况下，使用41680作为L链的摩尔吸光系数，使用78500作为H链的摩尔吸光系数；LPS抗体的情况下，使用31710作为L链的摩尔吸光系数，使用77470作为H链的摩尔吸光系数；曲妥珠单抗突变体的情况下，使用26251作为L链的摩尔吸光系数，使用81488作为H链的摩尔吸光系数；药物连接子的摩尔吸光系数(280nm)使用作为偶联物前体的化合物(1)的实测的摩尔吸光系数(280nm)。

[1047] 〔F-3-3〕根据下式计算相对于峰面积修正值合计的各链峰面积比(%)。

[1048] $$\text{L链峰面积比} = \frac{A_{Li}}{A_{L0}+A_{L1}} \times 100$$

[1049] $$\text{H链峰面积比} = \frac{A_{Hi}}{A_{H0}+A_{H1}+A_{H2}+A_{H3}} \times 100$$

[1050] A_{Li}，A_{Hi}：L_i，H_i各峰面积修正值

[1051] (F-3-4)抗体-药物偶联物的每一分子抗体的药物平均结合数按照下式计算。

[1052] 药物平均结合数＝(L_0峰面积比×0+L_0峰面积比×1+H_0峰面积比×0+H_1峰面积比×1+H_2峰面积比×2+H_3峰面积比×3)/100×2

[1053] 〈药物〉

[1054] 本发明的抗体-药物偶联物对癌细胞显示出细胞毒活性，因此可用作药物，特别是可用作针对癌的治疗剂和/或预防剂。

[1055] 作为本发明的抗体－药物偶联物所适用的癌的种类，可举出肺癌(非小细胞肺癌、小细胞肺癌等)、肾癌、尿路上皮癌、大肠癌、前列腺癌、多形性神经胶质母细胞瘤、卵巢癌(表层上皮性肿瘤、间质性肿瘤、生殖细胞肿瘤等)、胰腺癌、乳腺癌、黑色素瘤、肝癌、膀胱癌、胃癌、食道癌等、子宫内膜癌、睾丸癌(精原细胞瘤、非精原细胞瘤)、宫颈癌、胎盘绒毛膜癌、脑肿瘤、头颈癌及其转移型癌症，但作为治疗对象的癌细胞中，只要是表达抗体－药物偶联物中的抗体能够识别的蛋白质的癌细胞，就并不限定于此。

[1056] 本发明的抗体－药物偶联物可适合给药于哺乳动物，但更优选给药于人。

[1057] 作为含有本发明的抗体－药物偶联物的药物组合物中使用的物质，可根据给药量、给药浓度从该领域通常使用的制剂添加物中适当选择进行使用。

[1058] 本发明的抗体－药物偶联物能以包含一种以上药学相容性成分的药学组合物的形式给药。例如，代表性的上述药学组合物包含一种以上的药学载体(例如，灭菌液体(例如、包含水以及油(石油、源自动物、植物或合成的油(例如，花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等)))。将上述药学组合物静脉内给药的情况下，水是更具有代表性的载体。盐水溶液以及葡萄糖水溶液和甘油水溶液也可用作液体载体，特别可用于注射用溶液。合适的药学赋形剂为本领域公知的。上述组合物根据需要还可包含少量的润湿剂或乳化剂或pH缓冲剂。适合的药学载体的例子在E.W.Martin的“Remington's Pharmaceutical Sciences”中有记载。该处方对应于给药方式。

[1059] 各种递送系统是已知的，可用于本发明的抗体－药物偶联物的给药。作为导入方法，可举出皮内、肌内、腹膜内、静脉内以及皮下途径，但并不限定于此。给药例如可通过注入或大剂量注射(bolus injection)进行。在特定的优选实施方式中，上述配体药物结合体的给药是通过注入进行的。非消化道给药(parenteral administration)是优选的给药路径。

[1060] 在代表性实施方式中，上述药学组合物根据常规的程序设计适合于对人静脉内给药的药学组合物的处方。代表性的用于静脉内给药的组合物为无菌等渗水性缓冲液中的溶液。必要时，上述药物还可含有增溶剂以及用于缓和注射部位疼痛的局部麻醉剂(例如利多卡因)。通常，上述成分例如以显示活性剂量的安瓿或药囊(Sachet)等经过密封而封口的容器中的干燥冻干粉末或无水浓缩物的形式分开供给，或在单位剂型中一起混合供给。在预定上述药物通过注入给药的情况下，可通过例如装有灭菌制药用级的水或盐水的注入瓶来给药。如果通过注射给药，则注射用灭菌水或盐水的安瓿可以例如可在给药之前将上述成分混合的方式提供。

[1061] 本发明的药物组合物可为仅包含本申请的抗体－药物偶联物的药物组合物，也可为包含抗体－药物偶联物以及至少一种该抗体－药物偶联物以外的癌治疗剂的药物组合物。本发明的抗体－药物偶联物可与其他的癌治疗剂一起给药，由此可增强抗癌效果。以该目的使用的其他抗癌剂可与抗体－药物偶联物同时、分开或连续地给药至个体，也可以改变各自的给药间隔进行给药。此类癌治疗剂的实例可列举出：白蛋白结合型紫杉醇(abraxane)、卡铂(carboplatin)、顺铂(cisplatin)、吉西他滨(gemcitabine)、伊立替康(CPT－11)(irinotecan)、紫杉醇(paclitaxel)、培美曲塞(pemetrexed)、索拉非尼(sorafenib)、长春花碱(vinblastin)或WO2003/038043小册子中记载的药物和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)、芳香化酶抑制剂(阿那曲唑、来曲唑、依西美坦等)等。只要是具有抗肿瘤活性的药物就没有特别的限定。

[1062] 这样的药物组合物配制成具有所选择的组成和所需纯度的制剂、冻干制剂或者液状制剂即可。当配制成冻干制剂时，可为包含本领域使用的适当的制剂添加物的制剂。另外，同样液体制剂也可配制成包含本领域使用的各种制剂添加物的液状制剂。

[1063] 药物组合物的组成以及浓度根据给药方法而变化，但本发明的药物组合物中含有的抗体－药物偶联物就抗体－药物偶联物对抗原的亲和性，即相对于抗原的解离常数(Kd值)而言，亲和性越高(Kd值越低)，即使在小剂量下也可发挥药效。因此，在决定抗体－药物偶联物的给药量时，可根据抗体－药物偶联物与抗原的亲和性的状况设定给药量。本发明

的抗体－药物偶联物对人给药时，例如，将约0.001～100mg/kg以一次给药，或以每1～180天一次的间隔多次给药即可。

[1064] 另外，本发明的抗体或该抗体的功能性片段也可作为药物使用。此时，上述＜药物＞相关的“抗体－药物偶联物”的记载都可适当替换为“抗体或该抗体的功能性片段”的记载。

[1065] 进而，本发明的游离药物(新PBD衍生物化合物)、其盐或它们的水合物也可作为药物使用。此时，上述＜药物＞相关的“抗体－药物偶联物”的记载可适当地替换为“游离药物(新PBD衍生物化合物)、其盐或它们的水合物”的记载。

[1066] 实施例

[1067] 通过以下所示的实施例具体说明本发明，但本发明并不限定于此。另外，其中的所有含义都不是限定解释。另外，本说明书中，没有特别描述的试剂、溶剂以及起始原料都可从市售的供给源中容易地得到。

[1068] 参考例1：曲妥珠单抗－Tesirine

[1069] 工序1：抗体与药物连接子的偶联

[1070] 在曲妥珠单抗(参考例3)的5mM乙二胺四乙酸－磷酸缓冲生理盐水(pH6.5)溶液(9.91mg/mL，0.70mL)中，在20℃下加入磷酸二钾水溶液(1.0M，0.0112mL)、三(2－羧乙基)膦盐酸盐水溶液(10mM、0.0086mL)，在20℃下反应60分钟，再在室温下反应30分钟。在反应溶液中加入参考了文献(Med.Chem.Lett.2016，7，983－987)合成的Tesirine(0.36mg)的二甲基乙酰胺溶液(0.0415mL)，在室温下反应1小时。在反应溶液中加入N－乙酰半胱氨酸水溶液(100mM，0.0024mL)，反应30分钟使反应停止。

[1071] 精制操作：使用共通操作D对上述溶液进行精制，得到具有目标化合物的溶液3.5mL。

[1072] 特性评价：使用共通操作E、F得到下述的特性值。

[1073] 抗体浓度：1.40mg/mL，抗体产量：4.90mg(71％)，每一分子抗体的药物平均结合数(n)：2.0

[1074] 参考例2：抗CLDN6(H1L1)－Tesirine

[1075] 工序1：抗体与药物连接子的偶联

[1076] 在抗CLDN6(H1L1)抗体的5mM乙二胺四乙酸－磷酸缓冲生理盐水(pH6.5)溶液(9.87mg/mL，0.45mL)中，在20℃下加入磷酸二钾水溶液(1.0M，0.0072mL)、三(2－羧乙基)膦盐酸盐水溶液(10mM，0.0041mL)，在20℃下反应90分钟。在反应溶液中加入参考了文献(Med.Chem.Lett.2016，7，983－987)合成的Tesirine(0.15mg)的N，N－二甲基乙酰胺溶液(0.0277mL)，在20度下反应1小时。在反应溶液中加入N－乙酰半胱氨酸水溶液(100mM，0.001mL)，反应30分钟使反应停止。

[1077] 精制操作：使用共通操作D对上述溶液进行精制，得到具有目标化合物的溶液3.5mL。

[1078] 特性评价：使用共通操作E、F得到下述的特性值。

[1079] 抗体浓度：1.56mg/mL，抗体产量：3.90mg(88％)，每一分子抗体的药物平均结合数(n)：2.1

[1080] 参考例3：抗HER2抗体曲妥珠单抗

[1081] 抗HER2抗体参照US5821337进行制作。曲妥珠单抗的轻链以及重链的氨基酸序列示于序列号64以及序列号65。

[1082] 参考例4:抗LPS抗体h#1G5－H1L1

[1083] 抗LPS抗体参照WO2015/046505进行制作。h#1G5－H1L1的轻链以及重链的氨基酸序列示于序列号66以及序列号67。

[1084] 参考例5:抗TROP2抗体hRS7

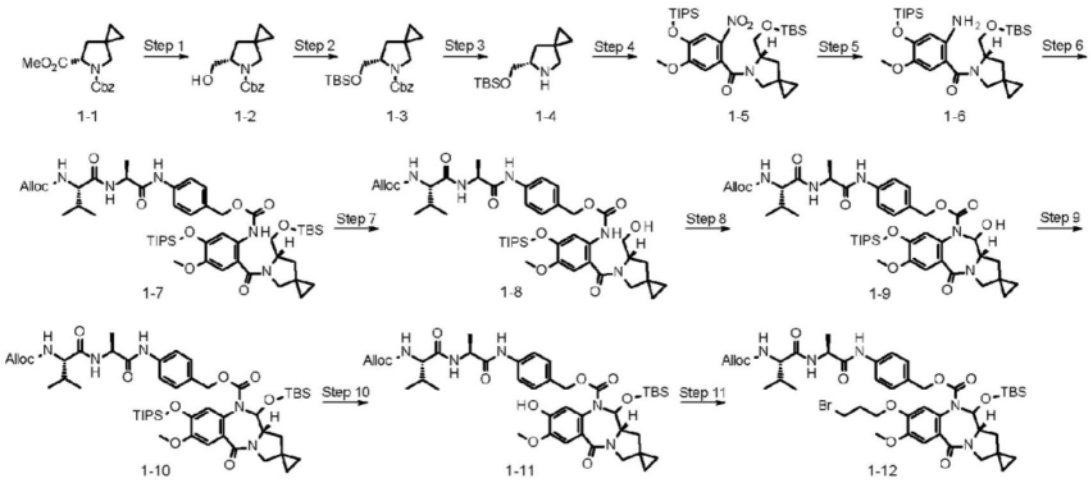
[1085] 抗TROP2抗体参照WO2003/074566,WO2015/098099(参考例1)制作。hRS7的轻链以及重链的氨基酸序列示于序列号68以及序列号69。

[1086] 参考例6:抗CD98抗体hM23－H1L1

[1087] 抗CD98抗体参照WO2015/146132制作。hM23－H1L1的轻链以及重链的氨基酸序列示于序列号70以及序列号71。

[1088] 〔制造中间体的合成〕

[1089] 实施例1:中间体1

[1090] 

[1091] 工序1:(6S)－6－(羟甲基)－5－氮杂螺[2.4]庚烷5－羧酸苄酯

[1092] 在5－苄基6－甲基(6S)－5－氮杂螺[2.4]庚烷－5,6－二羧酸酯(104mmol,WO2012087596)的THF(500mL)溶液中,在0℃、一点点地加入硼氢化锂(4.30g,178mmol)。在0℃搅拌30分钟后,在室温下搅拌2小时。在0℃加入水(180mL)、2当量浓度的盐酸(186mL),减压蒸馏除去。将得到的残渣用乙酸乙酯提取4次,用饱和盐水清洗有机层后,用无水硫酸钠进行干燥。减压蒸馏,将得到的残渣(27.9g,90%)直接用于下一步的反应中。

[1093] 工序2:(6S)－6－({[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}甲基)－5－氮杂螺[2.4]庚烷－5－羧酸苄酯

[1094] 在上述工序1所得到的化合物(27.9g,107mmol)与咪唑(14.5g,214mmol)的二氯甲烷(300mL)溶液中,在室温下加入叔丁基二甲基氯硅烷(24.2g,160mmol),在室温下搅拌18小时。将反应溶液用饱和柠檬酸水溶液、饱和碳酸氢钠水溶液、饱和盐水进行清洗,用无水硫酸钠干燥后,减压蒸馏除去。将得到的残渣用硅胶柱色谱法[己烷:乙酸乙酯＝100:0(v/v)～50:50(v/v)]进行精制,得到目标产物(32.5g,81%)。

[1095] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.39-7.34(5H,m),5.23-5.11(2H,m),4.10-3.48(4H,m),3.16-3.14(1H,m)2.15-2.04(1H,m),1.81-1.77(1H,m),0.91-0.88(9H,m),0.65-0.55(4H,m),0.08-0.01(6H,m).

[1096] MS(APCI)m/z:376(M+H)$^+$

[1097] 工序3:(6S)－6－({[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}甲基)－5－氮杂螺[2.4]庚烷

[1098] 在上述工序2所得到的化合物(32.5g,86.5mmol)的乙醇(400mL)溶液中,在室温下加入7.5％钯碳催化剂(54％水分、5.00g),在室温、氢气氛下搅拌6小时。将反应溶液进行硅藻土过滤,减压蒸馏除去滤液,得到目标产物(21.3g,定量)。

[1099] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:3.79-3.77(1H,m),3.71-3.69(1H,m),3.65-3.60(1H,m),3.01-2.98(2H,m),1.81-1.71(2H,m),0.90(9H,s),0.65-0.57(4H,m),0.08(3H,s),0.07(3H,s).

[1100] MS(APCI,ESI)m/z:242(M+H)$^+$

[1101] 工序4:[(6S)－6－({[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}甲基)－5－氮杂螺[2.4]庚－5－基](5－甲氧基－2－硝基－4－{[三(丙烷－2－基)硅烷基]氧基}苯基)甲酮

[1102] 在5－甲氧基－2－硝基－4－{三(丙烷－2－基)硅烷基]氧基}苯甲酸(52.2g、141mmol、US20150283262)与1－羟基苯并三唑一水合物(23.8g、155mmol)的二氯甲烷(500mL)溶液中,在冰冷却下加入N,N'－二环已基碳二亚胺(35.0g、170mmol)。将反应混合物在室温下搅拌。羧酸消失后,在－60℃下缓慢滴入上述工序3所得到的化合物(34.1g,141mmol)与三乙胺(29.4mL,212mmol)的二氯甲烷(100mL)溶液。将反应溶液在室温下搅拌一晚上以后,在反应混合物中加入饱和碳酸氢钠水溶液,用氯仿提取反应混合物。将有机层用水以及饱和盐水进行清洗,用无水硫酸镁进行干燥。在减压蒸馏除去得到的残渣中加入乙酸乙酯和二乙醚,过滤除去固体成分,对滤液进行减压蒸馏除去,将得到的残渣用硅胶柱色谱法[己烷:乙酸乙酯＝100:0(v/v)～25:75(v/v)]进行精制,得到目标产物(55.0g,66％)。

[1103] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.72-7.66(1H,m),6.80-6.73(1H,m),4.53-4.49(1H,m),4.04-3.95(1H,m),3.91-3.88(3H,m),3.59-3.54(1H,m),3.36-3.25(0.5H,m),3.01-2.96(1.5H,m),2.24-2.20(0.3H,m),2.09-2.05(0.7H,m),2.00-1.97(0.7H,m),1.69-1.67(0.3H,m),1.32-1.24(3H,m),1.12-1.05(18H,m),0.93-0.91(6H,m),0.79-0.77(3H,m),0.71-0.62(2H,m),0.57-0.40(2H,m),0.12-0.10(4H,m),0.11-0.15(2H,m).

[1104] MS(APCI,ESI)m/z:593(M+H)$^+$

[1105] 工序5:(2－氨基－5－甲氧基－4－{[三(丙烷－2－基)硅烷基]氧基}苯基)[(6S)－6－({[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}甲基)－5－氮杂螺[2.4]庚－5－基]甲酮

[1106] 在上述工序4所得到的化合物(55.0g,92.8mmol)的乙醇(300mL)溶液中,在氮气氛下加入7.5％钯碳(10.0g)。立即将氮气球替换成氢气球,将反应混合物在氢气氛下、室温下剧烈搅拌。原料消失后,过滤反应混合物,将滤液进行减压蒸馏除去,将得到的目标产物(52.2g,100％)直接用于下一个反应中。

[1107] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:6.71(1H,s),6.25(1H,s),4.55-4.28(2H,m),3.97(1H,m),3.75-3.62(3H,m),3.70(3H,s),3.09-3.07(1H,m),2.24-2.19(1H,m),1.81-1.68(1H,m),1.27-1.22(3H,m),1.09-1.05(18H,m),0.90(9H,s),0.65-0.46(4H,m),0.07-0.03(6H,m).

[1108] MS(APCI,ESI)m/z:563(M+H)$^+$

[1109] 工序6:N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－缬氨酰基－N－[4－({[(2－{[(6S)－6－({[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}甲基)－5－氮杂螺[2.4]庚－5－基]羰基}－4－甲氧基－5－{[三(丙烷－2－基)硅烷基]氧基}苯基)氨基甲酰基]氧基}甲基)苯

基]－L－丙氨酸酰胺

[1110] 在上述工序5所得到的化合物(18.6g,33.0mmol)以及三乙胺(6.26mL,45.2mmol)的THF(300mL)溶液中,在乙醇冰浴上缓慢添加三光气(4.22g,14.2mmol)。添加后,在冰冷却的反应混合物中,缓慢滴入N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－缬氨酰基－N－[4－(羟甲基)苯基]－L－丙氨酸酰胺(11.4g,30.2mmol,WO2011130598)与三乙胺(6.26mL,45.2mmol)的THF(100mL)、N,N－二甲基甲酰胺(30mL)混合溶液。滴入后,撤去冰浴,将反应混合物在氮气氛下在40℃下搅拌。原料消失后,在反应混合物中加入水,用乙酸乙酯提取反应混合物。用饱和盐水清洗有机层,用无水硫酸钠进行干燥。过滤后,将减压蒸馏除去而得到的残渣用硅胶柱色谱法[己烷:乙酸乙酯＝100:0(v/v)～40:60(v/v)]进行精制,得到目标产物(23.5g,74％)。

[1111] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.99(1H,m),8.58(1H,s),7.80(1H,s),7.55-7.53(2H,m),7.34-7.32(2H,m),6.77-6.75(2H,m),5.94-5.87(1H,m),5.40-5.38(1H,m),5.33-5.29(1H,m),5.23-5.21(1H,m),5.13(1H,m),5.10(2H,m),4.69-4.64(1H,m),4.62-4.52(2H,m),4.06-4.03(1H,m),3.98(1H,m),3.76-3.65(6H,m),3.04(1H,m),2.28-2.26(1H,m),2.18-2.13(1H,m),1.46(3H,m),1.32-1.25(3H,m),1.11-1.09(18H,m),0.99-0.84(15H,m),0.65-0.40(4H,m),0.08-0.00(6H,m).

[1112] MS(APCI,ESI)m/z:966$(M+H)^+$

[1113] 工序7:N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－缬氨酰基－N－[4－({[(2－{[(6S)－6－(羟甲基)－5－氮杂螺[2.4]庚－5－基]羰基}－4－甲氧基－5－{[三(丙烷－2－基)硅烷基]氧基}苯基)氨基甲酰基]氧基}甲基)苯基]－L－丙氨酸酰胺

[1114] 在上述工序6所得到的化合物(23.5g,24.3mmol)的THF(50mL)、甲醇(50mL)、水(44mL)溶液中,在室温下加入醋酸(200mL)。将反应混合物在室温下搅拌。原料消失后,将反应混合物用乙酸乙酯提取。将有机层用水以及饱和盐水进行清洗,用无水硫酸钠进行干燥。过滤后,将减压蒸馏除去得到的残渣用硅胶柱色谱法[己烷:乙酸乙酯＝100:0(v/v)～0:100(v/v)]进行精制,得到目标产物(18.0g,87％)。

[1115] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.64-8.62(1H,m),8.50(1H,m),7.69(1H,m),7.55-7.53(2H,m),7.34-7.32(2H,m),6.79-6.75(3H,m),5.91-5.89(1H,m),5.39(1H,m),5.32-5.29(1H,m),5.23-5.21(1H,m),4.68-4.54(4H,m),4.31(1H,m),4.06-4.04(1H,m),3.81-3.79(3H,m),3.76(3H,s),3.63-3.61(1H,m),3.13-3.11(1H,m),2.16-2.13(1H,m),1.87-1.81(2H,m),1.46-1.43(3H,m),1.30-1.24(3H,m),1.12-1.08(18H,m),0.98-0.91(6H,m),0.63-0.45(4H,m).

[1116] MS(APCI,ESI)m/z:852$(M+H)^+$

[1117] 工序8:N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－5'－氧代－8'－{[三(丙烷－2－基)硅烷基]氧基}－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[1118] 在二甲基亚砜(3.75mL,52.8mmol)的二氯甲烷(300mL)溶液中,在氮气氛下,在－78℃缓慢滴入草酰氯(2.17mL,25.3mmol)。滴入后,将反应混合物在－78℃下搅拌。在反应混合物中缓慢滴入上述工序7所得到的化合物(18.0g,21.1mmol)的二氯甲烷(50.0mL)溶

液。在反应溶液中在－78℃下加入三乙胺(14.6mL,105mmol)。添加后,除去制冷剂浴,缓慢升温至室温。原料消失后,在反应混合物中加入水,将反应混合物用氯仿(200mL)提取。将有机层用水以及饱和盐水进行清洗,用无水硫酸镁进行干燥。过滤后,将减压蒸馏除去而得到的残渣用硅胶柱色谱法[己烷:乙酸乙酯＝100:0(v/v)～0:60(v/v)]进行精制,得到目标产物(16.5g,92%)。

[1119] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.51-8.36(1H,m),7.54-7.38(2H,m),7.22-7.07(3H,m),6.73-6.64(1H,m),5.94-5.87(2H,m),5.33-5.22(3H,m),5.09(1H,m),4.97(1H,m),4.64-4.58(4H,m),4.02-4.00(1H,m),3.86-3.83(3H,m),3.75-3.70(1H,m),3.61-3.54(2H,m),3.38-3.29(1H,m),2.40(1H,m),2.16-2.14(1H,m),1.74-1.71(1H,m),1.44(3H,m),1.18-1.16(3H,m),1.05-1.00(18H,m),0.97-0.92(6H,m),0.72-0.60(4H,m).

[1120] MS(APCI,ESI)m/z:850$(M+H)^+$

[1121] 工序9:N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－{[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}－7'－甲氧基－5'－氧代－8'－{[三(丙烷－2－基)硅烷基]氧基}－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[1122] 在上述工序8所得到的化合物(12.0g,14.1mmol)以及2,6－二甲基吡啶(6.58mL,56.5mmol)的二氯甲烷(200mL)溶液中,在氮气氛下,在0℃缓慢滴入三氟甲基磺酸叔丁基二甲基硅烷酯(9.73mL,42.3mmol)。在冰冷却下搅拌10分钟后,除去冰浴,在室温下进行搅拌。原料消失后,在反应混合物中加入水,用氯仿提取反应混合物。将有机层用水以及饱和盐水进行清洗,用无水硫酸钠进行干燥。过滤后,将减压蒸馏除去而得到的残渣用硅胶柱色谱法[己烷:乙酸乙酯＝100:0(v/v)～25:75(v/v)]进行精制,得到目标产物(8.12g,60%)。

[1123] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.67-8.45(1H,m),7.50-7.44(2H,m),7.19(1H,s),7.13(2H,m),6.95(2H,m),6.62-6.57(2H,m),6.01(1H,m),5.95-5.86(1H,m),5.33-5.13(3H,m),4.82(1H,m),4.65-4.54(3H,m),4.03-4.01(1H,m),3.84-3.82(3H,m),3.73-3.66(1H,m),3.50-3.48(1H,m),3.27(1H,m),2.37-2.33(1H,m),2.19-2.13(1H,m),1.54-1.43(3H,m),1.22-1.13(3H,m),1.10-1.00(18H,m),0.97-0.91(6H,m),0.81(9H,s),0.76-0.59(4H,m),0.19--0.09(6H,m).

[1124] MS(APCI,ESI)m/z:964$(M+H)^+$

[1125] 工序10:N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－{[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}－8'－羟基－7'－甲氧基－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[1126] 在上述工序9所得到的化合物(8.12g,8.42mmol)的N,N－二甲基甲酰胺(90mL)与水(2mL)溶液中,加入醋酸锂(0.611g,9.26mmol),在室温下进行搅拌。原料消失后,在反应混合物中加入水,用乙酸乙酯进行提取。将有机层用水以及饱和盐水进行清洗,用无水硫酸钠进行干燥。过滤后,将减压蒸馏除去而得到的残渣用硅胶柱色谱法[己烷:乙酸乙酯＝100:0(v/v)～0:100(v/v)]进行精制,得到目标产物(5.48g,81%)。

[1127] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.76-8.60(1H,m),8.02-7.56(1H,m),7.45-7.44(2H,m),7.21(1H,s),7.10-7.09(2H,m),6.81-6.74(1H,m),6.65(1H,s),6.23(1H,s),6.01-5.99(1H,m),

5.95-5.84(1H,m),5.41-5.20(2H,m),5.16(1H,m),4.84(1H,m),4.67-4.54(4H,m),4.05-4.03(1H,m),3.87(3H,s),3.71(1H,m),3.55-3.51(1H,m),3.26(1H,m),2.35(1H,m),2.18-2.12(1H,m),1.55-1.42(3H,m),0.97-0.92(6H,m),0.81(9H,s),0.76-0.61(4H,m),0.20-0.06(6H,m).

[1128] MS(APCI,ESI)m/z:808$(M+H)^+$

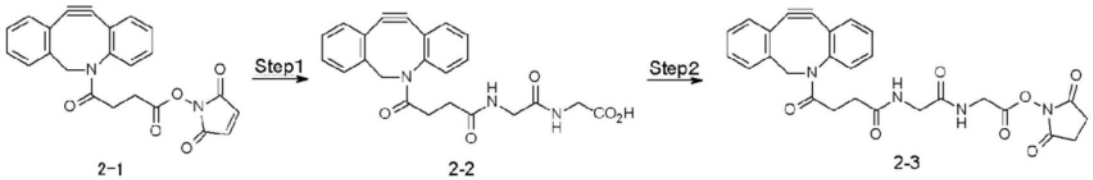
[1129] 工序11:N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－8'－(3－溴代丙氧基)－11'－{[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}－7'－甲氧基－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[1130] 将上述工序10所得到的化合物(2.40g,2.97mmol)与实施例4工序1同样地反应,得到目标产物(2.73g,99%)。

[1131] ^{1}H-NMR(DMSO-D6)δ:10.01-9.86(1H,m),8.24-8.04(2H,m),7.64-7.54(2H,m),7.32-7.14(4H,m),6.59-6.48(1H,m),5.94-5.88(2H,m),5.32-4.76(5H,m),4.44-4.38(3H,m),3.87-3.81(5H,m),3.64-3.55(2H,m),3.41(1H,m),3.14(1H,m),2.45-2.09(4H,m),1.97-1.94(1H,m),1.44-1.30(4H,m),0.89-0.53(9H,m),0.79(9H,s),0.13-0.06(6H,m).

[1132] MS(APCI,ESI)m/z:930[81Br,$(M+H)^+$],928[79Br,$(M+H)^+$].

[1133] 实施例2:中间体2

[1134] 

[1135] 工序1:N－[4－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]甘氨酰甘氨酸

[1136] 在甘氨酰甘氨酸(0.328g,2.49mmol)、N,N－二异丙基乙胺(0.433mL,2.49mmol)与N,N－二甲基甲酰胺(20mL)的混合物中,在室温下加入1－{[4－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]氧基}吡咯烷－2,5－二酮(1.00g,2.49mmol,Click Chemistry Tools)、水(10mL),在室温下搅拌一晚。减压蒸馏除去,将得到的残渣用硅胶柱色谱法[氯仿:CMW＝100:0(v/v)～0:100(v/v)]进行精制,得到目标产物(0.930g,89%)。

[1137] CMW是氯仿:甲醇:水＝7:3:1(v/v/v)的分配有机层

[1138] ^{1}H-NMR(DMSO-D_6)δ:12.58(1H,s),8.14-8.12(1H,m),8.08-8.07(1H,m),7.69-7.68(1H,m),7.62-7.61(1H,m),7.53-7.45(3H,m),7.40-7.29(3H,m),5.05-5.01(1H,m),3.73-3.72(2H,m),3.66-3.60(3H,m),2.66-2.60(1H,m),2.33-2.24(1H,m),2.08-2.04(1H,m),1.81-1.77(1H,m).

[1139] MS(APCI,ESI)m/z:420[$(M+H)^+$].

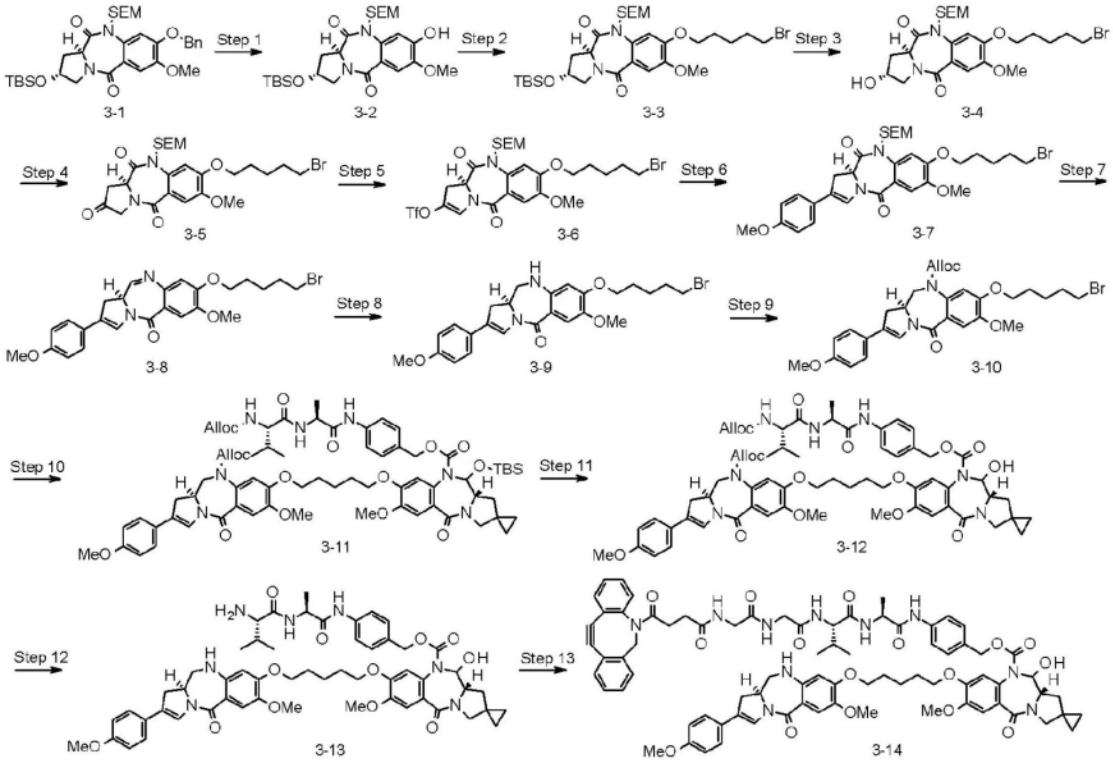
[1140] 工序2:N－[4－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]甘氨酰甘氨酸2,5－二氧代吡咯烷－1－基酯

[1141] 在上述工序1所得到的化合物(0.612g,1.46mmol))、N－羟基琥珀酰亚胺(0.168g,1.459mmol)的二氯甲烷(6mL)溶液中,加入1－乙基－3－(3－二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐

酸盐(0.420g,2.19mmol),在室温下搅拌21小时。减压蒸馏除去,将得到的残渣用硅胶柱色谱法[氯仿:CMW=100:0(v/v)～0:100(v/v)]进行精制,得到目标产物(0.375g,50%)。

[1142] CMW为氯仿:甲醇:水=7:3:1(v/v/v)的分配有机层

[1143] 实施例3:药物连接子1

[1144] 

[1145] 工序1:(2R,11aS)-2-{[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}-8-羟基-7-甲氧基-10-{[2-(三甲基硅烷基)乙氧基]甲基}-2,3-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-5,11(10H,11aH)-二酮

[1146] 在(2R,11aS)-8-(苄氧基)-2-{[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}-7-甲氧基-10-{[2-(三甲基硅烷基)乙氧基]甲基}-2,3-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-5,11(10H,11aH)-二酮(25.5g,41.6mmol,WO2016149546)的THF(150mL)、乙醇(150mL)溶液中,在氮气氛下,加入5%钯碳(54%水分,10.0g)后,将反应溶液在氢气氛下,在室温下搅拌三天。在反应溶液中加入氯仿,用硅藻土过滤后,将滤液减压蒸馏。将得到的残渣用硅胶柱色谱法[己烷:乙酸乙酯=100:0(v/v)～50:50(v/v)]进行精制,得到目标产物(19.4g,89%)。

[1147] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.36(1H,s),7.25(1H,s),6.01(1H,s),5.45-5.43(1H,m),4.69-4.67(1H,m),4.60-4.55(1H,m),4.23-4.21(1H,m),3.96(3H,s),3.76-3.68(2H,m),3.63-3.61(1H,m),3.56-3.53(1H,m),2.88-2.83(1H,m),2.03-2.00(1H,m),1.00-0.98(2H,m),0.87(9H,s),0.10(6H,s),0.02(9H,s).

[1148] MS(APCI,ESI)m/z:523$(M+H)^+$

[1149] 工序2:(2R,11aS)-8-[(5-溴代戊基)氧基]-2-{[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}-7-甲氧基-10-{[2-(三甲基硅烷基)乙氧基]甲基}-2,3-二氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓-5,11(10H,11aH)-二酮

[1150] 在上述工序1所得到的化合物(10.8g,20.7mmol)的N,N-二甲基甲酰胺(30mL)溶

液中，室温下加入1,5－二溴戊烷(23.8g,103mmol)、碳酸钾(3.43g,24.8mmol)。在室温下搅拌3小时后，在反应溶液中加入水，用乙酸乙酯提取。将得到的有机层用饱和盐水进行清洗，用硫酸钠进行干燥后，减压蒸馏除去。将得到的残渣用硅胶柱色谱法[己烷:乙酸乙酯＝90:10(v/v)～50:50(v/v)]进行精制，得到目标产物(14.5g,定量)。

[1151] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.34(1H,s),7.21(1H,s),5.52-5.49(1H,m),4.63-4.62(1H,m),4.58-4.55(1H,m),4.24-4.22(1H,m),4.07-4.04(2H,m),3.92(3H,s),3.82-3.64(3H,m),3.56-3.53(1H,m),3.45-3.43(2H,m),2.86-2.84(1H,m),2.04-2.00(1H,m),1.97-1.87(4H,m),1.66-1.62(2H,m),1.01-0.98(2H,m),0.87(9H,s),0.10(6H,s),0.04(9H,s).

[1152] MS(APCI,ESI)m/z:673[^{81}Br,$(M+H)^+$],671[^{79}Br,$(M+H)^+$].

[1153] 工序3:(2R,11aS)－8－[(5－溴代戊基)氧基]－2－羟基－7－甲氧基－10－{[2－(三甲基硅烷基)乙氧基]甲基}－2,3－二氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－5,11(10H,11aH)－二酮

[1154] 在上述工序2所得到的化合物(21.5mmol)的THF(40mL)溶液中，在0℃下加入1mol/L的氟化四丁基铵THF溶液(28.0mL,28.0mmol)。在室温下搅拌30分钟后，在反应溶液中加入水、用乙酸乙酯进行提取，将得到的有机层用饱和盐水进行清洗。用硫酸钠进行干燥后，减压蒸馏除去。将得到的残渣用硅胶柱色谱法[氯仿:甲醇＝97.5:2.5(v/v)～92.5:7.5(v/v)]进行精制，得到目标产物(11.3g,94%)。

[1155] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.34(1H,s),7.21(1H,s),5.53-5.50(1H,m),4.69-4.64(2H,m),4.32-4.30(1H,m),4.10-4.00(2H,m),3.91(3H,s),3.88-3.75(2H,m),3.73-3.64(2H,m),3.45-3.44(2H,m),2.99-2.96(1H,m),2.15-2.09(1H,m),1.99-1.85(5H,m),1.68-1.62(2H,m),1.01-0.95(2H,m),0.04(9H,s).

[1156] MS(APCI,ESI)m/z:559[^{81}Br,$(M+H)^+$],557[^{79}Br,$(M+H)^+$].

[1157] 工序4:(11aS)－8－[(5－溴代戊基)氧基]－7－甲氧基－10－{[2－(三甲基硅烷基)乙氧基]甲基}－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－2,5,11(3H,10H,11aH)－三酮

[1158] 在上述工序3所得到的化合物(11.3g,20.2mmol)、四丁基溴化铵(0.325g,1.01mmol)、溴化钾(0.240g,2.02mmol)溶解于饱和碳酸氢钠水溶液(60mL)、二氯甲烷(60mL)中，在0℃下加入nor－AZADO(0.0279g,0.202mmol)、次氯酸钠五水合物(2.03g,27.2mmol)，在0℃下搅拌30分钟。由于原料残留，在0℃下加入次氯酸钠五水合物(1.00g,13.4mmol)，在0℃下搅拌15分钟。进而在0℃下加入次氯酸钠五水合物(0.300g,4.03mmol)，在0℃下搅拌15分钟，用TLC(thin layer chromatography:薄层色谱法)确认原料消失。在反应溶液中加入硫代硫酸钠水溶液，用氯仿提取，将得到的有机层用硫酸钠进行干燥。减压蒸馏除去，将得到的残渣用硅胶柱色谱法[己烷:乙酸乙酯＝75:25(v/v)～40:60(v/v)]进行精制，得到目标产物(9.74g,87%)。

[1159] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.33(1H,s),7.24(1H,s),5.56-5.53(1H,m),4.71-4.69(1H,m),4.66-4.63(1H,m),4.27-4.22(1H,m),4.12-4.02(2H,m),3.93-3.88(4H,m),3.82-3.75(1H,m),3.69-3.67(1H,m),3.61-3.56(1H,m),3.46-3.44(2H,m),2.82-2.77(1H,m),1.97-1.89(4H,m),1.68-1.64(2H,m),1.05-0.93(2H,m),0.04(9H,s).

[1160] MS(APCI,ESI)m/z:557[^{81}Br,$(M+H)^+$],555[^{79}Br,$(M+H)^+$].

[1161] 工序5:(11aS)－8－[(5－溴代戊基)氧基]－7－甲氧基－5,11－二氧代－10－{[2－(三甲基硅烷基)乙氧基]甲基}－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－2－基三氟甲磺酸酯

[1162] 在上述工序4所得到的化合物(9.74g,17.5mmol)的二氯甲烷(160mL)溶液中,在－40℃下加入2,6－二甲基吡啶(8.17mL,70.1mmol),在－40℃下搅拌10分钟。在反应溶液中在－40℃下加入三氟甲磺酸酐(8.85mL,52.6mmol),在－40℃下搅拌30分钟。在反应溶液中加入10％柠檬酸水溶液,用氯仿提取,将得到的有机层用硫酸钠进行干燥。减压蒸馏除去,将得到的残渣用硅胶柱色谱法[己烷:乙酸乙酯＝95:5(v/v)～70:35(v/v)]精制后,用NH_2硅胶色谱法[己烷:乙酸乙酯＝95:5(v/v)～65:35(v/v)]进行精制,得到目标产物(7.10g,59％)。

[1163] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.32(1H,s),7.24(1H,s),7.15-7.14(1H,m),5.56-5.53(1H,m),4.70-4.68(1H,m),4.66-4.63(1H,m),4.11-4.01(2H,m),3.94-3.90(4H,m),3.84-3.75(1H,m),3.73-3.68(1H,m),3.46-3.44(2H,m),3.18-3.14(1H,m),1.96-1.88(4H,m),1.69-1.61(2H,m),1.02-0.92(2H,m),0.04(9H,s).

[1164] MS(APCI,ESI)m/z:689[^{81}Br,$(M+H)^+$],687[^{79}Br,$(M+H)^+$].

[1165] 工序6:(11aS)－8－[(5－溴代戊基)氧基]－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－10－{[2－(三甲基硅烷基)乙氧基]甲基}－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－5,11(10H,11aH)－二酮

[1166] 在上述工序5所得到的化合物(2.00g,2.91mmol)、4－甲氧基苯基硼酸(0.884g,5.82mmol)、四(三苯基膦)钯(0)(0.336g,0.291mmol)、碳酸钠(1.23g,11.6mmol)的混合物中在室温下加入甲苯(20mL)、乙醇(10mL)、水(10mL)。将反应溶液在室温下搅拌30分钟后,将反应溶液用乙酸乙酯进行提取,用水、饱和盐水进行清洗。将有机层用硫酸钠进行干燥后,减压蒸馏除去。将得到的残渣用硅胶柱色谱法[己烷:乙酸乙酯＝90:10(v/v)～50:50(v/v)]进行精制,得到目标产物(1.71g,91％)。

[1167] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.38-7.37(3H,m),7.33(1H,s),7.25(1H,s),6.89-6.88(2H,m),5.56-5.54(1H,m),4.71-4.68(1H,m),4.65-4.62(1H,m),4.09-4.04(2H,m),3.96-3.91(4H,m),3.85-3.66(5H,m),3.46-3.45(2H,m),3.16-3.12(1H,m),1.99-1.94(4H,m),1.69-1.64(2H,m),1.00-0.98(2H,m),0.04(9H,s).

[1168] MS(APCI,ESI)m/z:647[^{81}Br,$(M+H)^+$],645[^{79}Br,$(M+H)^+$].

[1169] 工序7:(11aS)－8－[(5－溴代戊基)氧基]－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－1,11a－二氢－5H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－5－酮

[1170] 将上述工序6所得到的化合物(0.789g,1.22mmol)溶解于乙醇(10mL)、THF(10mL)中,在0℃下加入2.0M的硼氢化锂四氢呋喃溶液(6.11mL,12.2mmol),在0℃下搅拌3小时。在反应溶液中加入水,用氯仿提取,将得到的有机层用硫酸钠进行干燥。减压蒸馏除去,将得到的残渣溶解于二氯甲烷(10mL)、乙醇(20mL)、水(10mL)中,在室温下加入硅胶(4g),在室温下搅拌4天。过滤除去硅胶,加入水,用氯仿进行提取,将得到的有机层用硫酸钠进行干燥。减压蒸馏除去,将得到的残渣用硅胶柱色谱法[己烷:乙酸乙酯＝60:40(v/v)～25:75(v/v)]进行精制,得到目标产物(0.496g,81％)。

[1171] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.90-7.89(1H,m),7.53(1H,s),7.40-7.40(1H,m),7.35-7.34

(2H,m),6.92-6.90(2H,m),6.83-6.81(1H,m),4.43-4.40(1H,m),4.13-4.06(2H,m),3.96(3H,s),3.84(3H,s),3.61-3.57(1H,m),3.47-3.36(3H,m),2.00-1.92(4H,m),1.67-1.63(2H,m).

[1172] MS(APCI,ESI)m/z:501[^{81}Br,$(M+H)^+$],499[^{79}Br,$(M+H)^+$].

[1173] 工序8:(11aS)－8－[(5－溴代戊基)氧基]－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－1,10,11,11a－四氢－5H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－5－酮

[1174] 在上述工序7所得到的化合物(0.496g,0.992mmol)的二氯甲烷(20mL)溶液中在0℃下加入三乙酰氧基硼氢化钠(0.421g,1.99mmol)。在室温下搅拌2小时后,加入饱和碳酸氢钠水溶液,用氯仿进行提取。将有机层用硫酸钠进行干燥,减压蒸馏除去后,将得到的残渣用硅胶柱色谱法[己烷:乙酸乙酯＝60:40(v/v)～25:75(v/v)]进行精制,得到目标产物(0.426g,86%)。

[1175] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.53-7.53(2H,m),7.32-7.30(2H,m),6.89-6.87(2H,m),6.05(1H,s),4.33-4.27(2H,m),4.00-3.98(2H,m),3.86(3H,s),3.82(3H,s),3.57-3.55(2H,m),3.42-3.38(3H,m),2.76-2.72(1H,m),1.96-1.88(4H,m),1.65-1.62(2H,m).

[1176] MS(APCI,ESI)m/z:503[^{81}Br,$(M+H)^+$],501[^{79}Br,$(M+H)^+$].

[1177] 工序9:(11aS)－8－[(5－溴代戊基)氧基]－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－11,11a－二氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－10(5H)－羧酸丙－2－烯－1－基酯

[1178] 在上述工序8所得到的化合物(0.426g,0.849mmol)的二氯甲烷(30mL)溶液中,在0℃下加入吡啶(0.102mL、1.27mmol)、氯甲酸烯丙酯(0.374mL,3.54mmol),在0℃下搅拌15分钟。在反应溶液中加入10％柠檬酸水溶液,用氯仿提取,将得到的有机层用饱和碳酸氢钠水溶液清洗后,用硫酸钠进行干燥。减压蒸馏除去,将得到的残渣用硅胶柱色谱法[己烷:乙酸乙酯＝90:10(v/v)～50:50(v/v)]进行精制,得到目标产物(0.465g,94%)。

[1179] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.38(1H,s),7.31-7.29(2H,m),7.26-7.25(1H,m),6.89-6.87(2H,m),6.71(1H,s),5.80-5.78(1H,m),5.14-5.11(2H,m),4.65-4.62(1H,m),4.39-4.26(3H,m),4.03-4.01(2H,m),3.92(3H,s),3.82(3H,s),3.66-3.64(1H,m),3.46-3.44(2H,m),3.30-3.27(1H,m),2.72-2.68(1H,m),1.96-1.88(4H,m),1.68-1.60(2H,m).

[1180] MS(APCI,ESI)m/z:587[^{81}Br,$(M+H)^+$],585[^{79}Br,$(M+H)^+$].

[1181] 工序10:N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－{[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}－7'－甲氧基－8'－{[5－({(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－10－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基}氧基)戊基]氧基}－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[1182] 在实施例1工序10所得到的化合物(0.130g,0.161mmol)与上述工序9所得到的化合物(0.104g,0.177mmol,)的N,N－二甲基甲酰胺(3mL)溶液中,在室温下加入碳酸钾(0.0266g,0.193mmol),在室温下搅拌一晚。将反应溶液用乙酸乙酯进行稀释,用水、饱和盐水清洗后,用硫酸钠进行干燥。减压蒸馏除去后,将得到的残渣用NH_2－硅胶柱色谱法[己烷:乙酸乙酯＝70:30(v/v)～0:100(v/v)]进行精制,得到目标产物(0.184g,87%)。

[1183] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.76(1H,s),7.58-7.56(2H,m),7.39(1H,s),7.32-7.30(2H,m),7.26-7.24(2H,m),7.19-7.17(3H,m),6.90-6.88(2H,m),6.78(1H,s),6.68-6.66(1H,m),6.37(1H,s),5.99-5.93(3H,m),5.34-5.20(6H,m),4.66-4.01(11H,m),3.90(3H,s),3.89(3H,s),3.78-3.54(9H,m),3.31-3.28(2H,m),2.73-2.69(1H,m),2.38-2.35(1H,m),2.19-2.13(1H,m),1.82-1.80(2H,m),1.46-1.29(6H,m),0.98-0.90(6H,m),0.83(9H,s),0.69-0.63(4H,m),0.19-0.16(6H,m).

[1184] MS(APCI,ESI)m/z:1312$(M+H)^+$

[1185] 工序11:N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－{[5－({(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－10－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基}氧基)戊基]氧基}－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[1186] 在上述工序10所得到的化合物(0.1837g,0.140mmol)与醋酸(0.048mL,0.840mmol)的THF(5.00mL)溶液中,在室温下加入1mol/L的氟化四丁基铵四氢呋喃溶液(0.700mL,0.700mmol),室温下搅拌3小时。将反应溶液用乙酸乙酯进行稀释,将有机层用饱和碳酸氢钠水溶液、饱和盐水进行清洗后,用硫酸钠进行干燥。减压蒸馏除去后,将得到的残渣用硅胶色谱法[氯仿:甲醇＝99.5:0.5(v/v)～95:5(v/v)]进行精制,得到目标产物(0.178g,定量)。

[1187] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.86(1H,s),7.60-7.59(2H,m),7.39(1H,s),7.32-7.20(7H,m),6.90-6.88(2H,m),6.78(1H,s),6.68(1H,s),6.38(1H,s),5.90-5.87(3H,m),5.39-5.22(6H,m),4.72-4.02(11H,m),3.90(3H,s),3.88(3H,s),3.83(3H,s),3.70-3.63(6H,m),3.32-3.29(3H,m),2.73-2.69(1H,m),2.43-2.40(1H,m),2.12-2.06(1H,m),1.77-1.74(2H,m),1.39-1.25(6H,m),0.96-0.89(6H,m),0.73-0.66(4H,m).

[1188] MS(APCI,ESI)m/z:1198$(M+H)^+$

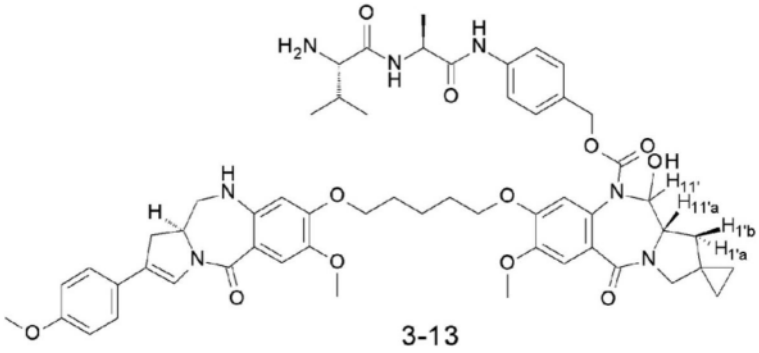
[1189] 工序12:L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－[(5－{[(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}戊基)氧基]－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}-L-丙氨酸酰胺

[1190] 在上述工序11所得到的化合物(0.140mmol)的二氯甲烷(2mL)溶液中,在室温下加入吡咯烷(0.0579mL,0.700mmol)、四(三苯基膦)钯(0)(0.0162g,0.0140mmol),在室温下搅拌15分钟。减压蒸馏除去后,将得到的残渣用硅胶色谱法[氯仿:甲醇＝99.5:0.5(v/v)～92.5:7.5(v/v)]进行精制,得到目标产物(0.143g,99%)。

[1191] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:9.12(1H,s),7.94-7.92(1H,m),7.57-7.53(4H,m),7.33-7.31(2H,m),7.20-7.18(3H,m),6.90-6.88(2H,m),6.36(1H,s),6.07(1H,s),5.91-5.88(1H,m),5.47-5.44(1H,m),5.21-5.13(1H,m),4.66-4.58(3H,m),4.32(1H,s),4.03-3.49(17H,m),3.38-3.29(4H,m),3.15-3.14(1H,m),2.77-2.73(1H,m),2.57(2H,s),2.43-2.40(1H,m),2.32-2.27(1H,m),1.81-1.39(8H,m),0.98-0.96(3H,m),0.85-0.83(3H,m),0.75-0.62(4H,

m).

[1192] ^{1}H-NMR(CD_3OD,50℃)δ:7.84(1H,s),7.56-7.48(2H,m),7.44-7.32(4H,m),7.26-7.13(3H,m),6.89(2H,d,J=8.5Hz),6.78-6.66(1H,m),6.26(1H,s),5.96(1H,d,J=9.7Hz,H_{11},),5.27(1H,d,J=12.1Hz),4.96-4.78(1H,m),4.63-4.58(2H,m),4.49(1H,q,J=6.9Hz),4.28-4.19(1H,m),4.07-3.89(4H,m),3.85(3H,s),3.79(3H,s),3.76(3H,s),3.67(1H,d,J=11.5Hz),3.61(1H,d,J=13.3Hz),3.54(1H,dd,J=9.7,8.2Hz,$H_{11',a}$),3.43-3.31(2H,m),3.21(1H,d,J=11.5Hz),3.14(1H,d,J=4.8Hz),2.78(1H,dd,J=16.6,4.5Hz),2.43(1H,dd,J=13.0,8.2Hz,$H_{1',b}$),2.05-1.93(1H,m),1.91-1.75(4H,m),1.73-1.55(2H,m),1.69(1H,d,J=13.3Hz,$H_{1',a}$),1.40(3H,d,J=7.3Hz),0.96(3H,d,J=6.7Hz),0.89(3H,d,J=7.3Hz),0.76-0.58(4H,m).

[1193] 

3-13

[1194] MS(APCI、ESI)m/z:1030(M+H)$^+$

[1195] 工序13:N-[4-(11,12-二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀-5(6H)-基)-4-氧代丁酰基]甘氨酰甘氨酰基-L-缬氨酰基-N-{4-[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－[(5－{[(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}戊基)氧基]－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

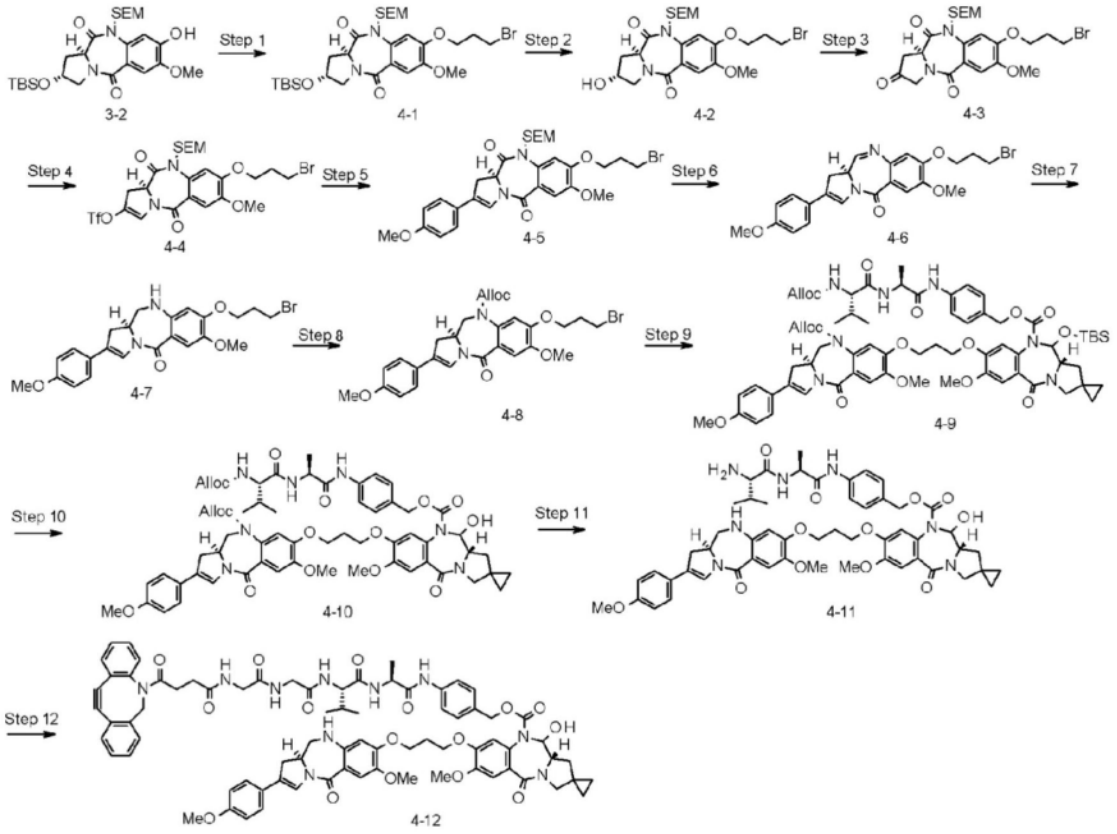
[1196] 在实施例2工序1所得到的化合物(0.0640g,0.153mmol)、N-乙氧基羰基－2－乙氧基－1,2－二氢喹啉(0.0446g,0.180mmol)的混合物中,在室温下加入二氯甲烷(2mL),在室温下搅拌15分钟。在反应溶液中加入上述工序13所得到的化合物(0.143g,0.139mmol)的二氯甲烷(2mL)溶液,在室温下搅拌5小时后,减压蒸馏除去。将得到的残渣用硅胶柱色谱法[氯仿:甲醇=99.5:0.5(v/v)～92.5:7.5(v/v)]进行精制,得到目标产物(0.103g,52%)。

[1197] Table1:对于药物连接子1的质子NMR峰位置以及MS

[1198] ^{1}H-NMR(DMSO-D_6)δ:9.93(1H,s),8.21-8.16(2H,m),8.07-8.04(1H,m),7.83-7.64(2H,m),7.60-7.55(3H,m),7.51-7.28(10H,m),7.19-7.16(2H,m),7.10-7.04(1H,m),6.92-6.90(2H,m),6.76-6.70(1H,m),6.39(1H,s),5.77-5.75(1H,m),5.21-5.18(1H,m),5.03-4.99(1H,m),4.82-4.79(1H,m),4.37-4.35(1H,m),4.21-4.20(2H,m),4.02-3.24(26H,m),3.16-3.13(1H,m),2.79-2.59(2H,m),2.39-2.28(2H,m),2.05-1.97(2H,m),1.91-1.77(4H,m),1.57-1.54(3H,m),1.28-1.23(3H,m),0.85-0.80(6H,m),0.67-0.61(4H,m).

[1199] MS(APCI,ESI)m/z:1431(M+H)$^+$

[1200] 实施例4:药物连接子2

[1201] 

[1202] 工序1:(2R,11aS)－8－(3－溴代丙氧基)－2－{[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}－7－甲氧基－10－{[2－(三甲基硅烷基)乙氧基]甲基}－2,3－二氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－5,11(10H,11aH)－二酮

[1203] 使实施例3工序1所得到的化合物(5.06g,9.67mmol)与1,3－二溴丙烷(4.93mL,48.4mmol)以与实施例3工序2同样地进行反应,得到目标产物(4.85g,78%)。

[1204] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.35(1H,s),7.26(1H,s),5.52-5.50(1H,m),4.65-4.63(1H,m),4.61-4.55(1H,m),4.25-4.14(3H,m),3.92(3H,s),3.82-3.62(5H,m),3.57-3.54(1H,m),2.86-2.84(1H,m),2.41-2.39(2H,m),2.06-1.99(1H,m),1.03-0.97(2H,m),0.87(9H,s),0.10(6H,s),0.04(9H,s).

[1205] MS(APCI,ESI)m/z:645[^{81}Br,$(M+H)^+$],643[^{79}Br,$(M+H)^+$].

[1206] 工序2:(2R,11aS)－8－(3－溴代丙氧基)－2－羟基7－甲氧基－10－{[2－(三甲基硅烷基)乙氧基]甲基}－2,3－二氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－5,11(10H,11aH)－二酮

[1207] 使上述工序1所得到的化合物(4.85g,7.54mmol)以与实施例3工序3同样地进行反应,得到了目标产物(4.05g,定量)。

[1208] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.35(1H,s),7.26(1H,s),5.53-5.51(1H,m),4.66-4.61(2H,m),4.32-4.30(1H,m),4.21-4.16(2H,m),3.91-3.85(4H,m),3.82-3.74(1H,m),3.71-3.59(4H,m),2.99-2.96(1H,m),2.43-2.37(2H,m),2.15-2.09(2H,m),1.04-0.96(2H,m),0.04(9H,s).

[1209] MS(APCI,ESI)m/z:531[^{81}Br,$(M+H)^+$],529[^{79}Br,$(M+H)^+$].

[1210] 工序3:(11aS)－8－(3－溴代丙氧基)－7－甲氧基－10－{[2－(三甲基硅烷基)

乙氧基]甲基}－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－2,5,11(3H,10H,11aH)－三酮

[1211] 使上述工序2所得到的化合物(7.54mmol)与实施例3工序4同样地进行反应,得到目标产物(3.73g,93%)。

[1212] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.34(1H,s),7.29(1H,s),5.56-5.53(1H,m),4.72-4.69(1H,m),4.67-4.61(1H,m),4.23-4.17(3H,m),3.97-3.88(4H,m),3.82-3.75(1H,m),3.74-3.56(4H,m),2.82-2.77(1H,m),2.43-2.38(2H,m),1.06-0.94(2H,m),0.08-0.00(9H,m).

[1213] 工序4:(11aS)－8－(3－溴代丙氧基)－7－甲氧基－5,11－二氧代－10－{[2－(三甲基硅烷基)乙氧基]甲基}－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－2－基三氟甲磺酸酯

[1214] 使上述工序3所得到的化合物(3.73g,7.08mmol)与实施例3工序5同样地反应,得到目标产物(3.27g,70%)。

[1215] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.33(1H,s),7.29(1H,s),7.15-7.15(1H,m),5.56-5.54(1H,m),4.70-4.65(2H,m),4.21-4.18(2H,m),3.94-3.91(4H,m),3.81-3.79(1H,m),3.70-3.64(3H,m),3.19-3.15(1H,m),2.47-2.38(2H,m),1.02-1.00(2H,m),0.04(9H,s).

[1216] MS(APCI,ESI)m/z:661[^{81}Br,$(M+H)^+$],659[^{79}Br,$(M+H)^+$].

[1217] 工序5:(11aS)－8－(3－溴代丙氧基)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基－10－{[2－(三甲基硅烷基)乙氧基]甲基}－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－5,11(10H,11aH)－二酮

[1218] 使上述工序4所得到的化合物(3.27g,4.96mmol)与实施例3工序6同样地反应,得到目标产物(2.49g,81%)。

[1219] ^{1}H-NMR(DMSO-D_6)δ:7.49-7.47(2H,m),7.40(1H,s),7.31-7.24(2H,m),6.93-6.88(2H,m),5.33-5.31(1H,m),5.25-5.18(1H,m),4.81-4.80(1H,m),4.23-4.10(2H,m),3.85(3H,s),3.77(3H,s),3.70-3.59(3H,m),3.52-3.40(2H,m),3.15-3.08(1H,m),2.33-2.27(2H,m),0.86-0.74(2H,m),-0.07(9H,s).

[1220] MS(APCI,ESI)m/z:619[^{81}Br,$(M+H)^+$],617[^{79}Br,$(M+H)^+$].

[1221] 工序6:(11aS)－8－(3－溴代丙氧基)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－1,11a－二氢－5H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－5－酮

[1222] 使上述工序5所得到的化合物(2.49g,4.04mmol)以与实施例3工序7同样地反应,得到目标产物(1.59g,84%)。

[1223] MS(APCI,ESI)m/z:473[^{81}Br,$(M+H)^+$],471[^{79}Br,$(M+H)^+$].

[1224] 工序7:(11aS)－8－(3－溴代丙氧基)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－1,10,11,11a－四氢－5H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－5－酮

[1225] 使上述工序6所得到的化合物(1.59g,3.38mmol)与实施例3工序8同样地反应得到目标产物(1.39g,87%)。

[1226] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.54(1H,s),7.54-7.51(1H,m),7.32-7.29(2H,m),6.89-6.87(2H,m),6.10(1H,s),4.32-4.28(2H,m),4.14-4.13(2H,m),3.85(3H,s),3.82(3H,s),3.63-3.62(2H,m),3.57-3.55(2H,m),3.40-3.36(1H,m),2.76-2.72(1H,m),2.40-2.37(2H,m).

[1227] MS(APCI,ESI)m/z:475[^{81}Br,$(M+H)^+$],473[^{79}Br,$(M+H)^+$].

[1228] 工序8:(11aS)－8－(3－溴代丙氧基)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－

氧代－11,11a－二氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－10(5H)－羧酸丙－2－烯1－基酯

[1229] 使上述工序7所得到的化合物(1.40g,2.95mmol)与实施例3工序9同样地反应,得到目标产物(0.885g,54%)。

[1230] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.34(1H,s),7.27-7.25(2H,m),7.22(1H,s),6.86-6.84(2H,m),6.73(1H,s),5.76-5.74(1H,m),5.11-5.09(2H,m),4.62-4.59(2H,m),4.33-4.31(1H,m),4.16-4.13(3H,m),3.88(3H,s),3.79(3H,s),3.60-3.59(3H,m),3.27-3.23(1H,m),2.69-2.65(1H,m),2.37-2.34(2H,m).

[1231] MS(APCI,ESI)m/z:559[^{81}Br,$(M+H)^+$],557[^{79}Br,$(M+H)^+$].

[1232] 工序9:N－{[(丙－2－烯－1－基)氧基]羰基}－L－缬氨酰基－N－[4－({[(11'aS)－11'－{[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}－7'－甲氧基－8'－(3－{[(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－10－{[(丙－2－烯－1－基)氧基]羰基}－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}丙氧基)－5'－氧代－11',11'a－二氢－1'H,3'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－羰基]氧基}甲基)苯基]－L－丙氨酸酰胺

[1233] 使上述工序8所得到的化合物(0.0381g,0.0683mmol)与实施例3工序10同样地反应,得到目标产物(0.0712g,81%)。

[1234] MS(APCI,ESI)m/z:1284$(M+H)^+$.

[1235] 工序10:N－{[(丙－2－烯－1－基)氧基]羰基}－L－缬氨酰基－N－[4－({[(11'aS)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－(3－{[(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－10－{[(丙－2－烯－1－基)氧基]羰基}－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}丙氧基)－5'－氧代－11',11'a－二氢－1'H,3'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－羰基]氧基}甲基)苯基]－L－丙氨酸酰胺

[1236] 使上述工序9所得到的化合物(0.0712g,0.0554mmol)与实施例3工序11同样地反应,得到目标产物(0.0671g,定量)。

[1237] MS(APCI,ESI)m/z:1170$(M+H)^+$.

[1238] 工序11:L－缬氨酰基－N－[4－({[(11'aS)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－(3－{[(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}丙氧基)－5'－氧代－11',11'a－二氢－1'H,3'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－羰基]氧基}甲基)苯基]－L－丙氨酸酰胺

[1239] 使上述工序10所得到的化合物(0.0571mmol)与实施例3工序12同样地反应,得到目标产物(0.0574g,99%)。

[1240] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:9.16(1H,s),7.93-7.91(1H,m),7.55-7.52(1H,m),7.50-7.47(3H,m),7.35-7.32(2H,m),7.21(1H,s),7.13-7.11(2H,m),6.90-6.87(2H,m),6.40(1H,s),6.08(1H,s),5.90-5.87(1H,m),5.37-5.34(1H,m),4.73-4.53(3H,m),4.23-4.08(5H,m),3.89(3H,s),3.82(3H,s),3.78-3.72(5H,m),3.57-3.51(3H,m),3.38-3.30(3H,m),2.76-2.71(1H,m),2.36-2.24(4H,m),1.78-1.42(6H,m),1.00-0.98(3H,m),0.87-0.84(3H,m),

0.74-0.62(4H,m).

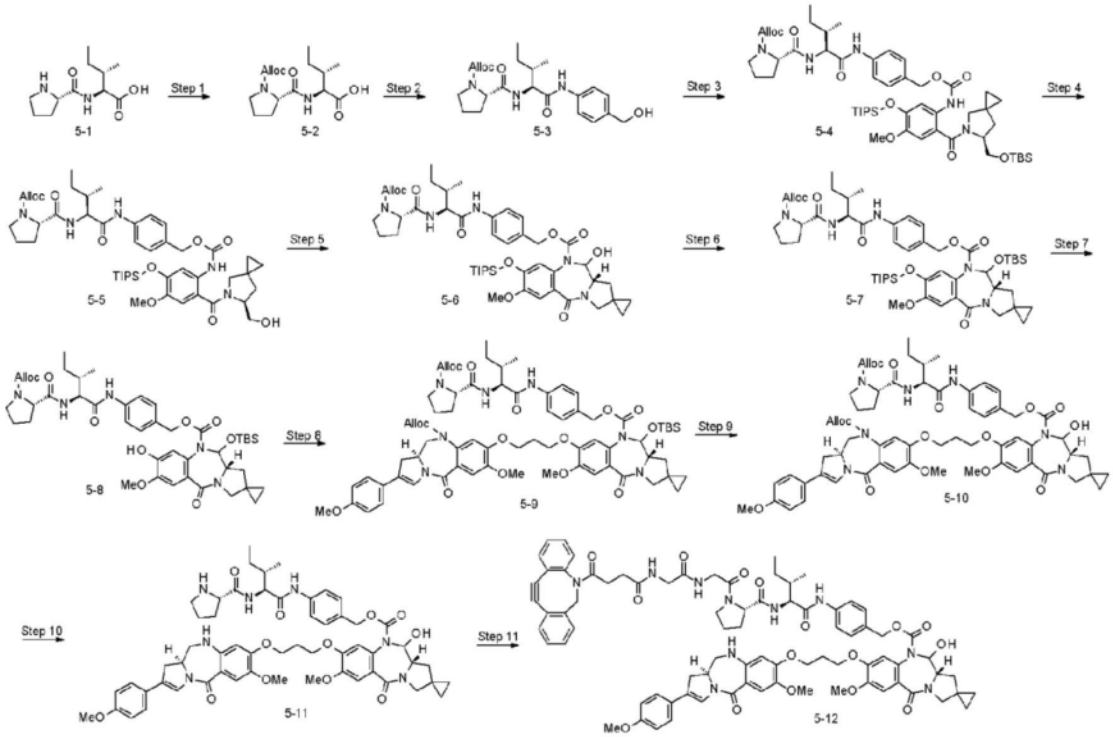
[1241] MS(APCI,ESI)m/z:1002(M+H)$^{+}$.

[1242] 工序12:N－[4－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]甘氨酰甘氨酰基－L－缬氨酰基－N－[4－({[(11'aS)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－(3－{[(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}丙氧基)－5'－氧代－11',11'a－二氢－1'H,3'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－羰基]氧基}甲基)苯基]－L－丙氨酸酰胺

[1243] 使上述工序11所得到的化合物(0.189g,0.189mmol)与实施例3工序13同样地反应,得到目标产物(0.169g,64%)。

[1244] MS(APCI,ESI)m/z:1402(M+H)$^{+}$.

[1245] 实施例5:药物连接子3

[1246] 

[1247] 工序1:1－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－脯氨酰基－L－异亮氨酸

[1248] 在L－脯氨酰基－L－异亮氨酸(1.00g,4.40mmol)的1mol/l氢氧化钠水溶液(8.80mL,8.80mmol)、1,4－二噁烷(30mL)溶液中,在0℃下缓慢滴入氯甲酸烯丙酯(0.690mL,6.53mmol)。将反应混合物在室温下搅拌5小时后,在反应混合物中加入硫酸氢钾水溶液,将pH调整为4左右,用氯仿提取。将有机层用饱和盐水进行清洗,用无水硫酸钠进行干燥。过滤后,在减压下进行浓缩,在残渣中加入己烷。将产生的固体进行过滤、干燥,由此得到目标产物(1.20g,88%)。

[1249] MS(APCI,ESI)m/z:311(M－H)$^{－}$

[1250] 工序2:1－[(丙－2－烯－1－基－氧基)羰基]－L－脯氨酰基－N－[4－(羟甲基)苯基]－L－异亮氨酸酰胺

[1251] 在上述工序1所得到的化合物(13.7g,43.4mmol)与4－氨基苄醇(6.00g,

48.7mmol)的THF溶液(100mL)中,在室温下加入N－乙氧基羰基－2－乙氧基－1,2－二氢喹啉(12.0g,48.7mmol)。将反应溶液在室温下搅拌23小时,加入二乙醚(200mL)后,过滤产生的固体,将得到的化合物(13.2g,65%)直接用于下一个反应中。

[1252] 工序3:1－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－脯氨酰基－N－[4－({[(2－{[(6S)－6－({[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}甲基)－5－氮杂螺[2.4]庚－5－基]羰基}－4－甲氧基－5－{[三(丙烷－2－基)硅烷基]氧基}苯基)氨基甲酰基]氧基}甲基)苯基]－L－异亮氨酸酰胺

[1253] 使上述工序2所得到的化合物(6.87g,16.5mmol)与实施例1工序6同样地反应,得到目标产物(7.46g,56%)。

[1254] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.99-8.97(1H,m),8.45-8.42(1H,m),7.81-7.49(3H,m),7.36-7.33(2H,m),6.81-6.77(2H,m),5.96-5.91(1H,m),5.32-5.23(2H,m),5.13-5.10(2H,m),4.73-4.30(6H,m),4.00-3.98(1H,m),3.78-3.52(7H,m),3.06-3.02(1H,m),2.37-2.12(5H,m),2.06-1.92(1H,m),1.77-1.48(2H,m),1.32-1.27(3H,m),1.11-1.09(18H,m),1.03-0.91(15H,m),0.66-0.44(4H,m),0.09-0.04(6H,m).

[1255] 工序4:1－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－脯氨酰基－N－[4－({[(2－{[(6S)－6－(羟甲基)－5－氮杂螺[2.4]庚－5－基]羰基}－4－甲氧基－5－{[三(丙烷－2－基)硅烷基]氧基}苯基)氨基甲酰基]氧基}甲基)苯基]－L－异亮氨酸酰胺

[1256] 使上述工序3所得到的化合物(7.46g,7.41mmol)与实施例1工序7同样地反应,得到目标产物(6.07g,92%)。

[1257] MS(APCI,ESI)m/z:892$(M+H)^+$

[1258] 工序5:1－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－脯氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－5'－氧代－8'－{[三(丙烷－2－基)硅烷基]氧基}－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－异亮氨酸酰胺

[1259] 使上述工序4所得到的化合物(6.07g,6.80mmol)与实施例1工序8同样地反应,得到目标产物(4.18g,69%)。

[1260] MS(APCI,ESI)m/z:890$(M+H)^+$

[1261] 工序6:1－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－脯氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－{[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}－7'－甲氧基－5'－氧代－8'－{[三(丙烷－2－基)硅烷基]氧基}－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－异亮氨酸酰胺

[1262] 使上述工序5所得到的化合物(4.18g,4.70mmol)与实施例1工序9同样地反应,得到目标产物(4.26g,90%)。

[1263] MS(APCI,ESI)m/z:1004$(M+H)^+$

[1264] 工序7:1－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－脯氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－{[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}－8'－羟基－7'－甲氧基－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－异亮氨酸酰胺

[1265] 使上述工序6所得到的化合物(4.26g,4.70mmol)与实施例1工序10同样地反应,得

到目标产物(2.48g,69%)。

[1266] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.44-8.41(1H,m),7.53-7.37(1H,m),7.24-7.23(1H,m),7.14-7.11(2H,m),6.82(1H,s),6.67-6.65(1H,m),6.11-6.07(1H,m),5.99-5.95(2H,m),5.33-5.02(4H,m),4.84-4.41(5H,m),3.94(3H,s),3.73-3.70(1H,m),3.59-3.52(4H,m),3.29-3.26(1H,m),2.39-2.24(5H,m),1.99-1.97(2H,m),1.56-1.53(1H,m),1.10-0.64(19H,m),0.20-0.16(3H,m),0.09-0.07(3H,m).

[1267] MS(APCI,ESI)m/z:848$(M+H)^+$

[1268] 工序8:1－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－脯氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－7'－甲氧基－8'－[3－({(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－10－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基}氧基)丙氧基]－5'－氧代－11'－[(三甲基硅烷基)氧基]－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－异亮氨酸酰胺

[1269] 使上述工序7所得到的化合物(0.200g,0.236mmol)与实施例4工序9同样地反应,得到目标产物(0.308g,99%)。

[1270] MS(APCI,ESI)m/z:1324$(M+H)^+$

[1271] 工序9:1－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－脯氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－[3－({(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－10－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基}氧基)丙氧基]－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－异亮氨酸酰胺

[1272] 使上述工序8所得到的化合物(0.308g,0.233mmol)与实施例3工序11同样地反应,得到目标产物(0.261g,93%)。

[1273] MS(APCI,ESI)m/z:1210$(M+H)^+$

[1274] 工序10:L－脯氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－(3－{[(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}丙氧基)－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－异亮氨酸酰胺

[1275] 使上述工序9所得到的化合物(0.261g,0.216mmol)与实施例3工序12同样地反应,得到目标产物(0.183g,81%)。

[1276] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:9.06(1H,s),8.33-8.31(1H,m),7.53-7.47(4H,m),7.33-7.31(2H,m),7.21(1H,s),7.11-7.09(2H,m),6.89-6.87(2H,m),6.40(1H,s),6.08(1H,s),5.91-5.88(1H,m),5.35-5.32(1H,m),4.69-4.66(2H,m),4.45-4.28(3H,m),4.15-4.05(3H,m),3.87(3H,s),3.82(3H,s),3.78(3H,s),3.74-3.72(3H,m),3.64-3.47(3H,m),3.37-3.30(2H,m),3.04-3.00(1H,m),2.94-2.88(1H,m),2.75-2.72(1H,m),2.42-2.39(1H,m),2.13-2.05(4H,m),1.92-1.55(6H,m),1.20-1.14(1H,m),0.98-0.96(3H,m),0.91-0.89(3H,m),0.70-0.66(4H,m).

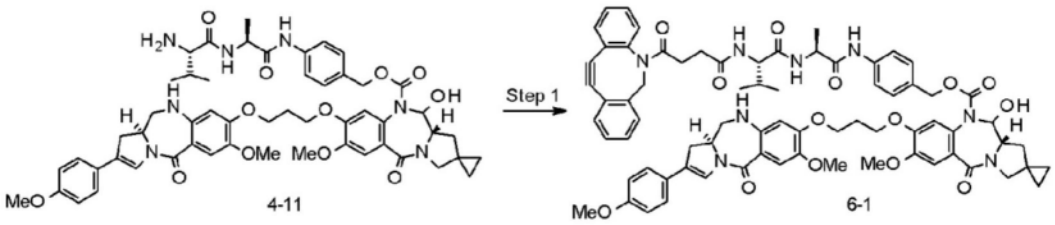
[1277] MS(APCI,ESI)m/z:1042(M+H)$^+$

[1278] 工序11:N－[4－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]甘氨酰甘氨酰基－L－脯氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－(3－{[(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}丙氧基)－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－异亮氨酸酰胺

[1279] 使上述工序10所得到的化合物(0.0474g,0.455mmol)与实施例3工序13同样地反应,得到目标产物(0.0495g,75%)。

[1280] MS(APCI,ESI)m/z:1443(M+H)+

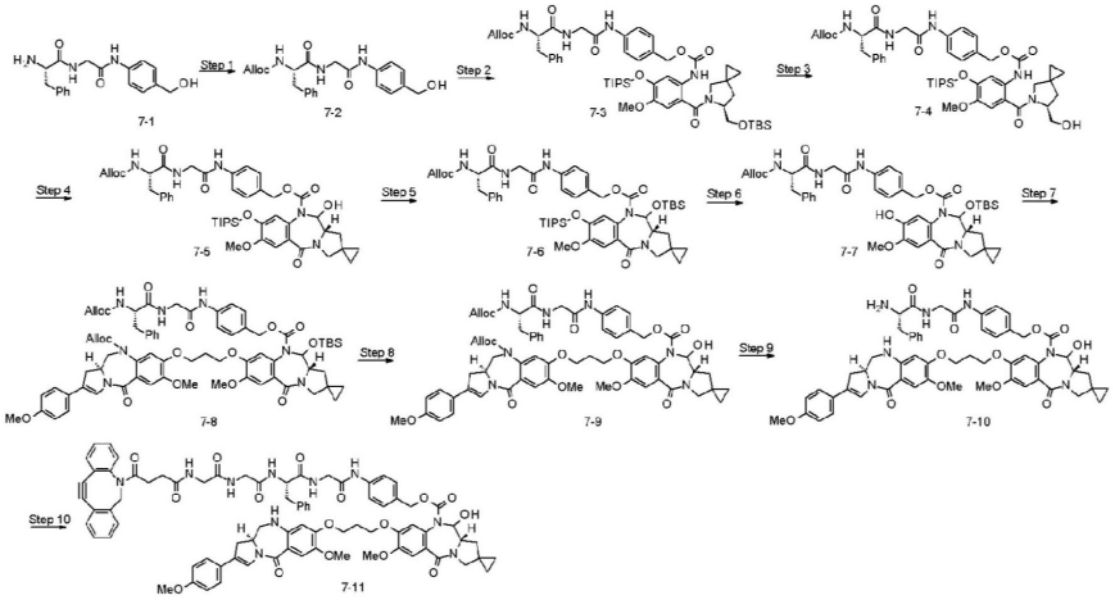
[1281] 实施例6:药物连接子4

[1282] 

[1283] 工序1:在实施例4工序11所得到的化合物(0.0564g,0.0563mmol)、三乙胺(0.00936mL,0.0675mmol)的N,N－二甲基甲酰胺(5mL)溶液中,在室温下加入1－{[4－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]氧基}吡咯烷－2,5－二酮(0.0249g,0.0619mmol)。在室温下搅拌2小时后,减压蒸馏除去,将得到的残渣用硅胶柱色谱法[氯仿:甲醇＝99.5:0.5(v/v)～90:10(v/v)]进行精制,得到目标产物(0.0490g,68%)。

[1284] MS(APCI,ESI)m/z:1289(M+H)$^+$

[1285] 实施例7:药物连接子5

[1286] 

[1287] 工序1:N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－苯丙氨酰基－N－[4－(羟甲基)苯基]甘氨酸酰胺

[1288] 在起始物质7－1(1.24g,3.80mmol,Bioorganic&Medicinal Chemistry 2015,3,3237-3247)、碳酸钾(0.945g,6.84mmol)的THF(18mL)、水(12mL)溶液中,在0℃下加入氯甲酸烯丙酯(0.482mL,4.560mmol),在室温下加入1小时。用乙酸乙酯提取后,用水、饱和盐水进行清洗,用硫酸钠进行干燥。减压蒸馏除去后,将得到的残渣溶解于少量的乙酸乙酯中,加入二乙醚。过滤生成的固体(1.30g,83%)直接用于下一个反应中。

[1289] 工序2:N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－苯丙氨酰基－N－[4－({[(2－{[(6S)－6－({[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}甲基)－5－氮杂螺[2.4]庚－5－基]羰基}－4－甲氧基－5－{[三(丙烷－2－基)硅烷基]氧基}苯基)氨基甲酰基]氧基}甲基)苯基]甘氨酸酰胺

[1290] 使上述工序1所得到的化合物(1.30g,3.16mmol)与实施例1工序6同样地反应,得到目标产物(1.32g,54%)。

[1291] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:9.01(1H,s),8.38(1H,s),7.80(1H,s),7.60-7.58(2H,m),7.32-7.29(5H,m),7.19-7.18(2H,m),6.76(1H,s),6.55(1H,s),5.89-5.83(1H,m),5.24-5.13(5H,m),4.56-4.55(3H,m),4.34-4.33(1H,m),4.10-4.06(1H,m),3.98-3.94(2H,m),3.75-3.72(5H,m),3.16-3.08(3H,m),2.28-2.25(1H,m),1.70-1.68(1H,m),1.30-1.27(3H,m),1.11-1.09(18H,m),0.90(9H,s),0.65-0.48(4H,m),0.05-0.02(6H,m).

[1292] MS(APCI,ESI)m/z:1000$(M+H)^+$

[1293] 工序3:N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－苯丙氨酰基－N－[4－({[(2－{[(6S)－6－(羟甲基)－5－氮杂螺[2.4]庚－5－基]羰基}－4－甲氧基－5－{[三(丙烷－2－基)硅烷基]氧基}苯基)氨基甲酰基]氧基}甲基)苯基]甘氨酸酰胺

[1294] 使上述工序2所得到的化合物(1.32g,1.32mmol)与实施例1工序7同样地反应,得到目标产物(1.23g,定量)。

[1295] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.48-8.38(2H,m),7.71(1H,s),7.61-7.59(2H,m),7.36-7.27(5H,m),7.20-7.18(2H,m),6.76(1H,s),6.55-6.52(1H,m),5.89-5.83(1H,m),5.28-5.13(5H,m),4.56-4.55(3H,m),4.34-4.33(1H,m),4.22-4.20(1H,m),4.10-4.06(1H,m),3.98-3.94(1H,m),3.78-3.75(5H,m),3.64-3.62(1H,m),3.17-3.07(3H,m),1.84-1.83(2H,m),1.30-1.26(3H,m),1.11-1.09(18H,m),0.61-0.49(4H,m).

[1296] MS(APCI,ESI)m/z:886$(M+H)^+$

[1297] 工序4:N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－苯丙氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－5'－氧代－8'－{[三(丙烷－2－基)硅烷基]氧基}－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}甘氨酸酰胺

[1298] 使上述工序3所得到的化合物(1.32mmol)与实施例1工序8同样地反应,得到目标产物(0.660g,57%)。

[1299] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.34(1H,s),7.53-7.51(2H,m),7.26-7.18(8H,m),6.66-6.57(2H,m),5.88-5.80(2H,m),5.27-5.21(3H,m),5.11-5.07(1H,m),4.99-4.96(1H,m),4.55-4.54(2H,m),4.36-4.34(1H,m),4.13-3.92(2H,m),3.83(3H,s),3.73-3.70(1H,m),3.57-3.55(1H,m),3.46-3.44(1H,m),3.32-3.29(1H,m),3.18-3.15(1H,m),3.09-3.05(1H,m),2.42-2.38(1H,m),1.75-1.72(1H,m),1.25-1.02(21H,m),0.73-0.60(4H,m).

[1300] MS(APCI,ESI)m/z:884(M+H)$^+$

[1301] 工序5:N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－苯丙氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－{[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}－7'－甲氧基－5'－氧代－8'－{[三(丙烷－2－基)硅烷基]氧基}－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}甘氨酸酰胺

[1302] 使上述工序4所得到的化合物(0.834g,0.943mmol)与实施例1工序9同样地反应,得到目标产物(0.555g,59%)。

[1303] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.26-8.23(1H,m),7.51-7.50(2H,m),7.29-7.28(3H,m),7.18-7.13(5H,m),6.64-6.62(1H,m),6.52-6.49(1H,m),6.02-6.00(1H,m),5.88-5.83(1H,m),5.25-5.17(4H,m),4.84-4.81(1H,m),4.55-4.55(2H,m),4.34-4.33(1H,m),4.06-3.97(2H,m),3.84(3H,s),3.71-3.68(1H,m),3.50-3.48(1H,m),3.28-3.05(3H,m),2.36-2.33(1H,m),1.56-1.53(1H,m),1.28-1.01(21H,m),0.81-0.61(13H,m),0.19(3H,s),0.09(3H,s).

[1304] MS(APCI,ESI)m/z:998(M+H)$^+$

[1305] 工序6:N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－苯丙氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－{[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}－8'－羟基－7'－甲氧基－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}甘氨酸酰胺

[1306] 使上述工序5所得到的化合物(0.555g,0.556mmol)与实施例1工序10同样地反应,得到目标产物(0.451g,96%)。

[1307] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.42-8.40(1H,m),7.50-7.46(2H,m),7.28-7.26(3H,m),7.20-7.18(3H,m),7.10-7.08(2H,m),6.67-6.65(2H,m),6.16-6.13(1H,m),6.02-5.99(1H,m),5.88-5.82(1H,m),5.28-5.18(4H,m),4.87-4.84(1H,m),4.54-4.53(2H,m),4.38-4.36(1H,m),4.10-4.07(1H,m),3.93-3.90(4H,m),3.72-3.69(1H,m),3.54-3.52(1H,m),3.25-3.17(2H,m),3.08-3.04(1H,m),2.36-2.33(1H,m),1.57-1.54(1H,m),0.81-0.61(13H,m),0.19(3H,s),0.10(3H,s).

[1308] MS(APCI,ESI)m/z:842(M+H)$^+$

[1309] 工序7:N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－苯丙氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－{[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}－7'－甲氧基－8'－[3－({(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－10－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基}氧基)丙氧基]－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}甘氨酸酰胺

[1310] 使上述工序6所得到的化合物(0.115g,0.137mmol)与实施例4工序9同样地反应,得到目标产物(0.160g,89%)。

[1311] MS(APCI,ESI)m/z:1318(M+H)$^+$

[1312] 工序8:N－[(丙－2－烯－1－基)羰基]－L－苯丙氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－[3－({(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－10－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基}氧基)丙氧基]－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺

[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}甘氨酸酰胺

[1313] 使上述工序7所得到的化合物(0.160g,0.121mmol)与实施例3工序11同样地反应,得到目标产物(0.136g,93%)。

[1314] MS(APCI,ESI)m/z:1204$(M+H)^+$

[1315] 工序9:L－苯丙氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－(3－{[(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}丙氧基)－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}甘氨酸酰胺

[1316] 使上述工序8所得到的化合物(0.136g,0.113mmol)与实施例3工序12同样地反应,得到目标产物(0.0372g,32%)。

[1317] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.84-8.81(1H,m),8.07-8.05(1H,m),7.53-7.39(4H,m),7.34-7.19(8H,m),7.12-7.10(2H,m),6.90-6.87(2H,m),6.44-6.42(1H,m),6.10-6.08(1H,m),5.90-5.88(1H,m),5.38-5.35(1H,m),4.76-4.72(1H,m),4.57-4.44(1H,m),4.32-4.29(1H,m),4.17-4.01(5H,m),3.89-3.52(17H,m),3.41-3.25(3H,m),2.72-2.69(2H,m),2.43-2.40(1H,m),2.19-2.16(2H,m),1.78-1.74(1H,m),1.59-1.56(1H,m),0.72-0.66(4H,m).

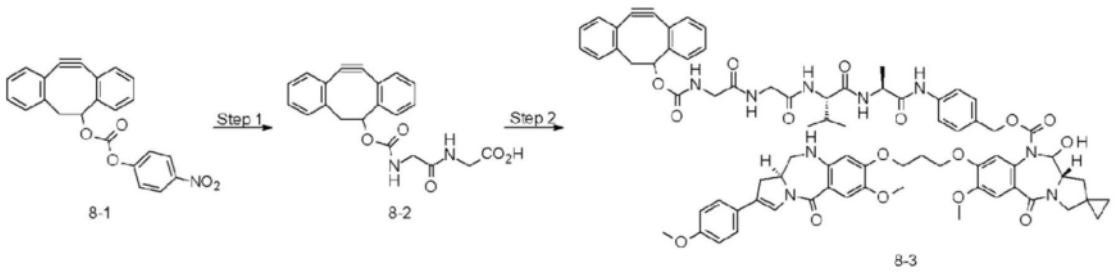
[1318] MS(APCI,ESI)m/z:1036$(M+H)^+$

[1319] 工序10:N－[4－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]甘氨酰甘氨酰基－L－苯丙氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－(3－{[(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}丙氧基)－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}甘氨酸酰胺

[1320] 使上述工序9所得到的化合物(0.0372g,0.0359mmol)与实施例3工序13同样地反应,得到目标产物(0.0170g,33%)。

[1321] MS(APCI,ESI)m/z:1437$(M+H)^+$

[1322] 实施例8:药物连接子6

[1323] 

[1324] 工序1:N－[(11,12－二脱氢－5,6－二氢二苯并[a,e][8]轮烯－5－基氧基)羰基]甘氨酰甘氨酸

[1325] 在11,12－二脱氢－5,6－二氢二苯并[a,e][8]轮烯－5－基4－硝基苯基氨基甲酸酯(0.437g,1.14mmol)、N,N－二异丙基乙胺(0.198mL,1.14mmol)的N,N－二甲基甲酰胺(6mL)溶液中,在室温下加入甘氨酰甘氨酸(0.150g,1.14mmol)、水(3mL),在室温下搅拌一

晚。减压蒸馏除去，将得到的残渣用硅胶柱色谱法[氯仿:CMW＝100:0(v/v)～0:100(v/v)]进行精制，得到目标产物(0.324g，75％)。

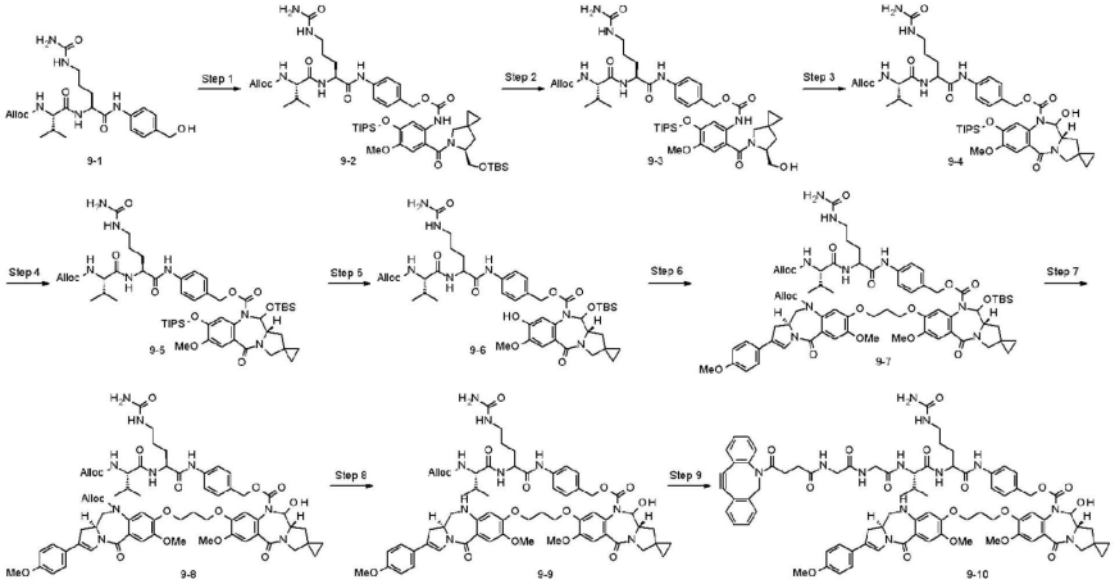
[1326] MS(APCI，ESI)m/z:378(M+H)$^+$

[1327] 工序2:N－[(11，12－二脱氢－5，6－二氢二苯并[a，e][8]轮烯－5－基氧基)羰基]甘氨酰甘氨酰基－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－(3－{[(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－5，10，11，11a－四氢－1H－吡咯并[2，1－c][1，4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}丙氧基)－5'－氧代－11'，11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1，2'－吡咯并[2，1－c][1，4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[1328] 使上述工序1所得到的化合物(0.0306g，0.0305mmol)与实施例3工序13同样地反应，得到目标产物(0.0361g，87％)。

[1329] MS(APCI，ESI)m/z:1362(M+H)$^+$

[1330] 实施例9:药物连接子7

[1331] 

[1332] 工序1:N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－缬氨酰基－N－[4－({[(2－{[(6S)－6－({[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}甲基)－5－氮杂螺[2.4]庚－5－基]羰基}－4－甲氧基－5－{[三(丙烷－2－基)硅烷基]氧基}苯基)氨基甲酰基]氧基}甲基)苯基]－N^5－氨基甲酰基－L－鸟氨酸酰胺

[1333] 使起始物质9－1与实施例1工序6同样地反应，得到目标产物(1.37g，45％)。

[1334] ^{1}H-NMR(DMSO-D_6)δ:10.06(1H，s)，9.16(1H，s)，8.10-8.06(1H，m)，7.62-7.60(2H，m)，7.33-7.31(2H，m)，7.27-7.24(2H，m)，6.84-6.81(1H，m)，5.94-5.89(2H，m)，5.41(2H，s)，5.32-5.28(1H，m)，5.18-5.16(1H，m)，5.03(2H，s)，4.48-4.42(3H，m)，4.30(1H，s)，3.93-3.73(6H，m)，3.47-3.14(3H，m)，3.00-2.95(2H，m)，2.00-1.89(2H，m)，1.65-1.60(2H，m)，1.42-1.39(2H，m)，1.26-1.19(3H，m)，1.04-1.01(18H，m)，0.88-0.75(15H，m)，0.51-0.49(4H，m)，0.05-0.17(6H，m).

[1335] MS(APCI，ESI)m/z:1052(M+H)$^+$

[1336] 工序2:N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－缬氨酰基－N^5－氨基甲酰基－

N－[4－({[(2－{[(6S)－6－(羟甲基)－5－氮杂螺[2.4]庚－5－基]羰基}－4－甲氧基－5－{[三(丙烷－2－基)硅烷基]氧基}苯基)氨基甲酰基]氧基}甲基)苯基]－L－鸟氨酸酰胺

[1337] 使上述工序1所得到的化合物(1.37g,1.31mmol)与实施例1工序7同样地反应,得到目标产物(1.00g,82%)。

[1338] ^{1}H-NMR(DMSO-D_6)δ:10.07(1H,s),9.13(1H,s),8.11-8.09(1H,m),7.62-7.60(2H,m),7.34-7.31(2H,m),7.26-7.23(2H,m),6.92-6.90(1H,m),5.97-5.86(2H,m),5.41(2H,s),5.32-5.28(1H,m),5.19-5.16(1H,m),5.04(2H,s),4.80(1H,s),4.48-4.41(3H,m),4.27(1H,s),3.93-3.87(1H,m),3.74(3H,s),3.61-3.58(2H,m),3.39-3.30(2H,m),3.03-2.97(3H,m),2.00-1.84(2H,m),1.65-1.60(2H,m),1.44-1.37(2H,m),1.26-1.19(3H,m),1.05-1.04(18H,m),0.87-0.83(6H,m),0.53-0.42(4H,m).

[1339] MS(APCI,ESI)m/z:938(M+H)$^{+}$

[1340] 工序3:N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－缬氨酰基－N^5－氨基甲酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－5'－氧基－8'－{[三(丙烷－2－基)硅烷基]氧基}－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－鸟氨酸酰胺

[1341] 在上述工序2所得到的化合物(1.00g,1.07mmol)、二氯甲烷(80mL)、二甲基甲酰胺(10mL)的混合物中,在0℃下加入戴斯－马丁氧化剂(0.455g,1.07mmol)。在0℃下搅拌一小时后,再一次加入戴斯－马丁氧化剂(0.455g,1.07mmol),在0℃下搅拌一小时。在反应溶液中加入饱和碳酸氢钠水溶液,用氯仿提取后,用饱和盐水进行清洗。减压蒸馏除去后,加入乙酸乙酯过滤固体。将滤液减压蒸馏除去,将得到的残渣用硅胶柱色谱法[己烷:乙酸乙酯＝50:50～己烷:乙酸乙酯＝0:100(v/v)]进行精制,与固体合并得到目标产物(0.671g,67%)。

[1342] ^{1}H-NMR(DMSO-D_6)δ:10.05(1H,s),8.11-8.09(1H,m),7.56-7.54(2H,m),7.25-7.23(1H,m),7.13-7.09(3H,m),6.62(1H,s),6.53(1H,s),5.94-5.88(2H,m),5.78-5.76(1H,m),5.40(2H,s),5.32-5.28(1H,m),5.17-5.14(2H,m),4.81-4.78(1H,m),4.48-4.41(3H,m),3.92-3.90(1H,m),3.79(3H,s),3.54-3.51(1H,m),3.16-3.14(1H,m),3.02-2.89(2H,m),2.37-2.34(2H,m),1.97-1.92(1H,m),1.63-1.57(3H,m),1.43-1.37(2H,m),1.08-1.01(21H,m),0.87-0.83(6H,m),0.67-0.61(4H,m).

[1343] MS(APCI,ESI)m/z:938(M+H)$^{+}$

[1344] 工序4:N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－{[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}－7'－甲氧基－5'－氧代－8'－{[三(丙烷－2－基)硅烷基]氧基}－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－N^5－氨基甲酰基－L－鸟氨酸酰胺

[1345] 将上述工序3所得到的化合物(0.671g,0.712mmol)使用二氯甲烷(80mL)、二甲基甲酰胺(5mL)的混合溶剂,与实施例1工序9同样地反应,得到目标产物(0.335g,44%)。

[1346] ^{1}H-NMR(DMSO-D_6)δ:10.04(1H,s),8.12-8.10(1H,m),7.56-7.54(2H,m),7.26-7.24(1H,m),7.14-7.11(3H,m),6.51(1H,s),5.94-5.91(3H,m),5.40-5.16(5H,m),4.79-4.76

(1H,m),4.47-4.44(3H,m),3.92-3.90(1H,m),3.80(3H,s),3.55-3.52(1H,m),3.17-3.14(1H,m),3.00-2.96(3H,m),2.56-2.30(1H,m),2.06-1.17(6H,m),1.10-0.99(21H,m),0.78-0.61(19H,m),0.17(3H,s),0.07(3H,s).

[1347] MS(APCI,ESI)m/z:1050(M+H)$^+$

[1348] 工序5:N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－{[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}－8'－羟基－7'－甲氧基－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－N^5－氨基甲酰基－L－鸟氨酸酰胺

[1349] 使上述工序4所得到的化合物(0.355g,0.712mmol)与实施例1工序10同样地反应,得到目标产物(0.264g,93%)。

[1350] ^{1}H-NMR(DMSO-D_6)δ:10.07-10.03(1H,m),9.89-9.86(1H,m),8.12-8.10(1H,m),7.63-7.54(2H,m),7.35-7.26(1H,m),7.14-7.12(2H,m),7.06(1H,s),6.62-6.59(1H,m),5.97-5.87(3H,m),5.43-5.40(2H,m),5.32-5.28(1H,m),5.17-5.14(2H,m),4.86-4.82(1H,m),4.46-4.42(3H,m),3.91-3.89(1H,m),3.81(3H,s),3.54-3.51(1H,m),3.42-3.40(1H,m),3.09-2.96(3H,m),2.40-2.34(1H,m),1.98-1.97(1H,m),1.68-1.59(2H,m),1.42-1.38(3H,m),0.77-0.64(19H,m),0.16(3H,s),0.08(3H,s).

[1351] MS(APCI,ESI)m/z:894(M+H)$^+$

[1352] 工序6:N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－{[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}－7'－甲氧基－8'－[3－({(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－10－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基}氧基)丙氧基]－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－N^5－氨基甲酰基－L－鸟氨酸酰胺

[1353] 使上述工序5所得到的化合物(0.113g,0.126mmol)与实施例4工序9同样地反应,得到目标产物(0.149g,86%)。

[1354] MS(APCI,ESI)m/z:1370(M+H)$^+$

[1355] 工序7:N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－缬氨酰基－N^5－氨基甲酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－[3－({(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－10－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基}氧基)丙氧基]－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－鸟氨酸酰胺

[1356] 使上述工序6所得到的化合物(0.149g,0.109mmol)与实施例3工序11同样地反应,得到目标产物(0.119g,87%)。

[1357] MS(APCI,ESI)m/z:1256(M+H)$^+$

[1358] 工序8:L－缬氨酰基－N^5－氨基甲酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－(3－{[(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}丙氧基)－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－

10’(5’H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－鸟氨酸酰胺

[1359] 使上述工序7所得到的化合物(0.050g,0.0398mmol)与实施例3工序12同样地反应,得到目标产物(0.0347g,80%)。

[1360] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:9.43(1H,s),7.96-7.94(1H,m),7.51-7.46(4H,m),7.33-7.31(2H,m),7.22(1H,s),7.13-7.11(2H,m),6.90-6.87(2H,m),6.46(1H,s),6.11(1H,s),5.92-5.89(1H,m),5.42-5.39(2H,m),4.78-4.67(4H,m),4.31-4.29(1H,m),4.11-4.04(3H,m),3.92-3.70(13H,m),3.60-3.23(8H,m),3.07-3.05(1H,m),2.75-2.70(1H,m),2.43-2.39(1H,m),2.19-2.16(3H,m),1.73-1.48(6H,m),0.98-0.96(3H,m),0.83-0.81(3H,m),0.71-0.65(4H,m).

[1361] MS(APCI,ESI)m/z:1088$(M+H)^+$

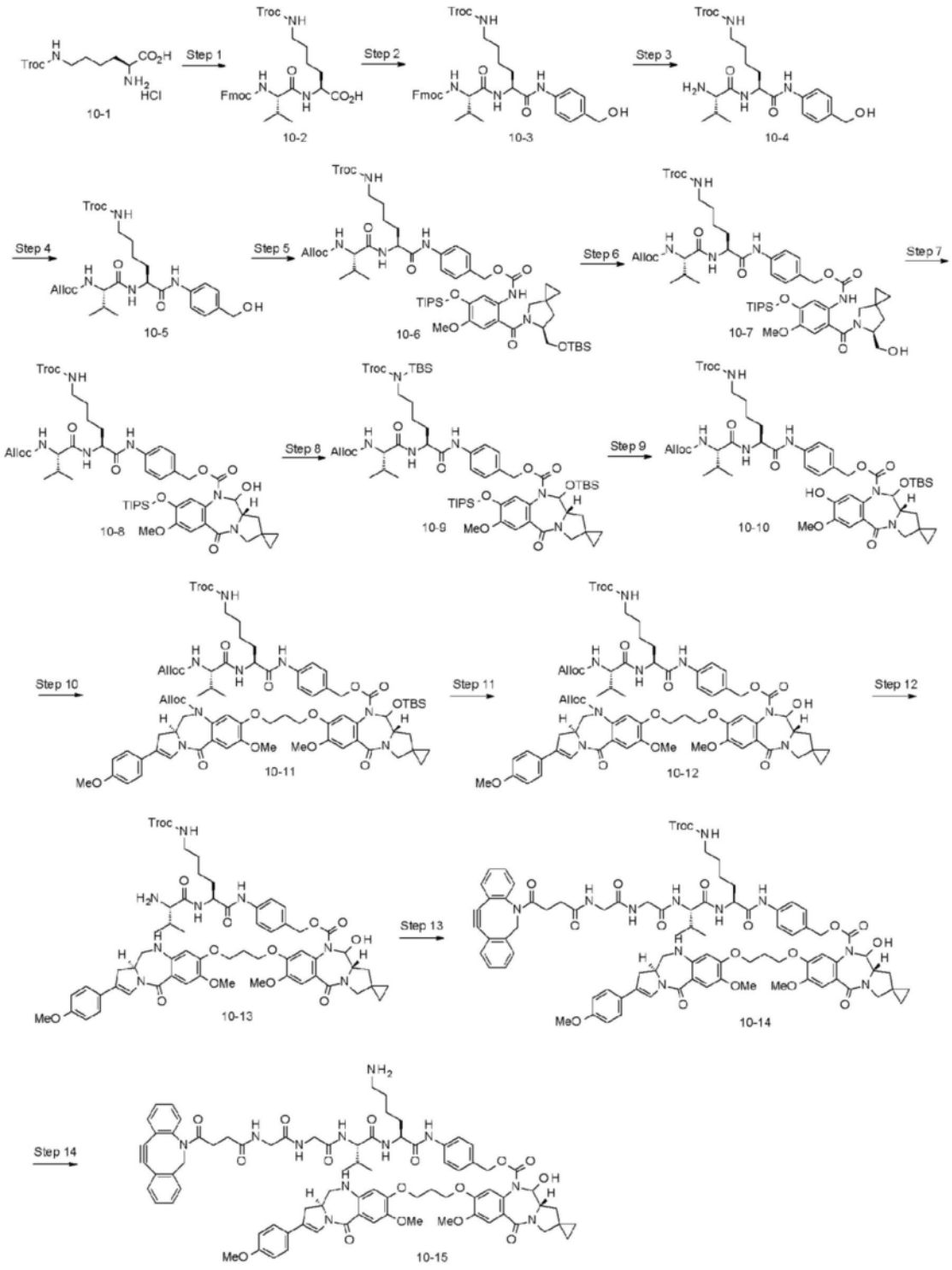
[1362] 工序9:N－[4－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]甘氨酰甘氨酰基－L－缬氨酰基－N^5－氨基甲酰基－N－{4－[({[(11a’S)－11’－羟基－7’－甲氧基－8’－(3－{[(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}丙氧基)－5’－氧代－11’,11a’－二氢－1’H－螺[环丙烷－1,2’－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10’(5’H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－鸟氨酸酰胺

[1363] 使上述工序8所得到的化合物(0.0347g,0.0319mmol)与实施例3工序13同样地反应,得到目标产物(0.00650g,14%)。

[1364] MS(APCI,ESI)m/z:1489$(M+H)^+$

[1365] 实施例10:药物连接子8

[1366]



[1367] 工序1:N－[(9H－芴－9－基甲氧基)羰基]－L－缬氨酰基－N^6－[(2,2,2－三氯乙氧基)羰基]－L－赖氨酸

[1368] 在起始物质10－1(2.78g,7.75mmol,Bioscience,Biotechnology,and Biochemistry 2012,76,205)的1,2－二甲氧基乙烷(30mL)、水(30mL)、THF(15mL)溶液中,在室温下加入碳酸氢钠(1.30g,15.5mmol)、N－[(9H－芴－9－基甲氧基)羰基]－L－缬氨酸2,5－二氧代吡咯烷－1－基酯(3.39g,7.76mmol)。在室温下搅拌反应溶液五天后,用氯仿与甲醇混合液(10:1,v/v)进行提取。将有机层用水、饱和盐水进行清洗后,减压蒸馏除去。将得到的残渣用二乙醚清洗,过滤除去固体。将滤液减压蒸馏除去,将得到的残渣用硅

胶柱色谱法[己烷:乙酸乙酯=30:70(v/v)～0:100(v/v)]进行精制,得到目标产物(2.13g,43%)。

[1369] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.78-7.76(2H,m),7.60-7.58(2H,m),7.41-7.39(2H,m),7.32-7.30(2H,m),6.85-6.83(1H,m),5.58-5.56(1H,m),5.32-5.30(1H,m),4.72-4.57(3H,m),4.46-4.34(2H,m),4.23-4.21(1H,m),4.05-4.03(1H,m),3.22-3.15(2H,m),2.06-1.88(3H,m),1.52-1.51(2H,m),1.40-1.38(2H,m),0.97-0.96(6H,m).

[1370] MS(APCI,ESI)m/z:642$(M+H)^+$

[1371] 工序2:N－[(9H－芴－9－基甲氧基)羰基]－L－缬氨酰基－N－[4－(羟甲基)苯基]－N^6－[(2,2,2－三氯乙氧基)羰基]－L－赖氨酸酰胺

[1372] 使上述工序1所得到的化合物(2.11g,3.29mmol)与实施例5工序2同样地反应,将得到的化合物(2.24g,91%)直接用于下一个反应中。

[1373] 工序3:L－缬氨酰基－N－[4－(羟甲基)苯基]－N^6－[(2,2,2－三氯乙氧基)羰基]－L－赖氨酸酰胺

[1374] 在上述工序2所得到的化合物(2.24g,3.00mmol)的N,N－二甲基甲酰胺(20mL)溶液中,在室温下加入哌啶(0.5934mL,5.994mmol),在室温下搅拌1小时。减压蒸馏除去,将得到的残渣(1.576g,定量)直接用于下一个反应中。

[1375] 工序4:N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－缬氨酰基－N－[4－(羟甲基)苯基]－N^6－[(2,2,2－三氯乙氧基)羰基]－L－赖氨酸酰胺

[1376] 使上述工序3所得到的化合物(1.58g,3.00mmol)与实施例7工序1同样地反应,将得到的化合物(1.50g,82%)直接用于下一个反应中。

[1377] 工序5:N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－缬氨酰基－N－[4－({[(2－{[(6S)－6－({[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}甲基)－5－氮杂螺[2.4]庚－5－基]羰基}－4－甲氧基－5－{[三(丙烷－2－基)硅烷基]氧基}苯基)氨基甲酰基]氧基}甲基)苯基]－N^6－[(2,2,2－三氯乙氧基)羰基]－L－赖氨酸酰胺

[1378] 使上述工序4所得到的化合物(1.57g,2.57mmol)与实施例1工序6同样地反应,得到目标产物(1.691g,71%)。

[1379] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:9.04-9.02(1H,m),8.48-8.45(1H,m),7.81(1H,s),7.55-7.53(2H,m),7.35-7.33(2H,m),6.76(1H,s),6.68-6.66(1H,m),5.94-5.86(1H,m),5.32-5.23(4H,m),5.14-5.10(2H,m),4.79-4.76(1H,m),4.69-4.67(1H,m),4.57-4.54(4H,m),4.03-4.02(2H,m),3.75-3.72(5H,m),3.29-3.22(2H,m),3.04-3.02(1H,m),2.27-2.01(4H,m),1.83-1.58(3H,m),1.46-1.44(2H,m),1.31-1.27(3H,m),1.11-1.09(18H,m),1.00-0.90(15H,m),0.65-0.48(4H,m),0.06-0.03(6H,m).

[1380] MS(APCI,ESI)m/z:1219$(M+Na)^+$

[1381] 工序6:N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－缬氨酰基－N－[4－({[(2－{[(6S)－6－(羟甲基)－5－氮杂螺[2.4]庚－5－基]羰基}－4－甲氧基－5－{[三(丙烷－2－基)硅烷基]氧基}苯基)氨基甲酰基]氧基}甲基)苯基]－N^6－[(2,2,2－三氯乙氧基)羰基]－L－赖氨酸酰胺

[1382] 使上述工序5所得到的化合物(1.69g,1.41mmol)与实施例1工序7同样地反应,得到目标产物(1.43g,94%)。

[1383] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.57-8.52(2H,m),7.70(1H,s),7.56-7.54(2H,m),7.35-7.33(2H,m),6.76-6.75(2H,m),5.91-5.90(1H,m),5.40-5.26(4H,m),5.12(2H,s),4.78-4.75(1H,m),4.69-4.66(1H,m),4.58-4.55(4H,m),4.37-4.34(1H,m),4.04-4.02(1H,m),3.80-3.77(5H,m),3.65-3.62(1H,m),3.28-3.11(3H,m),2.13-2.04(2H,m),1.81-1.78(3H,m),1.60-1.58(2H,m),1.45-1.43(2H,m),1.33-1.25(3H,m),1.11-1.09(18H,m),0.98-0.94(6H,m),0.58-0.51(4H,m).

[1384] MS(APCI,ESI)m/z:1083(M+H)$^{+}$

[1385] 工序7:N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－5'－氧代－8'－{[三(丙烷－2－基)硅烷基]氧基}－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－N^{6}－[(2,2,2－三氯乙氧基)羰基]－L－赖氨酸酰胺

[1386] 使上述工序6所得到的化合物(1.43g,1.32mmol)与实施例9工序3同样地反应,得到目标产物(0.714g,50％)。

[1387] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.49-8.46(1H,m),7.52-7.45(2H,m),7.19-7.18(3H,m),6.72-6.68(2H,m),5.90-5.87(2H,m),5.33-5.23(4H,m),5.10-5.07(1H,m),4.98-4.95(1H,m),4.78-4.76(1H,m),4.69-4.66(1H,m),4.58-4.53(3H,m),4.01(1H,s),3.83-3.81(4H,m),3.73-3.70(1H,m),3.57-3.55(2H,m),3.29-3.25(3H,m),2.42-2.39(1H,m),2.15-2.13(1H,m),2.03-2.01(2H,m),1.74-1.71(2H,m),1.44-1.42(2H,m),1.23-1.17(3H,m),1.03-0.93(24H,m),0.67-0.64(4H,m).

[1388] MS(APCI,ESI)m/z:1081(M+H)$^{+}$

[1389] 工序8:N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－缬氨酰基－N^{6}－[叔丁基(二甲基)硅烷基]－N－{4－[({[(11a'S)－11'－{[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}－7'－甲氧基－5'－氧代－8'－{[三(丙烷－2－基)硅烷基]氧基}－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－N^{6}－[(2,2,2－三氯乙氧基)羰基]－L－赖氨酸酰胺

[1390] 使上述工序7所得到的化合物(0.714g,0.660mmol)与实施例1工序9同样地反应,得到目标产物(0.476g,60％)。

[1391] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.63-8.51(1H,m),7.49-7.48(2H,m),7.18-7.14(3H,m),6.61-6.53(2H,m),5.99-5.94(2H,m),5.33-5.17(4H,m),4.81-4.78(3H,m),4.59-4.57(3H,m),4.03-4.01(1H,m),3.88-3.85(4H,m),3.70-3.67(2H,m),3.50-3.47(1H,m),3.24-3.17(3H,m),2.37-2.34(1H,m),2.13-2.07(2H,m),1.59-1.54(3H,m),1.38(2H,s),1.16-0.92(35H,m),0.81-0.76(9H,m),0.67-0.64(4H,m),0.34-0.31(6H,m),0.19(3H,s),0.09(3H,s).

[1392] 工序9:N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－缬氨酰基－N^{6}－[叔丁基(二甲基)硅烷基]－N－{4－[({[(11'S,11a'S)－11'－{[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}－8'－羟基－7'－甲氧基－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－N^{6}－[(2,2,2－三氯乙氧基)羰基]－L－赖氨酸酰胺

[1393] 使上述工序8所得到的化合物(0.476g,0.398mmol)与实施例1工序10同样地反应,得到目标产物(0.283g,68％)。

[1394] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.48(1H,s),7.51-7.47(2H,m),7.25-7.24(2H,m),7.12-7.10(2H,m),6.70-6.67(2H,m),6.09-6.07(1H,m),5.98-5.92(2H,m),5.33-5.20(5H,m),4.82-4.71(3H,m),4.59-4.56(3H,m),4.03-4.00(1H,m),3.91(3H,s),3.72-3.69(1H,m),3.54-3.52(1H,m),3.28-3.25(3H,m),2.37-2.34(1H,m),2.18-2.16(1H,m),2.05-1.99(1H,m),1.78-1.75(1H,m),1.56-1.53(2H,m),1.43-1.41(2H,m),0.98-0.94(6H,m),0.82-0.75(9H,m),0.67-0.64(4H,m),0.19(3H,s),0.10(3H,s).

[1395] MS(APCI,ESI)m/z:1039$(M+H)^+$

[1396] 工序10:N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－{[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}－7'－甲氧基－8'－[3－({(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－10－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基}氧基)丙氧基]－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－N^6－[(2,2,2－三氯乙氧基)羰基]－L－赖氨酸酰胺

[1397] 使上述工序9所得到的化合物(0.119g,0.114mmol)与实施例4工序9同样地反应,得到目标产物(0.134g,77％)。

[1398] 工序11:N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－[3－({(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－10－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基}氧基)丙氧基]－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－N^6－[(2,2,2－三氯乙氧基)羰基]－L－赖氨酸酰胺

[1399] 使上述工序10所得到的化合物(0.134g,0.0881mmol)与实施例3工序11同样地反应,得到目标产物(0.120g,97％)。

[1400] MS(APCI,ESI)m/z:1423$(M+Na)^+$

[1401] 工序12:L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－(3－{[(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}丙氧基)－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－N^6－[(2,2,2－三氯乙氧基)羰基]－L－赖氨酸酰胺

[1402] 使上述工序11所得到的化合物(0.120g,0.0855mmol)与实施例3工序12同样地反应,得到目标产物(0.0813g,77％)。

[1403] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:9.10(1H,s),7.94-7.92(1H,m),7.58(1H,s),7.47-7.45(3H,m),7.35-7.33(2H,m),7.21(2H,s),7.13-7.11(2H,m),6.90-6.88(2H,m),6.43(1H,s),6.11(1H,s),5.90-5.88(1H,m),5.51(1H,s),5.39-5.36(1H,m),4.73-4.70(3H,m),4.52-4.51(2H,m),4.32(1H,s),4.13-4.08(3H,m),3.89(3H,s),3.80-3.76(9H,m),3.60-3.50(4H,m),3.34-3.24(5H,m),2.76-2.72(1H,m)$_2$.44-2.12(4H,m),1.94-1.27(7H,m),1.00-0.98(3H,m),0.84-0.82(3H,m),0.70-0.66(4H,m).

[1404] MS(APCI,ESI)m/z:1233$(M+H)^+$

[1405] 工序13:N－[4－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]甘氨酰甘氨酰基－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－(3－{[(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}丙氧基)－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－N^6－[(2,2,2－三氯乙氧基)羰基]－L－赖氨酸酰胺

[1406] 使上述工序12所得到的化合物(0.0813g,0.0659mmol)与实施例3工序13同样地反应,得到目标产物(0.0721g,67%)。

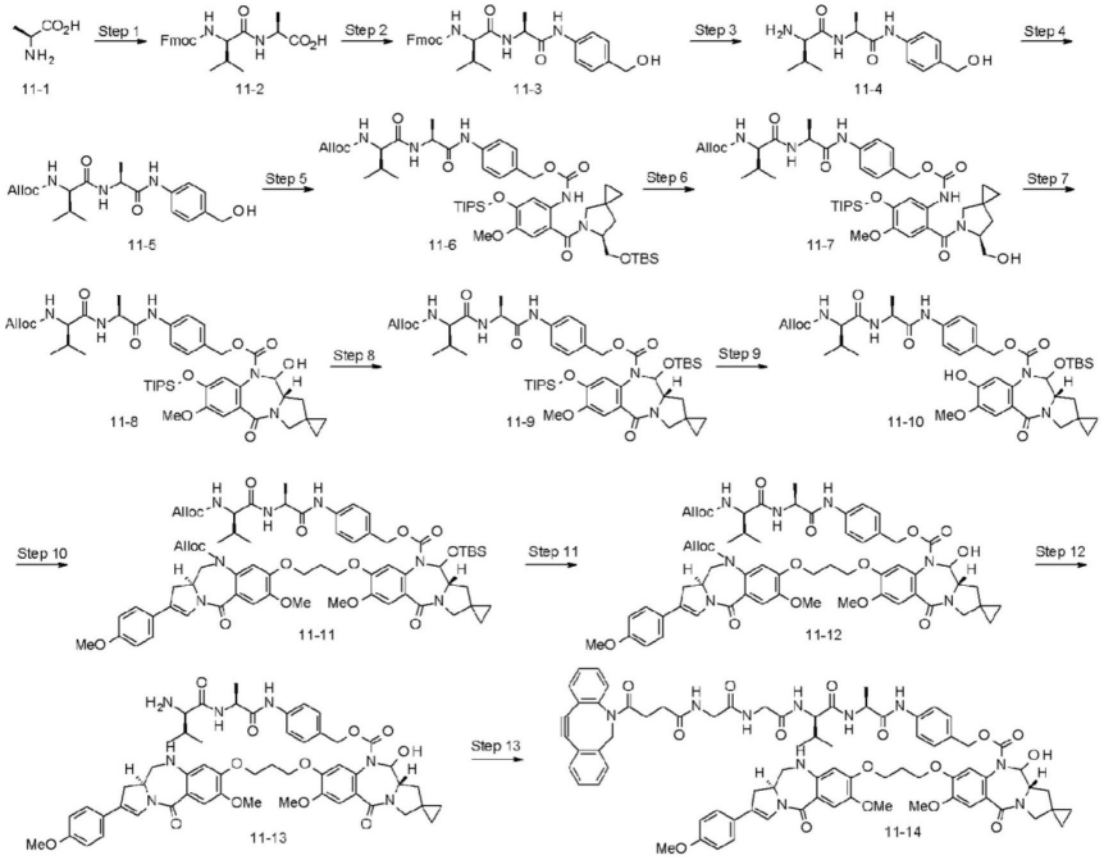
[1407] MS(APCI,ESI)m/z:1656$(M+Na)^+$

[1408] 工序14:N－[4－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]甘氨酰甘氨酰基－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－(3－{[(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}丙氧基)－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－赖氨酸酰胺

[1409] 使上述工序13得到的化合物(0.0721g,0.0441mmol)与实施例21工序6同样地反应,得到目标产物(0.0348g,54%)。

[1410] MS(APCI,ESI)m/z:1460$(M+H)^+$

[1411] 实施例11:药物连接子9

[1412] 

[1413] 工序1:N－[(9H－芴－9－基甲氧基)羰基]－D－缬氨酰基－L－丙氨酸

[1414] 使用N－[(9H－芴－9－基甲氧基)羰基]－D－缬氨酸2,5－二氧代吡咯烷－1－基

酯(0.528g,5.92mmol)来代替N－[(9H－芴－9－基甲氧基)羰基]－L－缬氨酸2,5－二氧代吡咯烷－1－基酯,使L－丙氨酸(0.0721g,0.0441mmol)与实施例10工序1同样地反应。将得到的化合物(0.0348g,54%)直接用于下一个反应中。

[1415] ^{1}H-NMR(DMSO-D_6)δ:10.55(1H,s),8.23-8.21(1H,m),7.91-7.89(2H,m),7.76-7.75(2H,m),7.42-7.40(3H,m),7.33-7.31(2H,m),4.31-4.20(4H,m),3.93-3.91(1H,m),1.97-1.93(1H,m),1.27-1.25(3H,m),0.86-0.84(6H,m).

[1416] MS(APCI,ESI)m/z:411$(M+H)^+$

[1417] 工序2:N－[(9H－芴－9－基甲氧基)羰基]－D－缬氨酰基－N－[4－(羟甲基)苯基]－L－丙氨酸酰胺

[1418] 使上述工序1所得到的化合物(2.05g,4.99mmol)与实施例5工序2同样地反应,将得到的化合物(2.19g,85%)直接用于下一个反应中。

[1419] 工序3:D－缬氨酰基－N－[4－(羟甲基)苯基]－L－丙氨酸酰胺

[1420] 使上述工序2所得到的化合物(2.19g,4.25mmol)与实施例10工序3同样地反应,将得到的化合物(0.966g,76%)直接用于下一个反应中。

[1421] 工序4:N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－D－缬氨酰基－N－[4－(羟甲基)苯基]－L－丙氨酸酰胺

[1422] 使上述工序3所得到的化合物(0.966g,3.29mmol)与实施例7工序1同样地反应,将得到的化合物(1.11g,89%)直接用于下一个反应中。

[1423] 工序5:N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－D－缬氨酰基－N－[4－({[(2－{[(6S)－6－({[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}甲基)－5－氮杂螺[2.4]庚－5－基]羰基}－4－甲氧基－5－{[三(丙烷－2－基)硅烷基]氧基}苯基)氨基甲酰基]氧基}甲基)苯基]－L－丙氨酸酰胺

[1424] 使上述工序4所得到的化合物(1.11g,2.93mmol)与实施例1工序6同样地反应,得到目标产物(1.75g,80%)。

[1425] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:9.02(1H,s),8.55(1H,s),7.81(1H,s),7.57-7.54(2H,m),7.34-7.32(2H,m),6.76(1H,s),6.52-6.50(1H,m),5.91-5.86(1H,m),5.30-5.22(3H,m),5.13-5.10(2H,m),4.65-4.59(4H,m),3.99-3.97(1H,m),3.87-3.85(1H,m),3.75-3.72(5H,m),3.04-3.02(1H,m),2.28-2.13(2H,m),1.70-1.68(1H,m),1.49-1.47(3H,m),1.31-1.27(3H,m),1.11-1.09(18H,m),1.00-0.90(15H,m),0.65-0.48(4H,m),0.06-0.03(6H,m).

[1426] MS(APCI,ESI)m/z:966$(M+H)^+$

[1427] 工序6:N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－D－缬氨酰基－N－[4－({[(2－{[(6S)－6－(羟甲基)－5－氮杂螺[2.4]庚－5－基]羰基}－4－甲氧基－5－{[三(丙烷－2－基)硅烷基]氧基}苯基)氨基甲酰基]氧基}甲基)苯基]－L－丙氨酸酰胺

[1428] 使上述工序5所得到的化合物(1.75g,1.81mmol)与实施例1工序7同样地反应,得到目标产物(1.53g,99%)。

[1429] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.66(1H,s),8.50(1H,s),7.69(1H,s),7.57-7.54(2H,m),7.34-7.32(2H,m),6.75-6.71(2H,m),5.90-5.85(1H,m),5.40-5.38(1H,m),5.29-5.21(2H,m),5.12(2H,s),4.71-4.50(4H,m),4.34-4.31(1H,m),3.89-3.77(6H,m),3.64-3.61(1H,m),3.13-3.10(1H,m),2.17-2.09(1H,m),1.87-1.84(2H,m),1.48-1.46(3H,m),1.32-1.28(3H,

m),1.11-1.09(18H,m),0.97-0.94(6H,m),0.63-0.49(4H,m).

[1430] MS(APCI,ESI)m/z:852(M+H)$^+$

[1431] 工序7:N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－D－缬氨酰基－N－{4－[({[(11'S,11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－5'－氧代－8'－{[三(丙烷－2－基)硅烷基]氧基}－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[1432] 使上述工序6所得到的化合物(1.53g,1.79mmol)与实施例9工序3同样地反应,得到目标产物(1.24g,81％)。

[1433] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.51(1H,s),7.51-7.49(2H,m),7.18-7.15(3H,m),6.65(1H,s),6.56-6.54(1H,m),5.90-5.85(2H,m),5.31-5.19(3H,m),5.10-5.07(1H,m),4.97-4.94(1H,m),4.67-4.50(3H,m),3.90-3.88(1H,m),3.84(3H,s),3.73-3.70(1H,m),3.58-3.56(2H,m),3.31-3.28(1H,m),2.42-2.39(1H,m),2.18-2.15(1H,m),1.74-1.71(1H,m),1.48-1.46(3H,m),1.19-0.88(27H,m),0.69-0.65(4H,m).

[1434] MS(APCI,ESI)m/z:850(M+H)$^+$

[1435] 工序8:N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－D－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－{[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基－7'－甲氧基－5'－氧代－8'－{[三(丙烷－2－基)硅烷基]氧基}－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[1436] 使上述工序7所得到的化合物(1.24g,1.45mmol)与实施例1工序9同样地反应,得到目标产物(0.979g,70％)。

[1437] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.48(1H,s),7.51-7.49(2H,m),7.19(1H,s),7.14-7.12(2H,m),6.62(1H,s),6.53-6.51(1H,m),6.01-5.99(1H,m),5.91-5.85(1H,m),5.30-5.28(2H,m),5.21-5.15(2H,m),4.82-4.79(1H,m),4.68-4.51(3H,m),3.88-3.84(4H,m),3.71-3.69(1H,m),3.50-3.47(1H,m),3.28-3.25(1H,m),2.37-2.34(1H,m),2.20-2.13(1H,m),1.52-1.47(4H,m),1.21-0.94(27H,m),0.80-0.77(9H,m),0.67-0.64(4H,m),0.19(3H,s),0.08(3H,s).

[1438] MS(APCI,ESI)m/z:964(M+H)$^+$

[1439] 工序9:N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－D－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－{[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}－8'－羟基－7'－甲氧基－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[1440] 使上述工序8所得到的化合物(0.979g,1.02mmol)与实施例1工序10同样地反应,得到目标产物(0.769g,94％)。

[1441] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.71(1H,s),7.37-7.35(2H,m),7.23(1H,s),7.04-7.02(2H,m),6.86-6.84(1H,m),6.74-6.72(1H,m),6.65(1H,s),6.05-5.85(2H,m),5.64-5.62(1H,m),5.32-5.20(3H,m),4.82-4.78(1H,m),4.70-4.52(3H,m),4.00-3.98(1H,m),3.93-3.90(3H,m),3.73-3.70(1H,m),3.55-3.53(1H,m),3.27-3.23(1H,m),2.38-2.18(2H,m),1.60-1.46(4H,m),1.00-0.92(6H,m),0.80(9H,s),0.68-0.63(4H,m),0.20(3H,s),0.10(3H,s).

[1442] MS(APCI,ESI)m/z:808(M+H)$^+$

[1443] 工序10:N－[(丙－2－烯)－1－基氧基)羰基]－D－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－{[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}－7'－甲氧基－8'－[3－({(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－10－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基}氧基)丙氧基]－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[1444] 使用上述工序9所得到的化合物(0.100g,0.124mmol),与实施例4工序9同样地反应,得到目标产物(0.148g,94%)。

[1445] MS(APCI,ESI)m/z:1284$(M+H)^+$

[1446] 工序11:N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－D－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－[3－({(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－10－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基}氧基)丙氧基]－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[1447] 使用上述工序10所得到的化合物(0.148g,0.124mmol)与实施例3工序11同样地反应,得到目标产物(0.132g,98%)。

[1448] MS(APCI,ESI)m/z:1170$(M+H)^+$

[1449] 工序12:D－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－(3－{[(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}丙氧基)－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[1450] 使用上述工序11所得到的化合物(0.132g,0.113mmol),与实施例3工序12同样地反应,得到目标产物(0.0963g,85%)。

[1451] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:9.12(1H,s),7.85-7.84(1H,m),7.54-7.52(1H,m),7.49(1H,s),7.44-7.42(2H,m),7.34-7.32(2H,m),7.21(1H,s),7.13-7.11(2H,m),6.90-6.88(2H,m),6.41(1H,s),6.10(1H,s),5.90-5.87(1H,m),5.35-5.32(1H,m),4.74-4.71(1H,m),4.60-4.56(2H,m),4.30(1H,s),4.13-4.10(4H,m),3.89(3H,s),3.83(3H,s),3.80(3H,s),3.74-3.71(1H,m),3.60-3.49(4H,m),3.39-3.35(1H,m),3.31-3.27(2H,m),2.75-2.72(1H,m),2.44-2.18(4H,m),1.78-1.44(6H,m),0.98-0.97(3H,m),0.74-0.68(7H,m).

[1452] MS(APCI,ESI)m/z:1002$(M+H)^+$

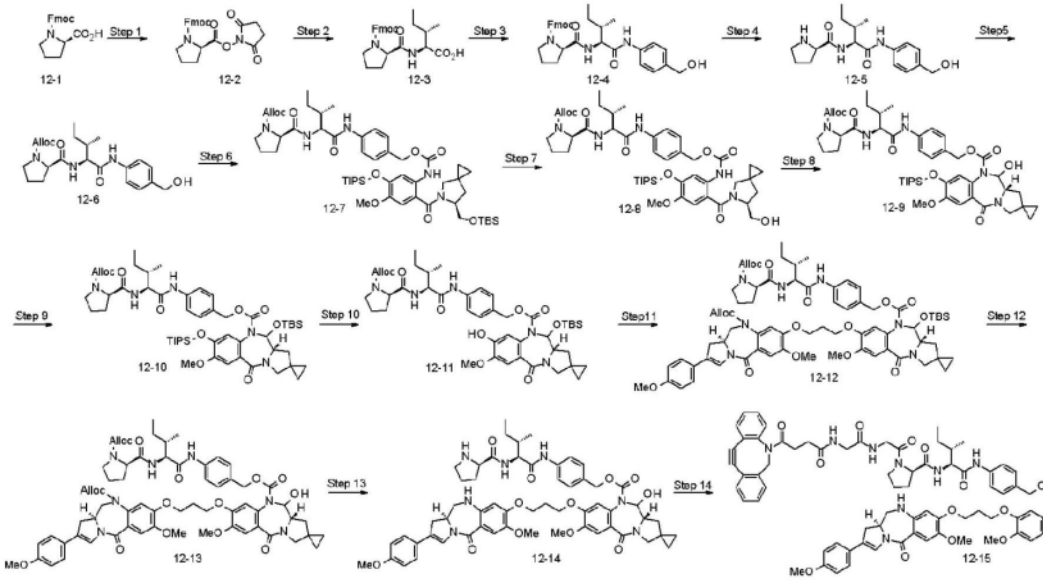
[1453] 工序13:N－[4－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]甘氨酰甘氨酰基－D－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－(3－{[(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}丙氧基)－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[1454] 使用上述工序12所得到的化合物(0.0455g,0.0454mmol),与实施例3工序13同样

地反应,得到目标产物(0.0416g,65%)。

[1455] MS(APCI,ESI)m/z:1403(M+H)$^+$

[1456] 实施例12:药物连接子10

[1457] 

[1458] 工序1:化合物12-2

[1459] 在起始物质12-1(2.01g,5.94mmol)的二氯甲烷(50mL)中,在室温下加入1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(1.37g,7.13mmol),在室温下搅拌10分钟后,在0℃下加入N-羟基琥珀酰亚胺(0.821g,7.13mmol)。将反应溶液在室温下搅拌1晚后,减压蒸馏除去溶剂。在得到的残渣中加入乙酸乙酯、水,将有机层用水、10%柠檬酸水溶液、饱和碳酸氢钠水溶液、饱和盐水进行清洗,用硫酸钠干燥。减压蒸馏除去后,将得到的残渣用硅胶柱色谱法[己烷:乙酸乙酯=90:10(v/v)~50:50(v/v)]进行精制,得到目标产物(2.11g,82%)。

[1460] MS(APCI,ESI)m/z:435(M+H)$^+$

[1461] 工序2:化合物12-3

[1462] 使用L-异亮氨酸代替N^6-[(2,2,2-三氯乙氧基)羰基]-L-赖氨酸盐酸盐,使上述工序1所得到的化合物(2.11g,4.85mmol)与实施例10工序1同样地反应,得到目标产物(2.16g,99%)。MS(APCI,ESI)m/z:451(M+H)$^+$

[1463] 工序3:化合物12-4

[1464] 使上述工序2所得到的化合物(2.16g,4.85mmol)与实施例5工序2同样地反应,得到目标产物(1.48g,56%)。

[1465] 工序4:化合物12-5

[1466] 使上述工序3所得到的化合物(1.48g,2.67mmol)与实施例10工序3同样地反应,得到目标产物(0.794g,89%)。

[1467] 工序5:化合物12-6

[1468] 使上述工序3所得到的化合物(0.794g,2.38mmol)与实施例7工序1同样地反应,得到目标产物(0.886g,89%)。

[1469] 工序6:化合物12-7

[1470] 使上述工序5所得到的化合物(0.794g,2.12mmol)与实施例1工序6同样地反应,得到目标产物(1.19g,72%)。

[1471] MS(APCI,ESI)m/z:1006$(M+H)^+$

[1472] 工序7:化合物12－8

[1473] 使上述工序6所得到的化合物(1.19g,1.18mmol)与实施例1工序7同样地反应,得到目标产物(1.07g,定量)。

[1474] MS(APCI,ESI)m/z:892$(M+H)^+$

[1475] 工序8:化合物12－9

[1476] 使上述工序7所得到的化合物(1.18mmol)与实施例1工序8同样地反应,得到目标产物(0.800g,76%)。MS(APCI,ESI)m/z:890$(M+H)^+$

[1477] 工序9:化合物12－10

[1478] 使上述工序8所得到的化合物(0.800g,0.899mmol)与实施例1工序9同样地反应,得到目标产物(0.567g,90%)。

[1479] MS(APCI,ESI)m/z:1004$(M+H)^+$

[1480] 工序10:化合物12－11

[1481] 使上述工序9所得到的化合物(0.567g,0.564mmol)与实施例1工序10同样地反应,得到目标产物(0.454g,94%)。

[1482] MS(APCI,ESI)m/z:848$(M+H)^+$

[1483] 工序11:化合物12－12

[1484] 使上述工序10所得到的化合物(0.100g,0.118mmol)与实施例4工序9同样地反应,得到目标产物(0.159g,定量)。

[1485] MS(APCI,ESI)m/z:1324$(M+H)^+$

[1486] 工序12:化合物12－13

[1487] 使上述工序11所得到的化合物(0.118mmol)与实施例3工序11同样地反应,得到目标产物(0.139g,97%)。

[1488] MS(APCI,ESI)m/z:1210$(M+H)^+$

[1489] 工序13:化合物12－14

[1490] 使上述工序12所得到的化合物(0.139g,0.114mmol)与实施例3工序12同样地反应,得到目标产物(0.0667g,56%)。

[1491] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.81(1H,s),8.21-8.19(1H,m),7.55-7.44(4H,m),7.33-7.31(2H,m),7.22(1H,s),7.13-7.11(2H,m),6.90-6.87(2H,m),6.39(1H,s),6.11(1H,s),5.89-5.87(1H,m),5.35-5.32(1H,m),4.80-4.58(2H,m),4.30(1H,s),4.22-4.07(5H,m),3.89(3H,s),3.81-3.72(9H,m),3.58-3.53(3H,m),3.38-3.31(2H,m),2.98-2.93(2H,m),2.76-2.72(1H,m),2.42-2.39(1H,m),2.18-2.12(3H,m),1.94-1.51(7H,m),1.31-1.13(1H,m),0.97-0.90(6H,m),0.71-0.66(4H,m).

[1492] MS(APCI,ESI)m/z:1042$(M+H)^+$

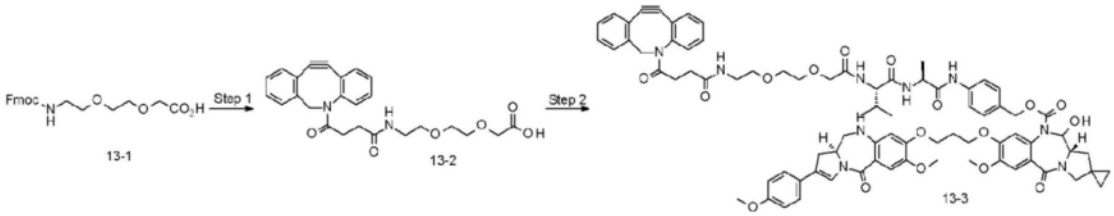
[1493] 工序14:N－[4－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]甘氨酰甘氨酰基－D－脯氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－(3－{[(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－5,10,11,11a－

四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}丙氧基)－5’－氧代－11’,11a’－二氢－1’H－螺[环丙烷－1,2’－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10’(5’H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－异亮氨酸酰胺

[1494] 使上述工序13所得到的化合物(0.0314g,0.0301mmol)与实施例3工序13同样地反应,得到目标产物(0.0300g,69%)。

[1495] MS(APCI,ESI)m/z:1443$(M+H)^+$

[1496] 实施例13:药物连接子11

[1497] 

[1498] 工序1:[2－(2－{[4－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]氨基}乙氧基)乙氧基]醋酸

[1499] 在起始物质13－1(3.00g,7.78mmol,东京化成工业株式会社)的N,N－二甲基甲酰胺(10mL)溶液中,在室温下加入1,8－二氮杂双环[5.4.0]－7－十一碳烯(1.16mL,7.78mL),在室温下搅拌2小时后,在室温下加入1－{[4－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]氧基}吡咯烷－2,5－二酮(1.10g,2.72mmol)、三乙胺(1.94mL,14.0mmol)。将反应溶液减压蒸馏除去后,将得到的残渣用硅胶柱色谱法[氯仿:甲醇＝100:0(v/v)～氯仿:甲醇＝90:10(v/v)]进行精制,得到目标产物(0.410g,12%)。

[1500] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.68-7.66(1H,m),7.55-7.53(1H,m),7.44-7.24(6H,m),6.58-6.56(1H,m),5.16-5.12(1H,m),4.16-4.11(2H,m),3.80-3.57(5H,m),3.48-3.44(2H,m),3.30-3.18(2H,m),2.90-2.86(1H,m),2.52-2.45(1H,m),2.26-2.22(1H,m),2.02-1.98(1H,m).

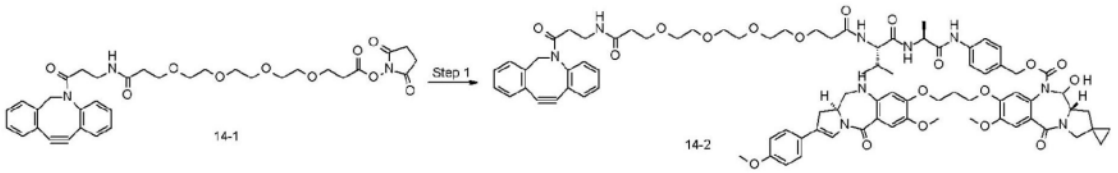
[1501] MS(APCI,ESI)m/z:451$(M+H)^+$

[1502] 工序2:N－{[2－(2－{[4－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]氨基}乙氧基)乙氧基]乙酰基}－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a’S)－11’－羟基－7’－甲氧基－8’－(3－{[(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}丙氧基)－5’－氧代－11’,11a’－二氢－1’H－螺[环丙烷－1,2’－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10’(5’H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[1503] 使上述工序1所得到的化合物(0.050g,0.0499mmol)与实施例3工序13同样地反应,得到目标产物(0.0590g,82%)。

[1504] MS(APCI,ESI)m/z:1434$(M+H)^+$

[1505] 实施例14:药物连接子12

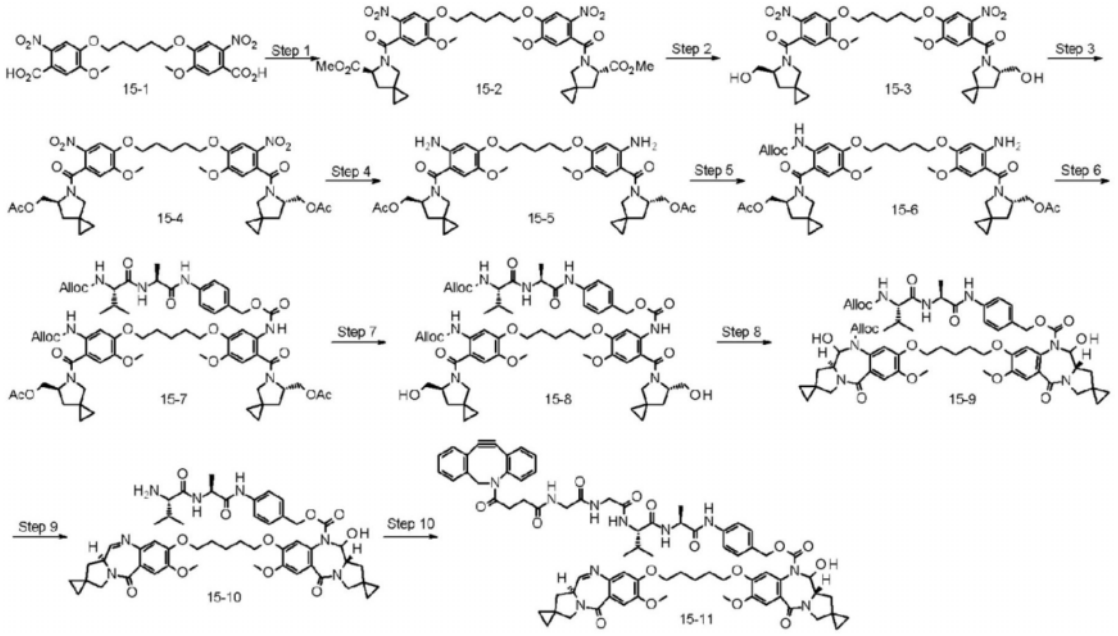
[1506] 

[1507] 工序1:N－[20－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－16,20－二氧代－4,7,10,13－四氧杂－17－氮杂二十烷－1－酰基]－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－(3－{[(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}丙氧基)－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[1508] 在室温下将实施例4工序11所得到的化合物(0.0500g,0.0499mmol)、起始物质14－1(0.050g,0.0499mmol,由Alfa Aesar贩卖)、三乙胺(0.00830mL,0.0599mmol)的二氯甲烷(3mL)溶液搅拌1晚。减压蒸馏除去后,将得到的残渣用硅胶柱色谱法[氯仿:甲醇＝100:0(v/v)～氯仿:甲醇＝90:10(v/v)]进行精制,得到目标产物(0.0490g,64%)。

[1509] MS(APCI,ESI)m/z:1536$(M+H)^+$

[1510] 实施例15:药物连接子13

[1511] 

[1512] 工序1:(6S,6'S)－5,5'－{1,5－戊二基双[氧基(5－甲氧基－2－硝基苯－4,1－二基)羰基]}双(5－氮杂螺[2.4]庚烷－6－羧酸二甲酯)

[1513] 在起始物质15－1(5.41g,10.9mmol,Journal of Medicinal Chemistry 2004,47,1161)的二氯甲烷(50mL)溶液中,在0℃下加入草酰氯(5.63mL,65.7mmol),滴入N,N－二甲基甲酰胺(0.0844mL,1.09mmol)。将反应溶液升温至室温,搅拌2小时。减压蒸馏,将得到的残渣溶解于二氯甲烷(100mL),在氮气氛下在－40℃下滴入(6S)－5－氮杂螺[2.4]庚烷－6－羧酸甲酯盐酸盐(4.28g,24.1mmol,Tetrahedron Letters 2012.53.3847)与三乙胺(6.07mL,43.8mmol)的二氯甲烷溶液(100mL)。将反应溶液升温至0℃搅拌2小时。在反应混合物中加入1当量浓度的盐酸(100mL),将有机层用水、饱和盐水清洗,用无水硫酸钠进行

干燥。减压蒸馏得到目标产物(8.40g,定量)。

[1514] ^{1}H-NMR(DMSO-D_6)δ:7.71(2H,s),6.88(2H,s),4.63(2H,m),4.15-4.12(4H,m),3.94(6H,s),3.71(6H,s),3.25(2H,m),3.10(2H,m),2.31-2.28(2H,m),1.90-1.83(6H,m),1.60-1.58(2H,m),0.71-0.49(8H,m).MS(APCI,ESI)m/z:769(M+H)$^+$.

[1515] 工序2:{1,5－戊二基双[氧基(5－甲氧基－2－硝基苯－4,1－二基)]}双{[(6S)－6－(羟甲基)－5－氮杂螺[2.4]庚－5－基]甲酮}

[1516] 在上述工序1所得到的化合物(8.40g,10.9mmol)的THF(100mL)溶液中加入硼氢化锂(714mg,32.8mmol),在0℃下搅拌30分钟,升温至室温搅拌1小时。在0℃下加入1当量浓度盐酸后,用乙酸乙酯提取,用饱和盐水进行清洗后,用无水硫酸钠进行干燥。在减压下蒸馏除去溶剂,得到目标产物(7.70g,99%)。

[1517] ^{1}H-NMR(DMSO-D_6)δ:7.67(2H,s),7.05(2H,s),4.86-4.74(2H,m),4.22-4.12(6H,m),3.92(6H,s),3.83-3.73(2H,m),3.62-3.51(2H,m),3.29(1H,m),3.11(2H,m),2.96(1H,m),2.12-2.03(2H,m),1.82-1.77(6H,m),1.59-1.56(2H,m),0.67-0.41(8H,m).

[1518] MS(APCI,ESI)m/z:713(M+H)$^+$.

[1519] 工序3:戊烷－1,5－二基双[氧基(5－甲氧基－2－硝基苯－4,1－二基)羰基(6S)－5－氮杂螺[2.4]庚烷－5,6－二基甲烷二基]二乙酸酯

[1520] 使上述工序2所得到的化合物(7.70g,10.8mmol)溶解于吡啶(20mL)以及醋酸酐(10mL,105.9mmol)中,在室温下搅拌。减压蒸馏得到目标产物(8.38g,97%)。

[1521] ^{1}H-NMR(DMSO-D_6)δ:7.68(2H,s),7.03(2H,s),4.47-4.46(2H,m),4.36-4.27(4H,m),4.13-4.11(6H,m),3.92(6H,s),3.16(2H,m),2.98(2H,m),2.17(1H,m),2.06(6H,s),1.84(4H,m),1.68(1H,m),1.58(2H,m),0.64-0.45(8H,m).

[1522] MS(APCI,ESI)m/z:797(M+H)$^+$.

[1523] 工序4:1,5－戊二基双[氧基(2－氨基－5－甲氧基苯－4,1－二基)羰基(6S)－5－氮杂螺[2.4]庚烷－5,6－二基甲烷二基]二乙酸酯

[1524] 在上述工序3所得到的化合物(8.28g,10.4mmol)的N,N－二甲基甲酰胺(100mL)溶液中加入5%钯碳(54%水分,1.00g)后,将反应溶液在氢气氛下、室温下剧烈搅拌6小时。硅藻土过滤后,将滤液减压蒸馏除去,将得到的残渣用硅胶柱色谱法[氯仿:甲醇＝100:0(v/v)～90:10(v/v)]进行精制,得到目标产物(5.05g,66%)。

[1525] ^{1}H-NMR(DMSO-D_6)δ:6.66(2H,s),6.36(2H,s),5.11(4H,s),4.49(2H,s),4.19(4H,m),3.90(4H,m),3.62(6H,s),3.48-3.46(2H,m),3.33(2H,s),3.23-3.20(2H,m),2.01(6H,s),1.78-1.74(6H,m),1.55(2H,m),0.61-0.58(4H,m),0.49-0.48(4H,m).

[1526] MS(APCI,ESI)m/z:737(M+H)$^+$.

[1527] 工序5:{(6S)－5－[4－({5－[4－({(6S)－6－[(乙酰氧基)甲基]－5－氮杂螺[2.4]庚－5－基}羰基)－5－氨基－2－甲氧基苯氧基]戊基}氧基)－5－甲氧基－2－{[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]氨基}苯甲酰基]－5－氮杂螺[2.4]庚－6－基}甲基乙酸酯(单烯丙氧基羰基体)

[1528] 在上述工序4所得到的化合物(5.05g,6.85mmol)的二氯甲烷(100mL)溶液中加入吡啶(1.10mL,13.7mmol),在氮气氛下,－78℃下加入氯甲酸烯丙酯(0.725mL,6.85mmol)并搅拌2小时。减压蒸馏除去,将得到的残渣用硅胶柱色谱法[己烷:乙酸乙酯＝70:30(v/v)～

100:0(v/v),氯仿:甲醇＝100:0(v/v)～90:10(v/v)]进行精制,得到目标产物双烯丙氧基羰基体(1.36g,22%)和单烯丙氧基羰基体(2.63g,47%)。

[1529] 戊烷－1,5－二基双[氧基(5－甲氧基－2－{[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]氨基}苯－4,1－二基)羰基(6S)－5－氮杂螺[2.4]庚烷－5,6－二基甲烷二基]二乙酸酯(双烯丙氧基羰基体):

[1530] ^{1}H-NMR(DMSO-D_6)δ:9.14(2H,s),7.14(2H,s),6.85(2H,s),5.94(2H,m),5.33(2H,m),5.21(2H,m),4.55(4H,m),4.47(1H,s),4.23(3H,s),3.96(4H,m),3.74(6H,s),3.34(6H,s),3.31(2H,m),3.21(2H,m),2.04(6H,s),1.79(4H,m),1.67(2H,m),1.56(2H,m),0.56-0.48(8H,m).

[1531] MS(APCI,ESI)m/z:905$(M+H)^+$.

[1532] 单烯丙氧基羰基体:

[1533] ^{1}H-NMR(DMSO-D_6)δ:9.14(1H,s),7.14(1H,s),6.85(1H,s),6.65(1H,s),6.35(1H,s),5.95(1H,m),5.33(1H,m),5.22(1H,m),5.11(2H,s),4.55(2H,m),4.48(2H,s),4.23-4.14(4H,m),3.96(2H,m),3.90(2H,m),3.74(3H,s),3.63(3H,s),3.49(1H,m),3.38-3.30(4H,m),3.21(1H,m),2.04(3H,s),2.01(3H,s),1.77(5H,m),1.68(1H,m),1.56(2H,m),0.63-0.48(8H,m).

[1534] MS(APCI,ESI)m/z:821$(M+H)^+$.

[1535] 工序6:N－[(2－丙烯－1－基氧基)羰基]－L－缬氨酰基－N－{4－[({[2－({(6S)－6－[(乙酰氧基)甲基]－5－氮杂螺[2.4]庚－5－基}羰基)－5－({5－[4－({(6S)－6－[(乙酰氧基)甲基]－5－氮杂螺[2.4]庚5－基}羰基)－2－甲氧基－5－{[(2－丙烯－1－基氧基)羰基]氨基}苯氧基]戊基}氧基)－4－甲氧基苯基]氨基甲酰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[1536] 使上述工序5所得到的单烯丙氧基羰基体(2.00g,2.44mmol)与实施例1工序6同样地反应,得到目标产物(2.64g,89%)。

[1537] ^{1}H-NMR(DMSO-D_6)δ:10.02(1H,s),9.14(2H,s),8.18(1H,m),7.59(2H,m),7.33(2H,m),7.27(1H,m),7.14(2H,s),6.85(2H,s),5.99-5.86(2H,m),5.31(2H,n),5.19(2H,m),5.03(2H,s),4.55(2H,m),4.48(2H,n),4.41(2H,m),4.23-4.21(3H,m),3.94-3.91(4H,m),3.88-3.86(2H,m),3.74(3H,s),3.74(3H,s),3.34(4H,s),3.32-3.30(2H,m),3.20-3.18(2H,m),2.03(6H,s),1.96(1H,m),1.79(4H,s),1.66(1H,m),1.55(2H,s),1.30(3H,m),0.88(3H,m),0.83(3H,m),0.54-0.49(8H,m).

[1538] MS(APCI,ESI)m/z:1224$(M+H)^+$.

[1539] 工序7:N－[(2－丙烯－1－基氧基)羰基]－L－缬氨酰基－N－[4－({[(2－{[(6S)－6－(羟甲基)－5－氮杂螺[2.4]庚烷－5－基]羰基}－5－{[5－(4－{[(6S)－6－(羟甲基)－5－氮杂螺[2.4]庚－5－基]羰基}－2－甲氧基－5－{[(2－丙烯－1－基氧基)羰基]氨基}苯氧基)戊基]氧基}－4－甲氧基苯基)氨基甲酰基]氧基}甲基)苯基]－L－丙氨酸酰胺

[1540] 在上述工序6所得到的化合物(2.64g,2.16mmol)的甲醇(10mL)溶液中加入碳酸钾(1.49g,10.8mmol),在室温下搅拌3小时。在反应混合物中加入饱和氯化铵水溶液(100mL),用乙酸乙酯提取。将有机层用无水硫酸钠干燥。减压蒸馏除去,得到目标产物(2.21g,

90%)。

[1541] ^{1}H-NMR(DMSO-D_6)δ:10.04(1H,s),9.18(1H,s),8.18(1H,m),7.59(2H,m),7.33(2H,m),7.26(1H,m),7.22(1H,s),7.14(2H,s),6.89(2H,s),5.98-5.86(2H,m),5.31(2H,m),5.19(2H,m),5.04(2H,s),4.80(2H,m),4.55(2H,m),4.48(2H,m),4.41(1H,m),4.26(2H,s),3.96-3.94(4H,m),3.90-3.85(1H,m),3.74(6H,s),3.59(2H,m),3.33(6H,s),3.09(1H,m),1.93-1.83(8H,m),1.57-1.54(2H,m),1.30(3H,m),0.88(3H,m),0.83(3H,m),0.52-0.43(8H,m).

[1542] MS(APCI,ESI)m/z:1140$(M+H)^+$.

[1543] 工序8:N－[(2－丙烯－1－基氧基)羰基]－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－8'－{[5－({(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－5'－氧代－10'－[(2－丙烯－1－基氧基)羰基]－5',10',11',11a'－四氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－8'－基}氧基)戊基]氧基}－7'－甲氧基－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[1544] 在上述工序7所得到的化合物(2.03g,1.78mmol)的二氯甲烷(50mL)溶液中加入戴斯－马丁氧化剂(1.59g,3.74mmol),在室温下搅拌一晚。在反应混合物中加入饱和碳酸氢钠水溶液(100mL),用氯仿提取。将有机层用无水硫酸钠进行干燥。减压蒸馏除去,将得到的残渣用硅胶柱色谱法[氯仿:甲醇＝100:0(v/v)～90:10(v/v)]进行精制,得到目标产物(2.05g,定量)。

[1545] ^{1}H-NMR(DMSO-D_6)δ:9.99(1H,s),8.16(1H,m),7.54(2H,m),7.32-7.22(3H,m),7.08-7.04(2H,m),6.80-6.72(2H,m),6.55(2H,s),5.94-5.86(2H,m),5.75(2H,m),5.31-5.04(2H,m),4.81(1H,m),4.62(1H,m),4.48-4.38(4H,m),4.00-3.87(4H,m),3.79-3.76(7H,m),3.54(2H,m),3.42-3.40(2H,m),3.33(4H,s),3.14(2H,m),2.35(2H,m),1.80-1.78(4H,m),1.59-1.56(4H,m),1.29(3H,m),0.87(3H,m),0.83(3H,m),0.70-0.59(8H,m).

[1546] MS(APCI,ESI)m/z:1136$(M+H)^+$.

[1547] 工序9:L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－[(5－{[(11a'S)－7'－甲氧基－5'－氧代－5',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－8'－基]氧基}戊基)氧基]－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[1548] 使上述工序8所得到的化合物(2.05g,1.80mmol)与实施例3工序12同样地反应,得到目标产物(1.02g,60%)。

[1549] ^{1}H-NMR(DMSO-D_6)δ:10.08(1H,s),7.57(2H,m),7.32-7.20(3H,m),7.05(2H,s),6.68-6.60(3H,m),5.74(1H,m),4.99-4.58(4H,m),3.99-3.94(4H,m),3.78-3.73(6H,m),3.66-3.38(4H,m),3.15-3.01(3H,m),2.40-2.34(3H,m),1.89-1.81(6H,m),1.57-1.53(4H,m),1.28(3H,m),0.88(3H,m),0.78(3H,m),0.64-0.55(8H,m).

[1550] MS(APCI,ESI)m/z:950$(M+H)^+$.

[1551] 工序10:N－[4－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]甘氨酰甘氨酰基－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲

氧基－8’－[(5－{[(11a’S)－7’－甲氧基－5’－氧代－5’,11a’－二氢－1’H－螺[环丙烷－1,2’－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－8’－基]氧基}戊基)氧基]－5’－氧代－11’,11a’－二氢－1’H－螺[环丙烷－1,2’－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10’(5’H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

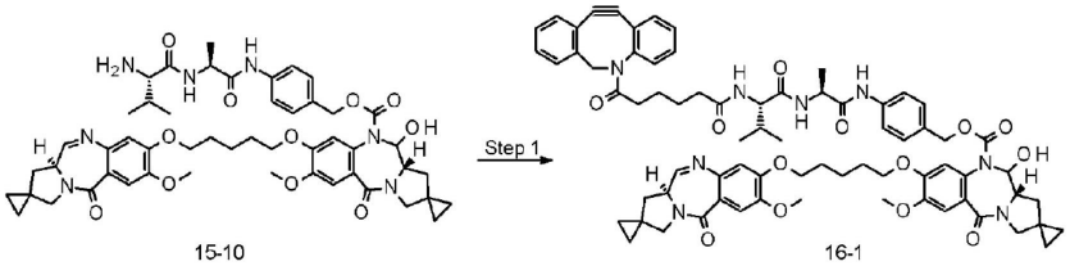
[1552] 将上述工序9所得到的化合物(0.710g,0.747mmol)与实施例2工序1所得到的化合物(0.313g,0.747mmol)溶解于二氯甲烷(1.5mL)与甲醇(0.1mL)的混合溶剂中。加入4－(4,6－二甲氧基－1,3,5－三嗪－2－基)－4－甲基吗啉鎓氯化物(0.264g,0.897mmol),在室温下搅拌1小时。减压蒸馏除去,将得到的残渣用硅胶柱色谱法[氯仿:甲醇＝100:0(v/v)～80:20(v/v)]进行精制,得到目标产物(0.671g,66%)。

[1553] Table2:药物连接子13的质子NMR的峰位置以及MS

[1554] ^{1}H-NMR(DMSO-D_6)δ:9.91(1H,s),8.32(1H,s),8.23-7.91(3H,m),7.81-7.19(14H,m),7.04(1H,m),6.80-6.62(3H,m),5.77-5.75(1H,m),5.20(1H,m),5.01(1H,m),4.79(1H,m),4.46-4.35(1H,m),4.04(4H,m),3.86-3.38(18H,m),3.22-3.15(2H,m),2.67-2.63(1H,m),2.46-2.23(3H,m),2.09-1.91(2H,m),1.80-1.78(5H,m),1.57(3H,m),1.27(3H,s),1.11-1.04(1H,m),0.87-0.79(6H,m),0.63-0.55(6H,m).

[1555] MS(APCI,ESI)m/z:1351(M+H)$^+$.

[1556] 实施例16:药物连接子14

[1557] 

15-10 16-1

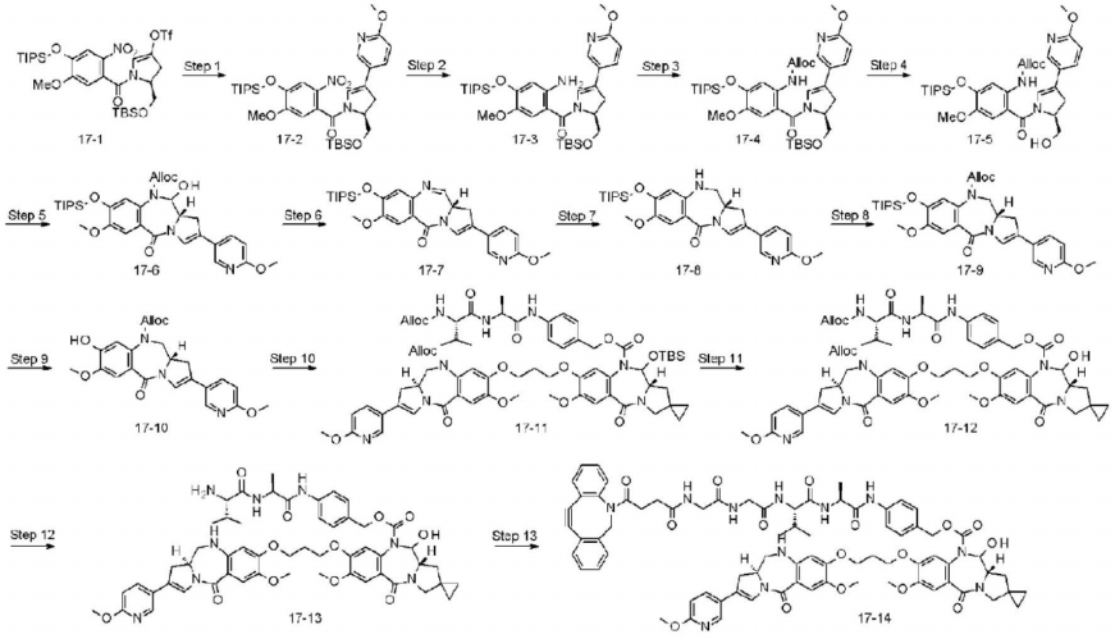
[1558] 工序1:N－[6－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－6－氧代己酰基]－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a’S)－11’－羟基－7’－甲氧基－8’－[(5－{[(11a’S)－7’－甲氧基－5’－氧代－5’,11a’－二氢－1’H－螺[环丙烷－1,2’－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－8’－基]氧基}戊基)氧基]－5’－氧代－11’,11a’－二氢－1’H－螺[环丙烷－1,2’－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10’(5’H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[1559] 使实施例15工序9所得到的化合物(0.100g,0.105mmol)与氮杂二苯并环辛炔酸(0.0351g,0.105mmol)与实施例15工序10同样地反应,得到目标产物(0.0702g,53%)。

[1560] ^{1}H-NMR(DMSO-D_6)δ:9.92(1H,s),8.14(1H,m),7.92-7.19(16H,m),7.04(1H,m),6.86-6.72(1H,m),6.60-6.58(1H,m),5.76(1H,m),5.20(1H,m),5.03(1H,m),4.81-4.78(1H,m),4.43-4.37(2H,m),4.11-3.41(14H,m),3.21-3.15(3H,m),2.43-2.37(2H,m),2.19-2.15(1H,m),2.03-1.92(3H,m),1.77-1.75(5H,m),1.55(4H,s),1.26-1.18(6H,m),1.09-1.04(1H,m),0.87-0.77(6H,m),0.69-0.50(8H,m).

[1561] MS(APCI,ESI)m/z:1265(M+H)$^+$.

[1562] 实施例17:药物连接子15

[1563] 

[1564] 工序1:化合物17－2

[1565] 使起始原料17－1(2.00g,2.81mmol,WO2013053872)与2－甲氧基－5－(4,4,5,5－四甲基－1,3,2－二氧杂硼烷－2－基)吡啶(2.00g,8.51mmol)与实施例3工序6同样地反应,得到目标产物(1.89g,定量)。

[1566] MS(APCI,ESI)m/z:672$(M+H)^+$.

[1567] 工序2:化合物17－3

[1568] 将上述工序1所得到的化合物(1.89g,2.81mmol)溶解于乙醇(30mL)与甲酸(1.5mL)的混合溶剂中。加入锌粉末(3.68g),在室温下搅拌1小时。硅藻土过滤,在滤液中加入饱和碳酸氢钠水溶液(100mL),用乙酸乙酯提取。将有机层用无水硫酸钠进行干燥。减压蒸馏除去得到目标产物(1.81g,定量)。

[1569] MS(APCI,ESI)m/z:642$(M+H)^+$.

[1570] 工序3:化合物17－4

[1571] 使上述工序2所得到的化合物(1.81g,2.82mmol)与实施例3工序9同样地反应,得到目标产物(1.76g,86%)。

[1572] MS(APCI,ESI)m/z:726$(M+H)^+$.

[1573] 工序4:化合物17－5

[1574] 使上述工序3所得到的化合物(1.76g,2.42mmol)与实施例1工序7同样地反应,得到目标产物(1.05g,71%)。

[1575] MS(APCI,ESI)m/z:612$(M+H)^+$.

[1576] 工序5:化合物17－6

[1577] 使上述工序4所得到的化合物(1.05g,1.71mmol)与实施例9工序3同样地反应,得到目标产物(0.686g,66%)。

[1578] MS(APCI,ESI)m/z:610$(M+H)^+$.

[1579] 工序6:化合物17－7

[1580] 使上述工序5所得到的化合物(0.481g,0.789mmol)与实施例3工序12同样地反应,

得到目标产物(0.288g,72%)。

[1581] MS(APCI,ESI)m/z:508(M+H)$^+$.

[1582] 工序7:化合物17－8

[1583] 使上述工序6所得到的化合物(0.288g,0.567mmol)与实施例3工序8同样地反应,得到目标产物(0.268g,93%)。

[1584] MS(APCI,ESI)m/z:510(M+H)$^+$.

[1585] 工序8:化合物17－9

[1586] 使上述工序7所得到的化合物(0.267g,0.525mmol)与实施例3工序9同样地反应,得到目标产物(0.278g,89%)。

[1587] MS(APCI,ESI)m/z:594(M+H)$^+$.

[1588] 工序9:化合物17－10

[1589] 使上述工序8所得到的化合物(0.278g,0.468mmol)与实施例1工序10同样地反应,得到目标产物(0.207g,定量)。

[1590] MS(APCI,ESI)m/z:438(M+H)$^+$.

[1591] 工序10:化合物17－11

[1592] 使用上述工序9所得到的化合物(0.0964g,0.220mmol)与实施例1工序11所得到的化合物(0.307g,0.331mmol),与实施例3工序10同样地反应,得到目标产物(0.224g,79%)。

[1593] MS(APCI,ESI)m/z:1285(M+H)$^+$.

[1594] 工序11:化合物17－12

[1595] 使上述工序10所得到的化合物(0.294g,0.228mmol)与实施例3工序11同样地反应,得到目标产物(0.284g,定量)。

[1596] MS(APCI,ESI)m/z:1171(M+H)$^+$.

[1597] 工序12:化合物17－13

[1598] 使上述工序11所得到的化合物(0.284g,0.242mmol)与实施例3工序12同样地反应,得到目标产物(0.114g,47%)。

[1599] MS(APCI,ESI)m/z:1003(M+H)$^+$.

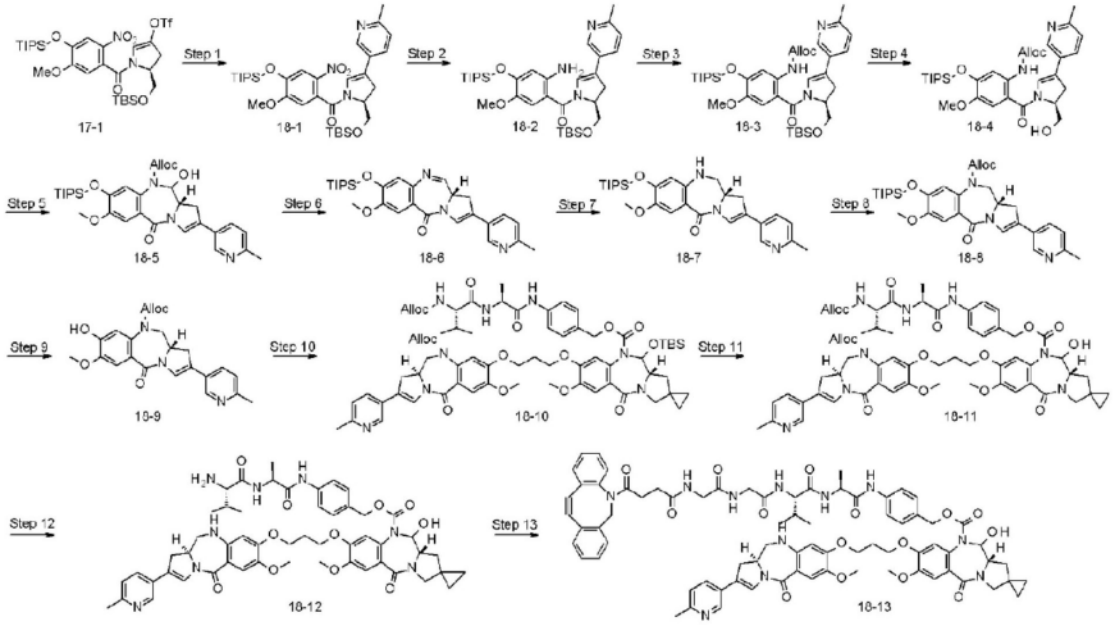
[1600] 工序13:N－[4－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]甘氨酰甘氨酰基－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－(3－{[7－甲氧基－2－(6－甲氧基－3－吡啶基)－5－氧代－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}丙氧基)－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[1601] 使上述工序12所得到的化合物(0.114g,0.113mmol)与实施例3工序13同样地反应,得到目标产物(0.0121g,8%)。

[1602] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.75(1H,s),8.24-8.09(2H,m),7.85-6.98(13H,m),6.75-6.73(2H,m),6.57-6.47(1H,m),6.18(1H,s),5.89(1H,s),5.37-4.96(3H,m),4.67-4.60(3H,m),4.41-4.06(6H,m),3.92(3H,s),3.86-3.82(3H,m),3.74-3.70(3H,m),3.59-3.45(3H,m),3.32-3.23(2H,m),2.81-2.64(3H,m),2.28-2.04(4H,m),1.49-1.38(4H,m),1.23-1.22(2H,m),1.09-1.01(3H,m),0.96-0.90(5H,m),0.69-0.64(6H,m).

[1603] MS(APCI,ESI)m/z:1404(M+H)$^+$.

[1604] 实施例18:药物连接子16

[1605] 

[1606] 工序1:化合物18－1

[1607] 使用起始原料17－1(2.00g,2.81mmol)与2－甲基－5－吡啶基硼酸(1.00g,7.30mmol)与实施例3工序6同样地进行铃木宫浦偶联反应,得到目标产物(0.901g,49%)。

[1608] MS(APCI,ESI)m/z:656(M+H)$^+$.

[1609] 工序2:化合物18－2

[1610] 使上述工序1所得到的化合物(1.98g,3.02mmol)与实施例17工序2同样地反应,得到目标产物(1.86g,98%)。

[1611] MS(APCI,ESI)m/z:626(M+H)$^+$.

[1612] 工序3:化合物18－3

[1613] 使上述工序2所得到的化合物(1.86g,2.97mmol)与实施例3工序9同样地反应,得到目标产物(1.36g,65%)。

[1614] MS(APCI,ESI)m/z:710(M+H)$^+$.

[1615] 工序4:化合物18－4

[1616] 使上述工序3所得到的化合物(1.36g,2.42mmol)与实施例1工序7同样地反应,得到目标产物(0.991g,87%)。

[1617] MS(APCI,ESI)m/z:596(M+H)$^+$.

[1618] 工序5:化合物18－5

[1619] 使上述工序4所得到的化合物(0.991g,1.66mmol)与实施例9工序3同样地反应,得到目标产物(0.608g,62%)。

[1620] MS(APCI,ESI)m/z:594(M+H)$^+$.

[1621] 工序6:化合物18－6

[1622] 使上述工序5所得到的化合物(0.405g,0.682mmol)与实施例3工序12同样地反应,得到目标产物(0.239g,71%)。

[1623] ^{1}H-NMR(DMSO-D_6)δ:8.60(1H,s),8.02(1H,m),7.87(1H,m),7.67(1H,s),7.62(1H,

m),7.57-7.54(1H,m),7.40(1H,s),7.25(1H,m),6.74(1H,s),4.53-4.49(1H,m),3.85(3H,s),3.52(2H,m),2.46(3H,s),1.30-1.24(3H,m),1.07-1.06(18H,m)观察到目标产物的水加成物。

[1624] MS(APCI,ESI)m/z:492$(M+H)^+$.

[1625] 工序7:化合物18－7

[1626] 使上述工序6所得到的化合物(0.239g,0.485mmol)与实施例3工序8同样地反应,得到目标产物(0.180g,75%)。

[1627] MS(APCI,ESI)m/z:494$(M+H)^+$.

[1628] 工序8:化合物18－8

[1629] 使上述工序7所得到的化合物(0.180g,0.364mmol)与实施例3工序9同样地反应,得到目标产物(0.179g,85%)。

[1630] MS(APCI,ESI)m/z:578$(M+H)^+$.

[1631] 工序9:化合物18－9

[1632] 使上述工序8所得到的化合物(0.179g,0.309mmol)与实施例1工序10同样地反应,得到目标产物(0.137g,定量)。

[1633] MS(APCI,ESI)m/z:422$(M+H)^+$.

[1634] 工序10:化合物18－10

[1635] 使用实施例1工序11所得到的化合物(0.258g,0.278mmol)来代替实施例1工序10所得到的化合物,使上述工序9所得到的化合物(0.0780g,0.185mmol)与实施例3工序10同样地反应,得到目标产物(0.213g,91%)。

[1636] MS(APCI,ESI)m/z:1269$(M+H)^+$.

[1637] 工序11:化合物18－11

[1638] 使上述工序10所得到的化合物(0.213g,0.168mmol)与实施例3工序11同样地反应,得到目标产物(0.182g,94%)。

[1639] ^{1}H-NMR(DMSO-D_6)δ:10.00-9.85(1H,m),8.54(1H,s),8.32(1H,m),8.16(1H,s),7.82(1H,m),7.65-7.56(3H,m),7.35-7.06(6H,m),6.79(1H,m),6.57(1H,s),5.87-5.80(3H,m),5.26-5.09(5H,m),4.85-4.83(1H,m),4.56-4.40(5H,m),4.13(5H,m),3.92-3.87(2H,m),3.80(5H,s),3.58-3.54(1H,m),3.21-3.09(3H,m),2.81(1H,m),2.45(3H,s),2.36-2.34(1H,m),2.16-2.10(2H,m),1.98-1.92(1H,m),1.57(2H,m),1.30-1.28(4H,m),0.92-0.84(7H,m),0.67-0.62(4H,m).

[1640] MS(APCI,ESI)m/z:1155$(M+H)^+$.

[1641] 工序12:化合物18－12

[1642] 使上述工序11所得到的化合物(0.182g,0.157mmol)与实施例3工序12同样地反应,得到目标产物(0.0751g,48%)。

[1643] ^{1}H-NMR(DMSO-D_6)δ:10.15(1H,s),8.54(1H,m),8.50(1H,s),7.78(1H,m),7.67(1H,s),7.57(2H,m),7.30(1H,s),7.21-7.19(3H,m),7.05(1H,s),6.77(1H,s),6.60-6.56(2H,m),6.35(1H,s),5.91-5.83(2H,m),5.76(1H,m),5.29-5.13(4H,m),4.84(1H,m),4.54-4.49(1H,m),4.19-4.03(4H,m),3.79(3H,s),3.65(3H,s),3.57-3.53(2H,m),3.42-3.40(1H,m),3.28-3.26(1H,m),3.14(1H,m),2.81(1H,m),2.44(3H,s),2.37-2.33(1H,m),2.21-2.01

(3H,m),1.57(1H,m),1.30-1.26(3H,m),0.93-0.83(6H,m),0.67-0.61(4H,m).

[1644] MS(APCI,ESI)m/z:987(M+H)$^+$.

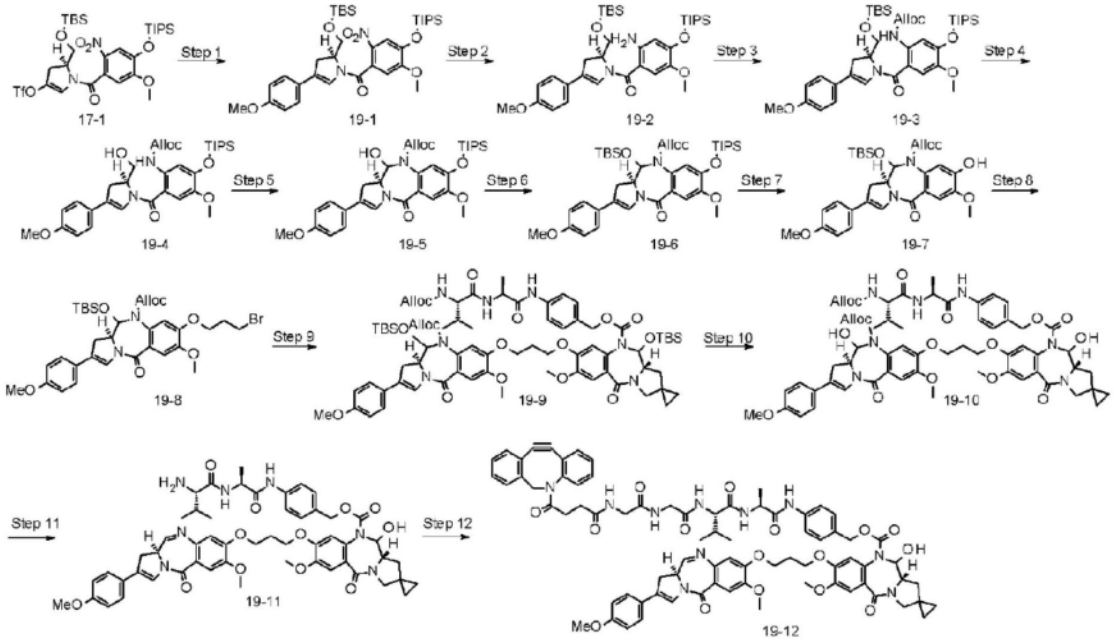
[1645] 工序13:N－[4－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]甘氨酰甘氨酰基－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－(3－{[7－甲氧基－2－(6－甲基－3－吡啶基)－5－氧代－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}丙氧基)－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[1646] 使上述工序12所得到的化合物(0.0751g,0.0761mmol)与实施例3工序13同样地反应,得到目标产物(0.0117g,11%)。

[1647] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.75(1H,s),8.48-8.46(1H,m),7.69-7.56(4H,m),7.47-6.89(14H,m),6.45(1H,m),6.24-6.19(1H,m),5.91(1H,m),5.37(1H,m),5.01(1H,m),4.67-4.59(3H,m),4.30-3.19(22H,m),2.88-2.63(3H,m),2.55(3H,s),2.42-2.34(2H,m),2.27-2.04(4H,m),1.51-1.34(4H,m),1.12-1.06(3H,m),0.99-0.84(3H,m),0.71-0.66(4H,m).

[1648] MS(APCI,ESI)m/z:1388(M+H)$^+$.

[1649] 实施例19:药物连接子17

[1650] 

[1651] 工序1:[(2S)－2－({[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}甲基)－4－(4－甲氧基苯基)－2,3－二氢－1H－吡咯－1－基](5－甲氧基－2－硝基－4－{[三(丙烷－2－基)硅烷基]氧基}苯基)甲酮

[1652] 使起始物质17－1(2.00g,2.81mmol)与实施例3工序6同样地反应,得到目标产物(1.31g,93%)。

[1653] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.75-7.73(1H,m),7.12(2H,m),6.82-6.76(4H,m),6.13-6.11(1H,m),4.80-4.70(1H,m),3.93-3.91(3H,m),3.79-3.75(4H,m),3.21-3.15(1H,m),3.01-2.93(1H,m),1.34-1.25(3H,m),1.12(18H,m),0.89(9H,s),0.13-0.18(6H,m).

[1654] MS(APCI,ESI)m/z:671(M+H)$^+$

[1655] 工序2:(2－氨基－5－甲氧基－4－{[三(丙烷－2－基)硅烷基]氧基}苯基)[(2S)－2－({[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}甲基)－4－(4－甲氧基苯基)－2,3－二氢－1H－吡咯－1－基]甲酮

[1656] 使上述工序1所得到的化合物(1.31g,1.95mmol)与实施例17工序2同样地反应,得到目标产物(1.12g,90%)。

[1657] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.21-7.18(2H,m),6.85-6.81(2H,m),6.79-6.76(2H,m),6.28(1H,s),4.42(2H,m),3.98-3.93(1H,m),3.90-3.86(1H,m),3.80(3H,s),3.71(3H,s),3.11(1H,m),2.98(1H,m),1.32-1.23(4H,m),1.12-1.10(18H,m),0.85(9H,s),0.08-0.02(6H,m).

[1658] 工序3:(2－{[(2S)－2－({[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}甲基)－4－(4－甲氧基苯基)－2,3－二氢－1H－吡咯－1－基]羰基}－4－甲氧基－5－{[三(丙烷－2－基)硅烷基]氧基}苯基)氨基甲酸丙－2－烯－1－基酯

[1659] 使上述工序2所得到的化合物(1.12g,1.59mmol)与实施例3工序9同样地反应,得到目标产物(0.890g,77%)。

[1660] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.57(1H,m),7.77(1H,m),7.18(2H,m),6.86-6.78(4H,m),5.95-5.90(1H,m),5.32(1H,m),5.20(1H,m),4.79-4.77(1H,m),4.64-4.57(2H,m),4.00-3.98(1H,m),3.93-3.91(1H,m),3.80(3H,s),3.76(3H,s),3.14-3.09(1H,m),3.00(1H,m),1.36-1.25(3H,m),1.14-1.11(18H,m),0.85(9H,s),0.11-0.03(6H,m).

[1661] MS(APCI,ESI)m/z:725$(M+H)^+$

[1662] 工序4:(2－{[(2S)－2－(羟甲基)－4－(4－甲氧基苯基)－2,3－二氢－1H－吡咯－1－基]羰基}－4－甲氧基－5－{[三(丙烷－2－基)硅烷基]氧基}苯基)氨基甲酸丙－2－烯－1－基酯

[1663] 使上述工序3所得到的化合物(0.890g,1.23mmol)与实施例1工序7同样地反应,得到目标产物(0.696g,93%)。

[1664] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.54-8.36(1H,m),7.71(1H,m),7.18-7.17(2H,m),6.86-6.84(3H,m),6.77(1H,m),5.94-5.90(1H,m),5.32(1H,m),5.21(1H,m),4.87-4.85(1H,m),4.61(2H,m),4.50(1H,m),3.96-3.84(2H,m),3.80(3H,s),3.76(3H,s),3.28(1H,m),2.64(1H,m),1.36-1.25(3H,m),1.13(18H,m).

[1665] MS(APCI,ESI)m/z:611$(M+H)^+$

[1666] 工序5:(11aS)－11－羟基－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－8－{[三(丙烷－2－基)硅烷基]氧基}－11,11a－二氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－10(5H)－羧酸丙－2－烯－1－基酯

[1667] 使上述工序4所得到的化合物(0.696g,1.14mmol)与实施例1工序8同样地反应,得到目标产物(0.532g,77%)。

[1668] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.36(1H,s),7.31-7.29(2H,m),7.22(1H,s),6.90-6.87(2H,m),6.72(1H,m),5.82-5.76(2H,m),5.19-5.14(2H,m),4.60(1H,m),4.49-4.46(1H,m),3.98-3.96(1H,m),3.86(3H,s),3.82(3H,s),3.44(1H,m),3.36(1H,m),3.05(1H,m),1.28-1.21(3H,m),1.10-1.07(18H,m).

[1669] MS(APCI,ESI)m/z:609$(M+H)^+$

[1670] 工序6:(11aS)－11－{[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－8－{[三(丙烷－2－基)硅烷基]氧基}－11,11a－二氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－10(5H)－羧酸丙－2－烯－1－基酯

[1671] 使上述工序5所得到的化合物(0.532g,0.874mmol)与实施例1工序9同样地反应,得到目标产物(0.532g,95%)。

[1672] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.35(1H,s),7.29(2H,m),7.23(1H,s),6.89(2H,m),6.70(1H,s),5.90(1H,m),5.76(1H,m),5.14-5.10(2H,m),4.60(1H,m),4.38(1H,m),3.93-3.85(1H,m),3.87(3H,s),3.82(3H,s),3.32(1H,m),2.82-2.78(1H,m),1.29-1.22(3H,m),1.12-1.07(18H,m),0.89(9H,s),0.27(3H,s),0.20(3H,s).

[1673] MS(APCI,ESI)m/z:723$(M+H)^+$

[1674] 工序7:(11aS)－11－{[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}－8－羟基－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－11,11a－二氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－10(5H)－羧酸丙－2－烯－1－基酯

[1675] 使上述工序6所得到的化合物(0.532g,0.756mmol)与实施例1工序10同样地反应,得到目标产物(0.359g,86%)。

[1676] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.34(1H,s),7.30-7.27(3H,m),6.90-6.88(2H,m),6.76(1H,s),5.93-5.90(2H,m),5.81-5.73(1H,m),5.12-5.08(2H,m),4.61(1H,m),4.42(1H,m),3.97(3H,s),3.93-3.88(1H,m),3.83(3H,s),3.31(1H,m),2.83-2.79(1H,m),0.91(9H,s),0.27(3H,s),0.22(3H,s).

[1677] MS(APCI,ESI)m/z:567$(M+H)^+$

[1678] 工序8:(11aS)－8－(3－溴代丙氧基)－11－{[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－11,11a－二氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－10(5H)－羧酸丙－2－烯－1－基酯

[1679] 使上述工序7所得到的化合物(0.405g,0.715mmol)与实施例4工序1同样地反应,得到目标产物(0.490g,99%)。

[1680] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.35(1H,s),7.29(2H,m),6.89(2H,m),6.69(1H,s),5.94(1H,m),5.82-5.75(1H,m),5.13-5.08(1H,m),5.13-5.08(2H,m),4.65(1H,m),4.41(1H,m),4.20-4.13(2H,m),3.94-3.88(1H,m),3.92(3H,s),3.83(3H,s),3.62(2H,m),3.32(1H,m),2.83-2.80(1H,m),2.41-2.36(2H,m),0.91(9H,s),0.27(3H,s),0.24(3H,s).

[1681] MS(APCI,ESI)m/z:687$(M+H)^+$

[1682] 工序9:N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－8'－[3－({(11aS)－11－{[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－10－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基}氧基)丙氧基]－11'－羟基－7'－甲氧基－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[1683] 使上述工序8所得到的化合物(0.490g,0.713mmol)与实施例3工序10同样地反应,得到目标产物(0.600g,60%)。

[1684] MS(APCI,ESI)m/z:1414$(M+H)^+$

[1685] 工序10:N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－8'－[3－({(11aS)－11－羟基－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－10－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基}氧基)丙氧基]－7'－甲氧基－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[1686] 使上述工序9所得到的化合物(0.600g,0.424mmol)与实施例3工序11同样地反应,得到目标产物(0.500g,99%)。

[1687] MS(APCI,ESI)m/z:1184$(M-H)^+$

[1688] 工序11:L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－(3－{[(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－5,11a－二氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}丙氧基)－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[1689] 使上述工序9所得到的化合物(0.500g,0.421mmol)与实施例3工序12同样地反应,得到目标产物(0.113g,27%)。

[1690] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.94(1H,s),7.70(1H,s),7.56-7.53(2H,m),7.46-7.44(2H,m),7.36(1H,s),7.31(2H,m),7.23(1H,s),7.03(2H,m),6.90-6.88(2H,m),6.68(1H,m),6.57(1H,s),6.40(1H,s),5.92(1H,m),5.43(1H,m),4.67(1H,m),4.55-4.53(1H,m),4.46(1H,m),4.35-4.33(1H,m),4.28-4.24(1H,m),4.15-4.13(1H,m),3.88(3H,s),3.87(3H,s),3.83(3H,s),3.77-3.72(1H,m),3.62-3.60(1H,m),3.52-3.47(2H,m),3.34(1H,m),3.30-3.28(1H,m),3.00-2.91(2H,m),2.50-2.41(2H,m),2.24-2.22(1H,m),2.10-2.08(1H,m),1.77-1.75(1H,m),1.40-1.37(1H,m),1.16(3H,m),0.82(3H,m),0.76-0.62(4H,m),0.69(3H,m).

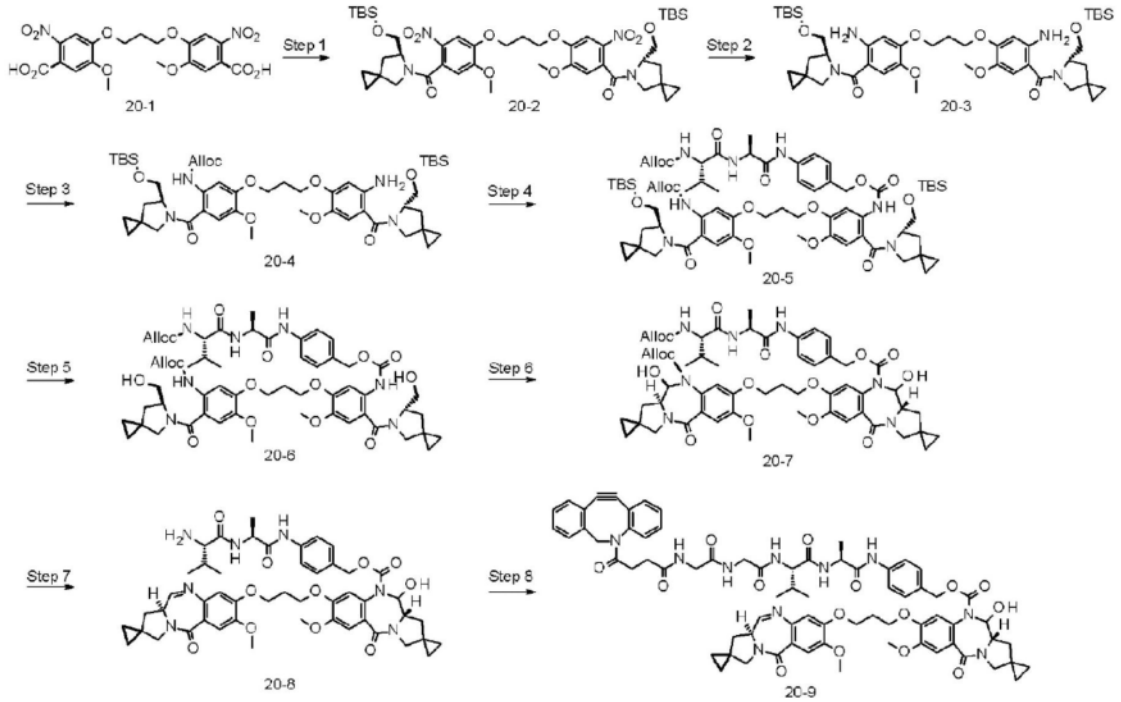
[1691] MS(APCI,ESI)m/z:1000$(M+H)^+$

[1692] 工序12:N－[4－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]甘氨酰甘氨酰基－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－(3－{[(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－5,11a－二氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}丙氧基)－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[1693] 使上述工序11所得到的化合物(0.157g,0.157mmol)与实施例3工序13同样地反应,得到目标产物(0.120g,49%)。

[1694] MS(APCI,ESI)m/z:1401$(M+H)^+$

[1695] 实施例20:药物连接子18

[1696] 

[1697] 工序1:{丙烷－1,3－二基双[氧基(5－甲氧基－2－硝基苯－4,1－二基)]}双{[(6S)－6－({[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}甲基)－5－氮杂螺[2.4]庚－5－基]甲酮}

[1698] 使起始原料20－1(3.00g,6.43mmol,Journal of the American Chemical Society 1992,13,4939)和实施例1工序3所得到的化合物(3.42g,14.2mmol)与实施例15工序1同样地反应,得到目标产物(3.74g,64%)。

[1699] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.79-7.70(2H,m),6.83-6.75(2H,m),4.52-4.50(1.5H,m),4.35-4.29(4.5H,m),4.03(0.5H,m),3.97-3.92(6H,m),3.88(0.5H,m),3.60-3.52(1H,m),3.38-3.33(0.5H,m),3.26-3.24(0.5H,m),3.04-2.93(3H,m),2.45-2.39(2H,m),2.25-2.21(1H,m),2.09-1.98(1H,m),1.68(1H,m),1.56(1H,m),0.93-0.90(14H,m),0.77-0.74(4H,m),0.71-0.62(4H,m),0.57-0.49(4H,m),0.44-0.40(2H,m),0.11(9H,m),-0.14(3H,m).

[1700] MS(APCI,ESI)m/z:912$(M+H)^+$

[1701] 工序2:{丙烷－1,3－二基双[氧基(2－氨基－5－甲氧基苯－4,1－二基)]}双{[(6S)－6－({[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}甲基)－5－氮杂螺[2.4]庚－5－基]甲酮}}

[1702] 使上述工序1所得到的化合物(3.74g,4.10mmol)与实施例15工序4同样地反应,得到目标产物(2.97g,85%)。

[1703] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.79-7.69(2H,m),6.82-6.75(2H,m),4.54-4.47(1.5H,m),4.36-4.26(4.5H,m),4.03(0.5H,m),3.98-3.92(6H,m),3.88(0.5H,m),3.61-3.51(1H,m),3.39-3.32(0.5H,m),3.28-3.21(0.5H,m),3.05-2.93(3H,m),2.45-2.39(2H,m),2.24-2.21(1H,m),2.08-2.06(1H,m),2.00-1.99(1H,m),1.69-1.66(1H,m),1.57-1.54(5H,m),0.94-0.88(14H,m),0.78-0.74(4H,m),0.71-0.62(4H,m),0.57-0.49(4H,m),0.44-0.40(2H,m),0.13-0.10(9H,m),-0.11-0.17(3H,m).

[1704] MS(APCI,ESI)m/z:853$(M+H)^+$

[1705] 工序3:(5－[3－(5－氨基－4－{[(6S)－6－({[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}甲基)－5－氮杂螺[2.4]庚－5－基]羰基}－2－甲氧基苯基)丙氧基]－2－{[(6S)－6－

({[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}甲基)－5－氮杂螺[2.4]庚－5－基]羰基}－4－甲氧基苯基)氨基甲酸丙－2－烯－1－基酯

[1706] 使上述工序2所得到的化合物(2.97g,3.48mmol)与实施例15工序5同样地反应,得到目标产物(0.549g,17%)。

[1707] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:9.18(1H,m),7.88(1H,m),6.80(1H,m),6.73(1H,s),6.31(1H,s),5.96(1H,m),5.36(1H,m),5.24(1H,m),4.68-4.59(4H,m),4.59-4.43(2H,m),4.27-4.25(2H,m),4.20-4.18(2H,m),4.00(2H,m),3.79-3.72(9H,m),3.05(1H,m),2.35(2H,m),2.32-2.19(2H,m),1.78-1.50(4H,m),0.99-0.89(20H,m),0.67-0.54(4H,m),0.50-0.48(2H,m),0.05(12H,m).

[1708] MS(APCI,ESI)m/z:1021$(M+H)^+$

[1709] 工序4:N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－缬氨酰基－N－[4－({[(2－{[(6S)－6－({[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}甲基)－5－氮杂螺[2.4]庚－5－基]羰基}－5－[3－(4－{[(6S)－6－({[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}甲基)－5－氮杂螺[2.4]庚－5－基]羰基}－2－甲氧基－5－{[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]氨基}苯氧基)丙氧基]－4－甲氧基苯基)氨基甲酰基]氧基}甲基)苯基]－L－丙氨酸酰胺

[1710] 使上述工序3所得到的化合物(0.549g,0.586mmol)与实施例1工序6同样地反应,得到目标产物(0.402g,51%)。

[1711] MS(APCI,ESI)m/z:1341$(M+H)^+$

[1712] 工序5:N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－缬氨酰基－N－[4－({[(2－{[(6S)－6－(羟甲基)－5－氮杂螺[2.4]庚－5－基]羰基}－5－[3－(4－{[(6S)－6－(羟甲基)－5－氮杂螺[2.4]庚－5－基]羰基}－2－甲氧基－5－{[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]氨基}苯氧基)丙氧基]－4－甲氧基苯基)氨基甲酰基]氧基}甲基)苯基]－L－丙氨酸酰胺

[1713] 使上述工序4所得到的化合物(0.402g,0.300mmol)与实施例1工序7同样地反应,得到目标产物(0.282g,85%)。

[1714] MS(APCI,ESI)m/z:1120$(M+H)^+$

[1715] 工序6:N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－8'－[3－({(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－5'－氧代－10'－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－5',10',11',11a'－四氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－8'－基}氧基)丙氧基]－7'－甲氧基－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[1716] 使上述工序5所得到的化合物(0.282g,0.253mmol)与实施例1工序8同样地反应,得到目标产物(0.0600g,21%)。

[1717] MS(APCI,ESI)m/z:1106$(M-H)^+$

[1718] 工序7:L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－(3－{[(11a'S)－7'－甲氧基－5'－氧代－5',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－8'－基]氧基}丙氧基)－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰

基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[1719] 使上述工序6所得到的化合物(0.0600g,0.0541mmol)与实施例3工序12同样地反应,得到目标产物(0.0347g,70%)。

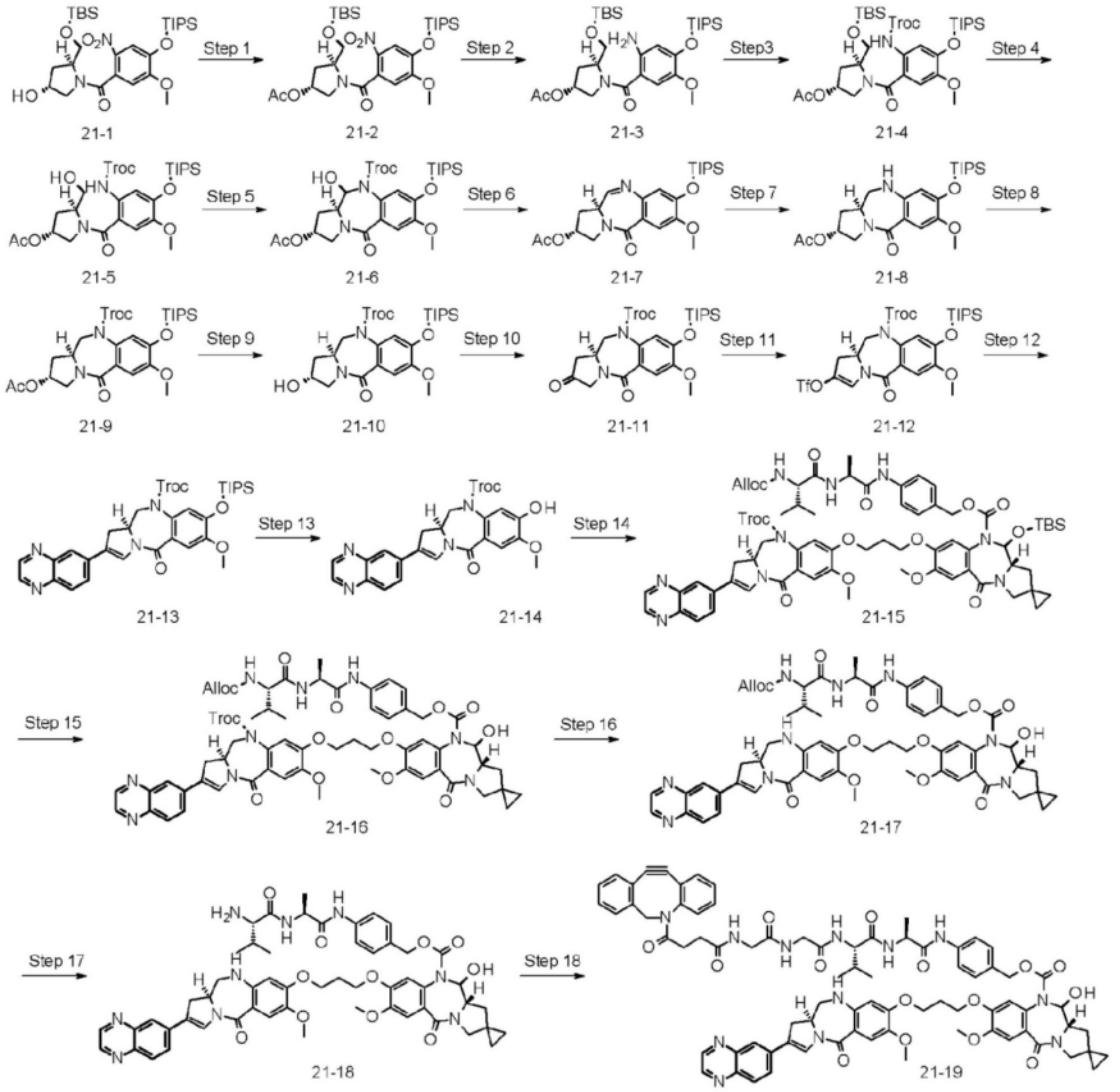
[1720] MS(APCI,ESI)m/z:922(M+H)$^+$

[1721] 工序8:N－[4－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]甘氨酰甘氨酰基－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－(3－{[(11a'S)－7'－甲氧基－5'－氧代－5',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－8'－基]氧基}丙氧基)－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[1722] 使上述工序7所得到的化合物(0.0347g,0.0376mmol)与实施例3工序13同样地反应,得到目标产物(0.00770g,16%)。

[1723] MS(APCI,ESI)m/z:1323(M+H)$^+$

[1724] 实施例21:药物连接子19

[1725] 

[1726] 工序1:化合物21－2

[1727] 在起始原料21－1(11.8g,20.2mmol,WO2013053872)以及吡啶(1.79mL,22.2mmol)

的THF(50mL)溶液中,在冰冷却下缓慢加入醋酸酐(2.10mL,22.3mmol)。接着加入4－二甲基氨基吡啶(0.459g,3.76mmol),在室温下搅拌。原料消失后,在反应混合物中加入水,将反应混合物用乙酸乙酯提取。将有机层用水以及饱和盐水进行清洗,用无水硫酸钠进行干燥。过滤后,减压蒸馏除去,将得到的残渣用硅胶柱色谱法[己烷:乙酸乙酯＝90:10(v/v)～60:40(v/v)]进行精制,得到目标产物(12.3g,97%)。

[1728] MS(APCI,ESI)m/z:625$(M+H)^+$

[1729] 工序2:化合物21－3

[1730] 使上述工序1所得到的化合物(12.3g,19.7mmol)与实施例15工序4同样地反应,得到目标化合物(11.3g,97%)。

[1731] MS(APCI,ESI)m/z:595$(M+H)^+$

[1732] 工序3:化合物21－4

[1733] 使用氯甲酸2,2,2－三氯乙酯(2.93mL,21.9mmol)来代替氯甲酸烯丙酯,使上述工序2所得到的化合物(11.3g,19.0mmol)与实施例3工序9同样地反应,得到目标产物(12.4g,85%)。

[1734] MS(APCI,ESI)m/z:769$(M+H)^+$

[1735] 工序4:化合物21－5

[1736] 使上述工序3所得到的化合物(12.4g,16.1mmol)与实施例1工序7同样地反应,得到目标产物(9.90g,94%)。

[1737] MS(APCI,ESI)m/z:655$(M+H)^+$

[1738] 工序5:化合物21－6

[1739] 使上述工序4所得到的化合物(9.90g,15.1mmol)与实施例1工序8同样地反应,得到目标产物(8.19g,83%)。

[1740] MS(APCI,ESI)m/z:653$(M+H)^+$

[1741] 工序6:化合物21－7

[1742] 在上述工序5所得到的化合物(3.00g,4.59mmol)的四氢呋喃(10mL)、10%醋酸铵水溶液(10mL)中加入10%Cd/Pb(3.00g、24.0mmol、90mass%),在氮气氛下剧烈搅拌。原料消失后,过滤反应混合物。将滤液用二氯甲烷提取。将有机层用饱和盐水进行清洗,用无水硫酸钠进行干燥。过滤后,减压蒸馏除去,将得到的化合物(2.10g,99%)直接用于下一个反应中。

[1743] MS(APCI,ESI)m/z:461$(M+H)^+$

[1744] 工序7:化合物21－8

[1745] 使上述工序6所得到的化合物(2.10g,4.56mmol)与实施例3工序8同样地反应,得到目标产物(2.09g,99%)。

[1746] MS(APCI,ESI)m/z:463$(M+H)^+$

[1747] 工序8:化合物21－9

[1748] 使工序7所得到的化合物(2.09g,4.52mmol)与实施例21工序3同样地反应,得到目标产物(2.88g,100%)。

[1749] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.23(1H,s),6.81(1H,s),5.40-5.37(1H,m),4.95(1H,m),4.41(1H,m),4.21(1H,m),4.05(1H,m),3.96-3.92(1H,m),3.86(3H,s),3.79-3.75(1H,m),3.64

(1H,m),2.34-2.28(1H,m),2.18-2.13(1H,m),2.05(3H,s),1.30-1.19(3H,m),1.11-1.04(18H,m).

[1750] MS(APCI,ESI)m/z:637(M+H)$^+$

[1751] 工序9:化合物21－10

[1752] 在工序8所得到的化合物(2.28g,4.51mmol)的甲醇(15mL)、四氢呋喃(5mL)混合溶液中缓慢滴入碳酸钾(0.624g,4.52mmol)的水(15mL)溶液,在室温下搅拌。原料消失后,在反应混合物中加入水,将反应混合物用乙酸乙酯提取。将有机层用饱和盐水进行清洗,用无水硫酸钠进行干燥。过滤后,减压蒸馏除去,将得到的残渣用硅胶柱色谱法[己烷:乙酸乙酯＝90:10(v/v)～0:100(v/v)]进行精制,得到目标产物(2.08g,77％)。

[1753] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.18(1H,s),6.80(1H,s),4.96(1H,m),4.64-4.59(1H,m),4.40(1H,m),4.18(1H,m),4.00-3.92(2H,m),3.82(3H,s),3.65(2H,m),2.28-2.20(2H,m),2.04-1.97(1H,m),1.27-1.20(3H,m),1.09-1.05(18H,m).

[1754] MS(APCI,ESI)m/z:595(M+H)$^+$

[1755] 工序10:化合物21－11

[1756] 在工序9所得到的化合物(2.08g,3.49mmol)以及2,2,6,6－四甲基－1－哌啶氧自由基(0.109g,0.698mmol)的二氯甲烷(50mL)溶液中,冰冷却下缓慢加入碘苯二乙酸盐(2.00g,6.21mmol)。将反应混合物在室温下搅拌2小时。原料消失后,在反应混合物中加入水,将反应混合物用二氯甲烷提取。将有机层用水和饱和盐水进行清洗,用无水硫酸镁进行干燥。过滤后,减压蒸馏除去,将得到的残渣用硅胶柱色谱法[己烷:乙酸乙酯＝90:10(v/v)～60:40(v/v)]进行精制,得到目标产物(1.94g,94％)。

[1757] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.21(1H,s),6.84(1H,s),4.96(1H,m),4.44(1H,m),4.34-4.23(3H,m),3.99-3.92(1H,m),3.86(3H,s),3.68-3.62(1H,m),2.94(1H,m),2.50-2.46(1H,m),1.29-1.21(3H,m),1.21-1.21(18H,m).

[1758] MS(APCI,ESI)m/z:593(M+H)$^+$

[1759] 工序11:化合物21－12

[1760] 使上述工序10所得到的化合物(1.94g,3.27mmol)与实施例3工序5同样地反应,得到目标产物(2.17g,92％)。

[1761] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.22-7.18(2H,m),6.84(1H,s),4.95(1H,m),4.45-4.39(2H,m),4.23-4.15(1H,m),3.85(3H,s),3.64(1H,m),3.36-3.30(1H,m),2.74-2.68(1H,m),1.29-1.19(3H,m),1.11-1.04(18H,m).

[1762] 工序12:化合物21－13

[1763] 使上述工序11所得到的化合物(0.837g,1.15mmol)和喹喔啉－6－硼酸频哪醇酯(1.18g,4.61mmol)与实施例3工序6同样地反应,得到目标产物(0.713g,88％)。

[1764] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.82-8.77(2H,m),8.05(1H,m),7.95(1H,m),7.79-7.75(2H,m),7.25(1H,s),6.88(1H,s),4.96(1H,m),4.49-4.40(2H,m),4.37-4.28(1H,m),3.88(3H,s),3.75(1H,m),3.48(1H,m),2.90(1H,m),1.30-1.22(3H,m),1.13-1.06(18H,m).

[1765] MS(APCI,ESI)m/z:705(M+H)$^+$

[1766] 工序13:化合物21－14

[1767] 使上述工序12所得到的化合物(0.713g,1.01mmol)与实施例1工序10同样地反应,

得到目标产物(0.400g,72%)。

[1768] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.81-8.80(2H,m),8.05(1H,m),7.95(1H,m),7.80-7.75(2H,m),7.29(1H,s),6.96(1H,s),6.10(1H,m),5.07(1H,m),4.45-4.32(3H,m),3.98(3H,s),3.80-3.73(1H,m),3.51-3.46(1H,m),2.91(1H,m).

[1769] MS(APCI,ESI)m/z:549$(M+H)^+$

[1770] 工序14:化合物21－15

[1771] 使用实施例1工序11所得到的化合物(0.321g,0.346mmol),使上述工序13所得到的化合物(0.200g,0.364mmol)与实施例3工序10同样地进行偶联反应,得到目标产物(0.475g,99%)。

[1772] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.83-8.79(2H,m),8.65-8.55(1H,m),8.09-7.98(2H,m),7.92-7.82(2H,m),7.47-7.31(2H,m),7.24-7.19(1H,m),7.14-7.02(2H,m),6.97-6.88(1H,m),6.80-6.66(1H,m),6.55-6.47(1H,m),6.06-6.00(1H,m),5.97-5.85(1H,m),5.51-5.09(3H,m),4.82-4.71(2H,m),4.63-4.52(2H,m),4.48-4.30(2H,m),4.26-4.17(2H,m),4.16-4.09(1H,m),4.08-3.98(3H,m),3.9-3.73(6H,m),3.53-3.44(2H,m),3.28-3.26(1H,m),2.94-2.91(1H,m),2.40-2.33(2H,m),2.21-2.13(1H,m),2.07-2.03(4H,m),1.67-1.50(2H,m),1.46-1.39(2H,m),1.29-1.24(2H,m),1.00-0.60(18H,m),0.22-0.06(6H,m).

[1773] MS(APCI,ESI)m/z:1395$(M+H)^+$

[1774] 工序15:化合物21－16

[1775] 使上述工序14所得到的化合物(0.475g,0.340mmol)与实施例3工序11同样地反应,得到目标产物(0.310g,71%)。

[1776] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.83-8.79(2H,m),8.72(1H,m),8.07-8.01(2H,m),7.88(2H,m),7.41-7.39(2H,m),7.23(1H,m),7.13(2H,m),6.84(1H,m),6.56(1H,s),5.95-5.88(2H,m),5.48-5.47(1H,m),5.32-5.10(3H,m),4.87-4.72(2H,m),4.61-4.55(2H,m),4.47-4.20(3H,m),4.07-4.03(2H,m),3.90(3H,s),3.83(3H,s),3.80-3.72(3H,m),3.58(1H,m),3.49(1H,m),3.31(1H,m),2.92(1H,m),2.41(1H,m),2.36-2.29(1H,m),2.19-2.11(1H,m),1.77-1.72(1H,m),1.68-1.66(3H,m),1.65-1.63(1H,m),1.42-1.41(3H,m),0.97(3H,m),0.93(3H,m),0.76-0.61(4H,m).

[1777] MS(APCI,ESI)m/z:1282$(M+H)^+$

[1778] 工序16:化合物21－17

[1779] 使上述工序15所得到的化合物(0.310g,0.242mmol)与实施例21工序6同样地反应,得到目标产物(0.168g,63%)。

[1780] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.85-8.76(3H,m),8.04-7.99(3H,m),7.86(1H,s),7.49-7.41(3H,m),7.25-7.06(3H,m),6.96-6.83(1H,m),6.49(1H,m),6.13(1H,s),5.51-5.45(2H,m),5.34-5.28(2H,m),5.21(1H,m),4.80-4.37(4H,m),4.17-4.02(6H,m),3.88(3H,s),3.84-3.70(6H,m),3.68-3.50(5H,m),3.31(1H,m),2.93-2.90(1H,m),2.42(1H,m),2.29-2.12(3H,m),1.78-1.75(1H,m),1.44(3H,m),0.97(3H,m),0.94(3H,m),0.79-0.60(4H,m).

[1781] MS(APCI,ESI)m/z:1108$(M+H)^+$

[1782] 工序17:化合物21－18

[1783] 使上述工序16所得到的化合物(0.168g,0.152mmol)与实施例3工序12同样地反

应,得到目标产物(0.112g,72%)。

[1784] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:9.18(1H,m),8.78(2H,m),8.04-8.02(2H,m),7.95-7.93(2H,m),7.77(1H,s),7.50-7.44(3H,m),7.23-7.21(1H,m),7.11(2H,m),6.44(1H,m),6.11(1H,m),5.90(1H,m),5.34(1H,m),4.74-4.63(3H,m),4.42(1H,m),4.16-4.03(3H,m),3.89(3H,s),3.80(3H,s),3.74-3.72(1H,m),3.65-3.51(4H,m),3.32-3.28(3H,m),2.92(1H,m),2.41(1H,m),2.34-2.28(1H,m),2.20-2.18(2H,m),1.76(4H,m),1.43(3H,m),1.00(3H,m),0.84(3H,m),0.75-0.62(4H,m).

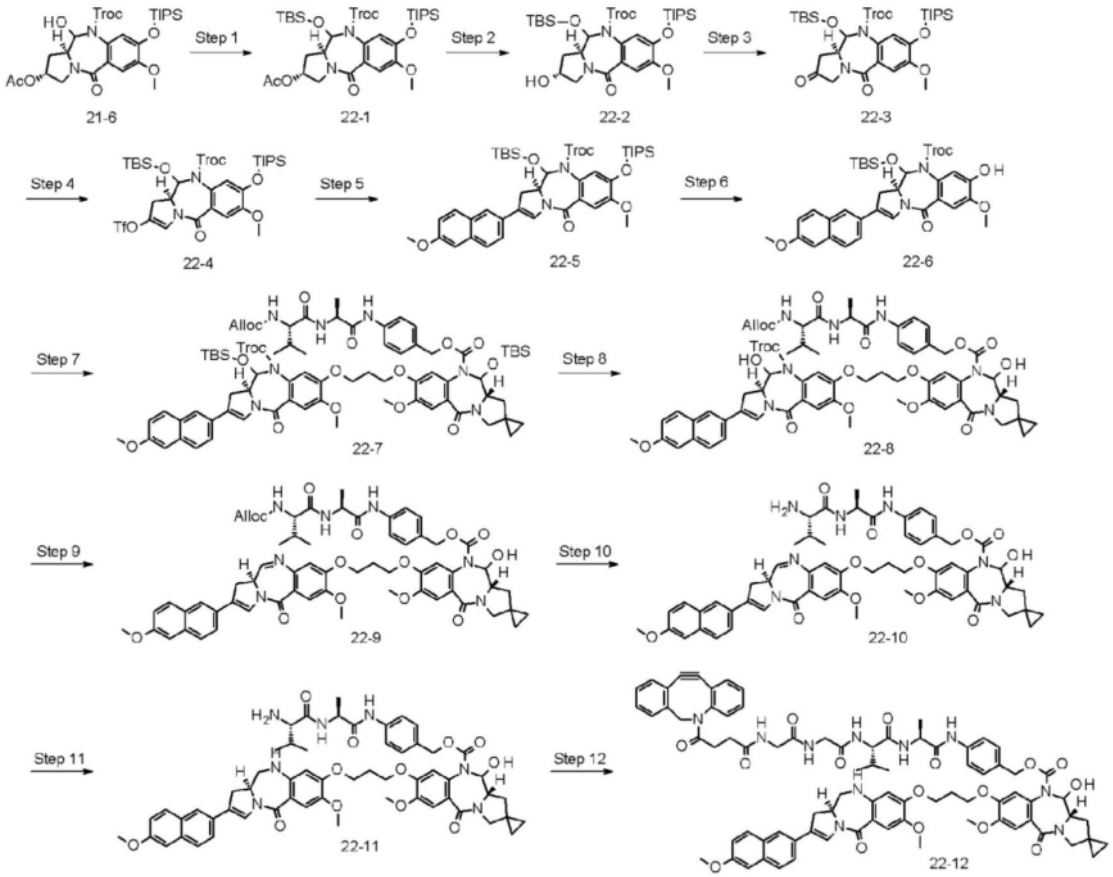
[1785] MS(APCI,ESI)m/z:1024$(M+H)^+$

[1786] 工序18:N－[4－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]甘氨酰甘氨酰基－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－(3－{[(11aS)－7－甲氧基－5－氧代－2－(喹喔啉－6－基)－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}丙氧基)－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[1787] 使上述工序18所得到的化合物(0.112g,0.109mmol)与实施例3工序13同样地反应,得到目标产物(0.110g,71%)。

[1788] MS(APCI,ESI)m/z:1425$(M+H)^+$

[1789] 实施例22:药物连接子20

[1790] 

[1791] 工序1:化合物22－1

[1792] 使实施例21工序5所得到的化合物(5.11g,7.81mmol)与实施例1工序9同样地反

应,得到目标产物(5.70g,95.0%)。

[1793] MS(APCI,ESI)m/z:767(M+H)$^+$

[1794] 工序2:化合物22－2

[1795] 使上述工序1所得到的化合物(5.70g,7.42mmol)与实施例21工序9同样地反应,得到目标产物(5.07g,94%)。

[1796] MS(APCI,ESI)m/z:725(M+H)$^+$

[1797] 工序3:化合物22－3

[1798] 使上述工序2所得到的化合物(5.07g,6.98mmol)与实施例21工序10同样地反应,得到目标产物(4.44g,88%)。

[1799] MS(APCI,ESI)m/z:723(M+H)$^+$

[1800] 工序4:化合物22－4

[1801] 使上述工序3所得到的化合物(4.44g,6.13mmol)与实施例3工序5同样地反应,得到目标产物(4.85g,92%)。

[1802] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.24-7.16(1H,m),6.78(1H,s),5.92(1H,m),5.05(1H,m),4.34(1H,m),3.91-3.87(2H,m),3.86(3H,s),3.35-3.29(1H,m),2.80(1H,m),1.28-1.22(3H,m),1.10-1.05(18H,m),0.86(9H,s),0.28(3H,s),0.21(3H,s).

[1803] 工序5:化合物22－5

[1804] 使用上述工序4所得到的化合物(1.20g,1.40mmol)与6－甲氧基－2－萘硼酸(0.850g,4.21mmol),与实施例3工序6同样地反应,得到目标产物(1.06g,88%)。

[1805] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.72-7.69(2H,m),7.59-7.51(3H,m),7.30(1H,s),7.16-7.07(2H,m),6.82(1H,s),5.94(1H,m),5.06(1H,m),4.34(1H,m),3.99-3.95(1H,m),3.93(3H,s),3.88(3H,s),3.46(1H,m),2.94(1H,m),1.30-1.23(3H,m),1.12-1.07(18H,m),0.93(9H,s),0.31(3H,s),0.23(3H,s).

[1806] 工序6:化合物22－6

[1807] 使上述工序5所得到的化合物(1.06g,1.23mmol)与实施例1工序10同样地反应,得到目标产物(0.6126g,71%)。

[1808] MS(APCI,ESI)m/z:707(M+H)$^+$

[1809] 工序7:化合物22－7

[1810] 使上述工序6所得到的化合物(0.205g,0.290mmol)与实施例1工序11所得到的化合物(0.255g,0.274mmol)与实施例3工序10同样地进行偶联反应,得到目标产物(0.375g,83%)。

[1811] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.68(1H,s),7.72(2H,m),7.67-7.55(3H,m),7.36-7.21(4H,m),7.16-7.06(4H,m),6.82-6.79(2H,m),6.53(1H,s),6.03-6.02(1H,m),5.97-5.89(2H,m),5.36-5.30(2H,m),5.23-5.16(3H,m),4.83-4.80(1H,m),4.75-4.72(1H,m),4.61-4.55(3H,m),4.33-4.29(1H,m),4.17-4.11(2H,m),4.06-4.01(2H,m),3.94(3H,s),3.92-3.90(2H,m),3.81(3H,s),3.72-3.70(1H,m),3.51-3.47(2H,m),3.26(1H,m),2.99-2.95(1H,m),2.42-2.32(2H,m),2.20-2.13(1H,m),1.55-1.40(4H,m),0.97-0.92(18H,m),0.84-0.81(9H,m),0.69-0.63(4H,m),0.30-0.05(12H,m).

[1812] 工序8:化合物22－8

[1813] 使上述工序7所得到的化合物(0.375g,0.241mmol)与实施例3工序11同样地反应,得到目标产物(0.236g,74%)。

[1814] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.70(1H,s),7.72-7.68(3H,m),7.63-7.58(2H,m),7.43-7.41(2H,m),7.27-7.22(2H,m),7.16-7.12(2H,m),6.91-6.86(2H,m),6.56(1H,s),5.95-5.84(2H,m),5.49(1H,m),5.34-5.14(4H,m),4.78(1H,m),4.64-4.53(4H,m),4.27-4.24(2H,m),4.17-4.02(3H,m),3.97-3.88(2H,m),3.93(3H,s),3.89(3H,s),3.88(3H,s),3.75-3.72(2H,m),3.61-3.48(3H,m),3.33-3.30(2H,m),3.23-3.19(1H,m),2.44-2.39(2H,m),2.29-2.27(2H,m),2.17-2.11(1H,m),1.76-1.72(1H,m),1.43(3H,m),0.95(3H,m),0.92(3H,m),0.77-0.61(4H,m).

[1815] 工序9:化合物22－9

[1816] 使上述工序8所得到的化合物(0.236g,0.178mmol)与实施例21工序6同样地反应,得到目标产物(0.201g,99%)。

[1817] MS(APCI,ESI)m/z:1134$(M+H)^{+}$

[1818] 工序10:化合物22－10

[1819] 使上述工序9所得到的化合物(0.201g,0.177mmol)与实施例3工序12同样地反应,得到目标产物(0.180g,97%)。

[1820] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:9.17(1H,s),7.90(1H,s),7.72-7.68(2H,m),7.63-7.53(4H,m),7.44-7.42(2H,m),7.25-7.22(1H,m),7.16-7.12(3H,m),7.02-6.99(2H,m),6.76-6.74(1H,m),6.59(1H,s),6.41(1H,s),5.94-5.87(2H,m),5.42(1H,m),4.66(1H,m),4.56-4.49(2H,m),4.40-4.38(1H,m),4.29-4.24(1H,m),4.17-4.11(1H,m),3.93(3H,s),3.89(3H,s),3.87(3H,s),3.85-3.70(2H,m),3.65-3.59(2H,m),3.37-3.31(2H,m),3.06(1H,m),2.46-2.41(2H,m),2.20(1H,m),2.10-2.06(1H,m),1.76-1.74(2H,m),1.17(3H,m),0.88-0.63(4H,m),0.78(3H,m),0.67(3H,m).

[1821] MS(APCI,ESI)m/z:1050$(M+H)^{+}$

[1822] 工序11:化合物22－11

[1823] 使上述工序10所得到的化合物(0.0870g,0.0828mmol)与实施例3工序8同样地反应,得到目标产物(0.0650g,75%)。

[1824] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:9.19(1H,s),7.92(1H,m),7.73-7.64(4H,m),7.55-7.44(4H,m),7.22(1H,s),7.15-7.09(4H,m),6.43(1H,s),6.09(1H,s),5.90(2H,m),5.34(1H,m),4.72(1H,m),4.65-4.63(1H,m),4.36-4.34(1H,m),4.17-4.02(4H,m),3.92(3H,s),3.89(3H,s),3.80(3H,s),3.78-3.72(3H,m),3.60-3.46(5H,m),3.31-3.27(2H,m),2.89-2.85(1H,m),2.41(1H,m),2.33-2.26(1H,m),2.21-2.15(2H,m),1.77-1.75(1H,m),1.43(3H,m),0.98(3H,m),0.83(3H,m),0.76-0.61(4H,m).

[1825] MS(APCI,ESI)m/z:1051$(M+H)^{+}$

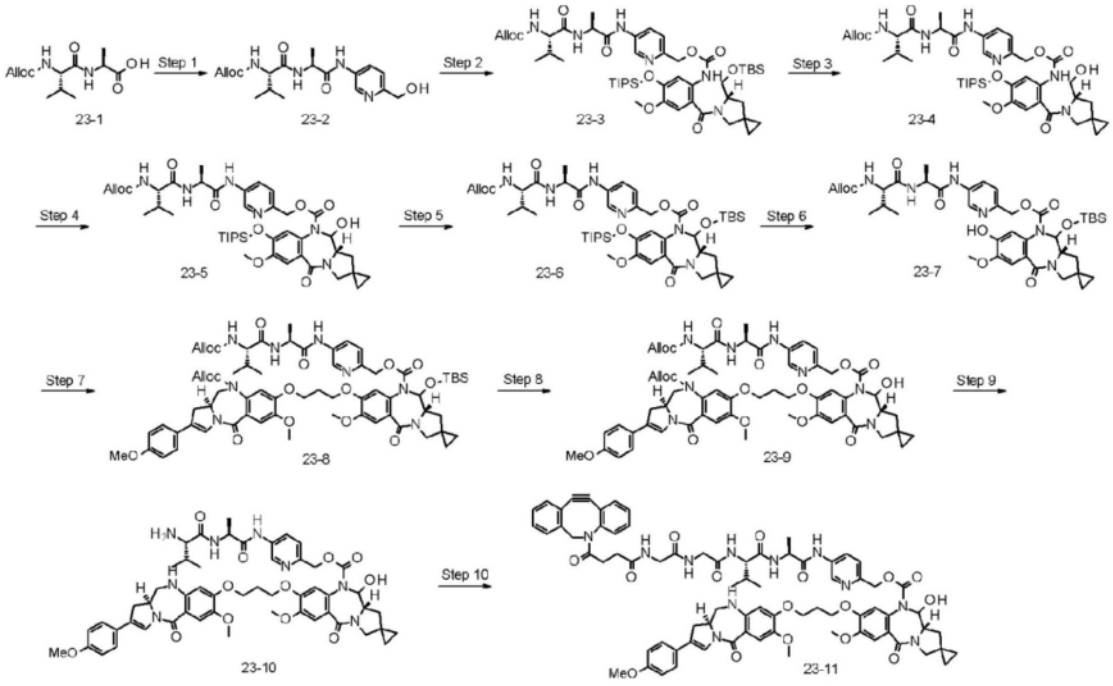
[1826] 工序12:N－[4－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]甘氨酰甘氨酰基－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－(3－{[(11aS)－7－甲氧基－2－(6－甲氧基萘－2－基)－5－氧代－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}丙氧基)－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－

10’(5’H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[1827] 使上述工序11所得到的化合物(0.065g,0.062mmol)与实施例3工序13同样地反应,得到目标产物(0.048g,54%)。

[1828] MS(APCI,ESI)m/z:1453(M+H)$^+$

[1829] 实施例23:药物连接子21

[1830] 

[1831] 工序1:化合物23－2

[1832] 使起始原料23－1(14.8g,54.4mmol,WO2011130613)与实施例5工序2同样地反应,得到目标产物(12.2g,63%)。

[1833] MS(APCI,ESI)m/z:379(M+H)$^+$

[1834] 工序2:化合物23－3

[1835] 使上述工序1所得到的化合物(3.78g,10.0mmol)与实施例1工序6同样地反应,得到目标产物(3.86g,40%)。

[1836] MS(APCI,ESI)m/z:967(M+H)$^+$

[1837] 工序3:化合物23－4

[1838] 使上述工序2所得到的化合物(3.860g,3.99mmol)与实施例1工序7同样地反应,得到目标产物(3.11g,92%)。

[1839] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:9.03(1H,m),8.70-8.63(2H,m),8.17-8.13(1H,m),7.68(1H,s),7.35(1H,m),6.82-6.76(2H,m),5.93-5.83(1H,m),5.49-5.42(1H,m),5.32-5.17(4H,m),4.73-4.52(5H,m),4.03(1H,m),3.86(1H,s),3.80-3.75(2H,m),3.77(3H,s),3.65-3.63(1H,m),3.12-3.10(1H,m),2.20-2.14(1H,m),1.93-1.88(1H,m),1.45(3H,m),1.31-1.23(3H,m),1.10-1.08(18H,m),0.98(3H,m),0.94(3H,m),0.64-0.47(4H,m).

[1840] 工序4:化合物23－5

[1841] 使上述工序3所得到的化合物(3.11g,3.65mmol)与实施例1工序8同样地反应,得到目标产物(2.58g,84%)。

[1842] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:9.02-8.88(1H,m),8.69-8.59(1H,m),8.17-8.02(1H,m),7.22-7.17(1H,m),7.02(1H,m),6.79-6.78(2H,m),6.63(1H,m),5.95-5.87(2H,m),5.33-5.11(4H,m),4.65-4.53(3H,m),4.01(1H,m),3.83(3H,s),3.73(1H,m),3.59(1H,m),3.32(1H,m),2.43-2.39(1H,m),2.18-2.16(1H,m),1.75-1.67(2H,m),1.48-1.43(3H,m),1.20-1.14(3H,m),1.10-0.94(24H,m),0.73-0.60(4H,m).

[1843] 工序5:化合物23－6

[1844] 使上述工序4所得到的化合物(2.58g,3.03mmol)与实施例1工序9同样地反应,得到目标产物(2.75g,94%)。

[1845] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.78(1H,m),8.58(1H,m),8.03(1H,m),7.21(1H,s),6.97(1H,m),6.73(1H,s),6.59-6.55(1H,m),6.02(1H,m),5.93-5.85(1H,m),5.32-5.04(4H,m),4.72-4.55(3H,m),3.99(1H,m),3.84(3H,s),3.73-3.70(1H,m),3.53(1H,m),3.28(1H,m)$_2$.36(1H,m)$_2$.21-2.14(1H,m),1.55-1.53(1H,m),1.47-1.44(4H,m),1.23-1.16(3H,m),1.10-1.00(18H,m),0.98(3H,m),0.94(3H,m),0.83(9H,s),0.81-0.60(4H,m),0.21-0.19(3H,m),0.18-0.16(3H,m).

[1846] 工序6:化合物23－7

[1847] 使上述工序5所得到的化合物(2.75g,2.85mmol)与实施例1工序10同样地反应,得到目标产物(2.28g,99%)。

[1848] MS(APCI,ESI)m/z:809$(M+H)^+$

[1849] 工序7:化合物23－8

[1850] 使上述工序6所得到的化合物(0.340g,0.420mmol)与实施例4工序9同样地反应,得到目标产物(0.530g,98%)。

[1851] MS(APCI,ESI)m/z:1285$(M+H)^+$

[1852] 工序8:化合物23－9

[1853] 使上述工序7所得到的化合物(0.530g,0.412mmol)与实施例3工序11同样地反应,得到目标产物(0.362g,75%)。

[1854] MS(APCI,ESI)m/z:1171$(M+H)^+$

[1855] 工序9:化合物23－10

[1856] 使上述工序8所得到的化合物(0.444g,0.379mmol)与实施例3工序12同样地反应,得到目标产物(0.347g,91%)。

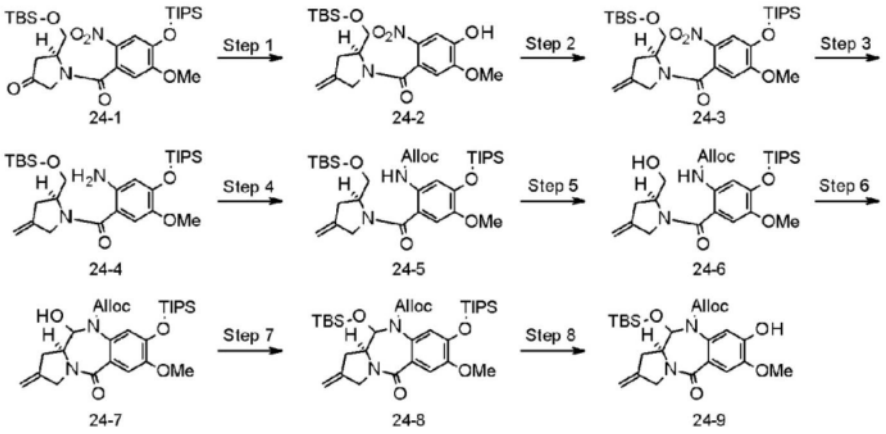
[1857] MS(APCI,ESI)m/z:1103$(M+H)^+$

[1858] 工序10:N－[4－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]甘氨酰甘氨酰基－L－缬氨酰基－N－{6－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－(3－{[(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}丙氧基)－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]吡啶－3－基}－L－丙氨酸酰胺

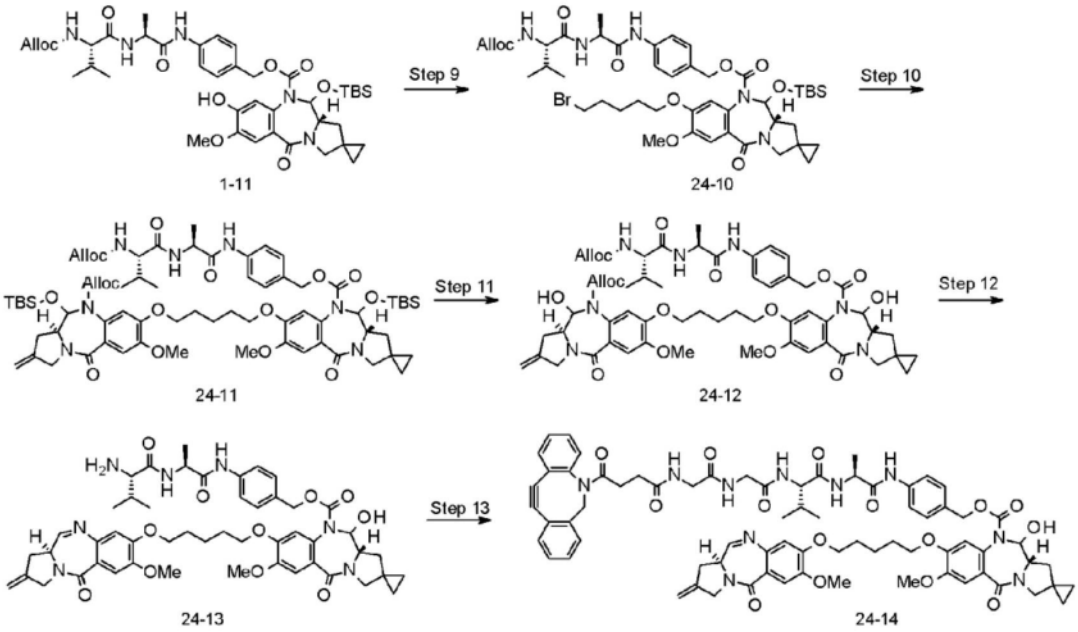
[1859] 使上述工序9所得到的化合物(0.100g,0.0997mmol)与实施例3工序13同样地反应,得到目标产物(0.067g,48%)。

[1860] MS(APCI,ESI)m/z:1404$(M+H)^+$

[1861] 实施例24:药物连接子22



[1862]



[1863] 工序1:化合物24－2

[1864] 在氮气氛下,在甲基三苯基溴化膦(7.28g,20.4mmol)的四氢呋喃(30mL)悬浮溶液中,在0℃下每次少量地加入叔丁醇钾(2.06g,18.3mmol)后,搅拌2小时。花2分钟滴入化合物24－1(1.18g,2.04mmol,WO2013053872)的THF(10mL)溶液,在0℃下搅拌28小时。在反应液中加入水以及柠檬酸水溶液后(pH＝4.0),用乙酸乙酯提取。将有机层用饱和盐水进行清洗,用硫酸钠进行干燥。减压蒸馏除去,将得到的残渣用硅胶柱色谱法[己烷:乙酸乙酯＝100:0(v/v)～0:100(v/v)]进行精制,得到目标产物(0.450g,52%)。

[1865] MS(APCI,ESI)m/z:423$(M+H)^+$.

[1866] 工序2:化合物24－3

[1867] 在氮气氛下,在上述工序1所得到的化合物(0.668g,1.58mmol)的N,N－二甲基甲酰胺(10mL)溶液中加入咪唑(0.211g,3.16mmol)。之后,滴入三异丙基氯甲硅烷(0.502mL,2.37mmol),在室温下搅拌6小时。在反应液中加入10%柠檬酸水溶液,用乙酸乙酯提取2次。将有机层用饱和盐水进行清洗,用无水硫酸钠干燥后,减压蒸馏除去。将得到的残渣用硅胶色谱法[己烷:乙酸乙酯＝100:0(v/v)～50:50(v/v)]进行精制,得到目标产物(0.520g,57%)。

[1868] MS(APCI,ESI)m/z:579(M+H)$^+$.

[1869] 工序3:化合物24－4

[1870] 使上述工序2所得到的化合物(0.520g,0.898mmol)与实施例17工序2同样地反应,得到目标产物(0.478g,97%)。

[1871] MS(APCI,ESI)m/z:547(M－H)$^+$.

[1872] 工序4:化合物24－5

[1873] 在氮气氛下,使上述工序3所得到的化合物(0.478g,0.871mmol)与实施例3工序9同样地反应。减压蒸馏除去后,将得到的残渣(0.570g)直接用于下一个反应。

[1874] 工序5:化合物24－6

[1875] 使上述工序4所得到的化合物(0.570g)与实施例1工序7同样地反应,得到目标产物(0.446g,95%)。

[1876] MS(APCI,ESI)m/z:519(M+H)$^+$.

[1877] 工序6:化合物24－7

[1878] 使上述工序5所得到的化合物(0.446g,0.859mmol)与实施例1工序8同样地反应,得到目标产物(0.196g,44%)。

[1879] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.19(1H,s),6.68(1H,s),5.78-5.76(1H,m),5.55(1H,m),5.19-5.13(4H,m),4.61-4.58(1H,m),4.49-4.46(1H,m),4.29(1H,m),4.15(1H,m),3.85(3H,s),3.61(1H,m),3.38(1H,s),2.93-2.90(1H,m),2.71(1H,m),1.30-1.18(3H,m),1.12-1.06(18H,m).

[1880] MS(APCI,ESI)m/z:517(M+H)$^+$.

[1881] 工序7:化合物24－8

[1882] 使上述工序6所得到的化合物(0.195g,0.377mmol)与实施例1工序9同样地反应,得到目标产物(0.230g,97%)。

[1883] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.19(1H,s),6.66(1H,s),5.75-5.65(1H,m),5.66(1H,m),5.12-5.10(4H,m),4.59(1H,m),4.35(1H,m),4.28(1H,m),4.11(1H,m),3.86(3H,s),3.53(1H,m),2.90-2.84(1H,m),2.48(1H,m),1.26-1.19(3H,m),1.09-1.06(18H,m),0.86(9H,s),0.23(3H,s),0.17(3H,s).

[1884] 工序8:化合物24－9

[1885] 使上述工序7所得到的化合物(0.230g,0.365mmol)与实施例1工序10同样地反应。本工序中,反应结束后进行分液操作,将有机溶剂减压蒸馏除去,将得到的粗产物(0.238g,定量)用于下一个反应中。

[1886] 工序9:化合物24－10

[1887] 使上述工序所得到的化合物与实施例1工序10所得到的化合物(0.251g,0.311mmol)与实施例3工序2同样地反应,得到目标产物(0.185g,62%)。

[1888] MS(APCI,ESI)m/z:958[^{81}Br,(M+H)$^+$],956[^{79}Br,(M+H)$^+$].

[1889] 工序10:化合物24－11

[1890] 使上述工序8所得到的化合物(0.0660g,0.139mmol)与上述工序9所得到的化合物(0.133g,0.139mmol)与实施例3工序10同样地反应,得到目标产物(0.123g,66%)。

[1891] MS(APCI,ESI)m/z:1350(M+H)$^+$.

[1892] 工序11:化合物24－12

[1893] 使上述工序10所得到的化合物(0.123g,0.0910mmol)与实施例3工序11同样地反应,得到目标产物(0.0950g,92%)。

[1894] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.65(1H,s),7.59(2H,m),7.31-7.29(2H,m),7.23-7.21(3H,m),6.89-6.86(1H,m),6.78(1H,s),6.38(1H,s),5.92-5.88(2H,m),5.81-5.79(1H,m),5.61-5.52(2H,m),5.31(2H,m),5.23(1H,n),5.13-5.10(4H,m),5.05-5.02(1H,m),4.69-4.67(2H,m),4.58-4.55(2H,m),4.49-4.46(1H,m),4.30(2H,m),4.16(1H,m),3.98-3.96(3H,m),3.93(3H,s),3.89(3H,s),3.81-3.78(2H,m),3.74(1H,m),3.69-3.66(1H,m),3.61(1H,m),3.43-3.41(1H,m),3.32(1H,m),2.89-2.87(1H,m),2.73(1H,m),2.42(1H,m),2.10-2.08(1H,m),1.80-1.73(4H,m),1.53-1.50(2H,m),1.25-1.24(3H,m),0.93-0.89(6H,m),0.75-0.63(4H,m).

[1895] MS(APCI,ESI)m/z:1122$(M+H)^{+}$.

[1896] 工序12:化合物24－13

[1897] 使上述工序11所得到的化合物(0.0950g,0.0847mmol)与实施例3工序12同样地反应,得到目标产物(0.0610g,76%)。

[1898] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:9.12-8.96(1H,m),7.82-7.60(4H,m),7.22-7.19(3H,m),6.94-6.66(1H,m),6.40-6.34(2H,m),5.89-5.86(1H,m),5.55(1H,m),5.40-5.07(3H,m),4.60-4.42(4H,m),4.23-4.09(5H,m),3.91-3.88(8H,m),3.81-3.75(8H,m),3.60(1H,m),3.32-3.30(2H,m),3.24-3.22(1H,m),3.12-3.09(1H,m),2.65-2.61(1H,m),2.41(1H,m),2.12-2.11(1H,m),1.89-1.84(9H,m),1.75(3H,m),1.40-1.38(2H,m),1.25-1.21(3H,m),0.99(3H,m),0.84(3H,m),0.74-0.66(6H,m).

[1899] MS(APCI,ESI)m/z:936$(M+H)^{+}$.

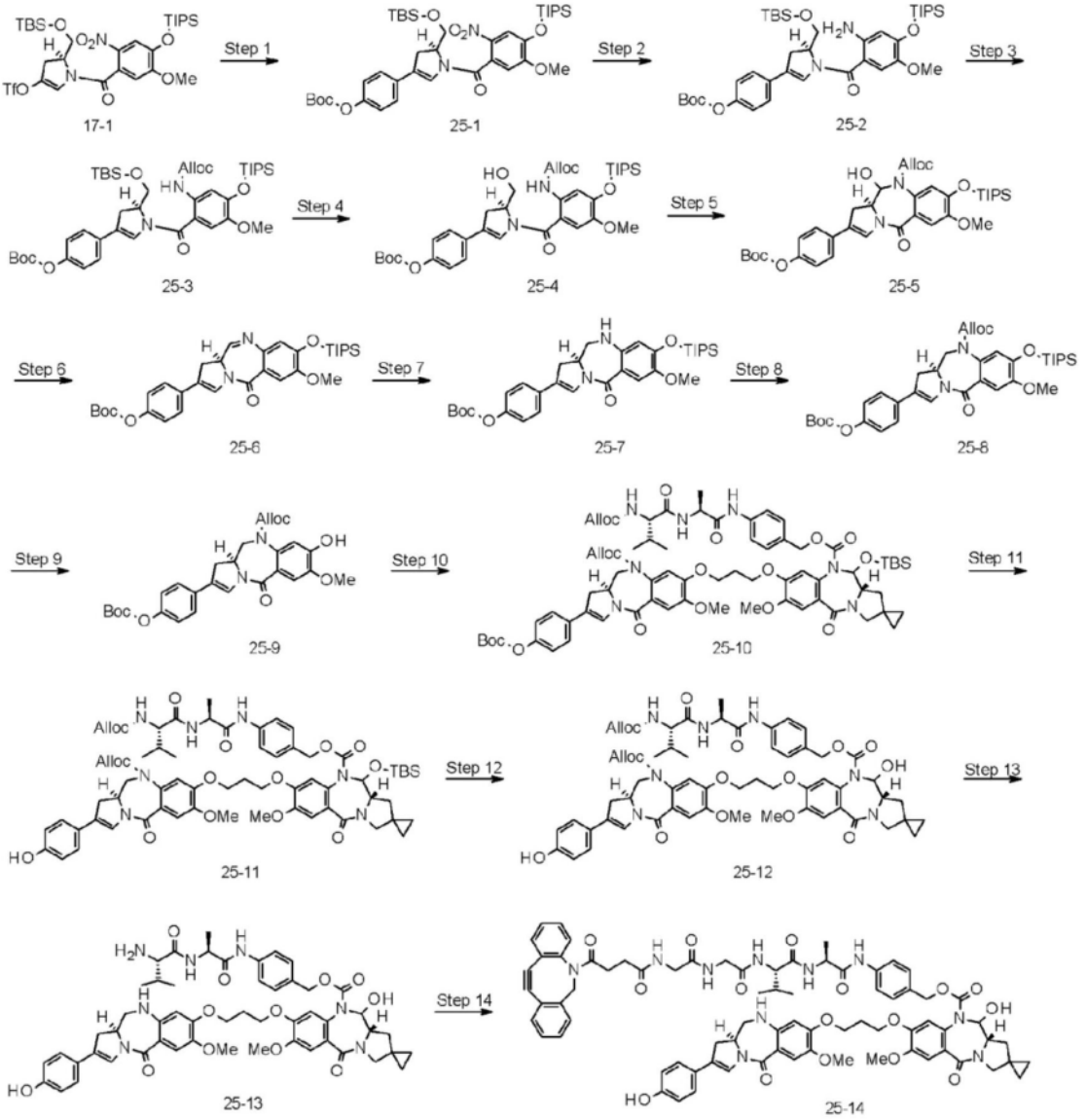
[1900] 工序13:N－[4－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]甘氨酰甘氨酰基－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－[(5－{[(11aS)－7－甲氧基－2－亚甲基－5－氧代－2,3,5,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}戊基)氧基]－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[1901] 使上述工序12所得到的化合物(0.0600g,0.0629mmol)与实施例3工序13同样地反应,得到目标产物(0.075g,89%)。

[1902] ^{1}H-NMR($DMSO\text{-}D_6$)δ:9.91(1H,s),8.21-8.16(2H,m),8.07-8.03(1H,m),7.74-7.65(3H,m),7.60-7.44(6H,m),7.39-7.29(5H,m),7.21-7.19(2H,m),7.03(1H,s),6.85(1H,s),6.72(1H,s),6.58-6.56(1H,m),5.77-5.74(1H,m),5.19-5.16(3H,m),5.03-5.00(1H,m),4.82-4.79(1H,m),4.36-4.33(1H,m),4.21-4.19(1H,m),4.14-4.11(2H,m),4.00-3.95(3H,m),3.80-3.73(10H,m),3.65-3.52(4H,m),3.41-3.38(2H,m),3.15-3.30(1H,m),3.14(1H,m),3.04-3.01(1H,m),2.68-2.66(1H,m),2.32-2.28(2H,m),2.05-1.98(2H,m),1.78-1.77(5H,m),1.57-1.54(3H,m),1.28-1.25(3H,m),0.86-0.81(6H,m),0.67-0.62(4H,m).

[1903] MS(APCI,ESI)m/z:1337$(M+H)^{+}$.

[1904] 实施例25:药物连接子23

[1905] 

[1906] 工序1:化合物25－1

[1907] 使起始物质17－1(3.81g,5.34mmol)与4－(4,4,5,5－四甲基－1,3,2－二氧杂硼烷－2－基)苯基碳酸叔丁酯(5.13g,16.0mmol)与实施例3工序6同样地反应,得到目标产物(3.05g,75%)。

[1908] MS(APCI,ESI)m/z:757$(M+H)^+$.

[1909] 工序2:化合物25－2

[1910] 使上述工序1所得到的化合物(3.05g,4.09mmol)与实施例17工序2同样地反应,得到目标产物(2.67g,91%)。

[1911] MS(APCI,ESI)m/z:727$(M+H)^+$.

[1912] 工序3:化合物25－3

[1913] 使上述工序2所得到的化合物(2.67g,3.67mmol)与实施例3工序9同样地反应。本工序中,反应结束后,进行分液操作,将有机溶剂减压浓缩而得到的粗产物(3.00g,定量)直接用于下一个反应中。

[1914] 工序4:化合物25－4

[1915] 使上述工序3所得到的化合物(3.05g)与实施例1工序7同样地反应,得到目标产物(2.67g,定量)。

[1916] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.34(1H,m),7.70(1H,m),7.24(2H,m),7.12(2H,m),6.86(1H,s),6.84(1H,s),5.95-5.89(1H,m),5.31(1H,m),5.21(1H,m),4.87-4.86(1H,m),4.61-4.61(2H,m),4.41(1H,m),3.93-3.90(2H,m),3.76(3H,s),3.29(1H,m),2.68-2.66(1H,m),1.55(9H,s),1.33-1.26(3H,m),1.13-1.11(18H,m).

[1917] MS(APCI,ESI)m/z:697$(M+H)^+$.

[1918] 工序5:化合物25－5

[1919] 使上述工序4所得到的化合物(1.22g,1.75mmol)与实施例9工序3同样地反应,得到目标产物(0.838g,69%)。

[1920] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.45(1H,s),7.37(2H,m),7.22(1H,s),7.15(2H,m),7.11-7.09(1H,m),6.72(1H,s),5.82-5.79(1H,m),5.19-5.16(2H,m),4.61-4.59(2H,m),4.50-4.47(1H,m),4.00(1H,m),3.86(3H,s),3.41-3.28(1H,m),3.09-3.05(1H,m),1.57(9H,s),1.29-1.25(3H,m),1.14-1.07(18H,m).

[1921] MS(APCI,ESI)m/z:695$(M+H)^+$.

[1922] 工序6:化合物25－6

[1923] 使上述工序5所得到的化合物(0.838g,1.21mmol)与实施例3工序12同样地反应,得到目标产物(0.745g,定量)。

[1924] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.88(1H,m),7.50(1H,s),7.48-7.48(1H,m),7.40(2H,m),7.18(2H,m),6.86(1H,s),4.45-4.43(1H,m),3.90(3H,s),3.60-3.56(1H,m),3.38(1H,m),1.57(9H,s),1.31-1.26(3H,m),1.11-1.10(18H,m).

[1925] MS(APCI,ESI)m/z:593$(M+H)^+$.

[1926] 工序7～9:化合物25－9

[1927] 使上述工序6所得到的化合物(0.745g,1.26mmol)与实施例3工序8、工序9以及实施例1工序10同样地反应,得到目标产物(0.516g,3工序产率78%)。

[1928] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.46(1H,s),7.35(2H,m),7.27-7.25(2H,m),7.15(2H,m),6.82(1H,s),5.93(1H,s),5.84-5.81(1H,m),5.12(1H,m),4.61(1H,m),4.49-4.46(1H,m),4.35-4.32(1H,m),4.23-4.21(1H,m),3.96(3H,s),3.65-3.62(1H,m),3.29(1H,m),2.71(1H,m),1.57(9H,s).

[1929] MS(APCI,ESI)m/z:523$(M+H)^+$.

[1930] 工序10:化合物25－10

[1931] 使上述工序9所得到的化合物(0.105g,0.200mmol)和实施例1工序11所得到的化合物(0.186g,0.200mmol)与实施例3工序10同样地进行偶联反应,得到目标产物(0.248g,90%)。

[1932] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.72-8.50(1H,m),7.52(1H,s),7.40-7.38(4H,m),7.23-7.21(2H,m),7.16(2H,m),7.09(1H,m),6.84-6.82(2H,m),6.51-6.49(1H,m),6.02(1H,m),5.92-5.90(1H,m),5.30-5.21(5H,m),4.71-4.61(6H,m),4.36-4.24(5H,m),4.02-4.00(3H,m),3.93-3.88(1H,m)3.87(3H,s),3.81(3H,s),3.71(2H,m),3.51-3.49(1H,m),3.32-3.28(2H,m),2.72(1H,m),2.37-2.34(3H,m),2.16-2.13(1H,m),1.66(9H,s),1.50-1.46(4H,m),

0.97-0.93(7H,m),0.82(9H,s),0.68-0.65(4H,m),0.20(3H,s),0.14(3H,s).

[1933] MS(APCI,ESI)m/z:1370(M+H)$^+$.

[1934] 工序11:化合物25－11

[1935] 在上述工序11中得到的化合物(0.248g,0.181mmol)的二氯甲烷(3mL)溶液中加入哌啶(3mL),在室温下搅拌2小时。将反应液用柠檬酸水溶液稀释,用乙酸乙酯提取2次。将有机层用饱和盐水进行清洗,用硫酸钠进行干燥。过滤后,将有机溶剂减压蒸馏除去,将得到的残渣用硅胶柱色谱法[氯仿:甲醇＝100:0(v/v)～90:10(v/v)]进行精制,得到目标产物(0.153g,93%)。

[1936] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.77-8.69(1H,m),7.40-7.36(3H,m),7.23-7.21(4H,m),7.07(2H,m),6.88-6.86(1H,m),6.82(2H,m),6.51(1H,s),6.03(1H,m),5.92-5.90(1H,m),5.30-5.21(4H,m),4.75-4.72(2H,m),4.58-4.55(3H,m),4.37-4.35(1H,m),4.23-4.21(3H,m),4.01-3.99(2H,m),3.86(3H,s),3.79(3H,s),3.72(2H,m),3.66-3.64(1H,m),3.51-3.48(1H,m),3.28(2H,m),2.67(1H,m),2.37-2.12(4H,m),1.55-1.52(2H,m),1.45-1.42(4H,m),0.95-0.91(6H,m),0.81(9H,s),0.81-0.78(2H,m),0.68-0.65(3H,m),0.20-0.15(6H,m).

[1937] MS(APCI,ESI)m/z:1270(M+H)$^+$.

[1938] 工序12:化合物25－12

[1939] 使上述工序11所得到的化合物(0.175g,0.138mmol)与实施例3工序11同样地反应,得到目标产物(0.162g,定量)。

[1940] MS(APCI,ESI)m/z:1156(M+H)$^+$.

[1941] 工序13:化合物25－13

[1942] 使上述工序12所得到的化合物(0.116g,0.100mmol)与实施例3工序12同样地反应,得到目标产物(0.0410g,41%)。

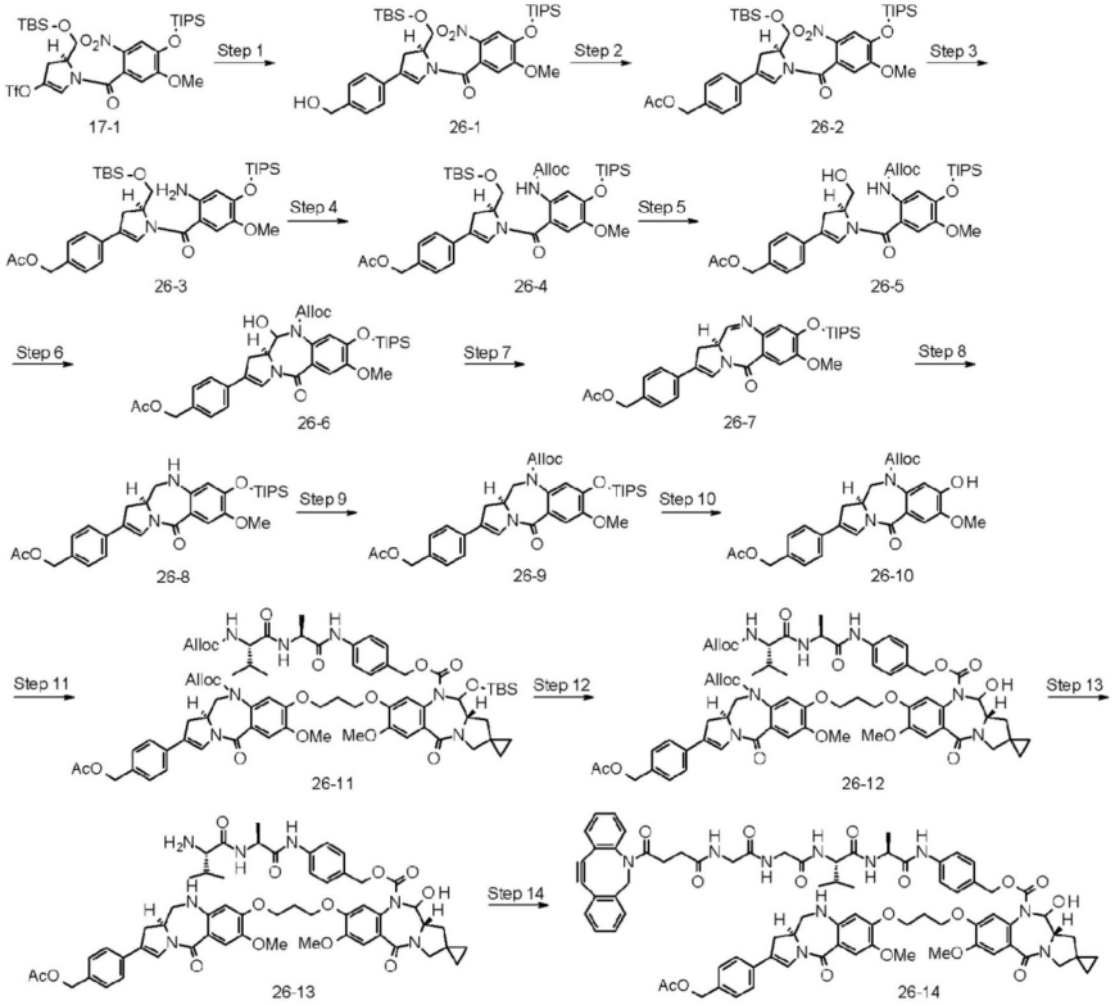
[1943] MS(APCI,ESI)m/z:988(M+H)$^+$.

[1944] 工序14:N－[4－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]甘氨酰甘氨酰基－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－8'－(3－{[(11aS)－2－(4－羟基苯基)－7－甲氧基－5－氧代－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}丙氧基)－7'－甲氧基－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[1945] 使上述工序13所得到的化合物(0.00500g,0.00506mmol)、实施例2工序2所得到的化合物(0.0100g,0.0202mmol)溶解于二氯甲烷(0.3mL)和甲醇(0.3mL)中,加入N,N－二异丙基乙胺(3.5μL,0.0202mmol),在室温下搅拌1小时。将反应液减压蒸馏除去,将得到的残渣用硅胶柱色谱法[氯仿:CMW＝100:0(v/v)～0:100(v/v)]进行精制,得到目标产物(0.00350g,50%)。

[1946] MS(APCI,ESI)m/z:1389(M+H)$^+$.

[1947] 实施例26:药物连接子24

[1948] 

[1949] 工序1:化合物26－1

[1950] 使起始物质17－1(3.93g,5.51mmol)和4－(羟甲基)苯基硼酸与实施例3工序6同样地反应,得到目标产物(3.09g,84%)。

[1951] MS(APCI,ESI)m/z:671$(M+H)^+$.

[1952] 工序2:化合物26－2

[1953] 使上述工序1所得到的化合物(3.09g,4.61mmol)的二氯甲烷(100mL)溶液进行冰浴冷却,加入三乙胺(1.60mL,11.5mmol)后,滴入乙酰氯(0.491mL,6.91mmol),在室温下搅拌2小时。用柠檬酸水溶液稀释反应液,用氯仿提取3次。将有机层用饱和碳酸钠水溶液、饱和盐水进行清洗,用无水硫酸钠干燥后,将溶剂减压蒸馏除去,将得到的化合物(3.75g,定量)直接用于下一个反应中。

[1954] 工序3:化合物26－3

[1955] 使上述工序2所得到的化合物(3.28g,4.60mmol)与实施例17工序2同样地反应,得到目标产物(2.09g,67%)。

[1956] MS(APCI,ESI)m/z:682$(M+H)^+$.

[1957] 工序4:化合物26－4

[1958] 使上述工序3所得到的化合物(1.01g,1.48mmol)与实施例3工序9同样地反应。减压蒸馏除去后,将得到的化合物(1.19g,定量)直接用于下一个反应中。

[1959] 工序5:化合物26－5

[1960] 使上述工序4所得到的化合物(1.19g,1.55mmol)与实施例1工序7同样地反应,得到目标产物(0.885g,87%)。

[1961] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.34(1H,m),7.71(1H,s),7.31(2H,m),7.24(2H,m),6.91(1H,s),6.84(1H,s),5.97-5.88(1H,m),5.35-5.29(1H,m),5.22-5.20(1H,m),5.07(2H,s),4.88-4.87(1H,m),4.62-4.61(3H,m),4.33-4.31(1H,m),3.94-3.91(2H,m),3.76(3H,s),3.33-3.29(1H,m),2.68(1H,m),1.33-1.29(4H,m),1.15-1.12(18H,m).

[1962] MS(APCI,ESI)m/z:653$(M+H)^+$.

[1963] 工序6～7:化合物26－7

[1964] 使上述工序5所得到的化合物(0.885g,1.36mmol)与实施例9工序3以及实施例3工序12同样地反应,得到目标产物(0.515g,85%)。

[1965] MS(APCI,ESI)m/z:549$(M+H)^+$.

[1966] 工序8－10:化合物26－10

[1967] 使上述工序7所得到的化合物(0.515g,0.983mmol)与实施例3工序8、工序9以及实施例1工序10同样地反应,得到目标产物(0.448g,定量)。

[1968] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.51(1H,s),7.37-7.30(4H,m),7.26-7.25(1H,m),6.82(1H,s),5.94(1H,s),5.86-5.79(1H,m),5.15-5.13(1H,m),5.09(3H,s),4.61(1H,m),4.48-4.46(1H,m),4.35-4.32(1H,m),4.25-4.23(1H,m),3.96(3H,s),3.64(1H,d,m),3.33-3.29(1H,m),2.73(1H,m),2.11(3H,s).

[1969] MS(APCI,ESI)m/z:479$(M+H)^+$.

[1970] 工序11:化合物26－11

[1971] 使上述工序10所得到的化合物(0.0690g,0.144mmol)和实施例1工序11所得到的化合物(0.134g,0.144mmol)与实施例3工序10同样地反应,得到目标产物(0.118g,62%)。

[1972] MS(APCI,ESI)m/z:1325$(M+H)^+$.

[1973] 工序12～13:化合物26－13

[1974] 使上述工序11所得到的化合物(0.134g,0.101mmol)与实施例3工序11以及实施例3工序12同样地反应,得到目标产物(0.0950g、两个工序的产率90%)。

[1975] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:9.14(1H,s),7.91(1H,m),7.69(1H,s),7.47(4H,m),7.40-7.38(2H,m),7.34-7.32(2H,m),7.21(1H,s),7.18(2H,m),7.13(2H,m),6.40(1H,s),6.08(1H,s),5.88(1H,m),5.36(1H,m),5.09(2H,s),4.72(1H,m),4.62-4.59(2H,m),4.35-4.32(1H,m),4.12-4.07(4H,m),3.89(3H,s),3.80(3H,s),3.74-3.71(2H,m),3.58-3.53(3H,m),3.41-3.38(1H,m),3.31-3.29(2H,m),2.78-2.74(1H,m),2.41(1H,m),2.31-2.31(1H,m),2.18-2.15(1H,m),2.11(3H,s),1.76(1H,m),1.44-1.42(3H,m),0.99(3H,m),0.83(3H,m),0.71-0.66(4H,m).

[1976] MS(APCI,ESI)m/z:1044$(M+H)^+$.

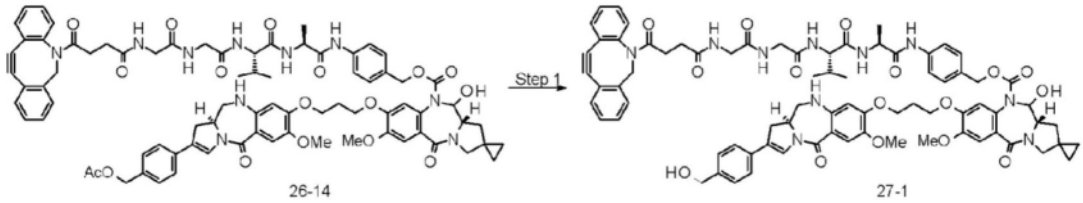
[1977] 工序14:N－[4－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]甘氨酰甘氨酰基－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－8'－(3－{[(11aS)－2－{4－[(乙酰氧基)甲基]苯基}－7－甲氧基－5－氧代－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}丙氧基)－11'－羟基－7'－

甲氧基－5’－氧代－11’,11a’－二氢－1’H－螺[环丙烷－1,2’－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10’(5’H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[1978] 使上述工序13所得到的化合物(0.0700g,0.0670mmol)与实施例3工序13同样地反应,得到目标产物(0.0520g,54%)。

[1979] MS(APCI,ESI)m/z:1445$(M+H)^+$.

[1980] 实施例27:药物连接子25

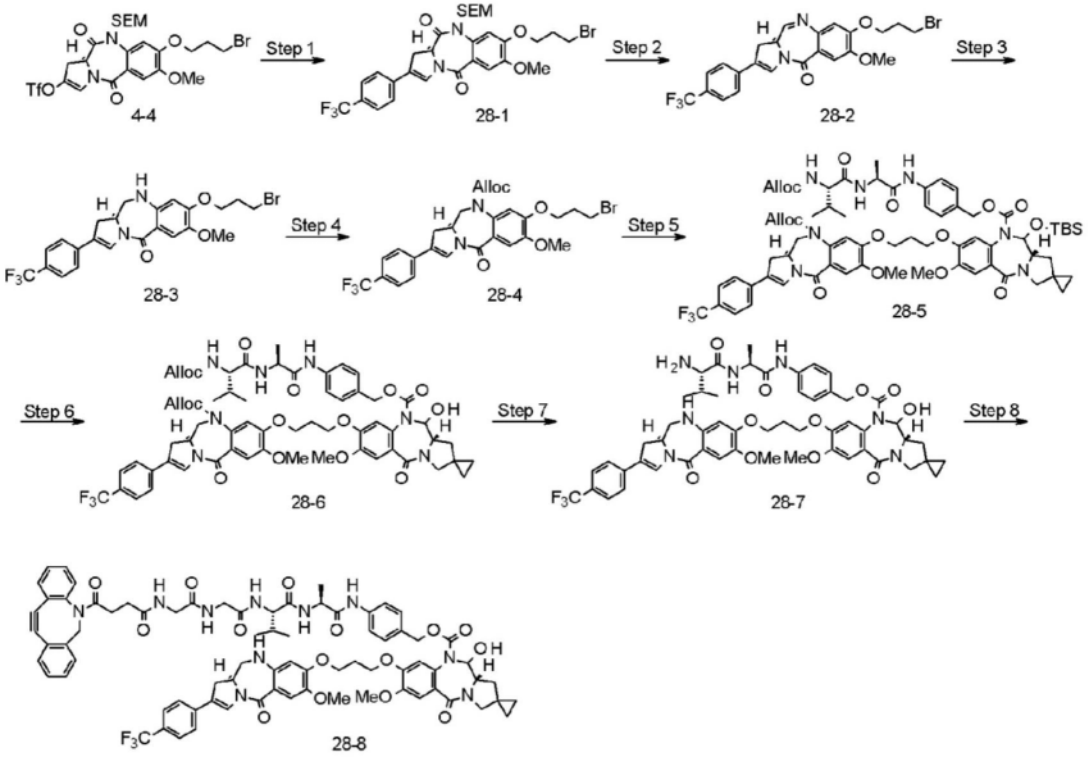
[1981] 

[1982] 工序1:N－[4－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]甘氨酰甘氨酰基－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a’S)－11’－羟基－8’－[3－({(11aS)－2－[4－(羟甲基)苯基]－7－甲氧基－5－氧代－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基}氧基)丙氧基]－7’－甲氧基－5’－氧代－11’,11a’－二氢－1’H－螺[环丙烷－1,2’－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10’(5’H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[1983] 在实施例26工序14所得到的化合物(0.0230g,0.0159mmol)的甲醇(2mL)溶液中加入1当量浓度的氢氧化钠溶液(0.0175mL,0.0175mmol),在室温下搅拌1小时。再加入1当量浓度的氢氧化钠溶液(0.0175mL,0.0175mmol),在室温下搅拌30分钟。在反应液中加入1当量浓度的盐酸水溶液(0.0350mL)以及水,用氯仿提取3次。用硫酸钠干燥有机层,减压蒸馏除去后,将得到的残渣用硅胶柱色谱法[氯仿:CMW＝100:0(v/v)～0:100(v/v)]进行精制,得到目标产物(0.0190g,85%)。

[1984] MS(APCI,ESI)m/z:1403$(M+H)^+$.

[1985] 实施例28:药物连接子26

[1986] 

[1987] 工序1:化合物28－1

[1988] 使实施例4工序4所得到的化合物(1.12g,1.70mmol)与4－(4,4,5,5－四甲基－1,3,2－二氧杂硼烷－2－基)三氟甲基苯(0.924g,3.40mmol)与实施例3工序6同样地反应,得到目标产物(0.918g,83%)。

[1989] MS(APCI,ESI)m/z:657[^{81}Br,$(M+H)^+$],655[^{79}Br,$(M+H)^+$].

[1990] 工序2:化合物28－2

[1991] 使上述工序1所得到的化合物(0.918g,1.40mmol)与实施例3工序7同样地反应,得到目标产物(0.425g,60%)。

[1992] MS(APCI,ESI)m/z:511[^{81}Br,$(M+H)^+$],509[^{79}Br,$(M+H)^+$].

[1993] 工序3:化合物28－3

[1994] 使上述工序2所得到的化合物(0.425g,0.834mmol)与实施例3工序8同样地反应。分液操作后,减压蒸馏除去,将得到的化合物(0.410g)直接用于下一个反应中。

[1995] 工序4:化合物28－4

[1996] 使上述工序2所得到的化合物(0.425g,0.834mmol)与实施例3工序8以及实施例3工序9同样地反应,得到目标产物(0.420g,85%)。

[1997] MS(APCI,ESI)m/z:597[^{81}Br,$(M+H)^+$],595[^{79}Br,$(M+H)^+$].

[1998] 工序5:化合物28－5

[1999] 使上述工序4所得到的化合物(0.0960g,0.160mmol)与实施例3工序10同样地反应,得到目标产物(0.212g,99%)。

[2000] MS(APCI,ESI)m/z:1321$(M+H)^+$.

[2001] 工序6:化合物28－6

[2002] 使上述工序5所得到的化合物(0.210g,0.159mmol)与实施例3工序11同样地反应,得到目标产物(0.162g,84%)。

[2003] MS(APCI,ESI)m/z:1208(M+H)$^+$.

[2004] 工序7:化合物28－7

[2005] 使用上述工序6所得到的化合物(0.160g,0.132mmol)与实施例3工序12同样地反应,得到目标产物(0.103g,75%)。

[2006] MS(APCI,ESI)m/z:1039(M+H)$^+$.

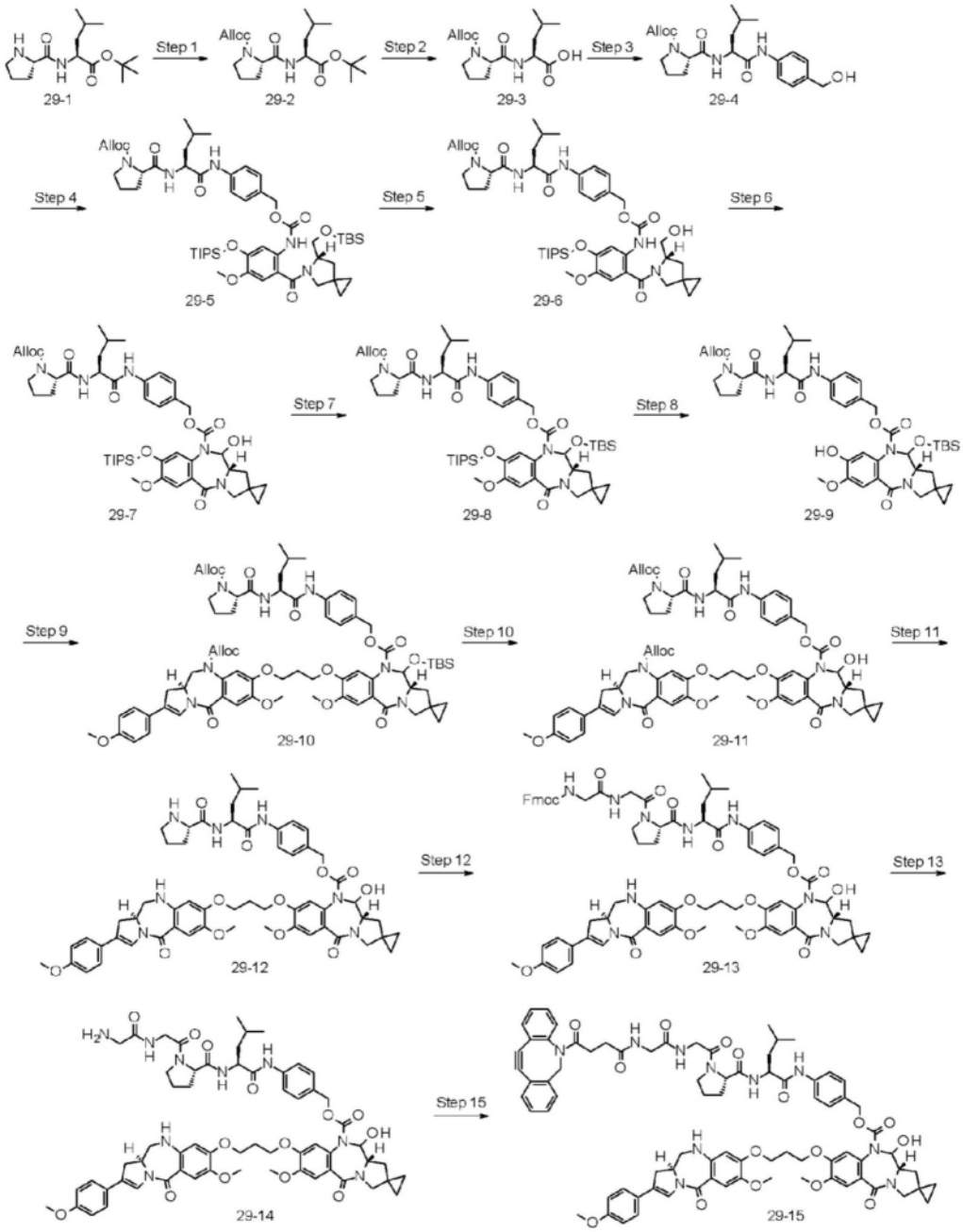
[2007] 工序8:N－[4－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]甘氨酰甘氨酰基－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－[3－({(11aS)－7－甲氧基－5－氧代－2－[4－(三氟甲基)苯基]－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基}氧基)丙氧基]－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[2008] 使起始原料4－4和上述工序7所得到的化合物(0.101g,0.0971mmol)与实施例3工序13同样地反应,得到目标产物(0.107g,76%)。

[2009] MS(APCI,ESI)m/z:1441(M+H)$^+$.

[2010] 实施例29:药物连接子27

[2011]



[2012] 工序1:1－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－脯氨酰基－L－亮氨酸叔丁酯

[2013] 使用三乙胺(3.41mL,24.5mmol)来代替吡啶,使叔丁基－L－脯氨酰基－L－亮氨酸酯(4.64g,16.3mmol)与实施例3工序9同样地反应。反应结束后,进行分液操作,将有机溶剂减压蒸馏除去,将所得到的化合物(5.79g,96%)直接用于下一个反应中。

[2014] 工序2:1－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－脯氨酰基－L－亮氨酸

[2015] 在上述工序1所得到的化合物(5.79g,15.7mmol)的二氯甲烷(60mL)溶液中加入三氟醋酸(20mL),在室温下搅拌1小时。在反应液中加入甲苯,减压蒸馏除去,将得到的化合物(2.69g,55%)直接用于下一个反应中。

[2016] 工序3:1－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－脯氨酰基－N－[4－(羟甲基)苯基]－L－亮氨酸酰胺

[2017] 在上述工序2所得到的化合物(6.10g,19.5mmol)的THF(100mL)溶液中加入N－乙

氧基羰基－2－乙氧基－1,2－二氢喹啉(5.07g,20.5mmol),在室温下搅拌1小时。加入4－氨基苄醇(2.16g,20.5mmol),搅拌一晚。将反应液减压蒸馏除去,将得到的残渣溶解于乙酸乙酯。用稀盐酸、饱和碳酸氢钠水溶液、饱和盐水进行清洗,用无水硫酸钠对有机层进行干燥。过滤后,将溶剂减压蒸馏除去,将得到的残渣用硅胶柱色谱法[己烷:乙酸乙酯＝90:10(v/v)～0:100(v/v)]进行精制,得到目标产物(1.60g,20％)。

[2018] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.62-8.33(1H,m),7.68-7.49(2H,m),7.31-7.30(2H,m),6.66-6.43(1H,m),5.97-5.70(1H,m),5.39-4.96(2H,m),4.64-4.53(5H,m),4.40-4.35(1H,m),3.57-3.50(2H,m),2.20-2.19(2H,m),1.98-1.97(3H,m),1.66-1.64(3H,m),0.97-0.94(6H,m).

[2019] MS(APCI,ESI)m/z:418(M+H)$^{+}$.

[2020] 工序4:1－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－脯氨酰基－N－[4－({[(2－{[(6S)－6－({[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}甲基)－5－氮杂螺[2.4]庚－5－基]羰基}－4－甲氧基－5－{[三(丙烷－2－基)硅烷基]氧基}苯基)氨基甲酰基]氧基}甲基)苯基]－L－亮氨酸酰胺

[2021] 使上述工序3所得到的化合物(0.838g,2.01mmol)与实施例1工序6同样地反应,得到目标产物(0.535g,37％)。

[2022] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.98(1H,m),8.62(1H,s),7.80(1H,s),7.65-7.50(2H,m),7.33-7.31(2H,m),6.76(1H,s),6.67-6.34(1H,m),5.95-5.92(1H,m),5.33-5.25(1H,m),5.30-5.27(1H,m),5.12(2H,s),4.66-4.63(3H,m),4.58-4.55(3H,m),4.38-4.36(1H,m),3.99-3.96(1H,m),3.73(3H,s),3.70-3.65(2H,m),3.57-3.55(2H,m),3.04-3.02(1H,m),2.21-2.20(3H,m),1.98-1.95(3H,m),1.74-1.62(3H,m),1.32-1.30(3H,m),1.11-1.09(16H,m),0.97-0.94(6H,m),0.90(9H,s),0.60-0.52(4H,m),0.05-0.04(6H,m).

[2023] 工序5～6:1－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－脯氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－5'－氧代－8'－{[三(丙烷－2－基)硅烷基]氧基}－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－亮氨酸酰胺

[2024] 使上述工序4所得到的化合物(0.535g,0.531mmol)与实施例1工序7以及实施例9工序3同样地反应,得到目标产物(0.367g,78％)。

[2025] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.60(1H,s),7.58-7.42(2H,m),7.19-7.16(3H,m),6.69-6.64(2H,m),5.89-5.87(2H,m),5.32-5.24(2H,m),5.10(1H,m),4.93(1H,m),4.65-4.63(1H,m),4.57-4.54(2H,m),4.37-4.34(1H,m),3.84(3H,s),3.72(1H,m),3.57-3.55(3H,m),3.40-3.38(1H,m),3.31(1H,m),2.41(1H,m),2.20-2.18(2H,m),1.98-1.95(3H,m),1.73(1H,m),1.66-1.63(1H,m),1.16-1.10(4H,m),1.05-0.99(18H,m)0.97-0.93(6H,m),0.71-0.64(4H,m).

[2026] MS(APCI,ESI)m/z:890(M+H)$^{+}$.

[2027] 工序7:1－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－脯氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－{[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}－7'－甲氧基－5'－氧代－8'－{[三(丙烷－2－基)硅烷基]氧基}－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－亮氨酸酰胺

[2028] 使用上述工序6所得到的化合物(0.367g,0.412mmol)与实施例1工序9同样地进行反应,得到目标产物(0.181g,44%)。

[2029] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.54(1H,s),7.52-7.45(2H,m),7.19(1H,s),7.14(2H,m),6.71-6.68(1H,m),6.61(1H,s),6.01(1H,m),5.94-5.92(1H,m),5.34-5.17(2H,m),4.77(1H,m),4.64-4.56(3H,m),4.38-4.35(1H,m),3.85(3H,s),3.72-3.69(1H,m),3.55-3.46(3H,m),3.27(1H,m),2.35(1H,m),2.21-2.18(2H,m),1.97-1.95(3H,m),1.54-1.51(2H,m),1.16-1.09(5H,m),1.02-1.01(18H,m),0.97-0.93(6H,m),0.81(9H,s),0.68-0.63(4H,m),0.19(3H,s),0.09(3H,s).

[2030] 工序8:1－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－脯氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－{[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}－8'－羟基－7'－甲氧基－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－亮氨酸酰胺

[2031] 使上述工序7所得到的化合物(0.181g,0.180mmol)与实施例1工序10同样地反应,得到目标产物(0.153g,定量)。

[2032] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.57-8.27(1H,m),7.69-7.41(2H,m),7.23(1H,s),7.12(2H,m),6.69-6.66(1H,m),6.64(1H,s),5.99-5.92(3H,m),5.34-5.19(3H,m),4.81(1H,m),4.63-4.57(4H,m),4.38-4.36(1H,m),3.94(3H,s),3.71(1H,m),3.54-3.52(3H,m),3.27(1H,m),2.35(1H,m),2.19(2H,m),1.97-1.95(3H,m),1.55-1.52(2H,m),0.97-0.93(6H,m),0.81(9H,s),0.76-0.61(4H,m),0.21(3H,s),0.09(3H,s).

[2033] MS(APCI,ESI)m/z:848$(M+H)^+$.

[2034] 工序9:1－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－脯氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－{[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}－7'－甲氧基－8'－[3－({(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－10－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基}氧基)丙氧基]－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－亮氨酸酰胺

[2035] 使上述工序8所得到的化合物(0.153g,0.180mmol)与实施例4工序9同样地反应,得到目标产物(0.137g,57%)。

[2036] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.79(1H,s),7.54-7.51(1H,m),7.39-7.37(2H,m),7.30-7.29(2H,m),7.23-7.21(3H,m),7.13-7.11(2H,m),6.88(2H,m),6.82-6.80(1H,m),6.50-6.48(1H,m),6.03-6.01(1H,m),5.92-5.89(1H,m),5.75-5.72(1H,m),5.28-5.26(3H,m),5.06-5.03(2H,m),4.74-4.71(1H,m),4.62-4.60(4H,m),4.36-4.34(2H,m),4.22-4.19(3H,m),4.01-3.99(1H,m),3.88(3H,s),3.84-3.81(6H,m),3.71(2H,m),3.53-3.50(4H,m),3.28-3.25(2H,m),2.72-2.68(1H,m),2.37-2.34(4H,m),2.19-2.16(3H,m),1.97-1.94(2H,m),1.49-1.43(2H,m),0.95-0.92(7H,m),0.81(9H,s),0.68-0.65(4H,m),0.19(3H,s),0.13(3H,s).

[2037] MS(APCI,ESI)m/z:1324$(M+H)^+$.

[2038] 工序10:1－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－脯氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－[3－({(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－

5－氧代－10－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基}氧基)丙氧基]－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－亮氨酸酰胺

[2039] 使上述工序9所得到的化合物(0.136g,0.103mmol)与实施例3工序11同样地反应,得到目标产物(0.116g,93%)。

[2040] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.83(1H,s),7.57-7.52(1H,m),7.39-7.37(2H,m),7.30-7.29(2H,m),7.24-7.20(5H,m),6.88(2H,m),6.81(1H,s),6.54-6.51(1H,m),5.90-5.88(2H,m),5.76-5.74(1H,m),5.55-5.53(1H,m),5.33-5.05(3H,m),4.79-4.76(1H,m),4.63-4.60(4H,m),4.35-4.33(2H,m),4.22-4.19(3H,m),4.04-4.03(1H,m),3.88(3H,s),3.85-3.83(6H,m),3.72(2H,m),3.62-3.56(4H,m),3.32-3.29(2H,m),2.70(1H,m),2.45-2.38(2H,m),2.30-2.27(2H,m),2.20-2.10(3H,m),1.94-1.89(4H,m),1.75-1.71(2H,m),0.95(7H,m),0.72-0.66(4H,m).

[2041] MS(APCI,ESI)m/z:1210$(M+H)^+$.

[2042] 工序11:L－脯氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－(3－{[(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}丙氧基)－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－亮氨酸酰胺

[2043] 使上述工序10所得到的化合物(0.116g,0.0958mmol)与实施例3工序12同样地反应,得到目标产物(0.0530g,53%)。

[2044] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:9.15(1H,s),8.11(1H,m),7.50-7.45(4H,m),7.32-7.31(2H,m),7.21(1H,s),7.13(2H,m),6.89(2H,m),6.37(1H,s),6.08(1H,s),5.88(1H,m),5.38(1H,m),4.69(1H,m),4.63-4.60(1H,m),4.53-4.51(1H,m),4.31-4.28(1H,m),4.13-4.08(3H,m),3.89(3H,s),3.83(3H,s),3.81(3H,s),3.75-3.70(4H,m),3.57-3.55(3H,m),3.37-3.33(2H,m),3.01-2.99(1H,m),2.90-2.86(1H,m),2.76-2.73(1H,m),2.41(1H,m),2.17-2.15(3H,m),1.90-1.87(1H,m),1.74(4H,m),1.25(2H,m),0.97-0.91(7H,m),0.67(4H,m).

[2045] MS(APCI,ESI)m/z:1042$(M+H)^+$.

[2046] 工序12:N－[(9H－芴－9－基氧基)羰基]甘氨酰甘氨酰基－L－脯氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－(3－{[(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}丙氧基)－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－亮氨酸酰胺

[2047] 在上述工序11所得到的化合物(0.0410g,0.0393mmol)与N－[(9H－芴－9－基甲氧基)羰基]甘氨酰甘氨酸(0.0410g,0.0393mmol)的N,N－二甲基甲酰胺(1mL)溶液中,加入1－羟基苯并三唑一水合物(0.000602g,0.00393mmol)以及1－乙基－3－(3－二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(0.00905g,0.0472mmol),在室温下搅拌1小时。减压蒸馏除去,将得到的残渣用硅胶柱色谱法(氯仿:甲醇＝100:0～90:10)进行精制,得到目标产物(0.0520g,

94%)。

[2048] ^{1}H-NMR(CDCl$_3$)δ:8.57(1H,s),7.77-7.75(3H,m),7.63-7.61(2H,m),7.51-7.48(2H,m),7.40-7.38(3H,m),7.31-7.29(4H,m),7.21-7.11(5H,m),6.88(2H,m),6.47(1H,s),6.08(1H,s),5.93(1H,m),5.21-5.19(1H,m),5.13(1H,m),4.78(1H,m),4.66-4.59(1H,m),4.53-4.51(1H,m),4.42-4.39(1H,m),4.33-4.31(1H,m),4.19-4.11(6H,m),4.10-3.86(4H,m),3.82(3H,s),3.76(3H,s),3.73-3.71(3H,m),3.56-3.51(7H,m),3.32-3.29(2H,m),2.73-2.69(1H,m),2.40(1H,m),2.29-2.27(3H,m),2.06-2.04(4H,m),1.73-1.70(2H,m),1.25(2H,m),0.96-0.93(6H,m),0.66(4H,m).

[2049] MS(APCI,ESI)m/z:1378(M+H)$^{+}$.

[2050] 工序13:甘氨酰甘氨酰基－L－脯氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－(3－{[(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}丙氧基)－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－亮氨酸酰胺

[2051] 在上述工序12所得到的化合物(0.0520g,0.0377mmol)的N,N－二甲基甲酰胺(2mL)溶液中加入1,8－二氮杂双环[5.4.0]－7－十一碳烯(67μL,0.0453mmol),在室温下搅拌1小时。减压蒸馏除去,将得到的残渣用硅胶柱色谱法[氯仿:CMW＝100:0(v/v)～0:100(v/v)]进行精制,得到目标产物(0.0420g,92%)。

[2052] ^{1}H-NMR(CDCl$_3$)δ:8.64(1H,s),7.74(1H,m),7.66-7.64(1H,m),7.50(1H,s),7.45(1H,s),7.33-7.30(3H,m),7.24-7.21(2H,m),7.18-7.16(3H,m),6.89(2H,m),6.51(1H,s),6.15(1H,s),5.89(1H,m),5.27(1H,m),4.82-4.78(1H,m),4.74(1H,m),4.56-4.54(1H,m),4.49-4.47(1H,m),4.23-4.20(3H,m),4.13-4.10(3H,m),3.96-3.92(1H,m),3.90(3H,s),3.83(3H,s),3.76(3H,s),3.72(2H,m),3.62-3.56(5H,m),3.40-3.36(1H,m),3.31(1H,m),3.04(1H,m),2.90-2.86(1H,m),2.75-2.71(1H,m),2.42-2.39(1H,m),2.36(2H,s),2.29-2.27(3H,m),2.07-2.05(3H,m),1.97-1.95(1H,m),1.75-1.72(2H,m),0.94(6H,m),0.69(4H,m).

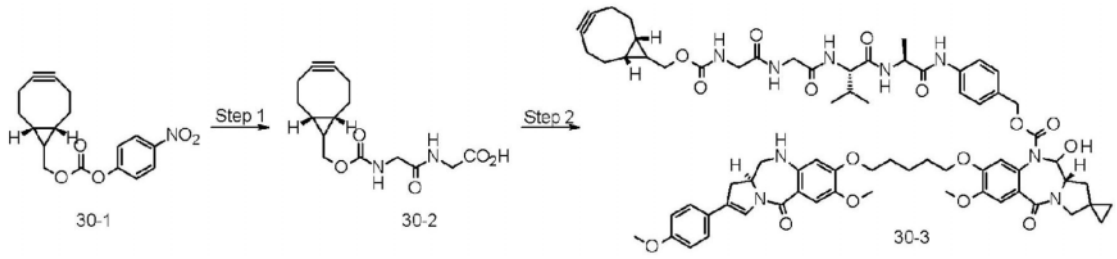
[2053] MS(APCI,ESI)m/z:1156(M+H)$^{+}$.

[2054] 工序14:N－[4－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]甘氨酰甘氨酰基－L－脯氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－(3－{[(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}丙氧基)－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－亮氨酸酰胺

[2055] 在上述工序13所得到的化合物(0.0400g,0.0346mmol)的N,N－二甲基甲酰胺(1mL)溶液中加入1－{[4－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]氧基}吡咯烷－2,5－二酮(0.0140g,0.0346mmol,Click Chemistry Tools)和二异丙胺(0.0240mL,0.138mmol),在室温下搅拌18小时。将反应液减压蒸馏除去,将得到的残渣用硅胶柱色谱法[氯仿:甲醇＝100:0(v/v)～90:10(v/v)]进行精制,得到目标产物(0.0230g,46%)。

[2056] MS(APCI,ESI)m/z:1443(M+H)$^+$.

[2057] 实施例30:药物连接子28

[2058] 

[2059] 工序1:N－{[(1R,8S)－双环[6.1.0]壬－4－炔－9－基甲氧基]羰基}甘氨酰甘氨酸

[2060] 在起始物质30－1(0.215g,0.682mmol,Chemistry－A European Journal 2016,22,639)的N,N－二甲基甲酰胺(4mL)溶液中,加入N,N－二异丙基乙胺(0.119mL,0.682mmol)、甘氨酰甘氨酸(0.0900g,0.682mmol)以及水(2mL),在室温下搅拌一晚。将反应液减压蒸馏除去,将得到的残渣用硅胶柱色谱法[氯仿:CMW＝100:0(v/v)～0:100(v/v)]进行精制,得到目标产物(0.205g,98%)。

[2061] MS(APCI,ESI)m/z:309(M+H)$^+$.

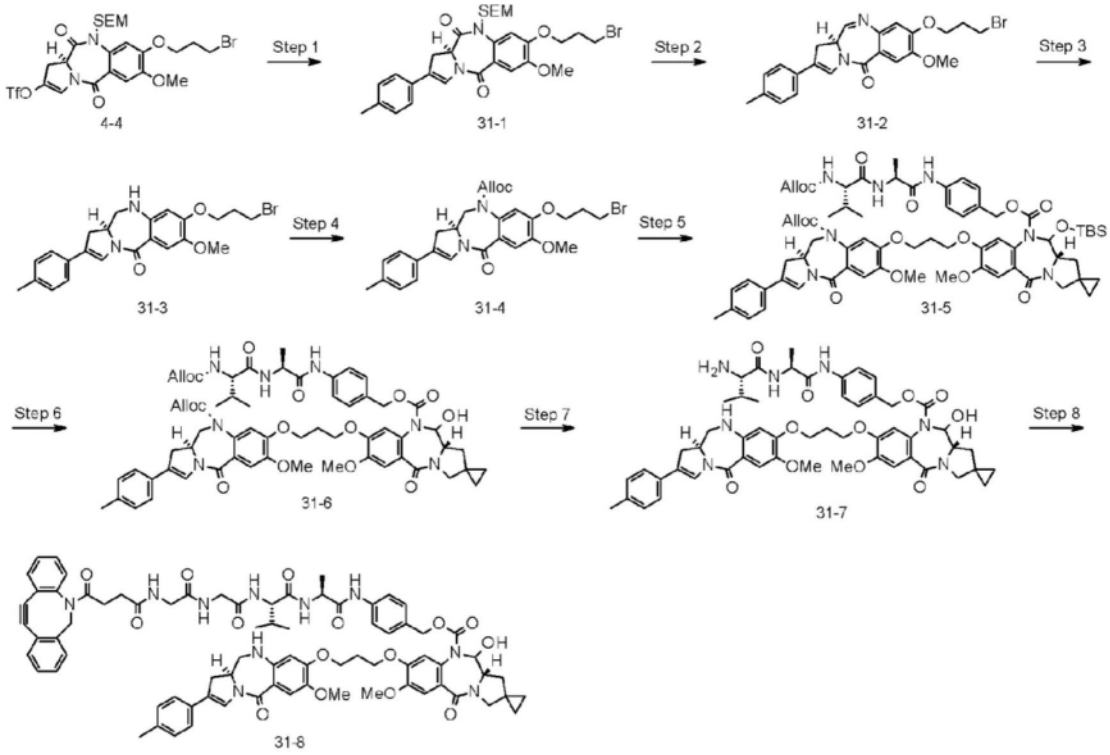
[2062] 工序2:N－{[(1R,8S)－双环[6.1.0]壬－4－炔－9－基甲氧基]羰基}甘氨酰甘氨酰基－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－[(5－{[(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}戊基)氧基]－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[2063] 使上述工序1所得到的化合物(0.0180g,0.0587mmol)与实施例3工序13同样地反应,得到目标产物(0.0420g,60%)。

[2064] ^{1}H-NMR(DMSO-D_6)δ:9.93(1H,s),8.25(1H,m),8.05(1H,s),7.85(1H,m),7.60-7.54(2H,m),7.45(1H,s),7.39-7.37(3H,m),7.29(1H,s),7.20(1H,m),7.04(1H,s),6.91(2H,m),6.72(1H,s),6.56-6.53(2H,m),6.31(1H,s),5.76-5.74(1H,m),5.19(1H,m),4.80(1H,m),4.38-4.36(1H,m),4.23-4.21(2H,m),4.04(2H,m),3.95-3.92(3H,m),3.78-3.76(9H,m),3.66(3H,s),3.60(2H,m),3.55-3.52(2H,m),3.45-3.38(2H,m),3.26-3.23(1H,m),3.14(1H,m),2.77-2.74(1H,m),2.35-2.33(1H,m),2.20-2.11(6H,m),1.99-1.96(1H,m),1.81-1.78(4H,m),1.56-1.54(5H,m),1.29-1.26(4H,m),0.87-0.82(9H,m),0.67-0.62(4H,m).

[2065] MS(APCI,ESI)m/z:1320(M+H)$^+$.

[2066] 实施例31:药物连接子29

[2067] 

[2068] 工序1:化合物31－1

[2069] 使实施例4工序4所得到的化合物(1.00g,1.52mmol)和4－甲基苯基硼酸(0.309g,2.27mmol)与实施例3工序6同样地反应,得到目标产物(0.653g,72%)。

[2070] 工序2:化合物31－2

[2071] 使上述工序1所得到的化合物(0.653g,1.09mmol)与实施例3工序7同样地反应,得到目标产物(0.377g,76%)。

[2072] MS(APCI,ESI)m/z:457[^{81}Br,$(M+H)^+$],455[^{79}Br,$(M+H)^+$].

[2073] 工序3:化合物31－3

[2074] 使上述工序2所得到的化合物(0.377g,0.828mmol)与实施例3工序8同样地反应,得到目标产物(0.311g,82%)。

[2075] MS(APCI,ESI)m/z:459[^{81}Br,$(M+H)^+$],457[^{79}Br,$(M+H)^+$].

[2076] 工序4:化合物31－4

[2077] 使上述工序3所得到的化合物(0.311g,0.68mmol)与实施例3工序9同样地反应,得到目标产物(0.320g,87%)。

[2078] MS(APCI,ESI)m/z:543[^{81}Br,$(M+H)^+$],541[^{79}Br,$(M+H)^+$].

[2079] 工序5:化合物31－5

[2080] 使上述工序4所得到的化合物(0.0737g,0.136mmol)与实施例3工序10同样地反应,得到目标产物(0.145g,92%)。

[2081] MS(APCI,ESI)m/z:1272$(M+H)^+$.

[2082] 工序6:化合物31－6

[2083] 使上述工序5所得到的化合物(0.145g,0.114mmol)与实施例3工序11同样地反应,得到目标产物(0.122g,93%)。

[2084] MS(APCI,ESI)m/z:1158$(M+H)^+$.

[2085] 工序7:化合物31－7

[2086] 使上述工序6所得到的化合物(0.122g,0.114mmol)与实施例3工序12同样地反应,得到目标产物(0.0598g,53%)。

[2087] MS(APCI,ESI)m/z:990$(M+H)^+$.

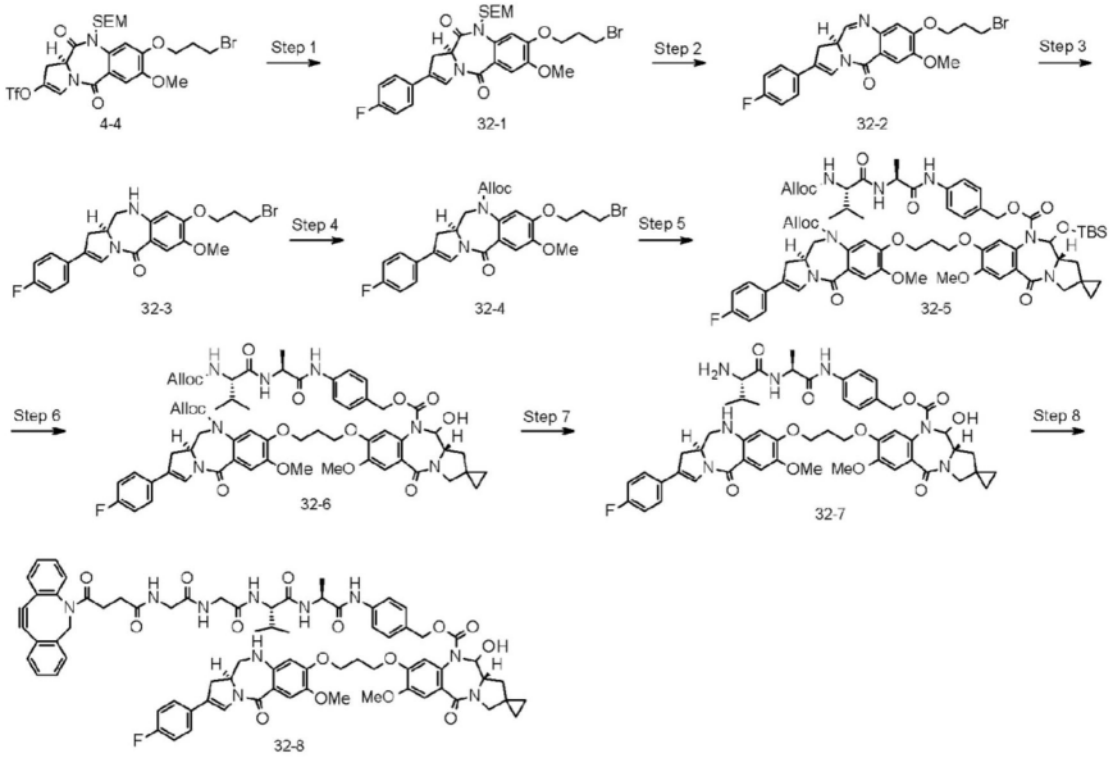
[2088] 工序8:N－[4－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]甘氨酰甘氨酰基－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－(3－{[(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}丙氧基)－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[2089] 使上述工序7所得到的化合物(0.0300g,0.0304mmol)与实施例3工序13同样地反应,得到目标产物(0.0184g,44%)。

[2090] MS(APCI,ESI)m/z:1391$(M+H)^+$.

[2091] 实施例32:药物连接子30

[2092]



[2093] 工序1:化合物32－1

[2094] 使实施例4工序4所得到的化合物(1.00g,1.52mmol)和4－氟苯基硼酸(0.318g,2.27mmol)与实施例3工序6同样地反应,得到目标产物(0.623g,68%)。

[2095] 工序2:化合物32－2

[2096] 使上述工序1所得到的化合物(0.623g,1.03mmol)与实施例3工序7同样地反应,得到目标产物(0.244g,52%)。

[2097] MS(APCI,ESI)m/z:461[^{81}Br,$(M+H)^+$],459[^{79}Br,$(M+H)^+$].

[2098] 工序3:化合物32－3

[2099] 使上述工序2所得到的化合物(0.244g,0.531mmol)与实施例3工序8同样地反应,

得到目标产物(0.144g,59%)。

[2100] MS(APCI,ESI)m/z:463[^{81}Br,(M+H)$^{+}$],461[^{79}Br,(M+H)$^{+}$].

[2101] 工序4:化合物32－4

[2102] 使上述工序3所得到的化合物(0.144g,0.312mmol)与实施例3工序9同样地反应,得到目标产物(0.139g,82%)。

[2103] MS(APCI,ESI)m/z:547[^{81}Br,(M+H)$^{+}$],545[^{79}Br,(M+H)$^{+}$].

[2104] 工序5:化合物32－5

[2105] 使上述工序4所得到的化合物(0.0742g,0.136mmol)与实施例3工序10同样地反应,得到目标产物(0.138g,88%)。

[2106] MS(APCI,ESI)m/z:1284(M+H)$^{+}$.

[2107] 工序6:化合物32－6

[2108] 使上述工序5所得到的化合物(0.138g,0.108mmol)与实施例3工序11同样地反应,得到目标产物(0.109g,87%)。

[2109] MS(APCI,ESI)m/z:1170(M+H)$^{+}$.

[2110] 工序7:化合物32－7

[2111] 使上述工序6所得到的化合物(0.109g,0.101mmol)与实施例3工序12同样地反应,得到目标产物(0.0613g,61%)。

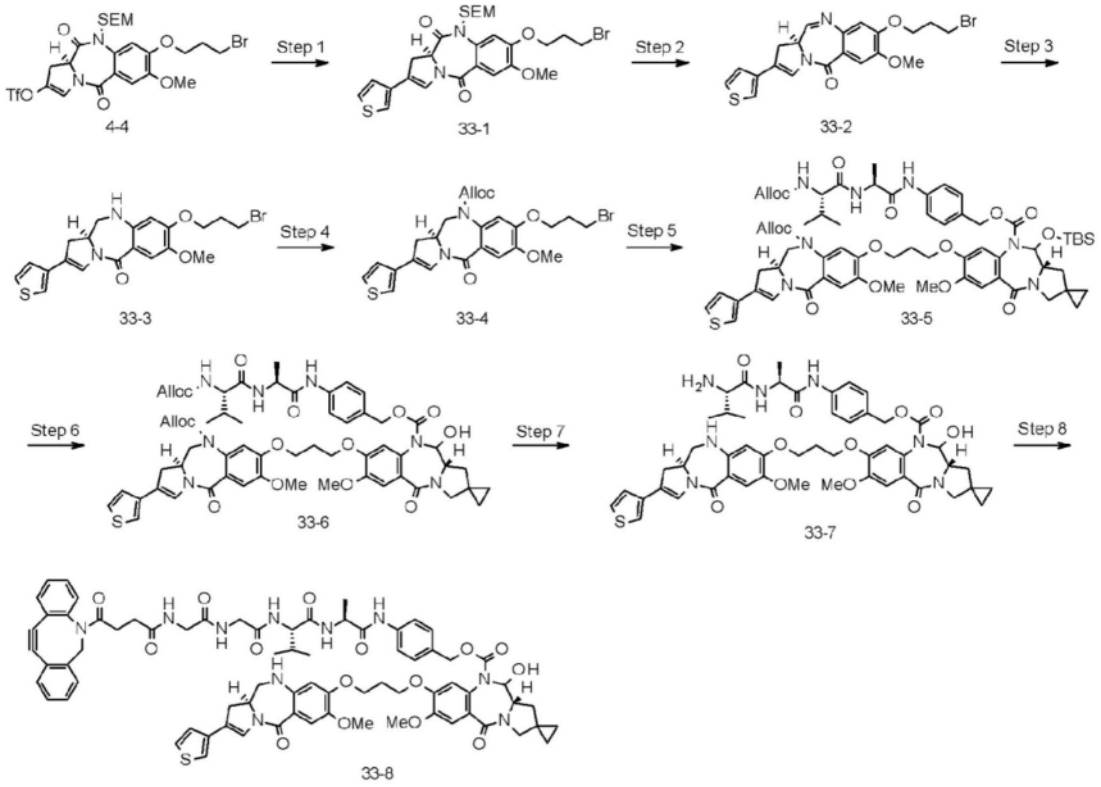
[2112] MS(APCI,ESI)m/z:1002(M+H)$^{+}$.

[2113] 工序8:N－[4－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]甘氨酰甘氨酰基－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－8'－(3－{[(11aS)－2－(4－氟苯基)－7－甲氧基－5－氧代－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}丙氧基)－11'－羟基－7'－甲氧基－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[2114] 使上述工序7所得到的化合物(0.0300g,0.0333mmol)与实施例3工序13同样地反应,得到目标产物(0.0191g,45%)。

[2115] MS(APCI,ESI)m/z:1402(M+H)$^{+}$.

[2116] 实施例33:药物连接子31

[2117] 

[2118] 工序1:化合物33－1

[2119] 使用实施例4工序4所得到的化合物(1.00g,1.52mmol)和噻吩－3－硼酸(0.582g,4.55mmol),与实施例3工序6同样地反应,得到目标产物(0.611g,68%)。

[2120] 工序2:化合物33－2

[2121] 使用上述工序1所得到的化合物(0.611g,1.03mmol),与实施例3工序7同样地反应,得到目标产物(0.397g,86%)。

[2122] MS(APCI,ESI)m/z:449[^{81}Br,$(M+H)^+$],447[^{79}Br,$(M+H)^+$].

[2123] 工序3:化合物33－3

[2124] 使用上述工序2所得到的化合物(0.397g,0.887mmol),与实施例3工序8同样地反应,得到目标产物(0.341g,86%)。

[2125] MS(APCI,ESI)m/z:451[^{81}Br,$(M+H)^+$],449[^{79}Br,$(M+H)^+$].

[2126] 工序4:化合物33－4

[2127] 使用上述工序3所得到的化合物(0.341g,0.759mmol),与实施例3工序9同样地反应,得到目标产物(0.368g,91%)。

[2128] MS(APCI,ESI)m/z:535[^{81}Br,$(M+H)^+$],533[^{79}Br,$(M+H)^+$].

[2129] 工序5:化合物33－5

[2130] 使用上述工序4所得到的化合物(0.0726g,0.136mmol),与实施例3工序10同样地反应,得到目标产物(0.125g,80%)。

[2131] MS(APCI,ESI)m/z:1260$(M+H)^+$.

[2132] 工序6:化合物33－6

[2133] 使用上述工序5所得到的化合物(0.125g,0.0992mmol),与实施例3工序11同样地反应,得到目标产物(0.109g,96%)。

[2134] MS(APCI,ESI)m/z:1146(M+H)$^+$.

[2135] 工序7:化合物33－7

[2136] 使用上述工序6所得到的化合物(0.109g,0.0951mmol),与实施例3工序12同样地反应,得到目标产物(0.0723g,78%)。

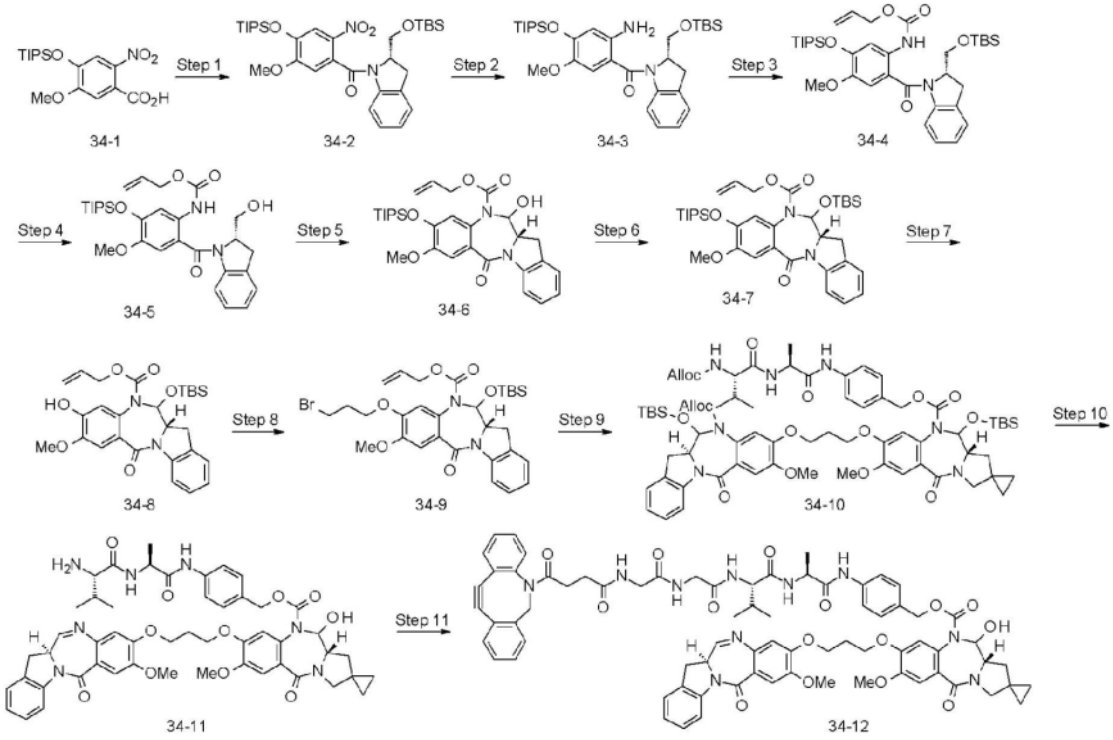
[2137] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:9.13-9.04(1H,m),7.89-7.87(1H,m),7.47-7.42(4H,m),7.27-7.23(3H,m),7.18(1H,s),7.12-7.08(2H,m),6.97-6.96(1H,m),6.42-6.37(1H,m),6.08-6.04(1H,m),5.86-5.84(1H,m),5.34-5.31(1H,m),4.65-4.58(3H,m),4.23-3.95(5H,m),3.85(3H,s),3.75-3.69(6H,m),3.57-3.47(3H,m),3.34-3.29(3H,m),2.72-2.68(1H,m),2.38-2.29(2H,m),2.15-2.14(2H,m),1.72-1.69(1H,m),1.40-1.38(3H,m),0.96-0.95(3H,m),0.80-0.61(7H,m).

[2138] 工序8:N－[4－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]甘氨酰甘氨酰基－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－(3－{[(11aS)－7－甲氧基－5－氧代－2－(噻吩－3－基)－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}丙氧基)－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[2139] 使用上述工序7所得到的化合物(0.0300g,0.0307mmol),与实施例3工序13同样地反应,得到目标产物(0.0101g,24%)。

[2140] MS(APCI,ESI)m/z:1379(M+H)$^+$.

[2141] 实施例34:药物连接子32

[2142] 

[2143] 工序1:化合物34－2

[2144] 在起始物质34－1(4.00g,10.8mmol,US20150283262)的二氯甲烷(100mL)溶液中,在0℃下加入N,N－二甲基甲酰胺(0.2mL)、草酰氯(2.75g,21.7mmol),在室温下搅拌30分

钟。将溶剂减压蒸馏除去后，将残渣在减压下干燥，溶解于二氯甲烷(60mL)中。在0℃下加入(2S)－2－({[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}甲基)－2,3－二氢－1H－吲哚(4.28g,16.2mmol,Journal of the American Chemical Society 2006,128,14264)、三乙胺(1.64g,16.2mmol)，在室温下搅拌15分钟。在反应溶液中加入水，用二氯甲烷进行提取。将得到的有机层用饱和盐水进行清洗，用硫酸镁干燥后，减压蒸馏除去。将得到的残渣用硅胶柱色谱法[己烷:乙酸乙酯＝100:0(v/v)～80:20(v/v)]进行精制，得到目标产物(6.10g,92%)。

[2145] MS(APCI,ESI)m/z:615$(M+H)^+$

[2146] 工序2:化合物34－3

[2147] 在上述工序1所得到的化合物(6.10g,9.90mmol)的乙醇(100mL)溶液中，在氮气氛下加入5%钯碳(54%水分,1.00g)后，将反应溶液在氢气氛下、在室温下搅拌4小时。将反应溶液进行硅藻土过滤后，将滤液减压蒸馏除去，得到目标产物(5.80g,定量)。

[2148] MS(APCI,ESI)m/z:585$(M+H)^+$

[2149] 工序3:化合物34－4

[2150] 使上述工序2所得到的化合物(2.90g,5.00mmol)与实施例3工序9同样地反应，得到目标产物(3.20g,96%)。

[2151] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.26(1H,s),7.78(1H,s),7.18-7.17(1H,m),6.94-6.83(3H,m),5.94-5.90(1H,m),5.35-5.19(2H,m),4.74(1H,m),4.65-4.60(2H,m),3.76-3.61(6H,m),3.31-3.27(1H,m),3.10(1H,m),1.35-1.17(3H,m),1.10(18H,m),0.79-0.70(9H,m),-0.03(3H,s),-0.08(3H,s).

[2152] 工序4:化合物34－5

[2153] 使上述工序3所得到的化合物(3.20g,4.80mmol)与实施例1工序7同样地反应，得到目标产物(2.32g,87%)。

[2154] MS(APCI,ESI)m/z:555$(M+H)^+$

[2155] 工序5:化合物34－6

[2156] 使上述工序4所得到的化合物(2.32g,4.18mmol)与实施例1工序8同样地反应，得到目标产物(1.68g,73%)。

[2157] MS(APCI,ESI)m/z:553$(M+H)^+$

[2158] 工序6:化合物34－7

[2159] 使上述工序5所得到的化合物(1.68g,3.04mmol)与实施例1工序9同样地反应，得到目标产物(2.32g,定量)。

[2160] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.16(1H,m),7.28-7.20(3H,m),7.09-7.07(1H,m),6.70(1H,s),5.80-5.76(2H,m),5.14-5.12(2H,m),4.60(1H,m),4.37(1H,m),4.01-3.99(1H,m),3.87(3H,s),3.45-3.41(1H,m),2.99-2.95(1H,m),1.28-1.23(3H,m),1.10-1.07(18H,m),0.92(9H,s),0.26(3H,s),0.19(3H,s).

[2161] 工序7:化合物34－8

[2162] 使上述工序6所得到的化合物(2.32g,3.48mmol)与实施例1工序10同样地反应，得到目标产物(1.42g,80%)。

[2163] MS(APCI,ESI)m/z:511$(M+H)^+$

[2164] 工序8:化合物34－9

[2165] 使上述工序7所得到的化合物(0.720g,1.41mmol)与实施例4工序1同样地反应,得到目标产物(0.580g,65%)。

[2166] MS(APCI,ESI)m/z:633[^{81}Br,$(M+H)^+$],631[^{79}Br,$(M+H)^+$].

[2167] 工序9:化合物34－10

[2168] 使上述工序8所得到的化合物(0.235g,0.371mmol)与实施例3工序10同样地反应,得到目标产物(0.347g,83%)。

[2169] MS(APCI,ESI)m/z:1359$(M+H)^+$

[2170] 工序10:化合物34－11

[2171] 使上述工序9所得到的化合物(0.347g,0.255mmol)与实施例3工序11同样地反应,得到硅烷基脱保护体(0.265g,92%)。使硅烷基脱保护体(0.265g,0.234mmol)与实施例1工序12同样地反应,得到目标产物(0.086g,39%)。

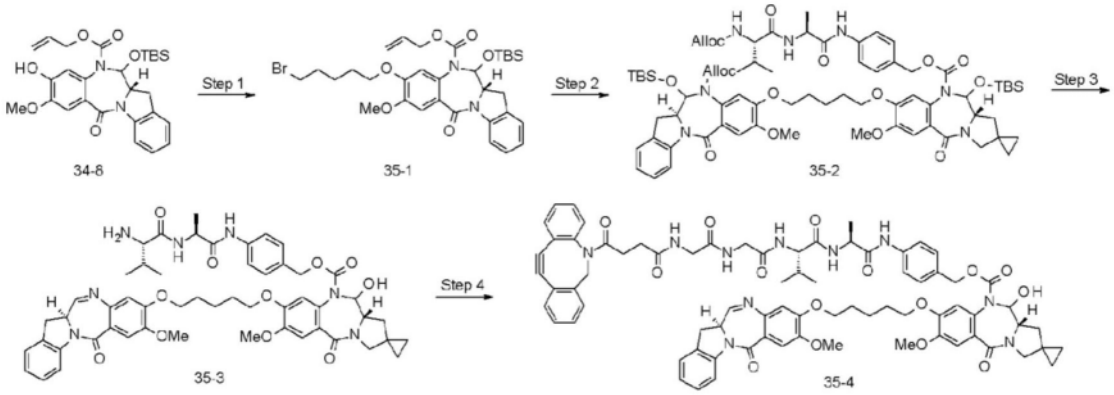
[2172] MS(APCI,ESI)m/z:944$(M+H)^+$

[2173] 工序11:N－[4－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]甘氨酰甘氨酰基－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－(3－{[(5aS)－10－甲氧基－12－氧代－5a,12－二氢－5H－吲哚并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－9－基]氧基}丙氧基)－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[2174] 使上述工序10所得到的化合物(0.0860g,0.0911mmol)与实施例3工序13同样地反应,得到目标产物(0.0800g,65%)。

[2175] MS(APCI,ESI)m/z:1345$(M+H)^+$

[2176] 实施例35:药物连接子33

[2177] 

[2178] 工序1:化合物35－1

[2179] 使实施例34工序7所得到的化合物(0.700g,1.37mmol)与实施例3工序2同样地反应,得到目标产物(0.790g,87%)。

[2180] MS(APCI,ESI)m/z:661[^{81}Br,$(M+H)^+$],659[^{79}Br,$(M+H)^+$].

[2181] 工序2:化合物35－2

[2182] 使上述工序1所得到的化合物(0.245g,0.371mmol)与实施例3工序10同样地反应,得到目标产物(0.368g,86%)。

[2183] MS(APCI,ESI)m/z:1387(M+H)$^+$

[2184] 工序3:化合物35－3

[2185] 使上述工序2所得到的化合物(0.368g,0.265mmol)与实施例3工序11,12同样地反应,得到目标产物(0.180g,81％)。

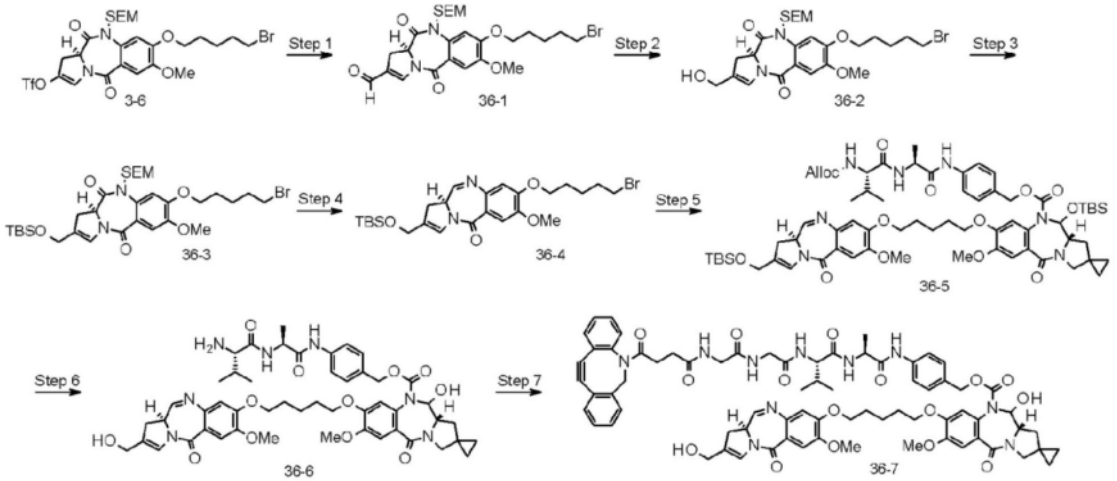
[2186] MS(APCI,ESI)m/z:972(M+H)$^+$

[2187] 工序4:N－[4－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]甘氨酰甘氨酰基－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－[(5－{[(5aS)－10－甲氧基－12－氧代－5a,12－二氢－5H－吲哚并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－9－基]氧基}戊基)氧基]－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[2188] 使上述工序3所得到的化合物(0.0700g,0.0720mmol)与实施例3工序13同样地反应,得到目标产物(0.0440g,44％)。

[2189] MS(APCI,ESI)m/z:1373(M+H)$^+$

[2190] 实施例36:药物连接子34

[2191] 

[2192] 工序1:(11aS)－8－[(5－溴代戊基)氧基]－7－甲氧基－5,11－二氧代－10－{[2－(三甲基硅烷基)乙氧基]甲基}－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－2－甲醛

[2193] 将实施例3工序5所得到的化合物(3.54g,5.15mmol)溶解于N,N－二甲基甲酰胺(52mL)中,加入N－甲酰基糖精(5.44g,25.7mmol)、醋酸钯(0.0578g,0.257mmol)、1,4－双(二苯基膦)丁烷(0.154g,0.360mmol)、碳酸钠(2.73g,25.7mmol)、三乙基硅烷(1.20g,10.3mmol),在室温下搅拌19小时。在反应溶液中加入水,将反应溶液用乙酸乙酯提取,用水、饱和盐水进行清洗。将有机层用硫酸镁干燥后,减压蒸馏除去。将得到的残渣用硅胶柱色谱法[己烷:乙酸乙酯＝100:0(v/v)～40:60(v/v)]进行精制,得到目标产物(0.760g,26％)。

[2194] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:9.74(1H,s),7.79(1H,s),7.32(1H,s),7.24(1H,s),5.54(1H,m),4.76-4.69(2H,m),4.07-4.05(2H,m),3.93(3H,s),3.83-3.65(3H,m),3.45(2H,m),3.02-2.98(1H,m),1.95-1.91(4H,m),1.69-1.58(2H,m),1.02-0.92(2H,m),0.06-0.03(9H,m).

[2195] 工序2:(11aS)－8－[(5－溴代戊基)氧基]－2－(羟甲基)－7－甲氧基－10－

{[2－(三甲基硅烷基)乙氧基]甲基}－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－5,11(10H,11aH)－二酮

[2196] 使上述工序1所得到的化合物(0.760g,1.34mmol)溶解于二氯甲烷(14mL)中,－78℃下加入硼氢化钠(0.101g,2.68mmol)后,升温至室温。在反应溶液中加入1当量浓度盐酸,用水、饱和盐水清洗有机层。将有机层用硫酸镁干燥后减压蒸馏除去。将得到的残渣用硅胶柱色谱法[己烷:乙酸乙酯＝100:0(v/v)～0:100(v/v)]进行精制,得到目标产物(0.432g,57%)。

[2197] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.35(1H,s),7.23(1H,s),6.93(1H,s),5.53(1H,m),4.67(1H,m),4.57-4.54(1H,m),4.32-4.31(2H,m),4.10-4.01(2H,m),3.92(3H,s),3.83-3.57(3H,m),3.45(2H,m),2.90-2.88(1H,m),1.99-1.88(4H,m),1.69-1.61(2H,m),1.00-0.98(2H,m),0.03(9H,s)

[2198] MS(APCI,ESI)m/z:571[^{81}Br,$(M+H)^+$],569[^{79}Br,$(M+H)^+$].

[2199] 工序3:(11aS)－8－[(5－溴代戊基)氧基]－2－({[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}甲基)－7－甲氧基－10－{[2－(三甲基硅烷基)乙氧基]甲基}－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－5,11(10H,11aH)－二酮

[2200] 使上述工序2所得到的化合物(0.432g,0.758mmol)溶解于N,N－二甲基甲酰胺(8mL)中,在室温下加入咪唑(0.0775g,1.14mmol)、叔丁基二甲基氯硅烷(0.137g,0.910mmol),在室温下搅拌10分钟。在反应溶液中加入水,将反应溶液用乙酸乙酯提取。将有机层用水、饱和盐水清洗,用硫酸镁进行干燥。减压蒸馏除去后,将得到的残渣用硅胶柱色谱法[己烷:乙酸乙酯＝100:0(v/v)～30:70(v/v)]进行精制,得到目标产物(0.485g,94%)。

[2201] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.35(1H,s),7.22(1H,s),6.87(1H,m),5.53(1H,m),4.68(1H,m),4.54-4.52(1H,m),4.33-4.28(2H,m),4.11-4.00(2H,m),3.92(3H,s),3.80-3.78(1H,m),3.69-3.66(1H,m),3.52-3.50(1H,m),3.45(2H,m),2.86-2.82(1H,m),1.99-1.87(4H,m),1.68-1.60(2H,m),1.00-0.98(2H,m),0.91(9H,s),0.09(6H,m),0.04(9H,s).

[2202] MS(APCI,ESI)m/z:685[^{81}Br,$(M+H)^+$],683[^{79}Br,$(M+H)^+$].

[2203] 工序4:(11aS)－8－[(5－溴代戊基)氧基]－2－({[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}甲基)－7－甲氧基－1,11a－二氢－5H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－5－酮

[2204] 使上述工序3所得到的化合物(0.103g,0.151mmol)与实施例3工序7同样地反应,得到目标产物(0.0590g,73%)。

[2205] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.83(1H,m),7.51(1H,s),6.92(1H,m),6.79(1H,s),4.32-4.30(3H,m),4.12-4.04(2H,m),3.93(3H,s),3.86-3.84(1H,m),3.46-3.39(2H,m),3.26-3.23(1H,m),3.07-3.03(1H,m),1.97-1.85(4H,m),1.68-1.63(2H,m),0.92(9H,s),0.09(6H,s).

[2206] MS(APCI,ESI)m/z:539[^{81}Br,$(M+H)^+$],537[^{79}Br,$(M+H)^+$].

[2207] 工序5:N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－{[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}－8'－[(5－{[(11aS)－2－({[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}甲基)－7－甲氧基－5－氧代－5,11a－二氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}戊基)氧基]－7'－甲氧基－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧

基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[2208] 使上述工序4所得到的化合物(0.251g,0.467mmol)与实施例3工序10同样地反应,得到目标产物(0.300g,51％)。

[2209] 工序6:L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－8'－[(5－{[(11aS)－2－(羟甲基)－7－甲氧基－5－氧代－5,11a－二氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}戊基)氧基]－7'－甲氧基－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[2210] 使上述工序5所得到的化合物(0.300g,0.237mmol)与实施例33工序11,12同样地反应,得到目标产物(0.0540g,53％)。

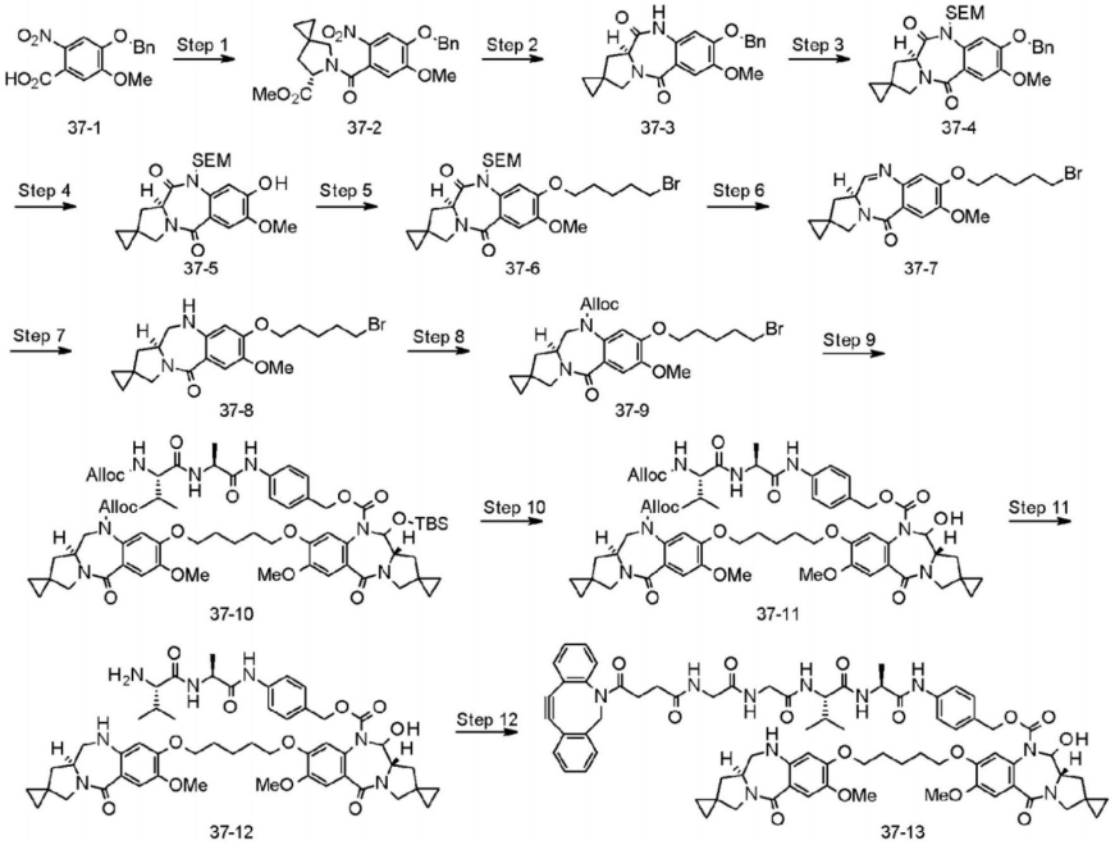
[2211] MS(APCI,ESI)m/z:952$(M+H)^+$

[2212] 工序7:N－[4－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]甘氨酰甘氨酰基－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－8'－[(5－{[(11aS)－2－(羟甲基)－7－甲氧基－5－氧代－5,11a－二氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}戊基)氧基]－7'－甲氧基－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[2213] 使上述工序6所得到的化合物(0.0500mg,0.0525mmol)与实施例3工序13同样地反应,得到目标产物(0.0340mg,48％)。

[2214] MS(APCI,ESI)m/z:1351$(M-H)^-$

[2215] 实施例37:药物连接子35

[2216] 

[2217] 工序1:(6S)－5－[4－(苄氧基)－5－甲氧基－2－硝基苯甲酰基]－5－氮杂螺[2.4]庚烷－6－羧酸甲酯

[2218] 在4－(苄氧基)－5－甲氧基－2－硝基苯甲酸(6.07g,20.0mmol,Tetrahedron1995,51,5617)、N,N－二甲基甲酰胺(1.08mL,13.9mmol)的二氯甲烷(100mL)溶液中,冰冷却下花5分钟滴入草酰氯(3.43mL,40.0mmol)。在室温下,搅拌反应溶液5小时后,减压蒸馏除去,将得到的残渣溶解于二氯甲烷(20mL)中,减压蒸馏除去。将该操作重复3次以后,使残渣悬浮于二氯甲烷(5mL)中,向其中加入过量的二乙醚和己烷,过滤,在减压下干燥得到粗制酰氯。将得到的酰氯溶解于二氯甲烷中,冷却至－40℃(干冰－乙腈浴),缓慢加入(6S)－5－氮杂螺[2.4]庚烷－6－羧酸甲酯盐酸盐(4.22g,22.0mmol,Tetrahedron Letters 2012.53.3847)、三乙胺(3.36mL,24.2mmol)。利用一晚上的时间将反应混合物升温至室温。在反应混合物中加入1当量浓度盐酸,用二氯甲烷提取反应混合物。将有机层用水、饱和碳酸氢钠水溶液以及饱和盐水清洗,用无水硫酸钠进行干燥。减压蒸馏除去,将得到的残渣用硅胶柱色谱法[己烷:乙酸乙酯＝100:0～50:50]进行精制,得到目标产物(6.55g,80%)。

[2219] MS(APCI,ESI)m/z:441$(M+H)^+$

[2220] 工序2:(11a'S)－8'－(苄氧基)－7'－甲氧基－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－5',11'(10'H,11a'H)－二酮在上述工序1所得到的化合物(6.55g,16.0mmol)的乙醇(150mL),THF(150mL)溶液中,在氮气氛下加入雷尼镍(7.00g)。在反应混合物中加入肼一水合物(7mL),缓慢升温至50℃。在50℃下搅拌2小时后加入雷尼镍(3.00g)、肼一水合物(3mL),并搅拌1小时。在反应混合物中加入THF(100mL),进行硅藻土过滤。减压蒸馏除去,将得到的残渣用硅胶柱色谱法[己烷:乙酸乙酯＝100:0(v/v)～25:75(v/v)]进行精制,得到目标产物(4.42g,73%)。

[2221] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.82(1H,s),7.48(1H,s),7.42-7.35(4H,m),7.32-7.31(1H,m),6.44(1H,s),5.16(2H,s),4.16-4.10(1H,m),3.93(3H,s),3.78-3.76(1H,m),3.39-3.37(1H,m),2.45-2.43(1H,m),2.24-2.21(1H,m),0.83-0.61(4H,m).

[2222] MS(APCI,ESI)m/z:379$(M+H)^+$

[2223] 工序3:(11a'S)－8'－(苄氧基)－7'－甲氧基－10'－{[2－(三甲基硅烷基)乙氧基]甲基}－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－5',11'(10'H,11a'H)－二酮

[2224] 在上述工序2所得到的化合物(10.0g,26.4mmol)的THF(150mL)溶液中,在－40℃下缓慢滴入2.6mol/L的正丁基锂正己烷溶液(12.0mL,31.8mmol)。将反应溶液在－40℃下搅拌15分钟后,缓慢滴入2－(氯甲氧基)乙基三甲基硅烷(5.57mL,31.7mmol)。将反应溶液在室温下搅拌3小时后,加入水,用乙酸乙酯提取。将有机层用水以及饱和盐水清洗,用无水硫酸钠进行干燥。减压蒸馏除去,将得到的残渣用硅胶柱色谱法[己烷:乙酸乙酯＝100:0(v/v)～30:70(v/v)]进行精制,得到目标产物(11.8g,88%)。

[2225] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.45-7.44(2H,m),7.37-7.32(4H,m),7.28(1H,s),5.48-5.46(1H,m),5.21(2H,s),4.50-4.48(1H,m),4.22-4.20(1H,m),3.95(3H,s),3.73-3.70(2H,m),3.62-3.60(1H,m),3.41-3.38(1H,m),2.45-2.43(1H,m),2.23-2.20(1H,m),0.98-0.96(2H,m),0.83-0.68(4H,m),0.04(9H,s).

[2226] MS(APCI,ESI)m/z:509(M+H)$^+$

[2227] 工序4:(11a'S)－8'－羟基－7'－甲氧基－10'－{[2－(三甲基硅烷基)乙氧基]甲基}－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－5',11'(10'H,11a'H)－二酮

[2228] 在上述工序3所得到的化合物(18.7g,36.8mmol)的THF(50mL)、乙醇(100mL)溶液中,在氮气氛下加入5％的钯碳催化剂(5.00g)。立即用氢气球替换氮气球,将反应混合物在氢气氛下下搅拌6小时。在反应混合物中加入氯仿进行稀释,硅藻土过滤后,将滤液减压蒸馏除去,将得到的残渣用硅胶柱色谱法[己烷:乙酸乙酯＝100:0(v/v)～25:75(v/v)]进行精制,得到目标产物(15.1g,98％)。

[2229] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.38(1H,s),7.28(1H,s),6.01(1H,s),5.49-5.47(1H,m),4.70-4.68(1H,m),4.24-4.22(1H,m),3.96(3H,s),3.76-3.71(2H,m),3.66-3.64(1H,m),3.42-3.39(1H,m),2.47-2.45(1H,m),2.23-2.21(1H,m),1.01-0.99(2H,m),0.89-0.63(4H,m),0.03(9H,s).

[2230] MS(APCI,ESI)m/z:419(M+H)$^+$

[2231] 工序5:(11a'S)－8'－[(5－溴代戊基)氧基]－7'－甲氧基－10'－{[2－(三甲基硅烷基)乙氧基]甲基}－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－5',11'(10'H,11a'H)－二酮

[2232] 使上述工序4所得到的化合物(2.77g,6.62mmol)与实施例3工序2同样地反应,得到目标产物(3.31g,88％)。

[2233] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.36(1H,s),7.25(1H,s),5.55(1H,m),4.65(1H,m),4.24-4.23(1H,m),4.11-4.03(2H,m),3.93(3H,s),3.85-3.78(1H,m),3.72-3.69(2H,m),3.46-3.39(3H,m),2.47-2.44(1H,m),2.25-2.22(1H,m),1.95-1.91(4H,m),1.67-1.59(1H,m),1.03-0.95(2H,m),0.90-0.85(1H,m),0.70-0.66(4H,m),0.05(9H,s).

[2234] 工序6:(11a'S)－8'－[(5－溴代戊基)氧基]－7'－甲氧基－1',11a'－二氢－5'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－5'－酮

[2235] 使上述工序5所得到的化合物(3.31g,5.83mmol)与实施例3工序7同样地反应,得到目标产物(1.11g,45％)。

[2236] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.81(1H,m),7.53(1H,s),6.82(1H,s),4.13-4.06(2H,m),3.97(3H,s),3.88-3.83(1H,m),3.69(1H,m),3.52-3.39(3H,m),2.55-2.52(1H,m),2.06-1.89(5H,m),1.67-1.63(2H,m),0.76-0.72(4H,m).

[2237] 工序7:(11a'S)－8'－[(5－溴代戊基)氧基]－7'－甲氧基－1',10',11',11a'－四氢－5'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－5'－酮

[2238] 使上述工序6所得到的化合物(2.56g,6.08mmol)与实施例3工序8同样地反应,得到目标产物(1.15g,45％)。

[2239] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.60(1H,s),6.07(1H,s),4.11-4.04(1H,m),3.99(2H,m),3.87-3.84(1H,m),3.85(3H,s),3.73(1H,m),3.58-3.53(2H,m),3.47-3.42(3H,m),2.03-1.78(6H,m),1.65-1.63(2H,m),0.77-0.56(4H,m).

[2240] 工序8:(11a'S)－8'－[(5－溴代戊基)氧基]－7'－甲氧基－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'

H)－羧酸丙－2－烯－1－基酯

[2241] 使上述工序7所得到的化合物(1.15g,2.72mmol)与实施例3工序9同样地反应,得到目标产物(1.14g,82%)。

[2242] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.23(1H,s),6.69(1H,s),5.79(1H,s),5.13-5.10(2H,m),4.68-4.66(1H,m),4.48-4.45(2H,m),4.01(2H,m),3.92(3H,s),3.76(1H,m),3.54-3.37(3H,m),2.39(1H,m),1.95-1.90(4H,m),1.68-1.61(3H,m),1.44(1H,m),0.75-0.66(4H,m).

[2243] 工序9:N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－{[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}－7'－甲氧基－8'－{[5－({(11a'S)－7'－甲氧基－5'－氧代－10'－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－5',10',11',11a'－四氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－8'－基}氧基)戊基]氧基}－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[2244] 使上述工序8所得到的化合物(0.374g,0.737mmol)与实施例3工序10同样地反应,得到目标产物(0.589g,65%)。

[2245] MS(APCI,ESI)m/z:1234$(M+H)^+$

[2246] 工序10:N－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－{[5－({(11a'S)－7'－甲氧基－5'－氧代－10'－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－5',10',11',11a'－四氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－8'－基}氧基)戊基]氧基}－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[2247] 使上述工序5所得到的化合物(0.589g,0.477mmol)与实施例3工序11同样地反应,得到目标产物(0.382g,71%)。

[2248] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.90(1H,s),7.55(2H,m),7.25-7.21(2H,m),6.74(2H,m),6.38(1H,s),5.90-5.87(5H,m),5.33-5.09(8H,m),4.66-4.60(8H,m),3.98-3.91(10H,m),3.77-3.30(12H,m),2.42-2.36(2H,m),1.77-1.39(6H,m),0.91-0.70(14H,m).

[2249] 工序11:L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－[(5－{[(11a'S)－7'－甲氧基－5'－氧代－5',10',11',11a'－四氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－8'－基]氧基}戊基)氧基]－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[2250] 使上述工序10所得到的化合物(0.382g,0.341mmol)与实施例3工序12同样地反应,得到目标产物(0.200g,62%)。

[2251] MS(APCI,ESI)m/z:952$(M+H)^+$

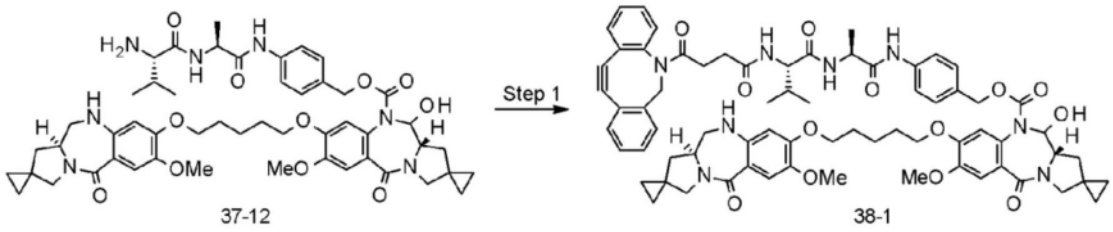
[2252] 工序12:N－[4－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]甘氨酰甘氨酰基－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－[(5－{[(11a'S)－7'－甲氧基－5'－氧代－5',10',11',11a'－四氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－8'－基]氧基}戊基)氧基]－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂

卓]－10’(5’H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[2253] 使上述工序11所得到的化合物(0.0560g,0.0588mmol)与实施例3工序13同样地反应,得到目标产物(0.0500g,63%)。

[2254] MS(APCI,ESI)m/z:1354(M+H)$^+$

[2255] 实施例38:药物连接子36

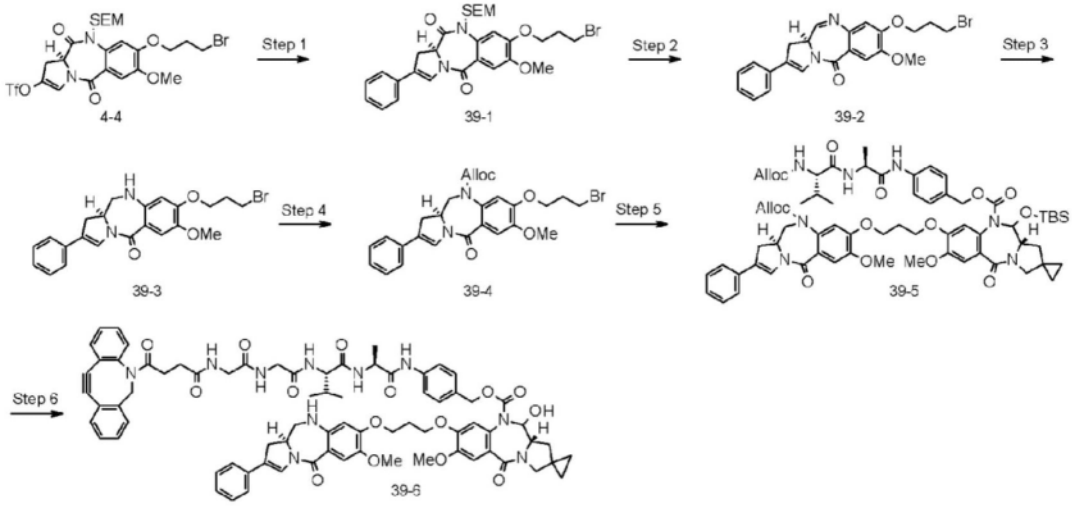
[2256] 

[2257] 工序1:N－[4－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a’S)－11’－羟基－7’－甲氧基－8’－[(5－{[(11a’S)－7’－甲氧基－5’－氧代－5’,10’,11’,11a’－四氢－1’H－螺[环丙烷－1,2’－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－8’－基]氧基}戊基)氧基]－5’－氧代－11’,11a’－二氢－1’H－螺[环丙烷－1,2’－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10’(5’H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[2258] 使实施例37工序11所得到的化合物(0.0410g,0.0430mmol)与实施例6工序1同样地反应,得到目标产物(0.0210g,39%)。

[2259] MS(APCI,ESI)m/z:1240(M+H)$^+$

[2260] 实施例39:药物连接子37

[2261] 

[2262] 工序1:化合物39－1

[2263] 使用实施例4工序4所得到的化合物(1.00g,1.52mmol)与苯基硼酸(0.370g,3.03mmol),与实施例3工序6同样地反应,得到目标产物(0.726g,81%)。

[2264] MS(APCI,ESI)m/z:589[^{81}Br,(M+H)$^+$],587[^{79}Br,(M+H)$^+$].

[2265] 工序2:化合物39－2

[2266] 使上述工序1所得到的化合物(0.726g,1.24mmol)与实施例3工序7同样地反应,得到目标产物(0.344g,63%)。

[2267] MS(APCI,ESI)m/z:443[^{81}Br,(M+H)$^+$],441[^{79}Br,(M+H)$^+$].

[2268] 工序3:化合物39－3

[2269] 使上述工序2所得到的化合物(0.344g,0.779mmol)与实施例3工序8同样地反应,得到目标产物(0.248g,72%)。

[2270] MS(APCI,ESI)m/z:445[^{81}Br,(M+H)$^{+}$],443[^{79}Br,(M+H)$^{+}$].

[2271] 工序4:化合物39－4

[2272] 使上述工序3所得到的化合物(0.248g,0.559mmol)与实施例3工序9同样地反应,得到目标产物(0.267g,90%)。

[2273] MS(APCI,ESI)m/z:529[^{81}Br,(M+H)$^{+}$],527[^{79}Br,(M+H)$^{+}$].

[2274] 工序5:化合物39－5

[2275] 使上述工序4所得到的化合物(0.100g,0.190mmol)与实施例3工序10同样地反应,得到目标产物(0.201g,85%)。

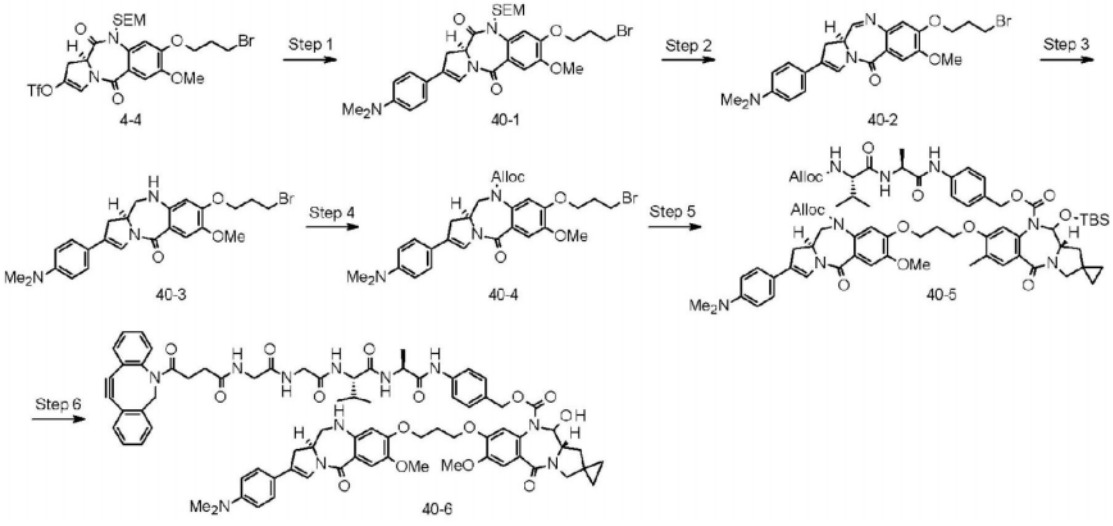
[2276] MS(APCI,ESI)m/z:1255(M+H)$^{+}$.

[2277] 工序6:N－[4－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]甘氨酰甘氨酰基－L－缬氨酰基1－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－(3－{[(11aS)－7－甲氧基－5－氧代－2－苯基－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}丙氧基)－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧代)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[2278] 使上述工序5所得到的化合物(0.201g,0.160mmol)与实施例3工序11,12,13同样地反应,得到目标产物(0.080g,36%)。

[2279] MS(APCI,ESI)m/z:1372(M+H)$^{+}$.

[2280] 实施例40:药物连接子38

[2281] 

[2282] 工序1:化合物40－1

[2283] 使实施例4工序4所得到的化合物(1.48g,2.24mmol)和4－(二甲基氨基)苯基硼酸(0.741g,4.49mmol)与实施例3工序6同样地反应,得到目标产物(0.520g,37%)。

[2284] MS(APCI,ESI)m/z:632[^{81}Br,(M+H)$^{+}$],630[^{79}Br,(M+H)$^{+}$].

[2285] 工序2:化合物40－2

[2286] 使上述工序1所得到的化合物(0.520g,0.825mmol)与实施例3工序7同样地反应,

得到目标产物(0.167g,42%)。

[2287] 工序3:化合物40－3

[2288] 使上述工序2所得到的化合物(0.167g,0.345mmol)与实施例3工序8同样地反应,得到目标产物(0.0650g,39%)。

[2289] MS(APCI,ESI)m/z:488[^{81}Br,(M+H)$^{+}$],486[^{79}Br,(M+H)$^{+}$].

[2290] 工序4:化合物40－4

[2291] 使上述工序3所得到的化合物(0.0650g,0.134mmol)与实施例3工序9同样地反应,得到目标产物(0.0690g,90%)。

[2292] MS(APCI,ESI)m/z:572[^{81}Br,(M+H)$^{+}$],570[^{79}Br,(M+H)$^{+}$].

[2293] 工序5:化合物40－5

[2294] 使上述工序4所得到的化合物(0.0690g,0.121mmol)与实施例3工序10同样地反应,得到目标产物(0.0660g,42%)。

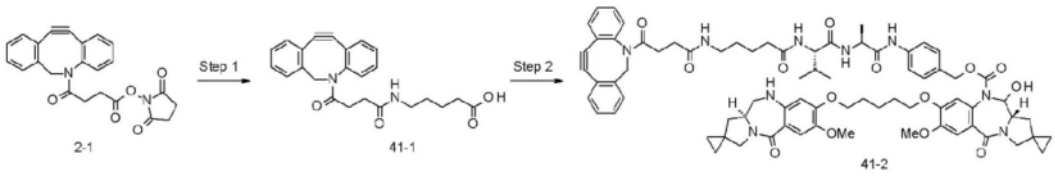
[2295] MS(APCI,ESI)m/z:1297(M+H)$^{+}$.

[2296] 工序6:N－[4－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]甘氨酰甘氨酰基－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－8'－[3－({(11aS)－2－[4－(二甲基氨基)苯基]－7－甲氧基－5－氧代－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基}氧基)丙氧基]－11'－羟基－7'－甲氧基－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[2297] 使上述工序5所得到的化合物(0.0660g,0.0509mmol)与实施例3工序11,12,13同样地反应,得到目标产物(0.0350g,49%)。

[2298] MS(APCI,ESI)m/z:1417(M+H)$^{+}$.

[2299] 实施例41:药物连接子39

[2300] 

2-1 41-1 41-2

[2301] 工序1:5－{[4－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]氨基}戊酸N,N－二甲基甲酰胺加成物

[2302] 将5－氨基戊酸(0.436g,3.72mmol)溶解于N,N－二甲基甲酰胺(10mL)中,在室温下加入1－{[4－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]氧基}吡咯烷－2,5－二酮(1.36g,3.38mmol)、三乙胺(0.937mL,6.76mmol),在室温下搅拌1.5小时。在反应溶液中加入1当量浓度盐酸,用氯仿提取,将得到的有机层用水、饱和盐水清洗后,用硫酸镁进行干燥。减压蒸馏除去,将得到的残渣用硅胶柱色谱法[氯仿～氯仿:甲醇:水＝7:3:1(v/v/v)的分配有机层]进行精制,得到固体的目标产物(0.730g,45%)。

[2303] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.06(1H,s),7.71(1H,m),7.54-7.52(1H,m),7.46-7.32(6H,m),6.04(1H,m),5.18(1H,m),3.72(1H,m),3.17-3.10(2H,m),3.00(3H,s),2.92(3H,s),2.84-2.80(1H,m),2.45-2.34(3H,m),2.28-2.24(1H,m),2.03-1.99(1H,m),1.66-1.58(2H,m),1.47-1.40(2H,m).

[2304] MS(APCI,ESI)m/z:405(M+H)$^+$

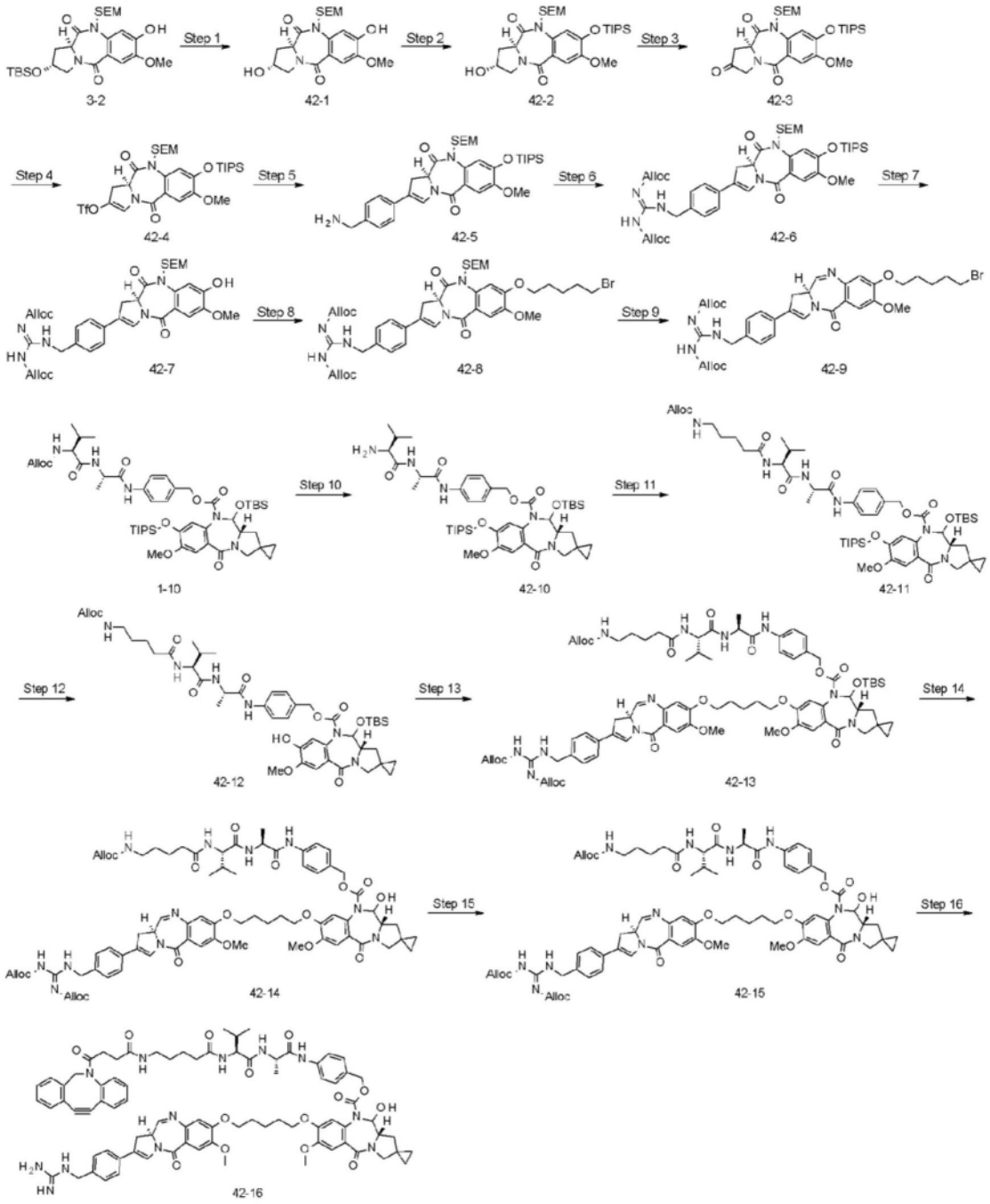
[2305] 工序2:N－(5－{[4－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]氨基}戊酰基)－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－[(5－{[(11a'S)－7'－甲氧基－5'－氧代－5',10',11',11a'－四氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－8'－基]氧基}戊基)氧基]－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[2306] 使上述工序1所得到的化合物(0.0176g,0.0368mmol)与实施例3工序13同样地反应,得到目标产物(0.00880g,18％)。

[2307] MS(APCI,ESI)m/z:1339(M+H)$^+$

[2308] 实施例42:药物连接子40

[2309]



[2310] 工序1:化合物42－1

[2311] 使实施例3工序1所得到的化合物(5.00g,9.66mmol)与实施例3工序3同样地反应,得到目标产物(3.95g,100%)。

[2312] MS(APCI,ESI)m/z:409$(M+H)^+$

[2313] 工序2:化合物42－2

[2314] 使上述工序1所得到的化合物(3.95g,9.67mmol)与实施例24工序2同样地反应,得到目标产物(4.78g,87%)。

[2315] MS(APCI,ESI)m/z:565$(M+H)^+$

[2316] 工序3:化合物42－3

[2317] 使上述工序2所得到的化合物(4.78g,8.43mmol)与实施例3工序4同样地反应,得

到目标产物(2.36g,50%)。

[2318] MS(APCI,ESI)m/z:563(M+H)$^+$

[2319] 工序4:化合物42－4

[2320] 使上述工序3所得到的化合物(1.53g,2.72mmol)与实施例3工序5同样地反应,得到目标化合物(1.27g,69%)。

[2321] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.31(2H,s),7.15(1H,m),5.52(1H,m),4.65(1H,m),4.57(1H,m),3.95-3.89(1H,m),3.87(3H,s),3.75-3.58(2H,m),3.18-3.14(1H,m),1.33-1.25(3H,m),1.10(18H,m),1.00-0.96(2H,m),0.03(9H,s).

[2322] 工序5:化合物42－5

[2323] 使上述工序4所得到的化合物(0.255g,0.367mmol)和4－(氨基甲基)苯基硼酸(0.344g,1.84mmol)与实施例3工序6同样地反应,得到目标产物(0.148g,62%)。

[2324] MS(APCI,ESI)m/z:652(M+H)$^+$

[2325] 工序6:化合物42－6

[2326] 在上述工序5所得到的化合物(0.142g,0.218mmol)与[(Z)－(甲基硫烷基)亚甲基]双氨基甲酸二丙－2－烯－1－基酯(0.079g,0.079mmol,WO9920628)的二甲基甲酰胺(2.2mL)的溶液中,在室温下加入三乙胺(0.090mL,0.653mmol)和氯化汞(II)(0.083g,0.305mmol)。在室温下搅拌反应溶液30分钟后,在反应溶液中加入乙酸乙酯进行稀释,过滤除去汞盐。将得到的有机层用0.1当量浓度的磷酸缓冲液和饱和盐水进行清洗。将有机层用硫酸钠干燥后,减压蒸馏除去。将得到的残渣用硅胶柱色谱法[己烷:乙酸乙酯＝100:0(v/v)～60:40(v/v)]进行精制,得到目标产物(0.157g,83%)。

[2327] MS(APCI,ESI)m/z:863(M+H)$^+$

[2328] 工序7:化合物42－7

[2329] 在上述工序6所得到的化合物(0.153g,0.177mmol)的THF(1.8mL)溶液中,室温下加入1mol/L的氟化四丁基铵四氢呋喃溶液(0.266mL,0.266mmol)。在室温下搅拌50分钟后,在反应溶液中加入0.1当量浓度磷酸缓冲液(pH7.0),用乙酸乙酯提取,将得到的有机层用0.1当量浓度磷酸缓冲液(pH7.0)清洗。用硫酸钠干燥后,减压蒸馏除去。将得到的残渣用硅胶柱色谱法[己烷:乙酸乙酯＝100:0(v/v)～0:100(v/v)]进行精制,得到目标产物(0.115g,92%)。

[2330] MS(APCI,ESI)m/z:706(M+H)$^+$

[2331] 工序8:化合物42－8

[2332] 在上述工序7所得到的化合物(0.115g,0.163mmol)的N,N－二甲基甲酰胺(1.0mL)溶液中,在室温下加入1,5－二溴戊烷(0.088mL,0.652mmol)、碳酸铯(0.032g,0.098mmol)。在室温下搅拌2小时后,在反应溶液中加入0.1当量浓度磷酸缓冲液(pH7.0),用乙酸乙酯进行提取。将得到的有机层用0.1当量浓度磷酸缓冲液(pH7.0)和饱和盐水进行清洗,用硫酸钠干燥后,减压蒸馏除去。将得到的残渣用硅胶柱色谱法[己烷:乙酸乙酯＝100:0(v/v)～50:50(v/v)]进行精制,得到目标产物(0.111g,80%)。

[2333] MS(APCI,ESI)m/z:856[^{81}Br,(M+H)$^+$],854[^{79}Br,(M+H)$^+$]

[2334] 工序9:化合物42－9

[2335] 使上述工序8所得到的化合物(0.105g,0.123mmol)与实施例3工序7同样地反应,

得到目标化合物(0.036g,41%)。

[2336] MS(APCI,ESI)m/z:772[^{81}Br,(M+H)$^{+}$],770[^{79}Br,(M+H)$^{+}$]

[2337] 工序10:化合物42－10

[2338] 使上述工序9所得到的化合物(0.163g,0.169mmol)与实施例3工序12同样地反应,得到目标化合物(0.132g,88%)。

[2339] MS(APCI,ESI)m/z:880(M+H)$^{+}$

[2340] 工序11:化合物42－11

[2341] 在上述工序10所得到的化合物(0.13g,0.147mmol)、5－{[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]氨基}戊酸(0.0386g,0.192mmol)和1－羟基苯并三唑一水合物(0.038g,0.251mmol)的二氯甲烷(3mL)溶液中,在室温下加入三乙胺(0.035mL,0.251mmol)和1－乙基－3－(3－二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(0.048g,0.251mmol),在室温下搅拌1小时。在反应溶液中加入0.1当量浓度磷酸缓冲液(pH7.0),用乙酸乙酯进行提取。将得到的有机层用0.1当量浓度磷酸缓冲液(pH7.0)清洗,将乙酸乙酯减压蒸馏除去。进行甲苯共沸,将得到的残渣用硅胶柱色谱法[己烷:乙酸乙酯＝100:0(v/v)～50:50(v/v)]进行精制,得到目标产物(0.150g,95%)。

[2342] MS(APCI,ESI)m/z:1063(M+H)$^{+}$

[2343] 工序12:化合物42－12

[2344] 在上述工序11所得到的化合物(0.150g,0.141mmol)的N,N－二甲基甲酰胺(3.5mL)溶液中,在室温下加入醋酸锂水溶液(1.52M,0.088mL)。在室温下搅拌1.5小时后,在反应溶液中加入水,用乙酸乙酯进行提取。将有机层用水清洗后,进行减压蒸馏除去。将得到的残渣用硅胶柱色谱法[氯仿:甲醇＝100:0(v/v)～95:5(v/v)]进行精制,得到目标产物(0.135g,96%)。

[2345] MS(APCI,ESI)m/z:907(M+H)$^{+}$

[2346] 工序13:化合物42－13

[2347] 在上述工序12所得到的化合物(0.048g,0.053mmol)和上述工序9所得到的化合物(0.034g,0.048mmol)的N,N－二甲基甲酰胺(0.5mL)溶液中,在室温下加入碳酸铯(0.011g,0.034mmol)。在室温下搅拌1.5小时后,在45℃下搅拌5小时。在反应溶液中加入0.1当量浓度磷酸缓冲液(pH7.0),用乙酸乙酯进行提取。将得到的有机层用0.1当量浓度磷酸缓冲液(pH7.0)进行清洗,用硫酸钠干燥后,减压蒸馏除去。将得到的残渣用硅胶柱色谱法[氯仿:甲醇＝100:0(v/v)～97:3(v/v)]进行精制,得到目标产物(0.038g,52%)。

[2348] MS(APCI,ESI)m/z:1534(M+H)$^{+}$

[2349] 工序14:化合物42－14

[2350] 使上述工序13所得到的化合物(0.038g,0.247mmol)与实施例3工序11同样地反应。将反应溶液分液后,将有机溶剂减压蒸馏除去,将得到的化合物直接用于下一个反应中。

[2351] MS(APCI,ESI)m/z:1420(M+H)$^{+}$

[2352] 工序15:化合物42－15

[2353] 在上述工序14所得到的化合物(0.034g,0.140mmol)的二甲基甲酰胺(2mL)溶液中,在室温下加入吡咯烷(0.048mL,0.574mmol)、四(三苯基膦)钯(0)(0.0054g,

0.0046mmol)，在室温下搅拌50分钟。将有机溶剂减压蒸馏除去后，将得到的残渣溶解于二甲基亚砜中，用反相柱色谱法(column:Develosil Combi－RP－5(Nomurachemical)，20mm×100mm.:0.1％甲酸水溶液:0.1％甲酸乙腈溶液＝79.2:20.8至51.4:48.6，流速:25mL/min，温度:25℃)进行精制，得到目标化合物(0.020g，72％)。

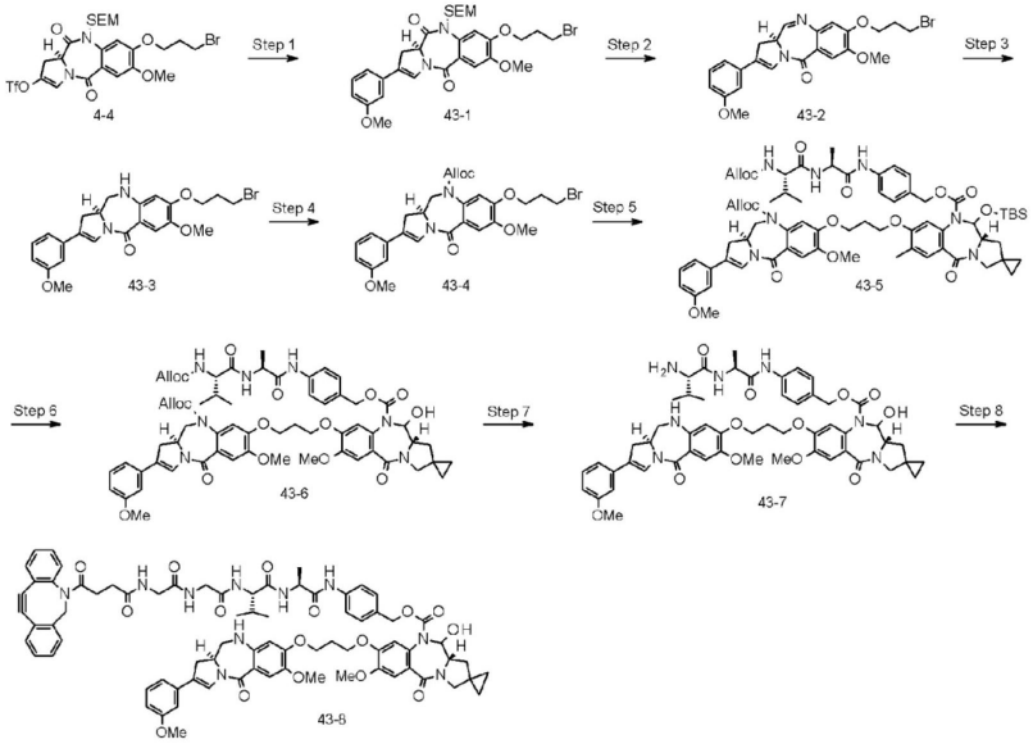
[2354] MS(APCI，ESI)m/z:1168$(M+H)^+$

[2355] 工序16:化合物42－16

[2356] 在上述工序15所得到的化合物(0.002g，0.0017mmol)的二甲基甲酰胺(0.5mL)溶液中，加入三乙胺(0.007mL，0.051mmol)和市售的1－{[4－(11，12－二脱氢苯并[b，f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]氧代吡咯烷－2，5－二酮(0.083g，0.0205mmol)，在室温下搅拌10小时。将有机溶剂减压蒸馏除去，将得到的残渣溶解于二甲基亚砜中，用反相柱色谱法(column:Develosil Combi－RP－5(Nomurachemical)，20mm×100mm.:0.1％甲酸水溶液:0.1％甲酸乙腈溶液＝62.5:37.5至34.7:65.3，流速:25mL/min，温度:25℃)以及硅胶柱色谱法[氯仿～氯仿:甲醇:水＝7:3:1(v/v/v)的分配有机层]进行精制，得到目标产物(0.033g，14％)。

[2357] MS(APCI，ESI)m/z:1455$(M+H)^+$

[2358] 实施例43:药物连接子41

[2359] 

[2360] 工序1:化合物43－1

[2361] 使实施例4工序4所得到的化合物(0.72g，1.09mmol)和3－甲氧基苯基硼酸(0.332g，2.18mmol)与实施例3工序6同样地反应，得到目标化合物(0.526g，78％)。

[2362] MS(APCI，ESI)m/z:619[^{81}Br，$(M+H)^+$]，617[^{79}Br，$(M+H)^+$]

[2363] 工序2:化合物43－2

[2364] 使上述工序1所得到的化合物(0.526g，0.851mmol)与实施例3工序7同样地反应，得到目标化合物(0.195g，49％)。

[2365] MS(APCI,ESI)m/z:473[^{81}Br,(M+H)$^{+}$],471[^{79}Br,(M+H)$^{+}$]

[2366] 工序3:化合物43－3

[2367] 使上述工序2所得到的化合物(0.195g,0.414mmol)与实施例3工序8同样地反应,得到目标化合物(0.195g,定量)。

[2368] MS(APCI,ESI)m/z:475[^{81}Br,(M+H)$^{+}$],473[^{79}Br,(M+H)$^{+}$]

[2369] 工序4:化合物43－4

[2370] 使上述工序3所得到的化合物(0.413mmol)与实施例3工序9同样地反应,得到目标化合物(0.106g,46％)。

[2371] MS(APCI,ESI)m/z:559[^{81}Br,(M+H)$^{+}$],557[^{79}Br,(M+H)$^{+}$]

[2372] 工序5:化合物43－5

[2373] 使上述工序4所得到的化合物(0.069g,0.124mmol)与实施例3工序10同样地反应,得到目标化合物(0.128g,80％)。

[2374] MS(APCI,ESI)m/z:1284(M+H)$^{+}$

[2375] 工序6:化合物43－6

[2376] 使上述工序5所得到的化合物(0.128g,0.099mmol)与实施例3工序11同样地反应,得到目标化合物(0.105g,90％)。

[2377] MS(APCI,ESI)m/z:1170(M+H)$^{+}$

[2378] 工序7:化合物43－7

[2379] 使上述工序6所得到的化合物(0.105g,0.089mmol)与实施例3工序12同样地反应,得到目标化合物(0.072g,80％)。

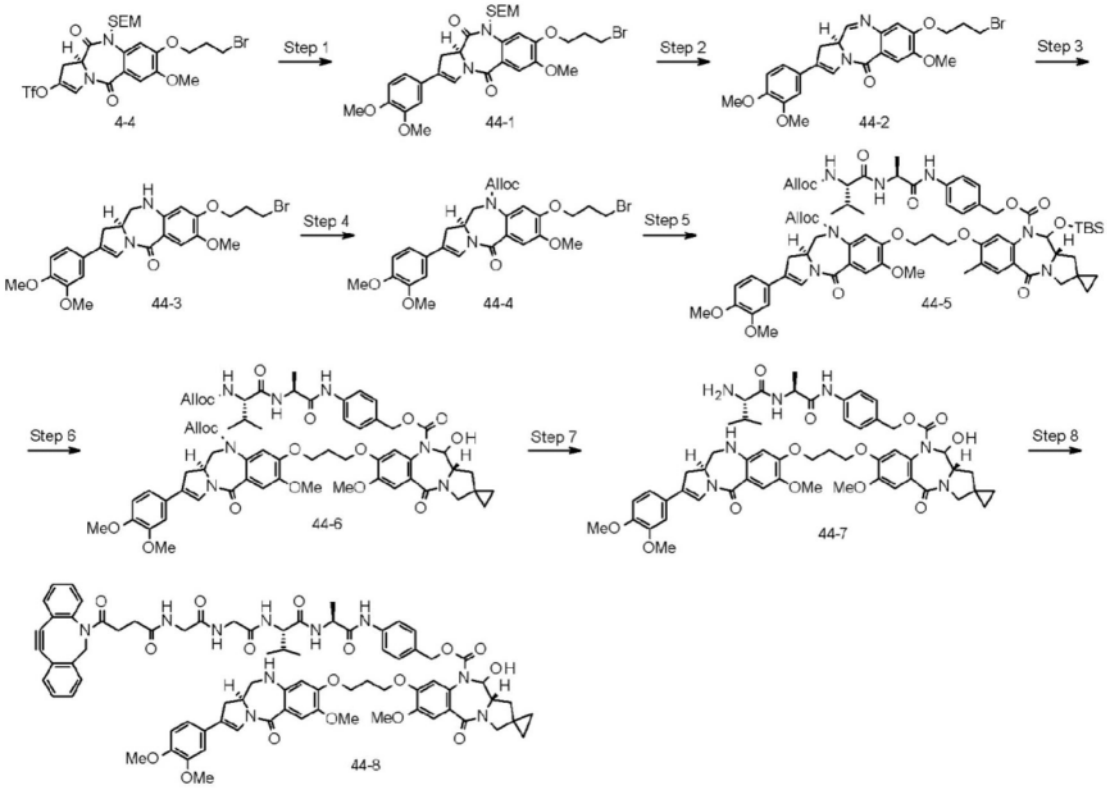
[2380] MS(APCI,ESI)m/z:1002(M+H)$^{+}$

[2381] 工序8:N－[4－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]甘氨酰甘氨酰基－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－(3－{[(11aS)－7－甲氧基－2－(3－甲氧基苯基)－5－氧代－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}丙氧基)－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[2382] 使上述工序7所得到的化合物(0.072g,0.072mmol)与实施例3工序13同样地反应,得到目标化合物(0.053g,52％)。

[2383] MS(APCI,ESI)m/z:1403(M+H)$^{+}$

[2384] 实施例44:药物连接子42

[2385] 

[2386] 工序1:化合物44－1

[2387] 使实施例4工序4所得到的化合物(0.68g,1.03mmol)和3,4－二甲氧基苯基硼酸(0.375g,2.06mmol)与实施例3工序6同样地反应,得到目标化合物(0.506g,75%)。

[2388] MS(APCI,ESI)m/z:649[^{81}Br,$(M+H)^+$],647[^{79}Br,$(M+H)^+$]

[2389] 工序2:化合物44－2

[2390] 使上述工序1得到的化合物(0.506g,0.781mmol)与实施例3工序7同样地反应,得到目标化合物(0.199g,50%)。

[2391] MS(APCI,ESI)m/z:503[^{81}Br,$(M+H)^+$],501[^{79}Br,$(M+H)^+$]

[2392] 工序3:化合物44－3

[2393] 使上述工序2得到的化合物(0.169g,0.337mmol)与实施例3工序8同样地反应,得到目标化合物(0.231g,定量)。

[2394] MS(APCI,ESI)m/z:505[^{81}Br,$(M+H)^+$],503[^{79}Br,$(M+H)^+$]

[2395] 工序4:化合物44－4

[2396] 使上述工序3得到的化合物(0.337mmol)与实施例3工序9同样地反应,得到目标化合物(0.170g,86%)。

[2397] MS(APCI,ESI)m/z:589[^{81}Br,$(M+H)^+$],587[^{79}Br,$(M+H)^+$]

[2398] 工序5:化合物44－5

[2399] 使上述工序4得到的化合物(0.076g,0.136mmol)与实施例3工序10同样地反应,得到目标化合物(0.116g,71%)。

[2400] MS(APCI,ESI)m/z:1314$(M+H)^+$

[2401] 工序6:化合物44－6

[2402] 使上述工序5得到的化合物(0.116g,0.088mmol)与实施例3工序11同样地反应,得

到目标化合物(0.108g,定量)。

[2403] MS(APCI,ESI)m/z:1200(M+H)$^+$

[2404] 工序7:化合物44－7

[2405] 使上述工序6得到的化合物(0.090mmol)与实施例3工序12同样地反应,得到目标化合物(0.066g,71%)。

[2406] MS(APCI,ESI)m/z:1032(M+H)$^+$

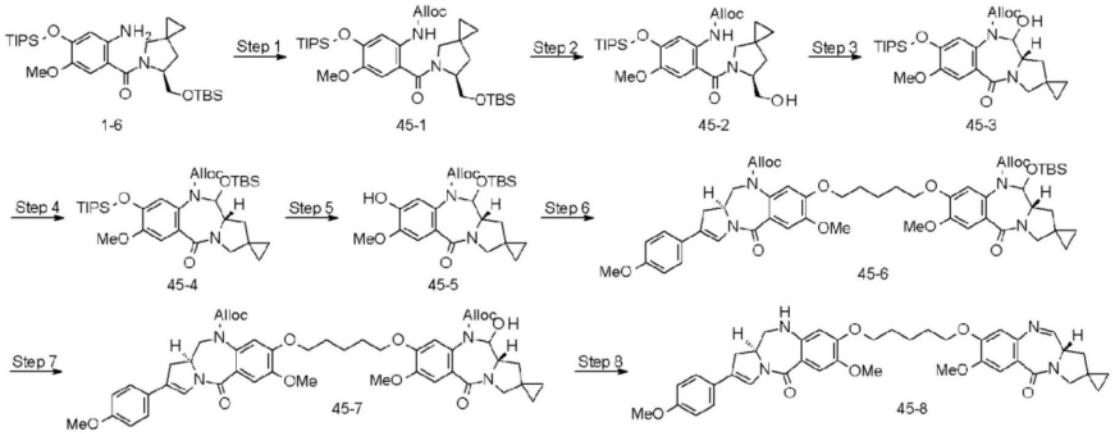
[2407] 工序8:N－[4－(11,12－二脱氢二苯并[b,f]氮杂环辛四稀－5(6H)－基)－4－氧代丁酰基]甘氨酰甘氨酰基－L－缬氨酰基－N－{4－[({[(11a'S)－8'－(3－{[(11aS)－2－(3,4－二甲氧基苯基)－7－甲氧基－5－氧代－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}丙氧基)－11'－羟基－7'－甲氧基－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－基]羰基}氧基)甲基]苯基}－L－丙氨酸酰胺

[2408] 使上述工序7得到的化合物(0.066g,0.064mmol)与实施例3工序13同样地反应,得到目标化合物(0.053g,58%)。

[2409] MS(APCI,ESI)m/z:1434(M+H)$^+$

[2410] 〔药物D的合成〕

[2411] 实施例45:药物1

[2412] 

[2413] 工序1:(2－{[(6S)－6－({[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}甲基)－5－氮杂螺[2.4]庚－5－基]羰基}－4－甲氧基－5－{[三(丙烷－2－基)硅烷基]氧基}苯基)氨基甲酸丙－2－烯－1－基酯

[2414] 使实施例1工序5所得到的化合物(4.59g,8.15mmol)与实施例3工序9同样地反应,得到目标产物(4.86g,92%)。

[2415] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.97(1H,s),7.77(1H,s),6.77(1H,s),5.97-5.94(1H,m),5.39-5.21(2H,m),4.67-4.59(3H,m),4.00-3.98(1H,m),3.74-3.66(5H,m),3.05-3.03(1H,m),2.30-2.28(1H,m),1.72-1.70(1H,m),1.30-1.27(3H,m),1.11-1.05(18H,m),0.99-0.91(9H,m),0.61-0.53(4H,m),0.10-0.06(6H,m).

[2416] MS(APCI,ESI)m/z:647(M+H)$^+$

[2417] 工序2:(2－{[(6S)－6－(羟甲基)－5－氮杂螺[2.4]庚－5－基]羰基}－4－甲氧基－5－{[三(丙烷－2－基)硅烷基]氧基}苯基)氨基甲酸丙－2－烯－1－基酯

[2418] 使上述工序1所得到的化合物(4.86g,7.51mmol)与实施例1工序7同样地反应,得

到目标产物(3.42g,86%)。

[2419] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:8.52(1H,s),7.71(1H,s),6.77(1H,s),6.00-5.94(1H,m),5.35-5.27(2H,m),4.65-4.64(3H,m),4.33-4.31(1H,m),3.82-3.77(5H,m),3.68-3.66(1H,m),3.15-3.13(1H,m),1.89-1.86(2H,m),1.30-1.26(3H,m),1.14-1.10(18H,m),0.66-0.51(4H,m).

[2420] MS(APCI,ESI)m/z:533$(M+H)^+$

[2421] 工序3:(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－5'－氧代－8'－{[三(丙烷－2－基)硅烷基]氧基}－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－羧酸丙－2－烯－1－基酯

[2422] 使上述工序2所得到的化合物(6.68g,12.5mmol)与实施例1工序8同样地反应,得到目标产物(6.44g,97%)。

[2423] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.20(1H,s),6.69(1H,s),5.89-5.78(2H,m),5.18-5.15(2H,m),4.62-4.60(1H,m),4.49-4.47(1H,m),3.85(3H,s),3.74-3.71(1H,m),3.59-3.57(1H,m),3.33-3.30(2H,m),2.43-2.40(1H,m),1.76-1.73(1H,m),1.28-1.20(3H,m),1.09-1.07(18H,m),0.74-0.65(4H,m).

[2424] MS(APCI,ESI)m/z:531$(M+H)^+$

[2425] 工序4:(11a'S)－11'－{[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}－7'－甲氧基－5'－氧代－8'－{[三(丙烷－2－基)硅烷基]氧基}－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－羧酸丙－2－烯－1－基酯

[2426] 使上述工序3所得到的化合物(3.24g,6.10mmol)与实施例1工序9同样地反应,得到目标产物(3.86g,98%)。

[2427] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.20(1H,s),6.67(1H,s),6.01-5.98(1H,m),5.79-5.73(1H,m),5.14-5.10(2H,m),4.64-4.61(1H,m),4.37-4.34(1H,m),3.86(3H,s),3.72-3.69(1H,m),3.52-3.50(1H,m),3.29-3.26(1H,m),2.38-2.34(1H,m),1.55-1.51(1H,m),1.28-1.24(3H,m),1.15-1.07(18H,m),0.81-0.66(13H,m),0.21(3H,s),0.18(3H,s).

[2428] MS(APCI,ESI)m/z:645$(M+H)^+$

[2429] 工序5:(11a'S)－11'－{[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}－8'－羟基－7'－甲氧基－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－羧酸丙－2－烯－1－基酯

[2430] 使上述工序4所得到的化合物(4.49g,6.96mmol)与实施例1工序10同样地反应,得到目标产物(3.24g,95%)。

[2431] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.25(1H,s),6.73(1H,s),6.02-6.00(1H,m),5.91(1H,s),5.77-5.75(1H,m),5.11-5.09(2H,m),4.64-4.62(1H,m),4.41-4.40(1H,m),3.95(3H,s),3.72-3.70(1H,m),3.54-3.53(1H,m),3.29-3.26(1H,m),2.36-2.34(1H,m),1.56-1.54(1H,m),0.79-0.67(13H,m),0.21(3H,s),0.20(3H,s).

[2432] MS(APCI,ESI)m/z:489$(M+H)^+$

[2433] 工序6:(11a'S)－11'－{[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}－7'－甲氧基－8'－{[5－({(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－10－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基}氧

基)戊基]氧基}－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－羧酸丙－2－烯－1－基酯

[2434] 使上述工序5所得到的化合物(0.080g,0.164mmol)与实施例3工序10同样地反应,得到目标产物(0.160g,98%)。

[2435] ^{1}H-NMR(DMSO-D_6)δ:7.44-7.42(3H,m),7.12-7.10(2H,m),7.05-7.03(1H,m),6.92-6.90(2H,m),6.61-6.59(1H,m),5.87-5.81(3H,m),5.10-5.07(4H,m),4.66-4.55(3H,m),4.43-4.39(2H,m),4.21-3.94(5H,m),3.83(3H,s),3.81(3H,s),3.76(3H,s),3.65-3.62(1H,m),3.56-3.54(1H,m),3.42-3.39(1H,m),3.22-3.14(2H,m),2.77-2.73(1H,m),2.42-2.33(1H,m),1.81-1.79(4H,m),1.55-1.44(3H,m),0.82(9H,s),0.72-0.53(4H,m),0.19(3H,s),0.17(3H,s).

[2436] MS(APCI,ESI)m/z:993$(M+H)^+$

[2437] 工序7:(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－{[5－({(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－10－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基}氧基)戊基]氧基}－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－羧酸丙－2－烯1－基酯

[2438] 使上述工序6所得到的化合物(160mg,0.161mmol)与实施例3工序11同样地反应,得到目标产物(141mg,定量)。

[2439] ^{1}H-NMR(DMSO-D_6)δ:7.44-7.42(3H,m),7.08-7.06(3H,m),6.92-6.90(2H,m),6.82-6.79(1H,m),6.56-6.54(1H,m),5.77-5.74(3H,m),5.09(4H,s),4.58-4.55(3H,m),4.43-4.41(2H,m),4.16-4.01(5H,m),3.81-3.81(6H,m),3.76(3H,s),3.64(1H,s),3.56-3.53(1H,m),3.42-3.38(1H,m),3.25-3.13(2H,m),2.74-2.70(1H,m),2.37-2.34(1H,m),1.82-1.79(4H,m),1.59-1.56(3H,m),0.66-0.62(4H,m).

[2440] MS(APCI,ESI)m/z:879$(M+H)^+$

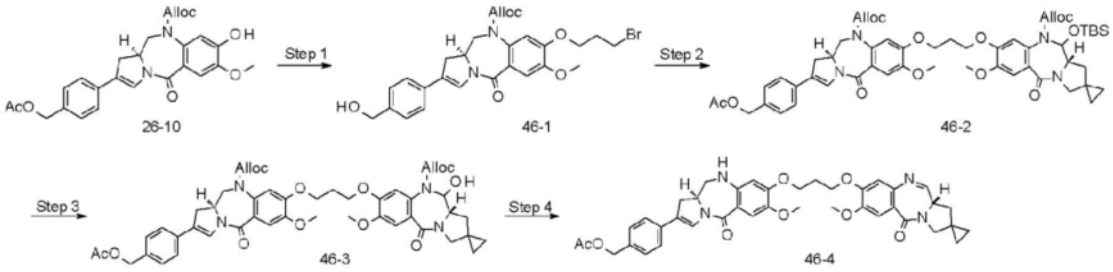
[2441] 工序8:(11a'S)－7'－甲氧基－8'－[(5－{[(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}戊基)氧基]－1',11a'－二氢－5'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－5'－酮

[2442] 使上述工序7所得到的化合物(141mg,0.161mmol)与实施例3工序12同样地反应,得到目标产物(109.8mg,99%)。

[2443] ^{1}H-NMR(DMSO-D_6)δ:7.92-7.91(1H,m),7.45(1H,s),7.39-7.37(2H,m),7.33(1H,s),7.29(1H,s),6.92-6.89(2H,m),6.85(1H,s),6.56-6.54(1H,m),6.31(1H,s),4.19-4.12(2H,m),4.05-3.99(1H,m),3.95-3.93(2H,m),3.82-3.79(4H,m),3.76(3H,s),3.66(3H,s),3.52-3.46(3H,m),3.30-3.21(2H,m),2.78-2.74(1H,m),2.45-2.42(1H,m),2.06-2.05(1H,m),1.89-1.82(4H,m),1.60-1.58(2H,m),0.80-0.63(4H,m).

[2444] MS(APCI,ESI)m/z:693$(M+H)^+$

[2445] 实施例46:药物2

[2446] 

[2447] 工序1:化合物46－1

[2448] 使用实施例26工序10所得到的化合物(0.246g,0.514mmol),与实施例4工序1同样地反应,得到目标产物(0.122g,40%)。

[2449] MS(APCI,ESI)m/z:601[^{81}Br,(M+H)$^+$],599[^{79}Br,(M+H)$^+$].

[2450] 工序2:化合物46－2

[2451] 使上述工序1所得到的化合物(0.122g,0.204mmol)与实施例45工序6同样地反应,得到目标产物(0.176g,86%)。

[2452] 工序3:化合物46－3

[2453] 使上述工序2所得到的化合物(0.0870g,0.0864mmol)与实施例3工序11同样地反应,得到目标产物(0.0660g,86%)。

[2454] MS(APCI,ESI)m/z:892(M+H)$^+$

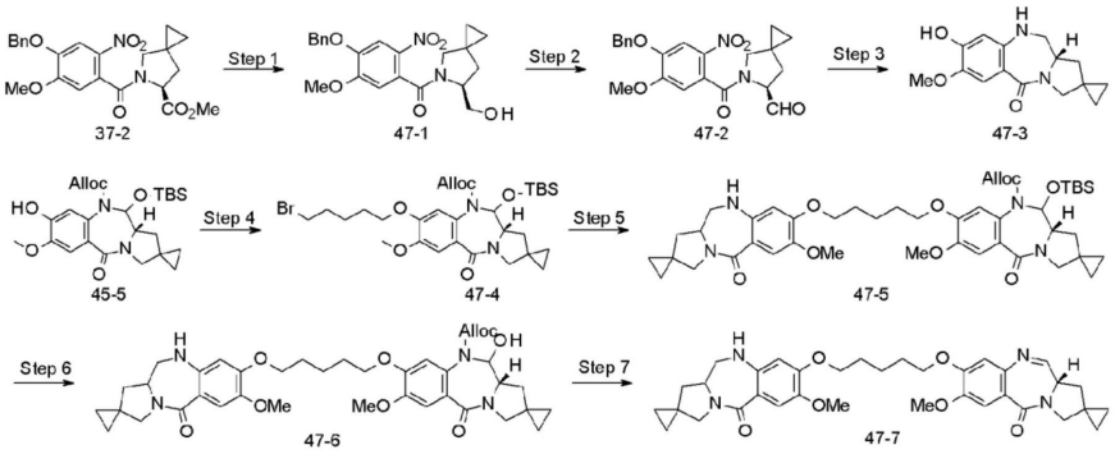
[2455] 工序4:4－[(11aS)－7－甲氧基－8－(3－{[(11a'S)－7'－甲氧基－5'－氧代－5',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－8'－基]氧基}丙氧基)－5－氧代－5,10,11,11a－四氢1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－2－基]苄基乙酸酯

[2456] 使上述工序3所得到的化合物(0.0660g,0.0793mmol)与实施例3工序12同样地反应,得到目标产物(0.0444g,85%)。

[2457] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.80-7.79(1H,m),7.66-7.65(1H,m),7.52-7.50(2H,m),7.39-7.33(5H,m),6.86-6.85(1H,m),6.14-6.13(1H,m),5.09(2H,s),4.32-4.23(6H,m),3.95-3.95(3H,m),3.85-3.82(4H,m),3.71-3.68(2H,m),3.55-3.49(3H,m),3.42-3.33(1H,m),2.79-2.72(1H,m),2.54-2.50(1H,m),2.40-2.36(2H,m),2.02-1.98(1H,m),1.26-1.24(1H,m),0.76-0.72(4H,m).

[2458] MS(APCI,ESI)m/z:706(M+H)$^+$

[2459] 实施例47:药物3

[2460] 

[2461] 工序1:[4－(苄基)－5－甲氧基－2－硝基苯基][(6S)－6－(羟甲基)－5－氮杂螺[2.4]庚5－基]甲酮

[2462] 在实施例37工序1所得到的化合物(6.49g,14.7mmol)的四氢呋喃(147mL)溶液中,在0℃加入硼氢化锂(0.642g,29.5mmol),在室温下搅拌2小时。在反应溶液中加入1当量浓度盐酸,用乙酸乙酯提取。将得到的有机层用饱和盐水进行清洗,用硫酸镁干燥后,减压蒸馏除去。将得到的残渣(6.94g,定量)未经过精制地直接用于下一个工序中。

[2463] MS(APCI,ESI)m/z:413$(M+H)^+$

[2464] 工序2:(6S)－5－[4－(苄氧基)－5－甲氧基－2－硝基苯甲酰基]－5－氮杂螺[2.4]庚烷－6－甲醛

[2465] 使上述工序1所得到的化合物(4.50g,11.0mmol)与实施例1工序8同样地反应,得到目标产物(1.94g,43%)。

[2466] MS(APCI,ESI)m/z:411$(M+H)^+$

[2467] 工序3:(11a'S)－8'－羟基－7'－甲氧基－1',10',11',11a'－四氢－5'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－5'－酮

[2468] 在上述工序2所得到的化合物(1.94g,4.73mmol)的四氢呋喃(25mL)、乙酸乙酯(25mL)、甲醇(25mL)的混合溶液中,在氮气氛下加入5%钯碳(54%水分,1.0g)后,将反应溶液在氢气氛下、在室温下搅拌22小时。将反应溶液硅藻土过滤后,将滤液减压蒸馏除去。将得到的残渣用硅胶柱色谱法[己烷:乙酸乙酯＝80:20(v/v)～0:100(v/v)]进行精制,得到目标产物(1.20g,93%)。

[2469] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.55(1H,s),6.16(1H,s),5.86(1H,s),4.08-4.02(2H,m),3.86(3H,s),3.72-3.69(1H,m),3.57-3.37(3H,m),2.04-2.01(1H,m),1.78-1.75(1H,m),0.79-0.53(4H,m).

[2470] MS(APCI,ESI)m/z:275$(M+H)^+$

[2471] 工序4:(11a'S)－8'－[(5－溴代戊基)氧基]－11'－{[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}－7'－甲氧基－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－羧酸丙－2－烯－1－基酯

[2472] 使实施例45工序3所得到的化合物(0.300g,0.614mmol)与实施例3工序2同样地反应,得到目标产物(0.388g,99%)。

[2473] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.24(1H,s),6.60(1H,s),6.02-5.98(1H,m),5.80-5.75(1H,m),

5.11-5.06(2H,m),4.68-4.64(1H,m),4.40-4.38(1H,m),4.02-3.98(2H,m),3.92(3H,s),3.72-3.69(1H,m),3.54-3.52(1H,m),3.46-3.41(2H,m),3.29-3.26(1H,m),2.38-2.34(1H,m),1.94-1.87(4H,m),1.65-1.62(2H,m),1.55-1.55(1H,m),0.86(9H,s),0.75-0.67(4H,m),0.24-0.22(6H,m).

[2474] MS(APCI,ESI)m/z:639[^{81}Br,(M+H)$^{+}$],637[^{79}Br,(M+H)$^{+}$].

[2475] 工序5:(11a'S)－11'－{[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}－7'－甲氧基－8'－[(5－{[(11a'S)－7'－甲氧基－5'－氧代－5',10',11',11a'－四氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－8'－基]氧基}戊基)氧基]－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－羧酸丙－2－烯－1－基酯

[2476] 使上述工序4所得到的化合物(0.203g,0.318mmol)和上述工序3所得到的化合物(0.131g,0.478mmol)与实施例3工序10同样地反应,得到目标产物(0.0880g,33％)。

[2477] MS(APCI,ESI)m/z:831(M+H)$^{+}$

[2478] 工序6:(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－[(5－{[(11a'S)－7'－甲氧基－5'－氧代－5',10',11',11a'－四氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－8'－基]氧基}戊基)氧基]－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－羧酸丙－2－烯－1－基酯

[2479] 使上述工序5所得到的化合物(0.0880g,0.106mmol)与实施例3工序11同样地反应,得到目标产物(0.0500g,66％)。

[2480] MS(APCI,ESI)m/z:717(M+H)$^{+}$

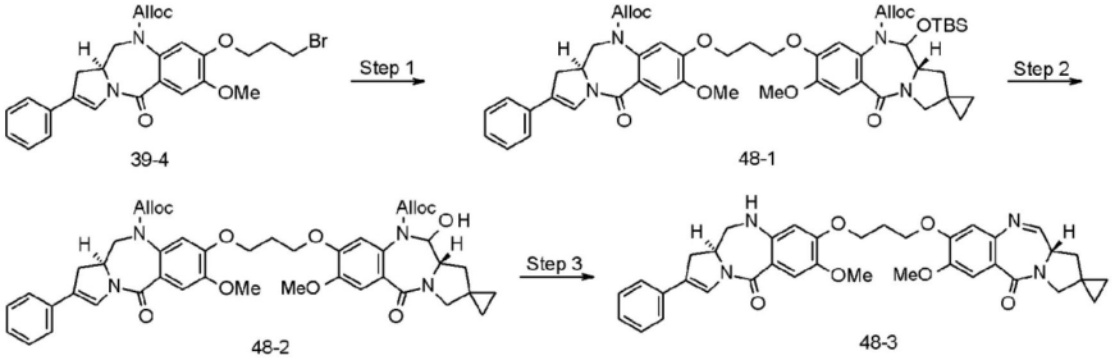
[2481] 工序7:(11a'S)－7'－甲氧基－8'－[(5－{[(11a'S)－7'－甲氧基－5'－氧代－5',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－8'－基]氧基}戊基)氧基]－1',10',11',11a'－四氢－5'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－5'－酮

[2482] 使上述工序6所得到的化合物(0.0500g,0.0698mmol)与实施例3工序12同样地反应,得到目标产物(0.0330g,77％)。

[2483] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.80(1H,m),7.58(1H,s),7.52(1H,s),6.81(1H,s),6.05(1H,s),4.17-3.97(5H,m),3.94(3H,s),3.87(1H,m),3.84(3H,s),3.72-3.68(3H,m),3.51-3.45(5H,m),2.54-2.51(1H,m),2.03-1.90(6H,m),1.75-1.68(2H,m),0.66(8H,m).

[2484] MS(APCI,ESI)m/z:615(M+H)$^{+}$

[2485] 实施例48:药物4

[2486] 

[2487] 工序1:化合物48－1

[2488] 使实施例39工序4所得到的化合物(0.165g,0.313mmol)与实施例45工序6同样地反应,得到目标产物(0.270g,92%)。

[2489] MS(APCI,ESI)m/z:935(M+H)$^+$.

[2490] 工序2:化合物48－2

[2491] 使上述工序1所得到的化合物(0.270g,0.289mmol)与实施例3工序11同样地反应,得到目标产物(0.208g,88%)。

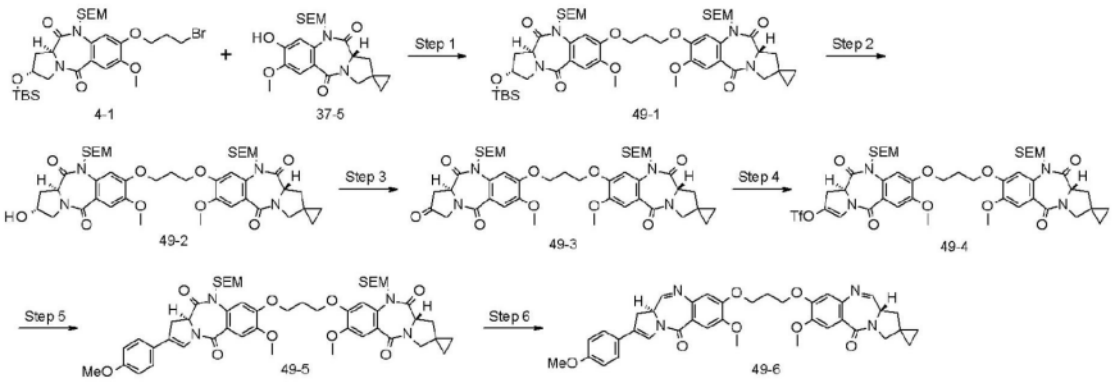
[2492] MS(APCI,ESI)m/z:821(M+H)$^+$.

[2493] 工序3:(11a'S)－7'－甲氧基－8'－(3－{[(11aS)－7－甲氧基－5－氧代－2－苯基－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}丙氧基)－1',11a'－二氢－5'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－5'－酮

[2494] 使上述工序2所得到的化合物(0.208g,0.253mmol)与实施例3工序12同样地反应,得到目标产物(0.130g,80%)。

[2495] MS(APCI,ESI)m/z:635(M+H)$^+$.

[2496] 实施例49:药物5

[2497] 

[2498] 工序1:化合物49－1

[2499] 使用化合物4－1(8.52g,13.2mmol)和实施例37工序4所得到的化合物37－5(6.09g,14.5mmol),与实施例3工序10同样地反应,得到目标产物(10.7g,83%)。

[2500] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.36(1H,s),7.34(1H,s),7.26(1H,s),7.23(1H,s),5.53-5.46(2H,m),4.72-4.69(2H,m),4.59-4.55(1H,m),4.28-4.20(6H,m),3.90-3.89(6H,m),3.80-3.63(6H,m),3.57-3.54(1H,m),3.42-3.39(1H,m),2.87-2.82(1H,m),2.47-2.40(3H,m),2.24-2.20(1H,m),2.04-1.99(1H,m),0.99-0.95(4H,m),0.87(9H,s),0.70-0.63(4H,m),

0.09(6H,s),0.02-0.00(18H,m).

[2501] 工序2:化合物49－2

[2502] 使上述工序1所得到的化合物(10.7g,10.9mmol)与实施例3工序3同样地反应,得到目标产物(9.45g,100%)。

[2503] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.36-7.34(2H,m),7.26(1H,s),7.23(1H,s),5.53-5.47(2H,m),4.72-4.64(3H,m),4.30-4.20(6H,m),3.89(6H,s),3.85-3.62(7H,m),3.42-3.39(1H,m),2.99-2.93(1H,m),2.47-2.39(3H,m),2.25-2.07(3H,m),0.99-0.95(4H,m),0.89-0.86(1H,m),0.70-0.64(3H,m),0.02-0.00(18H,m).

[2504] 工序3:化合物49－3

[2505] 使上述工序2所得到的化合物(9.45g,10.9mmol)与实施例3工序4同样地反应,得到目标产物(9.14g,97%)。

[2506] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.37(1H,s),7.33(1H,s),7.27-7.26(2H,m),5.54-5.51(2H,m),4.77-4.70(2H,m),4.64-4.61(1H,m),4.31-4.20(6H,m),3.91(3H,s),3.90(3H,s),3.80-3.65(6H,m),3.60-3.55(1H,m),3.42-3.39(1H,m),2.83-2.75(1H,m),2.47-2.41(3H,m),2.25-2.20(1H,m),1.00-0.95(4H,m),0.92-0.85(1H,m),0.71-0.63(3H,m),0.02-0.01(18H,m).

[2507] 工序4:化合物49－4

[2508] 使上述工序3所得到的化合物(4.27g,4.94mmol)与实施例3工序5同样地反应,得到目标产物(3.16g,64%)。

[2509] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.37(1H,s),7.32(1H,s),7.27-7.25(2H,m),7.15-7.14(1H,m),5.53-5.50(2H,m),4.77-4.70(2H,m),4.64-4.60(1H,m),4.30-4.20(6H,m),3.90(6H,s),3.81-3.66(4H,m),3.42-3.39(1H,m),3.18-3.13(1H,m),2.47-2.41(3H,m),2.25-2.20(1H,m),0.99-0.94(4H,m),0.89-0.86(1H,m),0.69-0.64(3H,m),0.02-0.00(18H,m).

[2510] 工序5:化合物49－5

[2511] 使上述工序4所得到的化合物(1.00g,1.00mmol)与实施例3工序6同样地反应,得到目标产物(0.900g,94%)。

[2512] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.69-7.65(1H,m),7.57-7.53(1H,m),7.49-7.45(1H,m),7.39-7.36(4H,m),7.33(1H,s),7.27(1H,s),6.90-6.88(2H,m),5.53-5.50(2H,m),4.77-4.71(2H,m),4.62-4.59(1H,m),4.30-4.20(5H,m),3.91(3H,s),3.91(3H,s),3.82(3H,s),3.80-3.65(4H,m),3.42-3.39(1H,m),3.16-3.10(1H,m),2.47-2.41(3H,m),2.25-2.20(1H,m),1.00-0.96(4H,m),0.89-0.85(1H,m),0.70-0.63(3H,m),0.02-0.01(18H,m).

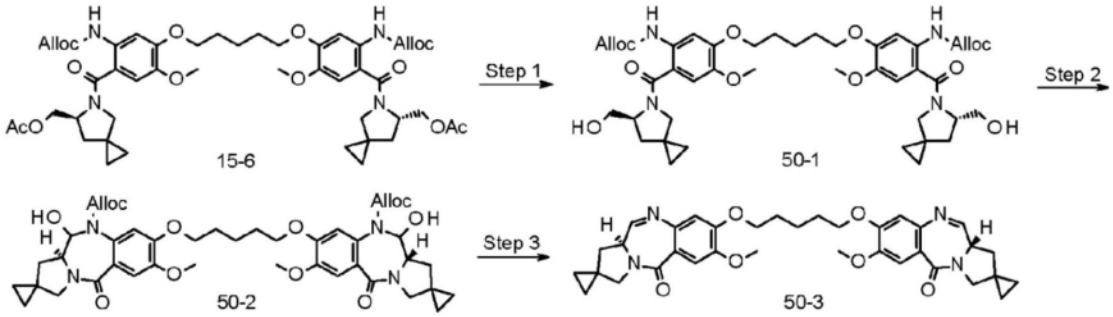
[2513] 工序6:(11a'S)－7'－甲氧基－8'－(3－{[(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－5,11a－二氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}丙氧基)－1',11a'－二氢－5'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－5'－酮

[2514] 在上述工序5所得到的化合物(0.900g,0.942mmol)的THF(30mL)、乙醇(3mL)溶液中,在0℃下缓慢加入硼氢化锂(0.456g,18.8mmol)。将反应混合物在室温下搅拌1.5小时后,在反应混合物中加入水,剧烈搅拌。将反应混合物用氯仿提取。将有机层用减压蒸馏除去,将得到的残渣溶解于二氯甲烷(10mL)、乙醇(20mL)、水(5mL)中。在反应混合物中加入硅

胶(15.0g),在氮气氛下搅拌3天。将反应混合物过滤,将有机层用饱和盐水清洗,用无水硫酸钠进行干燥。过滤后,减压蒸馏除去,将得到的残渣用硅胶柱色谱法[氯仿:甲醇=100:0(v/v)～92:8(v/v)]进行精制,得到目标产物(0.308g,49%)。

[2515] MS(APCI,ESI)m/z:663$(M+H)^+$

[2516] 实施例50:药物6

[2517] 

[2518] 工序1:{1,5－戊二基双[氧基(6－{[(6S)－6－(羟甲基)－5－氮杂螺[2.4]庚－5－基]羰基}－4－甲氧基苯－3,1－二基)]}双氨基甲酸二－2－丙烯－1－基酯

[2519] 将实施例15工序5所得到的双烯丙氧基羰基体15－6(0.460g、0.508mmol)溶解于甲醇(10mL)后,加入碳酸钾(351mg,2.54mmol),在室温下搅拌30分钟。加入饱和氯化铵水溶液50mL,用乙酸乙酯提取。将有机层用无水硫酸钠干燥。减压蒸馏除去,得到目标产物(0.421g,定量)。

[2520] ^{1}H-NMR(DMSO-D_6)δ:9.19(2H,s),7.22(2H,s),6.89(2H,s),5.97-5.92(2H,m),5.33(2H,m),5.22(2H,m),4.81(2H,m),4.55(4H,m),4.26(2H,s),3.96(4H,m),3.74(6H,s),3.62(2H,m),3.56(2H,s),3.37(2H,m),3.11(2H,m),1.88-1.78(8H,m),1.56-1.54(2H,m),0.54-0.43(8H,m).

[2521] MS(APCI,ESI)m/z:821$(M+H)^+$.

[2522] 工序2:(11a'S,11a""S)－8',8"－[戊烷－1,5－二基双(氧基)]双(11'－羟基－7'－甲氧基－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－羧酸)二丙－2－烯－1－基酯

[2523] 使上述工序1所得到的化合物(0.421g,0.513mmol)与实施例15工序8同样地反应,得到目标产物(0.326g,78%)。

[2524] ^{1}H-NMR(DMSO-D_6)δ:7.07(2H,s),6.80(2H,s),6.55(2H,m),5.84-5.81(2H,m),5.75(2H,m),5.09-5.05(4H,m),4.62(2H,mz),4.40(2H,m),3.98(4H,m),3.81(6H,s),3.54(2H,m),3.43-3.37(2H,m),3.14(2H,m),2.35(2H,m),1.81-1.79(4H,m),1.59-1.56(4H,m),0.70-0.59(8H,m).

[2525] MS(APCI,ESI)m/z:817$(M+H)^+$.

[2526] 工序3:(11a'S,11a""S)－8',8"－[1,5－戊二基双(氧基)]双(7'－甲氧基－1',11a'－二氢－5'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－5'－酮)

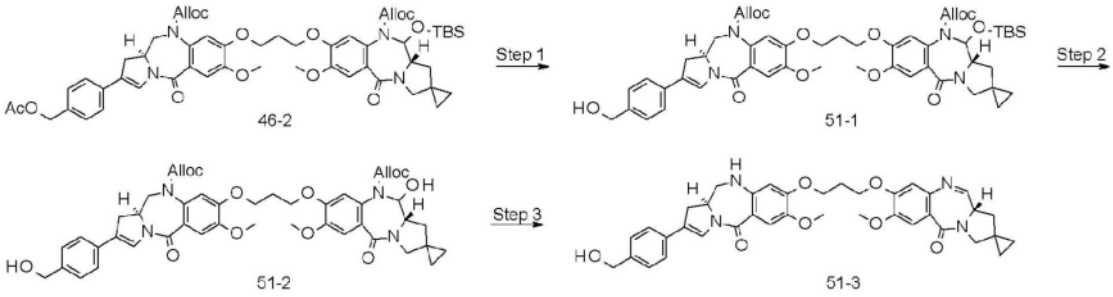
[2527] 使上述工序2所得到的化合物(0.326g,0.399mmol)与实施例3工序12同样地反应,得到目标产物(0.208g,85%)。

[2528] ^{1}H-NMR(DMSO-D_6)δ:7.91(2H,m),7.32(2H,s),6.84(2H,s),4.11(2H,m),4.06(2H,m),3.82(6H,s),3.51-3.31(6H,m),2.43(2H,m),2.05(2H,m),1.82-1.80(4H,m),1.60-1.58

(2H,m),0.79-0.77(2H,m),0.68-0.64(6H,m).

[2529] MS(APCI,ESI)m/z:613(M+H)$^+$.

[2530] 实施例51:药物7

[2531] 

[2532] 工序1:化合物51－1

[2533] 使化合物46－2(0.0870g,0.0863mmol)与实施例27工序1同样地反应,得到目标产物(0.0660mg,79%)。

[2534] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.50(1H,s),7.36-7.34(4H,m),7.27-7.24(2H,m),6.80(1H,s),6.64(1H,s),6.03(1H,m),5.80-5.74(2H,m),5.10-5.06(3H,m),4.70(2H,m),4.67-4.60(2H,m),4.41-4.37(3H,m),4.23-4.20(6H,m),3.90(3H,s),3.89(3H,s),3.72(1H,m),3.65-3.62(1H,m),3.51(1H,m),3.34-3.26(2H,m),2.75-2.71(1H,m),2.39-2.35(3H,m),1.74(1H,m),1.56-1.52(1H,m),0.85(9H,s),0.80-0.62(4H,m),0.22(3H,s),0.21(3H,s).

[2535] MS(APCI,ESI)m/z:965(M+H)$^+$.

[2536] 工序2:化合物51－2

[2537] 使上述工序1所得到的化合物(0.0660g,0.0683mmol)与实施例3工序11同样地反应,得到目标产物(0.0590g,定量)。

[2538] MS(APCI,ESI)m/z:851(M+H)$^+$.

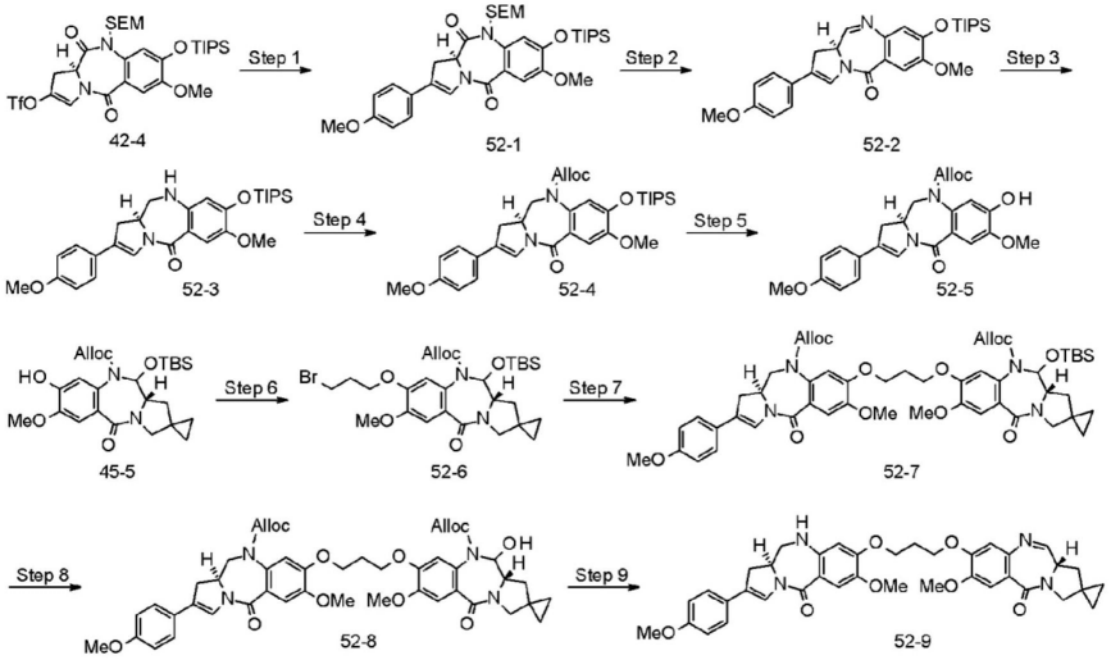
[2539] 工序3:(11a'S)－8'－[3－({(11aS)－2－[4－(羟甲基)苯基]－7－甲氧基－5－氧代－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基}氧基)丙氧基]－7'－甲氧基－1',11a'－二氢－5'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－5'－酮

[2540] 使上述工序2所得到的化合物(0.0590g,0.0693mmol)与实施例3工序12同样地反应,得到目标产物(0.0290g,63%)。

[2541] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.80-7.79(1H,m),7.64-7.64(1H,m),7.52-7.51(2H,m),7.36-7.33(4H,m),6.85(1H,m),6.14(1H,m),4.69(2H,m),4.30-4.26(6H,m),3.95-3.95(3H,m),3.86-3.84(3H,m),3.67(1H,m),3.56-3.54(2H,m),3.50-3.48(2H,m),3.39-3.30(1H,m),2.80-2.73(1H,m),2.52(1H,m),2.41-2.39(2H,m),2.00(1H,m),1.73-1.72(1H,m),0.76-0.70(4H,m).

[2542] MS(APCI,ESI)m/z:665(M+H)$^+$.

[2543] 实施例52:药物8

[2544] 

[2545] 工序1:(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－10－{[2－(三甲基硅烷基)乙氧基]甲基}－8－{[三(丙烷－2－基)硅烷基]氧基}－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－5,11(10H,11aH)－二酮

[2546] 使实施例42工序4所得到的化合物(0.519g,0.747mmol)与实施例3工序6同样地反应,得到目标化合物(0.511g,定量)。

[2547] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.41-7.31(5H,m),6.91-6.85(2H,m),5.52(1H,m),4.64(1H,m),4.57(1H,m),3.97-3.90(1H,m),3.88(3H,s),3.83(3H,s),3.75-3.56(2H,m),3.19-3.09(1H,m),1.36-1.23(3H,m),1.11(18H,m),1.02-0.97(2H,m),0.03(9H,s).

[2548] MS(APCI,ESI)m/z:653[$(M+H)^+$]

[2549] 工序2:(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－8－{[三(丙烷－2－基)硅烷基]氧基}－1,11a－二氢－5H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－5－酮

[2550] 使上述工序1所得到的化合物(0.178g,0.272mmol)与实施例3工序7同样地反应,得到目标化合物(0.094g,68%)。

[2551] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.87(1H,m),7.51(1H,s),7.41-7.39(1H,m),7.36-7.33(2H,m),6.93-6.89(2H,m),6.86(1H,s),4.44-4.38(1H,m),3.90(3H,s),3.83(3H,s),3.61-3.53(1H,m),3.41-3.34(1H,m),1.33-1.25(3H,m),1.11-1.06(18H,m).

[2552] MS(APCI,ESI)m/z:507$(M+H)^+$

[2553] 工序3:(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－8－{[三(丙烷－2－基)硅烷基]氧基}－1,10,11,11a－四氢－5H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－5－酮

[2554] 使用上述工序2所得到的化合物(0.063g,0.124mmol),与实施例3工序8同样地反应,得到目标化合物(0.046g,72%)。

[2555] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.53-7.48(2H,m),7.33-7.29(2H,m),6.90-6.86(2H,m),6.13-6.11(1H,m),4.36-4.29(1H,m),4.11(1H,s),3.82(3H,s),3.79(3H,s),3.59-3.50(2H,m),3.40-3.31(1H,m),2.78-2.68(1H,m),1.31-1.20(3H,m),1.13-1.02(18H,m).

[2556] MS(APCI,ESI)m/z:509$(M+H)^+$

[2557] 工序4:(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－8－{[三(丙烷－2－基)硅烷基]氧基}－11,11a－二氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－10(5H)－羧酸丙－2－烯－1－基酯

[2558] 使用上述工序3所得到的化合物(0.046g,0.090mmol),与实施例3工序9同样地反应,得到目标化合物(0.03g,56%)。

[2559] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.39-7.36(1H,m),7.31-7.28(2H,m),7.22(1H,s),6.90-6.86(3H,m),6.75-6.72(1H,m),5.82-5.69(1H,m),5.18-5.08(2H,m),4.59-4.52(1H,m),4.48-4.39(1H,m),4.39-4.29(1H,m),4.23-4.12(1H,m),3.86(3H,s),3.82(3H,s),3.64-3.58(1H,m),3.32-3.25(1H,m),2.73-2.65(1H,m),1.30-1.20(2H,m),1.12-1.06(18H,m).

[2560] MS(APCI,ESI)m/z:593$(M+H)^+$

[2561] 工序5:(11aS)－8－羟基－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－11,11a－二氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－10(5H)－羧酸丙－2－烯－1－基酯

[2562] 使上述工序4所得到的化合物(0.030g,0.050mmol)与实施例1工序10同样地反应,得到目标化合物(0.015g,0.034mmol)。

[2563] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.39-7.25(4H,m),6.92-6.78(3H,m),6.03-5.92(1H,m),5.86-5.68(1H,m),5.20-5.07(2H,m),4.66-4.57(1H,m),4.52-4.40(1H,m),4.40-4.27(1H,m),4.27-4.16(1H,m),3.95(3H,s),3.82(3H,s),3.66-3.59(1H,m),3.32-3.21(1H,m),2.74-2.64(1H,m).

[2564] MS(APCI,ESI)m/z:437(M+H)+

[2565] 工序6:(11a'S)－8'－(3－溴代丙氧基)－11'－{[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}－7'－甲氧基－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－羧酸丙－2－烯1－基酯

[2566] 使实施例45工序5所得到的化合物(0.131g,0.268mmol)与实施例4工序1同样地反应,得到目标产物(0.086g,52%)。

[2567] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.24(1H,s),6.65(1H,s),6.02(1H,m),5.87-5.71(1H,m),5.15-5.04(2H,m),4.72-4.62(1H,m),4.44-4.32(1H,m),4.23-4.07(3H,m),3.92(3H,s),3.77-3.47(4H,m),3.28(1H,m),2.37(3H,m),1.57-1.52(1H,m),0.86(9H,s),0.82-0.57(4H,m),0.21(6H,m).

[2568] MS(APCI,ESI)m/z:611[^{81}Br,$(M+H)^+$],609[^{79}Br,$(M+H)^+$]

[2569] 工序7:(11a'S)－11'－{[叔丁基(二甲基)硅烷基]氧基}－7'－甲氧基－8'－[3－({(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－10－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基}氧基)丙氧基]－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－羧酸丙－2－烯－1－基酯

[2570] 使上述工序5所得到的化合物(0.015g,0.034mmol)和上述工序6所得到的化合物(0.030g,0.048mmol)与实施例3工序10同样地反应,得到目标化合物(0.032g,96%)。

[2571] MS(APCI,ESI)m/z:965$(M+H)^+$

[2572] 工序8:(11a'S)－11'－羟基－7'－甲氧基－8'－[3－({(11aS)－7－甲氧基－

2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－10－[(丙－2－烯－1－基氧基)羰基]－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基}氧基)丙氧基]－5'－氧代－11',11a'－二氢－1'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－10'(5'H)－羧酸丙－2－烯－1－基酯

[2573] 使上述工序7所得到的化合物(0.031g,0.032mmol)与实施例3工序11同样地反应,得到目标产物(0.026g,95%)。

[2574] MS(APCI,ESI)m/z:851$(M+H)^+$

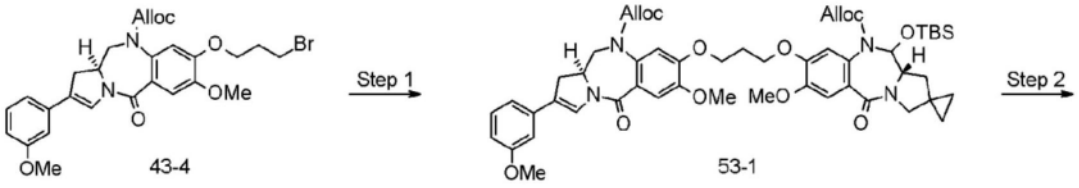
[2575] 工序9:(11a'S)－7'－甲氧基－8'－(3－{[(11aS)－7－甲氧基－2－(4－甲氧基苯基)－5－氧代－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}丙氧基)－1',11a'－二氢－5'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－5'－酮

[2576] 使上述工序8所得到的化合物(0.026g,0.030mmol)与实施例3工序12同样地反应,得到目标产物(0.018g,88%)。

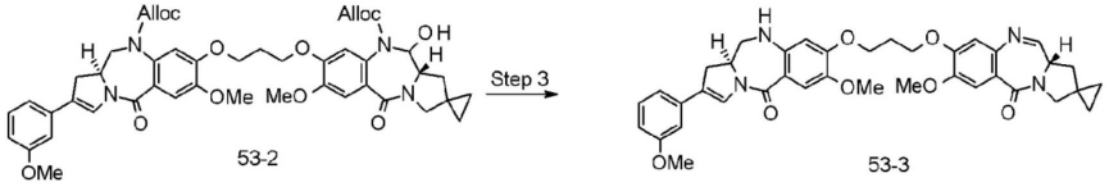
[2577] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.80(1H,m),7.54-7.51(3H,m),7.33-7.29(2H,m),6.91-6.85(3H,m),6.14(1H,s),4.35-4.17(6H,m),3.95(3H,s),3.85(3H,s),3.82(3H,s),3.76-3.25(5H,m),2.79-2.69(1H,m),2.52(1H,m),2.45-2.35(1H,m),2.03-1.96(1H,m),1.28-1.23(2H,m),0.78-0.69(4H,m).

[2578] MS(APCI,ESI)m/z:665$(M+H)^+$

[2579] 实施例53:药物9



[2580]



[2581] 工序1:化合物53－1

[2582] 使实施例43工序4所得到的化合物(0.027g,0.048mmol)与实施例45工序6同样地反应,得到目标化合物(0.037g,79%)。

[2583] MS(APCI,ESI)m/z:965$(M+H)^+$

[2584] 工序2:化合物53－2

[2585] 使上述工序1所得到的化合物(0.037g,0.038mmol)与实施例3工序11同样地反应,得到目标产物(35mg,定量)。

[2586] MS(APCI,ESI)m/z:851[$(M+H)^+$]

[2587] 工序3:(11a'S)－7'－甲氧基－8'－(3－{[(11aS)－7－甲氧基－2－(3－甲氧基苯基)－5－氧代－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}丙氧基)－1',11a'－二氢－5'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并

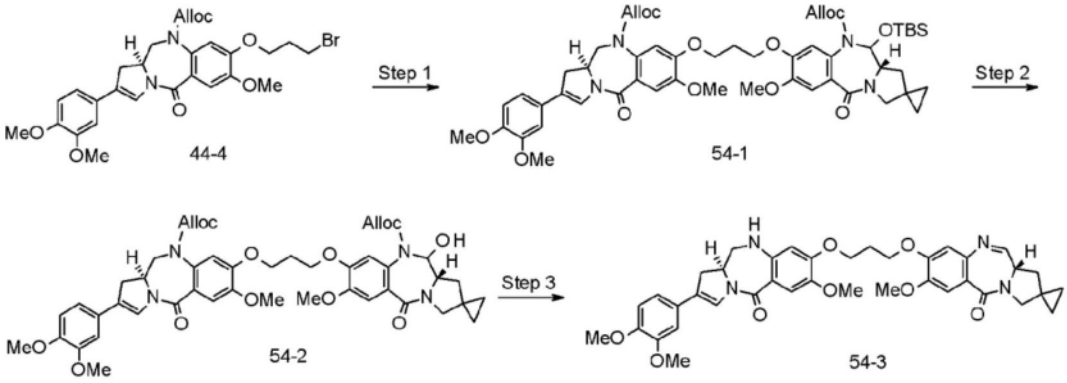
二氮杂卓]－5'－酮

[2588] 使上述工序2所得到的化合物(0.038mmol)与实施例45工序6～8同样地反应,得到目标产物(25mg,99%)。

[2589] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.81-7.78(1H,m),7.65-7.62(1H,m),7.53-7.49(2H,m),7.24(1H,m),6.96(1H,m),6.91-6.88(1H,m),6.85(1H,m),6.78(1H,m),6.14(1H,m),4.41-4.18(5H,m),3.97-3.92(3H,m),3.88-3.84(3H,m),3.83(3H,s),3.76-3.25(5H,m),2.78-2.71(1H,m),2.52(1H,m),2.45-2.35(2H,m),2.03-1.96(1H,m),1.29-1.21(2H,m),0.78-0.69(4H,m).

[2590] MS(APCI,ESI)m/z:664$(M+H)^+$

[2591] 实施例54:药物10

[2592] 

[2593] 工序1:化合物54－1

[2594] 使实施例44工序4所得到的化合物(0.027g,0.046mmol)与实施例45工序6同样地反应,得到目标化合物(0.037g,81%)。

[2595] MS(APCI,ESI)m/z:995$(M+H)^+$

[2596] 工序2:化合物54－2

[2597] 使上述工序1所得到的化合物(0.037g,0.037mmol)与实施例3工序11同样地反应,得到目标产物(0.034g,定量)。

[2598] MS(APCI,ESI)m/z:881$(M+H)^+$

[2599] 工序3:(11a'S)－8'－(3－{[(11aS)－2－(3,4－二甲氧基苯基)－7－甲氧基－5－氧代－5,10,11,11a－四氢－1H－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓－8－基]氧基}丙氧基)－7'－甲氧基－1',11a'－二氢－5'H－螺[环丙烷－1,2'－吡咯并[2,1－c][1,4]苯并二氮杂卓]－5'－酮

[2600] 使上述工序2所得到的化合物(0.037mmol)与实施例3工序12同样地反应,得到目标产物(0.027g,定量)。

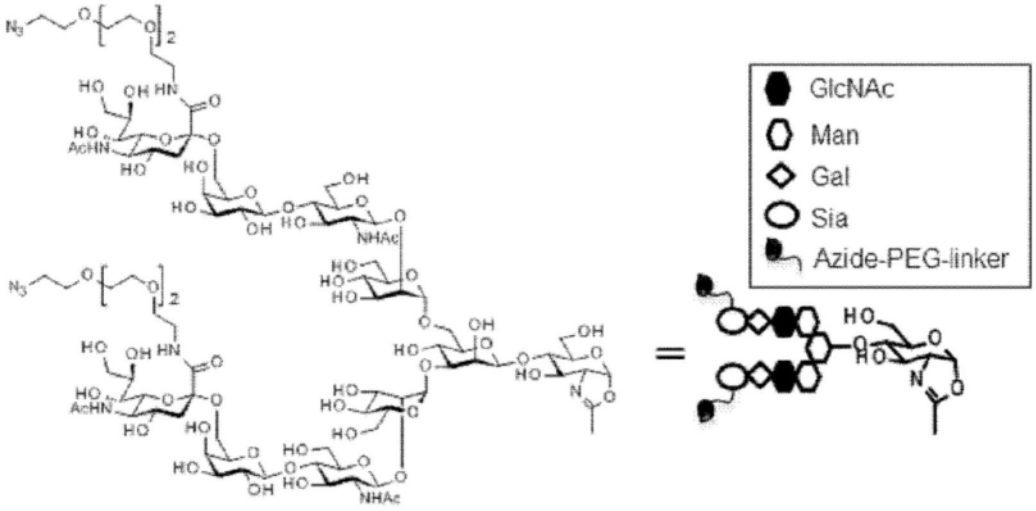
[2601] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.81-7.78(1H,m),7.55-7.49(3H,m),6.99-6.96(1H,m),6.87-6.82(3H,m),6.14(1H,m),4.41-3.28(22H,m),2.77-2.71(1H,m),2.57-2.48(1H,m),2.45-2.34(2H,m),2.04-1.96(1H,m),1.43-1.11(2H,m),0.79-0.67(4H,m).

[2602] MS(APCI,ESI)m/z:695$(M+H)^+$

[2603] 〔糖链供体的合成〕

[2604] 实施例55:$[N_3$－PEG(3)$]_2$－SG(10)－Ox

[2605]



[2606] (上图中,结构式的右示意图表示实施例58的反应式所示的具有导入了叠氮基的连接子结构的中间体的示意图中的对应结构。)

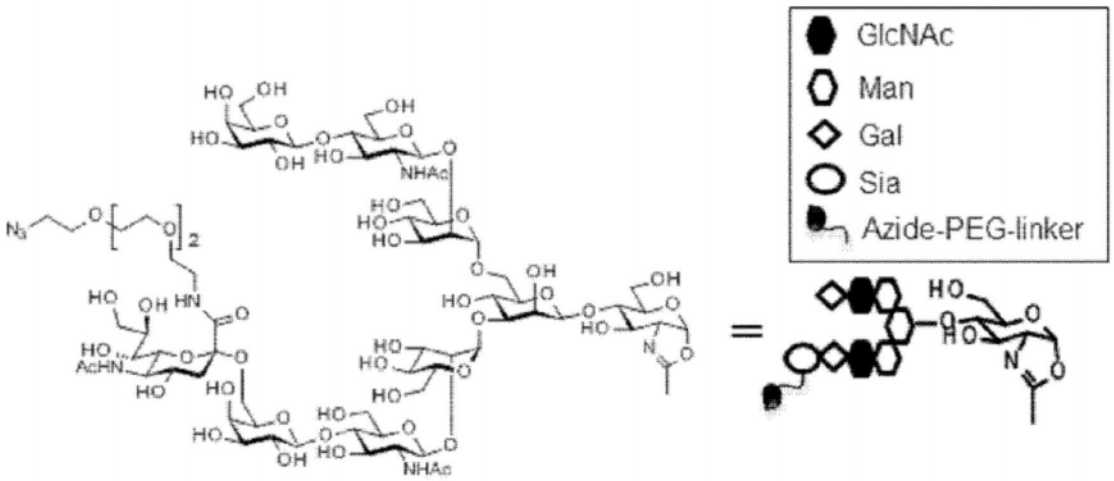
[2607] 工序1:[N_3－PEG(3)]$_2$－SG(10)

[2608] 在5ml采样管((株)Ina Optica)中加入11－叠氮基－3,6,9－三氧杂十一烷－1－胺(0.096mL,0.485mmol)、二唾液酸八糖(50mg,0.24mmol)的水溶液(0.5mL),搅拌1小时后,冷冻干燥。在冷冻干燥后的5ml采样管中加入0－(7－氮杂苯并三唑－1－基)－N,N,N',N'－四甲基脲鎓六氟磷酸盐(92mg,0.24mmol)的N,N－二甲基甲酰胺溶液(0.6mL)和二异丙基乙胺(0.042mL,0.24mmol),在37℃下搅拌4小时。反应结束后,将反应液转移至预先添加了二乙醚(20ml)的离心管(50ml)中。使用小型离心机(日立工机,CF16RX)使固态物沉淀,除去上清液。加入二乙醚(20ml)进行倾析。接着,加入乙腈(20mL)进行倾析之后,进行减压下干燥得到粗产物。将得到的固态物溶解于适量的0.2%三氟醋酸水溶液中,利用反相HPLC进行分离精制。使用0.1%三氟醋酸水溶液和0.1%三氟醋酸乙腈溶液作为洗脱液,装置使用Purif－Rp2(昭光Scientific制),柱使用Inertsil ODS－3(GL Sciences制)。收集在洗脱中UV检测(220nm)到的包含目标产物的馏分进行冷冻干燥,得到目标产物(42mg)。

[2609] 工序2:[N_3－PEG(3)]$_2$－SG(10)－Ox

[2610] 在5mL采样管((株)Ina Optica制)中加入上述工序1合成的化合物(40mg)、2－氯－1,3－二甲基－1H－苯并咪唑－3－鎓盐酸盐(伏见制药所制,17.9mg,0.083mmol)的水溶液(200μl)。在冰冷后的反应液中加入磷酸三钾(52.6mg,0.25mmol)的水溶液(200μl),在冰冷却下搅拌2小时。将得到的反应液使用Amicon Ultra(Ultracell 30K,Merck Millipore制)进行超滤,除去固态物。使用凝胶过滤色谱法对通过的液体进行精制。装置使用Purif－Rp2(昭光Scientific制),柱使用HiPrep 26/10Desalting(GE Healthcare制),流动相使用0.03%－NH3水溶液,流速设定为10mL/min,级分体积为10mL。收集在洗脱中UV检测(220nm)到的含有目标产物的馏分,加入1N氢氧化钠水溶液(33μl,0.033mmol)进行冷冻干燥,得到目标产物(34mg)。

[2611] 实施例56:[N3－PEG(3)]－MSG1－Ox

[2612] 

[2613] (上图中,结构式的右示意图表示实施例60,61,62,63,64,65,66的反应式所示的具有导入了叠氮基的连接子结构的中间体的示意图中的对应结构。)

[2614] 工序1:(MSG1－)Asn

[2615] 将市售品monosialo－Asn free(1S2G/1G2S－10NC－Asn,(株)糖链工程研究所制)(称为“(MSG－)Asn”)(500mg)在以下的条件下使用反相HPLC进行分离精制,分离为以第一主峰洗脱出的(MSG1－)Asn(保留时间15～19min左右)和以第二主峰洗脱出的(MSG2－)Asn(保留时间21～26min左右)。使用0.1％甲酸水溶液作为洗脱液,装置使用ELS－PDA触发分取系统(日本分光株式会社制),柱使用Inertsil ODS－3(10um,30Φ×250mm,GL Sciences社制),流速为30mL/min。收集洗脱中UV检测(210nm)出的归属为最初的峰的馏分,进行冷冻干燥得到目标产物(238mg)。

[2616] 工序2:MSG1

[2617] 使上述工序1所得到的化合物(229mg)溶解于200mM磷酸缓冲溶液(pH6.25)(1145μL)中,加入EndoM(东京化成工业(株)制,1U/mL))水溶液(100μL),在35℃下保温6天。反应结束后。使用VIVASPIN 15R(Hydrosart膜、30K、6000g)对反应液进行超滤,将得到的通过液体使用反相HPLC进行分离精制。使用0.1％三氟醋酸水溶液作为洗脱液,装置使用ELS－PDA触发分取系统(日本分光株式会社制),柱使用Inertsil ODS－3(GL Sciences社制)。收集在洗脱中UV检测(220nm)到的包含目标产物的馏分,进行冷冻干燥得到目标产物(117mg)。

[2618] 工序3:[N_3－PEG(3)]－MSG1

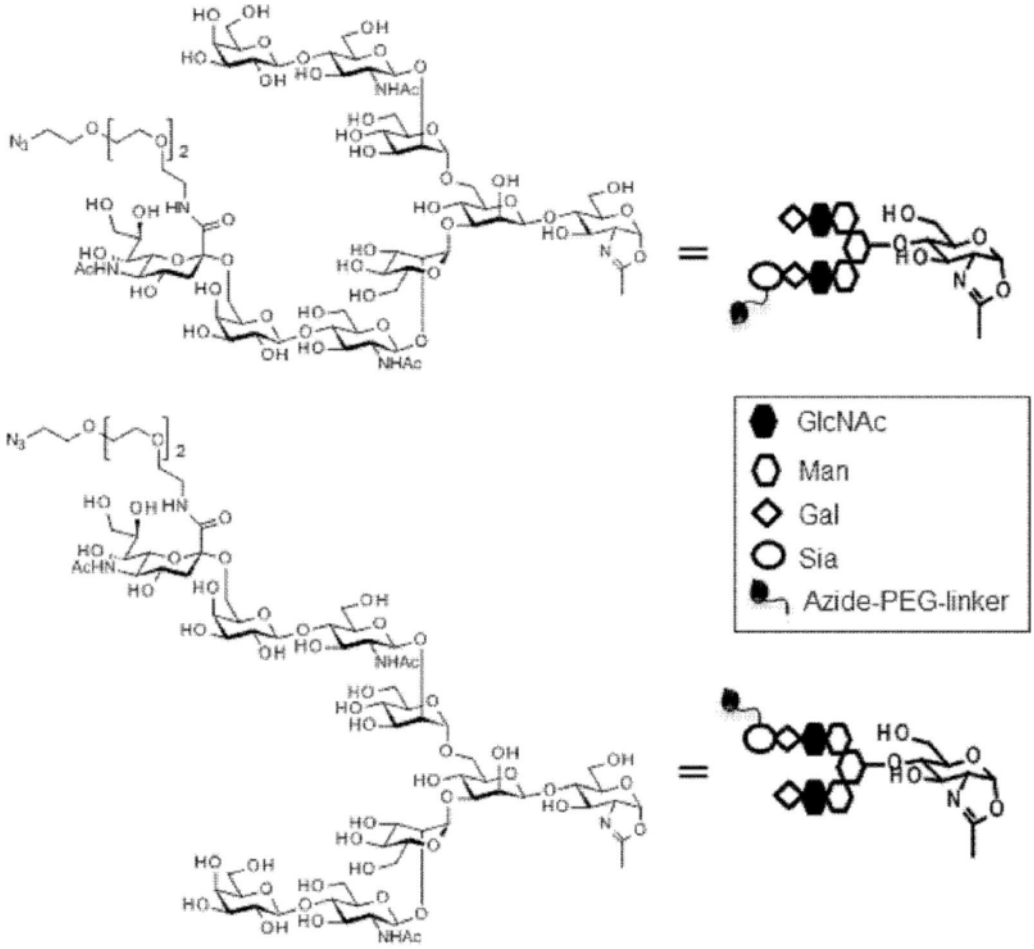
[2619] 使上述工序2合成的化合物(169mg)与实施例55工序1同样地反应,得到目标产物(94.2mg)。

[2620] 工序4[N_3－PEG(3)]－MSG1－Ox

[2621] 使上述工序3合成的化合物(100mg)与实施例55工序2同样地反应,得到目标产物(89mg)。

[2622] 实施例57:[N_3－PEG(3)]－MSG－Ox

[2623]



[2624] (上图中,结构式的右示意图表示实施例59的反应式所示的具有导入了叠氮基的连接子结构的中间体的示意图中的对应结构。)

[2625] 工序1:(MSG－)Asn的制备

[2626] 将市售品1S2G/1G2S－10NC－Asn－Fmoc((株)糖链工程研究所制)(称为“Fmoc－(MSG－)Asn”)(1000mg)溶解于乙醇/水(1/1)(10mL)中,加入1当量浓度的氢氧化钠水溶液(1.75mL、4当量),在室温下搅拌3小时。反应结束后,将反应液使用Amicon Ultra(30K,Millipore社制)进行超滤,除去固态物,在得到的通过液中加入1N盐酸(832μl,1.9当量)。使用高速浓缩装置V－10(Biotage社制)除去溶剂。加入乙腈,使用高速浓缩装置V－10(Biotage社制)除去溶剂后,使用反相HPLC进行分离精制。使用0.1％三氟醋酸水溶液和0.1％三氟醋酸乙腈溶液作为洗脱液,装置使用Purif－Rp2(昭光Scientific制),柱使用Inertsil ODS－3(GL Sciences制)。收集洗脱中UV检测(220nm)出的包含目标产物的馏分进行冷冻干燥。当再一次溶解于纯水中时,确认pH试纸显示酸性,因此加入18％氨水(150μl),用pH试纸确认显示碱性,再一次冷冻干燥。将得到的目标产物(840mg)直接用于下一个反应中。

[2627] 工序2:MSG的合成

[2628] 将工序1所得到的化合物(840mg)溶解于200mM磷酸缓冲溶液(pH6.25)(6000μL)中,加入EndoM(东京化成工业(株)制,1U/mL))水溶液(200μL),在28℃下保温26小时。由于反应还没有结束,因此加入EndoM(东京化成工业(株)制,1U/mL))水溶液(50μL),在28℃下保温2小时,然后室温放置直至反应结束。反应结束后,将反应液使用Amicon Ultra(30K,

Millipore社制)进行超滤。在得到的通过液中加入三氟醋酸(80μl),使用反相HPLC进行分离精制。使用0.1％三氟醋酸水溶液和0.1％三氟醋酸乙腈溶液作为洗脱液,装置使用Purif－Rp2(昭光Scientific制),柱使用Inertsil ODS－3(GL Sciences制)。收集洗脱中UV检测(220nm)出的包含目标产物的馏分进行冷冻干燥。为了除去残留的三氟醋酸再次溶解于纯水中,得到无色固体的目标化合物(618mg)。

[2629] ESI－MS:$C_{66}H_{110}N_4O_{49}$:$[M+H]^+$理论值1743.62,实际值1743.63

[2630] 工序3:[N_3－PEG(3)]－MSG的合成

[2631] 使用上述工序2所得到的化合物(120mg),以与实施例55工序1同样的方法得到目标产物(88.6mg)。

[2632] ESI－MS:$C_{73}H_{124}N_8O_{51}$:$[M+2H]^{2+}$理论值965.37,实际值965.37

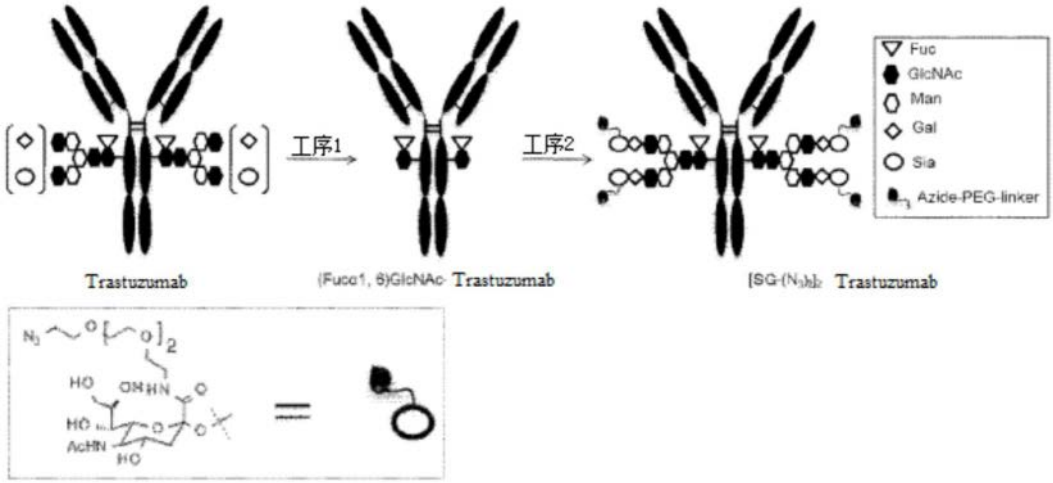
[2633] 工序4[N_3－PEG(3)]－MSG－Ox的合成

[2634] 使用上述工序4所得到的合成的化合物(100mg),以与实施例55工序2相同的方法得到目标产物(88mg)。

[2635] 〔糖链重构抗体的制备〕

[2636] 实施例58:糖链转换1(T－SG)

[2637]



[2638] (上式表示在SG型N297糖链的非还原末端唾液酸中导入了叠氮基的连接子结构。实施例58中,在N297糖链导入了叠氮基的中间体的连接子结构全部具有与上式同样的结构。)

[2639] 工序1:(Fucα1,6)GlcNAc－曲妥珠单抗的制备

[2640] 对于参考例3中制备的曲妥珠单抗溶液22mg/mL的(25mM组氨酸溶液(pH6.0),5％山梨醇溶液)(45.5mL),利用共通操作C,分2次进行与50mM磷酸缓冲液(pH6.0)的缓冲液交换。在得到的28.1mg/mL的曲妥珠单抗溶液(50mM磷酸缓冲液(pH6.0))(18mL)和28.0mg/mL的同溶液(18mL)中分别加入2.0mg/mL野生型EndoS溶液(PBS)1.26mL、1.27mL,在37℃下保温4小时。使用Experion电泳工作站(BIO－RAD制)确定反应的进度。反应结束后,根据以下的方法进行利用亲和色谱法的精制和利用羟基磷灰石柱的精制。

[2641] (1)利用亲和色谱法的精制

[2642] 精制装置:AKTA pure150(GE Healthcare制)

[2643] 柱:HiTrap rProtein A FF(5mL)(GE Healthcare制)

[2644] 流速:5mL/min(充电时为1.25mL/min)

[2645] 将上述得到的反应液分多次进行精制。连接两根柱,与柱结合时,将反应液向柱的上部添加,以1.25mL/min通入结合缓冲液(20mM磷酸缓冲液(pH6.0))2CV,再以5mL/min通入5CV。在中间清洗时,通入清洗溶液(20mM磷酸缓冲液(pH7.0)、0.5M氯化钠溶液)15CV。在洗脱时,通入6CV的洗脱缓冲液(Immuno Pure IgG Eution buffer,PIERCE制)。洗脱液用1M Tris缓冲液(pH9.0)直接中和。使用微量分光光度计Xpose(Trinean制)以及Experion电泳工作站(BIO－RAD制)确认在洗脱期间UV检测(280nm)出的馏分。利用共通操作C对包含目标产物的馏分,进行与5mM磷酸缓冲液50mM 2－吗啉代乙磺酸(MES)溶液(pH6.8)的缓冲液交换。

[2646] (2)利用羟基磷灰石色谱法的精制

[2647] 精制装置:AKTA avant25(GE Healthcare制)

[2648] 柱:Bio－Scale Mini CHT Type I Cartridge(5mL)(BIO－RAD制)

[2649] 流速:5mL/min(充电时为1.25mL/min)

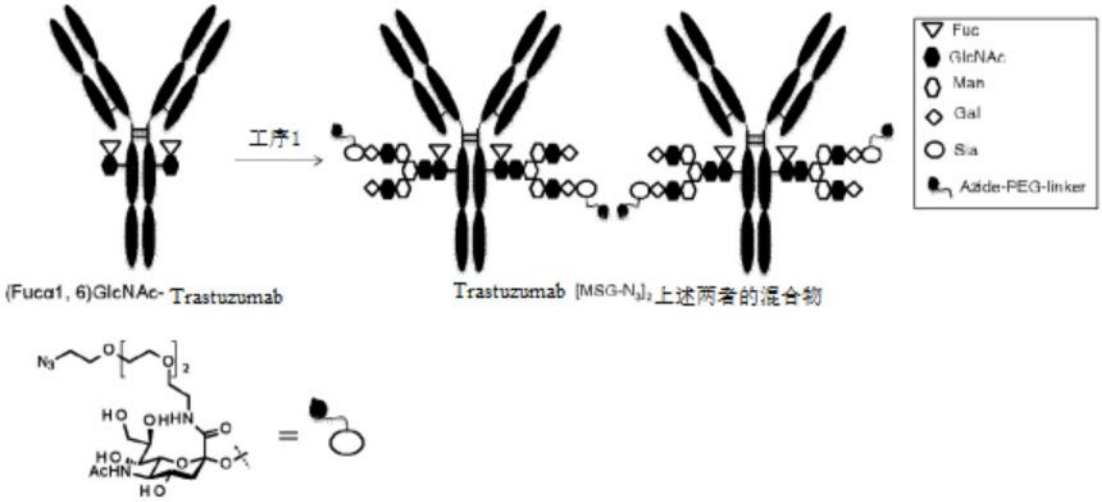
[2650] 连接2根柱,分多次对上述(1)所得到的溶液进行精制。将溶液向柱的上部添加,以1.25mL/min通入2CV、进一步以5mL/min通入3CV的A液(5mM磷酸缓冲液、50mM 2－吗啉代乙磺酸(MES)溶液(pH6.8))。然后使用A液和B液(5mM磷酸缓冲液50mM 2－吗啉代乙磺酸(MES)溶液(pH6.8)、2M氯化钠溶液)进行洗脱。洗脱条件为A液:B液＝100:0～0:100(15CV)。进而,通入清洗溶液(500mM磷酸缓冲液(pH6.5))5CV。

[2651] 利用共通操作C对包含目标产物的馏分进行缓冲液交换,得到25.5mg/mL的(Fucα1,6)GlcNAc－曲妥珠单抗溶液(50mM磷酸缓冲液(pH6.0))(35mL)。

[2652] 工序2:曲妥珠单抗[SG－$(N_3)_2$]$_2$的制备

[2653] 在上述工序1所得到的23.9mg/mL(Fucα1,6)GlcNAc－曲妥珠单抗溶液(50mM磷酸缓冲液(pH6.0))(3.37mL)中加入实施例55工序2中合成的化合物(12.9mg)的50mM磷酸缓冲液(pH6.0)溶液(0.258mL)、4.90mg/mL的EndoS D233Q/Q303L溶液(PBS)(0.328mL),在30℃下保温4.5小时。进行2组以上的操作。使用Experion电泳工作站(BIO－RAD制)确认反应的进度。反应结束后,与上述工序1同样地进行利用亲和色谱法的精制和利用羟基磷灰石色谱法的精制,之后利用共通操作C对包含目标产物的馏分进行与磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)的缓冲液交换,得到10.0mg/mL的曲妥珠单抗[SG－$(N_3)_2$]$_2$溶液(磷酸缓冲生理盐水(pH6.0))(15.5mL)。

[2654] 实施例59:糖链转换2(T－MSG)

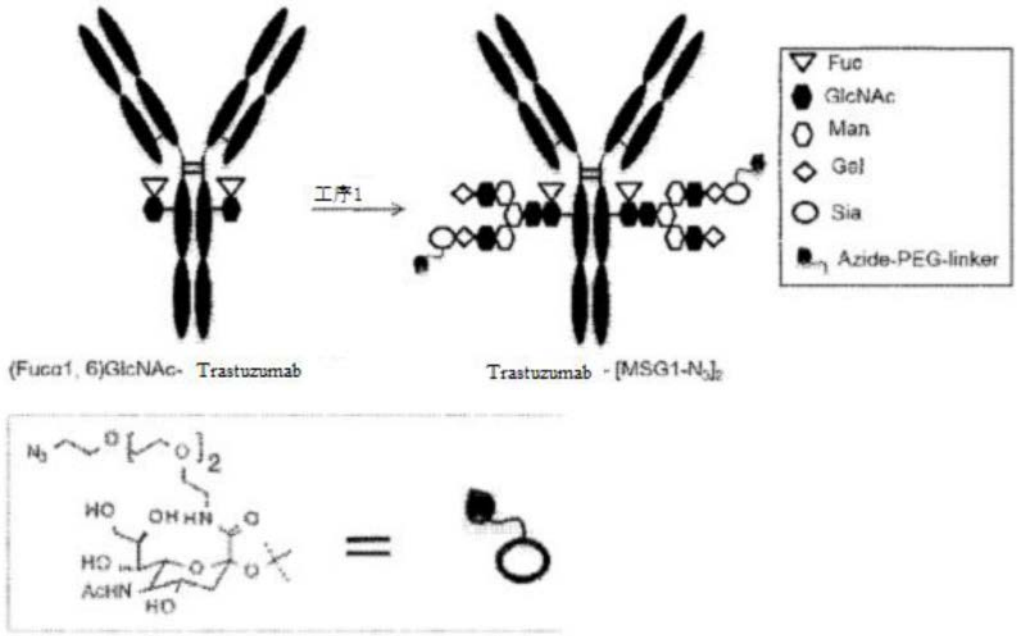
[2655] 

[2656] （上式表示在MSG型N297糖链的非还原末端唾液酸中导入了叠氮基的连接子结构。实施例59中，在N297糖链导入了叠氮基的中间体的连接子结构全部具有与上式相同的结构。）

[2657] 工序1：曲妥珠单抗[MSG－N_3]$_2$

[2658] 进行5组下述的操作。使用实施例58工序1所得到的化合物(20mg/mL，15.0mL)，使用实施例57工序4所得到的化合物(25.5mg)作为糖链供体，在30℃下保温3小时，进行与实施例59工序2同样的操作。合并5组而得到14.4mg/mL曲妥珠单抗[MSG－N_3]$_2$溶液(磷酸缓冲生理盐水(pH6.0))(93.5mL)。

[2659] 实施例60：糖链转换3(T－MSG1)

[2660] 

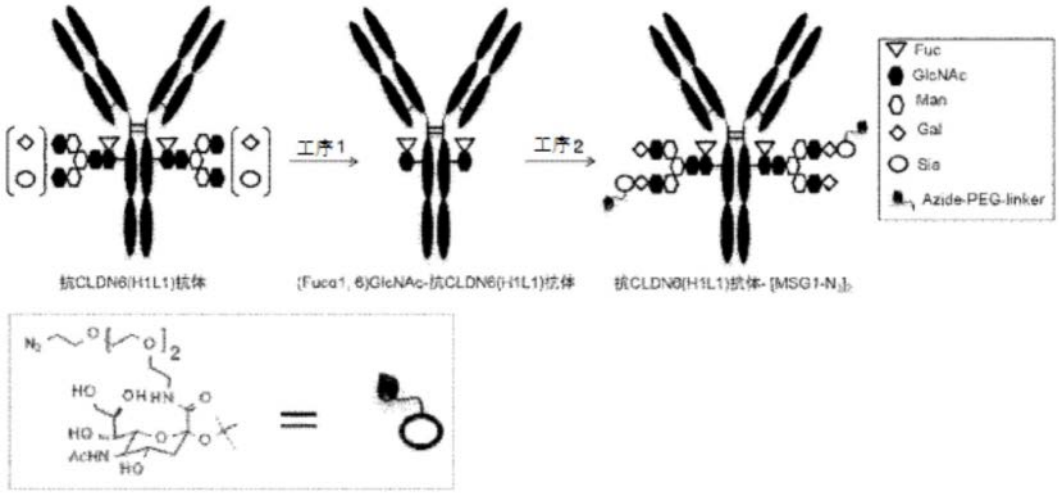
[2661] （上式表示在MSG1型N297糖链的非还原末端唾液酸中导入了叠氮基的连接子结构。实施例60中，在N297糖链导入了叠氮基的中间体的连接子结构全部具有与上式相同的结构。实施例61－66也同样。）

[2662] 工序1：曲妥珠单抗[MSG1－N_3]$_2$

[2663] 进行2组下述的操作。使用实施例58工序1所得到的化合物(25.5mL，7.8mL)，使用

实施例56工序4所得到的化合物(25.5mg)作为糖链供体,在30℃下保温3小时,进行与实施例59工序2同样的操作。合并2组而得到10.6mg/mL曲妥珠单抗[MSG1－N_3]$_2$溶液(磷酸缓冲生理盐水(pH6.0))(31mL)。

[2664] 实施例61:糖链转换4(CLDN6－MSG1(H1L1))

[2665] 

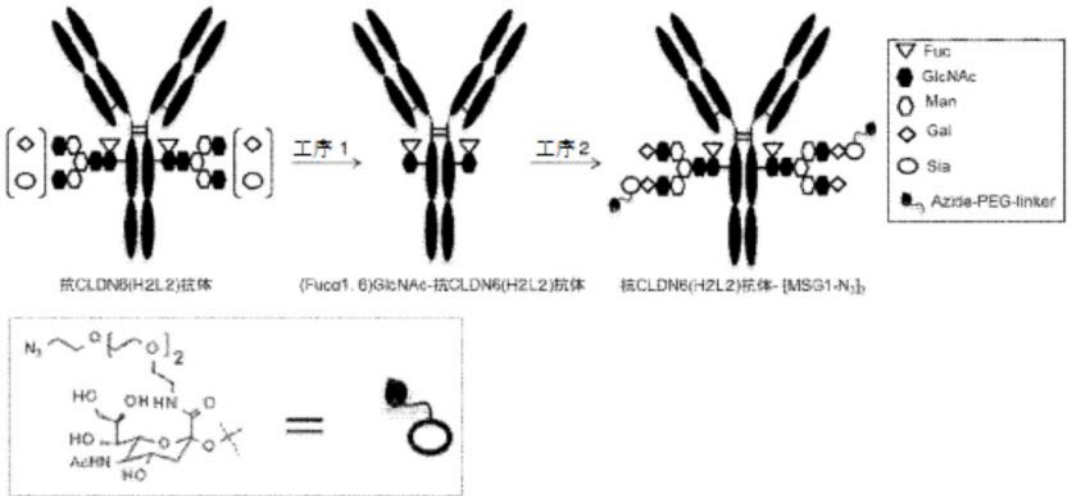
[2666] 工序1:(Fucα1,6)GlcNAc－抗CLDN6抗体(H1L1)

[2667] 使用实施例136中制备的抗CLDN6抗体溶液ca.37.7mg/mL(25mM组氨酸溶液(pH6.0),5%山梨醇溶液)(2.5mL),进行与实施例58工序1同样的操作,得到19.2mg/mL的(Fucα1,6)GlcNAc－抗CLDN6抗体(H1L1)溶液(50mM磷酸缓冲液(pH6.0))(4.8mL)。

[2668] 工序2:抗CLDN6抗体(H1L1)－[MSG1－N_3]$_2$

[2669] 使用上述工序1所得到的19.2mg/mL(Fucα1,6)GlcNAc－抗CLDN6(H1L1)抗体溶液(50mM磷酸缓冲液(pH6.0))(4.8mL),进行与实施例60工序1同样的操作,由此得到10.2mg/mL抗CLDN6抗体(H1L1)－[MSG1－N_3]$_2$溶液(磷酸缓冲生理盐水(pH6.0))(7.2mL)。

[2670] 实施例62:糖链转换5(CLDN6－MSG1(H2L2))

[2671] 

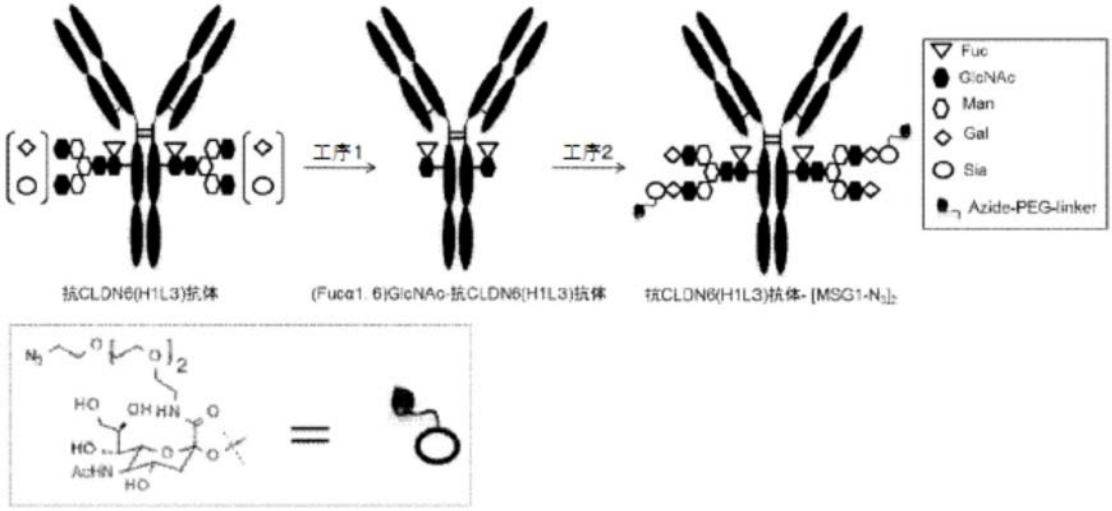
[2672] 工序1:(Fucα1,6)GlcNAc－抗CLDN6抗体(H2L2)

[2673] 使用实施例136制备的抗CLDN6抗体溶液ca.20mg/mL(25mM组氨酸溶液(pH6.0),5%山梨醇溶液)(6mL),进行与实施例58工序1同样的操作,得到21.84mg/mL的(Fucα1,6)GlcNAc－抗CLDN6抗体(H2L2)溶液(50mM磷酸缓冲液(pH6.0))(5.7mL)。

[2674] 工序2:抗CLDN6抗体(H2L2)－[MSG1－N_3]$_2$

[2675] 使用上述工序1所得到的21.8mg/mL(Fucα1,6)GlcNAc－抗CLDN6(H2L2)抗体溶液(50mM磷酸缓冲液(pH6.0))(5.7mL),进行与实施例60工序1同样的操作,由此得到10.2mg/mL抗CLDN6抗体(H2L2)－[MSG1－N_3]$_2$溶液(磷酸缓冲生理盐水(pH6.0))(11.1mL)。

[2676] 实施例63:糖链转换6(CLDN6－MSG1(H1L3))

[2677] 

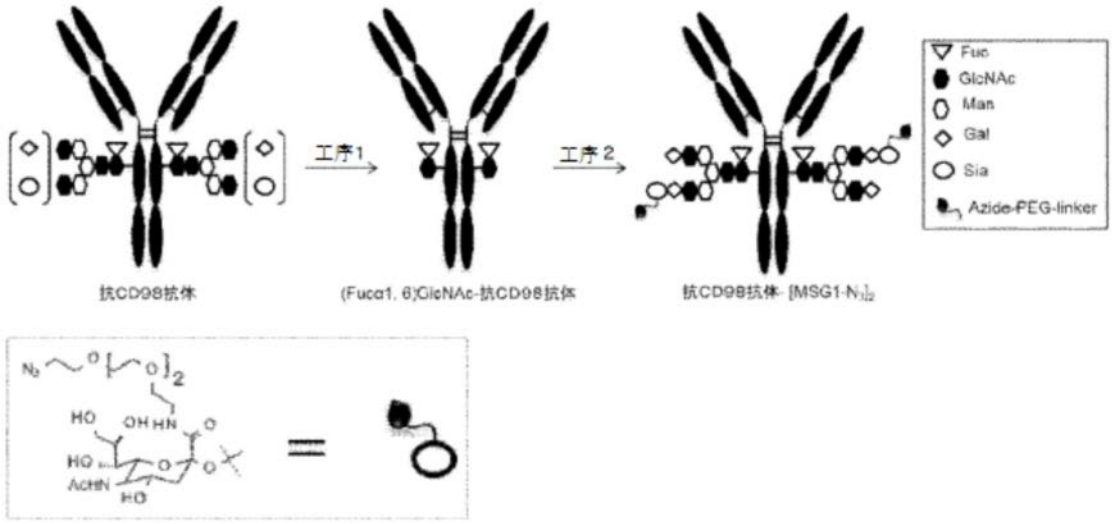
[2678] 工序1:(Fucα1,6)GlcNAc－抗CLDN6抗体(H1L3)

[2679] 使用实施例136制备的抗CLDN6抗体溶液ca.39.4mg/mL(25mM组氨酸溶液(pH6.0),5%山梨醇溶液)(3mL),进行与实施例58工序1同样的操作,得到39.2mg/mL的(Fucα1,6)GlcNAc－抗CLDN6抗体(H1L3)溶液(50mM磷酸缓冲液(pH6.0))(4.5mL)。

[2680] 工序2:抗CLDN6抗体(H1L3)－[MSG1－N_3]$_2$

[2681] 使用上述工序1所得到的39.2mg/mL(Fucα1,6)GlcNAc－抗CLDN6(H1L3)抗体溶液(50mM磷酸缓冲液(pH6.0))(4.5mL),进行与实施例60工序1同样的操作,由此得到9.83mg/mL抗CLDN6抗体(H1L3)－[MSG1－N_3]$_2$溶液(磷酸缓冲生理盐水(pH6.0))(7.2mL)。

[2682] 实施例64:糖链转换7(CD98－MSG1)

[2683] 

[2684] 工序1:(Fucα1,6)GlcNAc－抗CD98抗体

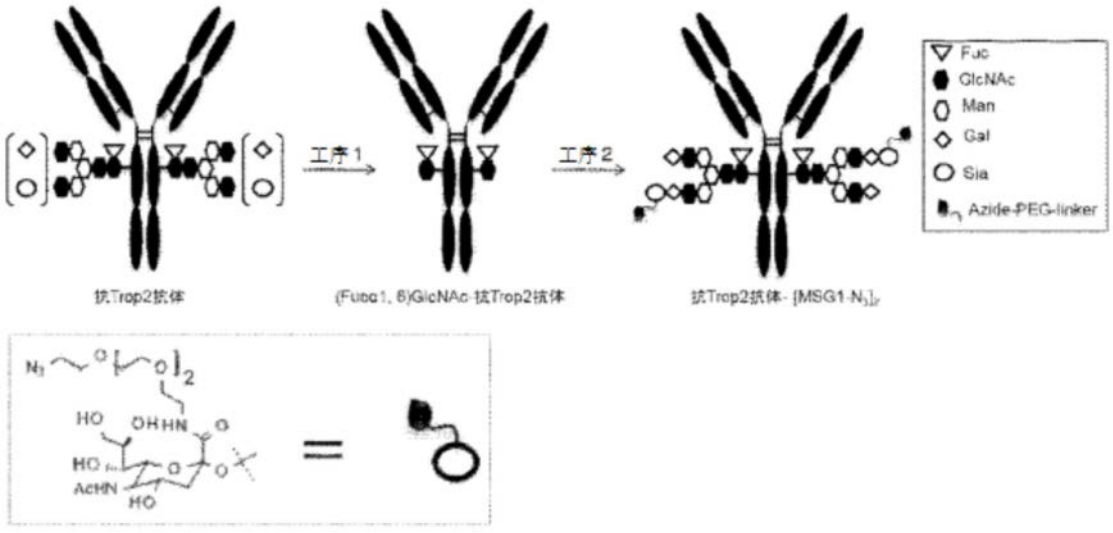
[2685] 使用参考例6制备的抗CD98抗体溶液ca.20mg/mL(25mM组氨酸溶液(pH6.0)、5%山

梨醇溶液)(6mL),进行与实施例58工序1同样的操作,得到21.7mg/mL的(Fucα1,6)GlcNAc－抗CD98抗体溶液(50mM磷酸缓冲液(pH6.0))(4.7mL)。

[2686] 工序2:抗CD98抗体－[MSG1－N_3]$_2$

[2687] 使用上述工序1所得到的21.7mg/mL(Fucα1,6)GlcNAc－抗CD98抗体溶液(50mM磷酸缓冲液(pH6.0))(4.7mL),进行与实施例60工序1同样的操作,由此得到10.1mg/mL的抗CD98抗体－[MSG1－N_3]$_2$溶液(磷酸缓冲生理盐水(pH6.0))(7.6mL)。

[2688] 实施例65:糖链转换8(TROP2－MSG1)

[2689] 

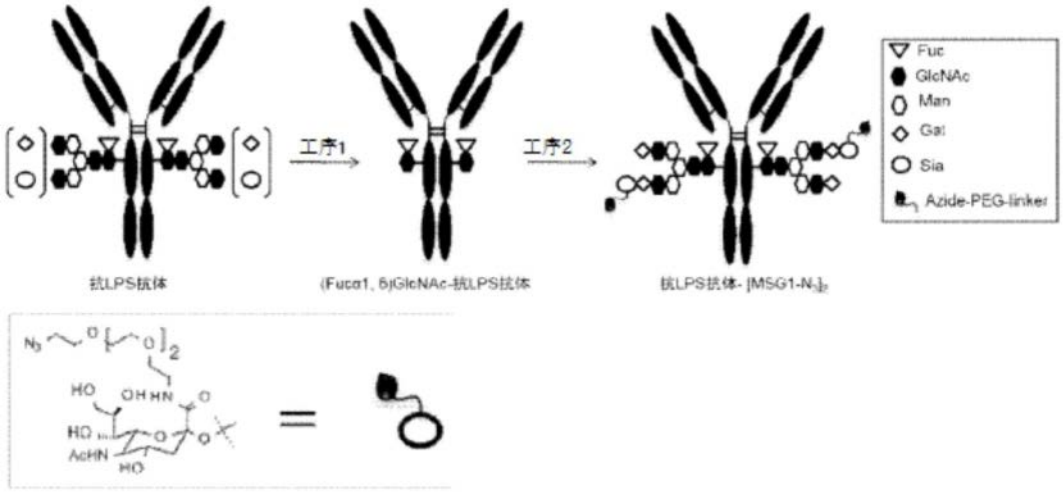
[2690] 工序1:(Fucα1,6)GlcNAc－抗Trop2抗体

[2691] 使用参考例5制备的抗Trop2抗体溶液ca.20mg/mL(25mM组氨酸溶液(pH6.0),5%山梨醇溶液)(6mL),进行与实施例58工序1同样的操作,得到21.69mg/mL的(Fucα1,6)GlcNAc－抗Trop2抗体溶液(50mM磷酸缓冲液(pH6.0))(3.3mL)。

[2692] 工序2:抗Trop2抗体－[MSG1－N_3]$_2$

[2693] 使用上述工序1所得到的21.69mg/mL(Fucα1,6)GlcNAc－抗Trop2抗体溶液(50mM磷酸缓冲液(pH6.0))(3.35mL),进行与实施例60工序1同样的操作,由此得到10.3mg/mL的抗Trop2抗体－[MSG1－N_3]$_2$溶液(磷酸缓冲生理盐水(pH6.0))(6.4mL)。

[2694] 实施例66:糖链转换9(LPS－MSG1)

[2695] 

[2696] 工序1:(Fucα1,6)GlcNAc－抗LPS抗体

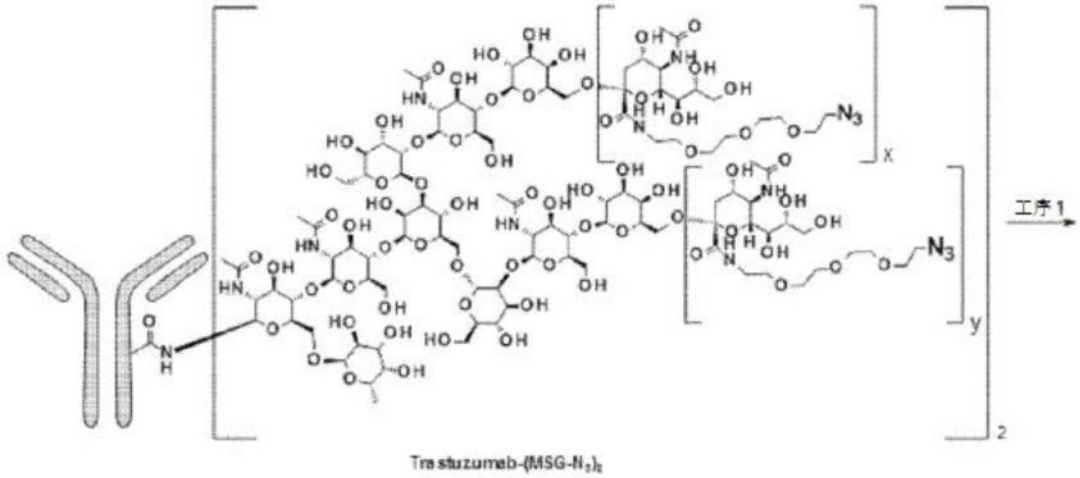
[2697] 使用参考例4制备的抗LPS抗体溶液ca.17mg/mL(25mM组氨酸溶液(pH6.0),5%山梨醇溶液)(6.6mL),进行与实施例58工序1同样的操作,得到21.03mg/mL的(Fucα1,6)GlcNAc－抗LPS抗体溶液(50mM磷酸缓冲液(pH6.0))(5.4mL)。

[2698] 工序2:抗LPS抗体－[MSG1－N_3]$_2$

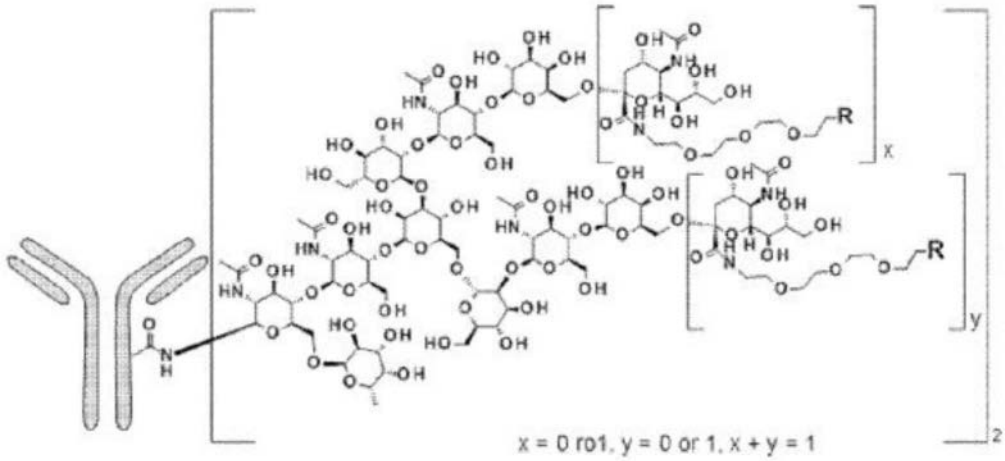
[2699] 使用上述工序1所得到的21.03mg/mL(Fucα1,6)GlcNAc－抗LPS抗体溶液(50mM磷酸缓冲液(pH6.0))(5.4mL),进行与实施例60工序1同样的操作,由此得到9.89mg/mL的抗LPS抗体－[MSG1－N_3]$_2$溶液(磷酸缓冲生理盐水(pH6.0))(7.9mL)。

[2700] 〔ADC的合成〕

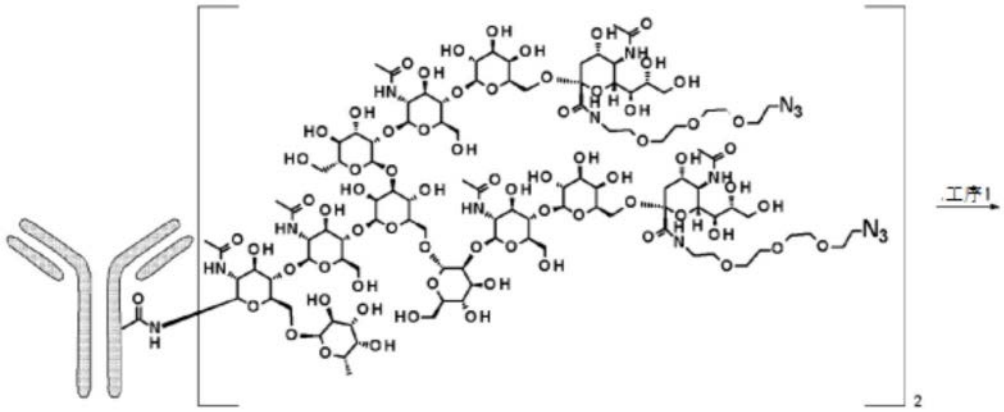
[2701] 实施例67～71、77～80、82～88、92～95、109～114、120所述的ADC,如以下的反应式所示,通过使实施例59的工序1所得到的抗体与药物连接子偶联来合成。式中,R根据各实施例中使用的药物连接子而不同。



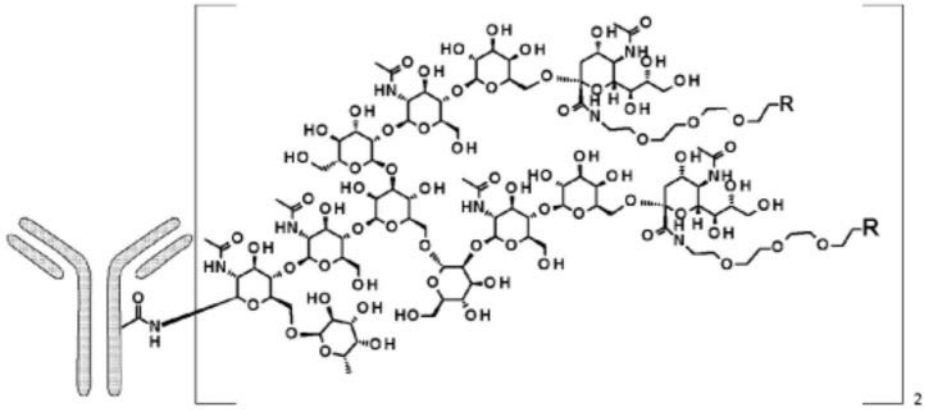
[2702]



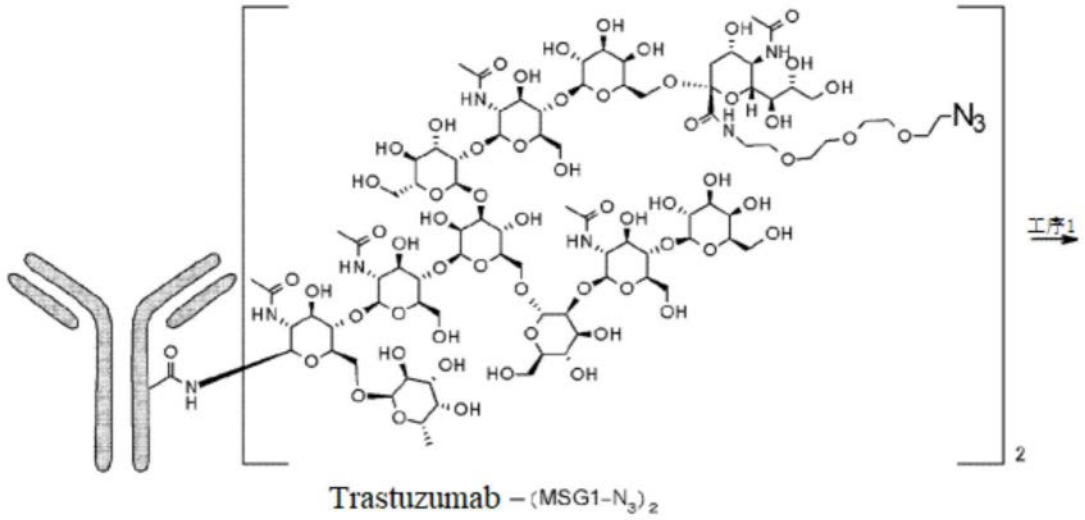
[2703] 实施例72、73、75、91所述的ADC,如下述反应式所示,通过使实施例58工序2所得到的抗体与药物连接子偶联来合成。式中,R根据各实施例使用的药物连接子而不同。



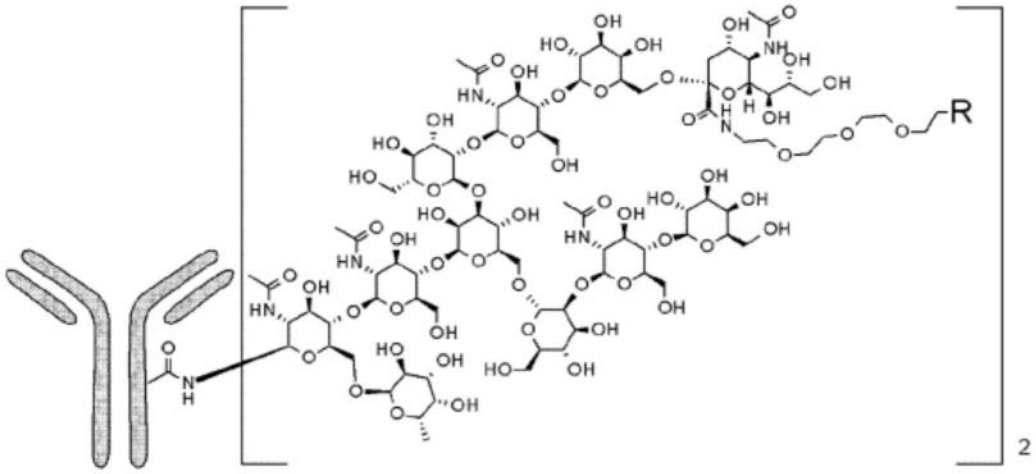
[2704]



[2705] 实施例74、81、89、90、96～105、115、118所述的ADC，如下述反应式所示，通过使实施例60工序1所得到的抗体与药物连接子偶联来合成。式中，R基根据各实施例使用的药物连接子而不同。

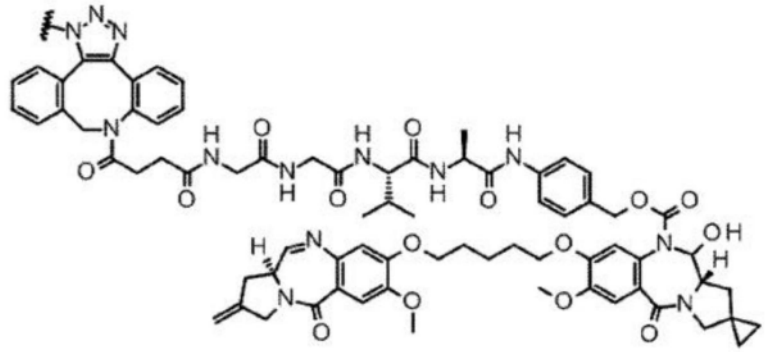


[2706]

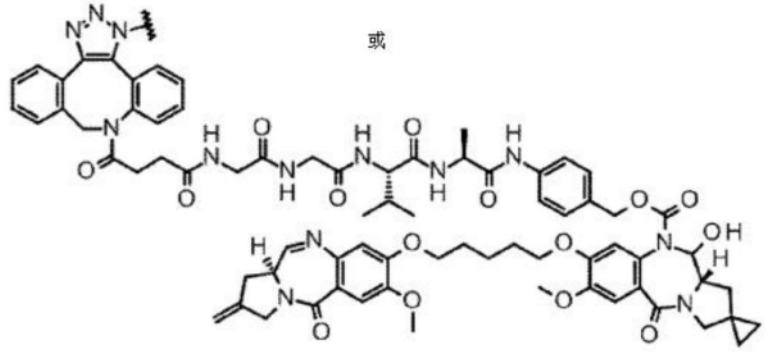


[2707] 实施例67:ADC1

[2708] R =



或



[2709] (工序1中形成的三唑环具有几何异构,实施例67工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。)

[2710] 工序1:抗体与药物连接子的偶联

[2711] 在实施例59工序1所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.0mg/mL,1.00mL)中,在室温下加入1,2－丙二醇(0.917mL)、包含实施例24工序13所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0825mL;相对于1分子抗体为12当量),使用管旋转器(MTR－103,AS ONE株式会社),在室温下反应48小时。

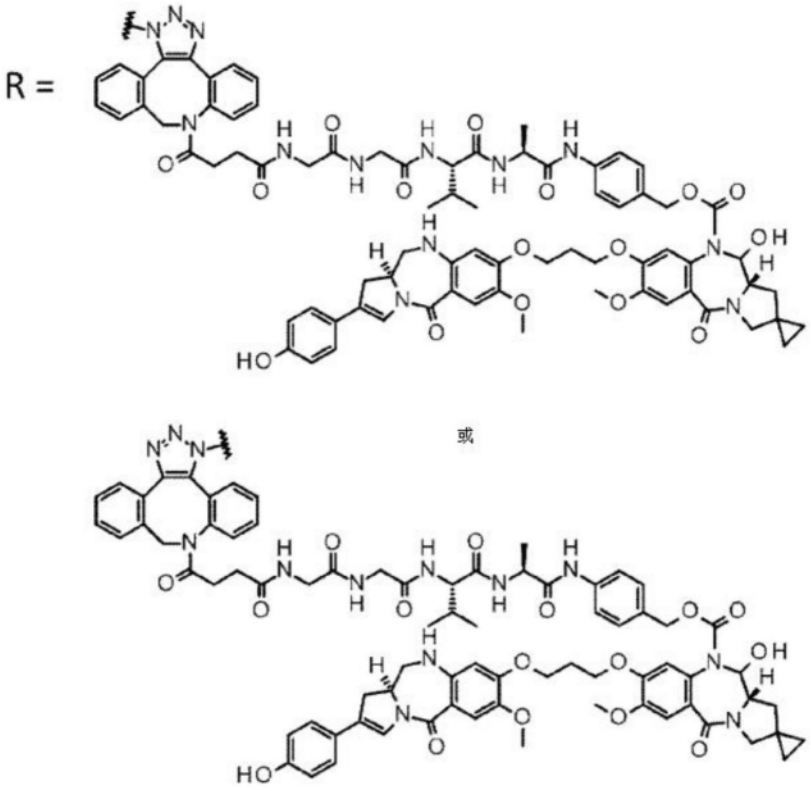
[2712] 精制操作:对上述溶液利用共通操作D进行精制,得到具有目标化合物的溶液14.00mL。对该溶液利用共通操作A进行浓缩,得到具有目标化合物的溶液0.75mL。

[2713] 特性评价:利用共通操作E、F得到下述的特性值。

[2714] 抗体浓度:11.4mg/mL,抗体产量:8.56mg(86%),每一分子抗体的药物平均结合数(n):1.9

[2715] 实施例68:ADC2

[2716]



[2717] （工序1中形成的三唑环具有几何异构，实施例68工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。）

[2718] 工序1：抗体与药物连接子的偶联

[2719] 在实施例59工序1所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.0mg/mL，1.00mL)中，在室温下加入1,2－丙二醇(0.917mL)、包含实施例25工序14所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0825mL；相对于1分子抗体为12当量)，使用管旋转器(MTR－103、AS ONE株式会社)，在室温下反应48小时。

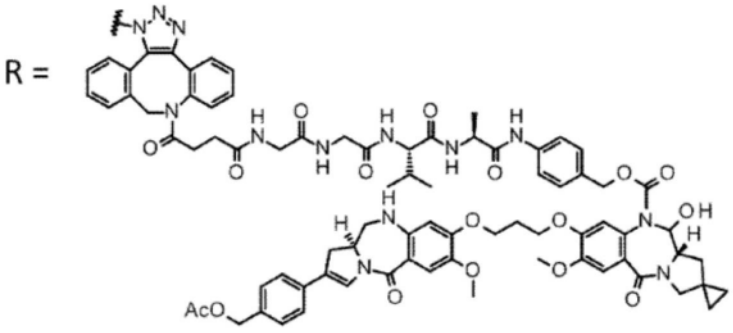
[2720] 精制操作：对上述溶液利用共通操作D进行精制，得到具有目标化合物的溶液6.00mL。

[2721] 特性评价：利用共通操作E、F得到下述的特性值。

[2722] 抗体浓度：1.48mg/mL，抗体产量：8.88mg(89％)，每一分子抗体的药物平均结合数(n)：1.9

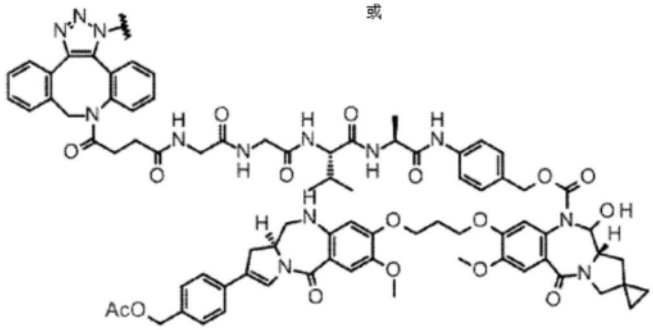
[2723] 实施例69：ADC3

R =



[2724]

或



[2725] (工序1中形成的三唑环具有几何异构,实施例69工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。)

[2726] 工序1:抗体与药物连接子的偶联

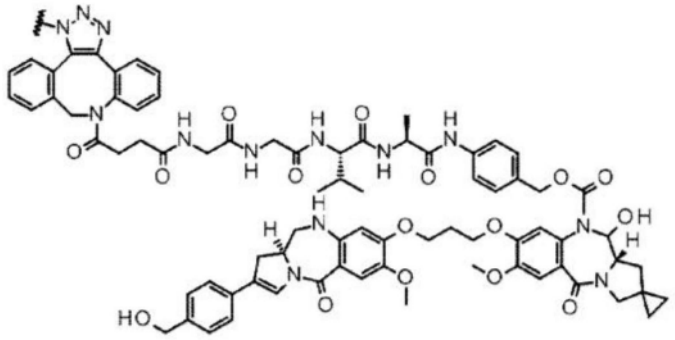
[2727] 在实施例59工序1所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.0mg/mL,1.00mL)中,在室温下加入1,2－丙二醇(0.917mL)、包含实施例26工序14所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0825mL;相对于1分子抗体为12当量),使用管旋转器(MTR－103,AS ONE株式会社),在室温下反应48小时。

[2728] 精制操作:对上述溶液利用共通操作D进行精制,得到具有目标化合物的溶液6.00mL。

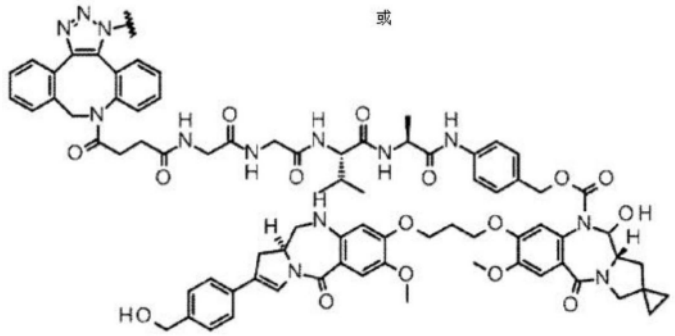
[2729] 特性评价:利用共通操作E、F得到下述的特性值。

[2730] 抗体浓度:1.45mg/mL,抗体产量:8.67mg(89%),每一分子抗体的药物平均结合数(n):1.9

[2731] 实施例70:ADC4

[2732] R = 

或



[2733] （工序1中形成的三唑环具有几何异构，实施例70工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。）

[2734] 工序1：抗体与药物连接子的偶联

[2735] 在实施例59工序1所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.0mg/mL，1.00mL)中，在室温下加入1,2－丙二醇(0.917mL)、包含实施例27工序1所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0825mL；相对于1分子抗体为12当量)，使用管旋转器(MTR－103，AS ONE株式会社)，在室温下反应48小时。

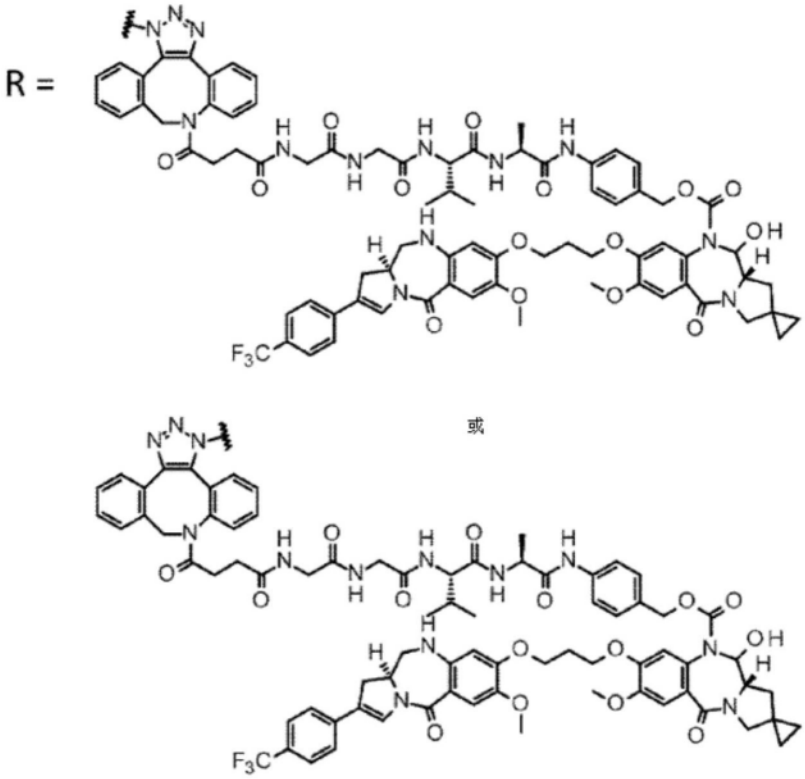
[2736] 精制操作：对上述溶液利用共通操作D进行精制，得到具有目标化合物的溶液6.00mL。

[2737] 特性评价：利用共通操作E、F得到下述的特性值。

[2738] 抗体浓度：1.30mg/mL，抗体产量：7.80mg(78％)，每一分子抗体的药物平均结合数(n)：1.9

[2739] 实施例71：ADC5

[2740]



[2741] (工序1中形成的三唑环具有几何异构,实施例71工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。)

[2742] 工序1:抗体与药物连接子的偶联

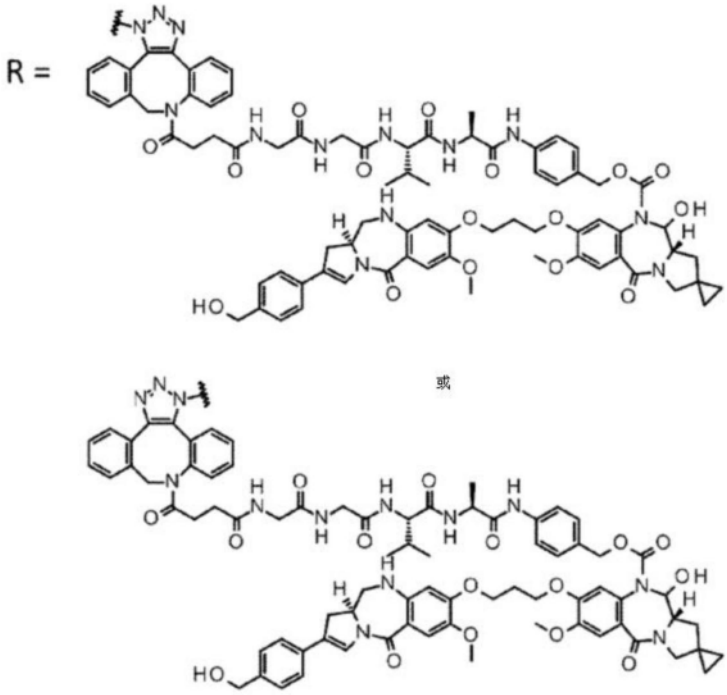
[2743] 在实施例59工序1所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.0mg/mL,1.00mL)中,在室温下加入1,2－丙二醇(0.917mL)、包含实施例28工序8所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0825mL;相对于1分子抗体为12当量),使用管旋转器(MTR－103,AS ONE株式会社),在室温下反应48小时。

[2744] 精制操作:对上述溶液利用共通操作D进行精制,得到具有目标化合物的溶液6.00mL。

[2745] 特性评价:利用共通操作E、F得到下述的特性值。

[2746] 抗体浓度:1.08mg/mL,抗体产量:6.48mg(65%),每一分子抗体的药物平均结合数(n):1.6

[2747] 实施例72:ADC6

[2748] 

[2749] (工序1中形成的三唑环具有几何异构,实施例72工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。)

[2750] 工序1:抗体与药物连接子的偶联

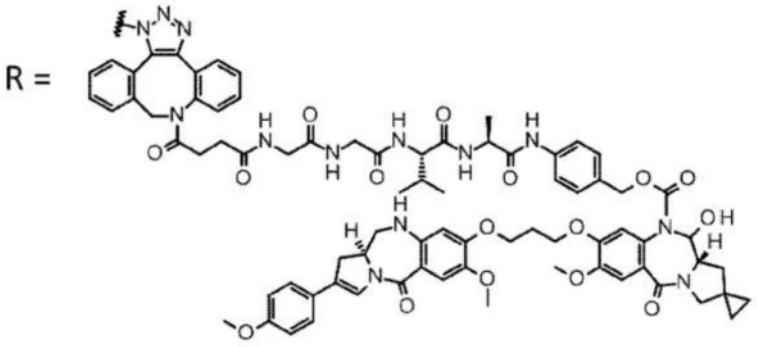
[2751] 在实施例58工序2所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.0mg/mL,1.00mL)中,在室温下加入1,2－丙二醇(0.835mL)、包含实施例27工序1所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.165mL;相对于抗体1分子的24当量),使用管旋转器(MTR－103,AS ONE株式会社),在室温下反应48小时。

[2752] 精制操作:对上述溶液利用共通操作D进行精制,得到具有目标化合物的溶液4.50mL。

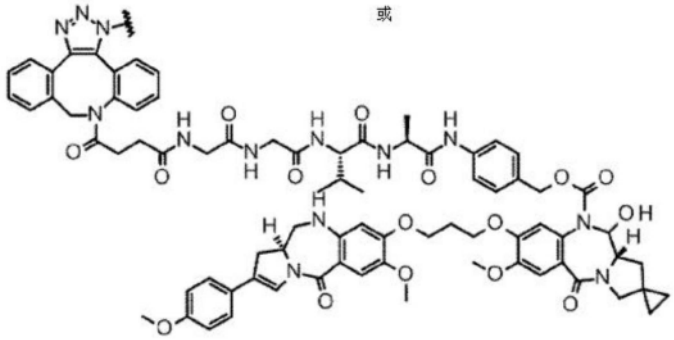
[2753] 特性评价:利用共通操作E、F得到下述的特性值。

[2754] 抗体浓度:1.75mg/mL,抗体产量:7.86mg(79%),每一分子抗体的药物平均结合数(n):3.8

[2755] 实施例73:ADC7

[2756] R = 

或



[2757] (工序1中形成的三唑环具有几何异构,实施例73工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。)

[2758] 工序1:抗体与药物连接子的偶联

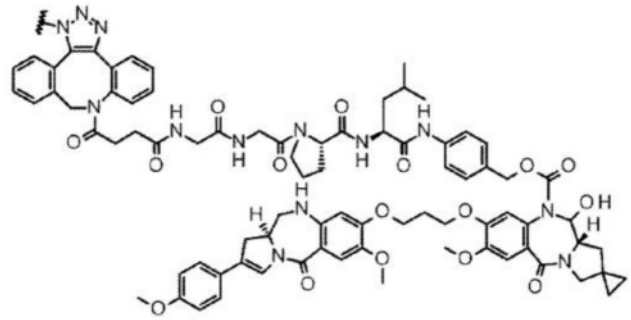
[2759] 在实施例58工序2所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.0mg/mL,1.00mL)中,在室温下加入1,2－丙二醇(0.835mL)、包含实施例4工序12所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.165mL;相对于1分子抗体为24当量),使用管旋转器(MTR－103,AS ONE株式会社),在室温下反应48小时。

[2760] 精制操作:对上述溶液利用共通操作D进行精制,得到具有目标化合物的溶液4.50mL。

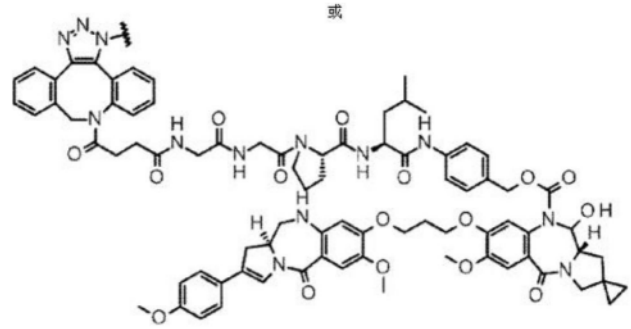
[2761] 特性评价:利用共通操作E、F得到下述的特性值。

[2762] 抗体浓度:1.66mg/mL,抗体产量:7.48mg(75%),每一分子抗体的药物平均结合数(n):3.8

[2763] 实施例74:ADC8

[2764] R = 

或



[2765] (工序1中形成的三唑环具有几何异构,实施例74工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。)

[2766] 工序1:抗体与药物连接子的偶联

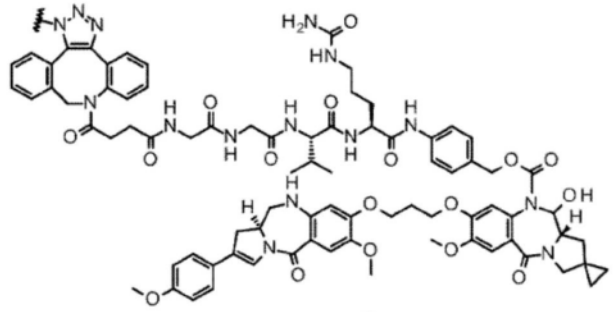
[2767] 在实施例60工序1所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.0mg/mL,1.00mL)中,在室温下加入1,2－丙二醇(0.917mL)、包含实施例29工序14所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0825mL;相对于1分子抗体为12当量),使用管旋转器(MTR－103,AS ONE株式会社),在室温下反应48小时。

[2768] 精制操作:对上述溶液利用共通操作D进行精制,得到具有目标化合物的溶液6.00mL。

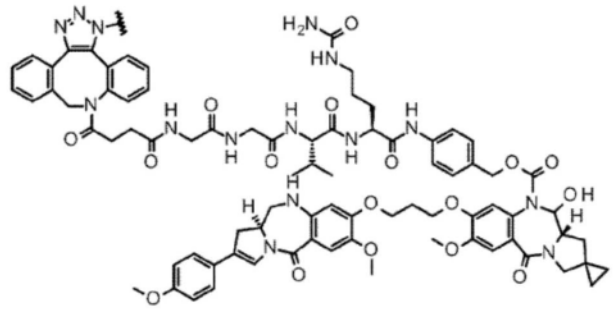
[2769] 特性评价:利用共通操作E、F得到下述的特性值。

[2770] 抗体浓度:1.36mg/mL,抗体产量:8.17mg(82%),每一分子抗体的药物平均结合数(n):1.8

[2771] 实施例75:ADC9

[2772] R = 

或



[2773] （工序1中形成的三唑环具有几何异构，实施例75工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。）

[2774] 工序1：抗体与药物连接子的偶联

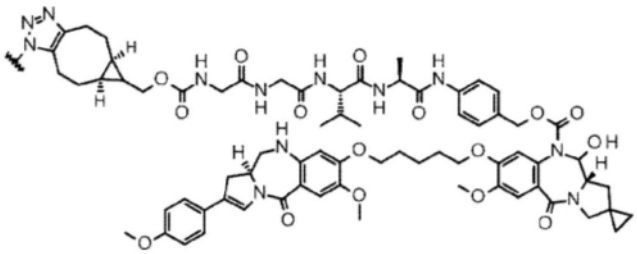
[2775] 在实施例58工序2所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.0mg/mL，1.00mL)中，在室温下加入1,2－丙二醇(0.835mL)、包含实施例9工序9所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.165mL；相对于1分子抗体为24当量)，使用管旋转器(MTR－103，ASONE株式会社)，在室温下反应48小时。

[2776] 精制操作：对上述溶液利用共通操作D进行精制，得到具有目标化合物的溶液8.50mL。

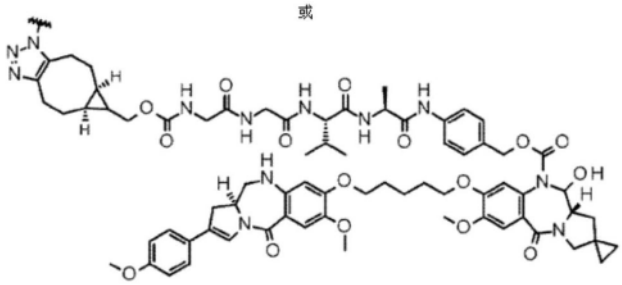
[2777] 特性评价：利用共通操作E、F得到下述的特性值。

[2778] 抗体浓度：0.86mg/mL，抗体产量：7.35mg(73％)，每一分子抗体的药物平均结合数(n)：3.6

[2779] 实施例76：ADC10

R = 

[2780] 或



[2781] （工序1中形成的三唑环具有几何异构，实施例76工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。）

[2782] 工序1：抗体与药物连接子的偶联

[2783] 如实施例106的反应式所示，在实施例61工序2所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.2mg/mL，0.400mL)中，在室温下加入1,2－丙二醇(0.200mL)、包含实施例30工序2所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0549mL；相对于抗体1分子为20当量)以及二甲基亚砜(0.145mL)，使用管旋转器(MTR－103，AS ONE株式会社)，在室温下反应72小时。

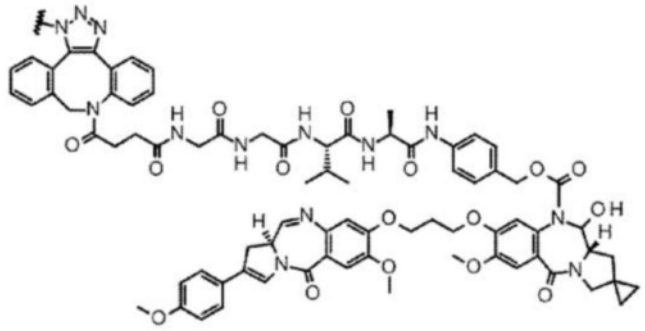
[2784] 精制操作：对上述溶液利用共通操作D进行精制，得到具有目标化合物的溶液2.50mL。

[2785] 特性评价：利用共通操作E、F得到下述的特性值。

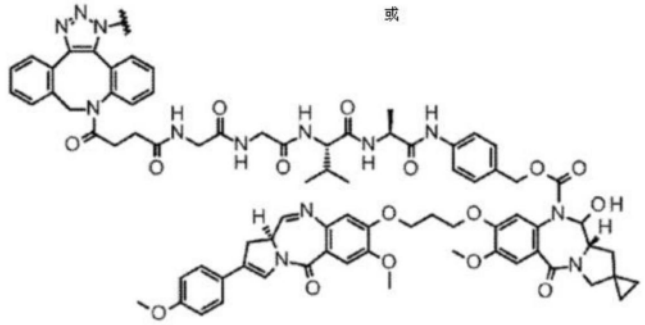
[2786] 抗体浓度：1.19mg/mL，抗体产量：2.98mg(75％)，每一分子抗体的药物平均结合数(n)：1.8

[2787] 实施例77：ADC11

[2788] R =



或



[2789] （工序1中形成的三唑环具有几何异构，实施例77工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。）

[2790] 工序1：抗体与药物连接子的偶联

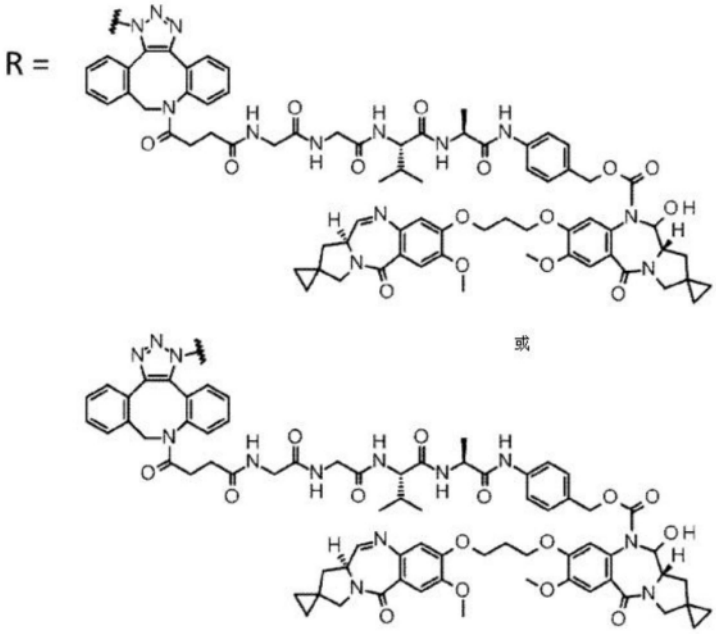
[2791] 在实施例59工序1所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(9.88mg/mL，0.500mL)中，在室温下加入1,2－丙二醇(0.459mL)、包含实施例19工序12所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0408mL；相对于1分子抗体为12当量)，使用管旋转器(MTR－103，AS ONE株式会社)，在室温下反应48小时。

[2792] 精制操作：对上述溶液利用共通操作D进行精制，对得到的溶液利用共通操作A进行浓缩，得到具有目标化合物的溶液0.470mL。

[2793] 特性评价：利用共通操作E、F得到下述的特性值。

[2794] 抗体浓度：8.31mg/mL，抗体产量：3.90mg(79％)，每一分子抗体的药物平均结合数(n)：1.8

[2795] 实施例78：ADC12

[2796] 

[2797] (工序1中形成的三唑环具有几何异构,实施例78工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。)

[2798] 工序1:抗体与药物连接子的偶联

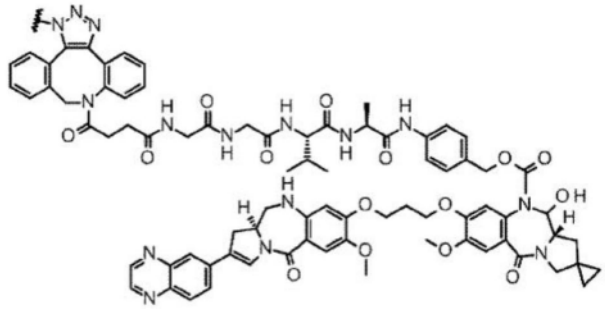
[2799] 在实施例59工序1所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.0mg/mL,1.00mL)中,在室温下加入1,2－丙二醇(0.917mL)、包含实施例20工序8所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0825mL;相对于1分子抗体为12当量),使用管旋转器(MTR－103,AS ONE株式会社),在室温下反应48小时。

[2800] 精制操作:对上述溶液利用共通操作D进行精制后,对得到的溶液利用共通操作A进行浓缩,得到具有目标化合物的溶液0.75mL。

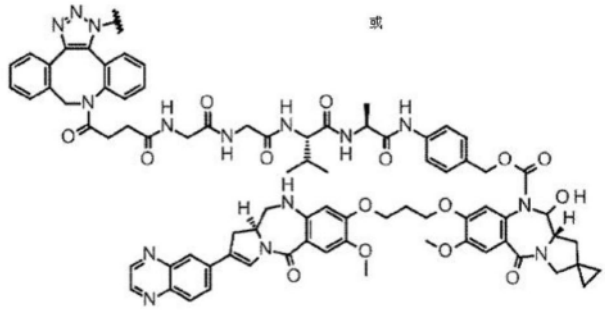
[2801] 特性评价:利用共通操作E、F得到下述的特性值。

[2802] 抗体浓度:8.70mg/mL,抗体产量:6.94mg(69%),每一分子抗体的药物平均结合数(n):1.7

[2803] 实施例79:ADC13

[2804] R = 

或



[2805] 工序1中形成的三唑环具有几何异构,实施例79工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。)

[2806] 工序1:抗体与药物连接子的偶联

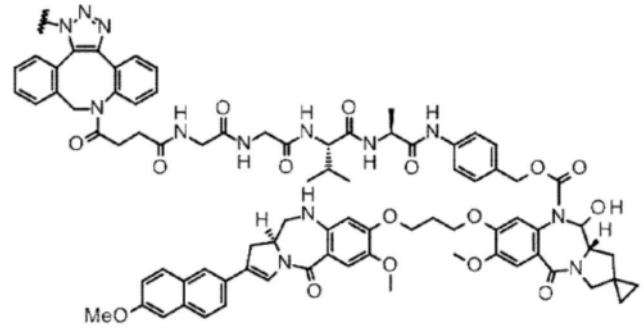
[2807] 在实施例59工序1所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.0mg/mL,1.00mL)中,在室温下加入1,2－丙二醇(0.917mL)、包含实施例21工序18所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0825mL;相对于1分子抗体为12当量),使用管旋转器(MTR－103,AS ONE株式会社),在室温下反应48小时。

[2808] 精制操作:对上述溶液利用共通操作D进行精制,得到具有目标化合物的溶液6.00mL。

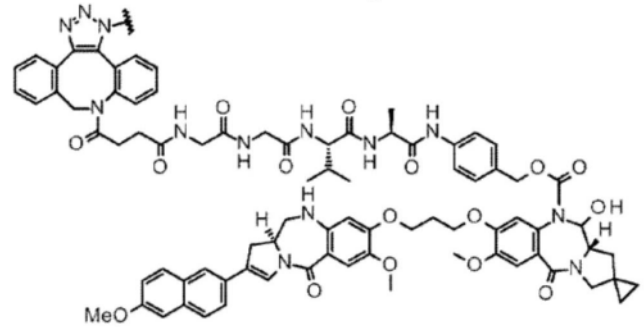
[2809] 特性评价:利用共通操作E、F得到下述的特性值。

[2810] 抗体浓度:0.96mg/mL,抗体产量:5.77mg(58%),每一分子抗体的药物平均结合数(n):1.9

[2811] 实施例80:ADC14

[2812] R = 

或



[2813] （工序1中形成的三唑环具有几何异构，实施例80工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。）

[2814] 工序1：抗体与药物连接子的偶联

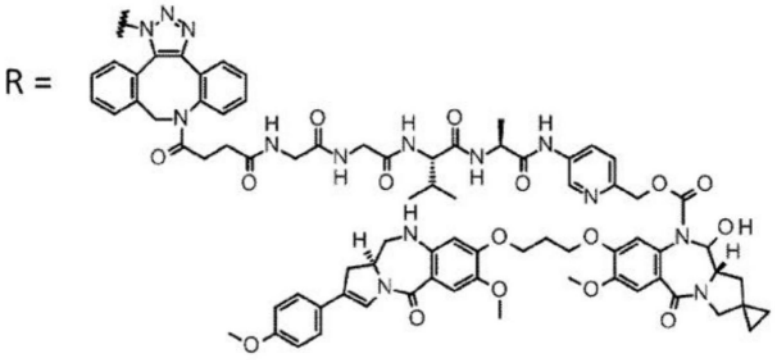
[2815] 在实施例59工序1所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.0mg/mL，1.00mL)中，在室温下加入1,2－丙二醇(0.917mL)和包含实施例22工序12所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0825mL；相对于1分子抗体为12当量)，使用管旋转器(MTR－103，AS ONE株式会社)，在室温下反应48小时。

[2816] 精制操作：对上述溶液利用共通操作D进行精制，得到具有目标化合物的溶液6.00mL。

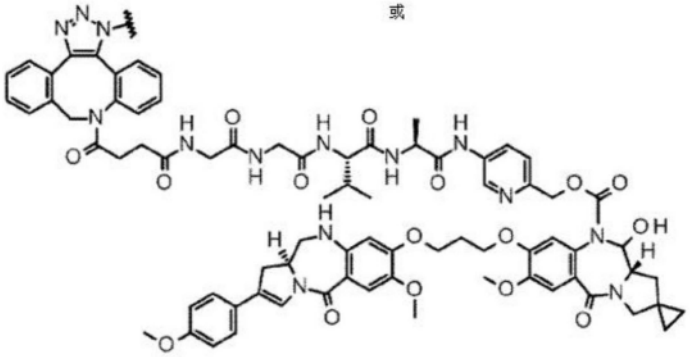
[2817] 特性评价：利用共通操作E、F得到下述的特性值。

[2818] 抗体浓度：1.28mg/mL，抗体产量：7.70mg(77％)，每一分子抗体的药物平均结合数(n)：1.8

[2819] 实施例81：ADC15

[2820] R = 

或



[2821] （工序1中形成的三唑环具有几何异构，实施例81工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。）

[2822] 工序1：抗体与药物连接子的偶联

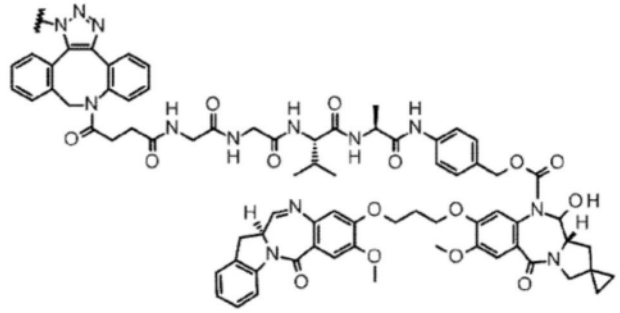
[2823] 在实施例60工序1所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.0mg/mL，1.00mL)中，在室温下加入1,2－丙二醇(0.917mL)以及包含实施例23工序10所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0825mL；相对于1分子抗体为12当量)，使用管旋转器(MTR－103，AS ONE株式会社)，在室温下反应48小时。

[2824] 精制操作：对上述溶液利用共通操作D进行精制，得到具有目标化合物的溶液6.00mL。

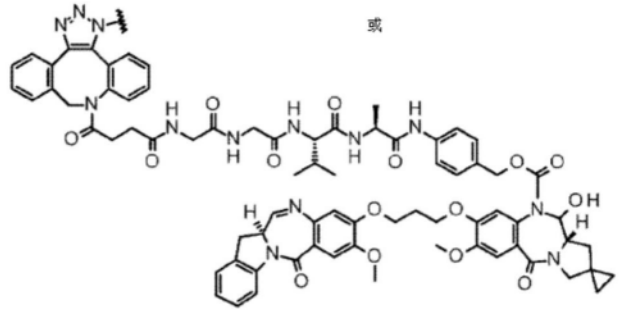
[2825] 特性评价：利用共通操作E、F得到下述的特性值。

[2826] 抗体浓度：1.60mg/mL，抗体产量：9.60mg(96％)，每一分子抗体的药物平均结合数(n)：1.9

[2827] 实施例82：ADC16

[2828] R = 

或



[2829] (工序1中形成的三唑环具有几何异构,实施例82工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。)

[2830] 工序1:抗体与药物连接子的偶联

[2831] 在实施例59工序1所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(9.88mg/mL,0.500mL)中,在室温下加入1,2－丙二醇(0.459mL)以及包含实施例34工序11所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0408mL;相对于1分子抗体为12当量),使用管旋转器(MTR－103,AS ONE株式会社),在室温下反应1天。

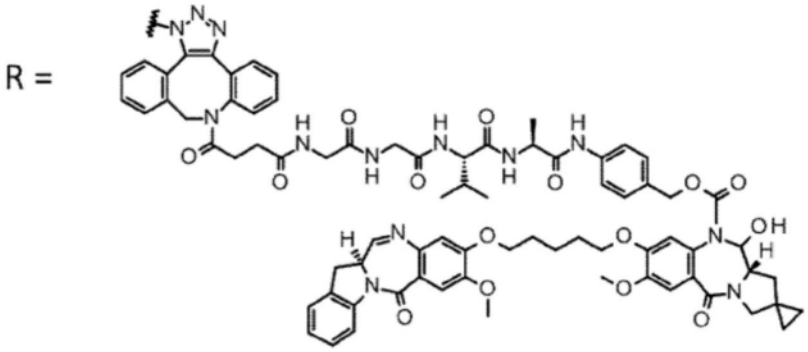
[2832] 精制操作:对上述溶液利用共通操作D进行精制,得到具有目标化合物的溶液10.5mL。利用共通操作A对该溶液进行浓缩,得到具有目标化合物的溶液0.500mL。

[2833] 特性评价:利用共通操作E、F得到下述的特性值。

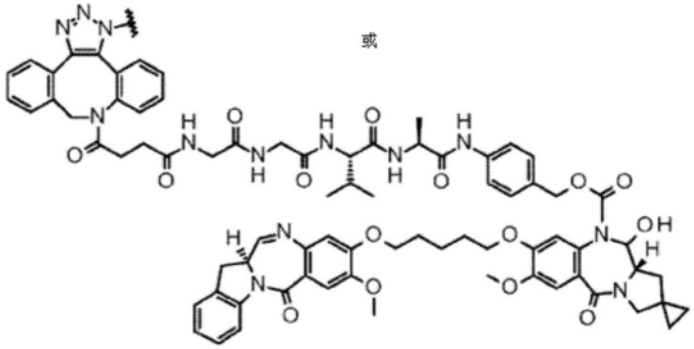
[2834] 抗体浓度:6.94mg/mL,抗体产量:3.47mg(70%),每一分子抗体的药物平均结合数(n):1.8

[2835] 实施例83:ADC17

[2836] R =



或



[2837] （工序1中形成的三唑环具有几何异构，实施例83工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。）

[2838] 工序1：抗体与药物连接子的偶联

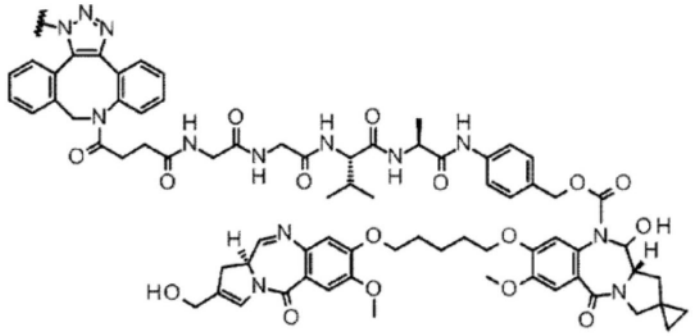
[2839] 在实施例59工序1所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(9.88mg/mL，0.500mL)中，在室温下加入1,2－丙二醇(0.459mL)以及包含实施例35工序4所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0408mL；相对于1分子抗体为12当量)，使用管旋转器(MTR－103，AS ONE株式会社)，在室温下反应1天。

[2840] 精制操作：对上述溶液利用共通操作D进行精制，对该溶液利用共通操作A进行浓缩，得到具有目标化合物的溶液0.500mL。

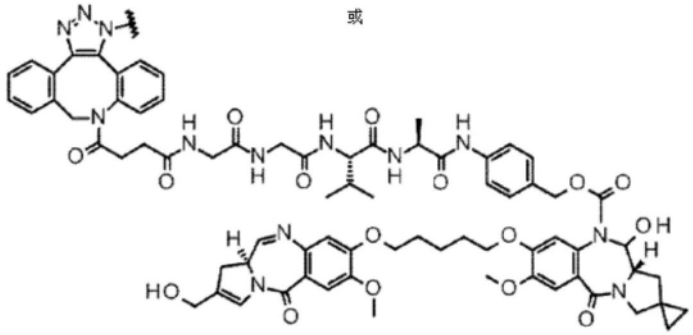
[2841] 特性评价：利用共通操作E、F得到下述的特性值。

[2842] 抗体浓度：8.07mg/mL，抗体产量：4.03mg(82％)，每一分子抗体的药物平均结合数(n)：1.8

[2843] 实施例84：ADC18

R = 

[2844]

或 

[2845] (工序1中形成的三唑环具有几何异构,实施例86工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。)

[2846] 工序1:抗体与药物连接子的偶联

[2847] 在实施例59工序1所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.0mg/mL,1.00mL)中,在室温下加入1,2－丙二醇(0.917mL)以及包含实施例36工序7所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0825mL;相对于1分子抗体为12当量),使用管旋转器(MTR－103,AS ONE株式会社),在室温下反应1天。

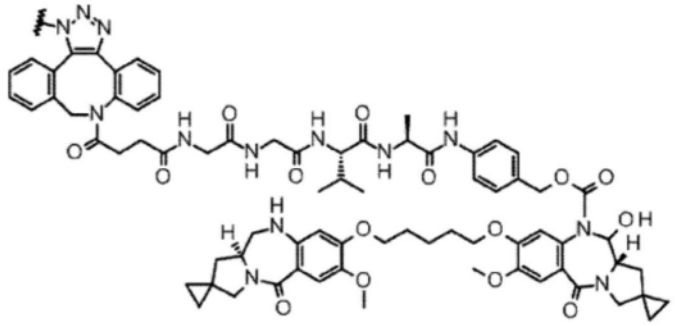
[2848] 精制操作:对上述溶液利用共通操作D进行精制,得到具有目标化合物的溶液14.0mL。利用共通操作A对上述溶液进行浓缩,得到具有目标化合物的溶液0.700mL。

[2849] 特性评价:利用共通操作E、F得到下述的特性值。

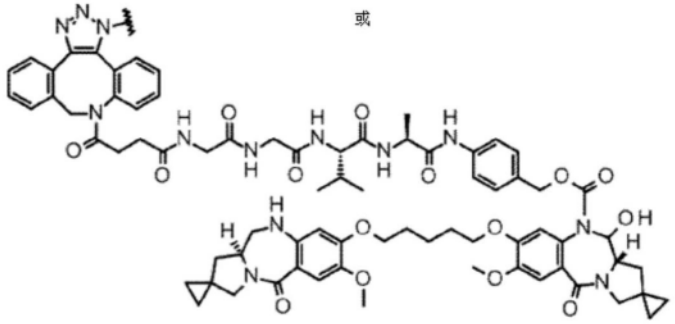
[2850] 抗体浓度:12.9mg/mL,抗体产量:9.00mg(90%),每一分子抗体的药物平均结合数(n):1.9

[2851] 实施例85:ADC19

[2852] R =



或



[2853] (工序1中形成的三唑环具有几何异构,实施例85工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。)

[2854] 工序1:抗体与药物连接子的偶联

[2855] 在实施例59工序1所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.0mg/mL,1.00mL)中,在室温下加入1,2－丙二醇(0.917mL)以及包含实施例37工序12所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0825mL;相对于1分子抗体为12当量),使用管旋转器(MTR－103,AS ONE株式会社),在室温下反应2天。

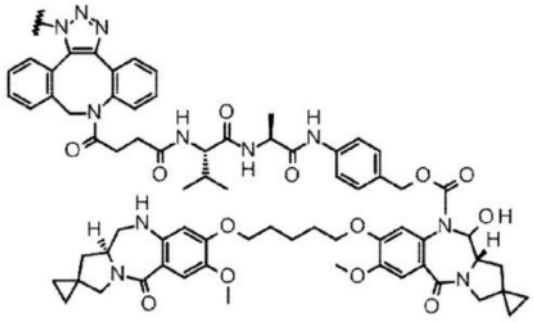
[2856] 精制操作:对上述溶液利用共通操作D进行精制,得到具有目标化合物的溶液6.0mL。

[2857] 特性评价:利用共通操作E、F得到下述的特性值。

[2858] 抗体浓度:1.33mg/mL,抗体产量:7.97mg(80%),每一分子抗体的药物平均结合数(n):1.9

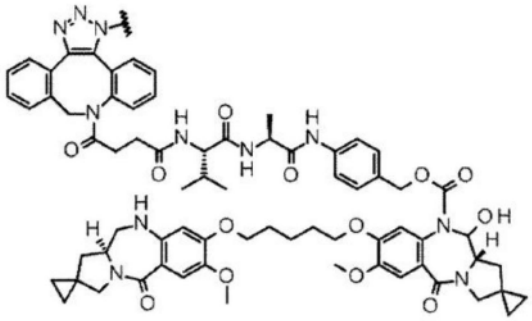
[2859] 实施例86:ADC20

R =



[2860]

或



[2861] (工序1中形成的三唑环具有几何异构,实施例86工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。)

[2862] 工序1:抗体与药物连接子的偶联

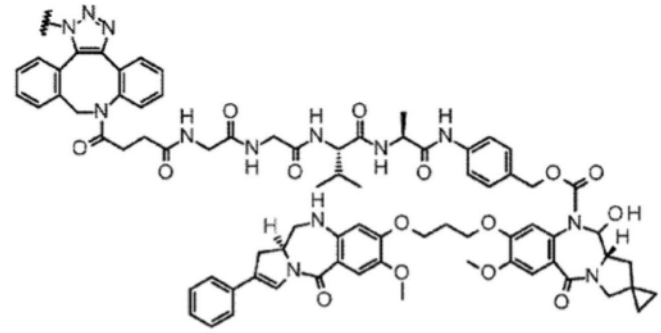
[2863] 在实施例59工序1所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.0mg/mL,1.00mL)中,在室温下加入1,2－丙二醇(0.917mL)以及包含实施例38工序1所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0825mL;相对于1分子抗体为12当量),使用管旋转器(MTR－103,AS ONE株式会社),在室温下反应2天。

[2864] 精制操作:对上述溶液利用共通操作D进行精制,得到具有目标化合物的溶液6.0mL。

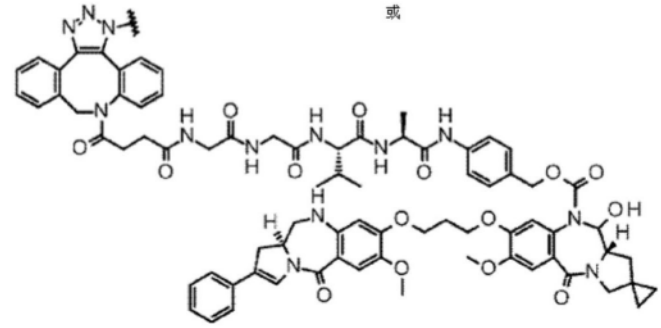
[2865] 特性评价:利用共通操作E、F得到下述的特性值。

[2866] 抗体浓度:1.56mg/mL,抗体产量:9.37mg(94%),每一分子抗体的药物平均结合数(n):2.0

[2867] 实施例87:ADC21

[2868] R = 

或



[2869] (工序1中形成的三唑环具有几何异构,实施例87工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。)

[2870] 工序1:抗体与药物连接子的偶联

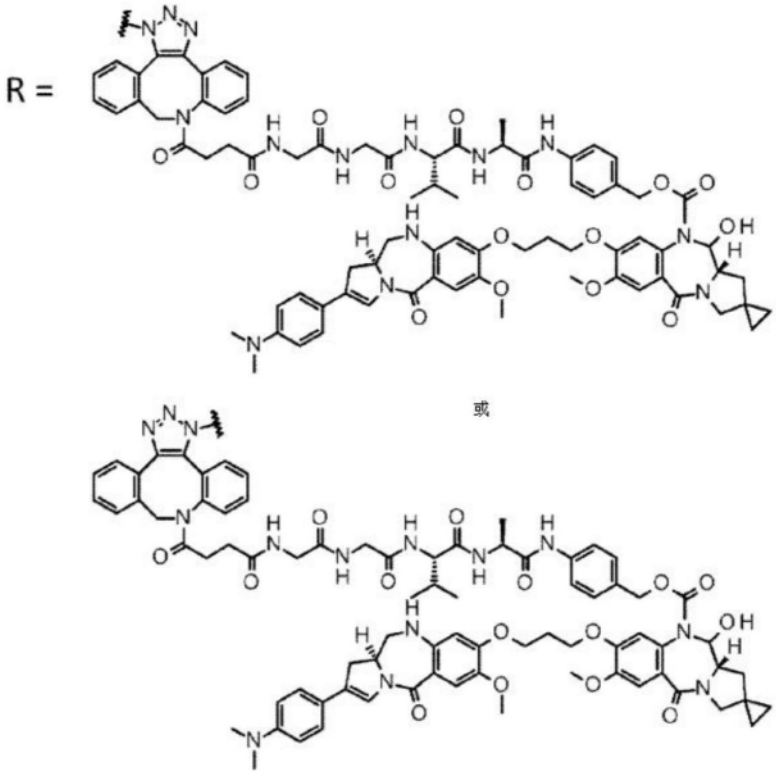
[2871] 在实施例59工序1所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.0mg/mL,1.00mL)中,在室温下加入1,2－丙二醇(0.917mL)以及包含实施例39工序6所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0825mL;相对于1分子抗体为12当量),使用管旋转器(MTR－103,AS ONE株式会社),在室温下反应2天。

[2872] 精制操作:对上述溶液利用共通操作D进行精制,得到具有目标化合物的溶液6.0mL。

[2873] 特性评价:利用共通操作E、F得到下述的特性值。

[2874] 抗体浓度:1.89mg/mL,抗体产量:11.4mg(定量),每一分子抗体的药物平均结合数(n):1.9

[2875] 实施例88:ADC22

[2876] 

[2877] (工序1中形成的三唑环具有几何异构,实施例88所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。)

[2878] 工序1:抗体与药物连接子的偶联

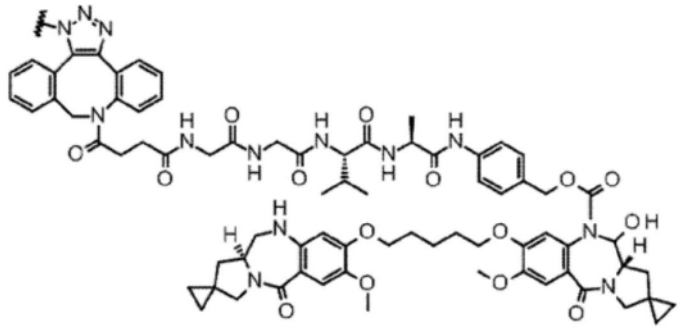
[2879] 在实施例59工序1所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.0mg/mL,1.00mL)中,在室温下加入1,2－丙二醇(0.917mL)以及包含实施例40工序6所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0825mL;相对于1分子抗体为12当量),使用管旋转器(MTR－103,AS ONE株式会社),在室温下反应2天。

[2880] 精制操作:对上述溶液利用共通操作D进行精制,得到具有目标化合物的溶液6.0mL。

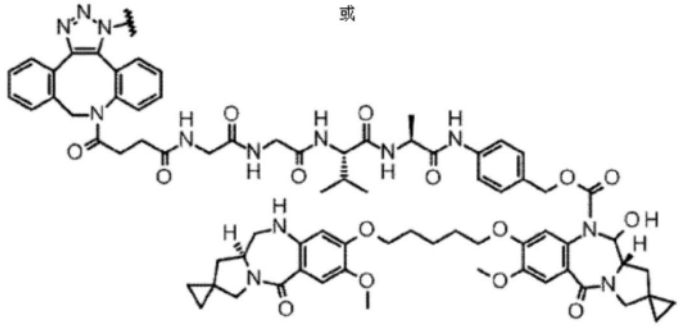
[2881] 特性评价:利用共通操作E、F得到下述的特性值。

[2882] 抗体浓度:1.47mg/mL,抗体产量:8.84mg(88%),每一分子抗体的药物平均结合数(n):1.9

[2883] 实施例89:ADC23

[2884] R = 

或



[2885] (工序1中形成的三唑环具有几何异构,实施例89工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。)

[2886] 工序1:抗体与药物连接子的偶联

[2887] 在实施例60工序1所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.0mg/mL,1.00mL)中,在室温下加入1,2－丙二醇(0.917mL)以及包含实施例37工序12所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0825mL;相对于1分子抗体为12当量),使用管旋转器(MTR－103,AS ONE株式会社),在室温下反应2天。

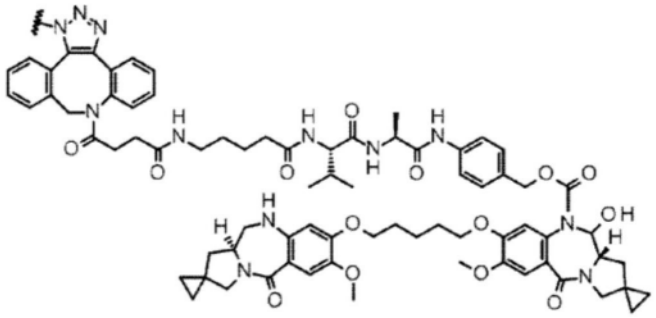
[2888] 精制操作:对上述溶液利用共通操作D进行精制,得到具有目标化合物的溶液6.0mL。

[2889] 特性评价:利用共通操作E、F得到下述的特性值。

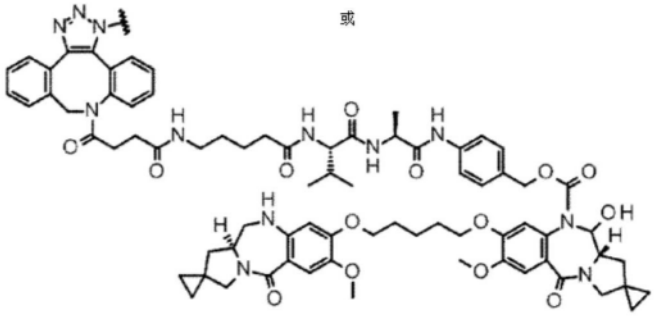
[2890] 抗体浓度:1.46mg/mL,抗体产量:8.76mg(88%),每一分子抗体的药物平均结合数(n):1.9

[2891] 实施例90:ADC24

[2892] R =



或



[2893] (工序1中形成的三唑环具有几何异构,实施例90工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。)

[2894] 工序1:抗体与药物连接子的偶联

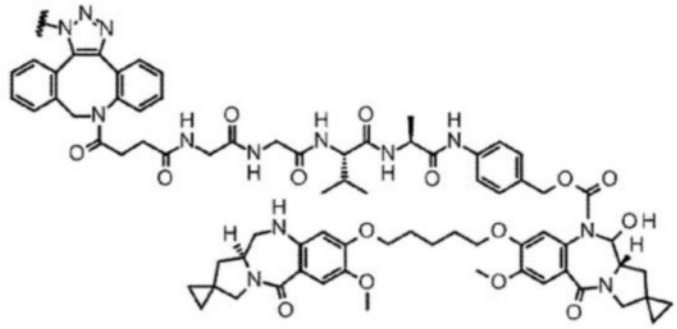
[2895] 在实施例60工序1所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.0mg/mL,1.00mL)中,在室温下加入1,2－丙二醇(0.917mL)以及包含实施例41工序2所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0825mL;相对于1分子抗体为12当量),使用管旋转器(MTR－103,AS ONE株式会社),在室温下反应2天。

[2896] 精制操作:对上述溶液利用共通操作D进行精制,得到具有目标化合物的溶液6.0mL。

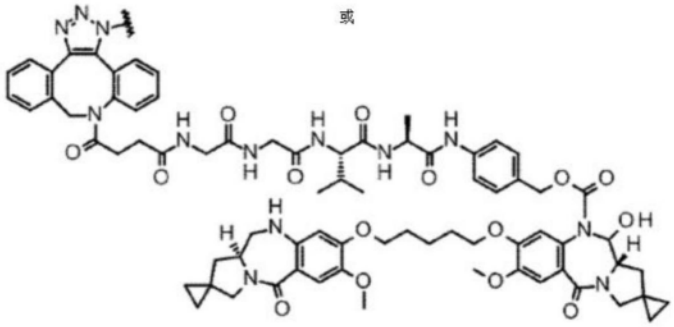
[2897] 特性评价:利用共通操作E、F得到下述的特性值。

[2898] 抗体浓度:1.53mg/mL,抗体产量:9.17mg(92%),每一分子抗体的药物平均结合数(n):1.9

[2899] 实施例91:ADC25

[2900] R = 

或



[2901] (工序1中形成的三唑环具有几何异构,实施例91所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。)

[2902] 工序1:抗体与药物连接子的偶联

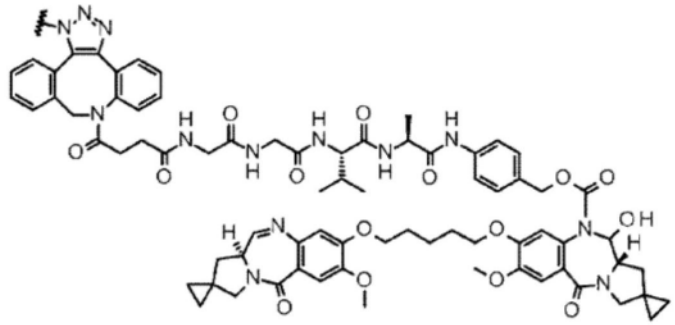
[2903] 在实施例58工序2所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.0mg/mL,1.00mL)中,在室温下加入1,2－丙二醇(0.835mL)以及包含实施例37工序12所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.165mL;相对于1分子抗体为24当量),使用管旋转器(MTR－103,AS ONE株式会社),在室温下反应2天。

[2904] 精制操作:对上述溶液利用共通操作D进行精制,得到具有目标化合物的溶液10.5mL。

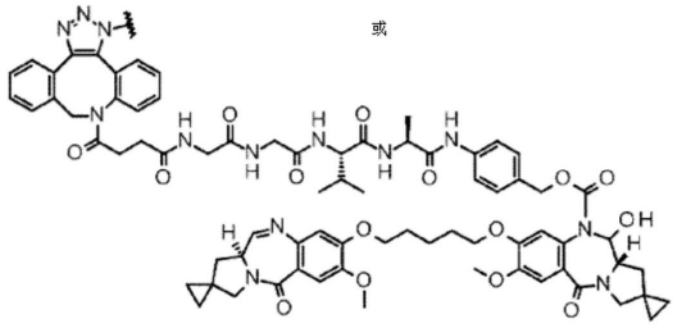
[2905] 特性评价:利用共通操作E、F得到下述的特性值。

[2906] 抗体浓度:0.73mg/mL,抗体产量:7.70mg(77%),每一分子抗体的药物平均结合数(n):3.8

[2907] 实施例92:ADC26

[2908] R = 

或



[2909] (工序1中形成的三唑环具有几何异构,实施例92工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。)

[2910] 工序1:抗体与药物连接子的偶联

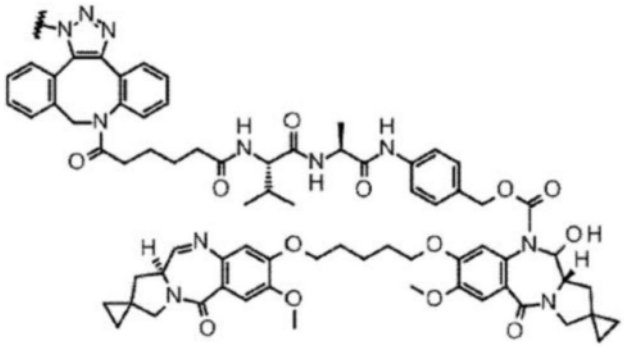
[2911] 在实施例59工序1所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(9.88mg/mL,0.500mL)中,在室温下加入1,2－丙二醇(0.459mL)以及包含实施例15工序10所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0408mL;相对于1分子抗体为12当量),使用管旋转器(MTR－103,AS ONE株式会社),在室温下反应1天。

[2912] 精制操作:对上述溶液利用共通操作D进行精制,得到具有目标化合物的溶液6.00mL。对该溶液利用共通操作A进行浓缩,得到具有目标化合物的溶液0.420mL。

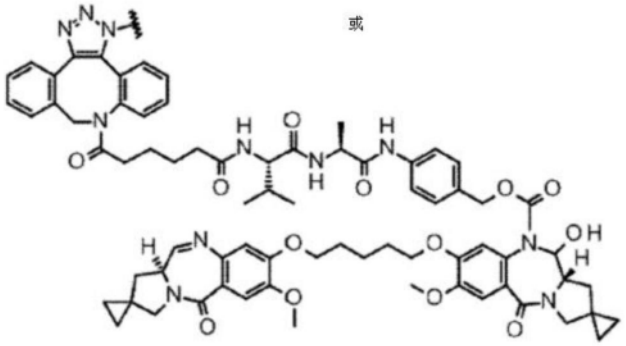
[2913] 特性评价:利用共通操作E、F得到下述的特性值。

[2914] 抗体浓度:7.27mg/mL,抗体产量:3.54mg(72%),每一分子抗体的药物平均结合数(n):1.8

[2915] 实施例93:ADC27

[2916] R = 

或



[2917] （工序1中形成的三唑环具有几何异构，实施例93工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。）

[2918] 工序1：抗体与药物连接子的偶联

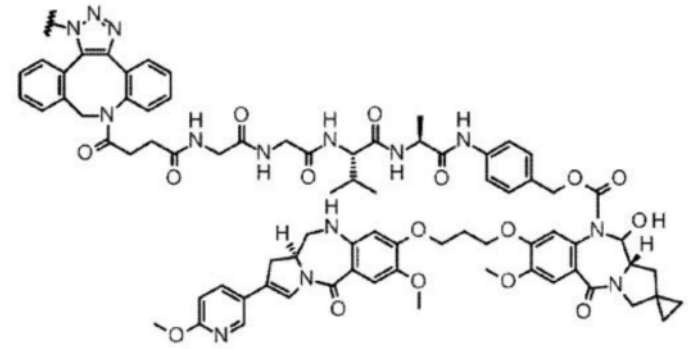
[2919] 在实施例59工序1所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(9.88mg/mL，1.00mL)中，在室温下加入1,2－丙二醇(0.917mL)以及包含实施例16工序1所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0825mL；相对于1分子抗体为12当量)，使用管旋转器(MTR－103，AS ONE株式会社)，在室温下反应1天。

[2920] 精制操作：对上述溶液利用共通操作D进行精制，得到具有目标化合物的溶液10.5mL。对该溶液利用共通操作A进行浓缩，得到具有目标化合物的溶液0.850mL。

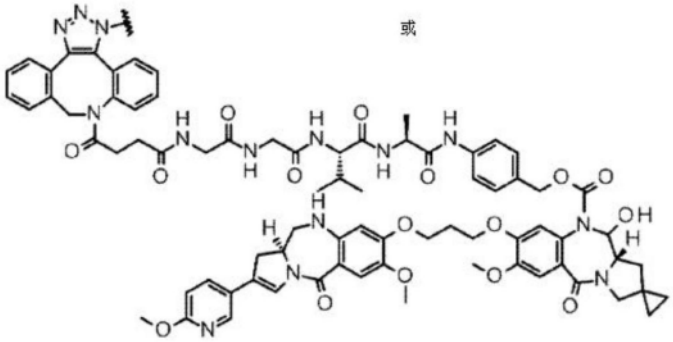
[2921] 特性评价：利用共通操作E、F得到下述的特性值。

[2922] 抗体浓度：8.90mg/mL，抗体产量：7.56mg(77％)，每一分子抗体的药物平均结合数(n)：1.8

[2923] 实施例94：ADC28

R = 

[2924]



[2925] (工序1中形成的三唑环具有几何异构,实施例94工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。)

[2926] 工序1:抗体与药物连接子的偶联

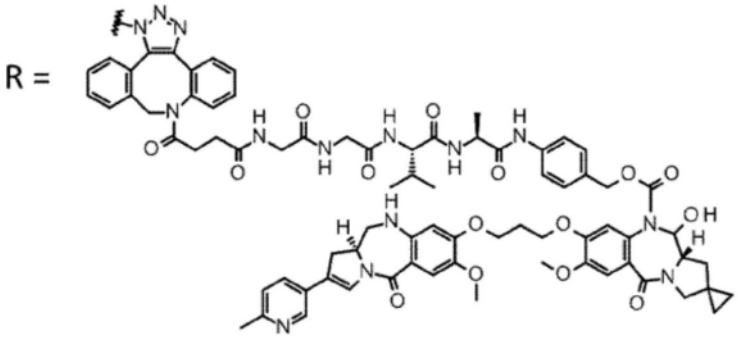
[2927] 在实施例59工序1所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.2mg/mL,1.00mL)中,在室温下加入1,2－丙二醇(0.917mL)以及包含实施例17工序13所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0825mL;相对于抗体1分子为12当量),使用管旋转器(MTR－103,AS ONE株式会社),在室温下反应2天。

[2928] 精制操作:对上述溶液利用共通操作D进行精制,得到具有目标化合物的溶液6.00mL。

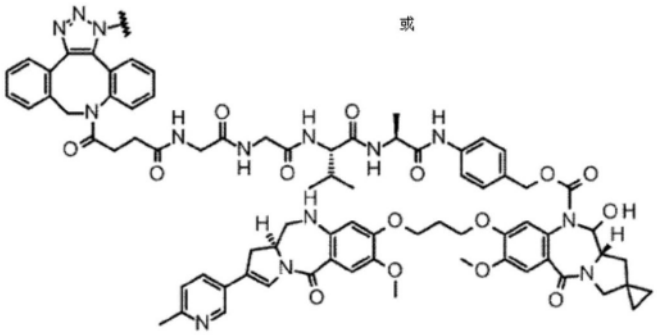
[2929] 特性评价:利用共通操作E、F得到下述的特性值。

[2930] 抗体浓度:1.24mg/mL,抗体产量:7.43mg(73%),每一分子抗体的药物平均结合数(n):1.5

[2931] 实施例95:ADC29

[2932] R = 

或



[2933] （工序1中形成的三唑环具有几何异构，实施例95工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。）

[2934] 工序1：抗体与药物连接子的偶联

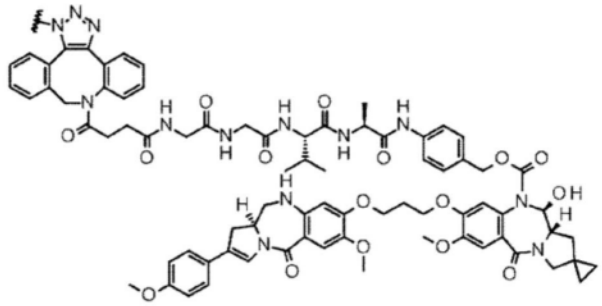
[2935] 在实施例59工序1所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.2mg/mL，1.00mL)中，在室温下加入1,2－丙二醇(0.917mL)以及包含实施例18工序13所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0825mL；相对于1分子抗体为12当量)，使用管旋转器(MTR－103，AS ONE株式会社)，在室温下反应2天。

[2936] 精制操作：对上述溶液利用共通操作D进行精制，得到具有目标化合物的溶液6.00mL。

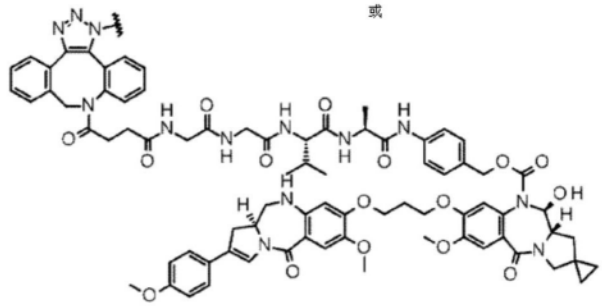
[2937] 特性评价：利用共通操作E、F得到下述的特性值。

[2938] 抗体浓度：1.29mg/mL，抗体产量：7.76mg(76％)，每一分子抗体的药物平均结合数(n)：1.9

[2939] 实施例96：ADC30

[2940] R = 

或



[2941] （工序1中形成的三唑环具有几何异构，实施例96工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。）

[2942] 工序1：抗体与药物连接子的偶联

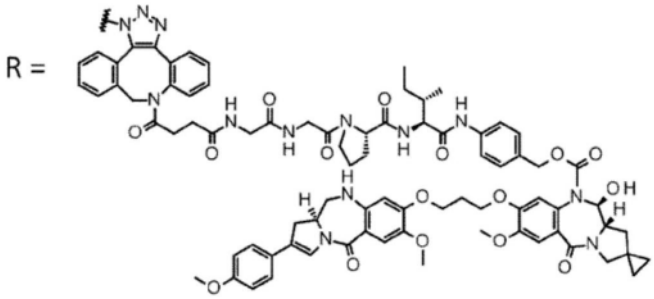
[2943] 在实施例60工序1所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.0mg/mL，5.00mL)中，在室温下加入1,2－丙二醇(4.59mL)以及包含实施例4工序12所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.413mL；相对于1分子抗体为12当量)，使用管旋转器(MTR－103，AS ONE株式会社)，在室温下反应48小时。

[2944] 精制操作：对上述溶液利用共通操作D进行精制，得到具有目标化合物的溶液30.0mL。

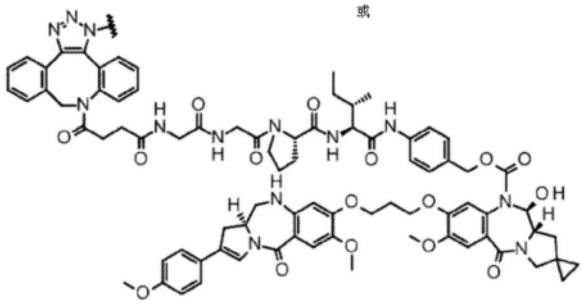
[2945] 特性评价：利用共通操作E、F得到下述的特性值。

[2946] 抗体浓度：1.30mg/mL，抗体产量：38.9mg(78％)，每一分子抗体的药物平均结合数(n)：1.9

[2947] 实施例97：ADC31

[2948] R = 

或



[2949] (工序1中形成的三唑环具有几何异构,实施例97工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。)

[2950] 工序1:抗体与药物连接子的偶联

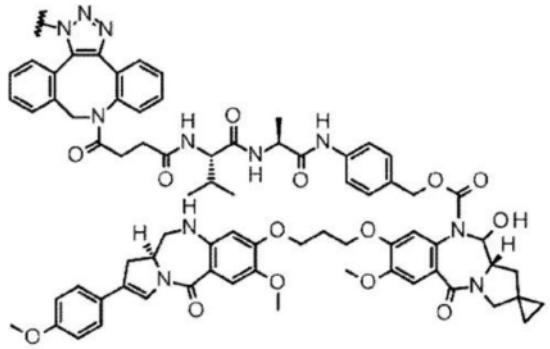
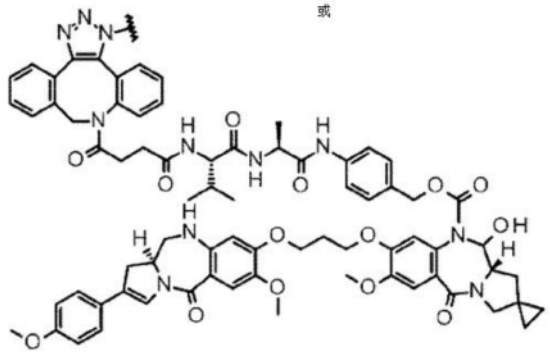
[2951] 在实施例60工序1所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.0mg/mL,1.00mL)中,在室温下加入1,2－丙二醇(0.917mL)以及包含实施例5工序11所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0825mL;相对于1分子抗体为12当量),使用管旋转器(MTR－103,AS ONE株式会社),在室温下反应48小时。

[2952] 精制操作:对上述溶液利用共通操作D进行精制,得到具有目标化合物的溶液6.0mL。

[2953] 特性评价:利用共通操作E、F得到下述的特性值。

[2954] 抗体浓度:1.47mg/mL,抗体产量:8.82mg(88%),每一分子抗体的药物平均结合数(n):1.8

[2955] 实施例98:ADC32

[2956] R =  或 

[2957] （工序1中形成的三唑环具有几何异构，实施例98工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。）

[2958] 工序1：抗体与药物连接子的偶联

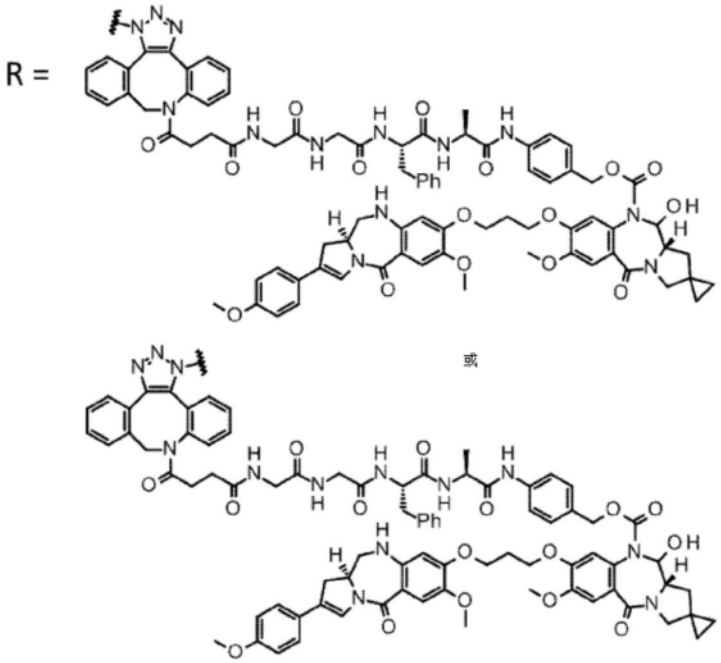
[2959] 在实施例60工序1所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.0mg/mL，1.00mL)中，在室温下加入1,2－丙二醇(0.917mL)以及包含实施例6工序1所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0825mL；相对于1分子抗体为12当量)，使用管旋转器(MTR－103，AS ONE株式会社)，在室温下反应48小时。

[2960] 精制操作：对上述溶液利用共通操作D进行精制，得到具有目标化合物的溶液6.0mL。

[2961] 特性评价：利用共通操作E、F得到下述的特性值。

[2962] 抗体浓度：1.35mg/mL，抗体产量：8.10mg(81％)，每一分子抗体的药物平均结合数(n)：1.8

[2963] 实施例99：ADC33

[2964] 

[2965] (工序1中形成的三唑环具有几何异构,实施例99工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。)

[2966] 工序1:抗体与药物连接子的偶联

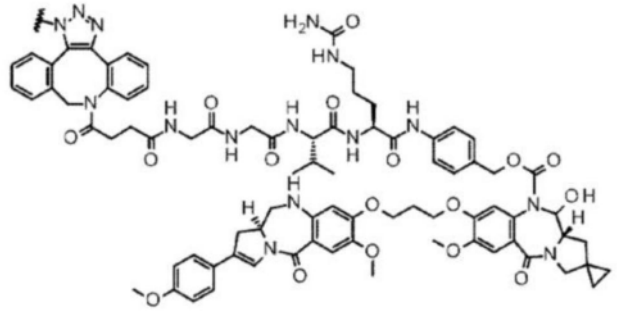
[2967] 在实施例60工序1所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.0mg/mL,1.00mL)中,在室温下加入1,2-丙二醇(0.917mL)以及包含实施例7工序10所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0825mL;相对于1分子抗体为12当量),使用管旋转器(MTR-103,AS ONE株式会社),在室温下反应48小时。

[2968] 精制操作:对上述溶液利用共通操作D进行精制,得到具有目标化合物的溶液6.0mL。

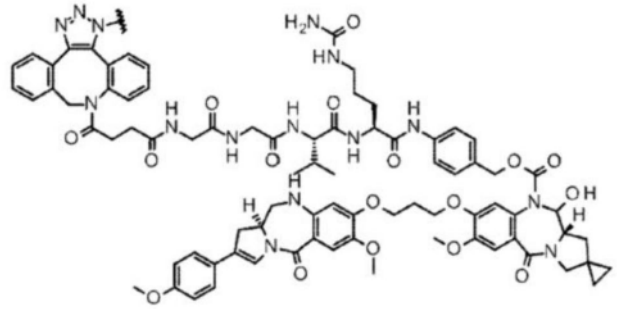
[2969] 特性评价:利用共通操作E、F得到下述的特性值。

[2970] 抗体浓度:1.41mg/mL,抗体产量:8.44mg(84%),每一分子抗体的药物平均结合数(n):1.8

[2971] 实施例100:ADC34

[2972] R = 

或



[2973] (工序1中形成的三唑环具有几何异构,实施例100工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。)

[2974] 工序1:抗体与药物连接子的偶联

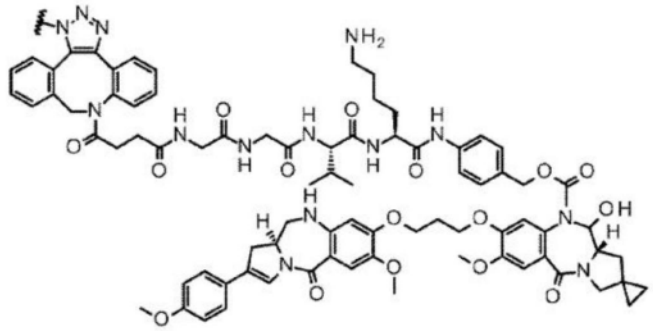
[2975] 在实施例60工序1所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.0mg/mL,1.00mL)中,在室温下加入1,2－丙二醇(0.917mL)以及包含实施例9工序9所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0825mL;相对于1分子抗体为12当量),使用管旋转器(MTR－103,AS ONE株式会社),在室温下反应48小时。

[2976] 精制操作:对上述溶液利用共通操作D进行精制,得到具有目标化合物的溶液6.0mL。

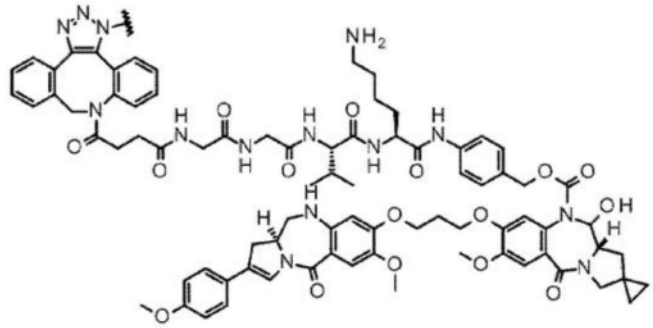
[2977] 特性评价:利用共通操作E、F得到下述的特性值。

[2978] 抗体浓度:1.47mg/mL,抗体产量:8.79mg(88%),每一分子抗体的药物平均结合数(n):1.8

[2979] 实施例101:ADC35

[2980] R = 

或



[2981] (工序1中形成的三唑环具有几何异构,实施例101工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。)

[2982] 工序1:抗体与药物连接子的偶联

[2983] 在实施例60工序1所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.0mg/mL,1.00mL)中,在室温下加入1,2－丙二醇(0.917mL)以及包含实施例10工序14所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0825mL;相对于1分子抗体为12当量),使用管旋转器(MTR－103,AS ONE株式会社),在室温下反应48小时。

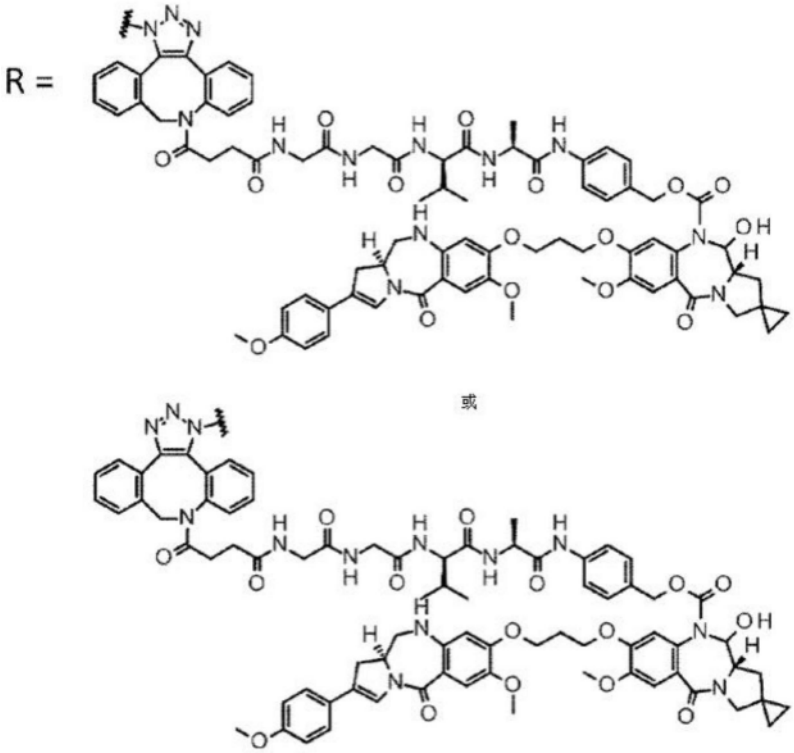
[2984] 精制操作:对上述溶液利用共通操作D进行精制,得到具有目标化合物的溶液6.0mL。

[2985] 特性评价:利用共通操作E、F得到下述的特性值。

[2986] 抗体浓度:1.67mg/mL,抗体产量:10.0mg(定量),每一分子抗体的药物平均结合数(n):1.8

[2987] 实施例102:ADC36

[2988]



[2989] (工序1中形成的三唑环具有几何异构,实施例103工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。)

[2990] 工序1:抗体与药物连接子的偶联

[2991] 在实施例60工序1所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.0mg/mL,1.00mL)中,在室温下加入1,2－丙二醇(0.917mL)以及包含实施例11工序13所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0825mL;相对于1分子抗体为12当量),使用管旋转器(MTR－103,AS ONE株式会社),在室温下反应48小时。

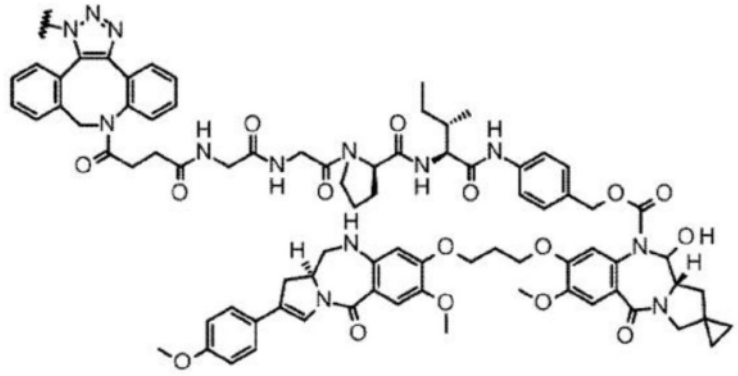
[2992] 精制操作:对上述溶液利用共通操作D进行精制,得到具有目标化合物的溶液6.0mL。

[2993] 特性评价:利用共通操作E、F得到下述的特性值。

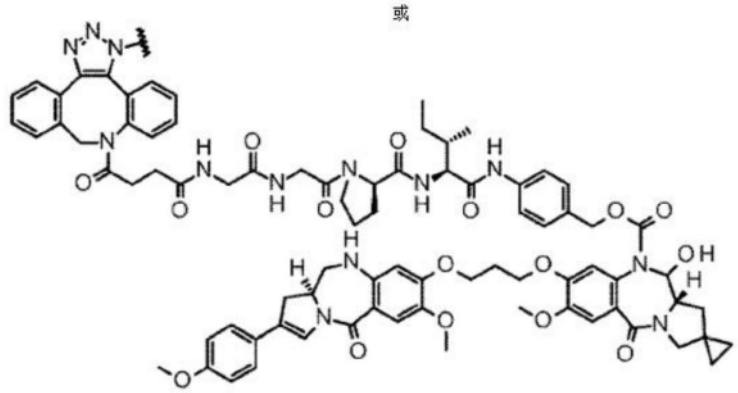
[2994] 抗体浓度:1.40mg/mL,抗体产量:8.39mg(84%),每一分子抗体的药物平均结合数(n):1.8

[2995] 实施例103:ADC37

[2996] R =



或



[2997] （工序1中形成的三唑环具有几何异构，实施例103工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。）

[2998] 工序1：抗体与药物连接子的偶联

[2999] 在实施例60工序1所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.0mg/mL，1.00mL)中，在室温下加入1,2－丙二醇(0.917mL)以及包含实施例12工序14所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0825mL；相对于1分子抗体为12当量)，使用管旋转器(MTR－103，AS ONE株式会社)，在室温下反应48小时。

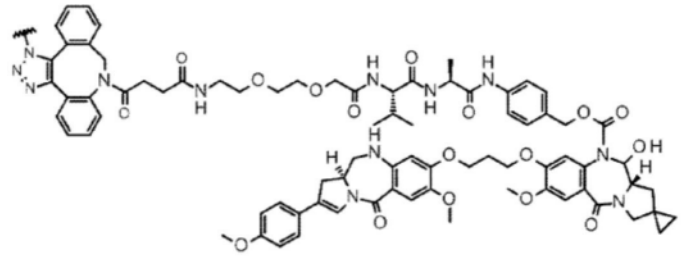
[3000] 精制操作：对上述溶液利用共通操作D进行精制，得到具有目标化合物的溶液6.0mL。

[3001] 特性评价：利用共通操作E、F得到下述的特性值。

[3002] 抗体浓度：1.41mg/mL，抗体产量：8.49mg(85％)，每一分子抗体的药物平均结合数(n)：1.8

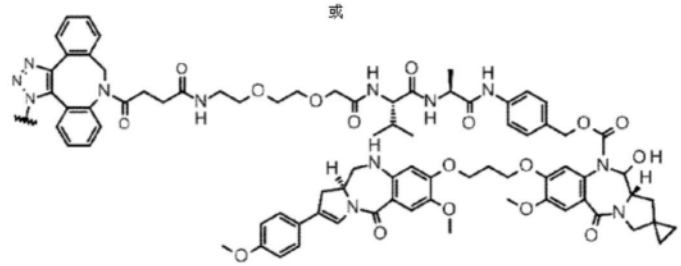
[3003] 实施例104：ADC：38

R =



[3004]

或



[3005] (工序1中形成的三唑环具有几何异构,实施例104工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。)

[3006] 工序1:抗体与药物连接子的偶联

[3007] 在实施例60工序1所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.0mg/mL,1.00mL)中,在室温下加入1,2－丙二醇(0.917mL)以及包含实施例13工序2所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0825mL;相对于1分子抗体为12当量),使用管旋转器(MTR－103,AS ONE株式会社),在室温下反应48小时。

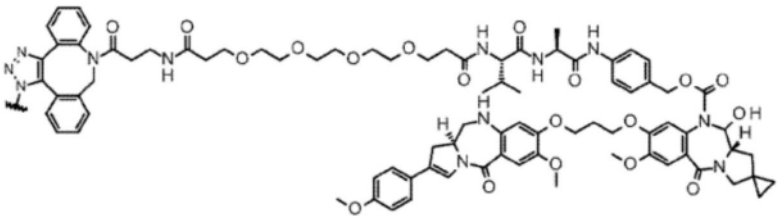
[3008] 精制操作:对上述溶液利用共通操作D进行精制,得到具有目标化合物的溶液6.0mL。

[3009] 特性评价:利用共通操作E、F得到下述的特性值。

[3010] 抗体浓度:1.63mg/mL,抗体产量:9.80mg(98%),每一分子抗体的药物平均结合数(n):1.8

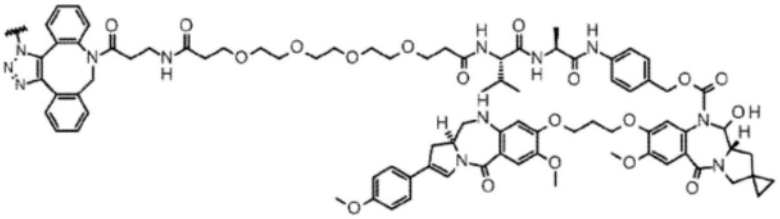
[3011] 实施例105:ADC39

R =



[3012]

或



[3013] (工序1中形成的三唑环具有几何异构,实施例105工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。)

[3014] 工序1:抗体与药物连接子的偶联

[3015] 在实施例60工序1所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.0mg/mL,

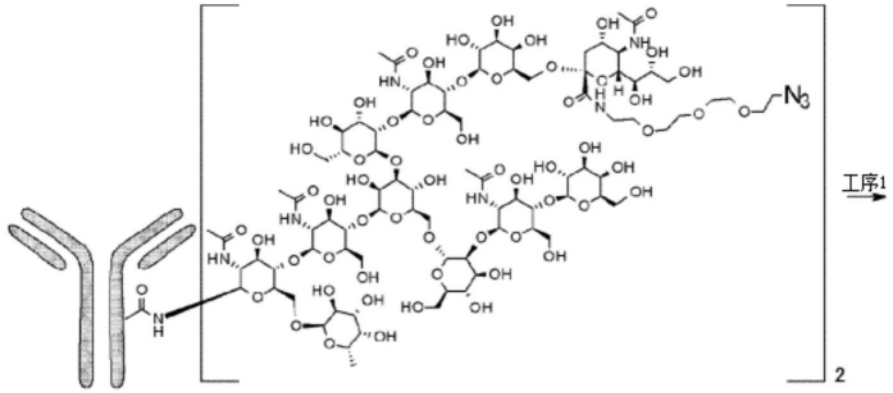
1.00mL)中,在室温下加入1,2－丙二醇(0.917mL)以及包含实施例14工序1所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0825mL;相对于1分子抗体为12当量),使用管旋转器(MTR－103,AS ONE株式会社),在室温下反应48小时。

[3016] 精制操作:对上述溶液利用共通操作D进行精制,得到具有目标化合物的溶液6.0mL。

[3017] 特性评价:利用共通操作E、F得到下述的特性值。

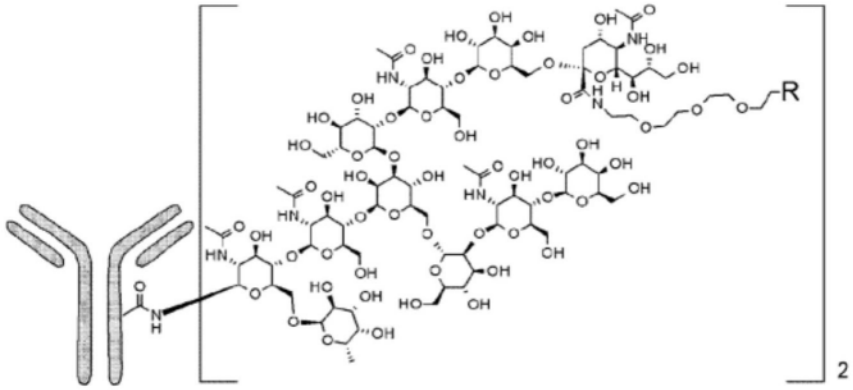
[3018] 抗体浓度:1.72mg/mL,抗体产量:10.3mg(定量),每一分子抗体的药物平均结合数(n):1.9

[3019] 实施例106:ADC40

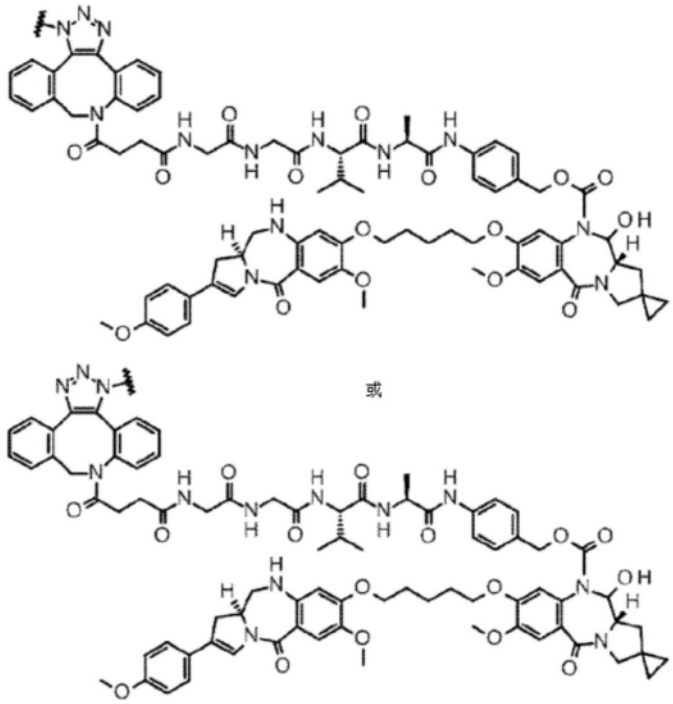


抗CLDN6(H1L1)－(MSG1-N_3)$_2$

[3020]



R =



[3021] （工序1中形成的三唑环具有几何异构，实施例106工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。）

[3022] 工序1：抗体与药物连接子的偶联

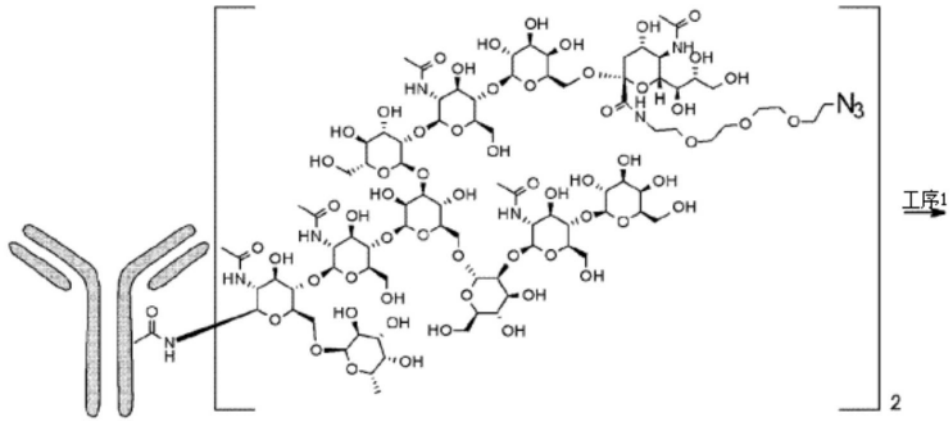
[3023] 在实施例61工序2所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.2mg/mL，2.50mL)中，在室温下加入1,2－丙二醇(2.29mL)以及包含实施例3工序13所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.206mL；相对于1分子抗体为12当量)，使用管旋转器(MTR－103，AS ONE株式会社)，在室温下反应48小时。

[3024] 精制操作：对上述溶液利用共通操作D进行精制，得到具有目标化合物的溶液14.5mL。

[3025] 特性评价：利用共通操作E、F得到下述的特性值。

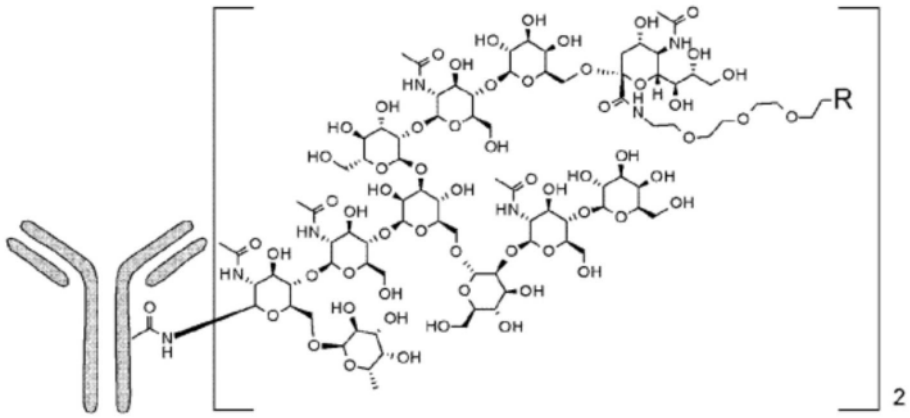
[3026] 抗体浓度：1.54mg/mL，抗体产量：22.3mg(89％)，每一分子抗体的药物平均结合数(n)：1.9

[3027] 实施例107：ADC41

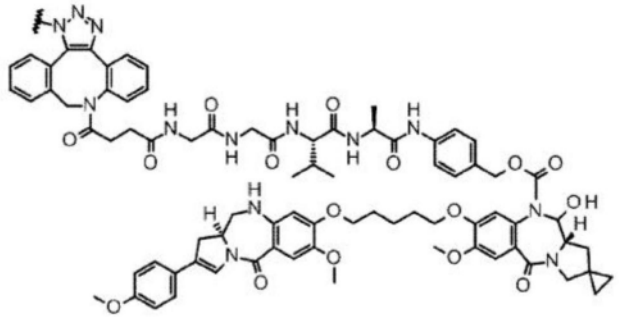


抗CLDN6(H2L2)－$(MSG1\text{-}N_3)_2$

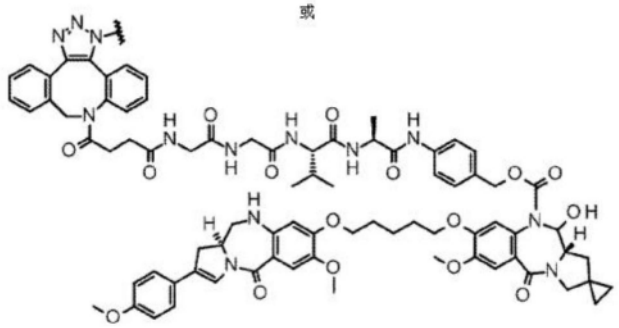
[3028]



[3029] R =



或



[3030] (工序1中形成的三唑环具有几何异构,实施例107工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。)

[3031] 工序1:抗体与药物连接子的偶联

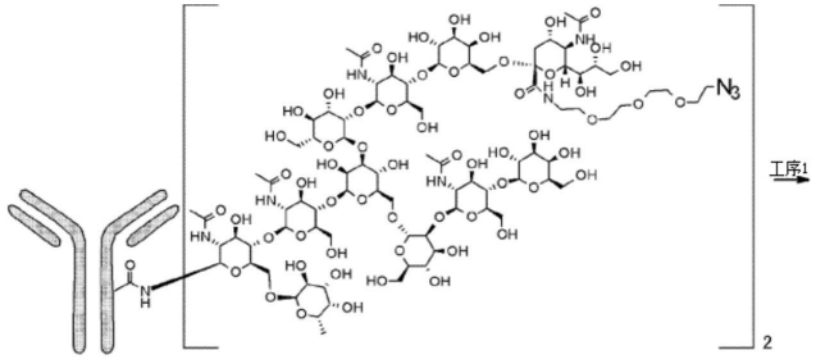
[3032] 在实施例62工序2所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(9.96mg/mL,2.50mL)中,在室温下加入1,2－丙二醇(2.29mL)以及包含实施例3工序13所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.206mL;相对于1分子抗体为12当量),使用管旋转器(MTR－103,AS ONE株式会社),在室温下反应48小时。

[3033] 精制操作:对上述溶液利用共通操作D进行精制,得到具有目标化合物的溶液14.5mL。

[3034] 特性评价:利用共通操作E、F得到下述的特性值。

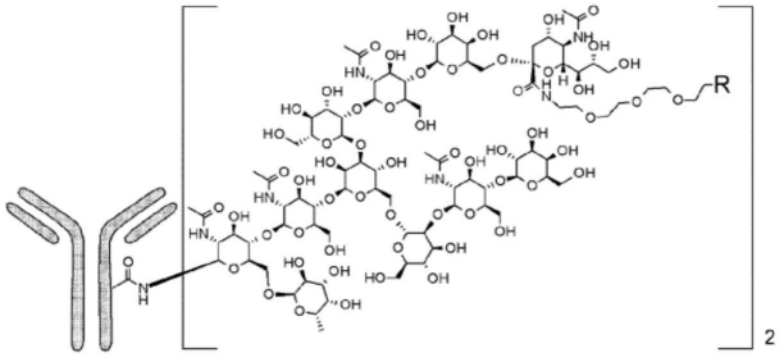
[3035] 抗体浓度:1.52mg/mL,抗体产量:22.0mg(88%),每一分子抗体的药物平均结合数(n):1.9

[3036] 实施例108:ADC42

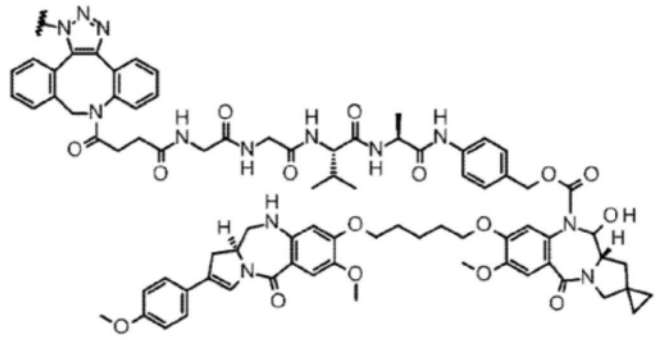


抗CLDN6(H1L3)－(MSG1-N_3)$_2$

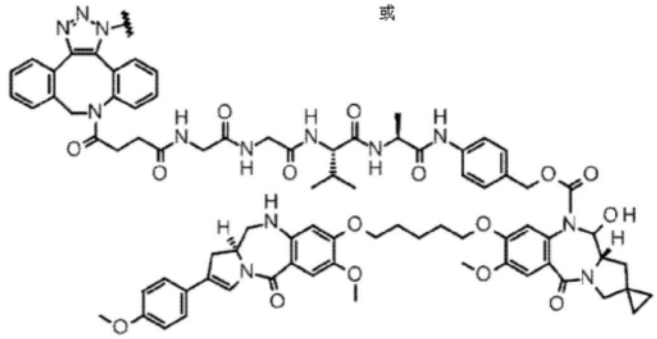
[3037]



R =



或



[3038] （工序1中形成的三唑环具有几何异构，实施例108工序1所得到的化合物混合上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。）

[3039] 工序1：抗体与药物连接子的偶联

[3040] 在实施例63工序2所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(9.83mg/mL，2.50mL)中，在室温下加入1,2－丙二醇(2.29mL)以及包含实施例3工序13所得到的化合物

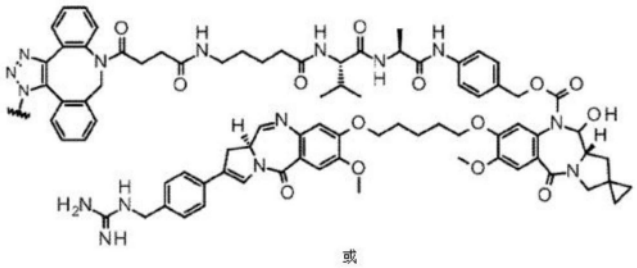
10mM的二甲基亚砜溶液(0.206mL;相对于1分子抗体为12当量),使用管旋转器(MTR－103,AS ONE株式会社),在室温下反应48小时。

[3041] 精制操作:对上述溶液利用共通操作D进行精制,得到具有目标化合物的溶液14.5mL。

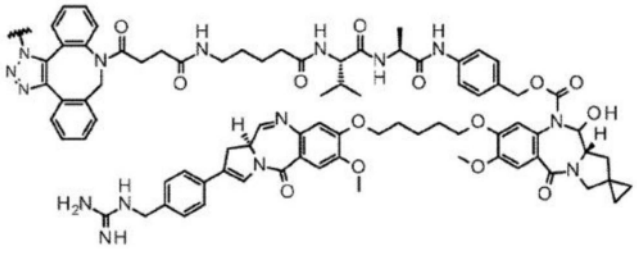
[3042] 特性评价:利用共通操作E、F得到下述的特性值。

[3043] 抗体浓度:1.45mg/mL,抗体产量:21.0mg(84%),每一分子抗体的药物平均结合数(n):1.9

[3044] 实施例109:ADC43

[3045] R = 

或



[3046] (工序1中形成的三唑环具有几何异构,实施例109工序1所得到的化合物包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。)

[3047] 工序1:抗体与药物连接子的偶联

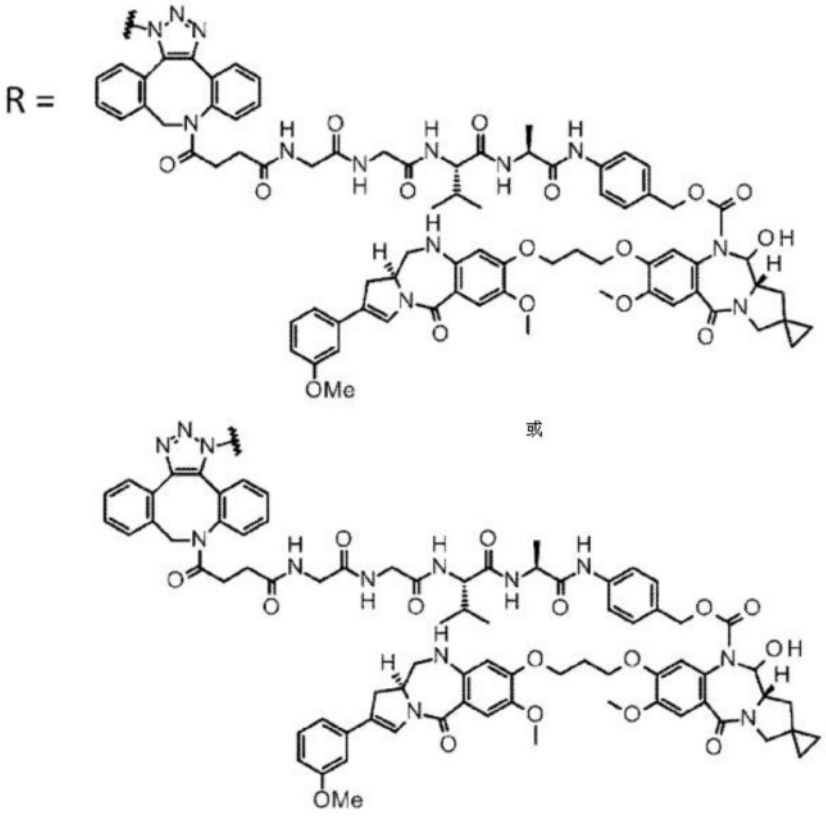
[3048] 在实施例59工序1所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.0mg/mL,1.00mL)中,在室温下加入1,2－丙二醇(0.917mL)以及包含实施例42工序16所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0825mL;相对于1分子抗体为12当量),使用管旋转器(MTR－103,AS ONE株式会社),在室温下反应48小时。

[3049] 精制操作:对上述溶液利用共通操作D进行精制,得到具有目标化合物的溶液3.0mL。

[3050] 特性评价:利用共通操作E、F得到下述的特性值。

[3051] 抗体浓度:1.30mg/mL,抗体产量:7.79mg(78%),每一分子抗体的药物平均结合数(n):1.9

[3052] 实施例110:ADC44

[3053] 

[3054] (工序1中形成的三唑环具有几何异构,实施例110工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。)

[3055] 工序1:抗体与药物连接子的偶联

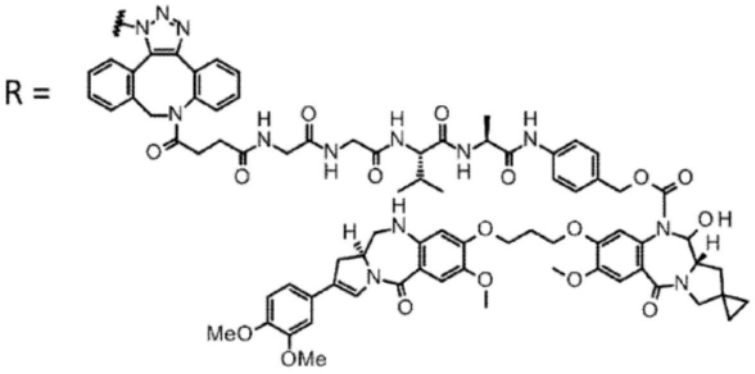
[3056] 在实施例59工序1所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.0mg/mL,1.00mL)中,在室温下加入1,2－丙二醇(0.917mL)以及包含实施例43工序8所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0825mL;相对于1分子抗体为12当量),使用管旋转器(MTR－103,AS ONE株式会社),在室温下反应48小时。

[3057] 精制操作:对上述溶液利用共通操作D进行精制,得到具有目标化合物的溶液6.0mL。

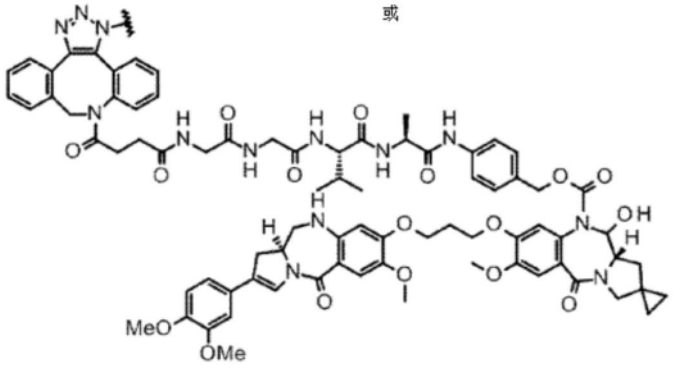
[3058] 特性评价:利用共通操作E、F得到下述的特性值。

[3059] 抗体浓度:0.93mg/mL,抗体产量:5.58mg(56%),每一分子抗体的药物平均结合数(n):1.9

[3060] 实施例111:ADC45

[3061] R = 

或



[3062] (工序1中形成的三唑环具有几何异构,实施例111工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。)

[3063] 工序1:抗体与药物连接子的偶联

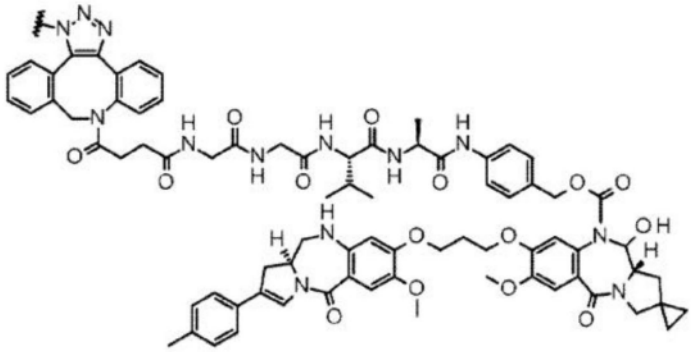
[3064] 在实施例59工序1所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.0mg/mL,1.00mL)中,在室温下加入1,2－丙二醇(0.917mL)以及包含实施例44工序8所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0825mL;相对于1分子抗体为12当量),使用管旋转器(MTR－103,AS ONE株式会社),在室温下反应48小时。

[3065] 精制操作:对上述溶液利用共通操作D进行精制,得到具有目标化合物的溶液6.0mL。

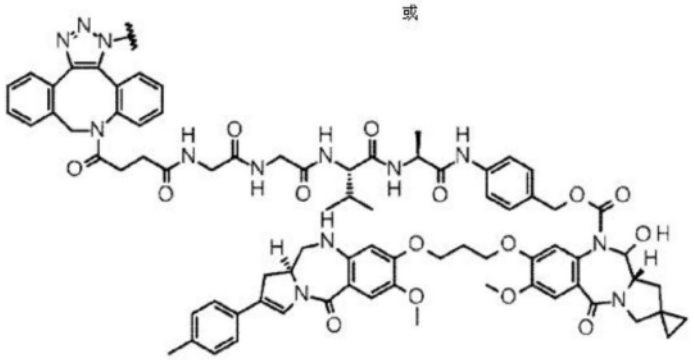
[3066] 特性评价:利用共通操作E、F得到下述的特性值。

[3067] 抗体浓度:0.99mg/mL,抗体产量:5.95mg(59%),每一分子抗体的药物平均结合数(n):1.9

[3068] 实施例112:ADC46

[3069] R = 

或



[3070] (工序1中形成的三唑环具有几何异构,实施例112工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。)

[3071] 工序1:抗体与药物连接子的偶联

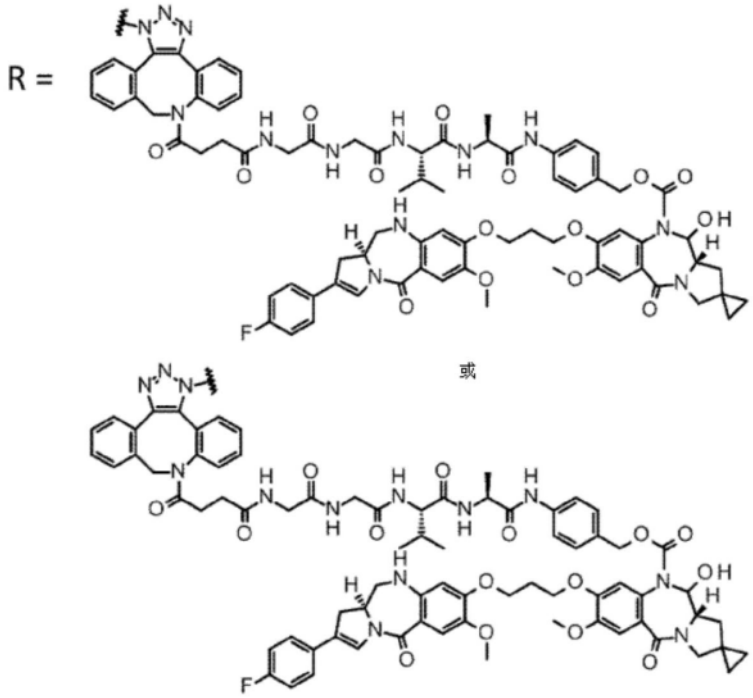
[3072] 在实施例59工序1所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.2mg/mL,1.00mL)中,在室温下加入1,2－丙二醇(0.917mL)以及包含实施例31工序8所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0825mL;相对于1分子抗体为12当量),使用管旋转器(MTR－103,AS ONE株式会社),在室温下反应2天。

[3073] 精制操作:对上述溶液利用共通操作D进行精制,得到具有目标化合物的溶液6.00mL。

[3074] 特性评价:利用共通操作E、F得到下述的特性值。

[3075] 抗体浓度:1.49mg/mL,抗体产量:8.94mg(89%),每一分子抗体的药物平均结合数(n):1.9

[3076] 实施例113:ADC47

[3077] 

[3078] (工序1中形成的三唑环具有几何异构,实施例113工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。)

[3079] 工序1:抗体与药物连接子的偶联

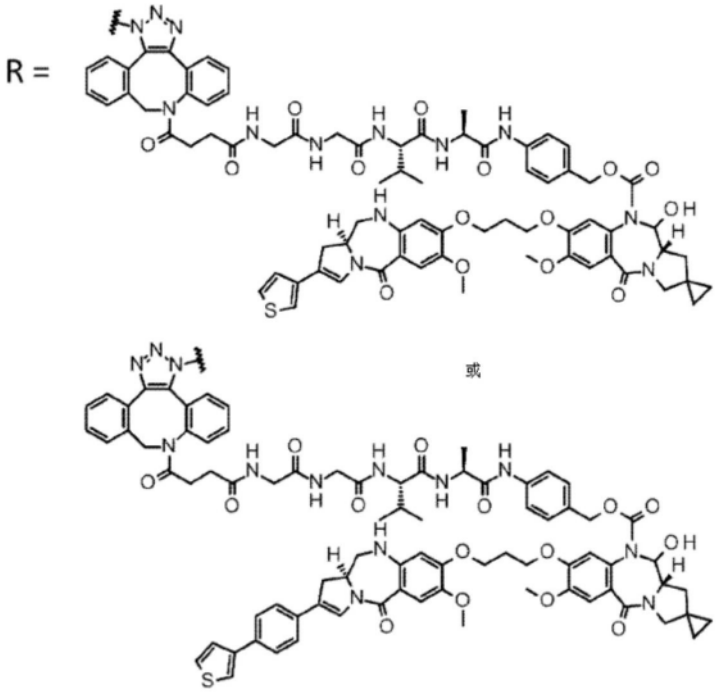
[3080] 在实施例59工序1所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.2mg/mL,1.00mL)中,在室温下加入1,2－丙二醇(0.917mL)以及包含实施例32工序8所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0825mL;相对于1分子抗体为12当量),使用管旋转器(MTR－103,AS ONE株式会社),在室温下反应2天。

[3081] 精制操作:对上述溶液利用共通操作D进行精制,得到具有目标化合物的溶液6.00mL。

[3082] 特性评价:利用共通操作E、F得到下述的特性值。

[3083] 抗体浓度:1.45mg/mL,抗体产量:8.73mg(87%),每一分子抗体的药物平均结合数(n):1.9

[3084] 实施例114:ADC48

[3085] 

[3086] (工序1中形成的三唑环具有几何异构,实施例114工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。)

[3087] 工序1:抗体与药物连接子的偶联

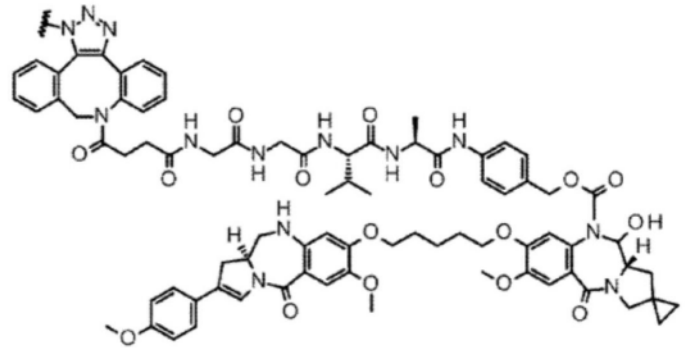
[3088] 在实施例59工序1所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.2mg/mL,1.00mL)中,在室温下加入1,2－丙二醇(0.917mL)以及包含实施例33工序8所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0825mL;相对于1分子抗体为12当量),使用管旋转器(MTR－103,AS ONE株式会社),在室温下反应2天。

[3089] 精制操作:对上述溶液利用共通操作D进行精制,得到具有目标化合物的溶液6.00mL。

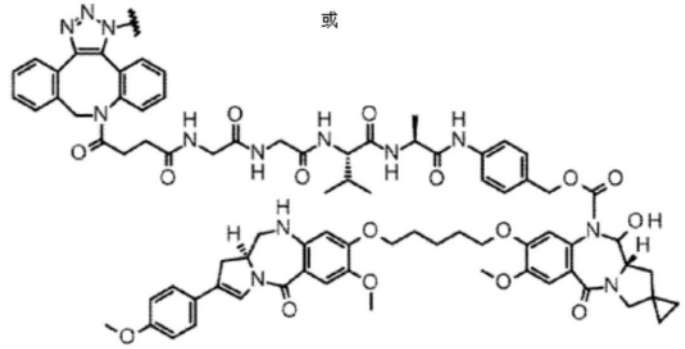
[3090] 特性评价:利用共通操作E、F得到下述的特性值。

[3091] 抗体浓度:1.45mg/mL,抗体产量:8.70mg(87%),每一分子抗体的药物平均结合数(n):1.9

[3092] 实施例115:ADC49

[3093] R = 

或



[3094] (工序1中形成的三唑环具有几何异构,实施例115工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。)

[3095] 工序1:抗体与药物连接子的偶联

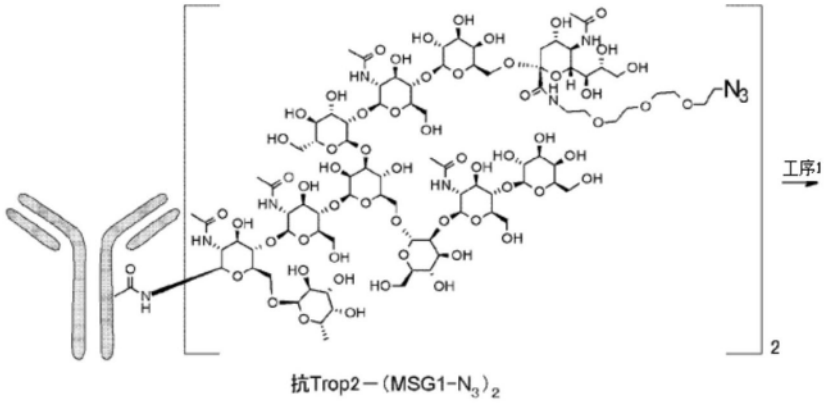
[3096] 在实施例60工序1所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.2mg/mL,1.00mL)中,在室温下加入1,2－丙二醇(0.917mL)以及包含实施例3工序13所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0825mL;相对于1分子抗体为12当量),使用管旋转器(MTR－103,AS ONE株式会社),在室温下反应2天。

[3097] 精制操作:对上述溶液利用共通操作D进行精制,得到具有目标化合物的溶液6.00mL。

[3098] 特性评价:利用共通操作E、F得到下述的特性值。

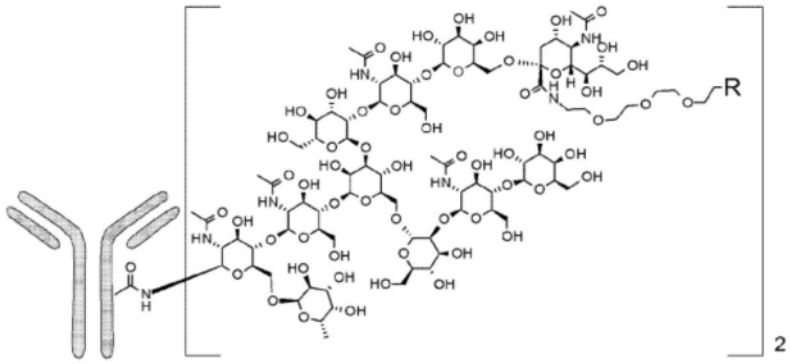
[3099] 抗体浓度:1.41mg/mL,抗体产量:8.45mg(85%),每一分子抗体的药物平均结合数(n):1.9

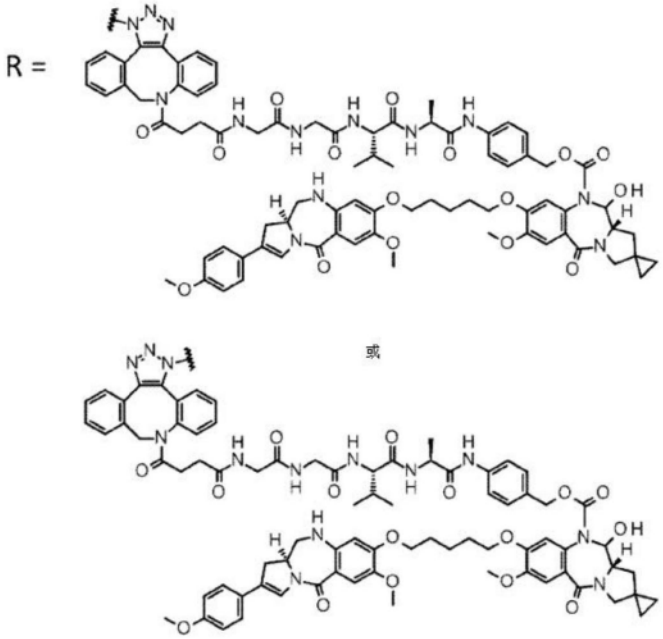
[3100] 实施例116:ADC50



抗Trop2－(MSG1-N_3)$_2$

[3101]





[3102] （工序1中形成的三唑环具有几何异构，实施例116工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。）

[3103] 工序1：抗体与药物连接子的偶联

[3104] 在实施例65工序2所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10mg/mL，1.00mL)中，在室温下加入1,2－丙二醇(0.917mL)以及包含实施例3工序13所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0825mL；相对于1分子抗体为12当量)，使用管旋转器(MTR－103，

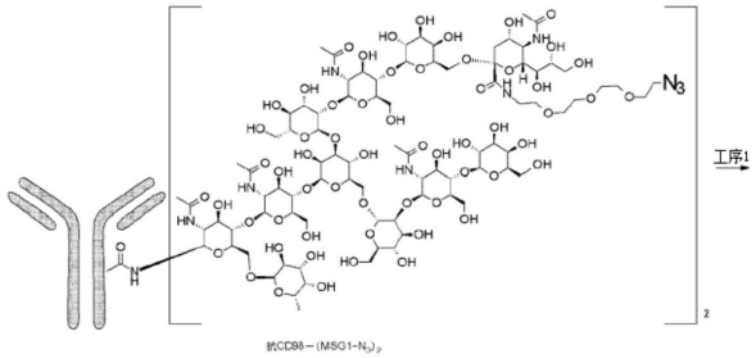
AS ONE株式会社),在室温下反应2天。

[3105] 精制操作:对上述溶液利用共通操作D进行精制,得到具有目标化合物的溶液6.00mL。

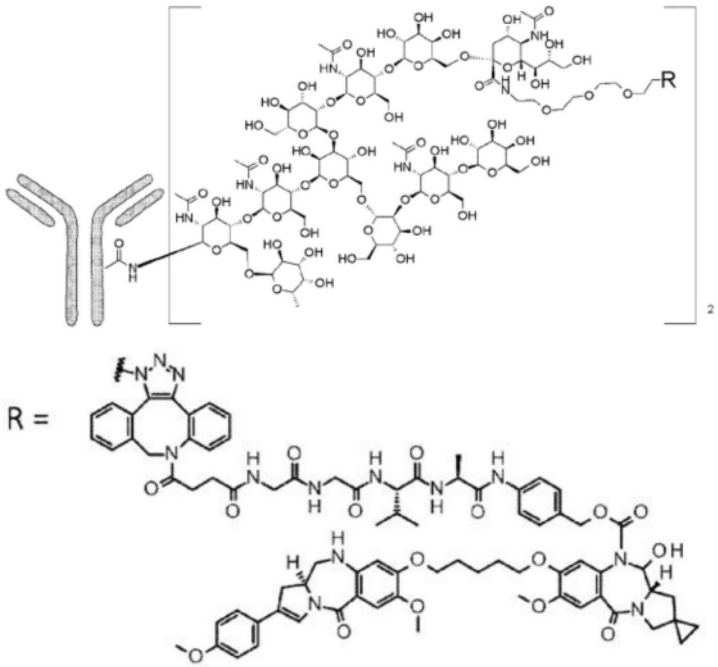
[3106] 特性评价:利用共通操作E、F得到下述的特性值。

[3107] 抗体浓度:1.47mg/mL,抗体产量:8.8mg(88%),每一分子抗体的药物平均结合数(n):1.9

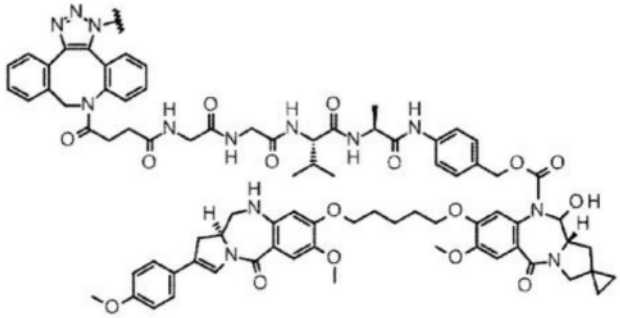
[3108] 实施例117:ADC51



[3109]



[3110] 或



[3111] (工序1中形成的三唑环具有几何异构,实施例117工序1所得到的化合物混合包含

上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。)

[3112] 工序1:抗体与药物连接子的偶联

[3113] 在实施例64工序2所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.2mg/mL,1.00mL)中,在室温下加入1,2－丙二醇(0.917mL)以及包含实施例3工序13所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0825mL;相对于1分子抗体为12当量),使用管旋转器(MTR－103,AS ONE株式会社),在室温下反应2天。

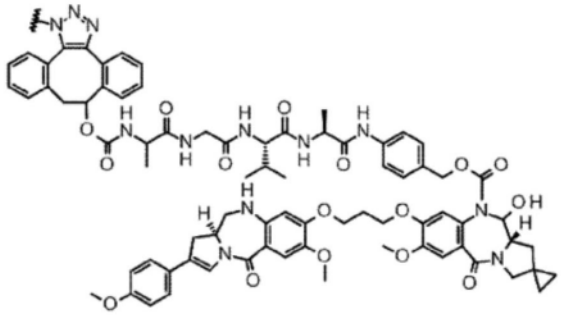
[3114] 精制操作:对上述溶液利用共通操作D进行精制,得到具有目标化合物的溶液6.00mL。

[3115] 特性评价:利用共通操作E、F得到下述的特性值。

[3116] 抗体浓度:1.36mg/mL,抗体产量:8.19mg(82%),每一分子抗体的药物平均结合数(n):1.8

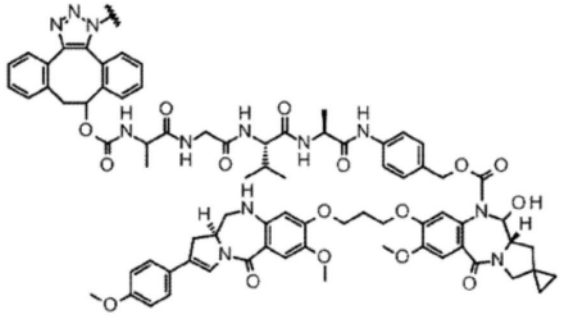
[3117] 实施例118:ADC52

R =



[3118]

或



[3119] (工序1中形成的三唑环具有几何异构,实施例118工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。)

[3120] 工序1:抗体与药物连接子的偶联

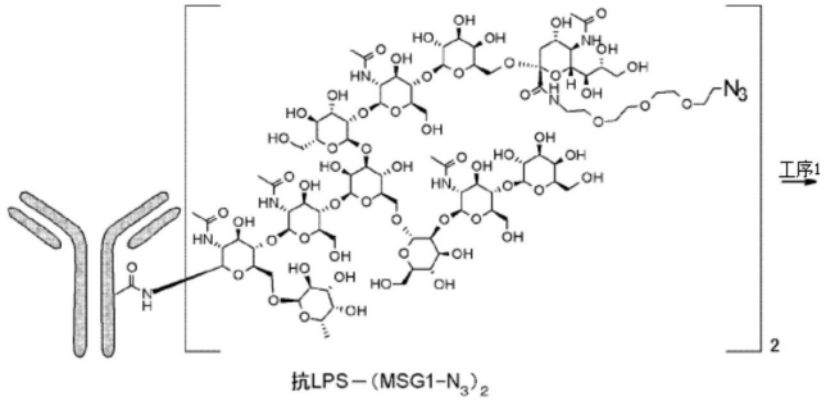
[3121] 在实施例60工序1所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.0mg/mL,1.00mL)中,在室温下加入1,2－丙二醇(0.917mL)以及包含实施例8工序2所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0825mL;相对于1分子抗体为12当量),使用管旋转器(MTR－103,AS ONE株式会社),在室温下反应3天。

[3122] 精制操作:对上述溶液利用共通操作D进行精制,得到具有目标化合物的溶液6.00mL。

[3123] 特性评价:利用共通操作E、F得到下述的特性值。

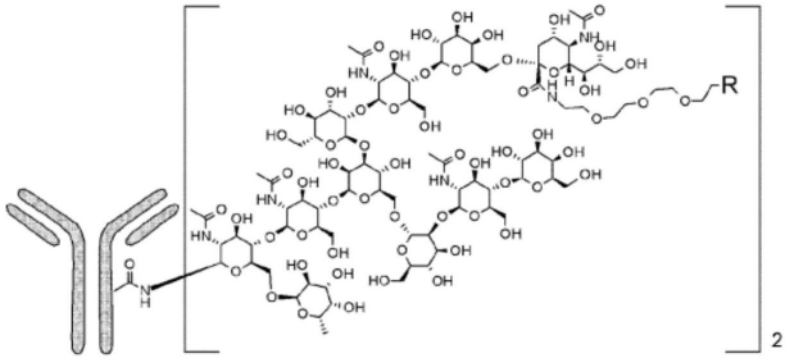
[3124] 抗体浓度:1.06mg/mL,抗体产量:6.35mg(63%),每一分子抗体的药物平均结合数(n):1.2

[3125] 实施例119:ADC53

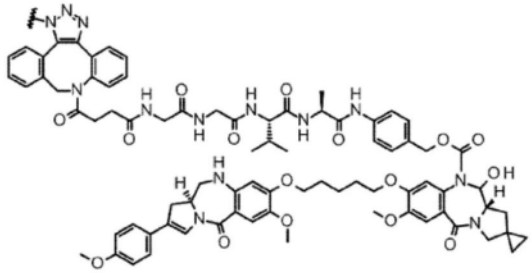


抗LPS－(MSG1-N_3)$_2$

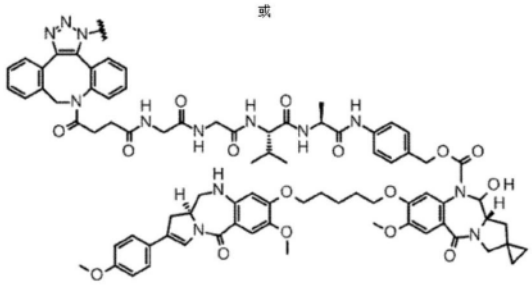
[3126]



R =



或



[3127] 工序1中形成的三唑环具有几何异构，实施例119工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。)

[3128] 工序1：抗体与药物连接子的偶联

[3129] 在实施例66工序2所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(9.89mg/mL，0.40mL)中，在室温下加入1,2－丙二醇(0.367mL)以及包含实施例3工序13所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0328mL；相对于1分子抗体为12当量)，使用管旋转器(MTR－103，AS ONE株式会社)，在室温下反应2天。

[3130] 精制操作：对上述溶液利用共通操作D进行精制，得到具有目标化合物的溶液

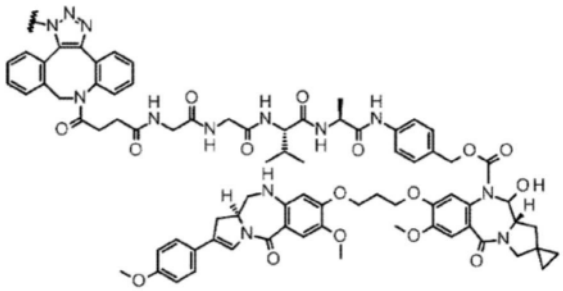
2.50mL。

[3131] 特性评价:利用共通操作E、F得到下述的特性值。

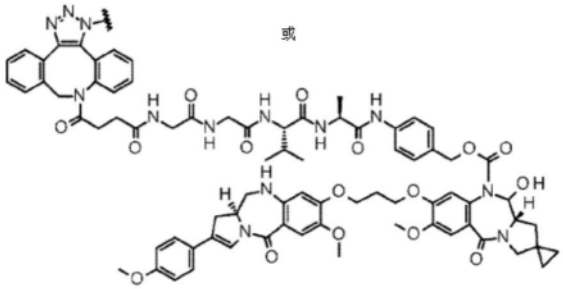
[3132] 抗体浓度:1.16mg/mL,抗体产量:2.89mg(72%),每一分子抗体的药物平均结合数(n):1.8

[3133] 实施例120:ADC54

[3134] R =



或



[3135] (工序1中形成的三唑环具有几何异构,实施例120工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。)

[3136] 工序1:抗体与药物连接子的偶联

[3137] 在实施例59工序1所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.0mg/mL,1.00mL)中,在室温下加入1,2-丙二醇(0.917mL)以及包含实施例4工序12所得到的化合物10mM的二甲基亚砜溶液(0.0825mL;相对于1分子抗体为12当量),使用管旋转器(MTR-103,AS ONE株式会社),在室温下反应48小时。

[3138] 精制操作:对上述溶液利用共通操作D进行精制,得到具有目标化合物的溶液6mL。

[3139] 特性评价:利用共通操作E、F得到下述的特性值。

[3140] 抗体浓度:1.49mg/mL,抗体产量:8.94mg(89%),每一分子抗体的药物平均结合数(n):1.8

[3141] 实施例121:抗体-药物偶联物的抗细胞效果(1)

[3142] 将作为HER2抗原阳性细胞的人胃癌株的NCI-N87(美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection);ATCC CRL-5822)在包含10%的胎牛血清(Hyclone)的RPMI1640培养基(Thermo Fisher Scientific;以下称为RPMI培养基)中培养。将HER2抗原阴性细胞的MDA-MB-468(ATCC HTB-132)在包含10%的胎牛血清(Hyclone)的Leibovitz's L-15培养基(Thermo Fisher Scientific;以下称为Leibovitz's培养基)中培养。将NCI-N87在RPMI培养基、将MDA-MB-468细胞在Leibovitz's培养基中分别以成为2.5×10^4Cells/mL的方式制备,在96孔细胞培养用微孔板中每孔添加80μL。细胞添加后,NCI-N87在37℃、5%CO_2下培养一晚,MDA-MB-468在37℃、未设定CO_2浓度的情况下培养一晚。

[3143] 第二天，将利用RPMI培养基或Leibovitz's培养基稀释成100nM、10nM、1nM、0.1nM、0.01nM、0.001nM的抗HER2抗体－药物偶联物以每孔20μL添加到微孔板。在未添加抗体－药物偶联物的孔中以每孔20μL的方式加入RPMI培养基或Leibovitz's培养基。将NCI－N87在37℃、5％CO_2下培养6天，将MDA－MB－468在37℃、未设定CO_2浓度的情况下培养6天。培养后，将微孔板从培养箱取出来在室温下静置30分钟。添加与培养液等量的CellTiter－Glo Luminescent Cell Viability Assay(Promega)，用平板混合器(Plate mixer)进行搅拌。在室温下静置10分钟后用酶标仪(PerkinElmer)计算发光量。

[3144] 活细胞率按照下式进行计算。

[3145] 活细胞率(％)＝a÷b×100

[3146] a:添加被验物质的孔的发光量的平均值

[3147] b:添加培养基的孔的发光量的平均值

[3148] IC_{50}值按照下式来计算。

[3149] $IC_{50}(nM)=antilog((50-d)\times(LOG_{10}(b)-LOG_{10}(a))\div(d-c)+LOG_{10}(b))$

[3150] a:被验物质的浓度a

[3151] b:被验物质的浓度b

[3152] c:添加浓度a的被验物质时的活细胞率

[3153] d:添加浓度b的被验物质时的活细胞率

[3154] a、b是夹着活细胞率50％的2点，a＞b。

[3155] 对于NCI－N87细胞，抗体－药物偶联物ADC17、ADC18、ADC1、ADC54、ADC20、ADC34、ADC23、ADC24、ADC25显示了IC_{50}＜0.001(nM)的抗细胞效果。抗体－药物偶联物ADC26、ADC27、ADC16、ADC11、ADC12、ADC2、ADC3、ADC4、ADC43、ADC5、ADC21、ADC48、ADC44、ADC6、ADC7、ADC28、ADC29、ADC13、ADC14、ADC30、ADC31、ADC32、ADC33、ADC35、ADC36、ADC8、ADC9、ADC38、ADC39显示了0.001≤IC_{50}＜0.1(nM)的抗细胞效果。另外，任一抗体－药物偶联物均没有显示出对MDA－MB－468细胞的抗细胞效果(IC_{50}＞0.1(nM))。

[3156] 实施例122:抗体－药物偶联物的抗细胞效果(2)

[3157] 将作为HER2抗原阳性细胞的人胃癌株的NCI－N87(ATCC CRL－5822)在包含10％的胎牛血清(Hyclone)的RPMI1640培养基(Thermo Fisher Scientific;以下称为RPMI培养基)上培养。将作为HER2抗原阳性细胞的人乳癌株的JIMT－1(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH;DSMZ ACC 589)在包含10％的胎牛血清(Hyclone)的Dulbecco's Modified Eagle培养基(Thermo Fisher Scientific;以下称为DMEM培养基)中培养。将NCI－N87利用RPMI培养基调制成5.0×10^4Cells/mL，将JIMT－1细胞利用DMEM培养基调制成1.3×10^4Cells/mL，在96孔细胞培养用微孔板中以每孔80μL进行添加，在37℃下在5％CO_2下培养一晚。

[3158] 第二天，将利用RPMI培养基或DMEM培养基稀释成400nM、80nM、16nM、3.2nM、0.64nM、0.13nM、0.026nM、0.0051nM、0.0010nM的抗HER2抗体－药物偶联物ADC49或抗LPS抗体－药物偶联物ADC53在微孔板上以每孔20μL进行添加。在未添加抗体－药物偶联物的孔中以每孔20μL添加RPMI培养基或DMEM培养基。在37℃、5％CO_2下培养6天。培养后，将微孔板从培养箱中取出，在室温下静置30分钟。添加与培养液等量的Cell Titer－Glo Luminescent Cell Viability Assay(Promega)，用平板混合器搅拌。在室温下静置10分钟

后,用酶标仪(PerkinElmer)计算发光量。

[3159] 活细胞率按照下式计算。

[3160] 活细胞率(%)=a÷b×100

[3161] a:添加了被验物质的孔的发光量的平均值

[3162] b:添加了培养基的孔的发光量的平均值

[3163] IC_{50}值按照下式来计算。

[3164] $IC_{50}(nM)=antilog((50-d)\times(LOG_{10}(b)-LOG_{10}(a))\div(d-c)+LOG_{10}(b))$

[3165] a:被验物质的浓度a

[3166] b:被验物质的浓度b

[3167] c:添加浓度a的被验物质时的活细胞率

[3168] d:添加浓度b的被验物质时的活细胞率

[3169] a、b是夹着活细胞率50%的两点,a>b。

[3170] 抗HER2抗体-药物偶联物ADC49对于NCI-N87、JIMT-1两细胞显示了$0.001<IC_{50}<0.1$(nM)的抗细胞效果。另一方面,抗LPS抗体-药物偶联物ADC53对任一细胞均未显示出抗细胞效果($IC_{50}>0.1$(nM))。

[3171] 实施例123:抗体-药物偶联物的抗细胞效果(3)

[3172] 将作为CLDN6抗原阳性细胞的人卵巢癌株的OV-90(ATCC CRL-11732)在包含15%的胎牛血清(Hyclone)的、培养基199(Thermo Fisher Scientific)与MCDB 105培养基(Sigma-Aldrich)按照1比1混合的培养基(以下,称为培养基)中培养。将OV-90细胞利用培养基调制成1.9×10^4Cells/mL,在96孔细胞培养用微孔板中添加80μL,在37℃、5%CO_2下培养一晚。

[3173] 第二天,将利用培养基稀释成50nM、10nM、2.0nM、400pM、80pM、16pM、3.2pM、0.64pM、0.13pM的抗CLDN6抗体-药物偶联物ADC40、ADC41、ADC42在微孔板中以每孔20μL进行添加。在未添加抗体-药物偶联物的孔中每孔添加20μL的培养基。在37℃、5%CO_2下培养6天。培养后,将微孔板从培养箱中取出,在室温下静置30分钟。添加与培养液等量的CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay(Promega),用平板混合器进行搅拌。室温下静置10分钟后,用酶标仪(PerkinElmer)计算发光量。

[3174] 活细胞率按照下式计算。

[3175] 活细胞率(%)=a÷b×100

[3176] a:添加了被验物质的孔的发光量的平均值

[3177] b:添加了培养基的孔的发光量的平均值

[3178] IC_{50}值按照下式计算。

[3179] $IC_{50}(nM)=antilog((50-d)\times(LOG_{10}(b)-LOG_{10}(a))\div(d-c)+LOG_{10}(b))$

[3180] a:被验物质的浓度a

[3181] b:被验物质的浓度b

[3182] c:添加浓度a的被验物质时的活细胞率

[3183] d:添加浓度b的被验物质时的活细胞率

[3184] a,b是夹着活细胞率50%的2点,a>b。

[3185] 抗CLDN6抗体-药物偶联物ADC40、ADC41、ADC42对于OV-90细胞显示出$0.001<$

IC_{50}＜0.1(nM)的抗细胞效果。

[3186] 实施例124:抗体－药物偶联物的抗肿瘤试验(1)

[3187] 小鼠:在使用5周龄的雌BALB/c裸鼠(日本Charles river)进行试验之前,在SPF条件下驯化4－7天。给小鼠投食灭菌的固态饲料(FR－2,Funabashi FarmsCo.,Ltd),提供灭菌的自来水(添加5－15ppm次氯酸钠溶液进行制备)。

[3188] 测量和计算公式:在所有研究中,每周使用电子数字卡尺(CD－15CX,MitutoyoCorp.)测量肿瘤的长径以及短径2－3次,计算肿瘤体积(mm^3)。计算式如下所示。

[3189] 肿瘤体积(mm^3)＝长径(mm)×[短径(mm)]^2×1/2

[3190] 抗体－药物偶联物以及抗体全部用10mM－Acetate Buffer(乙酸缓冲液),5％Sorbitol(山梨醇),pH5.5(Nacalai Tesque株式会社;ABS缓冲液)进行稀释,尾静脉内给药10mL/kg的液量。另外,作为对照组(Vehicle组),以同样的方式给药ABS缓冲液。

[3191] 将NCI－N87细胞(ATCC CRL－5822)悬浮在生理盐水(株式会社大冢制药工场)中,将1×10^7cells皮下移植到雌裸鼠的右体侧部(Day0),Day7进行随机分组。在Day7以0.3mg/kg的用量尾静脉内给药抗HER2抗体－药物偶联物ADC26,在Day7以1mg/kg的用量尾静脉内给药ADC19或ADC54。另外,作为对照组(Vehicle组),以同样的方式给药ABS缓冲液。

[3192] 结果如图4所示。确认到抗HER2抗体－药物偶联物ADC26、ADC19、ADC54显示很强的伴随肿瘤消退的抗肿瘤效果。对于给药了任意种抗HER2抗体－药物偶联物的小鼠,均观察到体重减轻。

[3193] 在以下的抗肿瘤试验的评价例中,没有特别的说明,均使用本评价例中使用的方法实施试验。

[3194] 实施例125:抗体－药物偶联物的抗肿瘤试验(2)

[3195] 将NCI－N87细胞(ATCC CRL－5822)悬浮于杜氏磷酸缓冲液(Dulbecco's phosphate buffered saline)(Sigma－Aldrich)中,将1×10^7cells皮下移植至雌裸鼠的右体侧部(Day0),在Day4进行随机分组。将抗HER2抗体－药物偶联物ADC49、抗HER2抗体曲妥珠单抗(参考例3)、或抗LPS抗体－药物偶联物ADC53在Day4全部以0.33mg/kg的用量进行尾静脉内给药。另外,作为对照组(Vehicle组)以同样的方式给药ABS缓冲液。

[3196] 结果如图5所示。抗HER2抗体－药物偶联物ADC49观察到很强的伴随肿瘤消退的抗肿瘤效果。相对于此,抗HER2抗体曲妥珠单抗、抗LPS抗体－药物偶联物ADC53未抑制肿瘤的增殖。另外,并未观察到抗体－药物偶联物ADC49、ADC53、或抗HER2抗体给药引起小鼠体重减轻。

[3197] 实施例126:抗体－药物偶联物的抗肿瘤试验(3)

[3198] 将KPL－4细胞(川崎医科大学・红林淳一先生,British Journal of Cancer,(1999)79(5/6).707－717)悬浮于杜氏磷酸缓冲液(Dulbecco's phosphate buffered saline)(Sigma－Aldrich),将1.5×10^7cells皮下移植于雌裸鼠的右体侧部(Day0),在Day14进行随机分组。将抗HER2抗体－药物偶联物ADC49、抗LPS抗体－药物偶联物ADC53、或曲妥珠单抗Tesirine(参考例1)在Day14以0.4mg/kg的用量进行尾静脉内给药。另外,作为对照组(Vehicle组)以同样的方式给药ABS缓冲液。

[3199] 结果如图6所示。确认到抗HER2抗体－药物偶联物ADC49具有很强的伴随肿瘤消退的抗肿瘤效果。相对于此,ADC53、曲妥珠单抗Tesirine没有观察到肿瘤的消退效果。另外,

未发现ADC49、曲妥珠单抗Tesirine的给药引起小鼠体重减轻。

[3200] 实施例127:抗体－药物偶联物的抗肿瘤试验(4)

[3201] 将JIMT－1细胞(DSMZ ACC 589)悬浮于生理盐水(株式会社大冢制药工场)中,将5×10^6cells皮下移植于雌裸鼠的右体侧部(Day0),在Day10进行随机分组。将抗HER2抗体－药物偶联物ADC49、或曲妥珠单抗Tesirine(参考例1)在Day10以0.4mg/kg的用量进行尾静脉内给药。另外,作为对照组(Vehicle组),以同样的方式给药ABS缓冲液。

[3202] 结果如图7所示。确认到抗HER2抗体－药物偶联物ADC49具有很强的伴随肿瘤消退的抗肿瘤效果。相对于此,曲妥珠单抗Tesirine虽然有抗肿瘤效果,但是没有发现肿瘤的消退。另外,也未发现给药ADC49、曲妥珠单抗Tesirine而引起小鼠的体重减轻。

[3203] 实施例128:抗体－药物偶联物的抗肿瘤试验(5)

[3204] 将OV－90细胞(ATCC CRL－11732)悬浮于基质胶(CORNING)中,将2.5×10^6cells皮下移植于雌裸鼠的右体侧部(Day0),在Day15进行随机分组。将抗CLDN6抗体－药物偶联物ADC40、或抗CLDN6抗体(H1L1)Tesirine在Day15以0.33mg/kg的用量进行尾静脉内给药。另外,作为对照组(Vehicle组),以同样的方式给药ABS缓冲液。

[3205] 结果如图8所示。观察到抗CLDN6抗体－药物偶联物ADC40具有很强的伴随肿瘤消退的抗肿瘤效果。相对于此,未发现抗CLDN6抗体(H1L1)－Tesirine有肿瘤消退的效果。另外,未发现ADC40、H1L1－Tesirine的给药而引起小鼠体重减轻。

[3206] 实施例129:抗体－药物偶联物的抗肿瘤试验(6)

[3207] 将NIH:OVCAR－3细胞(ATCC HTB－161)悬浮于基质胶(CORNING)中,将1×10^7cells皮下移植于雌裸鼠的右体侧部(Day0),在Day25进行随机分组。将抗CLDN6抗体－药物偶联物ADC40、或抗CLDN6抗体(H1L1)－Tesirine在Day25以0.33mg/kg的用量进行尾静脉内给药。另外,作为对照组(Vehicle组),以同样的方式给药ABS缓冲液。

[3208] 结果如图9所示。发现抗CLDN6抗体－药物偶联物ADC40具有很强的伴随肿瘤消退的抗肿瘤效果。相对于此,发现H1L1－Tesirine虽然具有抗肿瘤效果,但未发现肿瘤的消退。另外,未发现给药ADC40、H1L1－Tesirine而引起小鼠的体重减轻。

[3209] 实施例130:抗体－药物偶联物的抗肿瘤试验(7)

[3210] 将FaDu细胞(ATCCHTB－43)悬浮于生理盐水(株式会社大冢制药工场)中,将3×10^6cells皮下移植于雌裸鼠的右体侧部(Day0),在Day10进行随机分组。将抗TROP2抗体－药物偶联物ADC50、或抗LPS抗体－药物偶联物ADC53在Day10以0.4mg/kg的用量进行尾静脉内给药。另外,作为对照组(Vehicle组),以同样的方式给药ABS缓冲液。

[3211] 结果如图10所示。发现抗TROP2抗体－药物偶联物ADC50具有很强的伴随肿瘤消退的抗肿瘤效果。相对于此,抗LPS抗体－药物偶联物ADC53未抑制肿瘤的增殖。另外,未发现ADC50、ADC53的给药而引起小鼠的体重减轻。

[3212] 实施例131:小鼠抗CLDN6抗体B1产生杂交瘤(218B1)以及小鼠抗CLDN6抗体C7产生杂交瘤(218C7)

[3213] 131－1.小鼠的免疫与杂交瘤的获取

[3214] 1－1)用于小鼠免疫的细胞的准备

[3215] 将2×10^6个或者5×10^6个NOR－P1细胞(人胰腺癌细胞株,RIKEN RCB－2139)在RPMI－1640(Roswell Park Memorial Institute－1640)10％FBS(胎牛血清)(+)培养基

(10ml或者20ml)中培养5天后回收,用PBS(磷酸缓冲生理盐水)清洗2次,再悬浮于PBS(300μl)中。

[3216] 1－2)对小鼠的免疫

[3217] 对于BALB/c小鼠(12周龄),以大约1周的间隔用NOR－P1细胞(2×10^6个)对腹腔内进行第1～5次免疫。从第5次免疫起约2周后,用NOR－P1细胞(5×10^6个)对腹腔内免疫。从第6次免疫起约3周后用NOR－P1细胞(2×10^6个)对腹腔内免疫。第8～10次以约2周的间隔用2×10^6个NOR－P1细胞对腹腔内免疫。在第10次免疫起约3周后(第11次)以及其3天后(第12次,最终免疫)用5×10^6个NOR－P1细胞对腹腔内免疫。脾脏细胞在最终免疫起3天后摘出。

[3218] 1－3)免疫后的小鼠的脾脏细胞的准备

[3219] 摘出免疫后的小鼠的脾脏,研磨并悬浮在RPMI1640 10％FBS(+)培养基中。使细胞悬浮液通过细胞过滤器(70μm,BD Falcon社)后,在室温下,以1500rpm离心5分钟而废弃上清液。加入Tris－NH_4Cl溶液(20mM Tris－HCl pH7.2、77.6mM NH_4Cl;20mL),在室温下处理5分钟。加入PBS(20mL),以1500rpm在室温下离心5分钟。将上清液废弃后,加入RPMI1640 FBS(+)培养基(10ml)。

[3220] 1－4)骨髓瘤细胞的准备

[3221] 将P3U1细胞(小鼠骨髓瘤细胞株)在RPMI1640 FBS(+)培养基中培养5天后回收,再悬浮于RPMI1640FBS(+)培养基(20ml)中。

[3222] 1－5)细胞融合

[3223] 将脾脏细胞和骨髓瘤细胞以5:1的比例混合,以1500rpm在室温下离心5分钟。用RPMI1640 FBS(－)培养基(10ml)清洗2次后,离心分离(1500rpm,5分钟)。将得到的沉淀组分的细胞组充分地松散后,搅拌的同时花约1分钟慢慢加入聚乙二醇－1500(PEG－1500;1ml)。搅拌3分30秒后,在室温下静置30秒。然后,花1分钟在该细胞液中加入RPMI培养基10％Low IgG FBS(+)(10ml)。将该细胞悬浮液离心分离(1500rpm,5分钟),将得到的沉淀组分的细胞缓慢地松散后,缓慢地悬浮于HAT培养基(包含10％Low IgG FBS、HAT Media Supplement、5％BriClone的RPMI1640培养基;200ml)中。将该悬浮液以200μl/孔的方式分配到96孔培养板中,在37℃、5％CO_2的培养箱中培养6天。

[3224] 1－6)杂交瘤的筛选/探针的准备

[3225] 制作用于测定抗体的内化以及免疫毒素活性的重组复合蛋白质DT3C。该DT3C为利用基因工程使白喉毒素(DT)的催化区域和链球菌蛋白质G的抗体结合区域融合的蛋白质。DT3C特异性地与抗体的Fc部分结合,若被吞入细胞内,则通过抑制蛋白质合成来诱导细胞死亡。通过使用该系统,可同时观察到抗体的内化和免疫毒素引起的细胞杀伤效果(Yamaguchi,M.etal.,Biochemical and Biophysical Research Communications 454(2014)600－603)。

[3226] 1－7)基于DT3C的杂交瘤的筛选

[3227] 在96孔板中加入4μg/ml的DT3C(25μl),再加入工序1－5中得到的杂交瘤的培养上清液(25μl),在室温下孵育30分钟。接种2×10^5个/ml(RPMI培养基10％Low Ig GFBS(+))的NOR－P1细胞(50μl),并在37℃、CO_2培养箱内培养3天。培养后通过显微镜观察,将显示出使用阴性对照抗体时的附着细胞数的约25％以下的附着细胞数的孔确定为阳性。对所筛选的

纯系进行1～2次亚克隆，建立单克隆的杂交瘤细胞株8株。

[3228] 131－2:杂交瘤产生的抗体所结合的抗原的鉴定

[3229] 对实施例131－1中制备的杂交瘤产生的抗体中2个纯系218B1以及218C7进行抗原的鉴定。

[3230] 2－1)使用218B1抗体以及218C7抗体对生物素标记的细胞表面蛋白质进行免疫沉淀

[3231] 除去2×10^6个NTERA－2细胞(人睾丸癌细胞株、ATCC CRL－1973)的培养上清液，用PBS清洗2次。将EZ－Link Sulfo－NHS－Biotin(Thermo Fisher SCIENTIFIC社)以0.1mg/ml的浓度悬浮于PBS中。除去PBS后，加入Biotin/PBS溶液，在震荡器上孵育30分钟后，用100mM甘氨酸/PBS溶液(25ml)清洗2次，然后用PBS(10ml)清洗1次。将清洗后的细胞再悬浮于200μl的溶解缓冲液(150mM NaCl、50mM Tris－HCl pH7.4、1％DDM、蛋白酶抑制剂(Protease inhibitor)、Complete EDTA free(Roche社)1粒/50ml)中，在4℃下处理30分钟。离心分离(13000rpm、20分钟、4℃)而制备细胞溶解液。将Protein G Sepharose(Protein G Sepharose 4 Fast Flow(GE Healthcare社))的缓冲液置换为溶解缓冲液，将得到的Protein G Sepharose/溶解缓冲液(50％浆液;30μl)加入细胞溶解液中，在4℃下旋转30分钟后，在4℃下离心1分钟，回收上清液。在该上清液中加入218B1抗体或218C7抗体(约3μg)，在4℃下旋转30分钟后，加入Protein G Sepharose/溶解缓冲液(50％浆液;60μl)，在4℃下旋转1小时。用溶解缓冲液(1ml)清洗Protein G Sepharose 6次后，再悬浮于1×SDS样品缓冲液(BioRad社)中。在100℃下处理悬浮液5分钟后，回收溶液，制成用于SDS－PAGE(聚丙烯酰胺凝胶电泳)的样品。

[3232] 2－2)SDS－PAGE以及蛋白质印迹

[3233] 将2－1)中制备的SDS－PAGE样品使用Super Sep Ace 5－20％(Wako社)，在50mV下堆叠(stacking)30分钟后，在200mV下电泳1小时，然后在12mV下从凝胶向薄膜(membrane)转印(blotting)47分钟。将薄膜用PBS－T(PBS(－)－0.02％Tween 20)清洗后，封闭1小时。将薄膜用PBS－T花5分钟清洗3次后，与Streptavidin－horseradish peroxidase conjugate(GE Healthcare社;用PBS－T稀释2000倍使用)反应1小时。将薄膜用PBS－T花5分钟清洗2次之后，使用增强化学发光(enhanced chemiluminscense,ECL)法检测目标频带。在使用218B1抗体以及218C7抗体的任一情况下，无论是否添加DTT，都检测到分子量18kDa的频带。

[3234] 2－3)使用细胞蛋白质的218B1抗体以及218C7抗体对免疫沉淀产物进行质量分析

[3235] 回收2×10^7个NTERA－2细胞，用PBS清洗2次。使用细胞刮刀回收细胞，以1500rpm离心5分钟。除去上清液后，再悬浮于2ml的溶解缓冲液中，在4℃下处理30分钟。离心分离(13000rpm、20分钟、4℃)而制备细胞溶解液。将Protein G Sepharose/溶解缓冲液(50％浆液;180μl)加入细胞溶解液中，在4℃下旋转30分钟后在4℃下离心1分钟，回收上清液。在该上清液中加入218B1抗体(约9μg)，在4℃下旋转30分钟后，加入Protein G Sepharose/溶解缓冲液(50％浆液;180μl)，在4℃下旋转1小时。用溶解缓冲液(1ml)将Protein G Sepharose清洗6次后，再悬浮于1×SDS样品缓冲液中。在100℃下将悬浮液处理5分钟后，回收溶液，制成用于SDS－PAGE的样品。以与2－2)同样的方法进行SDS－PAGE，将电泳凝胶进行CBB(Coomassie brilliant blue:考马斯亮蓝)染色。从电泳凝胶切出相当于18kDa的部

分,供于质量分析。质量分析的结果是该凝胶片含有Claudin－6。

[3236] 2－4)FACS解析

[3237] 根据质量分析可预测218B1抗体以及218C7抗体的抗原为Claudin－6,因此基于cDNA基因转移进行了强制性表达分析。FACS解析的结果显示人Claudin－6表达CHO－K1细胞中,218B1抗体以及218C7抗体表现出强阳性反应,因此,表明218B1抗体以及218C7抗体的抗原为Claudin－6。

[3238] 实施例132:从杂交瘤培养上清液精制抗体

[3239] 将实施例131制作的小鼠抗CLDN6抗体B1产生杂交瘤(218B1)以及小鼠抗CLDN6抗体C7产生杂交瘤(218C7)在包含10％的Fetal Bovine Serum(胎牛血清),Ultra－LowIgG(Thermo Fisher Scientific)的Hybridoma－SFM(Thermo Fisher Scientific)中培养。离心回收培养上清液,用0.45μm的过滤器(Corning社制)进行过滤。在rProteinA亲和色谱法(4～6℃下)的一步工序中,从培养上清液精制抗体。rProtein A亲和色谱法精制后的缓冲置换工序在4～6℃下实施。首先将培养上清液应用于填充有利用PBS平衡化的MabSelectSuRe(GE Healthcare Bioscience社制)的柱中。培养液进入到柱后,用柱容量2倍以上的PBS清洗柱。接着,用2M精氨酸盐酸盐溶液(pH4.0)进行洗脱,收集包含抗体的组分。对该组分用透析(Thermo Scientific社、Slide－A－Lyzer Dialysis Cassette)进行与PBS(－)的液体置换。最后,用Centrifugal UFFilter Device VIVASPIN20(组分分子量UF10K、Sartorius社、4℃下)进行浓缩,将IgG浓度调制成1mg/mL以上。用Minisart－Plusfilter(Sartorius社)进行过滤,制成精制样品。

[3240] 实施例133:小鼠抗CLDN6抗体B1以及C7的in vitro(体外)评价

[3241] 133－1:使用流式细胞仪对小鼠抗CLDN6抗体的结合能力进行评价

[3242] 使用流式细胞仪法评价实施例132中制作的小鼠抗CLDN6抗体的人CLDN6以及家族分子CLDN3、CLDN4、CLDN9结合性。将从Origene社购买的human CLDN3/pCMV6－Entry、human CLDN4/pCMV6－Entry、human CLDN6/pCMV－Entry、human CLDN9/pCMV6－Entry、或pCMV6－Entry使用Lipofectamine(脂质体)2000(Thermo Fisher Scientific)一次性导入至293T细胞(Thermo Fisher Scientific HCL4517)中,在37℃、5％CO_2的条件下培养一晚,制备细胞悬浮液。将导入基因的293T细胞悬浮液离心,除去上清液后,将小鼠抗CLDN6抗体(纯系序号B1、C7)、或小鼠IgG1对照抗体(R&D Systems)以最终浓度为30μg/mL、10μg/mL、3.3μg/mL、1.1μg/mL的方式加入并进行悬浮,在4℃下静置1小时。用包含5％胎牛血清(Hyclone)的杜氏磷酸盐缓冲液Dulbecco'sphosphate buffered saline(Sigma－Aldrich)(以下,称为含有5％FBS的PBS)清洗2次后,加入用含有5％FBS的PBS稀释500倍后的FLUORES CEIN－CONJUGATED GOAT IGG FRACTION TO MOUSE IGG(WHOLE MOLECULE)(MP BIOMEDICALS)并进行悬浮,在4℃下静置1小时。用含有5％FBS的PBS清洗2次后,用流式细胞仪(FC500;Beckman Coulter)进行检测。数据分析使用FlowJo(TreeStar)进行。予以说明,用含有0.25％Tween20的PBS透化细胞后,使用小鼠抗FLAG抗体(Sigma－Aldrich)来确认各基因导入。结果如图40所示。图40的曲线图中,纵轴表示显示抗体结合量的FITC的荧光强度,横轴表示抗体浓度。制作的小鼠抗CLDN6抗体与人CLDN6以及人CLDN9以相同的程度进行结合,不与人CLDN3、人CLDN4结合。小鼠对照IgG1未与任何细胞结合。

[3243] 133－2:抗体内化活性

[3244] 小鼠抗CLDN6抗体B1以及C7的内化活性使用结合了阻碍蛋白质合成的毒素(皂草素)的抗小鼠IgG试剂Mab－ZAP(ADVANCED TARGETING SYSTEMS)进行评价。该评价中,取决于小鼠抗CLDN6抗体的内化活性,Mab－ZAP被吞入细胞内,抑制蛋白质合成的皂草素释放到细胞内,从而抑制细胞增殖。

[3245] 将作为人CLDN6阳性细胞的人绒毛膜癌株的JEG－3(ATCC HTB－36)、作为人CLDN6阳性细胞的人卵巢癌株的NIH:OVCAR－3(ATCC HTB－161)、或作为人CLDN6阴性细胞的人胰腺癌株的BxPC－3(ATCC CRL－1687),以2×10^3cells/well接种到96孔细胞培养用微孔板中,在37℃、5％CO_2的条件下培养一晚。第二天,添加将小鼠抗CLDN6抗体或小鼠IgG1抗体(R&D Systems)以最终浓度为1nM的方式与Mab－ZAP(最终浓度:0.5nM)、或未结合毒素的AffiniPure Goat Anti－Mouse IgG,Fcγ Fragment Specific(Jackson Immuno Research)(最终浓度:0.5nM)混合而成的混合溶液,在37℃、5％CO_2的条件下培养5天。使用CellTiter－Glo Luminescent Cell Viability Assay(发光细胞活力测定)(Promega)通过定量ATP活性来测定生存细胞数。加入抗CLDN6抗体而引起的细胞增殖抑制作用由以未添加混合溶液的孔的值为100％的相对生存率来计算。图41显示结果。小鼠抗CLDN6抗体(B1、C7)对人CLDN6阳性细胞株JEG－3和NIH:OVCAR－3显示细胞增殖抑制效果。相对于此,对于人CLDN6阴性细胞株BxPC－3未确认到细胞增殖抑制效果。另外,小鼠IgG1抗体对任一细胞株均未显示细胞增殖抑制效果。根据该结果认为,制作的抗CLDN6抗体(B1,C7)具有内化活性,适合用作抗体—药物偶联物用的抗体。

[3246] 实施例134:编码小鼠抗CLDN6抗体B1以及C7的可变区的cDNA的核苷酸序列的确定

[3247] 134－1:编码B1抗体的可变区的cDNA的核苷酸序列的确定

[3248] 134－1－1:B1抗体产生杂交瘤的total RNA的制备

[3249] 为了扩增编码B1抗体的可变区的cDNA,由B1抗体产生杂交瘤使用TRIzol Reagent(Ambion社)制备total RNA。

[3250] 134－1－2:利用5'－RACE PCR编码B1抗体的轻链可变区的cDNA的扩增和序列的确定

[3251] 编码轻链可变区的cDNA的扩增使用实施例134－1－1制备的total RNA的约1μg和SMARTer RACE 5'/3'Kit(套组)(Clontech社)进行实施。作为用于利用PCR扩增编码B1抗体的轻链基因的可变区的cDNA的引物,使用UPM(Universal Primer A Mix:附属于SMARTer RACE 5'/3'Kit)以及由公知的小鼠轻链的恒定区的序列设计的引物。

[3252] 将利用5'－RACE PCR扩增的编码轻链的可变区的cDNA克隆到质粒中,接着,实施编码轻链的可变区的cDNA的核苷酸序列的序列分析。

[3253] 将确定的编码B1抗体的轻链的可变区的cDNA的核苷酸序列示于序列号18,氨基酸序列如序列号19所示。

[3254] 134－1－3:利用5'－RACE PCR编码B1抗体的重链可变区的cDNA的扩增和序列的确定

[3255] 编码重链可变区的cDNA的扩增使用实施例134－1－1制备的total RNA的约1μg和SMARTer RACE 5'/3'Kit(Clontech社)进行实施。作为用于利用PCR扩增编码LB1抗体的重链基因的可变区的cDNA的引物,使用UPM(Universal Primer A Mix:附属于SMARTer RACE 5'/3'Kit)以及由公知的小鼠重链的恒定区的序列设计的引物。

[3256] 将利用5'－RACE PCR扩增的编码重链的可变区的cDNA克隆到质粒中，接着，实施编码重链的可变区的cDNA的核苷酸序列的序列分析。

[3257] 将确定的编码B1抗体的重链的可变区的cDNA的核苷酸序列示于序列号20，氨基酸序列如序列号21所示。

[3258] 134－2：编码C7抗体的可变区的cDNA的核苷酸序列的确定

[3259] 以与实施例134－1同样的方法实施。将确定的编码C7抗体的轻链的可变区的cDNA的核苷酸序列示于序列号22，氨基酸序列如序列号23所示。将编码重链的可变区的cDNA的核苷酸序列示于序列号24，氨基酸序列如序列号25所示。

[3260] 实施例135：嵌合化抗CLDN6抗体chB1的制作

[3261] 135－1：嵌合化抗CLDN6抗体chB1的表达载体的构建

[3262] 135－1－1：嵌合化以及人源化轻链表达载体pCMA－LK的构建

[3263] 将用限制酶XbaI以及PmeI消化质粒pcDNA3.3－TOPO/LacZ(Invitrogen社)而得到的约5.4kb的片段、和包含序列号26所示的人轻链信号序列以及编码人κ链恒定区的DNA序列的DNA片段，使用In－Fusion HD PCR克隆试剂盒(Clontech社)进行结合，制作pcDNA3.3/LK。通过从pcDNA3.3/LK中除去新霉素表达单元而构建pCMA－LK。

[3264] 135－1－2：嵌合化以及人源化IgG1LALA型重链表达载体pCMA－G1LALA的构建

[3265] 将用XbaI以及PmeI消化pCMA－LK，除去轻链信号序列以及人κ链恒定区的DNA片段、和包含序列号27所示的人重链信号序列及编码人IgG1LALA恒定区的DNA序列的DNA片段，使用In－Fusion HD PCR克隆试剂盒(Clontech社)进行结合而构建pCMA－G1LALA。

[3266] 135－1－3：嵌合化chB1重链表达载体的构建

[3267] 合成了序列号33所示的chB1重链的核苷酸序列的核苷酸编号36～440所示的DNA片段(GENEART社)。使用In－Fusion HD PCR克隆试剂盒(Clontech社)，在用限制酶BlpI切断pCMA－G1LALA的部位插入合成的DNA片段，由此构建chB1重链表达载体。chB1重链的氨基酸序列如序列号32所示。

[3268] 135－1－4：嵌合化chB1轻链表达载体的构建

[3269] 合成了包含序列号29所示的编码chB1轻链的DNA序列的DNA片段(GENEART社)。使用In－Fusion HD PCR克隆试剂盒(Clontech社)，将合成的DNA片段和用XbaI以及PmeI消化pCMA－LK而将轻链信号序列与人κ链恒定区除去的DNA片段结合，由此构建chB1轻链表达载体。chB1轻链的氨基酸序列如序列号28所示。

[3270] 135－2：嵌合化抗CLDN6抗体chB1的生产以及精制

[3271] 135－2－1：嵌合化抗体chB1的生产

[3272] 将FreeStyle 293F细胞(Invitrogen社)根据手册传代培养。将对数生长期的1.2×10^{9}个FreeStyle 293F细胞(Invitrogen社)接种于3L Fernbach Erlenmeyer Flask(CORNING社)，用FreeStyle 293expression培养基(Invitrogen社)进行稀释，调制成2.0×10^{6}细胞/mL。在40mL的Opti－Pro SFM培养基(Invitrogen社)中加入0.24mg的重链表达载体、0.36mg的轻链表达载体和1.8mg的Polyethyleneimine(聚乙烯亚胺)(Polyscience#24765)并平稳搅拌，再放置5分钟后，添加至FreeStyle 293F细胞中。在37℃、8％CO_2培养箱中以90rpm振荡培养4小时后，添加600mL的EX－CELL VPRO培养基(SAFC Biosciences社)、18mL的GlutaMAX I(GIBCO社)以及30mL的Yeastolate Ultrafiltrate(GIBCO社)，在37℃、

8％CO_2培养箱中以90rpm振荡培养7天，将得到的培养上清液用Disposable Capsule Filter(一次性胶囊过滤器)(Advantec#CCS－045－E1H)进行过滤。将得到的嵌合化抗CLDN6抗体命名为“chB1”。

[3273] 135－2－2:嵌合化抗体chB1的精制

[3274] 使用rProtein A亲和色谱法的一步工序从实施例135－2－1所得到的培养上清液精制抗体。将培养上清液应用于填充有用PBS平衡化的MabSelectSuRe的柱(GE Healthcare Bioscience社制)后，用柱容量的2倍以上的PBS清洗柱。接着，用2M精氨酸盐酸盐溶液(pH4.0)进行洗脱，收集含有抗体的组分。将该组分通过透析(Thermo Scientific社，Slide－A－Lyzer Dialysis Cassette)进行与PBS(－)的缓冲液置换。用Centrifugal UF Filter Device VIVASPIN20(组分分子量UF10K,Sartorius社)浓缩抗体，将IgG浓度调制为1mg/mL以上。最后，用Minisart－Plus filter(Sartorius社)进行过滤，制成精制样品。

[3275] 实施例136:人源化抗CLDN6抗体的制作

[3276] 136－1:抗CLDN6抗体的人源化体设计

[3277] 136－1－1:嵌合化抗体chB1的可变区的分子模拟

[3278] chB1的可变区的分子模拟利用公知的方法(Methods in Enzymology,203,121-153,(1991))作为同源建模(Homology modeling)。以对chB1的重链和轻链的可变区具有高的序列同一性的Protein Data Bank(Nuc.AcidRes.35,D301-D303(2007))中注册的结构(PDB ID:1XIW)作为模板，使用市售的蛋白质立体结构分析程序BioLuminate(Schrodinger社制)进行。

[3279] 136－1－2:人源化氨基酸序列的设计

[3280] chB1通过CDR移植(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86,10029-10033(1989))而人源化。Kabat et al.(Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th Ed.Public Health Service National Institutes of Health,Bethesda,MD.(1991))中既定的人的γ链亚组1以及κ链亚组1的共有序列与chB1的骨架区具有高的同一性，因此，分别被选作重链和轻链的受体。参考Queen et al.(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86,10029-10033(1989))给出的标准等对三维模型进行分析，来选择应当在受体上转移的供体残基。予以说明，由于CDRL3富含疏水性氨基酸，因此还设计了在CDRL3中导入变异的人源化轻链。

[3281] 136－2:chB1重链的人源化

[3282] 将设计的3种重链命名为hH1、hH2以及hH3。将hH1的重链全长氨基酸序列记载于序列号52(图34)。将编码序列号52的氨基酸序列的核苷酸序列记载于序列号53(图34)。将hH2的重链全长氨基酸序列记载于序列号56(图36)。将编码序列号56的氨基酸序列的核苷酸序列记载于序列号57(图36)。将hH3的重链全长氨基酸序列记载于序列号60(图38)。将编码序列号60的氨基酸序列的核苷酸序列记载于序列号61(图38)。

[3283] 将实施例135所示的作为人嵌合化抗CLDN6抗体chB1的重链的chB1__H、人源化抗体重链hH1、hH2以及hH3的氨基酸序列的比较示于图45。hH1、hH2以及hH3的序列中，“•”表示与chB1__H相同的氨基酸残基，记载了氨基酸残基的部位表示被取代的氨基酸残基。

[3284] 136－3:chB1轻链的人源化

[3285] 将设计的4种轻链命名为hL1、hL2、hL3以及hL4。将hL1的轻链全长氨基酸序列记载于序列号36(图26)。将编码序列号36的氨基酸序列的核苷酸序列记载于序列号37(图26)。

将hL2的轻链全长氨基酸序列记载于序列号40(图28)。将编码序列号40的氨基酸序列的核苷酸序列记载于序列号41(图28)。将hL3的轻链全长氨基酸序列记载于序列号44(图30)。将编码序列号44的氨基酸序列的核苷酸序列记载于序列号45(图30)。将hL4的轻链全长氨基酸序列记载于序列号48(图32)。将编码序列号48的氨基酸序列的核苷酸序列记载于序列号49(图32)。

[3286] 将实施例135所示的作为人嵌合化抗CLDN6抗体chB1的轻链的chB1__L、人源化抗体轻链hL1、hL2、hL3以及hL4的氨基酸序列的比较示于图46。hL1、hL2、hL3以及hL4的序列中,“•”表示与chB1__L相同的氨基酸残基,记载了氨基酸残基的部位表示被取代的氨基酸残基。

[3287] 136－4:利用重链以及轻链的组合的人源化抗体的设计

[3288] 将包含hH1以及hL1的抗体称为“H1L1抗体”或“H1L1”。将包含hH2以及hL2的抗体称为“H2L2抗体”或“H2L2”。将包含hH1以及hL3的抗体称为“H1L3抗体”或“H1L3”。将包含hH2以及hL4的抗体称为“H2L4抗体”或“H2L4”。将包含hH3以及hL3的抗体称为“H3L3抗体”或“H3L3”。

[3289] 136－5:人源化抗CLDN6抗体的制作

[3290] 136－5－1:人源化重链表达载体的构建

[3291] 136－5－1－1:hH1表达载体的构建

[3292] 合成序列号53所示的hH1的核苷酸序列的核苷酸编号36～440所示的DNA片段(GENEART社),以与实施例135－1－3同样的方法构建hH1表达载体。

[3293] 136－5－1－2:hH2表达载体的构建

[3294] 合成序列号57所示的hH2的核苷酸序列的核苷酸编号36～440所示的DNA片段(GENEART社),以与实施例135－1－3同样的方法构建hH2表达载体。

[3295] 136－5－1－3:hH3表达载体的构建

[3296] 合成序列号61所示的hH2的核苷酸序列的核苷酸编号36～440所示的DNA片段(GENEART社),以与实施例135－1－3同样的方法构建hH3表达载体。

[3297] 136－5－2:人源化轻链表达载体的构建

[3298] 136－5－2－1:hL1表达载体的构建

[3299] 合成序列号37所示的hL1的核苷酸序列的核苷酸编号37～402所示的DNA片段(GENEART社)。使用In－Fusion HD PCR克隆试剂盒(Clontech社),通过在用限制酶BsiWI切断pCMA－LK的部位插入合成的DNA片段来构建hL1表达载体。

[3300] 136－5－2－2:hL2表达载体的构建

[3301] 合成序列号41所示的hL2的核苷酸序列的核苷酸编号37～402所示的DNA片段(GENEART社),以与实施例136－5－2－1同样的方法构建hL2表达载体。

[3302] 136－5－2－3:hL3表达载体的构建

[3303] 合成序列号45所示的hL3的核苷酸序列的核苷酸编号37～402所示的DNA片段(GENEART社),以与实施例136－5－2－1同样的方法构建hL3表达载体。

[3304] 136－5－2－4:hL4表达载体的构建

[3305] 合成序列号49所示的hL4的核苷酸序列的核苷酸编号37～402所示的DNA片段(GENEART社),以与实施例136－5－2－1同样的方法构建hL4表达载体。

[3306] 136－5－3:人源化抗体的制备

[3307] 136－5－3－1:人源化抗体H1L1、H2L2、H1L3、H2L4、以及H3L3的生产

[3308] 以与实施例135－2－1同样的方法生产。通过与实施例136－4所示的重链和轻链的组合相对应的重链表达载体和轻链表达载体的组合,生产H1L1、H2L2、H1L3、H2L4、以及H3L3。

[3309] 136－5－3－2:人源化抗体H1L1、H2L2、H1L3、H2L4、以及H3L3的2步骤精制

[3310] 将实施例136－5－3－1所得到的培养上清液通过rProtein A亲和色谱法和陶瓷羟基磷灰石的两步工序进行精制。将培养上清液应用到填充有用PBS平衡化的MabSelectSuRe的柱(GE Healthcare Bioscience社制)后,用柱容量的2倍以上的PBS清洗柱。接着,用2M精氨酸盐酸盐溶液(pH4.0)洗脱抗体。将含有抗体的组分通过透析(Thermo Scientific社,Slide－A－Lyzer Dialysis Cassette)进行与PBS的缓冲液置换,用5mM磷酸钠/50mM MES/pH7.0的缓冲液稀释5倍后,应用于用5mM NaPi/50mM MES/30mM NaCl/pH7.0的缓冲液平衡化的陶瓷羟基磷灰石柱(日本Bio－Rad,Bio－Scale CHT Type－1Hydroxyapatite Column)中。利用氯化钠进行线性浓度梯度洗脱,并收集含有抗体的组分。将该组分通过透析(Thermo Scientific社,Slide－A－Lyzer Dialysis Cassette)进行与HBSor(25mM组氨酸/5％山梨醇,pH6.0)的缓冲液置换。再用Centrifugal UF Filter Device VIVASPIN20(组分分子量UF10K,Sartorius社)浓缩抗体,将IgG浓度调制为50mg/mL。最后用Minisart－Plus filter(Sartorius社)进行过滤,制成精制样品。

[3311] 实施例137:利用流式细胞仪的人源化抗CLDN6抗体的结合能力评价

[3312] 将实施例136中制作的人源化抗CLDN6抗体的人CLDN6以及家族分子CLDN3、CLDN4、CLDN9结合性用流式细胞仪法进行评价。使用以与实施例133－1同样的方法一时性基因导入的293T细胞。导入了人CLDN6或人CLDN9基因的细胞中以最终浓度为100nM、20nM、4nM、0.8nM的方式加入人源化抗CLDN6抗体H1L1、H2L2、H1L3、H2L4、以及H3L3,或人IgG1对照抗体(CALBIOCHEM)并进行悬浮,在4℃静置30分钟。导入了人CLDN3、人CLDN4基因、或空载体的细胞中以最终浓度100nM的方式加入人源化抗CLDN6抗体H1L1、H2L2、H1L3、H2L4以及H3L3并进行悬浮,在4℃下静置30分钟。用包含5％胎牛血清(Hyclone)的Dulbecco's phosphate buffered saline(Sigma－Aldrich)(以下,称为含有5％FBS的PBS)清洗后,加入用含有5％FBS的PBS稀释150倍后的FITC AffiniPureF(ab')2Fragment Goat Anti－Human IgG(H+L)(Jackson Immuno Research)并进行悬浮,在4℃下静置30分钟。用含有5％FBS的PBS清洗后,用流式细胞仪(FC500;Beckman Coulter)进行检测。数据分析使用FlowJo(TreeStar)进行,计算表示抗体的结合量的FITC的平均荧光强度(MFI)。结果如图42所示。图42的曲线图中,横轴表示抗体浓度,纵轴表示MFI。制作的人源化抗CLDN6抗体以同等程度与人CLDN6和人CLDN9结合,与人CLDN3、人CLDN4未结合。人对照IgG1未与任一细胞结合。

[3313] 实施例138:曲妥珠单抗突变体的制作

[3314] 138－1:曲妥珠单抗－LALA的重链表达载体的构建

[3315] 合成序列号74所示的曲妥珠单抗－LALA的重链的核苷酸序列的核苷酸编号36～434所示的DNA片段(GENEART社)。以与实施例135－1－3同样的方法构建表达载体。将曲妥珠单抗－LALA的重链的氨基酸序列示于序列号75。

[3316] 138－2:曲妥珠单抗－LALA的轻链表达载体的构建

[3317] 合成序列号72所示的曲妥珠单抗－LALA的轻链的核苷酸序列的核苷酸编号37～402所示的DNA片段(GENEART社)。以与实施例136－5－2－1同样的方法构建表达载体。曲妥珠单抗－LALA的轻链的氨基酸序列示于序列号73。

[3318] 138－3:曲妥珠单抗突变体的生产

[3319] 以与实施例135－2－1同样的方法生产。

[3320] 138－4:曲妥珠单抗突变体的精制

[3321] 由实施例138－3所得到的培养上清液以与实施例135－2－2同样的方法对曲妥珠单抗－LALA进行精制。其中,进行与50mM磷酸缓冲溶液(pH6.0)而不是PBS(－)的缓冲液置换。

[3322] 实施例139:糖链转换(曲妥珠单抗突变体－MSG1)

[3323] 工序1:(Fucα1,6)GlcNAc－曲妥珠单抗突变体

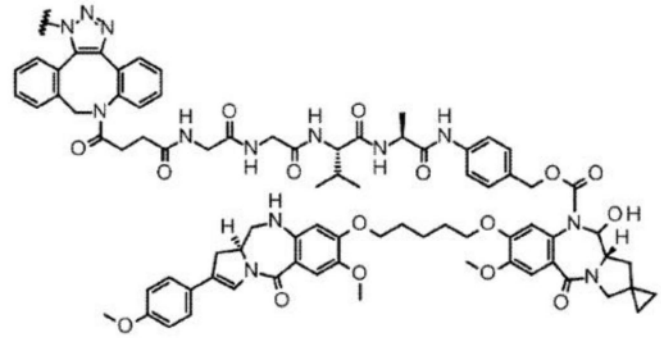
[3324] 使用实施例138调整的曲妥珠单抗突变体溶液ca.22.3mg/ml(50mM磷酸缓冲液(pH6.0))(2.7ml),以与实施例58工序1同样的操作,得到6.1mg/ml的(Fucα1,6)GlcNAc－曲妥珠单抗突变体溶液(50mM磷酸缓冲液(pH6.0))(6.1mL)。

[3325] 工序2:曲妥珠单抗突变体－$[MSG1－N_3]_2$

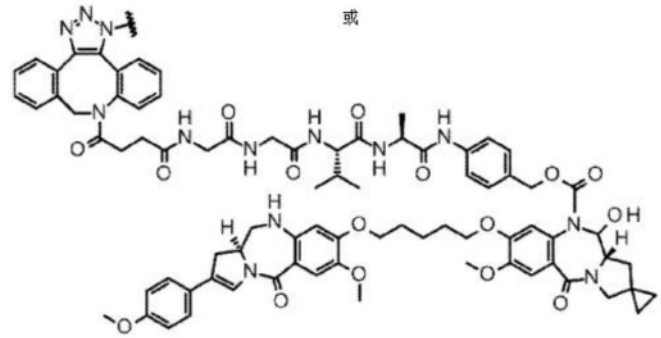
[3326] 使用上述工序1所得到的6.1mg/ml(Fucα1,6)GlcNAc－曲妥珠单抗突变体溶液(50mM磷酸缓冲液(pH6.0))(6.1ml),进行与实施例60工序1同样的操作,由此得到10.2mg/ml曲妥珠单抗突变体－$[MSG1－N_3]_2$溶液(磷酸缓冲生理盐水(pH6.0))(3.7ml)。

[3327] 实施例140:ADC55

[3328] R =



或



[3329] (工序1中所得到的化合物如上式所示具有三唑环几何异构体,实施例140工序1所得到的化合物混合包含上述作为R所示的2种结构的连接子而保持。)

[3330] 工序1:抗体与药物连接子的偶联

[3331] 在实施例139工序2所得到的抗体的磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(10.2mg/mL,0.40mL)中,在室温下加入磷酸缓冲生理盐水(pH6.0)溶液(0.40mL)1,2－丙二醇

(0.767mL)、二甲基甲酰胺(0.20mL),包含实施例3工序13所得到的化合物10mM的二甲基甲酰胺溶液(0.033mL;相对于1分子抗体为12当量),使用管旋转器(MTR－103、AS ONE株式会社)在室温下反应48小时。

[3332] 精制操作:对上述溶液利用共通操作D进行精制,得到具有目标化合物的溶液7.00mL。

[3333] 特性评价:利用共通操作E、F得到下述的特性值。

[3334] 抗体浓度:0.39mg/mL,抗体产量:1.38mg(35%),每一分子抗体的药物平均结合数(n):1.8

[3335] 实施例141:抗HER2抗体－药物偶联物的抗细胞效果

[3336] 利用含有10%胎牛血清(Hyclone)的RPMI1640培养基(Thermo Fisher Scientific;以下称为RPMI培养基),将作为HER2抗原阳性细胞的人乳癌株的KPL－4细胞(川崎医科大学・红林淳一先生)调制为6.25×10^3Cells/mL,以每孔80μL的量加入96孔细胞培养用微孔板中。加入细胞后,在37℃、5%CO_2下培养一晚。

[3337] 第二天,将利用RPMI培养基稀释成100nM、20nM、4nM、0.8nM、0.16nM、0.032nM、6.4pM、1.3pM、0.26pM的抗HER2抗体－药物偶联物以每孔20μL添加到微孔板中。在没有添加抗体－药物偶联物的孔中以每孔20μL的量加入RPMI培养基。KPL－4在37℃、5%CO_2下培养6天。培养后,将微孔板从培养箱中取出,在室温下静置30分钟。添加与培养液等量的CellTiter－Glo Luminescent Cell Viability Assay(Promega),用平板混合器进行搅拌。在室温下静置10分钟后,用酶标仪(PerkinElmer)测量发光量。

[3338] 活细胞率使用与实施例123同样的方法进行计算。

[3339] 抗HER2抗体－药物偶联物ADC49以及ADC55均显示对KPL－4细胞的$0.001<IC_{50}<0.01$(nM)的抗细胞效果。

[3340] 实施例142:抗HER2抗体－药物偶联物的抗肿瘤试验(1)

[3341] 使用与实施例124同样的实验动物以及方法,测定抗HER2抗体－药物偶联物的抗肿瘤的抗肿瘤效果。

[3342] 将KPL－4细胞(川崎医科大学・红林淳一先生)悬浮于Dulbecco's phosphate buffered saline(Sigma－Aldrich)中,将1.5×10^7细胞皮下植入雌裸鼠的右体侧部(Day0),在Day14进行随机分组。将抗HER2抗体－药物偶联物ADC49、或抗HER2抗体－药物偶联物ADC55在Day14以0.33mg/kg的用量进行尾静脉内给药。另外,作为对照组(Vehicle组)以同样的方式给药ABS缓冲液。

[3343] 结果如图47所示。ADC49与ADC55均在0.33mg/kg的给药方式下显示了同等的抗肿瘤活性。另外,并未观察到给药ADC49,ADC55而引起小鼠的体重减轻。

[3344] 实施例143:抗HER2抗体－药物偶联物的抗肿瘤试验(2)

[3345] 将JIMT－1细胞(DSMZ ACC 589)悬浮于生理盐水(株式会社大冢制药工场)中,将5×10^6细胞皮下植入雌裸鼠的右体侧部(Day0),在Day11进行随机分组。将ADC55在Day11以0.4mg/kg或0.2mg/kg的用量进行尾静脉内给药。另外,作为对照组(Vehicle组)以同样的方式给药ABS缓冲液。

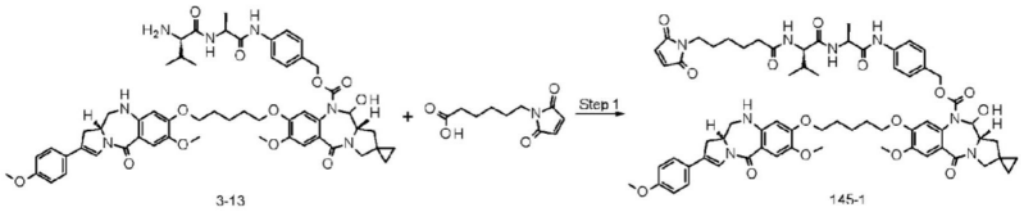
[3346] 结果如图48所示。ADC55以0.4mg/kg给药时观察到伴随肿瘤消退的抗肿瘤效果。另外,在任意一个给药剂量下均未观察到由于给药ADC55而引起小鼠的体重减轻。

[3347] 实施例144:抗HER2抗体－药物偶联物的抗肿瘤试验(3)

[3348] 将CFPAC－1细胞(ATCC CRL－1918)悬浮于生理盐水(株式会社大冢制药工场)中，并将5×10^6细胞皮下植入雌裸鼠的右体侧部(Day0)，在Day10进行随机分组。将抗HER2抗体－药物偶联物ADC49、ADC55或抗LPS抗体－药物偶联物ADC53在Day10以0.4mg/kg的用量尾静脉内给药。另外，作为对照组(Vehicle组)同样使用ABS缓冲液以同样的方式给药。

[3349] 结果如图49所示。在给药了ADC49和ADC55中任意一种的小鼠中均观察到伴随肿瘤消退的抗肿瘤效果。另外，未观察到给药ADC49、ADC55、或ADC53而引起小鼠的体重减轻。

[3350] 实施例145:药物连接子43

[3351] 

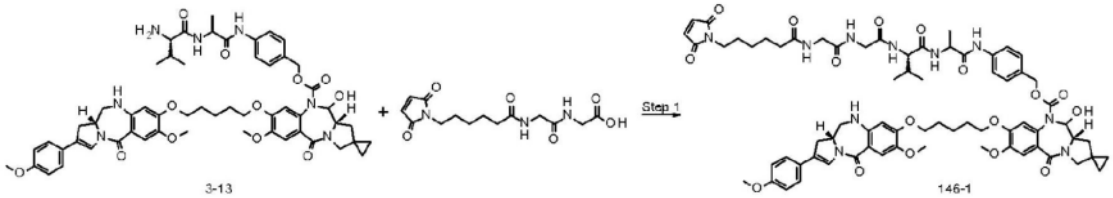
[3352] 在实施例3工序12得到的化合物(0.051g，0.049mmol)和市售的马来酰亚胺己酸(0.011g，0.054mmol)的二氯甲烷(5mL)溶液中，在室温下加入1－(3－二甲基氨基丙基)－3－乙基碳二亚胺盐酸盐(0.010g，0.054mmol)，在室温下搅拌2小时。用氯仿稀释反应溶液后，用水清洗有机层，用硫酸钠进行干燥。将有机溶剂浓缩后，将得到的残渣用硅胶色谱法(氯仿:甲醇＝97.5:2.5(v/v)～90:10(v/v))进行精制，得到目标化合物(41mg，69％)。

[3353] ^{1}H-NMR(DMSO-D_6)δ:9.94(1H,s)，8.20-8.12(1H,m)，7.86-7.77(1H,m)，7.65-7.52(2H,m)，7.45(1H,s)，7.38(2H,d,J＝7.9Hz)，7.30(1H,s)，7.24-7.16(2H,m)，7.11-7.01(1H,m)，7.00(2H,s)，6.91(2H,d,J＝8.5Hz)，6.83-6.67(1H,m)，6.63-6.45(2H,m)，6.31(1H,s)，5.81-5.71(1H,m)，5.23-5.14(1H,m)，4.86-4.74(1H,m)，4.43-4.32(1H,m)，4.24-4.11(2H,m)，4.03-3.88(3H,m)，3.88-3.69(4H,m)，3.76(3H,s)，3.66(3H,s)，3.60-3.49(2H,m)，3.47-3.08(5H,m)，2.82-2.64(1H,m)，2.40-2.29(1H,m)，2.25-2.04(2H,m)，2.04-1.89(1H,m)，1.88-1.67(4H,m)，1.63-1.38(7H,m)，1.35-1.09(6H,m)，0.90-0.76(6H,m)，0.76-0.50(4H,m)．

[3354] MS(APCI,ESI)m/z:1224$(M+H)^+$

[3355] 使用公知的方法(WO2014/057687)制作药物连接子43以及药物连接子44(实施例146)的抗CLDN6抗体(实施例136(H1L1))－PBD ADC(半胱氨酸偶联，m^1＝2)。该ADC显示了强的抗肿瘤效果。

[3356] 实施例146:药物连接子44

[3357] 

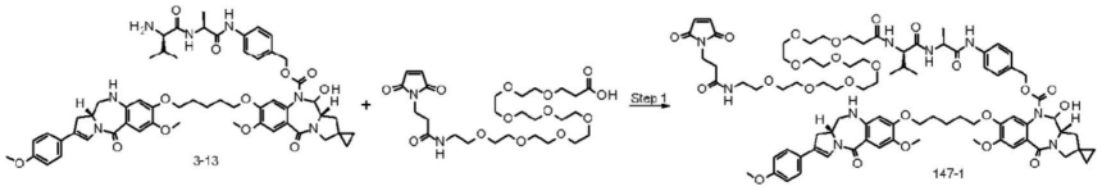
[3358] 使实施例3工序12得到的化合物(0.047g，0.046mmol)与市售的N－[6－(2,5－二氧代－2,5－二氢－1H－吡咯1－基)己酰基]甘氨酰甘氨酸(0.016g，0.050mmol)与实施例145同样地反应，得到目标化合物(30mg，50％)。

[3359] ^{1}H-NMR(DMSO-D_6)δ:9.92(1H,s)，8.23(1H,d,J＝6.7Hz)，8.12-8.02(2H,m)，7.84

(1H,d,J＝9.1Hz),7.65-7.50(2H,m),7.45(1H,s),7.38(2H,d,J＝9.1Hz),7.30(1H,s),7.26-7.16(2H,m),7.10-7.02(1H,m),7.00(2H,s),6.91(2H,d,J＝9.1Hz),6.82-6.67(1H,m),6.62-6.48(2H,m),6.31(1H,s),5.80-5.72(1H,m),5.25-5.15(1H,m),4.85-4.77(1H,m),4.43-4.30(1H,m),4.25-4.14(2H,m),4.06-3.87(3H,m),3.86-3.71(6H,m),3.76(3H,s),3.71-3.62(2H,m),3.66(3H,s),3.61-3.45(2H,m),3.45-3.08(1H,m),2.81-2.64(2H,m),2.39-2.29(1H,m),2.14-2.04(2H,m),2.05-1.90(1H,m),1.90-1.68(1H,m),1.62-1.39(7H,m),1.35-1.26(6H,m),1.26-1.13(6H,m),0.91-0.77(6H,m),0.75-0.52(4H,m).

[3360] MS(APCI,ESI)m/z:1338(M+H)$^+$

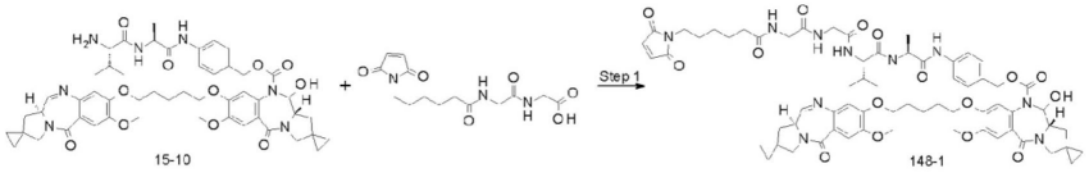
[3361] 实施例147:药物连接子45

[3362] 

[3363] 使实施例3工序12得到的化合物(0.050g,0.049mmol)与市售的31－(2,5－二氧代－2,5－二氢－1H－吡咯－1－基)－29－氧代－4,7,10,13,16,19,22,25－八杂氧－28－氮杂三十一烷－1－酸(0.029g,0.049mmol)与实施例145同样地反应,得到目标化合物(45mg,57％)。

[3364] MS(APCI,ESI)m/z:1604(M+H)$^+$

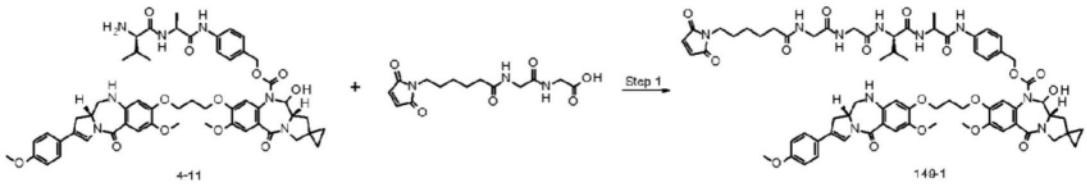
[3365] 实施例148:药物连接子46

[3366] 

[3367] 使实施例15工序9所得到的化合物(0.081g,0.085mmol)与市售的N－[6－(2,5－二氧代－2,5－二氢－1H－吡咯－1－基)己酰基]甘氨酰甘氨酸(0.042g,0.13mmol)以与实施例16工序1同样地反应,得到目标化合物(0.089g,82％)。

[3368] MS(APCI,ESI)m/z:1257(M+H)$^+$

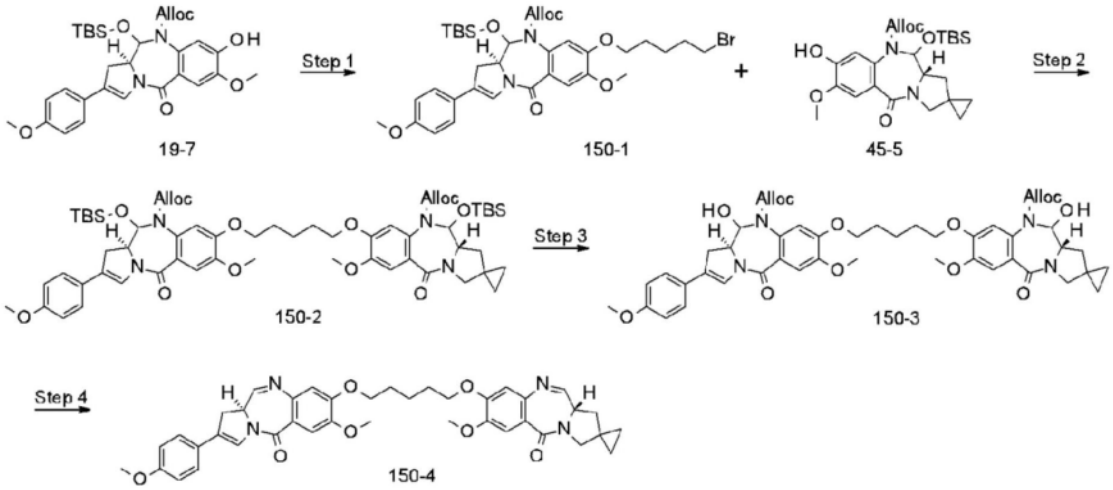
[3369] 实施例149:药物连接子47

[3370] 

[3371] 在市售的N－[6－(2,5－二氧代－2,5－二氢－1H－吡咯－1－基)己酰基]甘氨酰甘氨酸(0.036g,0.11mmol)的二氯甲烷(10mL)溶液中,在室温下加入N－乙氧基羰基－2－乙氧基－1,2－二氢喹啉(0.035g,0.14mmol),在室温下搅拌1小时。在反应溶液中加入实施例4工序11所得到的化合物(0.10g,0.10mmol)和甲醇(1mL),在室温下搅拌18小时。将反应溶液浓缩后,将得到的残渣用硅胶色谱法(氯仿～氯仿:甲醇＝80:20(v/v))进行精制,得到目标化合物(0.078g,60％)。

[3372] MS(APCI,ESI)m/Z:1309(M+H)$^+$

[3373] 实施例150:药物11

[3374] 

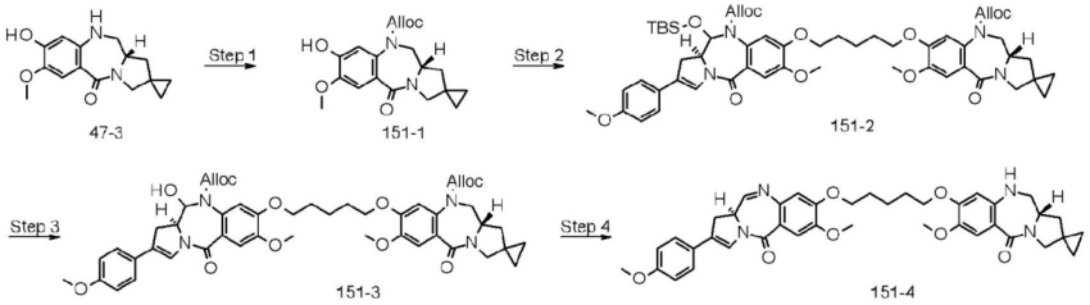
[3375] [工序1～4]

[3376] 实施例19工序7所得到的化合物与实施例3工序2、实施例3工序10、实施例3工序11、实施例3工序12同样地反应,得到药物11。

[3377] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.89-7.80(1H,m),7.60-7.51(2H,m),7.43-7.40(1H,m),7.34-7.30(2H,m),6.91-6.88(2H,m),6.81(1H,d,J=3.0Hz),4.39-4.32(1H,m),4.11-4.06(4H,m),3.95(4H,d,J=3.0Hz),3.87-3.84(5H,m),3.68-3.61(2H,m),3.51-3.49(3H,m),3.44-3.34(2H,m),2.53(1H,dd,J=13.0,8.2Hz),2.01-1.96(4H,m),1.69-1.68(2H,m),1.30-1.25(1H,m),0.93-0.77(4H,m).

[3378] MS(APCI,ESI)m/z:691(M+H)$^+$.

[3379] 实施例151:药物12

[3380] 

[3381] [工序1]

[3382] 将实施例47工序3得到的化合物(0.77g,2.8mmol)溶解于二氯甲烷(20mL)中,在0℃下加入吡啶(0.338mL,4.20mmol)、氯甲酸烯丙酯(0.355mL,3.36mmol),在室温下搅拌2小时。将反应溶液浓缩后,将得到的残渣溶解于甲醇(20mL)中,在室温下加入碳酸钾(1.93g,14.0mmol),在该状态下搅拌3小时。在反应溶液中加入水,减压蒸馏除去甲醇,在得到的残渣中加入1当量浓度盐酸,用氯仿进行提取。将有机层用硫酸钠进行干燥,过滤后,减压蒸馏除去溶剂。将得到的残渣用硅胶柱色谱法[己烷:乙酸乙酯=100:0(v/v)～0:100(v/v)]进行精制,得到淡黄色固体的目标化合物(0.921g,92%)。

[3383] MS(APCI,ESI)m/z:359(M+H)$^+$.

[3384] [工序2～4]

[3385] 使上述工序1所得到的化合物与实施例3工序10－12同样地反应，得到药物12。

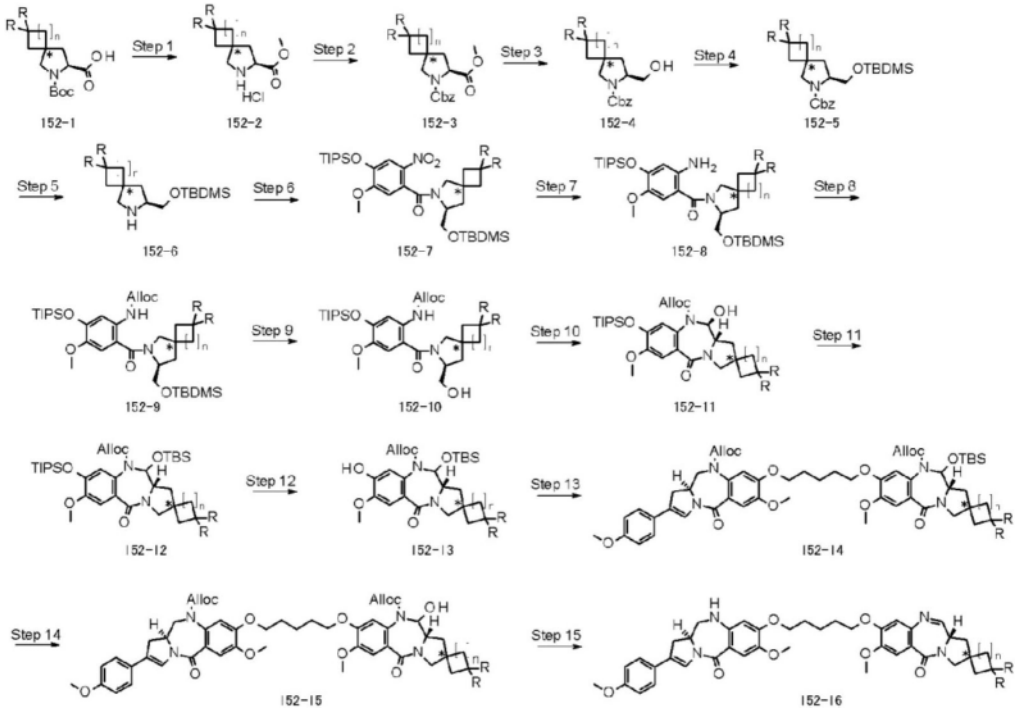
[3386] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.89(1H,d,J＝4.2Hz),7.59(1H,s),7.53(1H,s),7.40(1H,s),7.34(2H,d,J＝8.5Hz),6.91(2H,d,J＝8.5Hz),6.82(1H,s),6.05(1H,s),4.44-4.39(1H,m),4.16-4.11(2H,m),4.09-4.04(2H,m),3.99(2H,t,J＝6.7Hz),3.95(3H,s),3.84(6H,s),3.72(1H,d,J＝12.1Hz),3.59-3.49(3H,m),3.45-3.34(2H,m),2.00-1.92(4H,m),1.79(1H,dd,J＝12.4,7.0Hz),1.70-1.64(2H,m),1.25(1H,t,J＝7.0Hz),0.73-0.55(4H,m).

[3387] MS(APCI,ESI)m/z:693$(M+H)^+$.

[3388] 实施例152:药物13～16

[3389] n＝0 R＝F,*:(R)or(s)

[3390] n＝1 R＝F or H

[3391] 

[3392] [环丁基衍生物:药物13]n＝1,R＝F

[3393] [工序1]

[3394] 在市售的N-T-BOC-4-(3,3-二氟环丁基)-L-脯氨酸(Omega Chem Co.社OC-0707)(12g,41mmol)的甲醇(200mL)溶液中，在-78℃(干冰-丙酮浴)缓慢滴入亚硫酰氯(10mL,138mmol)。滴加后，撤去制冷剂浴，在室温下将反应混合物搅拌一晚，将反应混合物在减压下进行浓缩，用二乙醚清洗残渣，得到目标化合物(10g,quant.)。

[3395] [工序2]

[3396] 在上述工序1所得到的化合物(10g,41.4mmol)与碳酸钠(8.77g,82.7mmol)的1,4－二噁烷(200mL)、水(50mL)悬浮溶液中，冰冷却下缓慢加入氯甲酸苄酯(8.82mL,62.0mmol)。反应结束后加入水，用乙酸乙酯提取反应混合物。将有机层用水以及饱和盐水清洗，用无水硫酸钠进行干燥。过滤后，在减压下蒸馏除去溶剂而得到目标化合物。

[3397] [工序3～15]

[3398] 使上述工序所得到的化合物与实施例1工序1～5，实施例45工序1～8同样地反应，得到药物13。

[3399] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.72-7.71(1H,m),7.53-7.49(3H,m),7.34-7.28(2H,m),6.91-6.78(3H,m),6.06-6.03(1H,m),4.35-4.28(1H,m),4.16-4.04(2H,m),4.02-3.96(1H,m),3.94(3H,s),3.90-3.76(2H,m),3.84(2H,s),3.82(3H,s),3.59-3.31(2H,m),2.76-2.44(8H,m),1.99-1.88(4H,m),1.71-1.59(4H,m).

[3400] MS(APCI,ESI)m/z:743$(M+H)^+$.

[3401] [环丁基衍生物:药物14]n=1,R=H

[3402] [工序2～15]

[3403] 使市售的4－环丁基－L－脯氨酸甲基酯盐酸盐(Omega Chem Co.公司OC－0728)与上述工序2、实施例1工序1～5、实施例45工序1～8同样地反应,得到药物连接子14。

[3404] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.73-7.45(3H,m),7.34-7.14(2H,m),6.94-6.42(3H,m),6.05-5.99(1H,m),5.30-5.06(2H,m),4.49-4.28(2H,m),4.17-3.96(2H,m),3.95-3.79(9H,m),3.77-3.30(6H,m),2.77-2.70(1H,m),2.37-2.30(1H,m),2.19-1.85(8H,m),1.73-1.55(4H,m),1.30-1.16(2H,m).

[3405] MS(APCI,ESI)m/z:707$(M+H)^+$.

[3406] [环丙基衍生物:药物15]n=0,R=F,*:(S)

[3407] 使市售的N－t－BOC－4S－(2,2－二氟环丙基)－L－脯氨酸(Omega Chem Co.公司OC－0732)与上述工序1～15同样地反应,得到药物连接子15。

[3408] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.76-7.75(1H,m),7.54-7.47(3H,m),7.33-7.27(2H,m),6.93-6.85(2H,m),6.83-6.79(1H,m),6.08-5.96(1H,m),4.32-4.30(1H,m),4.16-3.96(3H,m),3.94(3H,s),3.84(3H,s),3.82(3H,s),3.74-3.67(3H,m),3.59-3.51(2H,m),3.39-3.34(1H,m),2.76-2.69(2H,m),2.38-2.33(1H,m),1.98-1.89(4H,m),1.69-1.54(4H,m),1.30-1.22(2H,m).

[3409] MS(APCI,ESI)m/z:729$(M+H)^+$.

[3410] [环丙基衍生物:药物16]n=0,R=F,*:(R)

[3411] 使市售的N－t－BOC－4R－(2,2－二氟环丙基)－L－脯氨酸(Omega Chem Co.公司OC－0722)与上述工序1～15同样地反应,得到药物连接子16。

[3412] ^{1}H-NMR($CDCl_3$)δ:7.76-7.69(1H,m),7.55-7.44(3H,m),7.33-7.28(2H,m),6.94-6.80(2H,m),6.59-6.42(1H,m),6.08-5.97(1H,m),4.36-4.24(1H,m),4.20-3.95(3H,m),3.95-3.76(12H,m),3.75-3.50(2H,m),3.42-3.31(1H,m),2.79-2.52(2H,m),2.48-2.32(1H,m),2.06-1.83(4H,m),1.72-1.41(4H,m),1.28-1.15(2H,m).

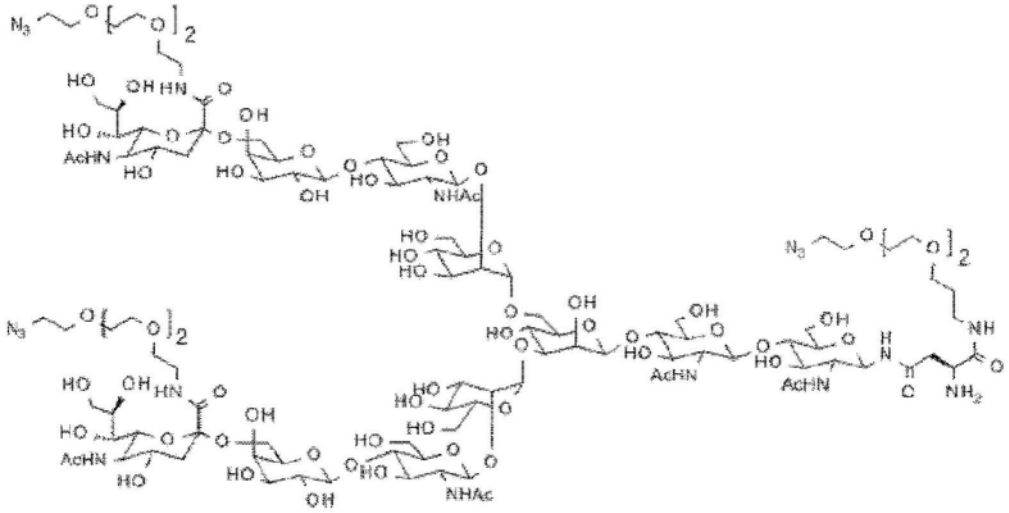
[3413] MS(APCI,ESI)m/z:729$(M+H)^+$.

[3414] 实施例153:$[N_3$－PEG(3)$]_2$－SG(10)

[3415] 工序1:Fmoc－(SG－)Asn游离体

[3416] 将Fmoc－(SG－)Asn(1S2S－11NC－Asn－Fmoc,糖链工程研究所制,2g)溶解于适量的0.1％三氟醋酸水溶液中,分多次使用反相HPLC进行分离精制。使用0.1％三氟醋酸水溶液和0.1％三氟醋酸乙腈溶液作为洗脱液,装置使用Purif－Rp2(昭光Scientific制),柱使用Inertsil ODS－3(GL Sciences制)。收集洗脱中UV检测(220nm)出的包含目标产物的馏分,进行冷冻干燥。得到无色固体(1.8g)。

[3417] 工序2:($[N_3$－PEG(3)$]_2$－SG)－Asn－PEG(3)－N_3的合成

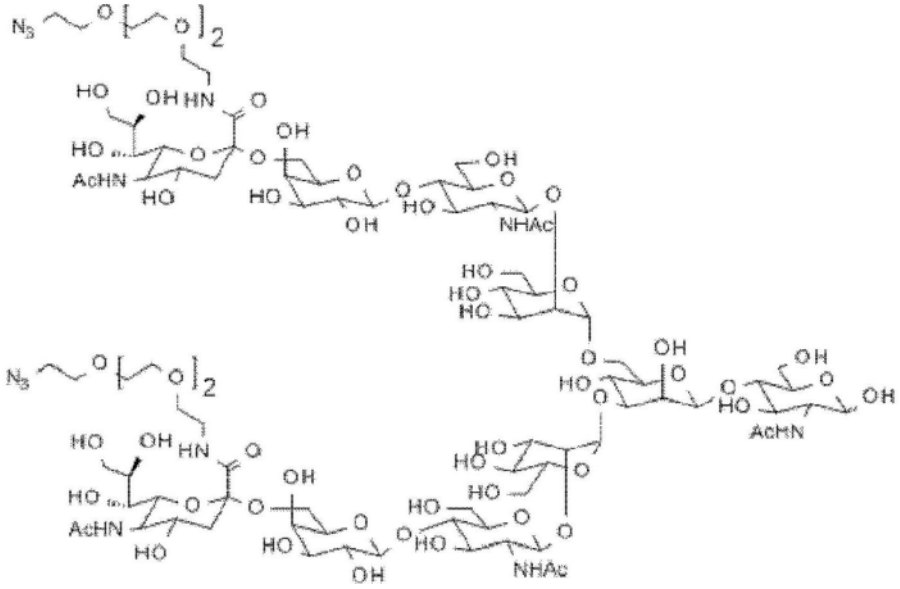
[3418] 

[3419] 在工序1制备的Fmoc－(SG－)Asn游离体(1000mg)的N,N－二甲基甲酰胺溶液(10ml)中加入HATU(891mg,2.34mmol)的N,N－二甲基甲酰胺溶液(3ml)、11－叠氮基－3,6,9－三氧杂十一烷－1－胺(东京化成工业(株)、511mg、2.34mmol)和二异丙基乙胺(816μL,4.69mmol)的N,N－二甲基甲酰胺溶液(3ml),在37℃下搅拌3小时。再加入HATU(148mg,0.39mmol)的N,N－二甲基甲酰胺溶液(500μL),在37℃下搅拌1小时。然后加入哌啶(386μL,3.91mmol),在37℃下搅拌1小时。反应结束后加入醋酸(469μL)。

[3420] 在2个预先加入二乙醚(100ml)的巨型锥形管(175ml)中分别加入一半的反应液。利用小型离心机(日立工机,CF16RX)使固态物沉淀,除去上清液。将胶状的固态物转移至离心管(50ml)中,加入二乙醚(30ml)、乙腈(10ml)进行倾析。重复2次上述操作。同样地加入适量的乙腈或适量的二乙醚进行倾析后,减压下干燥得到粗产物。将得到的固态物溶解于适量的0.2％三氟醋酸水溶液中,利用反相HPLC进行分离精制。使用0.1％三氟醋酸水溶液和0.1％三氟醋酸乙腈溶液作为洗脱液,装置使用Purif－Rp2(昭光Scientific制),柱使用Inertsil ODS－3(GL Sciences制)。收集在洗脱中UV检测(220nm)到的包含目标产物的馏分进行冷冻干燥,得到无色固体的标记目标化合物(637mg)。

[3421] ESI－MS:$C_{112}H_{192}N_{20}O_{70}$:$[M+3H]^{3+}$理论值980.6(ave.),实际值980.4

[3422] 工序3:$[N_3$－PEG(3)$]_2$－SG(10)的合成

[3423] 

[3424] 在2ml的试管中将在工序－2中合成的([N_3－PEG(3)]$_2$－SG)－Asn－PEG(3)－N_3(78.6mg)溶解到pH6.0的100mM磷酸缓冲液(Nacalai Tesque,Inc.,465μL)中。加入1U/mL EndoM(东京化成工业(株),70μL),在28℃振荡5小时后,在室温下静置4天。反应结束后,加入适量的0.2％三氟醋酸水溶液,使用反相HPLC进行分离精制。使用0.1％三氟醋酸水溶液和0.1％三氟醋酸乙腈溶液作为洗脱液,装置使用Purif－Rp2(昭光Scientific制),柱使用Inertsil ODS－3(GL Sciences制)。收集在洗脱中UV检测(220nm)到的包含目标产物的馏分进行冷冻干燥,得到无色固体的标记目标化合物(40mg)。

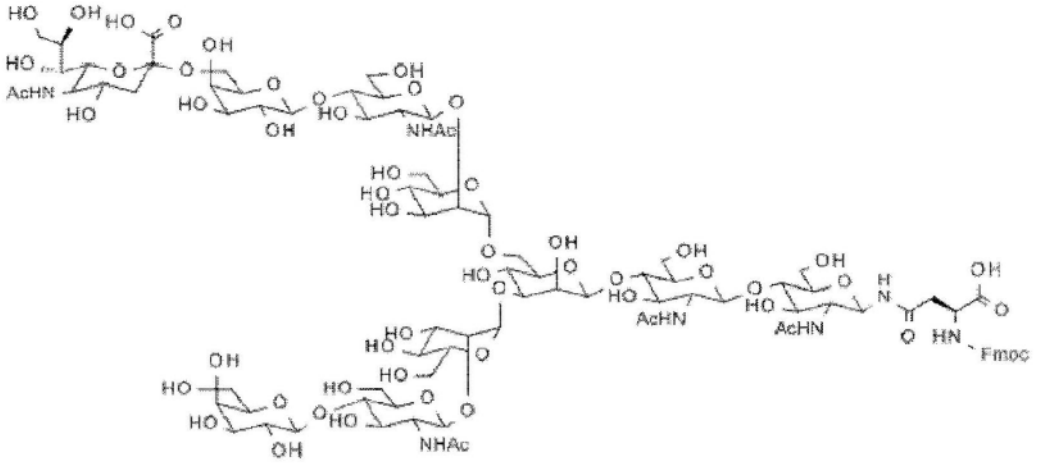
[3425] ESI－MS:$C_{92}H_{157}N_{13}O_{61}$:$[M+2H]^{2+}$理论值1211.7(ave.),实际值1211.5

[3426] 实施例154:[N_3－PEG(3)]－MSG2(9)、[N_3－PEG(3)]－MSG1(9)

[3427] 工序1:(MSG1－)Asn与(MSG2－)Asn

[3428] 将市售品monosialo－Asn free(1S2G/1G2S－10NC－Asn,(株)糖链工程研究所制)(称为“(MSG－)Asn”)(500mg)在以下的条件下进行反相HPLC分离精制,分离为以第一主峰的形式洗脱出的(MSG1－)Asn(保留时间15～19min左右)与以第二主峰的形式洗脱出的(MSG2－)Asn(保留时间21～26min左右)。使用0.1％甲酸水溶液作为洗脱液,装置使用ELS－PDA触发式分取系统(日本分光株式会社制),柱使用Inertsil ODS－3(10um,30Φ×250mm,GL Sciences公司制),流速设定为30ml/min。收集归属于在洗脱中UV检测(210nm)到的第一个峰的馏分,进行冷冻干燥得到无色固体(MSG1－)Asn(238mg)。收集归属于UV检测到的第二个峰的馏分并冷冻干燥,得到无色固体(MSG2－)Asn(193mg)。

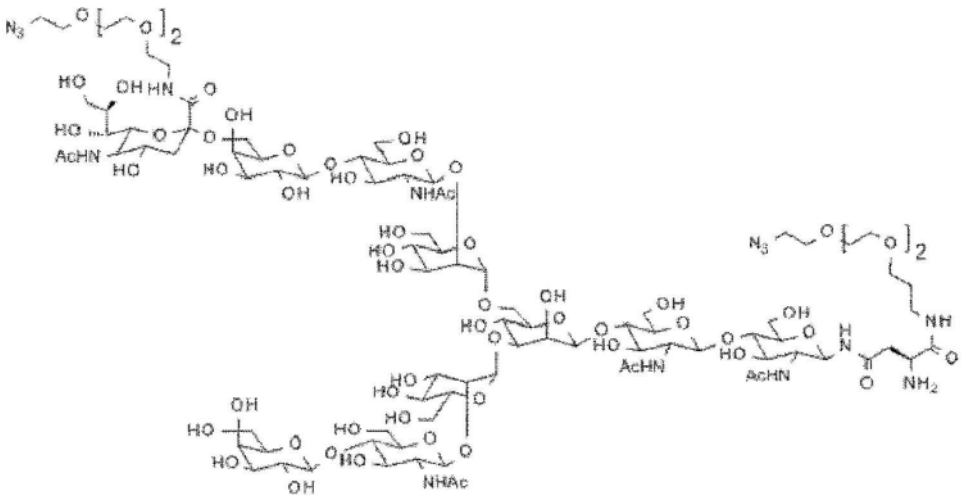
[3429] 工序－2:Fmoc－(MSG2－)Asn游离体

[3430] 

[3431] 将工序1中合成的(MSG2－)Asn(900mg)溶解于N,N－二甲基甲酰胺溶液(6ml)/蒸馏水(2ml)中,加入二异丙基乙胺(0.23ml)和9－芴基甲基N－琥珀酰亚胺基碳酸酯(223mg),在室温下搅拌30分钟。再加入二异丙基乙胺(0.16ml)、9－芴基甲基N－琥珀酰亚胺碳酸酯(74mg)以及N,N－二甲基甲酰胺溶液(1ml),在室温下搅拌30分钟。

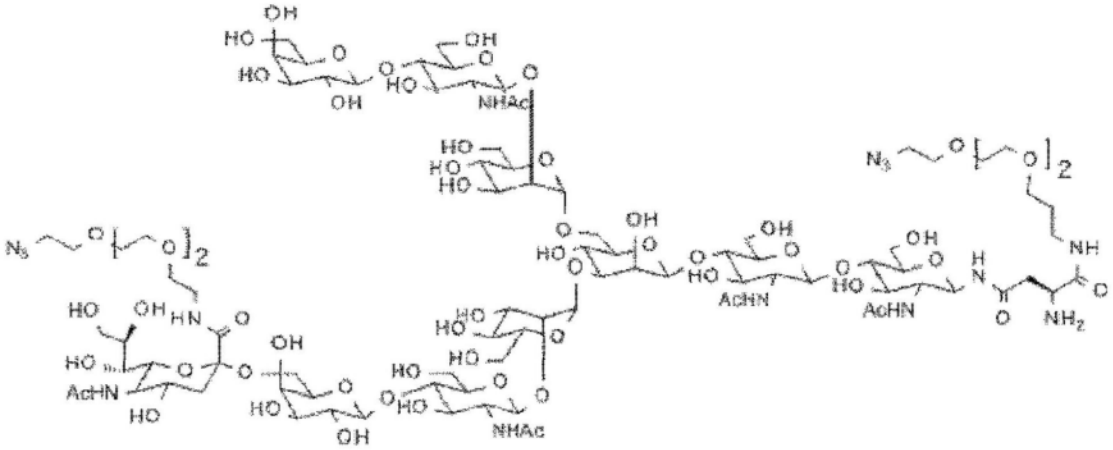
[3432] 在2个预先加入二乙醚(80ml)/乙腈(4ml)的巨型锥形管(175ml)中分别加入反应液的一半。使用小型离心机(日立工机,CF16RX)使固态物沉淀,去除上清液。将胶状的固态物转移至离心管(50ml)中,加入二乙醚(30ml)、乙腈(10ml)进行倾析。重复2次上述操作。同样地加入适量的乙腈或适量的二乙醚,进行倾析后,进行减压下干燥得到粗产物。将得到的固态物在适量的0.2%三氟醋酸水溶液中溶解,用反相HPLC进行分离精制。使用0.1%三氟醋酸水溶液和0.1%三氟醋酸乙腈溶液作为洗脱液,装置使用Purif－Rp2(昭光Scientific制),柱使用Inertsil ODS－3(GL Sciences制)。收集在洗脱中UV检测(220nm)到的包含目标产物的馏分,进行冷冻干燥,得到无色固体的所述目标化合物(830mg)。

[3433] 工序3:([N_3－PEG(3)]－MSG2)－Asn－PEG(3)－N_3

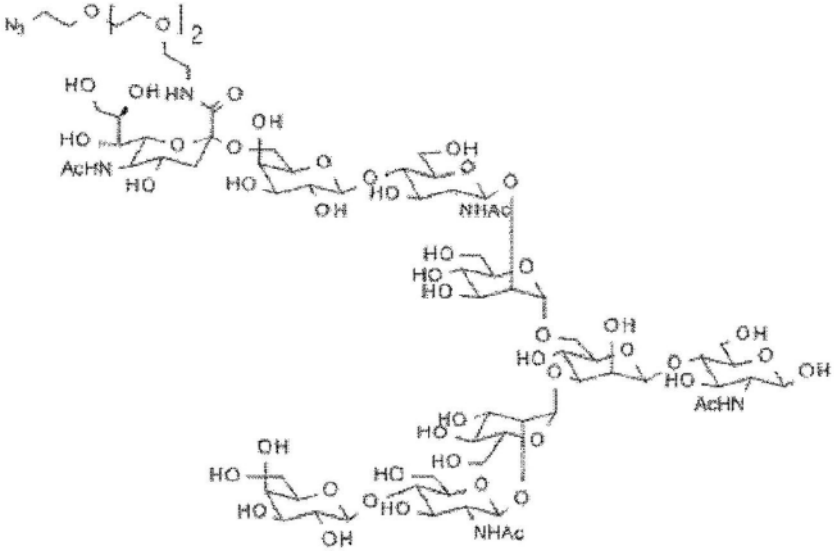
[3434] 

[3435] 使用工序2中合成的Fmoc－(MSG2－)Asn(830mg),利用与实施例153的工序2同样的方法得到固体的所述目标产物的粗产物(1.06g)。不进行进一步的精制地用于下一个反应中。

[3436] 同样地可由Fmoc－(MSG1－)Asn合成下述([N_3－PEG(3)]－MSG1)－Asn－PEG(3)－N_3。

[3437] 

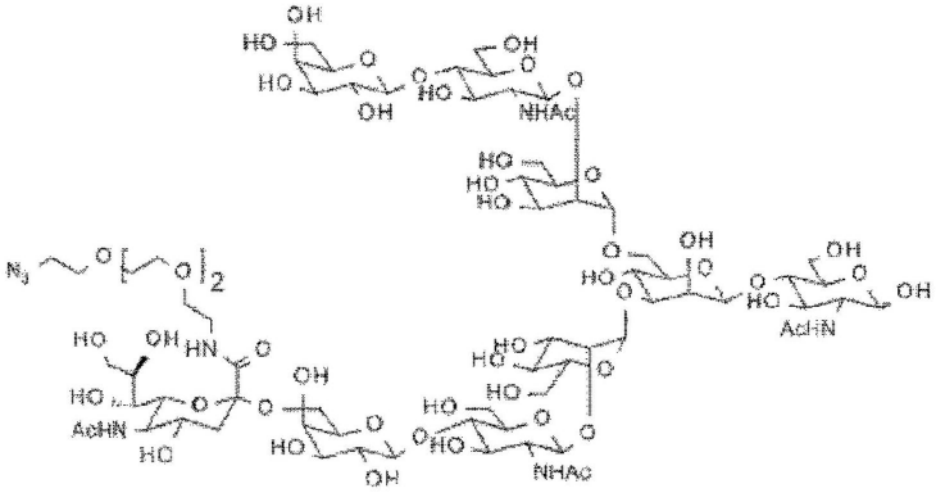
[3438] 工序4:[N_3－PEG(3)]－MSG2(9)

[3439] 

[3440] 在2ml的收集瓶中,将在工序3中合成的([N_3－PEG(3)]－MSG2)－Asn－PEG(3)－N_3粗产物(150mg)溶解于由200mM KH_2PO_4和200mM KH_2PO_4调制的pH6.25的200mM磷酸钾缓冲液(750μL)中。加入Endo－Rp(3ug),在50℃下静置16小时。反应结束后,加入5％三氟醋酸水溶液(150μL),利用反相HPLC进行分离精制。将0.1％三氟醋酸水溶液和0.1％三氟醋酸乙腈溶液作为洗脱液,装置使用ELS－PDA触发分取系统(日本分光株式会社制),柱使用Inertsil ODS－3(GL Sciences制)。收集在洗脱中UV检测(220nm)到的包含目标产物的馏分,进行冷冻干燥得到无色固体的所述目标化合物(62mg)。

[3441] ESI－MS:$C_{73}H_{124}N_8O_{51}$:$[M+2H]^{2+}$理论值965.3(ave.),实际值965.4

[3442] 同样的方式可由([N_3－PEG(3)]－MSG1)－Asn－PEG(3)－N_3合成下述[N_3－PEG(3)]－MSG1(9)。

[3443] 

[3444] 产业上的可利用性

[3445] 通过使用本发明的抗体－药物偶联物、抗体和/或PBD衍生物等可进行各种癌的治疗或预防。

[3446] 序列表自由文本

[3447] 序列号1:人CLDN6的氨基酸序列

[3448] 序列号2:编码人CLDN6的氨基酸序列的cDNA的核苷酸序列

[3449] 序列号3:人CLDN9的氨基酸序列

[3450] 序列号4:编码人CLDN9的氨基酸序列的cDNA的核苷酸序列

[3451] 序列号5:B1抗体轻链的CDRL1的氨基酸序列

[3452] 序列号6:B1抗体轻链的CDRL2的氨基酸序列

[3453] 序列号7:B1抗体轻链的CDRL3的氨基酸序列

[3454] 序列号8:人源化B1抗体轻链L4的CDRL3的氨基酸序列

[3455] 序列号9:B1抗体重链的CDRH1的氨基酸序列

[3456] 序列号10:B1抗体重链的CDRH2的氨基酸序列

[3457] 序列号11:B1抗体重链的CDRH3的氨基酸序列

[3458] 序列号12:C7抗体轻链的CDRL1的氨基酸序列

[3459] 序列号13:C7抗体轻链的CDRL2的氨基酸序列

[3460] 序列号14:C7抗体轻链的CDRL3的氨基酸序列

[3461] 序列号15:C7抗体重链的CDRH1的氨基酸序列

[3462] 序列号16:C7抗体重链的CDRH2的氨基酸序列

[3463] 序列号17:C7抗体重链的CDRH3的氨基酸序列

[3464] 序列号18:编码B1抗体轻链的可变区的cDNA的核苷酸序列

[3465] 序列号19:B1抗体轻链的可变区的氨基酸序列

[3466] 序列号20:编码B1抗体重链的可变区的cDNA的核苷酸序列

[3467] 序列号21:B1抗体重链的可变区的氨基酸序列

[3468] 序列号22:编码C7抗体轻链的可变区的cDNA的核苷酸序列

[3469] 序列号23:C7抗体轻链的可变区的氨基酸序列

[3470] 序列号24:编码C7抗体重链的可变区的cDNA的核苷酸序列

[3471] 序列号25:C7抗体重链的可变区的氨基酸序列

[3472] 序列号26:包含人轻链信号序列以及编码人κ链恒定区的DNA序列的DNA片段

[3473] 序列号27:包含人重链信号序列以及编码人IgG1LALA恒定区的DNA序列的DNA片段

[3474] 序列号28:chB1轻链的氨基酸序列

[3475] 序列号29:包含编码chB1轻链的氨基酸序列的DNA序列的DNA片段

[3476] 序列号30:chB1轻链的可变区的氨基酸序列

[3477] 序列号31:编码chB1轻链可变区的核苷酸序列

[3478] 序列号32:chB1重链的氨基酸序列

[3479] 序列号33:编码chB1重链的核苷酸序列

[3480] 序列号34:chB1重链的可变区的氨基酸序列

[3481] 序列号35:编码chB1重链的可变区的核苷酸序列

[3482] 序列号36:人源化抗体轻链hL1的氨基酸序列

[3483] 序列号37:编码人源化抗体轻链hL1的核苷酸序列

[3484] 序列号38:人源化抗体轻链hL1的可变区的氨基酸序列

[3485] 序列号39:编码人源化抗体轻链hL1的可变区的核苷酸序列

[3486] 序列号40:人源化抗体轻链hL2的氨基酸序列

[3487] 序列号41:编码人源化抗体轻链hL2的核苷酸序列

[3488] 序列号42:人源化抗体轻链hL2的可变区的氨基酸序列

[3489] 序列号43:编码人源化抗体轻链hL2的可变区的核苷酸序列

[3490] 序列号44:人源化抗体轻链hL3的氨基酸序列

[3491] 序列号45:编码人源化抗体轻链hL3的核苷酸序列

[3492] 序列号46:人源化抗体轻链hL3的可变区的氨基酸序列

[3493] 序列号47:编码人源化抗体轻链hL3的可变区的核苷酸序列

[3494] 序列号48:人源化抗体轻链hL4的氨基酸序列

[3495] 序列号49:编码人源化抗体轻链hL4的核苷酸序列

[3496] 序列号50:人源化抗体轻链hL4的可变区的氨基酸序列

[3497] 序列号51:编码人源化抗体轻链hL4的可变区的核苷酸序列

[3498] 序列号52:人源化抗体重链hH1的氨基酸序列

[3499] 序列号53:编码人源化抗体重链hH1的核苷酸序列

[3500] 序列号54:人源化抗体重链hH1的可变区的氨基酸序列

[3501] 序列号55:编码人源化抗体重链hH1的可变区的核苷酸序列

[3502] 序列号56:人源化抗体重链hH2的氨基酸序列

[3503] 序列号57:编码人源化抗体重链hH2的核苷酸序列

[3504] 序列号58:人源化抗体重链hH2的可变区的氨基酸序列

[3505] 序列号59:编码人源化抗体重链hH2的可变区的核苷酸序列

[3506] 序列号60:人源化抗体重链hH3的氨基酸序列

[3507] 序列号61:编码人源化抗体重链hH3的核苷酸序列

[3508] 序列号62:人源化抗体重链hH3的可变区的氨基酸序列

[3509] 序列号63:编码人源化抗体重链hH3的可变区的核苷酸序列

[3510] 序列号64:曲妥珠单抗轻链的氨基酸序列

[3511] 序列号65:曲妥珠单抗重链的氨基酸序列

[3512] 序列号66:抗LPS抗体(h#1G5－H1L1)轻链的氨基酸序列

[3513] 序列号67:抗LPS抗体(h#1G5－H1L1)重链的氨基酸序列

[3514] 序列号68:抗TROP2抗体(hRS7)轻链的氨基酸序列

[3515] 序列号69:抗TROP2抗体(hRS7)重链的氨基酸序列

[3516] 序列号70:抗CD98抗体(hM23－H1L1)轻链的氨基酸序列

[3517] 序列号71:抗CD98抗体(hM23－H1L1)重链的氨基酸序列

[3518] 序列号72:编码曲妥珠单抗突变体轻链的核苷酸序列

[3519] 序列号73:曲妥珠单抗突变体轻链的氨基酸序列

[3520] 序列号74:编码曲妥珠单抗突变体重链的核苷酸序列

[3521] 序列号75:曲妥珠单抗突变体重链的氨基酸序列。

[0001] 序列表

[0002] <110> 第一三共株式会社

[0003] <120> 抗体-吡咯并苯并二氮杂卓衍生物偶联物

[0004] <130> SAP-850-PCT

[0005] <141> 2018-09-28

[0006] <150> JP 2017190713

[0007] <151> 2017-09-29

[0008] <160> 75

[0009] <170> PatentIn 版本 3.5

[0010] <210> 1

[0011] <211> 220

[0012] <212> PRT

[0013] <213> 智人

[0014] <220>

[0015] <221> MISC_FEATURE

[0016] <223> 人CLDN6的氨基酸序列

[0017] <400> 1

[0018] Met Ala Ser Ala Gly Met Gln Ile Leu Gly Val Val Leu Thr Leu Leu

[0019] 1 5 10 15

[0020] Gly Trp Val Asn Gly Leu Val Ser Cys Ala Leu Pro Met Trp Lys Val

[0021] 20 25 30

[0022] Thr Ala Phe Ile Gly Asn Ser Ile Val Val Ala Gln Val Val Trp Glu

[0023] 35 40 45

[0024] Gly Leu Trp Met Ser Cys Val Val Gln Ser Thr Gly Gln Met Gln Cys

[0025] 50 55 60

[0026] Lys Val Tyr Asp Ser Leu Leu Ala Leu Pro Gln Asp Leu Gln Ala Ala

[0027] 65 70 75 80

[0028] Arg Ala Leu Cys Val Ile Ala Leu Leu Val Ala Leu Phe Gly Leu Leu

[0029] 85 90 95

[0030] Val Tyr Leu Ala Gly Ala Lys Cys Thr Thr Cys Val Glu Glu Lys Asp

[0031] 100 105 110

[0032] Ser Lys Ala Arg Leu Val Leu Thr Ser Gly Ile Val Phe Val Ile Ser

[0033] 115 120 125

[0034] Gly Val Leu Thr Leu Ile Pro Val Cys Trp Thr Ala His Ala Ile Ile

[0035] 130 135 140

[0036] Arg Asp Phe Tyr Asn Pro Leu Val Ala Glu Ala Gln Lys Arg Glu Leu

[0037] 145 150 155 160

[0038] Gly Ala Ser Leu Tyr Leu Gly Trp Ala Ala Ser Gly Leu Leu Leu Leu

[0039] 165 170 175

[0040] Gly Gly Gly Leu Leu Cys Cys Thr Cys Pro Ser Gly Gly Ser Gln Gly

[0041] 180 185 190

[0042] Pro Ser His Tyr Met Ala Arg Tyr Ser Thr Ser Ala Pro Ala Ile Ser
[0043] 195 200 205
[0044] Arg Gly Pro Ser Glu Tyr Pro Thr Lys Asn Tyr Val
[0045] 210 215 220
[0046] <210> 2
[0047] <211> 663
[0048] <212> DNA
[0049] <213> 智人
[0050] <220>
[0051] <221> misc_feature
[0052] <223> 编码人CLDN6的氨基酸序列的cDNA的核苷酸序列
[0053] <400> 2
[0054] atggcctctg ccggaatgca gatcctggga gtcgtcctga cactgctggg ctgggtgaat 60
[0055] ggcctggtct cctgtgccct gcccatgtgg aaggtgaccg ctttcatcgg caacagcatc 120
[0056] gtggtggccc aggtggtgtg ggagggcctg tggatgtcct gcgtggtgca gagcaccggc 180
[0057] cagatgcagt gcaaggtgta cgactcactg ctggcgctgc cacaggacct gcaggctgca 240
[0058] cgtgccctct gtgtcatcgc cctccttgtg gccctgttcg gcttgctggt ctaccttgct 300
[0059] ggggccaagt gtaccacctg tgtggaggag aaggattcca aggcccgcct ggtgctcacc 360
[0060] tctgggattg tctttgtcat ctcaggggtc ctgacgctaa tccccgtgtg ctggacggcg 420
[0061] catgccatca tccgggactt ctataacccc ctggtggctg aggcccaaaa gcgggagctg 480
[0062] ggggcctccc tctacttggg ctgggcggcc tcaggccttt tgttgctggg tgggggttg 540
[0063] ctgtgctgca cttgcccctc gggggggtcc cagggcccca gccattacat ggcccgctac 600
[0064] tcaacatctg cccctgccat ctctcggggg ccctctgagt accctaccaa gaattacgtc 660
[0065] tga 663
[0066] <210> 3
[0067] <211> 217
[0068] <212> PRT
[0069] <213> 智人
[0070] <220>
[0071] <221> MISC_FEATURE
[0072] <223> 人CLDN9的氨基酸序列
[0073] <400> 3
[0074] Met Ala Ser Thr Gly Leu Glu Leu Leu Gly Met Thr Leu Ala Val Leu
[0075] 1 5 10 15
[0076] Gly Trp Leu Gly Thr Leu Val Ser Cys Ala Leu Pro Leu Trp Lys Val
[0077] 20 25 30
[0078] Thr Ala Phe Ile Gly Asn Ser Ile Val Val Ala Gln Val Val Trp Glu
[0079] 35 40 45
[0080] Gly Leu Trp Met Ser Cys Val Val Gln Ser Thr Gly Gln Met Gln Cys
[0081] 50 55 60
[0082] Lys Val Tyr Asp Ser Leu Leu Ala Leu Pro Gln Asp Leu Gln Ala Ala
[0083] 65 70 75 80

[0084] Arg Ala Leu Cys Val Ile Ala Leu Leu Leu Ala Leu Leu Gly Leu Leu
[0085] 85 90 95
[0086] Val Ala Ile Thr Gly Ala Gln Cys Thr Thr Cys Val Glu Asp Glu Gly
[0087] 100 105 110
[0088] Ala Lys Ala Arg Ile Val Leu Thr Ala Gly Val Ile Leu Leu Leu Ala
[0089] 115 120 125
[0090] Gly Ile Leu Val Leu Ile Pro Val Cys Trp Thr Ala His Ala Ile Ile
[0091] 130 135 140
[0092] Gln Asp Phe Tyr Asn Pro Leu Val Ala Glu Ala Leu Lys Arg Glu Leu
[0093] 145 150 155 160
[0094] Gly Ala Ser Leu Tyr Leu Gly Trp Ala Ala Ala Ala Leu Leu Met Leu
[0095] 165 170 175
[0096] Gly Gly Gly Leu Leu Cys Cys Thr Cys Pro Pro Pro Gln Val Glu Arg
[0097] 180 185 190
[0098] Pro Arg Gly Pro Arg Leu Gly Tyr Ser Ile Pro Ser Arg Ser Gly Ala
[0099] 195 200 205
[0100] Ser Gly Leu Asp Lys Arg Asp Tyr Val
[0101] 210 215
[0102] <210> 4
[0103] <211> 654
[0104] <212> DNA
[0105] <213> 智人
[0106] <220>
[0107] <221> misc_feature
[0108] <223> 编码人CLDN9的氨基酸序列的cDNA的核苷酸序列
[0109] <400> 4
[0110] atggcttcga ccggcttaga actgctgggc atgaccctgg ctgtgctggg ctggctgggg 60
[0111] accctggtgt cctgcgccct gcccctgtgg aaggtgaccg ccttcatcgg caacagcatc 120
[0112] gtggtggccc aggtggtgtg ggagggcctg tggatgtcct gcgtggtgca gagcacgggc 180
[0113] cagatgcagt gcaaggtgta cgactcactg ctggctctgc cgcaggacct gcaggccgca 240
[0114] cgtgccctct gtgtcattgc cctcctgctg gccctgcttg gcctcctggt ggccatcaca 300
[0115] ggtgcccagt gtaccacgtg tgtggaggac gaaggtgcca aggcccgtat cgtgctcacc 360
[0116] gcgggggtca tcctcctcct cgccggcatc ctggtgctca tccctgtgtg ctggacggcg 420
[0117] cacgccatca tccaggactt ctacaacccc ctggtggctg aggccctcaa gcgggagctg 480
[0118] ggggcctccc tctacctggg ctgggcggcg gctgcactgc ttatgctggg cgggggggctc 540
[0119] ctctgctgca cgtgcccccc gccccaggtc gagcggcccc gcggacctcg gctgggctac 600
[0120] tccatcccct cccgctcggg tgcatctgga ctggacaaga gggactacgt gtga 654
[0121] <210> 5
[0122] <211> 11
[0123] <212> PRT
[0124] <213> 小鼠
[0125] <220>

[0126] <221> MISC_FEATURE

[0127] <223> B1抗体轻链的CDRL1的氨基酸序列

[0128] <400> 5

[0129] Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr Leu Asn

[0130] 1 5 10

[0131] <210> 6

[0132] <211> 7

[0133] <212> PRT

[0134] <213> 小鼠

[0135] <220>

[0136] <221> MISC_FEATURE

[0137] <223> B1抗体轻链的CDRL2的氨基酸序列

[0138] <400> 6

[0139] Phe Thr Ser Arg Leu His Ser

[0140] 1 5

[0141] <210> 7

[0142] <211> 9

[0143] <212> PRT

[0144] <213> 小鼠

[0145] <220>

[0146] <221> MISC_FEATURE

[0147] <223> B1抗体轻链的CDRL3的氨基酸序列

[0148] <400> 7

[0149] Gln Gln Gly Tyr Pro Leu Pro Trp Thr

[0150] 1 5

[0151] <210> 8

[0152] <211> 9

[0153] <212> PRT

[0154] <213> 人工序列

[0155] <220>

[0156] <223> 人源化抗体

[0157] <220>

[0158] <221> MISC_FEATURE

[0159] <223> 人源化B1抗体轻链L4的CDRL3的氨基酸序列

[0160] <400> 8

[0161] Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr

[0162] 1 5

[0163] <210> 9

[0164] <211> 10

[0165] <212> PRT

[0166] <213> 小鼠

[0167] <220>

[0168] <221> MISC_FEATURE

[0169] <223> B1抗体重链的CDRH1的氨基酸序列

[0170] <400> 9

[0171] Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Met His

[0172] 1 5 10

[0173] <210> 10

[0174] <211> 10

[0175] <212> PRT

[0176] <213> 小鼠

[0177] <220>

[0178] <221> MISC_FEATURE

[0179] <223> B1抗体重链的CDRH2的氨基酸序列

[0180] <400> 10

[0181] Gly Val Asn Pro Asn Ser Gly Asp Thr Ser

[0182] 1 5 10

[0183] <210> 11

[0184] <211> 13

[0185] <212> PRT

[0186] <213> 小鼠

[0187] <220>

[0188] <221> MISC_FEATURE

[0189] <223> B1抗体重链的CDRH3的氨基酸序列

[0190] <400> 11

[0191] Pro Gly Gly Tyr Asp Val Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

[0192] 1 5 10

[0193] <210> 12

[0194] <211> 11

[0195] <212> PRT

[0196] <213> 小鼠

[0197] <220>

[0198] <221> MISC_FEATURE

[0199] <223> C7抗体轻链的CDRL1的氨基酸序列

[0200] <400> 12

[0201] Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr Leu Asn

[0202] 1 5 10

[0203] <210> 13

[0204] <211> 7

[0205] <212> PRT

[0206] <213> 小鼠

[0207] <220>

[0208] <221> MISC_FEATURE

[0209] <223> C7抗体轻链的CDRL2的氨基酸序列

[0210] <400> 13

[0211] Ser Thr Ser Arg Leu His Ser

[0212] 1 5

[0213] <210> 14

[0214] <211> 9

[0215] <212> PRT

[0216] <213> 小鼠

[0217] <220>

[0218] <221> MISC_FEATURE

[0219] <223> C7抗体轻链的CDRL3的氨基酸序列

[0220] <400> 14

[0221] Gln Gln Gly Tyr Pro Leu Pro Trp Thr

[0222] 1 5

[0223] <210> 15

[0224] <211> 10

[0225] <212> PRT

[0226] <213> 小鼠

[0227] <220>

[0228] <221> MISC_FEATURE

[0229] <223> C7抗体重链的CDRH1的氨基酸序列

[0230] <400> 15

[0231] Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Met His

[0232] 1 5 10

[0233] <210> 16

[0234] <211> 10

[0235] <212> PRT

[0236] <213> 小鼠

[0237] <220>

[0238] <221> MISC_FEATURE

[0239] <223> C7抗体重链的CDRH2的氨基酸序列

[0240] <400> 16

[0241] Gly Val Asn Pro Asn Ser Gly Asp Thr Ser

[0242] 1 5 10

[0243] <210> 17

[0244] <211> 13

[0245] <212> PRT

[0246] <213> 小鼠

[0247] <220>

[0248] <221> MISC_FEATURE

[0249] <223> C7抗体重链的CDRH3的氨基酸序列

[0250] <400> 17

[0251] Pro Gly Gly Tyr Asp Val Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

[0252] 1 5 10

[0253] <210> 18

[0254] <211> 321

[0255] <212> DNA

[0256] <213> 小鼠

[0257] <220>

[0258] <221> misc_feature

[0259] <223> 编码B1抗体轻链的可变区的cDNA的核苷酸序列

[0260] <400> 18

[0261] gatatccaga tgacacagac tgcatcctcc ctgtctgcct ctcttggaga cagagtcacc 60

[0262] atcagttgca gggcaagtca ggacattaac aattatttaa actggtatca gcagaaacca 120

[0263] gatggaactg ttaaactcct gatctacttc acatcaagat tacactcagg agtcccatca 180

[0264] aggttcagtg gcagtgggtc tggaacacat tattctctca ccattactaa cctggaacaa 240

[0265] gaagatattg ccacttactt ttgccaacag ggttatccgc ttccgtggac gttcggtgga 300

[0266] ggcaccaaac tggaaatcaa a 321

[0267] <210> 19

[0268] <211> 107

[0269] <212> PRT

[0270] <213> 小鼠

[0271] <220>

[0272] <221> MISC_FEATURE

[0273] <223> B1抗体轻链的可变区的氨基酸序列

[0274] <400> 19

[0275] Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Ala Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

[0276] 1 5 10 15

[0277] Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr

[0278] 20 25 30

[0279] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

[0280] 35 40 45

[0281] Tyr Phe Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

[0282] 50 55 60

[0283] Ser Gly Ser Gly Thr His Tyr Ser Leu Thr Ile Thr Asn Leu Glu Gln

[0284] 65 70 75 80

[0285] Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Tyr Pro Leu Pro Trp

[0286] 85 90 95

[0287] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

[0288] 100 105

[0289] <210> 20

[0290] <211> 366

[0291] <212> DNA

[0292] <213> 小鼠

[0293] <220>

[0294] <221> misc_feature
[0295] <223> 编码B1抗体重链的可变区的cDNA的核苷酸序列
[0296] <400> 20
[0297] gaggtccagc ttcaacagtc tggacctgaa ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60
[0298] tcctgcaaga cttctggata cacattcact gaatacacca tgcactgggt gcagcagagc 120
[0299] catggaaaga gccttgagtg gattggaggt gttaatccta atagtggtga tactagctac 180
[0300] aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgttgaca agtcctccag cacagcctac 240
[0301] atggagctcc gcagcctgac atctgaggat tctgcagtct attactgtgc aagacccggg 300
[0302] gggtacgacg tgggttacta tgctatggac tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc 360
[0303] tcctca 366
[0304] <210> 21
[0305] <211> 122
[0306] <212> PRT
[0307] <213> 小鼠
[0308] <220>
[0309] <221> MISC_FEATURE
[0310] <223> B1抗体重链的可变区的氨基酸序列
[0311] <400> 21
[0312] Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
[0313] 1 5 10 15
[0314] Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
[0315] 20 25 30
[0316] Thr Met His Trp Val Gln Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
[0317] 35 40 45
[0318] Gly Gly Val Asn Pro Asn Ser Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
[0319] 50 55 60
[0320] Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[0321] 65 70 75 80
[0322] Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
[0323] 85 90 95
[0324] Ala Arg Pro Gly Gly Tyr Asp Val Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
[0325] 100 105 110
[0326] Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
[0327] 115 120
[0328] <210> 22
[0329] <211> 321
[0330] <212> DNA
[0331] <213> 小鼠
[0332] <220>
[0333] <221> misc_feature
[0334] <223> 编码C7抗体轻链的可变区的cDNA的核苷酸序列
[0335] <400> 22

[0336] gatatccaga tgacacagac tgcatcctcc ctgtctgcct ctcttggaga cagagtcacc 60
[0337] atcagttgca gggcaagtca ggacattaac aattatttaa actggtatca gcagaaacca 120
[0338] gatggaactg ttaaactcct gatctactcc acatcaagat tacactcagg agtcccatca 180
[0339] aggttcagtg gcagtgggtc tggaacacat tattctctca ccattactca cctggaacaa 240
[0340] gaagatattg ccacttactt ttgccaacag ggttatccgc ttccgtggac gttcggtgga 300
[0341] ggcaccaaac tggaaatcaa a 321
[0342] <210> 23
[0343] <211> 107
[0344] <212> PRT
[0345] <213> 小鼠
[0346] <220>
[0347] <221> MISC_FEATURE
[0348] <223> C7抗体轻链的可变区的氨基酸序列
[0349] <400> 23
[0350] Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Ala Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
[0351] 1 5 10 15
[0352] Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr
[0353] 20 25 30
[0354] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
[0355] 35 40 45
[0356] Tyr Ser Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[0357] 50 55 60
[0358] Ser Gly Ser Gly Thr His Tyr Ser Leu Thr Ile Thr His Leu Glu Gln
[0359] 65 70 75 80
[0360] Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Tyr Pro Leu Pro Trp
[0361] 85 90 95
[0362] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0363] 100 105
[0364] <210> 24
[0365] <211> 366
[0366] <212> DNA
[0367] <213> 小鼠
[0368] <220>
[0369] <221> misc_feature
[0370] <223> 编码C7抗体重链的可变区的cDNA的核苷酸序列
[0371] <400> 24
[0372] gaggtccagc ttcaacagtc tggacctgaa ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60
[0373] tcctgcaaga cttctggata cacattcact gaatacacca tgcactgggt gcagcagagc 120
[0374] catggaaaga gccttgagtg gattggaggt gttaatccta atagtggtga tactagctac 180
[0375] aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgttgaca agtcctccag cacagcctac 240
[0376] atggagctcc gcagcctgac atctgaggat tctgcagtct attactgtgc aagacccggg 300
[0377] gggtacgacg tgggttacta tgctatggac tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc 360

[0378] tcctca 366

[0379] <210> 25

[0380] <211> 122

[0381] <212> PRT

[0382] <213> 小鼠

[0383] <220>

[0384] <221> MISC_FEATURE

[0385] <223> C7抗体重链的可变区的氨基酸序列

[0386] <400> 25

[0387] Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

[0388] 1 5 10 15

[0389] Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr

[0390] 20 25 30

[0391] Thr Met His Trp Val Gln Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

[0392] 35 40 45

[0393] Gly Gly Val Asn Pro Asn Ser Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

[0394] 50 55 60

[0395] Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

[0396] 65 70 75 80

[0397] Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

[0398] 85 90 95

[0399] Ala Arg Pro Gly Gly Tyr Asp Val Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp

[0400] 100 105 110

[0401] Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

[0402] 115 120

[0403] <210> 26

[0404] <211> 449

[0405] <212> DNA

[0406] <213> 智人

[0407] <220>

[0408] <221> misc_feature

[0409] <223> 包含编码人轻链信号序列和人κ链恒定区的DNA序列的DNA片段

[0410] <400> 26

[0411] gcctccggac tctagagcca ccatggtgct gcagacccag gtgttcatct ccctgctgct 60

[0412] gtggatctcc ggcgcgtacg gcgatatcgt gatgattaaa cgtacggtgg ccgccccctc 120

[0413] cgtgttcatc ttcccccccct ccgacgagca gctgaagtcc ggcaccgcct ccgtggtgtg 180

[0414] cctgctgaat aacttctacc ccagagaggc caaggtgcag tggaaggtgg acaacgccct 240

[0415] gcagtccggg aactcccagg agagcgtgac cgagcaggac agcaaggaca gcacctacag 300

[0416] cctgagcagc accctgaccc tgagcaaagc cgactacgag aagcacaagg tgtacgcctg 360

[0417] cgaggtgacc caccagggcc tgagctcccc cgtcaccaag agcttcaaca gggggggagtg 420

[0418] ttaggggccc gtttaaacgg gggaggcta 449

[0419] <210> 27

[0420] <211> 1137

[0421] <212> DNA

[0422] <213> 智人

[0423] <220>

[0424] <221> misc_feature

[0425] <223> 包含编码人重链信号序列和人IgG1 LALA恒定区的DNA序列的DNA片段

[0426] <400> 27

[0427] ccagcctccg gactctagag ccaccatgaa acacctgtgg ttcttcctcc tgctggtggc 60

[0428] agctcccaga tgggtgctga gccaggtgca attgtgcagg cggttagctc agcctccacc 120

[0429] aagggcccaa gcgtcttccc cctggcaccc tcctccaaga gcacctctgg cggcacagcc 180

[0430] gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgaacccg tgaccgtgag ctggaactca 240

[0431] ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc cccgctgtcc tgcagtcctc aggactctac 300

[0432] tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 360

[0433] aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagttgagcc caaatcttgt 420

[0434] gacaaaactc acacatgccc accctgccca gcacctgaag ccgcgggggg accctcagtc 480

[0435] ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 540

[0436] tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 600

[0437] ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccccgggagg agcagtacaa cagcacgtac 660

[0438] cgggtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 720

[0439] tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 780

[0440] ggccagcccc gggaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag 840

[0441] aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 900

[0442] tgggagagca atggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccctcccgt gctggactcc 960

[0443] gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggc 1020

[0444] aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac ccagaagagc 1080

[0445] ctctccctgt ctcccggcaa atgagatatc gggcccgttt aaacggggga ggctaac 1137

[0446] <210> 28

[0447] <211> 234

[0448] <212> PRT

[0449] <213> 人工序列

[0450] <220>

[0451] <223> 嵌合抗体

[0452] <220>

[0453] <221> MISC_FEATURE

[0454] <223> chB1轻链的氨基酸序列

[0455] <400> 28

[0456] Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser

[0457] 1 5 10 15

[0458] Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Ala Ser Ser Leu Ser

[0459] 20 25 30

[0460] Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp

[0461] 35 40 45

[0462] Ile Asn Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val
[0463] 50 55 60
[0464] Lys Leu Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser
[0465] 65 70 75 80
[0466] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr His Tyr Ser Leu Thr Ile Thr
[0467] 85 90 95
[0468] Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Tyr
[0469] 100 105 110
[0470] Pro Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
[0471] 115 120 125
[0472] Ala Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
[0473] 130 135 140
[0474] Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
[0475] 145 150 155 160
[0476] Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
[0477] 165 170 175
[0478] Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
[0479] 180 185 190
[0480] Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
[0481] 195 200 205
[0482] His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
[0483] 210 215 220
[0484] Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[0485] 225 230
[0486] <210> 29
[0487] <211> 752
[0488] <212> DNA
[0489] <213> 人工序列
[0490] <220>
[0491] <223> 嵌合抗体
[0492] <220>
[0493] <221> misc_feature
[0494] <223> 包含编码chB1轻链的氨基酸序列的DNA序列的DNA片段
[0495] <400> 29
[0496] ccagcctccg gactctagag ccaccatggt gctgcagacc caggtgttca tcagcctgct 60
[0497] gctgtggatc agcggcgcct acggcgacat ccagatgacc cagacagcca gcagcctgag 120
[0498] cgccagcctg ggcgatagag tgaccatcag ctgcagagcc agccaggaca tcaacaacta 180
[0499] cctgaactgg tatcagcaga aacccgacgg caccgtgaag ctgctgatct acttcaccag 240
[0500] cagactgcac agcggcgtgc ccagcagatt ttctggcagc ggctctggca cccactacag 300
[0501] cctgaccatc accaacctgg aacaggaaga tatcgctacc tacttctgtc agcaaggcta 360
[0502] ccccctgccc tggacctttg gcggcggaac aaagctggaa atcaagcggg ccgtggccgc 420
[0503] tccctccgtg ttcatctttc cacccagcga cgagcagctg aagtccggca cagctagcgt 480

[0504] cgtgtgcctg ctgaacaact tctacccccg cgaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa 540
[0505] tgccctgcag agcggcaaca gccaggaaag cgtgaccgag caggacagca aggactccac 600
[0506] ctactccctg agcagcaccc tgaccctgag caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta 660
[0507] cgcctgcgaa gtgacccacc agggcctgtc tagccccgtg accaagagct tcaaccgggg 720
[0508] cgagtgttga gtttaaacgg gggaggctaa ct 752
[0509] <210> 30
[0510] <211> 107
[0511] <212> PRT
[0512] <213> 人工序列
[0513] <220>
[0514] <223> 嵌合抗体
[0515] <220>
[0516] <221> MISC_FEATURE
[0517] <223> chB1轻链的可变区的氨基酸序列
[0518] <400> 30
[0519] Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Ala Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
[0520] 1 5 10 15
[0521] Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr
[0522] 20 25 30
[0523] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
[0524] 35 40 45
[0525] Tyr Phe Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[0526] 50 55 60
[0527] Ser Gly Ser Gly Thr His Tyr Ser Leu Thr Ile Thr Asn Leu Glu Gln
[0528] 65 70 75 80
[0529] Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Tyr Pro Leu Pro Trp
[0530] 85 90 95
[0531] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0532] 100 105
[0533] <210> 31
[0534] <211> 321
[0535] <212> DNA
[0536] <213> 人工序列
[0537] <220>
[0538] <223> 嵌合抗体
[0539] <220>
[0540] <221> misc_feature
[0541] <223> 编码chB1轻链的可变区的氨基酸序列的核苷酸序列
[0542] <400> 31
[0543] gacatccaga tgacccagac agccagcagc ctgagcgcca gcctgggcga tagagtgacc 60
[0544] atcagctgca gagccagcca ggacatcaac aactacctga actggtatca gcagaaaccc 120
[0545] gacggcaccg tgaagctgct gatctacttc accagcagac tgcacagcgg cgtgcccagc 180

[0546] agattttctg gcagcggctc tggcacccac tacagcctga ccatcaccaa cctggaacag 240

[0547] gaagatatcg ctacctactt ctgtcagcaa ggctaccccc tgccctggac ctttggcggc 300

[0548] ggaacaaagc tggaaatcaa g 321

[0549] <210> 32

[0550] <211> 471

[0551] <212> PRT

[0552] <213> 人工序列

[0553] <220>

[0554] <223> 嵌合抗体

[0555] <220>

[0556] <221> MISC_FEATURE

[0557] <223> chB1重链的氨基酸序列

[0558] <400> 32

[0559] Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp

[0560] 1 5 10 15

[0561] Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys

[0562] 20 25 30

[0563] Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe

[0564] 35 40 45

[0565] Thr Glu Tyr Thr Met His Trp Val Gln Gln Ser His Gly Lys Ser Leu

[0566] 50 55 60

[0567] Glu Trp Ile Gly Gly Val Asn Pro Asn Ser Gly Asp Thr Ser Tyr Asn

[0568] 65 70 75 80

[0569] Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser

[0570] 85 90 95

[0571] Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val

[0572] 100 105 110

[0573] Tyr Tyr Cys Ala Arg Pro Gly Gly Tyr Asp Val Gly Tyr Tyr Ala Met

[0574] 115 120 125

[0575] Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr

[0576] 130 135 140

[0577] Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser

[0578] 145 150 155 160

[0579] Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu

[0580] 165 170 175

[0581] Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His

[0582] 180 185 190

[0583] Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser

[0584] 195 200 205

[0585] Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys

[0586] 210 215 220

[0587] Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu

[0588] 225 230 235 240
[0589] Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
[0590] 245 250 255
[0591] Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
[0592] 260 265 270
[0593] Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
[0594] 275 280 285
[0595] Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
[0596] 290 295 300
[0597] Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
[0598] 305 310 315 320
[0599] Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
[0600] 325 330 335
[0601] Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
[0602] 340 345 350
[0603] Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
[0604] 355 360 365
[0605] Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
[0606] 370 375 380
[0607] Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
[0608] 385 390 395 400
[0609] Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
[0610] 405 410 415
[0611] Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
[0612] 420 425 430
[0613] Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
[0614] 435 440 445
[0615] Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
[0616] 450 455 460
[0617] Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[0618] 465 470
[0619] <210> 33
[0620] <211> 1413
[0621] <212> DNA
[0622] <213> 人工序列
[0623] <220>
[0624] <223> 嵌合抗体
[0625] <220>
[0626] <221> misc_feature
[0627] <223> 编码chB1重链的核苷酸序列
[0628] <400> 33
[0629] atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagcgaa 60

[0630] gtgcagctgc agcagtctgg ccccgagctc gtgaaacctg gcgcctccgt gaagatcagc 120
[0631] tgcaagacca gcggctacac cttcaccgag tacaccatgc actgggtgca gcagagccac 180
[0632] ggcaagagcc tggaatggat cggcggcgtg aaccccaaca gcggcgacac cagctacaac 240
[0633] cagaagttca agggcaaggc caccctgacc gtggacaaga gcagcagcac cgcctacatg 300
[0634] gaactgcgga gcctgaccag cgaggacagc gccgtgtact actgtgccag acctggcggc 360
[0635] tacgacgtgg gctactacgc catggattac tggggccagg gcaccagcgt gaccgtcagc 420
[0636] tcagcctcca ccaagggccc aagcgtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 480
[0637] ggcggcacag ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc cgtgaccgtg 540
[0638] agctggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tccccgctgt cctgcagtcc 600
[0639] tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 660
[0640] acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag 720
[0641] cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccctgcc cagcacctga agccgcgggg 780
[0642] ggaccctcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 840
[0643] cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 900
[0644] tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccccggga ggagcagtac 960
[0645] aacagcacgt accgggtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 1020
[0646] aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag cccccatcga gaaaaccatc 1080
[0647] tccaaagcca aaggccagcc ccgggaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggag 1140
[0648] gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1200
[0649] atcgccgtgg agtgggagag caatggccag cccgagaaca actacaagac cacccctccc 1260
[0650] gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1320
[0651] tggcagcagg gcaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1380
[0652] acccagaaga gcctctccct gtctcccggc aaa 1413
[0653] <210> 34
[0654] <211> 122
[0655] <212> PRT
[0656] <213> 人工序列
[0657] <220>
[0658] <223> 嵌合抗体
[0659] <220>
[0660] <221> MISC_FEATURE
[0661] <223> chB1重链的可变区的氨基酸序列
[0662] <400> 34
[0663] Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
[0664] 1 5 10 15
[0665] Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
[0666] 20 25 30
[0667] Thr Met His Trp Val Gln Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
[0668] 35 40 45
[0669] Gly Gly Val Asn Pro Asn Ser Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
[0670] 50 55 60
[0671] Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

[0672] 65 70 75 80
[0673] Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
[0674] 85 90 95
[0675] Ala Arg Pro Gly Gly Tyr Asp Val Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
[0676] 100 105 110
[0677] Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
[0678] 115 120
[0679] <210> 35
[0680] <211> 366
[0681] <212> DNA
[0682] <213> 人工序列
[0683] <220>
[0684] <223> 嵌合抗体
[0685] <220>
[0686] <221> misc_feature
[0687] <223> 编码chB1重链的可变区的核苷酸序列
[0688] <400> 35
[0689] gaagtgcagc tgcagcagtc tggccccgag ctcgtgaaac ctggcgcctc cgtgaagatc 60
[0690] agctgcaaga ccagcggcta caccttcacc gagtacacca tgcactgggt gcagcagagc 120
[0691] cacggcaaga gcctggaatg gatcggcggc gtgaacccca acagcggcga caccagctac 180
[0692] aaccagaagt tcaagggcaa ggccaccctg accgtggaca agagcagcag caccgcctac 240
[0693] atggaactgc ggagcctgac cagcgaggac agcgccgtgt actactgtgc cagacctggc 300
[0694] ggctacgacg tgggctacta cgccatggat tactggggcc agggcaccag cgtgaccgtc 360
[0695] agctca 366
[0696] <210> 36
[0697] <211> 234
[0698] <212> PRT
[0699] <213> 人工序列
[0700] <220>
[0701] <223> 人源化抗体
[0702] <220>
[0703] <221> MISC_FEATURE
[0704] <223> 人源化抗体轻链hL1的氨基酸序列
[0705] <400> 36
[0706] Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
[0707] 1 5 10 15
[0708] Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
[0709] 20 25 30
[0710] Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp
[0711] 35 40 45
[0712] Ile Asn Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
[0713] 50 55 60

[0714] Lys Leu Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser
[0715] 65 70 75 80
[0716] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser
[0717] 85 90 95
[0718] Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr
[0719] 100 105 110
[0720] Pro Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
[0721] 115 120 125
[0722] Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
[0723] 130 135 140
[0724] Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
[0725] 145 150 155 160
[0726] Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
[0727] 165 170 175
[0728] Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
[0729] 180 185 190
[0730] Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
[0731] 195 200 205
[0732] His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
[0733] 210 215 220
[0734] Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[0735] 225 230
[0736] <210> 37
[0737] <211> 702
[0738] <212> DNA
[0739] <213> 人工序列
[0740] <220>
[0741] <223> 人源化抗体
[0742] <220>
[0743] <221> misc_feature
[0744] <223> 编码人源化抗体轻链hL1的核苷酸序列
[0745] <400> 37
[0746] atggtgctgc agacccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcgtacggc 60
[0747] gacatccaga tgacccagag ccctagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 120
[0748] atcacctgta gagccagcca ggacatcaac aactacctga actggtatca gcagaagccc 180
[0749] ggcaaggccc ccaagctgct gatctacttc accagcagac tgcacagcgg cgtgcccagc 240
[0750] agattttctg gcagcggctc cggcaccgac tacaccctga caatcagcag cctgcagccc 300
[0751] gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ggctaccccc tgccttggac atttggccag 360
[0752] ggcaccaagg tggaaatcaa gcgtacggtg gccgcccccc ccgtgttcat cttccccccc 420
[0753] tccgacgagc agctgaagtc cggcaccgcc tccgtggtgt gcctgctgaa taacttctac 480
[0754] cccagagagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagtccgg gaactcccag 540
[0755] gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctgagcag caccctgacc 600

[0756] ctgagcaaag ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc 660
[0757] ctgagctccc ccgtcaccaa gagcttcaac agggggggagt gt 702
[0758] <210> 38
[0759] <211> 107
[0760] <212> PRT
[0761] <213> 人工序列
[0762] <220>
[0763] <223> 人源化抗体
[0764] <220>
[0765] <221> MISC_FEATURE
[0766] <223> 人源化抗体轻链hL1的可变区的氨基酸序列
[0767] <400> 38
[0768] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[0769] 1 5 10 15
[0770] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr
[0771] 20 25 30
[0772] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
[0773] 35 40 45
[0774] Tyr Phe Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[0775] 50 55 60
[0776] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[0777] 65 70 75 80
[0778] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Pro Leu Pro Trp
[0779] 85 90 95
[0780] Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[0781] 100 105
[0782] <210> 39
[0783] <211> 321
[0784] <212> DNA
[0785] <213> 人工序列
[0786] <220>
[0787] <223> 人源化抗体
[0788] <220>
[0789] <221> misc_feature
[0790] <223> 编码人源化抗体轻链hL1的可变区的核苷酸序列
[0791] <400> 39
[0792] gacatccaga tgacccagag ccctagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60
[0793] atcacctgta gagccagcca ggacatcaac aactacctga actggtatca gcagaagccc 120
[0794] ggcaaggccc ccaagctgct gatctacttc accagcagac tgcacagcgg cgtgcccagc 180
[0795] agattttctg gcagcggctc cggcaccgac tacaccctga caatcagcag cctgcagccc 240
[0796] gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ggctaccccc tgccttggac atttggccag 300
[0797] ggcaccaagg tggaaatcaa g 321

[0798] <210> 40
[0799] <211> 234
[0800] <212> PRT
[0801] <213> 人工序列
[0802] <220>
[0803] <223> 人源化抗体
[0804] <220>
[0805] <221> MISC_FEATURE
[0806] <223> 人源化抗体轻链hL2的氨基酸序列
[0807] <400> 40
[0808] Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
[0809] 1 5 10 15
[0810] Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
[0811] 20 25 30
[0812] Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp
[0813] 35 40 45
[0814] Ile Asn Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Val
[0815] 50 55 60
[0816] Lys Leu Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser
[0817] 65 70 75 80
[0818] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr His Tyr Thr Leu Thr Ile Ser
[0819] 85 90 95
[0820] Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr
[0821] 100 105 110
[0822] Pro Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
[0823] 115 120 125
[0824] Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
[0825] 130 135 140
[0826] Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
[0827] 145 150 155 160
[0828] Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
[0829] 165 170 175
[0830] Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
[0831] 180 185 190
[0832] Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
[0833] 195 200 205
[0834] His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
[0835] 210 215 220
[0836] Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[0837] 225 230
[0838] <210> 41
[0839] <211> 702

[0840] <212> DNA

[0841] <213> 人工序列

[0842] <220>

[0843] <223> 人源化抗体

[0844] <220>

[0845] <221> misc_feature

[0846] <223> 编码人源化抗体轻链hL2的核苷酸序列

[0847] <400> 41

[0848] atggtgctgc agacccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcgtacggc 60

[0849] gacatccaga tgacccagag ccctagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 120

[0850] atcacctgta gagccagcca ggacatcaac aactacctga actggtatca gcagaaaccc 180

[0851] ggcaaggccg tgaagctgct gatctacttc accagcagac tgcacagcgg cgtgcccagc 240

[0852] agattttctg gcagcggctc tggcacccac tacaccctga caatcagcag cctgcagccc 300

[0853] gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ggctaccccc tgccttggac atttggccag 360

[0854] ggcaccaagg tggaaatcaa gcgtacggtg gccgcccccc ccgtgttcat cttcccccccc 420

[0855] tccgacgagc agctgaagtc cggcaccgcc tccgtggtgt gcctgctgaa taacttctac 480

[0856] cccagagagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagtccgg gaactcccag 540

[0857] gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctgagcag caccctgacc 600

[0858] ctgagcaaag ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc 660

[0859] ctgagctccc ccgtcaccaa gagcttcaac agggggggagt gt 702

[0860] <210> 42

[0861] <211> 107

[0862] <212> PRT

[0863] <213> 人工序列

[0864] <220>

[0865] <223> 人源化抗体

[0866] <220>

[0867] <221> MISC_FEATURE

[0868] <223> 人源化抗体轻链hL2的可变区的氨基酸序列

[0869] <400> 42

[0870] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

[0871] 1 5 10 15

[0872] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr

[0873] 20 25 30

[0874] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Val Lys Leu Leu Ile

[0875] 35 40 45

[0876] Tyr Phe Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

[0877] 50 55 60

[0878] Ser Gly Ser Gly Thr His Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

[0879] 65 70 75 80

[0880] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Pro Leu Pro Trp

[0881] 85 90 95

[0882] Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[0883] 100 105
[0884] <210> 43
[0885] <211> 321
[0886] <212> DNA
[0887] <213> 人工序列
[0888] <220>
[0889] <223> 人源化抗体
[0890] <220>
[0891] <221> misc_feature
[0892] <223> 编码人源化抗体轻链hL2的可变区的核苷酸序列
[0893] <400> 43
[0894] gacatccaga tgacccagag ccctagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60
[0895] atcacctgta gagccagcca ggacatcaac aactacctga actggtatca gcagaaaccc 120
[0896] ggcaaggccg tgaagctgct gatctacttc accagcagac tgcacagcgg cgtgcccagc 180
[0897] agattttctg gcagcggctc tggcacccac tacaccctga caatcagcag cctgcagccc 240
[0898] gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ggctaccccc tgccttggac atttggccag 300
[0899] ggcaccaagg tggaaatcaa g 321
[0900] <210> 44
[0901] <211> 234
[0902] <212> PRT
[0903] <213> 人工序列
[0904] <220>
[0905] <223> 人源化抗体
[0906] <220>
[0907] <221> MISC_FEATURE
[0908] <223> 人源化抗体轻链hL3的氨基酸序列
[0909] <400> 44
[0910] Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
[0911] 1 5 10 15
[0912] Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
[0913] 20 25 30
[0914] Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp
[0915] 35 40 45
[0916] Ile Asn Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gly Ala Val
[0917] 50 55 60
[0918] Lys Leu Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser
[0919] 65 70 75 80
[0920] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser
[0921] 85 90 95
[0922] Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr
[0923] 100 105 110

[0924] Pro Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
[0925] 115 120 125
[0926] Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
[0927] 130 135 140
[0928] Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
[0929] 145 150 155 160
[0930] Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
[0931] 165 170 175
[0932] Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
[0933] 180 185 190
[0934] Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
[0935] 195 200 205
[0936] His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
[0937] 210 215 220
[0938] Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[0939] 225 230
[0940] <210> 45
[0941] <211> 702
[0942] <212> DNA
[0943] <213> 人工序列
[0944] <220>
[0945] <223> 人源化抗体
[0946] <220>
[0947] <221> misc_feature
[0948] <223> 编码人源化抗体轻链hL3的核苷酸序列
[0949] <400> 45
[0950] atggtgctgc agacccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcgtacggc 60
[0951] gacatccaga tgacccagag ccctagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 120
[0952] atcacctgta gagccagcca ggacatcaac aactacctga actggtatca gcagaaaccc 180
[0953] ggcggagccg tgaagctgct gatctacttc accagcagac tgcacagcgg cgtgcccagc 240
[0954] agattttctg gcagcggctc cggcaccgac tacaccctga caatcagcag cctgcagccc 300
[0955] gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ggctaccccc tgccctggac atttggcggc 360
[0956] ggaacaaagg tggaaatcaa gcgtacggtg gccgcccccc ccgtgttcat cttcccccccc 420
[0957] tccgacgagc agctgaagtc cggcaccgcc tccgtggtgt gcctgctgaa taacttctac 480
[0958] cccagagagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagtccgg gaactcccag 540
[0959] gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctgagcag caccctgacc 600
[0960] ctgagcaaag ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc 660
[0961] ctgagctccc ccgtcaccaa gagcttcaac agggggagt gt 702
[0962] <210> 46
[0963] <211> 107
[0964] <212> PRT
[0965] <213> 人工序列

[0966] <220>

[0967] <223> 人源化抗体

[0968] <220>

[0969] <221> MISC_FEATURE

[0970] <223> 人源化抗体轻链hL3的可变区的氨基酸序列

[0971] <400> 46

[0972] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

[0973] 1 5 10 15

[0974] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr

[0975] 20 25 30

[0976] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gly Ala Val Lys Leu Leu Ile

[0977] 35 40 45

[0978] Tyr Phe Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

[0979] 50 55 60

[0980] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

[0981] 65 70 75 80

[0982] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Pro Leu Pro Trp

[0983] 85 90 95

[0984] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

[0985] 100 105

[0986] <210> 47

[0987] <211> 321

[0988] <212> DNA

[0989] <213> 人工序列

[0990] <220>

[0991] <223> 人源化抗体

[0992] <220>

[0993] <221> misc_feature

[0994] <223> 编码人源化抗体轻链hL3的可变区的核苷酸序列

[0995] <400> 47

[0996] gacatccaga tgacccagag ccctagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60

[0997] atcacctgta gagccagcca ggacatcaac aactacctga actggtatca gcagaaaccc 120

[0998] ggcggagccg tgaagctgct gatctacttc accagcagac tgcacagcgg cgtgcccagc 180

[0999] agattttctg gcagcggctc cggcaccgac tacaccctga caatcagcag cctgcagccc 240

[1000] gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ggctaccccc tgccctggac atttggcggc 300

[1001] ggaacaaagg tggaaatcaa g 321

[1002] <210> 48

[1003] <211> 234

[1004] <212> PRT

[1005] <213> 人工序列

[1006] <220>

[1007] <223> 人源化抗体

[1008] <220>
[1009] <221> MISC_FEATURE
[1010] <223> 人源化抗体轻链hL4的氨基酸序列
[1011] <400> 48
[1012] Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
[1013] 1 5 10 15
[1014] Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
[1015] 20 25 30
[1016] Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp
[1017] 35 40 45
[1018] Ile Asn Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gly Ala Val
[1019] 50 55 60
[1020] Lys Leu Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser
[1021] 65 70 75 80
[1022] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser
[1023] 85 90 95
[1024] Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn
[1025] 100 105 110
[1026] Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
[1027] 115 120 125
[1028] Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
[1029] 130 135 140
[1030] Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
[1031] 145 150 155 160
[1032] Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
[1033] 165 170 175
[1034] Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
[1035] 180 185 190
[1036] Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
[1037] 195 200 205
[1038] His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
[1039] 210 215 220
[1040] Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[1041] 225 230
[1042] <210> 49
[1043] <211> 702
[1044] <212> DNA
[1045] <213> 人工序列
[1046] <220>
[1047] <223> 人源化抗体
[1048] <220>
[1049] <221> misc_feature

[1050] <223> 编码人源化抗体轻链hL4的核苷酸序列

[1051] <400> 49

[1052] atggtgctgc agacccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcgtacggc 60

[1053] gacatccaga tgacccagag ccctagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 120

[1054] atcacctgta gagccagcca ggacatcaac aactacctga actggtatca gcagaaaccc 180

[1055] ggcggagccg tgaagctgct gatctacttc accagcagac tgcacagcgg cgtgcccagc 240

[1056] agattttctg gcagcggctc cggcaccgac tacaccctga caatcagcag cctgcagccc 300

[1057] gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ggcaacaccc tgccctggac atttggcgga 360

[1058] ggcaccaagg tggaaatcaa gcgtacggtg gccgcccccc ccgtgttcat cttcccccccc 420

[1059] tccgacgagc agctgaagtc cggcaccgcc tccgtggtgt gcctgctgaa taacttctac 480

[1060] cccagagagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagtccgg gaactcccag 540

[1061] gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctgagcag caccctgacc 600

[1062] ctgagcaaag ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc 660

[1063] ctgagctccc ccgtcaccaa gagcttcaac agggggggagt gt 702

[1064] <210> 50

[1065] <211> 107

[1066] <212> PRT

[1067] <213> 人工序列

[1068] <220>

[1069] <223> 人源化抗体

[1070] <220>

[1071] <221> MISC_FEATURE

[1072] <223> 人源化抗体轻链hL4的可变区的氨基酸序列

[1073] <400> 50

[1074] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

[1075] 1 5 10 15

[1076] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr

[1077] 20 25 30

[1078] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gly Ala Val Lys Leu Leu Ile

[1079] 35 40 45

[1080] Tyr Phe Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

[1081] 50 55 60

[1082] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

[1083] 65 70 75 80

[1084] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp

[1085] 85 90 95

[1086] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

[1087] 100 105

[1088] <210> 51

[1089] <211> 321

[1090] <212> DNA

[1091] <213> 人工序列

[1092] <220>
[1093] <223> 人源化抗体
[1094] <220>
[1095] <221> misc_feature
[1096] <223> 编码人源化抗体轻链hL4的可变区的核苷酸序列
[1097] <400> 51
[1098] gacatccaga tgacccagag ccctagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60
[1099] atcacctgta gagccagcca ggacatcaac aactacctga actggtatca gcagaaaccc 120
[1100] ggcggagccg tgaagctgct gatctacttc accagcagac tgcacagcgg cgtgcccagc 180
[1101] agattttctg gcagcggctc cggcaccgac tacaccctga caatcagcag cctgcagccc 240
[1102] gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ggcaacaccc tgccctggac atttggcgga 300
[1103] ggcaccaagg tggaaatcaa g 321
[1104] <210> 52
[1105] <211> 471
[1106] <212> PRT
[1107] <213> 人工序列
[1108] <220>
[1109] <223> 人源化抗体
[1110] <220>
[1111] <221> MISC_FEATURE
[1112] <223> 人源化抗体重链hH1的氨基酸序列
[1113] <400> 52
[1114] Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
[1115] 1 5 10 15
[1116] Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
[1117] 20 25 30
[1118] Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
[1119] 35 40 45
[1120] Thr Glu Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
[1121] 50 55 60
[1122] Glu Trp Met Gly Gly Val Asn Pro Asn Ser Gly Asp Thr Ser Tyr Ala
[1123] 65 70 75 80
[1124] Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser
[1125] 85 90 95
[1126] Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
[1127] 100 105 110
[1128] Tyr Tyr Cys Ala Arg Pro Gly Gly Tyr Asp Val Gly Tyr Tyr Ala Met
[1129] 115 120 125
[1130] Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
[1131] 130 135 140
[1132] Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
[1133] 145 150 155 160

[1134] Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
[1135] 165 170 175
[1136] Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
[1137] 180 185 190
[1138] Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
[1139] 195 200 205
[1140] Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
[1141] 210 215 220
[1142] Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
[1143] 225 230 235 240
[1144] Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
[1145] 245 250 255
[1146] Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
[1147] 260 265 270
[1148] Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
[1149] 275 280 285
[1150] Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
[1151] 290 295 300
[1152] Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
[1153] 305 310 315 320
[1154] Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
[1155] 325 330 335
[1156] Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
[1157] 340 345 350
[1158] Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
[1159] 355 360 365
[1160] Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
[1161] 370 375 380
[1162] Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
[1163] 385 390 395 400
[1164] Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
[1165] 405 410 415
[1166] Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
[1167] 420 425 430
[1168] Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
[1169] 435 440 445
[1170] Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
[1171] 450 455 460
[1172] Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[1173] 465 470
[1174] <210> 53
[1175] <211> 1413

[1176] <212> DNA

[1177] <213> 人工序列

[1178] <220>

[1179] <223> 人源化抗体

[1180] <220>

[1181] <221> misc_feature

[1182] <223> 编码人源化抗体重链hH1的核苷酸序列

[1183] <400> 53

[1184] atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagccag 60

[1185] gtgcagctgg tgcagtctgg cgccgaagtg aagaaaccag gcgccagcgt gaaggtgtcc 120

[1186] tgcaaggcca gcggctacac ctttaccgag tacaccatgc actgggtgcg ccaggctcca 180

[1187] ggccagggac tggaatggat gggcggcgtg aaccccaaca gcggcgatac aagctacgcc 240

[1188] cagaaattcc agggcagagt gaccatcacc gccgacacca gcacctccac cgcctacatg 300

[1189] gaactgagca gcctgcggag cgaggacacc gccgtgtact actgtgctag acctggcggc 360

[1190] tacgacgtgg gctactacgc catggattac tggggccagg gcaccctcgt gaccgtcagc 420

[1191] tcagcctcca ccaagggccc aagcgtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 480

[1192] ggcggcacag ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc cgtgaccgtg 540

[1193] agctggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tccccgctgt cctgcagtcc 600

[1194] tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 660

[1195] acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag 720

[1196] cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccctgcc cagcacctga agccgcgggg 780

[1197] ggaccctcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 840

[1198] cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 900

[1199] tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccccggga ggagcagtac 960

[1200] aacagcacgt accgggtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 1020

[1201] aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag cccccatcga gaaaaccatc 1080

[1202] tccaaagcca aaggccagcc ccgggaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggag 1140

[1203] gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1200

[1204] atcgccgtgg agtgggagag caatggccag cccgagaaca actacaagac cacccctccc 1260

[1205] gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1320

[1206] tggcagcagg gcaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1380

[1207] acccagaaga gcctctccct gtctcccggc aaa 1413

[1208] <210> 54

[1209] <211> 122

[1210] <212> PRT

[1211] <213> 人工序列

[1212] <220>

[1213] <223> 人源化抗体

[1214] <220>

[1215] <221> MISC_FEATURE

[1216] <223> 人源化抗体重链hH1的可变区的氨基酸序列

[1217] <400> 54

[1218] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[1219] 1 5 10 15
[1220] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
[1221] 20 25 30
[1222] Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[1223] 35 40 45
[1224] Gly Gly Val Asn Pro Asn Ser Gly Asp Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
[1225] 50 55 60
[1226] Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[1227] 65 70 75 80
[1228] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1229] 85 90 95
[1230] Ala Arg Pro Gly Gly Tyr Asp Val Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
[1231] 100 105 110
[1232] Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[1233] 115 120
[1234] <210> 55
[1235] <211> 366
[1236] <212> DNA
[1237] <213> 人工序列
[1238] <220>
[1239] <223> 人源化抗体
[1240] <220>
[1241] <221> misc_feature
[1242] <223> 编码人源化抗体重链hH1的可变区的核苷酸序列
[1243] <400> 55
[1244] caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac caggcgccag cgtgaaggtg 60
[1245] tcctgcaagg ccagcggcta cacctttacc gagtacacca tgcactgggt gcgccaggct 120
[1246] ccaggccagg gactggaatg gatgggcggc gtgaacccca acagcggcga tacaagctac 180
[1247] gcccagaaat tccagggcag agtgaccatc accgccgaca ccagcacctc caccgcctac 240
[1248] atggaactga gcagcctgcg gagcgaggac accgccgtgt actactgtgc tagacctggc 300
[1249] ggctacgacg tgggctacta cgccatggat tactggggcc agggcaccct cgtgaccgtc 360
[1250] agctca 366
[1251] <210> 56
[1252] <211> 471
[1253] <212> PRT
[1254] <213> 人工序列
[1255] <220>
[1256] <223> 人源化抗体
[1257] <220>
[1258] <221> MISC_FEATURE
[1259] <223> 人源化抗体重链hH2的氨基酸序列

[1260] <400> 56

[1261] Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
[1262] 1 5 10 15
[1263] Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
[1264] 20 25 30
[1265] Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe
[1266] 35 40 45
[1267] Thr Glu Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Ser Leu
[1268] 50 55 60
[1269] Glu Trp Met Gly Gly Val Asn Pro Asn Ser Gly Asp Thr Ser Tyr Ala
[1270] 65 70 75 80
[1271] Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser
[1272] 85 90 95
[1273] Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
[1274] 100 105 110
[1275] Tyr Tyr Cys Ala Arg Pro Gly Gly Tyr Asp Val Gly Tyr Tyr Ala Met
[1276] 115 120 125
[1277] Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
[1278] 130 135 140
[1279] Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
[1280] 145 150 155 160
[1281] Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
[1282] 165 170 175
[1283] Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
[1284] 180 185 190
[1285] Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
[1286] 195 200 205
[1287] Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
[1288] 210 215 220
[1289] Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
[1290] 225 230 235 240
[1291] Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
[1292] 245 250 255
[1293] Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
[1294] 260 265 270
[1295] Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
[1296] 275 280 285
[1297] Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
[1298] 290 295 300
[1299] Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
[1300] 305 310 315 320
[1301] Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

[1302] 325 330 335
[1303] Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
[1304] 340 345 350
[1305] Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
[1306] 355 360 365
[1307] Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
[1308] 370 375 380
[1309] Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
[1310] 385 390 395 400
[1311] Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
[1312] 405 410 415
[1313] Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
[1314] 420 425 430
[1315] Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
[1316] 435 440 445
[1317] Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
[1318] 450 455 460
[1319] Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[1320] 465 470
[1321] <210> 57
[1322] <211> 1413
[1323] <212> DNA
[1324] <213> 人工序列
[1325] <220>
[1326] <223> 人源化抗体
[1327] <220>
[1328] <221> misc_feature
[1329] <223> 编码人源化抗体重链hH2的核苷酸序列
[1330] <400> 57
[1331] atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagcgaa 60
[1332] gtgcagctgg tgcagtctgg cgccgaagtg aagaaaccag gcgccagcgt gaaggtgtcc 120
[1333] tgcaagacca gcggctacac ctttaccgag tacaccatgc actgggtgcg ccaggcccct 180
[1334] ggcaagagcc tggaatggat gggcggcgtg aaccccaaca gcggcgatac aagctacgcc 240
[1335] cagaaattcc agggcagagt gaccatcacc gccgacacca gcacctccac cgcctacatg 300
[1336] gaactgagca gcctgcggag cgaggacacc gccgtgtact actgtgctag acctggcggc 360
[1337] tacgacgtgg gctactacgc catggattac tggggccagg gcaccctcgt gaccgtcagc 420
[1338] tcagcctcca ccaagggccc aagcgtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 480
[1339] ggcggcacag ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc cgtgaccgtg 540
[1340] agctggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tccccgctgt cctgcagtcc 600
[1341] tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 660
[1342] acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag 720
[1343] cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccctgcc cagcacctga agccgcgggg 780

[1344] ggaccctcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 840
[1345] cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 900
[1346] tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccccggga ggagcagtac 960
[1347] aacagcacgt accgggtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 1020
[1348] aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag cccccatcga gaaaaccatc 1080
[1349] tccaaagcca aaggccagcc ccgggaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggag 1140
[1350] gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1200
[1351] atcgccgtgg agtgggagag caatggccag cccgagaaca actacaagac cacccctccc 1260
[1352] gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1320
[1353] tggcagcagg gcaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1380
[1354] acccagaaga gcctctccct gtctcccggc aaa 1413
[1355] <210> 58
[1356] <211> 122
[1357] <212> PRT
[1358] <213> 人工序列
[1359] <220>
[1360] <223> 人源化抗体
[1361] <220>
[1362] <221> MISC_FEATURE
[1363] <223> 人源化抗体重链hH2的可变区的氨基酸序列
[1364] <400> 58
[1365] Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[1366] 1 5 10 15
[1367] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
[1368] 20 25 30
[1369] Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Ser Leu Glu Trp Met
[1370] 35 40 45
[1371] Gly Gly Val Asn Pro Asn Ser Gly Asp Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
[1372] 50 55 60
[1373] Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[1374] 65 70 75 80
[1375] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1376] 85 90 95
[1377] Ala Arg Pro Gly Gly Tyr Asp Val Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
[1378] 100 105 110
[1379] Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[1380] 115 120
[1381] <210> 59
[1382] <211> 366
[1383] <212> DNA
[1384] <213> 人工序列
[1385] <220>

[1386] <223> 人源化抗体
[1387] <220>
[1388] <221> misc_feature
[1389] <223> 编码人源化抗体重链hH2的可变区的核苷酸序列
[1390] <400> 59
[1391] gaagtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac caggcgccag cgtgaaggtg 60
[1392] tcctgcaaga ccagcggcta cacctttacc gagtacacca tgcactgggt gcgccaggcc 120
[1393] cctggcaaga gcctggaatg gatgggcggc gtgaacccca acagcggcga tacaagctac 180
[1394] gcccagaaat tccagggcag agtgaccatc accgccgaca ccagcacctc caccgcctac 240
[1395] atggaactga gcagcctgcg gagcgaggac accgccgtgt actactgtgc tagacctggc 300
[1396] ggctacgacg tgggctacta cgccatggat tactggggcc agggcaccct cgtgaccgtc 360
[1397] agctca 366
[1398] <210> 60
[1399] <211> 471
[1400] <212> PRT
[1401] <213> 人工序列
[1402] <220>
[1403] <223> 人源化抗体
[1404] <220>
[1405] <221> MISC_FEATURE
[1406] <223> 人源化抗体重链hH3的氨基酸序列
[1407] <400> 60
[1408] Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
[1409] 1 5 10 15
[1410] Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
[1411] 20 25 30
[1412] Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe
[1413] 35 40 45
[1414] Thr Glu Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
[1415] 50 55 60
[1416] Glu Trp Met Gly Gly Val Asn Pro Asn Ser Gly Asp Thr Ser Tyr Ala
[1417] 65 70 75 80
[1418] Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser
[1419] 85 90 95
[1420] Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
[1421] 100 105 110
[1422] Tyr Tyr Cys Ala Arg Pro Gly Gly Tyr Asp Val Gly Tyr Tyr Ala Met
[1423] 115 120 125
[1424] Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
[1425] 130 135 140
[1426] Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
[1427] 145 150 155 160

[1428] Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
[1429] 165 170 175
[1430] Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
[1431] 180 185 190
[1432] Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
[1433] 195 200 205
[1434] Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
[1435] 210 215 220
[1436] Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
[1437] 225 230 235 240
[1438] Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
[1439] 245 250 255
[1440] Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
[1441] 260 265 270
[1442] Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
[1443] 275 280 285
[1444] Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
[1445] 290 295 300
[1446] Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
[1447] 305 310 315 320
[1448] Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
[1449] 325 330 335
[1450] Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
[1451] 340 345 350
[1452] Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
[1453] 355 360 365
[1454] Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
[1455] 370 375 380
[1456] Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
[1457] 385 390 395 400
[1458] Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
[1459] 405 410 415
[1460] Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
[1461] 420 425 430
[1462] Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
[1463] 435 440 445
[1464] Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
[1465] 450 455 460
[1466] Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[1467] 465 470
[1468] <210> 61
[1469] <211> 1413

[1470] <212> DNA
[1471] <213> 人工序列
[1472] <220>
[1473] <223> 人源化抗体
[1474] <220>
[1475] <221> misc_feature
[1476] <223> 编码人源化抗体重链hH3的核苷酸序列
[1477] <400> 61
[1478] atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagcgaa 60
[1479] gtgcagctgg tgcagtctgg cgccgaagtg aagaaaccag gcgccagcgt gaaggtgtcc 120
[1480] tgcaagacca gcggctacac ctttaccgag tacaccatgc actgggtgcg ccaggctcca 180
[1481] ggccagggac tggaatggat gggcggcgtg aaccccaaca gcggcgatac aagctacgcc 240
[1482] cagaaattcc agggcagagt gaccctgacc gtggacaaga gcaccagcac cgcctacatg 300
[1483] gaactgagca gcctgcggag cgaggacacc gccgtgtact actgtgctag acctggcggc 360
[1484] tacgacgtgg gctactacgc catggattac tggggccagg gcaccctcgt gaccgtcagc 420
[1485] tcagcctcca ccaagggccc aagcgtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 480
[1486] ggcggcacag ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc cgtgaccgtg 540
[1487] agctggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tccccgctgt cctgcagtcc 600
[1488] tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 660
[1489] acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag 720
[1490] cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccctgcc cagcacctga agccgcgggg 780
[1491] ggaccctcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 840
[1492] cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 900
[1493] tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccccggga ggagcagtac 960
[1494] aacagcacgt accgggtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 1020
[1495] aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag cccccatcga gaaaaccatc 1080
[1496] tccaaagcca aaggccagcc ccgggaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggag 1140
[1497] gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1200
[1498] atcgccgtgg agtgggagag caatggccag cccgagaaca actacaagac cacccctccc 1260
[1499] gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1320
[1500] tggcagcagg gcaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1380
[1501] acccagaaga gcctctccct gtctcccggc aaa 1413
[1502] <210> 62
[1503] <211> 122
[1504] <212> PRT
[1505] <213> 人工序列
[1506] <220>
[1507] <223> 人源化抗体
[1508] <220>
[1509] <221> MISC_FEATURE
[1510] <223> 人源化抗体重链hH3的可变区的氨基酸序列
[1511] <400> 62

[1512] Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[1513] 1 5 10 15
[1514] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
[1515] 20 25 30
[1516] Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[1517] 35 40 45
[1518] Gly Gly Val Asn Pro Asn Ser Gly Asp Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
[1519] 50 55 60
[1520] Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[1521] 65 70 75 80
[1522] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1523] 85 90 95
[1524] Ala Arg Pro Gly Gly Tyr Asp Val Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
[1525] 100 105 110
[1526] Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[1527] 115 120
[1528] <210> 63
[1529] <211> 366
[1530] <212> DNA
[1531] <213> 人工序列
[1532] <220>
[1533] <223> 人源化抗体
[1534] <220>
[1535] <221> misc_feature
[1536] <223> 编码人源化抗体重链hH3的可变区的核苷酸序列
[1537] <400> 63
[1538] gaagtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac caggcgccag cgtgaaggtg 60
[1539] tcctgcaaga ccagcggcta cacctttacc gagtacacca tgcactgggt gcgccaggct 120
[1540] ccaggccagg gactggaatg gatgggcggc gtgaacccca acagcggcga tacaagctac 180
[1541] gcccagaaat tccagggcag agtgaccctg accgtggaca agagcaccag caccgcctac 240
[1542] atggaactga gcagcctgcg gagcgaggac accgccgtgt actactgtgc tagacctggc 300
[1543] ggctacgacg tgggctacta cgccatggat tactggggcc agggcaccct cgtgaccgtc 360
[1544] agctca 366
[1545] <210> 64
[1546] <211> 214
[1547] <212> PRT
[1548] <213> 人工序列
[1549] <220>
[1550] <223> 人源化抗体
[1551] <220>
[1552] <221> MISC_FEATURE
[1553] <223> 曲妥珠单抗轻链的氨基酸序列

[1554] <400> 64

[1555] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

[1556] 1 5 10 15

[1557] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala

[1558] 20 25 30

[1559] Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

[1560] 35 40 45

[1561] Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

[1562] 50 55 60

[1563] Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

[1564] 65 70 75 80

[1565] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro

[1566] 85 90 95

[1567] Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

[1568] 100 105 110

[1569] Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

[1570] 115 120 125

[1571] Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

[1572] 130 135 140

[1573] Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

[1574] 145 150 155 160

[1575] Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

[1576] 165 170 175

[1577] Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

[1578] 180 185 190

[1579] Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

[1580] 195 200 205

[1581] Phe Asn Arg Gly Glu Cys

[1582] 210

[1583] <210> 65

[1584] <211> 450

[1585] <212> PRT

[1586] <213> 人工序列

[1587] <220>

[1588] <223> 人源化抗体

[1589] <220>

[1590] <221> MISC_FEATURE

[1591] <223> 曲妥珠单抗重链的氨基酸序列

[1592] <400> 65

[1593] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[1594] 1 5 10 15

[1595] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

[1596] 20 25 30
[1597] Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[1598] 35 40 45
[1599] Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
[1600] 50 55 60
[1601] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
[1602] 65 70 75 80
[1603] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1604] 85 90 95
[1605] Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
[1606] 100 105 110
[1607] Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
[1608] 115 120 125
[1609] Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
[1610] 130 135 140
[1611] Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
[1612] 145 150 155 160
[1613] Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
[1614] 165 170 175
[1615] Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
[1616] 180 185 190
[1617] Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
[1618] 195 200 205
[1619] Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
[1620] 210 215 220
[1621] Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
[1622] 225 230 235 240
[1623] Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
[1624] 245 250 255
[1625] Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
[1626] 260 265 270
[1627] Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
[1628] 275 280 285
[1629] Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
[1630] 290 295 300
[1631] Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
[1632] 305 310 315 320
[1633] Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
[1634] 325 330 335
[1635] Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
[1636] 340 345 350
[1637] Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

[1638] 355 360 365
[1639] Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
[1640] 370 375 380
[1641] Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
[1642] 385 390 395 400
[1643] Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
[1644] 405 410 415
[1645] Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
[1646] 420 425 430
[1647] Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
[1648] 435 440 445
[1649] Gly Lys
[1650] 450
[1651] <210> 66
[1652] <211> 234
[1653] <212> PRT
[1654] <213> 人工序列
[1655] <220>
[1656] <223> 人源化抗体
[1657] <220>
[1658] <221> MISC_FEATURE
[1659] <223> 抗LPS抗体(h#1G5-H1L1)轻链的氨基酸序列
[1660] <400> 66
[1661] Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
[1662] 1 5 10 15
[1663] Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala
[1664] 20 25 30
[1665] Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Glu Asn
[1666] 35 40 45
[1667] Val Gly Asn Ser Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
[1668] 50 55 60
[1669] Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp
[1670] 65 70 75 80
[1671] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
[1672] 85 90 95
[1673] Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Gln Ser Tyr
[1674] 100 105 110
[1675] Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
[1676] 115 120 125
[1677] Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
[1678] 130 135 140
[1679] Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr

[1680] 145 150 155 160
[1681] Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
[1682] 165 170 175
[1683] Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
[1684] 180 185 190
[1685] Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
[1686] 195 200 205
[1687] His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
[1688] 210 215 220
[1689] Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[1690] 225 230
[1691] <210> 67
[1692] <211> 474
[1693] <212> PRT
[1694] <213> 人工序列
[1695] <220>
[1696] <223> 人源化抗体
[1697] <220>
[1698] <221> MISC_FEATURE
[1699] <223> 抗LPS抗体(h#1G5-H1L1)重链的氨基酸序列
[1700] <400> 67
[1701] Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
[1702] 1 5 10 15
[1703] Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
[1704] 20 25 30
[1705] Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
[1706] 35 40 45
[1707] Thr Ser Tyr Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
[1708] 50 55 60
[1709] Glu Trp Met Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Ser Ser Ser Ile Asn Tyr Asn
[1710] 65 70 75 80
[1711] Glu Lys Phe Lys Ser Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser
[1712] 85 90 95
[1713] Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
[1714] 100 105 110
[1715] Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Ile Tyr Asn Tyr Gly Ser Ser Gly Tyr Asn
[1716] 115 120 125
[1717] Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[1718] 130 135 140
[1719] Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
[1720] 145 150 155 160
[1721] Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

[1722] 165 170 175
[1723] Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
[1724] 180 185 190
[1725] Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
[1726] 195 200 205
[1727] Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
[1728] 210 215 220
[1729] Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
[1730] 225 230 235 240
[1731] Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
[1732] 245 250 255
[1733] Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
[1734] 260 265 270
[1735] Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
[1736] 275 280 285
[1737] Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
[1738] 290 295 300
[1739] Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
[1740] 305 310 315 320
[1741] Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
[1742] 325 330 335
[1743] His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
[1744] 340 345 350
[1745] Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
[1746] 355 360 365
[1747] Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
[1748] 370 375 380
[1749] Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
[1750] 385 390 395 400
[1751] Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
[1752] 405 410 415
[1753] Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
[1754] 420 425 430
[1755] Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
[1756] 435 440 445
[1757] Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
[1758] 450 455 460
[1759] Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[1760] 465 470
[1761] <210> 68
[1762] <211> 234
[1763] <212> PRT

[1764] <213> 人工序列
[1765] <220>
[1766] <223> 人源化抗体
[1767] <220>
[1768] <221> MISC_FEATURE
[1769] <223> 抗TROP2抗体(hRS7)轻链的氨基酸序列
[1770] <400> 68
[1771] Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
[1772] 1 5 10 15
[1773] Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
[1774] 20 25 30
[1775] Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
[1776] 35 40 45
[1777] Val Ser Ile Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
[1778] 50 55 60
[1779] Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp
[1780] 65 70 75 80
[1781] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
[1782] 85 90 95
[1783] Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr
[1784] 100 105 110
[1785] Ile Thr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
[1786] 115 120 125
[1787] Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
[1788] 130 135 140
[1789] Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
[1790] 145 150 155 160
[1791] Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
[1792] 165 170 175
[1793] Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
[1794] 180 185 190
[1795] Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
[1796] 195 200 205
[1797] His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
[1798] 210 215 220
[1799] Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[1800] 225 230
[1801] <210> 69
[1802] <211> 470
[1803] <212> PRT
[1804] <213> 人工序列
[1805] <220>

[1806] <223> 人源化抗体

[1807] <220>

[1808] <221> MISC_FEATURE

[1809] <223> 抗TROP2抗体(hRS7)重链的氨基酸序列

[1810] <400> 69

[1811] Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp

[1812] 1 5 10 15

[1813] Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys

[1814] 20 25 30

[1815] Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

[1816] 35 40 45

[1817] Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

[1818] 50 55 60

[1819] Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr

[1820] 65 70 75 80

[1821] Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser

[1822] 85 90 95

[1823] Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val

[1824] 100 105 110

[1825] Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp

[1826] 115 120 125

[1827] Val Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys

[1828] 130 135 140

[1829] Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly

[1830] 145 150 155 160

[1831] Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro

[1832] 165 170 175

[1833] Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr

[1834] 180 185 190

[1835] Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val

[1836] 195 200 205

[1837] Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn

[1838] 210 215 220

[1839] Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro

[1840] 225 230 235 240

[1841] Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu

[1842] 245 250 255

[1843] Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

[1844] 260 265 270

[1845] Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp

[1846] 275 280 285

[1847] Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly

[1848] 290 295 300
[1849] Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
[1850] 305 310 315 320
[1851] Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
[1852] 325 330 335
[1853] Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
[1854] 340 345 350
[1855] Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
[1856] 355 360 365
[1857] Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
[1858] 370 375 380
[1859] Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
[1860] 385 390 395 400
[1861] Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
[1862] 405 410 415
[1863] Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
[1864] 420 425 430
[1865] Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
[1866] 435 440 445
[1867] Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
[1868] 450 455 460
[1869] Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[1870] 465 470
[1871] <210> 70
[1872] <211> 240
[1873] <212> PRT
[1874] <213> 人工序列
[1875] <220>
[1876] <223> 人源化抗体
[1877] <220>
[1878] <221> MISC_FEATURE
[1879] <223> 抗CD98抗体(hM23-H1L1)轻链的氨基酸序列
[1880] <400> 70
[1881] Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
[1882] 1 5 10 15
[1883] Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala
[1884] 20 25 30
[1885] Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser
[1886] 35 40 45
[1887] Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
[1888] 50 55 60
[1889] Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg

[1890] 65 70 75 80
[1891] Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
[1892] 85 90 95
[1893] Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr
[1894] 100 105 110
[1895] Tyr Cys Gln Arg Tyr Tyr Gly Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr
[1896] 115 120 125
[1897] Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
[1898] 130 135 140
[1899] Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
[1900] 145 150 155 160
[1901] Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
[1902] 165 170 175
[1903] Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
[1904] 180 185 190
[1905] Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
[1906] 195 200 205
[1907] Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
[1908] 210 215 220
[1909] Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[1910] 225 230 235 240
[1911] <210> 71
[1912] <211> 465
[1913] <212> PRT
[1914] <213> 人工序列
[1915] <220>
[1916] <223> 人源化抗体
[1917] <220>
[1918] <221> MISC_FEATURE
[1919] <223> 抗CD98抗体(hM23-H1L1)重链的氨基酸序列
[1920] <400> 71
[1921] Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
[1922] 1 5 10 15
[1923] Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
[1924] 20 25 30
[1925] Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe
[1926] 35 40 45
[1927] Ser Asn Tyr Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
[1928] 50 55 60
[1929] Glu Trp Met Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Val Thr Asn Tyr Asn
[1930] 65 70 75 80
[1931] Glu Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser

[1932] 85 90 95
[1933] Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
[1934] 100 105 110
[1935] Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Glu Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
[1936] 115 120 125
[1937] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
[1938] 130 135 140
[1939] Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
[1940] 145 150 155 160
[1941] Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
[1942] 165 170 175
[1943] Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
[1944] 180 185 190
[1945] Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
[1946] 195 200 205
[1947] Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
[1948] 210 215 220
[1949] Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
[1950] 225 230 235 240
[1951] Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
[1952] 245 250 255
[1953] Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
[1954] 260 265 270
[1955] Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
[1956] 275 280 285
[1957] Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
[1958] 290 295 300
[1959] Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
[1960] 305 310 315 320
[1961] Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
[1962] 325 330 335
[1963] Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
[1964] 340 345 350
[1965] Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
[1966] 355 360 365
[1967] Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
[1968] 370 375 380
[1969] Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
[1970] 385 390 395 400
[1971] Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
[1972] 405 410 415
[1973] Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys

[1974] 420 425 430

[1975] Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

[1976] 435 440 445

[1977] Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

[1978] 450 455 460

[1979] Lys

[1980] 465

[1981] <210> 72

[1982] <211> 702

[1983] <212> DNA

[1984] <213> 人工序列

[1985] <220>

[1986] <223> 人源化抗体

[1987] <220>

[1988] <221> misc_feature

[1989] <223> 编码曲妥珠单抗突变体轻链的核苷酸序列

[1990] <400> 72

[1991] atggtgctgc agacccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcgtacggc 60

[1992] gacatccaga tgacacagag ccctagcagc ctgtctgcca gcgtgggaga cagagtgacc 120

[1993] atcacctgta gagccagcca ggacgtgaac acagccgtgg cttggtatca gcagaagcct 180

[1994] ggcaaggccc ctaagctgct gatctacagc gccagctttc tgtacagcgg cgtgcccagc 240

[1995] agattcagcg gctctagaag cggcaccgac ttcaccctga ccataagcag tctgcagccc 300

[1996] gaggacttcg ccacctacta ctgtcagcag cactacacca cacctccaac ctttggccag 360

[1997] ggcaccaagg tggaaatcaa gcgtacggtg gccgcccccc ccgtgttcat cttcccccccc 420

[1998] tccgacgagc agctgaagtc cggcaccgcc tccgtggtgt gcctgctgaa taacttctac 480

[1999] cccagagagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagtccgg gaactcccag 540

[2000] gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctgagcag caccctgacc 600

[2001] ctgagcaaag ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc 660

[2002] ctgagctccc ccgtcaccaa gagcttcaac agggggggagt gt 702

[2003] <210> 73

[2004] <211> 234

[2005] <212> PRT

[2006] <213> 人工序列

[2007] <220>

[2008] <223> 人源化抗体

[2009] <220>

[2010] <221> MISC_FEATURE

[2011] <223> 曲妥珠单抗突变体轻链的氨基酸序列

[2012] <400> 73

[2013] Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser

[2014] 1 5 10 15

[2015] Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser

[2016] 20 25 30
[2017] Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp
[2018] 35 40 45
[2019] Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
[2020] 50 55 60
[2021] Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
[2022] 65 70 75 80
[2023] Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
[2024] 85 90 95
[2025] Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr
[2026] 100 105 110
[2027] Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
[2028] 115 120 125
[2029] Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
[2030] 130 135 140
[2031] Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
[2032] 145 150 155 160
[2033] Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
[2034] 165 170 175
[2035] Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
[2036] 180 185 190
[2037] Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
[2038] 195 200 205
[2039] His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
[2040] 210 215 220
[2041] Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[2042] 225 230
[2043] <210> 74
[2044] <211> 1407
[2045] <212> DNA
[2046] <213> 人工序列
[2047] <220>
[2048] <223> 人源化抗体
[2049] <220>
[2050] <221> misc_feature
[2051] <223> 编码曲妥珠单抗突变体重链的核苷酸序列
[2052] <400> 74
[2053] atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagcgag 60
[2054] gtgcagctgg ttgaatctgg cggaggactg gttcagcctg gcggatctct gagactgtct 120
[2055] tgtgccgcca gcggcttcaa catcaaggac acctacatcc actgggtccg acaggcccct 180
[2056] ggcaaaggac ttgaatgggt cgccagaatc taccccacca acggctacac cagatacgcc 240
[2057] gactctgtga agggcagatt caccatcagc gccgacacca gcaagaacac cgcctacctg 300

[2058] cagatgaaca gcctgagagc cgaggacacc gccgtgtact actgttctag atggggaggc 360
[2059] gacggcttct acgccatgga ttattggggc cagggcaccc tggttaccgt tagctcagcc 420
[2060] tccaccaagg gcccaagcgt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctggcggc 480
[2061] acagccgccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aacccgtgac cgtgagctgg 540
[2062] aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctgca gtcctcagga 600
[2063] ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 660
[2064] atctgcaacg tgaatcacaa gcccagcaac accaaggtgg acaagagagt tgagcccaaa 720
[2065] tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccc tgcccagcac ctgaagccgc gggggggaccc 780
[2066] tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 840
[2067] gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 900
[2068] gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagcccc gggaggagca gtacaacagc 960
[2069] acgtaccggg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 1020
[2070] tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 1080
[2071] gccaaaggcc agccccggga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 1140
[2072] accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1200
[2073] gtggagtggg agagcaatgg ccagcccgag aacaactaca agaccacccc tcccgtgctg 1260
[2074] gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1320
[2075] cagggcaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacccag 1380
[2076] aagagcctct ccctgtctcc cggcaaa 1407
[2077] <210> 75
[2078] <211> 469
[2079] <212> PRT
[2080] <213> 人工序列
[2081] <220>
[2082] <223> 人源化抗体
[2083] <220>
[2084] <221> MISC_FEATURE
[2085] <223> 曲妥珠单抗突变体重链的氨基酸序列
[2086] <400> 75
[2087] Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
[2088] 1 5 10 15
[2089] Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
[2090] 20 25 30
[2091] Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile
[2092] 35 40 45
[2093] Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
[2094] 50 55 60
[2095] Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala
[2096] 65 70 75 80
[2097] Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn
[2098] 85 90 95
[2099] Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val

[2100] 100 105 110
[2101] Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr
[2102] 115 120 125
[2103] Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
[2104] 130 135 140
[2105] Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
[2106] 145 150 155 160
[2107] Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
[2108] 165 170 175
[2109] Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
[2110] 180 185 190
[2111] Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
[2112] 195 200 205
[2113] Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
[2114] 210 215 220
[2115] Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
[2116] 225 230 235 240
[2117] Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
[2118] 245 250 255
[2119] Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
[2120] 260 265 270
[2121] Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
[2122] 275 280 285
[2123] Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
[2124] 290 295 300
[2125] Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
[2126] 305 310 315 320
[2127] Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
[2128] 325 330 335
[2129] Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
[2130] 340 345 350
[2131] Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
[2132] 355 360 365
[2133] Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
[2134] 370 375 380
[2135] Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
[2136] 385 390 395 400
[2137] Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
[2138] 405 410 415
[2139] Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
[2140] 420 425 430
[2141] Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser

[2142] 435 440 445

[2143] Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser

[2144] 450 455 460

[2145] Leu Ser Pro Gly Lys

[2146] 465

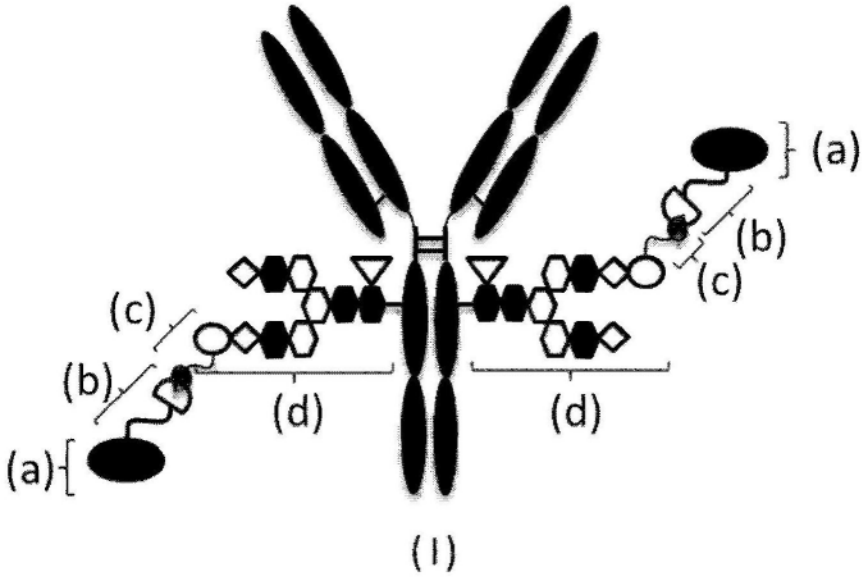


图1

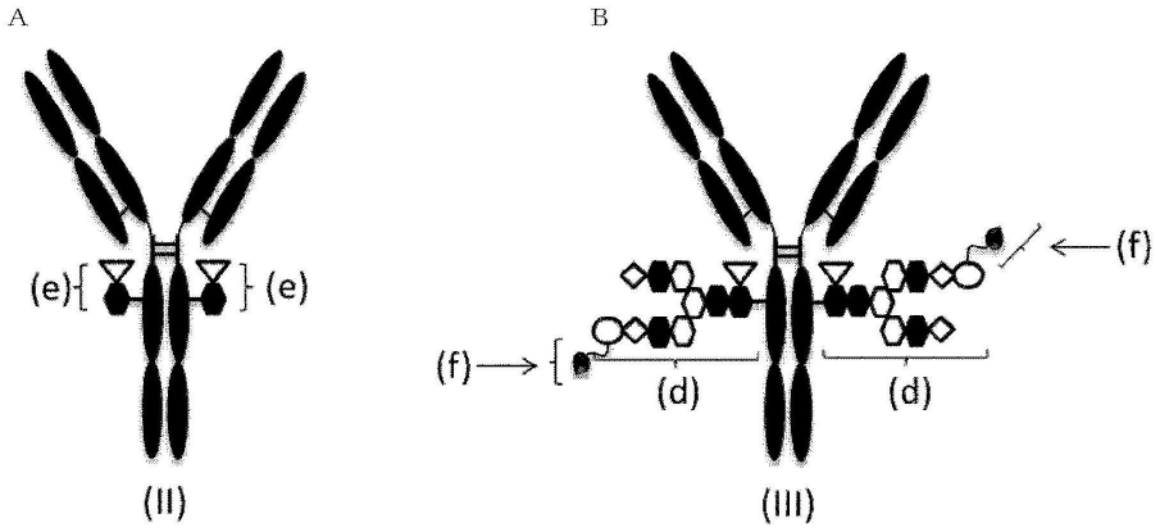


图2

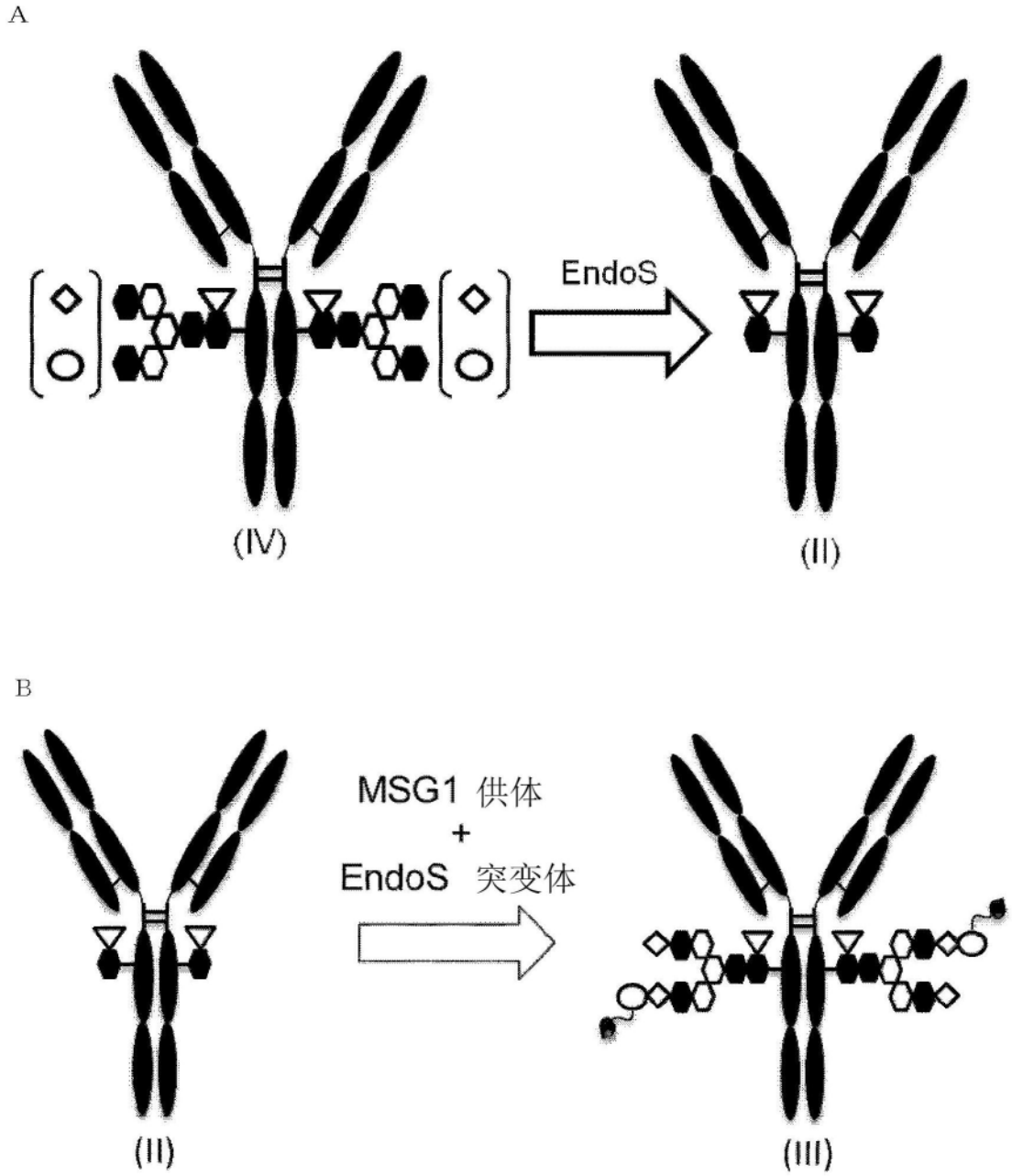


图3

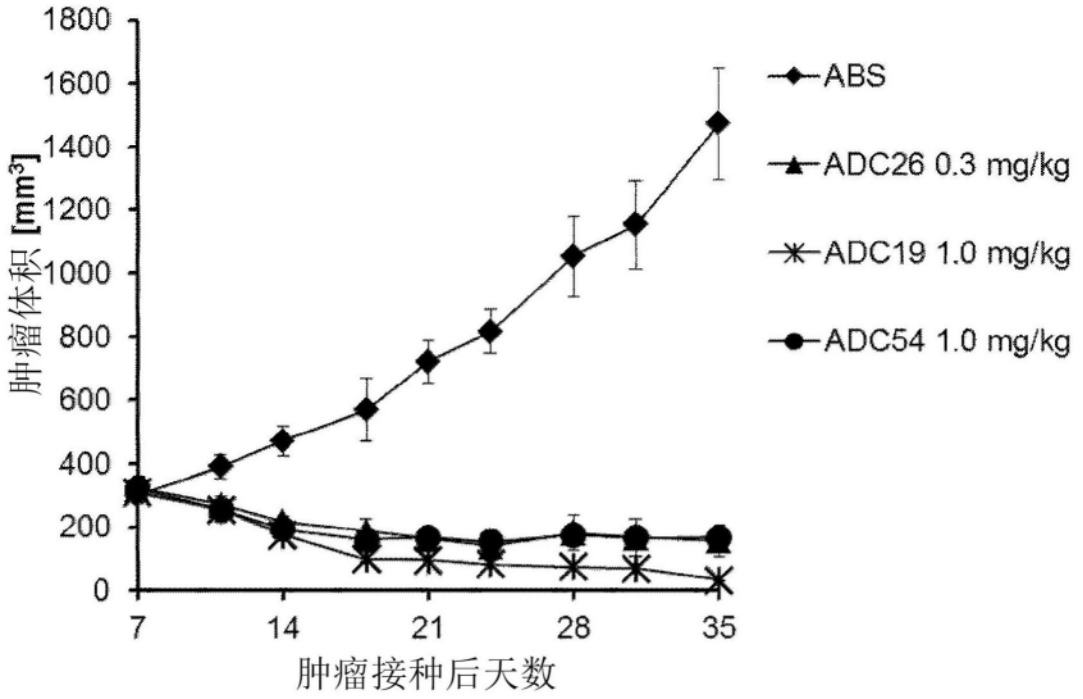

1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
肿瘤体积 [mm³]
7
14
21
28
35
肿瘤接种后天数
ABS
ADC26 0.3 mg/kg
ADC19 1.0 mg/kg
ADC54 1.0 mg/kg

图4

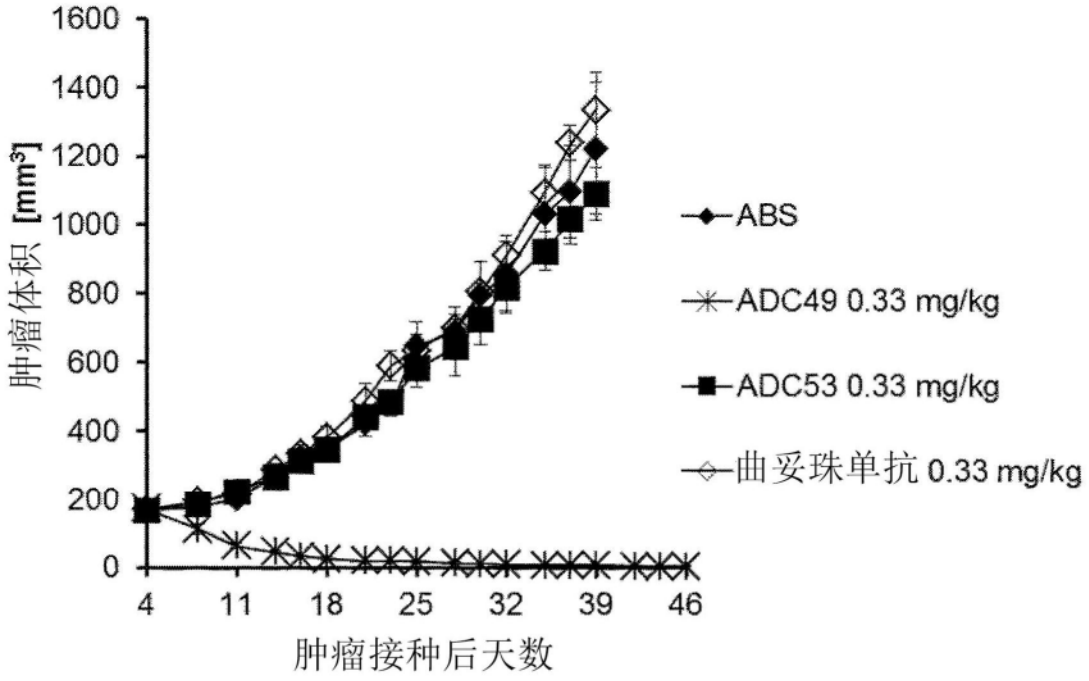

1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
肿瘤体积 [mm³]
4
11
18
25
32
39
46
肿瘤接种后天数
ABS
ADC49 0.33 mg/kg
ADC53 0.33 mg/kg
曲妥珠单抗 0.33 mg/kg

图5

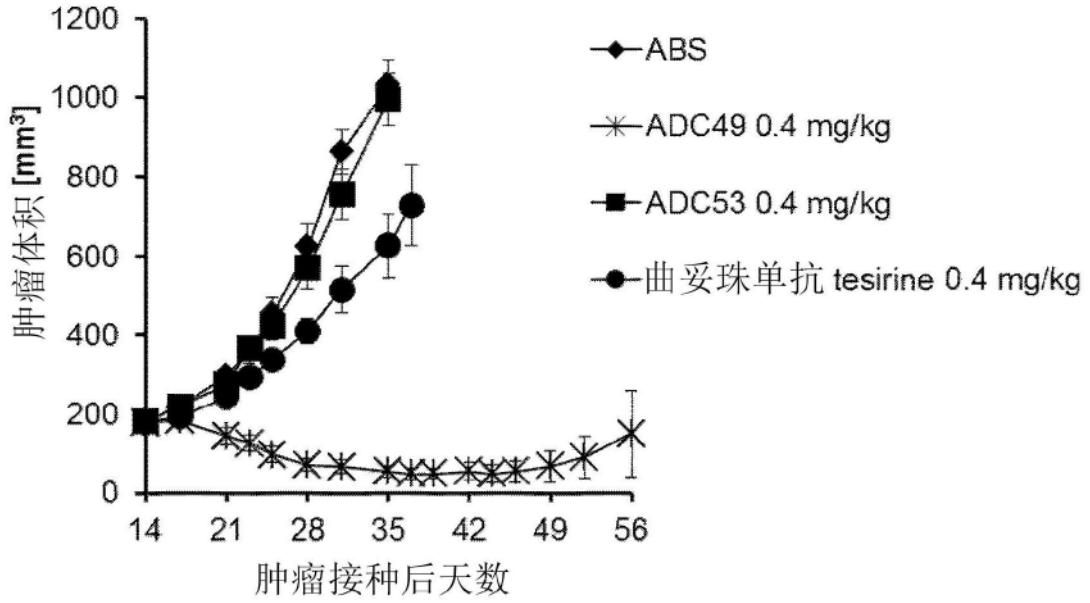

1200
1000
800
600
400
200
0
肿瘤体积 [mm³]
14 21 28 35 42 49 56
肿瘤接种后天数
ABS
ADC49 0.4 mg/kg
ADC53 0.4 mg/kg
曲妥珠单抗 tesirine 0.4 mg/kg

图6

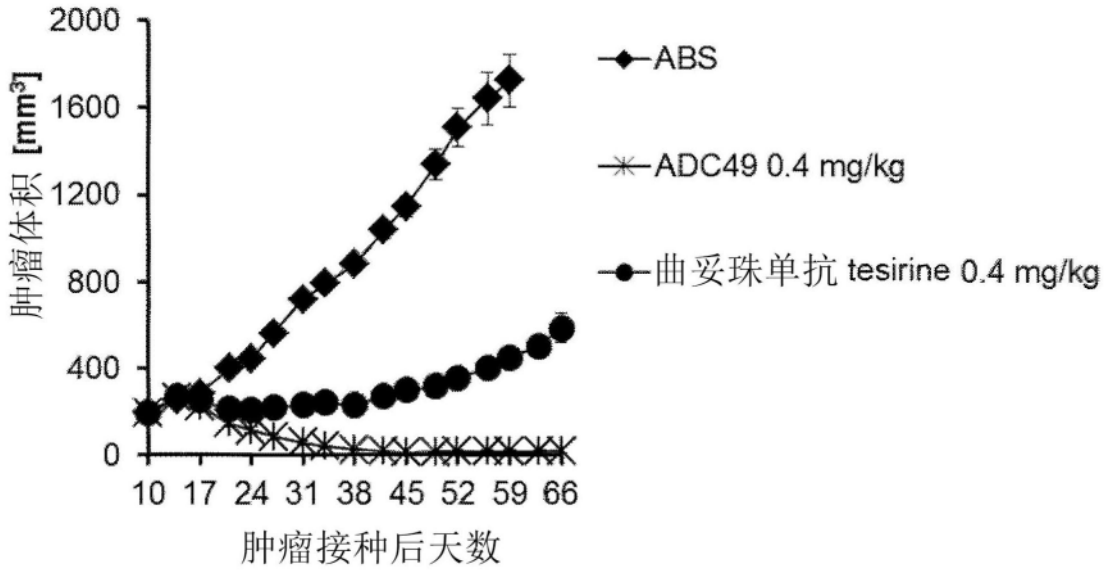

2000
1600
1200
800
400
0
肿瘤体积 [mm³]
10 17 24 31 38 45 52 59 66
肿瘤接种后天数
ABS
ADC49 0.4 mg/kg
曲妥珠单抗 tesirine 0.4 mg/kg

图7

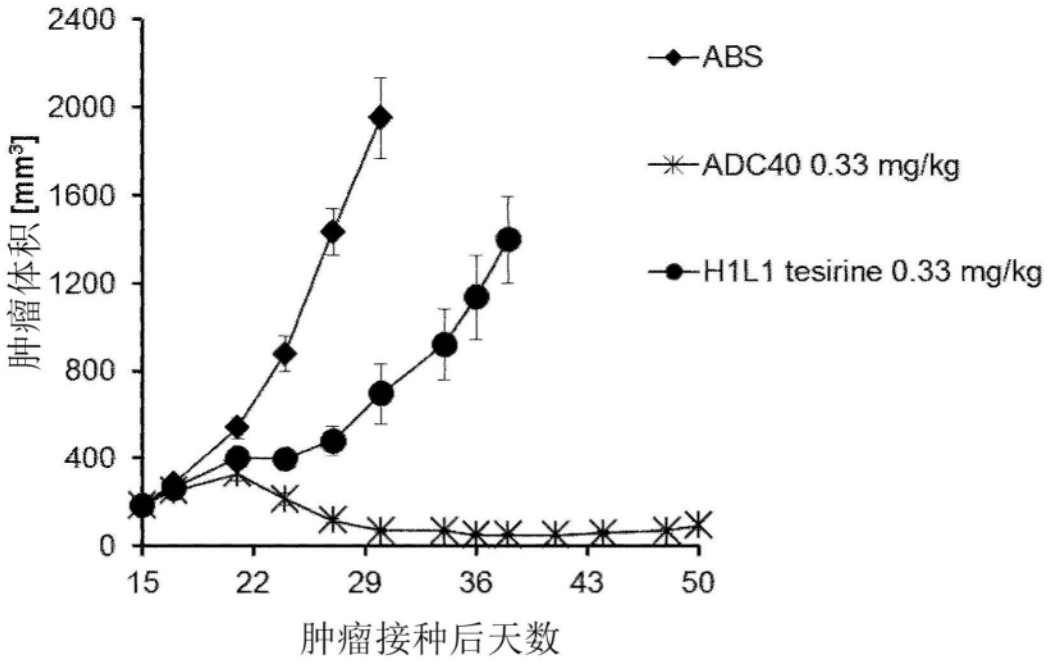

2400
2000
1600
1200
800
400
0
肿瘤体积 [mm³]
15
22
29
36
43
50
肿瘤接种后天数
ABS
ADC40 0.33 mg/kg
H1L1 tesirine 0.33 mg/kg

图8

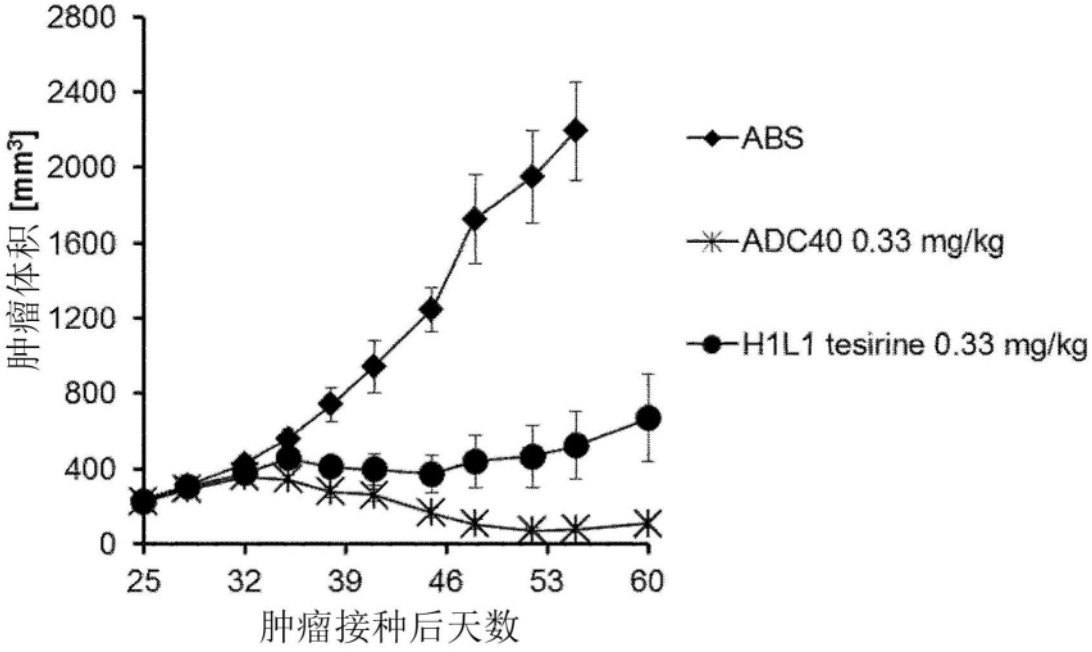

2800
2400
2000
1600
1200
800
400
0
肿瘤体积 [mm³]
25
32
39
46
53
60
肿瘤接种后天数
ABS
ADC40 0.33 mg/kg
H1L1 tesirine 0.33 mg/kg

图9

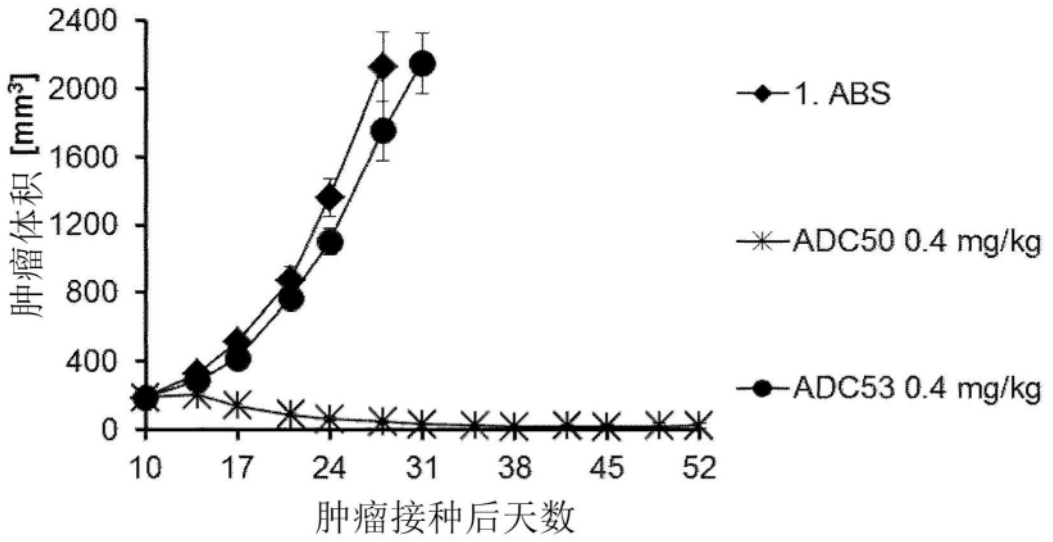


图10

人CLDN6的全长氨基酸序列（序列号1）

MASAGMQILGVVLTLLGWVNGLVSCALPMWKVTAFIGNSIVVAQVVWEGLWMSCVVQSTGQMQCKVYDSL
LALPQDLQAARALCVIALLVALFGLLVYLAGAKCTTCVEEKDSKARLVLTSGIVFVISGVLTLIPVCWTA
HAIIRDFYNPLVAEAQKRELGASLYLGWAASGLLLLGGGLLCCTCPSGGSQGPSHYMARYSTSAPAISRG
PSEYPTKNYV

人CLDN6的全长cDNA的碱基序列（序列号2）

atggcctctgccggaatgcagatcctgggagtcgtcctgacactgctgggctgggtgaatggcctggtct
cctgtgccctgcccatgtggaaggtgaccgctttcatcggcaacagcatcgtggtggcccaggtggtgtg
ggagggcctgtggatgtcctgcgtggtgcagagcaccggccagatgcagtgcaaggtgtacgactcactg
ctggcgctgccacaggacctgcaggctgcacgtgccctctgtgtcatcgccctccttgtggccctgttcg
gcttgctggtctaccttgctggggccaagtgtaccacctgtgtggaggagaaggattccaaggcccgcct
ggtgctcacctctgggattgtctttgtcatctcaggggtcctgacgctaatccccgtgtgctggacggcg
catgccatcatccgggacttctataacccccctggtggctgaggcccaaaagcgggagctgggggcctccc
tctacttgggctgggcggcctcaggcttttgttgctgggtgggggttgctgtgctgcacttgcccctc
gggggggtcccagggccccagccattacatggcccgctactcaacatctgcccctgccatctctcggggg
ccctctgagtaccctaccaagaattacgtctga

图11

人CLDN9的全长氨基酸序列（序列号3）

MASTGLELLGMTLAVLGWLGTLVSCALPLWKVTAFIGNSIVVAQVVWEGLWMSCVVQSTGQMQCKVY
DSLLALPQDLQAARALCVIALLLALLGLLVAITGAQCTTCVEDEGAKARIVLTAGVILLLAGILVLI
PVCWTAHAIIQDFYNPLVAEALKRELGASLYLGWAAAAALLMLGGGLLCCTCPPPQVERPRGPRLGYS
IPSRSGASGLDKRDYV

人CLDN9的全长cDNA的碱基序列（序列号4）

atggcttcgaccggcttagaactgctgggcatgaccctggctgtgctgggctggctggggaccctgg
tgtcctgcgccctgcccctgtggaaggtgaccgccttcatcggcaacagcatcgtggtggcccaggt
ggtgtgggagggcctgtggatgtcctgcgtggtgcagagcacgggccagatgcagtgcaaggtgtac
gactcactgctggctctgccgcaggacctgcaggccgcacgtgccctctgtgtcattgccctcctgc
tggccctgcttggcctcctggtggccatcacaggtgcccagtgtaccacgtgtgtggaggacgaagg
tgccaaggcccgtatcgtgctcaccgcgggggtcatcctcctcctcgccggcatcctggtgctcatc
cctgtgtgctggacggcgcacgccatcatccaggacttctacaaccccctggtggctgaggccctca
agcgggagctgggggcctccctctacctgggctgggcggcggctgcactgcttatgctgggcgggggg
gctcctctgctgcacgtgcccccgccccaggtcgagcggccccgcggacctcggctgggctactcc
atcccctcccgctcgggtgcatctggactggacaagagggactacgtgtga

图12

B1抗体轻链的CDRL1的氨基酸序列（序列号5）

RASQDINNYLN

B1抗体轻链的CDRL2的氨基酸序列（序列号6）

FTSRLHS

B1抗体轻链的CDRL3的氨基酸序列（序列号7）

QQGYPLPWT

图13

人源化B1抗体轻链L4的CDRL3的氨基酸序列（序列号8）

QQGNTLPWT

图14

B1抗体重链的CDRH1的氨基酸序列（序列号9）

GYTFTEYTMH

B1抗体重链的CDRH2的氨基酸序列（序列号10）

GVNPNSGDTS

B1抗体重链的CDRH3的氨基酸序列（序列号11）

PGGYDVGYYAMDY

图15

C7抗体轻链的CDRL1的氨基酸序列（序列号12）

RASQDINNYLN

C7抗体轻链的CDRL2的氨基酸序列（序列号13）

STSRLHS

C7抗体轻链的CDRL3的氨基酸序列（序列号14）

QQGYPLPWT

图16

C7抗体重链的CDRH1的氨基酸序列（序列号15）

GYTFTEYTMH

C7抗体重链的CDRH2的氨基酸序列（序列号16）

GVNPNSGDTS

C7抗体重链的CDRH3的氨基酸序列（序列号17）

PGGYDVGYYAMDY

图17

编码B1抗体轻链的可变区的cDNA的核苷酸序列（序列号18）

GATATCCAGATGACACAGACTGCATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTTGGAGACAGAGTCACCATCAGTT
GCAGGGCAAGTCAGGACATTAACAATTATTTAAACTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACTGTTAA
ACTCCTGATCTACTTCACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCT
GGAACACATTATTCTCTCACCATTACTAACCTGGAACAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAAC
AGGGTTATCCGCTTCCGTGGACGTTCGGTGGAGGCACCAAACTGGAAATCAAA

B1抗体轻链的可变区的氨基酸序列（序列号19）

DIQMTQTASSLSASLGDRVTISCRASQDINNYLNWYQQKPDGTVKLLIYFTSRLHSGVPSRFSGSGS
GTHYSLTITNLEQEDIATYFCQQGYPLPWTFGGGTKLEIK

图18

编码B1抗体重链的可变区的cDNA的核苷酸序列（序列号20）

GAGGTCCAGCTTCAACAGTCTGGACCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCA
AGACTTCTGGATACACATTCACTGAATACACCATGCACTGGGTGCAGCAGAGCCATGGAAAGAGCCT
TGAGTGGATTGGAGGTGTTAATCCTAATAGTGGTGATACTAGCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAG
GCCACATTGACTGTTGACAAGTCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGG
ATTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGACCCGGGGGGTACGACGTGGGTTACTATGCTATGGACTACTG
GGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

B1抗体重链的可变区的氨基酸序列（序列号21）

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYTMHWVQQSHGKSLEWIGGVNPNSGDTSYNQKFKGK
ATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARPGGYDVGYYAMDYWGQGTSVTVSS

图19

编码C7抗体轻链的可变区的cDNA的核苷酸序列（序列号22）

GATATCCAGATGACACAGACTGCATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTTGGAGACAGAGTCACCATCAGTT
GCAGGGCAAGTCAGGACATTAACAATTATTTAAACTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACTGTTAA
ACTCCTGATCTACTCCACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCT
GGAACACATTATTCTCTCACCATTACTCACCTGGAACAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAAC
AGGGTTATCCGCTTCCGTGGACGTTCGGTGGAGGCACCAAACTGGAAATCAAA

C7抗体轻链的可变区的氨基酸序列（序列号23）

DIQMTQTASSLSASLGDRVTISCRASQDINNYLNWYQQKPDGTVKLLIYSTSRLHSGVPSRFSGSGS
GTHYSLTITHLEQEDIATYFCQQGYPLPWTFGGGTKLEIK

图20

编码C7抗体重链的可变区的cDNA的核苷酸序列（序列号24）

GAGGTCCAGCTTCAACAGTCTGGACCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCA
AGACTTCTGGATACACATTCACTGAATACACCATGCACTGGGTGCAGCAGAGCCATGGAAAGAGCCT
TGAGTGGATTGGAGGTGTTAATCCTAATAGTGGTGATACTAGCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAG
GCCACATTGACTGTTGACAAGTCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGG
ATTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGACCCGGGGGGGTACGACGTGGGTTACTATGCTATGGACTACTG
GGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

C7抗体重链的可变区的氨基酸序列（序列号25）

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYTMHWVQQSHGKSLEWIGGVNPNSGDTSYNQKFKGK
ATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARPGGYDVGYYAMDYWGQGTSVTVSS

图21

chB1轻链氨基酸序列（序列号28）

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIQMTQTASSLSASLGDRVTISCRASQDINNYLNWYQQKPDGTVKLL
IYFTSRLHSGVPSRFSGSGSGTHYSLTITNLEQEDIATYFCQQGYPLPWTFGGGTKLEIKRAVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

信号序列（1-20）、轻链可变区（21-127）、轻链恒定区（128-234）

包含编码chB1轻链的氨基酸序列的DNA序列的DNA片段（序列号29）

ccagcctccggactctagagccaccATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCATCAGCCTGCTGCTGTGG
ATCAGCGGCGCCTACGGCGACATCCAGATGACCCAGACAGCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCG
ATAGAGTGACCATCAGCTGCAGAGCCAGCCAGGACATCAACAACTACCTGAACTGGTATCAGCAGAA
ACCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTACTTCACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGCCCAGCAGA
TTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCCACTACAGCCTGACCATCACCAACCTGGAACAGGAAGATATCG
CTACCTACTTCTGTCAGCAAGGCTACCCCCTGCCCTGGACCTTTGGCGGCGGAACAAAGCTGGAAAT
CAAGCGGGCCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTCATCTTTCCACCCAGCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGC
ACAGCTAGCGTCGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGG
ACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAAAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTA
CTCCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAA
GTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGTtgagtttaaa
cgggggaggctaact

信号序列（26-85）、轻链可变区（86-406）、轻链恒定区（407-727）

图22

chB1轻链的可变区的氨基酸序列（序列号30）

DIQMTQTASSLSASLGDRVTISCRASQDINNYLNWYQQKPDGTVKLLIYFTSRLHSGVPSRFSGSGS
GTHYSLTITNLEQEDIATYFCQQGYPLPWTFGGGTKLEIK

编码chB1轻链可变区的核苷酸序列（序列号31）

GACATCCAGATGACCCAGACAGCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGATAGAGTGACCATCAGCT
GCAGAGCCAGCCAGGACATCAACAACTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCCGACGGCACCGTGAA
GCTGCTGATCTACTTCACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCT
GGCACCCACTACAGCCTGACCATCACCAACCTGGAACAGGAAGATATCGCTACCTACTTCTGTCAGC
AAGGCTACCCCCTGCCCTGGACCTTTGGCGGCGGAACAAAGCTGGAAATCAAG

图23

chB1重链的氨基酸序列（序列号32）

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYTMHWVQQSHGKSLEWI
GGVNPNSGDTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARPGGYDVGYYAMDYWGQG
TSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK

信号序列（1-19）、重链可变区（20-141）、重链恒定区（142-471）

编码chB1重链的核苷酸序列（序列号33）

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGCGAAGTGCAGC
TGCAGCAGTCTGGCCCCGAGCTCGTGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATCAGCTGCAAGACCAGCGG
CTACACCTTCACCGAGTACACCATGCACTGGGTGCAGCAGAGCCACGGCAAGAGCCTGGAATGGATC
GGCGGCGTGAACCCCAACAGCGGCGACACCAGCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACCCTGA
CCGTGGACAAGAGCAGCAGCACCGCCTACATGGAACTGCGGAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGT
GTACTACTGTGCCAGACCTGGCGGCTACGACGTGGGCTACTACGCCATGGATTACTGGGGCCAGGGC
ACCAGCGTGACCGTCAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCA
AGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCCGTGAC
CGTGAGCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGCTGTCCTGCAGTCCTCA
GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCT
GCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAA
AACTCACACATGCCCACCCTGCCCAGCACCTGAAGCCGCGGGGGGACCCTCAGTCTTCCTCTTCCCC
CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGA
GCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC
AAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAG
GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGA
AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGA
GGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC
GTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCCGTGCTGGACTCCG
ACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTT
CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCC
GGCAAA

信号序列（1-57）、重链可变区（58-423）、重链恒定区（424-1413）

图24

chB1重链的可变区的氨基酸序列（序列号34）

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYTMHWVQQSHGKSLEWIGGVNPNSGDTSYNQKFKGK
ATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARPGGYDVGYYAMDYWGQGTSVTVSS

编码chB1重链的可变区的核苷酸序列（序列号35）

GAAGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCCCCGAGCTCGTGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATCAGCTGCA
AGACCAGCGGCTACACCTTCACCGAGTACACCATGCACTGGGTGCAGCAGAGCCACGGCAAGAGCCT
GGAATGGATCGGCGGCGTGAACCCCAACAGCGGCGACACCAGCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAG
GCCACCCTGACCGTGGACAAGAGCAGCAGCACCGCCTACATGGAACTGCGGAGCCTGACCAGCGAGG
ACAGCGCCGTGTACTACTGTGCCAGACCTGGCGGCTACGACGTGGGCTACTACGCCATGGATTACTG
GGGCCAGGGCACCAGCGTGACCGTCAGCTCA

图25

人源化抗体轻链hL1的氨基酸序列（序列号36）

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINNYLNWYQQKPGKAPKLL
IYFTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGYPLPWTFGQGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

信号序列（1-20）、轻链可变区（21-127）、轻链恒定区（128-234）

编码人源化抗体轻链hL1的核苷酸序列（序列号37）

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCGTACGGCGACATCC
AGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGC
CAGCCAGGACATCAACAACTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTG
ATCTACTTCACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCG
ACTACACCCTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGGCTA
CCCCCTGCCTTGGACATTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCTCC
GTGTTCATCTTCCCCCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGA
ATAACTTCTACCCCAGAGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGGAACTC
CCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTG
AGCAAAGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCTCCC
CCGTCACCAAGAGCTTCAACAGGGGGGAGTGT

信号序列（1-60）、轻链可变区（61-381）、轻链恒定区（382-702）

图26

人源化抗体轻链hL1的可变区的氨基酸序列（序列号38）

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINNYLNWYQQKPGKAPKLLIYFTSRLHSGVPSRFSGSGS
GTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGYPLPWTFGQGTKVEIK

编码人源化抗体轻链hL1的可变区的核苷酸序列（序列号39）

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCT
GTAGAGCCAGCCAGGACATCAACAACTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAA
GCTGCTGATCTACTTCACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCC
GGCACCGACTACACCCTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGC
AGGGCTACCCCCTGCCTTGGACATTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAG

图27

人源化抗体轻链hL2的氨基酸序列（序列号40）

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINNYLNWYQQKPGKAVKLL
IYFTSRLHSGVPSRFSGSGSGTHYTLTISSLQPEDFATYYCQQGYPLPWTFGQGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

信号序列（1-20）、轻链可变区（21-127）、轻链恒定区（128-234）

编码人源化抗体轻链hL2的核苷酸序列（序列号41）

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCGTACGGCGACATCC
AGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGC
CAGCCAGGACATCAACAACTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCCGGCAAGGCCGTGAAGCTGCTG
ATCTACTTCACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCC
ACTACACCCTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGGCTA
CCCCCTGCCTTGGACATTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCTCC
GTGTTCATCTTCCCCCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGA
ATAACTTCTACCCCAGAGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGGAACTC
CCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTG
AGCAAAGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCTCCC
CCGTCACCAAGAGCTTCAACAGGGGGGAGTGT

信号序列（1-60）、轻链可变区（61-381）、轻链恒定区（382-702）

图28

人源化抗体轻链hL2的可变区的氨基酸序列（序列号42）

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINNYLNWYQQKPGKAVKLLIYFTSRLHSGVPSRFSGSGS
GTHYTLTISSLQPEDFATYYCQQGYPLPWTFGQGTKVEIK

编码人源化抗体轻链hL2的可变区的核苷酸序列（序列号43）

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCT
GTAGAGCCAGCCAGGACATCAACAACTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCCGGCAAGGCCGTGAA
GCTGCTGATCTACTTCACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCT
GGCACCCACTACACCCTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGC
AGGGCTACCCCCTGCCTTGGACATTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAG

图29

人源化抗体轻链hL3的氨基酸序列（序列号44）

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINNYLNWYQQKPGGAVKLL
IYFTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGYPLPWTFGGGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

信号序列（1-20）、轻链可变区（21-127）、轻链恒定区（128-234）

编码人源化抗体轻链hL3的核苷酸序列（序列号45）

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCGTACGGCGACATCC
AGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGC
CAGCCAGGACATCAACAACTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCCGGCGGAGCCGTGAAGCTGCTG
ATCTACTTCACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCG
ACTACACCCTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGGCTA
CCCCCTGCCCTGGACATTTGGCGGCGGAACAAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCTCC
GTGTTCATCTTCCCCCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGA
ATAACTTCTACCCCAGAGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGGAACTC
CCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTG
AGCAAAGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCTCCC
CCGTCACCAAGAGCTTCAACAGGGGGGAGTGT

信号序列（1-60）、轻链可变区（61-381）、轻链恒定区（382-702）

图30

人源化抗体轻链hL3的可变区的氨基酸序列（序列号46）

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINNYLNWYQQKPGGAVKLLIYFTSRLHSGVPSRFSGSGS
GTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGYPLPWTFGGGTKVEIK

编码人源化抗体轻链hL3的可变区的核苷酸序列（序列号47）

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCT
GTAGAGCCAGCCAGGACATCAACAACTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCCGGCGGAGCCGTGAA
GCTGCTGATCTACTTCACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCC
GGCACCGACTACACCCTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGC
AGGGCTACCCCCTGCCCTGGACATTTGGCGGCGGAACAAAGGTGGAAATCAAG

图31

人源化抗体轻链hL4的氨基酸序列（序列号48）

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINNYLNWYQQKPGGAVKLL
IYFTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGGGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

信号序列（1-20）、轻链可变区（21-127）、轻链恒定区（128-234）

编码人源化抗体轻链hL4的核苷酸序列（序列号49）

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCGTACGGCGACATCC
AGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGC
CAGCCAGGACATCAACAACTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCCGGCGGAGCCGTGAAGCTGCTG
ATCTACTTCACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCG
ACTACACCCTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGGCAA
CACCCTGCCCTGGACATTTGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCTCC
GTGTTCATCTTCCCCCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGA
ATAACTTCTACCCCAGAGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGGAACTC
CCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTG
AGCAAAGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCTCCC
CCGTCACCAAGAGCTTCAACAGGGGGGAGTGT

信号序列（1-60）、轻链可变区（61-381）、轻链恒定区（382-702）

图32

人源化抗体轻链hL4的可变区的氨基酸序列（序列号50）

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINNYLNWYQQKPGGAVKLLIYFTSRLHSGVPSRFSGSGS
GTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGGGTKVEIK

编码人源化抗体轻链hL4的可变区的核苷酸序列（序列号51）

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCT
GTAGAGCCAGCCAGGACATCAACAACTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCCGGCGGAGCCGTGAA
GCTGCTGATCTACTTCACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCC
GGCACCGACTACACCCTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGC
AGGGCAACACCCTGCCCTGGACATTTGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAG

图33

人源化抗体重链hH1的氨基酸序列（序列号52）

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTMHWVRQAPGQGLEWM
GGVNPNSGDTSYAQKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPGGYDVGYYAMDYWGQG
TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK

信号序列（1-19）、重链可变区（20-141）、重链恒定区（142-471）

编码人源化抗体重链hH1的核苷酸序列（序列号53）

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGCCAGGTGCAGC
TGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCAGCGG
CTACACCTTTACCGAGTACACCATGCACTGGGTGCGCCAGGCTCCAGGCCAGGGACTGGAATGGATG
GGCGGCGTGAACCCCAACAGCGGCGATACAAGCTACGCCCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGACCATCA
CCGCCGACACCAGCACCTCCACCGCCTACATGGAACTGAGCAGCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGT
GTACTACTGTGCTAGACCTGGCGGCTACGACGTGGGCTACTACGCCATGGATTACTGGGGCCAGGGC
ACCCTCGTGACCGTCAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCA
AGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCCGTGAC
CGTGAGCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGCTGTCCTGCAGTCCTCA
GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCT
GCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAA
AACTCACACATGCCCACCCTGCCCAGCACCTGAAGCCGCGGGGGGACCCTCAGTCTTCCTCTTCCCC
CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGA
GCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC
AAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAG
GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGA
AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGA
GGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC
GTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCCGTGCTGGACTCCG
ACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTT
CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCC
GGCAAA

信号序列（1-57）、重链可变区（58-423）、重链恒定区（424-1413）

图34

人源化抗体重链hH1的可变区的氨基酸序列（序列号54）

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTMHWVRQAPGQGLEWMGGVNPNSGDTSYAQKFQGR
VTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPGGYDVGYYAMDYWGQGTLVTVSS

编码人源化抗体重链hH1的可变区的核苷酸序列（序列号55）

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAGGTGTCCTGCA
AGGCCAGCGGCTACACCTTTACCGAGTACACCATGCACTGGGTGCGCCAGGCTCCAGGCCAGGGACT
GGAATGGATGGGCGGCGTGAACCCCAACAGCGGCGATACAAGCTACGCCCAGAAATTCCAGGGCAGA
GTGACCATCACCGCCGACACCAGCACCTCCACCGCCTACATGGAACTGAGCAGCCTGCGGAGCGAGG
ACACCGCCGTGTACTACTGTGCTAGACCTGGCGGCTACGACGTGGGCTACTACGCCATGGATTACTG
GGGCCAGGGCACCCTCGTGACCGTCAGCTCA

图35

人源化抗体重链hH2的氨基酸序列（序列号56）

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFTEYTMHWVRQAPGKSLEWM
GGVNPNSGDTSYAQKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPGGYDVGYYAMDYWGQG
TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK

信号序列（1-19）、重链可变区（20-141）、重链恒定区（142-471）

编码人源化抗体重链hH2的核苷酸序列（序列号57）

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGCGAAGTGCAGC
TGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAGACCAGCGG
CTACACCTTTACCGAGTACACCATGCACTGGGTGCGCCAGGCCCCTGGCAAGAGCCTGGAATGGATG
GGCGGCGTGAACCCCAACAGCGGCGATACAAGCTACGCCCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGACCATCA
CCGCCGACACCAGCACCTCCACCGCCTACATGGAACTGAGCAGCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGT
GTACTACTGTGCTAGACCTGGCGGCTACGACGTGGGCTACTACGCCATGGATTACTGGGGCCAGGGC
ACCCTCGTGACCGTCAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCA
AGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCCGTGAC
CGTGAGCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGCTGTCCTGCAGTCCTCA
GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCT
GCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAA
AACTCACACATGCCCACCCTGCCCAGCACCTGAAGCCGCGGGGGGACCCTCAGTCTTCCTCTTCCCC
CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGA
GCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC
AAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAG
GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGA
AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGA
GGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC
GTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCCGTGCTGGACTCCG
ACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTT
CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCC
GGCAAA

信号序列（1-57）、重链可变区（58-423）、重链恒定区（424-1413）

图36

人源化抗体重链hH2的可变区的氨基酸序列（序列号58）

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFTEYTMHWVRQAPGKSLEWMGGVNPNSGDTSYAQKFQGR
VTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPGGYDVGYYAMDYWGQGTLVTVSS

编码人源化抗体重链hH2的可变区的核苷酸序列（序列号59）

GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAGGTGTCCTGCA
AGACCAGCGGCTACACCTTTACCGAGTACACCATGCACTGGGTGCGCCAGGCCCCTGGCAAGAGCCT
GGAATGGATGGGCGGCGTGAACCCCAACAGCGGCGATACAAGCTACGCCCAGAAATTCCAGGGCAGA
GTGACCATCACCGCCGACACCAGCACCTCCACCGCCTACATGGAACTGAGCAGCCTGCGGAGCGAGG
ACACCGCCGTGTACTACTGTGCTAGACCTGGCGGCTACGACGTGGGCTACTACGCCATGGATTACTG
GGGCCAGGGCACCCTCGTGACCGTCAGCTCA

图37

人源化抗体重链hH3的氨基酸序列（序列号60）

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFTEYTMHWVRQAPGQGLEWM
GGVNPNSGDTSYAQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPGGYDVGYYAMDYWGQG
TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK

信号序列（1-19）、重链可变区（20-141）、重链恒定区（142-471）

编码人源化抗体重链hH3的核苷酸序列（序列号61）

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGCGAAGTGCAGC
TGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAGACCAGCGG
CTACACCTTTACCGAGTACACCATGCACTGGGTGCGCCAGGCTCCAGGCCAGGGACTGGAATGGATG
GGCGGCGTGAACCCCAACAGCGGCGATACAAGCTACGCCCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGACCCTGA
CCGTGGACAAGAGCACCAGCACCGCCTACATGGAACTGAGCAGCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGT
GTACTACTGTGCTAGACCTGGCGGCTACGACGTGGGCTACTACGCCATGGATTACTGGGGCCAGGGC
ACCCTCGTGACCGTCAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCA
AGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCCGTGAC
CGTGAGCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGCTGTCCTGCAGTCCTCA
GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCT
GCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAA
AACTCACACATGCCCACCCTGCCCAGCACCTGAAGCCGCGGGGGGACCCTCAGTCTTCCTCTTCCCC
CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGA
GCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC
AAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAG
GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGA
AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGA
GGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC
GTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCCGTGCTGGACTCCG
ACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTT
CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCC
GGCAAA

信号序列（1-57）、重链可变区（58-423）、重链恒定区（424-1413）

图38

人源化抗体重链hH3的可变区的氨基酸序列（序列号62）

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFTEYTMHWVRQAPGQGLEWMGGVNPNSGDTSYAQKFQGR
VTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPGGYDVGYYAMDYWGQGTLVTVSS

编码人源化抗体重链hH3的可变区的核苷酸序列（序列号63）

GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAGGTGTCCTGCA
AGACCAGCGGCTACACCTTTACCGAGTACACCATGCACTGGGTGCGCCAGGCTCCAGGCCAGGGACT
GGAATGGATGGGCGGCGTGAACCCCAACAGCGGCGATACAAGCTACGCCCAGAAATTCCAGGGCAGA
GTGACCCTGACCGTGGACAAGAGCACCAGCACCGCCTACATGGAACTGAGCAGCCTGCGGAGCGAGG
ACACCGCCGTGTACTACTGTGCTAGACCTGGCGGCTACGACGTGGGCTACTACGCCATGGATTACTG
GGGCCAGGGCACCCTCGTGACCGTCAGCTCA

图39

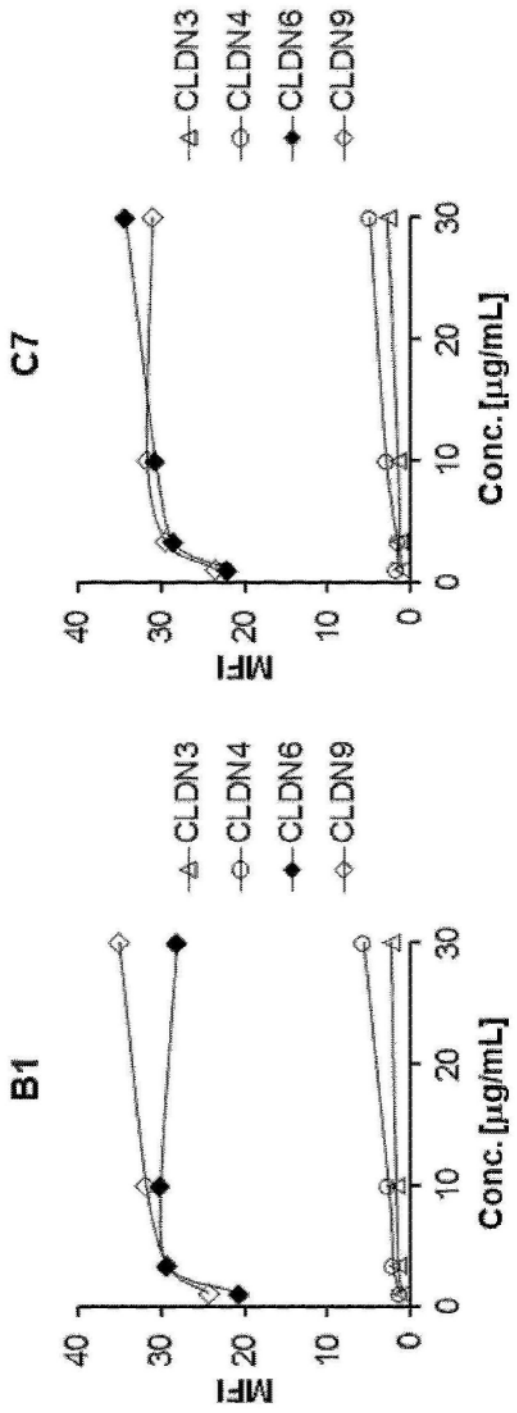


图40

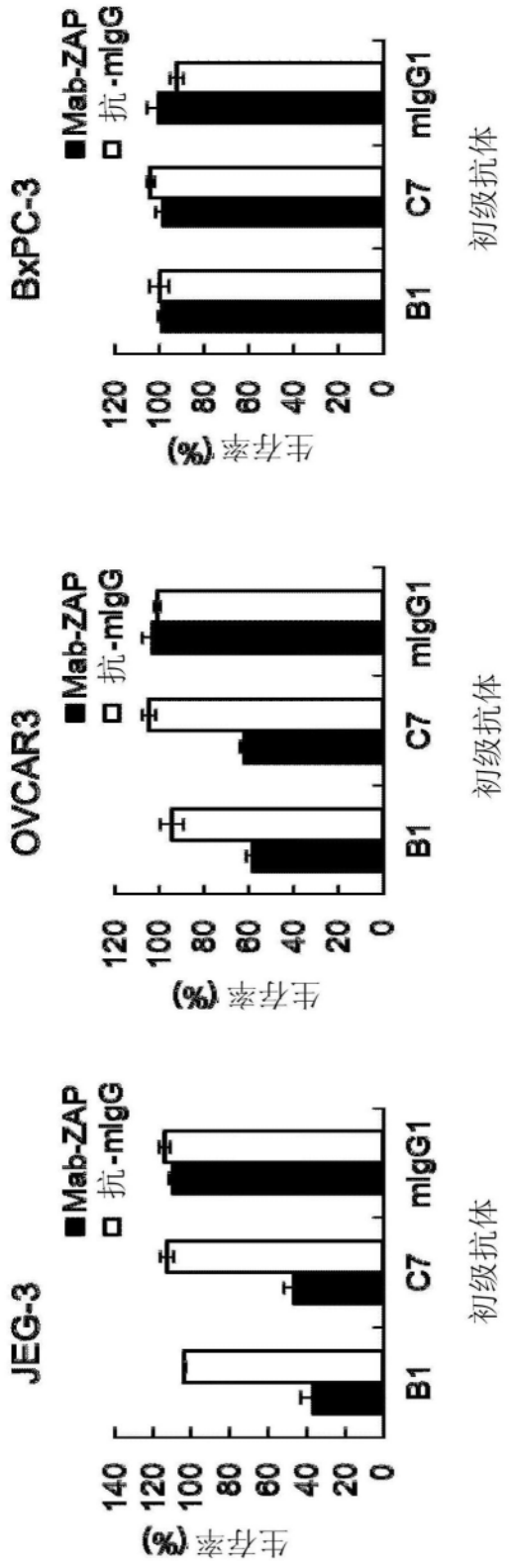

BxPC-3
OVCAR3
JEG-3
■Mab-ZAP
□ 抗-mIgG
B1
C7
mIgG1
初级抗体
生存率 (%)
0
20
40
60
80
100
120
140

图41

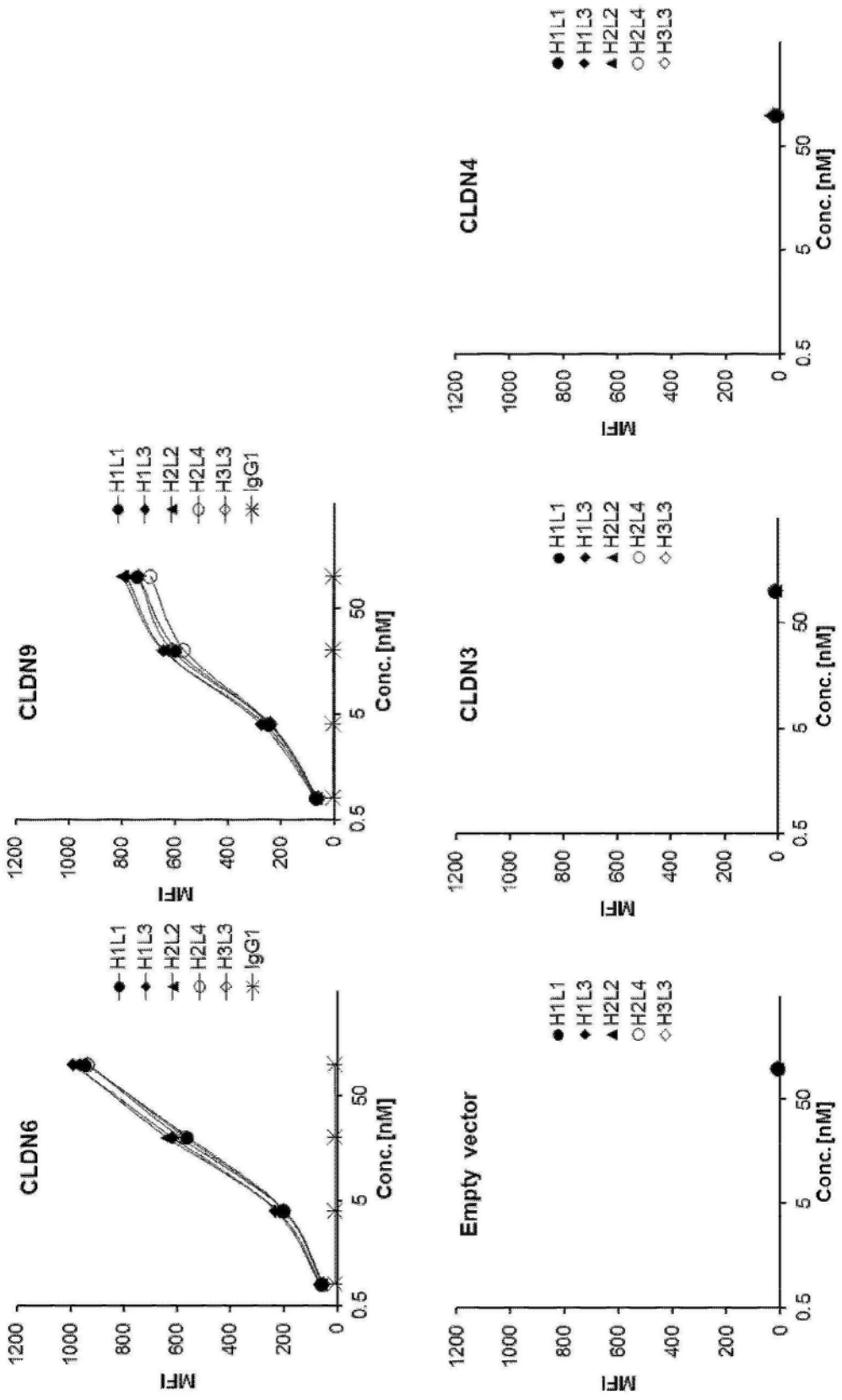

CLDN9
CLDN4
CLDN6
CLDN3
Empty vector
MFI
Conc.[nM]
H1L1
H1L3
H2L2
H2L4
H3L3
IgG1

图42

曲妥珠单抗轻链的氨基酸序列（序列号64）

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRS
GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL
SSPVTKSFNRGEC

曲妥珠单抗重链的重链的氨基酸序列（序列号65）

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGR
FTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS
SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY
ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

图43

曲妥珠单抗突变体轻链的氨基酸序列（序列号73）

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSAS
FLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC

信号序列（1-20）、轻链可变区（21-127）、轻链恒定区（128-234）

曲妥珠单抗突变体重链的氨基酸序列（序列号75）

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYP
TNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

信号序列（1-19）、重链可变区（20-139）、重链恒定区（140-469）

图44

```
chB1_H   1 EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYTMHWVQQSHGKSLEWIGGVNPNSGDTSYNQKFKGKATL 70
hH1      1 Q...V...A.VK.....V....A.....................R.AP.QG...M.....................A...Q.RV.I 70
hH2      1 ....V...A.VK.....V.....................R.AP.....M.....................A...Q.RV.I 70
hH3      1 ....V...A.VK.....V.....................R.AP.QG...M.....................A...Q.RV.. 70

chB1_H  71 TVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARPGGYDVGYYAMDYWGQGTSVTVSS                    122
hH1     71 .A.T.T.....S..R...T.....................................L.....           122
hH2     71 .A.T.T.....S..R...T.....................................L.....           122
hH3     71 .....T.....S..R...T.....................................L.....           122
```

图45

```
chB1_L   1 DIQMTQTASSLSASLGDRVTISCRASQDINNYLNWYQQKPDGTVKLLIYFTSRLHSGVPS 60
hL1      1 .......SP.....V.....T.....................GKAP..................  60
hL2      1 .......SP.....V.....T.....................GKA...................  60
hL3      1 .......SP.....V.....T.....................G.A...................  60
hL4      1 .......SP.....V.....T.....................G.A...................  60

chB1_L  61 RFSGSGSGTHYSLTITNLEQEDIATYFCQQGYPLPWTFGGGTKLEIK                 107
hL1     61 ..........D.T...SS.QP..F...Y.............Q...V...                 107
hL2     61 ..........T...SS.QP..F...Y.............Q...V...                 107
hL3     61 ..........D.T...SS.QP..F...Y.............V...                    107
hL4     61 ..........D.T...SS.QP..F...Y....NT.......V...                    107
```

图46

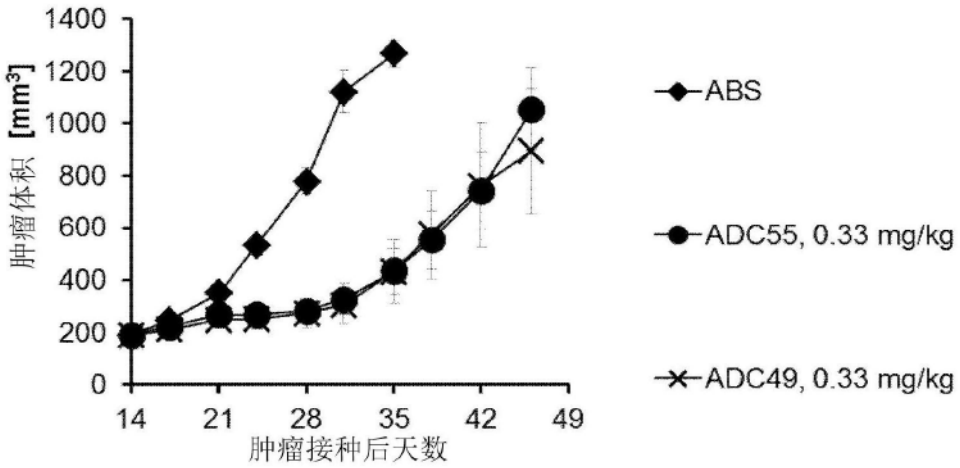

1400
1200
1000
800
600
400
200
0
肿瘤体积 [mm³]
14
21
28
35
42
49
肿瘤接种后天数
ABS
ADC55, 0.33 mg/kg
ADC49, 0.33 mg/kg

图47

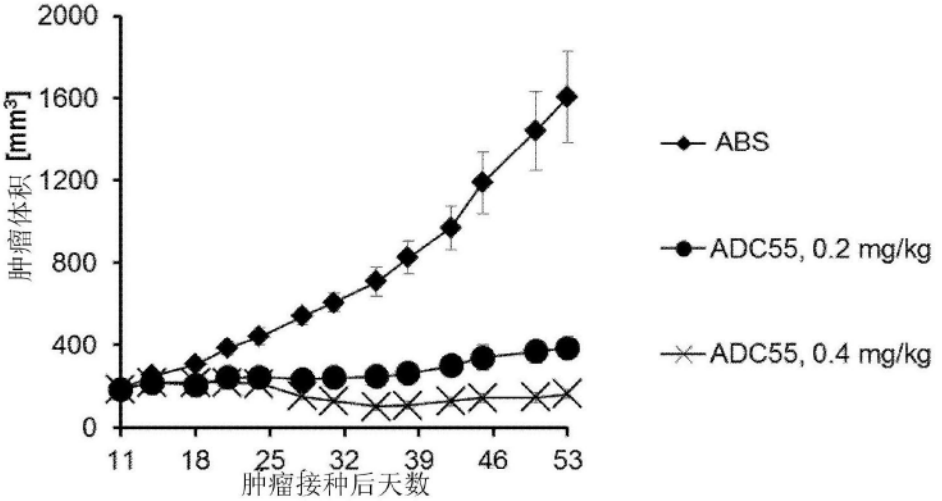

2000
1600
1200
800
400
0
肿瘤体积 [mm³]
11
18
25
32
39
46
53
肿瘤接种后天数
ABS
ADC55, 0.2 mg/kg
ADC55, 0.4 mg/kg

图48

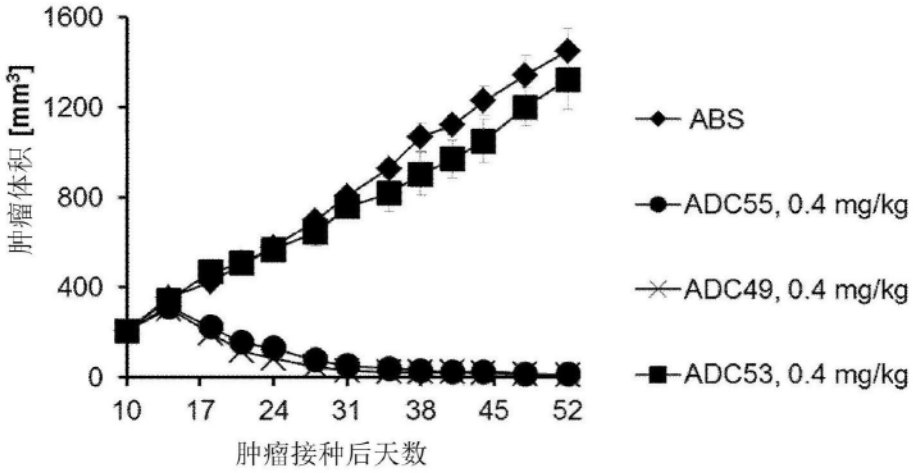

1600
1200
800
400
0
肿瘤体积 [mm³]
10
17
24
31
38
45
52
肿瘤接种后天数
ABS
ADC55, 0.4 mg/kg
ADC49, 0.4 mg/kg
ADC53, 0.4 mg/kg

图49