



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110464847 B

(45) 授权公告日 2024.02.09

(21) 申请号 201910768778.X

(51) Int.CI.

(22) 申请日 2015.01.28

A61K 47/68 (2017.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61K 47/65 (2017.01)

申请公布号 CN 110464847 A

A61K 31/4745 (2006.01)

(43) 申请公布日 2019.11.19

A61P 35/00 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61P 35/02 (2006.01)

2014-017777 2014.01.31 JP

C07D 491/22 (2006.01)

2014-168944 2014.08.22 JP

2014-227886 2014.11.10 JP

(56) 对比文件

JP 2006511526 A, 2006.04.06

(62) 分案原申请数据

JP 2013500253 A, 2013.01.07

201580003121.4 2015.01.28

JP 2013534535 A, 2013.09.05

(73) 专利权人 第一三共株式会社

WO 2011011474 A1, 2011.01.27

地址 日本东京都

Patrick J. Burke, et al.. Design,

(72) 发明人 内藤博之 扇谷祐辅 益田刚

Synthesis, and Biological Evaluation of Antibody-Drug Conjugates Comprised of Potent Camptothecin Analogues.

中田隆 吉田昌生 芦田真二  
森田浩司 宫崎秀树 畠谷裕司  
早川市郎 阿部有生

《Bioconjugate Chem.》.2009, 第20卷1242-1250.

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

审查员 齐丹丹

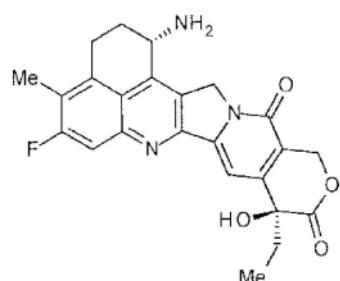
11256

权利要求书3页 说明书112页

专利代理人 牛蔚然 唐峥

序列表5页 附图7页

(54) 发明名称

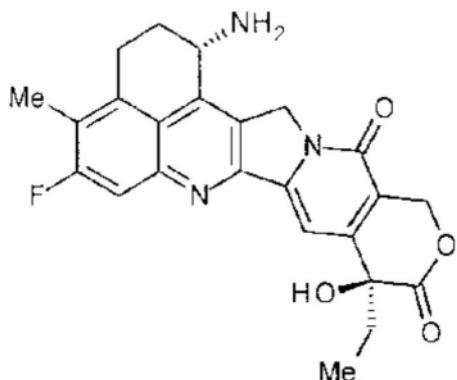


抗HER2抗体—药物偶联物

(57) 摘要

本发明涉及抗HER2抗体—药物偶联物。本发明提供一种抗体—药物偶联物作为抗肿瘤效果和安全性方面优异的具有优异的治疗效果的抗肿瘤药,所述抗体—药物偶联物的特征在于,其是将下式表示的抗肿瘤性化合物与抗HER2抗体介由下式: $-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)^n-L^a-(CH_2)^n-C(=O)-$ 表示的结构的接头连接而成的(抗HER2抗体连接于 $L^1$ 的末端,抗肿瘤性化合物以1位氨基的氮原子为连接部位、连接于 $-(CH_2)^n-C(=O)-$ 部分的羰基)。

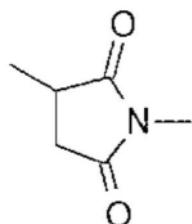
1. 抗体—药物偶联物在制造用于治疗表达HER2的癌的药剂中的用途, 其中, 所述抗体—药物偶联物为下述抗体—药物偶联物, 其中下式



表示的抗肿瘤性化合物以作为下式表示的药物—接头结构的形式偶联至抗HER2抗体,  
—(琥珀酰亚胺-3-基-N) —CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O) —GGFG—NH—CH<sub>2</sub>—O—CH<sub>2</sub>—C(=O) —(NH—DX)

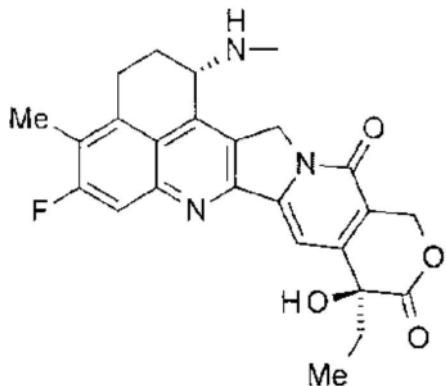
其中, 所述药物—接头结构通过在存在于抗HER2抗体的铰链部的二硫键部分中形成的硫醚键连接至抗HER2抗体; 并且,

—(琥珀酰亚胺-3-基-N) —为下式:



表示的结构, 以该结构的3位与抗HER2抗体连接, 在1位的氮原子上与包含该结构的接头结构内的亚甲基连接;

—(NH—DX) 表示下式:



表示的、1位氨基的氮原子成为连接部位的基团;

—GGFG—表示—Gly—Gly—Phe—Gly—的四肽残基; 并且

所述抗HER2抗体包含:

重链, 其氨基酸序列由序列号1中第1~449位氨基酸残基构成; 及轻链, 其氨基酸序列由序列号2中第1~214位氨基酸残基构成, 或者

重链, 其氨基酸序列由序列号1构成; 及轻链, 其氨基酸序列由序列号2构成; 并且

其中,所述药剂用于应用于非小细胞肺癌、大肠癌、卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、胃癌、食道癌和胆管癌。

2. 如权利要求1所述的用途,其中,所述抗HER2抗体包含:重链,其氨基酸序列由序列号1中第1~449位氨基酸残基构成;及轻链,其氨基酸序列由序列号2中第1~214位氨基酸残基构成。

3. 如权利要求1所述的用途,其中,所述抗HER2抗体包含:重链,其氨基酸序列由序列号1构成;及轻链,其氨基酸序列由序列号2构成。

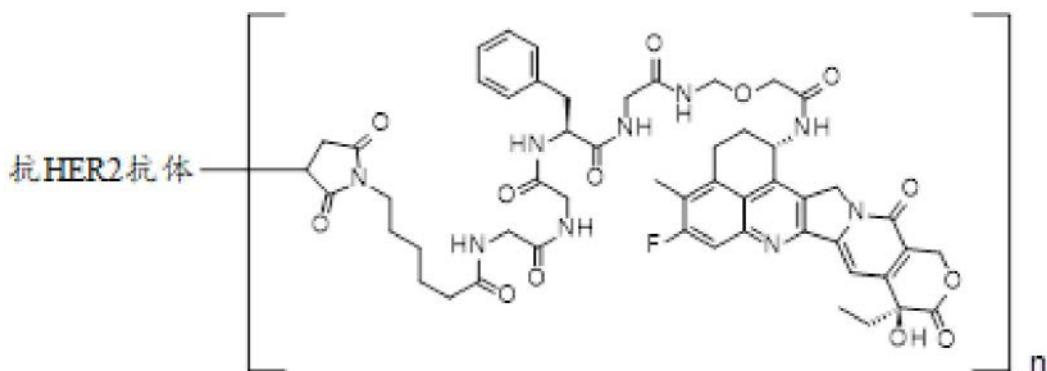
4. 如权利要求1所述的用途,其中,药物—接头结构相对于1抗体而言的平均连接数在2~8个的范围内。

5. 如权利要求1所述的用途,其中,药物—接头结构相对于1抗体而言的平均连接数在3~8个的范围内。

6. 如权利要求1所述的用途,其中,药物—接头结构相对于1抗体而言的平均连接数在7~8个的范围内。

7. 如权利要求1所述的用途,其中,药物—接头结构相对于1抗体而言的平均连接数约为8个。

### 8. 下式表示的抗体—药物偶联物，



其中, n为药物—接头结构相对于1抗HER2抗体而言的平均连接数,并且, n在2~8个的范围内,

所述抗体通过在存在于所述抗HER2抗体的铰链部的二硫键部分中形成的硫醚键连接至所述接头，

并且，

所述抗HER2抗体包含：

重链,其氨基酸序列由序列号1中第1~449位氨基酸残基构成;及轻链,其氨基酸序列由序列号2中第1~214位氨基酸残基构成,或者

重链,其氨基酸序列由序列号1构成;及轻链,其氨基酸序列由序列号2构成。

9. 如权利要求8所述的抗体-药物偶联物,其中,所述抗HER2抗体包含:重链,其氨基酸序列由序列号1中第1~449位氨基酸残基构成;及轻链,其氨基酸序列由序列号2中第1~214位氨基酸残基构成。

10. 如权利要求8所述的抗体—药物偶联物,其中,所述抗HER2抗体包含:重链,其氨基酸序列由序列号1构成;及轻链,其氨基酸序列由序列号2构成。

11. 如权利要求8所述的抗体-药物偶联物,其中,n在3~8个的范围内。

12. 如权利要求8所述的抗体—药物偶联物,其中,n在7~8个的范围内。
13. 如权利要求8所述的抗体—药物偶联物,其中,n约为8个。
14. 医药组合物,其含有权利要求8~13中任一项所述的抗体—药物偶联物、或其盐作为活性成分,且含有药学上可接受的制剂成分。
15. 如权利要求14所述的医药组合物,其应用于肺癌、尿道癌、大肠癌、前列腺癌、卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、膀胱癌、胃癌、胃肠道间质瘤、宫颈癌、食道癌、鳞状细胞癌、腹膜癌、肝癌、结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、子宫癌、唾液腺癌、肾癌、外阴癌、甲状腺癌、阴茎癌、白血病、恶性淋巴瘤、浆细胞瘤、骨髓瘤、或肉瘤。
16. 如权利要求15所述的医药组合物,其中,肝癌为肝细胞癌。
17. 如权利要求15所述的医药组合物,其中,子宫癌为子宫内膜癌。

## 抗HER2抗体—药物偶联物

[0001] 本申请是申请日为2015年01月28日、发明名称为“抗HER2抗体—药物偶联物”的中国发明专利申请No. 201580003121.4 (国际申请号为PCT/JP2015/000355) 的分案申请。

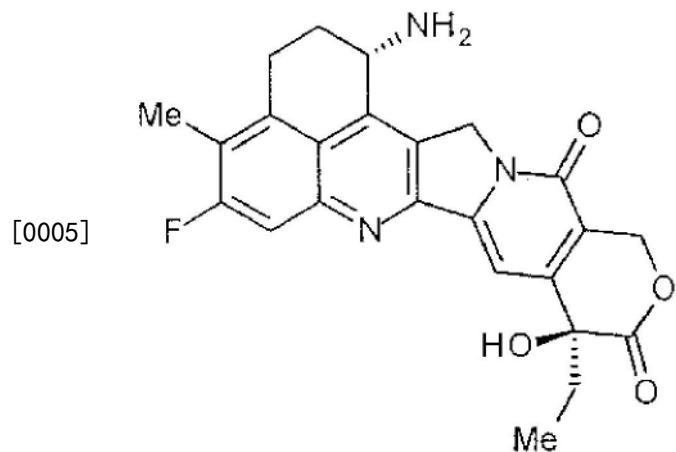
### 技术领域

[0002] 本发明涉及作为抗肿瘤药有用的抗体—药物偶联物,其是将抗HER2抗体与抗肿瘤性药物介由接头结构部分连接而成的。

### 背景技术

[0003] 向与在癌细胞表面表达、并且能向细胞内化的抗原结合的抗体上连接具有细胞毒性的药物得到的抗体—药物偶联物 (Antibody—Drug Conjugate; ADC) 能够选择性地向癌细胞输送药物,从而可预计其能使药物在癌细胞内蓄积,并杀死癌细胞(参照非专利文献1 ~ 3)。作为ADC,例如,于抗CD33抗体连接卡奇霉素 (calicheamicin) 而成的Mylotarg (注册商标;吉妥单抗 (Gemtuzumab ozogamicin)) 作为急性髓细胞性白血病的治疗药已获得承认。另外,最近,于抗CD30抗体连接耳他汀E而成的Adcetris (注册商标; Brentuximab vedotin) 作为霍奇金淋巴瘤和未分化大细胞淋巴瘤的治疗药获得承认(参照非专利文献4)。迄今为止被承认的ADC中含有的药物以DNA或微管蛋白为靶标。

[0004] 作为抗肿瘤性的低分子化合物,已知作为抑制拓扑异构酶I而呈现抗肿瘤作用的化合物的喜树碱衍生物。其中,下式



[0006] 表示的抗肿瘤性化合物(依沙替康,化学名: (1S,9S) —1—氨基—9—乙基—5—氟—2,3—二氢—9—羟基—4—甲基—1H,12H—苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉—10,13(9H,15H) —二酮) 是水溶性的喜树碱衍生物(专利文献1、2)。该化合物与目前临床中使用的伊立替康不同,呈现抗肿瘤效果不需要通过利用酶活化。另外,观察到比作为伊立替康的药效本体的SN—38、同在临床中使用的拓扑替康更强的拓扑异构酶I抑制活性,在体外(in vitro) 确认了针对多种癌细胞的更强的杀细胞活性。尤其是,对于通过P—糖蛋白的表达而对SN—38等显示耐性的癌细胞也确认了效果。另外,在小鼠的人肿瘤皮下移植模型中,也显示出强抗肿瘤效果,虽然进行了临床试验,但没有市售(参照非专利文

献5~10)。尚不清楚依沙替康作为ADC是否有效发挥作用。

[0007] DE-310是介由GGFG肽间隔物(spacer)将依沙替康连接于生物分解性的羧甲基葡聚糖多元醇聚合物而成的复合体(专利文献3)。通过将依沙替康形成高分子前体药物,从而保持较高血中滞留性,进而利用针对肿瘤新生血管的透过的亢进和肿瘤组织滞留性,从而提高了被动地指向肿瘤部位的指向性。通过利用酶对DE-310的肽间隔物进行切断,作为活性本体的依沙替康、及甘氨酸连接于氨基的依沙替康被持续地游离出。结果,药物动力学得以改善。在非临床试验中的各种肿瘤的评价模型中,对于DE-310而言,尽管其中包含的依沙替康的总量少于给予依沙替康单一药剂时的量,但与给予单一药剂时相比,显示更高的有效性。已对DE-310实施了临床试验,虽然有报道称确认到对人有效的患者例、活性本体更多地蓄积于肿瘤(相较于正常组织),但另一方面,也有报道称在人体中DE-310及活性本体在肿瘤中的蓄积与在正常组织中的蓄积并无明显不同,并未在人体中发现被动靶位(非专利文献11~14参照)。结果,DE-310也未市售,尚不清楚依沙替康作为这种指向靶位的药物是否有效发挥功能。

[0008] 作为DE-310的相关化合物,还已知将 $-\text{NH}-\text{(CH}_2\text{)}_4-\text{C}(=\text{O})-$ 表示的结构部分插入GGFG—间隔物与依沙替康之间、以 $-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{(CH}_2\text{)}_4-\text{C}(=\text{O})-$ 为间隔物结构的复合体(专利文献4),但完全不清楚该复合体的抗肿瘤效果。

[0009] HER2是被认定为人表皮生长因子受体2型相关癌基因的代表性生长因子受体型的癌基因产物之一,是分子量185kDa的具有酪氨酸激酶结构域的跨膜受体蛋白(非专利文献15)。HER2的DNA序列及氨基酸序列已在公开数据库上公开,例如,可通过M11730(Genbank)、NP\_004439.2(NCBI)等登录号而参照。

[0010] 已知HER2(neu,ErbB-2)是EGFR(epidermal growth factor receptor:表皮生长因子受体)家族之一,通过形成同源二聚体或与其他EGFR受体HER1(EGFR,ErbB-1)、HER3(ErbB-3)、HER4(ErbB-4)的异源二聚体(非专利文献16~18)而将细胞内酪氨酸残基自磷酸化从而将其活化,由此,在正常细胞及癌细胞中对细胞的增殖·分化·生存发挥重要的作用(非专利文献19、20)。报道了HER2在乳腺癌、胃癌、卵巢癌等多种癌症种类中过量表达(非专利文献21~26),在乳腺癌中是消极的预后因素(非专利文献27、28)。

[0011] 曲妥珠单抗是被称为重组人化抗HER2单克隆抗体(huMAb4D5-8,rhuMAb HER2、赫赛汀(注册商标))的、小鼠抗HER2抗体4D5(非专利文献29、专利文献5)的人化抗体(专利文献6)。曲妥珠单抗通过与HER2的胞外结构域IV特异性结合,诱导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)诱导、抑制基于HER2的信号传导而发挥抗瘤效果(非专利文献30、31)。曲妥珠单抗对过量表达HER2的肿瘤显示高的效果(非专利文献32),因此,作为针对过量表达HER2的转移性乳腺癌患者的治疗药,在美国已于1999年上市,在日本已于2001年上市。

[0012] 曲妥珠单抗对乳腺癌的治疗效果已得到充分证明(非专利文献33),另一方面,据报道,在大范围的接受了以往的抗癌治疗的过量表达HER2的乳腺癌患者中仅约15%对曲妥珠单抗有应答,上述大范围的接受了以往的抗癌治疗的过量表达HER2的乳腺癌患者中的约85%的患者对曲妥珠单抗处置无应答或仅微弱应答。

[0013] 因此,为治疗对曲妥珠单抗无应答或应答弱的罹患过量表达HER2的肿瘤或与HER2表达相关的障碍的患者,已认识到以与HER2表达相关的疾病为目标的治疗药的必要性,已开发了抗肿瘤性药物介由接头结构连接于曲妥珠单抗而成的T-DM1(曲妥珠单抗

emtansine、Kadcyla (注册商标) ; 非专利文献34) ; 以HER2的胞外结构域II为靶标、为了抑制异源二聚体形成而设计的帕妥珠单抗(PERJETA(注册商标) ; 非专利文献35、专利文献7)。然而,应答性、活性的强度、以及适应范围仍不充分,仍存在以HER2为靶标的尚未被满足的需求。

- [0014] 现有技术文献
- [0015] 专利文献
- [0016] 专利文献1:日本特开平5—59061号公报
- [0017] 专利文献2:日本特开平8—337584号公报
- [0018] 专利文献3:国际公开第1997/46260号
- [0019] 专利文献4:国际公开第2000/25825号
- [0020] 专利文献5:美国专利第5677171号说明书
- [0021] 专利文献6:美国专利第5821337号说明书
- [0022] 专利文献7:国际公开第01/00244号
- [0023] 非专利文献
- [0024] 非专利文献1:Ducry,L.,等,Bioconjugate Chem. (2010) 21,5—13.
- [0025] 非专利文献2:Alley,S.C.,等,Current Opinion in Chemical Biology (2010) 14,529—537.
- [0026] 非专利文献3:Damle N.K.Expert Opin.Biol.Ther. (2004) 4,1445—1452.
- [0027] 非专利文献4:Senter P.D.,等,Nature Biotechnology (2012) 30,631—637.
- [0028] 非专利文献5:Kumazawa,E.,Tohgo,A.,Exp.Opin.Invest.Drugs (1998) 7,625—632.
- [0029] 非专利文献6:Mitsui,I.,等,Jpn J.Cancer Res. (1995) 86,776—786.
- [0030] 非专利文献7:Takiguchi,S.,等,Jpn J.Cancer Res. (1997) 88,760—769.
- [0031] 非专利文献8:Joto,N.等,Int J Cancer (1997) 72,680—686.
- [0032] 非专利文献9:Kumazawa,E.等,Cancer Chemother.Pharmacol. (1998) 42,210—220.
- [0033] 非专利文献10:De Jager,R.,等,Ann N Y Acad Sci (2000) 922,260—273.
- [0034] 非专利文献11:Inoue,K.等,Polymer Drugs in the Clinical Stage,Edited by Maeda等 (2003) 145—153.
- [0035] 非专利文献12:Kumazawa,E.等,Cancer Sci (2004) 95,168—175.
- [0036] 非专利文献13:Soopenberg,O.等,Clinical Cancer Research, (2005) 11,703—711.
- [0037] 非专利文献14:Wente M.N.等,Investigational New Drugs (2005) 23,339—347.
- [0038] 非专利文献15:Coussens L,等,Science.1985;230(4730) :1132—1139.
- [0039] 非专利文献16:Graus—Porta G,等,EMBO J.1997;16:1647—1655.
- [0040] 非专利文献17:Karnagaran D,等,EMBO J.1996;15:254—264.
- [0041] 非专利文献18:Sliwkowski MX,等,J Biom Chem.1994;269:14661—14665.
- [0042] 非专利文献19:Di Fore PP,等,Science.1987;237:178—182.
- [0043] 非专利文献20:Hudziak RM,等,Proc Natl Acad Sci U S A.1987;84:7159—

7163.

- [0044] 非专利文献21:Hardwick R,等,Eur.J Surg Oncol.1997(23):30—35.
- [0045] 非专利文献22:Korkaya H,等,Oncogene.2008;27(47):6120—6130.
- [0046] 非专利文献23:Yano T,等,Oncol Rep.2006;15(1):65—71.
- [0047] 非专利文献24:Slamon DJ,等,Science.1987;235:177—182.
- [0048] 非专利文献25:Gravalos C,等,Ann Oncol 19:1523—1529,2008.
- [0049] 非专利文献26:Fukushige S等,Mol Cell Biol 6:955—958,1986.
- [0050] 非专利文献27:Slamon DJ,等Science.1989;244:707—712.
- [0051] 非专利文献28:Kaptain S等,Diagn Mol Pathol 10:139—152,2001.
- [0052] 非专利文献29:Fendly.等,Cancer Research 1990(50):1550—1558.
- [0053] 非专利文献30:Sliwkowski MX,等,Semin Oncol.1999;26(4,Suppl 12):60—70.
- [0054] 非专利文献31:Hudis CA,等,N Engl J Med.357:39—51,2007.
- [0055] 非专利文献32:Vogel CL,等,J Clin Oncol.2002;20(3):719—726.
- [0056] 非专利文献33:Baselga等,J.Clin.Oncol.14:737—744(1996).
- [0057] 非专利文献34:Howard A.等,J Clin Oncol 29:398—405.
- [0058] 非专利文献35:Adams CW,等,Cancer Immunol Immunother.2006;6:717—727.

## 发明内容

[0059] 发明所要解决的课题

[0060] 在利用抗体进行的肿瘤治疗中,有时也观察到即使抗体能识别抗原并与肿瘤细胞结合、但抗肿瘤效果仍不充分的情况,存在需要效果更好的抗肿瘤抗体的情况。另外,在抗肿瘤性的低分子化合物中,存在很多虽然抗肿瘤效果优异、但存在副作用、毒性方面等安全性上的问题的化合物,进一步提高安全性、获得更优的治疗效果成为课题。即,本发明的课题在于获得并提供抗肿瘤效果和安全性方面优异的、具有优异的治疗效果的抗肿瘤药。

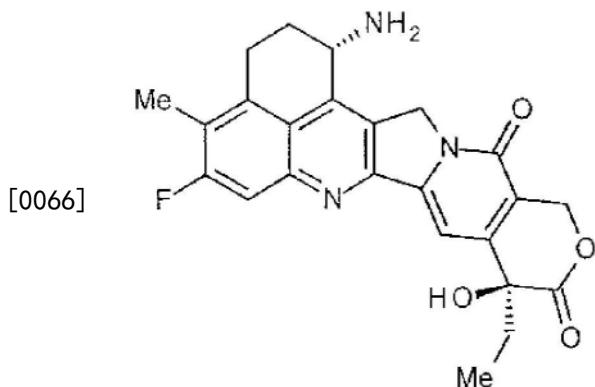
[0061] 用于解决技术问题的手段

[0062] 本申请的发明人认为,由于抗HER2抗体为能以肿瘤细胞为靶标的抗体,即,为具有能识别肿瘤细胞的特性、能与肿瘤细胞结合的特性、能向肿瘤细胞内化的特性、针对肿瘤细胞具有细胞毒性的特性、或针对肿瘤细胞的杀细胞活性等的抗体,所以,通过将作为抗肿瘤性化合物的依沙替康转化为介由接头结构部分连接于该抗体而成的抗体—药物偶联物,能实现以下效果:能更可靠地将抗肿瘤性化合物转移至肿瘤细胞,在肿瘤细胞内特异地发挥该化合物的抗肿瘤效果;从而在可靠地发挥抗肿瘤效果的同时可期待抗HER2抗体的杀细胞效果增强;进而,使得抗肿瘤性化合物的给予量较之单独给予该化合物时有所减少;即,通过上述效果,能缓和抗肿瘤性化合物对正常细胞的影响,因而能实现更高的安全性。

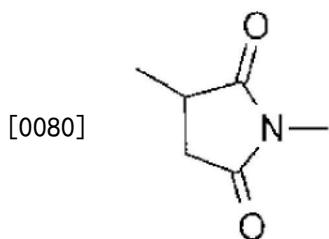
[0063] 因此,本发明人发明了特定结构的接头,成功地获得了介由该接头将抗HER2抗体与依沙替康连接而得到的抗体—药物偶联物,发现该偶联物发挥优异的抗肿瘤效果,从而完成了本发明。

[0064] 即,本申请发明涉及以下方案:

[0065] [1]抗体—药物偶联物,其特征在于,其是将下式



- [0067] 表示的抗肿瘤性化合物与抗HER2抗体介由下式：
- [0068]  $-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$
- [0069] 表示的结构的接头、通过在存在于抗HER2抗体的铰链部的二硫键部分中形成的硫醚键连接而成的。
- [0070] 其中，抗HER2抗体连接于 $L^1$ 的末端，抗肿瘤性化合物以1位氨基的氮原子为连接部位、连接于 $-(CH_2)n^2-C(=O)-$ 部分的羰基。
- [0071] 式中， $n^1$ 表示0~6的整数，
- [0072]  $n^2$ 表示0~5的整数，
- [0073]  $L^1$ 表示 $-(\text{琥珀酰亚胺}(\text{Succinimid})-3-\text{基}-\text{N})-(CH_2)n^3-C(=O)-$ ，
- [0074] 其中， $n^3$ 表示2~8的整数，
- [0075]  $L^2$ 表示 $-\text{NH}-(CH_2\text{CH}_2-\text{O})n^4-\text{CH}_2\text{CH}_2-C(=O)-$ 或单键，
- [0076] 其中， $n^4$ 表示1~6的整数，
- [0077]  $L^P$ 表示由2~7个氨基酸构成的肽残基，
- [0078]  $L^a$ 表示 $-\text{O}-$ 或单键，
- [0079]  $-(\text{琥珀酰亚胺}-3-\text{基}-\text{N})-$ 为下式：



- [0081] 表示的结构，以该结构的3位与抗HER2抗体连接，在1位的氮原子上与包含该结构的接头结构内的亚甲基连接。

[0082] 此外，本申请发明涉及以下的各方案。

[0083] [2][1]所述的抗体—药物偶联物，其中， $L^P$ 的肽残基为由选自苯丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、赖氨酸、瓜氨酸、丝氨酸、谷氨酸、天冬氨酸中的氨基酸形成的肽残基。

[0084] [3][1]或[2]所述的抗体—药物偶联物，其中， $L^P$ 为选自以下的组中的肽残基：

[0085]  $-\text{GGF}-$ 、

[0086]  $-\text{DGGF}-$ 、

[0087]  $-(\text{D}-)\text{D}-\text{GGF}-$ 、

[0088]  $-\text{EGGF}-$ 、

- [0089] —GGFG—、
- [0090] —SGGF—、
- [0091] —KGGF—、
- [0092] —DGGFG—、
- [0093] —GGFGG—、
- [0094] —DDGGFG—、
- [0095] —KDGGFG—、及
- [0096] —GGFGGGF—；
- [0097] 其中“(D—)D”表示D—天冬氨酸。
- [0098] [4] [1]或[2]所述的抗体—药物偶联物,其中,L<sup>P</sup>为由4个氨基酸构成的肽残基。
- [0099] [5] [1] ~ [4]中任一项所述的抗体—药物偶联物,其中,L<sup>P</sup>为四肽残基—GGFG—。
- [0100] [6] [1] ~ [5]中任一项所述的抗体—药物偶联物,其中,n<sup>3</sup>为2~5的整数,L<sup>2</sup>为单键。
- [0101] [7] [1] ~ [5]中任一项所述的抗体—药物偶联物,其中,n<sup>3</sup>为2~5的整数,L<sup>2</sup>为—NH—(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—O)n<sup>4</sup>—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—,n<sup>4</sup>为2或4,。
- [0102] [8] [1] ~ [7]中任一项所述的抗体—药物偶联物,其中,—NH—(CH<sub>2</sub>)n<sup>1</sup>—L<sup>a</sup>—(CH<sub>2</sub>)n<sup>2</sup>—C(=O)—为具有4~7原子的链长的部分结构。
- [0103] [9] [1] ~ [7]中任一项所述的抗体—药物偶联物,其中,—NH—(CH<sub>2</sub>)n<sup>1</sup>—L<sup>a</sup>—(CH<sub>2</sub>)n<sup>2</sup>—C(=O)—为具有5或6原子的链长的部分结构。
- [0104] [10] [1] ~ [9]中任一项所述的抗体—药物偶联物,其中,—NH—(CH<sub>2</sub>)n<sup>1</sup>—L<sup>a</sup>—(CH<sub>2</sub>)n<sup>2</sup>—C(=O)—为
- [0105] —NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—、
- [0106] —NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—、
- [0107] —NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—、
- [0108] —NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—、
- [0109] —NH—CH<sub>2</sub>—O—CH<sub>2</sub>—C(=O)—、
- [0110] —NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—O—CH<sub>2</sub>—C(=O)—、或
- [0111] —NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—O—C(=O)—。
- [0112] [11] [1] ~ [9]中任一项所述的抗体—药物偶联物,其中,—NH—(CH<sub>2</sub>)n<sup>1</sup>—L<sup>a</sup>—(CH<sub>2</sub>)n<sup>2</sup>—C(=O)—为
- [0113] —NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—、
- [0114] —NH—CH<sub>2</sub>—O—CH<sub>2</sub>—C(=O)—、或
- [0115] —NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—O—CH<sub>2</sub>—C(=O)—。
- [0116] [12] [1] ~ [9]中任一项所述的抗体—药物偶联物,其中,药物与—L<sup>1</sup>—L<sup>2</sup>—L<sup>P</sup>—NH—(CH<sub>2</sub>)n<sup>1</sup>—L<sup>a</sup>—(CH<sub>2</sub>)n<sup>2</sup>—C(=O)—连接而成的药物—接头结构部分为选自下述组中的1种药物—接头结构：
- [0117] —(琥珀酰亚胺—3—基—N)—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—GGFG—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—(NH—DX)、
- [0118] —(琥珀酰亚胺—3—基—N)—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—GGFG—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—

(NH—DX)、

[0119] —(琥珀酰亚胺-3-基-N)—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—GGFG—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—(NH—DX)、

[0120] —(琥珀酰亚胺-3-基-N)—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—GGFG—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—(NH—DX)、

[0121] —(琥珀酰亚胺-3-基-N)—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—GGFG—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—(NH—DX)、

[0122] —(琥珀酰亚胺-3-基-N)—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—GGFG—NH—CH<sub>2</sub>—O—CH<sub>2</sub>—C(=O)—(NH—DX)、

[0123] —(琥珀酰亚胺-3-基-N)—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—GGFG—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—O—CH<sub>2</sub>—C(=O)—(NH—DX)、

[0124] —(琥珀酰亚胺-3-基-N)—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—GGFG—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—O—C(=O)—(NH—DX)、

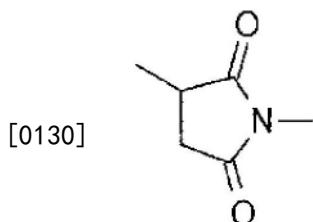
[0125] —(琥珀酰亚胺-3-基-N)—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—O—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—O—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—GGFG—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—(NH—DX)、

[0126] —(琥珀酰亚胺-3-基-N)—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—O—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—O—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—GGFG—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—(NH—DX)、

[0127] —(琥珀酰亚胺-3-基-N)—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—O—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—O—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—O—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—O—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—GGFG—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—(NH—DX)、

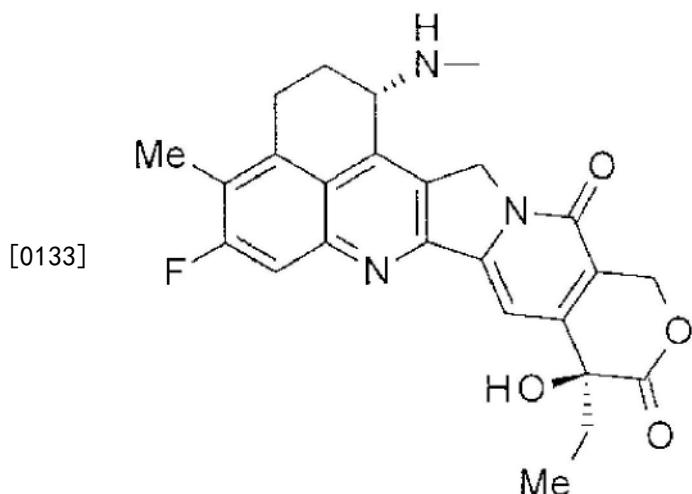
[0128] —(琥珀酰亚胺-3-基-N)—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—O—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—O—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—O—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—O—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—GGFG—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—(NH—DX)。

[0129] 其中,—(琥珀酰亚胺-3-基-N)—为下式:

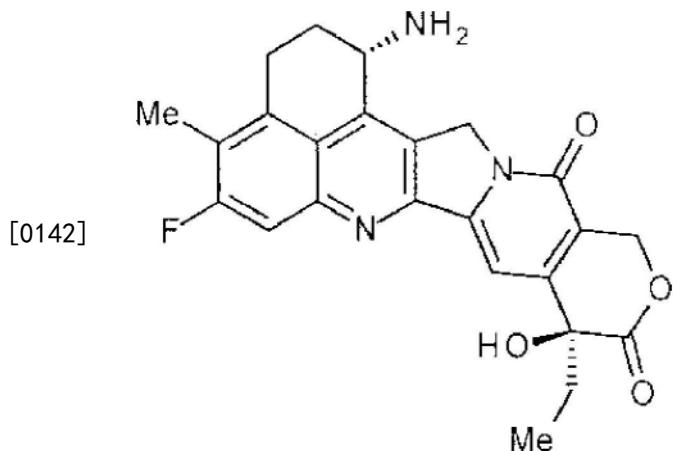


[0131] 表示的结构,以该结构的3位与抗HER2抗体连接,在1位的氮原子上与包含该结构的接头结构内的亚甲基连接。

[0132] —(NH—DX)表示下式:



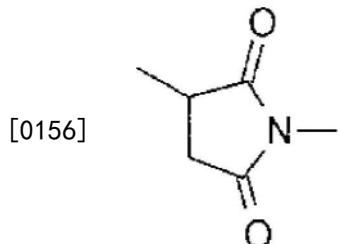
- [0134] 表示的、1位氨基的氮原子成为连接部位的基团。
- [0135] —GGFG—表示—Gly—Gly—Phe—Gly—的四肽残基。
- [0136] [13] [1] ~ [9] 中任一项所述的抗体—药物偶联物，其中，药物与  $-L^1-L^2-L^P-$   $NH-(CH_2)^{n^1}-L^a-(CH_2)^{n^2}-C(=O)-$  连接而成的药物—接头结构部分为选自下述组中的1种药物—接头结构：
- [0137] —(琥珀酰亚胺-3-基-N)  $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-0-$   $CH_2-C(=O)-(NH-DX)$ 、
- [0138] —(琥珀酰亚胺-3-基-N)  $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-0-$   $CH_2-C(=O)-(NH-DX)$ 、
- [0139] —(琥珀酰亚胺-3-基-N)  $-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-0-CH_2CH_2-0-$   $CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$ 。
- [0140] 其中，—(琥珀酰亚胺-3-基-N) —、—(NH-DX)、及—GGFG—如上文所述。
- [0141] [14] 抗体—药物偶联物，其特征在于，其是将下式



- [0143] 表示的抗肿瘤性化合物与抗HER2抗体介由下式：
- [0144]  $-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)^{n^1}-L^a-(CH_2)^{n^2}-C(=O)-$
- [0145] 表示的结构的接头、通过在存在于抗HER2抗体的铰链部的二硫键部分中形成的硫醚键连接而成的。
- [0146] 其中，抗HER2抗体连接于  $L^1$  的末端，抗肿瘤性化合物连接于  $- (CH_2)^{n^2}-C(=O)-$

部分的羰基。

- [0147] 式中,  $n^1$  表示 0 ~ 6 的整数,
- [0148]  $n^2$  表示 0 ~ 5 的整数,
- [0149]  $L^1$  表示  $-(\text{琥珀酰亚胺}-3-\text{基}-\text{N})-(\text{CH}_2)^{n^3}-\text{C}(=0)-$ ,
- [0150] 其中,  $n^3$  表示 2 ~ 8 的整数,
- [0151]  $L^2$  表示  $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})^{n^4}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=0)-$  或单键,
- [0152] 其中,  $n^4$  表示 1 ~ 6 的整数,
- [0153]  $L^P$  表示  $-\text{GGFG}-$  的四肽残基,
- [0154]  $L^a$  表示  $-0-$  或单键,
- [0155]  $-(\text{琥珀酰亚胺}-3-\text{基}-\text{N})-$  为下式:



[0157] 表示的结构, 以该结构的 3 位与抗 HER2 抗体连接, 在 1 位的氮原子上与包含该结构的接头结构内的亚甲基连接。

- [0158] [15] [14] 所述的抗体 - 药物偶联物, 其中,  $n^1$  为 3,  $n^2$  为 0,  $n^3$  为 2,  $L^2$  为  $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})^{n^4}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=0)-$ ,  $n^4$  为 2,  $L^a$  为单键, 或
- [0159]  $n^1$  为 1,  $n^2$  为 1,  $n^3$  为 5,  $L^2$  为单键,  $L^a$  为  $-0-$ , 或
- [0160]  $n^1$  为 2,  $n^2$  为 1,  $n^3$  为 5,  $L^2$  为单键,  $L^a$  为  $-0-$ 。
- [0161] [16] [14] 或 [15] 所述的抗体 - 药物偶联物, 其中,  $n^3$  为 2 或 5,  $L^2$  为单键。
- [0162] [17] [14] 或 [15] 所述的抗体 - 药物偶联物, 其中,  $n^3$  为 2 或 5,  $L^2$  为  $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})^{n^4}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=0)-$ ,  $n^4$  为 2 或 4,。
- [0163] [18] [14] ~ [17] 中任一项所述的抗体 - 药物偶联物, 其中,  $-\text{NH}-(\text{CH}_2)^{n^1}-\text{L}^a-(\text{CH}_2)^{n^2}-\text{C}(=0)-$  为
- [0164]  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=0)-$ 、
- [0165]  $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=0)-$ 、或
- [0166]  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=0)-$ 。
- [0167] [19] [14] ~ [18] 中任一项所述的抗体 - 药物偶联物, 其中, 药物与  $-\text{L}^1-\text{L}^2-\text{L}^P-\text{NH}-(\text{CH}_2)^{n^1}-\text{L}^a-(\text{CH}_2)^{n^2}-\text{C}(=0)-$  连接而成的药物 - 接头结构部分为选自下述组中的 1 种药物 - 接头结构:
- [0168]  $-(\text{琥珀酰亚胺}-3-\text{基}-\text{N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=0)-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=0)-(\text{NH}-\text{DX})$ 、
- [0169]  $-(\text{琥珀酰亚胺}-3-\text{基}-\text{N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=0)-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=0)-(\text{NH}-\text{DX})$ 、
- [0170]  $-(\text{琥珀酰亚胺}-3-\text{基}-\text{N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=0)-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=0)-(\text{NH}-\text{DX})$ 、

[0171] —(琥珀酰亚胺-3-基-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、

[0172] —(琥珀酰亚胺-3-基-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、

[0173] —(琥珀酰亚胺-3-基-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、

[0174] —(琥珀酰亚胺-3-基-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、

[0175] —(琥珀酰亚胺-3-基-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-C(=O)-(NH-DX)、

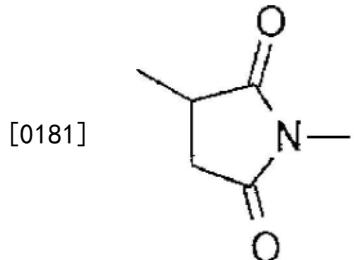
[0176] —(琥珀酰亚胺-3-基-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、

[0177] —(琥珀酰亚胺-3-基-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、

[0178] —(琥珀酰亚胺-3-基-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、

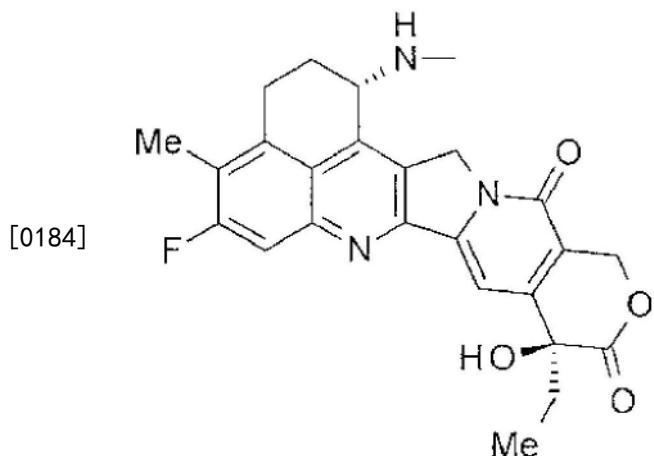
[0179] —(琥珀酰亚胺-3-基-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、

[0180] 其中, —(琥珀酰亚胺-3-基-N) 为下式:



[0182] 表示的结构,以该结构的3位与抗HER2抗体连接,在1位的氮原子上与包含该结构的接头结构内的亚甲基连接。

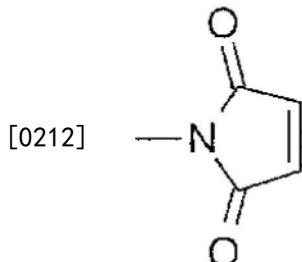
[0183] —(NH-DX) 表示下式:



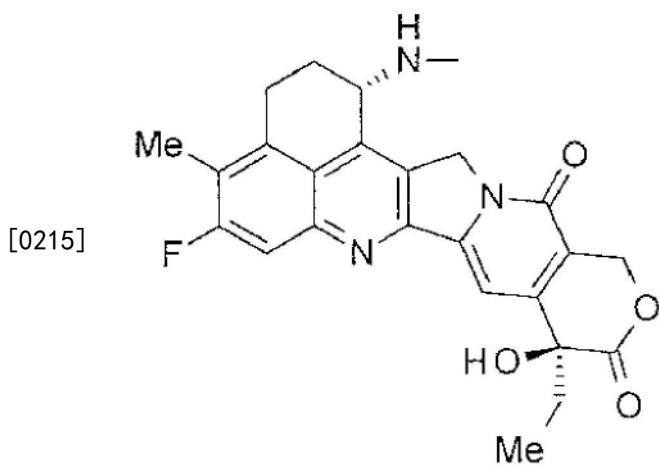
[0185] 表示的、1位氨基的氮原子成为连接部位的基团。

- [0186] —GGFG—表示—Gly—Gly—Phe—Gly—的四肽残基。
- [0187] [20] [14] ~ [18] 中任一项所述的抗体—药物偶联物, 其中, 药物与—L<sup>1</sup>—L<sup>2</sup>—L<sup>P</sup>—NH—(CH<sub>2</sub>)<sup>n1</sup>—L<sup>a</sup>—(CH<sub>2</sub>)<sup>n2</sup>—C(=O)—连接而成的药物—接头结构部分为选自下述组中的1种药物—接头结构:
- [0188] —(琥珀酰亚胺—3—基—N)—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—GGFG—NH—CH<sub>2</sub>—O—CH<sub>2</sub>—C(=O)—(NH—DX)、
- [0189] —(琥珀酰亚胺—3—基—N)—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—GGFG—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—O—CH<sub>2</sub>—C(=O)—(NH—DX)、
- [0190] —(琥珀酰亚胺—3—基—N)—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—O—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—O—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—GGFG—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—(NH—DX)。
- [0191] 其中,—(琥珀酰亚胺—3—基—N)—、—(NH—DX)、及—GGFG—如上文所述。
- [0192] [21] [1] ~ [20] 中任一项所述的抗体—药物偶联物, 其中, 选择的1种药物—接头结构相对于1抗体而言的平均连接数在1~10个的范围内。
- [0193] [22] [1] ~ [20] 中任一项所述的抗体—药物偶联物, 其中, 选择的1种药物—接头结构相对于1抗体而言的平均连接数在2~8个的范围内。
- [0194] [23] [1] ~ [20] 中任一项所述的抗体—药物偶联物, 其中, 选择的1种药物—接头结构相对于1抗体而言的平均连接数在3~8个的范围内。
- [0195] [24] 医药, 其含有[1] ~ [23] 中任一项所述的抗体—药物偶联物、其盐、或它们的水合物。
- [0196] [25] 抗肿瘤药及/或抗癌药, 其含有[1] ~ [23] 中任一项所述的抗体—药物偶联物、其盐、或它们的水合物。
- [0197] [26] [25] 所述的抗肿瘤药及/或抗癌药, 其用于应用于肺癌、尿道癌、大肠癌、前列腺癌、卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、膀胱癌、胃癌、胃肠道间质瘤、宫颈癌、食道癌、鳞状细胞癌、腹膜癌、肝癌、肝细胞癌、结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、子宫癌、唾液腺癌、肾癌、外阴癌、甲状腺癌、阴茎癌、白血病、恶性淋巴瘤、浆细胞瘤、骨髓瘤、或肉瘤。
- [0198] [27] 医药组合物, 其含有[1] ~ [23] 中任一项所述的抗体—药物偶联物、其盐、或它们的水合物作为活性成分, 且含有药学上可接受的制剂成分。
- [0199] [28] [27] 所述的医药组合物, 其用于应用于肺癌、尿道癌、大肠癌、前列腺癌、卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、膀胱癌、胃癌、胃肠道间质瘤、宫颈癌、食道癌、鳞状细胞癌、腹膜癌、肝癌、肝细胞癌、结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、子宫癌、唾液腺癌、肾癌、外阴癌、甲状腺癌、阴茎癌、白血病、恶性淋巴瘤、浆细胞瘤、骨髓瘤、或肉瘤。
- [0200] [29] 肿瘤及/或癌的治疗方法, 其特征在于, 给予[1] ~ [23] 中任一项所述的抗体—药物偶联物、其盐、或它们的水合物。
- [0201] [30] 抗体—药物偶联物的制造方法, 其特征在于, 利用下述方法, 将药物—接头部分连接于该抗体, 所述方法为, 使下式表示的化合物:
- [0202] (马来酰亚胺—N—基)—(CH<sub>2</sub>)<sup>n3</sup>—C(=O)—L<sup>2</sup>—L<sup>P</sup>—NH—(CH<sub>2</sub>)<sup>n1</sup>—L<sup>a</sup>—(CH<sub>2</sub>)<sup>n2</sup>—C(=O)—(NH—DX)
- [0203] 与抗HER2抗体或其反应性衍生物反应, 在存在于该抗体的铰链部的二硫键部分中形成硫醚键的方法。

- [0204] 式中,  $n^3$  表示整数2~8,
- [0205]  $L^2$  表示  $-\text{NH}- (\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})^4-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$  或单键,
- [0206] 其中,  $n^4$  表示1~6的整数,
- [0207]  $L^P$  表示由选自苯丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、赖氨酸、瓜氨酸、丝氨酸、谷氨酸、天冬氨酸中的2~7个氨基酸构成的肽残基,
- [0208]  $n^1$  表示0~6的整数,
- [0209]  $n^2$  表示0~5的整数,
- [0210]  $L^a$  表示  $-\text{O}-$  或单键,
- [0211] (马来酰亚胺-N-基) 为下式



- [0213] 表示的、氮原子成为连接部位的基团。
- [0214]  $-\text{(NH-DX)}$  为下式



- [0216] 表示的、1位氨基的氮原子成为连接部位的基团。
- [0217] [31] [30] 所述的制造方法, 其中, 将药物-接头部分连接于抗HER2抗体的方法为对该抗体进行还原处理而转化为反应性衍生物的方法。
- [0218] [32] [30] 或 [31] 所述的制造方法, 其中, 选择的1种药物-接头结构相对于1抗体而言的平均连接数在1~10个的范围内。
- [0219] [33] [30] 或 [31] 所述的制造方法, 其中, 选择的1种药物-接头结构相对于1抗体而言的平均连接数在2~8个的范围内。
- [0220] [34] [30] 或 [31] 所述的制造方法, 其中, 选择的1种药物-接头结构相对于1抗体而言的平均连接数在3~8个的范围内。
- [0221] [35] 抗体-药物偶联物, 其是利用[30]~[34]中任一种制造方法而得到的。
- [0222] [36] 抗体-药物偶联物, 其是通过以下方法而得到的, 所述方法为, 在还原条件下处理抗HER2抗体, 然后使其与选自以下的组中的化合物反应, 在该抗体的铰链部的巯醚键

部分中形成硫醚键：

- [0223] (马来酰亚胺-N-基) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、
- [0224] (马来酰亚胺-N-基) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、
- [0225] (马来酰亚胺-N-基) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、
- [0226] (马来酰亚胺-N-基) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、
- [0227] (马来酰亚胺-N-基) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、
- [0228] (马来酰亚胺-N-基) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、
- [0229] (马来酰亚胺-N-基) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、
- [0230] (马来酰亚胺-N-基) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、
- [0231] (马来酰亚胺-N-基) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、
- [0232] (马来酰亚胺-N-基) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、
- [0233] (马来酰亚胺-N-基) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、
- [0234] (马来酰亚胺-N-基) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、
- [0235] (马来酰亚胺-N-基) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、
- [0236] (马来酰亚胺-N-基) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、
- [0237] (马来酰亚胺-N-基) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、
- [0238] (马来酰亚胺-N-基) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、
- [0239] (马来酰亚胺-N-基) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、
- [0240] (马来酰亚胺-N-基) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、
- [0241] (马来酰亚胺-N-基) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、

[0242] (马来酰亚胺-N-基) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、

[0243] (马来酰亚胺-N-基)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-C(=O)-(NH-DX)、

[0244] (马来酰亚胺-N-基)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、

[0245] (马来酰亚胺-N-基)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、

[0246] (马来酰亚胺-N-基)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、

[0247] (马来酰亚胺-N-基) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、

[0248] (马来酰亚胺-N-基) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX).

[0249] (马来酰亚胺-N-基) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-DX

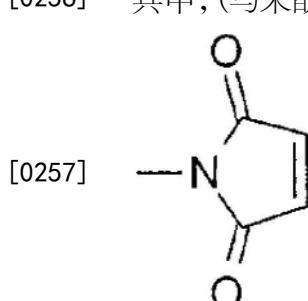
[0250] (马来酰亚胺-N-基)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-

[0252] (马来酰亚胺-N-基)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DA)、

[0254] (马来酰亚胺-N-基)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-

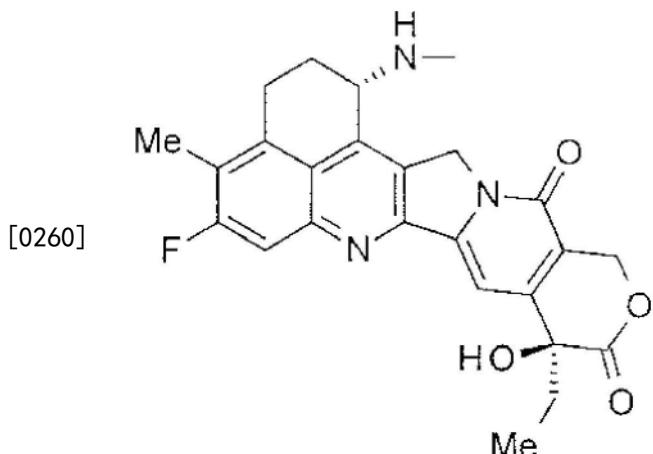
[0255] (马来酰亚胺-N-基)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-

$$0-\text{CH}_2\text{CH}_2-0-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CB}$$



[0258] 表示的、氮原子成为连接部位的基团。

[0259]  $-\text{NH}-\text{DX}$  为下式



- [0261] 表示的、1位氨基的氮原子成为连接部位的基团。
- [0262] —GGFG—表示—Gly—Gly—Phe—Gly—的四肽残基。
- [0263] [37]抗体—药物偶联物,其是通过以下方法而得到的,所述方法为,在还原条件下处理抗HER2抗体,然后使其与选自以下的组中的化合物反应,在该抗体的铰链部的硫醚键部分中形成硫醚键:
- [0264] (马来酰亚胺—N—基) —CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O) —NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—O—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—O—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O) —GGFG—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O) —(NH—DX) 、
- [0265] (马来酰亚胺—N—基) —CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O) —GGFG—NH—CH<sub>2</sub>—O—CH<sub>2</sub>—C(=O) —(NH—DX) 、及
- [0266] (马来酰亚胺—N—基) —CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O) —GGFG—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—O—CH<sub>2</sub>—C(=O) —(NH—DX) 。
- [0267] 其中, (马来酰亚胺—N—基) —、—(NH—DX) 、及—GGFG—如上文所述。
- [0268] [38] [36]或[37]所述的抗体—药物偶联物,其中,选择的1种药物—接头结构相对于1抗体而言的平均连接数在1~10个的范围内。
- [0269] [39] [36]或[37]所述的抗体—药物偶联物,其中,选择的1种药物—接头结构相对于1抗体而言的平均连接数在2~8个的范围内。
- [0270] [40] [36]或[37]所述的抗体—药物偶联物,其中,选择的1种药物—接头结构相对于1抗体而言的平均连接数在3~8个的范围内。
- [0271] 发明的效果
- [0272] 通过介由特定的结构的接头连接抗肿瘤性化合物依沙替康而成的抗HER2抗体—药物偶联物,可达成优异的抗肿瘤效果及安全性。

## 附图说明

- [0273] 图1表示人化抗HER2单克隆抗体重链的氨基酸序列(序列号1)。
- [0274] 图2表示人化抗HER2单克隆抗体轻链的氨基酸序列(序列号2)。
- [0275] 图3为表示抗体—药物偶联物(27)或曲妥珠单抗针对人乳腺癌株KPL—4细胞皮下移植裸鼠(nude mouse)的抗肿瘤效果的图。图中,横轴表示细胞移植后的天数,纵轴表示肿瘤体积。
- [0276] 图4为表示抗体—药物偶联物(8)、(28)、或曲妥珠单抗emtansine针对人胃癌株

NCI—N87细胞皮下移植裸鼠的抗肿瘤效果的图。图中,横轴表示细胞移植后的天数,纵轴表示肿瘤体积。

[0277] 图5为表示抗体—药物偶联物(8)、(29)、(30)、曲妥珠单抗、或曲妥珠单抗emtansine针对人乳腺癌株JIMT—1细胞皮下移植裸鼠的抗肿瘤效果的图。图中,横轴表示细胞移植后的天数,纵轴表示肿瘤体积。

[0278] 图6为表示抗体—药物偶联物(31)、曲妥珠单抗、或曲妥珠单抗emtansine针对人胰腺癌株Capan—1细胞皮下移植裸鼠的抗肿瘤效果的图。图中,横轴表示细胞移植后的天数,纵轴表示肿瘤体积。

[0279] 图7为表示抗体—药物偶联物(50)针对人胃癌株NCI—N87细胞皮下移植裸鼠的抗肿瘤效果的图。图中,横轴表示细胞移植后的天数,纵轴表示肿瘤体积。

[0280] 图8为表示抗体—药物偶联物(50)、曲妥珠单抗、或曲妥珠单抗emtansine针对人乳腺癌株ST225细胞皮下移植裸鼠的抗肿瘤效果的图。图中,横轴表示细胞移植后的天数,纵轴表示肿瘤体积。

[0281] 图9为表示抗体—药物偶联物(50)、曲妥珠单抗、或曲妥珠单抗emtansine针对人乳腺癌株ST910细胞皮下移植裸鼠的抗肿瘤效果的图。图中,横轴表示细胞移植后的天数,纵轴表示肿瘤体积。

[0282] 图10为表示抗体—药物偶联物(50)、曲妥珠单抗、或曲妥珠单抗emtansine针对人大肠癌株CTG—0401细胞皮下移植裸鼠的抗肿瘤效果的图。图中,横轴表示细胞移植后的天数,纵轴表示肿瘤体积。

[0283] 图11为表示抗体—药物偶联物(50)、曲妥珠单抗、或曲妥珠单抗emtansine针对人非小细胞肺癌株CTG—0860细胞皮下移植裸鼠的抗肿瘤效果的图。图中,横轴表示细胞移植后的天数,纵轴表示肿瘤体积。

[0284] 图12为表示抗体—药物偶联物(50)、曲妥珠单抗、或曲妥珠单抗emtansine针对人胆管癌株CTG—0927细胞皮下移植裸鼠的抗肿瘤效果的图。图中,横轴表示细胞移植后的天数,纵轴表示肿瘤体积。

[0285] 图13为表示抗体—药物偶联物(50)、曲妥珠单抗、或曲妥珠单抗emtansine针对人食道癌株CTG—0137细胞皮下移植裸鼠的抗肿瘤效果的图。图中,横轴表示细胞移植后的天数,纵轴表示肿瘤体积。

[0286] 图14为表示抗体—药物偶联物(50)、曲妥珠单抗、或曲妥珠单抗emtansine针对人卵巢癌株SK—OV—3细胞皮下移植裸鼠的抗肿瘤效果的图。图中,横轴表示细胞移植后的天数,纵轴表示肿瘤体积。

## 具体实施方式

[0287] 以下,参照附图来说明本发明的具体实施方式。需要说明的是,以下说明的实施方式表示本发明的代表实施方式的一例,本发明的范围并不受其限制。

[0288] 本发明的抗HER2抗体—药物偶联物为介由接头结构部分将抗肿瘤性化合物连接于抗HER2抗体而得到的抗肿瘤性药物,以下详细进行说明。

[0289] [抗体]

[0290] 本发明的抗HER2抗体—药物偶联物中使用的抗HER2抗体可来源于任何物种,可优

选例举人、大鼠、小鼠、及兔。当抗体来源于人以外的物种时,优选使用公知的技术,将其嵌合化或人源化。本发明的抗体可以是多克隆抗体,也可以是单克隆抗体,优选单克隆抗体。

[0291] 抗HER2抗体为能将肿瘤细胞作为靶标的抗体,即,具有能识别肿瘤细胞的特性、能与肿瘤细胞结合的特性、能进入到肿瘤细胞内而内化的特性、以及针对肿瘤细胞的杀细胞活性等,可介由接头与具有抗肿瘤活性的化合物连接而形成抗体—药物偶联物。

[0292] 抗体与肿瘤细胞的结合性可利用流式细胞仪确认。抗体进入到肿瘤细胞内可利用以下方法确认:(1)使用与治疗抗体结合的二抗(荧光标记),利用荧光显微镜观察已进入到细胞内的抗体的检验(Cell Death and Differentiation (2008) 15, 751—761);(2)使用与治疗抗体结合的二抗(荧光标记)、测定进入到细胞内的荧光量的检验(Molecular Biology of the Cell Vol.15, 5268—5282, December 2004);或者,(3)Mab—ZAP检验,其中使用与治疗抗体结合的免疫毒素,其进入到细胞内之后会放出毒素从而抑制细胞增殖(Bio Techniques 28:162—165, January 2000)。作为免疫毒素,也可使用白喉毒素的催化剂区域与G蛋白的重组体复合蛋白质。

[0293] 抗体的抗肿瘤活性可通过在体外(in vitro)测定抑制细胞增殖的活性而确认。例如,可培养过量表达了抗体的靶蛋白的癌细胞株,向培养体系中添加各种浓度的抗体,测定针对灶形成(focus formation)、集落(colony)形成及球体生长的抑制活性。可通过在体内试验(In vivo)中,例如向移植了高表达靶蛋白的肿瘤细胞株的裸鼠给予抗体,测定癌细胞的变化,来确认抗肿瘤活性。

[0294] 由于抗体—药物偶联物连接有发挥抗肿瘤效果的化合物,所以抗体自身不必须具有抗肿瘤效果,但优选具有抗肿瘤效果。为了特异地·选择性地在肿瘤细胞内发挥抗肿瘤性化合物的细胞毒性性,优选抗体具有内化而转移到肿瘤细胞内的性质,这是重要的。

[0295] 抗HER2抗体可通过已知的手段而获取。例如,可通过利用本领域中通常实施的方法,将作为抗原的多肽向动物免疫,采集在生物体内产生的抗体,并将其纯化而得到。抗原的来源不限于人,也可将来源于小鼠、大鼠等人以外的动物的抗原向动物免疫。这种情况下,通过对与获取的异种抗原结合的抗体与人抗原的交差性进行试验,可选择适用于人的疾病抗体。

[0296] 另外,也可按照已知的方法(例如,Kohler and Milstein, Nature (1975) 256, p. 495—497; Kennet, R. ed., Monoclonal Antibodies, p. 365—367, Plenum Press, N.Y. (1980)),通过将产生针对抗原的抗体的产抗体细胞与骨髓瘤细胞融合,从而建立杂交瘤,获得单克隆抗体。

[0297] 需要说明的是,抗原可通过利用基因操作使宿主细胞产生编码抗原蛋白的基因而得到。具体而言,制作可表达抗原基因的载体,将其导入至宿主细胞,使该基因表达,将表达的抗原纯化即可。也可通过使用将基于上述基因操作的抗原表达细胞、或表达抗原的细胞株向动物免疫的方法而获取抗体。

[0298] 本发明中可使用的抗HER2抗体没有特别限制,例如,优选具有以下特性的抗体。

[0299] (1) 抗HER2抗体,其特征在于,具有以下特性:

[0300] (a) 与HER2特异地结合。

[0301] (b) 具有通过与HER2结合而内化至HER2表达细胞中的活性。

[0302] (2) 上述(1)所述的抗体,其结合于HER2的胞外结构域。

- [0303] (3) 上述(1)或(2)所述的抗体,其为单克隆抗体。
- [0304] (4) 上述(1)~(3)中任一项所述的抗体,其具有抗体依赖性细胞毒性(ADCC)活性及/或补体依赖性细胞毒性(CDC)活性。
- [0305] (5) 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、或人化单克隆抗体。
- [0306] (6) 上述(1)~(5)中任一项所述的抗体,其为人化单克隆抗体,所述人化单克隆抗体包含:包含序列号1中记载的氨基酸序列的重链及包含序列号2中记载的氨基酸序列的轻链。
- [0307] (7) 上述(1)~(6)中任一项所述的抗体,其中,重链羧基末端的赖氨酸残基缺失。
- [0308] (8) 上述(7)所述的抗体,其包含:包含序列号1中氨基酸编号1~449中记载的氨基酸序列的重链及包含序列号2中氨基酸编号1~214中记载的氨基酸序列的轻链。
- [0309] (9) 抗体,其是利用包括以下工序的制造抗体的方法而得到的:培养已通过表达载体转化的宿主细胞的工序,所述表达载体含有编码上述(1)~(8)中任一项所述的抗体的多核苷酸;以及从在该工序中得到的培养物中采集目标抗体的工序。
- [0310] 以下,对本发明中使用的抗HER2抗体进行说明。
- [0311] 本说明书中,“癌”与“肿瘤”以相同含义使用。
- [0312] 本说明书中,术语“基因”,不仅包括DNA,还包括其mRNA、cDNA及其cRNA。
- [0313] 本说明书中,术语“多核苷酸”,以与核酸相同的含义使用,其也包括DNA、RNA、探针、寡核苷酸、及引物。
- [0314] 本说明书中,“多肽”“蛋白质”“蛋白”以无区别的方式使用。
- [0315] 本说明书中,“细胞”也包括动物个体内的细胞、培养细胞。
- [0316] 本说明书中,术语“HER2”,以与HER2蛋白相同的含义使用。
- [0317] 本说明书中,所谓抗HER2抗体,没有特别限制,可举出帕妥珠单抗(国际公开01/00245号)、曲妥珠单抗(美国专利第5821337号)等,优选曲妥珠单抗。但只要是特异性地与HER2结合、更优选通过与HER2结合而具有在HER2表达细胞中内化的活性的抗HER2抗体即可,不限于上述抗体。
- [0318] 本说明书中,有时也将“曲妥珠单抗”称为赫赛汀(HERCEPTIN)(注册商标)、huMAb4D5-8、rhuMAb4D5-8,为人化抗体,所述人化抗体包含:包含序列号1(图1)中氨基酸编号1~449中记载的氨基酸序列的重链及包含序列号2(图2)中氨基酸编号1~214中记载的氨基酸序列的轻链。
- [0319] 本说明书中,术语“特异性结合”,是指并非非特异的吸附的结合。作为结合是否特异的判定基准,例如,可举出解离常数(以下、“KD”)。优选的相对于抗体的HER2蛋白的KD值为 $1 \times 10^{-5}$ M以下、 $5 \times 10^{-6}$ M以下、 $2 \times 10^{-6}$ M以下、或 $1 \times 10^{-6}$ M以下;更优选地,为 $5 \times 10^{-7}$ M以下、 $2 \times 10^{-7}$ M以下、或 $1 \times 10^{-7}$ M以下;进一步优选地,为 $5 \times 10^{-8}$ M以下、 $2 \times 10^{-8}$ M以下、或 $1 \times 10^{-8}$ M以下;最优选地,为 $5 \times 10^{-9}$ M以下、 $2 \times 10^{-9}$ M以下、或 $1 \times 10^{-9}$ M以下。HER2蛋白与抗体的结合可利用表面等离子共振(Surface Plasmon Resonance)法、ELISA法、RIA法等已知的方法测定。
- [0320] 本说明书中的“CDR”是指,互补性决定区(CDR:Complementarity determining region)。已知抗体分子的重链及轻链中分别具有3个CDR。CDR也被称为高度可变区

(hypervariable domain), 其为在抗体的重链及轻链的可变区域内一级结构的变异性特别高的部位, 在重链及轻链的多肽链的一级结构上, 分别地, 分离在3处。本说明书中, 关于抗体的CDR, 针对重链的CDR, 从重链氨基酸序列的氨基末端侧开始记载为CDRH1、CDRH2、CDRH3, 针对轻链的CDR, 从轻链氨基酸序列的氨基末端侧开始, 记载为CDRL1、CDRL2、CDRL3。这些部位在立体结构上相互接近, 决定针对结合的抗原的特异性。

[0321] 本发明中, 所谓“在严格条件下进行杂交”, 是指在下述条件下或与其同等的条件下进行杂交, 在所述条件下, 可通过下述操作而进行鉴定: 在市售的杂交溶液ExpressHyb Hybridization Solution (Clontech公司制) 中, 于68℃进行杂交, 或者, 使用固定有DNA的滤器, 在0.7—1.0M的NaCl存在下, 于68℃进行杂交, 然后使用0.1—2倍浓度的SSC溶液(所谓1倍浓度SSC, 包含150mM NaCl、15mM柠檬酸钠), 于68℃进行洗涤。

### [0322] 1. HER2

[0323] HER2是被认定为人表皮生长因子受体2型相关癌基因的代表性生长因子受体型的癌基因产物之一, 其为分子量185kDa的具有酪氨酸激酶结构域的跨膜受体蛋白。已知是包含HER1 (EGFR, ErbB—1)、HER2 (neu, ErbB—2)、HER3 (ErbB—3)、HER4 (ErbB—4) 的EGFR家族之一, 通过形成同源二聚体或与作为其他EGFR的HER1、HER3、或HER4的异源二聚体, 而将细胞内酪氨酸残基自磷酸化从而将其活化, 由此, 在正常细胞及肿瘤细胞中对细胞的增殖・分化・生存发挥重要的作用。

[0324] 对于本发明中使用的HER2蛋白而言, 可从人、非人哺乳动物(大鼠、小鼠等)的HER2表达细胞中直接纯化而使用, 或者, 可制备该细胞的细胞膜级分而使用, 另外, 可通过在体外(*in vitro*)合成HER2、或通过基因操作而使宿主细胞产生HER2而得到。基因操作中, 具体而言, 通过在将HER2cDNA整合至可表达的载体中后, 在包含转录和翻译所需要的酶、底物及能量物质的溶液中进行合成, 或将其他原核生物、或真核生物的宿主细胞转化而使其表达HER2, 可得到该蛋白质。另外, 也可将基于前述的基因操作而得到的HER2表达细胞、或表达HER2的细胞株作为HER2蛋白而使用。

[0325] HER2的DNA序列及氨基酸序列已在公开数据库上公开, 例如, 可通过M11730 (Genbank)、NP\_004439.2 (NCBI) 等登录号而参考。

[0326] 另外, 上述HER2的氨基酸序列中, 包含1个或数个氨基酸被取代、缺失及/或添加而成的氨基酸序列, HER2中也包含具有与该蛋白质同等的生物活性的蛋白质。

[0327] 人HER2蛋白由N末端包含22氨基酸残基的信号序列、包含630氨基酸残基的胞外结构域、包含23氨基酸残基的跨细胞膜结构域、包含580氨基酸残基的胞内结构域构成。

### [0328] 2. 抗HER2抗体的制造

[0329] 本发明的针对HER2的抗体例如可通过以下方式得到: 按照本领域中通常实施的方法将选自HER2或HER2的氨基酸序列中的任意的多肽对动物进行免疫, 采集在生物体内产生的抗体并进行纯化。作为抗原的HER2的生物种类不限于人, 也可使用来源于小鼠、大鼠等人以外的动物的HER2、大鼠p185neu等对动物进行免疫。这种情况下, 通过对与获取的异种HER2结合的抗体与人HER2的交差性进行试验, 可选出可应用于人的疾病的抗体。

[0330] 另外, 也可通过按照已知的方法(例如, Kohler and Milstein, *Nature* (1975) 256, p. 495—497; Kennet, R. ed., *Monoclonal Antibodies*, p. 365—367, Plenum Press, N.Y. (1980)), 将产生针对HER2的抗体的产抗体细胞与骨髓瘤细胞融合而建立杂交瘤, 得到单克

隆抗体。

[0331] 需要说明的是,作为抗原的HER2可通过对HER2基因进行基因操作而使其在宿主细胞中表达而得到。

[0332] 具体而言,制作可表达HER2基因的载体,将其导入至宿主细胞,使该基因表达,将表达的HER2纯化即可。

[0333] 另外,也可将基于上述的基因操作的HER2表达细胞、或表达HER2的细胞株作为HER2蛋白使用。可利用已知的手段获取抗HER2抗体。以下,具体说明针对HER2的抗体的获取方法。

[0334] (1) 抗原的制备

[0335] 作为用于制作抗HER2抗体的抗原,可举出HER2或包含其至少6个连续氨基酸的部分氨基酸序列的多肽、或向它们中添加任意的氨基酸序列、载体而得到的衍生物。

[0336] HER2可从人的肿瘤组织或肿瘤细胞中直接纯化而使用,另外,可通过在体外(*in vitro*)合成HER2、或通过基因操作而在宿主细胞中产生HER2而得到。

[0337] 基因操作中,具体而言,通过在将HER2的cDNA整合至可表达的载体中后,在包含转录和翻译所需要的酶、底物及能量物质的溶液中进行合成,或将其他原核生物或真核生物的宿主细胞转化而使其表达HER2,可得到抗原。

[0338] 另外,也可通过使将作为膜蛋白质的HER2的细胞外区域与抗体的恒定区连接的融合蛋白质在适当的宿主·载体系统中表达,从而作为分泌蛋白质而得到抗原。

[0339] HER2的cDNA例如可通过所谓PCR法获取:以表达HER2的cDNA的cDNA文库为模板,使用特异地扩增HER2cDNA的引物,进行聚合酶链反应(PCR;参照Saiki, R.K., 等, *Science* (1988) 239, p. 487—489)。

[0340] 作为多肽的体外(*in vitro*)合成,例如,可举出Roche Diagnostics, Inc.制的Rapid Translation System(RTS),但不限于此。

[0341] 作为原核细胞的宿主,例如,可举出大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)等。为了将目标基因在这些宿主细胞内转化,用包含来源于能与宿主匹配的种类的复制子即复制起点、和调节序列的质粒载体转化宿主细胞。另外,作为载体,优选具有可向转化细胞赋予表型形状(表型)的选择性的序列的载体。

[0342] 真核细胞的宿主细胞包括脊椎动物、昆虫、酵母等细胞,作为脊椎动物细胞,例如,常使用作为猴的细胞的COS细胞(Gluzman, Y. *Cel1* (1981) 23, p. 175—182、ATCC CRL—1650; ATCC: American Type Culture Collection)、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系(Urlaub, G. and Chasin, L.A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1980) 77, p. 4126—4220)等,但不限于这些。

[0343] 可按照本领域中通常实施的方法培养如上所述地得到的转化体,通过该培养,可在细胞内或细胞外产生目标多肽。

[0344] 作为该培养中使用的培养基,可适当选择与采用的宿主细胞相应的常用的各种培养基,如果是大肠杆菌,例如,根据需要,可向LB培养基中添加氨苄西林等抗生素、IPMG而使用。

[0345] 对于通过上述培养而在转化体的细胞内或细胞外产生的重组蛋白,可通过利用了该蛋白的物理性质、化学性质等的各种已知的分离操作方法进行分离·纯化。

[0346] 作为该方法,具体而言,例如,可例举基于通常的蛋白质沉淀剂的处理、超滤、分子筛色谱法(凝胶过滤)、吸附色谱法、离子交换色谱法、亲和色谱法等各种液相色谱法、透析法、它们的组合等。

[0347] 另外,通过在表达的重组蛋白上连接包括6个残基的组氨酸标签,从而能用镍亲和柱高效地纯化。或者,通过在表达的重组蛋白上连接IgG的Fc区域,从而能用蛋白A柱高效地纯化。

[0348] 通过组合上述方法,能容易地以高收率、高纯度大量制造目标多肽。

[0349] 也可将上文所述的转化体自身作为抗原使用。另外,也可将表达HER2的细胞株作为抗原使用。作为这样的细胞株,可举出人乳腺癌株SK-BR-3、BT-474、KPL-4、或JIMT-1、人胃癌株NCI-N87、及人卵巢癌株SK-OV-3,但不限于这些细胞株,只要能表达HER2即可。

[0350] (2) 抗HER2单克隆抗体的制造

[0351] 作为与HER2特异性地结合的抗体的例子,可举出与HER2特异性地结合的单克隆抗体,其获取方法如下所述。

[0352] 在制造单克隆抗体时,通常需要下述这样的作业工序。

[0353] 即,

[0354] (a) 纯化作为抗原使用的生物高分子,或制备抗原表达细胞,

[0355] (b) 通过向动物注射抗原而将动物免疫,然后采集血液并检测其抗体效价,确定摘出脾脏的时机,然后制备产抗体细胞的工序,

[0356] (c) 制备骨髓瘤细胞(以下称为“骨髓瘤”),

[0357] (d) 进行产抗体细胞与骨髓瘤的细胞融合,

[0358] (e) 筛选产生目标抗体的杂交瘤组,

[0359] (f) 分割成单一细胞克隆(克隆),

[0360] (g) 根据情况,培养用于大量制造单克隆抗体的杂交瘤,或饲养移植了杂交瘤的动物,

[0361] (h) 对如上所述地制造的单克隆抗体的生理活性、及其结合特异性进行研究,或检验作为标记试剂的特性,等等。

[0362] 以下,按照上述工序详细说明单克隆抗体的制作方法,该抗体的制作方法不限于此,例如也可使用脾细胞以外的产抗体细胞及骨髓瘤。

[0363] (a) 抗原的纯化

[0364] 作为抗原,可使用利用上述那样的方法制备的HER2或其一部分。

[0365] 另外,也可将利用HER2表达重组体细胞制备的膜级分、或HER2表达重组体细胞自身、以及利用本领域技术人员公知的方法进行化学合成而得到的本发明的蛋白质的部分肽作为抗原使用。

[0366] 此外,也可将HER2表达细胞株作为抗原使用。

[0367] (b) 产抗体细胞的制备

[0368] 将工序(a)中得到的抗原、与弗式完全或不完全佐剂、或硫酸铝钾之类的助剂混合,作为免疫原而向实验动物免疫。此外,还有将抗原表达细胞作为免疫原而向实验动物免疫的方法。作为实验动物,可无障碍地使用已知的杂交瘤制作方法中使用的动物。具体而

言,例如,可使用小鼠、大鼠、山羊、绵羊、牛、马等。但是,从与摘出的产抗体细胞融合的骨髓瘤细胞的获得容易性等观点考虑,优选将小鼠或大鼠作为被免疫动物。

[0369] 另外,对于实际使用的小鼠及大鼠的系统没有特别限制,在小鼠的情况下,例如可使用各系统A、AKR、BALB/c、BDP、BA、CE、C3H、57BL、C57BL、C57L、DBA、FL、HTH、HT1、LP、NZB、NZW、RF、R III、SJL、SWR、WB、129等,另外,在大鼠的情况下,例如,可使用Wistar、Low、Lewis、Sprague、Dawley、ACI、BN、Fischer等。

[0370] 这些小鼠及大鼠可从例如CLEA Japan, Inc.、Charles River Laboratories Japan, Inc.等实验动物饲养销售商获得。

[0371] 考虑到与后述的骨髓瘤细胞的融合适应性,作为被免疫动物,小鼠中特别优选BALB/c系统,大鼠中特别优选Wistar及Low系统。

[0372] 另外,考虑抗原的人与小鼠的同源性,还优选使用除去了自身抗体的降低了生物体机能的小鼠,即自己免疫疾病小鼠。

[0373] 需要说明的是,这些小鼠或大鼠在免疫时的周龄优选为5~12周龄,进一步优选为6~8周龄。

[0374] 为了通过HER2或其重组体而将动物免疫,可使用例如Weir, D.M., *Handbook of Experimental Immunology* Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987); Kabat, E.A. and Mayer, M.M., *Experimental Immunoochemistry*, Charles C Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964) 等中详细记载的已知的方法。

[0375] 这些免疫方法中,可合适地用于本发明中的方法具体例如如下所述。

[0376] 即,首先,将作为抗原的膜蛋白质级分、或表达抗原的细胞向动物的皮内或腹腔内给予。但是,为了提高免疫效率,优选并用两者,前半段进行皮内给予,后半段或仅最后一次进行腹腔内给予,这样,可特别地提高免疫效率。

[0377] 抗原的给予时间表根据被免疫动物的种类、个体差别等的不同而不同,通常优选抗原给予次数为3~6次、给予间隔为2~6周,进一步优选给予次数为3~4次、给予间隔为2~4周。

[0378] 另外,抗原的给予量根据动物的种类、个体差异等的不同而不同,通常为0.05~5mg,优选为0.1~0.5mg左右。

[0379] 加强免疫在如上所述的抗原给予的1~6周后、优选为1~4周后、进一步优选为1~3周后进行。免疫原为细胞的情况下,使用 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 个细胞。

[0380] 需要说明的是,进行加强免疫时的抗原给予量根据动物的种类、大小等的不同而不同,通常,例如小鼠的情况下,设定为0.05~5mg、优选为0.1~0.5mg、进一步优选为0.1~0.2mg左右。免疫原为细胞的情况下,使用 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 个细胞。

[0381] 上述加强免疫1~10天后、优选为2~5天后、进一步优选为2~3天后,无菌地从被免疫动物取出包含产抗体细胞的脾脏细胞或淋巴细胞。此时,测定抗体效价,若将抗体效价足够高的动物作为产抗体细胞的供给源,则可提高后续操作的效率。

[0382] 作为其中使用的抗体效价的测定方法,例如,可举出RIA法或ELISA法,但不限于这些方法。本发明中的抗体效价的测定例如可利用ELISA法,按照以下记载的步骤进行。

[0383] 首先,将纯化或部分纯化的抗原吸附于ELISA用96孔板等的固相表面,进而利用与抗原没有关系的蛋白质例如牛血清白蛋白(BSA)覆盖未吸附抗原的固相表面,将该表面洗

涤后,与作为一抗的分级稀释的试样(例如小鼠血清)接触,使上述抗原与试样中的抗体结合。

[0384] 进而,作为二抗,添加经酶标记的针对小鼠抗体的抗体,使其与小鼠抗体结合,洗涤后添加该酶的底物,测定因基于底物分解的显色而导致的吸光度的变化等,由此计算抗体效价。

[0385] 可按照已知的方法(例如,Kohler等,Nature(1975)256,p.495;Kohler等,Eur.J.Immunol.(1977)6,p.511;Milstein等,Nature(1977),266,p.550;Walsh,Nature,(1977)266,p.495)从被免疫动物的脾脏细胞或淋巴细胞分离产抗体细胞。例如,在脾脏细胞的情况下,可采用常规方法:将脾脏切碎,用不锈钢网过滤细胞,然后悬浮于伊格尔最小限度培养基(MEM),分离产抗体细胞。

[0386] (c)骨髓瘤细胞(以下称为“骨髓瘤”)的制备

[0387] 对于用于细胞融合的骨髓瘤细胞没有特别限制,可从已知的细胞株中适当选择使用。但是,考虑到从融合细胞选择杂交瘤时的便利性,优选使用其选择工艺已确立的HGPRT(次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶,Hypoxanthine—guanine phosphoribosyl transferase)缺陷株系。

[0388] 即,为来源于小鼠的X63—Ag8(X63)、NS1—ANS/1(NS1)、P3X63—Ag8.U1(P3U1)、X63—Ag8.653(X63.653)、SP2/0—Ag14(SP2/0)、MPC11—45.6TG1.7(45.6TG)、F0、S149/5XX0、BU.1等,来源于大鼠的210.RSY3.Ag.1.2.3(Y3)等,来源于人的U266AR(SK0—007)、GM1500·GTG—A12(GM1500)、UC729—6、LICR—LOW—HMy2(HMy2)、8226AR/NIP4—1(NP41)等。这些HGPRT缺陷株系例如可从ATCC等获得。

[0389] 对于这些细胞株而言,用适当的培养基,例如8—氮鸟嘌呤培养基(在RPMI—1640培养基中添加了谷氨酰胺、2—巯基乙醇、庆大霉素、及胎牛血清(以下称为“FBS”),进一步添加8—氮鸟嘌呤而成的培养基)、Iscove改良Dulbecco培养基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium;以下称为“IMDM”)、或Dulbecco改良Eagle培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium;以下称为“DMEM”),进行继代培养,在细胞融合的3~4天前,用正常培养基(例如,包含10%FCS的ASF104培养基(味之素株式会社制))进行继代培养,在融合当天预先确保 $2 \times 10^7$ 以上的细胞数。

[0390] (d)细胞融合

[0391] 对于产抗体细胞与骨髓瘤细胞的融合而言,可按照已知的方法(Weir,D.M.,Handbook of Experimental Immunology Vol.I.II.III.,Blackwell Scientific Publications,Oxford(1987);Kabat,E.A.and Mayer,M.M.,Experimental Immunochemistry,Charles C Thomas Publisher Springfield,Illinois(1964)等),在不极度降低细胞的生存率的程度的条件下适当实施。

[0392] 作为这样的方法,例如,可使用在聚乙二醇等高浓度聚合物溶液中将产抗体细胞和骨髓瘤细胞混合的化学方法、利用电刺激的物理方法等。其中,上述化学方法的具体例如下所示。

[0393] 即,当使用聚乙二醇作为高浓度聚合物溶液时,在分子量1500~6000、优选为2000~4000的聚乙二醇溶液中,于30~40℃、优选35~38℃的温度,对产抗体细胞与骨髓瘤细胞进行1~10分钟、优选5~8分钟混合。

[0394] (e) 杂交瘤群的选择

[0395] 对于通过上述细胞融合而得到的杂交瘤的选择方法没有特别限制,通常可使用HAT(次黄嘌呤、氨基喋呤、胸嘧啶核苷,hypoxanthine, aminopterin, thymidine)选择法(Kohler等,Nature (1975) 256, p. 495; Milstein等,Nature (1977) 266, p. 550)。

[0396] 该方法在使用无法在氨基蝶呤中生存的HGPRT缺陷株系的骨髓瘤细胞得到杂交瘤的情况下是有效的。即,通过在HAT培养基中培养未融合细胞及杂交瘤,从而仅选择性地残留具有针对氨基蝶呤的耐性的杂交瘤,并且使其增殖。

[0397] (f) 分割成单一细胞克隆(克隆)

[0398] 作为杂交瘤的克隆法,例如可使用甲基纤维素法、软琼脂糖法、有限稀释法等已知的方法(例如参照Barbara, B.M. and Stanley, M.S.: Selected Methods in Cellular Immunology, W.H. Freeman and Company, San Francisco (1980))。这些方法中,特别优选甲基纤维素法等三维培养法。例如,将通过细胞融合而形成的杂交瘤群悬浮于ClonaCell-HY Selection Medium D (StemCell Technologies公司制#03804)等甲基纤维素培养基中而进行培养,通过回收形成的杂交瘤集落,可得到单克隆杂交瘤。培养回收的各杂交瘤集落,在得到的杂交瘤培养上清液中,选择稳定确认抗体效价的株作为HER2单克隆抗体产生杂交瘤株。

[0399] (g) 通过培养杂交瘤而制备单克隆抗体

[0400] 对于如上所述地选择的杂交瘤而言,可通过对其进行培养,而高效地得到单克隆抗体,但优选在培养之前,筛选产生目标单克隆抗体的杂交瘤。

[0401] 该筛选可采用本身已知的方法进行。

[0402] 本发明中的抗体效价的测定例如可利用上述(b)项中说明的ELISA法进行。

[0403] 利用以上的方法得到的杂交瘤,可在液氮中或-80℃以下的冰箱中以冷冻状态而保存。

[0404] 对于完成了克隆的杂交瘤,将培养基从HT培养基换成正常培养基而进行培养。

[0405] 大量培养可利用使用了大型培养瓶的旋转培养、或旋动培养进行。从该大量培养中的上清液中,利用凝胶过滤等本领域技术人员公知的方法进行纯化,从而可得到本发明的特异性地与蛋白质结合的单克隆抗体。

[0406] 另外,向同系的小鼠(例如,上述的BALB/c)、或Nu/Nu小鼠的腹腔内注射杂交瘤,使该杂交瘤增殖,由此,可得到大量含有本发明的单克隆抗体的腹水。

[0407] 当在腹腔内给予时,如果事先(3~7天前)给予2,6,10,14-四甲基十五烷(2,6,10,14-tetramethyl pentadecane; 姥鲛烷)等矿物油,则可得到更多量的腹水。

[0408] 例如,向与杂交瘤同系的小鼠的腹腔内预先注射免疫抑制剂,使T细胞失活,然后20天后,使 $10^6$ ~ $10^7$ 个的杂交瘤·克隆细胞悬浮于不含血清的培养基中(0.5ml)并向腹腔内给予,通常,在腹部膨胀、腹水积存时,从小鼠采集腹水。通过该方法,可得到与培养液中相比为约100倍以上的浓度的单克隆抗体。

[0409] 利用上述方法得到的单克隆抗体例如可利用Weir, D.M.: Handbook of Experimental Immunology, Vol. I, II, III, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1978)中记载的方法纯化。

[0410] 如上所述地得到的单克隆抗体针对HER2具有高抗原特异性。作为本发明的单克隆

抗体,没有特别限制,可举出小鼠单克隆抗体4D5(ATCC CRL 10463)。

[0411] (h) 单克隆抗体的检验

[0412] 如上所述地得到的单克隆抗体的同种型及亚类可按照以下方式确定。

[0413] 首先,作为鉴定法,可举出Ouchterlony法、ELISA法、或RIA法。

[0414] Ouchterlony法虽然简单,但在单克隆抗体的浓度低时,需要进行浓缩操作。

[0415] 另一方面,当使用ELISA法或RIA法时,使培养上清液与抗原吸附固相直接反应,进而使用作为二抗的各种免疫球蛋白同种型、亚类相对应的抗体,由此,可鉴定单克隆抗体的同种型、亚类。

[0416] 另外,作为更简单的方法,也可利用市售的鉴定用的试剂盒(例如,Mouse Typer Kit;Bio-Rad Laboratories, Inc.制)等。

[0417] 此外,蛋白质的定量可利用Folin Lowry法、及由280nm时的吸光度(1.4(OD280) = 免疫球蛋白1mg/ml)计算的方法进行。

[0418] 此外,在再次实施(2)的(a)~(h)的工序,另外独立地获得单克隆抗体时,可获得具有与(g)的工序中得到的抗HER2抗体同等的细胞毒性活性的抗体。作为这样的抗体中的一例,可举出与同与(g)的工序中得到的抗HER2抗体所结合的表位相同的表位结合的抗体。若新制作的单克隆抗体与前述抗HER2抗体结合的部分肽或部分立体结构结合,则判断为该单克隆抗体与相同的表位结合。另外,通过确认该单克隆抗体与前述抗HER2抗体竞争向HER2的结合(即,该单克隆抗体抑制前述抗HER2抗体与HER2的结合),即使不确定具体的表位的序列或结构,也能判断该单克隆抗体与抗HER2抗体结合于相同的表位。当确认了表位相同时,可强烈期待该单克隆抗体具有与前述抗HER2抗体同等的抗原结合能力或生物活性。

[0419] (3) 其他抗体

[0420] 本发明的抗体中,除了包括上述针对HER2的单克隆抗体之外,还包括以降低针对人的异种抗原性等为目的而进行了人为修饰的基因重组型抗体,例如包括嵌合(Chimeric)抗体、人化(Humanized)抗体、人抗体等。这些抗体可使用已知的方法制造。

[0421] 作为嵌合抗体,可举出将抗体的可变区和恒定区相互不同的抗体、例如来源于小鼠或大鼠的抗体的可变区接合于来源于人的恒定区而成的嵌合抗体(参照Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,81,6851—6855,(1984))。作为本发明的嵌合抗体,没有特别限制,可举出包含人IgG1或IgG2的重链恒定区的嵌合抗体4D5。

[0422] 作为人化抗体,可举出:仅将互补性决定区(CDR;complementarity determining region)整合至来源于人的抗体而得到的抗体(参照Nature (1986) 321, p.522—525),利用CDR移植法除了向人抗体移植CDR的序列之外、还移植一部分构架(frame work)的氨基酸残基而得到的抗体(国际公开第90/07861号),使用基因转变突变诱发(gene conversion mutagenesis)策略而进行了人化的抗体(美国专利第5821337号)。

[0423] 需要说明的是,本说明书中的“数个”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或2个。

[0424] 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。保守的氨基酸取代是,在与氨基酸侧链相关的氨基酸群组内发生的取代。优选的氨基酸群组如下所述:酸性群组=天冬氨酸、谷氨酸;碱性群组=赖氨酸、精氨酸、组氨酸;非极性群组=丙氨酸、缬氨

酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸；及非常电极性家族＝甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸。其他的优选氨基酸群组如下所述：脂肪族羟基群组＝丝氨酸及苏氨酸；含酰胺群组＝天冬酰胺及谷氨酰胺；脂肪族群组＝丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸及异亮氨酸；以及芳香族群组＝苯丙氨酸、色氨酸及酪氨酸。所述氨基酸取代，优选在不降低具有原来的氨基酸序列的物质的特性的范围内进行。

[0425] 可通过将显示与上述的重链氨基酸序列及轻链氨基酸序列的高同源性的序列进行组合，来选择具有与上述的各抗体同等的生物活性的抗体。这样的同源性通常为80%以上的同源性，优选为90%以上的同源性，更优选为95%以上的同源性，最优选为99%以上的同源性。另外，还可通过将重链或轻链的氨基酸序列中1个～数个氨基酸残基被取代、缺失或添加的氨基酸序列进行组合，来选择具有与上述的各抗体同等的生物活性的抗体。需要说明的是，本说明书中的“同源性”与“同一性”含义相同。

[0426] 两种氨基酸序列间的同源性可通过使用Blast algorithm version 2.2.2 (Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaeffer, 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) 的默认参数而确定。Blast algorithm也可通过互联网访问 [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) 而使用。

[0427] 作为本发明的抗体，还可举出与HER2结合的人抗体。抗HER2人抗体是指，仅具有来源于人染色体的抗体的基因序列的人抗体。抗HER2人抗体可通过以下方法得到：使用了具有包含人抗体的重链和轻链的基因的人染色体片段的产生人抗体的小鼠的方法（参照 Tomizuka, K. 等, Nature Genetics (1997) 16, p.133—143; Kuroiwa, Y. et.al., Nucleic Acids Res. (1998) 26, p.3447—3448; Yoshida, H. et.al., Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects vol.10, p.69—73 (Kitagawa, Y., Matsuda, T. and Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers, 1999; Tomizuka, K. et.al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000) 97, p.722—727等。）。

[0428] 这样的产生人抗体的小鼠具体可按照以下方式建立，通过制作敲除动物及转基因动物，以及使这些动物彼此交配，制作出以下动物：内源性免疫球蛋白重链及轻链的基因座被破坏，代替地，介由酵母人工染色体 (Yeast artificial chromosome, YAC) 载体等导入了人免疫球蛋白重链及轻链的基因座的基因重组动物。

[0429] 另外，也可通过基因重组技术，利用分别编码这样的人抗体的重链及轻链的cDNA、优选包含该cDNA的载体而转化真核细胞，培养产生基因重组人单克隆抗体的转化细胞，由此，从培养上清液中得到该抗体。

[0430] 其中，作为宿主，可使用例如真核细胞，优选CHO细胞、淋巴细胞、骨髓瘤等哺乳动物细胞。

[0431] 另外，还已知获取从人抗体文库中筛选的来源于噬菌体展示的人抗体的方法（参照 Wormstone, I. M. et.al, Investigative Ophthalmology & Visual Science. (2002) 43 (7), p. 2301—2308; Carmen, S. et.al., Briefings in Functional Genomics and Proteomics (2002), 1 (2), p. 189—203; Siriwardena, D. et.al., Ophthalmology (2002) 109 (3), p. 427—431等。）。

[0432] 例如,可使用使人抗体的可变区作为单链抗体(scFv)而在噬菌体表面表达,选择与抗原结合的噬菌体的噬菌体展示法(Nature Biotechnology (2005),23,(9),p.1105—1116)。

[0433] 通过对通过与抗原结合而选择的噬菌体的基因进行分析,可确定编码与抗原结合的人抗体的可变区的DNA序列。

[0434] 如果明确与抗原结合的scFv的DNA序列,则可通过制作具有该序列的表达载体、导入至适当的宿主而使其表达,从而获取人抗体(国际公开第92/01047号、国际公开92/20791号、国际公开93/06213号、国际公开93/11236号、国际公开93/19172号、国际公开95/01438号、国际公开95/15388号;Annu. Rev. Immunol (1994) 12, p. 433—455;Nature Biotechnology (2005) 23(9),p.1105—1116)。

[0435] 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。差示扫描量热测定仪(DSC)是能快速且准确地测定适于作为蛋白的相对结构稳定性的指标的热变性中点(T<sub>m</sub>)的装置。使用DSC测定T<sub>m</sub>值,比较该值,由此可比较热稳定性的不同。已知抗体的保存稳定性与抗体的热稳定性显示一定程度的相关性(Lori Burton,et.al.,Pharmaceutical Development and Technology (2007) 12,p.265—273),以热稳定性为指标,可选出合适的抗体。作为用于选出抗体的其他指标,可举出在适当的宿主细胞中的收量高,以及在水溶液中的凝集性低。例如收量最高的抗体不一定显示最高的热稳定性,因此,有必要基于上文说明的指标综合判断,选出最合适向人给予的抗体。

[0436] 本发明的抗体中也包括抗体的修饰体。该修饰体是指,对本发明的抗体实施化学修饰或生物修饰而成的修饰体。化学修饰体中,包括化学部分连接于氨基酸骨架的化学修饰体、连接于N—连接或O—连接的糖链的化学修饰体等。生物修饰体中,包括翻译后经修饰(例如,N—连接或O—连接的糖基化、N末端或C末端的加工、脱酰胺化、天冬氨酸的异构化、甲硫氨酸的氧化)的生物修饰体,使用原核生物宿主细胞进行表达从而于N末端添加甲硫氨酸残基而得到的生物修饰体。另外,为了能进行本发明的抗体或抗原的检出或分离而标记的标记物例如酶标记物、荧光标记物、亲和标记物也被包括在所述修饰物的含义之内。这样的本发明的抗体的修饰物对于改善抗体的稳定性及血中滞留性、抗原性的降低、抗体或抗原的检出或分离等是有用的。

[0437] 另外,通过调节连接于本发明的抗体的糖链修饰(糖基化、脱岩藻糖化等),可增强抗体依赖性细胞毒性活性。作为抗体的糖链修饰的调节技术,已知国际公开第99/54342号、国际公开00/61739号、国际公开02/31140号等,但不限于此。本发明的抗体也包括调节了该糖链修饰的抗体。

[0438] 在分离抗体基因后,导入至适当的宿主来制作抗体时,可使用适当的宿主与表达载体的组合。作为抗体基因的具体例,可举出组合本说明书中记载的抗体的编码重链序列的基因、及编码轻链序列的基因而成的抗体基因。当转化宿主细胞时,重链序列基因和轻链序列基因可被插入到同一表达载体中,或者也可被插入到分别的表达载体中。

[0439] 使用真核细胞作为宿主时,可使用动物细胞、植物细胞、真核微生物。尤其是,作为动物细胞,可举出哺乳类细胞,例如,作为猴的细胞的COS细胞(Gluzman, Y. 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系(Urlaub, G. and Chasin,

L.A.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.(1980)77,p.4126—4220)。

[0440] 使用原核细胞时,例如,可举出大肠杆菌、枯草芽孢杆菌。

[0441] 通过转化而向这些细胞中导入目标抗体基因,通过体外(*in vitro*)培养经转化的细胞,而可得到抗体。该培养中,随着抗体的序列的不同,收量有时存在差异,在具有同等结合活性的抗体中,可使用收量作为指标筛选出容易生产药物的抗体。因此,本发明的抗体中也包括通过以下制造方法得到的抗体,所述方法的特征在于,包括培养上述经转化的宿主细胞的工序,及从在该工序中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。

[0442] 需要说明的是,已知哺乳类培养细胞所生产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)),另外,重链羧基末端的甘氨酸、赖氨酸的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))。然而,这些重链序列的缺失及修饰不影响抗体的抗原结合能力及效应子功能(补体的活化、抗体依赖性细胞毒性作用等)。因此,本发明的抗体中也包括受到了该修饰的抗体及该抗体的功能性片段,也包括在重链羧基末端缺失1个或2个氨基酸的缺失体、经酰胺化的该缺失体(例如羧基末端部位的脯氨酸残基被酰胺化的重链)等。但是,只要能保持抗原结合能力及效应子功能即可,本发明涉及的抗体的重链的羧基末端的缺失体不限于上述种类。构成本发明涉及的抗体的2条重链可以是完全长度及选自上述的缺失体中的重链中的任一种,也可以是任意两种的组合。各缺失体的量比可受到产生本发明涉及的抗体的哺乳类培养细胞的种类及培养条件的影响,作为本发明涉及的抗体的主成分,可举出2条重链的双方的羧基末端的1个氨基酸残基缺失的情况。

[0443] 作为本发明的抗体的同种型,可举出例如IgG(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)等,可优选举出IgG1或IgG2。

[0444] 作为抗体的生物活性,通常,可举出:抗原结合活性、通过与抗原结合而向表达该抗原的细胞中内化的活性、将抗原的活性中和的活性、增强抗原的活性的活性、抗体依赖性细胞毒性(ADCC)活性、补体依赖性细胞毒性(CDC)活性及抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP),本发明涉及的抗体所具有的生物活性为相对于HER2的结合活性,优选为通过与HER2结合而向HER2表达细胞中内化的活性。此外,本发明的抗体除了具有细胞内化活性之外,也可同时具有ADCC活性、CDC活性及/或ADCP活性。

[0445] 对于得到的抗体,可纯化至均一(homogeneity)。对于抗体的分离、纯化而言,可使用通常的蛋白质所使用的分离、纯化方法。例如,可适当选择、组合柱色谱法、滤器过滤、超滤、盐析、透析、制备用聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电点电泳等,可对抗体进行分离、纯化(*Strategies for Protein Purification and Characterization:A Laboratory Course Manual*,Daniel R.Marshak等eds.,Cold Spring Harbor Laboratory Press(1996);*Antibodies:A Laboratory Manual*.Ed Harlow and David Lane,Cold Spring Harbor Laboratory(1988)),但不限于这些。

[0446] 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。

[0447] 这些色谱法可利用HPLC、FPLC等液相色谱法进行。

[0448] 作为亲和色谱法中使用的柱,可举出蛋白A柱、G蛋白柱。例如,作为使用了蛋白A柱

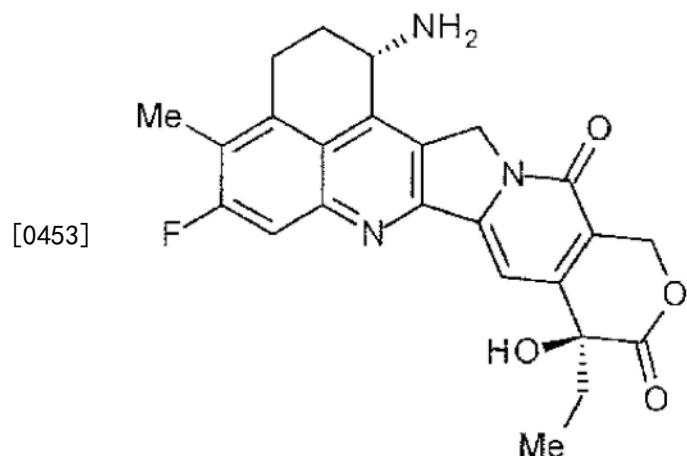
的柱,可举出Hyper D,POROS,Sephadex F.F.(Pharmacia Corporation)等。

[0449] 另外,也可使用将抗原固定的载体,利用针对抗原的结合性而纯化抗体。

[0450] [抗肿瘤性化合物]

[0451] 对本发明的抗HER2抗体—药物偶联物中连接的抗肿瘤性化合物进行说明。作为本发明中使用的抗肿瘤性化合物,只要是具有抗肿瘤效果、且具有能连接于接头结构的取代基、部分结构的化合物即可,没有特别限制。对于抗肿瘤性化合物而言,接头的一部分或全部在肿瘤细胞内被切断,游离出抗肿瘤性化合物部分,从而显示抗肿瘤效果。在与药物的连接部分切断接头时,以未修饰的结构游离出抗肿瘤性化合物,可发挥其本来的抗肿瘤效果。

[0452] 作为本发明中使用的抗肿瘤性化合物,可合适地使用作为喜树碱衍生物的依沙替康((1S,9S)-1-氨基-9-乙基-5-氟-2,3-二氢-9-羟基-4-甲基-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-10,13(9H,15H)-二酮;下式:)



[0454] 该依沙替康具有优异的抗肿瘤活性,但尚未作为抗肿瘤药在市场上销售。该化合物可利用已知的方法容易地获得,可优选将1位氨基作为与接头结构连接的连接部位使用。另外,有时依沙替康以连接接头的一部分的状态游离于肿瘤细胞内,即使是这种结构,也可发挥优异的抗肿瘤效果。

[0455] 依沙替康具有喜树碱结构,因此,在酸性水性介质中(例如pH3左右),平衡偏向形成了内酯环的结构(闭环体),另一方面,在碱性水性介质中(例如pH10左右),平衡偏向内酯环开环的结构(开环体),这是已知的。即使是导入了对应于上述闭环结构及开环结构的依沙替康残基的药物偶联物,也可期待同等的抗肿瘤效果,不言自明,本发明的范围内包含任意结构的该化合物。

[0456] 作为其他的抗肿瘤性化合物,例如,可举出多柔比星(doxorubicin)、柔红霉素(daunorubicin)、丝裂霉素C(mitomycin C)、博来霉素(bleomycin)、安西他滨(cyclophosphamide)、长春新碱(vincristine)、长春碱(vinblastine)、甲氨蝶呤(methotrexate)、铂系抗肿瘤剂(顺铂(cisplatin)或其衍生物)、紫杉醇(taxol)或其衍生物、以及喜树碱或其衍生物(日本特开平6-87746号公报中记载的抗肿瘤剂)等。

[0457] 抗体—药物偶联物中,连接于1分子抗体的药物的连接数是影响其有效性、安全性的重要因子。对于抗体—药物偶联物的制造而言,为了使药物的连接数为定数,可规定反应的原料·试剂的使用量等反应条件而进行实施,但与低分子化合物的化学反应不同,通常以连接不同数目的药物的混合物的形式获得。用平均值即平均药物连接数,规定、表示连接

于每分子抗体的药物的连接数。本发明中,原则上只要没有特别说明,即,除了表示具有不同的药物连接数的抗体—药物偶联物混合物中包含的具有特定的药物连接数的抗体—药物偶联物的情况之外,药物的连接数是指平均值。

[0458] 可控制连接于抗体分子的依沙替康的连接数,作为每抗体的药物平均连接数,可连接1~10个左右的依沙替康,优选为2~8个,更优选为3~8个。需要说明的是,本领域技术人员可根据本申请的实施例的记载,来设计在抗体上连接必要数目的药物的反应,可得到控制了依沙替康的连接数的抗体—药物偶联物。

[0459] [接头结构]

[0460] 对本发明的抗HER2抗体—药物偶联物中将抗肿瘤性化合物连接于抗HER2抗体的接头结构进行说明。该接头具有下式的结构:

[0461]  $-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$

[0462] 抗体连接于 $L^1$ 的末端(与连接 $L^2$ 的一侧相反的末端),抗肿瘤性化合物连接于 $-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$ 部分的羰基。

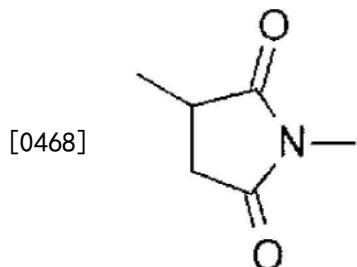
[0463]  $n^1$ 表示0~6的整数,优选为1~5的整数,更优选为1~3。

[0464]  $1.L^1$

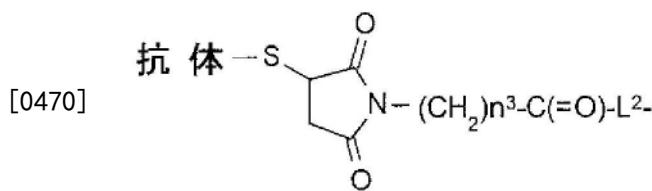
[0465]  $L^1$ 由以下结构表示:

[0466]  $-$ (琥珀酰亚胺-3-基-N)- $(CH_2)n^3-C(=O)-$

[0467] 其中, $n^3$ 为2~8的整数,“ $-$ (琥珀酰亚胺-3-基-N)-”具有下式



[0469] 表示的结构。该部分结构中的3位是与抗HER2抗体的连接部位。在该3位处的与该抗体的连接的特征是形成硫醚而连接。该结构部分的1位的氮原子与存在于包含该结构的接头内的亚甲基的碳原子连接。即, $-$ (琥珀酰亚胺-3-基-N)- $(CH_2)n^3-C(=O)-L^2-$ 为下式表示的结构(其中,“抗体-S-”是来源于抗体。)。



[0471] 式中, $n^3$ 为2~8的整数,优选为2~5。

[0472] 作为 $L^1$ 的具体例,可举出:

[0473]  $-$ (琥珀酰亚胺-3-基-N)- $CH_2CH_2-C(=O)-$ 、

[0474]  $-$ (琥珀酰亚胺-3-基-N)- $CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$ 、

[0475]  $-$ (琥珀酰亚胺-3-基-N)- $CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$ 、

[0476]  $-$ (琥珀酰亚胺-3-基-N)- $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$ 、等等。

[0477]  $2.L^2$

[0478]  $L^2$  为

[0479]  $-\text{NH}-\text{(CH}_2\text{CH}_2-\text{O})\text{n}^4-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$

[0480] 表示的结构,  $L^2$  也可以不存在, 这种情况下,  $L^2$  为单键。另外,  $n^4$  为 1 ~ 6 的整数, 优选为 2 ~ 4。 $L^2$  以末端的氨基连接于  $L^1$ , 以相反的末端的羰基与  $L^P$  连接。

[0481] 作为  $L^2$  的具体例, 可举出:

[0482]  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 、

[0483]  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 、

[0484]  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 、

[0485]  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 、

[0486]  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 、

[0487]  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 、等等。

[0488]  $3.L^P$

[0489]  $L^P$  为由 2 ~ 7 个氨基酸构成的肽残基。即, 由 2 ~ 7 个氨基酸以肽键连接而成的寡肽的残基构成。 $L^P$  在 N 末端连接于  $L^2$ , 在 C 末端与接头的  $-\text{NH}-\text{(CH}_2\text{)}\text{n}^1-\text{L}^a-\text{(CH}_2\text{)}\text{n}^2-\text{C}(=\text{O})-$  部分的氨基连接。其中, 所谓“肽残基”或“寡肽的残基”, 是由包含 2 个以上的氨基酸残基的肽衍生的基团, 表示将其 N 末端和 C 末端作为连接部位的 2 价的基团。

[0490] 构成  $L^P$  的氨基酸没有特别限制, 例如为 L- 或 D- 氨基酸, 优选为 L- 氨基酸。另外, 除了  $\alpha$ - 氨基酸之外, 还可以是  $\beta$ - 丙氨酸、 $\epsilon$ - 氨基己酸、 $\gamma$ - 氨基丁酸等结构的氨基酸, 此外, 也可以是例如经 N- 甲基化的氨基酸等非天然型的氨基酸。

[0491]  $L^P$  的氨基酸序列没有特别限制, 作为构成的氨基酸, 可举出苯丙氨酸 (Phe; F)、酪氨酸 (Tyr; Y)、亮氨酸 (Leu; L)、甘氨酸 (Gly; G)、丙氨酸 (Ala; A)、缬氨酸 (Val; V)、赖氨酸 (Lys; K)、瓜氨酸 (Cit)、丝氨酸 (Ser; S)、谷氨酸 (Glu; E)、天冬氨酸 (Asp; D) 等。这些中, 可优选举出苯丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、赖氨酸、瓜氨酸、丝氨酸、谷氨酸、天冬氨酸。构建具有从这些氨基酸中任意选择的 (可重复) 氨基酸的序列的  $L^P$  即可。可根据氨基酸的种类, 来控制药物游离的模式。氨基酸的数目可以是 2 ~ 7 个。

[0492] 作为  $L^P$  的具体例, 可举出:

[0493]  $-\text{GGF}-$ 、

[0494]  $-\text{DGGF}-$ 、

[0495]  $-(\text{D}-)\text{D}-\text{GGF}-$ 、

[0496]  $-\text{EGGF}-$ 、

[0497]  $-\text{GGFG}-$ 、

[0498]  $-\text{SGGF}-$ 、

[0499]  $-\text{KGGF}-$ 、

[0500]  $-\text{DGGFG}-$ 、

[0501]  $-\text{GGFGG}-$ 、

[0502]  $-\text{DDGGFG}-$ 、

[0503]  $-\text{KDGGFG}-$ 、

[0504] —GGFGGGF—。

[0505] 上述的“(D—)D”表示D—天冬氨酸。作为本发明的抗体—药物偶联物中特别优选的L<sup>a</sup>,可举出—GGFG—的四肽残基。

[0506] 4.L<sup>a</sup>—(CH<sub>2</sub>)<sup>n<sup>2</sup></sup>—C(=O)—

[0507] L<sup>a</sup>—(CH<sub>2</sub>)<sup>n<sup>2</sup></sup>—C(=O)—中的L<sup>a</sup>为—O—的结构或单键。n<sup>2</sup>为0~5的整数,优选为0~3,更优选为0或1。

[0508] 作为L<sup>a</sup>—(CH<sub>2</sub>)<sup>n<sup>2</sup></sup>—C(=O)—,可举出以下的结构。

[0509] —O—CH<sub>2</sub>—C(=O)—、

[0510] —O—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—、

[0511] —O—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—、

[0512] —O—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—、

[0513] —O—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—、

[0514] —CH<sub>2</sub>—C(=O)—、

[0515] —CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—、

[0516] —CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—、

[0517] —CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—、

[0518] —CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—、

[0519] —O—C(=O)—。

[0520] 这些中,优选的是:

[0521] —O—CH<sub>2</sub>—C(=O)—、

[0522] —O—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—、

[0523] —O—C(=O)—、

[0524] 或者,L<sup>a</sup>为单键,且n<sup>2</sup>为0。

[0525] 作为接头的—NH—(CH<sub>2</sub>)<sup>n<sup>1</sup></sup>—L<sup>a</sup>—(CH<sub>2</sub>)<sup>n<sup>2</sup></sup>—C(=O)—表示的结构的具体例,可举出:

[0526] —NH—CH<sub>2</sub>—C(=O)—、

[0527] —NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—、

[0528] —NH—CH<sub>2</sub>—O—CH<sub>2</sub>—C(=O)—、

[0529] —NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—O—CH<sub>2</sub>—C(=O)—、

[0530] —NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—、

[0531] —NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—、

[0532] —NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—、

[0533] —NH—CH<sub>2</sub>—O—C(=O)—、

[0534] —NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—O—C(=O)—、

[0535] —NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—O—C(=O)—、

[0536] —NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—O—C(=O)—、等等。

[0537] 这些中,更优选的是:

[0538] —NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—、

[0539] —NH—CH<sub>2</sub>—O—CH<sub>2</sub>—C(=O)—、

[0540]  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 。

[0541] 对于接头  $-\text{NH}-\text{(CH}_2\text{)}_{\text{n}^1}-\text{L}^{\text{a}}-\text{(CH}_2\text{)}_{\text{n}^2}-\text{C}(=\text{O})-$  而言, 作为链长, 优选具有4~7个原子的链长, 进一步优选具有5或6个原子的链长。

[0542] 对于本发明的抗HER2抗体-药物偶联物而言, 认为在转移至肿瘤细胞内后, 接头部分被切断, 游离出  $\text{NH}_2-\text{(CH}_2\text{)}_{\text{n}^1}-\text{L}^{\text{a}}-\text{(CH}_2\text{)}_{\text{n}^2}-\text{C}(=\text{O})-$   $-\text{(NH}-\text{DX})$  表示的结构的药物衍生物而显示抗肿瘤作用。作为从本发明的抗体-药物偶联物中游离而显示抗肿瘤效果的抗肿瘤性衍生物, 可举出具有上述中列举的接头  $-\text{NH}-\text{(CH}_2\text{)}_{\text{n}^1}-\text{L}^{\text{a}}-\text{(CH}_2\text{)}_{\text{n}^2}-\text{C}(=\text{O})-$  表示的结构的末端成为氨基的结构部分的抗肿瘤性衍生物, 特别优选的如下所示。

[0543]  $\text{NH}_2-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{(NH}-\text{DX})$ 、

[0544]  $\text{NH}_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{(NH}-\text{DX})$ 、

[0545]  $\text{NH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{(NH}-\text{DX})$ 、

[0546]  $\text{NH}_2-\text{CHCH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{(NH}-\text{DX})$ 。

[0547] 需要说明的是, 确认了在  $\text{NH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{(NH}-\text{DX})$  的情况下, 位于同分子内的缩醛胺结构不稳定, 因而进一步自分解而游离出

[0548]  $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{(NH}-\text{DX})$ 。

[0549] 这些化合物也可作为本发明的抗体-药物偶联物的制造中间体而合适地使用。

[0550] 在以依沙替康为药物的本发明的抗体-药物偶联物中, 优选将下述的结构的药物-接头结构部分  $[-\text{L}^1-\text{L}^2-\text{L}^{\text{P}}-\text{NH}-\text{(CH}_2\text{)}_{\text{n}^1}-\text{L}^{\text{a}}-\text{(CH}_2\text{)}_{\text{n}^2}-\text{C}(=\text{O})-\text{(NH}-\text{DX})]$  连接于抗体。对于这些药物-接头结构部分而言, 作为每1抗体的平均连接数, 可以为1~10, 优选为2~8, 更优选为3~8。

[0551]  $-\text{(琥珀酰亚胺-3-基-N)}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{(NH}-\text{DX})$ 、

[0552]  $-\text{(琥珀酰亚胺-3-基-N)}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{(NH}-\text{DX})$ 、

[0553]  $-\text{(琥珀酰亚胺-3-基-N)}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{(NH}-\text{DX})$ 、

[0554]  $-\text{(琥珀酰亚胺-3-基-N)}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{(NH}-\text{DX})$ 、

[0555]  $-\text{(琥珀酰亚胺-3-基-N)}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{(NH}-\text{DX})$ 、

[0556]  $-\text{(琥珀酰亚胺-3-基-N)}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{(NH}-\text{DX})$ 、

[0557]  $-\text{(琥珀酰亚胺-3-基-N)}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{(NH}-\text{DX})$ 、

[0558]  $-\text{(琥珀酰亚胺-3-基-N)}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{(NH}-\text{DX})$ 、

[0559]  $-\text{(琥珀酰亚胺-3-基-N)}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{(NH}-\text{DX})$ 、

[0560]  $-\text{(琥珀酰亚胺-3-基-N)}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-$

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

[0561] — (琥珀酰亚胺-3-基-N) —  $\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ 、

[0562] — (琥珀酰亚胺-3-基-N) —  $\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ 。

[0563] 这些中,更优选的是:

[0564] — (琥珀酰亚胺-3-基-N) —  $\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ 、

[0565] — (琥珀酰亚胺-3-基-N) —  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ 、

[0566] — (琥珀酰亚胺-3-基-N) —  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ 、

[0567] — (琥珀酰亚胺-3-基-N) —  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ 、

[0568] — (琥珀酰亚胺-3-基-N) —  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ 、

[0569] — (琥珀酰亚胺-3-基-N) —  $\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ 、

[0570] — (琥珀酰亚胺-3-基-N) —  $\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ 。

[0571] 进一步优选的是:

[0572] — (琥珀酰亚胺-3-基-N) —  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ 、

[0573] — (琥珀酰亚胺-3-基-N) —  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ 、

[0574] — (琥珀酰亚胺-3-基-N) —  $\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ 。

[0575] 本发明的抗体-药物偶联物中,对于连接抗HER2抗体与药物的接头结构而言,通过连接上文中说明的接头各部分中所述的优选结构,可构建优选的接头。作为这样的接头结构,可合适地使用以下的结构的接头。需要说明的是,结构的左端是与抗体的连接部位,右端是与药物的连接部位。

[0576] — (琥珀酰亚胺-3-基-N) —  $\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 、

[0577] — (琥珀酰亚胺-3-基-N) —  $\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 、

[0578] — (琥珀酰亚胺-3-基-N) —  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 、

[0579] — (琥珀酰亚胺-3-基-N) —  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 、

[0580] — (琥珀酰亚胺-3-基-N) —  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-$

CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—、

[0581] —(琥珀酰亚胺-3-基-N)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)GGFG—NH—CH<sub>2</sub>—0—CH<sub>2</sub>—C(=O)—、

[0582] —(琥珀酰亚胺-3-基-N)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)GGFG—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—0—CH<sub>2</sub>—C(=O)—、

[0583] —(琥珀酰亚胺-3-基-N)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)GGFG—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—0—C(=O)—、

[0584] —(琥珀酰亚胺-3-基-N)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—0—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—0—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)GGFG—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—、

[0585] —(琥珀酰亚胺-3-基-N)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—0—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—0—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)GGFG—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—、

[0586] —(琥珀酰亚胺-3-基-N)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—0—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—0—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—0—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)GGFG—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—、

[0587] —(琥珀酰亚胺-3-基-N)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—0—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—0—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—0—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)GGFG—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—。

[0588] 这些中,更优选的是:

[0589] —(琥珀酰亚胺-3-基-N)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)GGFG—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—、

[0590] —(琥珀酰亚胺-3-基-N)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)GGFG—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—、

[0591] —(琥珀酰亚胺-3-基-N)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)GGFG—NH—CH<sub>2</sub>—0—CH<sub>2</sub>—C(=O)—、

[0592] —(琥珀酰亚胺-3-基-N)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)GGFG—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—0—CH<sub>2</sub>—C(=O)—、

[0593] —(琥珀酰亚胺-3-基-N)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)GGFG—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—0—C(=O)—、

[0594] —(琥珀酰亚胺-3-基-N)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—0—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—0—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)GGFG—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—、

[0595] —(琥珀酰亚胺-3-基-N)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—0—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—0—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—0—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—0—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)GGFG—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—。

[0596] 可进一步优选举出:

[0597] —(琥珀酰亚胺-3-基-N)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)GGFG—NH—CH<sub>2</sub>—0—CH<sub>2</sub>—C(=O)—、

[0598] —(琥珀酰亚胺-3-基-N)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)GGFG—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—0—CH<sub>2</sub>—C(=O)—、

[0599] —(琥珀酰亚胺-3-基-N)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—0—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—0—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)GGFG—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O)—。

[0600] [制造方法]

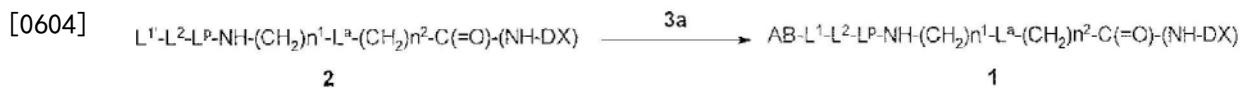
[0601] 接下来,对本发明的抗体-药物偶联物或其制造中间体的代表的制造方法进行说

明。需要说明的是,下文中,为了表示化合物,使用各反应式中所示的化合物的编号。即,称为“式(1)的化合物”、“化合物(1)”等。另外,其他编号的化合物也以同样方式记载。

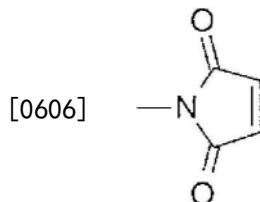
[0602] 1. 制造方法1

[0603] 式(1)表示的介由硫醚而将抗体与药物—接头结构连接而成的抗体—药物偶联物例如可通过下述方法制造。

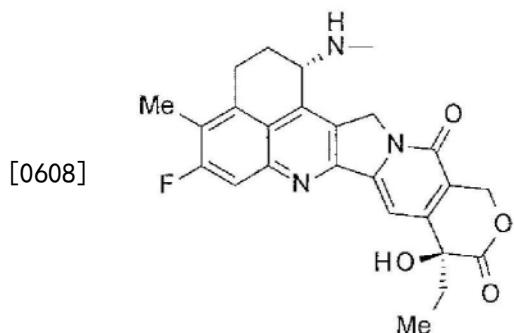
AB



[0605] [式中,AB表示具有巯基的抗体,L<sup>1</sup>表示L<sup>1</sup>表示的接头结构中接头末端为马来酰亚胺基(下式)



[0607] 的结构(其中,氮原子为连接部位)的接头,具体而言,表示L<sup>1</sup>中的—(琥珀酰亚胺—3—基—N)—(CH<sub>2</sub>)<sup>n</sup><sup>3</sup>—C(=O)—中—(琥珀酰亚胺—3—基—N)一部分为马来酰亚胺基的基团。另外,—(NH—DX)为下式:



[0609] 表示的结构,表示依沙替康的1位氨基的氢原子被去除1个而产生的基团。]

[0610] 需要说明的是,上述的反应式中,式(1)的化合物中,以1个从药物至接头末端的结构部分与1个抗体连接而得到的结构进行了解释,但这是为了说明方便,实际上,相对于1个抗体分子而言连接多个该结构部分的情况也是多见的。这种情况在以下的制造方法的说明中也同样。

[0611] 即,通过使利用后述的方法而可获得的化合物(2)与具有巯基的抗体(3a)反应,可制造抗体—药物偶联物(1)。

[0612] 具有巯基的抗体(3a)可利用本领域技术人员公知的方法获得(Hermanson, G. T, Bioconjugate Techniques, pp. 56—136, pp. 456—493, Academic Press (1996))。例如,可举出以下方法:使Traut's试剂与抗体的氨基作用;使N—琥珀酰亚胺基S—乙酰硫代链烷酸酯(N—succinimidyl S—acetylthioalkanoate)类与抗体的氨基作用后,与羟基胺作用;在使N—琥珀酰亚胺基3—(吡啶基二硫代)丙酸酯作用后,使还原剂作用;使二硫苏糖醇、2—巯基乙醇、三(2—羧基乙基)膦盐酸盐(TCEP)等还原剂与抗体作用而将抗体内的铰链部的二硫键还原从而产生巯基;等等,但不限于这些方法。

[0613] 具体而言,作为还原剂,相对于每1个抗体内铰链部二硫醚键,使用0.3~3摩尔当量TCEP,在含有螯合剂的缓冲液中,使其与抗体反应,由此,可得到部分或完全地将抗体内铰链部二硫醚还原而得到的抗体。作为螯合剂,可举出例如乙二胺四乙酸(EDTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)等。可以以1mM~20mM的浓度使用它们。作为缓冲液,可使用磷酸钠、硼酸钠、乙酸钠溶液等。具体而言,于4℃~37℃使抗体与TCEP反应1~4小时,由此,可得到部分或完全还原的具有巯基的抗体(3a)。

[0614] 此处,通过实施在药物—接头部分添加巯基的反应,可通过硫醚键而连接药物—接头部分。

[0615] 相对于每1个具有巯基的抗体(3a),可使用2~20摩尔当量的化合物(2),制造每1个抗体连接2个~8个药物而成的抗体—药物偶联物(1)。具体而言,在含有具有巯基的抗体(3a)的缓冲液中,添加溶解有化合物(2)的溶液并使其进行反应。此处,作为缓冲液,可使用乙酸钠溶液、磷酸钠、硼酸钠等。反应时的pH为5~9,更优选在pH7附近反应。作为溶解化合物(2)的溶剂,可使用二甲基亚砜(DMSO)、二甲基甲酰胺(DMF)、二甲基乙酰胺(DMA)、N—甲基—2—吡啶酮(NMP)等有机溶剂。

[0616] 可以以1~20%v/v将溶解有化合物(2)的有机溶剂溶液添加到含有具有巯基的抗体(3a)的缓冲液中并进行反应。反应温度为0~37℃、更优选为10~25℃,反应时间为0.5~2小时。可通过利用含硫醇试剂使未反应的化合物(2)的反应性失活而结束反应。含硫醇试剂例如为半胱氨酸或N—乙酰—L—半胱氨酸(NAC)。更具体而言,添加相对于使用的化合物(2)而言1~2摩尔当量的NAC,于室温孵育10~30分钟,由此使反应结束。

[0617] 对于制造的抗体—药物偶联物(1),可利用以下的共通操作,进行浓缩、缓冲液交换、纯化、抗体浓度及每一分子抗体的药物平均连接数的测定,进行抗体—药物偶联物(1)的鉴定。

[0618] 共通操作A:抗体或抗体—药物偶联物水溶液的浓缩

[0619] 在Amicon Ultra(50,000MWCO,Millipore Co.)的容器内,放入抗体或抗体—药物偶联物溶液,使用离心机(Allegra X—15R,Beckman Coulter,Inc.)进行离心操作(以2000G~3800G离心5~20分钟),将抗体或抗体—药物偶联物溶液浓缩。

[0620] 共通操作B:抗体的浓度测定

[0621] 使用UV测定器(Nanodrop 1000,Thermo Fisher Scientific Inc.),按照制造商规定的方法,进行抗体浓度的测定。此时,使用随着抗体不同而不同的280nm吸光系数( $1.3\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ~ $1.8\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )。

[0622] 共通操作C—1:抗体的缓冲液交换

[0623] 按照制造商规定的方法,用含有氯化钠(137mM)及乙二胺四乙酸(EDTA,5mM)的磷酸缓冲液(10mM,pH6.0;本说明书中称为PBS6.0/EDTA),将使用了Sephadex G—25载体的NAP—25柱(Cat.No.17—0852—02,GE Healthcare Japan Corporation)平衡化。针对一根该NAP—25柱,装填2.5mL抗体水溶液,然后分离获取用PBS6.0/EDTA3.5mL洗脱的级分(3.5mL)。利用共通操作A将该级分浓缩,使用共通操作B,进行抗体浓度的测定,然后使用PBS6.0/EDTA,将抗体浓度调整至10mg/mL。

[0624] 共通操作C—2:抗体的缓冲液交换

[0625] 按照制造商规定的方法,用含有氯化钠(50mM)及EDTA(2mM)的磷酸缓冲液(50mM,

pH6.5;本说明书中称为PBS6.5/EDTA)将使用了Sephadex G-25载体的NAP-25柱(Cat.No.17-0852-02,GE Healthcare Japan Corporation)平衡化。针对一根该NAP-25柱,装填2.5mL抗体水溶液,然后分离获取用PBS6.5/EDTA3.5mL洗脱的级分(3.5mL)。利用共通操作A将该级分浓缩,利用共通操作B进行抗体浓度的测定,然后使用PBS6.5/EDTA,将抗体浓度调整为20mg/mL。

[0626] 共通操作D:抗体—药物偶联物的纯化

[0627] 用市售的磷酸缓冲液(PBS7.4,Cat.No.10010-023,Invitrogen)、含有氯化钠(137mM)的磷酸钠缓冲液(10mM,pH6.0;本说明书中称为PBS6.0)或含有山梨糖醇(5%)的乙酸缓冲液(10mM,pH5.5;本说明书中称为ABS)中的任一种缓冲液将NAP-25柱平衡化。在该NAP-25柱中装填抗体—药物偶联物反应水溶液(约1.5mL),用制造商规定的量的缓冲液洗脱,由此分离获取抗体级分。将该分离获取的级分再次装填至NAP-25柱,用缓冲液洗脱,进行凝胶过滤纯化操作,反复操作计2~3次,由此,得到了除去了未连接的药物接头、低分子化合物(三(2-羧基乙基)膦盐酸盐(TCEP)、N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)、二甲基亚砜)的抗体—药物偶联物。

[0628] 共通操作E:抗体—药物偶联物中的抗体浓度及每一分子抗体的药物平均连接数的测定(1)

[0629] 抗体—药物偶联物中的连接药物浓度可通过以下方式算出:测定抗体—药物偶联物水溶液在280nm及370nm这两种波长下的UV吸光度,然后进行下述计算,由此算出。

[0630] 由于某一波长下的总吸光度等于存在于体系内的所有吸收化学物质种类的吸光度的和(吸光度的加成性),所以,假设在抗体与药物偶联前后,抗体及药物的摩尔吸光系数不发生变化时,抗体—药物偶联物中的抗体浓度及药物浓度如下述的关系式所示。

[0631]  $A_{280} = A_{D,280} + A_{A,280} = \epsilon_{D,280} C_D + \epsilon_{A,280} C_A$  式(I)

[0632]  $A_{370} = A_{D,370} + A_{A,370} = \epsilon_{D,370} C_D + \epsilon_{A,370} C_A$  式(II)

[0633] 此处,  $A_{280}$  表示280nm处的抗体—药物偶联物水溶液的吸光度,  $A_{370}$  表示370nm处的抗体—药物偶联物水溶液的吸光度,  $A_{A,280}$  表示280nm处的抗体的吸光度,  $A_{A,370}$  表示370nm处的抗体的吸光度,  $A_{D,280}$  表示280nm处的偶联物前体的吸光度,  $A_{D,370}$  表示370nm处的偶联物前体的吸光度,  $\epsilon_{A,280}$  表示280nm处的抗体的摩尔吸光系数,  $\epsilon_{A,370}$  表示370nm处的抗体的摩尔吸光系数,  $\epsilon_{D,280}$  表示280nm处的偶联物前体的摩尔吸光系数,  $\epsilon_{D,370}$  表示370nm处的偶联物前体的摩尔吸光系数,  $C_A$  表示抗体—药物偶联物中的抗体浓度,  $C_D$  表示抗体—药物偶联物中的药物浓度。

[0634] 此处,  $\epsilon_{A,280}$ 、 $\epsilon_{A,370}$ 、 $\epsilon_{D,280}$ 、 $\epsilon_{D,370}$  可使用事先准备的值(计算推定值或由化合物的UV测定得到的实测值)。例如,  $\epsilon_{A,280}$  可由抗体的氨基酸序列利用已知的计算方法(Protein Science, 1995, vol.4, 2411-2423)推定。 $\epsilon_{A,370}$  通常为0。实施例中,对于曲妥珠单抗的摩尔吸光系数而言,使用  $\epsilon_{A,280} = 215400$  (计算推定值) 及  $\epsilon_{A,370} = 0$ 。 $\epsilon_{D,280}$  及  $\epsilon_{D,370}$  可通过测定以一定摩尔浓度溶解使用的偶联物前体的溶液的吸光度并根据朗伯—比尔定律(吸光度=摩尔浓度×摩尔吸光系数×吸收池光程)而得到。对于实施例中的药物接头的摩尔吸光系数而言,只要没有特别说明,则使用  $\epsilon_{D,280} = 5000$  (实测平均值)、 $\epsilon_{D,370} = 19000$  (实测平均值)。测定抗体—药物偶联物水溶液的  $A_{280}$  及  $A_{370}$ , 将它们的值代入式(I)及(II), 解连立方程式, 从而可求出  $C_A$  及  $C_D$ 。进而, 通过将  $C_D$  除以  $C_A$ , 从而可求出每1抗体的药物平均连接数。

- [0635] 共通操作F:抗体—药物偶联物中的每一分子抗体的药物平均连接数的测定(2)
- [0636] 对于抗体—药物偶联物中的每一分子抗体的药物平均连接数而言,除了前述的共通操作E之外,也可通过使用了以下的方法的高效液相色谱法(HPLC)分析求出。
- [0637] [F—1.HPLC分析用样品的制备(抗体—药物偶联物的还原)]
- [0638] 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。于37℃孵育混合物30分钟,由此,将切断了抗体—药物偶联物的L链及H链间的二硫键的样品用于HPLC分析。
- [0639] [F—2.HPLC分析]
- [0640] 在下述的测定条件下进行HPLC分析。
- [0641] HPLC系统:Agilent 1290HPLC系统(Agilent Technologies)
- [0642] 检测器:紫外吸光度计(测定波长:280nm)
- [0643] 柱:PLRP—S (2.1×50mm、8μm、1000Å; Agilent Technologies、P/N PL1912—1802)
- [0644] 柱温:80℃
- [0645] 移动相A:0.04%三氟乙酸(TFA)水溶液
- [0646] 移动相B:含有0.04%TFA的乙腈溶液
- [0647] 梯度程序:29%—36%(0分钟—12.5分钟)、36%—42%(12.5—15分钟)、42%—29%(15分钟—15.1分钟)、29%—29%(15.1分钟—25分钟)
- [0648] 样品注入量:15μL
- [0649] [F—3.数据解析]
- [0650] (F—3—1)相对于未连接药物的抗体的L链( $L_0$ )及H链( $H_0$ ),对于连接了药物的L链(连接了一个药物的L链: $L_1$ )及H链(连接了一个药物的H链: $H_1$ 、连接了两个药物的H链: $H_2$ 、连接了三个药物的H链: $H_3$ )而言,与连接的药物的数目成比例地,疏水性增加,保留时间延长,因此,按照 $L_0$ 、 $L_1$ 、 $H_0$ 、 $H_1$ 、 $H_2$ 、 $H_3$ 的顺序被洗脱。通过与 $L_0$ 及 $H_0$ 的保留时间进行比较,可将检出峰分配给 $L_0$ 、 $L_1$ 、 $H_0$ 、 $H_1$ 、 $H_2$ 、 $H_3$ 中的某一个。
- [0651] (F—3—2)由于药物接头存在UV吸收,所以根据药物接头的连接数,使用L链、H链及药物接头的摩尔吸光系数,按照下式进行峰面积值的修正。

$$L\text{链峰面积修正值} (L_i) = \frac{\text{峰面积}}{L\text{链的摩尔吸光系数}}$$

[0652]

$$\times \frac{L\text{链的摩尔吸光系数}}{L\text{链的摩尔吸光系数} + \text{连接药物数} \times \text{药物接头的摩尔吸光系数}}$$

$$H\text{链峰面积修正值} (H_i) = \frac{\text{峰面积}}{H\text{链的摩尔吸光系数}}$$

[0653]

$$\times \frac{H\text{链的摩尔吸光系数}}{H\text{链的摩尔吸光系数} + \text{连接药物数} \times \text{药物接头的摩尔吸光系数}}$$

- [0654] 此处,各抗体中的L链及H链的摩尔吸光系数(280nm)可使用利用已知的计算方法(Protein Science, 1995, vol. 4, 2411—2423),由各抗体的L链及H链的氨基酸序列推定的值。在曲妥珠单抗的情况下,根据其氨基酸序列,作为L链的摩尔吸光系数,使用26150作为

推定值,作为H链的摩尔吸光系数,使用81290作为推定值。另外,对于药物接头的摩尔吸光系数(280nm)而言,用巯基乙醇或N-乙酰半胱氨酸使各药物接头反应,使用将马来酰亚胺基转化为琥珀酰亚胺硫醚而得到的化合物的实测的摩尔吸光系数(280nm)。

[0655] (F-3-3)按照下式计算相对于峰面积修正值总和的、各链峰面积比(%)。

$$[0656] L \text{ 链峰面积比} = \frac{A_{L1}}{A_{L0} + A_{L1}} \times 100$$

$$[0657] H \text{ 链峰面积比} = \frac{A_{H1}}{A_{H0} + A_{H1} + A_{H2} + A_{H3}} \times 100$$

[0658]  $A_{Li}$ 、 $A_{Hi}$ : $L_i$ 、 $H_i$ 各峰面积修正值

[0659] (F-3-4)按照下式计算抗体-药物偶联物中的每一分子抗体的药物平均连接数。

[0660] 药物平均连接数 =  $(L_0 \text{ 峰面积比} \times 0 + L_1 \text{ 峰面积比} \times 1 + H_0 \text{ 峰面积比} \times 0 + H_1 \text{ 峰面积比} \times 1 + H_2 \text{ 峰面积比} \times 2 + H_3 \text{ 峰面积比} \times 3) / 100 \times 2$

[0661] 在下文中说明制造方法1中使用的制造中间体化合物。制造方法1中的式(2)表示的化合物为下式表示的化合物:

[0662] (马来酰亚胺-N-基) -  $(CH_2)_n^3 - C(=O) - L^2 - L^P - NH - (CH_2)_n^1 - L^a - (CH_2)_n^2 - C(=O) - (NH - DX)$

[0663] 式中,

[0664]  $n^3$ 表示整数2~8,

[0665]  $L^2$ 表示 $-NH - (CH_2CH_2 - O)_n^4 - CH_2CH_2 - C(=O) -$ 或单键,

[0666] 此处, $n^4$ 表示1~6的整数,

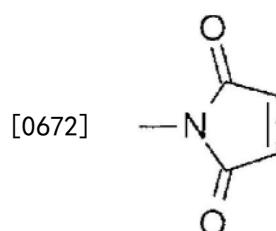
[0667]  $L^P$ 表示由选自苯丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、赖氨酸、瓜氨酸、丝氨酸、谷氨酸、天冬氨酸中的2~7个氨基酸构成的肽残基,

[0668]  $n^1$ 表示0~6的整数,

[0669]  $n^2$ 表示0~5的整数,

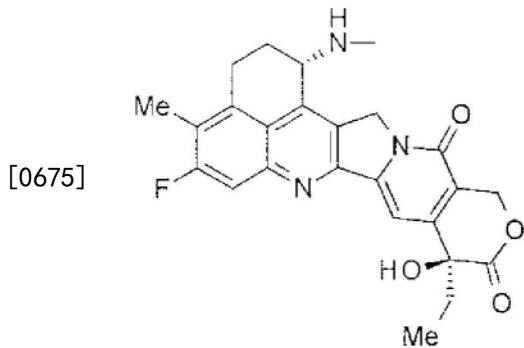
[0670]  $L^a$ 表示 $-O -$ 或单键,

[0671] (马来酰亚胺-N-基) - 为下式



[0673] 表示的、马来酰亚胺基(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基),为氮原子成为连接部位的基团,

[0674]  $- (NH - DX)$ 为下式



[0676] 表示的、1位氨基的氮原子成为连接部位的基团。

[0677] 作为制造中间体,优选的是,L<sup>2</sup>为单键、或-NH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O)n<sup>4</sup>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-时,n<sup>4</sup>为整数2~4。

[0678] 作为制造中间体,优选L<sup>P</sup>的肽残基为由选自苯丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、赖氨酸、瓜氨酸、丝氨酸、谷氨酸、天冬氨酸中的氨基酸形成的肽残基的化合物。作为制造中间体,优选这样的肽残基中L<sup>P</sup>为由4个氨基酸构成的肽残基的化合物。更具体而言,作为制造中间体,优选L<sup>P</sup>为-GGFG-的四肽残基的化合物。

[0679] 另外,作为制造中间体,优选-NH-(CH<sub>2</sub>)n<sup>1</sup>-L<sup>a</sup>-(CH<sub>2</sub>)n<sup>2</sup>-为-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-、或-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-的化合物,更优选-NH-(CH<sub>2</sub>)n<sup>1</sup>-L<sup>a</sup>-(CH<sub>2</sub>)n<sup>2</sup>-为-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-、或-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-的化合物。

[0680] 此外,对于式(2)表示的化合物而言,作为制造中间体,优选n<sup>3</sup>为整数2~5,L<sup>2</sup>为单键、-NH-(CH<sub>2</sub>)n<sup>1</sup>-L<sup>a</sup>-(CH<sub>2</sub>)n<sup>2</sup>-为-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-、或-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-的化合物。更优选-NH-(CH<sub>2</sub>)n<sup>1</sup>-L<sup>a</sup>-(CH<sub>2</sub>)n<sup>2</sup>-为-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-、或-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-的化合物。进一步优选n<sup>3</sup>为整数2或5的化合物。

[0681] 另外,对于式(2)表示的化合物而言,作为制造中间体,优选n<sup>3</sup>为整数2~5,L<sup>2</sup>为-NH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O)n<sup>4</sup>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-、n<sup>4</sup>为整数2~4、-NH-(CH<sub>2</sub>)n<sup>1</sup>-L<sup>a</sup>-(CH<sub>2</sub>)n<sup>2</sup>-为-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-、或-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-的化合物。更优选n<sup>4</sup>为整数2或4的化合物。进一步优选-NH-(CH<sub>2</sub>)n<sup>1</sup>-L<sup>a</sup>-(CH<sub>2</sub>)n<sup>2</sup>-为-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-、或-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-的化合物。

[0682] 作为这样的对于制造本发明化合物有用的中间体,可例举下述物质作为优选例。

[0683] (马来酰亚胺-N-基)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、

[0684] (马来酰亚胺-N-基)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、

[0685] (马来酰亚胺-N-基)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、

[0686] (马来酰亚胺-N-基)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-

0) — (NH—DX)、

[0687] (马来酰亚胺—N—基) —CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O) —GGFG—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O) —(NH—DX)、

[0688] (马来酰亚胺—N—基) —CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O) —GGFG—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O) —(NH—DX)、

[0689] (马来酰亚胺—N—基) —CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O) —GGFG—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O) —(NH—DX)、

[0690] (马来酰亚胺—N—基) —CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O) —GGFG—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O) —(NH—DX)、

[0691] (马来酰亚胺—N—基) —CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O) —GGFG—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O) —(NH—DX)、

[0692] (马来酰亚胺—N—基) —CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O) —GGFG—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O) —(NH—DX)、

[0693] (马来酰亚胺—N—基) —CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O) —GGFG—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O) —(NH—DX)、

[0694] (马来酰亚胺—N—基) —CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O) —GGFG—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O) —(NH—DX)、

[0695] (马来酰亚胺—N—基) —CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O) —GGFG—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O) —(NH—DX)、

[0696] (马来酰亚胺—N—基) —CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O) —GGFG—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O) —(NH—DX)、

[0697] (马来酰亚胺—N—基) —CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O) —GGFG—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O) —(NH—DX)、

[0698] (马来酰亚胺—N—基) —CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O) —GGFG—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O) —(NH—DX)、

[0699] (马来酰亚胺—N—基) —CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O) —GGFG—NH—CH<sub>2</sub>—O—CH<sub>2</sub>—C(=O) —(NH—DX)、

[0700] (马来酰亚胺—N—基) —CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O) —GGFG—NH—CH<sub>2</sub>—O—CH<sub>2</sub>—C(=O) —(NH—DX)、

[0701] (马来酰亚胺—N—基) —CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O) —GGFG—NH—CH<sub>2</sub>—O—CH<sub>2</sub>—C(=O) —(NH—DX)、

[0702] (马来酰亚胺—N—基) —CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O) —GGFG—NH—CH<sub>2</sub>—O—CH<sub>2</sub>—C(=O) —(NH—DX)、

[0703] (马来酰亚胺—N—基) —CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O) —GGFG—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—O—CH<sub>2</sub>—C(=O) —(NH—DX)、

[0704] (马来酰亚胺—N—基) —CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O) —GGFG—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—O—CH<sub>2</sub>—C(=O) —(NH—DX)、

[0705] (马来酰亚胺—N—基) —CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—C(=O) —GGFG—NH—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—O—CH<sub>2</sub>—C(=O) —(NH—DX)、

[0706] (马来酰亚胺-N-基) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、

[0707] (马来酰亚胺-N-基) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、

[0708] (马来酰亚胺-N-基) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、

[0709] (马来酰亚胺-N-基) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)。

[0710] 通过使选自上述的制造中间体化合物组中的药物-接头化合物与抗HER2抗体或其反应性衍生物反应而在存在于抗HER2抗体的铰链部的二硫键部分中形成硫醚键,可制造本发明的抗HER2抗体-药物偶联物。这种情况下,优选使用抗HER2抗体的反应性衍生物,特别优选对抗HER2抗体进行还原处理而得到的反应性衍生物。

[0711] 以下物质为作为制造中间体的更优选的化合物。

[0712] (马来酰亚胺-N-基) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、

[0713] (马来酰亚胺-N-基) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、

[0714] (马来酰亚胺-N-基) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、

[0715] (马来酰亚胺-N-基) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、

[0716] (马来酰亚胺-N-基) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、

[0717] (马来酰亚胺-N-基) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、

[0718] (马来酰亚胺-N-基) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、

[0719] (马来酰亚胺-N-基) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、

[0720] (马来酰亚胺-N-基) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、

[0721] (马来酰亚胺-N-基) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)。

[0722] 另外,上述的中间体化合物组中,下式:

[0723] (马来酰亚胺-N-基) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、

[0724] (马来酰亚胺-N-基) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)、或

[0725] (马来酰亚胺-N-基) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-

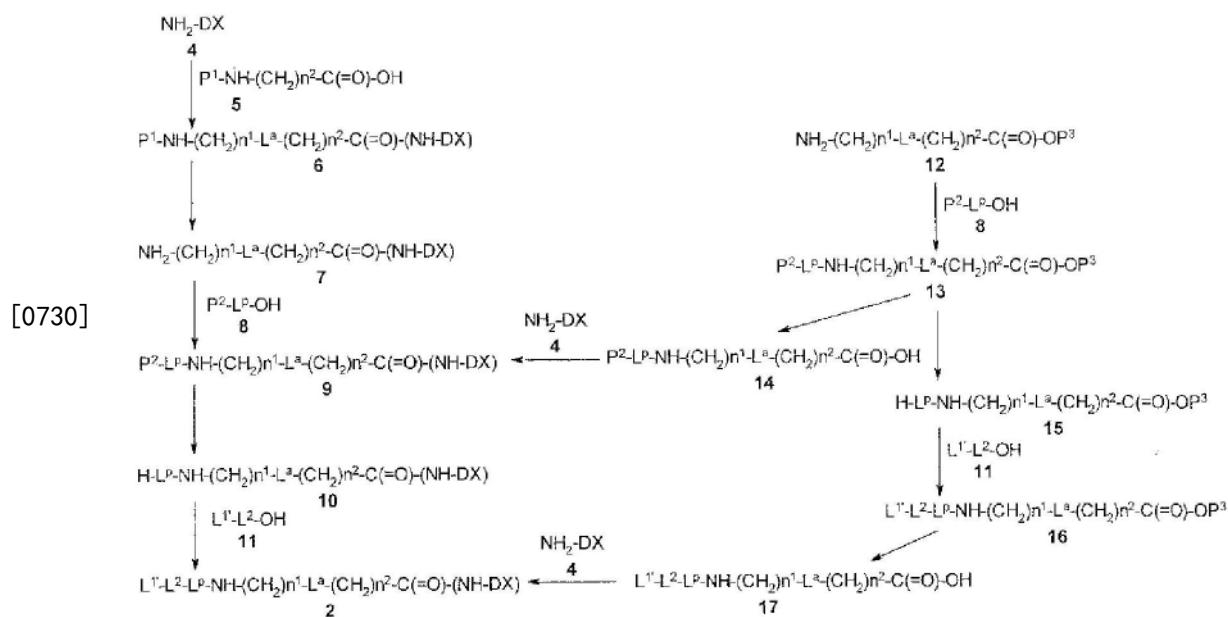
$C(=O) - (NH - DX)$ 、

[0726] 表示的化合物为进一步优选的化合物。

[0727] 需要说明的是,为了确保偶联物的量,可混合在同样的条件下制作而得到的平均药物数为同等程度的多种偶联物(例如 $\pm 1$ 程度)而形成新的一批。这种情况下,平均药物数落入混合前的平均药物数之间。

[0728] 2. 制造方法2

[0729] 之前的制造方法中使用的中间体式(2)表示的化合物及它们的药理学上可接受的盐例如可利用下述方法制造。



[0731] [式中,  $L^1$  表示末端马来酰亚胺基,  $P^1$ 、 $P^2$  及  $P^3$  表示保护基。]

[0732] 将羧酸(5)衍生为活性酯、混合酸酐、或酰卤等,在碱存在下,使其与  $NH_2 - DX$  (4) 或其药理学上可接受的盐反应,由此可制造化合物(6)。 $NH_2 - DX$  (4) 表示依沙替康(化学名: (1S, 9S) - 1 - 氨基 - 9 - 乙基 - 5 - 氟 - 2, 3 - 二氢 - 9 - 羟基 - 4 - 甲基 - 1H, 12H - 苯并 [de] 吡喃并 [3', 4': 6, 7] 呋噪嗪并 [1, 2 - b] 噩唑 - 10, 13 (9H, 15H) - 二酮)。

[0733] 该反应可使用肽合成中通常使用的反应试剂和条件。活性酯包括各种物质,例如可使用  $N, N'$  - 二环己基碳二亚胺或 1 - 乙基 - 3 - (3 - 二甲基氨基丙基) 碳二亚胺 - 盐酸盐等缩合剂,使对硝基苯酚等酚类、 $N$  - 羟基苯并三唑或  $N$  - 羟基琥珀酰亚胺等与羧酸(5)反应而制造。另外,活性酯也可利用以下反应来制造:羧酸(5)与三氟乙酸五氟苯基酯等的反应;羧酸(5)与 1 - 苯并三唑基氧基三吡咯烷磷鎓六氟亚磷酸盐的反应;羧酸(5)与氰基膦酸二乙酯的反应(盐入法);羧酸(5)与三苯基膦及 2, 2' - 二吡啶基二硫醚的反应(向山法);羧酸(5)与 4 - (4, 6 - 二甲氧基 - 1, 3, 5 - 三嗪 - 2 - 基) - 4 - 甲基吗啉鎓氯化物(DMTMM)之类的三嗪衍生物的反应;等等。另外,也可利用通过在碱存在下用亚硫酰氯、草酰氯等酰卤处理羧酸(5)而可进行制造的酰卤法等而进行反应。

[0734] 可通过在适当的碱的存在下,在惰性溶剂中,于  $-78^\circ C \sim 150^\circ C$  的反应温度下使如上所述地得到的羧酸(5)的活性酯、混合酸酐、或酰卤与化合物(4)反应,而制造化合物(6)。需要说明的是,“惰性溶剂”是指,在采用该溶剂的反应中,不抑制实施的目标反应的溶剂。

[0735] 作为上述的各工序中使用的具体的碱,例如,可举出碳酸钠、碳酸钾、乙醇钠、丁醇

钾、氢氧化钠、氢氧化钾、氢化钠、氢化钾等碱金属或碱土金属的碳酸盐、醇盐、氢氧化物、或氢化物；以正丁基锂等烷基锂、或二异丙基氨基锂等二烷基氨基锂为代表的有机金属碱；双(三甲基甲硅烷基)氨基锂等双甲硅烷基胺的有机金属碱；以及吡啶、2,6—二甲基吡啶、可力丁、4—二甲基氨基吡啶、三乙胺、N—甲基吗啉、二异丙基乙基胺、二氮杂双环[5.4.0]十一碳—7—烯(DBU)等叔胺或含氮杂环化合物等有机碱。

[0736] 作为本反应中使用的惰性溶剂，可举出二氯甲烷、氯仿、四氯化碳等卤化烃系溶剂；四氢呋喃、1,2—二甲氧基乙烷、二氧杂环己烷等醚系溶剂；苯、甲苯等芳香族烃系溶剂；N,N—二甲基甲酰胺、N,N—二甲基乙酰胺、N—甲基吡咯烷—2—酮等酰胺系溶剂，除了上述惰性溶剂之外，根据情况，还可以使用二甲基亚砜、环丁砜等亚砜系溶剂；丙酮、甲基乙基酮等酮系溶剂；甲醇、乙醇等醇系的溶剂等。此外，也可将它们混合而使用。

[0737] 作为化合物(6)的末端氨基的保护基<sup>1</sup>，可使用叔丁基氧基羰基、9—芴基甲基氧基羰基、苄基氧基羰基等在肽合成中通常使用的氨基的保护基。作为其他的氨基的保护基，可举出乙酰基等烷酰基；甲氧基羰基、乙氧基羰基等烷氧基羰基；对甲氧基苄基氧基羰基、对(或邻)硝基苄基氧基羰基等芳基甲氧基羰基；苄基、三苯基甲基等芳基甲基；苯甲酰基等芳酰基；2,4—二硝基苯磺酰基、邻硝基苯磺酰基等芳基磺酰基。保护基<sup>1</sup>可根据保护氨基的化合物的性质等进行选择。

[0738] 通过使得到的化合物(6)的末端氨基的保护基<sup>1</sup>脱保护，可制造化合物(7)。对于该脱保护而言，可根据该保护基来选择试剂、条件。

[0739] 将N末端被P<sup>2</sup>保护的肽羧酸(8)衍生为活性酯、混合酸酐等，与得到的化合物(7)进行反应，由此，可制造化合物(9)。形成肽羧酸(8)与化合物(7)的肽键的反应条件、试剂、及碱、惰性溶剂可从化合物(6)的合成中说明的那些中适当选择而使用。保护基P<sup>2</sup>可从化合物(6)的保护基中说明的那些中适当选择而使用，可根据保护氨基的化合物的性质等进行选择。另外，也可如在肽合成中通常使用的那样，针对构成肽羧酸(8)的氨基酸或肽，依次反复进行反应和脱保护而使其伸长，来制造化合物(9)。

[0740] 通过将得到的化合物(9)的氨基的保护基P<sup>2</sup>脱保护，可制造化合物(10)。对于该脱保护而言，可根据该保护基来适当选择试剂、条件。

[0741] 将羧酸(11)衍生为活性酯、混合酸酐、或酰卤等，使其与得到的化合物(10)进行反应，由此可制造化合物(2)。形成羧酸(11)与化合物(10)的肽键的反应条件、试剂、碱、及惰性溶剂可以从在化合物(6)的合成中说明的那些中适当选择使用。

[0742] 化合物(9)例如也可利用下述方法来制造。

[0743] 将N末端被P<sup>2</sup>保护的肽羧酸(8)衍生为活性酯、混合酸酐等，在碱存在下，使其与羧基被P<sup>3</sup>保护的胺化合物(12)反应，由此，可制造化合物(13)。形成肽羧酸(8)与化合物(12)的肽键的反应条件、试剂、碱、及惰性溶剂可从化合物(6)的合成中说明的那些中适当选择使用。

[0744] 作为化合物(13)的氨基的保护基P<sup>2</sup>，只要是通常使用的保护基即可，没有特别限制。

[0745] 具体而言，作为羟基的保护基，可举出甲氧基甲基等烷氧基甲基；苄基、4—甲氧基苄基、三苯基甲基等芳基甲基；乙酰基等烷酰基；苯甲酰基等芳酰基基；叔丁基二苯基甲硅烷基等甲硅烷基；等等。可将羧基形成为与甲基、乙基、叔丁基等烷基、烯丙基、或苄基等芳

基甲基的酯等来保护该羧基。关于氨基,除了叔丁基氧基羰基、甲氧基羰基、乙氧基羰基等烷基氧基羰基;烯丙基氧基羰基、或9—芴基甲基氧基羰基、苄基氧基羰基、对甲氧基苄基氧基羰基、对(或邻)硝基苄基氧基羰基等芳基甲氧基羰基之外,可举出乙酰基等烷酰基;苄基、三苯基甲基等芳基甲基;苯甲酰基等芳酰基;或2,4—二硝基苯磺酰基、邻硝基苯磺酰基等芳基磺酰基;等等。

[0746] 作为羧基的保护基<sup>P3</sup>,可使用有机合成化学中、尤其是肽合成中作为羧基的保护基通常使用的保护基,具体而言,为甲基、乙基、叔丁基等烷基酯、烯丙基酯、苄基酯等,可从上文所述的保护基中适当选择使用。

[0747] 这种情况下,优选可利用不同的方法或条件除去氨基的保护基和羧基的保护基。例如,可举出P<sup>2</sup>为叔丁基氧基羰基、P<sup>3</sup>为苄基的组合等情况作为代表。这些保护基可根据保护氨基和羧基的化合物的性质等从上文中说明的保护基中选择,在将这些保护基切断时,也可根据该保护基来选择试剂、条件。

[0748] 通过将得到的化合物(13)的羧基的保护基P<sup>3</sup>脱保护,可制造化合物(14)。对于该脱保护而言,可根据该保护基来选择试剂、条件。

[0749] 将得到的化合物(14)衍生为活性酯、混合酸酐、或酰卤等,在碱存在下,使其与化合物(4)反应,由此可制造化合物(9)。该反应可适用在肽合成中通常使用的反应试剂、条件,反应条件、试剂、及碱、惰性溶剂可从在化合物(6)的合成中说明的那些中适当选择使用。

[0750] 化合物(2)例如也可利用下述方法来制造。

[0751] 通过将化合物(13)的氨基的保护基P<sup>2</sup>脱保护,可制造化合物(15)。对于该脱保护而言,可根据该保护基来选择试剂、条件。

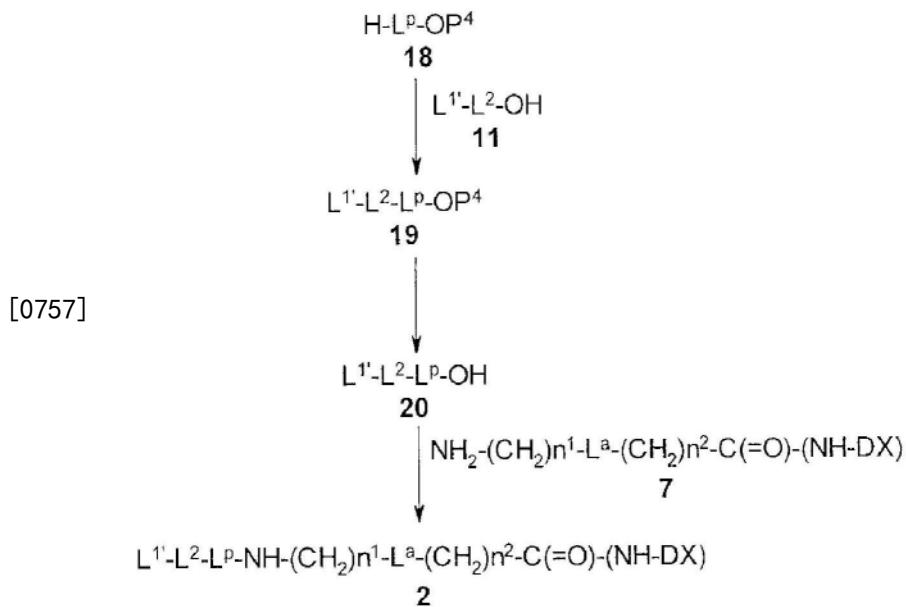
[0752] 将羧酸衍生物(11)衍生为活性酯、混合酸酐、或酰卤等,在碱存在下,使其与得到的化合物(15)反应,由此可制造化合物(16)。形成肽羧酸(11)与化合物(15)的酰胺键的反应条件、试剂、碱、及惰性溶剂可从化合物(6)的合成中说明的那些中适当选择使用。

[0753] 通过将得到的化合物(16)的羧基的保护基脱保护,可制造化合物(17)。对于该脱保护而言,可以与化合物(14)的制造中的羧基的脱保护同样地进行。

[0754] 将化合物(17)衍生为活性酯、混合酸酐、或酰卤等,在碱存在下,使其与化合物(4)反应,由此可制造化合物(2)。该反应可适用在肽合成中通常使用的反应试剂、条件,反应条件、试剂、碱、及惰性溶剂可从在化合物(6)的合成中说明的那些中适当选择使用。

[0755] 3. 制造方法3

[0756] 中间体式(2)表示的化合物也可通过下述方法制造。



[0758] [式中, L<sup>1'</sup> 为末端被转化为马来酰亚胺基的结构的 L<sup>1</sup>, P<sup>4</sup> 表示保护基]

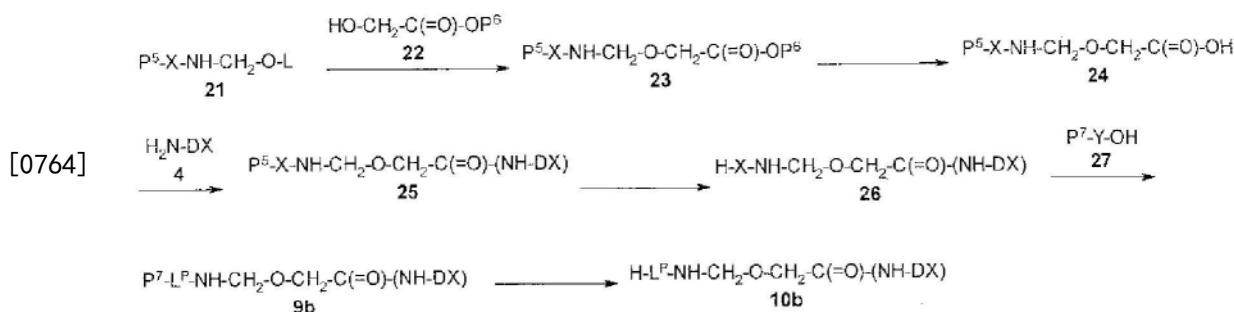
[0759] 将化合物 (11) 衍生为活性酯、混合酸酐等, 在碱存在下, 使其与 C 末端被 P<sup>4</sup> 保护的肽羧酸 (18) 反应, 由此可制造化合物 (19)。形成肽羧酸 (18) 与化合物 (11) 的肽键的反应条件、试剂、碱、及惰性溶剂可从化合物 (6) 的合成中说明的那些中适当选择使用。化合物 (18) 的羧基的保护基 P<sup>4</sup> 可从上文中说明的保护基中适当选择使用。

[0760] 通过将得到的化合物 (19) 的羧基的保护基脱保护, 可制造化合物 (20)。对于该脱保护而言, 可以与化合物 (14) 的制造中的羧基的脱保护同样地进行。

[0761] 将得到的化合物 (20) 转化为活性酯、或混合酸酐等, 使其与化合物 (7) 反应, 由此可制造化合物 (2)。该反应可适用在肽合成中通常使用的反应试剂、条件, 反应条件、试剂、碱、及惰性溶剂可从在化合物 (6) 的合成中说明的那些中适当选择使用。

#### [0762] 4. 制造方法4

[0763] 以下, 对制造方法2所述的制造中间体 (10) 中 n<sup>1</sup>=1、L<sup>a</sup>=0 的化合物 (10b) 的制造方法进行详细说明。式 (10b) 表示的化合物、其盐或它们的溶剂化物例如可利用下述方法制造。



[0765] [式中, L<sup>P</sup> 与上文中定义相同, L 表示酰基、且为乙酰基等烷酰基或苯甲酰基等芳酰基、或氢原子, X 及 Y 表示包含 1~3 个氨基酸的寡肽, P<sup>5</sup> 及 P<sup>7</sup> 表示氨基的保护基, P<sup>6</sup> 表示羧基的保护基]

[0766] 式 (21) 表示的化合物可通过日本特开 2002-60351 号公报中记载的方法、文献 (J. Org. Chem., 51 卷, 3196 页, 1986 年) 记载的方法、或应用其方法并根据需要进行保护基的

除去、官能团转化而制造。此外,可通过将末端氨基已被保护的氨基酸或氨基已被保护的寡肽的酰胺用醛或酮处理而得到。

[0767] 通过在惰性溶剂中,在酸或碱存在下,在从冷却下直到室温的温度条件下,使化合物(21)与具有羟基的化合物(22)反应,可制造化合物(23)。

[0768] 作为此处可使用的酸,例如,可举出氢氟酸、盐酸、硫酸、硝酸、磷酸、硼酸等无机酸;乙酸、柠檬酸、对甲苯磺酸、甲磺酸等有机酸;四氟硼酸盐、氯化锌、氯化锡、氯化铝、氯化铁等路易斯酸;等等。这些中,优选磺酸类,特别优选对甲苯磺酸。此外,作为碱,可从上文中说明的碱中适当选择使用,尤其是,优选叔丁醇钾等碱金属醇盐;氢氧化钠、氢氧化钾等碱金属氢氧化物;氢化钠、氢化钾等碱金属或碱土金属氢化物;以二异丙基氨基锂等二烷基氨基锂为代表的有机金属碱;双(三甲基甲硅烷基)氨基锂等双甲硅烷基胺的有机金属碱;等等。

[0769] 作为反应中使用的溶剂,可使用四氢呋喃、1,4—二氧杂环己烷等醚系溶剂;苯、甲苯等芳香族烃系溶剂;等等。上述的溶剂可以是与水的混合物。

[0770] 另外,作为P<sup>5</sup>中所例举的氨基的保护基,只要是通常可用于保护氨基的基团即可,没有特别限制。作为代表的氨基的保护基,可举出制造方法2中记载的氨基的保护基,但本反应中,有时P<sup>5</sup>中所例举的氨基的保护基被切断。这种情况下,根据需要,可适当地与适当的氨基的保护试剂反应,再次导入保护基。

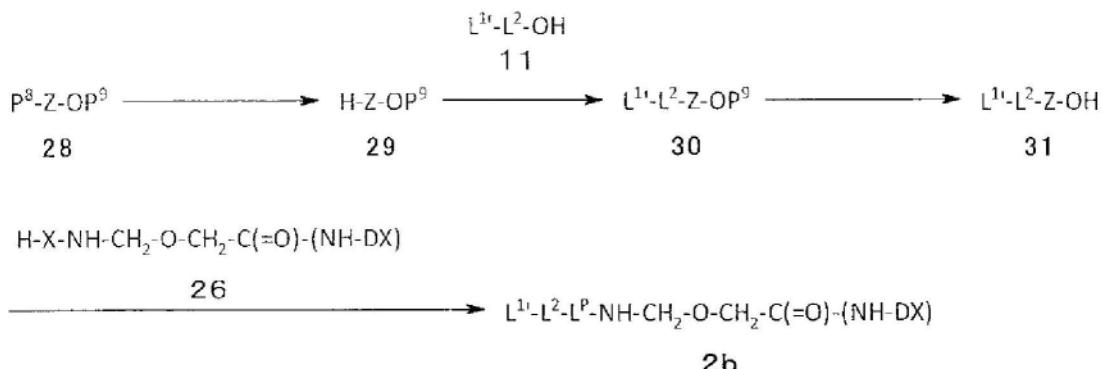
[0771] 化合物(24)可通过将化合物(23)的保护基P<sup>6</sup>除去而制造。此处,关于作为P<sup>6</sup>而例举的羧基的保护基,制造方法2中记载了代表的羧基的保护基,可从其中适当选择。化合物(23)中,优选可利用不同的方法或条件除去氨基的保护基P<sup>5</sup>和羧基的保护基P<sup>6</sup>的保护基。例如,可举出P<sup>5</sup>为9—芴基甲基氧基羰基、P<sup>6</sup>为苄基的组合等情况作为代表。这些保护基可根据保护氨基和羧基的化合物的性质等而选择,在将这些保护基除去时,也可根据该保护基来选择试剂、条件。

[0772] 将羧酸(24)衍生为活性酯、混合酸酐、或酰卤等,在在碱存在下,使其与化合物(4)或其药理学上可接受的盐反应,由此制造化合物(25),将得到的化合物(25)的保护基P<sup>5</sup>除去,由此可制造化合物(26)。在化合物(4)与羧酸(24)的反应及除去保护基P<sup>6</sup>的反应中,可使用与制造方法2中说明的试剂、反应条件同样的实际、反应条件。

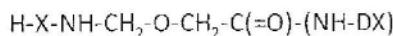
[0773] 通过使化合物(26)与末端氨基已被保护的氨基酸或氨基已被保护的寡肽(27)反应,而制造化合物(9b),通过将得到的化合物(9b)的保护基P<sup>7</sup>除去而可制造化合物(10b)。关于作为P<sup>7</sup>而说明的氨基的保护基,只要是通常可用于保护氨基的基团即可,没有特别限制。作为代表的氨基的保护基,可举出制造方法2中记载的氨基的保护基,在将其除去时,可根据保护基而选择试剂、条件。化合物(26)与化合物(27)的反应中,可使用肽合成中通常使用的反应试剂、条件。利用上述的方法制造的化合物(10b)可按照上述的制造方法转化为本发明化合物(1)。

[0774] 5. 制造方法5

[0775] 以下,对制造方法2所述的制造中间体(2)中n<sup>1</sup>=1、n<sup>2</sup>=1、L<sup>a</sup>=0的化合物(2)的制造方法进行详细说明。式(2)表示的化合物、其盐或它们的溶剂化物例如可利用下述方法制造。



[0776]



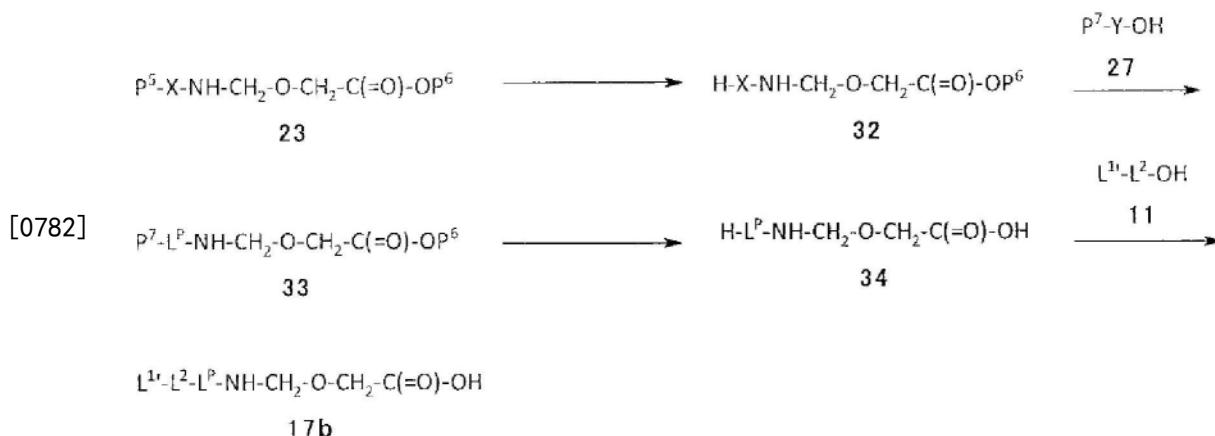
[0777] [式中,  $\text{L}^1$ 、 $\text{L}^2$ 、 $\text{L}^P$  与上文中定义相同, Z 表示包含 1~3 个氨基酸的寡肽,  $\text{P}^8$  表示氨基的保护基,  $\text{P}^9$  表示羧基的保护基。]

[0778] 通过将末端氨基及羧基已被保护的氨基酸或寡肽 (28) 的保护基  $\text{P}^8$  除去, 可得到化合物 (29)。通过使得到的胺体 (29) 与化合物 (11) 反应, 可制造化合物 (30)。关于作为  $\text{P}^8$  而说明的氨基的保护基, 只要是通常可用于保护氨基的基团即可, 没有特别限制, 作为代表的氨基的保护基, 可举出制造方法 2 中记载的氨基的保护基。另外, 在除去保护基  $\text{P}^8$  时, 也可根据该保护基而选择试剂、条件。在化合物 (29) 与羧酸 (11) 的反应中, 可使用与制造方法 2 中说明的试剂、反应条件同样的试剂、反应条件。

[0779] 通过将化合物 (30) 的保护基  $\text{P}^9$  除去而制造化合物 (31), 通过使得到的羧酸 (31) 与化合物 (26) 反应而可制造中间体 (2b)。关于作为  $\text{P}^8$  而说明的羧基的保护基, 可使用制造方法 2 中记载的代表的羧基的保护基, 此外, 在其脱保护反应中, 可使用与制造方法 2 中说明的试剂、反应条件同样的试剂、反应条件。另外, 在化合物 (26) 与羧酸 (31) 的反应中, 可使用肽合成中通常使用的反应试剂、条件。利用上述的方法制造的化合物 (2b) 可按照上述的制造方法转化为本发明化合物 (1)。

[0780] 6. 制造方法 6

[0781] 以下, 对制造方法 2 所述的制造中间体 (17) 中  $n^1=1$ 、 $n^2=1$ 、 $\text{L}^a=0$  的化合物 (17b) 的制造方法进行详细说明。式 (17b) 表示的化合物、其盐或它们的溶剂化物例如也可利用下述方法制造。



[0783] [式中,  $\text{L}^1$ 、 $\text{L}^2$ 、 $\text{L}^P$ 、X、Y、 $\text{P}^5$ 、 $\text{P}^6$  及  $\text{P}^7$  与上文中定义相同。]

[0784] 通过将末端氨基及末端羧基已被保护的化合物 (23) 的氨基的保护基  $\text{P}^5$  脱保护而制造化合物 (32), 通过使得到的胺体 (32) 与末端氨基或氨基已被保护的寡肽 (27) 反应而可

制造化合物(33)。关于作为P<sup>5</sup>而说明的氨基的保护基,只要是通常可用于保护氨基的基团即可,没有特别限制,作为代表的氨基的保护基,可举出制造方法2中记载的氨基的保护基。另外,在除去保护基P<sup>5</sup>时,也可根据该保护基而选择试剂、条件。此处,关于作为P<sup>6</sup>而说明的羧基的保护基及作为P<sup>7</sup>而说明的氨基的保护基,作为代表的羧基及氨基的保护基,可举出制造方法2中记载的羧基及氨基的保护基。化合物(33)中,优选羧基的保护基P<sup>6</sup>和氨基的保护基P<sup>7</sup>为可利用相同的方法或条件除去的保护基。例如,作为代表,可举出P<sup>6</sup>为苄基酯基、P<sup>7</sup>为苄基氨基的组合。

[0785] 化合物(34)可通过将化合物(33)的羧基的保护基P<sup>6</sup>和氨基的保护基P<sup>7</sup>除去而制造。可通过依次除去羧基的保护基P<sup>6</sup>和氨基的保护基P<sup>7</sup>而制造化合物(37),另外,如果P<sup>6</sup>和P<sup>7</sup>是可利用相同的方法或条件除去的保护基,则可在一工序中除去两者,可简便地制造化合物(34)。

[0786] 通过使得到的化合物(34)与化合物(11)反应,可制造化合物(17b)。化合物(34)与化合物(11)的反应中,可使用与制造方法2中说明的试剂、反应条件同样的试剂、反应条件。

[0787] 对于本发明的抗HER2抗体—药物偶联物而言,通过在大气中放置,或进行重结晶、纯化操作,有时吸收水分,或附着吸附水,等等,形成水合物,这样的含有水的化合物或盐也被包含在本发明中。

[0788] 另外,本发明中也包括用各种放射性或非放射性同位素标记的化合物。构成本发明的抗体—药物偶联物的原子中的一种以上,可以以非天然比例含有原子同位素。作为原子同位素,可举出例如氘(<sup>2</sup>H)、氚(<sup>3</sup>H)、碘—125(<sup>125</sup>I)或碳—14(<sup>14</sup>C)等。另外,本发明化合物可以用例如氘(<sup>3</sup>H)、碘—125(<sup>125</sup>I)或碳—14(<sup>14</sup>C)等放射性同位素进行放射性标记。经放射性标记的化合物作为治疗或预防剂、研究试剂例如检验试剂、及诊断剂、例如体内图像诊断剂是有用的。对于本发明的抗体—药物偶联物的所有同位素突变种而言,无论是否具有放射性,均包含在本发明的范围内。

[0789] [医药]

[0790] 本发明的抗HER2抗体—药物偶联物对癌细胞显示细胞毒性活性,因此,可作为医药、尤其是作为针对癌的治疗剂及/或预防剂使用。

[0791] 即,本发明的抗HER2抗体—药物偶联物可作为用于作为癌症治疗的主要治疗方法的化学疗法的药剂而选择使用,作为其结果,可减缓癌细胞的生长,抑制增殖,进而破坏癌细胞。由此,对于癌症患者而言,可从因癌而导致的症状中解脱,可实现QOL的改善,维持癌症患者的生命,达成治疗效果。在达到破坏癌细胞的程度的情况下,可通过抑制或控制癌细胞的增殖而使癌症患者达到更高的QOL,并且可实现更长期生存。

[0792] 除了在上述药物疗法中,单独使用药物之外,也可在辅助疗法中作为与其他疗法组合的药剂使用,也可与外科手术、放射线疗法、激素疗法等组合。此外,也可作为新辅助疗法中的药物疗法的药剂使用。

[0793] 除了用于上述这样的治疗之外,还可期待可抑制微小的转移癌细胞的增殖进而将其破坏的效果。尤其是,在原发性的癌细胞中确认了HER2的表达时,通过给予本发明的抗HER2抗体—药物偶联物,可期待癌转移的抑制、预防效果。例如,可期待抑制、破坏转移过程中存在于体液中的癌细胞的效果、对刚着床于某种组织后的微小的癌细胞的抑制、破坏等效果。因此,尤其是可期待抑制、预防用外科方法除去癌组织后发生的癌转移的效果。

[0794] 对于本发明的抗HER2抗体—药物偶联物而言,除了作为全身疗法向患者给予之外,也可期待局部地向癌组织给予的治疗效果。

[0795] 作为可应用本发明的抗HER2抗体—药物偶联物的癌的种类,可举出肺癌、尿道癌、大肠癌、前列腺癌、卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、膀胱癌、胃癌、胃肠道间质瘤、宫颈癌、食道癌、鳞状细胞癌、腹膜癌、肝癌、肝细胞癌、结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、子宫癌、唾液腺癌、肾癌、外阴癌、甲状腺癌、或阴茎癌等。对于本发明的抗HER2抗体—药物偶联物而言,在作为治疗对象的癌细胞中,表达抗体—药物偶联物中的抗体所能识别的HER2蛋白的癌细胞成为治疗对象。本说明书中,“表达HER2蛋白的癌”是指,包含在其细胞表面上具有HER2蛋白的细胞的癌。HER2蛋白在多种人的肿瘤中过量表达,可使用评价HER2蛋白的过量表达的免疫组织化学染色法(IHC)、评价HER2基因的扩增的荧光in situ杂交法(FISH)等本领域中通常实施的方法进行实施。

[0796] 另外,对于本发明的抗HER2抗体—药物偶联物而言,其抗HER2抗体识别在癌细胞表面表达的HER2蛋白,进而通过内化而显现抗肿瘤效果,因此,本发明的抗HER2抗体—药物偶联物的治疗对象不限于“表达HER2蛋白的癌”,例如白血病、恶性淋巴瘤、浆细胞瘤、骨髓瘤、或肉瘤也可成为治疗对象。

[0797] 本发明的抗HER2抗体—药物偶联物可合适地向哺乳动物给予,更优选为人。

[0798] 作为包含本发明的抗HER2抗体—药物偶联物的医药组合物中使用的物质,对于给予量、给予浓度而言,可从本领域中通常使用的制剂添加物中适当选择使用。

[0799] 本发明的抗HER2抗体—药物偶联物可作为包含1种以上的药学上的适应性的成分的药学组合物而给予。例如,代表性地,上述药学组合物包含1种以上的药学载体(例如,经灭菌的液体)。此处,液体例如包含水及油(石油、动物来源、植物来源、或合成来源的油)。油例如可以是花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。在静脉内给予上述药学组合物的情况下,水是更有代表性的载体。食盐水溶液、以及右旋糖(dextrose)水溶液及甘油水溶液也可作为液体载体,特别是可用于注射用溶液。适当的药学的赋形剂可从本领域中已知的药学赋形剂中适当选择。根据期望,上述组合物还可以包含微量的湿润剂或乳化剂、或pH缓冲化剂。适当的药学载体的例子在E.W.Martin的“Remington's Pharmaceutical Sciences”有记载。其处方与给予的方式对应。

[0800] 已知多种递送系统,可用于给予本发明的抗HER2抗体—药物偶联物。作为导入方法,可举出皮内、肌内、腹腔内、静脉内、及皮下的路径,但不限于这些。给予例如可利用输液或推注。特别优选的实施方式中,上述配体药物结合体的给予利用输液进行。肠胃外的给予是优选的给予路径。

[0801] 代表的实施方式中,将上述药学组合物形成为适于向人的静脉内给予的药学组合物,按照常规步骤而制备。代表性地,用于静脉内给予的组合物为灭菌的等张性的水性缓冲液中的溶液。必要时,上述医药还可包含增溶剂及用于缓解注射部位的疼痛的局麻药(例如,利多卡因)。通常,上述成分例如可以以下述方式供给:将呈现活性的量密封于安瓿或Sachet等中,制成在密封的容器中的干燥冷冻干燥粉末或无水的浓缩物,分别地,或在单位剂量型中一起混合。在利用输液而给予上述药物的情况下,例如,可将其投入到含有灭菌的制药等级的水或食盐水的输液瓶。在利用注射而给予上述药物的情况下,可提供注射用灭菌水或食盐水的安瓿,例如在给予上述成分前进行混合。

[0802] 本发明的医药组合物可以是仅包含本申请的抗HER2抗体—药物偶联物的医药组合物,也可以是包含抗HER2抗体—药物偶联物及至少一种除此之外的癌症治疗剂的医药组合物。本发明的抗HER2抗体—药物偶联物可以与其他癌症治疗剂共同给予,由此可增强抗癌效果。这样的目的下使用的其他抗癌剂可以与抗体—药物偶联物同时、分别、或连续地向个体给予,也可改变各自的给予间隔而给予。作为这样的癌症治疗剂,可举出5-FU、帕妥珠单抗(pertuzumab)、紫杉醇(paclitaxel)、卡铂(carboplatin)、顺铂(cisplatin)、吉西他滨(gemcitabine)、卡培他滨(capecitabine)、伊立替康(irinotecan)(CPT-11)、紫杉醇(paclitaxel)、多西他赛(docetaxel)、培美曲塞(pemetrexed)、索拉非尼(sorafenib)、长春花碱(vinblastine)、长春瑞滨(vinorelbine)、依维莫司(everolimus)、tanespimycin、贝伐单抗(bevacizumab)、奥沙利铂(oxaliplatin)、拉帕替尼(lapatinib)、ado-trastuzumab emtansine(T-DM1)或国际公开第2003/038043号中记载的药剂、以及LH—RH类似物(亮丙瑞林、戈舍瑞林等)、雌莫司汀·磷酸盐、雌激素拮抗剂(他莫昔芬、雷洛昔芬等)、芳香酶抑制剂(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剂即可,没有特别限制。

[0803] 对于这样的医药组合物,作为具有选择的组成和必要的纯度的制剂,可制成冷冻干燥制剂或液状制剂。制成冷冻干燥制剂时,可以是包含本领域中使用的适当的制剂添加物的制剂。另外,在液剂中也同样地操作,可制成包含本领域中使用的各种的制剂添加物的液状制剂。

[0804] 医药组合物的组成及浓度根据给予方法的不同而发生变化,对于本发明的医药组合物中包含的抗HER2抗体—药物偶联物而言,在针对抗体—药物偶联物的抗原的亲和性、即针对抗原的解离常数(Kd值)方面,亲和性越高(Kd值越低),就能以越少量的给予量发挥药效。因此,在确定抗体—药物偶联物的给予量时,也可基于抗体—药物偶联物与抗原的亲和性的情况而设定给予量。在将本发明的抗体—药物偶联物向人给予时,例如,以约0.001~100mg/kg给予1次,或每次间隔1~180天而给予多次。

#### [0805] 实施例

[0806] 通过以下所示的实施例具体地说明本发明,但本发明不受它们的限制。另外,不对这些实施例进行任何方式的限定性解释。另外,本说明书中,没有特别记载的试剂、溶剂及起始材料可由市售的供给源容易地获得。

#### [0807] 参考例1曲妥珠单抗的制备

[0808] 将14瓶量的赫赛汀(Herceptin)(Genentech, Inc.)440mg/小瓶(vial)溶解于2L阳离子交换色谱缓冲液A(25mM Citrate buffer, 30mM NaCl, pH5.0),用0.2μm滤器(Millipore Co.: Stericup 0.22μm, GVPVDF Membrane)进行过滤。向阳离子交换色谱柱(SP Sepharose HP 240ml, XK50柱)提供试样,用阳离子交换色谱缓冲液B(25mM Citrate buffer, 500mM NaCl, pH5.0),用NaCl浓度30mM~500mM的线性梯度(Linear gradient)使其洗脱,将IgG单体分级。利用尺寸排阻色谱分析,合并单体高纯度98%以上的样品,置换成基于UF30K(Millipore Co.: PELLICON XL Filter, BIOMAX 30K, PXB030A50)浓缩及CBS缓冲液(10mM Citrate/140mM NaCl, pH6.0)。对于已置换成CBS缓冲液的样品,用0.2μm滤器(Sartorius: Minisart-Plus 0.2μm, 17823K)进行过滤。

#### [0809] 参考例2曲妥珠单抗emtansine的制造T-DM1

[0810] 抗体的SMCC化:针对参考例1中制成的曲妥珠单抗,使用制造方法1中记载的共通操作C—2(作为缓冲液,使用PBS6.5/EDTA)、共通操作A及共通操作B(作为280nm吸光系数,使用 $1.37\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ),将缓冲液更换为PBS6.5/EDTA,在15mL聚丙烯制试管(tube)中准备曲妥珠单抗(160.0mg)溶解于PBS6.5/EDTA(7.60mL)的溶液。接下来,在室温下添加SMCC(1.84mg)的DMSO溶液(0.40mL;相对于一分子抗体,约相当于5.1当量),将反应溶液的抗体浓度调节为20mg/mL,使用试管混匀器(MTR—103,AS ONE Corporation),在室温下进行2小时反应。针对该反应液,按照共通操作D—2(作为缓冲液,使用PBS6.5/EDTA)进行纯化,得到12mL含有154.9mg经SMCC诱导的抗体的溶液。

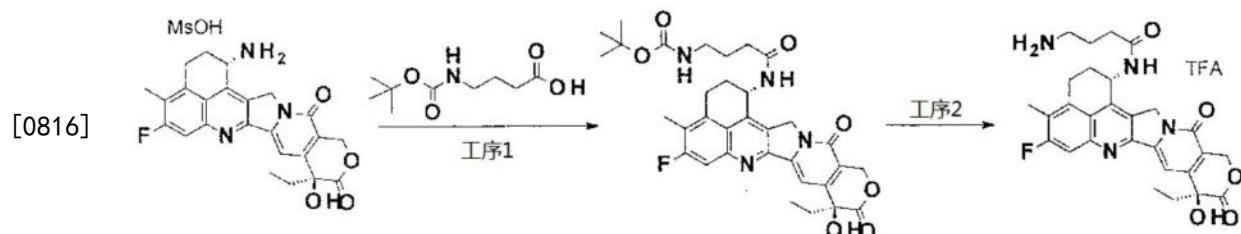
[0811] 抗体与药物接头的偶联:在室温下,向50mL聚丙烯制试管中装有的上述溶液中,添加PBS6.5/EDTA(2.56mL)及N<sup>2</sup>—脱乙酰—N<sup>2</sup>—(3—巯基—1—氧代丙基)—美登素(4.67mg;DM1,Journal of Medicinal Chemistry、2006年、49卷、14号、4392项)的DMA(二甲基乙酰胺)溶液(0.93mL;相对于经SMCC诱导的抗体一分子,约相当于5.8当量),将反应溶液的抗体浓度调整为10mg/mL,使用试管混匀器,在室温进行16.5小时反应。

[0812] 纯化操作:针对上述溶液,利用使用了含有氯化钠(137mM)的磷酸钠缓冲液(10mM, pH6.5)的共通操作D—1,进行纯化,得到35mL含有目标参考例化合物的溶液。

[0813] 特性评价:利用使用了252nm及280nm这两种波长下的UV吸光度的共通操作E,得到下述的特性值。

[0814] 抗体浓度:4.14mg/mL,抗体收量:144.9mg(91%),每一分子抗体的药物平均连接数(n):3.0。

[0815] 实施例1中间体(1)



[0817] 工序1:(4—{[(1S,9S)—9—乙基—5—氟—9—羟基—4—甲基—10,13—二氧代—2,3,9,10,13,15—六氢—1H,12H—苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2—b]喹啉—1—基]氨基}—4—氧代丁基)氨基甲酸叔丁酯

[0818] 将4—(叔丁氧基羰基氨基)丁酸(0.237g,1.13mmol)溶解于二氯甲烷(10mL),添加N—羟基琥珀酰亚胺(0.130g,1.13mmol)、及1—乙基—3—(3—二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(0.216g,1.13mmol),搅拌1小时。将该反应溶液滴加到添加有依沙替康的甲磺酸盐(0.500g,0.94mmol)、及三乙胺(0.157mL,1.13mmol)的N,N—二甲基甲酰胺溶液(10mL)中,在室温下搅拌1天。减压馏去溶剂,用硅胶柱色谱法[氯仿~氯仿:甲醇=8:2(v/v)]纯化得到的残留物,得到标题化合物(0.595g,定量)。

[0819] <sup>1</sup>H—NMR(400MHz,DMSO—d<sub>6</sub>) $\delta$ :0.87(3H,t,J=7.2Hz),1.31(9H,s),1.58(1H,t,J=7.2Hz),1.66(2H,t,J=7.2Hz),1.82—1.89(2H,m),2.12—2.21(3H,m),2.39(3H,s),2.92(2H,t,J=6.5Hz),3.17(2H,s),5.16(1H,d,J=18.8Hz),5.24(1H,d,J=18.8Hz),5.42(2H,s),5.59—5.55(1H,m),6.53(1H,s),6.78(1H,t,J=6.3Hz),7.30(1H,s),7.79(1H,d,J=11.0Hz),8.40(1H,d,J=8.6Hz)。

[0820] MS (APCI) m/z: 621 (M+H)<sup>+</sup>

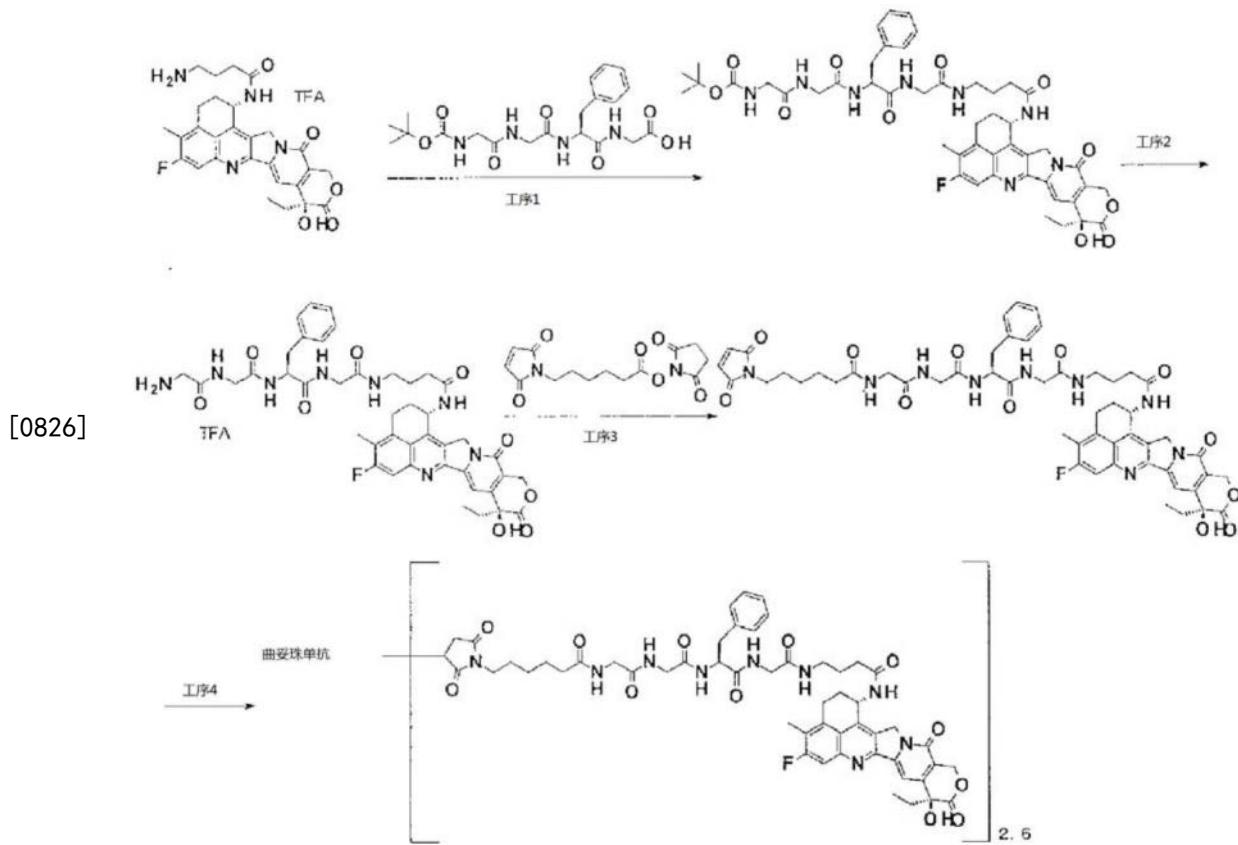
[0821] 工序2:4-氨基-N-[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基]丁酰胺

[0822] 将上述工序1中得到的化合物(0.388g, 0.61mmol)溶解于二氯甲烷(9mL)。添加三氟乙酸(9mL), 搅拌4小时。减压馏去溶剂, 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]纯化得到的残留物, 得到作为标题化合物的三氟乙酸盐(0.343g, 定量)。

[0823] <sup>1</sup>H-NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0.87 (3H, t, J=7.2Hz), 1.79~1.92 (4H, m), 2.10~2.17 (2H, m), 2.27 (2H, t, J=7.0Hz), 2.40 (3H, s), 2.80~2.86 (2H, m), 3.15~3.20 (2H, m), 5.15 (1H, d, J=18.8Hz), 5.26 (1H, d, J=18.8Hz), 5.42 (2H, s), 5.54~5.61 (1H, m), 6.55 (1H, s), 7.32 (1H, s), 7.72 (3H, brs), 7.82 (1H, d, J=11.0Hz), 8.54 (1H, d, J=8.6Hz).

[0824] MS (APCI) m/z: 521 (M+H)<sup>+</sup>

[0825] 实施例2抗体-药物偶联物(2)



[0827] 工序1:N-(叔丁氧基羰基)甘氨酰甘氨酰-L-苯基丙氨酰-N-[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基]氨基)-4-氧代丁基)甘氨酰胺

[0828] 将N-(叔丁氧基羰基)甘氨酰甘氨酰-L-苯基丙氨酰甘氨酸(0.081g, 0.19mmol)溶解于二氯甲烷(3mL), 添加N-羟基琥珀酰亚胺(0.021g, 0.19mmol)、及1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(0.036g, 0.19mmol), 搅拌3.5小时。将该反应溶液滴加到

添加有实施例1工序2中得到的化合物(0.080g, 0.15mmol)的N,N-二甲基甲酰胺溶液(1.5mL)中, 在室温下搅拌4小时。减压馏去溶剂, 用硅胶柱色谱法[氯仿~氯仿:甲醇=8:2(v/v)]纯化得到的残留物, 得到标题化合物(0.106g, 73%)。

[0829]  $^1\text{H-NMR}$  (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 0.87 (3H, t,  $J$ =7.4Hz), 1.36 (9H, s), 1.71 (2H, m), 1.86 (2H, t,  $J$ =7.8Hz), 2.15-2.19 (4H, m), 2.40 (3H, s), 2.77 (1H, dd,  $J$ =12.7, 8.8Hz), 3.02 (1H, dd,  $J$ =14.1, 4.7Hz), 3.08-3.11 (2H, m), 3.16-3.19 (2H, m), 3.54 (2H, d,  $J$ =5.9Hz), 3.57-3.77 (4H, m), 4.46-4.48 (1H, m), 5.16 (1H, d,  $J$ =19.2Hz), 5.25 (1H, d,  $J$ =18.8Hz), 5.42 (2H, s), 5.55-5.60 (1H, m), 6.53 (1H, s), 7.00 (1H, t,  $J$ =6.3Hz), 7.17-7.26 (5H, m), 7.31 (1H, s), 7.71 (1H, t,  $J$ =5.7Hz), 7.80 (1H, d,  $J$ =11.0Hz), 7.92 (1H, t,  $J$ =5.7Hz), 8.15 (1H, d,  $J$ =8.2Hz), 8.27 (1H, t,  $J$ =5.5Hz), 8.46 (1H, d,  $J$ =8.2Hz).

[0830] MS (APCI) m/z: 939 (M+H)<sup>+</sup>

[0831] 工序2: 甘氨酰甘氨酰-L-苯基丙氨酰-N-(4-[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基]氨基)-4-氧代丁基)甘氨酰胺

[0832] 将上述工序1中得到的化合物(1.97g, 2.10mmol)溶解于二氯甲烷(7mL), 添加三氟乙酸(7mL), 搅拌1小时。减压馏去溶剂, 向残留物中添加甲苯并使其共沸, 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]纯化得到的残留物, 得到作为标题化合物的三氟乙酸盐(1.97g, 99%)。

[0833]  $^1\text{H-NMR}$  (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 0.87 (3H, t,  $J$ =7.4Hz), 1.71-1.73 (2H, m), 1.82-1.90 (2H, m), 2.12-2.20 (4H, m), 2.40 (3H, s), 2.75 (1H, dd,  $J$ =13.7, 9.4Hz), 3.03-3.09 (3H, m), 3.18-3.19 (2H, m), 3.58-3.60 (2H, m), 3.64 (1H, d,  $J$ =5.9Hz), 3.69 (1H, d,  $J$ =5.9Hz), 3.72 (1H, d,  $J$ =5.5Hz), 3.87 (1H, dd,  $J$ =16.8, 5.9Hz), 4.50-4.56 (1H, m), 5.16 (1H, d,  $J$ =19.2Hz), 5.25 (1H, d,  $J$ =18.8Hz), 5.42 (2H, s), 5.55-5.60 (1H, m), 7.17-7.27 (5H, m), 7.32 (1H, s), 7.78-7.81 (2H, m), 7.95-7.97 (3H, m), 8.33-8.35 (2H, m), 8.48-8.51 (2H, m).

[0834] MS (APCI) m/z: 839 (M+H)<sup>+</sup>

[0835] 工序3:N-[6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰基]甘氨酰甘氨酰-L-苯基丙氨酰-N-(4-[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基]氨基)-4-氧代丁基)甘氨酰胺

[0836] 向上述工序2中得到的化合物(337mg, 0.353mmol)的N,N-二甲基甲酰胺(1.2mL)溶液中, 添加三乙胺(44.3mL, 0.318mmol)、6-马来酰亚胺己酸N-琥珀酰亚胺基酯(119.7mg, 0.388mmol), 在室温下, 搅拌1小时。减压馏去溶剂, 用硅胶柱色谱法[氯仿~氯仿:甲醇=5:1(v/v)]纯化得到的残留物, 以淡黄色固体形式得到标题化合物(278.0mg, 76%)。

[0837]  $^1\text{H-NMR}$  (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 0.87 (3H, t,  $J$ =7.3Hz), 1.12-1.22 (2H, m), 1.40-1.51 (4H, m), 1.66-1.76 (2H, m), 1.80-1.91 (2H, m), 2.05-2.21 (6H, m), 2.39 (3H, s), 2.79 (1H, dd,  $J$ =14.0, 9.8Hz), 2.98-3.21 (5H, m), 3.55-3.77 (8H, m), 4.41-4.48 (1H, m), 5.15 (1H, d,  $J$ =18.9Hz), 5.24 (1H, d,  $J$ =18.9Hz), 5.40 (1H, d,  $J$ =17.1Hz), 5.44 (1H, d,  $J$ =

17.1Hz), 5.54—5.60 (1H, m), 6.53 (1H, s), 6.99 (2H, s), 7.20—7.27 (5H, m), 7.30 (1H, s), 7.70 (1H, t,  $J=5.5$ Hz), 7.80 (1H, d,  $J=11.0$ Hz), 8.03 (1H, t,  $J=5.8$ Hz), 8.08 (1H, t,  $J=5.5$ Hz), 8.14 (1H, d,  $J=7.9$ Hz), 8.25 (1H, t,  $J=6.1$ Hz), 8.46 (1H, d,  $J=8.5$ Hz).

[0838] MS (APCI)  $m/z$ : 1032 ( $M+H$ )<sup>+</sup>

[0839] 工序4:抗体—药物偶联物 (2)

[0840] 抗体的还原:针对参考例1中制作的曲妥珠单抗,使用制造方法1中记载的共通操作C—1及共通操作B(作为280nm吸光系数,使用 $1.37\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ),用PBS6.0/EDTA制备成10mg/mL。将本溶液(3.0mL)装入到15mL聚丙烯制试管中,向其中添加10mM三(2—羧基乙基)膦盐酸盐(TCEP,东京化成工业株式会社)水溶液(0.0934mL;相对于一分子抗体为4.6当量)及1M磷酸氢二钾水溶液(Nacalai Tesque, Inc.; 0.150mL)。确认了本溶液的pH在 $7.4\pm 0.1$ 内后,于37℃孵育1小时,由此,将抗体内铰链部的二硫键还原。

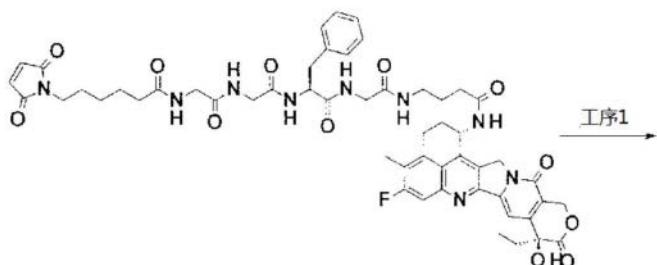
[0841] 抗体与药物接头的偶联:于22℃孵育上述溶液10分钟后,添加含有10mM上述工序3中得到的化合物的DMSO溶液(0.187mL;相对于一分子抗体为9.2当量),于22℃孵育40分钟,将药物接头与抗体连接。接下来,添加N—乙酰半胱氨酸(NAC, Sigma—Aldrich Co.LLC)水溶液(0.0374mL;相对于一分子抗体为18.4当量),进而于22℃孵育20分钟,终止药物接头的反应。

[0842] 纯化:针对上述溶液,进行利用了制造方法1中记载的共通操作D—1(作为缓冲液,使用PBS6.0)的纯化,得到6mL含有标题抗体—药物偶联物的溶液,然后,利用共通操作A将溶液浓缩。

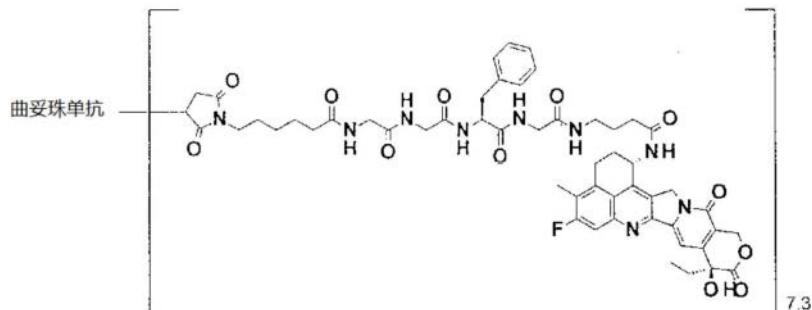
[0843] 特性评价:利用制造方法1中记载的共通操作E,得到下述的特性值。

[0844] 抗体浓度:3.21mg/mL,抗体收量:22.5mg (75%),每一分子抗体的药物平均连接数(n):2.6。

[0845] 实施例3抗体—药物偶联物 (3)



[0846]



[0847] 工序1:抗体—药物偶联物 (3)

[0848] 抗体的还原:针对参考例1中制作的曲妥珠单抗,利用共通操作C—1及B(作为280nm吸光系数,使用 $1.487\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ),将介质替换为PBS6.0/EDTA,制备成10mg/mL的抗体

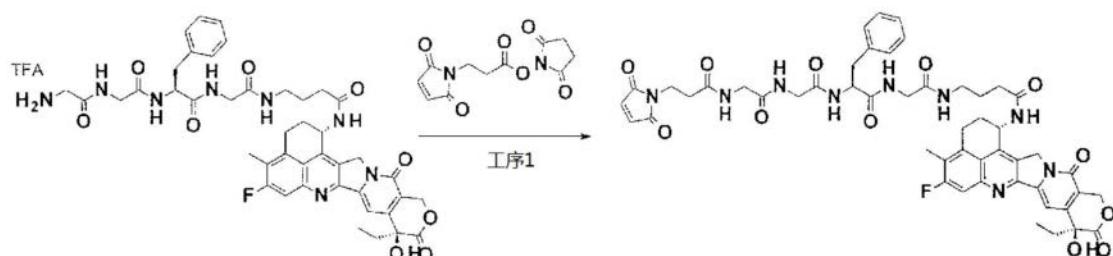
浓度。将本溶液(1.25mL)放入到1.5mL聚丙烯制试管中,向其中添加10mM TCEP水溶液(0.039mL;相对于一分子抗体为4.6当量)及1M磷酸氢二钾水溶液(0.0625mL)。确认了本溶液的pH在7.4±0.1内后,于37℃孵育1小时,由此,将抗体内部链部的二硫键还原。

[0849] 抗体与药物接头的偶联:在室温下,向上述溶液中添加DMSO(0.072mL)和含有10mM实施例2工序3的化合物的DMSO溶液(0.078mL;相对于一分子抗体为9.2当量),使用试管混匀器,在室温下搅拌40分钟,将药物接头与抗体连接。接下来,添加100mM NAC水溶液(0.0155mL;相对于一分子抗体为18.4当量),进而在室温下搅拌20分钟,终止药物接头的反应。

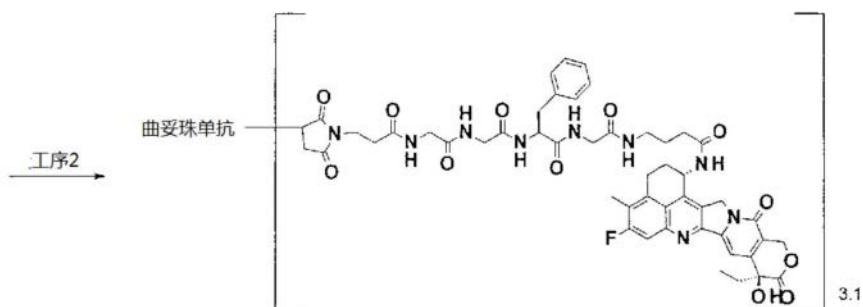
[0850] 纯化:针对上述溶液,进行利用了共通操作D(作为缓冲液,使用ABS)的纯化,得到6mL含有目标化合物的溶液。进而利用共通操作A将溶液浓缩,然后,利用共通操作E,得到下述的特性值。

[0851] 抗体浓度:9.85mg/mL,抗体收量:6.9mg(55%),每一分子抗体的药物平均连接数(n):7.3。

[0852] 实施例4抗体—药物偶联物(4)



[0853]



[0854] 工序1:N—[3—(2,5—二氧代—2,5—二氢—1H—吡咯—1—基)丙酰基]甘氨酰甘氨酰—L—苯基丙氨酰—N—(4—{(1S,9S)—9—乙基—5—氟—9—羟基—4—甲基—10,13—二氧代—2,3,9,10,13,15—六氢—1H,12H—苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2—b]喹啉—1—基}—4—氧代丁基)甘氨酰胺

[0855] 使用3—马来酰亚胺丙酸N—琥珀酰亚胺基酯(24.6mg,0.0924mmol),代替6—马来酰亚胺己酸N—琥珀酰亚胺基酯,与实施例2工序3同样地使实施例1的化合物(80mg,0.084mmol)反应,以淡黄色固体形式得到标题化合物(60.0mg,73%)。

[0856]  $^1\text{H-NMR}$ (400MHz,DMSO- $d_6$ ) $\delta$ :0.89(3H,t,J=7.3Hz),1.70—1.78(2H,m),1.81—1.94(2H,m),2.12—2.23(4H,m),2.42(3H,s),2.81(1H,dd,J=13.7,9.8Hz),3.01—3.15(3H,m),3.16—3.23(2H,m),3.30—3.35(1H,m),3.58—3.71(6H,m),3.71—3.79(1H,m),4.44—4.51(1H,m),5.19(1H,d,J=19.0Hz),5.27(1H,d,J=19.0Hz),5.43(1H,d,J=17.6Hz),5.47(1H,d,J=17.6Hz),5.57—5.63(1H,m),6.56(1H,s),7.02(2H,s),7.17—

7.22 (1H, m), 7.22—7.30 (5H, m), 7.34 (1H, s), 7.73 (1H, t,  $J=5.6\text{Hz}$ ), 7.83 (1H, d,  $J=10.7\text{Hz}$ ), 8.08 (1H, t,  $J=5.6\text{Hz}$ ), 8.15 (1H, d,  $J=7.8\text{Hz}$ ), 8.30 (2H, dt,  $J=18.7, 5.7\text{Hz}$ ), 8.49 (1H, d,  $J=8.8\text{Hz}$ ).

[0857] MS (APCI)  $m/z$ : 990 ( $M+H$ )<sup>+</sup>

[0858] 工序2:抗体—药物偶联物 (4)

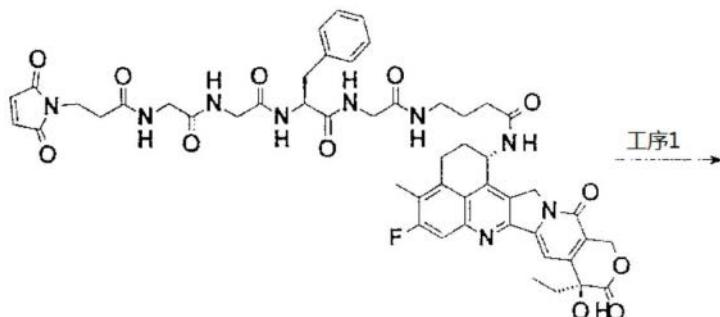
[0859] 抗体的还原:针对参考例1中制作的曲妥珠单抗,利用共通操作C—1及B(作为280nm吸光系数,使用 $1.48\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ),将介质替换为PBS6.0/EDTA,制备成10mg/mL的抗体浓度。将本溶液(1mL)装入到1.5mL聚丙烯制试管中,向其中添加10mM TCEP水溶液(0.0155mL;相对于一分子抗体为2.3当量)及1M磷酸氢二钾水溶液(0.050mL)。确认了本溶液的pH在 $7.4\pm0.1$ 内后,于37℃孵育1小时,由此,将抗体内铰链部的二硫键还原。

[0860] 抗体与药物接头的偶联:在室温下,向上述溶液中添加DMSO(0.072mL)和含有10mM实施例2工序3的化合物的DMSO溶液(0.031mL;相对于一分子抗体为4.6当量),使用试管混匀器,在室温下搅拌40分钟,将药物接头与抗体连接。接下来,添加100mM NAC水溶液(0.0078mL;相对于一分子抗体为9.2当量),进而在室温下搅拌20分钟,终止药物接头的反应。

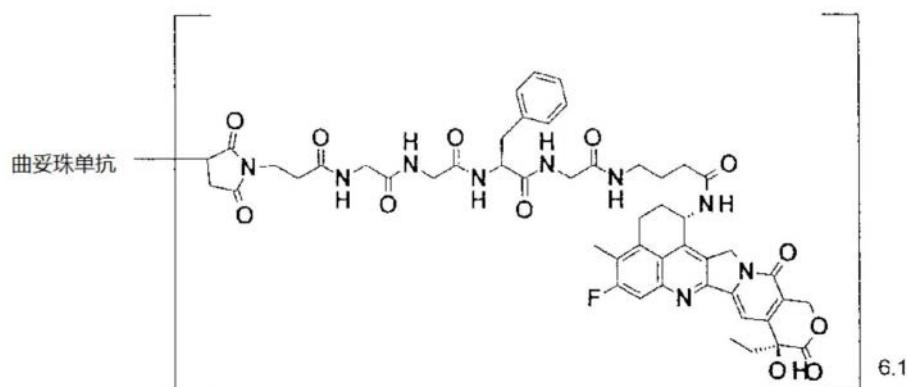
[0861] 纯化:针对上述溶液,进行利用了共通操作D(作为缓冲液,使用ABS)的纯化,得到6mL含有目标化合物的溶液。利用共通操作E,得到下述的特性值。

[0862] 抗体浓度:1.32mg/mL,抗体收量:7.9mg (79%),每一分子抗体的药物平均连接数(n):3.1。

[0863] 实施例5抗体—药物偶联物 (5)



[0864]



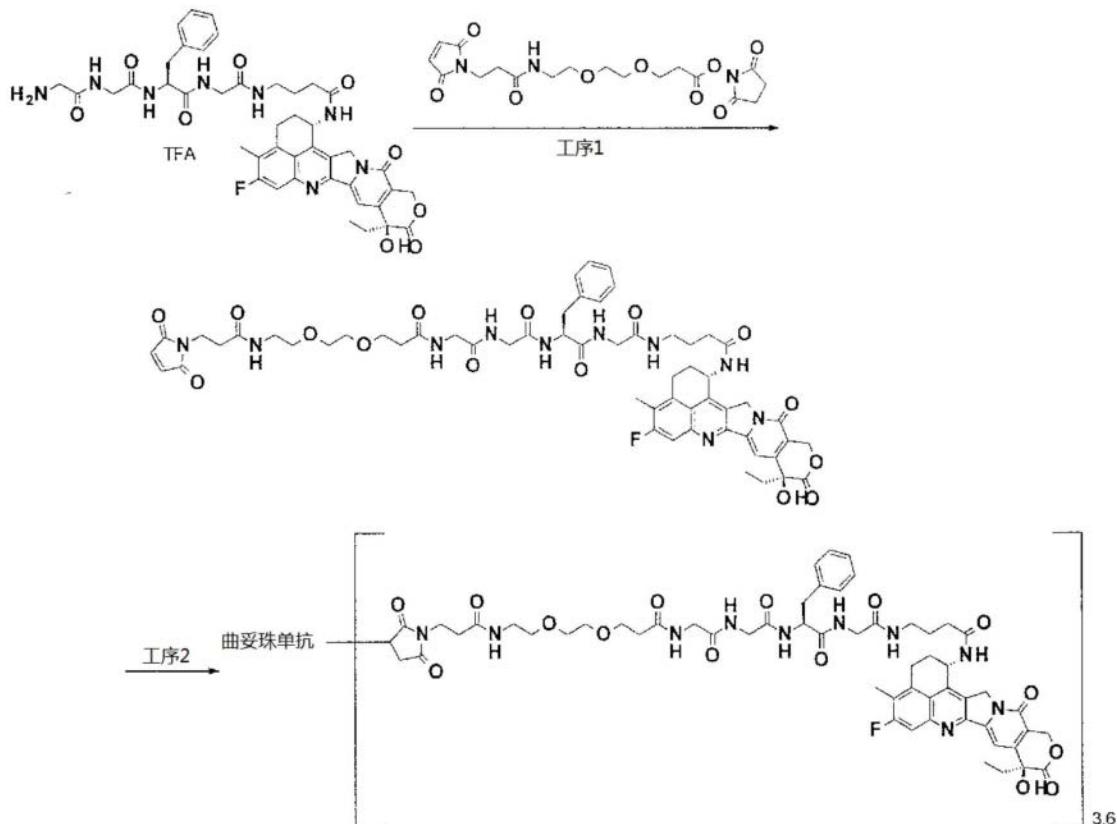
[0865] 工序1:抗体—药物偶联物 (5)

[0866] 调节10mM TCEP水溶液的添加量,使得在抗体还原时,TCEP相对于抗体的摩尔比为4.6,调节10mM药物接头溶液的添加量,使得在药物接头连接时,实施例4工序1的化合物相

对于抗体的摩尔比为9.2,另外,调节100mM NAC水溶液的添加量,使得在反应停止时,NAC相对于抗体的摩尔比为18.4,利用与实施例4工序2同样的操作,得到6mL含有标题抗体—药物偶联物的溶液,得到下述的特性值。

[0867] 抗体浓度:1.23mg/mL,抗体收量:7.4mg (74%),每一分子抗体的药物平均连接数(n):6.1。

[0868] 实施例6抗体—药物偶联物 (6)



[0870] 工序1:N—{3—[2—(2—{[3—(2,5—二氧代—2,5—二氢—1H—吡咯—1—基)丙酰基]氨基}乙氧基)乙氧基]丙酰基}甘氨酰甘氨酰—L—苯基丙氨酰—N—(4—{(1S,9S)—9—乙基—5—氟—9—羟基—4—甲基—10,13—二氧代—2,3,9,10,13,15—六氢—1H,12H—苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2—b]喹啉—1—基}—4—氧代丁基)甘氨酰胺

[0871] 使用二异丙基乙基胺(20.8μL,0.119mmol),代替三乙胺,使用3—(2—(3—马来酰亚胺丙酰胺)乙氧基)乙酸N—琥珀酰亚胺基酯(50.7mg,0.119mmol),代替6—马来酰亚胺己酸N—琥珀酰亚胺基酯,与实施例2工序3同样地使实施例2工序2中得到的化合物(100mg,0.119mmol)反应,以淡黄色固体形式得到标题化合物(66.5mg,48%)。

[0872]  $^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 0.85 (3H, t,  $J=7.4\text{Hz}$ ), 1.65—1.74 (2H, m), 1.77—1.90 (2H, m), 2.07—2.19 (4H, m), 2.30 (2H, t,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 2.33—2.36 (2H, m), 2.38 (3H, s), 2.76 (1H, dd,  $J=13.7, 9.8\text{Hz}$ ), 2.96—3.18 (9H, m), 3.42—3.44 (4H, m), 3.53—3.76 (10H, m), 4.43 (1H, td,  $J=8.6, 4.7\text{Hz}$ ), 5.14 (1H, d,  $J=18.8\text{Hz}$ ), 5.23 (1H, d,  $J=18.8\text{Hz}$ ), 5.38 (1H, d,  $J=17.2\text{Hz}$ ), 5.42 (1H, d,  $J=17.2\text{Hz}$ ), 5.52—5.58 (1H, m), 6.52 (1H, s), 6.98 (2H, s), 7.12—7.17 (1H, m), 7.18—7.25 (4H, m), 7.29 (1H, s), 7.69 (1H, t,  $J=5.5\text{Hz}$ ), 7.78 (1H, d,  $J$ )

$=11.3\text{Hz}$  ,  $7.98-8.03(2\text{H},\text{m})$  ,  $8.11(1\text{H},\text{d},J=7.8\text{Hz})$  ,  $8.16(1\text{H},\text{t},J=5.7\text{Hz})$  ,  $8.23(1\text{H},\text{t},J=5.9\text{Hz})$  ,  $8.44(1\text{H},\text{d},J=9.0\text{Hz})$  .

[0873] MS (APCI)  $m/z$ : 1149 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>

[0874] 工序2:抗体—药物偶联物(6)

[0875] 抗体的还原:针对参考例1中制作的曲妥珠单抗,利用共通操作C—1及B(作为 $280\text{nm}$ 吸光系数,使用 $1.48\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ),将介质替换为PBS6.0/EDTA,制备成 $10\text{mg/mL}$ 的抗体浓度。将本溶液( $1.25\text{mL}$ )放入到 $1.5\text{mL}$ 聚丙烯制试管中,向其中添加 $10\text{mM}$  TCEP水溶液( $0.019\text{mL}$ ;相对于一分子抗体为 $2.3$ 当量)及 $1\text{M}$ 磷酸氢二钾水溶液( $0.0625\text{mL}$ )。确认了本溶液的pH在 $7.4\pm0.1$ 内后,于 $37^\circ\text{C}$ 孵育1小时,由此,将抗体内铰链部的二硫键还原。

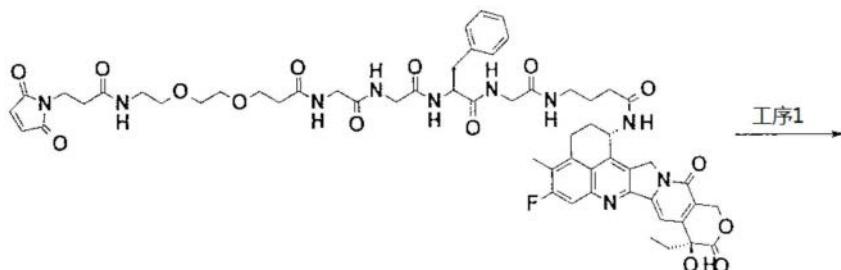
[0876] 抗体与药物接头的偶联:在室温下,向上述溶液中添加DMSO (Sigma—Aldrich Co. LLC;  $0.109\text{mL}$ ) 和含有 $10\text{mM}$ 上述工序1的化合物的DMSO溶液( $0.039\text{mL}$ ;相对于一分子抗体为 $4.6$ 当量),使用试管混匀器,在室温下搅拌40分钟,将药物接头与抗体连接。接下来,添加 $100\text{mM}$  NAC水溶液( $0.008\text{mL}$ ),进而在室温下搅拌20分钟,终止药物接头的反应。

[0877] 纯化:针对上述溶液,进行利用了共通操作D(作为缓冲液,使用ABS)的纯化,得到 $6\text{mL}$ 含有目标化合物的溶液。

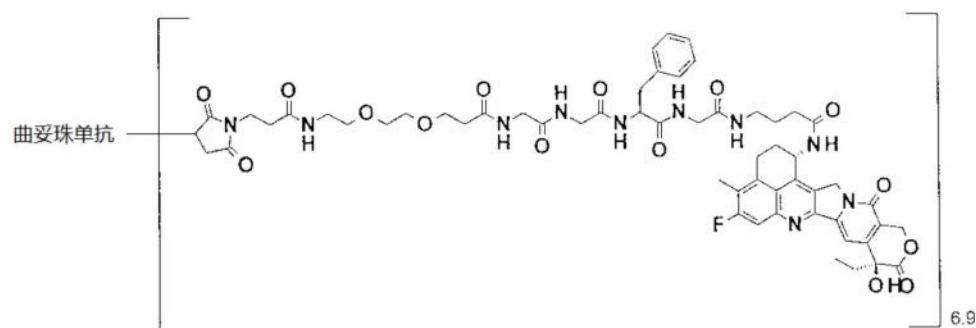
[0878] 特性评价:利用共通操作E,得到下述的特性值。

[0879] 抗体浓度: $1.76\text{mg/mL}$ ,抗体收量: $10.6\text{mg}$  (85%),每一分子抗体的药物平均连接数( $n$ ): $3.6$ 。

[0880] 实施例7抗体—药物偶联物(7)



[0881]



[0882] 工序1:抗体—药物偶联物(7)

[0883] 抗体的还原:针对参考例1中制作的曲妥珠单抗,利用共通操作C—1及B(作为 $280\text{nm}$ 吸光系数,使用 $1.48\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ),将介质替换为PBS6.0/EDTA,制备成 $10\text{mg/mL}$ 的抗体浓度。将本溶液( $1.25\text{mL}$ )放入到 $1.5\text{mL}$ 聚丙烯制试管中,向其中添加 $10\text{mM}$  TCEP水溶液( $0.039\text{mL}$ ;相对于一分子抗体为 $4.6$ 当量)及 $1\text{M}$ 磷酸氢二钾水溶液( $0.0625\text{mL}$ )。确认了本溶液的pH在 $7.4\pm0.1$ 内后,于 $37^\circ\text{C}$ 孵育1小时,由此,将抗体内铰链部的二硫键还原。

[0884] 抗体与药物接头的偶联:在室温下,向上述溶液中添加DMSO( $0.072\text{mL}$ )和含有 $10\text{mM}$

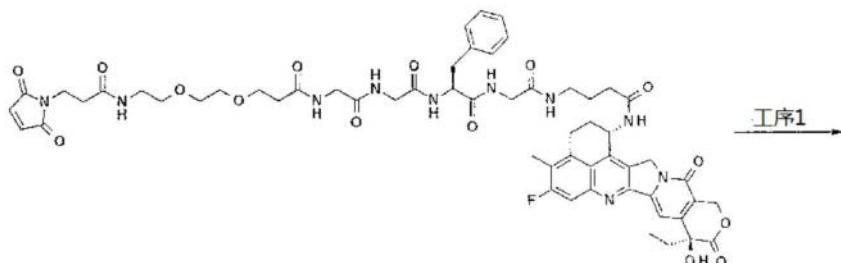
实施例6工序1的化合物的DMSO溶液(0.078mL;相对于一分子抗体为9.2当量),使用试管混匀器,在室温下搅拌40分钟,将药物接头与抗体连接。接下来,添加100mM NAC水溶液(0.0155mL),进而在室温下搅拌20分钟,终止药物接头的反应。

[0885] 纯化:针对上述溶液,进行利用了共通操作D(作为缓冲液,使用ABS)的纯化,得到6mL含有目标化合物的溶液。

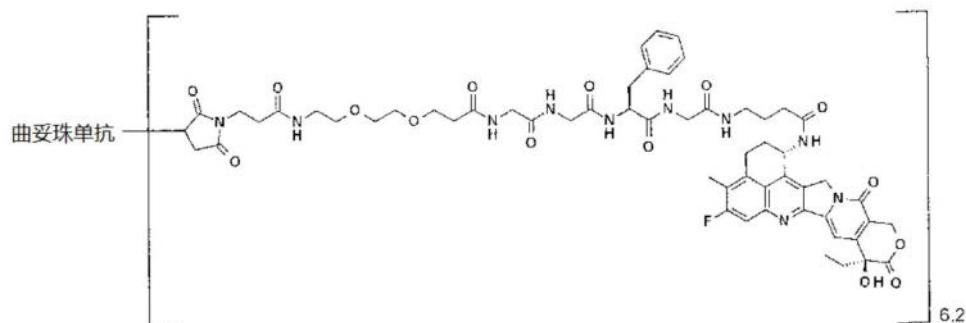
[0886] 特性评价:利用共通操作E,得到下述的特性值。

[0887] 抗体浓度:1.93mg/mL,抗体收量:11.6mg(93%),每一分子抗体的药物平均连接数(n):6.9。

[0888] 实施例8抗体—药物偶联物(8)



[0889]



[0890] 工序1:抗体—药物偶联物(8)

[0891] 抗体的还原:针对参考例1中制作的曲妥珠单抗,利用共通操作C—1及B(作为280nm吸光系数,使用 $1.48\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ),将介质替换为PBS6.0/EDTA,制备成10mg/mL的抗体浓度。将本溶液(1.25mL)放入到1.5mL聚丙烯制试管中,向其中添加10mM TCEP水溶液(0.039mL;相对于一分子抗体为4.6当量)及1M磷酸氢二钾水溶液(0.0625mL)。确认了本溶液的pH在 $7.4 \pm 0.1$ 内后,于37℃孵育1小时,由此,将抗体内铰链部的二硫键还原。

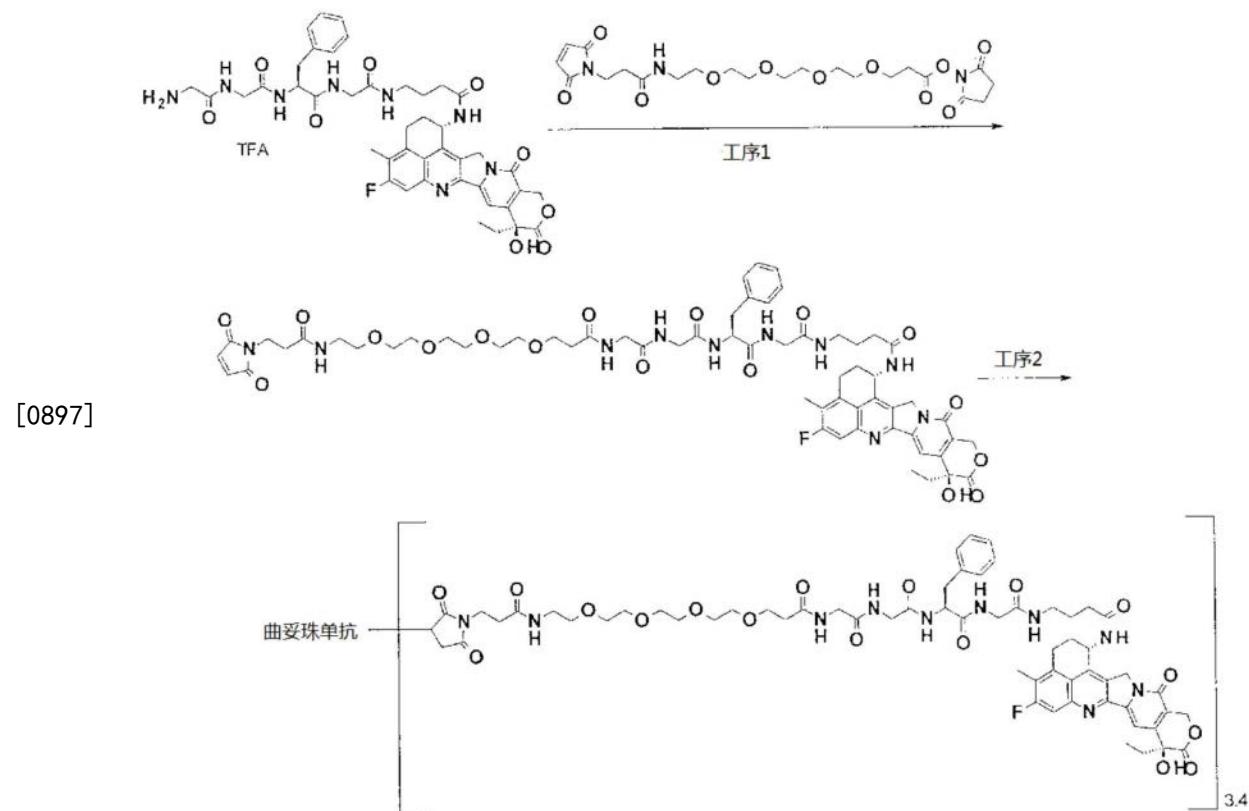
[0892] 抗体与药物接头的偶联:在室温下,向上述溶液中添加DMSO(0.072mL)和含有10mM实施例6工序1的化合物的DMSO溶液(0.078mL;相对于一分子抗体为9.2当量),使用试管混匀器,在室温下搅拌40分钟,将药物接头与抗体连接。接下来,添加100mM NAC水溶液(0.0155mL),进而在室温下搅拌20分钟,终止药物接头的反应。

[0893] 纯化:针对上述溶液,进行利用了共通操作D—1(作为缓冲液,使用ABS)的纯化,得到5.7mL含有目标化合物的溶液。

[0894] 特性评价:利用共通操作E,得到下述的特性值。

[0895] 抗体浓度:1.50mg/mL,抗体收量:8.55mg(86%),每一分子抗体的药物平均连接数(n):6.2。

[0896] 实施例9抗体—药物偶联物(9)



[0899] 使用二异丙基乙基胺( $18.7\mu\text{L}, 0.107\text{mmol}$ )，代替三乙胺，使用1-马来酰亚胺-3-氧代-7,10,13,16-四氧杂-4-氮杂十九烷-19-酸N-琥珀酰亚胺基酯( $55.1\text{mg}, 0.107\text{mmol}$ )，代替6-马来酰亚胺己酸N-琥珀酰亚胺基酯，与实施例2工序3同样地使实施例2工序2中得到的化合物( $90\text{mg}, 0.107\text{mmol}$ )反应，以淡黄色固体形式得到标题化合物( $50\text{mg}, 37\%$ )。

[0900]  $^1\text{H-NMR}$  ( $400\text{MHz}, \text{DMSO}-\text{d}_6$ )  $\delta$ : 0.85 (3H, t,  $J=7.2\text{Hz}$ ) , 1.64-1.74 (2H, m) , 1.77-1.90 (2H, m) , 2.06-2.19 (4H, m) , 2.27-2.32 (2H, m) , 2.33-2.37 (2H, m) , 2.38 (3H, s) , 2.72-2.80 (3H, m) , 2.96-3.19 (6H, m) , 3.39-3.48 (10H, m) , 3.52-3.75 (10H, m) , 4.39-4.48 (1H, m) , 5.14 (1H, d,  $J=18.8\text{Hz}$ ) , 5.23 (1H, d,  $J=18.8\text{Hz}$ ) , 5.38 (1H, d,  $J=17.0\text{Hz}$ ) , 5.42 (1H, d,  $J=17.0\text{Hz}$ ) , 5.52-5.58 (1H, m) , 6.52 (1H, s) , 6.98 (1H, s) , 7.13-7.24 (5H, m) , 7.29 (1H, s) , 7.69 (1H, t,  $J=5.5\text{Hz}$ ) , 7.78 (1H, d,  $J=10.9\text{Hz}$ ) , 7.98-8.03 (2H, m) , 8.10 (1H, d,  $J=7.8\text{Hz}$ ) , 8.16 (1H, t,  $J=5.7\text{Hz}$ ) , 8.23 (1H, t,  $J=5.7\text{Hz}$ ) , 8.44 (1H, d,  $J=8.6\text{Hz}$ ) .

[0901] MS (APCI)  $m/z$ :  $1237(\text{M}+\text{H})^+$

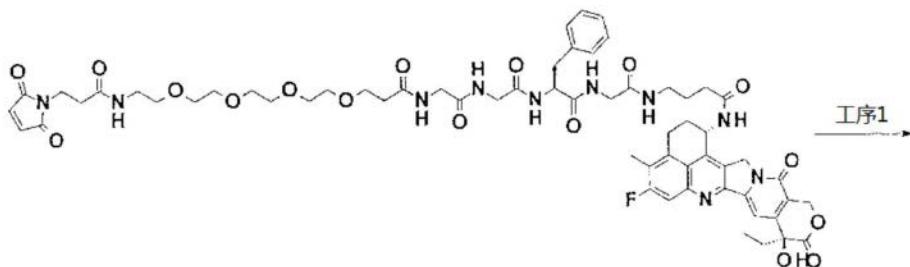
[0902] 工序2:抗体-药物偶联物(9)

[0903] 使用参考例1中制作的曲妥珠单抗及上述工序1中得到的化合物，利用与实施例6工序2同样的方法，得到标题抗体-药物偶联物。

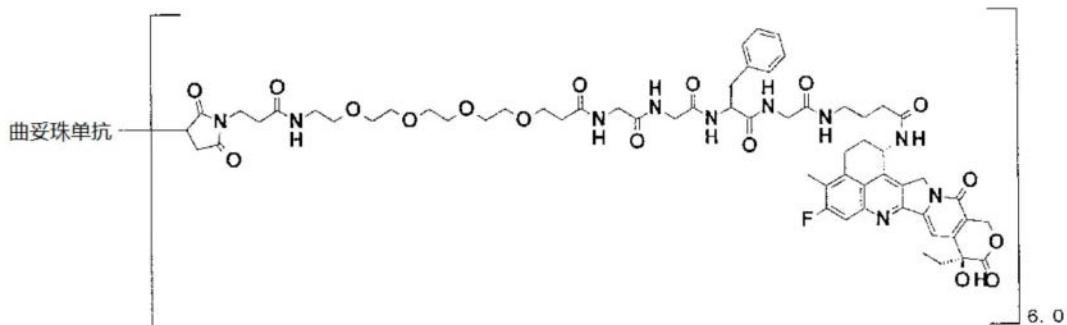
[0904] 抗体浓度: $1.75\text{mg/mL}$ ，抗体收量: $10.5\text{mg}$  (84%)，每一分子抗体的药物平均连接数

(n) : 3.4。

[0905] 实施例10抗体—药物偶联物(10)



[0906]

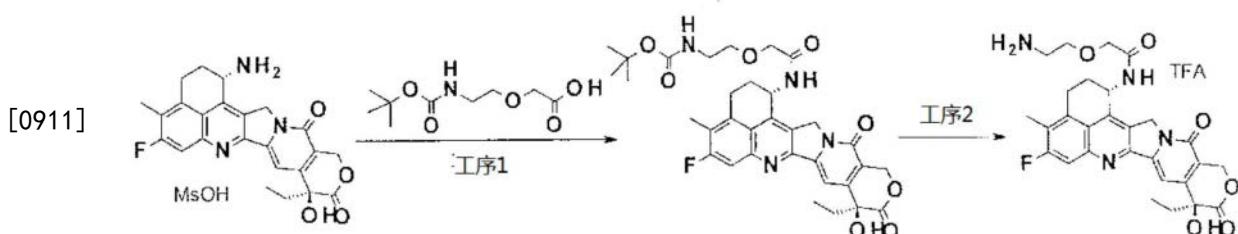


[0907] 工序1:抗体—药物偶联物(10)

[0908] 使用参考例1中制作的曲妥珠单抗及实施例9工序1中得到的化合物,利用与实施例7工序1同样的方法,得到标题抗体—药物偶联物。

[0909] 抗体浓度:1.79mg/mL,抗体收量:10.7mg (86%),每一分子抗体的药物平均连接数(n) :6.0。

[0910] 实施例11中间体(11)



[0912] 工序1:[2—(2—{[(1S,9S)—9—乙基—5—氟—9—羟基—4—甲基—10,13—二氧化代—2,3,9,10,13,15—六氢—1H,12H—苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2—b]喹啉—1—基]氨基}—2—氧代乙氧基)乙基]氨基甲酸叔丁酯

[0913] 使用{2—[(叔丁氧基羰基)氨基]乙氧基}乙酸(J.Med.Chem.,1992年,35卷,2928页;1.55g,6.01mmol),代替4—(叔丁氧基羰基氨基)丁酸,与实施例1工序1同样地使依沙替康的甲磺酸盐(3.10g,5.47mol)反应,以淡黄色固体形式得到标题化合物(2.56g,73%)。

[0914]  $^1\text{H-NMR}$  (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 0.87 (3H, t,  $J$ =7.3Hz), 1.26 (9H, s), 1.81—1.91 (2H, m), 2.13—2.22 (2H, m), 2.40 (3H, s), 3.08—3.26 (4H, m), 3.43—3.53 (2H, m), 4.00 (1H, d,  $J$ =15.1Hz), 4.05 (1H, d,  $J$ =15.1Hz), 5.14 (1H, d,  $J$ =18.7Hz), 5.22 (1H, d,  $J$ =18.7Hz), 5.40 (1H, d,  $J$ =16.6Hz), 5.44 (1H, d,  $J$ =16.6Hz), 5.59—5.66 (1H, m), 6.53 (1H, s), 6.86 (1H, t,  $J$ =5.4Hz), 7.31 (1H, s), 7.79 (1H, d,  $J$ =10.9Hz), 8.49 (1H, d,  $J$ =9.1Hz) .

[0915] MS (APCI)  $m/z$ : 637 ( $M+H$ )<sup>+</sup>

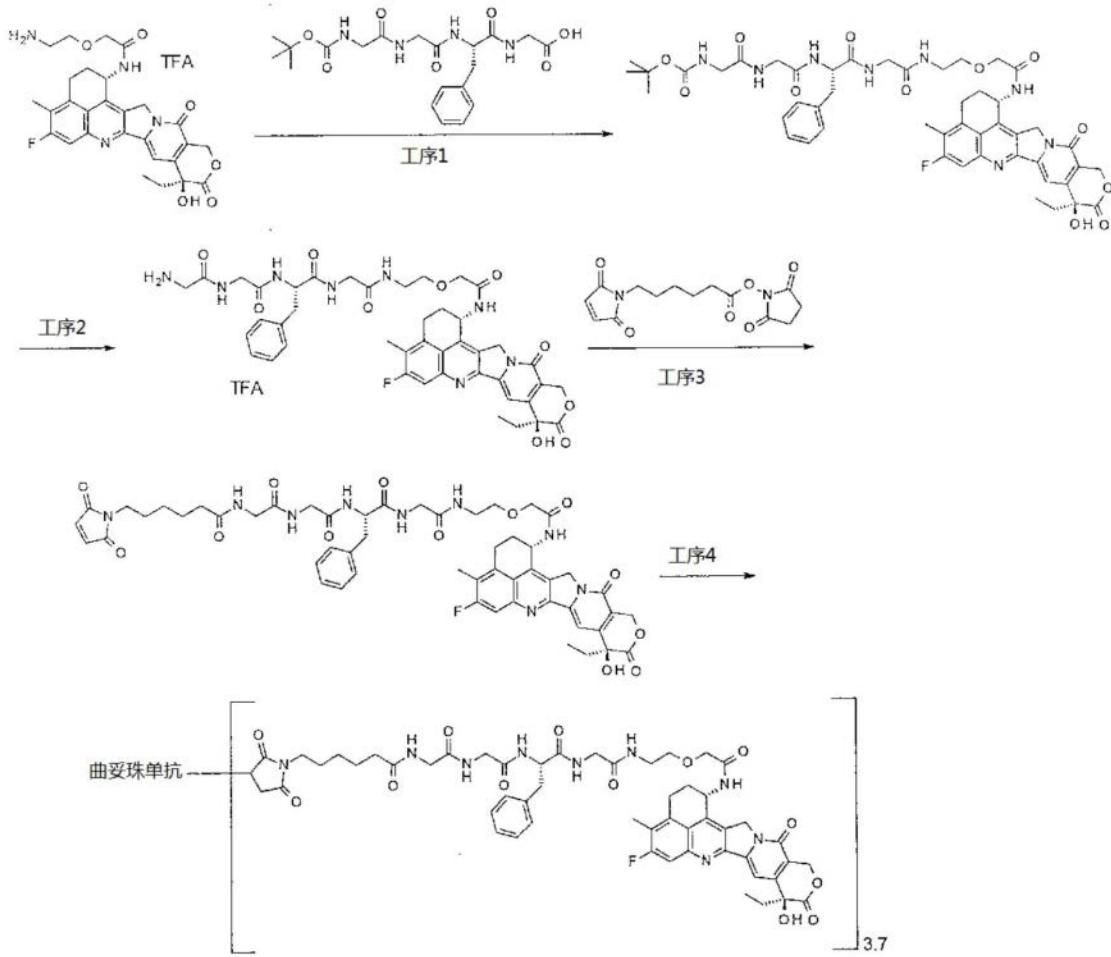
[0916] 工序2:2-(2-氨基乙氧基)-N-[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基]乙酰胺

[0917] 与实施例1工序2同样地使上述工序1中得到的化合物(1.50g,2.36mol)反应,以淡黄色固体形式得到作为标题化合物的三氟乙酸盐(1.50g,定量)。

[0918]  $^1\text{H-NMR}$  (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 0.87 (3H, t,  $J$ =7.5Hz), 1.81-1.92 (2H, m), 2.15-2.23 (2H, m), 2.41 (3H, s), 3.05 (2H, t,  $J$ =5.1Hz), 3.15-3.23 (2H, m), 3.71 (2H, t,  $J$ =5.1Hz), 4.10 (2H, s), 5.19 (1H, d,  $J$ =18.7Hz), 5.24 (1H, d,  $J$ =18.7Hz), 5.43 (2H, s), 5.58-5.66 (1H, m), 6.55 (1H, s), 7.33 (1H, s), 7.73-7.84 (4H, m), 8.55 (1H, d,  $J$ =9.1Hz) .

[0919] MS (APCI)  $m/z$ : 537 ( $M+H$ )<sup>+</sup>

[0920] 实施例12抗体-药物偶联物(12)



[0921] 工序1:N-(叔丁氧基羰基)甘氨酰甘氨酰-L-苯基丙氨酰-N-[2-(2-[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基]-2-氧代乙基)甘氨酰胺

[0922] 与实施例2工序1同样地使实施例11工序2的化合物(554mg,0.85mmol)反应,得到标题化合物(775mg,95%)。

[0923]  $^1\text{H-NMR}$  (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 0.85 (3H, t,  $J$ =7.3Hz), 1.36 (9H, s), 1.78-1.89

(2H, m), 2.13—2.22 (2H, m), 2.39 (3H, s), 2.71 (1H, dd,  $J=13.4, 9.8\text{Hz}$ ), 2.95 (1H, dd,  $J=13.4, 4.3\text{Hz}$ ), 3.09—3.23 (1H, m), 3.23—3.32 (2H, m), 3.40—3.62 (8H, m), 3.73 (1H, dd,  $J=16.5, 5.5\text{Hz}$ ), 4.03 (2H, s), 4.39—4.47 (1H, m), 5.17 (1H, d,  $J=18.9\text{Hz}$ ), 5.25 (1H, d,  $J=18.9\text{Hz}$ ), 5.41 (1H, d,  $J=16.8\text{Hz}$ ), 5.45 (1H, d,  $J=16.8\text{Hz}$ ), 5.57—5.64 (1H, m), 6.54 (1H, s), 6.99 (1H, t,  $J=5.8\text{Hz}$ ), 7.13—7.26 (5H, m), 7.31 (1H, s), 7.76—7.82 (2H, m), 7.90 (1H, t,  $J=5.2\text{Hz}$ ), 8.13 (1H, d,  $J=7.9\text{Hz}$ ), 8.27 (1H, t,  $J=5.8\text{Hz}$ ), 8.49 (1H, d,  $J=8.5\text{Hz}$ ).

[0925] MS (APCI) m/z: 955 (M+H)<sup>+</sup>

[0926] 工序2: 甘氨酰甘氨酰-L-苯基丙氨酰-N-[2-(2-{{(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基}氨基}-2-氧代乙氧基)乙基]甘氨酰胺

[0927] 与实施例2工序2同样地使上述工序1中得到的化合物 (630mg, 0.659mmol) 反应, 得到作为标题化合物的三氟乙酸盐 (588mg, 92%)。

[0928] <sup>1</sup>H-NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 0.86 (3H, t,  $J=7.3\text{Hz}$ ), 1.79—1.90 (2H, m), 2.13—2.22 (2H, m), 2.39 (3H, s), 2.71 (1H, dd,  $J=13.4, 10.1\text{Hz}$ ), 2.99 (1H, dd,  $J=13.4, 4.3\text{Hz}$ ), 3.09—3.23 (1H, m), 3.24—3.32 (3H, m), 3.41—3.71 (7H, m), 3.86 (1H, dd,  $J=16.8, 5.8\text{Hz}$ ), 4.04 (2H, s), 4.52 (1H, td,  $J=9.0, 4.1\text{Hz}$ ), 5.17 (1H, d,  $J=18.9\text{Hz}$ ), 5.25 (1H, d,  $J=18.9\text{Hz}$ ), 5.41 (1H, d,  $J=16.5\text{Hz}$ ), 5.45 (1H, d,  $J=16.5\text{Hz}$ ), 5.56—5.65 (1H, m), 6.55 (1H, s), 7.13—7.26 (5H, m), 7.32 (1H, s), 7.80 (1H, d,  $J=11.0\text{Hz}$ ), 7.87—8.01 (4H, m), 8.29—8.36 (2H, m), 8.46—8.55 (2H, m).

[0929] MS (APCI) m/z: 855 (M+H)<sup>+</sup>

[0930] 工序3:N-[6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰基]甘氨酰甘氨酰-L-苯基丙氨酰-N-[2-(2-{{(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基}氨基}-2-氧代乙氧基)乙基]甘氨酰胺

[0931] 与实施例2工序3同样地使上述工序2中得到的化合物 (240mg, 0.247mmol) 反应, 得到标题化合物 (162mg, 62%)。

[0932] <sup>1</sup>H-NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 0.86 (3H, t,  $J=7.6\text{Hz}$ ), 1.13—1.22 (2H, m), 1.40—1.51 (4H, m), 1.78—1.90 (2H, m), 2.09 (2H, t,  $J=7.6\text{Hz}$ ), 2.14—2.21 (2H, m), 2.39 (3H, s), 2.74 (1H, dd,  $J=13.6, 9.7\text{Hz}$ ), 2.96 (1H, dd,  $J=13.6, 4.5\text{Hz}$ ), 3.08—3.24 (1H, m), 3.24—3.30 (1H, m), 3.33—3.40 (4H, m), 3.47—3.68 (7H, m), 3.72 (1H, dd,  $J=16.6, 5.7\text{Hz}$ ), 4.03 (2H, s), 4.42 (1H, td,  $J=8.6, 4.2\text{Hz}$ ), 5.17 (1H, d,  $J=18.7\text{Hz}$ ), 5.25 (1H, d,  $J=18.7\text{Hz}$ ), 5.40 (1H, d,  $J=17.2\text{Hz}$ ), 5.44 (1H, d,  $J=17.2\text{Hz}$ ), 5.57—5.64 (1H, m), 6.52 (1H, s), 6.99 (2H, s), 7.13—7.25 (5H, m), 7.31 (1H, s), 7.74—7.81 (2H, m), 7.99 (1H, t,  $J=5.7\text{Hz}$ ), 8.03—8.11 (2H, m), 8.22 (1H, t,  $J=5.7\text{Hz}$ ), 8.47 (1H, d,  $J=9.1\text{Hz}$ ).

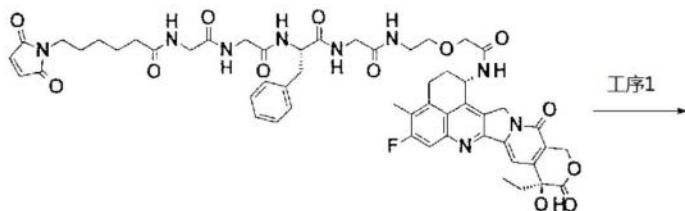
[0933] MS (APCI) m/z: 1048 (M+H)<sup>+</sup>

[0934] 工序4: 抗体-药物偶联物 (12)

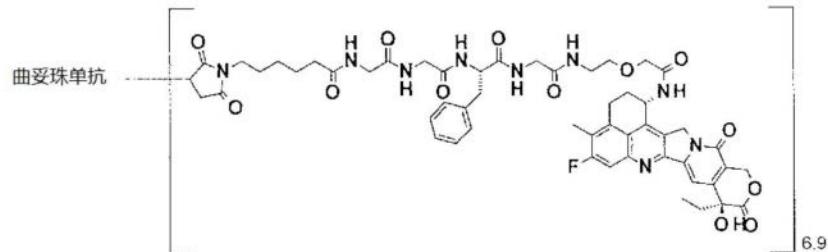
[0935] 使用参考例1中制作的曲妥珠单抗及上述工序3中得到的化合物, 利用与实施例6工序2同样的方法, 得到标题抗体-药物偶联物。进而利用共通操作A将溶液浓缩, 然后, 利用共通操作E, 得到下述的特性值。

[0936] 抗体浓度:10.77mg/mL,抗体收量:7.5mg (60%),每一分子抗体的药物平均连接数(n):3.7。

[0937] 实施例13抗体—药物偶联物(13)



[0938]

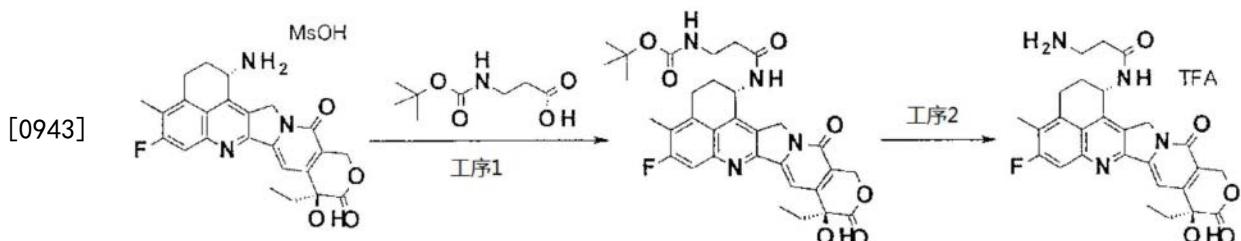


[0939] 工序1:抗体—药物偶联物(13)

[0940] 使用参考例1中制作的曲妥珠单抗及实施例12工序3中得到的化合物,利用与实施例7工序1同样的方法,得到标题抗体—药物偶联物。进而利用共通操作A将溶液浓缩,然后,利用共通操作E,得到下述的特性值。

[0941] 抗体浓度:10.69mg/mL,抗体收量:7.5mg (60%),每一分子抗体的药物平均连接数(n):6.9。

[0942] 实施例14中间体(14)



[0944] 工序1:(3—{(1S,9S)—9—乙基—5—氟—9—羟基—4—甲基—10,13—二氧化代—2,3,9,10,13,15—六氢—1H,12H—苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]呡哚嗪并[1,2—b]喹啉—1—基}氨基)—3—氧代丙基)氨基甲酸叔丁酯

[0945] 使用N—(叔丁氧基羰基)—β—丙氨酸,代替4—(叔丁氧基羰基氨基)丁酸,与实施例1工序1同样地使依沙替康的甲磺酸盐(500mg,0.941mmol)反应,以黄褐色固体形式得到标题化合物(616mg,定量)。

[0946]  $^1\text{H-NMR}$  (400MHz, DMSO—d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 0.87 (3H, t, J=7.2Hz), 1.29 (9H, s), 1.86 (2H, dt, J=15.1, 7.3Hz), 2.04—2.22 (2H, m), 2.31 (2H, t, J=6.8Hz), 2.40 (3H, s), 3.10—3.26 (4H, m), 5.15 (1H, d, J=18.8Hz), 5.26 (1H, d, J=19.2Hz), 5.42 (2H, dd, J=18.8, 16.4Hz), 5.57 (1H, dt, J=8.5, 4.2Hz), 6.53 (1H, s), 6.78 (1H, t, J=5.5Hz), 7.30 (1H, s), 7.80 (1H, d, J=11.0Hz), 8.46 (1H, d, J=8.6Hz).

[0947] MS (ESI) m/z: 607 (M+H)<sup>+</sup>

[0948] 工序2:N—[(1S,9S)—9—乙基—5—氟—9—羟基—4—甲基—10,13—二氧化代—

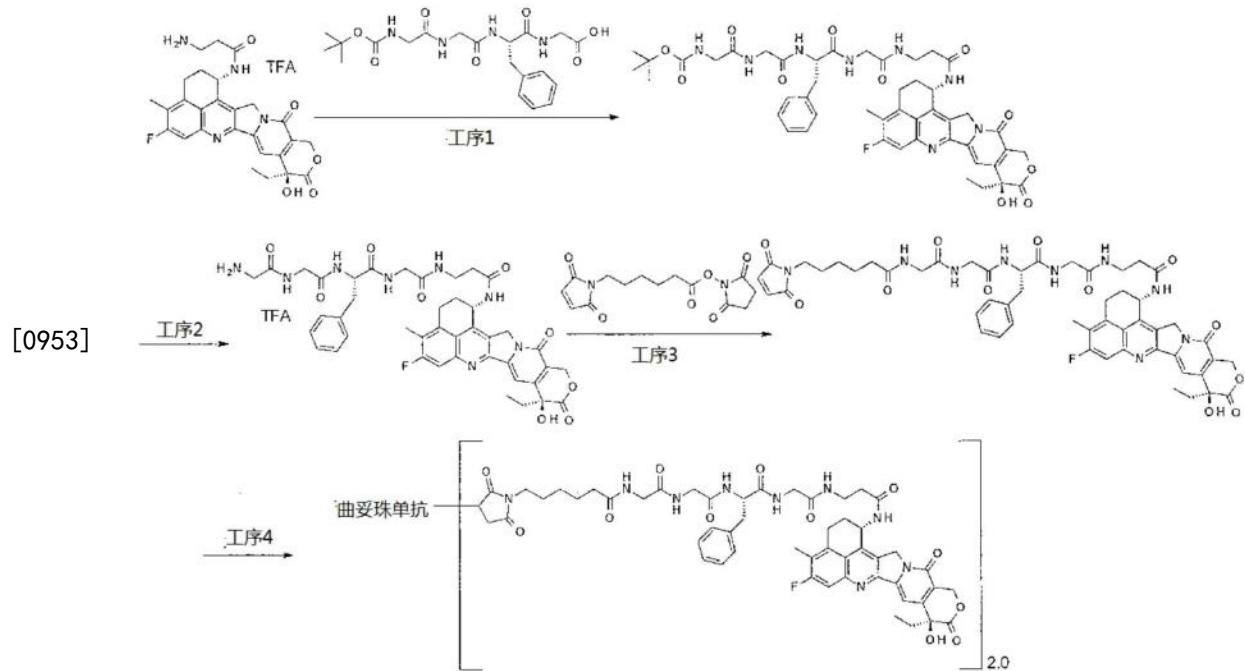
2,3,9,10,13,15—六氢—1H,12H—苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉—1—基]—β—丙氨酸酰胺

[0949] 与实施例1工序2同样地使上述工序1中得到的化合物反应,以黄色固体形式得到作为标题化合物的三氟乙酸盐(499mg,86%)。

[0950]  $^1\text{H-NMR}$  (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 0.87 (3H, t,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 1.86 (2H, dquin,  $J=14.6, 7.2, 7.2, 7.2, 7.2\text{Hz}$ ), 2.06—2.27 (1H, m), 2.41 (3H, s), 2.46—2.57 (2H, m), 3.08 (2H, t,  $J=6.8\text{Hz}$ ), 3.14—3.24 (2H, m), 5.22 (1H, d,  $J=18.8\text{Hz}$ ), 5.29 (1H, d,  $J=18.8\text{Hz}$ ), 5.43 (2H, s), 5.58 (1H, dt,  $J=8.5, 4.5\text{Hz}$ ), 6.55 (1H, s), 7.32 (1H, s), 7.74 (3H, brs), 7.82 (1H, d,  $J=11.0\text{Hz}$ ), 8.67 (1H, d,  $J=8.6\text{Hz}$ ).

[0951] MS (ESI)  $m/z$ : 507 ( $M+\text{H}$ )<sup>+</sup>

[0952] 实施例15抗体—药物偶联物(15)



[0954] 工序1:N—(叔丁氧基羰基)甘氨酰甘氨酰—L—苯基丙氨酰甘氨酰—N—[(1S, 9S)—9—乙基—5—氟—9—羟基—4—甲基—10,13—二氧代—2,3,9,10,13,15—六氢—1H,12H—苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉—1—基]—β—丙氨酸酰胺

[0955] 与实施例2工序1同样地使实施例14工序2中得到的化合物(484mg, 0.780mmol)反应,以淡黄色固体形式得到标题化合物(626mg, 87%)。

[0956]  $^1\text{H-NMR}$  (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 0.87 (3H, t,  $J=7.4\text{Hz}$ ), 1.27—1.42 (9H, m), 1.77—1.93 (2H, m), 2.06—2.22 (2H, m), 2.36 (2H, t,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 2.40 (3H, d,  $J=1.6\text{Hz}$ ), 2.44—2.54 (2H, m), 2.76 (1H, dd,  $J=14.5, 10.2\text{Hz}$ ), 3.02 (1H, dd,  $J=13.9, 4.5\text{Hz}$ ), 3.12—3.22 (2H, m), 3.52 (6H, d,  $J=6.3\text{Hz}$ ), 4.42—4.54 (1H, m), 5.19 (1H, d,  $J=19.2\text{Hz}$ ), 5.26 (1H, d,  $J=18.4\text{Hz}$ ), 5.42 (1H, dd,  $J=18.4, 16.4\text{Hz}$ ), 5.57 (1H, dt,  $J=8.7, 4.4\text{Hz}$ ), 6.53 (1H, s), 6.98 (1H, t,  $J=5.9\text{Hz}$ ), 7.14—7.28 (5H, m), 7.31 (1H, s), 7.77—7.84 (1H, m), 7.91 (1H, t,  $J=5.5\text{Hz}$ ), 8.16 (1H, d,  $J=7.8\text{Hz}$ ), 8.27 (1H, t,  $J=5.1\text{Hz}$ ), 8.52 (1H, d,  $J=9.0\text{Hz}$ ).

[0957] 工序2: 甘氨酰甘氨酰—L—苯基丙氨酰甘氨酰—N—[(1S, 9S)—9—乙基—5—

氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基]- $\beta$ -丙氨酸酰胺三氟乙酸盐

[0958] 与实施例2工序2同样地使上述工序1中得到的化合物(624mg, 0.675mmol)反应, 以黄色固体形式得到标题化合物(626mg, 92%)。

[0959]  $^1\text{H}$ -NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 0.87 (3H, t,  $J$ =7.4Hz), 1.86 (2H, tt,  $J$ =14.5, 7.2Hz), 2.07-2.22 (2H, m), 2.36 (2H, t,  $J$ =7.2Hz), 2.40 (3H, s), 2.44-2.54 (2H, m), 2.75 (1H, dd,  $J$ =13.7, 9.8Hz), 3.04 (1H, dd,  $J$ =13.7, 4.3Hz), 3.12-3.22 (2H, m), 3.58 (2H, d,  $J$ =4.7Hz), 3.69 (3H, td,  $J$ =11.2, 5.7Hz), 3.87 (1H, dd,  $J$ =17.0, 5.7Hz), 4.54 (1H, m,  $J$ =17.8, 4.5Hz), 5.19 (1H, d,  $J$ =19.2Hz), 5.26 (1H, d,  $J$ =18.8Hz), 5.43 (2H, s), 5.51-5.60 (1H, m), 6.55 (1H, s), 7.14-7.29 (5H, m), 7.32 (1H, s), 7.81 (1H, d,  $J$ =10.9Hz), 7.88 (1H, t,  $J$ =5.7Hz), 7.97 (3H, brs), 8.29-8.38 (2H, m), 8.50 (1H, t,  $J$ =5.7Hz), 8.55 (1H, d,  $J$ =8.6Hz)。

[0960] MS (ESI)  $m/z$ : 825 (M+H) $^+$

[0961] 工序3:N-[6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰基]甘氨酸酰甘氨酸酰-L-苯基丙氨酸酰甘氨酸-N-[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基]- $\beta$ -丙氨酸酰胺

[0962] 与实施例2工序3同样地使上述工序2中得到的化合物(60.0mg, 0.0646mmol)反应, 以固体形式得到标题化合物(14.0mg, 21%)。

[0963]  $^1\text{H}$ -NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 0.86 (3H, t,  $J$ =7.2Hz), 1.12-1.22 (2H, m), 1.39-1.51 (4H, m), 1.79-1.91 (2H, m), 2.02-2.20 (2H, m), 2.07 (2H, t,  $J$ =7.4Hz), 2.30-2.42 (4H, m), 2.40 (3H, s), 2.78 (1H, dd,  $J$ =14.1, 9.4Hz), 3.02 (1H, dd,  $J$ =14.7, 4.9Hz), 3.12-3.21 (2H, m), 3.26-3.42 (2H, m), 3.50-3.80 (6H, m), 4.40-4.51 (1H, m), 5.19 (1H, d,  $J$ =19.6Hz), 5.26 (1H, d,  $J$ =19.2Hz), 5.42 (2H, brs), 5.51-5.62 (1H, m), 6.53 (1H, s), 6.99 (2H, s), 7.13-7.28 (5H, m), 7.31 (1H, s), 7.74-7.84 (2H, m), 8.01 (1H, t,  $J$ =5.3Hz), 8.06 (1H, t,  $J$ =5.7Hz), 8.14 (1H, d,  $J$ =8.2Hz), 8.25 (1H, t,  $J$ =5.7Hz), 8.53 (1H, d,  $J$ =8.6Hz)。

[0964] MS (ESI)  $m/z$ : 1018 (M+H) $^+$

[0965] 工序4:抗体-药物偶联物(15)

[0966] 抗体的还原:针对参考例1中制作的曲妥珠单抗,利用共通操作C-1及共通操作B(作为280nm吸光系数,使用 $1.37\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ),用PBS6.0/EDTA制备成10mg/mL。取本溶液(1.0mL)至2mL试管中,添加10mM TCEP水溶液(0.0155mL;相对于一分子抗体为2.3当量)及1M磷酸氢二钾水溶液(0.050mL)。确认了本溶液的pH在 $7.4\pm 0.1$ 内后,在37°C下孵育1小时,由此,将抗体内的铰链部的二硫键还原。

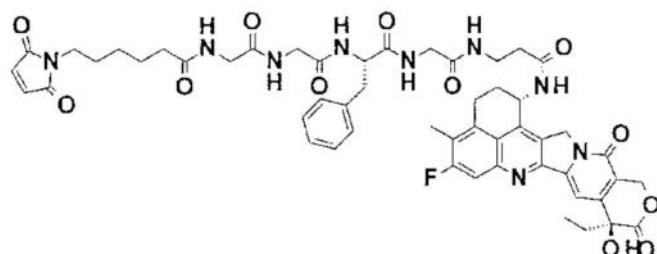
[0967] 抗体与药物接头的偶联:于22°C孵育上述溶液10分钟后,添加含有10mM上述工序3中得到的化合物的DMSO溶液(0.0311mL;相对于一分子抗体为4.6当量),于22°C孵育40分钟,将药物接头与抗体连接。接下来,添加100mM NAC水溶液(0.00622mL;相对于一分子抗体为9.2当量),进而于22°C孵育20分钟,终止药物接头的反应。

[0968] 纯化:针对上述溶液,进行利用了共通操作D-1(作为缓冲液,使用PBS6.0)的纯化,得到6mL含有标题抗体-药物偶联物的溶液。

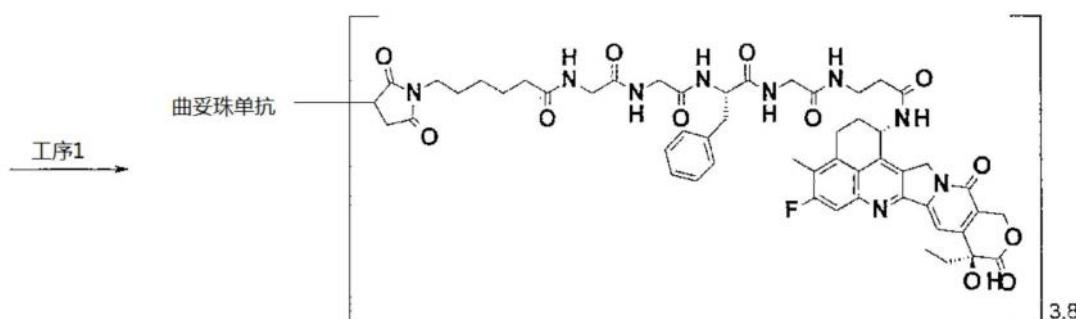
[0969] 特性评价:利用共通操作E,得到下述的特性值。

[0970] 抗体浓度:1.18mg/mL,抗体收量:7.08mg (71%),每一分子抗体的药物平均连接数(n):2.0。

[0971] 实施例16抗体—药物偶联物(16)



[0972]



[0973] 工序1:抗体—药物偶联物(16)

[0974] 抗体的还原:针对参考例1中制作的曲妥珠单抗,利用共通操作C—1及共通操作B(作为280nm吸光系数,使用 $1.37\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ),用PBS6.0/EDTA制备成10mg/mL。取本溶液(1.0mL)至2mL试管中,添加10mM TCEP水溶液(0.0311mL;相对于一分子抗体为4.6当量)及1M磷酸氢二钾水溶液(0.050mL)。确认了本溶液的pH在 $7.4\pm0.1$ 内后,在37℃下孵育1小时,由此,将抗体内的铰链部的二硫键还原。

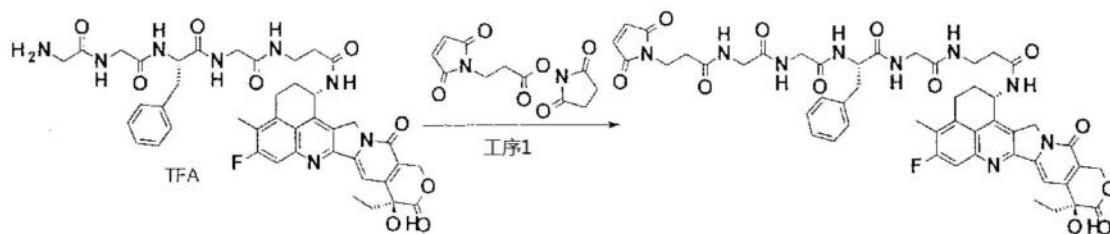
[0975] 抗体与药物接头的偶联:于22℃孵育上述溶液10分钟后,添加含有10mM实施例15工序3中得到的化合物的DMSO溶液(0.0622mL;相对于一分子抗体为9.2当量),于22℃孵育40分钟,将药物接头与抗体连接。接下来,添加100mM NAC水溶液(0.0124mL;相对于一分子抗体为18.4当量),进而于22℃孵育20分钟,终止药物接头的反应。

[0976] 纯化:针对上述溶液,进行利用了共通操作D—1(作为缓冲液,使用PBS6.0)的纯化,得到6mL含有标题抗体—药物偶联物的溶液。

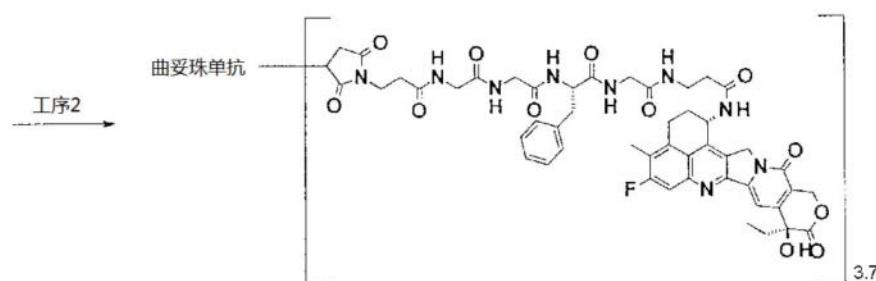
[0977] 特性评价:利用共通操作E,得到下述的特性值。

[0978] 抗体浓度:1.03mg/mL,抗体收量:6.18mg (62%),每一分子抗体的药物平均连接数(n):3.8。

[0979] 实施例17抗体—药物偶联物(17)



[0980]



[0981] 工序1:N—[3—(2,5—二氧代—2,5—二氢—1H—吡咯—1—基)丙酰基]甘氨酰甘氨酰—L—苯基丙氨酰甘氨酰—N—[(1S,9S)—9—乙基—5—氟—9—羟基—4—甲基—10,13—二氧代—2,3,9,10,13,15—六氢—1H,12H—苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉—1—基]—β—丙氨酸酰胺

[0982] 使用3—马来酰亚胺丙酸N—琥珀酰亚胺基酯,代替6—马来酰亚胺己酸N—琥珀酰亚胺基酯,与实施例2工序3同样地使实施例15工序2中得到的化合物(60.0mg,0.0646mmol)反应,以淡黄色固体形式得到标题化合物(36.0mg,57%)。

[0983]  $^1\text{H}$ —NMR (400MHz, DMSO—d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 0.86 (3H, t, J=7.4Hz), 1.85 (2H, dt, J=14.4, 7.5Hz), 2.05—2.22 (2H, m), 2.40 (3H, s), 2.30—2.44 (5H, m), 2.73—2.84 (1H, m), 3.02 (1H, dd, J=13.9, 4.5Hz), 3.17 (3H, d, J=5.1Hz), 3.26—3.40 (2H, m), 3.41—3.81 (6H, m), 4.40—4.51 (1H, m), 5.19 (1H, d, J=19.2Hz), 5.26 (1H, d, J=18.8Hz), 5.42 (2H, brs), 5.52—5.61 (1H, m), 6.53 (1H, s), 6.99 (2H, s), 7.13—7.28 (5H, m), 7.31 (1H, s), 7.80 (2H, d, J=10.2Hz), 8.03 (1H, t, J=5.5Hz), 8.12 (1H, d, J=8.2Hz), 8.20—8.31 (2H, m), 8.52 (1H, d, J=8.6Hz)。

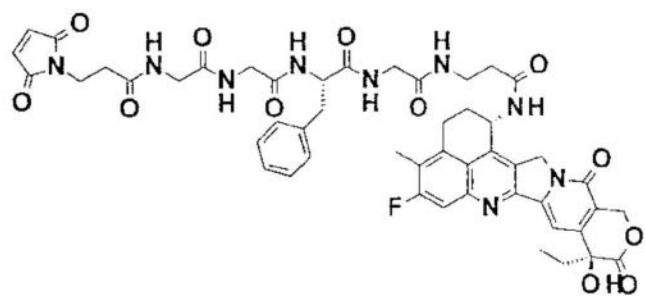
[0984] MS (ESI) m/z: 976 (M+H)<sup>+</sup>

[0985] 工序2:抗体—药物偶联物(17)

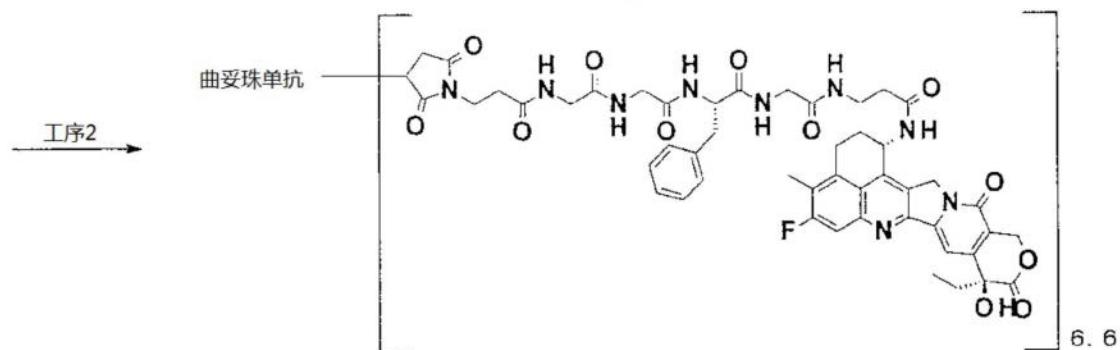
[0986] 使用参考例1中制作的曲妥珠单抗及上述工序1中得到的化合物,利用与实施例6工序2同样的方法,得到标题抗体—药物偶联物。

[0987] 抗体浓度:1.74mg/mL,抗体收量:10.4mg (83%),每一分子抗体的药物平均连接数(n):3.7。

[0988] 实施例18抗体—药物偶联物(18)



[0989]

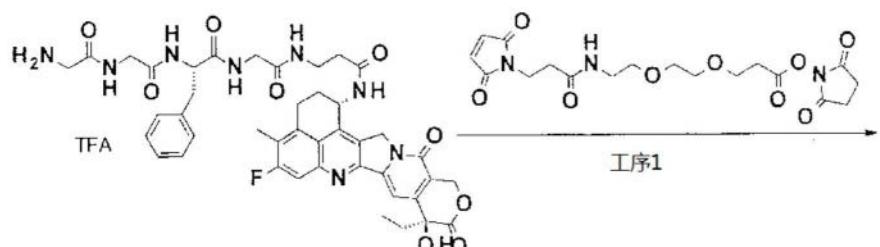


[0990] 工序1:抗体-药物偶联物(18)

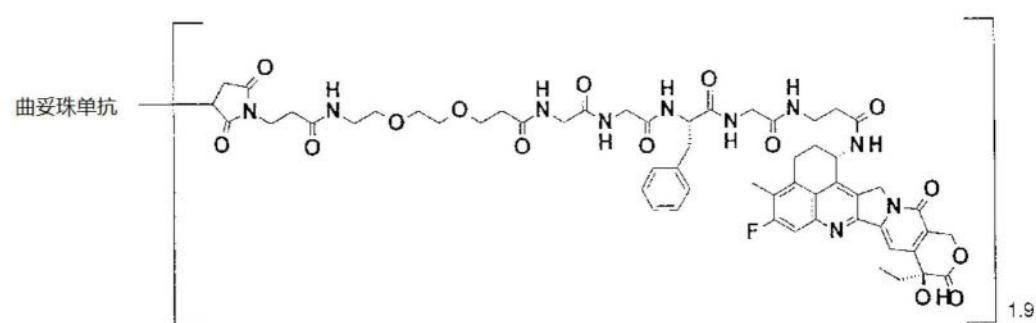
[0991] 使用参考例1中制作的曲妥珠单抗及实施例17工序1中得到的化合物,利用与实施例7工序1同样的方法,得到标题抗体-药物偶联物。

[0992] 抗体浓度:1.98mg/mL,抗体收量:11.9mg (95%),每一分子抗体的药物平均连接数(n):6.6。

[0993] 实施例19抗体-药物偶联物(19)



[0994]



[0995] 工序1: N—{3—[2—(2—{[3—(2,5—二氧代—2,5—二氢—1H—吡咯—1—基)丙酰基]氨基}乙氧基]丙酰基}甘氨酰甘氨酰—L—苯基丙氨酰甘氨酰—N—[(1S,9S)—9—乙基—5—氟—9—羟基—4—甲基—10,13—二氧代—2,3,9,10,13,15—六氢—1H,12H—苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉—1—基]—β—丙氨酸酰胺

[0996] 使用3—(2—(2—(3—马来酰亚胺丙酰胺)乙氧基)乙氧基)丙酸N—琥珀酰亚胺基,代替6—马来酰亚胺己酸N—琥珀酰亚胺基酯,与实施例2工序3同样地使实施例15工序2中得到的化合物(60.0mg,0.0646mmol)反应,以固体形式得到标题化合物(23.0mg,31%)。

[0997]  $^1\text{H-NMR}$  (400MHz, DMSO—d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 0.86 (3H, t,  $J=7.4\text{Hz}$ ) , 1.77—1.92 (2H, m) , 2.07—2.21 (2H, m) , 2.27—2.42 (6H, m) , 2.40 (3H, s) , 2.74—2.84 (1H, m) , 2.97—3.06 (1H, m) , 3.09—3.21 (4H, m) , 3.25—3.39 (6H, m) , 3.45 (4H, s) , 3.50—3.80 (8H, m) , 4.41—4.51 (1H, m) , 5.19 (1H, d,  $J=18.4\text{Hz}$ ) , 5.26 (1H, m,  $J=18.4\text{Hz}$ ) , 5.42 (2H, brs) , 5.51—5.61 (1H, m) , 6.54 (1H, s) , 7.00 (2H, s) , 7.13—7.28 (5H, m) , 7.31 (1H, s) , 7.74—7.87 (2H, m) , 7.93—8.07 (2H, m) , 8.09—8.21 (2H, m) , 8.26 (1H, brs) , 8.54 (1H, d,  $J=8.6\text{Hz}$ ) .

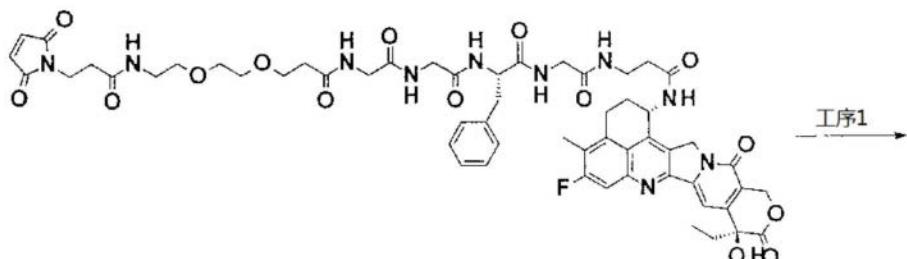
[0998] MS (ESI) m/z: 1135 (M+H)<sup>+</sup>

[0999] 工序2:抗体—药物偶联物(19)

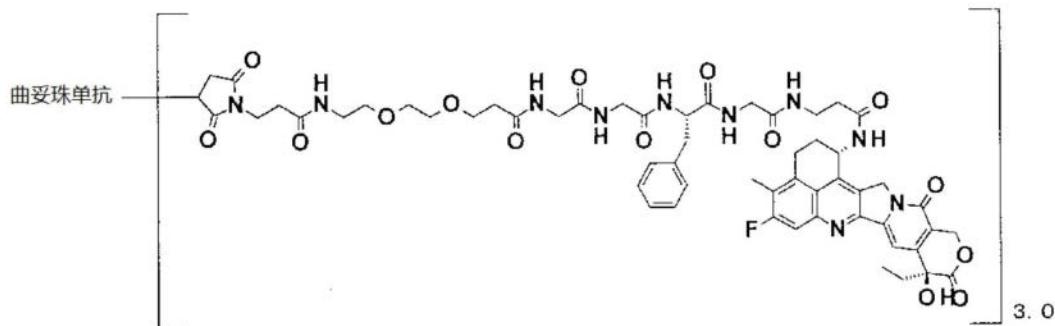
[1000] 使用参考例1中制作的曲妥珠单抗及上述工序1中得到的化合物,利用与实施例6工序2同样的方法,得到标题抗体—药物偶联物。

[1001] 抗体浓度:1.60mg/mL,抗体收量:9.6mg (77%),每一分子抗体的药物平均连接数(n):1.9。

[1002] 实施例20抗体—药物偶联物(20)



[1003]

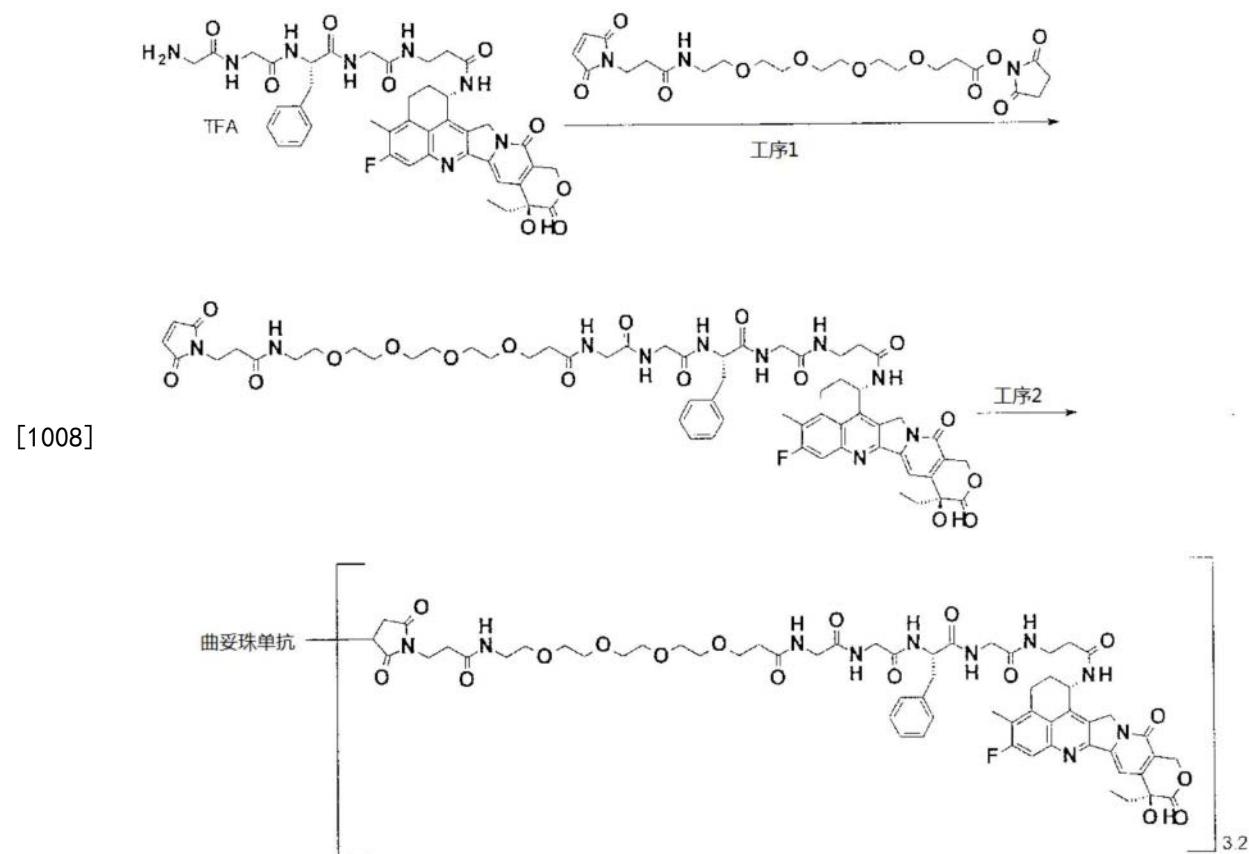


[1004] 工序1:抗体—药物偶联物(20)

[1005] 使用参考例1中制作的曲妥珠单抗及实施例19工序1中得到的化合物,利用与实施例7工序1同样的方法,得到标题抗体—药物偶联物。

[1006] 抗体浓度:1.69mg/mL,抗体收量:10.1mg (81%),每一分子抗体的药物平均连接数(n):3.0。

[1007] 实施例21抗体—药物偶联物(21)



[1009] 工序1:N—[19—(2,5—二氧代—2,5—二氢—1H—吡咯—1—基)—17—氧代—4,7,10,13—四氧杂—16—氮杂壬烷癸烷—1—酰基]甘氨酰甘氨酰—L—苯基丙氨酰甘氨酰—N—[(1S,9S)—9—乙基—5—氟—9—羟基—4—甲基—10,13—二氧代—2,3,9,10,13,15—六氢—1H,12H—苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2—b]喹啉—1—基]— $\beta$ —丙氨酸酰胺

[1010] 使用1—马来酰亚胺—3—氧代—7,10,13,16—四氧杂—4—氮杂十九烷酸N—琥珀酰亚胺基,代替6—马来酰亚胺己酸N—琥珀酰亚胺基酯,与实施例2工序3同样地使实施例15工序2中得到的化合物(60.0mg,0.0646mmol)反应,以固体形式得到标题化合物(23.0mg,29%)。

[1011]  $^1\text{H}$ —NMR (400MHz, DMSO— $d_6$ )  $\delta$ : 0.86 (3H, t,  $J$ =7.0Hz), 1.85 (2H, tt,  $J$ =14.6, 7.1Hz), 2.06—2.22 (2H, m), 2.40 (3H, s), 2.28—2.43 (6H, m), 2.78 (1H, dd,  $J$ =13.7, 9.4Hz), 3.02 (1H, dd,  $J$ =14.1, 3.9Hz), 3.09—3.22 (4H, m), 3.27—3.41 (4H, m), 3.47 (12H, d,  $J$ =8.6Hz), 3.53—3.81 (10H, m), 4.41—4.51 (1H, m), 5.19 (1H, d,  $J$ =19.2Hz), 5.26 (1H, d,  $J$ =18.8Hz), 5.42 (2H, brs), 5.53—5.61 (1H, m), 6.54 (1H, s), 7.00 (2H, s), 7.12—7.29 (5H, m), 7.31 (1H, s), 7.74—7.85 (2H, m), 8.03 (2H, d,  $J$ =6.6Hz), 8.11—8.21 (2H, m), 8.27 (1H, t,  $J$ =5.9Hz), 8.54 (1H, d,  $J$ =8.6Hz) .

[1012] MS (ESI)  $m/z$ : 1224 ( $M+H$ )<sup>+</sup>

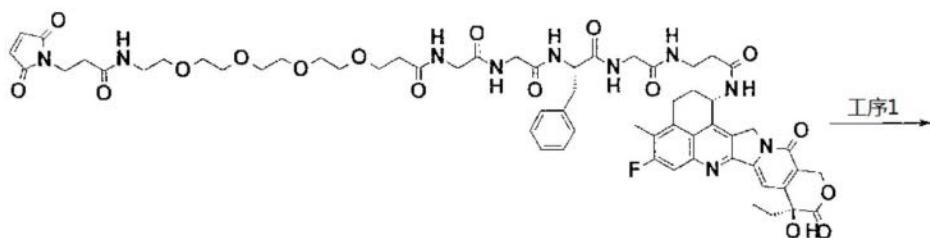
[1013] 工序2:抗体—药物偶联物(21)

[1014] 使用参考例1中制作的曲妥珠单抗及上述工序1中得到的化合物,利用与实施例6工序2同样的方法,得到标题抗体—药物偶联物。

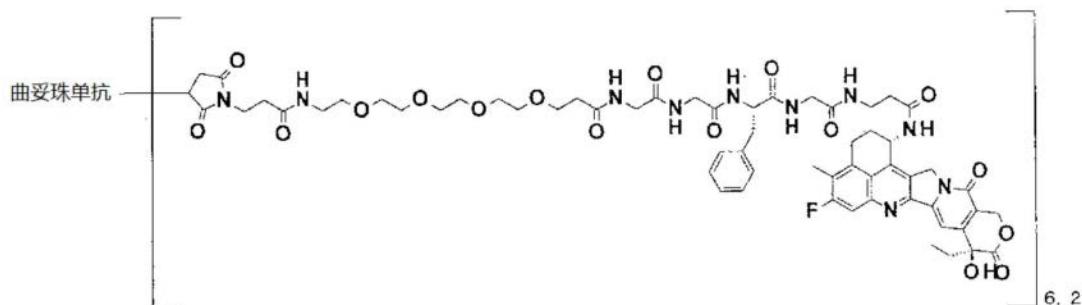
[1015] 抗体浓度:1.77mg/mL,抗体收量:10.6mg (85%),每一分子抗体的药物平均连接数

(n) : 3.2。

[1016] 实施例22抗体—药物偶联物 (22)



[1017]

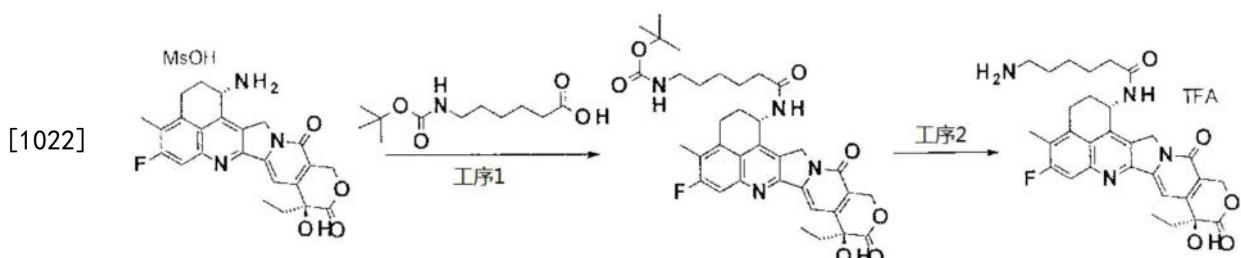


[1018] 工序1:抗体—药物偶联物 (22)

[1019] 使用参考例1中制作的曲妥珠单抗及实施例21工序1中得到的化合物,利用与实施例7工序1同样的方法,得到标题抗体—药物偶联物。

[1020] 抗体浓度:1.89mg/mL,抗体收量:11.3mg (90%),每一分子抗体的药物平均连接数(n) : 6.2。

[1021] 实施例23中间体 (23)



[1023] 工序1: (6—{[(1S,9S)—9—乙基—5—氟—9—羟基—4—甲基—10,13—二氧代—2,3,9,10,13,15—六氢—1H,12H—苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2—b]喹啉—1—基]氨基}—6—氧代己基)氨基甲酸叔丁酯

[1024] 使用6—(叔丁氧基羰基氨基)己酸,代替4—(叔丁氧基羰基氨基)丁酸,与实施例1工序1同样地使依沙替康的甲磺酸盐(0.500g,0.882mmol)反应,得到标题化合物(0.620g,定量)。

[1025]  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 0.83 (3H, t,  $J=7.8\text{Hz}$ ), 1.14—1.28 (2H, m), 1.31 (9H, s), 1.47—1.61 (2H, m), 1.75—1.89 (2H, m), 2.04—2.17 (4H, m), 2.35 (3H, s), 2.81—2.88 (2H, m), 3.09—3.16 (2H, m), 5.10 (1H, d,  $J=19.4\text{Hz}$ ), 5.16 (1H, d,  $J=19.4\text{Hz}$ ), 5.39 (2H, s), 5.48—5.55 (1H, m), 6.50 (1H, s), 6.73—6.78 (1H, m), 7.26 (1H, s), 7.74 (1H, d,  $J=10.9\text{Hz}$ ), 8.39 (1H, d,  $J=9.0\text{Hz}$ ).

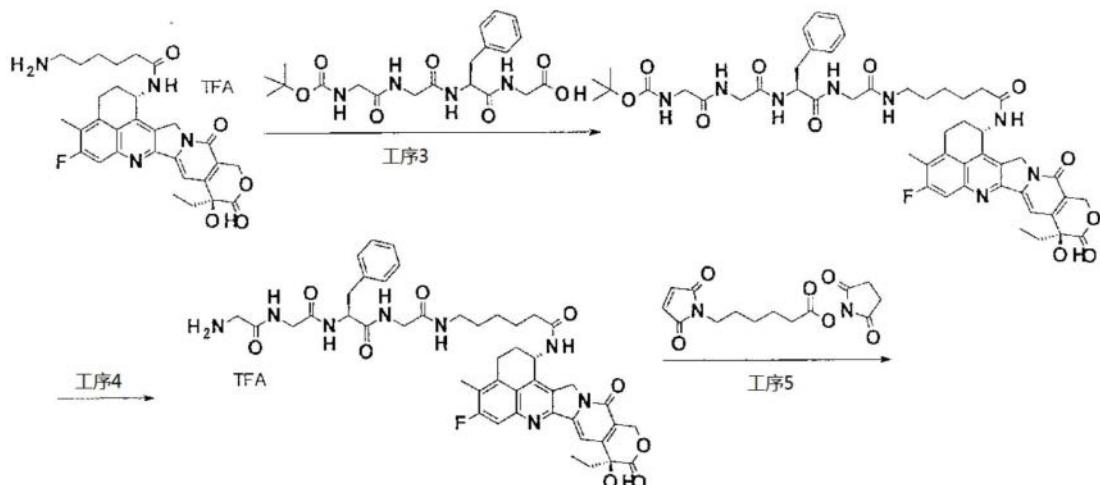
[1026] 工序2:6—氨基—N—[(1S,9S)—9—乙基—5—氟—9—羟基—4—甲基—10,13—二氧代—2,3,9,10,13,15—六氢—1H,12H—苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2—

b]喹啉-1-基]己酰胺

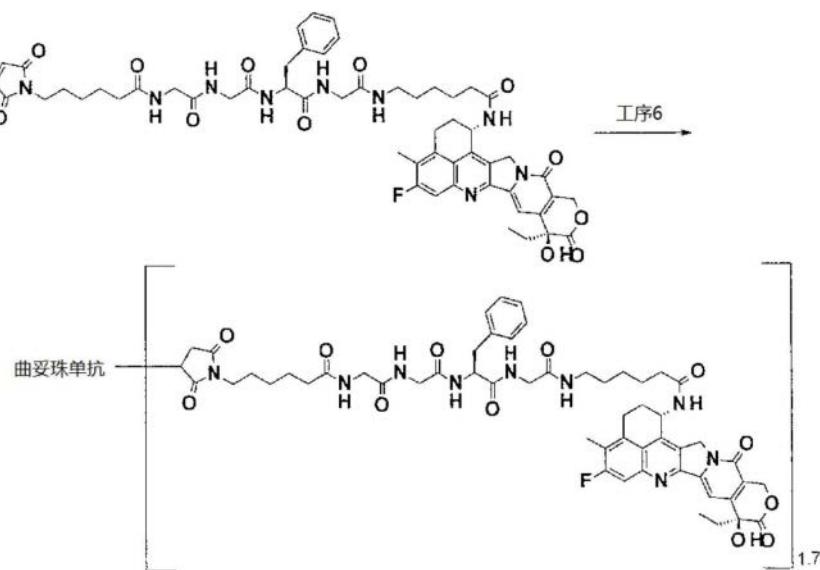
[1027] 与实施例1工序2同样地使上述工序1中得到的化合物(0.397g, 0.611mmol)反应, 得到作为标题化合物的三氟乙酸盐(0.342g, 84%)。

[1028]  $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 0.88(3H, t,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 1.31—1.41(2H, m), 1.52—1.70(4H, m), 1.80—1.94(2H, m), 2.05—2.18(2H, m), 2.21(2H, t,  $J=7.4\text{Hz}$ ), 2.40(3H, s), 2.81(2H, t,  $J=7.4\text{Hz}$ ), 3.10—3.25(2H, m), 3.33(2H, brs), 5.18(1H, d,  $J=19.8\text{Hz}$ ), 5.22(1H, d,  $J=19.8\text{Hz}$ ), 5.41(2H, d,  $J=16.6\text{Hz}$ ), 5.45(2H, d,  $J=16.6\text{Hz}$ ), 5.53—5.60(1H, m), 6.55(1H, s), 7.32(1H, s), 7.80(1H, d,  $J=10.9\text{Hz}$ ), 8.49(1H, d,  $J=9.2\text{Hz}$ )。

[1029] 实施例24抗体—药物偶联物(24)



[1030]



[1031] 工序1:N—(叔丁氧基羰基)甘氨酰甘氨酰-L—苯基丙氨酰-N—(6—{[(1S, 9S)—9—乙基—5—氟—9—羟基—4—甲基—10,13—二氧代—2,3,9,10,13,15—六氢—1H,12H—苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基]氨基}—6—氧化己基)甘氨酰胺

[1032] 与实施例2工序1同样地使实施例23工序2中得到的化合物(0.170g, 0.516mmol)反应, 得到标题化合物(0.225g, 91%)。

[1033]  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 0.88 (3H, t,  $J=7.4\text{Hz}$ ) , 1.43–1.70 (6H, m) , 1.87 (2H, td,  $J=15.0, 7.4\text{Hz}$ ) , 2.10–2.22 (3H, m) , 2.28–2.37 (1H, m) , 2.42 (3H, s) , 2.78–2.85 (1H, m) , 3.01–3.10 (3H, m) , 3.15–3.22 (2H, m) , 3.54–3.61 (5H, m) , 3.62–3.69 (1H, m) , 4.44–4.53 (1H, m) , 5.17 (1H, d,  $J=19.2\text{Hz}$ ) , 5.25 (1H, d,  $J=19.2\text{Hz}$ ) , 5.45 (2H, s) , 5.54–5.61 (1H, m) , 6.55 (1H, s) , 7.02 (1H, t,  $J=6.1\text{Hz}$ ) , 7.11–7.28 (5H, m) , 7.33 (1H, s) , 7.63–7.69 (1H, m) , 7.82 (1H, d,  $J=11.0\text{Hz}$ ) , 7.90–7.96 (1H, m) , 8.17 (1H, d,  $J=7.8\text{Hz}$ ) , 8.28 (1H, t,  $J=5.5\text{Hz}$ ) , 8.46 (1H, d,  $J=9.0\text{Hz}$ ) .

[1034] 工序2: 甘氨酰甘氨酰-L-苯基丙氨酰-N-(6-[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基]氨基)-6-氧代己基)甘氨酰胺与实施例2工序2同样地使上述工序1中得到的化合物(0.105g, 0.108mmol)反应, 得到标题化合物(0.068mg, 65%)。

[1035]  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 0.89 (3H, t,  $J=7.4\text{Hz}$ ) , 1.15–1.67 (6H, m) , 1.79–1.97 (2H, m) , 2.08–2.24 (4H, m) , 2.42 (3H, s) , 2.76–2.82 (1H, m) , 3.00–3.10 (5H, m) , 3.19 (1H, s) , 3.50–3.63 (2H, m) , 3.64–3.76 (3H, m) , 3.84–3.92 (1H, m) , 4.51–4.59 (1H, m) , 5.17 (1H, d,  $J=19.4\text{Hz}$ ) , 5.24 (1H, d,  $J=19.4\text{Hz}$ ) , 5.44 (2H, s) , 5.53–5.61 (1H, m) , 6.55 (1H, brs) , 7.15–7.29 (5H, m) , 7.33 (1H, s) , 7.72–7.78 (1H, m) , 7.82 (1H, d,  $J=11.0\text{Hz}$ ) , 7.96–8.08 (2H, m) , 8.30–8.38 (2H, m) , 8.46–8.56 (2H, m) .

[1036] 工序3:N-[6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰基]甘氨酰甘氨酰-L-苯基丙氨酰-N-(6-[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基]氨基)-6-氧代己基)甘氨酰胺与实施例2工序3同样地使上述工序2中得到的化合物(58mg, 0.060mmol)反应, 得到标题化合物(39mg, 62%)。

[1037]  $^1\text{H-NMR}$  (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 0.99 (3H, t,  $J=7.4\text{Hz}$ ) , 1.27 (2H, td,  $J=11.6, 6.1\text{Hz}$ ) , 1.38–1.44 (2H, m) , 1.50–1.63 (6H, m) , 1.65–1.80 (2H, m) , 1.89–1.98 (2H, m) , 2.17–2.25 (3H, m) , 2.26–2.36 (3H, m) , 2.40 (3H, s) , 2.95 (1H, dd,  $J=14.3, 9.2\text{Hz}$ ) , 3.12 (1H, dd,  $J=13.7, 5.7\text{Hz}$ ) , 3.15–3.25 (4H, m) , 3.44 (2H, t,  $J=7.2\text{Hz}$ ) , 3.65 (1H, d,  $J=17.2\text{Hz}$ ) , 3.76 (1H, d,  $J=17.2\text{Hz}$ ) , 3.79–3.86 (4H, m) , 4.43 (1H, dd,  $J=8.9, 6.0\text{Hz}$ ) , 5.10 (1H, d,  $J=18.9\text{Hz}$ ) , 5.25 (1H, d,  $J=18.9\text{Hz}$ ) , 5.35 (1H, d,  $J=16.6\text{Hz}$ ) , 5.56 (1H, d,  $J=16.0\text{Hz}$ ) , 5.60–5.64 (1H, m) , 6.76 (2H, s) , 7.12–7.24 (6H, m) , 7.58 (1H, s) , 7.60 (1H, d,  $J=10.9\text{Hz}$ ) , 7.68 (1H, t,  $J=5.7\text{Hz}$ ) .

[1038] MS (ESI)  $m/z$ : 1060 (M+H)<sup>+</sup>

[1039] 工序4: 抗体-药物偶联物(24)

[1040] 抗体的还原: 针对参考例1中制作的曲妥珠单抗, 利用共通操作C-1及共通操作B(作为280nm吸光系数, 使用1.37mL $\text{mg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), 用PBS6.0/EDTA制备成10mg/mL。取本溶液(9.0mL)至50mL试管中, 添加10mM TCEP水溶液(0.140mL; 相对于一分子抗体为2.3当量)及1M磷酸氢钾二水溶液(0.450mL)。确认了本溶液的pH在7.4±0.1内后, 在37°C下孵育1小时, 由此, 将抗体内的铰链部的二硫键还原。

[1041] 抗体与药物接头的偶联: 于22°C孵育上述溶液10分钟后, 添加含有10mM上述工序3的化合物的DMSO溶液(0.280mL; 相对于一分子抗体为4.6当量), 于22°C孵育40分钟, 将药物

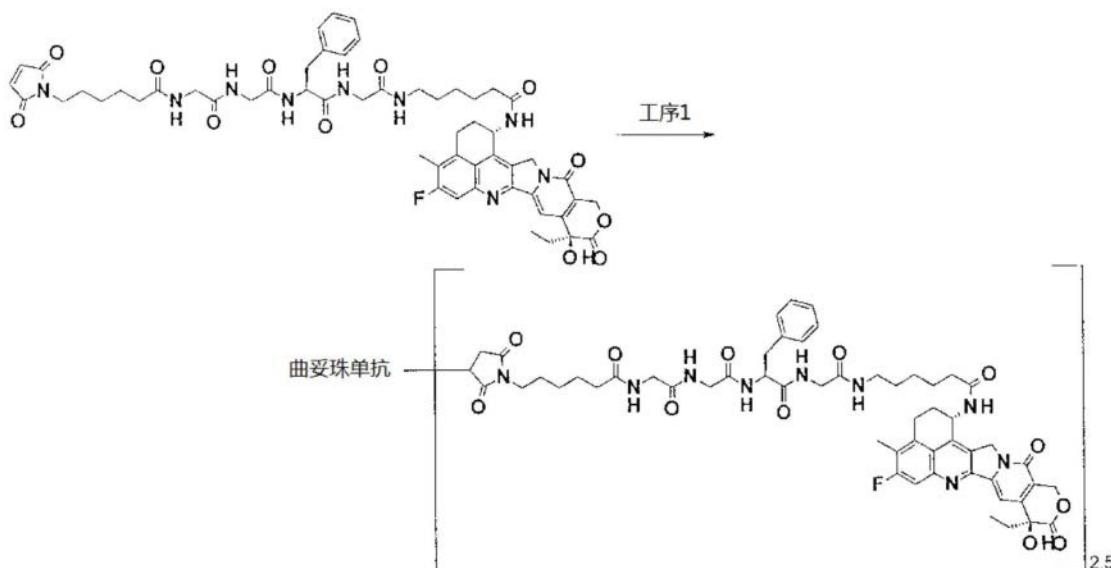
接头与抗体连接。接下来,添加100mM NAC水溶液(0.0559mL;相对于一分子抗体为9.2当量),进而于22℃孵育20分钟,终止药物接头的反应。

[1042] 纯化:针对上述溶液,进行利用了共通操作D—1(作为缓冲液,使用PBS7.4)的纯化,得到含有标题抗体—药物偶联物的溶液。

[1043] 特性评价:利用共通操作E,得到下述的特性值。

[1044] 抗体浓度:3.30mg/mL,抗体收量:53.5mg(59%),每一分子抗体的药物平均连接数(n):1.7。

[1045] 实施例25抗体—药物偶联物(25)



[1047] 工序1:抗体—药物偶联物(25)

[1048] 抗体的还原:针对参考例1中制作的曲妥珠单抗,利用共通操作C—1及共通操作B(作为280nm吸光系数,使用 $1.37\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ),用PBS6.0/EDTA制备成10mg/mL。取本溶液(9.0mL)至50mL试管中,添加10mM TCEP水溶液(0.280mL;相对于一分子抗体为4.6当量)及1M磷酸氢二钾水溶液(0.450mL)。确认了本溶液的pH在 $7.4 \pm 0.1$ 内后,在37℃下孵育1小时,由此,将抗体内铰链部的二硫键还原。

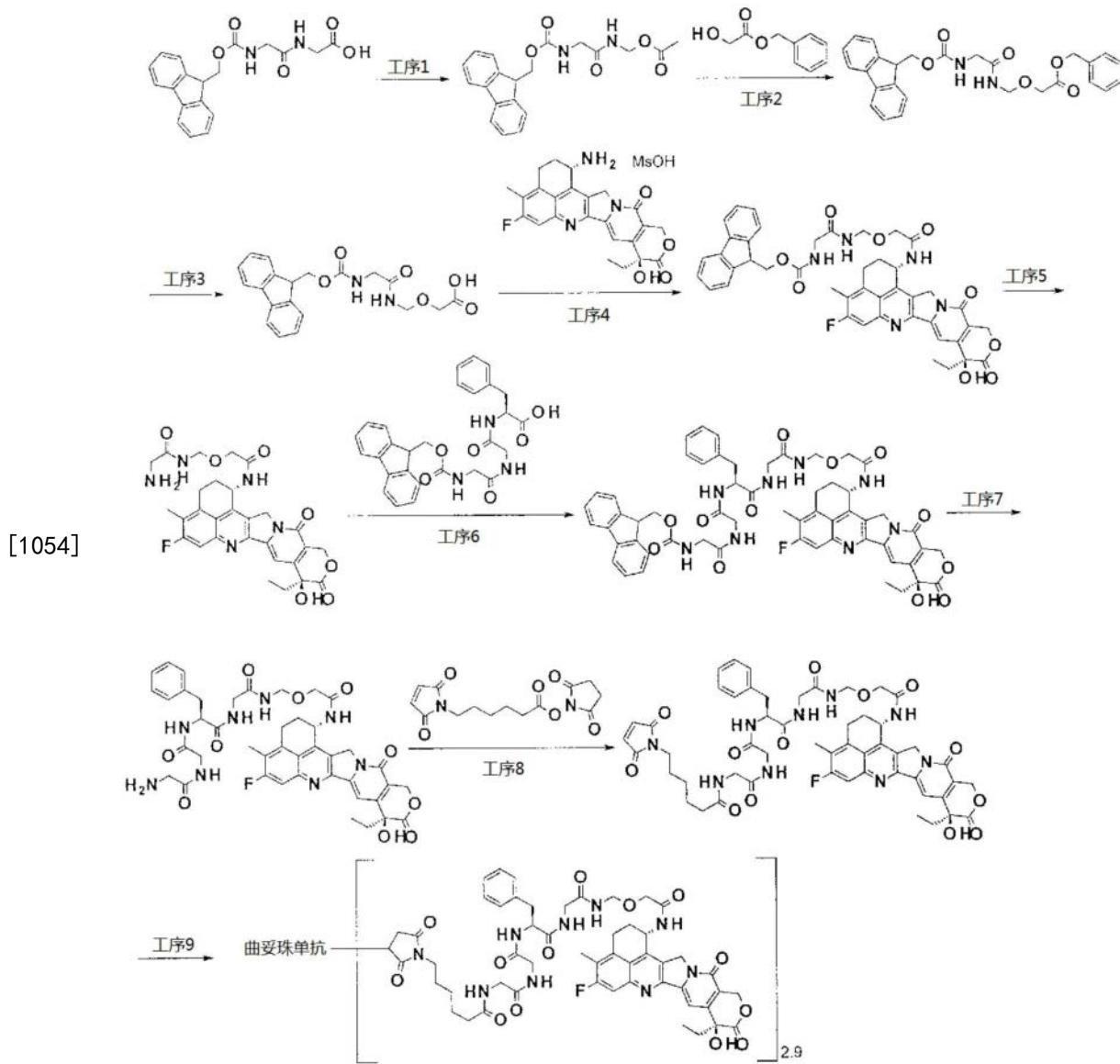
[1049] 抗体与药物接头的偶联:于22℃孵育上述溶液10分钟后,添加含有10mM实施例24工序3的化合物的DMSO溶液(0.559mL;相对于一分子抗体为9.2当量),于22℃孵育40分钟,将药物接头与抗体连接。接下来,添加100mM NAC水溶液(0.112mL;相对于一分子抗体为18.4当量),进而于22℃孵育20分钟,终止药物接头的反应。

[1050] 纯化:针对上述溶液,进行利用了共通操作D—1(作为缓冲液,使用PBS6.0)的纯化,得到含有标题抗体—药物偶联物的溶液。

[1051] 特性评价:利用共通操作E,得到下述的特性值。

[1052] 抗体浓度:10.65mg/mL,抗体收量:55.1mg(61%),每一分子抗体的药物平均连接数(n):2.5。

[1053] 实施例26抗体—药物偶联物(26)



[1055] 工序1: ({N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]甘氨酸}氨基)甲基乙酸酯

[1056] 向包含N-9-芴基甲氧基羰基甘氨酸(4.33g, 12.2mmol)、四氢呋喃(THF; 120ml)、及甲苯(40.0ml)的混合物中,添加吡啶(1.16ml, 14.7mmol)及四乙酸铅(6.84g, 14.7mmol),进行5小时加热回流。将反应液冷却至室温后,通过硅藻土过滤除去不溶物,减压下进行浓缩。将得到的残留物溶解于乙酸乙酯,用水及饱和食盐水洗涤后,用无水硫酸镁干燥有机层。在减压下馏去溶剂,然后,用硅胶柱色谱法[己烷:乙酸乙酯=9:1(v/v)~乙酸乙酯]纯化得到的残留物,以无色固体形式得到标题化合物(3.00g, 67%)。

[1057]  $^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 2.07 (3H, s), 3.90 (2H, d,  $J=5.1\text{Hz}$ ), 4.23 (1H, t,  $J=7.0\text{Hz}$ ), 4.46 (2H, d,  $J=6.6\text{Hz}$ ), 5.26 (2H, d,  $J=7.0\text{Hz}$ ), 5.32 (1H, brs), 6.96 (1H, brs), 7.32 (2H, t,  $J=7.3\text{Hz}$ ), 7.41 (2H, t,  $J=7.3\text{Hz}$ ), 7.59 (2H, d,  $J=7.3\text{Hz}$ ), 7.77 (2H, d,  $J=7.3\text{Hz}$ )。

[1058] 工序2: [{(N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]甘氨酸}氨基)甲氧基]乙酸苄酯

[1059] 于0℃,向上述工序1中得到的化合物(3.68g, 10.0mmol)及乙醇酸苯甲酯(4.99g, 30.0mmol)的THF(40.0mL)溶液中,添加叔丁醇钾(2.24g, 20.0mmol),在室温下搅拌15分钟。于0℃,向反应溶液中添加乙酸乙酯、水,用乙酸乙酯、氯仿萃取,用硫酸钠干燥得到的有机

层,进行过滤。减压馏去溶剂,将得到的残留物溶解于二氧杂环己烷(40.0mL)、水(10.0mL),添加碳酸氢钠(1.01g,12.0mmol)、氯甲酸9—芴基甲酯(2.59g,10.0mmol),在室温下搅拌2小时。向反应溶液中添加水,用乙酸乙酯萃取,用硫酸钠干燥得到的有机层,进行过滤。减压馏去溶剂,用硅胶柱色谱法[己烷:乙酸乙酯=100:0(v/v)~0:100]纯化得到的残留物,得到无色油状的标题化合物(1.88g,40%)。

[1060]  $^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3.84 (2H, d,  $J=5.5\text{Hz}$ ), 4.24 (3H, t,  $J=6.5\text{Hz}$ ), 4.49 (2H, d,  $J=6.7\text{Hz}$ ), 4.88 (2H, d,  $J=6.7\text{Hz}$ ), 5.15—5.27 (1H, m), 5.19 (2H, s), 6.74 (1H, brs), 7.31—7.39 (7H, m), 7.43 (2H, t,  $J=7.4\text{Hz}$ ), 7.61 (2H, d,  $J=7.4\text{Hz}$ ), 7.79 (2H, d,  $J=7.4\text{Hz}$ ).

[1061] 工序3: [(N—[(9H—芴—9—基甲氧基) 羰基] 甘氨酰) 氨基] 甲氧基] 乙酸

[1062] 将上述工序2中得到的化合物(1.88g,3.96mmol)溶解于乙醇(40.0mL)、乙酸乙酯(20.0mL)。添加钯碳催化剂(376mg),在氢气气氛下,在室温下搅拌2小时。通过硅藻土过滤除去不溶物,减压馏去溶剂,以无色固体形式得到标题化合物(1.52g,定量)。

[1063]  $^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 3.62 (2H, d,  $J=6.3\text{Hz}$ ), 3.97 (2H, s), 4.18—4.32 (3H, m), 4.60 (2H, d,  $J=6.7\text{Hz}$ ), 7.29—7.46 (4H, m), 7.58 (1H, t,  $J=5.9\text{Hz}$ ), 7.72 (2H, d,  $J=7.4\text{Hz}$ ), 7.90 (2H, d,  $J=7.4\text{Hz}$ ), 8.71 (1H, t,  $J=6.5\text{Hz}$ ).

[1064] 工序4: 9H—芴—9—基甲基(2—{[(2—{[(1S,9S)—9—乙基—5—氟—9—羟基—4—甲基—10,13—二氧代—2,3,9,10,13,15—六氢—1H,12H—苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉—1—基]氨基}—2—氧代乙氧基) 甲基]氨基}—2—氧代乙基) 氨基甲酸酯

[1065] 在冰冷却下,向依沙替康的甲磺酸盐(0.283g,0.533mmol)、N—羟基琥珀酰亚胺(61.4mg,0.533mmol)、及上述工序3中得到的化合物(0.205g,0.533mmol)的N,N—二甲基甲酰胺(10.0mL)溶液中,添加N,N—二异丙基乙基胺(92.9 $\mu\text{L}$ ,0.533mmol)及N,N'—二环己基碳二亚胺(0.143g,0.693mmol),在室温下搅拌3天。减压馏去溶剂,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]纯化得到的残留物,以淡褐色固体形式得到标题化合物(0.352g,82%)。

[1066]  $^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 0.81 (3H, t,  $J=7.4\text{Hz}$ ), 1.73—1.87 (2H, m), 2.06—2.20 (2H, m), 2.34 (3H, s), 3.01—3.23 (2H, m), 3.58 (2H, d,  $J=6.7\text{Hz}$ ), 3.98 (2H, s), 4.13—4.25 (3H, m), 4.60 (2H, d,  $J=6.7\text{Hz}$ ), 5.09—5.22 (2H, m), 5.32—5.42 (2H, m), 5.50—5.59 (1H, m), 6.49 (1H, s), 7.24—7.30 (3H, m), 7.36 (2H, t,  $J=7.4\text{Hz}$ ), 7.53 (1H, t,  $J=6.3\text{Hz}$ ), 7.66 (2H, d,  $J=7.4\text{Hz}$ ), 7.75 (1H, d,  $J=11.0\text{Hz}$ ), 7.84 (2H, d,  $J=7.4\text{Hz}$ ), 8.47 (1H, d,  $J=8.6\text{Hz}$ ), 8.77 (1H, t,  $J=6.7\text{Hz}$ ).

[1067] MS (ESI)  $m/z$ : 802 (M+H)<sup>+</sup>

[1068] 工序5:N—[(2—{[(1S,9S)—9—乙基—5—氟—9—羟基—4—甲基—10,13—二氧代—2,3,9,10,13,15—六氢—1H,12H—苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉—1—基]氨基}—2—氧代乙氧基) 甲基] 甘氨酰胺

[1069] 向上述工序4中得到的化合物(0.881g,1.10mmol)的N,N—二甲基甲酰胺(11.0mL)溶液中,添加哌啶(1.1mL),在室温下搅拌2小时。减压馏去溶剂,得到含有标题化合物的混合物。不对本混合物进行进一步纯化地将其用于后续反应。

[1070] 工序6:N—[(9H—芴—9—基甲氧基) 羰基] 甘氨酰甘氨酰—L—苯基丙氨酰—N—

[ $(2-\{(1S,9S)-9-\text{乙基}-5-\text{氟}-9-\text{羟基}-4-\text{甲基}-10,13-\text{二氧代}-2,3,9,10,13,15-\text{六氢}-1\text{H},12\text{H}-\text{苯并}[\text{de}]\text{吡喃并}[3',4':6,7]\text{吲哚嗪并}[1,2-\text{b}]\text{喹啉}-1-\text{基}]\text{氨基}\}-2-\text{氧代乙氧基}\}\text{甲基}]\text{甘氨酰胺}$

[1071] 在冰冷却下,向上述工序5中得到的混合物(0.439mmol)、N-羟基琥珀酰亚胺(0.101g,0.878mmol)、及N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]甘氨酰甘氨酰-L-苯丙氨酸(日本特开2002-60351号;0.440g,0.878mmol)的N,N-二甲基甲酰胺(50.0mL)溶液中,添加N,N'-二环己基碳二亚胺(0.181g,0.878mmol),在室温下搅拌4天。减压馏去溶剂,用硅胶柱色谱法[氯仿~氯仿:甲醇=9:1(v/v)]纯化得到的残留物,以淡橙色固体形式得到标题化合物(0.269g,58%)。

[1072] MS (ESI) m/z: 1063 (M+H)<sup>+</sup>

[1073] 工序7:甘氨酰甘氨酰-L-苯基丙氨酸-N-[(2-[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基]氨基)-2-氧代乙氧基]甲基]甘氨酰胺

[1074] 向上述工序6中得到的化合物(0.269g,0.253mmol)的N,N-二甲基甲酰胺(4.00mL)溶液中,添加哌啶(0.251mL,2.53mmol),在室温下搅拌2小时。减压馏去溶剂,得到含有标题化合物的混合物。不对本混合物进行进一步纯化地将其用于后续反应。

[1075] 工序8:N-[6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰基]甘氨酰甘氨酰-L-苯基丙氨酸-N-[(2-[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基]氨基)-2-氧代乙氧基]甲基]甘氨酰胺

[1076] 向上述工序7中得到的化合物(0.253mmol)的N,N-二甲基甲酰胺(10.0mL)溶液中,添加6-马来酰亚胺己酸N-琥珀酰亚胺基酯(0.156g,0.506mmol),在室温下搅拌3天。减压馏去溶剂,用硅胶柱色谱法[氯仿~氯仿:甲醇=9:1(v/v)]纯化得到的残留物,以淡黄色固体形式得到标题化合物(0.100g,38%)。

[1077] <sup>1</sup>H-NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0.83 (3H, t, J=7.2Hz), 1.09-1.21 (2H, m), 1.33-1.47 (4H, m), 1.75-1.90 (2H, m), 2.00-2.23 (4H, m), 2.36 (3H, s), 2.69-2.81 (1H, m), 2.94-3.03 (1H, m), 3.06-3.22 (2H, m), 3.23-3.74 (6H, m), 3.98 (2H, s), 4.39-4.50 (1H, m), 4.60 (2H, d, J=6.7Hz), 5.17 (2H, s), 5.39 (2H, s), 5.53-5.61 (1H, m), 6.50 (1H, s), 6.96 (2H, s), 7.11-7.24 (5H, m), 7.28 (1H, s), 7.75 (1H, d, J=11.0Hz), 7.97 (1H, t, J=5.7Hz), 8.03 (1H, t, J=5.9Hz), 8.09 (1H, d, J=7.8Hz), 8.27 (1H, t, J=6.5Hz), 8.48 (1H, d, J=9.0Hz), 8.60 (1H, t, J=6.5Hz) .

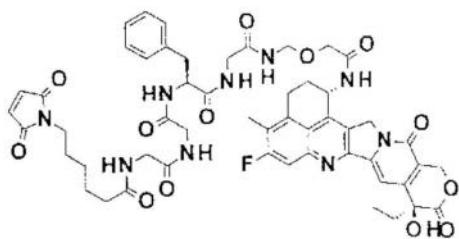
[1078] MS (ESI) m/z: 1034 (M+H)<sup>+</sup>

[1079] 工序9:抗体-药物偶联物(26)

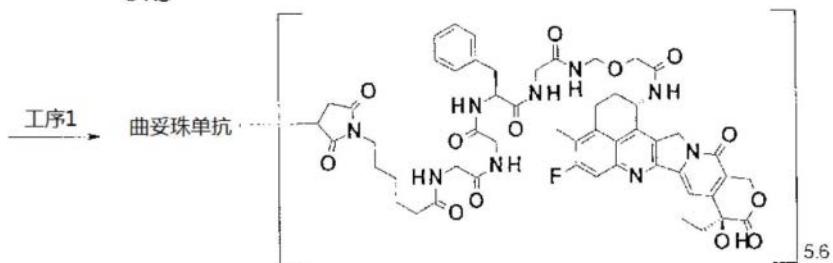
[1080] 使用参考例1中制作的曲妥珠单抗及上述工序8中得到的化合物,利用与实施例6工序2同样的方法,得到标题抗体-药物偶联物。

[1081] 抗体浓度:1.61mg/mL,抗体收量:9.7mg (77%),每一分子抗体的药物平均连接数(n):2.9。

[1082] 实施例27抗体-药物偶联物(27)



[1083]

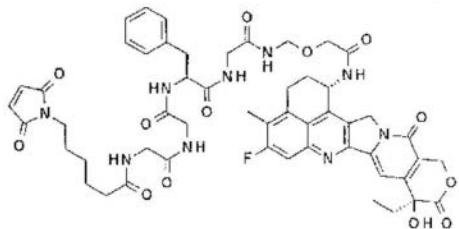


[1084] 工序1:抗体—药物偶联物 (27)

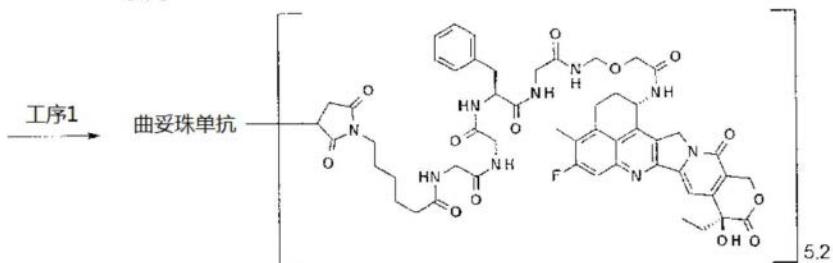
[1085] 使用参考例1中制作的曲妥珠单抗及实施例26工序8中得到的化合物,利用与实施例7工序1同样的方法,得到标题抗体—药物偶联物。

[1086] 抗体浓度:1.58mg/mL,抗体收量:9.5mg (76%),每一分子抗体的药物平均连接数(n):5.6。

[1087] 实施例28抗体—药物偶联物 (28)



[1088]



[1089] 工序1:抗体—药物偶联物 (28)

[1090] 抗体的还原:针对参考例1中制作的曲妥珠单抗,利用共通操作C—1及B(作为280nm吸光系数,使用 $1.48\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ),将介质替换为PBS6.0/EDTA,制备成10mg/mL的抗体浓度。将本溶液(1.25mL)放入到2个1.5mL聚丙烯制试管中,向其中添加10mM TCEP水溶液(0.039mL;相对于一分子抗体为4.6当量)及1M磷酸氢二钾水溶液(0.0625mL)。确认了本溶液的pH在 $7.4 \pm 0.1$ 内后,于37℃孵育1小时,由此,将抗体内铰链部的二硫键还原。

[1091] 抗体与药物接头的偶联:在室温下,向上述溶液中添加DMSO(0.072mL)和含有10mM实施例26工序8的化合物的DMSO溶液(0.078mL;相对于一分子抗体为9.2当量),使用试管混匀器,在室温下搅拌40分钟,将药物接头与抗体连接。接下来,添加100mM NAC水溶液(0.0155mL),进而在室温下搅拌20分钟,终止药物接头的反应。

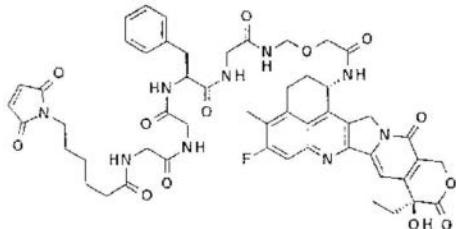
[1092] 纯化:针对上述溶液,进行利用了共通操作D—1(作为缓冲液,使用ABS)的纯化,合

并含有目标化合物的溶液,得到11.7mL。

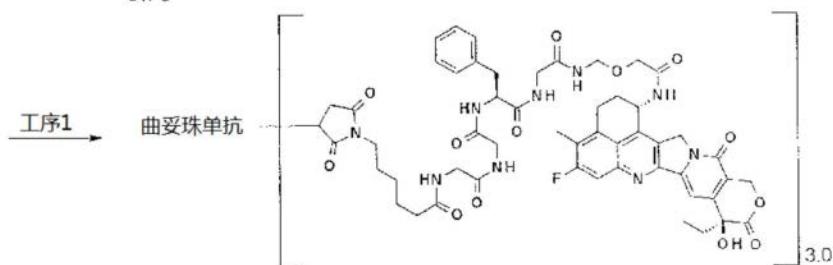
[1093] 特性评价:利用共通操作E,得到下述的特性值。

[1094] 抗体浓度:1.60mg/mL,抗体收量:18.7mg (94%),每一分子抗体的药物平均连接数(n):5.2。

[1095] 实施例29抗体—药物偶联物(29)



[1096]



[1097] 工序1:抗体—药物偶联物(29)

[1098] 抗体的还原:针对参考例1中制作的曲妥珠单抗,利用共通操作C—1及B(作为280nm吸光系数,使用 $1.48\text{mL}\text{mg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ),将介质替换为PBS6.0/EDTA,制备成10mg/mL的抗体浓度。将本溶液(6mL)放入到聚丙烯制试管中,向其中添加10mM TCEP水溶液(0.108mL;相对于一分子抗体为2.5当量)及1M磷酸氢二钾水溶液(0.091mL)。确认了本溶液的pH在7.0±0.1内后,于37℃孵育1小时,由此,将抗体内铰链部的二硫键还原。

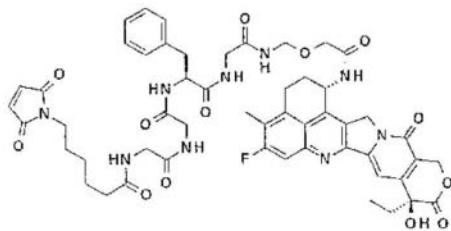
[1099] 抗体与药物接头的偶联:在室温下,向上述溶液中添加DMSO(0.146mL)和含有10mM实施例26工序8的化合物的DMSO溶液(0.193mL;相对于一分子抗体为4.5当量),于15℃孵育1小时,将药物接头与抗体连接。接下来,添加100mM NAC水溶液(0.029mL),进而在室温下搅拌20分钟,终止药物接头的反应。

[1100] 纯化:针对上述溶液,进行利用了共通操作D(作为缓冲液,使用ABS)的纯化,得到24mL含有目标化合物的溶液。

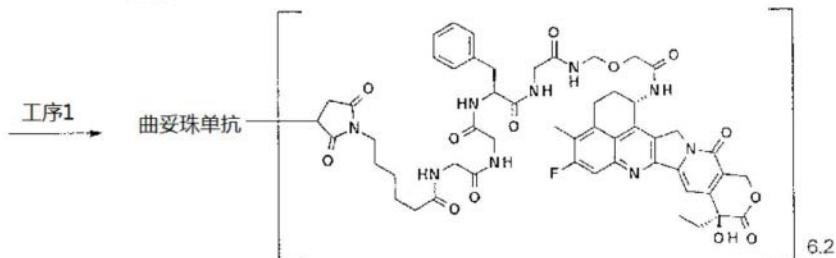
[1101] 特性评价:利用共通操作E及F(使用 $\epsilon_D, 280=5178$ (实测值)、 $\epsilon_D, 370=20217$ (实测值)),得到下述的特性值。

[1102] 抗体浓度:1.77mg/mL,抗体收量:42mg (85%),利用共通操作E测得的每一分子抗体的药物平均连接数(n):3.0;利用共通操作F测得的每一分子抗体的药物平均连接数(n):3.4。

[1103] 实施例30抗体—药物偶联物(30)



[1104]



[1105] 工序1:抗体—药物偶联物(30)

[1106] 抗体的还原:针对参考例1中制作的曲妥珠单抗,利用共通操作C—1及B(作为280nm吸光系数,使用 $1.48\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ),将介质替换为PBS6.0/EDTA,制备成10mg/mL的抗体浓度。将本溶液(6mL)放入到聚丙烯制试管中,向其中添加10mM TCEP水溶液(0.215mL;相对于一分子抗体为5当量)及1M磷酸氢二钾水溶液(0.094mL)。确认了本溶液的pH在 $7.0 \pm 0.1$ 内后,于37°C孵育1小时,由此,将抗体内铰链部的二硫键还原。

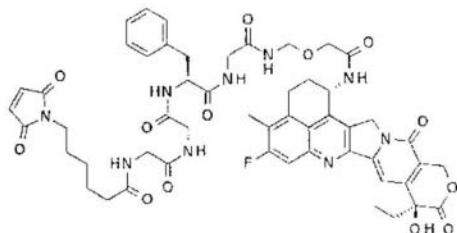
[1107] 抗体与药物接头的偶联:在室温下,向上述溶液中添加含有10mM实施例26工序8的化合物的DMSO溶液(0.370mL;相对于一分子抗体为8.6当量),于15°C孵育1小时,将药物接头与抗体连接。接下来,添加100mM NAC水溶液(0.056mL),进而在室温下搅拌20分钟,终止药物接头的反应。

[1108] 纯化:针对上述溶液,进行利用了共通操作D(作为缓冲液,使用ABS)的纯化,得到24mL含有目标化合物的溶液。

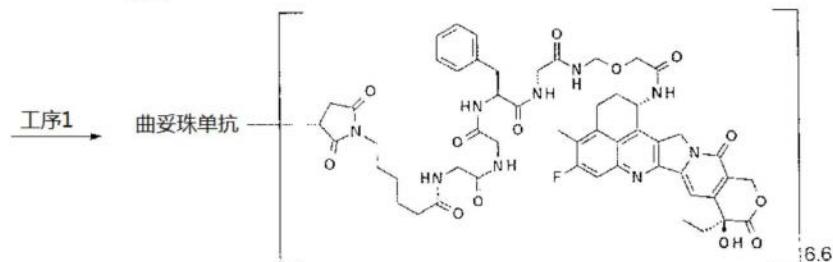
[1109] 特性评价:利用共通操作E及F(使用 $\epsilon_D, 280 = 5178$ (实测值)、 $\epsilon_D, 370 = 20217$ (实测值)),得到下述的特性值。

[1110] 抗体浓度:1.92mg/mL,抗体收量:46mg(92%),利用共通操作E测得的每一分子抗体的药物平均连接数(n):6.2;利用共通操作F测得的每一分子抗体的药物平均连接数(n):7.1。

[1111] 实施例31抗体—药物偶联物(31)



[1112]



[1113] 工序1:抗体—药物偶联物(31)

[1114] 抗体的还原:针对参考例1中制作的曲妥珠单抗,利用共通操作C—1及B(作为280nm吸光系数,使用 $1.48\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ),将介质替换为PBS6.0/EDTA,制备成10mg/mL的抗体浓度。将本溶液(50.00mL)放入到聚丙烯制容器中,在搅拌下,在室温下,添加1M磷酸氢二钾水溶液(0.745mL),然后,添加10mM TCEP水溶液(1.868mL;相对于一分子抗体为5.4当量)。确认了本溶液的pH在 $7.0 \pm 0.1$ 内后,停止搅拌,在37℃下孵育1小时,由此,将抗体内铰链部的二硫键还原。

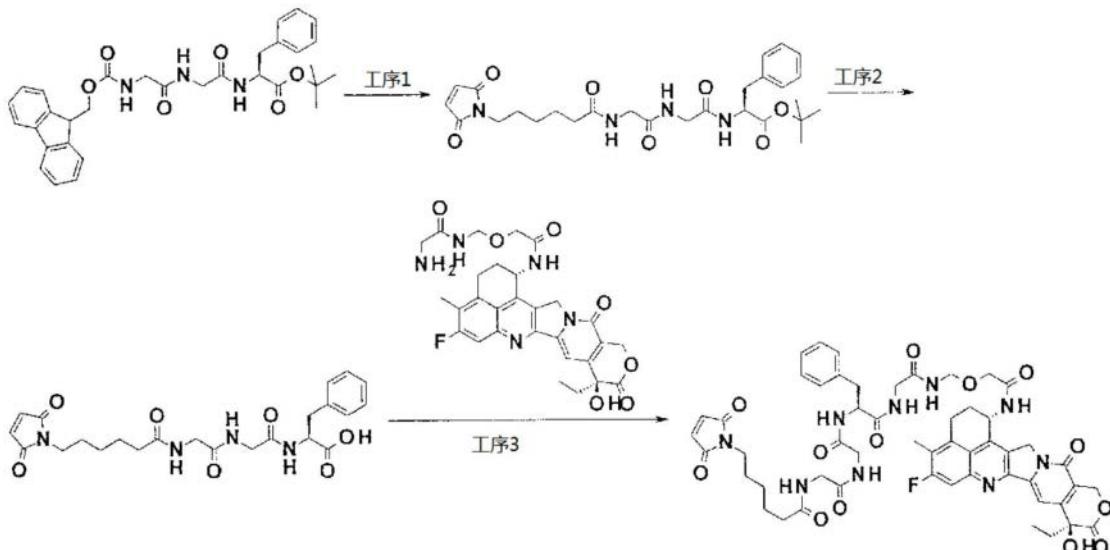
[1115] 抗体与药物接头的偶联:将上述溶液冷却至15℃后,在搅拌下,缓缓滴加含有10mM实施例26工序8的化合物的DMSO溶液(2.958mL;相对于一分子抗体为8.6当量)。保持15℃,在开始的30分钟进行搅拌,在接下来的1小时,停止搅拌,进行孵育,将药物接头与抗体连接。接下来,在搅拌下,添加100mM NAC水溶液(0.444mL),进而在室温下搅拌20分钟,终止药物接头的反应。

[1116] 纯化:在搅拌下,向上述溶液中缓缓添加20%乙酸水溶液(约0.25mL)和ABS(50mL),使本溶液的pH为 $5.5 \pm 0.1$ 。对该溶液进行微孔过滤(Millipore Co.Millex—HV滤器、0.45μm、PVDF膜)而除去白浊物。针对该溶液,使用由超滤膜(Merck Japan,Pellicon XL Cassette,Biomax 50KDa)、管泵(tube pump)(Cole-Parmer International MasterFlex Pump model 77521—40,泵头model 7518—00)及试管(Cole-Parmer International MasterFlex Tube L/S16)构成的超滤装置,进行超滤纯化。即,一边向反应液中滴加作为纯化缓冲液的ABS(计800mL),一边进行超滤纯化,由此,在将未连接的药物接头及其他低分子量试剂除去的同时,将缓冲液置换成ABS,进而进行至浓缩。针对得到的纯化溶液,进行微孔过滤(0.22μm(Millipore Co.Millex—GV滤器、PVDF膜)及0.10μm(Millipore Co.Millex—VV滤器、PVDF膜)),得到含有标题抗体—药物偶联物的溶液。

[1117] 特性评价:利用共通操作E及F(使用 $\epsilon_D, 280=5178$ (实测值)、 $\epsilon_D, 370=20217$ (实测值)),得到下述的特性值。

[1118] 抗体浓度:11.28mg/mL,抗体收量:451mg(90%),利用共通操作E测得的每一分子抗体的药物平均连接数(n):6.6;利用共通操作F测得的每一分子抗体的药物平均连接数(n):7.7。

[1119] 实施例32(实施例26工序8的化合物的其他途径合成法)



[1121] 工序1:N—[6—(2,5—二氧代—2,5—二氢—1H—吡咯—1—基)己酰基]甘氨酰甘氨酰—L—苯基丙氨酸叔丁酯

[1122] 在冰冷却下,向N—[(9H—芴—9—基甲氧基)羰基]甘氨酰甘氨酰—L—苯基丙氨酸叔丁酯(J.Peat.Res.,1999年,53卷,393项;0.400g,0.717mmol)的THF(12.0ml)溶液中,添加1,8—二氮杂双环[5.4.0]—7—十一碳烯(0.400ml),在室温下搅拌4天后,进一步添加6—马来酰亚胺己酸N—琥珀酰亚胺基酯(0.221g,0.717mmol),搅拌3小时。用乙酸乙酯稀释反应液,用10%柠檬酸水溶液、饱和碳酸氢钠水溶液、及饱和食盐水洗涤后,用无水硫酸镁干燥有机层。在减压下馏去溶剂,然后,用硅胶柱色谱法[氯仿~氯仿:甲醇=9:1(v/v)]纯化得到的残留物,以淡黄色固体形式得到标题化合物(0.295g,78%)。

[1123]  $^1\text{H-NMR}$ (400MHz,CDCl<sub>3</sub>) $\delta$ :1.28—1.36(2H,m),1.41(9H,s),1.57—1.71(4H,m),2.23(2H,t,J=7.6Hz),3.09(2H,d,J=6.0Hz),3.51(2H,t,J=7.6Hz),3.85—4.02(4H,m),4.69—4.78(1H,m),6.15(1H,t,J=4.6Hz),6.33(1H,d,J=7.3Hz),6.60(1H,t,J=5.0Hz),6.68(2H,s),7.10—7.16(2H,m),7.22—7.31(3H,m).

[1124] MS(ESI)m/z:529(M+H)<sup>+</sup>

[1125] 工序2:N—[6—(2,5—二氧代—2,5—二氢—1H—吡咯—1—基)己酰基]甘氨酰甘氨酰—L—苯丙氨酸

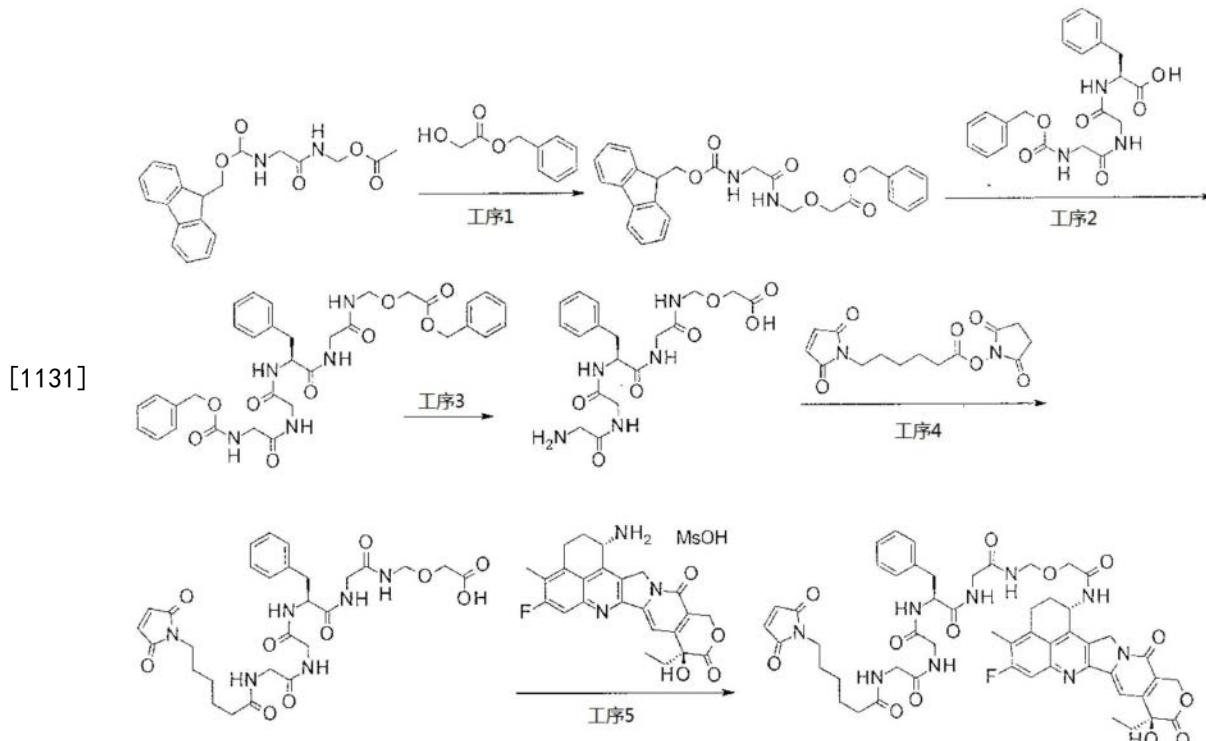
[1126] 向上述工序1中得到的化合物(0.295g,0.558mmol)的二氯甲烷(8.00ml)溶液中添加三氟乙酸(4.00mL),在室温下搅拌18小时。减压馏去溶剂,以淡黄色固体形式得到标题化合物(0.240g,91%)。

[1127]  $^1\text{H-NMR}$ (400MHz,DMSO—d<sub>6</sub>) $\delta$ :1.15—1.23(2H,m),1.40—1.53(4H,m),2.10(2H,t,J=7.6Hz),2.88(1H,dd,J=13.7,8.9Hz),3.04(1H,dd,J=13.7,5.0Hz),3.35—3.43(2H,m),3.58—3.77(4H,m),4.41(1H,td,J=7.8,5.0Hz),7.00(2H,s),7.16—7.31(5H,m),8.00(1H,t,J=5.7Hz),8.06(1H,t,J=5.7Hz),8.13(1H,d,J=7.8Hz).

[1128] 工序3:N—[6—(2,5—二氧代—2,5—二氢—1H—吡咯—1—基)己酰基]甘氨酰甘氨酰—L—苯基丙氨酸—N—[(2—{(1S,9S)—9—乙基—5—氟—9—羟基—4—甲基—10,13—二氧代—2,3,9,10,13,15—六氢—1H,12H—苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2—b]喹啉—1—基}—2—氧代乙氧基)甲基]甘氨酰胺

[1129] 将上述工序2中得到的化合物(0.572g, 1.21mmol)溶解于二氯甲烷(12.0mL), 添加N-羟基琥珀酰亚胺(0.152g, 1.32mmol)、及1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(0.253g, 1.32mmol), 搅拌1小时。将反应溶液添加到实施例26工序5中得到的混合物(1.10mmol)的N,N-二甲基甲酰胺(22.0mL)溶液中, 在室温下搅拌3小时。向反应溶液中添加10%柠檬酸水溶液, 用氯仿进行萃取, 用硫酸钠干燥得到的有机层, 进行过滤。减压馏去溶剂, 用硅胶柱色谱法[氯仿~氯仿: 甲醇=8:2(v/v)]纯化得到的残留物, 以淡黄色固体形式得到标题化合物(0.351g, 31%)。设备数据与实施例26工序8的化合物同样。

[1130] 实施例33(实施例26工序8的化合物的其他途径合成法)



[1132] 工序1: [(N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]甘氨酰氨基)甲氧基]乙酸苄酯

[1133] 于0℃, 向实施例26工序1中得到的化合物(7.37g, 20.0mmol)的THF(200mL)溶液中, 添加乙醇酸苯甲酯(6.65g, 40.0mmol)、及对甲苯磺酸一水合物(0.381g, 2.00mmol), 在室温下, 搅拌2小时30分钟。向反应溶液中添加饱和碳酸氢钠水溶液, 用乙酸乙酯萃取, 用硫酸钠干燥得到的有机层, 进行过滤。减压馏去溶剂, 用硅胶柱色谱法[己烷: 乙酸乙酯=100: 0(v/v) ~ 0:100]纯化得到的残留物, 以无色固体形式得到标题化合物(6.75g, 71%)。设备数据与实施例26工序2的化合物同样。

[1134] 工序2:N-[(苄基氧基)羰基]甘氨酰甘氨酰-L-苯丙氨酸-N-[(2-(苄基氧基)-2-氧代乙氧基)甲基]甘氨酰胺

[1135] 于0℃, 向上述工序1中得到的化合物(6.60g, 13.9mmol)的N,N-二甲基甲酰胺(140mL)溶液中, 添加1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯(2.22g, 14.6mmol), 在室温下搅拌15分钟。向反应溶液中, 添加预先在室温下、搅拌N-[(苄基氧基)羰基]甘氨酰甘氨酰-L-苯丙氨酸(6.33g, 15.3mmol)、N-羟基琥珀酰亚胺(1.92g, 16.7mmol)、及1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(3.20g, 16.7mmol)的N,N-二甲基甲酰胺(140mL)溶液1小时后的溶液, 在室温下搅拌4小时。向反应溶液中添加0.1当量盐酸, 用氯仿

进行萃取,用硫酸钠干燥得到的有机层,进行过滤。减压馏去溶剂,用硅胶柱色谱法[氯仿~氯仿:甲醇=8:2(v/v)]纯化得到的残留物,以无色固体形式得到标题化合物(7.10g,79%)。

[1136]  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 2.78 (1H, dd,  $J=13.9, 9.6\text{Hz}$ ) , 3.05 (1H, dd,  $J=13.9, 4.5\text{Hz}$ ) , 3.56~3.80 (6H, m) , 4.15 (2H, s) , 4.47~4.55 (1H, m) , 4.63 (2H, d,  $J=6.6\text{Hz}$ ) , 5.03 (2H, s) , 5.15 (2H, s) , 7.16~7.38 (15H, m) , 7.52 (1H, t,  $J=5.9\text{Hz}$ ) , 8.03 (1H, t,  $J=5.5\text{Hz}$ ) , 8.17 (1H, d,  $J=8.2\text{Hz}$ ) , 8.36 (1H, t,  $J=5.7\text{Hz}$ ) , 8.61 (1H, t,  $J=6.6\text{Hz}$ ) .

[1137] 工序3: 甘氨酰甘氨酰-L-苯基丙氨酰-N-[(羧基甲氧基)甲基]甘氨酰胺

[1138] 向上述工序2中得到的化合物(7.00g, 10.8mmol)的N,N-二甲基甲酰胺(216mL)溶液中,添加钯碳催化剂(7.00g),在氢气气氛下,在室温下搅拌24小时。通过硅藻土过滤除去不溶物,减压馏去溶剂。将得到的残留物溶解到水中,通过硅藻土过滤除去不溶物,重复2次减压馏去溶剂的操作,以无色固体形式得到标题化合物(3.77g, 82%)。

[1139]  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 2.84 (1H, dd,  $J=13.7, 9.8\text{Hz}$ ) , 3.08 (1H, dd,  $J=13.7, 4.7\text{Hz}$ ) , 3.50~3.72 (4H, m) , 3.77~3.86 (2H, m) , 3.87 (2H, s) , 4.52~4.43 (1H, m) , 4.61 (2H, d,  $J=6.6\text{Hz}$ ) , 7.12~7.30 (5H, m) , 8.43 (1H, t,  $J=5.9\text{Hz}$ ) , 8.54 (1H, d,  $J=7.8\text{Hz}$ ) , 8.70 (1H, t,  $J=6.3\text{Hz}$ ) , 8.79 (1H, t,  $J=5.5\text{Hz}$ ) .

[1140] 工序4:N-[6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰基]甘氨酰甘氨酰-L-苯基丙氨酰-N-[(羧基甲氧基)甲基]甘氨酰胺

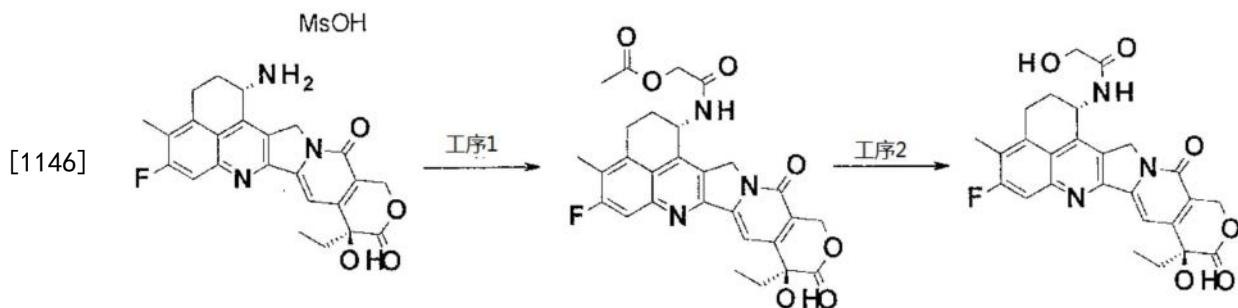
[1141] 向上述工序3中得到的化合物(3.59g, 8.48mmol)的N,N-二甲基甲酰胺(85.0mL)溶液中,添加6-马来酰亚胺己酸N-琥珀酰亚胺基酯(2.88g, 9.33mmol)、及三乙胺(0.858g, 8.48mmol),在室温下,搅拌1小时。向反应溶液中添加0.1当量盐酸,用氯仿、氯仿与甲醇的混合溶剂[氯仿:甲醇=4:1(v/v)]进行萃取,用硫酸钠干燥得到的有机层,进行过滤。减压馏去溶剂,用硅胶柱色谱法[氯仿~氯仿:甲醇:水=7:3:1(v/v/v)的分配有机层]纯化得到的残留物,以无色固体形式得到标题化合物(3.70g, 71%)。

[1142]  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 1.13~1.24 (2H, m) , 1.42~1.53 (4H, m) , 2.11 (2H, t,  $J=7.4\text{Hz}$ ) , 2.80 (1H, dd,  $J=13.7, 9.8\text{Hz}$ ) , 3.06 (1H, dd,  $J=13.9, 4.5\text{Hz}$ ) , 3.37 (2H, t,  $J=7.2\text{Hz}$ ) , 3.56~3.78 (6H, m) , 3.97 (2H, s) , 4.46~4.53 (1H, m) , 4.61 (2H, d,  $J=6.3\text{Hz}$ ) , 7.00 (2H, s) , 7.15~7.29 (5H, m) , 8.03~8.20 (3H, m) , 8.32 (1H, t,  $J=5.9\text{Hz}$ ) , 8.60 (1H, t,  $J=6.7\text{Hz}$ ) .

[1143] 工序5:N-[6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰基]甘氨酰甘氨酰-L-苯基丙氨酰-N-[(2-[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-1-基]氨基)-2-氧代乙氧基]甲基]甘氨酰胺

[1144] 于0℃,向依沙替康的甲磺酸盐(1.14g, 2.00mmol)的N,N-二甲基甲酰胺(40.0mL)溶液中,添加三乙胺(0.202g, 2.00mmol)、上述工序4中得到的化合物(1.48g, 2.40mmol)、及16.4%含水的4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基吗啉鎓氯化物(0.993g, 3.00mmol),在室温下,搅拌1小时。减压馏去溶剂,用硅胶柱色谱法[氯仿~氯仿:甲醇=8:2(v/v)]纯化得到的残留物,以淡黄色固体形式得到标题化合物(1.69g, 82%)。设备数据与实施例26工序8的化合物同样。

## [1145] 实施例34中间体(34)



[1147] 工序1:乙酸2-{{(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基}氨基}-2-氧代乙基酯

[1148] 在冰冷却下,向依沙替康的甲磺酸盐(0.500g,0.941mmol)的N,N-二甲基甲酰胺(20.0mL)悬浮液中,添加N,N-二异丙基乙基胺(0.492mL,2.82mmol)及乙酰氧基乙酰氯化物(0.121mL,1.13mmol),在室温下,搅拌1小时。减压馏去溶剂,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]纯化得到的残留物,以淡黄色固体形式得到标题化合物(0.505g,定量)。

[1149]  $^1\text{H-NMR}$  (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 0.87 (3H, t,  $J$ =7.4Hz), 1.81-1.92 (2H, m), 2.08 (3H, s), 2.08-2.22 (2H, m), 2.41 (3H, s), 3.14-3.21 (2H, m), 4.51 (2H, dd,  $J$ =19.4, 14.7Hz), 5.22 (2H, dd,  $J$ =40.1, 19.0Hz), 5.43 (2H, s), 5.56-5.61 (1H, m), 6.53 (1H, s), 7.31 (1H, s), 7.81 (1H, d,  $J$ =11.0Hz), 8.67 (1H, d,  $J$ =8.6Hz).

[1150] MS (ESI)  $m/z$ : 536 (M+H)<sup>+</sup>

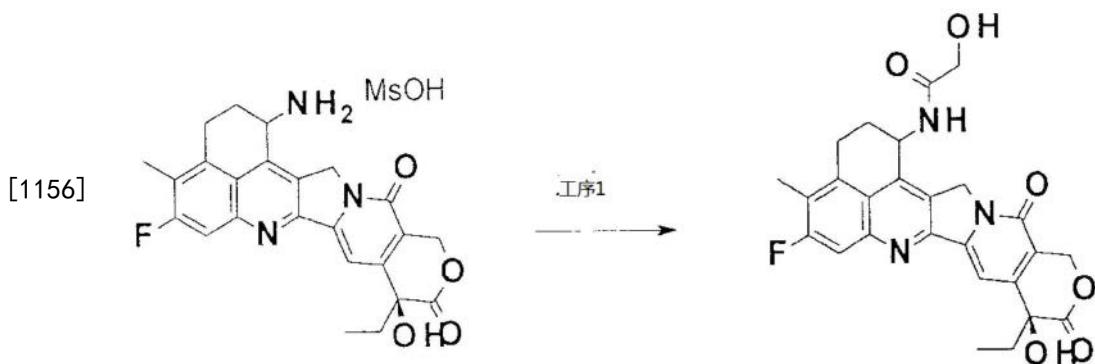
[1151] 工序2:N-[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基]-2-羟基乙酰胺

[1152] 向上述工序1中得到的化合物(0.504g,0.941mmol)的甲醇(50.0mL)悬浮液中,添加THF(20.0mL)及1当量氢氧化钠水溶液(4.00mL,4.00mmol),在室温下,搅拌1小时。添加1当量盐酸(5.00mL,5.00mmol),终止反应,减压馏去溶剂。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]纯化得到的残留物,以淡黄色固体形式得到标题化合物(0.412g,89%)。将抗体-药物偶联物(45)、(46)向小鼠给予时,在肿瘤中确认了该化合物。

[1153]  $^1\text{H-NMR}$  (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 0.87 (3H, t,  $J$ =7.3Hz), 1.78-1.95 (2H, m), 2.09-2.28 (2H, m), 2.39 (3H, s), 3.07-3.27 (2H, m), 3.96 (2H, d,  $J$ =6.0Hz), 5.11-5.26 (2H, m), 5.42 (2H, s), 5.46-5.54 (1H, m), 5.55-5.63 (1H, m), 6.52 (1H, s), 7.30 (1H, s), 7.78 (1H, d,  $J$ =10.9Hz), 8.41 (1H, d,  $J$ =9.1Hz).

[1154] MS (ESI)  $m/z$ : 494 (M+H)<sup>+</sup>

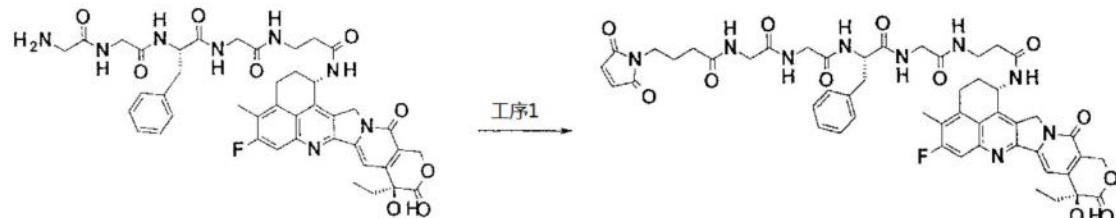
[1155] 实施例35(实施例34的化合物的其他途径合成法)



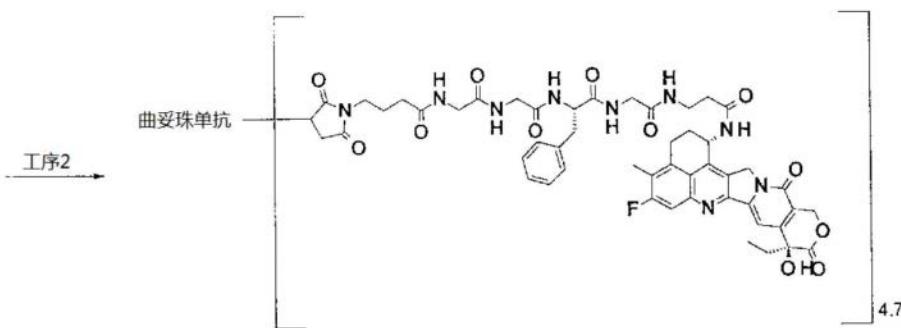
[1157] 工序1:N—[(1S,9S)—9—乙基—5—氟—9—羟基—4—甲基—10,13—二氧代—2,3,9,10,13,15—六氢—1H,12H—苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2—b]喹啉—1—基]—2—羟基乙酰胺

[1158] 将羟基乙酸(0.0201g,0.27mmol)溶解于N,N—二甲基甲酰胺(1.0mL),添加N—羟基琥珀酰亚胺(0.0302g,0.27mmol)、及1—(3—二甲基氨基丙基)—3—乙基碳二亚胺盐酸盐(0.0508g,0.27mmol),搅拌1小时。将反应溶液添加到依沙替康的甲磺酸盐(0.1g,0.176mmol)的N,N—二甲基甲酰胺(1.0mL)悬浮液中,添加三乙胺(0.025mL,0.18mmol),在室温下搅拌24小时。减压馏去溶剂,用硅胶柱色谱法[氯仿~氯仿:甲醇=10:1(v/v)]纯化得到的残留物,以淡黄色固体形式得到标题化合物(0.080g,92%)。设备数据与实施例34工序2中得到的化合物同样。

[1159] 实施例36抗体—药物偶联物(36)



[1160]



[1161] 工序1:N—[4—(2,5—二氧代—2,5—二氢—1H—吡咯—1—基)丁酰基]甘氨酰甘氨酰—L—苯基丙氨酰甘氨酰—N—[(1S,9S)—9—乙基—5—氟—9—羟基—4—甲基—10,13—二氧代—2,3,9,10,13,15—六氢—1H,12H—苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2—b]喹啉—1—基]—β—丙氨酸酰胺

[1162] 使用4—马来酰亚胺丁酸N—琥珀酰亚胺基,代替6—马来酰亚胺己酸N—琥珀酰亚胺基酯,与实施例2工序3同样地使实施例15的工序2中得到的化合物(60.0mg,0.0646mmol)反应,以淡白色固体形式得到标题化合物(24.0mg,38%)。

[1163]  $^1\text{H}$ —NMR (400MHz, DMSO—d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 0.86 (3H, t, J=7.2Hz), 1.68 (2H, quin, J=7.4Hz),

1.78—1.92 (2H, m), 2.06—2.22 (2H, m), 2.10 (2H, t,  $J=7.8\text{Hz}$ ), 2.31—2.43 (2H, m), 2.40 (3H, s), 2.78 (1H, dd,  $J=13.7, 9.4\text{Hz}$ ), 3.01 (1H, dd,  $J=13.7, 4.7\text{Hz}$ ), 3.17 (4H, d,  $J=5.1\text{Hz}$ ), 3.29—3.40 (2H, m), 3.52—3.80 (6H, m), 4.40—4.51 (1H, m), 5.19 (1H, d,  $J=18.4\text{Hz}$ ), 5.26 (1H, d,  $J=18.8\text{Hz}$ ), 5.42 (2H, s), 5.52—5.61 (1H, m), 6.53 (1H, s), 6.99 (2H, s), 7.12—7.28 (5H, m), 7.31 (1H, s), 7.74—7.84 (2H, m), 8.02 (1H, t,  $J=5.9\text{Hz}$ ), 8.08—8.16 (2H, m), 8.25 (1H, t,  $J=5.9\text{Hz}$ ), 8.52 (1H, d,  $J=8.2\text{Hz}$ ).

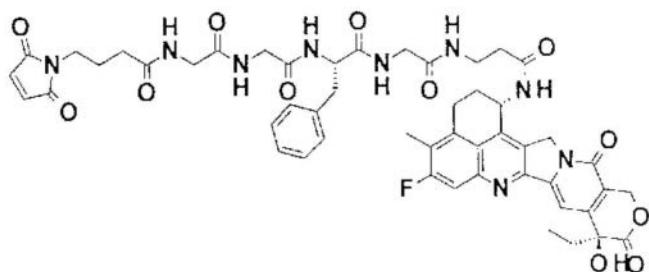
[1164] MS (ESI)  $m/z$ : 990 ( $M+\text{H}$ )<sup>+</sup>

[1165] 工序2: 抗体—药物偶联物 (33)

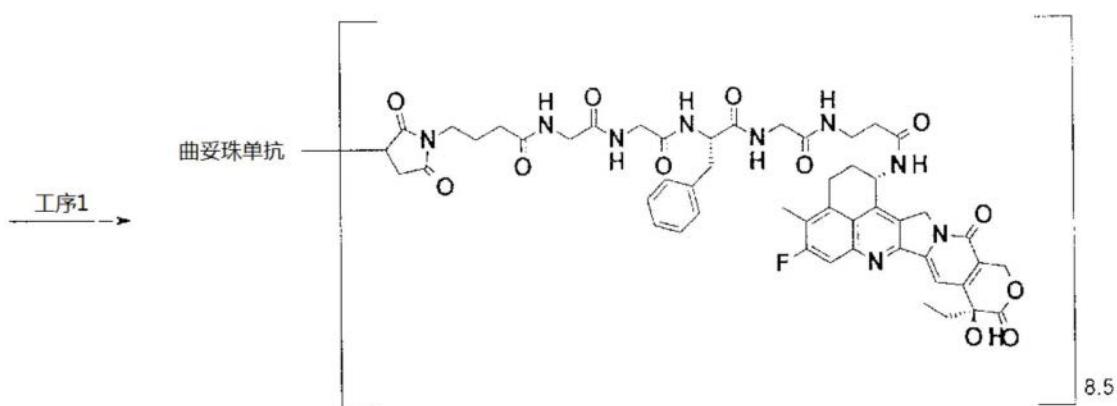
[1166] 使用参考例1中制作的曲妥珠单抗及上述工序1中得到的化合物, 利用与实施例6工序2同样的方法, 得到标题抗体—药物偶联物。

[1167] 抗体浓度: 1.75mg/mL, 抗体收量: 10.5mg (84%), 每一分子抗体的药物平均连接数 (n): 4.7。

[1168] 实施例37抗体—药物偶联物 (37)



[1169]

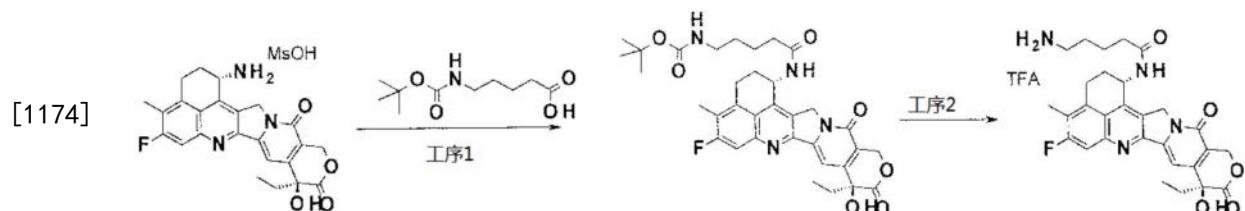


[1170] 工序1: 抗体—药物偶联物 (37)

[1171] 使用参考例1中制作的曲妥珠单抗及实施例36工序1中得到的化合物, 利用与实施例7工序1同样的方法, 得到标题抗体—药物偶联物。

[1172] 抗体浓度: 1.89mg/mL, 抗体收量: 11.3mg (90%), 每一分子抗体的药物平均连接数 (n): 8.5。

[1173] 实施例38中间体 (38)



[1175] 工序1: (5- {[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧化代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基]氨基}-5-氧代戊基)氨基甲酸叔丁酯

[1176] 使用5-(叔丁氧基羰基氨基)戊酸,代替4-(叔丁氧基羰基氨基)丁酸,与实施例1工序1同样地使依沙替康的甲磺酸盐(500mg,0.941mmol)反应,以黄褐色固体形式得到标题化合物(571mg,96%)。不进行进一步纯化地将其用于后续反应。

[1177] MS (ESI) m/z: 635 (M+H)<sup>+</sup>

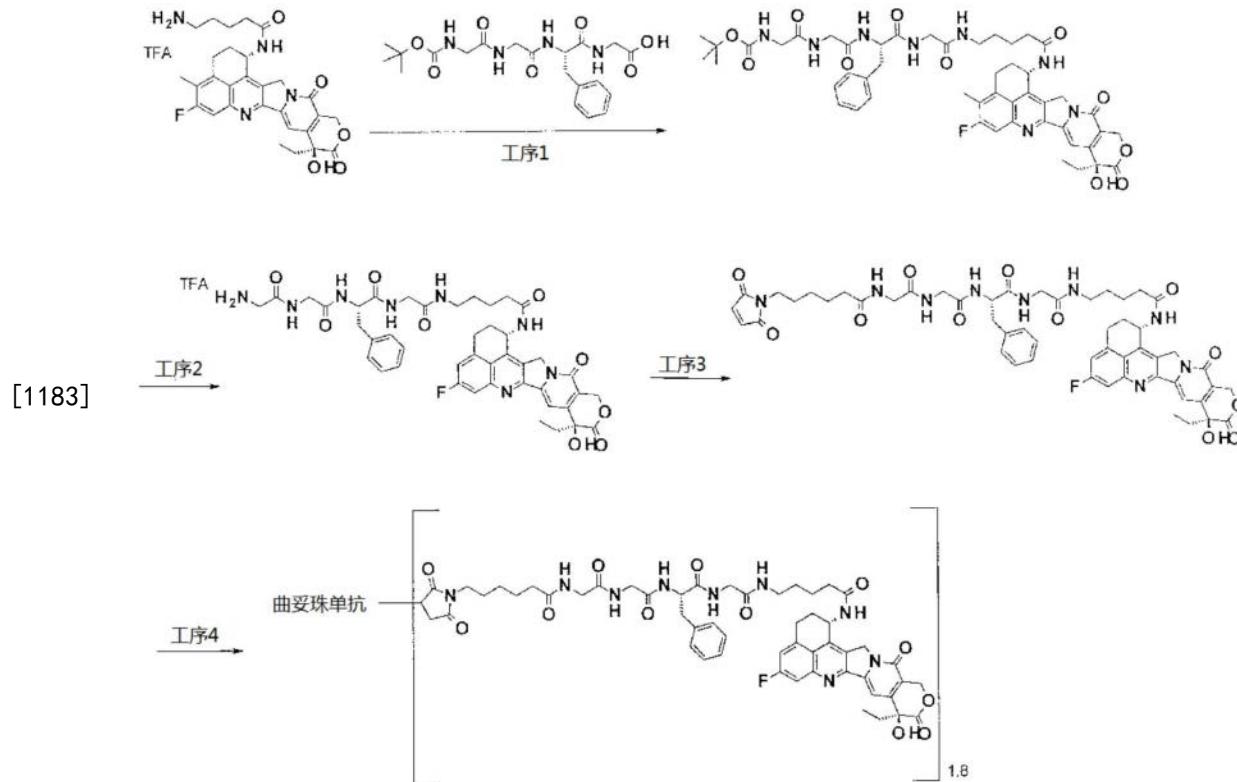
[1178] 工序2:5-氨基-N-[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧化代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基]戊酰胺

[1179] 与实施例1工序2同样地使上述工序1中得到的化合物(558mg,0.879mmol)反应,以黄色固体形式得到作为标题化合物的三氟乙酸盐(363mg,64%)。

[1180] <sup>1</sup>H-NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0.88 (3H, t, J=7.4Hz), 1.52-1.71 (4H, m), 1.87 (2H, tt, J=14.4, 6.9Hz), 2.07-2.18 (2H, m), 2.22 (2H, t, J=7.0Hz), 2.40 (3H, s), 2.76-2.88 (2H, m), 3.13-3.22 (2H, m), 5.18 (1H, d, J=18.8Hz), 5.24 (1H, d, J=18.8Hz), 5.43 (2H, s), 5.53-5.61 (1H, m), 6.55 (1H, s), 7.33 (1H, s), 7.65 (3H, br. s.), 7.81 (1H, d, J=11.3Hz), 8.49 (1H, d, J=8.6Hz) .

[1181] MS (ESI) m/z: 535 (M+H)<sup>+</sup>

[1182] 实施例39抗体-药物偶联物(39)



[1184] 工序1:N-(叔丁氧基羰基)甘氨酸酰甘氨酸酰-L-苯基丙氨酸酰-N-(5- {[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧化代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基]氨基}-5-氧代戊

基) 甘氨酰胺

[1185] 与实施例2工序1同样地使实施例38工序2中得到的化合物(348mg, 0.537mmol)反应, 以淡黄色固体形式得到标题化合物(429mg, 84%)。不进行进一步纯化地将其用于后续反应。

[1186] 工序2: 甘氨酰甘氨酰-L-苯基丙氨酰-N-(5-[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基]氨基)-5-氧代戊基) 甘氨酰胺

[1187] 与实施例2工序2同样地使上述工序1中得到的化合物(427mg, 0.448mmol)反应, 以黄色固体形式得到作为标题化合物的三氟乙酸盐(430mg, 99%)。

[1188]  $^1\text{H-NMR}$  (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 0.87 (3H, t,  $J$ =7.2Hz), 1.38-1.49 (2H, m), 1.54-1.66 (2H, m), 1.86 (2H, tt,  $J$ =14.5, 7.0Hz), 2.08-2.16 (2H, m), 2.19 (2H, t,  $J$ =7.2Hz), 2.40 (3H, s), 2.76 (1H, dd,  $J$ =13.9, 10.0Hz), 3.00-3.12 (3H, m), 3.14-3.21 (2H, m), 3.57 (2H, d,  $J$ =4.7Hz), 3.60-3.75 (3H, m), 3.87 (1H, dd,  $J$ =16.8, 5.9Hz), 4.55 (1H, td,  $J$ =9.0, 4.7Hz), 5.16 (1H, d,  $J$ =18.8Hz), 5.23 (1H, d,  $J$ =18.4Hz), 5.44 (2H, s), 5.53-5.60 (1H, m), 6.55 (1H, s), 7.14-7.29 (5H, m), 7.32 (1H, s), 7.74 (1H, t,  $J$ =5.5Hz), 7.81 (1H, d,  $J$ =10.9Hz), 7.96 (3H, br. s.), 8.30-8.37 (1H, m), 8.44-8.53 (2H, m).

[1189] MS (ESI) m/z: 853 (M+H) $^+$

[1190] 工序3: N-[6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基) 己酰基] 甘氨酰甘氨酰-L-苯基丙氨酰-N-(5-[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基]氨基)-5-氧代戊基) 甘氨酰胺与实施例2工序3同样地使上述工序2中得到的化合物(60.0mg, 0.0621mmol)反应, 以固体形式得到标题化合物(16.0mg, 25%)。

[1191]  $^1\text{H-NMR}$  (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 0.87 (3H, t,  $J$ =7.4Hz), 1.13-1.21 (2H, m), 1.36-1.52 (6H, m), 1.53-1.65 (2H, m), 1.79-1.92 (2H, m), 2.05-2.15 (4H, m), 2.19 (2H, s), 2.40 (3H, s), 2.79 (1H, dd,  $J$ =13.7, 10.2Hz), 2.98-3.10 (3H, m), 3.12-3.21 (2H, m), 3.29-3.37 (2H, m), 3.53-3.79 (6H, m), 4.41-4.50 (1H, m), 5.16 (1H, d,  $J$ =18.8Hz), 5.23 (1H, d,  $J$ =18.8Hz), 5.43 (2H, s), 5.52-5.60 (1H, m), 6.53 (1H, s), 6.99 (2H, s), 7.12-7.28 (5H, m), 7.31 (1H, s), 7.63 (1H, t,  $J$ =5.7Hz), 7.80 (1H, d,  $J$ =10.6Hz), 8.02 (1H, t,  $J$ =5.9Hz), 8.08 (1H, t,  $J$ =5.7Hz), 8.12 (1H, d,  $J$ =7.8Hz), 8.24 (1H, t,  $J$ =5.7Hz), 8.45 (1H, d,  $J$ =8.6Hz).

[1192] MS (ESI) m/z: 1046 (M+H) $^+$

[1193] 工序4: 抗体-药物偶联物(39)

[1194] 抗体的还原: 针对参考例1中制作的曲妥珠单抗, 利用共通操作C-1及共通操作B(作为280nm吸光系数, 使用 $1.37\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), 用PBS 6.0/EDTA制备成10mg/mL。取本溶液(1.0mL)至2mL试管中, 添加10mM TCEP水溶液(0.0155mL; 相对于一分子抗体为2.3当量)及1M磷酸氢钾二水溶液(0.050mL)。确认了本溶液的pH在7.4±0.1内后, 在37°C下孵育1小时, 由此, 将抗体内的二硫键还原。

[1195] 抗体与药物接头的偶联: 于22°C孵育上述溶液10分钟后, 添加含有10mM上述工序3中得到的化合物的DMSO溶液(0.0311mL; 相对于一分子抗体为4.6当量), 于22°C孵育40分钟, 将药物接头与抗体连接。接下来, 添加100mM NAC水溶液(0.00622mL; 相对于一分子抗体

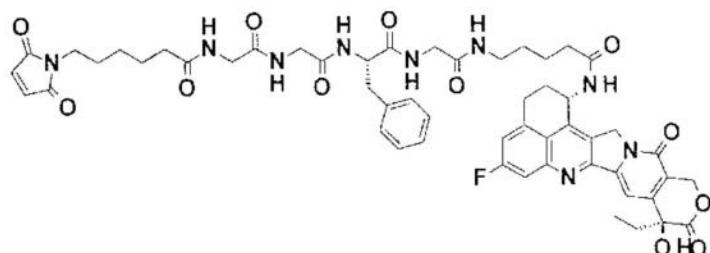
为9.2当量),进而于22℃孵育20分钟,终止药物接头的反应。

[1196] 纯化:针对上述溶液,进行利用了共通操作D-1(作为缓冲液,使用PBS6.0)的纯化,得到6mL含有标题抗体-药物偶联物的溶液。

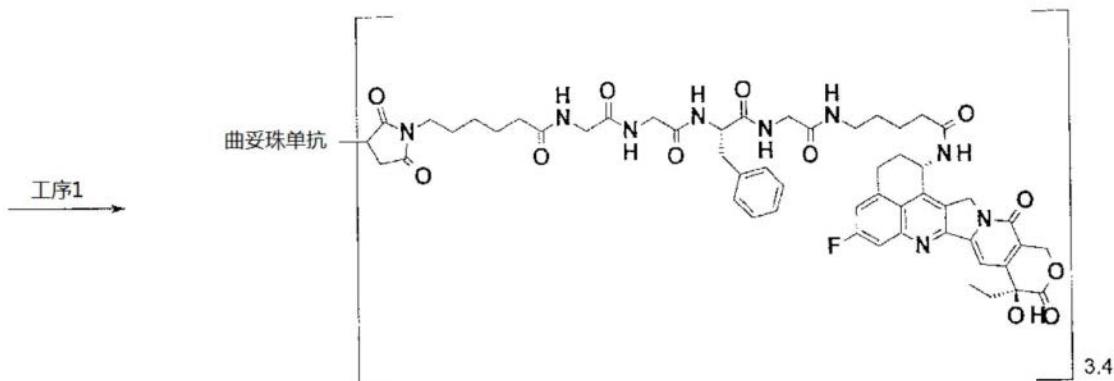
[1197] 特性评价:利用共通操作E,得到下述的特性值。

[1198] 抗体浓度:1.12mg/mL,抗体收量:6.72mg(67%),每一分子抗体的药物平均连接数(n):1.8。

### [1199] 实施例40抗体-药物偶联物(40)



[1200]



## [1201] 工序1: 抗体-药物偶联物 (40)

[1202] 抗体的还原:针对参考例1中制作的曲妥珠单抗,利用共通操作C-1及共通操作B(作为280nm吸光系数,使用 $1.37\text{mL}\text{mg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ),用PBS6.0/EDTA制备成10mg/mL。取本溶液(1.0mL)至2mL试管中,添加10mM TCEP水溶液(0.0311mL;相对于一分子抗体为4.6当量)及1M磷酸氢二钾水溶液(0.050mL)。确认了本溶液的pH在 $7.4\pm0.1$ 内后,在37℃下孵育1小时,由此,将抗体内铰链部的二硫键还原。

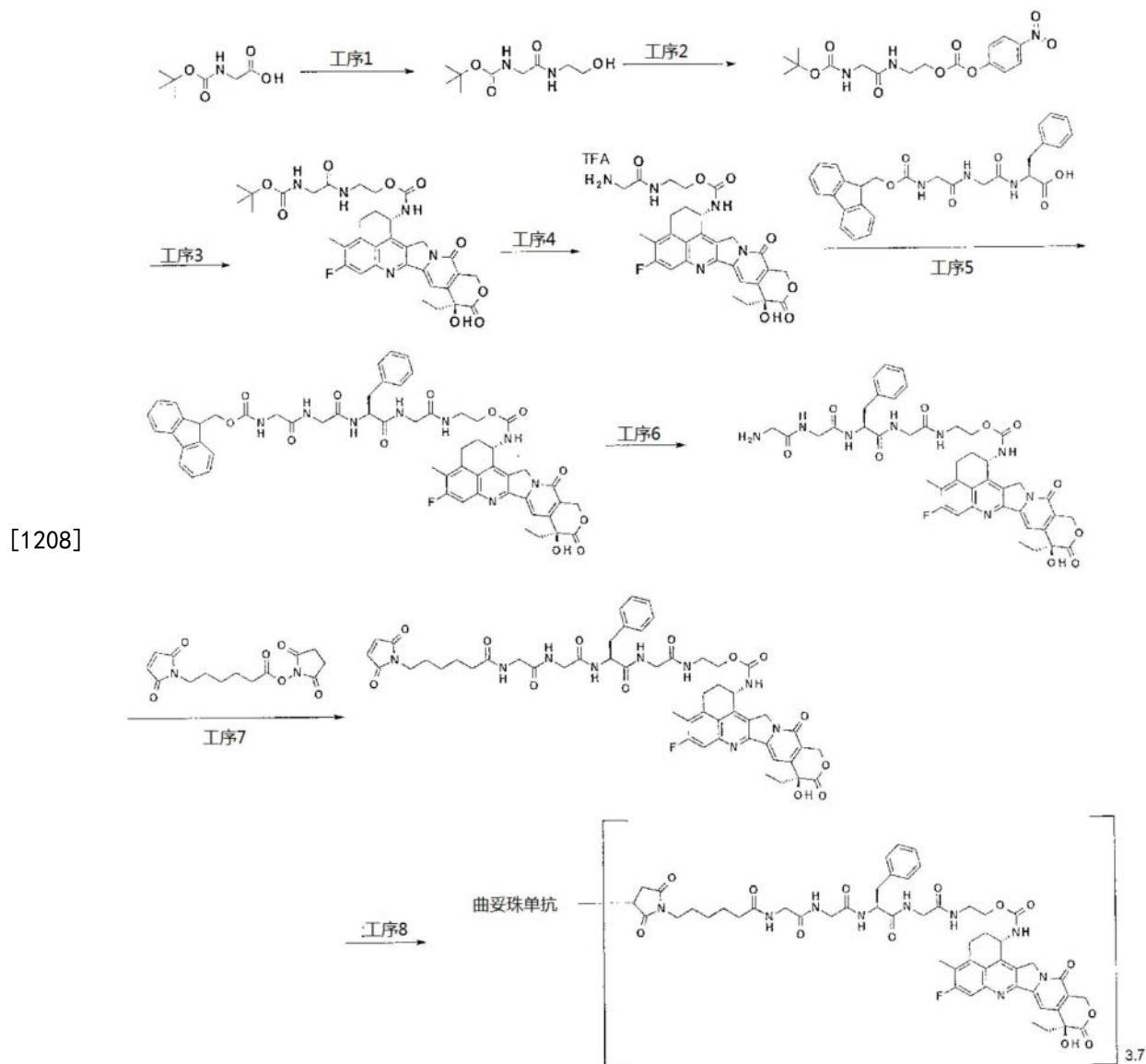
[1203] 抗体与药物接头的偶联:于22℃孵育上述溶液10分钟后,添加含有10mM实施例39工序3中得到的化合物的DMSO溶液(0.0622mL;相对于一分子抗体为9.2当量),于22℃孵育40分钟,将药物接头与抗体连接。接下来,添加100mM NAC水溶液(0.0124mL;相对于一分子抗体为18.4当量),进而于22℃孵育20分钟,终止药物接头的反应。

[1204] 纯化:针对上述溶液,进行利用了共通操作D-1(作为缓冲液,使用PBS6.0)的纯化,得到6mL含有标题抗体-药物偶联物的溶液。

[1205] 特性评价:利用共通操作E,得到下述的特性值。

[1206] 抗体浓度:0.98mg/mL,抗体收量:5.88mg(59%),每一分子抗体的药物平均连接数(n):3.4。

### [1207] 实施例41抗体-药物偶联物(41)



=5.9Hz), 4.36(2H, t, J=5.1Hz), 5.07(1H, s), 6.48—6.53(1H, m), 7.38(2H, dt, J=9.9, 2.7Hz), 8.27(2H, dt, J=9.9, 2.7Hz).

[1215] 工序3:2—({[(叔丁氧基羰基)氨基]乙酰}氨基)乙基[(1S,9S)—9—乙基—5—氟—9—羟基—4—甲基—10,13—二氧代—2,3,9,10,13,15—六氢—1H,12H—苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2—b]喹啉—1—基]氨基甲酸酯

[1216] 向依沙替康的甲磺酸盐(0.70g, 1.2mmol)、上述工序2中得到的化合物(0.57g, 1.5mmol)、1—羟基苯并三唑(3.7g, 24mmol)中, 添加二甲基甲酰胺(23mL), 添加二异丙基乙基胺(0.43mL, 2.5mmol), 在室温下搅拌12小时。减压馏去溶剂, 向残留物中添加甲苯并使其共沸, 用硅胶柱色谱法[氯仿~氯仿: 甲醇=10:1(v/v)]纯化得到的残留物, 以淡黄色固体形式得到标题化合物(0.86g, 定量)。

[1217]  $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 0.87(3H, t, J=7.4Hz), 1.35(9H, s), 1.78—1.94(1H, m), 2.07—2.17(1H, m), 2.17—2.27(1H, m), 2.37(3H, s), 3.05—3.16(1H, m), 3.19—3.26(1H, m), 3.34—3.39(2H, m), 3.50—3.56(2H, m), 4.00—4.07(1H, m), 4.13—4.21(1H, m), 5.15—5.34(3H, m), 5.44(2H, s), 6.54(1H, s), 6.90—6.96(1H, m), 7.32(1H, s), 7.78(1H, d, J=11.0Hz), 7.93—8.07(2H, m).

[1218] 工序4:2—(甘氨酰氨基)乙基[(1S,9S)—9—乙基—5—氟—9—羟基—4—甲基—10,13—二氧代—2,3,9,10,13,15—六氢—1H,12H—苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2—b]喹啉—1—基]氨基甲酸酯

[1219] 将上述工序3中得到的化合物(0.86g, 2.1mmol)溶解于二氯甲烷(15mL)。添加三氟乙酸(15mL), 搅拌1小时。减压馏去溶剂, 向残留物中添加甲苯并使其共沸, 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]纯化得到的残留物, 以淡黄色固体形式得到标题化合物(0.86g, 99%)。

[1220]  $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 0.87(3H, t, J=7.2Hz), 1.79—1.95(2H, m), 2.06—2.18(1H, m), 2.18—2.29(1H, m), 2.38(3H, s), 3.07—3.17(1H, m), 3.20—3.29(1H, m), 3.36—3.50(2H, m), 3.51—3.62(2H, m), 3.99—4.08(1H, m), 4.22—4.31(1H, m), 5.16—5.35(3H, m), 5.42(1H, d, J=18.8Hz), 5.46(1H, d, J=18.8Hz), 6.56(1H, s), 7.34(1H, s), 7.65(2H, brs), 7.79(1H, d, J=10.6Hz), 7.99—8.06(1H, m), 8.51(1H, t, J=5.5Hz).

[1221] MS(APCI)  $m/z$ : 939(M+H)<sup>+</sup>

[1222] 工序5:N—[(9H—芴—9—基甲氧基)羰基]甘氨酰甘氨酰—L—苯基丙氨酰—N—[2—({[(1S,9S)—9—乙基—5—氟—9—羟基—4—甲基—10,13—二氧代—2,3,9,10,13,15—六氢—1H,12H—苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2—b]喹啉—1—基]氨基甲酰}氧基)乙基]甘氨酰胺

[1223] 将N—[(9H—芴—9—基甲氧基)羰基]甘氨酰甘氨酰—L—苯丙氨酸(日本特开2002—60351号; 0.21g, 0.41mmol)溶解于N,N—二甲基甲酰胺(3mL), 添加N—羟基琥珀酰亚胺(0.052g, 0.45mmol)、及1—乙基—3—(3—二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(0.086g, 0.45mmol), 搅拌1小时。将反应溶液滴加到添加有上述工序4中得到的化合物(0.24g, 0.35mmol)、及三乙胺(0.078mL、0.45mmol)的N,N—二甲基甲酰胺溶液(2mL)中, 在室温下, 搅拌1小时。减压馏去溶剂, 用硅胶柱色谱法[氯仿~氯仿: 甲醇=8:2(v/v)]纯化得到的残留物, 以淡黄色固体形式得到标题化合物(0.24g, 65%)。

[1224]  $^1\text{H-NMR}$  (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 0.86 (3H, t,  $J=7.3\text{Hz}$ ), 1.79-1.90 (2H, m), 2.05-2.27 (2H, m), 2.36 (3H, s), 2.73-2.81 (1H, m), 2.98-3.12 (2H, m), 3.17-3.26 (1H, m), 3.35-3.42 (2H, m), 3.55-3.79 (6H, m), 4.00-4.10 (1H, m), 4.12-4.23 (2H, m), 4.23-4.29 (2H, m), 4.45-4.55 (1H, m), 5.13-5.33 (3H, m), 5.40 (1H, d,  $J=17.2\text{Hz}$ ), 5.44 (1H, d,  $J=17.2\text{Hz}$ ), 6.53 (1H, s), 7.11-7.26 (5H, m), 7.26-7.33 (3H, m), 7.38 (2H, t,  $J=7.6\text{Hz}$ ), 7.57 (1H, t,  $J=5.9\text{Hz}$ ), 7.68 (2H, d,  $J=7.4\text{Hz}$ ), 7.77 (1H, d,  $J=11.0\text{Hz}$ ), 7.85 (2H, d,  $J=9.0\text{Hz}$ ), 7.91-7.97 (1H, m), 7.98-8.05 (2H, m), 8.14 (1H, d,  $J=7.8\text{Hz}$ ), 8.31-8.26 (1H, m).

[1225] MS (APCI) m/z: 1063 (M+H)<sup>+</sup>

[1226] 工序6: 甘氨酰甘氨酰-L-苯基丙氨酰-N-[2-({[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基]氨基甲酰}氨基)乙基]甘氨酰胺

[1227] 与实施例26工序7同样地使上述工序5中得到的化合物 (0.24g, 0.35mmol) 反应, 以淡黄色固体形式得到标题化合物 (0.12g, 65%)。

[1228]  $^1\text{H-NMR}$  (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 0.86 (3H, t,  $J=7.4\text{Hz}$ ), 1.78-1.94 (2H, m), 2.06-2.27 (2H, m), 2.37 (3H, s), 2.72-2.81 (1H, m), 2.98-3.07 (1H, m), 3.12-3.17 (2H, m), 3.57-3.81 (6H, m), 4.00-4.21 (3H, m), 4.45-4.54 (1H, m), 5.15-5.35 (3H, m), 5.41 (1H, d,  $J=17.2\text{Hz}$ ), 5.45 (1H, d,  $J=17.2\text{Hz}$ ), 6.54 (1H, s), 7.11-7.26 (6H, m), 7.32 (1H, s), 7.78 (1H, d,  $J=11.0\text{Hz}$ ), 7.93-8.00 (1H, m), 8.03 (1H, d,  $J=9.4\text{Hz}$ ), 8.06-8.13 (1H, m), 8.21-8.27 (2H, m), 8.30-8.36 (1H, m).

[1229] MS (APCI) m/z: 841 (M+H)<sup>+</sup>

[1230] 工序7:N-[6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰基]甘氨酰甘氨酰-L-苯基丙氨酰-N-[2-({[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基]氨基甲酰}氨基)乙基]甘氨酰胺

[1231] 与实施例2工序3同样地使上述工序6中得到的化合物 (42.0mg, 0.0499mmol) 反应, 以淡黄色固体形式得到标题化合物 (38.3mg, 74%)。

[1232]  $^1\text{H-NMR}$  (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 0.87 (3H, t,  $J=7.4\text{Hz}$ ), 1.12-1.23 (2H, m), 1.40-1.51 (4H, m), 1.80-1.95 (2H, m), 2.05-2.27 (4H, m), 2.38 (3H, s), 3.43-2.40 (8H, m), 3.53-3.78 (6H, m), 4.00-4.21 (2H, m), 4.44-4.55 (1H, m), 5.17-5.36 (3H, m), 5.43 (2H, s), 6.54 (1H, s), 6.99 (2H, s), 7.19 (5H, d,  $J=23.9\text{Hz}$ ), 7.33 (1H, s), 7.78 (1H, d,  $J=10.6\text{Hz}$ ), 7.91-8.16 (5H, m), 8.24-8.31 (1H, m).

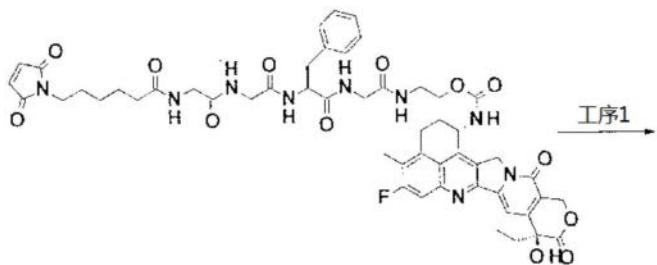
[1233] MS (ESI) m/z: 1034 (M+H)<sup>+</sup>

[1234] 工序8:抗体-药物偶联物 (41)

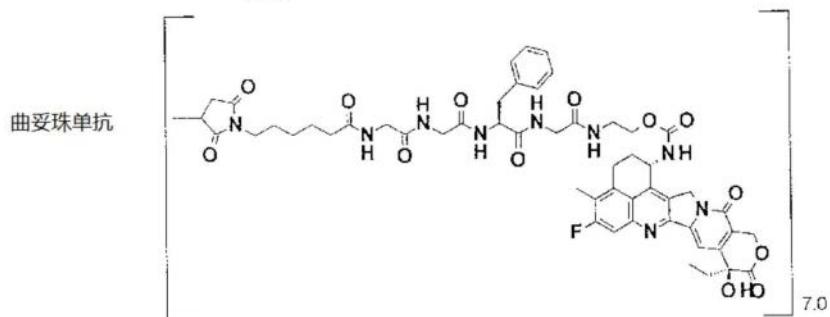
[1235] 使用参考例1中制作的曲妥珠单抗及上述工序7中得到的化合物, 利用与实施例6工序2同样的方法, 得到标题抗体-药物偶联物。

[1236] 抗体浓度: 1.54mg/mL, 抗体收量: 9.2mg (74%), 每一分子抗体的药物平均连接数 (n): 3.7。

[1237] 实施例42抗体-药物偶联物 (42)



[1238]

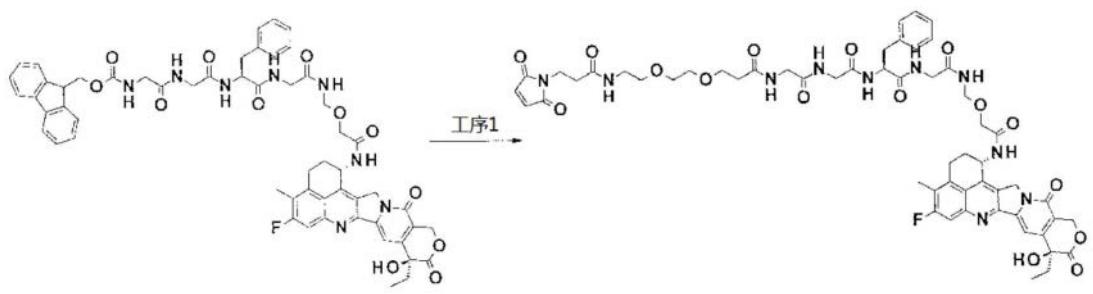


[1239] 工序1:抗体—药物偶联物(42)

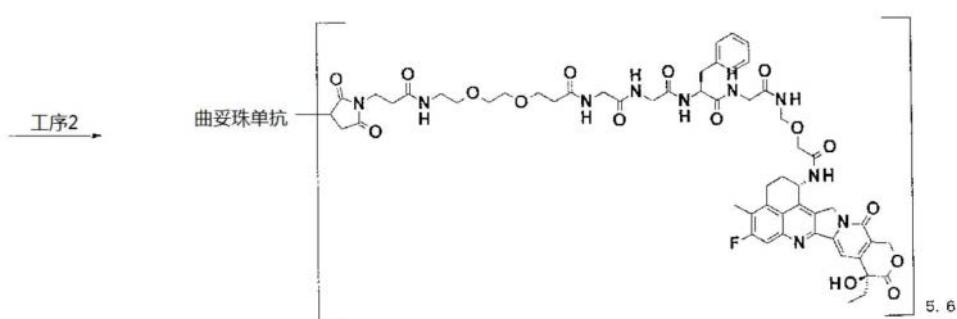
[1240] 使用参考例1中制作的曲妥珠单抗及实施例41工序7中得到的化合物,利用与实施例7工序1同样的方法,得到标题抗体—药物偶联物。

[1241] 抗体浓度:1.47mg/mL,抗体收量:8.8mg(71%),每一分子抗体的药物平均连接数(n):7.0。

[1242] 实施例43抗体—药物偶联物(43)



[1243]



[1244] 工序1:N—{3—[2—(2—{[3—(2,5—二氧代—2,5—二氢—1H—吡咯1—基)丙酰基}氨基)乙氧基]乙氧基]丙酰基}甘氨酰甘氨酰—L—苯基丙氨酰—N—[(2—{[(1S,9S)—9—乙基—5—氟—9—羟基—4—甲基—10,13—二氧代—2,3,9,10,13,15—六氢—1H,12H—苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2—b]喹啉—1—基]氨基}—2—氧代乙氧基)甲基]甘氨酰胺

[1245] 将实施例26工序6中得到的化合物(53.7mg,50.5μmoL)溶解于N,N—二甲基甲酰胺(1.50mL),添加1,8—二氮杂双环(5.4.0)—7—十一碳烯(7.5μL,50.5μmoL),在室温下,搅

拌30分钟。向反应溶液中添加对甲苯磺酸毗啶鎓(14.0mg,5.56 $\mu$ moL),然后添加3-(2-(2-(3-马来酰亚胺丙酰胺)乙氧基)乙氧基)丙酸N-琥珀酰亚胺基酯(32.3mg,75.8 $\mu$ moL),在室温下搅拌2.25小时。减压馏去溶剂,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]纯化得到的残留物,以淡黄色固体形式得到标题化合物(27.1mg,47%)。

[1246]  $^1$ H-NMR (DMSO-d6)  $\delta$ : 0.87 (3H, t,  $J$ =7.0Hz), 1.79-1.91 (2H, m), 2.18 (2H, t,  $J$ =15.1Hz), 2.29-2.33 (4H, m), 2.39 (3H, s), 2.76 (1H, dd,  $J$ =13.9, 9.2Hz), 3.02 (1H, dd,  $J$ =13.7, 3.9Hz), 3.13-3.15 (2H, m), 3.44-3.46 (6H, m), 3.57-3.59 (6H, m), 3.69-3.75 (6H, m), 4.01 (2H, s), 4.46-4.48 (1H, m), 4.63 (2H, d,  $J$ =6.3Hz), 5.21 (2H, s), 5.42 (2H, s), 5.60 (1H, dd,  $J$ =13.5, 5.7Hz), 6.54 (1H, s), 7.00 (2H, s), 7.17-7.24 (6H, m), 7.31 (1H, s), 7.79 (1H, d,  $J$ =11.0Hz), 8.00-8.02 (2H, m), 8.13 (1H, d,  $J$ =7.8Hz), 8.17 (1H, t,  $J$ =6.3Hz), 8.52 (1H, d,  $J$ =9.0Hz), 8.65 (1H, t,  $J$ =6.5Hz) .

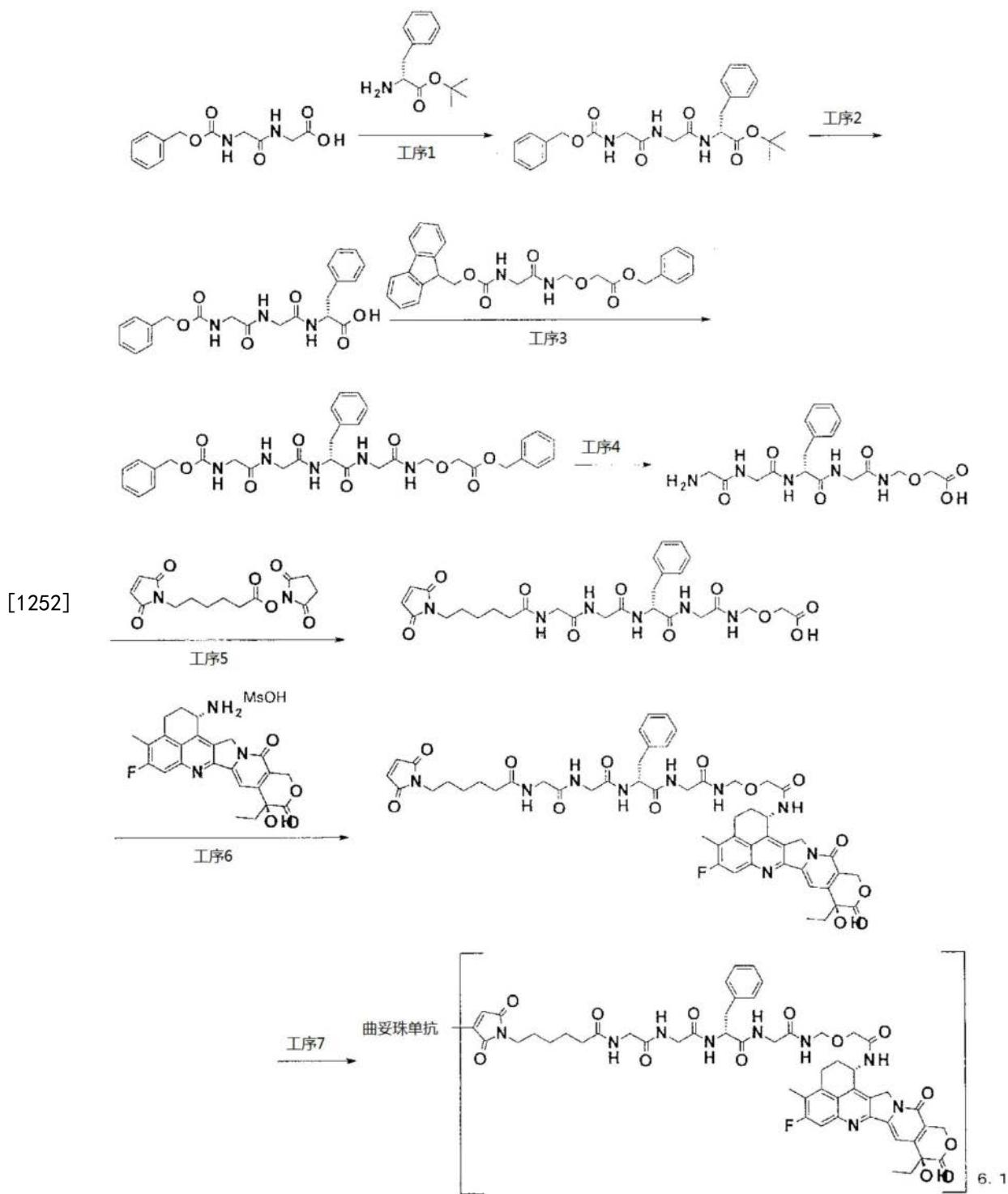
[1247] MS (ESI) m/z=1151 (M+H)<sup>+</sup>

[1248] 工序2:抗体-药物偶联物(43)

[1249] 使用参考例1中制作的曲妥珠单抗及上述工序1中得到的化合物,利用与实施例7工序1同样的方法,得到标题抗体-药物偶联物。

[1250] 抗体浓度:1.96mg/mL,抗体收量:17.6mg (88%),每一分子抗体的药物平均连接数(n):5.6。

[1251] 实施例44抗体-药物偶联物(44)



[1253] 工序1: N-[(苄基氨基)羰基]甘氨酰甘氨酰-D-苯丙氨酸叔丁酯

[1254] 将N-[(苄基氨基)羰基]甘氨酰甘氨酸(3.00g, 11.3mmol)溶解于N,N-二甲基甲酰胺(20.0mL), 添加N-羟基琥珀酰亚胺(1.43g, 12.4mmol)、及1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(2.37g, 12.4mmol), 搅拌1小时。向该反应溶液中滴加添加有D-苯丙氨酸叔丁基(2.74g, 12.38mmol)及三乙胺(1.73mL, 12.4mmol)的N,N-二甲基甲酰胺溶液(10mL), 在室温下搅拌2小时。向反应液中添加二氯甲烷, 用水、1当量盐酸及饱和碳酸氢钠水溶液洗涤后, 用无水硫酸钠干燥有机层。在减压下馏去溶剂, 然后, 用硅胶柱色谱法[氯仿~氯仿: 甲醇=9:1 (v/v)]纯化得到的残留物, 以无色固体形式得到标题化合物(4.21g,

80% ) 。

[1255]  $^1\text{H-NMR} (\text{CDCl}_3) \delta: 1.41 (9\text{H}, \text{s}), 3.03-3.14 (2\text{H}, \text{m}), 3.86-3.97 (4\text{H}, \text{m}), 4.70-4.77 (1\text{H}, \text{m}), 5.13 (2\text{H}, \text{s}), 5.43 (1\text{H}, \text{brs}), 6.42 (1\text{H}, \text{d}, J=10.0\text{Hz}), 6.64-6.71 (1\text{H}, \text{m}), 7.11-7.15 (2\text{H}, \text{m}), 7.20-7.31 (4\text{H}, \text{m}), 7.31-7.38 (4\text{H}, \text{m})$  .

[1256]  $\text{MS} (\text{APCI}) \text{m/z:} 470 (\text{M}+\text{H})^+$

[1257] 工序2:N-[ (苄基氨基) 羰基] 甘氨酰甘氨酰-D-苯丙氨酸

[1258] 将工序1中得到的化合物(4.21g, 8.97mmol)溶解于乙酸乙酯(20mL), 添加4当量盐酸的乙酸乙酯溶液(20.0mL), 在室温下, 放置一夜。在减压下馏去溶剂, 然后, 添加甲苯, 在减压下馏去溶剂。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]纯化得到的残留物, 以无色固体形式得到标题化合物(1.66g, 45%)。

[1259]  $^1\text{H-NMR} (\text{CDCl}_3) \delta: 2.92-3.01 (1\text{H}, \text{m}), 3.10-3.18 (1\text{H}, \text{m}), 3.65-3.81 (3\text{H}, \text{m}), 3.88-3.98 (1\text{H}, \text{m}), 4.64-4.73 (1\text{H}, \text{m}), 5.06 (2\text{H}, \text{s}), 5.87 (1\text{H}, \text{brs}), 7.10-7.37 (13\text{H}, \text{m})$  .

[1260]  $\text{MS} (\text{APCI}) \text{m/z:} 412 (\text{M}+\text{H})^-$

[1261] 工序3:N-[ (苄基氨基) 羰基] 甘氨酰甘氨酰-D-苯基丙氨酸-N-{[2-(苄基氨基)-2-氧代乙氧基] 甲基} 甘氨酰胺

[1262] 向实施例32工序1中得到的化合物(1.25g, 2.63mmol)的二氧杂环己烷(25.0mL)溶液中, 添加哌啶(5.00mL)、N,N-二甲基甲酰胺(5.00mL), 在室温下, 搅拌30分钟。在减压下馏去溶剂, 将得到的残留物溶解于N,N-二甲基甲酰胺(20.0mL)。添加上述工序2的化合物(1.20g, 2.90mmol)、及16.4%含水的4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基吗啉鎓氯化物(1.03g, 3.16mmol), 在室温下搅拌2小时。向反应液中添加氯仿, 用水洗涤后, 用无水硫酸钠干燥有机层。在减压下馏去溶剂, 然后, 用硅胶柱色谱法[氯仿~氯仿: 甲醇=9:1(v/v)]纯化得到的残留物, 以无色固体形式得到标题化合物(270mg, 16%)。

[1263]  $^1\text{H-NMR} (\text{DMSO}-\text{d}_6) \delta: 2.78 (1\text{H}, \text{dd}, J=13.6, 10.0\text{Hz}), 3.05 (1\text{H}, \text{dd}, J=13.9, 4.2\text{Hz}), 3.56-3.79 (6\text{H}, \text{m}), 4.15 (2\text{H}, \text{s}), 4.47-4.54 (1\text{H}, \text{m}), 4.63 (2\text{H}, \text{d}, J=6.7\text{Hz}), 5.03 (2\text{H}, \text{s}), 5.15 (2\text{H}, \text{s}), 7.14-7.39 (15\text{H}, \text{m}), 7.50 (1\text{H}, \text{t}, J=5.7\text{Hz}), 8.02 (1\text{H}, \text{t}, J=5.4\text{Hz}), 8.16 (1\text{H}, \text{d}, J=7.9\text{Hz}), 8.34 (1\text{H}, \text{t}, J=6.0\text{Hz}), 8.60 (1\text{H}, \text{t}, J=7.0\text{Hz})$  .

[1264]  $\text{MS} (\text{APCI}) \text{m/z:} 648 (\text{M}+\text{H})^+$

[1265] 工序4: 甘氨酰甘氨酰-D-苯基丙氨酸-N-[ (羧基甲氨基) 甲基] 甘氨酰胺

[1266] 将上述工序3中得到的化合物(200mg, 0.31mmol)溶解于N,N-二甲基甲酰胺(5.0mL), 添加5%钯碳催化剂(0.12g), 在氢气气氛下, 在室温下搅拌9小时。对反应液进行硅藻土过滤, 用水和N,N-二甲基甲酰胺的混合溶剂洗涤残留物。将滤液与洗液合并, 在减压下馏去, 以无色固体形式得到标题化合物(0.15g, 定量)。

[1267]  $^1\text{H-NMR} (\text{DMSO}-\text{d}_6) \delta: 2.85 (1\text{H}, \text{dd}, J=13.3, 9.7\text{Hz}), 3.08 (1\text{H}, \text{dd}, J=13.9, 5.4\text{Hz}), 3.43-3.52 (4\text{H}, \text{m}), 3.62-3.89 (7\text{H}, \text{m}), 4.36-4.44 (1\text{H}, \text{m}), 4.58-4.67 (2\text{H}, \text{m}), 7.12-7.29 (5\text{H}, \text{m}), 8.44 (1\text{H}, \text{t}, J=5.7\text{Hz}), 8.67 (1\text{H}, \text{d}, J=7.3\text{Hz}), 8.78 (1\text{H}, \text{t}, J=5.4\text{Hz}), 8.91 (1\text{H}, \text{brs})$  .

[1268]  $\text{MS} (\text{APCI}) \text{m/z:} 424 (\text{M}+\text{H})^+$

[1269] 工序5:N-[6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基) 己酰基] 甘氨酰甘氨酰-D-苯基丙氨酸-N-[ (羧基甲氨基) 甲基] 甘氨酰胺

[1270] 将上述工序4中得到的化合物(0.15g, 0.35mmol)溶解于N,N-二甲基甲酰胺(10mL), 添加6-马来酰亚胺己酸N-琥珀酰亚胺基酯(0.11g, 0.35mmol), 在室温下, 搅拌1小时。向反应液中添加氯仿, 用水洗涤后, 用无水硫酸钠干燥有机层。在减压下馏去溶剂, 然后, 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]纯化得到的残留物, 以无色固体形式得到标题化合物(41mg, 26%)。

[1271]  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 1.13-1.24 (2H, m), 1.42-1.53 (4H, m), 2.12 (2H, t,  $J$ =7.3Hz), 2.82 (1H, dd,  $J$ =13.9, 10.0Hz), 3.09 (1H, dd,  $J$ =13.9, 4.8Hz), 3.17 (2H, d,  $J$ =4.2Hz), 3.47-3.89 (8H, m), 4.08-4.14 (1H, m), 4.41-4.49 (1H, m), 4.58-4.69 (2H, m), 7.00 (2H, s), 7.14-7.27 (5H, m), 8.31 (1H, t,  $J$ =6.0Hz), 8.39 (1H, brs), 8.55 (2H, brs), 8.93 (1H, brs)。

[1272] MS (APCI) m/z: 615 (M-H)<sup>-</sup>

[1273] 工序6:N-[6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰基]甘氨酰甘氨酰-D-苯基丙氨酰-N-[(2-{{[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基]氨基}-2-氧代乙氧基)甲基]甘氨酰胺

[1274] 于0℃, 向依沙替康的甲磺酸盐(22mg, 0.388mmol)的N,N-二甲基甲酰胺(10mL)溶液中, 添加三乙胺(5.42 $\mu$ L, 0.388mmol)、上述工序5中得到的化合物(29mg, 0.466mmol)、及16.4%含水的4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基吗啉鎓氯化物(19mg, 0.686mmol), 在室温下, 搅拌1小时。在减压下馏去反应液, 然后, 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]纯化得到的残留物, 以淡黄色固体形式得到标题化合物(26mg, 65%)。

[1275]  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 0.87 (3H, t,  $J$ =7.3Hz), 1.12-1.22 (2H, m), 1.40-1.51 (4H, m), 1.79-1.92 (2H, m), 2.09 (2H, t,  $J$ =7.6Hz), 2.13-2.23 (2H, m), 2.39 (3H, s), 2.78 (1H, dd,  $J$ =13.6, 9.4Hz), 2.98-3.05 (1H, m), 3.13-3.23 (2H, m), 3.54-3.78 (8H, m), 4.02 (2H, s), 4.41-4.50 (1H, m), 4.61-4.66 (2H, m), 5.21 (2H, s), 5.42 (2H, s), 5.56-5.64 (1H, m), 6.53 (1H, s), 6.99 (2H, s), 7.14-7.27 (5H, m), 7.31 (1H, s), 7.79 (1H, d,  $J$ =10.9Hz), 8.01 (1H, t,  $J$ =5.4Hz), 8.07 (1H, t,  $J$ =5.7Hz), 8.14 (1H, d,  $J$ =7.9Hz), 8.31 (1H, t,  $J$ =5.7Hz), 8.53 (1H, d,  $J$ =9.1Hz), 8.63 (1H, t,  $J$ =6.3Hz)。

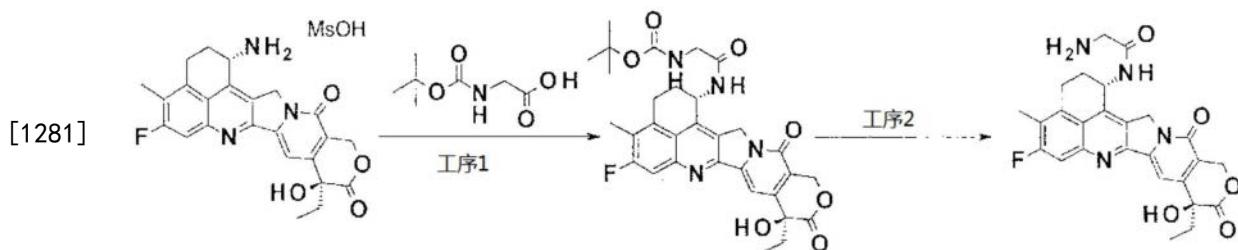
[1276] MS (APCI) m/z: 1034 (M+H)<sup>+</sup>

[1277] 工序7: 抗体-药物偶联物(44)

[1278] 使用参考例1中制作的曲妥珠单抗及上述工序6中得到的化合物, 利用与实施例7工序1同样的方法, 得到标题抗体-药物偶联物。

[1279] 抗体浓度: 1.87mg/mL, 抗体收量: 16.8mg (84%), 每一分子抗体的药物平均连接数(n): 6.1。

[1280] 实施例45中间体(45)



[1282] 工序1: (2- {[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧化代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基]氨基}-2-氧代乙基)氨基甲酸叔丁酯

[1283] 向N-(叔丁氧基羰基)-甘氨酸(0.395g, 2.26mmol)的二氯甲烷(3.00mL)溶液中, 添加N-羟基琥珀酰亚胺(0.260g, 2.26mmol)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(0.433mg, 2.26mmol), 在室温下, 搅拌1小时。将该溶液添加到包含依沙替康的甲磺酸盐(1.00g, 1.88mmol)、三乙胺(0.315mL, 2.26mmol)、及N,N-二甲基甲酰胺(3.00mL)的溶液中, 在室温下搅拌16.5小时。用氯仿稀释反应溶液, 用10%柠檬酸溶液洗涤后, 用无水硫酸钠干燥有机层。减压馏去溶剂, 用硅胶柱色谱法[氯仿~氯仿:甲醇=9:1(v/v)]纯化得到的残留物, 以黄色固体形式得到标题化合物(1.16g, 99%)。

[1284]  $^1\text{H-NMR}$  (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 0.86 (3H, t,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 1.30 (9H, s), 1.81-1.89 (2H, m), 2.09-2.21 (2H, m), 2.38 (3H, s), 3.15-3.17 (2H, m), 3.55-3.56 (2H, m), 5.15 (1H, d,  $J=18.8\text{Hz}$ ), 5.23 (1H, d,  $J=19.2\text{Hz}$ ), 5.41 (2H, s), 5.55-5.56 (1H, m), 6.53 (1H, s), 6.95 (1H, t,  $J=5.5\text{Hz}$ ), 7.28 (1H, s), 7.77 (1H, d,  $J=11.0\text{Hz}$ ), 8.39 (1H, d,  $J=8.6\text{Hz}$ ) .

[1285] MS (APCI)  $m/z$ : 593 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>

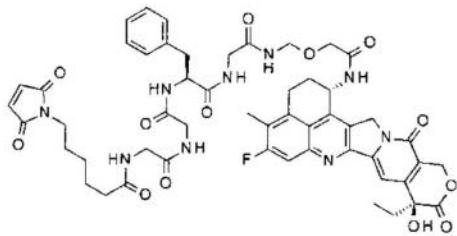
[1286] 工序2:N-[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧化代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基]甘氨酰胺

[1287] 与实施例1工序2同样地使上述工序1中得到的化合物(0.513g, 1.01mmol)反应, 以黄色固体形式得到标题化合物(0.463g, 93%)。

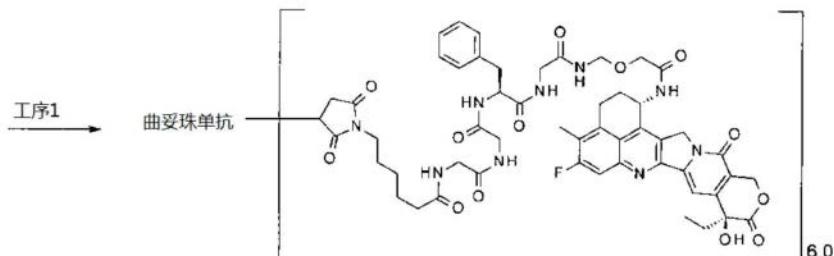
[1288]  $^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 0.96 (3H, t,  $J=7.0\text{Hz}$ ), 1.89-1.91 (2H, m), 2.14-2.16 (1H, m), 2.30 (3H, s), 2.40-2.42 (1H, m), 3.15-3.21 (2H, m), 3.79-3.86 (2H, m), 4.63-4.67 (1H, m), 5.00-5.05 (1H, m), 5.23 (1H, d,  $J=16.0\text{Hz}$ ), 5.48 (1H, d,  $J=16.0\text{Hz}$ ), 5.62-5.64 (1H, m), 7.40-7.45 (2H, m) .

[1289] MS (APCI)  $m/z$ : 493 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>

[1290] 实施例46抗体-药物偶联物(46)



[1291]



[1292] 工序1:抗体—药物偶联物(46)

[1293] 抗体的还原:针对参考例1中制作的曲妥珠单抗,利用共通操作C—1及B(作为280nm吸光系数,使用 $1.48\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ),将介质替换为PBS6.0/EDTA,制备成10mg/mL的抗体浓度。将本溶液(50mL)放入到聚碳酸酯制的125mL锥形瓶容器中,在磁力搅拌器搅拌下,在室温下,添加1M磷酸氢二钾水溶液(0.750mL),然后,添加10mM TCEP水溶液(1.857mL;相对于一分子抗体为5.4当量)。确认了本溶液的pH在 $7.0 \pm 0.1$ 内后,停止搅拌,在37℃下孵育1小时,由此,将抗体内铰链部的二硫键还原。

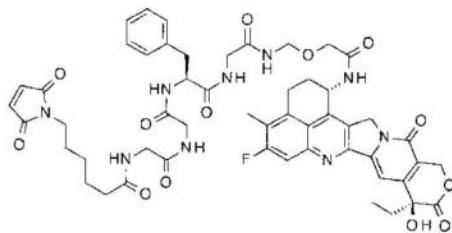
[1294] 抗体与药物接头的偶联:将上述溶液冷却至15℃后,在搅拌下,缓缓滴加含有10mM实施例26工序8的化合物的DMSO溶液(2.958mL;相对于一分子抗体为8.6当量)。于15℃,在开始的30分钟进行搅拌,在接下来的1小时,停止搅拌,进行孵育,将药物接头与抗体连接。接下来,在搅拌下,添加100mM NAC水溶液(0.444mL;相对于一分子抗体为12.9当量),进而室温下搅拌20分钟,使未反应的药物接头的反应性终止。

[1295] 纯化:在搅拌下,向上述溶液中缓缓添加20%乙酸水溶液(约0.25mL)和ABS(50mL),使本溶液的pH成为 $5.5 \pm 0.1$ 。对该溶液进行微孔过滤(Millipore Co.Millex—HV滤器、0.45μm、PVDF膜),除去白浊物。针对该溶液,使用由超滤膜(Merck公司,Pellicon XL Cassette,Biomax 50KDa)、管泵(Cole-Parmer International MasterFlex Pump model 77521—40,泵头model 7518—00)及试管(Cole-Parmer International MasterFlex Tube L/S16)构成的超滤装置,进行超滤纯化。即,一边向反应液中滴加作为纯化缓冲液的ABS(计800mL)、一边进行超滤纯化,由此,在将未连接的药物接头及其他低分子量试剂除去的同时,将缓冲液置换成ABS,进而进行至浓缩。针对得到的纯化溶液,进行微孔过滤(0.22μm(Millipore Co.Millex—GV滤器、PVDF膜)及0.10μm(Millipore Co.Millex—VV滤器、PVDF膜)),得到42.5mL含有标题抗体—药物偶联物的溶液。

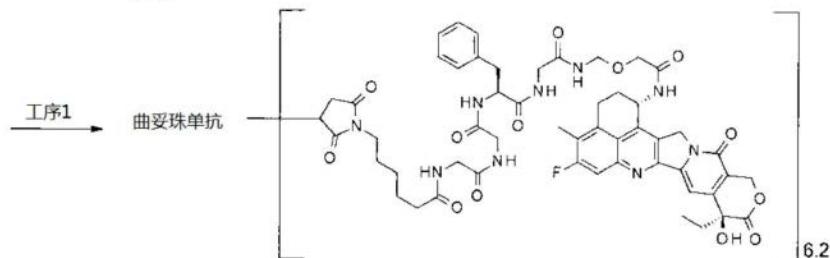
[1296] 特性评价:利用共通操作E及F(使用 $\epsilon_D, 280 = 5178$ (实测值)、 $\epsilon_D, 370 = 20217$ (实测值)),得到下述的特性值。

[1297] 抗体浓度:10.4mg/mL,抗体收量:442mg(88.5%),利用共通操作E测得的每一分子抗体的药物平均连接数(n):6.0;利用共通操作F测得的每一分子抗体的药物平均连接数(n):7.5。

[1298] 实施例47抗体—药物偶联物(47)



[1299]



[1300] 工序1:抗体—药物偶联物(47)

[1301] 抗体的还原:针对参考例1中制作的曲妥珠单抗,利用共通操作C—1及B(作为280nm吸光系数,使用 $1.48\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ),将介质替换为PBS6.0/EDTA,制备成10mg/mL的抗体浓度。将本溶液(15mL)放入到聚丙烯制试管中,向其中添加10mM TCEP水溶液(0.567mL;相对于一分子抗体为5.5当量)及1M磷酸氢二钾水溶液(0.225mL)。确认了本溶液的pH在7.0±0.1内后,于37℃孵育2小时,将抗体内铰链部的二硫键还原。

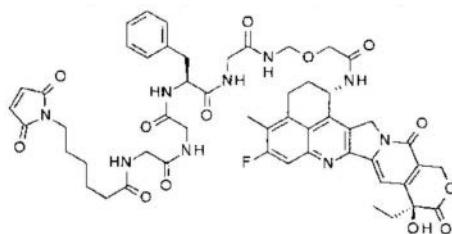
[1302] 抗体与药物接头的偶联:在室温下,向上述溶液中添加DMSO(0.146mL)和含有10mM实施例26工序8的化合物的DMSO溶液(0.928mL;相对于一分子抗体为9.0当量),于15℃孵育30分钟,将药物接头与抗体连接。接下来,添加100mM NAC水溶液(0.133mL;相对于一分子抗体为12.9当量),进而在室温下搅拌20分钟,使未反应的药物接头的反应性终止。

[1303] 纯化:针对上述溶液,进行利用了共通操作D(作为缓冲液,使用ABS)的纯化,得到49mL含有目标化合物的溶液。

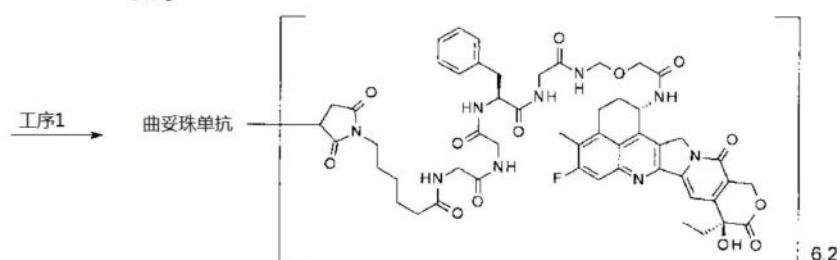
[1304] 特性评价:利用共通操作E(使用 $\epsilon_{D,280}=5178$ 、 $\epsilon_{D,370}=20217$ ),得到下述的特性值。

[1305] 抗体浓度:2.91mg/mL,抗体收量:143mg(95%),每一分子抗体的药物平均连接数(n):6.2

[1306] 实施例48抗体—药物偶联物(48)



[1307]



[1308] 工序1:抗体—药物偶联物(48)

[1309] 抗体的还原:针对参考例1中制作的曲妥珠单抗,利用共通操作C-1及B(作为280nm吸光系数,使用 $1.48\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ),将介质替换为PBS6.0/EDTA,制备成10mg/mL的抗体浓度。将本溶液(280mL)放入到聚碳酸酯制的1000mL锥形瓶容器中,在磁力搅拌器搅拌下,在室温下,添加1M磷酸氢二钾水溶液(4.200mL),然后,添加10mM TCEP水溶液(10.594mL;相对于一分子抗体为5.5当量)。确认了本溶液的pH在 $7.0\pm0.1$ 内后,停止搅拌,于37℃孵育2小时,由此,将抗体内的铰链部的二硫键还原。

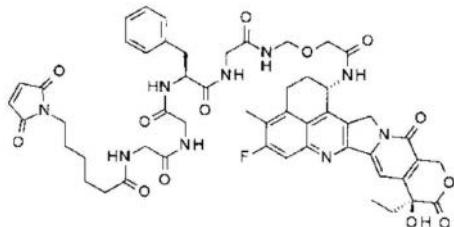
[1310] 抗体与药物接头的偶联:将上述溶液冷却至15℃后,在搅拌下,缓缓滴加含有10mM实施例26工序8的化合物的DMSO溶液(17.335mL;相对于一分子抗体为9.0当量)。于15℃,搅拌30分钟,将药物接头与抗体连接。接下来,在搅拌下,添加100mM NAC水溶液(2.485mL;相对于一分子抗体为12.9当量),进而在室温下搅拌20分钟,使未反应的药物接头的反应性终止。

[1311] 纯化:在搅拌下,向上述溶液中缓缓添加20%乙酸水溶液(约1.4mL)和ABS(280mL),使本溶液的pH成为 $5.5\pm0.1$ 。对该溶液进行微孔过滤(0.45μm、PVDF膜),除去白浊物,得到约600mL滤液。针对该溶液,使用由超滤膜(Merck公司,Pellicon XL Cassette,Biomax 50KDa)、管泵(Cole-Parmer International MasterFlex Pump model 77521-40,泵头model 7518-00)及试管(Cole-Parmer International MasterFlex Tube L/S16)构成的超滤装置,进行超滤纯化。即,一边向反应液中滴加作为纯化缓冲液的ABS(计4800mL),一边进行超滤纯化,由此,在将未连接的药物接头及其他低分子量试剂除去的同时,将缓冲液置换成ABS,进而进行至浓缩。针对得到的纯化溶液,进行微孔过滤(0.22μm及0.10μm的2次、PVDF膜),得到70mL含有标题抗体-药物偶联物的溶液。

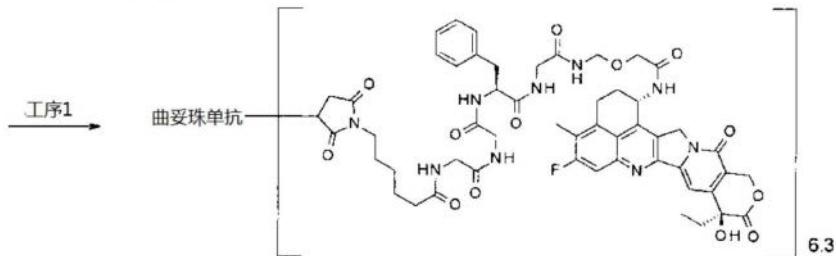
[1312] 特性评价:利用共通操作E(使用 $\epsilon_{D,280}=5178$ 、 $\epsilon_{D,370}=20217$ ),得到下述的特性值。

[1313] 抗体浓度:35.96mg/mL,抗体收量:2517mg(90%),每一分子抗体的药物平均连接数(n):6.2

[1314] 实施例49抗体-药物偶联物(49)



[1315]



[1316] 工序1:抗体-药物偶联物(49)

[1317] 抗体的还原:针对参考例1中制作的曲妥珠单抗,利用共通操作C-1及B(作为280nm吸光系数,使用 $1.48\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ),将介质替换为PBS6.0/EDTA,制备成10mg/mL的抗体浓度。将本溶液(280mL)放入到聚碳酸酯制的1000mL锥形瓶容器中,在磁力搅拌器搅拌下,

在室温下,添加1M磷酸氢二钾水溶液(4.200mL),然后,添加10mM TCEP水溶液(10.594mL;相对于一分子抗体为5.5当量)。确认了本溶液的pH在7.0±0.1内后,停止搅拌,于37℃孵育2小时,由此,将抗体内铰链部的二硫键还原。

[1318] 抗体与药物接头的偶联:将上述溶液冷却至15℃后,在搅拌下,缓缓滴加含有10mM实施例26工序8的化合物的DMSO溶液(17.335mL;相对于一分子抗体为9.0当量)。于15℃,缓缓搅拌30分钟,将药物接头与抗体连接。接下来,在搅拌下,添加100mM NAC水溶液(2.485mL;相对于一分子抗体为12.9当量),进而在室温下搅拌20分钟,使未反应的药物接头的反应性终止。

[1319] 纯化:在搅拌下,向上述溶液中缓缓添加20%乙酸水溶液(约1.4mL)和ABS(280mL),使本溶液的pH成为5.5±0.1。对该溶液进行微孔过滤(0.45μm、PVDF膜),除去白浊物,得到约600mL滤液。针对该溶液,使用由超滤膜(Merck公司,Pellicon XL Cassette,Ultracell 30KDa)、管泵(Cole-Parmer International MasterFlex Pump model 77521-40,泵头model 7518-00)及试管(Cole-Parmer International MasterFlex Tube L/S16)构成的超滤装置,进行超滤纯化。即,一边向反应液中滴加作为纯化缓冲液的ABS(计4800mL),一边进行超滤纯化,由此,在将未连接的药物接头及其他低分子量试剂除去的同时,将缓冲液置换成ABS,进而进行至浓缩。针对得到的纯化溶液,进行微孔过滤(0.22μm及0.10μm的2次、PVDF膜),得到130mL含有标题抗体—药物偶联物的溶液。

[1320] 特性评价:利用共通操作E(使用 $\epsilon_{D,280}=5178$ 、 $\epsilon_{D,370}=20217$ ),得到下述的特性值。

[1321] 抗体浓度:21.00mg/mL,抗体收量:2730mg(97.5%),每一分子抗体的药物平均连接数(n):6.3

[1322] 实施例50抗体—药物偶联物(50)

[1323] 工序1:抗体—药物偶联物(50)

[1324] 将实施例47、48及49中制作的抗体—药物偶联物(47)、(48)及(49)混合(243mL),进而添加ABS(39.75mL),得到283mL含有标题抗体—药物偶联物的溶液。

[1325] 特性评价:利用共通操作E及F(使用 $\epsilon_{D,280}=5178$ 、 $\epsilon_{D,370}=20217$ ),得到下述的特性值。

[1326] 抗体浓度:20.0mg/mL,抗体收量:5655mg,利用共通操作E测得的每一分子抗体的药物平均连接数(n):6.3;利用共通操作F测得的每一分子抗体的药物平均连接数(n):7.8。

[1327] 评价例1抗体—药物偶联物的抗细胞效果(1)

[1328] 将作为HER2抗原阳性细胞的人乳腺癌株的KPL-4(川崎医科大学・红林淳一先生,British Journal of Cancer, (1999) 79 (5/6) .707-717)、抗原阴性细胞的MCF7(European Collection of Cell Cultures; ECACC),在含有10%的胎牛血清(MOREGATE)的RPMI1640(GIBCO;以下称为培养基)中培养。在培养基中将KPL-4、MCF7分别制备为 $2.5 \times 10^4$ 个细胞/mL的浓度,以每孔100μL添加到96孔细胞培养用微孔板中,培养一夜。

[1329] 第二天,以每孔10μL将用培养基稀释为1000nM、200nM、40nM、8nM、1.6nM、0.32nM、0.064nM的曲妥珠单抗或抗体—药物偶联物添加到微孔板中。以每孔10μL向未添加抗体的孔中添加培养基。在37℃、5%CO<sub>2</sub>下培养5~7天。培养后,从培养箱中取出微孔板,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)并进行搅拌。在室温下,静置10分钟后,用酶标仪(PerkinElmer)测量发光

量。 $IC_{50}$ 值用下式计算。

$$[1330] IC_{50} (\text{nM}) = \text{antilog}((50-d) \times (\text{LOG}_{10}(b) - \text{LOG}_{10}(a)) \div (d-c) + \text{LOG}_{10}(b))$$

[1331] a:样品a的浓度

[1332] b:样品b的浓度

[1333] c:样品a的活细胞率

[1334] d:样品b的活细胞率

[1335] 各浓度下的细胞生存率利用下式计算。

$$[1336] \text{细胞生存率} (\%) = a \div b \times 100$$

[1337] a:样品孔的发光量的平均值 (n=2)

[1338] b:不添加抗体的孔的发光量的平均值 (n=10)

[1339] 抗体—药物偶联物 (2)、(3)、(5)、(7)、(10)、(12)、(13)、(16)、(18)、(40)、(42) 对 KPL-4 细胞显示  $IC_{50} < 0.1$  (nM) 的抗细胞效果。

[1340] 抗体—药物偶联物 (4)、(6)、(9)、(15)、(17)、(21)、(22)、(25)、(36)、(37)、(39)、(41)、(43) 显示  $0.1 < IC_{50} < 1$  (nM) 的抗细胞效果。

[1341] 抗体—药物偶联物 (20)、(24)、(27) 显示  $1 < IC_{50} < 100$  (nM) 的抗细胞效果。抗体—药物偶联物 (19)、(26) 未显示抗细胞效果 ( $> 100$  (nM))。

[1342] 另一方面,针对MCF7细胞, (5)、(13)、(43) 显示  $1 < IC_{50} < 100$  (nM) 的抗细胞效果,但抗体—药物偶联物 (2)、(3)、(4)、(6)、(7)、(9)、(10)、(12)、(15)、(16)、(17)、(18)、(25)、(26)、(27)、(39)、(40)、(41)、(42)、(44) 未显示抗细胞效果 ( $> 100$  (nM))。

[1343] 另外,曲妥珠单抗对KPL-4细胞、MCF7细胞均显示抗细胞效果 ( $> 100$  (nM))。

[1344] 评价例2抗肿瘤试验 (1)

[1345] 小鼠:将5—6周龄的雌性裸鼠 (Charles River Laboratories Japan, Inc.) 在实验使用前于SPF条件下驯化4—7天。用经灭菌的固态饲料 (FR-2, Funabashi Farms Co., Ltd) 饲喂小鼠,提供经灭菌的自来水 (添加5—15ppm次亚氯酸钠溶液而制备)。

[1346] 测定・计算式:在所有的研究中,用电子数字卡尺 (CD-15CX, Mitutoyo Corp.) 每周测定2次肿瘤的长径及短径,计算肿瘤体积 ( $\text{mm}^3$ )。计算式如下所示。

$$[1347] \text{肿瘤体积} (\text{mm}^3) = 1/2 \times \text{长径} (\text{mm}) \times [\text{短径} (\text{mm})]^2$$

[1348] 抗体—药物偶联物及抗体全部用生理盐水 (株式会社大冢制药工场) 稀释,向尾静脉内给予10mL/kg的液量。

[1349] 将KPL-4细胞悬浮于生理盐水,将 $1.5 \times 10^7$ 个细胞向雌性裸鼠的右体侧部皮下移植 (第0天),在第15天进行随机分组。在第15、22天,全部以10mg/kg的用量向尾静脉内给予抗体—药物偶联物 (27) 或抗HER2抗体曲妥珠单抗 (参考例1),其中给予抗HER2抗体曲妥珠单抗的是对照组。作为对照组,设置了无处置组。

[1350] 结果示于图3。通过给予曲妥珠单抗而抑制了肿瘤的增殖,但给予抗体—药物偶联物 (27) 的组中,肿瘤增殖抑制效果更明显。需要说明的是,图中,横轴表示细胞移植后的天数,纵轴表示肿瘤体积。另外,对于给予了曲妥珠单抗或抗体—药物偶联物 (27) 的小鼠而言,并未观察到体重减少等特别明显的变化,认为抗体—药物偶联物 (27) 具有高安全性。需要说明的是,在以下的关于抗肿瘤试验的评价例中,只要没有特别记载,均是用本评价例中使用的方法实施试验的。

[1351] 评价例3抗肿瘤试验 (2)

[1352] 将从ATCC (American Type Culture Collection) 购入的人胃癌株NCI—N87细胞悬浮于生理盐水, 将 $1 \times 10^7$ 个细胞向雌性裸鼠的右体侧部皮下移植(第0天), 在第7天随机实施分组。在第7天, 全部以10mg/kg的用量向尾静脉内给予抗体—药物偶联物(8)、(28)、或曲妥珠单抗emtansine(参考例2)。作为对照组, 设置了无处置组。

[1353] 结果示于图4。确认了抗体—药物偶联物(8)、(28)具有强抗肿瘤效果, 肿瘤与使用曲妥珠单抗emtansine的情况同等程度地萎缩。另外, 未确认因给予抗体—药物偶联物(8)、(28)、或曲妥珠单抗emtansine而导致的小鼠的体重减少。

[1354] 评价例4抗肿瘤试验 (3)

[1355] 将从DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) 购入的人乳腺癌株JIMT—1细胞悬浮于生理盐水, 将 $3 \times 10^6$ 个细胞向雌性裸鼠的右体侧部皮下移植(第0天), 在第12天随机实施分组。在第12、19天, 全部以10mg/kg的用量向尾静脉内给予抗体—药物偶联物(8)、(29)、(30)、或曲妥珠单抗、曲妥珠单抗emtansine。作为对照组, 设置了生理盐水给予组。

[1356] 结果示于图5。针对JIMT—1肿瘤, 给予曲妥珠单抗、曲妥珠单抗emtansine时并未抑制肿瘤的增殖。另一方面, 通过给予抗体—药物偶联物(8)、(29)、(30), 肿瘤的增殖被显著抑制。另外, 并未确认到因给予抗体—药物偶联物(8)、(29)、(30)、曲妥珠单抗、或曲妥珠单抗emtansine而导致的小鼠的体重减少。

[1357] 评价例5抗体—药物偶联物的抗细胞效果 (2)

[1358] 用含有10%的胎牛血清(MOREGATE)的Eagle's Minimum Essential Medium (GIBCO; 以下称为MEM培养基)培养人非小细胞肺癌株Calu—3 (ATCC)。

[1359] 用含有10%的胎牛血清的RPMI1640Medium (GIBCO; 以下称为RPMI培养基)培养人胃癌株NCI—N87 (ATCC)、人胃癌株MKN—45 (人类科学资源库(Human Science Research Resources Bank))。

[1360] 用含有10%的胎牛血清的Leibovitz's L—15Medium (GIBCO; 以下称为Leibovitz's培养基)培养人乳腺癌株MDA—MB—453 (ATCC)、人乳腺癌株MDA—MB—468 (ATCC)。

[1361] 这5种细胞株中, Calu—3、NCI—N87、MDA—MB—453为HER2阳性细胞, MKN—45及MDA—MB—468为HER2阴性细胞。

[1362] 用MEM培养基或RPMI培养基, 制备Calu—3、NCI—N87、MKN—45, 使得浓度成为 $4 \times 10^4$ 个细胞/mL, 以每孔25 $\mu$ L向已装有65 $\mu$ L的培养基的96孔细胞培养用微孔板的各孔中添加, 在37°C、5%CO<sub>2</sub>下, 培养一夜。另外, 用Leibovitz's培养基制备MDA—MB—453、MDA—MB—468, 使得浓度成为 $4 \times 10^4$ 个细胞/mL, 以每孔25 $\mu$ L向已装有65 $\mu$ L的培养基的96孔细胞培养用微孔板的各孔中添加, 未设定CO<sub>2</sub>浓度, 在37°C下培养一夜。

[1363] 第二天, 用RPMI培养基或Leibovitz's培养基将标本稀释成1000nM、200nM、40nM、8nM、1.6nM、0.32nM、0.064nM, 进而以10 $\mu$ L向上述微孔板的各孔中添加RPMI培养基或Leibovitz's培养基, 在37°C、5%CO<sub>2</sub>下、或37°C、未设定CO<sub>2</sub>浓度的条件下培养6天。

[1364] 在Calu—3、NCI—N87、MDA—MB—468中添加抗体—药物偶联物(46), 在其他细胞中添加抗体—药物偶联物(50)作为标本。培养后, 从培养箱中取出微孔板, 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) ,用板混合器进行搅拌,将细胞完全溶解。在室温下,静置10分钟,然后用酶标仪测量发光量。

[1365] 活细胞率用下式计算。

[1366] 活细胞率(%) = a ÷ b × 100

[1367] a:标本添加孔的发光量的平均值

[1368] b:培养基添加孔的发光量的平均值

[1369] IC<sub>50</sub>值用下式计算。

[1370] IC<sub>50</sub> (nM) = antilog ((50-d) × (LOG<sub>10</sub>(b) - LOG<sub>10</sub>(a)) ÷ (d-c) + LOG<sub>10</sub>(b))

[1371] a:标本浓度a

[1372] b:标本浓度b

[1373] c:标本浓度a中的活细胞率

[1374] d:标本浓度b中的活细胞率

[1375] a、b为将活细胞率50%夹入的2点,且a>b。

[1376] 抗体—药物偶联物(46)对HER2阳性细胞Calu-3、NCI-N87显示IC<sub>50</sub><1 (nM)的抗细胞效果。另一方面,对HER2阴性细胞MDA-MB-468,未显示出抗细胞效果(>100 (nM))。

[1377] 抗体—药物偶联物(50)对HER2阳性细胞MDA-MB-453显示IC<sub>50</sub><1 (nM)的抗细胞效果。另一方面,对HER2阴性细胞MKN-45,未显示出抗细胞效果(>100 (nM))。

[1378] 评价例6抗肿瘤试验(4)

[1379] 将作为HER2低表达的人胰腺癌株Capan-1细胞(ATCC)悬浮于生理盐水,将4×10<sup>7</sup>个细胞向雌性裸鼠的右体侧部皮下移植,制成Capan-1固态肿瘤。然后,通过将该固态肿瘤移植至雌性裸鼠而进行多次继代培养,将其用于本试验。将固态肿瘤的肿瘤片向雌性裸鼠的右体侧部皮下移植(第0天),在第20天随机实施分组。

[1380] 在第20天全部以10mg/kg的用量向尾静脉内给予抗体—药物偶联物(31)、曲妥珠单抗、或曲妥珠单抗emtansine。作为对照组,设置了生理盐水给予组。

[1381] 结果示于图6。对于Capan-1肿瘤,给予曲妥珠单抗、曲妥珠单抗emtansine未抑制肿瘤的增殖。与此相对,通过给予抗体—药物偶联物(31),肿瘤的增殖被显著抑制,确认了抗体—药物偶联物(31)即使是对HER2低表达肿瘤也具有有效性。对于HER2非表达胃癌株GCIY肿瘤,抗体—药物偶联物(31)未显示肿瘤增殖抑制。

[1382] 需要说明的是,关于肿瘤中的HER2的表达,基于利用HER2检查指南第三版(日本病理学会,曲妥珠单抗病理部会制作)中记载的免疫组织化学染色进行测定而得到的结果,将评分为3+的分类为高表达,将评分为2+的分类为中表达,将评分为1+的分类为低表达。另外,将虽然在该测定方法中评分为0、但例如通过基于流式细胞仪的测定方法等其他测定方法得到的结果为阳性的情况分类为低表达。

[1383] 评价例7抗肿瘤试验(5)

[1384] 将从ATCC购入的人胃癌株NCI-N87细胞悬浮于生理盐水,将1×10<sup>7</sup>个细胞向雌性裸鼠的右体侧部皮下移植(第0天),在第6天随机实施分组。在第6天,针对各组,分别以0.3、1、3、10mg/kg的用量向尾静脉内给予抗体—药物偶联物(50)。作为对照组,设置了乙酸缓冲液给予组。

[1385] 结果示于图7。抗体—药物偶联物(50)依赖于给予量而显示出抗肿瘤效果。另外,未发现因给予抗体—药物偶联物(50)而导致的小鼠的体重减少。

[1386] 评价例8抗肿瘤试验(6)

[1387] 本试验利用以下的方法实施。

[1388] 小鼠:将6—12周龄的雌性裸鼠(Charles River Laboratories Japan, Inc.)供于实验。

[1389] 测定、计算式:用电子数字卡尺每周测定2次肿瘤的长径及短径,计算肿瘤体积( $\text{mm}^3$ )。计算式如下所示。

[1390] 肿瘤体积( $\text{mm}^3$ ) = 0.52 × 长径( $\text{mm}$ ) × [短径( $\text{mm}$ )]<sup>2</sup>

[1391] 抗体—药物偶联物、曲妥珠单抗、及曲妥珠单抗emtansine用乙酸缓冲液稀释,向尾静脉内给予10mL/kg的液量。

[1392] 将通过将从乳腺癌患者摘出的肿瘤移植至雌性裸鼠而进行了多次继代培养的肿瘤(ST225;South Texas Accelerated Research Therapeutics (START)公司)用于本试验。该肿瘤为HER2中表达(基于免疫组织化学染色的判定为2+)。

[1393] 将固态肿瘤的肿瘤片向雌性裸鼠的体侧部皮下移植,在肿瘤体积达到100—300 $\text{mm}^3$ 的时间点,随机实施分组。将分组日作为第0天,在第0天,均以10mg/kg的用量向尾静脉内给予抗体—药物偶联物(50)、曲妥珠单抗、或曲妥珠单抗emtansine。作为对照组,设置了乙酸缓冲液给予组。

[1394] 结果示于图8。对于HER2中表达的乳腺癌ST225肿瘤,给予曲妥珠单抗未抑制肿瘤的增殖。与此相对,通过给予曲妥珠单抗emtansine或抗体—药物偶联物(50),肿瘤的增殖被显著抑制。

[1395] 评价例9抗肿瘤试验(7)

[1396] 将通过将从乳腺癌患者摘出的肿瘤移植至雌性裸鼠而进行了多次继代培养的肿瘤(ST910;START公司)用于本试验。该肿瘤为HER2低表达(基于免疫组织化学染色的判定为1+)。

[1397] 将固态肿瘤的肿瘤片向雌性裸鼠的体侧部皮下移植,在肿瘤体积达到100—300 $\text{mm}^3$ 的时间点,随机实施分组。将分组日作为第0天,在第0天,均以10mg/kg的用量向尾静脉内给予抗体—药物偶联物(50)、曲妥珠单抗、或曲妥珠单抗emtansine。作为对照组,设置了乙酸缓冲液给予组。

[1398] 结果示于图9。对于HER2低表达的乳腺癌ST910肿瘤,给予曲妥珠单抗及曲妥珠单抗emtansine未抑制肿瘤的增殖。与此相对,通过给予抗体—药物偶联物(50),肿瘤的增殖被显著抑制,确认了抗体—药物偶联物(50)对HER2低表达乳腺癌肿瘤的有效性。需要说明的是,该评价例9用与评价例8相同的方法实施。

[1399] 评价例10抗肿瘤试验(8)

[1400] 本试验利用以下的方法实施。此外,评价例11~13也利用本方法实施。

[1401] 小鼠:将5—8周龄的雌性裸鼠(Harlan Laboratories公司)供于实验。

[1402] 测定、计算式:用电子数字卡尺每周测定2次肿瘤的长径及短径,计算肿瘤体积( $\text{mm}^3$ )。计算式如下所示。

[1403] 肿瘤体积( $\text{mm}^3$ ) = 0.52 × 长径( $\text{mm}$ ) × [短径( $\text{mm}$ )]<sup>2</sup>

[1404] 抗体—药物偶联物、曲妥珠单抗、及曲妥珠单抗emtansine用乙酸缓冲液稀释,向尾静脉内给予10mL/kg的液量。

[1405] 将通过将从大肠癌患者摘出的肿瘤移植至雌性裸鼠而进行了多次继代培养的肿瘤(CTG—0401;CHAMPIONS ONCOLOGY公司)用于本试验。该肿瘤为HER2低中表达(基于免疫组织化学染色的判定为1+或2+)。

[1406] 将固态肿瘤的肿瘤片向雌性裸鼠的左体侧部皮下移植,在肿瘤体积达到100—300mm<sup>3</sup>的时间点,随机实施分组。将分组日作为第0天,在第0天,均以10mg/kg的用量向尾静脉内给予抗体—药物偶联物(50)、曲妥珠单抗、或曲妥珠单抗emtansine。作为对照组,设置了乙酸缓冲液给予组。

[1407] 结果示于图10。对于HER2低中表达大肠癌CTG—0401肿瘤,给予曲妥珠单抗或曲妥珠单抗emtansine未抑制肿瘤的增殖。与此相对,通过给予抗体—药物偶联物(50),肿瘤的增殖被显著抑制。

[1408] 评价例11抗肿瘤试验(9)

[1409] 将通过将从非小细胞肺癌患者摘出的肿瘤移植至雌性裸鼠而进行了多次继代培养的肿瘤(CTG—0860;CHAMPIONS ONCOLOGY公司)用于本试验。该肿瘤为HER2中表达(基于免疫组织化学染色的判定为2+)。

[1410] 将固态肿瘤的肿瘤片向雌性裸鼠的左体侧部皮下移植,在肿瘤体积达到100—300mm<sup>3</sup>的时间点,随机实施分组。将分组日作为第0天,在第0天,均以10mg/kg的用量向尾静脉内给予抗体—药物偶联物(50)、曲妥珠单抗、或曲妥珠单抗emtansine。作为对照组,设置了乙酸缓冲液给予组。

[1411] 结果示于图11。对于HER2中表达非小细胞肺癌CTG—0860肿瘤,给予曲妥珠单抗或曲妥珠单抗emtansine未抑制肿瘤的增殖。与此相对,通过给予抗体—药物偶联物(50),肿瘤的增殖被显著抑制。

[1412] 评价例12抗肿瘤试验(10)

[1413] 将通过将从胆管癌患者摘出的肿瘤移植至雌性裸鼠而进行了多次继代培养的肿瘤(CTG—0927;CHAMPIONS ONCOLOGY公司)用于本试验。该肿瘤为HER2高表达(基于免疫组织化学染色的判定为3+)。

[1414] 将固态肿瘤的肿瘤片向雌性裸鼠的左体侧部皮下移植,在肿瘤体积达到100—300mm<sup>3</sup>的时间点,随机实施分组。将分组日作为第0天,在第0天,均以10mg/kg的用量向尾静脉内给予抗体—药物偶联物(50)、曲妥珠单抗、或曲妥珠单抗emtansine。作为对照组,设置了乙酸缓冲液给予组。

[1415] 结果示于图12。对于HER2高表达胆管癌CTG—0927肿瘤,给予曲妥珠单抗未抑制肿瘤的增殖。与此相对,通过给予曲妥珠单抗emtansine的给予,肿瘤的增殖被抑制。进而,给予抗体—药物偶联物(50)诱导了肿瘤的萎缩。

[1416] 评价例13抗肿瘤试验(11)

[1417] 将通过将从食道癌患者摘出的肿瘤移植至雌性裸鼠而进行了多次继代培养的肿瘤(CTG—0137;CHAMPIONS ONCOLOGY公司)用于本试验。该肿瘤为HER2高表达(基于免疫组织化学染色的判定为3+)。

[1418] 将固态肿瘤的肿瘤片向雌性裸鼠的左体侧部皮下移植,在肿瘤体积达到100—

300mm<sup>3</sup>的时间点,随机实施分组。将分组日作为第0天,在第0天,均以10mg/kg的用量向尾静脉内给予抗体—药物偶联物(50)、曲妥珠单抗、或曲妥珠单抗emtansine。作为对照组,设置了乙酸缓冲液给予组。

[1419] 结果示于图13。对于HER2高表达食道癌CTG—0137肿瘤,给予曲妥珠单抗未抑制肿瘤的增殖。与此相对,通过给予曲妥珠单抗emtansine或抗体—药物偶联物(50),肿瘤的增殖被显著抑制。

[1420] 评价例14抗肿瘤试验(12)

[1421] 将从ATCC购入的HER2高表达的人卵巢癌株SK—0V—3细胞悬浮于生理盐水,将4×10<sup>7</sup>个细胞向雌性裸鼠的右体侧部皮下移植,制成SK—0V—3固态肿瘤。然后,通过将该固态肿瘤移植至雌性裸鼠而进行多次继代培养,将其用于本试验。

[1422] 将固态肿瘤的肿瘤片向雌性裸鼠的右体侧部皮下移植,在肿瘤体积达到100—300mm<sup>3</sup>的时间点,随机实施分组。将分组日作为第0天,在第0天,均以10mg/kg的用量向尾静脉内给予抗体—药物偶联物(50)、曲妥珠单抗、或曲妥珠单抗emtansine。作为对照组,设置了生理盐水给予组。

[1423] 结果示于图14。对于SK—0V—3肿瘤,给予曲妥珠单抗未抑制肿瘤的增殖。与此相对,通过给予曲妥珠单抗emtansine或抗体—药物偶联物(50),肿瘤的增殖被显著抑制。

[1424] 序列表中的文字

[1425] 序列号1:人化抗HER2单克隆抗体重链的氨基酸序列

[1426] 序列号2:人化抗HER2单克隆抗体轻链的氨基酸序列

## 序列表

<110> 第一三共株式会社

<120> 抗 HER2 抗体—药物偶联物

<130> PD20-9008WO

<150> JP2014-017777

<151> 2014-01-31

<150> JP2014-168944

<151> 2014-08-22

<150> JP2014-227886

<151> 2014-11-10

<160> 2

<170> PatentIn 版本 3.5

[0001] <210> 1

<211> 450

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 曲妥珠单抗的重链的氨基酸序列

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr  
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val

50	55	60
----	----	----

Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr
65															80

Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
															95
85															

Ser	Arg	Trp	Gly	Gly	Asp	Gly	Phe	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
															110
100															

Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
115															125

Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala
130															140

[0002]

Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser
145															160

Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
165															175

Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
180															190

Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys
195															205

Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
210															220

Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	

225	230	235	240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile			
245	250	255	
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu			
260	265	270	
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His			
275	280	285	
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg			
290	295	300	
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys			
305	310	315	320
[0003]			
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu			
325	330	335	
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr			
340	345	350	
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu			
355	360	365	
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp			
370	375	380	
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val			
385	390	395	400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp			

405

410

415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
435 440 445

Gly Lys  
450

<210> 2  
<211> 214  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
[0004] <223> 曲妥珠单抗的轻链的氨基酸序列

<400> 2

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala  
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

[0005] Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

### 序列号1：人化抗HER2单克隆抗体重链的氨基酸序列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSV  
 KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRGGDFYAMDYWGQGTIVTVSSASTKGPSV  
 FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALTSGVHTFPAPLQSSGLYSLSSVVTVP  
 SSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPPKDTLMI  
 SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK  
 EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW  
 ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP  
 GK

图1

### 序列号2：人化抗HER2单克隆抗体轻链的氨基酸序列

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSG  
 SRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG  
 TASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSTLTLKADYEKHKVY  
 ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图2

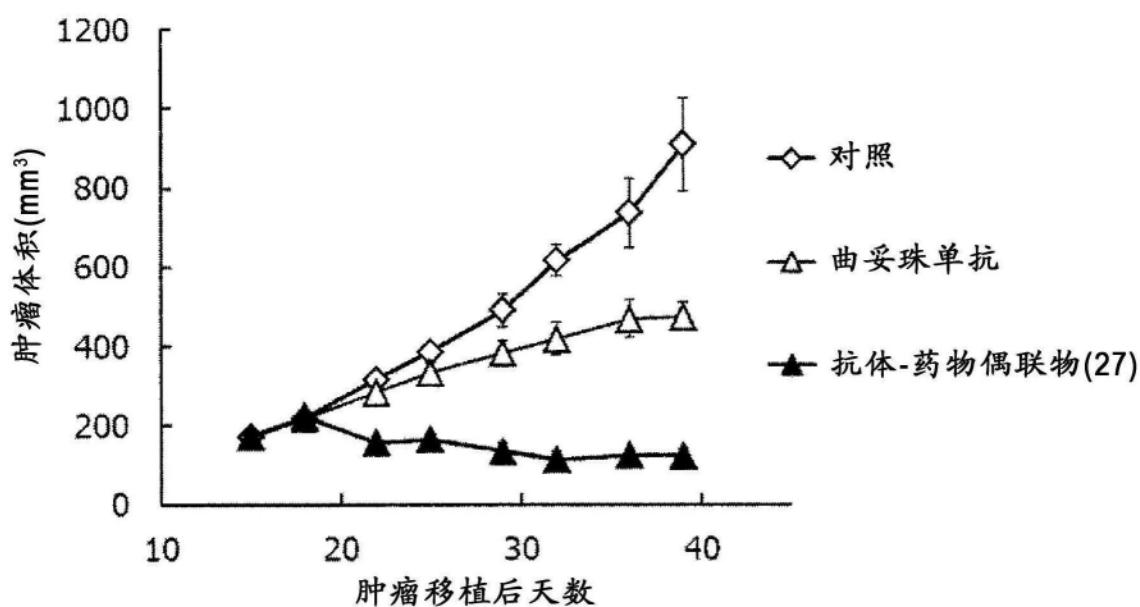


图3

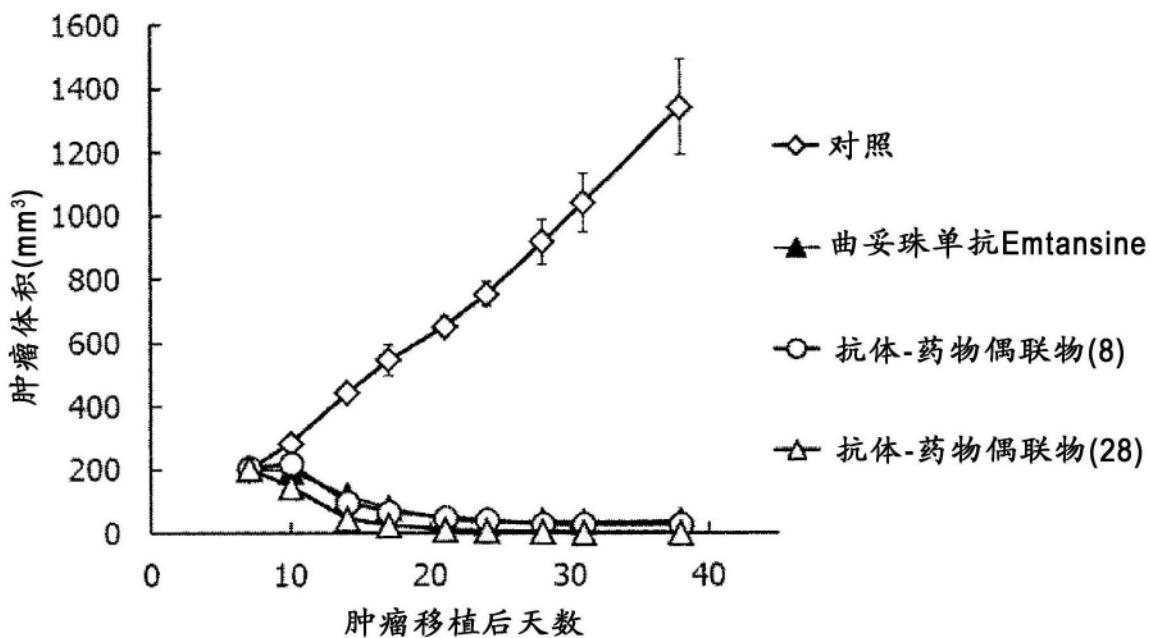


图4

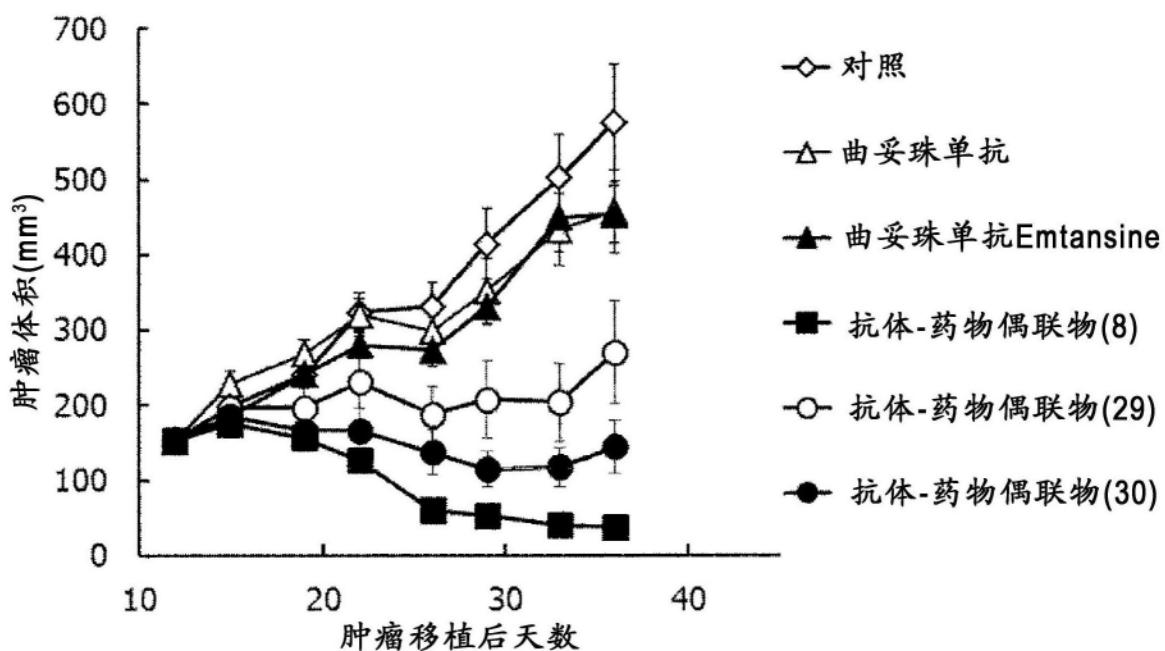


图5

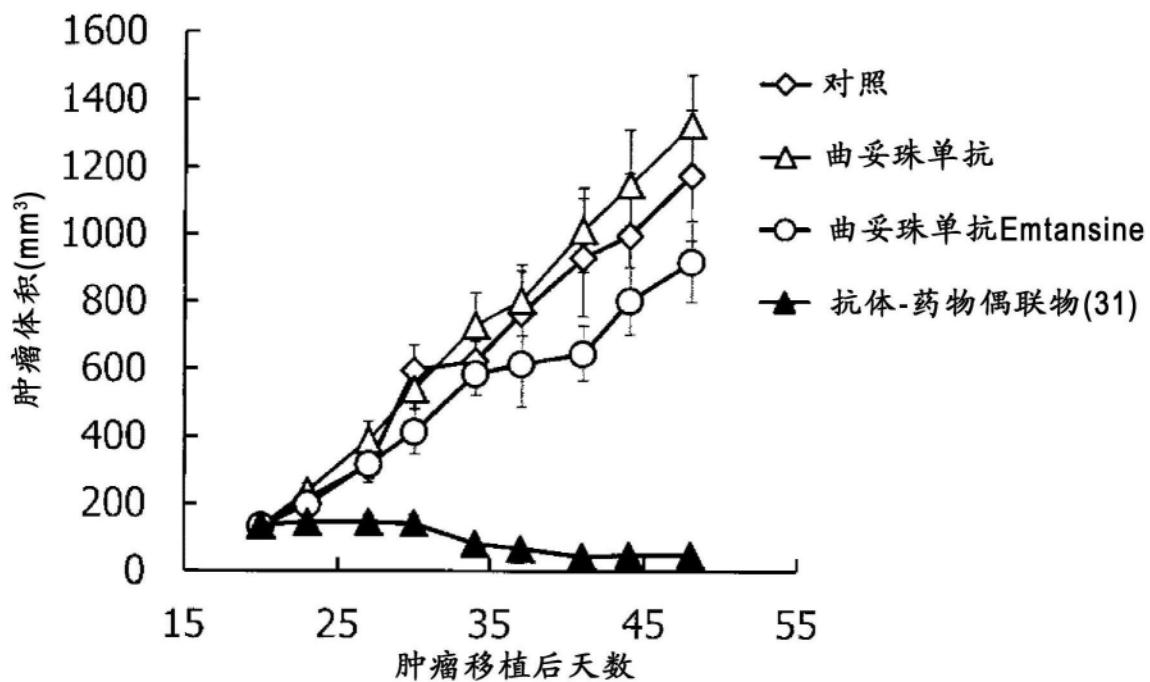


图6

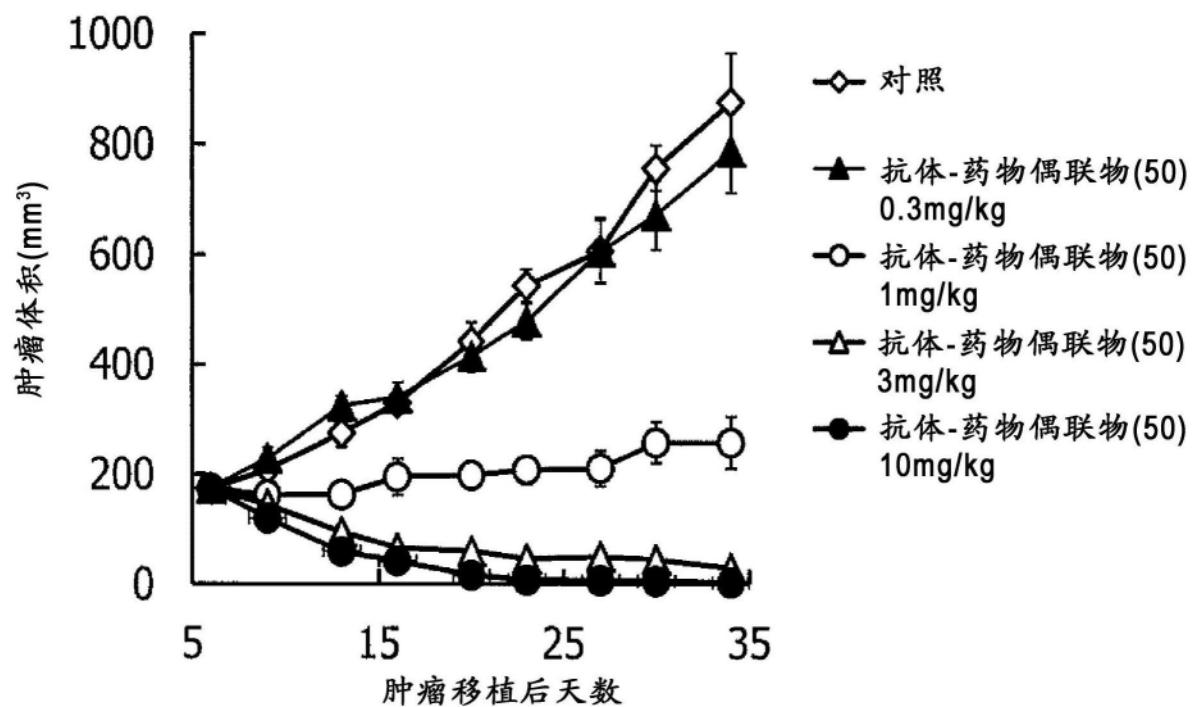


图7

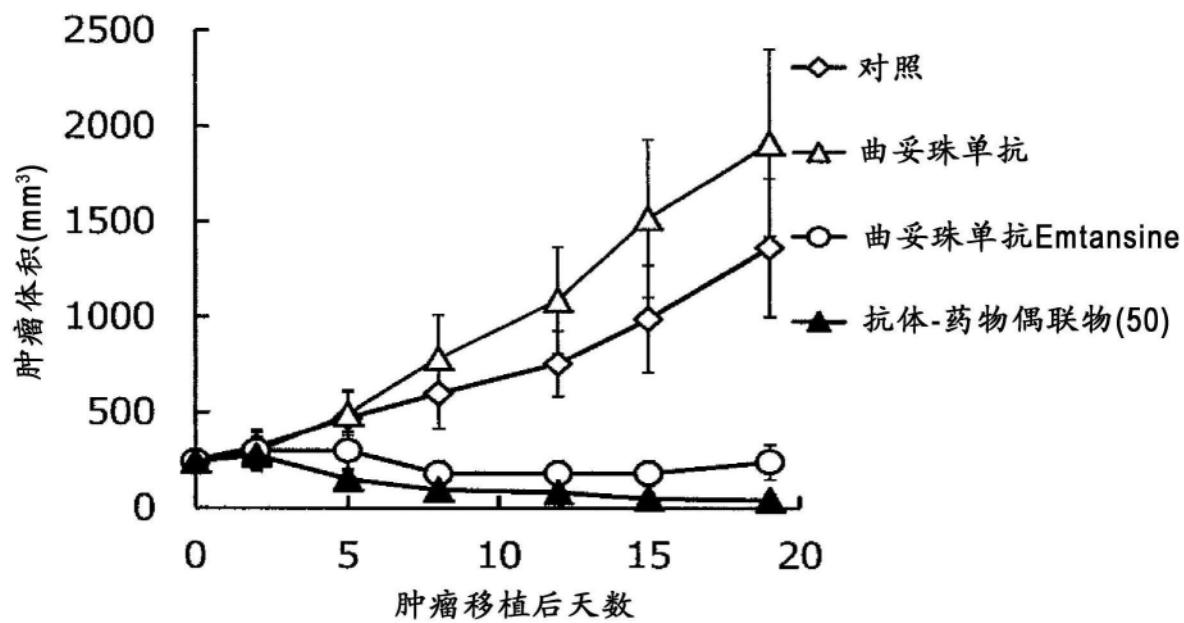


图8

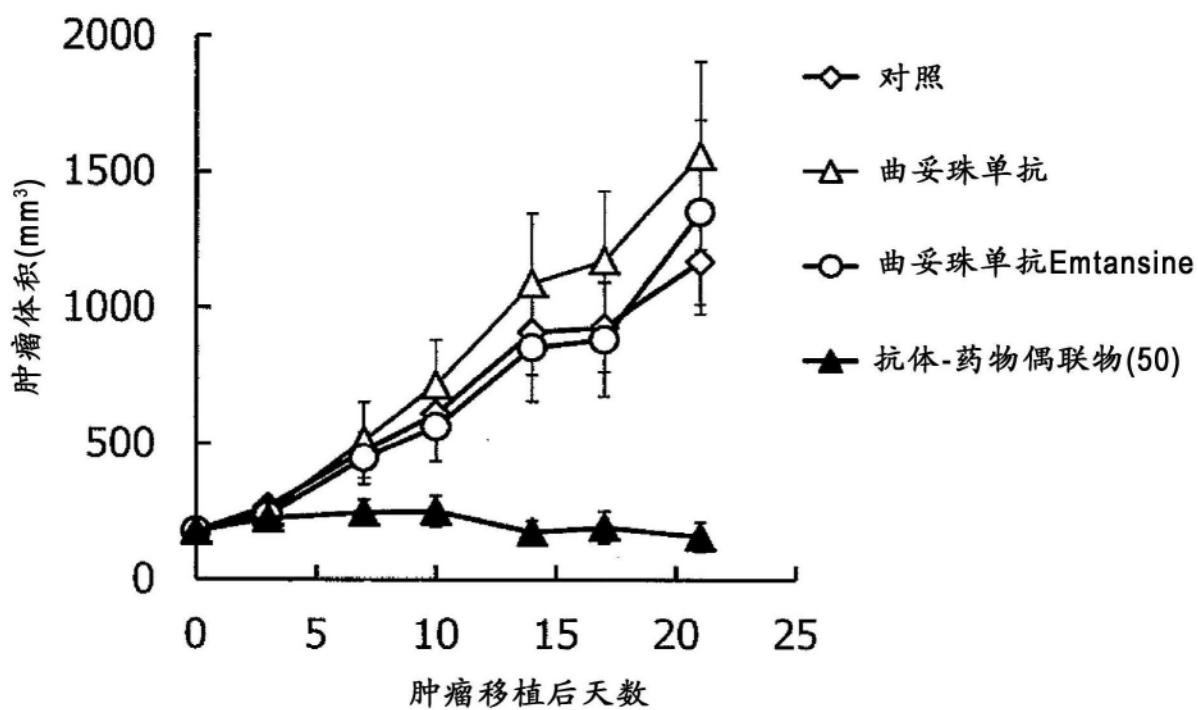


图9

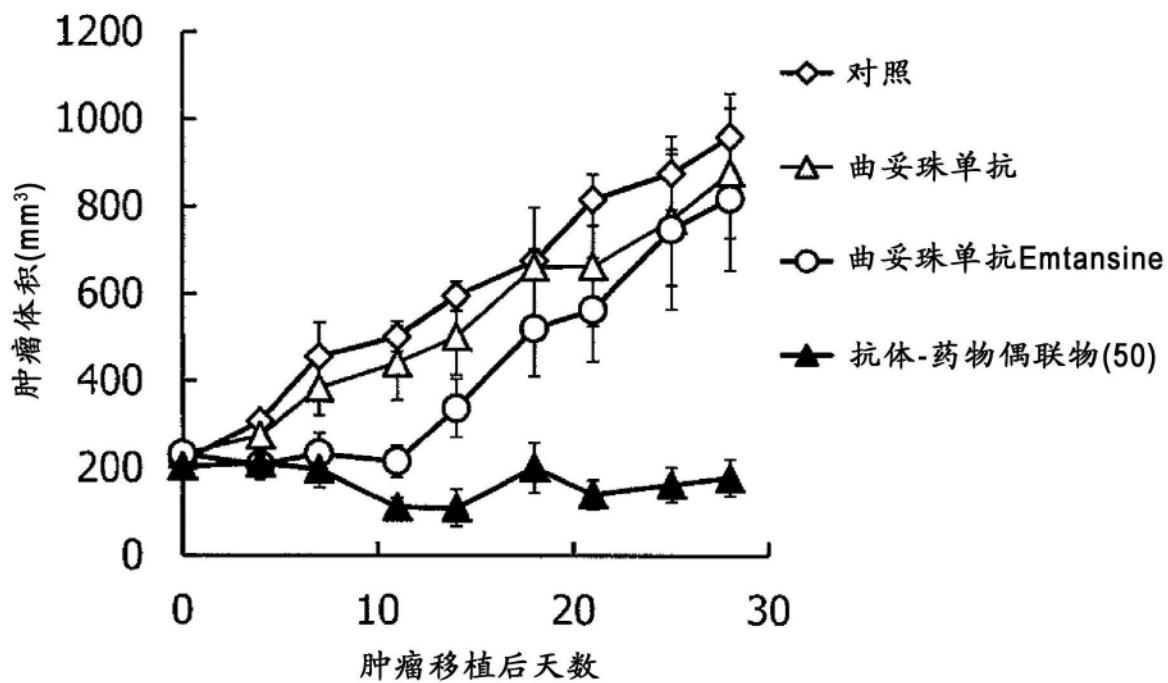


图10

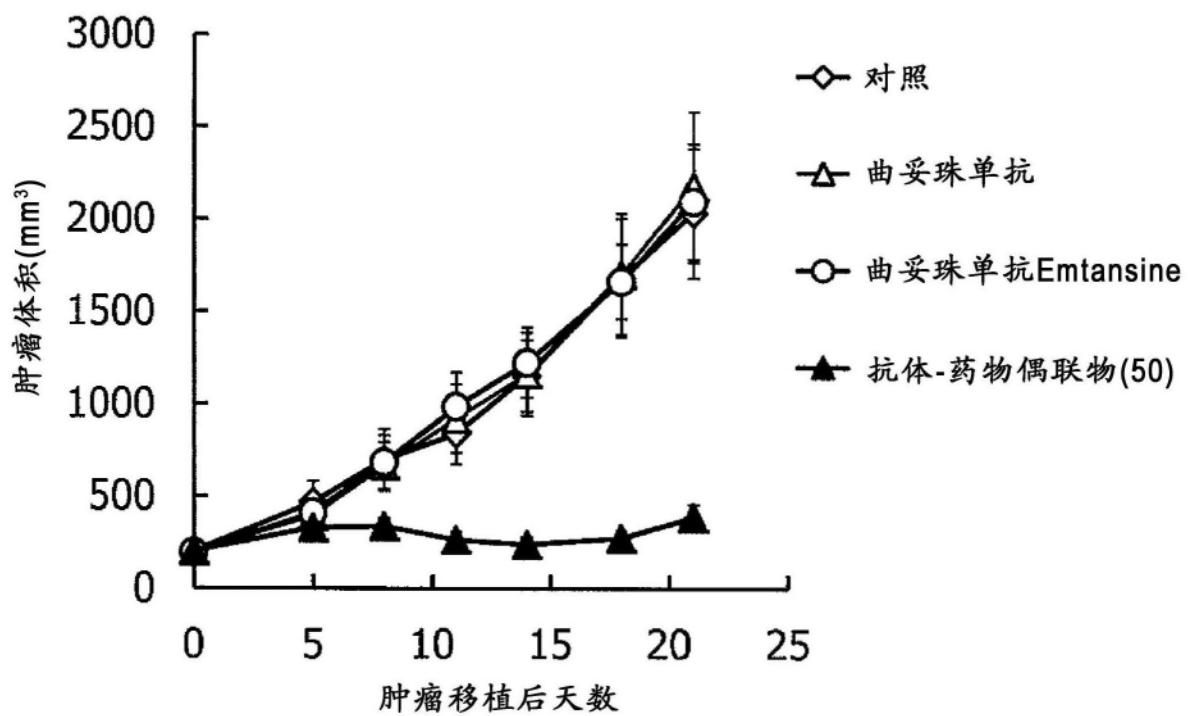


图11

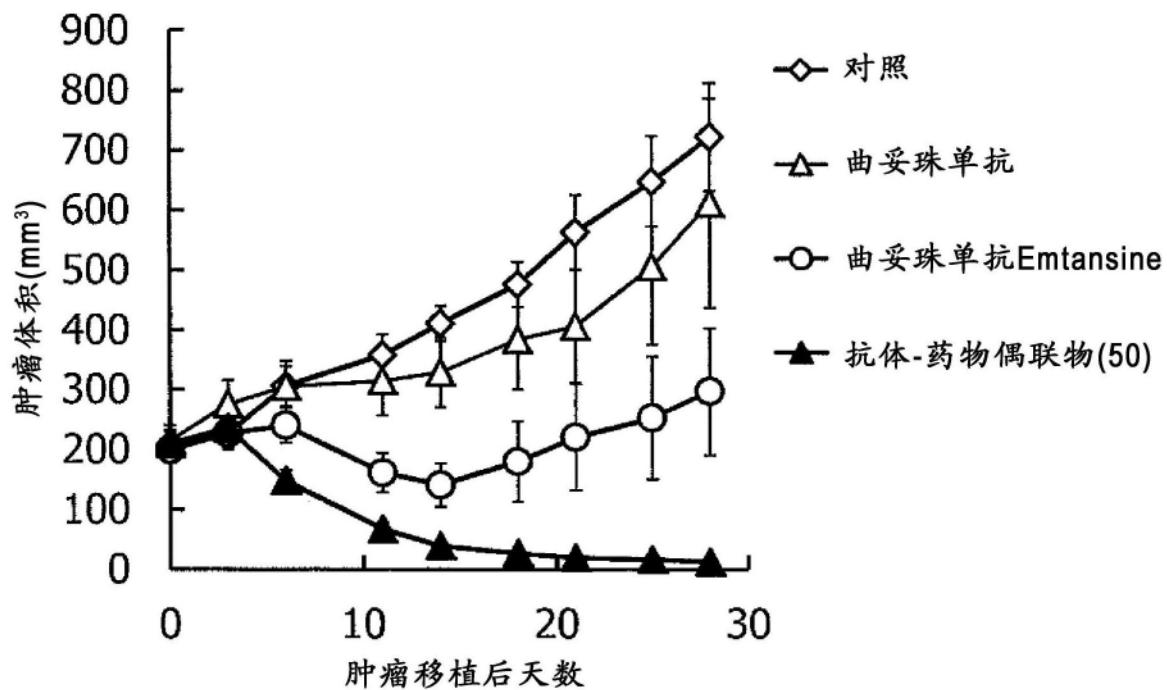


图12

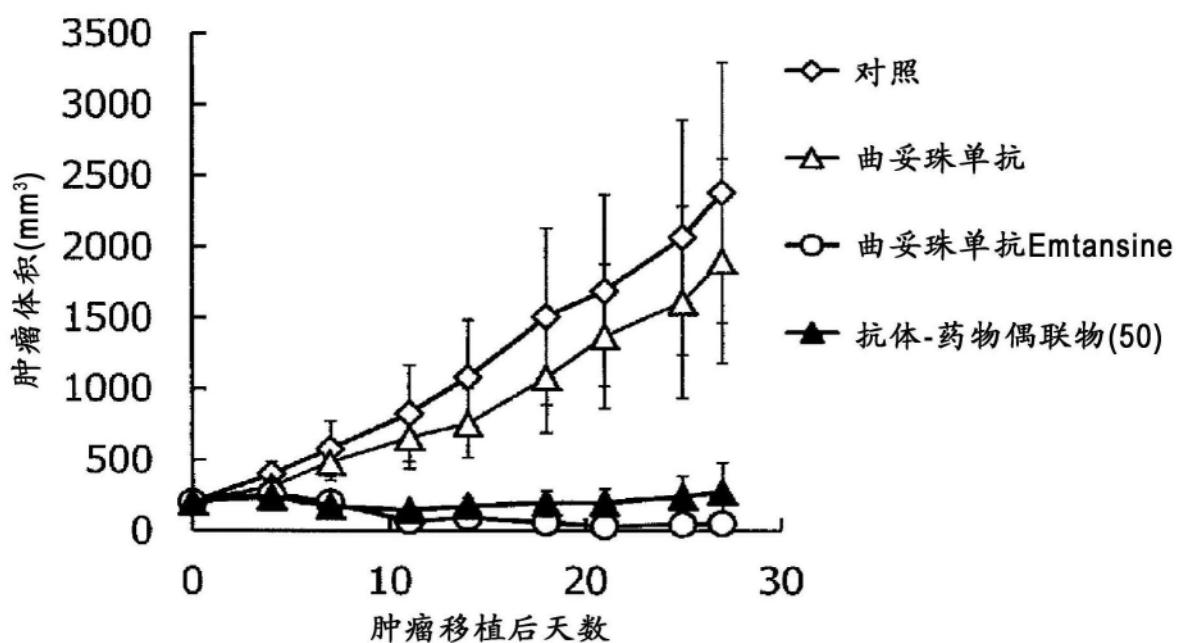


图13

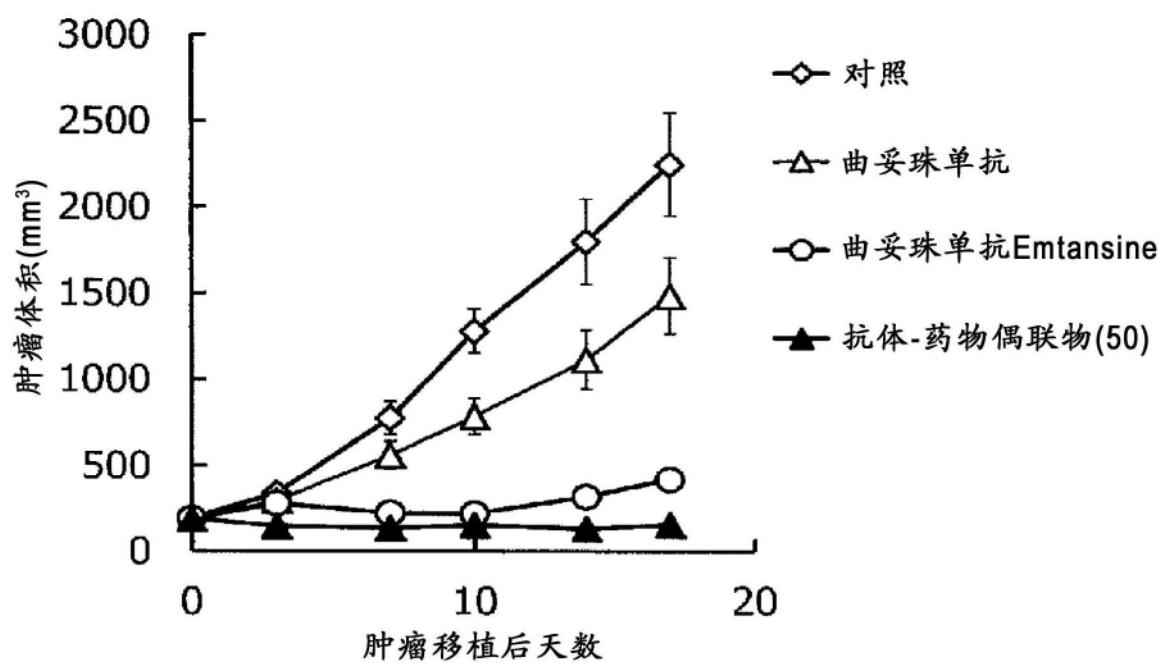


图14