



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I617555 B

(45)公告日：中華民國 107 (2018) 年 03 月 11 日

(21)申請案號：101104846

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 02 月 15 日

(51)Int. Cl. : C07D403/12 (2006.01)

A61K31/5513 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2011/02/15 美國

61/443,062

2011/02/15 美國

61/443,092

2011/05/06 美國

61/483,499

(71)申請人：免疫原公司(美國) IMMUNOGEN, INC. (US)

美國

(72)發明人：李為 LI, WEI (CN)；米勒 麥可 MILLER, MICHAEL (US)；費雪金 納森

FISHKIN, NATHAN (US)；洽里 拉維 V J CHARI, RAVI V. J. (US)

(74)代理人：閻啟泰；林景郁

(56)參考文獻：

WO 20108091150A1

審查人員：簡正芳

申請專利範圍項數：85 項 圖式數：60 共 301 頁

(54)名稱

細胞毒性苯并二氮呋衍生物

CYTOTOXIC BENZODIAZEPINE DERIVATIVES

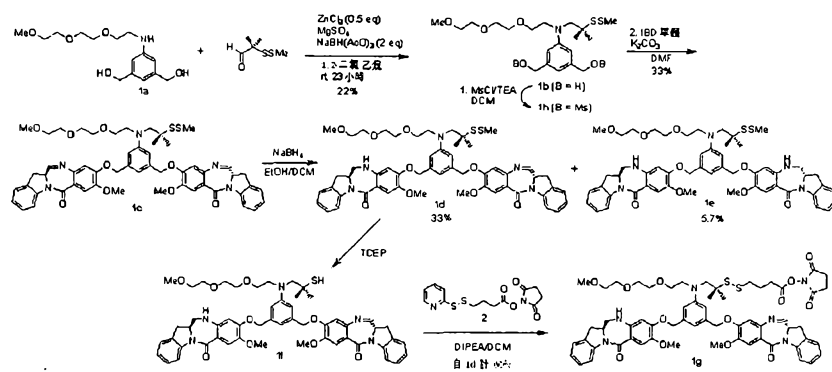
(57)摘要

本發明係關於具有抗增殖活性之新穎苯并二氮呋衍生物，且更具體言之，關於式(I)至(VII)之新穎苯并二氮呋化合物。本發明亦提供苯并二氮呋化合物與細胞結合劑連接之連結物。本發明還提供可用於使用本發明化合物或連結物在哺乳動物中抑制異常細胞生長或治療增生性病徵之組合物及方法。

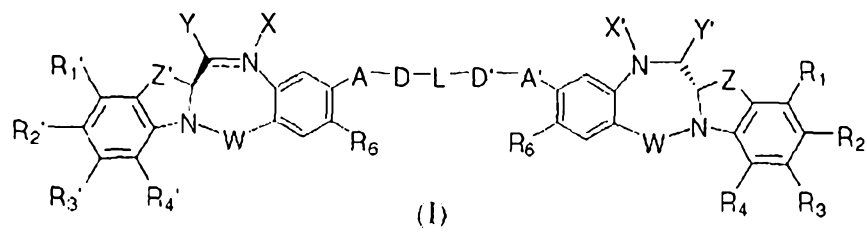
The invention relates to novel benzodiazepine derivatives with antiproliferative activity and more specifically to novel benzodiazepine compounds of formula (I)-(VII). The invention also provides conjugates of the benzodiazepine compounds linked to a cell-binding agent. The invention further provides compositions and methods useful for inhibiting abnormal cell growth or treating a proliferative disorder in a mammal using the compounds or conjugates of the invention.

指定代表圖：

第 1 圖 連接基 1b 及二聚體 1d-g 之合成流程



特徵化學式：



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於新穎細胞毒性化合物，及包含該等細胞毒性化合物及細胞結合劑之細胞毒性連結物。更具體言之，本發明係關於新穎的苯并二氮呋化合物、其衍生物、其中間物、其連結物及其醫藥學上可接受之鹽，其可用作藥劑，尤其可用作抗增生劑。

本申請案依據 35 U.S.C. §119(e)要求 2011 年 2 月 15 日提交的美國臨時申請案第 61/443,062 號及 2011 年 5 月 6 日提交的美國臨時申請案第 61/483,499 號，以及 2011 年 2 月 15 日提交的美國臨時申請案第 61/443,092 號在提交日時的權益，各案完整內容，包括所有圖式、結構式、說明書及申請專利範圍，皆以引用之方式併入。

【先前技術】

苯并二氮呋衍生物係適用於治療各種病症之化合物，且包括諸如抗癲癇藥(咪唑并[2,1-b][1,3,5]苯并硫代二氮呋，美國專利第 4,444,688 號；美國專利第 4,062,852 號)、抗細菌藥(嘧啶并[1,2-c][1,3,5]苯并硫代二氮呋，GB 1476684)、利尿劑及降壓藥(吡咯并(1,2-b)[1,2,5]苯并硫代二氮呋 5,5 二氧化物，美國專利第 3,506,646 號)、降血脂藥(WO 03091232)、抗抑鬱藥(美國專利第 3,453,266 號)；骨質疏鬆症(JP 2138272)之藥劑。

近來，已在動物腫瘤模型中顯示，苯并二氮呋衍生物，

諸如吡咯并苯并二氮呋(PBD)，充當抗腫瘤藥(N-2-咪唑基烷基取代之 1,2,5-苯并硫代二氮呋-1,1-二氧化物，美國專利第 6,156,746 號)、苯并-吡啶并或二吡啶并硫代二氮呋(WO 2004/069843)、吡咯并[1,2-b][1,2,5]苯并硫代二氮呋及吡咯并[1,2-b][1,2,5]苯并二氮呋衍生物(WO2007/015280)、托馬黴素(tomaymycin)衍生物(例如吡咯并[1,4]苯并二氮呋)，諸如 WO 00/12508、WO2005/085260、WO2007/085930 及 EP 2019104 中所述者。亦已知苯并二氮呋影響細胞生長及分化(Kamal A. 等人，Bioorg Med Chem. 2008 年 8 月 15 日；16(16):7804-10(及其中引用的參考文獻)；Kumar R, Mini Rev Med Chem. 2003 年 6 月；3(4):323-39(及其中引用的參考文獻)；Bednarski J J 等人，2004；Sutter A. P 等人，2002；Blatt N B 等人，2002)、Kamal A. 等人，Current Med. Chem., 2002；2；215-254, Wang J-J., J. Med. Chem., 2206；49:1442-1449, Alley M.C. 等人，Cancer Res. 2004；64:6700-6706, Pepper C. J., Cancer Res 2004；74:6750-6755, Thurston D.E. 及 Bose D.S., Chem Rev 1994；94:433-465；以及 Tozuka, Z. 等人，Journal of Antibiotics, (1983) 36；1699-1708。PBD 之一般結構描述於 US 公開案第 20070072846 號中。各 PBD 之芳族 A 環及吡咯并 C 環中取代基之數量、類型及位置以及 C 環之飽和度不同。其在小溝中形成加合物及交聯 DNA 之能力使其能夠干擾 DNA 加工，因此有用作抗增殖劑之潛力。

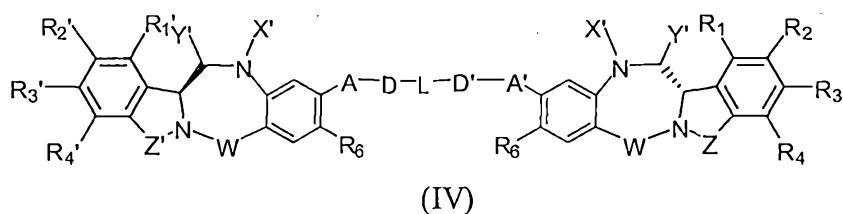
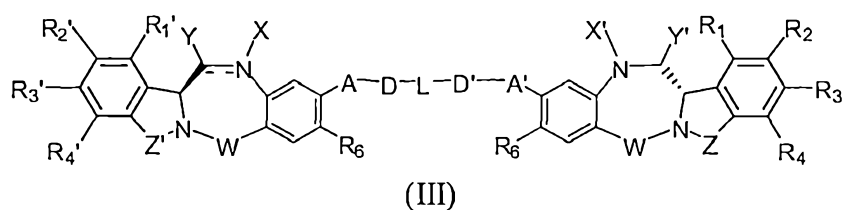
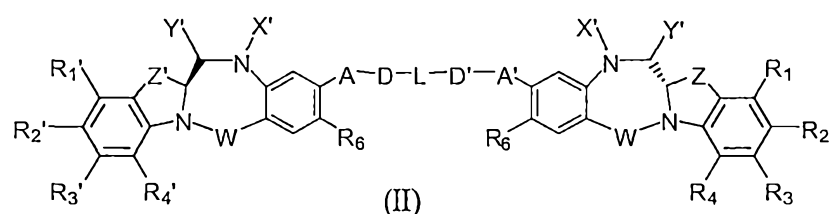
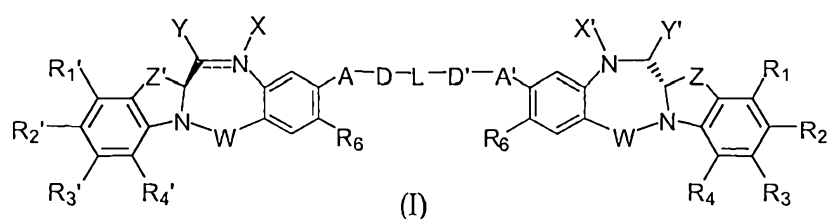
第一種進入臨床之吡咯并苯并二氮呼 SJG-136(NSC 694501)為引起 DNA 鏈間交聯之有效細胞毒性劑(S.G. Gregson 等人, 2001, *J. Med. Chem.*, 44: 737-748; M.C. Alley 等人, 2004, *Cancer Res.*, 64: 6700-6706; J.A. Hartley 等人, 2004, *Cancer Res.*, 64: 6693-6699; C. Martin 等人, 2005, *Biochemistry.*, 44: 4135-4147; S. Arnould 等人, 2006, *Mol. Cancer Ther.*, 5: 1602-1509)。由 SJG-136 之 I 期臨床評價得到之結果揭露, 該藥物在極低劑量下有毒(最大耐受劑量為 $45 \mu\text{g}/\text{m}^2$, 且觀察到幾種不良作用, 包括血管滲漏症候群、周圍水腫、肝毒性及疲勞。在所有劑量下, 在循環淋巴細胞中觀察到 DNA 損傷(D. Hochhauser 等人, 2009, *Clin. Cancer Res.*, 15: 2140-2147)。因此, 需要改良之苯并二氮呼衍生物, 其毒性較低, 且在治療諸如癌症等多種增生性疾病狀態方面仍具有治療活性。

【發明內容】

此項技術中揭示之細胞毒性苯并二氮呼二聚物具有呈遊離形式或可逆保護形式(諸如水合物、烷氧化物或磺酸酯)之兩個亞胺官能基。這兩個亞胺官能基之存在引起 DNA 之交聯 (S.G. Gregson 等人, 2001, *J. Med. Chem.*, 44: 737-748)。本發明部分上基於一個出乎預料的發現: 與此項技術中先前揭示之可交聯 DNA 的苯并二氮呼衍生物相比較, 新細胞毒性苯并二氮呼衍生物之細胞結合劑連結

物，諸如不含兩個亞胺官能基(例如一個亞胺官能基及一個胺官能基)且因此不能交聯 DNA 之吡啶并苯并二氮卞二聚物在活體內呈現出高得多的治療指數(最大耐受劑量與最小有效劑量之比率)。

因此，本發明一個目的為提供細胞毒性化合物，其包含鏈接至能夠將該細胞毒性化合物共價連接至細胞結合劑(CBA，參看下文)之反應性基團的連接基團，其中該細胞毒性化合物以下式中任一者表示：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

N 與 C 之間之雙線=表示單鍵或雙鍵，其限制條件為，

當其為雙鍵時，X 不存在，且 Y 為 -H，或具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基，且當其為單鍵時，X 為 -H、鍵接至該反應性基團之連接基團、或胺保護部分；

Y 為 -H，或選自以下之離去基團：-OR、-OCOR'、-OCOOR'、-OCONR'R''、-NR'R''、-NR'COR''、-NR'NR'R''、視情況取代之 5 員或 6 員含氮雜環(例如吡啶、四氫吡咯、吡唑、嗎啉等)、以 -NR'(C=NH)NR'R'' 表示之胍、胺基酸，或以 -NRCOP' 表示之肽，其中 P' 為胺基酸或含有 2 至 20 個胺基酸單元之多肽、-SR、-SOR'、-SO₂M、-SO₃M、-OSO₃M、鹵素、氰基及疊氮基；或

Y 為亞硫酸根(HSO₃、HSO₂ 或者 HSO₃⁻、SO₃²⁻ 或 HSO₂⁻ 與陽離子形成的鹽)、偏亞硫酸氫根(H₂S₂O₅ 或者 S₂O₅²⁻ 與陽離子形成的鹽)、單-、二-、三-和四-硫代磷酸根(PO₃SH₃、PO₂S₂H₂、POS₃H₂、PS₄H₂ 或者 PO₃S³⁻、PO₂S₂³⁻、POS₃³⁻ 或 PS₄³⁻ 與陽離子形成的鹽)、硫代磷酸酯(RⁱO)₂PS(ORⁱ)、RⁱS-、RⁱSO、RⁱSO₂、RⁱSO₃、硫代硫酸根(HS₂O₃ 或者 S₂O₃²⁻ 與陽離子形成的鹽)、連二亞硫酸根(dithionite)(HS₂O₄ 或者 S₂O₄²⁻ 與陽離子形成的鹽)、二硫代磷酸根(phosphorodithioate)(P(=S)(OR^{k'})(S)(OH)或其與陽離子形成的鹽)、羥肟酸(R^{k'}C(=O)NOH 或與陽離子形成的鹽)、甲醛次硫酸根(formaldehyde sulfoxylate)(HOCH₂SO₂⁻ 或 HOCH₂SO₂⁻ 與陽離子形成的鹽，諸如 HOCH₂SO₂⁻Na⁺)或其混合物，其中 Rⁱ 為具有 1 至 10 個碳原子之直鏈或分支烷基且經至少一個選自

$-N(R^j)_2$ 、 $-CO_2H$ 、 $-SO_3H$ 及 $-PO_3H$ 之取代基取代； R^i 可進一步視情況經本文所述之烷基之取代基取代； R^j 為具有 1 至 6 個碳原子之直鏈或分支烷基； $R^{k'}$ 為具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、芳基、雜環基或雜芳基；較佳 Y 為亞硫酸氫根(bisulfite)、連二亞硫酸根(hydrosulfite)或偏亞硫酸氫根或其鹽(諸如鈉鹽)之加合物；

M 為 $-H$ 或陽離子；

R 在每次出現時獨立選自由以下組成之群： $-H$ 、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、聚乙二醇單元 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$ 、視情況取代之具有 6 至 18 個碳原子之芳基、視情況取代之含有一或多個獨立選自氮、氧及硫之雜原子的 5 員至 18 員雜芳基環、或視情況取代之含有 1 至 6 個獨立選自 O、S、N 及 P 之雜原子的 3 員至 18 員雜環；

R' 及 R'' 各獨立選自 $-H$ 、 $-OH$ 、 $-OR$ 、 $-NHR$ 、 $-NR_2$ 、 $-COR$ 、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、聚乙二醇單元 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$ 、及視情況取代之具有 1 至 6 個獨立選自 O、S、N 及 P 之雜原子的 3 員至 18 員雜環；

R^c 為 $-H$ 、或取代或未取代之具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基，或鍵接至反應性基團之連接基團；

n 為 1 至 24 之整數；

W 選自 $C=O$ 、 $C=S$ 、 CH_2 、 BH 、 SO 及 SO_2 ；

X' 選自 -H、胺保護基、鍵接至反應性基團之連接基團、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、聚乙二醇單元 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$ 、視情況取代之具有 6 至 18 個碳原子之芳基、視情況取代之含有一或多個獨立選自氮、氧及硫之雜原子的 5 員至 18 員雜芳基環、及視情況取代之含有 1 至 6 個獨立選自 O、S、N 及 P 之雜原子的 3 員至 18 員雜環；

Y' 選自 -H、側氧基、鍵接至反應性基團之連接基團、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、視情況取代之 6 員至 18 員芳基、視情況取代之含有一或多個獨立選自氮、氧及硫之雜原子的 5 員至 18 員雜芳基環、視情況取代之具有 1 至 6 個雜原子之 3 員至 18 員雜環；

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_1' 、 R_2' 、 R_3' 及 R_4' 各獨立選自由以下組成之群：-H、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、聚乙二醇單元 $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$ 、鹵素、胍 $[-NH(C=NH)NH_2]$ 、-OR、-NR'R''、-NO₂、-NCO、-NR'COR''、-SR、以 -SOR' 表示之亞砷、以 -SO₂R' 表示之砷、磺酸根 -SO₃⁻M⁺、硫酸根 -OSO₃⁻M⁺、以 -SO₂NR'R'' 表示之磺醯胺、氰基、疊氮基、-COR'、-OCOR'、-OCONR'R''、及鍵接至反應性基團之連接基團；

R_6 為 -H、-R、-OR、-SR、-NR'R''、-NO₂、鹵素、或鍵接至反應性基團之連接基團；

Z 及 Z' 獨立選自 $-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_n-CR_7R_8-(CH_2)_n-$ 、

$-(CH_2)_{n'}-NR_9-(CH_2)_{na'}-$ 、 $-(CH_2)_{n'}-O-(CH_2)_{na'}-$ 、及
 $-(CH_2)_{n'}-S-(CH_2)_{na'}-$ ；

n' 與 na' 相同或不同，且選自 0、1、2 及 3；

R_7 與 R_8 相同或不同，且各獨立選自 $-H$ 、 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-COOH$ 、 $-NHR'$ 、聚乙二醇單元 $-(OCH_2CH_2)_n-$ 、胺基酸、帶有 2 至 6 個胺基酸之肽單元、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基；

R_9 獨立選自 $-H$ 、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、聚乙二醇單元 $-(OCH_2CH_2)_n-$ ；

A 與 A' 相同或不同，且獨立選自 $-O-$ 、側氧基 $(-C(=O)-)$ 、 $-CRR'O-$ 、 $-CRR'-$ 、 $-S-$ 、 $-CRR'S-$ 、 $-NR_5$ 、及 $-CRR'N(R_5)-$ ；

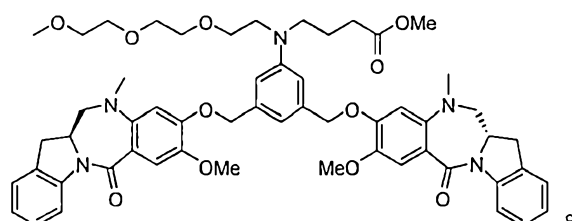
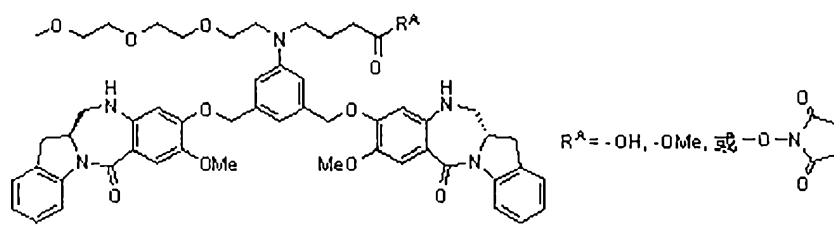
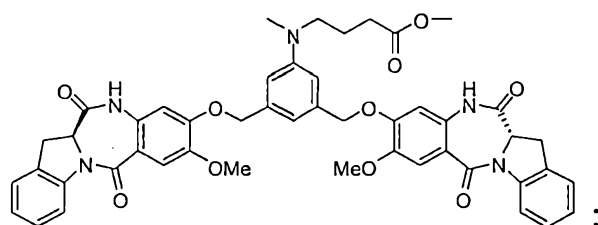
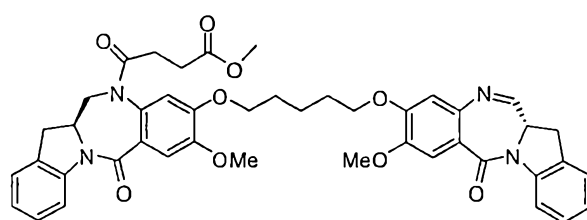
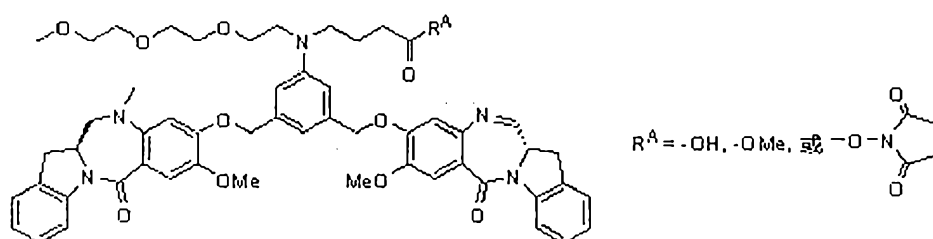
R_5 在每次出現時獨立地為 $-H$ 或視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈或分支烷基；

D 與 D' 相同或不同，且獨立地不存在或選自由以下組成之群：視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、胺基酸、帶有 2 至 6 個胺基酸之肽、及聚乙二醇單元 $-(OCH_2CH_2)_n-$ ；

L 不存在、或為鍵接至反應性基團之連接基團、聚乙二醇單元 $-(OCH_2CH_2)_n-$ 、具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基或烯基、苯基、具有 1 至 6 個獨立選自 O 、 S 、 N 及 P 之雜原子的 3 員至 18 員雜環或 5 員至 18 員雜芳基環，其中該烷基或烯基視情況經鍵接至反應性基團之連接基團取代；苯基或雜環或雜芳基環可視情況經取代，其中該取代基可為鍵接至反應性基團之連接基團。

•



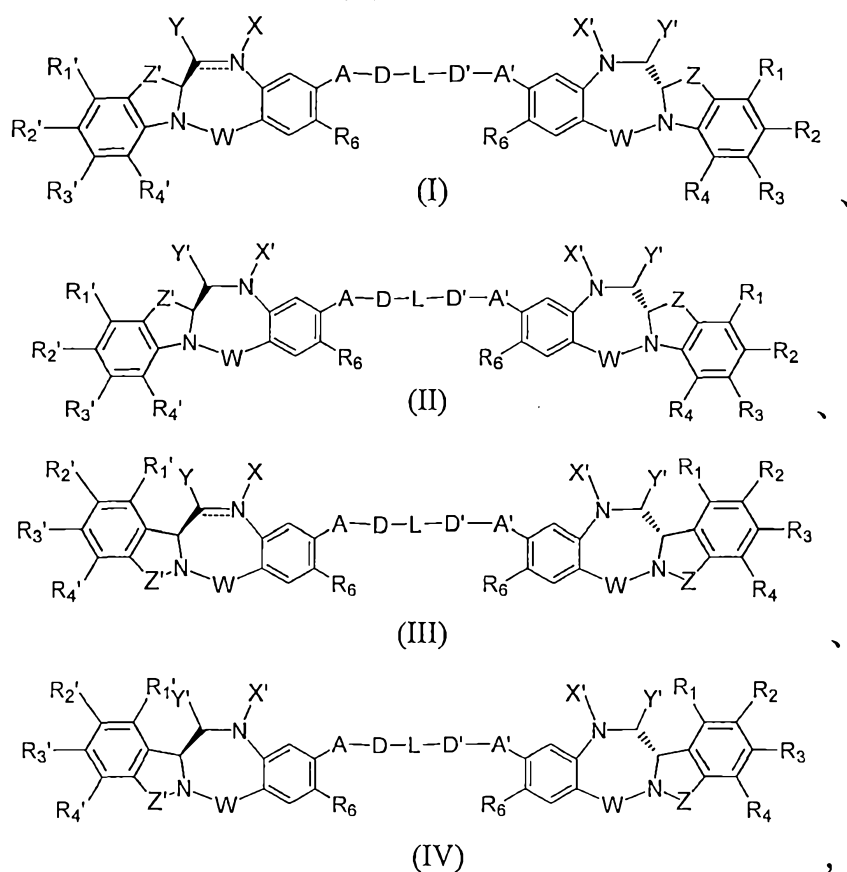


12

啉、四氫吡咯、吡啶、嗎啉等)、以 $-NR'(C=NH)NR'R''$ 表示之胍、胺基酸或以 $-NRCOP'$ 表示之肽，其中 P' 為胺基酸或含有 2 至 20 個胺基酸單元之多肽、 $-SR$ 、 $-SOR'$ 、 $-SO_2M$ 、 $-SO_3M$ 、 $-OSO_3M$ 、鹵素、氰基及疊氮基。

本發明之第二個目的為提供細胞結合劑與本發明之新穎苯并二氮呋化合物或其衍生物之連結物。該等連結物可用作治療劑，其經特定地傳遞至靶細胞並具有細胞毒性。

具體言之，本發明之連結物可包含：細胞毒性化合物及細胞結合劑(CBA)，其中該細胞毒性化合物包含將細胞毒性化合物共價連接至 CBA 之連接基團，且其中該細胞毒性化合物由以下任一式表示：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

N 與 C 之間之雙線 $\equiv$ 表示單鍵或雙鍵，其限制條件為，當其為雙鍵時，X 不存在，且 Y 為 -H 或具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基，且當其為單鍵時，X 為 -H、連接基團或胺保護部分；

Y 為 -H 或選自以下之離去基團：-OR、-OCOR'、-OCOOR'、-OCONR'R''、-NR'R''、-NR'COR''、-NR'NR'R''、視情況取代之 5 員或 6 員含氮雜環(例如吡啶、四氫吡咯、吡唑、嗎啉)、以 -NR'(C=NH)NR'R'' 表示之胍、胺基酸、或以 -NRCOP' 表示之肽，其中 P' 為胺基酸或含有 2 至 20 個胺基酸單元之多肽、-SR、-SOR'、-SO₂M、-SO₃M、-OSO₃M、鹵素、氰基及疊氮基；或

Y 為亞硫酸根(HSO₃、HSO₂ 或者 HSO₃⁻、SO₃²⁻ 或 HSO₂⁻ 與陽離子形成的鹽)、偏亞硫酸氫根(H₂S₂O₅ 或者 S₂O₅²⁻ 與陽離子形成的鹽)、單-、二-、三-及四-硫代磷酸根(PO₃SH₃、PO₂S₂H₂、POS₃H₂、PS₄H₂ 或者 PO₃S³⁻、PO₂S₂³⁻、POS₃³⁻ 或 PS₄³⁻ 與陽離子形成的鹽)、硫代磷酸酯(RⁱO)₂PS(ORⁱ)、RⁱS-、RⁱSO、RⁱSO₂、RⁱSO₃、硫代硫酸根(HS₂O₃ 或 S₂O₃²⁻ 與陽離子形成的鹽)、連二亞硫酸根(HS₂O₄ 或者 S₂O₄²⁻ 與陽離子形成的鹽)、二硫代磷酸根(P(=S)(OR^{k'})(S)(OH) 或其與陽離子形成的鹽)、羥肟酸(R^{k'}C(=O)NOH 或與陽離子形成的鹽)、甲醛次硫酸根(HOCH₂SO₂⁻ 或 HOCH₂SO₂⁻ 與陽離子形成的鹽，諸如 HOCH₂SO₂⁻Na⁺) 或其混合物，其中 Rⁱ 為具有 1 至 10 個碳原子之直鏈或分支烷基且經至少一個選自 -N(R^j)₂、

$-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 及 $-\text{PO}_3\text{H}$ 之取代基取代； R^i 可進一步視情況經本文所述之烷基之取代基取代； R^j 為具有 1 至 6 個碳原子之直鏈或分支烷基； $\text{R}^{k'}$ 為具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、芳基、雜環基或雜芳基；較佳 Y 為亞硫酸氫根、連二亞硫酸根或偏亞硫酸氫根或其鹽(諸如鈉鹽)之加合物；

M 為 $-\text{H}$ 或陽離子；

R 在每次出現時獨立選自由以下組成之群： $-\text{H}$ 、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、聚乙二醇單元 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$ 、視情況取代之具有 6 至 18 個碳原子之芳基、視情況取代之含有一或多個獨立選自氮、氧及硫之雜原子的 5 員至 18 員雜芳基環、或視情況取代之含有 1 至 6 個獨立選自 O 、 S 、 N 及 P 之雜原子的 3 員至 18 員雜環；

R' 及 R'' 各獨立選自 $-\text{H}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{OR}$ 、 $-\text{NHR}$ 、 $-\text{NR}_2$ 、 $-\text{COR}$ 、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、聚乙二醇單元 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$ 、及視情況取代之具有 1 至 6 個獨立選自 O 、 S 、 N 及 P 之雜原子的 3 員至 18 員雜環；

R^c 為 $-\text{H}$ 、或取代或未取代之具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基，或連接基團；

n 為 1 至 24 之整數；

W 選自 $\text{C}=\text{O}$ 、 $\text{C}=\text{S}$ 、 CH_2 、 BH 、 SO 及 SO_2 ；

X' 選自 $-\text{H}$ 、胺保護基、連接基團、視情況取代之具有 1

至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、聚乙二醇單元 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$ 、視情況取代之具有 6 至 18 個碳原子之芳基、視情況取代之含有一或多個獨立選自氮、氧及硫之雜原子的 5 員至 18 員雜芳基環、及視情況取代之含有 1 至 6 個獨立選自 O、S、N 及 P 之雜原子的 3 員至 18 員雜環；

Y' 選自 $-H$ 、側氧基、連接基團、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、視情況取代之 6 員至 18 員芳基、視情況取代之含有一或多個獨立選自氮、氧及硫之雜原子的 5 員至 18 員雜芳基環、視情況取代之具有 1 至 6 個雜原子之 3 員至 18 員雜環；

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_1' 、 R_2' 、 R_3' 及 R_4' 各獨立選自由以下組成之群： $-H$ 、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、聚乙二醇單元 $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$ 、鹵素、胍 $[-NH(C=NH)NH_2]$ 、 $-OR$ 、 $-NR'R''$ 、 $-NO_2$ 、 $-NCO$ 、 $-NR'COR''$ 、 $-SR$ 、以 $-SOR'$ 表示之亞磺、以 $-SO_2R'$ 表示之磺、磺酸根 $-SO_3^-M^+$ 、硫酸根 $-OSO_3^-M^+$ 、以 $-SO_2NR'R''$ 表示之磺醯胺、氰基、疊氮基、 $-COR'$ 、 $-OCOR'$ 、 $-OCONR'R''$ 及連接基團；

R_6 為 $-H$ 、 $-R$ 、 $-OR$ 、 $-SR$ 、 $-NR'R''$ 、 $-NO_2$ 、鹵素或連接基團；

Z 及 Z' 獨立選自 $-(CH_2)_{n'}$ 、 $-(CH_2)_{n'}-CR_7R_8-(CH_2)_{na'}$ 、 $-(CH_2)_{n'}-NR_9-(CH_2)_{na'}$ 、 $-(CH_2)_{n'}-O-(CH_2)_{na'}$ 及

$-(CH_2)_{n'}-S-(CH_2)_{na'}-$;

n' 與 na' 相同或不同，且選自 0、1、2 及 3；

R_7 與 R_8 相同或不同，且各獨立選自 -H、-OH、-SH、-COOH、-NHR'、聚乙二醇單元 $-(OCH_2CH_2)_n-$ 、胺基酸、帶有 2 至 6 個胺基酸之肽單元、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基；

R_9 獨立選自 -H、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、聚乙二醇單元 $-(OCH_2CH_2)_n-$ ；

A 與 A' 相同或不同，且獨立選自 -O-、側氧基 $(-C(=O)-)$ 、-CRR'O-、-CRR'-、-S-、-CRR'S-、-NR₅、及 -CRR'N(R₅)-，

R_5 在每次出現時獨立地為 -H 或視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈或分支烷基；

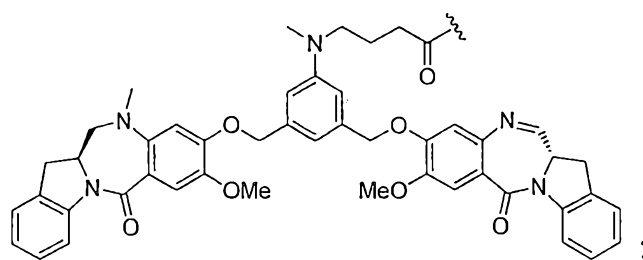
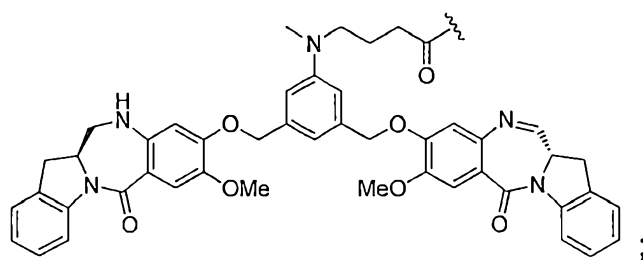
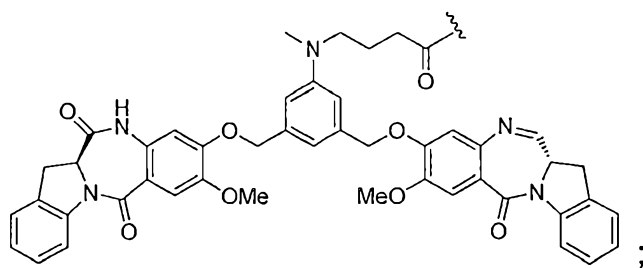
D 與 D' 相同或不同，且獨立地不存在或選自由以下組成之群：視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、胺基酸、帶有 2 至 6 個胺基酸之肽、及聚乙二醇單元 $-(OCH_2CH_2)_n-$ ；

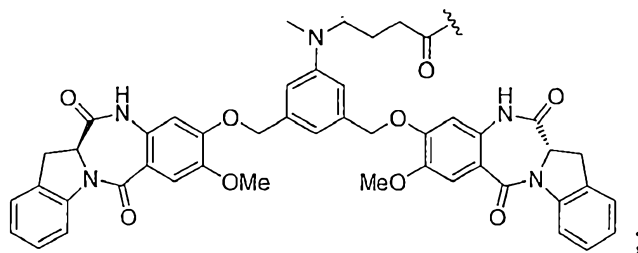
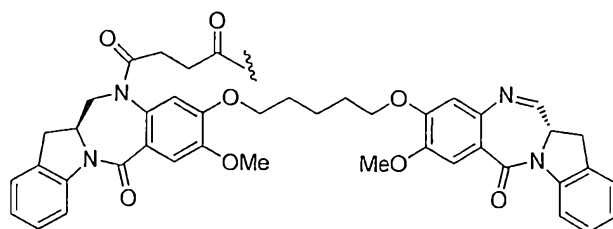
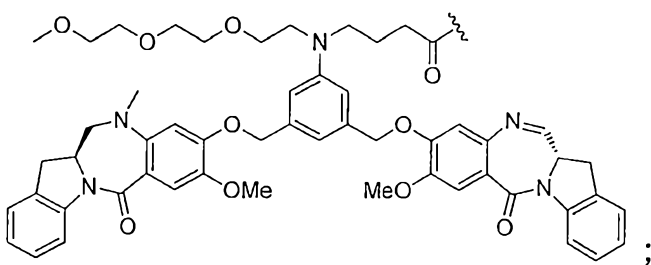
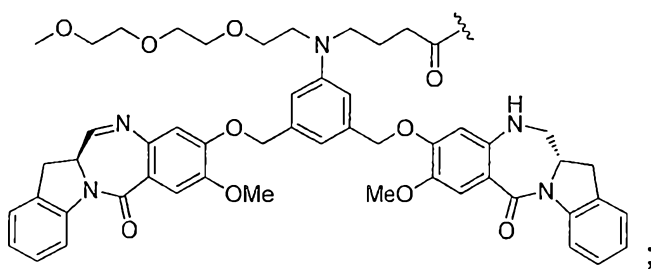
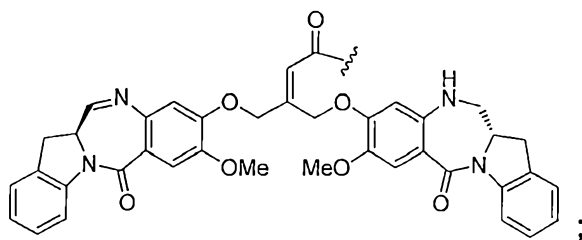
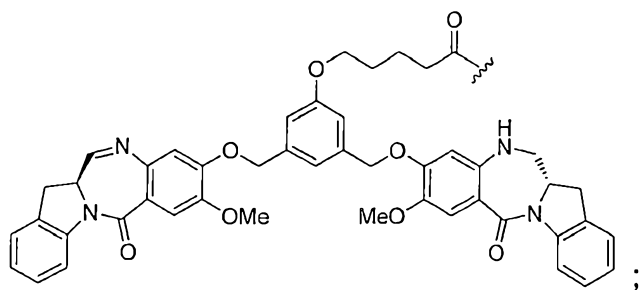
L 不存在、或為連接基團、聚乙二醇單元 $-(OCH_2CH_2)_n-$ 、具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基或烯基、苯基、具有 1 至 6 個獨立選自 O、S、N 及 P 之雜原子的 3 員至 18 員雜環或 5 員至 18 員雜芳基環，其中該烷基或烯基視情況經連接基團取代；苯基或雜環或雜芳基環可視情況經取代，其中該取代基可為連接基團。

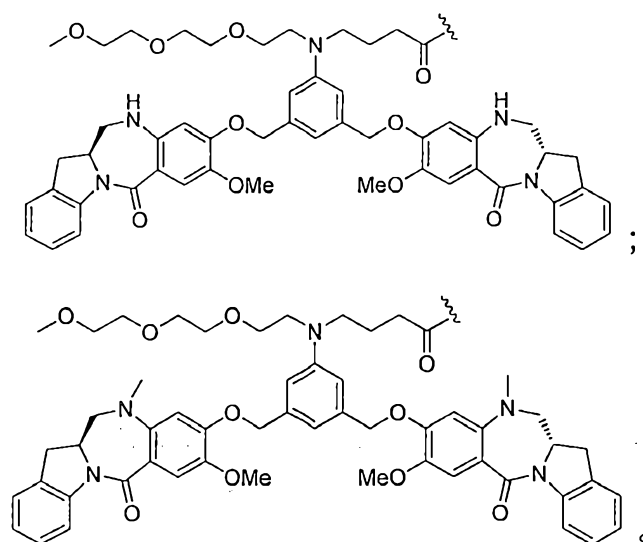
在某些實施例中，X 不為連接基團。在某些實施例中，N 與 C 之間之雙線 $=$ 表示單鍵，Y 不為 -H。

在某些實施例中，Y 為 -H 或選自以下之離去基團：-OR、-OCOR'、-OCOOR'、-OCONR'R''、-NR'R''、-NR'COR''、-NR'NR'R''、視情況取代之 5 員或 6 員含氮雜環(例如吡啶、四氫吡咯、吡唑、嗎啉等)、以 -NR'(C=NH)NR'R'' 表示之胍、胺基酸或以 -NRCOP' 表示之肽，其中 P' 為胺基酸或含有 2 至 20 個胺基酸單元之多肽、-SR、-SOR'、-SO₂M、-SO₃M、-OSO₃M、鹵素、氰基及疊氮基。在某些實施例中，Y 不為 -H。

在某些實施例中，該連結物之化合物不為以下任一化合物(波狀鍵表示將該化合物連接至 CBA 之鍵)：







本發明亦包括一種組合物(例如醫藥組合物),其包含新穎苯并二氮呿化合物、其衍生物或其連結物(及/或其溶劑化物、水合物及/或鹽)及載劑(醫藥學上可接受之載劑)。本發明另外包括一種組合物(例如醫藥組合物),其包含新穎苯并二氮呿化合物、其衍生物或其連結物(及/或其溶劑化物、水合物及/或鹽)及載劑(醫藥學上可接受之載劑),進一步包含第二治療劑。本發明組合物可用於在哺乳動物(例如人類)中抑制異常細胞生長或治療增生性病徵。本發明組合物可用於治療哺乳動物(例如人類)諸如癌症、類風濕性關節炎、多發性硬化、移植物抗宿主疾病(GVHD)、移植物排斥、狼瘡、肌炎、感染、免疫缺陷(諸如 AIDS)及發炎性疾病之病況。

本發明包括一種在哺乳動物(例如人類)中抑制異常細胞生長或治療增生性病徵的方法,其包括對該哺乳動物投予治療有效量之單獨或與第二治療劑組合之新穎苯并二氮呿化合物、其衍生物或其連結物(及/或其溶劑化物

及鹽)或其組合物。

本發明包括一種合成並使用新穎苯并二氮呋化合物、其衍生物及其連結物以在活體外、原位及活體內診斷或治療哺乳動物細胞、有機體或相關病理病況的方法。

本發明化合物、其衍生物或其連結物及包含其之組合物可用於治療諸如以異常細胞生長為特徵之病症(例如癌症)或減輕其嚴重程度。本發明化合物及連結物之其他應用包括(但不限於)治療哺乳動物(例如人類)諸如癌症、類風濕性關節炎、多發性硬化、移植物抗宿主疾病(GVHD)、移植物排斥、狼瘡、肌炎、感染、免疫缺陷(諸如 AIDS)及發炎性疾病之病況。

如本文中所用，當提到一個基團(例如 R^c 、L、X'等)「為」(或「不為」)連接基團或鏈接至反應性基團之連接基團時，意思指該基團「包含」(或「不包含」)連接基團或鏈接至反應性基團之連接基團。

【實施方式】

現將詳細參照本發明某些實施例，該等實施例之實例以所附結構及結構式予以說明。儘管本發明將結合列舉之實施例進行描述，但應瞭解，其不欲將本發明局限於該等實施例。相反，本發明擬涵蓋可包括在由申請專利範圍所界定之本發明範疇內的所有替代物、修改及等效物。熟諳本技術者將認識到與本文所述者相類似或相當之許多方法及材料，其可用於實踐本發明。

應瞭解，除非清楚聲明或不適當，否則本文所述任一實施例，包括在本發明不同態樣(例如化合物、化合物-連接基分子、連結物、組合物、製備及使用方法)及本說明書不同部分(包括僅在實例中所述之實施例)下所述者，可與本發明一個或多個其他實施例組合。實施例組合不限於經由多個獨立請求項主張之該等具體組合。

定義

如本文中所用，「直鏈或分支烷基」係指具有 1 至 20 個碳原子之飽和直鏈或分支鏈單價烴基。烷基之實例包括(但不限於)甲基、乙基、1-丙基、2-丙基、1-丁基、2-甲基-1-丙基、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、2-丁基、2-甲基-2-丙基、1-戊基、2-戊基、3-戊基、2-甲基-2-丁基、3-甲基-2-丁基、3-甲基-1-丁基、2-甲基-1-丁基、1-己基)、2-己基、3-己基、2-甲基-2-戊基、3-甲基-2-戊基、4-甲基-2-戊基、3-甲基-3-戊基、2-甲基-3-戊基、2,3-二甲基-2-丁基、3,3-二甲基-2-丁基、1-庚基、1-辛基及其類似基團。較佳烷基具有 1 至 10 個碳原子。更佳烷基具有 1 至 4 個碳原子。

「直鏈或分支烯基」係指具有 2 至 20 個碳原子及至少一個不飽和位點(即碳-碳雙鍵)之直鏈或分支鏈單價烴基，其中烯基包括具有「順式」及「反式」定向或者「E」及「Z」定向之基團。實例包括(但不限於)乙烯基($-\text{CH}=\text{CH}_2$)、烯丙基($-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$)及其類似基團。較佳烯基具有 2 至 10 個碳原子。更佳烷基具有 2 至 4 個碳原子。

「直鏈或分支炔基」係指具有 2 至 20 個碳原子及至少

一個不飽和位點(即碳-碳三鍵)之直鏈或分支單價烴基。實例包括(但不限於)乙炔基、丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、1-戊炔基、2-戊炔基、3-戊炔基、己炔基及其類似基團。較佳炔基具有 2 至 10 個碳原子。更佳炔基具有 2 至 4 個碳原子。

術語「**碳環(carbocycle)**」、「**碳環基**」及「**碳環(carbocyclic ring)**」係指具有 3 至 12 個碳原子呈單環形式或 7 至 12 個碳原子呈雙環形式之單價非芳族、飽和或部分不飽和環。具有 7 至 12 個原子之雙環碳環可佈置成例如雙環[4,5]、[5,5]、[5,6]或[6,6]系統，且具有 9 或 10 個環原子之雙環碳環可佈置成雙環[5,6]或[6,6]系統，或橋接系統，諸如雙環[2.2.1]庚烷、雙環[2.2.2]辛烷及雙環[3.2.2]壬烷。單環碳環之實例包括(但不限於)環丙基、環丁基、環戊基、1-環戊-1-烯基、1-環戊-2-烯基、1-環戊-3-烯基、環己基、1-環己-1-烯基、1-環己-2-烯基、1-環己-3-烯基、環己二烯基、環庚基、環辛基、環壬基、環癸基、環十一烷基、環十二烷基及其類似基團。

術語「**環狀烷基**」及「**環烷基**」可互換使用。其係指單價飽和碳環基團。較佳環狀烷基為 3 至 7 員單環基團。更佳環狀烷基為環己基。

術語「**環狀烯基**」係指在環結構中具有至少一個雙鍵之碳環基團。

術語「**環狀炔基**」係指在環結構中具有至少一個三鍵之碳環基團。

「芳基」意謂藉由自母體芳族環系統之單一碳原子移除一個氫原子得到之具有 6 至 18 個碳原子之單價芳族烴基。一些芳基在示範性結構中以「Ar」表示。芳基包括包含芳族環與飽和、部分不飽和環或芳族碳環或雜環稠合之雙環基團。典型芳基包括(但不限於)衍生自苯(苯基)、經取代苯、萘、蒽、茛基、茛滿基、1,2-二氫萘、1,2,3,4-四氫萘基及其類似基團之基團。較佳芳基為苯基。

術語「雜環(heterocycle)」、「雜環基」及「雜環(heterocyclic ring)」在本文中可互換使用且係指具有 3 至 18 個環原子之飽和或部分不飽和(即在環內具有一個或多個雙鍵及/或三鍵)碳環基團，其中至少一個環原子為選自氮、氧、磷及硫之雜原子，其餘環原子為 C，其中一個或多個環原子視情況獨立地經下文所述之一個或多個取代基取代。雜環可為具有 3 至 7 個環成員(2 至 6 個碳原子及 1 至 4 個選自 N、O、P 及 S 之雜原子)之單環或具有 7 至 10 個環成員(4 至 9 個碳原子及 1 至 6 個選自 N、O、P 及 S 之雜原子)的雙環，例如：雙環[4,5]、[5,5]、[5,6] 或 [6,6] 系統。雜環描述於 Paquette, Leo A.; 「Principles of Modern Heterocycle Chemistry」(W. A. Benjamin, New York, 1968)，尤其第 1、3、4、6、7 及 9 章；「The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs」(John Wiley & Sons, New York, 1950 出版)，尤其第 13、14、16、19 及 28 卷；及 J. Am. Chem. Soc.

(1960) 82:5566。「雜環基」亦包括雜環基團與飽和、部分不飽和環或芳族碳環或雜環稠合之基團。雜環之實例包括(但不限於)吡咯啉基、四氫呋喃基、二氫呋喃基、四氫噻吩基、四氫哌喃基、二氫哌喃基、四氫噻喃基、N-哌啉基、N-嗎啉基、N-硫嗎啉基、氧硫雜環己烷基(thioxanyl)、哌嗪基、高哌嗪基、氮雜環丁烷基、氧雜環丁烷基、硫雜環丁烷基、高哌啉基、氧雜環庚烷基、硫雜環庚烷基、氧氮雜環庚烷基、二氮呋基、硫氮雜環庚烷基、2-吡咯啉基、3-吡咯啉基、吲哚啉基、2H-哌喃基、4H-哌喃基、二噁烷基、1,3-二氧雜環戊烷基、吡唑啉基、二硫雜環己烷基、二硫雜環戊烷基、二氫哌喃基、二氫噻吩基、二氫呋喃基、吡啉啉基咪唑啉基、咪唑啉基、3-氮雜雙環[3.1.0]己基、3-氮雜雙環[4.1.0]庚基及氮雜雙環[2.2.2]己基。螺環部分亦包括在此定義之範疇內。環原子經側氧基(=O)部分取代之雜環基團之實例為嘧啶酮基及 1,1-二側氧基-硫嗎啉基。

術語「雜芳基」係指具有 5 或 6 員環之單價芳族基團，且包括具有 5 至 18 個原子且含有一或多個獨立選自氮、氧及硫之雜原子之稠環系統(其中至少一者為芳族的)。雜芳基之實例為吡啉基(包括例如 2-羥基吡啉基)、咪唑基、咪唑并吡啉基、嘧啉基(包括例如 4-羥基嘧啉基)、吡唑基、三唑基、吡嗪基、四唑基、呋喃基、噻吩基、異噁唑基、噻唑基、噁唑基、異噻唑基、吡咯基、喹啉基、異喹啉基、吲哚基、苯并咪唑基、苯并呋喃基、口辛哌

基(cinnolinyI)、吲唑基、吲嗪基、酞嗪基、噻嗪基、三嗪基、異吲唑基、蝶啶基、嘌呤基、噁二唑基、三唑基、噻二唑基、呋咕基、苯并呋咕基、苯并噻吩基、苯并噻唑基、苯并噁唑基、喹唑啉基、喹喔啉基、茶啶基、呋喃并吡啶基。

可能時，雜環或雜芳基可為碳(碳連接)或氮(氮連接)附接的。例如且不限於，碳鏈接之雜環或雜芳基係在吡啶之 2、3、4、5 或 6 位；噻嗪之 3、4、5 或 6 位；嘧啶之 2、4、5 或 6 位；吡嗪之 2、3、5 或 6 位；呋喃、四氫呋喃、硫呋喃、噻吩、吡咯或四氫吡咯之 2、3、4 或 5 位；噁唑、咪唑或噻唑之 2、4 或 5 位；異噁唑、吡唑或異噻唑之 3、4 或 5 位；氮雜環丙烷之 2 或 3 位；氮雜環丁烷之 2、3 或 4 位；喹啉之 2、3、4、5、6、7 或 8 位；或異喹啉之 1、3、4、5、6、7 或 8 位鏈接。

例如且不限於，氮鏈接雜環或雜芳基係在氮雜環丙烷、氮雜環丁烷、吡咯、吡咯啶、2-吡咯啉、3-吡咯啉、咪唑、咪唑啶、2-咪唑啉、3-咪唑啉、吡唑、吡唑啉、2-吡唑啉、3-吡唑啉、哌啶、哌嗪、吲哚、吲哚啉、1H-吲唑之 1 位；異吲哚或異吲哚啉之 2 位；嗎啉之 4 位；及噻唑或或 O-噻吧啉(O-carboline)之 9 位鏈接。

雜芳基或雜環基中存在之雜原子包括氧化形式，諸如 NO、SO 及 SO₂。

術語「鹵基」或「鹵素」係指 F、Cl、Br 或 I。

上述烷基、烯基、炔基、環狀烷基、環狀烯基、環狀

炔基、碳環基、芳基、雜環基及雜芳基可視情況經一或多個(例如 2、3、4、5、6 或更多個)取代基取代。

若一取代基描述為「經取代的」，則非氫取代基代替該取代基之碳、氧、硫或氮上之氫取代基。因此，例如經取代烷基取代基為至少一個非氫取代基代替烷基取代基上之氫取代基的烷基取代基。為便於說明，單氟烷基為經氟取代基取代之烷基，且二氟烷基為經兩個氟取代基取代之烷基。應認識到，若在取代基上存在一個以上取代，則每一非氫取代基可為相同或不同的(除非另作規定)。

若一取代基描述為「視情況經取代的」，則該取代基可為(1)未取代的或(2)經取代的。若一取代基之碳描述為視情況經取代基清單中之一或多者取代，則該碳上之一或多個氫(在存在的氫原子數情況下)可單獨及/或一起經獨立選擇之視情況選用之取代基替代。若一取代基之氮描述為視情況經取代基清單中之一或多者取代，則該氮上之一或多個氫(在存在的氫原子數情況下)可各自經獨立選擇之視情況選用之取代基替代。一個示範性取代基可描述為 $-NR'R''$ ，其中 R' 及 R'' 連同其所連接之氮原子一起可形成雜環。由 R' 及 R'' 連同其所連接之氮原子一起形成之雜環可為部分或完全飽和的。在一個實施例中，雜環由 3 至 7 個原子組成。在另一實施例中，雜環選自由以下組成之群：吡咯基、咪唑基、吡唑基、三唑基、四唑基、異噁唑基、吡啶基及噻唑基。

本說明書使用的術語「取代基」及「基團 (radical/group)」可互換。

若一組取代基統一描述為視情況經取代基清單中之一或多者取代，則該組可包括：(1)不可取代之取代基、(2)未經視情況選用之取代基取代的可取代之取代基、及/或(3)經一或多個視情況選用之取代基取代之可取代之取代基。

若一取代基描述為視情況經至多特定數量之非氫取代基取代，則該取代基可為(1)未取代的；或(2)經至多該特定數量之非氫取代基或取代基上至多最大數量之可取代位置取代，以數量較少者為準。因此，例如，若一取代基描述為視情況經至多 3 個非氫取代基取代之雜芳基，則具有少於 3 個可取代位置之任何雜芳基將視情況經至多僅該雜芳基所具有之可取代位置之數量的非氫取代基取代。在非限制性實例中，該等取代基可選自具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基；芳基、雜芳基、雜環基、鹵素、胍 $[-NH(C=NH)NH_2]$ 、 $-OR^{100}$ 、 $NR^{101}R^{102}$ 、 $-NO_2$ 、 $-NR^{101}COR^{102}$ 、 $-SR^{100}$ 、以 $-SOR^{101}$ 表示之亞磺、以 $-SO_2R^{101}$ 表示之磺、磺酸根 $-SO_3M$ 、硫酸根 $-OSO_3M$ 、以 $-SO_2NR^{101}R^{102}$ 表示之磺醯胺、氰基、疊氮基、 $-COR^{101}$ 、 $-OCOR^{101}$ 、 $-CONR^{101}R^{102}$ 及聚乙二醇單元 $(-OCH_2CH_2)_nR^{101}$ ，其中 M 為 H 或陽離子(諸如 Na^+ 或 K^+)； R^{101} 、 R^{102} 及 R^{103} 各獨立選自 H、具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、聚乙二醇單元

$(-\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{R}^{104}$ (其中 n 為 1 至 24 之整數)、具有 6 至 10 個碳原子之芳基、具有 3 至 10 個碳原子之雜環及具有 5 至 10 個碳原子之雜芳基；且 R^{104} 為 H 或具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基，其中以 R^{100} 、 R^{101} 、 R^{102} 、 R^{103} 及 R^{104} 表示之基團中的烷基、烯基、炔基、芳基、雜芳基及雜環基視情況經一或多個(例如 2、3、4、5、6 或更多)獨立選自以下基團之取代基取代：鹵素、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 及未取代之具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基。較佳視情況取代之上述烷基、烯基、炔基、環狀烷基、環狀烯基、環狀炔基、碳環基、芳基、雜環基及雜芳基的取代基包括鹵素、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NR}^{102}\text{R}^{103}$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{OR}^{101}$ 、芳基、雜芳基、雜環基、 $-\text{SR}^{101}$ 、 $-\text{SOR}^{101}$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}^{101}$ 及 $-\text{SO}_3\text{M}$ 。

術語「化合物」或「細胞毒性化合物」、「細胞毒性二聚體」及「細胞毒性二聚體化合物」可互換使用。其擬包括結構或結構式或其任何衍生物已經揭示於本發明或者結構或結構式或其任何衍生物以引用方式併入的化合物。該術語亦包括本發明中揭示之所有結構式之化合物的立體異構體、幾何異構體、互變異構體、溶劑化物、代謝物、鹽(例如醫藥學上可接受之鹽)以及前藥及前藥之鹽。該術語亦包括前述任一者之任何溶劑化物、水合物及多晶型物。在本申請案中所述本發明某些態樣中有關「立體異構體」、「幾何異構體」、「互變異構體」、「溶劑化物」、「代謝物」、「鹽」、「前藥」、「前藥鹽」、「連結物」、「連結物鹽」、「溶劑化物」、「水合物」或「多晶型物」

之具體陳述不應解釋為擬在術語「化合物」之使用未用該等其他形式陳述之本發明其他態樣中省略該等形式。

如本文中所用，術語「**連結物**」係指連接到細胞結合劑之本文所述化合物或其衍生物。

如本文中所用，術語「**可連接至細胞結合劑**」係指本文所述化合物或其衍生物包含至少一個適於將該等化合物或其衍生物鏈接至細胞結合劑之連接基團或其前體。

術語給定基團之「**前體**」係指可藉由任何脫保護、化學改質或偶合反應產生該基團之任何基團。

術語「**連接至細胞結合劑**」係指連結物分子包含至少一種本文所述化合物(例如式(I)-(IV)及(VIII)-(XI)之化合物及本文所述之藥物-連接基化合物)或其衍生物經由適合的連接基團或其前體結合至細胞結合劑。

術語「**對掌性**」係指分子具有鏡像搭配物之不可重合性，而術語「**非對掌性**」係指分子可重合於其鏡像搭配物。

術語「**立體異構體**」係指具有相同化學構成及連接性但原子之空間定向不同，無法藉由圍繞單鍵之旋轉而相互轉化的化合物。

「**非對映異構體**」係指具有兩個或兩個以上對掌性中心且分子彼此不呈鏡像之立體異構體。非對映異構體具有不同物理性質，例如熔點、沸點、光譜性質及反應性。非對映異構體混合物可借助諸如結晶法、電泳法及層析

法之高解析度分析程序分離。

「對映異構體」係指彼此互為不可重合之鏡像的化合物之兩種立體異構體。

本文中使用的立體化學定義及規則一般遵循 S. P. Parker 編輯, McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms(1984) McGraw-Hill Book Company, New York; 以及 Eliel, E. 及 Wilen, S., 「Stereochemistry of Organic Compound,」 John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994。

本發明化合物可含有不對稱或對掌性中心, 且因此以不同立體異構形式存在。預期本發明化合物之所有立體異構形式, 包括(但不限於)非對映異構體、對映異構體及阻轉異構體, 以及其混合物, 諸如外消旋混合物, 形成本發明之部分。許多有機化合物以光學活性形式存在, 即, 其能夠旋轉平面偏振光之平面。在描述光學活性化合物時, 使用前綴 D 及 L 或 R 及 S 表示分子關於其對掌性中心之絕對構型。前綴 d 及 l 或 (+) 及 (-) 用於表示化合物旋轉平面偏振光之符號, 其中 (-) 或 l 意謂該化合物為左旋的。帶有前綴 (+) 或 d 之化合物為右旋的。對於給定化學結構, 該等立體異構體為相同的, 但其彼此互為鏡像。特定立體異構體亦可稱為對映異構體, 且該等異構體之混合物通常稱為對映異構體混合物。對映異構體之 50:50 混合物稱為外消旋混合物或外消旋物, 其可在化學反應或製程無立體選擇性或立體特異性之情形下出現。術語「外消旋混合物」及「外消旋物」係指兩種對映異構物

質之等莫耳量混合物，不具有光學活性。

術語「互變異構體」或「互變異構形式」係指具有不同能量之結構異構體，其可經由低能障壁相互轉化。舉例而言，質子互變異構體(亦稱為質子異變的互變異構體)包括經由質子遷移發生之相互轉化，諸如酮基-烯醇及亞胺-烯胺異構化。價態互變異構體包括藉由一些鍵接電子之重排發生之相互轉化。

本申請案中使用之術語「前藥」係指能夠酶促或水解活化或轉化成更具活性之母體形式的本發明化合物之前體或衍生物形式。參看例如 Wilman, 「Prodrugs in Cancer Chemotherapy」 Biochemical Society Transactions, 14, 第 375-382 頁, 615th Meeting Belfast(1986)及 Stella 等人, 「Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery,」 Directed Drug Delivery, Borchardt 等人(編輯), 第 247-267 頁, Humana Press(1985)。本發明之前藥包括(但不限於)含酯前藥、含磷酸酯前藥、含硫代磷酸酯前藥、含硫酸酯前藥、含肽前藥、D-胺基酸修飾之前藥、醣化前藥、含 β -內醯胺前藥、含視情況取代之苯氧基乙醯胺的前藥、含視情況取代之苯基乙醯胺的前藥、5-氟胞嘧啶及其他 5-氟尿嘧啶前藥，其可轉化成更具活性且無細胞毒性之藥物。可衍生化成為適用於本發明中之前藥形式的細胞毒性藥物之實例包括(但不限於)本發明化合物及諸如上文所述之化療劑。

術語「前藥」亦擬包括可在生理條件(活體外或活體內)

下水解、氧化或以其他方式反應以提供本發明化合物之化合物之衍生物。前藥可僅在生理條件下發生該反應後變得具有活性，或其未反應形式可具有活性。本發明所涵蓋之前藥之實例包括(但不限於)包含生物可水解部分之本文所揭示任一結構式之化合物的類似物或衍生物，該等生物可水解部分諸如生物可水解醯胺、生物可水解酯、生物可水解胺基甲酸酯、生物可水解碳酸酯、生物可水解醯脲及生物可水解磷酸酯類似物。前藥之其他實例包括包含-NO、-NO₂、-ONO 或-ONO₂ 部分之本文所揭示任一結構式之化合物的衍生物。前藥通常可使用熟知方法製備，諸如 Bürger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery(1995) 172-178, 949-982(Manfred E. Wolff 編輯，第 5 版)所述之方法；亦參看 Goodman and Gilman's, The Pharmacological basis of Therapeutics, 第 8 版，McGraw-Hill, Int. 編，1992，「Biotransformation of Drugs」。

本發明之前藥之一種較佳形式包括包含在化合物/連結物之亞胺鍵與亞胺反應性試劑之間形成之加合物的本發明之化合物(具有或不具有任何連接基團)及連結物。本發明前藥之另一較佳形式包括諸如式(I) -(IV)者之化合物，其中當 N 與 C 之間之雙線=表示單鍵時，X 為 H 或胺保護基，且該化合物變為前藥。本發明之前藥可含有本文所述前藥形式中之一種或兩種(例如含有在化合物/連結物之亞胺鍵與亞胺反應性試劑之間形成的加合物，

及/或當 X 為 -H 時含有 Y 離去基團)。

術語「亞胺反應性試劑」係指能夠與亞胺基團反應之試劑。亞胺反應性試劑之實例包括(但不限於)亞硫酸根(H_2SO_3 、 H_2SO_2 或者 HSO_3^- 、 SO_3^{2-} 或 HSO_2^- 與陽離子形成的鹽)、偏亞硫酸氫根($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 或 $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$ 與陽離子形成的鹽)、單、二、三及四-硫代磷酸根(PO_3SH_3 、 $\text{PO}_2\text{S}_2\text{H}_3$ 、 POS_3H_3 、 PS_4H_3 或 PO_3S^{3-} 、 $\text{PO}_2\text{S}_2^{3-}$ 、 POS_3^{3-} 或 PS_4^{3-} 與陽離子形成的鹽)、硫代磷酸酯($(\text{R}^i\text{O})_2\text{PS}(\text{OR}^i)$ 、 R^iSH 、 R^iSOH 、 $\text{R}^i\text{SO}_2\text{H}$ 、 $\text{R}^i\text{SO}_3\text{H}$)、各種胺(羥基胺(例如 NH_2OH)、肼(例如 NH_2NH_2)、 $\text{NH}_2\text{O}-\text{R}^i$ 、 $\text{R}^{i'}\text{NH}-\text{R}^i$ 、 NH_2-R^i)、 $\text{NH}_2-\text{CO}-\text{NH}_2$ 、 $\text{NH}_2-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}_2$ 、硫代硫酸根($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 或 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 與陽離子形成的鹽)、連二亞硫酸根($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 或 $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ 與陽離子形成的鹽)、二硫代磷酸根($\text{P}(=\text{S})(\text{OR}^k)(\text{SH})(\text{OH})$ 或其與陽離子形成的鹽)、羥肟酸($\text{R}^k\text{C}(=\text{O})\text{NHOH}$ 或與陽離子形成的鹽)、醯肼($\text{R}^k\text{CONHNH}_2$)、甲醛次硫酸根($\text{HOCH}_2\text{SO}_2\text{H}$ 或 $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ 與陽離子形成的鹽, 諸如 $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-\text{Na}^+$)、糖化核苷酸(諸如 GDP-甘露糖)、氟達拉濱(fludarabine)或其混合物, 其中 R^i 及 $\text{R}^{i'}$ 各獨立地為具有 1 至 10 個碳原子之直鏈或分支烷基且經至少一個選自 $-\text{N}(\text{R}^j)_2$ 、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 及 $-\text{PO}_3\text{H}$ 之取代基取代; R^i 及 $\text{R}^{i'}$ 可視情況經本文所述之烷基之取代基取代; R^j 為具有 1 至 6 個碳原子之直鏈或分支烷基; 且 R^k 為具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基, 芳基、雜環基或雜芳基(較佳 R^k 為具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基; 更佳 R^k 為甲基、乙基

或丙基)。較佳該陽離子為一價陽離子，諸如 Na^+ 或 K^+ 。較佳亞胺反應性試劑選自亞硫酸鹽、羥基胺、脲及胍。更佳亞胺反應性試劑為 NaHSO_3 或 KHSO_3 。

如本文中所用且除非另作指示，否則術語「生物可水解醯胺」、「生物可水解酯」、「生物可水解胺基甲酸酯」、「生物可水解碳酸酯」、「生物可水解醯脲」及「生物可水解磷酸酯類似物」分別意謂這樣一種醯胺、酯、胺基甲酸酯、碳酸酯、醯脲或磷酸酯類似物，其：1) 不會破壞該化合物之生物活性且在活體內賦予該化合物有益之性質，諸如吸收、作用持續時間或作用起始；或 2) 自身不具生物活性，但在活體內轉化成生物活性化合物。生物可水解醯胺之實例包括(但不限於)低級烷基醯胺、 α -胺基酸醯胺、烷氧基醯基醯胺及烷基胺基烷基羰基醯胺。生物可水解酯之實例包括(但不限於)低級烷基酯、烷氧基醯氧基酯、烷基醯基胺基烷基酯及膽鹼酯。生物可水解胺基甲酸酯之實例包括(但不限於)低級烷基胺、經取代伸乙基二胺、胺基酸、羥基烷基胺、雜環及雜芳族胺，以及聚醚胺。尤佳之前藥及前藥鹽為該等化合物投予哺乳動物時增加本發明化合物之生物可用度者。

如本文中所用，短語「醫藥學上可接受之鹽」係指本發明化合物之醫藥學上可接受之有機或無機鹽。示範性鹽包括(但不限於)硫酸鹽、檸檬酸鹽、乙酸鹽、草酸鹽、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸鹽、硫酸氫鹽、磷酸鹽、酸式磷酸鹽、異煙酸鹽、乳酸鹽、水楊酸鹽、酸式檸檬

酸鹽、酒石酸鹽、油酸鹽、丹寧酸鹽、泛酸鹽、酒石酸氫鹽、抗壞血酸鹽、琥珀酸鹽、馬來酸鹽、龍膽酸鹽(gentisinate)、富馬酸鹽、葡糖酸鹽、葡糖醛酸鹽、糖酸鹽(saccharate)、甲酸鹽、苯甲酸鹽、麩胺酸鹽、甲烷磺酸鹽「甲磺酸鹽」、乙烷磺酸鹽、苯磺酸鹽、對甲苯磺酸鹽、帕莫酸鹽(pamoate)(即 1,1'-亞甲基-雙-(2-羥基-3-萘酸鹽))、鹼金屬(例如鈉及鉀)鹽、鹼土金屬(例如鎂)鹽及銨鹽。醫藥學上可接受之鹽可涉及包括另一分子，諸如乙酸根離子、琥珀酸根離子或其他平衡離子。該平衡離子可為使母體化合物上之電荷穩定的任何有機或無機部分。此外，醫藥學上可接受之鹽之結構中可具有一個以上帶電原子。多個帶電原子為醫藥學上可接受之鹽之一部分的情形可具有多個平衡離子。因此，醫藥學上可接受之鹽可具有一或多個帶電原子及/或一或多個平衡離子。

若本發明化合物為鹼，則所需醫藥學上可接受之鹽可藉由此項技術中可用之任何適合方法製備，例如用諸如鹽酸、氫溴酸、硫酸、硝酸、甲烷磺酸、磷酸及其類似酸之無機酸或用諸如乙酸、馬來酸、琥珀酸、扁桃酸、富馬酸、丙二酸、丙酮酸、草酸、乙醇酸、水楊酸、吡喃糖苷酸(pyranosidyl acid)(諸如葡糖醛酸或半乳糖醛酸)、 α 羥基酸(諸如檸檬酸或酒石酸)、胺基酸(諸如天冬胺酸或麩胺酸)、芳族酸(諸如苯甲酸或肉桂酸)、磺酸(諸如對甲苯磺酸或乙烷磺酸)或其類似酸之有機酸處理遊

離鹼。

若本發明之化合物為酸，則所需醫藥學上可接受之鹽可藉由任何適合之方法製備，例如用諸如胺(一級、二級或三級胺)、鹼金屬氫氧化物或鹼土金屬氫氧化物或其類似鹼之無機或有機鹼處理遊離酸。適合的鹽之說明性實例包括(但不限於)衍生自胺基酸(諸如甘胺酸及精胺酸)、氨、一級胺、二級胺及三級胺、及環狀胺(諸如哌啶、嗎啉及哌嗪)之有機鹽，以及衍生自鈉、鈣、鉀、鎂、錳、鐵、銅、鋅、鋁及鋰之無機鹽。

如本文中所用，術語「**溶劑化物**」意謂進一步包括藉由非共價分子間力結合之化學計量或非化學計量之量的溶劑(諸如水、異丙醇、丙酮、乙醇、甲醇、DMSO、乙酸乙酯、乙酸以及乙醇胺二氯甲烷、2-丙醇或其類似溶劑)的化合物。化合物之溶劑化物或水合物易於藉由將至少 1 莫耳當量羥基溶劑(諸如甲醇、乙醇、1-丙醇、2-丙醇或水)添加至化合物以引起亞胺部分之溶劑化或水合作用來製備。

術語「**異常細胞生長**」與「**增生性病變**」在本申請案中可互換使用。除非另作指示，否則如本文中所用，「**異常細胞生長**」係指細胞生長與正常調控機制無關(例如喪失接觸抑制作用)。此包括例如以下各物之異常生長：(1)藉由表現突變之酪胺酸激酶或過度表現受體酪胺酸激酶而增殖之腫瘤細胞(腫瘤)；(2)發生異常酪胺酸激酶活化之其他增生性疾病的良性及惡性細胞；(3)由受體酪胺酸

激酶增殖之任何腫瘤；(4)由異常絲胺酸/酰胺酸激酶活化引起之增殖之任何腫瘤；及(5)發生異常絲胺酸/酰胺酸激酶活化之其他增生性疾病的良性及惡性細胞。

術語「癌症」及「癌症的」係指或描述通常以不受調控之細胞生長為特徵的哺乳動物生理病況。「腫瘤」包含一或多個癌細胞及/或良性或癌前期細胞。癌症之實例包括(但不限於)癌瘤、淋巴瘤、母細胞瘤、肉瘤及白血病或淋巴系統惡性疾病。該等癌症之更特定之實例包括鱗狀細胞癌(例如上皮鱗狀細胞癌)、肺癌(包括小細胞肺癌、非小細胞肺癌(「NSCLC」))、肺腺癌及肺鱗狀細胞癌、腹膜癌、肝細胞癌、胃癌(包括胃腸癌)、胰腺癌、膠質母細胞瘤、子宮頸癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝細胞瘤、乳癌、結腸癌、直腸癌、結直腸癌、子宮內膜癌或子宮癌、唾液腺癌、腎癌、前列腺癌、外陰癌、甲狀腺癌、肝癌、肛門癌、陰莖癌、急性白血病、頭/腦及頸癌、淋巴器官癌症，及血液系統惡性疾病包括白血病(急性淋巴細胞白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴細胞白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、急性單核細胞白血病(AMOL)、毛細胞白血病(HCL)、T細胞幼淋巴細胞白血病(T-PLL)、大顆粒淋巴細胞白血病、成人T細胞白血病)、淋巴瘤(小淋巴細胞淋巴瘤(SLL)、霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin's lymphomas)(結節硬化型、混合細胞型、富含淋巴細胞型、淋巴細胞耗盡型或未耗盡型、及結節性淋巴細胞為主型霍奇金氏淋巴瘤)、非霍奇金氏淋巴瘤(所

有亞型)、慢性淋巴細胞白血病/小淋巴細胞淋巴瘤、B 細胞幼淋巴細胞白血病、淋巴漿細胞淋巴瘤(諸如瓦氏巨球蛋白血症(Waldenström macroglobulinemia))、脾邊緣區淋巴瘤、漿細胞贅瘤(漿細胞骨髓瘤、漿細胞瘤、單株免疫球蛋白沈積病、重鏈疾病)、結外邊緣區 B 細胞淋巴瘤(MALT 淋巴瘤)、結內邊緣區 B 細胞淋巴瘤(NMZL)、濾泡淋巴瘤、套細胞淋巴瘤、彌漫大 B 細胞淋巴瘤、縱隔(胸腺)大 B 細胞淋巴瘤、血管內大 B 細胞淋巴瘤、原發性滲出性淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤(Burkitt lymphoma)/白血病、T 細胞幼淋巴細胞白血病、T 細胞大顆粒淋巴細胞白血病、侵襲性 NK 細胞白血病、成人 T 細胞白血病/淋巴瘤、結外 NK/T 細胞淋巴瘤(鼻型)、腸病型 T 細胞淋巴瘤、肝脾 T 細胞淋巴瘤、母細胞性 NK 細胞淋巴瘤、蕁樣真菌病/塞紮裡氏症候群(Sezary syndrome)、原發性皮膚 CD30 陽性 T 細胞淋巴增生性病變、原發性皮膚型間變性大細胞淋巴瘤、淋巴瘤樣丘疹病、血管免疫母細胞性 T 細胞淋巴瘤、周圍 T 細胞淋巴瘤(非特指型)、間變性大細胞淋巴瘤)、多發性骨髓瘤(漿細胞骨髓瘤或卡勒氏病(Kahler's disease))。

「治療劑」涵蓋諸如抗體、肽、蛋白質、酶之生物試劑或化療劑。

「化療劑」為適用於治療癌症之化合物。化療劑之實例包括厄洛替尼(Erlotinib)(TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.)、硼替佐米(Bortezomib)(VELCADE®, Millennium

Pharm.)、氟維斯群 (Fulvestrant)(FASLODEX®， AstraZeneca)、索坦 (Sutent)(SU11248， Pfizer)、來曲唑 (Letrozole)(FEMARA®， Novartis)、甲磺酸伊馬替尼 (Imatinib mesylate)(GLEEVEC®， Novartis)、PTK787/ZK 222584(Novartis)、奧沙利鉑 (Oxaliplatin)(Eloxatin®， Sanofi)、5-FU(5-氟尿嘧啶)、瘤可維 (Leucovorin)、雷帕黴素 (Rapamycin)(西羅莫斯 (Sirolimus)， RAPAMUNE®， Wyeth)、拉帕替尼 (Lapatinib)(TYKERB®， GSK572016， Glaxo Smith Kline)、洛那法尼 (Lonafarnib)(SCH 66336)、索拉非尼 (Sorafenib)(BAY43-9006， Bayer Labs)及吉非替尼 (Gefitinib)(IRESSA®， AstraZeneca)、AG1478、AG1571(SU 5271； Sugen)、烷基化劑 (諸如塞替派 (thiotepa)及 CYTOXAN®環磷醯胺；烷基磺酸酯，諸如白消安 (busulfan)、英丙舒凡 (improsulfan)及哌泊舒凡 (piposulfan)；氮雜環丙烷，諸如苯并多巴 (benzodopa)、卡波醌 (carboquone)、麥特多巴 (meturedopa)及優多巴 (uredopa)；乙烯亞胺及甲基三聚氰胺，包括六甲蜜胺 (altretamine)、曲他胺 (triethylenemelamine)、三伸乙基磷醯胺、三伸乙基硫代磷醯胺及三羥甲基三聚氰胺 (trimethylomelamine)；多聚乙醯 (acetogenin)(尤其布拉它辛 (bullatacin)及布拉它辛酮 (bullatacinone))；喜樹鹼 (camptothecin)(包括合成類似物拓撲替康 (topotecan))；苔蘚蟲素 (bryostatin)；海綿抑素 (callystatin)；CC-1065(包括其阿多來新 (adozelesin)、卡澤來新 (carzelesin)及比折

來新(bizelesin)合成類似物)；念珠藻素(cryptophycin)(尤其念珠藻素 1 及念珠藻素 8)；多拉司他汀(dolastatin)；倍癌黴素(duocarmycin)(包括合成類似物 KW-2189 及 CB1-TM1)；艾榴塞洛素(eleutherobin)；水鬼蕉鹼(pancratistatin)；匍枝珊瑚醇(sarcodictyin)；海綿抑素(spongistatin)；氮芥，諸如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chloronaphazine)、氯磷醯胺、雌莫司汀(estramustine)、異環磷醯胺(ifosfamide)、氮芥(mechlorethamine)、鹽酸甲氧氮芥(mechlorethamine oxide hydrochloride)、馬法蘭(melphalan)、新恩比興(novembichin)、膽甾醇苯乙酸氮芥(phenesterine)、潑尼莫司汀(prednimustine)、氯乙環磷醯胺(trofosfamide)、尿嘧啶芥(uracil mustard)；亞硝基脲，諸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)及雷尼莫司汀(ranimustine)；抗生素，諸如烯二炔抗生素(例如刺孢黴素(calicheamicin)，尤其刺孢黴素 γ 11 及刺孢黴素 ω 11)(Angew Chem. Intl. Ed. Engl. (1994) 33:183-186)；達內黴素(dynemicin)，包括達內黴素 A；雙膦酸鹽，諸如氯屈膦酸鹽(clodronate)；埃斯培拉黴素(esperamicin)；以及新抑癌蛋白生色團(neocarzinostatin chromophore)及相關色蛋白烯二炔抗生素生色團)、阿克拉黴素(aclacinomysins)、放線菌素(actinomycin)、安麴黴素(authramycin)、重氮絲氨酸(azaserine)、博萊黴素

(bleomycin)、放線菌素 C (cactinomycin)、卡柔比星 (carabycin)、洋紅黴素 (caminomycin)、卡巴米嗪 (carzinophilin)、色黴素 (chromomycinis)、更生黴素 (dactinomycin)、道諾黴素 (daunorubicin)、地托比星 (detorubicin)、6-重氮-5-側氧基-L-正白氨酸、ADRIAMYCIN®(阿黴素 (doxorubicin))、N-嗎啉并-阿黴素 (morpholino-doxorubicin)、氰基 N-嗎啉并阿黴素 (cyanomorpholino-doxorubicin)、2-吡啶并-阿黴素 (2-pyrrolino-doxorubicin) 及脫氧阿黴素)、表柔比星 (epirubicin)、依索比星 (esorubicin)、依達比星 (idarubicin)、麻西羅黴素 (marcellomycin)、絲裂黴素 (mitomycin)(諸如絲裂黴素 C)、黴酚酸 (mycophenolic acid)、諾拉黴素 (nogalamycin)、橄欖黴素 (olivomycins)、培洛黴素 (peplomycin)、泊非黴素 (porfiromycin)、嘌羅黴素 (puromycin)、三鐵阿黴素 (quelamycin)、多柔比星 (rodorubicin)、鏈黑菌素 (streptonigrin)、鏈唑黴素 (streptozocin)、塊菌素 (tubercidin)、烏苯美司 (ubenimex)、淨司他丁 (zinostatin)、佐柔比星 (zorubicin)；抗代謝物，諸如甲胺蝶呤 (methotrexate) 及 5-氟尿嘧啶 (5-FU)；葉酸類似物，諸如二甲葉酸 (denopterin)、甲胺蝶呤、蝶羅呤 (pteropterin)、三甲曲沙 (trimetrexate)；嘌呤類似物，諸如氟達拉濱、6-巰基嘌呤、硫咪嘌呤 (thiamniprine)、硫鳥嘌呤；嘧啶類似物，諸如安西他濱 (ancitabine)、阿紫胞苷 (azacitidine)、6-氮雜尿苷、卡莫

氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、雙脫氧尿苷、去氧
 氟尿苷(doxifluridine)、依諾他濱(enocitabine)、氟尿嘧
 啶(floxuridine)；雄激素，諸如卡魯甾酮(calusterone)、
 丙酸羥甲雄酮(dromostanolone propionate)、環硫雄醇
 (epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)、去氫甾內酯
 (testolactone)；抗腎上腺素，諸如氫魯米特
 (aminogluthimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦
 (trilostane)；葉酸補充劑，諸如亞葉酸；醋葡醛內酯
 (aceglatone)；丙醛氧基磷醯胺糖苷(aldophosphamide
 glycoside)；胺基乙醯丙酸；恩尿嘧啶(eniluracil)；胺苯
 吡啶(amsacrine)；貝曲布辛(bestrabucil)；比生群
 (bisantrene)；依達曲沙(edatraxate)；地法胺
 (defofamine)；秋水仙胺(demecolcine)；地吡醯
 (diaziquone)；艾氟米辛(elformithine)；依利醋鉍
 (elliptinium acetate)；埃坡黴素(epothilone)；依託格魯
 (etoglucid)；硝酸鎂；羥基脲；香菇多糖(lentinan)；洛
 尼達寧(lonidainine)；美登醇(maytansinoid)，諸如美登
 素(maytansine)及柄型菌素(ansamitocins)；米托胍脲
 (mitoguazone)；米托蒽醯(mitoxantrone)；莫匹達莫
 (mopidanmol)；二胺硝吡啶(nitraerine)；噴司他丁
 (pentostatin)；蛋氨酸芥(phenamet)；吡柔比星
 (pirarubicin)；洛索蒽醯(losoxantrone)；足葉草酸；2-乙
 基醯肼；甲苄肼(procarbazine)；PSK®多糖複合物(JHS
 Natural Products, Eugene, Oreg.)；雷佐生(razoxane)；根

瘤菌素 (rhizoxin) ; 施佐非蘭 (sizofuran) ; 鍺螺旋胺
 (spirogermanium) ; 細交鏈孢菌酮酸 (tenuazonic acid) ;
 三亞胺醌 (triaziquone) ; 2,2',2''-三氯三乙基胺 ; 單端孢
 黴烯 (trichothecene)(尤其 T-2 毒素、黏液黴素
 A(verracurin A)、桿孢菌素 A(roridin A)及安貴定
 (anguidine)) ; 脲烷 (urethan) ; 長春地辛 (vindesine) ; 達
 卡巴嗪 (dacarbazine) ; 甘露莫司汀 (mannomustine) ; 二溴
 甘露醇 (mitobronitol) ; 二溴衛矛醇 (mitolactol) ; 哌泊溴
 烷 (pipobroman) ; 蓋噻托辛 (gacytosine) ; 阿糖胞苷
 (arabinoside)(「Ara-C」) ; 環磷醯胺 ; 塞替派 ; 紫杉烷，
 例如 TAXOL®(紫杉醇 (paclitaxel) ; Bristol-Myers Squibb
 Oncology, Princeton, N.J.) 、
 ABRAXANE®(Cremophor-free)、紫杉醇之白蛋白工程改造
 之奈米粒子調配物 (American Pharmaceutical Partners,
 Schaumburg, Ill.)及 TAXOTERE®(多烯紫杉醇 (doxetaxel) ;
 Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France) ; 氯胺布西
 (chloranmbucil) ; GEMZAR®(gemcitabine) ; 6-硫鳥嘌呤 ;
 巯基嘌呤 ; 甲胺蝶呤 ; 鉑類似物，諸如順鉑 (cisplatin)及
 卡鉑 (carboplatin) ; 長春鹼 (vinblastine) ; 依託泊苷
 (etoposide)(VP-16) ; 異環磷醯胺 ; 米托蒽醌 ; 長春新鹼
 (vincristine) ; NAVELBINE®(長春瑞濱 (vinorelbine)) ; 諾消
 靈 (novantrone) ; 替尼泊苷 (teniposide) ; 依達賽特
 (edatrexate) ; 柔紅黴素 (daunomycin) ; 胺基蝶呤
 (aminopterin) ; 卡培他濱 (capecitabine)(XELODA®) ; 伊班

膦酸鹽 (ibandronate)；CPT-11；拓撲異構酶抑制劑 RFS 2000；二氟甲基鳥胺酸 (DMFO)；類視色素，諸如視黃酸；及上述任一者之醫藥學上可接受之鹽、酸及衍生物。

「化療劑」之定義中亦包括：(i)用於調控或抑制針對腫瘤之激素作用的抗激素劑，諸如抗雌激素劑及選擇性雌激素受體調節劑 (SERM)，包括例如他莫昔芬 (tamoxifen)(包括 NOLVADEX®；檸檬酸他莫昔芬)、雷洛昔芬 (raloxifene)、屈洛昔芬 (droloxifene)、4-羥基他莫昔芬、曲沃昔芬 (trioxifene)、凱奧昔芬 (keoxifene)、LY117018、奧那司酮 (onapristone)及 FARESTON®(檸檬酸托瑞米芬 (toremifine citrate))；(ii)抑制調控腎上腺中雌激素產生之芳香酶的芳香酶抑制劑，諸如 4(5)-咪唑、胺魯米特、MEGASE®(醋酸甲地孕酮 (megestrol acetate))、AROMASIN®(依西美坦 (exemestane)；Pfizer)、福美坦 (formestane)、法屈唑 (fadrozole)、RIVISOR®(伏氣唑 (vorozole))、FEMARA®(來曲唑；Novartis)及 ARIMIDEX®(阿納曲唑 (anastrozole)；AstraZeneca)；(iii)抗雄激素，諸如氟他胺 (flutamide)、尼魯米特 (nilutamide)、比卡魯胺 (bicalutamide)、柳菩林 (leuprolide) 及戈舍瑞林 (goserelin)；以及曲沙他濱 (troxacitabine)(1,3-二氧雜環戊烷胞嘧啶核苷類似物)；(iv)蛋白激酶抑制劑；(v)脂質激酶抑制劑；(vi) 反義寡核苷酸，尤其抑制異常 T 細胞增殖所涉及之信號傳導路徑中基因表現者，例如 PKC- α 、Raf 及 H-Ras；(vii) 核糖酶，諸如 VEGF 表現抑制劑(例

如 ANGIOZYME®)及 HER2 表現抑制劑；(viii)疫苗，諸如基因療法疫苗，例如 ALLOVECTIN®、LEUVECTIN®及 VAXID®；PROLEUKIN® rIL-2；拓撲異構酶 1 抑制劑，諸如 LURTOTECAN®；ABARELIX® rmRH；(ix)抗血管生成劑，諸如貝伐單抗(bevacizumab)(AVASTIN®, Genentech)；及(x)上述任一者之醫藥學上可接受之鹽、酸及衍生物。其他抗血管生成劑包括 MMP-2(基質金屬蛋白酶 2)抑制劑、MMP-9(基質金屬蛋白酶 9)抑制劑、COX-II(環加氧酶 II)抑制劑及 VEGF 受體酪胺酸激酶抑制劑。可與本發明化合物/組合物組合使用之該等有用之基質金屬蛋白酶抑制劑的實例描述於：WO 96/33172、WO 96/27583、EP 818442、EP 1004578、WO 98/07697、WO 98/03516、WO 98/34918、WO 98/34915、WO 98/33768、WO 98/30566、EP 606,046、EP 931,788、WO 90/05719、WO 99/52910、WO 99/52889、WO 99/29667、WO 99/07675、EP 945864、美國專利第 5,863,949 號、美國專利第 5,861,510 號及 EP 780,386，所有該等專利皆以全文引用之方式併入本文中。VEGF 受體酪胺酸激酶抑制劑之實例包括 4-(4-溴-2-氟苯胺基)-6-甲氧基-7-(1-甲基哌啶-4-基甲氧基)喹唑啉(ZD6474；WO 01/32651 內之實例 2)、4-(4-氟-2-甲基吡啶-5-基氧基)-6-甲氧基-7-(3-吡咯啶-1-基丙氧基)-喹唑啉(AZD2171；WO 00/47212 內之實例 240)、瓦他拉尼(vatalanib)(PTK787；WO 98/35985)及 SU11248(舒尼替尼(sunitinib)；WO 01/60814)，及諸如 PCT 公開案第 WO

97/22596 號、第 WO 97/30035 號、第 WO 97/32856 號及第 WO 98/13354 號中所揭示者之化合物)。

可與本發明化合物組合使用之化療劑之其他實例包括 PI3K(磷酸肌醇-3 激酶)抑制劑，諸如以下中報導者：Yaguchi 等人 (2006) Jour. of the Nat. Cancer Inst. 98(8):545-556；美國專利第 7,173,029 號；美國專利第 7,037,915 號；美國專利第 6,608,056 號；美國專利第 6,608,053 號；美國專利第 6,838,457 號；美國專利第 6,770,641 號；美國專利第 6,653,320 號；美國專利第 6,403,588 號；WO 2006/046031；WO 2006/046035；WO 2006/046040；WO 2007/042806；WO 2007/042810；WO 2004/017950；US 2004/092561；WO 2004/007491；WO 2004/006916；WO 2003/037886；US 2003/149074；WO 2003/035618；WO 2003/034997；US 2003/158212；EP 1417976；US 2004/053946；JP 2001247477；JP 08175990；JP 08176070；美國專利第 6,703,414 號；及 WO 97/15658，所有該等專利文獻均以全文引用之方式併入本文中。該等 PI3K 抑制劑之具體實例包括 SF-1126(PI3K 抑制劑，Semafore Pharmaceuticals)、BEZ-235(PI3K 抑制劑，Novartis)、XL-147(PI3K 抑制劑，Exelixis, Inc.)。

化療劑亦可包括本文中引用之通用藥物或商標名藥物之生物類似物或其改進藥物中任一者，包括改進之調配物、前藥、傳遞方式(持續釋放、生物黏附性塗層、靶向傳遞等)及劑型。

「代謝物」為由特定化合物、其衍生物或其連結物或其鹽在體內代謝產生之產物。化合物、其衍生物或其連結物之代謝物可使用此項技術中已知之常規技術鑒別，且其活性可使用諸如本文所述者之測試確定。該等產物可例如由投予之化合物之氧化、羥基化、還原、水解、胺化、脫胺、酯化、脫酯、酶促裂解及其類似反應產生。因此，本發明包括藉由包含使本發明化合物、其衍生物或其連結物與哺乳動物接觸一段足以產生其代謝產物之時間之方法而製備的本發明化合物、其衍生物或其連結物之代謝物(包括化合物、其衍生物或其連結物)。

短語「醫藥學上可接受之」表示物質或組合物必須與構成調配物之其他成分及/或用其治療之哺乳動物在化學上及/或毒理學上相容。

術語「保護基」或「保護部分」係指常用於在化合物、其衍生物或其連結物上之其他官能基反應時阻斷或保護特定官能基的取代基。舉例而言，「胺保護基」或「胺基保護部分」為連接至胺基以阻斷或保護化合物中之胺基官能基的取代基。該等基團為此項技術中熟知的(參看例如 P. Wuts 及 T. Greene, 2007, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 第 7 章, J. Wiley & Sons, NJ)且例證為胺基甲酸酯，諸如胺基甲酸甲酯及胺基甲酸乙酯、Fmoc、經取代胺基甲酸乙基酯、藉由 1,6- β -消除反應(亦稱「自消耗(self immolative)」)裂解之胺基甲酸酯；脲；醯胺；肽；烷基及芳基衍生物。適合之胺基保護基包括

乙醯基、三氟乙醯基、第三丁氧羰基(BOC)、苯甲氧基羰基(CBZ)及9-芴基亞甲基氧基羰基(fluorenylmethylenoxycarbonyl; Fmoc)。有關保護基及其應用之一般描述，參看 P. G.M. Wuts & T. W. Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, New York, 2007。

術語「離去基團」係指一組在取代或置換期間離去之帶電或不帶電部分。該等離去基團為此項技術中熟知的，且包括(但不限於)鹵素、酯、烷氧基、羥基、甲苯磺酸酯基、三氟甲磺酸酯基、甲磺酸酯基、腈、疊氮基、胺基甲酸酯基、二硫化物、硫酯、硫醚及重氮化合物。

術語「雙官能交聯劑」、「雙官能連接基」或「交聯劑」係指具有兩個反應性基團之改質劑，該兩個反應性基團中一者能夠與細胞結合劑反應，而另一者與細胞毒性化合物反應，以將兩個部分連接在一起。該等雙官能交聯劑為此項技術中熟知的(參看例如 Isalm 及 Dent in *Bioconjugation* 第 5 章，第 218-363 頁，Groves Dictionaries Inc. New York, 1999)。舉例而言，能夠經由硫醚鍵鍵聯之雙官能交聯劑包括用以引入馬來醯亞胺基之 *N*-琥珀醯亞胺基-4-(*N*-馬來醯亞胺基甲基)-環己烷-1-甲酸酯(SMCC)或用以引入碘代乙醯基之 *N*-琥珀醯亞胺基-4-(碘代乙醯基)-胺基苯甲酸酯(SIAB)。將馬來醯亞胺基或鹵代乙醯基引入細胞結合劑上之其他雙官能交聯劑為此項技術中熟知的(參看美國專利申請案

2008/0050310、20050169933，可從 Pierce Biotechnology Inc. P.O. Box 117, Rockland, IL 61105, USA 獲得)且包括(但不限於)雙-馬來醯亞胺基聚乙二醇(BMPEO)、 BM(PEO)_2 、 BM(PEO)_3 、 $\text{N-(}\beta\text{-馬來醯亞胺基丙氧基)琥珀醯亞胺酯(BMPS)}$ 、 γ -馬來醯亞胺基丁酸 N-琥珀醯亞胺酯(GMBS) 、 ϵ -馬來醯亞胺基己酸 N-羥基琥珀醯亞胺酯(EMCS) 、5-馬來醯亞胺基戊酸 NHS、HBVS、 $\text{N-琥珀醯亞胺基-4-(N-馬來醯亞胺基甲基)-環己烷-1-羧基-(6-醯胺基己酸酯)}$ (其為 SMCC(LC-SMCC)之「長鏈」類似物)、間馬來醯亞胺基苯甲醯基- N-羥基琥珀醯亞胺酯(MBS) 、4-(4- N-馬來醯亞胺基苯基)-丁醯肼或鹽酸鹽(MPBH)、 $\text{N-琥珀醯亞胺基 3-(溴乙醯胺基)丙酸酯(SBAP)}$ 、 $\text{N-琥珀醯亞胺基碘代乙酸酯(SIA)}$ 、 κ -馬來醯亞胺基十一烷酸 N-琥珀醯亞胺酯(KMUA) 、 $\text{N-琥珀醯亞胺基 4-(對馬來醯亞胺基苯基)-丁酸酯(SMPB)}$ 、 $\text{琥珀醯亞胺基-6-(}\beta\text{-馬來醯亞胺基丙醯胺)己酸酯(SMPH)}$ 、 $\text{琥珀醯亞胺基-(4-乙烯基磺醯基)苯甲酸酯(SVSB)}$ 、二硫代雙-馬來醯亞胺基乙烷(DTME)、1,4-雙-馬來醯亞胺基丁烷(BMB)、1,4 雙馬來醯亞胺基-2,3-二羥基丁烷(BMDB)、雙-馬來醯亞胺基己烷(BMH)、雙-馬來醯亞胺基乙烷(BMOE)、磺基琥珀醯亞胺基 4-(N-馬來醯亞胺基-甲基)環己烷-1-甲酸酯(磺基-SMCC)、磺基琥珀醯亞胺基(4-碘-乙醯基)胺基苯甲酸酯(磺基-SIAB)、間馬來醯亞胺基苯甲醯基- $\text{N-羥基磺基琥珀醯亞胺酯(磺基-MBS)}$ 、 $\text{N-(}\gamma\text{-馬來醯亞胺基丁醯氧基)磺基琥珀醯亞胺酯}$

(磺基-GMBS)、N-(ϵ -馬來醯亞胺基己醯氧基)磺基琥珀醯亞胺酯(磺基-EMCS)、N-(κ -馬來醯亞胺基十一烷醯基)磺基琥珀醯亞胺酯(磺基-KMUS)、及磺基琥珀醯亞胺基4-(對馬來醯亞胺基苯基)丁酸酯(磺基-SMPB)。

異雙官能交聯劑為具有兩個不同反應性基團之雙官能交聯劑。亦可使用含有胺反應性 N-羥基琥珀醯亞胺基(NHS 基團)及羰基反應性肼基之異雙官能交聯劑將本文所述細胞毒性化合物與細胞結合劑(例如抗體)連接。該等市售異雙官能交聯劑之實例包括琥珀醯亞胺基 6-肼基煙醯胺丙酮脒(SANH)、琥珀醯亞胺基 4-肼基對苯二甲酸酯鹽酸鹽(SHTH)、及琥珀醯亞胺基肼煙酸酯鹽酸鹽(SHNH)。帶有酸不穩定鍵聯之連結物亦可使用帶有肼之本發明苯并二氮呋衍生物製備。可用的雙官能交聯劑之實例包括琥珀醯亞胺基-對甲醯基苯甲酸酯(SFB)及琥珀醯亞胺基-對甲醯基苯氧基乙酸酯(SFPA)。

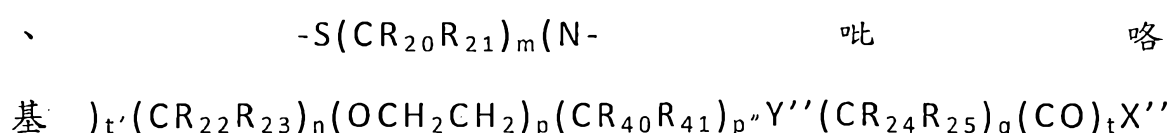
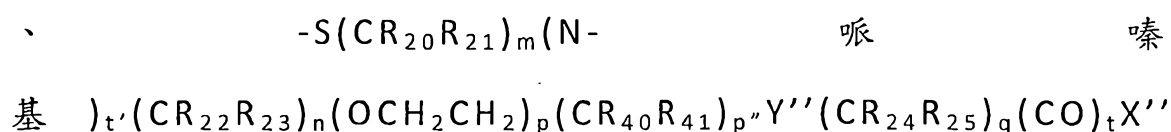
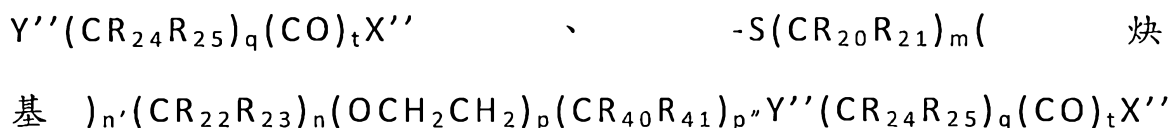
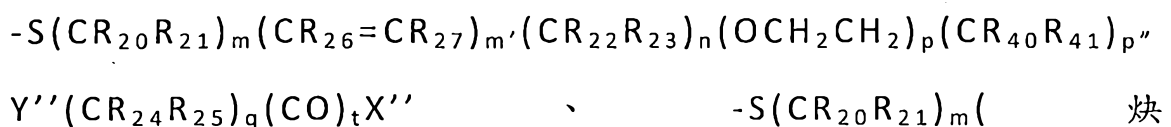
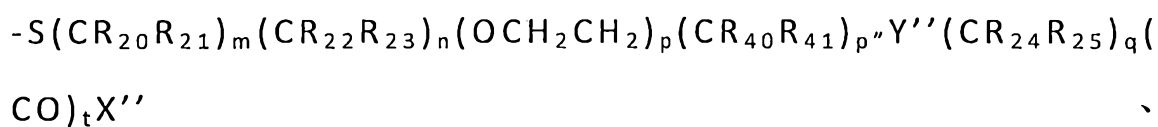
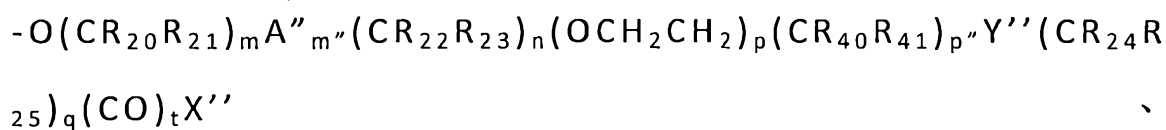
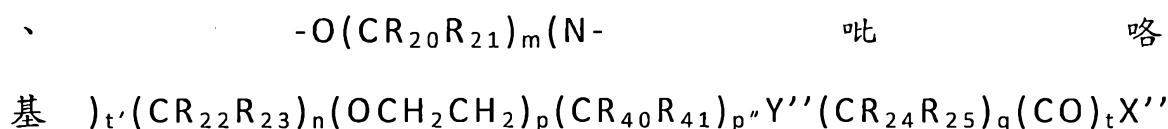
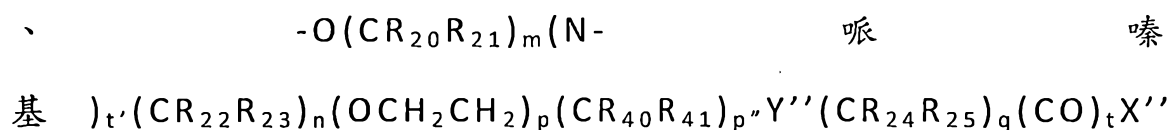
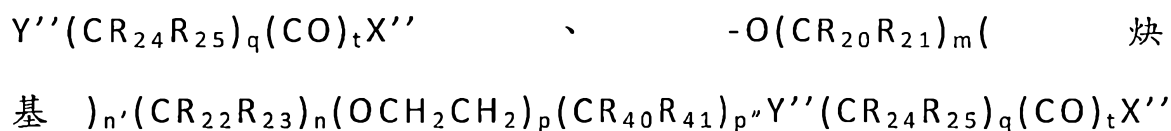
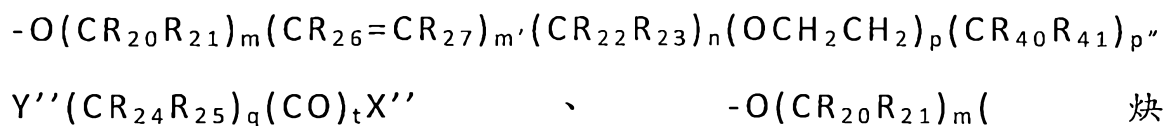
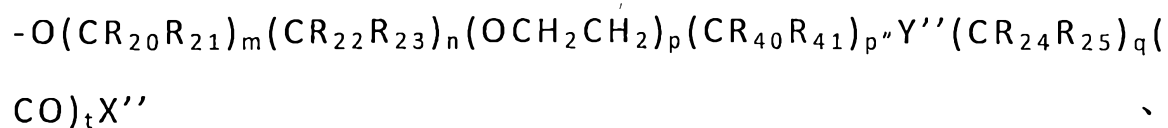
能夠經由二硫鍵將細胞結合劑與細胞毒性化合物鍵聯之雙官能交聯劑為此項技術中已知的且包括用以引入二硫吡啶基之 N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)、N-琥珀醯亞胺基-4-(2-吡啶基二硫基)戊酸酯(SPP)、N-琥珀醯亞胺基-4-(2-吡啶基二硫基)丁酸酯(SPDB)、N-琥珀醯亞胺基-4-(2-吡啶基二硫基)2-磺基丁酸酯(磺基-SPDB)。可用以引入二硫基團之其他雙官能交聯劑為此項技術中已知的且揭示於：美國專利 6,913,748、6,716,821 及 US 專利公開案 20090274713 及

20100129314，所有該等專利皆以引用方式併入本文中。或者，亦可使用交聯劑，諸如 2-亞胺基硫雜環戊烷、高半胱胺酸硫內酯或 S-乙醯基琥珀酸酐引入硫醇基。

如本文所定義，「**連接基**」、「**連接部分**」或「**連接基團**」係指將兩個基團(諸如細胞結合劑與細胞毒性化合物)連接在一起之部分。通常，連接基在連接其所連接之兩個基團之條件下實質上呈惰性。雙官能交聯劑可包含兩個反應性基團，在連接部分每一端各一個，以致一個反應性基團可首先與細胞毒性化合物反應以提供帶有連接部分及另一反應性基團之化合物，該化合物隨後可與細胞結合劑反應。或者，雙官能交聯劑之一端可首先與細胞結合劑反應以提供帶有連接部分及另一反應性基團之細胞結合劑，該細胞結合劑隨後可與細胞毒性化合物反應。連接部分可含有使細胞毒性部分在特定部位釋放之化學鍵。適合之化學鍵為此項技術中熟知的且包括二硫鍵、硫醚鍵、酸不穩定鍵、光不穩定鍵、肽酶不穩定鍵及酯酶不穩定鍵(參看例如美國專利 5,208,020；5,475,092；6,441,163；6,716,821；6,913,748；7,276,497；7,276,499；7,368,565；7,388,026 及 7,414,073)。較佳為二硫鍵、硫醚鍵及肽酶不穩定鍵。可用於本發明中之其他連接基包括不可裂解之連接基，諸如美國公開案第 20050169933 號中詳細描述者；或帶電連接基或親水性連接基，且描述於 US 2009/0274713、US 2010/01293140 及 WO 2009/134976，各案以引用之方式清楚地併入本文

中，各案以引用之方式清楚地併入本文中。

在一個實施例中，一端連接有反應性基團(諸如反應性酯)之連接基團選自以下：



-S(CR₂₀R₂₁)_mA''_m''(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_p''Y''(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX''

-NR₃₃(C=O)_p''(CR₂₀R₂₁)_m(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_p''Y''(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX''

-NR₃₃(C=O)_p''(CR₂₀R₂₁)_m(CR₂₆=CR₂₇)_m'(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_p''Y''(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX''、-NR₃₃(C=O)_p''(CR₂₀R₂₁)_m(炔基)_n'(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_p''Y''(CR₂₄R₂₅)_q-(CO)_tX''

、-NR₃₃(C=O)_p''(CR₂₀R₂₁)_m(N- 哌 嗪基)_t'(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_p''Y''(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX''

、-NR₃₃(C=O)_p''(CR₂₀R₂₁)_m(N- 吡 咯基)_t'(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_p''Y''(CR₂₄R₂₅)_q-(CO)_tX''

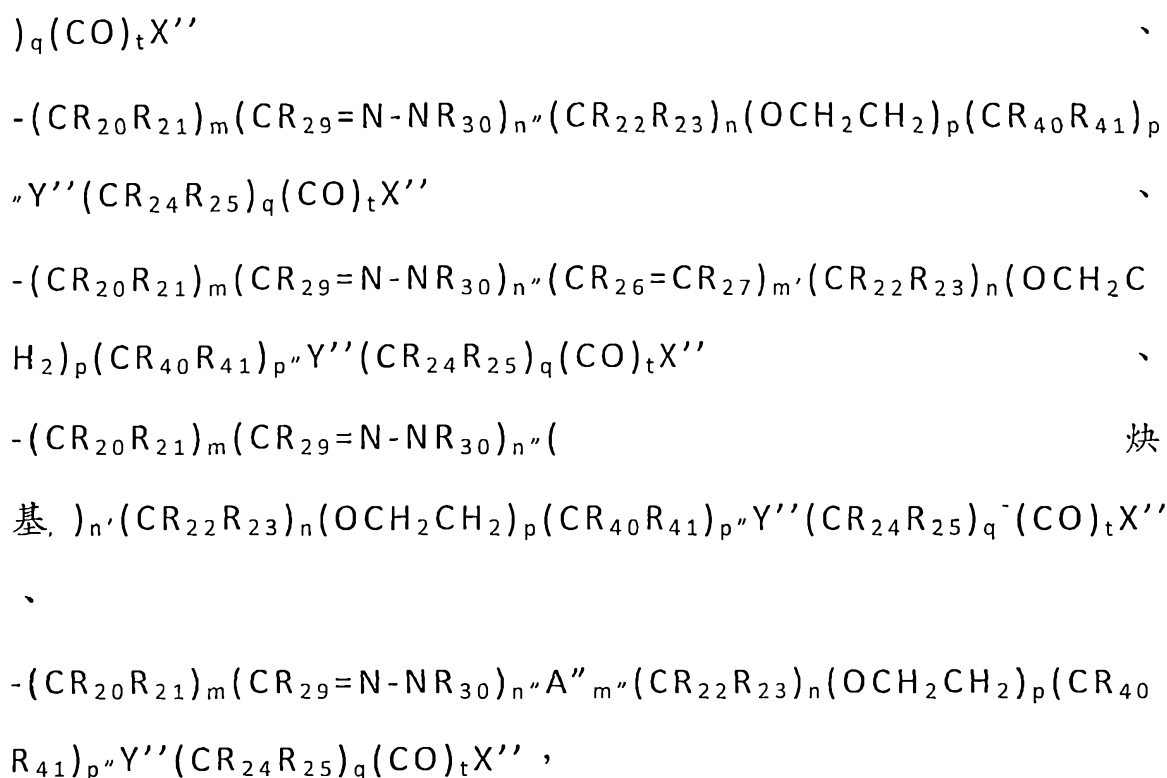
、-NR₃₃(C=O)_p''(CR₂₀R₂₁)_mA''_m''(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_p''Y''(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX''

-(CR₂₀R₂₁)_m(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_p''Y''(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX''

-(CR₂₀R₂₁)_m(CR₂₆=CR₂₇)_m'(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_p''Y''(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX''、-(CR₂₀R₂₁)_m(炔基)_n'(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_p''Y''(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX''

、-(CR₂₀R₂₁)_m(N- 哌 嗪基)_t'(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_p''Y''(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX''

-(CR₂₀R₂₁)_mA''_m''(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_p''Y''(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX''



其中：

m 、 n 、 p 、 q 、 m' 、 n' 、 t' 為 1 至 10 之整數，或視情況為 0；

t 、 m'' 、 n'' 及 p'' 為 0 或 1；

X'' 選自 OR_{36} 、 SR_{37} 、 $\text{NR}_{38}\text{R}_{39}$ ，其中 R_{36} 、 R_{37} 、 R_{38} 、 R_{39} 為 H，或具有 1 至 20 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基，及或聚乙二醇單元 $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$ ； R_{37} 視情況為硫醇保護基，當 $t = 1$ 時， COX'' 形成選自以下各物之反應性酯：N-羥基琥珀醯亞胺酯、N-羥基鄰苯二甲醯亞胺酯、N-羥基磺基-琥珀醯亞胺酯、對硝基苯基酯、二硝基苯基酯、五氟苯基酯及其衍生物，其中該等衍生物有助於醯胺鍵形成；

Y'' 不存在，或選自 O、S、S-S 或 NR_{32} ，其中 R_{32} 具有上文關於 R 所給相同之定義；或

當 Y'' 不為 $S-S$ 且 $t = 0$ 時， X'' 選自馬來醯亞胺基、鹵代乙醯基或 SR_{37} ，其中 R_{37} 具有與上述相同之定義；

A'' 為選自以下各物之胺基酸：甘胺酸、丙胺酸、白胺酸、纈胺酸、離胺酸、瓜胺酸及麩胺酸；或含有 2 至 20 個胺基酸單元之多肽；

R_{20} 、 R_{21} 、 R_{22} 、 R_{23} 、 R_{24} 、 R_{25} 、 R_{26} 及 R_{27} 相同或不同，且為 $-H$ 或具有 1 至 5 個碳原子之直鏈或分支烷基；

R_{29} 與 R_{30} 相同或不同，且為 $-H$ 或具有 1 至 5 個碳原子之烷基；

R_{33} 為 $-H$ ，或具有 1 至 12 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、聚乙二醇單元 $R-(OCH_2CH_2)_n-$ ，或 R_{33} 為 $-COR_{34}$ 、 $-CSR_{34}$ 、 $-SOR_{34}$ 或 $-SO_2R_{34}$ ，其中 R_{34} 為 H ，或具有 1 至 20 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基，或聚乙二醇單元 $-(OCH_2CH_2)_n$ ；且

R_{40} 及 R_{41} 中一者視情況為帶負電或帶正電官能基，且另一者為 H 或具有 1 至 4 個碳原子之烷基、烯基、炔基。

上述連接基團中任一者可存在於任一本發明化合物、藥物-連接基化合物、或連結物中，包括代替本文所述任一結構式之連接基團。

術語「胺基酸」係指以 $NH_2-C(R^{aa'}R^{aa})-C(=O)OH$ 表示之天然存在胺基酸或非天然存在胺基酸，其中 R^{aa} 及 $R^{aa'}$ 各獨立地為 H ；視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基；芳基；雜芳基；或雜環基。術語「胺基酸」亦係指當一個氫原子自胺基酸

之胺及 / 或羧基端移除時得到之相應殘基，諸如
 $-\text{NH}-\text{C}(\text{R}^{\text{aa}}\text{'R}^{\text{aa}})-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ 。

術語「陽離子」係指帶正電之離子。陽離子可為一價(例如 Na^+ 、 K^+ 等)、二價(例如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等)或多價(例如 Al^{3+} 等)。較佳陽離子為一價。

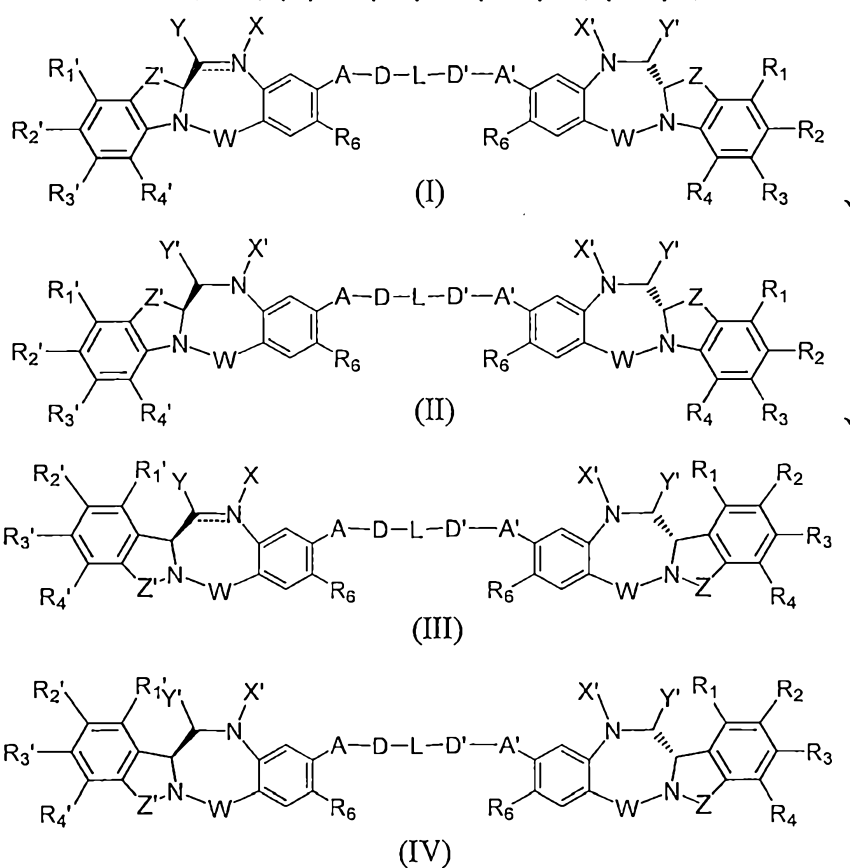
術語「治療有效量」意謂在受試者體內引起所需生物反應之活性化合物或連結物之量。該反應包括減輕所治療疾病或病症之症狀；預防、抑制或延遲疾病症狀或疾病本身之復發；相比不存在該治療之情形增加受試者之壽命；或預防、抑制或延遲疾病症狀或疾病本身之發展。有效量之確定在熟諳本技術者之能力範圍內，尤其依據本文提供之詳細揭示內容。化合物 I 之毒性及治療功效可由利用細胞培養及實驗動物之標準醫藥學程序確定。本發明化合物或連結物或欲投予受試者之其他治療劑的有效量將取決於多發性骨髓瘤之階段、類別及狀態，以及受試者之特徵，諸如一般健康狀況、年齡、性別、體重及耐藥性。本發明化合物或連結物或欲投予之其他治療劑的有效量亦取決於投藥途徑及劑型。劑量及間隔可個別調整以提供足以維持所需治療效果之活性化合物的血漿含量。

細胞毒性化合物

本發明針對本文所述細胞毒性化合物(例如式(I)、(II)、(III)及(IV)之化合物)。在一個實施例中，本發明細胞毒性化合物不包括 US 2010/0203007(其完整教導以引用方式

併入本文中)中所述任何化合物，諸如下文限制條件中特別否決者。

在第一個特定實施例中，本發明提供一種細胞毒性化合物，其包含鏈接至反應性基團之連接基團，其能夠將細胞毒性化合物共價連接至細胞結合劑(CBA)，其中該細胞毒性化合物以下式(I)、(II)、(III)或(IV)中任一者表示：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

N與C之間之雙線=表示單鍵或雙鍵，其限制條件為，當其為雙鍵時，X不存在，且Y為-H或具有1至4個碳原子之直鏈或分支烷基，且當其為單鍵時，X為-H、鏈接至反應性基團之連接基團、或胺保護部分；較佳N與C之間之雙線=表示雙鍵；

Y為-H或選自以下之離去基團：-OR、-OCOR'、

$-\text{OCOOR}'$ 、 $-\text{OCONR}'\text{R}''$ 、 $-\text{NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{NR}'\text{COR}''$ 、 $-\text{NR}'\text{NR}'\text{R}''$ 、
 視情況取代之 5 員或 6 員含氮雜環(例如吡啶、四氫吡
 咯、吡唑、嗎啉等)、以 $-\text{NR}'(\text{C}=\text{NH})\text{NR}'\text{R}''$ 表示之胍、胺基
 酸或以 $-\text{NRCOP}'$ 表示之肽(其中 P' 為胺基酸或含有 2 至 20
 個胺基酸單元之多肽)、 $-\text{SR}$ 、 $-\text{SOR}'$ 、 $-\text{SO}_2\text{M}$ 、 $-\text{SO}_3\text{M}$ 、
 $-\text{OSO}_3\text{M}$ 、鹵素、氰基及疊氮基，其中 M 為 $-\text{H}$ 或陽離子；
 諸如 Na^+ 或 K^+ 。較佳 M 為 $-\text{H}$ 或 Na^+ 。較佳 Y 選自 $-\text{SO}_3\text{M}$ 、
 $-\text{OH}$ 、 $-\text{OMe}$ 、 $-\text{OEt}$ 或 $-\text{NHOH}$ 。更佳 Y 為 $-\text{SO}_3\text{M}$ 或 $-\text{OH}$ ；或
 Y 為亞硫酸根(HSO_3 、 HSO_2 或 HSO_3^- 、 SO_3^{2-} 或 HSO_2^- 與陽
 離子形成的鹽)、偏亞硫酸氫根($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 或 $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$ 與陽離子
 形成的鹽)、單-、二-、三-及四-硫代磷酸根(PO_3SH_3 、
 $\text{PO}_2\text{S}_2\text{H}_2$ 、 POS_3H_2 、 PS_4H_2 或 PO_3S^{3-} 、 $\text{PO}_2\text{S}_2^{3-}$ 、 POS_3^{3-} 或 PS_4^{3-}
 與陽離子形成的鹽)、硫代磷酸酯($\text{R}^i\text{O})_2\text{PS}(\text{OR}^i)$ 、 R^iS 、
 R^iSO 、 R^iSO_2 、 R^iSO_3 、硫代硫酸根(HS_2O_3 或 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 與陽離
 子形成的鹽)、連二亞硫酸根(HS_2O_4 或 $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ 與陽離子形
 成的鹽)、二硫代磷酸根($\text{P}(=\text{S})(\text{OR}^{k'}) (\text{S})(\text{OH})$ 或其與陽離子
 形成的鹽)、羥肟酸($\text{R}^{k'}\text{C}(=\text{O})\text{NOH}$ 或與陽離子形成的鹽)、
 甲醛次硫酸根($\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ 或 $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ 與陽離子形成的
 鹽，諸如 $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-\text{Na}^+$)或其混合物，其中 R^i 為具有 1
 至 10 個碳原子之直鏈或分支烷基且經至少一個選自
 $-\text{N}(\text{R}^j)_2$ 、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 及 $-\text{PO}_3\text{H}$ 之取代基取代； R^i 可進一
 步視情況經本文所述之烷基之取代基取代； R^j 為具有 1
 至 6 個碳原子之直鏈或分支烷基； $\text{R}^{k'}$ 為具有 1 至 10 個碳
 原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基，芳基、雜

環基或雜芳基；較佳 Y 為亞硫酸氫根、連二亞硫酸根或偏亞硫酸氫根或其鹽(諸如鈉鹽)之加合物；

R 在每次出現時獨立選自由以下組成之群：-H、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、聚乙二醇單元 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$ 、視情況取代之具有 6 至 18 個碳原子之芳基、視情況取代之含有一或多個獨立選自氮、氧及硫之雜原子的 5 員至 18 員雜芳基環、或視情況取代之含有 1 至 6 個獨立選自 O、S、N 及 P 之雜原子的 3 員至 18 員雜環；

R' 與 R'' 相同或不同，且獨立選自 -H、-OH、-OR、-NHR、-NR₂、-COR、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、聚乙二醇單元 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$ 、及視情況取代之具有 1 至 6 個獨立選自 O、S、N 及 P 之雜原子的 3 員至 18 員雜環；

R^c 為 -H，或取代或未取代之具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基，或鏈接至反應性基團之連接基團；

n 為 1 至 24 之整數；

W 選自 C=O、C=S、CH₂、BH、SO 及 SO₂；

X' 選自由以下組成之群：-H、-OH、胺保護基、鏈接至反應性基團之連接基團、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、聚乙二醇單元 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$ 、視情況取代之具有 6 至 18 個碳原子之芳基(例如苯基)、視情況取代之含有一或多個獨立選自氮、氧及硫之雜原子的 5 員至 18 員雜芳基環，及視情

況取代之含有 1 至 6 個獨立選自 O、S、N 及 P 之雜原子的 3 員至 18 員雜環。較佳 X' 為 -H、-OH、-Me 或鏈接至反應性基團之連接基團。更佳 X' 為 -H；

Y' 選自由以下組成之群：-H、側氧基、鏈接至反應性基團之連接基團、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、視情況取代之 6 員至 18 員芳基、視情況取代之含有一或多個獨立選自氮、氧及硫之雜原子的 5 員至 18 員雜芳基環、視情況取代之具有 1 至 6 個雜原子之 3 員至 18 員雜環。較佳 Y' 選自 -H 或側氧基。更佳 Y' 為 -H；

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_1' 、 R_2' 、 R_3' 及 R_4' 各獨立選自由以下組成之群：-H、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、聚乙二醇單元 $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$ 、鹵素、胍 $[-NH(C=NH)NH_2]$ 、-OR、-NR'R''、-NO₂、-NCO、-NR'COR''、-SR、以 -SOR' 表示之亞碸、以 -SO₂R' 表示之碸、磺酸根 $-SO_3^-M^+$ 、硫酸根 $-OSO_3^-M^+$ 、以 -SO₂NR'R'' 表示之磺醯胺、氰基、疊氮基、-COR'、-OCOR'、-OCONR'R'' 及鏈接至反應性基團之連接基團。較佳 R_2 、 R_3 、 R_2' 及 R_3' 中一者為鏈接至反應性基團之連接基團且其餘為 -H；

R_6 為 -H、-R、-OR、-SR、-NR'R''、-NO₂、鹵素、鏈接至反應性基團之連接基團、-OR^c 或 -SR^c，其中 R^c 為 -H、具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基。較佳 R_6 為 -OMe 或 -SMe。甚至更佳 R_6 為 -OMe；

Z 及 Z' 獨立選自 $-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_n-CR_7R_8-(CH_2)_{n_a}-$ 、

$-(CH_2)_{n'}-NR_9-(CH_2)_{na'}-$ 、 $-(CH_2)_{n'}-O-(CH_2)_{na'}-$ 及
 $-(CH_2)_{n'}-S-(CH_2)_{na'}-$ ；

n' 與 na' 相同或不同且選自 0、1、2 及 3；

R_7 與 R_8 相同或不同且各獨立選自 -H、-OH、-SH、
 -COOH、-NHR'、聚乙二醇單元 $-(OCH_2CH_2)_n-$ 、胺基酸、帶
 有 2 至 6 個胺基酸之肽單元、視情況取代之具有 1 至 10
 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基；

R_9 獨立選自 -H、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之
 直鏈、分支或環狀烷基、聚乙二醇單元 $-(OCH_2CH_2)_n-$ ；

A 與 A' 相同或不同，且獨立選自 -O-、側氧基 $(-C(=O)-)$ 、
 $-CRR'O-$ 、 $-CRR'-$ 、-S-、 $-CRR'S-$ 、 $-N(R_5)-$ 及 $-CRR'N(R_5)-$ 。
 較佳 A 與 A' 相同或不同且選自 -O- 及 -S-。更佳 A 及 A' 為
 -O-；

R_5 在每次出現時獨立地為 -H 或視情況取代之具有 1 至
 10 個碳原子之直鏈或分支烷基；

D 與 D' 相同或不同，且獨立地不存在或選自由以下組
 成之群：胺基酸、帶有 2 至 6 個胺基酸之肽、及聚乙二
 醇單元 $-(OCH_2CH_2)_n-$ 、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原
 子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基，其中烷基、
 烯基及炔基視情況經一或多個(例如 2、3、4、5、6 或更
 多)獨立選自由以下組成之群之取代基取代：鹵素、-OR、
 $-NR'COR''$ 、-SR 及 -COR'；

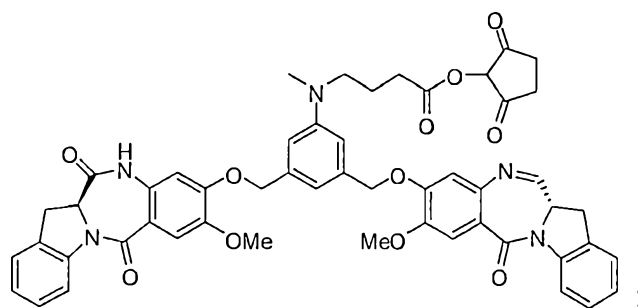
較佳 D 與 D' 相同或不同，且獨立選自具有 1 至 10 個
 碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基。更佳 D

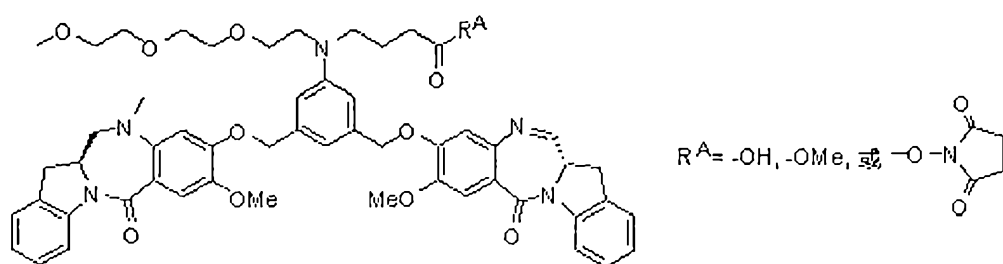
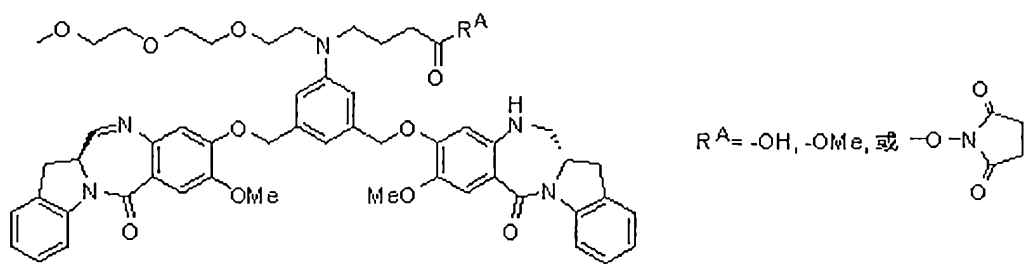
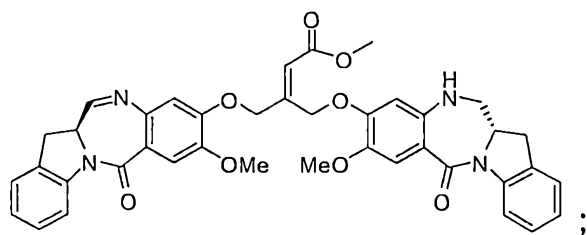
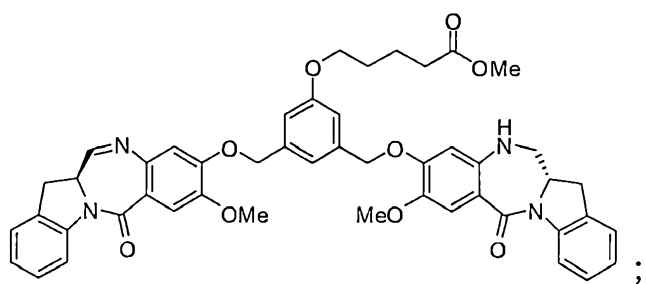
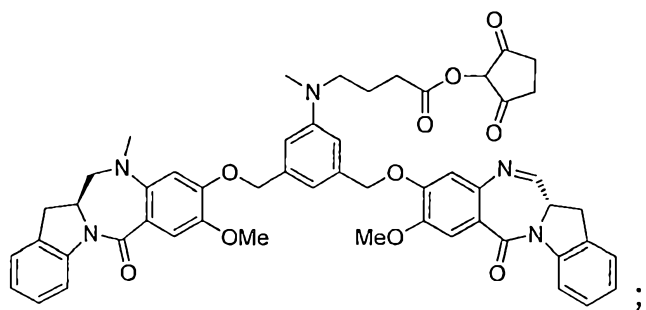
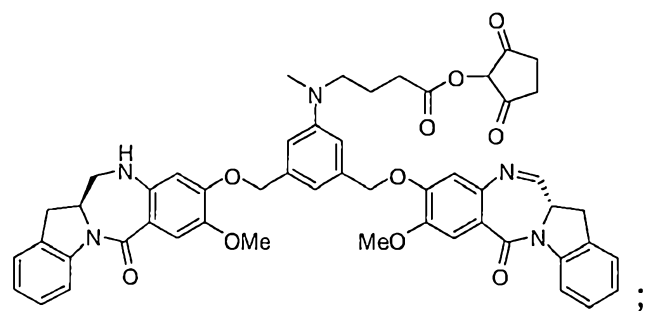
與 D' 為帶有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基。甚至更佳 D 與 D' 相同或不同，且選自具有 1 至 4 個碳原子之直鏈烷基；

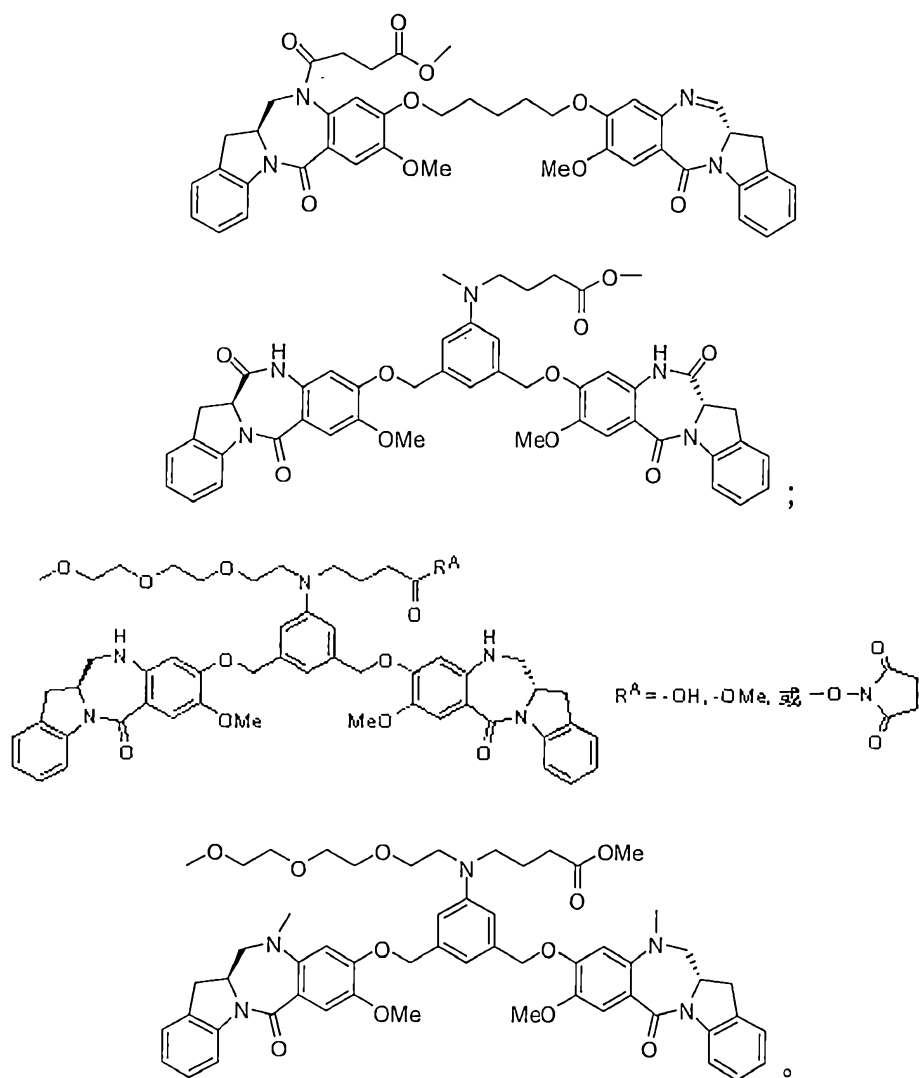
L 不存在、或為鏈接至反應性基團之連接基團、聚乙二醇單元 $(-\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$ 、具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基或烯基(例如 1-6 個碳原子)、苯基、具有 1 至 6 個獨立選自 O、S、N 及 P 之雜原子的 3 員至 18 員雜環或 5 員至 18 員雜芳基環，其中烷基或烯基視情況經鏈接至反應性基團之連接基團取代；苯基或雜環或雜芳基環可視情況經取代，其中該取代基可為鏈接至反應性基團之連接基團。

在某些實施例中，X 不為鏈接至反應性基團之連接基團。在某些實施例中，N 與 C 之間之雙線 $=$ 表示單鍵，Y 不為 -H。

在某些實施例中，本發明細胞毒性化合物不為以下任一化合物：







在某些實施例中，Y 為 -H 或選自以下之離去基團：-OR、-OCOR'、-OCOOR'、-CONR'R''、-NR'R''、-NR'COR''、-NR'NR'R''、視情況取代之 5 員或 6 員含氮雜環(例如哌啶、四氫吡咯、吡啶、嗎啉等)、以 -NR'(C=NH)NR'R'' 表示之胍、胺基酸或以 -NRCOP' 表示之肽(其中 P' 為胺基酸或含有 2 至 20 個胺基酸單元之多肽)、-SR、-SOR'、-SO₂M、-SO₃M、-OSO₃M、鹵素、氰基及疊氮基。較佳 Y 為亞硫酸氫鈉加合物、連二亞硫酸鈉加合物或偏亞硫酸氫鈉加合物。在某些實施例中，Y 不為 -H。

在某些實施例中，L 不存在，或選自視情況取代之苯基

及視情況取代之吡啶基，其中苯基及吡啶基帶有鏈接至反應性基團之連接基團，或 L 為帶有鏈接至反應性基團之連接基團之胺基(即，-N(連接基團)-)，或 L 為具有 1 至 6 個碳原子且帶有鏈接至反應性基團之連接基團之直鏈、分支或環狀烷基或烯基。

在第二個特定實施例中，對於細胞毒性二聚體 (I)、(II)、(III) 及 (IV)，變數如下文所述：

N 與 C 之間之雙線 = 表示雙鍵；

Y 為 -H；

W 為 C=O；

R₁、R₂、R₁'、R₂'、R₄ 及 R₄' 為 -H；

R₃ 或 R₃' 中一者視情況為連接基團且另一者為 -H；

R₆ 為 -OMe；

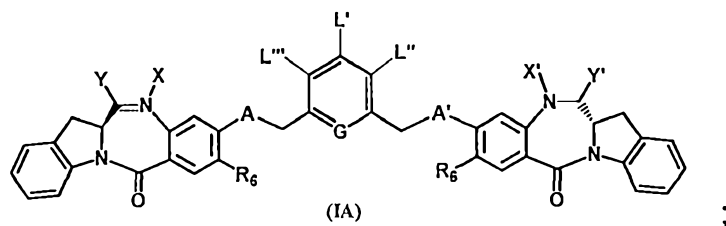
Z 及 Z' 為 -CH₂-；

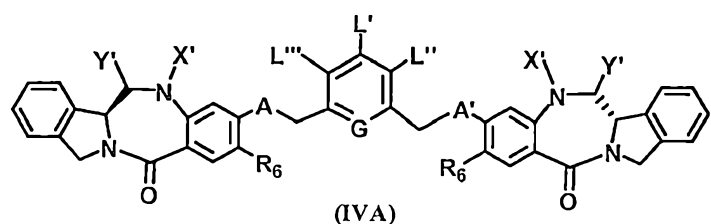
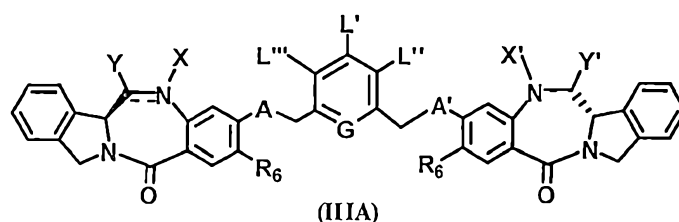
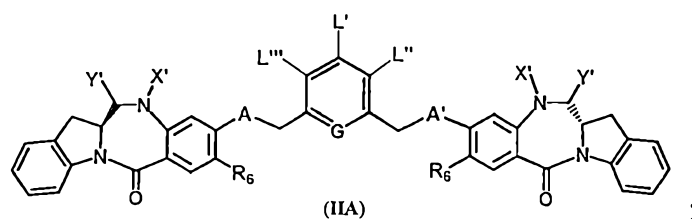
X' 為 -H；

Y' 為 -H；

A 及 A' 為 -O-；且其餘變數如第一個特定實施例中所述。

在第三個特定實施例中，式 (I)、(II)、(III) 及 (IV) 之細胞毒性二聚體以下式表示：





其中：

N 與 C 之間之雙線 = 表示單鍵或雙鍵，其限制條件為，當其為雙鍵時，X 不存在，且 Y 為 -H，且當其為單鍵時，X 選自 -H、鍵接至反應性基團之連接基團、或胺保護基(較佳 X 為 -H)；

Y 選自 -H、-OR、-OCOR'、-SR、-NR'R''、-SO₃M、-SO₂M 或 -OSO₃M，其中 M 為 -H 或陽離子，諸如 Na⁺、K⁺。較佳 Y 選自 -OH、-OMe、-OEt、-NHOH 或 -SO₃M。甚至更佳 Y 為 -OH 或 -SO₃M，較佳 M 為 -H 或 Na⁺；

R 為 -H、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、或 PEG 基團 -(CH₂CH₂O)_n-R^c，其中 n 為 1 至 24 之整數且 R^c 為具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基；

R' 與 R'' 相同或不同，且選自 -H、-OH、-OR、-NRR^{B'}、-COR、

視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、視情況取代之具有 6 至 18 個碳原子之芳基、視情況取代之具有 1 至 6 個選自 O、S、N 及 P 之雜原子之 3 員至 18 員雜環、PEG 基團 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$ ，其中 n 為 1 至 24 之整數，較佳 n 為 2、4 或 8；且 $R^{g'}$ 為 -H、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、或 PEG 基團 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$ ；

X' 選自由以下組成之群：-H、-OH、取代或未取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、苯基及胺保護基。較佳 X' 為 -H、-OH 或 -Me。更佳 X' 為 -H；

Y' 選自由以下組成之群：-H、側氧基、取代或未取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基。較佳 Y' 選自 -H 或 -Me。更佳 Y' 為 -H；

R_6 為 $-OR^c$ 或 $-SR^c$ ，其中 R^c 為具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基。較佳 R_6 為 -OMe 或 -SMe。甚至更佳 R_6 為 -OMe；

A 及 A' 選自 -O- 及 -S-。較佳 A 及 A' 為 -O-；

L' 、 L'' 與 L''' 相同或不同且獨立選自 -H、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、聚乙二醇單元 $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$ 、鹵素、胍 $[-NH(C=NH)NH_2]$ 、-OR、-NR'R''、-NO₂、-NR'COR''、-SR、以 -SOR' 表示之亞磺、以 -SO₂R' 表示之磺、磺酸根 -SO₃⁻M⁺、硫酸根 -OSO₃⁻M⁺、以 SO₂NR'R'' 表示之磺醯胺、氰基、疊

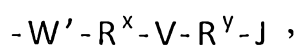
氮基、 $-\text{COR}'$ 、 $-\text{OCOR}'$ 、 $-\text{OCONR}'\text{R}''$ 及鏈接至反應性基團之連接基團，其限制條件為， L' 、 L'' 及 L''' 中僅一者為鏈接至反應性基團之連接基團。較佳 L' 為鏈接至反應性基團之連接基團。或者， L' 、 L'' 或 L''' 中一者為鏈接至反應性基團之連接基團，而其他為 $-\text{H}$ 。更佳 L' 為鏈接至反應性基團之連接基團，且 L'' 及 L''' 為 $-\text{H}$ ；

G 選自 $-\text{CH}-$ 或 $-\text{N}-$ ；且其餘變數如第一個特定實施例中所述。

在某些實施例中， X 不為鏈接至反應性基團之連接基團。在某些實施例中， N 與 C 之間之雙線 $=$ 表示單鍵、 Y 不為 $-\text{H}$ 。

在某些實施例中， A 及 A' 都為 $-\text{O}-$ ， R_6 為 $-\text{OMe}$ 且 G 為 $-\text{CH}-$ 。

在第四個特定實施例中，對於式(IA)、(IIA)、(IIIA)或(IVA)之細胞毒性二聚體， L' 以下式表示：



其中：

W' 與 V 相同或不同，且各獨立地不存在或選自 $-\text{CR}^{\text{e}}\text{R}^{\text{e}'}$ -、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{SO}-$ 、 $-\text{SO}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{NR}^{\text{e}}-$ 、 $-\text{O}-(\text{C}=\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{O}-(\text{C}=\text{O})\text{N}(\text{R}^{\text{e}})-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{\text{e}})-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{\text{e}})-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{R}^{\text{e}})-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{\text{e}})-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{N}(\text{C}(=\text{O})\text{R}^{\text{e}})\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{N}(\text{C}(=\text{O})\text{R}^{\text{e}})-$ 、 $-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-$ 、 $-\text{SS}-$ 或 $-\text{C}(=\text{O})-$ 或胺基酸，或具有2至8個胺基酸之肽；

R^{X} 與 R^{Y} 相同或不同，且各獨立地不存在或為視情況取

代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、帶有 6 至 10 個碳原子之芳基或帶有 1 至 3 個選自 O、N 或 S 之雜原子之 3 員至 8 員雜環；

R^e 與 $R^{e'}$ 相同或不同，且選自 -H、具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、或 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$ ，其中 R^k 為 -H，具有 1 至 6 個碳原子且視情況帶有二級胺基（例如 $-NHR^{101}$ ）或三級胺基（ $-NR^{101}R^{102}$ ）之直鏈、分支、環狀烷基，或 5 員或 6 員含氮雜環，諸如吡啶或嗎啉，其中 R^{101} 及 R^{102} 各獨立地為具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基。較佳 R^{101} 及 R^{102} 各獨立地為具有 1 至 6 個碳原子之直鏈或分支烷基；

n 為 1 至 24 之整數；且

J 包含所鍵接之反應性基團，且選自馬來醯亞胺、鹵代乙醯胺、-SH、 $-SSR^d$ 、 $-CH_2SH$ 、 $-CH(Me)SH$ 、 $-C(Me)_2SH$ 、 $-NHR^{c1}$ 、 $-CH_2NHR^{c1}$ 、 $-NR^{c1}NH_2$ 、-COOH 及 -COE，其中 -COE 表示選自（但不限於）以下各物之反應性酯：N-羥基琥珀醯亞胺酯、N-羥基磺基琥珀醯亞胺酯、硝基苯基（例如 2 或 4-硝基苯基）酯、二硝基苯基（例如 2,4-二硝基苯基）酯、磺基-四氟苯基（例如 4-磺基-2,3,5,6-四氟苯基）酯、及五氟苯基酯，且其中 R^{c1} 為 -H、或取代或未取代之具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基，且

R^d 選自苯基、硝基苯基（例如 2 或 4-硝基苯基）、二硝基苯基（例如 2 或 4-硝基苯基）、羧基硝基苯基（例如 3-羧

基-4-硝基苯基)、吡啶基或硝基吡啶基(例如 4-硝基吡啶基)。

在某些實施例中，J 為 -SH、-SSR^d、馬來醯亞胺、或 N-羥基琥珀醯亞胺酯。

在某些實施例中，R^{e'} 為 -H 或 -Me；R^e 為具有 1 至 6 個碳原子之直鏈或分支烷基、或 -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k；n 為 2 至 8 之整數；較佳 R^k 為 -H、-Me 或 -CH₂CH₂-NMe₂，且其餘變數如上文在第四個特定實施例中所述。

在某些實施例中，V 為胺基酸或具有 2 至 8 個胺基酸之肽。在某些實施例中，V 為纈胺酸-瓜胺酸、gly-gly-gly 或 ala-leu-ala-leu。

在某些實施例中，

W' 為 -O-、-N(R^e)-或 -N(R^e)-C(=O)-；

R^e 為 H、具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基、或 -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k；

R^x 為具有 1 至 6 個碳原子之直鏈或分支烷基；

V 不存在或為 -(O-CH₂-CH₂)_n-、-C(=O)-NH-、-S-、-NH-C(=O)-；

R^y 不存在，或為具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基；且

J 為 -SH、-SSR^d 或 -COE(較佳 N-羥基琥珀醯亞胺酯)。其餘變數如第四個特定實施例中所述。

在某些實施例中，

W' 為 -O-、-N(R^e)-或 -N(R^e)-C(=O)-；

R^e 為 H、Me 或 $-(CH_2-CH_2-O)_n-Me$ ；

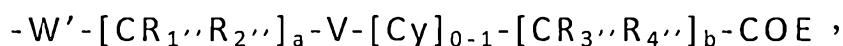
n 為 2 至 6 之整數；

R^x 為帶有 1 至 6 個碳原子之直鏈或分支烷基；

V 及 R^y 不存在；且

J 為 $-COE$ ，較佳為 N-羥基琥珀醯亞胺酯。其餘變數如第四個特定實施例中所述。

在第五個特定實施例中， L' 以下式表示：



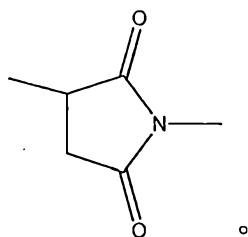
其中：

$R_{1''}$ 、 $R_{2''}$ 及 $R_{3''}$ 各獨立地為 $-H$ ，或帶有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基，較佳為 $-Me$ ；

$R_{4''}$ 為 $-H$ 、帶有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基(較佳為 $-Me$)、 $-SO_3H$ 或 $-SO_3^-M^+$ ，其中 M^+ 為醫藥學上可接受之陽離子；

a 為 0-5 之整數(例如 0 至 2、3、4 或 5)且 b 為 0-6 之整數(例如 0 至 3、4、5 或 6)；且

Cy 為視情況取代之帶有 N 雜原子之 5 員雜環，較佳 Cy 為



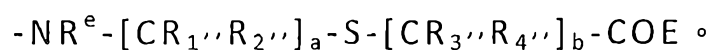
在某些實施例中， W' 為 $-N(R^e)-$ 。

在某些實施例中，諸如在第四及/或第五個特定實施例

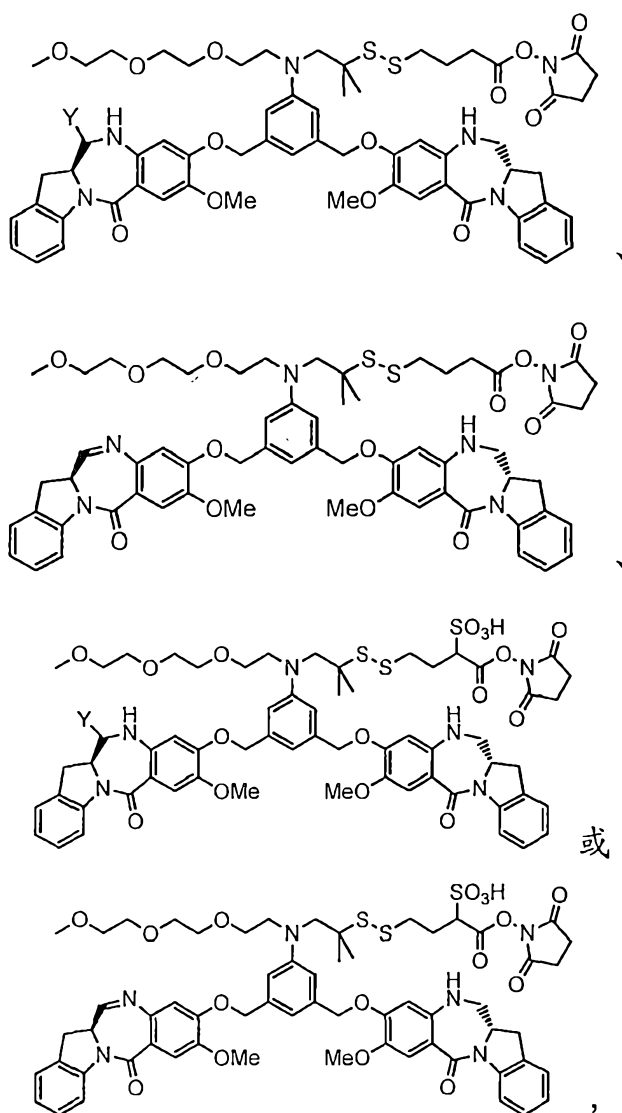
中， R^e 為 $-(CH_2-CH_2-O)_{2-6}-R^k$ ，其中 R^k 為 $-H$ 、具有 1 至 6 個碳原子之直鏈、分支環狀烷基。

在某些實施例中，諸如在第四及/或第五個特定實施例中， V 為 $-S-$ 或 $-SS-$ 。

在第六個特定實施例中，諸如在第四及/或第五個特定實施例中， L' 以下式表示：



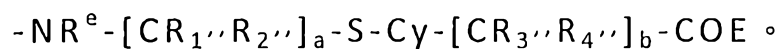
在某些實施例中，化合物為以下任一者：



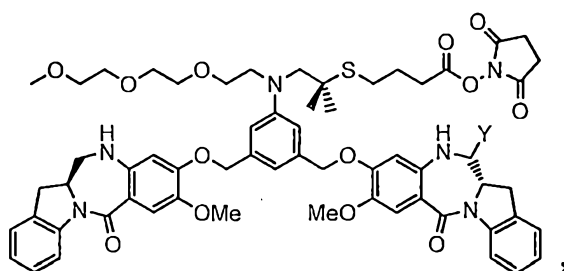
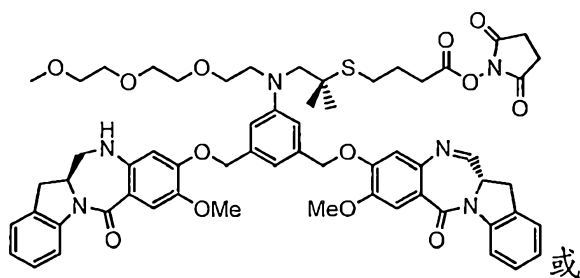
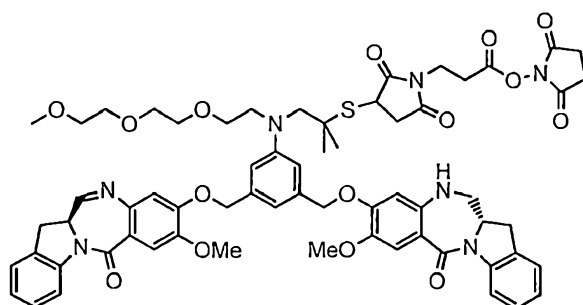
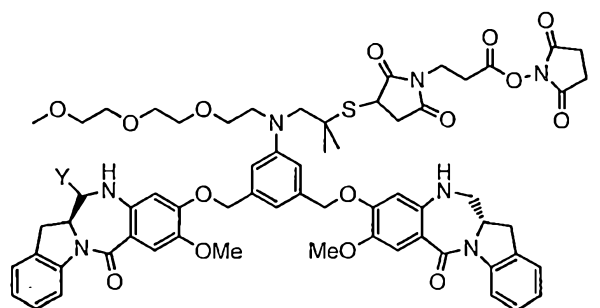
其中 Y 為 $-H$ 或 $-SO_3M$ ，且 M 為 $-H$ 或醫藥學上可接受之

陽離子。在某些實施例中，Y 為 $-\text{SO}_3\text{M}$ 。

在第七個特定實施例中，諸如在第四及/或第五個特定實施例中，L'以下式表示：

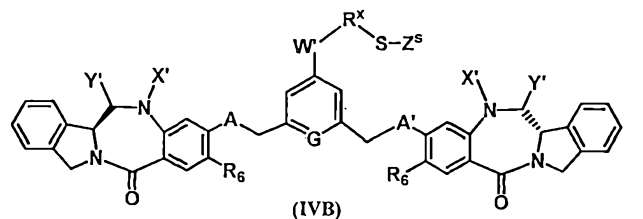
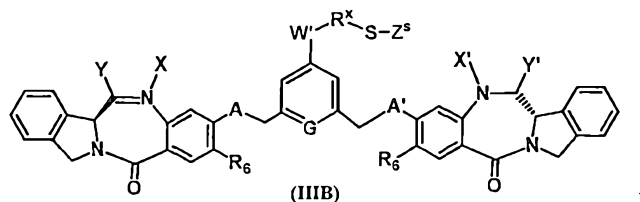
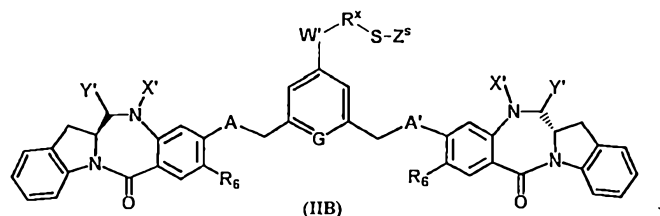
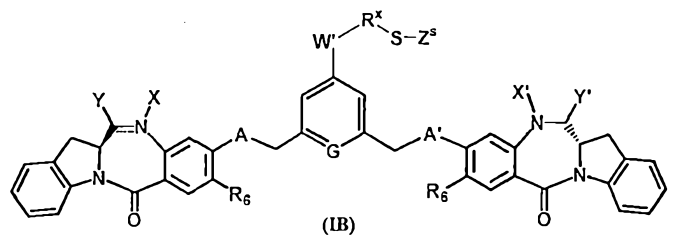


在某些實施例中，化合物為以下任一者：



其中 Y 為 $-\text{H}$ 或 $-\text{SO}_3\text{M}$ ，且 M 為 $-\text{H}$ 或醫藥學上可接受之陽離子。在某些實施例中，Y 為 $-\text{SO}_3\text{M}$ 。

在第八個特定實施例中，式(I)、(II)、(III)及(IV)之細胞毒性二聚體以下式表示：



其中：

W' 不存在或選自 $-O-$ 、 $-N(R^e)-$ 、 $-N(R^e)-C(=O)-$ 、 $-N(C(=O)R^e)-$ 、 $-S-$ 或 $-CH_2-S-$ 、 $-CH_2NR^e-$ ；

R^x 不存在，或選自具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基；

R^e 為 $-H$ 、具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基，或 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$ ，其中 R^k 為 $-H$ ，具有 1 至 6 個碳原子且視情況帶有二級胺基(例如 $-NHR^{101}$)或三級胺基($-NR^{101}R^{102}$)之直鏈、分支環狀烷基，或 5 員

或 6 員含氮雜環，諸如哌啶或嗎啉，其中 R^{101} 及 R^{102} 各獨立地為具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基。較佳 R^{101} 及 R^{102} 各獨立地為具有 1 至 6 個碳原子之直鏈或分支烷基；

Z^s 為 $-H$ 、 $-SR^m$ ；

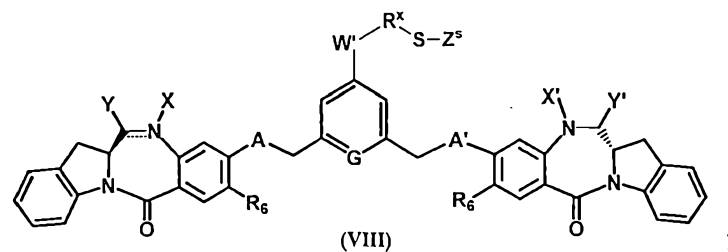
R^m 為 R^d ，或帶有選自以下各物之反應性酯的取代或未取代之具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基：N-羥基琥珀醯亞胺酯、N-羥基鄰苯二甲醯亞胺酯、N-羥基磺基琥珀醯亞胺酯、對硝基苯基酯、二硝基苯基酯、五氟苯基酯；

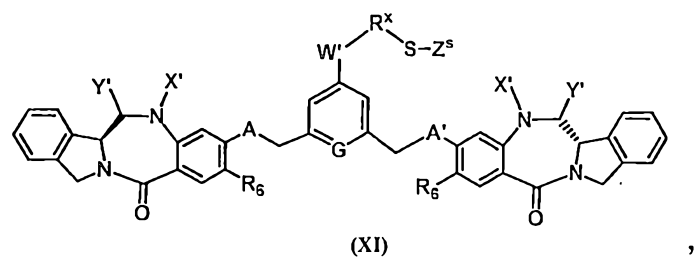
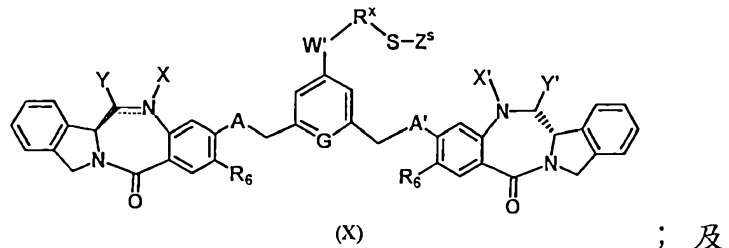
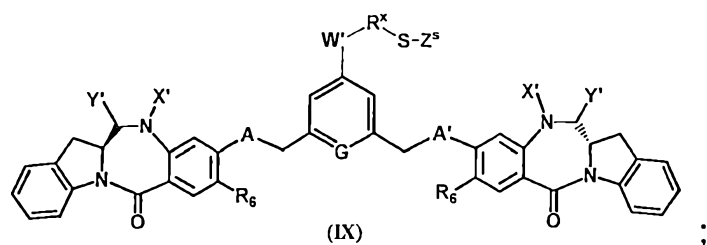
R^d 選自苯基、硝基苯基、二硝基苯基、羧基硝基苯基、吡啶基或硝基吡啶基；且

n 為 1 至 24 之整數；且其餘變數如上文在第三個特定實施例中所述。

較佳 R^k 為 $-H$ 或 $-Me$ ，且 n 為 2 至 8 之整數。較佳 R^x 為具有 1 至 6 個碳原子之直鏈或分支烷基；且其餘變數如上文在第三、第四及/或第五個特定實施例中所述。

在第九個特定實施例中，式(I)、(II)、(III)及(IV)之細胞毒性二聚體以下式表示：





其中：

N 與 C 之間之雙線 = 表示單鍵或雙鍵，其限制條件為，當其為雙鍵時，X 不存在，且 Y 為 -H，且當其為單鍵時，X 選自 -H、鍵接至反應性基團之連接基團、或胺保護基（較佳 X 為 -H 或胺保護基；更佳 X 為 -H）；

Y 選自 -H、-OR、-OCOR'、-SR、-NR'R''、-SO₃M、-SO₂M 或 -OSO₃M（例如 Y 為 -OR、-OCOR'、-SR、-NR'R''、-SO₃M、-SO₂M 或 -OSO₃M），其中 M 為 -H 或陽離子，諸如 Na⁺ 或 K⁺；

R 為 -H、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基，或 PEG 基團 -(CH₂CH₂O)_n-R^c，其中 n 為 1 至 24 之整數，且 R^c 為具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基；

R' 與 R'' 相同或不同，且選自 $-H$ 、 $-OH$ 、 $-OR$ 、 $-NRR^{g'}$ 、 $-COR$ 、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、視情況取代之具有 6 至 18 個碳原子之芳基、視情況取代之具有 1 至 6 個選自 O、S、N 及 P 之雜原子之 3 員至 18 員雜環，PEG 基團 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$ ，其中 n 為 1 至 24 之整數，較佳 n 為 2、4 或 8；且 $R^{g'}$ 為 $-H$ 、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基，或 PEG 基團 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$ ；

X' 選自由以下組成之群： $-H$ 、 $-OH$ 、取代或未取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、苯基及胺保護基；

Y' 選自由以下組成之群： $-H$ 、側氧基、取代或未取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基；

A 及 A' 選自 $-O-$ 及 $-S-$ ；

W' 不存在或選自 $-O-$ 、 $-N(R^e)-$ 、 $-N(R^e)-C(=O)-$ 、 $-N(C(=O)R^e)-$ 、 $-S-$ 或 $-CH_2-S-$ 、 $-CH_2NR^e-$ ；

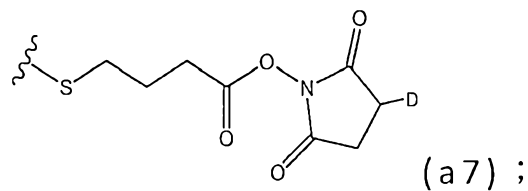
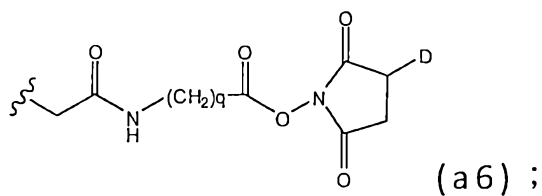
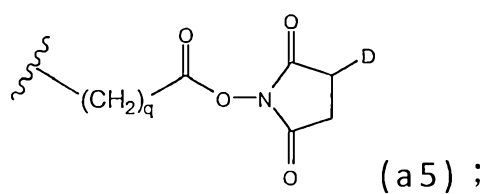
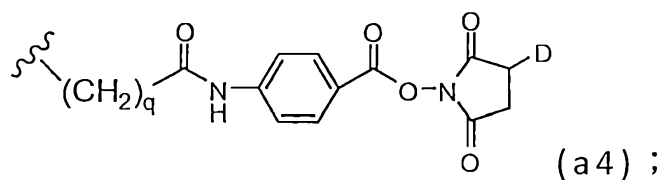
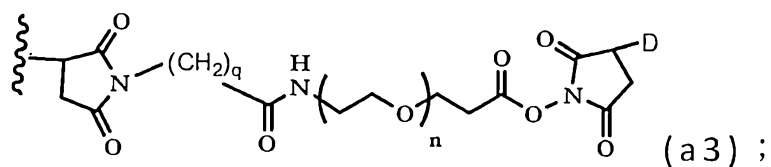
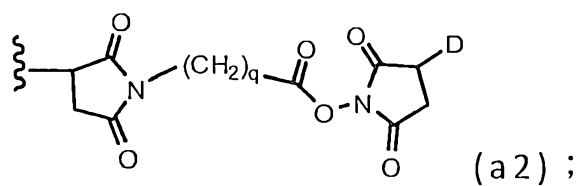
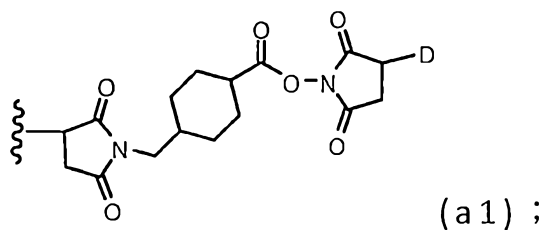
R^x 不存在，或選自具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基；

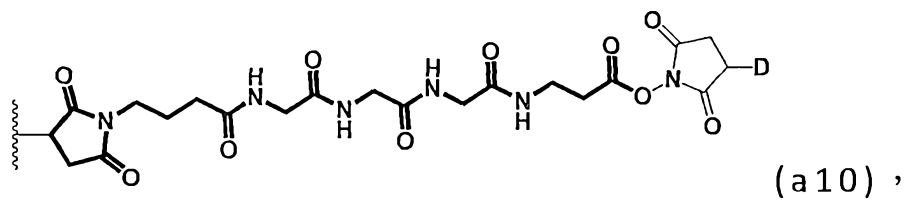
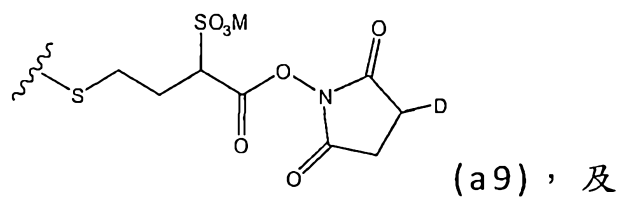
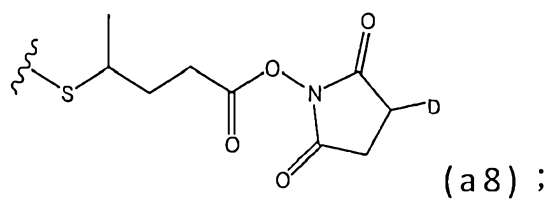
R^e 為 $-H$ 、具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基，或 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$ ，其中 R^k 為 $-H$ ，具有 1 至 6 個碳原子且視情況帶有二級胺基(例如 $-NHR^{101}$)或三級胺基($-NR^{101}R^{102}$)之直鏈、分支環狀烷基，或 5 員或 6 員含氮雜環，諸如哌啶或嗎啉，其中 R^{101} 及 R^{102} 各

獨立地為具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基；

G 選自 -CH- 或 -N-；

Z^s 為 -H 或選自以下任一式：





其中：

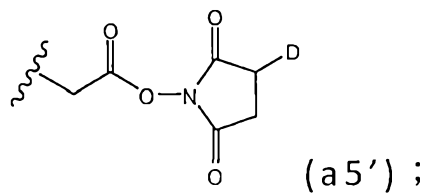
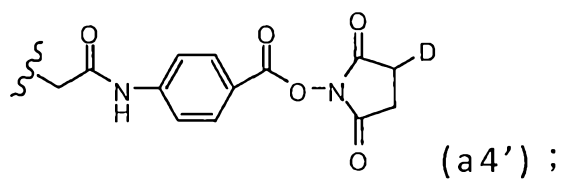
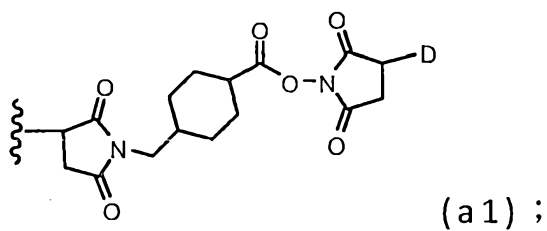
q 為 1 至 5 之整數；

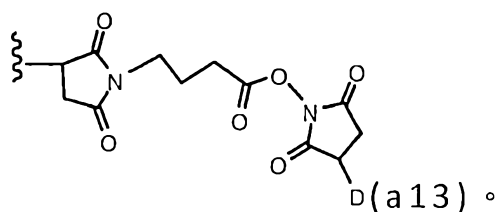
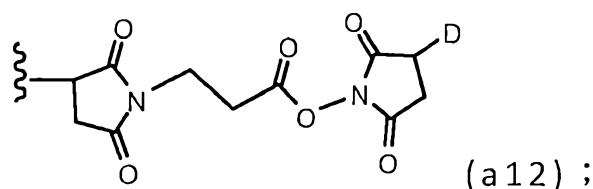
n 為 2 至 6 之整數；

D 為 -H 或 -SO₃M；

M 為 -H 或陽離子，諸如 Na⁺或 K⁺。

在某些實施例中，Z^s 由以下任一式表示：





在某些實施例中， W' 為 $-N(R^e)-$ 。

在某些實施例中， R^e 為 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$ ，其中 R^k 為 $-H$ 、具有 1 至 6 個碳原子之直鏈、分支環狀烷基。

在某些實施例中， R^k 為 $-H$ 或 $-Me$ ， n 為 4 且 q 為 2。

在某些實施例中， R^x 為具有 1 至 6 個碳原子之直鏈或分支烷基。

在某些實施例中， R^x 可為 $-(CH_2)_p-(CR^fR^g)-$ ，其中 R^f 及 R^g 各獨立選自 H 或具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基；且 p 為 0、1、2 或 3。

在某些實施例中， R^f 與 R^g 相同或不同且選自 $-H$ 及 $-Me$ ；且 p 為 1。

在第十個特定實施例中，對於在第九個特定實施例中所述之式 (VIII)、(IX)、(X) 及 (XI) 之化合物，變數如下文所述：

N 與 C 之間之雙線 $=$ 表示單鍵或雙鍵，其限制條件為，當其為雙鍵時， X 不存在，且 Y 為 $-H$ ，且當其為單鍵時， X 為 $-H$ ； Y 為 $-H$ 、 $-OH$ 或 $-SO_3M$ ；

M 為 $-H$ 或醫藥學上可接受之陽離子(例如 Na^+)；

X' 及 Y' 均為 $-H$ ；

A 及 A' 均為 $-O-$ ；

R_6 為 $-OMe$ ；且

R^x 為具有 1 至 6 個碳原子之直鏈或分支烷基。

在相關實施例中， Y 為 $-OH$ 或 $-SO_3M$ 。

在另一實施例中，對於在第九個特定實施例中所述之式 (VIII)、(IX)、(X) 及 (XI) 之化合物，變數如下文所述：

W' 為 $-O-$ 、 $-N(R^e)-$ 、 $-N(R^e)-C(=O)-$ 、 $-N(COR^e)-$ 、 $-S-$ 或 $-CH_2-S-$ ；

R^x 不存在，或選自具有 1 至 6 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基；

R^e 為 $-H$ 、具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基，或 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$ ，其中 R^k 為 $-H$ ，具有 1 至 6 個碳原子且視情況帶有一級、二級或三級胺基之直鏈、分支環狀烷基，或 5 員或 6 員含氮雜環，諸如哌啶或嗎啉；

n 為 1 至 24 之整數；且其餘變數如上文在第九個特定實施例中所述。

較佳 R^k 為 $-H$ 或 $-Me$ ，且 n 為 2 至 8 之整數。較佳 R^x 為具有 1 至 6 個碳原子之直鏈或分支烷基。

較佳 R^x 為 $-(CH_2)_p-(CR^fR^g)-$ ，其中 R^f 及 R^g 各獨立選自 H 或具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基； p 為 0、1、2 或 3。更佳 R^f 與 R^g 相同或不同、且選自 $-H$ 及 $-Me$ ；且 p 為 1。

在另一較佳實施例中，連接基以選自上文所示的式(a1)、(a4)、(a5)、(a10)及(a11)之任一式表示；且其餘變數如上文在第十個特定實施例中所述。

在第十一個特定實施例中，對於在第八個特定實施例中所述之式(1B)、(11B)、(111B)及(1VB)之化合物，變數如下文所述：

N與C之間之雙線 $\equiv$ 表示單鍵或雙鍵，其限制條件為，當其為雙鍵時，X不存在，且Y為-H，且當其為單鍵時，X為-H；Y為-H、-OH或-SO₃M(例如Y為-OH或-SO₃M)；

M為-H或Na⁺；

X'及Y'均為-H；

A及A'均為-O-；

R₆為-OMe；

R^x為具有1至6個碳原子之直鏈或分支烷基；且其餘變數如上文在第三、第四或第五個特定實施例中所述。

較佳R^x為-(CH₂)_p-(CR^fR^g)-，其中R^f及R^g各獨立選自H或具有1至4個碳原子之直鏈或分支烷基；p為0、1、2或3。更佳R^f與R^g相同或不同且選自-H及-Me；且p為1。

在任一上述具體實施例(例如第一至第十一特定實施例)中，N與C之間之雙線 $\equiv$ 可表示雙鍵。

在任一上述具體實施例(例如第一至第十一特定實施例)中，N與C之間之雙線 $\equiv$ 可表示單鍵，X為-H、鍵接至反應性基團之連接基團、或胺保護基(例如X為-H或胺

保護基)；且 Y 選自 -H、-OR、-OCOR'、-SR、-NR'R''、視情況取代之 5 員或 6 員含氮雜環、-SO₃M、-SO₂M 及硫酸根 -OSO₃M(例如 Y 為 -OR、-OCOR'、-SR、-NR'R''、視情況取代之 5 員或 6 員含氮雜環、-SO₃M、-SO₂M 及硫酸根 -OSO₃M)。

在某些實施例中，Y 選自 -H、-SO₃M、-OH、-OMe、-OEt 或 -NHOH(例如 Y 為 -SO₃M、-OH、-OMe、-OEt 或 -NHOH)。

在某些實施例中，Y 為 -H、-SO₃M 或 -OH(例如 Y 為 -SO₃M 或 -OH)。

在某些實施例中，M 為 -H、Na⁺或 K⁺。

在任一上述具體實施例(例如第一至第十一特定實施例)中，W 存在時為 C=O。

在任一上述具體實施例(例如第一至第十一特定實施例)中，Z 及 Z' 存在時為 -CH₂。

在任一上述具體實施例(例如第一至第十一特定實施例)中，X' 選自由以下組成之群：-H、-OH、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、苯基、結合至反應性基團之連接基團、及胺保護基。

在某些實施例中，X' 為 -H、-OH、-Me 或結合至反應性基團之連接基團。

在某些實施例中，X' 為 -H。

在任一上述具體實施例(例如第一至第十一特定實施例)中，Y' 選自由以下組成之群：-H、側氧基、取代或未

取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基。

在某些實施例中，Y' 為 -H 或側氧基。

在某些實施例中，Y' 為 -H。

在任一上述具體實施例(例如第一至第十一特定實施例)中，A 與 A' 相同或不同且選自 O、S、NR₅ 及側氧基(C=O)。A 與 A' 可相同或不同且選自 -O- 及 -S-。較佳 A 及 A' 均為 -O-。

在任一上述具體實施例(例如第一至第十一特定實施例)中，D 與 D' 存在時為相同或不同，且獨立選自聚乙二醇單元(-OCH₂CH₂)_n(其中 n 為 1 至 24 之整數)、胺基酸、帶有 2 至 6 個胺基酸之肽、或具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基，其中烷基、烯基及炔基視情況經一或多個獨立選自由以下組成之群之取代基取代：鹵素、-OR、-NR'COR''、-SR 及 -COR'。較佳 D 及 D' 為帶有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基。

在第十二實施例中，如第一、第三及第九實施例中所述之本發明細胞毒性化合物以下述表示：

N 與 C 之間之雙線 = 表示雙鍵；

Y 為 -H；

W 為 C=O；

R₁、R₂、R₁'、R₂'、R₄ 及 R₄' 為 -H；

R₃ 或 R₃' 中一者視情況為結合至反應性基團之連接基團且另一者為 -H；

R_6 為 -OMe；

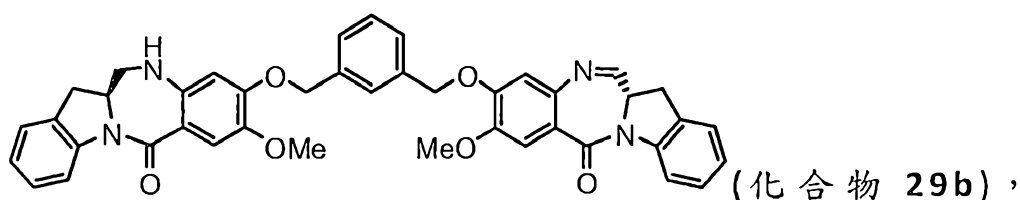
Z 及 Z' 為 -CH₂；

X' 為 -H；

Y' 為 -H；且

A 及 A' 為 -O-。

在第十三實施例中，本發明細胞毒性化合物為：



或其醫藥學上可接受之鹽。

在一個實施例中，化合物 29b 可用於本文所述之本發明方法中。在一個較佳實施例中，化合物 29b 可用於治療增生性病徵，諸如癌症。

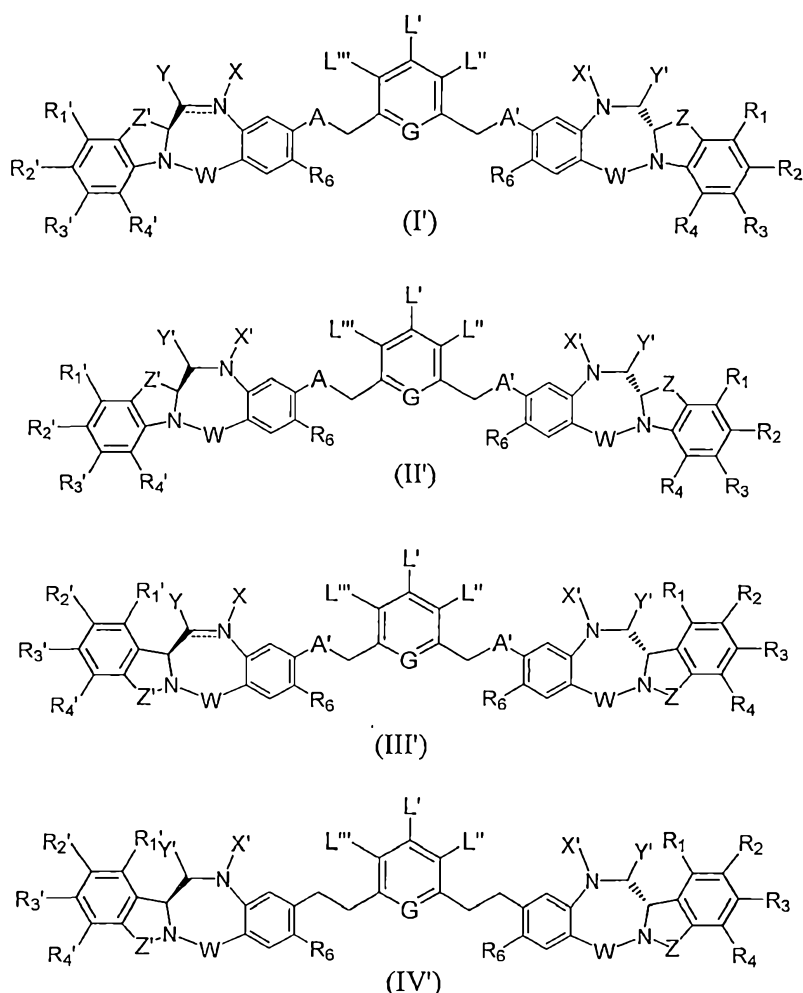
在另一實施例中，化合物 29b 可用於篩選細胞株以鑒別對苯并二氮呋化合物(諸如本文所述之苯并二氮呋衍生物)敏感之細胞株。

藥物化合物及藥物-連接基化合物

上述細胞毒性化合物包含鏈接至反應性基團之連接基團，該等化合物可由雙官能交聯試劑與「較少連接基(linker-less)」化合物反應形成所謂的藥物-連接基化合物而得到。或者，在其他方面與藥物-連接基化合物相同但不含連接部分之藥物化合物亦涵蓋在本發明內。

因此，在某些實施例中，本發明提供一種不含連接基但能夠與雙官能交聯劑反應形成本發明化合物(諸如上

文所述第一至第十二個特定實施例中任一者)；或形成本發明細胞結合劑連結物(諸如下文所述者)的細胞毒性化合物。示範性本發明之較少連接基之細胞毒性化合物包括上文第十三特定實施例之化合物 **29b**。本發明之較少連接基之細胞毒性化合物以下式(I')、(II')、(III')或(IV')中任一者表示：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

N 與 C 之間之雙線 = 表示單鍵或雙鍵，其限制條件為，當其為雙鍵時，X 不存在，且 Y 為 -H 或具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基，且當其為單鍵時，X 為 -H 或胺保護部分；較佳 N 與 C 之間之雙線 = 表示雙鍵；

Y 為 -H 或選自以下之離去基團：-OR、-OCOR'、-OCOOR'、-OCONR'R''、-NR'R''、-NR'COR''、-NR'NR'R''、視情況取代之 5 員或 6 員含氮雜環(例如哌啶、四氫吡咯、吡啶、嗎啉等)、以 -NR'(C=NH)NR'R'' 表示之胍、胺基酸，或以 -NRCOP' 表示之肽(其中 P' 為胺基酸或含有 2 至 20 個胺基酸單元之多肽)、-SR、-SOR'、-SO₂M、-SO₃M、-OSO₃M、鹵素、氰基及疊氮基，其中 M 為 -H 或陽離子；諸如 Na⁺ 或 K⁺。較佳 M 為 -H 或 Na⁺。較佳 Y 選自 -SO₃M、-OH、-OMe、-OEt 或 -NHOH。更佳 Y 為 -SO₃M 或 -OH；或

Y 為亞硫酸根(HSO₃、HSO₂ 或 HSO₃⁻、SO₃²⁻ 或 HSO₂⁻ 與陽離子形成的鹽)、偏亞硫酸氫根(H₂S₂O₅ 或 S₂O₅²⁻ 與陽離子形成的鹽)、單-、二-、三-及四-硫代磷酸根(PO₃SH₃、PO₂S₂H₂、POS₃H₂、PS₄H₂ 或 PO₃S³⁻、PO₂S₂³⁻、POS₃³⁻ 或 PS₄³⁻ 與陽離子形成的鹽)、硫代磷酸酯(RⁱO)₂PS(ORⁱ)、RⁱS-、RⁱSO、RⁱSO₂、RⁱSO₃、硫代硫酸根(HS₂O₃ 或 S₂O₃²⁻ 與陽離子形成的鹽)、連二亞硫酸根(HS₂O₄ 或 S₂O₄²⁻ 與陽離子形成的鹽)、二硫代磷酸根(P(=S)(OR^{k'})(S)(OH)或其與陽離子形成的鹽)、羥肟酸(R^{k'}C(=O)NOH 或與陽離子形成的鹽)、甲醛次硫酸根(HOCH₂SO₂⁻ 或 HOCH₂SO₂⁻ 與陽離子形成的鹽，諸如 HOCH₂SO₂⁻Na⁺)或其混合物，其中 Rⁱ 為具有 1 至 10 個碳原子之直鏈或分支烷基且經至少一個選自 -N(R^j)₂、-CO₂H、-SO₃H 及 -PO₃H 之取代基取代；Rⁱ 可進一步視情況經本文所述之烷基之取代基取代；R^j 為具有 1 至 6 個碳原子之直鏈或分支烷基；R^{k'} 為具有 1 至 10 個碳

原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、芳基、雜環基或雜芳基；較佳 Y 為亞硫酸氫根、連二亞硫酸根或偏亞硫酸氫根或其鹽(諸如鈉鹽)之加合物；

R 在每次出現時獨立選自由以下組成之群：-H、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、聚乙二醇單元 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$ 、視情況取代之具有 6 至 18 個碳原子之芳基、視情況取代之含有一或多個獨立選自氮、氧及硫之雜原子的 5 員至 18 員雜芳基環、或視情況取代之含有 1 至 6 個獨立選自 O、S、N 及 P 之雜原子的 3 員至 18 員雜環；

R' 與 R'' 相同或不同且獨立選自 -H、-OH、-OR、-NHR、-NR₂、-COR、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、聚乙二醇單元 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$ 、及視情況取代之具有 1 至 6 個獨立選自 O、S、N 及 P 之雜原子的 3 員至 18 員雜環；

R^c 為 -H、或取代或未取代之具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基；

n 為 1 至 24 之整數；

W 選自 C=O、C=S、CH₂、BH、SO 及 SO₂；

X' 選自由以下組成之群：-H、-OH、胺保護基、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、聚乙二醇單元 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$ 、視情況取代之具有 6 至 18 個碳原子之芳基(例如苯基)、視情況取代之含有一或多個獨立選自氮、氧及硫之雜原子的 5 員至

18 員雜芳基環、及視情況取代之含有 1 至 6 個獨立選自 O、S、N 及 P 之雜原子的 3 員至 18 員雜環。較佳 X' 為 -H、-OH 或 -Me。更佳 X' 為 -H；

Y' 選自由以下組成之群：-H、側氧基、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、視情況取代之 6 員至 18 員芳基、視情況取代之含有一或多個獨立選自氮、氧及硫之雜原子的 5 員至 18 員雜芳基環、視情況取代之具有 1 至 6 個雜原子之 3 員至 18 員雜環。較佳 Y' 選自 -H 或側氧基。更佳 Y' 為 -H；

R₁、R₂、R₃、R₄、R₁'、R₂'、R₃' 及 R₄' 各獨立選自由以下組成之群：-H、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、聚乙二醇單元 -(OCH₂CH₂)_n-R^c、鹵素、胍 [-NH(C=NH)NH₂]、-OR、-NR'R''、-NO₂、-NCO、-NR'COR''、-SR、以 -SOR' 表示之亞碸、以 -SO₂R' 表示之碸、磺酸根 -SO₃⁻M⁺、硫酸根 -OSO₃⁻M⁺、以 -SO₂NR'R'' 表示之磺醯胺、氰基、疊氮基、-COR'、-OCOR' 及 -OCONR'R''。較佳 R₂、R₃、R₂' 及 R₃' 中 1、2、3 個或全部為 -H；

R₆ 為 -H、-R、-OR、-SR、-NR'R''、-NO₂、鹵素、-OR^c 或 -SR^c，其中 R^c 為 -H、具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基。較佳 R₆ 為 -OMe 或 -SMe。甚至更佳 R₆ 為 -OMe；

Z 及 Z' 獨立選自 -(CH₂)_n-、-(CH₂)_n'-CR₇R₈-(CH₂)_{na}'-、-(CH₂)_n'-NR₉-(CH₂)_{na}'-、-(CH₂)_n'-O-(CH₂)_{na}'- 及 -(CH₂)_n'-S-(CH₂)_{na}'-；

n' 與 na' 相同或不同且選自 0、1、2 及 3；

R_7 與 R_8 相同或不同，且各獨立選自 -H、-OH、-SH、-COOH、-NHR'、聚乙二醇單元 $-(OCH_2CH_2)_n-$ 、胺基酸、帶有 2 至 6 個胺基酸之肽單元、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基；

R_9 獨立選自 -H、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、聚乙二醇單元 $-(OCH_2CH_2)_n-$ ；

A 與 A' 相同或不同，且獨立選自 -O-、側氧基 $(-C(=O)-)$ 、-CRR'O-、-CRR'-、-S-、-CRR'S-、 $-N(R_5)-$ 及 $-CRR'N(R_5)-$ 。

較佳 A 與 A' 相同或不同，且選自 -O- 及 -S-。更佳 A 及 A' 為 -O-；

R_5 在每次出現時獨立地為 -H 或視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈或分支烷基；

L' 、 L'' 及 L''' 相同或不同且獨立選自 -H、鹵素、視情況取代之直鏈、分支或環狀烷基、鹵代烷基、烷氧基、鹵代烷氧基、 $-NO_2$ 或 $-CN$ ；

G 選自 -CH- 或 -N-。

在某些實施例中，N 與 C 之間之雙線 = 表示單鍵，Y 不為 -H。

在某些實施例中，N 與 C 之間之雙線 = 表示單鍵或雙鍵，其限制條件為，當其為雙鍵時，X 不存在，且 Y 為 -H，且當其為單鍵時，X 選自 -H 或胺保護基（較佳 X 為 -H）；W 為 $C=O$ ； R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_1' 、 R_2' 、 R_3' 及 R_4' 為 -H；Z 及 Z' 為 $-CH_2-$ ；A 及 A' 均為 -O-；W 為 $-(C=O)-$ ；G 為 -CH-； R_6

為 -H 或視情況取代之 C1-C10 直鏈、C1-C10 分支或 C3-C7 環狀烷基、-O-烷基或 -O-鹵代-烷基，諸如 -OMe；X' 選自由以下組成之群：-H、-OH、取代或未取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、苯基及胺保護基；且 Y' 選自由以下組成之群：-H、側氧基、取代或未取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基。

較佳當 Y 不為 -H 時，Y 選自 -OR、-OCOR'、-SR、-NR'R''、-SO₃M、-SO₂M 或 -OSO₃M，其中 M 為 -H 或陽離子，諸如 Na⁺、K⁺。較佳 Y 選自 -H、-OH、-OMe、-OEt、-NHOH 或 -SO₃M(例如 Y 為 -OH、-OMe、-OEt、-NHOH 或 -SO₃M)。甚至更佳 Y 為 -H、-OH 或 -SO₃M(例如 Y 為 -OH 或 -SO₃M)，較佳 M 為 -H 或 Na⁺。

在某些實施例中，N 與 C 之間之雙線 = 表示單鍵或雙鍵，其限制條件為，當其為雙鍵時，X 不存在，且 Y 為 -H，且當其為單鍵時，X 選自 -H 或胺保護基(較佳 X 為 -H)；W 為 C=O；R₁、R₂、R₃、R₄、R₁'、R₂'、R₃'、R₄'、X' 及 Y' 為 -H；Z 及 Z' 為 -CH₂-；A 及 A' 均為 -O-；W 為 -(C=O)-；G 為 -CH-；R₆ 為 -H、或視情況取代之 C1-C10 直鏈、C1-C10 分支或 C3-C7 環狀烷基、-O-烷基或 -O-鹵代-烷基，諸如 -OMe。

雙官能交聯劑可為此項技術中已知之任何雙官能連接基。舉例而言，可用於製備藥物-連接基化合物之雙官能連接基為與細胞毒性化合物形成二硫鍵、硫醚鍵、酸不

穩定鍵、光不穩定鍵、肽酶不穩定鍵及酯酶不穩定鍵者 (參看例如美國專利 5,208,020 ; 5,475,092 ; 6,441,163 ; 6,716,821 ; 6,913,748 ; 7,276,497 ; 7,276,499 ; 7,368,565 ; 7,388,026 及 7,414,073 , 所有該等專利均以引用之方式併入本文中)。較佳雙官能交聯劑為與細胞毒性化合物形成二硫鍵、硫醚鍵及肽酶不穩定鍵者。可用於本發明中之其他雙官能交聯劑包括不可裂解之連接基, 諸如美國公開案第 US 2005/0169933 號中所述者; 或帶電連接基或親水性連接基, 且描述於 US 2009/0274713 、 US 2010/01293140 及 WO 2009/134976 中, 各案以引用之方式清楚地併入本文中。可用於製備本發明(藥物-連接基)化合物之雙官能交聯劑亦包括 *Thermo Scientific Pierce Crosslinking Technical Handbook* (其完整教導以引用之方式併入本文中) 中所述者。

細胞毒性化合物之合成

用於製備本發明細胞毒性二聚體化合物之代表性方法顯示於第 1-11 圖中。該等二聚體係藉由使單體與具有兩個離去基團(諸如鹵素、三氟甲磺酸酯基、甲磺酸酯基或甲苯磺酸酯基)之連接基化合物反應來製備, 諸如第 1 圖中 **1c** 之合成所述者。帶有硫醇或二硫部分以便能經由可還原或不可還原的鍵與細胞結合劑鍵聯之代表性二聚體的合成顯示於第 1-5、7、8 及 10 圖中。在第 1 圖中, 含有短聚乙二醇部分及烷基二硫化物之連接基係經由 **1a** 之還原胺化製備。**1b** 轉化成其相應甲磺酸酯且與 IBD(吡

啉并苯并二氮呋)單體單元偶合，得到二聚體 **1c**，其被還原成單-亞胺，轉化成遊離硫醇且與 **2** 偶合，得到本發明之化合物 **1g**。在第 3 圖中，製備 IBD 單體之修飾形式且偶合得到本發明之二聚體，其中經還原之亞胺轉化成連接基。第 4 圖描述了具有短聚乙二醇部分及醯胺二硫化物之二聚體，其被還原成硫醇 **4c** 且轉化成反應性酯。第 5 圖描述了含有吡啶基二硫化物之連接基 **5e** 的合成，其被轉化成本發明之單-亞胺硫醇 **5i**，隨後轉化成反應性酯。具有可與細胞結合劑反應之連接基之代表性二聚體的合成係藉由將甲基酯轉化成離去基團之相應反應性酯(諸如但不限於 N-羥基琥珀醯亞胺酯、N-羥基鄰苯二甲醯亞胺酯、N-羥基磺基-琥珀醯亞胺酯、對硝基苯基酯、五氟苯基酯)來製備，如第 6、9 及 11 圖中所示。

用於製備適於與細胞結合劑一步式連結之本發明之細胞毒性二聚體化合物的代表性方法顯示於第 1 及 12-19 圖中。在所有該等實例中，含有硫醇部分之二聚體與在一側上具有反應性基團(諸如但不限於硫吡啶基、馬來醯亞胺、碘化物、溴化物或甲苯磺酸酯)及具有適於與細胞結合劑反應之反應性取代基(諸如但不限於 N-羥基琥珀醯亞胺酯、N-羥基鄰苯二甲醯亞胺酯、N-羥基磺基-琥珀醯亞胺酯、對硝基苯基酯、五氟苯基酯)的雙官能交聯試劑反應。

用於製備代表性本發明之細胞毒性二聚體化合物的替代性合成方法顯示於第 20-21 圖中。在第 20 圖中，單還

原性二聚體(即，具有一個亞胺基團)之合成係藉由兩步式偶合方法達成，其中單體之還原形式先與連接基偶合隨後與 IBD 單體偶合，或該二聚體係在與反應性連接基偶合時使用還原單體與 IBD 單體之混合物製備。儘管雙還原二聚體可能為先前所述第二合成路徑之副產物，但更直接途徑顯示於第 21 圖中，其中還原單體借助連接基直接與兩者偶合。

細胞結合劑

本發明連結物作為治療劑之效用取決於適宜細胞結合劑之小心選擇。細胞結合劑可為目前已知或將已知之任何種類，且包括肽及非肽。一般而言，該等細胞結合劑可為抗體(尤其單株抗體)、淋巴因子、激素、生長因子、維生素(諸如葉酸等，其可結合於其細胞表面受體，例如葉酸受體)、營養運輸分子(諸如轉鐵蛋白)或任何其他細胞結合分子或物質。

在某些實施例中，該等細胞結合劑為蛋白質或多肽，或包含蛋白質或多肽之化合物。較佳蛋白質或多肽包含一或多個具有側鏈-NH₂基團之 Lys 殘基。或者或另外，該等蛋白質或多肽包含一或多個 Cys 殘基。Cys 殘基之側鏈-SH 基團可為完整的，或可呈可還原之二硫鍵形式。較佳二硫鍵之還原不會顯著不利地影響蛋白質或多肽之細胞結合功能(例如在抗體或其抗原結合部分之情況下，還原二硫鍵不會實質性增加輕鏈/重鏈之解離)。

Lys 側鏈-NH₂基團及/或 Cys 側鏈-SH 基團可共價連接至

連接基，該等連接基又連接至本發明之二聚體化合物，由此將細胞結合劑連結至本發明之二聚體化合物。每一基於蛋白質之細胞結合劑均可含有多個可經由雙官能交聯劑連接本發明化合物之 Lys 側鏈-NH₂ 基團及/或 Cys 側鏈-SH 基團。

可用的細胞結合劑之更具體實例包括：

多株抗體；

單株抗體；

抗體片段，諸如 Fab、Fab'及 F(ab')₂、Fv、微型抗體、雙鏈抗體、三鏈抗體、四鏈抗體(Parham, *J. Immunol.* 131:2895-2902 (1983)；Spring 等人, *J. Immunol.* 113:470-478 (1974)；Nisonoff 等人, *Arch. Biochem. Biophys.* 89:230-244 (1960)；Kim 等人, *Mol. Cancer Ther.*, 7 : 2486-2497 (2008), Carter, *Nature Revs.*, 6: 343-357 (2006))；

干擾素(例如 α 、 β 、 γ)；

淋巴因子，諸如 IL-2、IL-3、IL-4、IL-6；

激素，諸如胰島素、TRH(促甲狀腺激素釋放激素)、MSH(促黑素細胞激素)、類固醇激素(諸如雄激素及雌激素)；

生長因子及集落刺激因子，諸如 EGF、TGF- α 、FGF、VEGF、G-CSF、M-CSF 及 GM-CSF(Burgess, *Immunology Today* 5:155-158(1984))；

轉鐵蛋白 (O'Keefe 等人, *J. Biol. Chem.*

260:932-937(1985))；

維生素，諸如葉酸；

基於 III 型纖維連接蛋白(FN3)重複之共同序列之蛋白質骨架(亦稱為 Centyrins；參看美國公開案 2010/0255056，以引用之方式併入本文中)；

設計錨重複蛋白(Designer Ankyrin Repeat Protein)(DARPs；美國專利申請案第 20040132028 號；第 20090082274 號；第 20110118146 號；第 20110224100 號，以引用之方式併入本文中)、C. Zahnd 等人，2010, Cancer Res., 70; 1595-1605，以引用之方式併入本文中)；及

纖維連接蛋白結構域骨架蛋白(Adnectins：美國專利申請案第 20070082365 號；第 20080139791 號，以引用之方式併入本文中)。

單株抗體技術可產生呈特定單株抗體形式之極為特定之細胞結合劑。此項技術中尤其熟知藉由用相關抗原(諸如完整靶細胞)、自靶細胞分離之抗原、完整病毒、減毒之完整病毒、及病毒蛋白(諸如病毒包膜蛋白)對小鼠、大鼠、倉鼠或任何其他哺乳動物進行免疫來產生單株抗體的技術。亦可使用敏化人類細胞。產生單株抗體之另一方法係使用 scFv(單鏈可變區)，尤其人類 scFv 之噬菌體庫(參看例如 Griffiths 等人，美國專利第 5,885,793 號及第 5,969,108 號；McCafferty 等人，WO 92/01047；Liming 等人，WO 99/06587)。此外，亦可使用美國專利第

5,639,641 號中揭示之表面重塑抗體，以及嵌合抗體及人化抗體。適宜細胞結合劑之選擇係一個取決於欲靶向之特定細胞群之選擇，但若有一個適宜的人類單株抗體可用，則其一般較佳。

舉例而言，單株抗體 MY9 為鼠類 IgG1 抗體，其特異性結合於 CD33 抗原 {J.D. Griffin 等人, 8 Leukemia Res., 521(1984)} 且可用於靶細胞表現 CD33 (如在急性骨髓性白血病 (AML) 之疾病中) 之情形。細胞結合劑可為可以特異性或非特異性方式結合細胞之任何化合物。一般而言，該等細胞結合劑可為抗體 (尤其單株抗體及抗體片段)、干擾素、淋巴因子、激素、生長因子、維生素、營養運輸分子 (諸如轉鐵蛋白) 或任何其他細胞結合分子或物質。

在細胞結合劑為抗體之情況下，其結合於多肽形式之抗原且可為跨膜分子 (例如受體) 或配體，諸如生長因子。示範性抗原包括諸如腎素之分子；生長激素，包括人類生長激素及牛生長激素；生長激素釋放因子；副甲狀腺激素；促甲狀腺激素；脂蛋白； α -1-抗胰蛋白酶；胰島素 A 鏈；胰島素 B 鏈；胰島素原；促卵泡激素；降鈣素；促黃體素；胰高血糖素；凝血因子，諸如因子 vmc、因子 IX、組織因子 (TF) 及溫韋伯氏因子 (von Willebrands factor)；抗凝血因子，諸如蛋白質 C；心房鈉尿因子；肺界面活性物質；纖溶酶原活化物，諸如尿激酶或人尿，或組織型纖溶酶原活化物 (t-PA)；鈴蟾肽；凝血酶；造血生長因子；腫瘤壞死因子- α 及 - β ；腦啡肽酶；RANTES (調

. . 控活化正常 T 細胞表現及分泌因子); 人類巨噬細胞炎症
 . . 蛋白 (MIP-1- α); 血清白蛋白, 諸如人類血清白蛋白; 苗
 勒管抑制物 (Muellerian-inhibiting substance); 鬆弛素 A
 鏈; 鬆弛素 B 鏈; 鬆弛素原; 小鼠性促素相關肽; 微生
 物蛋白, 諸如 β -內醯胺酶; DNase; IgE; 細胞毒性 T 淋
 巴細胞相關抗原 (CTLA), 諸如 CTLA-4; 抑制素; 活化素;
 血管內皮生長因子 (VEGF); 激素或生長因子受體; 蛋白
 質 A 或 D; 類風濕因子; 神經營養因子, 諸如骨源性神
 經營養因子 (BDNF)、神經營養素-3、-4、-5 或 -6 (NT-3、
 NT4、NT-5 或 NT-6), 或神經生長因子, 諸如 NGF- β ; 血
 小板源性生長因子 (PDGF); 纖維母細胞生長因子, 諸如
 aFGF 及 bFGF; 纖維母細胞生長因子受體 2 (FGFR2)、表皮
 生長因子 (EGF); 轉化生長因子 (TGF), 諸如 TGF- α 及
 TGF- β , 包括 TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4 或 TGF- β 5;
 類胰島素生長因子 -I 及 -II (IGF-I 及 IGF-II);
 des(1-3)-IGF-I (腦 IGF-I)、類胰島素生長因子結合蛋白、
 黑素轉鐵蛋白、EpCAM、GD3、FLT3、PSMA、PSCA、MUC1、
 MUC16、STEAP、CEA、TENB2、EphA 受體、EphB 受體、
 葉酸受體、FOLR1、間皮素、槲皮素、 $\alpha_v\beta_6$ 、整合素、VEGF、
 VEGFR、EGFR、轉鐵蛋白受體 IRTA1、IRTA2、IRTA3、IRTA4、
 IRTA5; CD 蛋白, 諸如 CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD8、
 CD11、CD14、CD19、CD20、CD21、CD22、CD25、CD26、
 CD28、CD30、CD33、CD36、CD37、CD38、CD40、CD44、
 CD52、CD55、CD56、CD59、CD70、CD79、CD80。CD81、

CD103、CD105、CD134、CD137、CD138、CD152，或結合於美國公開案第 20080171040 號或美國公開案第 20080305044 號中所揭示(以全文引用方式併入)之一或多種腫瘤相關抗原或細胞表面受體的抗體；紅細胞生成素；骨生成誘導因子；免疫毒素；骨形態生成蛋白(BMP)；干擾素，諸如干擾素- α 、- β 及- γ ；集落刺激因子(CSFs)，例如 M-CSF、GM-CSF 及 G-CSF；白介素(IL)，例如 IL-1 至 IL-10；超氧化物歧化酶；T 細胞受體；表面膜蛋白；衰變加速因子；病毒抗原，諸如 HIV 包膜之一部分；運輸蛋白；歸巢受體；地址素(addressin)；調控蛋白；整合素，諸如 CD11a、CD11b、CD11c、CD18、ICAM、VLA-4 及 VCAM；腫瘤相關抗原，諸如 HER2、HER3 或 HER4 受體；內皮蛋白(endoglin)、c-Met、c-kit、1GF1R、PSGR、NGEP、PSMA、PSCA、LGR5、B7H4，及上文所列多肽中任一者之片段。

此外，結合於骨髓細胞之 GM-CSF 可用作來自急性骨髓性白血病之患病細胞之細胞結合劑。結合於活化 T 細胞之 IL-2 可用於預防移植物排斥、用於治療及預防移植物抗宿主疾病及用於治療急性 T 細胞白血病。結合於黑素細胞之 MSH 可用於治療黑素瘤，如同針對黑素瘤之抗體。葉酸可用於靶向卵巢及其他腫瘤上表現之葉酸受體。表皮生長因子可用於靶向鱗狀細胞癌，諸如肺癌及頭頸癌。生長抑素可用於靶向神經母細胞瘤及其他腫瘤類型。

利用雌激素(或雌激素類似物)或雄激素(或雄激素類似物)分別作為細胞結合劑，可成功地靶向乳癌及睪丸癌。

在一個實施例中，細胞結合劑為人化單株抗體。在另一實施例中，細胞結合劑為 huMy9-6 或其他相關抗體，其描述於美國專利第 7,342,110 號及第 7,557,189 號(以引用之方式併入本文中)。在另一實施例中，細胞結合劑為抗葉酸受體抗體，描述於美國臨時申請案第 61/307,797 號、第 61/346,595 號、第 61/413,172 號及美國申請案第 13/033,723 號(以 US 2012-0009181 A1 公開)。所有該等申請案之教導皆以全文引用之方式併入本文中。

在某些實施例中，細胞結合劑可為共有對抗原與本文所揭示之抗體結合至關重要的序列的單株抗體或其抗原結合片段，諸如 huMy9-6 或美國專利第 7,342,110 號及第 7,557,189 號(以引用之方式併入本文中)中所述之其相關抗體。與本文所述抗體相比較，該等衍生物抗體可具有實質上相同或一致之(1)輕鏈及/或重鏈 CDR3 區；(2)輕鏈及/或重鏈 CDR1、CDR2 及 CDR3 區；或(3)輕鏈及/或重鏈區。該等區域內之序列可含有保守胺基酸取代，包括 CDR 區內之取代。較佳存在不超過 1、2、3、4 或 5 個保守取代。在某些實施例中，衍生物抗體之輕鏈區及/或重鏈區與本文所述抗體具有至少約 90%、95%、99% 或 100% 一致性。該等衍生物抗體對靶抗原之結合特異性及/或親和力可與本文所述抗體實質上相同。較佳衍生物抗體之 K_d 及/或 k_{off} 值在本文所述抗體之 10 倍(更高或更

低)、5 倍(更高或更低)、3 倍(更高或更低)或 2 倍(更高或更低)範圍內。該等衍生物抗體可為完全人類抗體或人化抗體或嵌合抗體。衍生物抗體可根據任何業界認可之方法產生。

在一個實施例中，抗葉酸受體抗體為特異性結合人類葉酸受體 1 之人化抗體或其抗原結合片段，其中該抗體包含：(a)重鏈 CDR1，其包含 GYFMN(SEQ ID NO: 1)；重鏈 CDR2，其包含 RIHPYDGDTFYNQXaa₁FXaa₂Xaa₃(SEQ ID NO: 2)；及重鏈 CDR3，其包含 YDGSRAMDY(SEQ ID NO: 3)；及(b)輕鏈 CDR1，其包含 KASQSVSFAGTSLMH(SEQ ID NO: 4)；輕鏈 CDR2，其包含 RASNLEA(SEQ ID NO: 5)；及輕鏈 CDR3，其包含 QQSREYPYT(SEQ ID NO: 6)；其中 Xaa₁選自 K、Q、H 及 R；Xaa₂選自 Q、H、N 及 R；且 Xaa₃選自 G、E、T、S、A 及 V。較佳重鏈 CDR2 序列包含 RIHPYDGDTFYNQKFQG(SEQ ID NO: 7)。

在另一實施例中，抗葉酸受體抗體為特異性結合人類葉酸受體 1 之人化抗體或其抗原結合片段，其包含具有以下胺基酸序列之重鏈：

QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWKQSPGQSL
EWIGRIHPYDGDTFYNQKFQ GKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDF
AVYYCTRYDGSRAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST
SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV

KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:
8)。

在另一實施例中，抗葉酸抗體為由 2010 年 4 月 7 日寄
存於 ATCC 且 ATCC 寄存編號為 PTA-10772 及 PTA-10773
或 10774 之質體 DNA 編碼之人化抗體或其抗原結合片
段。

在另一實施例中，抗葉酸受體抗體為特異性結合人類
葉酸受體 1 之人化抗體或其抗原結合片段，其包含具有
以下胺基酸序列之輕鏈：
DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQ
QPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYCQ
QSREYPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLT
LTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:
9) ; 或

DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQ
QPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQ
QSREYPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLT
LTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:
10)。

在另一實施例中，抗葉酸受體抗體為特異性結合人類葉酸受體 1 之人化抗體或其抗原結合片段，其包含具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 8 之重鏈及具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 10 之輕鏈。較佳該抗體包含具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 8 之重鏈及具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 10 之輕鏈(hu FOLR1)。

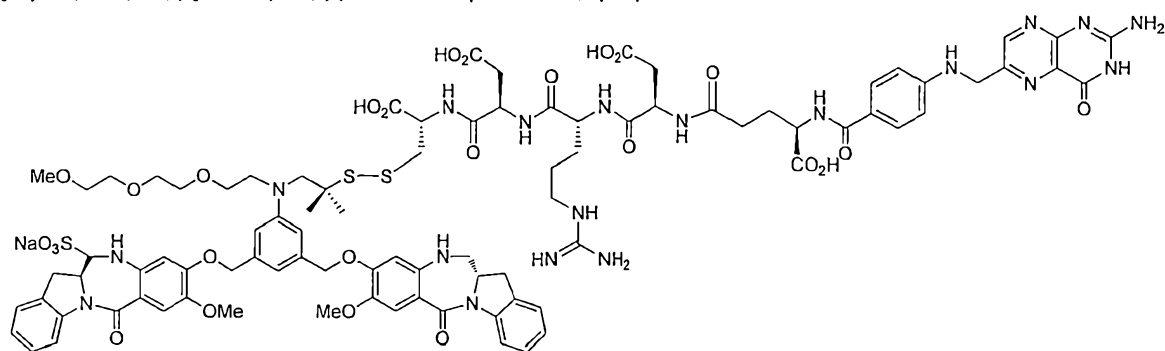
在另一實施例中，抗葉酸受體抗體為由 2010 年 4 月 7 日寄存於 ATCC 且 ATCC 寄存編號為 PTA-10772 及 PTA-10773 或 10774 之質體 DNA 編碼之人化抗體或其抗原結合片段。

在另一實施例中，抗葉酸受體抗體為人化抗體或其抗原結合片段，其包含與以下序列具有至少約 90%、95%、99% 或 100% 一致性之重鏈可變結構域：
 QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSL
 EWIGRIHPYDGDTFYNQKFQKGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDF
 AVYYCTRYDGSRAMDYWGQGTTVTVSS(SEQ ID NO: 11)，及與
 以下序列具有至少約 90%、95%、99%或 100%一致性之
 輕 鏈 可 變 結 構 域：
 DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQ
 QPRLLIYRASNL EAGVPDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYCQ
 QSREYPYTFGGGTKLEIKR(SEQ ID NO: 12) ； 或
 DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQ
 QPRLLIYRASNL EAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQ
 QSREYPYTFGGGTKLEIKR(SEQ ID NO: 13)。

細胞結合劑-藥物連結物

本發明亦提供細胞結合劑-藥物連結物，其包含經由多種連接基(包括但不限於，二硫化物連接基、硫醚連接基、醯胺鍵接之連接基、肽酶不穩定性連接基、酸不穩定性連接基、酯酶不穩定性連接基)連接至一或多種本發明細胞毒性化合物之細胞結合劑。

本發明之代表性連結物為抗體/細胞毒性化合物、抗體片段/細胞毒性化合物、表皮生長因子(EGF)/細胞毒性化合物、促黑素細胞激素(MSH)/細胞毒性化合物、促甲狀腺激素(TSH)/細胞毒性化合物、生長抑素/細胞毒性化合物、葉酸/細胞毒性化合物、雌激素/細胞毒性化合物、雌激素類似物/細胞毒性化合物、雄激素/細胞毒性化合物及雄激素類似物/細胞毒性化合物。代表性葉酸/細胞毒性化合物連結物描述於下文，其中視情況在兩種藥物單體之一者之亞胺鍵上存在 $-\text{SO}_3^-\text{Na}^+$ 加合物。此連結物之代表性合成流程顯示於第 54 圖中。



葉酸/細胞毒性化合物連結物

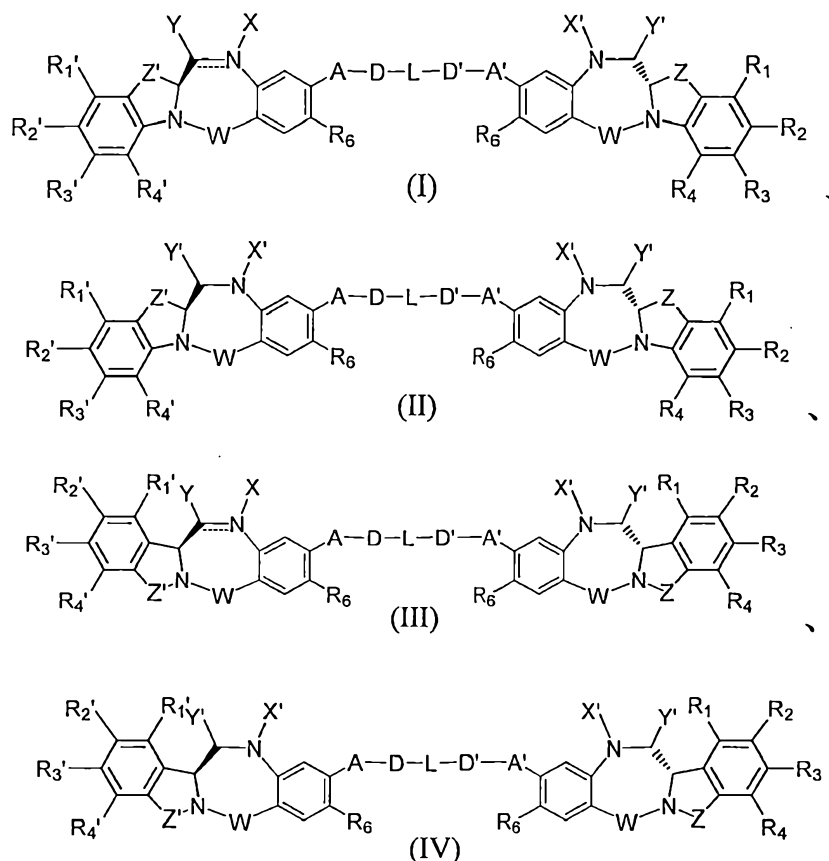
在一個較佳實施例中，本發明提供包含經由共價鍵連接之吡啶并苯并二氮呋二聚體化合物(例如式

(I)-(IV)、(IA)-(IVA)及(IB)-(IVB)之化合物)及細胞結合劑的連結物。該連接基可在腫瘤/非想要增殖細胞之部位處裂解，以多種方式將細胞毒性劑傳遞至其靶標。連接基可例如藉由低 pH(脛)、還原環境(二硫化物)、蛋白水解(醯胺/肽鍵)或經由酶促反應(酯酶/糖苷酶)來裂解。

在一個較佳態樣中，本發明之代表性細胞毒性連結物為抗體/吲哚啉并苯并二氮呋二聚體化合物、抗體片段/吲哚啉并苯并二氮呋二聚體化合物、表皮生長因子(EGF)/吲哚啉并苯并二氮呋二聚體化合物、促黑素細胞激素(MSH)/吲哚啉并苯并二氮呋二聚體化合物、促甲狀腺激素(TSH)/吲哚啉并苯并二氮呋二聚體化合物、生長抑素/吲哚啉并苯并二氮呋二聚體化合物、葉酸/吲哚啉并苯并二氮呋二聚體化合物、雌激素/吲哚啉并苯并二氮呋二聚體化合物、雌激素類似物/吲哚啉并苯并二氮呋二聚體化合物、前列腺特異性膜抗原(PSMA)抑制劑/吲哚啉并苯并二氮呋二聚體化合物、間質蛋白酶(matriptase)抑制劑/吲哚啉并苯并二氮呋二聚體化合物、設計錨重複蛋白(DARPin)/吲哚啉并苯并二氮呋二聚體化合物、雄激素/吲哚啉并苯并二氮呋二聚體化合物及雄激素類似物/吲哚啉并苯并二氮呋二聚體化合物。

因此，在第十四個特定實施例中，本發明提供一種連結物，其包含：細胞毒性化合物及細胞結合劑(CBA)，其中該細胞毒性化合物包含將細胞毒性化合物共價連接至CBA之連接基團，且其中該細胞毒性化合物由以下任一

式表示：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

N 與 C 之間之雙線 = 表示單鍵或雙鍵，其限制條件為，當其為雙鍵時，X 不存在，且 Y 為 -H 或具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基，且當其為單鍵時，X 為 -H、連接基團或胺保護部分；

Y 為 -H 或選自以下之離去基團：-OR、-OCOR'、-OCOOR'、-OCONR'R''、-NR'R''、-NR'COR''、-NR'NR'R''、視情況取代之 5 員或 6 員含氮雜環(例如哌啶、四氫吡咯、吡唑、嗎啉)、以 -NR'(C=NH)NR'R'' 表示之脒、胺基酸或以 -NRCOP' 表示之肽(其中 P' 為胺基酸或含有 2 至 20 個胺基酸單元之多肽)、-SR、-SOR'、-SO₂M、-SO₃M、-OSO₃M、鹵素、氰基及疊氮基；或

Y 為亞硫酸根 (HSO_3 、 HSO_2 或 HSO_3^- 、 SO_3^{2-} 或 HSO_2^- 與陽離子形成的鹽)、偏亞硫酸氫根 ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 或 $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$ 與陽離子形成的鹽)、單-、二-、三-及四-硫代磷酸根 (PO_3SH_3 、 $\text{PO}_2\text{S}_2\text{H}_2$ 、 POS_3H_2 、 PS_4H_2 或 PO_3S^{3-} 、 $\text{PO}_2\text{S}_2^{3-}$ 、 POS_3^{3-} 或 PS_4^{3-} 與陽離子形成的鹽)、硫代磷酸酯 ($(\text{R}^i\text{O})_2\text{PS}(\text{OR}^i)$ 、 $\text{R}^i\text{S}-$ 、 R^iSO 、 R^iSO_2 、 R^iSO_3 、硫代硫酸根 (HS_2O_3 或 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 與陽離子形成的鹽)、連二亞硫酸根 (HS_2O_4 或 $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ 與陽離子形成的鹽)、二硫代磷酸根 ($\text{P}(=\text{S})(\text{OR}^{k'})_2(\text{S})(\text{OH})$ 或其與陽離子形成的鹽)、羥肟酸 ($\text{R}^{k'}\text{C}(=\text{O})\text{NOH}$ 或與陽離子形成的鹽)、甲醛次硫酸根 ($\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ 或 $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ 與陽離子形成的鹽，諸如 $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-\text{Na}^+$) 或其混合物，其中 R^i 為具有 1 至 10 個碳原子之直鏈或分支烷基且經至少一個選自 $-\text{N}(\text{R}^j)_2$ 、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 及 $-\text{PO}_3\text{H}$ 之取代基取代； R^i 可進一步視情況經本文所述之烷基之取代基取代； R^j 為具有 1 至 6 個碳原子之直鏈或分支烷基； $\text{R}^{k'}$ 為具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、芳基、雜環基或雜芳基；較佳 Y 為亞硫酸氫根、連二亞硫酸根或偏亞硫酸氫根或其鹽(諸如鈉鹽)之加合物；

M 為 $-\text{H}$ 或陽離子；

R 在每次出現時獨立選自由以下組成之群： $-\text{H}$ 、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、聚乙二醇單元 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$ 、視情況取代之具有 6 至 18 個碳原子之芳基、視情況取代之含有一或多個獨立選自氮、氧及硫之雜原子的 5 員至 18 員雜

芳基環，或視情況取代之含有 1 至 6 個獨立選自 O、S、N 及 P 之雜原子的 3 員至 18 員雜環；

R' 及 R'' 各獨立選自 -H、-OH、-OR、-NHR、-NR₂、-COR、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、聚乙二醇單元 -(CH₂CH₂O)_n-R^c、及視情況取代之具有 1 至 6 個獨立選自 O、S、N 及 P 之雜原子的 3 員至 18 員雜環；

R^c 為 -H、或取代或未取代之具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基、或連接基團；

n 為 1 至 24 之整數；

W 選自 C=O、C=S、CH₂、BH、SO 及 SO₂；

X' 選自 -H、胺保護基、連接基團、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、聚乙二醇單元 -(CH₂CH₂O)_n-R^c、視情況取代之具有 6 至 18 個碳原子之芳基、視情況取代之含有一或多個獨立選自氮、氧及硫之雜原子的 5 員至 18 員雜芳基環，及視情況取代之含有 1 至 6 個獨立選自 O、S、N 及 P 之雜原子的 3 員至 18 員雜環；

Y' 選自 -H、側氧基、連接基團、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、視情況取代之 6 員至 18 員芳基、視情況取代之含有一或多個獨立選自氮、氧及硫之雜原子的 5 員至 18 員雜芳基環、視情況取代之具有 1 至 6 個雜原子之 3 員至 18 員雜環；

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_1' 、 R_2' 、 R_3' 及 R_4' 各獨立選自由以下組成之群： $-H$ 、視情況取代之具有1至10個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、聚乙二醇單元 $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$ 、鹵素、胍 $[-NH(C=NH)NH_2]$ 、 $-OR$ 、 $-NR'R''$ 、 $-NO_2$ 、 $-NCO$ 、 $-NR'COR''$ 、 $-SR$ 、以 $-SOR'$ 表示之亞砷、以 $-SO_2R'$ 表示之砷、磺酸根 $-SO_3^-M^+$ 、硫酸根 $-OSO_3^-M^+$ 、以 $-SO_2NR'R''$ 表示之磺醯胺、氰基、疊氮基、 $-COR'$ 、 $-OCOR'$ 、 $-OCONR'R''$ 及連接基團；

R_6 為 $-H$ 、 $-R$ 、 $-OR$ 、 $-SR$ 、 $-NR'R''$ 、 $-NO_2$ 、鹵素或連接基團；

Z 及 Z' 獨立選自 $-(CH_2)_{n'}-$ 、 $-(CH_2)_{n'}-CR_7R_8-(CH_2)_{na'}-$ 、 $-(CH_2)_{n'}-NR_9-(CH_2)_{na'}-$ 、 $-(CH_2)_{n'}-O-(CH_2)_{na'}-$ 及 $-(CH_2)_{n'}-S-(CH_2)_{na'}-$ ；

n' 與 na' 相同或不同，且選自0、1、2及3；

R_7 與 R_8 相同或不同，且各獨立選自 $-H$ 、 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-COOH$ 、 $-NHR'$ 、聚乙二醇單元 $-(OCH_2CH_2)_n-$ 、胺基酸、帶有2至6個胺基酸之肽單元、視情況取代之具有1至10個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基；

R_9 獨立選自 $-H$ 、視情況取代之具有1至10個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、聚乙二醇單元 $-(OCH_2CH_2)_n-$ ；

A 與 A' 相同或不同，且獨立選自 $-O-$ 、側氧基 $(-C(=O)-)$ 、 $-CRR'O-$ 、 $-CRR'-$ 、 $-S-$ 、 $-CRR'S-$ 、 $-NR_5$ 及 $-CRR'N(R_5)-$ ；

R_5 在每次出現時獨立地為 $-H$ 或視情況取代之具有1至10個碳原子之直鏈或分支烷基；

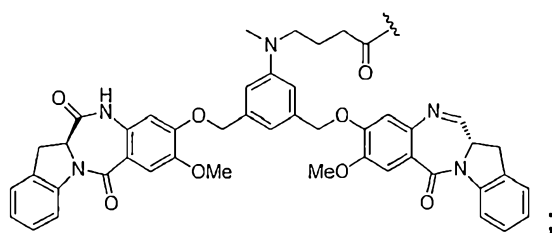
D 與 D'相同或不同，且獨立地不存在或選自由以下組成之群：視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、胺基酸、帶有 2 至 6 個胺基酸之肽、及聚乙二醇單元 $(-\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$ ；

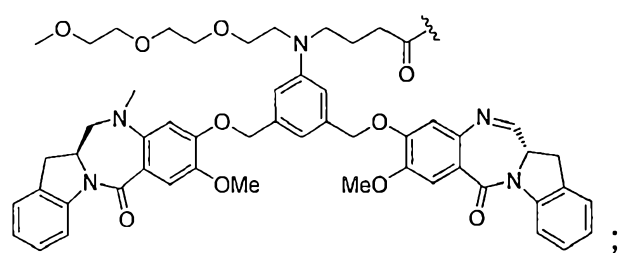
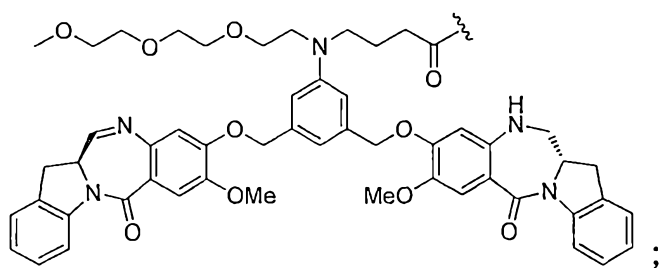
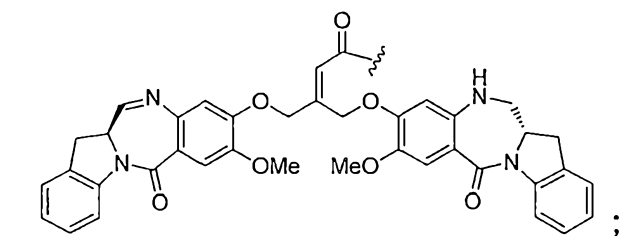
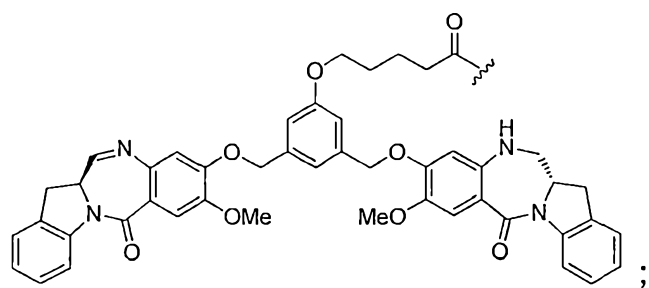
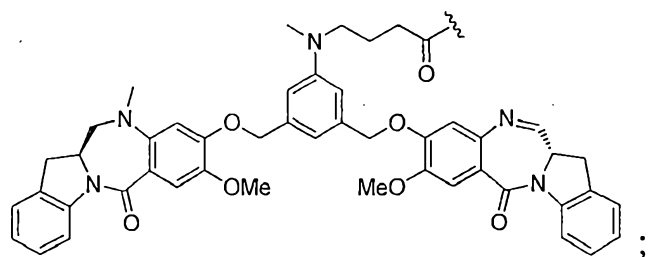
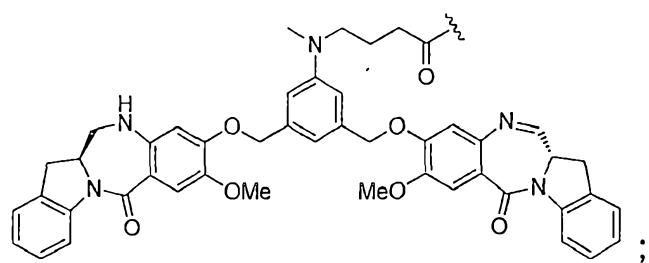
L 不存在、或為連接基團、聚乙二醇單元 $(-\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$ 、具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基或烯基、苯基、具有 1 至 6 個獨立選自 O、S、N 及 P 之雜原子的 3 員至 18 員雜環或 5 員至 18 員雜芳基環，其中該烷基或烯基視情況經連接基團取代；苯基或雜環或雜芳基環可視情況經取代，其中該取代基可為連接基團。

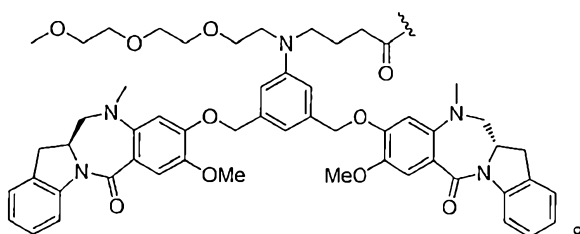
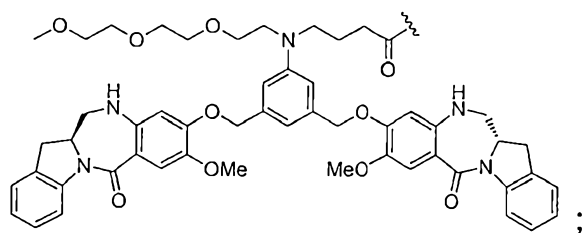
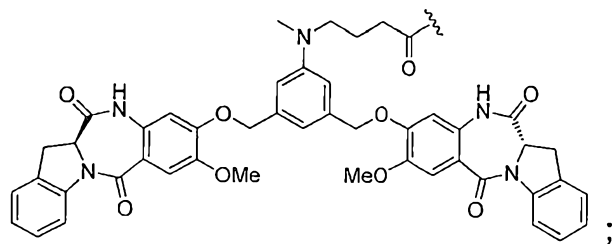
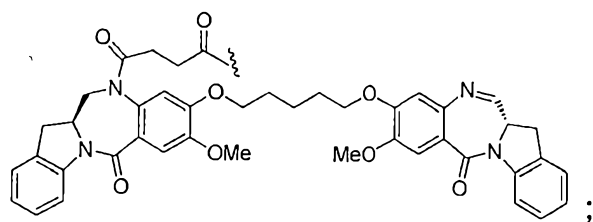
在某些實施例中，X 不為連接基團。在某些實施例中，N 與 C 之間之雙線 $=$ 表示單鍵，Y 不為-H。

在某些實施例中，Y 為選自以下之離去基團： $-\text{OR}$ 、 $-\text{OCOR}'$ 、 $-\text{OCOOR}'$ 、 $-\text{OCONR}'\text{R}''$ 、 $-\text{NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{NR}'\text{COR}''$ 、 $-\text{NR}'\text{NR}'\text{R}''$ 、視情況取代之 5 員或 6 員含氮雜環(例如吡啶、四氫吡咯、吡唑、嗎啉等)、以 $-\text{NR}'(\text{C}=\text{NH})\text{NR}'\text{R}''$ 表示之脒、胺基酸或以 $-\text{NRCOP}'$ 表示之肽(其中 P'為胺基酸或含有 2 至 20 個胺基酸單元之多肽)、 $-\text{SR}$ 、 $-\text{SOR}'$ 、 $-\text{SO}_2\text{M}$ 、 $-\text{SO}_3\text{M}$ 、 $-\text{OSO}_3\text{M}$ 、鹵素、氰基及疊氮基。

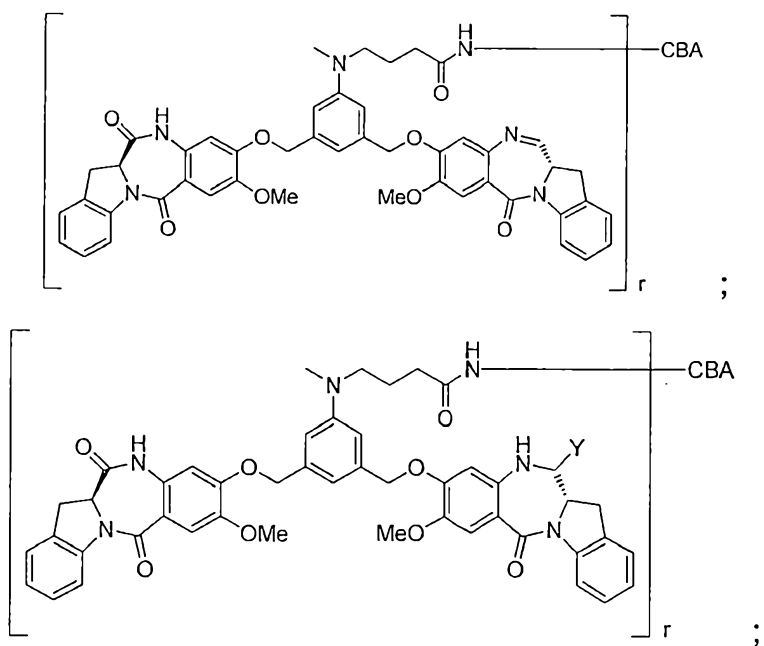
在某些實施例中，化合物不為以下化合物中任一者：

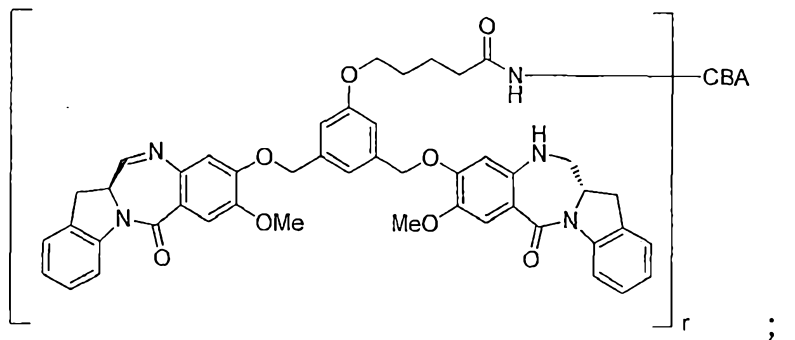
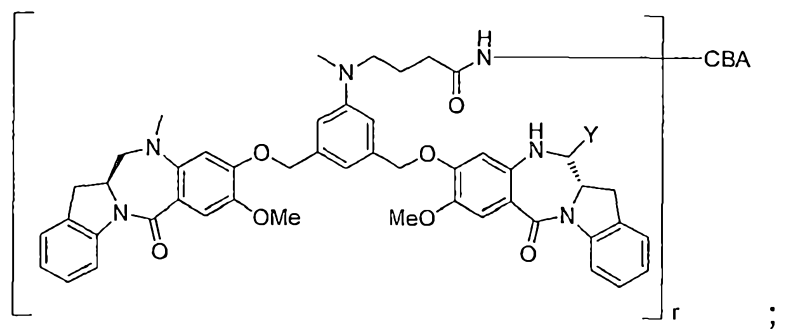
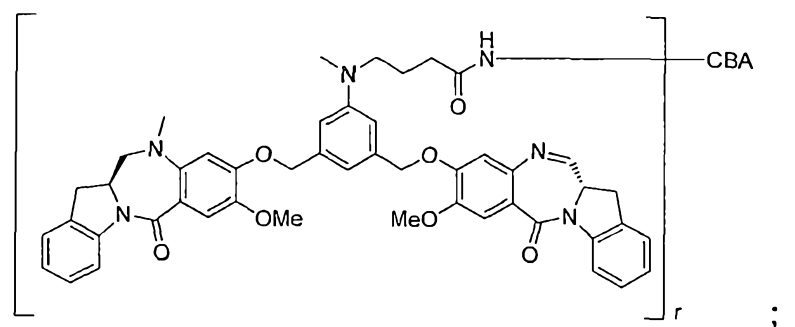
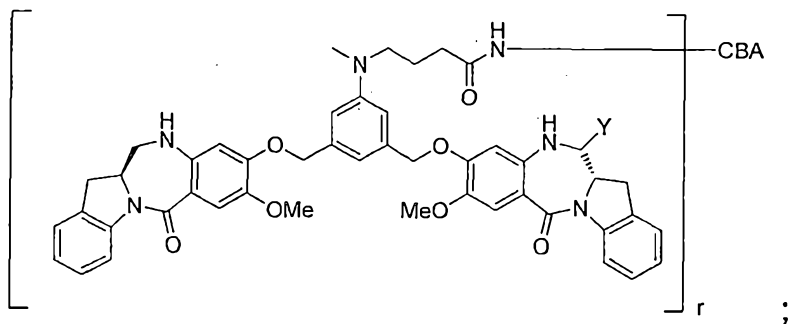




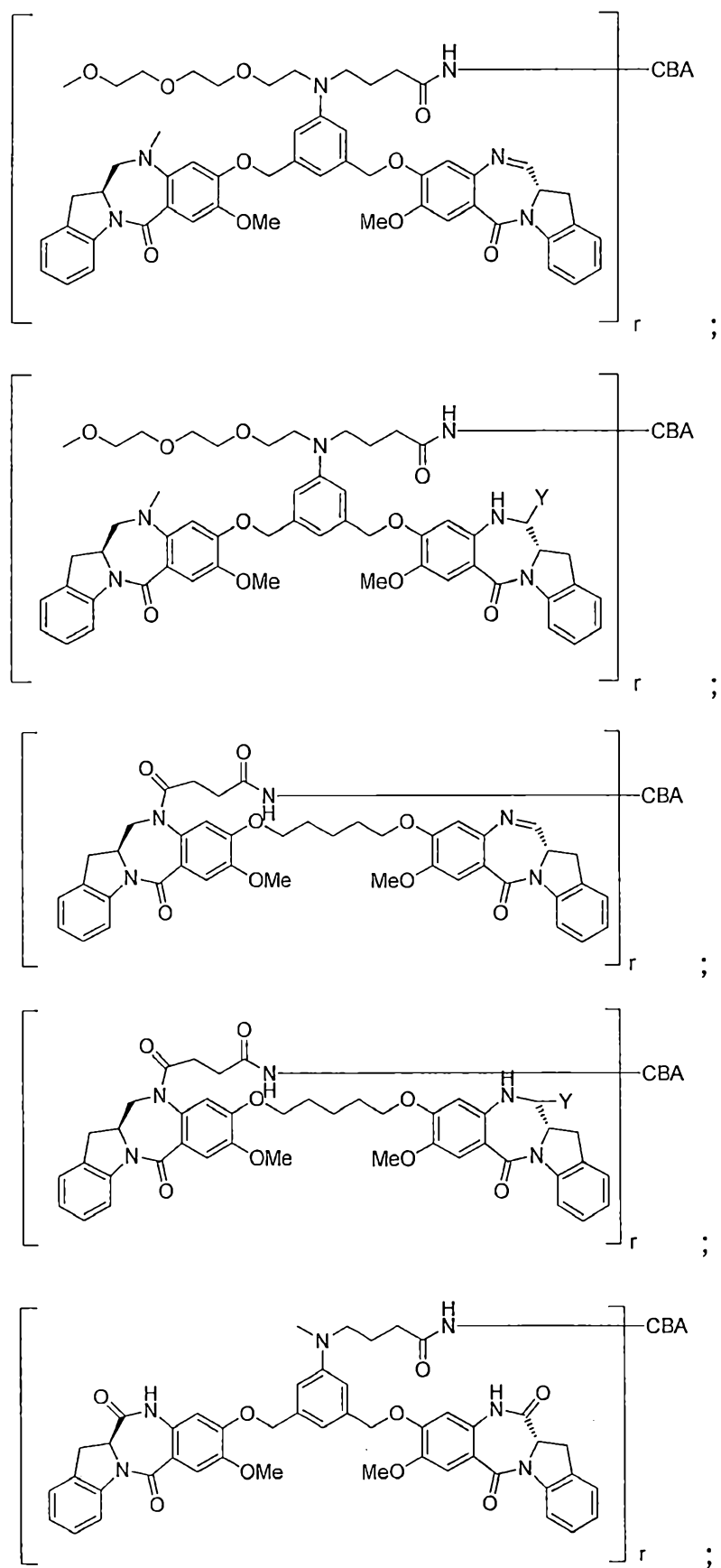


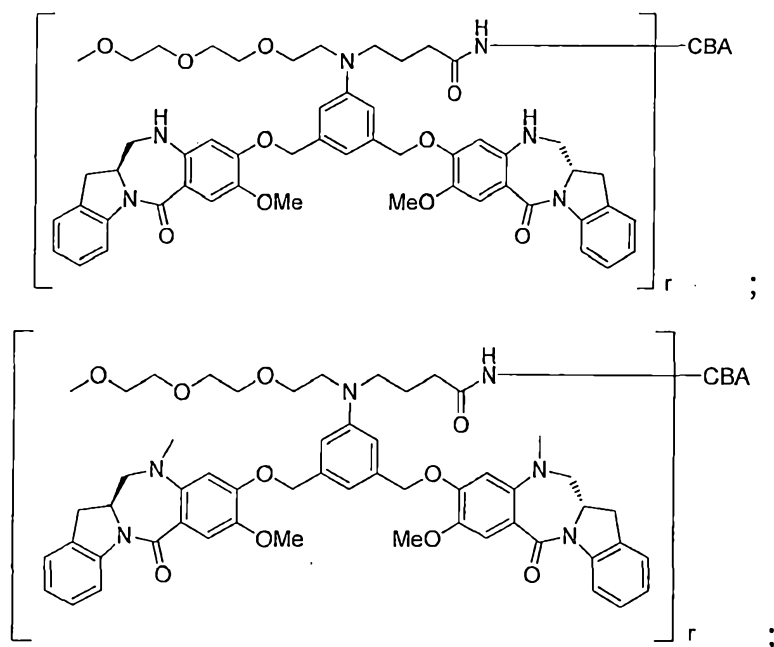
在某些實施例中，本發明之連結物包括以下各物：









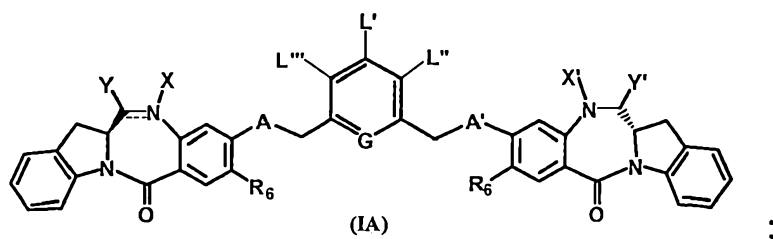


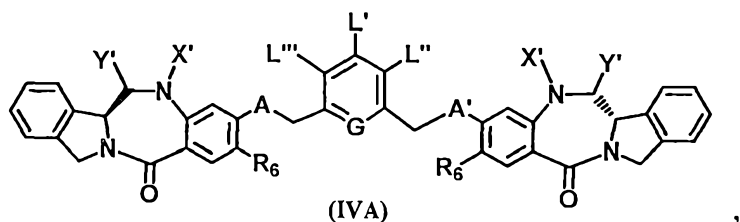
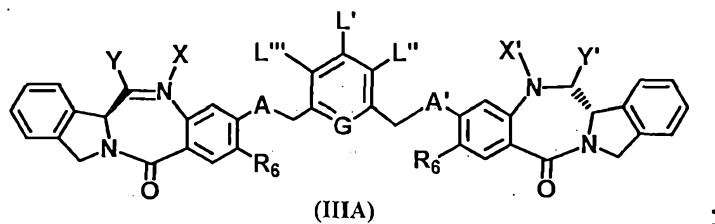
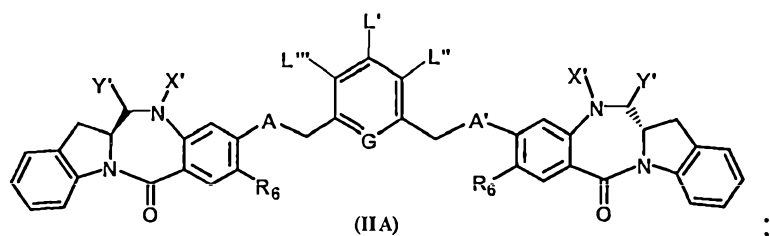
其中：

CBA 為細胞結合劑， r 為 1 至 10 之整數， Y 為 $-H$ 、亞硫酸氫根加合物、連二亞硫酸根或偏亞硫酸氫根或其鹽，或 $-SO_3M$ ，且 M 為 $-H$ 或醫藥學上可接受之陽離子。

在某些實施例中， L 不存在，或選自視情況取代之苯基及視情況取代之吡啶基，其中該苯基及該吡啶基帶有連接基團，或 L 為帶有連接基團之胺基(即 $-N(\text{連接基團})-$)，或 L 為具有 1 至 6 個碳原子且帶有連接基團之直鏈、分支或環狀烷基或烯基。

在第十五個特定實施例中，化合物由以下任一式表示：





其中：

L' 、 L'' 及 L''' 相同或不同，且獨立選自-H、視情況取代之具有1至10個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、聚乙二醇單元 $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$ 、鹵素、胍 $[-NH(C=NH)NH_2]$ 、 $-OR$ 、 $-NR'R''$ 、 $-NO_2$ 、 $-NR'COR''$ 、 $-SR$ 、以 $-SOR'$ 表示之亞磺、以 $-SO_2R'$ 表示之磺、磺酸根 $-SO_3M$ 、硫酸根 $-OSO_3M$ 、以 $-SO_2NR'R''$ 表示之磺醯胺、氰基、疊氮基、 $-COR'$ 、 $-OCOR'$ 、 $-OCONR'R''$ 及連接基團，其限制條件為， L' 、 L'' 及 L''' 中僅一者為連接基團；且

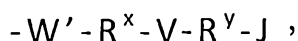
G 選自 $-CH-$ 或 $-N-$ 。其餘基團如上文第十四個特定實施例中所述。

在某些實施例中， L' 、 L'' 或 L''' 中一者為連接基團，而其餘為-H。較佳 L' 為連接基團且 L'' 及 L''' 為-H。

在某些實施例中， A 及 A' 均為 $-O-$ ， R_6 為 $-OMe$ 且 G 為

-CH-。

在第十六個特定實施例中，L'以下式表示：



其中：

W'與V相同或不同，且各獨立地不存在，或選自 -CR^eR^{e'}-、-O-、-O-C(=O)-、-C(=O)-O-、-S-、-SO-、-SO₂-、-CH₂-S-、-CH₂O-、-CH₂NR^e-、-O-(C=O)O-、-O-(C=O)N(R^e)-、-N(R^e)-、-N(R^e)-C(=O)-、-C(=O)-N(R^e)-、-N(R^e)-C(=O)O-、-N(C(=O)R^e)C(=O)-、-N(C(=O)R^e)-、-(O-CH₂-CH₂)_n-、-SS-或-C(=O)-或胺基酸，或具有2至8個胺基酸之肽；

R^x與R^y相同或不同，且各獨立地不存在，或為視情況取代之具有1至10個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、帶有6至10個碳原子之芳基，或帶有1至3個選自O、N或S之雜原子之3員至8員雜環；

R^e與R^{e'}相同或不同，且選自-H、具有1至10個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基，或-(CH₂-CH₂-O)_n-R^k，其中R^k為-H、具有1至6個碳原子且視情況帶有二級胺基(例如-NHR¹⁰¹)或三級胺基(-NR¹⁰¹R¹⁰²)之直鏈、分支環狀烷基，或5員或6員含氮雜環，諸如哌啶或嗎啉，其中R¹⁰¹及R¹⁰²各獨立地為具有1至10個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基；較佳R¹⁰¹及R¹⁰²各獨立地為具有1至6個碳原子之直鏈或分支烷基；

n為1至24之整數；且

J 共價連接至 CBA，且選自琥珀醯亞胺、乙醯胺基、-S-、-SS-、-CH₂S-、-CH(Me)S-、-C(Me)₂S-、-NR^{c1}-、-CH₂NR^{c1}-、-NR^{c1}N-及-C(=O)-，其中 R^{c1} 為 -H，或取代或未取代之具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基。

在某些實施例中，J 為 -S-、-SS-、琥珀醯亞胺或 -C(=O)-。

在某些實施例中，R^{e'} 為 -H 或 -Me；R^e 為具有 1 至 6 個碳原子之直鏈或分支烷基、或 -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k；n 為 2 至 8 之整數；且 R^k 為 -H、-Me 或 -CH₂CH₂-NMe₂，且其餘變數如上文在第十五個特定實施例中所述。

在某些實施例中，V 為胺基酸或具有 2 至 8 個胺基酸之肽。

在某些實施例中，V 為纈胺酸-瓜胺酸、gly-gly-gly 或 ala-leu-ala-leu。

在某些實施例中，

W' 為 -O-、-N(R^e)-或 -N(R^e)-C(=O)-；

R^e 為 H、具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基、或 -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k；

R^x 為具有 1 至 6 個碳原子之直鏈或分支烷基；

V 不存在或為 -(O-CH₂-CH₂)_n-、-C(=O)-NH-、-S-、-NH-C(=O)-；

R^y 不存在，或為具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基；且

J 為 -S-、-SS-或 -C(=O)-，且其餘基團如第十六個特定實施例中所定義。

在某些實施例中，

W' 為 $-O-$ 、 $-N(R^e)-$ 或 $-N(R^e)-C(=O)-$ ；

R^e 為 $-H$ 、 $-Me$ 或 $-(CH_2-CH_2-O)_n-Me$ ；

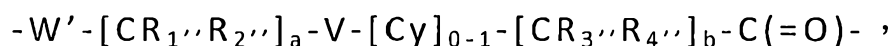
n 為 2 至 6 之整數；

R^x 為帶有 1 至 6 個碳原子之直鏈或分支烷基；

V 及 R^y 不存在；且

J 為 $-C(=O)-$ 。其餘基團如第十六個特定實施例中所定義。

在第十七個特定實施例中，第十六個特定實施例中之 L' 以下式表示：



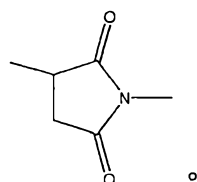
其中：

$R_{1''}$ 、 $R_{2''}$ 及 $R_{3''}$ 各獨立地為 $-H$ 或帶有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基，較佳為 $-Me$ ；

$R_{4''}$ 為 $-H$ 、帶有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基 (較佳 $-Me$)、 $-SO_3H$ 或 $-SO_3^-M^+$ ，其中 M^+ 為醫藥學上可接受之陽離子；

a 為 0-5 之整數 (例如 0 至 2、3、4 或 5) 且 b 為 0-6 之整數 (例如 0 至 3、4、5 或 6)；且

Cy 為視情況取代之帶有 N 雜原子之 5 員雜環，較佳 Cy 為

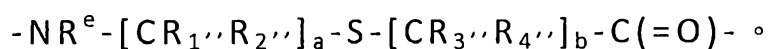


在某些實施例中，諸如在第十六或第十七個特定實施例中， W' 為 $-N(R^e)-$ 。

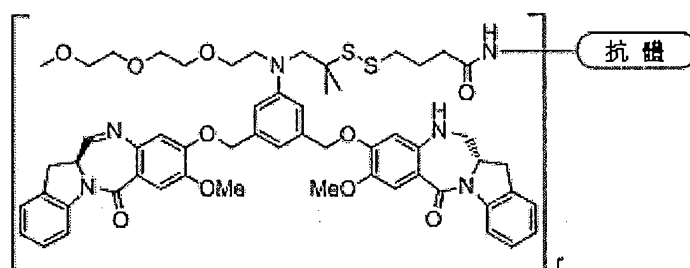
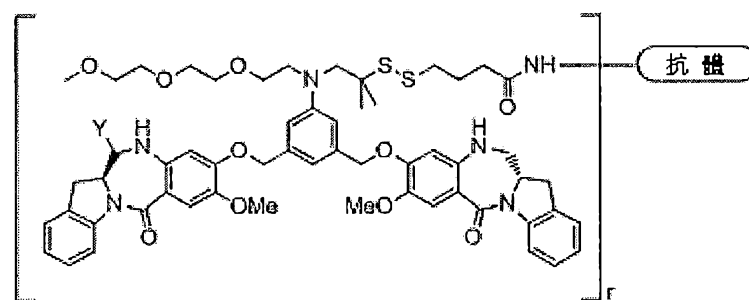
在某些實施例中，諸如在第十六或第十七個特定實施例中， R^e 為 $-(CH_2-CH_2-O)_{2-6}-R^k$ ，其中 R^k 為具有 1 至 6 個碳原子之直鏈或分支烷基。

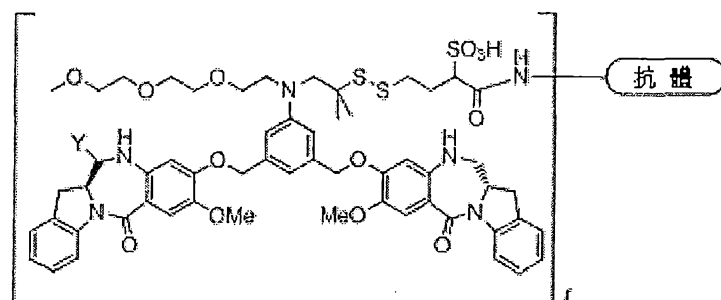
在某些實施例中，諸如在第十六或第十七個特定實施例中， V 為 $-S-$ 或 $-SS-$ 。

在第十八個特定實施例中，在第十六或第十七個特定實施例中之 L' 以下式表示：

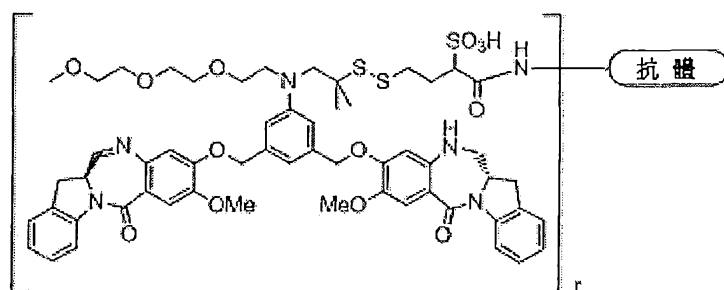


在某些實施例中，諸如在第十六至第十八個特定實施例中，連結物為：





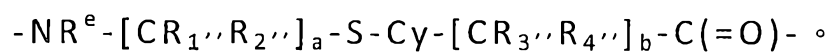
或



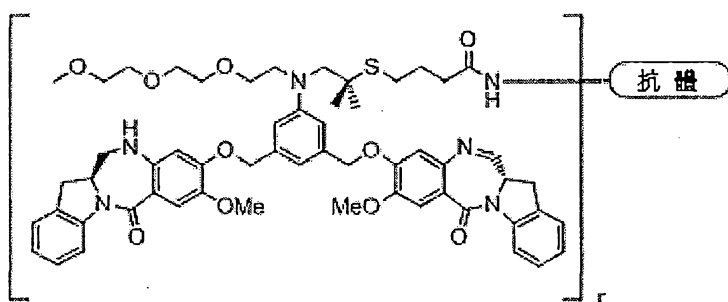
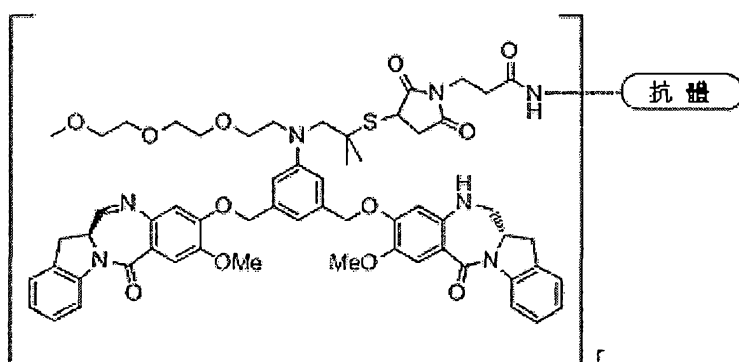
其中 r 為 1 至 10 之整數， Y 為 $-H$ 或 $-SO_3M$ (例如 Y 為 $-SO_3M$)，且 M 為 $-H$ 或醫藥學上可接受之陽離子。

在某些實施例中，諸如在第十六至第十八個特定實施例中，抗體為 huMy9-6。

在第十九個特定實施例中，在第十六或第十七個特定實施例中之 L' 以下式表示：



在某些實施例中，諸如在第十六、第十七及第十九個特定實施例中，連結物為：

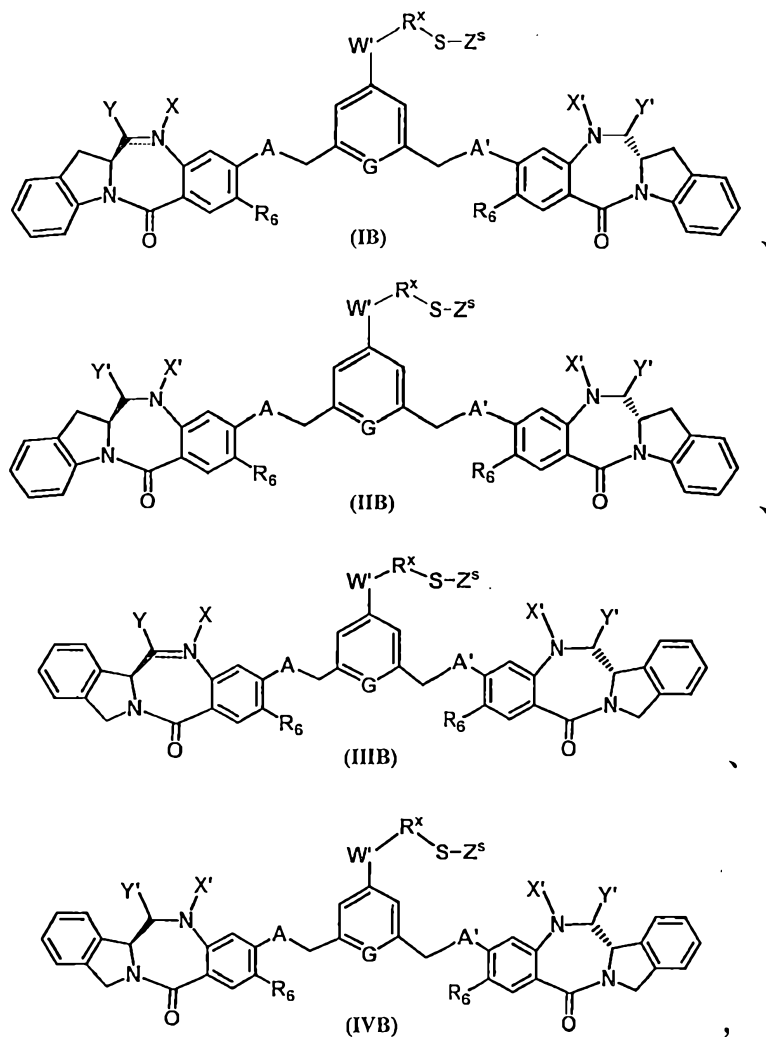


抗體

124

在有些實施例中，諸如在第十六、第十七及第十九個特定實施例中，抗體為 huMy9-6。

在第二十個特定實施例中，化合物以下式表示：



其中：

W' 不存在，或選自 $-O-$ 、 $-N(R^e)-$ 、 $-N(R^e)-C(=O)-$ 、 $-N(C(=O)R^e)-$ 、 $-S-$ 、 $-CH_2-S-$ 或 $-CH_2NR^e-$ ；

R^x 不存在，或選自具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基；

R^e 為 $-H$ 、具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基，或 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$ ，其中 R^k 為 $-H$ 、具

有 1 至 6 個碳原子且視情況帶有二級胺基(例如 $-\text{NHR}^{101}$)或三級胺基($-\text{NR}^{101}\text{R}^{102}$)之直鏈、分支環狀烷基，或 5 員或 6 員含氮雜環，諸如哌啶或嗎啉，其中 R^{101} 及 R^{102} 各獨立地為具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基；

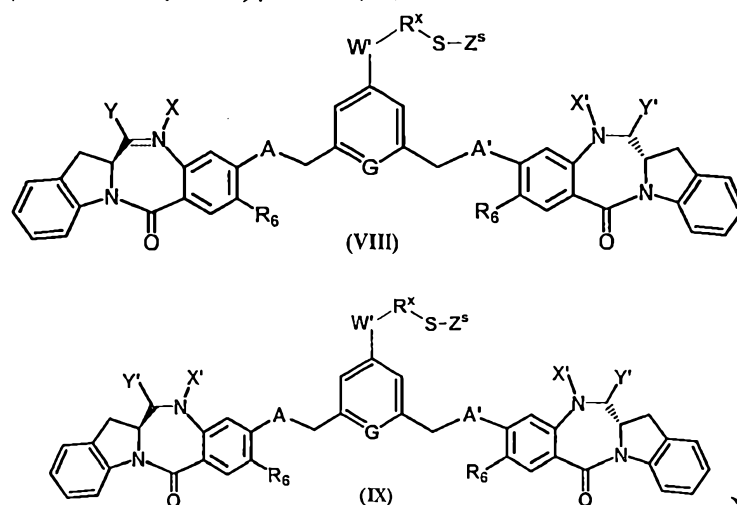
Z^s 連接至 CBA，且為一鍵結或 $-\text{SR}^m-$ ；

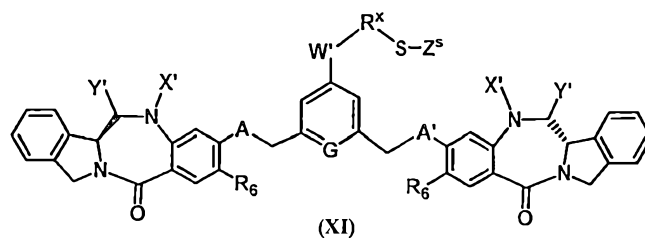
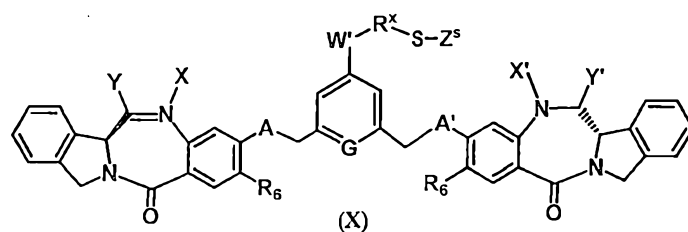
R^m 為 R^d ，或經取代之具有 1 至 4 個碳原子且帶有選自以下各物之反應性酯之直鏈或分支烷基：N-羥基琥珀醯亞胺酯、N-羥基鄰苯二甲醯亞胺酯、N-羥基磺基-琥珀醯亞胺酯、對硝基苯基酯、二硝基苯基酯及五氟苯基酯；

R^d 選自苯基、硝基苯基、二硝基苯基、羧基硝基苯基、吡啶基或硝基吡啶基；且

n 為 1 至 24 之整數；且其餘變數如上文在第八或第十五個特定實施例中所述。

在第二十一個特定實施例中，化合物以下式表示：





其中：

W' 不存在，或選自 $-O-$ 、 $-N(R^e)-$ 、 $-N(R^e)-C(=O)-$ 、 $-N(C(=O)R^e)-$ 、 $-S-$ 、 $-CH_2-S-$ 或 $-CH_2NR^e-$ ；

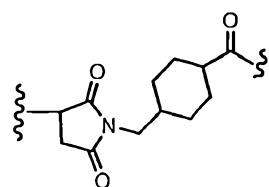
R^x 不存在，或選自具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基；

R^e 為 $-H$ 、具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基，或 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$ ，其中 R^k 為 $-H$ 、具有 1 至 6 個碳原子且視情況帶有二級胺基(例如 $-NHR^{101}$)或三級胺基($-NR^{101}R^{102}$)之直鏈、分支環狀烷基，或 5 員或 6 員含氮雜環，諸如吡啶或嗎啉，其中 R^{101} 及 R^{102} 各獨立地為具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基；

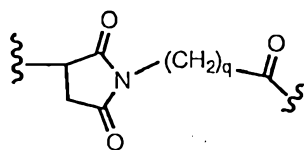
n 為 2 至 6 之整數；

Z^s 連接至 CBA，且選自：

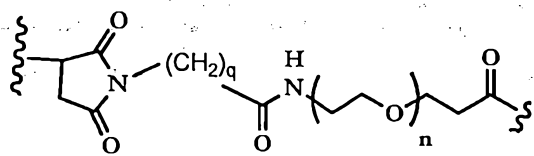
一鍵；



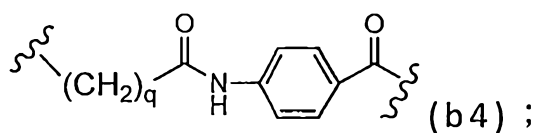
(b1) ;



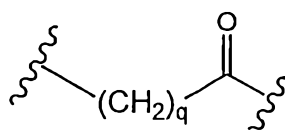
(b2) ;



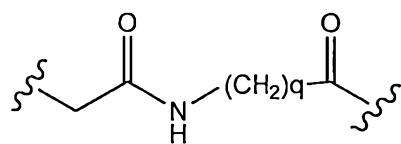
(b3) ;



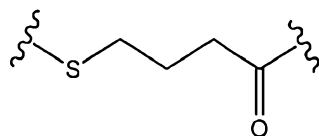
(b4) ;



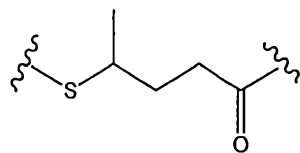
(b5) ;



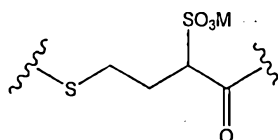
(b6) ;



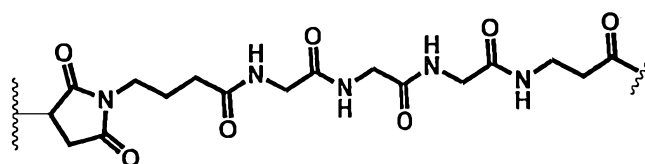
(b7) ;



(b8) ;



(b9) , 及



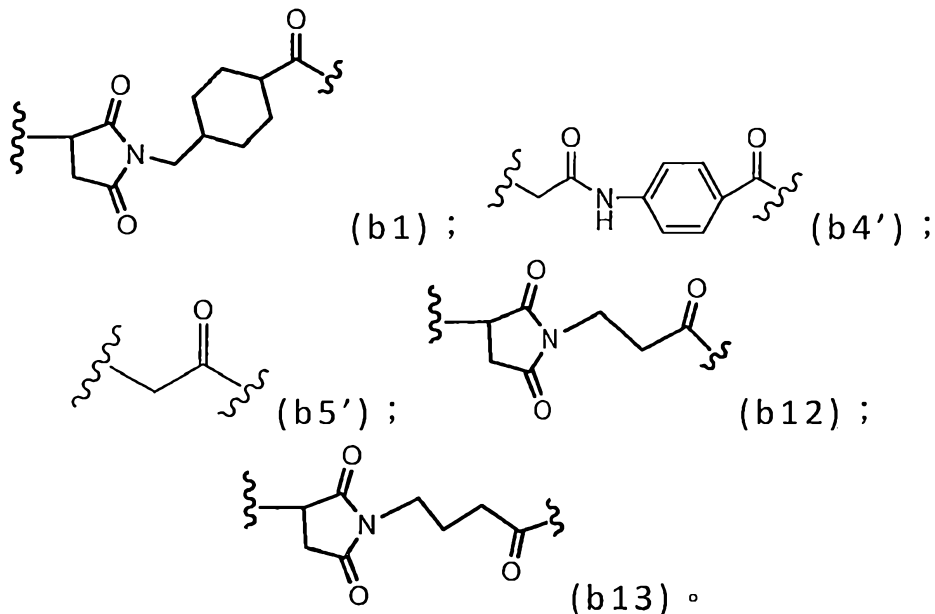
(b10) ,

其中：

q 為 1 至 5 之整數；且

M 為 -H 或陽離子，諸如 Na^+ 或 K^+ 。

在某些實施例中， Z^s 由以下任一式表示：



在某些實施例中， W' 為 $-\text{N}(\text{R}^e)-$ 。

在某些實施例中， R^e 為 $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{R}^k$ ，其中 R^k 為 -H、具有 1 至 6 個碳原子之直鏈、分支環狀烷基。

在某些實施例中， R^k 為 -H 或 -Me， n 為 4 且 q 為 2。

在某些實施例中， R^x 為具有 1 至 6 個碳原子之直鏈或分支烷基。

在某些實施例中， R^x 為 $-(\text{CH}_2)_p-(\text{CR}^f\text{R}^g)-$ ，其中 R^f 及 R^g 各獨立選自 H 或具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基；且 p 為 0、1、2 或 3。

在某些實施例中， R^f 與 R^g 相同或不同，且選自 -H 及 -Me；且 p 為 1。

在第二十二個特定實施例中，對於在第二十一個特定

實施例中所述之式(VIII)、(IX)、(X)及(XI)之連結物，變數如下文所述：

N 與 C 之間之雙線==表示單鍵或雙鍵，其限制條件為，當其為雙鍵時，X 不存在，且 Y 為 -H，且當其為單鍵時，X 為 -H；Y 為 -H、-OH 或 -SO₃M(例如 Y 為 -OH 或 -SO₃M)；

M 為 -H 或醫藥學上可接受之陽離子(例如 Na⁺)；

X' 及 Y' 均為 -H；

A 及 A' 均為 -O-；

R₆ 為 -OMe；且

R^x 為具有 1 至 6 個碳原子之直鏈或分支烷基。

在第二十三個特定實施例中，對於在第二十個特定實施例中所述之式(IB)、(IIB)、(IIIB)及(IVB)之化合物，變數如下文所述：

N 與 C 之間之雙線==表示單鍵或雙鍵，其限制條件為，當其為雙鍵時，X 不存在，且 Y 為 -H，且當其為單鍵時，X 為 -H；Y 為 -H、-OH 或 -SO₃M(例如 Y 為 -OH 或 -SO₃M)；

M 為 -H 或 Na⁺；

X' 及 Y' 均為 -H；

A 及 A' 均為 -O-；

R₆ 為 -OMe；

R^x 為具有 1 至 6 個碳原子之直鏈或分支烷基。

較佳 R^x 為 -(CH₂)_p-(CR^fR^g)-，其中 R^f 及 R^g 各獨立選自 -H 或具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基；p 為 0、1、2 或 3。更佳 R^f 與 R^g 相同或不同，且選自 -H 及 -Me；且 p

為 1。

在上述關於本發明連結物之任一特定實施例(諸如第十四至第二十三個特定實施例)中，N與C之間之雙線 $\equiv$ 可表示雙鍵。

在上述關於本發明連結物之任一特定實施例(諸如第十四至第二十三個特定實施例)中，N與C之間之雙線 $\equiv$ 可表示單鍵，X為-H、連接基團或胺保護基(例如X為-H)；且Y為-H或選自-OR、-OCOR'、-SR、-NR'R''、視情況取代之5員或6員含氮雜環、-SO₃M、-SO₂M及硫酸根-OSO₃M。在某些實施例中，Y不為-H。

在某些實施例中，Y選自-H、-SO₃M、-OH、-OMe、-OEt或-NHOH(例如Y為-SO₃M、-OH、-OMe、-OEt或-NHOH)。

在某些實施例中，Y為-H、-SO₃M或-OH(例如Y為-SO₃M或-OH)。

在某些實施例中，M為-H、Na⁺或K⁺。

在上述關於本發明連結物之任一特定實施例(諸如第十四至第二十三個特定實施例)中，W存在時為C=O。

在上述關於本發明連結物之任一特定實施例(諸如第十四至第二十三個特定實施例)中，Z及Z'存在時為-CH₂-。

在上述關於本發明連結物之任一特定實施例(諸如第十四至第二十三個特定實施例)中，X'選自由以下組成之群：-H、-OH、視情況取代之具有1至10個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、苯基、連接基團及胺保護基。

在某些實施例中，X'為-H、-OH、-Me或連接基團。

在某些實施例中，X'為-H。

在上述關於本發明連結物之任一特定實施例(諸如第十四至第二十三個特定實施例)中，Y'選自由以下組成之群：-H、側氧基、取代或未取代之具有1至10個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基。

在某些實施例中，Y'為-H或側氧基。

在某些實施例中，Y'為-H。

在上述關於本發明連結物之任一特定實施例(諸如第十四至第二十三個特定實施例)中，A與A'相同或不同，且選自-O-、-S-、-N(R₅)-及側氧基(C=O)。

在某些實施例中，A與A'相同或不同，且選自-O-及-S-。

在某些實施例中，A及A'為-O-。

在上述關於本發明連結物之任一特定實施例(諸如第十四至第二十三個特定實施例)中，D及D'存在時相同或不同，且獨立選自聚乙二醇單元(-OCH₂CH₂)_n(其中n為1至24之整數)、胺基酸、帶有2至6個胺基酸之肽、或具有1至10個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基，其中烷基、烯基及炔基視情況經一或多個獨立選自由以下組成之群之取代基取代：鹵素、-OR、-NR'COR''、-SR及-COR'。

在某些實施例中，D及D'為帶有1至4個碳原子之直鏈或分支烷基。

在第二十四個特定實施例中，如第十四、第十五或第

二十一個特定實施例中所述之本發明連結物以下述表示：

N 與 C 之間之雙線 $\equiv$ 表示雙鍵；

Y 為 -H；

W 為 C=O；

R₁、R₂、R₁'、R₂'、R₄ 及 R₄' 為 -H；

R₃ 或 R₃' 中一者視情況為連接基團且另一者為 -H；

R₆ 為 -OMe；

Z 及 Z' 為 -CH₂；

X' 為 -H；

Y' 為 -H；且

A 及 A' 為 -O-。

在某些實施例中，所述任一實施例(諸如第十四至第二十四個特定實施例)之連結物可包含 1-10 種細胞毒性化合物、2-9 種細胞毒性化合物、3-8 種細胞毒性化合物、4-7 種細胞毒性化合物或 5-6 種細胞毒性化合物，每一細胞毒性化合物包含將細胞毒性化合物連接至 CBA 之連接基團，且連結物上之每一細胞毒性化合物相同。

在任一連結物實施例(諸如第十四至第二十四個特定實施例)中，細胞結合劑可結合於選自以下各物之靶細胞：腫瘤細胞、感染病毒之細胞、感染微生物之細胞、感染寄生蟲之細胞、自體免疫細胞、活化細胞、骨髓細胞、活化 T 細胞、B 細胞或黑素細胞；表現 CD4、CD6、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD38、CD40、

CD44、CD56、EpCAM、CanAg、CALLA 或 Her-2 抗原；Her-3 抗原之細胞；或表現胰島素生長因子受體、表皮生長因子受體及葉酸受體之細胞。

在任一連結物實施例(諸如第十四至第二十四個特定實施例)中，細胞結合劑可為特異性結合於該靶細胞之抗體、單鏈抗體、抗體片段；特異性結合於靶細胞之單株抗體、單鏈單株抗體或單株抗體片段；特異性結合於該靶細胞之嵌合抗體、嵌合抗體片段；特異性結合於該靶細胞之結構域抗體、結構域抗體片段；淋巴因子；激素；維生素；生長因子；集落刺激因子；或營養運輸分子。

抗體可為表面重塑抗體、表面重塑單鏈抗體或表面重塑抗體片段。

抗體可為單株抗體、單鏈單株抗體或其單株抗體片段。

抗體可為人化抗體、人化單鏈抗體或人化抗體片段。

本發明進一步提供醫藥組合物，其包含本文所述任一連結物及醫藥學上可接受之載劑。

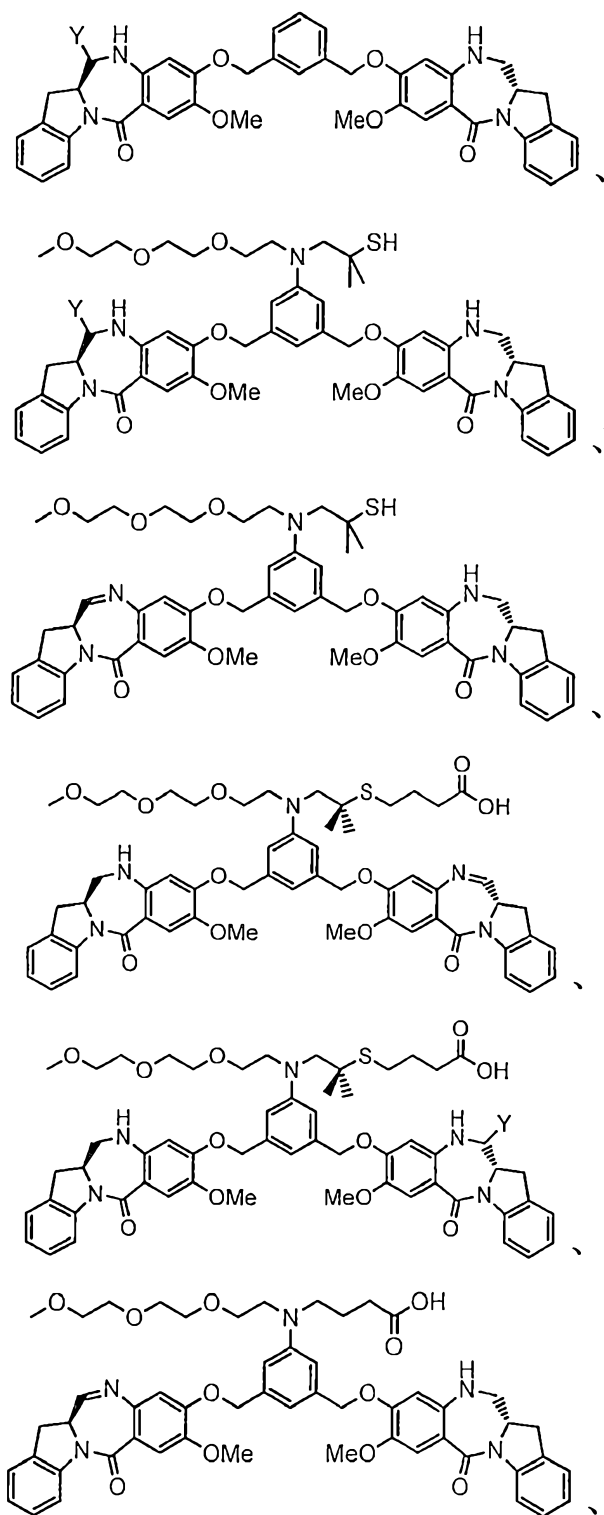
本發明進一步提供藥物-連接基化合物，其包含共價連接至雙官能連接基之任一主題化合物。

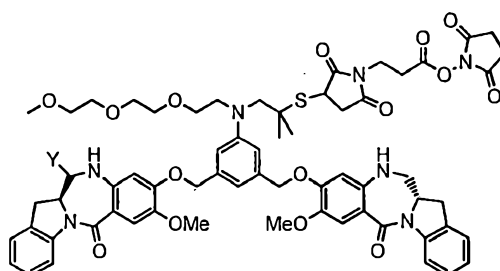
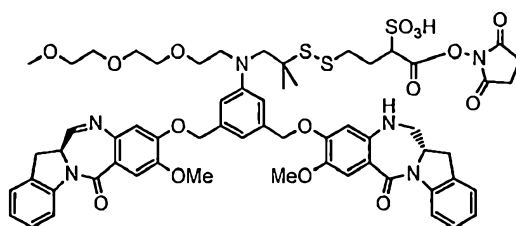
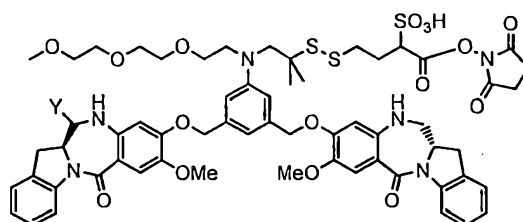
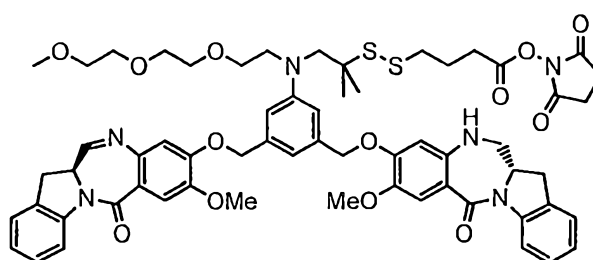
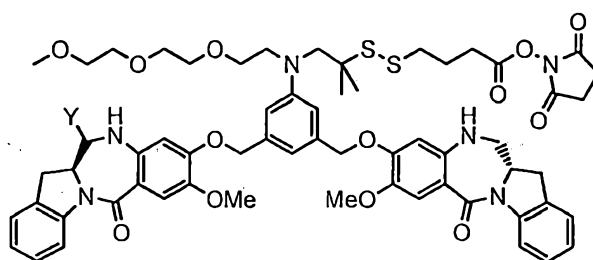
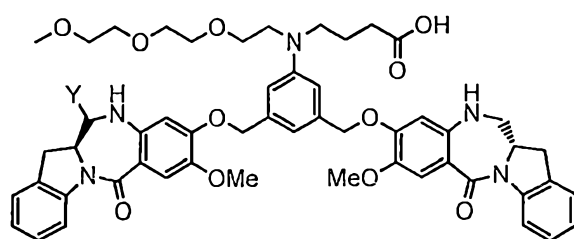
本發明亦提供一種連結物，其包含連接至細胞結合劑之任一主題化合物或主題藥物-連接基化合物。

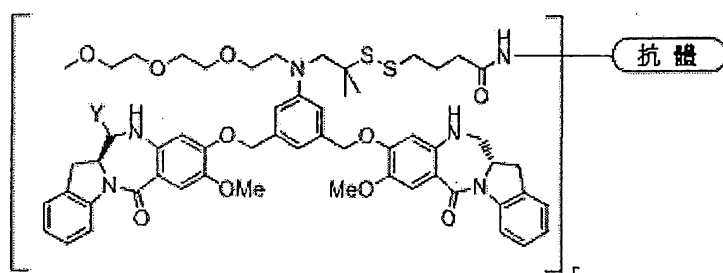
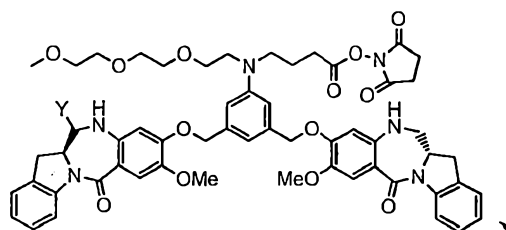
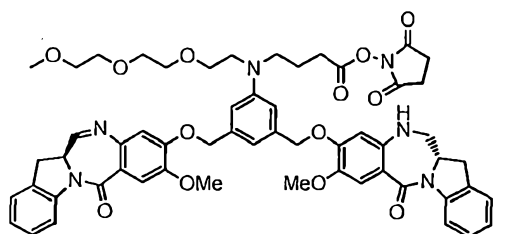
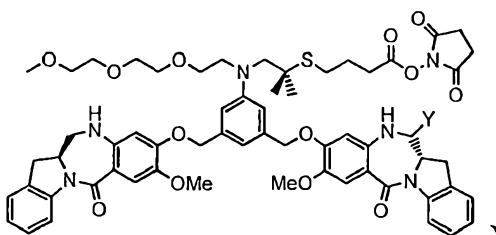
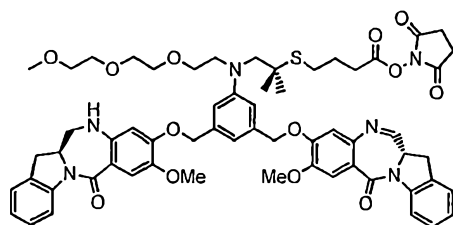
本發明進一步提供在哺乳動物中抑制異常細胞生長或治療增生性病徵、自體免疫病徵、破壞性骨病徵、感染性疾病、病毒疾病、纖維化疾病、神經退化性病徵、胰腺炎或腎病之方法，其包括對該哺乳動物投予治療有效

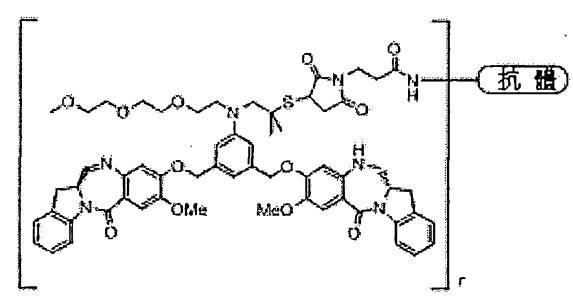
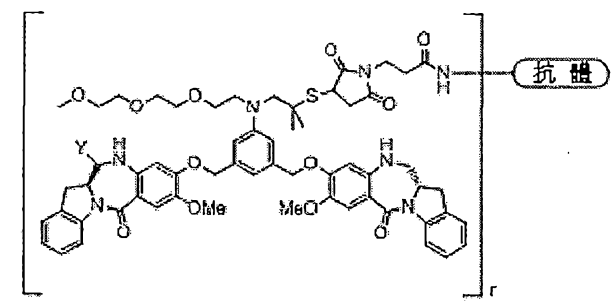
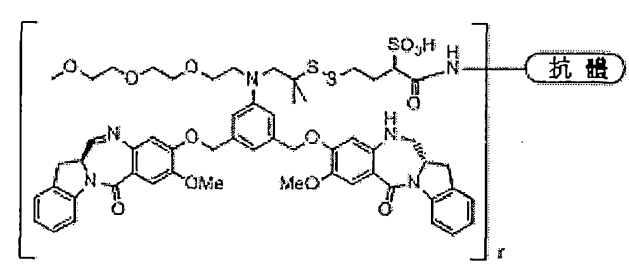
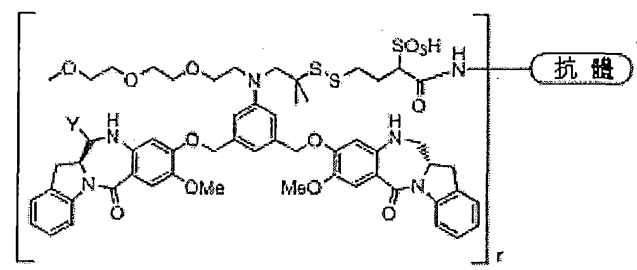
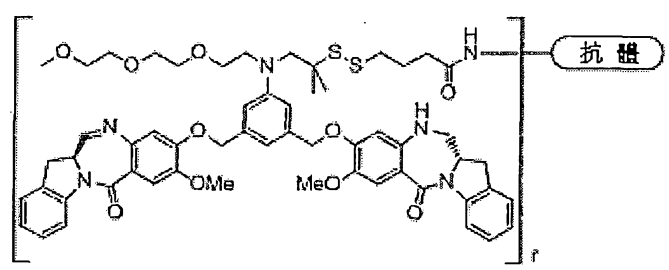
量之本發明之任一化合物(具有或不具有連接基)或連結物及視情況使用之第二化療劑。

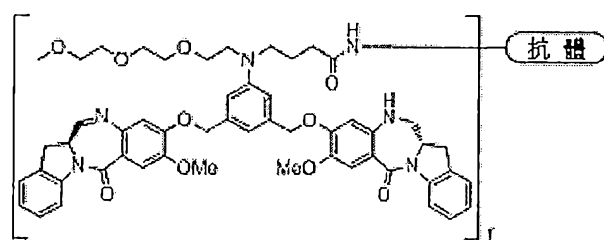
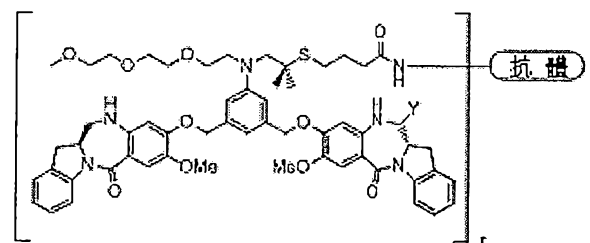
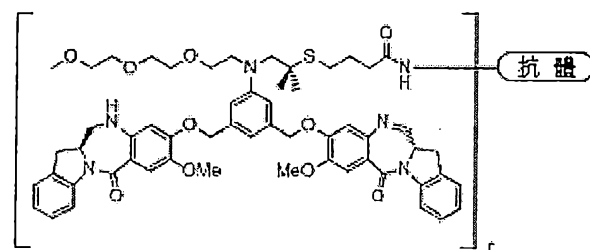
在某些實施例中，化合物或連結物為：



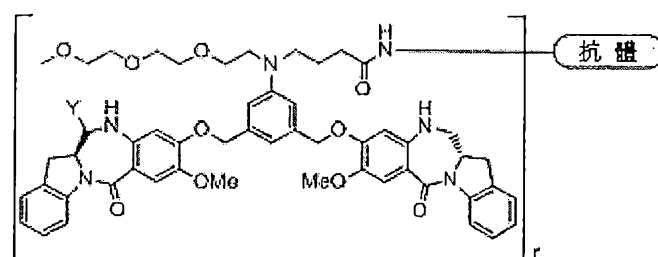








或



其中 r 為 1 至 10 之整數， Y 為 $-H$ 或 $-SO_3M$ (例如 Y 為 $-SO_3M$) 且 M 為 $-H$ 或醫藥學上可接受之陽離子。

在某些實施例中，第二化療劑係依序或連貫投予該哺乳動物。

在某些實施例中，該方法用於治療選自癌症、類風濕性關節炎、多發性硬化、移植物抗宿主疾病 (GVHD)、移植物排斥、狼瘡、肌炎、感染及免疫缺陷之病況。

在某些實施例中，該方法或連結物用於治療癌症。

在某些實施例中，癌症選自乳癌、結腸癌、腦癌、前列腺癌、腎癌、胰腺癌、卵巢癌、頭頸癌、黑素瘤、結直腸癌、胃癌、鱗狀細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、睪丸癌、套細胞癌、膠質母細胞瘤、神經母細胞瘤、淋巴器官癌症，及血液系統惡性疾病，包括白血病(急性淋巴細胞白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴細胞白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、急性單核細胞白血病(AMOL)、毛細胞白血病(HCL)、T細胞幼淋巴細胞白血病(T-PLL)、大顆粒淋巴細胞白血病、成人T細胞白血病)、淋巴瘤(小淋巴細胞淋巴瘤(SLL)、霍奇金氏淋巴瘤(結節硬化型、混合細胞型、富含淋巴細胞型、淋巴細胞耗盡型或未耗盡型、及結節性淋巴細胞為主型霍奇金氏淋巴瘤)、非霍奇金氏淋巴瘤(所有亞型)、慢性淋巴細胞白血病/小淋巴細胞淋巴瘤、B細胞幼淋巴細胞白血病、淋巴漿細胞淋巴瘤(諸如瓦氏巨球蛋白血症)、脾邊緣區淋巴瘤、漿細胞贅瘤(漿細胞骨髓瘤、漿細胞瘤、單株免疫球蛋白沈積病、重鏈疾病)、結外邊緣區B細胞淋巴瘤(MALT淋巴瘤)、結內邊緣區B細胞淋巴瘤(NMZL)、濾泡淋巴瘤、套細胞淋巴瘤、彌漫大B細胞淋巴瘤、縱隔(胸腺)大B細胞淋巴瘤、血管內大B細胞淋巴瘤、原發性滲出性淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤/白血病、T細胞幼淋巴細胞白血病、T細胞大顆粒淋巴細胞白血病、侵襲性NK細胞白血病、成人T細胞白血病/淋巴瘤、結外NK/T細胞淋巴瘤(鼻型)、腸病型T細胞淋巴瘤、肝脾T細胞淋

巴瘤、母細胞性 NK 細胞淋巴瘤、蕁樣真菌病/塞紮裡氏症候群、原發性皮膚 CD30 陽性 T 細胞淋巴增生性病、原發性皮膚型間變性大細胞淋巴瘤、淋巴瘤樣丘疹病、血管免疫母細胞性 T 細胞淋巴瘤、周圍 T 細胞淋巴瘤(非特指型)、間變性大細胞淋巴瘤)、多發性骨髓瘤(漿細胞骨髓瘤或卡勒氏病)。

細胞結合劑-藥物連結物之製備

為了將本發明之細胞毒性化合物或其衍生物連接至細胞結合劑，細胞毒性化合物可包含鏈接至反應性基團之連接部分。在一個實施例中，雙官能交聯試劑可先與細胞毒性化合物反應以提供帶有鏈接至一個反應性基團之連接部分之化合物(即藥物-連接基化合物)，其隨後可與細胞結合劑反應。或者，雙官能交聯試劑之一端可先與細胞結合劑反應以提供帶有鏈接至一個反應性基團之連接部分之細胞結合劑，其隨後可與細胞毒性化合物反應。連接部分可含有允許細胞毒性部分在特定部位釋放之化學鍵。適合之化學鍵為此項技術中熟知的且包括二硫鍵、硫醚鍵、酸不穩定鍵、光不穩定鍵、肽酶不穩定鍵及酯酶不穩定鍵(參看例如美國專利 5,208,020；5,475,092；6,441,163；6,716,821；6,913,748；7,276,497；7,276,499；7,368,565；7,388,026 及 7,414,073)。較佳為二硫鍵、硫醚鍵及肽酶不穩定鍵。可用於本發明中之其他連接基包括不可裂解之連接基，諸如美國公開案第 2005/0169933 號中詳細描述者；或帶電連接基或親水性

連接基，且描述於 US 2009/0274713、US 2010/01293140 及 WO 2009/134976 中，各案以引用之方式清楚地併入本文中，各案以引用之方式清楚地併入本文中。

式 (I)-(IV)、(IA)-(IVA) 及 (IB)-(IVB) 之化合物可經由 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_1' 、 R_2' 、 R_3' 、 R_4' 、 L' 、 L'' 、 L''' 或 X (存在時) 連接。其中，較佳之可連接基團為 R_2' 、 R_3' 、 R_4' 、 L' 、 L'' 、 L''' ，且最佳之可連接基團為 R_2' 、 R_3' 及 L' 。用於式 (I)-(IV)、(IA)-(IVA) 及 (IB)-(IVB) 之化合物之連接基團之實例如上文所述。

在一個實施例中，抗體於水性緩衝劑中之溶液可與莫耳過量之抗體修飾劑，諸如 *N*-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯 (SPDP) 或與 *N*-琥珀醯亞胺基-4-(2-吡啶基二硫基)丁酸酯 (SPDB) 一起培育，以引入二硫吡啶基。經修飾抗體隨後與含硫醇細胞毒性化合物 (諸如化合物 2a) 反應，以產生二硫化物連接之抗體-吡啶并苯并二氮嘧二聚體連結物。細胞結合劑-藥物連結物隨後可使用此項技術中已知之任何純化方法 (諸如美國專利第 7,811,572 號及美國公開案第 2006/0182750 號中所述者，兩項專利皆以引用之方式併入本文中) 純化。舉例而言，細胞結合劑-藥物連結物可使用切向流過濾法、吸附層析法、吸附過濾法、選擇性沈澱法、非吸附過濾法或其組合來純化。較佳使用切向流過濾法 (TFF，亦稱為橫流過濾法、超濾法及滲濾法) 及 / 或吸附層析樹脂來純化該等連結物。

或者，抗體可與莫耳過量之抗體修飾劑，諸如 2-亞胺

基硫雜環戊烷、L-高半胱氨酸硫內酯(或衍生物)或 N-琥珀醯亞胺基-S-乙醯基硫代乙酸酯(SATA)一起培育，以引入硫氫基。經修飾抗體隨後與適宜之含二硫化物細胞毒性劑反應，以產生二硫化物連接之抗體-細胞毒性劑連結物。抗體-細胞毒性劑連結物隨後可藉由上述方法純化。細胞結合亦可經過工程改造以引入硫醇部分，諸如美國專利第 7,772,485 號及第 7,855,275 號中揭示之半胱氨酸工程改造之抗體。

在另一實施例中，抗體於水性緩衝劑中之溶液可與莫耳過量之抗體修飾劑，諸如 N-琥珀醯亞胺基-4-(N-馬來醯亞胺基甲基)-環己烷-1-甲酸酯一起培育以引入馬來醯亞胺基，或與 N-琥珀醯亞胺基-4-(碘代乙醯基)-胺基苯甲酸酯(SIAB)一起培育以引入碘代乙醯基。經修飾抗體隨後與含硫醇細胞毒性劑反應以產生硫醚連接之抗體-細胞毒性劑連結物。抗體-細胞毒性劑連結物隨後可藉由上述方法純化。

每一抗體分子結合之細胞毒性劑分子的數量可以分光光度法藉由量測在 280 nm 及 330 nm 下吸光度之比率來確定。可藉由本文所述之方法連接平均 1-10 種細胞毒性化合物/抗體分子。每一抗體分子連接之細胞毒性化合物的較佳平均數量為 2-5，且最佳為 2.5-4.0。

含有以 N-羥基琥珀醯亞胺基(NHS)酯封端之連接基之細胞毒性劑，諸如化合物 **1g** 及 **10**，可與抗體反應以產生直接醯胺連接之連結物，諸如 huMy9-6-SPDB-**1f** 或

huMy9-6-BMPS-1f。抗體-細胞毒性劑連結物隨後可藉由凝膠過濾法，藉由上述任何方法純化。

用於製備本發明之細胞結合劑-藥物連結物之代表性方法顯示於第 22 及 23 圖中。本發明之細胞毒性二聚體化合物可經由一步式或兩步式連結方法與細胞結合劑連結。在第 22a 及 22b 圖中描述了代表性實例，其中具有諸如 N-羥基琥珀醯亞胺酯之連接基之二聚體化合物直接與細胞結合劑(諸如抗體)反應，產生所需連結物。在第 22c 圖中，可連接的二聚體 1g 先用硫酸氫鈉處理，以提供經修飾二聚體化合物 26，隨後添加抗體以形成本發明之連結物 huMy9-6-SBDP-1f。

兩步式連結方法之代表性實例描述於第 23 圖中，其中抗體先用雙官能交聯劑修飾，產生具有所需數量適於與具有遊離硫醇部分之二聚體化合物反應之連接基的抗體。在此實例中，抗體 huMy9-6 先用 SPDB 修飾，得到具有含二硫吡啶基部分之連接基的抗體。經修飾抗體隨後暴露於遊離硫醇，諸如 2a，產生所需連結物 huMy9-6-SPDB-2a。

用於合成本發明之藥物-連接基化合物及連結物之方法亦描述於 2011 年 2 月 15 日申請之美國臨時專利申請案第 61/443,092 號及要求其申請日期之權益且在本申請案同一天申請之標題為「METHODS OF PREPARATION OF CONJUGATES」的美國實用新型申請案中，該等申請案之完整內容，包括所有圖式、結構式、合成流程、說明書

及申請專利範圍，均以引用之方式併入本文中。

本發明代表性化合物及連結物之結構顯示於表 1-8 中。該等化合物及連結物可根據本文所述方法製備。

表 1. 本發明代表性化合物之結構。

注解： $n = 1$ 或 3; $m = 3$ 或 4 $W = OH, OMe, ONHS, NHNH_2, H, Me, Ph, 肽$ $X = CH_2, O, S, NH$ 或 NMe $Y = CH_2$ 或不存在 $Z'' = H, Me, SMe, S(CH_2)_3C(O)NHS$ 或 $CH_2C(O)NHS$ 或 $BMPS$ 或 $SMCC$ 或 SPy	

或 SPy-NO₂

表 2.本發明代表性化合物之結構(續).

注解:
n = 1、2 或 3
m = 3 或 4
W = OH、OMe、ONHS、NHNH₂、H、Me、Ph、肽
X = CH₂、O、S、NH、NMe
Y = 不存在或 CH₂
Z = CH 或 N
Z'' = H、Me、SMe、S(CH₂)₃C(O)NHS 或 CH₂C(O)NHS 或 BMPS 或 SMCC 或 SPy 或 SPy-NO₂

表 3.本發明代表性化合物之結構(續).

注解：
 $n = 1, 2$ 或 3
 $m = 3$ 或 4
 $W = OH, OMe, ONHS, NHNH_2, H, Me, Ph, 肽$
 $X = CH_2, O, S, NH, NMe$
 $Z = CH$ 或 N
 $Z'' = H, Me, SMe, S(CH_2)_3C(O)NHS$ 或 $CH_2C(O)NHS$ 或 $BMPS$ 或 $SMCC$ 或 SPy 或 $SPy-NO_2$

表 4. 本發明代表性化合物之結構(續).

注解:

$n = 1、2$ 或 3

$m = 3$ 或 4

$W = OH、OMe、ONHS、NHNH_2、H、Me、Ph、肽$

$X = CH_2、O、S、NH、NMe$

$Z = CH$ 或 N

$Z'' = H、Me、SMe、S(CH_2)_3C(O)NHS$ 或 $CH_2C(O)NHS$ 或 $BMPS$ 或 $SMCC$ 或 SPy 或 $SPy-NO_2$

表 5. 本發明代表性化合物之結構.

[illegible]

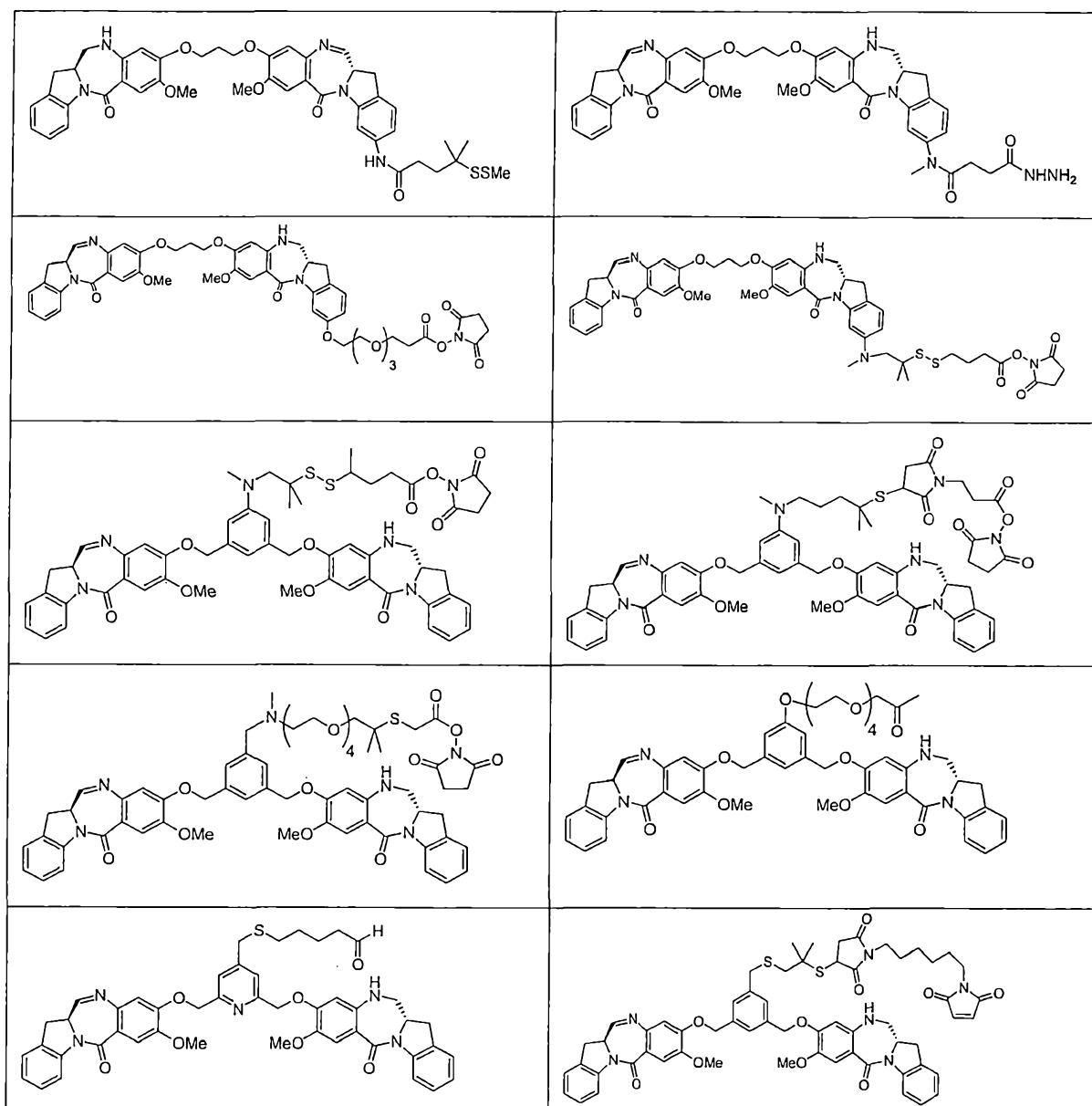
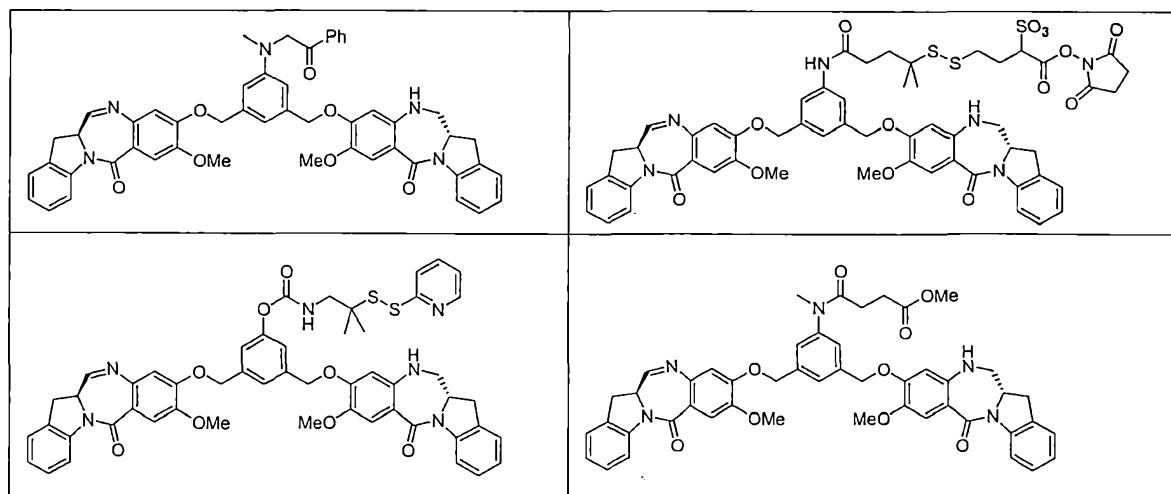


表 6.本發明代表性化合物之結構(續).



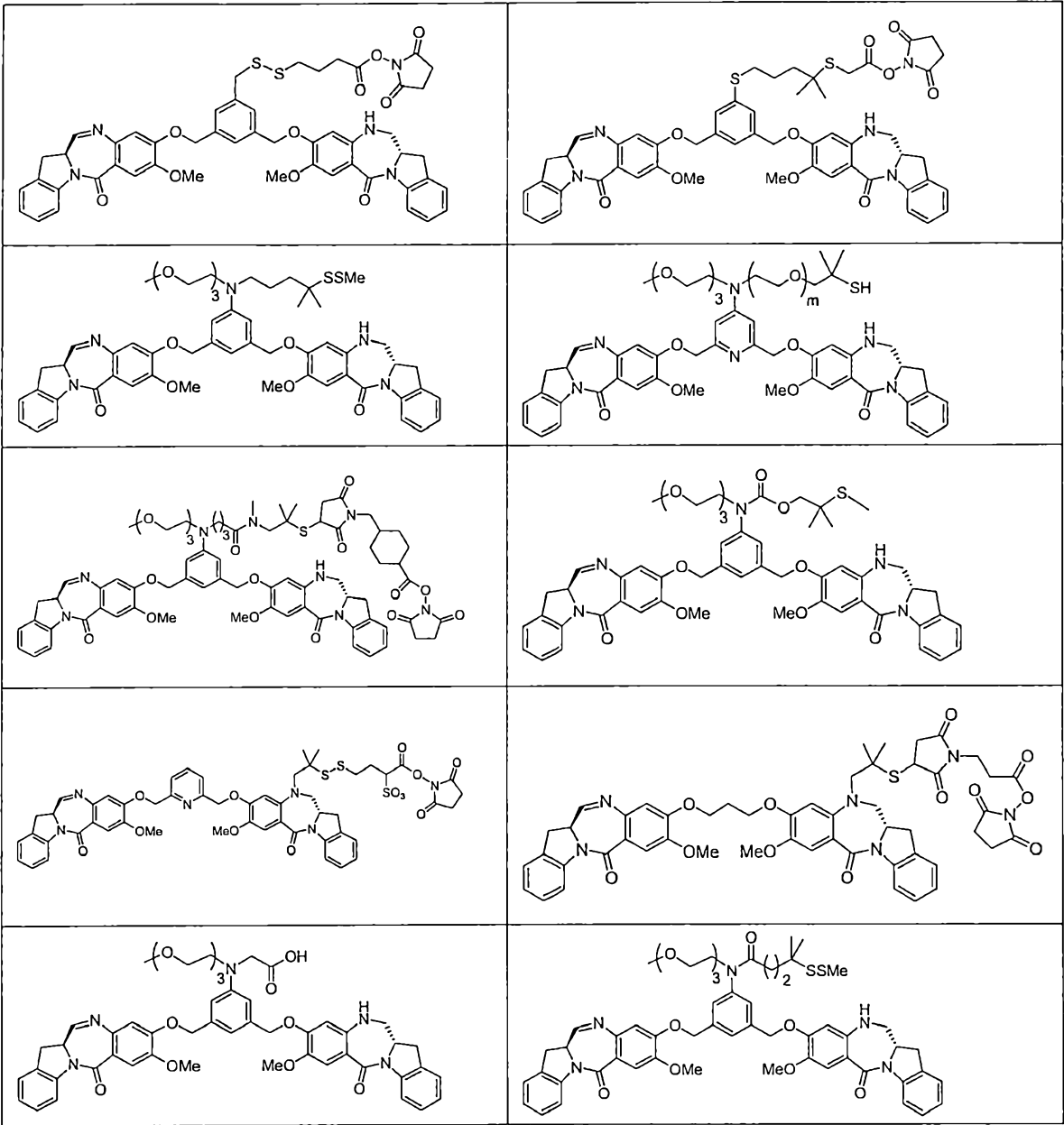


表 7.本發明代表性化合物之結構(續).

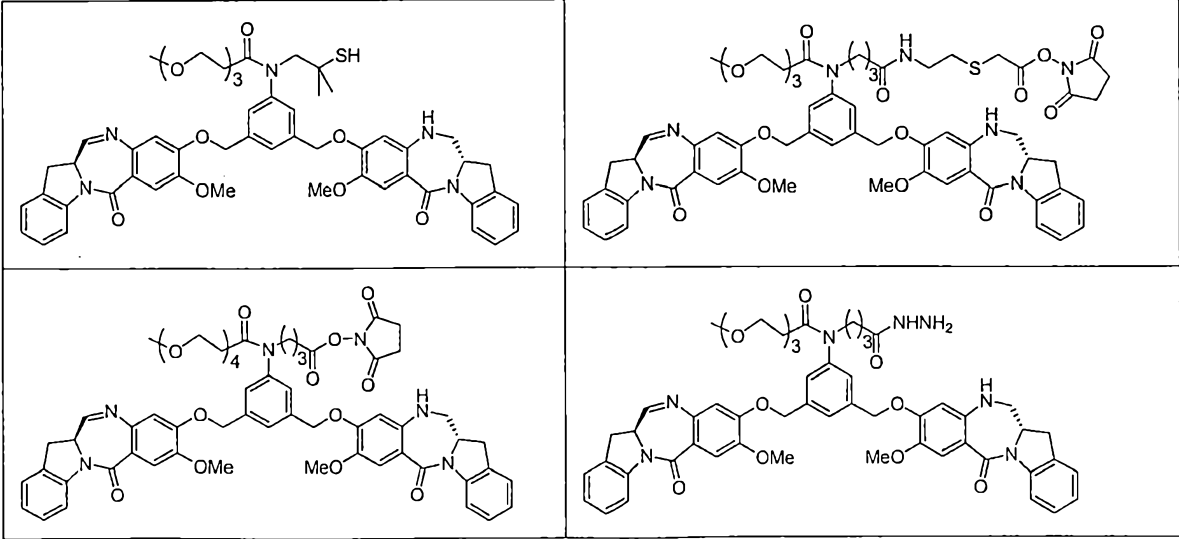
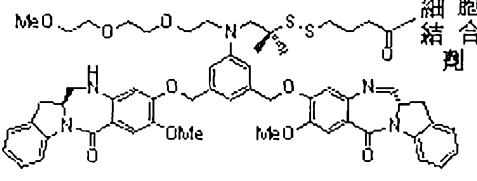
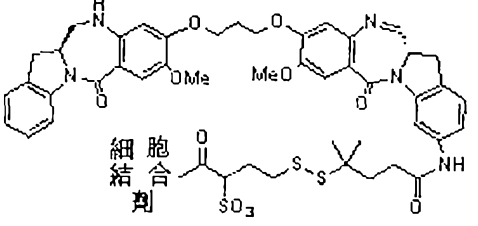
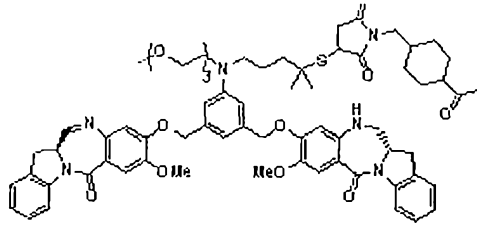
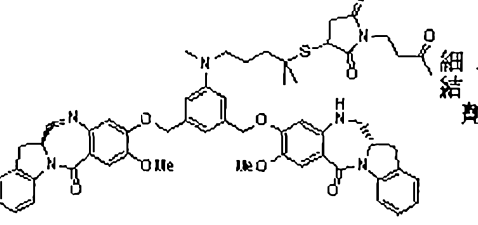
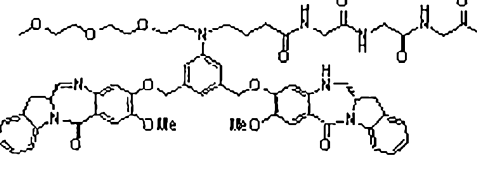
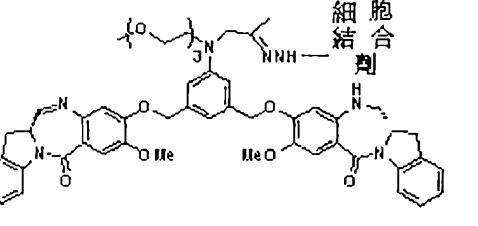
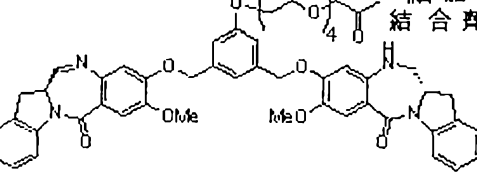
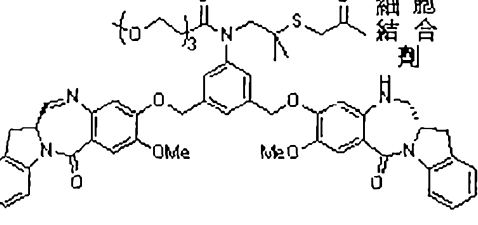
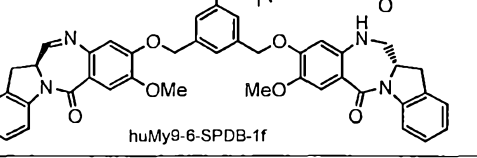
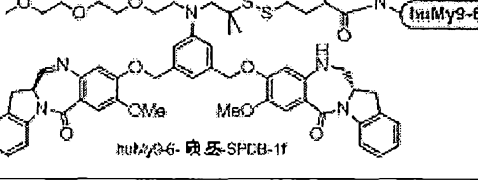
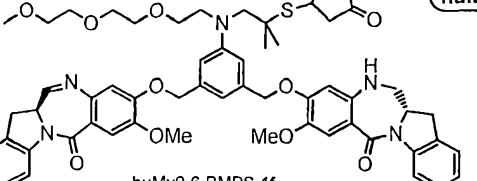


表 8. 本發明代表性化合物之結構.

化合物及連結物之活體外細胞毒性

可在活體外評價本發明之細胞毒性化合物及細胞結合劑-藥物連結物抑制各種癌細胞增殖之能力。舉例而言，

可使用諸如人類結腸癌細胞株 COLO 205、橫紋肌肉瘤細胞株 RH-30 及多發性骨髓瘤細胞株 MOLP-8 之細胞株來評估該等化合物及連結物之細胞毒性。可將待評價之細胞暴露於化合物或連結物 1 至 5 天，且在直接分析法中藉由已知方法量測存活細胞分率。隨後可由該等分析法之結果計算 IC_{50} 值。或者或另外，可使用活體外細胞株敏感性篩選法，諸如美國國立癌症協會 (U.S. National Cancer Institute) (參看 Voskoglou-Nomikos 等人，2003, *Clinical Cancer Res.* 9: 42227-4239，以引用之方式併入本文中) 中所述者，作為一種確定可能對用本發明化合物或連結物之治療敏感之癌症類型的指南。

本發明之抗體-細胞毒性劑連結物之活體外效力及靶標特異性的實例顯示於第 25-26 圖中。所有該等連結物對抗原陽性癌細胞具有極高細胞毒性且 IC_{50} 在低皮莫耳濃度範圍內。抗原陰性細胞株暴露於相同連結物時仍保持活力。吲哚啉并苯并二氮呋二聚體用未連結之抗體 huMy9-6 (抗 CD33 抗體) 阻斷時顯示之靶標特異性效力為低於 160 倍有效，且用未連結之抗體 FOLR1 (抗葉酸受體抗體) 阻斷時顯示出低於 40 倍效力。舉例而言，huMy9-6-SPDB-1f 連結物殺死抗原陽性 HL60/QC 細胞且 IC_{50} 值為 10.5 pM，而添加過量未連結之 huMy9-6 抗體降低此細胞毒性作用 ($IC_{50} = 1.69$ nM)，展現出抗原特異性 (第 25A 圖)。此外，huMy9-6-SPDB-1f 連結物亦對 HL60/ATCC 細胞株 (IC_{50} 值為 21 pM) 及 NB-4 細胞株 (IC_{50}

值為 190 pM)高度有效(第 25B 及 25C 圖)。

類似地，huFOLR1-SPDB-1f 連結物對抗原陽性 KB 細胞高度有效，且 IC_{50} 值為 55 pM(第 26 圖)。添加過量未連結之 huFOLR1 抗體降低此細胞毒性作用 >40 倍，展現出抗原特異性。

連結對抗體結合之影響係藉由將未連結之 huMy9-6 抗體與 huMy9-6-SPDB-1f 連結物對 HL60/QC 細胞株之結合相比較來量測(第 27 圖)。FACS 分析披露，該連結物之結合能力相對於裸抗體沒有變化，表明結合不會因細胞毒性劑連結至抗體而削弱。

在一個實例中，量測細胞結合劑/細胞毒性劑連結物之活體內功效。用 huMy9-6-SPDB-1f 連結物處理帶有人類 HL60/QC 腫瘤之裸小鼠，且在多個劑量下觀察到顯著腫瘤消退，而未經處理小鼠之腫瘤快速生長(第 28 圖)。在低至 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之劑量下觀察到活性，而該劑量為最大耐受劑量之至少 1/35。

亞胺飽和對耐受性之影響顯示於表 9 中。以多種劑量測試二亞胺 huFOLR1-藥物 1，發現所有劑量均具有高毒性，僅在以 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 測試之最低劑量組中留有存活者。相比之下，發現部分還原之單亞胺 huFOLR1-藥物 2 及 huFOLR1-SPDB-IGN(huFOLR1-SPDB-1f)連結物具有顯著改進之耐受性，其中 huFOLR1-SPDB-IGN(huFOLR1-SPDB-1f)連結物在 560 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之最高測試劑量下顯示 100%動物存活率。

組合物及使用方法

本發明包括一種組合物(例如醫藥組合物),其包含本文所述之新穎苯并二氮呋化合物(例如吲哚啉并苯并二氮呋或噁唑啉并苯并二氮呋)、其衍生物或其連結物(及/或其溶劑化物、水合物及/或鹽)及載劑(醫藥學上可接受之載劑)。本發明亦包括一種組合物(例如醫藥組合物),其包含本文所述之新穎苯并二氮呋化合物、其衍生物或其連結物(及/或其溶劑化物、水合物及/或鹽)及載劑(醫藥學上可接受之載劑),進一步包含第二治療劑。本發明組合物可用於在哺乳動物(例如人類)中抑制異常細胞生長或治療增生性病徵。本發明組合物亦可用於治療哺乳動物(例如人類)之抑鬱、焦慮、壓力、恐懼、恐慌、心境惡劣、精神障礙、疼痛及發炎性疾病。

本發明包括一種在哺乳動物(例如人類)中抑制異常細胞生長或治療增生性病徵之方法,其包括對該哺乳動物投予治療有效量之單獨或與第二治療劑組合之本文所述新穎苯并二氮呋化合物(例如吲哚啉并苯并二氮呋或噁唑啉并苯并二氮呋)、其衍生物或其連結物(及/或其溶劑化物及鹽)或其組合物。

本發明亦提供治療方法,其包括對有需要之受試者投予有效量之上述任一連結物。

類似地,本發明提供一種用於誘導所選細胞群之細胞死亡的方法,其包括使靶細胞或含靶細胞之組織與有效量細胞毒性劑接觸,該細胞毒性劑包含任一本發明細胞

· · 毒性化合物-細胞結合劑(例如連接至細胞結合劑之吡啶
· · 啉并苯并二氮呋或噁唑啉并苯并二氮呋二聚體)、其鹽或
溶劑化物。靶細胞為細胞結合劑可結合之細胞。

必要時，其他活性劑，諸如其他抗腫瘤劑，可與該連結物一起投予。

適合之醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑及賦形劑為熟知的且可由熟諳本技術者依據臨床狀況許可確定。

適合的載劑、稀釋劑及/或賦形劑之實例包括：(1)杜貝卡氏磷酸鹽緩衝生理食鹽水(Dulbecco's phosphate buffered saline)，pH 為約 7.4，含有或不含約 1 mg/mL 至 25 mg/mL 人類血清白蛋白；(2) 0.9%生理食鹽水(0.9% w/v NaCl)；及(3) 5%(w/v)右旋糖；且亦可含有抗氧化劑，諸如色胺；及穩定劑，諸如 Tween 20。

用於誘導所選細胞群中細胞死亡之方法可在活體外、活體內或離體實行。

活體外應用之實例包括在自體骨髓移植入同一患者前進行處理以殺死患病或惡性細胞；骨髓在移植之前進行處理以便殺死勝任 T 細胞(competent T cells)且預防移植物抗宿主疾病(GVHD)；處理細胞培養物以便殺死除不表現靶抗原之所需變體外之所有細胞；或殺死表現非所需抗原之變體。

非臨床活體外應用之條件易於由熟諳本技術者確定。

臨床離體應用之實例為在自體移植以治療癌症或治療自體免疫疾病之前自骨髓移除腫瘤細胞或淋巴細胞，或

在移植前從自體或異體骨髓或組織移除 T 細胞及其他淋巴細胞以預防 GVHD。治療可如下進行。自患者或其他個體採集骨髓，隨後在約 37°C 下，在加有濃度在約 10 μ M 至 1 pM 範圍內之本發明細胞毒性劑之含血清培養基中培育約 30 分鐘至約 48 小時。有關培育濃度及時間(即劑量)之確切條件易於由熟諳本技術者確定。在培育後，用含血清培養基洗滌骨髓細胞，並根據已知方法經靜脈內回輸給患者。在骨髓採集與經處理細胞回輸時間之間患者接受其他治療(諸如根治性化療或全身照射療程)的情況下，將經處理骨髓細胞使用標準醫療設備冷凍儲存於液氮中。

對於臨床活體內應用，本發明之細胞毒性劑將以經測試無菌性及內毒素含量之溶液或凍乾粉形式提供。適合的連結物投予方案之實例如下。每週以靜脈內推注方式給與連結物，持續 4 週。所給推注劑量為 50 至 1000 mL 生理食鹽水，其中可加有 5 至 10 mL 人類血清白蛋白。劑量將為每次靜脈內投予 10 μ g 至 2000 mg(範圍為每天 100 ng 至 20 mg/kg)。治療 4 週後，患者可繼續每週接受治療。有關投藥途徑、賦形劑、稀釋劑、劑量、時間等具體臨床方案可由熟諳本技術者根據臨床狀況許可確定。

可根據誘導所選細胞群中細胞死亡之活體內或離體方法治療之醫學病況的實例包括任一類型之惡性疾病，包括例如肺癌(小細胞及非小細胞)、乳癌、結腸癌、腦癌、

.. 前列腺癌、腎癌、胰腺癌、卵巢癌、頭頸癌、皮膚癌(黑
.. 素瘤)、套細胞癌、膠質母細胞瘤、神經母細胞瘤及淋巴
器官癌症；自體免疫疾病，諸如系統性狼瘡、類風濕性
關節炎及多發性硬化；移植物排斥，諸如腎移植物排斥、
肝移植物排斥、肺移植物排斥、心臟移植物排斥及骨髓
移植物排斥；移植物抗宿主疾病；病毒感染，諸如 CMV
感染、HIV 感染、AIDS 等；及寄生蟲感染，諸如賈第蟲
病 (giardiasis)、阿米巴病 (amoebiasis)、血吸蟲病
(schistosomiasis)，及如熟諳本技術者確定之其他疾病。

癌症療法及其劑量、投藥途徑及推薦用法為此項技術
中已知的，且已描述於諸如 Physician's Desk
Reference(PDR)之文獻中。PDR 揭示了已用於治療各種癌
症之試劑的劑量。治療有效之上述該等化療藥物的給藥
方案及劑量將取決於所治療之特定癌症、疾病程度及熟
諳本技術之醫師熟悉之其他因素，且可由醫師確定。PDF
之內容以全文引用之方式清楚地併入本文中。熟諳本技
術者可使用以下一或多個參數評述 PDR，以確定可根據
本發明教導使用之化療劑及連結物之給藥方案及劑量。
該等參數包括：

綜合指標

製造商提供

產品(公司或商標藥物名稱)

類目索引

通用/化學指數(非商標常用藥物名稱)

藥物之彩色圖像

產品信息，符合 FDA 標記

化學信息

功能/作用

適應症及禁忌症

試驗研究、副作用、警告

類似物及衍生物

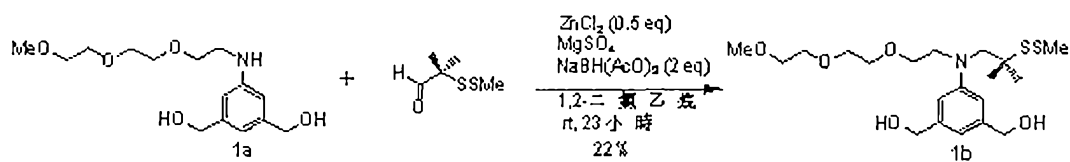
熟諳細胞毒性劑技術者將易於瞭解，本文所述每一細胞毒性劑可以一定方式修飾以使所得化合物仍保持初始化合物之特異性及/或活性。熟諳本技術者亦將瞭解，該等化合物中有許多可用來代替本文所述細胞毒性劑。因此，本發明之細胞毒性劑包括本文所述化合物之類似物及衍生物。

本文及以下實例中引用之所有參考文獻均以全文引用之方式清楚地併入本文中。

實例

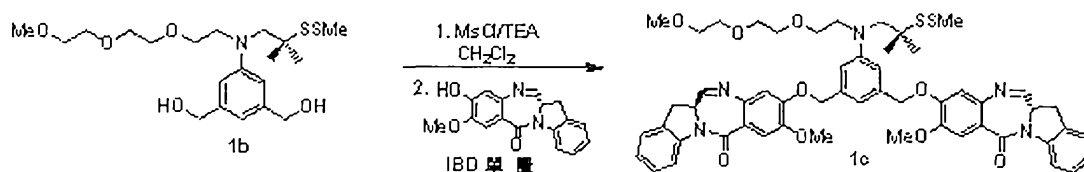
現將參照非限制性實例說明本發明。除非另作規定，否則所有百分比、比率、份數等均以重量計。所有試劑均購自 Aldrich Chemical Co.(New Jersey)或其他商業來源。核磁共振 (^1H NMR) 光譜係在 Bruker 400 MHz 儀器上獲得且質譜係在 Bruker Daltonics Esquire 3000 儀器上使用電噴霧電離法獲得。

實例 1



化合物 **1b**：

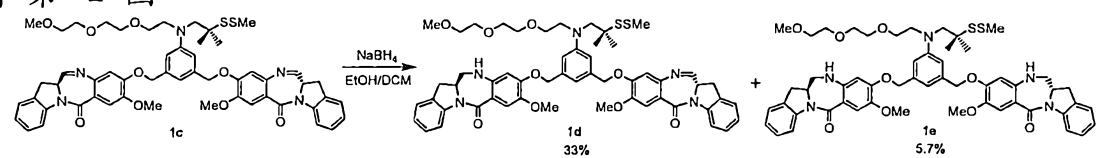
向經攪拌之苯胺 **1a** (1.55 g, 5.18 mmol) 及 2-(甲基二硫基)-異丁醛 (0.7 mL, 5.18 mmol) 於無水 1,2-二氯甲烷 (20 mL) 中之溶液中添加三乙醯氧基硼氫化鈉 (1.1 g, 5.18 mmol) 及氯化鋅粉末 (353 mg, 2.59 mmol)，隨後添加無水硫酸鎂 (800 mg)。混合物在室溫 (rt) 下攪拌 6 小時，接著再添加一份 2-(甲基二硫基)-異丁醛 (0.7 mL, 5.18 mmol) 及三乙醯氧基硼氫化鈉 (1.1 g, 5.18 mmol)。繼續在室溫下攪拌隔夜。反應混合物濾過矽藻土並用二氯甲烷洗滌。濃縮濾液並藉由矽膠層析法 (Combiflash, 40 g 管柱，二氯甲烷/MeOH) 純化殘餘物，得到無色油狀之化合物 **1b** (487 mg, yield = 22%)。亦回收未反應之起始物質苯胺 **1a** (1.02 g)，產率 65%。¹H NMR (400 Hz, CDCl₃): δ 6.76 (s, 2H), 6.63 (s, 1H), 4.55 (s, 4H), 3.65-3.51 (m, 14H), 3.35 (s, 3H), 2.44 (s, 3H), 1.33 (s, 6H); ¹³C NMR (400 Hz, CDCl₃): δ 149.0, 142.35, 114.0, 111.1, 71.98, 70.7, 70.6, 70.5, 67.6, 65.5, 59.75, 59.1, 53.9, 51.9, 26.6, 25.7, 20.75; MS (m/z): 實驗值 456.2 (M + Na)⁺。參看第 1 圖。



化合物 **1c**：

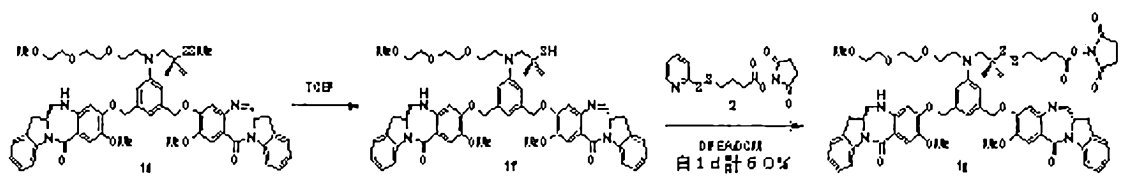
向經攪拌之 **1b** (243 mg, 0.56 mmol) 於無水二氯甲烷 (3.5 mL) 中之溶液中添加三乙胺 (234 μ l, 1.68 mmol)。混合物冷卻至 -10°C 且經由注射器經 15 分鐘緩慢添加甲烷磺醯氯 (113 μ l, 1.46 mmol)。溶液繼續在 -10 至 -7°C 下攪拌 60 分鐘且藉由添加冰/水淬滅反應。用乙酸乙酯稀釋並用冷水洗滌。有機層經無水硫酸鈉乾燥，過濾，濃縮並抽高真空，得到淺黃色油狀之甲磺酸酯 (340 mg)。將甲磺酸酯轉移至裝有乙酸乙酯/二氯甲烷之 10 mL 圓底燒瓶，濃縮並抽高真空。添加 IBD 單體 (412 mg, 1.4 mmol)，隨後添加無水二甲基甲醯胺 (3 mL) 及無水碳酸鉀 (232 mg, 1.68 mmol)。所得淺黃色混合物在室溫下攪拌隔夜。用二氯甲烷稀釋並用鹽水洗滌。有機層經無水硫酸鈉乾燥，過濾並濃縮。殘餘物溶解於二氯甲烷中並裝載至矽膠管柱上且用二氯甲烷/甲醇 (15:1 隨後 10:1) 溶離。合併含化合物 **1c** 之部分並濃縮，得到 705 mg 粗產物，藉由製備型逆相 HPLC (C18 管柱，用乙腈/水溶離) 進一步純化，得到淺黃色蓬鬆固體狀之化合物 **1c** (181 mg, $y = 33\%$)。 ^1H NMR (400 Hz, CDCl_3): δ 8.28 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.86 (d, $J = 3.6$ Hz, 2H), 7.59 (s, 2H), 7.31-7.26 (m, 4H), 7.12 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 6.87-6.80 (m, 5H), 5.18 (dd, $J_1 = 20.8$ Hz, $J_2 = 12.4$ Hz, 4H), 4.50-4.47 (m, 2H), 3.99 (s, 6H), 3.75-3.48 (m, 18H), 3.37 (s, 3H), 2.44 (s, 3H), 1.32 (s, 6H); MS (m/z): 實驗值 1025.9 ($\text{M} + \text{H}_2\text{O} + \text{Na}$) $^+$, 1043.9 ($\text{M} + 2\text{H}_2\text{O} + \text{Na}$) $^+$, 983.8 ($\text{M} - \text{H}$) $^-$, 1055.8 ($\text{M} + 4\text{H}_2\text{O} - \text{H}$) $^-$ 。參

看第 1 圖。



化合物 1d：

0℃ 下，向經攪拌之化合物 1c(112 mg, 0.114 mmol)於無水二氯甲烷(0.3 mL)及無水乙醇(0.6 mL)中之溶液中添加硼氫化鈉(0.9 mg, 0.023 mmol)。5 分鐘後移除冰浴且混合物在室溫下攪拌 3 小時，隨後冷卻至 0℃ 並用飽和氯化銨淬滅，用二氯甲烷稀釋，分離且有機層用鹽水洗滌，經無水 Na₂SO₄ 乾燥並濾過矽藻土且濃縮。殘餘物藉由逆相 HPLC(C18 管柱，乙腈/水)純化。相應部分用二氯甲烷萃取且濃縮，得到產物 1d、1e 及未反應之起始物質 1c。化合物 1d: 37.1 mg(y = 33%)，MS(m/z): 實驗值 1010.4 (M + Na)⁺, 1028.4 (M + H₂O + Na)⁺, 1040.3 (M + 3H₂O - H)⁻；化合物 1e: 6.4 mg (y = 5.7%)，MS (m/z): 實驗值 1012.4 (M + Na)⁺；化合物 1c: 44.1 mg(y = 39%)。參看第 1 圖。

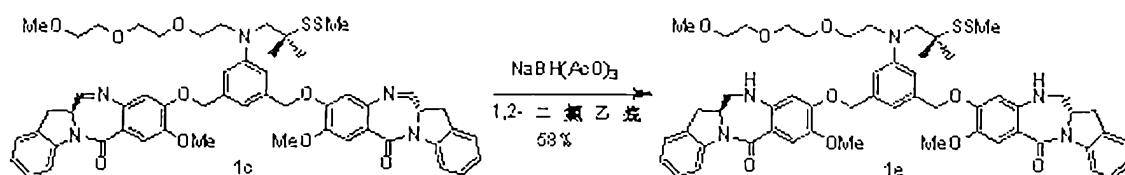


化合物 1g：

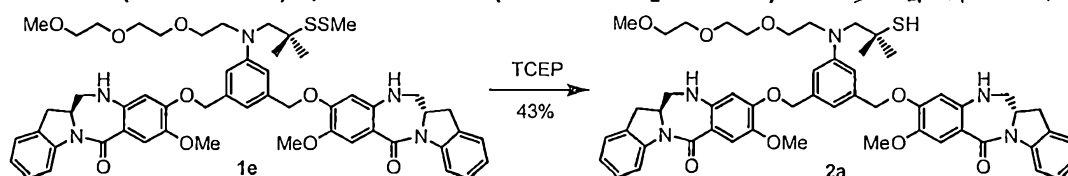
在室溫下，向經攪拌之 1d(23.6 mg, 0.024 mmol)於乙腈(3 mL)及甲醇(3 mL)中之溶液中添加新製的 TCEP 溶液(17 mg TCEP 鹽酸鹽用飽和碳酸氫鈉中和至 pH 6~6.5，隨後用 0.5 mL pH 6.5 磷酸鹽緩衝液稀釋)。混合物在室溫下

攪拌 3 小時，隨後用二氯甲烷及去離子水稀釋，分離且有機層用鹽水洗滌，經無水硫酸鈉乾燥並過濾。濃縮濾液並抽高真空，得到 22 mg 淺黃色泡沫狀之 **1f**。遵循相同程序，由 19 mg **1d** 製備另一份 18 mg **1f**。將合併之 40 mg (0.042 mmol) **1f** 溶解於無水二氯甲烷 (0.5 mL) 中並攪拌。向此經攪拌溶液中添加 SPDB NHS 酯 **2** (34.6 mg, 80% 純度, 0.085 mmol) 及二異丙基乙胺 (15 μ l, 0.085 mmol)。繼續在室溫下攪拌隔夜，用飽和氯化銨淬滅並用二氯甲烷稀釋，分離且用鹽水洗滌，經硫酸鈉乾燥，過濾並濃縮。殘餘物藉由製備型逆相 HPLC (C18 管柱，乙腈/水) 純化。合併含產物部分，用二氯甲烷萃取並濃縮，得到白色固體狀之化合物 **1g** (29.7 mg, $y = 60\%$)。 ^1H NMR (400 Hz, CD_3CN): δ 8.28-8.25 (m, 1H), 8.20-8.17 (m, 1H), 7.87-7.84 (m, 1H), 7.49 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H), 7.39 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H), 7.31-7.19 (m, 4H), 7.13-7.01 (m, 2H), 6.92-6.87 (m, 3H), 6.77 (bs, 1H), 6.31-6.29 (m, 1H), 5.16-5.09 (m, 2H), 5.00 (d, $J = 4.4$ Hz, 2H), 4.94 (bs, -NH), 4.48-4.43 (m, 1H), 4.40-4.34 (m, 1H), 3.90 (d, $J = 4.4$ Hz, 3H), 3.77 (d, $J = 4.4$ Hz, 3H), 3.64-3.39 (m, 18H), 3.26 (d, $J = 4.4$ Hz, 3H), 2.82-2.70 (m, 8H), 2.17 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H), 2.08-2.01 (m, 3H), 1.30 (d, $J = 4.4$ Hz, 6H); MS (m/z): 實驗值 1025.9 ($\text{M} + \text{H}_2\text{O} + \text{Na}$) $^+$, 1043.9 ($\text{M} + 2\text{H}_2\text{O} + \text{Na}$) $^+$, 983.8 ($\text{M} - \text{H}$) $^-$, 1055.8 ($\text{M} + 4\text{H}_2\text{O} - \text{H}$) $^-$; MS (m/z), 實驗值 1179.5 ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$ 。參看第 1 圖。

實例 2

化合物 **1e**：

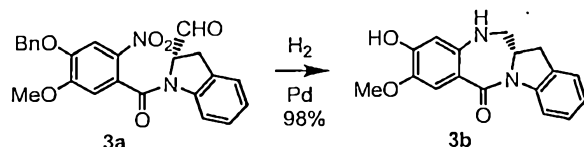
向經攪拌之 **1c** (8 mg, 0.0081 mmol) 於無水 1,2-二氯甲烷 (0.2 mL) 中之溶液中添加三乙醯氧基硼氫化鈉 (3.8 mg, 0.018 mmol)。混合物在室溫下攪拌 1.5 小時，隨後混合物用二氯甲烷稀釋且用飽和碳酸氫鈉淬滅，分離且有機層用鹽水洗滌，經硫酸鈉乾燥，並過濾。濃縮濾液且殘餘物藉由逆相 HPLC (C18 管柱，乙腈/水) 純化，得到白色固體狀之化合物 **1e** (4.7 mg, $y = 58\%$)。MS (m/z)，實驗值 1012.4 ($M + Na$)⁺, 1024.2 ($M + 2H_2O - H$)⁻。參看第 2 圖。

化合物 **2a**：

在室溫下向經攪拌之化合物 **1e** (12 mg, 0.012 mmol) 於乙腈 (1 mL) 及甲醇 (3 mL) 中之溶液中添加新製的 TCEP 溶液 (11 mg TCEP 鹽酸鹽用飽和碳酸氫鈉中和至 pH ~6.5，隨後用 0.4 mL pH 6.5 磷酸鹽緩衝液稀釋)。混合物在室溫下攪拌 3.5 小時，隨後用二氯甲烷及去離子水稀釋，分離且有機層用鹽水洗滌，經無水硫酸鈉乾燥並過濾。濃縮濾液且殘餘物藉由逆相 HPLC (C18 管柱，乙腈/水) 純化，得到白色固體狀之化合物 **2a** (4.9 mg, $y = 43\%$)。MS

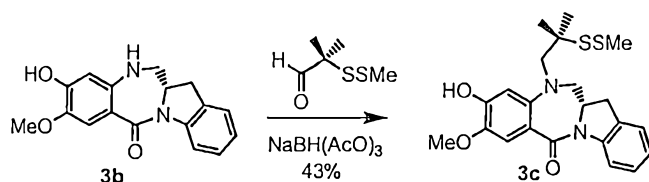
(m/z), 實驗值 966.4 ($M + Na$)⁺, 978.2 ($M + 2H_2O - H$)⁻。參看第 2 圖。

實例 3



化合物 **3b** :

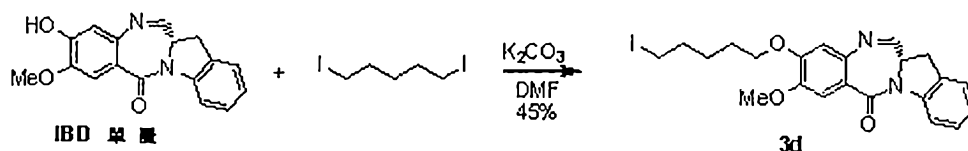
向化合物 **3a** (830 mg, 1.9 mmol) 於甲醇 (15 mL) 中之溶液中添加 Pd/C (10%, 204 mg, 0.19 mmol)。藉由真空移除燒瓶中之空氣，隨後用氣球中之氫氣置換。混合物在室溫下攪拌隔夜。混合物濾過矽藻土且用二氯甲烷及甲醇洗滌矽藻土/Pd/C。濃縮濾液且殘餘物用二氯甲烷稀釋並蒸發幾個回合，隨後藉由矽膠層析法 (二氯甲烷/甲醇) 純化，得到淺黃色固體狀之化合物 **3b** (558 mg, $y = 98\%$)。¹H NMR (400 Hz, CDCl₃): δ 8.34 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.22 (dd, $J_1 = 8.0$ Hz, $J_2 = 7.6$ Hz, 1H), 7.17 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.02 (dd, $J_1 = 7.2$ Hz, $J_2 = 7.6$ Hz, 1H), 6.16 (s, 1H), 4.37 (tt, $J_1 = 10.4$ Hz, $J_2 = 7.2$ Hz, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.49-3.36 (m, 3H), 2.73 (dd, $J_1 = 16.8$ Hz, $J_2 = 3.6$ Hz, 1H); ¹³C NMR (400 Hz, CDCl₃): δ 167.0, 150.4, 142.6, 141.2, 140.8, 129.9, 127.7, 124.8, 123.96, 117.4, 113.7, 112.5, 104.7, 57.3, 56.3, 54.7, 33.0; MS (m/z), 實驗值 295.1 ($M - H$)⁻。參看第 3 圖。



化合物 **3c** :

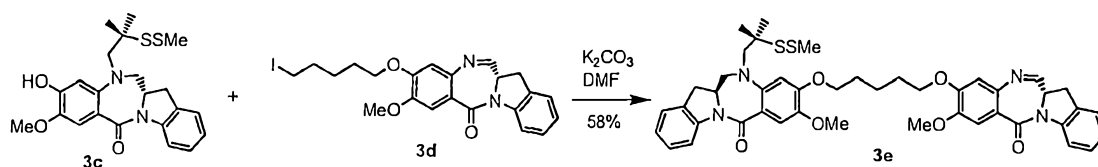
向 2-(甲基二硫基)-異丁醛 (113 mg, 0.75 mmol) 及化合物 **3b** (148 mg, 0.5 mmol) 於無水 1,2-二氯乙烷 (2 mL) 中之溶液中添加三乙醯氧基硼氫化鈉 (212 mg, 1.0 mmol)。混合物在室溫下攪拌 2 天。在此期間，再添加兩份 (0.05 mL, 0.5 mmol/份) 2-(甲基二硫基)-異丁醛以及一份三乙醯氧基硼氫化鈉 (106 mg, 0.5 mmol)。反應用飽和碳酸氫鈉淬滅，用二氯甲烷及水稀釋。有機層用鹽水洗滌，經硫酸鈉乾燥並過濾。減壓濃縮濾液且殘餘物藉由矽膠層析法 (Combiflash, 24 g 管柱，己烷/乙酸乙酯) 純化，得到白色蓬鬆固體狀之化合物 **3c** (92.5 mg, $y = 43\%$)。未反應之起始物質 **3b** 亦回收 (49.3 mg, $y = 33\%$)。 ^1H NMR (400 Hz, CDCl_3): δ 8.30 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.28 (dd, $J_1 = 6.8$ Hz, $J_2 = 7.6$ Hz, 1H), 7.25-7.20 (m, 2H), 7.07 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 6.80 (s, 1H), 6.17 (s, 1H), 4.36-4.28 (m, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.78 (d, $J = 14.4$ Hz, 1H), 3.46-3.34 (m, 3H), 2.90 (d, $J = 14.4$ Hz, 1H), 2.73 (dd, $J_1 = 16.4$ Hz, $J_2 = 2.8$ Hz, 1H), 2.34 (s, 3H), 1.17 (s, 3H), 1.05 (s, 3H); ^{13}C NMR (400 Hz, CDCl_3): δ 167.2, 149.0, 142.5, 142.2, 141.9, 129.9, 128.0, 125.3, 124.5, 124.1, 117.1, 112.0, 108.5, 64.8, 61.4, 58.1, 56.3, 53.4, 32.0, 26.3, 25.7, 25.4; MS (m/z), 實驗值 453.3 ($M +$

$\text{Na})^+$, $429.2 (\text{M} - \text{H})^-$ 。參看第 3 圖。



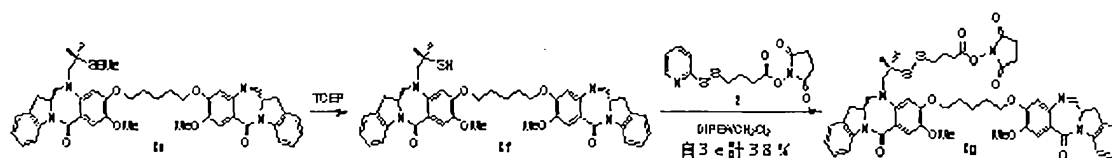
化合物 **3d**：

向經攪拌之 IBD 單體 (125 mg, 0.425 mmol) 及 1,5-二碘戊烷 (0.63 mL, 4.25 mmol) 於無水二甲基甲醯胺 (3 mL) 中之溶液中添加碳酸鉀 (59 mg, 0.425 mmol) 且混合物在室溫下攪拌隔夜。反應溶液用二氯甲烷稀釋，用鹽水洗滌且經無水硫酸鈉乾燥。過濾並濃縮。殘餘物藉由矽膠層析法 (己烷/乙酸乙酯) 純化，得到淺黃色泡沫狀之化合物 **3d** (94 mg, $y = 45\%$)。 ^1H NMR (400 Hz, CDCl_3): δ 8.27 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.86 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.27 (dd, $J_1 = 8.4$ Hz, $J_2 = 7.6$ Hz, 2H), 7.10 (dd, $J_1 = 7.6$ Hz, $J_2 = 7.2$ Hz, 1H), 6.82 (s, 1H), 4.48 (dt, $J_1 = 10.8$ Hz, $J_2 = 4.4$ Hz, 1H), 4.15-4.07 (m, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.70 (dd, $J_1 = 16.8$ Hz, $J_2 = 10.8$ Hz, 1H), 3.49 (dd, $J_1 = 16.8$ Hz, $J_2 = 4.0$ Hz, 1H), 3.22 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.96-1.87 (m, 4H), 1.64-1.57 (m, 2H); ^{13}C NMR (400 Hz, CDCl_3): δ 164.0, 163.2, 151.4, 148.3, 142.2, 140.3, 129.6, 128.3, 124.9, 120.5, 117.0, 112.0, 110.6, 68.8, 56.4, 55.1, 33.3, 32.7, 28.0, 27.2, 6.6; MS (m/z), 實驗值 $513.3 (\text{M} + \text{Na})^+$, $543.2 (\text{M} + 3\text{H}_2\text{O} - \text{H})^-$ 。參看第 3 圖。



化合物 3e：

向經攪拌之起始物質 **3c** (91 mg, 0.21 mmol) 及 **3d** (94 mg, 0.19 mmol) 於無水二甲基甲醯胺 (1 mL) 中之溶液中添加碳酸鉀 (29 mg, 0.21 mmol) 且混合物在室溫下攪拌隔夜。反應溶液用二氯甲烷稀釋，用鹽水洗滌且經無水硫酸鈉乾燥。過濾、濃縮且殘餘物藉由矽膠層析法 (己烷/乙酸乙酯) 純化，得到淺黃色泡沫狀之化合物 **3e** (89.1 mg, $y = 58\%$)。 ^1H NMR (400 Hz, CDCl_3): δ 8.32-8.28 (m, 2H), 7.91 (bs, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.36-7.21 (m, 5H), 7.15-7.05 (m, 2H), 6.85 (s, 1H), 6.74 (s, 1H), 4.53-4.48 (m, 1H), 4.37-4.31 (m, 1H), 4.21-4.03 (m, 4H), 3.98 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.86-3.70 (m, 2H), 3.55-3.35 (m, 4H), 2.93 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H), 2.73 (dd, $J_1 = 16.4$ Hz, $J_2 = 2.4$ Hz, 1H), 2.36 (s, 3H), 2.03-1.96 (m, 3H), 1.77-1.67 (m, 3H), 1.21 (s, 3H), 1.06 (s, 3H); MS (m/z), 實驗值 815.3 ($M + \text{Na}$) $^+$ 。參看第 3 圖。

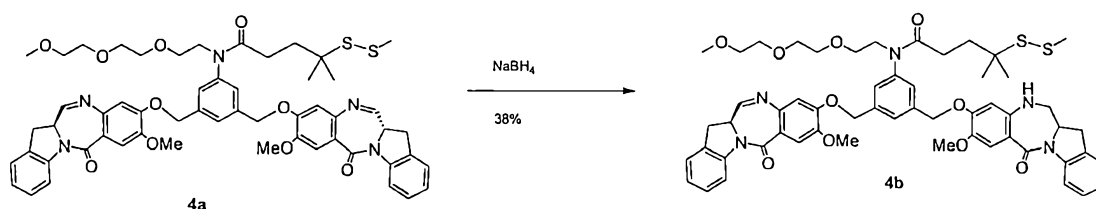


化合物 3g：

在室溫下向經攪拌之化合物 **3e** (33.1 mg, 0.042 mmol) 於乙腈 (2 mL) 及甲醇 (4 mL) 中之溶液中添加新製的 TCEP

溶液 (36 mg TCEP 鹽酸鹽用飽和碳酸氫鈉中和至 pH ~6.5，隨後用 0.4 mL pH 6.5 磷酸鹽緩衝液稀釋)。混合物在室溫下攪拌 3 小時，隨後用二氯甲烷及去離子水稀釋，分離且有機層用鹽水洗滌，經無水硫酸鈉乾燥並過濾。濃縮濾液並抽高真空，得到 31 mg 淺黃色固體狀之化合物 **3f**。將其溶解於無水二氯甲烷 (0.5 mL) 中。隨後添加 SPDB NHS 酯 **2** (26 mg, 80% 純度, 0.063 mmol) 及二異丙基乙胺 (11 μ L, 0.063 mmol)。混合物繼續在室溫下攪拌隔夜，用飽和氯化銨淬滅且用二氯甲烷稀釋，分離並用鹽水洗滌，經硫酸鈉乾燥，過濾且濃縮。殘餘物藉由製備型逆相 HPLC (C18 管柱，乙腈/水) 純化。合併含產物部分，用二氯甲烷萃取且濃縮，得到淺黃色固體狀之化合物 **3g** (15.2 mg, $y = 38\%$)。MS (m/z)，實驗值 $984.3 (M + Na)^+$, $1014.2 (M + 3H_2O - H)^-$ 。參看第 3 圖。

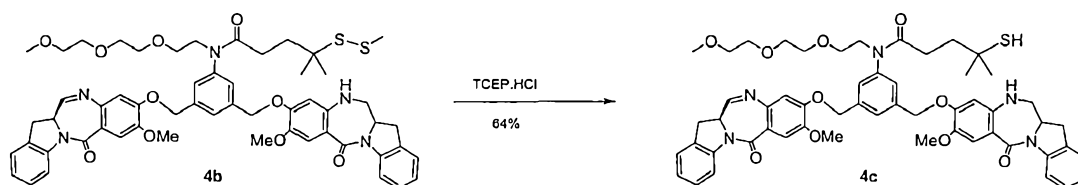
實例 4



化合物 **4b**：

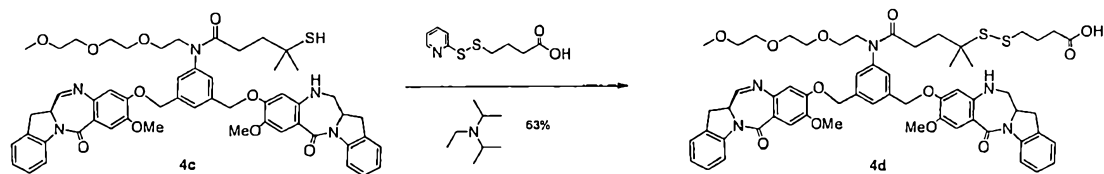
在冰浴中將經攪拌之化合物 **4a** (111 mg, 0.108 mmol) 於無水乙醇 (720 μ L) 及無水二氯甲烷 (360 μ L) 中之溶液冷卻至 0°C。在 0°C 下添加含硼氫化鈉 (0.817 mg, 0.022 mmol) 之 50 μ L 無水乙醇。反應在環境溫度下攪拌 2 小時。混合物在冰浴中冷卻至 0°C，用飽和氯化銨淬滅且

用二氯甲烷萃取。有機萃取物用鹽水洗滌，經無水硫酸鈉乾燥且濾過矽藻土。減壓濃縮濾液且粗物質藉由 RP-HPLC(C18, 去離子水/乙腈)純化，得到化合物 **4b**(43mg, 38%)。¹H NMR (400 Hz, CDCl₃): δ 8.26 (d, 1H, *J* = 8.0Hz), 8.18 (d, 1H, *J* = 8.0Hz), 7.77 (d, 1H, *J* = 4.4 Hz), 7.51 (s, 1H), 7.41 (s, 2H), 7.17 (m, 6H), 7.03 (t, 1H, *J* = 7.2Hz), 6.96 (t, 1H, *J* = 7.2Hz), 6.76 (s, 1H), 6.04 (s, 1H), 5.13 (m, 4H), 4.38 (m, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.79 (m, 2H), 3.63 (m, 1H), 3.51 (m, 8H), 3.43 (m, 6H), 3.25 (s, 3H), 2.73 (dd, 1H, *J* = 3.6, 16.4Hz), 2.22 (s, 3H), 2.04 (m, 2H), 1.81 (m, 2H), 1.18 (s, 6H); MS (*m/z*) 實驗值 1051.9 (*M*+Na), 1069.9 (*M*+Na+H₂O)。參看第 4 圖。



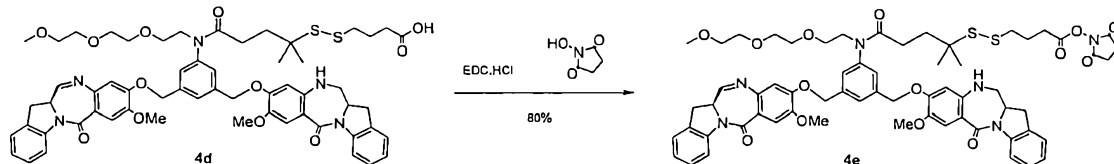
化合物 **4c** :

向經攪拌之化合物 **4b**(40 mg, 0.039 mmol)於甲醇(4.45 mL)及乙腈(2.225 mL)中之溶液中添加含 TCEP.HCl(39.0 mg, 0.136 mmol)之磷酸鈉緩衝液(0.89mL, pH 6.5)。混合物在環境溫度下攪拌 18 小時。混合物用二氯甲烷稀釋且用水及鹽水洗滌。有機萃取物經無水硫酸鈉乾燥，過濾且濃縮。藉由 RP-hPLC(C18,去離子水/乙腈)純化且用二氯甲烷萃取，得到化合物 **4c**(26.5 mg, 64%); MS (*m/z*) 實驗值 1006.0 (*M*+Na)。參看第 4 圖。



化合物 **4d** :

向經攪拌之化合物 **4c**(24 mg, 0.024 mmol)於無水二氯甲烷(800 μ L)中之溶液中添加 PBA(11.18 mg, 0.049 mmol)及二異丙基乙胺(20.18 μ L, 0.116 mmol)。在環境溫度下攪拌 18 小時後，反應物用二氯甲烷稀釋且用飽和氯化銨淬滅。分離各層且有機物用鹽水洗滌，經無水硫酸鈉乾燥，過濾且減壓濃縮。藉由 PTLC(5% 甲醇/二氯甲烷)純化，得到化合物 **4d**(17mg, 63%); MS (m/z) 實驗值 1123.9 ($M+Na$) 1139.9 ($M+K$); 1099.8 ($M-H$) 117.9 ($M-H+H_2O$)。參看第 4 圖。

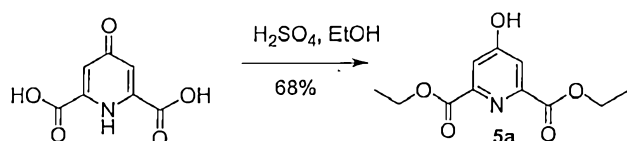


化合物 **4e** :

向化合物 **4d**(15 mg, 0.014 mmol)及 N-羥基琥珀醯亞胺(4.70 mg, 0.041 mmol)於無水二氯甲烷(1.0 mL)中之混合物中添加 EDC.HCl(7.83 mg, 0.041 mmol)。在環境溫度下攪拌 18 小時後，反應物用二氯甲烷稀釋且用飽和氯化銨淬滅。混合物用鹽水洗滌，經無水硫酸鈉乾燥，過濾且減壓濃縮。粗物質藉由 RP-HPLC(C18, 去離子水/乙腈)純化。彙集含有產物之部分且用二氯甲烷萃取，經無水硫酸鎂乾燥，過濾且濃縮，得到化合物 **4e**(13 mg, 80%);

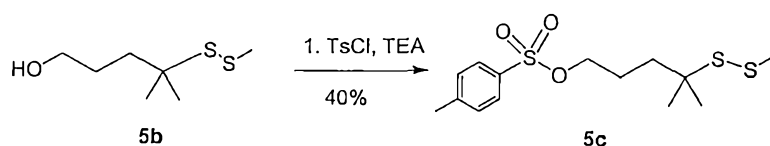
MS (m/z) 實驗值 1220.8 ($M+Na$) 1238.8 ($M+Na+H_2O$), 1254.8 ($M+K+H_2O$)。參看第 4 圖。

實例 5



化合物 **5a**：

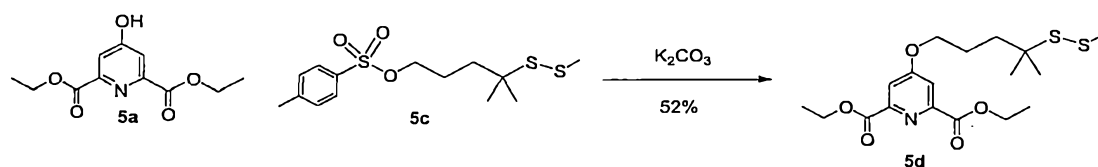
使白屈胺酸水合物 (chelidamic acid hydrate) (3.0 g, 15.56 mmol) 及硫酸 (0.6 mL, 11.26 mmol) 於無水乙醇 (40 mL) 中之混合物回流 20 小時。反應物冷卻至環境溫度，用碳酸鈉水溶液中中和，隨後用濃 HCl 酸化。添加水且混合物用二氯甲烷萃取。萃取物用無水硫酸鎂乾燥，過濾且濃縮。粗物質藉由矽膠層析法 (5% 甲醇 / 二氯甲烷) 純化，得到白色固體狀之 4-羥基吡啶-2,6-二甲酸二乙酯 (**5a**) (2.5 g, 68%)。參看第 5 圖。



化合物 **5c**：

在冰浴中將 4-甲基-4-(甲基二硫烷基)戊-1-醇 (**5b**) (2.0 g, 11.09 mmol) 於無水二氯甲烷 (55.5 mL) 中之溶液冷卻至 $0^\circ C$ 。在 $0^\circ C$ 下添加三乙胺 (5.41 mL, 38.8 mmol) 及甲苯磺醯氯 (3.17 g, 16.64 mmol)。反應物在環境溫度下攪拌 3 小時。混合物用乙酸乙酯萃取且用鹽水洗滌。有機萃取物用無水硫酸鈉乾燥，過濾且濃縮。藉由矽膠層析法 (5%

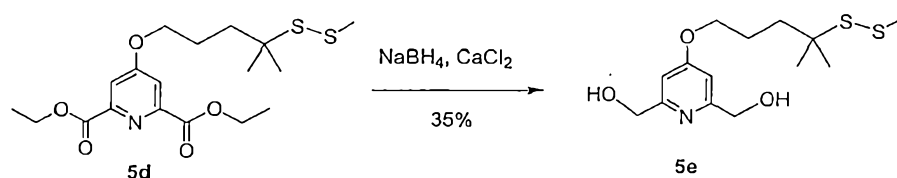
乙酸乙酯/己烷)純化, 得到 4-甲基苯磺酸 4-甲基-4-(甲基二硫烷基)戊基酯 (5c) (1.5 g, 40%)。5b: ^1H NMR (400 Hz, CDCl_3): δ 3.42 (m, 2H), 2.19 (s, 3H), 1.77 (bs, 1H), 1.43 (m, 4H), 1.09 (s, 6H)。5c: ^1H NMR (400 Hz, CDCl_3): δ 7.66 (d, 2H, $J=7.6\text{Hz}$), 7.22 (d, 2H, $J=8.0\text{Hz}$), 3.90 (t, 2H, $J=6.4\text{Hz}$), 2.32 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 1.60 (m, 2H), 1.44 (m, 2H), 1.11 (s, 6H)。參看第 5 圖。



化合物 5d:

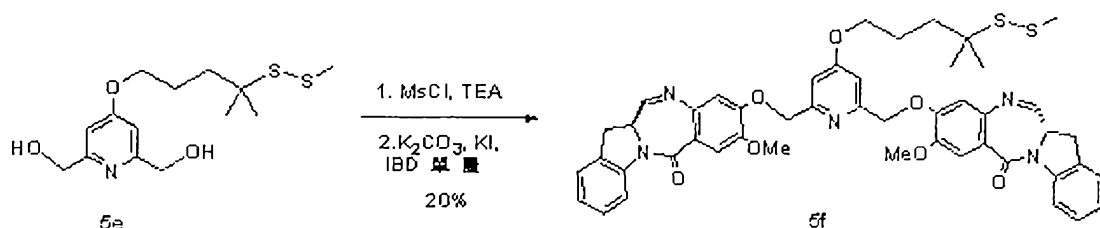
向經攪拌之 4-甲基苯磺酸 4-甲基-4-(甲基二硫烷基)戊基酯 (5c) (0.48 g, 1.435 mmol) 及 4-羥基吡啶-2,6-二甲酸二乙酯 (5a) (0.343 g, 1.435 mmol) 於無水二甲基甲醯胺 (6.5 mL) 中之溶液中添加碳酸鉀 (0.297 g, 2.152 mmol)。反應物在 90°C 下攪拌 18 小時。隨後冷卻至環境溫度且用飽和氯化銨淬滅。混合物用乙酸乙酯萃取 3 次。萃取物用無水硫酸鈉乾燥, 過濾且減壓濃縮。藉由矽膠層析法 (30% 己烷/乙酸乙酯) 純化, 得到 4-(4-甲基-4-(甲基二硫烷基)戊氧基)吡啶-2,6-二甲酸二乙酯 (5d) (300 mg, 52%); ^1H NMR (400 Hz, CDCl_3): δ 7.70 (s, 2H), 4.40 (q, 4H, $J=7.2, 14.4\text{Hz}$), 4.07 (t, 2H, $J=6.4\text{Hz}$), 2.35 (s, 3H), 1.86 (m, 2H), 1.70 (m, 2H), 1.38 (t, 6H, $J=7.2\text{Hz}$), 1.27 (s, 6H); MS (m/z), 實驗值 424.1 ($M+\text{Na}$), 440.1 ($M+\text{K}$)。參

看第 5 圖。



化合物 5e：

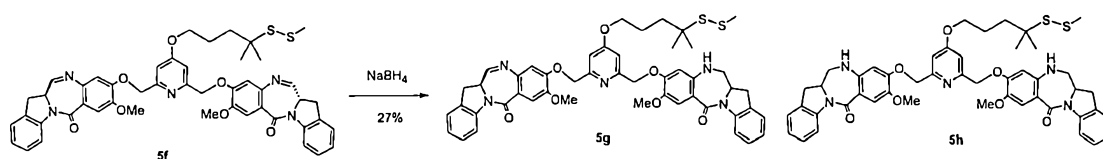
向經攪拌之 4-(4-甲基-4-(甲基二硫烷基)戊氧基)吡啶-2,6-二甲酸二乙酯 (5d) (270 mg, 0.672 mmol) 於無水乙醇 (7.0 mL) 中之溶液中添加氯化鈣 (224 mg, 2.017 mmol) 及硼氫化鈉 (76 mg, 2.017 mmol)。反應物在環境溫度下攪拌 90 分鐘，之後用水淬滅且真空濃縮以移除乙醇。混合物隨後用二氯甲烷萃取 2 次。合併有機萃取物，用水洗滌，用無水硫酸鎂乾燥且濾過矽藻土。減壓濃縮濾液且粗物質藉由矽膠層析法 (用 10% 甲醇/二氯甲烷溶離) 純化，得到 4-(4-甲基-4-(甲基二硫烷基)戊氧基)吡啶-2,6-二基)二甲醇 (5e) (75 mg, 35%)； ^1H NMR (400 Hz, CDCl_3): δ 6.63 (s, 2H), 4.60 (s, 4H), 3.95 (t, 2H, $J = 6.2\text{ Hz}$), 3.54 (bs, 2H), 2.35 (s, 3H), 1.82 (m, 2H), 1.66 (m, 2H), 1.26 (s, 6H)；MS (m/z), 實驗值 340.1 ($M+\text{Na}$)。參看第 5 圖。



化合物 5f：

在丙酮/冰浴中將經攪拌之 4-(4-甲基-4-(甲基二硫烷基)戊氧基)吡啶-2,6-二基)二甲醇 (5e) (51 mg, 0.161 mmol)

於無水二氯甲烷(1.6 mL)中之溶液冷卻至 -5°C 。添加三乙胺(0.112 mL, 0.803 mmol)及甲烷磺醯氯(0.031 mL, 0.402 mmol)。混合物在 -5°C 下攪拌 60 分鐘。反應用冰水淬滅且用冷乙酸乙酯萃取。有機萃取物用冰水洗滌，用無水硫酸鈉乾燥，過濾且減壓濃縮，得到二甲磺酸酯。向經攪拌之二甲磺酸酯中間物(179 mg, 0.378 mmol)及 IBD 單體(256 mg, 0.869 mmol)於無水二甲基甲醯胺(3.8 mL)中之混合物中添加碳酸鉀(261 mg, 1.890 mmol)及碘化鉀(31.4 mg, 0.189 mmol)。在環境溫度下攪拌反應 18 小時。混合物用水淬滅且用二氯甲烷萃取 3 次。有機萃取物用硫酸鈉乾燥，過濾且濃縮。粗物質再溶解於乙腈中且藉由 RP-HPLC(C18，去離子水/乙腈)純化。合併含產物部分且用二氯甲烷萃取，用無水硫酸鎂乾燥，過濾且減壓濃縮，得到化合物 **5f**(65 mg, 20%); ^1H NMR (400 Hz, CDCl_3): δ 8.20 (d, 2H, $J = 8.0\text{Hz}$), 7.78 (m, 2H), 7.53 (s, 2H), 7.20 (m, 4H), 7.04 (t, 2H, $J = 7.4\text{Hz}$), 6.91 (m, 2H), 6.80 (s, 2H), 5.22 (s, 4H), 4.40 (m, 2H), 3.94 (s, 6H), 3.93 (m, 2H), 3.63 (m, 2H), 3.42 (dd, 2H, $J = \text{Hz}$), 2.32 (s, 3H), 1.80 (m, 2H), 1.64 (m, 2H), 1.24 (s, 6H); MS (m/z), 實驗值 892.3 ($\text{M}+\text{Na}$) 910.3 ($\text{M}+\text{Na}+\text{H}_2\text{O}$) 928.3 ($\text{M}+\text{Na}+2\text{H}_2\text{O}$)。參看第 5 圖。

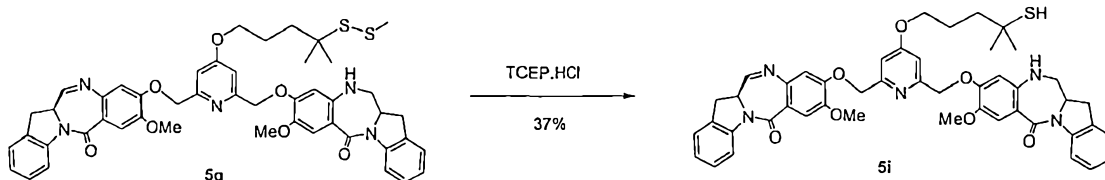


化合物 **5g** 及 **5h** :

在冰浴中將化合物 **5f** (74 mg, 0.085 mmol) 於無水乙醇 (600 μ L) 及無水二氯甲烷 (300 μ L) 中之溶液冷卻至 0°C。在 0°C 下添加含硼氫化鈉 (0.644 mg, 0.017 mmol) 之 50 μ L 無水乙醇。混合物在環境溫度下攪拌 2 小時，隨後冷卻至 0°C。反應用飽和氯化銨淬滅且用二氯甲烷萃取。有機萃取物用鹽水洗滌，經無水硫酸鈉乾燥，濾過矽藻土且減壓濃縮。粗物質再溶解於二甲基甲醯胺中且藉由 RP-HPLC (C18, 去離子水/乙腈) 純化。單獨合併含化合物 **5g** 及 **5h** 部分且用二氯甲烷萃取，用無水硫酸鎂乾燥，過濾且濃縮，得到化合物 **5g** (20 mg, 27%) 及化合物 **5h**。

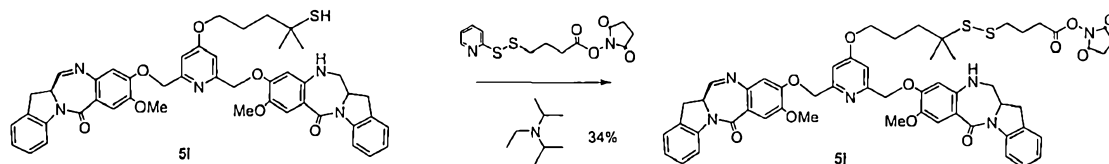
5g: ^1H NMR (400 Hz, CDCl_3): δ 8.25 (m, 1H), 8.18 (m, 1H), 7.77 (m, 1H), 7.51 (ss, 1H), 7.40 (ss, 1H), 7.18 (m, 4H), 7.08 (m, 1H), 7.03 (m, 1H), 6.92 (m, 2H), 6.86 (ss, 1H), 5.98/6.06 (ss, 1H), 5.24 (m, 4H), 4.40 (m, 1H), 4.30 (m, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.92 (m, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.62 (m, 1H), 3.37 (m, 4H), 2.65 (m or dd, 1H), 2.32 (ss, 3H), 1.77 (m, 2H), 1.64 (m, 2H), 1.24 (s, 6H)。

5h: ^1H NMR (400 Hz, CDCl_3): δ 8.24 (d, 2H, $J = 8.0\text{Hz}$), 7.39 (s, 2H), 7.14 (m, 4H), 6.97 (m, 2H), 6.93 (m, 2H), 6.15 (ss, 2H), 5.25 (s, 4H), 4.37 (m or t, 2H, $J = 9.8\text{Hz}$), 4.2 (bs, 2H), 3.94 (m, 2H), 3.83 (s, 6H), 3.40 (m, 6H), 2.72 (dd, 2H, $J = \text{Hz}$), 2.32 (s, 3H), 1.79 (m, 2H), 1.64 (m, 2H), 1.24 (s, 6H)。參看第 5 圖。



化合物 5i :

向經攪拌之化合物 5g (20 mg, 0.023 mmol) 於甲醇 (5.25 mL) 及乙腈 (1.750 mL) 中之溶液中添加含 TCEP.HCl (19.72 mg, 0.069 mmol) 的磷酸鈉緩衝液 (0.7 mL, pH 6.5)。混合物在環境溫度下攪拌 3 小時，隨後用二氯甲烷及水稀釋。分離各層且有機物用鹽水洗滌。粗產物藉由 RP-HPLC (C18, 去離子水/乙腈) 純化。合併含產物部分，用二氯甲烷萃取且蒸發，得到化合物 5i (7 mg, 37%)。MS (m/z), 實驗值 848.3 ($M+Na$) 866.3 ($M+Na+H_2O$) 880.3 ($M+Na+MeOH$)。參看第 5 圖。



化合物 5j :

向經攪拌之化合物 5i (7 mg, 8.47 μ mol) 及 4-(吡啶-2-基二硫烷基)丁酸 2,5-二側氧基吡咯啉-1-基酯 (8.64 mg, 0.021 mmol) 於無水二氯甲烷 (113 μ L) 中之溶液中添加二異丙基乙胺 (3.69 μ L, 0.021 mmol)。在環境溫度下攪拌 18 小時後，反應用飽和氯化銨溶液淬滅且用二氯甲烷萃取。有機萃取物用鹽水洗滌，用無水硫酸鈉乾燥，過濾且減壓濃縮。粗物質藉由製備型 RP-HPLC (C18, 去離子水/乙腈) 純化。含產物部分用二氯甲烷萃取，過濾且蒸發，

得到化合物 **5j** (3 mg, 34%)。MS (m/z), 實驗值 1063.3 ($M+Na$) 1081.3 ($M+Na+H_2O$)。參看第 5 圖。

實例 6

抗體-SPDB-藥物連結物之製備：

在 25°C 下，用 3 莫耳當量亞硫酸氫鈉(使用新製的 $NaHSO_3$ 水溶液)於 96-98% DMA 之水溶液預處理化合物 **1g** 4-5 小時。為進行連結，在 25°C 下，使 2 mg/mL 人化抗體與 5-7 莫耳當量化合物 **1g**(經 $NaHSO_3$ 預處理)於含有 10-15% *N,N*-二甲基乙醯胺(DMA)之 85-90% PBS(pH 7.4)水性緩衝液或 50 mM HEPES(pH 8.5)水性緩衝液中反應 6 小時，隨後經由 G25 凝膠過濾管柱純化於 PBS(pH 7.4)中，以移除未反應或水解之藥物化合物。在 10 mM 組胺酸、250 mM 甘胺酸、1%蔗糖、pH 6.5 緩衝液中透析人化抗體-SPDB-藥物連結物。由在 280 及 320 nm 下之 UV 吸光度量測值且使用藥物及抗體在 280 nm($215,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)及 320 nm($9137\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)下之消光係數來量測該等連結物之藥物抗體比(DAR)為 2.2-2.9。藉由 SEC(尺寸排阻層析法)，使用 TSK-Gel G300SWXL 管柱(7.8 mm × 300 mm, 5 μm 粒度)測定該等連結物中單體之百分含量 >90%。基於在 SEC 中單體峰之 UV 吸光度，亦證實該單體連結物峰連接有藥物分子。對於遊離(未連結)藥物分析法，用丙酮萃取該連結物以移除蛋白質，乾燥且在移動相中複水，並注射至 VYDAC 208TP C8 逆相 HPLC 管柱(4.6 × 250 mm, 7 μm 粒度)上並與標準物相比較。該連結物中游離藥物化合物

之百分含量測定為小於經連結藥物化合物之 0.5%。參看第 22 圖。

人化 Ab-SPDB-2a 連結物之製備：

在 25°C 下，於含有 5% DMA(v/v)之 95% PBS(PH 7.4)中用 4-6 莫耳當量 SPDB 異型雙官能連接基將 8 mg/mL 人化抗體衍生化，持續 1.5 小時，隨後經由 G25 脫鹽管柱純化至檸檬酸鹽緩衝液(35 mM 檸檬酸鹽緩衝液，pH 5.5，含有 2 mM EDTA、150 mM NaCl)中以移除未反應之連接基。在不添加及添加 50 mM 二硫蘇糖醇(用以量測總抗體及釋放二硫蘇糖醇之 SPy)之情況下，使用在 280 及 343 nm 下之 UV 吸光度量測 LAR(連接基抗體比)，且測定得到 2.7-4.1 LAR。使 2 mg/mL 經 SPDB 修飾之抗體與 2 莫耳當量化合物 2a(鹽酸鹽)/連接之 SPDB 在環境溫度下於 85% 檸檬酸鹽緩衝液、15% DMA(v/v)中反應 20 小時，隨後經由 G25 脫鹽管柱純化至 PBS(pH 7.4)中以移除未連結之藥物化合物。藉由在 280 及 350 nm 下進行之 UV 分光光度法量測最終人化 Ab-SPDB-2a 連結物之 DAR 且計算得到約 1.7-2.1 DAR。藉由 HPLC，使用 SEC(尺寸排阻層析法)管柱測定該連結物中之單體及單體上連接之藥物化合物的百分含量。參看第 23 圖。

實例 7

遊離藥物及連結物之活體外效力：

所用一般程序：將未連結之遊離藥物化合物或藥物連結物之樣品添加至 96 孔平底組織培養板且使用連續稀

釋液滴定以涵蓋所需莫耳濃度範圍。將抗原陽性(Ag^+)或抗原陰性(Ag^-)細胞以特定細胞密度以一定方式添加至各孔中，以致對於每一相應細胞株，每一藥物濃度具有三個重複樣品。隨後根據細胞株，在 $37^{\circ}C$ 下於含 5% CO_2 之氛圍中培育板 4-5 天：COLO 205(1,000 個細胞/孔)、Namalwa(3,000 個細胞/孔)、HEL 92.1.7(3,000 個細胞/孔) - 4 天；RH30(1,000 個細胞/孔)、HL60/QC(5,000 個細胞/孔)、Ramos(10,000 個細胞/孔)、KB(2,000 個細胞/孔)、BJAB(2,000 個細胞/孔)、NB4(3,000 個細胞/孔) - 5 天，RPMI 8226(8,000 個細胞/孔) - 6 天。

在培育期結束時，接著使用基於 WST-8 之細胞活力分析法評估細胞毒性效力且藉由用 WST-8 顯現(2-7 小時)量測存活細胞。量測各孔中之吸光度且繪製在每一濃度下存活細胞之分率的圖，以揭示(連結物之)細胞毒性及/或抗原特異性。

使用上述一般程序，量測未連結之遊離藥物化合物針對以下 7 種細胞株之細胞毒性：KB(HeLa 細胞污染物)、HL60/QC(急性骨髓性白血病細胞株)、Namalwa(伯基特氏淋巴瘤細胞株)、NB4(急性早幼粒細胞白血病細胞株)、HEL92.1.7(紅血球性白血病細胞株)、RPMI8226(多發性骨髓瘤細胞株)及 BJAB(B 細胞白血病細胞株)。第 24 圖及表 10 中所示之結果證實該等化合物在多種細胞類型中具有高效力。量測抗體-藥物連結物針對抗原表現細胞之效力及特異性，其中添加及不添加過量之阻斷性未連結抗體

以顯示殺滅作用之特異性。MY9-6-藥物連結物對以下三種不同之抗原表現細胞極為有效：HL60/ATCC、HL60/QC及NB-4，儘管在NB4細胞中存在極低抗原表現。特異性效力可藉由添加過量之未連結抗體阻斷，證實該細胞殺滅作用具有抗原特異性。類似地，huFOLR1-藥物連結物有效地以特定方式殺滅抗原表現KB細胞。結果圖示於第25及26圖中。

表 10. 遊離藥物對各種細胞株之效力。表中所列 IC_{50} 值以 nM 為單位。

	Namalwa	KB	HL60/QC	NB4	HEL92.1.7	RPMI8226	BJAB
1c	0.056	0.16	0.023				
1d	0.069	0.18	0.032				
1e	2.4	>3.0	0.67				
27d		0.23	0.05	0.039	0.14	0.07	0.04
27e		0.39	0.09	0.13	0.2	0.24	0.12
27f		4.4	1.7	1.1	1.8	>3.0	1
29a	0.002	0.004	0.001	0.0023	0.0031	0.011	0.001
29b	0.003	0.007	0.006	0.007	0.007	0.005	0.003
29c	0.013	0.057	0.03	0.023	0.027	0.16	0.015

使用包括以下各物之不同細胞株及不同之本發明連結物亦獲得類似結果：huMY9-6-SPDB-1f 針對 HL60/QC(Ag^+)細胞、HL60/ATCC(Ag^+)細胞及 NB-4(Ag^+)細胞(第 25 圖)；huFOLR1-SPDB-1f 針對 KB(Ag^+)細胞(第 26 圖)；huMY9-6-SPDB-1f 針對抗原陽性 HL60/QC 細胞、HL60/ATCC 細胞、NB-4 細胞及 HEL 92.1.7 細胞(第 29 圖)；huMy9-6-SPDB-1f、huMy9-6-磺基 SPDB-1f 及 huMy9-6-BMPS-1f 針對 HL60/QC(Ag^+)細胞(第 34 圖)；

chB38.1-SPDB-1f 及 chB38.1-磺基 SPDB-1f 針對 COLO205(Ag^+)細胞(第 35 圖); huMy9-6-SPDB-1f、huMy9-6-磺基 SPDB-1f 及 huMy9-6-BMPS-1f 針對 OCI-AML3(Ag^+)細胞(第 44 圖)。有關各種連結物針對各種細胞株之效力(以 IC_{50} 值(nM)表示)，亦參看第 49 圖。應注意，在第 25、29、34、35 及 44 圖中，連結物係在亞硫酸氫鈉存在下製備。

為比較在存在及不存在諸如亞硫酸氫鈉之亞胺反應性試劑情況下製備的主題連結物之活體外效力量測值，在存在及不存在亞硫酸氫鈉情況下，使用原位磺化方法製備 huMy9-6-BMPS-1f、huMy9-6-磺基-SPDB-1f 及 huMy9-6-藥物 2(其中首先將相應本發明化合物與亞硫酸氫鈉及帶有反應性基團之雙官能交聯劑混合，隨後反應混合物不經進一步純化即與作為細胞結合劑之 huMy9-6 單株抗體反應)。連結物針對 HL60-QC 細胞之 IC_{50} 顯示於下面。資料表明，在連結物製備步驟中包括亞胺反應性基團(諸如亞硫酸氫鈉)不會不利地影響主題連結物之活體外效力。

連結物	NaHSO_3 處理	IC_{50} (pM)	IC_{50} (pM) huMy9-6 阻斷
huMy9-BMPS-1f	-	2	130
	+	1.5	55
huMy9-6-磺基-SPDB-1f	-	5.6	1200
	+	7.1	610
huMy9-6-藥物 2	-	16	> 3000
	+	6.8	> 3000

很明顯，在與 huMy9-6 連結之前用亞硫酸氫鈉(5 莫耳當量，22 小時， 4°C ，90:10 DMA: pH 5.5 之水)預處理藥物化合物對連結物之抗原依賴性或抗原非依賴性(用 1

μ M 未連結之 huMy9-6 阻斷抗原)活體外效力無顯著影響。

實例 8

抗體-藥物連結物之結合類似於未修飾抗體之結合：

使用流動式細胞測量術比較 huMY9-6-藥物連結物之結合與針對抗原表現 HL60/QC 細胞之未修飾 huMY9-6 抗體的結合。簡言之，將抗原陽性細胞與連結物或未修飾抗體在 4°C 下培育，隨後與二次抗體-FITC 連結物在 4°C 下培育，用甲醛(1%之 PBS 溶液)固定並藉由流動式細胞測量術分析。連結物之結合與未修飾抗體之結合之間未觀察到顯著差異。一個實例顯示於第 27 中，其中 huMY9-6-藥物連結物以高親和力結合於抗原陽性細胞，與未修飾抗體類似。

實例 9

huMY9-6-SPDB-1f 連結物於帶 HL60/QC 腫瘤之裸小鼠中之活體內功效：

本研究中，在帶有 HL60/QC 腫瘤之雌性裸小鼠(一種人類急性骨髓性白血病之模型)中研究 huMY9-6-SPDB-1f 之抗腫瘤活性。將 HL60/QC 腫瘤細胞按 2×10^6 個細胞/小鼠以 0.1 mL/小鼠之體積皮下接種至 5 週齡雌性無胸腺裸小鼠右肩上方之區域中。腫瘤細胞接種後 8 天，依照腫瘤體積將小鼠隨機分組($n = 6$ /組)。隨機分組後一天起始治療，且該等組包括給與 PBS(每次注射 200 μ L)之對照組，或給與各種劑量(5 至 100 μ g/kg) huMY9-6-SPDB-1f

(50 $\mu\text{g/kg}$ 1f 劑量對應於 2.5 mg/kg 抗體劑量)之單次治療組。所有治療之耐受性均良好，且平均體重減輕與在 PBS 對照小鼠中所見之減輕相當。平均腫瘤體積隨時間之變化顯示於(第 28 及 36 圖)中，且資料證實了 huMY9-6-SPDB-1f 連結物之劑量依賴性抗腫瘤活性。據估計最小有效劑量為 20 $\mu\text{g/kg}$ ，其為最大耐受劑量之約 1/35。

實例 10

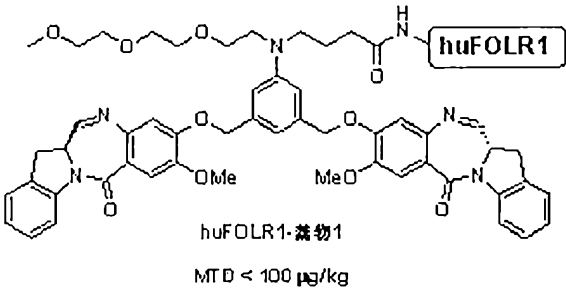
在雌性 CD-1 小鼠中研究 huFOLR-1 連結物之耐受性。在研究起始前持續 7 天觀察動物且發現無疾病或病痛。對小鼠經單次靜脈內注射投予連結物且每日監測動物之體重減輕、發病率或死亡率。表 9 顯示，對於 huFOLR1-藥物 1，該連結物僅耐受最低測試劑量 50 $\mu\text{g/kg}$ 。相比之下，發現單亞胺連結物 huFOLR1-藥物 2 及 huFOLR1-SPDB-1f 之耐受性更佳，最大耐受劑量分別在 <198 $\mu\text{g/kg}$ 及 >560 $\mu\text{g/kg}$ 。

表 9. (A) huFOLR1-藥物 1、(B) huFOLR1-藥物 2 及 (C) huFOLR1-SPDB-1f 連結物之耐受性比較資料。

A)

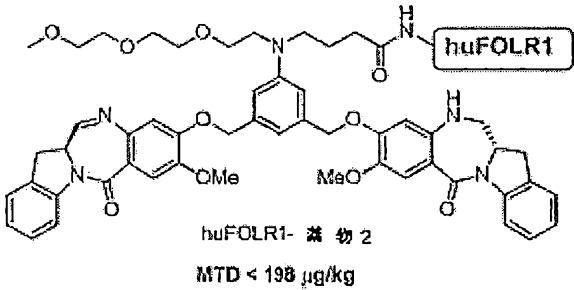
劑量 $\mu\text{g/kg}$	存活率%
50	100
100	0
200	0

300	0
400	0



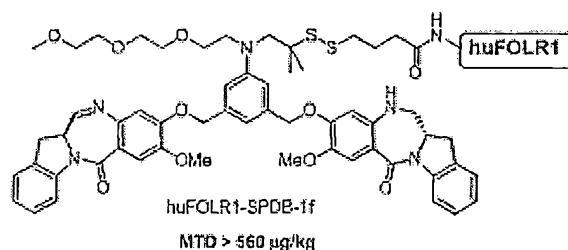
B)

劑量 ($\mu\text{g/kg}$)	存活率%
66	100
132	100
198	50
264	25

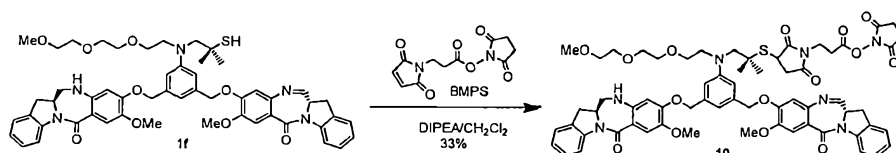


C)

劑量 ($\mu\text{g/kg}$)	存活率%
120	100
160	100
200	100
320	100
560	100



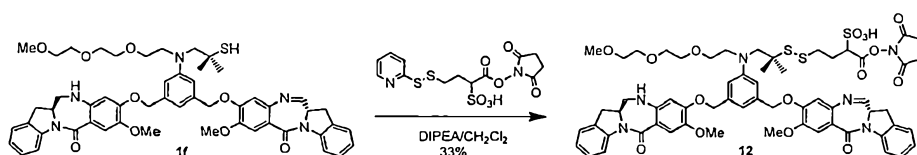
實例 11



化合物 10：

向經攪拌之 **1f** (18 mg, 0.019 mmol) 及 *N*-(β-馬來醯亞胺基丙氧基)琥珀醯亞胺 (BMPs) 酯 (9.2 mg, 0.034 mmol) 於無水二氯甲烷 (0.3 mL) 中之溶液中添加無水二異丙基乙胺 (5 µL, 0.029 mmol)。混合物在室溫下攪拌 27 小時，用飽和氯化銨淬滅且用二氯甲烷稀釋。有機層用鹽水洗滌，經無水硫酸鈉乾燥，過濾且減壓濃縮。殘餘物藉由製備型逆相 HPLC (C18 管柱，CH₃CN/H₂O) 純化。合併含產物部分，用二氯甲烷萃取且蒸發，得到白色固體狀之化合物 **10** (7.6 mg, γ = 33%)。MS (m/z): 實驗值 1208.3 ($M + H$)⁺。參看第 13 圖。

實例 12



化合物 12：

向經攪拌之 **1f** (16.5 mg, 0.018 mmol) 及磺基-SPDB (14.2 mg, 0.036 mmol) 於無水二氯甲烷 (0.3 mL) 中之溶液中添加無水二異丙基乙胺 (9 μ L, 0.054 mmol)。混合物在室溫下攪拌隔夜且減壓濃縮。殘餘物藉由製備型逆相 HPLC (C18 管柱, CH₃CN/H₂O) 純化。合併含產物部分, 用二氯甲烷萃取且蒸發, 得到 6.6 mg 淺黃色泡沫狀之化合物 **12**。凍乾水層, 又得到 0.5 mg 白色固體狀之化合物 **12**。MS (m/z): 實驗值 1235.0 ($M-H$)⁻。參看第 15 圖。

實例 13

人化抗體-磺基 SPDB-**1f** 連結物之製備

使含有溶於 50 mM HEPES (4-(2-羥基乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸) pH 8.5 緩衝液及 15% v/v DMA (*N,N*-二甲基乙醯胺) 共溶劑中之 2.5 mg/mL huMy9-6 抗體及 10 莫耳當量 **10** (用 5 倍過量之亞硫酸氫鈉於 90:10 DMA:水中之溶液預處理) 之反應物在 25°C 下連結 6 小時。反應後, 使用 NAP 脫鹽管柱 (Illustra Sephadex G-25 DNA 級, GE Healthcare), 純化連結物且緩衝液交換成 250 mM 甘胺酸、10 mM 組胺酸、1% 蔗糖、0.01% Tween、50 μ M 亞硫酸氫鈉調配物緩衝液。在室溫下, 利用 Slide-a-Lyzer 透析盒 (ThermoScientific 20,000 MWCO) 在相同緩衝液中進行透析 4 小時。發現純化連結物之 DAR 為 2.4 (藉由 UV-Vis, 使用莫耳消光係數 $\epsilon_{330\text{ nm}} = 15,484\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, 對於 **1f**, $\epsilon_{280\text{ nm}} = 30,115\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, 且對於 My9-6 抗體, $\epsilon_{280\text{ nm}} = 146,000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$), 具有 96.7% 單體 (藉由尺寸排阻層析

法)、<1%未連結之遊離藥物化合物(藉由丙酮萃取/逆相 HPLC)，且最終蛋白質濃度為 1.4 mg/mL。

根據實例 7 中所述一般程序，量測抗體-磺基 SPDB-1f 連結物之活體外效力且資料顯示於第 34 及 35 圖中。抗體-磺基 SPDB-1f 連結物之效力相當於或高於抗體-SPDB-1f 連結物。

使用共價亞胺反應物，諸如亞硫酸氫鈉，改進了抗體-化合物連結物之規格(例如單體%及藥物負荷)。在一個實驗中，在 25℃ 下，5 莫耳當量亞胺反應物在含 NHS-BMPS-1f 之 90% DMSO/10% PBS pH 7.4 中形成加合物，歷時 4 小時。隨後將反應混合物添加至 huMy9-6 抗體(4 莫耳當量 IGN, 2 mg/ml, 10% v/v DMSO, 50 mM HEPES 緩衝液，pH 8.5，5 小時，25℃)。使用連二亞硫酸、亞硫酸氫鈉或偏亞硫酸氫鈉製備之連結物具有類似 IGN/抗體比率及單體%，而在無添加劑處理的情況下製備之連結物產生極低藥物併入量。參看下表。

反應物	IGN/抗體 (UV)	單體% (SEC)	單體上之 1f %
連二亞硫酸鈉	2.6	88	82
亞硫酸氫鈉	2.6	88	83
偏亞硫酸氫鈉	2.7	88	82
無添加劑	0.1	98	94

實例 14

人化抗體-BMPS-1f 連結物之製備

使含有溶於 50 mM HEPES (4-(2-羥基乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸) pH 8.5 緩衝液及 15% v/v DMA (N,N-二甲基乙醯胺)

共溶劑中之 2.0 mg/mL huMy9-6 抗體及 5 莫耳當量 **12**(用 5 倍過量之亞硫酸氫鈉於 90:10 DMA:水中之溶液預處理)之反應物在 25°C 下反應 6 小時。反應後，使用 NAP 脫鹽管柱 (Illustra Sephadex G-25 DNA 級，GE Healthcare)，純化連結物且緩衝液交換成 250 mM 甘胺酸、10 mM 組胺酸、1% 蔗糖、0.01% Tween、50 μ M 亞硫酸氫鈉調配物緩衝液。在室溫下，利用 Slide-a-Lyzer 透析盒 (ThermoScientific 20,000 MWCO) 在相同緩衝液中進行透析 4 小時。發現純化連結物之 DAR 為 2.8(藉由 UV-Vis，使用莫耳消光係數 $\epsilon_{330\text{ nm}} = 15,484\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ，對於 **1f**， $\epsilon_{280\text{ nm}} = 30,115\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ，且對於 My9-6 抗體， $\epsilon_{280\text{ nm}} = 146,000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)，具有 91.7% 單體(藉由尺寸排阻層析法)、<1% 未連結之遊離藥物化合物(藉由丙酮萃取/逆相 HPLC)，且最終蛋白質濃度為 1.2 mg/mL。

根據實例 7 中所述一般程序，量測抗體-BMPS-**1f** 連結物之活體外效力且資料顯示於第 34 及 35 圖中。抗體-BMPS-**1f** 連結物之效力與抗體-SPDB-**1f** 連結物相當。

實例 15

hu FOLR1-SPDB-**1f** 連結物於帶有 KB 腫瘤之裸小鼠中的活體內功效：

本研究中，在帶有 KB 腫瘤之雌性裸小鼠(一種人類子宮頸癌模型)中研究 hu FOLR1-SPDB-**1f** 之抗腫瘤活性。將 KB 按 1×10^7 個細胞/小鼠以 0.1 mL/小鼠之體積皮下接種至 6 週齡雌性無胸腺裸小鼠右肩上方之區域中。腫瘤細

胞接種後 6 天，依照腫瘤體積將小鼠隨機分組 ($n = 6/\text{組}$)。隨機分組後一天起始治療，且該等組包括給與 PBS(每次注射 200 μL)之對照組，或給與各種劑量(20 至 200 $\mu\text{g/kg}$) hu FOLR1-SPDB-1f (50 $\mu\text{g/kg}$ 經連接之藥物劑量對應於 2.8 mg/kg 抗體劑量)之單次治療組。所有治療之耐受性均良好，且在任一測試組中均未見到體重減輕。圖示出平均腫瘤體積隨時間之變化(第 37 圖)且資料證實了 hu FOLR1-SPDB-1f 連結物之劑量依賴性抗腫瘤活性。據估計最小有效劑量為 $<50 \mu\text{g/kg}$ ，其為最大耐受劑量之約 1/14。

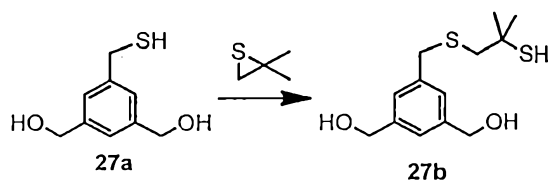
使用本發明其他連結物針對各種其他癌症模型亦已觀察到類似活體內結果，包括 huMy9-6-磺基-SPDB-1f 於帶 MOLM-13 腫瘤小鼠中(第 50 圖)；huMy9-6-磺基-SPDB-1f 於帶 NB4 腫瘤小鼠中(第 51 圖)；huMy9-6-BMPS-1f 於帶 HL60/QC 腫瘤小鼠中(第 52 圖)；huMy9-6-BMPS-1f 於帶 MOLM-13 腫瘤小鼠中(第 53 圖)；huMy9-6-藥物 2 於帶 HL60/QC 腫瘤小鼠中(第 56 圖)；及 huMy9-6-藥物 2 於帶 MOLM-13 腫瘤小鼠中(第 57 圖)。應注意，在第 53、54、56 及 57 圖中，連結物係在亞硫酸氫鈉存在下製備。

為比較所製備之帶有或不帶有亞胺反應性基團之主題連結物的活體內功效，在存在或不存在 50 μM 亞硫酸氫鈉下調配 huMy9-6-藥物 2，且使用該等連結物治療帶有 HL60-QC 腫瘤異種移植物之小鼠。以下資料顯示在存在或不存在 50 μM 亞硫酸氫鈉下調配之連結物在約 20

$\mu\text{g/kg}$ 藥物劑量下顯示出相當的 T/C%，表明在連結物製備步驟中包括亞硫酸氫鈉不會不利地影響主題連結物之活體內效力。

NaHSO ₃	最小有效劑量($\mu\text{g/kg}$ 藥物)	T/C %
-	18	20
+	19	16

實例 16

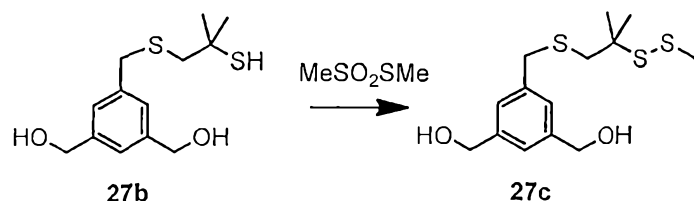


化合物 27b：

(5-((2-巰基-2-甲基丙基硫基)甲基)-1,3-伸苯基)二甲醇：在小瓶中將(5-(巰基甲基)-1,3-伸苯基)二甲醇(0.163 g, 0.885 mmol)溶解於甲醇(3 mL)中且添加攪拌棒。向此溶液中相繼添加三乙胺(0.016 mL, 0.118 mmol)及 2,2-二甲基硫雜環丙烷(0.058 mL, 0.590 mmol)且封蓋所得混合物並在室溫下攪拌隔夜(16 小時)。隨後濃縮反應物，再溶解於二氯甲烷中，裝載至二氧化矽 ptlc 板(1000 微米)上且使用含 10% 甲醇之二氯甲烷使板顯影。刮下對應於產物之譜帶，利用淨乙酸乙酯過濾且濃縮，得到(5-((2-巰基-2-甲基丙基硫基)甲基)-1,3-伸苯基)二甲醇(0.095 g, 0.349 mmol, 59.1% 產率)。¹H NMR (400 Hz, CDCl₃): δ 7.26 (s, 3H), 4.69 (s, 4H), 3.82 (s, 2H), 2.74 (s, 2H), 2.17 (s, 1H), 2.12 (br s, 2H), 1.43 (s, 6H); ¹³C NMR (400 Hz, CDCl₃): δ 141.6, 138.9, 126.7, 124.3, 65.0, 49.0, 45.4, 38.4,

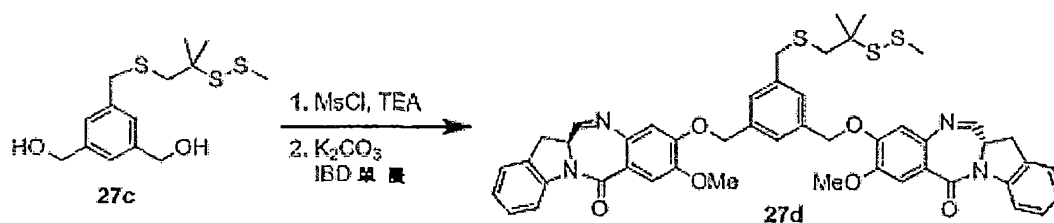
31.5; MS (m/z), 預期值: 272.4, 實驗值 295.0 ($M+Na$)。

參看第 30 圖。



化合物 **27c** :

(5-((2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基硫基)甲基)-1,3-伸苯基)二甲醇: 將(5-((2-巯基-2-甲基丙基硫基)甲基)-1,3-伸苯基)二甲醇(0.120 g, 0.440 mmol)溶解於乙醇(5 mL)及 1.0 M 磷酸鉀緩衝液(pH 7)(5.00 mL)中且在冰浴中冷卻(形成 ppt 但可忽略)。添加 S-甲烷硫代磺酸甲酯(S-methyl methanesulfonothioate)(0.083 mL, 0.881 mmol)且混合物攪拌隔夜, 同時逐漸(經 30 分鐘)升溫至室溫。反應物用二氯甲烷稀釋且移除有機層, 用水洗滌, 經無水硫酸鈉乾燥且真空濃縮。殘餘物溶解於二氯甲烷且裝載至 500 微米 ptlc 板上, 並用含 66% 乙酸乙酯之己烷顯影。刮下對應於產物之譜帶, 使用乙酸乙酯過濾且濃縮, 得到(5-((2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基硫基)甲基)-1,3-伸苯基)二甲醇(0.091 g, 0.286 mmol, 64.9% 產率)。 ^1H NMR (400 Hz, CDCl_3): δ 7.27 (s, 3H), 4.71 (s, 4H), 3.78 (s, 2H), 2.77 (s, 2H), 2.41 (s, 3H), 1.94 (br s, 2H), 1.38 (s, 6H); ^{13}C NMR (400 Hz, CDCl_3): δ 141.6, 139.0, 126.7, 124.2, 65.0, 51.8, 44.0, 38.2, 26.7, 25.3; MS (m/z), 預期值 341.5, 實驗值 341.1 ($M+Na$)。參看第 30 圖。

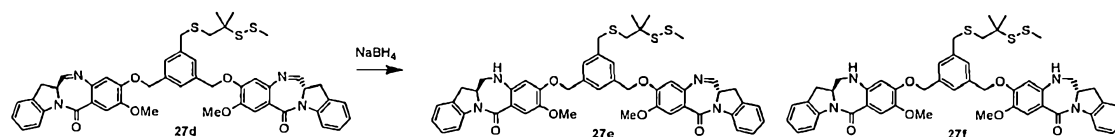


化合物 27d：

在鹽水/冰浴中將溶於無水二氯甲烷 (1.75 mL) 之 (5-((2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基硫基)甲基)-1,3-伸苯基)二甲醇 (80 mg, 0.251 mmol) 冷卻至 -5°C 。在 -5°C 下添加三乙胺 (105 μL , 0.753 mmol)，隨後添加甲烷磺醯氯 (50.7 μL , 0.653 mmol)。在 -5°C 下攪拌反應 1 小時，之後用冷乙酸乙酯稀釋且添加冰。混合物轉移至分液漏斗中且用冷乙酸乙酯萃取。有機萃取物用冰水洗滌，隨後用無水硫酸鎂及硫酸鈉乾燥，過濾且減壓濃縮。所得 (5-((2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基硫基)甲基)-1,3-伸苯基)雙(亞甲基)二甲烷磺酸酯不經進一步純化即使用。

在環境溫度下將溶於無水 N,N-二甲基甲醯胺 (1.75 mL) 之 IBD 單體 (177 mg, 0.602 mmol) 添加至 (5-((2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基硫基)甲基)-1,3-伸苯基)雙(亞甲基)二甲烷磺酸酯 (119 mg, 0.251 mmol)。添加碳酸鉀 (173 mg, 1.253 mmol) 且在環境溫度下攪拌反應 20 小時。反應混合物用水淬滅且用二氯甲烷萃取。萃取物用鹽水洗滌，隨後用無水硫酸鈉乾燥，過濾且高真空濃縮。粗產物藉由急驟矽膠層析法 (純淨 DCM $\rightarrow$ 2% MeOH/DCM) 純化。合併含產物部分，濃縮且藉由半製備型 RP-HPLC (C18, A=

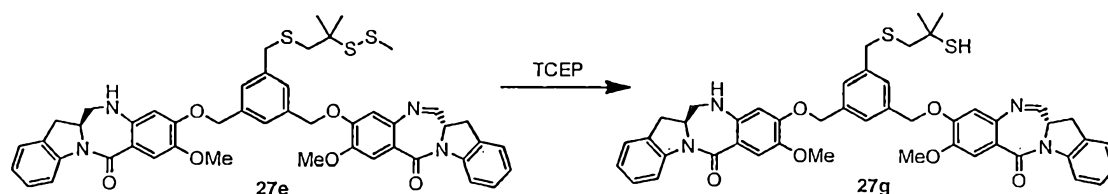
去離子水，B=ACN，20 mL/min)純化。合併含所需產物之部分，用二氯甲烷萃取，用無水硫酸鎂乾燥，過濾且濃縮，得到所需產物(46 mg, 21%)。 ^1H NMR (400 Hz, CDCl_3): δ 8.19 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.77 (m, d, J = 4.4 Hz, 2H), 7.50 (s, 2H), 7.34 (s, 1H), 7.31 (s, 2H), 7.19 (m, 4H), 7.03 (t, J = 7.2, 7.6 Hz, 2H), 6.77 (s, 2H), 5.14 (m, 4H), 4.40 (m, 2H), 3.91 (s, 6H), 3.70 (m, 2H), 3.63 (m, 2H), 3.41 (m, 2H), 2.65 (s, 2H), 2.29 (s, 3H), 1.26 (s, 6H)。MS (m/z), 計算值 893.2 ($M+\text{Na}$) $^+$; 實驗值 893.2 ($M + \text{Na}$) $^+$, 911.2 ($M + \text{H}_2\text{O} + \text{Na}$) $^+$, 929.2 ($M + 2\text{H}_2\text{O} + \text{Na}$) $^+$, 945.1 ($M + 2\text{H}_2\text{O} + \text{K}$) $^+$ 。參看第 30 圖。



化合物 27e 及 27f：

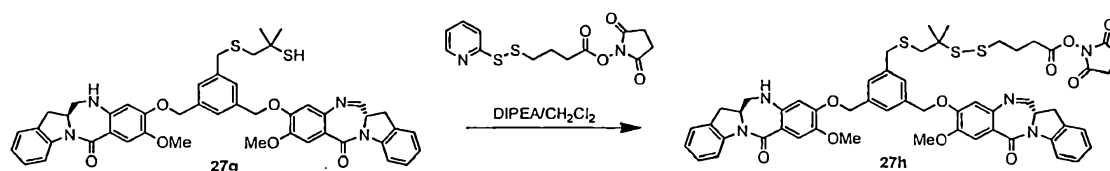
向 27d(50 mg, 0.057 mmol)於無水二氯甲烷(225 μL)及乙醇(450 μL)中之冷溶液(0 $^\circ\text{C}$)中添加硼氫化鈉(0.651 mg, 0.017 mmol)。在 0 $^\circ\text{C}$ 下攪拌反應 5 分鐘，隨後在環境溫度下攪拌 2.5 小時。反應混合物冷卻至 0 $^\circ\text{C}$ ，用飽和氯化銨淬滅且用二氯甲烷萃取。有機萃取物用鹽水洗滌，經無水硫酸鈉乾燥，濾過矽藻土且濃縮。粗物質藉由半製備型 RP-HPLC(C18，A=去離子水，B=ACN，20 mL/min)純化。合併含所需產物之部分，用二氯甲烷萃取，用無水硫酸鎂乾燥，過濾且濃縮，得到經單還原之胺 27e(11 mg,

22%), MS (m/z), 計算值 $895.3 (M+Na)^+$, 實驗值 $895.2 (M + Na)^+$, $913.2 (M + H_2O + Na)^+$, $929.2 (M + H_2O + K)^+$, 及雙還原之胺 27f(5 mg, 10%) MS (m/z), 計算值 $897.3 (M+Na)^+$, 實驗值 $897.3 (M + Na)^+$ 。參看第 30 圖。



化合物 27g :

向經攪拌之 27e(10 mg, 0.011 mmol)於甲醇(733 μ L)及乙腈(880 μ L)中之溶液中添加含參(2-羧基乙基)膦鹽酸鹽(9.85 mg, 0.034 mmol)之緩衝液 6.5(147 μ L)。混合物在環境溫度下攪拌 3 小時。反應用二氯甲烷稀釋。添加水且分離各層。有機層用鹽水洗滌，用無水硫酸鈉乾燥，過濾且減壓濃縮，得到化合物 27g(9 mg, 95%)。MS (m/z), 計算值 $849.3 (M+Na)^+$; 實驗值 $849.2 (M + Na)^+$, $867.2 (M + K)^+$ 。參看第 30 圖。

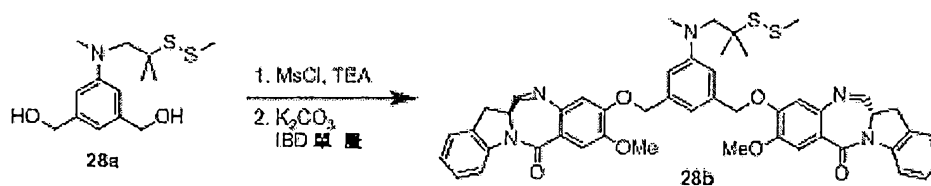


化合物 27h :

向經攪拌之 27g(9 mg, 10.88 μ mol)及 4-(吡啶-2-基二硫烷基)丁酸 2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯(9.3 mg, 0.023 mmol)於無水二氯甲烷(0.4 mL)中之溶液中添加無水二異丙基乙胺(9 μ l, 0.054 mmol)且在室溫下攪拌反應隔夜。混合物用飽和氯化銨溶液淬滅且用二氯甲烷萃取。萃取

物用鹽水洗滌，用無水硫酸鈉乾燥且減壓濃縮。殘餘物藉由製備型逆相 HPLC(C18 管柱，CH₃CN/H₂O)純化。合併含產物部分，用二氯甲烷萃取且蒸發，得到化合物 **27h**(5 mg, 44%)。MS (*m/z*)，計算值 1064.3 (*M* + Na)⁺；實驗值 1064.1 (*M* + Na)⁺, 1082.1 (*M* + H₂O + Na)⁺, 1098.1 (*M* + H₂O + K)⁺。參看第 30 圖。

實例 17

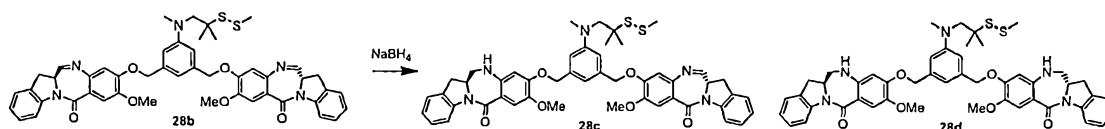


化合物 **28b**：

將 (5-(甲基(2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基)胺基)-1,3-伸苯基)二甲醇 (52 mg, 0.172 mmol) 溶解於無水二氯甲烷 (1.7 mL) 中且在丙酮/冰浴中冷卻至 -5。先添加三乙胺 (0.120 mL, 0.862 mmol)，隨後添加甲烷磺醯氯 (0.040 mL, 0.517 mmol)。在該浸浴中攪拌混合物 1 小時。反應物隨後用冷乙酸乙酯稀釋且用冷水洗滌 3 次，隨後經無水硫酸鎂乾燥。過濾二甲磺酸酯，真空濃縮且置於高真空下，直至完全乾燥。產物以原樣直接用於下一步驟。

在環境溫度下將溶於無水 N,N-二甲基甲醯胺 (1.5 mL) 之 IBD 單體 (115 mg, 0.39 mmol) 添加至 (5-(甲基(2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基)胺基)-1,3-伸苯基)雙(亞甲基)二甲磺酸酯 (72 mg, 0.156 mmol) 中。添加碳酸鉀 (108 mg,

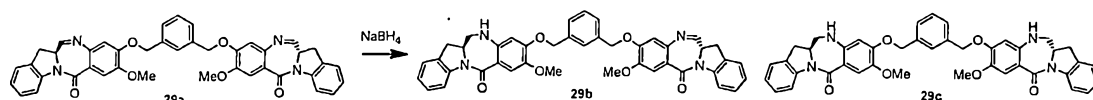
0.780 mmol)且在環境溫度下攪拌反應 20 小時。在攪拌下，將水(10 mL)直接添加至混合物，形成白色沈澱。過濾混合物且再用數份水洗滌固體。固體隨後溶解於二氯甲烷中，用水萃取，有機層隨後經無水硫酸鈉乾燥，過濾且真空濃縮，得到化合物 **28b**(104 mg, 78%)，不經進一步處理即用於下一步驟中。MS (m/z)，實驗值 912.1 ($M + 2H_2O + Na$)。參看第 31 圖。



化合物 **28c** 及 **28d**：

將化合物 **28b**(55 mg, 0.064 mmol)溶解於二氯甲烷(0.4 mL)及乙醇(0.8 mL)之無水混合物中且在冰浴中冷卻至 0 °C。隨後添加溶解於乙醇(100 μ l)中之硼氫化鈉(0.731 mg, 0.019 mmol)溶液，攪拌混合物 5 分鐘且移除冰浴。攪拌反應 2 小時，在低溫下藉由添加飽和氯化銨及二氯甲烷淬滅，分離且有機層用鹽水洗滌，經無水硫酸鈉乾燥，過濾且真空濃縮。殘餘物藉由半製備型 RP-HPLC(C18, A=去離子水, B=ACN, 20 mL/min)純化。含所需產物部分用二氯甲烷萃取且濃縮，得到單亞胺 **28c**(19 mg, 32%) MS (m/z)，預期值 855.1，實驗值 896.2 ($M + H_2O + Na$)，及雙還原胺 **28d**(22 mg, 38%) MS (m/z)，預期值 857.1，實驗值 880.2 ($M + Na$)⁺。參看第 31 圖。

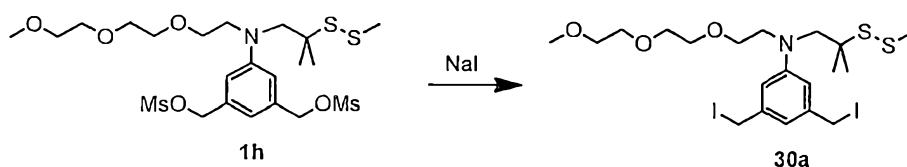
實例 18



化合物 29b 及 29c：

將化合物 29a (60 mg, 0.043 mmol) 溶解於二氯甲烷 (0.25 mL) 及乙醇 (0.5 mL) 之無水混合物中且在冰浴中冷卻至 0℃。隨後添加溶解於乙醇 (50 μL) 中之硼氫化鈉 (0.493 mg, 0.013 mmol) 溶液，混合物攪拌 5 分鐘，並移除冰浴。攪拌反應 3 小時，在低溫下藉由添加飽和氯化銨及二氯甲烷淬滅，分離且有機層用鹽水洗滌，經無水硫酸鈉乾燥，過濾且真空濃縮。殘餘物藉由半製備型 RP-HPLC (C18, A=去離子水, B=ACN, 20 mL/min) 純化。含所需產物部分用二氯甲烷萃取且濃縮，得到單亞胺 29b (20 mg, 33%) MS (m/z), 預期值 715.7, 實驗值 715.2 (M + Na)⁺, 733.2 (M + H₂O + Na)⁺, 749.2 (M + H₂O + K)⁺, 及雙還原胺 29c (12 mg, 20%) MS (m/z), 預期值 694.7, 實驗值 717.2 (M + Na)⁺。參看第 32 圖。

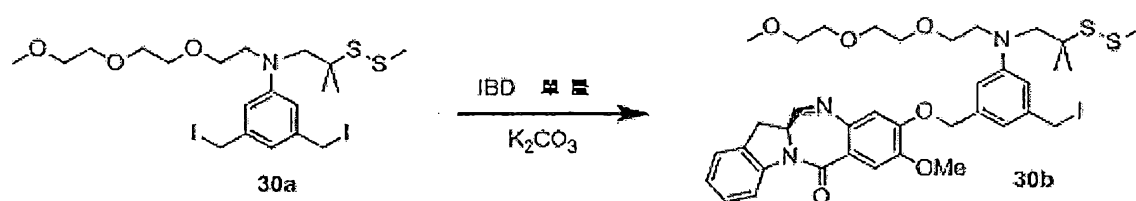
實例 19



化合物 30a：

將 (5-((2-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)乙基)(2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基)胺基)-1,3-伸苯基)雙(亞甲基)二甲烷磺酸酯 (0.566 g, 0.960 mmol) 溶解於丙酮 (30 mL) 中且在用力攪拌下，添加碘化鈉 (0.544 g, 3.63 mmol) 溶解

於丙酮(2 mL)中之溶液。藉由 tlc(含 50%乙酸乙酯之己烷)監測反應且 2 小時後，過濾反應物，真空濃縮且將二氯甲烷添加至殘餘物。過濾留下之固體鹽，濃縮濾液且所得殘餘物在矽膠上使用 3:5:2 之乙酸乙酯:己烷:二氯甲烷之混合物純化，得到黃色油狀之 3,5-雙(碘甲基)-N-(2-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)乙基)-N-(2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基)苯胺(0.505 g, 0.773 mmol, 74.5% 產率)。¹H NMR (400 Hz, CDCl₃): δ 6.75 (s, 2H), 6.73 (s, 1H), 4.38 (s, 4H), 3.63 (m, 14H), 3.40 (s, 3H), 2.50 (s, 3H), 1.38 (s, 6H); ¹³C NMR (400 Hz, CDCl₃): δ 148.7, 140.3, 117.3, 113.4, 71.9, 70.7, 70.6, 67.2, 59.8, 59.1, 53.5, 53.4, 51.8, 26.5, 25.6, 6.11; MS (m/z), 計算值 676.0 (M + Na)⁺; 實驗值 675.8 (M + Na)⁺。參看第 33 圖。



化合物 **30b** :

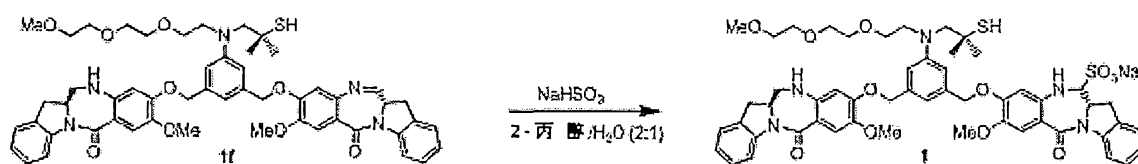
在小瓶中，將 IBD 單體(0.060 g, 0.204 mmol)溶解於丙酮(4 mL)中，添加攪拌棒，隨後添加 3,5-雙(碘甲基)-N-(2-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)乙基)-N-(2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基)苯胺(0.167 g, 0.255 mmol)及碳酸鉀(0.070 g, 0.510 mmol)。封蓋小瓶且在室溫下攪拌隔夜。濾出固體且濃縮濾液。殘餘物溶解於二氯甲烷中，用水萃取且有機層經無水硫酸鈉乾燥，過濾且真空濃

縮，得到 108 mg 粗物質。在矽膠上使用 30% 乙酸乙酯純化粗物質以移除二碘起始物質，隨後在矽膠上使用含 10% 甲醇之二氯甲烷純化，得到所需產物 **30b** (21 mg, 0.026 mmol, 13%)。MS (m/z)，預期值 819.1，實驗值 858.0 ($M + K$)⁺, 890.0 ($M + CH_3OH + K$)⁺。參看第 33 圖。

化合物 **1d**：

在小瓶中，將還原單體 **3b** (4.16 mg, 0.014 mmol) 溶解於丙酮 (2 ml) 中，添加攪拌棒，隨後添加 **30b** (10 mg, 0.012 mmol) 及碳酸鉀 (4.21 mg, 0.030 mmol)。封蓋小瓶且在室溫下攪拌隔夜。濃縮反應物以移除丙酮，隨後再溶解於二氯甲烷中，用水萃取，經無水硫酸鈉乾燥，過濾且真空濃縮。殘餘物藉由逆相 C18 HPLC 純化，得到 **1d** (2.1 mg, 2.125 μ mol, 17.42% 產率)。MS (m/z): 實驗值 1010.4 ($M + Na$)⁺, 1028.4 ($M + H_2O + Na$)⁺。參看第 33 圖。

實例 20 化合物 **1** 之合成

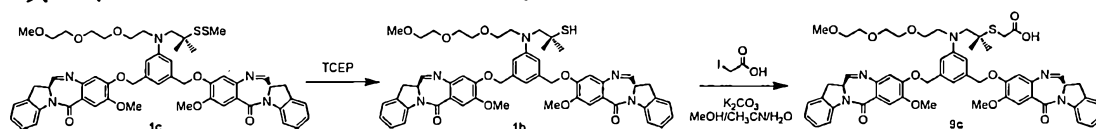


化合物 **1**：

向經攪拌之 **1f** (226 mg, 0.24 mmol) 於 IPA (20 mL) 及去離子水 (10 mL) 中之懸浮液中添加亞硫酸氫鈉 (50 mg, 0.48 mmol)。混合物在室溫下用力攪拌 2 小時。用乾冰/丙酮冷凍且凍乾。所得白色蓬鬆固體溶解於 CH_3CN/H_2O 中且藉由逆相 HPLC (C18 管柱, CH_3CN/H_2O) 純化。合併含所需

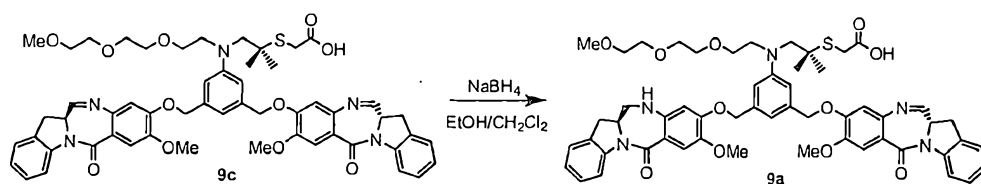
產物部分，且用乾冰/丙酮冷凍並凍乾，得到白色蓬鬆固體狀之所需化合物 **1** (179.6 mg, 5 = 71.6%)。MS (m/z): 實驗值 1022.0 ($M - H$)⁻。參看第 38 圖。

實例 21 化合物 **9c** 之合成



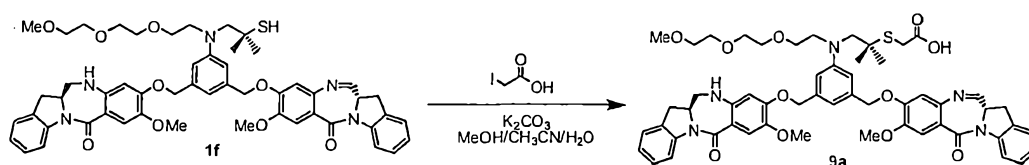
化合物 **9c** :

在室溫下向經攪拌之 **1c** (60 mg, 0.061 mmol) 於 CH₃CN (3 mL) 中之溶液中添加新製的 TCEP 溶液 (49 mg, 0.17 mmol TCEP 鹽酸鹽用飽和碳酸氫鈉中和至 pH ~6.5，隨後用 0.5 mL pH 6.5 磷酸鹽緩衝液稀釋)。添加 MeOH (2.5 mL) 且混合物在室溫下攪拌 3 小時。反應混合物用二氯甲烷及去離子水稀釋，分離且有機層用鹽水洗滌，經無水 Na₂SO₄ 乾燥並過濾。洗提濾液並抽高真空，得到 60 mg 淺黃色泡沫狀之 **1h**。MS (m/z): 實驗值 940.1 ($M + H$)⁺。將其溶解於甲醇 (1.0 mL) 及 CH₃CN (1.4 mL) 中，隨後添加碘乙酸 (24 mg, 0.13 mmol)、去離子水 (0.1 mL) 及碳酸鉀 (27 mg, 0.19 mmol)。混合物在室溫下攪拌隔夜 (藉由 LCMS 監測)。用飽和氯化銨淬滅，使溶液呈酸性，隨後用二氯甲烷稀釋，分離且用鹽水洗滌，經無水 Na₂SO₄ 乾燥，過濾且洗提，得到化合物 **9c** (57.8 mg, $y = 91\%$)，不經純化即直接用於下一步驟。MS (m/z): 實驗值 998.1 ($M + H$)⁺。參看第 12A 圖。



化合物 9a :

在 0°C 下向經攪拌之化合物 9c (57.8 mg, 0.058 mmol) 於無水二氯甲烷 (0.2 mL) 及無水乙醇 (0.6 mL) 中之溶液中添加 NaBH₄ (2.5 mg, 0.066 mmol)。移除冰浴且混合物在室溫下攪拌 3 小時，隨後用飽和氯化銨淬滅，用二氯甲烷稀釋，分離且有機層用鹽水洗滌，經無水 Na₂SO₄ 乾燥且濾過矽藻土並洗提。殘餘物藉由逆相 HPLC (C18 管柱，CH₃CN/H₂O) 純化。產物部分用二氯甲烷萃取且洗提，得到化合物 9a (13.0 mg, *y* = 22%)。MS(*m/z*): 實驗值 1000.0 (*M* + *H*)⁺, 1015.9 (*M* + H₂O - *H*)⁻。參看第 12A 圖。

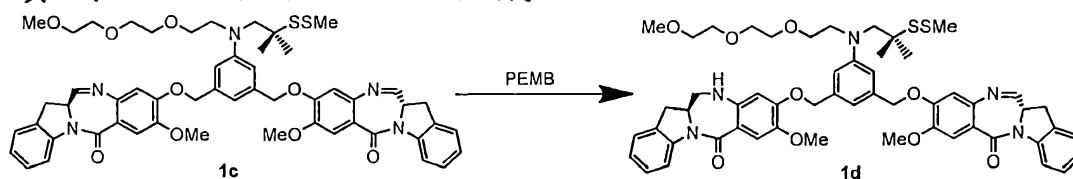


化合物 9a :

向遊離硫醇 1f (45 mg, 0.048 mmol) 及碘乙酸 (18 mg, 0.096 mmol) 於甲醇 (1.0 mL) 及 CH₃CN (1.4 mL) 中之溶液中添加去離子水 (0.1 mL) 及碳酸鉀 (20 mg, 0.14 mmol)。混合物在室溫下攪拌隔夜 (藉由 LCMS 監測)。用飽和氯化銨淬滅，使溶液呈酸性，隨後用二氯甲烷稀釋，分離且用鹽水洗滌，經無水 Na₂SO₄ 乾燥，過濾且洗提。殘餘物藉由製備型逆相 HPLC (C18, CH₃CN/H₂O) 純化。純產物部分 (基於 MS 確定) 用二氯甲烷萃取，洗提，得到所需酸 9a (18 mg,

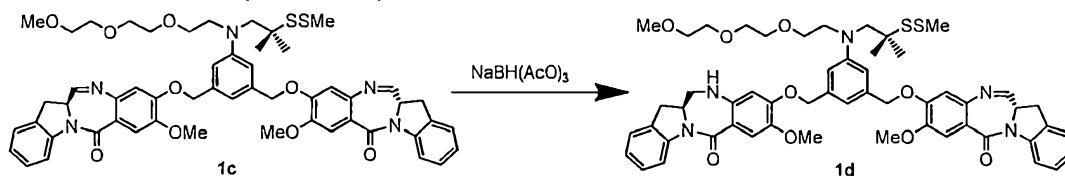
$y = 38\%$)。MS(m/z): 實驗值 $1000.1(M + H)^+$ 。參看第 12B 圖。

實例 22 化合物 1d 之合成



化合物 1d :

向經攪拌之化合物 **1c** (178 mg, 0.18 mmol) 於無水二氯甲烷 (1.2 mL) 及無水乙醇或無水甲醇 (0.1 mL) 中之溶液中逐滴添加 5-乙基-2-甲基吡啶硼烷 (PEMB, 0.017 mL, 0.11 mmol)。混合物在室溫下攪拌 1 小時且用 88% 甲酸淬滅。用飽和 NaHCO_3 鹼化且用二氯甲烷稀釋，分離且有機層用鹽水洗滌，經無水 Na_2SO_4 乾燥且濾過矽藻土並洗提。殘餘物溶解於 $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/88\% \text{HCOOH}$ (5:1:0.05) 中且藉由逆相 HPLC (C_{18} , $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$) 純化。含純產物部分用二氯甲烷萃取且洗提，得到化合物 **1d** (56 mg, $y = 31\%$)。MS(m/z): 實驗值 $988.1(M + H)^+$ 。參看第 39 圖。

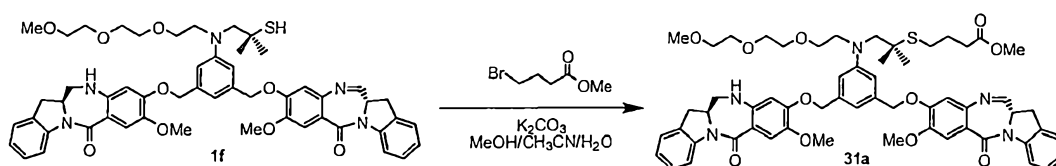


化合物 1d :

向經攪拌之化合物 **1c** (71 mg, 0.072 mmol) 於無水 1,2-二氯乙烷 (0.8 mL) 中之溶液中添加三乙醯氧基硼氫化鈉 (14 mg, 0.65 mmol)。混合物在室溫下攪拌 2 小時且用飽和 NaHCO_3 淬滅並用二氯甲烷稀釋，分離且有機層用鹽水

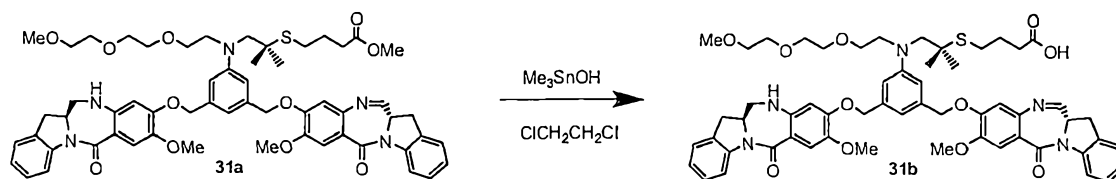
洗滌，經無水 Na_2SO_4 乾燥，濾過矽藻土且洗提。殘餘物溶解於 $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/88\% \text{HCOOH}(5:1:0.05)$ 中且藉由逆相 HPLC(C_{18} , $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$) 純化。含純產物部分用二氯甲烷萃取且洗提，得到化合物 **1d** (17 mg, $y = 24\%$)。MS(m/z): 實驗值 988.1($\text{M} + \text{H}$)⁺。亦回收未反應之起始物質 **1c** (24 mg, $y = 34\%$)。參看第 40 圖。

實例 23 化合物 **31c** 之合成



化合物 **31a** :

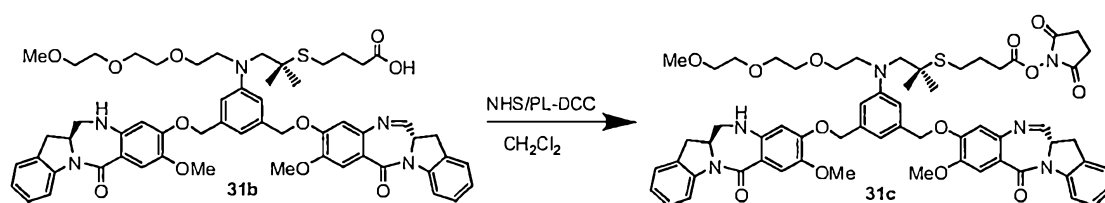
向化合物 **1f** (57.8 mg, 0.061 mmol) 及 4-溴丁酸甲酯 (22 mg, 0.12 mmol) 於甲醇 (1.0 mL) 及 CH_3CN (1.0 mL) 中之溶液中添加去離子水 (0.1 mL) 及碳酸鉀 (17 mg, 0.12 mmol)。混合物在室溫下攪拌隔夜，隨後用飽和氯化銨淬滅並用二氯甲烷稀釋，分離且用鹽水洗滌，經無水 Na_2SO_4 乾燥，過濾且洗提。殘餘物藉由製備型逆相 HPLC(C_{18} , $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$) 純化，得到淺黃色泡沫狀之所需產物 **31a** (14 mg, $y = 22\%$)。MS(m/z): 實驗值 1042.1($\text{M} + \text{H}$)⁺。參看第 41 圖。



化合物 **31b** :

向甲基酯 **31a** (14 mg, 0.013 mmol) 於無水 1,2-二氯乙烷

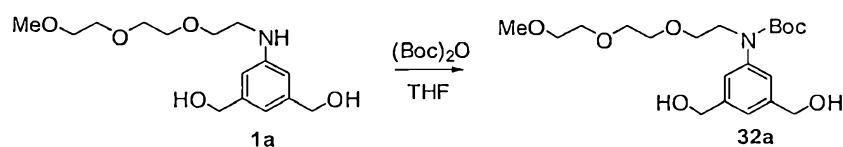
(1.5 mL)中之溶液中添加三甲基氫氧化錫(36 mg, 0.2 mmol)。混合物在 80°C 油浴中攪拌隔夜，直至起始物質完全消耗。冷卻至室溫，用二氯甲烷稀釋，用鹽水/數滴 5% HCl 及鹽水洗滌，乾燥並過濾。洗提濾液且用矽膠層析法(二氯甲烷/MeOH)純化，得到淺黃色固體狀之酸 **31b**(10.2 mg, $y = 74\%$)。MS(m/z): 實驗值 $1028.2(M + H)^+$, $1044.1(M + H_2O - H)^-$ 。參看第 41 圖。



化合物 **31c**：

向酸 **31b**(10.2 mg, 0.0099 mmol)於無水二氯甲烷(0.5 mL)中之溶液中添加 N-羥基琥珀醯亞胺(3.4 mg, 0.03 mmol)及 PL-DCC(26 mg, 0.04 mmol, 1.55 mmol/g)。混合物在室溫下攪拌隔夜並過濾以移除樹脂。樹脂用二氯甲烷隨後用乙酸乙酯洗滌。洗提濾液且殘餘物藉由逆相 HPLC(C18, CH₃CN/H₂O)純化。合併含產物部分並凍乾，得到白色固體狀之 NHS 酯 **31c**(3.6 mg, $y = 32\%$)。MS(m/z): 實驗值 $1125.1(M + H)^+$ 。參看第 41 圖。

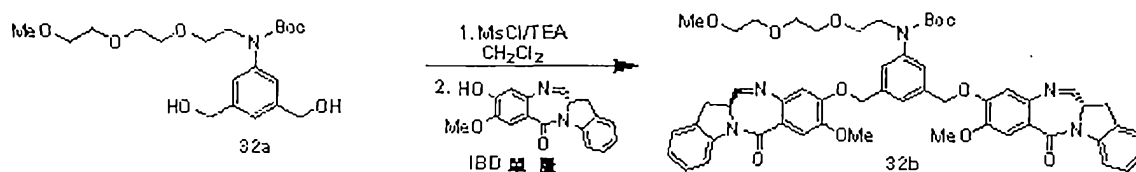
實例 24 化合物 **32c** 之合成



化合物 **32a**：

向經攪拌之苯胺 **1a**(339 mg, 1.1 mmol)於無水四氫呋

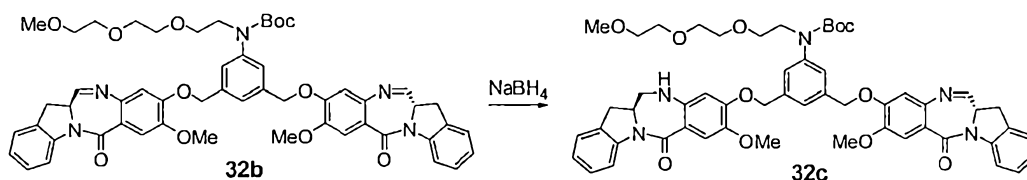
喃(4.0 mL)中之溶液中添加 Boc 酐(272 mg, 1.2 mmol)。混合物繼續在室溫下攪拌 3 天。減壓濃縮反應混合物且殘餘物藉由矽膠層析法($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$)純化，得到無色油狀之化合物 **32a**(405 mg, $y = 90\%$)。 ^1H NMR (400 Hz, CDCl_3): δ 7.00 (s, 2H), 6.97 (s, 1H), 4.38 (s, 4H), 4.12 (s, 2H), 3.64 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 3.48-3.44 (m, 8H), 3.40-3.38 (m, 2H), 3.21 (s, 3H), 1.31 (s, 9H); ^{13}C NMR (400 Hz, CDCl_3): δ 154.65, 142.3, 142.1, 124.1, 122.7, 80.2, 71.6, 70.3, 70.1, 69.9, 68.5, 63.9, 58.65, 49.4, 28.1。參看第 42 圖。



化合物 **32b**：

在 -5 至約 -10°C 下向經攪拌之化合物 **32a**(51 mg, 0.128 mmol)於無水二氯甲烷中之溶液中添加三乙胺(0.053 mL, 0.383 mmol)。隨後用注射器在 15 分鐘內緩慢添加甲烷磺醯氯(0.026 mL, 0.332 mmol)。混合物在 -5 - 10°C 下攪拌 1 小時(TLC, DCM/MeOH 10:1)。反應物用冰/水淬滅，用冷 AcOEt 稀釋，分離且有機層用冷水洗滌，經無水 $\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{MgSO}_4$ 乾燥，過濾且洗提。殘餘物轉移至含二氯甲烷之小反應燒瓶中，洗提並抽高真空。將其溶解於無水 DMF(0.8 mL)中，隨後添加 IBD 單體(90 mg, 0.31 mmol)及鉀(53 mg, 0.38 mmol)。混合物在室溫下攪拌隔夜。用

二氯甲烷稀釋，用鹽水洗滌，經無水硫酸鈉乾燥，過濾且洗提。殘餘物藉由逆相 HPLC(C18, CH₃CN/H₂O)純化，得到淺黃色固體狀之化合物 **32b**(56 mg, 46%)。%)。 ¹H NMR (400 Hz, CDCl₃): δ 8.29 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.87 (d, J = 4.8 Hz, 2H), 7.60 (s, 2H), 7.38-7.36 (m, 3H), 7.33-7.27 (m, 4H), 7.13 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 6.88 (s, 2H), 5.21 (dd, J₁ = 20.0 Hz, J₂ = 12.4 Hz, 4H), 4.49 (dt, J₁ = 11.2 Hz, J₂ = 4.0 Hz, 2H), 3.99 (s, 6H), 3.83 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 3.76-3.48 (m, 14H), 3.35 (s, 3H), 1.43 (s, 9H); MS (m/z): 實驗值 992.2 (M + H₂O + Na)⁺, 1010.2 (M + 2H₂O + Na)⁺。參看第 42 圖。



化合物 **32c**：

在 0°C 下向經攪拌之化合物 **32b**(56 mg, 0.059 mmol)於無水二氯甲烷(0.3 mL)及無水乙醇(0.9 mL)中之溶液中添加 NaBH₄(2.7 mg, 0.07 mmol)。移除冰浴且混合物在室溫下攪拌 3 小時，隨後用飽和氯化銨淬滅，用二氯甲烷稀釋，分離且有機層用鹽水洗滌，經無水 Na₂SO₄乾燥，濾過矽藻土且洗提。殘餘物藉由逆相 HPLC(C18 管柱，CH₃CN/H₂O)純化。回收之起始物質 **32b** 重 12 mg，使其再經歷反應條件且藉由逆相 HPLC 純化。所有含純產物之部分用二氯甲烷萃取且洗提，得到淺黃色固體狀之化合物 **32c**(20.7 mg, γ = 37%)。MS(m/z): 實驗值 954.2(M +

H)⁺。參看第 42 圖。

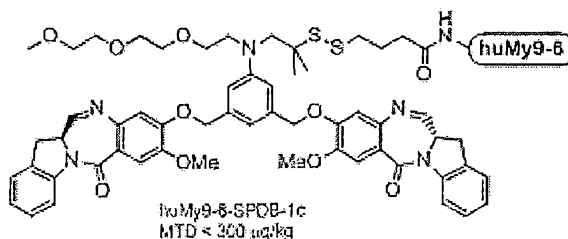
實例 25

在雌性 CD-1 小鼠中研究 huMy9-6 連結物之耐受性。在研究起始前持續 7 天觀察動物且發現無疾病或病痛。對小鼠經單次靜脈內注射投予連結物且每日監測動物之體重減輕、發病率或死亡率。表 10 顯示，含二亞胺二硫化物之連結物 huMy9-6-SPDB-1c 在低於 300 $\mu\text{g/kg}$ 之劑量下具有耐受性。相比之下，發現單亞胺二硫化物連結物 huMy9-6-SPDB-1f 及 huMy9-6-磺基-SPDB-1f 之耐受性更佳，最大耐受劑量分別在 >729 $\mu\text{g/kg}$ 及 <750 $\mu\text{g/kg}$ 。

表 10. (A) huMy9-6-SPDB-1c、(B) huMy9-6-SPDB-1f、(C) huMy9-6-磺基-SPDB-1f 及 (D) huMy9-6-BMPS-1f 連結物之耐受性比較資料。

A)

劑量 $\mu\text{g/kg}$	存活率%
100	100
300	50
500	0
700	0



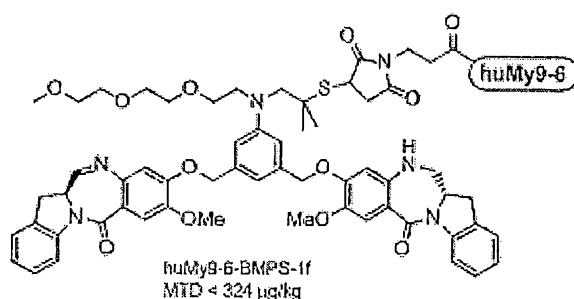
B)



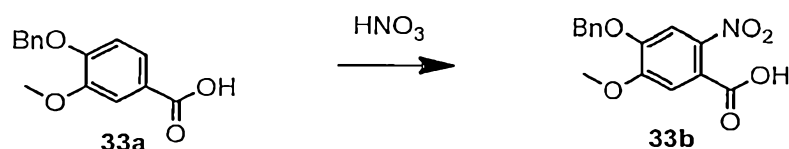
劑量 μ g/kg)	存活率%
450	100
600	100
750	88
900	50



劑量 μ g/kg)	存活率%
100	100
200	100
284	100
324	83
405	50



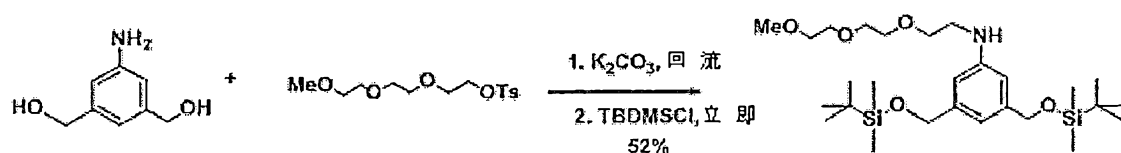
實例 26



化合物 33b：

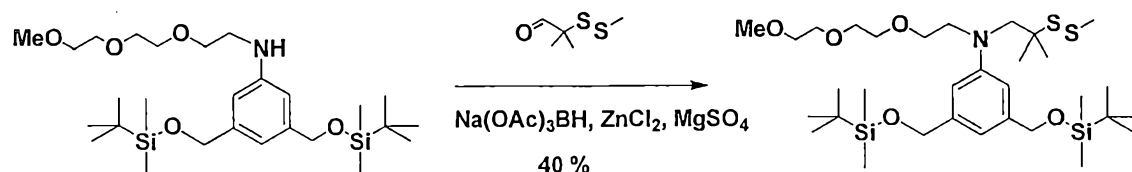
添加化合物 33a (20 g, 77 mmol) 於無水二氯甲烷 (100 mL) 中之濃稠懸浮液且冷卻至 0°C。添加乙酸 (191 mL)，產生澄清溶液，在 0°C 下攪拌直至冷卻。經由加液漏斗緩慢逐滴添加硝酸 (26 mL, 581 mmol)。移除冰浴且溶液繼續在室溫下攪拌。3 小時後，反應物用去離子水稀釋且用二氯甲烷萃取。有機層用鹽水洗滌，經無水硫酸鎂乾燥且真空濃縮濾液。粗殘餘物使用乙酸乙酯及己烷再結晶。過濾固體且用洗滌己烷，得到黃色蓬鬆固體狀之化合物 33b (13.8g, $y = 59\%$)。¹H NMR (400 Hz, CDCl₃): δ 7.48-7.43 (m, 6H), 7.25 (s, 1H), 5.25 (s, 2H), 4.02 (s, 3H), MS (m/z): 326.1 (M + Na)⁺。參看第 45 圖。

實例 27



3,5-雙(((第三丁基二甲基矽烷基)氧基)甲基)-N-(2-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)乙基)苯胺：

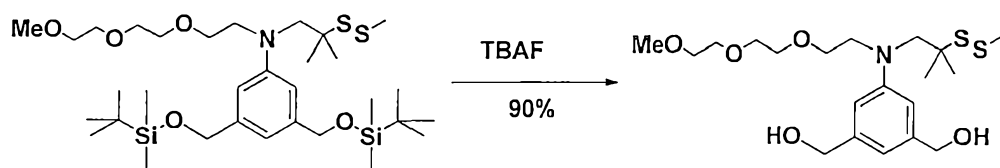
使(5-胺基-1,3-伸苯基)二甲醇(11.78 g, 77 mmol)、4-甲基苯磺酸 2-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)乙酯(15.3 g, 48.1 mmol)及碳酸鉀(13.28 g, 96 mmol)於 DMF(96 ml)中之混合物回流 20 小時。反應物冷卻至環境溫度且用二氯甲烷稀釋。混合物濾過矽藻土且真空濃縮。將所得橙色油狀物溶解於二氯甲烷(240 ml)中且添加第三丁基二甲基矽烷基氯(18.09 g, 120 mmol)及咪唑(9.80 g, 144 mmol)。反應在環境溫度下攪拌 20 小時，此時用二氯甲烷稀釋且濾過矽藻土。藉由矽膠層析法(EtOAc/己烷)純化，得到 3,5-雙(((第三丁基二甲基矽烷基)氧基)甲基)-N-(2-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)乙基)苯胺(13 g, 52%)。¹H NMR (400 Hz, CDCl₃): δ 6.52 (s, 1H), 6.40 (s, 2H), 4.56 (s, 4H), 3.60 (t, 2H, J = 5.2 Hz), 3.56 (m, 6H), 3.46 (m, 2H), 3.29 (s, 3H), 3.20 (t, 2H, J = 5.2 Hz), 0.84 (s, 18H), 0.00 (s, 12H)。MS (m/z): 實驗值 550.1 (M + Na)⁺。參看第 46 圖。



3,5-雙(((第三丁基二甲基矽烷基)氧基)甲基)-N-(2-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)乙基)-N-(tert-butyl)dimethylsulfonamide

基)-N-(2-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)乙基)-N-(2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基)苯胺：

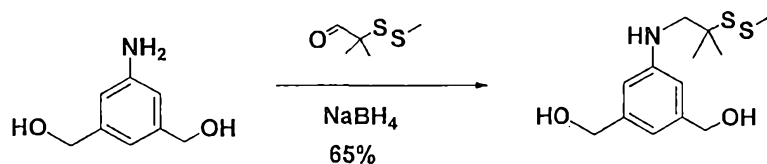
向 3,5-雙(((第三丁基二甲基矽烷基)氧基)甲基)-N-(2-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)乙基)苯胺 (6.7 g, 12.69 mmol) 於無水 1,2-二氯乙烷 (50 ml) 中之溶液中添加 2-(甲基二硫基)異丁醛 (2.74 ml, 19.04 mmol)、三乙醯氧基硼氫化鈉 (2.8 g, 1eq)、氯化鋅(II) (0.865 g, 6.35 mmol) 及硫酸鎂 (2.292 g, 19.04 mmol)。混合物在環境溫度下攪拌 5 小時。添加三乙醯氧基硼氫化鈉 (2.8 g, 1eq)。反應物繼續在環境溫度下攪拌 20 小時。混合物濾過矽藻土，用二氯甲烷沖洗，且減壓濃縮，隨後用乙酸乙酯及水萃取。有機萃取物用鹽水洗滌，經硫酸鎂乾燥，過濾，濃縮且藉由 combiflash (EtOAc/己烷) 純化，得到 3,5-雙(((第三丁基二甲基矽烷基)氧基)甲基)-N-(2-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)乙基)-N-(2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基)苯胺 (3.5 g, 40%)。¹H NMR (400 Hz, CDCl₃): δ 6.73 (s, 2H), 6.59 (s, 1H), 4.56 (s, 4H), 3.65-3.51 (m, 14H), 3.30 (s, 3H), 2.38 (s, 3H), 1.28 (s, 6H), 0.84 (s, 18H), 0.00 (s, 12H). MS (m/z): 實驗值 684.2 (M + Na)⁺。參看第 46 圖。



(5-((2-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)乙基)(2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基)胺基)-1,3-伸苯基)二甲醇 (**1b**)：

在 0°C 冰浴中將氟化四丁基銨(1M 之 THF 溶液)(10.57 ml, 10.57 mmol)逐滴添加至攪拌之 3,5-雙(((第三丁基二甲基矽烷基)氧基)甲基)-N-(2-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)乙基)-N-(2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基)苯胺(3.5 g, 5.29 mmol)於無水 THF(65 ml)中之溶液中。添加後，混合物在環境溫度下攪拌 2 小時。混合物用飽和氯化銨淬滅且用乙酸乙酯萃取。萃取物用水及鹽水洗滌，用硫酸鎂乾燥，過濾且減壓濃縮。藉由矽膠層析法(MeOH/DCM)純化，得到(5-((2-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)乙基)(2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基)胺基)-1,3-伸苯基)二甲醇(2 g, 87%)。¹H NMR (400 Hz, CDCl₃): δ 6.76 (s, 2H), 6.63 (s, 1H), 4.55 (s, 4H), 3.65-3.51 (m, 14H), 3.35 (s, 3H), 2.44 (s, 3H), 1.33 (s, 6H); ¹³C NMR (400 Hz, CDCl₃): δ 149.0, 142.35, 114.0, 111.1, 71.98, 70.7, 70.6, 70.5, 67.6, 65.5, 59.75, 59.1, 53.9, 51.9, 26.6, 25.7, 20.75; MS (m/z): 實驗值 456.2 (M + Na)⁺。參看第 46 圖。

實例 28



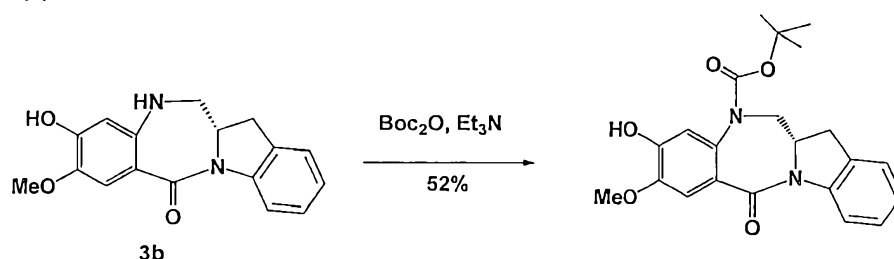
(5-(2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基胺基)-1,3-伸苯基)二甲醇：

在環境溫度下，在無水乙醇(82 ml)中攪拌(5-胺基-1,3-伸苯基)二甲醇(2.5 g, 16.32 mmol)及 2-(甲基二硫基)異丁

醛 (2.347 ml, 16.32 mmol) 直至完全溶解 (3 小時)。混合物在冰浴中冷卻至 0°C 且添加硼氫化鈉 (0.741 g, 19.59 mmol)。在 0°C 下攪拌反應 1 小時，隨後用冷 5% HCl 溶液緩慢淬滅。混合物用二氯甲烷稀釋且 pH 用飽和碳酸氫鈉溶液調至 pH=8，隨後用二氯甲烷萃取，隨後用鹽水洗滌。有機萃取物經無水硫酸鈉乾燥，過濾且減壓濃縮。藉由矽膠層析法 (MeOH/DCM) 純化，得到白色固體狀之 (5-(2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基胺基)-1,3-伸苯基) 二甲醇 (3 g, 65%)。

^1H NMR (400 Hz, CDCl_3): δ 6.62 (s, 1H), 6.54 (s, 2H), 4.53 (s, 4H), 3.13 (s, 2H), 2.30 (s, 3H), 1.32 (s, 6H)。參看第 47 圖。

實例 29



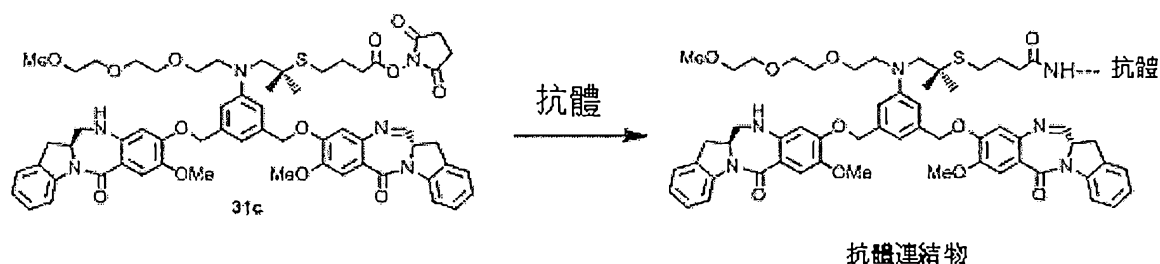
9-羥基-8-甲氧基-6-側氧基-12a,13-二氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮吡并[1,2-a]吡啶-11(12H)-甲酸第三丁酯：

向 9-羥基-8-甲氧基-11,12,12a,13-四氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮吡并[1,2-a]吡啶-6-酮 **3b** (0.3 g, 1.012 mmol) 於甲醇 (5.06 ml) 中之溶液中添加二碳酸二-第三丁酯 (0.265 g, 1.215 mmol)、三乙胺 (0.212 ml, 1.519 mmol) 及 DMAP (6.18 mg, 0.051 mmol)。在環境溫度下攪拌 5 小時

後，真空濃縮反應混合物。殘餘物再溶解於二氯甲烷中且濾過矽藻土。藉由矽膠層析法(20% EtOAc/DCM)純化，得到白色固體狀之 9-羥基-8-甲氧基-6-側氧基-12a,13-二氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮呋并[1,2-a]吡啶-11(12H)-甲酸第三丁酯(0.21 g, 52%)。¹H NMR (400 Hz, CDCl₃): δ 8.25 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.18 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 7.11 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 6.98 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 6.39 (s, 1H), 4.37 (m, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.42 (m, 3H), 2.74 (dd, J = 3.6, 16.4 Hz, 1H), 1.47 (s, 9H)。參看第 48 圖。

實例 30

huMy9-6-31c 之製備及測試



使含有溶於 50 mM HEPES(4-(2-羥基乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸) pH 8.5 緩衝液及 10% v/v DMA(*N,N*-二甲基乙醯胺)共溶劑中之 2.0 mg/mL huMy9-6 抗體及 5 莫耳當量化合物 **31c**(用 5 倍過量之亞硫酸氫鈉於 90:10 DMA:水中之溶液預處理)之反應物在 25°C 下連結 6 小時。反應後，使用 NAP 脫鹽管柱 (Illustra Sephadex G-25 DNA 級，GE Healthcare)，純化連結物且緩衝液交換成 250 mM 甘胺酸、10 mM 組胺酸、1%蔗糖、0.01% Tween、50 μM 亞硫

酸氫鈉調配物緩衝液 pH 6.2。在室溫下，利用 Slide-a-Lyzer 透析盒(ThermoScientific 20,000 MWCO)在相同緩衝液中進行透析 4 小時。

發現純化連結物每一抗體平均連接 3.1 個 IGN 分子(藉由 UV-Vis，使用莫耳消光係數 $\epsilon_{330\text{ nm}} = 15,484\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ，對於 **1**， $\epsilon_{280\text{ nm}} = 30,115\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ，且對於 My9-6 抗體， $\epsilon_{280\text{ nm}} = 207,000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)，具有 98%單體(藉由尺寸排阻層析法)、<0.2%未連結之藥物(藉由雙管柱逆相 HPLC 分析)，且最終蛋白質濃度為 0.4 mg/ml。

huMy9-6 與 **31c** 在兩種不同藥物負荷下之連結物的活體外效力顯示於下文。兩種連結物對抗原陽性 HL60-QC 細胞均高度有效，且 IC_{50} 值介於 1.3-1.8 pM 之間。用 1 μM 未連結之 huMy9-6 阻斷抗原顯著減弱該效力，表明細胞毒性作用之抗原特異性。

連結物	$\text{IC}_{50}(\text{pM})$	$\text{IC}_{50}(\text{pM})$ huMy9-6 阻斷	特異性窗
huMy9-6- 31c			
3.1 IGN/抗體	1.8	940	522
3.9 IGN/抗體	1.3	790	608

實例 31

各種連結物於帶腫瘤裸小鼠中之活體內功效

本研究中，在帶有各種腫瘤之免疫缺陷小鼠(裸小鼠或 SCID 小鼠)，較佳為雌性裸小鼠中研究本發明數種連結物之抗腫瘤活性。在一些情況下，或者或另外，可採用裸大鼠。欲測試之連結物包括本文所述任一種或多種連結物。可用於接種裸小鼠之各種腫瘤細胞株包括

HL60/QC、MOLM-13、NB4、HEL92.1.7、OCI-AML3、KB 及/或此項技術中認可作為適合的疾病適應症(例如癌症)模型的任何其他癌症細胞株。可用於選擇適於活體內評價之腫瘤細胞株的一些標準包括：a)腫瘤細胞上靶抗原之表現，及 b)腫瘤細胞在活體外對未連結之藥物之敏感性。舉例而言，可使用活體外細胞株敏感性篩選法，諸如美國國立癌症協會(U.S. National Cancer Institute)所述之 60-細胞株篩選法(參看 Voskoglou-Nomikos 等人, 2003, Clinical Cance Res. 9; 42227-4239，以引用之方式併入本文中)作為確定適於用本發明化合物治療之癌症之類型的一個準則。相應地量測如以 IC_{50} 值(nM)表示之各種連結物針對各種腫瘤細胞株之效力。

使用與實例 15 中略述實質上相同之方案將各種腫瘤細胞株接種至裸或 SCID 小鼠。舉例而言，將約 $1 \times 10^6 - 5 \times 10^7$ 個腫瘤細胞(通常 1×10^7)/小鼠以約 0.1-0.2 mL/小鼠之體積皮下接種至 6 週齡雌性無胸腺裸小鼠右肩上方之區域中。當腫瘤之平均尺寸達到約 100 mm^3 (通常在腫瘤細胞接種後 6 至 8 天)時，依據腫瘤體積將小鼠隨機分組(例如 $n = 5 - 8$ 只/組)。隨機分組後一天起始治療，且該等組包括給與適宜媒劑(200 μL /注射)之對照組，或給與各種劑量(5 至 700 $\mu\text{g/kg}$)上述藥物連結物(50 $\mu\text{g/kg}$ 經連接之藥物劑量對應於約 2 mg/kg 抗體劑量)之單次治療組。亦可採用多次給藥時程(例如，在第 1 天、第 3 天、第 5 天或第 1 天、第 4 天、第 7 天治療)。

隨時間量測中值及平均腫瘤體積，且資料證實了主題連結物之劑量依賴性抗腫瘤活性。隨後計算最小有效劑量且與最大耐受劑量相比較。

實例 32

使用 4-硝基吡啶基-磺基-SPDB 連接基製備 huMy9-6-磺基-SPDB-1d

在 25°C 下，在 50 mM EPPS 緩衝液 pH 8 中培育含有 6 mg/mL huMy9-6 抗體及 5 莫耳當量高反應性 *N*-琥珀醯亞胺基-4-(4-硝基吡啶基-2-二硫基)丁酸酯連接基(20 mM 之乙醇儲備液)之反應物 3 小時。使用 NAP 脫鹽管柱(Illustra Sephadex G-25 DNA 級，GE Healthcare)移除未反應之連接基。基於抗體濃度及藉由 UV-Vis(於 394 nm = 14205 cm⁻¹M⁻¹，對於 2-硫基-4-硝基吡啶酮)測定之 DTT 釋放之硝基吡啶-2-硫酮濃度，測定連接基與抗體之比率(LAR)為約 2.3。

在 50 mM HEPES 緩衝液 pH 8.5、10% v/v DMA 中將連接基修飾之 huMy9-6 稀釋至 2 mg/mL，並與 2 莫耳當量化合物 1d/連接基(5 mM 之 DMA 儲備液；4.6 當量/抗體)在 25°C 下反應 30 分鐘。藉由用 UV 監測在 394 nm 下吸光度之增加來確定二硫化物交換反應完成。

反應後，使用脫鹽管柱(G-25 Sephadex，精細級，GE Healthcare)純化連結物且緩衝液交換成 250 mM 甘胺酸、10 mM 組胺酸、1%蔗糖、0.01% Tween-20、50 μM 亞硫酸氫鈉，pH 6.2。

發現純化連結物每一抗體連接平均 2.1 個 **1d** 分子(藉由 UV-Vis, 使用莫耳消光係數 $\epsilon_{330\text{ nm}} = 15,484\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, 對於 **1d**, $\epsilon_{280\text{ nm}} = 30,115\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, 且對於 huMy9-6, $\epsilon_{280\text{ nm}} = 207,000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$), 具有 98%單體(藉由尺寸排阻層析法)、<1%未連結之 **1d**(藉由丙酮萃取/逆相 HPLC)、70%蛋白質產率及 32%總 **1d** 產率。參看第 60 圖。

【圖式簡單說明】

第 1-6 圖顯示用於合成苯并二氮呋化合物及適於本發明之連結之相應可連接化合物之流程。

第 7 圖顯示用於合成本發明之具有 PEG 修飾之連接基之代表性化合物的流程。

第 8 圖顯示用於合成本發明之具有甲硫基連接基之代表性化合物的流程。

第 9-10 圖顯示用於合成本發明之含有三級胺之代表性化合物的流程。

第 11 圖顯示用於合成本發明之具有肽連接基之代表性化合物的流程。

第 12-19 圖顯示用於合成本發明之適於一步式連結方法之代表性化合物的流程。

第 20 圖顯示兩步式單-亞胺二聚體合成之流程。

第 21 圖顯示兩步式雙還原二聚體合成之流程。

第 22 圖顯示代表性抗體-藥物連結物之一步式合成流程。

第 23 圖顯示代表性抗體-藥物連結物之兩步式合成流程。

第 24 圖顯示甲基二硫基二聚體 **1d** 對 Namalwa、KB 及 HL60/QC 細胞株之活體外細胞毒性。

第 25 圖顯示 huMy9-6-SPDB-**1f** 連結物對各種細胞株之活體外細胞毒性及特異性。應注意，亞硫酸氫鈉添加至連結反應中以製備連結物。

第 26 圖顯示 huFOLR1-SPDB-**1f** 連結物之活體外細胞毒性及特異性。

第 27 圖顯示二聚體連結不會降低抗體之結合親和力。應注意，亞硫酸氫鈉添加至連結反應中以製備連結物。

第 28 圖顯示 huMy9-6 連結物之活體內抗腫瘤活性。應注意，亞硫酸氫鈉添加至連結反應中以製備連結物。

第 29 圖顯示 huMy9-6-SPDB-**1f** 連結物對抗原陽性細胞之活體外細胞毒性。應注意，亞硫酸氫鈉添加至連結反應中以製備連結物。

第 30 圖顯示用於製備含硫醚連接基二硫化物 **27e-h** 之合成流程。

第 31 圖顯示用於製備二聚體 **28c-f** 之合成流程。

第 32 圖顯示用於製備苯基連接之二聚體 **29b-c** 之合成流程。

第 33 圖顯示單-亞胺二聚體之替代性兩步式合成流程。

第 34 圖顯示在阻斷和不阻斷抗原結合位點情況下

huMy9-6-SPDB-1f(A) 、 huMy9-6-sulfoSPDB-1f(B) 及 huMy9-6-BMPS-1f(C) 對 HL60/QC(Ag^+)細胞之活體外細胞毒性。應注意，在全部三個實驗(34A、34B 及 34C)中，亞硫酸氫鈉添加至連結反應中以製備連結物。

第 35 圖顯示 chB38.1-SPDB-1f(A) 及 chB38.1-sulfoSPDB-1f(B) 對 COLO205(Ag^+)細胞之活體外細胞毒性。應注意，在兩個實驗中，亞硫酸氫鈉添加至連結反應中以製備連結物。

第 36 圖顯示 huMy9-6-SPDB-1f 在帶 HL60/QC 之小鼠中的活體內功效。應注意，亞硫酸氫鈉添加至連結反應中。

第 37 圖顯示 huFOLR1-SPDB-1f 在 KB 帶腫瘤小鼠中之活體內功效。

第 38 圖顯示化合物 1 之合成流程。

第 39 圖顯示利用 5-乙基-2-甲基吡啶硼烷(PEMB)之化合物 1d 的合成流程。

第 40 圖顯示利用三乙醯氧基硼氫化鈉(STAB)之化合物 1d 之合成流程。

第 41 圖顯示化合物 31a-c 之合成流程。

第 42 圖顯示化合物 32c,d 之合成流程。

第 43 圖顯示化合物 1i 及 12a 之合成流程。

第 44 圖顯示藉由在阻斷及不阻斷抗原結合位點情況下比較(A) huMy9-6-SPDB-1f、(B) huMy9-6-sulfoSPDB-1f 及(C) huMy9-6-BMPS-1f 對 OCI-AML3(Ag^+)細胞得到之抗增殖活性。應注意，在全部三個實驗中，亞硫酸氫鈉添

加至連結反應中以製備連結物。

第 45 圖顯示用於合成用於製備 IBD 單體之 4-(苯甲氧基)-5-甲氧基-2-硝基苯甲酸的替代流程。

第 46 圖為(5-((2-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)乙基)(2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基)胺基)-1,3-伸苯基)二甲醇(1b)之替代合成流程。

第 47 圖為(5-((2-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)乙基)(2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基)胺基)-1,3-伸苯基)二甲醇(1b)之替代合成流程。

第 48 圖為兩步式單-亞胺二聚體合成之替代合成流程。

第 49 圖顯示各種連結物對各種細胞株之效力。表中所列 IC₅₀ 值以 nM 為單位。

第 50 圖顯示 huMy9-6-磺基-SPDB-1f 在 MOLM-13 帶腫瘤小鼠中之活體內功效。

第 51 圖顯示 huMy9-6-磺基-SPDB-1f 在 NB4 帶腫瘤小鼠中之活體內功效。

第 52 圖顯示 huMy9-6-BMPS-1f 在 HL60/QC 帶腫瘤小鼠中之活體內功效。

第 53 圖顯示 huMy9-6-BMPS-1f 在 MOLM-13 帶腫瘤小鼠中之活體內功效。應注意，亞硫酸氫鈉添加至連結反應中以製備連結物。

第 54 圖顯示磺酸化葉酸鹽/細胞毒性化合物連結物之代表性合成流程。

第 55 圖顯示幾種利用不同連接基之代表性磺酸化藥物-抗體連結物。

第 56 圖顯示 huMy9-6-藥物 2 在 HL60/QC 帶腫瘤小鼠中之活體內功效。應注意，亞硫酸氫鈉添加至連結反應中以製備連結物。

第 57 圖顯示 huMy9-6-藥物 2 在 MOLM-13 帶腫瘤小鼠中之活體內功效。應注意，亞硫酸氫鈉添加至連結反應中以製備連結物。

第 58 圖顯示在不存在及存在亞硫酸氫鈉情況下製備之連結物 HuMy9-6-藥物 2 對 CD33-抗原表現 HL60 細胞之類似活體外細胞毒性。

第 59 圖顯示在不存在及存在亞硫酸氫鈉情況下製備之抗-CD22 抗體-藥物 2 連結物對 CD22-抗原表現 BJAB 細胞之類似活體外細胞毒性。

第 60 圖顯示使用高反應性 4-硝基吡啶基-磺基-SPDB 連接基進行之 huMy9-6-磺基-SPDB-1d 的製備。

【主要元件符號說明】

無

序列表

<110> 免疫原公司(IMMUNOGEN, INC.)

<120> 細胞毒性苯并二氮呋衍生物

<130> 121162-00263

<140> 101104846

<141> 2012-02-15

<150> 61/483,499

<151> 2011-05-06

<150> 61/443,062

<151> 2011-02-15

<150> 61/443,092

<151> 2011-02-15

<160> 14

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的說明: 合成肽

<400> 1

Gly Tyr Phe Met Asn

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的說明: 合成肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> Lys, Gln, His 或 Arg

<220>

<221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> Gln, His, Asn 或 Arg

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> Gly, Glu, Thr, Ser, Ala 或 Val

<400> 2

Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Xaa Phe Xaa

1 5 10 15

Xaa

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的說明: 合成肽

<400> 3

Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明: 合成肽

<400> 4
Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala Gly Thr Ser Leu Met His
1 5 10 15

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明: 合成肽

<400> 5
Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明: 合成肽

<400> 6
Gln Gln Ser Arg Glu Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 7
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明: 合成肽

<400> 7
Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 8

<211> 448

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的說明: 合成多肽

<400> 8

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr

20 25 30

Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His

65 70 75 80

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Thr Arg Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 9
<211> 218
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的說明: 合成多肽

<400> 9

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile Ser
65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
85 90 95

Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 10

<211> 218

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的說明: 合成多肽

<400> 10

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
85 90 95

Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 11

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的說明: 合成多肽

<400> 11

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His
65 70 75 80

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 12

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的說明: 合成多肽

<400> 12

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
 20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro
 35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile Ser
65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
 85 90 95

Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

<210> 13
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明: 合成多肽

<400> 13
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
 20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
85 90 95

Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 14
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的說明: 合成肽

<400> 14
Ala Leu Ala Leu
1

發明專利說明書

公告本

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫；惟已有申請案號者請填寫)

※申請案號：

101104846

※申請日期：

101. 2. 15

※IPC 分類：

C07D403/12 (2006.01)

A61K31/5513 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

細胞毒性苯并二氮呋衍生物/CYTOTOXIC BENZODIAZEPINE DERIVATIVES

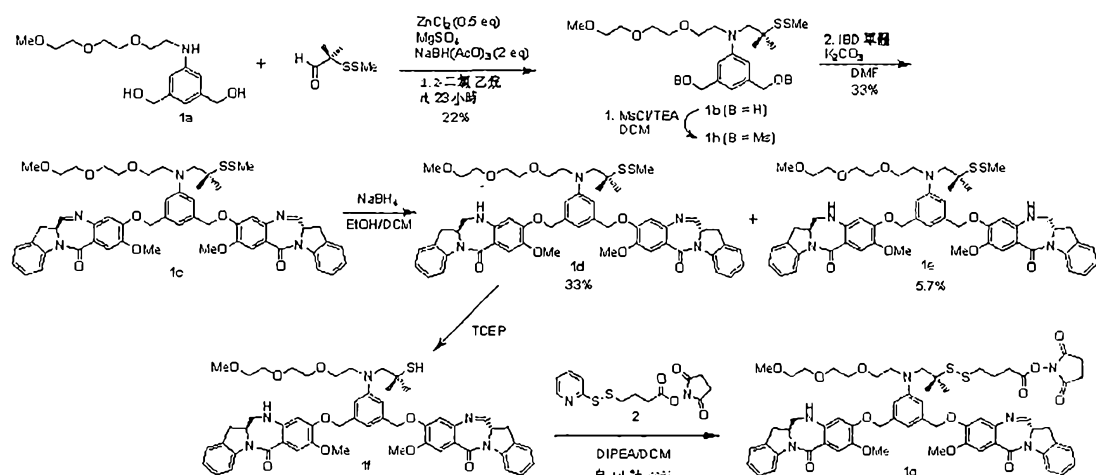
二、中文發明摘要：

本發明係關於具有抗增殖活性之新穎苯并二氮呋衍生物，且更具體言之，關於式(I)至(VII)之新穎苯并二氮呋化合物。本發明亦提供苯并二氮呋化合物與細胞結合劑連接之連結物。本發明還提供可用於使用本發明化合物或連結物在哺乳動物中抑制異常細胞生長或治療增生性病徵之組合物及方法。

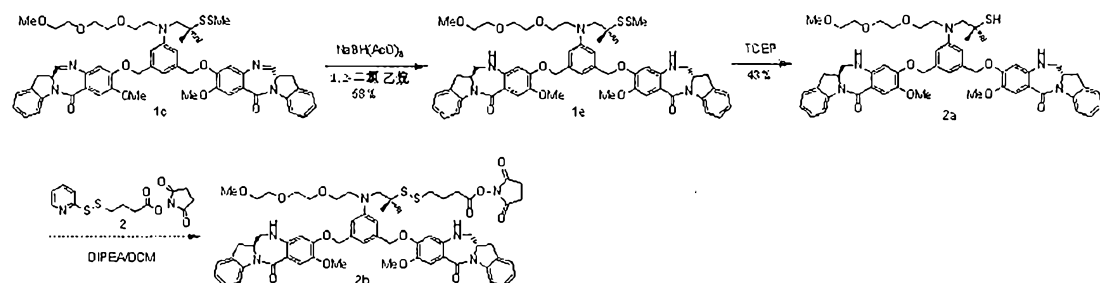
三、英文發明摘要：

The invention relates to novel benzodiazepine derivatives with antiproliferative activity and more specifically to novel benzodiazepine compounds of formula (I)-(VII). The invention also provides conjugates of the benzodiazepine compounds linked to a cell-binding agent. The invention further provides compositions and methods useful for inhibiting abnormal cell growth or treating a proliferative disorder in a mammal using the compounds or conjugates of the invention.

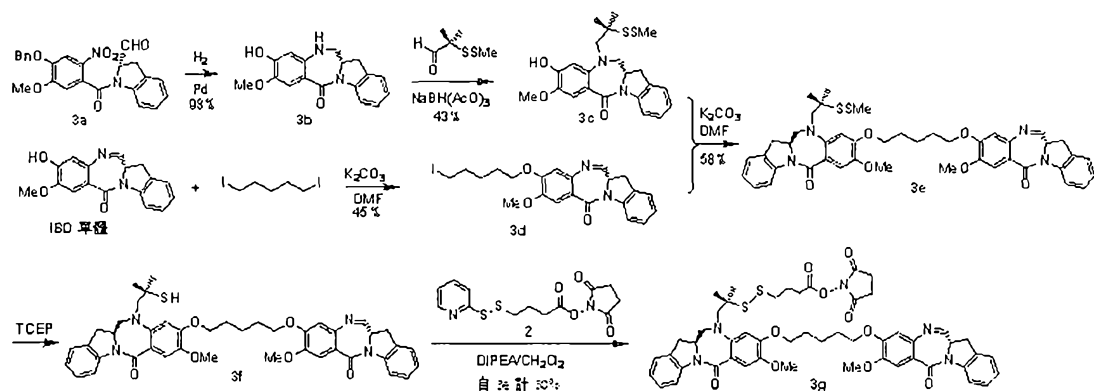
第 1 圖 連接基 1b 及二聚體 1d-g 之合成流程



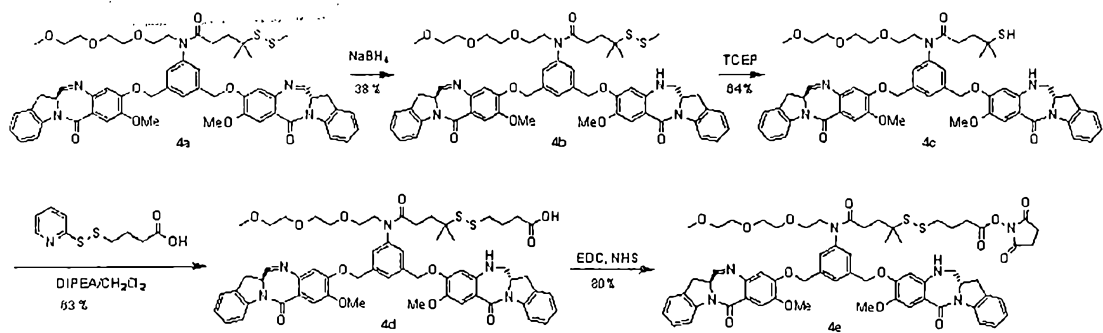
第 2 圖 二聚體 2a-b 之合成流程



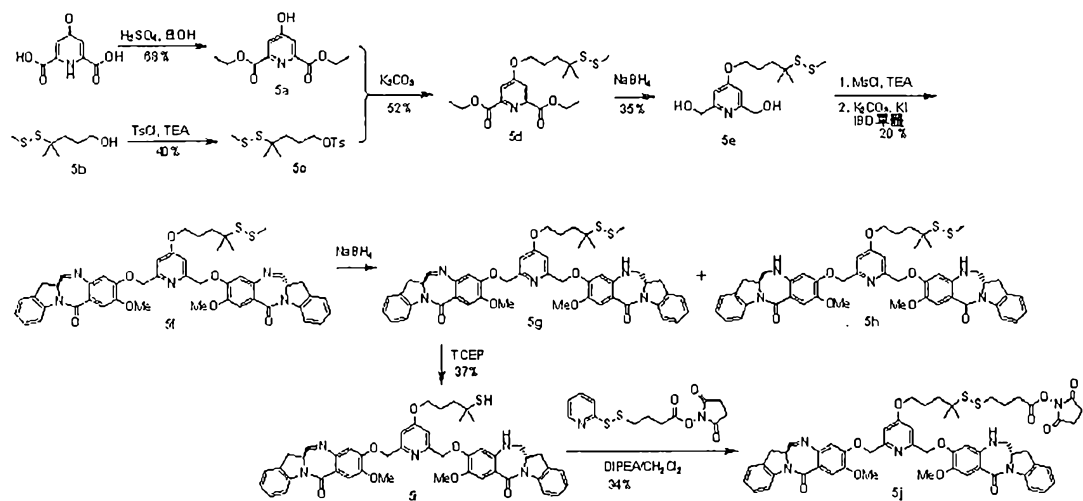
第 3 圖 二聚體 3e-g 之合成流程



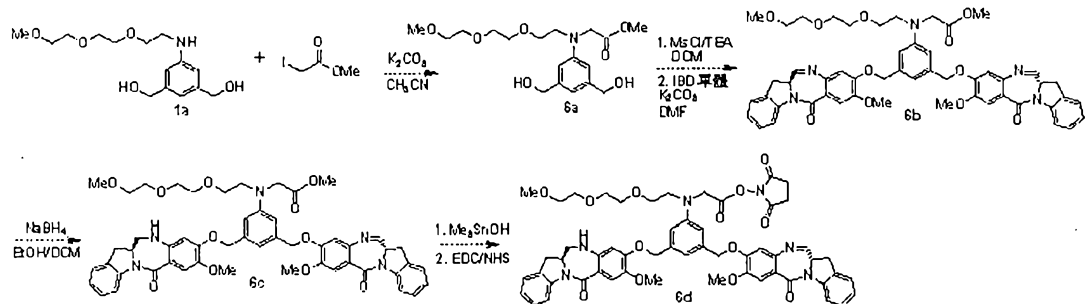
第 4 圖 二聚體 4b-e 之合成流程



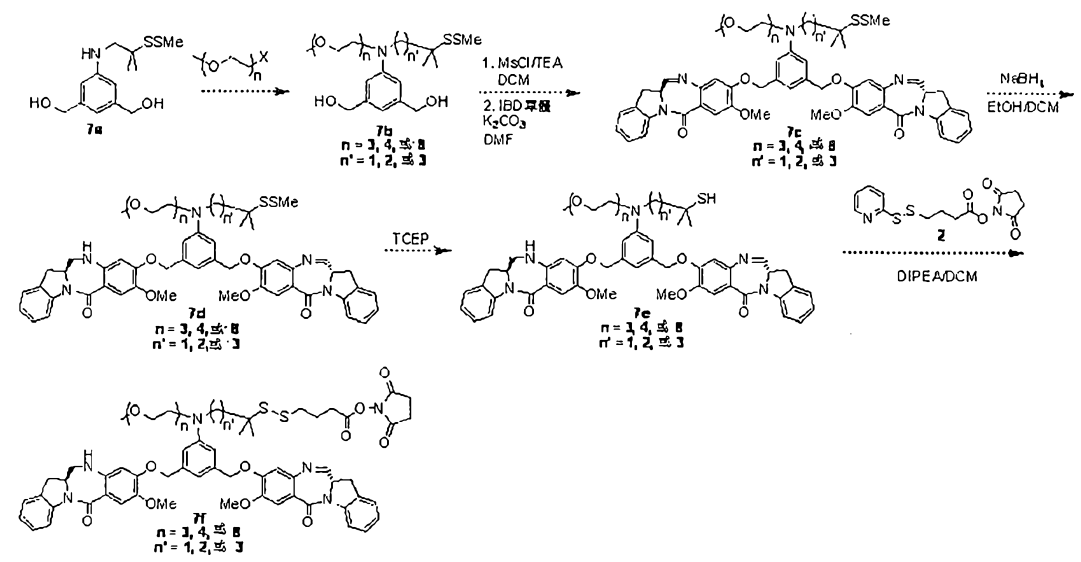
第 5 圖 連接基 5e 及二聚體 5g-j 之合成流程



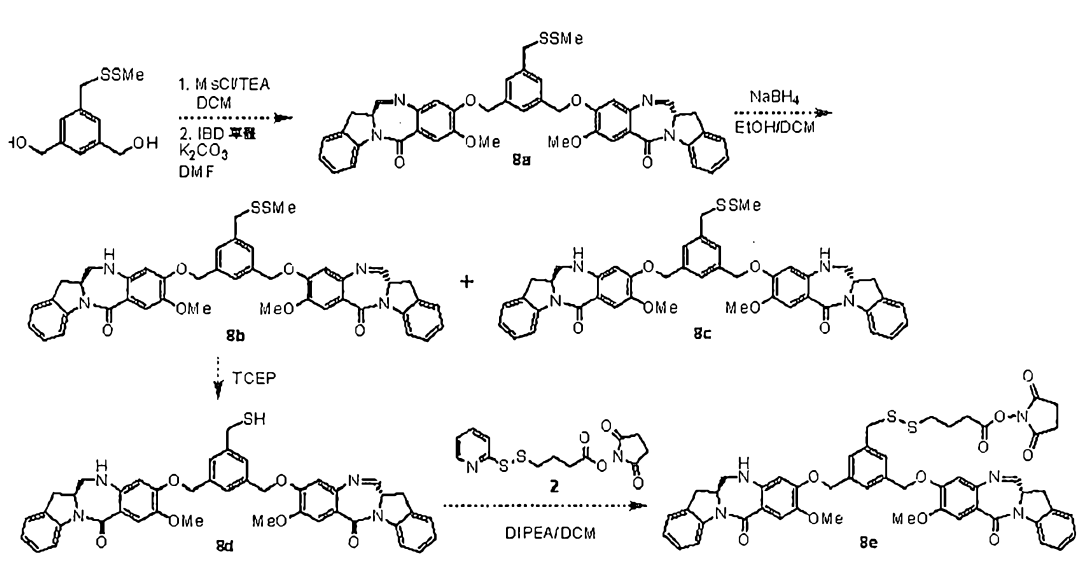
第 6 圖 連接基 6a 及二聚體 6c-d 之合成流程



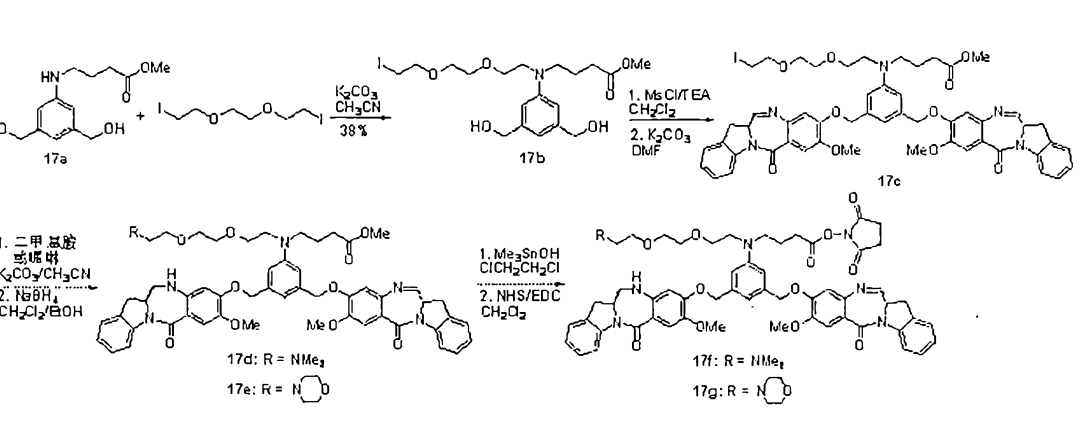
第 7 圖 PEG 修飾之連接基 7b 及二聚體 7d-f 之合成流程



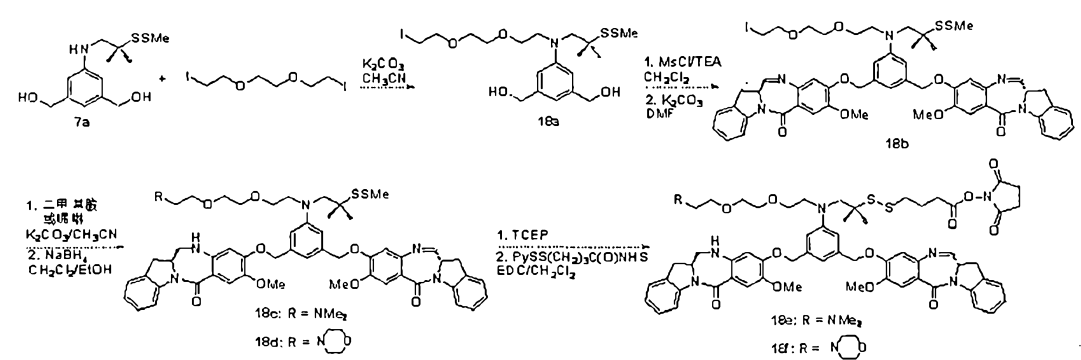
第 8 圖 含硫醇二聚體 8b-e 之合成流程



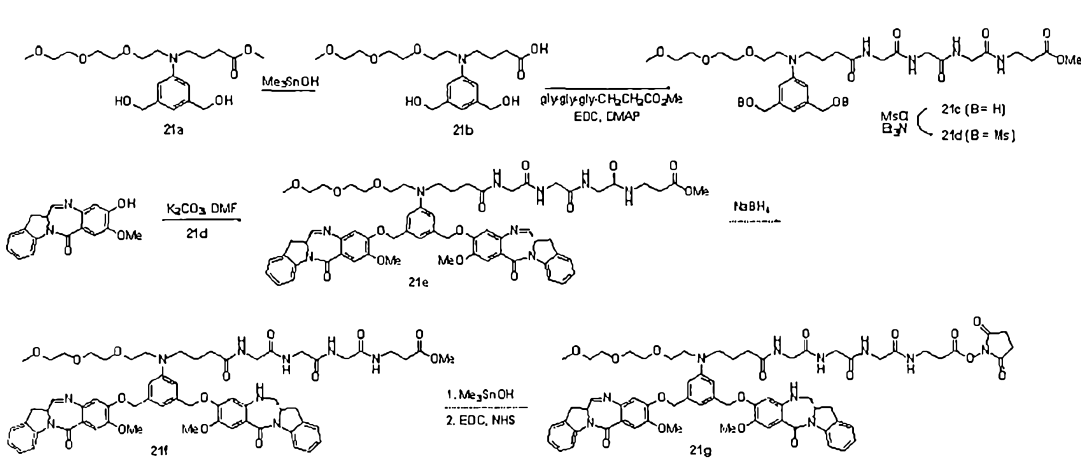
第 9 圖 含三級胺之二聚體 17d-g 之合成流程



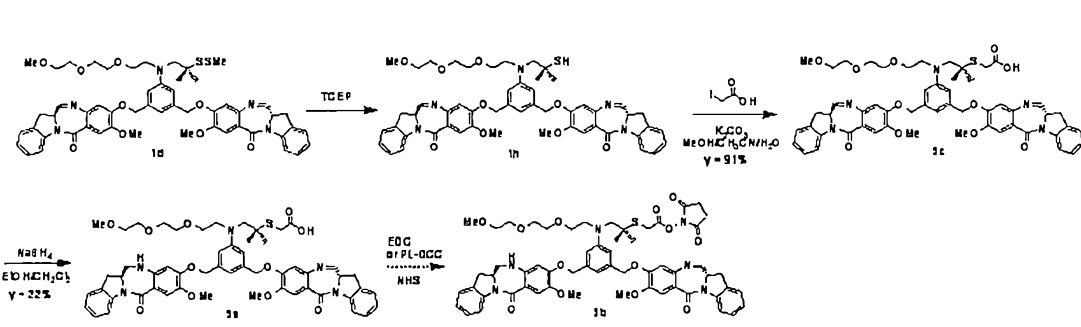
第 10 圖 含三級胺之二聚體 18c-f 之合成流程



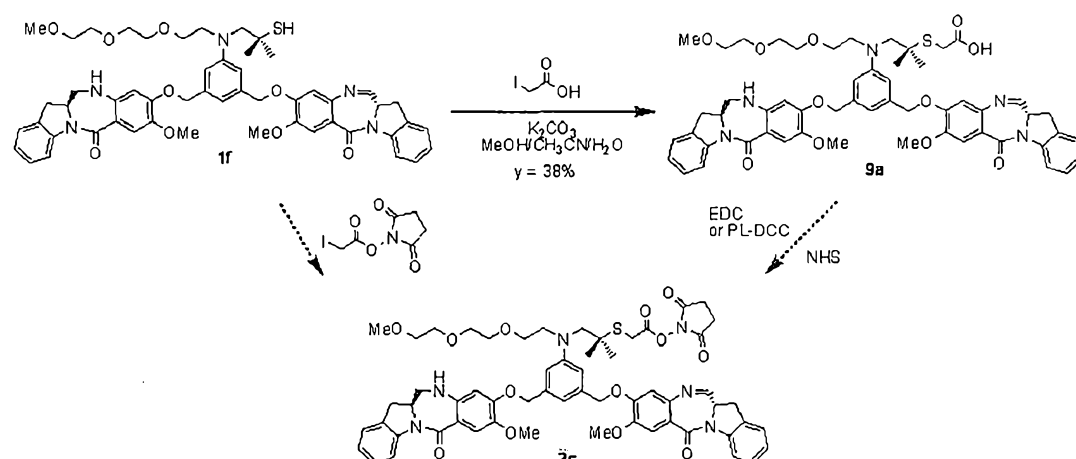
第 11 圖 含肽連接基之二聚體 21f-g 之合成流程



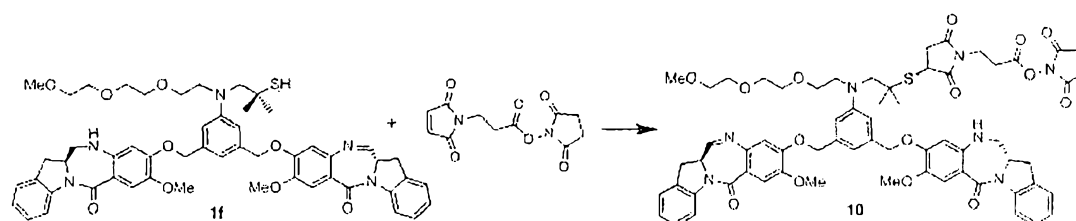
第 12A 圖 一步式硫代乙醯基可連接二聚體 9a-b 之合成流程



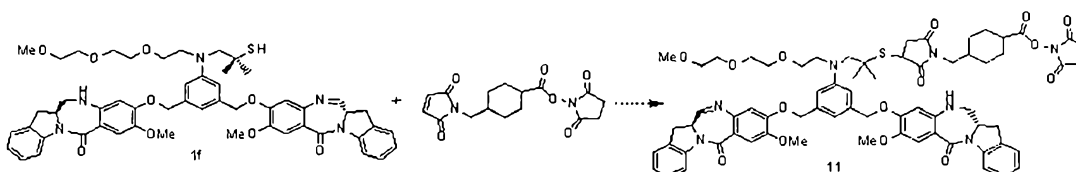
第 12B 圖 一步式硫代乙醯基可連接二聚體 9a-b 之替代合成流程



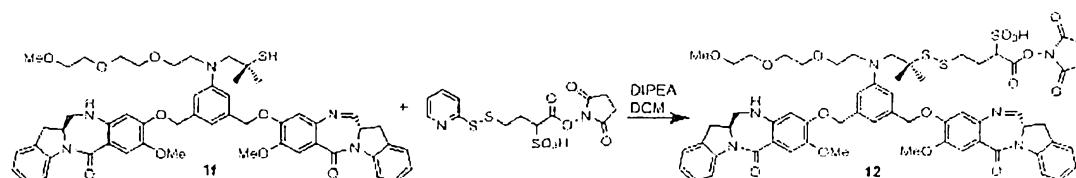
第 13 圖 一步式 BMPS 可連接二聚體 10 之合成流程



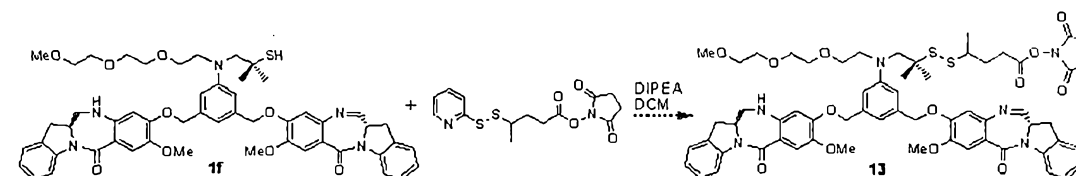
第 14 圖 一步式 SMCC 可連接二聚體 11 之合成流程



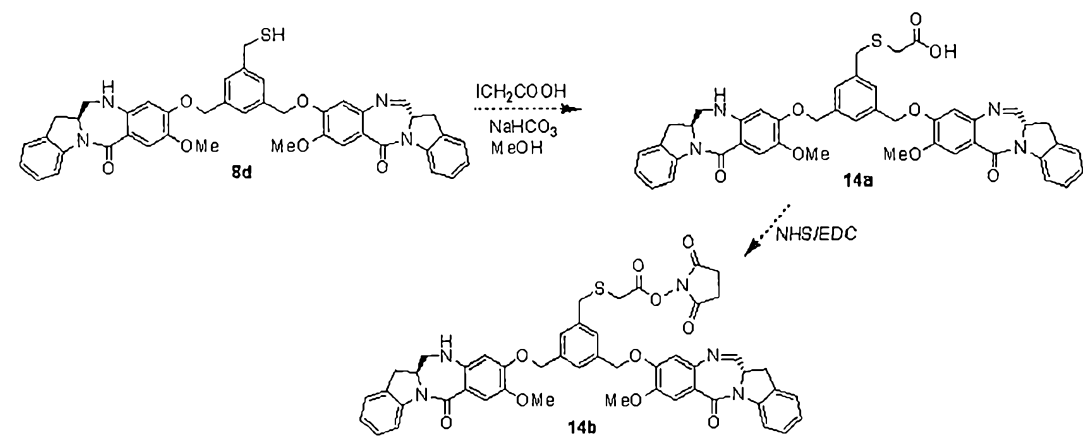
第 15 圖 一步式磺基-SPDB 可連接二聚體 12 之合成流程



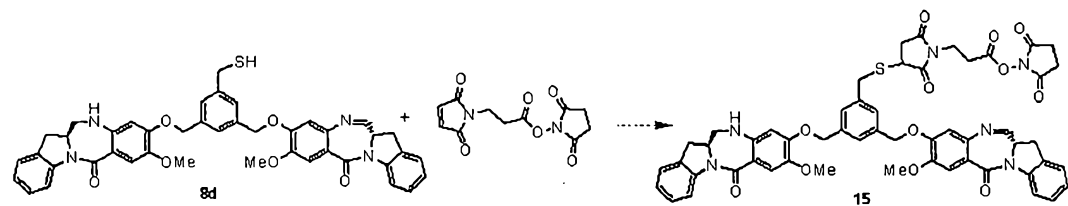
第 16 圖 一步式 SPP 可連接二聚體 13 之合成流程



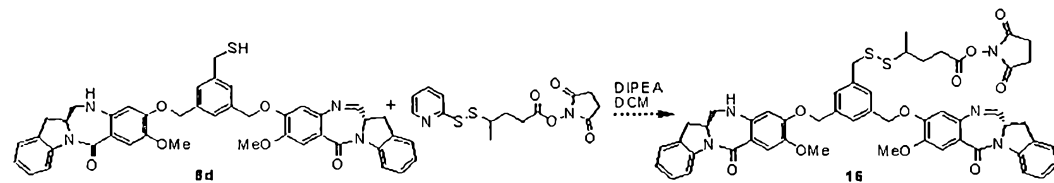
第 17 圖 一步式硫代乙醯基可連接二聚體 14a-b 之合成流程



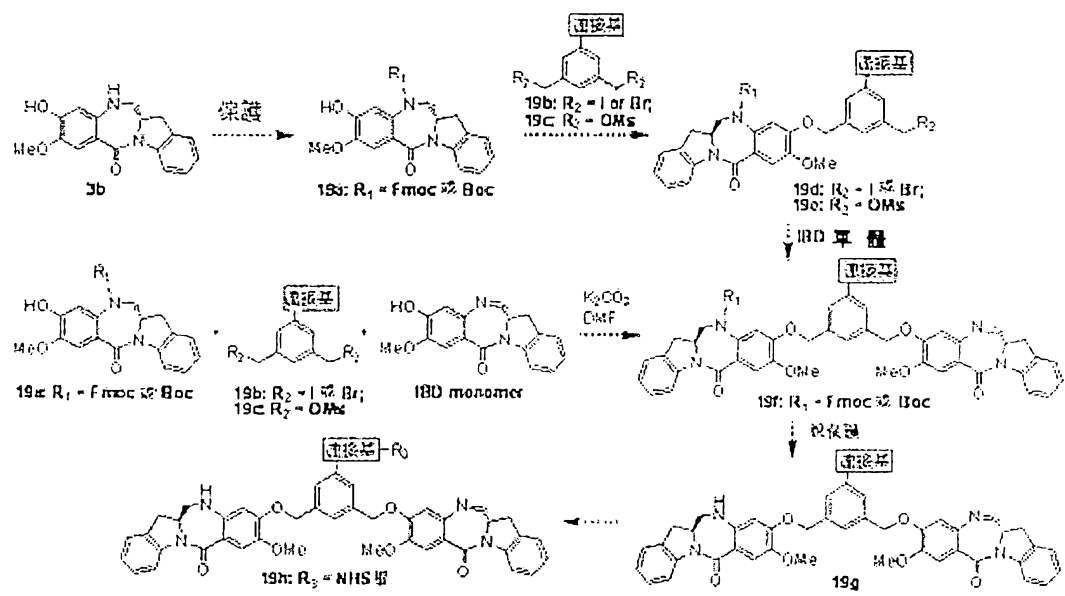
第 18 圖 一步式 BMPs 可連接二聚體 15 之合成流程



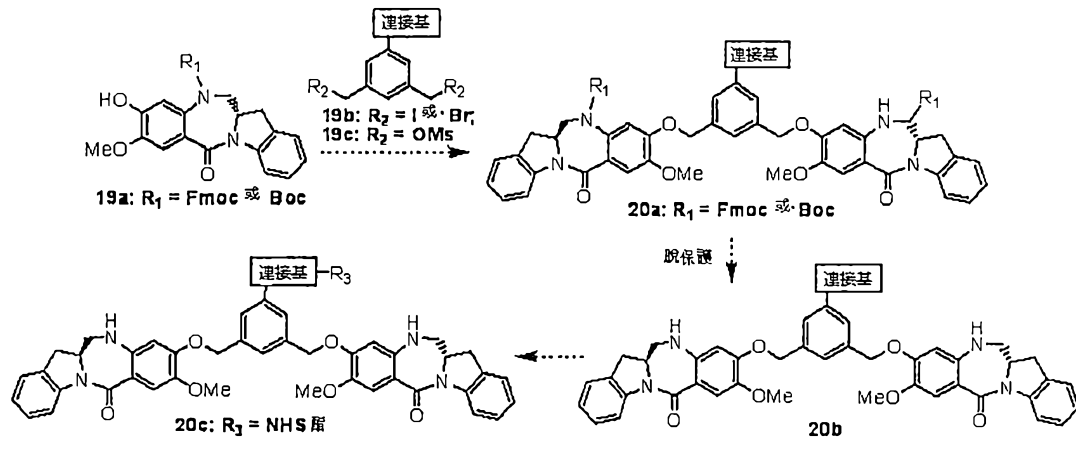
第 19 圖 一步式 SPP 可連接二聚體 16 之合成流程



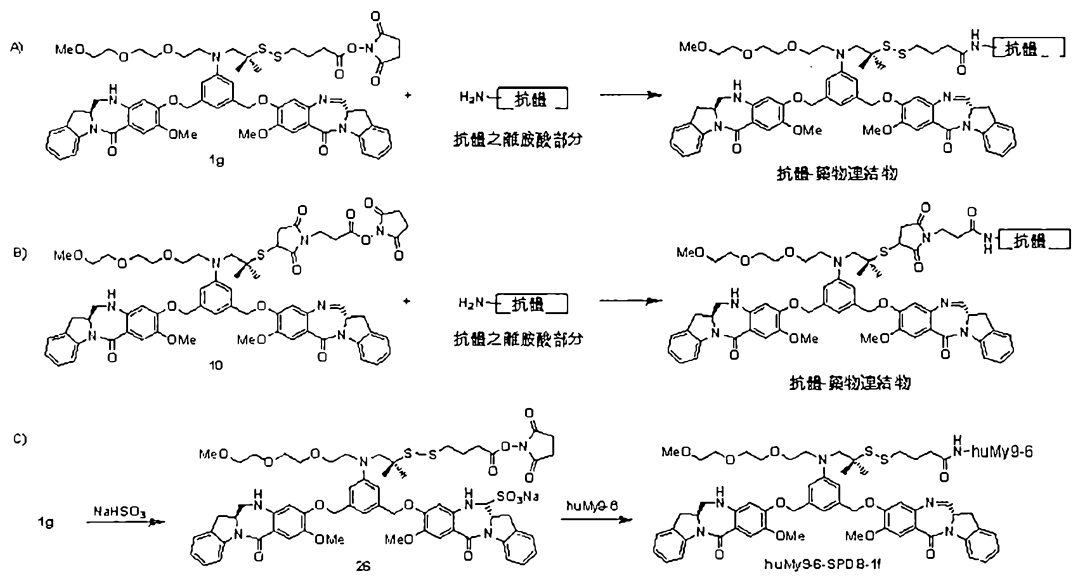
第 20 圖 兩步式單亞胺二聚體合成之合成流程



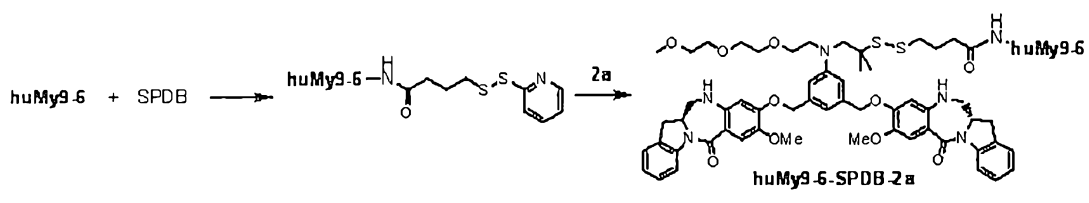
第 21 圖 兩步式雙還原二聚體合成之合成流程



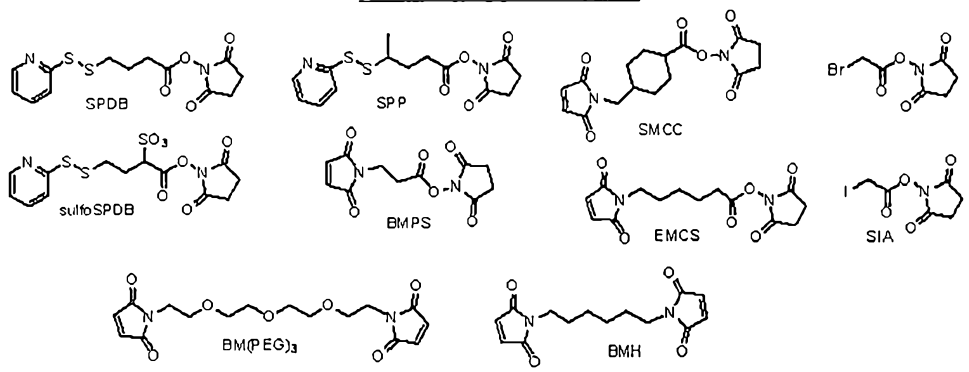
第 22 圖 一步式連結流程



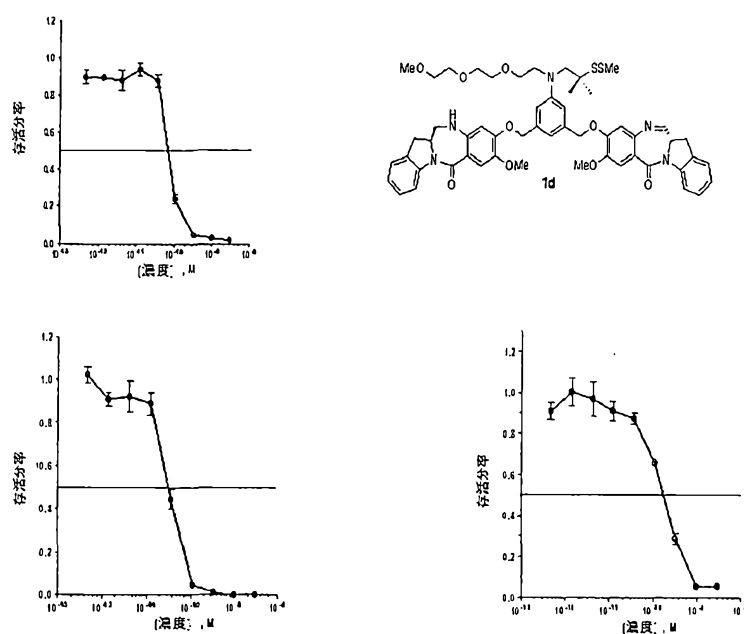
第 23 圖 兩步式連結流程



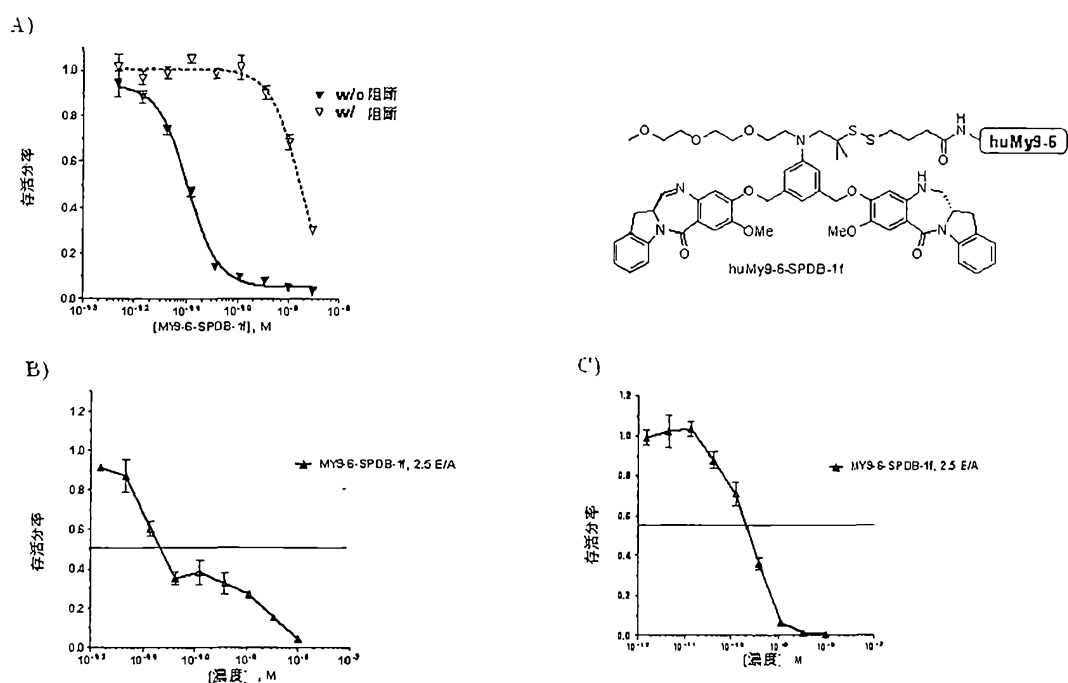
代表性硫醇反應性連接基:



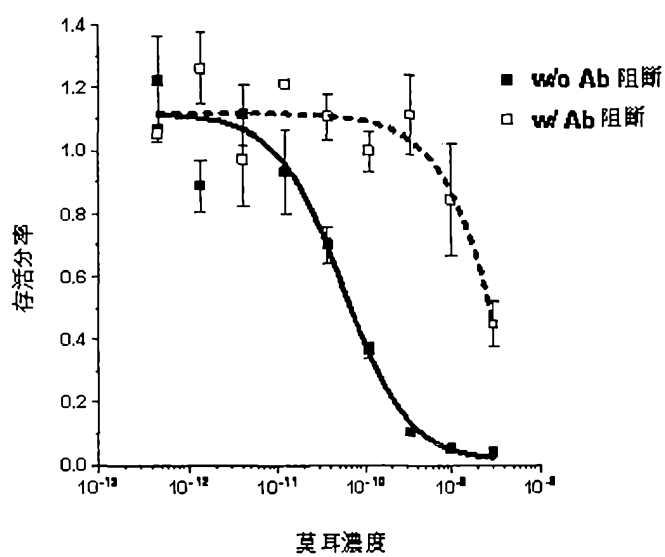
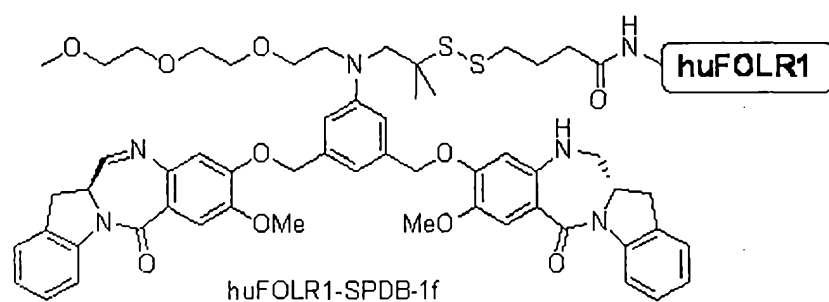
第 24 圖 甲基二硫基二聚體 1d 對(A) Namalwa 細胞、(B) HL60/QC 細胞及(C) KB 細胞之抗增殖活性



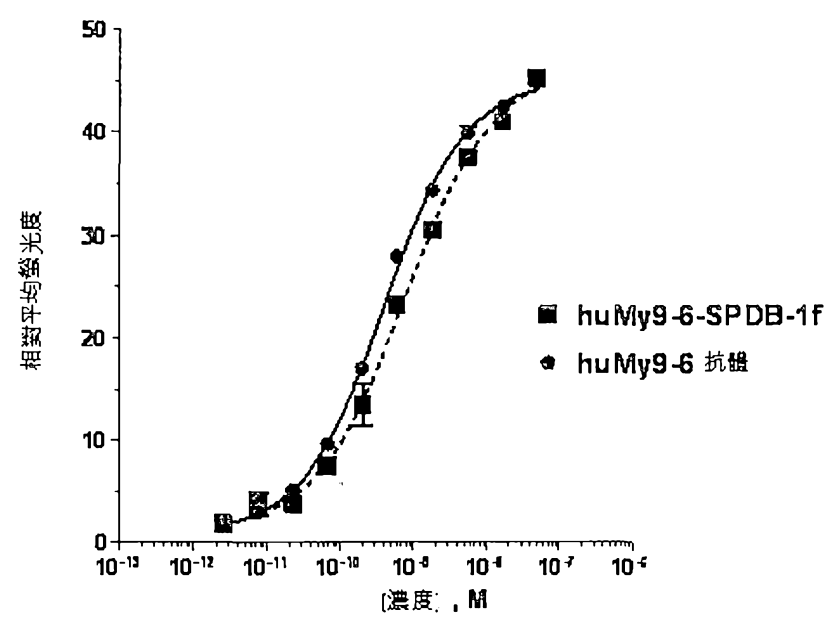
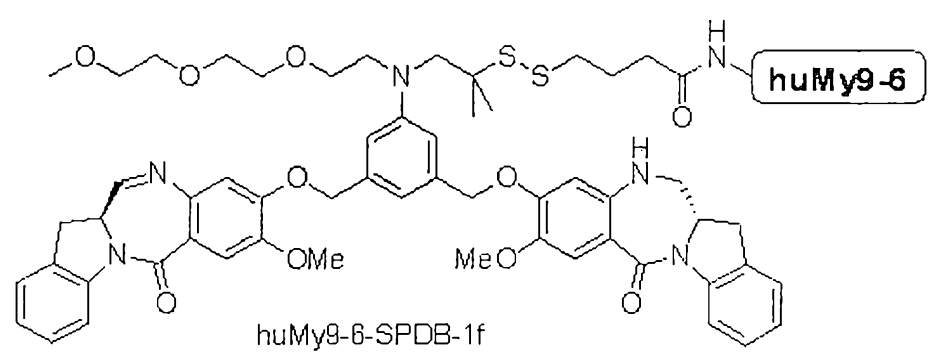
第 25 圖 huMY9-6-SPDB-1f(A)在抗原結合位點阻斷及未阻斷情況下對 HL60/QC (Ag⁺)細胞、(B)對 HL60/ATCC (Ag⁺)細胞及(C)對 NB-4 (Ag⁺)細胞之抗增殖活性



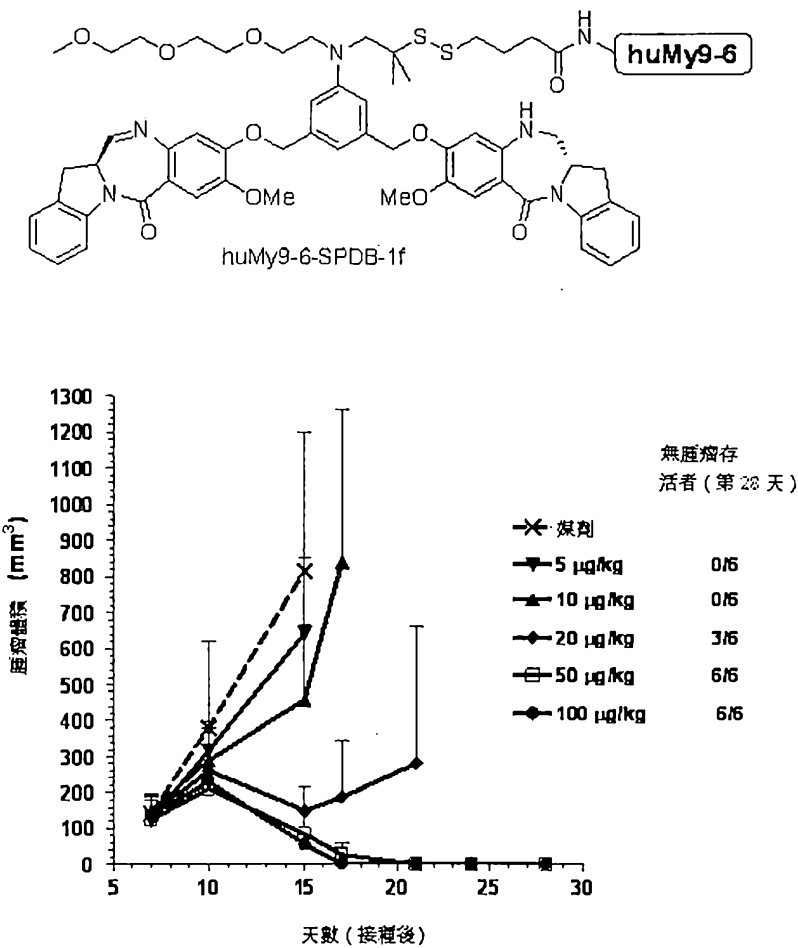
第 26 圖 huFOLR1-SPDB-1f 在抗原結合位點阻斷及
未阻斷情況下對 KB (Ag⁺) 細胞之抗增殖活性



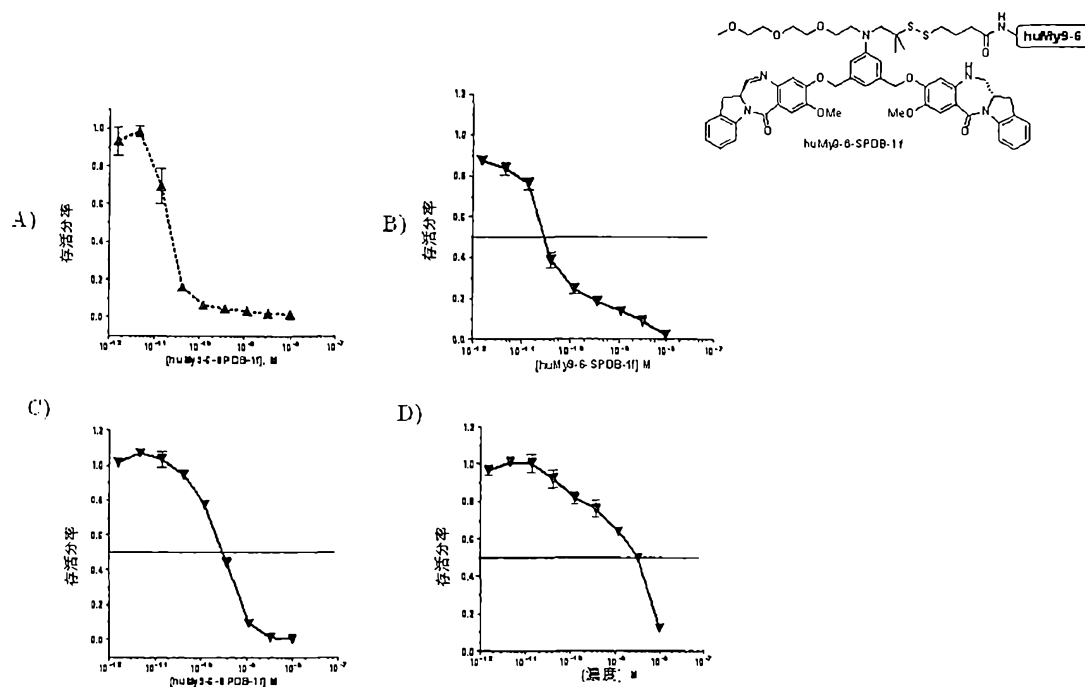
第 27 圖 huMY9-6-SPDB-1f 之結合親和力 (FACS 分析)



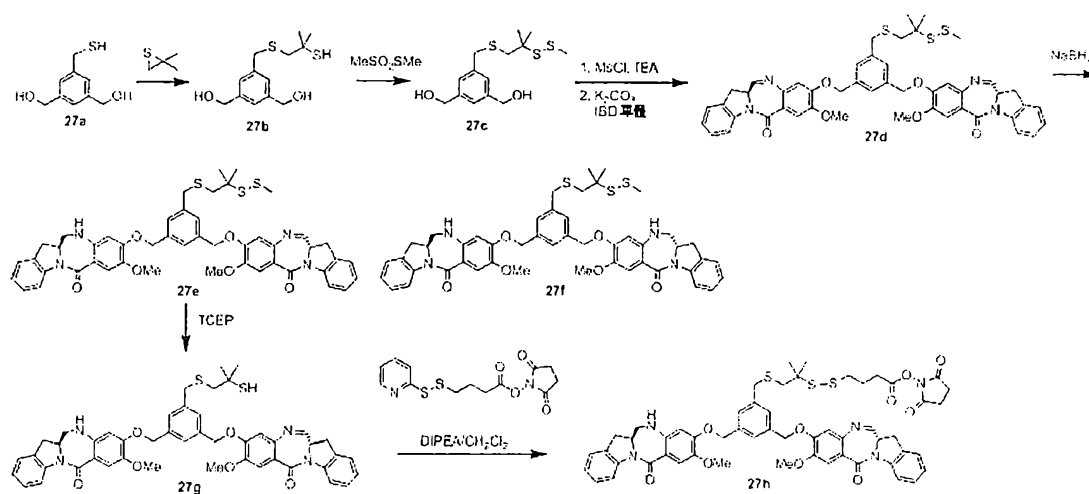
第 28 圖 huMy9-6-SPDB-1f 於帶 HL60/QC 腫瘤裸小鼠中之活體內功效



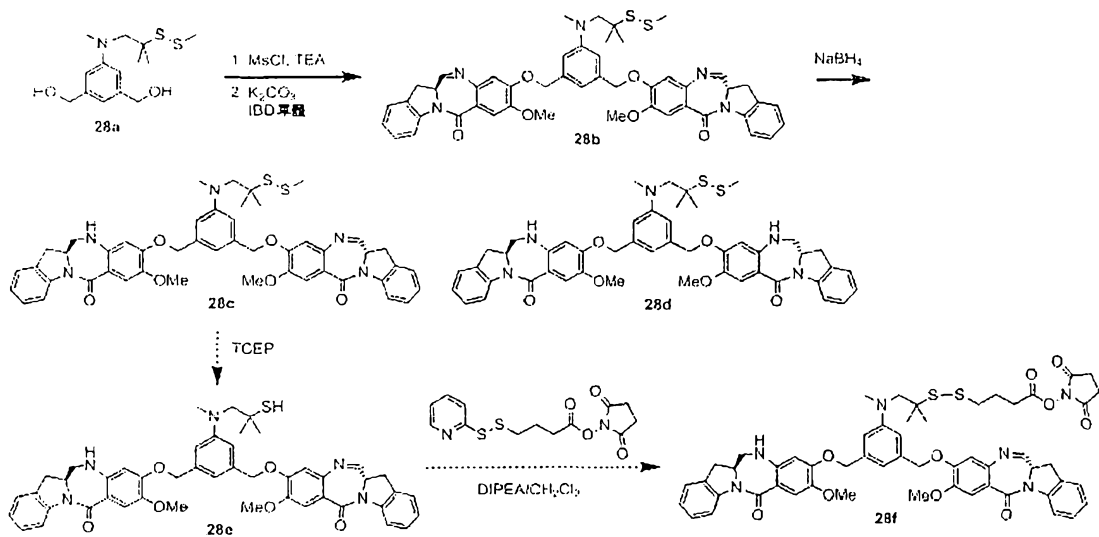
第 29 圖 huMY9-6-SPDB-1f 對抗原陽性細胞株 (A) HL60/QC 細胞、(B) HL60/ATCC 細胞、(C) NB-4 細胞及 HEL 92.1.7 細胞 (D) 之抗增殖活性



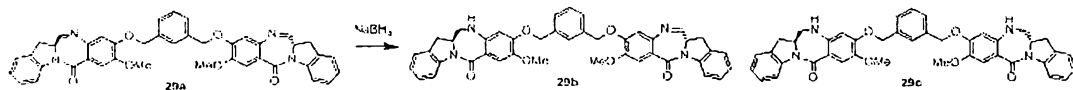
第 30 圖 含硫醚連接基二硫化物 27e-h 之合成流程



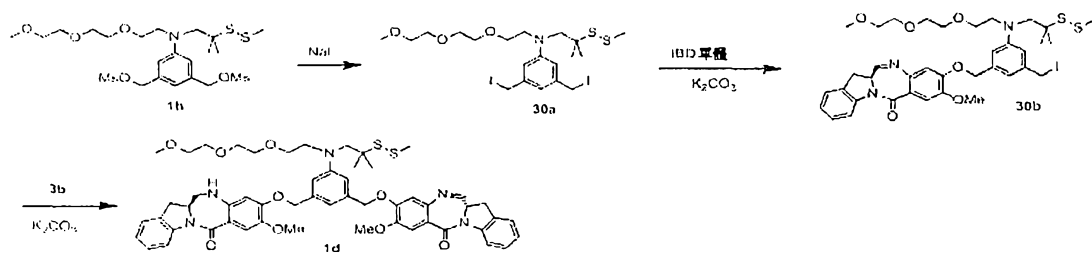
第 31 圖 二聚體 28c-f 之合成流程



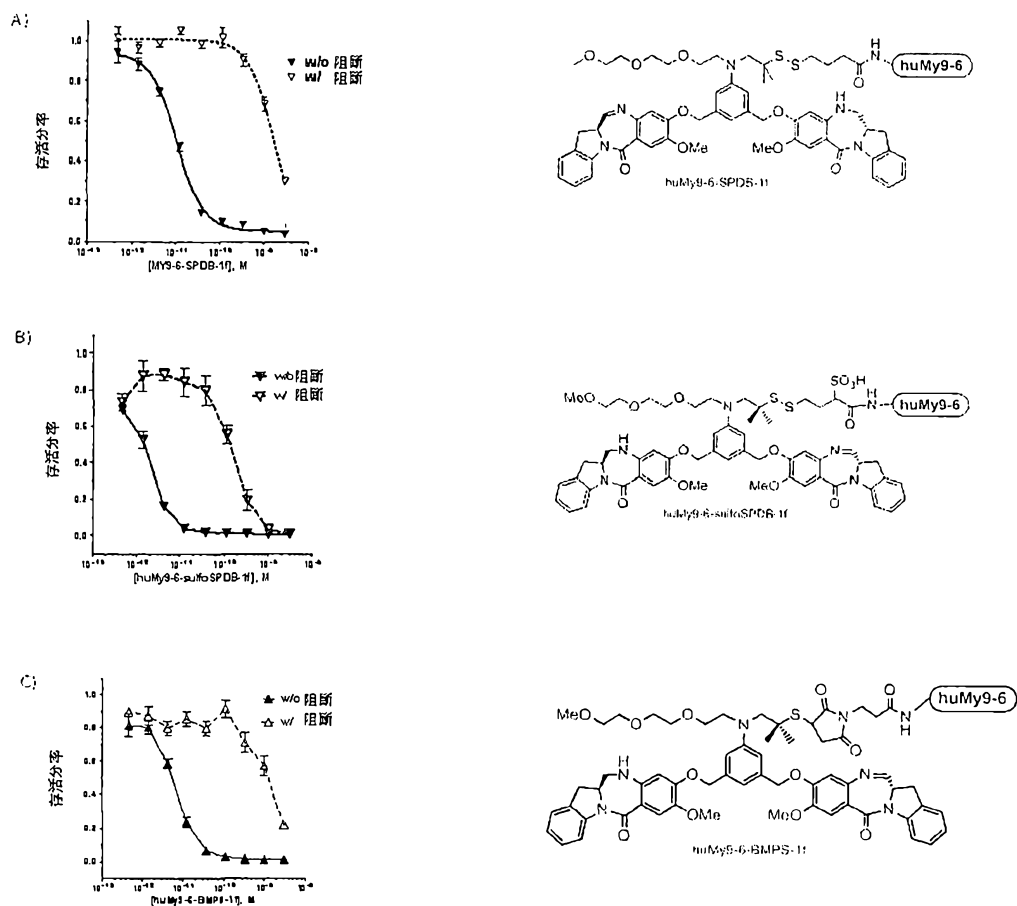
第 32 圖 苯基連接之二聚體 29b-c 之合成流程



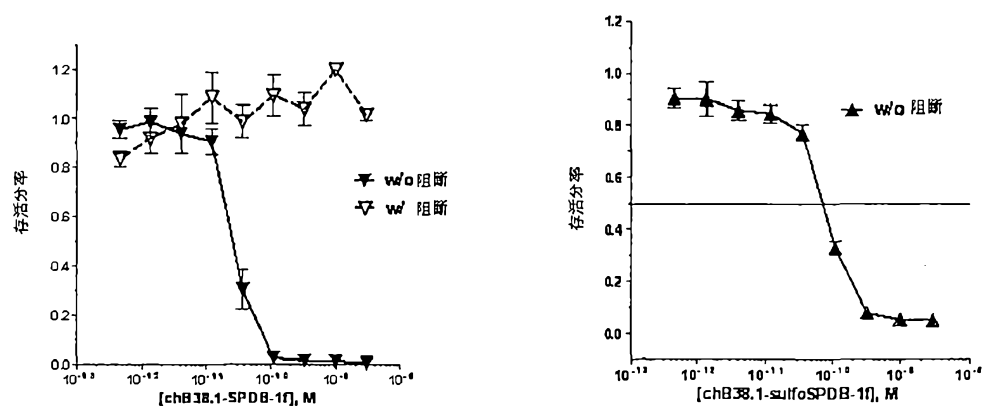
第 33 圖 替代性兩步式單亞胺二聚體合成法



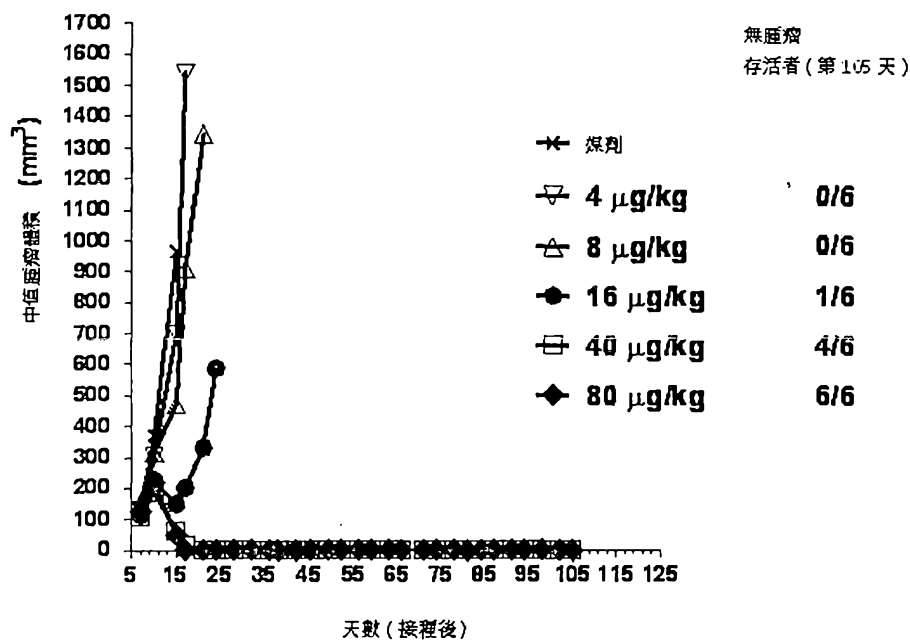
第 34 圖 比較(A) huMy9-6-SPDB-1f 與(B) huMy9-6-磺基 SPDB-1f 及(C) huMy9-6-BMPS-1f 在抗原結合位點阻斷及未阻斷情況下對 HL60/QC (Ag⁺)細胞的抗增殖活性



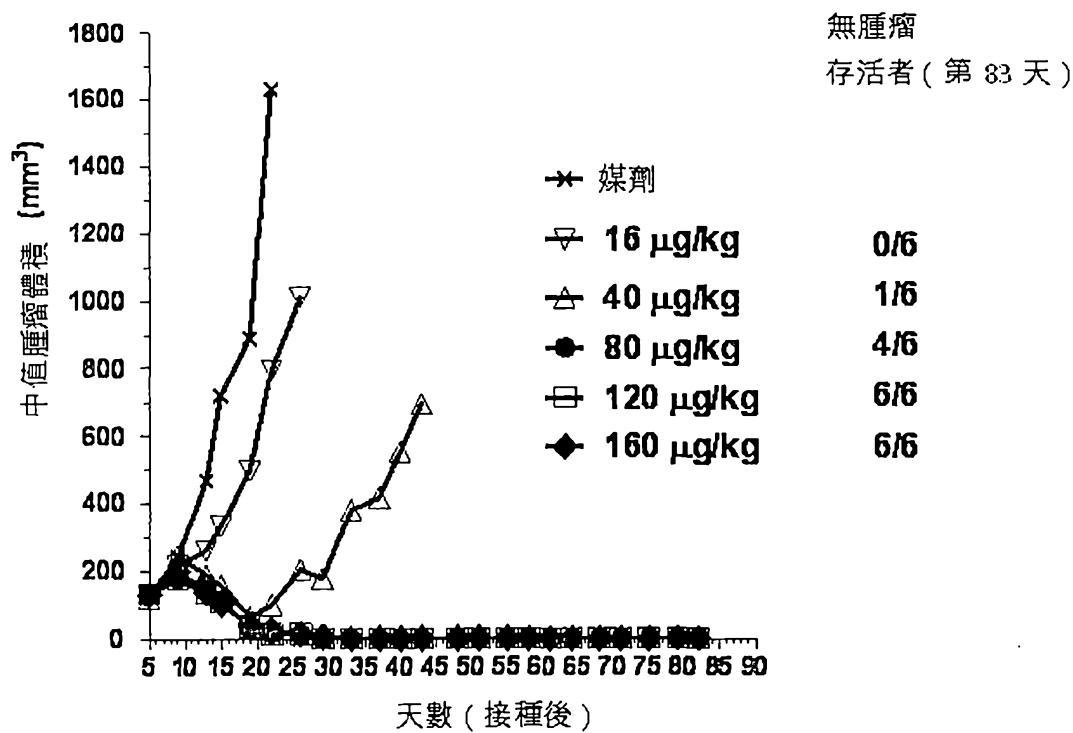
第 35 圖 比較(A) chB38.1-SPDB-1f 與(B) chB38.1-磺基 SPDB-1f 對 COLO205 (Ag⁺)細胞之抗增殖活性



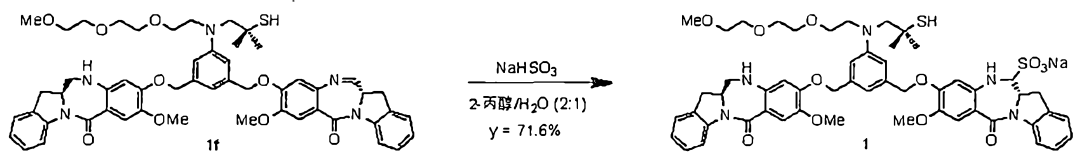
第 36 圖 huMy9-6-SPDB-1f 於帶 HL60/QC 腫瘤小鼠中之活體內功效



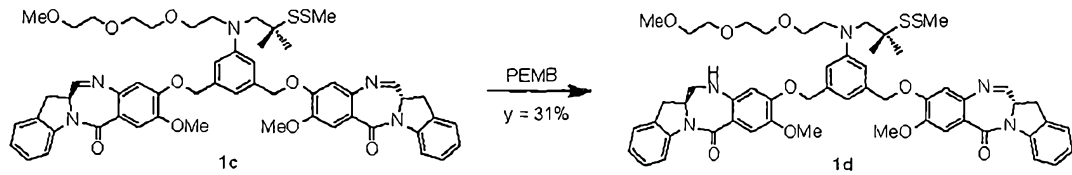
第 37 圖 huFOLR1-SPDB-1f 於帶 KB 腫瘤小鼠中之活體內功效



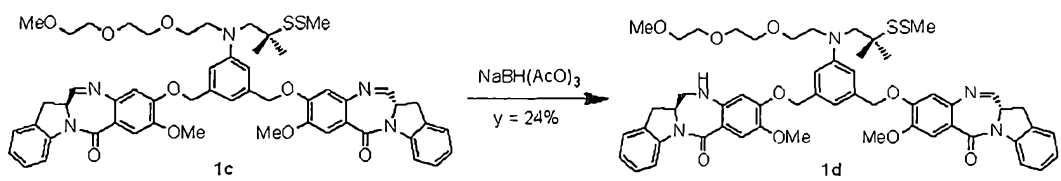
第 38 圖 化合物 1 之合成流程



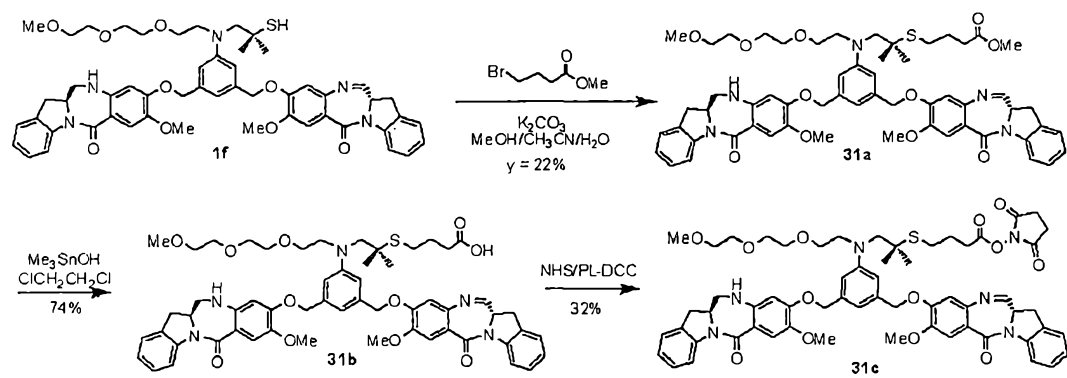
第 39 圖 利用 5-乙基-2-甲基吡啶硼烷(PEMB)之化合物 1d 的合成流程



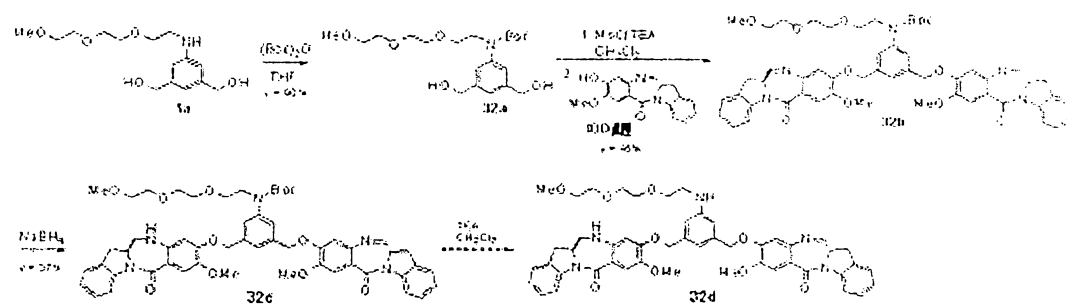
第 40 圖 利用四乙醯氧基硼氫化鈉(STAB)之化合物 1d 的合成流程



第 41 圖 化合物 31a-c 之合成流程



第 42 圖 化合物 32d 之合成流程



第 43 圖 化合物 1i 及 12a 之合成流程

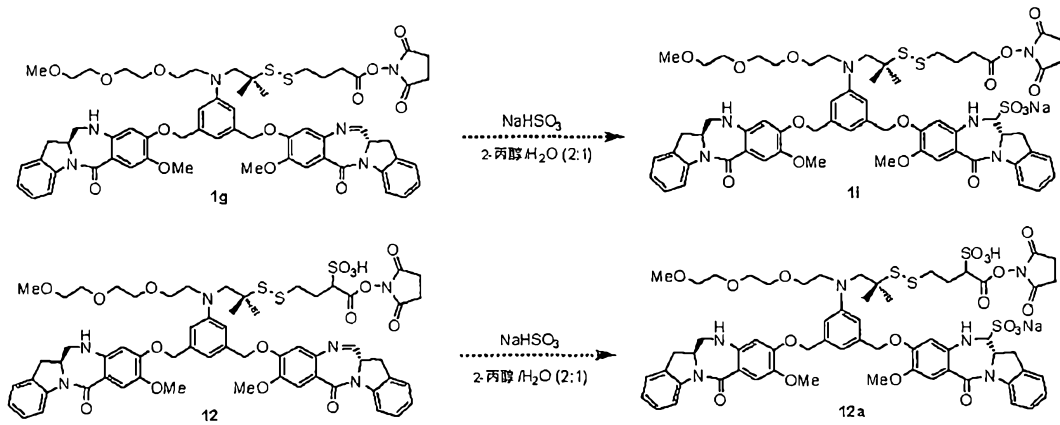
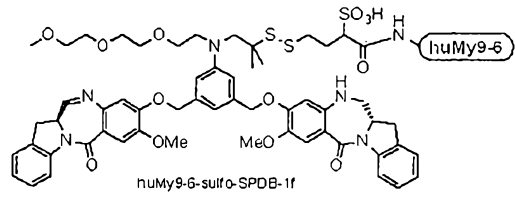
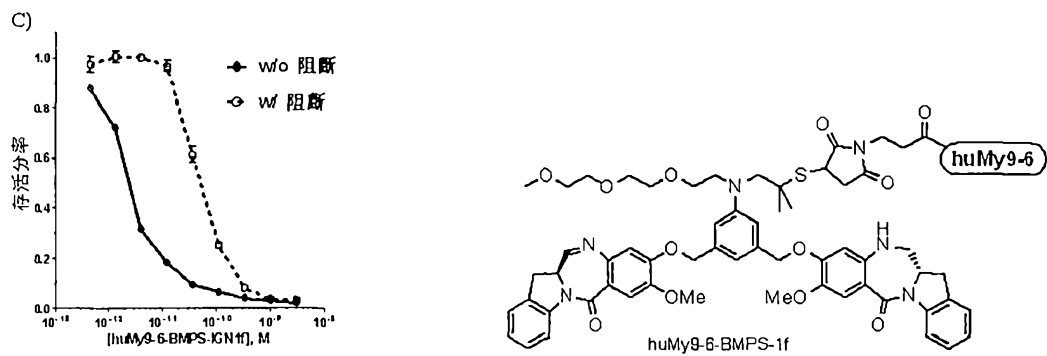
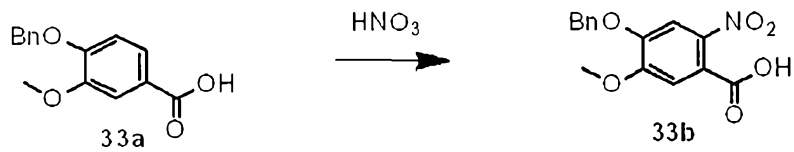


Figure 1 is a line graph showing the dose-response curves for the inhibition of the growth of *E. coli* by the combination of huM9-5-sulfo-SPDB-10 and gentamicin. The x-axis represents the concentration of huM9-5-sulfo-SPDB-10 in M, on a logarithmic scale from 10^{-12} to 10^{-9} . The y-axis represents the survival fraction, ranging from 0.0 to 1.0. Two curves are plotted: one for 'w/o 阻斷' (without inhibition) and one for 'w/ 阻斷' (with inhibition). The 'w/o 阻斷' curve shows a sharp decline in survival fraction starting around 10^{-12} M, reaching near zero by 10^{-10} M. The 'w/ 阻斷' curve shows a much higher survival fraction, starting around 1.0 at 10^{-12} M and declining more gradually, reaching near zero by 10^{-9} M.

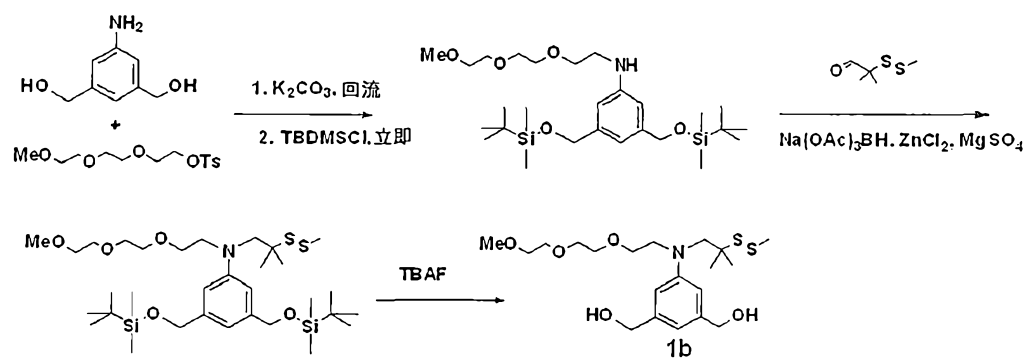




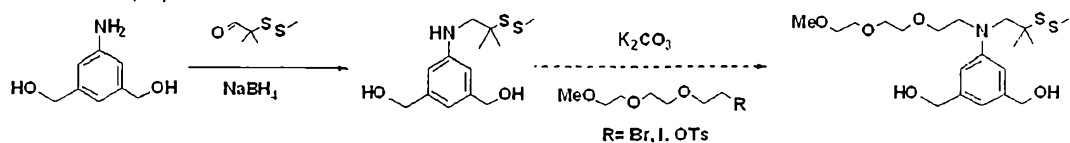
第 45 圖 用於製備 18D 單體之 4-(苯甲氧基)-5-甲氧基-2-硝基苯甲酸之替代合成方法



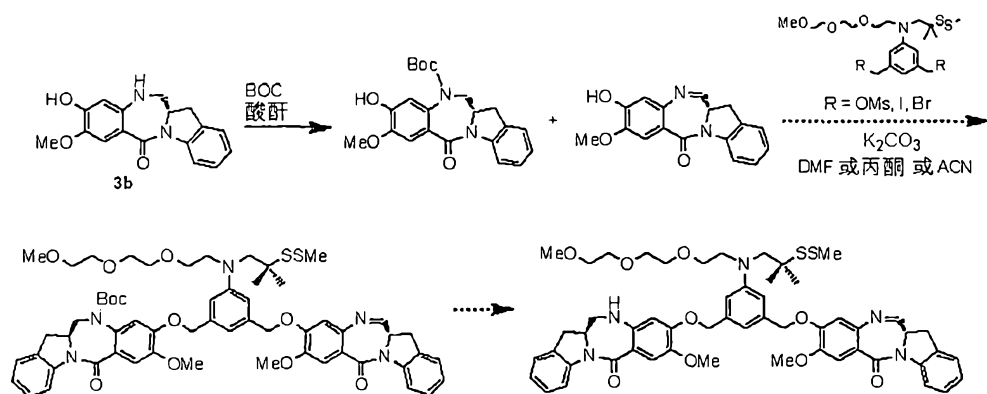
第 46 圖 (5-((2-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)乙基)(2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基)胺基)-1,3-伸苯基)二甲
醇(1b)之替代合成方法



第 47 圖 (5-((2-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)乙基)(2-甲基-2-(甲基二硫烷基)丙基)胺基)-1,3-伸苯基)二甲
醇(1b)之替代合成方法



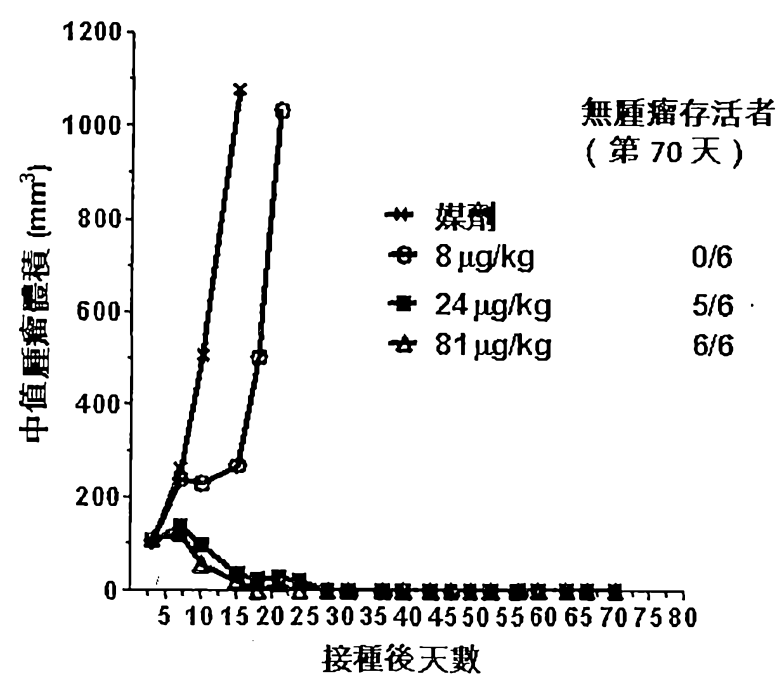
第 48 圖 兩步式單亞胺二聚體合成之替代性合成流程



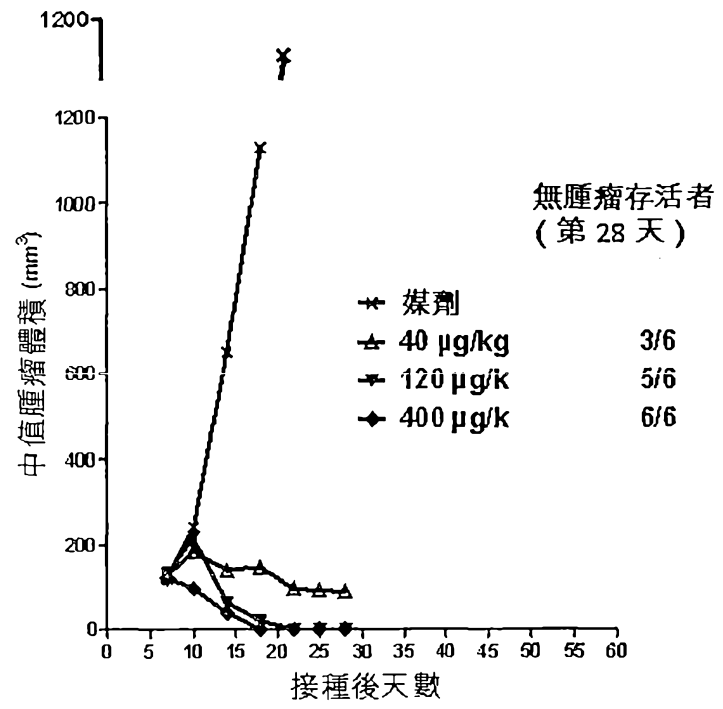
第 49 圖 藉由 IC_{50} 值(nM)量測之連結物對各種細胞株的效力

連結物	HL60/OC	MOLM-13	NB4	HEL92.1.7	OCI-AML3
huMy9-6-SPDB-1f	0.005	0.003	0.3	0.5	0.01
huMy9-6-磺基-SPDB-1f	0.006	0.002	0.4	0.05	0.008
huMy9-6-BMPS-1f	0.003	0.001	0.04	0.04	0.003

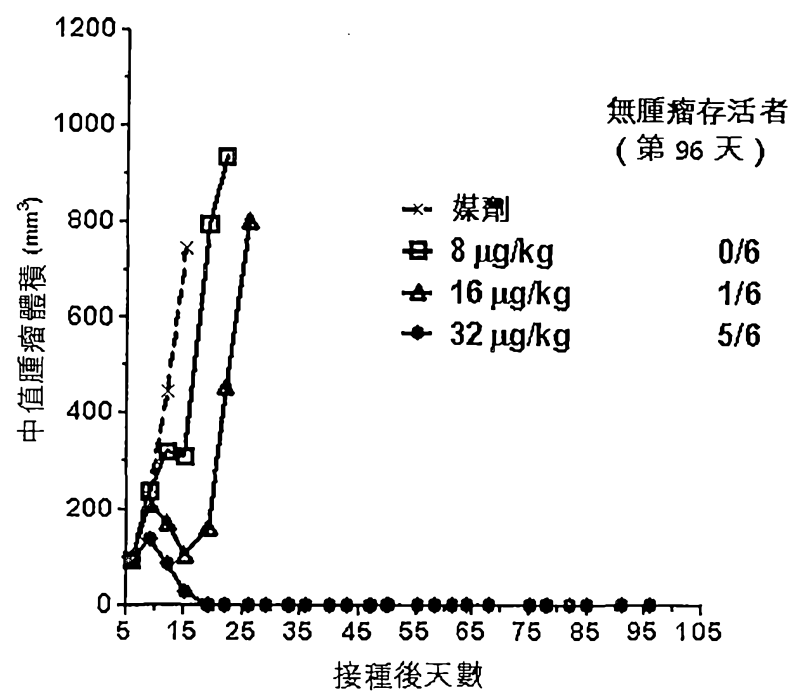
第 50 圖 huMy9-6-磺基-SPDB-1f 於帶 MOLM-13 腫瘤小鼠中之活體內功效



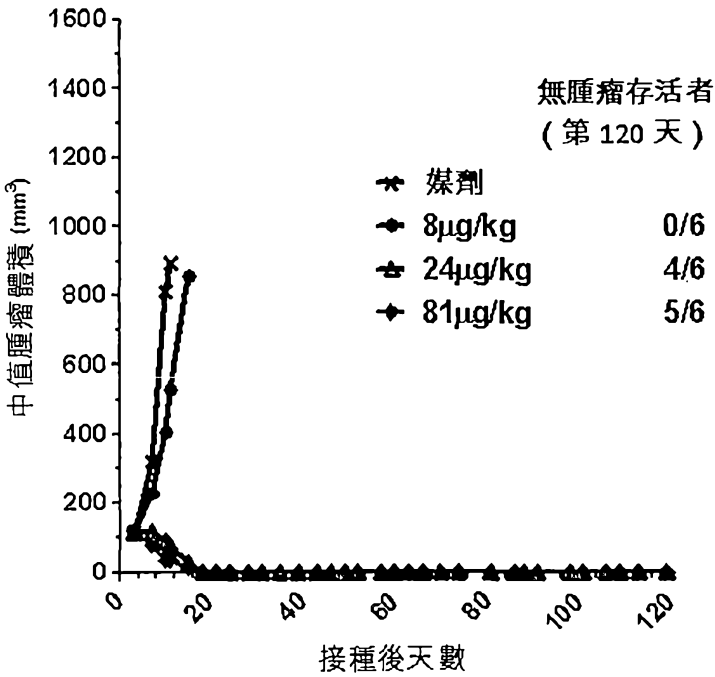
第 51 圖 huMy9-6-磺基-SPDB-1f 於帶 NB4 腫瘤小鼠中之活體內功效



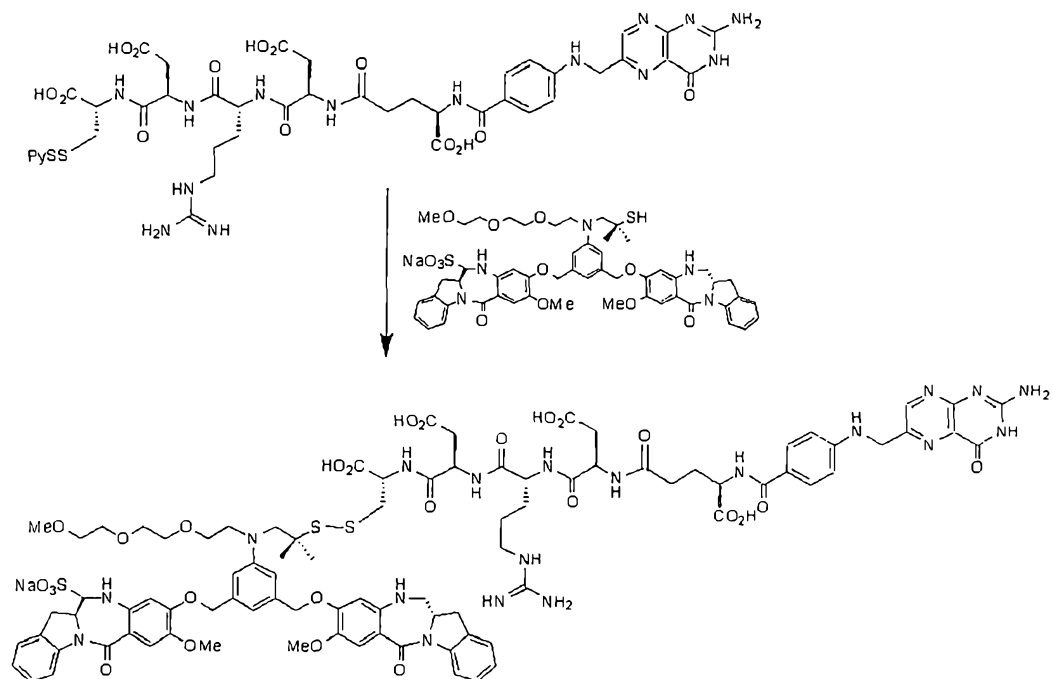
第 52 圖 huMy9-6-BMPS-1f 於帶 HL60/QC 腫瘤小鼠中之活體內功效



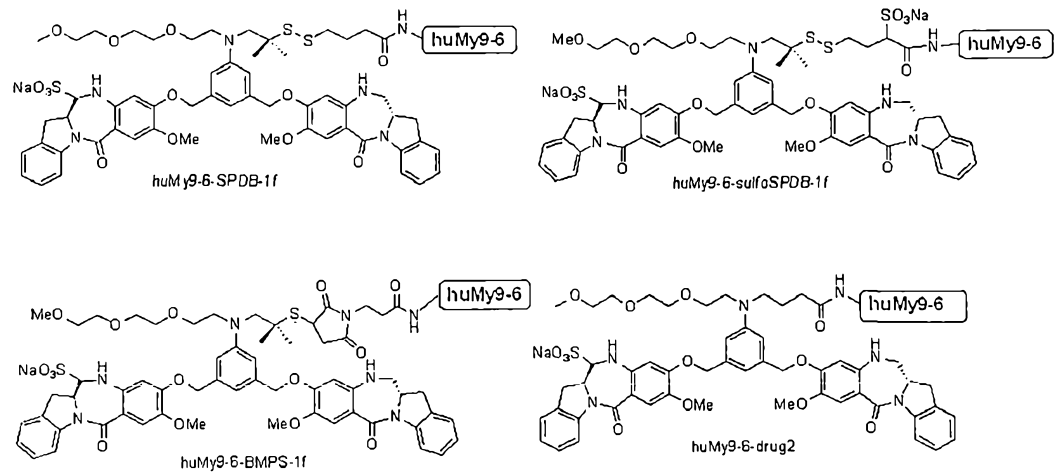
第 53 圖 huMy9-6-BMPS-1f 於帶 MOLM-13 腫瘤小鼠中之活體內功效



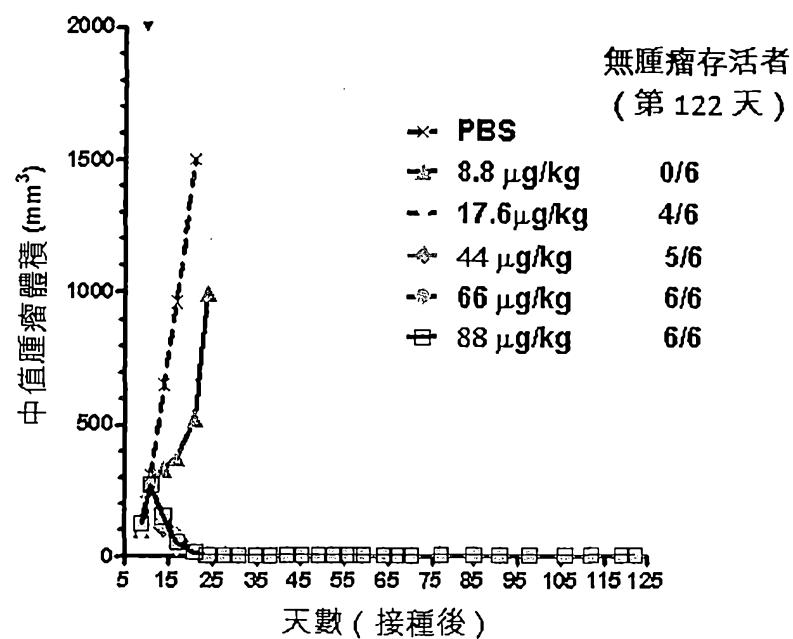
第 54 圖 磺酸化葉酸/細胞毒性化合物連結物之代表性合成流程



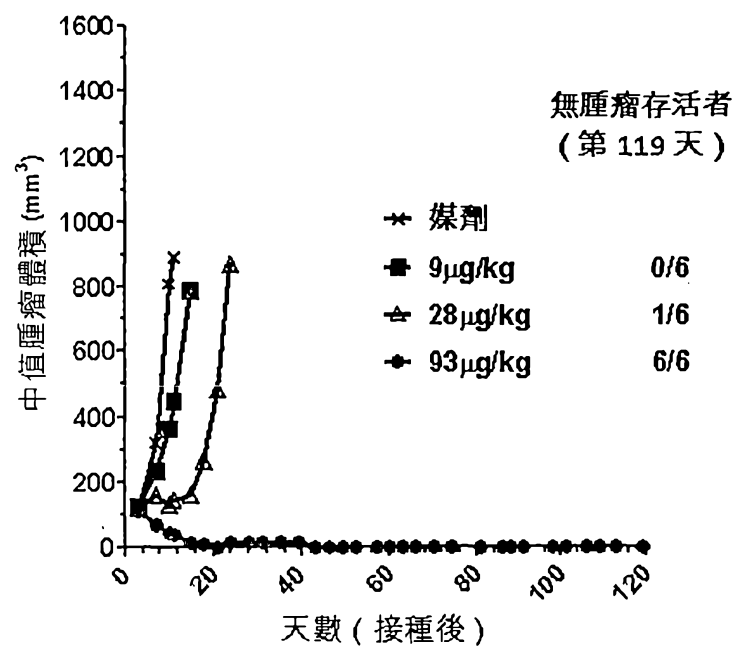
第 55 圖 幾種磺酸化藥物-抗體(huMy9-6)連結物之結構



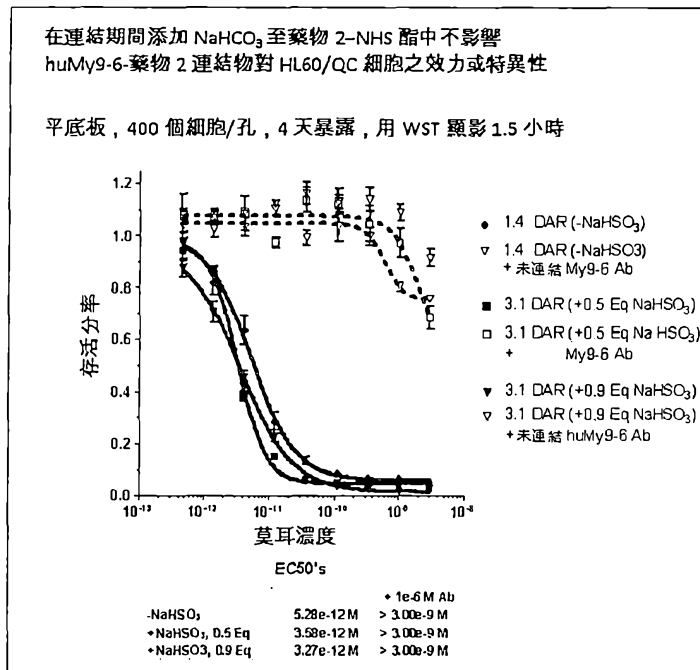
第 56 圖 huMy9-6-藥物 2 於帶 HL60/QC 腫瘤小鼠中之活體內功效



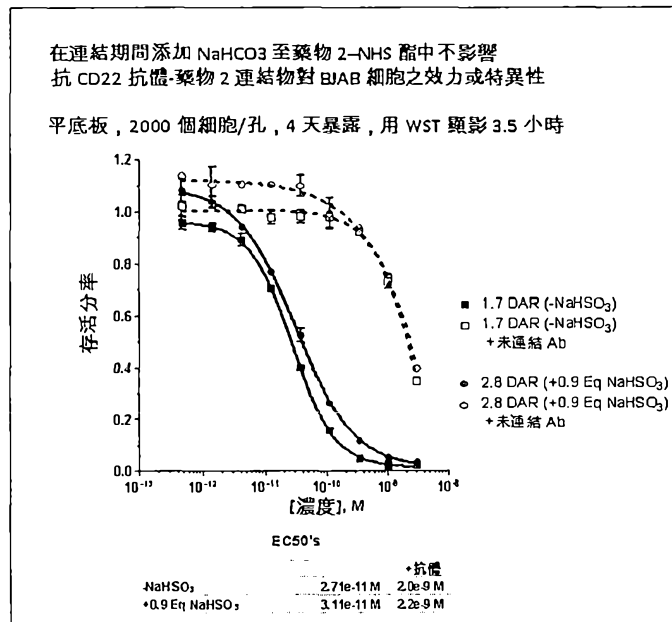
第 57 圖 huMy9-6-藥物 2 於帶 MOLM-13 腫瘤小鼠中之活體內功效



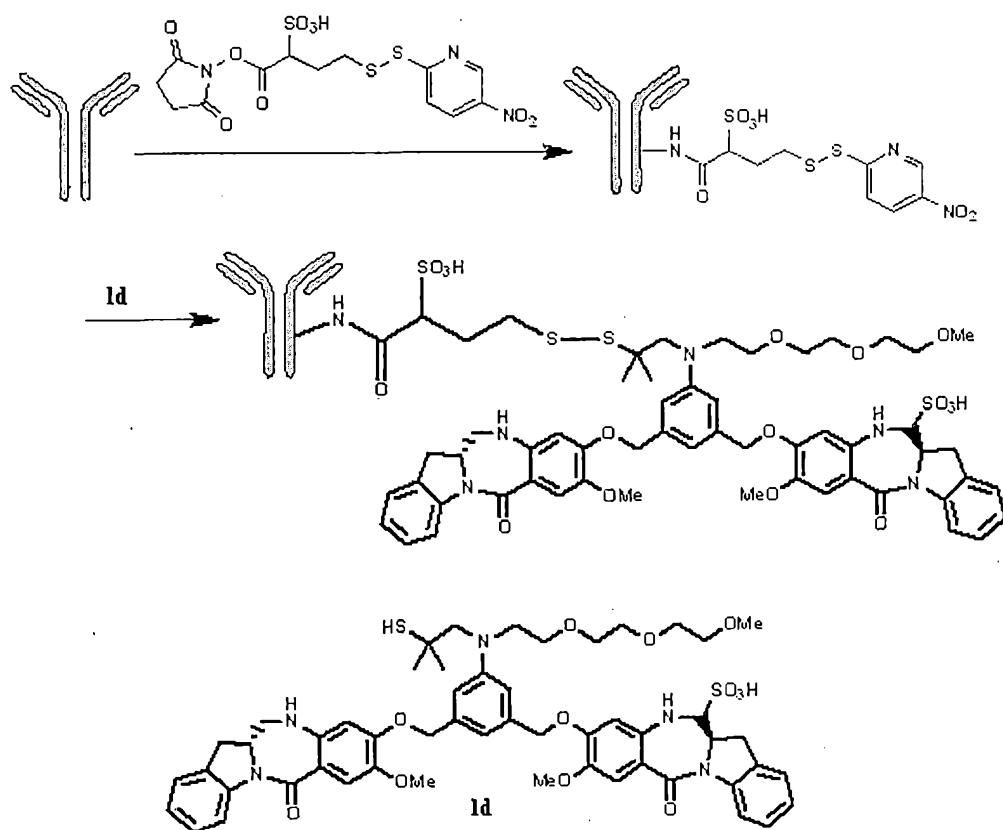
第 58 圖 在亞硫酸氫鈉存在及不存在下製備之 HuMy9-6-2 連結物對表現 CD33 抗原之 HL60 細胞顯示類似的活體外細胞毒性



第 59 圖 在亞硫酸氫鈉存在及不存在下製備之抗 CD22 抗體-2 連結物對表現 CD22 抗原之 BJAB 細胞顯示類似的活體外細胞毒性



第 60 圖



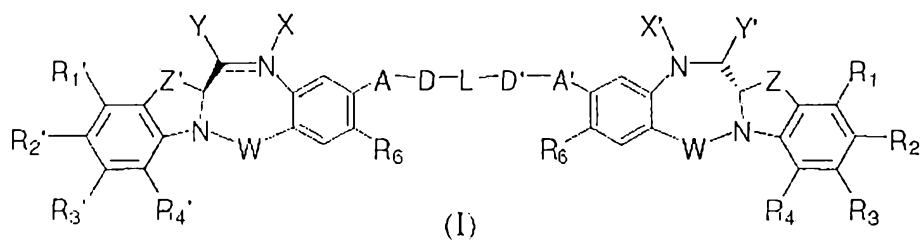
四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

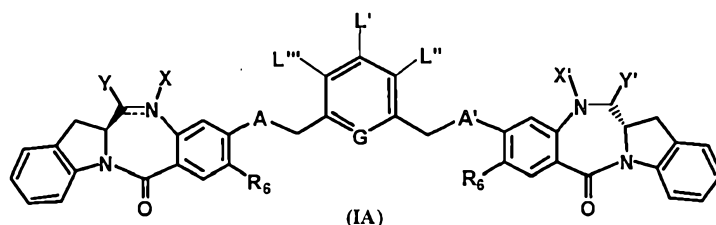
五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：



七、申請專利範圍：

105 年 9 月 / 日 修正
補充

1. 一種細胞毒性化合物，其包含鏈接至反應性基團之連接基團，該連接基團能夠將該細胞毒性化合物共價鏈接至細胞結合劑(CBA)，其中該細胞毒性化合物由下式表示：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

N 與 C 之間之雙線 = 表示單鍵或雙鍵，其限制條件為，當其為雙鍵時，X 不存在，且 Y 為 -H 或具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基，且當其為單鍵時，X 為 -H，且 Y 為選自以下之離去基團：-OR、-OCOR'、-OCOOR'、-OCONR'R''、-NR'R''、-NR'COR''、-NR'NR'R''、視情況取代之 5 員或 6 員含氮雜環、以 -NR'(C=NH)NR'R'' 表示之胍、胺基酸或以 -NRCOP' 表示之肽(其中 P' 為胺基酸或含有 2 至 20 個胺基酸單元之多肽)、-SR、-SOR'、-SO₂M、-SO₃M、-OSO₃M、鹵素、氰基及疊氮基；

M 為 -H 或陽離子；

R 在每次出現時獨立選自由以下組成之群：-H、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、聚乙二醇單元 -(CH₂CH₂O)_n-R^c、視情況取代之具有 6 至 18 個碳原子之芳基、視情況取代之含有一或

多個獨立選自氮、氧及硫之雜原子的 5 員至 18 員雜芳基環，或視情況取代之含有 1 至 6 個獨立選自 O、S、N 及 P 之雜原子的 3 員至 18 員雜環；

R' 及 R'' 各獨立選自 -H、-OH、-OR、-NHR、-NR₂、-COR、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、聚乙二醇單元 -(CH₂CH₂O)_n-R^c，及視情況取代之具有 1 至 6 個獨立選自 O、S、N 及 P 之雜原子的 3 員至 18 員雜環；

R^c 為 -H，或取代或未取代之具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基；

n 為 1 至 24 之整數；

X' 為 -H；

Y' 為 -H；

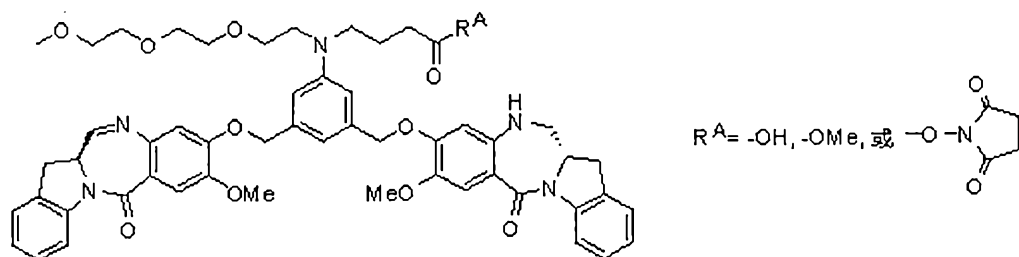
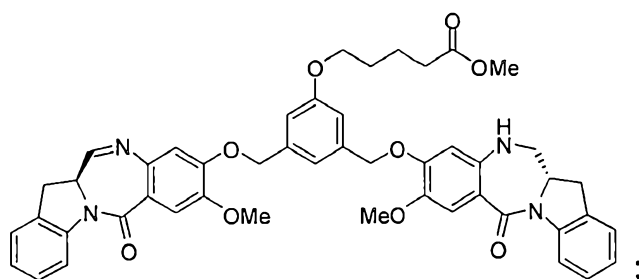
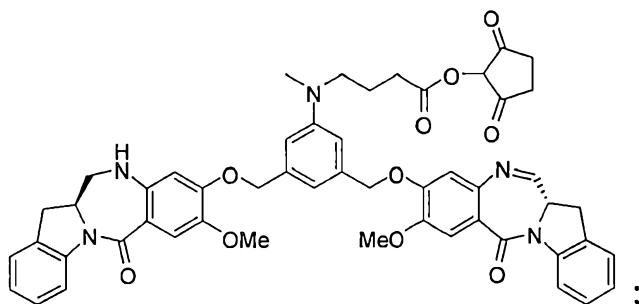
R₆ 為 -OMe；

A 與 A' 為 -O-，

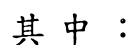
R₅ 在每次出現時獨立地為 -H，或視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈或分支烷基；

L' 獨立選自 -H、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、聚乙二醇單元 -(OCH₂CH₂)_n-R^c、鹵素、胍 [-NH(C=NH)NH₂]、-OR、-NR'R''、-NO₂、-NR'COR''、-SR、以 -SOR' 表示之亞砷、以 -SO₂R' 表示之砷、磺酸根 -SO₃M、硫酸根 -OSO₃M、以 -SO₂NR'R'' 表示之磺醯胺、氰基、疊氮基、-COR'、-OCOR'、-OCONR'R'' 及鍵接至反應性基團之連接基團；

其限制條件為，該化合物不為以下化合物中任一者：



2. 如請求項 1 之化合物，其中 L' 為該鏈接至反應性基團之連接基團，且 L'' 及 L''' 為 -H。
3. 如請求項 1 之化合物，其中 L' 以下式表示：



W'與V相同或不同，且各獨立地不存在，或選自- $\text{CR}^e\text{R}^{e'}$ -、
-O-、-O-C(=O)-、-C(=O)-O-、-S-、-SO-、-SO₂-、-CH₂-S-

-CH₂O-、-CH₂NR^e-、-O-(C=O)O-、-O-(C=O)N(R^e)-、-N(R^e)-、
 -N(R^e)-C(=O)-、-C(=O)-N(R^e)-、-N(R^e)-C(=O)O-、
 -N(C(=O)R^e)C(=O)-、-N(C(=O)R^e)-、-(O-CH₂-CH₂)_n-、-SS-
 或 -C(=O)- 或胺基酸，或具有 2 至 8 個胺基酸之肽；

R^x 與 R^y 相同或不同，且各獨立地不存在，或為視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、帶有 6 至 10 個碳原子之芳基或帶有 1 至 3 個選自 O、N 或 S 之雜原子之 3 員至 8 員雜環；

R^e 與 R^{e'} 相同或不同，且選自 -H、具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基，或 -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k，其中 R^k 為 -H、具有 1 至 6 個碳原子且視情況帶有二級胺基 -NHR¹⁰¹ 或三級胺基 -NR¹⁰¹R¹⁰² 之直鏈、分支環狀烷基，或 5 員或 6 員含氮雜環，其中 R¹⁰¹ 及 R¹⁰² 各獨立地為具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基；

n 為 1 至 24 之整數；

J 包含該所鍵接之反應性基團，且選自馬來醯亞胺、鹵代乙醯胺基、-SH、-SSR^d、-CH₂SH、-CH(Me)SH、-C(Me)₂SH、-NHR^{c1}、-CH₂NHR^{c1}、-NR^{c1}NH₂、-COOH 及 -COE，其中 -COE 表示反應性酯，其選自但不限於 N-羥基琥珀醯亞胺酯、N-羥基磺基琥珀醯亞胺酯、硝基苯基酯、二硝基苯基酯、磺基-四氟苯基酯、及五氟苯基酯，且其中 R^{c1} 為 -H、或取代或未取代之具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基，且

R^d 選自苯基、硝基苯基、二硝基苯基、羧基硝基苯基、吡啶基或硝基吡啶基。

4. 如請求項 3 之化合物，其中 J 為 -SH、-SSR^d、馬來醯亞胺、或 N-羥基琥珀醯亞胺酯。

5. 如請求項 4 之化合物，其中：

$R^{e'}$ 為 -H 或 -Me；

R^e 為具有 1 至 6 個碳原子之直鏈或分支烷基、或 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$ ；

n 為 2 至 8 之整數；且

R^k 為 -H、-Me 或 $-CH_2CH_2-NMe_2$ 。

6. 如請求項 5 之化合物，其中 V 為胺基酸或具有 2 至 8 個胺基酸之肽。

7. 如請求項 6 之化合物，其中 V 為纈胺酸-瓜胺酸、gly-gly-gly 或 ala-leu-ala-leu。

8. 如請求項 3 之化合物，其中：

W' 為 -O-、 $-N(R^e)-$ 或 $-N(R^e)-C(=O)-$ ；

R^e 為 -H、具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基、或 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$ ；

R^x 為具有 1 至 6 個碳原子之直鏈或分支烷基；

V 不存在，或為 $-(O-CH_2-CH_2)_n-$ 、 $-C(=O)-NH-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-C(=O)-$ ；

R^y 不存在，或為具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基；
且

J 為 -SH、-SSR^d 或 -COE。

9. 如請求項 3 之化合物，其中：

W' 為 $-O-$ 、 $-N(R^e)-$ 或 $-N(R^e)-C(=O)-$ ；

R^e 為 $-H$ 、 $-Me$ 或 $-(CH_2-CH_2-O)_n-Me$ ；

n 為 2 至 6 之整數；

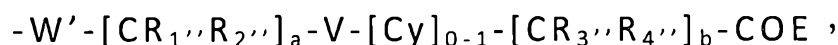
R^x 為帶有 1 至 6 個碳原子之直鏈或分支烷基；

V 及 R^y 不存在；且

J 為 $-COE$ 。

10. 如請求項 9 之化合物，其中 $-COE$ 為 N -羥基琥珀醯亞胺酯。

11. 如請求項 9 之化合物，其中 L' 以下式表示：



其中：

$R_{1''}$ 、 $R_{2''}$ 及 $R_{3''}$ 各獨立地為 $-H$ 或 $-Me$ ；

$R_{4''}$ 為 $-H$ 、 $-Me$ 、 $-SO_3H$ 或 $-SO_3^-M^+$ ，其中 M^+ 為醫藥學上可接受之陽離子；

a 為 0-2 之整數， b 為 0-3 之整數；且

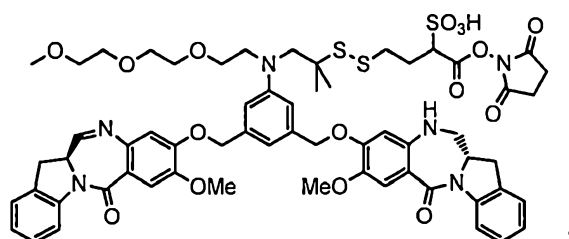
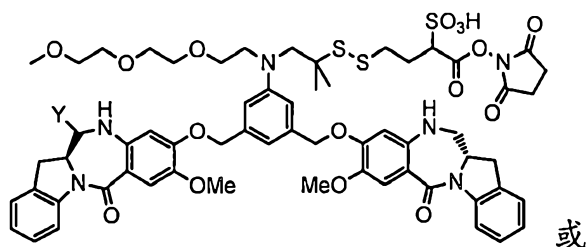
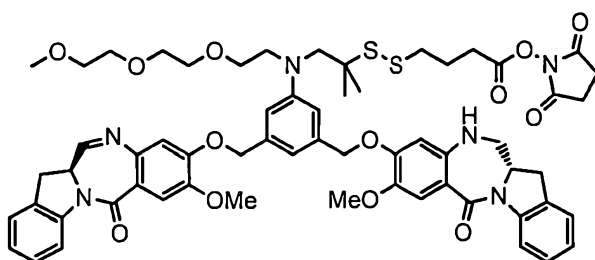
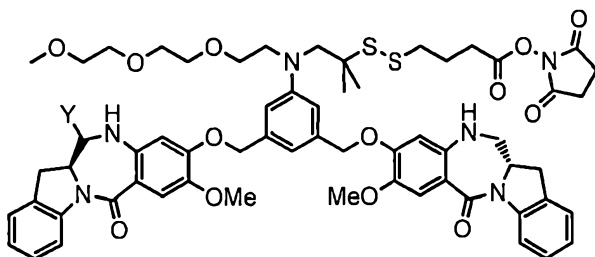
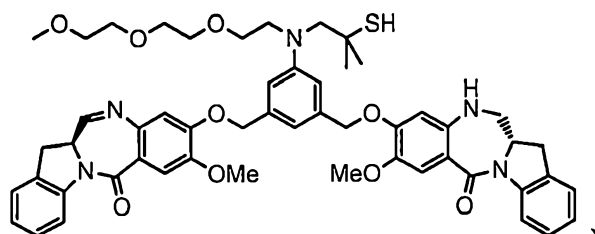
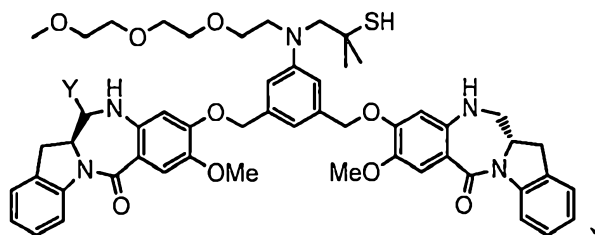
Cy 為視情況取代之帶有 N 雜原子之 5 員雜環。

12. 如請求項 11 之化合物，其中 W' 為 $-N(R^e)-$ 。

13. 如請求項 12 之化合物，其中 R^e 為 $-(CH_2-CH_2-O)_{2-6}-R^k$ ，其中 R^k 為 $-H$ 、具有 1 至 6 個碳原子之直鏈、分支環狀烷基。

14. 如請求項 13 之化合物，其中 V 為 $-S-$ 或 $-SS-$ 。

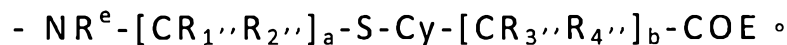
15. 如請求項 11 之化合物，其中 L' 以下式表示：



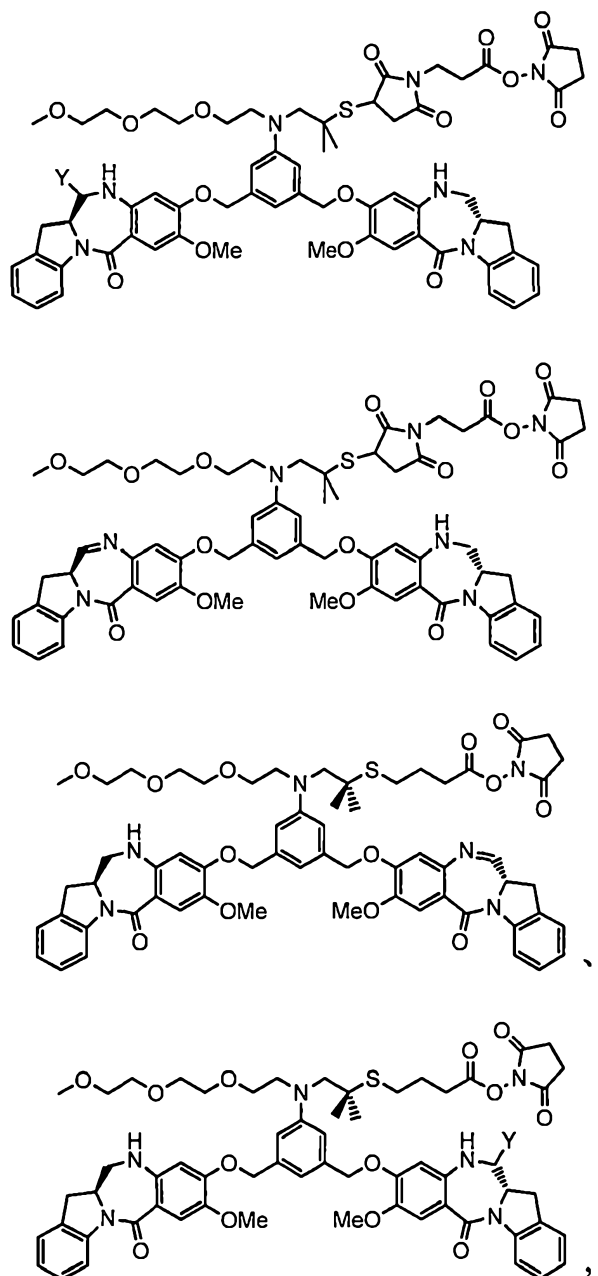
或其醫藥學上可接受之鹽，其中 $Y-SO_3M$ 且 M 為 $-H$ 或醫藥學上可接受之陽離子。

17. 如請求項 16 之化合物，其中 M 為 $-H$ 、 Na^+ 或 K^+ 。

18. 如請求項 11 之化合物，其中 L' 以下式表示：



19. 如請求項 1 之化合物，其為：

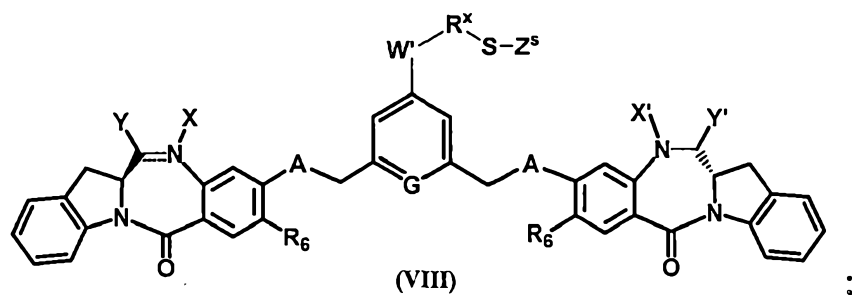


或其醫藥學上可接受之鹽，其中 Y 為 $-SO_3M$ 且 M 為 $-H$ 或

醫藥學上可接受之陽離子。

20. 如請求項 19 之化合物，其中 M 為 $-H$ 、 Na^+ 或 K^+ 。

21. 如請求項 1 之化合物，其中該化合物由下式表示：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

N 與 C 之間之雙線 $=$ 表示單鍵或雙鍵，其限制條件為，當其為雙鍵時，X 不存在，且 Y 為 $-H$ ，且當其為單鍵時，X 為 $-H$ ，且

Y 為 $-OR$ 、 $-OCOR'$ 、 $-SR$ 、 $-NR'R''$ 、 $-SO_3M$ 、 $-SO_2M$ 或 $-OSO_3M$ ，其中 M 為 $-H$ 或陽離子；

R 為 $-H$ 、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、或 PEG 基團 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$ ，其中 n 為 1 至 24 之整數，且 R^c 為具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基；

R' 與 R'' 相同或不同，且選自 $-H$ 、 $-OH$ 、 $-OR$ 、 $-NRR^{B'}$ 、 $-COR$ 、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、視情況取代之具有 6 至 18 個碳原子之芳基、視情況取代之具有 1 至 6 個選自 O、S、N 及 P 之雜原子之 3 員至 18 員雜環、PEG 基團 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$ ，其中 n 為 1 至 24 之整數；且 $R^{B'}$ 為 $-H$ 、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基

基，或 PEG 基團 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$ ；

X' 為 $-H$ ；

Y' 為 $-H$ ；

A 及 A' 為 $-O-$ ；

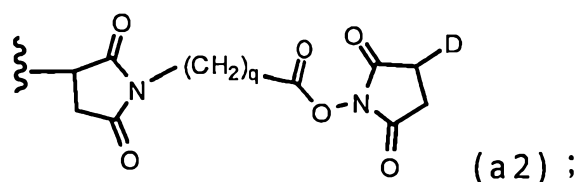
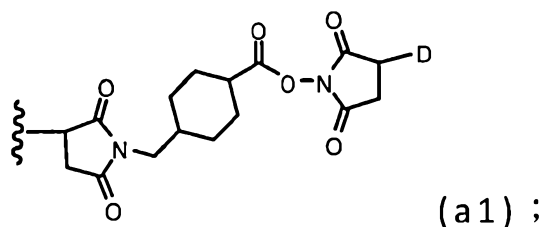
W' 不存在，或選自 $-O-$ 、 $-N(R^e)-$ 、 $-N(R^e)-C(=O)-$ 、 $-N(C(=O)R^e)-$ 、 $-S-$ 或 $-CH_2-S-$ 、 $-CH_2NR^e-$ ；

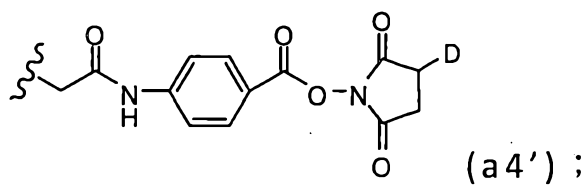
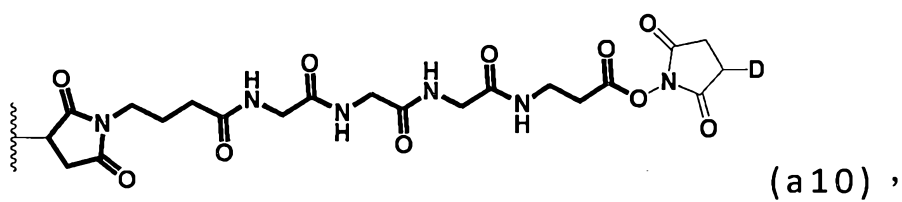
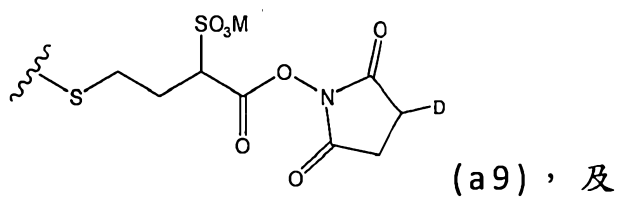
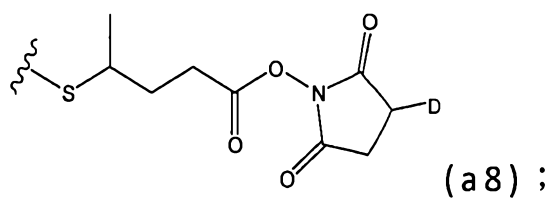
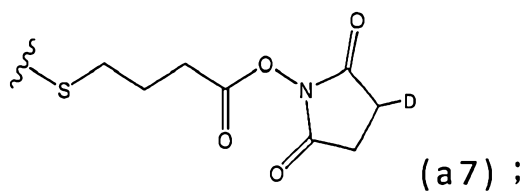
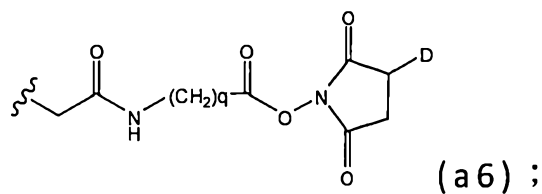
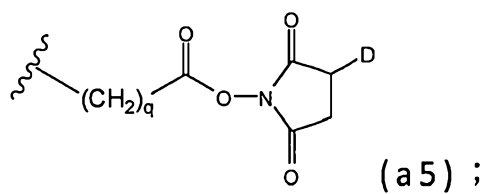
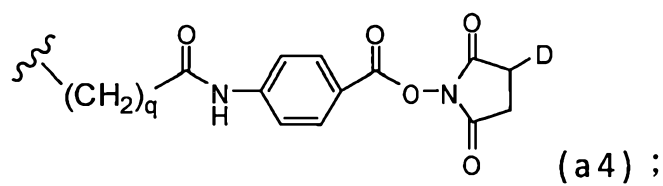
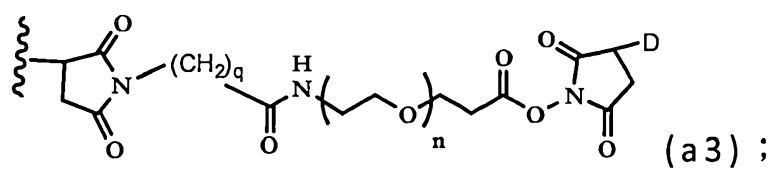
R^x 不存在，或選自具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基；

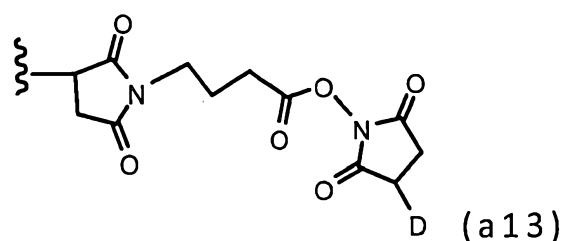
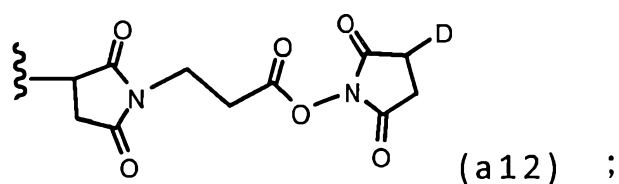
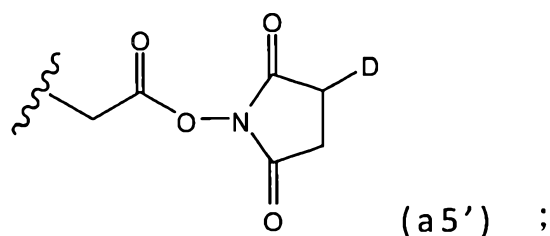
R^e 為 $-H$ 、具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基，或 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$ ，其中 R^k 為 $-H$ 、具有 1 至 6 個碳原子且視情況帶有二級胺基 $-NHR^{101}$ 或三級胺基 $-NR^{101}R^{102}$ 之直鏈、分支環狀烷基，或 5 員或 6 員含氮雜環，其中 R^{101} 及 R^{102} 各獨立地為具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基；

G 為 $-CH-$ ；

Z^s 為 $-H$ 或選自以下任一式：







其中：

q 為 1 至 5 之整數；

n 為 2 至 6 之整數；

D 為 -H 或 $-\text{SO}_3\text{M}$ ；

M 為 -H 或陽離子。

22. 如請求項 21 之化合物，其中 W' 為 $-\text{N}(\text{R}^e)-$ 。

23. 如請求項 22 之化合物，其中 R^e 為 $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{R}^k$ ，其中 R^k 為 -H、具有 1 至 6 個碳原子之直鏈、分支環狀烷基。

24. 如請求項 23 之化合物，其中 R^k 為 -H 或 -Me，n 為 4 且 q 為 2。

25. 如請求項 23 之化合物，其中 R^x 為具有 1 至 6 個碳原子之直鏈或分支烷基。

26. 如請求項 23 之化合物，其中 R^x 為 $-(\text{CH}_2)_p-(\text{CR}^f\text{R}^g)-$ ，

其中 R^f 及 R^g 各獨立選自 -H 或具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基；且 p 為 0、1、2 或 3。

27. 如請求項 26 之化合物，其中 R^f 與 R^g 相同或不同，且選自 -H 及 -Me；且 p 為 1。

28. 如請求項 21 之化合物，其中：

N 與 C 之間之雙線 $=$ 表示單鍵或雙鍵，其限制條件為，當其為雙鍵時，X 不存在，且 Y 為 -H，且當其為單鍵時，X 為 -H；Y 為 -OH 或 $-SO_3M$ ；

M 為 -H 或醫藥學上可接受之陽離子；

X' 及 Y' 均為 -H；

A 及 A' 均為 -O-；

R_6 為 -OMe；且

R^x 為具有 1 至 6 個碳原子之直鏈或分支烷基。

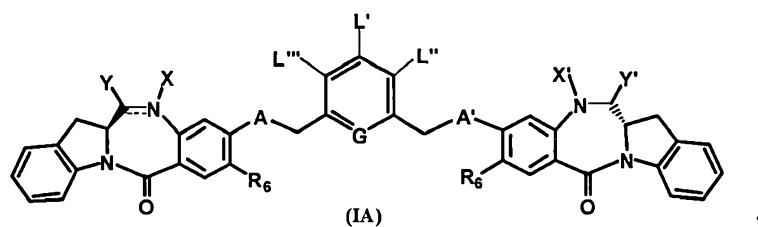
29. 如請求項 1 至 15、18 和 21-28 中任一項之化合物，其中 N 與 C 之間之雙線 $=$ 表示雙鍵。

30. 如請求項 1 至 15、18 和 21-28 中任一項之化合物，其中 Y 為 $-SO_3M$ 、-OH、-OMe、-OEt 或 -NHOH。

31. 如請求項 30 之化合物，其中 Y 為 $-SO_3M$ 。

32. 如請求項 31 之化合物，其中 M 為 -H、 Na^+ 或 K^+ 。

33. 一種連結物，其包含：細胞毒性化合物及細胞結合劑 (CBA)，其中該細胞毒性化合物包含將該細胞毒性化合物共價連接至該 CBA 之連接基團，且其中該細胞毒性化合物由下式表示：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

N 與 C 之間之雙線 = 表示單鍵或雙鍵，其限制條件為，當其為雙鍵時，X 不存在，且 Y 為 -H 或具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基，且當其為單鍵時，X 為 -H，且 Y 為選自以下之離去基團：-OR、-OCOR'、-OCOOR'、-OCONR'R''、-NR'R''、-NR'COR''、-NR'NR'R''、視情況取代之 5 員或 6 員含氮雜環、以 -NR'(C=NH)NR'R'' 表示之胍、胺基酸或以 -NRCOP' 表示之肽 (其中 P' 為胺基酸或含有 2 至 20 個胺基酸單元之多肽)、-SR、-SOR'、-SO₂M、-SO₃M、-OSO₃M、鹵素、氰基及疊氮基；

M 為 -H 或陽離子；

R 在每次出現時獨立選自由以下組成之群：-H、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、聚乙二醇單元 -(CH₂CH₂O)_n-R^c、視情況取代之具有 6 至 18 個碳原子之芳基、視情況取代之含有一或多個獨立選自氮、氧及硫之雜原子的 5 員至 18 員雜芳基環，或視情況取代之含有 1 至 6 個獨立選自 O、S、N 及 P 之雜原子的 3 員至 18 員雜環；

R' 及 R'' 各獨立選自 -H、-OH、-OR、-NHR、-NR₂、-COR、

視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、聚乙二醇單元 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$ 及視情況取代之具有 1 至 6 個獨立選自 O、S、N 及 P 之雜原子的 3 員至 18 員雜環；

R^c 為 -H 或取代或未取代之具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基；

n 為 1 至 24 之整數；

X' 為 -H；

Y' 為 -H；

R_6 為 -OMe；

A 與 A' 為 -O-；

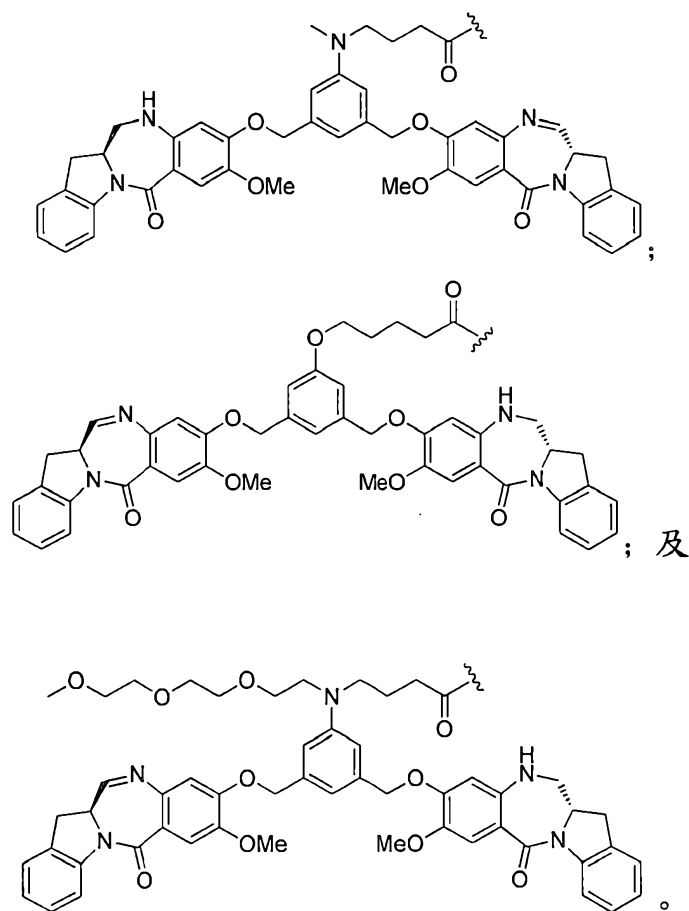
R_5 在每次出現時獨立地為 -H 或視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈或分支烷基；

L' 獨立選自 -H、視情況取代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、聚乙二醇單元 $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$ 、鹵素、胍 $[-NH(C=NH)NH_2]$ 、-OR、-NR'R''、-NO₂、-NR'COR''、-SR、以 -SOR' 表示之亞砷、以 -SO₂R' 表示之砷、磺酸根 -SO₃M、硫酸根 -OSO₃M、以 -SO₂NR'R'' 表示之磺醯胺、氰基、疊氮基、-COR'、-OCOR'、-OCONR'R'' 及該連接基團；

L'' 和 L''' 為 -H；且

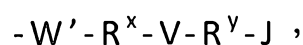
G 為 -CH-；

其限制條件為，該化合物不為以下化合物中任一者：



34. 如請求項 33 之連結物，其中 L' 為該連接基團且 L'' 及 L''' 為 $-H$ 。

35. 如請求項 33 之連結物，其中 L' 以下式表示：



其中：

W' 與 V 相同或不同，且各獨立地不存在或選自 $-CR^eR^{e'}$ 、 $-O-$ 、 $-O-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-O-$ 、 $-S-$ 、 $-SO-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-CH_2-S-$ 、 $-CH_2O-$ 、 $-CH_2NR^e$ 、 $-O-(C=O)O-$ 、 $-O-(C=O)N(R^e)-$ 、 $-N(R^e)-$ 、 $-N(R^e)-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-N(R^e)-$ 、 $-N(R^e)-C(=O)O-$ 、 $-N(C(=O)R^e)C(=O)-$ 、 $-N(C(=O)R^e)-$ 、 $-(O-CH_2-CH_2)_n-$ 、 $-SS-$ 或 $-C(=O)-$ 或胺基酸，或具有 2 至 8 個胺基酸之肽；

R^x 與 R^y 相同或不同，且各獨立地不存在，或為視情況取

代之具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基、帶有 6 至 10 個碳原子之芳基或帶有 1 至 3 個選自 O、N 或 S 之雜原子之 3 員至 8 員雜環；

R^e 與 $R^{e'}$ 相同或不同，且選自 -H、具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基，或 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$ ，其中 R^k 為 -H、具有 1 至 6 個碳原子且視情況帶有二級胺基 $-NHR^{101}$ 或三級胺基 $-NR^{101}R^{102}$ 之直鏈、分支環狀烷基，或 5 員或 6 員含氮雜環，其中 R^{101} 及 R^{102} 各獨立地為具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基；

n 為 1 至 24 之整數；且

J 共價連接至該 CBA，且選自琥珀醯亞胺、乙醯胺基、-S-、-SS-、 $-CH_2S-$ 、 $-CH(Me)S-$ 、 $-C(Me)_2S-$ 、 $-NR^{c1}-$ 、 $-CH_2NR^{c1}-$ 、 $-NR^{c1}N-$ 及 $-C(=O)-$ ，其中 R^{c1} 為 -H，或取代或未取代之具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基。

36. 如請求項 35 之連結物，其中 J 為 -S-、-SS-、琥珀醯亞胺或 $-C(=O)-$ 。

37. 如請求項 36 之連結物，其中：

$R^{e'}$ 為 -H 或 -Me；

R^e 為具有 1 至 6 個碳原子之直鏈或分支烷基、或 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$ ；

n 為 2 至 8 之整數；且

R^k 為 -H、-Me 或 $-CH_2CH_2-NMe_2$ 。

38. 如請求項 37 之連結物，其中 V 為胺基酸或具有 2 至

8 個胺基酸之肽。

39. 如請求項 38 之連結物，其中 V 為纈胺酸-瓜胺酸、gly-gly-gly 或 ala-leu-ala-leu。

40. 如請求項 35 之連結物，其中：

W' 為 -O-、-N(R^e)-或 -N(R^e)-C(=O)-；

R^e 為 -H、具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基、或 -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k；

R^x 為具有 1 至 6 個碳原子之直鏈或分支烷基；

V 不存在，或為 -(O-CH₂-CH₂)_n-、-C(=O)-NH-、-S-、-NH-C(=O)-；

R^y 不存在，或為具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基；
且

J 為 -S-、-SS-或 -C(=O)-。

41. 如請求項 35 之連結物，其中：

W' 為 -O-、-N(R^e)-或 -N(R^e)-C(=O)-；

R^e 為 -H、-Me 或 -(CH₂-CH₂-O)_n-Me；

n 為 2 至 6 之整數；

R^x 為帶有 1 至 6 個碳原子之直鏈或分支烷基；

V 及 R^y 不存在；且

J 為 -C(=O)-。

42. 如請求項 35 之連結物，其中 L'以下式表示：

-W'-[CR_{1''}R_{2''}]_a-V-[Cy]₀₋₁-[CR_{3''}R_{4''}]_b-C(=O)-，

其中：

R_{1''}、R_{2''}及 R_{3''}各獨立地為 -H 或 -Me；

$R_{4''}$ 為 $-H$ 、 $-Me$ 、 $-SO_3H$ 或 $-SO_3^-M^+$ ，其中 M^+ 為醫藥學上可接受之陽離子；

a 為 0-2 之整數、 b 為 0-3 之整數；且

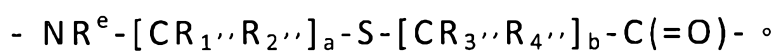
Cy 為視情況取代之帶有 N 雜原子之 5 員雜環。

43. 如請求項 42 之連結物，其中 W' 為 $-N(R^e)-$ 。

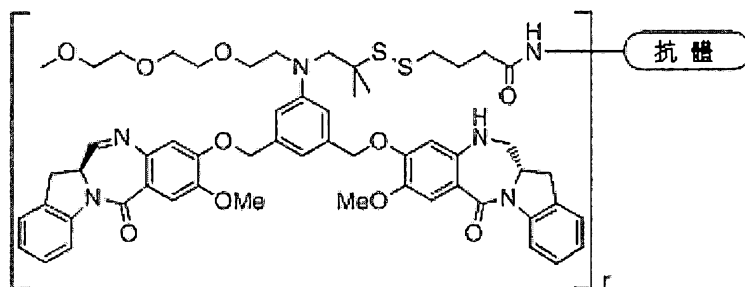
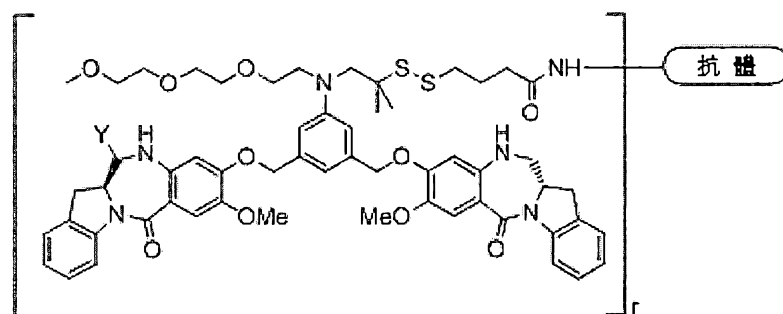
44. 如請求項 43 之連結物，其中 R^e 為 $-(CH_2-CH_2-O)_{2-6}-R^k$ ，其中 R^k 為具有 1 至 6 個碳原子之直鏈或分支烷基。

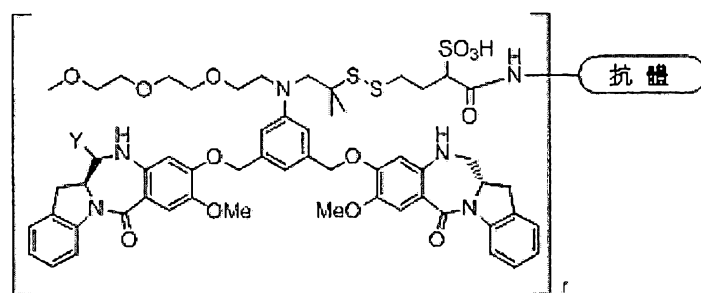
45. 如請求項 44 之連結物，其中 V 為 $-S-$ 或 $-SS-$ 。

46. 如請求項 42 之連結物，其中 L' 以下式表示：

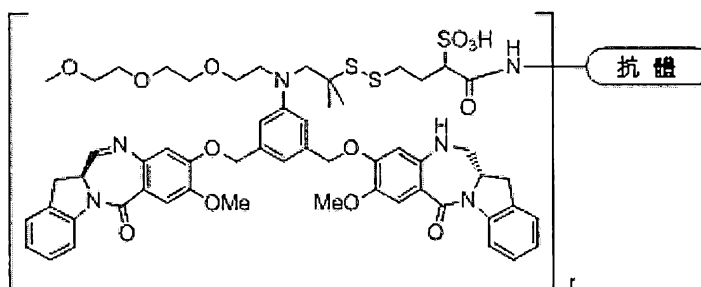


47. 如請求項 33 之連結物，其為：





或

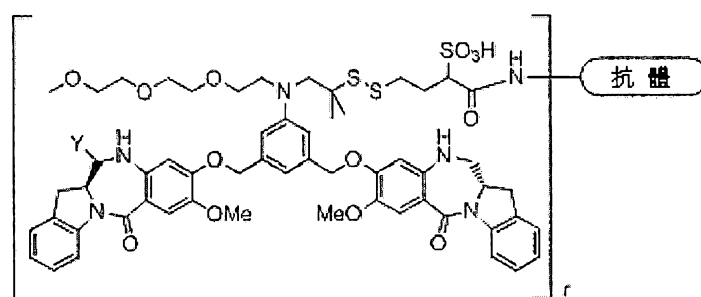


或其醫藥學上可接受之鹽，其中 r 為 1 至 10 之整數， Y 為 $-\text{SO}_3\text{M}$ 且 M 為 $-\text{H}$ 或醫藥學上可接受之陽離子。

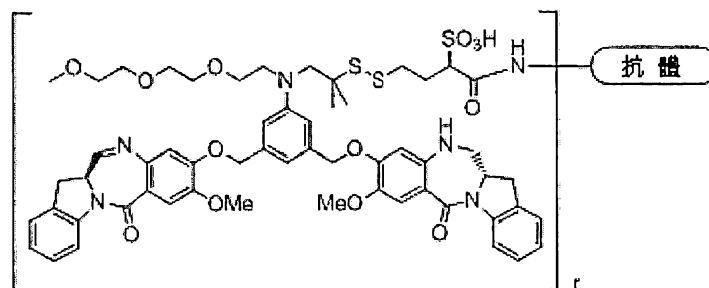
48. 如請求項 47 之連結物，其中 M 為 $-\text{H}$ 、 Na^+ 或 K^+ 。

49. 如請求項 48 之連結物，其中該抗體為 huMy9-6。

50. 如請求項 47 之連結物，其為



或



或其醫藥學上可接受之鹽。

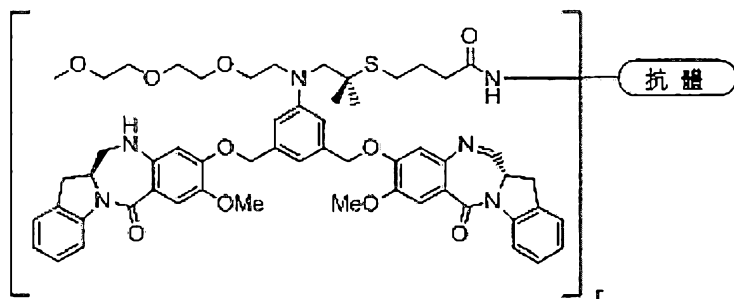
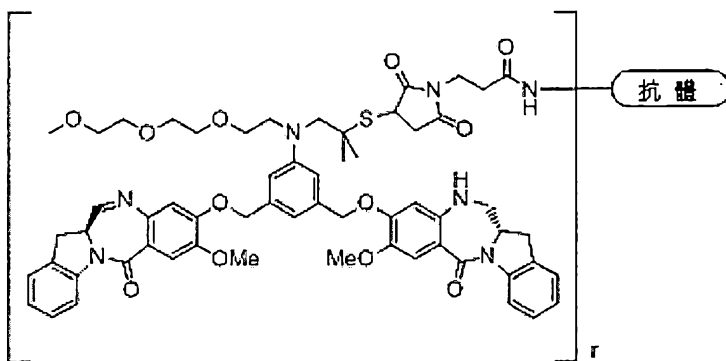
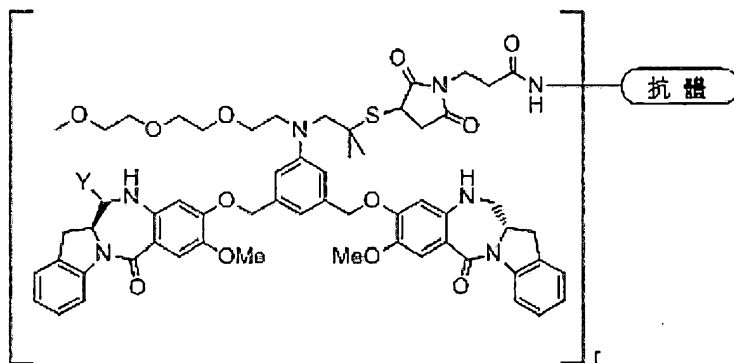
51. 如請求項 50 之連結物，其中 M 為 -H、Na⁺ 或 K⁺。

52. 如請求項 51 之連結物，其中該抗體為 huMy9-6。

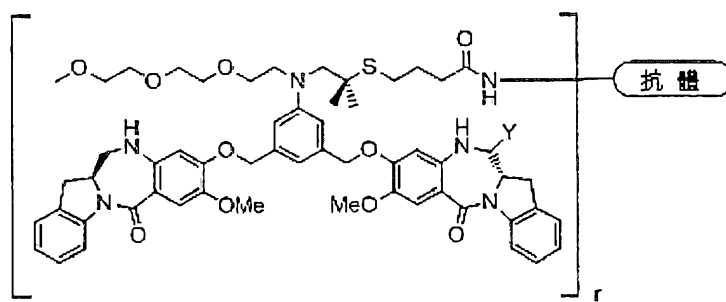
53. 如請求項 42 之連結物，其中 L' 以下式表示：



54. 如請求項 33 之連結物，其為：



或

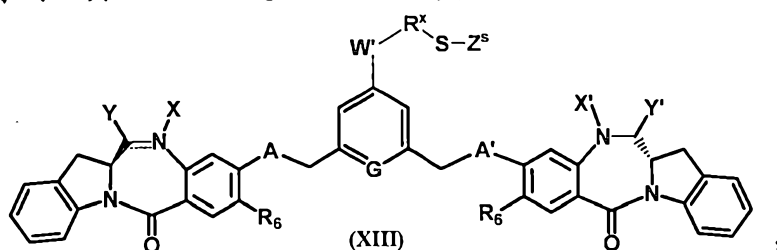


或其醫藥學上可接受之鹽，其中 r 為 1 至 10 之整數， Y 為 $-\text{SO}_3\text{M}$ 且 M 為 $-\text{H}$ 或醫藥學上可接受之陽離子。

55. 如請求項 54 之連結物，其中 M 為 $-\text{H}$ 、 Na^+ 或 K^+ 。

56. 如請求項 55 之連結物，其中該抗體為 huMy9-6。

57. 如請求項 33 之連結物，其中該化合物以下式表示：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

W' 不存在或選自 $-\text{O}-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^e)-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^e)-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{N}(\text{C}(=\text{O})\text{R}^e)-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}-$ 或 $-\text{CH}_2\text{NR}^e-$ ；

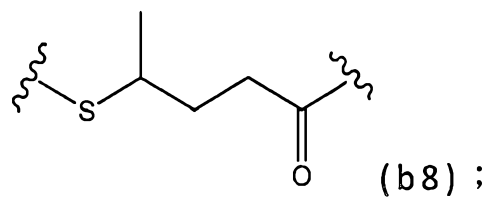
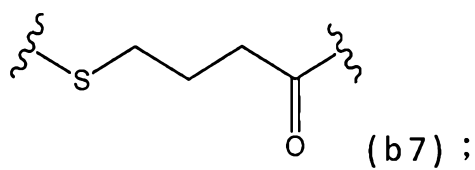
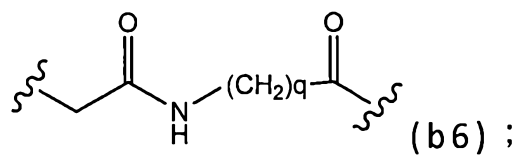
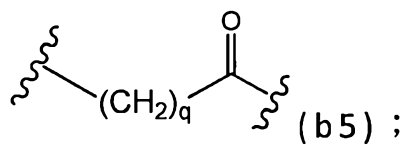
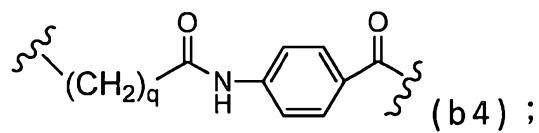
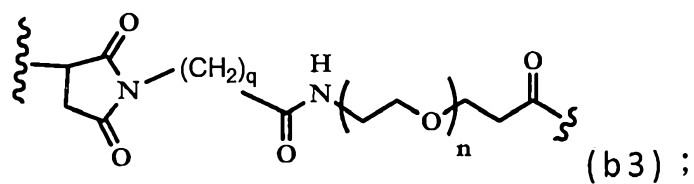
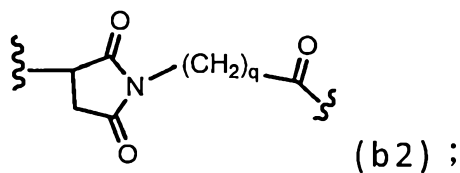
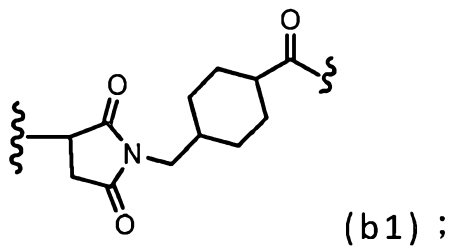
R^x 不存在，或選自具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基；

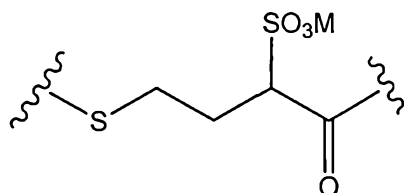
R^e 為 $-\text{H}$ 、具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基，或 $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{R}^k$ ，其中 R^k 為 $-\text{H}$ 、具有 1 至 6 個碳原子且視情況帶有二級胺基 $-\text{NHR}^{101}$ 或三級胺基 $-\text{NR}^{101}\text{R}^{102}$ 之直鏈、分支環狀烷基，或 5 員或 6 員含氮雜環，其中 R^{101} 及 R^{102} 各獨立地為具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支或環狀烷基、烯基或炔基；

n 為 2 至 6 之整數；

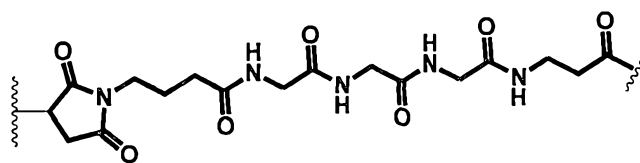
Z^s 連接至該 CBA，且選自：

一 鍵；

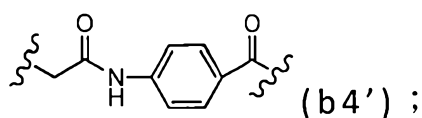




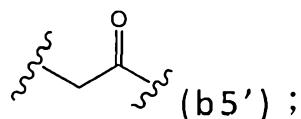
(b9), 及



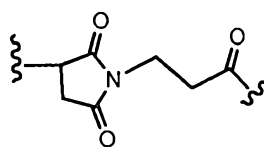
(b10),



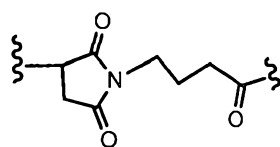
(b4') ;



(b5') ;



(b12) ;



(b13)

其中：

q 為 1 至 5 之整數；且

M 為 -H 或陽離子。

58. 如請求項 57 之連結物，其中 W' 為 $-N(R^e)-$ 。

59. 如請求項 58 之連結物，其中 R^e 為 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$ ，
其中 R^k 為 -H、具有 1 至 6 個碳原子之直鏈、分支環狀烷
基。

60. 如請求項 59 之連結物，其中 R^k 為 -H 或 -Me，n 為 4
且 q 為 2。

61. 如請求項 59 之連結物，其中 R^x 為具有 1 至 6 個碳原

子之直鏈或分支烷基。

62. 如請求項 59 之連結物，其中 R^x 為 $-(CH_2)_p-(CR^fR^g)-$ ，其中 R^f 及 R^g 各獨立選自 H 或具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支烷基；且 p 為 0、1、2 或 3。

63. 如請求項 62 之連結物，其中 R^f 與 R^g 相同或不同，且選自 H 及 Me；且 p 為 1。

64. 如請求項 57 之連結物，其中：

N 與 C 之間之雙線 $=$ 表示單鍵或雙鍵，其限制條件為，當其為雙鍵時，X 不存在，且 Y 為 -H，且當其為單鍵時，X 為 -H；Y 為 -OH 或 $-SO_3M$ ；

M 為 -H 或醫藥學上可接受之陽離子；

X' 及 Y' 均為 -H；

A 及 A' 均為 -O-；

R_6 為 -OMe；且

R^x 為具有 1 至 6 個碳原子之直鏈或分支烷基。

65. 如請求項 33-46、53 和 57-64 中任一項之連結物，其中 N 與 C 之間之雙線 $=$ 表示雙鍵。

66. 如請求項 33-46、53 和 57-64 中任一項之連結物，其中 Y 選自 $-SO_3M$ 、-OH、-OMe、-OEt 或 -NHOH。

67. 如請求項 66 之連結物，其中 Y 為 $-SO_3M$ 。

68. 如請求項 67 之連結物，其中 M 為 -H、 Na^+ 或 K^+ 。

69. 如請求項 33 之連結物，其中該連結物包含 1-10 個細胞毒性化合物，各細胞毒性化合物包含將該細胞毒性化合物連接至該 CBA 之連接基團，且該連結物上之各細胞

毒性化合物相同。

70. 如請求項 33 之連結物，其中該細胞結合劑結合於選自以下各物之靶細胞：腫瘤細胞、感染病毒之細胞、感染微生物之細胞、感染寄生蟲之細胞、自體免疫細胞、活化細胞、骨髓細胞、活化 T 細胞、B 細胞或黑素細胞；表現 CD4、CD6、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD38、CD40、CD44、CD56、EpCAM、CanAg、CALLA、Her-2 抗原或 Her-3 抗原之細胞；或表現胰島素生長因子受體、表皮生長因子受體或葉酸受體之細胞。

71. 如請求項 70 之連結物，其中該細胞結合劑為特異性結合於該靶細胞之抗體、單鏈抗體、抗體片段；特異性結合於靶細胞之單株抗體、單鏈單株抗體或單株抗體片段；特異性結合於該靶細胞之嵌合抗體、嵌合抗體片段；特異性結合於該靶細胞之結構域抗體、結構域抗體片段；淋巴因子；激素；維生素；生長因子；集落(colony)刺激因子；或營養運輸分子。

72. 如請求項 71 之連結物，其中該抗體為表面重塑(resurfaced)抗體、表面重塑單鏈抗體或表面重塑抗體片段。

73. 如請求項 71 之連結物，其中該抗體為單株抗體、單鏈單株抗體或其單株抗體片段。

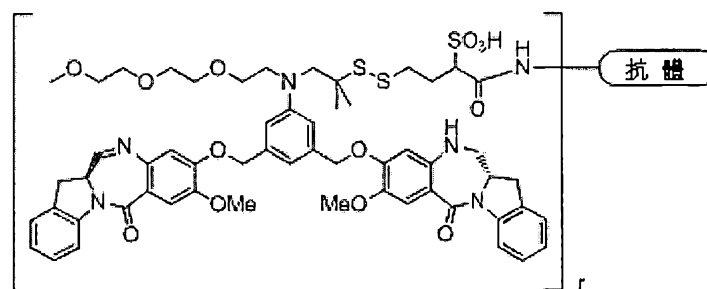
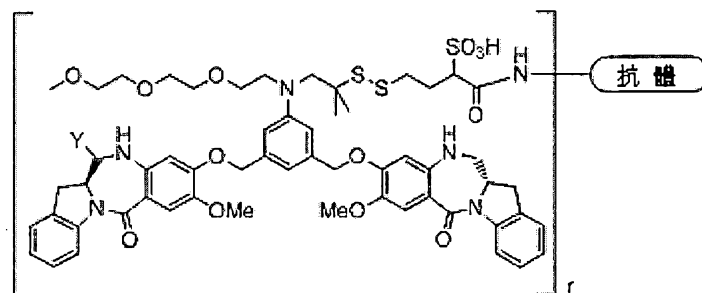
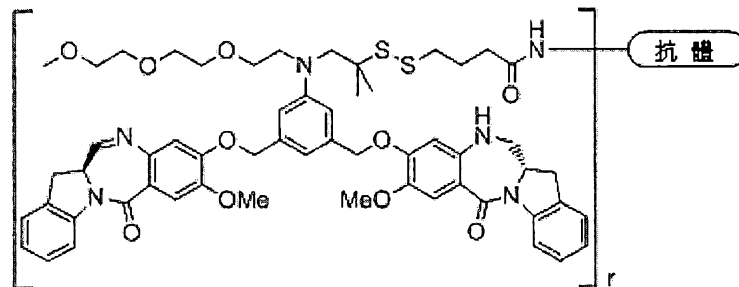
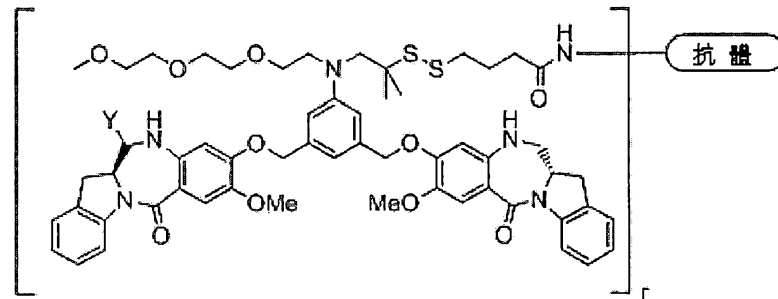
74. 如請求項 71 之連結物，其中該抗體為人化抗體、人化單鏈抗體或人化抗體片段。

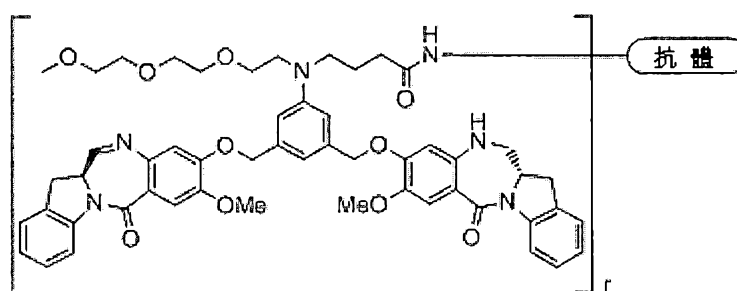
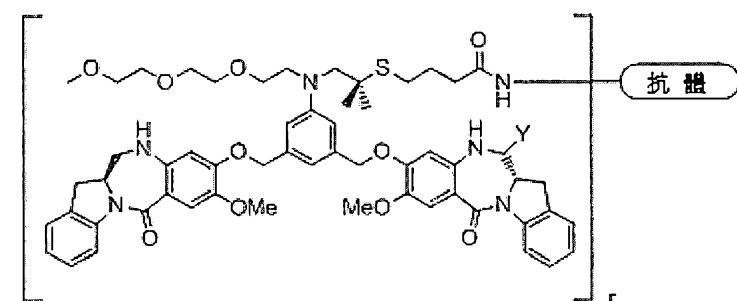
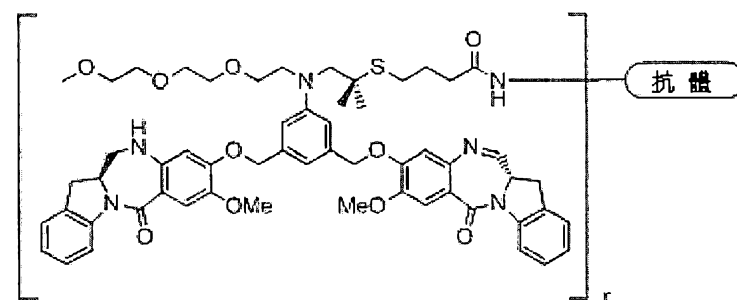
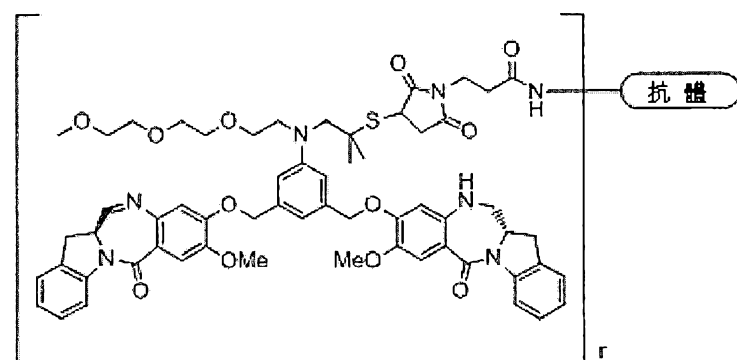
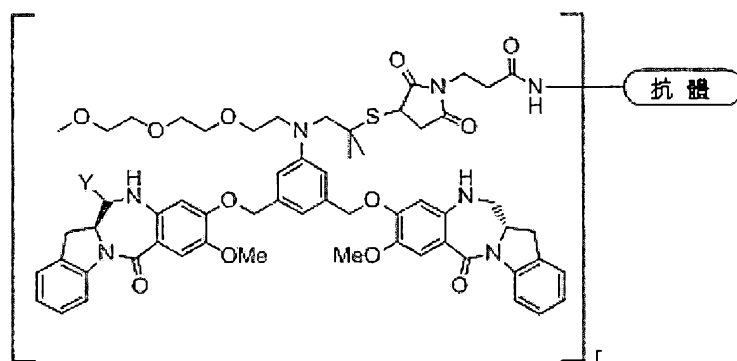
75. 一種醫藥組合物，其包含如請求項 33-74 中任一項之

連結物及醫藥學上可接受之載劑。

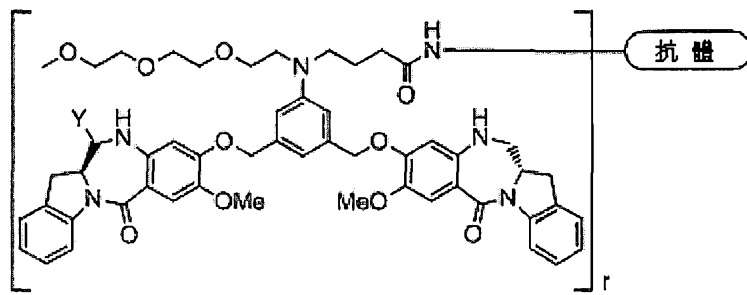
76. 一種如請求項 33-74 中任一項之連結物之用途，其係用於製備用於治療哺乳動物中的癌症之醫藥品，其中該醫藥品視情況包含化療劑。

77. 如請求項 76 之用途，其中該連結物為：





或



或其醫藥學上可接受之鹽，其中 r 為 1 至 10 之整數， Y 為 $-SO_3M$ 且 M 為 $-H$ 或醫藥學上可接受之陽離子。

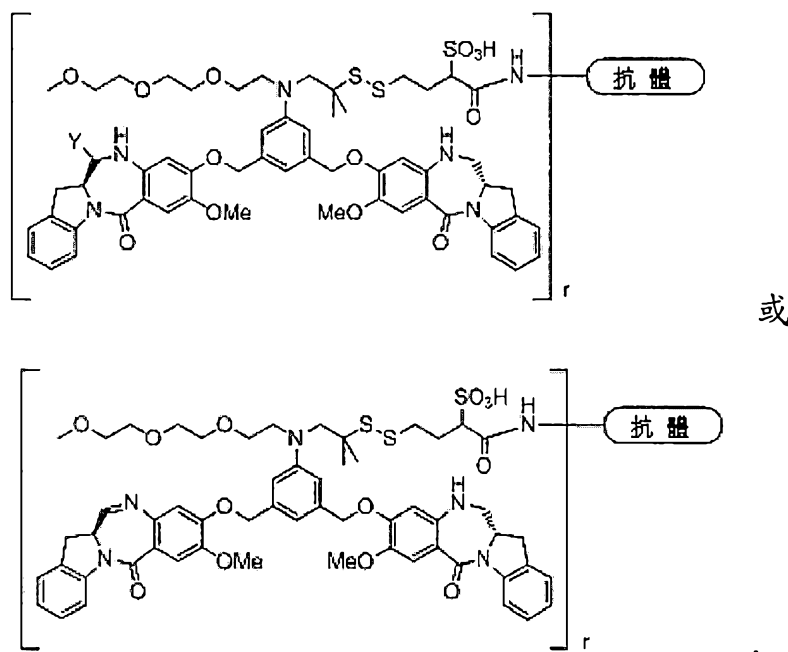
78. 如請求項 76 之用途，其中該第二化療劑係依序或連貫投予該哺乳動物。

79. 如請求項 76 之用途，其中該癌症選自乳癌、結腸癌、腦癌、前列腺癌、腎癌、胰腺癌、卵巢癌、頭頸癌、黑素瘤、結直腸癌、胃癌、鱗狀細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、睪丸癌、套細胞癌(Merkel cell carcinoma)、膠質母細胞瘤、神經母細胞瘤、淋巴器官癌症及血液系統惡性疾病，包括白血病(急性淋巴細胞白血病(Acute lymphoblastic leukemia, ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴細胞白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、急性單核細胞白血病(AMOL)、毛細胞白血病(HCL)、T 細胞幼淋巴細胞(prolymphocytic)白血病(T-PLL)、大顆粒淋巴細胞白血病、成人 T 細胞白血病)、淋巴瘤(小淋巴細胞淋巴瘤(SLL)、霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin's lymphomas)(結節硬化型、混合細胞型、富含淋巴細胞型、淋巴細胞耗盡型或未耗盡型及結節性淋巴細胞為主型霍奇金氏淋巴瘤)、非霍奇金氏淋巴瘤(所有亞型)、慢性淋巴細胞白血

病/小淋巴細胞淋巴瘤、B 細胞幼淋巴細胞白血病、淋巴漿細胞淋巴瘤、脾邊緣區淋巴瘤、漿細胞贅瘤(漿細胞骨髓瘤、漿細胞瘤、單株免疫球蛋白沈積病、重鏈疾病)、結外邊緣區 B 細胞淋巴瘤(MALT 淋巴瘤)、結內邊緣區 B 細胞淋巴瘤(NMZL)、濾泡淋巴瘤、套細胞淋巴瘤、彌漫大 B 細胞淋巴瘤、縱隔(胸腺)大 B 細胞淋巴瘤、血管內大 B 細胞淋巴瘤、原發性滲出性淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤(Burkitt lymphoma)/白血病、T 細胞大顆粒淋巴細胞白血病、侵襲性 NK 細胞白血病、成人 T 細胞白血病/淋巴瘤、結外 NK/T 細胞淋巴瘤(鼻型)、腸病型 T 細胞淋巴瘤、肝脾 T 細胞淋巴瘤、母細胞性(Blastic)NK 細胞淋巴瘤、蕁樣真菌病(Mycosis fungoides)/塞紮裡氏症候群(Sezary syndrome)、原發性皮膚 CD30 陽性 T 細胞淋巴增生性病、原發性皮膚型間變性(anaplastic)大細胞淋巴瘤、淋巴瘤樣丘疹病、血管免疫母細胞性 T 細胞淋巴瘤、周圍 T 細胞淋巴瘤(非特指型)、間變性大細胞淋巴瘤)、多發性骨髓瘤(漿細胞骨髓瘤或卡勒氏病(Kahler's disease))。

80. 如請求項 79 之用途，其中該癌症是急性骨髓性白血病(AML)。

81. 如請求項 77 之用途，其中該連結物為



或其醫藥學上可接受之鹽。

82. 如請求項 81 之用途，其中該抗體為 huMy9-6。

83. 如請求項 81 之用途，其中該癌症係選自乳癌、結腸癌、腦癌、前列腺癌、腎癌、胰腺癌、卵巢癌、頭頸癌、黑素瘤、結直腸癌、胃癌、鱗狀細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、睪丸癌、套細胞癌、膠質母細胞瘤、神經母細胞瘤、淋巴器官癌症及血液系統惡性疾病，包括白血病(急性淋巴細胞白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴細胞白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、急性單核細胞白血病(AMOL)、毛細胞白血病(HCL)、T 細胞幼淋巴細胞白血病(T-PLL)、大顆粒淋巴細胞白血病、成人 T 細胞白血病)、淋巴瘤(小淋巴細胞淋巴瘤(SLL)、霍奇金氏淋巴瘤(結節硬化型、混合細胞型、富含淋巴細胞型、淋巴細胞耗盡型或未耗盡型及結節性淋巴細胞為主型霍奇金氏淋巴瘤)、非霍奇金氏淋巴瘤(所有

亞型)、慢性淋巴細胞白血病/小淋巴細胞淋巴瘤、B 細胞幼淋巴細胞白血病、淋巴漿細胞淋巴瘤、脾邊緣區淋巴瘤、漿細胞贅瘤(漿細胞骨髓瘤、漿細胞瘤、單株免疫球蛋白沈積病、重鏈疾病)、結外邊緣區 B 細胞淋巴瘤(MALT 淋巴瘤)、結內邊緣區 B 細胞淋巴瘤(NMZL)、濾泡淋巴瘤、套細胞淋巴瘤、彌漫大 B 細胞淋巴瘤、縱隔(胸腺)大 B 細胞淋巴瘤、血管內大 B 細胞淋巴瘤、原發性滲出性淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤/白血病、T 細胞大顆粒淋巴細胞白血病、侵襲性 NK 細胞白血病、成人 T 細胞白血病/淋巴瘤、結外 NK/T 細胞淋巴瘤(鼻型)、腸病型 T 細胞淋巴瘤、肝脾 T 細胞淋巴瘤、母細胞性 NK 細胞淋巴瘤、蕁樣真菌病/塞紮裡氏症候群、原發性皮膚 CD30 陽性 T 細胞淋巴增生性病變、原發性皮膚型間變性大細胞淋巴瘤、淋巴瘤樣丘疹病、血管免疫母細胞性 T 細胞淋巴瘤、周圍 T 細胞淋巴瘤(非特指型)、間變性大細胞淋巴瘤)、多發性骨髓瘤(漿細胞骨髓瘤或卡勒氏病)。

84. 如請求項 83 之用途，其中該癌症為急性骨髓性白血病(AML)。

85. 如請求項 82 之用途，其中該癌症為急性骨髓性白血病(AML)。

八、圖式：

如次頁