



(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 I572361 B

(45)公告日：中華民國 106 (2017) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：103140861

(22)申請日：中華民國 103 (2014) 年 11 月 25 日

(51)Int. Cl. : A61K47/48 (2006.01)

C07K1/113 (2006.01)

C07K16/00 (2006.01)

(30)優先權：2013/11/26 美國

61/909,236

2014/05/23 美國

62/002,614

(71)申請人：諾華公司(瑞士) NOVARTIS AG (CH)

瑞士

(72)發明人：胡 基英 HU, QI-YING (US)；今瀨秀友 IMASE, HIDETOMO (JP)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

Shandiz AT wt al. "Intramolecular cross-linking evaluated as a structural probe of the protein folding transition state." *Biochemistry*, 2007, 46(48), 13711-13719.

2. Zachary M. Carrico wt al. "N-Terminal Labeling of Filamentous Phage To Create Cancer Marker Imaging Agents." *ACS nano*, 2012, 6(8), 6675-6680

審查人員：陳瓊如

申請專利範圍項數：14 項 圖式數：9 共 75 頁

(54)名稱

肱共軛至酮修飾多肽的方法

METHODS FOR OXIME CONJUGATION TO KETONE-MODIFIED POLYPEPTIDES

(57)摘要

本發明提供用以自酮修飾蛋白質製備蛋白質共軛物的經改良之方法。在一個實施例中，該蛋白質係藉由以下製備：藉由與 1,3-二鹵丙酮或類似含酮反應物反應來鍵聯兩種游離半胱氨酸，將該兩種半胱氨酸之硫原子鍵聯在一起。隨後使用插入該等硫原子之間的酮來形成肱，因此共軛該蛋白質至有效負載物。在另一實施例中，兩種半胱氨酸殘基藉由與 1,3-二鹵丙酮或類似反應物反應而連接在一起，且使用新的酮來形成具有合適有效負載分子的肱，因此共軛該蛋白質至有效負載物。該方法為肱形成提供經改良之反應條件，由此達成較高產率及經改良之產物均質性。

The invention provides improved methods to prepare protein conjugates from a ketone-modified protein. In one embodiment, the protein is prepared by linking two free cysteines by reaction with a 1,3-dihaloacetone or similar ketone-containing reactant, linking the sulfur atoms of the two cysteines together. The ketone inserted between the sulfur atoms is then used to form an oxime, thus conjugating the protein to a payload. In another embodiment, two cysteine residues are tied together by reaction with a 1,3-dihaloacetone or similar reactant, and the new ketone is used to form an oxime with a suitable payload molecule, thus conjugating the protein to a payload. The method provides improved reaction conditions for the oxime formation, whereby higher yields and improved product homogeneity are achieved.

指定代表圖：

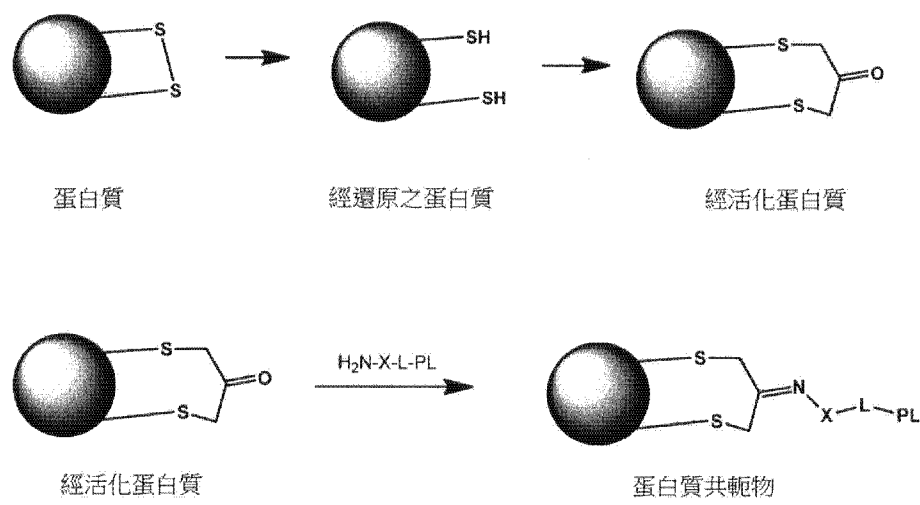
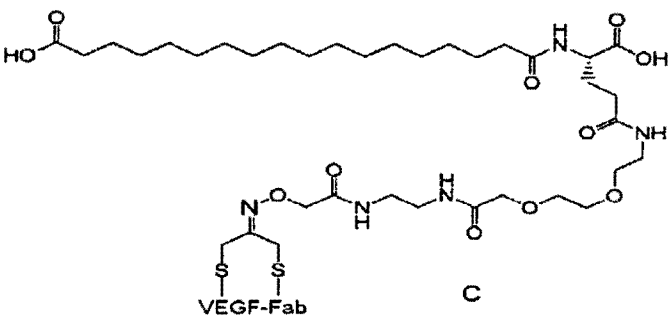


圖1

特徵化學式：



發明摘要

公告本

※ 申請案號：103140861

A61K47/48 (2006.01)

※ 申請日：103.11.25

※IPC 分類：C07K 1/13 (2006.01)

C07K16/00 (2006.01)

【發明名稱】

肱共軛至酮修飾多肽的方法

METHODS FOR OXIME CONJUGATION TO KETONE-MODIFIED POLYPEPTIDES

【中文】

本發明提供用以自酮修飾蛋白質製備蛋白質共軛物的經改良之方法。在一個實施例中，該蛋白質係藉由以下製備：藉由與1,3-二鹵丙酮或類似含酮反應物反應來鍵聯兩種游離半胱胺酸，將該兩種半胱胺酸之硫原子鍵聯在一起。隨後使用插入該等硫原子之間的酮來形成肱，因此共軛該蛋白質至有效負載物。在另一實施例中，兩種半胱胺酸殘基藉由與1,3-二鹵丙酮或類似反應物反應而連接在一起，且使用新的酮來形成具有合適有效負載分子的肱，因此共軛該蛋白質至有效負載物。該方法為肱形成提供經改良之反應條件，由此達成較高產率及經改良之產物均質性。

【英文】

The invention provides improved methods to prepare protein conjugates from a ketone-modified protein. In one embodiment, the protein is prepared by linking two free cysteines by reaction with a 1,3-dihaloacetone or similar ketone-containing reactant, linking the sulfur atoms of the two cysteines together. The ketone inserted between the sulfur atoms is then used to form an oxime, thus conjugating the protein to a payload. In another embodiment, two cysteine residues are tied together by reaction with a 1,3-dihaloacetone or similar reactant, and the new ketone is used to form an oxime with a suitable payload molecule, thus conjugating the protein to a payload. The method provides improved reaction conditions for the oxime formation, whereby higher yields and improved product homogeneity are achieved.

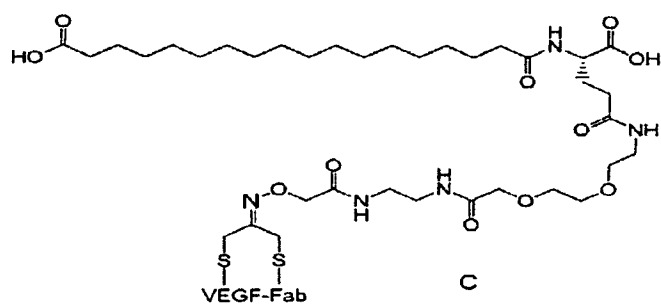


【本案指定代表圖】：第（1）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：



發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

肱共軛至酮修飾多肽的方法

METHODS FOR OXIME CONJUGATION TO KETONE-MODIFIED POLYPEPTIDES

【先前技術】

已將廣泛多種化學部分(「有效負載物」)共價連接至酶、抗體及其他大多肽或蛋白質，以形成共軛物。有效負載物可用於定位其所連接之蛋白質(例如標記)，以便修飾蛋白質之物理化學特性或穩定性(例如聚乙二醇化)；以便能夠連接蛋白質至另一分子或蛋白質(用於連接共軛物至另一化合物或另一共軛物之偶合基團)；或以便修飾有效負載物或蛋白質(例如疫苗共軛物)之功能或活性。蛋白質亦可充當遞送所連接之有效負載物至特定組織或細胞類型的載體，諸如在抗體-藥物共軛物(ADC)中。可有效鍵聯至蛋白質之有效負載物的類別包括可偵測部分(標記)、用以連接蛋白質至表面或另一化合物之錨定部分、當共軛至蛋白質時誘發免疫反應之抗原、容易與化學互補偶合搭配物反應(因此連接蛋白質至另一實體)之偶合基團及諸如細胞毒素及其他生物活性劑之治療性部分。以控制及可再生方式連接此等相異結構至蛋白質通常對於共軛物恰當起作用而言極其重要。因此，需要多種方法來連接許多類型之有效負載物至許多不同的蛋白質或多肽。

已開發出多種用於連接有效負載物至蛋白質以形成蛋白質共軛物的方法。參見例如 Sletten, E. M. 及 Bertozzi, C. R. *Angew. Chem.* 國際版2009, 48, 6974 - 6998 ; Basle', E. ; Joubert, N. ; 及 Pucheault, M. *Chemistry & Biology* 2010, 17, 213-227。在一些蛋白質共軛物中，用

於連接蛋白質與有效負載物的方法對共軛物之活性或相關特性可具有不可偵測的影響；在其他情況下，蛋白質與有效負載物之間的鍵性質可顯著影響共軛物之活性或特性。有時，極其重要的是控制例如每一蛋白質之有效負載物部分的數目或控制連接有效負載物之精確位置，使得其不會干擾蛋白質之功能。舉例而言，因為ADC要求蛋白質識別且結合靶向細胞上之表面結構以賦予選擇性，所以不可能安置有效負載物，以免干擾抗體與該抗體必須識別之表面結構(抗原)的結合。參見例如 *Expert Opin. Biol. Ther.* **2012**, *12*, 1191-1206； *Toxins* **2011**, *3*, 848-883；及 Laurent Ducry *Drug Delivery in Oncology: From Basic Research to Cancer Therapy*, 第一版. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. **2012**, *12*, 355-374。

用於連接有效負載物至蛋白質的大多數方法涉及在蛋白質與特定相關有效負載物之間添加鍵聯化學結構(連接子)。連接子提供一種使用各部分上之可用官能基連接相關有效負載物至蛋白質的方式。連接子通常允許調變有效負載物與蛋白質之間的距離，且亦可包括可於活體內溶解或降解之可分解的部分，以將有效負載物自蛋白質釋放，其中釋放對於有效負載物實現其目標而言至關重要。舉例而言，在ADC中，共軛物在有效負載物可具有所需效應之位置處分裂且釋放有效負載物可能極其重要。因為相異類型之蛋白質-有效負載物共軛物對連接有效負載物與蛋白質的方式之要求不同，所以仍需要用以持續且有效鍵聯有效負載物與蛋白質的新穎方法。

用於形成蛋白質共軛物之大多數常用方法皆依賴於許多天然蛋白質中天然存在之某些胺基酸的化學反應性：通常使用離胺酸及半胱胺酸，因為其提供用於連接有效負載物至蛋白質之反應位點。離胺酸具有可與鍵聯基團或有效負載物上之合適的親電子官能基反應之游離胺基，且半胱胺酸可經由其游離硫氫基反應。然而，依賴於此等天然存

在之反應位點可為複雜的：例如當相關蛋白質中存在過多或過少的特定類型之胺基酸時，變得難以恰當地使有效負載物『負載』於蛋白質上。蛋白質表面上之高豐度離胺酸使位點及區域選擇性共軛變得困難，且產生異質產物。相比而言，半胱胺酸為相對罕見的，且主要以雙硫鍵聯對形式存在於蛋白質中。在半胱胺酸處共軛通常需要還原雙硫基，隨後與共軛試劑(例如順丁烯二醯亞胺)反應以分別標記個別半胱胺酸。因為此舉移除雙硫鍵，所以此方法可能逐漸損害蛋白質結構及穩定性。

蛋白質通常亦具有多於待連接之有效負載物之最佳數目的離胺酸：為了確保一致性，添加充足的有效負載物部分以佔據所有可用離胺酸，所以為了達到最佳功效，均質產物可添加過多有效負載物分子。此可藉由僅使用一些離胺酸用於共軛來避免，但該部分的或不完整的負載一般將得到異質產物，其可由於多種原因而難以解決——例如，在第一種商品化ADC Mylotarg™之案例中，ADC產品之異質性看來可能造成導致決定撤銷產品註冊之問題。Fuenmayor等人, *Cancers*, 第3卷, 3370-93 (2011)。此外，即使當存在充足的特定類型之胺基酸基團(例如離胺酸)用於最佳負載時，若蛋白質呈其溶液構形，則一些或所有該等基團可能『隱埋』於蛋白質內部，使得其無法有效地用於共軛，或使該等基團可「部分地」獲得，這亦可引起共軛物之異質性。因此，雖然離胺酸可為用於共軛之適用位點，但在許多情況下其並不理想。

在天然蛋白質中半胱胺酸之出現頻率低於離胺酸之出現頻率，且若充足半胱胺酸為可用的，則半胱胺酸可適用作共軛位點；若存在的半胱胺酸過少，則一或多個半胱胺酸可藉由標準蛋白質修飾方法插入。然而，通常較佳避免藉由插入半胱胺酸而修改天然蛋白質之序列；此外，通常將天然蛋白質中之表面可獲得的半胱胺酸靠近其他半

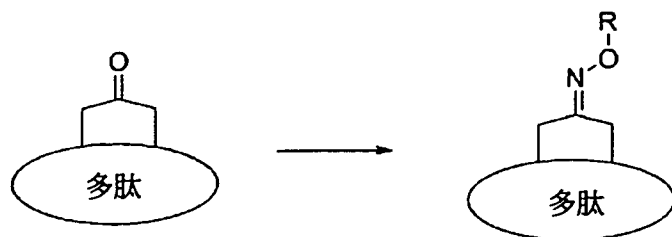
胱胺酸安置以形成雙硫基；其可對於維持蛋白質之活性構形至關重要。然而，藉由還原雙硫基(此舉可破壞蛋白質之二級或三級結構)，不難將雙硫基轉化成兩個游離半胱胺酸。

已報導一些嘗試在蛋白質上將繫鏈插入藉由還原雙硫基所形成之半胱胺酸殘基之間的方法。一種該方法涉及經碘取代之甲基丙烯酸酯衍生物。US2006/0210526。此方法形成反應性中間物，該反應物在環化之前需要消除步驟，且用於該多步驟方法之條件可使半胱胺酸之間的連接子(繫鏈)之形成不完整，且反應條件甚至可引起蛋白質變性。另一方法使用順丁烯二醯亞胺衍生物。WO2011/018613。然而，在此方法中所形成之共軛物遭受穩定性問題，因為在順丁烯二醯亞胺上之硫醇之邁克爾加成(Michael addition)為可逆的。因此需要經改良之方法來共軛化學部分至含有雙硫鍵之蛋白質，以形成蛋白質共軛物。特定而言，需要以下方法：使用雙硫基組份(硫氫基)而不放棄控制雙硫基之效應的構形，同時亦提供有效共軛、穩定性及一致的有效負載物/蛋白質比率。另外，需要使蛋白質保持特定構形之固定方法(參見例如 Expert Opin. Drug Discov. (2011) 6(9):937-963; Tetrahedron 55 (1999) 11711-11743)，該等方法亦提供共軛經固定之蛋白質與有效負載物的方式。本發明提供該等方法，包括用於在酮修飾蛋白質或多肽與烷氧基胺化合物之間形成肟之經改良之方法。

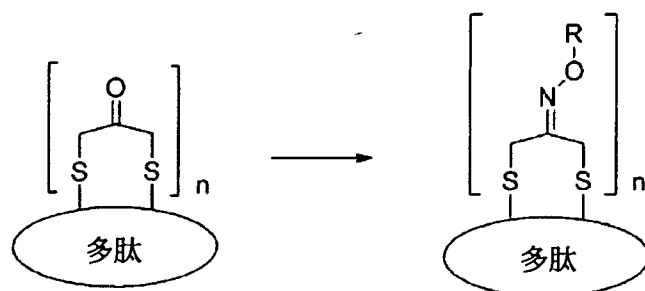
【發明內容】

本發明提供用於使經酮修飾之多肽或蛋白質與烷氧基胺化合物(例如烷氧基胺或芳氧基胺)共軛以形成如以下反應中所說明之經肟修飾之多肽或蛋白質的經改良之方法。該方法涉及選擇促進高效肟形成之條件，提供更高肟產率及更完整的肟形成物；結果為肟形成之產率改良，及對於具有兩種或兩種以上酮修飾之多肽或蛋白質，產物均質性改良。該方法包含典型地在緩衝液中使用胺或胺鹽作為促

進劑。通常，促進劑或緩衝液或兩者將含有羧酸，例如可使用乙酸鹽或苯甲酸鹽緩衝液。視情況，胺可用作羧酸鹽或其可為經羧基取代之胺化合物，該化合物可為兩性離子型的。苯胺、胺基苯甲酸、3,5-二胺基苯甲酸、胼及3,5-二羧基苯胺為適用於此等方法之胺。



在一個較佳實施例中，經酮修飾之多肽及胼具有下文所示之式，其中硫原子來自多肽中之半胱胺酸基團：



其中 n 為2-8，較佳2或4，且 n 指示酮修飾或衍生自存在於多肽上之酮修飾之胼的數目。多肽可為抗體或抗體片段，其中兩個硫原子係衍生自多肽之鏈間雙硫鍵。因為經改良之方法提高胼形成之效率、改良共軛產物之均質性，所以其尤其適用於其中 n 大於1之肽。尤其在其中典型地存在四個可用於酮修飾之雙硫基的抗體中，經改良之方法提高諸如每一抗體分子具有4個有效負載物基團(DAR=4)之抗體-藥物共軛物(ADC)之共軛產物的產率。ADC之均質性的重要性已充分確立，如 Mylotarg™ 事件所例示，其中咸信非均質性已促使第一個經US FDA認可的ADC撤市。

在一個態樣中，本發明提供使用兩個半胱胺酸殘基的方法，該方法在蛋白質表面上形成雙硫基以鍵聯有效負載物至蛋白質，形成蛋白質共軛物。該方法涉及還原雙硫基以提供兩個游離巰基，及將兩個

巯基用一繫鏈繫結在一起，該繫鏈將其保持在與其形成雙硫基時所佔用之位置大約相同處。將半胱胺酸基團保持在其大致相同位置處，使可在雙硫基還原後出現之任何對蛋白質之構形不利的影響減至最小。經引入用以將兩個巯基鍵聯在一起之繫鏈含有可用於連接相關有效負載物之反應官能基。在一些實施例中，繫鏈含有反應性充足之羰基，以便與外部胺基形成亞胺或肟或腙鍵，且藉由形成該鍵，將有效負載物共軛至活化蛋白質。舉例而言，經還原之蛋白質可與諸如二氯丙酮或二溴丙酮之1,3-二鹵丙酮反應，由此插入使兩個硫原子連接在一起之3-碳繫鏈。此可適當模擬雙硫基效應，亦即使蛋白質保持與雙硫基存在時其具有之構形極其類似的構形，同時與雙硫基相比，其亦提供更高的穩定性以及連接有效負載物之位置。用於本發明之方法及組合物之繫鏈提供化學反應官能基，且含有此類在兩個半胱胺酸硫原子之間的繫鏈之蛋白質在本文中稱作活化蛋白質。較佳繫鏈為藉由使經還原之雙硫基團與1,3-二氯丙酮反應所獲得之酮連接子，亦即-CH₂-C(O)-CH₂-。可使用繫鏈上之官能基連接有效負載物至活化蛋白質。

舉例而言，藉由使蛋白質之硫醇與二鹵丙酮反應所形成之繫鏈提供作為共軛之位點之羰基。含有合適的胺(胺化有效負載物)、較佳如本文中進一步所描述之式R-O-NH₂之胺氧基的有效負載物，可藉由在有效負載物之胺氧基官能基與繫鏈之羰基(酮)之間形成肟容易地共軛至此類活化蛋白質。在一個較佳實施例中，在胺促進劑存在下，使兩個半胱胺酸殘基之間插入酮之活化多肽或蛋白質與烷氧基胺(RONH₂)接觸，其中烷氧基(R)包含諸如治療劑或能夠用於連接治療劑之反應基團的有效負載物。合適的胺促進劑包括苯胺或苯胺鹽(例如乙酸苯胺、苯甲酸苯胺及其類似物)、醯基肼(例如乙醯基肼)或胺基苯甲酸(諸如PABA、3-胺基苯甲酸、3,5-二胺基苯甲酸、3,5-二羧基苯胺及其類似物)。本文中提供用以促進有效肟形成之合適的反應條

件。

此等方法可應用於任何具有一或多個可獲得的雙硫鍵之蛋白質，且典型地適用於分子量大於500 Da且典型地大於2,000 Da之天然蛋白質，其中雙硫基存在於天然或活性形式之蛋白質中。其可與含有一個以上雙硫基，諸如2-10個或典型地多達6個雙硫基團之蛋白質一起使用，該等雙硫基中至少一者為表面可獲得的，藉由習知雙硫基還原劑足以還原。此等方法產生針對所利用之各雙硫基團含有至少一種有效負載物之共軛物，且繫鏈實質上保留蛋白質之天然或活性構形。

在另一實施例中，本發明提供藉由將兩個半胱胺酸殘基繫結在一起來固定蛋白質之方式，從而提供僵化構形，其中該固定方法用含酮鍵將兩個半胱胺酸繫結在一起，該含酮鍵隨後適用於共軛經固定之蛋白質至有效負載物。藉由使含有至少兩個半胱胺酸殘基之蛋白質與諸如1,3-二氯丙酮或1,3-二溴丙酮之二鹵酮反應實現固定，以形成含有[cys1]-S-CH₂-C(=O)-CH₂-S-[cys2]鍵之環化蛋白質，隨後如本文中進一步所描述，允許該鍵經由肟形成與式H₂N-O-L-PL之胺氧基化合物反應以形成共軛物。本發明提供製造此等經固定之共軛肽的經改良之方法。

【圖式簡單說明】

圖1為說明本發明之應用的流程(其中X為O)，其始於含雙硫基之蛋白質且提供蛋白質-有效負載物共軛物。

圖2說明偶合兩個具有互補的偶合基團作為其有效負載物之蛋白質-有效負載物共軛物。

圖3A至3C展示實例1之起始蛋白質、活化蛋白質及蛋白質共軛物的質譜。

圖4展示實例1之經疊氮基取代之CRM197構築體的SDS Page凝膠分析。

圖5展示實例4之活化蛋白質及活化(酮修飾)蛋白質之LC-MS數據的示意性描繪。

圖6展示實例4中所描述之蛋白質-有效負載物共軛物及該產物之LC-MS數據的示意性描繪。

圖7展示實例6之方法A之共軛物及經還原之共軛物的凝膠，隨附用於比較之分子量梯級。其亦展示方法B之產物的LC-MS，其展示若干種不同共軛物之形成。

圖8展示實例7之步驟1；步驟2之方法A (PL1)及步驟2之方法B (PL2)的產物之LC-MS數據。

圖9展示實例8之產物的SDS PAGE凝膠及LC-MS數據。

【實施方式】

如本文中所使用之『蛋白質』及多肽係指含有五個或五個以上、典型地十個或十個以上之藉由醯胺(肽)鍵所連接之胺基酸殘基的肽。典型地，雖然本文中所描述之蛋白質主要或僅包含天然存在之胺基酸，但該等方法同樣適用於含有一或多種非天然胺基酸之多肽。通常(但未必)，胺基酸大部分或全部具有L組態且係選自常用的『主要』胺基酸。

縮寫

DAR	藥物與抗體比率
DCM	二氯甲烷
DIC	二異丙基碳化二亞胺
DIPEA	二異丙基乙胺
EDT	乙烷二硫醇
HBTU	N,N,N',N'-四甲基-O-(1H-苯并三唑-1-基)六氟磷酸銨
MeCN	乙腈
NMP	N-甲基吡咯啉酮

PBS	磷酸鹽緩衝生理食鹽水
TCEP	參(羧基乙基)膦
TFA	三氟乙酸
TIPS	三異丙基矽烷

本發明提供當共軛經酮修飾之多肽與經取代之烷氧基胺時用於肟形成的經改良之條件。經改良之條件使用胺促進劑來促進肟形成：可使用苯胺，但經取代之苯胺、尤其經羧基取代之苯胺(諸如本文所揭示之彼等苯胺)更合適。亦可使用諸如乙醯基肼或苯甲醯基醯肼之醯基醯肼。胺促進劑可以游離胺形式或以具有任何合適的相對離子之胺鹽形式添加；在一些實施例中，較佳為諸如乙酸根或檸檬酸根之羧酸根相對離子。典型地，使用過量胺促進劑。

反應典型地在緩衝液中在pH 3-8、較佳pH 4-8下操作。可使用各種緩衝液，包括PBS、Tris、磷酸鈉、乙酸鹽、甲酸鹽、檸檬酸鹽及其類似物以維持合適的pH值。用於反應之合適的多肽濃度高於習知所用之濃度：在一些實施例中，多肽濃度為至少1 mg/mL或至少2 mg/mL，且較佳為約5 mg/mL或更高，至多為無法溶解之濃度，例如至多約25 mg/mL。

反應典型地在適用於維持多肽之結構及功能之溫度下進行；溫度通常在4°C與70°C之間、較佳在10°C與30°C之間。可使用0.5小時至48小時之反應時間：足夠的反應時間可藉由用已知方法監測反應進程容易地測定。在約4°C與約25°C之間的溫度下，小於一小時至約4小時之反應時間一般為充足的。

在一些實施例中，該方法包含在1,3-二氯丙酮存在下還原多肽之雙硫基。本文中所提供之數據表明，在添加還原劑斷開雙硫鍵之前將二氯丙酮添加至多肽之緩衝溶液中，出乎意料地得到實質性改良的產物產率。當多肽上之一個以上雙硫鍵經還原時，在起始雙硫基還原時

存在二氯丙酮為尤其重要的。舉例而言，當多肽為抗體時，用TCEP進行之還原會還原四個鏈間雙硫鍵，允許與二氯丙酮反應以引入四個含酮繫鏈基團。若藉由在添加二氯丙酮之前首先添加TCEP以起始還原步驟來執行反應，則充分修飾之抗體的產率為約33-35% (pH 8.0, 50 mM TRIS作為緩衝液，環境溫度)。約50%多肽產物含有共價鍵聯至輕鏈片段之重鏈片段。若在相同條件下在添加TCEP之前用多肽基質預培育1,3-二氯丙酮，則充分修飾之抗體的產率增加至75-77%。用於此等反應之產物組合物藉由微晶片電泳SDS方法評估(參考：Electrophoresis 2012, 33, 765-772)。HC-HC、HC-LC及HC-HC-LC片段之偵測指示對相關共價繫鏈產物(鏈間雙硫基之一者或兩者已藉由二氯丙酮衍生之繫鏈置換)之部分修飾，且對應於(HC)₂(LC)₂之『完整』抗體與各鏈間雙硫基皆藉由二氯丙酮衍生之繫鏈置換之充分修飾之四聚體抗體相對應。

本發明之應用之一實例展示於圖1中。該圖描繪呈環狀且具有曝露之雙硫基團的蛋白質。還原雙硫基，形成具有兩個衍生自雙硫基之游離硫醇的經還原之蛋白質。隨後允許經還原之蛋白質與二鹵丙酮或類似的雙-親電子劑(例如1,3-二氯丙酮或1,3-二溴丙酮)反應以形成活化蛋白質，其中兩個硫醇經由官能化繫鏈鍵聯在一起：在此實例中繫鏈含有酮基團，該酮基團具有針對希夫鹼(Schiff base)形成之相對反應性。隨後經由希夫鹼形成將有效負載物分子鍵聯至活化蛋白質之繫鏈，以提供蛋白質共軛物。在該實例中經由鍵聯基團將有效負載物連接至繫鏈。式H₂N-X-L-PL之化合物(其中PL為有效負載物化合物)含有活化胺基(H₂N-)，該活化胺基藉由連接子L連接至PL，且藉由使用胺氧基或類似的活化胺(-X-NH₂，其中X為O)使得胺尤其具有反應性，其有助於酮羰基與連接至PL之胺之間形成希夫鹼。一替代實施例始於具有兩個游離半胱胺酸基團之蛋白質，諸如圖1中之經還原之蛋白

質，且使用該等基團將蛋白質『固定』於限定構形內，同時亦提供用於將有效負載物共軛於經固定之蛋白質上的連接點。

本發明之方法適用於任何經酮修飾之多肽，但尤其適用於自含有至少一個在兩個半胱胺酸之間的雙硫鍵或含有兩個游離半胱胺酸殘基的蛋白質形成共軛物，其中該等游離半胱胺酸殘基可藉由與1,3-二鹵丙酮反應物反應而連接在一起。典型地，蛋白質為如下蛋白質，其中在本文中所描述之條件下，兩個硫醇皆與二氯丙酮或二溴丙酮反應，以產生兩個硫醇之至少50%交聯，且交聯程度常常為至少約70%、80%或90%。

待鍵聯在一起之兩個半胱胺酸可處於單一多肽上，或其可處於形成蛋白質複合物之獨立多肽上。在某些實施例中，該等方法利用具有1-6個雙硫鍵或2-6個游離半胱胺酸殘基之蛋白質，且涉及還原此等雙硫基中之至少一者。含雙硫基之蛋白質可為任何具有至少5個胺基酸殘基、較佳至少10個胺基酸之多肽，其含有在單一多肽序列內之雙硫鍵；或可為蛋白質複合物，其中雙硫基連接一個多肽序列至另一胺基酸或多肽，其限制條件在於當為了將繫鏈插入硫原子之間而還原雙硫基時，複合物不會快速解離。用於本發明之方法之典型蛋白質包括環狀肽及線性肽，該等肽含有約5至約5000個胺基酸、典型地至少10個胺基酸且至多約1000個，包括諸如酶或受體之功能性蛋白質；具有至少一個雙硫鍵(通常連接兩個獨立的多肽鏈)之蛋白質複合物；結構蛋白；用作疫苗骨架之蛋白質，諸如CRM197或其他具有佐劑活性之蛋白質；及抗體或抗體片段。尤其適用於此等方法之蛋白質包括抗體，尤其單株抗體，包括經工程改造抗體、經修飾抗體及抗體片段；疫苗載體蛋白，諸如CRM197；及單鏈蛋白，其具有至少一個雙硫鍵或至少兩個半胱胺酸殘基且分子量在500與500,000之間、典型地在1,000與200,000之間。例如用於工程改造抗體或其他蛋白質以引入一

或多個半胱胺酸殘基及用於修飾抗體之方法已為此項技術中所熟知。

該等方法尤其適用於具有至少兩個鏈間雙硫基之抗體及抗體變異體，包括IgG及Fc。該等方法亦適用於疫苗載體蛋白，諸如白喉類毒素、白喉毒素(197)之無毒交叉反應物質(CRM197)、破傷風類毒素、匙孔螺血氫蛋白、腦膜炎奈瑟氏菌(*N.meningitidis*)外膜蛋白質及非分型H型流感衍生蛋白D。此等疫苗載體蛋白可藉由已知方法及/或藉由本文中所揭示之方法用抗原進行官能化。本發明方法亦可用於連接佐劑化合物，諸如包括咪喹莫特(imiquimod)、咪唑喹啉(imidazoquinoline)及加德喹莫特(gardiquimod)之TLR促效劑(TLR3、TLR4、TLR5、TLR7、TLR8或TLR9之配位體)、PRR配位體、RLR配位體、NOD2配位體、環狀二-AMP、環狀二-GMP、鞭毛蛋白、單磷酸基脂質A、N-甘醇酸化胞壁醯二肽、CpG寡脫氧核苷酸(CpG ODN)、三醯化脂蛋白或聚(I:C)，以提供增強的免疫反應。

用於本發明之方法及組合物之含雙硫基之蛋白質的雙硫鍵經還原以形成兩個游離巰基：用於該還原之方法已為此項技術中所熟知。在一些實施例中，使用選擇性地還原蛋白質周圍之易於溶於溶劑的雙硫鍵之還原劑進行還原：一種合適的還原劑為參(2-羧基乙基)膦(TCEP)及其鹽——參見*Analytical Biochemistry* 273, 73-80 (1999)。亦可使用其他已知的雙硫基還原劑，諸如二硫蘇糖醇、2-巰基乙醇、半胱胺及二硫丁胺(JM Perkel, *Chem. Eng'g News*, 2012年2月29日；Lukesh等人, *J. Am. Chem. Soc.*, 134, 4057-59 (2012))；及三烷基膦，諸如三丁基膦(WO2008/157380)。用於還原蛋白質中之雙硫基的方法已為此項技術中所熟知。

鍵聯基團L可為連接有效負載物化合物至-X-NH₂(其中X表示O)之任何合適的有機鍵。合適鍵之一些實例包括[X]-(CH₂)₁₋₆-[PL]；[X]-CH₂C(=O)-[PL]；[X]-CH₂C(=O)-NH-[PL]；[X]-CH₂C(=O)-O-[PL]；

[X]-(CH₂CH₂O)_n-[PL]；[X]-苯基-C(O)NH-[PL]，[X]-(CH₂)₁₋₁₀-C(=O)-NH-(CH₂)₂₋₁₀-NH-C(=O)-(CH₂)₀₋₁₀-(OCH₂CH₂)₀₋₁₀-(AA)₀₋₁₀-[PL] (AA 可為必需胺基酸中任一者，例如 glu、gly、ala、asp 等)及其類似物，其中 n 典型地為 1-20，且 [X] 及 [PL] 分別指示連接至 X 及連接至 PL 之連接子之末端。在一些實施例中，連接子 L 可連接有兩個或三個有效負載物，以增加共軛物上之有效負載物負載，且當一個以上有效負載物連接至既定連接子時，該等有效負載物可相同或不同。合適的連接子亦包括此等基團之組分之組合：連接子之性質對於本發明之實踐並不重要，且可基於連接至至少一個有效負載物 PL 之方法的便利性及可用性或基於共軛物之所需物理化學特性。對合適連接子之選擇在一般技術水準內且視有效負載物之結構及修飾該有效負載物以連接連接子 L 之可用方法而定。典型地，連接子經由醯胺或酯基團連接於一個或兩個末端處；連接子 L 常常含有肽鍵或酯以允許藉由蛋白酶或酯酶活性 (例如 val-cit，其為藉由組織蛋白酶 B 裂解之二肽；或 Gly-phe-leu-gly，其亦可藉由組織蛋白酶 B 裂解) 在活體內溶解；視情況，其含有一或多個環氧乙烷單元(-OCH₂CH₂-)；且在許多實施例中，其含有至少一個且至多六個胺基酸部分。L 之合適實施例亦可包含一或多個可選自以下基團之間隔基：

(a) -鍵、-O-、-S-、-S-S-、-NH-、-N((C₁-C₆)烷基)-、-NH-C(O)-NH-、-C(O)-NH-、-NH-C(O)；

(b)(C₁-C₂₀)伸烷基、(C₂-C₂₀)伸烯基、(C₂-C₂₀)伸炔基、-Z-(C₁-C₂₀)伸烷基、-Z-(C₂-C₂₀)伸烯基、-Z-(C₂-C₂₀)伸炔基、(C₁-C₂₀)伸烷基-Z-(C₁-C₂₀)伸烷基、(C₂-C₂₀)伸烯基-Z-(C₂-C₂₀)伸烯基、(C₂-C₂₀)伸炔基-Z-(C₂-C₂₀)伸炔基，其中 Z 為 -NH-、-N(C₁-C₆)烷基)-、-NH-C(O)-NH-、-C(O)-NH-、-NH-C(O)-、(C₃-C₇)伸環烷基、伸苯基、伸雜芳基或伸雜環基，且其中該 (C₁-C₂₀)伸烷基、該 (C₂-C₂₀)伸烯基及該 (C₂-

C₂₀)伸炔基部分各獨立地視情況含有交錯分散於該等部分內之一或多個氧原子，使得氧原子由至少一個且較佳兩個碳原子分離；

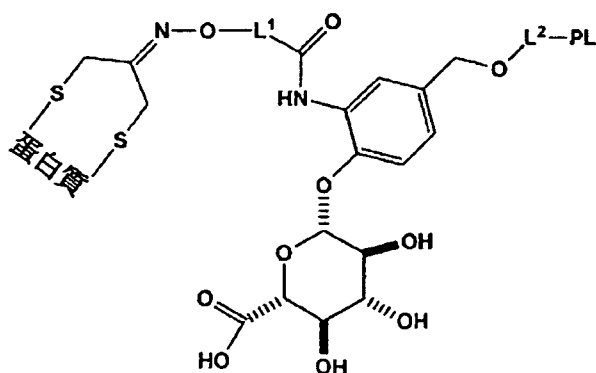
(c)(C₃-C₇)伸環烷基、(C₃-C₇)伸環烷基-Y-(C₃-C₇)伸環烷基、-Y-(C₃-C₇)伸環烷基、伸苯基、-Y-伸苯基、伸苯基-Y-伸苯基、伸雜芳基、Y-伸雜芳基、伸雜芳基-Y-伸雜芳基、伸雜環基、-Y-伸雜環基或伸雜環基-Y-伸雜環基，其中Y為(C₁-C₂₀)伸烷基、(C₂-C₂₀)伸烯基、(C₂-C₂₀)伸炔基、-O-、-C(O)-、-S-、-NH-、-N((C₁-C₆)烷基)-、-NH-C(O)-NH-、-C(O)-NH-或-NH-C(O)-，且其中該(C₃-C₇)伸環烷基、該伸苯基、該伸雜芳基及該伸雜環基部分各獨立地視情況經1至3個選自鹵基、(C₁-C₄)烷基或經鹵基取代之(C₁-C₄)烷基的取代基取代；

(d)-[OCH₂CH₂]_v-，其中v為1-2,000、較佳1至10；及

(e)包含1至100個胺基酸、較佳1-30個或1至6個胺基酸之肽；

(f)能夠攜帶2、3、4、5或6或2-10個有效負載物部分之多價連接子。

此外，L可為或可包含可裂解連接子，諸如Val-Cit (纈胺酸-瓜胺酸，其為藉由組織蛋白酶B選擇性裂解之二肽)或val-cit-PABC (纈胺酸-瓜胺酸對-胺基苯甲基胺基甲酸酯，參見*Bioconjugate Chem.* 19(10), 1960-63 (2008))；雙硫基；或藉由葡糖醛酸酶裂解之連接子，諸如存在於此式中之連接子：



其中蛋白質表示用於共軛之蛋白質，PL表示如本文中所描述之

有效負載物，且 L^1 及 L^2 獨立為視情況選用之連接子，諸如上文所描述之基團L。(ACS Med. Chem. Letters, 第1卷, 277-280 (2010))。

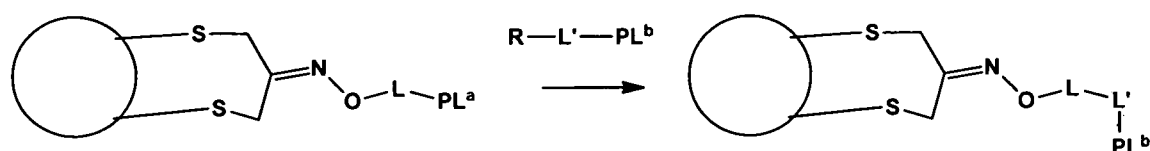
有效負載物(PL)可為適用於連接至蛋白質之任何部分。可有效連接至蛋白質之化合物的許多實例為此項技術中已知的。實例包括使得使用者能夠定位或鑑別蛋白質之標記部分，該等標記部分包括結合金屬離子以提供共軛物的可偵測性之螯合劑；結合部分，諸如生物素或抗生物素蛋白、聚核苷酸、抗體或其片段、含有5-15個胺基酸殘基之聚精胺酸或聚離胺酸等，其使得純化或分離蛋白質或使蛋白質附著至表面變得容易；特性修飾基團，諸如脂肪酸基團或聚乙二醇(PEG)；抗原基團，諸如多醣或特定類型之細胞或細菌所特有的細胞表面蛋白；偶合基團，其使得經修飾蛋白或肽能夠連接至另一分子以製造更複雜的共軛物，諸如雙特異性抗體(參見圖2)；及生物活性化合物，包括如RNA、DNA、mRNA、siRNA及其片段的核酸；醫藥化合物，諸如各種治療性藥物；及放射性核種及細胞毒素，其可搭載於蛋白質上，達至其可產生所需效應之所需組織或細胞。當此等搭載化合物保持共軛至蛋白質或其一部分時，其可起作用；或若鍵聯基團為可易於在活體內裂解者，則該等化合物可首先自蛋白質脫離。適用於此等方法之醫藥有效負載物包括微管抑制劑、拓撲異構酶I抑制劑、插入劑、細胞內信號傳導路徑抑制劑、激酶抑制劑、諸如siRNA、aRNA及miRNA之轉錄抑制劑及DNA小溝黏合劑；此等有效負載物包括以下化合物種類，諸如類美登素、奧瑞他汀(auristatin)、瓢菌素、刺孢黴素、塞姆博素(PSYMBERIN)、倍癌黴素、蔥環黴素、喜樹鹼、小紅莓、紫杉醇、吡咯并苯并二氮呋及其類似物。

此等具有治療性或診斷性用途之醫藥有效負載物的特定實例包括太平洋紫杉醇、多西他賽(docetaxel)、依託泊苷、特諾波賽(tenoposide)、長春新鹼、長春鹼、秋水仙鹼、小紅莓、道諾黴素、

光神黴素、放射菌素、糖皮質激素、嘌呤黴素、表柔比星(epirubicin)、環磷醯胺、甲胺喋呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶、鉑、鏈佐黴素、美濃黴素C、蒽環黴素、放線菌素D或放射菌素、博萊黴素、光神黴素、安甦黴素、倍癌黴素、異環磷醯胺、米托蒽醌、柔紅黴素、洋紅黴素、阿尼莫特素(animoterin)、美法侖(melphalan)、埃斯波黴素、萊克希托普森(lexitropsin)、奧瑞他汀(例如奧瑞他汀E、奧瑞他汀F、AEB、AEVB、AEFP、MMAE、MMAF)、伊路瑟瑞博素(eleuthorobin)、紡錘菌素、足葉草毒素、包括美登素及DM1之類美登素(maytansinod)及考布他汀(combretastatin)。

可用作有效負載物之合適的偶合基團(可用於偶合共軛物至另一部分之基團)包括順丁烯二醯亞胺、硫醇、 α -鹵酮(例如 $-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{X}$ ，其中X為氯、溴或碘)、羧酸、胺、羥基、烯烴、炔烴(包括環辛炔，其可用於無銅『點擊』化學)、疊氮化物及其類似物。使用此等偶合基團來連接本發明之共軛物至具有互補偶合基團之其他化合物的方法已為此項技術中所熟知，且包括硫醇與順丁烯二醯亞胺之邁克爾加成、用 α -鹵酮使硫醇烷基化、胺與羧酸之間的醯胺鍵形成、藉由形成1,2,3-三唑環以鍵聯疊氮化物至炔烴的『點擊』化學(參見例如 Meldal等人, **Chem Rev.**, 第108卷, 2952-3015 (2008))及『無銅點擊』化學。參見 Meeuwissen等人 **Polymer Chemistry**, 第3卷, 1783-95 (2012)。「互補」偶合基團為易於組合形成共價鍵之兩個偶合基團，諸如上文所提及之對(羧酸根加胺以形成醯胺；疊氮化物加炔烴以形成1,2,3-三唑；順丁烯二醯亞胺加硫醇，其中硫醇經由邁克爾加成加成至雙鍵； α -鹵酮加硫醇，其藉由硫醇烷基化形成 α -硫基酮等)。圖2中提供對於含有作為有效負載物之偶合基團的共軛物與第二種含有互補偶合基團之共軛物偶合的描繪。在特定實例中，充當有效負載物(PL)之偶合基團係選自由以下組成之群：鹵素、 $-\text{C}\equiv\text{CH}$ 、 $-\text{C}=\text{CH}_2$ 、-

OH、-SH、-SO₂-CH=CH₂、-O-NH₂、-N₃、-O-P(O)(OH)₂、-C(O)-H、-C(O)-CH₃、-NH-C(O)-CH₂-I、順丁烯二醯亞胺基、3,5-二側氧基-1,2,4-三唑啉-4-基、1*H*-吡咯-2,5-二酮-1-基、吡啶-2-基-二硫基、四氫-1*H*-噻吩并[3,4-*d*]咪唑-2(3*H*)-酮-4-基、1-羰氧基-2,5-二側氧基吡咯啉、1-羰氧基-2,5-二側氧基吡咯啉-3-磺酸鈉、-SSR¹、-C(O)-OR¹、-N(R¹)H、-NH-N(R¹)H (其中R¹為H或(C₁-C₆)烷基)及-C(O)-R² (其中R²為H、(C₁-C₄)烷基、經鹵基取代之(C₁-C₄)烷基、-CH=CH₂、N(R¹)H或-NH-N(R¹)H)。當此等有效負載物用作初始有效負載物(PL^a)時，共軛物可與包含第二種有效負載物(PL^b)之化合物反應，且可在形成新共軛物之過程中引入額外連接子L'：



PL^a為偶合基團，例如順丁烯二醯亞胺、經保護之硫醇、N₃、炔烴

R為PL^a之互補反應基團

PL^b為新的有效負載物，諸如標記或生物物質，包括蛋白質、抗體、si-RNA、毒素等。

應注意，在此等反應中，熟習此項技術者應理解，L及L'可保留PL^a及/或R之一部分，視用於連接新的有效負載物PL^b之反應而定。

以下所列舉之實施例說明本發明之特定態樣。

1. 一種將經酮修飾之多肽轉化成經肟修飾之多肽的方法，其中該方法包含在胺促進劑存在下，使該經酮修飾之多肽與式R-O-NH₂之基團接觸。

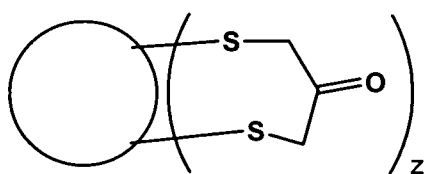
2. 如實施例1之方法，其中該胺促進劑為苯胺、包括3,5-二胺基苯甲酸或3,5-二羧基苯胺之經取代之苯胺或諸如乙醯基醯肼之醯基

醯肼。

在此等方法之一個實施例中，經酮修飾之多肽係藉由還原雙硫基以形成兩個游離硫醇而自雙硫基形成；且該等游離硫醇藉由與1,3-二氯丙酮或1,3-二溴丙酮反應而鍵聯在一起。在此方法之一特定實施例中，在諸如(但不限於) TRIS或PBS之緩衝液中，使具有可還原雙硫鍵之多肽與諸如(但不限於)TCEP及1,3-二氯丙酮之還原劑接觸。較佳地，在添加該還原劑之前，將多肽及緩衝液與1,3-二氯丙酮組合，使得當還原發生時存在1,3-二氯丙酮。

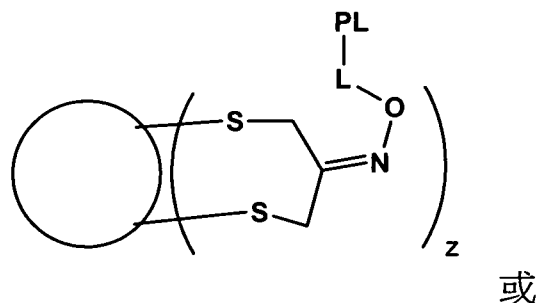
3. 如實施例1或2之方法，其中該式R-O-NH₂之基團為式H₂N-O-L-PL之化合物，其中L表示連接子且PL表示有效負載物基團。

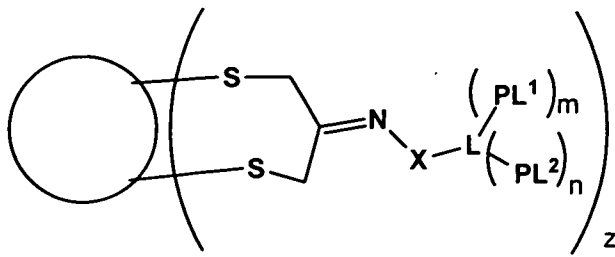
4. 如實施例1之方法，其中該經酮修飾之多肽具有下式



其中該環表示多肽，且各硫原子為該多肽之半胱胺酸殘基之硫氫基，且z為1至10之整數。

5. 如前述實施例中任一者之方法，其中該蛋白質-有效負載物共軛物具有下式：





其中X為O，L表示連接子且PL、PL¹及PL²在每次出現時獨立表示有效負載物基團，其中m及n各獨立為1至10；z為1至10、較佳1-5，其限制條件為m及n不同時為0。

6. 如前述實施例中任一者之方法，其中該多肽為抗體(例如IgG、Fab或F(ab)₂、Fc)。

7. 如實施例1至5中任一者之方法，其中該多肽為疫苗載體。

8. 如實施例1至8中任一者之方法，其中該有效負載物包含治療劑。

9. 如實施例1至7中任一者之方法，其中該有效負載物包含可偵測標記或反應基團，其適用於連接包含互補反應基團之有效負載物基團。

10. 如實施例8之方法，其中L包含可裂解鍵聯部分。

11. 如實施例1至10中任一者之方法，其中L包含至少一個選自以下之間隔基：

(a)-鍵、-O-、-S-、-NH-、-N((C₁-C₆)烷基)H-、-NH-C(O)-NH-、-C(O)-NH-、-NH-C(O)；

(b)(C₁-C₂₀)伸烷基、(C₂-C₂₀)伸烯基、(C₂-C₂₀)伸炔基、-Z-(C₁-C₂₀)伸烷基、-Z-(C₂-C₂₀)伸烯基、-Z-(C₂-C₂₀)伸炔基、(C₁-C₂₀)伸烷基-Z-(C₁-C₂₀)伸烷基、(C₂-C₂₀)伸烯基-Z-(C₂-C₂₀)伸烯基、(C₂-C₂₀)伸炔基-Z-(C₂-C₂₀)伸炔基，其中Z為-NH-、-N(C₁-C₆)烷基)-、-NH-C(O)-NH-、-C(O)-NH-、-NH-C(O)-、(C₃-C₇)伸環烷基、伸苯基、伸雜芳基

或伸雜環基，且其中該(C₁-C₂₀)伸烷基、該(C₂-C₂₀)伸烯基及該(C₂-C₂₀)伸炔基部分各獨立地視情況含有交錯分散於該等部分內之1-10個氧原子；

(c)(C₃-C₇)伸環烷基、(C₃-C₇)伸環烷基-Y-(C₃-C₇)伸環烷基、-Y-(C₃-C₇)伸環烷基、伸苯基、-Y-伸苯基、伸苯基-Y-伸苯基、伸雜芳基、Y-伸雜芳基、伸雜芳基-Y-伸雜芳基、伸雜環基、-Y-伸雜環基或伸雜環基-Y-伸雜環基，其中Y為(C₁-C₂₀)伸烷基、(C₂-C₂₀)伸烯基、(C₂-C₂₀)伸炔基、-O-、-C(O)-、-S-、-NH-、-N((C₁-C₆)烷基)H-、-NH-C(O)-NH-、-C(O)-NH-或-NH-C(O)-，且其中該(C₃-C₇)伸環烷基、該伸苯基、該伸雜芳基及該伸雜環基部分各獨立地視情況經1至3個選自鹵基、(C₁-C₄)烷基或經鹵基取代之(C₁-C₄)烷基的取代基取代；

(d)-[OCH₂CH₂]_v-、-X{CH₂[OCH₂CH₂]_v}_w-，其中v為1至2,000，w為1至4；X為C或N；及

(e)包含1至100個胺基酸之肽；及

(f)樹突狀巨分子，包括樹枝狀聚合物、規則樹枝狀高分子及超分支聚合物。

12. 一種將包含可還原雙硫鍵之多肽轉化成經酮修飾之多肽的方法，該經酮修飾之多肽包含式[PP]-S-CH₂-C(=O)-CH₂-S-[PP]之基團，其中各S為來自該雙硫鍵的硫，且[PP]指示該鍵聯基團之末端連接至該多肽之位置，

其中該方法包含形成含有可還原雙硫鍵之多肽、水性緩衝液與1,3-二鹵丙酮之混合物，隨後添加能夠還原該雙硫鍵之還原劑。

13. 如實施例12之方法，其中該1,3-二鹵丙酮為1,3-二氯丙酮。

14. 如實施例12或13之方法，其中該還原劑為水溶性膦或膦鹽。TCEP為合適的還原劑。

15. 如實施例12至14中任一者之方法，其中該多肽為抗體或抗

體片段。該多肽適當為抗體，其可為單株且可為人類化的。針對癌細胞所特有之抗原的抗體為合適的多肽。

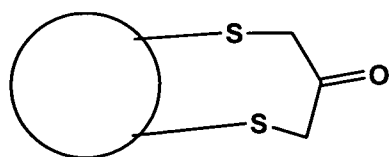
16. 一種將經酮修飾之多肽轉化成經肟修飾之多肽的方法，其中該方法包含在胺促進劑存在下及在至少約1 mg/mL之多肽濃度下，使該經酮修飾之多肽與式R-O-NH₂之基團接觸。典型地，在此等方法中R包含如本文中所描述之有效負載物及連接子。合適的有效負載物包括類美登素(例如DM1、DM4)、奧瑞他汀(例如MMAE、MMAF)、瓢菌素、刺孢黴素、塞姆博素、倍癌黴素、蔥環黴素、喜樹鹼、小紅莓、紫杉醇、吡咯并苯并二氮呋及其類似物。

17. 如請求項5之方法，其中該經酮修飾之多肽係藉由如實施例12至16中任一者之方法製造。

18. 如實施例17之方法，其中該胺促進劑為經羧基取代之苯胺或醯基肼。

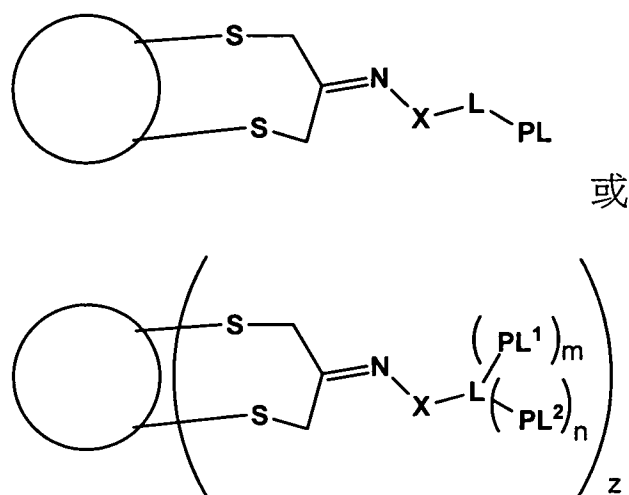
19. 如實施例12-17中任一者之方法，其中該式R-O-NH₂之基團為式H₂N-O-L-PL之化合物，其中L表示連接子且PL表示有效負載物基團。

20. 如實施例16之方法，其中該經酮修飾之多肽具有下式



其中該環表示該多肽，且各硫原子為該多肽之半胱胺酸殘基之硫氫基。

21. 如實施例16至20中任一者之方法，其中該蛋白質-有效負載物共軛物具有下式：



其中X為O，L表示連接子，z為1至10的整數，且PL、PL¹及PL²在每次出現時獨立表示有效負載物基團。

22. 如實施例12至21中任一者之方法，其中該多肽為抗體。

23. 如實施例12至21中任一者之方法，其中該多肽為疫苗載體。

24. 如實施例16至23中任一者之方法，其中該有效負載物包含治療劑。

25. 如實施例16至24中任一者之方法，其中該有效負載物包含可偵測標記或結合基團。

26. 如實施例25之方法，其中L包含可裂解鍵聯部分。

27. 如實施例16至26中任一者之方法，其中L包含至少一個選自以下之間隔基：

(a)-鍵、-O-、-S-、-NH-、-N((C₁-C₆)烷基)-、-NH-C(O)-NH-、-C(O)-NH-、-NH-C(O)；

(b)(C₁-C₂₀)伸烷基、(C₂-C₂₀)伸烯基、(C₂-C₂₀)伸炔基、-Z-(C₁-C₂₀)伸烷基、-Z-(C₂-C₂₀)伸烯基、-Z-(C₂-C₂₀)伸炔基、(C₁-C₂₀)伸烷基-Z-(C₁-C₂₀)伸烷基、(C₂-C₂₀)伸烯基-Z-(C₂-C₂₀)伸烯基、(C₂-C₂₀)伸炔基-Z-(C₂-C₂₀)伸炔基，其中Z為-NH-、-N(C₁-C₆)烷基)H-、-NH-C(O)-

NH-、-C(O)-NH-、-NH-C(O)-、(C₃-C₇)伸環烷基、伸苯基、伸雜芳基或伸雜環基，且其中該(C₁-C₂₀)伸烷基、該(C₂-C₂₀)伸烯基及該(C₂-C₂₀)伸炔基部分各獨立地視情況含有交錯分散於該等部分內之1-10個氧原子；

(c)(C₃-C₇)伸環烷基、(C₃-C₇)伸環烷基-Y-(C₃-C₇)伸環烷基、-Y-(C₃-C₇)伸環烷基、伸苯基、-Y-伸苯基、伸苯基-Y-伸苯基、伸雜芳基、Y-伸雜芳基、伸雜芳基-Y-伸雜芳基、伸雜環基、-Y-伸雜環基或伸雜環基-Y-伸雜環基，其中Y為(C₁-C₂₀)伸烷基、(C₂-C₂₀)伸烯基、(C₂-C₂₀)伸炔基、-O-、-C(O)-、-S-、-NH-、-N((C₁-C₆)烷基)H-、-NH-C(O)-NH-、-C(O)-NH-或-NH-C(O)-，且其中該(C₃-C₇)伸環烷基、該伸苯基、該伸雜芳基及該伸雜環基部分各獨立地視情況經1至3個選自鹵基、(C₁-C₄)烷基或經鹵基取代之(C₁-C₄)烷基的取代基取代；

(d)-[OCH₂CH₂]_v-或-J-{CH₂[OCH₂CH₂]_v}_w-，其中v為1-2,000，w為1-4，且J為CH₂或NH；

(e)包含1至100個胺基酸之肽；及

(f)樹突狀巨分子，包括樹枝狀聚合物、規則樹枝狀高分子及超分支聚合物。

如圖1中所概述，本發明之方法涉及還原待修飾之蛋白質的雙硫基，形成含有兩個游離巰基之經還原之蛋白質。使經還原之蛋白質與經官能化之繫鏈化合物接觸，該化合物能夠與經還原之蛋白質上之兩個游離硫醇反應以將游離硫醇繫鏈在一起，同時亦在繫鏈上保留至少一個適用於連接有效負載物的官能基。在一些實施例中，繫鏈上之官能基為羰基，例如使游離硫醇與1,3-二鹵酮反應時所獲得的酮。因為游離硫醇具有強親核性，其容易經由不可逆反應與諸如烷基鹵化物或甲苯磺酸烷酯之親電子劑反應，該等不可逆反應涉及取代脫離基且形成共價硫-碳鍵。經官能化之含羰基繫鏈化合物之一些合適實例包括

1,3-二氯丙酮及1,3-二溴丙酮。已使用此等試劑藉由將硫氫基繫鏈在一起，使小環狀肽中之雙硫部分穩定化。參見例如WO2008/157380(二氯丙酮與經還原之環狀五肽反應，隨後還原羰基)。亦可使用1,3-二羥基丙酮之磺酸酯(例如甲磺酸酯、三氟甲磺酸酯、苯基磺酸酯、甲苯磺酸酯及其類似物)。此等試劑具有針對經還原之蛋白質之游離硫醇的充足反應性，以提供適度快速反應，從而形成具有兩個繫鏈在一起之半胱胺酸殘基的經活化蛋白質，其中各游離硫醇共價連接至經官能化之繫鏈基團。

使經還原之蛋白質與經官能化之繫鏈化合物在適於促進繫鏈化合物與經還原之蛋白質之兩個游離硫醇之間之反應的條件下接觸，且特定而言在以下濃度及溫度條件下接觸，該等條件有利於使得預先以雙硫鍵接合之兩個游離硫醇與繫鏈化合物之單一分子反應，因此其再次繫結在一起，但現在用短繫鏈而非用直接雙硫鍵使其連接。此反應形成如圖1中所說明之經活化蛋白質，其具有在兩個硫原子之間的經官能化之繫鏈 $[-CH_2C(O)-CH_2-]$ 。圖1中之繫鏈包括可用於經由清潔且高效的希夫鹼形成化學有效連接有效負載物的羰基。

在整個此論述中應理解，即使將蛋白質描繪為環或球體，蛋白質亦可為小於10個胺基酸之小的多肽或兩個或兩個以上次單元或不同蛋白質之大的酶或複合物。雙硫基之兩個硫原子可處於多聚體複合物之一個次單元上，或其可處於不同次單元上。除了參與本文中所描述之轉化的雙硫基之外，蛋白質亦可含有其他可經還原且經官能化或可能由於其在蛋白質內之位置而不能經還原的雙硫鍵。雖然僅展示單一雙硫基、繫鏈基團或共軛，但應理解包含一個該雙硫基、繫鏈基團或共軛之多肽或蛋白質亦可含有一者以上。本發明之方法可利用已知方法來選擇性地還原靠近摺疊蛋白質之表面的可溶於溶劑之雙硫鍵，通常不還原『隱埋』之雙硫基，對於維持蛋白質之總體形狀及官能基或

使多次單元複合物中之兩個次單元保持鍵聯在一起而言，該等雙硫基可為必需的。如實例說明，蛋白質或多肽可含有一個以上經官能化之繫鏈基團，且由此可含有一個以上共軛位點，即使為簡單起見典型地僅描繪一個共軛位點時亦如此。

在已形成經活化蛋白質後，可將有效負載物連接至經官能化之繫鏈。舉例而言，可藉由在有效負載物之胺與繫鏈之酮之間形成希夫鹼，使含胺(或胺化)有效負載物連接至由二鹵丙酮形成之繫鏈。合適的有效負載物化合物含有可獲得且具有反應性的-NH₂胺基；在較佳實施例中，胺為針對於形成希夫鹼而經活化者。合適的胺之實例包括氧基胺(X=O)、硫基胺(X=S)及肼(X=NH)，例如：已知此等經雜原子取代之胺容易與酮縮合，該等酮諸如處於如圖1中所示之由二鹵丙酮形成的經活化蛋白質繫鏈之上者。

經活化蛋白質典型地在不純化或分離該經活化蛋白質之情況下與含胺有效負載物接觸。可使用有效負載物(PL)上之游離-NH₂基團(若可用)，但若無游離-NH₂基團可用，則如圖1及實例中所說明可經由鍵聯基團添加一者。在一些實施例中，在產生經活化蛋白質後，將胺基有效負載物添加至反應混合物中，其中經活化蛋白質在促進所需希夫鹼形成之條件下形成。如圖1中所說明，胺基-有效負載物隨後經由其胺基與經活化蛋白質之羰基反應，由此形成所需蛋白質-有效負載物共軛物，其中X為O、NH或經取代之N；L為鍵聯基團；且PL表示有效負載物。

實例

在以下實例中使用以下HPLC方法。

方法A：溶離劑A：水+ 0.1%甲酸，溶離劑B：乙腈+ 0.08%甲酸

梯度：在2 min內3至80% B-流速1.0 ml/min。管柱：Proswift Monolith 4.6×50 mm，40°C

方法B：溶離劑A：水+ 0.1%甲酸，溶離劑B：乙腈+ 0.04%甲酸

梯度：在2 min內3至80% B-流速1.0 ml/min。管柱：Proswift Monolith 4.6×50 mm，40°C

方法C：溶離劑A：水+ 3.75 mM乙酸銨+ 2%乙腈，溶離劑B：乙腈

梯度：在1.7 min內2至98% B-流速1.0 ml/min。管柱：Acquity CSH 2.1×50 mm，50°C

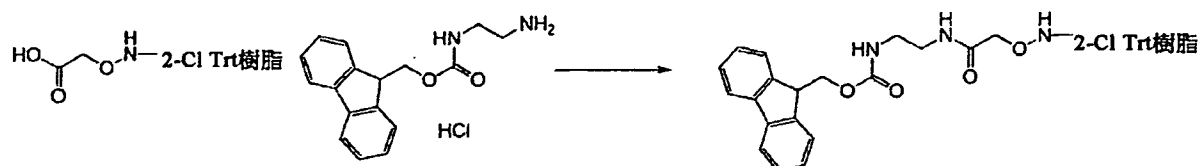
方法D (HRMS)：溶離劑A：水+ 0.05%甲酸+3.75 mM乙酸銨，溶離劑B：乙腈+ 0.04%甲酸。

梯度：在4.4 min內2至98% B-流速1.0 ml/min。管柱：Acquity CSH 2.1×50 mm，50°C

合成連接子

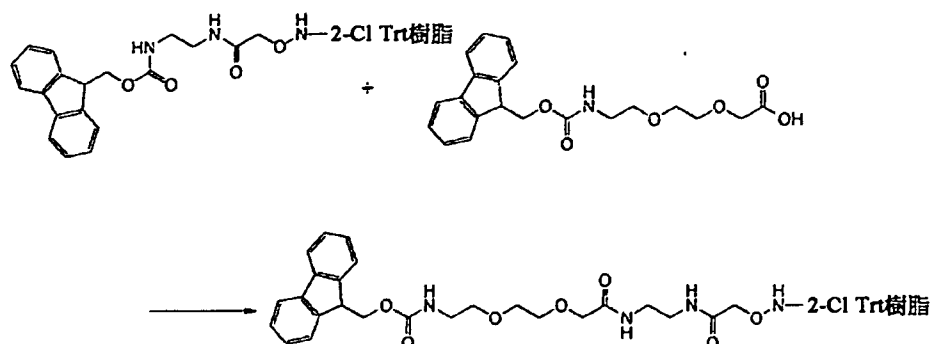


使100 mL玻璃器皿中之2-氯三苯甲基氯樹脂(1.55 mmol/g) (0.500 g，0.775 mmol)在DCM (20 mL)中膨脹30 min且將其排出。將2-(胺氧基)乙酸半鹽酸鹽(0.338 g，3.10 mmol)及DIPEA (1.354 mL，7.75 mmol)於NMP (7 ml)/DCM (4 ml)中之懸浮液添加至樹脂中，震盪5 h。將溶劑排出。樹脂分別用DCM/MeOH/DIPEA (17/2/1，40 mL)、DCM (50 mL)、NMP (50 mL)及DCM (50 mL)沖洗。所得樹脂用KOH/NaOH乾燥隔夜。

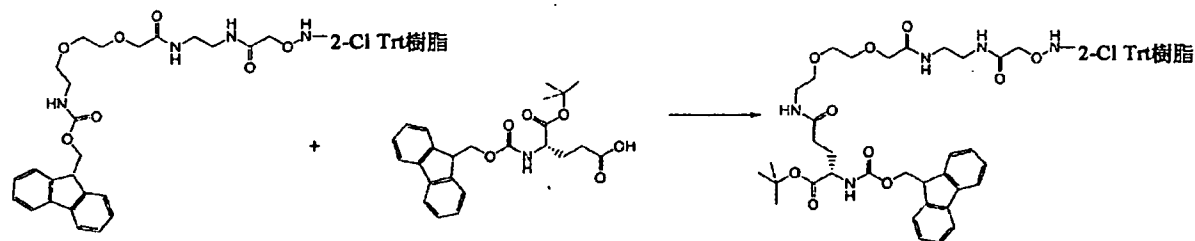


使100 mL玻璃器皿中之樹脂(0.775 mmol)在DCM (20 ml)中膨脹30 min且將其排出。向2-胺基乙基胺基甲酸(9H-芴-9-基)甲酯鹽酸鹽(0.081 g，0.775 mmol)、HOAt (0.422 g，3.10 mmol)及DIPEA (1.354

mL, 7.75 mmol)於NMP (8 mL)中之懸浮液中添加NMP(2.5 mL)中之HBTU(1.176 g, 3.10 mmol), 在室溫下震盪2 h。將溶劑排出, 且樹脂依次用NMP (10 mL)及DCM (10 mL)沖洗。將所得樹脂乾燥隔夜。



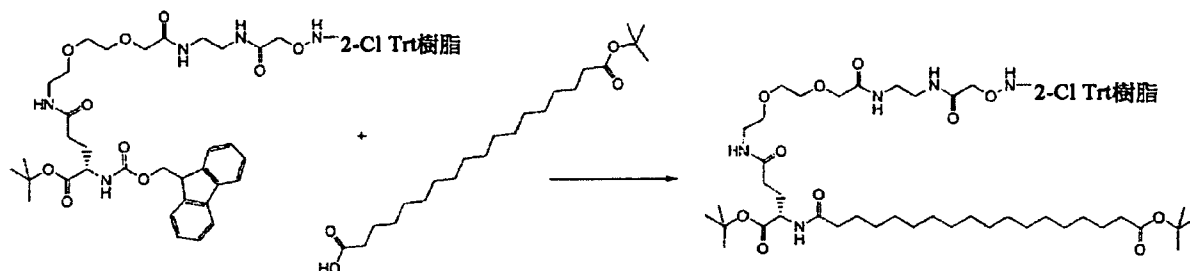
將樹脂(0.775 mmol)饋入反應容器中。添加10 mL之20%哌啶/NMP (v/v), 且在室溫下將懸浮液攪動5 min。將溶劑排出之後, 再添加10 mL之20%哌啶/NMP (v/v)且在室溫下攪動20 min。將HOAt (0.316 g, 2.325 mmol)及1-(9H-芴-9-基)-3-側氧基-2,7,10-三氧雜-4-氮雜十二烷-12-酸(0.896 g, 2.325 mmol)於NMP (8 mL)中之溶液添加至樹脂中, 且添加NMP (1 mL)中之DIC (0.362 mL, 2.325 mmol)。在室溫下將反應混合物攪動2 h, 且將樹脂濾出且用NMP (10 mL)沖洗四次。將所得樹脂乾燥隔夜。



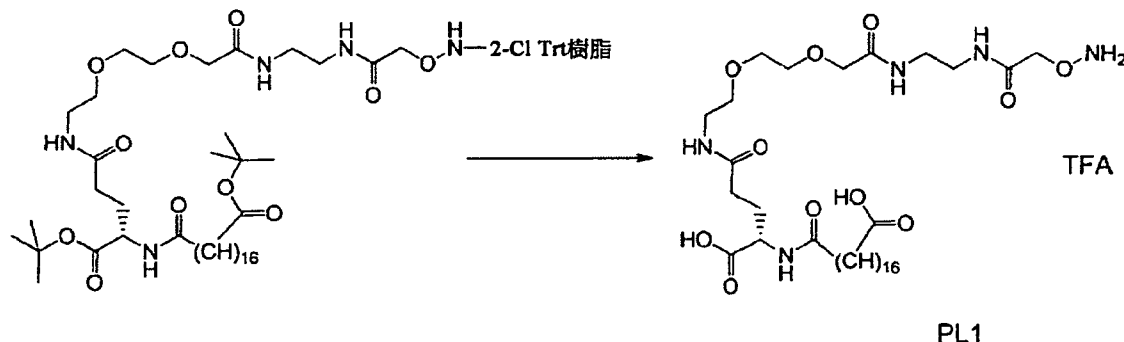
將樹脂(0.775 mmol)饋入反應容器中。將10 mL之20%哌啶/NMP (v/v)添加至樹脂中, 且在室溫下將懸浮液攪動5 min。將溶劑排出之後, 再添加10 mL之20%哌啶/NMP(v/v)且在室溫下攪動20 min。將HOAt (0.316 g, 2.325 mmol)及Fmoc-Glu-OtBu (0.989 g, 2.325 mmol)於NMP (8 mL)中之溶液添加至樹脂中, 且添加NMP (2.00 mL)中之DIC (0.362 mL, 2.325 mmol)。在室溫下將反應混合物攪動2 h。將樹脂濾

出且用NMP (10 ml)沖洗四次。將所得樹脂乾燥隔夜。

連接有效負載物至連接子



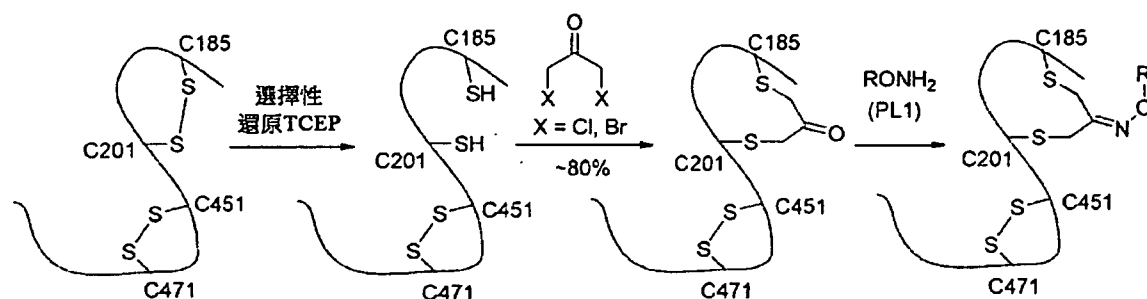
將樹脂(2-氯三苯甲基氯樹脂，0.775 mmol)饋入反應容器中。將10 mL之20%哌啶/NMP (0.775 mmol, v/v)添加至樹脂中，且在室溫下將懸浮液攪動5 min。將溶劑排出之後，再添加10 mL之20%哌啶/NMP(0.775 mmol)且在室溫下攪拌20 min。將18-第三丁氧基-18-側氧基十八烷酸(0.862 g, 2.325 mmol)及HOAt (0.316 g, 2.325 mmol)於NMP (8 mL)中之溶液添加至樹脂中，且添加NMP (2.00 mL)中之DIC (0.362 mL, 2.325 mmol)。在室溫下將反應混合物攪動4 h。將樹脂濾出且用NMP (10 mL)沖洗四次。將所得樹脂乾燥隔夜。



在室溫下，將來自前述步驟之樹脂(0.775 mmol)用20 mL裂解混合液(TFA/TIPS/水=95/2.5/2.5, v/v)處理1.5 h。樹脂藉由過濾移除且用TFA沖洗。在真空中濃縮濾液。用C18管柱以15-50% MeCN/水加0.1% TFA溶離進行RP-HPLC，產生(S)-1-(胺氧基)-19-羧基-2,7,16,21-四側氧基-9,12-二氧雜-3,6,15,20-四氮雜三十八烷-38-酸與2,2,2-三氟乙酸(1:1) (207 mg, 0.294 mmol, 37.9%產率) (PL1)。HRMS[M+1] (方法D)；704.4459 (觀測值),704.4486 (預期值)。

實例1

CRM197 (參考：G. Giannini及R. Rappuoli, *Nucleic Acids Res.*, 1984, 25, 4063。)用TCEP (xx)處理，使得C201-C185雙硫基經還原，而C451-C471雙硫基極少或未還原(參見實例3)。經還原之CRM197用1,3-二氯丙酮處理以提供經活化蛋白質，其中具有完整C451-C471雙硫基，且C201經由-CH₂-C(=O)-CH₂-鍵繫鏈至C185。使此經活化蛋白質與PL1(其為含有胺氧基之胺化脂肪酸衍生物，其製備描述於上文中)接觸，以形成鍵聯脂肪酸衍生物至蛋白質之胛。預期連接有脂肪酸基團之共軛物降低腎臟清除率，因此延長CRM197蛋白質之循環半衰期且增加其作為共軛物疫苗中之載體的效用。圖3中提供天然蛋白質(圖3A，使用方法A)、經活化蛋白質(圖3B)及蛋白質共軛物(圖3C)之質譜數據。



合成承載CRM197之位點確定之疊氮基化合物

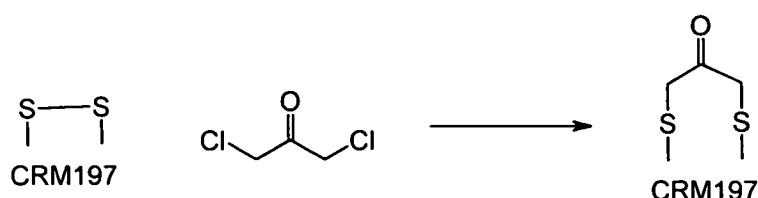
方法A-

溶離劑A：水+ 0.1%甲酸，溶離劑B：乙腈++ 0.1%甲酸

梯度：在2 min內3至80% B-流速1.8 ml/min。管柱：AcQuity

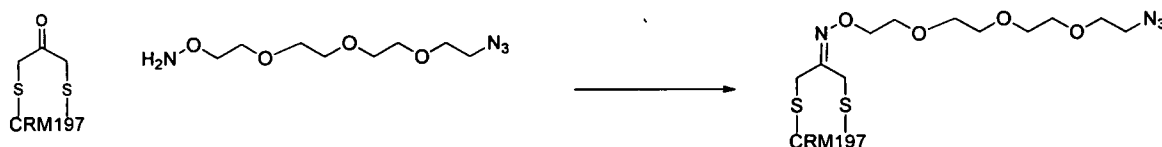
BEH300 SEC 4.6×30 mm，50℃

SDS Page凝膠分析—NuPage 4-12% Bis-Tris凝膠；1.5 mm×10孔



向pH 7.4磷酸鈉緩衝液(230 μ L)中的CRM197 (32.5 mg/ml) (185 μ L, 0.103 μ mol)中添加TCEP HCl(3 mg/mL, 水, 58.9 μ L, 0.616 μ mol)。在室溫下將反應物攪拌16 h, 隨後添加1,3-二氯丙-2-酮(20 mg/mL, 於DMSO中, 13.04 μ L, 2.054 μ mol)。將反應物攪拌3.5 h, 隨後通過0.5 mL Zeba™自旋尺寸排阻管柱(7K MWCO, 來自Thermo Scientific), 且將緩衝液更換成0.1 M之pH 6磷酸鈉緩衝液, 以獲得承載酮之CRM197 (6.78 mg/ml, 1.3 mL, 奈米滴方法)

LCMS [M+1] = 58465



向經酮修飾之CRM197 (6.78 mg/ml- pH 6磷酸鈉緩衝液, 1.3 mL, 0.151 μ mol)之溶液中添加O-(2-(2-(2-(2-疊氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基)脛胺(300 mg/ml-DMSO) (0.044 mL, 0.045 mmol)。在23°C下將反應混合物攪動36 h, 隨後通過用PBS 7.4溶離之5 mL Zeba™自旋管柱, 以提供標題化合物(4.41 mg/ml, 1.6 mL, 80%產率, 奈米滴方法)

LCMS [M+1] = 58682.5

圖4展示標題化合物經修飾CRM197之SDS Page。

實例2

起始物質製備：合成pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-OH (雙硫基C⁶-C¹²) (8)



用DCM (3×)洗滌2-氯三苯甲基氯樹脂(40.0 g , 64.0 mmol)。添加Fmoc-F-OH (24.8 g , 64.0 mmol)於DCM (400 mL)及DIPEA (44.7 mL , 256 mmol)中之溶液，且在室溫下將懸浮液震盪22 h。樹脂用DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1) (3x)、DCM (3x)、DMA (3x)、DCM (3x)充分洗滌。隨後樹脂用哌啶/DMA (1:4) (400 mL)之混合物處理四次持續10 min，隨後用DMA (2×180 ml)洗滌。收集哌啶/DMA溶液及DMA洗滌溶液，用於測定樹脂負載量。將1 mL之組合溶液用MeOH稀釋至500 mL，且在299.8 nm下之UV吸收率經量測為 $A = 0.368$ 。此對應於46.2 mmol之Fmoc量。樹脂用DCM (3×)、DMA (3×)、DCM (3×)充分洗滌且在真空中乾燥以產生中間物 **8a** (50.7 g ; 負載量=0.91 mmol/g)。

- 製備中間物**8b**(線性肽之總成)

中間物**8a** (2.64 g, 2.40 mmol)在Prelude™肽合成器上經歷固相肽合成。如下進行偶合：

偶合	AA	偶合次數×反應時間	合成循環
1	C(Trt)	2 x 30 min	D
2	Nle	2 x 15 min	A
3	P	2 x 15 min	A
4	G	2 x 30 min	A
5	K(Boc)	2 x 15 min	A
6	H(Trt)	2 x 15 min	A
7	C(Trt)	2 x 60 min	D
8	L	2 x 15 min	A
9	R(Pbf)	4 x 1 h	A
10	P	2 x 15 min	A
11	R(Pbf)	4 x 1 h	A
12	pE	2 x 15 min	A

- 製備中間物**8c** (藉由移除保護基自樹脂裂解)

中間物**8b** (2.40 mmol)用DCM (4×)仔細洗滌。添加95% TFA/EDT/TIPS (95:2.5:2.5)水溶液之混合物(50 mL)且在室溫下將懸浮液震盪1h。將裂解溶液濾出，且添加新鮮裂解溶液(35 mL)。在室溫下將懸浮液震盪1 h，隨後將裂解溶液濾出。添加新鮮溶液(35 mL)且在室溫下將懸浮液震盪1 h。將裂解溶液濾出。將組合之裂解溶液緩慢傾入冷庚烷/乙醚(1:1)之經攪拌混合物(500 mL)上，得到沈澱物。在室溫下將懸浮液攪拌2 h且隨後允許沈澱物沉降。上清液用玻璃料吸出。殘餘物用冷庚烷/乙醚(1:1) (2 × 100 mL)洗滌，上清液用玻璃料吸出。在高真空中乾燥固體以獲得呈灰白色固體狀之中間物**8c** (3.75 g, 1.88 mmol)。

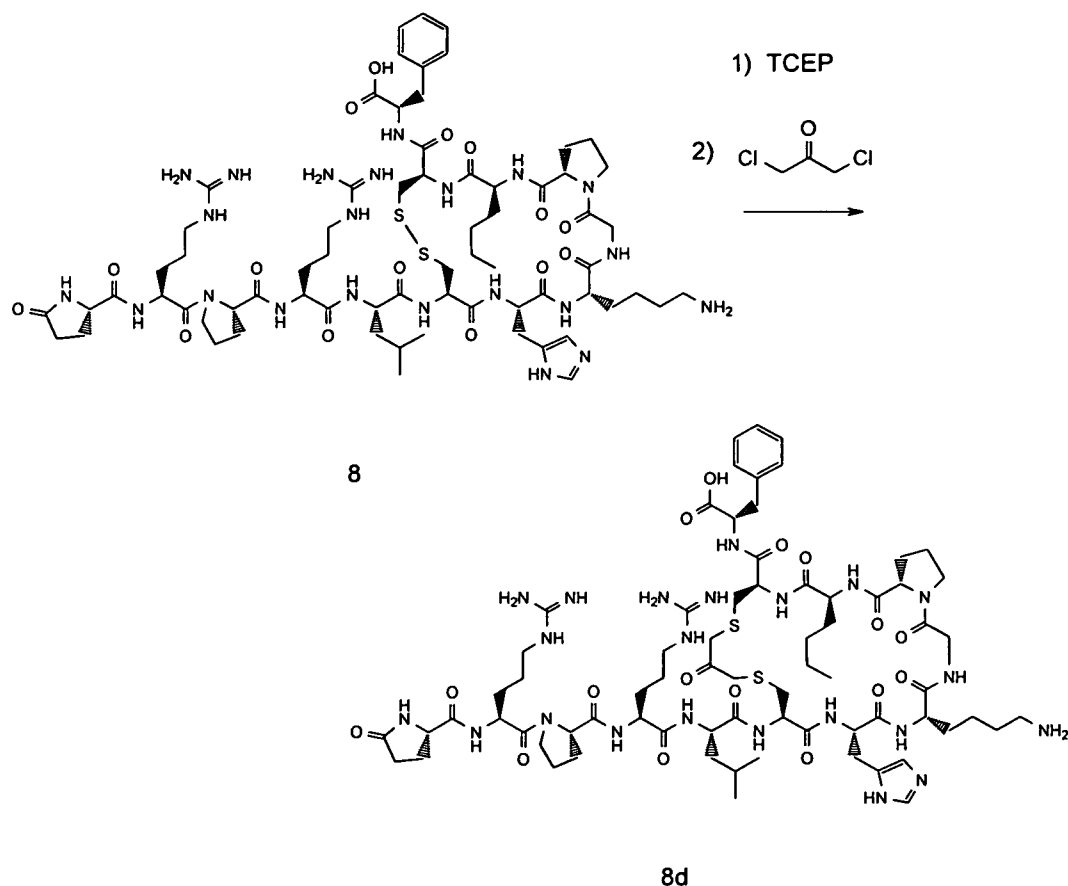
製備環狀肽**8** (環化及純化)

將中間物**8c** (3.75 g, 1.88 mmol)溶解於H₂O (375 mL)中。將50 mM I₂於AcOH (45.1 mL, 2.26 mmol)中之溶液一次性添加至經攪拌之溶液中，且在室溫下將溶液攪拌10 min。添加H₂O (5.64 mL, 2.82 mmol)中之0.5 M抗壞血酸以淬滅過量的I₂。將溶液濃縮至接近乾燥。

在室溫下分兩部分進行反應：0.188 mmol規模及1.69 mmol規模。組合粗物質用於純化。藉由製備型HPLC純化粗物質，且自ACN/H₂O凍乾以獲得呈白色固體狀之化合物**8** (1.53 g, 0.767 mmol)。

藉由分析型HPLC (分析型方法C： $t_R=3.43$ min)及UPLC-MS (分析型方法B；量測值： $[M+3]/3=512.4$ ；計算值： $[M+3]/3=512.6$)來分析純產物。

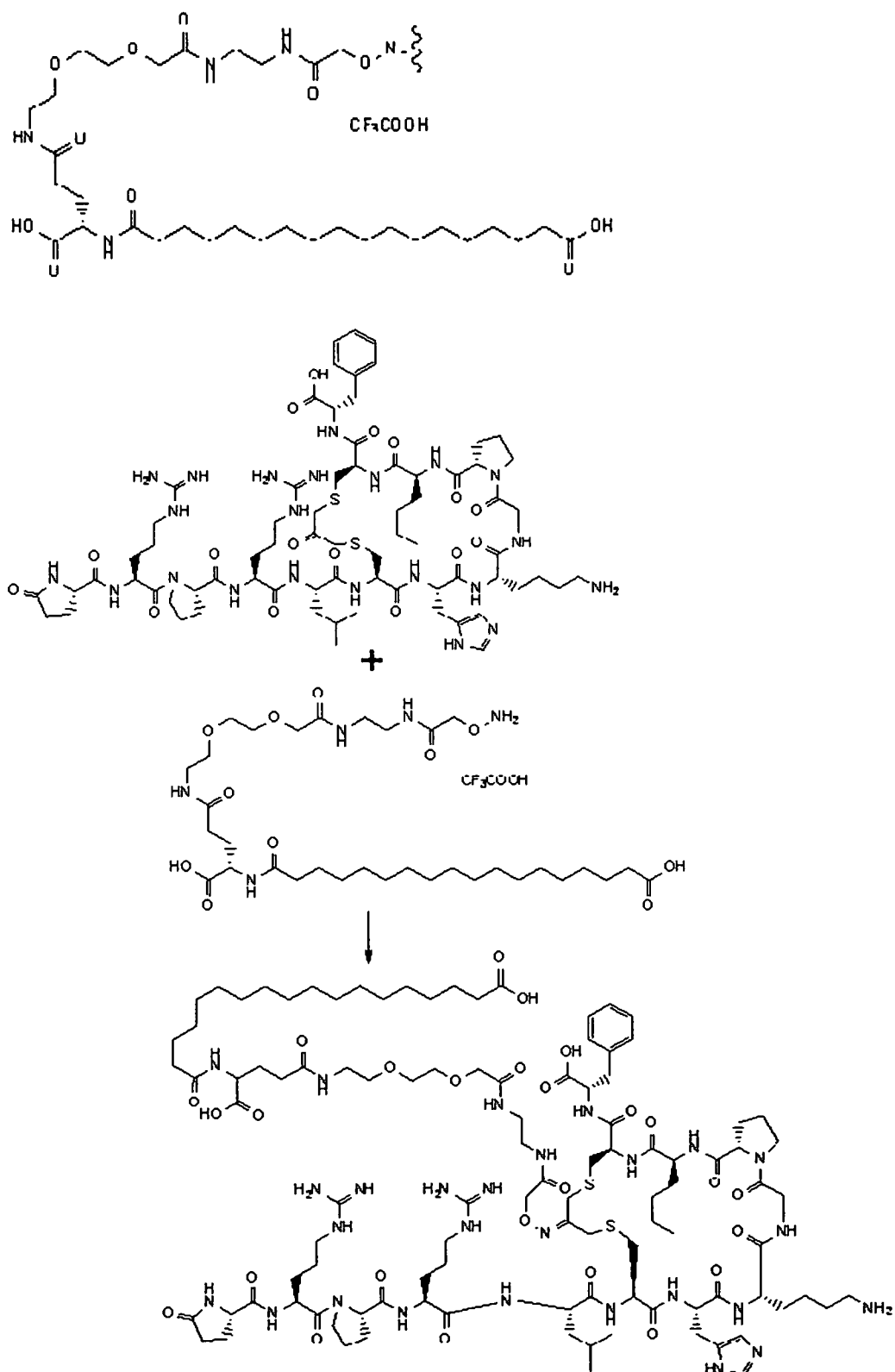
此實例說明經活化蛋白質之形成以環狀肽**8**為起始物質。



將環狀肽**8** (12 mg, 6.76 μ mol)溶解於50 mM之pH 6.5磷酸Na緩衝液 (1.5 ml) 中，在室溫下向其中添加TCEP HCl (2.91 mg, 10.13 μ mol)。在室溫下將此反應混合物攪拌1h。在室溫下向以上溶液中添加1,3-二氯丙-2-酮 (4.29 mg, 0.034 mmol)，在室溫下攪拌30 min。用15-60% MeCN/具有0.1% TFA之水溶離進行RP-HPLC，產生經活化蛋白質**8d** (6 mg, 2.93 μ mol, 43.4%產率)。HRMS $[M+1]$ (方法D)；

1590.7911 (觀測值), 1590.7912 (預期值)。

在位置6及12 $[C^6-C^{12}]$ 處之2個半胱胺酸之間具有-S-CH₂-C(=Z)-CH₂-S-鍵的*pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-OH*, 且Z為:



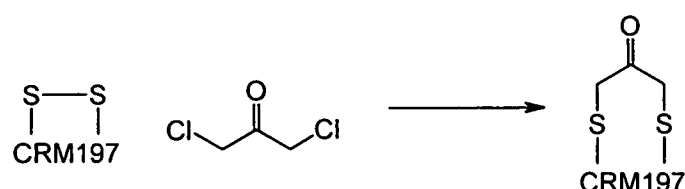
在室溫下向化合物8 ((S)-2-((3S,6R,14R,17S,20S,28aS)-17-((1H-咪

唑-5-基)甲基)-20-(4-胺基丁基)-3-丁基-14-((S)-2-((S)-5-胍基-2-((S)-1-((S)-5-胍基-2-((S)-5-側氧基吡咯啉-2-甲醯胺基)戊醯基)吡咯啉-2-甲醯胺基)戊醯胺基)-4-甲基戊醯胺基)-1,4,10,15,18,21,24-七側氧基二十六氫吡咯并[2,1-異][1,23,4,7,10,13,16,19]二硫雜六氮雜環二十六烷-6-甲醯胺基)-3-苯基丙酸)

(11.5 mg, 5.62 μmol)及(S)-1-(胺氧基)-19-羧基-2,7,16,21-四側氧基-9,12-二氧雜-3,6,15,20-四氮雜三十八烷-38-酸化合物與2,2,2-三氟乙酸(1:1) (9.19 mg, 0.011 mmol)於100 mM之pH 6.0磷酸Na緩衝液(1 ml)中之溶液中添加苯胺(2.051 μl, 0.022 mmol)。添加DMSO (50 μl)產生均質溶液。在室溫下將此反應混合物攪拌2 h。用15-60% MeCN/具有0.1% TFA之水溶離進行RP-HPLC，產生預期共軛物(1-((Z)-((3S,6R,14R,17S,20S,28aS)-17-((1H-咪唑-5-基)甲基)-20-(4-胺基丁基)-3-丁基-6-((S)-1-羧基-2-苯基乙基胺甲醯基)-14-((S)-2-((S)-5-胍基-2-((S)-1-((S)-5-胍基-2-((S)-5-側氧基吡咯啉-2-甲醯胺基)戊醯基)吡咯啉-2-甲醯胺基)戊醯胺基)-4-甲基戊醯胺基)-1,4,15,18,21,24-六側氧基二十二氫吡咯并[2,1-異][1,23,4,7,10,13,16,19]二硫雜六氮雜環二十六烷-10(1H,9H,11H)-亞基)胺氧基)-19-羧基-2,7,16,21-四側氧基-9,12-二氧雜-3,6,15,20-四氮雜三十八烷-38-酸)

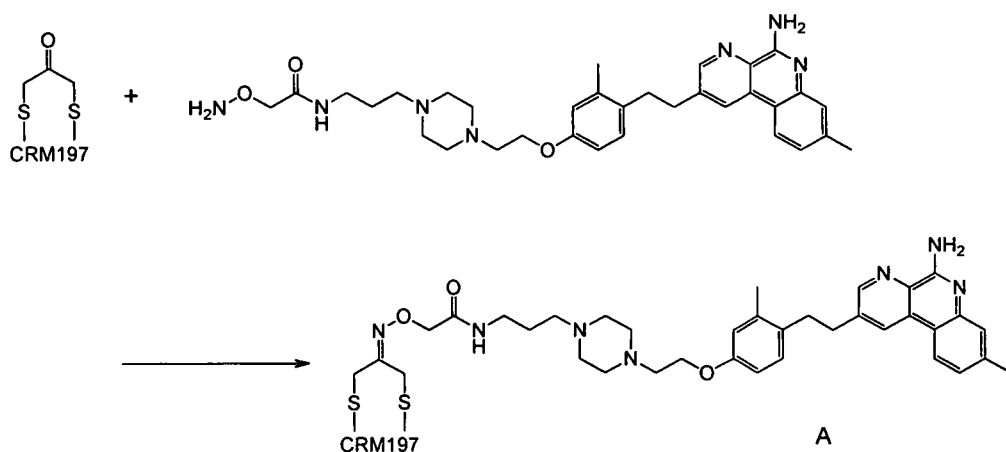
(4.5 mg, 1.646 μmol, 29.3%產率)。HRMS (方法D) [(M+3)/3] ; 759.7487 (觀測值), 759.7462 (預期值)。滯留時間4.12 min。

實例3



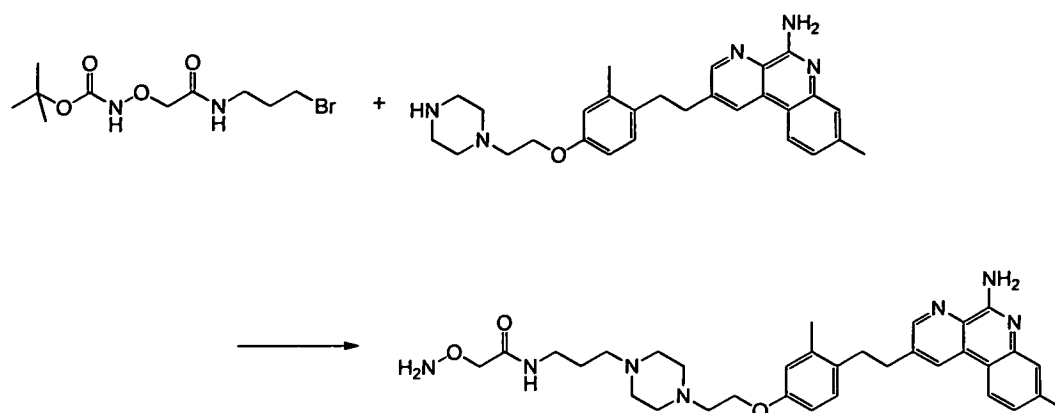
向CRM197 (200 μg, 6.2 μl, 0.0034 μmol)於50 mM之pH 7.4磷酸

Na緩衝液(10 μ l)中之溶液中添加TCEP HCl水溶液(5.89 μ g, 0.021 μ mol)。在室溫下將此反應混合物靜置15 h。將1,3-二氯丙-2-酮(4.58 μ g, 0.034 μ mol, 10 eq)添加至混合物中。在室溫下將此反應物靜置2 h。使粗物質通過Zeba™尺寸排阻管柱。LCMS; [M+1] = 58465。此經活化蛋白質可與諸如TLR促效劑之胺化有效負載物反應，以形成載體蛋白質，其與可增強對添加至載體蛋白質中之任何抗原之免疫反應的化合物共軛。



向經酮修飾之CRM197 (5 mg/ml, 磷酸Na緩衝液, pH 6.0) (50 μ g, 0.00086 μ mol)之溶液中添加N-(3-(4-(2-(4-(2-(5-胺基-8-甲基苯并[f][1,7]噻啉-2-基)乙基)-3-甲基苯氧基)乙基)哌嗪-1-基)丙基)-2-(胺氧基)乙醯胺(66.8 μ g, 0.064 μ mol)及苯胺(0.0020 μ l, 0.021 μ mol)。在23°C下將此反應物靜置14 h以產生基於LCMS分析之所需共軛物A。使反應混合物通過用pH 7.2之PBS緩衝液溶離之0.5 mL Zeba™尺寸排阻管柱。LCMS; [M+1] = 59032。

合成PL：



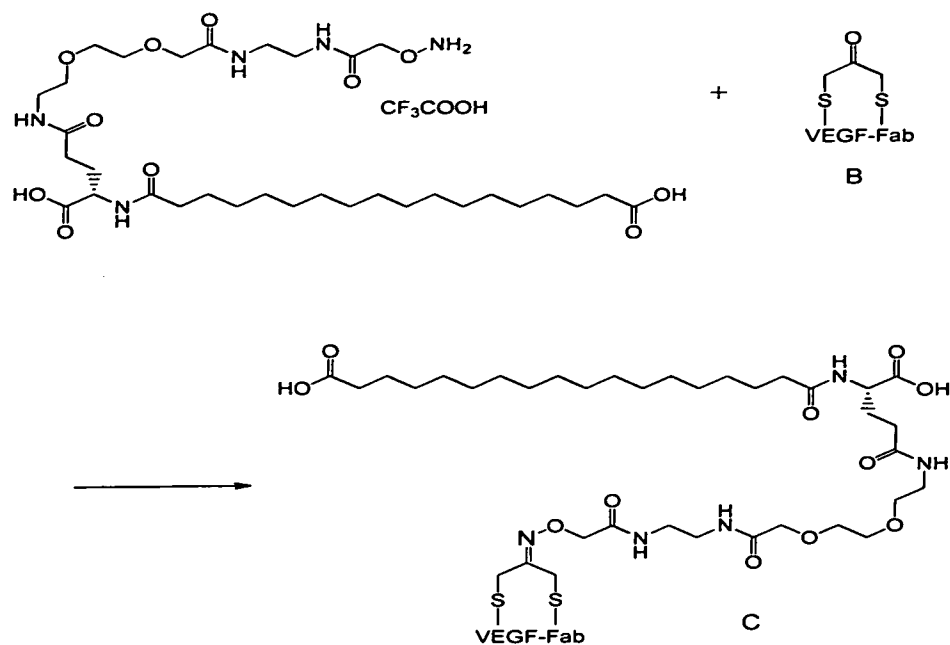
在室溫下向2-(3-溴丙基胺基)-2-側氧基乙氧基胺基甲酸第三丁酯 (53.3 mg, 0.171 mmol)及8-甲基-2-(2-甲基-4-(2-(哌嗪-1-基)乙氧基)苯乙基)苯并[f][1,7]啉啶-5-胺(52 mg, 0.114 mmol)於DMF (0.5 ml)中之溶液中添加碳酸鉀(39.4 mg, 0.285 mmol)，在室溫下攪拌24 h。添加水及EtOAc。分離有機層。用EtOAc萃取水層。組合之有機層經Na₂SO₄乾燥、過濾且在真空中濃縮以產生經Boc-保護之粗物質。將此粗物質溶解於DMF (0.5 mL)中，向其中添加TFA (0.5 ml, 6.49 mmol)。在室溫下將此攪拌30 min。移除溶劑之後，用15-60% MeCN/具有0.1% TFA之水溶離進行RP-HPLC純化，生成N-(3-(4-(2-(4-(2-(5-胺基-8-甲基苯并[f][1,7]啉啶-2-基)乙基)-3-甲基苯氧基)乙基)哌嗪-1-基)丙基)-2-(胺氧基)乙醯胺(25 mg, 0.024 mmol, 21.02%產率)。LCMS; [M+1] = 586。

實例4

以下實例使用抗VEGF抗體片段(VEGF-Fab)及為增加抗體片段之血清半衰期而添加的脂肪酸衍生物。在若干難以獲得之鏈內雙硫鍵存在下，使用在pH 7下之PBS中之TCEP達成鏈間雙硫基之選擇性還原。使經還原之蛋白質與二鹵丙酮(二溴丙酮或二氯丙酮)反應以提供具有將硫原子鍵聯在一起之三碳繫鏈-CH₂-C(=O)-CH₂-的經活化蛋白質。使經活化蛋白質與具有作為反應部分之胺氧基的连接子-有效負載物

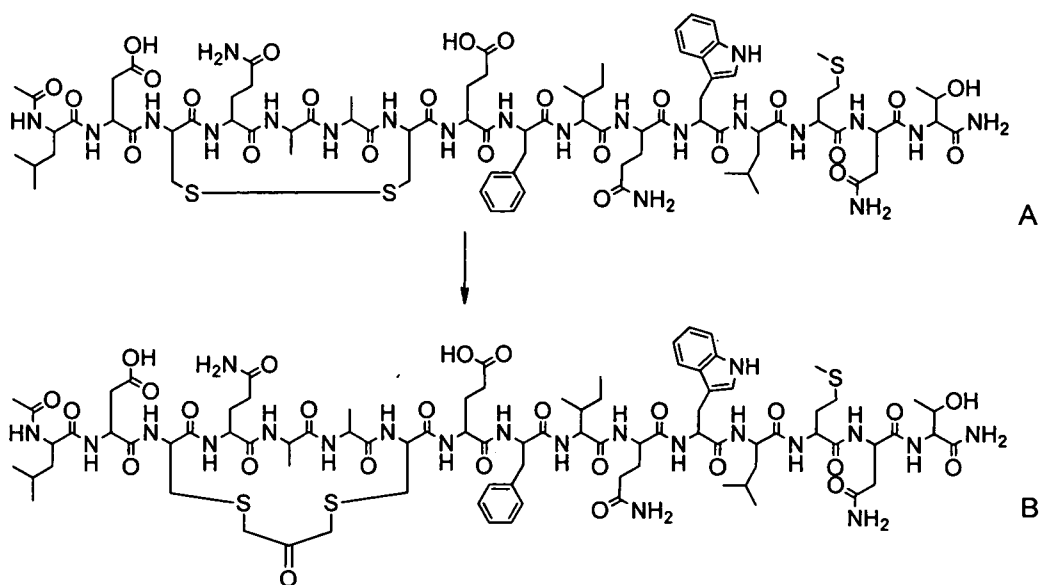
•





在室溫下向**B** (36.36 μg , 0.00076 μmol)於pH 7.4之PBS(22.5 μl)中之溶液中添加(S)-1-(胺氧基)-19-羧基-2,7,16,21-四側氧基-9,12-二氧雜-3,6,15,20-四氮雜三十八烷-38-酸化合物與2,2,2-三氟乙酸(1:1) (64.33 μg , 0.079 μmol)及苯胺(0.00105 μl , 0.011 μmol)，在23 $^{\circ}\text{C}$ 下攪拌14 h。消耗**B**且將其轉化成所需產物**C**。使粗物質通過ZebaTM自旋脫鹽管柱7K MWCO (來自Thermo Scientific) LCMS; $[\text{M}+1]$ (方法 A) = 48222。圖6描繪蛋白質共軛物之形成且展示關於共軛物形成之質譜跡象。

實例5

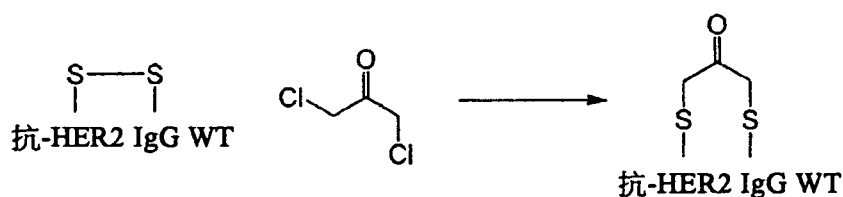


將肽A (1 mg, 0.519 μmol)溶解於緩衝液(2.5 ml) (50 mM之pH 6.5 磷酸鈉緩衝液(1.5 mL)、40% MeCN (0.9 mL)、2.5% DMF (0.1 mL)) 中，在室溫下向其中添加TCEP HCl (0.164 mg, 0.571 μmol)。將此反應混合物攪拌60 min。在室溫下將DMF (0.1 ml)中之1,3-二溴丙酮 (0.164 mg, 0.571 μmol)添加至反應混合物中。攪拌3 min之後，觀測丙酮加合物B以形成基於LCMS分析之定量轉化。LCMS (方法C) $[M+2]/2 = 991$ 。

實例6：製備抗Her2抗體-藥物共軛物。

方法A：

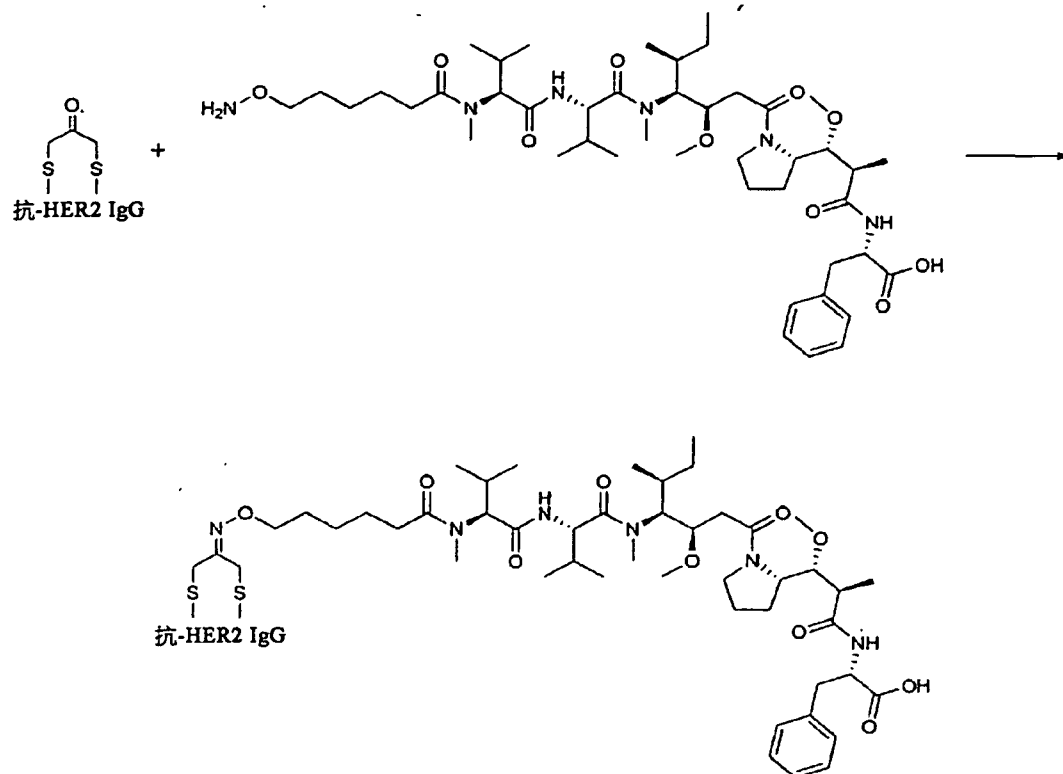
步驟1：



步驟1：向**抗-HER2 IgG** (20.36 mg/ml於0.1 M Tris/HCl中，30 μl ，610.8 μg ，0.0041 μmol)及1,3-二氯丙-2-酮(66.1 μg ，0.495 μmol)之溶液中添加TCEP HCl (14.17 μg ，0.049 μmol)，在4 $^{\circ}\text{C}$ 下攪動16 h。使反應混合物通過用PBS緩衝液(pH 7.2)溶離之0.5mL ZebaTM自旋管

柱。藉由利用取自反應溶液之樣本用PNGase F (New England Biolab)、內切蛋白酶Lys-C (Roche)及非還原/還原型SDS PAGE (具有膠態藍染色之4-12% Bis-Tris凝膠)進行分析，來確認4個鏈間雙硫基的修飾。LCMS (方法B); 145394 (用PNGase F脫糖基化後)。

步驟2:

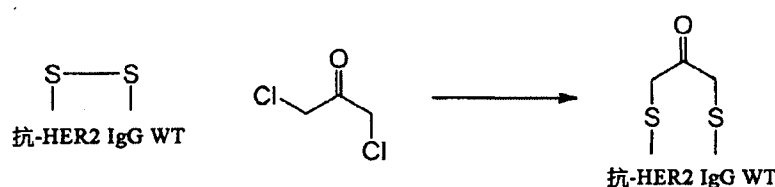


在室溫下向步驟1中所製備之經修飾抗-HER2 IgG之溶液(7.14 mg/mL, 100 mM之pH 4.8乙酸苯胺緩衝液, 600 μ g, 0.0040 μ mol)中添加(S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(6-(胺氧基)-N-甲基己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-N,3-二甲基丁醯胺基)-3-甲氧基-5-甲基庚醯基)吡咯啉-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙醯胺基)-3-苯基丙酸(30 mg/ml, 104 μ g, 0.121 μ mol)。在室溫下將所得混合物攪動19 h。使混合物通過用PBS緩衝液(pH 7.2)溶離之0.5 ml Zeba™自旋管柱一次。藉由利用取自反應溶液之樣本用PNGase F (New England Biolab)、內切蛋白酶Lys-C (Roche)及非還原/還原型SDS PAGE (具有膠態藍染色之4-12% Bis-Tris凝膠，展示於下文)進行分析，來確認酮的修飾。

DAR (藥物-抗體比率)為3.2。LCMS (方法B);148770 (脫糖基化後)。
圖7展示共軛物及還原之後的共軛物(參見下文)。使用SeeBlue Plus2®
預染色標準品(Invitrogen)作為表觀分子量梯級。此表明極少或無未共
軛之抗體存在於共軛產物中：未共軛抗體在還原後由於僅藉由雙硫鍵
結合在一起之抗體解離而將產生較低分子量能帶。具有經由-S-CH₂-
C(=X)-CH₂-S-鍵共價鍵聯之片段的共軛物在還原後不能解離。

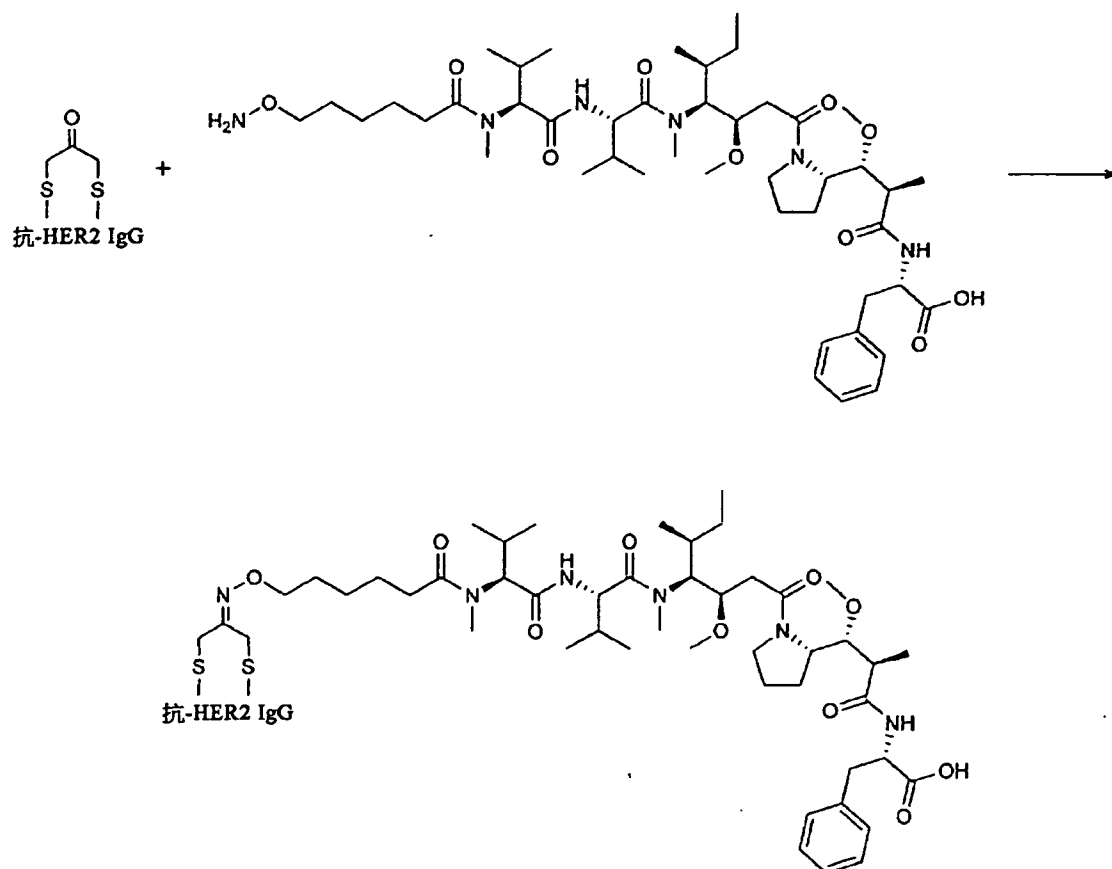
方法B：

步驟1：



向抗-HER2 IgG (20.36 mg/ml於0.1 M Tris/HCl中) (610.8 μg ,
0.0041 μmol) (30 μl)及1,3-二氯丙-2-酮(66.1 μg , 0.495 μmol)之溶液中
添加TCEP HCl (14.17 μg , 0.049 μmol), 在4℃下攪動16 h。使反應混
合物通過用pH 7.2之PBS溶離之0.5 mL Zeba™自旋管柱。藉由利用取
自反應溶液之樣本用PNGase F (New England Biolab)、內切蛋白酶
Lys-C (Roche)及非還原/還原型SDS PAGE (具有膠態藍染色的4-12%
Bis-Tris凝膠)進行分析，來確認在鏈間雙硫基處藉由形成4丙酮所進
行的成功修飾。LCMS (方法B); 145394 (脫糖基化後)。遵循之前所描
述之程序製備用於SDS PAGE之經還原之樣本。

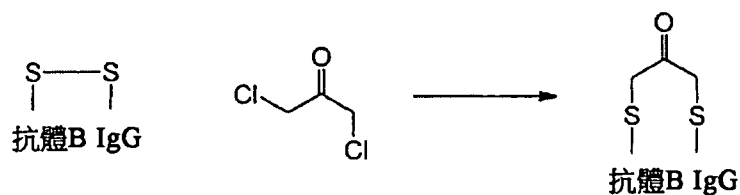
步驟2：



在室溫下向經修飾**抗-HER2 IgG** (7.14 mg/mL, 100 mM之pH 4.8 乙酸苯胺緩衝液) (600 μ g, 0.0040 μ mol)之溶液中添加(S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(6-(胺氧基)-N-甲基己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-N,3-二甲基丁醯胺基)-3-甲氧基-5-甲基庚醯基)吡咯啉-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙醯胺基)-3-苯基丙酸(30 mg/ml, 104 μ g, 0.121 μ mol), 在室溫下攪動19 h。使所得混合物通過用pH 7.2之PBS 溶離之0.5 ml Zeba™自旋管柱一次。藉由利用取自反應溶液之樣本用 PNGase F (New England Biolab)、內切蛋白酶Lys-C (Roche)及非還原/還原型SDS PAGE (具有膠態藍染色之4-12% Bis-Tris凝膠, 展示於圖8 中)進行分析, 來確認酮的成功修飾。DAR為3.8。LCMS (方法B); 148770 (脫糖基化後)。使用SeeBlue Plus2™預染色標準品(Invitrogen) 作為表觀分子量梯級。遵循之前所描述之程序製備用於SDS PAGE之經還原之樣本。SDS PAGE呈現於圖8中。

實例7：製備抗體B-DM1共軛物：

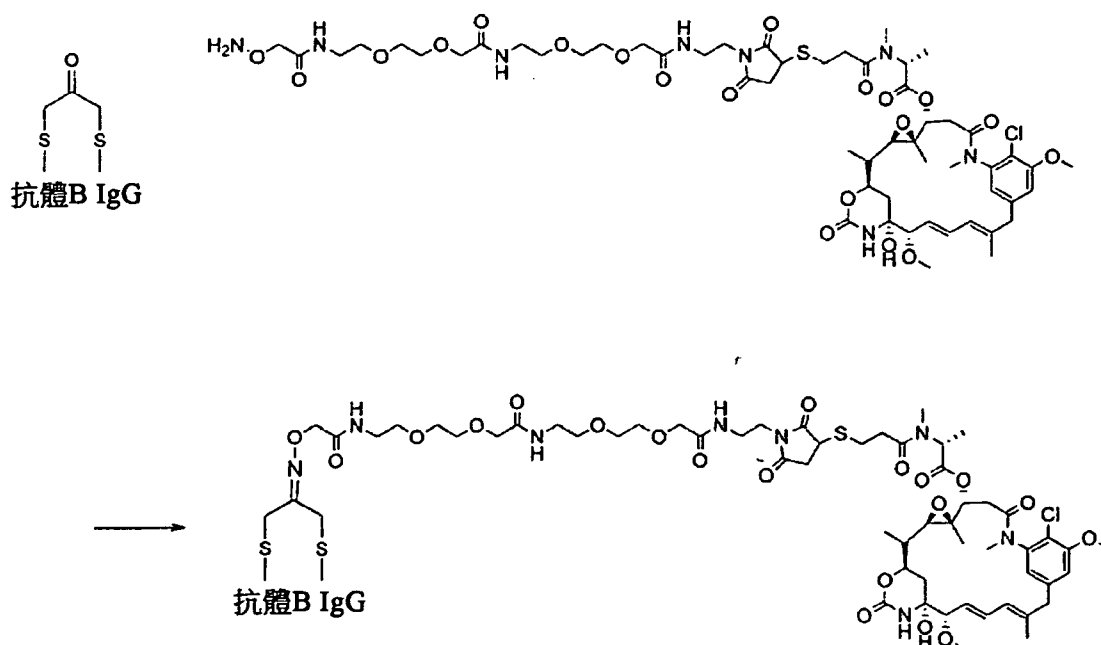
步驟1：



向二氯丙酮(7.35 mg, 0.055 mmol, 368 μ l)於Tris緩衝液(4800 μ l)中之溶液中添加抗體B IgG (抗體B IgG識別與Her2不同之抗原：68.2 mg, 0.458 μ mol, 400 μ l)，將其冷卻至4°C持續60 min。在4°C下添加TCEP HCl (1.576 mg, 5.50 μ mol, 524 μ l)，在室內4°C下將其靜置16 h。混合物經由10K Amicon®膜過濾濃縮且用PBS稀釋。將此循環重複2次。過濾後，使樣本通過5 ml Zeba™脫鹽管柱。藉由利用取自反應溶液之樣本用PNGase F (New England Biolab)及非還原/還原型SDS PAGE (具有膠態藍染色之4-12% Bis-Tris凝膠)進行分析，來確認在鏈間雙硫基處藉由形成4丙酮所進行的成功修飾。LCMS (方法B); 146020 (脫糖基化後)。遵循之前所描述之程序製備用於SDS PAGE之經還原之樣本。

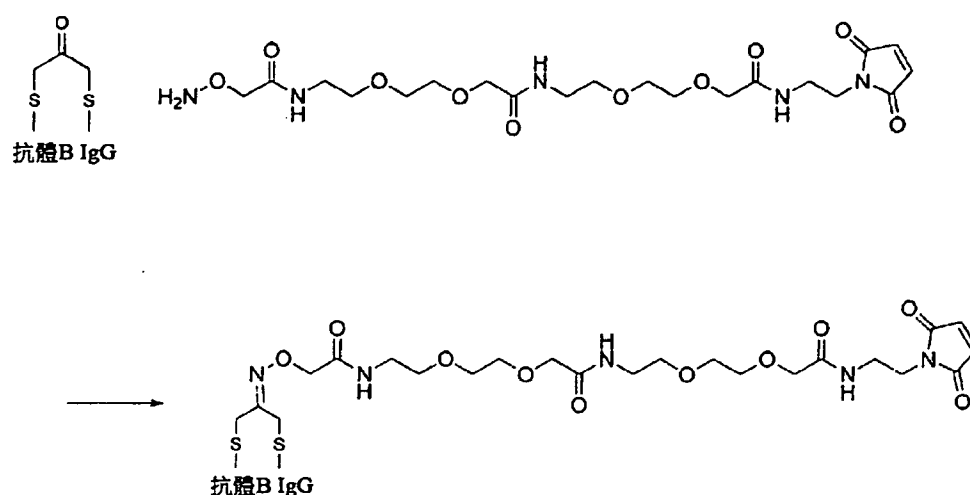
步驟2：

PL1 (方法A)：

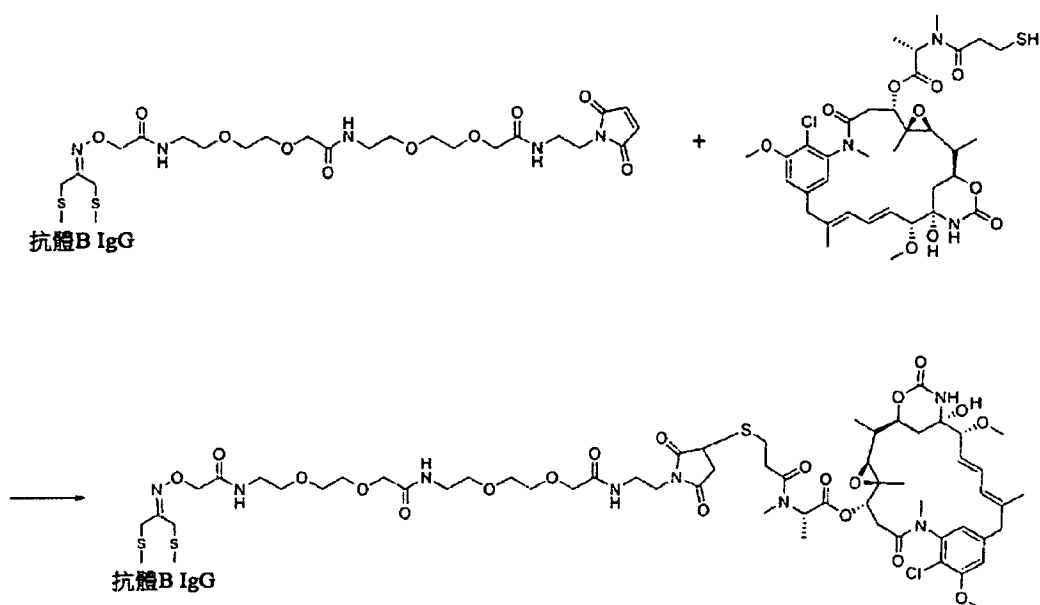


向經修飾抗體B IgG (48 mg, 0.322 μ mol, 1.2 ml)之溶液中添加DM-1衍生物(10.00 mg, 8.05 μ mol, 67 μ l)及3,5-二胺基苯甲酸(14.70 mg, 0.097 mmol, 30 μ l)之DMSO溶液, 在23 $^{\circ}$ C下攪拌15 h。混合物經由10K Amicon[®]膜過濾濃縮且用PBS稀釋。將此循環重複3次。過濾後, 使樣本通過5 ml Zeba[™]脫鹽管柱。藉由用PNGase F (New England Biolab)分析來確認酮的成功修飾。基於LCMS, DAR為4。LCMS (方法B); 150915 (脫糖基化後)。

PL1 (方法B):

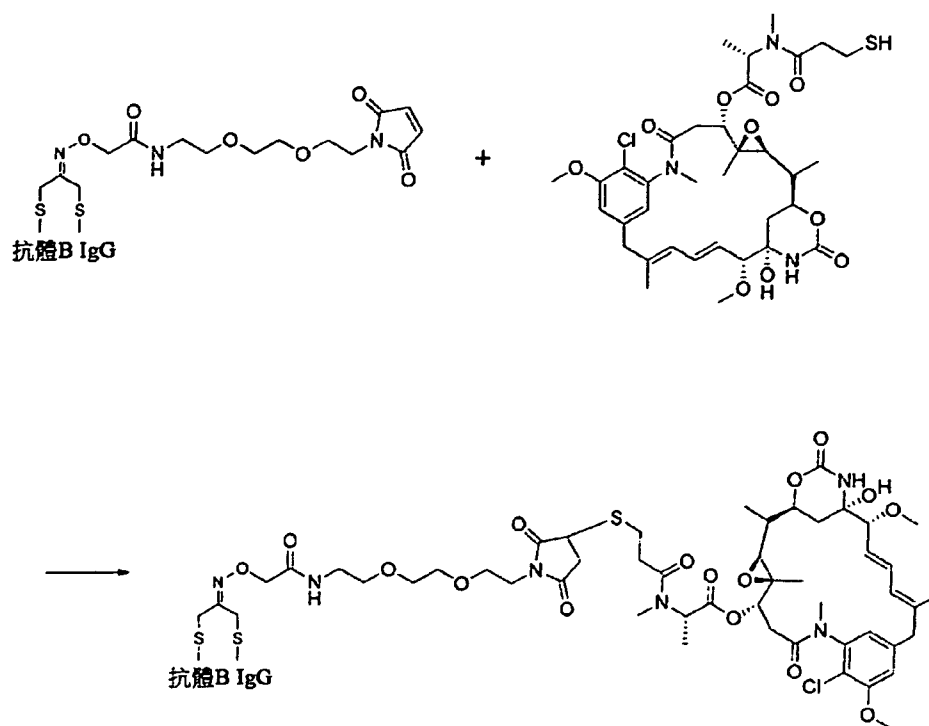


在室溫下向經修飾抗體B IgG (679 μ g, 0.0046 μ mol)於0.1 M之pH 6.0磷酸鈉中之溶液中添加DMSO (563 μ g, 0.911 μ mol, 2.25 μ l)中之2-(胺氧基)-N-(1-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-4,13-二側氧基-6,9,15,18-四氧雜-3,12-二氮雜二十烷-20-基)乙醯胺, 在23 $^{\circ}$ C下攪拌20 h。使反應混合物通過用具有EDTA之100 mM HEPES溶離之0.5 ml脫鹽管柱3次。藉由LCMS來確認引入3.8順丁烯二醯亞胺連接子/抗體 (DAR=3.8)。LCMS (方法B); 147968 (用PNGase F (New England Biolab)脫糖基化後)。

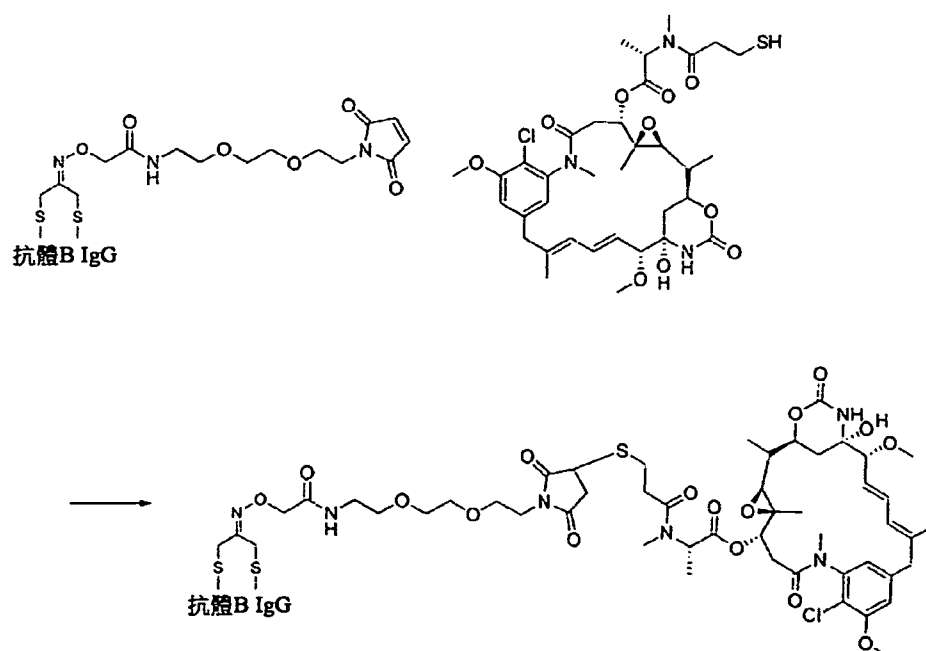


在室溫下向經修飾抗體B IgG (177 μg , 0.0012 μmol)於具有10 mM EDTA之100 mM HEPES緩衝液中之溶液中添加DMSO (8.65 μg , 0.012 μmol , 0.288 μl)中之DM-1 , 在23 $^{\circ}\text{C}$ 下攪動6 h。將N-甲基順丁烯二醯亞胺(1.3 mg/ml於DMSO中) (2.083 μg , 0.019 μmol)添加至反應溶液中 , 攪動10 min。使反應混合物通過用100 mM HEPES緩衝液溶離之0.5 mL脫鹽管柱。基於LCMS , DAR為3.7。LCMS (方法B); 153967 (DAR4) (經糖基化)。

PL2 :

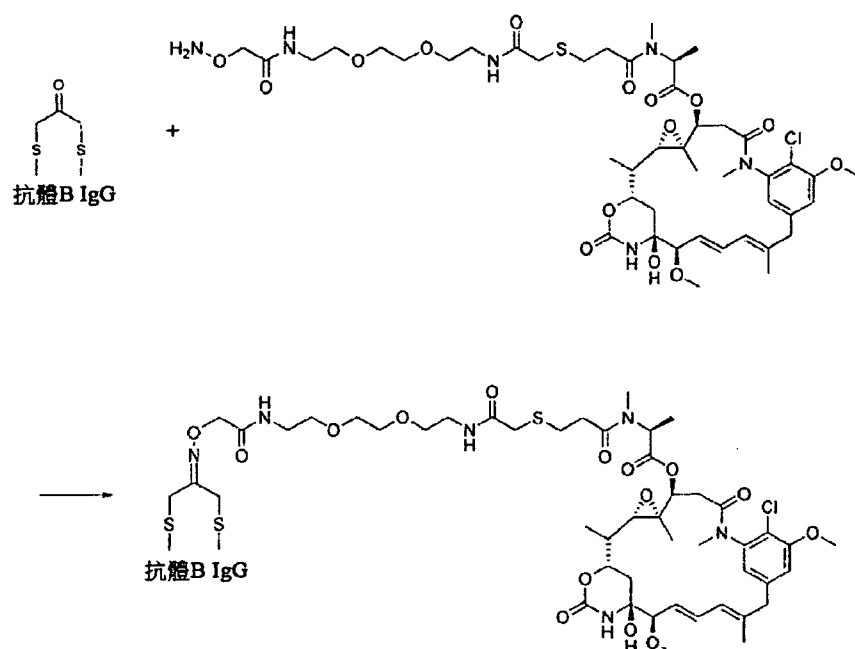


在室溫下向經修飾抗體B IgG (420 μg , 0.0028 μmol)於具有10 mM EDTA之HEPES緩衝液中之溶液中添加DMSO (10.61 μg , 0.014 μmol , 0.55 μl)中之DM-1, 在室溫下攪動8 h。使反應混合物通過用具有EDTA之100 mM HEPES溶離之0.5 ml脫鹽管柱3次。使反應混合物通過用100 mM HEPES緩衝液溶離之0.5 mL脫鹽管柱。基於LCMS, DAR為3.6。LCMS (方法B); 150101 (DAR4) (用PNGase F (New England Biolab)脫糖基化後)。



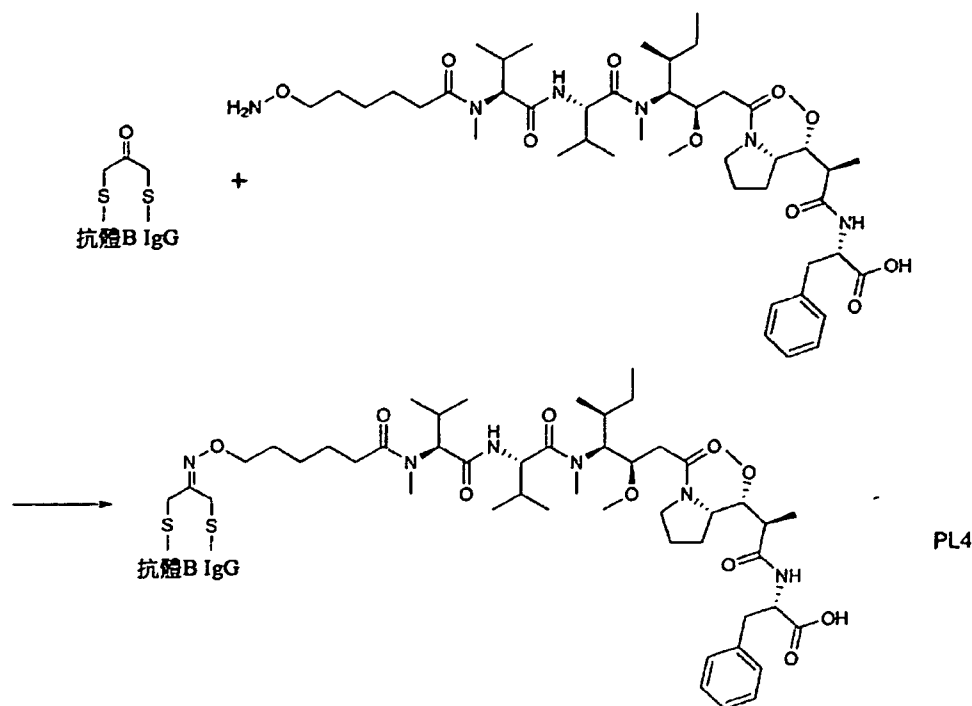
在室溫下向經修飾抗體B IgG (420 μg , 0.0028 μmol)於具有10 mM EDTA之HEPES緩衝液中之溶液中添加DMSO (10.61 μg , 0.014 μmol , 0.55 μl)中之DM-1，在室溫下攪動8 h。使反應混合物通過用具有EDTA之100 mM HEPES溶離之0.5 ml脫鹽管柱3次。使反應混合物通過用100 mM HEPES緩衝液溶離之0.5 mL脫鹽管柱。基於LCMS，DAR為3.6。LCMS (方法B); 150101 (DAR4) (用PNGase F (New England Biolab)脫糖基化後)。

PL3 :



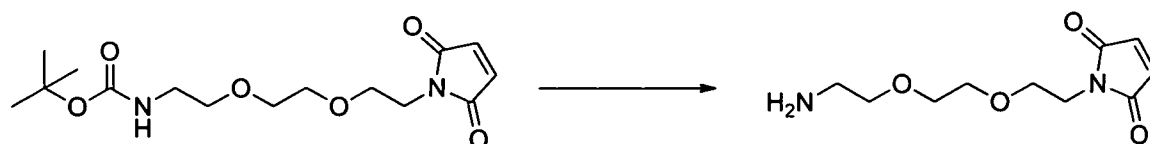
向經修飾抗體B IgG (47.3 mg , 0.317 μmol , 1.1 ml)之溶液中添加DM-1衍生物(6.34 mg , 6.35 μmol , 42.3 μl)及3,5-二胺基苯甲酸(13.52 mg , 0.089 mmol , 27 μl)之DMSO溶液，在23 $^{\circ}\text{C}$ 下攪拌15 h。混合物經由10K Amicon[®]膜過濾濃縮且用PBS稀釋。將此循環重複2次。過濾後，使樣本通過5 ml Zeba[™]脫鹽管柱。藉由用PNGase F (New England Biolab)分析來確認酮的成功修飾。基於LCMS，DAR為4。LCMS (方法B); 150910 (脫糖基化後)。

PL4 :

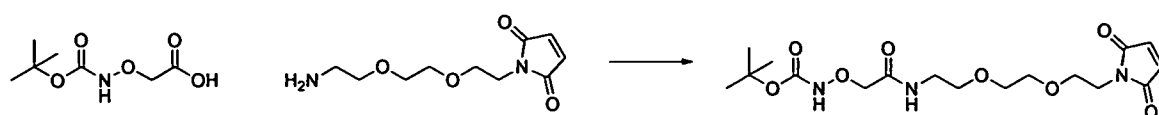


在室溫下向經修飾抗體B IgG (250 μg , 0.0017 μmol , 10 μl)於PBS中之溶液中添加以上所示之所需烷氧基胺(21.66 μg , 0.025 μmol , 0.245 μl)及3,5-二胺基苯甲酸(383 μg , 2.52 μmol , 0.43 μl) , 在23 $^{\circ}\text{C}$ 下攪動24 h。使反應混合物通過用PBS溶離之0.5 mL脫鹽管柱兩次。基於LCMS , DAR為4。LCMS (方法B); 152446 (經糖基化)。

PL1合成：



在室溫下將(2-(2-(2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙氧基)乙氧基)乙基)胺基甲酸第三丁酯(245 mg , 0.746 mmol)溶解於二噁烷(2 ml , 8.00 mmol)中之4N HCl中 , 在室溫下攪拌1 h。移除溶劑後 , 粗物質不經進一步純化即用於下一反應。



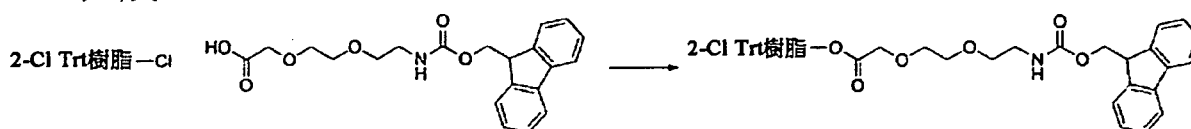
在室溫下向2-(((第三丁氧基羰基)胺基)氧基)乙酸(185 mg , 0.970

mmol)及TEA (0.520 ml, 3.73 mmol)於DCM (8 ml)中之溶液中添加EDC (172 mg, 0.895 mmol)及HOBT (114 mg, 0.746 mmol), 在室溫下攪拌5 min。將DCM (4 mL)中之1-(2-(2-(2-胺基乙氧基)乙氧基)乙基)-1H-吡咯-2,5-二酮(197 mg, 0.746 mmol)添加至以上反應混合物中。攪拌1 h後, 添加DCM及水。分離有機層。用DCM萃取水層。組合之有機層經Na₂SO₄乾燥、過濾且在真空中濃縮。用15-65% MeCN/具有0.1% TFA之水溶離進行RP-HPLC純化, 產生呈無色油狀之2-((2-(2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙氧基)乙氧基)乙基)胺基)-2-側氧基乙氧基胺基甲酸第三丁酯(62 mg, 0.154 mmol, 20.70% 產率, 關於2個步驟)。ESI-MS (方法A) m/z: 402[M+1]⁺, 滯留時間: 1.60 min。¹H-NMR (CDCl₃-d, 400 MHz); 1.48 (s, 9H), 3.49-3.75 (m, 14H), 6.71 (s, 2H)。



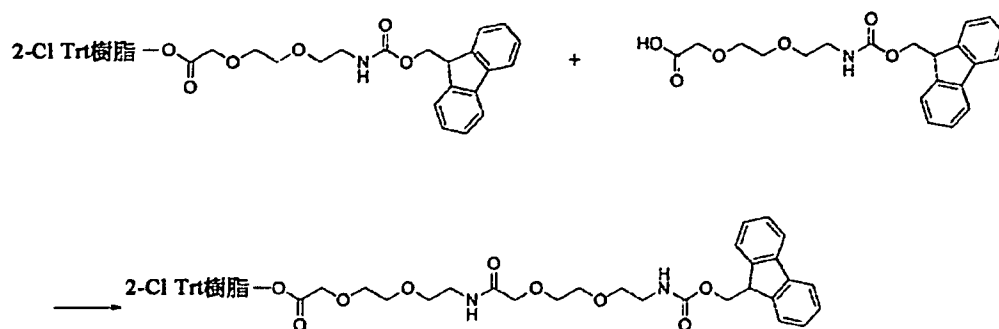
在室溫下向2-((2-(2-(2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙氧基)乙氧基)乙基)胺基)-2-側氧基乙氧基胺基甲酸第三丁酯(62 mg, 0.154 mmol)於DCM (400 μ l)中之溶液中添加TFA (400 μ l), 在室溫下攪拌1 h。移除溶劑後, 將粗物質置於真空中隔夜, 以便不經進一步純化即使用。ESI-MS (方法A) m/z: 302[M+1]⁺

PL2合成:

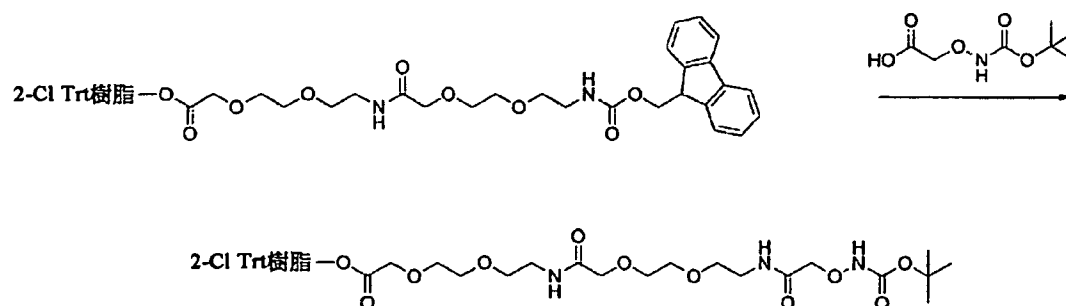


向2-Cl Trt樹脂(1.70 mmol /g) (0.086 g, 1.7 mmol)及1-(9H-蒽-9-基)-3-側氧基-2,7,10-三氧雜-4-氮雜十二烷-12-酸(2 g, 5.19 mmol)於DCM (8 mL)/DMF (4 mL)中之懸浮液中逐滴添加DIPEA (2.67 ml,

15.30 mmol)，在室溫下攪拌 15 h。將溶劑排出。樹脂用 DCM/MeOH/DIPEA (17/2/1, 40 ml)、DCM (8 mL×2)、DMF (8 mL×2)、DCM (8 mL×2)沖洗且在真空中乾燥。

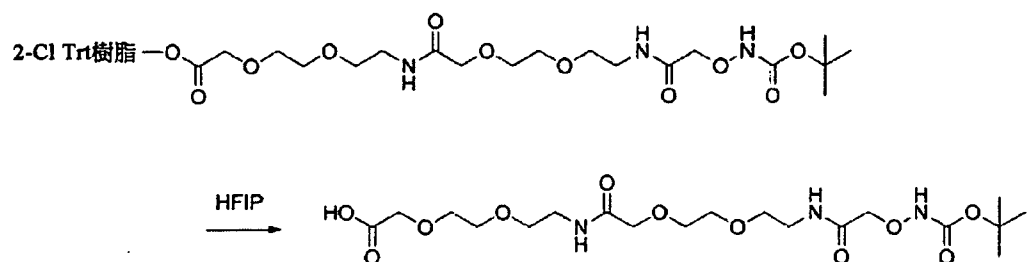


將樹脂(0.679 g, 1.7 mmol)饋入反應容器中。添加 5 mL 之於 DMF 中之 20% 吡啶，將其輕輕攪拌 1 min 且移除。再添加 10 mL 之於 DMF 中之 20% 吡啶，等待 20 min 同時間歇攪拌且將其移除。添加 DMF (10 mL)，攪拌 15 s 且經由真空過濾將其移除。將此步驟重複四次(用 Kaiser 測試檢查；陽性，紫色-深藍色)。將 HOAt (0.463 g, 3.40 mmol) 及 2-(((第三丁氧基羰基)胺基)氧基)乙酸(0.650 g, 3.40 mmol)於 DMF (8 mL) 中之溶液添加至樹脂中，且添加 DMF (4 mL) 中之 DIC (0.530 mL, 3.40 mmol)。在室溫下將反應混合物攪動 1.5 h。將樹脂濾出、用 DMF (10 mL) 沖洗四次且在真空中乾燥。

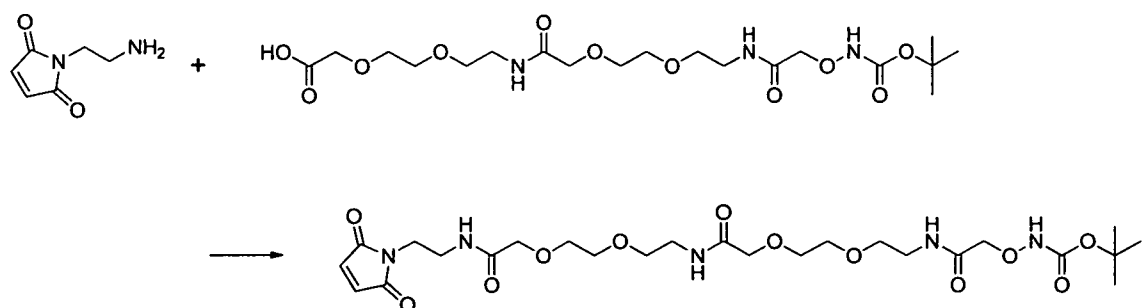


將樹脂(0.926 g, 1.7 mmol)饋入反應容器中。添加 5 mL 之於 DMF 中之 20% 吡啶，將其輕輕攪拌 1 min 且移除。再添加 10 mL 之於 DMF 中之 20% 吡啶，等待 20 min 同時間歇攪拌且將其移除。添加 DMF (10 mL)，攪拌 15 s 且經由真空過濾將其移除。將此步驟重複四次(用 Kaiser 測試檢查；陽性，紫色-深藍色)。將 HOAt (0.463 g, 3.40

mmol)及2-(((第三丁氧基羰基)胺基)氧基)乙酸(0.650 g, 3.40 mmol)於DMF (8 mL)中之溶液添加至樹脂中，且添加DMF (4 mL)中之DIC (0.530 mL, 3.40 mmol)。在室溫下將反應混合物攪動1.5 h。將樹脂濾出、用DMF(10 mL)沖洗四次且在真空中乾燥。

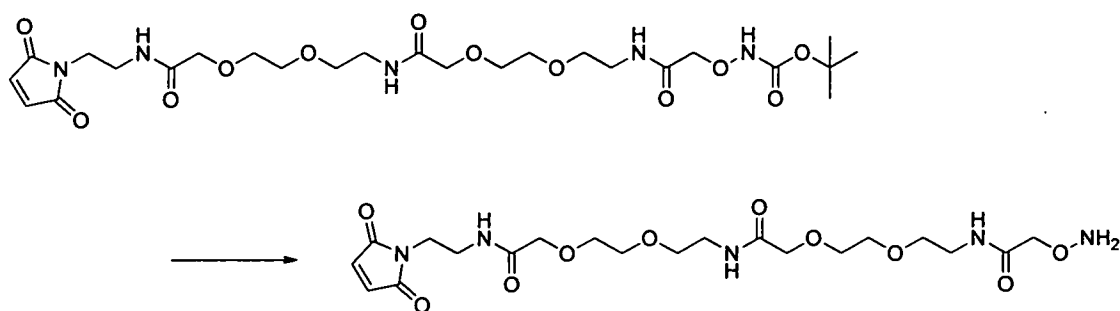


樹脂與30% HFIP (六氟異丙醇)懸浮於CHCl₃ (20 mL, 1.700 mmol)中，在室溫下攪動2 h。將所排出之溶劑濃縮以產生粗物質2,2-二甲基-4,8,17-三側氧基-3,6,12,15,21,24-六氧雜-5,9,18-三氮雜二十六-26-烷酸(1.13 g, 2.347 mmol, 138%產率)。此粗物質不經進一步純化即用於下一反應。ESI-MS m/z: 482[M+]⁺，滯留時間：1.10 min (方法B)。

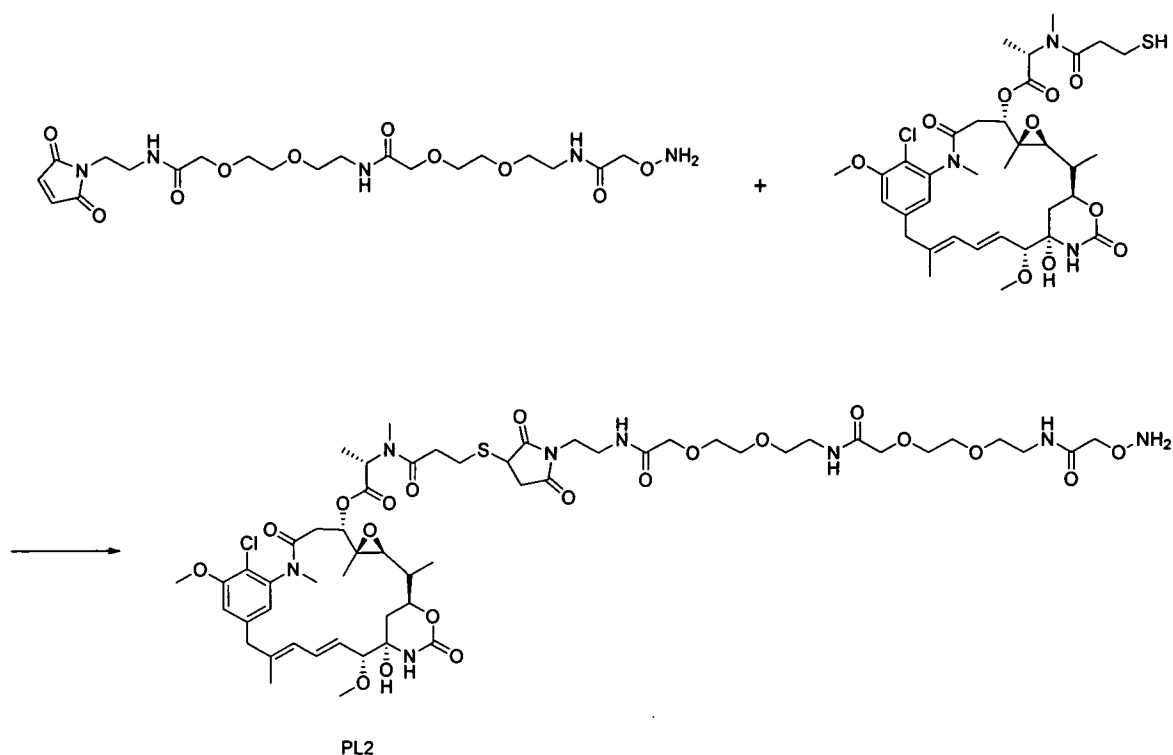


在室溫下分別向2,2-二甲基-4,8,17-三側氧基-3,6,12,15,21,24-六氧雜-5,9,18-三氮雜二十六-26-烷酸(819 mg, 1.7 mmol)於DMF (6 mL)中之溶液中添加HOAt (463 mg, 3.40 mmol)及DIC (0.530 mL, 3.40 mmol)，在室溫下攪拌5 min。在室溫下向以上混合物中添加1-(2-胺基乙基)-1H-吡咯-2,5-二酮(518 mg, 2.040 mmol)及DIPEA (二異丙基乙胺, 0.594 mL, 3.40 mmol)，在室溫下攪拌1 h。反應混合物用水及EtOAc (乙酸乙酯)稀釋。分離有機層。用EtOAc萃取水層。組合之有

機層經 Na_2SO_4 乾燥、過濾且在真空中濃縮。基於LCMS，所需化合物大部分處於水層中。凍乾水層後，粗物質經由用15-70% MeCN/具有0.1% TFA之水溶離之RP-HPLC來純化，產生(23-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-2,11,20-三側氧基-6,9,15,18-四氧雜-3,12,21-三氮雜二十三基)氧基胺基甲酸第三丁酯(600 mg, 0.994 mmol, 58.5%產率)。ESI-MS m/z : 604 $[\text{M}+1]^+$ ，滯留時間：1.14 min (方法B)。 ^1H -NMR (CDCl_3 -d, 400 MHz); 1.48 (s, 7.5H), 1.55 (s, 1.5H), 3.47-3.71 (m, 20H), 3.97 (s, 2H), 4.04 (s, 2H), 4.37 (s, 1.65 H), 4.47 (s, 0.35H), 6.72 (s, 2H)。



在室溫下向(23-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-2,11,20-三側氧基-6,9,15,18-四氧雜-3,12,21-三氮雜二十三基)氧基胺基甲酸第三丁酯(8.4 mg, 0.014 mmol)於DCM (100 μl)中之溶液中添加TFA (100 μl)，在室溫下攪動1 h。移除溶劑，得到2-(胺氧基)-N-(1-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-4,13-二側氧基-6,9,15,18-四氧雜-3,12-二氮雜二十烷-20-基)乙醯胺。此物質不經進一步純化即用於下一反應。ESI-MS m/z : 504 $[\text{M}+1]^+$ ，滯留時間：0.69 min (方法A)。



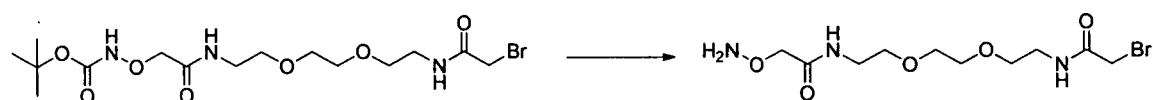
PL3 合成：在 5℃ 下向 2-(胺氧基)-N-(1-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-4,13-二側氧基-6,9,15,18-四氧雜-3,12-二氮雜二十烷-20-基)乙醯胺 (22.79 mg, 0.031 mmol) 於 DMA (0.6 mL) 中之溶液中添加 DM-1 (23 mg, 0.031 mmol) 及 100 mM 之 pH 7.4 磷酸 Na (0.600 mL)。在相同溫度下添加 DIPEA (10.88 μ l, 0.062 mmol)。使此反應混合物升溫至室溫且攪拌 1.5 h。反應混合物用 DCM 及飽和碳酸氫鈉水溶液稀釋。有機層用飽和 NH_4Cl (水溶液) 及鹽水洗滌。組合之有機層經 Na_2SO_4 乾燥、過濾且在真空中濃縮。用 0-15% MeOH/DCM 溶離進行矽膠層析，產生所需化合物 (21 mg, 0.017 mmol, 54.3% 產率)。ESI-MS m/z : 1242 $[\text{M}+1]^+$ ，滯留時間：1.00 min (方法 A)。 ^1H -NMR (CDCl_3 -d, 400 MHz); 0.80 (s, 3H), 1.21-1.33 (m, 9H), 1.41-1.51 (m, 1H), 1.56-1.59 (m, 1H), 2.31-2.39 (m, 1H), 2.57-2.65 (m, 2H), 2.79-2.88 (m, 1H), 2.86 (s, 3H), 2.91-3.13 (m, 5H), 3.16-3.24 (m, 1H), 3.20 (s, 3H), 3.36 (s, 3H), 3.43-3.76 (m, 25H), 3.90 (d, $J = 3.6\text{Hz}$, 2H), 3.98 (s, 3H), 4.02 (s, 2H), 4.17 (s, 2H), 4.25-4.32 (m, 1H), 4.77-4.80 (m, 1H),

•

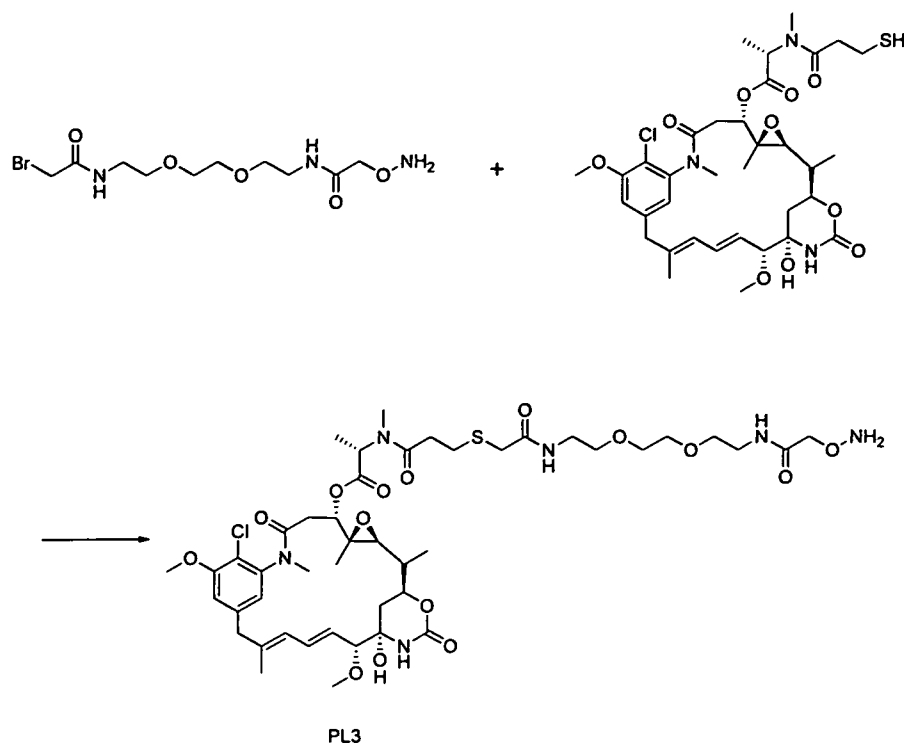


100

min，使其升溫至室溫。添加EtOAc及水。分離有機層。用EtOAc萃取水層。組合之有機層經Na₂SO₄乾燥、過濾且在真空中濃縮。用0-5% MeOH/DCM溶離進行矽膠層析純化，產生(14-溴-2,13-二側氧基-6,9-二氧雜-3,12-二氮雜十四烷基)氧基胺基甲酸第三丁酯(150 mg，0.339 mmol，39.5%產率)。ESI-MS m/z:343[M+1 -Boc]⁺，滯留時間：1.30 min (方法A)。H-NMR (CDCl₃, 400 MHz); 1.49 (s, 9H), 3.47-3.55 (m, 4H), 3.59-3.63 (m, 4H), 3.65 (s, 4H), 3.88 (s, 2H), 4.34 (s, 2H)。



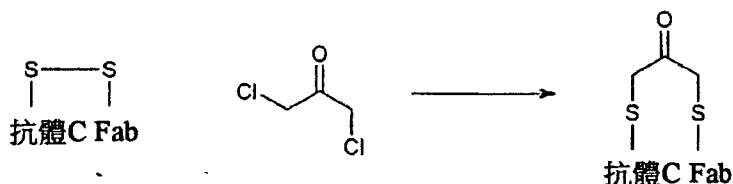
將(14-溴-2,13-二側氧基-6,9-二氧雜-3,12-二氮雜十四烷基)氧基胺基甲酸第三丁酯(150 mg，0.339 mmol)溶解於DCM (體積：1 mL，比率：1.000)，在室溫下向其中添加TFA (體積：1，比率：1.000)。在室溫下將此反應混合物攪拌30 min。移除溶劑後，用10-25% MeCN/含有0.1% TFA之水溶離進行RP-HPLC，產生2-(胺氧基)-N-(2-(2-(2-(2-溴乙醯胺基)乙氧基)乙氧基)乙基)乙醯胺(110 mg，0.241 mmol，71.1%產率)。ESI-MS m/z: 344[M+2]⁺，滯留時間：0.44 min (方法A)。



在5℃下向2-(胺氧基)-N-(2-(2-(2-(2-溴乙醯胺基)乙氧基)乙氧基)乙基)乙醯胺(42.9 mg, 0.075 mmol)於DMA (1 mL)中之溶液中添加DM-1 (37 mg, 0.050 mmol)及75 mM之pH 8.5磷酸Na (1 mL)。在相同溫度下添加DIPEA (0.026 mL, 0.150 mmol)。使此反應混合物升溫至室溫且攪拌1 h。反應混合物用DCM及飽和碳酸氫鈉水溶液稀釋，且有機層用飽和NH₄Cl水溶液及鹽水洗滌。組合之有機層經Na₂SO₄乾燥、過濾且在真空中濃縮。用0-15% MeOH/DCM溶離進行矽膠層析，產生所需化合物(31 mg, 0.031 mmol, 61.9%產率)。ESI-MS m/z: 1000[M+1]⁺，滯留時間：1.61 min (方法A)。¹H-NMR (CDCl₃-d, 400 MHz); 0.79 (s, 3H), 1.20-1.33 (m, 9H), 1.41-1.50 (m, 2H), 2.17-2.22 (m, 1H), 2.50-2.63 (m, 2H), 2.70-2.81 (m, 2H), 2.86-2.94 (m, 3H), 2.99-3.01 (m, 1H), 3.10-3.13 (m, 1H), 3.18-3.20 (m, 4H), 3.36 (s, 3H), 3.45-3.62 (m, 14H), 3.98 (s, 3H), 4.17 (s, 2H), 4.25-4.31 (m, 1H), 4.78-4.82 (m, 1H), 5.30-5.35 (m, 1H), 5.63-5.69 (m, 1H), 6.27 (s, 1H), 6.39-6.45 (m, 1H), 6.61-6.64 (m, 2H), 6.83 (s, 1H), 6.87 (brs, 1H)。

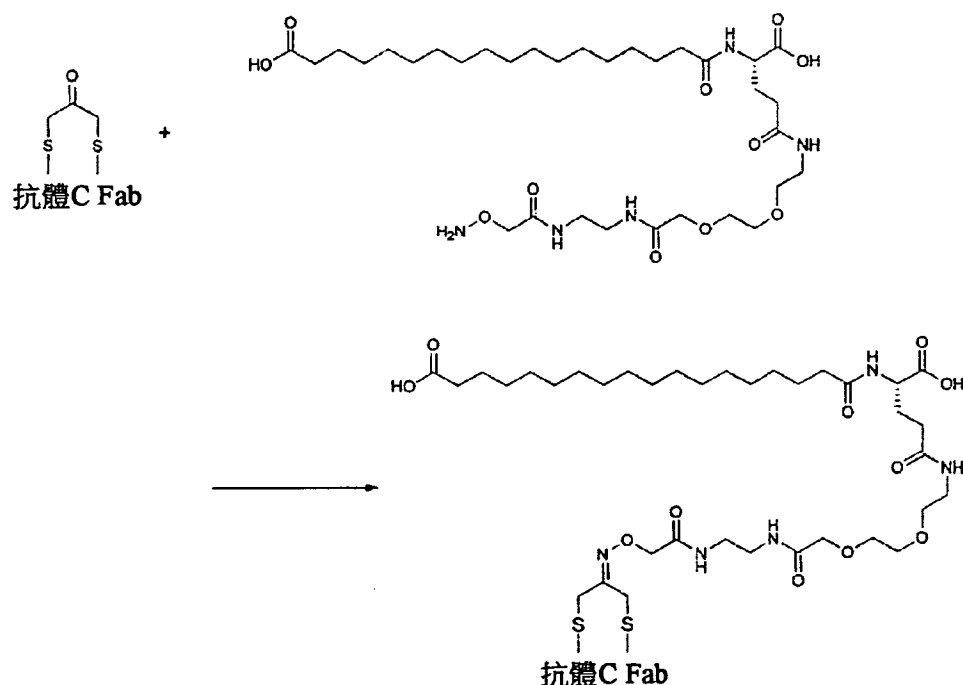
實例8：抗體C Fab共軛物：

步驟1：



在室溫下向抗體C Fab (抗體C結合不同於Her2及抗體B的標靶抗原：1668 μg ，0.035 μmol ，120 μl)於100 mM具有EDTA之磷酸Na (pH 7.4)中之溶液中添加TCEP HCl (35.2 μg ，0.123 μmol ，11.73 μl)，在23 $^{\circ}\text{C}$ 下攪動1.5 h。將1,3-二氯丙-2-酮(117 μg ，0.878 μmol ，5.85 μl)添加至反應混合物中，在23 $^{\circ}\text{C}$ 下攪動40 min。藉由LCMS觀測到1個丙酮橋鍵修飾。使反應混合物通過用100 mM NaOAc緩衝液(pH 5.2)溶離之0.5脫鹽管柱。LCMS (方法B); 47554。

步驟2：



在室溫下向經修飾抗體C Fab (1668 μg ，0.035 μmol ，148 μl)於100 mM NaOAc緩衝液(pH 5.2)及所示經胺氧基取代之脂肪酸(1852 μg ，2.63 μmol)中之溶液中添加3,5-二胺基苯甲酸(694 μg ，4.56 μmol ，5.34 μl)，在23 $^{\circ}\text{C}$ 下攪動20 h。胺氧基-脂肪酸(1852 μg ，2.63

μmol)再添加至混合物中，在室溫下攪動24 h。使反應混合物通過用PBS (pH 7.4)溶離之5 ml脫鹽管柱，產生預期抗體C Fab-脂肪酸共軛物(30%產率)。LCMS (方法B); 48238。

圖9中提供共軛物之SDS PAGE影像及質譜。

實例9：二氯丙酮及TCEP之添加順序的影響。

所有反應皆在25℃下使用50 mM緩衝液(除非另外說明，否則為TRIS)在pH 8.0下操作。反應用(58.8微升)及緩衝液(20微升之1 M緩衝液)在孔中操作，隨後添加IgG1 (6.6微升含有170.5 mg/mL之溶液)及TCEP (8.6微升具有3 mg/mL TCEP之水溶液)。等待指定時段之後，添加1,3-二氯丙酮(6微升於DMSO中之具有20 mg/mL之溶液)。

在第一系列實驗中，反應藉由首先添加還原劑(TCEP-HCl)且一小時後添加1,3-二氯丙酮來操作。在產物混合物經DTT或TCEP還原後藉由微晶片電泳-SDS方法分析產物分佈(*Electrophoresis* 2012, 第33卷, 765-72)。結果展示於下表中：LC =輕鏈，HC =重鏈，HL =重鏈+輕鏈，HH =重鏈+重鏈；HHL = HC + HC + LC；且LHHL = LC + HC + HC + LC。數據展示在還原以裂解任何剩餘雙硫基之後，主要產物為HC-LC (重鏈-輕鏈)加合物。此表明在此等條件下僅發生部分反應。數據亦表明反應基本上在前半小時內完成。

樣本名稱	相對面積	相對面積	相對面積	相對面積	相對面積	相對面積
	% LC	% HC	% HL	% HH	% HHL	% LHHL
先添加TCEP t=0.5 h	3.3	5.4	50.9	0.6	6.5	33.3
先添加TCEP t=1 h	3.2	4.7	51.9	0.8	5.9	33.6
先添加TCEP t=1.5 h	2.9	4.6	50.1	0.6	6.4	35.5
先添加TCEP t=2 h	3.0	4.5	51.8	0.7	6.0	33.9
先添加TCEP t=3 h	2.9	4.0	52.2	0.6	6.1	34.2
先添加TCEP t=17 h	2.7	4.5	50.6	0.8	6.4	35.0

第二組實驗在相同條件下操作，不同之處在於在添加還原劑前將1,3-二氯丙酮添加至多肽/緩衝液反應混合物中。此等實驗之結果展示於下表中，其展示LHHL顯著增加，對應於抗體之至少四分之三的

雙硫基轉化成由1,3-二氯丙酮與來自雙硫基之兩個硫原子反應所形成之共價鍵。同樣，反應似乎基本上在30分鐘內完成。

樣本名稱	相對面積	相對面積	相對面積	相對面積	相對面積	相對面積
	% LC	% HC	% HL	% HH	% HHL	% LHHL
先添加二氯丙酮 t=0.5 h	2.83	0.82	7.13	0.98	13.01	75.23
先添加二氯丙酮 t=1 h	2.95	0.72	6.94	1.17	13.42	74.81
先添加二氯丙酮 t=1.5 h	2.64	0.61	6.42	1.09	13.61	75.63
先添加二氯丙酮 t=2 h	2.63	0.61	6.43	1.08	13.49	75.77
先添加二氯丙酮 t=3 h	2.38	0.51	6.4	1.07	13.41	76.23
先添加二氯丙酮 t=17 h	2.47	0.56	5.94	1.04	13.39	76.59

此等實驗表明在起始雙硫基還原之前添加二氯丙酮使得硫氫基與硫氫基交聯反應之效率出人意料地大幅增加。用PBS作為緩衝液時產物產率較低。

在各別實驗中，已表明將所用二氯丙酮之量增加十倍會阻礙反應，且將pH還原至7.40、7.10、6.80及6.60會產生類似的或略微改良的LHHL產物產率。

實例10：篩檢緩衝液。

反應藉由在室溫下將還原劑(TCEP-HCl)添加至1,3-二氯丙酮及IgG於緩衝液(100 mM)中之預混合溶液中來操作。在產物混合物經DTT或TCEP還原7 h後，藉由微晶片電泳-SDS方法分析產物分佈。結果展示於下表中：LC =輕鏈，HC =重鏈，HL =重鏈+輕鏈，HH =重鏈+重鏈；HHL = HC + HC + LC；且『完整』= (HC)₂(LC)₂；LHHL = LC + HC +HC + LC。產率係自LHHL之百分比推導出。

量測之pH值	緩衝液	反應產率[%]
7	Bis-TRIS	87.7
6.9	Bis-TRIS-丙烷	87.4
6.5	丁二酸鹽	75.8
6.8	ADA	86.2
6.8	咪唑	85.5
7.4	TRIS	86.5
6.6	MES	85.0
6.6	檸檬酸鹽	79.6
6.6	PIPES	83.3
6.6	MOPS	86.9

7.2	麥黃酮	86.8
6.3	TES	85.9
6.3	HEPES	82.7
7.1	EPPS	84.3
7.1	N,N-二羥乙基甘胺酸	86.5
7	PBS50/TRIS50	86.5
7.1	TAPS	85.1
6.8	雙甘胺肽	86.6
6.5	PBS75/TRIS25	86.1
6.1	PBS90/TRIS10	84.7
8.7	碳酸鹽	67.8

【符號說明】

無

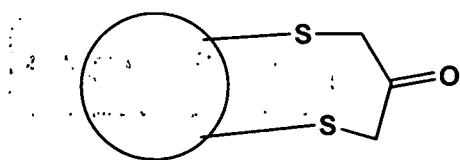
申請專利範圍

105年10月7日修正本

1. 一種將包含可還原雙硫鍵之多肽轉化成經酮修飾之多肽的方法，該經酮修飾之多肽包含式 $[PP]-S-CH_2-C(=O)-CH_2-S-[PP]$ 之基團，其中各S為來自該雙硫鍵的硫，且[PP]指示該基團之末端連接至該多肽之位置，

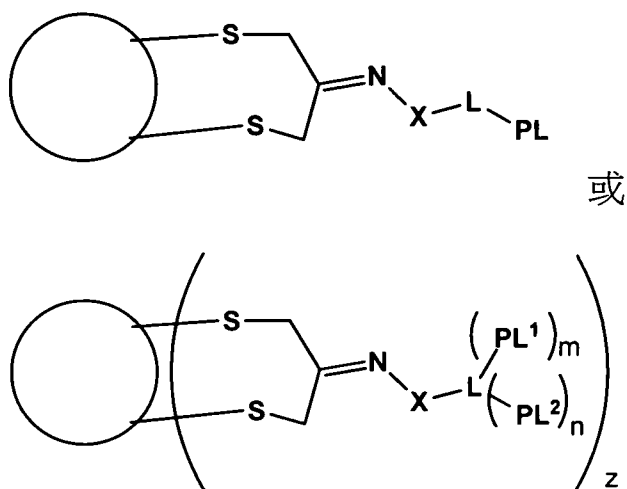
其中該方法包含形成含有可還原雙硫鍵之多肽、水性緩衝液及1,3-二鹵丙酮之混合物，隨後添加能夠還原該雙硫鍵之還原劑；及在胺促進劑存在下，使該經酮修飾之多肽與式 $R-O-NH_2$ 之基團接觸，其中該式 $R-O-NH_2$ 之基團為式 $H_2N-O-L-PL$ 之化合物，其中L表示連接子且PL表示有效負載物基團。

2. 如請求項1之方法，其中該1,3-二鹵丙酮為1,3-二氯丙酮。
3. 如請求項1或2之方法，其中該還原劑為水溶性磷或磷鹽。
4. 如請求項1或2之方法，其中該多肽為抗體或抗體片段。
5. 一種將經酮修飾之多肽轉化成經肟修飾之多肽的方法，其中該方法包含在胺促進劑存在下及在至少約1 mg/mL之多肽濃度下，使該經酮修飾之多肽與式 $R-O-NH_2$ 之基團接觸，其中該式 $R-O-NH_2$ 之基團為式 $H_2N-O-L-PL$ 之化合物，其中L表示連接子且PL表示有效負載物基團，
其中該經酮修飾之多肽係藉由如請求項1至4中任一項之方法製造。
6. 如請求項5之方法，其中該胺促進劑為經羧基取代之苯胺或醯基肼。
7. 如請求項5之方法，其中該經酮修飾之多肽具有下式



其中該環表示該多肽，且各硫原子為該多肽之半胱氨酸殘基之硫氫基。

8. 如請求項5至7中任一項之方法，其中該經酮修飾之多肽具有下式：



其中X為O，L表示連接子，z為1至10的整數，且PL、PL¹及PL²在每次出現時獨立地表示有效負載物基團。

9. 如請求項5至7中任一項之方法，其中該多肽為抗體。
10. 如請求項5至7中任一項之方法，其中該多肽為疫苗載體。
11. 如請求項5至7中任一項之方法，其中該有效負載物包含治療劑。
12. 如請求項5至7中任一項之方法，其中該有效負載物包含可偵測標記或結合基團。
13. 如請求項12之方法，其中L包含可裂解鍵聯部分。
14. 如請求項5至7中任一項之方法，其中L包含至少一個選自以下之間隔基：

(a)-鍵、-O-、-S-、-NH-、-N((C₁-C₆)烷基)H-、-NH-C(O)-NH-、-C(O)-NH-、-NH-C(O)-；

(b)(C₁-C₂₀)伸烷基、(C₂-C₂₀)伸烯基、(C₂-C₂₀)伸炔基、-Z-(C₁-C₂₀)伸烷基-、-Z-(C₂-C₂₀)伸烯基、-Z-(C₂-C₂₀)伸炔基、(C₁-C₂₀)伸烷基-Z-(C₁-C₂₀)伸烷基、(C₂-C₂₀)伸烯基-Z-(C₂-C₂₀)伸烯基、(C₂-C₂₀)伸炔基-Z-(C₂-C₂₀)伸炔基，其中Z為-NH-、-N(C₁-C₆)烷基)-、-NH-C(O)-NH-、-C(O)-NH-、-NH-C(O)-、(C₃-C₇)伸環烷基、伸苯基、伸雜芳基或伸雜環基，且其中該(C₁-C₂₀)伸烷基、該(C₂-C₂₀)伸烯基及該(C₂-C₂₀)伸炔基部分各獨立地視情況含有交錯分散於該等部分內之1-10個氧原子；

(c)(C₃-C₇)伸環烷基、(C₃-C₇)伸環烷基-Y-(C₃-C₇)伸環烷基、-Y-(C₃-C₇)伸環烷基、伸苯基、-Y-伸苯基、伸苯基-Y-伸苯基、伸雜芳基、Y-伸雜芳基、伸雜芳基-Y-伸雜芳基、伸雜環基、-Y-伸雜環基或伸雜環基-Y-伸雜環基，其中Y為(C₁-C₂₀)伸烷基、(C₂-C₂₀)伸烯基、(C₂-C₂₀)伸炔基、-O-、-C(O)-、-S-、-NH-、-N((C₁-C₆)烷基)-、-NH-C(O)-NH-、-C(O)-NH-或-NH-C(O)-，且其中該(C₃-C₇)伸環烷基、該伸苯基、該伸雜芳基及該伸雜環基部分各獨立地視情況經1至3個選自鹵基、(C₁-C₄)烷基或經鹵基取代之(C₁-C₄)烷基的取代基取代；

(d)-[OCH₂CH₂]_v-或-J-{CH₂[OCH₂CH₂]_v}-，其中v為1-2,000，w為1-4，且J為CH₂或NH；

(e)包含1至100個胺基酸之肽；及

(f)樹突狀巨分子，包括樹枝狀聚合物、規則樹枝狀高分子及超分支聚合物。