

# 發明專利說明書

(本申請書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：96118553

※申請日期：96年05月24日

※IPC分類：

C07D 309/30 (2006.01)

C07D 309/34 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

## 一、發明名稱：

(中) 細黴素 (leptomycin) 衍生物

(英) Leptomycin derivatives

## 二、申請人：(共 1 人)

1. 姓 名：(中) 賽諾菲－安萬特公司

(英) SANOFI-AVENTIS

代表人：(中) 1. 喬希安 莫里爾

(英) 1. MERLIER, JOSIANE

地 址：(中) 法國巴黎法國大道一七四號

(英) 174, Avenue de France, Paris 75013, France

國籍：(中英) 法國 FRANCE

## 三、發明人：(共 3 人)

1. 姓 名：(中) 荷維 鮑查德：

(英) BOUCHARD, HERVE

國 籍：(中) 法國

(英) FRANCE

2. 姓 名：(中) 亞蘭 柯蒙康

(英) COMMERCON, ALAIN

國 籍：(中) 法國

(英) FRANCE

3. 姓 名：(中) 瑞維 查理

(英) CHARI, RAVI V. J.

國 籍：(中) 美國

(英) U.S.A.

## 四、聲明事項：

◎本案申請前已向下列國家(地區)申請專利 ☐ 主張國際優先權：

(5)

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

1.歐洲 ; 2006/06/09 ; 06290948.6 ☒有主張優先權

## 五、中文發明摘要

發明之名稱：細黴素 (leptomycin) 衍生物

本發明係揭示具有可與細胞結合試劑，如抗體，共軛之部分，如硫化物或二硫化物，的細黴素 (leptomycin) 衍生物。也敘述該細黴素衍生物共軛物的治療用途；該共軛物具有治療用途，因為彼等可以靶定方式輸送細胞毒性細黴素衍生物至特定的細胞群。

## 六、英文發明摘要

發明之名稱：

### LEPTOMYCIN DERIVATIVES

Leptomycin derivatives having a moiety, such as a sulfide or a disulfide, that can conjugate to a cell binding reagent such as an antibody are disclosed. The therapeutic use of such leptomycin derivative conjugates is also described; such conjugates have therapeutic use because they can deliver cytotoxic leptomycin derivatives to a specific cell population in a targeted fashion.

七、指定代表圖：

(一)、本案指定代表圖為：無

(二)、本代表圖之元件代表符號簡單說明：無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：無

(1)

## 九、發明說明

### 【發明所屬之技術領域】

本發明係關於新穎細黴素衍生物及彼之治療用途。更特定言之，本發明係關於包括可與細胞結合劑共價結合之部分（連結基團）的新穎細黴素衍生物，以及含有經由連結體與該細胞結合劑結合之該細黴素衍生物的對應之共軛物。該共軛物提供能夠在活體內活化及釋放，並以靶定方式輸送至特定的細胞群之治療劑。

### 【先前技術】

已出現許多指向以單株抗體-藥物共軛物靶定腫瘤細胞的報告 {Sela 等人之 *Immunoconjugates*, pp. 189-216 (C. Vogel, ed. 1987); Ghose 等人之 *Targeted Drugs*, pp. 1-22 (E. Goldberg. ed. 1983); Diener 等人之 *Antibody Mediated Delivery Systems*, pp. 1-23 (J. Rodwell ed. 1988); Pietersz 等人之 *Antibody Mediated Delivery Systems*, pp. 25-53 (J. Rodwell, ed. 1988); Bumol 等人之 *Antibody Mediated Delivery Systems*, pp. 55-79 (J. Rodwell, ed. 1988); G. A. Pietersz & K. Krauer, 2 J. Drug Targeting, 183-215 (1994); R. V. J. Chari, 31 Adv. Drug Delivery Revs., 89-104 (1998); W. A. Blattler & R. V. J. Chari 之 *Anticancer Agents*, *Frontiers in Cancer Chemotherapy*, 317-338, ACS Symposium Series 796; 及 I. Ojima 等人編輯之 *American Chemical Society* 2001}。細

## (2)

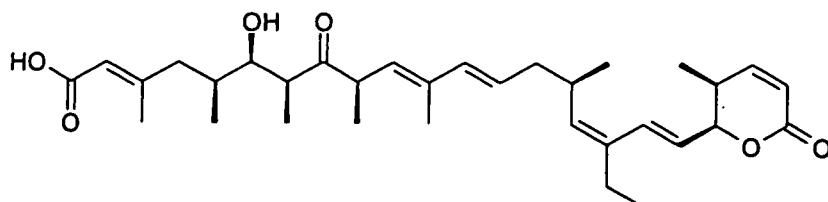
胞毒性藥物，如滅殺除癌錠 (methotrexate)、道諾紅菌素 (daunorubicin)、小紅莓 (doxorubicin)、長春新鹼 (vincristine)、長春花鹼 (vinblastine)、黴法蘭 (melphalan)、絲裂黴素 C、氯芥苯丁酸、刺孢黴素 (calicheamicin) 及類美坦素 (maytansinoid) 已與各種鼠科動物單株抗體共軛。在一些例子中，藥物分子經由中間載體分子，如血清白蛋白 {Garnett 等人之 46 *Cancer Res.* 2407-2412 (1986); Ohkawa 等人之 23 *Cancer Immunol. Immunother.* 81-86 (1986); Endo 等人之 47 *Cancer Res.* 1076-1080 (1980)}、聚葡萄糖 {Hurwitz 等人之 2 *Appl. Biochem.* 25-35 (1980); Manabi 等人之 34 *Biochem. Pharmacol.* 289-291 (1985); Dillman 等人之 46 *Cancer Res.* 4886-4891 (1986); 及 Shoval 等人之 85 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 8276-8280 (1988)} 或聚麩胺酸 {Tsukada 等人之 73 *J. Natl. Canc. Inst.* 721-729 (1984); Kato 等人之 27 *J. Med. Chem.* 1602-1607 (1984); Tsukada 等人之 52 *Br. J. Cancer* 111-116 (1985)} 與抗體分子連結。

現在已有廣泛大量的連結體可用於製備該等免疫共軛物，包括可裂解及不裂解兩種連結體。然而，在試管內細胞毒性試驗揭露抗體-藥物共軛物鮮少達成與自由的未共軛藥物相同的細胞毒性效力。這暗示使藥物分子自共軛抗體釋放的機制非常無效。在免疫毒素領域中的早期研究顯示在單株抗體與催化活性蛋白毒素之間經由二硫化物橋所

(3)

形成的共軛物比含有其它連結體之共軛物更具細胞毒性 {Lambert 等人之 260 J. Biol. Chem. 12035-12041 (1985) ; Lambert 等人之 Immunotoxins 175-209 (A. Frankel ed. 1988) ; Ghetie 等人之 48 Cancer Res. 2610-2617 (1988)}。該改進之細胞毒性歸因於高細胞內濃度的還原之麩胱甘肽，提供在抗體分子與毒素之間有效的二硫化物鍵裂解。類美坦素及刺孢黴素為經由二硫化物鍵與單株抗體連結的高細胞毒性藥物的第一種實例。已證明這些藥物的抗體共軛物在試管內具有高效力及在小鼠中的人類腫瘤異種移植模式中具有異常的抗腫瘤活性 {R. V. J. Chari 等人之 52 Cancer Res., 127-131 (1992) ; C. Liu 等人之 93, Proc. Natl. Acad. Sci., 8618-8623 (1996) ; L. M. Hinman 等人之 53, Cancer Res., 3536-3542 (1993) ; 及 P. R. Hamann 等人之 13, BioConjugate Chem., 40-46 (2002)}。

細黴素 B :



為最初自鏈黴菌屬所分離之天然產物，如 US 4,771,070 及 US 4,792,522 中所報導。其最初係由於篩選抗微生物活性所證實及接著被證實為抗腫瘤劑

(4)

(Komiyama 等人之 *J. Antibiotics* 1985, 38(3), 427-429 及 US 2003/0162740)。在分子層次上，細黴素 B 充當核輸出受體 CRM1 抑制劑，其結合及影響“運送蛋白”之核轉移。在細胞層次上，細黴素 B 係藉由在細胞周期的 G1 及 G2 期結束時制止細胞而起作用 (Kalesse 等人之 *Synthesis* 2002, 8, 981-1003)。然而，其對哺乳類細胞的極度毒性 (Hamamoto 等人之 *J. Antibiotics* 1983, 36(6), 639-645) 使其不可能具有臨床用途。因此，非常希望減低細黴素衍生物對非靶定細胞的毒性。

細黴素衍生物的治療效率可藉由經由靶定輸送至腫瘤位置而改變在活體內分佈，對非靶定組織造成較低的活性及因此造成較低的全面毒性而顯著地改進。爲了達成該目標，本發明者考慮製備細黴素 B 之衍生物與特別靶定腫瘤細胞的細胞結合劑之共軛物，以展現高的靶定特異性細胞毒性。

#### 【發明內容】

本發明的目的係提供細黴素衍生物，其包括可與細胞結合劑共價結合的連結基團，以及含有經由連結體與該細胞結合劑結合之該細黴素衍生物的對應之共軛物。該共軛物提供能夠在活體內活化及釋放，並以靶定方式輸送至特定的細胞群之治療劑。爲了進一步增強水溶解度，可將隨意的聚乙二醇間隔基引入連結基團中。

本發明的化合物可用在細胞毒性共軛物中，其中細胞



(5)

結合劑與一或多種本發明的化合物連結。細胞結合劑包括抗體及其碎片、干擾素、淋巴介質、維他命、激素及生長因子。也提供含有該等共軛物之醫藥組成物。

細胞毒性共軛物可用在藉由投予有效量之上述醫藥組成物而治療病患的方法中。根據選定之細胞結合劑結合的細胞類型，許多疾病可在活體內、活體外或試管內治療。該等疾病包括例如治療許多種類的癌症，包括淋巴瘤、白血病、肺癌、乳癌、結腸癌、攝護腺癌、腎臟癌、胰臟癌及類似疾病。

因此，本發明提供與特定的細胞結合劑共軛的方式可用於靶定特定的細胞類型之細黴素衍生物。

#### 【實施方式】

本發明者發現能夠與細胞結合劑連結的細黴素衍生物，藉此使該等衍生物的治療效率藉由經由靶定輸送至腫瘤位置的衍生物而改變在活體內分佈，對非靶定組織造成較低的毒性及因此造成較低的全面毒性而予以改進。

爲了達成該目標，本發明者合成典範的細黴素衍生物，其包含使細黴素衍生物與細胞結合劑共軛的連結基團。連結基團可包括聚乙二醇間隔基。連結基團被用於與細胞結合劑共軛，而且較佳地包含二硫化物鍵或硫化物（或在本文被稱爲硫醚）鍵。

先前已證明使用可裂解連結體，如二硫化物鍵，連結高毒性藥物與抗體來確保完整的活性藥物在細胞內釋放，

(6)

以及該等共軛物具有抗原特異方式的細胞毒性 {R. V. J. Chari 等人之 52 *Cancer Res.* 127-131 (1992); R. V. J. Chari 等人之 55 *Cancer Res.* 4079-4084 (1995); 及美國專利第 5,208,020 號與第 5,475,092 號}。在本發明中，本發明者敘述細黴素衍生物的合成，彼等與單株抗體共軛及測量試管內細胞毒性的方法，以及該等共軛物的特異性。因此，本發明提供製備治療劑的有用化合物，該治療劑指向消除生病或不正常細胞，使細胞被殺死或溶解，如腫瘤細胞、病毒感染之細胞、微生物感染之細胞、寄生蟲感染之細胞、自體免疫細胞（產生自體抗體之細胞）、活化之細胞（那些涉入移植物排斥或移植物對宿主疾病之細胞），或任何其它類型的生病或不正常細胞，同時展現最小的副作用。

因此，本發明指導可與細胞結合劑化學連結及在釋放保護基時維持母體細黴素衍生物的高細胞毒性之細黴素衍生物的合成。當與細胞結合劑連結時，這些化合物對與細胞結合劑結合之細胞具有細胞毒性，而對非靶定細胞較具非常低的毒性。

本發明的細黴素衍生物

根據本發明的細黴素衍生物包含能夠使衍生物與細胞結合劑共軛的連結基團。

根據本發明，「細黴素衍生物」係指如 Kalesse 等人之 *Synthesis* 2002, 8, 981-1003 所定義之細黴素家族之成

(7)

員，並包括：細黴素類，如細黴素 A 及細黴素 B，寇利斯汀類（callystatins），瑞特佳冬類（ratjadones），如瑞特佳冬 A 及瑞特佳冬 B，安吉諾黴素類（anguinomycins），如安吉諾黴素 A、B、C、D，卡蘇沙黴素類（kasusamycins），利普托斯汀（leptolstatin），利普托夫拉尼類（leptofuranins），如利普托夫拉尼 A、B、C、D。以細黴素 A 及 B 之衍生物較佳。

爲了連結衍生物與細胞結合劑，故衍生物必須包括允許衍生物經由連結物，如二硫化物鍵、硫化物（或在本文被稱爲硫醚）鍵、酸不穩定性基團、光不穩定性基團、肽酶不穩定基團或酯酶不穩定性基團，與細胞結合劑連結的部分（連結基團）。製備衍生物，使得彼等包括使細黴素衍生物經由例如二硫化物鍵、硫醚鍵、酸不穩定性基團、光不穩定性基團、肽酶不穩定基團或酯酶不穩定性基團與細胞結合劑連結所必要的部分。爲了進一步增強在水溶液中的溶解度，故連結基團可包括聚乙二醇間隔基。

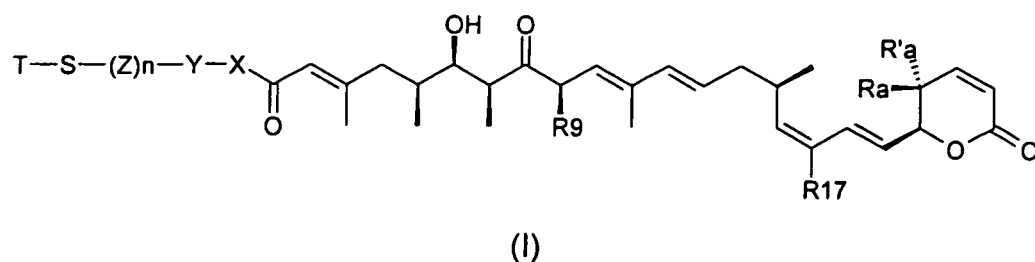
較佳地，使用硫化物或二硫化物連結物，因爲靶定細胞的還原環境造成硫化物或二硫化物裂解及釋放具有聯合增加細胞毒性之衍生物。

根據較佳的觀點，本發明提供其中末端羰官能基代表能夠使衍生物與細胞結合劑連結的部分之細黴素衍生物。連結部分可包括聚乙二醇間隔基。實例包括能夠經由二硫化物鍵、硫醚鍵、酸不穩定性基團、光不穩定性基團、肽酶不穩定基團或酯酶不穩定性基團連結的部分，並爲本技

(8)

藝中眾所周知 { 參見例如美國專利 5,846,545 , 將其併入本文以供參考 } 。較佳的部分為那些能夠經由二硫化物鍵 , 例如硫醇或二硫化物 , 連結的部分。也可使用含有任何末端離棄基 , 如麩胱甘肽、烷硫基 , 如甲硫基、吡啶硫基、芳硫基、硝基吡啶硫基、羥羰基吡啶硫基、(硝基)羥羰基吡啶硫基及類似物之混合型二硫化物 , 其先決條件係該等二硫化物能夠進行使衍生物與細胞結合劑偶合的二硫化物交換反應。

更特定言之 , 本發明的衍生物具有式 (I) :



其中

Ra 及 Ra' 為 H 或 -Alk ; 較佳地 , Ra 為 -Alk , 較佳為甲基 , 以及 Ra' 為 H ;

R17 為隨意地被 OR、CN、NRR'、全氟烷基取代之烷基 ; 較佳地 , R17 為烷基 , 更佳為甲基或乙基 ;

R9 為隨意地被 OR、CN、NRR'、全氟烷基取代之烷基 ; 較佳地 , R9 為烷基 , 更佳為甲基 ;

X 為 -O- 或 -NR- ; 較佳地 , X 為 -NR- ;

Y 為 -U-、-NR-U-、-O-U-、-NR-CO-U-、-U-NR-CO-、-U-CO-、-CO-U- ;

2

•



(10)

$-(\text{CH}_2\text{-}_q(\text{CH}_3)_q)_p$ ，其中  $p$  代表從 1 至 10 之整數；以及  $q$  代表從 0 至 2 之整數；較佳地，Alk 代表  $-(\text{CH}_2)$ -或  $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ ；

或彼等在醫藥上可接受之鹽類、水合物、或水合鹽類、或這些化合物的多晶型晶體結構或彼等之光學異構物、外消旋物、非鏡像異構物或鏡像異構物。

較佳的化合物可選自：

(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羥基-3,5,7,9,11,15,17-七甲基-19-((2S,3S)-3-甲基-6-酮基-3,6-二氫-2H-哌喃-2-基)-8-酮基-十九碳-2,10,12,16,18-五烯酸之(2-甲硫基-乙基)-醯胺，

雙-[(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羥基-3,5,7,9,11,15,17-七甲基-19-((2S,3S)-3-甲基-6-酮基-3,6-二氫-2H-哌喃-2-基)-8-酮基-十九碳-2,10,12,16,18-五烯酸之(2-巰乙基)-醯胺]，

(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羥基-3,5,7,9,11,15,17-七甲基-19-((2S,3S)-3-甲基-6-酮基-3,6-二氫-2H-哌喃-2-基)-8-酮基-十九碳-2,10,12,16,18-五烯酸之(2-巰乙基)-醯胺，

(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羥基-3,5,7,9,11,15,17-七甲基-19-((2S,3S)-3-甲基-6-酮基-3,6-二氫-2H-哌喃-2-基)-8-酮基-十九碳-2,10,12,16,18-五烯酸之(2-甲基二硫基-乙基)-醯胺，

(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羥基-3,5,7,9,11,15,17-

(11)

七甲基-19-((2S,3S)-3-甲基-6-酮基-3,6-二氫-2H-嘓喃-2-基)-8-酮基-十九碳-2,10,12,16,18-五烯酸之(2-甲基-2-甲基二硫基-丙基)-醯胺，

(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羥基-3,5,7,9,11,15,17-七甲基-19-((2S,3S)-3-甲基-6-酮基-3,6-二氫-2H-嘓喃-2-基)-8-酮基-十九碳-2,10,12,16,18-五烯酸之(2-巰基-2-甲基-丙基)-醯胺，

或彼等在醫藥上可接受之鹽類、水合物、或水合鹽類、或這些化合物的多晶型晶體結構或彼等之光學異構物、外消旋物、非鏡像異構物或鏡像異構物。

如本文所定義之烷基包括直鏈或支鏈  $C_1$ - $C_{20}$  烷基。直鏈烷基的實例包括甲基、乙基、丙基、丁基、戊基及己基。支鏈烷基的實例包括異丙基、異丁基、第二丁基、第三丁基、異戊基及 1-乙基丙基。環烷基，即環族烷基的實例包括環丙基、環丁基、環戊基及環己基。芳基的實例包括苯基及萘基。經取代之芳基的實例包括以烷基、鹵素，如 Cl、Br、F，硝基、胺基、磺酸基、羧酸基、羥基及烷氧基取代之芳基，如苯基或萘基。雜環基係指含有一或多個選自 O、N 及 S 之雜原子的隨意地芳香族環，而實例包括呋喃基、吡咯基、吡啶基（例如經 2-取代之嘧啶基）及噻吩基。

本發明的含硫化物或二硫化物及巰基之衍生物可就彼等在培養條件下抑制在試管內各種不希望的細胞系增殖的能力予以評估。細胞系，如例 Ramos 細胞系及 HL60，可

(12)

輕易用於評定這些化合物的細胞毒性。可將欲評估之細胞曝露於化合物 24 小時，並以已知的方法在直接分析法中測量存活的細胞部分。接著可從分析法結果計算  $IC_{50}$  值。

如本文所使用的“可與細胞結合劑連結”用語係指含有至少一種連結基團或其前驅體之細黴素衍生物，該連結基團適合使該衍生物與細胞結合劑結合；較佳的連結基團為硫醇、硫化物或二硫化物鍵或其前趨體。

如本文所使用的“與細胞結合劑連結”用語係指含有至少一種經由適合連結基團與細胞結合劑結合的細黴素衍生物之共軛分子，或其前驅體；較佳的連結基團為硫醇、硫化物或二硫化物鍵或其前趨體。

如本文所使用的“病患”術語係指受一或多種本文所述之疾病及症狀折磨或具有受該等折磨的可能性之動物，如以繁殖、作伴或保育為目的的有價值之動物，或較佳地係指人類或人類幼兒。

如本文所使用的“治療有效量”係指有效預防、減輕、消除、治療或控制本文所述之疾病及症狀徵候的本發明化合物量。意欲以“控制”術語指其中可能有降低、中斷、阻止或停止本文所述之疾病及症狀進展，但沒必要顯示完全消除所有的疾病及症狀徵候的所有方法，並意欲包括預防治療。

如本文所使用的“醫藥上可接受”術語係指在健全的醫學判斷範圍內適合與人類及動物組織接觸而沒有過度毒



(13)

性、刺激、過敏反應或其它與合理的利益 / 風險比相稱之問題複雜化的那些化合物、材料、賦形劑、組成物或劑型。

如本文所使用的「醫藥上可接受之鹽類」係指所揭示之化合物的衍生物，其中母體化合物係藉由製成其酸性或鹼性鹼而予以改良。醫藥上可接受之鹽類包括從例如無毒性無機或有機酸所形成的母體化合物之慣例的無毒性鹽類或四級銨鹽類。例如，該等慣例的無毒性鹽類包括那些自無機酸，如鹽酸、氫溴酸、硫酸、胺磺酸、磷酸、硝酸及類似物所衍生之鹽類；以及從有機酸，如乙酸、丙酸、丁二酸、酒石酸、檸檬酸、甲烷磺酸、苯磺酸、葡萄糖醛酸、麩胺酸、苯甲酸、水楊酸、甲苯磺酸、草酸、富馬酸、順丁烯二酸、乳酸及類似物所製備之鹽類。更多的加成鹽類包括銨鹽類，如胺基丁三醇、甲基葡萄糖胺、艾普拉明（epolamine）等；金屬鹽類，如鈉、鉀、鈣、鋅或鎂。

本發明的醫藥上可接受之鹽類可從包括鹼性或酸性部分之母體化合物以慣例的化學方法合成。通常該等鹽類可藉由這些化合物的自由酸或鹼型式與化學計量之適當的鹼或酸在水中或在有機溶劑中或在二者的混合物中反應而製備。通常以非水性介質較佳，諸如醚、乙酸乙酯、乙醇、異丙醇或乙腈。適合的鹽類清單見於 Remington's Pharmaceutical Sciences, 17<sup>th</sup> ed., Mack Publishing Company, Easton PA, 1985, p.1418，將其揭示內容併入本

(14)

文以供參考。

根據進一步的觀點，本發明也關於製備本發明化合物的方法。

本發明的化合物及方法可以那些熟諳本技藝者熟知的許多方式製備。化合物可藉由例如使用或改編下述方法或由熟諳的技術員認知的其變法合成。適當的改良及取代可輕易明白且眾所周知，或可輕易從科學文獻至那些熟諳本技藝者獲得。

特別地，該等方法可發現在 R. C. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, Wiley-VCH Publishers, 1999 中。

應認知本發明的化合物可包括一或多個不對稱取代之碳原子，並可分離出光學活性或外消旋性型式。因此，意指結構的所有對掌性、非鏡像異構物、外消旋性型式及所有幾何異構物型式，除非特定的立體化學或異構物型式被特別指出。在本技藝中熟知如何製備及分離該等光學活性型式。例如，立體異構物之混合物可藉由標準技術，包括（但不限於此）離析外消旋性型式、正-、反-相及對掌性色層分析法、優先的鹽形成作用、再結晶法及類似技術，或藉由從對掌性原料的對掌性合成法或藉由對掌性靶中心的蓄意合成法分離。

本發明的化合物可以各種合成途徑製備。試劑及原料為市售商品，或可以本技術領域中具有通常知識者以熟知的技術輕易合成。所有的取代基如先前所定義，除非有其

(15)

它另外的指示。

在下述的反應中，可能有必要保護這些被要求在最終產物中的反應性官能基，例如羥基、胺基、亞胺基、硫基或羧基，以避免彼等不希望的反應參與。可根據標準實施使用慣例的保護基，例如參見 T. W. Greene 及 P. G. M. Wuts 之 *Protective Groups in Organic Chemistry*, 3<sup>rd</sup> ed., John Wiley and Sons, 1999；J. F. W. McOmie 之 *Protective Groups in Organic Synthesis*, Plenum Press, 1973。

一些反應可在鹼的存在下進行。在該反應中所使用的鹼之本性沒有任何特別的限制，而且在該類型的反應中所慣例使用的任何鹼可同樣用在本文中，其先決條件係該鹼對分子的其它部分沒有任何反作用。適合的鹼類實例包括：氫氧化鈉、碳酸鉀、三乙胺、鹼金屬氫化物，如氫化鈉及氫化鉀；烷基鋰化合物，如甲基鋰及丁基鋰；及鹼金屬烷醇化物，如甲醇鈉及乙醇鈉。

反應經常在適合的溶劑中進行。可使用各種溶劑，其先決條件係其對所涉及之反應或試劑沒有任何反作用。適合的溶劑類實例包括：烴類，其可為芳香族、脂肪族或環脂肪族烴類，如己烷、環己烷、苯、甲苯及二甲苯；醯胺類，如二甲基甲醯胺；醇類，如乙醇及甲醇；及醚類，如二乙醚及四氫呋喃。

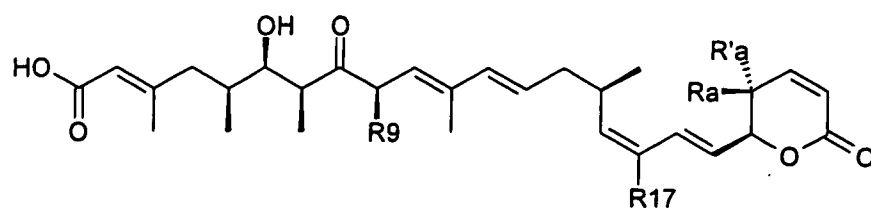
反應可發生在廣泛的溫度範圍內。通常吾等發現方便在從 0℃ 至 150℃ 之溫度下進行反應（更佳地從約室溫至

(16)

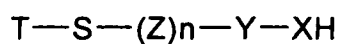
100℃)。反應所需要的時間也可依據許多因素，尤其為反應溫度及試劑本性而廣泛地改變。然而，先決條件係反應係在上述概括的較佳條件下完成，從3小時至20小時的期間經常足夠了。

因此所製備之化合物可藉由慣例方式從反應混合物回收。例如，化合物可藉由蒸餾反應混合物的溶劑而回收，或者若必要時，在蒸餾反應混合物的溶劑之後，將殘餘物倒入水中，接著以與水不互溶之有機溶劑萃取及蒸餾萃取物的溶劑。此外，若要求時，可將產物以各種熟知的技術，如再結晶、再沉澱或各種層析技術，尤其為管柱色層分析法或製備性薄層色層分析法，進一步純化。

製備式(I)化合物的方法包含對應之式(II)與(III)化合物反應的步驟：



(II)



(III)

其中 Ra、Ra'、R17、R9、X、Y、Z、T、n 如式(I)中所定義。

通常該反應可在一般的偶合劑，包括抑制外消旋化之

(17)

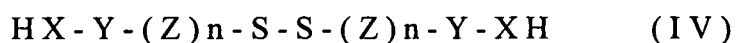
試劑，如 HOBT，及 / 或用於活化趨向形成醯胺或酯的羧酸之脫水劑，如 DIC、DCC 的存在下進行。

典型地，該反應可在適合的有機溶劑中進行，如二氯甲烷。

當式(I)中的 T 為 H 時，則反應可另一選擇以 N-醯化劑，如特戊醯氯，在鹼，包括有機鹼，如三乙胺的存在下進行。

在式(I)中的 T 為 H 的情況中，另一選擇係式(I)化合物也可從其中 T 為 S-R1 的對應之式(I)化合物在二硫化物鍵的還原劑，如三烷基磷及更特別為 TCEP 存在下獲得。該反應通常可在水性介質，如有機溶劑與水之混合物，例如 THF / 水的存在下進行。

式(I)之二聚合化合物可藉由對應之式(II)化合物與對應之式(IV)化合物：



在一般的偶合劑，包括抑制外消旋化之試劑，如 HOBT，及 / 或用於活化趨向形成醯胺或酯的羧酸之脫水劑，如 DIC、DCC 的存在下反應。

典型地，該反應可在適合的有機溶劑中進行，如二氯甲烷。

該反應也可包括進一步分離所獲得的產物之步驟。

本發明也關於一種細黴素衍生物共軛物，其包含經由

(18)

含有該連結基團之連結體與一或多種根據本發明的細胞素衍生物連結之細胞結合劑。

較佳地，細胞結合劑為抗體或其碎片。

較佳地，連結體包含-S-或-S-S-基團。

#### 細胞結合劑之製備

細胞結合劑可為目前已知或成為已知的任何種類，並包括肽及非肽。通常這些可為抗體（尤其為單株抗體）或抗體之包括至少一個結合位置的碎片、淋巴介質、激素、生長因子、營養素輸送分子（如運鐵蛋白）或任何其它的細胞結合分子或基質。

可使用的細胞結合劑更特定的實例包括：

- 單株抗體；
- 單鏈抗體；
- 抗體之碎片，如 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub> 及 F<sub>v</sub> { Parham, 131 J. Immunol. 2895-2902 (1983); Spring 等人之 113 J. Immunol. 470-478 (1974); Nisonoff 等人之 89 Arch. Biochem. Biophys. 230-244 (1960) } ；
- 干擾素；
- 肽；
- 淋巴介質，如 IL-2、IL-3、IL-4、IL-6；
- 激素，如胰島素、TRH（促甲狀腺素釋素）、MSH（黑素細胞刺激素）、類固醇激素，如雄激素及雌激素；
- 生長因子及群落刺激因子，如 EGF、TGF $\alpha$ 、似胰

(19)

島素生長因子 (IGF-I、IGF-II)、G-CSF、M-CSF 及 GM-CSF { Burgess, 5 Immunology Today 155-158 (1984)} ; 維他命, 如葉酸鹽; 及

- 運鐵蛋白 { O'Keefe 等人之 260 J. Biol. Chem. 932-937 (1985)} 。

單株抗體技術容許生產具有特異性單株抗體型式的極高選擇性細胞結合劑。在本技藝中特別熟知用於產生由小鼠、大鼠、倉鼠或任何其它的哺乳類以有利的抗原, 如完整無缺的靶細胞、自靶細胞分離的抗原、全病毒、減弱的全病毒及病毒蛋白, 如病毒鞘蛋白, 免疫化所生產之單株抗體的技術。

適當的細胞結合劑之選擇係依據欲靶定之特定的細胞群而定的一種選擇問題, 但是如果可取得適當的抗體, 則通常以單株抗體較佳。

例如, 單株抗體 MY9 為鼠科動物 IgG<sub>1</sub> 抗體, 其特別與 CD33 抗原結合 { J. D. Griffin 等人之 8 Leukemia Res., 521 (1984)} , 並可在如果靶細胞表現在急性骨髓性白血病 (AML) 中的 CD33 時使用。同樣地, 單株抗體抗-B4 為鼠科動物 IgG<sub>1</sub> 抗體, 其與 B 細胞上的 CD19 抗原結合 { Nadler 等人之 131 J. Immunol. 244-250 (1983)} , 並可在如果靶細胞為表現該抗原的 B 細胞或生病細胞時使用, 如在非-霍奇金氏 (Hodgkin's) 淋巴瘤或慢性淋巴胚細胞白血病中。

此外, 與骨髓細胞結合的 GM-CSF 可用作來自急性骨

(20)

髓性白血病之生病細胞的細胞結合劑。與活化之 T-細胞結合之 IL-2 可用於預防移植物排斥、治療和預防移植物對宿主疾病及治療急性 T-細胞白血病。與黑細胞結合之 MSH 可用於治療黑色素瘤。

#### 共軛物之製備

衍生物與細胞結合劑之共軛物可使用目前已知或後來發展的任何技術形成。通常本發明的共軛物製備方法包含使本發明的細胞毒素衍生物與細胞結合劑在包含反應性趨向衍生物之連結基團與細胞結合劑之功能的試劑存在下反應，使得衍生物與細胞結合劑經由含有該連結基團之連結體連結在一起。較佳地，該連結體包含硫化物或二硫化物鍵。

可製備包括自由胺基之衍生物，並接著經由酸不穩定性連結體或光不穩定性連結體與抗體或其它細胞結合劑連結。衍生物可與具有適合的序列之肽縮合及接著與細胞結合劑連結，以生產肽酶不穩定性連結體。可製備包括一級羥基之細胞毒性化合物，可將其丁二醯化及與細胞結合劑連結，以生產共軛物，可將其以細胞內酯酶裂解，以釋出自由細胞毒素衍生物。較佳地，合成包括具有或不具有含 PEG 間隔基的自由或經保護之硫醇基團之衍生物，並接著將含有一或多個硫化物、二硫化物或硫醇之衍生物分別經由二硫化物鍵或硫醚鍵與細胞結合劑共價連結。

本發明的代表性共軛物為細胞毒素衍生物與抗體、抗體



(21)

碎片、表皮生長因子（EGF）、黑素細胞刺激素（MSH）、甲狀腺刺激素（TSH）、雌激素、雌激素類似物、雄激素及雄激素類似物之共軛物。

製備細胞素衍生物與細胞結合劑的各種共軛物的代表性實例敘述於下。

二硫化物連結體：抗體 huMy-9-6 為指向對抗在包括大部分急性骨髓性白血病（AML）例的人類骨髓細胞表面上發現的 CD33 抗原之鼠科動物單株抗體 My-9-6 之基因人類化型式（E. J. Favaloro, K. F. Bradstock, A. Kabral, P. Grimsley & M. C. Berndt, *Disease Markers*, 5(4):215 (1987); M. G. Hoffee, D. Tavares, R. J. Lutz, Robert J., PCT Int. Appl. (2004) WO 2004043344）。My-9-6 可用於製備共軛物。抗體如上所述以 3-吡啶二硫基丙酸 N-丁二醯亞胺酯改良 { J. Carlsson, H. Drevin & R. Axen, *Biochem. J.*, 173:723 (1978) }，每一抗體分子引入平均 4 個吡啶硫基。改良型抗體與含硫醇之細胞素衍生物反應，以生產經二硫化物連結之共軛物。

硫醚連結體：本發明的含硫醇之衍生物可經由硫醚連結體與抗體及其它的細胞結合劑連結，如先前所述（美國專利第 5,208,020 號）。抗體或其它的細胞結合劑可以已知或市售取得的化合物改良，如 4-(5-硝基-2-吡啶二硫基)丁酸 N-磺基丁二醯亞胺酯（SSNPB）、4-(順丁烯二醯亞胺甲基)環己烷羧酸 N-丁二醯亞胺酯（SMCC）、N-丁二醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺甲基)-環己烷-1-羧基-(6-

(22)

醯胺基己酸酯)，其為 SMCC 之“長鏈”類似物（LC-SMCC）。這些交聯試劑形成以順丁烯二醯亞胺基為主之部分所衍生之不可裂解之連結體。

含有以鹵乙醯基為主之部分的交聯試劑包括 4-(碘乙醯基)-胺基苯甲酸 N-丁二醯亞胺酯（SIAB）、碘基乙酸 N-丁二醯亞胺酯（SIA）、溴基乙酸 N-丁二醯亞胺酯（SBA）及 3-(溴基乙醯胺基)丙酸 N-丁二醯亞胺酯（SBAP）。這些交聯試劑形成以鹵乙醯基為主之部分所衍生之不可裂解之連結體。改良型細胞結合劑可與含硫醇之藥物反應，以提供經硫醚連結之共軛物。

酸不穩定性連結體：本發明的含胺基之細胞素衍生物可經由酸不穩定性連結體與抗體及其它的細胞結合劑連結，如上所述 { W. A. Blattler 等人之 *Biochemistry* 24, 1517-1524 (1985)；美國專利第 4,542,225 號、第 4,569,789 號、第 4,618,492 號、第 4,764,368 號 }。

同樣地，本發明的含醯肼基之細胞素衍生物可經由酸不穩定性脙連結體與抗體的碳水化合物部位及其它的細胞結合劑連結 { 脙連結體的實例參見 B. C. Laguzza 等人之 *Med. Chem.*, 32, 548-555 (1989)；R. S. Greenfield 等人之 *Cancer Res.*, 50, 6600-6607 (1990) }。

光不穩定性連結體：本發明的含胺基之細胞素衍生物可經由光不穩定性連結體與抗體及其它的細胞結合劑連結，如上所述 { P. Senter 等人之 *Photochemistry and Photobiology*, 42, 231-237 (1985)；美國專利第 4,625,014

(23)

號 }。

肽酶不穩定性連結體：本發明的含胺基之細黴素衍生物也可經由肽間隔基與細胞結合劑連結。已於先前證明在藥物與巨分子蛋白載體之間短的肽間隔基在血清中具有穩定性，但是可輕易被分子內肽酶水解 { A. Trouet 等人之 *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79, 626-629 (1982) }。含胺基之細黴素衍生物可使用縮合劑，如 1-乙基-3-(3-二甲胺基丙基)碳化二醯亞胺-HCl (EDC-HCl)，與肽縮合，得到可與細胞結合劑連結之肽衍生物。

酯酶不穩定性連結體：本發明的攜帶羥烷基之細黴素衍生物也可以丁二酸酐丁二醯化及結著與細胞結合劑連結，以生產共軛物，其可被細胞內酯酶裂解，以釋出自由藥物 { 實例參見 E. Aboud-Pirak 等人之 *Biochem. Pharmacol.*, 38, 641-648 (1989) }。

抗體、抗體碎片、蛋白質或肽激素、蛋白質或肽生長因子及其它的蛋白質之共軛物可以已知方法的相同方式製得。例如，肽及抗體可以交聯試劑以已知的方法改良，如 3-(2-吡啶二硫基)丙酸 N-丁二醯亞胺酯、4-(2-吡啶二硫基)戊酸 N-丁二醯亞胺酯 (SPP)、4-丁二醯亞胺基-氧羰基- $\alpha$ -甲基- $\alpha$ -(2-吡啶二硫基)-甲苯 (SMPT)、3-(2-吡啶二硫基)丁酸 N-丁二醯亞胺酯 (SDPB)、吡啶二硫基丙酸丁二醯亞胺酯 (SPDP)、4-(2-吡啶二硫基)丁酸 N-羥基丁二醯亞胺酯 (SPDB)、4-[N-順丁烯二醯亞胺甲基]環己烷-1-羧酸丁二醯亞胺酯 (SMCC)、3-(2-(5-硝基吡啶二硫基))

(24)

丁酸 N-磺基丁二醯亞胺酯 (SSNPB)、2-亞胺基四氫噻吩或 S-乙醯基丁二酸酐。參見 Carlsson 等人之 173, Biochem. J. 723-737 (1978); Blattler 等人之 24, Biochem. 1517-1524 (1985); Lambert 等人之 22, Biochem. 3913-3920 (1983); Klotz 等人之 96, Arch. Biochem. Biophys., 605 (1962); 及 Liu 等人之 18, Biochem., 690 (1979), Blakey and Thorpe, 1 Antibody, Immunoconjugates & Radio-pharmaceuticals, 1-16 (1988), Worrell 等人之 1 Anti-Cancer Drug Design 179-184 (1986)。因此所衍生之含自由或經保護之硫醇之細胞結合劑接著與含二硫化物或硫醇之細黴素衍生物反應，以生產共軛物。

以上述方法所製得的共軛物可以標準的管柱色層分析法或 HPLC 純化。

較佳地，在單株抗體或細胞結合劑與本發明的細黴素衍生物之間的共軛物為那些經由二硫化物或硫醚鍵接合之共軛物，如上述所討論。該等細胞結合共軛物可以已知的方法製備，如以吡啶二硫基丙酸丁二醯亞胺酯 (SPDP) 改良單株抗體 { Carlsson 等人之 173, Biochem. J., 723-737 (1978) }。所得硫代吡啶基接著以含硫醇之細黴素衍生物處理而被置換，以生產經二硫化物連結之共軛物。含有 1 至 10 個經由二硫化物橋連結之細黴素衍生物的共軛物可輕易以該方法製備。以該方法的共軛作用完整地敘述在美國專利第 5,585,499 號中，將其併入以供參考。

(25)

在細胞結合劑與本發明的細黴素衍生物之間的共軛物在試管內的細胞毒性

本發明的細黴素衍生物及彼等與細胞結合劑之共軛物的細胞毒性可在保護基裂解及轉化成活性藥物之後測量。對非貼附性細胞系，如 Namalwa 及 HL60 之細胞毒性可以細胞增殖曲線的反推法測量，如在 Goldmacher 等人之 J. Immunol., 3648-3651 (1985)中所述。這些化合物對貼附性細胞系，如 A-375 及 SCaBER 之細胞毒性可以細胞群落分析法測定，如在 Goldmacher 等人之 102, J. Cell Biol. 1312-1319 (1986)中所述。

用於抑制選定之細胞群生長的治療劑及方法

本發明也提供一種用於抑制選定之細胞群生長的治療劑，其包含：

(a) 細胞毒性量之一或多種與細胞結合劑連結之上述細黴素衍生物，及

(b) 醫藥上可接受之載體、稀釋劑或賦形劑。

同樣地，本發明提供一種用於抑制選定之細胞群生長的方法，其包含將細胞群或懷疑含有來自該選定之細胞群的細胞之組織該與細胞毒性量之含有一或多種與細胞結合劑連結之上述細黴素衍生物的細胞毒性劑接觸。

細胞毒性劑如上所述製備。

適合的醫藥上可接受之載體、稀釋劑及賦形劑為眾所周知，並可以那些熟諳本技藝者以臨床表現為根據而決

(26)

定。

適合的載體、稀釋劑及 / 或賦形劑的實例包括：

(1) 杜貝克氏 (Dulbecco's) 磷酸鹽緩衝之食鹽水，pH 約 7.4，其包括約 1 毫克 / 毫升至 25 毫克 / 毫升之人類血清白蛋白，(2) 0.9% 食鹽水 (0.9% w/v 之 NaCl) 及 (3) 5% (w/v) 之右旋糖。

用於抑制選定之細胞群生長的方法可在試管內、活體內或活體外實施。

試管內使用的實例包括細胞培養物的處理，以便殺死除了未表現靶抗原之所欲變體之外的所有細胞；或殺死表現非所欲抗原之變體。

非臨床的試管內使用的條件可輕易由熟諳的技術員決定。

活體外使用的實例包括在自體骨髓移植至相同的病患之前的該骨髓處理，以便殺死生病或惡化的細胞；在骨髓移植之前的骨髓處理，以便殺死勝任 T 細胞及預防移植物對宿主疾病 (GVHD)。

在癌症治療或自體免疫疾病的治療中，在自體移植之前，從骨髓移除腫瘤細胞或淋巴細胞，或在移植之前，從同種性骨髓或組織移除 T 細胞及其它淋巴細胞以預防 GVHD 的臨床活體外治療可進行如下。自病患或其它個體獲取骨髓，並接著在 37°C 下在加入濃度範圍從約 10  $\mu$  M 至 1 pM 之本發明的細胞毒性劑的含血清之培養基中培養約 30 分鐘至約 48 小時。濃度及培養時間的實際條件 (=

(27)

劑量)可輕易由熟諳的技術員決定。在培養之後，將骨髓細胞以含血清之培養基清洗及以根據已知方法的 i.v. 灌注方式送回病患中。在病患在獲取骨髓與再灌注處理之細胞的時間之間接受其它治療的情況中，如根除式化學治療或全身照射期間，將處理之骨髓使用標準的醫學設備貯存冷凍在液態氮中。

供臨床活體內使用的本發明的細胞毒性劑將以經檢測無菌性及內毒素水平的溶液或可以再溶解在注射用之無菌水中的冷凍固體供應。適合的共軛物投予模式的實例如下。共軛物每週以靜脈注射施予歷經 6 週。單次劑量係施予可加入人類血清白蛋白（例如，0.5 至 1 毫升濃縮之人類血清白蛋白溶液，100 毫克 / 毫升）的 50 至 400 毫升生理食鹽水。劑量係每週以靜脈注射約 50 微克至 10 毫克 / 每公斤體重（每次注射 10 微克至 100 毫克 / 公斤之範圍）。在治療 6 週之後，病患可接受第二期治療。關於投予途徑、接受者、稀釋劑、劑量、時間等的特異性臨床模式可由那些熟諳的技術員以臨床表現為根據而決定。

可根據殺死選定之細胞群的活體內或活體外方法治療的醫學症狀的實例包括任何類型的惡性腫瘤，包括例如肺癌、乳癌、結腸癌、攝護腺癌、腎臟癌、胰臟癌、卵巢癌與淋巴器官癌；黑色素瘤；自體免疫性疾病，如系統性狼瘡、類風濕性關節炎與多發性硬化症；移植物排斥，如腎移植排斥、肝移植排斥、肺移植排斥、心臟移植排斥與骨髓移植排斥；移植物對宿主疾病；病毒感染，如 CMV 感

(28)

染、HIV 感染、AIDS 等；細菌感染；及寄生蟲感染，如梨形鞭毛蟲症、變形蟲病、血吸蟲病與以熟諳本技藝者決定的其它症狀。

### 實例

本發明現將以參考非限制性實例說明。除非有其它另外的陳述，所有的百分比、比、份量等係以重量計。

### 材料及方法

熔點係使用電熱裝置測量且未經校正。NMR 光譜記錄在 Bruker AVANCE400 (400 MHz) 光譜儀上。化學位移係以相對於作為內標準的 TMS 以 ppm 報告。質譜係使用 Bruker Esquire 3000 系統獲得。紫外光譜記錄在 Hitachi U1200 分光光度計上。HPLC 係使用配備 Beckman Coulter 系統 GOLD 168 可變式波長偵測器及 Waters RADIALPAK (逆相 C-18 管柱) 之 Beckman Coulter GOLD 125 系統執行。薄層色層分析法係在 Analtech GF 矽膠 TLC 板上執行。快速管柱色層分析法用之矽膠來自 Baker。四氫呋喃係藉由在鈉金屬上蒸餾而乾燥。二甲基乙醯胺及二甲基甲醯胺係藉由在減壓下在氫化鈣上蒸餾而乾燥。所使用的所有其它溶劑為試劑級或 HPLC 級。

人類癌細胞系 HL60、Namalwa、A-375、COLO 205 及 Ramos 係自美國菌株保存中心 (American Type Culture Collection) (ATCC) 獲得。Kara 為已以人類 CD33 抗原



(29)

穩定轉染之鼠科動物腫瘤細胞系。

# 實驗部分

質譜法分析進行如下：

EI-CI 分析：直接引入（DCI=在電絲上的樣品沉積物）

質譜儀 Finnigan SSQ7000；質量範圍  $m/z=29-900$ ；  
電子能量 70eV；電源溫度 70℃；反應物氣體氬化銨；EI=經由電自撞擊而離子化；CI=化學離子化。

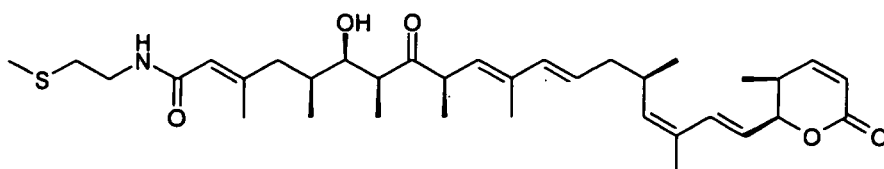
電噴霧分析：（正電噴霧： $ES^+$ ；負電噴霧： $ES^-$ ）

LC-MS-DAD-ELSD：

MS：Waters-Micromass ZQ；LC：Agilent HP 1100；  
LC管柱 Xbridge Waters C18，3x50 毫米，2.5 微米；溶析劑：梯度之水（具有 0.1%甲酸）+乙腈；UV：DAD（ $\lambda=200-400$  奈米）。

## 實例 1：

(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羥基-3,5,7,9,11,15,17-七甲基-19-((2S,3S)-3-甲基-6-酮基-3,6-二氫-2H-呋喃-2-基)-8-酮基-十九碳-2,10,12,16,18-五烯酸之(2-甲硫基-乙基)-醯胺



(30)

將 7.65 微升 DIC (N,N'-二異丙基碳化二醯亞胺) 在接近 20°C 之溫度下引入在 0.3 毫升二氯甲烷中的 20 毫克 (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羥基-3,5,7,9,11,15,17-七甲基-19-((2S,3S)-3-甲基-6-酮基-3,6-二氫-2H-嘓喃-2-基)-8-酮基-十九碳-2,10,12,16,18-五烯酸及 5.6 毫克 HOBt (1-羥基苯並三唑) 之溶液中, 接著引入 5.2 毫克 2-(硫甲基)乙胺。將反應混合物在接近 20°C 之溫度下攪拌 20.5 小時, 接著以直接沉積在 2 個製備性矽膠 TLC 板上 (厚度 0.5 毫米, 20x20 公分) 純化。將製備性 TLC 板以甲醇/二氯甲烷 (以體積計 5 / 95) 之混合物溶析, 接著以甲醇/二氯甲烷 (以體積計 15 / 85) 之混合物自矽膠萃取所欲產物。獲得成為黃色固體的 1.4 毫克 (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羥基-3,5,7,9,11,15,17-七甲基-19-((2S,3S)-3-甲基-6-酮基-3,6-二氫-2H-嘓喃-2-基)-8-酮基-十九碳-2,10,12,16,18-五烯酸之 (2-甲硫基-乙基)-醯胺, 其特徵如下:

質譜:

• CI:  $m/z=617:[M+NH_4]^+$ ;  $m/z=600:[M+H]^+$

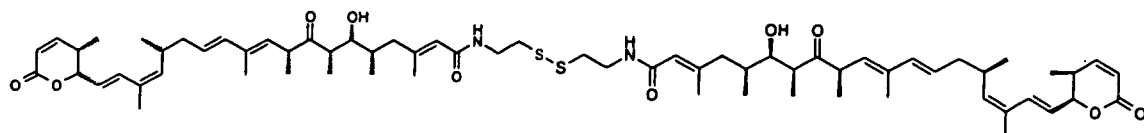
在光譜儀 BRUKER AVANCE DMX-600 上獲得在 600MHz 下具有下列化學位移 (以 ppm 計之  $\delta$ ) 之  $^1H$  NMR 光譜-在作為溶劑的氯仿中-在 303K 之溫度下以 7.27 之 d1 (CDCl<sub>3</sub>-d1) 作為參考值: 0.79(d, J=6.5Hz, 3H); 0.97(d, J=7.0Hz, 3H); 1.07(d, J=7.0Hz, 3H); 1.12(d,

(31)

$J=7.0\text{ Hz}$  , 3H) ; 1.15(d ,  $J=7.5\text{ Hz}$  , 3H) ; 1.71(m , 1H) ;  
 1.81(s , 3H) ; 1.82(m 部分遮蔽 , 1H) ; 1.83(s , 3H) ;  
 2.08(m , 2H) ; 2.11(s , 3H) ; 2.13(s , 3H) ; 2.15(dd ,  
 $J=6.5$  及  $13.5\text{ Hz}$  , 1H) ; 2.45(m 寬 , 1H) ; 2.53(m , 1H) ;  
 2.66(t ,  $J=6.5\text{ Hz}$  , 2H) ; 2.70(m , 1H) ; 2.82(m , 1H) ;  
 3.50(q ,  $J=6.5\text{ Hz}$  , 2H) ; 3.61(m , 1H) ; 3.65(m , 1H) ;  
 5.01(dd ,  $J=4.5$  及  $7.5\text{ Hz}$  , 1H) ; 5.09(d ,  $J=10.0\text{ Hz}$  ,  
 1H) ; 5.26(d ,  $J=10.0\text{ Hz}$  , 1H) ; 從 5.55 至 5.66(m , 2H) ;  
 5.69(dd ,  $J=7.5$  及  $16.0\text{ Hz}$  , 1H) ; 5.97(t , 寬 ,  $J=6.5\text{ Hz}$  ,  
 1H) ; 6.00(d ,  $J=10.0\text{ Hz}$  , 1H) ; 6.02(d ,  $J=15.5\text{ Hz}$  , 1H) ;  
 6.75(d ,  $J=16.0\text{ Hz}$  , 1H) ; 6.95(dd ,  $J=6.0$  及  $10.0\text{ Hz}$  ,  
 1H) 。

實例 2 :

雙 -[(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羥基 -3,5,7,9,11,15,  
 17-七甲基 -19-((2S,3S)-3-甲基 -6-酮基 -3,6-二氫 -2H-嘓喃 -  
 2-基) -8-酮基 -十九碳 -2,10,12,16,18-五烯酸之 (2-巯乙基) -  
 醯胺]



將 12.8 毫克胱胺之二鹽酸鹽 , 7.65 微升 DIC ( N,N'-  
 二異丙基碳化二醯亞胺 ) 在接近  $20^{\circ}\text{C}$  之溫度下引入在 0.3  
 毫升二氯甲烷中的 20 毫克 (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羥

(32)

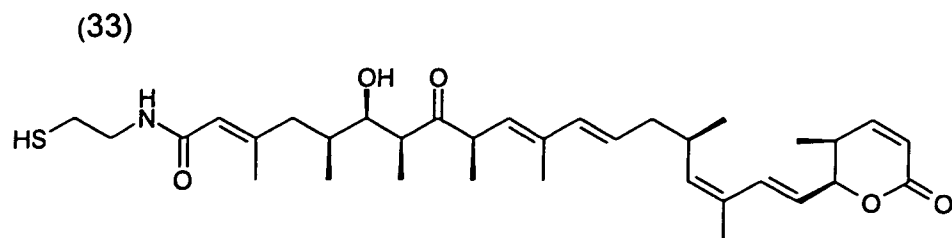
基 -3,5,7,9,11,15,17-七甲基 -19-((2S,3S)-3-甲基 -6-酮基 -3,6-二氫 -2H-哌喃 -2-基) -8-酮基 -十九碳 -2,10,12,16,18-五烯酸及 5.6 毫克 HOBt (1-羥基苯並三唑) 之溶液中，接著引入 11.6 微升三乙胺。將反應混合物在接近 20℃ 之溫度下攪拌 22 小時，接著以直接沉積在 2 個製備性矽膠 TLC 板上 (厚度 0.5 毫米，20x20 公分) 純化。將製備性 TLC 板以甲醇 / 二氯甲烷 (以體積計 5 / 95) 之混合物溶解，接著以甲醇 / 二氯甲烷 (以體積計 15 / 85) 之混合物自矽膠萃取所欲產物。獲得成為白色固體的 4.6 毫克雙 -[(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羥基 -3,5,7,9,11,15,17-七甲基 -19-((2S,3S)-3-甲基 -6-酮基 -3,6-二氫 -2H-哌喃 -2-基) -8-酮基 -十九碳 -2,10,12,16,18-五烯酸之 (2-巰乙基) -醯胺]，其特徵如下：

質譜：

- $ES^+$  :  $m/z=1167:[M+H]^+$
- $ES^-$  :  $m/z=1211:[M-H+HCOOH]^-$

實例 3：

(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羥基 -3,5,7,9,11,15,17-七甲基 -19-((2S,3S)-3-甲基 -6-酮基 -3,6-二氫 -2H-哌喃 -2-基) -8-酮基 -十九碳 -2,10,12,16,18-五烯酸之 (2-巰乙基) -醯胺



將 6.1 微升特戊醯氯在接近 0℃ 之溫度下引入在 0.15 毫升二氯甲烷中的 20 毫克 (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羥基-3,5,7,9,11,15,17-七甲基-19-((2S,3S)-3-甲基-6-酮基-3,6-二氫-2H-呓喃-2-基)-8-酮基-十九碳-2,10,12,16,18-五烯酸及 8 微升三乙胺之溶液中。在接近 0℃ 之溫度下 15 分鐘之後，加入在 0.15 毫升二氯甲烷及 0.05 毫升乙醇中的 4.4 毫克 2-胺基乙烷硫醇之溶液。將反應混合物在接近 20℃ 之溫度下攪拌 1 小時，接著以直接沉積在 2 個製備性矽膠 TLC 板上（厚度 0.5 毫米，20x20 公分）純化。將製備性 TLC 板以甲醇 / 二氯甲烷（以體積計 8 / 92）之混合物溶析，接著以甲醇 / 二氯甲烷（以體積計 15 / 85）之混合物自矽膠萃取所欲產物。獲得成為無色玻璃狀的 2.3 毫克 (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羥基-3,5,7,9,11,15,17-七甲基-19-((2S,3S)-3-甲基-6-酮基-3,6-二氫-2H-呓喃-2-基)-8-酮基-十九碳-2,10,12,16,18-五烯酸之(2-巰乙基)-醯胺，其特徵如下：

質譜：

- $ES^+$  :  $m/z = 586 : [M+H]^+$
- $ES^-$  :  $m/z = 630 : [M-H+HCOOH]^-$

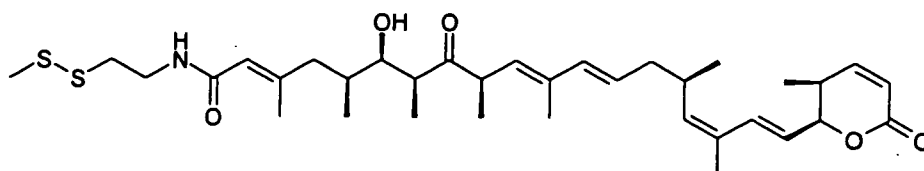
在光譜儀 BRUKER AVANCE DRX-400 上獲得在 400MHz 下具有下列化學位移（以 ppm 計之  $\delta$ ）之  $^1H$  NMR 光譜-在作為溶劑的氯仿中-在 303K 之溫度下以 7.27

(34)

之 d1 ( CDC13-d1 ) 作為參考值：0.80(d, J=6.5 Hz, 3H)；0.98(d, J=6.5 Hz, 3H)；1.08(d, J=7.5 Hz, 3H)；1.14(d, J=6.5 Hz, 3H)；1.16(d, J=7.0 Hz, 3H)；1.72(m, 1H)；從 1.80 至 1.87(m 遮蔽, 1H)；1.82(s, 3H)；1.84(s, 3H)；2.09(m, 2H)；2.11(s, 3H)；2.16(dd, J=6.5 及 13.5, 1H)；2.54(m, 1H)；從 2.65 至 2.74(m, 3)；2.83(m, 1H)；3.48(q, J=6.5 Hz, 2H)；從 3.60 至 3.70(m, 2H)；5.00(dd, J=4.0 及 7.0 Hz, 1H)；5.10(d, J=10.5 Hz, 1H)；5.27(d, J=10.5 Hz, 1H)；5.58(s, 1H)；5.60(td 部分遮蔽, J=7.5 及 15.5 Hz, 1H)；5.70(dd, J=7.0 及 15.5 Hz, 1H)；從 5.96 至 6.06(m, 3H), 6.75(d, 寬, J=15.5 Hz, 1H)；6.97(dd, J=6.0 及 10.0 Hz, 1H)。

實例 4：

(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羥基-3,5,7,9,11,15,17-七甲基-19-((2S,3S)-3-甲基-6-酮基-3,6-二氫-2H-呋喃-2-基)-8-酮基-十九碳-2,10,12,16,18-五烯酸之(2-甲基二硫基-乙基)-醯胺



將 7.65 微升 DIC ( N,N'-二異丙基碳化二醯亞胺 ) 在接近 20℃ 之溫度下引入在 0.15 毫升二氯甲烷中的 20 毫克

(S)

(35)

(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6- 羥基 -3,5,7,9,11,15,17- 七 甲  
基 -19-((2S,3S)-3- 甲 基 -6- 酮 基 -3,6- 二 氫 -2H- 嘓 喃 -2- 基 )-8-  
酮 基 -十 九 碳 -2,10,12,16,18- 五 烯 酸 及 5.6 毫 克 HOBT ( 1-  
羥 基 苯 並 三 唑 ) 之 溶 液 中 , 接 著 引 入 在 0.15 毫 升 二 氯 甲  
烷 中 的 8 毫 克 2- 甲 基 二 硫 基 乙 胺 之 溶 液 。 將 反 應 混 合 物  
在 接 近 20℃ 之 溫 度 下 攪 拌 2 小 時 , 接 著 以 直 接 沉 積 在 2  
個 製 備 性 矽 膠 TLC 板 上 ( 厚 度 0.5 毫 米 , 20x20 公 分 ) 純  
化 。 將 製 備 性 TLC 板 以 甲 醇 / 二 氯 甲 烷 ( 以 體 積 計 7 /  
93 ) 之 混 合 物 溶 析 , 接 著 以 甲 醇 / 二 氯 甲 烷 ( 以 體 積 計  
15 / 85 ) 之 混 合 物 自 矽 膠 萃 取 所 欲 產 物 。 獲 得 成 為 淡 黃 色  
油 的 3.4 毫 克 (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6- 羥 基 -  
3,5,7,9,11,15,17- 七 甲 基 -19-((2S,3S)-3- 甲 基 -6- 酮 基 -3,6-  
二 氫 -2H- 嘓 喃 -2- 基 )-8- 酮 基 -十 九 碳 -2,10,12,16,18- 五 烯 酸  
之 (2- 甲 基 二 硫 基 -乙 基 )- 醯 胺 , 其 特 徵 如 下 :

質 譜 :

- $ES^+$  :  $m/z=632:[M+H]^+$
- $ES^-$  :  $m/z=630:[M-H]^-$  ;  $m/z=676:[M-H+HCOOH]^-$

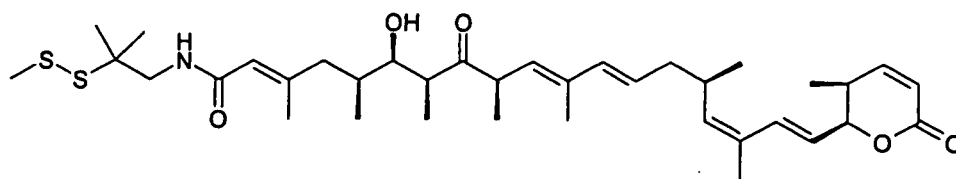
在 光 譜 儀 BRUKER AVANCE DRX-400 上 獲 得 在  
400MHz 下 具 有 下 列 化 學 位 移 ( 以 ppm 計 之  $\delta$  ) 之  $^1H$   
NMR 光 譜 -在 作 為 溶 劑 的 氯 仿 中 -在 303K 之 溫 度 下 以 7.27  
之 d1 ( CDCl<sub>3</sub>-d1 ) 作 為 參 考 值 : 0.81(d , J=6.5Hz , 3H) ;  
0.98(d , J=6.5Hz , 3H) ; 1.08(d , J=7.5Hz , 3H) ; 1.14(d ,  
J=6.5Hz , 3H) ; 1.16(d , J=7.0Hz , 3H) ; 1.72(m , 1H) ; 從  
1.79 至 1.86(m , 1H) ; 1.82(s , 3H) ; 1.84(s , 3H) ;

(36)

2.09(m, 2H); 2.11(s, 寬, 3H); 2.15(dd,  $J=5.5$  及  $13.5\text{ Hz}$ , 1H); 2.35(s 寬, 1H); 2.43(m, 3H); 2.54(m, 1H); 2.70(m, 1H); 2.83(m, 1H); 2.86(t,  $J=6.5\text{ Hz}$ , 2H); 從 3.59 至 3.70(m, 4H); 5.01(dd,  $J=4.0$  及  $7.0\text{ Hz}$ , 1H); 5.11(d,  $J=10.0\text{ Hz}$ , 1H); 5.27(d,  $J=10.0\text{ Hz}$ , 1H); 5.56(s, 1H); 5.60(td 部分遮蔽,  $J=7.5$  及  $15.5\text{ Hz}$ , 1H); 5.70(dd,  $J=7.0$  及  $15.5\text{ Hz}$ , 1H); 5.93(t,  $J=6.0\text{ Hz}$ , 1H); 6.00(d,  $J=10.0\text{ Hz}$ , 1H); 6.02(d,  $J=15.5\text{ Hz}$ , 1H); 6.75(d,  $J=15.5\text{ Hz}$ , 1H); 6.96(dd,  $J=6.0$  及  $10.0\text{ Hz}$ , 1H)。

實例 5：

(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羥基-3,5,7,9,11,15,17-七甲基-19-((2S,3S)-3-甲基-6-酮基-3,6-二氫-2H-呓喃-2-基)-8-酮基-十九碳-2,10,12,16,18-五烯酸之(2-甲基-2-甲基二硫基-丙基)-醯胺



將在 1.5 毫升二氯甲烷中的 63.6 毫克 HOBt (1-羥基苯並三唑) 及 110 毫克 2-甲基-2-甲基二硫基丙胺之溶液在接近  $0^{\circ}\text{C}$  之溫度下引入在 1.5 毫升二氯甲烷中的 225.4 毫克 (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羥基-3,5,7,9,11,15,17-

(S)



(37)

七甲基-19-((2S,3S)-3-甲基-6-酮基-3,6-二氫-2H-嘓喃-2-基)-8-酮基-十九碳-2,10,12,16,18-五烯酸之溶液中，接著引入 86.2 微升 DIC (N,N'-二異丙基碳化二醯亞胺)。將反應混合物在接近 0℃ 之溫度下攪拌 15 小時，接著以 30 毫升二氯甲烷稀釋。將有機相以 10 毫升水清洗兩次，在硫酸鈉上乾燥，在燒結玻璃上過濾，接著在接近 40℃ 之溫度的減壓下濃縮。將如此獲得的殘餘物在矽膠上以管柱色層分析法 (20 公克 SiO<sub>2</sub>, 15-35 微米，溶析梯度為從 0 / 100 至 10 / 90 (以體積計) 之甲醇 / 二氯甲烷) 純化。將含有所欲產物之餾份在接近 40℃ 之溫度的減壓下濃縮。獲得成為黃色玻璃狀的 212.1 毫克 (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羥基-3,5,7,9,11,15,17-七甲基-19-((2S,3S)-3-甲基-6-酮基-3,6-二氫-2H-嘓喃-2-基)-8-酮基-十九碳-2,10,12,16,18-五烯酸之(2-甲基-2-甲基二硫基-丙基)-醯胺，其特徵如下：

質譜：

• ES<sup>+</sup> : m/z=660: [M+H]<sup>+</sup>

• ES<sup>-</sup> : m/z=658: [M-H]<sup>-</sup> ; m/z=704 : [M-H+HCOOH]<sup>-</sup>

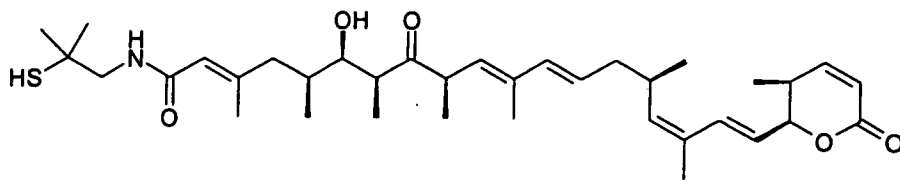
在光譜儀 BRUKER AVANCE DRX-400 上獲得在 400MHz 下具有下列化學位移 (以 ppm 計之  $\delta$ ) 之 <sup>1</sup>H NMR 光譜-在作為溶劑的氯仿中-在 303K 之溫度下以 7.27 之 d1 (CDCl<sub>3</sub>-d1) 作為參考值：0.80(d, J=6.5Hz, 3H)；0.97(d, J=6.5Hz, 3H)；1.08(d, J=7.5Hz, 3H)；1.14(d, J=6.5Hz, 3H)；1.16(d, J=7.0Hz, 3H)；1.32(s, 6H)；

(38)

1.72(m, 1H); 1.82(s, 3H); 1.83(m 遮蔽, 1H); 1.84(s, 3H); 2.08(m, 2H); 2.11(s 寬, 3H); 2.15(dd, J=6.5 及 13.5 Hz, 1H); 2.43(s, 3H); 2.54(m, 1H); 2.70(m, 1H); 2.83(m, 1H); 3.45(d, J=6.0 Hz, 2H); 從 3.59 至 3.69(m, 2H); 5.00(dd, J=4.0 及 7.0 Hz, 1H); 5.10(d, J=10.5 Hz, 1H); 5.26(d, J=10.0 Hz, 1H); 從 5.54 至 5.64(m, 2H); 5.70(dd, J=7.0 及 15.5 Hz, 1H); 5.83(t, J=6.0 Hz, 1H); 6.00(d, J=10.5 Hz, 1H); 6.02(d, J=15.5 Hz, 1H); 6.75(d, J=15.5 Hz, 1H); 6.96(dd, J=6.5 及 10.5 Hz, 1H)。

## 實例 6：

(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羥基-3,5,7,9,11,15,17-七甲基-19-((2S,3S)-3-甲基-6-酮基-3,6-二氫-2H-呋喃-2-基)-8-酮基-十九碳-2,10,12,16,18-五烯酸之(2-巰基-2-甲基-丙基)-醯胺



將 217.2 毫克 TCEP (參(2-羧乙基)膦之鹽酸鹽) 加入在接近 20°C 之溫度下在 7.7 毫升四氫呋喃及 3.85 毫升水中的 200 毫克 (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羥基-3,5,7,9,11,15,17-七甲基-19-((2S,3S)-3-甲基-6-酮基-3,6-二氫-2H-呋喃-2-基)-8-酮基-十九碳-2,10,12,16,18-五烯酸

(S)

(39)

之(2-甲基-2-甲基二硫基-丙基)-醯胺之溶液中。在接近 20℃之溫度下 16 小時，將反應混合物以 30 毫升乙酸乙酯稀釋，以 15 毫升水及 15 毫升食鹽水清洗兩次，在硫酸鎂上乾燥，在燒結玻璃上過濾及在接近 40℃之溫度的減壓下濃縮。將如此獲得的黃色油在矽膠上以管柱色層分析法(25 公克 SiO<sub>2</sub>，15-35 微米，溶析梯度為從 1 / 99 至 10 / 90 (以體積計)之甲醇 / 二氯甲烷)純化。將含有所欲產物之餾份在接近 40℃之溫度的減壓下濃縮。獲得成為黃色玻璃狀的 122.6 毫克(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羥基-3,5,7,9,11,15,17-七甲基-19-((2S,3S)-3-甲基-6-酮基-3,6-二氫-2H-嘓喃-2-基)-8-酮基-十九碳-2,10,12,16,18-五烯酸之(2-巰基-2-甲基-丙基)-醯胺，其特徵如下：

質譜：

- ES<sup>+</sup> : m/z=614:[M+H]<sup>+</sup>
- ES<sup>-</sup> : m/z=612:[M-H]<sup>-</sup> ; m/z=658 : [M-H+HCOOH]<sup>-</sup>

在光譜儀 BRUKER AVANCE DRX-500 上獲得在 500MHz 下具有下列化學位移(以 ppm 計之  $\delta$ )之 <sup>1</sup>H NMR 光譜-在作為溶劑的氯仿中-在 303K 之溫度下以 7.27 之 d1 (CDCl<sub>3</sub>-d1) 作為參考值：

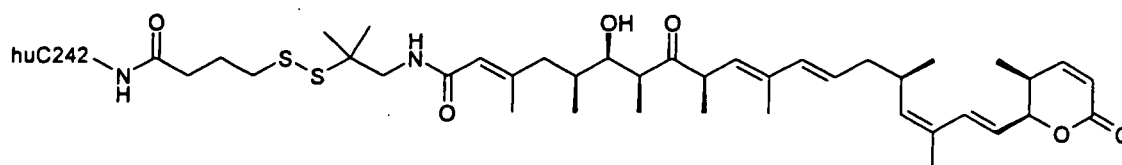
0.80(d, J=6.5Hz, 3H); 0.97(d, J=6.5Hz, 3H); 1.07(d, J=7.5Hz, 3H); 1.13(d, J=6.5Hz, 3H); 1.16(d, J=6.5Hz, 3H); 1.38(s, 6H); 1.72(m, 1H); 1.82(s, 3H); 1.84(s, 3H); 1.85(m 部分遮蔽, 1H); 2.09(m, 2H); 2.11(s, 3H); 2.17(dd, J=6.5 及 13.5Hz, 1H);

(40)

2.54(m, 1H); 2.70(m, 1H); 2.83(m, 1H); 3.38(d, J=6.5Hz, 2H); 從 3.61 至 3.70(m, 2H); 5.01(dd, J=4.0 及 7.0Hz, 1H); 5.09(d, J=10.0Hz, 1H); 5.26(d, J=10.0Hz, 1H); 5.59(dt 部分遮蔽, J=7.5 及 15.5Hz, 1H); 5.63(s, 1H); 5.69(dd, J=7.0 及 15.5Hz, 1H); 6.00(d, J=10.0Hz, 1H); 6.02(d, J=15.5Hz, 1H); 6.04(t 部分遮蔽, J=6.5Hz, 1H); 6.75(d, J=15.5Hz, 1H); 6.97(dd, J=6.0 及 10.0Hz, 1H)。

抗體與細黴素衍生物之共軛物：

抗結腸癌抗體 huC242 與細黴素衍生物之共軛物：



製備人類化抗結腸腫瘤抗體 (huC242) 與實例 6 之化合物的經二硫化物連結之共軛物 (在本文被稱為 huC242-SSNPB-實例 6 之細黴素)。將 huC242 抗體與 6 倍莫耳過量之抗體改良劑 SSNPB (4-(5-硝基-2-吡啶二硫基)丁酸 N-磺基丁二醯亞胺酯) 在 50mM 磷酸鉀緩衝液 (pH6.5, 含有 50mM NaCl、2mM EDTA、5%二甲基乙醯胺) 中的 9 毫克 / 毫升之抗體濃度下於室溫下反應 90 分鐘。將反應混合物以在 50mM 磷酸鉀緩衝液 (pH6.5, 含有 50mM NaCl 及 2mM EDTA) 中平衡的 Sephadex G-25 大小排斥色

(41)

層分析法純化。以加入或不加入  $\beta$ -巯基乙醇來分析改良型抗體樣品，並測定每一抗體具有~6 個併入的硝基吡啶二硫基。將每一連接基團以 2 倍莫耳過量之細黴素-SH 藥物加入在 50mM 磷酸鉀緩衝液（pH6.5，含有 50mM NaCl、2mM EDTA、10%二甲基乙醯胺）中的 2 毫克 / 毫升之改良型抗體樣品中。以分光光度分析（394 奈米）方式追蹤反應，並接著以 HPLC 測量釋放的 5-硝基吡啶-2-硫酮。在室溫下反應約 90 分鐘之後，將混合物以在 50mM 磷酸鉀緩衝液（pH6.5，含有 50mM NaCl 及 2mM EDTA）中的 Sephadex G-25 大小排斥色層分析法純化。在 250 奈米 / 280 奈米下，以共軛物的 0.78 之吸收度比對未改良型抗體的 0.37 之吸收度比證明在共軛物中併入細黴素基團（造成在 250 奈米之吸收度增加）。

去糖化 huC242-細黴素共軛物的質譜分析顯示出對應於每一抗體分子併入 1、2、3 及 4 個細黴素分子的 147492、148212、148936 及 149660 道耳頓的共軛物峰。

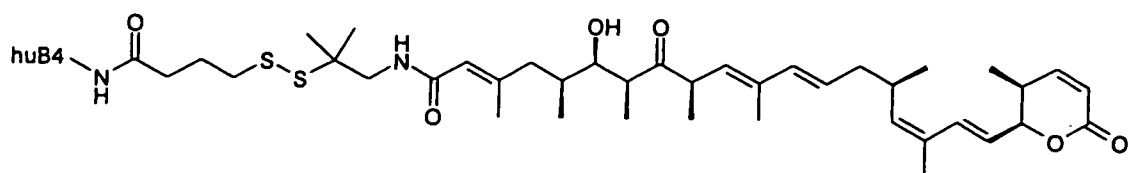
抗-CD19（huB4）抗體與細黴素衍生物之共軛物：

以二硫化物及不可裂解之硫醚連結體製備抗-CD19 抗體（人類化 B4 抗體）與細黴素之共軛物。第一個樣品（-S-S-連結體）係由經由二硫化物連結體 SSNPB（4-(5-硝基-2-吡啶二硫基)丁酸 N-磺基丁二醯亞胺酯）與實例 6 之化合物連結之抗-CD19（huB4）抗體所組成。第二個樣品係由經由順丁烯二醯亞胺連結體 SMCC（4-(順丁烯二醯亞胺甲基)環己烷羧酸 N-丁二醯亞胺酯）與實例 6 之化合物

(42)

連結之 huB4 抗體所組成。

huB4-SSNPB-細黴素共軛物 ( huB4-SSNPB-實例 6 之細黴素 ) :



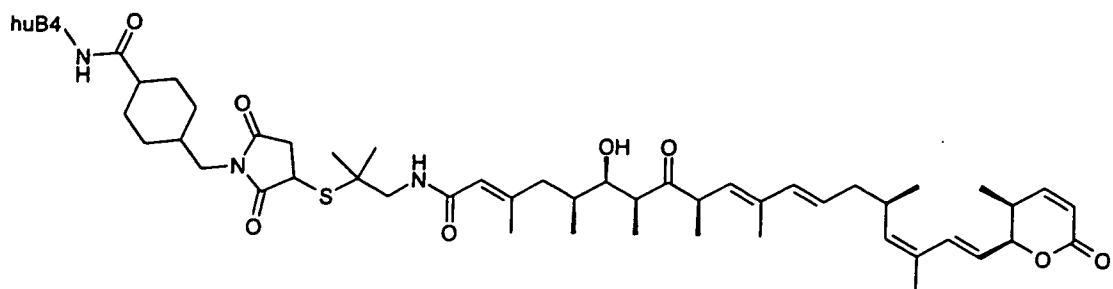
將 4 毫克 huB4 抗體與 7.5 倍莫耳過量之 SSNPB 連結體在 50mM 磷酸鉀緩衝液 ( pH6.5 , 含有 50mM NaCl 、 2mM EDTA 、 5% 二甲基乙醯胺 ) 中的 8 毫克 / 毫升之抗體濃度下於室溫下反應 90 分鐘。將反應混合物以在 50mM 磷酸鉀緩衝液 ( pH6.5 , 含有 50mM NaCl 及 2mM EDTA ) 中的 Sephadex G-25 大小排斥色層分析法純化。以加入或不加入  $\beta$ -巯基乙醇來分析改良型抗體樣品，並測定每一抗體具有 5.3 個併入的硝基吡啶二硫基。將每一連接基團以 3 倍莫耳過量之實例 6 的藥物加入在 50mM 磷酸鉀緩衝液 ( pH6.5 , 含有 50mM NaCl 、 2mM EDTA 、 10% 二甲基乙醯胺 ) 中的 1 毫克 / 毫升之改良型抗體樣品中。以分光光度分析 ( 394 奈米 ) 方式追蹤反應，並接著以 HPLC 測量釋放的 5-硝基吡啶-2-硫酮。在室溫下反應隔夜之後，將混合物以在 10mM 檸檬酸鹽緩衝液 ( pH5.5 , 含有 135mM NaCl ) 中的 Sephadex G-25 大小排斥色層分析法純化。以加入或不加入  $\beta$ -巯基乙醇來分析樣品，並測定每一抗體具有 4.3 個反應之連結體。大小排斥色層分析法 ( SEC )

( S )

(43)

分析顯示 95%單體抗體。

huB4-SMCC-細黴素共軛物：



將 4 毫克 huB4 抗體與 7.5 倍莫耳過量之 SMCC 連結體在 50mM 磷酸鉀緩衝液 ( pH6.5 , 含有 50mM NaCl 、 2mM EDTA 、 5%二甲基乙醯胺 ) 中的 8 毫克 / 毫升之抗體濃度下於室溫下反應 90 分鐘。將反應混合物以在 50mM 磷酸鉀緩衝液 ( pH6.5 , 含有 50mM NaCl 及 2mM EDTA ) 中的 Sephadex G-25 大小排斥色層分析法純化。藉由加入過量硫醇 ( 胱胺 ) 來分析併入樣品中的順丁烯二醯亞胺數量，並測定每一抗體具有 3.3 個連結基團。將每一順丁烯二醯亞胺基團以 3 倍莫耳過量之實例 6 的藥物加入在 50mM 磷酸鉀緩衝液 ( pH6.5 , 含有 50mM NaCl 、 2mM EDTA 、 10%二甲基乙醯胺 ) 中的 1 毫克 / 毫升之改良型抗體樣品中。在室溫下反應隔夜之後，將混合物以在 10mM 檸檬酸鹽緩衝液 ( pH5.5 , 含有 135mM NaCl ) 中的 Sephadex G-25 大小排斥色層分析法純化。SEC 分析顯示 98%單體抗體。

去糖化 huB4-SMCC-細黴素共軛物的質譜分析顯示出

(44)

對應於每一抗體分子併入 1、2 及 3 個細黴素分子的 145138、145860 及 146566 道耳頓的共軛物峰。

生物結果：

以 WST-存活率分析 huB4-SSNPB-實例 6 之細黴素共軛物在 Ramos (CD19 抗原-陽性) 及 HL60 (抗原陰性) 癌細胞上的細胞毒性評估分別顯示  $1.4 \times 10^{-9} \text{M}$  及  $4.2 \times 10^{-9} \text{M}$  之  $\text{IC}_{50}$  值，因此證明細黴素-抗體共軛物之抗原特異性細胞毒性活性。

huC242-SSNPB-實例 6 之細黴素共軛物在 COLO 205 (CanAg 抗原-陽性) 癌細胞及 A375 細胞上的細胞毒性評估分別顯示  $1.3 \times 10^{-10} \text{M}$  及  $> 5.0 \times 10^{-9} \text{M}$  之  $\text{IC}_{50}$  值 (圖 1)。

特定的專利及出版的刊物被本發明述及，將彼等的教導以彼等各自完整的內容分別併入本文以供參考。

雖然本發明被詳細地且參考其特殊的具體實施例加以敘述，但是熟諳本技藝者將明白可以進行各種不違背本發明的精神及範圍的變化及修改。

#### 【圖式簡單說明】

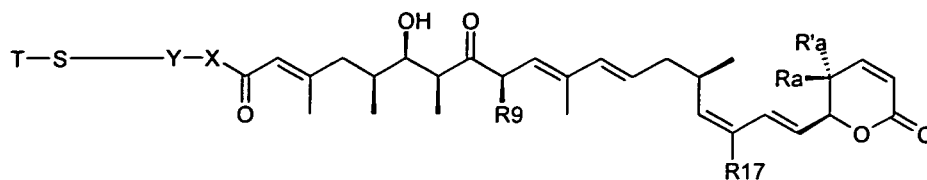
圖 1 顯示實例 6 之共軛物 huC242-SSNPB-細黴素衍生物的試管內細胞毒性及特異性。



p.1-5

## 十、申請專利範圍

1. 一種式 (I) 細黴素 (leptomycin) 衍生物，



(I)

其中：

Ra 及 Ra' 為 H 或直鏈或支鏈 C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> 烷基；

R17 為被 OR、CN、NRR'、全氟烷基取代或未經取代之直鏈或支鏈 C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> 烷基；

R9 為被 OR、CN、NRR'、全氟烷基取代或未經取代之直鏈或支鏈 C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> 烷基；

X 為 -NR-；

Y 為直鏈或支鏈 C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> 烷基；

T 代表 Ac、R<sub>1</sub> 或 SR<sub>1</sub>，其中 R<sub>1</sub> 代表 H、直鏈或支鏈 C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> 烷基、環烷基、芳基或雜環基；

R，R' 相同地或不同地為 H 或直鏈或支鏈 C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> 烷基；

或彼等在醫藥上可接受之鹽類或彼等之光學異構物、外消旋物、非鏡像異構物或鏡像異構物。

2. 根據申請專利範圍第 1 項之細黴素衍生物，其中 Ra 為直鏈或支鏈 C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> 烷基及 Ra' 為 H。

3. 根據申請專利範圍第 1 項之細黴素衍生物，其中 R17 為未經取代之直鏈或支鏈 C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> 烷基。

4. 根據申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之細黴素衍生物，其中 R<sub>9</sub> 為未經取代之直鏈或支鏈 C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> 烷基。

5. 根據申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之細黴素衍生物，其中 T 為 H 或 SR<sub>1</sub>，其中 R<sub>1</sub> 代表直鏈或支鏈 C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> 烷基。

6. 根據申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之細黴素衍生物，其係選自：

(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羥基-3,5,7,9,11,15,17-七甲基-19-((2S,3S)-3-甲基-6-酮基-3,6-二氫-2H-嘓喃-2-基)-8-酮基-十九碳-2,10,12,16,18-五烯酸之(2-甲硫基-乙基)-醯胺，

雙-[(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羥基-3,5,7,9,11,15,17-七甲基-19-((2S,3S)-3-甲基-6-酮基-3,6-二氫-2H-嘓喃-2-基)-8-酮基-十九碳-2,10,12,16,18-五烯酸之(2-巰乙基)-醯胺]，

(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羥基-3,5,7,9,11,15,17-七甲基-19-((2S,3S)-3-甲基-6-酮基-3,6-二氫-2H-嘓喃-2-基)-8-酮基-十九碳-2,10,12,16,18-五烯酸之(2-巰乙基)-醯胺，

(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羥基-3,5,7,9,11,15,17-七甲基-19-((2S,3S)-3-甲基-6-酮基-3,6-二氫-2H-嘓喃-2-基)-8-酮基-十九碳-2,10,12,16,18-五烯酸之(2-甲基二硫基-乙基)-醯胺，

(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羥基-3,5,7,9,11,15,17-

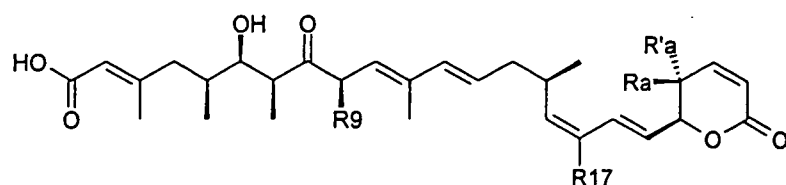
七甲基-19-((2S,3S)-3-甲基-6-酮基-3,6-二氫-2H-嘧喃-2-基)-8-酮基-十九碳-2,10,12,16,18-五烯酸之(2-甲基-2-甲基二硫基-丙基)-醯胺，

(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羥基-3,5,7,9,11,15,17-七甲基-19-((2S,3S)-3-甲基-6-酮基-3,6-二氫-2H-嘧喃-2-基)-8-酮基-十九碳-2,10,12,16,18-五烯酸之(2-巯基-2-甲基-丙基)-醯胺，

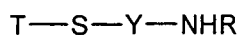
或彼等在醫藥上可接受之鹽類、或彼等之光學異構物、外消旋物、非鏡像異構物或鏡像異構物。

7.一種醫藥組成物，其包含根據申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項之細黴素衍生物及醫藥上可接受之載體。

8.一種製備根據申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項之細黴素衍生物的方法，其包含使對應之式(II)及(III)化合物反應的步驟



(II)



(III)

其中 Ra、Ra'、R17、R9、Y、T 係根據申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項中所定義。

9.一種製備根據申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項之細黴素衍生物的方法，其中在式(I)中，T 為 H，該方法包含使其中 T 為 S-R<sub>1</sub> 的對應之式(I)化合物在二硫化物鍵之

還原劑的存在下反應。

10.一種製備共軛物的方法，其包含使根據申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項之細黴素衍生物與包含對該衍生物的連結基團具反應性之功能的改良型細胞結合劑反應的步驟，使得衍生物與細胞結合劑經由含有該連結基團之連結體連結在一起。

11.根據申請專利範圍第 10 項之方法，其中包含對該衍生物的該連結基團具反應性之功能的該改良型細胞結合劑係藉由該細胞結合劑與選自 4-(順丁烯二醯亞胺甲基)環己烷羧酸 N-丁二醯亞胺酯(SMCC)、4-(5-硝基-2-吡啶二硫基)丁酸 N-磺基丁二醯亞胺酯(SSNPB)、4-(N-順丁烯二醯亞胺甲基)環己烷-1-羧基-(6-醯胺基己酸) N-丁二醯亞胺酯(LC-SMCC)、4-(碘乙醯基)-胺基苯甲酸 N-丁二醯亞胺酯(SIAB)、碘基乙酸 N-丁二醯亞胺酯(SIA)、溴基乙酸 N-丁二醯亞胺酯(SBA)、3-(溴基乙醯胺基)丙酸 N-丁二醯亞胺酯(SBAP)之試劑反應所獲得。

12.一種製備硫醚連結共軛物的方法，其包含使根據申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項所定義之含硫醇的細黴素衍生物與經下列試劑改良的抗體或細胞結合劑反應，該試劑為 4-(5-硝基-2-吡啶二硫基)丁酸 N-磺基丁二醯亞胺酯(SSNPB)、4-(順丁烯二醯亞胺甲基)環己烷羧酸 N-丁二醯亞胺酯(SMCC)、4-(N-順丁烯二醯亞胺甲基)環己烷-1-羧基-(6-醯胺基己酸) N-丁二醯亞胺酯(LC-SMCC)、4-(碘乙醯基)-胺基苯甲酸 N-丁二醯亞胺酯(SIAB)、碘基乙酸

N-丁二醯亞胺酯 (SIA)、溴基乙酸 N-丁二醯亞胺酯 (SBA)、3-(溴基乙醯胺基)丙酸 N-丁二醯亞胺酯 (SBAP)。

13.一種製備共軛物的方法，其包含使根據申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項所定義之含二硫化物或含硫醇的細黴素衍生物與經下列試劑改良的肽或抗體反應，該試劑係選自 4-(2-吡啶二硫基)戊酸 N-丁二醯亞胺酯、4-丁二醯亞胺基-氧羰基- $\alpha$ -甲基- $\alpha$ -(2-吡啶二硫基)-甲苯、3-(2-吡啶二硫基)丁酸 N-丁二醯亞胺酯、吡啶二硫基丙酸丁二醯亞胺酯、4-(2-吡啶二硫基)丁酸 N-羥基丁二醯亞胺酯、4-[N-順丁烯二醯亞胺甲基]環己烷-1-羧酸丁二醯亞胺酯、3-(2-(5-硝基吡啶二硫基)丁酸 N-磺基丁二醯亞胺酯、2-亞胺基四氫噻吩或 S-乙醯基丁二酸酐。

14.一種用於抑制選定之細胞群生長的治療劑，其包含：

(a) 細胞毒性量之一或多種與細胞結合劑連結之根據申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項之細黴素衍生物，及

(b) 醫藥上可接受之載體、稀釋劑或賦形劑。

15.根據申請專利範圍第 14 項之治療劑，係用於治療惡性腫瘤。

16.根據申請專利範圍第 14 項之治療劑，係用於治療肺癌、乳癌、結腸癌、攝護腺癌、腎臟癌、胰臟癌、卵巢癌、淋巴器官癌或黑色素瘤之癌症。

17.一種根據申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項之細黴素衍生物之用途，係用於製造治療癌症之藥物。

852505

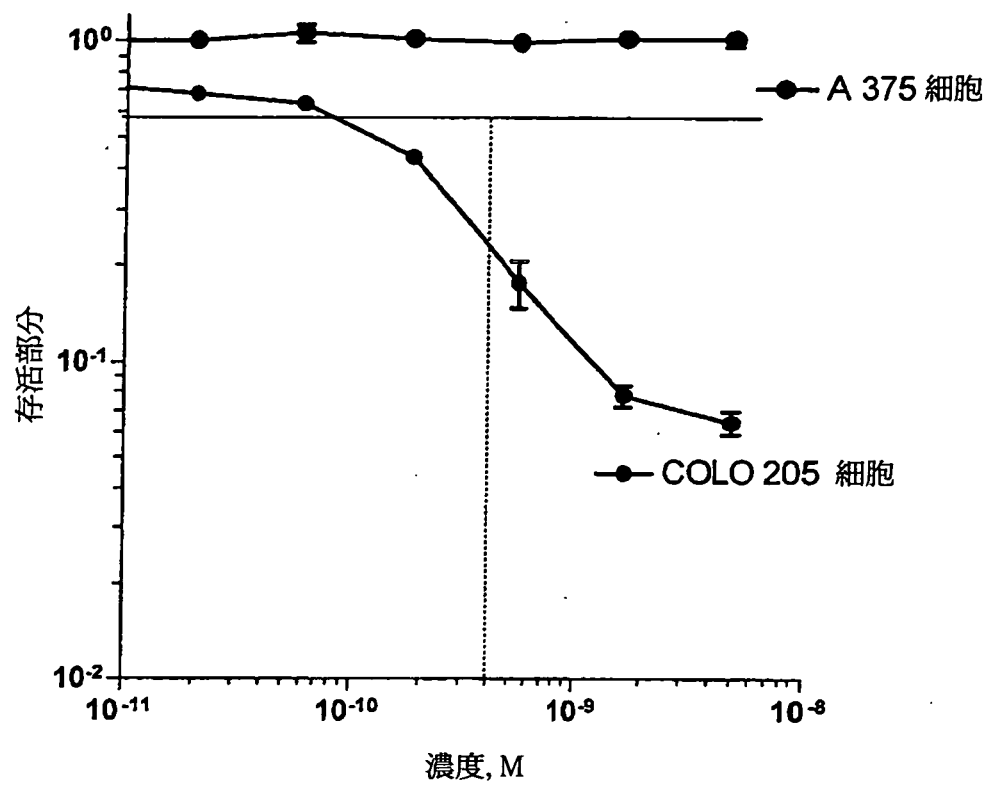


圖 1