



(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 I819474 B

(45)公告日：中華民國 112 (2023) 年 10 月 21 日

(21)申請案號：111102997

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 09 月 02 日

(51)Int. Cl. : C07D487/04 (2006.01)

A61K31/5517(2006.01)

A61K47/00 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2014/09/03 美國

62/045,248

2014/12/03 美國

62/087,040

2015/04/17 美國

62/149,370

2015/05/20 美國

62/164,305

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

美國

(72)發明人：洽里 拉維 V J CHARI, RAVI V. J. (US)；米勒 麥克 路易斯 MILLER,

MICHAEL LOUIS (US)；席斯卡 馬納迷 SHIZUKA, MANAMI (US)

(74)代理人：閻啓泰；林景郁

(56)參考文獻：

TW I697493B

WO 2010/091150A1

WO 2012/112687A1

審查人員：陳世芹

申請專利範圍項數：2 項 圖式數：26 共 269 頁

(54)名稱

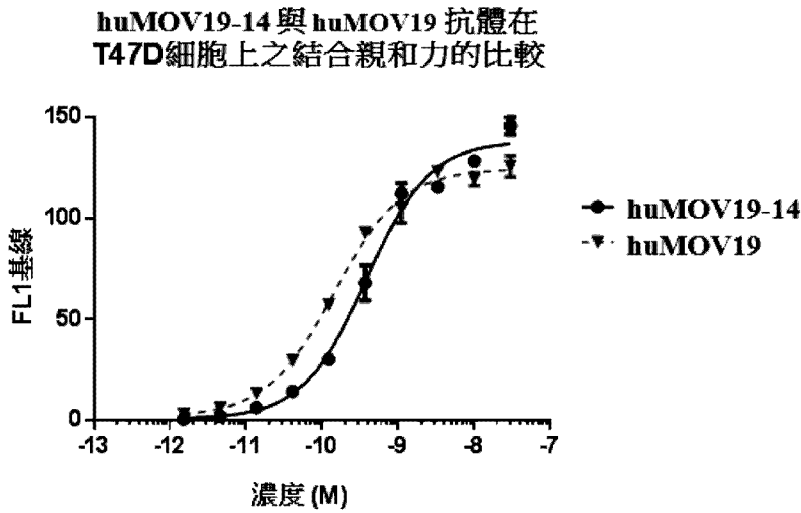
細胞毒性苯并二氮呋衍生物

(57)摘要

本發明係關於具有抗增殖活性之苯并二氮呋衍生物，且更具體言之，係關於具有式(I)-(VI)之新穎苯并二氮呋化合物。本發明亦提供該等苯并二氮呋化合物連接至細胞結合劑之偶聯物。本發明進一步提供可用於在哺乳動物中使用本發明之化合物或偶聯物抑制異常細胞生長或治療增生性病症的組成物及方法。

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

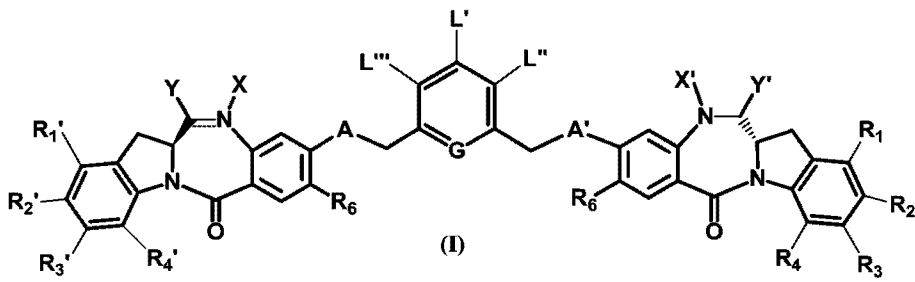
指定代表圖：



	huMOV19-14	huMOV19
EC50	3.793e-010	1.438e-010

圖 1

特徵化學式：





I819474

【發明摘要】

【中文發明名稱】 細胞毒性苯并二氮呋衍生物

【英文發明名稱】 CYTOTOXIC BENZODIAZEPINE DERIVATIVES

【中文】

本發明係關於具有抗增殖活性之苯并二氮呋衍生物，且更具體言之，係關於具有式(I)-(VI)之新穎苯并二氮呋化合物。本發明亦提供該等苯并二氮呋化合物連接至細胞結合劑之偶聯物。本發明進一步提供可用於在哺乳動物中使用本發明之化合物或偶聯物抑制異常細胞生長或治療增生性病徵的組成物及方法。

【英文】

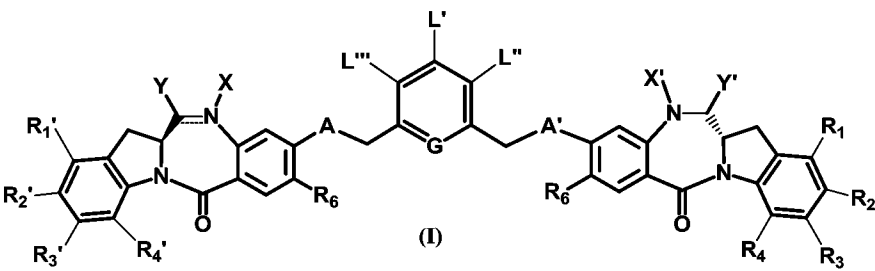
The invention relates to novel benzodiazepine derivatives with antiproliferative activity and more specifically to novel benzodiazepine compounds of formula (I)-(VI). The invention also provides conjugates of the benzodiazepine compounds linked to a cell-binding agent. The invention further provides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

【指定代表圖】 圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】



【發明說明書】

【中文發明名稱】 細胞毒性苯并二氮呋衍生物

【英文發明名稱】 CYTOTOXIC BENZODIAZEPINE DERIVATIVES

【技術領域】

【0001】 本發明係關於新穎細胞毒性化合物及包含該等細胞毒性化合物及細胞結合劑之細胞毒性偶聯物。更具體言之，本發明係關於可用作藥物，特別是用作抗增生劑之新穎苯并二氮呋化合物、其衍生物、其中間物、其偶聯物及其醫藥學上可接受之鹽。

〔相關申請案之引用〕

【0002】 本申請案依據35 U.S.C. §119(e)要求在2014年9月3日提交之美國臨時申請案號62/045,248、2014年12月3日提交之美國臨時申請案號62/087,040、2015年4月17日提交之美國臨時申請案號62/149,370及2015年5月20日提交之美國臨時申請案號62/164,305之提交日之權益，各案之完整內容，包括所有附圖、化學式、說明書及申請專利範圍，均以引用之方式併入本文中。

【先前技術】

【0003】 苯并二氮呋衍生物為適用於治療各種病症之化合物，並且包括諸如抗癲癇藥(咪唑并[2,1-b][1,3,5]苯并硫雜二氮呋，美國專利號4,444,688；美國專利號4,062,852)、抗細菌劑(嘧啶并[1,2-c][1,3,5]苯并硫雜二氮呋，GB 1476684)、利尿劑及降血壓劑(吡咯并(1,2-b)[1,2,5]苯并硫雜二氮呋5,5二氧化物，美國專利號3,506,646)、降血脂藥(WO 03091232)、抗抑鬱劑(美國專利號3,453,266)、骨質疏鬆症(JP 2138272)之藥物。

【0004】 在動物腫瘤模型中已顯示，苯并二氮呋衍生物，例如吡咯并苯并二氮呋(PBD)，充當抗腫瘤劑(N-2-咪唑基烷基取代之1,2,5-苯并硫雜二氮呋-1,1-二氧化物，美國專利號6,156,746)、苯并-吡啶并或二吡啶并硫雜二氮呋(WO 2004/069843)、吡咯并[1,2-b] [1,2,5]苯并硫雜二氮呋及吡咯并[1,2-b][1,2,5]苯并二氮呋衍生物(WO2007/015280)、茅屋黴素衍生物(tomaymycin derivative)(例如，吡咯并[1,4]苯并二氮呋)，諸如WO 00/12508、WO2005/085260、WO2007/085930及EP 2019104中描述之該等苯并二氮呋衍生物。亦已知苯并二氮呋可影響細胞生長及分化(Kamal A.等人, *Bioorg Med Chem.* 2008年8月15日;16(16):7804-10 (及其中引用之參考文獻)；Kumar R, *Mini Rev Med Chem.* 2003年6月; 3(4):323-39 (及其中引用之參考文獻)；Bednarski J J等人, 2004；Sutter A. P等人, 2002；Blatt N B等人, 2002), Kamal A.等人, *Current Med. Chem.*, 2002；2；215-254, Wang J-J., *J. Med. Chem.*, 2206；49:1442-1449, Alley M.C. 等人, *Cancer Res.* 2004；64:6700-6706, Pepper C. J., *Cancer Res* 2004；74:6750-6755, Thurston D.E.及Bose D.S., *Chem Rev* 1994；94:433-465；及Tozuka, Z.等人, *Journal of Antibiotics*, (1983) 36；1699-1708。PBD之一般結構描述於美國公開案號20070072846中。各PBD在取代基之數量、類型及位置；其芳族A環及吡咯并C環；以及C環飽和度方面有所不同。其在小溝中形成加合物及交聯DNA之能力使其能夠干擾DNA加工，由此其有可能用作抗增生劑。

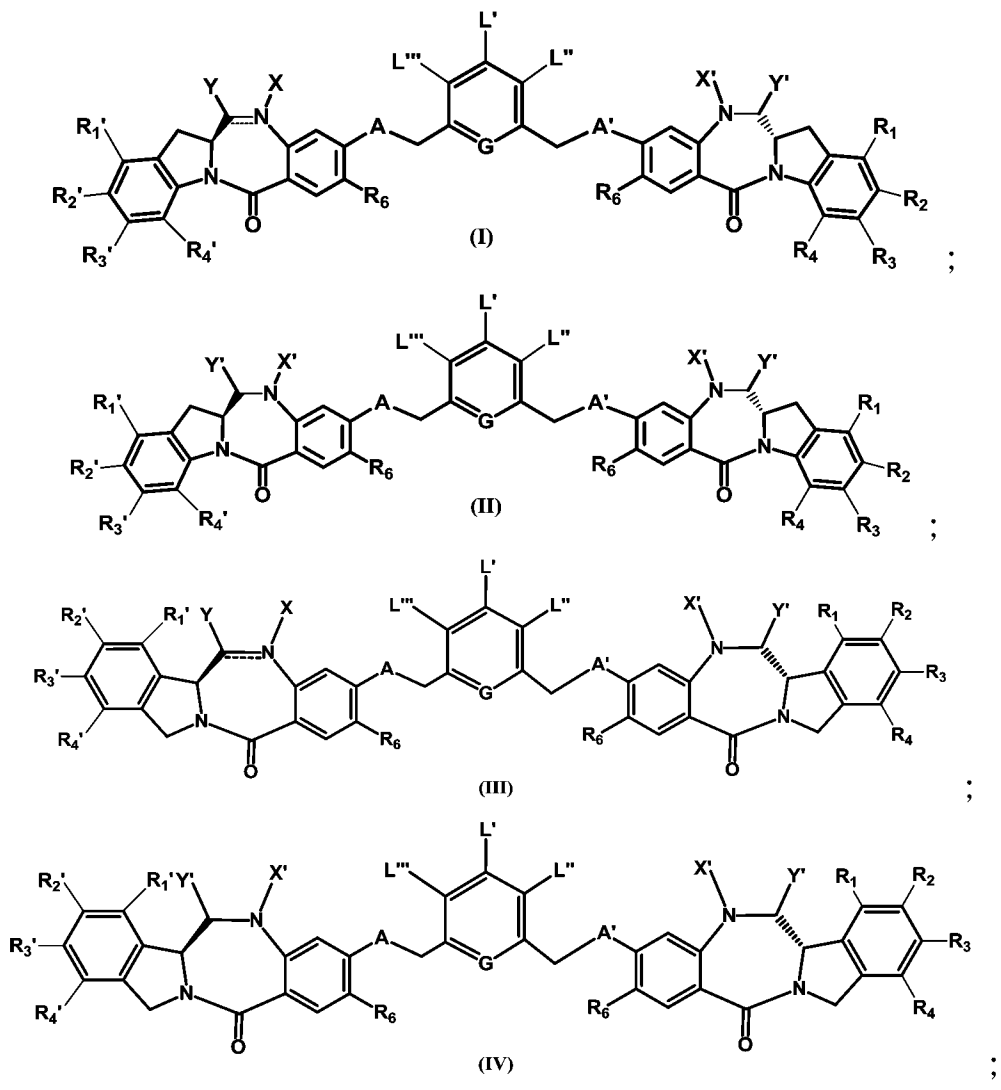
【0005】 最先進入臨床之吡咯并苯并二氮呋SJG-136 (NSC 694501)係引起DNA鏈間交聯之有效細胞毒性劑(S.G Gregson等人, 2001, *J. Med. Chem.*, 44: 737-748；M.C. Alley等人, 2004, *Cancer Res.*, 64: 6700-6706；J.A. Hartley等人, 2004, *Cancer Res.*, 64: 6693-6699；C. Martin等人, 2005, *Biochemistry.*, 44: 4135-4147；S. Arnould等人, 2006, *Mol. Cancer Ther.*, 5: 1602-1509)。由SJG-136之I期臨床評價得到的結果揭露，此藥物在極低劑量(最大耐受劑量為45 $\mu\text{g}/\text{m}^2$)

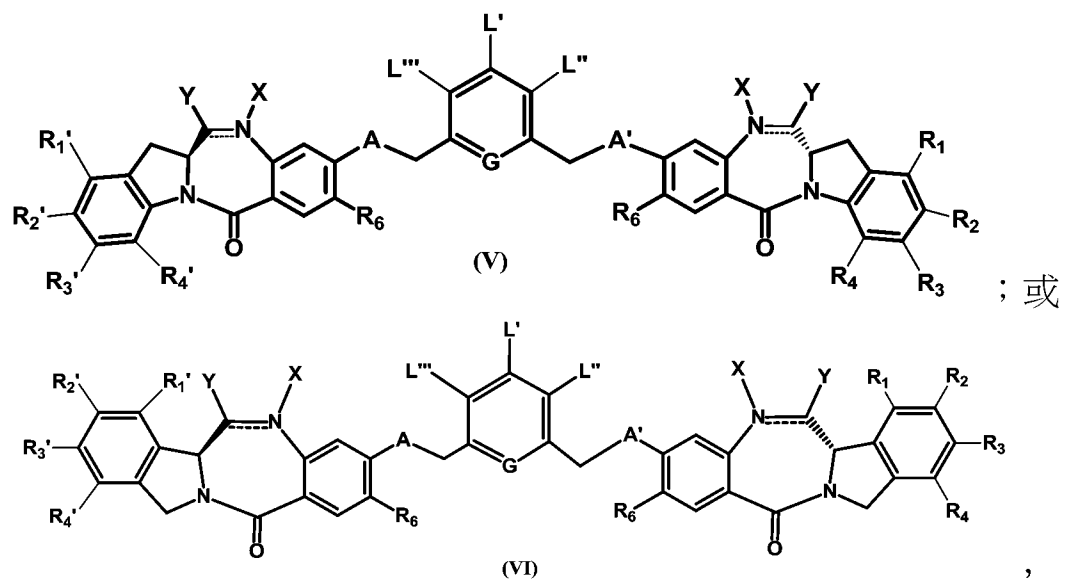
下具有毒性，且觀察到若干不良作用，包括血管滲漏症候群、外周性水腫、肝毒性及疲勞。在所有劑量下，在循環淋巴細胞中觀察到DNA損傷(D. Hochhauser 等人, 2009, *Clin. Cancer Res.*, 15: 2140-2147)。因此，需要毒性較低且仍對於治療諸如癌症之多種增生性疾病具有治療活性的改良之苯并二氮呋衍生物。

【發明內容】

【0006】 本文所描述之新穎苯并二氮呋化合物及其偶聯物針對各種腫瘤細胞具有意外地高效力。

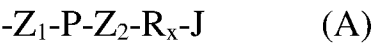
【0007】 本發明一個目的係提供一種由下式中之任一個表示之細胞毒性化合物：





或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

L'、L''及L'''之一係由下式表示：



且其餘兩個相同或不同，且獨立地選自-H；視情況經取代的具有1至10個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；聚乙二醇單元-(CH₂CH₂O)_n-R^c；鹵素；胍鎗[-NH(C=NH)NH₂]；-OR；-NR'R''；-NO₂；-NR'COR''；-SR；-SOR'；-SO₂R'；-SO₃H；-OSO₃H；-SO₂NR'R''；氰基；疊氮基；-COR'；-OCOR'；及-CONR'R''；

Z₁及Z₂之一為-C(=O)-，且另一個為-NR₅-；

P為胺基酸殘基或含有介於2至20個之間之胺基酸殘基的肽；

R_x為視情況經取代的具有1至10個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；

J為包含能夠將該細胞毒性化合物共價連接至細胞結合劑之反應性基團的部分；

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

Y為選自以下之離去基團： $-\text{OR}$ 、 $-\text{OCOR}'$ 、 $-\text{OCOOR}'$ 、 $-\text{OCONR}'\text{R}''$ 、 $-\text{NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{NR}'\text{COR}''$ 、 $-\text{NR}'\text{NR}'\text{R}''$ 、視情況經取代之5員或6員含氮雜環(例如，經由氮原子附接之吡啶、四氫吡咯、吡唑、嗎啉等)、由 $-\text{NR}'(\text{C}=\text{NH})\text{NR}'\text{R}''$ 表示之胍鎘、胺基酸殘基或由 $-\text{NRCOP}'$ 表示之肽、 $-\text{SR}$ 、 $-\text{SOR}'$ 、鹵素、氰基、疊氮基、 $-\text{OSO}_3\text{H}$ 、亞硫酸酯基($-\text{SO}_3\text{H}$ 或 $-\text{SO}_2\text{H}$)、偏亞硫酸氫酯($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_5$)、單-、二-、三-及四-硫代磷酸酯(PO_3SH_3 、 $\text{PO}_2\text{S}_2\text{H}_2$ 、 POS_3H_2 、 PS_4H_2)、硫代磷酸酯(R^iO) $_2\text{PS}(\text{OR}^i)$ 、 $\text{R}^i\text{S}-$ 、 R^iSO 、 R^iSO_2 、 R^iSO_3 、硫代硫酸酯(HS_2O_3)、連二亞硫酸酯(HS_2O_4)、二硫代磷酸酯($\text{P}(=\text{S})(\text{OR}^k)(\text{S})(\text{OH})$)、羧肟酸($\text{R}^k\text{C}(=\text{O})\text{NOH}$)及甲醛次硫酸根($\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$)，或其混合物，其中 R^i 為具有1至10個碳原子之直鏈或分支鏈烷基，且經至少一個選自 $-\text{N}(\text{R}^j)_2$ 、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 及 $-\text{PO}_3\text{H}$ 之取代基取代； R^i 可進一步視情況經本文關於烷基所描述之取代基取代； R^j 為具有1至6個碳原子之直鏈或分支鏈烷基； R^k 為具有1至10個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；芳基；雜環基；或雜芳基；

P' 為胺基酸殘基或含有介於2至20個之間之胺基酸殘基的多肽；

R 在每次出現時獨立地選自由以下各物組成之群： $-\text{H}$ ；視情況經取代的具有1至10個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；聚乙二醇單元 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$ ；視情況經取代的具有6至18個碳原子之芳基；視情況經取代的含有一個或多個獨立地選自氮、氧及硫之雜原子的5員至18員雜芳基；或視情況經取代的含有1至6個獨立地選自O、S、N及P之雜原子的3員至18員雜環；

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

R^c 為 $-\text{H}$ ，或視情況經取代的具有1至4個碳原子之直鏈或分支鏈烷基；

n為1至24之整數；

X'係選自-H；胺保護基；視情況經取代的具有1至10個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；聚乙二醇單元-(CH₂CH₂O)_n-R^c；視情況經取代的具有6至18個碳原子之芳基；視情況經取代的含有一個或多個獨立地選自氮、氧及硫之雜原子的5員至18員雜芳基環；及視情況經取代的含有1至6個獨立地選自O、S、N及P之雜原子的3員至18員雜環；

Y'係選自-H；側氧基；視情況經取代的具有1至10個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；視情況經取代之6員至18員芳基；視情況經取代的含有一個或多個獨立地選自氮、氧及硫之雜原子的5員至18員雜芳基環；視情況經取代的含有1至6個雜原子之3員至18員雜環；

R₁、R₂、R₃、R₄、R₁'、R₂'、R₃'及R₄'各自獨立地選自由以下各物組成之群：
-H；視情況經取代的具有1至10個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；聚乙二醇單元-(CH₂CH₂O)_n-R^c；鹵素；胍鎗[-NH(C=NH)NH₂]；-OR；-NR'R''；-NO₂；-NCO；-NR'COR''；-SR；-SOR'；-SO₂R'；-SO₃H；-OSO₃H；-SO₂NR'R''；氰基；疊氮基；-COR'；-OCOR'；及-OCONR'R''；

R₆為-H、-R、-OR、-SR、-NR'R''、-NO₂或鹵素；

G為-CH-或-N-；

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

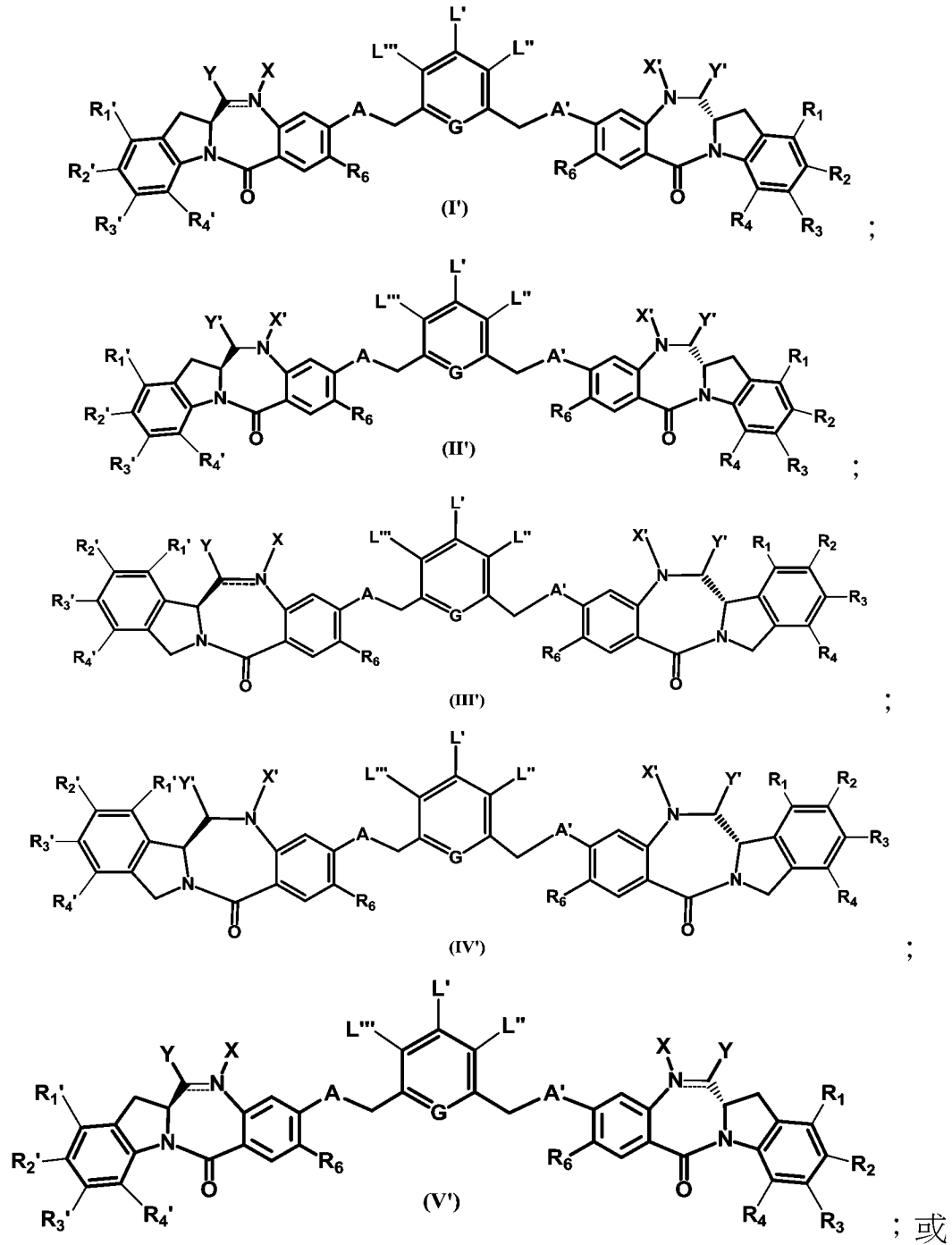
R₅在每次出現時獨立地為-H，或視情況經取代的具有1至10個碳原子之直鏈或分支鏈烷基。

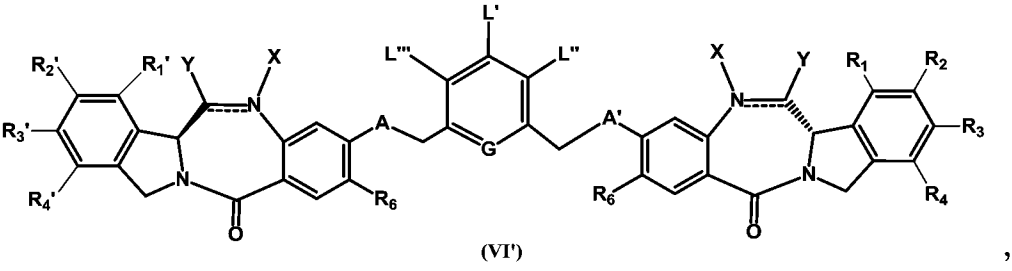
【0008】 在一個實施例中，對於具有結構式(I)-(VI)之化合物，G為-CH-。

【0009】 本發明另一目的係提供細胞結合劑與本發明之新穎苯并二氮呋喃化合物或其衍生物的偶聯物。該等偶聯物可用作治療劑，其特異性遞送至靶細

胞且具有細胞毒性。

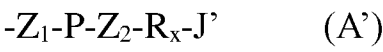
【0010】 詳言之，本發明之偶聯物可包含：細胞毒性化合物與細胞結合劑 (CBA)，其中該細胞毒性化合物共價連接至該CBA，且其中該細胞毒性化合物係由下式中之任一個表示：





或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

L'、L''及L'''之一係由下式表示：



且其餘兩個相同或不同，且獨立地選自-H；視情況經取代的具有1至10個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；聚乙二醇單元-(CH₂CH₂O)_n-R^c；鹵素；胍鎗[-NH(C=NH)NH₂]；-OR；-NR'R''；-NO₂；-NR'COR''；-SR；由-SOR'表示之亞磺；由-SO₂R'表示之磺；磺酸酯基-SO₃M；硫酸酯基-OSO₃M；由-SO₂NR'R''表示之磺醯胺；氰基；疊氨基；-COR'；-OCOR'；及-OCONR'R''；

J'為包含共價連接至該細胞結合劑之連接基團的部分；且

其餘變數係如以上關於式(I)-(VI)所描述。

【0011】 在一個實施例中，對於具有結構式(I')-(VI')之偶聯物，G為-CH-。

【0012】 在另一實施例中，對於具有結構式(I')-(VI')之偶聯物，該細胞結合劑為抗葉酸受體抗體或其抗體片段。更具體言之，該抗葉酸受體抗體為huMOV19抗體。

【0013】 在又另一實施例中，對於具有結構式(I')-(VI')之偶聯物，該細胞結合劑為抗EGFR抗體或其抗體片段。在一個實施例中，該抗EGFR抗體為非拮抗劑抗體，包括例如WO2012058592(以引用之方式併入本文中)中所描述之抗體。在另一實施例中，抗EGFR抗體為非功能性抗體，例如人類化ML66。更具體言之，抗EGFR抗體為huML66。

【0014】 本發明亦包括一種組成物(例如醫藥組成物)，其包含新穎苯并二氮吡化合物、其衍生物或其偶聯物(及/或其溶劑化物、水合物及/或鹽)及載劑(醫

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

【0015】 本發明包括一種在哺乳動物(例如人類)中抑制異常細胞生長或治療增生性病徵之方法，該方法包括向該哺乳動物施用單獨或與第二治療劑組合的治療有效量之新穎苯并二氮呋化合物、其衍生物或其偶聯物(及/或其溶劑化物、水合物及/或鹽)或其組成物。

【0016】 本發明包括一種合成及使用新穎苯并二氮呋化合物、其衍生物及其偶聯物以在活體外、原位及活體內診斷或治療哺乳動物細胞、生物體或相關病理病狀的方法。

【0017】 本發明之化合物、其衍生物或其偶聯物及包含其之組成物可用於治療或減輕諸如以細胞異常生長為特徵之病症(例如癌症)之嚴重程度。本發明之化合物及組成物的其他應用包括但不限於，治療哺乳動物(例如人類)之病狀，諸如癌症、類風濕性關節炎、多發性硬化、移植物抗宿主疾病(GVHD)、移植排斥反應、狼瘡、肌炎、感染、免疫缺陷(諸如AIDS)及發炎性疾病。

【圖式簡單說明】

【0018】 [圖1]顯示了huMOV19-14偶聯物與未偶聯之抗體huMOV19在T47D細胞上之結合親和力的比較。

【0019】 [圖2]顯示了huMOV19-14偶聯物之活體外細胞毒性及特異性。

【0020】 [圖3]顯示，**huMOV19-14**偶聯物對相鄰抗原陰性細胞展現出較弱的旁觀者細胞毒性效應。

【0021】 [圖4]4A、4B及4C顯示了**huMy9-6-14**偶聯物針對各種細胞株之活體外細胞毒性。

【0022】 [圖5]5A及5B顯示，**huMy9-6-14**偶聯物對相鄰抗原陰性細胞展現出旁觀者細胞毒性效應。

【0023】 [圖6]顯示了**huMOV19-80**及**huMOV19-90**偶聯物在帶有NCI-H2110之SCID小鼠中之活體內功效。

【0024】 [圖7]7A-7D顯示了本發明之代表性偶聯物之質譜曲線。

【0025】 [圖8]顯示了**huML66-90**偶聯物之質譜曲線。

【0026】 [圖9]顯示了**huML66-90**偶聯物之活體外細胞毒性及特異性。

【0027】 [圖10、11及12]顯示了**huMOV19-90**偶聯物之活體外細胞毒性及特異性。

【0028】 [圖13]顯示，**huMOV19-90**偶聯物對相鄰抗原陰性細胞展現出較強的旁觀者細胞毒性效應。

【0029】 [圖14]顯示了**huMOV19-90**偶聯物在帶有NCI-H2110之SCID小鼠中之活體內功效。

【0030】 [圖15]15A及15B顯示了**huMOV19-90**偶聯物與未偶聯之抗體**huMOV19**在T47D細胞上之結合親和力的比較。

【0031】 [圖16]顯示了本發明之代表性偶聯物之質譜曲線。

【0032】 [圖17]顯示了**huML66-90**偶聯物在帶有NCI-H1703 NSCLC之SCID小鼠中之活體內功效。

【0033】 [圖18]顯示了**huMOV19-90**在CD-1小鼠中之藥物動力學。

【0034】 [圖19]19A及19B顯示了**huMOV19-90**偶聯物之結構(圖19A)，以

及由在KB子宮頸癌細胞中活體外形成的**huMOV19-90**偶聯物得到的分解代謝物之孵育、純化及分離方案(圖19B)。顯示了由LC-MS鑒別之三種分解代謝物以及質量計算值。

【0035】 [圖20]顯示了**huMOV19-107**偶聯物與未偶聯之抗體**huMOV19**在T47D細胞上之結合親和力的比較。

【0036】 [圖21]顯示了**huMOV19-90**偶聯物及**huMOV19-107**偶聯物之活體外細胞毒性及特異性。

【0037】 [圖22]顯示了**huMOV19-90**偶聯物在帶有NCI-H2110 NSCLC異種移植物之SCID小鼠中之活體內功效。

【0038】 [圖23]顯示了**huMOV19-90**偶聯物在帶有Hec-1b子宮內膜異種移植物之SCID小鼠中之活體內功效。

【0039】 [圖24]顯示了**huMOV19-90**偶聯物在帶有Ishikawa子宮內膜異種移植物之SCID小鼠中之活體內功效。

【0040】 [圖25]顯示了**huMOV19-107**偶聯物在帶有NCI-H2110 NSCLC異種移植物之SCID小鼠中之活體內功效。

【0041】 [圖26]顯示了**huCD123-6Gv4.7S3-90**偶聯物與未偶聯之抗體在HNT-34細胞上之結合親和力的比較。

【實施方式】

【0042】 現將更詳細地提及本發明某些實施例，其實例以所附結構及化學式說明。儘管本發明將結合所列舉之實施例進行描述，但應瞭解，其不意欲將本發明局限於該等實施例。正相反，本發明意欲涵蓋可包括在由申請專利範圍所界定之本發明之範圍內的所有替代方案、修改及等效內容。熟習此項技術者將認識到與本文所描述之方法及材料類似或等效的許多方法及材料，其可用於

實踐本發明。

【0043】 應瞭解，除非清楚地否定或不恰當，否則本文所描述之任何實施例，包括在本發明不同態樣及本說明書不同部分(包括僅在實例中描述之實施例)下描述之該等實施例(例如化合物、化合物-連接子分子、偶聯物、組成物、製備及使用方法)可與本發明之一個或多個其他實施例組合。實施例組合不限於經由多個附屬申請專利範圍要求之該等具體實施例。

定義

【0044】 如本文所使用，術語「**細胞結合劑**」或「**CBA**」係指可結合細胞(例如，在細胞表面配體上)或結合與細胞相連或鄰近細胞之配體(較佳以一種特異性方式結合)之化合物。在某些實施例中，與細胞或者細胞上或細胞附近之配體結合係特異性的。**CBA**可包括肽及非肽。

【0045】 如本文所使用，「**直鏈或分支鏈烷基**」係指具有一至二十個碳原子之飽和直鏈或分支鏈單價烴基。烷基之實例包括但不限於，甲基、乙基、1-丙基、2-丙基、1-丁基、2-甲基-1-丙基、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、2-丁基、2-甲基-2-丙基、1-戊基、2-戊基、3-戊基、2-甲基-2-丁基、3-甲基-2-丁基、3-甲基-1-丁基、2-甲基-1-丁基、1-己基、2-己基、3-己基、2-甲基-2-戊基、3-甲基-2-戊基、4-甲基-2-戊基、3-甲基-3-戊基、2-甲基-3-戊基、2,3-二甲基-2-丁基、3,3-二甲基-2-丁基、1-庚基、1-辛基及類似基團。較佳地，烷基具有一至十個碳原子。更佳地，烷基具有一至四個碳原子。

【0046】 「**直鏈或分支鏈烯基**」係指具有兩個至二十個碳原子及至少一個不飽和位點(亦即，碳-碳雙鍵)之直鏈或分支鏈單價烴基，其中烯基包括具有「順式」及「反式」取向，或替代地具有「**E**」及「**Z**」取向之基團。實例包括但不限於，乙烯基($-\text{CH}=\text{CH}_2$)、丙烯基($-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$)及類似基團。較佳地，烯基具有兩個至十個碳原子。更佳地，烯基具有兩個至四個碳原子。

【0047】 「**直鏈或分支鏈炔基**」係指具有兩個至二十個碳原子及至少一個不飽和位點(亦即，碳-碳參鍵)之直鏈或分支鏈單價烴基。實例包括但不限於，乙炔基、丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、1-戊炔基、2-戊炔基、3-戊炔基、己炔基及類似基團。較佳地，炔基具有兩個至十個碳原子。更佳地，炔基具有兩個至四個碳原子。

【0048】 術語「**碳環**」、「**碳環基**」及「**碳環狀環**」係指具有3至12個碳原子(單環形式)或具有7至12個碳原子(雙環形式)的單價非芳族飽和或部分不飽和環。具有7至12個碳原子之雙環碳環可例如按雙環[4,5]、[5,5]、[5,6]或[6,6]系統形式佈置，且具有9或10個環原子之雙環碳環可按雙環[5,6]或[6,6]系統形式佈置，或按橋接系統形式佈置，諸如雙環[2.2.1]庚烷、雙環[2.2.2]辛烷及雙環[3.2.2]壬烷。單環碳環之實例包括但不限於，環丙基、環丁基、環戊基、1-環戊-1-烯基、1-環戊-2-烯基、1-環戊-3-烯基、環己基、1-環己-1-烯基、1-環己-2-烯基、1-環己-3-烯基、環己二烯基、環庚基、環辛基、環壬基、環癸基、環十一烷基、環十二烷基及類似基團。

【0049】 術語「**環狀烷基**」及「**環烷基**」可互換使用。該等術語係指單價飽和碳環基團。較佳地，環狀烷基為3員至7員單環基團。更佳地，環狀烷基為環己基。

【0050】 術語「**環狀烯基**」係指在環結構中具有至少一個雙鍵之碳環基團。

【0051】 術語「**環狀炔基**」係指在環結構中具有至少一個參鍵之碳環基團。

【0052】 「**芳基**」意思指藉由自母體芳族環系統之單一碳原子移除一個氫原子得到的具有6至18個碳原子之單價芳族烴基。一些芳基在示例性結構中以「Ar」表示。芳基包括含與飽和、部分不飽和環或芳族碳環或雜環稠合之芳族環的雙環基團。典型的芳基包括但不限於，衍生自苯(苯基)、經取代苯、萘、蒽、茚基、二氫茚基、1,2-二氫萘、1,2,3,4-四氫萘基及類似基團之基團。較佳地，芳

基為苯基。

【0053】術語「**雜環**」、「**雜環基**」及「**雜環狀環**」在本文中可互換使用，且指至少一個環原子為選自氮、氧、磷及硫之雜原子且其餘環原子為C的具有3至18個環原子之飽和或部分不飽和(亦即，在環內具有一個或多個雙鍵及/或參鍵)碳環基團，其中一個或多個環原子視情況獨立地經一個或多個以下描述之取代基取代。雜環可為具有3至7個環成員(2至6個碳原子及1至4個選自N、O、P及S之雜原子)之單環，或具有7至10個環成員(4至9個碳原子及1至6個選自N、O、P及S之雜原子)之雙環，例如：雙環[4,5]、[5,5]、[5,6]或[6,6]系統。雜環描述於Paquette, Leo A.; 「Principles of Modern Heterocyclic Chemistry」(W. A. Benjamin, New York, 1968)，具體言之，第1、3、4、6、7及9章；「The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs」(John Wiley & Sons, New York, 1950至今)，具體言之，第13、14、16、19及28卷；及J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566中。「**雜環基**」亦包括雜環基團與飽和、部分不飽和環或芳族碳環或雜環稠合的基團。雜環之實例包括但不限於，吡咯啉基、四氫呋喃基、二氫呋喃基、四氫噻吩基、四氫吡喃基、二氫吡喃基、四氫硫代吡喃基、N-吡啶基(piperidino)、N-嗎啉基(morpholino)、硫代嗎啉基、氧硫雜環己基、哌嗪基、高哌嗪基、吡啶基、氧雜環丁基、硫雜環丁基、高哌啶基、氧雜環庚基、硫雜環庚基、氧氮呋基、二氮呋基、硫氮呋基(thiazepinyl)、2-吡咯啉基、3-吡咯啉基、吡啶基、2H-吡喃基、4H-吡喃基、二噁烷基、1,3-二氧雜環戊基、吡啶基、二硫雜環己基、二硫雜環戊烯基、二氫吡喃基、二氫噻吩基、二氫呋喃基、吡啶基、咪啶基、咪啶基、3-氮雜雙環[3.1.0]己基、3-氮雜雙環[4.1.0]庚基及氮雜雙環[2.2.2]己基。在此定義之範圍內亦包括螺部分。環原子經側氧基(=O)部分取代之雜環基團的實例有嘧啶酮基及1,1-二側氧基-硫嗎啉基。

【0054】術語「**雜芳基**」係指含有一個或多個獨立地選自氮、氧及硫之雜

原子的具有5員或6員環之單價芳族基團，且包括具有5-18個原子之稠環系統(其中至少一個為芳族環)。雜芳基之實例為吡啶基(包括例如，2-羥基吡啶基)、咪唑基、咪唑并吡啶基、嘧啶基(包括例如，4-羥基嘧啶基)、吡唑基、三唑基、吡嗪基、四唑基、呋喃基、噻吩基、異噁唑基、噻唑基、噁唑基、異噻唑基、吡咯基、喹啉基、異喹啉基、吲哚基、苯并咪唑基、苯并呋喃基、噌啉基、吲唑基、吲哚嗪基、吡嗪基、噻嗪基、三嗪基、異吲哚基、喋啶基、嘌呤基、噁二唑基、三唑基、噻二唑基、呋咕基、苯并呋咕基、苯并噻吩基、苯并噻唑基、苯并噁唑基、喹唑啉基、喹啉基、蔡啶基及呋喃并吡啶基。

【0055】 若可能，雜環或雜芳基可為碳附接的(碳連接的)或氮附接的(氮連接的)。舉例而言且非限制，碳鍵結之雜環或雜芳基係在吡啶之2、3、4、5或6位鍵結，在噻嗪之3、4、5或6位鍵結，在嘧啶之2、4、5或6位鍵結，在吡嗪之2、3、5或6位鍵結，在呋喃、四氫呋喃、硫代呋喃、噻吩、吡咯或四氫吡咯之2、3、4或5位鍵結，在噁唑、咪唑或噻唑之2、4或5位鍵結，在異噁唑、吡唑或異噻唑之3、4或5位鍵結，在氮丙啶之2或3位鍵結，在吡丁啶之2、3或4位鍵結，在喹啉之2、3、4、5、6、7或8位鍵結，或在異喹啉之1、3、4、5、6、7或8位鍵結。

【0056】 舉例而言且非限制，氮鍵結之雜環或雜芳基係在氮丙啶、吡丁啶、吡咯、吡咯啶、2-吡咯啉、3-吡咯啉、咪唑、咪唑啶、2-咪唑啉、3-咪唑啉、吡唑、吡唑啉、2-吡唑啉、3-吡唑啉、哌啶、哌嗪、吲哚、吲哚啉、1H-吲哚之1位；異吲哚或異吲哚啉之2位；嗎啉之4位；及呋唑或O-呋啉之9位處鍵結。

【0057】 雜芳基或雜環基中存在之雜原子包括氧化形式，諸如NO、SO及SO₂。

【0058】 術語「**鹵基**」或「**鹵素**」係指F、Cl、Br或I。

【0059】 上述烷基、烯基、炔基、環狀烷基、環狀烯基、環狀炔基、碳環基、芳基、雜環基及雜芳基可視情況經超過一個(例如2、3、4、5、6或更多個)

取代基取代。

【0060】 若取代基被描述為「**經取代**」，則非氫取代基係在該取代基之碳、氧、硫或氮上氫取代基之位置。因此，例如，經取代之烷基取代基係至少一個非氫取代基處於烷基取代基上氫取代基之位置的烷基取代基。為了說明，單氟烷基係經氟取代基取代之烷基，且二氟烷基係經兩個氟取代基取代之烷基。應認識到，若一個取代基上存在超過一個取代，則每一非氫取代基可相同或不同(除非另作陳述)。

【0061】 若一個取代基被描述為「**視情況經取代**」，則該取代基可為(1)未經取代，或(2)經取代的。若取代基之碳被描述為視情況經取代基清單中之一個或多個取代，則該碳上之一個或多個氫(其範圍為存在之任何數量)可獨立地及/或一起經獨立選擇的視情況存在之取代基置換。若取代基之氮被描述為視情況經取代基清單中之一個或多個取代，則該氮上之一個或多個氫(其範圍為存在之任何數量)可各自經獨立選擇的視情況存在之取代基置換。一個示例性取代基可以-NR'R''描繪，其中R'及R''連同其所附接之氮原子一起可形成雜環。由R'及R''連同其所附接之氮原子一起形成之雜環可為部分或完全飽和的。在一個實施例中，雜環由3至7個原子組成。在另一個實施例中，該雜環係選自由吡咯基、咪唑基、吡唑基、三唑基、四唑基、異噁唑基、吡啶基及噻唑基組成之群。

【0062】 本說明書使用了可互換之術語「**取代基**」、「**基團(radical)**」及「**基團(group)**」。

【0063】 若一組取代基共同地描述為視情況經取代基清單中之一個或多個取代，則該組可包括：(1)不可取代之取代基；(2)未經視情況存在之取代基取代的可取代之取代基；及/或(3)經一個或多個視情況存在之取代基取代的可取代之取代基。

【0064】 若一個取代基被描述為視情況經特定數量之非氫取代基取代，則

該取代基可(1)未經取代；或(2)經至多該特定數量之非氫取代基或經至多該取代基上最大數量之可取代位置取代，以數量較小的為準。因此，例如，若一個取代基被描述為視情況經至多3個非氫取代基取代之雜芳基，則具有少於3個可取代位置之任何雜芳基將視情況經至多僅該雜芳基所具有之可取代位置之數量的非氫取代基取代。在非限制性實例中，此類取代基可選自具有1至10個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；芳基；雜芳基；雜環基；鹵素；胍鎗 $[-NH(C=NH)NH_2]$ ； $-OR^{100}$ ； $NR^{101}R^{102}$ ； $-NO_2$ ； $-NR^{101}COR^{102}$ ； $-SR^{100}$ ；以 $-SOR^{101}$ 表示之亞磺；以 $-SO_2R^{101}$ 表示之磺；磺酸酯基 $-SO_3M$ ；硫酸酯基 $-OSO_3M$ ；以 $-SO_2NR^{101}R^{102}$ 表示之磺醯胺；氰基；疊氮基； $-COR^{101}$ ； $-OCOR^{101}$ ； $-OCONR^{101}R^{102}$ ；及聚乙二醇單元 $(-CH_2CH_2O)_nR^{101}$ ，其中M為H或陽離子(諸如 Na^+ 或 K^+)， R^{101} 、 R^{102} 及 R^{103} 各自獨立地選自H；具有1至10個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；聚乙二醇單元 $(-CH_2CH_2O)_n-R^{104}$ ，其中n係1至24之整數；具有6至10個碳原子之芳基；具有3至10個碳原子之雜環，及具有5至10個碳原子之雜芳基，且 R^{104} 為H，或具有1至4個碳原子之直鏈或分支鏈烷基，其中以 R^{100} 、 R^{101} 、 R^{102} 、 R^{103} 及 R^{104} 表示之基團中的烷基、烯基、炔基、芳基、雜芳基及雜環基視情況經一個或多個(例如2、3、4、5、6或更多個)獨立地選自以下之取代基取代：鹵素、 $-OH$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ ，及具有1至4個碳原子之未經取代之直鏈或分支鏈烷基。較佳地，上述視情況經取代之烷基、烯基、炔基、環狀烷基、環狀烯基、環狀炔基、碳環基、芳基、雜環基及雜芳基的取代基包括鹵素、 $-CN$ 、 $-NR^{102}R^{103}$ 、 $-CF_3$ 、 $-OR^{101}$ 、芳基、雜芳基、雜環基、 $-SR^{101}$ 、 $-SOR^{101}$ 、 $-SO_2R^{101}$ 及 $-SO_3M$ 。

【0065】 術語「化合物」或「細胞毒性化合物」、「細胞毒性二聚體」及「細胞毒性二聚體化合物」可互換使用。其意欲包括結構或化學式或其任何衍生物已在本發明中揭示，或結構或化學式或其任何衍生物已以引用之方式併入的化合物。該術語亦包括本發明中所揭示之所有化學式之化合物的立體異構體、幾

何異構體、互變異構體、溶劑化物、代謝物、鹽(例如醫藥學上可接受之鹽)及前藥，以及前藥鹽。該術語亦包括前述任一種之任何溶劑化物、水合物及多晶形物。在本申請案中所描述的本發明之某些態樣中，有關「立體異構體」、「幾何異構體」、「互變異構體」、「溶劑化物」、「代謝物」、「鹽」、「前藥」、「前藥鹽」、「偶聯物」、「偶聯物鹽」、「溶劑化物」、「水合物」或「多晶形物」之具體陳述不應解釋為意圖在未使用該等其他形式陳述術語「化合物」的本發明之其他態樣中省略該等形式。

【0066】 如本文所使用，術語「**偶聯物**」係指連接至細胞結合劑的本文所描述之化合物或其衍生物。

【0067】 如本文所使用，術語「**可連接至細胞結合劑**」係指包含至少一個適於將化合物或其衍生物鍵結至細胞結合劑之連接基團或其前驅物的本文所描述之化合物或其衍生物。

【0068】 術語給定基團之「**前驅物**」係指可藉由任何脫保護、化學改質或偶合反應而產生該基團的任何基團。

【0069】 術語「**連接至細胞結合劑**」係指包含經由適合連接基團或其前驅物結合至細胞結合劑的本文所描述之化合物(例如式(I)-(IV)及(VIII)-(XI)之化合物及本文所描述之藥物-連接子化合物)或其衍生物中至少一種的偶聯物分子。

【0070】 術語「**手性**」係指具有鏡像搭配物不可重疊性之特性的分子，而術語「**非手性**」係指在其鏡像搭配物可重疊上之分子。

【0071】 術語「**立體異構體**」係指具有相同化學構造及連接性，但其原子在空間中之取向不同且無法藉由關於單鍵旋轉而互變的化合物。

【0072】 「**非對映異構體**」係指具有兩個或更多個手性中心且分子間不呈鏡像之立體異構體。非對映異構體具有不同的物理特性，例如熔點、沸點、光譜特性及反應性。非對映異構體混合物可依據高解析度分析程序，諸如結晶、

電泳及層析法分離。

【0073】 「**對映異構體**」係指一種化合物的具有彼此不可重疊之鏡像的兩種立體異構體。

【0074】 本文所使用之立體化學定義及慣例一般遵循S. P. Parker編輯, McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York ; 以及Eliel, E.及Wilén, S., 「Stereochemistry of Organic Compounds」, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994。本發明之化合物可含有不對稱或手性中心, 且因此以不同立體異構形式存在。預期本發明化合物之所有立體異構形式, 包括但不限於, 非對映異構體、對映異構體及構型異構體, 以及其混合物, 諸如外消旋混合物, 形成本發明之一部分。許多有機化合物以光學活性形式存在, 亦即, 其能夠旋轉平面偏振光之平面。在描述光學活性化合物時, 使用了前綴D及L, 或R及S來指示該分子關於其手性中心之絕對構型。前綴d及l或(+)及(-)用於指示化合物旋轉平面偏振光之標記, 其中(-)或l意味著該化合物為左旋的。具有前綴(+)或d之化合物為右旋的。對於指定化學結構, 該等立體異構體係相同的, 不過其彼此呈鏡像。特定立體異構體亦可稱為對映異構體, 且此類異構體之混合物常稱為對映異構體混合物。對映異構體之50:50混合物稱為外消旋混合物或外消旋物, 其可在化學反應過程中無立體選擇性或立體特異性情況下出現。術語「外消旋混合物」及「外消旋物」係指兩種對映異構物質之等莫耳量混合物, 不管光學活性如何。

【0075】 術語「**互變異構體**」或「**互變異構形式**」係指可經由低能量障壁互變的具有不同能量之結構異構體。舉例而言, 質子互變異構體(亦稱為質子轉移互變異構體)包括經由質子移動引起之互變, 諸如酮-烯醇及鹽亞胺-烯胺異構。價鍵異構體包括由一些鍵結電子再組織引起的互變。

【0076】 如本申請案中所使用, 術語「**前藥**」係指能夠酶促或水解活化或

者轉化成更具活性之活性母體形式的本發明化合物之前驅物或衍生物形式。參見例如，Wilman, 「Prodrugs in Cancer Chemotherapy」, Biochemical Society Transactions, 14, 第375-382頁, 615th Meeting Belfast (1986)；及Stella等人, 「Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery」, Directed Drug Delivery, Borchardt等人(編輯), 第247-267頁, Humana Press (1985)。本發明之前藥包括但不限於，含酯前藥、含磷酸酯前藥、含硫代磷酸酯前藥、含硫酸酯前藥、含肽前藥、D-胺基酸修飾之前藥、糖基化前藥、含 β -內醯胺之前藥、含視情況經取代之苯氧基乙醯胺的前藥、含視情況經取代之苯基乙醯胺的前藥、5-氟胞嘧啶及其他5-氟尿嘧啶前藥，其可轉化成更具活性之細胞毒性遊離藥物。可衍生化成用於本發明中之前藥形式的細胞毒性藥物之實例包括但不限於，本發明之化合物及化學治療劑，如以上所描述。

【0077】術語「前藥」亦意欲包括在生物條件(活體外或活體內)下可水解、氧化或以其他方式反應而提供本發明化合物的化合物之衍生物。前藥可能僅在生物條件下反應時變得有活性，或其可在呈其未反應形式時具有活性。本發明所涵蓋之前藥的實例包括但不限於，具有本文所揭示之任一化學式之化合物的類似物或衍生物，其包含可生物水解部分，諸如可生物水解之醯胺、可生物水解之酯、可生物水解之胺基甲酸酯、可生物水解之碳酸酯、可生物水解之醯脲及可生物水解之磷酸酯類似物。前藥之其他實例包括了包含-NO、-NO₂、-ONO或-ONO₂部分的具有本文所揭示之任一化學式之化合物的衍生物。前藥可典型地使用熟知方法製備，諸如Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery (1995) 172-178, 949-982 (Manfred E. Wolff編輯, 第5版)所描述之方法；亦參見Goodman 及 Gilman, The Pharmacological basis of Therapeutics, 第8版, McGraw-Hill, Int.編輯, 1992, 「Biotransformation of Drugs」。

【0078】本發明前藥之一種較佳形式包括含本發明之化合物/偶聯物之亞

胺鍵與亞胺反應性試劑之間形成之加合物的本發明化合物(存在或不存在連接基團)及偶聯物。本發明前藥之另一較佳形式包括諸如具有式(I) - (IV)之化合物，其中當N與C之間之雙線 $\equiv$ 表示單鍵時，X為H或胺保護基，且該化合物變為前藥。本發明之前藥可含有本文所述前藥之一種或兩種形式(例如含有在化合物/偶聯物之亞胺鍵與亞胺反應性試劑之間形成的加合物，及/或當X為-H時含有Y離去基團)。

【0079】 術語「亞胺反應性試劑」係指能夠與亞胺基團反應之試劑。亞胺反應性試劑之實例包括但不限於，亞硫酸鹽(H_2SO_3 、 H_2SO_2 ，或 HSO_3^- 、 SO_3^{2-} 或 HSO_2^- 與陽離子形成之鹽)；偏亞硫酸氫鹽($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ，或 $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$ 與陽離子形成之鹽)；單-、二-、三-及四-硫代磷酸鹽(PO_3SH_3 、 $\text{PO}_2\text{S}_2\text{H}_3$ 、 POS_3H_3 、 PS_4H_3 ，或 PO_3S^{3-} 、 $\text{PO}_2\text{S}_2^{3-}$ 、 POS_3^{3-} 或 PS_4^{3-} 與陽離子形成之鹽)；硫代磷酸酯($(\text{R}^i\text{O})_2\text{PS}(\text{OR}^i)$ 、 R^iSH 、 R^iSOH 、 $\text{R}^i\text{SO}_2\text{H}$ 、 $\text{R}^i\text{SO}_3\text{H}$)；各種胺(經胺(例如 NH_2OH)、肼(例如 NH_2NH_2)、 $\text{NH}_2\text{O}-\text{R}^i$ 、 $\text{R}^{i'}\text{NH}-\text{R}^i$ 、 NH_2-R^i)、 $\text{NH}_2-\text{CO}-\text{NH}_2$ 、 $\text{NH}_2-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}_2$ ；硫代硫酸鹽($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ，或 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 與陽離子形成之鹽)；連二亞硫酸鹽($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ，或 $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ 與陽離子形成之鹽)；二硫代磷酸鹽($\text{P}(=\text{S})(\text{OR}^k)(\text{SH})(\text{OH})$ ，或其與陽離子形成之鹽)；異脛肟酸($\text{R}^k\text{C}(=\text{O})\text{NHOH}$ ，或與陽離子形成之鹽)；醯肼($\text{R}^k\text{CONHNH}_2$)；甲醛次硫酸鹽($\text{HOCH}_2\text{SO}_2\text{H}$ ，或 $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ 與陽離子形成之鹽，諸如 $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-\text{Na}^+$)；糖化核苷酸(諸如GDP-甘露糖)；氟達拉濱(fludarabine)；或其混合物，其中 R^i 及 $\text{R}^{i'}$ 各自獨立地為具有1至10個碳原子之直鏈或分支鏈烷基且經至少一個選自 $-\text{N}(\text{R}^j)_2$ 、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 及 $-\text{PO}_3\text{H}$ 之取代基取代； R^i 及 $\text{R}^{i'}$ 可進一步視情況本文所述之烷基取代基取代； R^j 係具有1至6個碳原子之直鏈或分支鏈烷基；且 R^k 係具有1至10個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；芳基；雜環基；或雜芳基(較佳 R^k 係具有1至4個碳原子之直鏈或分支鏈烷基；更佳 R^k 為甲基、乙基或丙基)。較佳地，該陽離子為單價陽離子，諸如 Na^+ 或 K^+ 。較佳地，亞胺反應性試劑係選

自亞硫酸鹽、羥胺、尿素及胼。更佳地，亞胺反應性試劑為 NaHSO_3 或 KHSO_3 。

【0080】 如本文所使用且除非另作指示，否則術語「可生物水解之醯胺」、「可生物水解之酯」、「可生物水解之胺基甲酸酯」、「可生物水解之碳酸酯」、「可生物水解之醯脲」及「可生物水解之磷酸酯類似物」分別意謂這樣一種醯胺、酯、胺基甲酸酯、碳酸酯、醯脲或磷酸酯類似物，其1)不會破壞該化合物之生物活性且賦予該化合物有利的活體內特性，諸如吸收、作用持續時間或作用起始；2)本身不具生物活性，但在活體內轉化成生物活性化合物。可生物水解之醯胺的實例包括但不限於，低級烷基醯胺、 α -胺基酸醯胺、烷氧基醯基醯胺及烷基胺基烷基羰基醯胺。可生物水解之酯之實例包括但不限於，低級烷基酯、烷氧基醯氧基酯、烷基醯胺基烷基酯及膽鹼酯。可生物水解之胺基甲酸酯之實例包括但不限於，低級烷基胺、經取代之仲乙基二胺、胺基酸、羥基烷基胺、雜環及雜芳族胺，及聚醚胺。特別有益之前藥及前藥鹽係當將本發明化合物施用給哺乳動物時，增加該等化合物之生物利用率者。

【0081】 如本文所使用，短語「醫藥學上可接受之鹽」係指本發明化合物之醫藥學上可接受之有機或無機鹽。示例性鹽包括但不限於，硫酸鹽、檸檬酸鹽、乙酸鹽、草酸鹽、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸鹽、硫酸氫鹽、磷酸鹽、酸式磷酸鹽、異煙鹼酸鹽、乳酸鹽、水楊酸鹽、酸式檸檬酸鹽、酒石酸鹽、油酸鹽、丹寧酸鹽、泛酸鹽、酒石酸氫鹽、抗壞血酸鹽、琥珀酸鹽、順丁烯二酸鹽、龍膽酸鹽、反丁烯二酸鹽、葡萄糖酸鹽、葡萄糖醛酸鹽、糖酸鹽、甲酸鹽、苯甲酸鹽、麩胺酸鹽、甲磺酸鹽(「甲磺酸鹽」)、乙磺酸鹽、苯磺酸鹽、對甲苯磺酸鹽、雙羥萘酸鹽(亦即，1,1'-亞甲基-雙-(2-羥基-3-萘酸鹽))、鹼金屬(例如鈉及鉀)鹽、鹼土金屬(例如鎂)鹽，及銨鹽。醫藥學上可接受之鹽可涉及包含另一分子，諸如乙酸根離子、琥珀酸根離子或其他相對離子。該相對離子可為使母體化合物上之電荷穩定的任何有機或無機部分。另外，醫藥學上可接受之鹽

可在其結構中具有超過一個帶電原子。多個帶電原子作為該醫藥學上可接受之鹽之一部分的情形可具有多個相對離子。因此，醫藥學上可接受之鹽可具有一個或多個帶電原子及/或一個或多個相對離子。

【0082】 若本發明之化合物為一種鹼，則所需醫藥學上可接受之鹽可藉由此項技術中可用之任何適合方法製備，例如，用諸如鹽酸、氫溴酸、硫酸、硝酸、甲烷磺酸、磷酸及類似物之無機酸，或用諸如乙酸、順丁烯二酸、琥珀酸、扁桃酸、反丁烯二酸、丙二酸、酮戊酸、草酸、乙醇酸、水楊酸、哌喃糖苷酸(諸如葡萄糖醛酸或半乳糖醛酸)、 α 羧基酸(諸如檸檬酸或酒石酸)、胺基酸(諸如天冬胺酸或麩胺酸)、芳族酸(諸如苯甲酸或肉桂酸)、磺酸(諸如對甲苯磺酸或乙烷磺酸)或類似物處理遊離鹼。

【0083】 若本發明之化合物為一種酸，則所需醫藥學上可接受之鹽可藉由任何適合方法製備，例如，用無機或有機鹼，諸如胺(一級胺、二級胺或三級胺)、鹼金屬氫氧化物或鹼土金屬氫氧化物，或類似物處理遊離酸。適合鹽的說明性實例包括但不限於，衍生自胺基酸(諸如甘胺酸及精胺酸)、氨、一級胺、二級胺及三級胺，以及環狀胺(諸如哌啶、嗎啉及哌嗪)之有機鹽，以及衍生自鈉、鈣、鉀、鎂、錳、鐵、銅、鋅、鋁及鋰之無機鹽。

【0084】 如本文所使用，術語「**溶劑化物**」意思指進一步包括藉由非共價分子間力結合的化學計算量或非化學計算量之溶劑的化合物，該溶劑為諸如水、異丙醇、丙酮、乙醇、甲醇、DMSO、乙酸乙酯、乙酸及乙醇胺、二氯甲烷、2-丙醇或類似物。化合物之溶劑化物或水合物易於藉由向該化合物中添加至少一莫耳當量羥基溶劑(諸如甲醇、乙醇、1-丙醇、2-丙醇或水)以引起亞胺部分之溶劑化或水合作用來製備。

【0085】 術語「**異常細胞生長**」及「**增生性病徵**」在本申請案中可互換使用。除非另作指示，否則如本文中所使用，「**異常細胞生長**」係指獨立於正常調

控機制(例如喪失接觸抑制作用)的細胞生長。此包括例如以下各物之異常生長：
(1)藉由表現突變之酪胺酸激酶或過表現受體酪胺酸激酶來增殖的腫瘤細胞(腫瘤)；(2)發生異常酪胺酸激酶活化之其他增生性疾病之良性及惡性細胞；(3)在受體酪胺酸激酶作用下增殖之任何腫瘤；(4)藉由異常絲胺酸/蘇胺酸激酶活化而增殖之任何腫瘤；及(5)發生異常絲胺酸/蘇胺酸激酶活化之其他增生性疾病的良性及惡性細胞。

【0086】 術語「**癌症**」及「**癌**」係指或描述哺乳動物中典型地以不受調控之細胞生長為特徵的生理病狀。「**腫瘤**」包含一個或多個癌細胞，及/或良性或癌變前細胞。

【0087】 「**治療劑**」涵蓋生物試劑，諸如抗體、肽、蛋白質、酶或化學治療劑。

【0088】 「**化學治療劑**」係可用於治療癌症之化合物。

【0089】 「**代謝產物**」係經由特定化合物、其衍生物或其偶聯物，或其鹽在體內代謝產生的產物。化合物、其衍生物或其偶聯物之代謝產物可使用此項技術中已知之常規技術鑑別，且其活性可使用多項測試(諸如本文所描述之該等測試)測定。此類產物可例如由所施用之化合物的氧化、羥基化、還原、水解、醯胺化、脫醯胺、酯化、去酯化、酶促裂解及類似反應產生。因此，本發明包括本發明之化合物、其衍生物或其偶聯物的代謝產物，包括藉由使本發明之化合物、其衍生物或其偶聯物與哺乳動物接觸一段足以得到其代謝產物之時間的方法產生的化合物、其衍生物或其偶聯物。

【0090】 短語「**醫藥學上可接受**」指示，該物質或組成物必須在化學上及/或毒理學上與構成配製物之其他成分及/或用其治療之哺乳動物相容。

【0091】 術語「**保護基**」或「**保護部分**」係指在化合物、其衍生物或其偶聯物上之其他官能基反應時，常用於阻斷或保護特定官能基之取代基。舉例而

言，「**胺保護基**」或「**胺保護部分**」係附接至胺基以阻斷或保護化合物中之胺基官能基的取代基。此類基團係此項技術中熟知的(參見例如，P. Wuts及T. Greene, 2007, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 第7章, J. Wiley & Sons, NJ)，且其實例有胺基甲酸酯，諸如胺基甲酸甲酯及胺基甲酸乙酯、FMOC、經取代之胺基甲酸乙酯、經1,6- β -消除裂解之胺基甲酸酯(亦稱為「**自降解**」)、尿素、醯胺、肽、烷基及芳基衍生物。適合胺基保護基包括乙醯基、三氟乙醯基、第三丁氧基羰基(BOC)、苯甲氧基羰基(CBZ)及9-芴基甲氧羰基(Fmoc)。有關保護基及其用途之一般說明，參見P. G.M. Wuts & T. W. Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, New York, 2007。

【0092】 術語「**離去基團**」係指在取代或置換期間離開的帶電荷基團或不帶電荷部分。此類離去基團為此項技術中熟知的且包括但不限於，鹵素、酯、烷氧基、羥基、甲苯磺酸酯基、三氟甲磺酸酯基、甲磺酸酯基、腈、疊氮化物、胺基甲酸酯基、二硫化物、硫酯及重氮鎘化合物。

【0093】 術語「**雙官能交聯劑**」、「**雙官能連接子**」或「**交聯劑**」係指具有兩個反應性基團之改質劑；其中一個反應性基團能夠與細胞結合劑反應，而另一個與細胞毒性化合物反應，由此將兩個部分連接在一起。此類雙官能交聯劑係此項技術中熟知的(參見例如，Isalm及Dent, *Bioconjugation*, 第5章, 第218-363頁, Groves Dictionaries Inc. New York, 1999)。舉例而言，能夠經由硫酯鍵來鍵聯的雙官能交聯劑包括用以引入順丁烯二醯亞胺基的*N*-琥珀醯亞胺基-4-(*N*-順丁烯二醯亞胺基甲基)-環己烷-1-甲酸酯(SMCC)，或用以引入碘代乙醯基的*N*-琥珀醯亞胺基-4-(碘代乙醯基)-胺基苯甲酸酯(SIAB)。在細胞結合劑上引入順丁烯二醯亞胺基或鹵代乙醯基之其他雙官能交聯劑係此項技術中熟知的(參見美國專利申請案號2008/0050310、20050169933，自Pierce Biotechnology Inc. P.O. Box 117、Rockland、IL 61105、USA獲得)，且包括但不限於，雙-順丁烯二醯亞胺基聚乙

二醇(BMPEO)、BM(PEO)₂、BM(PEO)₃、N-(β-順丁烯二醯亞胺基丙氧基)琥珀醯亞胺酯(BMPS)、γ-順丁烯二醯亞胺基丁酸N-琥珀醯亞胺基酯(GMBS)、ε-順丁烯二醯亞胺基己酸N-羥基琥珀醯亞胺酯(EMCS)、5-順丁烯二醯亞胺基戊酸NHS、HBVS、N-琥珀醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)-環己烷-1-羧基-(6-醯胺基己酸酯)(其為SMCC之「長鏈」類似物(LC-SMCC))、間順丁烯二醯亞胺基苯甲醯基-N-羥基琥珀醯亞胺酯(MBS)、4-(4-N-順丁烯二醯亞胺基苯基)-丁酸醯肼或鹽酸鹽(MPBH)、N-琥珀醯亞胺基3-(溴代乙醯胺基)丙酸酯(SBAP)、N-琥珀醯亞胺基碘代乙酸酯(SIA)、κ-順丁烯二醯亞胺基十一烷酸N-琥珀醯亞胺基酯(KMUA)、N-琥珀醯亞胺基4-(p-順丁烯二醯亞胺基苯基)-丁酸酯(SMPB)、琥珀醯亞胺基-6-(β-順丁烯二醯亞胺基丙醯胺基)己酸酯(SMPH)、琥珀醯亞胺基-(4-乙烯基磺醯基)苯甲酸酯(SVSB)、二硫代雙-順丁烯二醯亞胺基乙烷(DTME)、1,4-雙-順丁烯二醯亞胺基丁烷(BMB)、1,4雙順丁烯二醯亞胺基-2,3-二羥基丁烷(BMDB)、雙-順丁烯二醯亞胺基己烷(BMH)、雙-順丁烯二醯亞胺基乙烷(BMOE)、磺基琥珀醯亞胺基4-(N-順丁烯二醯亞胺基-甲基)環己烷-1-甲酸酯(磺基-SMCC)、磺基-琥珀醯亞胺基(4-碘-乙醯基)胺基苯甲酸酯(磺基-SIAB)、間順丁烯二醯亞胺基苯甲醯基-N-羥基磺基琥珀醯亞胺酯(磺基-MBS)、N-(γ-順丁烯二醯亞胺基丁氧基)磺基琥珀醯亞胺酯(磺基-GMBS)、N-(ε-順丁烯二醯亞胺基辛醯氧基)磺基琥珀醯亞胺酯(磺基-EMCS)、N-(κ-順丁烯二醯亞胺基十一烷醯氧基)磺基琥珀醯亞胺酯(磺基-KMUS)及磺基琥珀醯亞胺基4-(對順丁烯二醯亞胺基苯基)丁酸酯(磺基-SMPB)。

【0094】 雜雙官能交聯劑為具有兩個不同反應性基團之雙官能交聯劑。含有胺反應性N-羥基琥珀醯亞胺基(NHS基團)及羰基反應性肼基之雜雙官能交聯劑亦可用於連接本文所描述之細胞毒性化合物與細胞結合劑(例如抗體)。此類可商購之雜雙官能交聯劑的實例包括琥珀醯亞胺基6-肼基煙鹼醯胺丙酮胺(SANH)、琥珀醯亞胺基4-肼基對苯二甲酸酯鹽酸鹽(SHTH)及琥珀醯亞胺基肼煙

鹼酸酯鹽酸鹽(SHNH)。帶有酸不穩定性鍵聯之偶聯物亦可使用本發明之帶有胍之苯并二氮呋衍生物製備。可使用之雙官能交聯劑的實例包括琥珀醯亞胺基-對甲醯基苯甲酸酯(SFB)及琥珀醯亞胺基-對甲醯基苯氧基乙酸酯(SFPA)。

【0095】 能夠經由二硫鍵連接細胞結合劑與細胞毒性化合物的雙官能交聯劑係此項技術中已知的且包括用以引入二硫代吡啶基的*N*-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)、*N*-琥珀醯亞胺基-4-(2-吡啶基二硫基)戊酸酯(SPP)、*N*-琥珀醯亞胺基-4-(2-吡啶基二硫基)丁酸酯(SPDB)、*N*-琥珀醯亞胺基-4-(2-吡啶基二硫基)2-磺基丁酸酯(磺基-SPDB)。可用於引入二硫基團之其他雙官能交聯劑係此項技術中已知的且揭示於美國專利6,913,748、6,716,821，及美國專利公開案20090274713及20100129314中，全部以引用之方式併入本文中。或者，亦可使用引入硫醇基團之交聯劑，諸如2-亞胺基硫雜環戊烷、高半胱胺酸硫代內酯或S-乙醯基琥珀酸酐。

【0096】 如本文所定義，「**連接子**」、「**連接部分**」或「**連接基團**」係指將兩個基團(諸如細胞結合劑及細胞毒性化合物)連接在一起的部分。典型地，該連接子在連接其所連接之兩個基團的條件下基本上呈惰性。雙官能交聯劑可包含兩個反應性基團，連接部分之每一端一個，由此使一個反應性基團可首先與細胞毒性化合物反應以提供帶有連接部分及第二反應性基團之化合物，接著該第二反應性基團可與細胞結合劑反應。或者，雙官能交聯劑之一端可首先與細胞結合劑反應以提供帶有連接部分及第二反應性基團之細胞結合劑，接著該第二反應性基團可與細胞毒性化合物反應。連接部分可含有允許該細胞毒性部分在特定位元元元元點釋放的化學鍵。適合化學鍵係此項技術中熟知的且包括二硫鍵、硫醚鍵、酸不穩定性鍵、光不穩定性鍵、肽酶不穩定性鍵及酯酶不穩定性鍵(參見例如，美國專利5,208,020、5,475,092、6,441,163、6,716,821、6,913,748、7,276,497、7,276,499、7,368,565、7,388,026及7,414,073)。較佳為二硫鍵、硫醚

鍵及肽酶不穩定性鍵。可用於本發明中之其他連接子包括不可裂解之連接子，諸如美國公開案號20050169933中詳細描述的該等連接子；或帶電荷之連接子或親水性連接子，其描述於US 2009/0274713、US 2010/01293140及WO 2009/134976，各專利以引用之方式明確地併入本文中。

【0097】 在一個實施例中，在一端附接有反應性基團(諸如反應性酯)之連接基團係選自以下各物：

- O(CR₂₀R₂₁)_m(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_pY''(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX''、
- O(CR₂₀R₂₁)_m(CR₂₆=CR₂₇)_{m'}(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_pY''(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX''、
- O(CR₂₀R₂₁)_m(炔基)_{n'}(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_pY''(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX''、
- O(CR₂₀R₂₁)_m(哌嗪基)_{t'}(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_pY''(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX''、
- O(CR₂₀R₂₁)_m(吡咯基)_{t'}(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_pY''(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX''、
- O(CR₂₀R₂₁)_mA''_{m''}(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_pY''(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX''、
- S(CR₂₀R₂₁)_m(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_pY''(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX''、
- S(CR₂₀R₂₁)_m(CR₂₆=CR₂₇)_{m'}(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_pY''(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX''、
- S(CR₂₀R₂₁)_m(炔基)_{n'}(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_pY''(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX''、
- S(CR₂₀R₂₁)_m(哌嗪基)_{t'}(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_pY''(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX''、
- S(CR₂₀R₂₁)_m(吡咯基)_{t'}(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_pY''(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX''、
- S(CR₂₀R₂₁)_mA''_{m''}(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_pY''(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX''、
- NR₃₃(C=O)_{p''}(CR₂₀R₂₁)_m(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_pY''(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX''、
- NR₃₃(C=O)_{p''}(CR₂₀R₂₁)_m(CR₂₆=CR₂₇)_{m'}(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_pY''(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX''、
- NR₃₃(C=O)_{p''}(CR₂₀R₂₁)_m(炔基)_{n'}(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_pY''(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX''、
- NR₃₃(C=O)_{p''}(CR₂₀R₂₁)_m(哌嗪基)_{t'}(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_pY''(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX''、
- NR₃₃(C=O)_{p''}(CR₂₀R₂₁)_m(吡咯基)_{t'}(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_pY''(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX''、

-NR₃₃(C=O)_p"(CR₂₀R₂₁)_m(
基)_t'(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_p"Y"(CR₂₄R₂₅)_q-(CO)_tX"、
-NR₃₃(C=O)_p"(CR₂₀R₂₁)_mA"_m"(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_p"Y"(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_t
X"、 -(CR₂₀R₂₁)_m(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_p"Y"(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX"、
-(CR₂₀R₂₁)_m(CR₂₆=CR₂₇)_m'(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_p"Y"(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX"
、 -(CR₂₀R₂₁)_m(炔基)_n'(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_p"Y"(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX"、
-(CR₂₀R₂₁)_m(吡嗪基)_t'(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_p"Y"(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX"、
-(CR₂₀R₂₁)_mA"_m"(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_p"Y"(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX"、
-(CR₂₀R₂₁)_m(CR₂₉=N-NR₃₀)_n"(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_p"Y"(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX
"、
-(CR₂₀R₂₁)_m(CR₂₉=N-NR₃₀)_n"(CR₂₆=CR₂₇)_m'(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_p"Y"(C
R₂₄R₂₅)_q(CO)_tX"、 -(CR₂₀R₂₁)_m(CR₂₉=N-NR₃₀)_n"(炔
基)_n'(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_p"Y"(CR₂₄R₂₅)_q-(CO)_tX"、
-(CR₂₀R₂₁)_m(CR₂₉=N-NR₃₀)_nA"_m"(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_p"Y"(CR₂₄R₂₅)_q(C
O)_tX"，

其中：

m、n、p、q、m'、n'、t'為1至10之整數或視情況為0；

t、m''、n''及p''為0或1；

X"係選自OR₃₆、SR₃₇、NR₃₈R₃₉，其中R₃₆、R₃₇、R₃₈、R₃₉為H，或具有1至20
個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基，及或聚乙二醇單元
-(OCH₂CH₂)_n，當t=1時R₃₇視情況為硫醇保護基，COX"形成選自N-羥基琥珀醯亞
胺酯、N-羥基鄰苯二甲醯亞胺酯、N-羥基磺基琥珀醯亞胺酯、對硝基苯酯、二
硝基苯酯、全氟苯酯及其衍生物之反應性酯，其中該等衍生物有助於醯胺鍵之
形成；

Y''不存在或選自O、S、S-S或NR₃₂，其中R₃₂具有以上關於R所給相同之定義；或

當Y''不為S-S且t = 0時，X''係選自順丁烯二醯亞胺基、鹵代乙醯基或SR₃₇，其中R₃₇具有與上述相同之定義；

A''為胺基酸殘基或含有介於2至20個之間之胺基酸殘基的多肽；

R₂₀、R₂₁、R₂₂、R₂₃、R₂₄、R₂₅、R₂₆及R₂₇相同或不同，且為-H或具有1至5個碳原子之直鏈或分支鏈烷基；

R₂₉與R₃₀相同或不同，且為-H或具有1至5個碳原子之烷基；

R₃₃為-H；或具有1至12個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；聚乙二醇單元R-(OCH₂CH₂)_n，或R₃₃為-COR₃₄、-CSR₃₄、-SOR₃₄或-SO₂R₃₄，其中R₃₄為H，或具有1至20個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基，或聚乙二醇單元-(OCH₂CH₂)_n；且

R₄₀及R₄₁之一為視情況帶負電荷或帶正電荷之官能基且另一個為H或具有1至4個碳原子之烷基、烯基、炔基。

【0098】 以上連接基團中之任一個均可存在於本發明之化合物、藥物-連接子化合物或偶聯物中之任一個中，包括置換本文所描述之任一式中之連接基團。

【0099】 術語「**胺基酸**」係指天然存在之胺基酸或非天然存在之胺基酸。在一個實施例中，胺基酸係由NH₂-C(R^{aa'}R^{aa})-C(=O)OH表示，其中R^{aa}及R^{aa'}各自獨立地為H；視情況經取代的具有1至10個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；芳基；雜芳基；或雜環基，或R^{aa}與N末端氮原子一起可形成雜環(例如在脯胺酸中)。術語「**胺基酸殘基**」係指當自胺基酸之胺端及/或羧基端移除一個氫原子時的相應殘基，諸如-NH-C(R^{aa'}R^{aa})-C(=O)O-。

【0100】 術語「**陽離子**」係指帶有正電荷之離子。陽離子可為單價的(例

如 Na^+ 、 K^+ 等)、二價的(例如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等)或多價的(例如 Al^{3+} 等)。較佳陽離子為單價的。

【0101】 術語「**治療有效量**」意思指，在受試者體內引起所希望之生物反應的活性化合物或偶聯物之量。此類反應包括相較於不存在該治療，或預防、抑制或延遲疾病症狀或疾病本身之發展的情況，減輕所治療之疾病或病症的症狀，預防、抑制或延遲疾病症狀或疾病本身之復發，增加受試者之壽命。有效量之確定恰在熟習此項技術者之能力範圍內，尤其是依據本文所提供之詳細揭示內容。化合物I之毒性及治療功效可藉由在細胞培養及實驗動物中進行的標準醫藥程序確定。本發明化合物或偶聯物或者擬施用給受試者之其他治療劑的有效量將取決於多發性骨髓瘤之分期、類別及狀態，以及受試者之特徵，諸如一般健康狀況、年齡、性別、體重及耐藥性。本發明化合物或偶聯物或者擬施用之其他治療劑的有效量亦將取決於施用途徑及劑型。可單獨地調整劑量及時間間隔以提供足以維持所希望之治療效果的活性化合物之血漿含量。

細胞毒性化合物

【0102】 在第一實施例中，本發明係針對本文所描述之細胞毒性化合物(例如具有結構式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)或(VI)之化合物，或其醫藥學上可接受之鹽)。在某些實施例中，該細胞毒性化合物係由結構式(I)或其醫藥學上可接受之鹽表示。

【0103】 在某些實施例中，對於結構式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)及(VI)， L' 、 L'' 及 L''' 之一係由式(A)表示，且其餘各自獨立地為 $-\text{H}$ 、具有1至6個碳原子之直鏈或分支鏈烷基、鹵素、 $-\text{OH}$ 、 $(\text{C}_1\text{-C}_6)$ 烷氧基或 $-\text{NO}_2$ 。具體言之， L' 、 L'' 及 L''' 之一係由式(A)表示，且其餘為 $-\text{H}$ 。

【0104】 在第1個具體實施例中，對於結構式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)及(VI)， L' 係由式(A)表示，且 L'' 及 L''' 均為 $-\text{H}$ ；且其餘變數係如以上在第一實施例

中所描述。

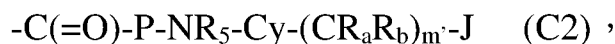
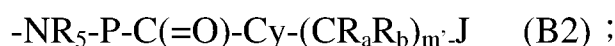
【0105】 在第2個具體實施例中，對於結構式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)及(VI)， R_x 為視情況經鹵素、-OH、 (C_1-C_3) 烷基、 (C_1-C_3) 烷氧基、鹵 (C_1-C_3) 烷基或帶電荷之取代基或可離子化基團Q取代的具有1至6個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基；且其餘變數係如以上在第一實施例或第1個具體實施例中所描述。

【0106】 在某些實施例中，Q為i) $-SO_3H$ 、 $-Z'-SO_3H$ 、 $-OPO_3H_2$ 、 $-Z'-OPO_3H_2$ 、 $-PO_3H_2$ 、 $-Z'-PO_3H_2$ 、 $-CO_2H$ 、 $-Z'-CO_2H$ 、 $-NR_{11}R_{12}$ 或 $-Z'-NR_{11}R_{12}$ ，或其醫藥學上可接受之鹽；或ii) $-N^+R_{14}R_{15}R_{16}X^-$ 或 $-Z'-N^+R_{14}R_{15}R_{16}X^-$ ； Z' 為視情況經取代之伸烷基、視情況經取代之伸環烷基或視情況經取代之伸苯基； R_{14} 至 R_{16} 各自獨立地為視情況經取代之烷基；且 X^- 為醫藥學上可接受之陰離子；且其餘變數係如以上在第2個具體實施例中所描述。更具體言之，Q為 $-SO_3H$ 或其醫藥學上可接受之鹽。

【0107】 在第3個具體實施例中，對於結構式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)及(VI)，J為包含選自由 NHR^{cl} 、 $-COOH$ 及 $-COE$ 組成之群之反應性基團的部分，其中 $-COE$ 表示反應性酯且 R^{cl} 為-H或視情況經鹵素、-OH或 (C_1-C_3) 烷氧基取代的具有1至4個碳原子之直鏈或分支鏈烷基；且其餘變數係如以上在第一實施例或第1個或第2個具體實施例中所描述。

【0108】 在某些實施例中，J為COE，該COE選自N-羥基琥珀醯亞胺酯、N-羥基磺基琥珀醯亞胺酯、硝基苯基(例如2-硝基苯基或4-硝基苯基)酯、二硝基苯基(例如2,4-二硝基苯基)酯、磺基-四氟苯基(例如4-磺基-2,3,5,6-四氟苯基)酯及全氟苯基酯；且其餘變數係如以上在第3個具體實施例中所描述。更具體言之，COE為N-羥基琥珀醯亞胺酯。

【0109】 在第4個具體實施例中，對於結構式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)及(VI)， L' 係由下式表示：



其中：

J為-COE；

R_a 及 R_b 在每次出現時各自獨立地為-H、 (C_1-C_3) 烷基，或帶電荷之取代基或可離子化之基團Q；

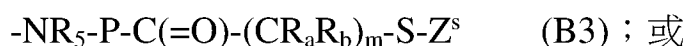
m為1至6之整數；

m' 為0或1至6之整數；

Cy為視情況經鹵素、-OH、 (C_1-C_3) 烷基、 (C_1-C_3) 烷氧基或鹵 (C_1-C_3) 烷基取代的具有5或6個環碳原子之環狀烷基；且其餘變數係如以上在第一實施例或第1、2或3個具體實施例中所描述。

【0110】 在某些實施例中， R_a 及 R_b 均為H；式(B2)及(C2)中之Cy為環己烷；且 R_5 為H或Me；且其餘變數係如以上在第4個具體實施例中所描述。更具體言之，式(B2)及(C2)中之 m' 為0或1。

【0111】 在第5個具體實施例中，對於結構式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)及(VI)， L' 係由下式表示：

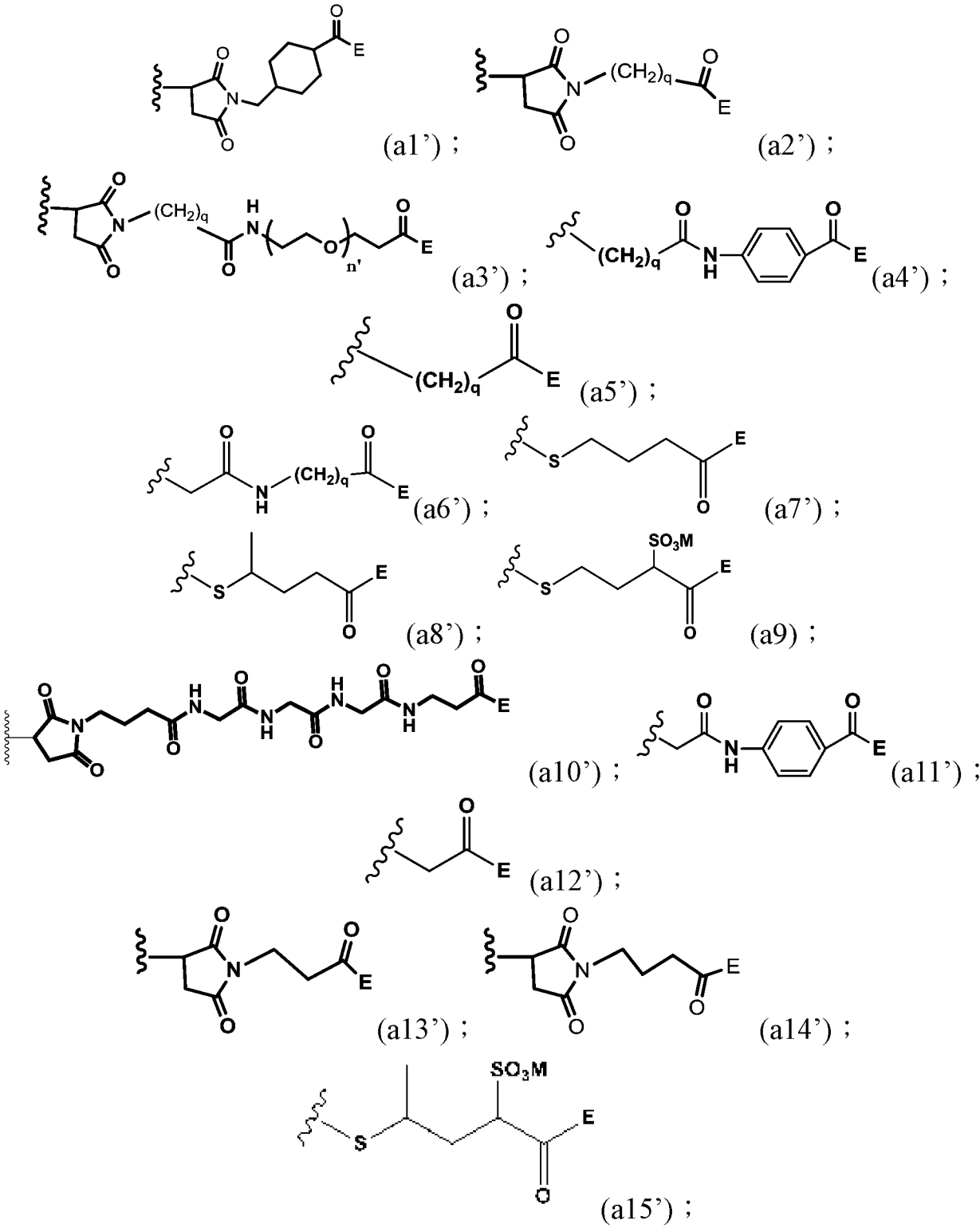


其中：

R_a 及 R_b 在每次出現時各自獨立地為-H、 (C_1-C_3) 烷基，或帶電荷之取代基或可離子化之基團Q；

m為1至6之整數；

Z^s 為-H、-SR^d、-C(=O)R^{d1}，或選自下式中之任一個：



其中：

q為1至5之整數；

n'為2至6之整數；

M為陽離子(例如H⁺、Na⁺或K⁺)；

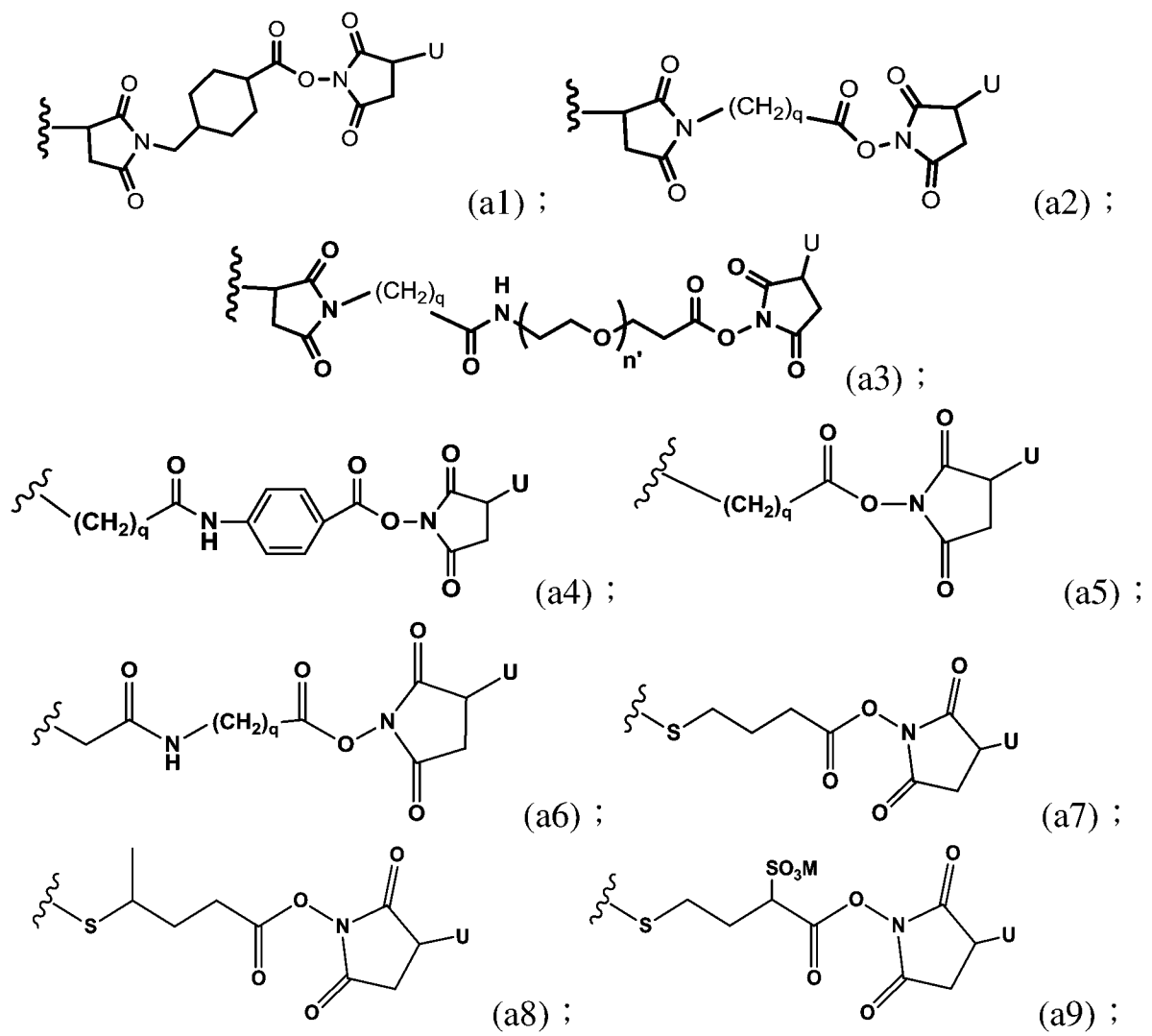
R^d為具有1至6個碳原子之直鏈或分支鏈烷基，或選自苯基、硝基苯基(例如2-硝基苯基或4-硝基苯基)、二硝基苯基(例如2,4-二硝基苯基)、羧基硝基苯基(例如3-羧基-4-硝基苯基)、吡啶基或硝基吡啶基(例如4-硝基吡啶基)；

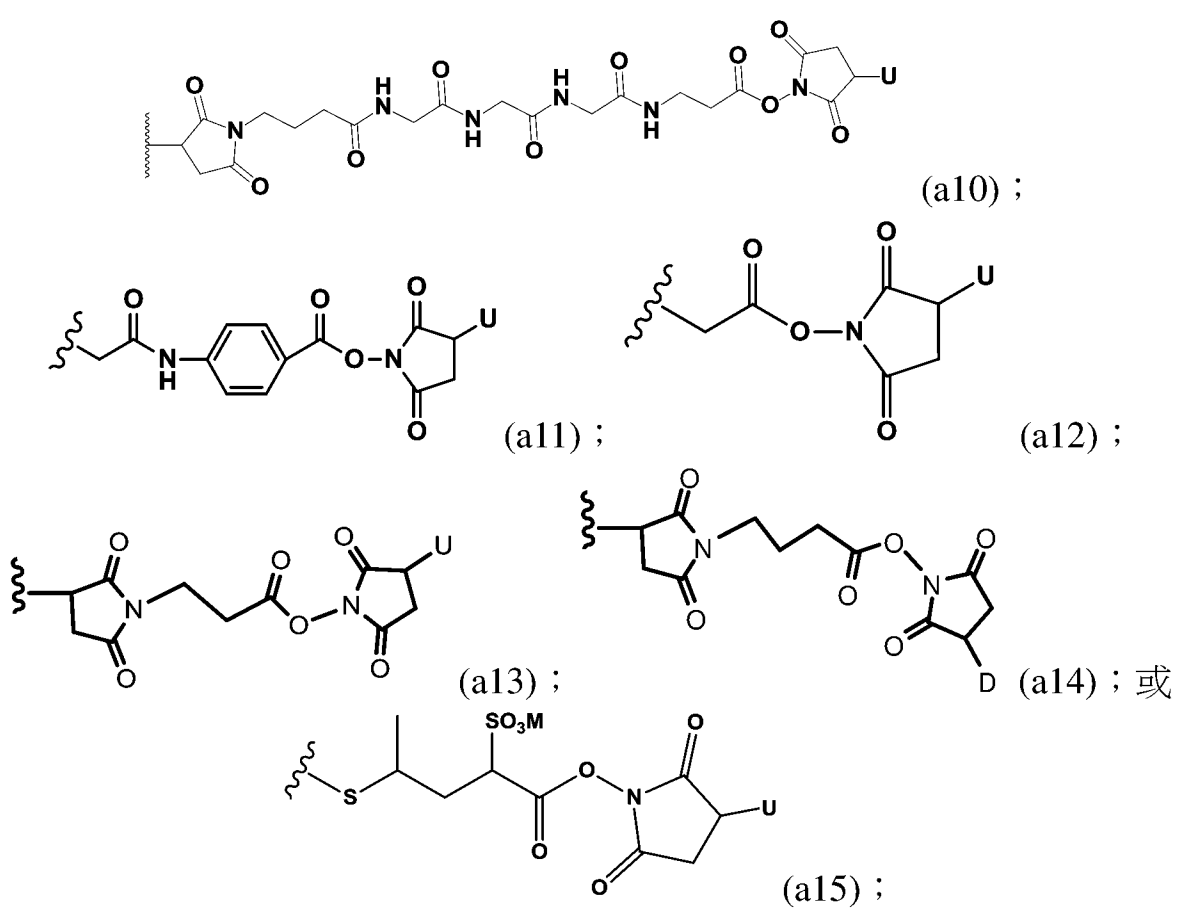
R^{d1}為具有1至6個碳原子之直鏈或分支鏈烷基；

且其餘變數係如以上在第一實施例或第1、2、3或4個具體實施例中所描述。

【0112】 在一個實施例中，Z^s為-H。在另一個實施例中，Z^s為-SMe或-SPy (Py為吡啶基)。

【0113】 在又另一個實施例中，Z^s係選自下式中之任一個：





其中U為-H或-SO₃M；且其餘變數係如以上關於式(a1')-(a15')所描述。

【0114】 在某些實施例中，帶電荷之取代基或可離子化基團Q為i) -SO₃H、-Z'-SO₃H、-OPO₃H₂、-Z'-OPO₃H₂、-PO₃H₂、-Z'-PO₃H₂、-CO₂H、-Z'-CO₂H、-NR₁₁R₁₂或-Z'-NR₁₁R₁₂，或其醫藥學上可接受之鹽；或ii) -N⁺R₁₄R₁₅R₁₆X⁻或-Z'-N⁺R₁₄R₁₅R₁₆X⁻；Z'為視情況經取代之伸烷基、視情況經取代之伸環烷基或視情況經取代之伸苯基；R₁₄至R₁₆各自獨立地為視情況經取代之烷基；且X⁻為醫藥學上可接受之陰離子；且其餘變數係如以上在第5個具體實施例中所描述。更具體言之，Q為-SO₃H或其醫藥學上可接受之鹽。

【0115】 在某些實施例中，R_a及R_b均為-H且R₅為H或Me；且其餘變數係如以上在第5個具體實施例中所描述。

【0116】 在某些實施例中，-(CR_aR_b)_m-為-(CH₂)_m-C(Me)₂-且m''為1至5之整數；且其餘變數係如以上在第5個具體實施例中所描述。

【0117】 在第6個具體實施例中，對於結構式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)及

(VI)，P為含有2至10個胺基酸殘基之肽；且其餘變數係如以上在第一實施例或第1、2、3、4或5個具體實施例中所描述。

【0118】 在某些實施例中，P為含有2至5個胺基酸殘基之肽；且其餘變數係如以上在第6個具體實施例中所描述。

【0119】 在某些實施例中，P係選自Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Lle-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-N⁹-甲 苯磺醯基-Arg、Phe-N⁹-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu、β-Ala-Leu-Ala-Leu及Gly-Phe-Leu-Gly、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met及Met-Ala；且其餘變數係如以上在第6個具體實施例中所描述。

【0120】 在某些實施例中，P為Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala及D-Ala-D-Ala；且其餘變數係如以上在第6個具體實施例中所描述。

【0121】 在第7個具體實施例中，對於結構式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)及(VI)，在N與C之間之雙線=表示雙鍵；且其餘變數係如以上在第一實施例或第1、2、3、4、5或6個具體實施例中所描述。

【0122】 在第8個具體實施例中，對於結構式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)及(VI)，在N與C之間之雙線=表示單鍵，X為-H或胺保護基；且Y係選自-H、-OR、-OCOR'、-SR、-NR'R''、視情況經取代之5或6員含氮雜環、-SO₃H、-SO₂H及-OSO₃H；且其餘變數係如以上在第一實施例或第1、2、3、4、5、6或7個具體實施例中所描述。

【0123】 在某些實施例中，Y係選自-H、-SO₃M、-OH、-OMe、-OEt

或-NHOH，其中M為-H、Na⁺或K⁺；且其餘變數係如以上在第8個具體實施例中所描述。更具體言之，Y為-H、-SO₃M或-OH。

【0124】 在第9個具體實施例中，對於結構式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)及(VI)，X'係選自由以下各物組成之群：-H；-OH；視情況經取代的具有1至10個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；或苯基；且其餘變數係如以上在第一實施例或第1、2、3、4、5、6、7或8個具體實施例中所描述。

【0125】 在某些實施例中，X'為-H、-OH、(C₁-C₃)烷基、鹵(C₁-C₃)烷基或苯基；且其餘變數係如以上在第9個具體實施例中所描述。更具體言之，X'為-H、-OH或-Me。甚至更具體言之，X'為-H。

【0126】 在第10個具體實施例中，對於結構式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)及(VI)，Y'為-H、側氧基、(C₁-C₃)烷基或鹵(C₁-C₃)烷基；且其餘變數係如以上在第一實施例或第1、2、3、4、5、6、7、8或9個具體實施例中所描述。更具體言之，Y'為-H或側氧基。甚至更具體言之，Y'為-H。

【0127】 在第11個具體實施例中，對於結構式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)及(VI)，A與A'相同或不同，且選自-O-、-S-、-NR₅-及側氧基-(C=O)-；且其餘變數係如以上在第一實施例或第1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個具體實施例中所描述。更具體言之，A與A'相同或不同，且選自-O-及-S-。甚至更具體言之，A及A'為-O-。

【0128】 在第12個具體實施例中，對於結構式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)及(VI)，R₆為-OMe；且其餘變數係如以上在第一實施例或第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11個具體實施例中所描述。

【0129】 在第13個具體實施例中，對於結構式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)及(VI)，R₁、R₂、R₃、R₄、R₁'、R₂'、R₃'及R₄'獨立地為-H、鹵素、-NO₂、-OH、(C₁-C₃)烷基、鹵(C₁-C₃)烷基或(C₁-C₃)烷氧基；且其餘變數係如在第一實施例或

第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12個具體實施例中所描述。更具體言之， R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_1' 、 R_2' 、 R_3' 及 R_4' 均為-H。

【0130】 在第14個具體實施例中，對於結構式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)及(VI)， R 、 R' 、 R'' 及 R_5 各自獨立地為-H或(C_1 - C_3)烷基；且其餘變數係如在第一實施例或第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或13個具體實施例中所描述。

【0131】 在第15個具體實施例中，對於結構式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)及(VI)，在N與C之間之雙線 $=$ 表示單鍵或雙鍵，條件為當其為雙鍵時，X不存在且Y為-H，且當其為單鍵時，X為-H，Y為-OH或- SO_3M ；

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_1' 、 R_2' 、 R_3' 及 R_4' 均為-H；

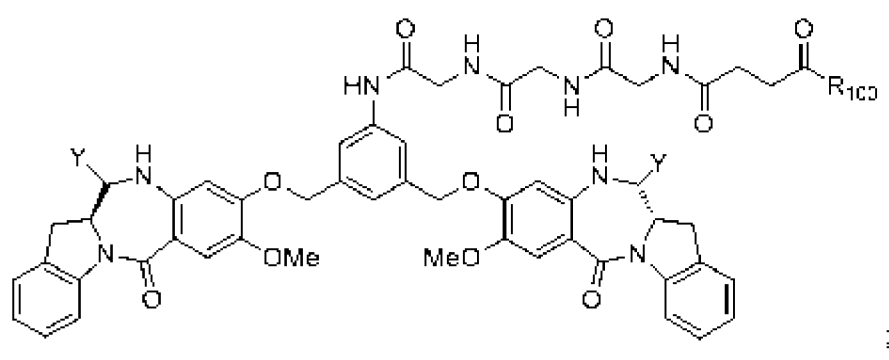
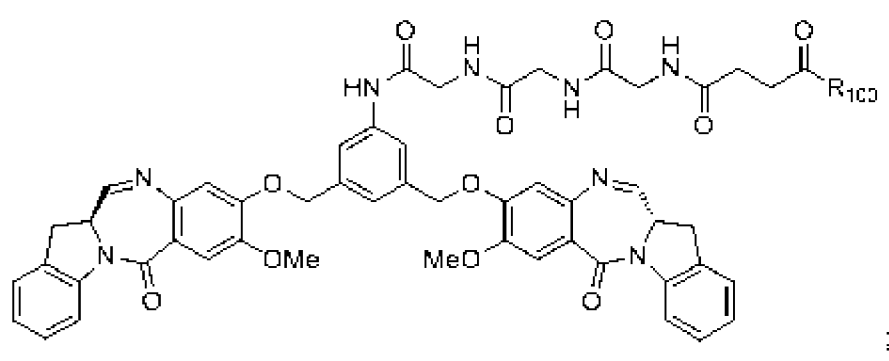
R_6 為-OMe；

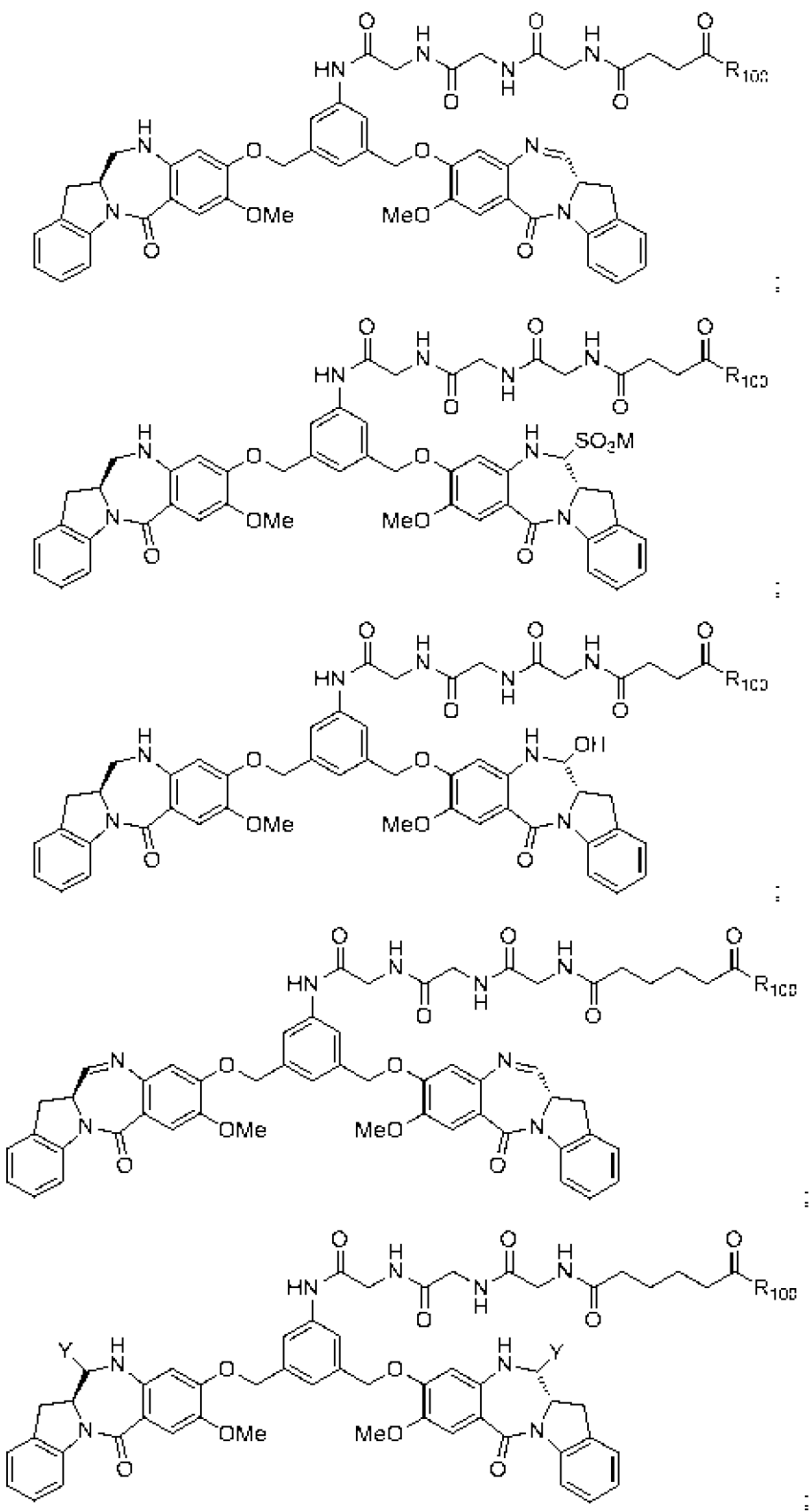
X' 及 Y' 均為-H；

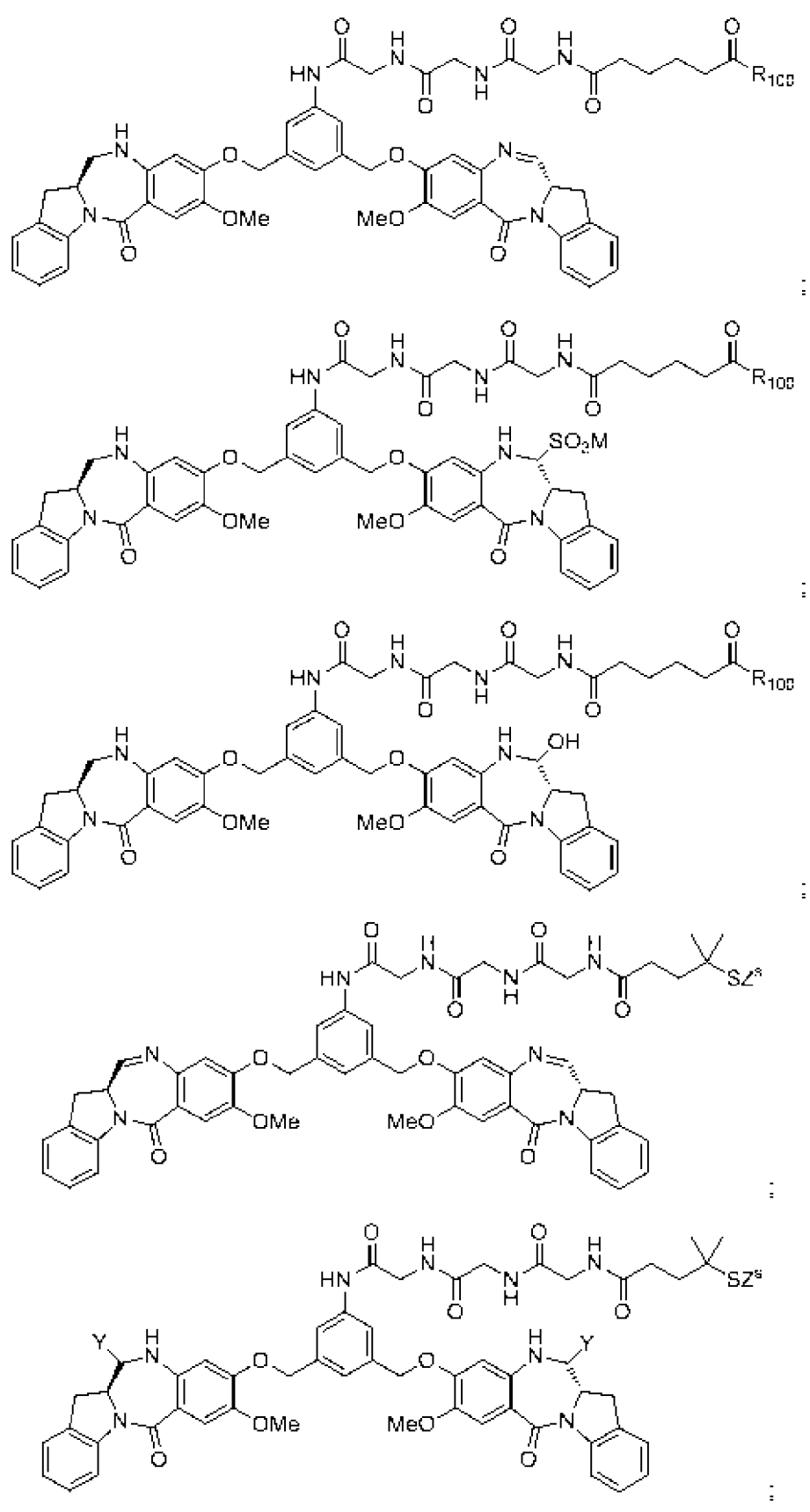
A及A'為-O-；

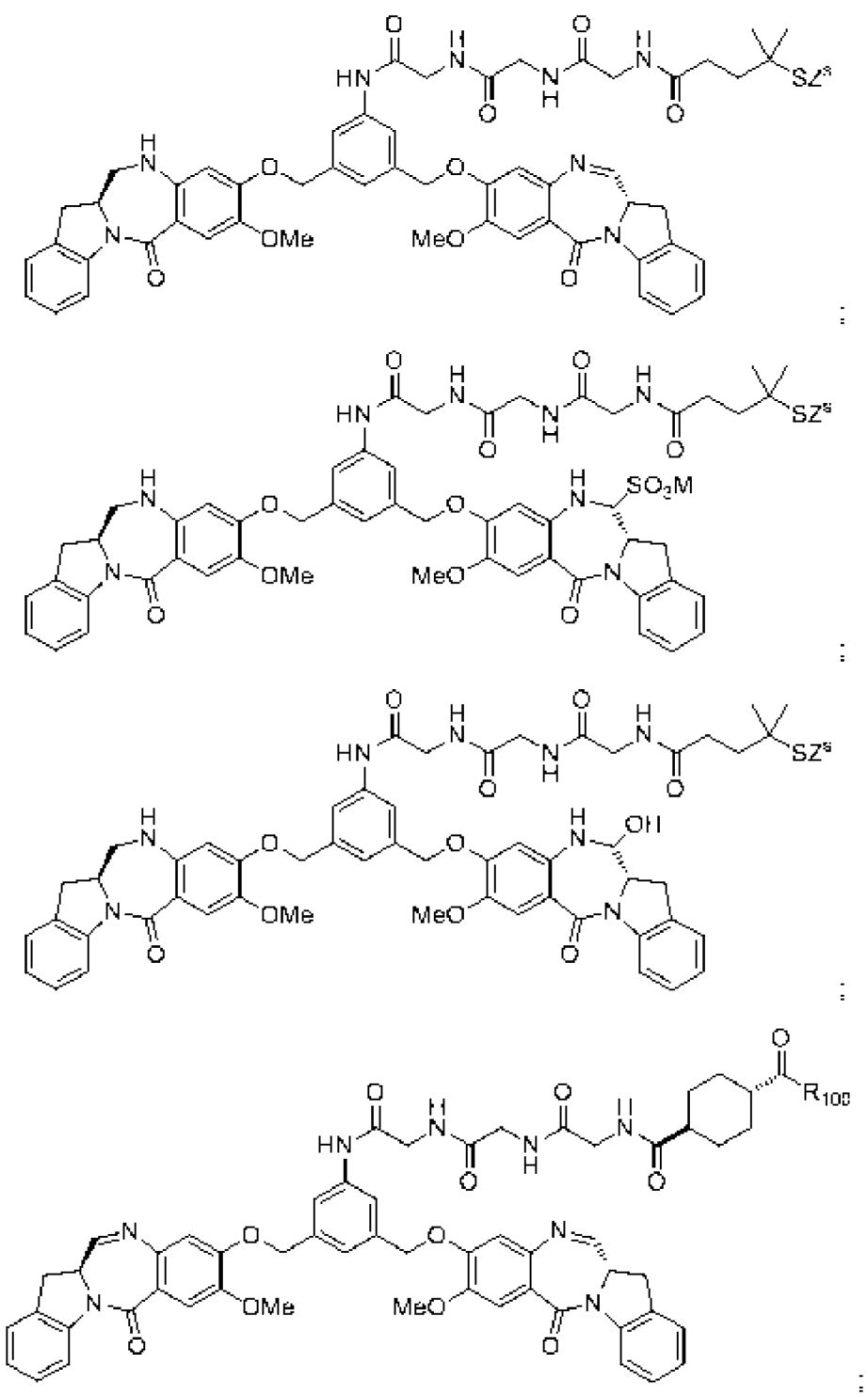
M為H、 Na^+ 或 K^+ ；且其餘變數係如第一實施例或第1、2、3、4、5或6個具體實施例中所描述。

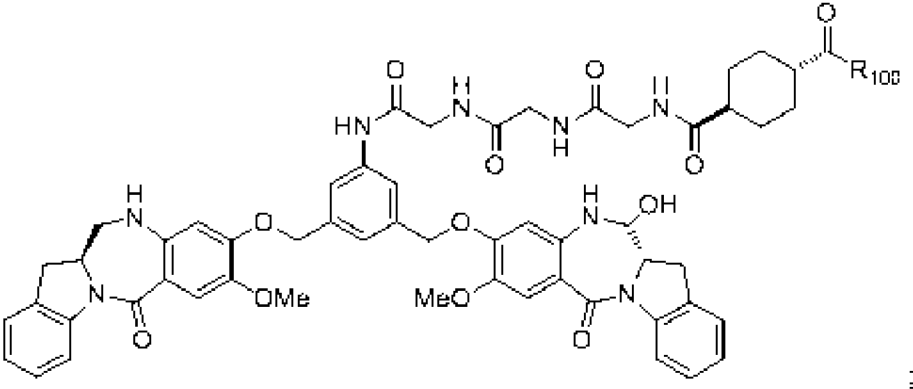
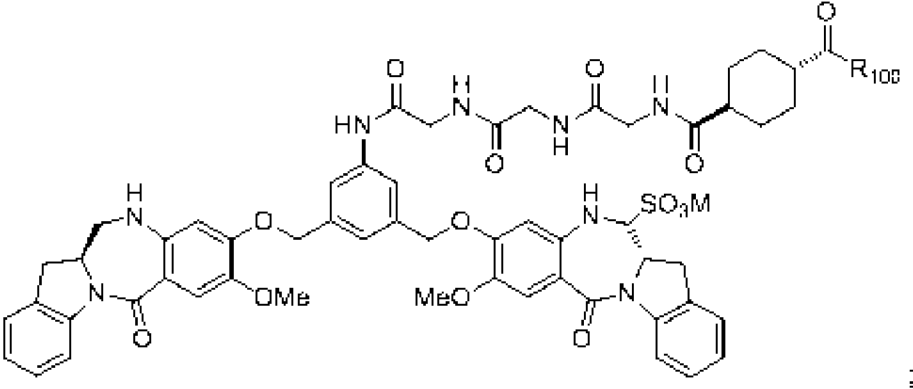
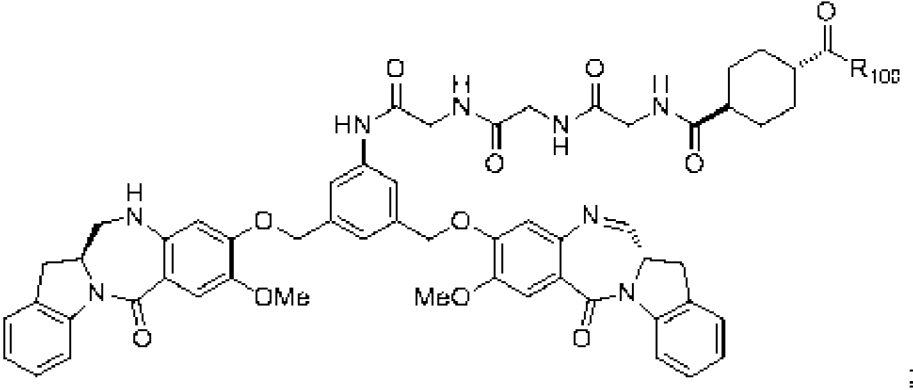
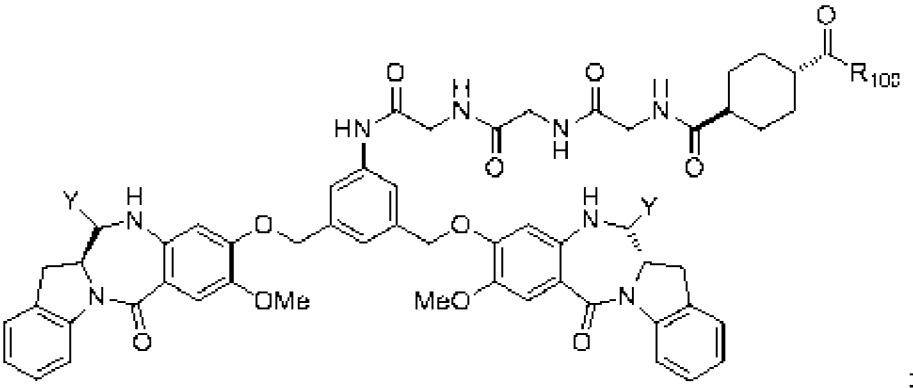
【0132】 在第16個具體實施例中，本發明之細胞毒性化合物係選自下式：

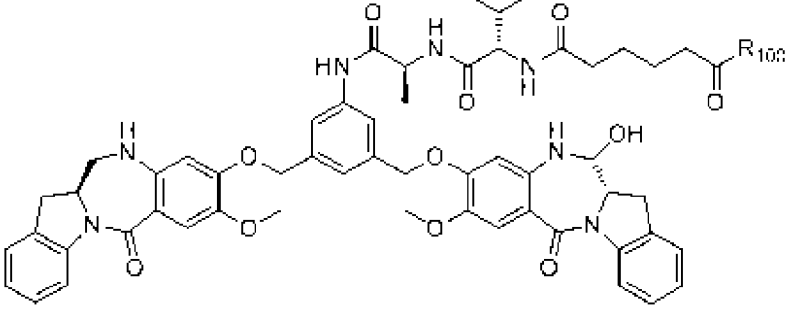
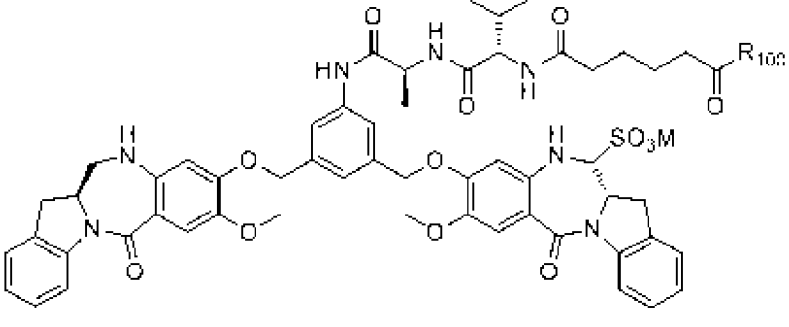
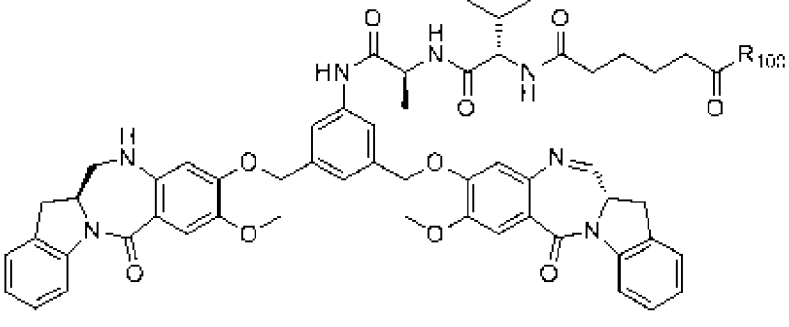
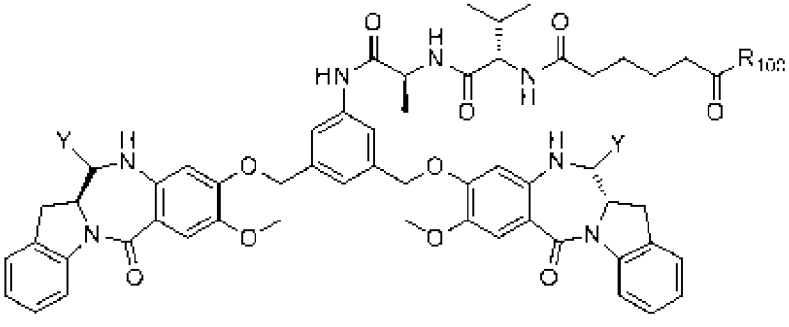
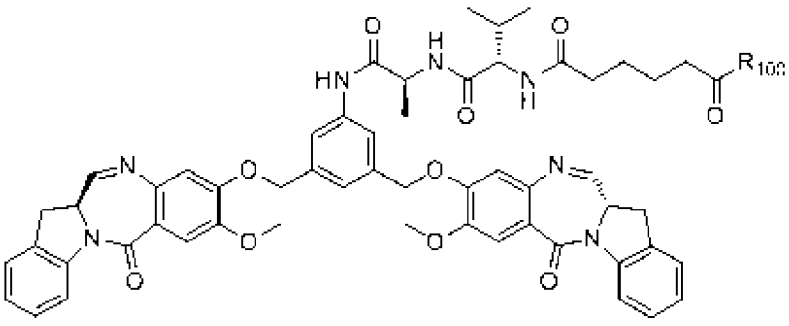


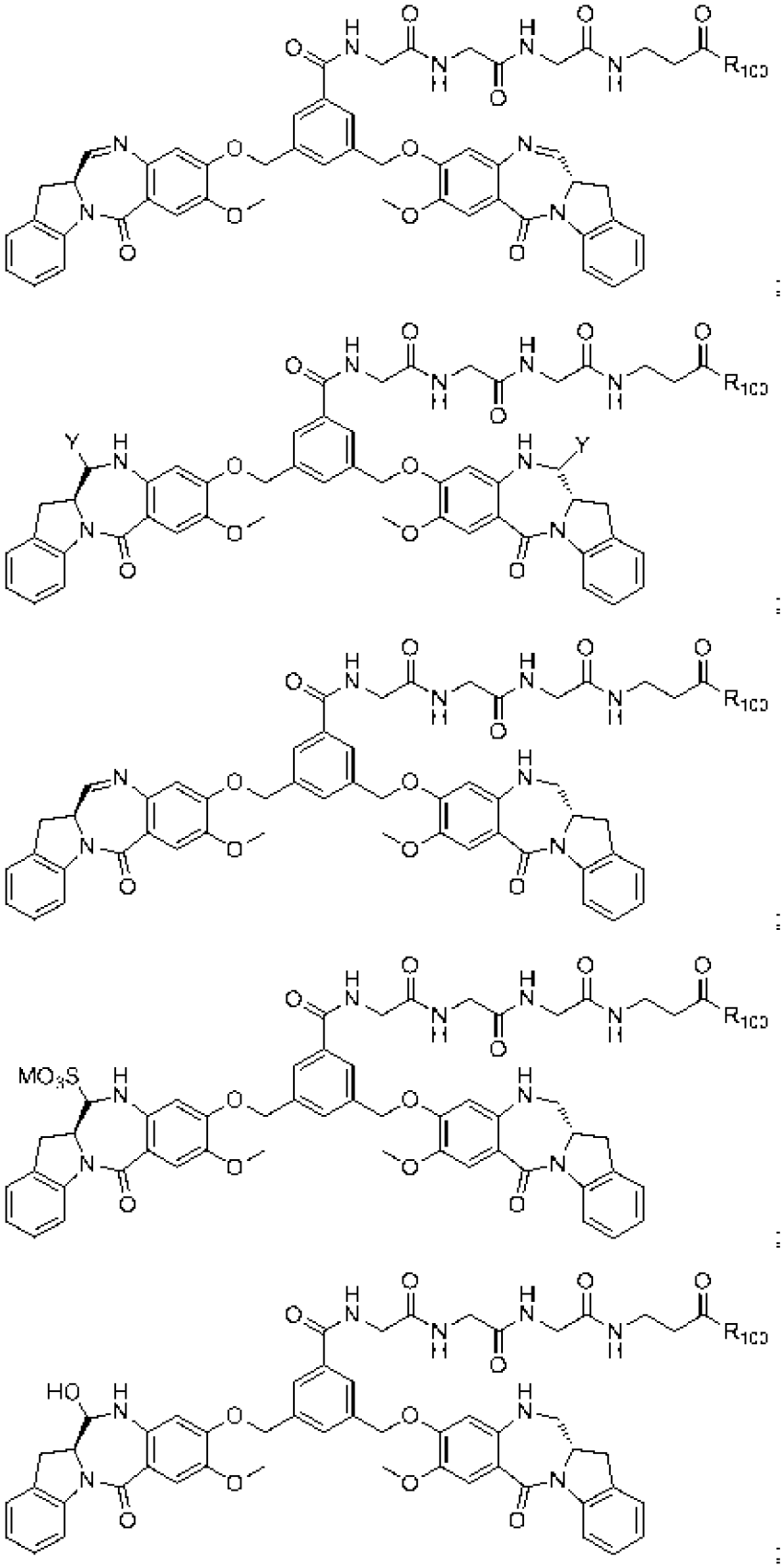


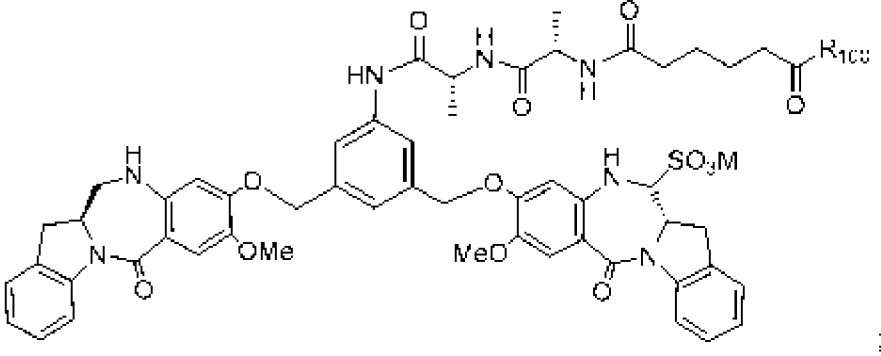
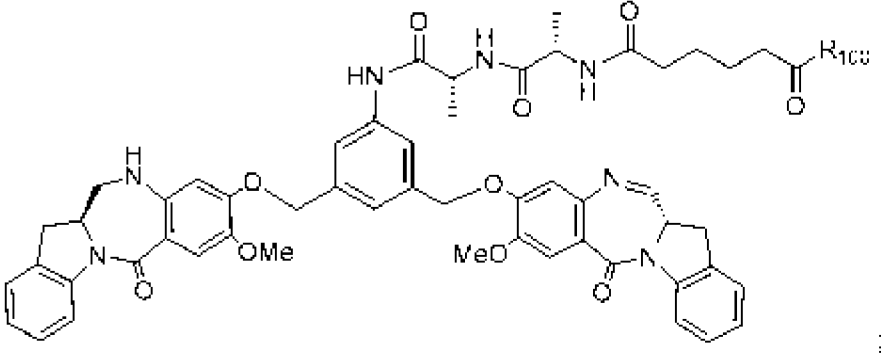
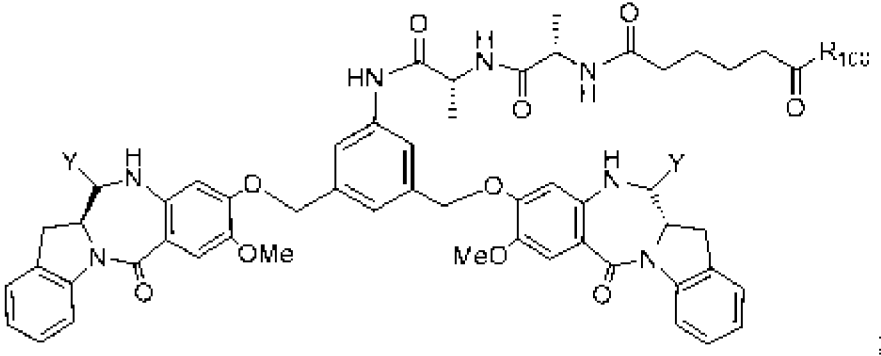
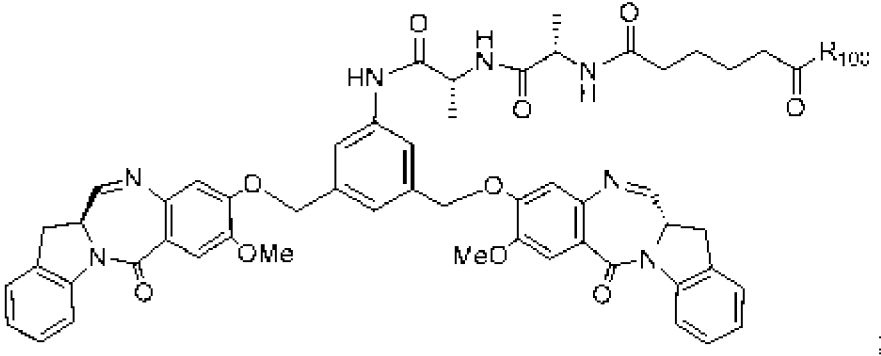


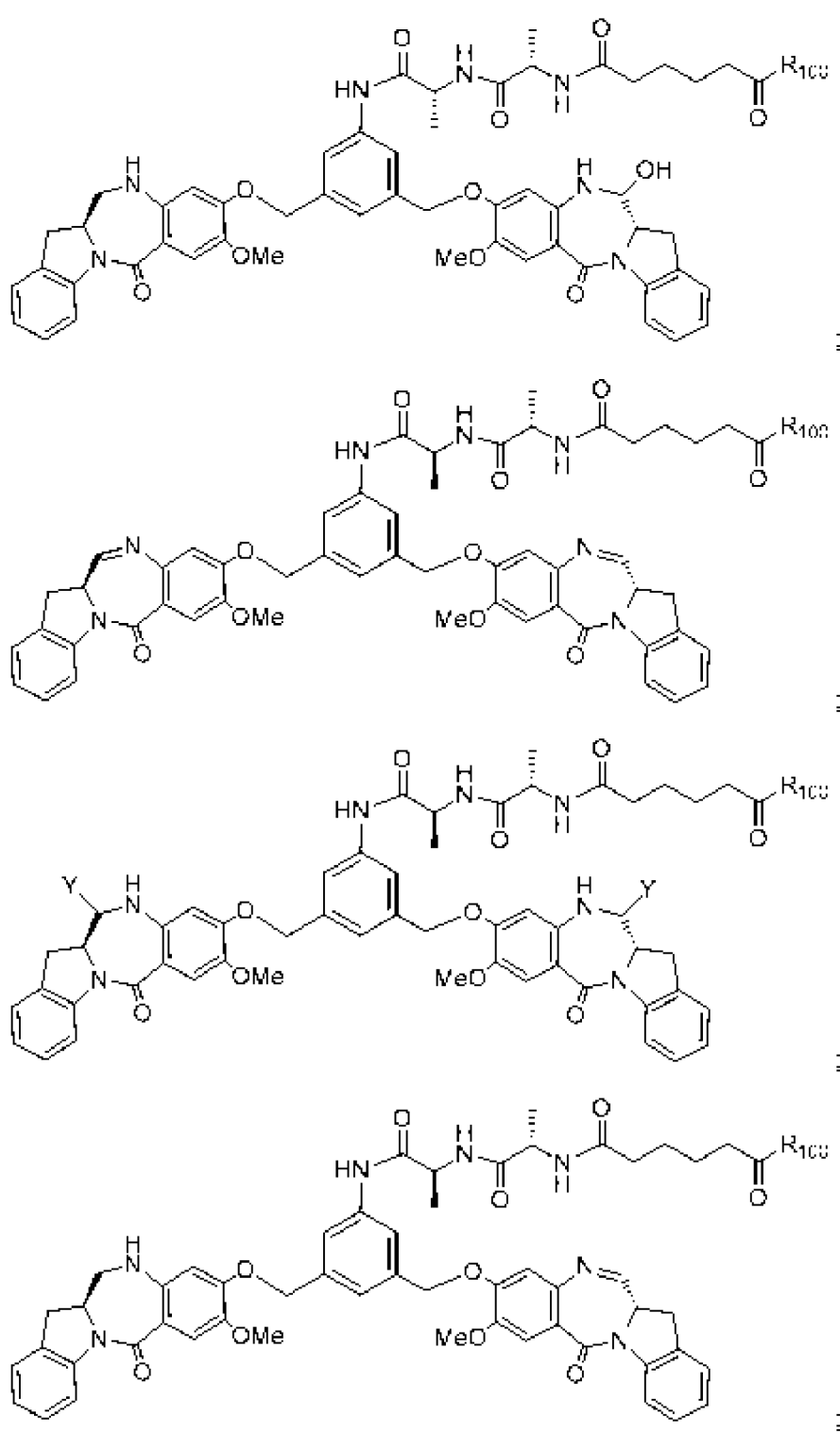


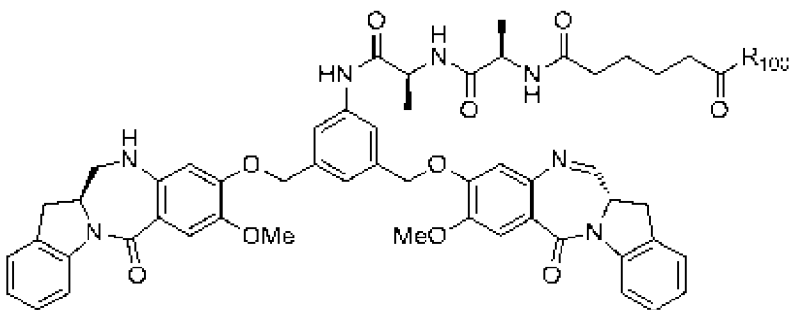
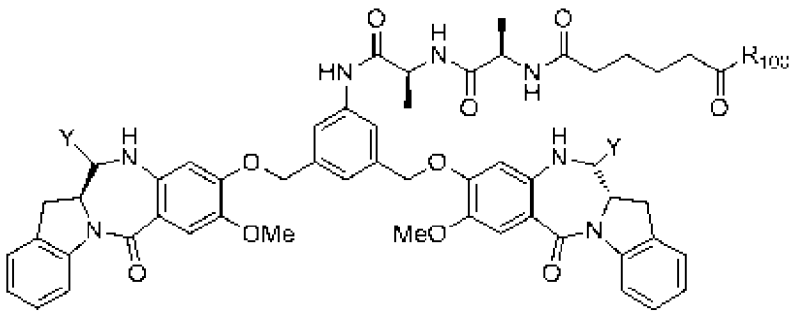
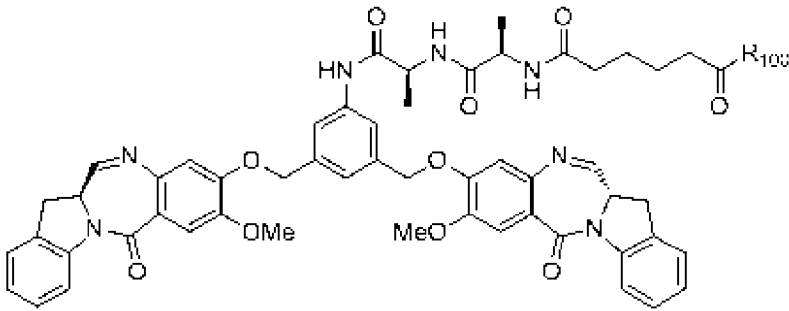
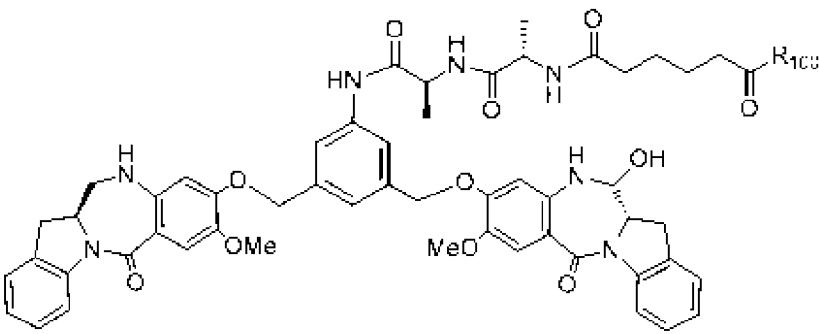
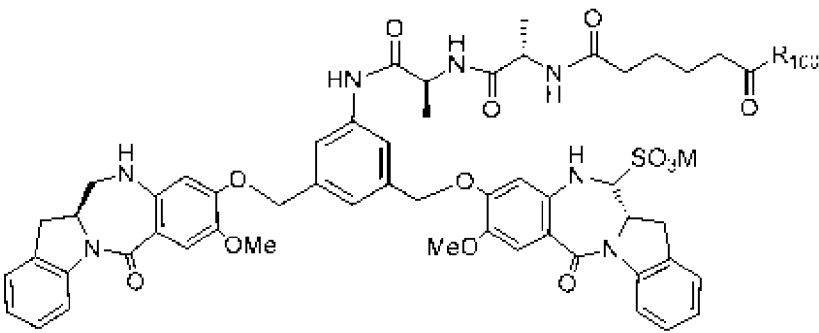


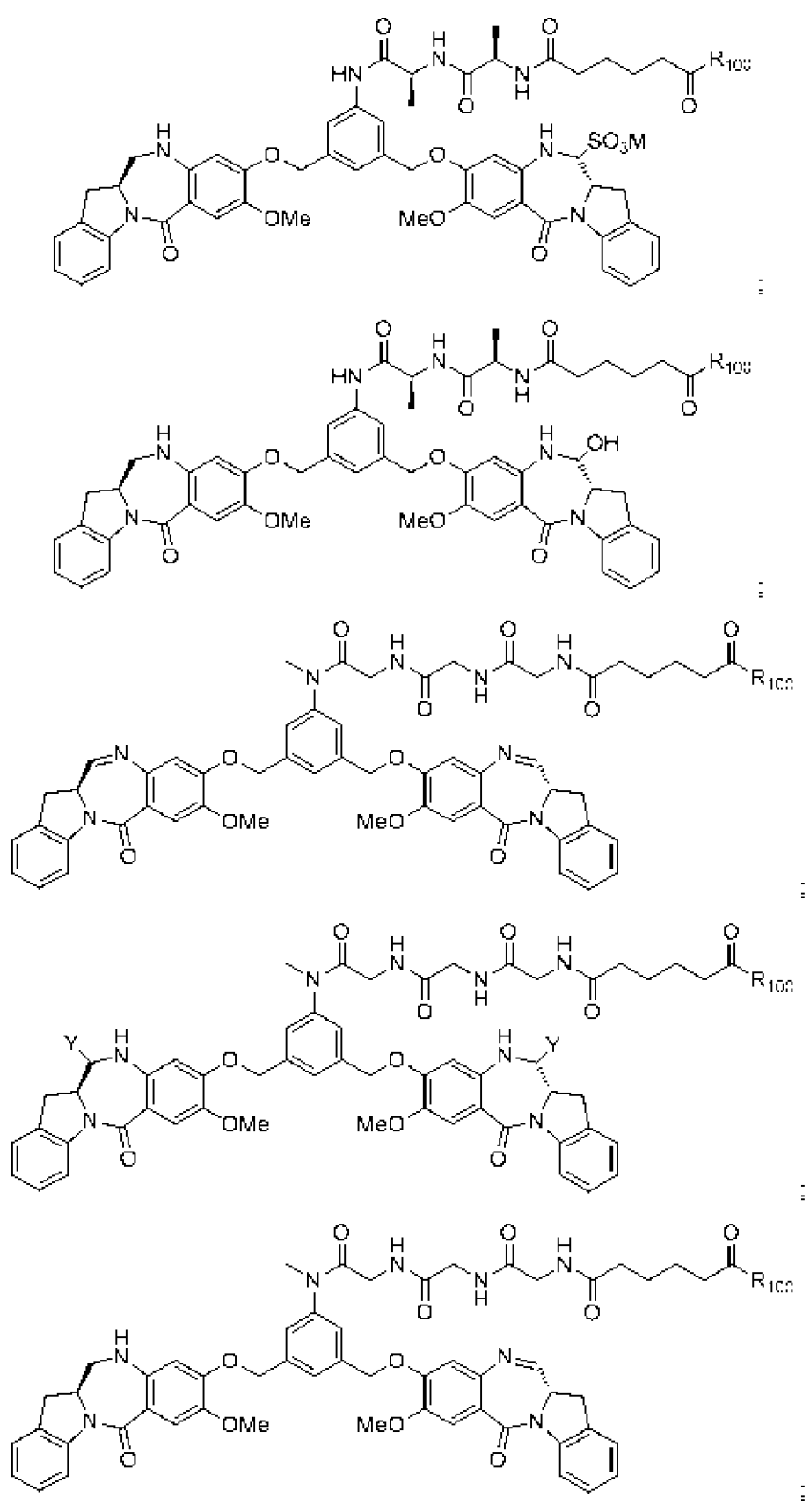


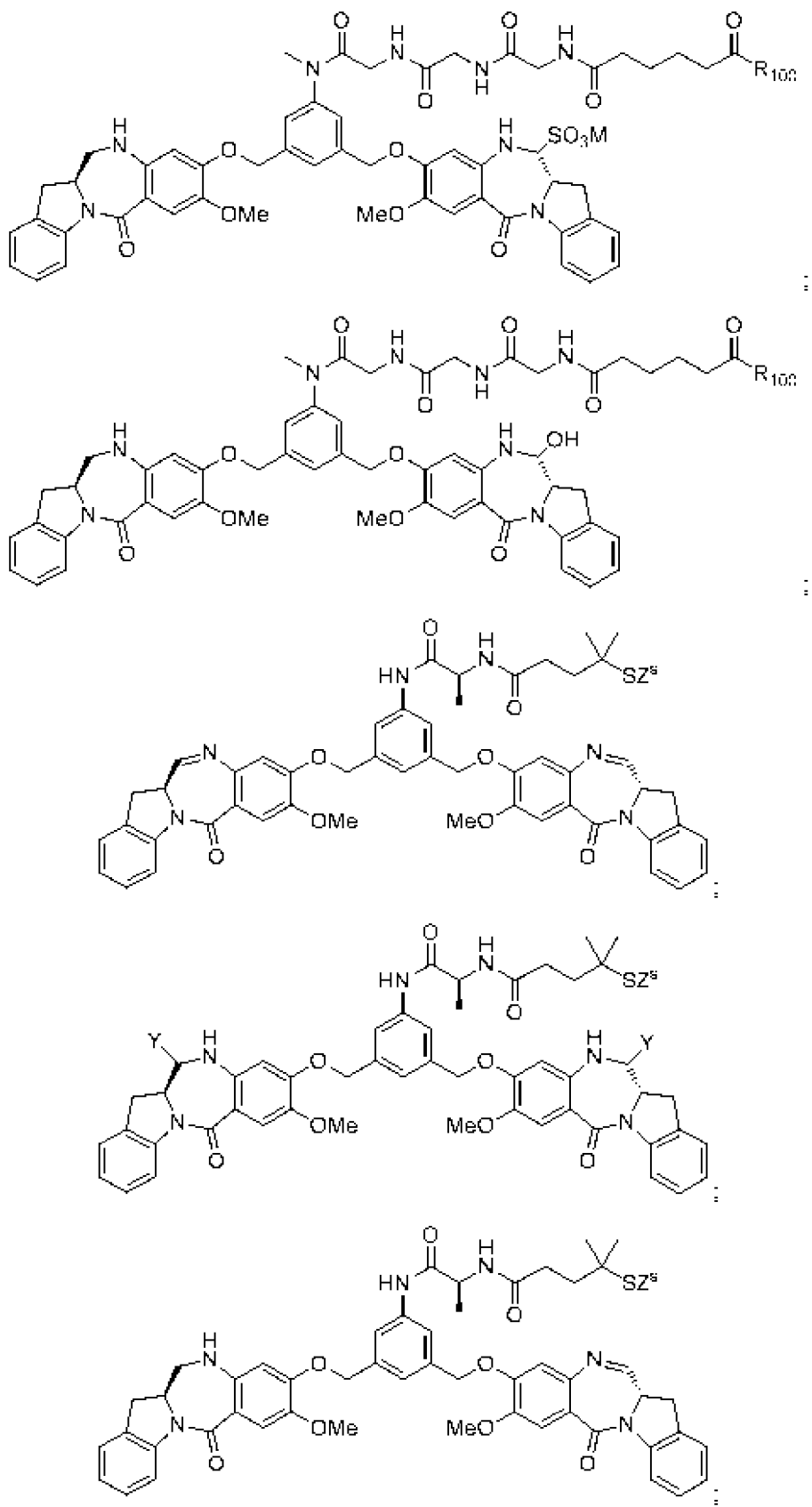


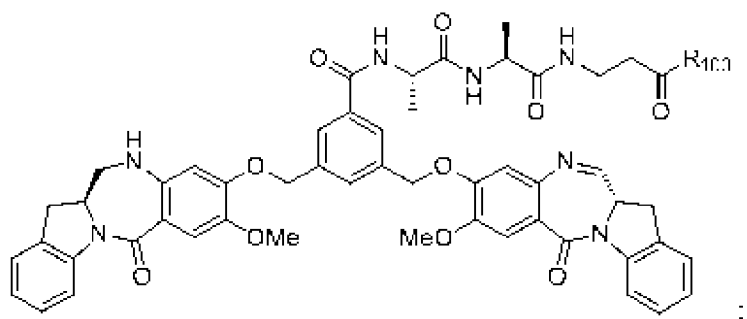
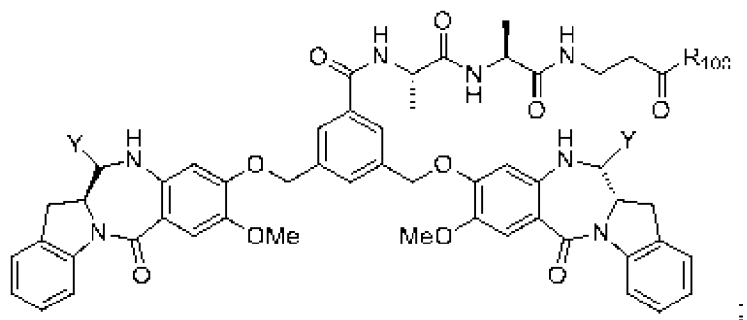
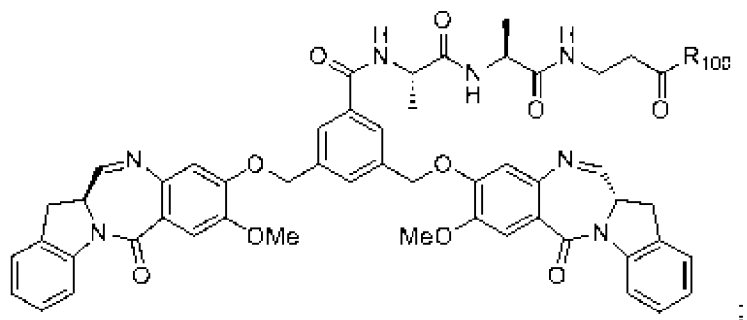
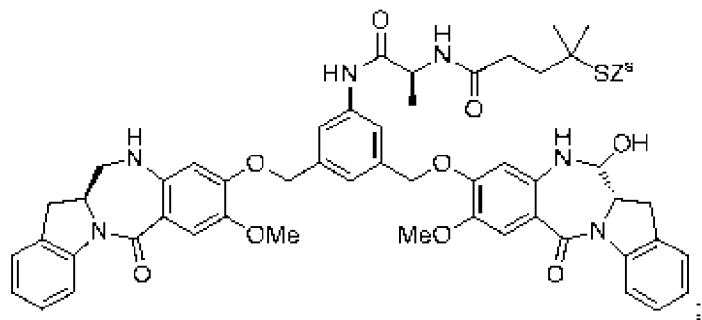
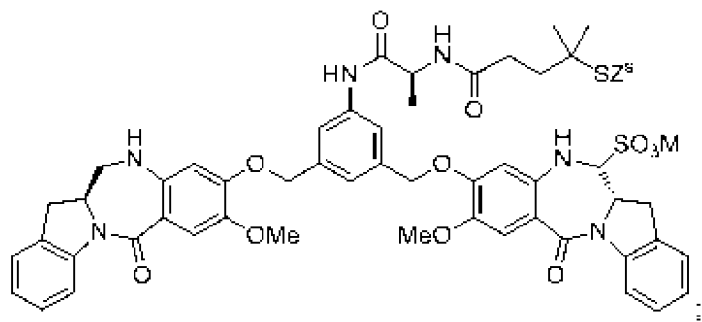


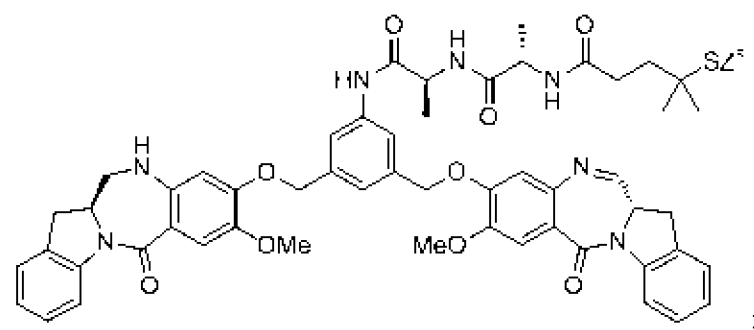
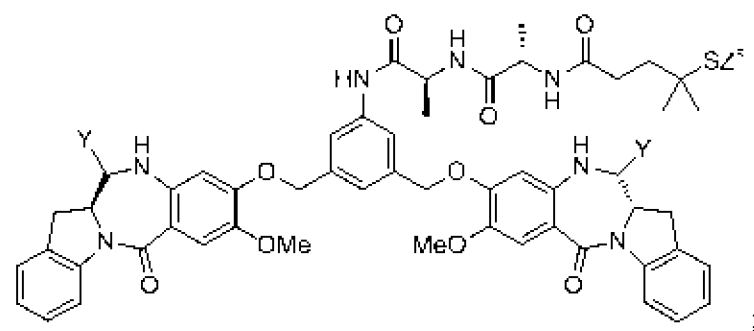
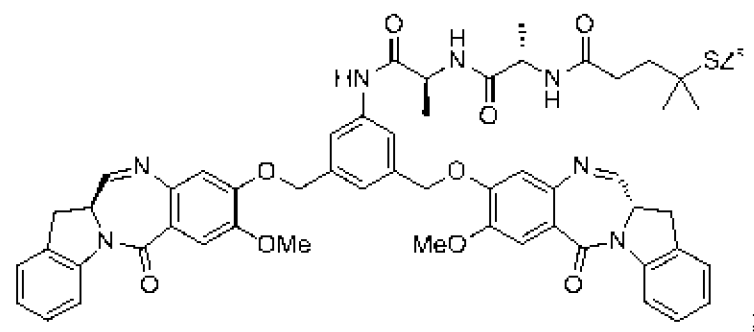
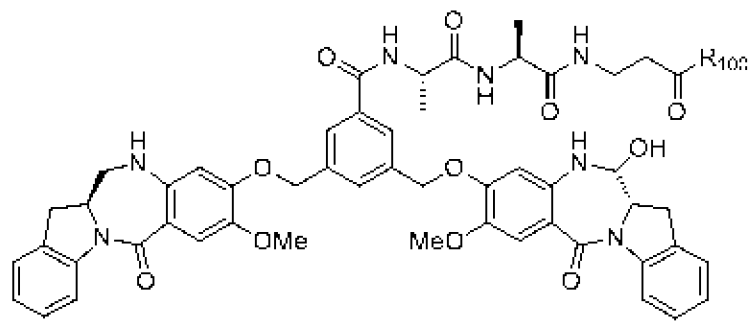
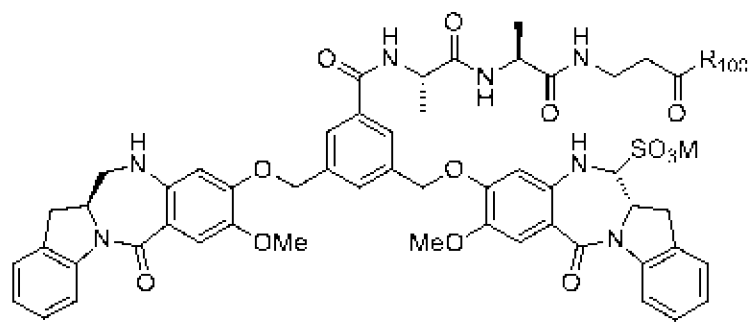


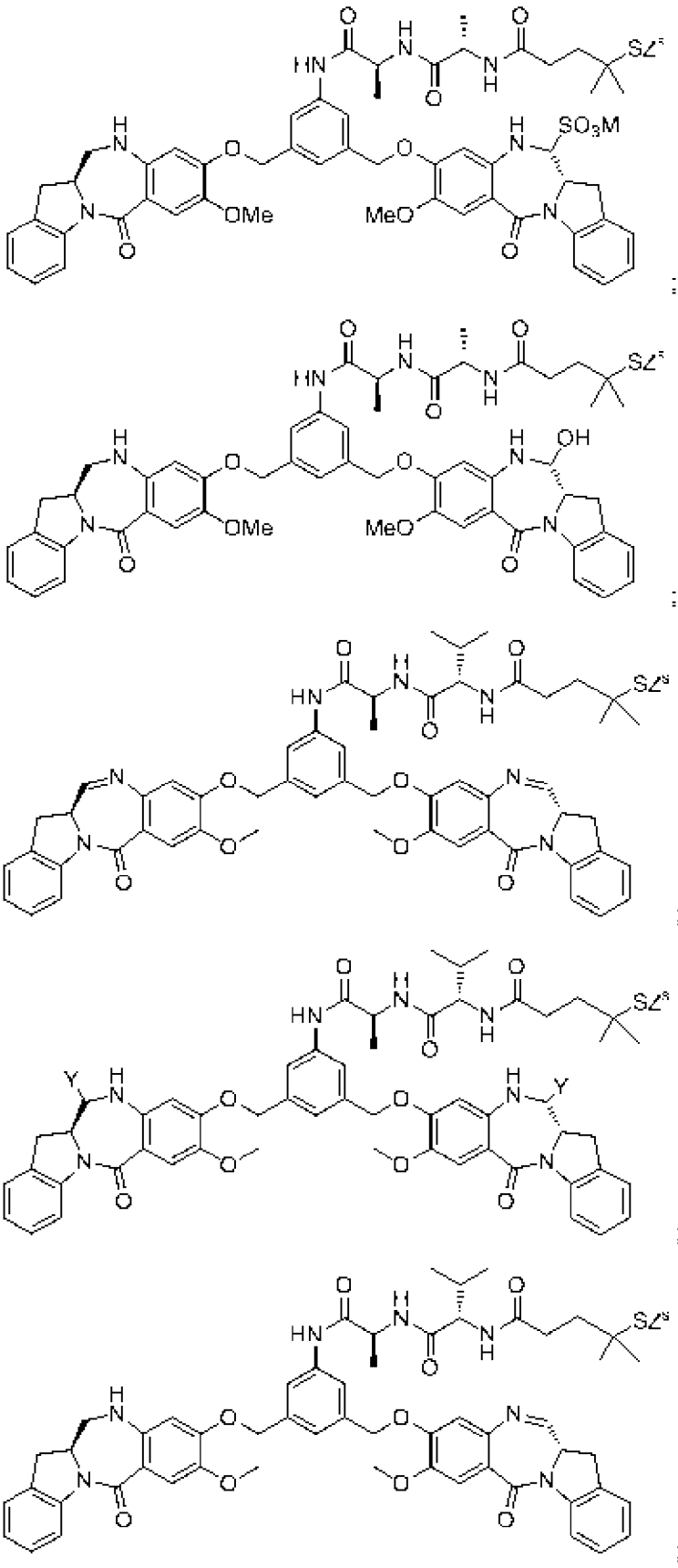


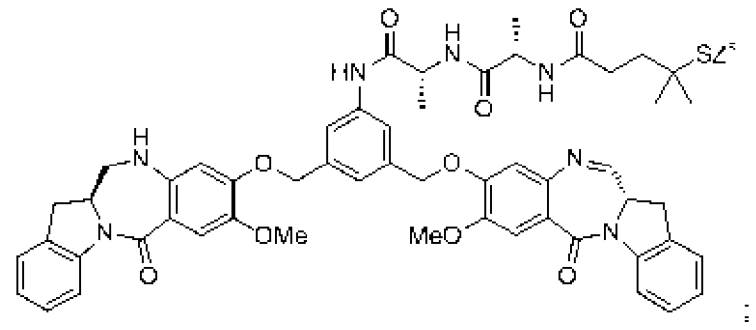
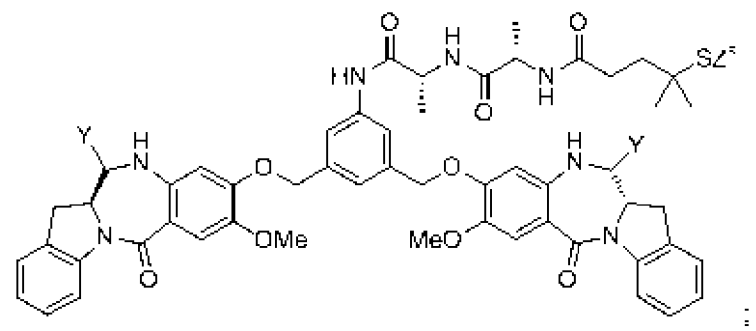
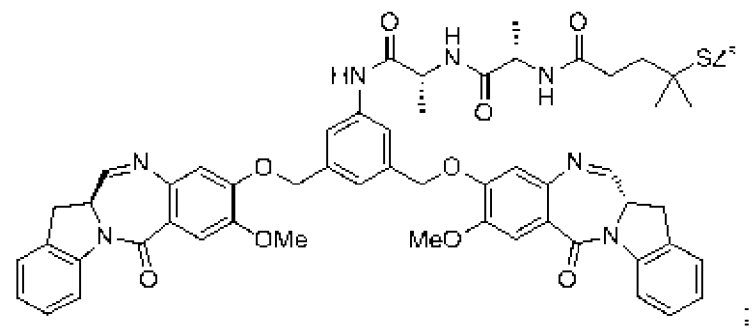
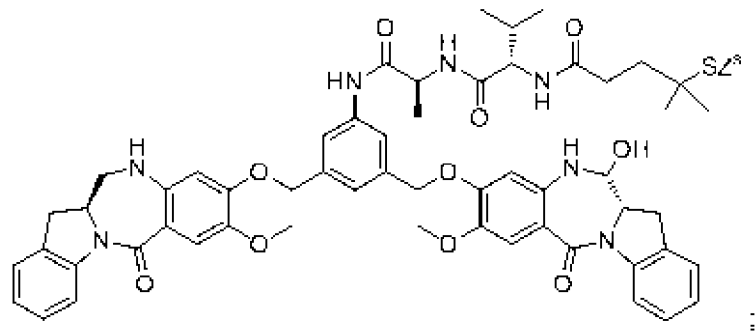
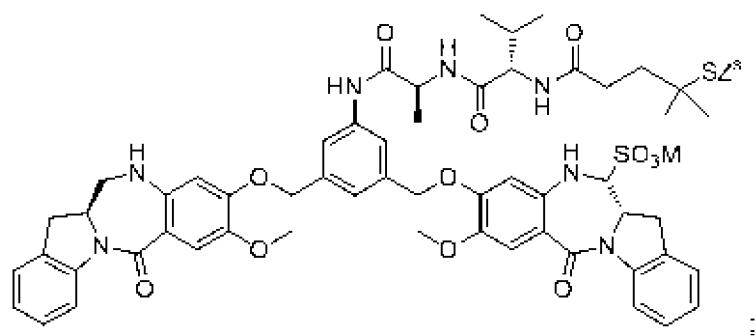


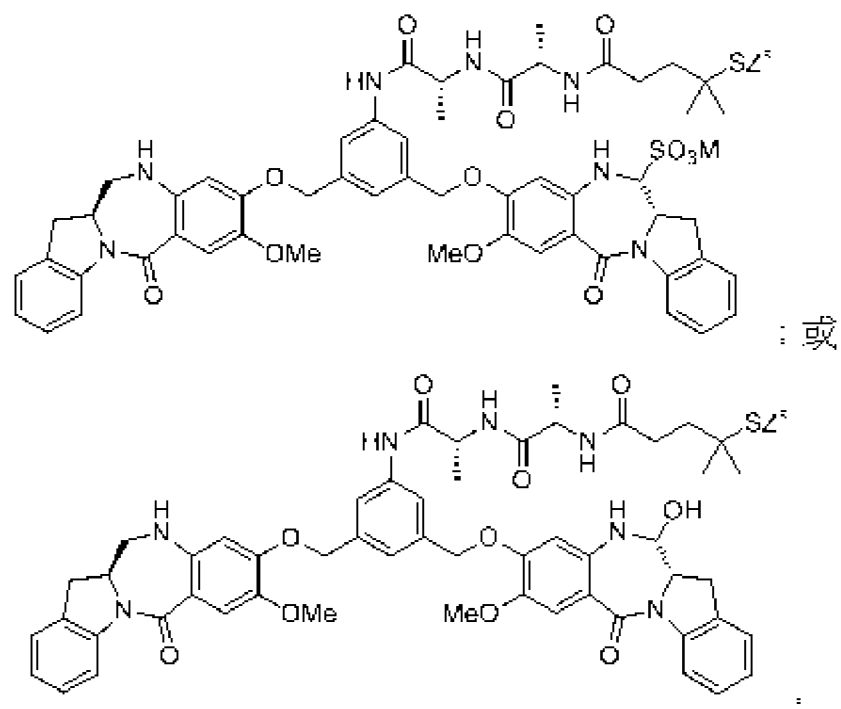




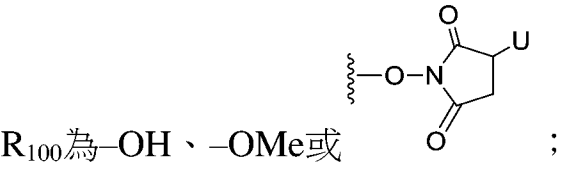








或其醫藥學上可接受之鹽，其中：



R₁₀₀為-OH、-OMe或

Y為-H、-OH或-SO₃M；且

M為醫藥學上可接受之陽離子(例如H⁺、Na⁺或K⁺)；

Z^s為-H、-SR^d、-C(=O)R^{d1}，或選自以上描述之式(a1’)-(a15’)。

【0133】 在一具體實施例中，Z^s係選自以上描述之式(a1)-(a15)。

【0134】 在一更具體之實施例中，Z^s係選自式(a7)、(a8)、(a9)及(a15)。在一甚至更具體之實施例中，Z^s係由式(a9)表示。或者，Z^s係由式(a7)表示。

【0135】 在另一具體實施例中，Z^s為-H。

【0136】 在另一具體實施例中，Y為-SO₃M。或者，Y為-OH。

【0137】 本發明亦包括本文所描述之任何細胞毒性化合物或細胞結合劑-細胞毒性劑偶聯物之代謝產物。

合成細胞毒性化合物

【0138】 本發明之細胞毒性化合物可根據美國專利號8,765,740及美國申

請公開案號2012/0238731中所描述之方法製備。

【0139】 用於製備本發明之細胞毒性二聚體化合物之代表性方法顯示於實例1-10中。

細胞結合劑

【0140】 本發明之偶聯物作為治療劑之效用取決於適當細胞結合劑之謹慎選擇。細胞結合劑可為目前已知或將瞭解之任何類別，包括肽類及非肽類。一般而言，該等類別可為抗體(諸如多株抗體及單株抗體，尤其是單株抗體)、淋巴因子、激素、生長因子、維生素(諸如葉酸等，其可結合至其細胞表面受體，例如葉酸受體)、養分轉運分子(諸如轉鐵蛋白)或任何其他細胞結合分子或物質。

【0141】 適當細胞結合劑之選擇係一個選擇問題，其部分取決於欲靶向之特定細胞群，而在許多(但非全部)情形中，人類單株抗體係良好的選擇，若適當抗體係可獲得的。舉例而言，單株抗體MY9係特異性結合至CD33抗原之鼠類IgG₁抗體(J.D. Griffin等人, *Leukemia Res.*, 8:521 (1984))，且在靶細胞表現CD33，如在急性骨髓性白血病(AML)中時可使用。

【0142】 在某些實施例中，細胞結合劑不為蛋白質。舉例而言，在某些實施例中，細胞結合劑可為結合至維生素受體(諸如細胞表面受體)之維生素。就此而言，維生素A結合至視黃醇結合蛋白(RBP)，形成複合物，該複合物又以高親和力結合STRA6受體且增加維生素A之攝入。在另一實例中，葉酸/葉酸鹽/維生素B₉以高親和力結合細胞表面葉酸受體(FR)，例如FR α 。可使用葉酸或結合至FR α 之抗體靶向在卵巢腫瘤及其他腫瘤上表現之葉酸受體。此外，維生素D及其類似物結合至維生素D受體。

【0143】 在其他實施例中，細胞結合劑為一種蛋白質或多肽，或包含蛋白質或多肽的化合物，包括抗體、非抗體蛋白質或多肽。較佳地，該等蛋白質或多肽包含一個或多個帶有側鏈-NH₂基團之Lys殘基。Lys側鏈-NH₂基團可共價連

接至雙官能交聯劑，該等交聯劑又連接至本發明之二聚體化合物，由此將細胞結合劑偶聯至本發明之二聚體化合物。每一基於蛋白質之細胞結合劑均可含有多個可用於經雙官能交聯劑連接本發明之化合物的Lys側鏈-NH₂基團。

【0144】 在一個實施例中，GM-CSF，一種結合至骨髓細胞之配體/生長因子，可用作針對來自急性骨髓性白血病之患病細胞的細胞結合劑。結合至活化T細胞之IL-2可用於預防移植物排斥反應，用於治療及預防移植物抗宿主疾病，及用於治療急性T細胞白血病。結合至黑素細胞之MSH及可針對黑素瘤之抗體可用於治療黑素瘤。表皮生長因子可用於靶向鱗狀細胞癌，諸如肺及頭頸部之鱗狀細胞癌。生長抑素可用於靶向神經母細胞瘤及其他腫瘤類型。雌激素(或雌激素類似物)可用於靶向乳癌。雄激素(或雄激素類似物)可用於靶向睪丸。

【0145】 在某些實施例中，細胞結合劑可為淋巴因子、激素、生長因子、集落刺激因子或養分轉運分子。

【0146】 在某些實施例中，細胞結合劑為抗體模擬物，諸如錨蛋白重複序列蛋白、Centyrin、或adnectin/單抗體。

【0147】 在其他實施例中，細胞結合劑為抗體、單鏈抗體、特異性結合至靶細胞之抗體片段、單株抗體、單鏈單株抗體、特異性結合至靶細胞之單株抗體片段(或「抗原結合部分」、嵌合抗體、特異性結合至靶細胞之嵌合抗體片段(「抗原結合部分」、結構域抗體(例如sdAb)，或特異性結合至靶細胞之結構域抗體片段。

【0148】 在某些實施例中，細胞結合劑為人類化抗體、人類化單鏈抗體或人類化抗體片段(或「抗原結合部分」)。在一具體實施例中，人類化抗體為huMy9-6或另一相關抗體，如美國專利號7,342,110及7,557,189中所描述。在另一具體實施例中，人類化抗體為美國臨時申請案號61/307,797、61/346,595及61/413,172以及美國申請案號13/033,723(以US 2012/0009181 A1公開)所描述之抗葉酸受體抗

體。所有該等申請案之教示內容以引用之方式整體併入本文中。

【0149】 在某些實施例中，細胞結合劑為表面重塑之抗體、表面重塑之單鏈抗體、表面重塑之抗體片段(或「抗原結合部分」)或雙特異性抗體。

【0150】 在某些實施例中，細胞結合劑為微型抗體、avibody、雙鏈抗體、三鏈抗體、四鏈抗體、奈米抗體、probody、結構域抗體或單抗體。

【0151】 換言之，示例性細胞結合劑可包括抗體、單鏈抗體、特異性結合至靶細胞之抗體片段、單株抗體、單鏈單株抗體、特異性結合至靶細胞之單株抗體片段、嵌合抗體、特異性結合至靶細胞之嵌合抗體片段、雙特異性抗體、結構域抗體、特異性結合至靶細胞之結構域抗體片段、干擾素(例如 α 、 β 、 γ)、淋巴因子(例如IL-2、IL-3、IL-4及IL-6)、激素(例如胰島素、促甲狀腺激素釋放激素(TRH)、黑素細胞刺激激素(MSH)及類固醇激素(例如雄激素及雌激素))、維生素(例如葉酸)、生長因子(例如EGF、TGF- α 、FGF、VEGF)、集落刺激因子、養分轉運分子(例如轉鐵蛋白；參見O'Keefe等人(1985) *J. Biol. Chem.* 260:932-937，以引用之方式併入本文中)、Centyrin (基於III型纖維連接蛋白(FN3)重複序列之共同序列的蛋白質支架；參見美國專利公開案2010/0255056、2010/0216708及2011/0274623，以引用之方式併入本文中)、錨蛋白重複序列蛋白(例如經設計之錨蛋白重複序列蛋白，稱為DARPin；參見美國專利公開案號2004/0132028、2009/0082274、2011/0118146及2011/0224100，以引用之方式併入本文中；且亦參見C. Zahnd等人, *Cancer Res.* (2010) 70:1595-1605；Zahnd等人, *J. Biol. Chem.* (2006) 281(46):35167-35175；及Binz, H.K., Amstutz, P. & Pluckthun, A., *Nature Biotechnology* (2005) 23:1257-1268，以引用之方式併入本文中)、錨蛋白樣重複序列蛋白或合成肽(參見例如，參見美國專利公開案號2007/0238667；美國專利號7,101,675；WO 2007/147213；及WO 2007/062466，以引用之方式併入本文中)、Adnectin (纖維連接蛋白結構域支架蛋白；參見美國專利公開案號

2007/0082365、2008/0139791，以引用之方式併入本文中)、Avibody (包括雙鏈抗體、三鏈抗體及四鏈抗體；參見美國公開案號2008/0152586及2012/0171115)、雙受體重靶向(dual receptor retargeting, DART)分子(P.A. Moore等人, *Blood*, 2011; 117(17):4542-4551；Veri MC等人, *Arthritis Rheum.*, 2010年3月30日；62(7):1933-43；Johnson, S等人, *J. Mol. Biol.*, 2010年4月9日;399(3):436-49)、細胞穿透超荷電蛋白(cell penetrating supercharged protein)(*Methods in Enzymol.* 502, 293-319 (2012)及其他細胞結合分子或物質。

【0152】 在某些實施例中，細胞結合劑可為結合至靶細胞上之部分(諸如細胞表面受體)之配體。舉例而言，該配體可為生長因子或其結合至生長因子受體之片段，或可為細胞因子或其結合至細胞因子受體之片段。在某些實施例中，該生長因子受體或細胞因子受體為細胞表面受體。

【0153】 在細胞結合劑為抗體或其抗原結合部分(包括抗體衍生物)，或某些抗體模擬物之某些實施例中，CBA可結合至靶細胞上之配體，諸如細胞表面配體，包括細胞表面受體。

【0154】 具體示例性抗原或配體可包括腎素；生長激素(例如人生長激素及牛生長激素)；生長激素釋放因子；副甲狀腺激素；促甲狀腺激素；脂蛋白； α -1-抗胰蛋白酶；胰島素A鏈；胰島素B鏈；胰島素原；促卵泡激素；降鈣素；促黃體激素；胰高血糖素；凝血因子(例如因子vmc、因子IX、組織因子及血管性血友病因子)；抗凝血因子(例如蛋白質C)；心房利鈉肽；肺表面活性物質；纖溶酶原活化物(例如尿激酶、人尿或組織型纖溶酶原活化物)；蛙皮素；凝血酶；造血生長因子；腫瘤壞死因子- α 及腫瘤壞死因子- β ；腦啡肽酶；RANTES (亦即，正常T細胞表現及分泌之活性調控蛋白)；人巨噬細胞炎性蛋白-1- α ；血清白蛋白(人血清白蛋白)；苗勒抑制物質(Muellerian-inhibiting substance)；鬆弛素A鏈；鬆弛素B鏈；鬆弛素原；小鼠促性腺激素相關肽；微生物蛋白(β -內醯胺酶)；DNA酶；

IgE；細胞毒性T-淋巴細胞相關抗原(例如CTLA-4)；抑制素；活化素；血管內皮生長因子；激素或生長因子受體；蛋白質A或D；類風濕因子；神經營養因子(例如骨源性神經營養因子、神經營養素-3、神經營養素-4、神經營養素-5或神經營養素-6)、神經生長因子(例如NGF- β)；血小板源性生長因子；纖維母細胞生長因子(例如aFGF及bFGF)；纖維母細胞生長因子受體2；表皮生長因子；轉化生長因子(例如TGF- α 、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4及TGF- β 5)；胰島素樣生長因子-I及胰島素樣生長因子-II；des(1-3)-IGF-I(腦IGF-I)；胰島素樣生長因子結合蛋白；黑素轉鐵蛋白；EpCAM；GD3；FLT3；PSMA；PSCA；MUC1；MUC16；STEAP；CEA；TENB2；EphA受體；EphB受體；葉酸受體；FOLR1；間皮素；cripto； $\alpha_v\beta_6$ ；整合素；VEGF；VEGFR；EGFR；轉鐵蛋白受體；IRTA1；IRTA2；IRTA3；IRTA4；IRTA5；CD蛋白(例如CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD8、CD11、CD14、CD19、CD20、CD21、CD22、CD25、CD26、CD28、CD30、CD33、CD36、CD37、CD38、CD40、CD44、CD52、CD55、CD56、CD59、CD70、CD79、CD80、CD81、CD103、CD105、CD123、CD134、CD137、CD138及CD152)、一種或多種腫瘤相關抗原或細胞表面受體(參見美國公開案號2008/0171040或美國公開案號2008/0305044，以引用之方式整體併入)；紅細胞生成素；骨誘導因子；免疫毒素；骨形態發生蛋白；干擾素(例如干擾素- α 、干擾素- β 及干擾素- γ)；集落刺激因子(例如M-CSF、GM-CSF及G-CSF)；介白素(例如IL-1至IL-10)；超氧化物歧化酶；T細胞受體；表面膜蛋白；衰變加速因子；病毒抗原(例如HIV包膜蛋白之一部分)；轉運蛋白、歸巢受體；地址素；調控蛋白；整合素(例如CD11a、CD11b、CD11c、CD18、ICAM、VLA-4及VCAM)；腫瘤相關抗原(例如HER2、HER3及HER4受體)；內皮素；c-Met；c-kit；IGF1R；PSGR；NGEP；PSMA；PSCA；TMEFF2；LGR5；B7H4；及以上所列多肽中任一種之片段。

【0155】 如本文所使用，術語「**抗體**」包括免疫球蛋白(Ig)分子。在某些實施例中，該抗體為全長抗體，其包含四條多肽鏈，即，藉由二硫鍵互連之兩條重鏈(HC)及兩條輕鏈(LC)。每一重鏈包含重鏈可變區(HCVR或VH)及重鏈恆定區(CH)。重鏈恆定區包含三個結構域，即CH1、CH2及CH3。每一輕鏈包含輕鏈可變區(LCVR或VL)及輕鏈恆定區(CL)，該輕鏈恆定區包含一個結構域，即CL。VH區及VL區可進一步細分為高變區，稱為互補決定區(CDR)。在該等區域中間雜有保守性較強之構架區(FR)。每一VH及VL係由自胺基末端至羧基末端按以下次序排列之三個CDR及四個FR構成：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及FR4。

【0156】 在某些實施例中，該抗體為IgG、IgA、IgE、IgD或IgM。在某些實施例中，該抗體為IgG1、IgG2、IgG3或IgG4；或IgA1或IgA2。

【0157】 在某些實施例中，細胞結合劑為單株抗體之「抗原結合部分」，其共有對於抗原與抗體結合至關重要之序列(諸如美國專利號7,342,110及7,557,189中所描述之huMy9-6或其相關抗體，該等專利以引用之方式併入本文中)。

【0158】 如本文所使用，術語抗體之「**抗原結合部分**」(或有時可互換稱為「**抗體片段**」)包括抗體之保持特異性結合至抗原之能力的一個或多個片段。經顯示，抗體之抗原結合功能可由全長抗體之某些片段執行。術語抗體之「**抗原結合部分**」內所涵蓋之結合片段的實例包括(但不限於)：(i) **Fab**片段，一種由VL、VH、CL及CH1結構域組成之單價片段(例如，由木瓜蛋白酶消化之抗體得到三個片段：兩個抗原結合**Fab**片段，及一個不結合抗原之**Fc**片段)；(ii) **F(ab')₂**片段，一種包含在鉸鏈區藉由二硫橋連接之兩個**Fab**片段的二價片段(例如，由胃蛋白酶消化之抗體得到兩個片段：二價抗原結合**F(ab')₂**片段，及不結合抗原之**pFc'**片段)及其相關**F(ab')**單價單元；(iii)由VH及CH1結構域組成之**Fd**片段(亦

即，重鏈中包括在Fab中之部分)；(iv)由抗體單一臂之VL及VH結構域組成之**Fv**片段，及相關**二硫鍵連接之Fv**；(v) **dAb** (結構域抗體)或**sdAb** (單結構域抗體)片段(Ward等人, *Nature* 341:544-546, 1989)，其由VH結構域組成；及(vi)分離之互補決定區(**CDR**)。在某些實施例中，該抗原結合部分為**sdAb** (單結構域抗體)。

【0159】 在某些實施例中，抗原結合部分亦包括某些工程改造或重組之衍生物(或「**衍生物抗體**」)，該等衍生物除可能未見於天然存在之抗體中之元件或序列外，亦包括抗體中保持特異性結合至抗原之能力的一個或多個片段。

【0160】 舉例而言，儘管Fv片段之兩個結構域VL及VH係由獨立基因編碼，但其可使用重組法由合成連接子接合，該連接子能夠使其製造成VL區與VH區配對形成單價分子之單一蛋白鏈(稱為單鏈Fv (**scFv**)；參見例如，Bird等人, *Science* 242:423-426, 1988；及Huston等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883, 1988)。

【0161】 在本文所描述之所有實施例中，scFv之N末端可為VH結構域(亦即，N-VH-VL-C)或VL結構域(亦即，N-VL-VH-C)。

【0162】 二價(或雙價)單鏈可變片段(**di-scFv**、**bi-scFv**)可藉由連接兩個scFv進行工程改造。由此產生具有兩個VH區及兩個VL區之單一肽鏈，得到串聯scFv (**tascFv**)。可藉由以頭至尾之方式連接三個或更多個scFv，類似地產生更多串聯重複序列，諸如**tri-scFv**。

【0163】 在某些實施例中，scFv可經由連接肽連接，該等連接肽過短(約五個胺基酸)而無法使兩個可變區折疊在一起，迫使scFv二聚合，並形成**雙鏈抗體**(參見例如，Holliger等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448, 1993；Poljak等人, *Structure* 2:1121-1123, 1994)。雙鏈抗體可為雙特異性或單特異性的。經顯示，雙鏈抗體之解離常數比相應scFv低40倍，即對於靶具有高得多的親和力。

【0164】 又，較短之連接子(一個或兩個胺基酸)導致形成三聚體，或所謂

的**三鏈抗體(triobody/tribody)**。**四鏈抗體**亦以類似之方式產生。其對其靶之親和力甚至高於雙鏈抗體。雙鏈抗體、三鏈抗體及四鏈抗體有時統稱為「**AVIBODY™**」細胞結合劑(或簡稱為「**AVIBODY**」)。即，具有兩個、三個或四個靶結合區(TBR)之**AVIBODY**常稱為雙鏈抗體、三鏈抗體及四鏈抗體。有關詳情，參見例如，美國公開案號2008/0152586及2012/0171115，其完整教示內容以引用之方式併入本文中。

【0165】 所有該等形式均可由對兩種或更多種不同抗原具有特異性之可變片段構成，在此情形中，其為雙特異性或多特異性抗體類型。舉例而言，某些雙特異性串聯di-scFv稱為雙特異性T細胞接合物(**BiTE**)。

【0166】 在某些實施例中，串聯scFv或雙鏈抗體/三鏈抗體/四鏈抗體中之每個scFv可具有相同或不同之結合特異性，且各自可獨立地具有N末端VH或N末端VL。

【0167】 單鏈Fv(scFv)亦可與Fc部分，諸如人IgG Fc部分融合以獲得類IgG特性，但儘管如此，其仍由單一基因編碼。由於此類**scFv-Fc**蛋白質在哺乳動物體內之短暫產生可易於達到毫克量，故此衍生物抗體形式特別適合於許多研究應用。

【0168】 **Fcab**為由抗體之Fc恆定區工程改造之抗體片段。**Fcab**可表現為可溶性蛋白質，或其可重新工程改造成全長抗體，諸如IgG，由此產生**mAb2**。**mAb2**係**Fcab**代替正常Fc區之全長抗體。利用該等另外之結合位點，**mAb2**雙特異性單株抗體可同時結合兩種不同靶。

【0169】 在某些實施例中，該等工程改造之抗體衍生物具有減小之大小的抗原結合Ig源性重組蛋白(「微型化」之完整大小**mAb**)，其係藉由移除認為對功能不重要之結構域而產生。一個最佳實例為**SMIP**。

【0170】 小模組免疫藥物或**SMIP**係主要由抗體(免疫球蛋白)之部分構建

的人工蛋白質且擬用作藥物。**SMIP**具有與抗體類似之生物半衰期，但小於抗體，且因此可具有更佳之組織滲透特性。**SMIP**係包含一個結合區、作為連接子之一個鉸鏈區及一個效應子結構域之單鏈蛋白質。該結合區包含經修飾之單鏈可變片段(scFv)，且該蛋白質之其餘部分可由抗體(諸如IgG1)之Fc(諸如CH2及作為效應子結構域之CH3)及鉸鏈區構造。經遺傳修飾之細胞產生呈抗體樣二聚體形式之**SMIP**，其比實際抗體小約30%。

【0171】 此類工程改造之微型化抗體的另一實例為「**單抗體**」，其中鉸鏈區已自IgG4分子移除。IgG4分子不穩定且可彼此交換輕鏈-重鏈異二聚體。鉸鏈區之缺失防止重鏈-重鏈完全配對，留下高度特異性之單價輕鏈/重鏈異二聚體，同時保持Fc區以確保活體內穩定性及半衰期。

【0172】 **單結構域抗體(sdAb)**，包括但不限於Ablynx稱為**奈米抗體**之該等抗體)係由單一單體可變抗體結構域組成之抗體片段。與完整抗體相同，其能夠選擇性結合至特定抗原，但由於其分子量僅為12-15 kDa而小得多。在某些實施例中，單結構域抗體係由重鏈抗體(hcIgG)工程改造得到。首例此類sdAb係基於在駱駝中發現之hcIgG工程改造得到，稱為V_HH片段。在某些實施例中，單結構域抗體係使用V_{NAR}片段，由IgNAR(「免疫球蛋白新抗原受體」，參見下文)工程改造得到。軟骨魚類(諸如鯊魚)具有此類重鏈IgNAR抗體。在某些實施例中，sdAb係藉由將來自常見免疫球蛋白G(IgG)，諸如來自人類或小鼠之免疫球蛋白G的二聚體可變結構域分離成單體來進行工程改造。在某些實施例中，奈米抗體係衍生自重鏈可變結構域。在某些實施例中，奈米抗體係衍生自輕鏈可變結構域。在某些實施例中，sdAb係藉由針對與靶抗原之結合篩選單結構域重鏈序列(例如人單結構域HC)文庫來獲得。

【0173】 單一可變新抗原受體結構域抗體片段(V_{NAR}，或**V_{NAR}結構域**)係衍生自軟骨魚類(例如鯊魚)免疫球蛋白新抗原受體抗體(IgNAR)。作為已知最小的

基於免疫球蛋白之蛋白質支架之一，此類單結構域蛋白質展現出有利的大小及隱蔽表位識別特性。成熟IgNAR抗體由一個可變新抗原受體(V_{NAR})結構域及五個恆定新抗原受體(C_{NAR})結構域之同二聚體組成。此分子具有高度穩定性，且具有高效之結合特徵。其固有穩定性可能歸因於(i)潛在的Ig支架，相較於鼠類抗體中所見之習知抗體VH及VL結構域，其呈現相當大數量的帶電荷及親水性表面暴露殘基；及(ii)使包括環間二硫橋及環內氫鍵模式在內之互補決定區(CDR)環中的結構特徵穩定。

【0174】 微型抗體係包含連接至CH結構域，諸如CH3 γ 1 (IgG1之CH3結構域)或CH4 ϵ (IgE之CH4結構域)之scFv的工程改造之抗體片段。舉例而言，癌胚抗原(CEA)特異性scFv連接至CH3 γ 1，產生微型抗體，先前已證實，其結合活體內快速清除作用而具有優良的腫瘤靶向性(Hu等人, *Cancer Res.*56:3055–3061, 1996)。scFv可具有N末端VH或VL。連接可為產生非共價、無鉸鏈之微型抗體的短肽(例如，兩個胺基酸之連接子，諸如ValGlu)。或者，該連接可為產生共價、鉸鏈-微型抗體之IgG1鉸鏈及GlySer連接肽。

【0175】 天然抗體為單特異性但二價的，因為其表現兩個相同的抗原結合結構域。相比之下，在某些實施例中，某些工程改造之抗體衍生物為雙特異性或多特異性分子，其具有兩個或更多個不同的抗原結合結構域，各自具有不同的靶特異性。雙特異性抗體可藉由融合兩個抗體產生細胞來產生，其各自具有不同的特異性。該等「四源雜交瘤」產生多種分子物質，因為兩個不同的輕鏈與兩個不同的重鏈在四源雜交瘤中以多種配置自由重組。自此，已使用多種技術(參見上文)產生雙特異性Fab、scFvs及完整大小之mAb。

【0176】 雙可變結構域免疫球蛋白(DVD-Ig)係一類同時靶向兩個抗原/表位之雙特異性IgG (DiGiammarino等人, *Methods Mol Biol.* 899:145-56, 2012)。該分子含有Fc區及恆定區，其配置類似於習知IgG。然而，DVD-Ig蛋白之獨特性在於，

該分子之每個臂均含有兩個可變結構域(VD)。一個臂內的VD係串聯連接且可具有不同結合特異性。

【0177】 亦可藉由例如表現具有兩個不同Fab及一個Fc之雙特異性抗體來產生三特異性抗體衍生物分子。一個實例為小鼠IgG2a抗Ep-CAM、大鼠IgG2b抗CD3四源雜交瘤(稱為BiUII)，其被認為容許表現Ep-CAM之腫瘤細胞、表現CD3之T細胞及表現FC γ RI之巨噬細胞共定位，由此增強免疫細胞之共刺激及抗腫瘤功能。

【0178】 **Probody**為在健康組織中保持惰性，但在疾病環境中特異性活化(例如，經由疾病環境中富集或特有之蛋白酶的蛋白酶裂解)的完全重組之經掩蔽單株抗體。參見Desnoyers等人, *Sci. Transl. Med.*, 5:207ra144, 2013。可對本文所描述之任何抗體或其抗原結合部分使用類似掩蔽技術。

【0179】 **內抗體**係經修飾以在細胞內定位，在細胞內作用以結合至細胞內抗原之抗體。內抗體可保留在細胞質中，或可具有核定位信號，或可具有供ER靶向之KDEL序列。內抗體可為單鏈抗體(scFv)、具有超穩定性之經修飾免疫球蛋白VL結構域、選擇的對還原性較強之細胞內環境具有抗性之抗體，或以與麥芽糖結合蛋白或其他穩定細胞內蛋白質之融合蛋白形式表現。此類優化使內抗體之穩定性及結構得到改善，且可大體上適用於本文所描述之任何抗體或其抗原結合部分。

【0180】 本發明之抗原結合部分或衍生物抗體與衍生/工程改造得到其之抗體相比較，可具有基本上相同或同一的(1)輕鏈及/或重鏈CDR3區；(2)輕鏈及/或重鏈CDR1、CDR2及CDR3區；或(3)輕鏈及/或重鏈區。在該等區域內之序列可含有保守性胺基酸取代，包括在CDR區內之取代。在某些實施例中，存在不超過1、2、3、4或5個保守性取代。在一替代方案中，該等抗原結合部分或衍生物抗體具有與衍生/工程改造得到其之抗體至少約90%、95%、99%或100%同一

的輕鏈區及/或重鏈區。相較於該抗體，該等抗原結合部分或衍生物抗體可對靶抗原具有基本上相同之特異性及/或親和力。在某些實施例中，該等抗原結合部分或衍生物抗體之 K_d 及/或 k_{off} 值在本文所描述之抗體的10倍(更高或更低)、5倍(更高或更低)、3倍(更高或更低)或2倍(更高或更低)內。

【0181】 在某些實施例中，該等抗原結合部分或衍生物抗體可衍生自/工程改造自完全人類抗體、人類化抗體或嵌合抗體，且可根據任何技術認可之方法製備。

【0182】 單株抗體技術允許產生特異性極高的呈特異性單株抗體形式之細胞結合劑。此項技術中尤其熟知的是藉由用所關注之抗原，諸如完整靶細胞、自靶細胞分離之抗原、完整病毒、減毒之完整病毒及病毒蛋白(諸如病毒外殼蛋白)使小鼠、大鼠、倉鼠或任何其他哺乳動物免疫來產生單株抗體的技術。亦可使用敏化之人類細胞。產生單株抗體之另一方法係使用scFv(單鏈可變區)，尤其是人scFv之噬菌體文庫(參見例如，Griffiths等人,美國專利號5,885,793及5,969,108；McCafferty等人, WO 92/01047；Liming等人, WO 99/06587)。此外，亦可使用美國專利號5,639,641中所揭示之表面重塑抗體，以及嵌合抗體及人類化抗體。

【0183】 細胞結合劑亦可為由噬菌體呈現技術(參見例如，Wang等人,*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2011) 108(17), 6909-6914)或肽文庫技術(參見例如，Dane等人,*Mol. Cancer. Ther.* (2009) 8(5):1312-1318)得到之肽。

【0184】 在某些實施例中，本發明之CBA亦包括抗體模擬物，諸如DARPin、親和體、人類泛素、affitin、抗運載蛋白、高親和性多聚體、Fynomer、Kunitz結構域肽、單抗體或nanofitin。

【0185】 如本文所使用，術語「**DARPin**」及「(經設計)錨蛋白重複序列蛋白」可互換使用，指典型地展現優先(有時特異性)靶結合的某些遺傳工程改造

之抗體模擬蛋白。該靶可為蛋白質、碳水化合物或其他化學實體，且結合親和力可相當高。**DARPin**可衍生自含天然錨蛋白重複序列之蛋白質，且較佳由該等蛋白質之至少三個、通常四個或五個錨蛋白重複基元(典型地，每一錨蛋白重複基元中約33個殘基)組成。在某些實施例中，**DARPin**含有約四個或五個重複序列，且分子質量可分別為約14或18 kDa。可在DNA層面上，使用多種技術，諸如核糖體呈現或信號識別顆粒(**SRP**)噬菌體呈現來產生具有隨機化潛在靶相互作用殘基及超過 10^{12} 個變異體之多樣性的**DARPin**文庫，以用於選擇以皮莫耳濃度之親和力及特異性結合所希望靶之**DARPin** (例如，充當受體促效劑或拮抗劑、反促效劑、酶抑制劑或簡單的靶蛋白結合劑)。有關**DARPin**製備，參見例如美國專利公開案號2004/0132028、2009/0082274、2011/0118146及2011/0224100；WO 02/20565及WO 06/083275 (其完整教示內容以引用之方式併入本文中)，且亦參見C. Zahnd等人(2010) *Cancer Res.*, 70:1595-1605；Zahnd等人(2006) *J. Biol. Chem.*, 281(46):35167-35175；及Binz, H.K., Amstutz, P. & Pluckthun, A. (2005) *Nature Biotechnology*, 23:1257-1268 (皆以引用之方式併入本文中)。有關相關錨蛋白樣重複序列蛋白或合成肽，亦參見美國專利公開案號2007/0238667；美國專利號7,101,675；WO 2007/147213；及WO 2007/062466 (其完整教示內容以引用之方式併入本文中)。

【0186】 **親和體**分子係工程改造成以高親和力結合至大量靶蛋白或肽，由此模擬單株抗體的小蛋白質。親和體由含58個胺基酸之三個 α 螺旋組成且莫耳質量為約6 kDa。經顯示，其可經受住高溫(90°C)或酸性及鹼性條件(pH 2.5或pH 11)，且已藉由原生文庫選擇獲得親和力低至亞奈莫耳濃度範圍之結合劑，且已在親和力成熟後獲得具有皮莫耳濃度親和力之結合劑。在某些實施例中，親和體與弱親電子試劑偶聯以共價結合至靶。

【0187】 **單抗體**(又稱為**Adnectin**)係能夠結合至抗原的遺傳工程改造之抗

體模擬蛋白。在某些實施例中，單抗體由94個胺基酸組成且分子質量為約10 kDa。其係基於人纖連蛋白之結構，更具體言之基於其III型第十個細胞外結構域，其結構類似於抗體可變結構域，具有形成桶狀之七個 β 折疊且在每一側上具有對應於三個互補決定區的三個暴露之環。可藉由修飾環BC (在第二個 β 折疊與第三個 β 折疊之間)及FG (在第六個折疊與第七個折疊之間)來定制對不同蛋白質具有特異性的單抗體。

【0188】 **三鏈抗體**係基於小鼠及人軟骨基質蛋白(CMP)之C末端捲曲螺旋區設計的自組裝抗體模擬物，其自組裝成為平行的三聚體複合物。其係藉由使特定靶結合部分與衍生自CMP之三聚化結構域融合而產生的高度穩定之三聚體靶向配體。所得融合蛋白可高效地自組裝成為充分確定的具有高穩定性之平行同源三聚體。關於該等三聚體靶向配體之表面電漿共振(SPR)分析證實相較於相應單體明顯增強之靶結合強度。細胞結合研究確定，此類三鏈抗體對於其對應受體具有優良結合強度。

【0189】 **Centyrin**係可使用基於共同FN3結構域序列之構架構建之文庫獲得的另一抗體模擬物(Diem等人, *Protein Eng. Des. Sel.*, 2014)。該文庫採用FN3結構域之C鏈、CD環、F鏈及FG環內之各種位置，且可針對特定靶選擇高親和力Centyrin變異體。

【0190】 在一個實施例中，細胞結合劑為抗葉酸受體抗體。更具體言之，抗葉酸受體抗體為特異性結合人葉酸受體1(又稱為葉酸受體 α (FR- α))之人類化抗體或其抗原結合片段。除非另外指示，否則如本文所使用，術語「人葉酸受體1」、「FOLR1」或「葉酸受體 α (FR- α)」係指任何天然人FOLR1。因此，所有該等術語均可指如本文所指示之蛋白質或核酸序列。術語「FOLR1」涵蓋「全長」未加工之FOLR1以及由在細胞中加工得到的任何FOLR1形式。FOLR1抗體包含：(a) 包含 GYFMN (SEQ ID NO: 1) 之重鏈 CDR1、包含

RIHPYDGDTFYNQXaa₁FXaa₂Xaa₃ (SEQ ID NO: 2)之重鏈CDR2，及包含YDGSRAMDY (SEQ ID NO: 3)之重鏈CDR3；及(b)包含KASQSVSFAGTSLMH (SEQ ID NO: 4)之輕鏈CDR1、包含RASNLEA (SEQ ID NO: 5)之輕鏈CDR2，及包含QQSREYPYT (SEQ ID NO: 6)之輕鏈CDR3；其中Xaa₁係選自K、Q、H及R；Xaa₂係選自Q、H、N及R；且Xaa₃係選自G、E、T、S、A及V。較佳地，重鏈CDR2序列包含RIHPYDGDTFYNQKFQG (SEQ ID NO: 7)。

【0191】 在另一實施例中，抗葉酸受體抗體為特異性結合人葉酸受體1之人類化抗體或其抗原結合片段，該人葉酸受體1包含具有胺基酸序列QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSLEWIGRIHPYDGDTFYNQKFQ GKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 8)之重鏈。

【0192】 在另一實施例中，抗葉酸受體抗體係由2010年4月7日保藏在ATCC且ATCC保藏號為PTA-10772及PTA-10773或PTA-10774之質體DNA編碼的人類化抗體或其抗原結合片段。

【0193】 在另一實施例中，抗葉酸受體抗體為特異性結合人葉酸受體1之人類化抗體或其抗原結合片段，該人葉酸受體1包含具有胺基酸序列DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWHYHQKPGQQPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGG

TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC (SEQ ID NO: 9) ; 或
DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPRLLIY
RASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGG
TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC (SEQ ID NO: 10)之輕鏈。

【0194】 在另一實施例中，抗葉酸受體抗體為特異性結合人葉酸受體1之人類化抗體或其抗原結合片段，該人葉酸受體1包含具有胺基酸序列SEQ ID NO: 8之重鏈，及具有胺基酸序列SEQ ID NO: 9或SEQ ID NO: 10之輕鏈。較佳地，該抗體包含具有胺基酸序列SEQ ID NO: 8之重鏈及具有胺基酸序列SEQ ID NO: 10之輕鏈(hu FOLR1)。

【0195】 在另一實施例中，抗葉酸受體抗體係由2010年4月7日保藏在ATCC且ATCC保藏號為PTA-10772及PTA-10773或10774之質體DNA編碼的人類化抗體或其抗原結合片段。

【0196】 在另一實施例中，抗葉酸受體抗體為特異性結合人葉酸受體1且包含與
QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSLEWIGRI
HPYDGDTFYNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYDGSR
AMDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 11)具有至少約90%、95%、99%或100%同一性之重鏈可變結構域，及與
DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPRLLIYR
ASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGGTK

LEIKR (SEQ ID NO: 12) 或

DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPRLLIYR
ASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGTK
LEIKR (SEQ ID NO: 13)具有至少約90%、95%、99%或100%同一性之輕鏈可變結構域的人類化抗體或其抗原結合片段。

【0197】 在另一實施例中，抗葉酸受體抗體為huMov19或M9346A (參見例如，美國專利號8,709,432、美國專利號8,557,966，及WO2011106528，均以引用之方式併入本文中)。

【0198】 在另一實施例中，細胞結合劑為抗EGFR抗體或其抗體片段。在一個實施例中，該抗EGFR抗體為非拮抗劑抗體，包括例如WO2012058592(以引用之方式併入本文中)中所描述之抗體。在另一實施例中，抗EGFR抗體為非功能性抗體，例如人類化ML66或EGFR-8。更具體言之，抗EGFR抗體為huML66。

【0199】 在又另一實施例中，抗EGFR抗體包含具有胺基酸序列SEQ ID NO: 14之重鏈及具有胺基酸序列SEQ ID NO: 15之輕鏈。如本文所使用，帶雙底線之序列表示重鏈或輕鏈序列之可變區(亦即，重鏈可變區或HCVR，及輕鏈可變區或LCVR)，而粗體序列表示CDR區(亦即，自N末端至C末端，分別來自重鏈或輕鏈序列之CDR1、CDR2及CDR3)。

抗體	全長重鏈/輕鏈胺基酸序列
huML66HC	<u>QVQLQESGPGLVKPS</u> <u>ETLSLTCTVSGLSLASNSVSWIRQPPGKGLE</u> <u>WMGVIWNHG</u> <u>GT</u> <u>DYNPSIKSRLSISRDTSKSQVELKMNSLTAADTAMYFCVRKGG</u> <u>IYFDYWQQGV</u> <u>LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS</u> WNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH

	NHYTQKSLSLS PG (SEQ ID NO:14)
huML66LC	<u>DTVLTQSPSLAVSPGERATISCRASESVSTLMHWYQQKPGQOPKL</u> <u>LIYLASHRESG</u> <u>VPARESGSGSGTDFTLTIDPMEAEDTATYYCQQSRNDPWTFEGQGT</u> <u>KLELKRTVAA</u> PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C (SEQ ID NO:15)

【0200】 在又另一實施例中，抗EGFR抗體包含SEQ ID NO: 14之重鏈CDR1-CDR3，及/或SEQ ID NO: 15之輕鏈CDR1-CDR3，且較佳特異性結合EGFR。

【0201】 在又另一實施例中，抗EGFR抗體包含與SEQ ID NO: 14具有至少約90%、95%、97%、99%或100%同一性之重鏈可變區(HCVR)序列，及/或與SEQ ID NO: 15具有至少約90%、95%、97%、99%或100%同一性之輕鏈可變區(LCVR)序列，且較佳特異性結合EGFR。

【0202】 在另一實施例中，抗EGFR抗體為8,790,649及WO 2012/058588(以引用之方式併入本文中)所描述之抗體。在一個實施例中，抗EGFR抗體為huEGFR-7R抗體。

【0203】 在一個實施例中，抗EGFR抗體包含具有胺基酸序列
QVQLVQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMQWVKQRPGQGLECIGTI
YPGDGDTTYYTQKFQGKATLTADKSSSTAYMQLSSLRSEDSAVYYCARYDAP
GYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK
PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV

TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
 HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
 QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 16)之免疫球
 蛋 白 重 鏈 區 ， 及 具 有 胺 基 酸 序 列
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINNYLAWYQHKPGKGPKLLIHYTS
TLHPGIPSRFSGSGSGRDISFSSISLEPEDVATYYCLQYDNLLYTFGGGTKLEI
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
 SQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
 GEC (SEQ ID NO: 17)之免疫球蛋白輕鏈區，或具有胺基酸序列
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINNYLAWYQHKPGKGPKLLIHYTS
TLHPGIPSRFSGSGSGRDISFSSISLEPEDVATYYCLQYDNLLYTFGGGTKLEI
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
 SQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
 GEC (SEQ ID NO: 18)之免疫球蛋白輕鏈區。

【0204】 在另一實施例中，抗EGFR抗體包含具有SEQ ID NO:16中陳述之
 胺基酸序列之免疫球蛋白重鏈區，及具有SEQ ID NO: 17中陳述之胺基酸序列之
 免疫球蛋白重鏈區。

【0205】 在另一實施例中，抗EGFR抗體包含具有SEQ ID NO:16中陳述之
 胺基酸序列之免疫球蛋白重鏈區，及具有SEQ ID NO: 18中陳述之胺基酸序列之
 免疫球蛋白重鏈區。

【0206】 在又另一實施例中，抗EGFR抗體包含SEQ ID NO: 16之重鏈
 CDR1-CDR3，及/或SEQ ID NO: 17或18之輕鏈CDR1-CDR3，且較佳特異性結合
 EGFR。

【0207】 在又另一實施例中，抗EGFR抗體包含與SEQ ID NO: 16具有至少約90%、95%、97%、99%或100%同一性之重鏈可變區(HCVR)序列，及/或與SEQ ID NO: 17或18具有至少約90%、95%、97%、99%或100%同一性之輕鏈可變區(LCVR)序列，且較佳特異性結合EGFR。

【0208】 在另一實施例中，細胞結合劑為抗CD19抗體，諸如美國專利號8,435,528及WO2004/103272(以引用之方式併入本文中)中所描述之該等抗體。在一個實施例中，抗CD19抗體包含具有胺基酸序列

**QVQLVQPGAEEVVKPGASVKLSCKTSGYTFSTSNWMHWVKQAPGQGLEWIGE
IDPSDSYTNYNQNFQGKAKLTVDKSTSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCARGSNP
YYYAMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 19)之免疫球
蛋白重鏈區，及具有胺基酸序列**

**EIVLTQSPAIMSASPGERVTMTCSASSGVNYMHWYQQKPGTSPRRWIYDTSK
LASGVPARFSGSGSGTDYSLTISSMEPEDAATYYCHQRGSYTFGGGTKLEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
C (SEQ ID NO: 20)之免疫球蛋白輕鏈區。**

【0209】 在另一實施例中，抗CD19抗體為huB4抗體。

【0210】 在又另一實施例中，抗CD19抗體包含SEQ ID NO: 19之重鏈

CDR1-CDR3，及/或SEQ ID NO: 20之輕鏈CDR1-CDR3，且較佳特異性結合CD19。

【0211】 在又另一實施例中，抗CD19抗體包含與SEQ ID NO: 19具有至少約90%、95%、97%、99%或100%同一性之重鏈可變區(HCVR)序列，及/或與SEQ ID NO: 20具有至少約90%、95%、97%、99%或100%同一性之輕鏈可變區(LCVR)序列，且較佳特異性結合CD19。

【0212】 在又另一實施例中，細胞結合劑為抗Muc1抗體，諸如美國專利號7,834,155、WO 2005/009369及WO 2007/024222(以引用之方式併入本文中)中所描述之該等抗體。在一個實施例中，抗Muc1抗體包含具有胺基酸序列

QAQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGY
IYPGNGATNYNQKFQGGKATLTADTSSSTAYMQISLTSEDSAVYFCARGDSV
PFAYWGQGTLLTVSAAASKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 21)之免疫球蛋白重鏈區，及具有胺基酸序列

EIVLTQSPATMSASPGERVITITCSAHSSVSFMHWFQOKPGTSPKLWIYSTSSLA
SGVPARFEGGSGSGTSYSLTISSMEEAEDAATYYCQQRSSFPLTFGAGTKLELKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:22)之免疫球蛋白輕鏈區。

【0213】 在另一實施例中，抗Muc1抗體為huDS6抗體。

【0214】 在又另一實施例中，抗Muc1抗體包含SEQ ID NO: 21之重鏈CDR1-CDR3，及/或SEQ ID NO: 22之輕鏈CDR1-CDR3，且較佳特異性結合Muc1。

【0215】 在又另一實施例中，抗Muc1抗體包含與SEQ ID NO: 21具有至少約90%、95%、97%、99%或100%同一性之重鏈可變區(HCVR)序列，及/或與SEQ ID NO: 22具有至少約90%、95%、97%、99%或100%同一性之輕鏈可變區(LCVR)序列，且較佳特異性結合Muc1。

【0216】 在另一實施例中，細胞結合劑為抗CD33抗體或其片段，諸如美國專利號7,557,189、7,342,110、8,119,787及8,337,855以及WO2004/043344(以引用之方式併入本文中)中所描述之抗體或其片段。在另一實施例中，抗CD33抗體為huMy9-6抗體。

【0217】 在一個實施例中，抗CD33抗體包含具有胺基酸序列
QVQLQQPGAIEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHQKQTPGQGLEWVGVI
YPGNDDISYNQKFQGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLR
YFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:23)之免疫球蛋白重
鏈區，及具有胺基酸序列
EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQSPRLLI
YWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQPEDLAIIYCHQYLSSRTFGQGT

KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:24)之免疫球蛋白輕鏈區。

【0218】 在又另一實施例中，抗CD33抗體包含SEQ ID NO: 23之重鏈CDR1-CDR3，及/或SEQ ID NO: 24之輕鏈CDR1-CDR3，且較佳特異性結合CD33。

【0219】 在又另一實施例中，抗CD33抗體包含與SEQ ID NO: 23具有至少約90%、95%、97%、99%或100%同一性之重鏈可變區(HCVR)序列，及/或與SEQ ID NO: 24具有至少約90%、95%、97%、99%或100%同一性之輕鏈可變區(LCVR)序列，且較佳特異性結合CD33。

【0220】 在另一實施例中，細胞結合劑為抗CD37抗體或其抗體片段，諸如美國專利號8,765,917及WO 2011/112978(以引用之方式併入本文中)中所描述之該等抗體。在一個實施例中，抗CD37抗體為huCD37-3抗體。

【0221】 在一個實施例中，抗CD37抗體包含具有胺基酸序列
DIQMTQSPSSLSVSVGERVTITCRASENIRSNLAWYQQKPGKSPKLLNVATN
LADGVPSRFSGSGSGTDYSLKINSIQPEDFGTYCYCQHYWGTTWTFTGQGTKL
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGEC(SEQ ID NO: 25)之免疫球蛋白輕鏈區，及具有胺基酸序列
QVQVQESGPGLVAPSQTLSITCTVSGFSLTSGVSWVRQPPGKGLEWLGVIW
GDGSTNYHPSLKSRLSIKKDHKSQVFLKLNLSLTAADTATYYCAKGGYSLAH
WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV

DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 26)之免疫球蛋白重鏈區，或具有胺基酸序列

QVQVQESGPGLVAPSQTLSITCTVSGFSLTTS~~GV~~SWVRQPPGKGLEWLGVIW

~~GDGSTNYHSSLKSRLSIKKDHSKSQVFLKLNSLTAADTATYYCAKGGYSLAH~~

WGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW

NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 27)之免疫球蛋白重鏈區。

【0222】 在另一實施例中，抗CD37抗體包含具有SEQ ID NO:25中陳述之胺基酸序列之免疫球蛋白重鏈區，及具有SEQ ID NO: 26中陳述之胺基酸序列之免疫球蛋白重鏈區。

【0223】 在又另一實施例中，抗CD37抗體包含具有SEQ ID NO:25中陳述之胺基酸序列之免疫球蛋白輕鏈區，及具有SEQ ID NO: 27中陳述之胺基酸序列之免疫球蛋白重鏈區。

【0224】 在又另一實施例中，抗CD37抗體包含SEQ ID NO: 26或27之重鏈CDR1-CDR3，及/或SEQ ID NO: 25之輕鏈CDR1-CDR3，且較佳特異性結合CD37。

【0225】 在又另一實施例中，抗CD37抗體包含與SEQ ID NO: 26或27具有至少約90%、95%、97%、99%或100%同一性之重鏈可變區(HCVR)序列，及/或與SEQ ID NO: 25具有至少約90%、95%、97%、99%或100%同一性之輕鏈可變區(LCVR)序列，且較佳特異性結合CD37。

【0226】 在又另一實施例中，抗CD37抗體包含具有胺基酸序列 EIVLTQSPATMSASPGERVMTCSATSSVTYMHWYQQKPGQSPKRWIYDTSN
LPYGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSDNPPTFGQGTKLEI
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GEC (SEQ ID NO: 28)之免疫球蛋白輕鏈區，及具有胺基酸序列 QVQLQESGPGLLKPSQSLSLTCTVSGYSITSGFAWHWIRQHPGNKLEWMGYI
LYSGSTVYSPSLKSRISITRDTSKNHFFLQLNSVTAADTATYYCARGYYGYGA
WFAYWGQGTLLTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 29)之免疫球蛋白
重鏈區。

【0227】 在又另一實施例中，抗CD37抗體包含SEQ ID NO: 29之重鏈CDR1-CDR3，及/或SEQ ID NO: 28之輕鏈CDR1-CDR3，且較佳特異性結合CD37。

【0228】 在又另一實施例中，抗CD37抗體包含與SEQ ID NO: 29具有至少

約90%、95%、97%、99%或100%同一性之重鏈可變區(HCVR)序列，及/或與SEQ ID NO: 28具有至少約90%、95%、97%、99%或100%同一性之輕鏈可變區(LCVR)序列，且較佳特異性結合CD37。

【0229】 在又另一實施例中，抗CD37抗體為huCD37-50抗體。

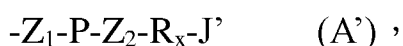
細胞結合劑-藥物偶聯物

【0230】 本發明亦提供細胞結合劑-藥物偶聯物，其包含經由多種連接子，包括但不限於，二硫化物連接子、硫醚連接子、醯胺鍵結之連接子、肽酶不穩定性連接子、酸不穩定性連接子、酯酶不穩定性連接子連接至一個或多個本發明之細胞毒性化合物的細胞結合劑。

【0231】 在一第二實施例中，本發明提供一種偶聯物，其包含：細胞毒性化合物及細胞結合劑(CBA)，其中該細胞毒性化合物共價連接至該CBA，且其中該細胞毒性化合物係由結構式(I')、(II')、(III')、(IV')、(V')或(VI')表示，其中變數係如以上所描述。

【0232】 在某些實施例中，該細胞毒性化合物係由結構式(I')或其醫藥學上可接受之鹽表示。

【0233】 在某些實施例中，對於結構式(I')、(II')、(III')、(IV')、(V')及(VI')，L'、L''及L'''之一係由式(A')表示：



且其餘為-H、具有1至6個碳原子之直鏈或分支鏈烷基、鹵素、-OH、(C₁-C₆)烷氧基或-NO₂。具體言之，L'、L''及L'''之一係由式(A')表示，且其餘為-H。

【0234】 在第1個具體實施例中，對於結構式(I')、(II')、(III')、(IV')、(V')及(VI')，L'係由式(A')表示，且L''及L'''均為-H；且其餘變數係如以上在第一實施例中所描述。

【0235】 在第2個具體實施例中，對於結構式(I')、(II')、(III')、(IV')、(V')

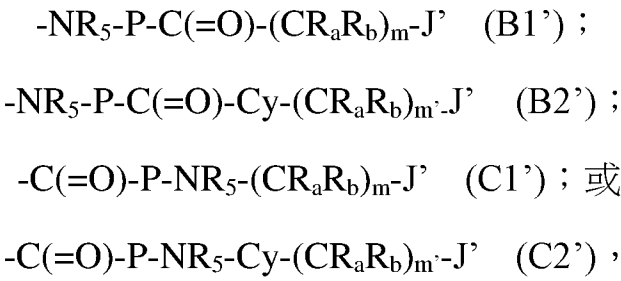
及(VI')，R_x為視情況經鹵素、-OH、(C₁-C₃)烷基、(C₁-C₃)烷氧基、鹵(C₁-C₃)烷基或帶電荷之取代基或可離子化基團Q取代的具有1至6個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基；且其餘變數係如以上在第一實施例或第1個具體實施例中所描述。

【0236】 在某些實施例中，Q為i) -SO₃H、-Z'-SO₃H、-OPO₃H₂、-Z'-OPO₃H₂、-PO₃H₂、-Z'-PO₃H₂、-CO₂H、-Z'-CO₂H、-NR₁₁R₁₂或-Z'-NR₁₁R₁₂，或其醫藥學上可接受之鹽；或ii) -N⁺R₁₄R₁₅R₁₆X⁻或-Z'-N⁺R₁₄R₁₅R₁₆X⁻；Z'為視情況經取代之伸烷基、視情況經取代之伸環烷基或視情況經取代之伸苯基；R₁₄至R₁₆各自獨立地為視情況經取代之烷基；且X⁻為醫藥學上可接受之陰離子；且其餘變數係如以上在第2個具體實施例中所描述。更具體言之，Q為-SO₃H或其醫藥學上可接受之鹽。

【0237】 在第3個具體實施例中，對於結構式(I')、(II')、(III')、(IV')、(V')及(VI')，J'包含共價連接至該CBA之部分，且為-NR^{cl}或-C(=O)-，其中R^{cl}為-H或視情況經鹵素、-OH或(C₁-C₃)烷氧基取代的具有1至4個碳原子之直鏈或分支鏈烷基；且其餘變數係如以上在第一實施例或第1或2個具體實施例中所描述。

【0238】 在某些實施例中，J'為-C(=O)-；且其餘變數係如以上在第3個具體實施例中所描述。

【0239】 在第4個具體實施例中，對於結構式(I')、(II')、(III')、(IV')、(V')及(VI')，L'係由下式表示：



其中：

J'為-C(=O)-；

R_a 及 R_b 在每次出現時各自獨立地為-H、 (C_1-C_3) 烷基，或帶電荷之取代基或可離子化之基團Q；

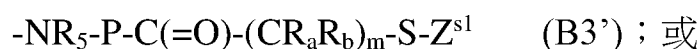
m 為1至6之整數；

m' 為0或1至6之整數；且

Cy為視情況經鹵素、-OH、 (C_1-C_3) 烷基、 (C_1-C_3) 烷氧基或鹵 (C_1-C_3) 烷基取代的具有5或6個環碳原子之環狀烷基；且其餘變數係如以上在第一實施例或第1、2或3個具體實施例中所描述。

【0240】 在某些實施例中， R_a 及 R_b 均為H；式(B2')及(C2')中之Cy為環己烷；且 R_5 為H或Me；且其餘變數係如以上在第4個具體實施例中所描述。更具體言之，式(B2')及(C2')中之 m' 為0或1。

【0241】 在第5個具體實施例中，對於結構式(I')、(II')、(III')、(IV')、(V')及(VI')， L' 係由下式表示：

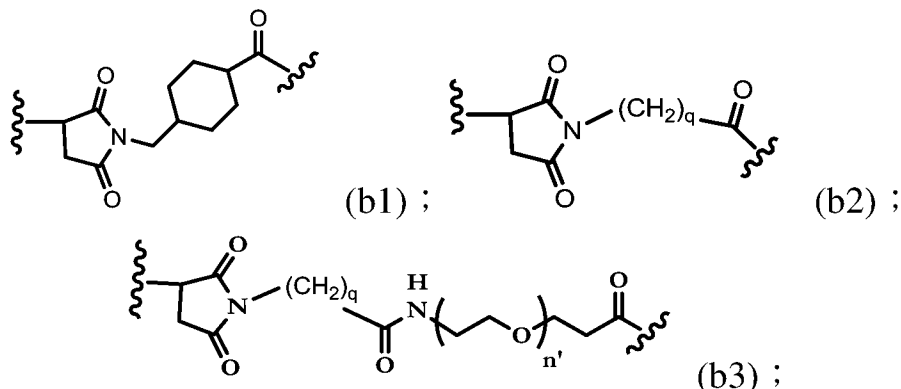


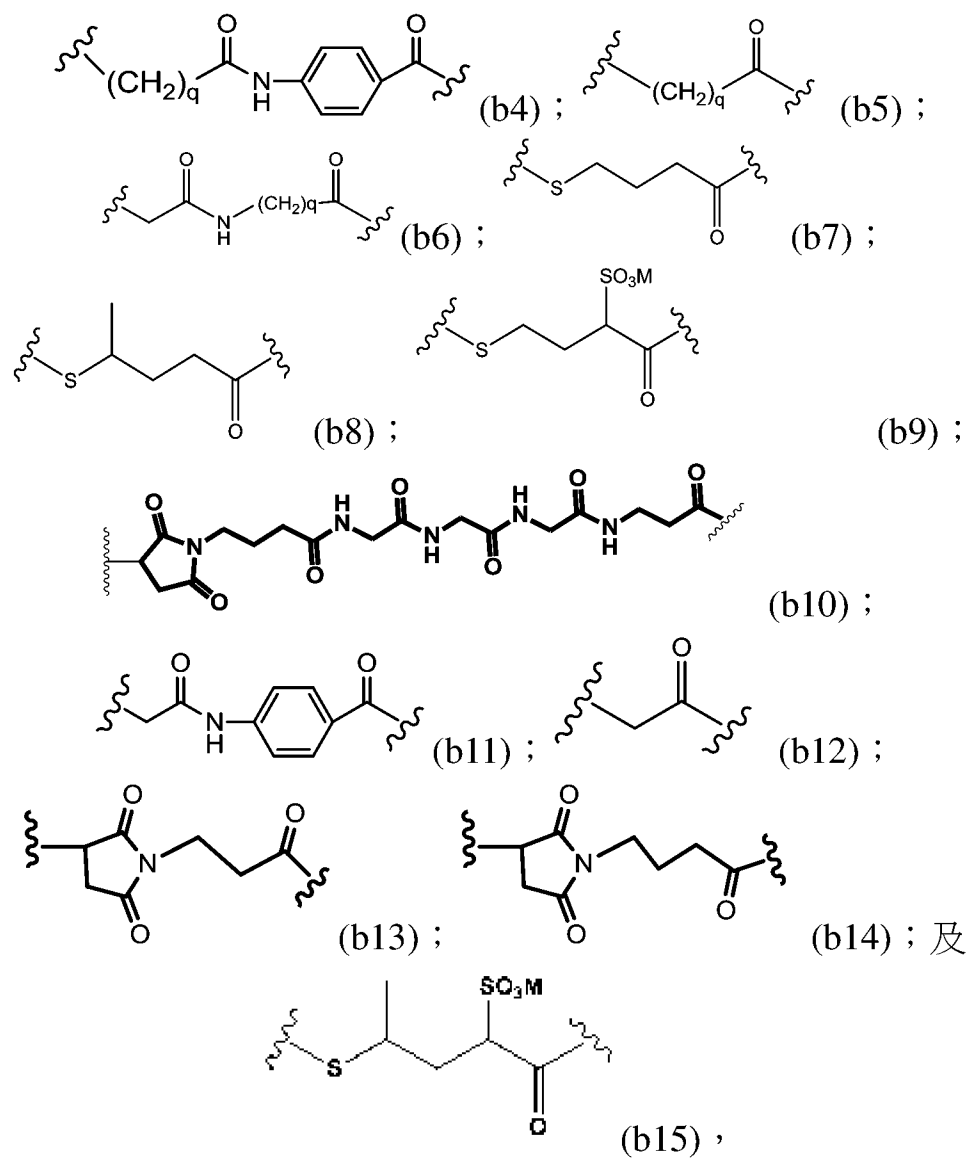
其中：

R_a 及 R_b 在每次出現時各自獨立地為-H、 (C_1-C_3) 烷基，或帶電荷之取代基或可離子化之基團Q；

m 為1至6之整數；

Z^{s1} 係選自下式中之任一個：





其中：

q為1至5之整數；

n'為2至6之整數；

U為-H或SO₃M；

M為醫藥學上可接受之陽離子(例如，H⁺、Na⁺或K⁺)；且其餘變數係如以上在第一實施例或第1、2、3或4個具體實施例中所描述。

【0242】 在某些實施例中，帶電荷之取代基或可離子化基團Q為i) -SO₃H、-Z'-SO₃H、-OPO₃H₂、-Z'-OPO₃H₂、-PO₃H₂、-Z'-PO₃H₂、-CO₂H、-Z'-CO₂H、-NR₁₁R₁₂或-Z'-NR₁₁R₁₂，或其醫藥學上可接受之鹽；或ii) -N⁺R₁₄R₁₅R₁₆X⁻或

$-Z'-N^+R_{14}R_{15}R_{16}X^-$ ； Z' 為視情況經取代之伸烷基、視情況經取代之伸環烷基或視情況經取代之伸苯基； R_{14} 至 R_{16} 各自獨立地為視情況經取代之烷基；且 X 為醫藥學上可接受之陰離子；且其餘變數係如以上在第5個具體實施例中所描述。更具體言之， Q 為 $-SO_3H$ 或其醫藥學上可接受之鹽。

【0243】 在某些實施例中， R_a 及 R_b 均為 $-H$ 且 R_5 為 H 或 Me ；且其餘變數係如以上在第5個具體實施例中所描述。

【0244】 在某些實施例中， $-(CR_aR_b)_m-$ 為 $-(CH_2)_{m''}-C(Me_2)-$ 且 m'' 為1至5之整數；且其餘變數係如以上在第5個具體實施例中所描述。

【0245】 在第6個具體實施例中，對於結構式(I')、(II')、(III')、(IV')、(V')及(VI')， P 為含有2至10個胺基酸殘基之肽；且其餘變數係如以上在第一實施例或第1、2、3、4或5個具體實施例中所描述。

【0246】 在某些實施例中， P 為含有2至5個胺基酸殘基之肽；且其餘變數係如以上在第6個具體實施例中所描述。

【0247】 在某些實施例中， P 係選自Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe- N^9 -甲 苯磺醯基-Arg、Phe- N^9 -硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu、 β -Ala-Leu-Ala-Leu及Gly-Phe-Leu-Gly、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met、Met-Ala；且其餘變數係如以上在第6個具體實施例中所描述。

【0248】 在某些實施例中， P 為Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala及D-Ala-D-Ala；且其餘變數係如以上在第6個具體實施例中所描述。

【0249】 在第7個具體實施例中，對於結構式(I')、(II')、(III')、(IV')、(V')及(VI)，在N與C之間之雙線 $\equiv$ 表示雙鍵；且其餘變數係如以上在第一實施例或第1、2、3、4、5或6個具體實施例中所描述。在第8個具體實施例中，對於結構式(I')、(II')、(III')、(IV')、(V')及(VI')，在N與C之間之雙線 $\equiv$ 表示單鍵，X為-H或胺保護基；且Y係選自-H、-OR、-OCOR'、-SR、-NR'R''、視情況經取代之5-或6-員含氮雜環、-SO₃H、-SO₂H及-OSO₃H；且其餘變數係如以上在第一實施例或第1、2、3、4、5、6或7個具體實施例中所描述。

【0251】 在某些實施例中，Y係選自-H、-SO₃M、-OH、-OMe、-OEt或-NHOH，其中M為-H、Na⁺或K⁺；且其餘變數係如以上在第8個具體實施例中所描述。更具體言之，Y為-H、-SO₃M或-OH。

【0252】 在第9個具體實施例中，對於結構式(I')、(II')、(III')、(IV')、(V')及(VI')，X'係選自由以下各物組成之群：-H；-OH；視情況經取代的具有1至10個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；及苯基；且其餘變數係如以上在第一實施例或第1、2、3、4、5、6、7或8個具體實施例中所描述。

【0253】 在某些實施例中，X'為-H、-OH、(C₁-C₃)烷基、鹵(C₁-C₃)烷基或苯基；且其餘變數係如以上在第9個具體實施例中所描述。更具體言之，X'為-H、-OH或-Me。甚至更具體言之，X'為-H。

【0254】 在第10個具體實施例中，對於結構式(I')、(II')、(III')、(IV')、(V')及(VI')，Y'為-H、側氧基、(C₁-C₃)烷基或鹵(C₁-C₃)烷基；且其餘變數係如以上在第一實施例或第1、2、3、4、5、6、7、8或9個具體實施例中所描述。更具體言之，Y'為-H或側氧基。甚至更具體言之，Y'為-H。

【0255】 在第11個具體實施例中，對於結構式(I')、(II')、(III')、(IV')、(V')及(VI')，A與A'相同或不同，且選自-O-、-S-、-NR₅-及側氧基-(C=O)-；且其餘變數係如以上在第一實施例或第1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個具體實施例

中所描述。更具體言之，A與A'相同或不同，且選自-O-及-S-。甚至更具體言之，A及A'為-O-。

【0256】 在第12個具體實施例中，對於結構式(I')、(II')、(III')、(IV')、(V')及(VI')，R₆為-OMe；且其餘變數係如以上在第一實施例或第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11個具體實施例中所描述。

【0257】 在第13個具體實施例中，對於結構式(I')、(II')、(III')、(IV')、(V')及(VI')，R₁、R₂、R₃、R₄、R₁'、R₂'、R₃'及R₄'獨立地為-H、鹵素、-NO₂、-OH、(C₁-C₃)烷基、鹵(C₁-C₃)烷基或(C₁-C₃)烷氧基；且其餘變數係如以上在第一實施例或第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12個具體實施例中所描述。更具體言之，R₁、R₂、R₃、R₄、R₁'、R₂'、R₃'及R₄'均為-H。

【0258】 在第14個具體實施例中，對於結構式(I')、(II')、(III')、(IV')、(V')及(VI')，R、R'、R''及R₅各自獨立地為-H或(C₁-C₃)烷基；且其餘變數係如以上在第一實施例或第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或13個具體實施例中所描述。

【0259】 在第14個具體實施例中，對於結構式(I')、(II')、(III')、(IV')、(V')及(VI')，在N與C之間之雙線=表示單鍵或雙鍵，條件為當其為雙鍵時，X不存在且Y為-H，且當其為單鍵時，X為-H，Y為-OH或-SO₃M；R₁、R₂、R₃、R₄、R₁'、R₂'、R₃'及R₄'均為-H；

R₆為-OMe；

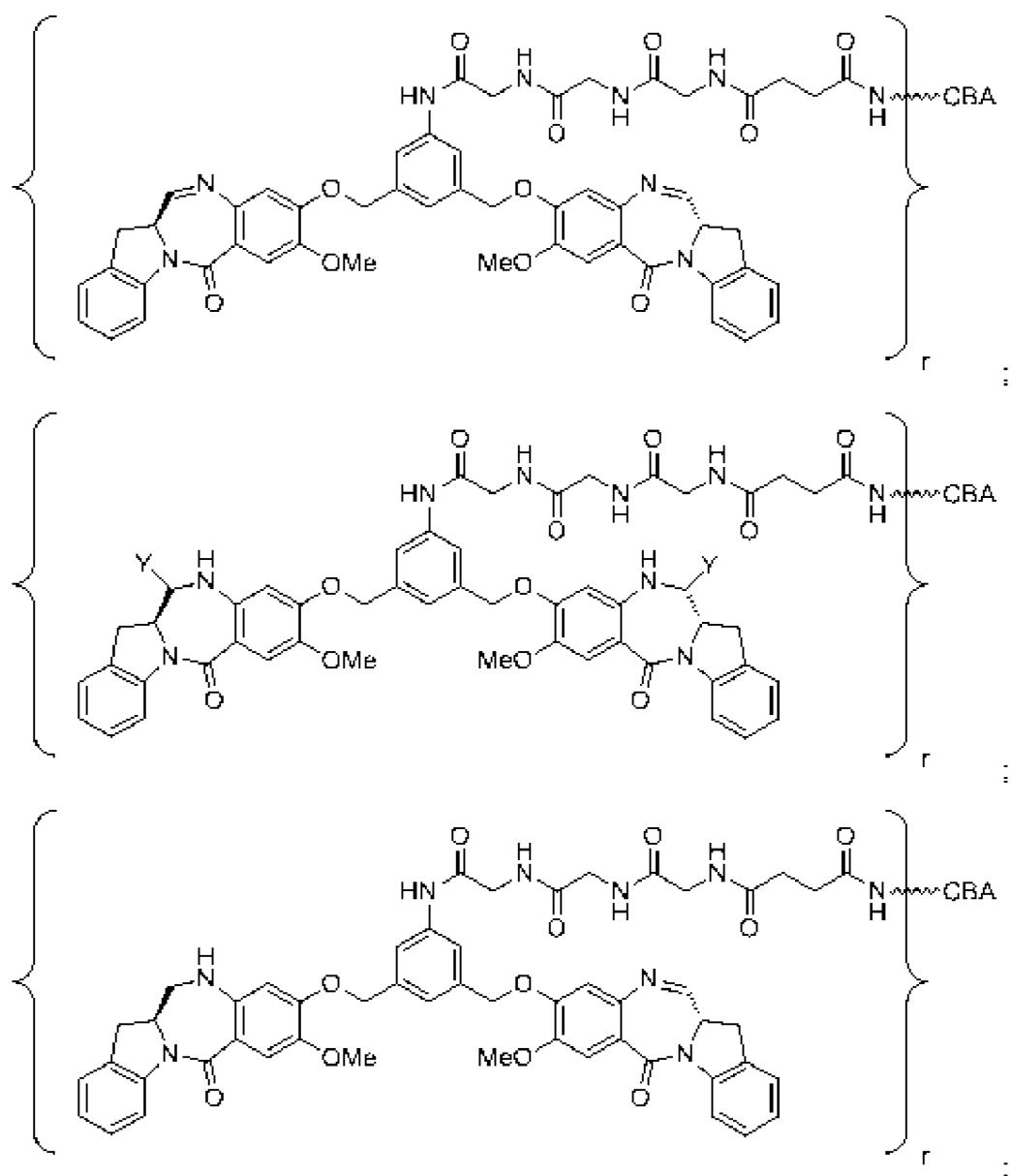
X'及Y'均為-H；

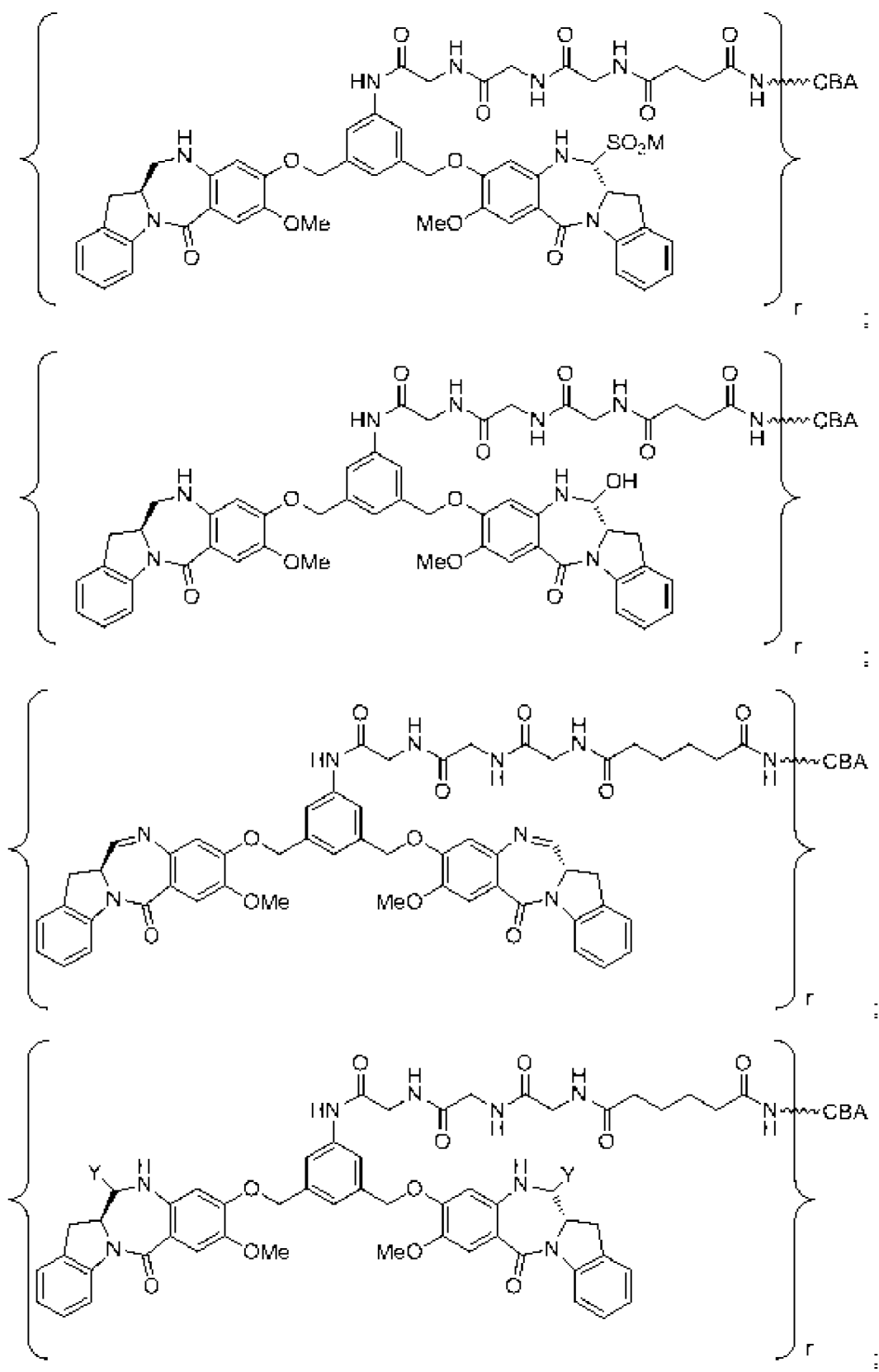
A及A'為-O-；

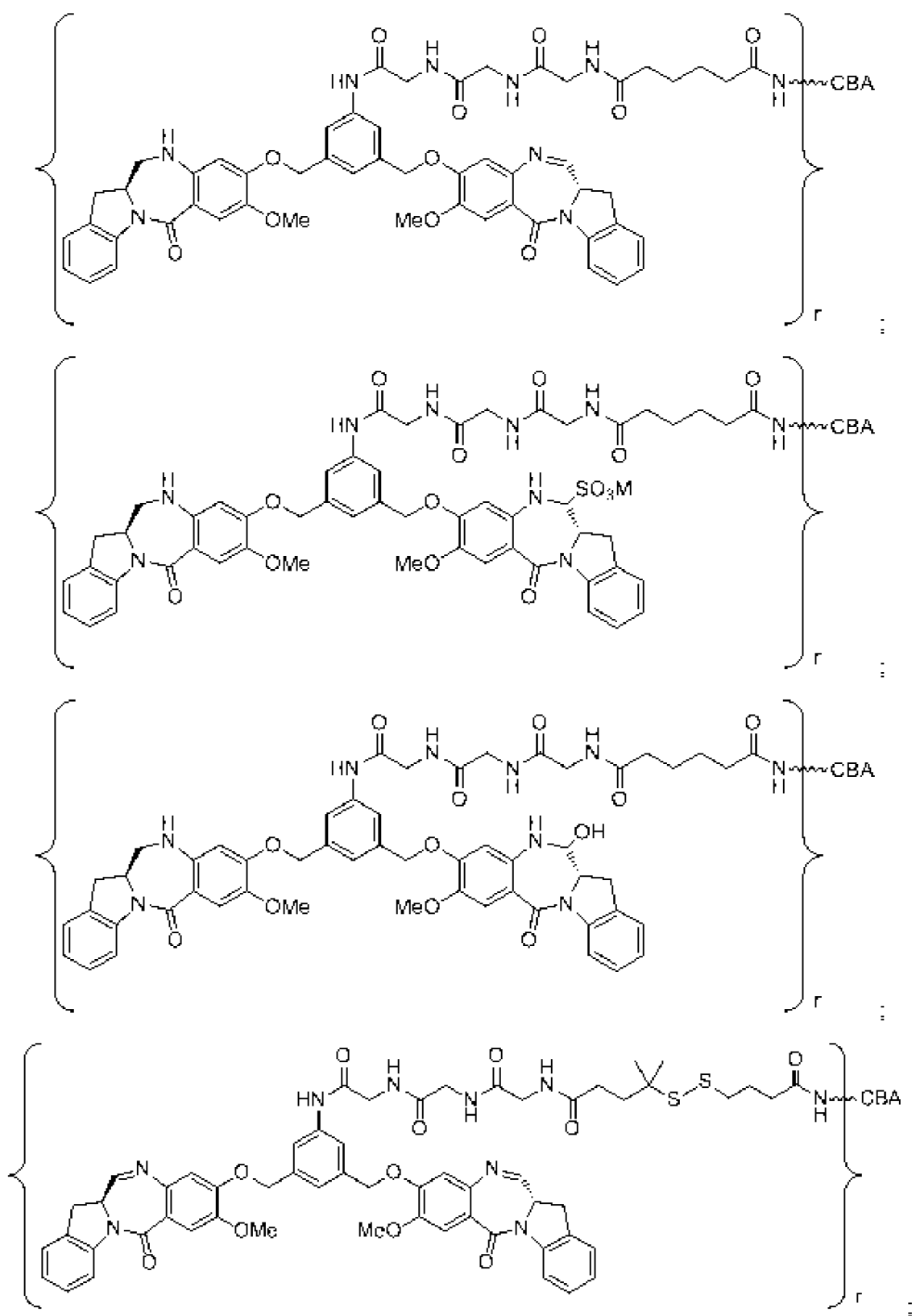
M為H、Na⁺或K⁺；且其餘變數係如以上在第一實施例或第1、2、3、4、5或6個具體實施例中所描述。

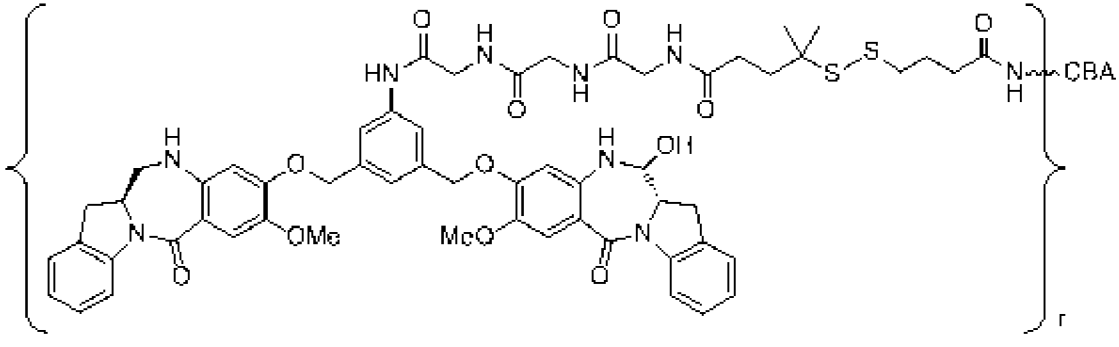
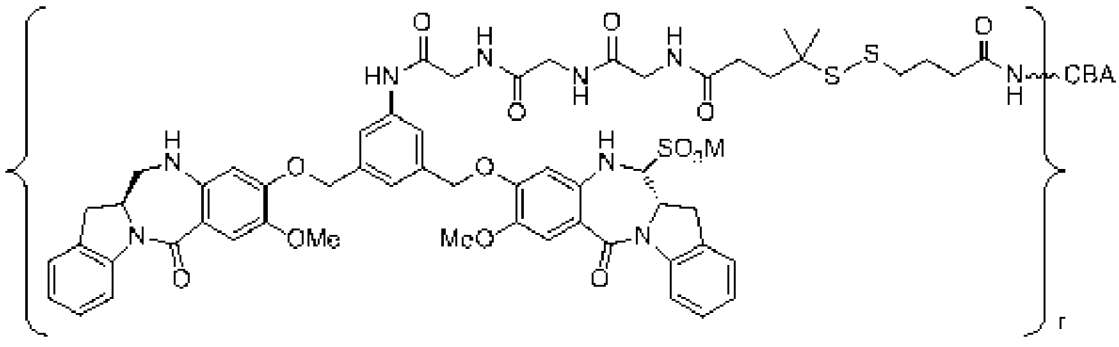
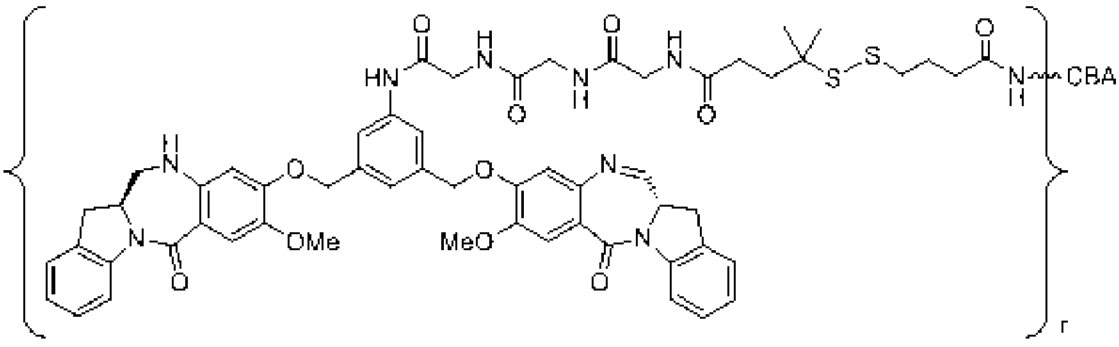
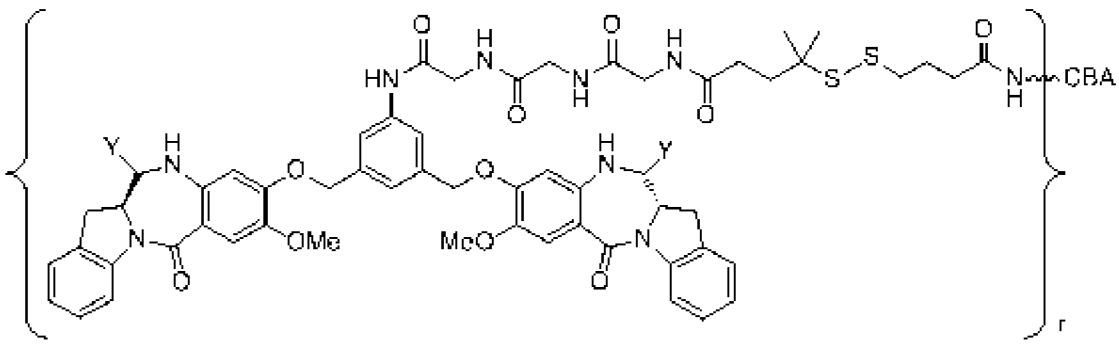
【0260】 在第15個具體實施例中，本發明之偶聯物係由以下結構式中之任

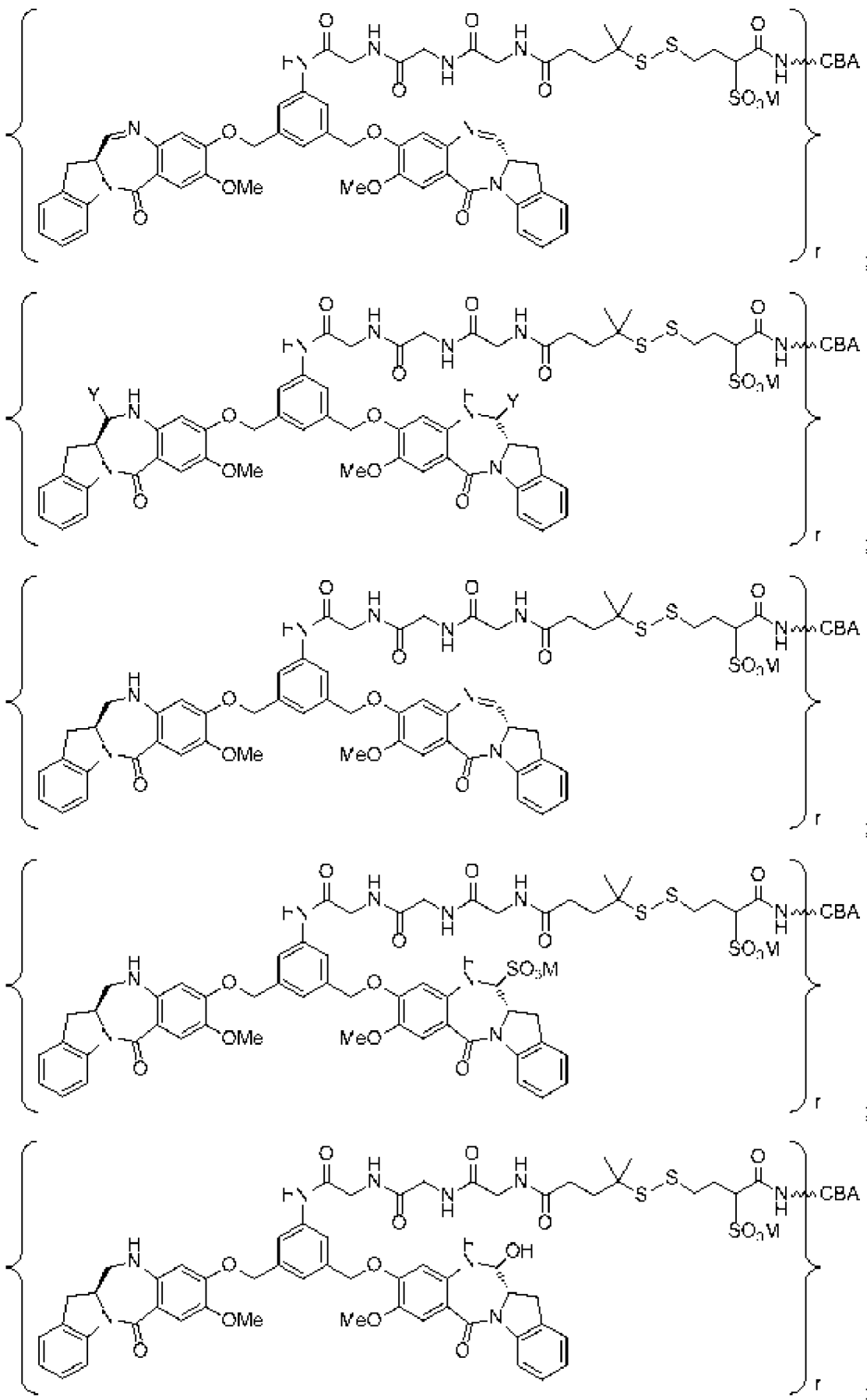
一個表示：

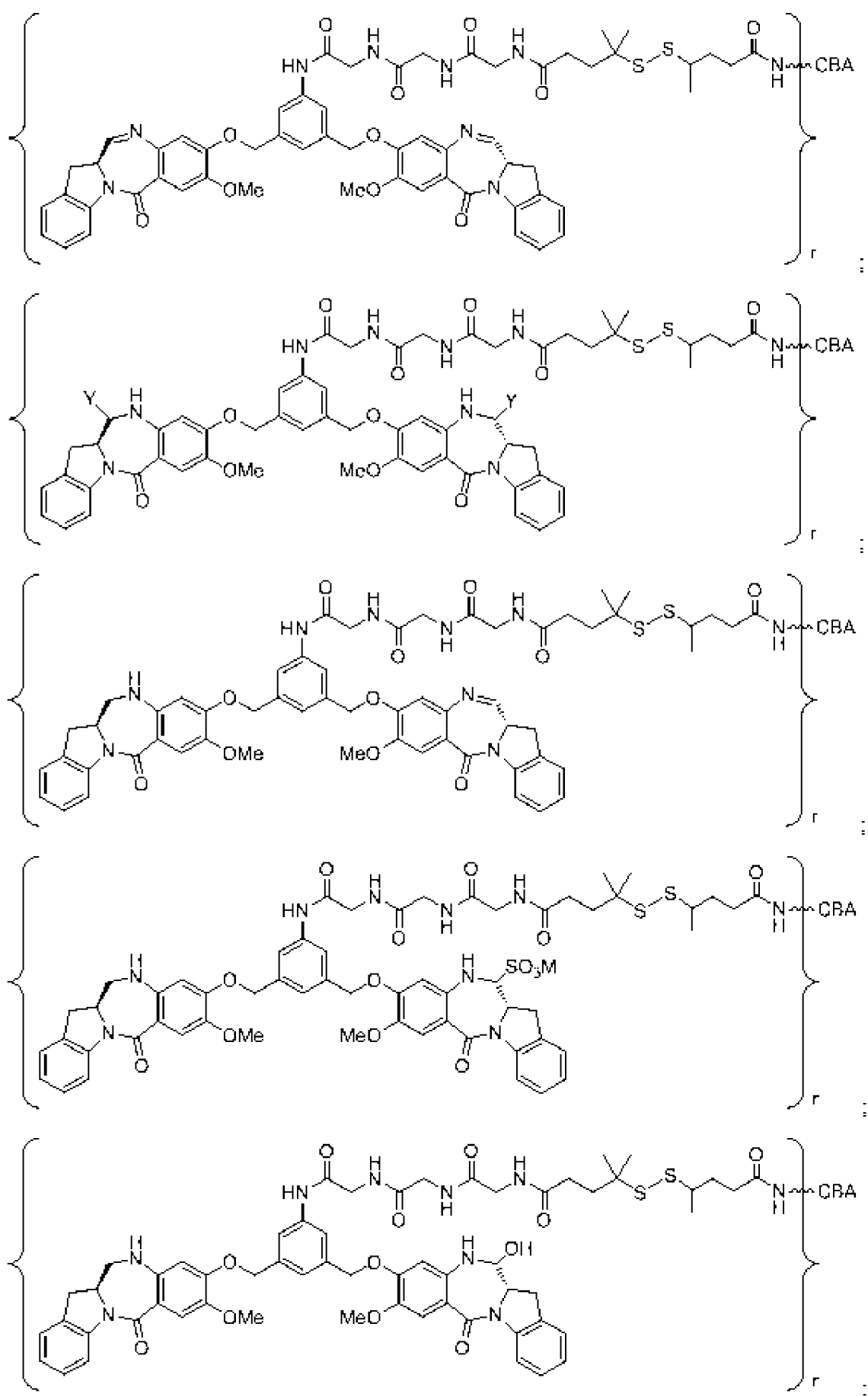


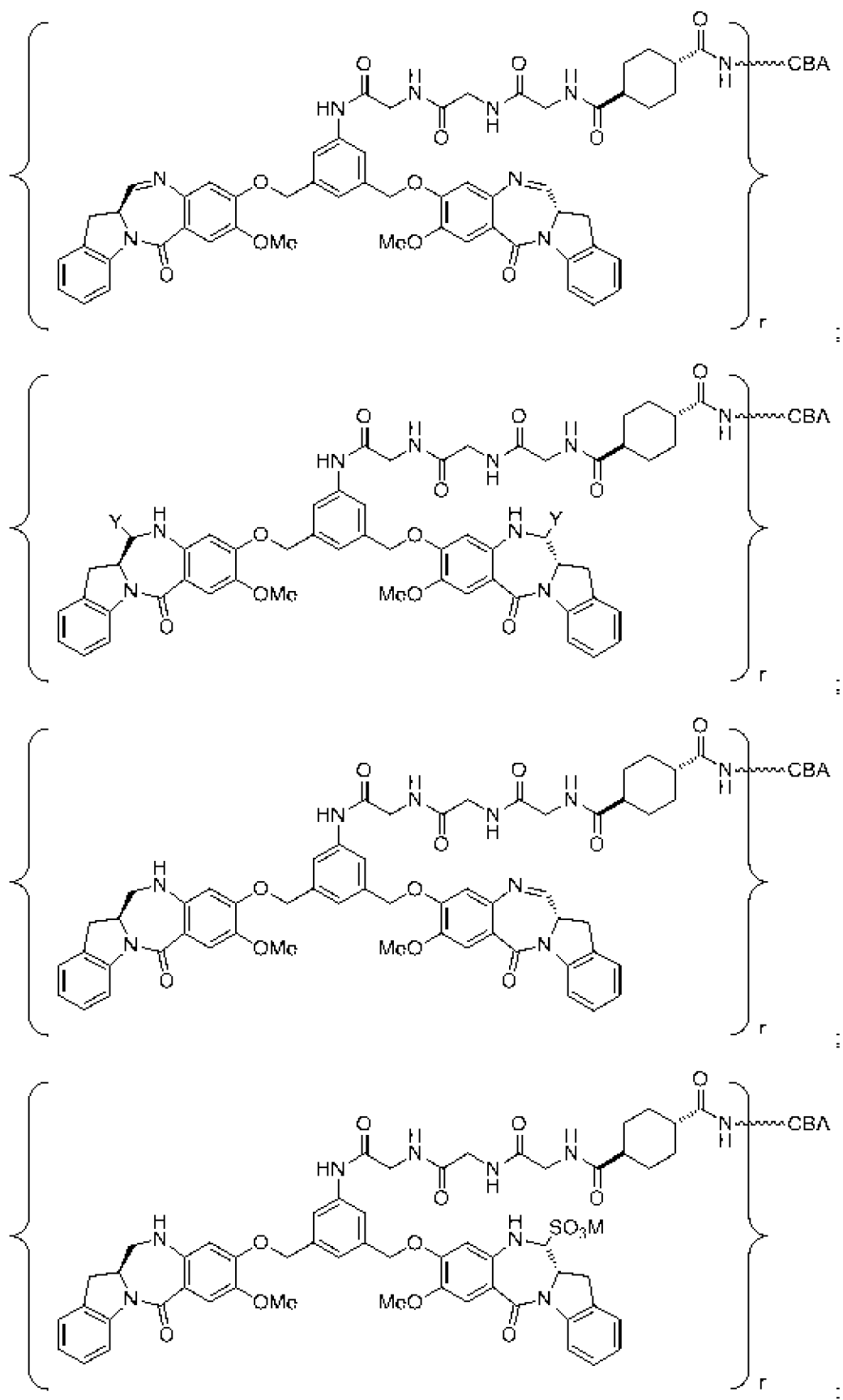


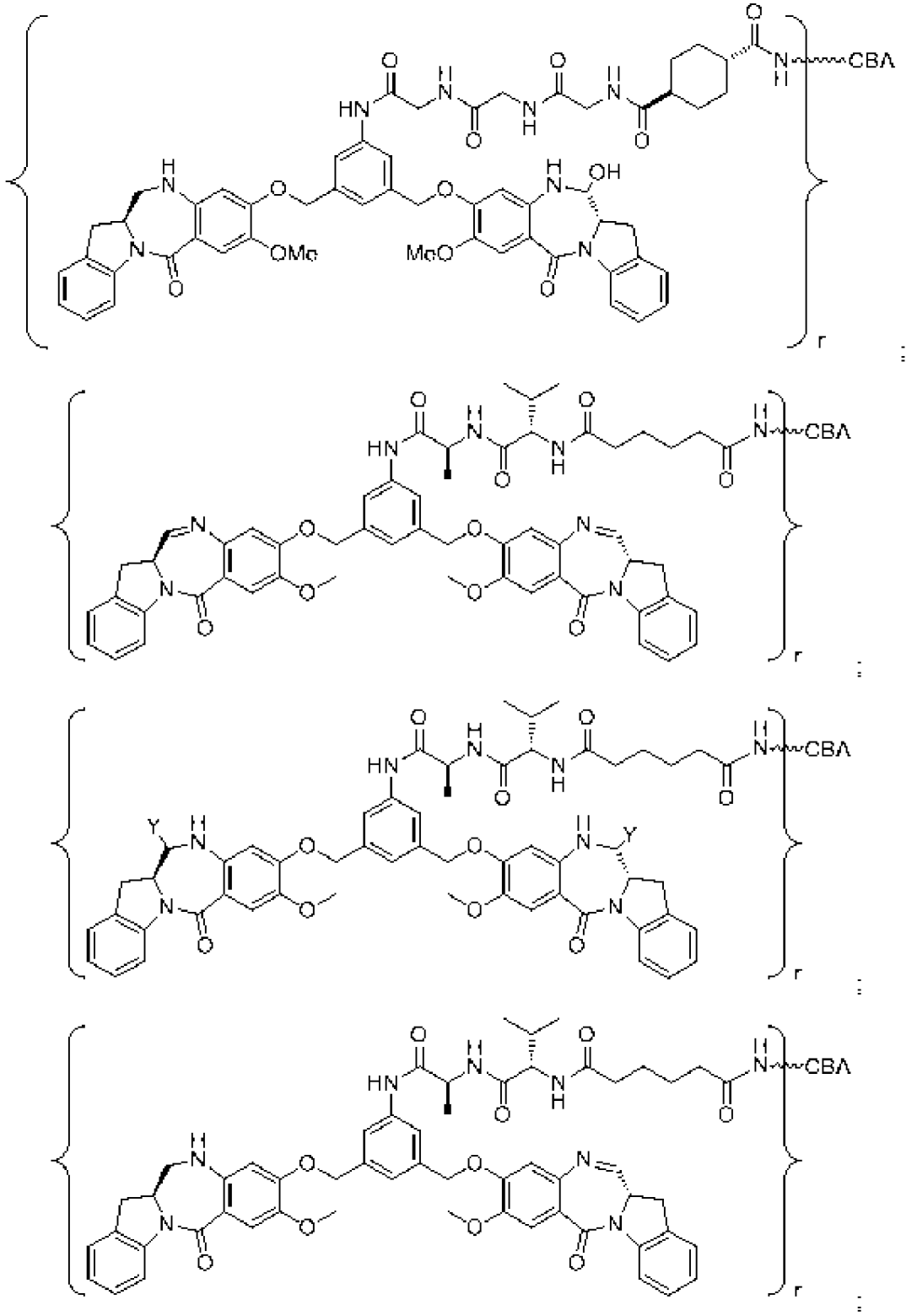


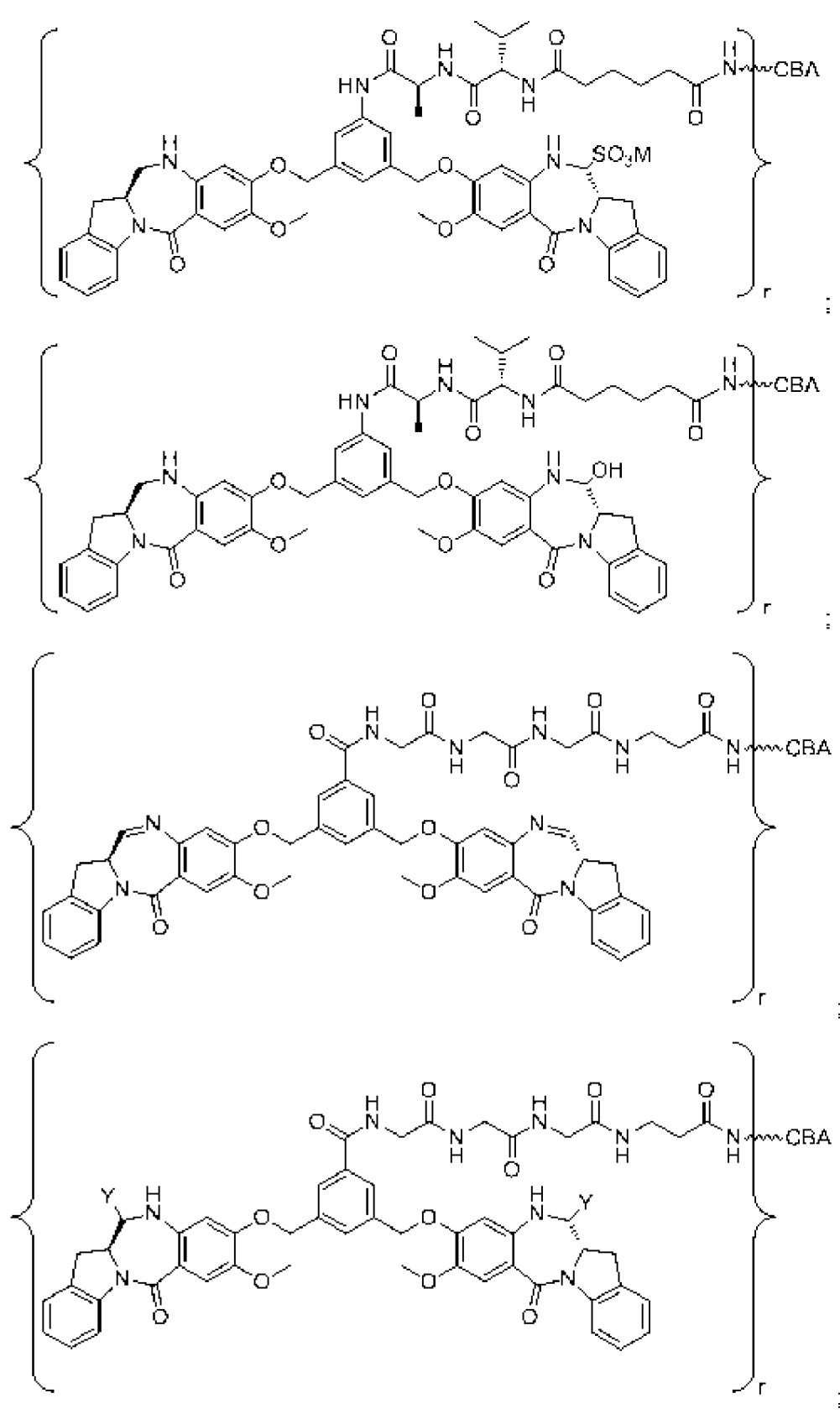


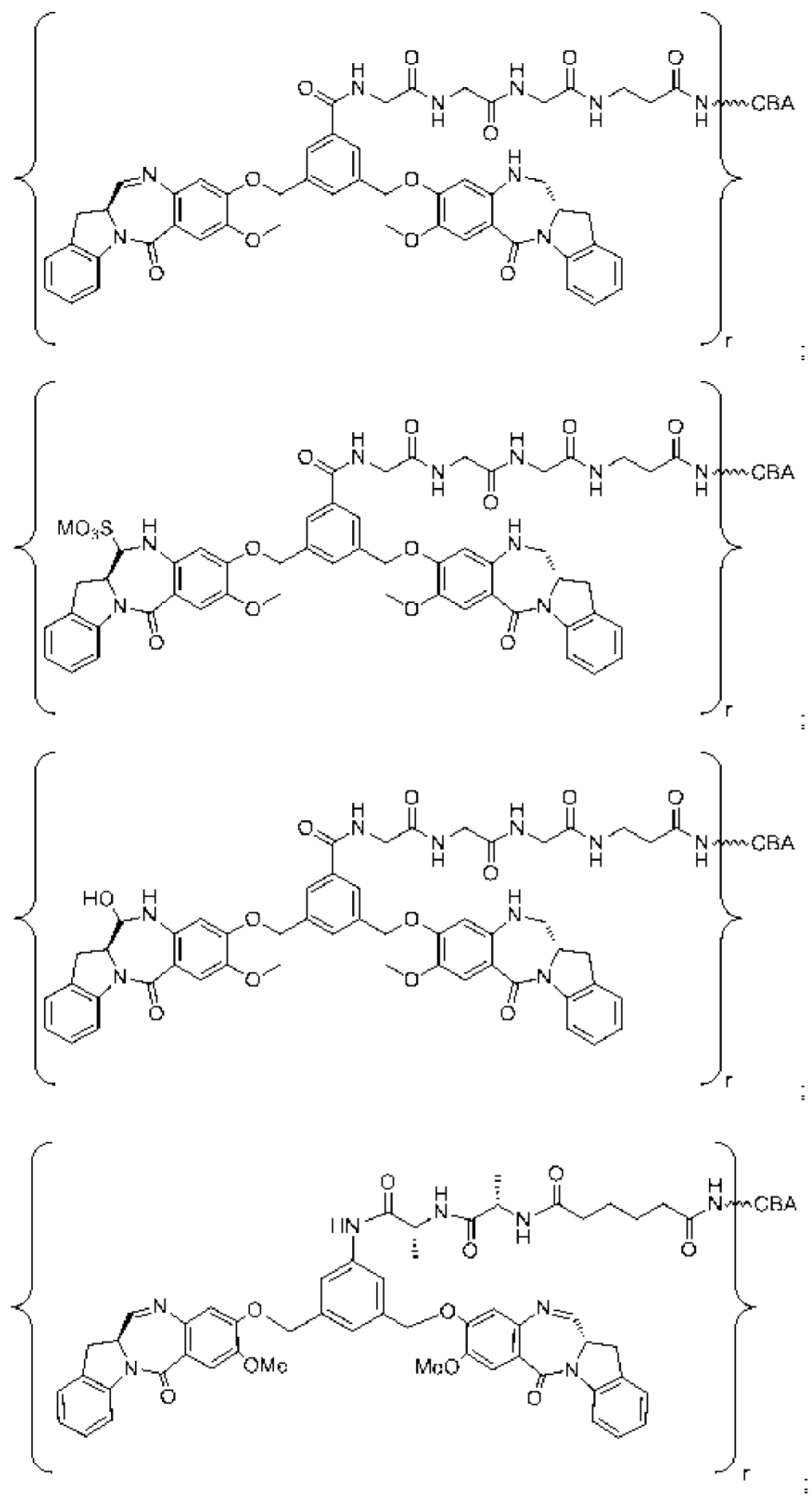


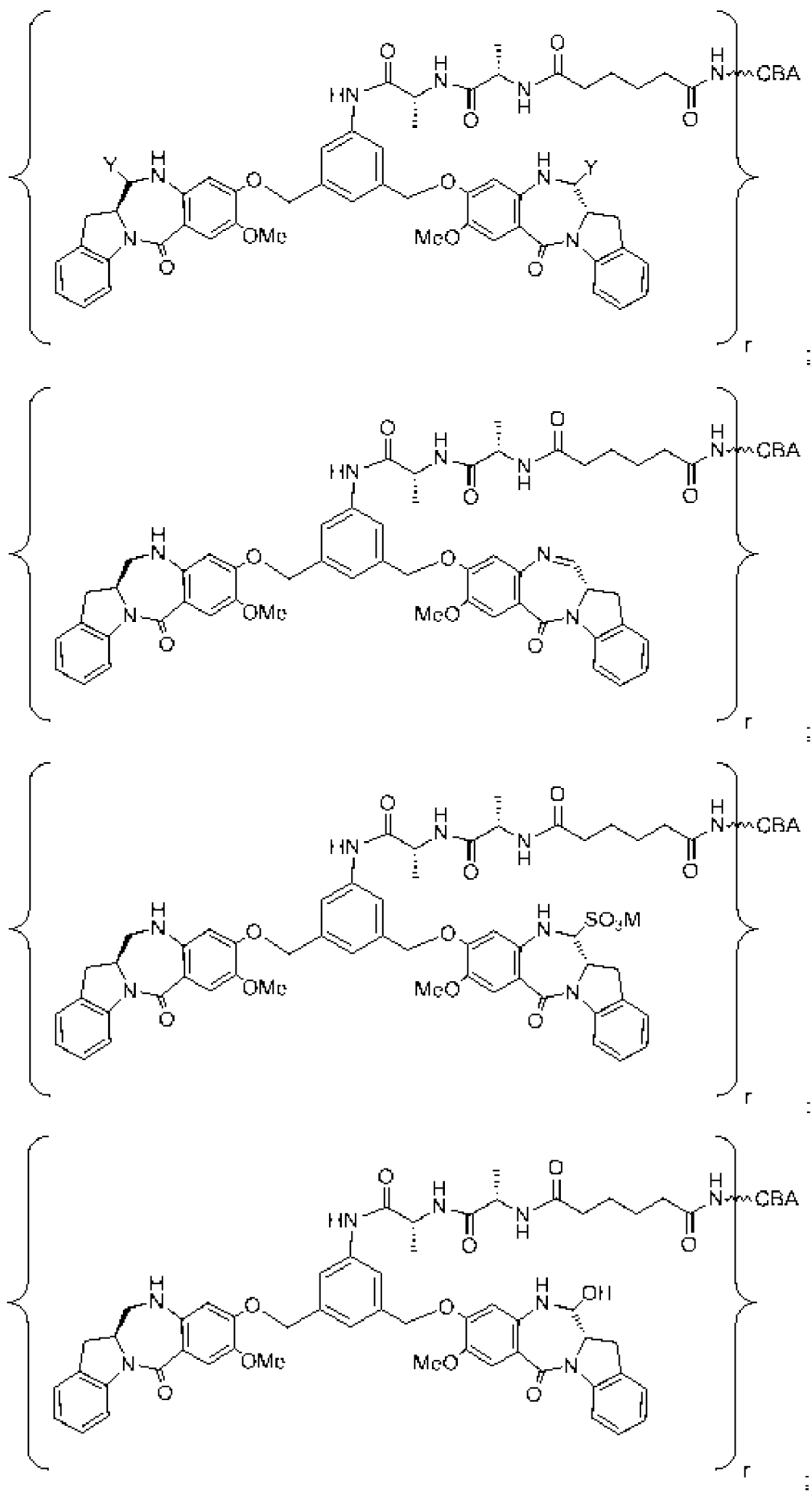


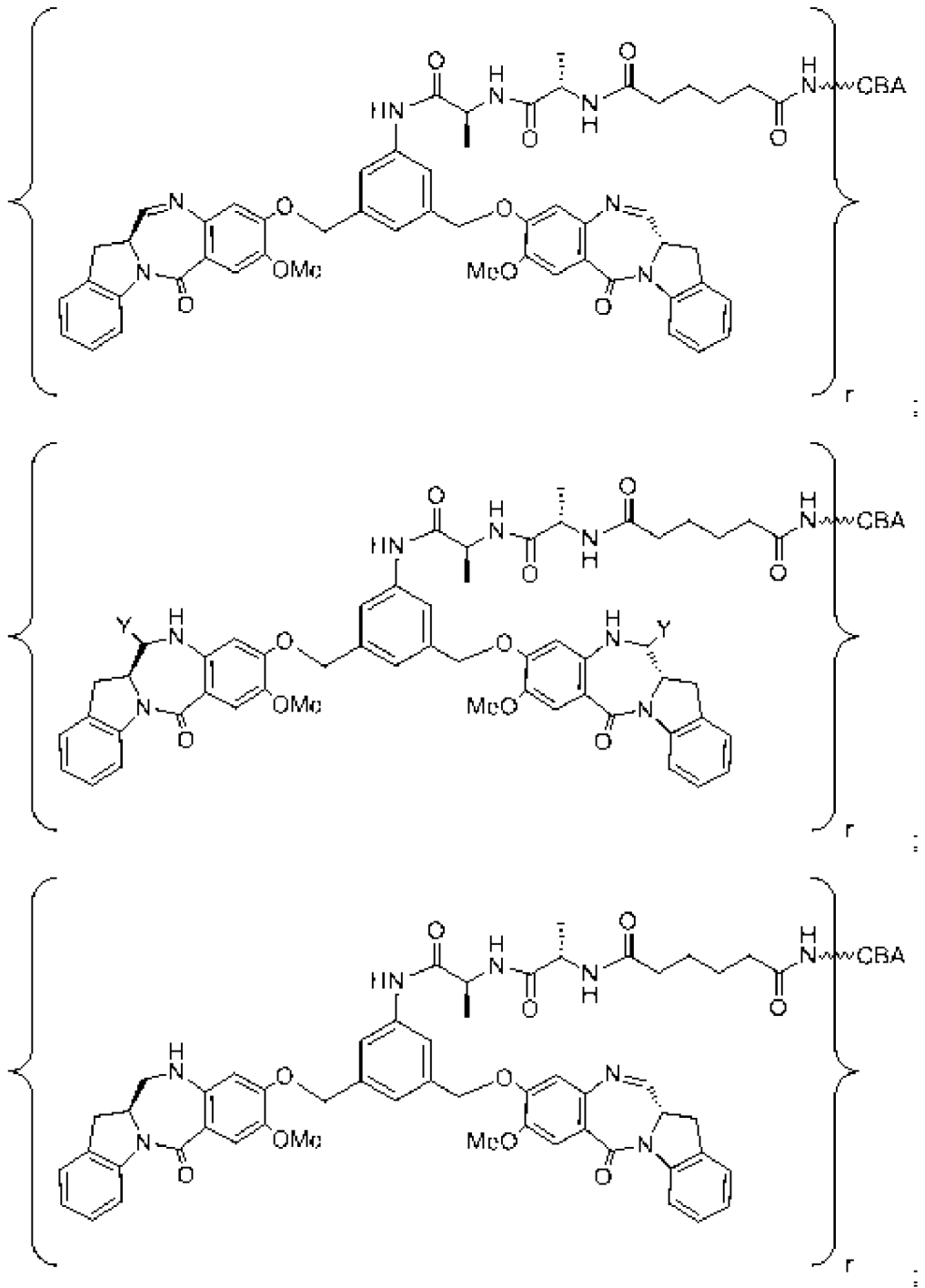


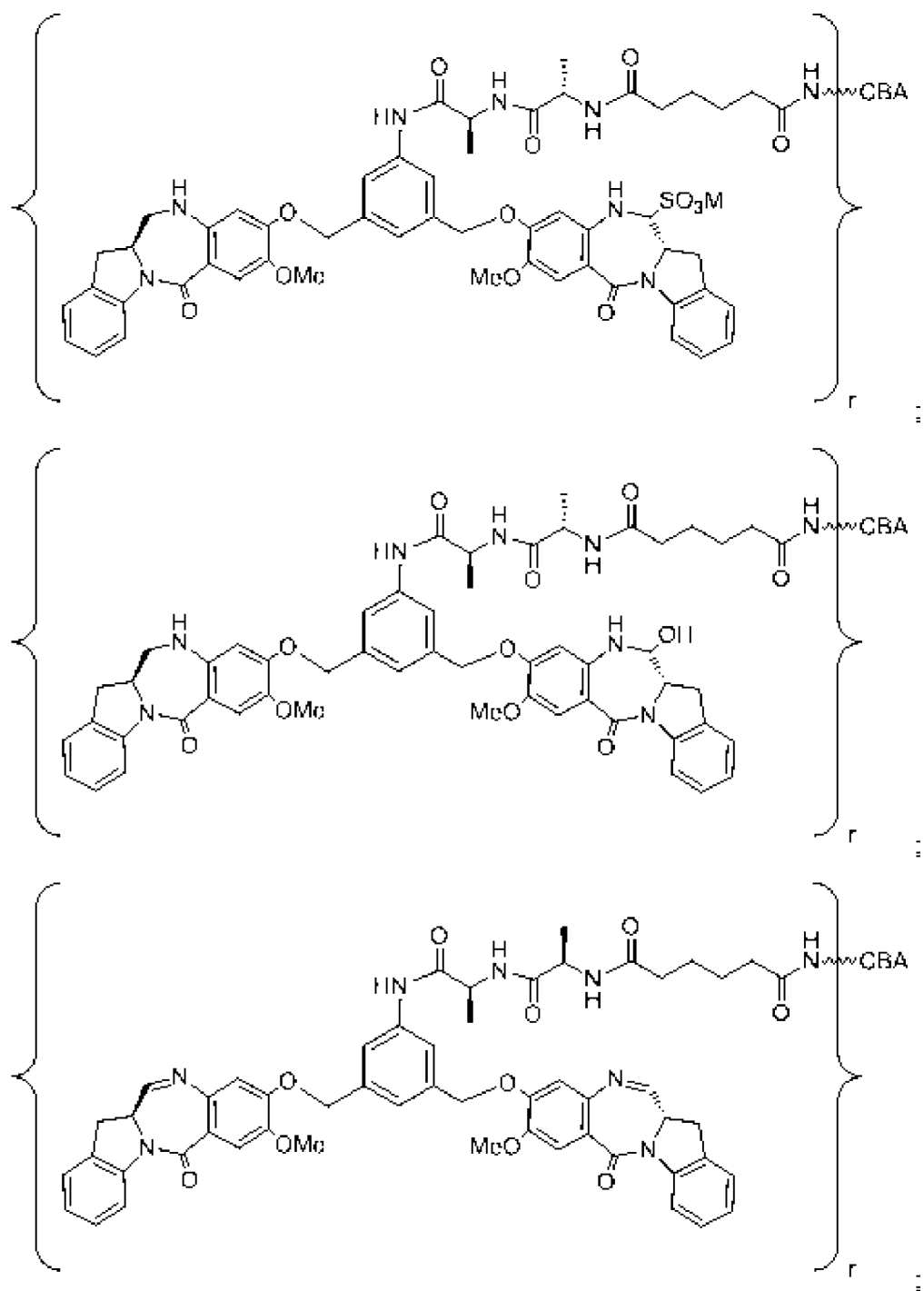


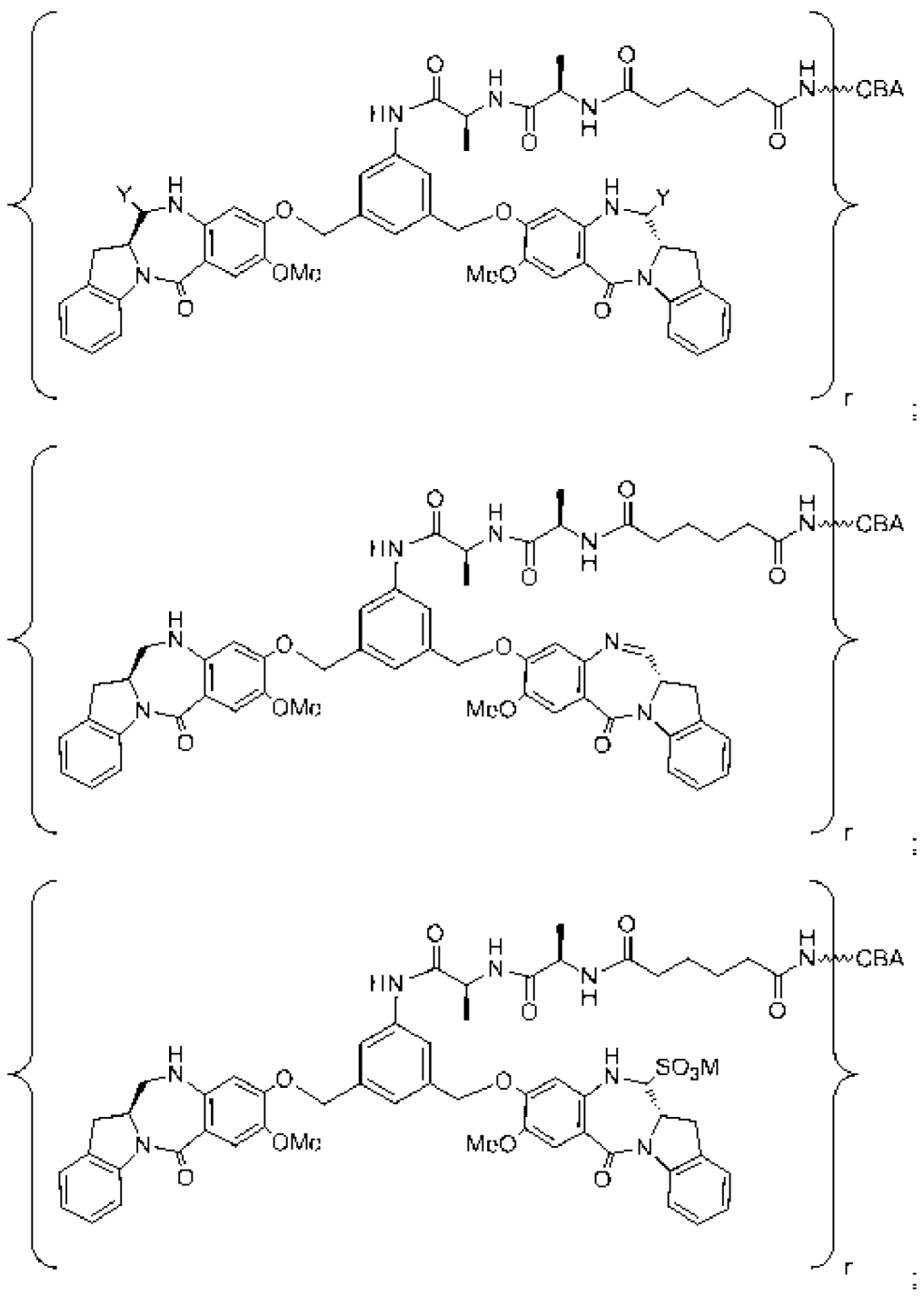


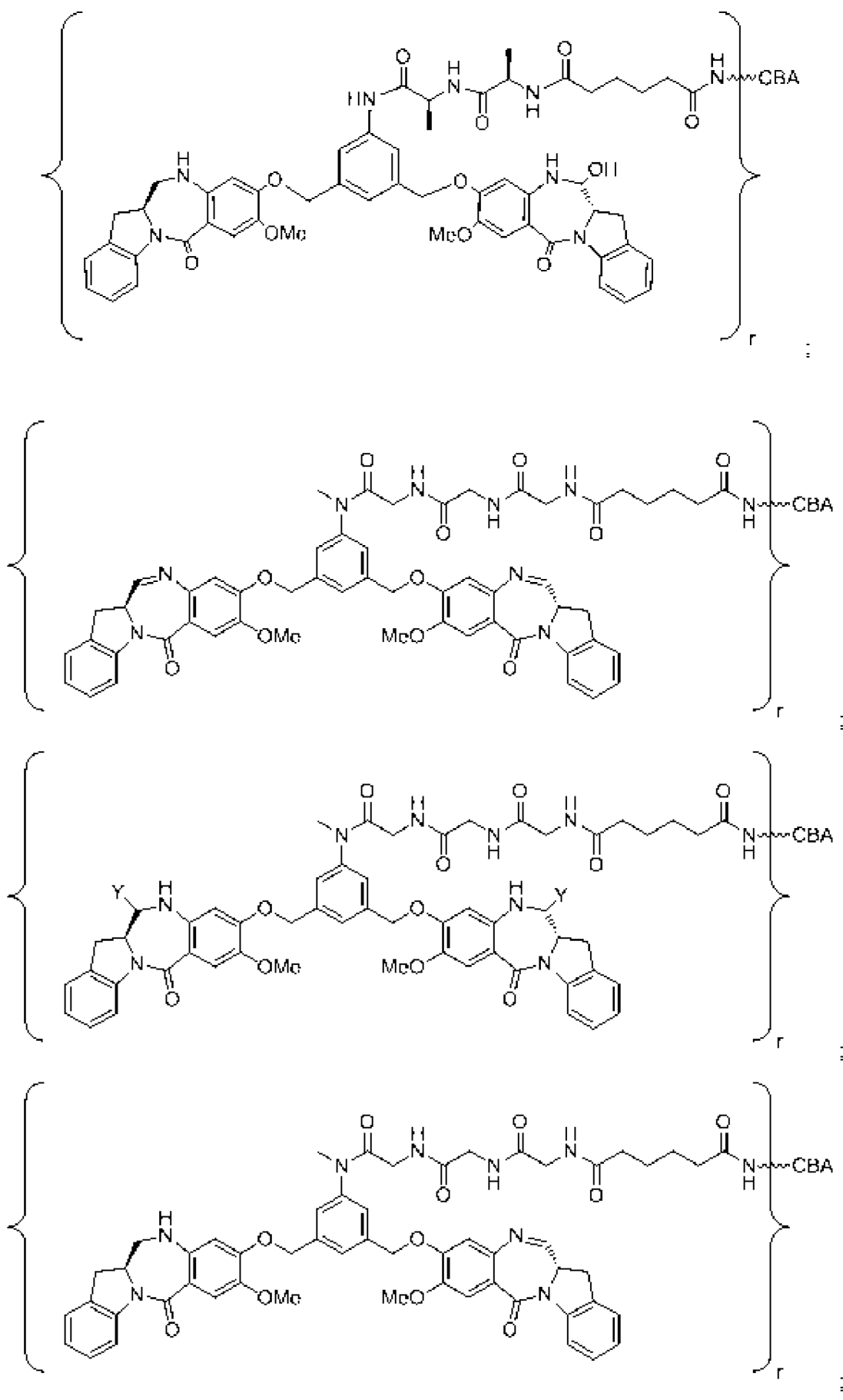


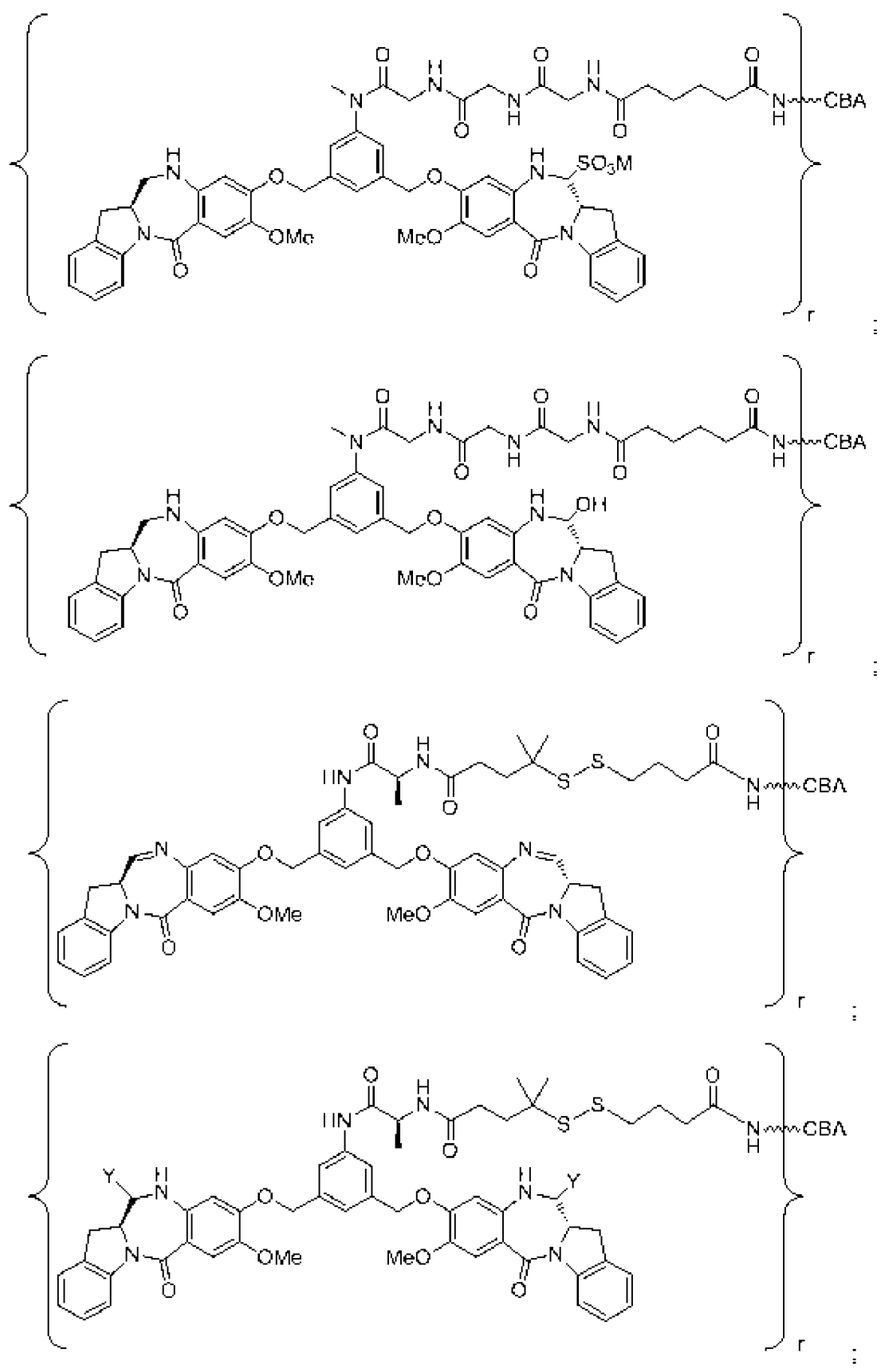


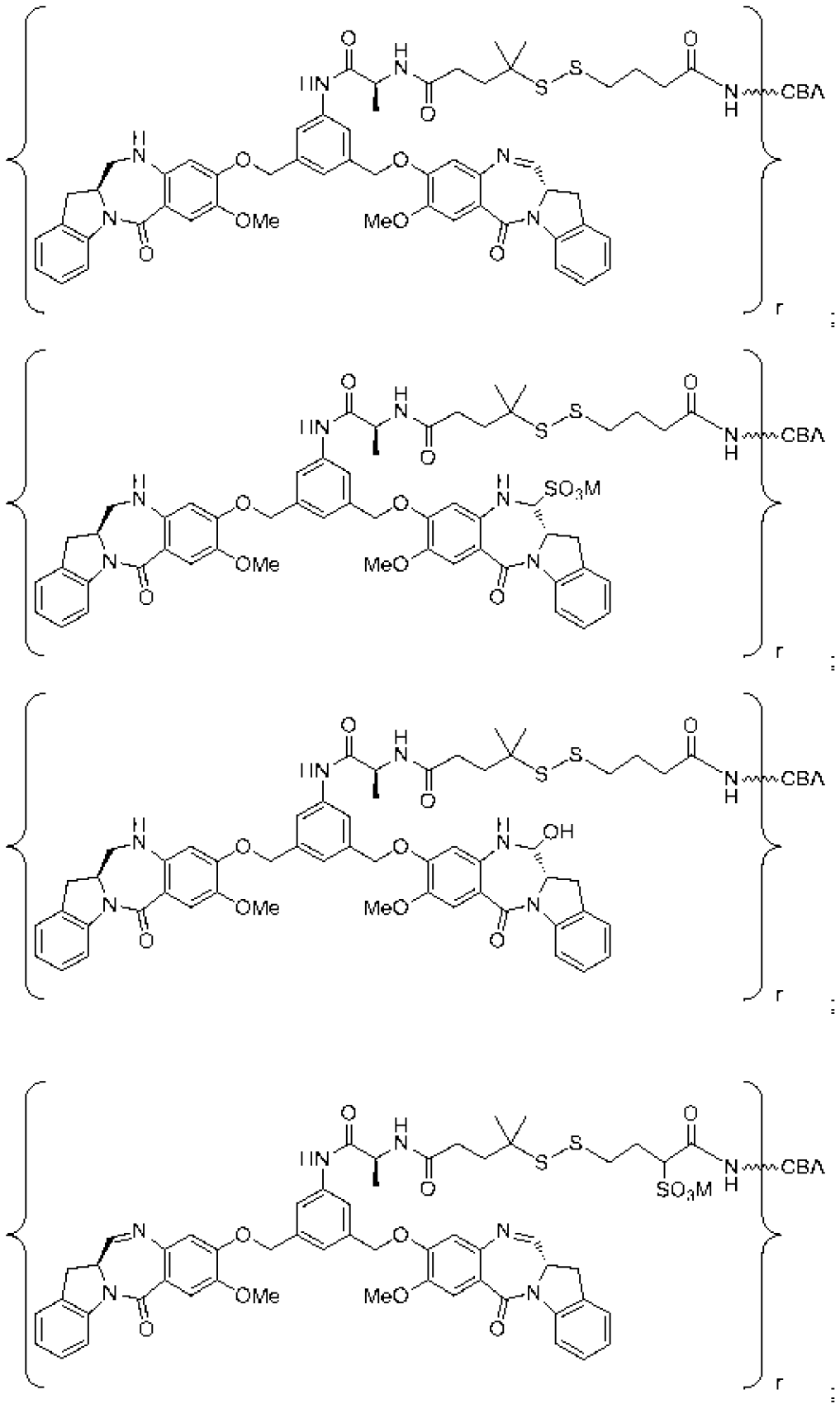


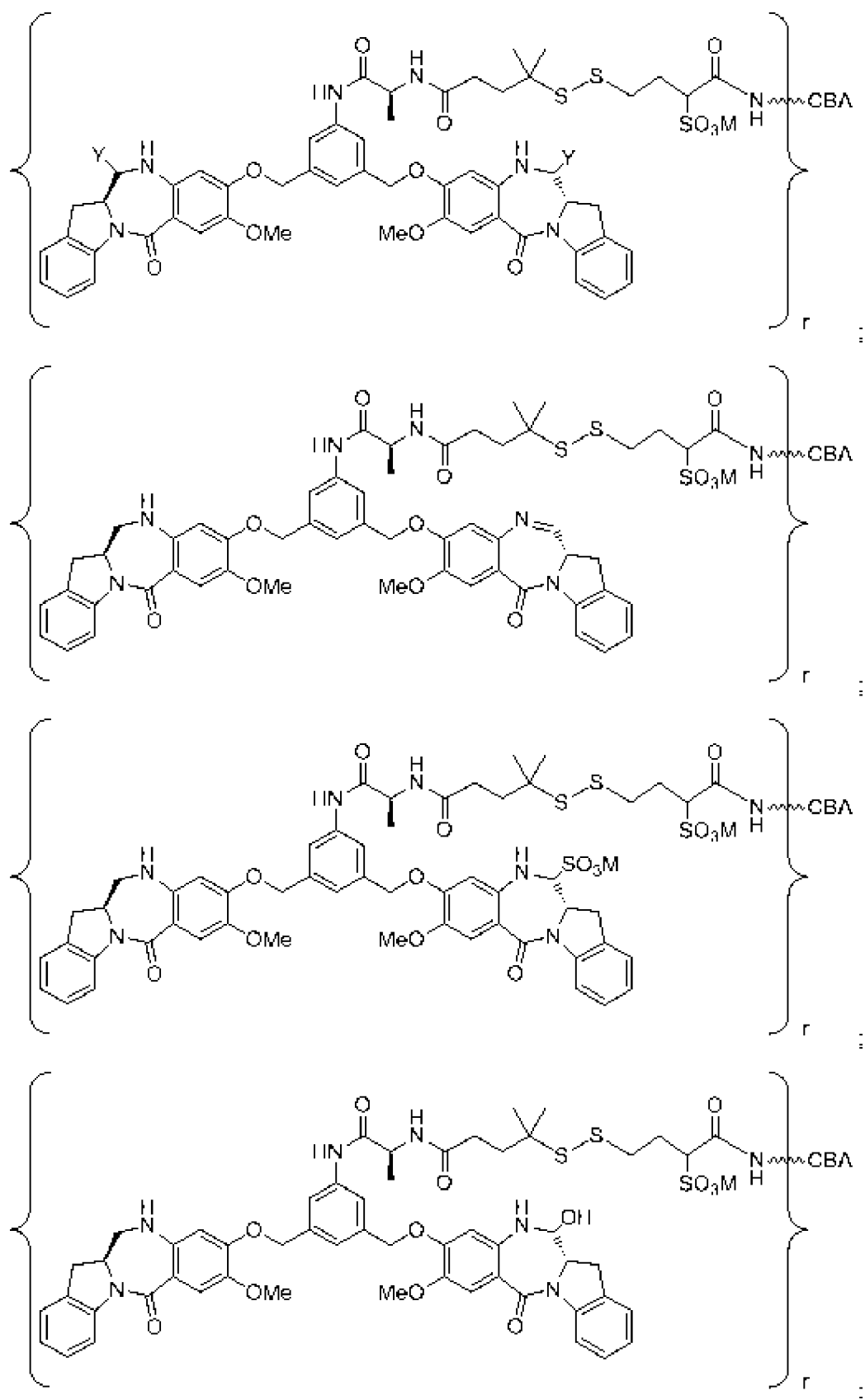


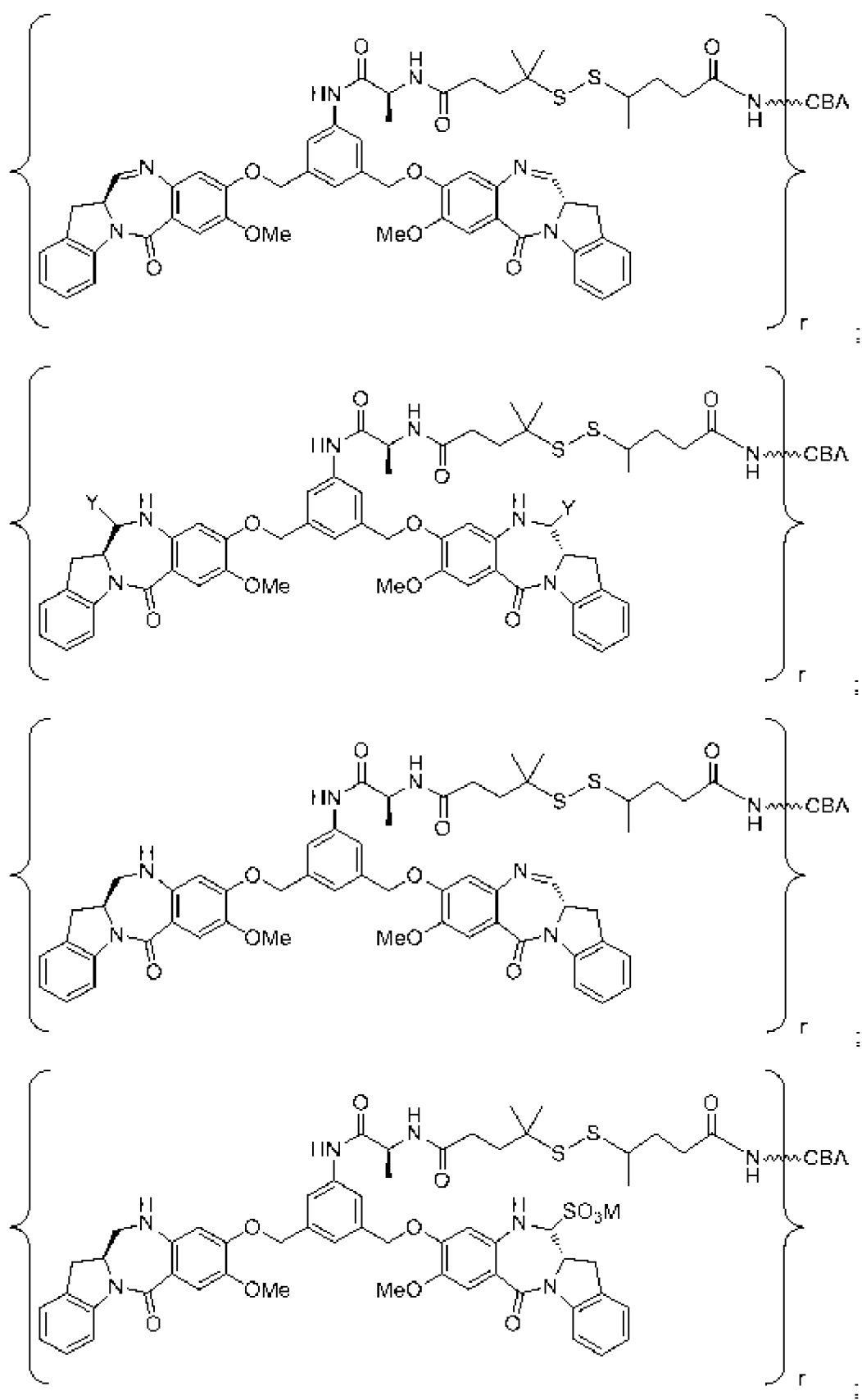


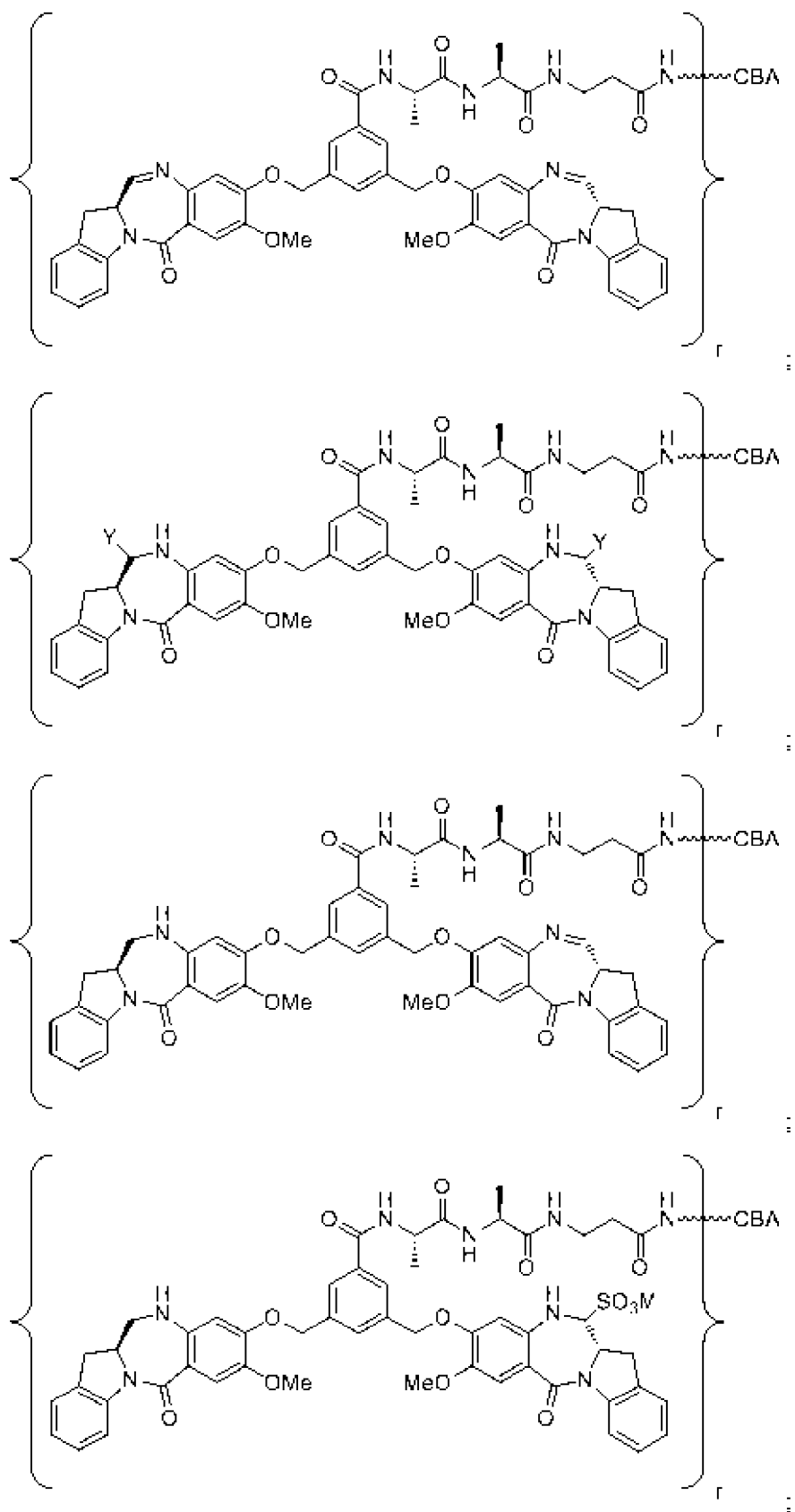


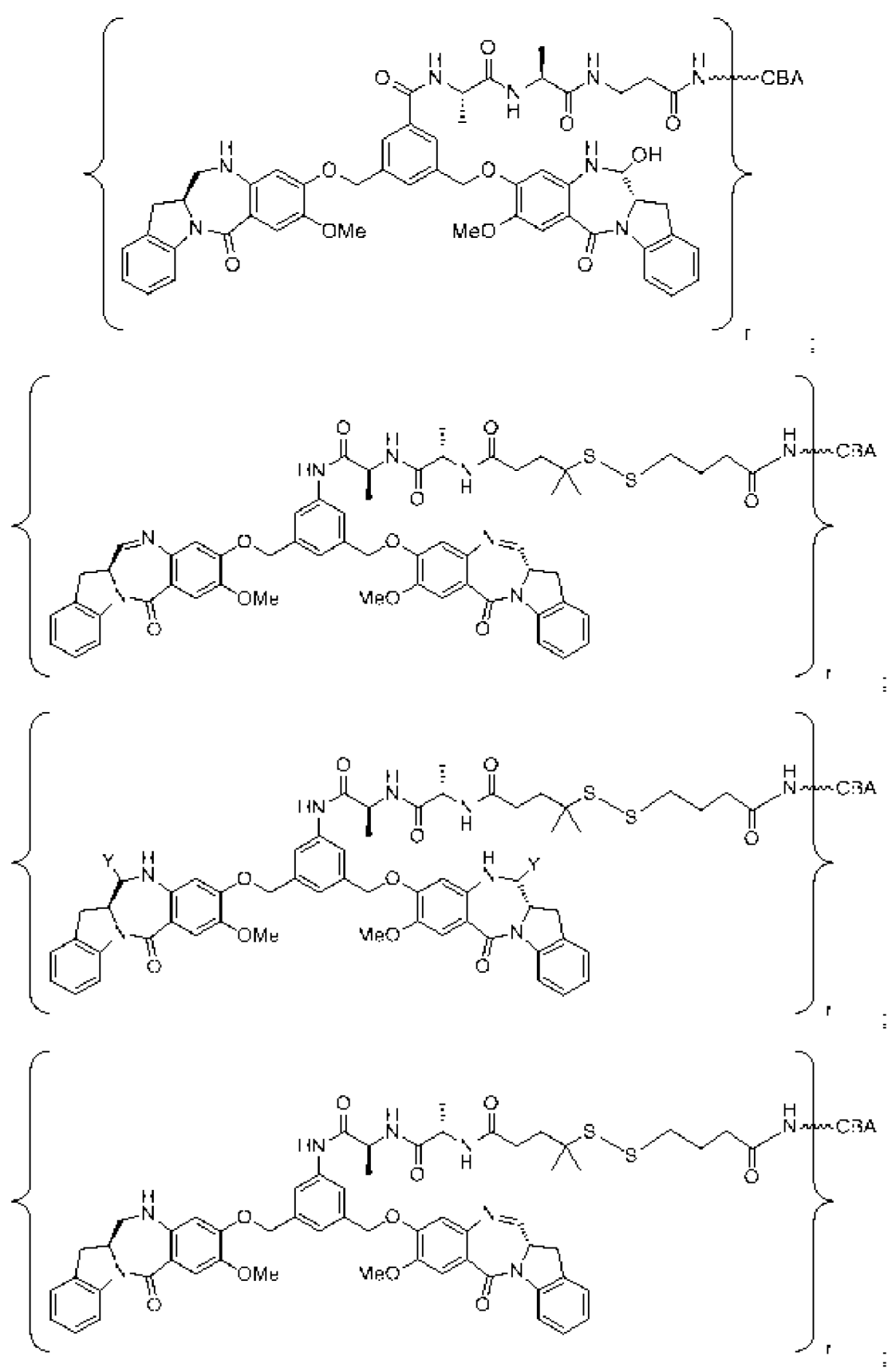


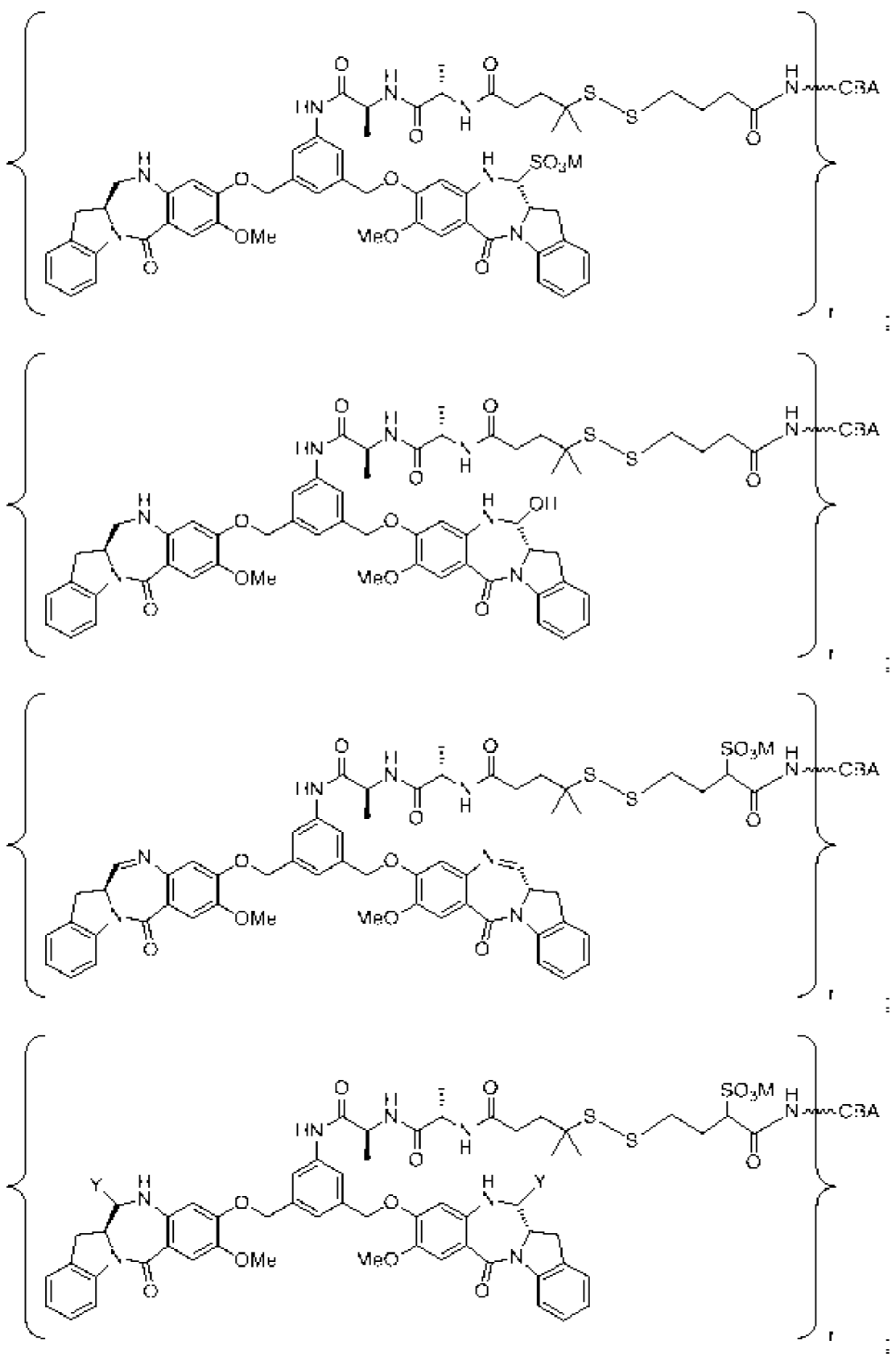


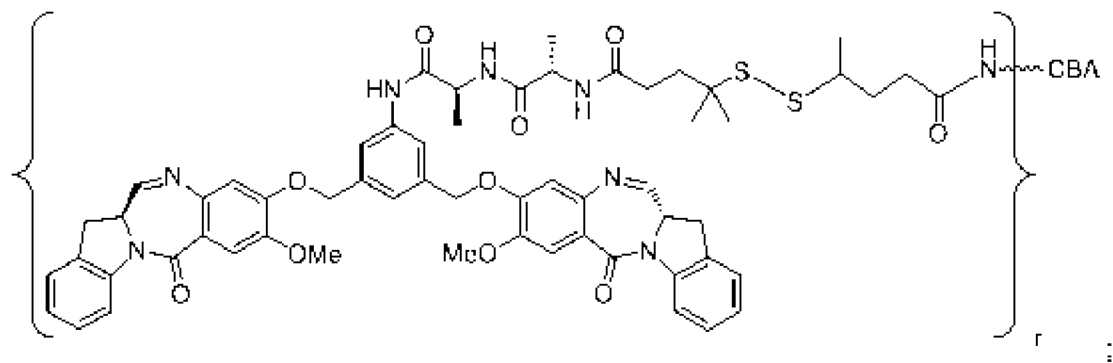


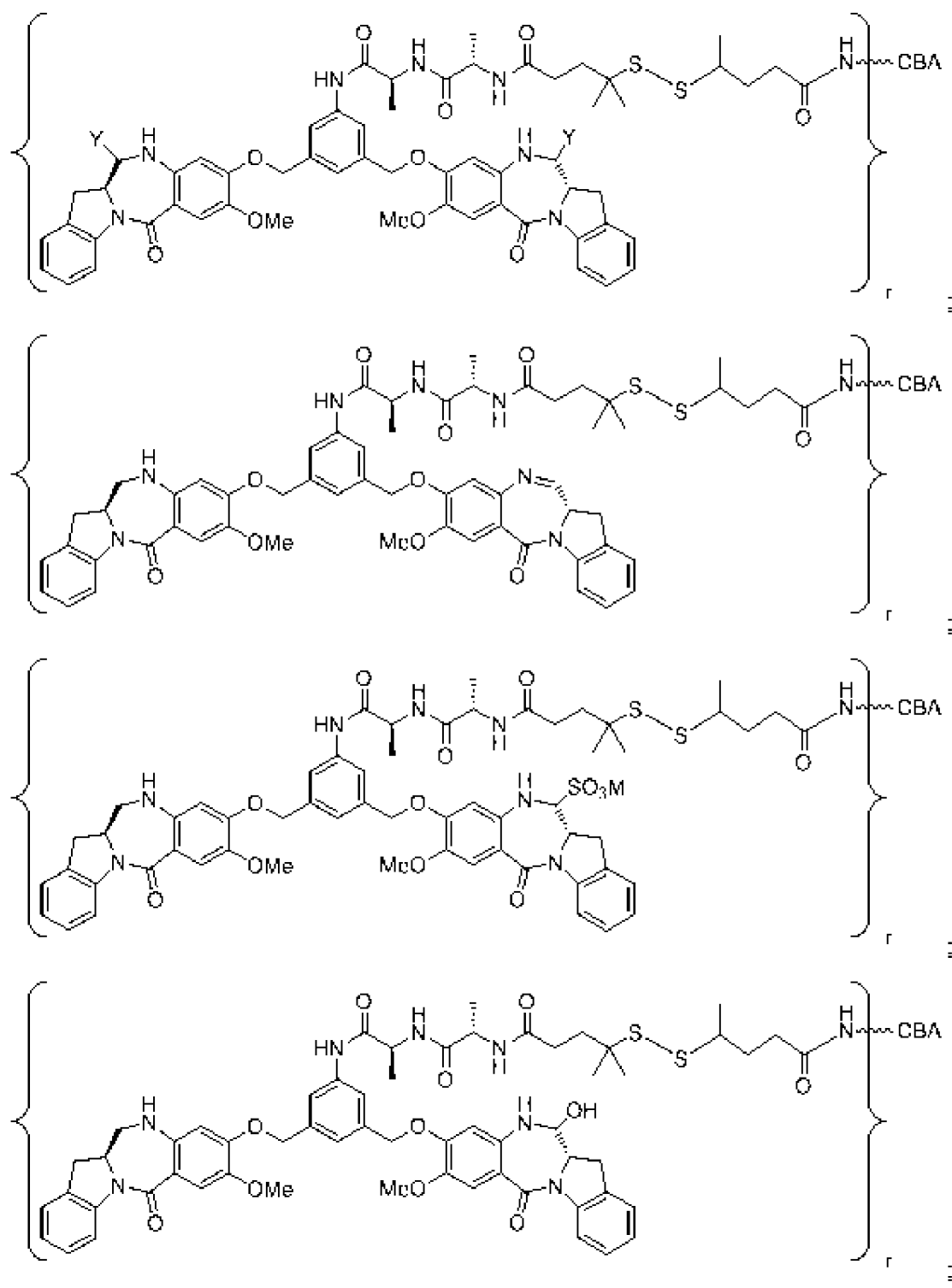


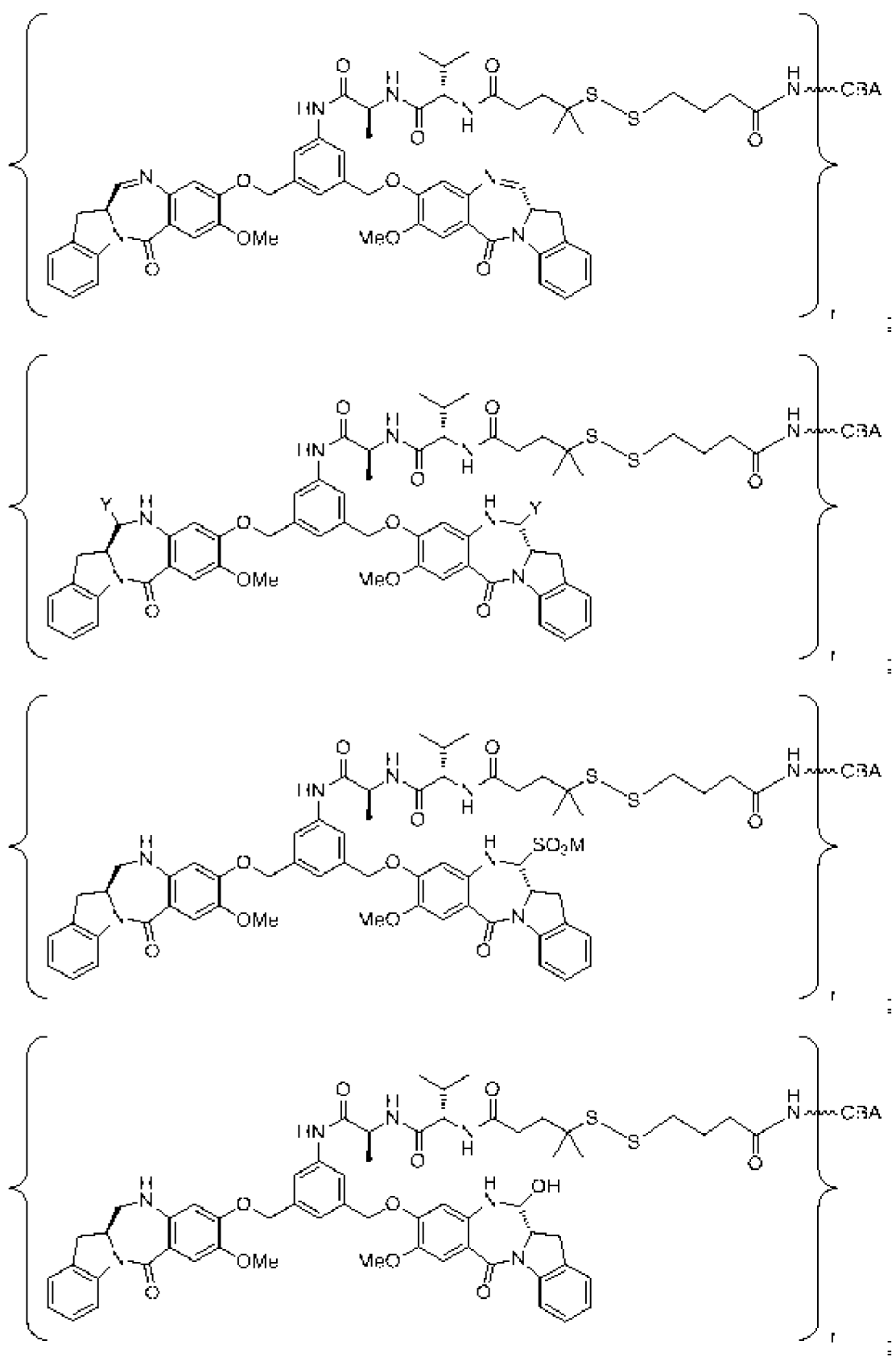


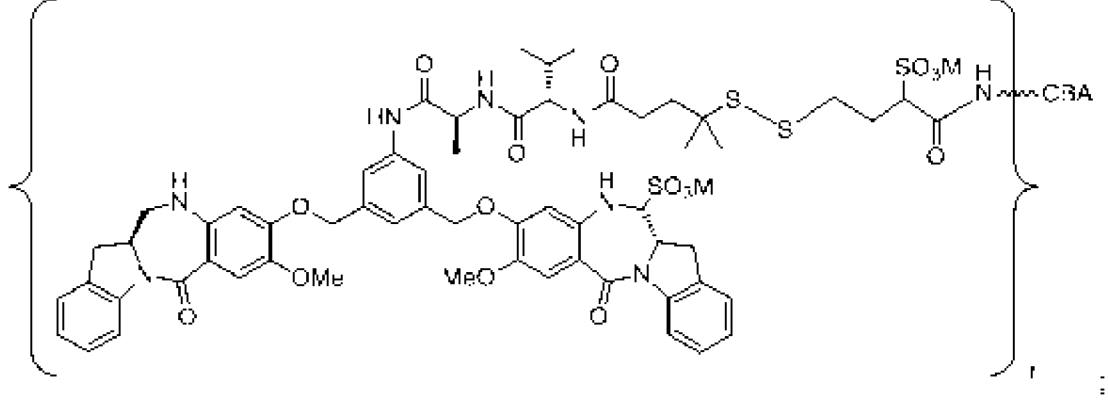
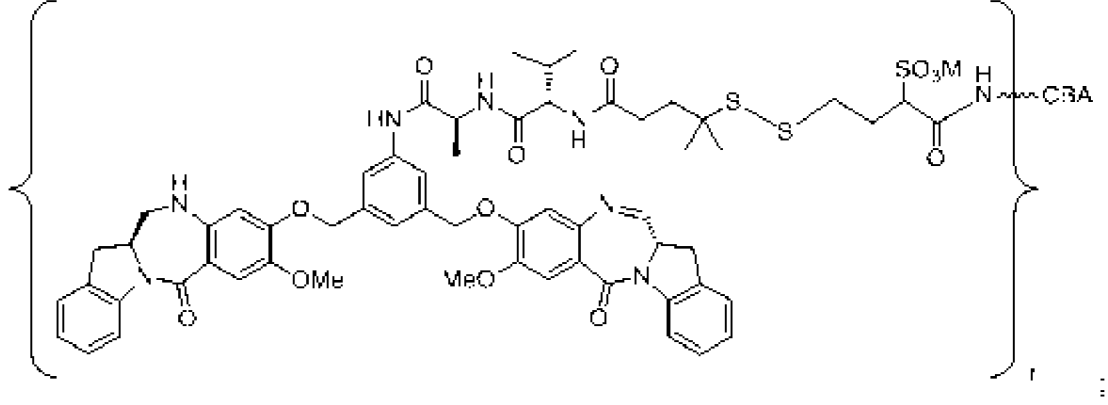
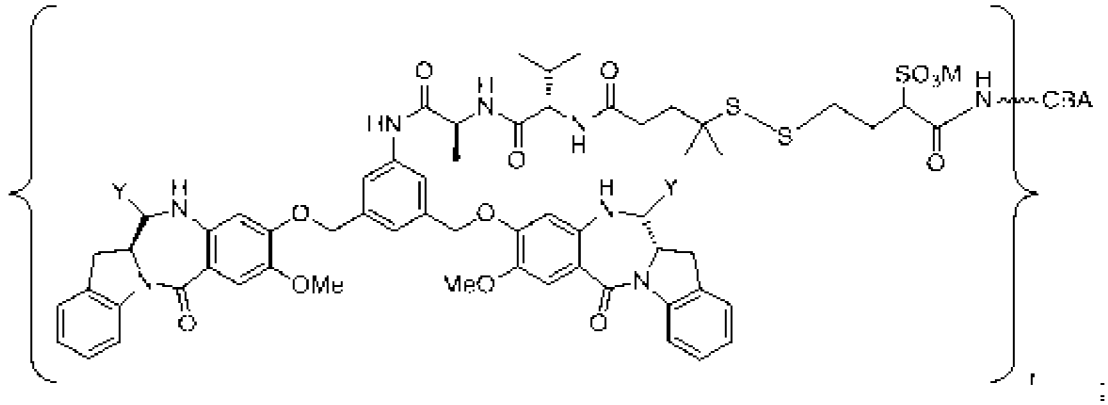
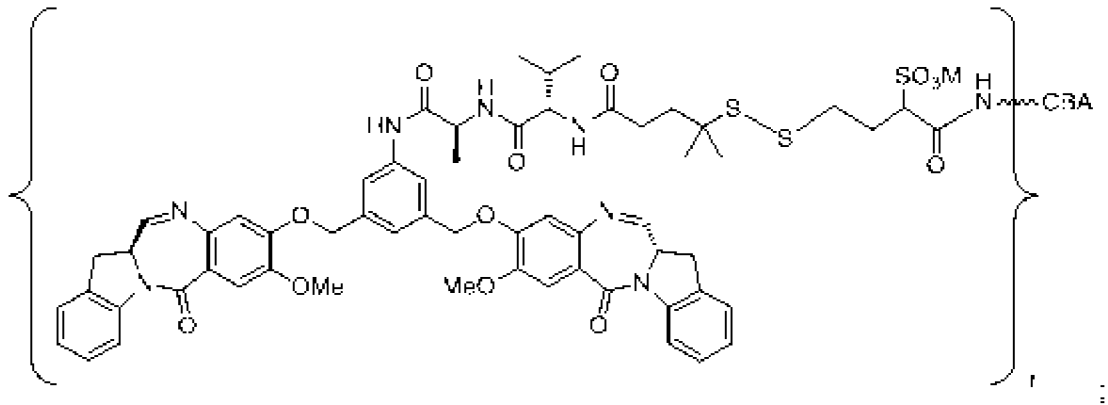


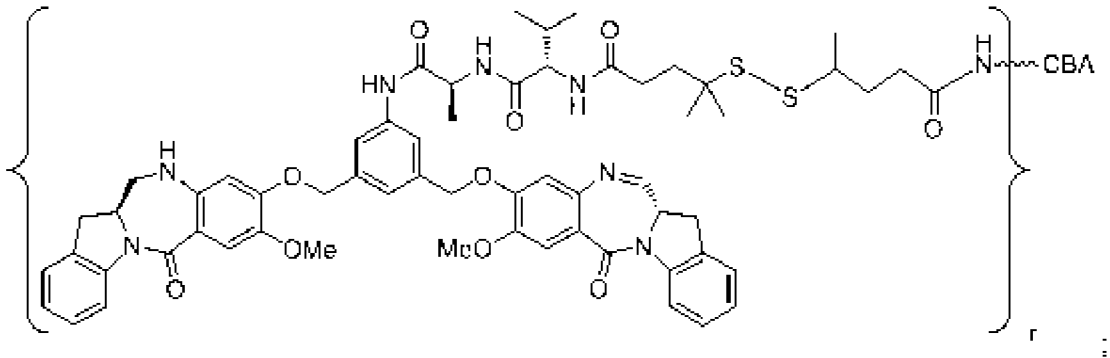
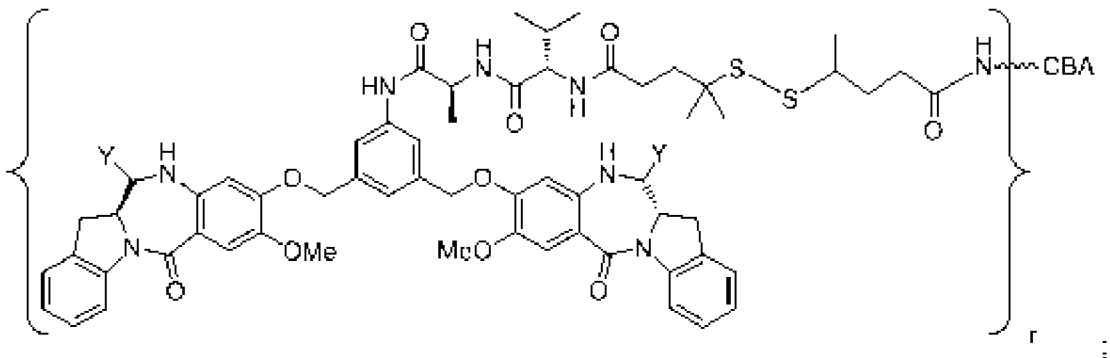
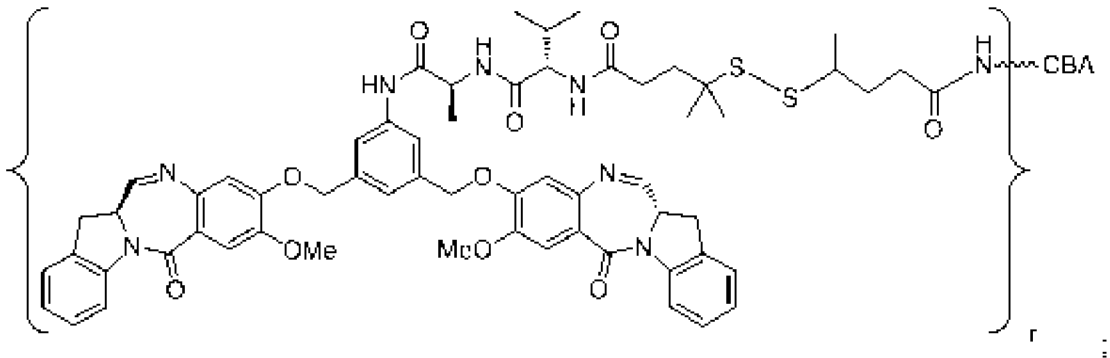
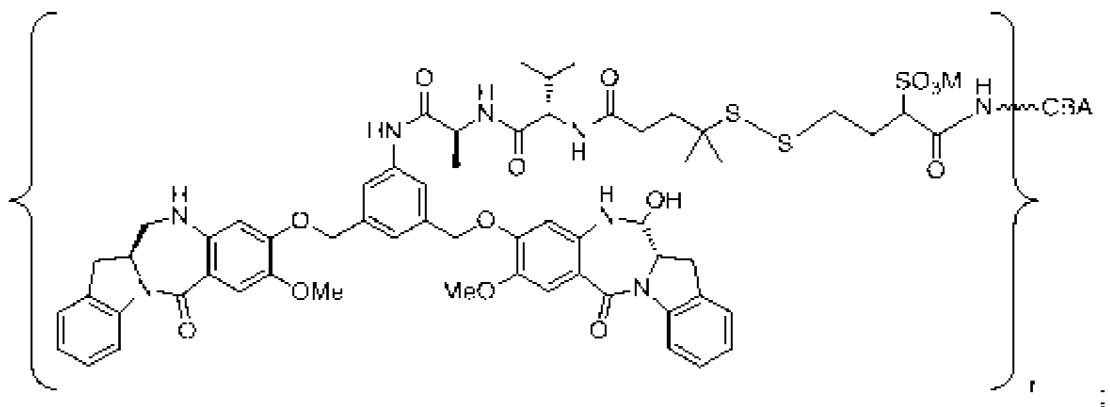


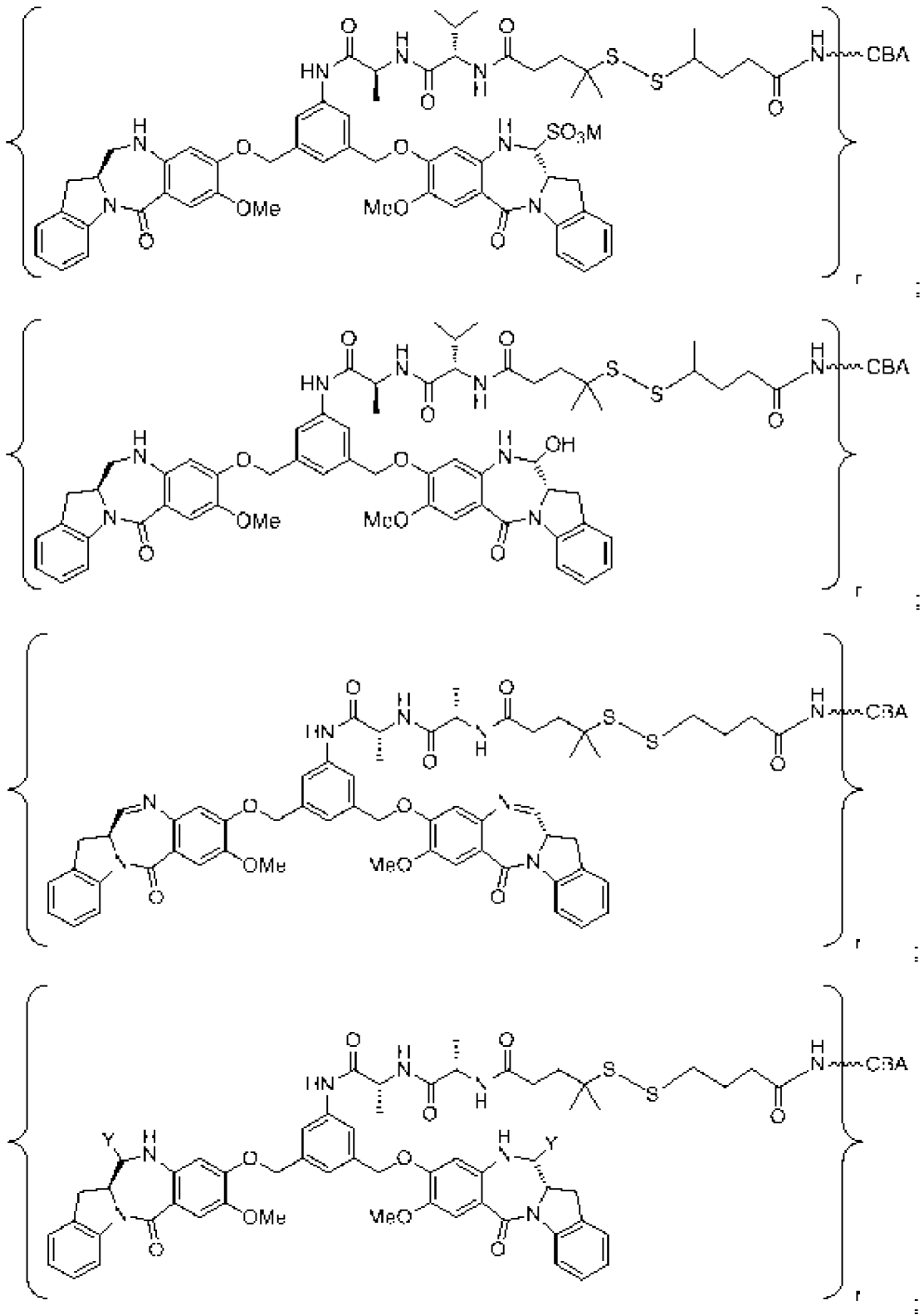


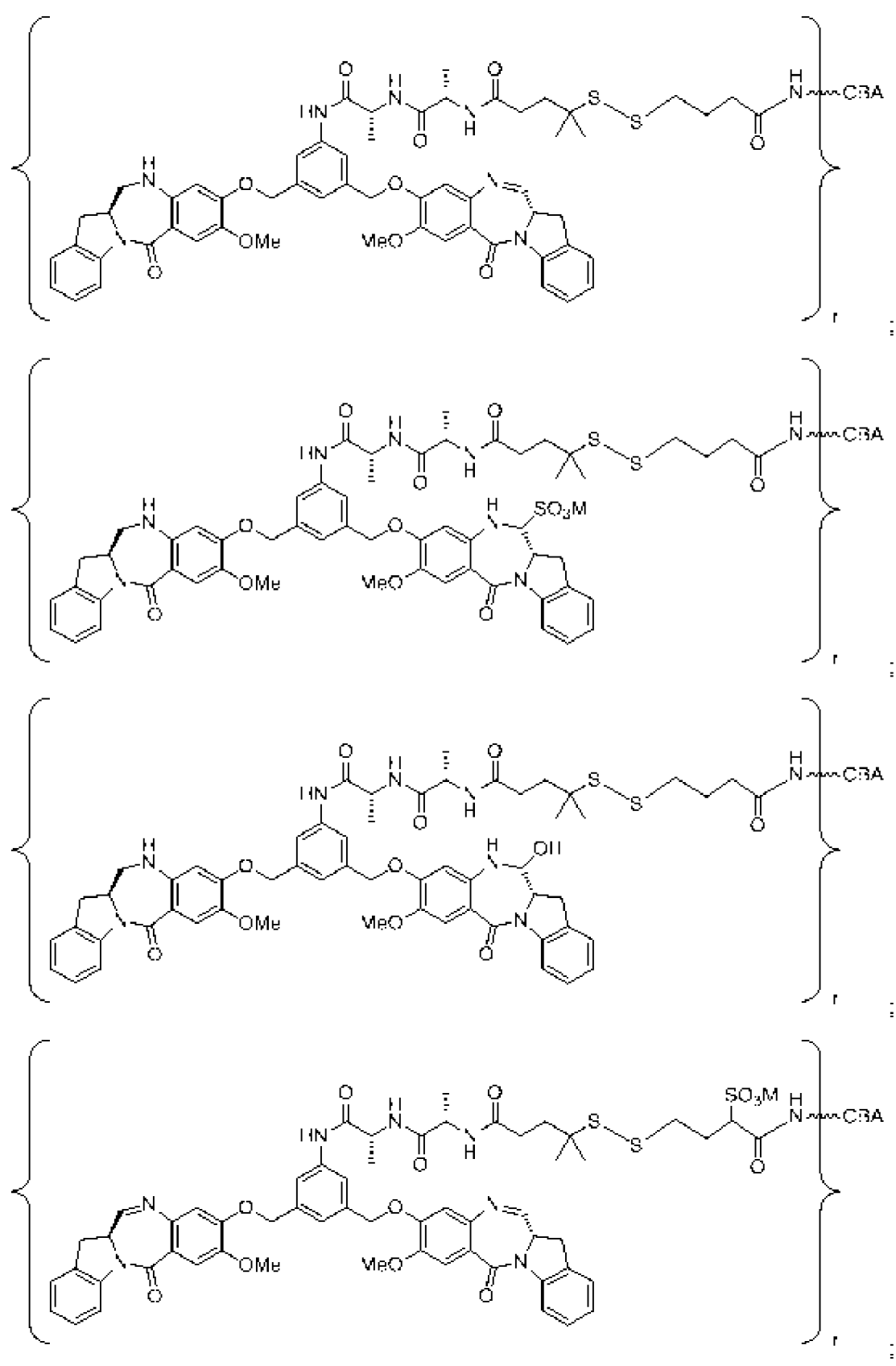


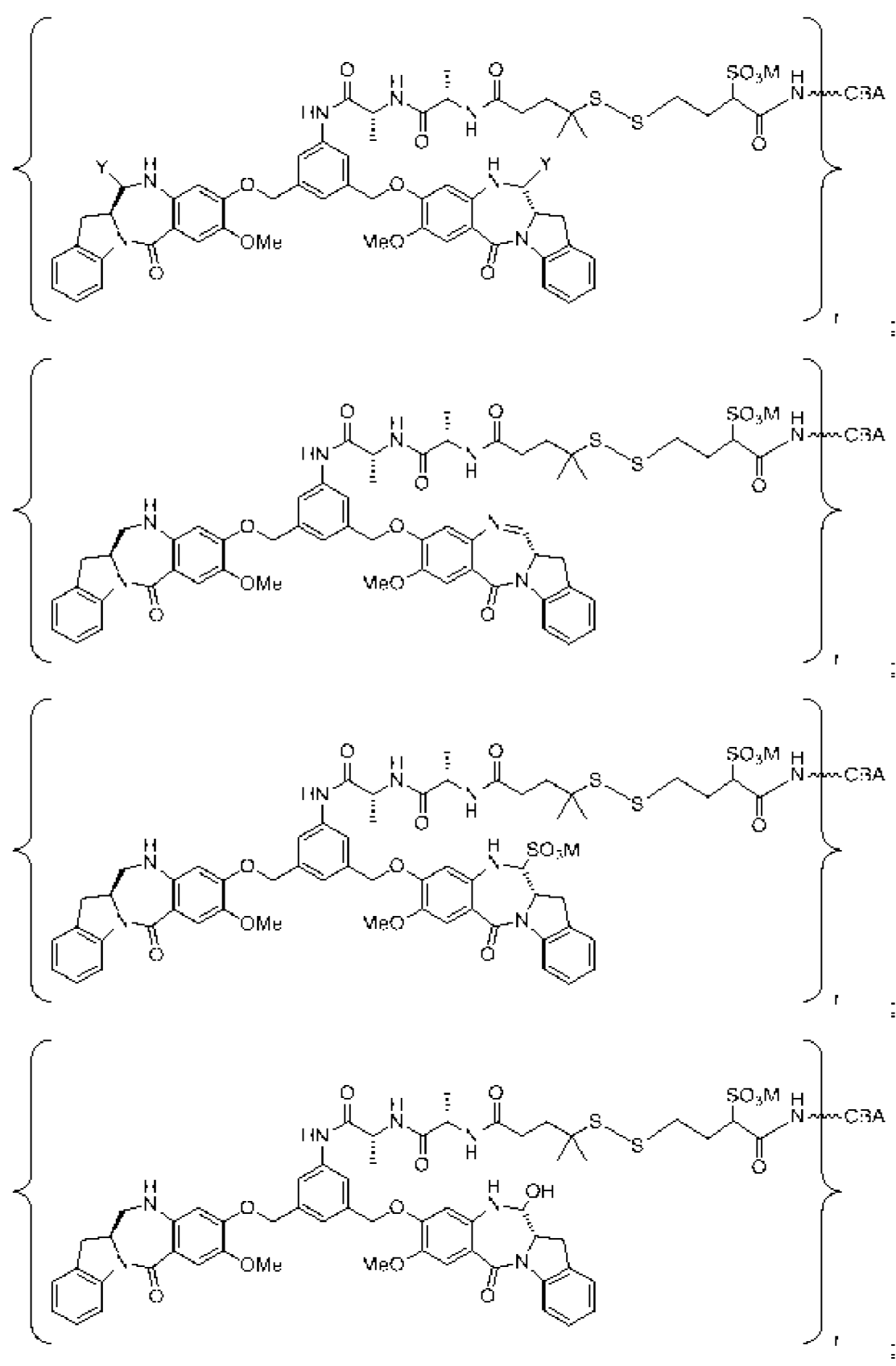


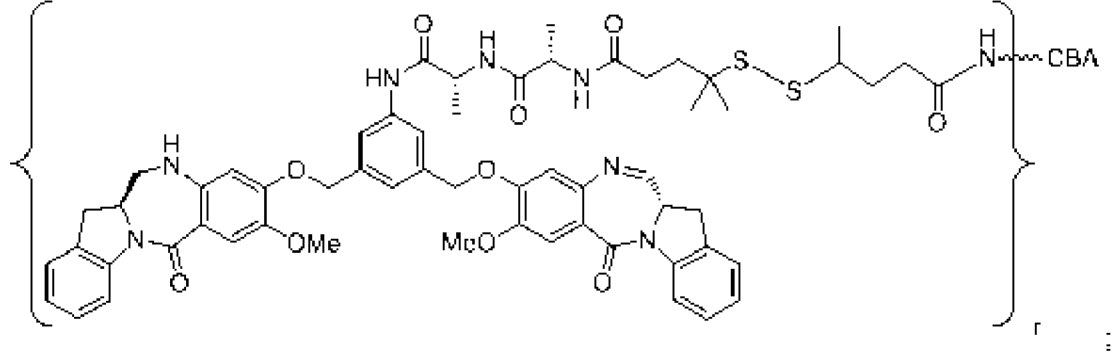
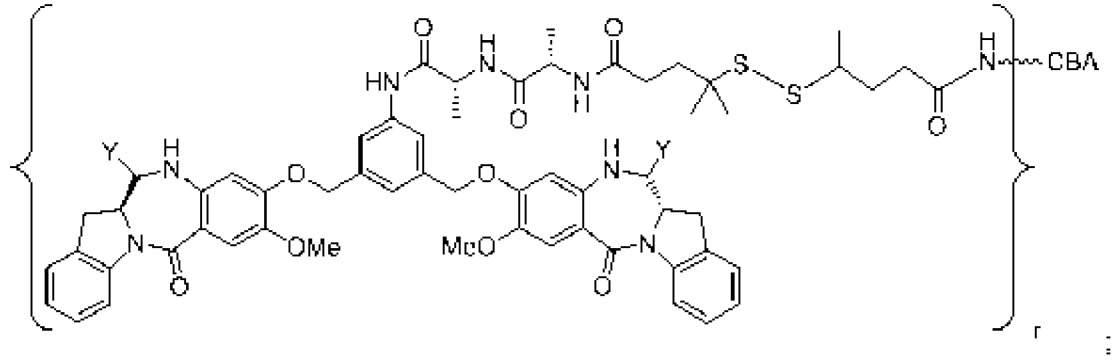
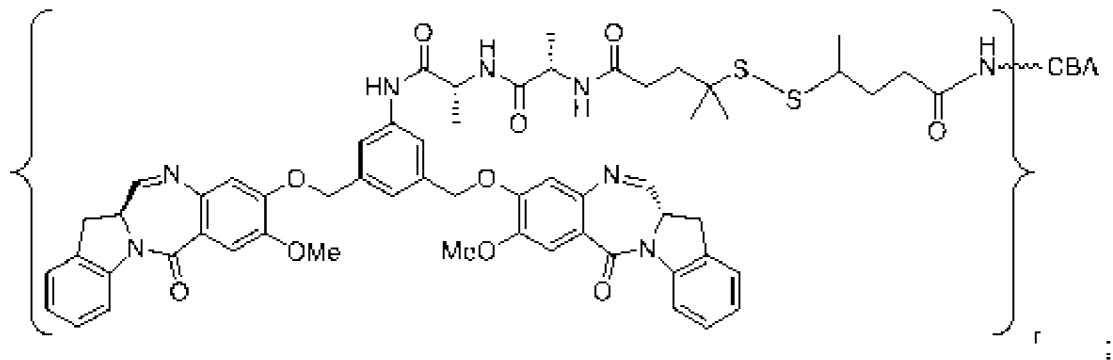




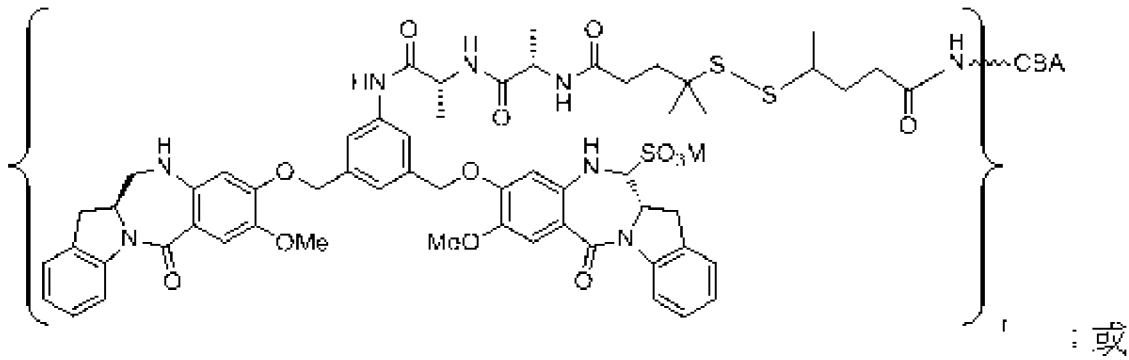


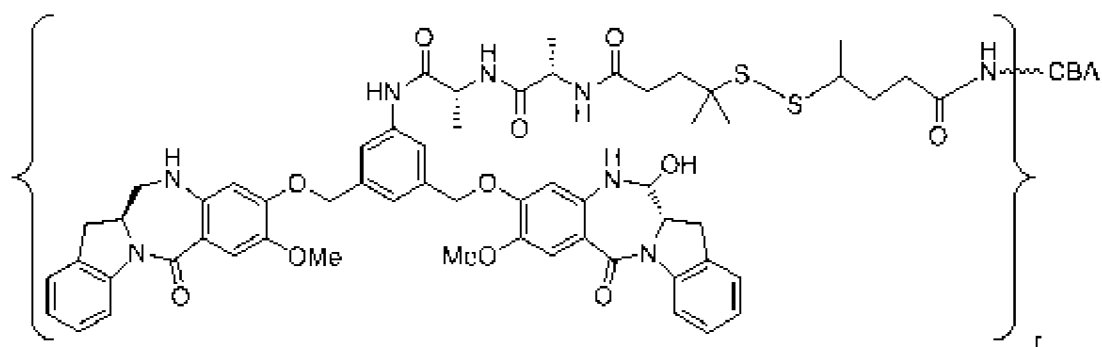






or





或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

r 為1至10之整數；

Y 為 $-H$ 、 $-OH$ 或 $-SO_3M$ ；且

M 為醫藥學上可接受之陽離子(例如 H^+ 、 Na^+ 或 K^+)。

更具體言之， Y 為 $-SO_3M$ 。或者， Y 為 $-OH$ 。

【0261】 在某些實施例中，本文所描述之偶聯物，諸如第二實施例或第1至15個具體實施例中所描述之該等偶聯物可包含1-10個細胞毒性化合物、2-9個細胞毒性化合物、3-8個細胞毒性化合物、4-7個細胞毒性化合物或5-6個細胞毒性化合物，每一細胞毒性化合物包含將該細胞毒性化合物連接至CBA之連接基團，且在偶聯物上之每一細胞毒性化合物均相同。

【0262】 在任何偶聯物實施例，諸如第二實施例或第1至15個具體實施例中，細胞結合劑可結合至選自以下之靶細胞：腫瘤細胞、感染病毒之細胞、感染微生物之細胞、感染寄生蟲之細胞、自體免疫細胞、活化之細胞、骨髓細胞、活化之T細胞、B細胞或黑素細胞；表現CD4、CD6、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD38、CD40、CD44、CD56、EpCAM、CanAg、CALLA或Her-2抗原；Her-3抗原之細胞；或表現胰島素生長因子受體、表皮生長因子受體及葉酸受體之細胞。

【0263】 在任何偶聯物實施例，諸如第二實施例或第1至15個具體實施例中，該細胞結合劑可為抗體、單鏈抗體、特異性結合至該靶細胞之抗體片段、

單株抗體、單鏈單株抗體或特異性結合至靶細胞之單株抗體片段、嵌合抗體、特異性結合至該靶細胞之嵌合抗體片段、結構域抗體、特異性結合至該靶細胞之結構域抗體片段、淋巴因子、激素、維生素、生長因子、集落刺激因子或養分轉運分子。

【0264】 該抗體可為表面重塑抗體、表面重塑之單鏈抗體或表面重塑之抗體片段。

【0265】 該抗體可為單株抗體、單鏈單株抗體或其單株抗體片段。

【0266】 該抗體可為人類化抗體、人類化單鏈抗體或人類化抗體片段。

【0267】 在以上任何偶聯物實施例，諸如第二實施例或第1至15個具體實施例中，細胞結合劑可為抗葉酸受體抗體或其抗體片段。更具體言之，該抗葉酸受體抗體為huMOV19抗體。

【0268】 或者，在以上任何偶聯物實施例，諸如第二實施例或第1至15個具體實施例中，細胞結合劑可為抗EGFR抗體或其抗體片段。在一個實施例中，該抗EGFR抗體為非拮抗劑抗體，包括例如WO2012058592(以引用之方式併入本文中)中所描述之抗體。在另一實施例中，抗EGFR抗體為非功能性抗體，例如人類化ML66。更具體言之，抗EGFR抗體為huML66。

【0269】 本發明另外提供一種醫藥組成物，其包含本文所描述之任何偶聯物及醫藥學上可接受之載劑。

【0270】 本發明亦提供一種包含連接至細胞結合劑之任何主題化合物的偶聯物。

【0271】 本發明另外提供一種在哺乳動物中抑制異常細胞生長或治療增生性病徵、自體免疫病徵、破壞性骨病、感染性疾病、病毒疾病、纖維化疾病、神經退化性疾病、胰腺炎或腎病之方法，該方法包括向該哺乳動物施用治療有效量的本發明之任何化合物(含或不含任何連接子基團)或偶聯物及視情況使用

之第二化學治療劑。

【0272】 在某些實施例中，第二化學治療劑係依序或連續地施用給哺乳動物。

【0273】 在某些實施例中，該方法係用於治療選自癌症、類風濕性關節炎、多發性硬化、移植物抗宿主疾病(GVHD)、移植排斥反應、狼瘡、肌炎、感染及免疫缺陷之病狀。

【0274】 在某些實施例中，該方法或偶聯物係用於治療癌症。

【0275】 在某些實施例中，該癌症為血液科癌症或實體腫瘤。更具體言之，該癌症為卵巢癌、胰腺癌、子宮頸癌、黑素瘤、肺癌(例如非小細胞肺癌(NSCLC))、乳癌、頭頸部鱗狀細胞癌、前列腺癌、子宮內膜癌、淋巴瘤(例如非霍奇金淋巴瘤)、骨髓增生異常症候群(MDS)、腹膜癌或白血病(例如急性骨髓性白血病(AML)、急性單核細胞性白血病、早幼粒細胞性白血病、嗜伊紅性白血病、急性淋巴母細胞性白血病(例如B-ALL)、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)及慢性骨髓性白血病(CML))。

細胞結合劑-藥物偶聯物之製備

【0276】 為了將本發明之細胞毒性化合物或其衍生物連接至細胞結合劑，該細胞毒性化合物可包含鍵結至反應性基團之連接部分，諸如化合物**14** (實例1)、**23** (實例2)、**35** (實例3)、**49** (實例4)、**80** (實例5)、**90** (實例6)、**63** (實例7)或**70** (實例8)。該等化合物可直接連接至細胞結合劑。用於將鍵結有反應性基團之細胞毒性化合物與細胞結合劑連接以製造細胞結合劑-細胞毒性劑偶聯物的代表性方法描述於實例11、13、14-17、19及20中。

【0277】 在一個實施例中，可首先使雙官能交聯劑與細胞毒性化合物反應以提供帶有鍵結至一個反應性基團之連接部分的化合物(亦即，藥物-連接子化合物)，其可接著與細胞結合劑反應。或者，可首先使雙官能交聯試劑之一端與細

胞結合劑反應以提供帶有鍵結至一個反應性基團之連接部分的細胞結合劑，接著可使其與細胞毒性化合物反應。連接部分可含有允許該細胞毒性部分在特定位點釋放的化學鍵。適合化學鍵係此項技術中熟知的且包括二硫鍵、硫醚鍵、酸不穩定性鍵、光不穩定性鍵、肽酶不穩定性鍵及酯酶不穩定性鍵(參見例如，美國專利5,208,020、5,475,092、6,441,163、6,716,821、6,913,748、7,276,497、7,276,499、7,368,565、7,388,026及7,414,073)。較佳為二硫鍵、硫醚鍵及肽酶不穩定性鍵。可用於本發明中之其他連接子包括不可裂解之連接子，諸如美國公開案號2005/0169933中詳細描述的該等連接子；或帶電荷之連接子或親水性連接子，其描述於US 2009/0274713、US 2010/01293140及WO 2009/134976，各專利以引用之方式明確地併入本文中。

【0278】 在一個實施例中，可將細胞結合劑(例如抗體)於水性緩衝液中之溶液與莫耳過量之雙官能交聯劑，諸如*N*-琥珀醯亞胺基-4-(2-吡啶基二硫基)戊酸酯(SPP)、*N*-琥珀醯亞胺基-4-(2-吡啶基二硫基)丁酸酯(SPDB)、*N*-琥珀醯亞胺基-4-(2-吡啶基二硫基)2-磺基丁酸酯(磺基-SPDB)一起溫育，以引入二硫吡啶基。接著使經修飾之細胞結合劑(例如經修飾之抗體)與本文所描述的含硫醇之細胞毒性化合物，諸如化合物**98**或**99** (實例9及10)反應，以製備本發明的二硫化物連接之細胞結合劑-細胞毒性劑偶聯物。

【0279】 在另一實施例中，可使本文所描述的含硫醇之細胞毒性化合物，諸如化合物**98**或**99**與雙官能交聯劑，諸如*N*-琥珀醯亞胺基-4-(2-吡啶基二硫基)戊酸酯(SPP)、*N*-琥珀醯亞胺基-4-(2-吡啶基二硫基)丁酸酯(SPDB)、*N*-琥珀醯亞胺基-4-(2-吡啶基二硫基)2-磺基丁酸酯(磺基-SPDB)反應，以形成細胞毒性劑-連接子化合物，接著可使其與細胞結合劑反應，以製備本發明的二硫化物連接之細胞結合劑-細胞毒性劑偶聯物。細胞毒性劑-連接子化合物可在與細胞結合劑反應之前原位製備，無需純化。代表性方法描述於實例12及18中。或者，細胞毒

性劑-連接子化合物可在與細胞結合劑反應之前經純化。

【0280】 細胞結合劑-細胞毒性劑偶聯物可使用此項技術中已知之任何純化方法，諸如美國專利號7,811,572及美國公開案號2006/0182750(均以引用之方式併入本文中)中所描述之該等方法純化。舉例而言，細胞結合劑-細胞毒性劑偶聯物可使用切向流過濾、吸附層析法、吸附過濾法、選擇性沈澱法、非吸附過濾法或其組合進行純化。較佳使用切向流過濾(TFF，又稱為橫流式過濾、超濾及透濾)及/或吸附層析樹脂純化該等偶聯物。

【0281】 或者，可將細胞結合劑(例如抗體)與莫耳過量之抗體修飾劑，諸如2-亞胺基硫雜環戊烷、L-高半胱胺酸硫內酯(或衍生物)或N-琥珀醯亞胺基-S-乙醯基硫代乙酸酯(SATA)一起溫育，以引入硫氫基。接著使經修飾之抗體與適當的含二硫化物之細胞毒性劑反應，以製備二硫化物連接之抗體-細胞毒性劑偶聯物。接著，可藉由以上描述之方法純化抗體-細胞毒性劑偶聯物。細胞結合劑亦可經工程改造以引入硫醇部分，諸如美國專利號7,772,485及7,855,275中所揭示的半胱胺酸工程改造之抗體。

【0282】 在另一實施例中，可將細胞結合劑(例如抗體)於水性緩衝液中之溶液與莫耳過量之抗體修飾劑一起溫育，諸如與N-琥珀醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)-環己烷-1-甲酸酯一起溫育以引入順丁烯二醯亞胺基，或與N-琥珀醯亞胺基-4-(碘代乙醯基)-胺基苯甲酸酯(SIAB)一起溫育，以引入碘代乙醯基。接著使經修飾之細胞結合劑(例如經修飾抗體)與含硫醇之細胞毒性劑反應，以製備硫醚連接之細胞結合劑-細胞毒性劑偶聯物。接著，可藉由以上描述之方法純化該偶聯物。

【0283】 可藉由量測在280 nm與在330 nm下吸光度之比率，以分光光度法測定每一抗體分子結合之細胞毒性分子之數量。每一抗體分子可藉由本文所描述之方法連接平均1-10個細胞毒性化合物。每一抗體分子連接之細胞毒性化合物

之平均數量較佳為2-5個，且最佳為2.5-4.0個。

【0284】 用於製備本發明之細胞結合劑-藥物偶聯物之代表性方法描述於8,765,740及美國申請公開案號2012/0238731中。該等參考文獻之完整教示內容以引用之方式併入本文中。

化合物及偶聯物之細胞毒性

【0285】 可對本發明之細胞毒性化合物及細胞結合劑-藥物偶聯物在活體外抑制各種癌細胞增殖之能力進行評價。舉例而言，可使用細胞株，諸如人子宮頸癌細胞株KB、人急性單核細胞性白血病細胞株THP-1、人早幼粒細胞性白血病細胞株HL60、人急性骨髓性白血病細胞株HNT-34來評估該等化合物及偶聯物之細胞毒性。可使待評價之細胞暴露於該等化合物或偶聯物1-5天，且藉由已知方法在直接分析中量測細胞之存活分數。接著，可由該等分析之結果計算IC₅₀值。或者或另外，可使用活體外細胞株敏感性篩選，諸如美國國家癌症協會(U.S. National Cancer Institute)所描述之篩選法(參見Voskoglou-Nomikos等人，2003, *Clinical Cancer Res.* 9: 42227-4239，以引用之方式併入本文中)作為一種指導以確定可能對本發明之化合物或偶聯物治療敏感的癌症類型。

【0286】 本發明之抗體-細胞毒性劑偶聯物之活體外效力及靶特異性的實例顯示於圖2及4中。所有該等偶聯物對抗原陽性癌細胞具有極高細胞毒性，且IC₅₀在較低皮莫耳濃度範圍內。抗原陰性細胞當暴露於該等偶聯物時仍保持活力。

【0287】 在一個實例中，量測了細胞結合劑/細胞毒性劑偶聯物之活體內功效。用huMov19-80及huMov19-90偶聯物處理帶有NCI-H2110腫瘤細胞之SCID小鼠且觀察到在多種劑量下腫瘤顯著消退，而未處理之小鼠腫瘤生長迅速(圖6)。在低至5 µg/kg劑量下觀察到huMov19-90偶聯物之活性。

組成物及使用方法

【0288】 本發明包括一種組成物(例如醫藥組成物)，其包含本文所描述之新穎苯并二氮呋化合物(例如，吲哚啉并苯并二氮呋或噁唑啉并苯并二氮呋)、其衍生物或其偶聯物(及/或其溶劑化物、水合物及/或鹽)及載劑(醫藥學上可接受之載劑)。本發明亦包括一種組成物(例如醫藥組成物)，其包含本文所描述之新穎苯并二氮呋化合物、其衍生物或其偶聯物(及/或其溶劑化物、水合物及/或鹽)及載劑(醫藥學上可接受之載劑)，另外包含第二治療劑。本發明之組成物可用於在哺乳動物(例如人類)中抑制異常細胞生長或治療增生性病徵。本發明之組成物亦可用於治療哺乳動物(例如人類)之抑鬱症、焦慮症、應激症、恐怖症、驚慌、煩躁、心理障礙、疼痛及炎性疾病。

【0289】 本發明包括一種在哺乳動物(例如人類)中抑制異常細胞生長或治療增生性病徵之方法，該方法包括向該哺乳動物施用單獨或與第二治療劑組合的治療有效量之本文所描述之新穎苯并二氮呋化合物(例如，吲哚啉并苯并二氮呋或噁唑啉并苯并二氮呋)、其衍生物或其偶聯物(及/或其溶劑化物、水合物及/或鹽)或其組成物及載劑(醫藥學上可接受之載劑)。

【0290】 本發明亦提供治療方法，該方法包括向需要治療之受試者施用有效量的以上所描述之任何偶聯物。

【0291】 類似地，本發明提供一種用於誘導所選細胞群中細胞死亡之方法，該方法包括使靶細胞或含有靶細胞之組織與有效量的本發明之包含細胞毒性劑之任何細胞毒性化合物-結合劑(例如連接至細胞結合劑之吲哚啉并苯并二氮呋或噁唑啉并苯并二氮呋二聚體)、其鹽或溶劑化物接觸。靶細胞係細胞結合劑能結合之細胞。

【0292】 必要時，可與該偶聯物一起施用其他活性劑，諸如其他抗腫瘤劑。

【0293】 適合醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑及賦形劑係熟知的且可由熟習此項技術者依據臨床情況所允許來確定。

【0294】 適合載劑、稀釋劑及/或賦形劑之實例包括：(1)杜貝卡氏磷酸鹽緩衝生理食鹽水(Dulbecco's phosphate buffered saline)，約pH 7.4，含有或不含有約1 mg/mL至25 mg/mL人血清白蛋白；(2) 0.9%生理食鹽水(0.9% w/v NaCl)；及(3) 5% (w/v)右旋葡萄糖；且亦可含有抗氧化劑(諸如色胺)及穩定劑(諸如Tween 20)。

【0295】 用於誘導所選細胞群中細胞死亡之方法可在活體外、活體內或離體實行。

【0296】 活體外應用之實例包括自體骨髓在植入同一患者體內之前進行處理以便殺死患病細胞或惡性細胞；骨髓在移植之前進行處理以便殺死勝任T細胞且防止移植物抗宿主疾病(GVHD)；處理細胞培養物以便殺死除所需變異體外的不表現靶抗原之所有細胞；或殺死表現非所需抗原之變異體。

【0297】 非臨床活體外應用之條件易於由熟悉此項技術者決定。

【0298】 臨床上離體應用之實例係在自體移植以治療癌症或治療自體免疫疾病之前自骨髓移除腫瘤細胞或淋巴樣細胞，或在移植之前由自體或異體骨髓移除T細胞及其他淋巴樣細胞以便防止GVHD。治療可進行如下。自患者或其他個體採集骨髓，且接著在約37°C下，在添加有濃度範圍為約10 μ M至1 pM之本發明細胞毒性劑的含血清培養基中孵育約30分鐘至約48小時。濃度及孵育時間(亦即，劑量)之確切條件易於由熟習此項技術者決定。在孵育之後，用含血清之培養基洗滌骨髓細胞且根據已知方法，將其經靜脈內回輸給患者。在患者于骨髓採集時間與經處理細胞回輸之間接受其他治療，諸如消融性化學療法或全身照射療程之情況下，使用標準醫療設備將經處理骨髓細胞冷凍儲存在液氮中。

【0299】 對於臨床上活體內應用，所供應的本發明之細胞毒性劑將係針對無菌性及內毒素含量進行測試之溶液或凍乾粉。適合施用偶聯物之方案的實例如下。偶聯物係每週一次以靜脈內推注給與，持續4周。推注劑量係在添加有5至10 mL人血清白蛋白之50至1000 mL標準生理食鹽水中給與。每次靜脈內施用

的劑量將為10 µg至2000 mg(在每天100 ng至20 mg/kg範圍內)。治療四周之後，患者可每週繼續接受治療。有關施用途徑、賦形劑、稀釋劑、劑量、時間等之具體臨床方案可由普通熟習此項技術者根據臨床情況之允許來決定。

【0300】 可根據誘導所選細胞群中細胞死亡之活體內或離體方法治療的醫療病況之實例包括任何類型之惡性疾病，包括例如，癌症；自體免疫疾病；諸如全身性狼瘡、類風濕性關節炎及多發性硬化；移植物排斥，諸如腎移植排斥反應、肝移植排斥反應、肺移植排斥反應、心臟移植排斥反應及骨髓移植排斥反應；移植物抗宿主疾病；病毒感染，諸如CMV感染、HIV感染、AIDS等；及寄生蟲感染，諸如賈第鞭毛蟲病、阿米巴病、血吸蟲病及普通熟習此項技術者所確定之其他疾病。

【0301】 癌症療法及其劑量、施用途徑及推薦劑量係此項技術中已知的且已描述於如Physician's Desk Reference (PDR)之文獻中。PDR揭示了用於治療各種癌症之藥劑的劑量。該等以上提及的在治療上有效之化學治療藥物之給藥方案及劑量將取決於所治療之特定癌症、疾病程度及熟習此項技術之醫師所熟悉之其他因素，且可由醫師決定。PDR之內容係以引用之方式清楚地整體併入本文中。熟習此項技術者可評述PDR，使用以下一個或多個參數來確定可根據本發明之教示內容使用的化學治療藥物及偶聯物之給藥方案及劑量。該等參數包括：

- 綜合指數
- 製造商
- 產品(公司或商標藥物名)
- 種類索引
- 通用名/化學物質索引(非商標通用藥物名)
- 藥物之彩色圖像
- 產品資訊，與FDA標貼相符

化學特性資訊

功能/作用

適應症與禁忌症

試驗研究、副作用、警告

類似物及衍生物

【0302】 熟習細胞毒性劑領域之技術人員將易於瞭解，本文所描述之每一細胞毒性劑可藉由使所得化合物仍保持起始化合物之特異性及/或活性之方式進行修飾。熟練技術人員亦應瞭解，該等化合物中有許多可代替本文所描述之細胞毒性劑使用。因此，本發明之細胞毒性劑包括本文所描述之偶聯劑的類似物及衍生物。

【0303】 本文及以下實例中引用之所有參考文獻均以引用之方式清楚地整體併入本文中。

實例

【0304】 現將參照非限制性實例說明本發明。除非另作規定，否則所有百分比、比率、份數等均以重量計。所有試劑均購自Aldrich Chemical Co.(New Jersey)或其他商業來源。核磁共振(^1H NMR)譜係在Bruker 400 MHz儀器上獲得。質譜係在Bruker Daltonics Esquire 3000儀器上獲得且LCMS係在帶有Agilent 6120單級四極桿MS之Agilent 1260 Infinity LC上使用電噴霧電離法獲得。

【0305】 以下溶劑、試劑、保護基、部分及其他名稱可藉由括弧中之縮寫提及。

Me =甲基；Et =乙基；Pr =丙基；*i*-Pr =異丙基；Bu =丁基；*t*-Bu =第三丁基；Ph =苯基；及Ac =乙醯基

AcOH或HOAc =乙酸

ACN或CH₃CN =乙腈

Ala = 丙胺酸

aq = 水溶液

BH₃·DMS = 硼烷二甲硫醚錯合物

Bn = 苯甲基

Boc或BOC = 第三丁氧羰基

CBr₄ = 四溴化碳

Cbz或Z = 苄氧羰基

DCM或CH₂Cl₂ = 二氯甲烷

DCE = 1,2-二氯乙烷

DMAP = 4-二甲基氨基吡啶

DI water = 去離子水

DIBAL = 氫化二異丁基鋁

DIEA或DIPEA = N,N-二異丙基乙胺

DMA = N,N-二甲基乙醯胺

DMF = N,N-二甲基甲醯胺

DMSO = 二甲亞砜

DTT = 二硫蘇糖醇

EDC = 1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳化二亞胺

EEDQ = N-乙氧基羰基-2-乙氧基-1,2-二氫喹啉

ESI或ES = 電噴霧電離

EtOAc = 乙酸乙酯

Gly = 甘胺酸

g = 公克

h = 小時

HATU = 六磷酸N,N,N',N'-四甲基-O-(7-氮雜苯并三唑-1-基)脲鎧鹽

HPLC = 高效液相層析

HOBt或HOBT = 1-羥基苯并三唑

LAH = 氫化鋁鋁

LC = 液相層析

LCMS = 液相層析質譜法

min = 分鐘

mg = 毫克

mL = 毫升

mmol = 毫莫耳

μg = 微克

μL = 微升

μmol = 微莫耳

Me = 甲基

MeOH = 甲醇

MeI = 碘甲烷

MS = 質譜法

MsCl = 甲烷磺醯氯(甲磺醯氯)

Ms₂O = 甲烷磺酸酐

NaBH(OAc)₃ = 三乙醯氧基硼氫化鈉

NHS = N-羥基琥珀醯胺

NMR = 核磁共振波譜

PPh₃ = 三苯基膦

PTLC = 製備型薄層層析法

rac = 外消旋混合物

R_f = 滯留因子

RPHPLC或RP-HPLC =反相高效液相層析法

RT或*t_r* =室溫(環境溫度，約25℃)

sat或sat'd =飽和

STAB =三乙醯氧基硼氫化鈉($\text{NaBH}(\text{OAc})_3$)

TBSCl或TBDMSCl =氯化第三丁基二甲基矽烷

TBS =第三丁基二甲基矽烷

TCEP·HCl = 參(2-羧基乙基)膦鹽酸鹽

TEA =三乙胺(Et_3N)

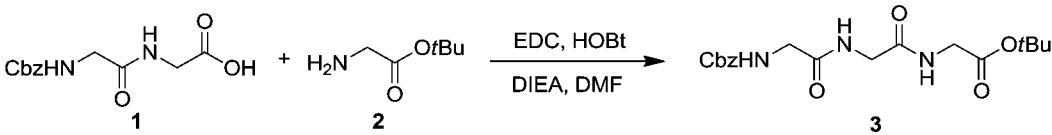
TFA =三氟乙酸

THF =四氫呋喃

TLC =薄層層析

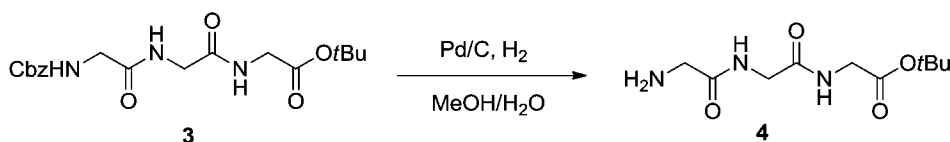
Val =纈胺酸

實例1. 合成6-((2-((2-((2-((3-(((S)-8-甲氧基-6-側氧基-11,12,12a,13-四氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮呋并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)-5-(((S)-8-甲氧基-6-側氧基-12a,13-二氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮呋并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)苯基)胺基)-2-側氧基乙基)胺基)-2-側氧基乙基)胺基)-2-側氧基乙基)胺基)-6-側氧基己酸2,5-二側氧基吡咯啉-1-基酯(化合物**14**)

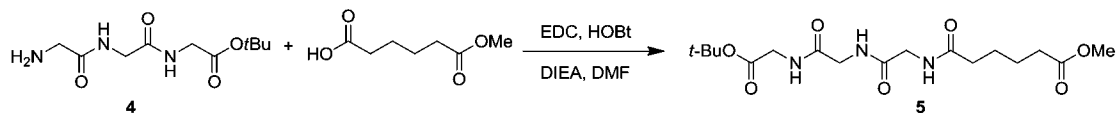


【0306】 步驟1： 將Z-Gly-Gly-OH化合物**1** (5.0 g，18.78 mmol) 及H-Gly-Ot-Bu·HCl化合物**2** (3.46 g，20.66 mmol)溶解於DMF (37.6 mL)中。將EDC·HCl (3.96 g，20.66 mmol)及HOBT (2.88 g，18.78 mmol)添加至反應燒瓶中，

隨後添加DIPEA (8.18 mL, 46.9 mmol)。在Ar下，在室溫下攪拌反應隔夜。反應混合物用CH₂Cl₂稀釋，用sat'd NH₄Cl、sat'd NaHCO₃，隨後水及鹽水洗滌。有機層經Na₂SO₄乾燥，過濾並濃縮。粗產物藉由矽膠急驟層析法(MeOH/DCM，梯度0%至5%)純化，得到呈白色固體狀之純化合物**3** (6.35 g, 89%產率)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.18-8.13 (m, 2H), 7.48 (t, 1H, *J* = 6.0 Hz), 7.37-7.36 (m, 3H), 7.34-7.32 (m, 1H), 5.04 (s, 2H), 4.09 (q, 1H, *J* = 5.2 Hz), 3.74 (t, 4H, *J* = 6.1 Hz), 3.67 (d, 2H, *J* = 6.0 Hz), 3.17 (d, 2H, *J* = 5.2 Hz), 1.41 (s, 9H)。LCMS = 4.28 min (8分鐘方法)。質量觀測值(ESI⁺): 324.15 (M-*t*-Bu+H)。

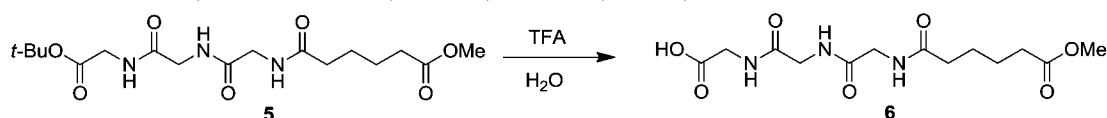


【0307】 步驟2：將化合物**3** (6.3 g, 16.60 mmol)溶解於MeOH (52.7 mL)及水(2.64 mL)中。反應混合物用Ar淨化且脫氣5分鐘。緩慢添加Pd/C (潮濕，10%) (0.884 g, 0.830 mmol)。接著，以來自氣球之H₂鼓泡1分鐘。在氫氣球下，在室溫下攪拌反應隔夜。使反應混合物濾過Celite且濾餅用MeOH (30 mL)洗滌並濃縮。將CH₃CN (20 mL)添加至殘餘物中並濃縮。將此操作再重複2次，得到粘性固體。使殘餘物在EtOAc/己烷(2:1, 50 mL)中形成漿液且過濾，並用EtOAc/己烷(1:1, 30 mL)沖洗。固體在真空/N₂下乾燥1小時，得到呈白色固體狀之化合物**4** (3.66 g, 90%產率)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.21-8.18 (m, 1H), 8.12 (bs, 1H), 3.76 (bs, 2H), 3.73 (d, 2H, *J* = 6.0 Hz), 3.13 (s, 2H), 1.93 (bs, 2H), 1.41 (s, 9H)。

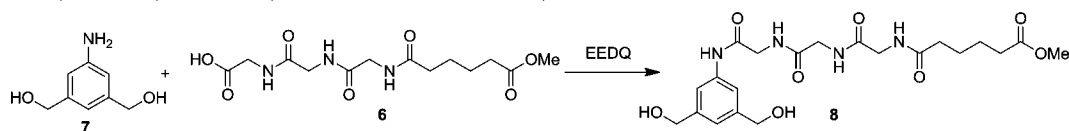


【0308】 步驟3：將胺化合物**4** (1.0 g, 4.08 mmol)及己二酸單甲酯(664 μL, 4.48 mmol)溶解於DMF (13.59 mL)中。將EDC·HCl (860 mg, 4.48 mmol)及HOBT (624 mg, 4.08 mmol)添加至反應混合物中，隨後添加DIEA (1.424 mL, 8.15 mmol)。在室溫下攪拌反應隔夜。反應混合物用DCM/MeOH (20 mL, 5:1)稀釋且

用sat'd NH_4Cl 、sat'd NaHCO_3 、水及鹽水洗滌。有機層經 Na_2SO_4 乾燥，過濾並濃縮。粗產物藉由矽膠急驟層析法(梯度，0%至20% MeOH/DCM)純化，得到呈白色固體狀之純化合物**5**(1.5 g，95%產率)。 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 8.17-8.06 (m, 3H), 3.74-3.71 (m, 6H), 3.59 (s, 3H), 2.32 (bt, 2H, $J = 6.9$ Hz), 2.14 (bt, 2H, $J = 6.7$ Hz), 1.52-1.49 (m, 4H), 1.41 (s, 9H)。

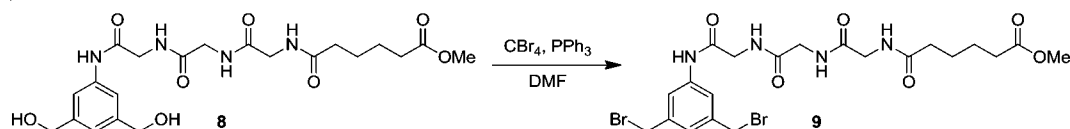


【0309】 步驟4：在室溫下，在TFA (5.97 mL，77.0 mmol)及去離子水(300 μL)中攪拌化合物**5** (1.5 g，3.87 mmol)隔夜。將 CH_3CN (10 mL)添加至反應混合物中並攪拌5分鐘。混合物變濃稠並具有許多白色沈澱。再添加 CH_3CN (30 mL)且再攪拌5分鐘。混合物過濾且在真空/ N_2 下乾燥1小時，得到呈白色固體狀之純化合物**6**(0.7 g，55%產率)。 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 12.56 (s, 1H), 8.16-8.06 (m, 3H), 3.73 (dt, 6H, $J = 8.6, 6.1$ Hz), 3.59 (s, 3H), 2.32-2.29 (m, 2H), 2.16-2.13 (m, 2H), 1.51 (bt, 4H, $J = 3.5$ Hz)。

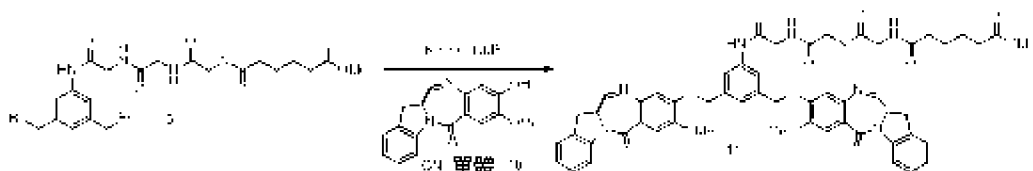


【0310】 步驟5：在室溫下，將苯胺化合物**7** (100 mg，0.653 mmol)及酸化化合物**6** (227 mg，0.685 mmol)懸浮於 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (4.35 mL/2.2 mL)中。添加EEDQ (323 mg，1.306 mmol)且在室溫下攪拌反應隔夜。濃縮溶劑且使殘餘物在EtOAc (15 mL)中形成漿液並過濾。固體用EtOAc (2×15 mL)洗滌且在真空/ N_2 下乾燥，得到呈白色固體狀之化合物**8**(260 mg，85%產率)。 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 9.74 (s, 1H), 8.21-8.19 (m, 2H), 8.11-8.08 (m, 1H), 7.45 (s, 2H), 6.96 (s, 1H), 5.17 (t, 2H, $J = 5.7$ Hz), 4.45 (d, 4H, $J = 5.6$ Hz), 3.87 (d, 2H, $J = 5.8$ Hz), 3.75 (dd, 4H, $J = 5.7, 13.4$ Hz), 3.58 (s, 3H), 2.31-2.27 (m, 2H), 2.16-2.13 (m, 2H), 1.52-1.48 (m, 4H)。LCMS = 0.886 min (15分鐘方法)。質量觀測值(ESI^+): 489.3

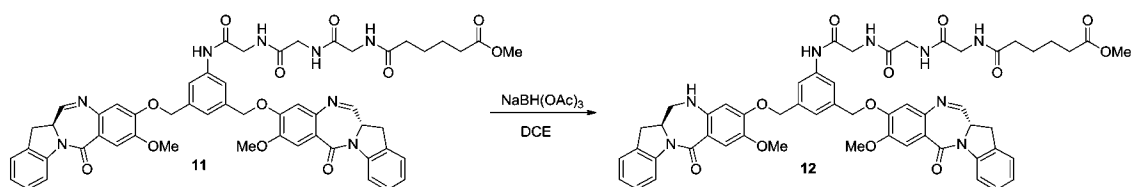
(M+Na)。



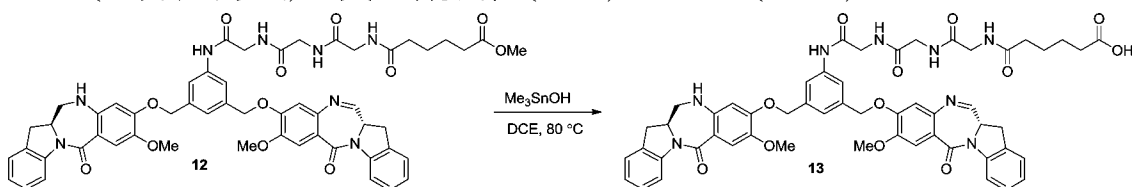
【0311】 步驟6：將二醇化合物**8** (260 mg, 0.557 mmol)及四溴化硼(555 mg, 1.672 mmol)溶解於DMF (5.57 mL)中。添加三苯基膦(439 mg, 1.672 mmol)且褐色混合物在Ar下在室溫下攪拌4小時。反應混合物用DCM/MeOH (10:1, 30 mL)稀釋且用水及鹽水洗滌。有機層經Na₂SO₄乾燥，過濾並濃縮。粗殘餘物藉由矽膠急驟層析法(MeOH/DCM, 0%至10%, 梯度)純化，得到呈黃色固體狀之化合物**9**。產物在CH₂Cl₂/EtOAc (1:10, 30 mL)中形成漿液且接著過濾。固體用EtOAc洗滌且在真空/N₂下乾燥，得到呈灰白色固體狀之純化合物**9**(170 mg, 52%產率)。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.95 (s, 1H), 8.25-8.20 (m, 2H), 8.12-8.10 (m, 1H), 7.65 (s, 2H), 7.22 (s, 1H), 4.68 (s, 3H), 3.89 (d, 2H, *J* = 5.8 Hz), 3.77 (dd, 4H, *J* = 5.7, 7.4 Hz), 3.58 (s, 3H), 2.31-2.27 (m, 2H), 2.16-2.13 (m, 2H), 1.51-1.49 (m, 4H)。LCMS = 3.335 min (15分鐘方法)。質量觀測值(ESI⁺): 593.2 (M+H)。



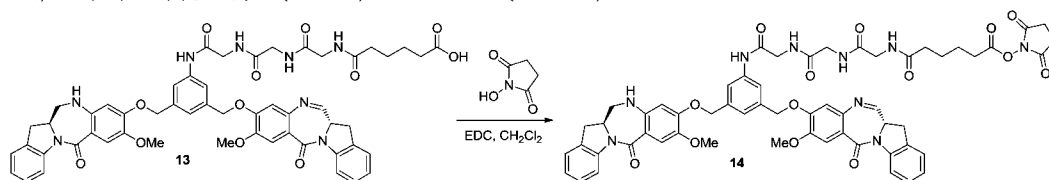
【0312】 步驟7：將二溴化物化合物**9** (109 mg, 0.184 mmol)及IGN單體化合物**10** (119 mg, 0.405 mmol)溶解於DMF (1.84 mL)中。添加碳酸鉀(63.6 mg, 0.460 mmol)且在室溫下攪拌隔夜。將水(20 mL)添加至反應混合物中以以使產物沈澱。漿液在室溫下攪拌5分鐘且接著過濾，並在真空/N₂下乾燥1小時。粗產物藉由矽膠急驟層析法(MeOH/CH₂Cl₂, 梯度0%至5%)純化，得到呈黃色固體狀之化合物**11**(160 mg, 60%產率, 70%純度)。LCMS = 5.240 min (15分鐘方法)。質量觀測值(ESI⁺): 1019.7 (M+H)。



【0313】 **步驟8**：將二亞胺化合物**11** (140 mg, 0.11 mmol)溶解於1,2-二氯乙烷(1.1 mL)中。將NaBH(OAc)₃ (23.29 mg, 0.11 mmol)添加至反應混合物中且在室溫下攪拌1小時。反應物用CH₂Cl₂ (30 mL)稀釋且用sat'd aq NH₄Cl溶液(15 mL)淬滅。分離各層且用鹽水洗滌，經Na₂SO₄乾燥並濃縮。粗殘餘物藉由RPHPLC (C18管柱，CH₃CN/H₂O，梯度35%至55%)純化，得到呈白色蓬鬆固體狀之單亞胺化合物**12**(33 mg, 29%產率)且亦回收到起始物質化合物**11** (25 mg). LCMS = 7.091 min (15分鐘方法)。質量觀測值(ESI⁺): 1021.7 (M+H)。



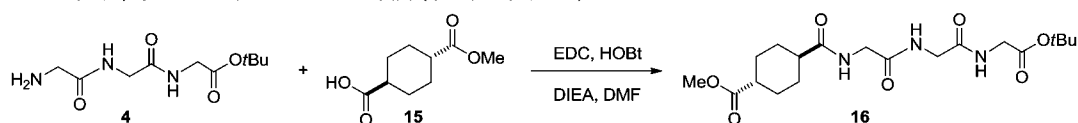
【0314】 **步驟9**：將甲酯化合物**12** (33 mg, 0.029 mmol)溶解於THF (1.09 mL)及水(364 μ L)中。添加LiOH (6.97 mg, 0.291 mmol)且在室溫下攪拌反應1.5小時。反應混合物用H₂O (5 mL)稀釋且用0.5 M HCl水溶液酸化直至約pH 4。水層用CH₂Cl₂/MeOH (3:1, 3 $\times$ 20 mL)萃取。合併之有機層經Na₂SO₄乾燥，過濾並濃縮，得到呈黃色固體狀之粗化合物**13**(29 mg, 99%產率)。LCMS = 5.356 min (15分鐘方法)。質量觀測值(ESI⁺): 1007.7 (M+H)。



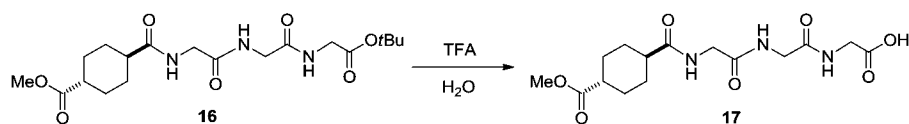
【0315】 **步驟10**：在室溫下，將EDC·HCl (22.08 mg, 0.115 mmol)添加至酸化合物**13** (29 mg, 0.023 mmol)及N-羥基琥珀醯胺(21.21 mg, 0.184 mmol)於CH₂Cl₂ (2.3 mL)中之經攪拌溶液中。攪拌反應混合物2小時。反應混合物用CH₂Cl₂稀釋且用水(1 $\times$ 15 mL)及鹽水(1 $\times$ 15 mL)洗滌。有機層經Na₂SO₄乾燥，過濾並濃

縮。粗產物藉由RPHPLC (C18管柱, CH₃CN/H₂O, 梯度35%至55%)純化。合併含產物之溶離份並凍乾, 得到呈白色蓬鬆固體狀之6-((2-((2-((2-((3-(((S)-8-甲氧基-6-側氧基-11,12,12a,13-四氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮呋并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)-5-(((S)-8-甲氧基-6-側氧基-12a,13-二氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮呋并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)苯基)胺基)-2-側氧基乙基)胺基)-2-側氧基乙基)胺基)-2-側氧基乙基)胺基)-6-側氧基己酸2,5-二側氧基吡咯啉-1-基酯, 即化合物**14**(8 mg, 31%產率)。LCMS = 5.867 min (15分鐘方法)。質量觀測值(ESI⁺): 1104.7 (M+H)。

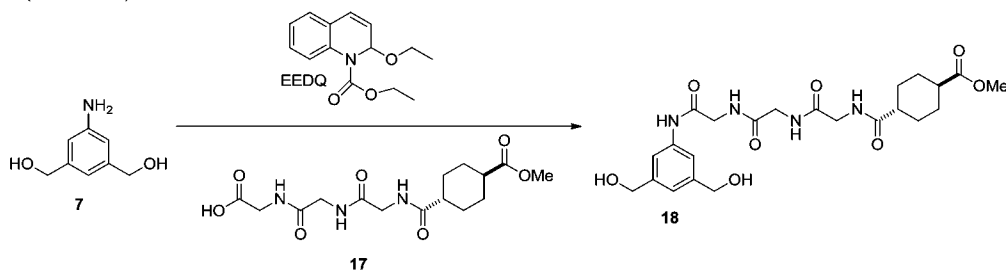
實例2. 合成(1r,4r)-4-((2-((2-((2-((3-(((S)-8-甲氧基-6-側氧基-11,12,12a,13-四氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮呋并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)-5-(((S)-8-甲氧基-6-側氧基-12a,13-二氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮呋并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)苯基)胺基)-2-側氧基乙基)胺基)-2-側氧基乙基)胺基)-2-側氧基乙基)胺基)-6-側氧基己酸2,5-二側氧基吡咯啉-1-基酯(化合物**23**)



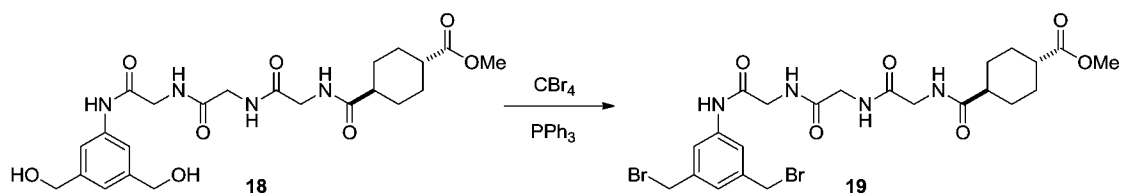
【0316】 步驟1: 將胺化合物**4** (200 mg, 0.815 mmol)及1,4-反-環己烷二甲酸單甲酯化合物**15** (182 mg, 0.978 mmol)溶解於DMF (2.72 mL)中。將EDC·HCl (188 mg, 0.978 mmol)及HOBT (125 mg, 0.815 mmol)添加至反應混合物中, 隨後添加DIEA (285 μL, 1.631 mmol)。混合物在室溫下攪拌隔夜。反應混合物用CH₂Cl₂稀釋且用sat'd NH₄Cl、sat'd NaHCO₃、鹽水及水洗滌。有機層經Na₂SO₄乾燥且濃縮成粘性殘餘物。將CH₃CN (15 mL)添加至殘餘物中並濃縮。將此操作再重複2次, 得到呈乾燥白色粉末狀之化合物**16**(300 mg, 85%產率)。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.16 (t, 1H, *J* = 5.9 Hz), 8.04 (dt, 2H, *J* = 5.6, 14.8 Hz), 3.74-3.69 (m, 6H), 3.59 (s, 3H), 2.31-2.25 (m, 1H), 2.20-2.13 (m, 1H), 1.94-1.91 (m, 2H), 1.82-1.79 (m, 2H), 1.41 (s, 9H), 1.34 (d, 3H, *J* = 11.7 Hz)。



【0317】 **步驟2**：在室溫下，將TFA (1.40 mL, 18.14 mmol)及DI水(67.8 μ L)添加至淨化合物**16** (300 mg, 0.726 mmol)中並攪拌3小時。將CH₃CN (20 mL)添加至反應混合物中並濃縮。將此操作再重複2次，得到呈白色固體狀之化合物**17**(230 mg, 89%產率)。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.16-8.13 (m, 1H), 8.07-8.01 (m, 2H), 3.76-3.73 (m, 4H), 3.70 (bd, 2H, *J* = 5.1 Hz), 3.59 (s, 3H), 2.31-2.25 (m, 1H), 2.19-2.14 (m, 1H), 1.94-1.91 (m, 2H), 1.82-1.79 (m, 2H), 1.42-1.26 (m, 4H)。

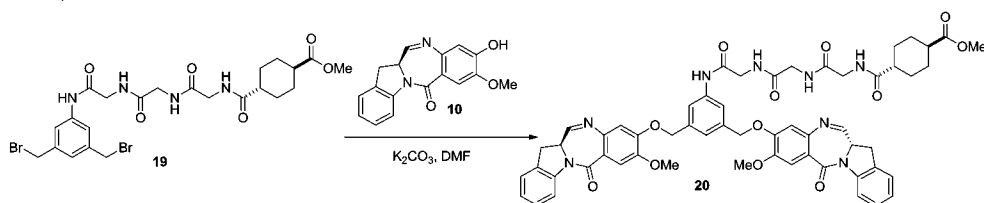


【0318】 **步驟3**：在室溫下，將苯胺化合物**7** (135 mg, 0.881 mmol)及酸化化合物**17** (331 mg, 0.925 mmol)懸浮於CH₂Cl₂/MeOH (2.9 mL/1.5 mL)中。添加EEDQ (436 mg, 1.763 mmol)且在室溫下攪拌反應隔夜。濃縮溶劑且使殘餘物在EtOAc (15 mL)中形成漿液並過濾。固體用EtOAc (2 $\times$ 15 mL)洗滌且在真空/N₂下乾燥，得到呈白色固體狀之化合物**18**(330 mg, 61%產率)。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.73 (s, 1H), 8.18 (dt, 2H, *J* = 6.0, 19.2 Hz), 8.09-8.01 (m, 2H), 7.45 (s, 2H), 6.96 (s, 1H), 5.17 (t, 2H, *J* = 5.7 Hz), 4.45 (d, 4H, *J* = 5.6 Hz), 3.88-3.84 (m, 3H), 3.77-3.69 (m, 8H), 3.63 (s, 2H), 3.59 (s, 6H), 2.30-2.22 (m, 2H), 2.19-2.13 (m, 2H), 1.94-1.90 (m, 4H), 1.82-1.78 (m, 4H), 1.41-1.26 (m, 8H)。

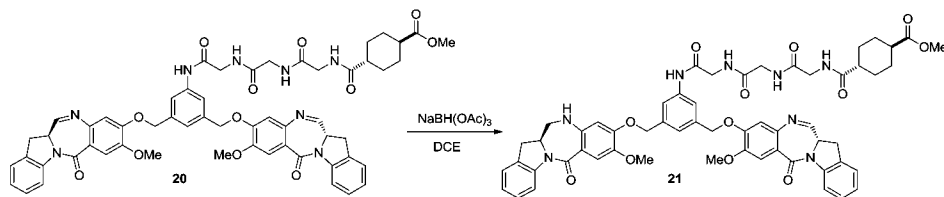


【0319】 **步驟4**：將化合物**18** (330 mg, 0.536 mmol)及CBr₄ (533 mg, 1.608

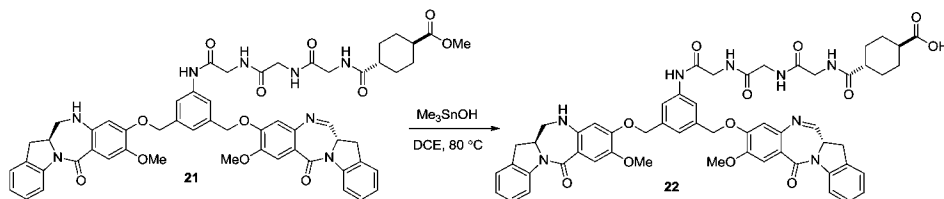
mmol)溶解於DMF (5.36 mL)中。將PPh₃ (422 mg, 1.608 mmol)添加至反應混合物中，此時反應物變為黃色並伴隨輕微放熱。在Ar下攪拌反應4小時。反應混合物用CH₂Cl₂稀釋並用水及鹽水洗滌。有機層經Na₂SO₄乾燥並濃縮。粗殘餘物藉由矽膠急驟層析法(MeOH/CH₂Cl₂, 梯度0%至10%)純化，得到呈白色固體狀之化合物**19** (234 mg, 64%產率)。LCMS = 4.453 min (8分鐘方法)。質量觀測值(ESI⁺): 617.10 (M+H)。



【0320】 步驟5：化合物**20**係以與實例1中化合物**11**類似之方式製備。在純化後獲得呈黃色固體狀之化合物**20** (264 mg, 60%產率)。LCMS = 4.831 min (8分鐘方法)。質量觀測值(ESI⁺): 1045.20 (M+H)。

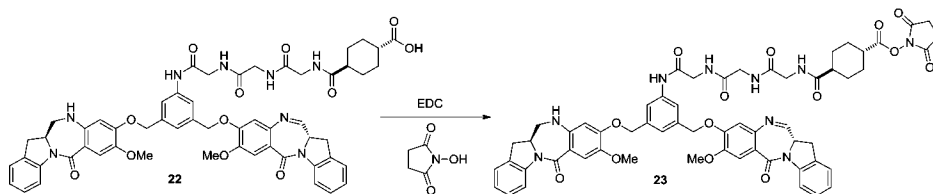


【0321】 步驟6：化合物**21**係以與實例1中化合物**12**類似之方式製備。在C18純化後獲得呈白色固體狀之化合物**21** (51 mg, 31%產率)。LCMS = 5.127 min (8分鐘方法)。質量觀測值(ESI⁺): 1047.30 (M+H)。



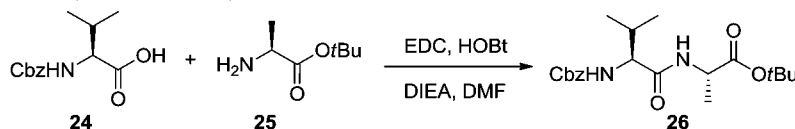
【0322】 步驟7：將甲酯化合物**21** (48 mg, 0.046 mmol)溶解於1,2-二氯乙烷(3.06 mL)中。將三甲基錫烷醇(124 mg, 0.688 mmol)添加至反應混合物中且在80°C下加熱隔夜。反應混合物冷卻至室溫且用水(15 mL)稀釋。水層用1 M HCl酸化至約pH 4。混合物用CH₂Cl₂/MeOH (10:1, 3 × 20 mL)萃取。合併之有機層用

鹽水洗滌且經 Na_2SO_4 乾燥並濃縮。粗殘餘物經由短矽膠塞塞住且用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (10:1, 接著5:1, $2 \times 30 \text{ mL}$) 沖洗並濃縮。獲得呈黃色固體狀之酸化化合物**22**且不經進一步純化即用於下一步驟中(48 mg, 100%產率)。LCMS = 5.338 min (15分鐘方法)。質量觀測值(ESI^+): 1033.7 ($\text{M}+\text{H}$)。



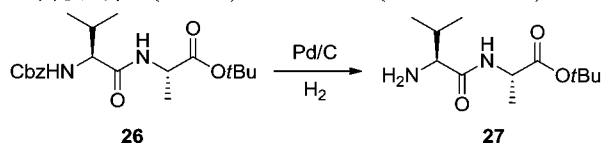
【0323】 步驟8：化合物**23**係以與實例1中化合物**13**類似之方式製備。在 C18 純化後獲得呈白色固體狀之(1*r*,4*r*)-4-((2-((2-((2-((3-(((*S*)-8-甲氧基-6-側氧基-11,12,12*a*,13-四氫-6*H*-苯并[5,6][1,4]二氮呋并[1,2-*a*]吡啉-9-基)氧基)甲基)-5-(((*S*)-8-甲氧基-6-側氧基-12*a*,13-二氫-6*H*-苯并[5,6][1,4]二氮呋并[1,2-*a*]吡啉-9-基)氧基)甲基)苯基)胺基)-2-側氧基乙基)胺基)-2-側氧基乙基)胺基)-2-側氧基乙基)胺甲酯基)環己烷甲酸2,5-二側氧基吡咯啉-1-基酯，即化合物**23**(8 mg, 19%產率)。LCMS = 6.007 min (15分鐘方法)。質量觀測值(ESI^+): 1130.8 ($\text{M}+\text{H}$)。

實例3. 合成6-(((*S*)-1-(((*S*)-1-((3-(((*S*)-8-甲氧基-6-側氧基-11,12, 12*a*,13-四氫-6*H*-苯并[5,6][1,4]二氮呋并[1,2-*a*]吡啉-9-基)氧基)甲基)-5-(((*S*)-8-甲氧基-6-側氧基-12*a*,13-二氫-6*H*-苯并[5,6][1,4]二氮呋并[1,2-*a*]吡啉-9-基)氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)胺基)-3-甲基-1-側氧基丁-2-基)胺基)-6-側氧基己酸2,5-二側氧基吡咯啉-1-基酯(化合物**35**)

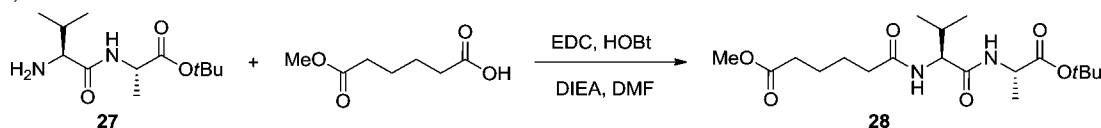


【0324】 步驟1：將Z-Val-OH 化合物**24** (3.0 g, 11.94 mmol)及L-Ala-OTfBu 化合物**25** (1.907 g, 13.13 mmol)溶解於DMF (23.88 mL)中。將EDC·HCl (2.52 g, 13.13 mmol)及HOBt (2.011 g, 13.13 mmol)添加至反應混合物中，隨後添加DIEA (4.59 mL, 26.3 mmol)。在Ar下在室溫下攪拌反應隔夜。反應混合物用 CH_2Cl_2 稀

釋且用sat'd NaHCO₃、sat'd NH₄Cl、水及鹽水洗滌。有機層經Na₂SO₄乾燥，過濾並濃縮。粗殘餘物藉由矽膠急驟層析法(EtOAc/己烷，梯度0%至50%)純化，得到呈白色固體狀之化合物**26**(3.68 g，81%產率)。¹HNMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.39-7.29 (m, 5H), 6.29 (bd, 1H, *J* = 6.9 Hz), 5.34 (bd, 1H, *J* = 8.4 Hz), 5.11 (s, 2H), 4.45 (p, 1H, *J* = 7.2 Hz), 4.02-3.98 (m, 1H), 2.18-2.09 (m, 1H), 1.56 (s, 9H), 1.37 (d, 3H, *J* = 7.0 Hz), 0.98 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz), 0.93 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz)。LCMS = 5.571 min (8分鐘方法)。質量觀測值(ESI⁺): 323.25 (M-*t*Bu+H)。

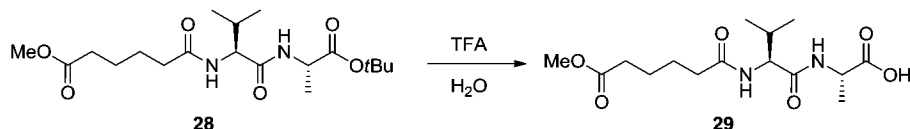


【0325】 步驟2：將化合物**26** (3.68 g，9.72 mmol)溶解於MeOH (30.9 mL)及水(1.543 mL)中。溶液用Ar淨化並脫氣5分鐘。將Pd/C (10%，潮濕，0.517 g)緩慢添加至反應混合物中。接著使H₂在其中鼓泡一分鐘。中止鼓泡且接著在氫氣球下攪拌反應隔夜。使反應混合物濾過Celite且濾餅用MeOH (30 mL)洗滌並濃縮，得到呈白色固體狀之化合物**27**(2.35 g，99%產率)。¹HNMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.79-7.77 (m, 1H), 4.50 (p, 1H, *J* = 7.3 Hz), 3.27 (d, 1H, *J* = 3.9 Hz), 2.34-2.26 (m, 1H), 1.49 (s, 9H), 1.40 (d, 3H, *J* = 7.1 Hz), 1.01 (d, 3H, *J* = 7.0 Hz), 0.86 (d, 3H, *J* = 6.9 Hz)。

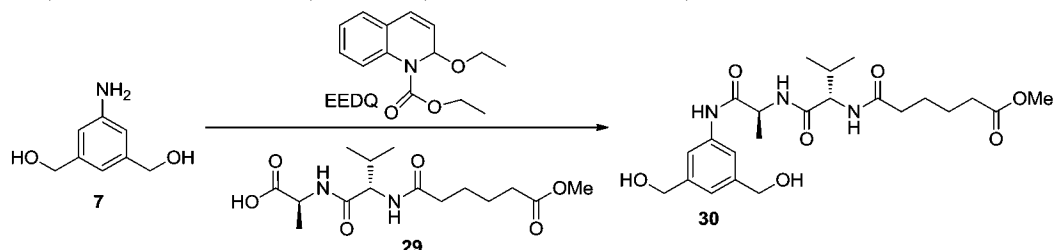


【0326】 步驟3：將胺化合物**27** (2.35 g，9.62 mmol)及己二酸單甲酯(1.69 g，10.58 mmol)溶解於DMF (32.1 mL)中。將EDC·HCl (1.94 g，10.10 mmol)及HOBT (1.47 g，9.62 mmol)添加至反應混合物中，隨後添加DIEA (3.36 mL，19.24 mmol)。在室溫下攪拌反應隔夜。反應混合物用DCM/MeOH (20 mL，5:1)稀釋且用sat'd NH₄Cl、sat'd NaHCO₃、水及鹽水洗滌。有機層經Na₂SO₄乾燥，過濾並濃縮。粗產物藉由矽膠急驟層析法(EtOAc/己烷，梯度0%至50%)純化，得到呈白色

固體狀之化合物**28**(2.77 g, 75%產率)。¹HNMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.29 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz), 6.12 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 4.43(p, 1H, *J* = 7.2 Hz), 4.27 (dd, 1H, *J* = 6.4, 8.6 Hz), 3.66 (s, 3H), 2.35-2.31 (m, 2H), 2.26-2.23 (m, 2H), 2.12-2.03 (m, 1H), 1.70-1.63 (m, 4H), 1.46 (s, 9H), 1.36 (d, 3H, *J* = 7.1 Hz), 0.95 (明顯t, 6H, *J* = 6.6 Hz)。



【0327】 步驟4：在室溫下，將TFA (8.28 mL, 108.0 mmol)及水(0.56 mL)添加至淨化合物**28** (2.77 g, 7.17 mmol)中並攪拌2.5小時。將CH₃CN (30 mL)添加至反應混合物中並濃縮。將此操作再重複2次，得到呈淺黃色固體狀之化合物**29**(2.0 g, 84%產率)。¹HNMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.11 (bs, 1H), 7.29 (d, 1H, *J* = 8.9 Hz), 7.14 (d, 1H, 6.8 Hz), 4.58 (p, 1H, *J* = 7.1 Hz), 4.37 (t, 1H, *J* = 8.7 Hz), 3.68 (s, 3H), 2.37-2.32 (m, 4H), 2.03-1.99 (m, 2H), 1.69-1.63 (m, 4H), 1.49 (d, 3H, *J* = 7.2 Hz), 0.97 (d, 3H, *J* = 4.8 Hz), 0.96 (d, 3H, *J* = 4.8 Hz)。

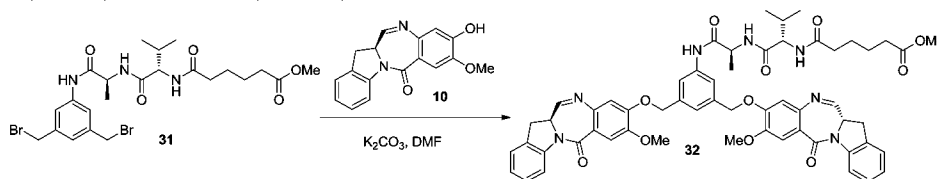


【0328】 步驟5：在室溫下，將苯胺化合物 **7** (150 mg, 0.98 mmol)及酸化化合物**29** (340 mg, 1.03 mmol)懸浮於CH₂Cl₂/MeOH (3.26 mL, 1.62 mL)中。添加EEDQ (484 mg, 1.96 mmol)且在室溫下攪拌反應隔夜。濃縮溶劑且使殘餘物在EtOAc/Et₂O (15 mL, 15 mL)中形成漿液並過濾。固體用Et₂O (2 × 15 mL)洗滌並在真空/N₂下乾燥，得到呈白色固體狀之化合物**30**(150 mg, 33%產率)。¹HNMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.61 (s, 2H), 7.47 (d, 1H, *J* = 7.1 Hz), 7.14 (s, 1H), 6.64 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 4.82-4.75 (m, 1H), 4.45-4.40 (m, 4H), 3.64 (s, 3H), 2.36-2.27 (m, 4H), 2.16-2.07 (m, 1H), 1.68-1.59 (m, 4H), 1.47 (d, 3H, *J* = 7.0 Hz), 0.98 (d, 3H, *J* = 3.6

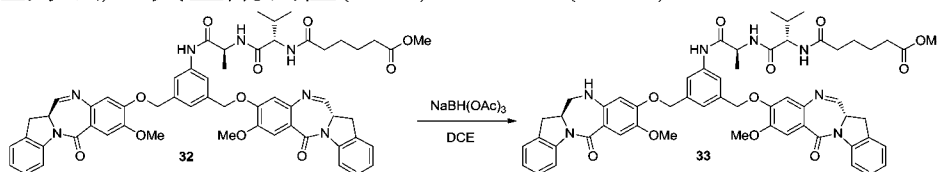
Hz), 0.95 (d, 3H, $J = 4.8$ Hz) 。 LCMS = 3.073 min (8分鐘方法) 。 質量觀測值(ESI^+): 466.25 ($\text{M}+\text{H}$) 。



【0329】 步驟6：將二醇化合物**30** (150 mg, 0.322 mmol)及 CBr_4 (321 mg, 0.967 mmol)溶解於DMF (3222 μl)中。將 PPh_3 (254 mg, 0.967 mmol)添加至反應混合物中，此時反應物變為粉紅色且伴隨輕微放熱。在Ar下攪拌反應4小時。反應混合物用 CH_2Cl_2 稀釋並用水及鹽水洗滌。有機層經 Na_2SO_4 乾燥並濃縮。粗殘餘物藉由矽膠急驟層析法(EtOAc/己烷，梯度0%至100%)純化，得到呈灰白色固體狀之化合物**31**(473 mg, 75%產率)。 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 8.19 (d, 1H, $J = 6.6$ Hz), 7.85 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz), 7.64 (s, 2H), 7.21 (s, 1H), 4.68 (s, 3H), 4.37 (p, 1H, $J = 7.0$ Hz), 4.18 (dd, 1H, $J = 7.2, 8.4$ Hz), 3.58 (s, 3H), 2.32-2.29 (m, 2H), 2.33-2.12 (m, 2H), 2.01-1.91 (m, 1H), 1.53-1.49 (m, 4H), 1.31 (d, 3H, $J = 7.1$ Hz), 0.89 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz), 0.85 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz) 。 LCMS = 5.259 min (8分鐘方法) 。 質量觀測值(ESI^+): 592.05 ($\text{M}+\text{H}$) 。

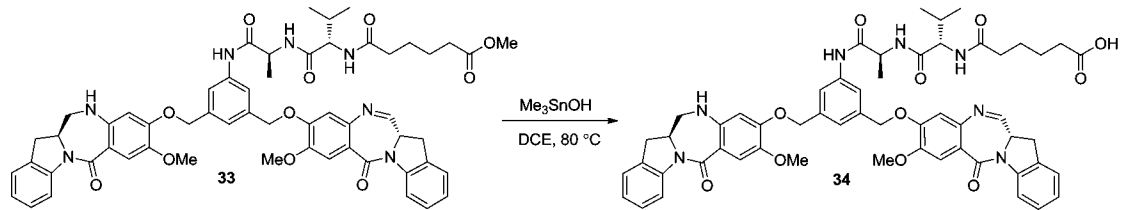


【0330】 步驟7：化合物**32**係以與實例1中化合物**11**類似之方式製備。在純化後獲得呈黃色固體狀之化合物**32**(162 mg, 57%產率, 70%純度) 。 LCMS = 6.461 min (15分鐘方法) 。 質量觀測值(ESI^+): 1018.7 ($\text{M}+\text{H}$) 。

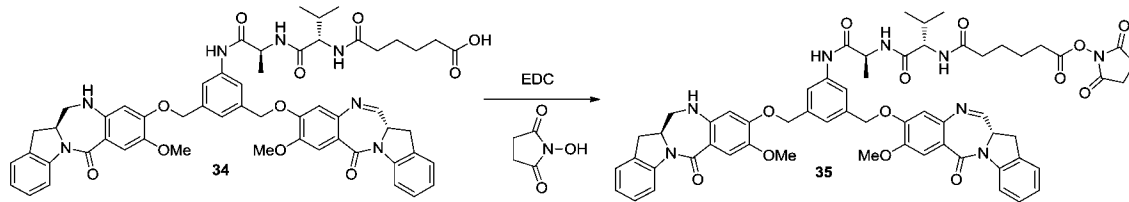


【0331】 步驟8：化合物**33**係以與實例1中化合物**12**類似之方式製備。在

C18純化後獲得呈白色固體狀之化合物**33**(40 mg，31%產率)。LCMS = 5.528 min (8分鐘方法)。質量觀測值(ESI⁺): 1020.30 (M+H)。

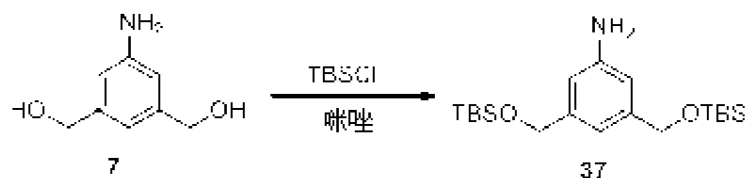


【0332】 步驟9：化合物**34**係以與實例2中化合物**22**類似之方式製備。在二氧化矽塞後獲得呈黃色固體狀之化合物**34**(38 mg，100%產率)。LCMS = 5.211 min (8分鐘方法)。質量觀測值(ESI⁺): 1006.35 (M+H)。

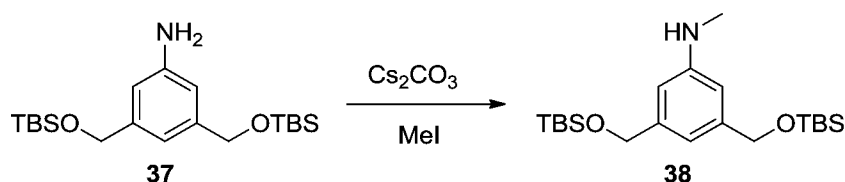


【0333】 步驟10：化合物**35**係以與實例1中化合物**14**類似之方式製備。在C18純化後獲得呈白色固體狀之6-(((S)-1-(((S)-1-((3-(((S)-8-甲氧基-6-側氧基-11,12,12a,13-四氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮呋并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)-5-(((S)-8-甲氧基-6-側氧基-12a,13-二氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮呋并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)胺基)-3-甲基-1-側氧基丁-2-基)胺基)-6-側氧基己酸2,5-二側氧基吡咯啉-1-基酯，即化合物**35**(8 mg，20%產率)。LCMS = 7.031 min (15分鐘方法)。質量觀測值(ESI⁺): 1103.7 (M+H)。

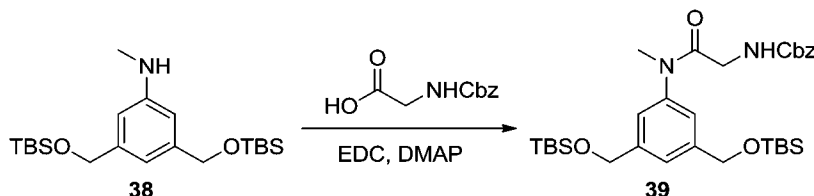
實例4. 合成2-(3-(((S)-8-甲氧基-6-側氧基-11,12,12a,13-四氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮呋并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)-5-(((S)-8-甲氧基-6-側氧基-12a,13-二氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮呋并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)苯基)-3,6,9,12-四側氧基-2,5,8,11-四氮雜十七碳-17酸2,5-二側氧基吡咯啉-1-基酯(化合物**49**)



【0334】 **步驟1**：將(5-胺基-1,3-伸苯基)二甲醇化合物**7** (5.0 g, 32.6 mmol) 溶解於THF (65.3 mL)中。添加TBSCl (12.30 g, 82 mmol)及咪唑(6.67 g, 98 mmol)且在Ar下，在室溫下攪拌隔夜。反應混合物用EtOAc稀釋且用sat'd NH₄Cl及鹽水洗滌，經Na₂SO₄乾燥且濃縮。粗殘餘物藉由矽膠急驟層析法(EtOAc/己烷，梯度0%至30%)純化，得到呈黃色油狀之化合物**37**(13 g, 100%產率)。¹HNMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.71 (s, 1H), 6.60 (s, 2H), 4.65 (s, 4H), 0.94 (s, 18 H), 0.10 (s, 12 H)。

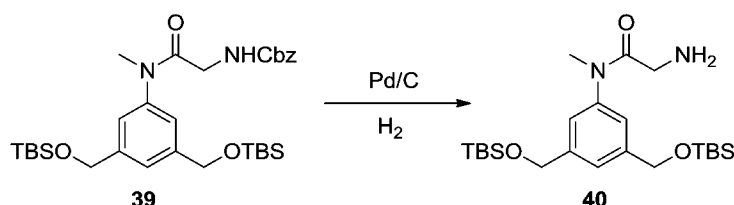


【0335】 **步驟2**：將Cs₂CO₃ (8.54 g, 26.2 mmol)添加至苯胺化合物**37** (10 g, 26.2 mmol)於DMF (52.4 mL)中之經攪拌溶液中。添加碘甲烷(1.474 mL, 23.58 mmol)且在室溫下攪拌反應3小時。將水(10 mL)及EtOAc (30 mL)添加至反應混合物中。分離各層且用EtOAc (2×)萃取。有機層用水(4×)洗滌，經Na₂SO₄乾燥，過濾並濃縮。粗殘餘物藉由矽膠急驟層析法(EtOAc/己烷，梯度0%至10%)純化，得到所需單甲基化產物化合物**38** (3.8 g, 37%產率)。¹HNMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.63 (s, 1H), 6.52 (s, 2H), 4.67 (s, 4H), 2.84 (s, 3H), 0.94 (s, 18H), 0.10 (s, 12H)。

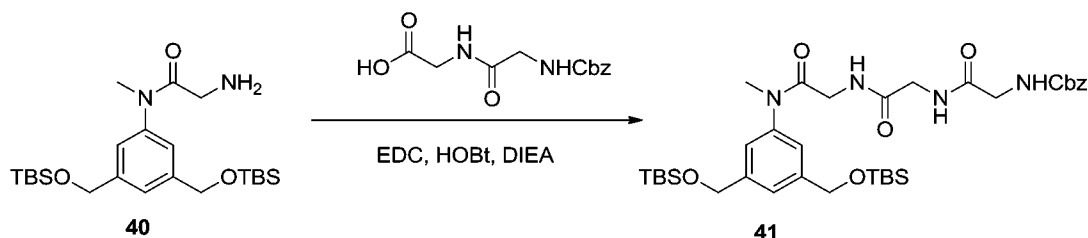


【0336】 **步驟3**：將苯胺化合物**38** (1.0 g, 2.53 mmol)及Z-Gly-OH (0.582 g, 2.78 mmol)溶解於DMF (8.42 mL)中。將EDC·HCl (1.21 g, 6.32 mmol)及DMAP (340 mg, 2.78 mmol)添加至反應混合物中且在80°C下加熱隔夜。反應混合物用

EtOAc稀釋且用sat'd NaHCO₃及水(2×)洗滌，經Na₂SO₄乾燥，過濾並濃縮。粗殘餘物藉由矽膠層析法(EtOAc/己烷，梯度0%至30%至100%)純化，得到呈黃色粘性固體狀之化合物**39**(780 mg，53%產率)。¹HNMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.27 (m, 6H), 6.90 (s, 2H), 4.94 (s, 2H), 4.62 (s, 4H), 3.58 (s, 2H), 3.16 (s, 3H), 0.83 (s, 18H), 0.00 (s, 12 H)。

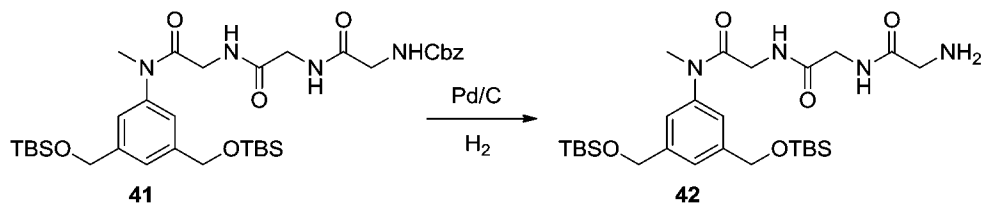


【0337】 步驟4：將化合物**39** (1.26 g，2.147 mmol)溶解於MeOH (6.82 mL)及THF (6.8 mL)中且溶液用N₂淨化。添加Pd/C (10%，0.228 g，0.215 mmol)且使H₂在其中鼓泡數分鐘。在氫氣球下攪拌反應隔夜。使反應混合物濾過Celite且用MeOH洗滌並濃縮，得到純化合物**40** (1 g，100%產率)。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.41-7.30 (m, 2H), 7.27-7.21 (m, 1H), 7.06 (s, 2H), 4.65 (s, 4H), 3.23 (s, 3H), 3.12 (s, 2H), 0.82 (s, 18H), 0.00 (s, 12H)。

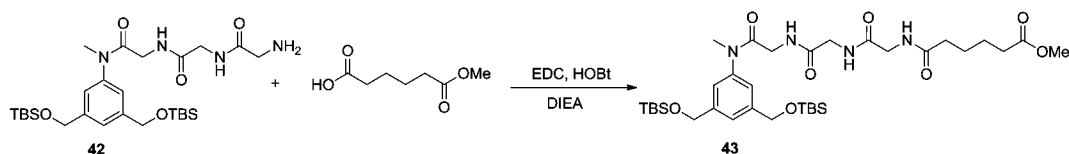


【0338】 步驟5：將胺化合物**40** (1.0 g，1.988 mmol)及Z-Gly-Gly-Gly-OH (662 mg，2.385 mmol)溶解於DMF (6.63 mL)中。將EDC·HCl (457 mg，2.385 mmol)及HOBT (304 mg，1.988 mmol)添加至反應混合物中，隨後添加DIEA (694 μL，3.98 mmol)。在室溫下攪拌反應隔夜。反應混合物用EtOAc稀釋且用sat'd NaHCO₃、鹽水及水(2×)洗滌。有機層經Na₂SO₄乾燥，過濾並濃縮。粗殘餘物藉由矽膠急驟層析法(MeOH/DCM，梯度0%至10%)純化，得到呈白色粘性泡沫狀之化合物**41**(994 mg，71%產率)。¹HNMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.38-7.32 (m, 7H),

7.31-7.27 (m, 2H), 7.01 (s, 2H), 5.13 (s, 2H), 4.74 (s, 4H), 3.97 (d, 2H, $J = 4.6$ Hz), 3.92 (d, 2H, $J = 5.3$ Hz), 3.74 (d, 2H, $J = 3.7$ Hz), 3.27 (s, 3H), 0.94 (s, 18H), 0.11 (s, 12H)。

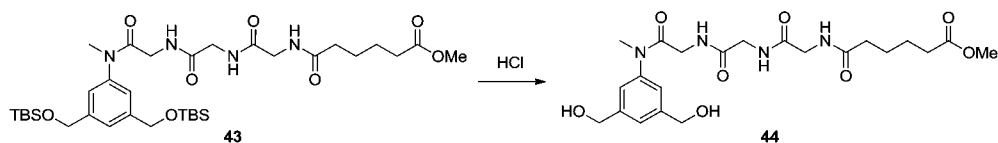


【0339】 步驟6：將化合物**41** (994 mg, 1.418 mmol)懸浮於MeOH (6.65 mL)及水(443 μ L)中且用N₂淨化。添加Pd/C (10%濕度, 302 mg, 0.284 mmol)且使H₂在其中鼓泡數分鐘。在氫氣球下攪拌反應隔夜。使溶液濾過Celite且用MeOH洗滌並濃縮, 得到純化合物**42** (725 mg, 90%產率)。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.10-7.97 (m, 1H), 7.91-7.85 (m, 1H), 7.31-7.23 (m, 1H), 7.05 (s, 2H), 7.65 (s, 4H), 3.68-3.62 (m, 2H), 3.56-3.45 (m, 1H), 3.09 (s, 3H), 3.08-3.06 (m, 2H), 3.06-3.03 (m, 2H), 0.82 (s, 18H), 0.00 (s, 12H)。LCMS = 5.574 min (8分鐘方法)。質量觀測值 (ESI⁺): 567.30 (M+H)。

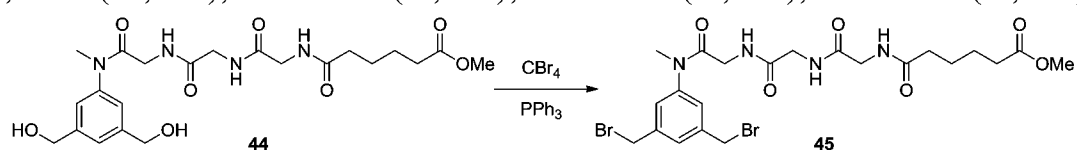


【0340】 步驟7：將胺化合物**42** (725 mg, 1.279 mmol)及己二酸單甲酯(246 mg, 1.535 mmol)溶解於DMF (6.5 mL)中。將EDC·HCl (294 mg, 1.535 mmol)及HOBt (196 mg, 1.279 mmol)添加至反應混合物中, 隨後添加DIEA (447 μ L, 2.56 mmol)。在室溫下攪拌反應隔夜。反應混合物用DCM (20 mL)稀釋且用sat'd NH₄Cl、sat'd NaHCO₃、水及鹽水洗滌。有機層經Na₂SO₄乾燥, 過濾並濃縮。粗產物藉由矽膠急驟層析法(MeOH/DCM, 梯度0%至10%)純化, 得到化合物**43** (425 mg, 33%產率)。¹HNMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.30 (s, 1H), 7.01 (s, 2H), 6.89-6.85 (m, 1H), 6.75-6.72 (m, 1H), 6.41-6.40 (m, 1H), 4.73 (s, 4H), 3.98-3.96 (m, 4H), 3.74 (bd, 2H, $J = 3.5$ Hz), 3.66 (s, 3H), 3.27 (s, 3H), 2.33 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz), 2.28 (t, 2H, J

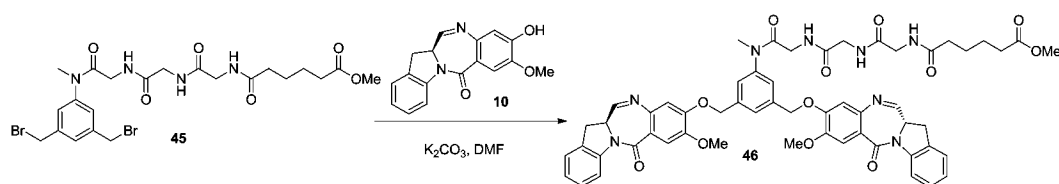
= 6.5 Hz), 0.94 (s, 18H), 0.11 (s, 12H) 。LCMS = 7.709 min (8分鐘方法) 。質量觀測值(ESI⁺): 709.35 (M+H) 。



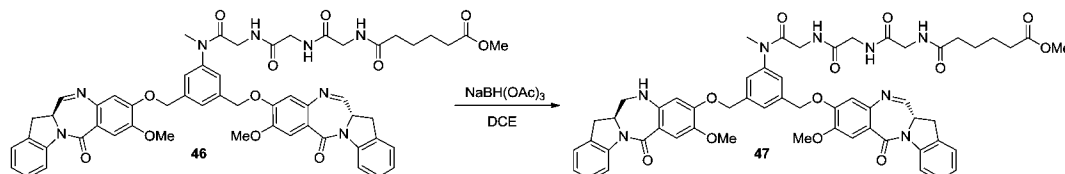
【0341】 **步驟8**：將化合物**43** (422 mg, 0.417 mmol)溶解於THF (1.89 mL) 及水(189 μ L)中。添加HCl (水溶液, 5 M) (833 μ L, 4.17 mmol)且在室溫下攪拌反應2.5小時。濃縮反應混合物。將ACN (約15 mL)添加至殘餘物中並濃縮。將此操作再重複兩次, 得到呈白色泡沫狀之化合物**44**(200 mg, 100%產率)。LCMS = 0.389 min (8分鐘方法)。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.09-8.04 (m, 2H), 7.93-7.90 (m, 1H), 7.30 (bs, 1H), 7.14 (s, 2H), 4.52 (s, 4H), 3.71-3.68 (m, 4H), 3.58 (s, 3H), 3.17 (bs, 3H), 2.22-2.18 (m, 2H), 2.15-2.12 (m, 2H), 1.53-1.47 (m, 4H) 。



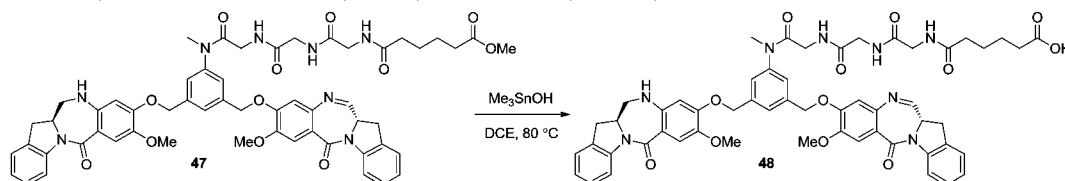
【0342】 **步驟9**：將二醇化合物**44** (110 mg, 0.229 mmol)及CBr₄ (228 mg, 0.687 mmol)溶解於DMF (2.29 mL)中。將PPh₃ (180 mg, 0.687 mmol)添加至反應混合物中, 此時反應物變為粉紅色並伴隨輕微放熱。在Ar下攪拌反應6小時。反應混合物用CH₂Cl₂/MeOH (10:1)稀釋並用水及鹽水洗滌。有機層經Na₂SO₄乾燥並濃縮。粗殘餘物藉由矽膠急驟層析法(MeOH/CH₂Cl₂, 梯度0%至10%)純化, 得到化合物**45** (30 mg, 22%產率)。¹HNMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.46 (bs, 1H), 7.32-7.26 (m, 2H), 7.26-7.19 (m, 2H), 6.89-6.85 (m, 1H), 4.60 (d, 2H, *J* = 3.6 Hz), 4.48 (d, 2H, *J* = 3.9 Hz), 3.98 (d, 4H, *J* = 5.1 Hz), 3.76 (bs, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.30 (bs, 3H), 2.34 (bt, 2H, *J* = 6.7 Hz), 2.30 (bt, 2H, *J* = 6.6 Hz), 1.70-1.64 (m, 4H) 。LCMS = 4.326 min (8分鐘方法) 。質量觀測值(ESI⁺): 605.10 (M+H) 。



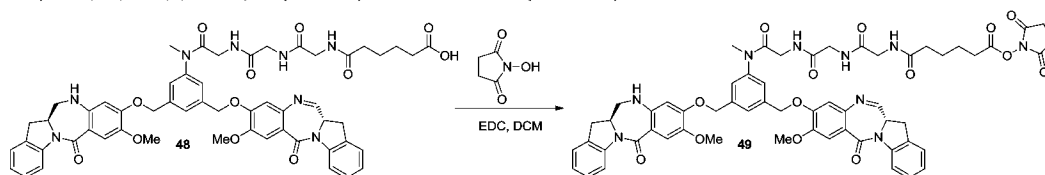
【0343】 步驟10：化合物46係以與實例1中化合物11類似之方式製備。在純化後獲得呈黃色固體狀之化合物46(40 mg，59%產率)。LCMS = 4.751 min (8分鐘方法)。質量觀測值(ESI⁺): 1033.35 (M+H)。



【0344】 步驟11：化合物47係以與實例1中化合物12類似之方式製備。在C18純化後獲得呈白色固體狀之化合物47(14 mg，32%產率)。LCMS = 5.857 min (15分鐘方法)。質量觀測值(ESI⁺): 1035.7 (M+H)。



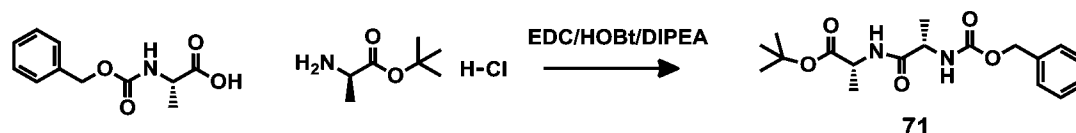
【0345】 步驟12：化合物48係以與實例2中22類似之方式製備。在二氧化矽塞後獲得呈黃色固體狀之化合物48(7 mg，100%產率)。LCMS = 4.817 min (8分鐘方法)。質量觀測值(ESI⁺): 1021.35 (M+H)。



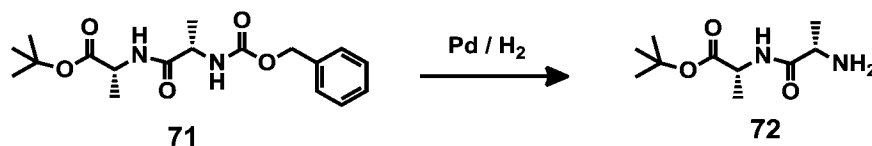
【0346】 步驟13：化合物49係以與實例1中化合物14類似之方式製備。在C18純化後獲得呈白色固體狀之2-(3-(((S)-8-甲氧基-6-側氧基-11,12,12a,13-四氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮呋并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)-5-(((S)-8-甲氧基-6-側氧基-12a,13-二氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮呋并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)苯基)-3,6,9,12-四側氧基-2,5,8,11-四氮雜十七碳-17-酸2,5-二側氧基吡咯啉-1-基酯，即化合物49(6.5 mg，74%產率)。LCMS = 5.805 min (15分鐘方法)。質量觀

測值(ESI⁺): 1118.7 (M+H)。

實例5. 合成6-(((S)-1-(((R)-1-((3-(((S)-8-甲氧基-6-側氧基-11,12,12a,13-四氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮呋并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)-5-(((R)-8-甲氧基-6-側氧基-12a,13-二氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮呋并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)胺基)-6-側氧基己酸2,5-二側氧基吡咯啉-1-基酯(化合物**80**)

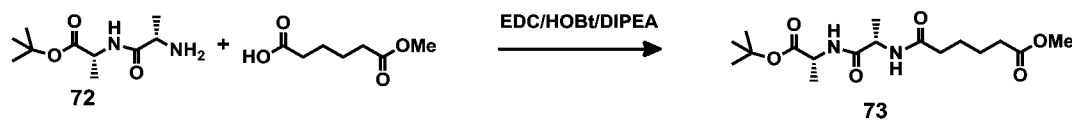


【0347】 步驟1：將(S)-2-(((苯甲氧基)羰基)胺基)丙酸(5 g, 22.40 mmol)及(R)-2-胺基丙酸第三丁酯鹽酸鹽(4.48 g, 24.64 mmol)溶解于無水DMF (44.8 ml)中。添加EDC·HCl (4.72 g, 24.64 mmol)、HOBt (3.43 g, 22.40 mmol)且接著添加DIPEA (9.75 ml, 56.0 mmol)。在氬氣下在室溫下攪拌反應隔夜。反應混合物用二氯甲烷稀釋且接著用飽和氯化銨、飽和碳酸氫鈉、水及鹽水洗滌。有機層經硫酸鈉乾燥並濃縮。粗油狀物經由矽膠層析法(己烷/乙酸乙酯)純化，得到化合物**71** (5.6 g, 71%產率)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.39-7.34 (m, 5H), 6.54 (s, 1H), 5.28 (s, 1H), 5.15 (s, 2H), 4.47-4.43 (m, 1H), 4.48 (s, 1H), 1.49 (s, 9H), 1.42-1.37 (m, 6H)。

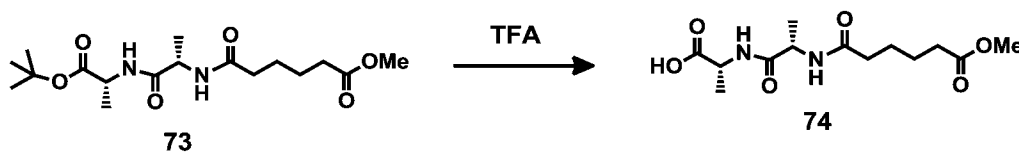


【0348】 步驟2：將化合物**71** (5.6 g, 15.98 mmol)溶解於甲醇(50.7 mL)及水(2.54 mL)中。溶液用氬氣淨化五分鐘。緩慢添加鈀/碳(潮濕, 10%) (0.850 g, 0.799 mmol)。攪在氬氣氛圍下拌反應隔夜。使溶液濾過Celite，用甲醇沖洗並濃縮。殘餘物與甲醇及乙腈共沸且所得油狀物直接放于高真空上，得到化合物**72** (3.57 g, 100%產率)，直接用於下一步驟中。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.67 (s,

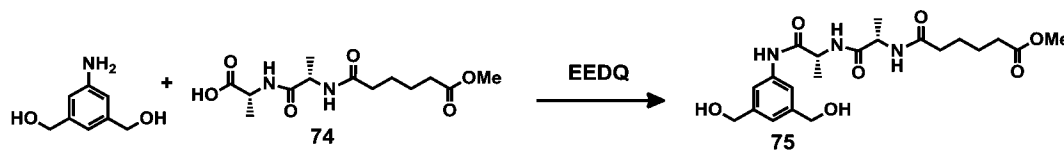
1H), 4.49-4.42 (m, 1H), 3.54-3.49 (m, 1H), 1.48 (s, 9H), 1.40 (d, 3H, $J = 7.2$ Hz), 1.36 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz)。



【0349】 步驟3：將化合物72 (3.57 g, 16.51 mmol)及己二酸單甲酯(2.69 mL, 18.16 mmol)溶解于無水DMF (55.0 mL)中。添加EDC·HCl (3.48 g, 18.16 mmol)及HOBt (2.53 g, 16.51 mmol)，隨後添加DIPEA (5.77 mL, 33.0 mmol)。混合物在室溫下攪拌隔夜。反應物用二氯甲烷/甲醇(80 mL, 5:1)稀釋且用飽和氯化銨、飽和碳酸氫鈉及鹽水洗滌。將其經硫酸鈉乾燥，過濾並汽提。將該化合物與乙腈(5x)共沸，接著在高真空上在35°C下抽吸，得到化合物73 (5.91 g, 100%產率)。粗物質不經純化即用於下一步驟。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.67 (d, 1H, $J = 6.8$ Hz), 6.22 (d, 1H, $J = 7.2$ Hz), 4.56-4.49 (m, 1H), 4.46-4.38 (m, 1H), 3.68 (s, 3H), 2.37-2.33 (m, 2H), 2.27-2.24 (m, 2H), 1.70 -1.68 (m, 4H), 1.47 (s, 9H), 1.40 (s, 3H), 1.38 (s, 3H)。

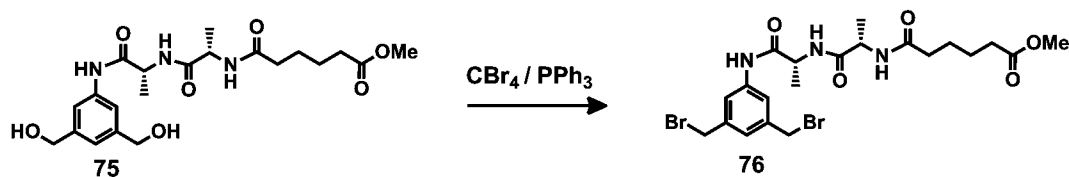


【0350】 步驟4：在室溫下，在TFA (25.4 mL, 330 mmol)及去離子水(1.3 mL)中攪拌化合物73 (5.91 g, 16.5 mmol)三小時。在乙腈存在下濃縮反應混合物且將其放于高真空上乾燥，得到粗化合物74 (4.99 g, 100%產率)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.44 (d, 1H, $J = 7.2$ Hz), 6.97 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 4.81-4.73 (m, 1H), 4.59-4.51 (m, 1H), 3.69 (s, 3H), 2.39-2.32 (m, 2H), 2.31-2.23 (m, 2H), 1.70-1.61 (m, 4H), 1.48 (d, 3H, $J = 7.2$ Hz), 1.40 (d, 3H, $J = 7.2$ Hz)。

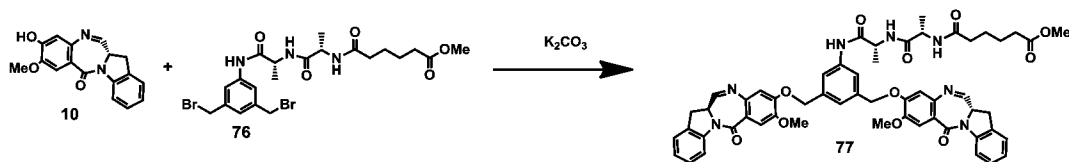


【0351】 步驟5：將化合物74 (4.8 g, 15.88 mmol)溶解于無水二氯甲烷(101

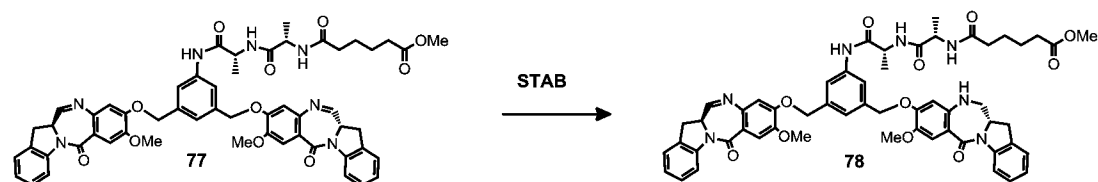
mL)及無水甲醇(50.4 mL)中。添加(5-胺基-1,3-伸苯基)二甲醇(2.316 g, 15.12 mmol)及EEDQ (7.48 g, 30.2 mmol)且在室溫下攪拌反應隔夜。去除溶劑且粗物質藉由矽膠層析法(二氯甲烷/甲醇)純化, 得到化合物**75** (1.65 g, 25%產率)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.68 (s, 1H), 8.29 (d, 1H, $J = 7.2$ Hz), 8.11 (d, 1H, $J = 6.4$ Hz), 7.52 (s, 2H), 6.97 (s, 1H), 5.15 (s, 2H), 4.45 (s, 4H), 4.39-4.32 (m, 1H), 4.28-4.21 (m, 1H), 3.57 (s, 3H), 2.30-2.27 (m, 2H), 2.17-2.13 (m, 2H), 1.54-1.45 (m, 4H) 1.30 (d, 3H, $J = 7.2$ Hz), 1.20 (d, 3H, $J = 7.2$ Hz)。MS (m/z): 460.2 ($M + Na$)⁺。



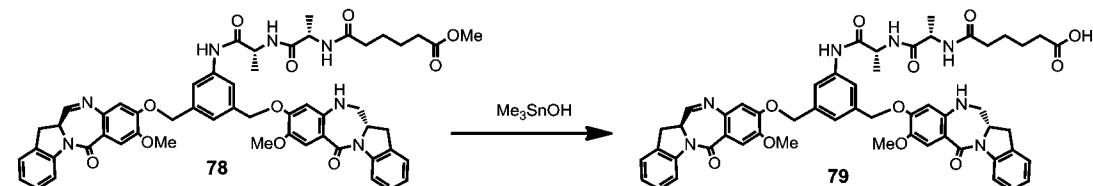
【0352】 步驟6：將化合物**75** (0.486 g, 1.111 mmol)及四溴化碳(1.105 g, 3.33 mmol)溶解于無水DMF (11.11 mL)中。添加三苯基磷(0.874 g, 3.33 mmol)且在氬氣下攪拌反應四小時。反應混合物用DCM/MeOH (10:1)稀釋且用水及鹽水洗滌。將其經硫酸鈉乾燥, 過濾並濃縮。粗物質藉由矽膠層析法(DCM/MeOH)純化, 得到化合物**76** (250 mg, 40%產率)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.82 (s, 1H), 8.38 (d, 1H, $J = 7.2$ Hz), 8.17 (d, 1H, $J = 6.0$ Hz), 7.76 (s, 2H), 7.22 (s, 1H), 4.66 (s, 4H), 4.38-4.31 (m, 1H), 4.25-4.19 (m, 1H), 3.56 (s, 3H), 2.30-2.27 (m, 2H), 2.18-2.15 (m, 2H), 1.53-1.51 (m, 4H), 1.32 (d, 3H, $J = 7.2$ Hz), 1.21 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz)。



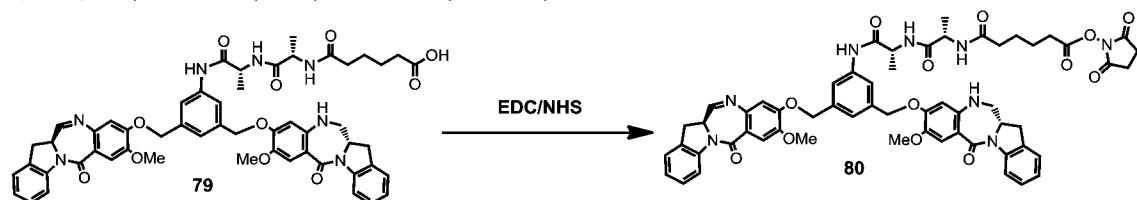
【0353】 步驟7：化合物**77**係以與實例1中**11**類似之方式製備。粗物質藉由矽膠層析法(二氯甲烷/甲醇)純化, 得到化合物**77** (340 mg, 60%產率, 77%純度)。LCMS = 5.87 min (15分鐘方法)。MS (m/z): 990.6 ($M + 1$)⁺。



【0354】 步驟8：化合物78係以與實例1中化合物12類似之方式製備。粗物質經由RPHPLC (C18管柱，乙腈/水)純化，得到化合物78 (103 mg，30%產率)。LCMS = 6.65 min (15分鐘方法)。MS (m/z): 992.7 (M + 1)⁺。



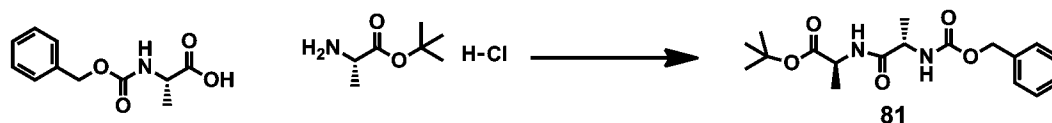
【0355】 步驟9：化合物78係以與實例2中22類似之方式製備。使粗物質通過二氧化矽塞，得到化合物79 (38 mg，55%產率，75%純度)。LCMS = 5.83 min (15分鐘方法)。MS (m/z): 978.6 (M + 1)⁺。



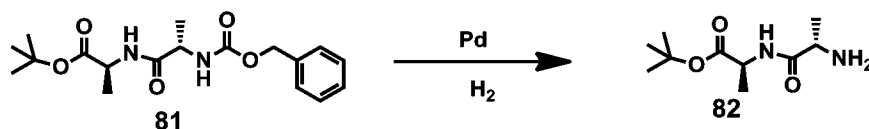
【0356】 步驟10：化合物80係以與實例1中化合物14類似之方式製備。粗物質經由RPHPLC (C18管柱，乙腈/水)純化，得到6-(((S)-1-(((R)-1-((3-(((S)-8-甲氧基-6-側氧基-11,12,12a,13-四氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮呋并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)-5-(((R)-8-甲氧基-6-側氧基-12a,13-二氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮呋并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)胺基)-6-側氧基己酸2,5-二側氧基吡咯啉-1-基酯，即化合物80 (6.5 mg，30%產率)。LCMS = 6.53 min (15分鐘方法)。MS (m/z): 1075.7 (M + 1)⁺及1097.7(M + Na)⁺。

實例6. 合成6-(((S)-1-(((S)-1-((3-(((S)-8-甲氧基-6-側氧基-11,12,12a,13-四氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮呋并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)-5-(((R)-8-甲氧基-6-側氧基-12a,13-二氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮呋并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基) 苯基)胺

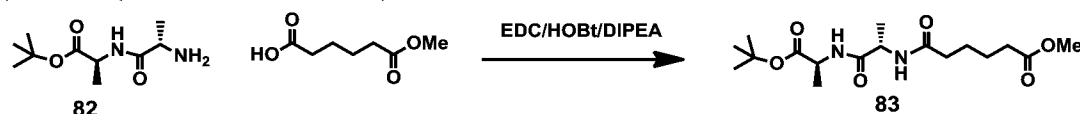
基)-1-側氧基丙-2-基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)胺基)-6-側氧基己酸2,5-二側氧基吡咯啉-1-基酯，即化合物**90**



【0357】 步驟1：將(S)-2-(((苯甲氧基)羰基)胺基)丙酸(5 g，22.40 mmol)及(S)-2-胺基丙酸第三丁酯鹽酸鹽(4.48 g，24.64 mmol)溶解于無水DMF (44.8 mL)。添加EDC·HCl (4.72 g，24.64 mmol)、HOBt (3.43 g，22.40 mmol)及DIPEA (9.75 mL，56.0 mmol)。在氬氣下，在室溫下攪拌反應隔夜。反應混合物用二氯甲烷稀釋且接著用飽和氯化銨、飽和碳酸氫鈉、水及鹽水洗滌。有機層經硫酸鈉乾燥並濃縮。粗油狀物經由矽膠層析法(己烷/乙酸乙酯)純化，得到化合物**81** (6.7 g，85%產率)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.38-7.31 (m, 5H), 6.53-6.42 (m, 1H), 5.42-5.33 (m, 1H), 5.14 (s, 2H), 4.48-4.41 (m, 1H), 4.32-4.20 (m, 1H), 1.49 (s, 9H), 1.42 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz), 1.38 (d, 3H, *J* = 7.2 Hz)。

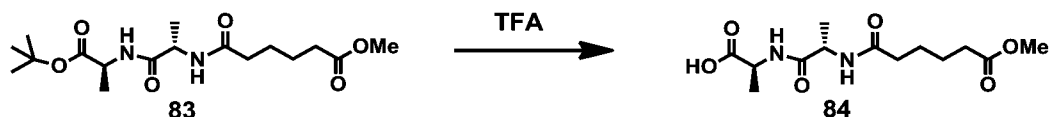


【0358】 步驟2：將化合物**81** (6.7 g，19.12 mmol)溶解於甲醇(60.7 mL)及水(3.03 mL)中。溶液用氬氣淨化五分鐘。緩慢添加鈀/碳(潮濕，10%) (1.017 g，0.956 mmol)。在氬氣氛圍下攪拌反應隔夜。使溶液濾過Celite，用甲醇沖洗並濃縮。使其與甲醇及乙腈共沸且所得油狀物直接放于高真空上，得到化合物**82** (4.02 g，97%產率)，直接用於下一步驟中。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.78-7.63 (m, 1H), 4.49-4.42 (m, 1H), 3.55-3.50 (m, 1H), 1.73 (s, 2H), 1.48 (s, 9H), 1.39 (d, 3H, *J* = 7.2 Hz), 1.36 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz)。

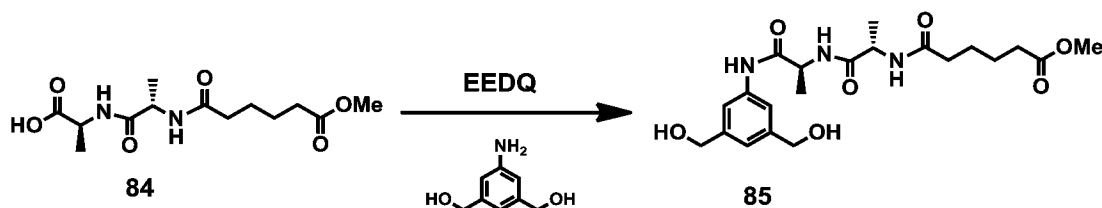


【0359】 步驟3：將化合物**82** (4.02 g，18.59 mmol)及己二酸單甲酯 (3.03

mL, 20.45 mmol)溶解于無水DMF (62.0 mL)中。添加EDC·HCl (3.92 g, 20.45 mmol)、HOBT (2.85 g, 18.59 mmol)及DIPEA (6.49 mL, 37.2 mmol)。混合物在室溫下攪拌隔夜。反應物用二氯甲烷/甲醇(150 mL, 5:1)稀釋且用飽和氯化銨、飽和碳酸氫鈉及鹽水洗滌。將其經硫酸鈉乾燥，過濾並汽提。使該化合物與乙腈(5×)共沸，接著在高真空上在35°C下抽吸，得到化合物**83** (6.66 g, 100%產率)。粗物質不經純化即用於下一步驟。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.75 (d, 1H, *J* = 6.8 Hz), 6.44 (d, 1H, *J* = 6.8 Hz), 4.52-4.44 (m, 1H), 4.43-4.36 (m, 1H), 3.65 (s, 3H), 2.35-2.29 (m, 2H), 2.25-2.18 (m, 2H), 1.71-1.60 (m, 4H), 1.45 (s, 9H), 1.36 (t, 6H, *J* = 6.0 Hz)。

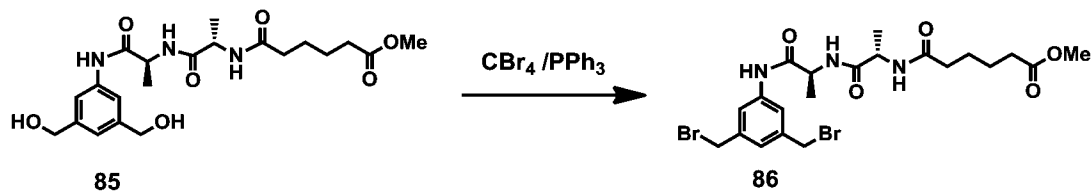


【0360】 步驟4：在室溫下，在TFA (28.6 mL, 372 mmol)及去離子水(1.5 mL)中攪拌化合物**83** (5.91 g, 16.5 mmol)三小時。在乙腈存在下濃縮反應混合物且將其放于高真空上，得到呈黏性固體狀之粗化合物**84** (5.88 g, 100%產率)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.21 (d, 1H, *J* = 6.8 Hz), 6.81 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 4.69-4.60 (m, 1H), 4.59-4.51 (m, 1H), 3.69 (s, 3H), 2.40-2.33 (m, 2H), 2.31-2.24 (m, 2H), 1.72-1.63 (m, 4H), 1.51-1.45 (m, 3H), 1.42-1.37 (m, 3H)。

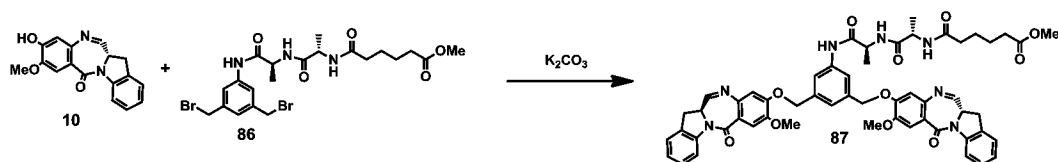


【0361】 步驟5：將化合物**84** (5.6 g, 18.52 mmol)溶解于無水二氯甲烷(118 mL)及無水甲醇(58.8 mL)中。添加(5-胺基-1,3-仲苯基)二甲醇(2.70 g, 17.64 mmol)及EEDQ (8.72 g, 35.3 mmol)且在室溫下攪拌反應隔夜。去除溶劑且添加乙酸乙酯。過濾所得漿液，用乙酸乙酯洗滌且在真空/N₂下乾燥，得到化合物**85** (2.79 g, 36%產率)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.82 (s, 1H), 8.05, (d, 1H, *J* = 9.2 Hz),

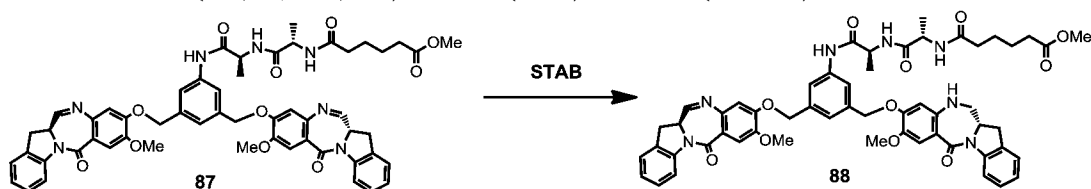
8.01 (d, 1H, $J = 7.2$ Hz), 7.46 (s, 2H), 6.95 (s, 1H), 5.21-5.12 (m, 2H), 4.47-4.42 (m, 4H), 4.40-4.33 (m, 1H), 4.33-4.24 (m, 1H), 3.58 (s, 3H), 2.33-2.26 (m, 2H), 2.16-2.09 (m, 2H), 1.54-1.46 (m, 4H), 1.30 (d, 3H, $J = 7.2$ Hz), 1.22 (d, 3H, $J = 4.4$ Hz)。



【0362】 步驟6：將化合物**85** (0.52 g, 1.189 mmol)及四溴化碳(1.183 g, 3.57 mmol)溶解于無水DMF (11.89 mL)中。添加三苯基膦(0.935 g, 3.57 mmol)且在氬氣下攪拌反應四小時。反應混合物用DCM/MeOH (10:1)稀釋且用水及鹽水洗滌，經硫酸鈉乾燥，過濾並濃縮。粗物質藉由矽膠層析法(DCM/MeOH)純化，得到化合物**86** (262 mg, 39%產率)。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.01 (s, 1H), 8.11 (d, 1H, $J = 6.8$ Hz), 8.03 (d, 1H, $J = 6.8$ Hz), 7.67 (s, 2H), 7.21 (s, 1H), 4.70-4.64 (m, 4H), 4.40-4.32 (m, 1H), 4.31-4.23 (m, 1H), 3.58 (s, 3H), 2.34-2.26 (m, 2H), 2.18-2.10 (m, 2H), 1.55-1.45 (m, 4H), 1.31 (d, 3H, $J = 7.2$ Hz), 1.21 (d, 3H, $J = 7.2$ Hz)。

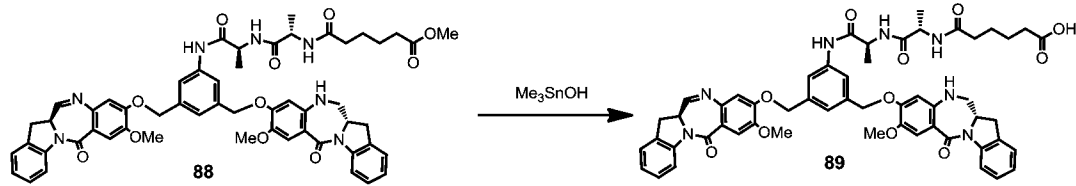


【0363】 步驟7：化合物**87**係以與實例1中化合物**11**類似之方式製備。粗物質藉由矽膠層析法(二氯甲烷/甲醇)純化，得到化合物**87** (336 mg, 74%產率)。LCMS = 5.91 min (15分鐘方法)。MS (m/z): 990.6 ($M + 1$)⁺。

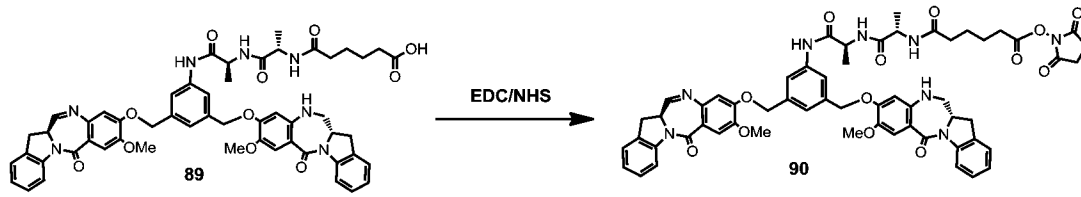


【0364】 步驟8：化合物**88**係以與實例1中化合物**12**類似之方式製備。粗物質經由RPHPLC (C18管柱，乙腈/水)純化，得到化合物**88** (85.5 mg, 25%產率)。

LCMS =6.64 min (15分鐘方法)。MS (m/z): 992.6 (M + 1)⁺。

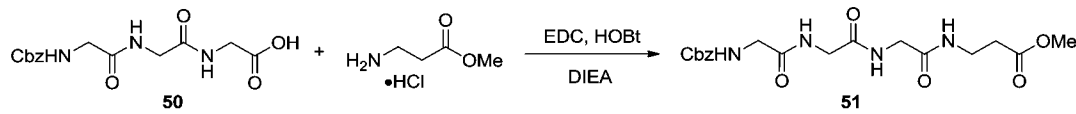


【0365】 步驟9：化合物88係以與實例2中22類似之方式製備。使粗物質通過二氧化矽塞，得到化合物89 (48.8 mg，80%產率)。LCMS = 5.89 min (15分鐘方法)。MS (m/z): 978.6 (M + 1)⁺。



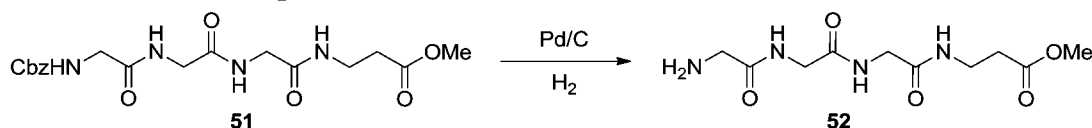
【0366】 步驟10：化合物90係以與實例1中14類似之方式製備。粗物質經由RPHPLC (C18管柱，乙腈/水)純化，得到6-(((S)-1-(((S)-1-(3-(((S)-8-甲氧基-6-側氧基-11,12,12a,13-四氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮呋并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)-5-(((R)-8-甲氧基-6-側氧基-12a,13-二氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮呋并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)胺基)-6-側氧基己酸2,5-二側氧基吡咯啉-1-基酯，即化合物90 (8.2 mg，30%產率)。LCMS = 6.64 min (15分鐘方法)。MS (m/z): 1075.4 (M + 1)⁺。

實例7. 合成 1-(3-(((S)-8-甲氧基-6-側氧基-11,12,12a,13-四氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮呋并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)-5-(((S)-8-甲氧基-6-側氧基-12a,13-二氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮呋并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)苯基)-1,4,7,10-四側氧基-2,5,8,11-四氮雜十四碳-14-酸2,5-二側氧基吡咯啉-1-基酯 (化合物63)

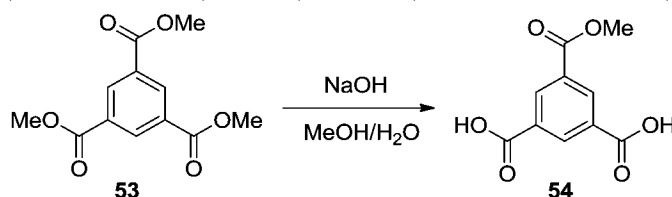


【0367】 步驟1：將Z-Gly-Gly-GlyOH化合物50 (1.0 g，3.09 mmol)及β-丙胺酸甲酯·HCl (453 mg，3.25 mmol)溶解於DMF (12.37 mL)中。將EDC·HCl (623

mg, 3.25 mmol)及HOBt (497 mg, 3.25 mmol)添加至反應混合物中，隨後添加 DIEA (1.08 mL, 6.19 mmol)。在室溫下攪拌反應隔夜。次日，形成部分白色沈澱。反應混合物用CH₂Cl₂/MeOH (5:1, 30 mL)稀釋且用sat'd NaHCO₃、sat'd NH₄Cl及鹽水洗滌。有機層變渾濁。添加EtOAc (15 mL)至有機層中以使產物沈澱析出。過濾混合物且固體用水(10 mL)及CH₃CN (2 × 15 mL)洗滌，不經純化得到呈白色粉末狀之純化合物**51**(880 mg, 70%產率)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.16 (bt, 1H, *J* = 5.4 Hz), 8.11 (bt, 1H, *J* = 5.6 Hz), 7.88-7.85 (m, 1H), 7.49 (bt, 1H, *J* = 5.5 Hz), 7.40-7.31 (m, 5H), 5.04 (s, 2H), 3.74 (d, 2H, *J* = 5.5 Hz), 3.67 (t, 4H, *J* = 6.2 Hz), 3.60 (s, 3H), 3.29 (q, 1H, *J* = 6.4 Hz), 2.47 (t, 3H, *J* = 6.9 Hz)。

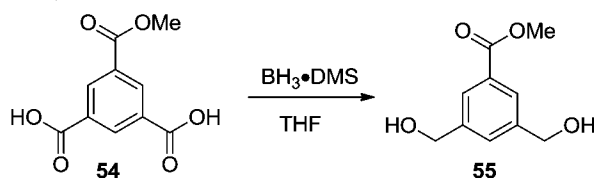


【0368】 步驟2：將化合物**51** (876 mg, 2.145 mmol)溶解於MeOH (20.4 mL)及水(1.02 mL)中且用Ar淨化。使溶液脫氣5分鐘。緩慢添加Pd/C (10%，用50%水潤濕，228 mg)。使H₂經由氣球在其中鼓泡一分鐘。在氫氣球下攪拌反應隔夜。將H₂O (約3 mL)添加至反應混合物中以溶解形成的所有白色固體。接著使溶液濾過Celite且濾餅用MeOH (30 mL)洗滌並濃縮。殘餘物溶解於CH₃CN (20 mL)中並濃縮。將此操作再重複2次。藉由添加CH₃CN (約15 mL)使所得粘性固體沈澱析出。將濃稠白色漿液攪拌10分鐘，過濾並用CH₃CN洗滌。固體在真空/N₂下乾燥1.5小時，得到呈白色固體狀之化合物**52**(450 mg, 76%產率)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.18-8.12 (m, 2H), 7.88 (t, 1H, *J* = 5.4 Hz), 3.75 (s, 2H), 3.65 (d, 2H, *J* = 5.9 Hz), 3.6 (s, 3H), 3.33-3.27 (m, 4H), 2.47 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz), 1.94 (bs, 1H)。

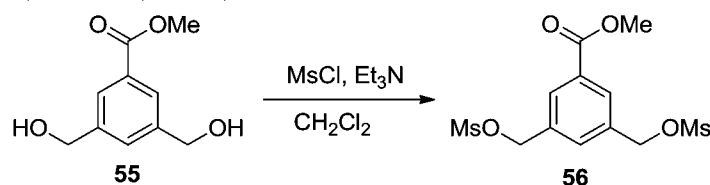


【0369】 步驟3：將NaOH (1.665 g, 41.6 mmol)添加至三甲基苯-1,3,5-三甲

酸酯化合物**53** (5 g, 19.82 mmol)於MeOH (66.1 mL)及水(13.22 mL)中之經攪拌溶液中。使反應混合物在Ar下回流3小時。形成大量白色沈澱。將溶液冷卻至室溫且用H₂O稀釋，直至所有固體均溶解。將混合物用5 N HCl水溶液酸化至約pH 2-3，用EtOAc (3×)萃取，經Na₂SO₄乾燥，過濾並濃縮。粗產物溶解於熱EtOAc (50 mL)中且緩慢冷卻至室溫。過濾沈澱(沈澱為副產物且並非產物)。濃縮母液，得到呈白色固體狀之化合物**54**(3.45 g, 78%產率)。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 13.62 (bs, 2H), 8.65 (s, 3H), 3.93 (s, 3H)。LCMS = 3.209 min (8分鐘方法)。質量觀測值(ESI⁺): 244.90 (M+H)。

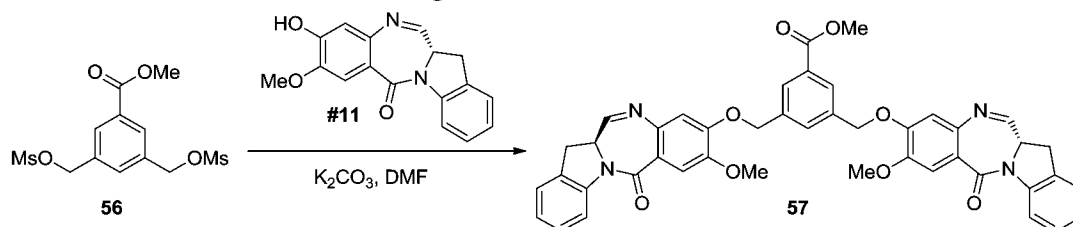


【0370】 步驟4：將二酸化化合物**54** (1.0 g, 4.46 mmol)溶解於THF (17.84 mL)中。將溶液冷卻至0°C且在Ar下緩慢添加BH₃·DMS (2 M之THF溶液) (8.92 mL, 17.84 mmol)。在0°C下攪拌反應5分鐘，接著升溫至室溫並攪拌隔夜。將反應物對空氣敞開且緩慢用MeOH淬滅，隨後緩慢添加H₂O，直至觀察不到氣體放出。混合物用EtOAc (2×)萃取且分離各層。有機層用約3% H₂O₂水溶液、檸檬酸水溶液及鹽水洗滌，經Na₂SO₄乾燥，過濾並濃縮。粗殘餘物藉由矽膠急驟層析法(EtOAc/己烷，梯度20%至100%)純化，得到呈白色固體狀之二醇化合物**55**(385 mg, 44%產率)。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.81 (s, 2H), 7.52 (s, 1H), 5.33 (bs, 2H), 4.56 (s, 4H), 3.86 (s, 3H)。

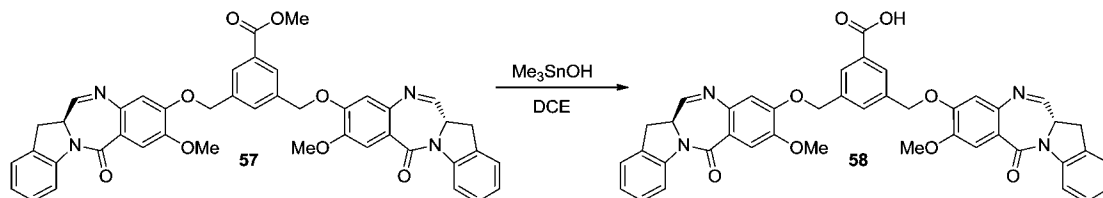


【0371】 步驟5：在Ar下，將二醇化合物**55** (320 mg, 1.631 mmol)溶解於DCM (10.9 mL)中。將溶液冷卻至-5°C且添加TEA (0.568 mL, 4.08 mmol)，隨後

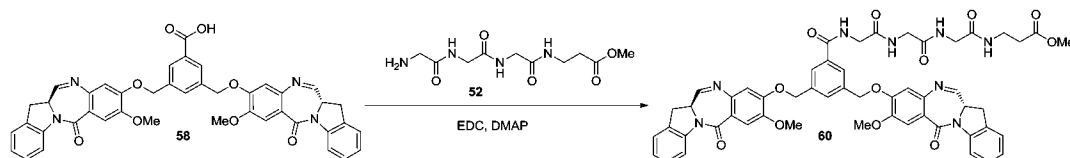
緩慢添加MsCl (0.292 mL, 3.75 mmol)，此時顏色在添加後立即變為黃色，接著變為深紅/褐色。反應混合物在Ar下在-5°C下攪拌1.5小時。反應混合物用冰水淬滅且用EtOAc (2×)萃取。有機層用水(2×)洗滌，經乾燥Na₂SO₄，過濾並濃縮，得到粗二甲磺酸酯化合物**56** (435 mg, 76%產率)。



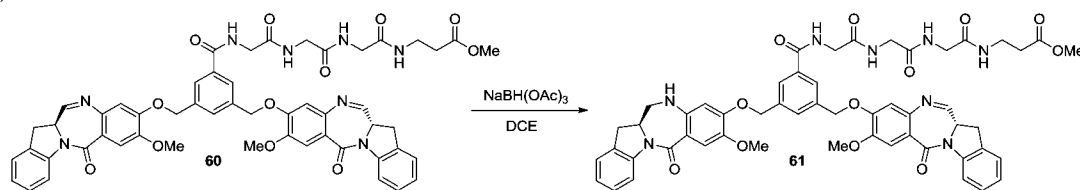
【0372】 步驟6：將二甲磺酸酯化合物**56** (435 mg, 1.11 mmol)溶解於DMF (5.55 mL)中。添加IGN單體化合物**10** (719 mg, 2.444 mmol)，隨後添加K₂CO₃ (384 mg, 2.78 mmol)且在室溫下在Ar下攪拌隔夜。添加水(20 mL)以使產物沈澱析出。漿液攪拌5分鐘，過濾且在真空/N₂下乾燥1.5小時。粗殘餘物藉由矽膠急驟層析法(EtOAc/己烷，梯度50%至100%；接著5% MeOH/DCM)純化，得到呈黃色固體狀之化合物**57**(535 mg, 64%產率，2個步驟)。LCMS = 6.973 min (15分鐘方法)。質量觀測值(ESI⁺): 749.4 (M+H)。



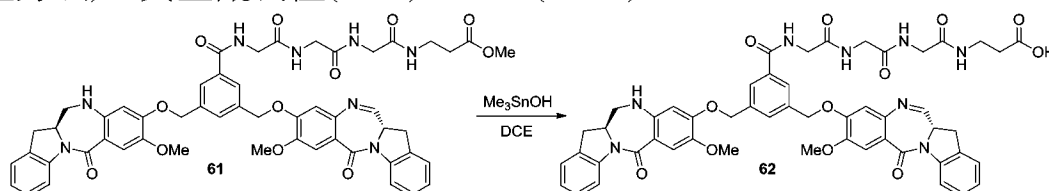
【0373】 步驟7：將化合物**57** (100 mg, 0.134 mmol)溶解於DCE (1.34 mL)中。添加三甲基錫烷醇(362 mg, 2.003 mmol)且在80°C下加熱隔夜。將反應混合物冷卻至室溫且用水稀釋。水層用1 M HCl酸化至約pH 4且用DCM (3×)萃取，經Na₂SO₄乾燥，過濾並濃縮。粗產物經由短二氧化矽塞塞住且用DCM/MeOH (10:1, 50 mL)沖洗並濃縮，得到呈淺黃色固體狀之化合物**58**(100 mg, 100%產率)。LCMS = 5.872 min (15分鐘方法)。質量觀測值(ESI⁺): 735.3 (M+H)。



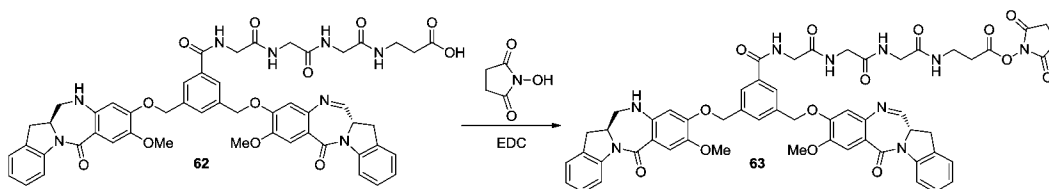
【0374】 **步驟8**：將酸化合物**58** (80 mg, 0.087 mmol)及胺化合物**52** (36 mg, 0.131 mmol)溶解於DMF (871 μ L)中。添加EDC·HCl (25 mg, 0.131 mmol)及DMAP (10.6 mg, 0.087 mmol)且在室溫下攪拌4小時。添加水(4 mL)以使產物沈澱析出。將漿液攪拌5分鐘，過濾並在真空/ N_2 下乾燥。粗殘餘物藉由矽膠急驟層析法(MeOH/DCM，梯度0%至20%)純化，得到呈黃色固體狀之化合物**60**(37 mg, 43%產率)。LCMS = 4.605 min (8分鐘方法)。質量觀測值(ESI^+): 991.35 (M+H)。



【0375】 **步驟9**：化合物**61**係以與實例1中化合物**12**類似之方式製備。在C18純化後獲得呈白色固體狀之化合物**61**(8 mg, 25%產率)。LCMS = 5.421 min (15分鐘方法)。質量觀測值(ESI^+): 993.7 (M+H)。



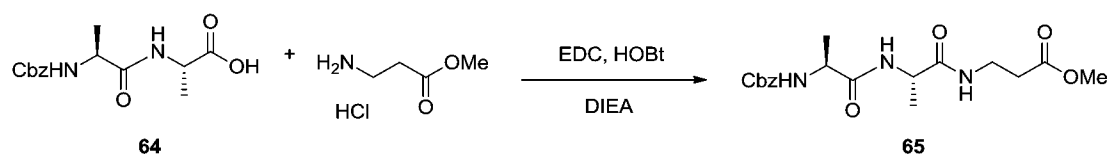
【0376】 **步驟10**：化合物**62**係以與實例2中化合物**22**類似之方式製備。在經由短二氧化矽塞塞住之後，獲得呈黃色固體狀之粗化合物**62**(13 mg, 90%產率)。LCMS = 4.693 min (8分鐘方法)。質量觀測值(ESI^+): 979.35 (M+H)。



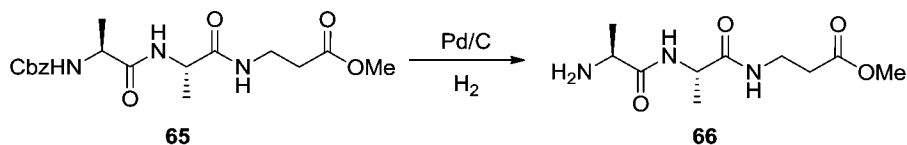
【0377】 **步驟11**：化合物**63**係以與實例1中化合物**14**類似之方式製備。在C18純化後獲得呈白色固體狀之1-(3-(((S)-8-甲氧基-6-側氧基-11,12,12a,13-四氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮呋并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)-5-(((S)-8-甲氧基-6-側氧基-12a,13-二氫-6H-benzo [5,6][1,4]二氮呋并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)苯

基)-1,4,7,10-四側氧基-2,5,8,11-四氮雜十四碳-14-酸2,5-二側氧基吡咯啉-1-基酯，即化合物**63**(4 mg，31%產率)。LCMS = 5.495 min (15分鐘方法)。質量觀測值(ESI⁺): 1076.7 (M+H)。

實例8. 合成3-((S)-2-((S)-2-(3-(((S)-8-甲氧基-6-側氧基-11,12,12a,13-四氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮呋并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)-5-(((S)-8-甲氧基-6-側氧基-12a,13-二氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮呋并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)苯甲醯胺基)丙醯胺基)丙醯胺基)丙酸2,5-二側氧基吡咯啉-1-基酯(化合物**70**)

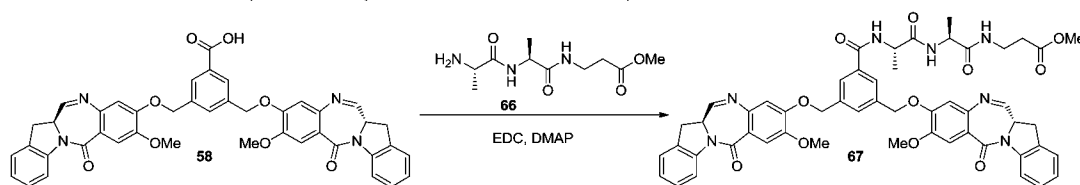


【0378】 步驟1：將Z-L-Ala-L-Ala-OH 化合物**64** (3.0 g，10.19 mmol)及β-丙胺酸甲酯·HCl (1.565 g，11.21 mmol)溶解於DMF (20.39 mL)中。添加EDC·HCl (2.150 g，11.21 mmol)及HOBT (1.561 g，10.19 mmol)，隨後添加DIPEA (4.44 mL，25.5 mmol)。在Ar下，在室溫下攪拌反應隔夜。反應混合物用EtOAc稀釋且用sat'd NH₄Cl、sat'd NaHCO₃及鹽水洗滌。將己烷添加至有機層中，此時溶液變渾濁並沈澱。將漿液攪拌數分鐘，過濾並用EtOAc/己烷(3:1)洗滌固體。固體在真空/N₂下乾燥，得到呈白色固體狀之純化合物**65**(3.11 g，80%產率)。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.91 (d, 2H, *J* = 7.0 Hz), 7.46 (d, 1H, *J* = 7.4 Hz), 6.39-7.30 (m, 5H), 5.02 (d, 2H, *J* = 2.3 Hz), 4.20 (p, 1H, *J* = 7.2 Hz), 4.04 (p, 1H, *J* = 7.3 Hz), 3.59 (s, 3H), 3.30-3.22 (m, 1H), 2.45 (t, 2H, *J* = 6.8 Hz), 1.18 (apparent t, 6H, *J* = 7.2 Hz)。LCMS = 3.942 min (8分鐘方法)。質量觀測值(ESI⁺): 380.10 (M+H)。

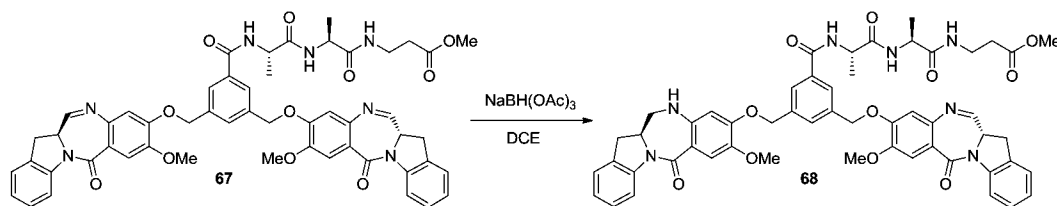


【0379】 步驟2：將化合物**65** (1.0 g，2.64 mmol)溶解於甲醇(12.55 mL)、水(0.628 mL)及THF (2 mL)中。溶液用Ar淨化且接著脫氣5分鐘。緩慢添加Pd/C

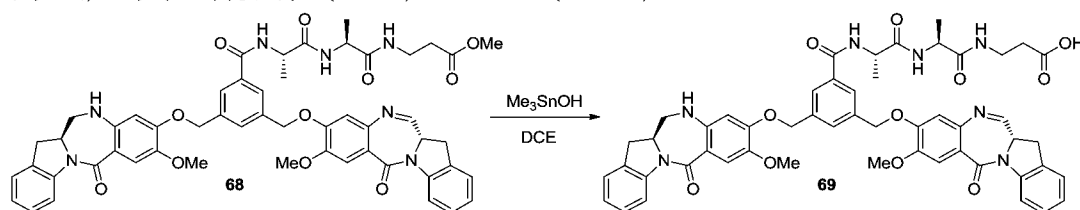
(10%，用50%水潤濕，0.140 g)。使H₂在溶液中鼓泡一分鐘且在氫氣球(1 atm)下再攪拌反應隔夜。使反應混合物濾過Celite且用MeOH (30 mL)洗滌並濃縮。將CH₃CN (15 mL)添加至殘餘物中並濃縮。將此操作再重複2次，得到呈灰白色固體狀之化合物**66**(650 mg，100%產率)。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.03-7.99 (m, 2H), 4.24-4.18 (m, 1H), 3.60 (s, 3H), 3.31-3.22 (m, 5H), 2.46 (t, 2H, *J* = 6.8 Hz), 1.17 (d, 3H, *J* = 7.0 Hz), 1.12 (d, 3H, *J* = 6.9 Hz)。



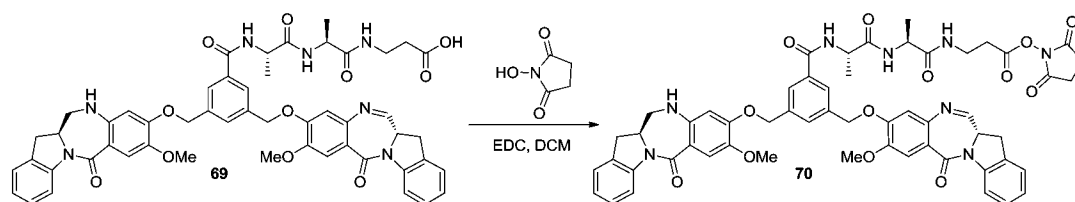
【0380】 步驟3：化合物**67**係以與實例7中**60**類似之方式製備。在矽膠急驟層析法之後，獲得呈黃色固體狀之化合物**67**(69 mg，53%產率)。LCMS = 4.843 min (8分鐘方法)。質量觀測值(ESI⁺): 962.25 (M+H)。



【0381】 步驟4：化合物**68**係以與實例1中化合物**12**類似之方式製備。在C18純化後獲得呈白色固體狀之化合物**68**(11.5 mg，19%產率)。LCMS = 5.136 min (8分鐘方法)。質量觀測值(ESI⁺): 964.35 (M+H)。

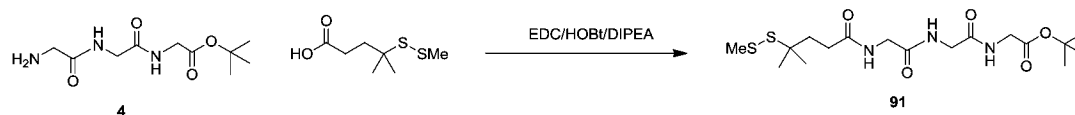


【0382】 步驟5：化合物**69**係以與實例2中化合物**22**類似之方式製備。在經由短二氧化矽塞塞住之後，獲得呈黃色固體狀之粗化合物**69**(13 mg，100%產率)。LCMS = 5.640 min (15分鐘方法)。質量觀測值(ESI⁺): 950.4 (M+H)。



【0383】 **步驟6**：化合物**70**係以與實例1中化合物**14**類似之方式製備。在C18純化後，獲得呈白色固體狀之3-((S)-2-((S)-2-(3-(((S)-8-甲氧基-6-側氧基-11,12,12a,13-四氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮呋并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)-5-(((S)-8-甲氧基-6-側氧基-12a,13-二氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮呋并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)苯甲醯胺基)丙醯胺基)丙醯胺基)丙酸2,5-二側氧基吡咯啉-1-基酯，即化合物**70**(5 mg，35%產率)。LCMS = 6.138 min (15分鐘方法)。質量觀測值(ESI⁺): 1047.4 (M+H)。

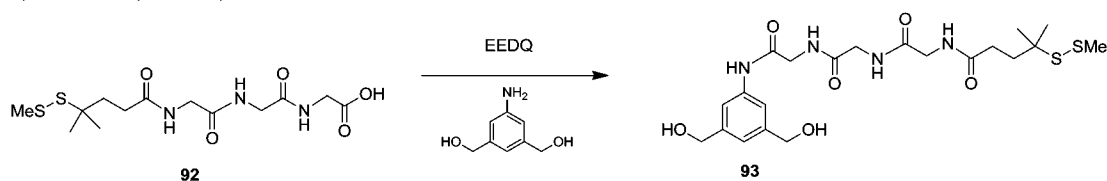
實例9。合成(12S,12aS)-9-((3-(2-(2-(2-(4-巯基-4-甲基戊醯胺基)乙醯胺基)乙醯胺基)乙醯胺基)-5-(((S)-8-甲氧基-6-側氧基-11,12,12a,13-四氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮呋并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)苯甲基)氧基)-8-甲氧基-6-側氧基-11,12,12a,13-四氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮呋并[1,2-a]吡啉-12-磺酸(化合物**98**)



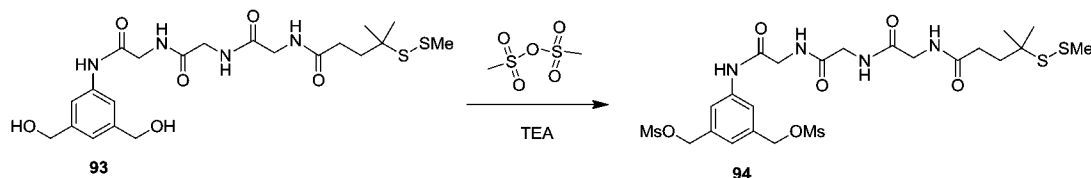
【0384】 **步驟1**：將化合物**4** (2.0 g，8.15 mmol)及4-甲基-4-(甲基二硫基)戊酸(1.743 g，8.97 mmol)溶解于無水DMF (27.2 mL)中。添加EDC·HCl (1.719 g，8.97 mmol)及HOBt (1.249 g，8.15 mmol)，隨後添加DIPEA (2.85 mL，16.31 mmol)。混合物在室溫下攪拌隔夜。反應物用二氯甲烷/甲醇(5:1)稀釋且用飽和氯化銨、飽和碳酸氫鈉及鹽水洗滌。將其經硫酸鈉乾燥，過濾並汽提。粗油狀物與乙腈(3×)共沸，接著在高真空上在35°C下抽吸約1.5小時，得到化合物**91**，不經進一步純化即使用(3.44 g，100%產率)。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.18-8.09 (m, 3H), 3.76-3.68 (m, 6H), 2.41 (s, 3H), 2.28-2.21 (m, 2H), 1.84-1.77 (m, 2H), 1.41 (s, 9H), 1.25 (s, 6H)。



【0385】 **步驟2**：在室溫下，在TFA (12.56 mL, 163 mmol)及去離子水 (0.65mL)中攪拌化合物**91** (3.44 g, 8.15 mmol) 3.5小時。反應物用乙腈稀釋且蒸發至幹。用乙酸乙酯使粗固體形成漿液，過濾並用乙酸乙酯且接著二氯甲烷/甲醇(1:1)沖洗，得到化合物**92** (2.98 g, 100%產率)。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.19-8.08 (m, 3H), 3.80-3.68 (m, 6H), 2.41 (s, 3H), 2.28-2.20 (m, 2H), 1.85-1.76 (m, 2H), 1.25 (s, 6H)。

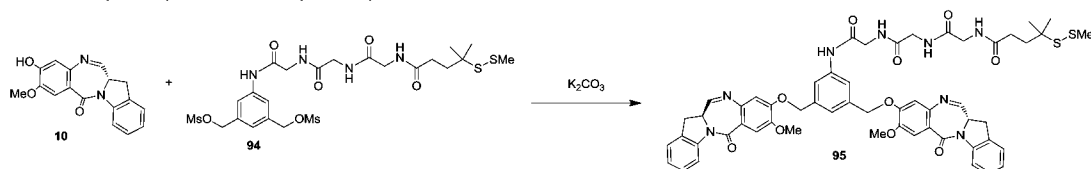


【0386】 **步驟3**：將化合物**92** (1.74 g, 4.76 mmol)溶解於二氯甲烷(30.2 mL)及甲醇(15.11 mL)中。添加N-乙氧基羰基-2-乙氧基-1,2-二氫喹啉(2.243 g, 9.07 mmol)及(5-胺基-1,3-伸苯基)二甲醇(0.695 g, 4.53 mmol)且在室溫下攪拌反應隔夜。移除溶劑且添加乙酸乙酯。使固體濾過Celite且用乙酸乙酯且接著甲醇洗滌。蒸發濾液且藉由矽膠層析法(二氯甲烷/甲醇)純化，得到化合物**93** (569 mg, 25%產率)。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.74 (s, 1H), 8.24-8.15 (m, 3H), 7.45 (s, 2H), 6.96 (s, 1H), 5.17 (t, 2H, *J* = 5.6 Hz), 4.45 (d, 4H, *J* = 5.6 Hz), 3.87 (d, 2H, *J* = 6.0 Hz), 3.77 (d, 2H, *J* = 6.0 Hz), 3.73 (d, 2H, *J* = 5.6 Hz), 2.40 (s, 3H), 2.28-2.21 (m, 2H), 1.83 -1.76 (m, 2H), 1.24 (s, 6H)。

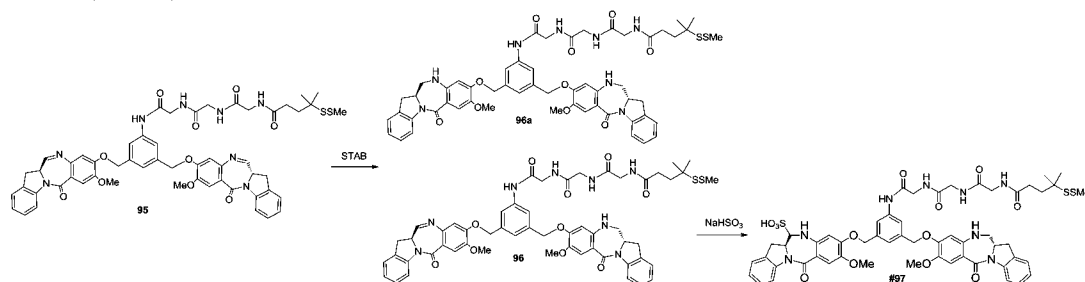


【0387】 **步驟4**：將化合物**93** (305 mg, 0.609 mmol)懸浮于無水DCM (5.992 mL)中。添加無水DMF，直至溶液變均質(約2.5 mL)。在丙酮/乾冰浴中將溶液冷卻至-10℃。添加三乙胺(0.425 mL, 3.05 mmol)，隨後添加甲烷磺酸酐(274 mg，

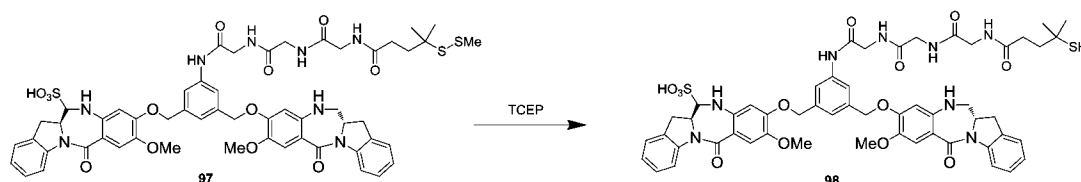
1.523 mmol)。混合物在 -10°C 下攪拌1小時。反應物用冰水淬滅且用冷乙酸乙酯/甲醇(20:1)萃取。有機層用冰水洗滌且經無水硫酸鈉乾燥，過濾並濃縮。粗物質在高真空上乾燥，得到化合物**94** (380 mg, 95%產率)。LCMS = 4.2 min (15分鐘方法)。MS (m/z): 655.0 ($\text{M}-1$)⁻。



【0388】 步驟5：化合物**95**係以與實例7中化合物**57**類似之方式製備。將粗固體溶解於二氯甲烷/甲醇(10:1)中，用水洗滌且有機物經無水硫酸鈉乾燥。在真空中移除溶劑且藉由矽膠層析法(二氯甲烷/甲醇)純化，得到化合物**95** (445 mg, 42%產率, 54%純度)。LCMS = 6.64 min (15分鐘方法)。MS (m/z): 1053.4 ($\text{M} + 1$)⁺ and 1051.3 ($\text{M} - 1$)⁻。

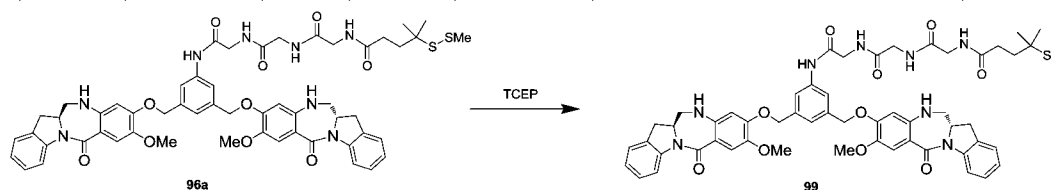


【0389】 步驟6：將化合物**95** (445 mg, 0.423 mmol)溶解於1,2-二氯乙烷(2.82 mL)中。在室溫下添加三乙醯氧基硼氫化鈉(80 mg, 0.359 mmol)並攪拌1小時。反應物用二氯甲烷稀釋且用飽和氯化銨洗滌。有機層用鹽水洗滌並乾燥，得到化合物**95**、**96**及**96a**之混合物(496 mg)。將此粗混合物溶解於2-丙醇(39.17 mL)及水(19.59 mL)中。添加亞硫酸氫鈉(245 mg, 2.35 mmol)且在室溫下攪拌3.5小時。將混合物冷凍並凍乾，得到蓬鬆白色固體，藉由RPHPLC (C18, 乙腈/水)純化，得到化合物**97** (54 mg, 10%產率)及化合物**96a** (24 mg, 5%產率)。LCMS (化合物**97**) = 4.83 min (15分鐘方法)且LCMS (化合物**96a**) = 8.05 min (15分鐘方法)。



【0390】 **步驟7**：向化合物**97** (54 mg, 0.047 mmol)於CH₃CN (3.85 mL)中之經攪拌溶液中添加新制的TCEP/pH 6.5緩衝溶液(TCEP·HCl (46.7 mg)溶解於數滴去離子水中，隨後逐滴添加飽和碳酸氫鈉直至約pH 6.5。溶液用0.55 mL的pH=6.5，1 M磷酸鈉緩衝液稀釋)及甲醇(2.75 mL)。混合物在室溫下攪拌3小時且接著冷凍並凍乾。固體藉由RPHPLC (C18，乙腈/水)純化，得到(12S,12aS)-9-((3-(2-(2-(2-(4-巯基-4-甲基戊醯胺基)乙醯胺基)乙醯胺基)乙醯胺基)-5-((((S)-8-甲氧基-6-側氧基-11,12,12a,13-四氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮吡并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)苯甲基)氧基)-8-甲氧基-6-側氧基-11,12,12a,13-四氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮吡并[1,2-a]吡啉-12-磺酸，即化合物**98** (2 mg, 4%產率)。LCMS = 4.32 min (15分鐘方法)。MS (m/z): 1089.3 (M -1)⁻。

實例10. 合成N-(2-((2-((2-((3,5-雙(((S)-8-甲氧基-6-側氧基-11,12,12a,13-四氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮吡并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)苯基)胺基)-2-側氧基乙基)胺基)-2-側氧基乙基)胺基)-2-側氧基乙基)-4-巯基-4-甲基戊醯胺(化合物**99**)



【0391】 化合物**99**係以與實例9中化合物**98**類似之方式製備。在C18純化後，獲得呈白色固體狀之N-(2-((2-((2-((3,5-雙(((S)-8-甲氧基-6-側氧基-11,12,12a,13-四氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮吡并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)苯基)胺基)-2-側氧基乙基)胺基)-2-側氧基乙基)胺基)-2-側氧基乙基)-4-巯基-4-甲基戊醯胺，即化合物**99**(6.3 mg, 27%產率)。LCMS = 7.26 min (15分鐘方法)。MS (m/z): 1033.5 (M +Na)⁺。

實例11. 製備huMOV19-14

【0392】 使在50 mM HEPES (4-(2-羥乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸) pH 8.5緩衝液及15% v/v DMA (*N,N*-二甲基乙醯胺)共溶劑中含有2.0 mg/mL huMOV19抗體及8莫耳當量化合物**14** (用溶於90:10 DMA:水中的5倍過量之亞硫酸氫鈉預處理)的反應物在25°C下偶聯6小時。

【0393】 反應後，使用NAP脫鹽柱(Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare)純化該偶聯物且緩衝液交換成250 mM甘胺酸、10 mM組胺酸、1%蔗糖、0.01% Tween-20、50 μ M亞硫酸氫鈉配製緩衝液(pH 6.2)。在4°C下，利用Slide-a-Lyzer透析盒(ThermoScientific 20,000 MWCO)以相同緩衝液透析20小時。

【0394】 發現經純化之偶聯物每個抗體連接有平均3.0個IGN91分子(藉由UV-Vis，對於化合物**14**，使用莫耳消光係數 $\epsilon_{330\text{ nm}} = 15,280\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ 及 $\epsilon_{280\text{ nm}} = 30,115\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ，且對於huMOV19抗體，使用 $\epsilon_{280\text{ nm}} = 201,400\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)，具有90%單體(藉由尺寸排阻層析法)，<0.1%之未偶聯化合物**14** (藉由丙酮沈澱，反相HPLC分析)且最終蛋白質濃度為0.78 mg/ml。藉由凝膠晶片分析發現，偶聯之抗體為>87%完整的。MS光譜資料顯示於圖7A中。

實例12. 製備huMOV19-磺基-SPDB-98

【0395】 將在含10 mM *N,N*-二異丙基乙胺(DIPEA)之DMA中含有最終濃度為3.9 mM之化合物**98**及3 mM磺基-SPDB連接子的原位混合物溫育60分鐘，隨後將20倍過量的所得化合物**98**-磺基-SPDB-NHS添加至在15 mM HEPES pH 8.5 (90:10水: DMA)中含有4 mg/ml huMOV19抗體之反應物中。使該溶液在25°C下偶聯隔夜。

【0396】 反應後，使用NAP脫鹽柱(Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare)純化該偶聯物且緩衝液交換成100 mM精胺酸、20 mM組胺酸、2%蔗糖、0.01% Tween-20、50 μ M亞硫酸氫鈉配製緩衝液(pH 6.2)。在4°C下，利用

Slide-a-Lyzer透析盒(ThermoScientific 10,000 MWCO)以相同緩衝液透析隔夜。

【0397】 發現經純化之偶聯物每個抗體連接有平均3.7個分子之化合物**98**(藉由SEC，對於化合物**98**，使用莫耳消光係數 $\epsilon_{330\text{ nm}} = 15,484\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ 及 $\epsilon_{280\text{ nm}} = 30,115\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ，且對於huMOV19抗體，使用 $\epsilon_{280\text{ nm}} = 201,400\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)，具有99%單體(藉由尺寸排阻層析法)且最終蛋白質濃度為0.18 mg/ml。MS光譜資料顯示於圖7A中。

實例13. 製備huMOV19-35

【0398】 使在50 mM HEPES (4-(2-羥乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸) pH 8.5緩衝液及15% v/v DMA (*N,N*-二甲基乙醯胺)共溶劑中含有2.5 mg/mL huMOV19抗體及5莫耳當量化合物**35** (用溶於90:10 DMA:水中的5倍過量之亞硫酸氫鈉預處理)的反應物在25°C下偶聯6小時。

【0399】 反應後，使用NAP脫鹽柱(Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare)純化該偶聯物且緩衝液交換成250 mM甘胺酸、10 mM組胺酸、1%蔗糖、0.01% Tween-20、50 μM 亞硫酸氫鈉配製緩衝液(pH 6.2)。在室溫下，利用Slide-a-Lyzer透析盒(ThermoScientific 10,000 MWCO)以相同緩衝液透析8小時。

【0400】 發現經純化之偶聯物每個抗體連接有平均2.9個分子之化合物**35**(藉由UV-Vis，對於IGN128，使用莫耳消光係數 $\epsilon_{330\text{ nm}} = 15,484\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ 及 $\epsilon_{280\text{ nm}} = 30,115\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ，且對於huMOV19抗體，使用 $\epsilon_{280\text{ nm}} = 201,400\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)，具有97%單體(藉由尺寸排阻層析法)，<1%之未偶聯化合物**35** (藉由丙酮沈澱，反相HPLC分析)且最終蛋白質濃度為1.4 mg/ml。MS光譜資料顯示於圖7A中。

實例14. 製備huMOV19-63

【0401】 使在50 mM HEPES (4-(2-羥乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸) pH 8.5緩衝液及15% v/v DMA (*N,N*-二甲基乙醯胺)共溶劑中含有2.0 mg/mL huMOV19抗體及7莫耳當量化合物**63** (用溶於90:10 DMA:水中的5倍過量之亞硫酸氫鈉預處理)

的反應物在25°C下偶聯6小時。

【0402】 反應後，使用NAP脫鹽柱(Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare)純化該偶聯物且緩衝液交換成250 mM甘胺酸、10 mM組胺酸、1%蔗糖、0.01% Tween-20、50 μ M亞硫酸氫鈉配製緩衝液(pH 6.2)。在4°C下，利用Slide-a-Lyzer透析盒(ThermoScientific 20,000 MWCO)以相同緩衝液透析20小時。

【0403】 發現經純化之偶聯物每個抗體連接有平均2.7個分子之化合物**63**(藉由UV-Vis，對於IGN131，使用莫耳消光係數 $\epsilon_{330\text{ nm}} = 15,280\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ 及 $\epsilon_{280\text{ nm}} = 30,115\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ，且對於huMOV19抗體，使用 $\epsilon_{280\text{ nm}} = 201,400\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)，具有99%單體(藉由尺寸排阻層析法)，<0.1%之未偶聯化合物**63** (藉由丙酮沈澱，反相HPLC分析)且最終蛋白質濃度為1.6 mg/ml。藉由凝膠晶片分析發現，偶聯之抗體為>90%完整的。MS光譜資料顯示於圖7B中。

實例15. 製備huMOV19-80

【0404】 使在50 mM HEPES (4-(2-羥乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸) pH 8.5緩衝液及15% v/v DMA (N,N-二甲基乙醯胺)共溶劑中含有2.0 mg/mL huMOV19抗體及7莫耳當量化合物**80** (用溶於90:10 DMA:水中的5倍過量之亞硫酸氫鈉預處理)的反應物在25°C下偶聯6小時。

【0405】 反應後，使用NAP脫鹽柱(Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare)純化該偶聯物且緩衝液交換成250 mM甘胺酸、10 mM組胺酸、1%蔗糖、0.01% Tween-20、50 μ M亞硫酸氫鈉配製緩衝液(pH 6.2)。在4°C下，利用Slide-a-Lyzer透析盒(ThermoScientific 20,000 MWCO)以相同緩衝液透析20小時。

【0406】 發現經純化之偶聯物每個抗體連接有平均2.5個分子之化合物**80**(藉由UV-Vis，對於化合物**80**，使用莫耳消光係數 $\epsilon_{330\text{ nm}} = 15,280\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ 及 $\epsilon_{280\text{ nm}} = 30,115\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ，且對於huMOV19抗體，使用 $\epsilon_{280\text{ nm}} = 201,400\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)，具有99%單體(藉由尺寸排阻層析法)，<0.1%之未偶聯化合物**80** (藉由丙酮沈澱，反相

HPLC分析)且最終蛋白質濃度為2.4 mg/ml。藉由凝膠晶片分析發現，偶聯之抗體為>90%完整的。

實例16. 製備huMOV19-90

【0407】 使在15 mM HEPES (4-(2-羥乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸) pH 8.5緩衝液及15% v/v DMA (*N,N*-二甲基乙醯胺)共溶劑中含有2.0 mg/mL huMOV19抗體及3.9莫耳當量化合物90 (在25°C用溶於95:5 DMA:50 mM琥珀酸酯pH 5.5中的5倍過量之亞硫酸氫鈉預處理4小時)的反應物在25°C下偶聯4小時。反應後，使用NAP脫鹽柱(Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare)純化該偶聯物且緩衝液交換成10 mM琥珀酸酯、50 mM氯化鈉、8.5% w/v蔗糖、0.01% Tween-20、50 μ M亞硫酸氫鈉配製緩衝液(pH 6.2)。利用Slide-a-Lyzer透析盒(ThermoScientific 30,000 MWCO)在室溫下以相同緩衝液透析4小時且接著在4°C下透析隔夜。

【0408】 發現經純化之偶聯物的最終蛋白質濃度為1.8 mg/ml且每個抗體連接有平均2.7個分子之化合物90(藉由UV-Vis，對於IGN152，使用莫耳消光係數 $\epsilon_{330\text{ nm}} = 15,280\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ 及 $\epsilon_{280\text{ nm}} = 30,115\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ，且對於huMOV19抗體，使用 $\epsilon_{280\text{ nm}} = 201,400\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)，具有98.3%單體(藉由尺寸排阻層析法)；及<1.1%之未偶聯化合物90 (藉由丙酮沈澱，反相HPLC分析)。MS光譜資料顯示於圖7B中。

實例17. 製備huMOV19-49

【0409】 使在50 mM HEPES (4-(2-羥乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸) pH 8.5緩衝液及10% v/v DMA (*N,N*-二甲基乙醯胺)共溶劑中含有2.0 mg/mL huMOV19抗體及5莫耳當量化合物49 (用溶於90:10 DMA:水中的5倍過量之亞硫酸氫鈉預處理)的反應物在25°C下偶聯4小時。

【0410】 反應後，使用NAP脫鹽柱(Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare)純化該偶聯物且緩衝液交換成250 mM甘胺酸、10 mM組胺酸、1%蔗糖、0.01% Tween-20、50 μ M亞硫酸氫鈉配製緩衝液(pH 6.2)。在室溫下，利用

Slide-a-Lyzer透析盒(ThermoScientific 20,000 MWCO)以相同緩衝液透析4小時。

【0411】 發現經純化之偶聯物每個抗體連接有平均2.8個分子之化合物49(藉由UV-Vis，對於化合物49，使用莫耳消光係數 $\epsilon_{330\text{ nm}} = 15,280\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ 及 $\epsilon_{280\text{ nm}} = 30,115\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ，且對於huMOV19抗體，使用 $\epsilon_{280\text{ nm}} = 201,400\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)，具有94%單體(藉由尺寸排阻層析法)，<0.1%之未偶聯化合物49(藉由丙酮沈澱，反相HPLC分析)且最終蛋白質濃度為1.5 mg/ml。藉由凝膠晶片分析發現，偶聯之抗體為>95%完整的。MS光譜資料顯示於圖7C中。

實例18. 製備huMOV19-磺基-SPDB-99

【0412】 將在含10 mM *N,N*-二異丙基乙胺(DIPEA)之DMA中含有最終濃度為1.95 mM之化合物99及1.5 mM磺基-SPDB連接子的原位混合物溫育20分鐘，隨後用4 mM順丁烯二醯亞胺基丙酸MPA封端。將6倍過量的所得99-磺基-SPDB-NHS添加至在15 mM HEPES pH 8.5 (82:18水: DMA)中含有2.5 mg/ml huMOV19抗體之反應物中。使該溶液在25°C下偶聯隔夜。

【0413】 反應後，使用NAP脫鹽柱(Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare)純化該偶聯物且緩衝液交換成20 mM組胺酸、50 mM氯化鈉、8.5%蔗糖、0.01% Tween-20、50 μM 亞硫酸氫鈉配製緩衝液(pH 6.2)。在4°C下，利用Slide-a-Lyzer透析盒(ThermoScientific 10,000 MWCO)以相同緩衝液透析隔夜。

【0414】 發現經純化之偶聯物每個抗體連接有平均1.6個分子之化合物99(藉由UV/Vis，對於化合物99，使用莫耳消光係數 $\epsilon_{330\text{ nm}} = 15,484\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ 及 $\epsilon_{280\text{ nm}} = 30,115\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ，且對於huMOV19抗體，使用 $\epsilon_{280\text{ nm}} = 201,400\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)，具有99%單體(藉由尺寸排阻層析法)且最終蛋白質濃度為0.59 mg/ml。MS光譜資料顯示於圖7C中。

實例19. 製備huMOV19-70

【0415】 使在50 mM HEPES (4-(2-羥乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸) pH 8.5緩衝

液及10% v/v DMA (*N,N*-二甲基乙醯胺)共溶劑中含有2.0 mg/mL huMOV19抗體及5莫耳當量化合物**70** (用溶於90:10 DMA:水中的5倍過量之亞硫酸氫鈉預處理)的反應物在25°C下偶聯4小時。

【0416】 反應後，使用NAP脫鹽柱(Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare)純化該偶聯物且緩衝液交換成20 mM組胺酸、100 mM精胺酸、2%蔗糖、0.01% Tween-20、50 μ M亞硫酸氫鈉配製緩衝液(pH 6.2)。純化後，在4°C下，利用Slide-a-Lyzer透析盒(ThermoScientific 20,000 MWCO)以相同緩衝液透析18小時。

【0417】 發現經純化之偶聯物每個抗體連接有平均3.0個分子之化合物**70**(藉由UV-Vis，對於化合物**70**，使用莫耳消光係數 $\epsilon_{330\text{ nm}} = 15,484\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ 及 $\epsilon_{280\text{ nm}} = 30,115\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ，且對於huMOV19抗體，使用 $\epsilon_{280\text{ nm}} = 201,400\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)，具有94%單體(藉由尺寸排阻層析法)，<0.1%之未偶聯化合物**70** (藉由丙酮沈澱，反相HPLC分析)且最終蛋白質濃度為1.3 mg/ml。

實例20. 製備huMOV19-23

【0418】 使在50 mM HEPES (4-(2-羥乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸) pH 8.5緩衝液及15% v/v DMA (*N,N*-二甲基乙醯胺)共溶劑中含有2.5 mg/mL huMOV19抗體及4莫耳當量化合物**23** (用溶於90:10 DMA:水中的5倍過量之亞硫酸氫鈉預處理)的反應物在25°C下偶聯6小時。

【0419】 反應後，使用NAP脫鹽柱(Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare)純化該偶聯物且緩衝液交換成250 mM甘胺酸、10 mM組胺酸、1%蔗糖、0.01% Tween-20、50 μ M亞硫酸氫鈉配製緩衝液(pH 6.2)。在室溫下，利用Slide-a-Lyzer透析盒(ThermoScientific 10,000 MWCO)以相同緩衝液透析8小時。

【0420】 發現經純化之偶聯物每個抗體連接有平均2.8個分子之化合物**23**(藉由UV-Vis，對於化合物**23**，使用莫耳消光係數 $\epsilon_{330\text{ nm}} = 15,484\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ 及 $\epsilon_{280\text{ nm}}$

$\epsilon_{280\text{ nm}} = 30,115\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ，且對於huMOV19抗體，使用 $\epsilon_{280\text{ nm}} = 201,400\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ），具有98%單體(藉由尺寸排阻層析法)，<3%之未偶聯化合物**23** (藉由丙酮沈澱，反相HPLC分析)且最終蛋白質濃度為1.3 mg/ml。MS光譜資料顯示於圖7D中。

實例21. 有關huMOV19-14、huMOV19-90及huMOV19-107偶聯物之結合親和力的流動式細胞測量術分析

【0421】 在4°C下，在96孔盤(Falcon，圓底)中，一式兩份用FACS緩衝液(1% BSA，1x PBS)稀釋起始濃度為 $3 \times 10^{-8}\text{ M}$ 的每孔100 μl 偶聯物huMOV19-14、huMOV19-90或huMOV19-107或抗體huMOV19且以FACS緩衝液進行3倍連續稀釋。在PBS中將在補充有熱滅活10% FBS (Life Technologies)、0.1 mg/ml/ml慶大黴素(gentamycin)(Life Technologies)及0.2 IU牛胰島素/ml (Sigma)之RPMI-1640 (Life Technologies)中生長的T47D細胞(人乳房腫瘤)洗滌一次，且用Versene (Life Technologies)移除。將T47D細胞再懸浮於生長培養基(參見上文)中以中和versene，並在Coulter計數器上計數。接著在冷FACS緩衝液中洗滌細胞兩次，在每次洗滌之間以1200 rpm離心5分鐘。將100 μl /ml的 2×10^4 個細胞/孔添加至含有偶聯物、抗體或僅含FACS緩衝液之孔中並在4°C下孵育2小時。孵育之後，如先前所述對細胞進行離心，且在每孔200 μl 之冷FACS緩衝液中洗滌一次。接著，在4°C下用每孔200 μl 偶聯FITC之山羊抗人IgG-Fc γ 二次抗體(所包括之對照物為未染色細胞及僅用二次抗體染色之該等細胞)對細胞染色，保持40分鐘，離心且在每孔200 μl 之冷PBS-D中洗滌一次。將細胞固定于每孔200 μl 之1%甲醛/ PBS-D中且在4°C下儲存。儲存之後，使用流動式細胞測量術，在FACS Calibur (BD Biosciences)上偵測偶聯物或抗體之細胞表面染色。使用GraphPad Prism將幾何平均值對偶聯物或抗體之對數濃度作圖，且經由非線性4參數邏輯斯蒂回歸分析(non-linear 4-parameter logistic regression analysis)計算EC₅₀。

【0422】 對於huMOV19-90偶聯物重複該結合分析且資料顯示於圖15B

中。

【0423】 如圖1、圖15A、圖15B及圖20中所示，在流動式細胞測量術中該等偶聯物以與未偶聯抗體類似之方式結合至表現靶抗原之T47D細胞的表面，由此證實，結合不受偶聯過程之影響。

實例22. 關於huMOV19-14偶聯物之細胞毒性分析

【0424】 在環境溫度下，在96孔盤(Corning，平底)中，一式三份用補充有熱滅活10% FBS (Life Technologies)及0.1 mg/ml慶大黴素(Life Technologies)之RPMI-1640 (Life Technologies)稀釋起始濃度為 3.5×10^{-9} M至 3.5×10^{-8} M的每孔100 μ l huMOV19-14偶聯物，並在上述培養基中進行3倍連續稀釋。在PBS中洗滌在補充有熱滅活10% FBS (Life Technologies)及0.1 mg/ml慶大黴素(Life Technologies)之EMEM (ATCC)中生長之KB細胞(口腔表皮腫瘤)一次，並用0.05%胰蛋白酶-EDTA (Life Technologies)移除。將KB細胞再懸浮於生長培養基(參見上文)中以中和胰蛋白酶，並在Coulter計數器上計數。將100 μ l/ml之 1×10^3 個細胞/孔添加至含有偶聯物或僅含培養基之孔中，且在37°C且含5% CO₂之恆溫箱中，在存在及不存在1 μ M阻斷性抗FOLR1抗體(huMOV19)情況下孵育5天。總體積為每孔200 μ l。孵育之後，藉由添加每孔20 μ l WST-8 (Dojindo)並使其顯影2小時來分析細胞活力。在板讀取器上，在450及620 nm下讀取吸光度。用450 nm下之吸光度減去620 nm下之吸光度。進一步用經校正之吸光度減去僅含培養基之孔中的背景值且以Excel計算未處理細胞之存活分數(SF)。使用Graph Pad Prism創建ADC濃度(M)隨SF變化之XY曲線。

【0425】 如圖2中所示，該偶聯物對KB細胞具有高效力且IC₅₀值為 4×10^{-12} M。添加過量未偶聯抗體使細胞毒性效應顯著降低，從而展現出抗原特異性。

實例23. 關於huMOV19-14及huMOV19-90偶聯物之旁觀者細胞毒性分析

【0426】 在96孔盤(Falcon，圓底)中，一式六份用補充有熱滅活之10% FBS

(Life Technologies)、0.1 mg/ml 慶大黴素 (Life Technologies) 及 β ME (Life Technologies) 之 RPMI-1640 (Life Technologies) 中稀釋濃度介於 1×10^{-10} M 至 4×10^{-10} M 之間的每孔 100 μ l huMOV19-14 或 huMOV19-90。在 Coulter 計數器上對表現重組 FOLR1 (FR1#14) 或無表現載體(親本)之 300.19 細胞(小鼠)進行計數。將 50 μ l/ml 每孔 1000 個 FR1#14 細胞添加至含有該偶聯物或僅含培養基之孔中，將 50 μ l/ml 每孔 2000 個親本細胞添加至含有該偶聯物或僅含培養基之孔中且將 FR1#14 與親本細胞一起添加至含有該偶聯物或僅含培養基之孔中。所有盤在含 5% CO_2 之 37°C 恆溫箱中孵育 4 天。總體積為每孔 150 μ l。孵育之後，藉由添加每孔 75 μ l Cell Titer Glo (Promega) 且使其顯影 45 分鐘來分析細胞活力。在光度計上讀取發光度且自所有值減去僅含培養基之孔的背景值。使用 Graph Pad Prism 繪製每一細胞處理之平均值的直條圖。

【0427】 如圖3中所示，偶聯物 huMOV19-14 對相鄰抗原陰性細胞展現出較弱的旁觀者細胞毒性效應。

【0428】 如圖13中所示，偶聯物 huMov19-90 展現較強的旁觀者殺滅活性。

實例24. 關於 huMy9-6-14 偶聯物之活體外細胞毒性分析

【0429】 將偶聯物稀釋液添加至 96 孔盤中在適當生長培養基中含有每孔 2×10^3 至 1×10^4 個細胞的孔中。在每一分析盤中納入含有細胞及培養基但無測試化合物之對照孔，以及僅含培養基之孔。在含有 6% CO_2 之潮濕氛圍中在 37°C 下孵育該等盤四至六天。接著將 10% v/v WST-8 試劑 (Dojindo Molecular Technologies, Gaithersburg, MD) 添加至孔中，且該等盤在 37°C 下孵育 2 至 6 小時。接著，在板讀取器分光光度計上以雙波長模式 450 nm/650 nm 量測吸光度，且減去在 650 nm 下之吸光度(由細胞引起之非特異性光散射)。藉由首先針對培養基背景吸光度校正，且接著用每一值除以對照孔(未處理孔)中該等值之平均值來計算每個孔中細胞之表觀存活分數。

【0430】 如圖3中所示，該偶聯物對各種抗原陽性癌細胞具有高效力；而抗原陰性L-540細胞當暴露於該偶聯物時仍保持活力。

實例25. 關於huMy9-6-14偶聯物之旁觀者細胞毒性分析

【0431】 進行初步測試以測定對抗原陰性RADA-1細胞無細胞毒性但殺死所有抗原陽性KARA細胞的huMy9-6-14濃度。將RADA-1 (每孔500個細胞)及KARA (每孔500、1000、2000、4000個細胞)接種于96孔圓底盤中。在細胞培養基(補充有10%熱滅活胎牛血清及50 mg/L慶大黴素之RPMI1640培養基)中製備huMy9-6-14之稀釋液 且將其添加至細胞中。在37°C下孵育盤4天，且使用WST-8試劑(Dojindo Molecular Technologies, Inc.)測定每個孔中之細胞活力。為了測試偶聯物之旁觀者效力，將RADA-1細胞與KARA細胞以不同比率((500個RADA-1細胞加無KARA細胞；500個RADA-1細胞加500個KARA細胞；500個RADA-1細胞加1000個KARA細胞；500個RADA-1細胞加2000個KARA細胞；500個RADA-1細胞加4000個KARA細胞)混合在一起，且將其接種于96孔圓底盤中。接著，將1.0e-9M或5.0e-10M huMy9-6-14(對RADA-1細胞無毒但殺死所有KARA細胞之濃度)添加至細胞混合物中。在37°C下孵育盤4天，且使用WST-8試劑(Dojindo Molecular Technologies, Inc.)測定每個孔中RADA-1細胞之活力。在板讀取器分光光度計上以雙波長模式450 nm/650 nm量測吸光度，且減去在650 nm下之吸光度(由細胞引起之非特異性光散射)。

【0432】 如圖5中所示，該偶聯物對相鄰抗原陰性細胞展現出旁觀者殺滅效應。

實例26. 單次劑量之huMOV19-80及huMOV19-90針對雌性SCID小鼠中NCI-H2110 NSCLC異種移植植物之抗腫瘤活性

【0433】 自Charles River Laboratories獲得6周齡之雌性CB.17 SCID小鼠。藉由在右側腹中皮下注射，用懸浮於0.1 ml 50%基質膠/無血清培養基中之 1×10^7

個NCI-H2110腫瘤細胞接種小鼠。當腫瘤體積達到約100 mm³ (接種後第7天)時，基於腫瘤體積將動物隨機分入5個組中，每組6只小鼠。第1天(接種後第8天)，動物接受單次靜脈內施用之媒劑對照物(每只小鼠0.2 ml)、基於**huMOV19-80**或**huMOV19-90**濃度之5 µg/kg及25 µg/kg的**huMOV19-80**或**huMOV19-90**。huMOV19為選擇性結合至葉酸受體1 (FOLR1)之人類化單株抗體。

【0434】 每週兩到三次使用測徑器以三個尺寸量測腫瘤大小。腫瘤體積係使用式 $V = \text{長度} \times \text{寬度} \times \text{高度} \times \frac{1}{2}$ 計算，以mm³表示。當腫瘤體積減小50%或更多時，認為小鼠具有部分消退(PR)，當無法偵測到明顯腫瘤時，認為具有完全腫瘤消退(CR)。腫瘤體積係藉由StudyLog軟體測定。

【0435】 腫瘤生長抑制(T/C值)係使用下式測定：

$$T/C (\%) = \text{治療組之中值腫瘤體積} / \text{對照組之中值腫瘤體積} \times 100。$$

【0436】 當媒劑對照組之腫瘤體積達到預定大小1000 mm³時，同時測定治療組(T)及媒劑對照組(C)之腫瘤體積。測定每一治療組之每日中值腫瘤體積，包括無腫瘤小鼠(0 mm³)。根據NCI標準， $T/C \leq 42\%$ 為抗腫瘤活性之最低水準。 $T/C < 10\%$ 被視為高抗腫瘤活性水準。

【0437】 如圖6中所示，**huMOV19-90**偶聯物在5 µg/kg及25 µg/kg劑量下具有高活性；而**huMOV19-80**偶聯物在25 µg/kg劑量下具有高活性。

實例27. 製備huML66-90

【0438】 使在15 mM HEPES (4-(2-羥乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸) pH 8.5緩衝液及10% v/v DMA (N,N-二甲基乙醯胺)共溶劑中含有2.0 mg/mL huML66抗體、抗EGFR抗體(參見WO 2012/058592，以引用之方式整體併入本文中)及3.5莫耳當量化合物**90** (在25°C用溶於90:10 DMA:50 mM琥珀酸酯pH 5.5中的5倍過量之亞硫酸氫鈉預處理4小時)的反應物在25°C下偶聯4小時。反應後，使用NAP脫鹽柱(Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare)純化該偶聯物且緩衝液交換成

20 mM組胺酸、50 mM氯化鈉、8.5% w/v蔗糖、0.01% Tween-20、50 μ M亞硫酸氫鈉配製緩衝液(pH 6.2)。利用Slide-a-Lyzer透析盒(ThermoScientific 30,000 MWCO)在室溫下以相同緩衝液透析4小時且接著在4°C下透析隔夜。

【0439】 發現經純化之偶聯物的最終蛋白質濃度為0.9 mg/ml且每個抗體連接有平均2.7個分子之化合物**90**(藉由UV-Vis，對於化合物**90**，使用莫耳消光係數 $\epsilon_{330\text{ nm}} = 15,280\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ 及 $\epsilon_{280\text{ nm}} = 30,115\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ，且對於huML66抗體，使用 $\epsilon_{280\text{ nm}} = 205,520\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)，具有99.1%單體(藉由尺寸排阻層析法)；及<1%之未偶聯IGN149 (藉由丙酮沈澱，反相HPLC分析)。MS光譜資料顯示於圖8中。

實例28. 關於huML66-90偶聯物之活體外細胞毒性分析

【0440】 使用活體外細胞毒性分析量測**huML66-90**偶聯物抑制細胞生長之能力。將靶細胞以每孔 1-2,000個細胞接種于100 μ L完全RPMI培養基(RPMI-1640、10%胎牛血清、2 mM麩醯胺酸、1%青黴素-鏈黴素，所有試劑均來自Invitrogen)中。使用3倍連續稀釋在完全RPMI培養基中稀釋抗體，且每孔添加100 μ L。最終濃度通常在 $3 \times 10^{-8}\text{ M}$ 至 $4.6 \times 10^{-12}\text{ M}$ 範圍內。在37°C下，在含5% CO₂之潮濕恆溫箱中孵育細胞5至6天。藉由比色WST-8分析(Dojindo Molecular Technologies, Inc., Rockville, MD, US)測定殘留細胞之活力。WST-8經活細胞中之脫氫酶還原成可溶於組織培養基中的橙色甲臍產物。所產生的甲臍量與活細胞數量成正比。將WST-8添加至10%最終體積中且在37°C下，在含5% CO₂之潮濕恆溫箱中再孵育盤2-4小時。藉由在多孔板讀取器中量測在450 nm下之吸光度(A₄₅₀)來分析盤。自所有值中減去僅含培養基及WST-8之孔的背景A₄₅₀吸光度。藉由用每一經處理樣品值除以含未處理細胞之孔的平均值來計算活力百分比。活力百分比= $100 * (A_{450}\text{經處理樣品} - A_{450}\text{背景}) / (A_{450}\text{未處理樣品} - A_{450}\text{背景})$ 。對於每一處理，以半對數曲線繪製活力百分比值針對抗體濃度之曲線。藉由非線性回歸生成劑量-反應曲線且使用GraphPad Prism (GraphPad

software, San Diego, CA)計算每一曲線之EC₅₀值。

活體外細胞毒性活性

【0441】 在存在及不存在過量未偶聯抗體情況下評價**huML66-90**偶聯物之活體外細胞毒性且將其與非特異性**huIgG-90**偶聯物在表現EGFR細胞中之活性相比較，且由典型細胞毒性分析得到的結果示於圖9中。**huML66-90**偶聯物引起Detroit-562 SCC-HN細胞之特異性細胞殺滅作用，且EC₅₀值為16 pM。過量未偶聯抗體之存在使活性顯著降低且產生的EC₅₀值為約2 nM。類似地，含有非結合性huIgG對照抗體之**huIgG-90**偶聯物引起細胞殺滅作用且EC₅₀值為約8 nM。

【0442】 同樣，**huML66-90**偶聯物引起NCI-H292 NSCLC細胞之特異性細胞殺滅作用，且EC₅₀值為12 pM。過量未偶聯抗體之存在使活性顯著降低且產生的EC₅₀值為約2 nM。類似地，含有非結合性huIgG對照抗體之**huIgG-90**偶聯物引起細胞殺滅作用且EC₅₀值為約8 nM。

【0443】 類似地，亦觀察到對於NCI-H1703細胞之特異性細胞殺滅作用。

表1.

偶聯物	Detroit EC ₅₀ , pM	NCI-H292 EC ₅₀ , pM	NCI-H1703 EC ₅₀ , pM
huML66-90	16	12	20
huML66-90 +阻斷劑	2,350	1,570	2,140
huIgG-90對照物	8,350	8,350	N/A

實例29. huMOV19-90之活體外細胞毒性活性

【0444】 在環境溫度下，在96孔盤(Corning，平底)中，一式三份用補充有熱滅活10% FBS (Life Technologies)及0.1 mg/ml慶大黴素(Life Technologies)之RPMI-1640 (Life Technologies)分別稀釋起始濃度為3.5e-9 M至3.5 e-8 M的每孔100 µl **huMOV19-90**偶聯物，並在上述培養基中進行3倍連續稀釋。在PBS中洗滌在補充有熱滅活10% FBS (Life Technologies)及0.1 mg/ml慶大黴素(Life

Technologies)之EMEM (ATCC)中生長的KB細胞(口腔表皮腫瘤)一次，並用0.05%胰蛋白酶-EDTA (Life Technologies)移除。所測試的其他細胞為在補充有熱滅活10% FBS (Life Technologies)及0.1 mg/ml慶大黴素 (Life Technologies)之RPMI-1640 (LifeTechnologies)中生長的NCI-H2110 (NSCLC)及T47D (乳房上皮細胞)。T47D培養基還補充有0.2 IU/ml牛胰島素。所有細胞再懸浮於生長培養基(參見上文)中以中和胰蛋白酶，並在血細胞計數器上計數。將100 µl/ml之1000個KB細胞/孔或2000個T47D及NCI-H2110細胞/孔添加至含有偶聯物或僅含培養基之孔中，且在37°C且含5% CO₂之恆溫箱中，在存在及不存在1 µM阻斷性抗FOLR1抗體(huMOV19)情況下孵育5天。總體積為每孔200 µl。在KB細胞上每一偶聯物之起始濃度為3.5e-9 M，且對於T47D細胞及NCI-H2110細胞，每一偶聯物之起始濃度為3.5e-8 M。孵育之後，藉由添加每孔20 µl WST-8 (Dojindo)並使其顯影2小時來分析細胞活力。在板讀取器上，在450及620 nm下讀取吸光度。用450 nm下之吸光度減去620 nm下之吸光度。進一步用經校正之吸光度減去僅含培養基之孔中的背景值且以Excel計算未處理細胞之存活分數(SF)。使用Graph Pad Prism創建ADC濃度(M)隨SF變化之XY曲線。

【0445】 如圖10-12及表2中所示，huMOV19-90偶聯物對KB細胞、T47D細胞及NCI-H2110細胞具有高效力。添加過量未偶聯抗體使細胞毒性效應顯著降低，從而展現出抗原特異性。

表2.

	KB		NCI-H2110		T47D	
	-阻斷劑	+阻斷劑	-阻斷劑	+阻斷劑	-阻斷劑	+阻斷劑
IC ₅₀	4e-12 M	8e-10 M	2e-11 M	1e-8 M	3e-11 M	8e-9 M

【0446】 在另一實驗中，使用基於WST-8之活體外細胞毒性分析來量測偶聯物抑制細胞生長之能力。用在適當細胞培養基中各種濃度之偶聯物處理96孔盤中之細胞(通常每孔1×10³個)，且總體積為0.2 ml。在每一分析盤中納入含有細

胞及培養基但無測試化合物之對照孔，以及僅含培養基之孔。在含有6% CO₂之潮濕氛圍中在37°C下孵育該等盤4至6天。接著將WST-8試劑(10%，體積/體積；Dojindo Molecular Technologies)添加至孔中，且取決於細胞株，將該等盤在37°C下孵育2至6天。接著，在板讀取器分光光度計上以雙波長模式450 nm/620 nm量測吸光度，且減去在620 nm下之吸光度(由細胞引起之非特異性光散射)。利用所得OD₄₅₀值，使用GraphPad Prism v4 (GraphPad software, San Diego, CA)計算細胞之表觀存活分數。藉由首先針對培養基背景吸光度校正，且接著用每一值除以對照孔(未處理孔)中該等值之平均值來計算每個孔中細胞之表觀存活分數。使用S形曲線擬合，在Graph Pad Prism中利用可變斜率，藉由非線性回歸來生成劑量反應曲線。藉由該軟體產生IC₅₀ (抑制濃度50%)。

【0447】 如圖21及表3中所示，該等偶聯物針對所測試之細胞株Ishikawa(子宮內膜癌)、KB(子宮頸癌)及NCI-H2110(非小細胞肺癌)具有活性。細胞殺滅活性具有FOLR1依賴性，因為過量的未偶聯huMOV19抗體(1 μM)使該偶聯物之效力明顯降低(20至200倍)。

表3.

細胞株	IC50，nM			
	huMOV19-90		huMOV19-107	
	偶聯物	偶聯物+未修飾抗體	偶聯物	偶聯物+未修飾抗體
Ishikawa	0.05	1.0	0.05	2.0
KB	0.005	1.0	0.005	0.8
NCI-H2110	0.1	4.0	0.1	7.0

實例30. 單次劑量之huMOV19-90偶聯物針對雌性SCID小鼠中NCI-H2110 NSCLC異種移植物之抗腫瘤活性

【0448】 自Charles River Laboratories獲得6周齡之雌性CB.17 SCID小鼠。藉由在右側腹中皮下注射，用懸浮於0.1 ml 50%基質膠/無血清培養基中之1 × 10⁷個NCI-H2110腫瘤細胞接種小鼠。當腫瘤體積達到約100 mm³ (接種後第7天)

時，基於腫瘤體積將動物隨機分入4個組中，每組6只小鼠。第1天(接種後第8天)，動物接受單次靜脈內施用之媒劑對照物(每只小鼠0.2 ml)，或基於化合物**90**濃度之1 µg/kg、3 µg/kg及5 µg/kg的**huMOV19-90**。

【0449】 每週兩到三次使用測徑器以三個尺寸量測腫瘤大小。腫瘤體積係使用式 $V = \text{長度} \times \text{寬度} \times \text{高度} \times \frac{1}{2}$ 計算，以 mm^3 表示。當腫瘤體積減小50%或更多時，認為小鼠具有部分消退(PR)，當無法偵測到明顯腫瘤時，認為具有完全腫瘤消退(CR)。腫瘤體積係藉由StudyLog軟體測定。

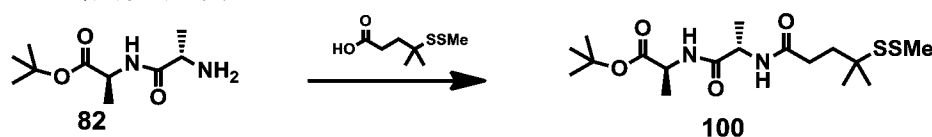
【0450】 腫瘤生長抑制(T/C值)係使用下式測定：

$$T/C (\%) = \text{治療組之中值腫瘤體積} / \text{對照組之中值腫瘤體積} \times 100。$$

【0451】 當媒劑對照組之腫瘤體積達到預定大小1000 mm^3 時，同時測定治療組(T)及媒劑對照組(C)之腫瘤體積。測定每一治療組之每日中值腫瘤體積，包括無腫瘤小鼠(0 mm^3)。根據NCI標準， $T/C \leq 42\%$ 為抗腫瘤活性之最低水準。 $T/C < 10\%$ 被視為高抗腫瘤活性水準。

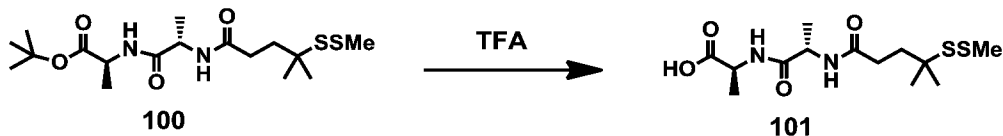
【0452】 如圖14中所示，**huMOV19-90**偶聯物在3 µg/kg劑量下具有活性且在5 µg/kg劑量下具有高活性。

實例31. 合成化合物107

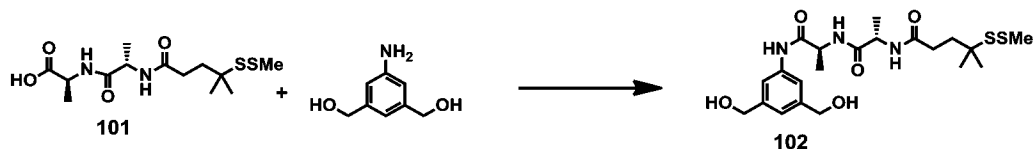


【0453】 **步驟1**：將化合物**82** (500 mg, 2.31 mmol)、4-甲基-4-(甲基二硫基)戊酸(449 mg, 2.31 mmol)、EDC·HCl (465 mg, 2.43 mmol)、HOBt (354 mg, 2.31 mmol)及DIPEA (0.81 mL, 4.62 mmol)溶解於DMF (7.7 mL)中且攪拌隔夜，直至反應完成。反應物用乙酸乙酯稀釋且用飽和碳酸氫鈉、飽和氯化銨洗滌且用水洗滌兩次。乾燥有機物並真空濃縮，得到化合物**100** (875 mg, 96%產率)，直接用於下一步驟中。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO): δ 8.15 (d, 1H, $J = 6.8$ Hz), 8.02

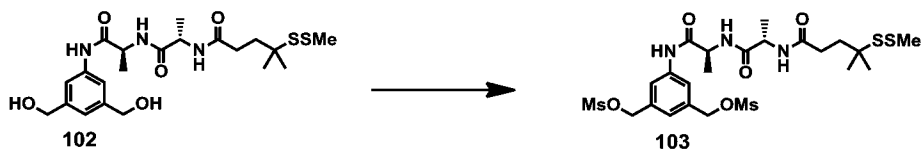
(d, 1H, $J = 6.8$ Hz), 4.26-4.33 (m, 1H), 4.03-4.12 (m, 1H), 2.41 (s, 3H), 2.18-2.22 (m, 2H), 1.76-1.80 (m, 2H), 1.39 (s, 9H), 1.24 (s, 6H), 1.24 (d, 3H, $J = 7.2$ Hz), 1.19 (d, 3H, $J = 7.2$ Hz)。



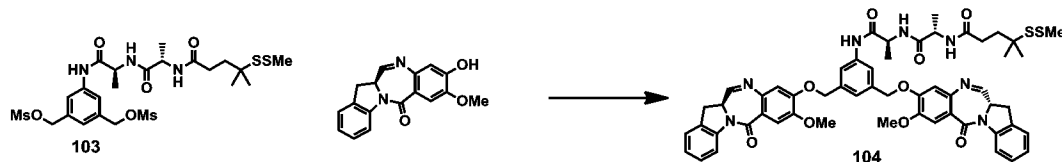
【0454】 步驟2：將TFA (2.6ml)及水(0.17ml)添加至淨化合物**100** (875 mg, 2.23 mmol)中且在室溫下攪拌，直至反應完成。稀釋反應物且使其與乙腈共沸，得到粘性油狀物。接著將其用乙腈及水稀釋，冷凍並凍乾，得到呈灰白色固體狀之化合物**101** (1 g, 100%產率)，不經進一步純化即使用。LCMS = 3.99 min (8分鐘方法)。MS (m/z): 337.0 ($M + 1$)⁺。



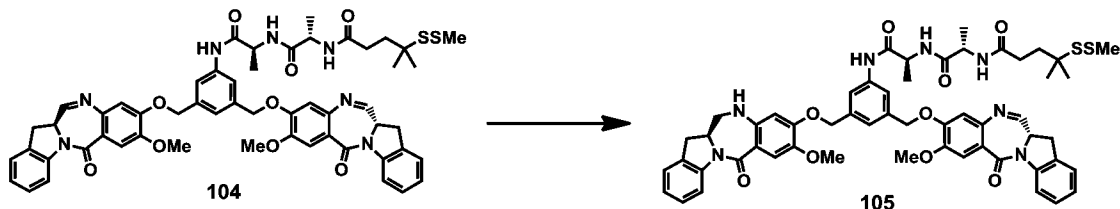
【0455】 步驟3：將化合物**101** (923 mg, 1.65mmol)及(5-胺基-1,3-伸苯基)二甲醇(240mg, 1.57mmol)溶解於DMF (5.2ml)中。在室溫下添加EDC·HCl (601 mg, 3.13 mmol)及DMAP (96 mg, 0.78 mmol)且在室溫下攪拌反應隔夜。反應物用乙酸乙酯稀釋且用水洗滌三次。乾燥有機層，真空濃縮且藉由矽膠層析法(DCM/MeOH)純化，得到化合物**102** (150 mg, 20%產率)。LCMS = 3.91 min (8分鐘方法)。MS (m/z): 472.2 ($M + 1$)⁺。¹H NMR (400 MHz, MeOD): δ 9.69 (s, 1H), 8.21 (d, 1H, $J = 6.8$ Hz), 8.18 (d, 1H, $J = 6.8$ Hz), 7.52 (s, 2H), 7.12 (s, 1H), 4.58 (s, 4H), 4.44-4.48 (m, 1H), 4.29-4.32 (m, 1H), 3.34 (s, 2H), 2.38 (s, 3H), 2.34-2.40 (m, 2H), 1.90-1.95 (m, 2H), 1.43 (d, 3H, $J = 7.2$ Hz), 1.36 (d, 3H, $J = 7.2$ Hz), 1.30 (s, 6H)。



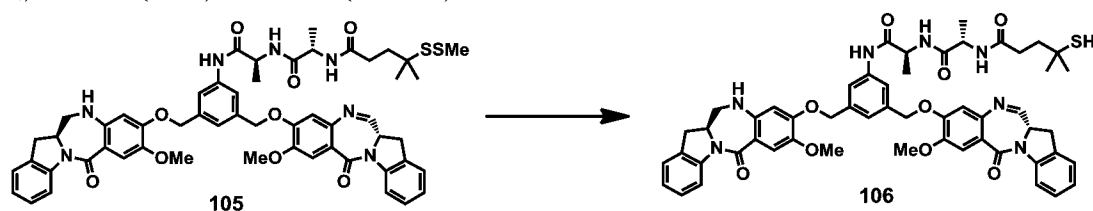
【0456】 步驟4：化合物**102**係以與實例9中化合物**94**類似之方式製備。粗物質在高真空下乾燥，得到化合物**103** (174 mg, 101%產率)，不經進一步純化即直接用於下一步驟中。LCMS = 4.95 min (8分鐘方法)。



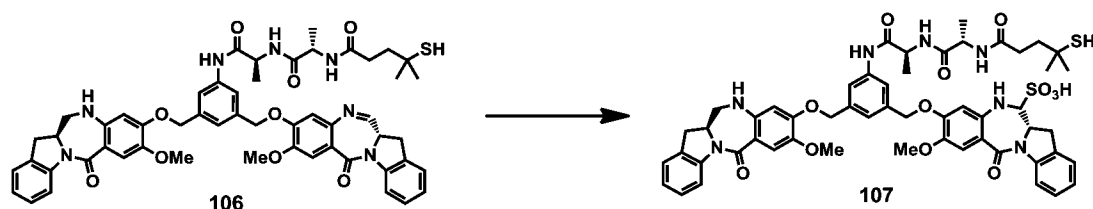
【0457】 步驟5：化合物**103**係以與實例7中化合物**57**類似之方式製備。粗固體含有化合物**104** (203 mg, 44%產率, 60%純度)，不經進一步純化即使用。LCMS = 5.68 min (8分鐘方法)。MS (m/z): 1024.3(M + 1)⁺。



【0458】 步驟6：化合物**104**係以與實例1中化合物**12**類似之方式製備。粗殘餘物藉由RPHPLC (C18管柱, CH₃CN/H₂O, 梯度50%至65%)純化，得到呈固體狀之單亞胺化合物**105** (22 mg, 16%產率, 90%純度)。LCMS = 6.00 min (8分鐘方法)。MS (m/z): 1027.3(M + 1)⁺。



【0459】 步驟7：在室溫下，將化合物**106**溶解於THF (0.5 mL)及ACN (0.23 mL)中。接著以與實例9中化合物**98**類似之方式製備。攪拌混合物直至完成且接著用DCM及DI水稀釋。有機層用鹽水洗滌，乾燥並過濾。濃縮濾液，得到粗硫醇，即化合物**106** (21 mg, 100%產率)，直接用於下一反應中。LCMS = 5.67 min (8分鐘方法)。MS (m/z): 980.4 (M + 1)⁺。



【0460】 **步驟8**：將化合物**106** (21 mg, 0.021 mmol)懸浮於2-丙醇(1428 μ l)及水(714 μ l)中。添加偏亞硫酸氫鈉(22.30 mg, 0.214 mmol)且在室溫下攪拌反應直至完成。反應混合物用乙腈/水稀釋，冷凍並凍乾。所得白色粉末藉由RPHPLC (C18管柱，CH₃CN/H₂O，梯度20%至40%)純化且收集所需溶離份並凍乾，得到化合物**107** (5.3 mg, 23%產率)。LCMS = 5.67 min (8分鐘方法)。MS (m/z): 1060.2 (M - 1)⁻。

實例32. huMOV19-磺基-SPDB-**107** (或huMOV19-**107**)偶聯物之製備

【0461】 將在琥珀酸鹽緩衝液(pH 5)：DMA (30 : 70)中含有最終濃度為1.95 mM之化合物**107**及1.5 mM磺基-SPDB連接子的原位混合物溫育6小時，隨後將7倍過量的**107**-磺基-SPDB-NHS添加至在15 mM HEPES pH 8.5 (87:13，水：DMA)中含有4 mg/ml huMOV19抗體之反應物中。使該溶液在25°C下偶聯隔夜。

【0462】 反應後，使用NAP脫鹽柱(Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare)純化該偶聯物且緩衝液交換成10 mM Tris、80 mM NaCl、50 μ M亞硫酸氫鹽、3.5%蔗糖、0.01% Tween-20配製緩衝液(pH 7.6)。在4°C下，利用Slide-a-Lyzer透析盒(ThermoScientific 10,000 MWCO)以相同緩衝液透析隔夜。

【0463】 發現經純化之偶聯物每個抗體連接有平均2.7個分子之化合物**107**(藉由UV/Vis及SEC，對於化合物**107**，使用莫耳消光係數 $\epsilon_{330\text{ nm}} = 15,484\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ 及 $\epsilon_{280\text{ nm}} = 30,115\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ，且對於huMOV19抗體，使用 $\epsilon_{280\text{ nm}} = 201,400\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)，具有95%單體(藉由尺寸排阻層析法)且最終蛋白質濃度為1.1 mg/ml。MS光譜資料顯示於圖16中。

實例33. 單次劑量之huML66-90偶聯物針對雌性SCID小鼠中NCI-H1703 NSCLC異種移植植物之抗腫瘤活性

第 186 頁，共 193 頁(發明說明書)

FCP-066399

【0464】 自Charles River Laboratories獲得6周齡之雌性CB.17 SCID小鼠。藉由在右側腹中皮下注射，用懸浮於0.2 ml 50%基質膠/無血清培養基中之 5×10^6 個NCI-H1703腫瘤細胞接種小鼠。當腫瘤體積達到約100 mm³ (接種後第16天)時，基於腫瘤體積將動物隨機分入4個組中，每組6只小鼠。第1天(接種後第17天)，動物接受單次靜脈內施用之媒劑對照物(每只小鼠0.1 ml)，或基於化合物**90**濃度之5 µg/kg、20 µg/kg及50 µg/kg的**huML66-90**偶聯物。

【0465】 每週兩到三次使用測徑器以三個尺寸量測腫瘤大小。腫瘤體積係使用式 $V = \text{長度} \times \text{寬度} \times \text{高度} \times \frac{1}{2}$ 計算，以mm³表示。當腫瘤體積減小50%或更多時，認為小鼠具有部分消退(PR)，當無法偵測到明顯腫瘤時，認為具有完全腫瘤消退(CR)。腫瘤體積係藉由StudyLog軟體測定。

【0466】 腫瘤生長抑制(T/C值)係使用下式測定：

$$T/C (\%) = \text{治療組之中值腫瘤體積} / \text{對照組之中值腫瘤體積} \times 100。$$

【0467】 當媒劑對照組之腫瘤體積達到預定大小1000 mm³時，同時測定治療組(T)及媒劑對照組(C)之腫瘤體積。測定每一治療組之每日中值腫瘤體積，包括無腫瘤小鼠(0 mm³)。根據NCI標準， $T/C \leq 42\%$ 為抗腫瘤活性之最低水準。 $T/C < 10\%$ 被視為高抗腫瘤活性水準。

【0468】 如圖17中所示，**huML66-90**偶聯物在20 µg/kg及50 µg/kg下具有高活性，其中20 µg/kg為最低有效劑量(MED)。

實例34. 單次劑量之**huMov19-90**偶聯物在雌性CD-1小鼠中之藥物動力學

【0469】 自Charles River Laboratories獲得7周齡之雌性CD-1 小鼠。小鼠接受經側尾靜脈以單次靜脈內快速注射單次靜脈內施用的**huMov19-90**偶聯物。每只小鼠接受基於Ab之2.5 mg/kg劑量。該劑量及注射體積係基於每只小鼠之體重個別地考慮。注射係使用配備27號½吋針之1.0 mL注射器進行。在施用**huMov19-90**偶聯物之後2分鐘及30分鐘，以及2小時、4小時及8小時，及1天、2

天、3天、5天、7天、10天、14天、21及28天，藉由吸入異氟烷使小鼠麻醉，且經由右眼眶後血竇自小鼠收集約150 μ L血液放入肝素化之毛細管中。在每一時間點(自0至21天)，自一組全部三隻小鼠收集血液。各組依序抽血；由此使該組中之小鼠在24小時之時段內不會抽血超過兩次。在最後一個時間點，即在施藥後28天，所有小鼠均納入樣品收集。對血液樣品離心以分離血漿。對於每一樣品及時間點，將30 μ L血漿轉移至獨立標記之微量離心管中，且接著在-80°C下冷凍儲存以便隨後藉由ELISA分析，使用抗吲哚啉并苯并二氮呋抗體，測定總Ab(未偶聯Ab加完整偶聯物)及完整偶聯物之濃度。

【0470】 如圖18中所示，**huMov19-90**偶聯物具有與該抗體類似之清除率。

實例35. 藉由用蛋白質A樹脂親和力捕獲來富集分解代謝物

【0471】 在5 × T150組織培養盤中培養表現葉酸受體 α (FR α)之KB細胞。37°C下，在用5% CO₂緩衝之潮濕恆溫箱中將飽和量的FR α 靶向性**huMov19-90**偶聯物與KB細胞一起孵育24小時。24小時之後，採集含有細胞流出之分解代謝物之培養基且彙集用於隨後分析。

【0472】 藉由在4°C下孵育隔夜，使飽和量之抗吲哚啉并苯并二氮呋抗體結合至蛋白質A樹脂之漿液。在端至端旋轉器上，用25 mL培養基孵育1 mL預先結合之蛋白質A/抗吲哚啉并苯并二氮呋抗體複合物數小時。以1000 rpm輕柔地離心樹脂且傾析上清液。用PBS洗滌結合至分解代謝物之蛋白質A/抗吲哚啉并苯并二氮呋抗體樹脂。藉由丙酮萃取將分解代謝物釋放至有機相中。將分解代謝物真空乾燥隔夜，直至有機溶液完全蒸發。分解代謝物用20%乙腈水溶液複水，且藉由LC-MS進行分析。

MS分析

【0473】 藉由UHPLC/MS/MS，使用Q-Exactive高解析度質譜儀(Thermo)鑒別細胞分解代謝物。使用萃取離子層析圖(XIC)鑒別並表徵靶細胞分解代謝

物。鑒別含有特徵性吡啶并苯并二氮呋(286 m/z)質量標誌之所有分解代謝物質(參見圖19A及19B)。

實例36. 單次劑量之huMov19-90針對雌性CB.17 SCID小鼠中之NCI-H2110 NSCLC異種移植物、Hec-1b子宮內膜異種移植物及Ishikawa子宮內膜異種移植物之抗腫瘤活性

【0474】 自Charles River Laboratories獲得6周齡之雌性CB.17 SCID小鼠。藉由在右側腹中皮下注射，用懸浮於0.1 ml 50%基質膠/無血清培養基中之 1×10^7 個NCI-H2110腫瘤細胞接種一組小鼠。藉由在右側腹中皮下注射，用懸浮於0.1 ml 無血清培養基中之 1×10^7 個Hec-1b腫瘤細胞接種第二組小鼠。藉由在右側腹中皮下注射，用懸浮於0.1 ml 50%基質膠/無血清培養基中之 1×10^7 個Ishikawa腫瘤細胞接種第三組小鼠。

【0475】 當腫瘤體積達到約100 mm³ (NCI-H2110在接種後第7天，Hec-1b在接種後第7天且Ishikawa在接種後第17天)時，基於腫瘤體積，將動物隨機分成陣列，每組6只小鼠。

【0476】 在NCI-H2110異種移植物實驗中，小鼠在第1天(接種後第8天)接受單次靜脈內施用的媒劑對照物(每只小鼠0.2 ml)或基於藥物濃度之1 µg/kg、3 µg/kg或5 µg/kg的huMov19-90。

【0477】 在Hec-1b異種移植物實驗中，小鼠在第1天(接種後第8天)接受單次靜脈內施用的媒劑對照物(每只小鼠0.2 ml)或基於藥物濃度之10 µg/kg或30 µg/kg的huMov19-90，或30 µg/kg的非靶向性對照偶聯物chKTI-90。

【0478】 在Ishikawa異種移植物實驗中，小鼠在第1天(接種後第18天)接受單次靜脈內施用的媒劑對照物(每只小鼠0.2 ml)或基於藥物濃度之10 µg/kg或30 µg/kg的huMov19-90，或30 µg/kg的非靶向性對照偶聯物chKTI-90。

【0479】 對於所有實驗，每週兩到三次使用測徑器以三個尺寸量測腫瘤大

小。腫瘤體積係使用式 $V = \text{長度} \times \text{寬度} \times \text{高度} \times \frac{1}{2}$ 計算，以 mm^3 表示。當腫瘤體積減小50%或更多時，認為小鼠具有部分消退(PR)，當無法偵測到明顯腫瘤時，認為具有完全腫瘤消退(CR)。腫瘤體積係藉由StudyLog軟體測定。

【0480】 腫瘤生長抑制(T/C值)係使用下式測定：

$$T/C (\%) = \text{治療組之中值腫瘤體積} / \text{對照組之中值腫瘤體積} \times 100。$$

【0481】 當媒劑對照組之腫瘤體積達到預定大小 1000 mm^3 時，同時測定治療組(T)及媒劑對照組(C)之腫瘤體積。測定每一治療組之每日中值腫瘤體積，包括無腫瘤小鼠(0 mm^3)。根據NCI標準， $T/C \leq 42\%$ 為抗腫瘤活性之最低水準。 $T/C < 10\%$ 被視為高抗腫瘤活性水準。

【0482】 如圖22中所示，在NCI-H2110異種移植物模型中，huMov19-90偶聯物在 $1 \mu\text{g/kg}$ 劑量下不具活性，在 $3 \mu\text{g/kg}$ 劑量下具有活性且具有13%之T/C及1/6 PR，並在 $5 \mu\text{g/kg}$ 劑量下具有高活性且具有2%之T/C、6/6 PR及4/6 CR。

【0483】 如圖23中所示，在Hec-1b異種移植物模型中，huMov19-90偶聯物在 $10 \mu\text{g/kg}$ 劑量下具有活性且具有15%之T/C及1/6 PR，並在 $30 \mu\text{g/kg}$ 劑量下具有高活性且具有9%之T/C、6/6 PR及6/6 CR。非靶向性對照偶聯物chKTI-90在 $30 \mu\text{g/kg}$ 劑量下具有活性，且T/C為34%。

【0484】 如圖24中所示，在Ishikawa異種移植物模型中，huMov19-90偶聯物在 $10 \mu\text{g/kg}$ 劑量下具有活性且具有27%之T/C、6/6 PR及6/6 CR，並在 $30 \mu\text{g/kg}$ 劑量下具有活性且具有15%之T/C、6/6 PR及6/6 CR。非靶向性對照偶聯物chKTI-90在 $30 \mu\text{g/kg}$ 劑量下具有活性，且具有24%之T/C及4/6 PR。

實例37. 單次劑量之huMov19-107針對雌性CB.17 SCID小鼠中NCI-H2110 NSCLC異種移植物之抗腫瘤活性

【0485】 根據以上實例30中所描述之方案，在SCID小鼠中測定huMOV19-107之活體內抗腫瘤活性。如圖25中所示，huMov19-107偶聯物在10

μg/kg劑量下具有高活性且具有6/6 CR。

實例38. CD123-90偶聯物之結合親和力

【0486】 使用HNT-34細胞，藉由流動式細胞測量術分析示例性人類化抗CD123抗體，即huCD123-6Gv4.7S3抗體之ADC偶聯物的結合親和力，並將其與相應未偶聯抗體相比較。將HNT-34細胞(每份樣品 5×10^4 個細胞)與在200 μL FACS緩衝液(補充有2%正常山羊血清之DMEM培養基)中不同濃度之ADC及未偶聯huCD123-6Gv4.7S3抗體一起孵育。接著使細胞集結成團，洗滌兩次，並與100 μL藻紅蛋白(PE)偶聯之山羊抗人IgG抗體(Jackson Laboratory)一起孵育1小時。再使細胞集結成團，用FACS緩衝液洗滌且使其再懸浮於含有1%甲醛之200 μL PBS中。使用帶有HTS多孔取樣器之FACSCalibur流式細胞儀，或FACS陣列流式細胞儀獲取樣品，且使用CellQuest Pro (均來自BD Biosciences, San Diego, US)進行分析。對於每一樣品，計算出FL2之幾何平均螢光強度且在半對數曲線中針對抗體濃度作圖。藉由非線性回歸生成劑量-反應曲線，且使用GraphPad Prism v4 (GraphPad software, San Diego, CA)計算每一曲線之EC50值，其對應於每一抗體之表觀解離常數(Kd)。

【0487】 如圖26中所示，偶聯僅適度地影響示例性抗CD123抗體之結合親和力。

實例39. huCD123-90之活體外細胞毒性活性

【0488】 使用活體外細胞毒性分析量測huCD123-6(一種抗CD123抗體)之抗體-藥物偶聯物(ADC)殺滅在細胞表面上表現CD123之細胞的能力。在由細胞供應商(ATCC或DSMZ)所推薦之細胞培養基中培養細胞株。將細胞以100 μL培養基中2,000至10,000個添加至平底96孔盤之每個孔中。為了阻斷細胞表面上之Fc受體，細胞培養基補充有100 nM chKTI抗體(屬於相同同型之抗體)。使用3倍連續稀釋在培養基中稀釋偶聯物，且每孔添加100 μL。為了確定不依賴於CD123

之細胞毒性貢獻，在測試偶聯物之前，向一些孔中添加CD123阻斷劑(例如100 nM chCD123-6抗體)。在每一分析盤中納入含有細胞及培養基但無偶聯物之對照孔，以及僅含培養基之孔。對於每一資料點，一式三份進行分析。在37℃下，在含6% CO₂之潮濕恆溫箱中孵育該等盤4至7天。接著，使用基於WST-8之Cell Counting Kit-8 (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Rockville, MD)測定每個孔中存活細胞之相對數量。藉由首先針對培養基背景吸光度校正，且接著用每一值除以對照孔(未處理孔)中該等值之平均值來計算每個孔中細胞之表觀存活分數。將細胞存活分數以半對數曲線針對偶聯物濃度作圖。

【0489】 在本研究中使用了不同起源(AML、B-ALL、CML及NHL)的十五種CD123陽性細胞株(表4)。大多數細胞株源自於帶有惡性腫瘤且具有至少一個不良預後因子(例如P-糖蛋白之過表現、EVI1之過表現、p53改變、DNMT3A突變、FLT3內部串聯重複)的患者。該等偶聯物對該等細胞株展現高效力且IC₅₀值在亞皮莫耳濃度至低奈莫耳濃度範圍內(表4)。

表4. huCD123-6-90偶聯物針對不同起源之CD123陽性細胞株之活體外細胞毒性

細胞株	起源	不良預後因子	IC ₅₀ (M)
THP1	AML	p53缺失	6.7E-12
SHI-1	AML	p53基因改變	1.3E-11
KO52	AML	p53突變，Pgp過表現	1.4E-11
KASUMI-3	AML	EVI1及Pgp過表現	9.8E-12
KG-1	AML	p53突變，Pgp過表現	2.2E-10
OCI-AML2	AML	DNMT3A突變	8.8E-11
HNT-34	AML	MECOM (EVI1)過表現	2.0E-12
MV4-11	AML	FLT3內部串聯重複	5.6E-13
MOLM-13	AML	FLT3內部串聯重複	4.9E-13
EOL-1	AML		2.5E-12
MOLM-1	CML	EVI1及Pgp過表現	2.9E-11
KOPN8	B-ALL		1.1E-11
JM-1	B-ALL		2.4E-11
KCL-22	CML		3.0E-11
Granta519	NHL		1.2E-12

【0490】 本文引用之所有出版物、專利、專利申請、互聯網站及登錄號/

資料庫序列(包括多聚核苷酸及多肽序列)均以引用之方式整體併入本文中用於所有目的，其引用程度就如同特定且個別地指示每一個別出版物、專利、專利申請、互聯網站或登錄號/資料庫序列如此以引用之方式併入一般。

【符號說明】

無

【序列表】

<110> 免疫原公司(ImmunoGen, Inc.)

<120> 細胞毒性苯并二氮呋衍生物

<150> US 62/045,248

<151> 2014-09-03

<150> US 62/087,040

<151> 2014-12-03

<150> US 62/149,370

<151> 2015-04-17

<150> US 62/164,305

<151> 2015-05-20

<160> 29

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 特異性結合人葉酸受體1重鏈CDR1之人類化抗體或其抗原結合片段

<400> 1

Gly Tyr Phe Met Asn
1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 特異性結合人葉酸受體1重鏈CDR2之人類化抗體或其抗原結合片段

<220>

<221> X

<222> (14)..(14)

<223> Lys、Gln、His或Arg

<220>
<221> X
<222> (16)..(16)
<223> Gln、His、Asn或Arg

<220>
<221> X
<222> (17)..(17)
<223> Gly, GLu, Thr, Ser, Ala或Val

<220>
<221> X
<222> (17)..(17)
<223> Gly、Glu、Thr、Ser、Ala或Val

<400> 2

Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Xaa Phe Xaa
1 5 10 15

Xaa

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 特異性結合人葉酸受體1重鏈CDR3之人類化抗體或其抗原結合片段

<400> 3

Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 4
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 特異性結合人葉酸受體1輕鏈CDR1之人類化抗體或其抗原結合片段

<400> 4

Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala Gly Thr Ser Leu Met His
1 5 10 15

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 特異性結合人葉酸受體1輕鏈CDR2之人類化抗體或其抗原結合片段

<400> 5

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 特異性結合人葉酸受體1輕鏈CDR3之人類化抗體或其抗原結合片段

<400> 6

Gln Gln Ser Arg Glu Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 7
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 特異性結合人葉酸受體1重鏈CDR2之較佳人類化抗體或其抗原結合片段

<400> 7

Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 8
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 特異性結合人葉酸受體1重鏈的呈人類化抗體形式之抗葉酸受體抗體或其抗原結合片段

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	
			165					170						175		
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	
			180					185						190		
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	
			195				200						205			
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	
			210				215						220			
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	
225					230					235					240	
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	
				245					250						255	
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	
			260						265					270		
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	
			275					280					285			
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	
			290				295						300			
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	
305					310					315					320	
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	
				325						330					335	
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	
			340					345						350		
Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	

355 360 365

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

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

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

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

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

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

<220>
<223> 特異性結合人葉酸受體1輕鏈的呈人類化抗體形式之抗葉酸受體抗體或其抗原結合片段

<400> 9

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

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

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

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile Ser

I819474

65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg

 85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

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

<210>	10
<211>	218
<212>	PRT
<213>	人工序列

<220>

<223> 特異性結合人葉酸受體1輕鏈的呈人類化抗體形式之抗葉酸受體抗體或其抗原結合片段

 $\langle 400 \rangle$ 10

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1						5						10						15
Gln	Pro	Ala	Ile	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Phe	Ala			
			20					25					30					
Gly	Thr	Ser	Leu	Met	His	Trp	Tyr	His	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Gln	Pro			
			35					40					45					
Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ala	Gly	Val	Pro	Asp			
50						55					60							
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Lys	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser			
65					70					75					80			
Pro	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Arg			
				85					90					95				
Glu	Tyr	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg			
			100					105					110					
Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln			
115						120					125							
Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr			
130						135					140							
Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser			
145					150					155					160			
Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr			
				165					170					175				
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys			
			180					185					190					
His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro			
195							200					205						

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

<210> 11
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 特異性結合人葉酸受體1重鏈可變結構域的呈人類化抗體形式之抗葉酸受體抗體或其抗原結合片段

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 12
<211> 112
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 特異性結合人葉酸受體1輕鏈可變結構域的呈人類化抗體形式之抗葉酸受體抗體或其抗原結合片段

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

<210> 13

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 特異性結合人葉酸受體1輕鏈可變結構域的呈人類化抗體形式之抗葉酸受體抗體或其抗原結合片段

<400> 13

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

Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala

20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 14
<211> 445
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗體：huML66HC全長重鏈

<400> 14

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Leu Ser Leu Ala Ser Asn
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Asn His Gly Gly Thr Asp Tyr Asn Pro Ser Ile Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu

65					70						75					80
Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Phe	Cys	Val	
				85					90					95		
Arg	Lys	Gly	Gly	Ile	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Val	Leu	Val	
			100					105					110			
Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	
		115					120					125				
Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	
	130					135					140					
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	
145					150					155					160	
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	
				165					170					175		
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	
		180						185					190			
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	
		195					200					205				
Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	
	210					215					220					
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
225					230					235					240	
Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	
				245					250					255		
Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	
		260						265					270			

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- <210> 15
- <211> 213
- <212> PRT
- <213> 人工序列

<220>

<223> 抗體：huML66LC全長重鏈

<400> 15

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

Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Thr Leu Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Leu Ala Ser His Arg Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Pro Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg Asn Asp Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

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

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala

180185190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195200205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 16
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗EGFR抗體免疫球蛋白重鏈

<400> 16

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Ala Lys Pro Gly Ala
151015

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
202530

Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Cys Ile
354045

Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Thr Tyr Thr Gln Lys Phe
505560

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65707580

Met Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
859095

Ala Arg Tyr Asp Ala Pro Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100105110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115

120

125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 17
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗EGFR抗體免疫球蛋白輕鏈

<400> 17

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

His Tyr Thr Ser Thr Leu His Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Leu Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 18

<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗EGFR抗體免疫球蛋白輕鏈

<400> 18

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

His Tyr Thr Ser Thr Leu His Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Leu Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165170175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180185190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195200205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 19
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗CD19抗體重鏈

<400> 19

Gln Val Gln Leu Val Gln Pro Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
151015

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Asn
202530

Trp Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
354045

Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Asn Phe
505560

Gln Gly Lys Ala Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65707580

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
859095

Ala Arg Gly Ser Asn Pro Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100						105						110					
Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val		
115						120						125					
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala		
130						135						140					
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser		
145						150						160					
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val		
165						170						175					
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro		
180						185						190					
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys		
195						200						205					
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp		
210						215						220					
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly		
225						230						240					
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile		
245						250						255					
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu		
260						265						270					
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His		
275						280						285					
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg		
290						295						300					

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
450

<210> 20
<211> 211
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗CD19抗體輕鏈

<400> 20

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Gly	Val	Asn	Tyr	Met
			20					25					30		
His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Thr	Ser	Pro	Arg	Arg	Trp	Ile	Tyr
		35					40					45			
Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
	50					55					60				
Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Met	Glu	Pro	Glu
65					70					75				80	
Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	His	Gln	Arg	Gly	Ser	Tyr	Thr	Phe	Gly
				85					90					95	
Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val
			100					105					110		
Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser
		115					120					125			
Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln
	130					135					140				
Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val
145					150					155				160	
Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu
				165					170					175	
Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu
			180					185					190		
Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg

195

200

205

Gly Glu Cys
210

<210> 21
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗Muc1抗體重鏈

<400> 21

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

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

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Asp Ser Val Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

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

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys

130					135					140					
Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser
145					150					155					160
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser
				165					170					175	
Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser
			180					185					190		
Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn
	195						200					205			
Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His
210						215					220				
Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val
225					230					235					240
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr
				245					250					255	
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu
		260						265					270		
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys
	275						280					285			
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser
290						295					300				
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
305					310					315					320
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile
				325					330					335	

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

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

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

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

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

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

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

<210> 22
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗Muc1抗體輕鏈

<400> 22

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

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala His Ser Ser Val Ser Phe Met
20 25 30

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

Ser Thr Ser Ser Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Gly Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

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

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 23
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD33抗體免疫球蛋白重鏈

<400> 23

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

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

Tyr Ile His Trp Ile Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Val Ile Tyr Pro Gly Asn Asp Asp Ile Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Val Arg Leu Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

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

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

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

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180185190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195200205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210215220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225230235240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245250255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260265270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275280285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290295300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305310315320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325330335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340345350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355360365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370375380

Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp
385					390					395					400
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
				405					410					415	
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala
			420					425					430		
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	
		435					440					445			
<210> 24															
<211> 219															
<212> PRT															
<213> 人工序列															
<220>															
<223> 抗CD33抗體免疫球蛋白輕鏈															
<400> 24															
Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Pro	Gly
1			5					10					15		
Glu	Arg	Val	Thr	Met	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Val	Phe	Phe	Ser
			20					25					30		
Ser	Ser	Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Ile	Pro	Gly	Gln
		35					40					45			
Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Val
	50				55					60					
Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr
65				70					75					80	
Ile	Ser	Ser	Val	Gln	Pro	Glu	Asp	Leu	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	His	Gln
			85					90					95		

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 25
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗CD37抗體免疫球蛋白輕鏈

<400> 25

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

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Arg Ser Asn
20 25 30

Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Val																	
35			40			45																										
Asn	Val	Ala	Thr	Asn	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly																	
50			55			60																										
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ser	Leu	Lys	Ile	Asn	Ser	Leu	Gln	Pro																	
65			70			75			80																							
Glu	Asp	Phe	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Tyr	Trp	Gly	Thr	Thr	Trp																	
85			90			95																										
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala																	
100			105			110																										
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly																	
115			120			125																										
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala																	
130			135			140																										
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln																	
145			150			155			160																							
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser																	
165			170			175																										
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr																	
180			185			190																										
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser																	
195			200			205																										
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys																											
210																																
<210> 26																																

<211> 444
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗CD37抗體免疫球蛋白重鏈

<400> 26

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

Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Ser
20 25 30

Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Lys Lys Asp His Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

Lys Leu Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Lys Gly Gly Tyr Ser Leu Ala His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly

165170175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
180185190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
195200205

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
210215220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225230235240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245250255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260265270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275280285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290295300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305310315320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325330335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340345350

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355360365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

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

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

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

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

<210> 27
<211> 444
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗CD37抗體免疫球蛋白重鏈

<400> 27

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

Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Ser
20 25 30

Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Ser Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Lys Lys Asp His Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

Lys Leu Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Lys Gly Gly Tyr Ser Leu Ala His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

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

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

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

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

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

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

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

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys

275280285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290295300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305310315320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325330335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340345350

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355360365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370375380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385390395400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405410415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420425430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435440

<210> 28
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗CD37抗體免疫球蛋白輕鏈

<400> 28

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

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Thr Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Asn Leu Pro Tyr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Asp Asn Pro Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

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

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 29
<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗CD37抗體免疫球蛋白重鏈

<400> 29

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

Phe Ala Trp His Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Leu Tyr Ser Gly Ser Thr Val Tyr Ser Pro Ser Leu
50 55 60

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

Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Tyr Gly Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

325330335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340345350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355360365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370375380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385390395400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405410415

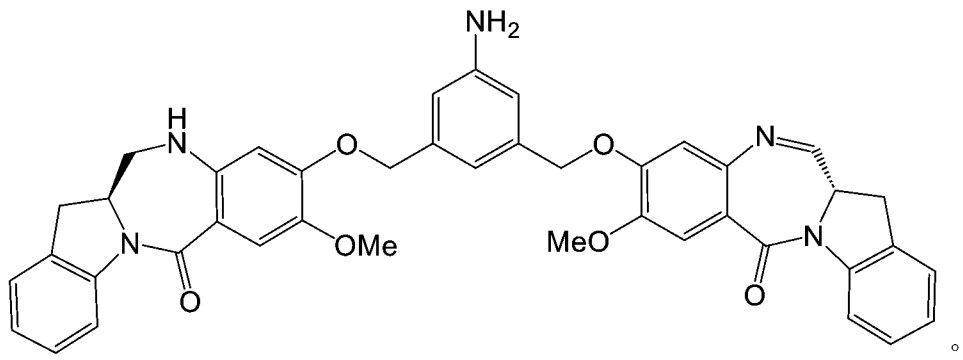
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420425430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435440445

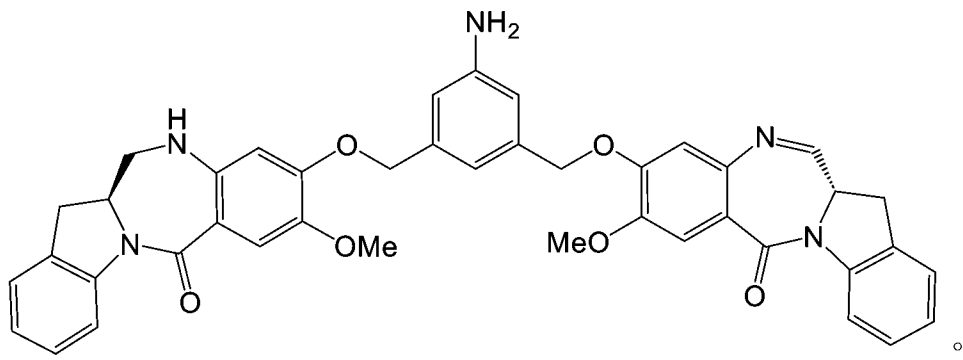
Gly

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種由下式表示之化合物或其醫藥學上可接受之鹽，

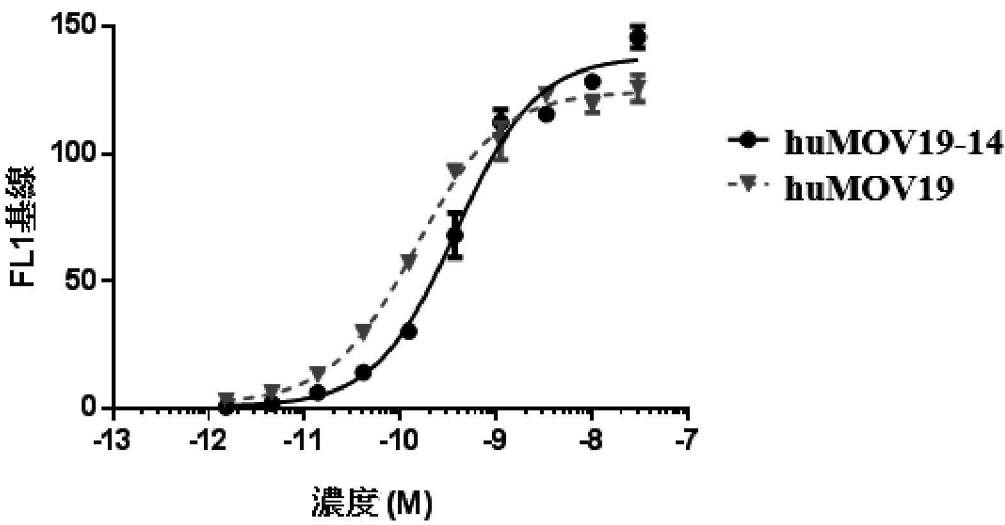


【請求項2】如請求項1之化合物，其中該化合物由下式表示



【發明圖式】

huMOV19-14 與 huMOV19 抗體在
T47D細胞上之結合親和力的比較



	huMOV19-14	huMOV19
EC50	3.793e-010	1.438e-010

圖 1

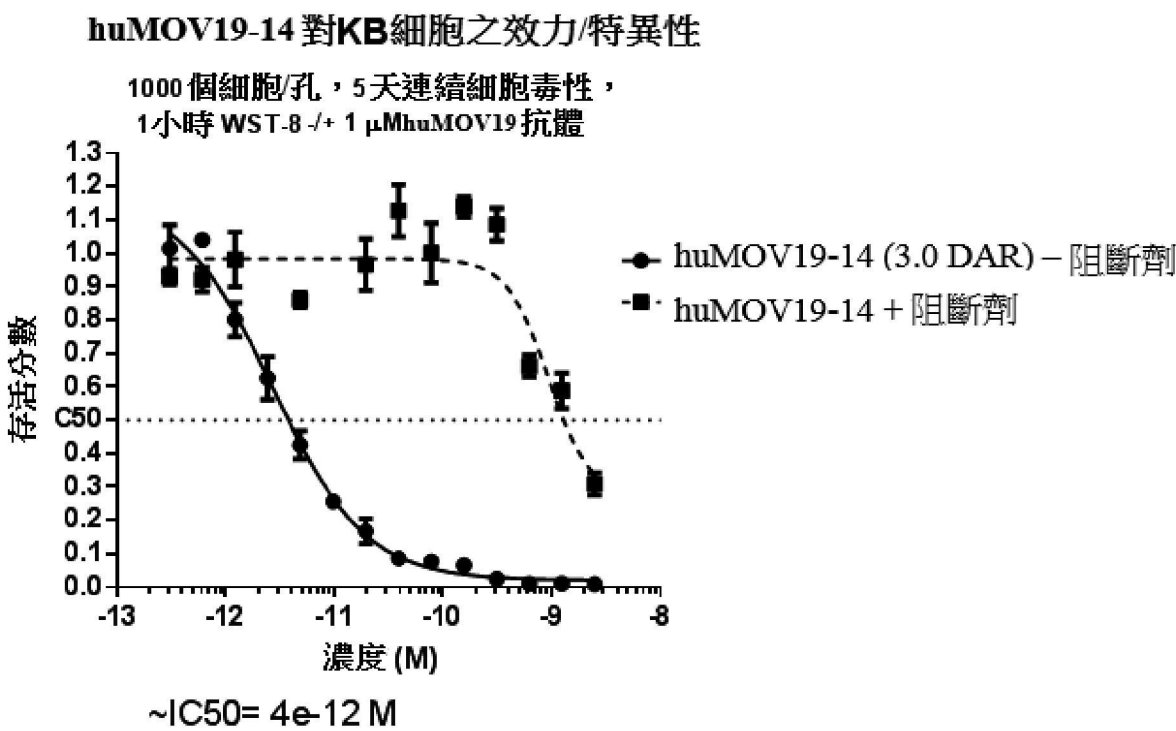


圖 2

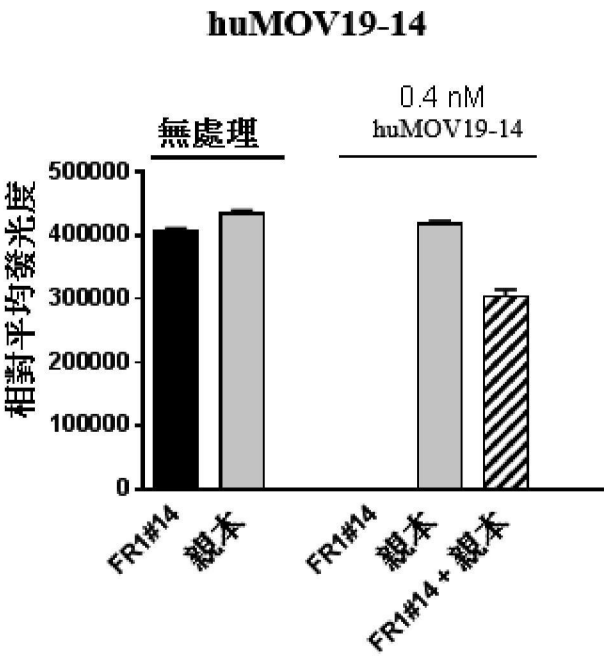


圖 3

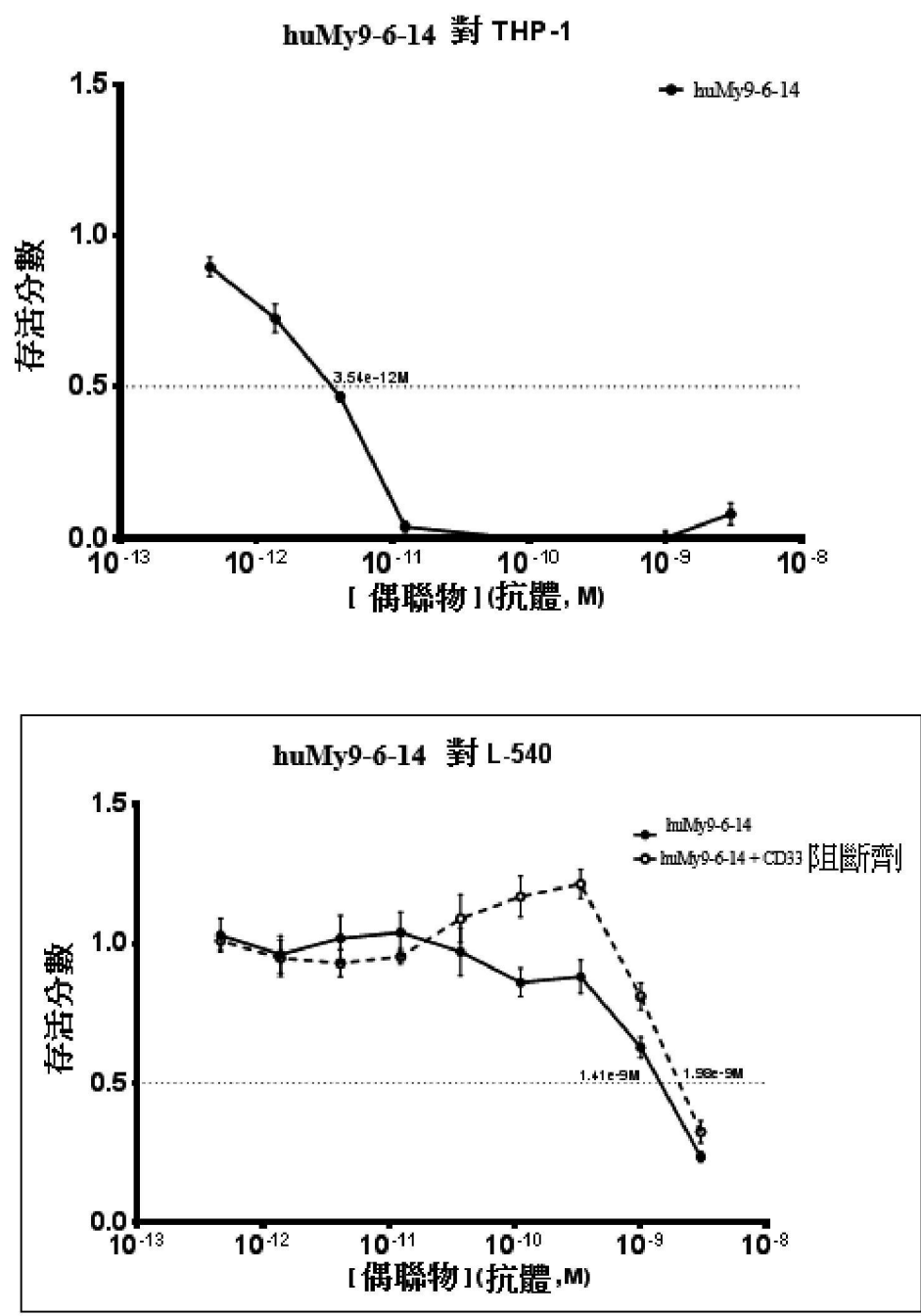


圖 4A

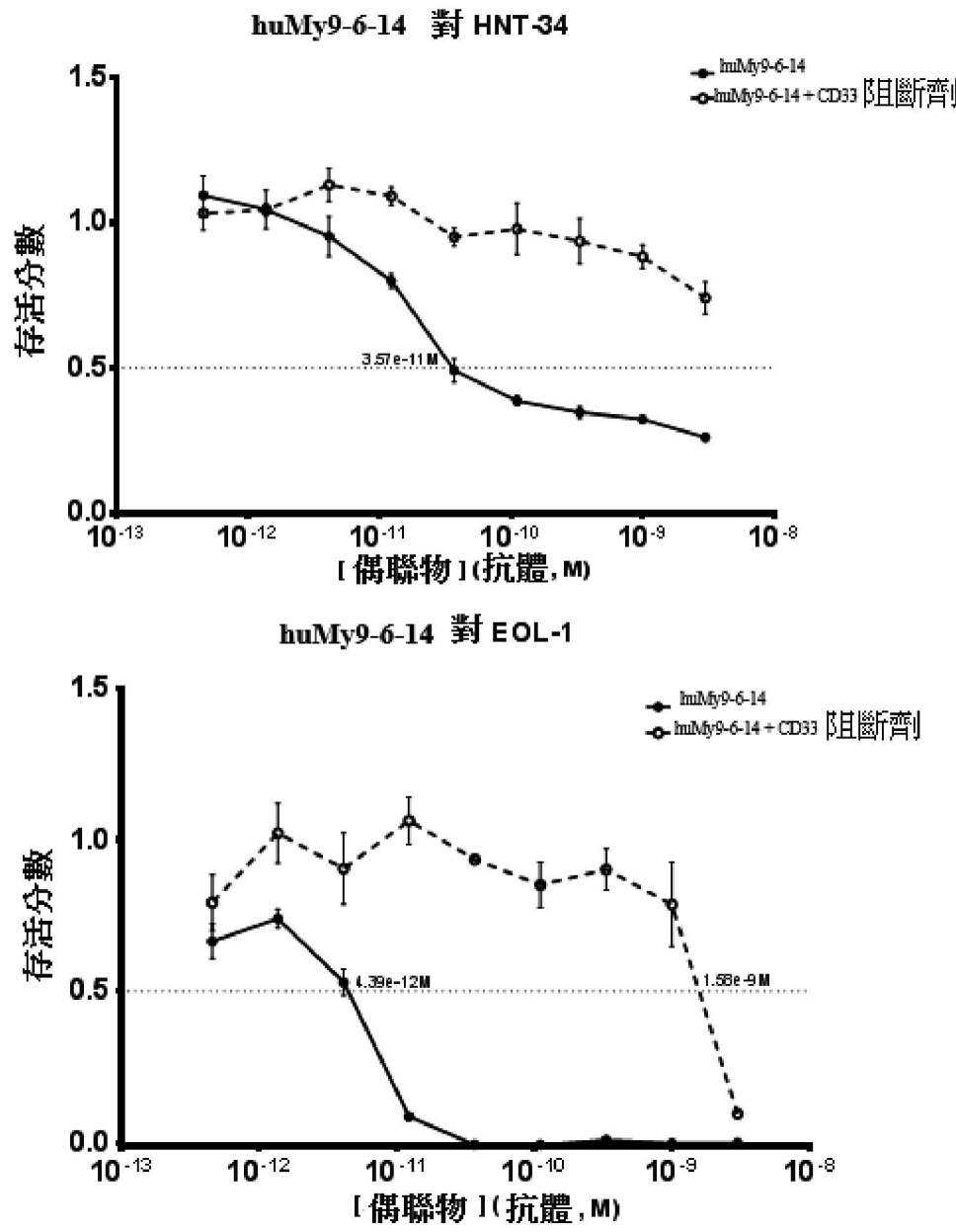


圖 4B

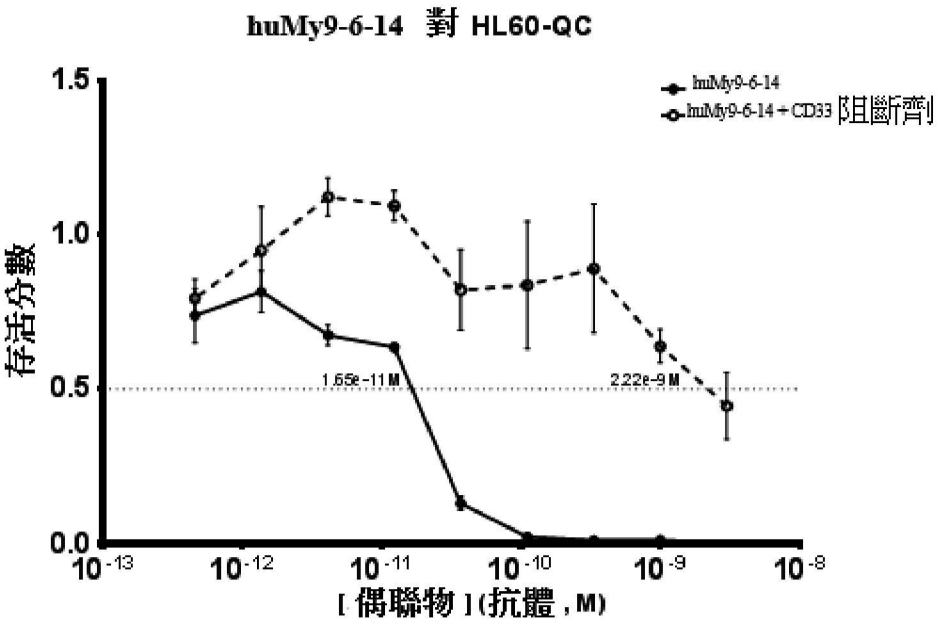


圖 4C

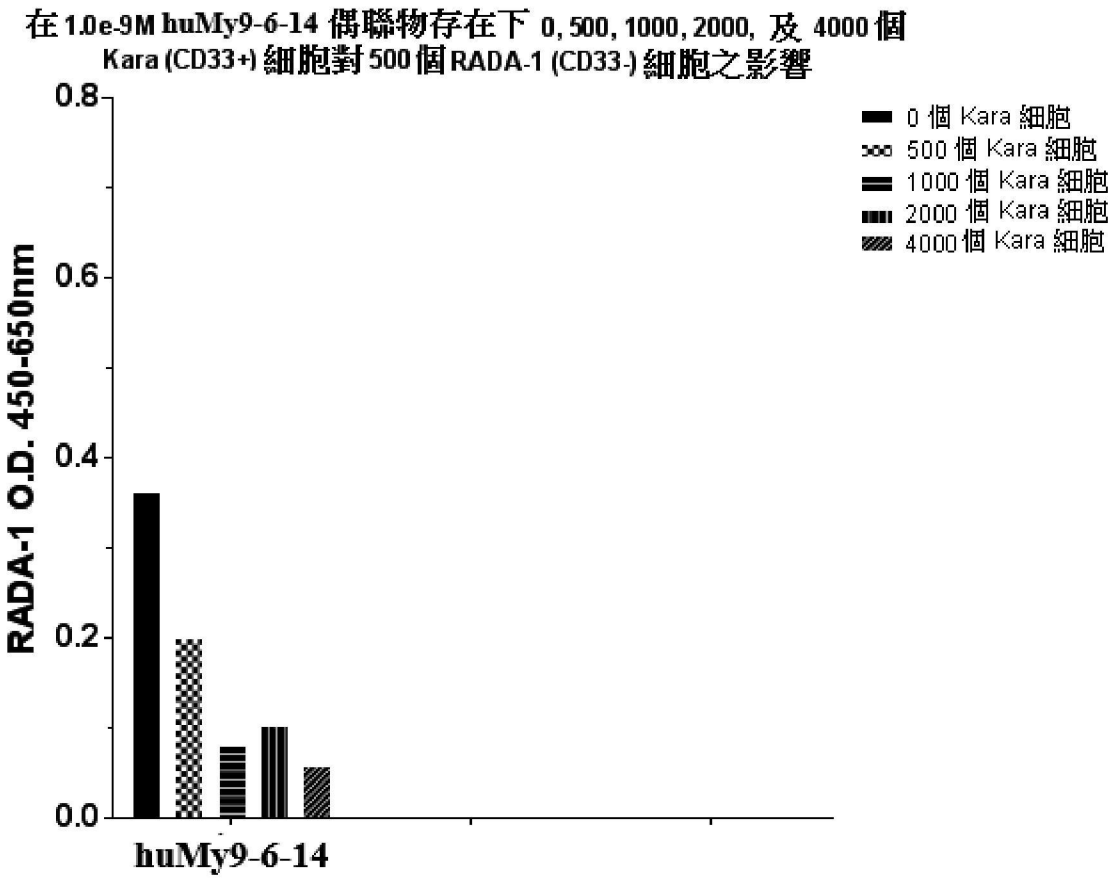


圖 5A

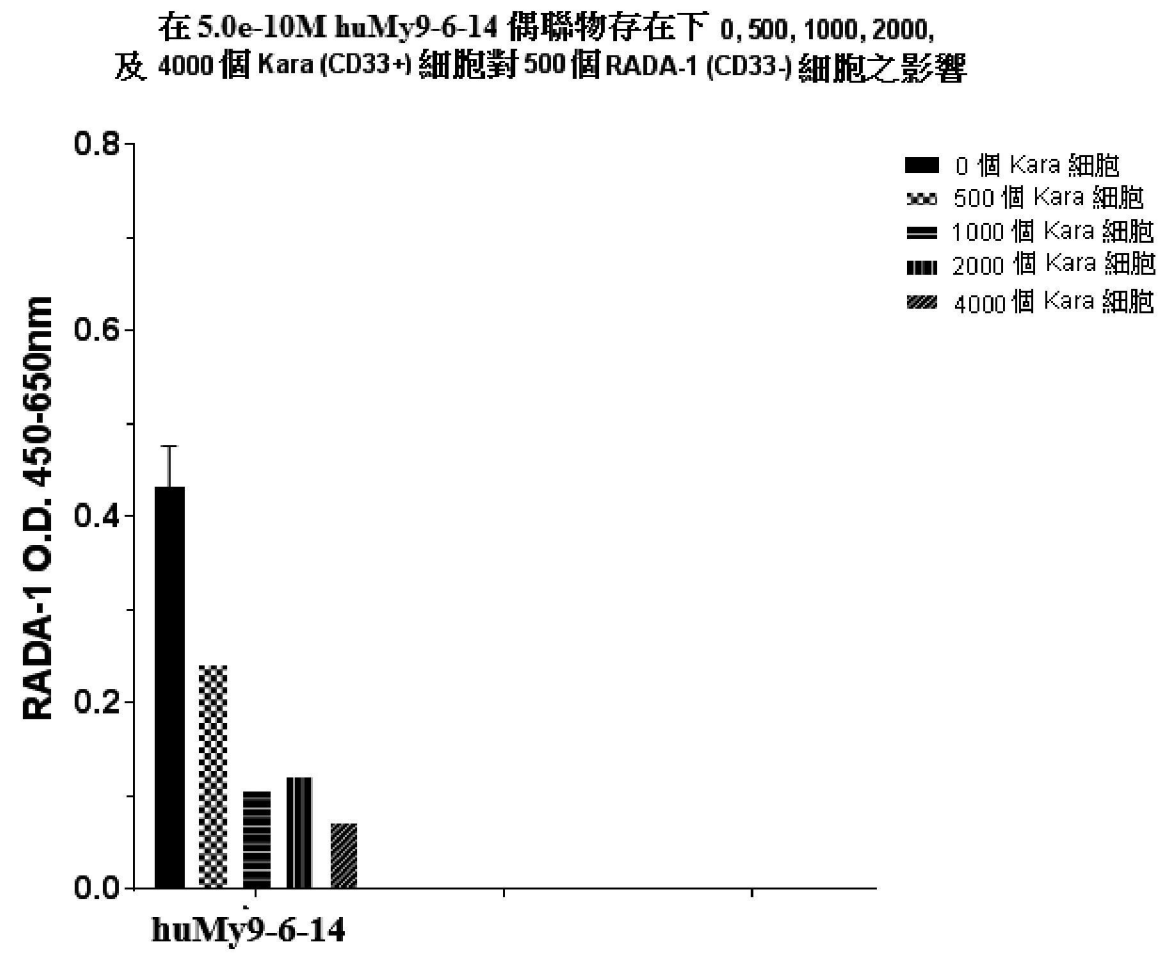
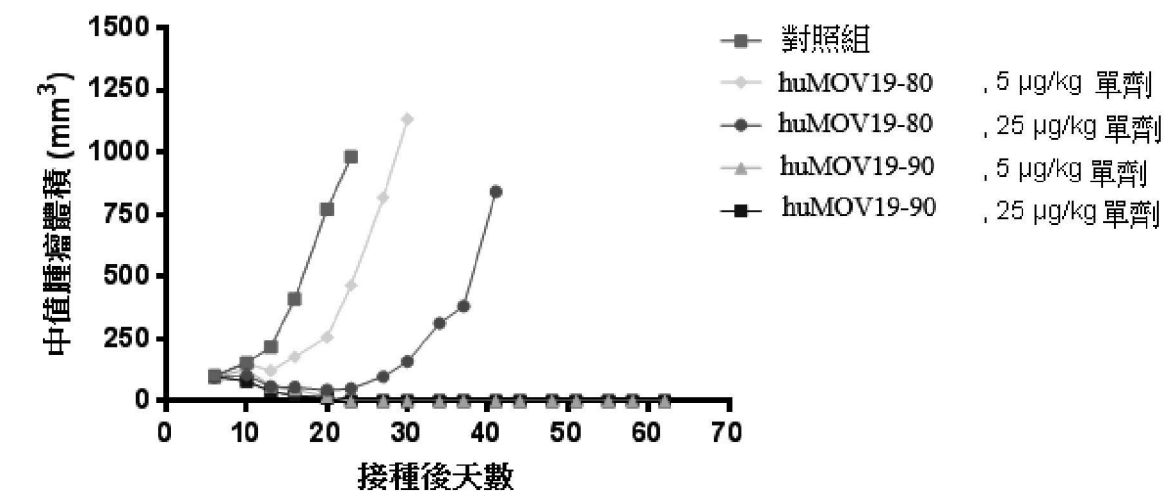


圖 5B

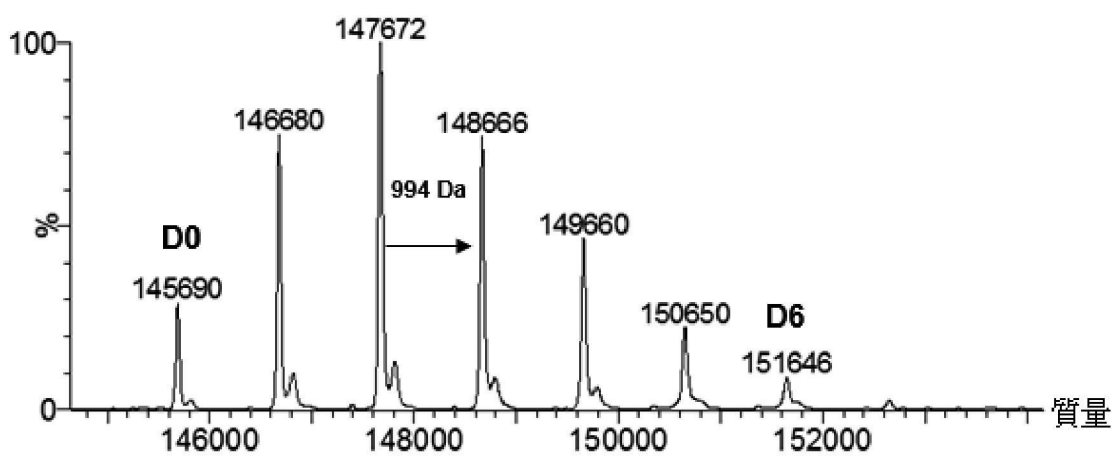
huMOV19-80及huMOV19-90在帶有NCI-H2110異種移植動物之SCID小鼠中之抗腫瘤活性
(中值腫瘤體積，mm³)



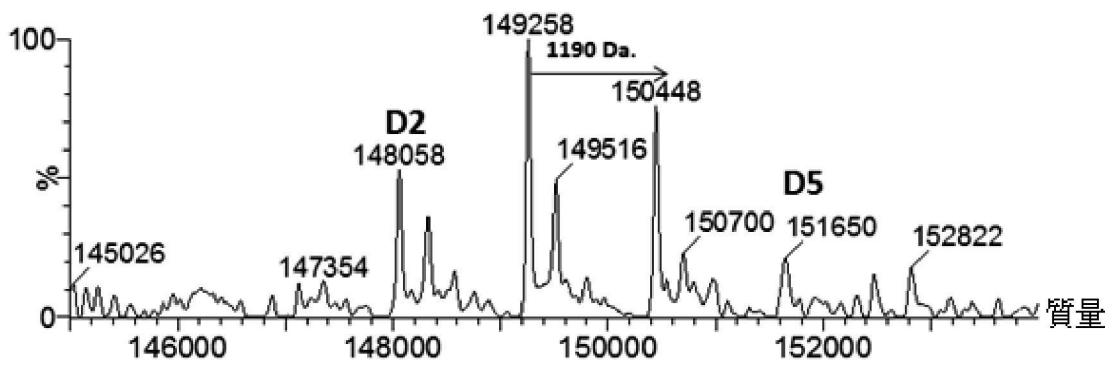
治療組		劑量 (ug/kg)	T/C (第23天)	消退		結果
				PR	CR	
A	對照組	-	-	-	-	-
B	huMOV19-80	5	47%	0/6	0/6	無活性
C	huMOV19-80	25	5%	5/6	1/6	高活性
D	huMOV19-90	5	0%	6/6	6/6	高活性
E	huMOV19-90	25	0%	6/6	6/6	高活性

圖 6

去糖基化 huMov19-14 偶聯物之 MS



去糖基化 huMov19-磺基-SPDB-98 偶聯物之 MS



去糖基化 huMov19-35 偶聯物之 MS

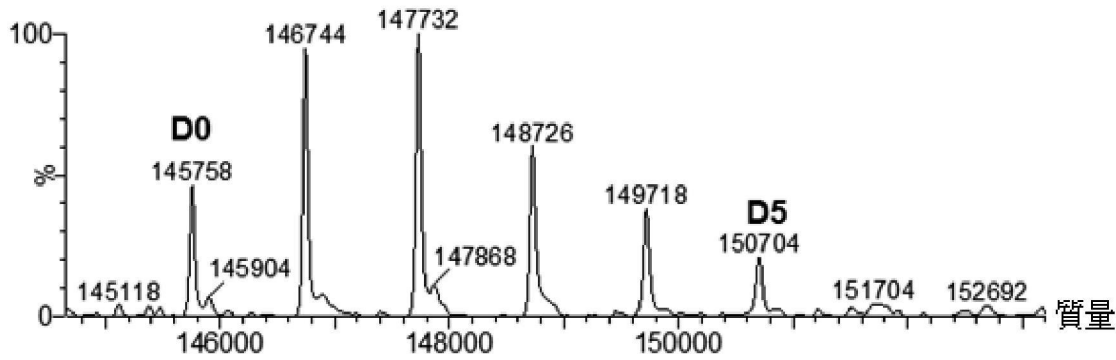
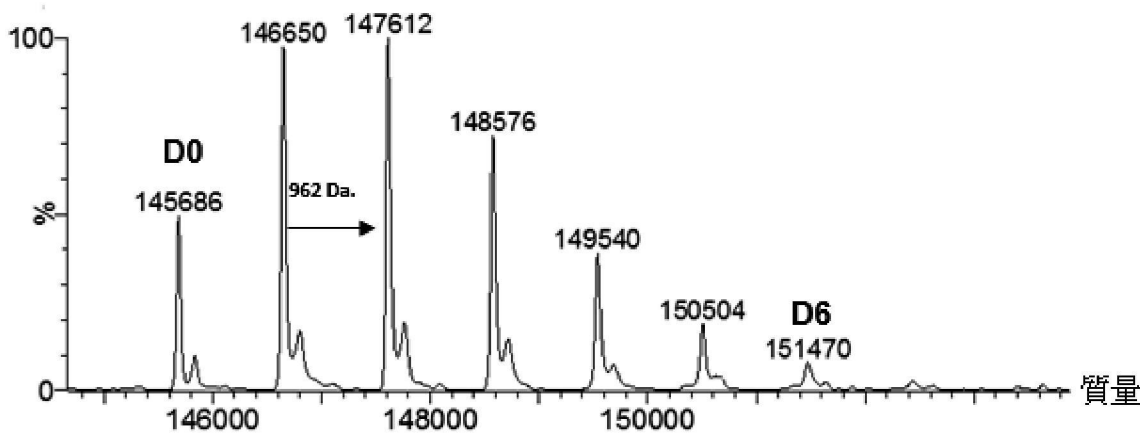
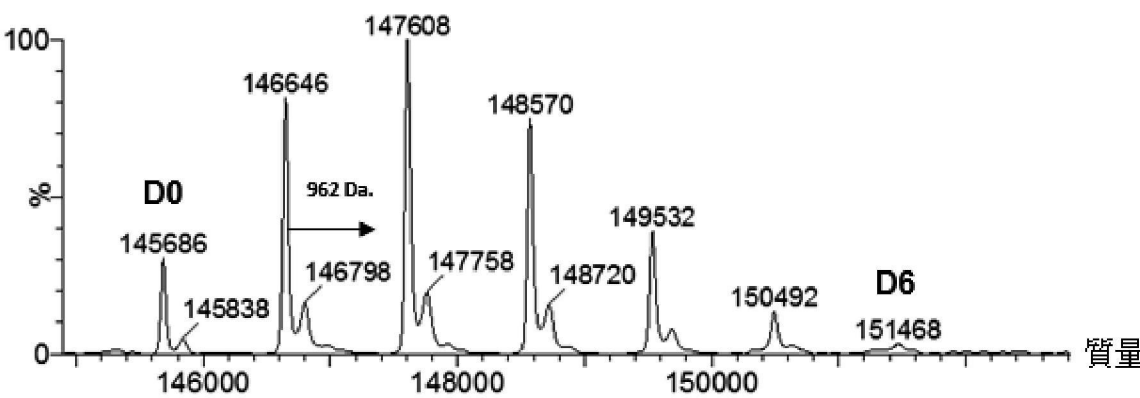


圖 7A

去糖基化huMov19-63偶聯物之 MS



去糖基化huMov19-80偶聯物之 MS



去糖基化huMOV19-90 偶聯物之 MS

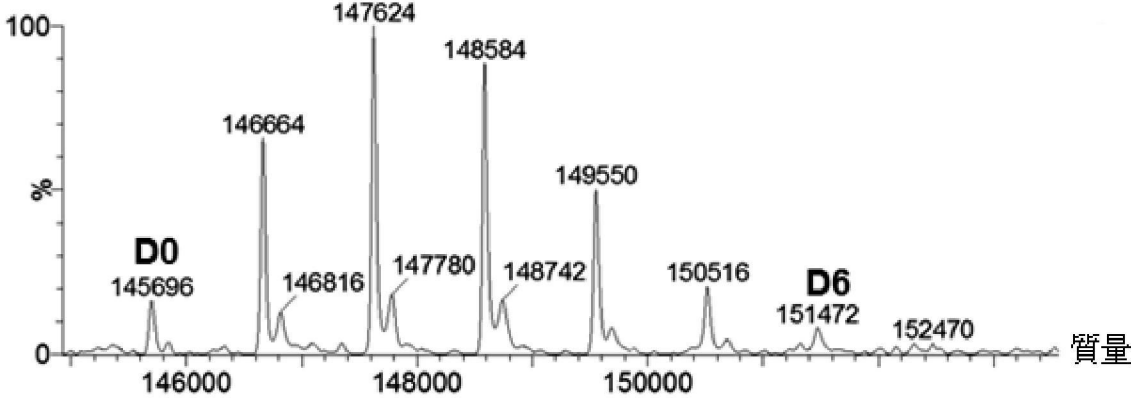
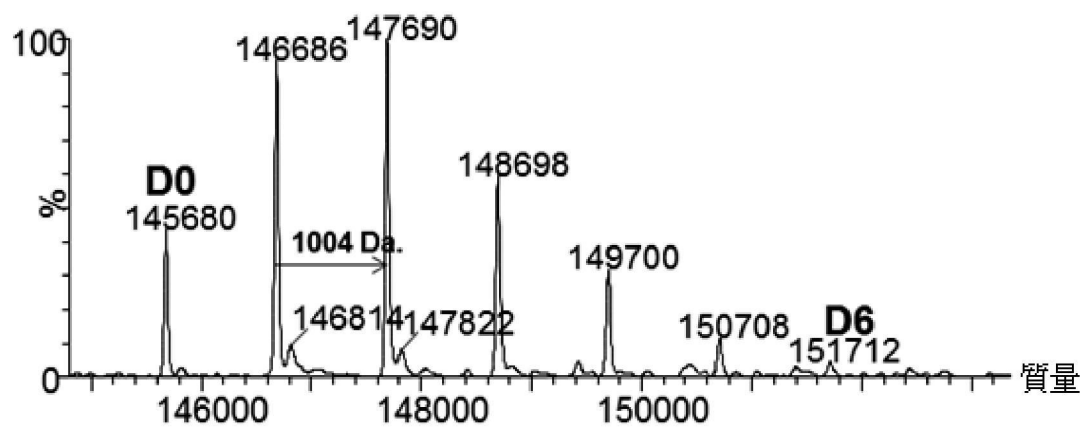
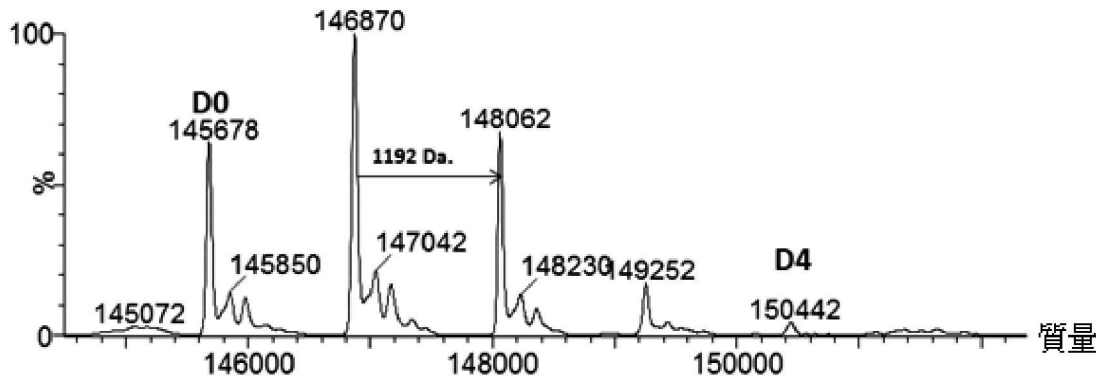


圖 7B

去糖基化huMov19-49 偶聯物之 MS



去糖基化huMov19-磺基-SPDB-99 偶聯物之 MS



去糖基化huMov19-70 偶聯物之 MS

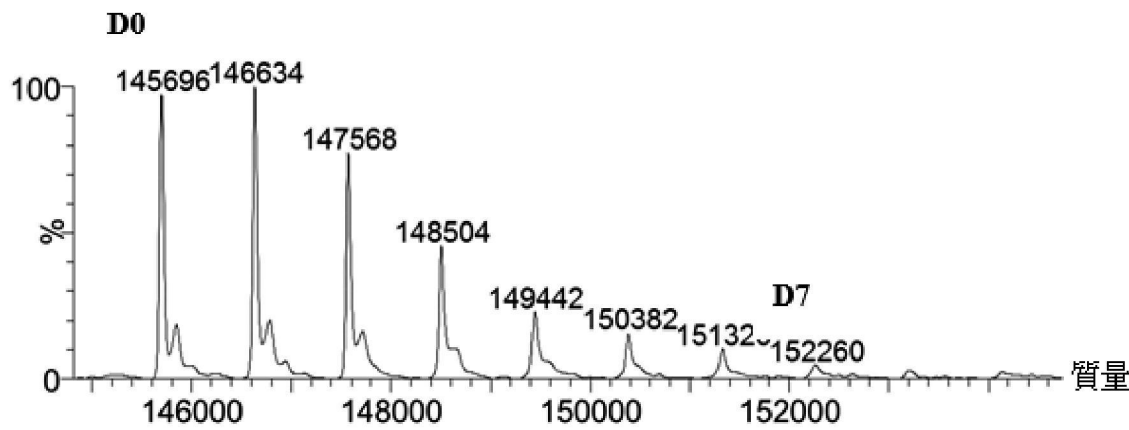


圖 7C

去糖基化huMov19-23偶聯物之 MS

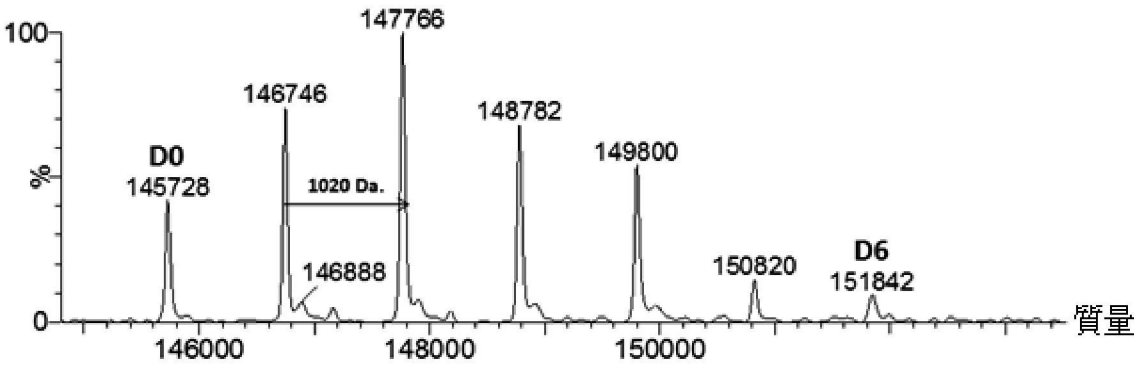


圖 7D

去糖基化huML66-90偶聯物之MS

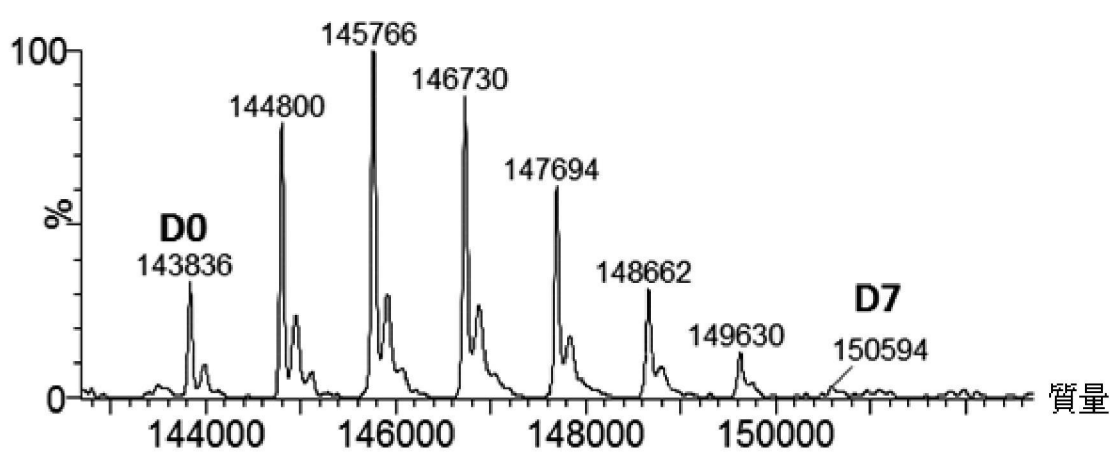


圖 8

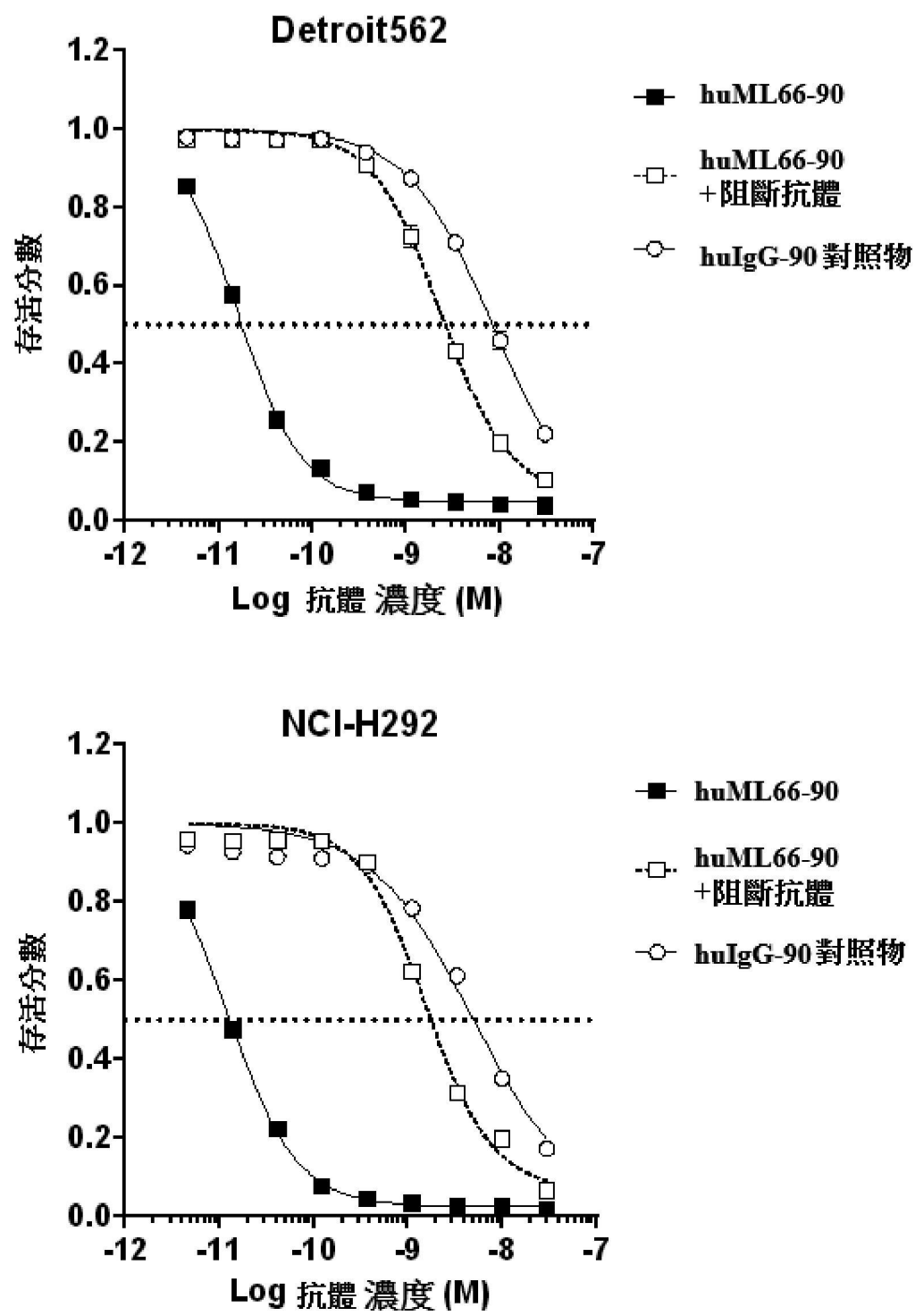


圖 9

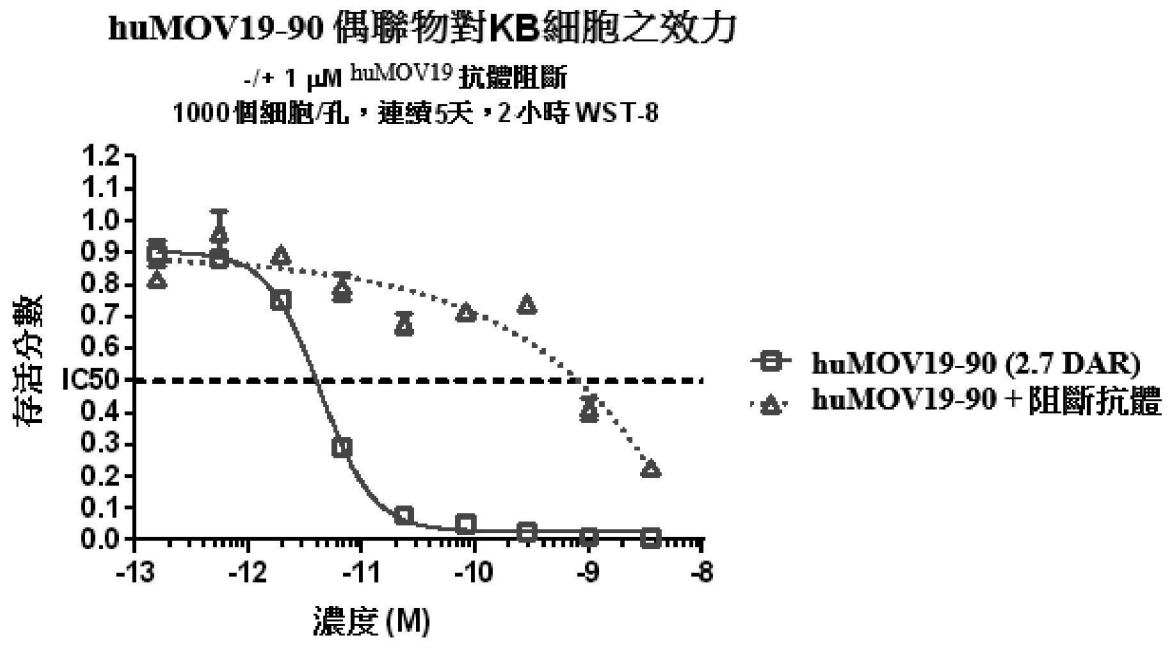


圖 10

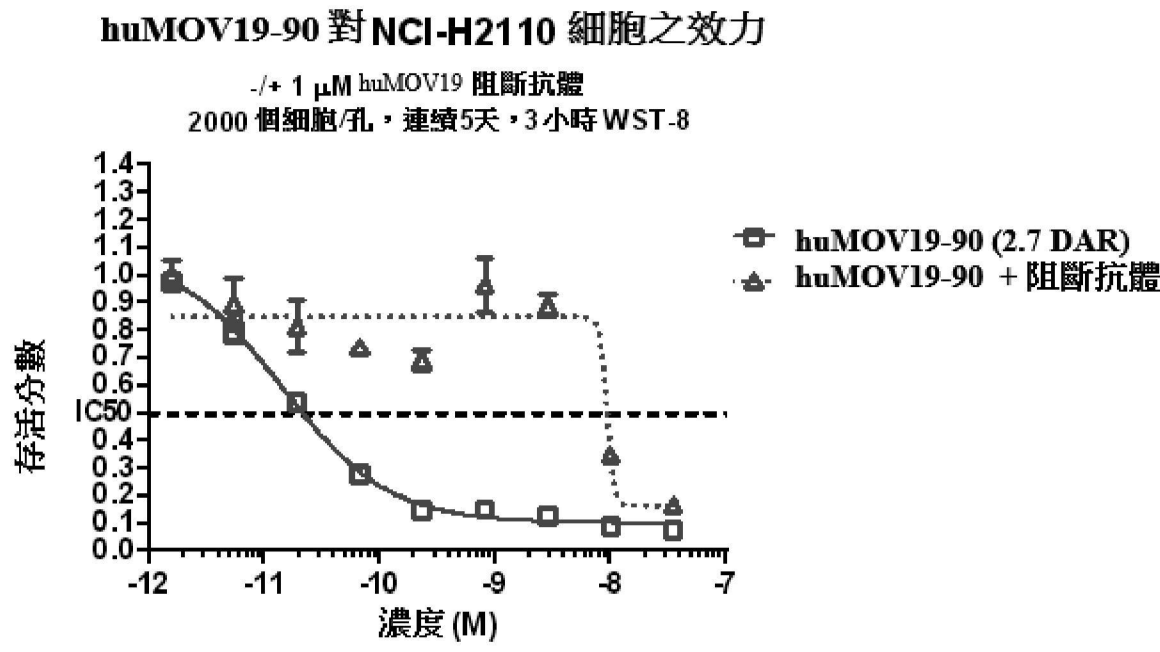


圖 11

huMOV19-90 對 T47D 細胞之效力

-/+ 1 μ M huMOV19 阻斷抗體

2000個細胞/孔，連續6天孵育，存在/不存在 Alamar Blue

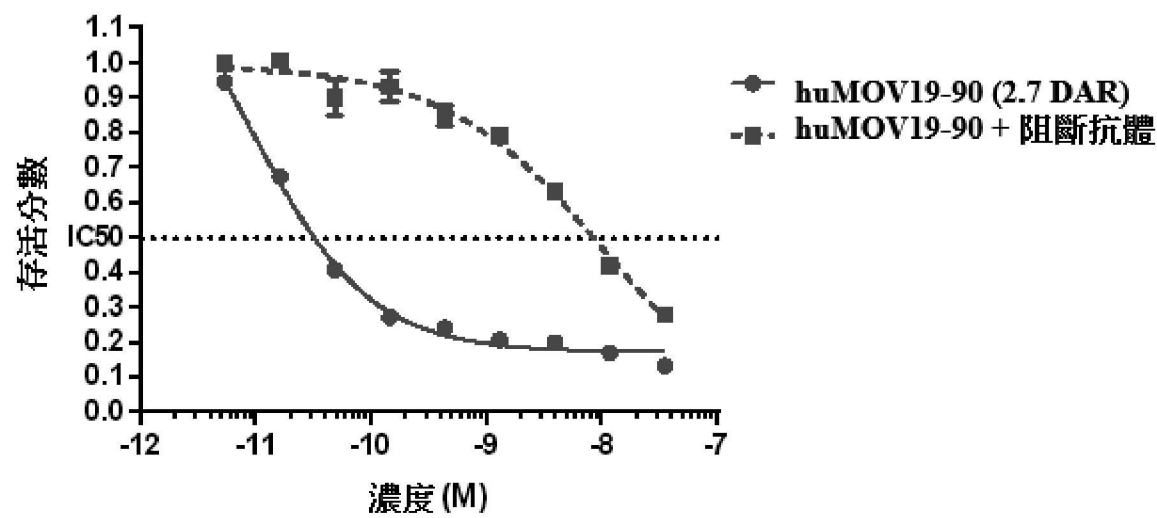


圖 12

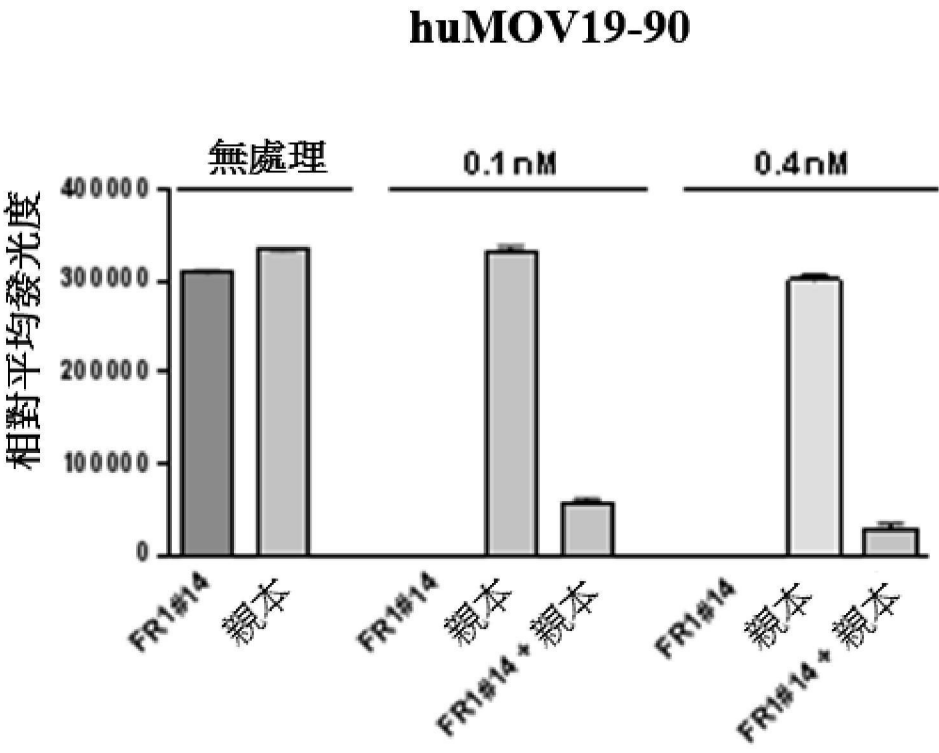
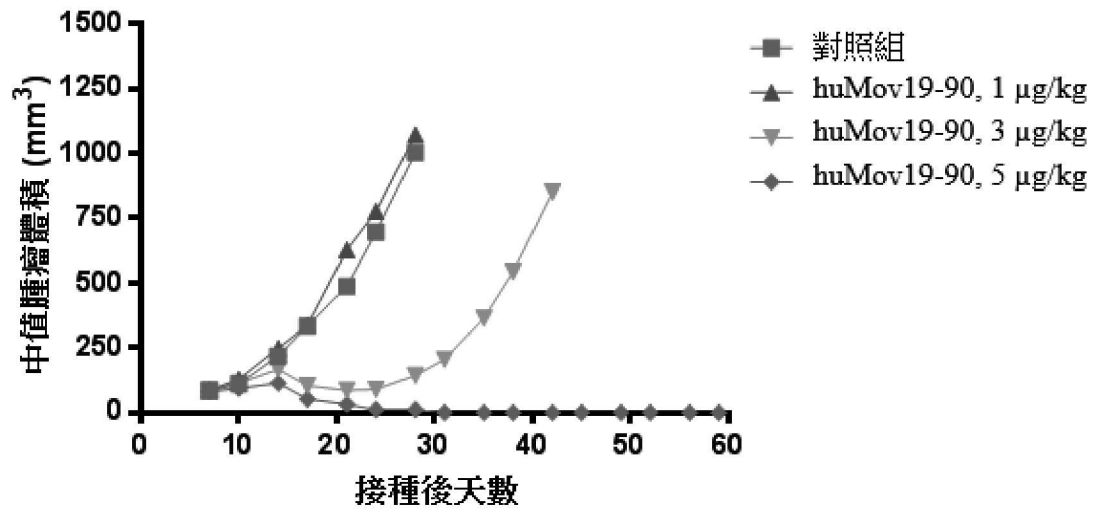


圖 13

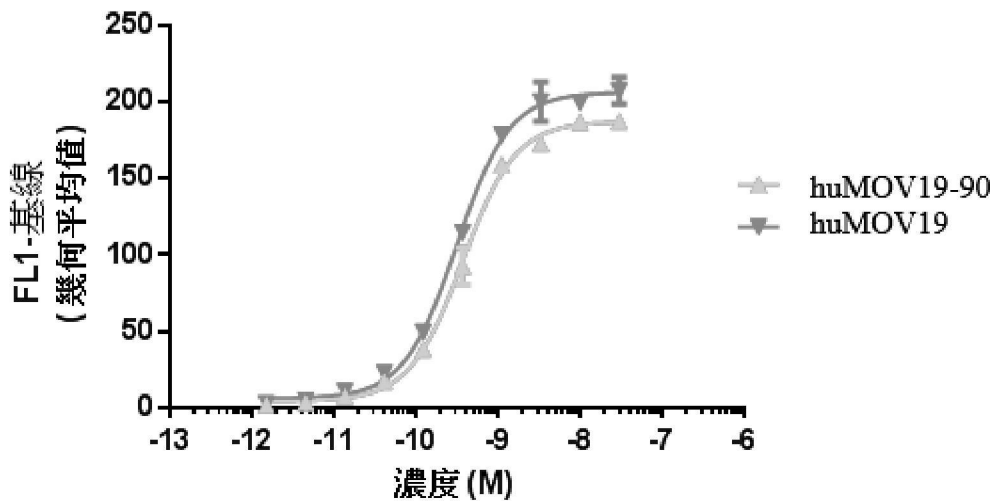
huMov19-90在帶有NCI-H2110異種移植瘤之SCID小鼠中之抗腫瘤活性(中值腫瘤體積，mm³)



治療組		化合物劑量 (µg/kg)	T/C (第28天)	消退		結果
				PR	CR	
A	對照組	-	-	-	-	-
B	huMov19-90	1	107%	0/6	0/6	無活性
C	huMov19-90	3	14%	1/6	0/6	有活性
D	huMov19-90	5	1%	6/6	3/6	高活性

圖 14

huMOV19-90 偶聯物在T47D細胞上之結合



	huMOV19-90	huMOV19
EC50	3.708e-010	3.136e-010

圖 15A

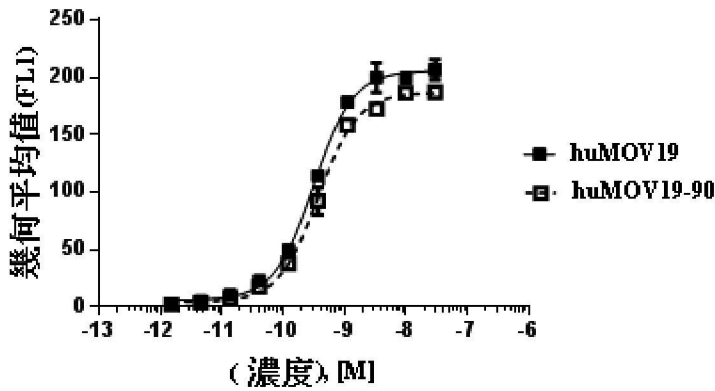


圖 15B

圖 15

去糖基化 huMov19- 磺基 -SPDB-107 偶聯物之 MS

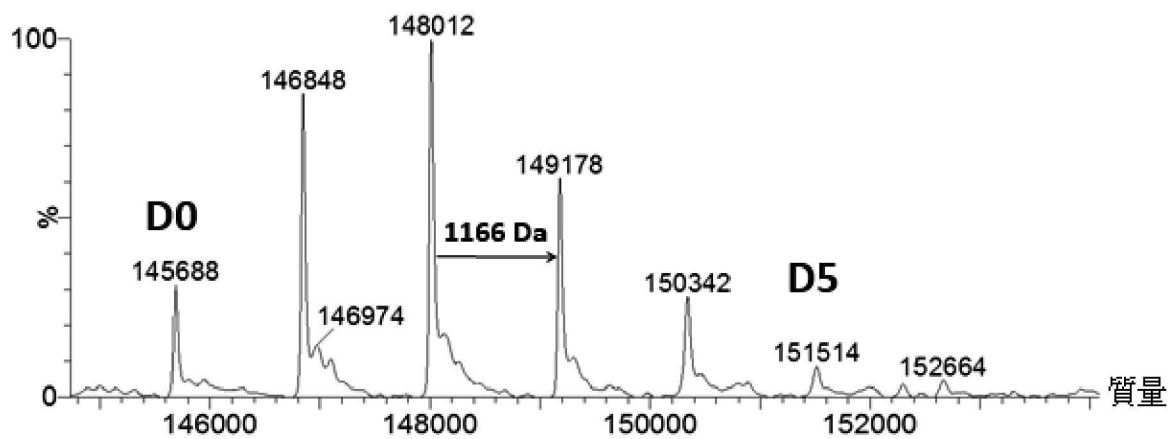
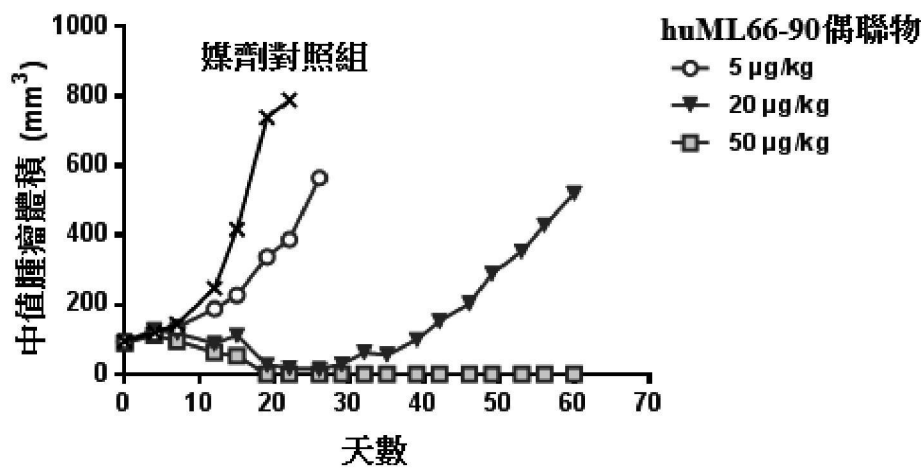


圖 16

huML66-90偶聯物在帶有NCI-H1703異種移植物之SCID小鼠中之抗腫瘤活性(中值腫瘤體積，mm³)



藥劑	化合物90之劑量(µg/kg)	抗體之劑量(mg/kg)	T/C (%)	CR	結果
huML66-90偶聯物	5	0.3	46	0/6	無活性
	20	1.1	4	3/6	高活性
	50	2.8	0	6/6	高活性

圖 17

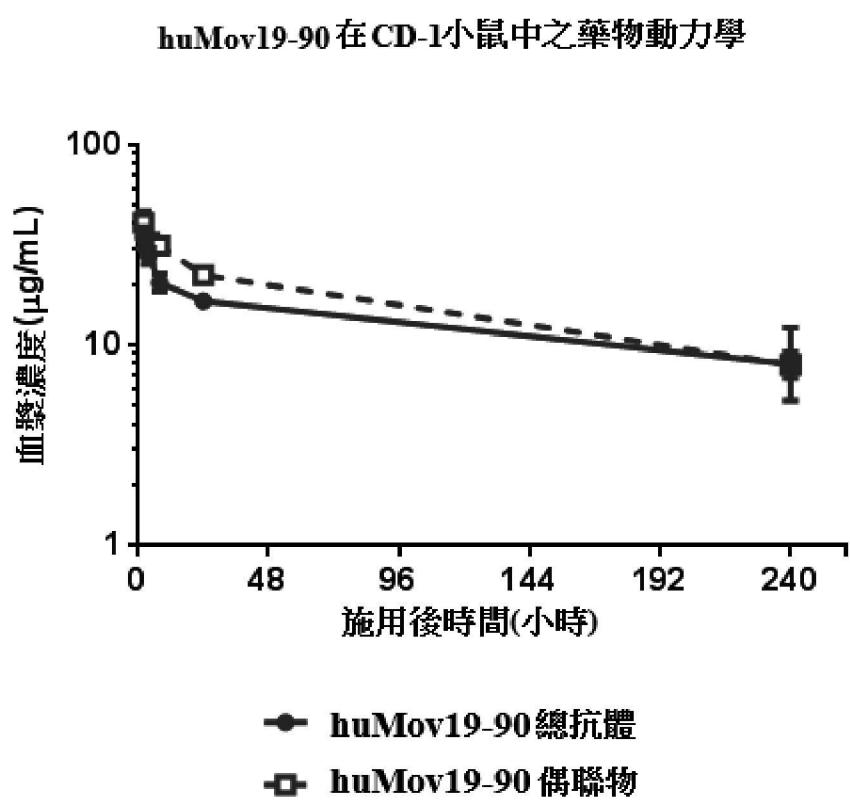


圖 18

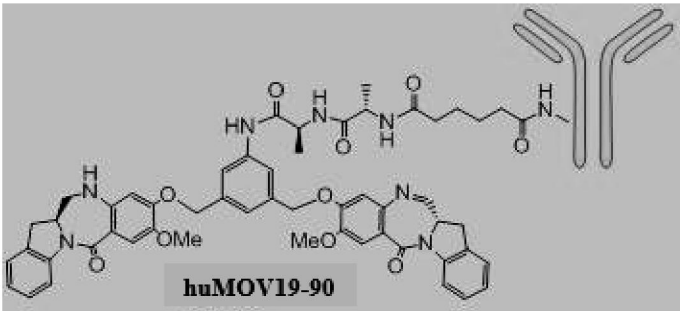


圖 19A

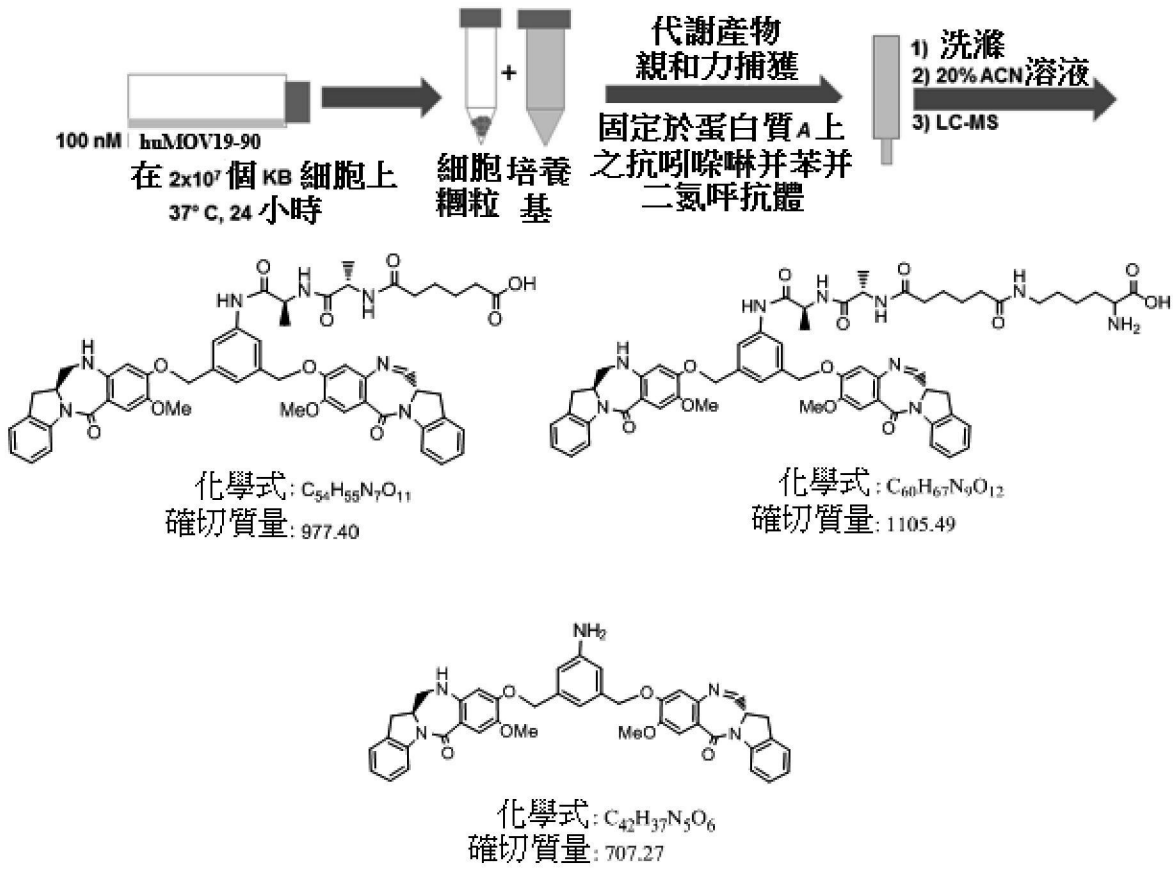


圖 19B

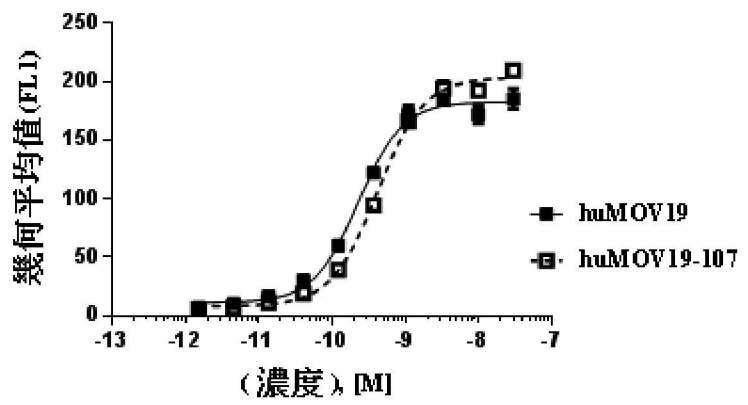


圖 20

圖 21A Ishikawa 細胞

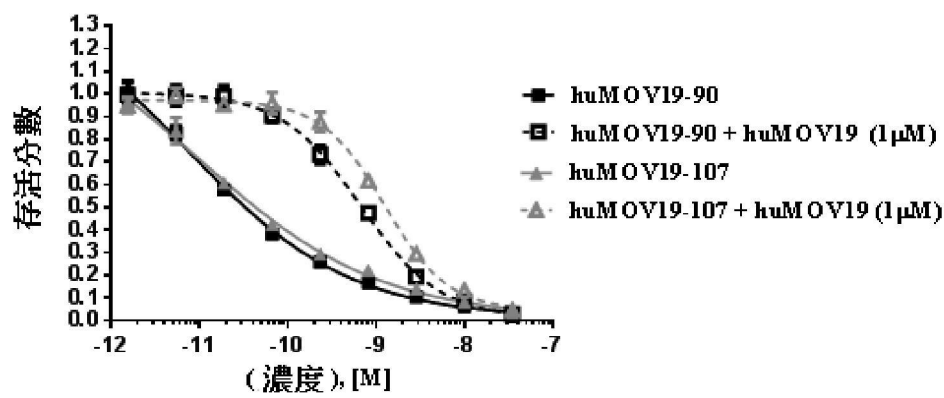


圖 21B KB 細胞

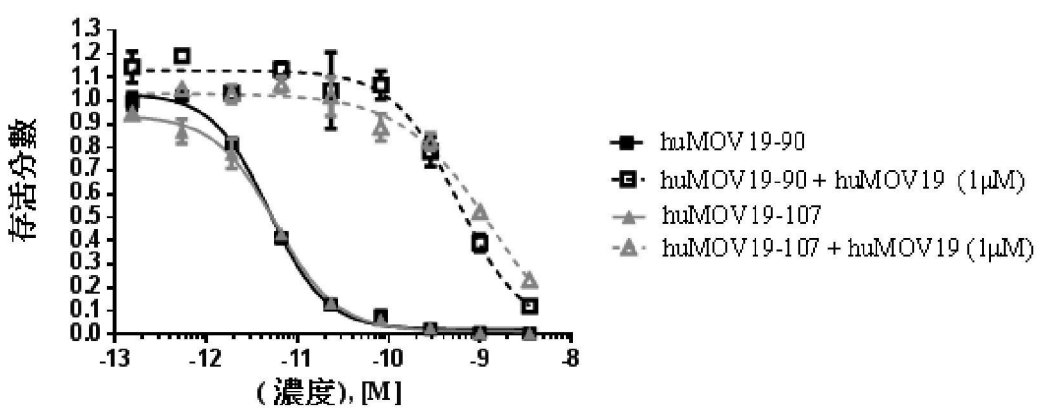


圖 21C NCI-H2110 細胞

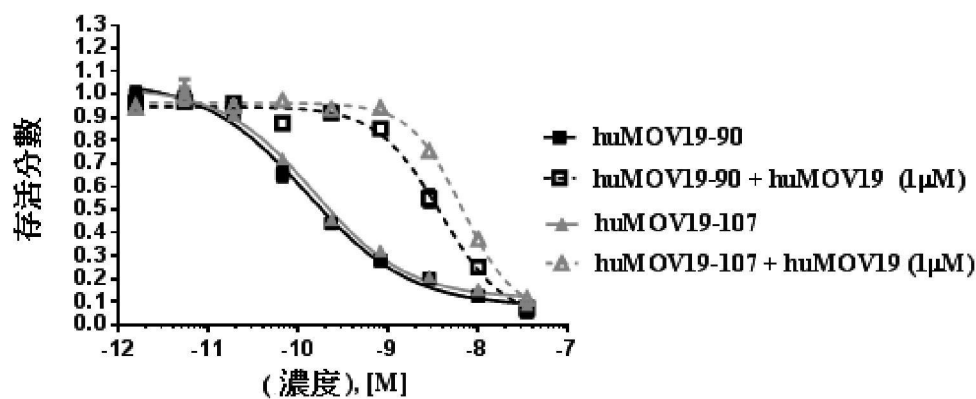
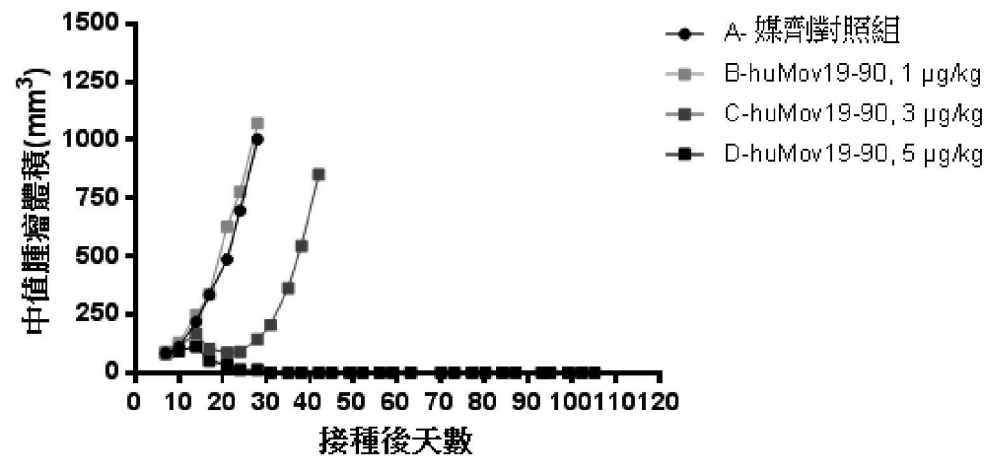
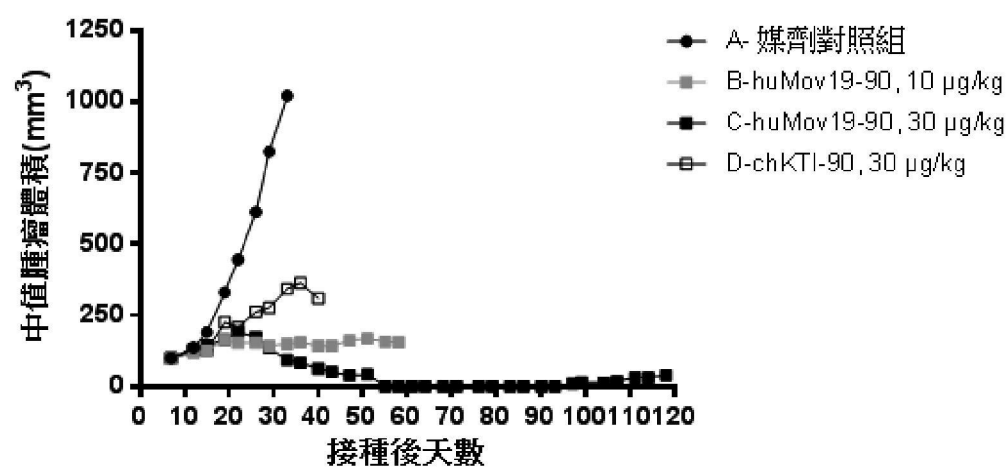


圖 21



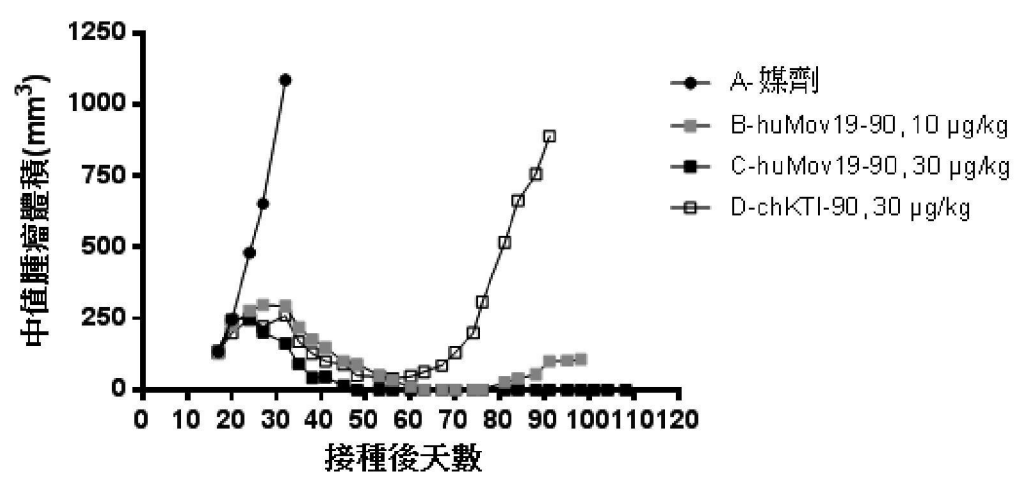
治療組		劑量 ($\mu\text{g/kg}$)	T/C (第24天)	消退		結果
				PR	CR	
A	媒劑對照組	—	—	—	—	—
B	huMov19-90	1	117%	0/6	0/6	無活性
C	huMov19-90	3	13%	1/6	0/6	有活性
D	huMov19-90	5	2%	6/6	4/6	高活性

圖 22



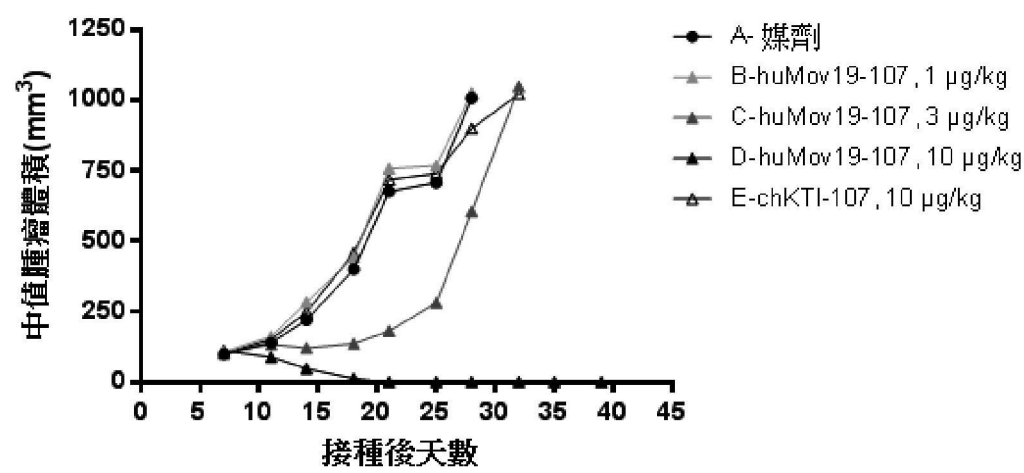
治療組		劑量 ($\mu\text{g/kg}$)	T/C (第33天)	消退		結果
				PR	CR	
A	媒劑對照組	-	-	-	-	-
B	huMov19-90	10	15%	1/6	0/6	有活性
C	huMov19-90	30	9%	6/6	6/6	高活性
D	chKTI-90	30	34%	0/6	0/6	有活性

圖 23



治療組		劑量 (µg/kg)	T/C (第32天)	消退		結果
				PR	CR	
A	媒劑對照組	-	-	-	-	-
E	huMov19-90	10	27%	6/6	6/6	有活性
F	huMov19-90	30	15%	6/6	6/6	有活性
G	chKTI-90	30	24%	4/6	0/6	有活性

圖 24



治療組		劑量 (µg/kg)	T/C (第28天)	消退		結果
				PR	CR	
A	媒劑對照組	-	-	-	-	-
B	huMov19-107	1	102%	0/6	0/6	無活性
C	huMov19-107	3	60%	1/6	1/6	無活性
D	huMov19-107	10	0%	6/6	6/6	高活性
E	chKTI-107	10	89%	0/6	0/6	無活性

圖 25

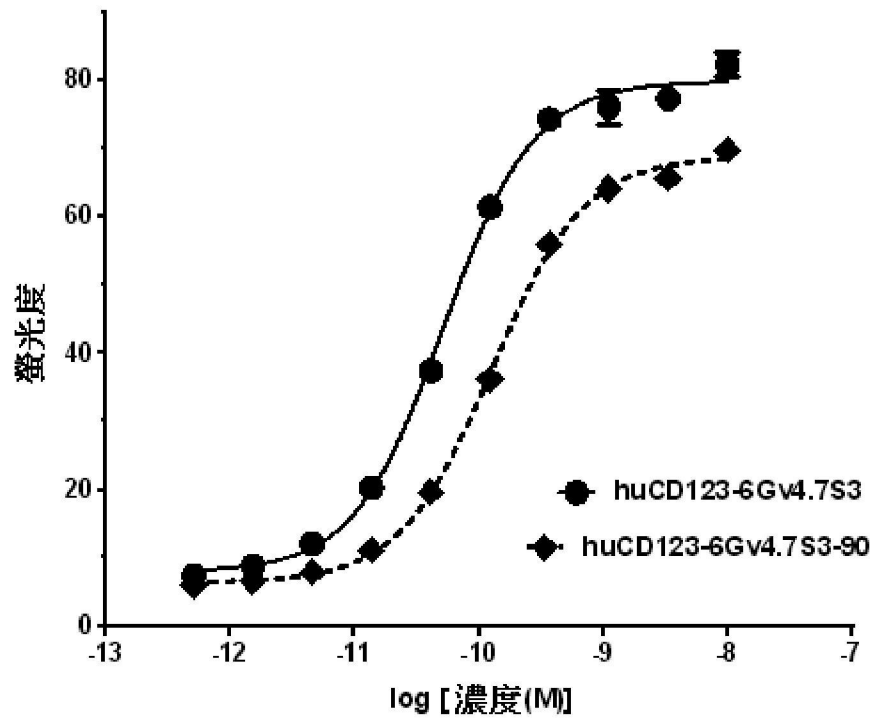


圖 26