



(21)申請案號：109109506

(22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 03 月 20 日

(51)Int. Cl.：A61K47/68 (2017.01)

(30)優先權：2019/03/21 美國 62/821,707  
2019/06/04 美國 62/856,942

(71)申請人：美商伊繆諾金公司 (美國) IMMUNOGEN, INC. (US)  
美國

(72)發明人：西得伯朗德 史考特 A HILDERBRAND, SCOTT A. (US)；密藍諾 丹尼爾  
F MILANO, DANIEL F. (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：239 項 圖式數：8 共 224 頁

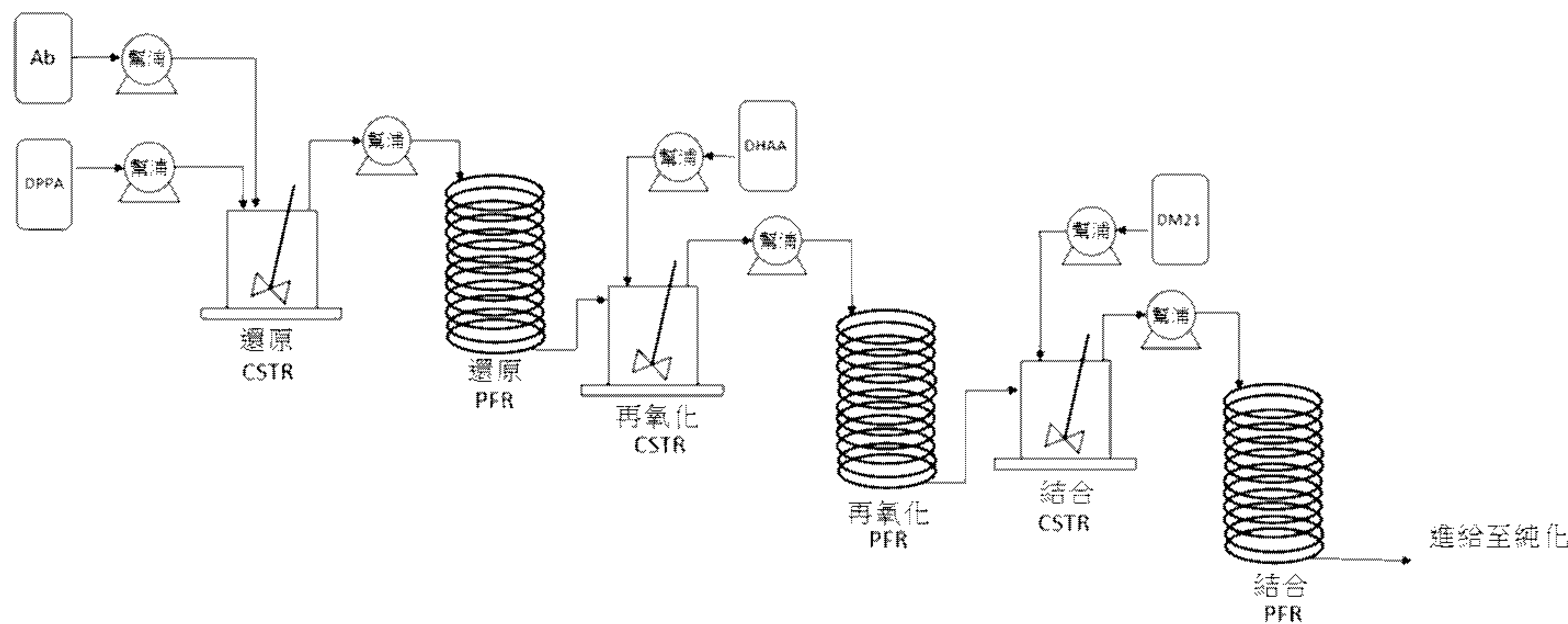
(54)名稱  
製備細胞結合劑-藥物結合物之方法

(57)摘要

本發明提供製備細胞結合劑-細胞毒性劑結合物之方法，該細胞結合劑-細胞毒性劑結合物包含具有共價連接至細胞毒性劑的一或多個未配對半胱胺酸殘基之細胞結合劑(CysCBA)。亦提供藉由本文所述之方法製備之結合物及其醫藥組合物及使用方法。

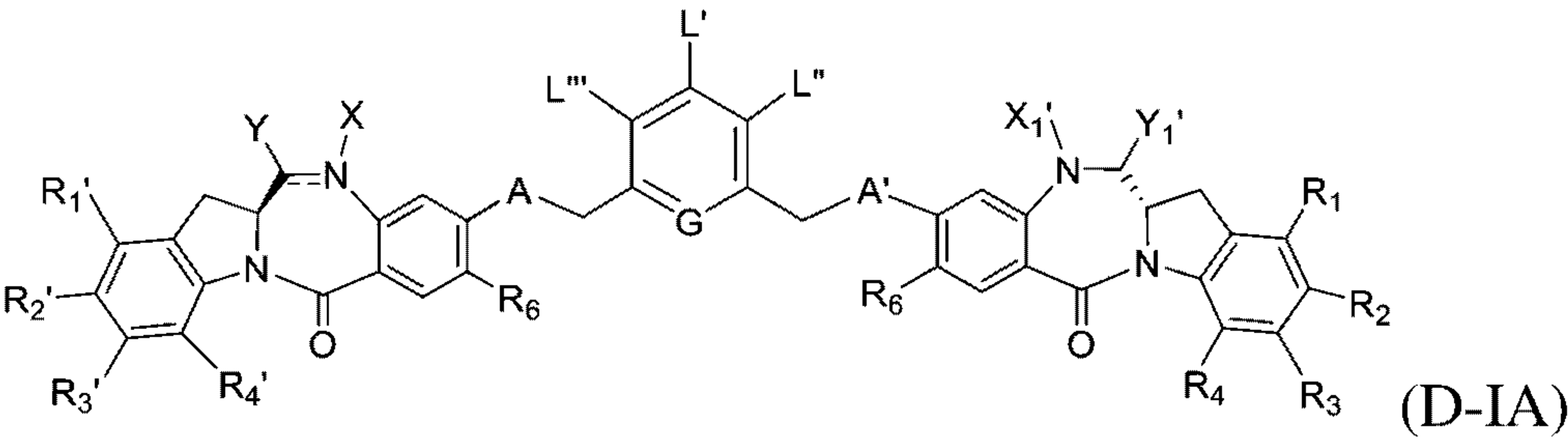
The present invention provides methods of preparing a cell-binding agent-cytotoxic agent conjugate comprising a cell-binding agent (CysCBA) having one or more unpaired cysteine residues covalently linked to a cytotoxic agent. Also provided are conjugates prepared by the methods described herein and pharmaceutical composition and methods of use thereof.

指定代表圖：



【圖 5】

特徵化學式：





202102270

## 【發明摘要】

【中文發明名稱】製備細胞結合劑-藥物結合物之方法

【英文發明名稱】METHODS OF PREPARING CELL-BINDING AGENT-DRUG CONJUGATES

【中文】

本發明提供製備細胞結合劑-細胞毒性劑結合物之方法，該細胞結合劑-細胞毒性劑結合物包含具有共價連接至細胞毒性劑的一或多個未配對半胱胺酸殘基之細胞結合劑(CysCBA)。亦提供藉由本文所述之方法製備之結合物及其醫藥組合物及使用方法。

【英文】

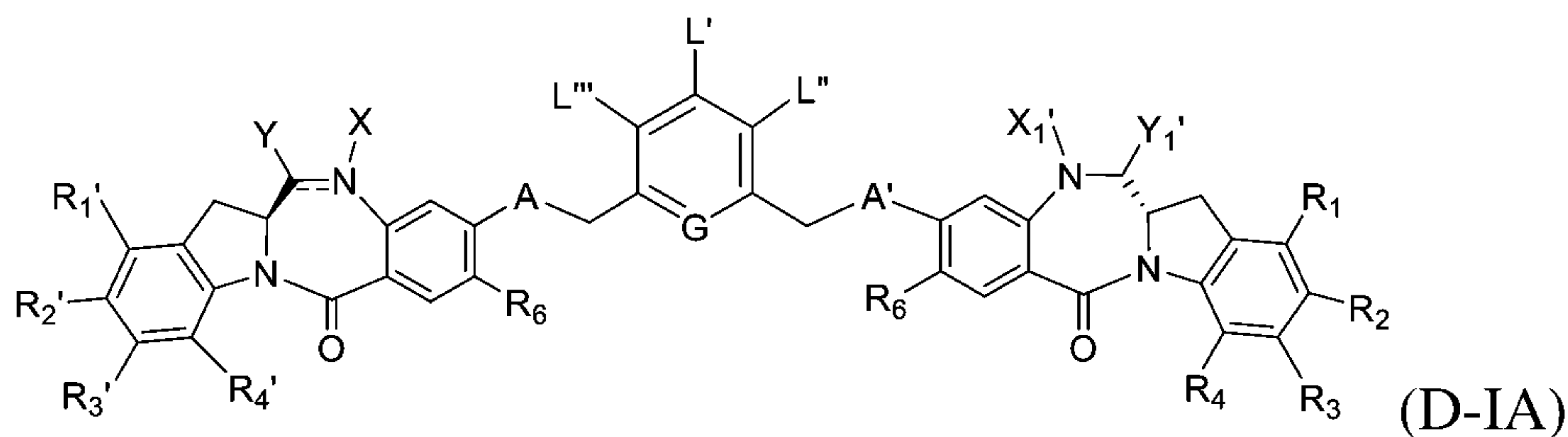
The present invention provides methods of preparing a cell-binding agent-cytotoxic agent conjugate comprising a cell-binding agent (CysCBA) having one or more unpaired cysteine residues covalently linked to a cytotoxic agent. Also provided are conjugates prepared by the methods described herein and pharmaceutical composition and methods of use thereof.

【指定代表圖】圖 5

【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】製備細胞結合劑-藥物結合物之方法

【英文發明名稱】METHODS OF PREPARING CELL-BINDING AGENT-DRUG CONJUGATES

【技術領域】

【0001】 本發明一般而言係關於製備細胞結合劑-藥物結合物之方法，該等細胞結合劑-藥物結合物包含具有共價連接至細胞毒性劑的一或多個未配對半胱胺酸殘基之細胞結合劑。

【先前技術】

【0002】 細胞結合劑-藥物結合物(諸如抗體-藥物結合物(ADC))作為在多種癌症中具有功效之一類特效抗腫瘤劑出現。細胞結合劑-藥物結合物(諸如 ADC)通常由三種不同要素構成：細胞結合劑(例如抗體)；連接體；及細胞毒性部分。該細胞毒性藥物部分可經由諸如順丁烯二醯亞胺基之硫醇反應性基團共價連接至該抗體上之半胱胺酸硫醇基，以形成位點特異性 ADC。經半胱胺酸工程改造之抗體可用於製備位點特異性 ADC。然而，在抗體產生期間，經工程改造之半胱胺酸通常藉由諸如半胱胺酸或麩胱甘肽之其他含硫醇部分封端，以形成二硫化物。在與細胞毒性劑結合之前，該等二硫化物需要經還原劑處理以移除封端部分且形成用於與該細胞毒性劑反應之游離硫醇。該處理亦還原抗體鏈間二硫鍵，該等抗體鏈間二硫鍵需要藉由不會再氧化經工程改造之半胱胺酸上的游離硫醇基的選擇性氧化步驟再形成。選擇性氧化藉由使用溫和氧化劑以及移除還原劑及封端劑(諸如半胱胺酸及/或麩胱甘肽)來實現。該等還原及選擇性氧化步驟在用經半胱胺酸工程改造之抗體製備 ADC 的過程中引入複雜性，且通常需要多個純化步驟，使得該過程變得麻煩且對於 ADC 之大規模製造不太有效。

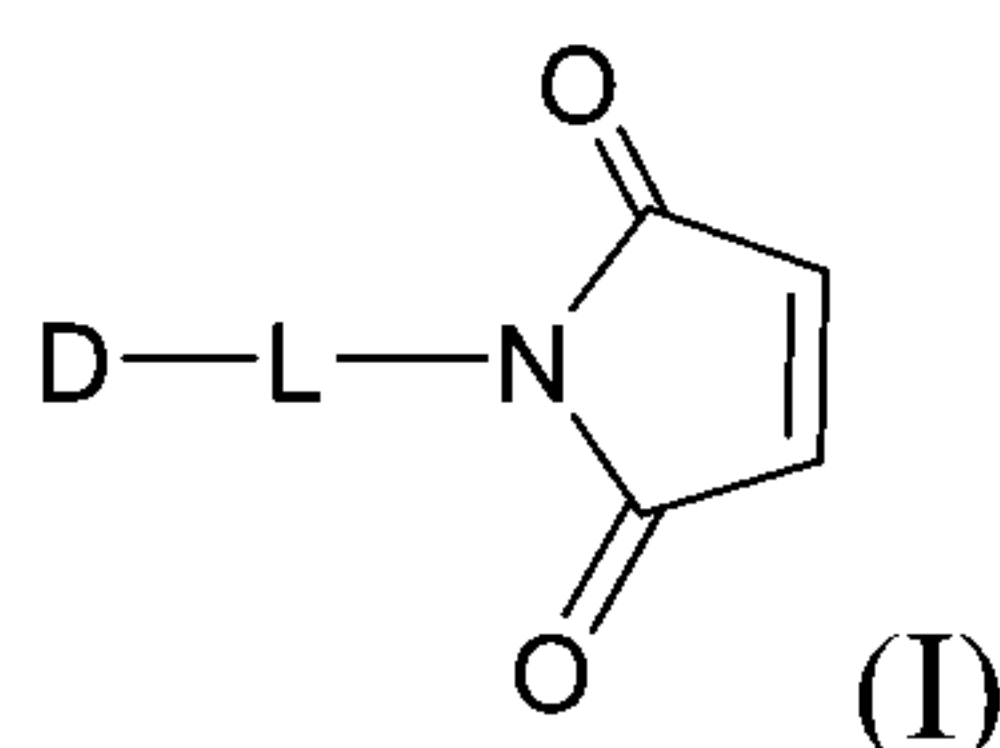
【0003】 因此，需要開發適用於大規模製造過程之用於製備經工程改造之半胱胺酸抗體的 ADC 之新型有效方法。

【發明內容】

【0004】 本發明係基於如下令人滿意的發現，即包含共價連接至細胞毒性劑之經半胱胺酸工程改造之抗體的 ADC 可藉由在反應步驟之間無需純化之一鍋方法以高純度及反應產率來製備。此外，比較數據顯示當與藉由在反應步驟之間需要純化之多步驟方法製備的 ADC 相比時，該一鍋方法出乎意料地增加最終 ADC 產物之單體百分率(參見實例 5)。

【0005】 在某些實施例中，本發明提供一種製備細胞結合劑-細胞毒性劑結合物之方法，該細胞結合劑-細胞毒性劑結合物包含具有共價連接至細胞毒性劑的一或多個未配對半胱胺酸殘基之細胞結合劑(CysCBA)，其中該方法包括以下步驟：

- (a) 使還原劑與具有經封端劑封端之一或多個未配對半胱胺酸殘基之經封端細胞結合劑(cCysCBA)反應以形成經還原細胞結合劑，其中該封端劑經移除以在該經還原細胞結合劑中形成游離硫醇(-SH)基；
- (b) 使該經還原細胞結合劑與選擇性氧化劑反應以形成該 CysCBA，其中未配對半胱胺酸殘基中的游離硫醇基未經氧化；及
- (c) 使該 CysCBA 與式(I)化合物：



或其醫藥學上可接受之鹽反應，由此形成該結合物，其中步驟(a)中之經還原細胞結合劑未經純化即用於步驟(b)；且步驟(b)中之 CysCBA 未經純化即用於步驟(c)，其中：

D 為細胞毒性劑；且

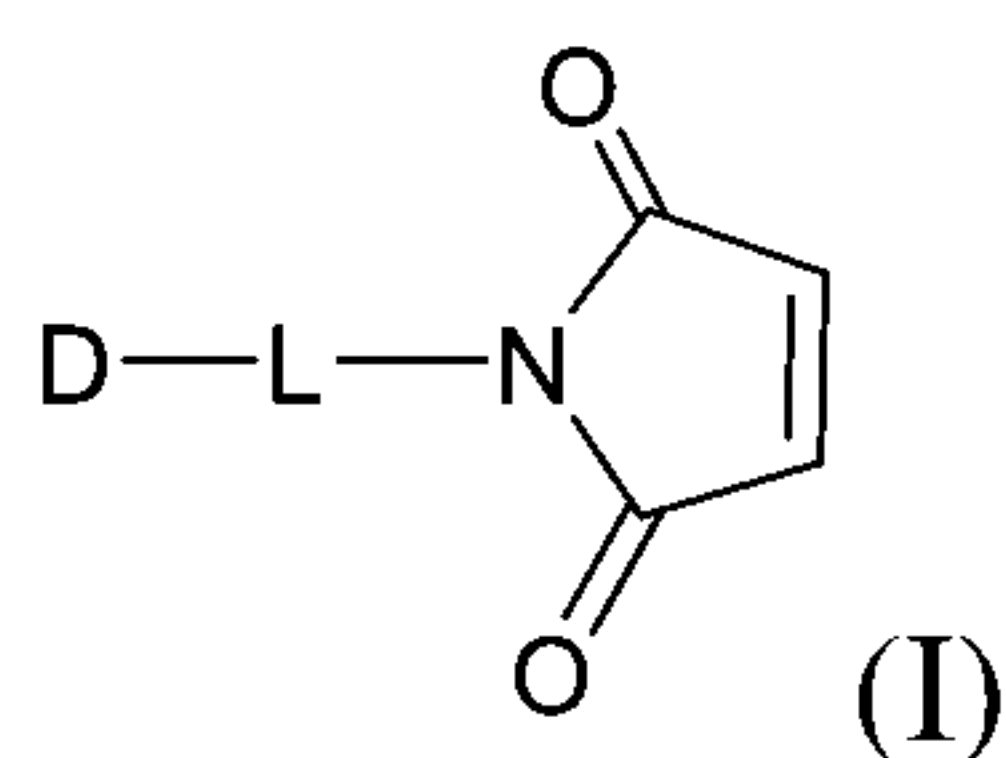
L 為連接體。

【0006】 在某些實施例中，本發明提供一種製備細胞結合劑-細胞毒性劑結合物(ADC)之連續方法，該細胞結合劑-細胞毒性劑結合物(ADC)包含具有共價連接至細胞毒性劑的一或多個未配對半胱胺酸殘基之細胞結合劑(CysCBA)，其中該方法包括以下步驟：

(a) 使還原劑與具有經封端劑封端之一或多個未配對半胱胺酸殘基之經封端細胞結合劑(cCysCBA)反應以形成經還原細胞結合劑，其中該封端劑經移除以在該經還原細胞結合劑中形成游離硫醇(-SH)基；

(b) 使該經還原細胞結合劑與選擇性氧化劑反應以形成該 CysCBA，其中未配對半胱胺酸殘基中的游離硫醇基未經氧化；及

(c) 使該 CysCBA 與式(I)化合物：



或其醫藥學上可接受之鹽反應，由此形成該結合物，

其中步驟(a)中之經還原細胞結合劑未經純化即用於步驟(b)；步驟(b)中之 CysCBA 未經純化即用於步驟(c)，且選自步驟(a)至(c)之任一或多個步驟係連續地執行，且其中：

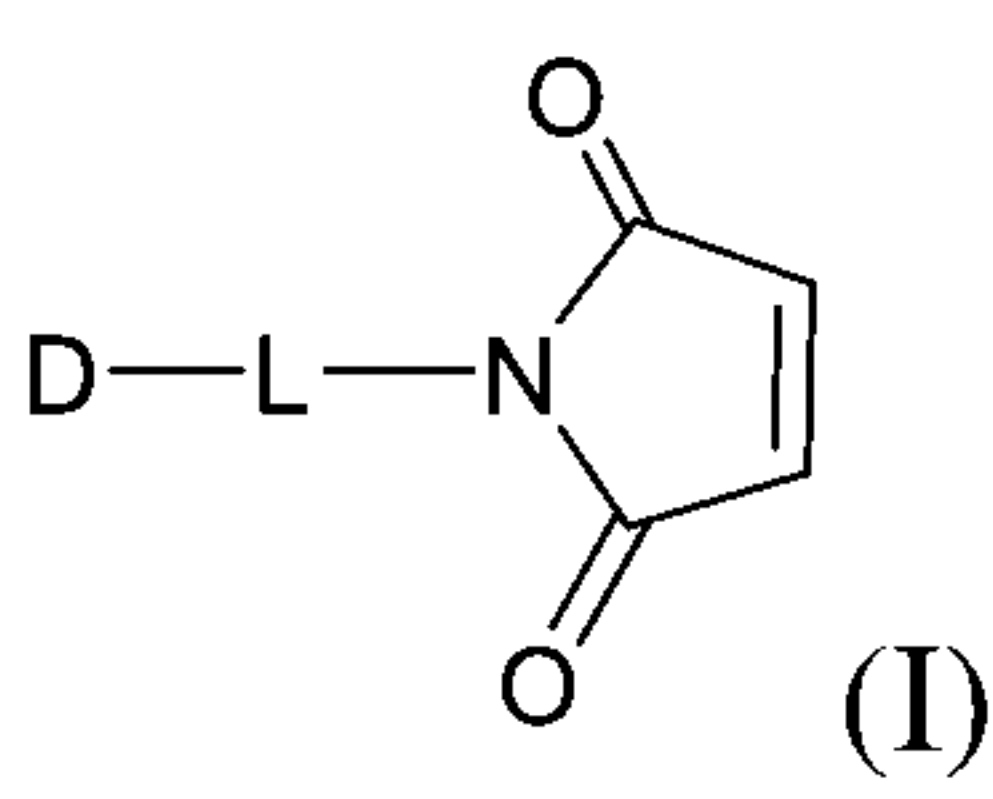
D 為細胞毒性劑；且

L 為連接體

【0007】 在某些實施例中，本發明提供一種製備細胞結合劑-細胞毒性劑結合物(ADC)之連續方法，該細胞結合劑-細胞毒性劑結合物(ADC)包含具有共價連接至細胞毒性劑的一或多個未配對半胱胺酸殘基之細胞結合劑(CysCBA)，其中該

方法包括以下步驟：

- (a) 使還原劑與具有經封端劑封端之一或多個未配對半胱胺酸殘基之經封端細胞結合劑(cCysCBA)反應以形成經還原細胞結合劑，其中該封端劑經移除以在該經還原細胞結合劑中形成游離硫醇(-SH)基；
- (b) 使該經還原細胞結合劑與選擇性氧化劑反應以形成該 CysCBA，其中未配對半胱胺酸殘基中的游離硫醇基未經氧化；及
- (c) 使該 CysCBA 與式(I)化合物：



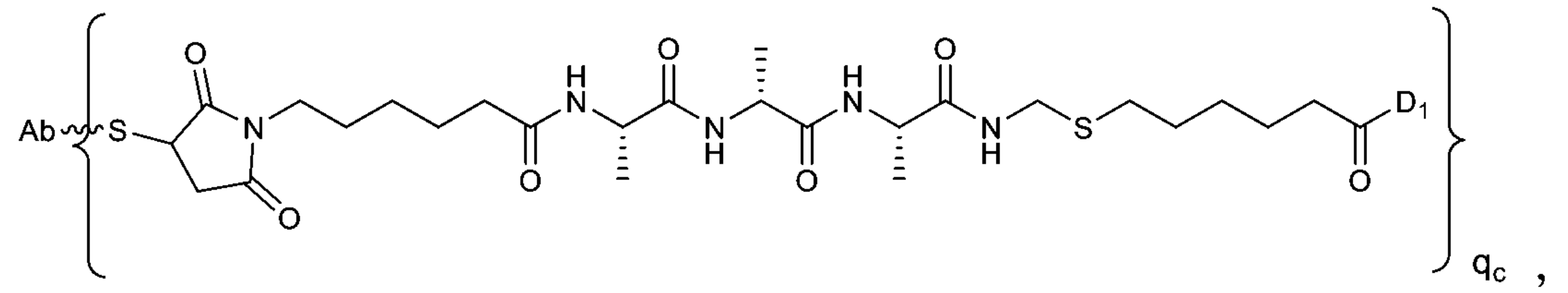
- 或其醫藥學上可接受之鹽反應，由此形成該結合物；及
- (d) 移除未結合之式(I)化合物；

其中步驟(a)中之經還原細胞結合劑未經純化即用於步驟(b)；步驟(b)中之 CysCBA 未經純化即用於步驟(c)，且選自步驟(a)至(d)之任一或多個步驟係連續地執行；且其中：

D 為細胞毒性劑；且

L 為連接體

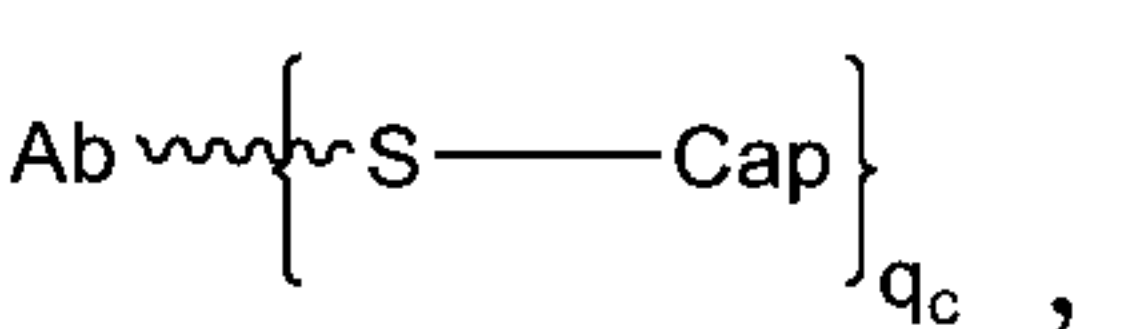
【0008】 在某些實施例中，本發明提供一種製備抗體-細胞毒性劑結合物(ADC)之方法，該抗體-細胞毒性劑結合物(ADC)由下式表示：



該方法包括以下步驟：

- (a) 使還原劑與由下式表示之經封端的半胱胺酸工程改造之抗體(cCysAb)反

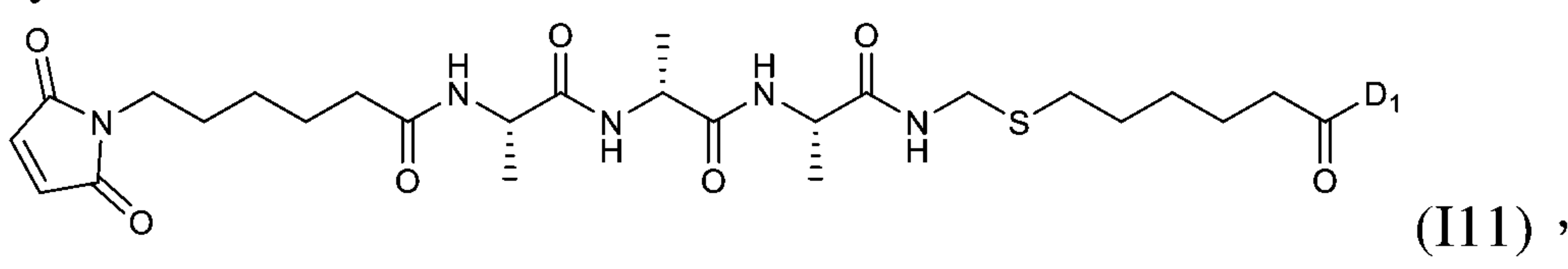
應：



以形成經還原抗體或其抗原結合片段，其中該封端劑(Cap)經移除以在該經還原抗體或其抗原結合片段中形成游離硫醇(-SH)基；

(b) 使該經還原抗體或其抗原結合片段與選擇性氧化劑反應以形成 CysAb，其中經工程改造之半胱胺酸殘基中的游離硫醇基未經氧化；及

(c) 使該 CysAb 與由下式表示之化合物：



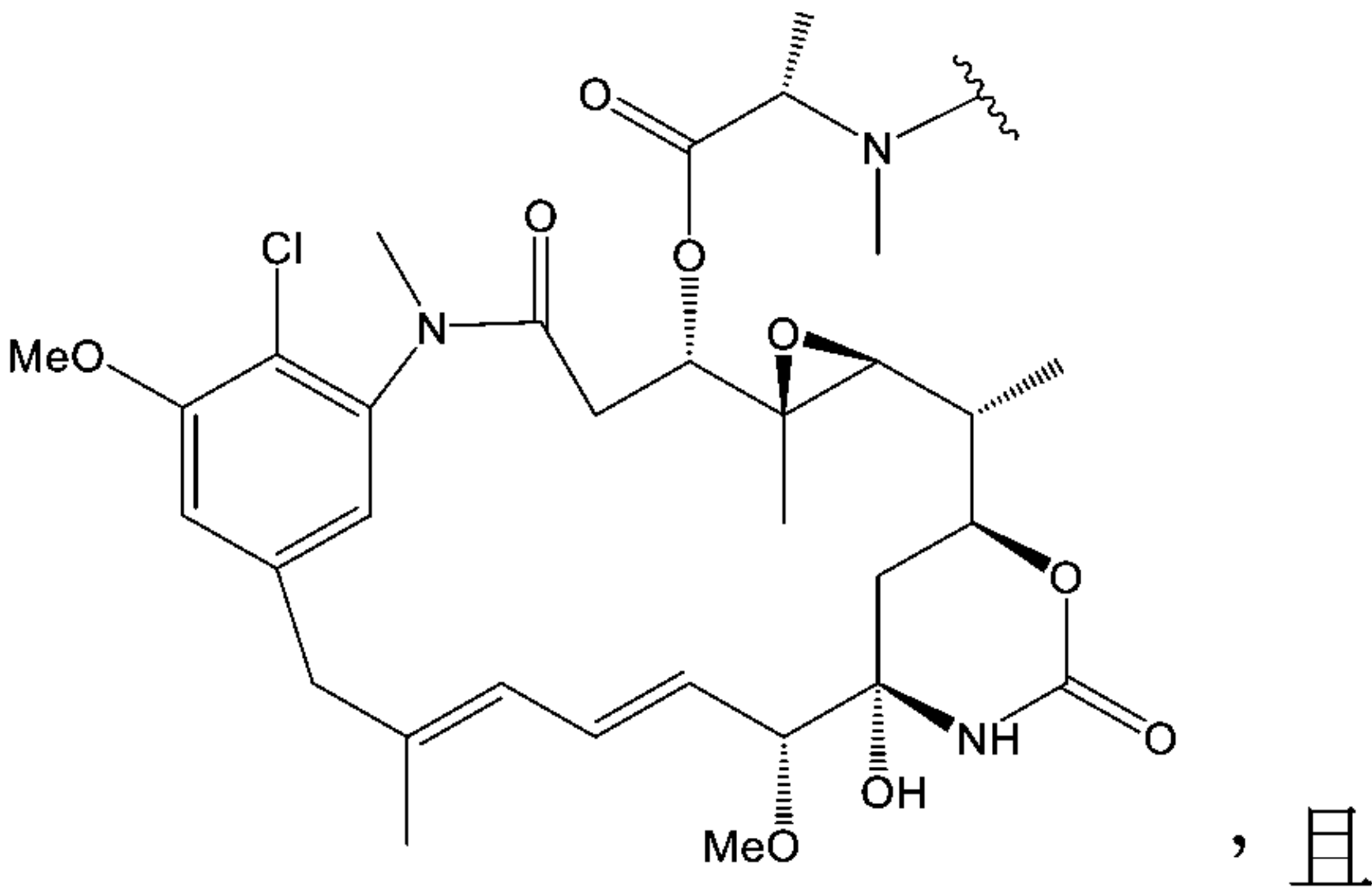
或其醫藥學上可接受之鹽反應，由此形成該 ADC，其中步驟(a)中之經還原抗體或其抗原結合片段未經純化即用於步驟(b)，且步驟(b)中之 CysAb 或其抗原結合片段未經純化即用於步驟(c)，

其中：

Ab~S—係經由位於經工程改造之半胱胺酸殘基上的硫醇基共價連接至該細胞毒性劑之經半胱胺酸工程改造之抗體(CysAb)或其抗原結合片段；且其中該 CysAb 或其抗原結合片段係包含 CDR<sub>H</sub>1 域、CDR<sub>H</sub>2 域及 CDR<sub>H</sub>3 域以及 CDR<sub>L</sub>1 域、CDR<sub>L</sub>2 域及 CDR<sub>L</sub>3 域之人類化抗 ADAM9 抗體或其 ADAM9 結合片段，該等域分別具有序列 SEQ ID NO: 24、25 及 26 以及 SEQ ID NO: 21、22、23；

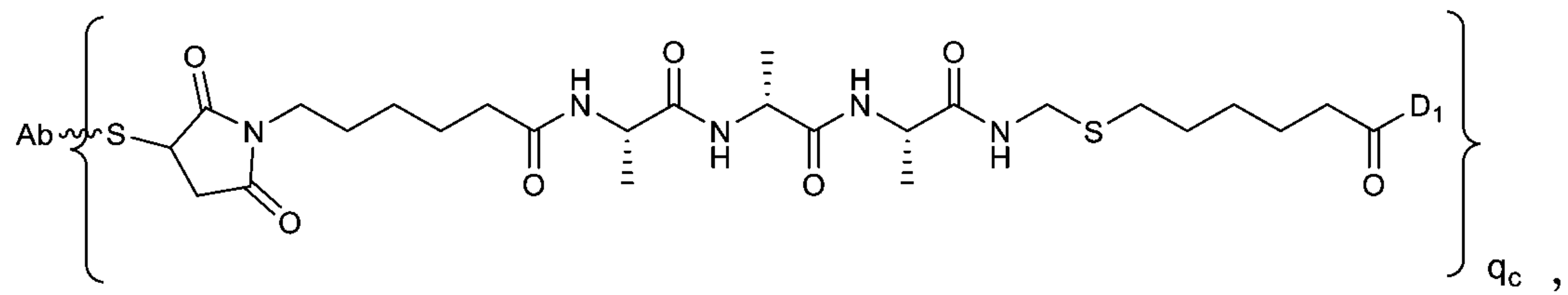
q<sub>c</sub> 為 1 或 2；

D<sub>1</sub> 係由下式表示：



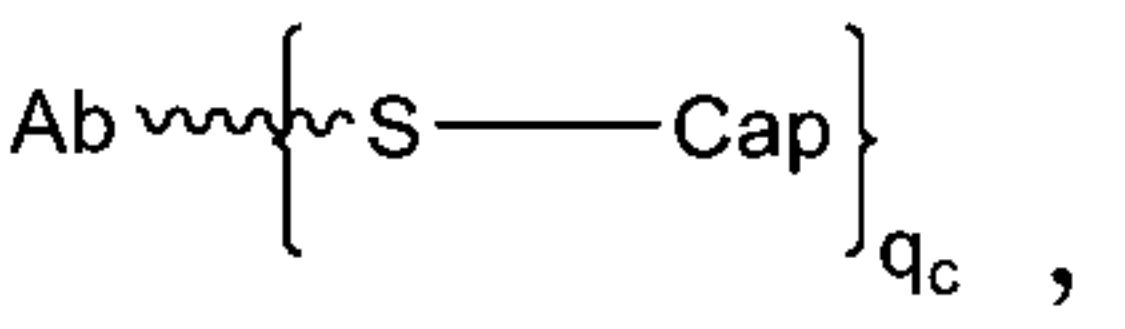
Cap 為封端劑。

【0009】 在某些實施例中，本發明提供一種製備抗體-細胞毒性劑結合物(ADC)之連續方法，該抗體-細胞毒性劑結合物(ADC)由下式表示：



該方法包括以下步驟：

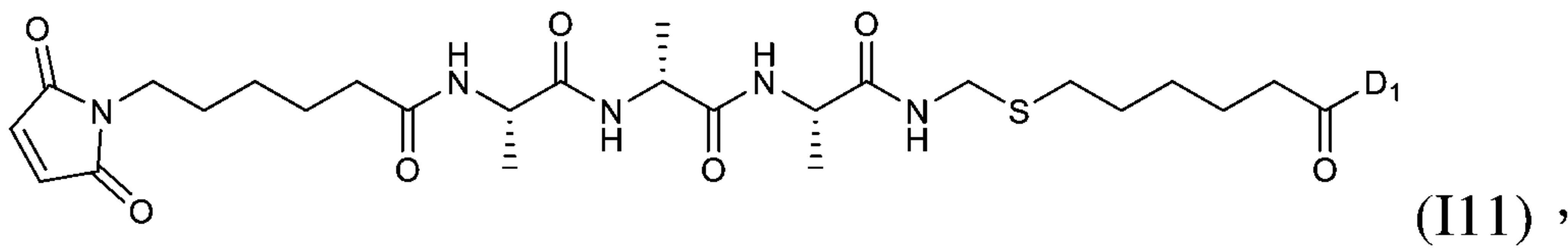
(a) 使還原劑與由下式表示之經封端的半胱氨酸工程改造之抗體(cCysAb)反應：



以形成經還原抗體或其抗原結合片段，其中該封端劑(Cap)經移除以在該經還原抗體或其抗原結合片段中形成游離硫醇(-SH)基；

(b) 使該經還原抗體或其抗原結合片段與選擇性氧化劑反應以形成 CysAb，其中經工程改造之半胱氨酸殘基中的游離硫醇基未經氧化；及

(c) 使該 CysAb 與由下式表示之化合物：



或其醫藥學上可接受之鹽反應，由此形成該 ADC，其中步驟(a)中之經還原抗體或其抗原結合片段未經純化即用於步驟(b)，步驟(b)之 CysAb 或其抗原結合片段

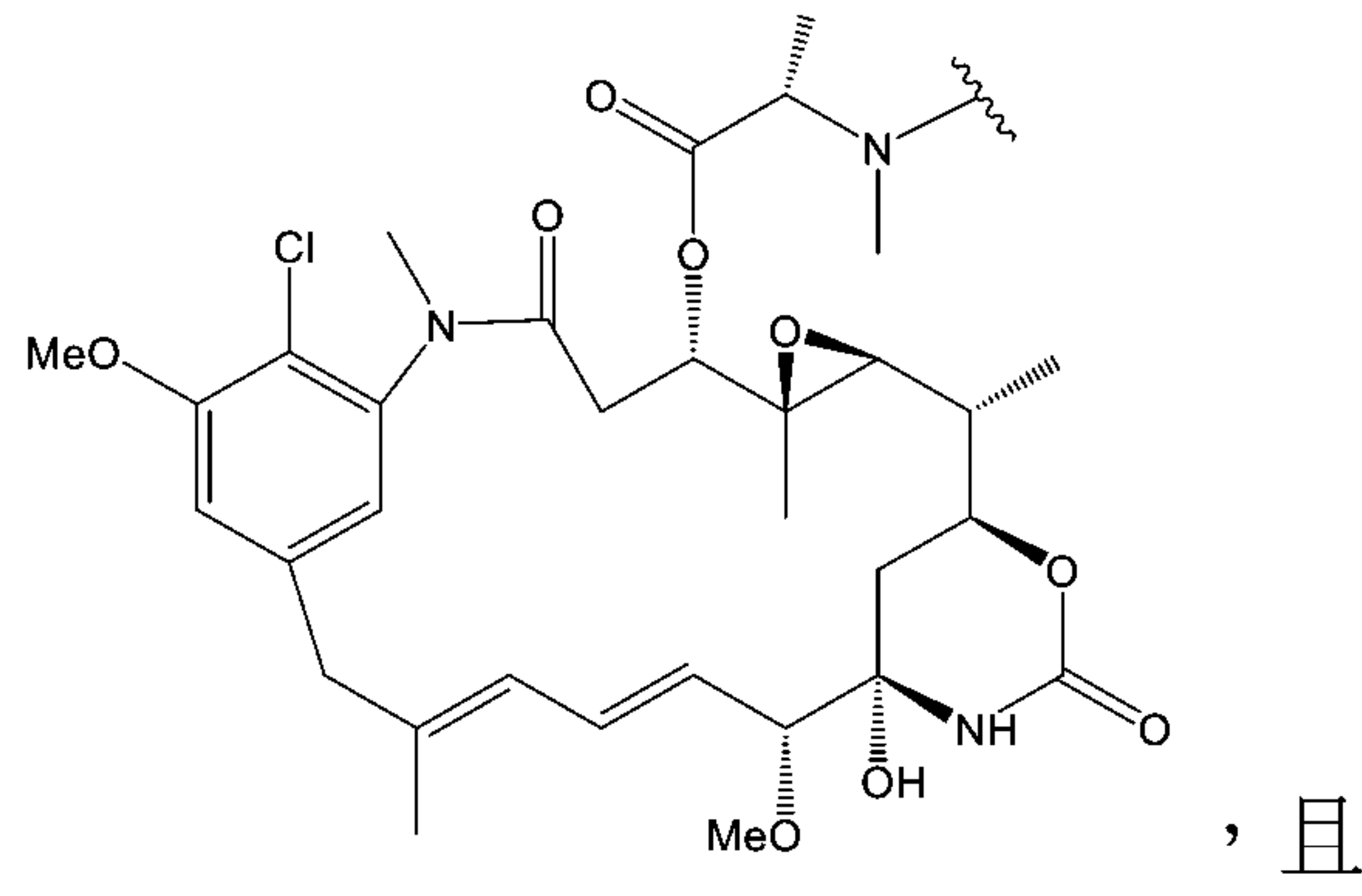
未經純化即用於步驟(c)，且步驟(a)至(c)係連續地執行，且

其中：

Ab~S—係經由位於經工程改造之半胱胺酸殘基上的硫醇基共價連接至該細胞毒性劑之經半胱胺酸工程改造之抗體(CysAb)或其抗原結合片段；且其中該 CysAb 或其抗原結合片段係包含 CDR<sub>H</sub>1 域、CDR<sub>H</sub>2 域及 CDR<sub>H</sub>3 域以及 CDR<sub>L</sub>1 域、CDR<sub>L</sub>2 域及 CDR<sub>L</sub>3 域之人類化抗 ADAM9 抗體或其 ADAM9 結合片段，該等域分別具有序列 SEQ ID NO: 24、25 及 26 以及 SEQ ID NO: 21、22、23；

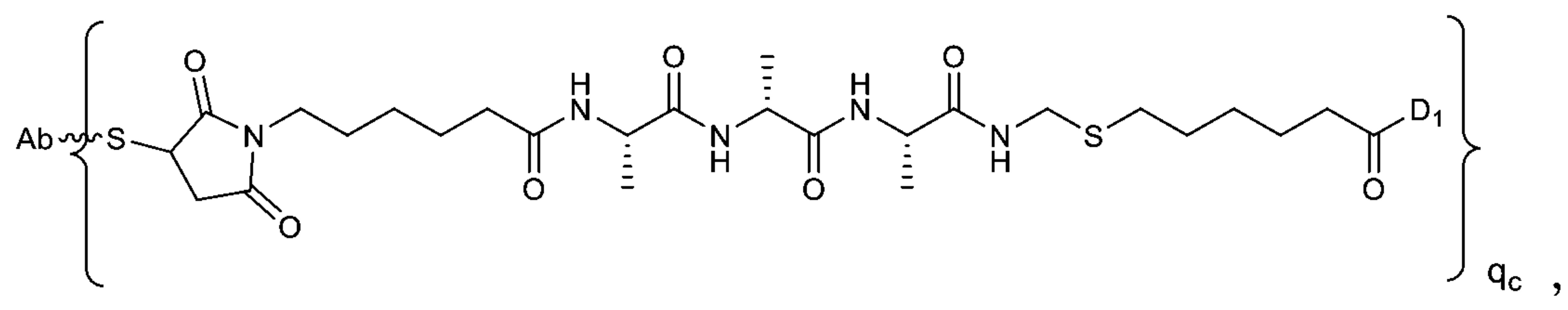
q<sub>c</sub> 為 1 或 2；

D<sub>1</sub> 係由下式表示：



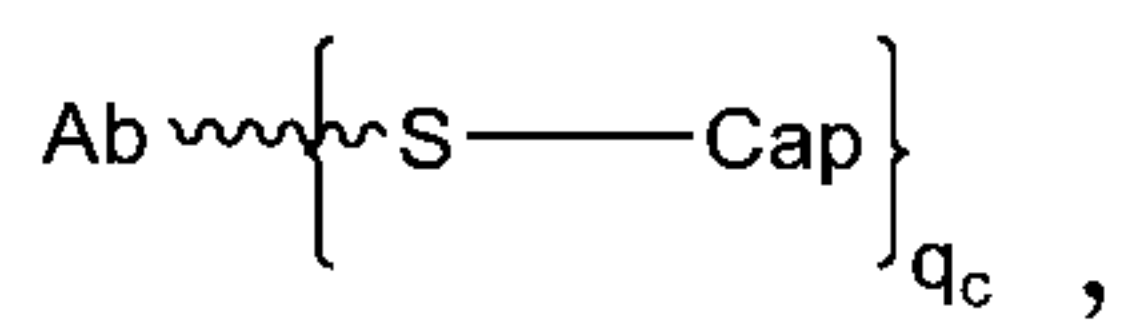
Cap 為封端劑。

【0010】 在某些實施例中，本發明提供一種製備抗體-細胞毒性劑結合物(ADC)之連續方法，該抗體-細胞毒性劑結合物(ADC)由下式表示：



該方法包括以下步驟：

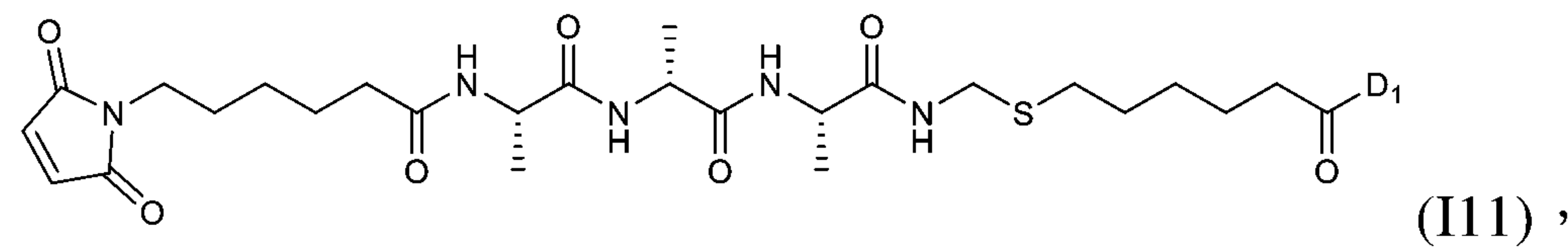
(a) 使還原劑與由下式表示之經封端的半胱胺酸工程改造之抗體(cCysAb)反應：



以形成經還原抗體或其抗原結合片段，其中該封端劑(Cap)經移除以在該經還原抗體或其抗原結合片段中形成游離硫醇(-SH)基；

(b) 使該經還原抗體或其抗原結合片段與選擇性氧化劑反應以形成 CysAb，其中經工程改造之半胱胺酸殘基中的游離硫醇基未經氧化；

(c) 使該 CysAb 與由下式表示之化合物：



或其醫藥學上可接受之鹽反應，由此形成該 ADC；及

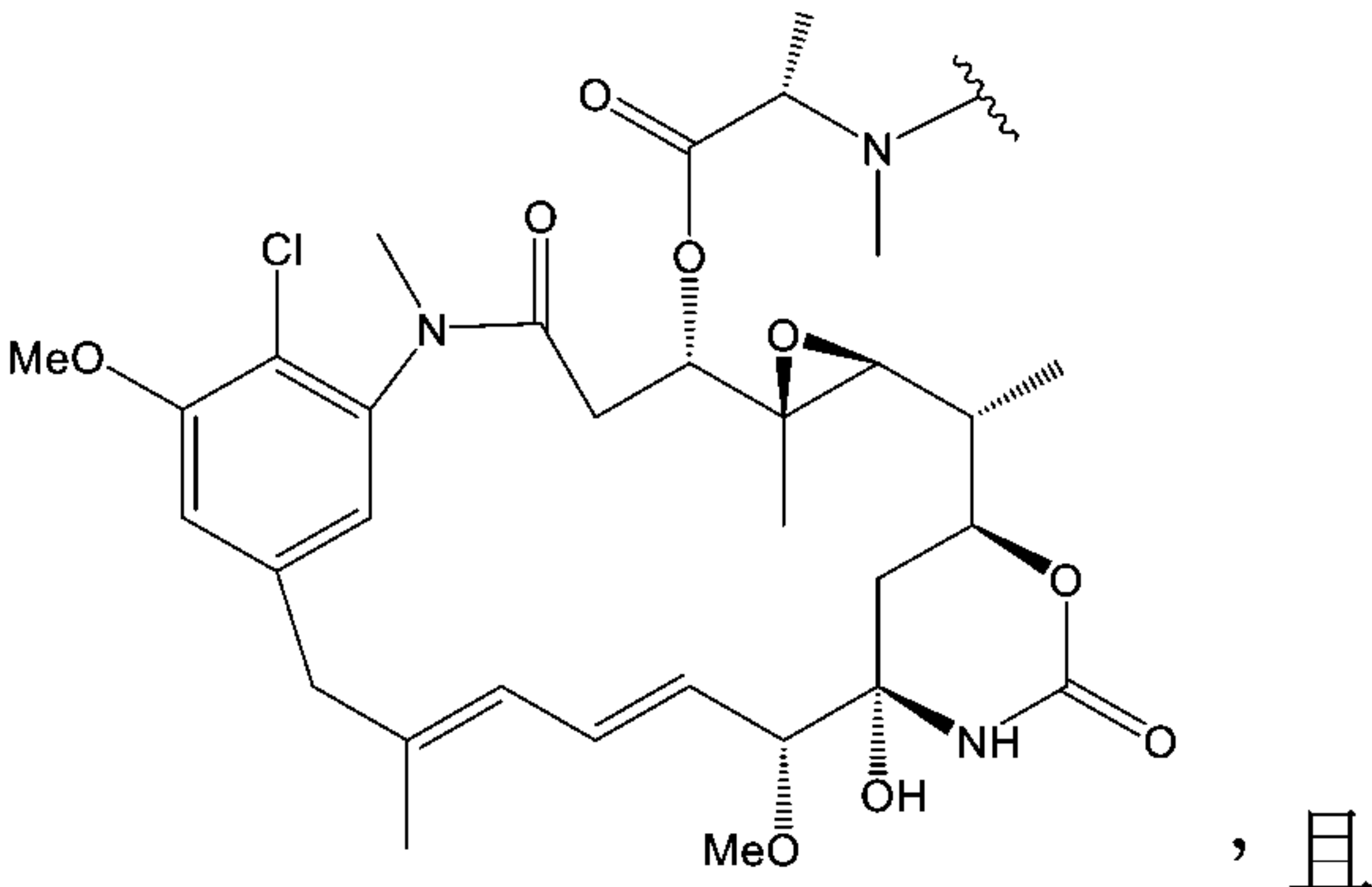
(d) 移除未結合之式(I11)化合物；

其中步驟(a)中之經還原抗體或其抗原結合片段未經純化即用於步驟(b)，步驟(b)之 CysAb 或其抗原結合片段未經純化即用於步驟(c)，且步驟(a)至(d)係連續地執行，且  
其中：

Ab~S—係經由位於經工程改造之半胱胺酸殘基上的硫醇基共價連接至該細胞毒性劑之經半胱胺酸工程改造之抗體(CysAb)或其抗原結合片段；且其中該 CysAb 或其抗原結合片段係包含 CDR<sub>H</sub>1 域、CDR<sub>H</sub>2 域及 CDR<sub>H</sub>3 域以及 CDR<sub>L</sub>1 域、CDR<sub>L</sub>2 域及 CDR<sub>L</sub>3 域之人類化抗 ADAM9 抗體或其 ADAM9 結合片段，該等域分別具有序列 SEQ ID NO: 24、25 及 26 以及 SEQ ID NO: 21、22、23；

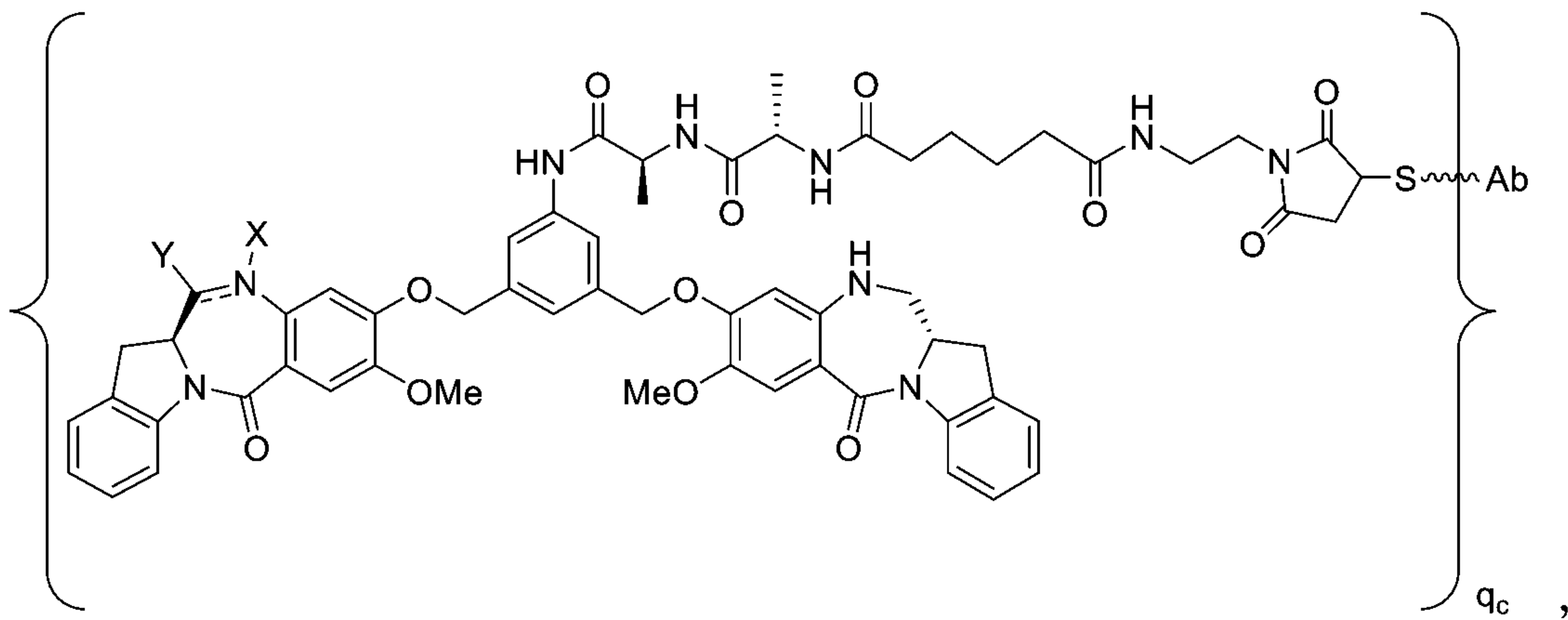
q<sub>c</sub> 為 1 或 2；

D<sub>1</sub> 係由下式表示：



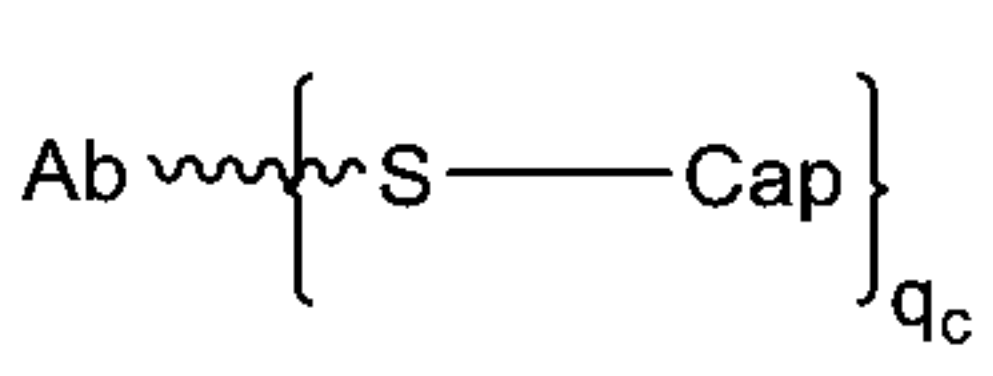
Cap 為封端劑。

【0011】 在某些實施例中，本發明提供一種製備抗體-細胞毒性劑結合物(ADC)之方法，該抗體-細胞毒性劑結合物(ADC)由下式表示：



該方法包括以下步驟：

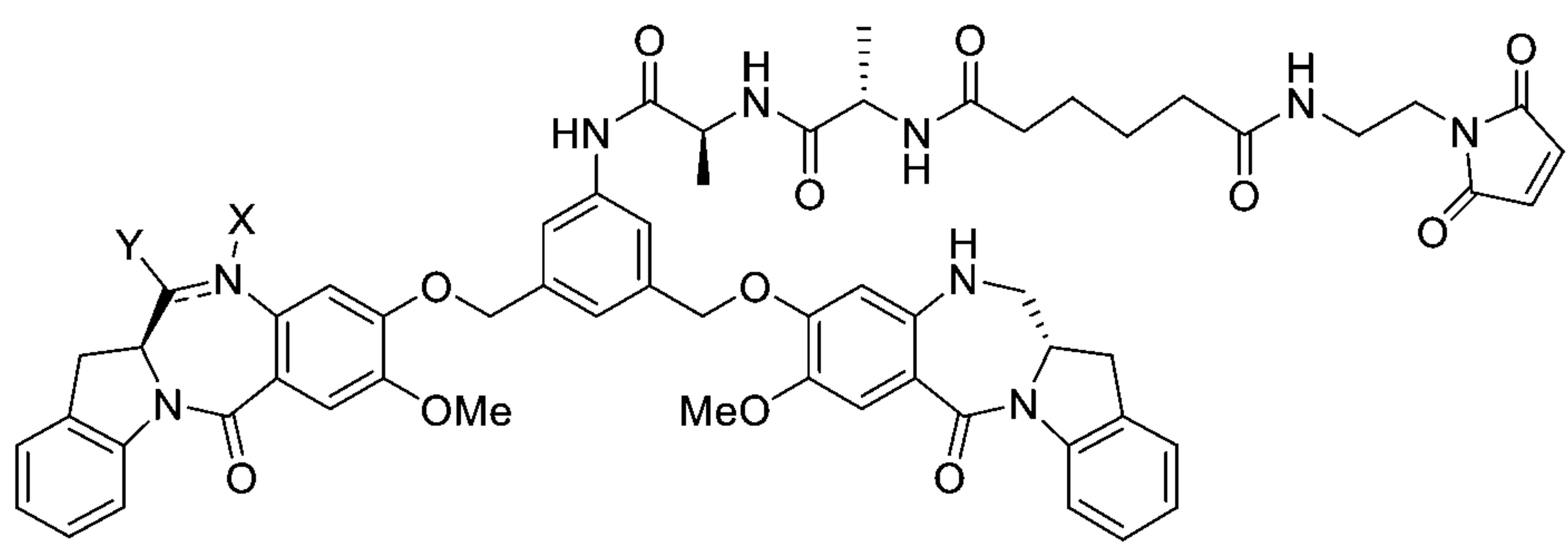
(a) 使還原劑與由下式表示之經封端的半胱胺酸工程改造之抗體(cCysAb)反應：



以形成經還原抗體或其抗原結合片段，其中該封端劑經移除以在該經還原抗體或其抗原結合片段中形成游離硫醇(-SH)基；

(b) 使該經還原抗體或其抗原結合片段與選擇性氧化劑反應以形成 CysAb，其中經工程改造之半胱胺酸殘基中的游離硫醇基未經氧化；及

(c) 使該 CysAb 與由下式表示之化合物：

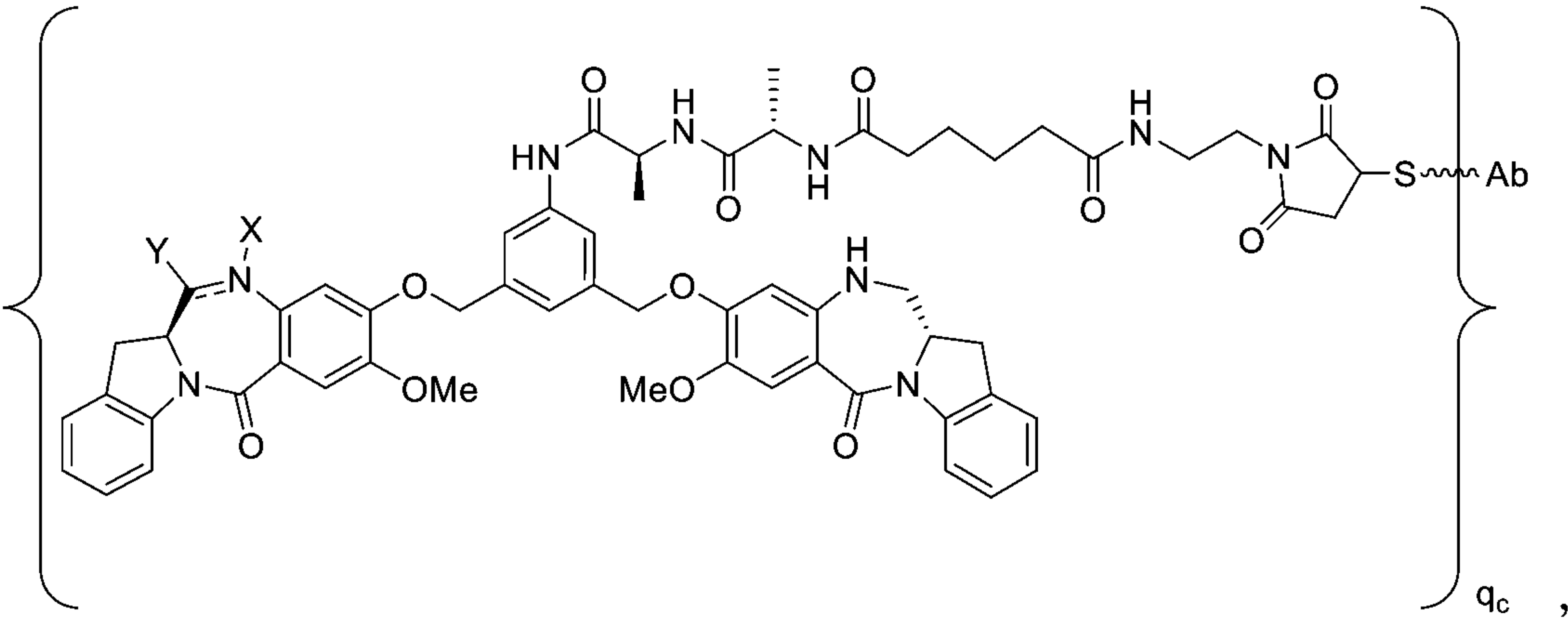


或其醫藥學上可接受之鹽反應，由此形成該 ADC，其中步驟(a)中之經還原抗體或其抗原結合片段未經純化即用於步驟(b)，且步驟(b)中之 CysAb 或其抗原結合片段未經純化即用於步驟(c)，其中：

N 與 C 之間的雙線=表示單鍵或雙鍵，其限制條件在於當其為雙鍵時，X 不存在且 Y 為-H，且當其為單鍵時，X 為-H，且 Y 為-SO<sub>3</sub>M，且 M 為 H<sup>+</sup>或陽離子；  
Ab~S一係經由位於經工程改造之半胱胺酸殘基上的硫醇基共價連接至該細胞毒性劑之經半胱胺酸工程改造之抗體或其抗原結合片段；其中該經半胱胺酸工程改造之抗體係抗 CD123 抗體或抗原結合片段，其包含：

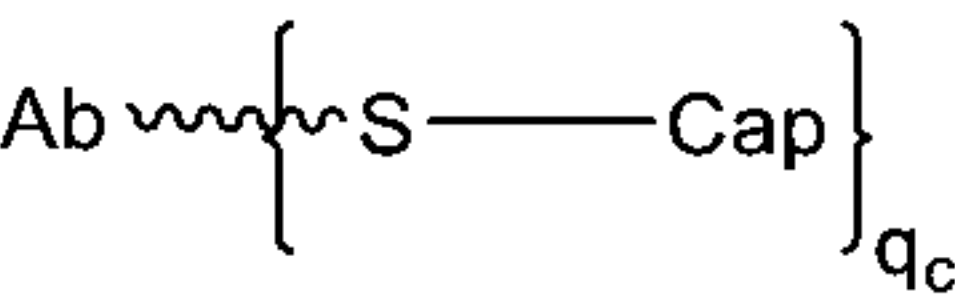
- a) 免疫球蛋白重鏈可變區，其包含具有以 SEQ ID NO:4 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>H</sub>1、具有以 SEQ ID NO:5 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>H</sub>2 及具有以 SEQ ID NO:6 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>H</sub>3；及
  - b) 免疫球蛋白輕鏈可變區，其包含具有以 SEQ ID NO:1 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>L</sub>1、具有以 SEQ ID NO:2 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>L</sub>2 及具有以 SEQ ID NO:3 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>L</sub>3；
- q<sub>c</sub> 為 1 或 2；且  
Cap 為封端劑。

【0012】 在某些實施例中，本發明提供一種製備抗體-細胞毒性劑結合物(ADC)之連續方法，該抗體-細胞毒性劑結合物(ADC)由下式表示：



該方法包括以下步驟：

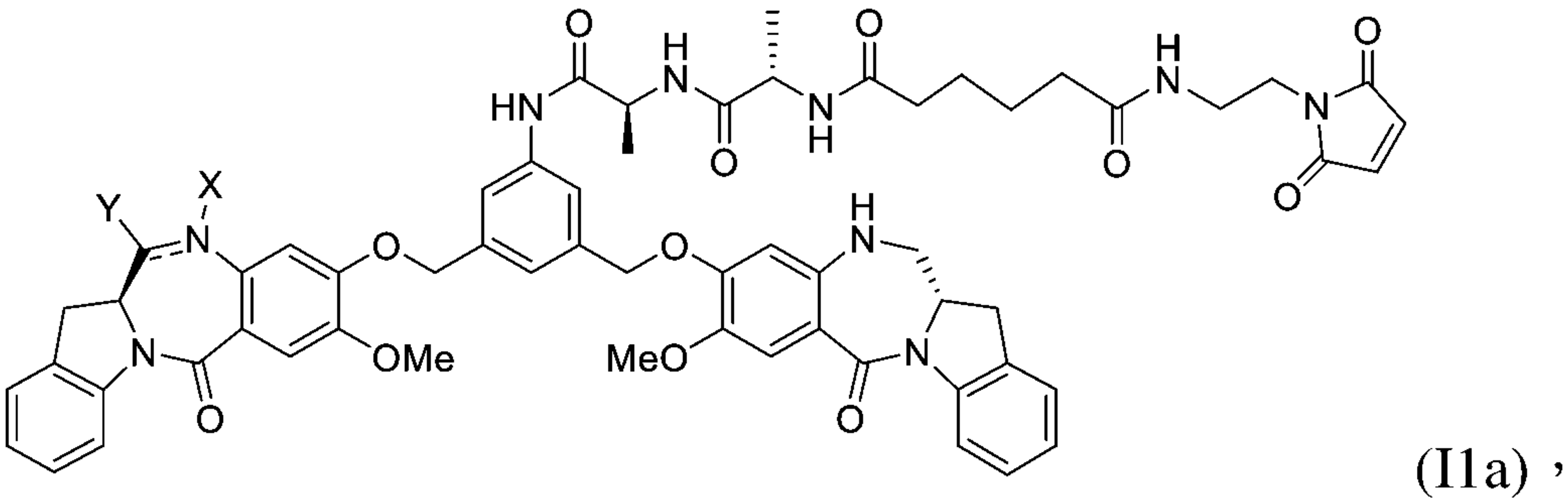
(a) 使還原劑與由下式表示之經封端的半胱胺酸工程改造之抗體(cCysAb)反應：



以形成經還原抗體或其抗原結合片段，其中該封端劑經移除以在該經還原抗體或其抗原結合片段中形成游離硫醇(-SH)基；

(b) 使該經還原抗體或其抗原結合片段與選擇性氧化劑反應以形成 CysAb，其中經工程改造之半胱胺酸殘基中的游離硫醇基未經氧化；及

(c) 使該 CysAb 與由下式表示之化合物：



或其醫藥學上可接受之鹽反應，由此形成該 ADC，其中步驟(a)中之經還原抗體或其抗原結合片段未經純化即用於步驟(b)，且步驟(b)之 CysAb 或其抗原結合片段未經純化即用於步驟(c)；且步驟(a)至(c)係連續地執行，其中：

N 與 C 之間的雙線=表示單鍵或雙鍵，其限制條件在於當其為雙鍵時，X 不存

在且 Y 為-H，且當其為單鍵時，X 為-H，且 Y 為-SO<sub>3</sub>M，且 M 為 H<sup>+</sup>或陽離子；

Ab~S 一係經由位於經工程改造之半胱胺酸殘基上的硫醇基共價連接至該細胞毒性劑之經半胱胺酸工程改造之抗體或其抗原結合片段；其中該經半胱胺酸工程改造之抗體係抗 CD123 抗體或抗原結合片段，其包含：

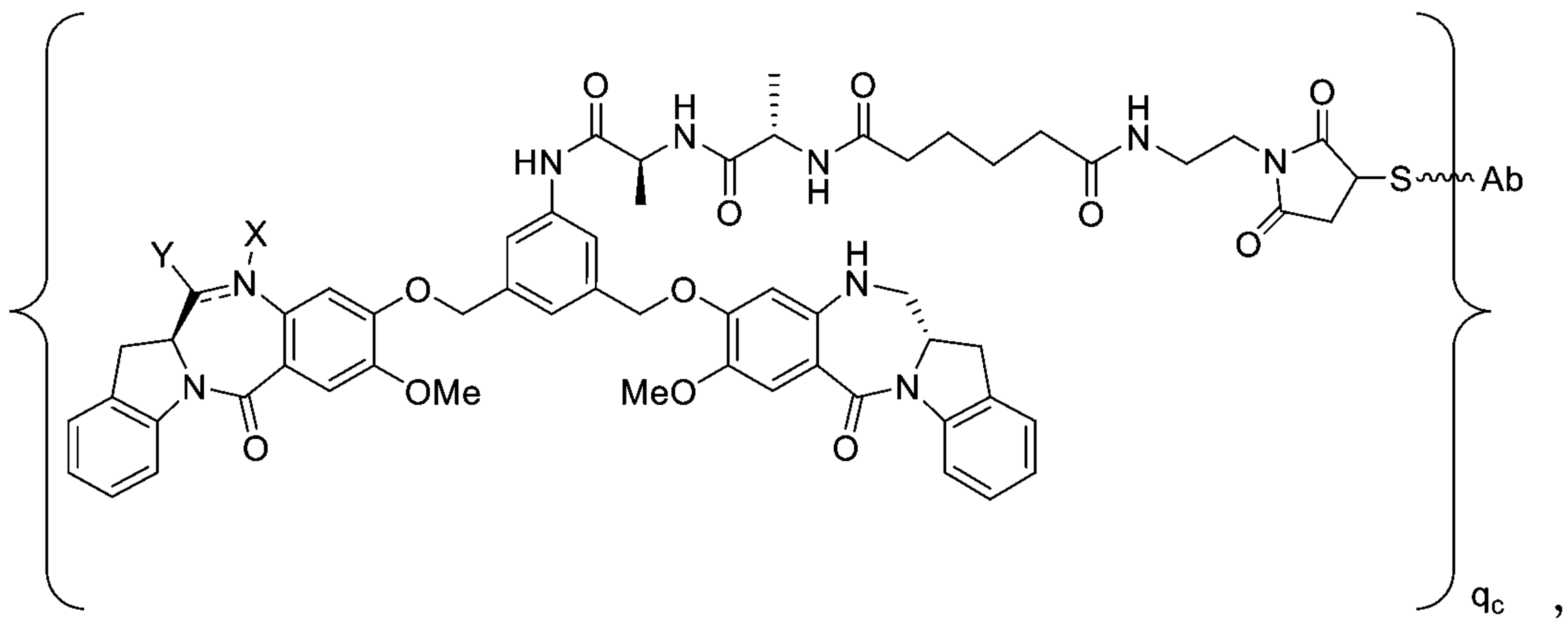
a) 免疫球蛋白重鏈可變區，其包含具有以 SEQ ID NO:4 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>H</sub>1、具有以 SEQ ID NO:5 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>H</sub>2 及具有以 SEQ ID NO:6 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>H</sub>3；及

b) 免疫球蛋白輕鏈可變區，其包含具有以 SEQ ID NO:1 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>L</sub>1、具有以 SEQ ID NO:2 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>L</sub>2 及具有以 SEQ ID NO:3 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>L</sub>3；

q<sub>c</sub> 為 1 或 2；且

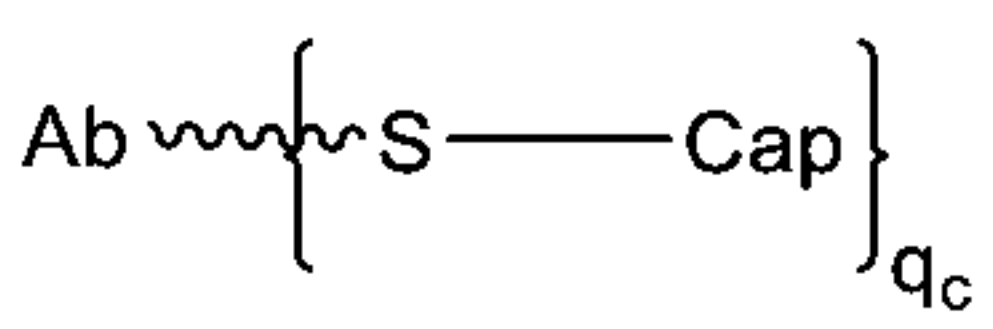
Cap 為封端劑。

【0013】 在某些實施例中，本發明提供一種製備抗體-細胞毒性劑結合物(ADC)之連續方法，該抗體-細胞毒性劑結合物(ADC)由下式表示：



該方法包括以下步驟：

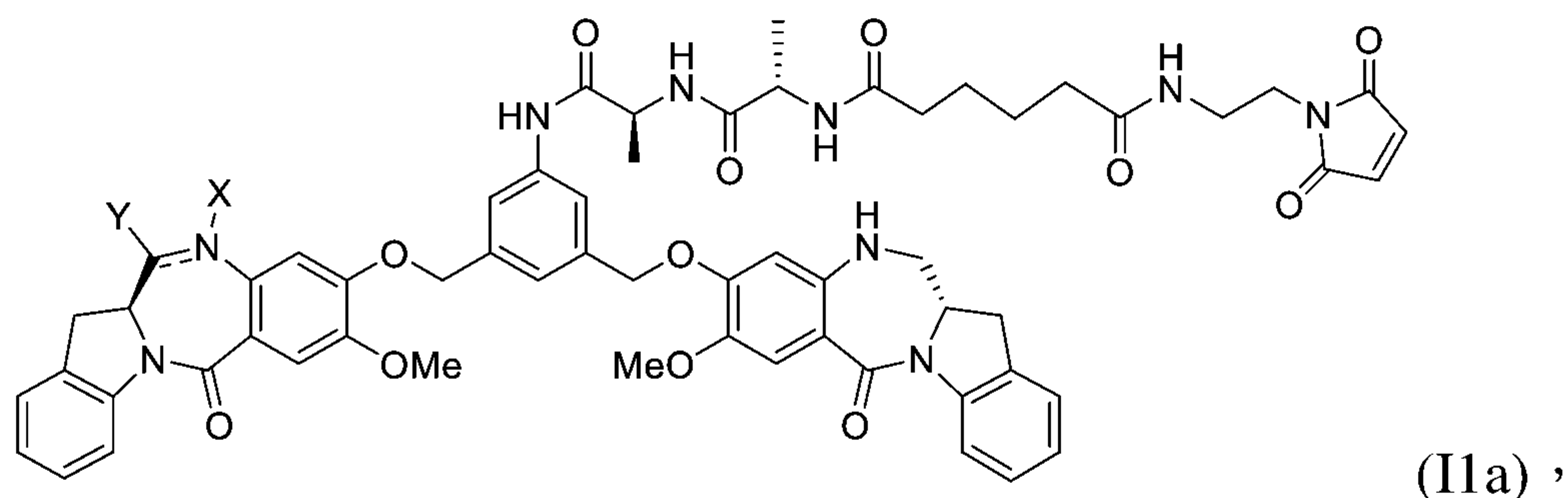
(a) 使還原劑與由下式表示之經封端的半胱胺酸工程改造之抗體(cCysAb)反應：



以形成經還原抗體或其抗原結合片段，其中該封端劑經移除以在該經還原抗體或其抗原結合片段中形成游離硫醇(-SH)基；

(b) 使該經還原抗體或其抗原結合片段與選擇性氧化劑反應以形成 CysAb，其中經工程改造之半胱胺酸殘基中的游離硫醇基未經氧化；及

(c) 使該 CysAb 與由下式表示之化合物：



或其醫藥學上可接受之鹽反應，由此形成該 ADC；及

(d) 移除未結合之式(I1a)化合物，其中步驟(a)中之經還原抗體或其抗原結合片段未經純化即用於步驟(b)，且步驟(b)之 CysAb 或其抗原結合片段未經純化即用於步驟(c)；且步驟(a)至(d)係連續地執行，

其中：

N 與 C 之間的雙線=表示單鍵或雙鍵，其限制條件在於當其為雙鍵時，X 不存在且 Y 為-H，且當其為單鍵時，X 為-H，且 Y 為-SO<sub>3</sub>M，且 M 為 H<sup>+</sup>或陽離子；

Ab~S—係經由位於經工程改造之半胱胺酸殘基上的硫醇基共價連接至該細胞毒性劑之經半胱胺酸工程改造之抗體或其抗原結合片段；其中該經半胱胺酸工程改造之抗體係抗 CD123 抗體或抗原結合片段，其包含：

a) 免疫球蛋白重鏈可變區，其包含具有以 SEQ ID NO:4 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>H1</sub>、具有以 SEQ ID NO:5 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>H2</sub> 及具有以 SEQ ID NO:6 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>H3</sub>；及

b) 免疫球蛋白輕鏈可變區，其包含具有以 SEQ ID NO:1 陳述之胺基酸序列的

CDR<sub>L</sub>1、具有以 SEQ ID NO:2 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>L</sub>2 及具有以 SEQ ID NO:3 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>L</sub>3；

q<sub>c</sub> 為 1 或 2；且

Cap 為封端劑。

【0014】 在某些實施例中，本文所述之方法中的任一步驟均可在惰性氛圍(例如 N<sub>2</sub>)下進行。在某些實施例中，本文所述之方法係在惰性氛圍(例如 N<sub>2</sub>)下進行。在某些實施例中，本文所述之方法中的任一步驟均可在 O<sub>2</sub> 存在下進行。在某些實施例中，本文所述之方法係在 O<sub>2</sub> 存在下進行。

【0015】 預期除非明確地否認或不適用，否則本文所述之任一實施例，包括僅在本發明之一態樣中描述的彼等(而非在其他態樣中描述，抑或在其他態樣中重複)及僅在實例中描述之彼等，均可與本發明之任一或多個其他實施例組合。

#### 【圖式簡單說明】

【0016】 圖 1 顯示所用之氧化劑 DHAA 及還原劑 2-二苯基膦基乙胺的量對 DAR 之影響。

【0017】 圖 2 顯示針對 TCEP 還原之反應時間及溫度對 DAR 之影響。

【0018】 圖 3 顯示針對 TCEP 還原之反應時間及溫度對單體百分率之影響。

【0019】 圖 4 顯示用於還原反應之 TCEP 的量對 DAR 之影響。

【0020】 圖 5 顯示用於實例 5 中描述之 CD123 靶向性抗體藥物結合物(ADC)之整合連續製造過程。Ab 係指抗 CD123 單株抗體 G4723A。

【0021】 圖 6 顯示用於實例 5 中描述之 CD123 靶向性 ADC 之整合製造過程的逆流 TFF 純化。

【0022】 圖 7 顯示在線過程自動化技術(PAT)之使用可如何用於增加控制及可偵測性。

【0023】 圖 8 顯示可能用於在升高溫度下脈衝化結合反應之加熱及冷卻反應器的示意圖。在脈衝反應器(標記為「PR」)中，夾套溫度升高，使得含於線圈內之反應組分暫時地經加熱以誘導短暫溫度漂移。接著，在冷卻反應器(標記為「CR」)中，夾套溫度保持在較冷溫度下以使線圈內之反應組分自升高溫度冷卻下來。此可減少反應期間出現之聚集之量。滯留時間反應器(RTR)維持在脈衝完成之後所需的反應溫度，且其體積可基於所需反應時間。

## 【實施方式】

### 1. 定義

【0024】 為了促進理解本發明，下文定義多個術語及措辭。

【0025】 如本文所用，術語「抗體藥物結合物」(ADC)及「免疫結合物」係指連接至細胞結合劑(例如抗體或其抗原結合片段)且由以下通式定義之化合物或其衍生物：D-L-A，其中 D=細胞毒性藥物，L=連接體，且 A=抗體或抗體片段。ADC 亦可以逆序由以下通式定義：A-L-D。ADC 可包含每個抗體或其抗原結合片段多個藥物及連接體，例如(D-L)<sub>4</sub>-A 或 A-(L-D)<sub>2</sub>。術語「抗體藥物結合物」及「免疫結合物」在本文中可互換使用。

【0026】 除非另外指示，否則如本文中可互換使用之術語「(人類) IL-3R $\alpha$ 」、「介白素-3 受體  $\alpha$ 」或「CD123」係指任何原生(人類) IL-3R $\alpha$  或 CD123。CD123 蛋白係雜二聚細胞介素受體之介白素 3 特異性次單元(IL-3 受體或 IL-3R)。IL-3R 包含配位體特異性  $\alpha$  次單元，及由介白素 3 (IL3)、群落刺激因子 2 (CSF2 / GM-CSF)及介白素 5 (IL5)之受體共享的信號轉導通用  $\beta$  次單元(亦稱作 CD131)。CD123/IL-3R $\alpha$  與 IL3 之結合取決於該  $\beta$  次單元。該  $\beta$  次單元藉由配位體結合來活化，且係 IL3 之生物活性所需的。

【0027】 關於 CD123 之所有此等上述術語均可指如本文所指示之蛋白質或核

酸序列。術語「CD123/IL-3R $\alpha$ 」涵蓋「全長」未加工 CD123/IL-3R $\alpha$ ，以及由細胞內之加工產生的任何形式之 CD123/IL-3R $\alpha$ 。該術語亦涵蓋 CD123/IL-3R $\alpha$  蛋白或核酸之天然存在之變異體，例如剪接變異體、等位基因變異體及同功異型物。本文所述之 CD123/IL-3R $\alpha$  多肽及聚核苷酸可自多種來源，諸如自人類組織類型或自另一來源分離，或藉由重組或合成方法製備。CD123/IL-3R $\alpha$  序列之實例包括但不限於 NCBI 參考編號 NP\_002174 及 NM\_002183 (針對人類 CD123 變異體 1 之蛋白質及核酸序列)，以及 NP\_001254642 及 NM\_001267713 (針對人類 CD123 變異體 2 之蛋白質及核酸序列)。

【0028】 術語「ADAM9」係指含有去整合素及金屬蛋白酶域之蛋白 9，其為 ADAM 分子家族之成員。其經合成為無活性形式，該無活性形式經蛋白水解裂解以產生活性酶。上游處之加工對於酶原之活化而言尤其重要。ADAM9 表現於纖維母細胞(Zigrino, P.等人 (2011) 「*The Disintegrin-Like And Cysteine-Rich Domains Of ADAM-9 Mediate Interactions Between Melanoma Cells And Fibroblasts*,」 J. Biol. Chem. 286:6801-6807)、經活化血管平滑肌細胞(Sun, C.等人 (2010) 「*ADAM15 Regulates Endothelial Permeability And Neutrophil Migration Via Src/ERK1/2 Signalling*,」 Cardiovasc. Res. 87:348-355)、單核球(Namba, K.等人 (2001) 「*Involvement Of ADAM9 In Multinucleated Giant Cell Formation Of Blood Monocytes*,」 Cell. Immunol. 213:104-113)及經活化巨噬細胞(Oksala, N.等人 (2009) 「*ADAM-9, ADAM-15, And ADAM-17 Are Upregulated In Macrophages In Advanced Human Atherosclerotic Plaques In Aorta And Carotid And Femoral Arteries – Tampere Vascular Study*,」 Ann. Med. 41:279-290)中。代表性人類 ADAM9 多肽為 NCBI 序列 NP\_003807。在 ADAM9 多肽之 819 個胺基酸殘基中，殘基 1-28 為信號序列，殘基 29-697 為細胞外域，殘基 698-718 為跨膜域，且殘基 719-819 為細

胞內域。三個結構域位於細胞外域內：**Reprolysin (M12B)**家族鋅金屬蛋白酶域(在大約殘基 212-406 處)；去整合素域(在大約殘基 423-497 處)；及 EGF 樣域(在大約殘基 644-697 處)。多種轉譯後修飾及同功異型物已經鑑別且該蛋白質在其到達質膜以產生成熟蛋白質之前在反面高爾基體網狀結構中經蛋白水解裂解。前域之移除經由兩個不同位點處之裂解而發生。加工最有可能在前域與催化域之間的邊界處(Arg-205/Ala-206)藉由諸如弗林蛋白酶之原蛋白轉化酶而發生。額外上游裂解原蛋白轉化酶位點(Arg-56/Glu-57)在 ADAM9 之活化中具有重要作用。代表性食蟹獼猴 ADAM9 多肽為 NCBI 序列 XM\_005563126.2，包括可能 28 個胺基酸殘基之信號序列。該蛋白質之 **Reprolysin (M12B)**家族鋅金屬蛋白酶域在大約殘基 212-406 處)；該蛋白質之去整合素域在大約殘基 423-497 處。

**【0029】** 術語「抗體」意謂免疫球蛋白分子，其經由該免疫球蛋白分子之可變區內的至少一個抗原識別位點識別且特異性地結合於標靶，諸如蛋白質、多肽、肽、碳水化合物、聚核苷酸、脂質或前述各物之組合。如本文所用，術語「抗體」涵蓋完整多株抗體、完整單株抗體、抗體片段(諸如 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub> 及 Fv 片段)、單鏈 Fv (scFv)突變體、多特異性抗體(諸如雙特異性抗體)、嵌合抗體、人類化抗體、人類抗體、包含抗體之抗原決定部分的融合蛋白及包含抗原識別位點之任何其他經修飾免疫球蛋白分子，只要該等抗體展現所需生物活性即可。抗體基於其重鏈恆定域之屬性(分別稱作  $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$  及  $\mu$ )可為免疫球蛋白之五種主要類別中的任一者：IgA、IgD、IgE、IgG 及 IgM，或其亞類(同型)(例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 及 IgA2)。不同類別之免疫球蛋白具有不同且熟知之次單元結構及三維組態。抗體可為裸的或結合於其他分子，諸如毒素、放射性同位素等。

**【0030】** 在一些實施例中，抗體為非天然存在之抗體。在一些實施例中，抗

體自天然組分經純化。在一些實施例中，抗體係重組產生的。在一些實施例中，抗體係藉由融合瘤產生的。

【0031】 術語「抗 CD123 抗體」、「抗 IL-3R $\alpha$  抗體」或「(特異性地)結合於 CD123/IL-3R $\alpha$  之抗體」係指能夠以充足親和力結合 CD123 / IL-3R $\alpha$  的抗體，以致該抗體可用作靶向 CD123/IL-3R $\alpha$  之診斷及/或治療劑。除非另外規定，否則抗 CD123/IL-3R $\alpha$  抗體與無關、非 CD123/IL-3R $\alpha$  蛋白之結合程度小於該抗體與 CD123/IL-3R $\alpha$  之結合的約 10%，如例如藉由放射性免疫分析(RIA)所量測。在某些實施例中，結合於 CD123/IL-3R $\alpha$  之抗體具有 $\leq 0.5$  nM、 $\leq 0.3$  nM、 $\leq 0.1$  nM、 $\leq 0.05$  nM 或 $\leq 0.01$  nM 之解離常數( $K_d$ )。在一個實施例中，抗 CD123/IL-3R $\alpha$  抗體不結合通用  $\beta$  鏈 CD131。在一個實施例中，抗 CD123/IL-3R $\alpha$  抗體不結合 CD123 中由諸如 7G3 (小鼠 IgG<sub>2a</sub>)、6H6 (小鼠 IgG<sub>1</sub>)及 9F5 (小鼠 IgG<sub>1</sub>)之已知且市售 CD123 抗體結合之相同抗原決定基(Sun 等人, *Blood* 87(1): 83-92, 1996)。

【0032】 本文提供本發明之抗 CD123/IL-3R $\alpha$  抗體及其抗原結合片段之序列。

【0033】 術語「抗體片段」係指完整抗體之一部分且係指完整抗體之抗原決定可變區。抗體片段之實例包括但不限於 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub> 及 F<sub>v</sub> 片段、線性抗體、單鏈抗體及由抗體片段形成之多特異性抗體。術語抗體之「抗原結合片段」包括抗體中保持特異性地結合於抗原之能力的一或多個片段。已顯示抗體之抗原結合功能可藉由全長抗體之某些片段執行。涵蓋於術語抗體之「抗原結合片段」內的結合片段之實例包括(但不限於)：(i) Fab 片段，即由 V<sub>L</sub>、V<sub>H</sub>、C<sub>L</sub> 及 C<sub>H1</sub> 域組成之單價片段(例如，藉由木瓜蛋白酶消化之抗體產生三個片段：兩個抗原結合 Fab 片段及一個不結合抗原之 Fc 片段)；(ii) F(ab')<sub>2</sub> 片段，即包含由鉸鏈區處之二硫橋連接的兩個 Fab 片段之二價片段(例如，藉由胃蛋白酶消化之抗體產

生兩個片段：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)  $F_d$  片段，其由  $V_H$  及  $C_{H1}$  域組成(亦即，重鏈中包括於  $Fab$  中的彼部分)；(iv)由抗體單臂之  $V_L$  及  $V_H$  域組成的  $F_v$  片段，及相關二硫化物連接之  $F_v$ ；(v)  $dAb$  (域抗體)或  $sdAb$  (單域抗體)片段(Ward 等人, *Nature* 341:544-546, 1989)，其由  $V_H$  域組成；及(vi)經分離互補決定區(CDR)。

**【0034】** 「單株抗體」係指牽涉於單一抗原決定子或抗原決定基之高度特異性識別及結合中的均質抗體群體。此與多株抗體形成對照，多株抗體典型地包括針對不同抗原決定子之不同抗體。術語「單株抗體」涵蓋完整及全長單株抗體，以及抗體片段(諸如  $Fab$ 、 $Fab'$ 、 $F(ab')_2$ 、 $F_v$ )、單鏈( $scFv$ )突變體、包含抗體部分之融合蛋白及包含抗原識別位點之任何其他經修飾免疫球蛋白分子。此外，「單株抗體」係指以多種方式製得之該等抗體，該等方式包括但不限於藉由融合瘤、噬菌體選擇、重組表現及基因轉殖動物。

**【0035】** 術語「人類化抗體」係指非人類(例如鼠科動物)抗體之形式，該等形式為特異性免疫球蛋白鏈、嵌合免疫球蛋白或其含有最小非人類(例如鼠科動物)序列之片段。典型地，人類化抗體係其中來自互補決定區(CDR)之殘基由來自非人類物種(例如小鼠、大鼠、兔、倉鼠)之 CDR 的殘基置換之具有所需特異性、親和力及能力之人類免疫球蛋白(Jones 等人, *Nature* 321:522-525, 1986；Riechmann 等人, *Nature* 332:323-327, 1988；Verhoeyen 等人, *Science* 239:1534-1536, 1988)。

**【0036】** 在一些情況下，人類免疫球蛋白之  $F_v$  構架區(FR)殘基經來自非人類物種之具有所需特異性、親和力及能力之抗體中的相應殘基置換。該人類化抗體可藉由  $F_v$  構架區中及/或經置換非人類殘基內額外殘基之取代進一步經修飾以細化及最佳化抗體特異性、親和力及/或能力。一般而言，人類化抗體將包含實

質上全部的至少一個且典型地兩個或三個可變域，該等可變域含有全部或實質上全部的對應於非人類免疫球蛋白之 CDR 區，而全部或實質上全部 FR 區為人類免疫球蛋白共有序列之彼等。人類化抗體亦可包含免疫球蛋白恆定區或域(Fc) (典型地，人類免疫球蛋白之恆定區或域)的至少一部分。用於產生人類化抗體之方法之實例描述於美國專利 5,225,539 及 5,639,641，Roguska 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(3):969-973, 1994；及 Roguska 等人, *Protein Eng.* 9(10):895-904, 1996 (均以引用之方式併入本文中)中。在一些實施例中，「人類化抗體」為表面重塑抗體。在一些實施例中，「人類化抗體」為 CDR 移植抗體。

【0037】 抗體之「可變區」係指抗體輕鏈之可變區或抗體重鏈之可變區，單獨或組合。重鏈及輕鏈之可變區各自由四個藉由三個互補決定區(CDR) (亦稱作高變區)連接之構架區(FR)組成。各鏈中之 CDR 藉由 FR 緊密地保持在一起且與來自另一鏈之 CDR 一起促進形成抗體之抗原結合位點。存在至少兩種用於測定 CDR 之技術：(1)基於交叉物種序列變異性之方法(亦即，Kabat 等人 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第 5 版, 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.)；及(2)基於抗原-抗體複合物之結晶學研究的方法(Al-lazikani 等人, *J. Molec. Biol.* 273:927-948, 1997)。此外，此兩種方法之組合有時用於此項技術中以測定 CDR。

【0038】 當提及可變域中之殘基(大約為輕鏈之殘基 1-107 及重鏈之殘基 1-113)時，一般使用 Kabat 編號系統(例如 Kabat 等人, *Sequences of Immunological Interest*, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。

【0039】 如 Kabat 中之胺基酸位置編號係指在 Kabat 等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes

of Health, Bethesda, Md. (1991) (以引用之方式併入本文中)中用於抗體之彙編的重鏈可變域或輕鏈可變域之編號系統。使用此編號系統，實際線性胺基酸序列可含有較少或額外胺基酸，其對應於可變域之 FR 或 CDR 的縮短或插入其中。例如，重鏈可變域可包括在 H2 之殘基 52 後面的單一胺基酸插入(根據 Kabat 之殘基 52a)及在重鏈 FR 殘基 82 後面插入之殘基(例如，根據 Kabat 的殘基 82a、82b 及 82c 等)。殘基之 Kabat 編號可針對既定抗體藉由在該抗體之序列的同源區處與「標準」Kabat 編號序列比對來測定。而 Chothia 指出結構環之位置(Chothia 及 Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917,1987)。當使用 Kabat 編號慣例編號時 Chothia CDR-H1 環之末端在 H32 與 H34 之間變化，視該環之長度而定。此係因為 Kabat 編號方案將插入置於 H35A 及 H35B 處—若 35A 及 35B 均不存在，則該環在 32 處結束；若僅 35A 存在，則該環在 33 處結束；若 35A 及 35B 均存在，則該環在 34 處結束。AbM 高變區表示在 Kabat CDR 與 Chothia 結構環之間的折衷，且藉由 Oxford Molecular 之 AbM 抗體模型化軟體使用。

| 環  | Kabat    | AbM          | Chiothia    |
|----|----------|--------------|-------------|
| L1 | L24-L34  | L24-L34      | L24-L34     |
| L2 | L50-L56  | L50-L56      | L50-L56     |
| L3 | L89-L97  | L89-L97      | L89-L97     |
| H1 | H31-H35B | H26-H35B     | H26-H32..34 |
|    |          | (Kabat 編號)   |             |
| H1 | H31-H35  | H26-H35      | H26-H32     |
|    |          | (Chothia 編號) |             |
| H2 | H50-H65  | H50-H58      | H52-H56     |
| H3 | H9S-H102 | H95-H102     | H95-H102    |

【0040】 如 Kabat 或 EU 編號方案中之 EU 指數或 EU 指數係指基於 Edelman 等人, 1969, Proc Natl Acad Sci USA 63:78-85 (以引用之方式併入本文中)之人類 IgG1 Eu 抗體的編號系統。

【0041】 術語「人類抗體」意謂由人類產生之抗體，或使用此項技術中已知

之任何技術製得的具有對應於由人類產生之抗體之胺基酸序列的抗體。在某些實施例中，該人類抗體不具有非人類序列。人類抗體之此定義包括完整或全長抗體，或其抗原結合片段。

**【0042】** 術語「嵌合抗體」係指其中免疫球蛋白分子之胺基酸序列係源於兩種或更多種物種之抗體。典型地，輕鏈及重鏈之可變區對應於源於一種哺乳動物物種(例如小鼠、大鼠、兔等)的具有所需特異性、親和力及能力之抗體之可變區，而恆定區與源於另一物種(通常為人類)之抗體中的序列同源以避免或減少在彼物種(例如人類)中引發免疫反應之機會。在某些實施例中，嵌合抗體可包括包含至少一種人類重鏈及/或輕鏈多肽之抗體或其抗原結合片段，諸如包含鼠科動物輕鏈及人類重鏈多肽之抗體。

**【0043】** 術語「抗原決定基」或「抗原決定子」在本文中可互換使用且係指抗原中能夠由特定抗體識別且特異性地結合之彼部分。當抗原為多肽時，抗原決定基可由連續胺基酸及藉由蛋白質之三重摺疊並置之非連續胺基酸形成。由連續胺基酸形成之抗原決定基在蛋白質變性時典型地經保持，而藉由三重摺疊形成之抗原決定基在蛋白質變性時典型地喪失。抗原決定基典型地包括呈獨特空間構形之至少 3 個且更通常地至少 5 個或 8-10 個胺基酸。

**【0044】** 「結合親和力」一般係指在分子(例如抗體)之單一結合位點與其結合搭配物(例如抗原)之間的非共價相互作用之合計強度。除非另外指示，否則如本文所用，「結合親和力」係指反映結合對之成員(例如，抗體及抗原)之間的 1:1 相互作用之固有結合親和力。分子 X 對其搭配物 Y 之親和力一般可由解離常數( $K_d$ )或半最大有效濃度( $EC_{50}$ )表示。親和力可藉由此項技術中已知之常見方法，包括本文所述之彼等來量測。低親和力抗體一般緩慢地結合抗原且傾向於快速地解離，而高親和力抗體一般更快結合抗原且傾向於保持更久結合。此項技術

中已知多種量測結合親和力之方法，其中任一者均可用於本發明之目的。本文描述特定說明性實施例。

【0045】 「特異性地結合」一般意謂抗體經由其抗原結合域結合於抗原決定基，且該結合使得該抗原結合域與該抗原決定基之間需要一些互補性。根據此定義，與抗體將結合於隨機、無關抗原決定基相比，當抗體更容易地經由其抗原結合域結合於一抗原決定基時，據說該抗體「特異性地結合」於彼抗原決定基。術語「特異性」在本文中用於限定特定抗體結合於特定抗原決定基時之相關親和力。例如，抗體「A」可被認為與抗體「B」相比對既定抗原決定基具有較高特異性，或據說與抗體「A」對相關抗原決定基「D」之特異性相比，抗體「A」可以較高特異性結合於抗原決定基「C」。

【0046】 如本文所用，術語「免疫結合物」、「結合物」或「ADC」係指連接至細胞結合劑(例如抗體或其抗原結合片段)之化合物或其衍生物。

【0047】 「連接體」係能夠以穩定、共價方式連接諸如本文所述之細胞毒性劑(例如吲哚啉并苯并二氮呋(IGN)化合物)之化合物(通常為藥物)至諸如抗體或其片段之細胞結合劑的任何化學部分。連接體在使該化合物或該抗體保持活性之條件下可易經受或實質上抵抗酸誘導性裂解、光誘導性裂解、肽酶誘導性裂解、酯酶誘導性裂解及二硫鍵裂解。合適連接體為此項技術中熟知的且包括例如二硫基、硫醚基、酸不穩定基團、光不穩定基團、肽酶不穩定基團及酯酶不穩定基團。連接體亦包括帶電連接體，及如本文所述及此項技術中已知之其親水形式。

【0048】 術語「經半胱胺酸工程改造之抗體」包括具有通常未存在於抗體輕鏈或重鏈之既定殘基處的至少一個 Cys 之抗體。該等 Cys 亦可稱作「經工程改造之 Cys」，可使用任何習知分子生物學或重組 DNA 技術(例如，藉由用 Cys

之編碼序列置換在標靶殘基處的非 Cys 殘基之編碼序列)經工程改造。例如，若初始殘基為具有編碼序列 5'-UCU-3'之 Ser，則該編碼序列可突變(例如，藉由定點誘變)為 5'-UGU-3'，其編碼 Cys。在某些實施例中，本發明之經 Cys 工程改造之抗體在重鏈中具有經工程改造之 Cys。在某些實施例中，經工程改造之 Cys 在重鏈之 CH3 域中或附近。

**【0049】** 術語「未配對半胱胺酸」係指位於細胞結合劑(例如抗體或其抗原結合片段)上之半胱胺酸殘基，其未牽涉於與該細胞結合劑之另一半胱胺酸殘基形成二硫鍵。在某些實施例中，抗體或其抗原結合片段之未配對半胱胺酸係未牽涉於形成鏈間或鏈內二硫鍵之半胱胺酸殘基。在某些實施例中，未配對半胱胺酸係經工程改造之半胱胺酸殘基。

**【0050】** 術語「封端劑」係指具有硫醇-SH 基團之試劑，其可與 CBA 之未配對半胱胺酸形成二硫化物。在某些實施例中，封端劑為用於 CBA (例如抗體或其抗原結合片段)之產生或純化的含硫醇試劑，諸如用於供產生抗體或其抗原結合片段用之培養基中的一或多種含硫醇試劑。在某些實施例中，封端劑為半胱胺酸、麩胱甘肽、高半胱胺酸或其組合。在某些實施例中，封端劑係經固定含硫醇試劑或硫醇-親和力樹脂(例如硫丙基瓊脂糖 6B)。參見 Guo, J.等人, Nat Protoc. 2014 年 1 月; 9(1): 64-75，以引用之方式併入本文中。

**【0051】** 如本文所用，術語「連續過程」係指如下過程，其中當反應繼續進行時及在已形成至少一種反應產物之後，一或多種反應試劑繼續添加至反應中。當反應繼續進行時，反應產物可繼續自反應中移出。

**【0052】** 如本文所用，術語「流式反應器」係指用於連續反應化學之任何反應容器，典型地管狀。流式反應器可由不鏽鋼、玻璃、聚合物等製成。

**【0053】** 如本文所用，術語「過濾器」係指允許流體中之物質分離之選擇性

障壁。分離係藉由選擇性傳遞(滲透)流體之一或多種物質通過過濾器，同時阻止一或多種其他物質之傳遞來實現。

【0054】 如本文所用，術語「進料流」係指經進給至過濾器或膜以在該過濾器或膜中分離組分之流體。

【0055】 如本文所用，術語「滲餘物」係指進料流中未傳遞通過過濾器之部分。

【0056】 如本文所用，術語「滲透物」係指進料流中傳遞通過過濾器之部分。

【0057】 如本文所用，術語「切向流過濾」(TFF)係指基於膜之過濾過程，其中進料流平行於膜面傳遞。進料流之一部分傳遞通過膜(滲透物)，而剩餘物(滲餘物)再循環返回進料儲器。TFF 亦稱作交叉流過濾。用於執行 TFF 之系統為已知的且包括例如 Pellicon 類型系統(Millipore, Billerica, MA)、Sartocon 卡匣系統(Sartorius AG, Edgewood, NY)及 Centrasette 類型系統(Pall Corporation, East Hills, NY)。

【0058】 如本文所用，術語「單程切向流過濾」(SPTFF)係指切向流過濾過程，其中進料流僅在膜面上傳遞一次。用於執行 SPTFF 之系統為已知的且包括例如 Cadance 類型系統(Pall Corporation, Westborough, MA)。用於執行 SPTFF 之系統及方法揭示於例如美國專利第 7,384,549 號、美國專利第 7,510,654 號、美國專利第 7,682,511 號、美國專利第 7,967,987 號、美國專利第 8,157,999 號及美國專利第 8,231,787 號中，其中每一者均以引用之方式整體併入本文中。

【0059】 如本文所用，術語「連續透濾」係指如下透濾過程，其中藉由使進料流與稀釋劑混合並將其泵送通過膜，同時移出滲透物及滲餘物而以連續方式實現溶質之選擇性分離。當過濾進行時，產物未形成於容器中；相反，其在過濾過程期間連續地自該系統中抽出。「逆流透濾」係指過程流(例如滲透物或滲

餘物)在透濾步驟中再循環之連續透濾過程。

【0060】 術語「在線監測」係指例如在產生或純化過程期間，即時監測分析物。在線監測不同於不提供即時反饋之過程中取樣或離線分析。

【0061】 術語「在線過程自動化技術」係指用於在過程期間監測分析物之任何在線量測器件。

【0062】 如本文所用，術語「分析物」為廣泛術語，且其係指但不限於流體中可經分析之物質或化學組分。分析物可包括天然存在之物質、人工物質、代謝物及/或反應產物。在一些實施例中，用於本文所揭示之方法中的量測之分析物為抗體或其抗原結合片段、藥物、連接體、結合於抗體或其抗原結合片段之連接體、結合於藥物之連接體、抗體-藥物結合物(ADC)、藥物:抗體比率(DAR)及/或雜質。

【0063】 如本文所用，術語「調配緩衝液」係指允許活性成分具有生物活性且不含對將投與調配物之個體具有不可接受之毒性的額外組分之緩衝液。

【0064】 術語「癌症」及「癌的」係指或描述哺乳動物中之生理學疾患，其中細胞群體之特徵在於不受調控之細胞生長。「腫瘤」及「贅瘤」係指由於過度細胞生長或增生而產生之一或多種細胞，其為良性(非癌的)或惡性(癌的)，包括癌前病變。

【0065】 癌症之實例包括肺癌(例如非小細胞肺癌)、結腸直腸癌、膀胱癌、胃癌、胰臟癌、腎細胞癌、前列腺癌、食道癌、乳癌、頭頸部癌、子宮癌、卵巢癌、肝癌、子宮頸癌、甲狀腺癌、睪丸癌、骨髓癌、黑色素瘤及淋巴癌。在某些實施例中，該癌症為非小細胞肺癌、結腸直腸癌、胃癌或胰臟癌。在某些實施例中，該癌症為非小細胞肺癌(鱗狀細胞癌、非鱗狀細胞癌、腺癌或大細胞未分化癌)、結腸直腸癌(腺癌、胃腸類癌腫瘤、胃腸基質腫瘤、原發性結腸直腸淋

巴瘤、平滑肌肉瘤或鱗狀細胞癌)或乳癌(例如三陰性乳癌(TNBC))。在某些實施例中，癌症為淋巴瘤及白血病。在某些實施例中，癌症之實例包括 AML、CML、ALL (例如 B-ALL)、CLL、骨髓發育不良症候群、母細胞性漿細胞樣 DC 贅瘤(BPDCN)白血病、B 細胞淋巴瘤，包括非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphomas，NHL)、前驅體 B 細胞淋巴母細胞性白血病/淋巴瘤及成熟 B 細胞贅瘤，諸如 B 細胞慢性淋巴球性白血病(B-CLL) /小淋巴球性淋巴瘤(SLL)、B 細胞幼淋巴球性白血病、淋巴漿細胞性淋巴瘤、套細胞淋巴瘤(MCL)、濾泡性淋巴瘤(FL) (包括低級、中間級及高級 FL)、皮膚濾泡中心淋巴瘤、邊緣區 B 細胞淋巴瘤(MALT 類型、淋巴結及脾類型)、毛細胞白血病(HCL)、彌漫性大 B 細胞淋巴瘤(DLBCL)、伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、漿細胞瘤、漿細胞骨髓瘤、移植後淋巴增生性病變、華氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)、間變性大細胞淋巴瘤(ALCL)及霍奇金氏白血病(HL)。在某些實施例中，該癌症為 BPDCN 白血病。在某些實施例中，該癌症為 ALL。在其他實施例中，該癌症為 AML。

**【0066】** 術語「個體」係指欲為特定治療之接受者的任何動物(例如哺乳動物)，包括但不限於人類、非人類靈長類動物、嚙齒動物及其類似動物。典型地，術語「個體」及「患者」在本文中關於人類個體可互換使用。

**【0067】** 術語「醫藥組合物」係指呈允許活性成分之生物活性有效之形式，且不含對將投與該組合物之個體具有不可接受之毒性的額外組分之製劑。該組合物可為無菌的。

**【0068】** 如本文所揭示之免疫結合物的「治療有效量」為足以進行特定陳述之目的的量。「治療有效量」可關於所陳述之目的憑經驗且以常規方式確定。

**【0069】** 如本文所用，「烷基」或「直鏈或分支鏈烷基」係指飽和直鏈或分支鏈單價烴基。在較佳實施例中，直鏈或分支鏈烷基具有三十個或三十個以下

碳原子(例如，關於直鏈烷基為  $C_1-C_{30}$  且關於分支鏈烷基為  $C_3-C_{30}$ )，且更佳地二十個或二十個以下碳原子。甚至更佳地，直鏈或分支鏈烷基具有十個或十個以下碳原子(亦即，關於直鏈烷基為  $C_1-C_{10}$  且關於分支鏈烷基為  $C_3-C_{10}$ )。在其他實施例中，直鏈或分支鏈烷基具有六個或六個以下碳原子(亦即，關於直鏈烷基為  $C_1-C_6$  且關於分支鏈烷基為  $C_3-C_6$ )。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、 $-CH_2CH(CH_3)_2$ 、2-丁基、2-甲基-2-丙基、1-戊基、2-戊基、3-戊基、2-甲基-2-丁基、3-甲基-2-丁基、3-甲基-1-丁基、2-甲基-1-丁基、1-己基)、2-己基、3-己基、2-甲基-2-戊基、3-甲基-2-戊基、4-甲基-2-戊基、3-甲基-3-戊基、2-甲基-3-戊基、2,3-二甲基-2-丁基、3,3-二甲基-2-丁基、1-庚基、1-辛基及其類似基團。此外，如本說明書、實例及申請專利範圍中所用之術語「烷基」意欲包括「未經取代烷基」及「經取代烷基」，其中後者係指具有置換烴骨架之一或多個碳上的氫之取代基之烷基部分。如本文所用， $(C_x-C_{xx})$  烷基或  $C_{x-xx}$  烷基意謂具有  $x-xx$  個碳原子之直鏈或分支鏈烷基。

**【0070】** 「烯基」或「直鏈或分支鏈烯基」係指具有兩個至二十個碳原子且具有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「E」及「Z」取向之基團。實例包括但不限於乙烯基(ethylenyl 或 vinyl,  $-CH=CH_2$ )、烯丙基( $-CH_2CH=CH_2$ )及其類似基團。較佳地，烯基具有兩個至十個碳原子。更佳地，烷基具有兩個至四個碳原子。

**【0071】** 「炔基」或「直鏈或分支鏈炔基」係指具有兩個至二十個碳原子且具有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、己炔基及其類似基團。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。

【0072】 術語「環狀烷基」及「環烷基」可互換使用。如本文所用，該術語係指飽和碳環之基團。在較佳實施例中，環烷基在其環結構中具有 3 至 10 個碳原子，且更佳地在環結構中具有 5 至 7 個碳原子。在一些實施例中，該兩個環可共同具有兩個或更多個原子，例如該等環為「稠環」。合適環烷基包括但不限於環庚基、環己基、環戊基、環丁基及環丙基。在一些實施例中，環烷基為單環基團。在一些實施例中，環烷基為二環基團。在一些實施例中，環烷基為三環基團。

【0073】 術語「環烷基烷基」係指經環烷基取代之上述烷基。

【0074】 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。

【0075】 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。

【0076】 如本文所用，術語「芳基」或「芳環」包括經取代或未經取代單環芳族基團，其中該環之每一個原子均為碳。較佳地，該環為 5 至 7 員環，更佳地 6 員環。芳基包括但不限於苯基、苯酚、苯胺及其類似基團。術語「芳基」亦包括「多環基」、「多環」及「多環狀」環系統，其具有兩個或更多個環，其中兩個或更多個原子為兩個鄰接環所共有，例如該等環為「稠環」，其中該等環中之至少一者為芳族，例如其他環可為環烷基、環烯基、環炔基或芳環。在一些較佳實施例中，多環具有 2-3 個環。在某些較佳實施例中，多環系統具有兩個環，其中該等環均為芳族。多環之每一個環均可經取代或未經取代。在某些實施例中，多環之每一個環在環中含有 3 至 10 個碳原子，較佳地 5 至 7 個。例如，芳基包括但不限於苯基、甲苯基、蔥基、萸基、茛基、藜基及蒽基，以及苯并稠合碳環部分，諸如 5,6,7,8-四氫萘基及其類似基團。在一些實施例中，芳基為單環芳族基團。在一些實施例中，芳基為雙環芳族基團。在一些實施例中，芳

基為三環芳族基團。

【0077】 如本文所用，術語「雜環(heterocycle)」、「雜環基」及「雜環(heterocyclic ring)」係指 3 員至 18 員環、較佳地 3 員至 10 員環、更佳地 3 員至 7 員環之經取代或未經取代非芳環結構，其環結構包括至少一個雜原子，較佳地一至四個雜原子，更佳地一或兩個雜原子。在某些實施例中，該環結構可具有兩個環。在一些實施例中，該兩個環可共同具有兩個或更多個原子，例如該等環為「稠環」。雜環基包括例如哌啶、哌啉、吡咯啶、嗎啉、內酯、內醯胺及其類似基團。雜環描述於 Paquette, Leo A.；「Principles of Modern Heterocyclic Chemistry」(W. A. Benjamin, New York, 1968)，尤其第 1、3、4、6、7 及 9 章；「The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs」(John Wiley & Sons, New York, 1950 年至今)，尤其第 13、14、16、19 及 28 卷；及 J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566 中。雜環之實例包括但不限於四氫呋喃、二氫呋喃、四氫噻吩、四氫哌喃、二氫哌喃、四氫噻喃、硫代嗎啉、噻呋烷、高哌啉、氮雜環丁烷、氧雜環丁烷、硫雜環丁烷、高哌啶、哌啶、哌啉、吡咯啶、嗎啉、氧雜環庚烷、硫雜環庚烷、氧氮呋、二氮呋、硫氮呋、2-吡咯啉、3-吡咯啉、吡啶啉、2H-哌喃、4H-哌喃、二呋烷、1,3-二氧戊環、吡啶啉、二噻烷、二硫戊環、二氫哌喃、二氫噻吩、二氫呋喃、吡啶啉基咪啶啉、咪啶啉、3-氮雜雙環[3.1.0]己烷、3-氮雜雙環[4.1.0]庚烷及氮雜雙環[2.2.2]己烷。螺部分亦包括於此定義之範圍內。其中環原子經側氧基(=O)部分取代之雜環基團的實例為嘧啶酮及 1,1-二側氧基-硫代嗎啉。

【0078】 如本文所用，術語「雜芳基(heteroaryl)」或「雜芳環(heteroaromatic ring)」係指經取代或未經取代芳族單環結構，較佳地 6 員至 18 員環，較佳地 5 員至 7 員環，更佳地 5 員至 6 員環，其環結構包括至少一個雜原子(例如，O、N 或 S)，較佳地一至四個或一至三個雜原子，更佳地一或兩個雜原子。當兩個或更多個

[illegible]

【0079】 在可能的情況下，雜環或雜芳基可為碳(碳連接)或氮(氮連接)附接的。舉例而言且非限制，碳鍵結之雜環或雜芳基鍵結於吡啶之 2、3、4、5 或 6 位、噻吩之 3、4、5 或 6 位、嘧啶之 2、4、5 或 6 位、吡嗪之 2、3、5 或 6 位、呋喃、四氫呋喃、硫代呋喃、噻吩、吡咯或四氫吡咯之 2、3、4 或 5 位、咪唑、咪唑或噻唑之 2、4 或 5 位、異咪唑、吡唑或異噻唑之 3、4 或 5 位、氮丙啶之 2 或 3 位、氮雜環丁烷之 2、3 或 4 位、喹啉之 2、3、4、5、6、7 或 8 位或異喹啉之 1、3、4、5、6、7 或 8 位。

【0080】 舉例而言且非限制，氮鍵結之雜環或雜芳基鍵結於氮丙啶、氮雜環丁烷、吡咯、吡咯啉、2-吡咯啉、3-吡咯啉、咪唑、咪唑啉、2-咪唑啉、3-咪唑啉、吡唑、吡唑啉、2-吡唑啉、3-吡唑啉、哌啶、哌啶、吡啶、吡啶啉、1H-吡啶啉之 1 位、異吡啶或異吡啶啉之 2 位、嗎啉之 4 位及呋唑或 O-呋啉之 9 位。

【0081】 存在於雜芳基或雜環基中之雜原子包括經氧化形式，諸如 NO、SO 及 SO<sub>2</sub>。

【0082】 在一些實施例中，雜芳環為 5 至 18 員環。

【0083】 術語「鹵基」或「鹵素」係指氟(F)、氯(Cl)、溴(Br)或碘(I)。在一些實施例中，鹵素為氟。在一些實施例中，鹵素為氯。在一些實施例中，鹵素為溴。在一些實施例中，鹵素為碘。如本文所用，術語「鹵烷基」係指如本文所定義之烷基，其由如本文所定義之一或多個鹵基取代。鹵烷基可為單鹵烷基、二鹵烷基或聚鹵烷基。單鹵烷基可具有一個氟、氯、溴或碘取代基。二鹵烷基或聚鹵烷基可經兩個或更多個相同鹵原子或不同鹵基之組合取代。鹵烷基之實例包括但不限於氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、氯甲基、二氯甲基、三氯甲基、五氟乙基、七氟丙基、二氟氯甲基、二氯氟甲基、二氟乙基、二氟丙基、二氯乙基及二氯丙基。

【0084】 本文所用之「烷氧基」係指烷基-O-，其中烷基定義於上文中。烷氧基之實例包括但不限於甲氧基、乙氧基、丙氧基、2-丙氧基、丁氧基、第三丁氧基、戊氧基、己氧基及其類似基團。

【0085】 上文所述之烷基、鹵烷基、烷氧基、烯基、炔基、環狀烷基、環狀烯基、環狀炔基、碳環基、芳基、雜環基及雜芳基可視情況經一或多個(例如，2、3、4、5、6 個或更多個)取代基取代。

【0086】 除非特定地陳述為「未經取代」，否則本文中對化學部分之提及應理解為亦包括經取代變異體。例如，對「烷基」基團或部分之提及暗含包括經取代及未經取代變異體。化學部分上之取代基的實例包括但不限於鹵素、羥基、羰基(諸如羧基、烷氧羰基、甲醯基或醯基)、硫羰基(諸如硫酯、硫代乙酸酯或硫代甲酸酯)、烷氧基、烷硫基、醯氧基、磷醯基、磷酸酯、膦酸酯、胺基、醯

胺基、脒、亞胺、氰基、硝基、疊氮基、巯基、烷硫基、硫酸酯、磺酸酯、胺磺醯基、磺醯胺基、磺醯基、雜環基、芳烷基或芳基或雜芳基部分。

【0087】 「視情況選用之」或「視情況」意謂隨後描述之情形可發生或可不發生，使得該申請案包括其中該情形發生之情況及其中該情形不發生之情況。例如，措辭「視情況經取代」意謂非氫取代基可或可不存在於既定原子上，且因此該申請案包括其中存在非氫取代基之結構及其中不存在非氫取代基之結構。

【0088】 術語「經取代」係指具有置換一或多個碳、氮、氧或硫原子上的氫之取代基之部分。應理解，「取代」或「經取代」包括暗含限制條件，即該取代與經取代原子及取代基之允許價態一致，且該取代產生穩定化合物，例如該化合物不會自發地經歷諸如藉由重排、環化、消去等導致之轉化。如本文所用，術語「經取代」預期包括有機化合物之所有可允許取代基。在一廣泛態樣中，該等可允許取代基包括有機化合物之無環及環狀、分支及未分支、碳環及雜環、芳族及非芳族取代基。該等可允許取代基可為用於適當有機化合物之一或多者且相同或不同。出於本發明之目的，諸如氮之雜原子可具有氫取代基及/或本文所述之有機化合物的滿足雜原子價態之任何可允許取代基。取代基可包括本文所述之任何取代基，例如鹵素、羥基、羰基(諸如羧基、烷氧羰基、甲醯基或醯基)、硫羰基(諸如硫酯、硫代乙酸酯或硫代甲酸酯)、烷氧基、烷硫基、醯氧基、磷醯基、磷酸酯、膦酸酯、胺基、醯胺基、脒、亞胺、氰基、硝基、疊氮基、巯基、烷硫基、硫酸酯、磺酸酯、胺磺醯基、磺醯胺基、磺醯基、雜環基、芳烷基或芳族或雜芳族部分。為了說明，單氟烷基為經一個氟取代基取代之烷基，且二氟烷基為經兩個氟取代基取代之烷基。應認識到，若取代基上存在超過一個取代，則各非氫取代基可為一致或不同的(除非另外規定)。

【0089】 若取代基之碳經描述為視情況經取代基清單中之一或多者取代，則該碳上的一或多個氫(就存在一些而言)可獨立地及/或合起來經獨立選擇之視情況選用之取代基置換。若取代基之氮經描述為視情況經取代基清單中之一或多者取代，則該氮上的一或多個氫(就存在一些而言)可各自經獨立選擇之視情況選用之取代基置換。一種例示性取代基可經描繪為-NR'R''，其中 R'及 R''與其所附接之氮原子一起可形成雜環。由 R'及 R''與其所附接之氮原子一起形成之雜環可部分地或完全地飽和。在一些實施例中，雜環由 3 至 7 個原子組成。在其他實施例中，雜環係選自吡咯基、咪唑基、吡唑基、三唑基、四唑基、異噁唑基、吡啶基及噻唑基。

【0090】 此說明書可互換地使用術語「取代基」、「基團(radical)」及「基團(group)」。

【0091】 若取代基之基團共同地經描述為視情況由取代基清單中之一或多者取代，則該基團可包括：(1)不可取代之取代基，(2)可取代之取代基，其未由視情況選用之取代基取代，及/或(3)可取代之取代基，其由視情況選用之取代基中的一或多者取代。

【0092】 若取代基經描述為視情況經多達特定數目之非氫取代基取代，則彼取代基可(1)未經取代；或(2)由多達彼特定數目之非氫取代基或由多達該取代基上之可取代位置的最大數目之非氫取代基(取較小者)取代。因此，舉例而言，若取代基經描述為視情況經多達 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均將視情況經多達僅與該雜芳基具有之可取代位置同樣多的非氫取代基取代。在非限制性實例中，該等取代基可選自具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基、芳基、雜芳基、雜環基、鹵素、胍鹽[-NH(C=NH)NH<sub>2</sub>]、-OR<sup>100</sup>、NR<sup>101</sup>R<sup>102</sup>、-NO<sub>2</sub>、-NR<sup>101</sup>COR<sup>102</sup>、-SR<sup>100</sup>、由-SOR<sup>101</sup>

表示之亞磺、由 $-\text{SO}_2\text{R}^{101}$ 表示之磺、磺酸酯基 $-\text{SO}_3\text{M}$ 、硫酸酯基 $-\text{OSO}_3\text{M}$ 、由 $-\text{SO}_2\text{NR}^{101}\text{R}^{102}$ 表示之磺醯胺、氰基、疊氮基、 $-\text{COR}^{101}$ 、 $-\text{OCOR}^{101}$ 、 $-\text{OCONR}^{101}\text{R}^{102}$ 及聚乙二醇單元 $(-\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{R}^{101}$ ，其中 M 為 H 或陽離子(諸如  $\text{Na}^+$  或  $\text{K}^+$ )； $\text{R}^{101}$ 、 $\text{R}^{102}$  及  $\text{R}^{103}$  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 $(-\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{R}^{104}$  (其中 n 為整數 1 至 24)、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  $\text{R}^{104}$  為 H 或具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支鏈烷基，其中該等基團中由  $\text{R}^{100}$ 、 $\text{R}^{101}$ 、 $\text{R}^{102}$ 、 $\text{R}^{103}$  及  $\text{R}^{104}$  表示之烷基、烯基、炔基、芳基、雜芳基及雜環基視情況經獨立地選自鹵素、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$  及具有 1 至 4 個碳原子之未經取代直鏈或分支鏈烷基的一或多個(例如，2、3、4、5、6 個或更多個)取代基取代。較佳地，用於上文所述之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、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NR}^{102}\text{R}^{103}$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{OR}^{101}$ 、芳基、雜芳基、雜環基、 $-\text{SR}^{101}$ 、 $-\text{SOR}^{101}$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}^{101}$  及  $-\text{SO}_3\text{M}$ 。

【0093】 基團中之碳原子數目在本文中可由字首「 $\text{C}_{x-\text{xx}}$ 」或「 $\text{C}_x\text{-C}_{\text{xx}}$ 」規定，其中 x 及 xx 為整數。例如，「 $\text{C}_{1-4}$  烷基」或「 $\text{C1-C4}$  烷基」為具有 1 至 4 個碳原子之烷基。

【0094】 術語「化合物」、「細胞毒性劑」或「細胞毒性化合物」可互換使用。其意欲包括如下化合物，其結構或式或任何衍生物已揭示於本發明中或其結構或式或任何衍生物已以引用之方式併入。該術語亦包括本發明中所揭示之所有式之化合物的立體異構體、幾何異構體、互變異構體、溶劑合物、代謝物及鹽(例如，醫藥學上可接受之鹽)。該術語亦包括前述任一者之任何溶劑合物、水合物及多晶型物。在此申請案中描述之本發明的某些態樣中，特定陳述「立

體異構體」、「幾何異構體」、「互變異構體」、「溶劑合物」、「代謝物」、「鹽」、「結合物」、「結合物鹽」、「溶劑合物」、「水合物」或「多晶型物」不應解釋為在其中使用術語「化合物」而未陳述此等其他形式的本發明之其他態樣中意欲省略此等形式。

【0095】 術語「對掌性」係指具有鏡像搭配物之不可重疊特性之分子，而術語「非對掌性」係指在其鏡像搭配物上可重疊之分子。

【0096】 術語「立體異構體」係指如下化合物，其具有一致化學組成及連接性，但其原子在空間中之不同取向無法藉由繞單鍵旋轉而互變。

【0097】 「非對映異構體」係指具有兩個或更多個對掌性中心且分子彼此不為鏡像之立體異構體。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。非對映異構體之混合物可根據高解析度分析程序，諸如結晶、電泳及層析來分離。

【0098】 「對映異構體」係指化合物之兩種立體異構體，其彼此為不可重疊鏡像。

【0099】 本文中使用的立體化學定義及慣例通常遵循 S. P. Parker 編，McGraw-Hill, *Dictionary of Chemical Terms* (1984) McGraw-Hill Book Company, New York；及 Eliel, E.及 Wilen, S., *Stereochemistry of Organic Compounds*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994。本發明化合物可含有非對稱或對掌性中心，且因此以不同立體異構體形式存在。預期本發明化合物之所有立體異構體形式形成本發明之一部分，包括但不限於非對映異構體、對映異構體及位阻異構體，以及其混合物，諸如外消旋混合物。多種有機化合物以光學活性形式存在，亦即，其具有使平面偏振光之平面旋轉的能力。在描述光學活性化合物時，字首 D 及 L 或 R 及 S 用於表示該分子繞其對掌性中心之絕對組態。字首 d 及 l 或 (+) 及

(-)用於指示該化合物使平面偏振光旋轉之符號，其中(-)或  $l$  意謂該化合物為左旋的。字首為(+)或  $d$  之化合物為右旋的。關於既定化學結構，此等立體異構體為一致的，只是其彼此為鏡像。特定立體異構體亦可稱作對映異構體，且該等異構體之混合物通常稱作對映異構體混合物。對映異構體之 50:50 混合物係稱作外消旋混合物或外消旋體，其可在化學反應或過程中不具有立體選擇或立體特異性之情況下存在。術語「外消旋混合物」及「外消旋體」係指兩種對映異構體物質之等莫耳濃度混合物，其缺乏光學活性。

【0100】 術語「互變異構體」或「互變異構體形式」係指可經由低能障壁互變之具有不同能量之結構異構體。例如，質子互變異構體(亦稱作質子移變互變異構體)包括經由質子遷移實現之互變，諸如酮-烯醇及亞胺-烯胺異構化。價互變異構體包括藉由一些鍵結電子之重組實現之互變。

【0101】 如本文所用，措辭「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。例示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、酸性磷酸鹽、異菸鹼酸鹽、乳酸鹽、水楊酸鹽、酸性檸檬酸鹽、酒石酸鹽、油酸鹽、鞣酸鹽、泛酸鹽、酒石酸氫鹽、抗壞血酸鹽、丁二酸鹽、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、糖質酸鹽、甲酸鹽、苯甲酸鹽、麩胺酸鹽、甲烷磺酸鹽「甲磺酸鹽」、乙烷磺酸鹽、苯磺酸鹽、對甲苯磺酸鹽、雙羥萘酸鹽(亦即，1,1'-亞甲基-雙-(2-羥基-3-萘甲酸鹽))、鹼金屬(例如，鈉及鉀)鹽、鹼土金屬(例如，鎂)鹽及銨鹽。醫藥學上可接受之鹽可涉及包括另一分子，諸如乙酸鹽離子、丁二酸鹽離子或其他相對離子。相對離子可為使母化合物上之電荷穩定化的任何有機或無機部分。此外，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。其中多個帶電原子為醫藥學上可接受之鹽的一部分

之情況可具有多個相對離子。因此，醫藥學上可接受之鹽可具有一或多個帶電原子及/或一或多個相對離子。

**【0102】** 若本發明化合物為鹼，則所需醫藥學上可接受之鹽可藉由此項技術中可獲得之任何合適方法製備，例如用諸如鹽酸、氫溴酸、硫酸、硝酸、甲烷磺酸、磷酸及其類似物之無機酸，或用諸如乙酸、順丁烯二酸、丁二酸、扁桃酸、反丁烯二酸、丙二酸、丙酮酸、草酸、乙醇酸、水楊酸、哌喃糖酸(諸如葡萄糖醛酸或半乳糖醛酸)、 $\alpha$  羥基酸(諸如檸檬酸或酒石酸)、胺基酸(諸如天冬胺酸或麩胺酸)、芳香酸(諸如苯甲酸或肉桂酸)、磺酸(諸如對甲苯磺酸或乙烷磺酸)或其類似物之有機酸處理游離鹼。

**【0103】** 若本發明化合物為酸，則所需醫藥學上可接受之鹽可藉由任何合適方法製備，例如用諸如胺(一級、二級或三級)、鹼金屬氫氧化物或鹼土金屬氫氧化物或其類似物之無機或有機鹼處理游離酸。合適鹽之說明性實例包括但不限於源於諸如甘胺酸及精胺酸之胺基酸、氨水、一級、二級及三級胺及諸如哌啶、嗎啉及哌吡之環狀胺的有機鹽，及源於鈉、鈣、鉀、鎂、錳、鐵、銅、鋅、鋁及鋰之無機鹽。

**【0104】** 如本文所用，術語「溶劑合物」意謂如下化合物，其進一步包括藉由非共價分子間力結合之化學計量或非化學計量之量的溶劑，諸如水、異丙醇、丙酮、乙醇、甲醇、DMSO、乙酸乙酯、乙酸及乙醇胺二氯甲烷、2-丙醇或其類似物。化合物之溶劑合物或水合物容易藉由向該化合物中添加至少一莫耳當量之羥基溶劑(諸如甲醇、乙醇、1-丙醇、2-丙醇或水)以產生亞胺部分之溶劑化或水合來製備。

**【0105】** 措辭「醫藥學上可接受」指示該物質或組合物必須可在化學上及/或在毒物學上與構成該調配物之其他成分及/或用其治療之哺乳動物相容。

【0106】 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，胺基酸由  $\text{NH}_2\text{-C}(\text{R}^{\text{aa}}\text{'R}^{\text{aa}})\text{-C(=O)OH}$  表示，其中  $\text{R}^{\text{aa}}$  及  $\text{R}^{\text{aa}}$  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  $\text{R}^{\text{aa}}$  及 N 端氮原子可合起來形成雜環(例如，如在脯胺酸中)。術語「胺基酸殘基」係指當一個氫原子自胺基酸之胺及/或羧基末端移除時之相應殘基，諸如  $\text{-NH-C}(\text{R}^{\text{aa}}\text{'R}^{\text{aa}})\text{-C(=O)-}$ 。

【0107】 術語「陽離子」係指具有正電荷之離子。陽離子可為單價(例如， $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{NH}_4^+$ 等)、二價(例如， $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 等)或多價(例如， $\text{Al}^{3+}$ 等)。較佳地，陽離子為單價。

【0108】 術語「硫醇反應性基團」係指可與硫醇( $\text{-SH}$ )基團反應以形成共價鍵之基團。例示性硫醇反應性基團包括但不限於順丁烯二醯亞胺、鹵基乙醯基、鹵基乙醯胺、乙烯基砜、乙烯基磺醯胺或乙烯基吡啶。在一個實施例中，硫醇反應性基團為順丁烯二醯亞胺。

【0109】 應理解，在本文中用語言「包含」描述實施例之任何情況下，亦提供根據「由.....組成」及/或「基本上由.....組成」描述之其他類似實施例。

【0110】 如本文中諸如「A 及/或 B」之措辭中所用的術語「及/或」意欲包括「A 及 B」、「A 或 B」、「A」及「B」。同樣，如諸如「A、B 及/或 C」之措辭中所用的術語「及/或」意欲涵蓋以下實施例中之每一者：A、B 及 C；A、B 或 C；A 或 C；A 或 B；B 或 C；A 及 C；A 及 B；B 及 C；A(單獨)；B(單獨)；及 C(單獨)。

## 2. 製備免疫結合物之方法

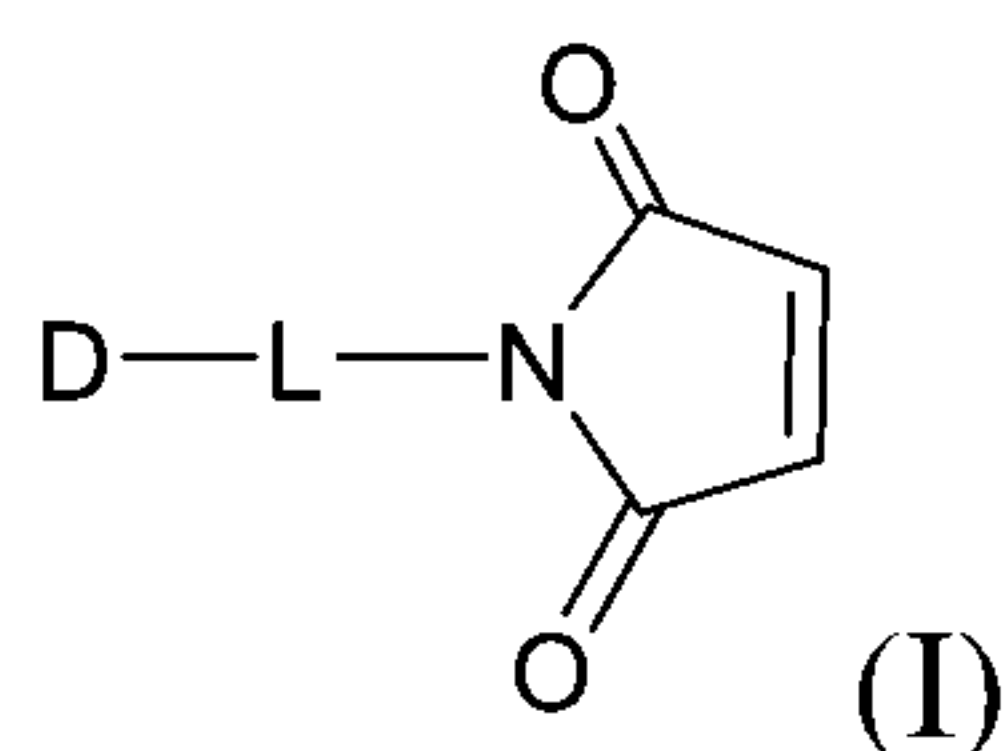
【0111】 在第一態樣中，本發明提供一種製備細胞結合劑-細胞毒性劑結合物之方法，該細胞結合劑-細胞毒性劑結合物包含具有共價連接至細胞毒性劑的一

或多個未配對半胱胺酸殘基之細胞結合劑(CysCBA)，其中該方法包括以下步驟：

(a) 使還原劑與具有經封端劑封端之一或多個未配對半胱胺酸殘基之經封端細胞結合劑(cCysCBA)反應以形成經還原細胞結合劑，其中該封端劑經移除以在該經還原細胞結合劑中形成游離硫醇(-SH)基；

(b) 使該經還原細胞結合劑與選擇性氧化劑反應以形成該 CysCBA，其中未配對半胱胺酸殘基中的游離硫醇基未經氧化；及

(c) 使該 CysCBA 與式(I)化合物：



或其醫藥學上可接受之鹽反應，由此形成該結合物，其中步驟(a)中之經還原細胞結合劑未經純化即用於步驟(b)；且步驟(b)中之 CysCBA 未經純化即用於步驟(c)，其中：

D 為細胞毒性劑；且

L 為連接體。

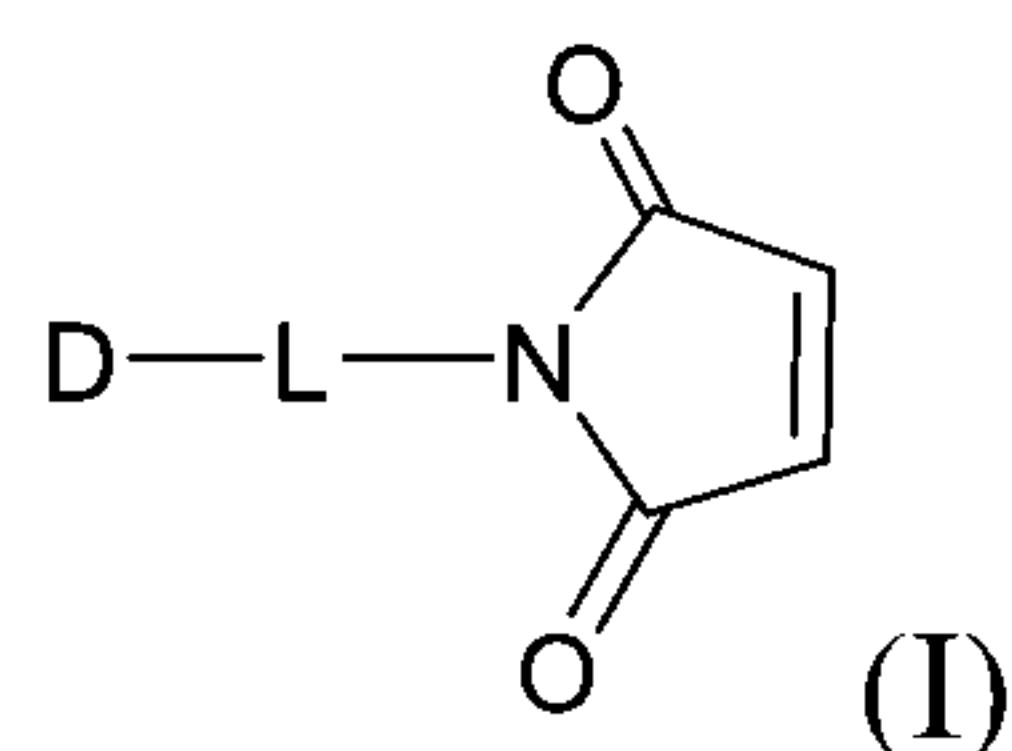
**【0112】** 在第二態樣中，本發明提供一種製備細胞結合劑-細胞毒性劑結合物(ADC)之連續方法，該細胞結合劑-細胞毒性劑結合物(ADC)包含具有共價連接至細胞毒性劑的一或多個未配對半胱胺酸殘基之細胞結合劑(CysCBA)，其中該方法包括以下步驟：

(a) 使還原劑與具有經封端劑封端之一或多個未配對半胱胺酸殘基之經封端細胞結合劑(cCysCBA)反應以形成經還原細胞結合劑，其中該封端劑經移除以在該經還原細胞結合劑中形成游離硫醇(-SH)基；

(b) 使該經還原細胞結合劑與選擇性氧化劑反應以形成該 CysCBA，其中未配對

半胱胺酸殘基中的游離硫醇基未經氧化；及

(c) 使該 CysCBA 與式(I)化合物：



或其醫藥學上可接受之鹽反應，由此形成該結合物，

其中步驟(a)中之經還原細胞結合劑未經純化即用於步驟(b)；步驟(b)中之 CysCBA 未經純化即用於步驟(c)，且選自步驟(a)至(c)之任一或多個步驟係連續地執行，其中：

D 為細胞毒性劑；且

L 為連接體。

【0113】 在一些實施例中，上文所述之第二態樣之方法中的步驟(a)至(c)係連續地執行。

【0114】 在本文所提供之連續方法中，組分繼續添加至正在進行中的過程中，且產物可在該過程中經移出，而非在該過程結束時整體移出。例如，在上文所述之連續方法的步驟(a) (還原步驟)中，當該反應繼續進行時及在已形成至少一種產物(亦即，經還原細胞結合劑)之後，還原劑及/或經封端細胞結合劑(cCysCBA)繼續添加至還原反應中。在上文所述之連續方法的步驟(b) (氧化步驟)中，當該反應繼續進行時及在已形成至少一種產物(亦即，CysCBA)之後，經還原細胞結合劑及/或選擇性氧化劑繼續添加至氧化反應中。在上文所述之連續方法的步驟(c) (結合步驟)中，當該反應繼續進行時及在已形成至少一種結合反應產物(ADC)之後，CysCBA 及/或式(I)化合物繼續添加至結合反應中。同樣，在下游連續濃縮、純化及/或緩衝液交換過程中，當彼等過程繼續進行時，ADC、緩衝液及/或其他組分繼續添加至濃縮純化及/或緩衝液交換過程中，且經濃縮、經純化及

經緩衝液交換之 ADC 可連續地自彼等正在進行中的過程中移出。因此，整個 ADC 過程可為連續的(參見例如圖 5 及圖 6)。

【0115】 本發明人已證明，本文所述之製備 ADC 之方法可使用流式反應器連續地執行。當反應繼續進行時及在已形成至少一種反應產物之後，流式反應器允許一或多種試劑連續地添加至反應中。流式反應器在該等連續方法中的使用容許反應之控制及方法之多功能性(例如，快速溫度改變/更嚴格溫度控制、藉由擴散介導之混合因此更均一且無容器約束或套件限制)及方法之經改良可擴展性(亦即，分批加工之習知按比例增加風險不適用且時空產率經最佳化(例如，藉由運轉本發明過程持續較長時間來執行假的按比例增加(增加輸出)))。

【0116】 在某些實施例中，塞流反應器(PFR)用於本發明之連續方法。

【0117】 在某些實施例中，在一或多種試劑添加至流式反應器中之前，反應容器(例如連續攪拌槽反應器(CSTR))用於反應物之連續添加。反應容器(例如 CSTR)及流式反應器(例如塞流反應器)之連續使用具有如下優勢，即減少總體積需求、改良反應物流之間的混合及增加風險緩解能力(包括較寬滯留時間分佈)。

【0118】 在某些實施例中，關於本文所述之連續方法中的還原步驟(a)，當該反應繼續進行時及在已形成至少一種產物(亦即，經還原細胞結合劑)之後，還原劑及經封端細胞結合劑(cCysCBA)連續地添加(例如，針對還原劑使用進料幫浦且針對 cCysCBA 使用獨立進料幫浦)至反應容器(例如 CSTR)中。反應混合物使用幫浦(例如蠕動幫浦)連續地自反應容器(例如 CSTR)中抽出且經由流式反應器(例如 PFR)進給。在一些實施例中，自反應容器(例如 CSTR)中抽出材料之體積流動速率與將還原劑及 cCysCBA 添加至 CSTR 中之組合流動速率相同，亦即進入及離開反應容器(例如 CSTR)之流動速率相同。

【0119】 同樣，關於本文所述之連續方法中的選擇性再氧化步驟(b)，當該反

應繼續進行時及在已形成至少一種產物(亦即，CysCBA)之後，經還原細胞結合劑及選擇性氧化劑連續地添加(例如，針對經還原細胞結合劑使用進料幫浦且針對選擇性氧化劑使用獨立進料幫浦)至反應容器(例如 CSTR)中。反應混合物使用幫浦(例如蠕動幫浦)連續地自反應容器(例如 CSTR)中抽出且經由流式反應器(例如 PFR)進給。在一些實施例中，自反應容器(例如 CSTR)中抽出材料之體積流動速率與將經還原細胞結合劑及選擇性氧化劑添加至 CSTR 中之組合流動速率相同，亦即進入及離開反應容器(例如 CSTR)之流動速率相同。

【0120】 在一些實施例中，關於本文所述之連續方法中的結合步驟(c)，當該反應繼續進行時及在已形成至少一種產物(亦即，ADC)之後，CysCBA 及式(I)化合物連續地添加(例如，針對 CysCBA 使用進料幫浦且針對式(I)化合物使用獨立進料幫浦)至反應容器(例如 CSTR)中。反應混合物使用幫浦(例如蠕動幫浦)連續地自反應容器(例如 CSTR)中抽出且經由流式反應器(例如 PFR)進給。在一些實施例中，自 CSTR 中抽出材料之體積流動速率與將 CysCBA 及式(I)化合物添加至反應容器(例如 CSTR)中之組合流動速率相同，亦即進入及離開反應容器(例如 CSTR)之流動速率相同。

【0121】 在一些實施例中，產生各反應之動力學數據且規定各反應之所需標靶轉化。基於此等結果，各反應之 CSTR 及 PFR 體積係基於所用管之內徑及實現各反應步驟之所需滯留時間所需的體積流動速率經規定。

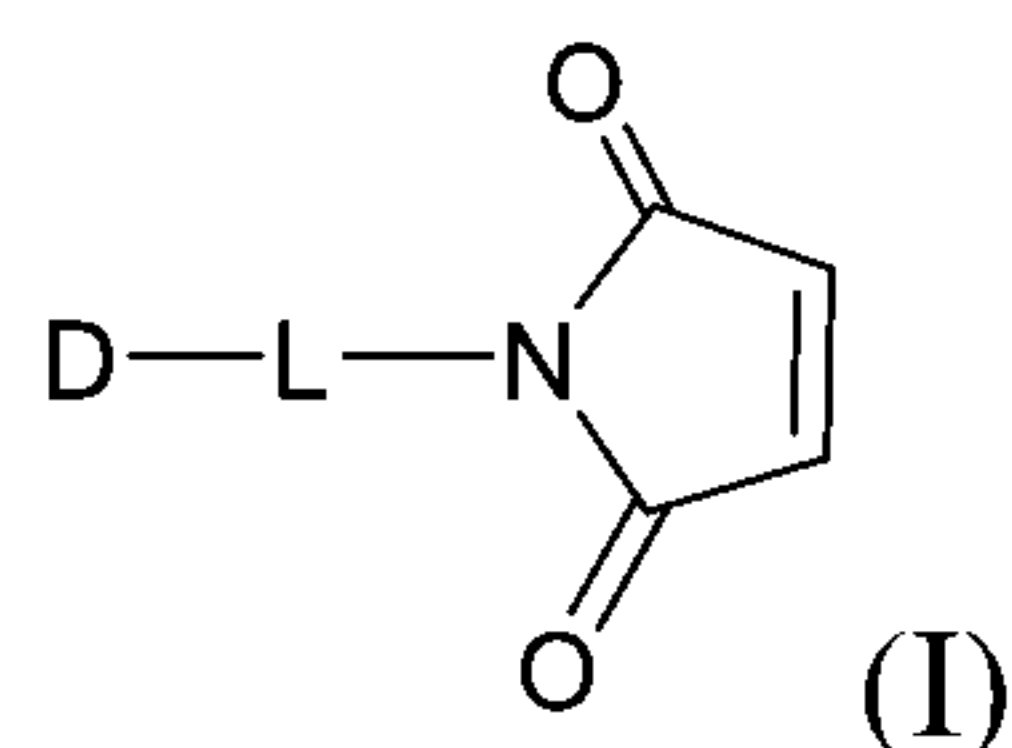
【0122】 在第三態樣中，本發明提供一種製備細胞結合劑-細胞毒性劑結合物(ADC)之連續方法，該細胞結合劑-細胞毒性劑結合物(ADC)包含具有共價連接至細胞毒性劑的一或多個未配對半胱胺酸殘基之細胞結合劑(CysCBA)，其中該方法包括以下步驟：

(a) 使還原劑與具有經封端劑封端之一或多個未配對半胱胺酸殘基之經封端細胞

結合劑(cCysCBA)反應以形成經還原細胞結合劑，其中該封端劑經移除以在該經還原細胞結合劑中形成游離硫醇(-SH)基；

(b) 使該經還原細胞結合劑與選擇性氧化劑反應以形成該 CysCBA，其中未配對半胱胺酸殘基中的游離硫醇基未經氧化；及

(c) 使該 CysCBA 與式(I)化合物：



或其醫藥學上可接受之鹽反應，由此形成該結合物；

(d) 移除未結合之式(I)化合物；及視情況

(e) 將該結合物交換至穩定緩衝液中；

其中步驟(a)中之經還原細胞結合劑未經純化即用於步驟(b)；步驟(b)中之 CysCBA 未經純化即用於步驟(c)，選自步驟(a)至(e)之任一或多個步驟係連續地執行，且使用單程切向流過濾(SPTFF)及/或逆流透濾來移除未結合之藥物及/或將 ADC 交換至穩定緩衝液中；且其中：

D 為細胞毒性劑；且

L 為連接體。

**【0123】** 在一些實施例中，關於第三態樣中所述之連續方法，該方法包括步驟(a)至(d)。在一些實施例中，步驟(a)至(d)係連續地執行。在一些實施例中，僅步驟(d)係連續地執行。

**【0124】** 在一些實施例中，關於第三態樣中所述之連續方法，該方法包括步驟(a)至(e)。在一些實施例中，步驟(a)至(e)係連續地執行。在一些實施例中，僅步驟(d)及(e)係連續地執行。

**【0125】** 本發明人亦已證明，連續 ADC 加工可使用單程切向流過濾(SPTFF)

來實現，SPTFF 可成功地分離未結合之藥物(亦即，式(I)化合物)與 ADC)。ADC 加工可涉及 ADC 之結合(形成) (亦即，上文所述之步驟(c))、ADC 濃縮、ADC 純化及/或 ADC 調配。儘管特別適用的是自 ADC 結合至調配之整個過程為連續的，亦有可能組合連續加工步驟與分批加工步驟。另外，有可能上游加工步驟(例如抗體之製備，亦即此處所述之方法中的步驟(a)及(b))為連續的且連續地進給至 ADC 結合中。

**【0126】** 整體(習知)透濾涉及用第一緩衝液 A (產物最初所處之緩衝液)起動切向流過濾(TFF)系統。產物接著添加至滲餘物容器中，在滲餘物容器中其與起動體積混合。用於滲餘物容器之進料幫浦自滲餘物經 TFF 膜泵送產物，在 TFF 膜中產物經保持(且返回滲餘物)或棄去。另一幫浦(透濾幫浦)將自該容器進給至含於獨立容器中之緩衝液 B (產物將交換進入之緩衝液)中，該獨立容器具有自該容器至滲餘物容器中之進料線。兩個幫浦均開始且滲餘物容器中之產物開始經 TFF 膜傳遞。當緩衝液經由廢物流移除時，滲餘物中之體積藉由添加緩衝液 B (相等體積)至滲餘物容器中經維持。結果，產物緩慢地交換至緩衝液 B 中。

**【0127】** SPTFF 使用將最初在緩衝液 A 中之產物交換至緩衝液 B 中之相關概念。然而，該產物僅僅曾經完成經該膜之單程，因此必須實現使所有適當體積之緩衝液 B 達成完全緩衝液交換。為此，SPTFF 可經堆疊階段添加緩衝液 B。因此，產物僅傳遞通過該等膜一次：進入緩衝液 A 中且離開緩衝液 B 中之模塊。

**【0128】** 同樣，可使用逆流透濾實現連續 ADC 加工。逆流透濾涉及兩次或更多次 SPTFF (例如模塊 1、模塊 2 等)。在一些實施例中，逆流透濾涉及兩個 SPTFF 模塊，其中來自模塊 1 之滲餘物與透濾緩衝液之額外進料組合且接著直接地進給至模塊 2 中，且來自模塊 2 之滲透物經再循環且與模塊 1 之進料組合。例示性逆流透濾顯示於圖 6 中。未經純化之粗 ADC 產物與透濾(DF)緩衝液流組合且接

著經由逆流 TFF 純化單元之模塊 1 進行進給。來自模塊 1 之滲透物經由廢物流移除且來自模塊 1 之滲餘物與 DF 緩衝液之額外進料組合且接著經由模塊 2 進行進給。經純化 ADC 自模塊 2 之滲餘物經回收且來自模塊 2 之滲透物經再循環且與模塊 1 之進料組合。

**【0129】** 因此，如與分批 ADC 加工相比，本文所提供之連續 ADC 加工方法(例如，使用 SPTFF 及/或逆流透濾)可減少加工時間，改良產率，及/或改良產物一致性。本文所提供之連續 ADC 加工方法(例如，使用 SPTFF 及/或逆流透濾)亦可消除用於分批結合方法中之保留步驟。本文所提供之連續 ADC 加工方法(例如，使用 SPTFF 及/或逆流透濾)亦可容許較小設備之使用。SPTFF 亦為有利的，因為對潛在地由剪切力引起之氧化敏感的抗體可更加適用於 SPTFF。

**【0130】** SPTFF 之使用可容許結合反應中組分之連續添加及/或移除。因此，可使用 SPTFF 來製備用於 ADC 結合及用於加工經組裝 ADC 之試劑。SPTFF 可使得能夠進行連續 ADC 加工，以致於針對特定 ADC 之全部(或子集)加工步驟(例如，產生、濃縮、純化及/或調配)可同時發生。亦可使用逆流透濾來製備用於 ADC 結合及用於加工經組裝 ADC 之試劑。

**【0131】** 根據本文所提供之方法，可使用 SPTFF 來濃縮 ADC，純化 ADC，及/或調配 ADC (例如，藉由將 ADC 交換至調配緩衝液中)。可使用 SPTFF 將 ADC 自第一緩衝液轉移至第二緩衝液。亦可使用逆流透濾來濃縮 ADC，純化 ADC，及/或調配 ADC (例如，藉由將 ADC 交換至調配緩衝液中)，且亦可使用逆流透濾將 ADC 自第一緩衝液轉移至第二緩衝液。

**【0132】** 在本文所提供之一些方法中，SPTFF 用於 ADC 產生、純化及調配中，使得自 ADC 產生至調配之整個過程為連續的。在本文所提供之一些方法中，逆流透濾用於 ADC 產生、純化及調配中，使得自 ADC 產生至調配之整個過程為

連續的。

【0133】 在本文所提供之一些方法中，SPTFF 與習知 TFF 組合使用，以致該等過程之一些部分為連續的，而其他部分分批執行。例如，抗體或其抗原結合片段可在結合之前使用習知(分批) TFF 進行緩衝液交換且接著經進給至連續過程中，其中 SPTFF 係用於下游過程。逆流透濾可替代 SPTFF 或與 SPTFF 組合用於該等方法中。

【0134】 無論用於使緩衝液中之抗體進行結合之過程係分批或以連續方式執行，在結合反應下游之 ADC 濃縮及純化過程可使用 SPTFF 且以連續方式執行，或可使用習知 TFF 且以分批方式執行。同樣，無論用於使緩衝液中之抗體進行結合之過程係在分批或連續過程中執行，且無論 ADC 係使用分批或連續過程經濃縮及純化，ADC 可使用 SPTFF 以連續方式或使用習知 TFF 以分批方式經調配。逆流透濾可替代 SPTFF 或與 SPTFF 組合用於該等方法中。

【0135】 在一些實施例中，ADC 過程中之至少兩個步驟係使用 SPTFF 經執行。例如，在一些實施例中，使用 SPTFF 將抗體或其抗原結合片段轉移至結合緩衝液中且在 ADC 形成之後，使用 SPTFF 濃縮且純化 ADC，而使用 SPTFF 或 TFF 將 ADC 交換至調配緩衝液中。在一些實施例中，使用 SPTFF 將抗體或其抗原結合片段轉移至結合緩衝液中且使用 SPTFF 將經純化 ADC 交換至調配緩衝液中，而在 ADC 形成之後，使用 SPTFF 或 TFF 濃縮且純化 ADC。在一些實施例中，使用 SPTFF 濃縮且純化 ADC 且使用 SPTFF 將經濃縮及純化 ADC 交換至調配緩衝液中，其中使用 SPTFF 或 TFF 將抗體或其抗原結合片段轉移至結合緩衝液中。

【0136】 SPTFF 可使用超濾膜，例如在濃縮 ADC 之方法中。SPTFF 可使用透濾膜，例如在純化 ADC 之方法中及/或在將 ADC 轉移至緩衝液(例如調配緩衝液)

中之方法中。

【0137】 在一些實施例中，ADC 過程中之至少兩個步驟係使用 SPTFF 及/或逆流透濾經執行。例如，在一些實施例中，使用 SPTFF 及/或逆流透濾將抗體或其抗原結合片段轉移至結合緩衝液中且在 ADC 形成之後，使用 SPTFF 及/或逆流透濾濃縮且純化 ADC，而使用 SPTFF、逆流透濾及/或 TFF 將 ADC 交換至調配緩衝液中。在一些實施例中，使用 SPTFF 及/或逆流透濾將抗體或其抗原結合片段轉移至結合緩衝液中且使用 SPTFF 及/或逆流透濾將經純化 ADC 交換至調配緩衝液中，而在 ADC 形成之後，使用 SPTFF、逆流透濾及/或 TFF 濃縮且純化 ADC。在一些實施例中，使用 SPTFF 及/或逆流透濾濃縮且純化 ADC 且使用 SPTFF 及/或逆流透濾將經濃縮及純化 ADC 交換至調配緩衝液中，其中使用 SPTFF、逆流透濾及/或 TFF 將抗體或其抗原結合片段轉移至結合緩衝液中。

【0138】 管柱層析亦可以流通模式用於本文所提供之連續 ADC 加工方法中(例如，與 SPTFF 及/或逆流透濾組合)。例如，結合反應(例如連續結合反應)可進給至流通管柱層析中以自該結合反應移除未結合之藥物。經由流通管柱層析純化之 ADC 可接著進給至 SPTFF 過程中以緩衝液交換至調配緩衝液中。經由流通管柱層析純化之 ADC 亦可進給至逆流透濾過程中以緩衝液交換至調配緩衝液中。

【0139】 在一些情況下，本文所提供之連續方法的反應參數可快速地發生改變或「經脈衝化」。例如，在本文所述之連續方法中，溫度可快速地變化，例如藉由使用水浴、經囊封反應器、加熱器、熱電源及/或使反應流經之線圈及/或管之剖面絕緣。另外，在連續流動結合中，pH 可快速地變化，例如藉由添加酸或鹼。因此，在某些情況下，使用脈衝化參數來執行連續反應。脈衝化參數之使用可例如縮短反應時間(亦即，增加反應速度)而不損害產物品質，藉由快速地

降低溫度暫時地淬滅或停止反應，在引入另一擾亂(例如，添加另一化學試劑)之前穩定化溶液中之結合物，而較長時間暴露於同一參數可急劇地降低產物品質或產物穩定性。

**【0140】** 在某些情況下，使該連續反應暴露於變化之溫度(例如，增加或降低)持續規定之時間增量，持續規定次數。例如，在一種情況下，溫度增加至少 2°C、至少 3°C、至少 4°C 或至少 5°C。因此，溫度可增加或降低至少 5°C、10°C、15°C、20°C、25°C、30°C 或 35°C。例如，溫度可增加或降低 5°C、10°C、15°C、20°C、25°C、30°C 或 35°C。溫度亦可增加或降低 5°C-10°C、10°C-15°C、15°C-20°C、20°C-25°C、25°C-30°C 或 30°C-35°C。因此，例如，溫度可增加(例如，自約 20°C)至 25°C、30°C、35°C、40°C、45°C、50°C 或 55°C 之升高溫度。溫度亦可增加(例如，自約 25°C)至 30°C、35°C、40°C、45°C、50°C 或 55°C 之升高溫度。在某些情況下，溫度不超過 55°C。在某些情況下，溫度增加(例如，自 20°C)至介於 35°C-55°C 範圍內之升高溫度或至介於 40°C-50°C 範圍內之升高溫度。在某些情況下，溫度增加(例如，自 20°C)至 60°C、70°C、80°C、90°C 或 100°C 之升高溫度(例如持續短時間增量，諸如 10 秒)。在某些情況下，溫度增加(例如，自 20°C)至介於 60°C-70°C 範圍內、介於 70°C-80°C 範圍內、介於 80°C-90°C 範圍內或介於 90°C-100°C 範圍內之升高溫度(例如持續短時間增量，諸如 10 秒)。在某些情況下，增加或降低溫度至升高溫度或降低溫度所用之時間係不超過 2 分鐘。在某些情況下，增加或降低溫度至升高溫度或降低溫度所用之時間係不超過 1 分鐘。

**【0141】** 在某些情況下，使該連續反應暴露於變化之 pH (例如，增加或降低)持續規定之時間增量，持續規定次數。例如，在一種情況下，pH 增加或降低 1、2、3、4 或 5。在一種情況下，pH 增加 1-2、2-3、3-4 或 4-5。因此，例如，pH 可增加(例如，自 4)至 5、6、7、8 或 9。PH 亦可增加(例如，自 5)至 6、7、8 或

9。PH 亦可降低(例如，自 9)至 8、7、6、5 或 4。

【0142】 在某些情況下，脈衝(例如，暴露於變化之溫度及/或 pH)存在 30 秒、1 分鐘、2 分鐘、3 分鐘、4 分鐘、5 分鐘、6 分鐘、7 分鐘、8 分鐘、9 分鐘、10 分鐘、15 分鐘、30 分鐘、1 小時、1.5 小時或 2 小時。脈衝(例如，暴露於變化之溫度及/或)亦可存在例如 30 秒-1 分鐘、1 分鐘-2 分鐘、2 分鐘-3 分鐘、3 分鐘-4 分鐘、4 分鐘-5 分鐘、6 分鐘-7 分鐘、7 分鐘-8 分鐘、8 分鐘-9 分鐘或 9 分鐘-10 分鐘。脈衝(例如，暴露於變化之溫度及/或)亦可存在例如 1-10 分鐘、1-15 分鐘、1-30 分鐘、1 分鐘-1 小時、1 分鐘-1.5 小時或 1 分鐘-2 小時。脈衝(例如，暴露於變化之溫度及/或)亦可存在例如 1-5 分鐘或 5-10 分鐘、10-15 分鐘、15 分鐘-30 分鐘、30 分鐘-1 小時、1 小時-1.5 小時或 1.5 小時-2 小時。在某些情況下，脈衝(例如，暴露於變化之溫度及/或 pH)不超過 2 小時、1 小時、30 分鐘、20 分鐘或 15 分鐘。

【0143】 在某些情況下，脈衝(例如，暴露於變化之溫度及/或 pH)發生一次。在某些情況下，脈衝(例如，暴露於變化之溫度及/或)重複兩次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次或十次。在某些情況下，脈衝(例如，暴露於變化之溫度及/或)發生一次至五次。在某些情況下，脈衝(例如，暴露於變化之溫度及/或)發生兩次至二十次，或五次至十次。

【0144】 連續方法(例如，使用 SPTFF 及/或逆流透濾)可與在線監測過程(論述於下文)一起或不一起使用。

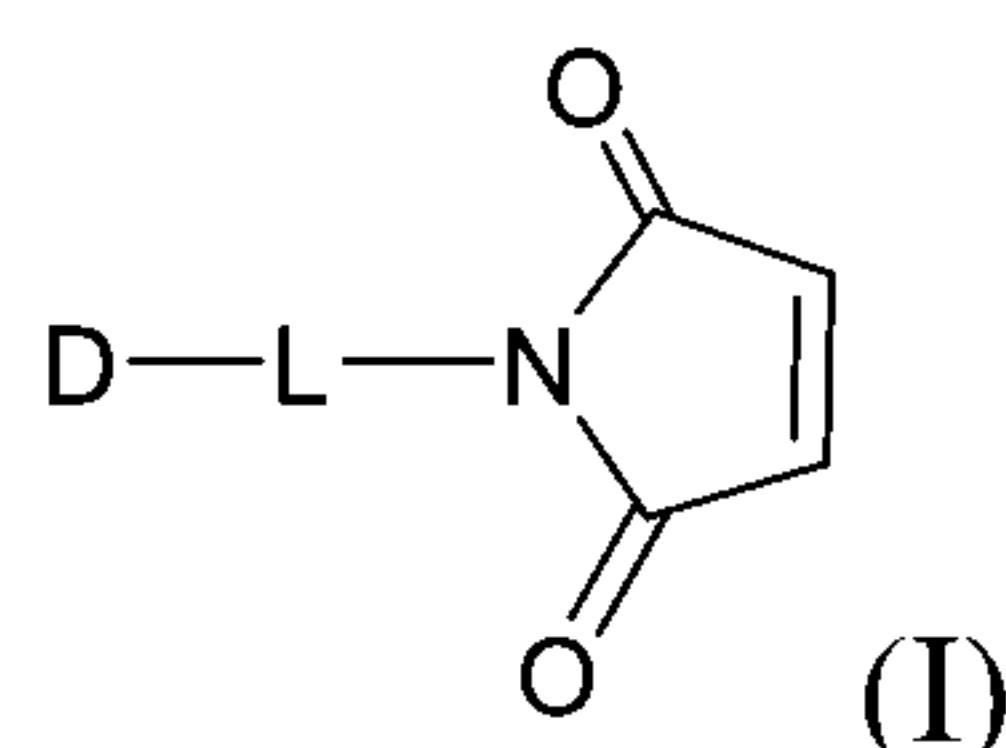
【0145】 在第一實施例中，第一、第二或第三態樣或其中所述之任何實施例中的 CysCBA 係經半胱胺酸工程改造之抗體(CysAb)或其抗原結合片段且該方法包括以下步驟：

(a) 使還原劑與具有經封端劑封端之一或多個經工程改造之半胱胺酸殘基之經封

端的半胱胺酸工程改造之抗體(cCysAb)或其抗原結合片段反應以形成經還原抗體或其抗原結合片段，其中該封端劑經移除以在該經還原抗體或其抗原結合片段中形成游離硫醇(-SH)基；

(b) 使該經還原抗體或其抗原結合片段與選擇性氧化劑反應以形成該 CysAb，其中經工程改造之半胱胺酸殘基中的游離硫醇基未經氧化；及

(c) 使該 CysAb 與式(I)化合物：



或其醫藥學上可接受之鹽反應，由此形成該抗體-細胞毒性劑結合物(ADC)，其中步驟(a)中之經還原抗體或其抗原結合片段未經純化即用於步驟(b)；且步驟(b)中之 CysAb 或其抗原結合片段未經純化即用於步驟(c)，其中：

D 為細胞毒性劑；且

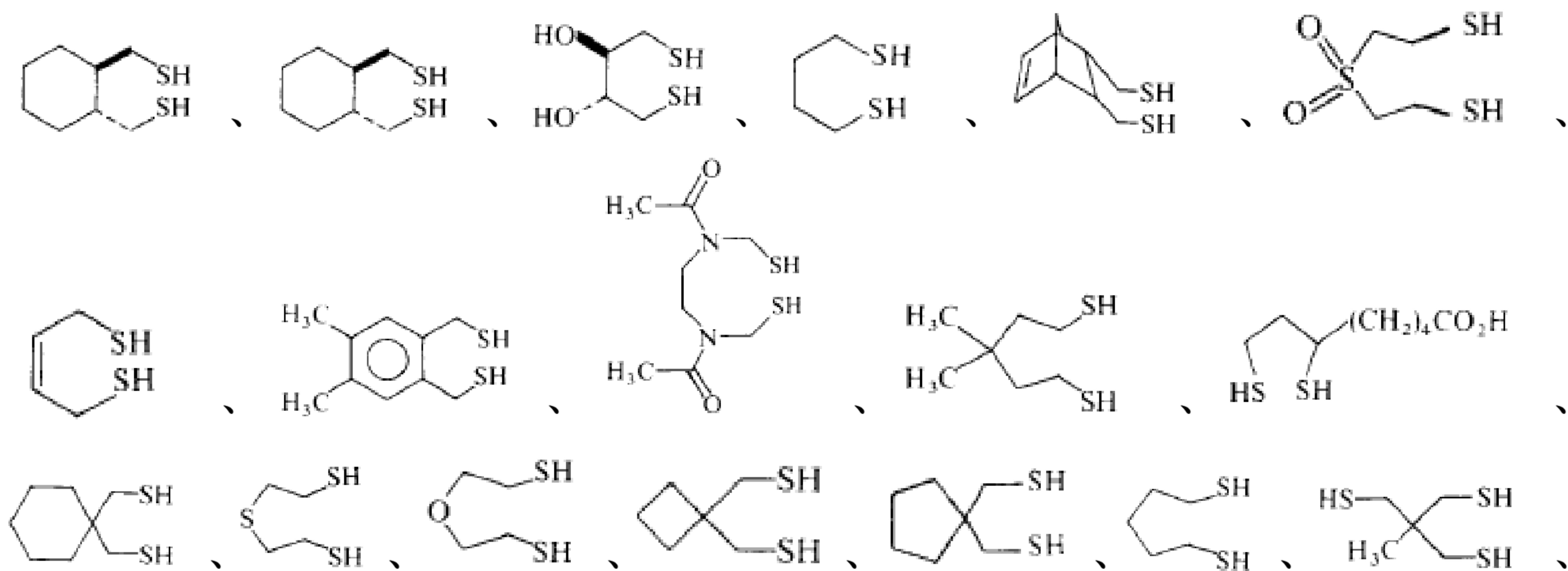
L 為連接體。

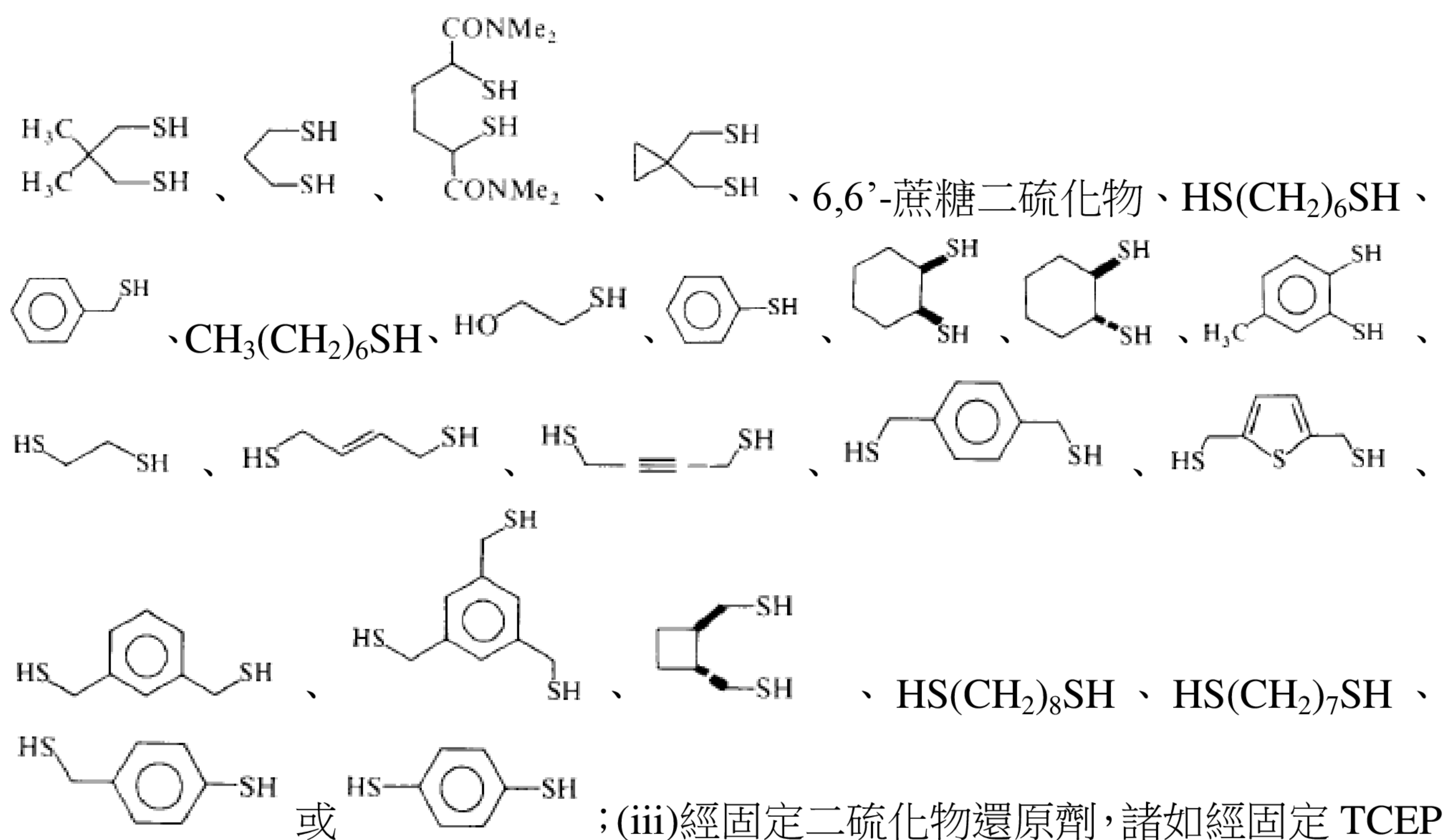
【0146】 在某些實施例中，第一態樣或第一實施例之方法中的步驟(a)、(b)及(c)係在同一反應容器中進行。

【0147】 在某些實施例中，關於第一實施例或其中所述之任何實施例之方法，經封端的半胱胺酸工程改造之抗體(cCysAb)或其抗原結合片段中之一或多個鏈間二硫鍵係在步驟(a)中經還原。在某些實施例中，該一或多個鏈間二硫鍵係在步驟(b)中再形成。

【0148】 在某些實施例中，關於第一、第二或第三態樣或第一實施例或其中所述之任何實施例之方法，任何合適還原劑均可用於步驟(a)之反應中。用還原劑處理 cCysCBA (例如 cCysAb 或其抗原結合片段)可自未配對半胱胺酸殘基移除封端劑以形成游離硫醇(-SH)基且亦可還原在細胞結合劑之兩個半胱胺酸殘基

之間形成的二硫鍵，例如抗體或其抗原結合片段之鏈間及/或鏈內二硫鍵。例示性還原劑包括但不限於(i)基於磷之還原劑，諸如參(2-羧基乙基)膦鹽酸鹽(TCEP)、參羥基丙基膦(THPP)、參(2-氰基乙基)膦、二環己基膦基)苯磺酸、雙(對磺酸根基苯基)苯基膦、(二苯基膦基)苯磺酸、(二苯基膦基)苯甲酸、三氟甲磺酸 2-(二苯基膦基)-N,N,N-三甲基苯甲基銨、(二苯基膦基)乙胺、2-(二異丙基膦基)乙胺、3-(二苯基膦基)丙胺(DPPA)、3,3',3''-三苯基膦三間磺酸鈉、3-(二苯基膦基)苯磺酸鈉、4-(二苯基膦基)苯磺酸鈉、雙(對磺酸根基苯基)苯基膦二水合物二鉀鹽、雙(對磺酸根基苯基)苯基膦二水合物二鉀鹽、丙酸 3,3',3''-次膦基參-,1,1',1''-三甲酯(TmTCEP)、丙腈 3,3'-(苯基亞膦基)雙-苯胺(亦稱作 N,N-雙(氰基乙基)苯胺)、4-(二乙基膦基)-N,N-二甲基-參(3-甲氧基丙基)膦、2-(二苯基膦基)乙酸、(S) 2-[2-(二苯基膦基)乙基]-吡啶、2-2-(二苯基膦基)-1-苯基乙胺、四氟硼酸 2-(二苯基膦基)乙銨、3-(二苯基膦基)-丙酸、(乙酸, 2-(二苯基膦基)-, 乙酯)或 4-(二苯基膦基)丁酸；(i)基於硫醇之還原劑，諸如二硫蘇糖醇(DTT)、1,4-二硫赤藻糖醇(DTE)、1,4-丁二硫醇、L-1,4-二硫蘇糖醇、(S)-2-胺基丁烷-1,4-二硫醇鹽酸鹽、(2S)-2-胺基丁烷-1,4-二硫醇(DTBA)、2-胺基乙烷硫醇(MEA) (或其鹽酸鹽)，或以下任一者：





二硫化物還原凝膠或樹脂、含有已固定有基於硫醇之還原劑的珠粒狀樹脂之經固定還原劑管柱，或(iv)其他還原劑，諸如硒醇、胍-HCl 或尿素。

【0149】 在某些實施例中，還原劑係基於 CBA (例如抗體或其抗原結合片段) 之等電點(pI)經選擇。

【0150】 在某些實施例中，第一態樣、第二態樣或第三態樣或第一實施例或其中所述之任何實施例之方法進一步包括測定 CBA (例如抗體或其抗原結合片段)之 pI 及基於 CBA 之 pI 選擇還原劑。CBA 之 pI 可使用已知之任何合適方法經測定。

【0151】 在某些實施例中，關於第一態樣、第二態樣或第三態樣或第一實施例或其中所述之任何實施例之方法，任何合適氧化劑均可用於步驟(b)之反應中。該氧化劑選擇性地氧化且再形成在 CBA 之兩個半胱胺酸殘基之間形成的二硫鍵，而不會再氧化未配對半胱胺酸殘基之游離硫醇。在某些實施例中，該氧化劑選擇性地再形成抗體或其抗原結合片段之鏈間及/或鏈內二硫鍵，而不會再氧化未配對半胱胺酸殘基之游離硫醇。例示性氧化劑包括但不限於去氫抗壞血酸

(DHAA)、硫酸銅、氧氣、空氣或  $\text{Cu(II)-(1,10-鄰二氮雜菲)}_3$  及碘溶液(參見 Hamdan, F.F.等人, *Biochemistry*, 2002, 41(24), 第 7647-7658 頁, 以引用之方式併入本文中)。

【0152】 在第二實施例中, 關於第一態樣、第二態樣或第三態樣或第一實施例或其中所述之任何實施例之方法, 步驟(a)中之還原劑為 TCEP 或 DPPA。

【0153】 在第三實施例中, 關於第一態樣、第二態樣或第三態樣或第一實施例、第二實施例或其中所述之任何實施例之方法, 氧化劑為 DHAA。

【0154】 在第四實施例中, 關於第一態樣、第二態樣或第三態樣或第一、第二或第三實施例或其中所述之任何實施例之方法, 步驟(a)之反應係在 5.0 與 8.5 之間的 pH 下進行。更特定言之, 步驟(a)之反應係在 6.0 與 7.5 之間的 pH 下進行。

【0155】 在某些實施例中, 關於第一態樣、第二態樣或第三態樣或第一、第二、第三或第四實施例或其中所述之任何實施例之方法, 步驟(b)之反應係在 5.0 與 8.5 之間的 pH 下進行。更特定言之, 步驟(b)之反應係在 6.0 與 7.5 之間的 pH 下進行。

【0156】 在某些實施例中, 關於第一態樣、第二態樣或第三態樣或第一、第二、第三或第四實施例或其中所述之任何實施例之方法, 步驟(c)之反應係在 5.0 與 8.5 之間的 pH 下進行。更特定言之, 步驟(c)之反應係在 6.0 與 7.5 之間的 pH 下進行。甚至更特定言之, 步驟(c)之反應係在 5.5 與 6.5 之間的 pH 下進行。在另一特定實施例中, 步驟(c)之反應係在 pH 6.0 下進行。在另一特定實施例中, 步驟(c)之反應係在 pH 6.5 下進行。

【0157】 在某些實施例中, 關於第一態樣、第二態樣或第三態樣或第一、第二、第三或第四實施例或其中所述之任何實施例之方法, 該方法進一步包括在步驟(c)中使 CysCBA 與細胞毒性劑反應之前調節步驟(b)之後的反應混合物之

pH。

【0158】 在某些實施例中，關於第一態樣、第二態樣或第三態樣或第一、第二、第三或第四實施例或其中所述之任何實施例之方法，步驟(b)之後的反應混合物之 pH 未在步驟(c)中使 CysCBA 與細胞毒性劑反應之前經調節。

【0159】 在第五實施例中，關於第一態樣、第二態樣或第三態樣或第一、第二、第三或第四實施例或其中所述之任何實施例之方法，步驟(a)中之還原劑為 TCEP 且步驟(a)之反應係在 7.0 與 8.0 之間、更特定言之 7.3 與 7.7 之間的 pH 下且甚至更特定言之在 pH 7.5 下進行。

【0160】 在某些實施例中，關於第五實施例之方法，氧化劑為 DHAA 且步驟(b)之反應係在 7.0 與 8.0 之間、更特定言之 7.3 與 7.7 之間的 pH 下且甚至更特定言之在 pH 7.5 下進行。

【0161】 在某些實施例中，關於第五實施例或其中所述之任何實施例之方法，步驟(b)之後的反應混合物之 pH 係在步驟(c)中使 CysCBA 與細胞毒性劑反應之前自 7.3 與 7.7 之間的 pH (例如 pH 7.5)經調節至 5.8 至 6.2 之間的 pH (例如 pH 6.0)。

【0162】 在第六實施例中，關於第一態樣、第二態樣或第三態樣或第一、第二、第三或第四實施例或其中所述之任何實施例之方法，步驟(a)中之還原劑為 DPPA 且步驟(a)之反應係在 6.0 與 7.0 之間、更特定言之 6.3 與 6.7 之間的 pH 下、甚至更特定言之在 pH 6.5 下進行。

【0163】 在某些實施例中，關於第六實施例之方法，氧化劑為 DHAA 且步驟(b)之反應係在 6.0 與 7.0 之間、更特定言之 6.3 與 6.7 之間的 pH 下、甚至更特定言之在 pH 6.5 下進行。

【0164】 在某些實施例中，關於第六實施例或其中所述之任何實施例之方法，

步驟(b)之後的反應混合物之 pH 未在步驟(c)中使 CysCBA 與細胞毒性劑反應之前經調節且步驟(c)之反應係在 6.0 與 7.0 之間、更特定言之 6.3 與 6.7 之間的 pH 下、甚至更特定言之在 pH 6.5 下進行。

【0165】 在第七實施例中，關於第一或第二態樣或第一、第二、第三、第四、第五或第六實施例或其中所述之任何實施例之方法，該結合物係藉由切向流過濾(TFF)、吸附層析、非吸附層析、吸附過濾、選擇性沈澱或其組合經純化。更特定言之，該結合物係藉由 TFF 經純化。

【0166】 任何合適 TFF 系統均可用於純化，包括 Pellicon 類型系統(Millipore, Billerica, Mass.)、Sartocon 卡匣系統(Sartorius AG, Edgewood, N.Y.)、TangenX 卡匣(TangenX Technology Corporation, Shrewsbury, MA)及 Centrasette 類型系統(Pall Corp., East Hills, N.Y.)

【0167】 任何合適吸附層析樹脂均可用於純化，其中該樹脂可保持細胞結合劑-細胞毒性劑結合物且允許雜質之溶離，或保持雜質且允許細胞結合劑-細胞毒性劑結合物之溶離。較佳吸附層析樹脂包括羥磷灰石層析、疏水性電荷誘導層析(HCIC)、疏水性相互作用層析(HIC)、離子交換層析、混合模式離子交換層析、固定金屬親和力層析(IMAC)、染料配位體層析、親和力層析、逆相層析及其組合。合適羥磷灰石樹脂之實例包括陶瓷羥磷灰石(CHT I 型及 II 型，Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.)、HA Ultrogel 羥磷灰石(Pall Corp., East Hills, N.Y.) 及陶瓷氟磷灰石(CFT I 型及 II 型，Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.)。合適 HCIC 樹脂之實例為 MEP Hypercel 樹脂(Pall Corp., East Hills, N.Y.)。合適 HIC 樹脂之實例包括 Butyl-Sepharose、Hexyl-Sepaharose、Phenyl-Sepharose 及 Octyl Sepharose 樹脂(均來自 GE Healthcare, Piscataway, N.J.)，以及 Macro-prep Methyl 及 Macro-Prep t-Butyl 樹脂(Biorad Laboratories, Hercules, Calif.)。合適離子交換樹

脂之實例包括 SP-Sepharose、CM-Sepharose 及 Q-Sepharose 樹脂(均來自 GE Healthcare, Piscataway, N.J.)及 Unosphere S 樹脂(Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.)。合適混合模式離子交換劑之實例包括 Bakerbond ABx 樹脂(JT Baker, Phillipsburg N.J.)合適 IMAC 樹脂之實例包括 Chelating Sepharose 樹脂(GE Healthcare, Piscataway, N.J.)及 Profinity IMAC 樹脂(Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.)。合適染料配位體樹脂之實例包括 Blue Sepharose 樹脂(GE Healthcare, Piscataway, N.J.)及 Affi-gel Blue 樹脂(Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.)。合適親和力樹脂之實例包括蛋白 A 瓊脂糖樹脂(例如 MabSelect, GE Healthcare, Piscataway, N.J.)，其中細胞結合劑為抗體；及凝集素親和力樹脂，例如小扁豆凝集素瓊脂糖樹脂(GE Healthcare, Piscataway, N.J.)，其中細胞結合劑攜帶適當凝集素結合位點。或者，可使用對細胞結合劑具特異性之抗體。該種抗體可經固定至例如 Sepharose 4 Fast Flow 樹脂(GE Healthcare, Piscataway, N.J.)。合適逆相樹脂之實例包括 C4、C8 及 C18 樹脂(Grace Vydac, Hesperia, Calif.)。

**【0168】** 任何合適非吸附層析樹脂均可用於純化。合適非吸附層析樹脂之實例包括但不限於 SEPHADEX™ G-25、G-50、G-100、SEPHACRYL™ 樹脂(例如 S-200 及 S-300)、SUPERDEX™ 樹脂(例如 SUPERDEX™ 75 及 SUPERDEX™ 200)、BIO-GEL® 樹脂(例如 P-6、P-10、P-30、P-60 及 P-100)，及一般技術者已知之其他樹脂。

**【0169】** 在一些實施例中，該結合物係藉由單程切向流過濾(SPTFF)經純化。在一些實施例中，該結合物係藉由逆流透濾經純化。

**【0170】** 在一些實施例中，使用 SPTFF 來移除未結合之藥物及/或將 ADC 交換至穩定緩衝液中。在一些實施例中，使用流通管柱層析來移除未結合之藥物且使用 SPTFF 將 ADC 交換至穩定緩衝液中。

【0171】 在一些實施例中，使用逆流透濾來移除未結合之藥物及/或將 ADC 交換至穩定緩衝液中。在一些實施例中，使用流通管柱層析來移除未結合之藥物且使用逆流透濾將 ADC 交換至穩定緩衝液中。

【0172】 在一些實施例中，SPTFF 使用超濾膜。在一些實施例中，SPTFF 使用透濾膜。

【0173】 在一些實施例中，該方法改良 ADC 產生之一致性。在一些實施例中，該方法降低用於 ADC 產生之時間。

【0174】 在一些實施例中，SPTFF 改良 ADC 產生之一致性。在一些實施例中，SPTFF 降低用於 ADC 濃縮、純化或轉移之時間。在一些實施例中，SPTFF 降低所用緩衝液之量。

【0175】 在一些實施例中，逆流透濾改良 ADC 產生之一致性。在一些實施例中，逆流透濾降低用於 ADC 濃縮、純化或轉移之時間。在一些實施例中，逆流透濾降低所用緩衝液之量。

【0176】 在某些實施例中，關於第一態樣、第二態樣或第三態樣或第一、第二、第三、第四、第五、第六或第七實施例或其中所述之任何實施例之方法，該方法進一步包括在該結合物經純化之前調節步驟(c)之後的反應混合物之 pH。在一些實施例中，步驟(c)之後的反應混合物之 pH 係經調節至 4.0 與 6.0 之間、4.0 與 5.5 之間、4.0 與 5.0 之間、4.5 與 5.0 之間或 4.6 與 4.8 之間之 pH。在一特定實施例中，該 pH 係經調節至 4.5、4.6、4.7、4.8、4.9 或 5.0。在另一特定實施例中，該 pH 係經調節至 4.7。

【0177】 在第八實施例中，關於第一態樣、第二態樣或第三態樣或第一、第二、第三、第四、第五、第六或第七實施例或其中所述之任何實施例之方法，相對於 cCysCBA 過量之還原劑用於步驟(a)中。更特定言之，還原劑與 cCysCBA

(例如抗體或其抗原結合片段)之莫耳比率係在 1:1 與 50:1 之間、2:1 與 30:1 之間、5:1 與 25:1 之間或 10:1 與 25:1 之間。甚至更特定言之，該莫耳比率係在 15:1 與 20:1 之間。

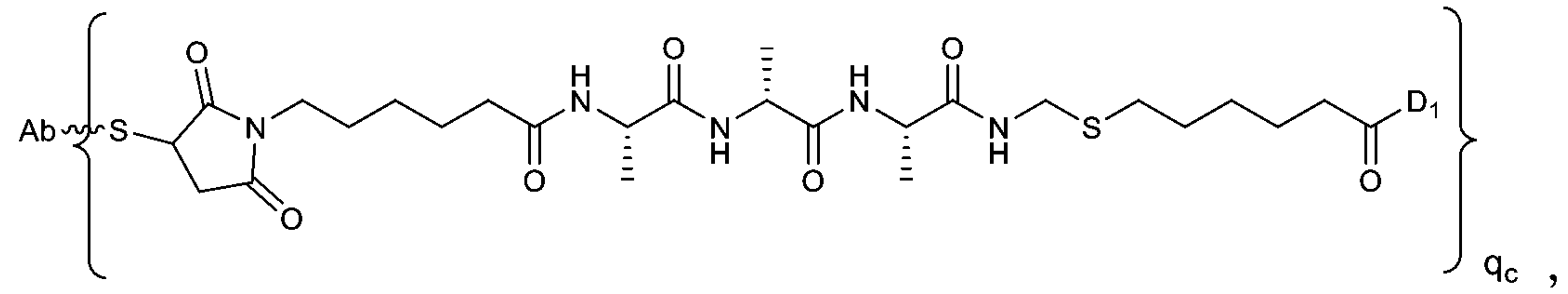
**【0178】** 在第九實施例中，關於第一態樣、第二態樣或第三態樣或第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七或第八實施例或其中所述之任何實施例之方法，步驟(a)中之還原劑與步驟(b)中之氧化劑的莫耳比率係在 20:1 與 1:20 之間、10:1 與 1:10 之間、5:1 與 1:5 之間、2:1 與 1:2 之間、1.2:1 與 1:1.5 之間、1:1 與 1:20 之間或 1:1 與 1:10 之間。更特定言之，還原劑與氧化劑之莫耳比率係在 1:1 與 1:1.5 之間。甚至更特定言之，還原劑與氧化劑之莫耳比率為 1:1。或者，還原劑與氧化劑之莫耳比率為 1:1.5。

**【0179】** 在第十實施例中，關於第一態樣、第二態樣或第三態樣或第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八或第九實施例或其中所述之任何實施例之方法，相對於 CysCBA (例如抗體或其抗原結合片段)或其抗原結合片段過量之式(I)化合物用於步驟(c)中。更特定言之，對於每一當量之 CysCBA，使用 1.1 與 20 之間、1.5 與 20 之間、2 與 20 之間、2 與 10 之間、2 與 5 之間、3.5 與 5 之間、4.2 與 5 之間、4.3 與 4.9 之間、4.4 與 4.8 之間或 4.5 與 4.7 之間莫耳當量之式(I)化合物。在一特定實施例中，對於每一當量之 CysCBA，使用 4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9 或 5.0 莫耳當量之式(I)化合物。在另一特定實施例中，對於每一當量之 CysCBA，使用 4.6 莫耳當量之式(I)化合物。

**【0180】** 在某些實施例中，關於本文所述之方法(例如，第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九或第十實施例或其中所述之任何實施例之方法)，CysAb 係在一或多個位置處具有經工程改造之半胱胺酸殘基的抗體，該一或多個位置選自該抗體之 EU/OU 編號位置 40、43、84、88、103、112、113、

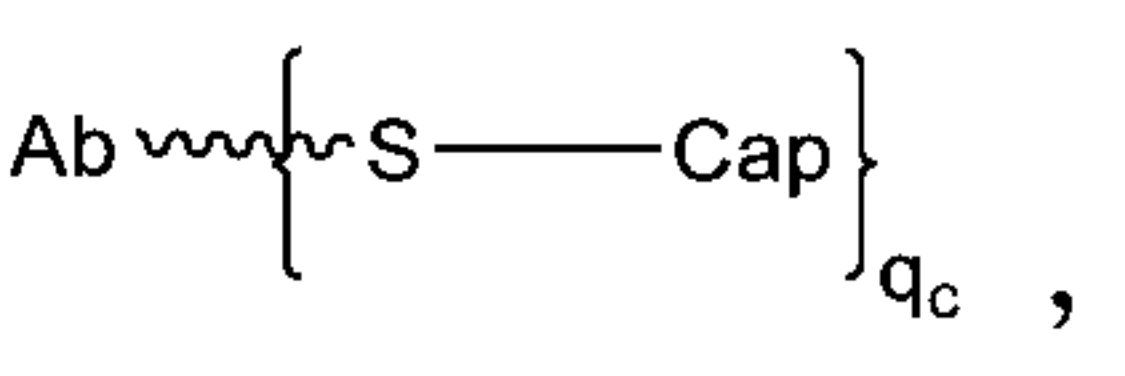
114、115、118、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、161、168、172、179、187、209、234、235、236、237、238、239、244、245、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、260、262、265、267、270、272、274、279、280、282、283、284、285、286、288、289、293、295、297、298、303、305、307、308、309、311、312、313、314、315、316、317、318、325、326、327、328、329、330、332、334、338、339、340、341、343、345、360、361、362、371、373、375、376、377、378、380、382、384、385、386、387、389、390、391、413、422、423、424、427、428、430、431、433、434、435、436、437、438、440、442、443 及 446。在其他實施例中，CysAb 係在一或多個位置處具有經工程改造之半胱胺酸殘基的抗體，該一或多個位置選自 Kabat 編號位置 15、43、106、108、110、112、113、119、120、121、142、144、149、153、156、158、168、173、175、205 及 207。在某些實施例中，CysAb 係在描述於 WO 2016/040856 及美國專利第 7,521,541 號中之一或多個位置處具有經工程改造之半胱胺酸殘基的抗體，該等文獻各自以引用之方式併入本文中。更特定言之，CysAb 為如下抗體，其在該抗體之重鏈之 EU/OU 編號位置 442 處具有經工程改造之半胱胺酸殘基。甚至更特定言之，CysAb 係在兩條重鏈之 EU/OU 編號位置 442 處均具有經工程改造之半胱胺酸殘基的抗體。

【0181】 在第十一實施例中，本發明提供一種製備抗體-細胞毒性劑結合物 (ADC)之方法，該抗體-細胞毒性劑結合物(ADC)由下式表示：



該方法包括以下步驟：

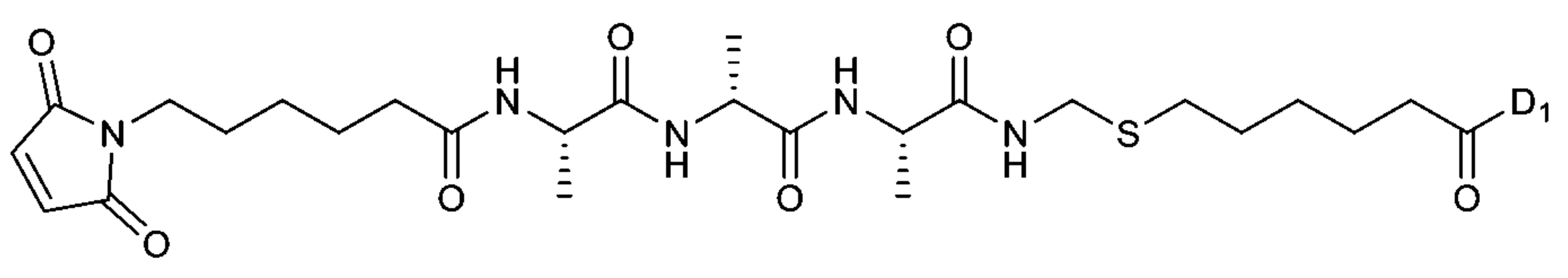
(a) 使還原劑與由下式表示之經封端的半胱胺酸工程改造之抗體(cCysAb)反應：



以形成經還原抗體或其抗原結合片段，其中該封端劑(Cap)經移除以在該經還原抗體或其抗原結合片段中形成游離硫醇(-SH)基；

(b) 使該經還原抗體或其抗原結合片段與選擇性氧化劑反應以形成 CysAb，其中經工程改造之半胱氨酸殘基中的游離硫醇基未經氧化；及

(c) 使該 CysAb 與由下式表示之化合物：



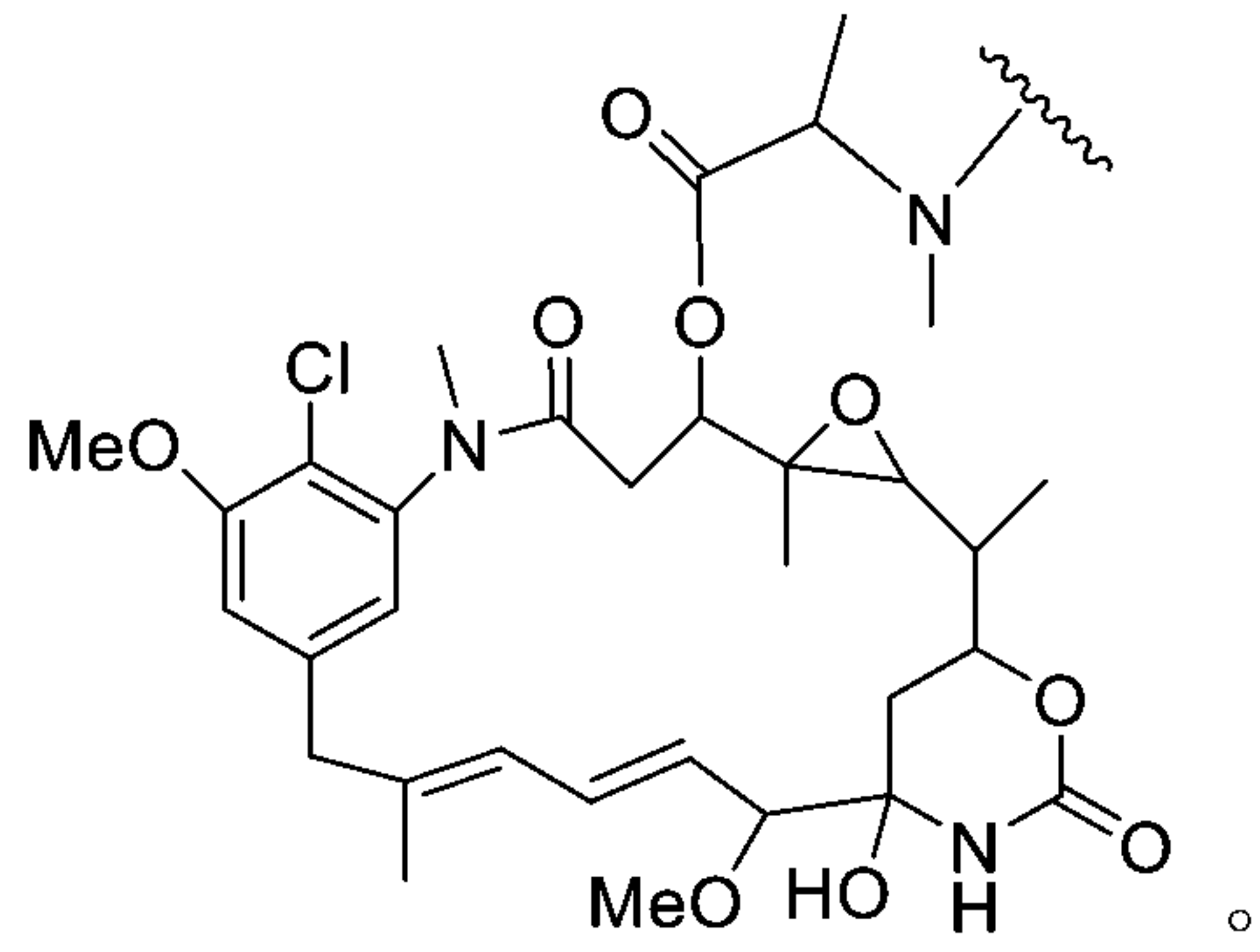
或其醫藥學上可接受之鹽反應，由此形成該 ADC，其中步驟(a)中之經還原抗體或其抗原結合片段未經純化即用於步驟(b)，且步驟(b)之 CysAb 或其抗原結合片段未經純化即用於步驟(c)，其中：

Ab~S 一係經由位於經工程改造之半胱氨酸殘基上的硫醇基共價連接至該細胞毒性劑之經半胱氨酸工程改造之抗體(CysAb)或其抗原結合片段；且其中該 CysAb 或其抗原結合片段係包含 CDR<sub>H</sub>1 域、CDR<sub>H</sub>2 域及 CDR<sub>H</sub>3 域以及 CDR<sub>L</sub>1 域、CDR<sub>L</sub>2 域及 CDR<sub>L</sub>3 域之人類化抗 ADAM9 抗體或其 ADAM9 結合片段，該等域分別具有序列 SEQ ID NO: 24、25 及 26 以及 SEQ ID NO: 21、22、23；

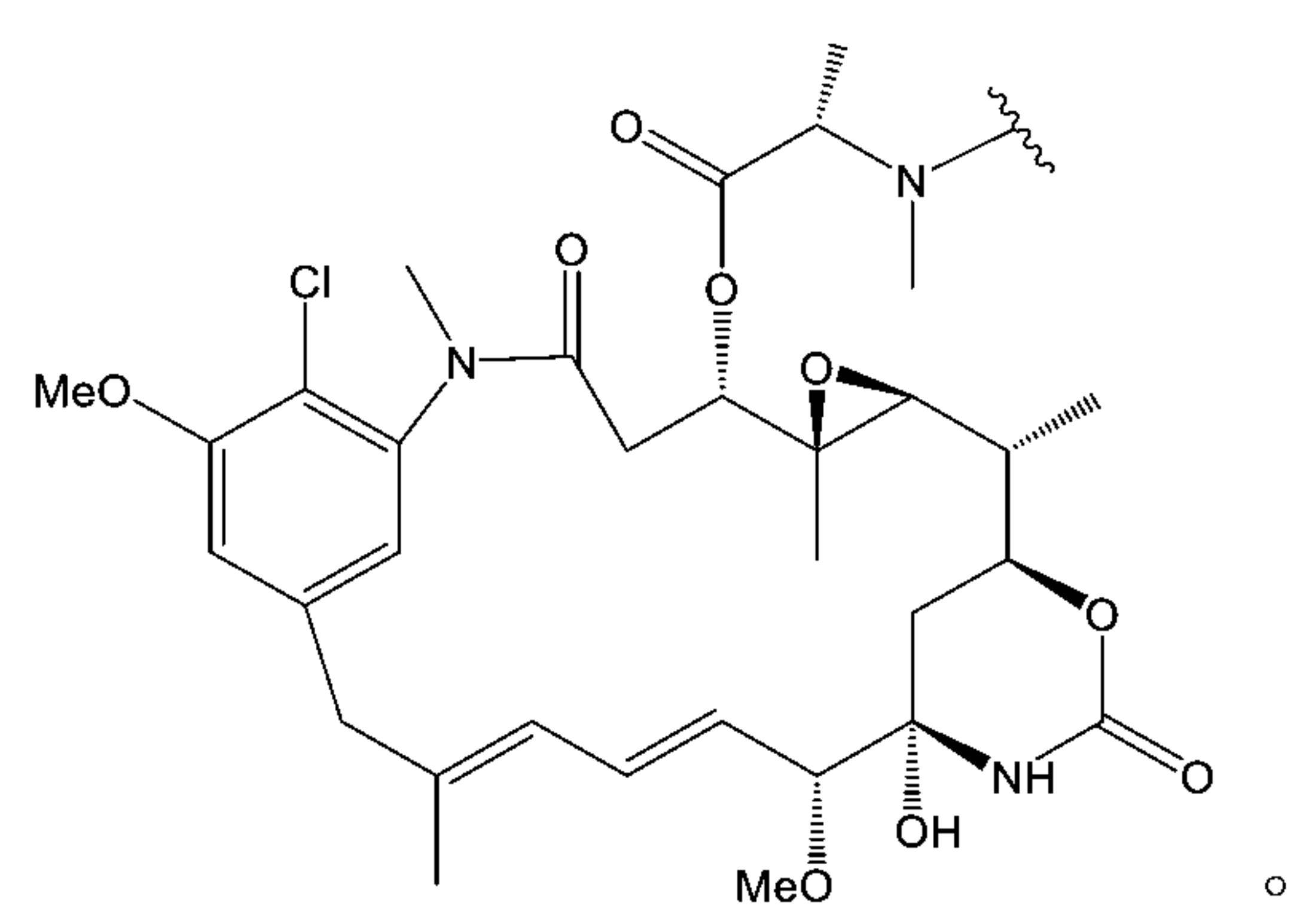
q<sub>c</sub> 為 1 或 2；

Cap 為封端劑；且

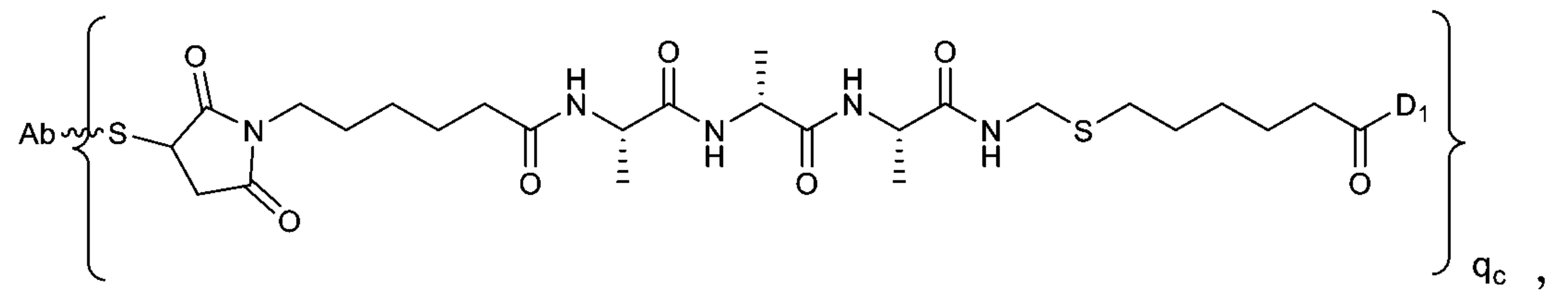
D<sub>1</sub> 係由下式表示：



【0182】 較佳地，D<sub>1</sub>係由下式表示：

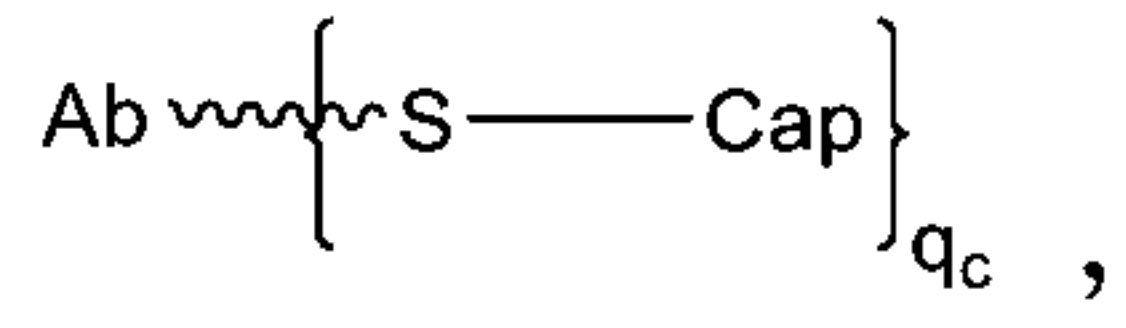


【0183】 在第十二實施例中，本發明提供一種製備抗體-細胞毒性劑結合物 (ADC)之連續方法，該抗體-細胞毒性劑結合物(ADC)由下式表示：



該方法包括以下步驟：

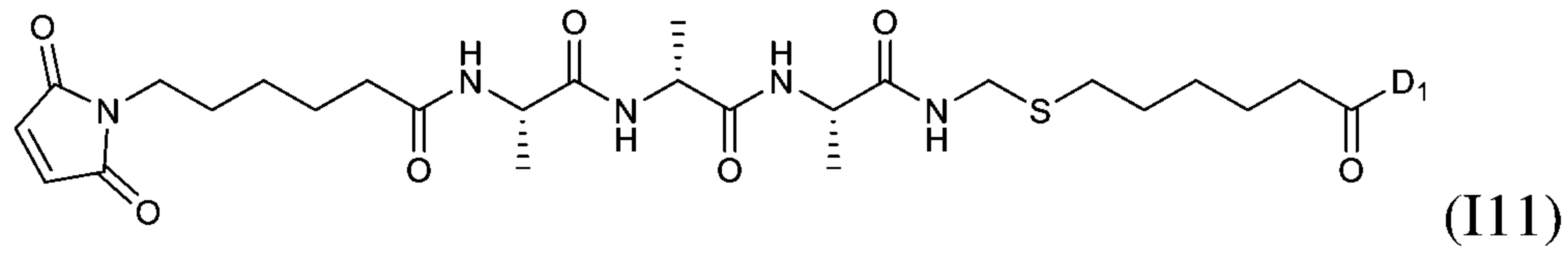
(a) 使還原劑與由下式表示之經封端的半胱氨酸工程改造之抗體(cCysAb)反應：



以形成經還原抗體或其抗原結合片段，其中該封端劑(Cap)經移除以在該經還原抗體或其抗原結合片段中形成游離硫醇(-SH)基；

(b) 使該經還原抗體或其抗原結合片段與選擇性氧化劑反應以形成 CysAb，其中經工程改造之半胱氨酸殘基中的游離硫醇基未經氧化；及

(c) 使該 CysAb 與由下式表示之化合物：



或其醫藥學上可接受之鹽反應，由此形成該 ADC，

其中步驟(a)中之經還原抗體或其抗原結合片段未經純化即用於步驟(b)，且步驟

(b)之 CysAb 或其抗原結合片段未經純化即用於步驟(c)，且步驟(a)至(c)係連續地

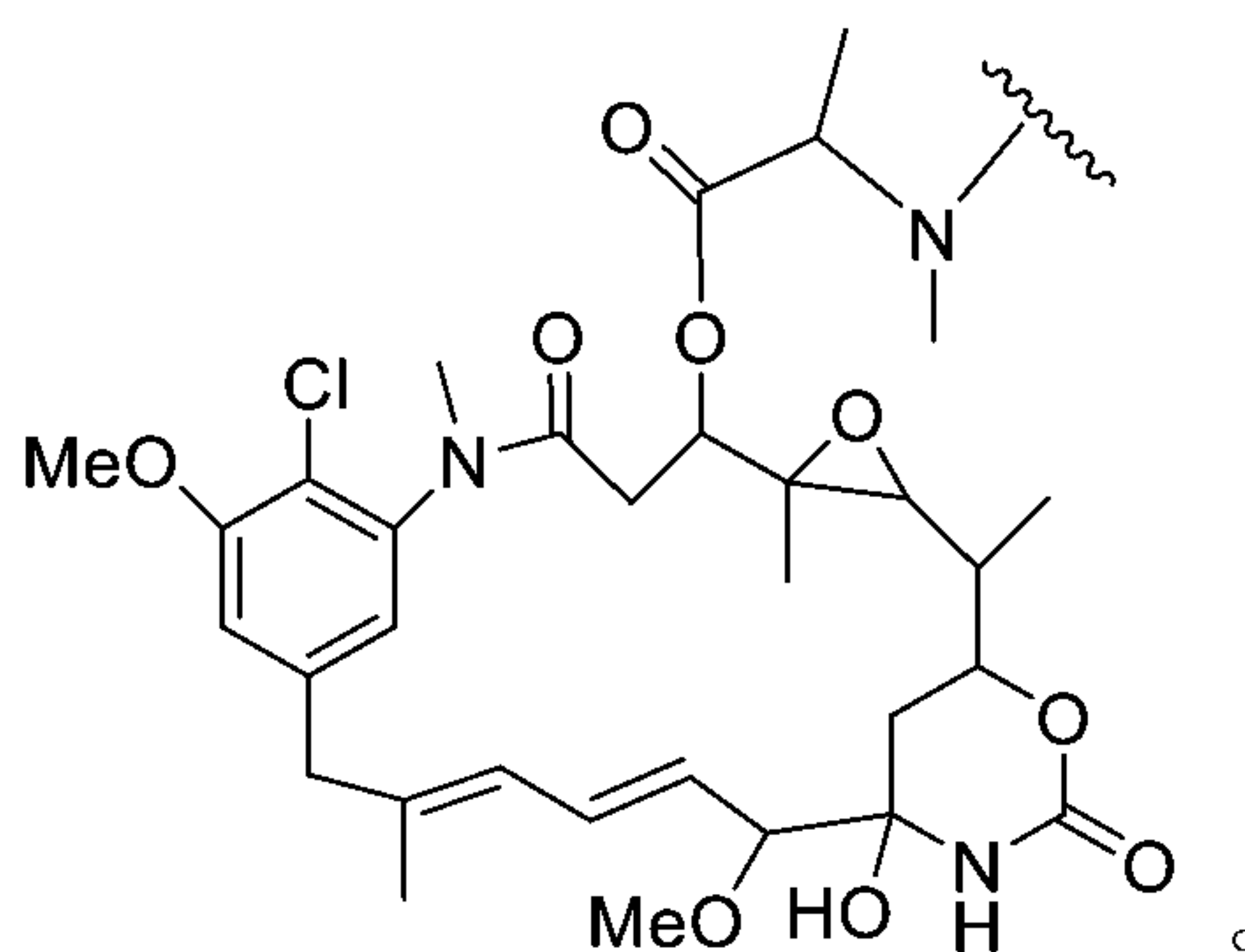
執行，且其中：

Ab~S 係經由位於經工程改造之半胱氨酸殘基上的硫醇基共價連接至該細胞毒性劑之經半胱氨酸工程改造之抗體(CysAb)或其抗原結合片段；且其中該 CysAb 或其抗原結合片段係包含 CDR<sub>H</sub>1 域、CDR<sub>H</sub>2 域及 CDR<sub>H</sub>3 域以及 CDR<sub>L</sub>1 域、CDR<sub>L</sub>2 域及 CDR<sub>L</sub>3 域之人類化抗 ADAM9 抗體或其 ADAM9 結合片段，該等域分別具有序列 SEQ ID NO: 24、25 及 26 以及 SEQ ID NO: 21、22、23；

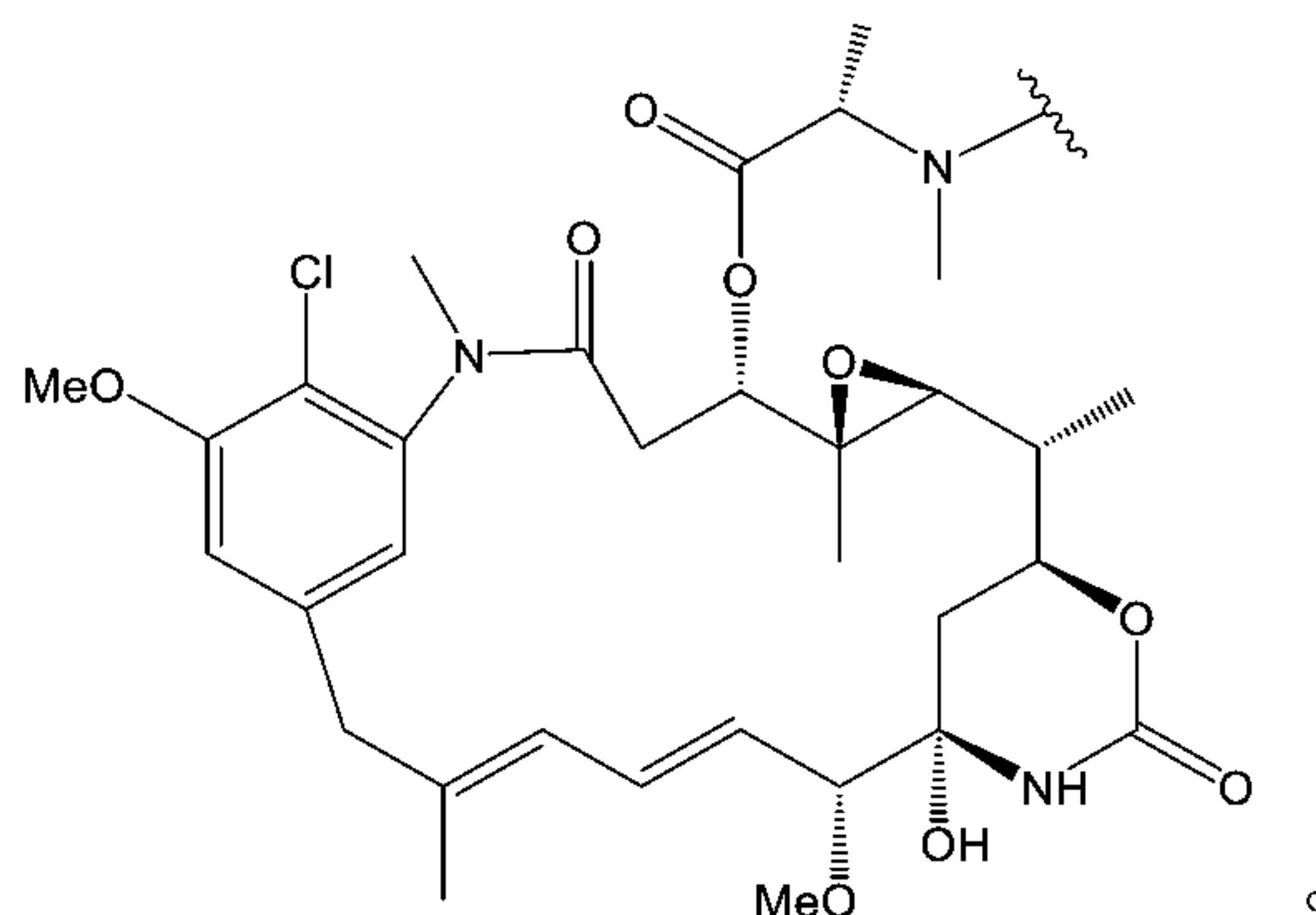
q<sub>c</sub> 為 1 或 2；

Cap 為封端劑；且

D<sub>1</sub> 係由下式表示：



【0184】 較佳地，D<sub>1</sub> 係由下式表示：



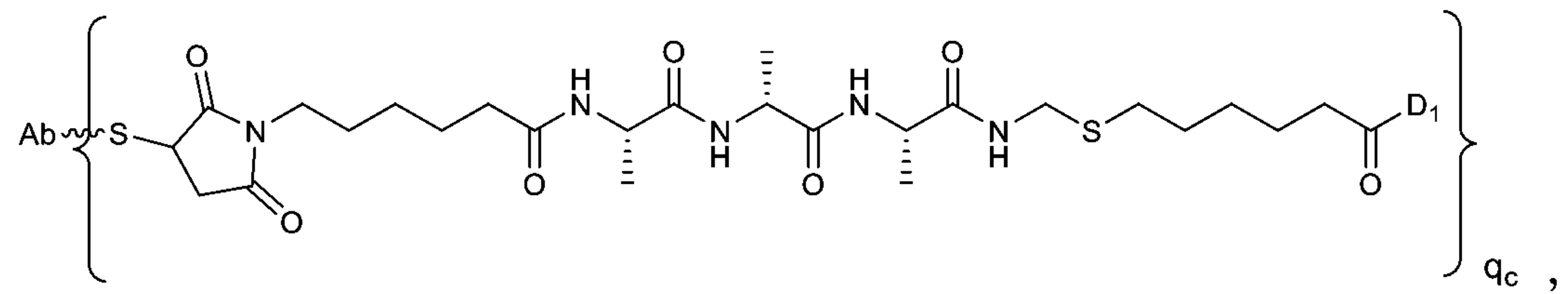
【0185】 在第十三實施例中，如本文所述之第十一或第十二實施例之方法進一步包括以下步驟：(d)移除未結合之式(I11)化合物；及視情況(e)將 ADC 交換至穩定緩衝液中。

【0186】 在一些實施例中，使用 SPTFF 來移除未結合之藥物及/或將 ADC 交

換至穩定緩衝液中。在一些實施例中，使用逆流透濾來移除未結合之藥物及/或將 ADC 交換至穩定緩衝液中。

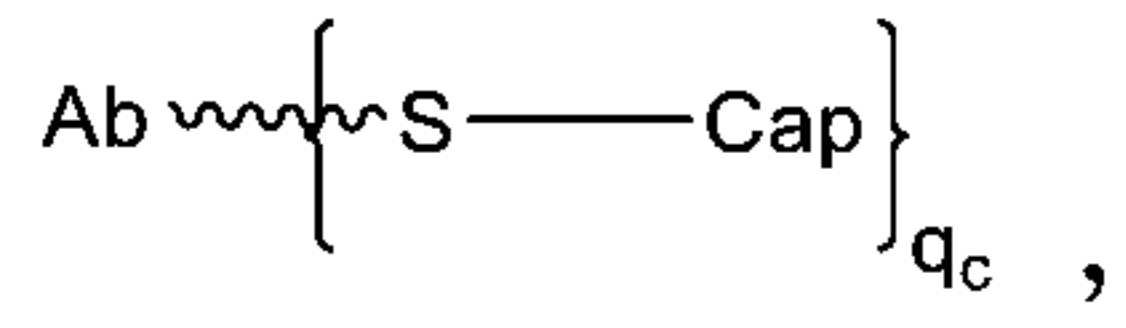
【0187】 在某些實施例中，步驟(d)及(e)係連續地執行。

【0188】 在第十四實施例中，本發明提供一種製備抗體-細胞毒性劑結合物(ADC)之連續方法，該抗體-細胞毒性劑結合物(ADC)由下式表示：



該方法包括以下步驟：

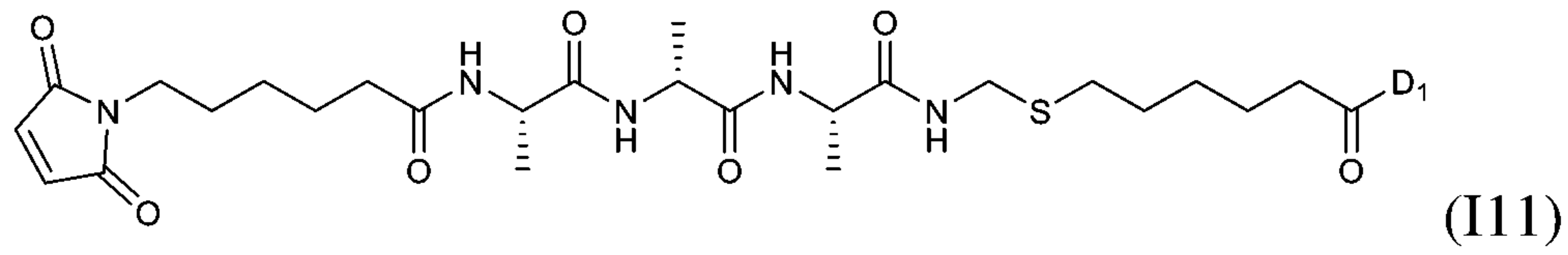
(a) 使還原劑與由下式表示之經封端的半胱氨酸工程改造之抗體(cCysAb)反應：



以形成經還原抗體或其抗原結合片段，其中該封端劑(Cap)經移除以在該經還原抗體或其抗原結合片段中形成游離硫醇(-SH)基；

(b) 使該經還原抗體或其抗原結合片段與選擇性氧化劑反應以形成 CysAb，其中經工程改造之半胱氨酸殘基中的游離硫醇基未經氧化；及

(c) 使該 CysAb 與由下式表示之化合物：



或其醫藥學上可接受之鹽反應，由此形成該 ADC；及

(d) 藉由逆流透濾移除未結合之式(I11)化合物；

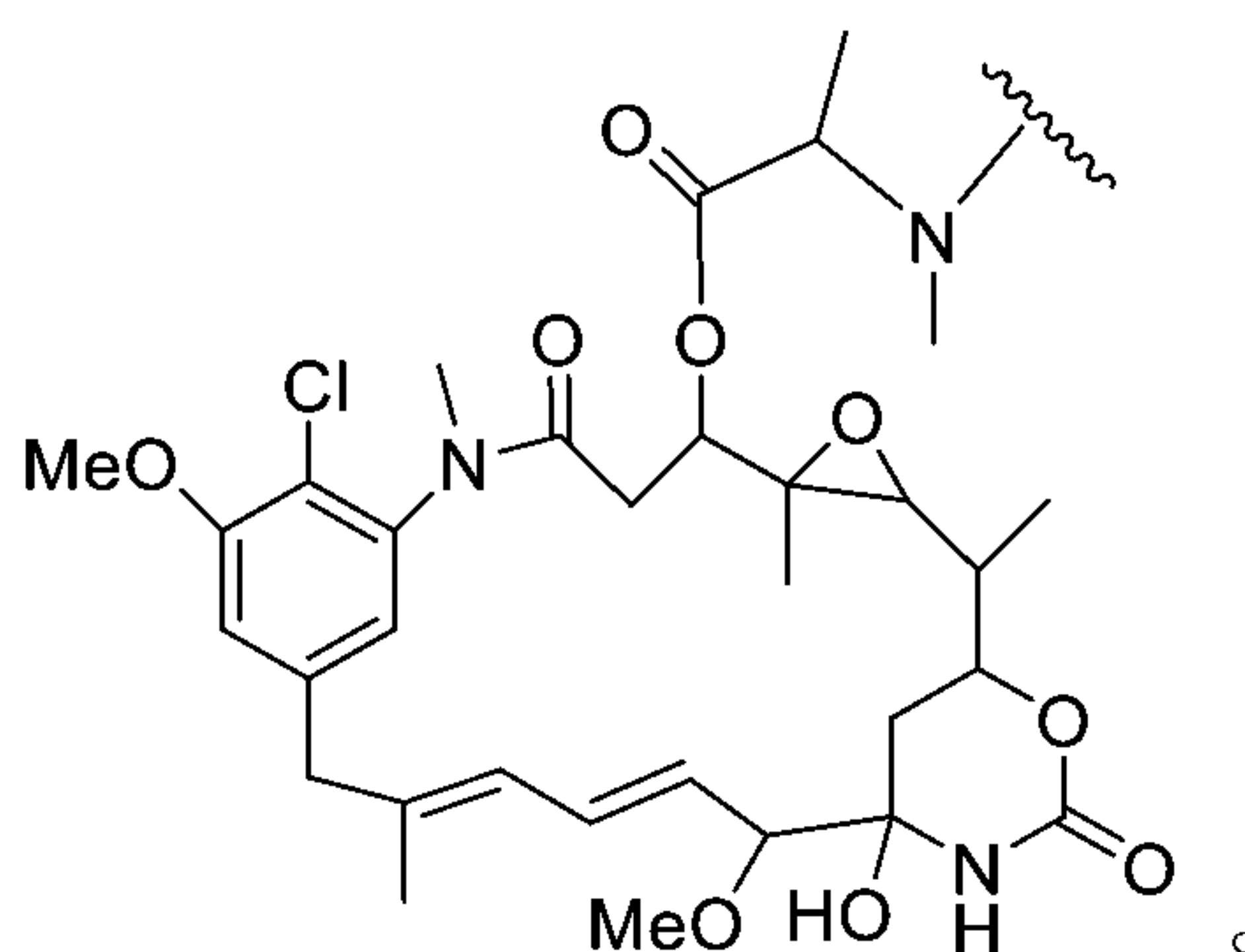
其中步驟(a)中之經還原抗體或其抗原結合片段未經純化即用於步驟(b)，且步驟(b)之 CysAb 或其抗原結合片段未經純化即用於步驟(c)，且步驟(a)至(d)係連續地執行，且其中：

Ab~S 一係經由位於經工程改造之半胱胺酸殘基上的硫醇基共價連接至該細胞毒性劑之經半胱胺酸工程改造之抗體(CysAb)或其抗原結合片段；且其中該 CysAb 或其抗原結合片段係包含 CDR<sub>H</sub>1 域、CDR<sub>H</sub>2 域及 CDR<sub>H</sub>3 域以及 CDR<sub>L</sub>1 域、CDR<sub>L</sub>2 域及 CDR<sub>L</sub>3 域之人類化抗 ADAM9 抗體或其 ADAM9 結合片段，該等域分別具有序列 SEQ ID NO: 24、25 及 26 以及 SEQ ID NO: 21、22、23；

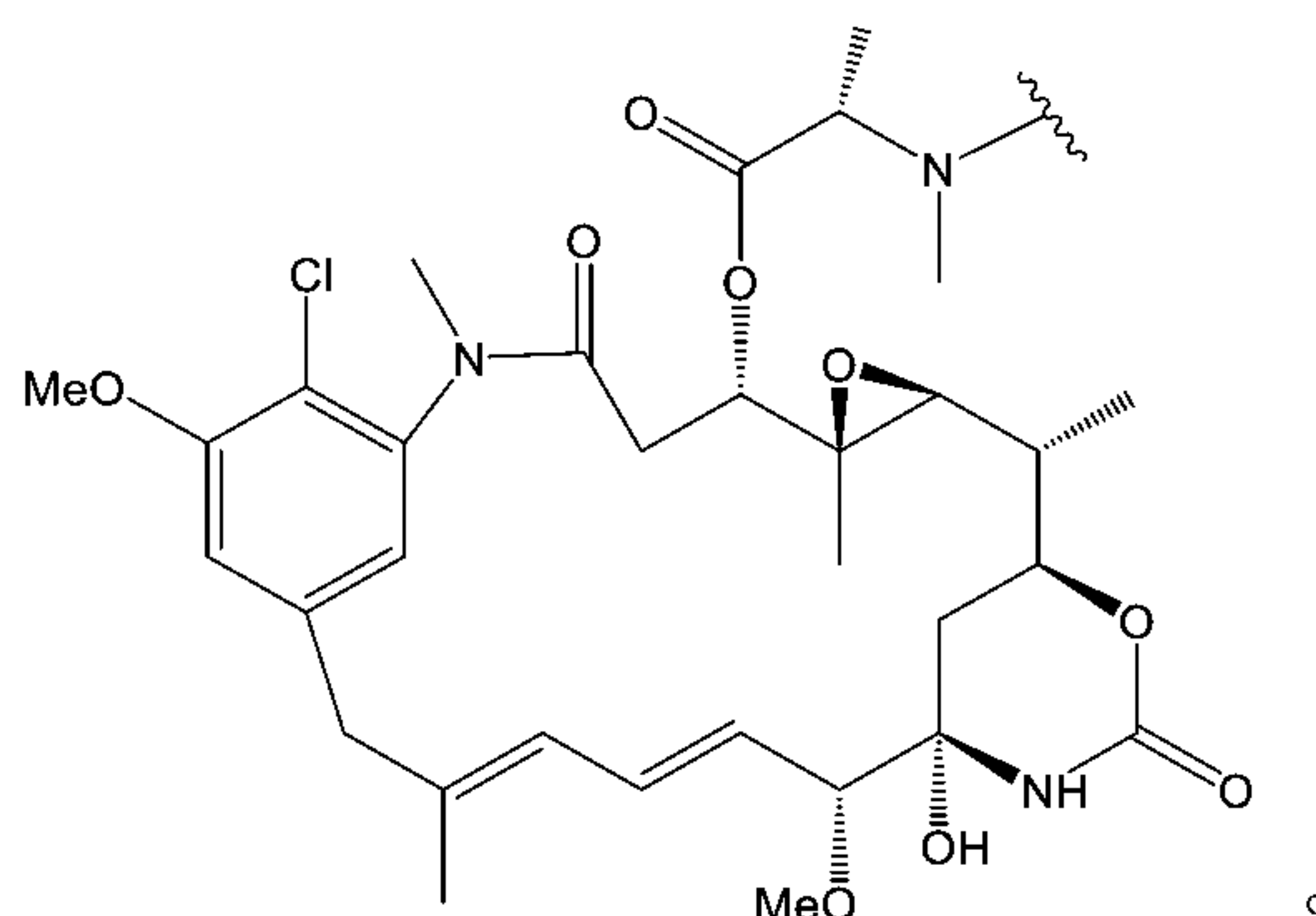
q<sub>c</sub> 為 1 或 2；

Cap 為封端劑；且

D<sub>1</sub> 係由下式表示：



【0189】 較佳地，D<sub>1</sub> 係由下式表示：



【0190】 在某些實施例中，關於第十一、第十二、第十三或第十四實施例或其中所述之任何實施例之方法，該人類化抗 ADAM9 抗體或其 ADAM9 結合片段包含分別具有序列 SEQ ID NO:27 及 SEQ ID NO:28 之重鏈可變域(V<sub>H</sub>)及輕鏈可變域(V<sub>L</sub>)。

【0191】 在某些實施例中，關於第十一、第十二、第十三或第十四實施例或

其中所述之任何實施例之方法，該人類化抗 ADAM9 抗體包含分別具有序列 SEQ ID NO:29 及 SEQ ID NO:30 之重鏈及輕鏈。

【0192】 在某些實施例中，關於第十一、第十二、第十三或第十四實施例或其中所述之任何實施例之方法，還原劑為 DPPA。在某些實施例中，在步驟(a)中，對於每一當量之 cCysAb，使用 10 與 20 之間莫耳當量之 DPPA。更特定言之，在步驟(a)中，對於每一當量之 cCysAb，使用 15 與 17 之間莫耳當量之 DPPA。甚至更特定言之，在步驟(a)中，對於每一當量之 cCysAb，使用 16 莫耳當量之 DPPA。

【0193】 在某些實施例中，關於第十一、第十二、第十三或第十四實施例或其中所述之任何實施例之方法，步驟(a)中之反應係在 6.0 與 7.0 之間的 pH 下或在 6.3 與 6.7 之間的 pH 下進行。更特定言之，步驟(a)中之反應係在 pH 6.5 下進行。

【0194】 在某些實施例中，關於第十一、第十二、第十三或第十四實施例或其中所述之任何實施例之方法，氧化劑為 DHAA。在某些實施例中，在步驟(b)中，對於每一當量之 cCysAb，使用 20 與 30 之間莫耳當量之 DHAA。更特定言之，在步驟(b)中，對於每一當量之 cCysAb，使用 23 與 25 之間莫耳當量之 DHAA。甚至更特定言之，在步驟(b)中，對於每一當量之 cCysAb，使用 23 與 25 之間莫耳當量之 DHAA。甚至更特定言之，在步驟(b)中，對於每一當量之 cCysAb，使用 24 莫耳當量之 DHAA。

【0195】 在某些實施例中，關於第十一、第十二、第十三或第十四實施例或其中所述之任何實施例之方法，步驟(b)中之反應係在 6.0 與 7.0 之間的 pH 下或在 6.3 與 6.7 之間的 pH 下進行。更特定言之，步驟(b)中之反應係在 pH 6.5 下進行。

【0196】 在某些實施例中，關於第十一、第十二、第十三或第十四實施例或其中所述之任何實施例之方法，步驟(c)中之反應係在 6.0 與 7.0 之間的 pH 下或在 6.3 與 6.7 之間的 pH 下進行。更特定言之，步驟(c)中之反應係在 pH 6.5 下進行。

【0197】 在某些實施例中，關於第十一、第十二、第十三或第十四實施例或其中所述之任何實施例之方法，相對於 CysAb (例如抗體或其抗原結合片段)或其抗原結合片段過量之式(I11)化合物用於步驟(c)中。更特定言之，對於每一當量之 CysAb，使用 1.1 與 20 之間、1.5 與 20 之間、2 與 20 之間、2 與 10 之間、2 與 5 之間、3.5 與 5 之間、4.2 與 5 之間、4.3 與 4.9 之間、4.4 與 4.8 之間或 4.5 與 4.7 之間莫耳當量之式(I11)化合物。在一特定實施例中，對於每一當量之 CysAb，使用 4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9 或 5.0 莫耳當量之式(I11)化合物。在另一特定實施例中，對於每一當量之 CysAb，使用 4.6 莫耳當量之式(I11)化合物。

【0198】 在某些實施例中，關於第十一、第十二、第十三或第十四實施例或其中所述之任何實施例之方法，在步驟(a)中，對於每一當量之 cCysAb，使用 15 與 17 之間莫耳當量之 DPPA；步驟(a)中之反應係在 6.3 與 6.7 之間的 pH 下進行；在步驟(b)中，對於每一當量之 cCysAb，使用 23 與 25 之間莫耳當量之 DHAA；步驟(b)中之反應係在 6.3 與 6.7 之間的 pH 下進行；且步驟(c)中之反應係在 6.3 與 6.7 之間的 pH 下進行。

【0199】 在某些實施例中，關於第十一、第十二、第十三或第十四實施例或其中所述之任何實施例之方法，在步驟(a)中，對於每一當量之 cCysAb，使用 16 莫耳當量之 DPPA；步驟(a)中之反應係在 pH 6.5 下進行；在步驟(b)中，對於每一當量之 cCysAb，使用 24 莫耳當量之 DHAA；步驟(b)中之反應係在 pH 6.5 下

進行；且步驟(c)中之反應係在 pH 6.5 下進行。

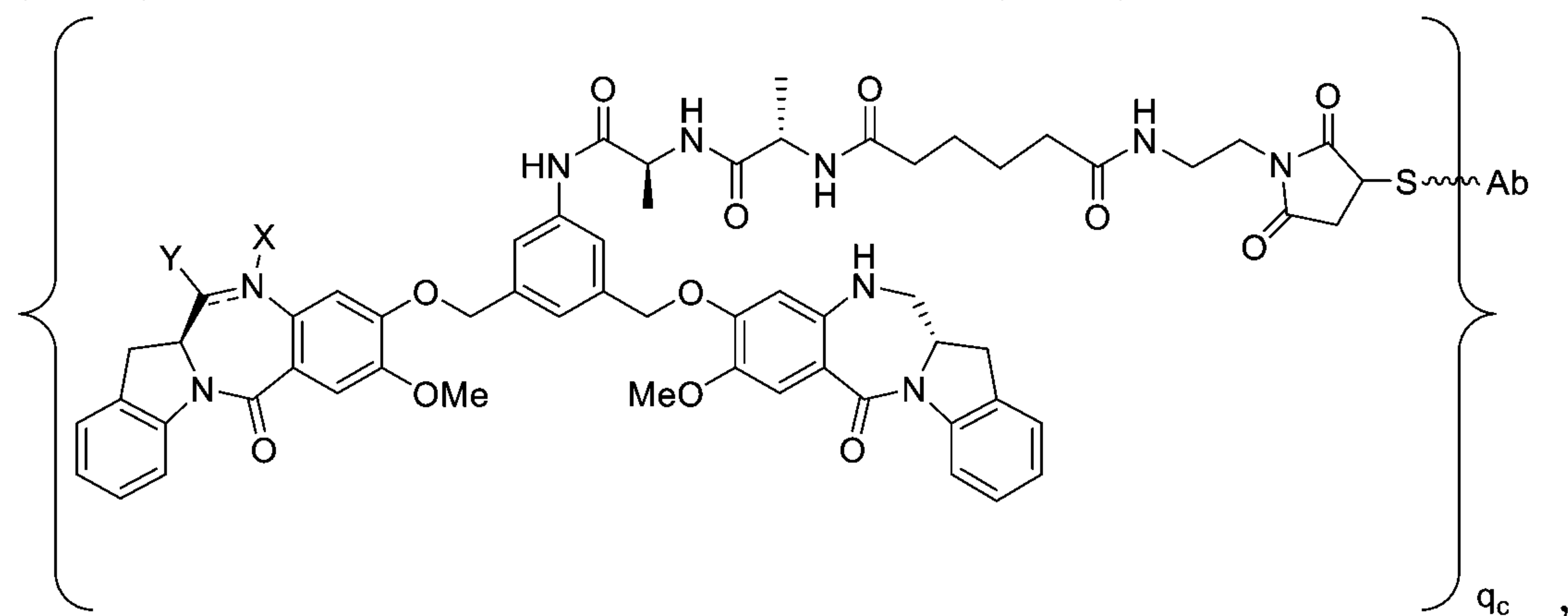
【0200】 在某些實施例中，關於第十一、第十二、第十三或第十四實施例或其中所述之任何實施例之方法，該方法進一步包括在該結合物經純化之前(例如，在步驟(d)之前)調節步驟(c)之後的反應混合物之 pH。在一些實施例中，步驟(c)之後的反應混合物之 pH 係經調節至 4.0 與 6.0 之間、4.0 與 5.5 之間、4.0 與 5.0 之間、4.5 與 5.0 之間或 4.6 與 4.8 之間之 pH。在一特定實施例中，該 pH 係經調節至 4.5、4.6、4.7、4.8、4.9 或 5.0。在另一特定實施例中，該 pH 係經調節至 4.7。

【0201】 在某些實施例中，關於第十一、第十二、第十三或第十四實施例或其中所述之任何實施例之方法，該封端劑為半胱胺酸、麩胱甘肽或其組合。

【0202】 在某些實施例中，關於第十一、第十二、第十三或第十四實施例或其中所述之任何實施例之方法， $q_c$  為 2。

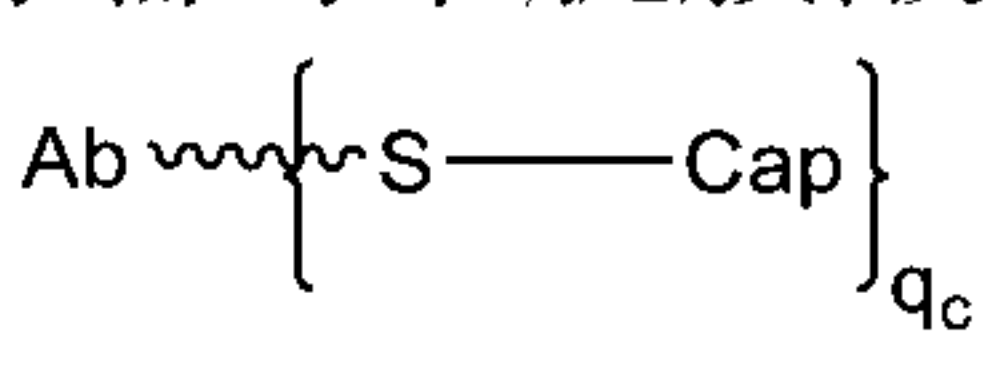
**【0203】** 在某些實施例中，包含藉由第十一實施例或其中所述之任何實施例之方法製備的免疫結合物之組合物(例如醫藥組合物)具有介於 1.0-2.5、1.5-2.5、1.8-2.2 或 1.9-2.1 範圍內之 DAR 值。在一些實施例中，DAR 為 1.8、1.9、2.0 或 2.1。

【0204】 在第十五實施例中，本發明提供一種製備抗體-細胞毒性劑結合物(ADC)之方法，該抗體-細胞毒性劑結合物(ADC)由下式表示：



該方法包括以下步驟：

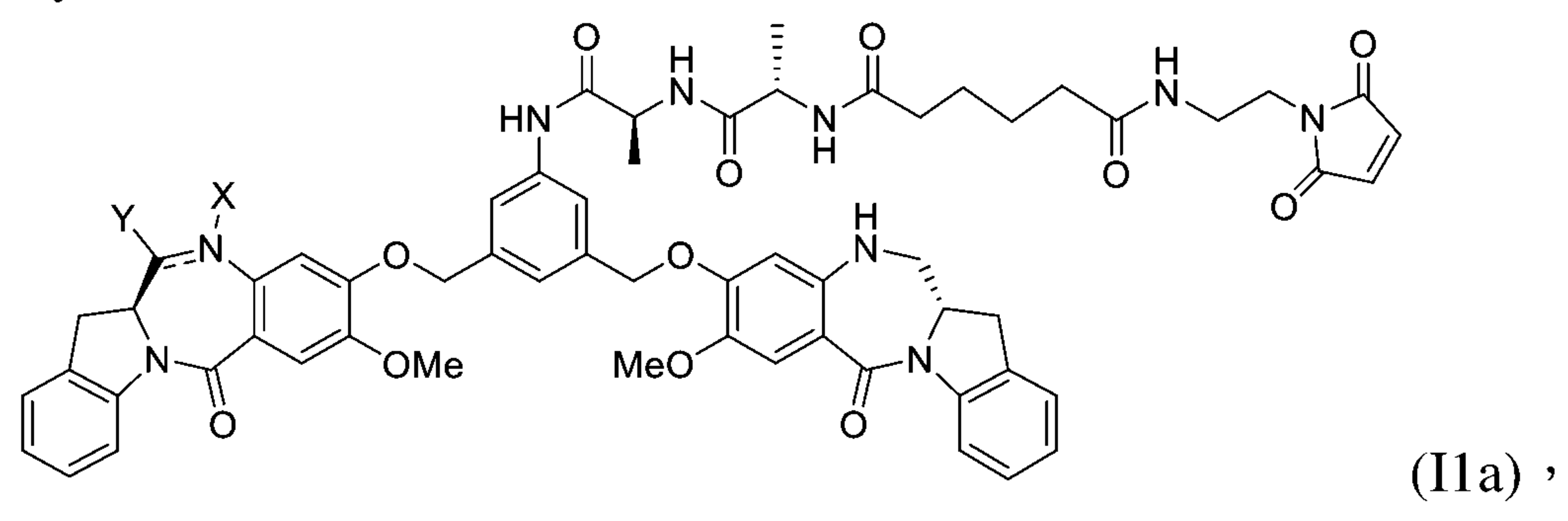
(a) 使還原劑與由下式表示之經封端的半胱胺酸工程改造之抗體(cCysAb)反應：



以形成經還原抗體或其抗原結合片段，其中該封端劑經移除以在該經還原抗體或其抗原結合片段中形成游離硫醇(-SH)基；

(b) 使該經還原抗體或其抗原結合片段與選擇性氧化劑反應以形成 CysAb，其中經工程改造之半胱胺酸殘基中的游離硫醇基未經氧化；及

(c) 使該 CysAb 與由下式表示之化合物：



或其醫藥學上可接受之鹽反應，由此形成該 ADC，其中步驟(a)中之經還原抗體或其抗原結合片段未經純化即用於步驟(b)，且步驟(b)之 CysAb 或其抗原結合片段未經純化即用於步驟(c)，其中：

N 與 C 之間的雙線=表示單鍵或雙鍵，其限制條件在於當其為雙鍵時，X 不存在且 Y 為-H，且當其為單鍵時，X 為-H，且 Y 為-SO<sub>3</sub>M，且 M 為 H<sup>+</sup>或陽離子；

Ab~S 一係經由位於經工程改造之半胱胺酸殘基上的硫醇基共價連接至該細胞毒性劑之經半胱胺酸工程改造之抗體或其抗原結合片段；其中該經半胱胺酸工程改造之抗體係抗 CD123 抗體或抗原結合片段，其包含：

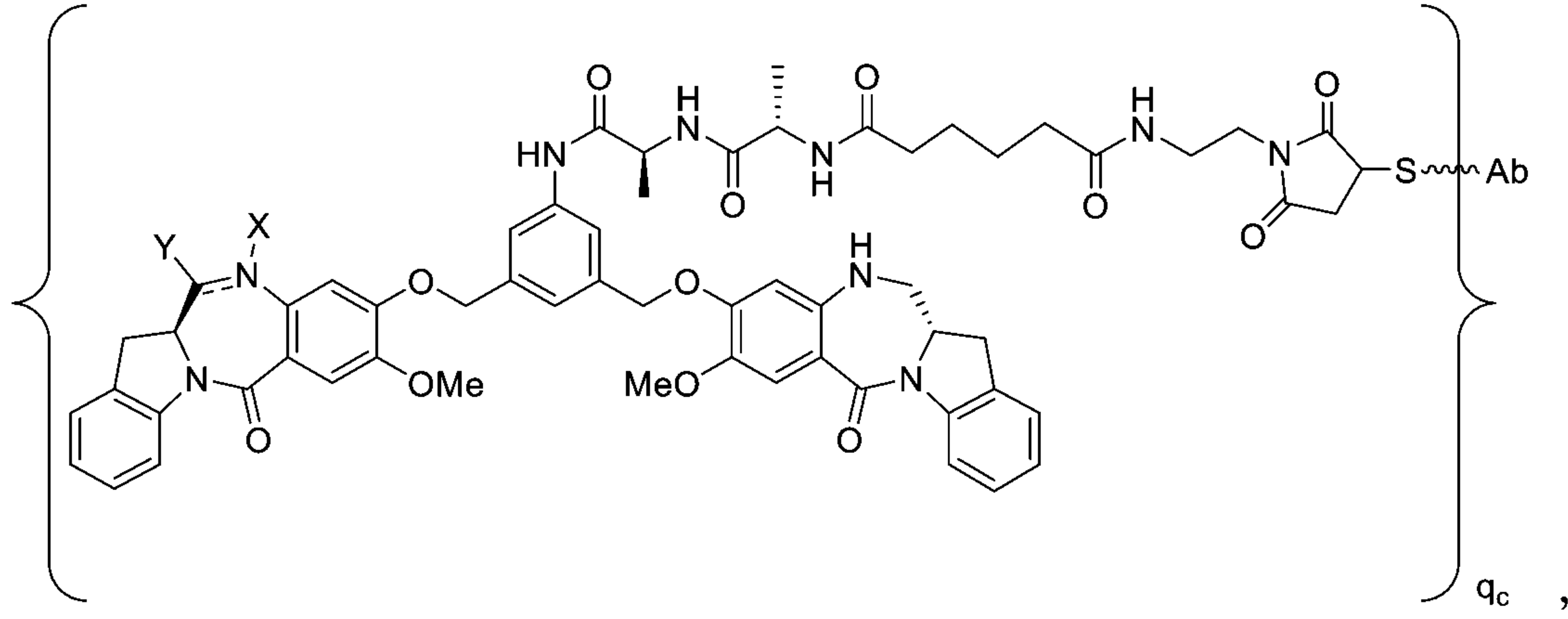
a) 免疫球蛋白重鏈可變區，其包含具有以 SEQ ID NO:4 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>H</sub>1、具有以 SEQ ID NO:5 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>H</sub>2 及具有以 SEQ ID NO:6 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>H</sub>3；及

b) 免疫球蛋白輕鏈可變區，其包含具有以 SEQ ID NO:1 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>L</sub>1、具有以 SEQ ID NO:2 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>L</sub>2 及具有以 SEQ ID NO:3 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>L</sub>3；

q<sub>c</sub> 為 1 或 2；且

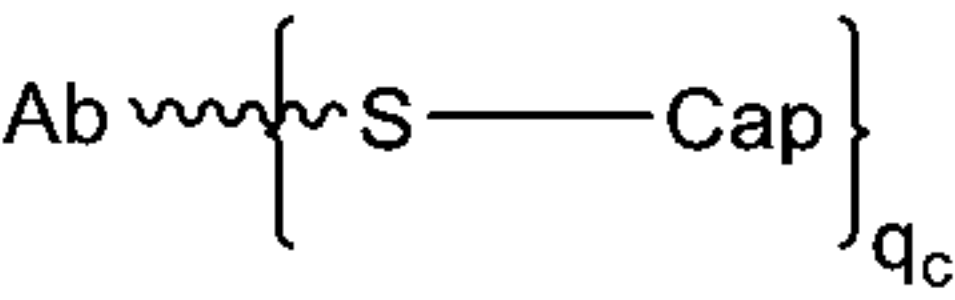
Cap 為封端劑。

【0205】 在第十六實施例中，本發明提供一種製備抗體-細胞毒性劑結合物 (ADC)之連續方法，該抗體-細胞毒性劑結合物(ADC)由下式表示：



該方法包括以下步驟：

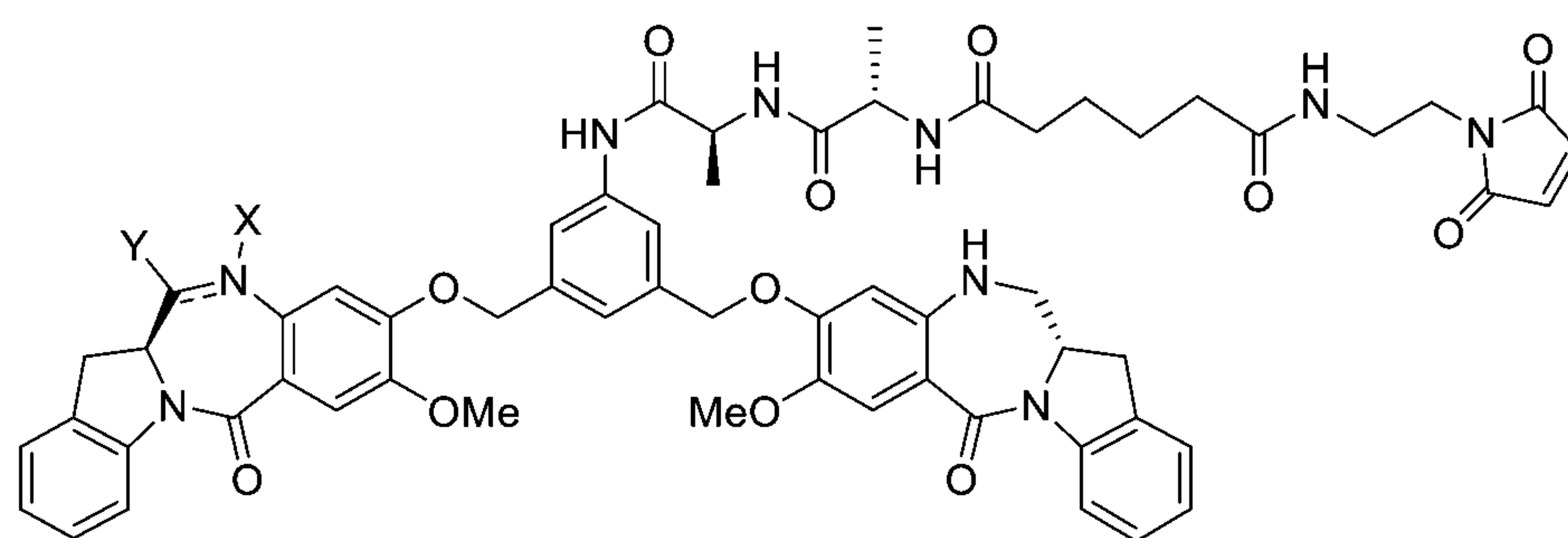
(a) 使還原劑與由下式表示之經封端的半胱胺酸工程改造之抗體(cCysAb)反應：



以形成經還原抗體或其抗原結合片段，其中該封端劑經移除以在該經還原抗體或其抗原結合片段中形成游離硫醇(-SH)基；

(b) 使該經還原抗體或其抗原結合片段與選擇性氧化劑反應以形成 CysAb，其中經工程改造之半胱胺酸殘基中的游離硫醇基未經氧化；及

(c) 使該 CysAb 與由下式表示之化合物：



(IIa),

或其醫藥學上可接受之鹽反應，由此形成該 ADC，

其中步驟(a)中之經還原抗體或其抗原結合片段未經純化即用於步驟(b)，且步驟(b)之 CysAb 或其抗原結合片段未經純化即用於步驟(c)，且步驟(a)至(c)係連續地執行，其中：

N 與 C 之間的雙線=表示單鍵或雙鍵，其限制條件在於當其為雙鍵時，X 不存在且 Y 為-H，且當其為單鍵時，X 為-H，且 Y 為-SO<sub>3</sub>M，且 M 為 H<sup>+</sup>或陽離子；

Ab~S 一係經由位於經工程改造之半胱胺酸殘基上的硫醇基共價連接至該細胞毒性劑之經半胱胺酸工程改造之抗體或其抗原結合片段；其中該經半胱胺酸工程改造之抗體係抗 CD123 抗體或抗原結合片段，其包含：

a) 免疫球蛋白重鏈可變區，其包含具有以 SEQ ID NO:4 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>H</sub>1、具有以 SEQ ID NO:5 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>H</sub>2 及具有以 SEQ ID NO:6 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>H</sub>3；及

b) 免疫球蛋白輕鏈可變區，其包含具有以 SEQ ID NO:1 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>L</sub>1、具有以 SEQ ID NO:2 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>L</sub>2 及具有以 SEQ ID NO:3 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>L</sub>3；

q<sub>c</sub> 為 1 或 2；且

Cap 為封端劑。

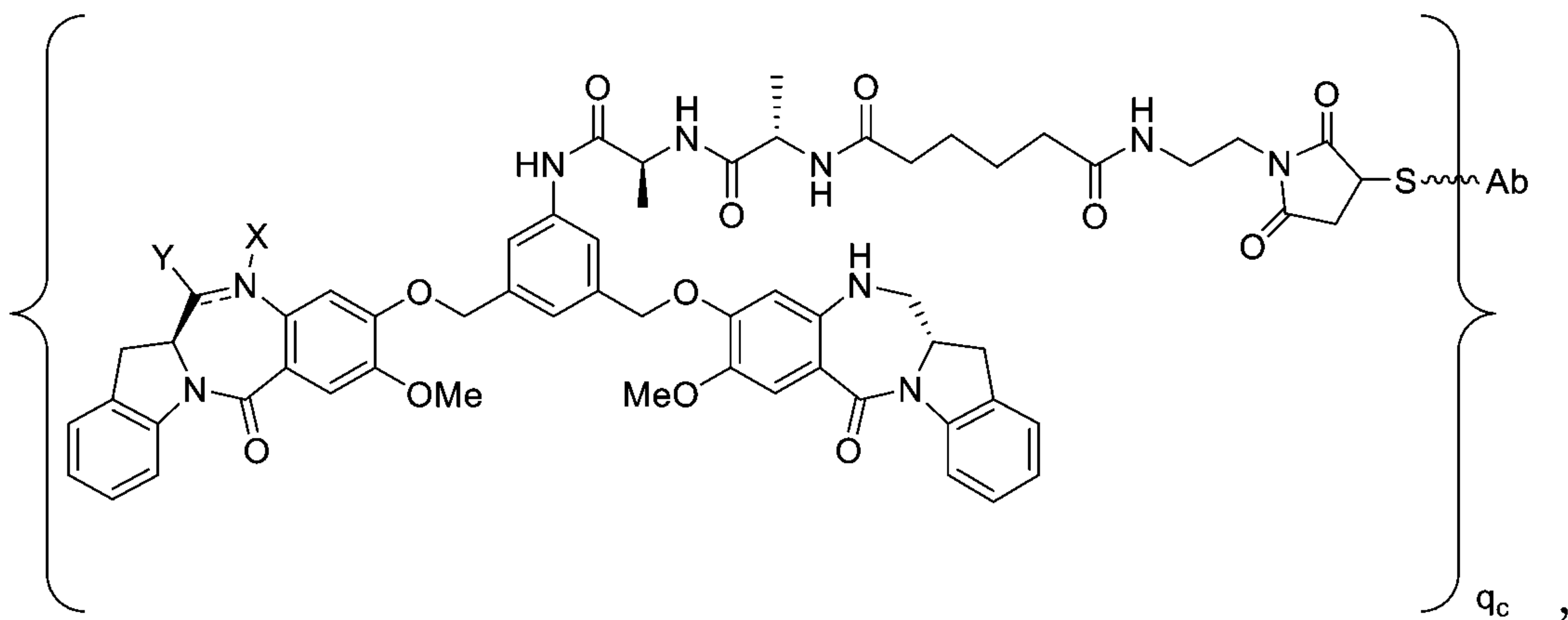
【0206】 在第十七實施例中，如本文所述之第十五或第十六實施例之方法進一步包括以下步驟：(d)移除未結合之式(IIa)化合物；及視情況(e)將 ADC 交換至

穩定緩衝液中。

【0207】 在一些實施例中，使用 SPTFF 來移除未結合之藥物及/或將 ADC 交換至穩定緩衝液中。在一些實施例中。在一些實施例中，使用逆流透濾來移除未結合之式(IIa)化合物；及/或將 ADC 交換至穩定緩衝液中。

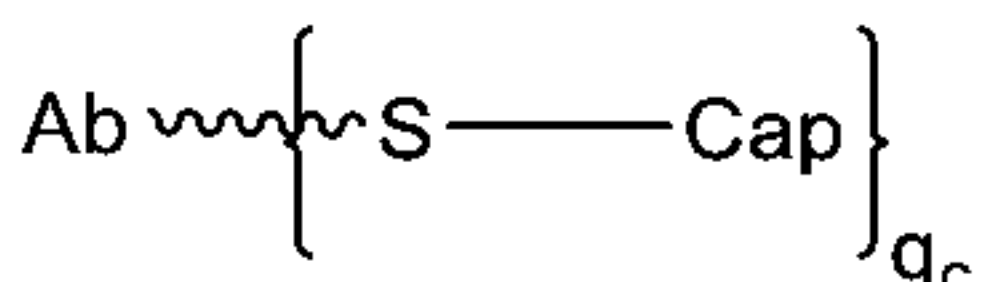
【0208】 在某些實施例中，步驟(d)及(e)係連續地執行。

【0209】 在第十八實施例中，本發明提供一種製備抗體-細胞毒性劑結合物(ADC)之連續方法，該抗體-細胞毒性劑結合物(ADC)由下式表示：



該方法包括以下步驟：

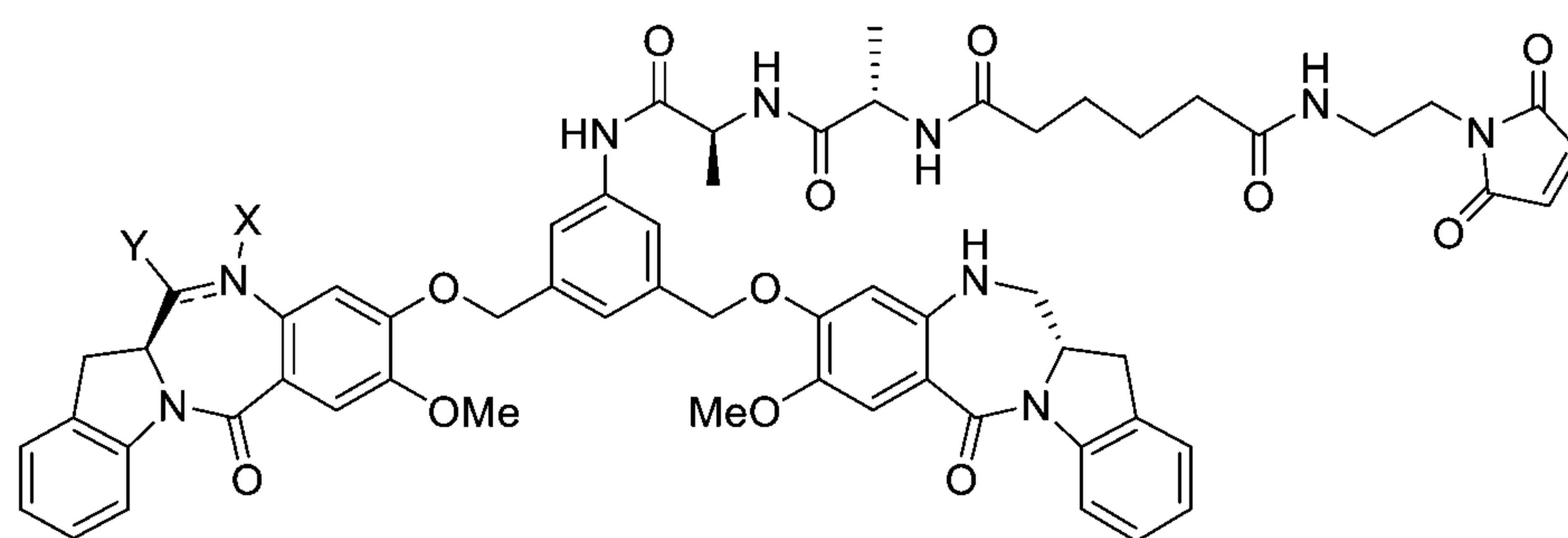
(a) 使還原劑與由下式表示之經封端的半胱氨酸工程改造之抗體(cCysAb)反應：



以形成經還原抗體或其抗原結合片段，其中該封端劑經移除以在該經還原抗體或其抗原結合片段中形成游離硫醇(-SH)基；

(b) 使該經還原抗體或其抗原結合片段與選擇性氧化劑反應以形成 CysAb，其中經工程改造之半胱氨酸殘基中的游離硫醇基未經氧化；及

(c) 使該 CysAb 與由下式表示之化合物：



(IIa) ,

或其醫藥學上可接受之鹽反應，由此形成該 ADC；及

(d) 藉由逆流透濾移除未結合之式(IIa)化合物；

其中步驟(a)中之經還原抗體或其抗原結合片段未經純化即用於步驟(b)，且步驟(b)之 CysAb 或其抗原結合片段未經純化即用於步驟(c)，且步驟(a)至(d)係連續地執行，其中：

N 與 C 之間的雙線==表示單鍵或雙鍵，其限制條件在於當其為雙鍵時，X 不存在且 Y 為-H，且當其為單鍵時，X 為-H，且 Y 為-SO<sub>3</sub>M，且 M 為 H<sup>+</sup>或陽離子；

Ab~S—係經由位於經工程改造之半胱胺酸殘基上的硫醇基共價連接至該細胞毒性劑之經半胱胺酸工程改造之抗體或其抗原結合片段；其中該經半胱胺酸工程改造之抗體係抗 CD123 抗體或抗原結合片段，其包含：

a) 免疫球蛋白重鏈可變區，其包含具有以 SEQ ID NO:4 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>H</sub>1、具有以 SEQ ID NO:5 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>H</sub>2 及具有以 SEQ ID NO:6 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>H</sub>3；及

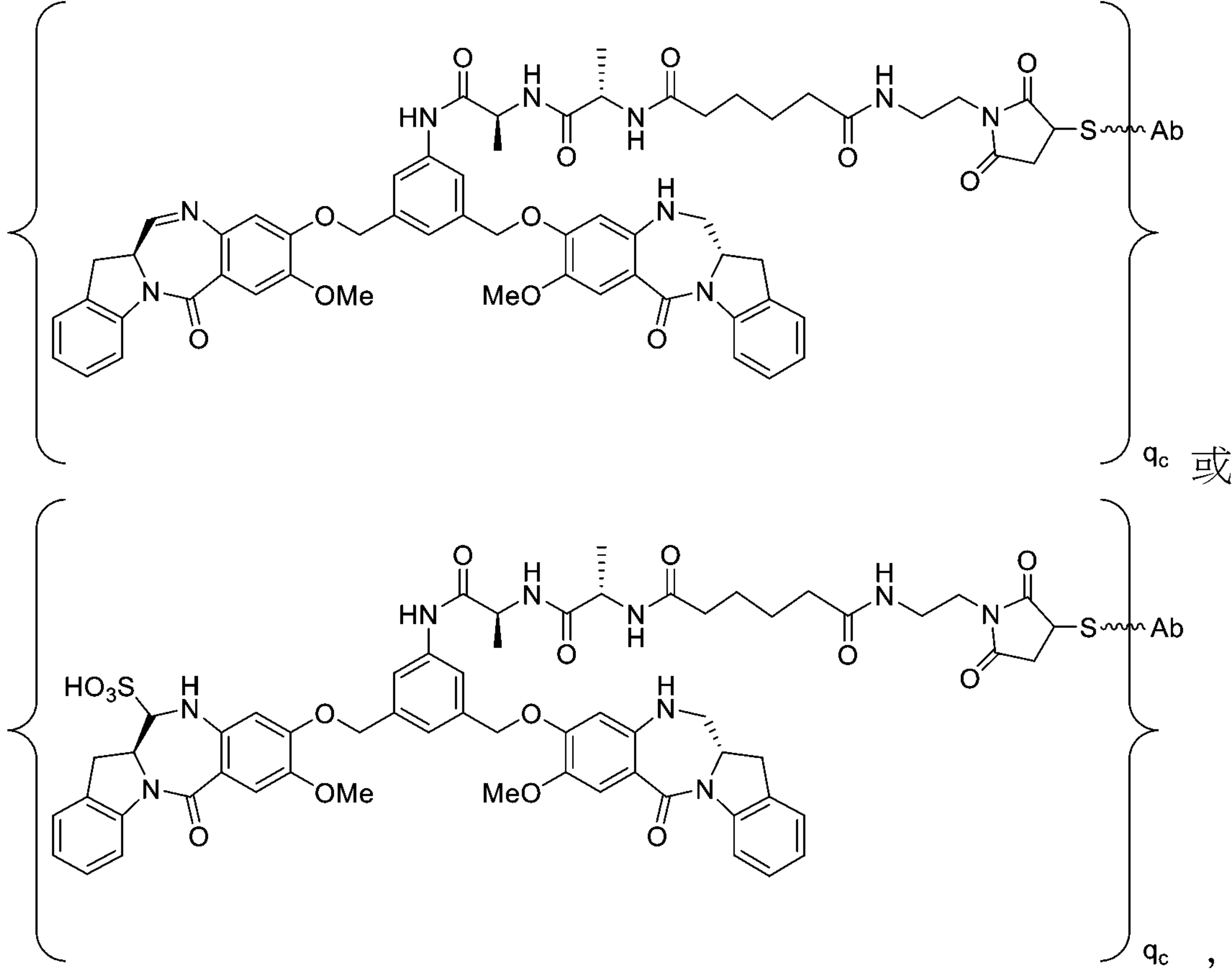
b) 免疫球蛋白輕鏈可變區，其包含具有以 SEQ ID NO:1 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>L</sub>1、具有以 SEQ ID NO:2 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>L</sub>2 及具有以 SEQ ID NO:3 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>L</sub>3；

q<sub>c</sub> 為 1 或 2；且

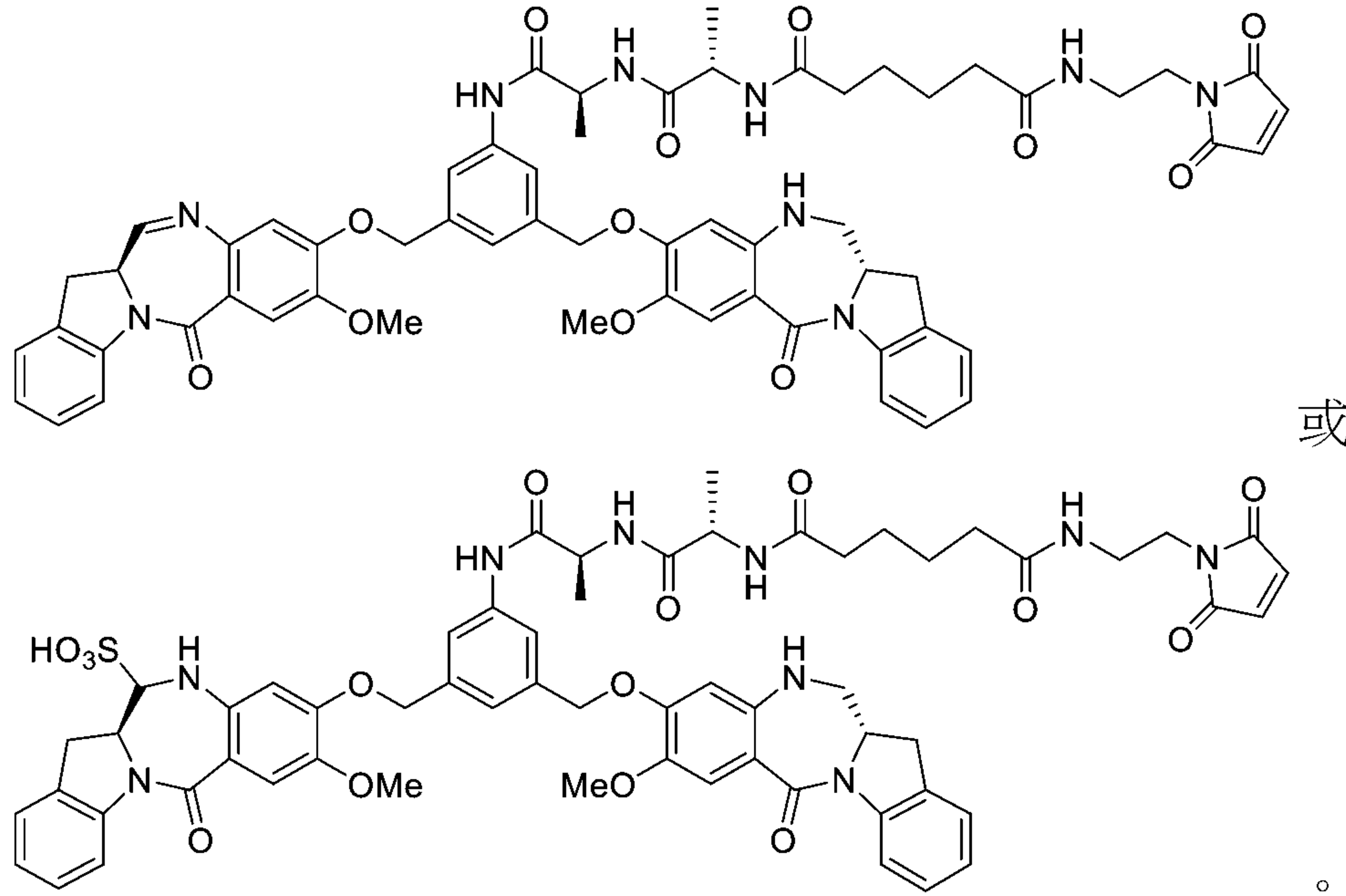
Cap 為封端劑。

【0210】 在某些實施例中，藉由第十五、第十六、第十七及第十八實施例製

備之結合物係由下式或其醫藥學上可接受之鹽表示：



且該化合物係由下式或其醫藥學上可接受之鹽表示：



【0211】 在某些實施例中，該醫藥學上可接受之鹽為鈉鹽或鉀鹽。在某些實施例中，該醫藥學上可接受之鹽為鈉鹽。

【0212】 在某些實施例中，關於第十五、第十六、第十七或第十八實施例之方法，抗 CD123 抗體或其抗原結合片段包含 V<sub>H</sub> 序列 SEQ ID NO: 7 及 V<sub>L</sub> 序列 SEQ ID NO:9。

【0213】 在某些實施例中，關於第十五、第十六、第十七或第十八實施例之方法，該抗 CD123 抗體包含：

a) 具有以 SEQ ID NO:8 陳述之胺基酸序列的重鏈；及

b) 具有以 SEQ ID NO:10 陳述之胺基酸序列的輕鏈。

【0214】 在某些實施例中，關於第十五、第十六、第十七或第十八實施例之方法，還原劑為 DPPA 或 TCEP。在某些實施例中，還原劑為 TCEP。

【0215】 在某些實施例中，關於第十五、第十六、第十七或第十八實施例之方法，步驟(a)中之反應係在 5.0 與 8.5 之間、7.0 與 8.0 之間或 7.3 與 7.7 之間的 pH 下進行。更特定言之，步驟(a)之反應係在 pH 7.5 下進行。

【0216】 在某些實施例中，關於第十五、第十六、第十七或第十八實施例之方法，氧化劑為 DHAA。

【0217】 在某些實施例中，關於第十五、第十六、第十七或第十八實施例之方法，步驟(b)中之反應係在 5.0 與 8.5 之間、7.0 與 8.0 之間或 7.3 與 7.7 之間的 pH 下進行。更特定言之，步驟(b)之反應係在 pH 7.5 下進行。

【0218】 在某些實施例中，關於第十五、第十六、第十七或第十八實施例之方法，步驟(c)之反應係在 5.0 與 8.5 之間、5.5 與 6.5 之間或 5.8 與 6.2 之間的 pH 下進行。更特定言之，步驟(c)之反應係在 pH 6.0 下進行。

【0219】 在某些實施例中，關於第十五、第十六、第十七或第十八實施例或其中所述之任何實施例之方法，相對於 CysAb (例如抗體或其抗原結合片段)或其抗原結合片段過量之式(IIa)化合物用於步驟(c)中。更特定言之，對於每一當

量之 CysAb，使用 1.1 與 20 之間、1.5 與 20 之間、2 與 20 之間、2 與 10 之間、2 與 5 之間、3.5 與 5 之間、4.2 與 5 之間、4.3 與 4.9 之間、4.4 與 4.8 之間或 4.5 與 4.7 之間莫耳當量之式(I1a)化合物。在一特定實施例中，對於每一當量之 CysAb，使用 4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9 或 5.0 莫耳當量之式(I1a)化合物。在另一特定實施例中，對於每一當量之 CysAb，使用 4.6 莫耳當量之式(I11)化合物。

**【0220】** 在某些實施例中，關於第十五、第十六、第十七或第十八實施例之方法，還原劑為 TCEP；步驟(a)中之反應係在 7.3 與 7.7 之間的 pH 下進行；氧化劑為 DHAA；步驟(b)中之反應係在 7.3 與 7.7 之間的 pH 下進行；且步驟(b)之後的反應混合物之 pH 係在步驟(c)中使 CysAb 與細胞毒性劑反應之前自 7.3 與 7.7 之間的 pH 經調節至 5.8 至 6.2 之間的 pH。

**【0221】** 在某些實施例中，關於第十五、第十六、第十七或第十八實施例之方法，還原劑為 TCEP；步驟(a)中之反應係在 pH 7.5 下進行；氧化劑為 DHAA；步驟(b)中之反應係在 pH 7.5 下進行；且步驟(b)之後的反應混合物之 pH 係在步驟(c)中使 CysAb 與細胞毒性劑反應之前自 pH 7.5 經調節至 pH 6.0。

**【0222】** 在某些實施例中，關於第十五、第十六、第十七或第十八實施例之方法，該方法進一步包括在該結合物經純化之前(例如，在步驟(d)之前)調節步驟(c)之後的反應混合物之 pH。在一些實施例中，步驟(c)之後的反應混合物之 pH 係經調節至 4.0 與 6.0 之間、4.0 與 5.5 之間、4.0 與 5.0 之間、4.5 與 5.0 之間或 4.6 與 4.8 之間之 pH。在一特定實施例中，該 pH 係經調節至 4.5、4.6、4.7、4.8、4.9 或 5.0。在另一特定實施例中，該 pH 係經調節至 4.7。

**【0223】** 在某些實施例中，關於第十五、第十六、第十七或第十八實施例之方法，該封端試劑為半胱胺酸、麩胱甘肽或其組合。

【0224】 在某些實施例中，包含藉由第十五、第十六或第十七實施例或其中所述之任何實施例之方法製備的免疫結合物之組合物(例如醫藥組合物)具有介於 1.0-2.5、1.5-2.5、1.8-2.2 或 1.9-2.1 範圍內之 DAR 值。在一些實施例中，DAR 為 1.8、1.9、2.0 或 2.1。

【0225】 藉由本發明方法製備之結合物具有實質上高純度及穩定性。在某些實施例中，藉由本發明方法製備之結合物具有大於 90%、95%、96%、97%、98%、99%或 99.5%之單體百分率。在某些實施例中，藉由本發明方法製備之結合物具有小於約 10%、小於約 5% (例如，小於或等於約 4%、3%、2%、1%或 0%)之高分子量物質。如本文所用，術語「高分子量物質」或「HMW」係指具有高分子量之含抗體或含結合物物質。高分子量物質可為藉由該抗體或結合物或其組合之聚集形成之二聚體、三聚體、其他較高級寡聚物。高分子量物質可藉由 SEC-HPLC 經鑑別且測定其量。

【0226】 在某些實施例中，該結合物之組合物中之細胞毒性劑與 CysCBA 的平均莫耳比率(亦即，DAR)為 1.0-2.5、1.5-2.5、1.7-2.3、1.8-2.2 或 1.9-2.1。在另一實施例中，藉由本發明方法製備之結合物之組合物的 DAR 為 1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4 或 2.5。在一個實施例中，DAR 為 2.0。DAR 值可藉由此項技術中已知之任何方法經測定。在一個實施例中，DAR 值可藉由 UV/Vis 光譜法使用在分別針對抗體及細胞毒性劑之波長下的吸光度值經測定。或者，DAR 值可藉由質譜法及/或 HPLC 經測定。

【0227】 在某些實施例中，關於本文所述之方法(例如，第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三、第十四、第十五、第十六、第十七或第十八實施例或其中所述之任何實施例之方法)，步驟(a)、步驟(b)或步驟(c)之反應係在緩衝溶液中進行。任何合適緩衝液均

可用於本發明方法中。例示性緩衝液包括但不限於檸檬酸鹽緩衝液、乙酸鹽緩衝液、丁二酸鹽緩衝液、磷酸鹽緩衝液、MES ((2-(N-嗎啉基)乙烷磺酸))緩衝液、bis-tris 甲烷(2-[雙(2-羥基乙基)胺基]-2-(羥基甲基)丙烷-1,3-二醇)緩衝液、ADA (N-(2-乙醯胺基)亞胺基二乙酸)緩衝液、ACES (N-2-胺基乙烷磺酸)緩衝液、PIPES (哌啶-N,N'-雙(2-乙烷磺酸))、MOPSO ( $\beta$ -羥基-4-嗎啉丙烷磺酸)緩衝液、bis-tris 丙烷(1,3-雙(參(羥基甲基)甲基胺基)丙烷)緩衝液、BES (N,N-雙(2-羥基乙基)-2-胺基乙烷磺酸)、TES (N-[參(羥基甲基)甲基]-2-胺基乙烷磺酸)緩衝液、HEPES (4-(2-羥基乙基)哌啶-1-乙烷磺酸)緩衝液、DIPSO、(3-(N,N-雙[2-羥基乙基]胺基)-2-羥基丙烷磺酸或 N,N-雙(2-羥基乙基)-3-胺基-2-羥基丙烷磺酸)、MOBS (4-(N-嗎啉基)丁烷磺酸)緩衝液、TAPSO (3-[[1,3-二羥基-2-(羥基甲基)丙-2-基]胺基]-2-羥基丙烷-1-磺酸)緩衝液、trizma (Tris 或 2-胺基-2-(羥基甲基)-1,3-丙二醇)緩衝液、HEPPSO (N-(2-羥基乙基)哌啶-N'-(2-羥基丙烷磺酸))緩衝液、POPSO (哌啶-1,4-雙-(2-羥基-丙烷-磺酸)去水合物)緩衝液、EPPS (4-(2-羥基乙基)哌啶-1-丙烷磺酸)緩衝液、tricine (N-(2-羥基-1,1-雙(羥基甲基)乙基)甘胺酸)緩衝液、gly-gly、bicine (2-(雙(2-羥基乙基)胺基)乙酸)緩衝液、HEPBS (N-(2-羥基乙基)哌啶-N'-(4-丁烷磺酸))緩衝液、TAPS (3-[[1,3-二羥基-2-(羥基甲基)丙-2-基]胺基]丙烷-1-磺酸)緩衝液、AMPD (2-胺基-2-甲基-1,3-丙二醇)緩衝液、TABS (N-參(羥基甲基)甲基-4-胺基丁烷磺酸)緩衝液、AMPSO (N-(1,1-二甲基-2-羥基乙基)-3-胺基-2-羥基丙烷磺酸)緩衝液或其組合。在某些實施例中，緩衝液為磷酸鹽緩衝液。

**【0228】** 在某些實施例中，關於本文所述之方法(例如，第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三、第十四、第十五、第十六、第十七或第十八實施例或其中所述之任何實施例之方法)，步驟(a)、步驟(b)或步驟(c)之反應係在少量有機溶劑存在下進行。更特定言

之，有機溶劑為二甲基乙醯胺(DMA)。有機溶劑(例如 DMA)可以反應混合物之總體積計以 1%-20%、1-15%、2-15%、5-15%或 5-10%之量存在。

【0229】 在某些實施例中，關於上文所述之本發明方法，使步驟(a)、步驟(b)或步驟(c)之反應繼續進行至完成或實質性完成，例如持續 2 分鐘至 1 週、1 小時至 48 小時、1 小時至 36 小時、1 小時至 24 小時、1 小時至 12 小時、1 小時至 8 小時、5 小時至 15 小時、5 小時至 10 小時、1 小時至 5 小時、30 分鐘至 2 小時或 5 分鐘至 30 分鐘之時期。在某些實施例中，使步驟(a)之反應繼續進行，持續 1 小時至 12 小時、1 小時至 8 小時、2 小時至 8 小時、3 小時至 7 小時或 4 小時至 6 小時之時期。在一特定實施例中，使步驟(a)之反應繼續進行，持續 5 小時。在某些實施例中，使步驟(b)之反應繼續進行，持續 1 小時至 12 小時、1 小時至 8 小時、3 小時至 9 小時、4 小時至 8 小時或 5 小時至 7 小時之時期。在一特定實施例中，使步驟(b)之反應繼續進行，持續 6 小時。在某些實施例中，使步驟(c)之反應繼續進行，持續 1 小時至 24 小時、5 小時至 15 小時、6 小時至 14 小時、7 小時至 13 小時、8 小時至 12 小時或 9 小時至 11 小時之時期。在一特定實施例中，使步驟(c)之反應繼續進行，持續 10 小時。

【0230】 在某些實施例中，關於上文所述之本發明方法，步驟(a)、步驟(b)或步驟(c)之反應可在任何合適溫度下進行。在某些實施例中，該反應可在 10°C-50°C、10°C-40°C或 10°C-30°C之溫度下進行。在某些實施例中，該反應可在 15°C-30°C、20°C-30°C、15°C-25°C、16°C-24°C、17°C-23°C、18°C-22°C或 19°C-21°C之溫度下進行。在某些實施例中，該反應可在 15°C、16°C、17°C、18°C、19°C、20°C、21°C、22°C、23°C、24°C或 25°C下進行。

【0231】 在某些實施例中，關於上文所述之本發明方法中的步驟(a)、步驟(b)或步驟(c)之反應，細胞結合劑(例如抗體)之濃度可介於 1 mg/mL-50 mg/mL、1

mg/mL-20 mg/mL、1 mg/mL-15 mg/mL、1 mg/mL-10 mg/mL、1 mg/mL-6 mg/mL 或 2 mg/mL-5 mg/mL 範圍內。在某些實施例中，細胞結合劑(例如抗體)之濃度係介於 3 mg/mL-5 mg/mL 範圍內。

【0232】 在某些實施例中，關於本文所述之方法，穩定緩衝液為用於 ADC 之調配緩衝液。

### 3. 在線過程自動化技術(在線 PAT)

【0233】 本文提供用於本文所述之連續方法(例如，用於形成且加工第一、第二或第三態樣或其中所述之任何實施例中所述的抗體藥物結合物(ADC)之方法)之在線過程自動化技術。該等技術提供直接量測，其可消除離線分析且降低由操作者處置材料。可使用在線監測來監測 ADC (蛋白質)濃度以及游離藥物之移除。此可允許基於自在線讀數獲得之數據，而非基於用於該等過程(例如，純化過程)中之透濾體積的具體體積或數字來靶向最終 ADC 濃度。PAT 實施容許增加控制及可偵測性(例如，在產物品質受影響之前可使用穩態操作期間之改變來偵測問題)且多個 PAT 模塊(例如，FlowVPE、UV 感測器、pH 計、電導率計、壓力感測器或流量計)之使用可確保個別單元操作中之穩固過程效能。

【0234】 在線監測可例如用於在例如抗體還原及/或氧化反應及/或 ADC 結合反應(例如，描述於第一、第二或第三態樣或其中所述之任何實施例中的方法中所述之反應)中監測來自任何幫浦之進料流中的流動速率。在線監測可例如用於監測添加至抗體還原及/或氧化反應及/或 ADC 結合反應(例如，描述於第一、第二或第三態樣或其中所述之任何實施例中的方法中所述之反應)中之組分的濃度。該監測可確保對該等反應之化學計量的適當控制。在線監測可監測例如抗體或其抗原結合片段、還原劑、氧化劑、細胞毒性劑或細胞毒性劑-連接體化合物(例如由式(I)表示之化合物)及/或結合緩衝液之流動速率或濃度。在線監測可監測抗

體或其抗原結合片段濃縮至結合反應緩衝液中之流動速率。

【0235】 在線監測亦可例如用於測定何時停止結合反應，例如藉由停止添加結合緩衝液，藉由停止結合緩衝液之循環，及/或開始沖洗或移除結合緩衝液。在本文所提供之一些實施例中，可使用未結合之藥物(例如式(I)化合物)之在線監測。未結合之藥物之量測可用於推斷在結合反應中實現的平均藥物數目/抗體(DAR)。因此，當達到標靶 DAR 時，可停止結合反應。

【0236】 在線監測亦可用於監測 ADC 之濃縮及/或純化。濃縮及/或純化可使用過濾(例如超濾、透濾)。該過濾可為切向流過濾，包括 SPTFF。該過濾可為逆流透濾。當用於監測過濾時，在線監測可用於量測滲餘物或滲透物中之分析物。因此，例如，滲餘物中的未結合之藥物或未結合之藥物-連接體化合物之在線監測可用於分析 ADC 的純化程度。未結合之藥物或未結合之藥物-連接體化合物之水準可在結合反應之後不久在滲餘物中為高的，但在純化之後在滲餘物中為低的。滲餘物或滲透物中之 ADC 之在線監測可用於分析濃縮及/或純化過程期間的 ADC 損失。

【0237】 該純化亦可使用層析(例如流通管柱層析)。在層析管柱末端處之在線監測可例如量測 ADC 水準且可用於測定管柱何時超載或何時存在 ADC 突破。

【0238】 在線監測亦可用於量測 pH，其可例如用於測定緩衝液交換之完全性。

【0239】 例示性在線監測技術包括例如傅立葉轉換紅外(FTIR)流動池、高效液相層析(HPLC)或超高效液相層析(UPLC)之使用。

【0240】 在線監測技術可使用例如 FlowVPE 或 UV 感測器。在一些實施例中，使用 FlowVPE 來執行在線監測。FlowVPE 使用流動池來進行連續監測。

【0241】 切向流過濾(例如單程切向流過濾(SPTFF))之功效可使用 FlowVPE、

UV 感測器、pH 計、電導率計、壓力感測器、流量計等進行在線監測。逆流透濾之功效亦可使用 FlowVPE、UV 感測器、pH 計、電導率計、壓力感測器、流量計等進行在線監測。

【0242】 在線監測過程可與本發明之連續方法(論述於上文)，例如使用單程切向流過濾及/或逆流透濾之連續結合過程，或與分批結合過程(其為此項技術中已知的)組合使用。

#### 4. 細胞結合劑(CysCBA)

【0243】 本發明之免疫結合物中的細胞結合劑可為目前已知或變成已知之任何種類，包括肽及非肽。一般而言，此等細胞結合劑可為抗體(諸如多株抗體及單株抗體，尤其單株抗體)、淋巴因子、激素、生長因子、維他命(諸如葉酸鹽等，其可結合於其細胞表面受體，例如葉酸鹽受體)、營養物轉運分子(諸如轉鐵蛋白)或任何其他細胞結合分子或物質。

【0244】 在某些實施例中，細胞結合劑為抗體、單鏈抗體、特異性地結合於標靶細胞之抗體片段、單株抗體、單鏈單株抗體、特異性地結合於標靶細胞之單株抗體片段(或「抗原結合部分」或「抗原結合片段」)、嵌合抗體、特異性地結合於標靶細胞之嵌合抗體片段(或「抗原結合部分」或「抗原結合片段」)、域抗體(例如，sdAb)或特異性地結合於標靶細胞之域抗體片段。

【0245】 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」或「抗原結合片段」)。

【0246】 在某些實施例中，細胞結合劑為表面重塑抗體、表面重塑單鏈抗體或表面重塑抗體片段(或「抗原結合部分」或「抗原結合片段」)。

【0247】 在某些實施例中，細胞結合劑為抗體或其抗原結合部分(包括抗體衍生物)，CBA 可結合於標靶細胞上之配位體，諸如細胞表面配位體，包括細胞表

面受體。

【0248】 在某些實施例中，細胞結合劑為經半胱胺酸工程改造之抗體或其抗原結合片段。在某些實施例中，經半胱胺酸工程改造之抗體或其抗原結合片段為抗葉酸鹽受體抗體或其抗原結合片段、抗 EGFR 抗體或其抗原結合片段、抗 CD33 抗體或其抗原結合片段、抗 CD19 抗體或其抗原結合片段、抗 Muc1 抗體或其抗原結合片段、抗 CD37 抗體其抗原結合片段、抗 cMet 抗體或其抗原結合片段或抗 EpCAM 抗體或其抗原結合片段。

【0249】 在某些實施例中，細胞結合劑為如下抗體或其抗原結合片段，其：  
(a)結合人類 CD123 / IL3-R $\alpha$  抗原之胺基酸 101-346 內的抗原決定基，及(b)抑制抗原陽性 TF-1 細胞中之 IL3 依賴性增生(參見 WO2017/004026，以引用之方式整體併入本文中)。

【0250】 在某些實施例中，細胞結合劑係如 WO2017/004026 (其以引用之方式併入本文中)中所述之抗 CD123 抗體或其抗原結合片段。

【0251】 在某些實施例中，抗 CD123 抗體或其抗原結合片段可包含：a)至少一個輕鏈可變區或其片段，其分別包含三個連續互補決定區(CDR) CDR<sub>L</sub>1、CDR<sub>L</sub>2 及 CDR<sub>L</sub>3，其中 CDR<sub>L</sub>1 具有胺基酸序列 RASQDINSYLS (SEQ ID NO:1)，CDR<sub>L</sub>2 具有胺基酸序列 RVNRLVD (SEQ ID NO:2)，且 CDR<sub>L</sub>3 具有胺基酸序列 LQYDAFPYT (SEQ ID NO:3)；及 b)至少一個重鏈可變區或其片段，其分別包含三個連續互補決定區(CDR) CDR<sub>H</sub>1、CDR<sub>H</sub>2 及 CDR<sub>H</sub>3，其中 CDR<sub>H</sub>1 具有胺基酸序列 SSIMH (SEQ ID NO:4)，CDR<sub>H</sub>2 具有胺基酸序列 YIKPYNDGTTYNEKFKG (SEQ ID NO:5)，且 CDR<sub>H</sub>3 具有胺基酸序列 EGGNDYYDTMDY (SEQ ID NO:6)。

【0252】 在某些實施例中，抗 CD123 抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區

(V<sub>H</sub>)，其具有胺基酸序列

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSSIMHWVRQAPGQGLEWIGYI  
KPYNDGTTYNEKFKGRATLTSDRSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAREEGG  
NDYYDTMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:7)

及輕鏈可變區(V<sub>L</sub>)，其具有胺基酸序列

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINSYLSWFQQKPGKAPKTLIYRVNR  
LVDGVPSRFSGSGSGNDYTLTISSLQPEDFATYYCLQYDAFPYTFGQGGTKVEI  
KR (SEQ ID NO:9)。

【0253】 在某些實施例中，抗 CD123 抗體具有重鏈全長序列

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSSIMHWVRQAPGQGLEWIGYI  
KPYNDGTTYNEKFKGRATLTSDRSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAREEGG  
NDYYDTMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKD  
YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN  
VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS  
RTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS  
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD  
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS  
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLCLSPG (SEQ ID NO:8)

及輕鏈全長序列

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINSYLSWFQQKPGKAPKTLIYRVNR  
LVDGVPSRFSGSGSGNDYTLTISSLQPEDFATYYCLQYDAFPYTFGQGGTKVEI  
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN  
SQESVTEQDSKDSSTYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN

RGEC (SEQ ID NO:10)

【0254】 在某些實施例中，細胞結合劑係如美國專利第 7,342,110 號及第 7,557,189 號(其以引用之方式併入本文中)中所述之抗 CD33 抗體或其抗原結合片段。

【0255】 在某些實施例中，抗 CD33 抗體或其抗原結合片段可包含：a)至少一個輕鏈可變區或其片段，其分別包含三個連續互補決定區(CDR) CDR<sub>L</sub>1、CDR<sub>L</sub>2 及 CDR<sub>L</sub>3，其中 CDR<sub>L</sub>1 具有胺基酸序列 KSSQSVFFSSSQKNYLA (SEQ ID NO:11)，CDR<sub>L</sub>2 具有胺基酸序列 WASTRES (SEQ ID NO:12)，且 CDR<sub>L</sub>3 具有胺基酸序列 HQYLSSRT (SEQ ID NO:13)；及 b)至少一個重鏈可變區或其片段，其分別包含三個連續互補決定區(CDR) CDR<sub>H</sub>1、CDR<sub>H</sub>2 及 CDR<sub>H</sub>3，其中 CDR<sub>H</sub>1 具有胺基酸序列 SYYIH (SEQ ID NO:14)，CDR<sub>H</sub>2 具有胺基酸序列 VIYPGNDDISYNQKFQG (SEQ ID NO:15)，且 CDR<sub>H</sub>3 具有胺基酸序列 EVRLRYFDV (SEQ ID NO:16)。

【0256】 在某些實施例中，抗 CD33 抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區(V<sub>H</sub>)，其具有胺基序列

QVQLQQPGAEEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYYIHWIKQTPGQGLEWVGVI  
YPGNDDISYNQKFQGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREEVRL  
RYFDVWGQGTTVTSS (SEQ ID NO:17)

及輕鏈可變區(V<sub>L</sub>)，其具有胺基酸序列

EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQSPRLL  
 IYWASTRESGVDPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYCHQYLSSRTFGQG  
 TKLEIKR (SEQ ID NO:19)。

【0257】 在某些實施例中，抗 CD33 抗體具有重鏈全長序列

QVQLQQPGAEEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSY<sup>Y</sup>IHWIKQTPGQGLEWVGVI  
YPGNDDISYNQKFEQGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREEVRL  
RYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP  
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP  
SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV  
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL  
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN  
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD  
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLXLSPG (SEQ ID NO:18)

及輕鏈全長序列

EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSQKNYLAWYQQIPGQSPRL  
IYWASTRESGVDPDRFTGSGSGTDFTLTISVQPEDLAIIYCHHQYLSSRTFGQG  
TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA  
LQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV  
TKSFNRGEC (SEQ ID NO:20)，其中 SEQ ID NO:18 中之 X 為 S 或 C。在一個實  
施例中，X 為 C。

【0258】 在某些實施例中，該抗 CD33 抗體為 huMy9-6 抗體。

【0259】 在某些實施例中，細胞結合劑係如 WO2018/119196 及美國臨時申請  
案第 62/690052 號及第 62/691342 號(其各自以引用之方式併入本文中)中所述之  
抗 ADAM9 抗體或其抗原結合片段。

【0260】 在某些實施例中，抗 ADAM9 抗體或其抗原結合片段係特異性地結  
合於人類 ADAM9 及 cyno ADAM9 之人類化抗 ADAM9 抗體或其抗原結合片  
段。

【0261】 在某些實施例中，人類化抗 ADAM9 抗體或其 ADAM9 結合片段係經最佳化以具有對 cyno ADAM9 之結合親和力的至少 100 倍增強且如與嵌合或鼠科動物親本抗體相比，保持對人類 ADAM9 之高親和力結合。

【0262】 在某些實施例中，抗 ADAM9 抗體或其抗原結合片段(例如，人類化抗 ADAM9 抗體或其抗原結合片段)包含：a)至少一個輕鏈可變區或其片段，其分別包含三個連續互補決定區(CDR) CDR<sub>L</sub>1、CDR<sub>L</sub>2 及 CDR<sub>L</sub>3，其中 CDR<sub>L</sub>1 具有胺基酸序列 KASQSDYSGDSYMN (SEQ ID NO:21)，CDR<sub>L</sub>2 具有胺基酸序列 AASDLES (SEQ ID NO:22)，且 CDR<sub>L</sub>3 具有胺基酸序列 QQSHEDPFT (SEQ ID NO:23)；及 b)至少一個重鏈可變區或其片段，其分別包含三個連續互補決定區(CDR) CDR<sub>H</sub>1、CDR<sub>H</sub>2 及 CDR<sub>H</sub>3，其中 CDR<sub>H</sub>1 具有胺基酸序列 SYWMH (SEQ ID NO:24)，CDR<sub>H</sub>2 具有胺基酸序列 EIPIFGHTNYNEKFKS (SEQ ID NO:25)，且 CDR<sub>H</sub>3 具有胺基酸序列 GGYYYYYPRQGFLDY (SEQ ID NO:26)。

【0263】 在某些實施例中，抗 ADAM9 抗體或其抗原結合片段(例如，人類化抗 ADAM9 抗體或其抗原結合片段)包含重鏈可變區(V<sub>H</sub>)，其具有胺基序列  
EVQLVESGGG LVKPGGSLRLSCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVG  
E EIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARG  
G YYYYYPROGFL DYWGQGTTVT VSS (SEQ ID NO:27)

及輕鏈可變區(V<sub>L</sub>)，其具有胺基酸序列

DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKKASQSDYSGDSYMNWYQQKPGQPPKLLI  
YAAASDLES GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFATYYCQQSHEDPFTFGQ  
GTKLEI K (SEQ ID NO:28)。

【0264】 在某些實施例中，抗 ADAM9 抗體具有重鏈全長序列  
EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVG

E IPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGS LRAED TAVYYCARG  
G YYYYYPRQGFL DYWGQGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALG  
 C LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG  
 TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP P  
 KPKDTLYIT REPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE  
 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR  
 EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT  
 PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLCLS  
 PG (SEQ ID NO:29)

及輕鏈全長序列

DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKASQSDYSGDSYMNWYQQKPGQPPKLLI  
 YAAASDLESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFATYYCQQSHEDPFTFGQG  
 TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA  
 LQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV  
 TKSFNRGEC (SEQ ID NO:30)。

【0265】 在某些實施例中，細胞結合劑係如美國臨時申請案第 62/751,530 號  
 (其以引用之方式併入本文中)中所述之抗 EpCAM 抗體或其抗原結合片段。

【0266】 在某些實施例中，抗 EpCAM 抗體或其抗原結合片段可包含：a)至少  
 一個輕鏈可變區或其片段，其分別包含三個連續互補決定區(CDR) CDR<sub>L</sub>1、  
 CDR<sub>L</sub>2 及 CDR<sub>L</sub>3，其中 CDR<sub>L</sub>1 具有胺基酸序列 RSSRSLHSDGFTYLY (SEQ ID  
 NO:31)，CDR<sub>L</sub>2 具有胺基酸序列 QTSNLAS (SEQ ID NO:32)，且 CDR<sub>L</sub>3 具有胺  
 基酸序列 AQNLELPNT (SEQ ID NO:33)；及 b)至少一個重鏈可變區或其片段，  
 其分別包含三個連續互補決定區(CDR) CDR<sub>H</sub>1、CDR<sub>H</sub>2 及 CDR<sub>H</sub>3，其中 CDR<sub>H</sub>1

具有胺基酸序列 NYYIH (SEQ ID NO:34) ， CDR<sub>H</sub>2 具有胺基酸序列 WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO:35) ， 且 CDR<sub>H</sub>3 具有胺基酸序列 DGPWFAY (SEQ ID NO:36) 。

【0267】 在某些實施例中，抗 EpCAM 抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區(V<sub>H</sub>)，其具有胺基序列

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQRLEYIGWI  
YPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARDDGP  
WFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:37)

及輕鏈可變區(V<sub>L</sub>)，其具有胺基酸序列

DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIY  
QTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAAQNLELPNTFGQG  
TKLEIK (SEQ ID N:38) 。

【0268】 在某些實施例中，抗 EpCAM 抗體具有重鏈全長序列

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQRLEYIGWI  
YPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARDDGP  
WFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV  
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS  
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT  
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH  
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ  
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS  
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLXLSPG (SEQ ID NO:39)

及輕鏈全長序列

DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIY  
QTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPNTFGQG  
 TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA  
 LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPV  
 TKSFNRGEC (SEQ ID NO:40)，其中 SEQ ID NO:39 中之 X 為 S 或 C。在一個實施例中，X 為 C。

【0269】 在某些實施例中，該細胞結合劑為抗葉酸鹽受體抗體。在某些實施例中，細胞結合劑係如美國專利 8,709,432、美國專利第 8,557,966 號及 WO2011106528 (其均以引用之方式併入本文中)中所述之抗人類葉酸鹽受體 1 (FOLR1)抗體或其抗原結合片段。

【0270】 在某些實施例中，抗 FOLR1 抗體或其抗原結合片段可包含：a)至少一個輕鏈可變區或其片段，其分別包含三個連續互補決定區(CDR) CDR<sub>L</sub>1、CDR<sub>L</sub>2 及 CDR<sub>L</sub>3，其中 CDR<sub>L</sub>1 具有胺基酸序列 KASQSVSFAGTSLMH (SEQ ID NO:41)，CDR<sub>L</sub>2 具有胺基酸序列 RASNLEA (SEQ ID NO:42)，且 CDR<sub>L</sub>3 具有胺基酸序列 QQSREYPYT (SEQ ID NO:43)；及 b)至少一個重鏈可變區或其片段，其分別包含三個連續互補決定區(CDR) CDR<sub>H</sub>1、CDR<sub>H</sub>2 及 CDR<sub>H</sub>3，其中 CDR<sub>H</sub>1 具有胺基酸序列 GYFMN (SEQ ID NO:44)或 GYTFTGYFMN (SEQ ID NO:47)，CDR<sub>H</sub>2 具有胺基酸序列 RIHPYDGDTFYNQKFQG (SEQ ID NO:45) 或 RIHPYDGDTF (SEQ ID NO:48)，且 CDR<sub>H</sub>3 具有胺基酸序列 YDGSRAMDY (SEQ ID NO:46)。在某些實施例中，抗 FOLR1 抗體或其抗原結合片段包含 a)輕鏈可變區，其包含具有以 SEQ ID NO:41 陳述之胺基序列的 CDR<sub>L</sub>1、具有以 SEQ ID NO:42 陳述之胺基序列的 CDR<sub>L</sub>2 及具有以 SEQ ID NO:43 陳述之胺基序列的 CDR<sub>L</sub>3；及 b)重鏈可變區，其包含具有以 SEQ ID NO:44 陳述之胺基序列的 CDR<sub>H</sub>1、

具有以 SEQ ID NO:45 陳述之胺基序列的 CDR<sub>H</sub>2 及具有以 SEQ ID NO:46 陳述之胺基序列的 CDR<sub>H</sub>3。在某些實施例中，抗 FOLR1 抗體或其抗原結合片段包含 a)輕鏈可變區，其包含具有以 SEQ ID NO:41 陳述之胺基序列的 CDR<sub>L</sub>1、具有以 SEQ ID NO:42 陳述之胺基序列的 CDR<sub>L</sub>2 及具有以 SEQ ID NO:43 陳述之胺基序列的 CDR<sub>L</sub>3；及 b)重鏈可變區，其包含具有以 SEQ ID NO:47 陳述之胺基序列的 CDR<sub>H</sub>1、具有以 SEQ ID NO:48 陳述之胺基序列的 CDR<sub>H</sub>2 及具有以 SEQ ID NO:46 陳述之胺基序列的 CDR<sub>H</sub>3。

【0271】 在某些實施例中，抗 FOLR1 抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區 (V<sub>H</sub>)，其具有胺基序列

QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSLEWIGRI  
HPYDGDTFYNQKEQGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYYDG  
SRAMDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:49)

及輕鏈可變區(V<sub>L</sub>)，其具有胺基酸序列

DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPRLLIY  
RASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYCQOSREYPYTFGGG  
 TKLEIKR (SEQ ID NO:50)，或

DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPRLLIY  
RASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQOSREYPYTFGGG  
 TKLEIKR (SEQ ID NO:51)。

【0272】 在某些實施例中，抗 FOLR1 抗體具有重鏈全長序列

QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSLEWIGRI  
HPYDGDTFYNQKEQGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYYDG  
SRAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPE

PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HK  
PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV  
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL  
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN  
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD  
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLXLSPGY (SEQ ID NO:52)

及輕鏈全長序列

DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPRLLIY  
RASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGG  
TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA  
LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV  
TKSFNRGEC (SEQ ID NO:53)，或

DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPRLLIY  
RASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGG  
TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA  
LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV  
TKSFNRGEC (SEQ ID NO:54)，其中 SEQ ID NO:52 中之 X 為 C 或 S 且 SEQ ID  
NO:52 中之 Y 為 K 或不存在。在一個實施例中，X 為 C。

【0273】 在某些實施例中，該抗 FOLR1 抗體為 huMov19 或 M9346A 抗體。

【0274】 在某些實施例中，本文所述之抗體為鼠科動物、非人類哺乳動物、  
嵌合、人類化或人類抗體。例如，該人類化抗體可為 CDR 移植抗體或表面重塑  
抗體。在某些實施例中，該抗體為全長抗體。在某些實施例中，其抗原結合片  
段為 Fab、Fab’、F(ab’)<sub>2</sub>、F<sub>d</sub>、單鏈 Fv 或 scFv、二硫化物連接之 F<sub>v</sub>、V-NAR 域、

IgNar、內體、IgGΔCH<sub>2</sub>、微型抗體、F(ab')<sub>3</sub>、四功能抗體、三功能抗體、雙功能抗體、單域抗體、DVD-Ig、Fcab、mAb<sub>2</sub>、(scFv)<sub>2</sub> 或 scFv-Fc。

【0275】 在某些實施例中，該細胞結合劑為替代蛋白質骨架，諸如 Centyrin (基於纖維連接蛋白 III 型(FN3)重複序列之共有序列的蛋白質骨架；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)、錨蛋白重複蛋白(例如經設計之錨蛋白重複蛋白，稱作 DARPin；參見美國專利公開案第 2004/0132028 號、第 2009/0082274 號、第 2011/0118146 號及第 2011/0224100 號，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.及 Pluckthun, A., *Nature Biotechnology* (2005) 23:1257-1268，以引用之方式併入本文中)、錨蛋白樣重複蛋白或合成肽(參見例如美國專利公開案第 2007/0238667 號；美國專利第 7,101,675 號；WO 2007/147213；及 WO 2007/062466，以引用之方式併入本文中)、纖維蛋白(纖維連接蛋白域骨架蛋白；參見美國專利公開案第 2007/0082365 號；第 2008/0139791 號，以引用之方式併入本文中)、Avibody (包括雙功能抗體、三功能抗體及四功能抗體；參見美國公開案第 2008/0152586 號及第 2012/0171115 號)、雙重受體再靶向(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)及細胞滲透超電荷蛋白(*Methods in Enzymol.* 502, 293-319 (2012))。

【0276】 在某些實施例中，該細胞結合劑為可活化抗體或可活化抗原結合抗體片段(統稱為 AA)。在一些實施例中，該可活化抗體或可活化抗原結合抗體片段包含特異性地結合於標靶細胞(或「標靶」)上之配位體的抗體或抗原結合抗體

片段(例如，本文所述之抗體或抗原結合抗體片段)，該標靶細胞(或「標靶」)偶合至遮蔽部分(MM)，以致 MM 之偶合減少該抗體或抗原結合抗體片段結合該標靶之能力。在一些實施例中，該 MM 經由包括蛋白酶之受質之序列進行偶合，該蛋白酶例如在患病組織中具活性之蛋白酶及/或與該標靶共定位於個體中之治療位點處的蛋白酶。該等可活化抗體較佳地在循環中穩定，在療法及/或診斷之預期位點處但不在正常(例如，健康)組織或治療及/或診斷未靶向之其他組織中經活化，且當經活化時，展現至少可相當於相應、未經修飾抗體之與標靶的結合。在一些實施例中，該等 AA 係描述於 WO 2009/025846、WO 2010/081173、WO 2015/048329、WO 2015/116933 及 WO 2016/118629 中之彼等，該等文獻各自以引用之方式整體併入。

**【0277】** 在一些實施例中，該可活化抗體或抗體片段包含：

- (a) 偶合至該抗體或抗體片段(統稱為「AB」)之可裂解部分(CM)，其中該 CM 係充當蛋白酶之受質的多肽；及
  - (b) 偶合至該抗體或抗體片段之遮蔽部分(MM)，其中當該可活化抗體處於未裂解狀態時，該 MM 抑制該抗體或抗體片段與配位體之結合，
- 其中處於未裂解狀態之可活化抗體自 N 端至 C 端具有如下結構安排：  
(MM)-(CM)-(AB)或(AB)-(CM)-(MM)。

**【0278】** 在一些實施例中，該遮蔽部分(或「遮蔽」)為如下胺基酸序列，其偶合或以其他方式附接於該抗體且定位於可活化抗體構築體內，以致該遮蔽部分減少該抗體特異性地結合該標靶之能力。合適遮蔽部分使用多種已知技術中之任一者經鑑別。例如，肽遮蔽部分使用描述於 WO 2009/025846 中之方法經鑑別，該文獻之內容以引用之方式整體併入本文中。

**【0279】** 經 MM 修飾之 AB 針對標靶的  $K_d$  可比未經 MM 修飾之 AB 或親本

AB 針對標靶的  $K_d$  大至少 5、10、25、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、50,000、100,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000 倍或更多倍，或在 5-10、10-100、10-1,000、10-10,000、10-100,000、10-1,000,000、10-10,000,000、100-1,000、100-10,000、100-100,000、100-1,000,000、100-10,000,000、1,000-10,000、1,000-100,000、1,000-1,000,000、1000-10,000,000、10,000-100,000、10,000-1,000,000、10,000-10,000,000、100,000-1,000,000 或 100,000-10,000,000 倍之間。相反，經 MM 修飾之 AB 針對標靶的結合親和力可比未經 MM 修飾之 AB 或親本 AB 針對標靶的結合親和力低至少 5、10、25、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、50,000、100,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000 倍或更多倍，或在 5-10、10-100、10-1,000、10-10,000、10-100,000、10-1,000,000、10-10,000,000、100-1,000、100-10,000、100-100,000、100-1,000,000、100-10,000,000、1,000-10,000、1,000-100,000、1,000-1,000,000、1000-10,000,000、10,000-100,000、10,000-1,000,000、10,000-10,000,000、100,000-1,000,000 或 100,000-10,000,000 倍之間。

【0280】 MM 針對 AB 之解離常數( $K_d$ )一般大於 AB 針對標靶之  $K_d$ 。MM 針對 AB 之  $K_d$  可比 AB 針對標靶之  $K_d$  大至少 5、10、25、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、100,000、1,000,000 或甚至 10,000,000 倍。相反，MM 針對 AB 之結合親和力一般低於 AB 針對標靶之結合親和力。MM 針對 AB 之結合親和力可比 AB 針對標靶之結合親和力低至少 5、10、25、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、100,000、1,000,000 或甚至 10,000,000 倍。

【0281】 如與未經 MM 修飾之 AB 與標靶之特異性結合或親本 AB 與標靶之特異性結合相比，當 AB 經 MM 修飾且在標靶存在下時，AB 與其標靶之特異性結合可減少或受抑制。當如 WO 2010/081173 所述活體內或在標靶位移活體外免

疫吸附劑分析中量測時，當與未經 MM 修飾之 AB 與標靶之結合或親本 AB 與標靶之結合相比時，AB 在經 MM 修飾時結合標靶的能力可減少至少 50%、60%、70%、80%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%及甚至 100%，持續至少 2、4、6、8、12、28、24、30、36、48、60、72、84、96 小時，或 5、10、15、30、45、60、90、120、150、180 天，或 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 個月或更久。

【0282】 MM 可抑制 AB 與標靶之結合。MM 可結合 AB 之抗原結合域且抑制 AB 與其標靶之結合。MM 可在空間上抑制 AB 與標靶之結合。MM 可別位抑制 AB 與其標靶之結合。在此等實施例中，當如 WO 2010/081173 所述活體內或在標靶位移活體外免疫吸附劑分析中量測時，如與未經 MM 修飾之 AB、親本 AB 或未偶合至 MM 之 AB 與標靶的結合相比，當 AB 經 MM 修飾或偶合至 MM 且在標靶存在下時，AB 與標靶不結合或實質上不結合，或存在 AB 與標靶之僅.001%、.01%、.1%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%或 50%結合，持續至少 2、4、6、8、12、28、24、30、36、48、60、72、84、96 小時，或 5、10、15、30、45、60、90、120、150、180 天，或 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 個月或更久。

【0283】 當 AB 偶合至 MM 或由 MM 修飾時，該 MM 可『遮蔽』或減少或抑制 AB 與其標靶之特異性結合。當 AB 偶合至 MM 或由 MM 修飾時，該偶合或修飾可實現結構改變，該結構改變減少或抑制 AB 特異性地結合其標靶之能力。

【0284】 偶合至 MM 或經 MM 修飾之 AB 可由以下各式表示(依自胺基(N)端區至羧基(C)端區之次序)：

(MM)-(AB)

(AB)-(MM)

(MM)-L-(AB)

(AB)-L-(MM)

其中 MM 為遮蔽部分，Ab 為抗體或標靶結合抗原片段，且 L 為連接體。在多個實施例中，可需要將一或多個連接體(例如柔性連接體)插入至該組合物中以便提供柔性。

【0285】 在某些實施例中，該 MM 不為 Ab 之天然結合搭配物。在一些實施例中，該 MM 不含或實質上不含與 Ab 之任何天然結合搭配物之同源性。在一些實施例中，該 MM 與 Ab 之任何天然結合搭配物僅 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或 80%相似。在一些實施例中，該 MM 與 Ab 之任何天然結合搭配物僅 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或 80%一致。在一些實施例中，該 MM 與 Ab 之任何天然結合搭配物僅 25%一致。在一些實施例中，該 MM 與 Ab 之任何天然結合搭配物僅 50%一致。在一些實施例中，該 MM 與 Ab 之任何天然結合搭配物僅 20%一致。在一些實施例中，該 MM 與 Ab 之任何天然結合搭配物僅 10%一致。

【0286】 本文所提供之可活化抗體亦可包括可裂解部分(CM)。該等 AA 展現與 AB 之標靶之可活化/可轉換結合。AA 一般包括抗體或抗體片段(AB)，其藉由遮蔽部分(MM)及可修飾或可裂解部分(CM)修飾或偶合至遮蔽部分(MM)及可修飾或可裂解部分(CM)。在一些實施例中，該 CM 含有充當所關注之蛋白酶之受質的胺基酸序列。在其他實施例中，該 CM 提供可藉由還原裂解之半胱胺酸-半胱胺酸二硫鍵。在其他實施例中，該 CM 提供可藉由光解活化之光解受質。

【0287】 在一些實施例中，該可裂解部分(或「受質」)包括作為蛋白酶、通常細胞外蛋白酶之受質之胺基酸序列。合適受質使用多種已知技術中之任一者經

鑑別。例如，肽受質使用描述於美國專利第 7,666,817 號及第 8,563,269 號；及 WO 2014/026136 中之方法經鑑別，該等文獻中每一者之內容均以引用之方式整體併入本文中。(亦參見 Boulware 等人, *Biotechnol Bioeng.* 106(3):339-346 (2010))。視情況，該 CM 包含能夠形成二硫鍵之半胱胺酸-半胱胺酸對，該二硫鍵可藉由還原劑之作用經裂解。該 CM 係經定位以致當該 CM 在標靶存在下藉由裂解劑裂解(例如，CM 之蛋白酶受質藉由蛋白酶裂解及/或半胱胺酸-半胱胺酸二硫鍵經由藉由暴露於還原劑實現之還原受到破壞)，從而引起裂解狀態時，Ab 結合該標靶，且在未裂解狀態中，在標靶存在下，Ab 與標靶之結合受到 MM 抑制。應注意，CM 之胺基酸序列可與 MM 重疊或包括於 MM 內，以致當該可活化抗體呈未裂解構形時，CM 之全部或一部分促進 Ab 之「遮蔽」。

**【0288】** 在一些實施例中，CM 可基於與該可活化抗體之所需標靶共定位於組織中之蛋白酶加以選擇。已知其中共定位所關注之標靶與蛋白酶之多種不同條件，其中該蛋白酶之受質為此項技術中已知的。例如，標靶組織可為癌組織，特別地實體腫瘤之癌組織。文獻中已多次報告，具有已知受質之蛋白酶在多種癌症(例如實體腫瘤)中具有增加之水準。參見例如 La Rocca 等人, (2004) *British J. of Cancer* 90(7): 1414-1421。

**【0289】** 例示性受質可包括但不限於可藉由以下酶中之一或多者裂解之受質：MMP-I、MMP-2、MMP-3、MMP-8、MMP-9、MMP-14、血纖維蛋白溶酶、PSA、PSMA、組織蛋白酶 D、組織蛋白酶 K、組織蛋白酶 S、ADAM10、ADAM12、ADAMTS、半胱天冬酶-1、半胱天冬酶-2、半胱天冬酶-3、半胱天冬酶-4、半胱天冬酶-5、半胱天冬酶-6、半胱天冬酶-7、半胱天冬酶-8、半胱天冬酶-9、半胱天冬酶-10、半胱天冬酶-11、半胱天冬酶-12、半胱天冬酶-13、半胱天冬酶-14 及 TACE。

【0290】 在一些實施例中，該 CM 為多達 15 個胺基酸長之多肽。

【0291】 在一些實施例中，該 CM 為如下多肽，其包括作為至少一種基質金屬蛋白酶(MMP)之受質的第一可裂解部分(CM1)及作為至少一種絲胺酸蛋白酶(SP)之受質的第二可裂解部分(CM2)。在一些實施例中，CM1-CM2 受質之 CM1 受質序列及 CM2 受質序列中之每一者均獨立地為多達 15 個胺基酸長之多肽。

【0292】 在一些實施例中，該 CM 為豆莢蛋白、血纖維蛋白溶酶、TMPRSS-3/4、MMP-9、MT1-MMP、組織蛋白酶、半胱天冬酶、人類嗜中性球彈性蛋白酶、 $\beta$ -分泌酶、uPA 或 PSA 之受質。

【0293】 經 MM 及 CM 修飾之 Ab 針對標靶的  $K_d$  可比未經 MM 及 CM 修飾之 Ab 或親本 Ab 針對標靶的  $K_d$  大至少 5、10、25、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、50,000、100,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000 倍或更多倍，或在 5-10、10-100、10-1,000、10-10,000、10-100,000、10-1,000,000、10-10,000,000、100-1,000、100-10,000、100-100,000、100-1,000,000、100-10,000,000、1,000-10,000、1,000-100,000、1,000-1,000,000、1000-10,000,000、10,000-100,000、10,000-1,000,000、10,000-10,000,000、100,000-1,000,000 或 100,000-10,000,000 倍之間。相反，經 MM 及 CM 修飾之 Ab 針對標靶的結合親和力可比未經 MM 及 CM 修飾之 Ab 或親本 Ab 針對標靶的結合親和力低至少 5、10、25、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、50,000、100,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000 倍或更多倍，或在 5-10、10-100、10-1,000、10-10,000、10-100,000、10-1,000,000、10-10,000,000、100-1,000、100-10,000、100-100,000、100-1,000,000、1,000-10,000、1,000-100,000、1,000-1,000,000、1000-10,000,000、10,000-100,000、10,000-1,000,000、10,000-10,000,000、100,000-1,000,000 或 100,000-10,000,000

倍之間。

【0294】 如與未經 MM 及 CM 修飾之 Ab 或親本 Ab 與標靶之特異性結合相比，當 Ab 經 MM 及 CM 修飾且在標靶存在下但不在修飾劑(例如酶、蛋白酶、還原劑、光)存在下時，Ab 與其標靶之特異性結合可減少或受抑制。當如 WO201008117 (以引用之方式整體併入本文中)所述活體內或在標靶位移活體外免疫吸附劑分析中量測時，當與親本 Ab 與其標靶之結合或未經 MM 及 CM 修飾之 Ab 與其標靶之結合相比時，Ab 在經 MM 及 CM 修飾時結合標靶的能力可減少至少 50%、60%、70%、80%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 及甚至 100%，持續至少 2、4、6、8、12、28、24、30、36、48、60、72、84、96 小時，或 5、10、15、30、45、60、90、120、150、180 天，或 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 個月或更久。

【0295】 如本文所用，術語裂解狀態係指在 CM 之蛋白酶修飾及/或 CM 之半胱胺酸-半胱胺酸二硫鍵的還原及/或光活化之後 AA 之狀態。如本文所用，術語未裂解狀態係指在 CM 之蛋白酶裂解不存在下及/或在 CM 之半胱胺酸-半胱胺酸二硫鍵的還原不存在下及/或在光不存在下 AA 之狀態。如上文所論述，術語 AA 在本文中用於指呈其未裂解(原生)狀態以及呈其裂解狀態之 AA。一般技術人員應顯而易見，在一些實施例中，裂解之 AA 可歸因於 CM 之蛋白酶裂解，導致至少 MM 之釋放而缺乏 MM (例如，其中 MM 未藉由共價鍵(例如半胱胺酸殘基之間的二硫鍵)接合於 AA)。

【0296】 可活化或可轉換意謂 AA 當呈經抑制、經遮蔽或未裂解狀態(亦即，第一構形)時展現第一水準之與標靶之結合，且在未抑制、未遮蔽及/或裂解狀態(亦即，第二構形)下展現第二水準之與標靶之結合，其中該第二水準之標靶結合大於該第一水準之結合。一般而言，標靶對 AA 之 Ab 的接近在能夠裂解 CM 之

裂解劑存在下大於該種裂解劑不存在下。因此，當 AA 係呈未裂解狀態時，Ab 經抑制以免於標靶結合且可經遮蔽以免於標靶結合(亦即，第一構形使得 Ab 無法結合標靶)，且在裂解狀態下，AB 關於標靶結合未受抑制或未經遮蔽。

【0297】 AA 之 CM 及 AB 可經選擇，使得 AB 表示用於所關注之標靶的結合部分，且 CM 表示與標靶共定位於個體中之治療位點處之蛋白酶的受質。或者或另外，該 CM 為半胱胺酸-半胱胺酸二硫鍵，其可由於此二硫鍵之還原而裂解。AA 含有蛋白酶可裂解 CM 或半胱胺酸-半胱胺酸二硫鍵中之至少一者，且在一些實施例中包括兩個種類之 CM。AA 可替代地或進一步包括可藉由光源活化之光不穩定受質。本文所揭示之 AA 發現特定用途，其中例如與非治療位點之組織中(例如健康組織中)相比，能夠裂解 CM 中之位點的蛋白酶以相對較高水準存在於治療位點之含標靶組織(例如患病組織；例如用於治療性治療或診斷性治療)中。本文所揭示之 AA 亦發現特定用途，其中例如與非治療非診斷位點之組織中相比，能夠還原 CM 中之位點的還原劑以相對較高水準存在於治療或診斷位點之含標靶組織中。本文所揭示之 AA 亦發現特定用途，其中例如能夠光解 CM 中之位點的光源(例如，藉助於雷射)經引入至治療或診斷位點之含標靶組織。

【0298】 在一些實施例中，AA 可提供減少之毒性及/或不良副作用，若 Ab 並未經遮蔽或以其他方式經抑制以免於結合其標靶，則該等毒性及/或不良副作用可能原本由非治療位點處之 Ab 結合引起。在 AA 含有可藉由促進二硫鍵之還原的還原劑裂解之 CM 的情況下，該等 AA 之 AB 可經選擇以利用 Ab 之活化，其中所關注之標靶存在於所需治療位點處，該治療位點之特徵在於升高之還原劑水準，以致該環境具有高於例如非治療位點之環境的還原潛力。

【0299】 一般而言，AA 可藉由選擇所關注之 Ab 且構建 AA 之剩餘部分而經設計，使得當構形受約束時，MM 提供 Ab 之遮蔽或 Ab 與其標靶之結合的減少。

結構設計準則應考慮提供此功能特徵。

【0300】 提供與未抑制構形相對，在經抑制構形中展現針對標靶結合之所需動態範圍之可轉換表型的 AA。動態範圍一般係指(a)在第一條件集合下參數之最大偵測水準與(b)在第二條件集合下彼參數之最小偵測值的比率。例如，在 AA 之情況下，動態範圍係指(a)在能夠裂解 AA 之 CM 的蛋白酶存在下與 AA 結合之標靶蛋白之最大偵測水準與(b)在該蛋白酶不存在下與 AA 結合之標靶蛋白之最小偵測水準的比率。AA 之動態範圍可經計算為 AA 裂解劑(例如酶)治療之平衡解離常數與該 AA 裂解劑治療之平衡解離常數的比率。AA 之動態範圍愈大，AA 之可轉換表型愈佳。具有相對較高動態範圍值(例如大於 1)之 AA 展現更所需之轉換表型，以致與裂解劑不存在下相比，AA 之標靶蛋白結合在能夠裂解 AA 之 CM 的裂解劑(例如酶)存在下以較大程度發生(例如，主要地發生)。

【0301】 AA 可以多種結構組態經提供。AA 之例示性式提供於下文。特定地預期，AB、MM 及 CM 之 N 端至 C 端次序可在 AA 內逆轉。亦特定地預期，CM 及 MM 之胺基酸序列可重疊，例如以致 CM 含於 MM 內。

【0302】 例如，AA 可由下式表示(依自胺基(N)端區至羧基(C)端區之次序：

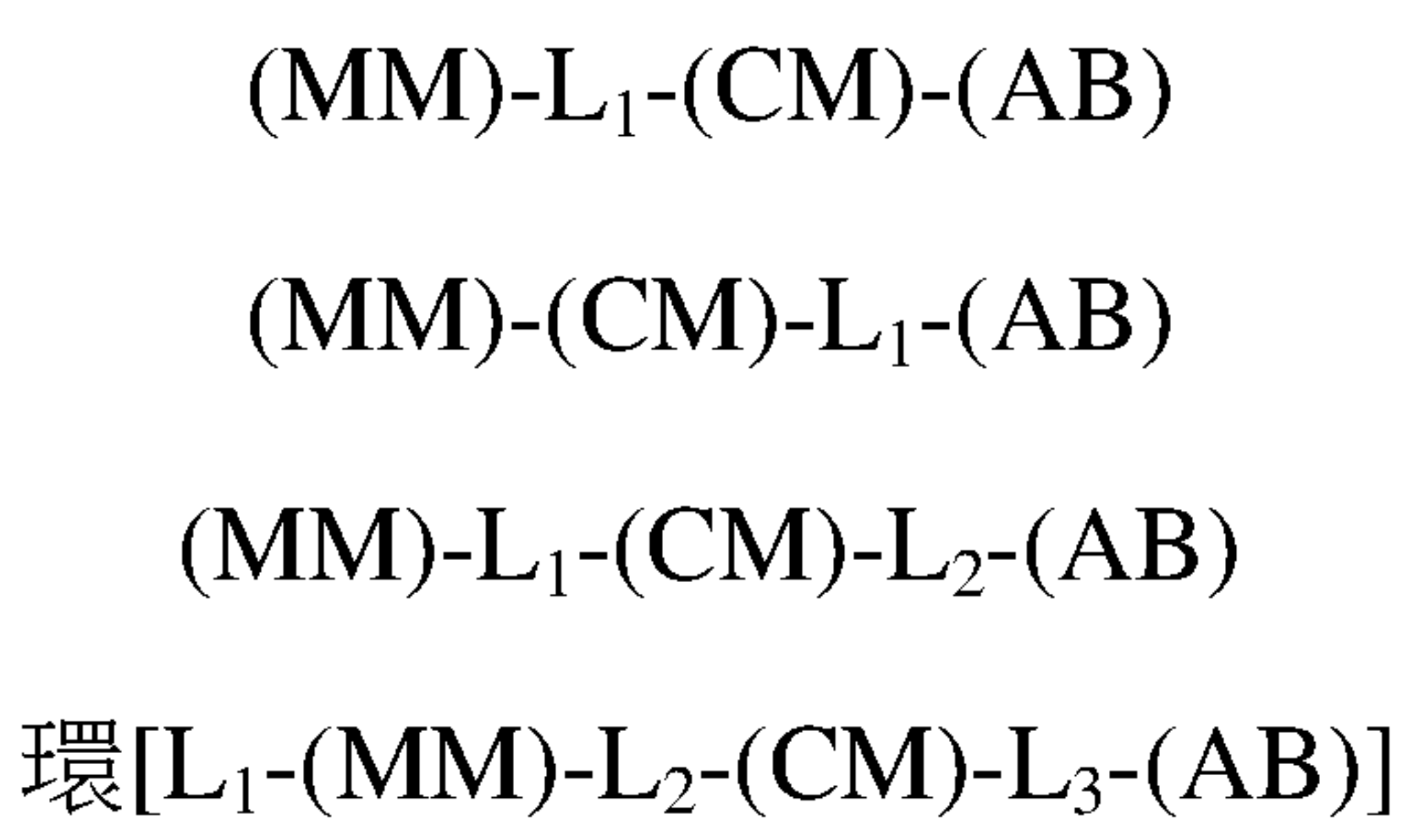
(MM)-(CM)-(AB)

(AB)-(CM)-(MM)，其中 MM 為遮蔽部分，CM 為可裂解部分，且 AB 為抗體或其片段。應注意，儘管 MM 及 CM 經指示為上式中之不同組分，在本文所揭示之所有例示性實施例(包括各式)中，預期 MM 及 CM 之胺基酸序列可能重疊，例如以致 CM 完全地或部分地含於 MM 內。另外，以上各式提供可定位於 AA 要素之 N 端或 C 端之額外胺基酸序列。

【0303】 在某些實施例中，可需要將一或多個連接體(例如柔性連接體)插入至 AA 構築體中以便在 MM-CM 接頭、CM-AB 接頭或兩者中之一或多者處提供柔

性。例如，AB、MM 及/或 CM 可未含充足數目之殘基(例如 Gly、Ser、Asp、Asn，尤其 Gly 及 Ser，特別地 Gly)來提供所需柔性。因而，該等 AA 構築體之可轉換表型可受益於為了提供柔性連接體而引入之一或多個胺基酸。另外，如下文所述，在 AA 作為構形受約束之構築體經提供的情況下，柔性連接體可操作性地經插入以促進未裂解 AA 中之環狀結構之形成及維持。

【0304】 例如，在某些實施例中，AA 包含以下各式之一(其中下式表示呈 N 端至 C 端方向或 C 端至 N 端方向之胺基酸序列)：



其中 MM、CM 及 AB 係如上文所定義；其中 L<sub>1</sub>、L<sub>2</sub> 及 L<sub>3</sub> 各自獨立地且視情況存在或不存在，係包括至少 1 個柔性胺基酸(例如 Gly)之相同或不同柔性連接體；且其中在環存在的情況下，AA 歸因於在 AA 中之一對半胱胺酸之間存在二硫鍵而呈環狀結構之形式。另外，以上各式提供可定位於 AA 要素之 N 端或 C 端之額外胺基酸序列。應理解，在式環[L<sub>1</sub>-(MM)-L<sub>2</sub>-(CM)-L<sub>3</sub>-(AB)]中，負責二硫鍵之半胱胺酸可定位於 AA 中以容許一個或兩個尾，由此當 AA 處於二硫化物鍵結之結構(且因此構形受約束之狀態)中時產生套索或 ω 結構。該(等)尾之胺基酸序列可提供額外 AA 特徵，諸如結合於標靶受體以促進 AA 之定位，增加 AA 之血清半衰期，及其類似特徵。標靶部分(例如，針對存在於標靶組織中之細胞之受體的配位體)及血清半衰期延長部分(例如結合血清蛋白之多肽，諸如免疫球蛋白(例如 IgG)或血清白蛋白(例如人類血清白蛋白(HSA)))。

【0305】 適用於本文所述之 AA 之連接體一般為提供經修飾 AB 或該 AA 之柔

性以促進對 AB 與標靶之結合的抑制之連接體。該等連接體一般稱作柔性連接體。合適連接體可容易地經選擇且可具有任何合適之不同長度，諸如 1 個胺基酸(例如 Gly)至 20 個胺基酸、2 個胺基酸至 15 個胺基酸、3 個胺基酸至 12 個胺基酸，包括 4 個胺基酸至 10 個胺基酸、5 個胺基酸至 9 個胺基酸、6 個胺基酸至 8 個胺基酸或 7 個胺基酸至 8 個胺基酸，且可為 1、2、3、4、5、6 或 7 個胺基酸。

【0306】 例示性柔性連接體包括甘胺酸聚合物(G)<sub>n</sub>、甘胺酸-絲胺酸聚合物(包括例如(GS)<sub>n</sub>、(GSGGS)<sub>n</sub>及(GGGS)<sub>n</sub>，其中 n 係至少為 1 之整數)、甘胺酸-丙胺酸聚合物、丙胺酸-絲胺酸聚合物及此項技術中已知之其他柔性連接體。甘胺酸及甘胺酸-絲胺酸聚合物相對地未結構化，且因此可能夠充當組分之間的中性繫栓。甘胺酸接近甚至比丙胺酸顯著更多之 phi-psi 空間，且與具有較長側鏈之殘基相比更不受限制(參見 Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142 (1992))。例示性柔性連接體包括但不限於 Gly-Gly-Ser-Gly、Gly-Gly-Ser-Gly-Gly、Gly-Ser-Gly-Ser-Gly、Gly-Ser-Gly-Gly-Gly、Gly-Gly-Gly-Ser-Gly、Gly-Ser-Ser-Ser-Gly 及其類似連接體。一般技術人員應認識到，AA 之設計可包括全部或部分地具柔性之連接體，以致該連接體可包括柔性連接體以及賦予較少柔性結構以提供所需 AA 結構之一或多個部分。

【0307】 除了上文所述之要素以外，經修飾 AB 及 AA 亦可含有額外要素，諸如 AA 之胺基酸序列 N 端或 C 端。例如，AA 可包括靶向部分以促進遞送至所關注之細胞或組織。此外，AA 可在骨架蛋白之情況下經提供以促進細胞表面上 AA 之呈現

【0308】 在一些實施例中，該可活化抗體亦包括信號肽。在一些實施例中，該信號肽經由間隔體結合於該可活化抗體。在一些實施例中，該間隔體在信號肽不存在下結合於該可活化抗體。在一些實施例中，該間隔體直接地接合於該

可活化抗體之 MM。在一些實施例中，在自 N 端至 C 端具有間隔體-MM-CM-AB 之結構安排中，該間隔體直接地接合於該可活化抗體之 MM。

【0309】 合適間隔體及間隔體技術為此項技術中已知的且可常規地用於在所提供之可活化抗體之一些實施例中併入間隔體。參見例如 WO 2016/179285 (例如在第 52-53 頁)，其內容以引用之方式整體併入本文中。

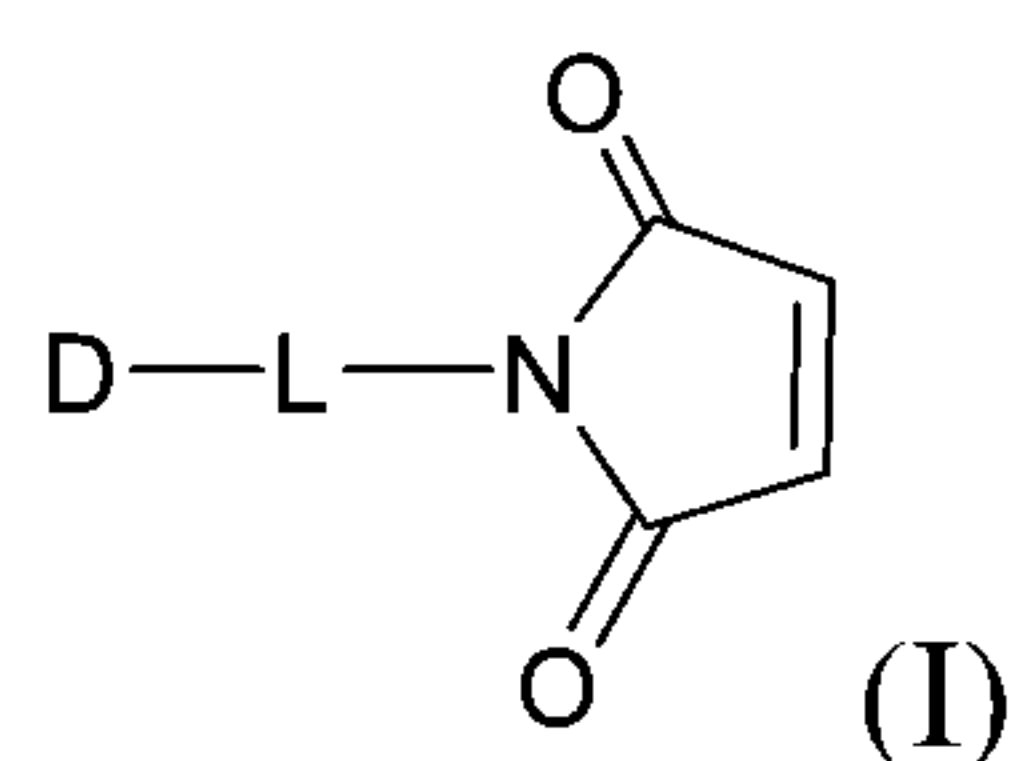
【0310】 在一些實施例中，該可活化抗體暴露於蛋白酶且藉由蛋白酶裂解，以致在經活化或裂解狀態中，該可活化抗體包括如下輕鏈序列，該序列在該蛋白酶已裂解 CM 之後包括 LP2 及/或 CM 序列之至少一部分。

【0311】 該 CM 由至少一種蛋白酶以約  $0.001-1500 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$  或至少 0.001、0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1、2.5、5、7.5、10、15、20、25、50、75、100、125、150、200、250、500、750、1000、1250 或  $1500 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$  之速率特異性地裂解。在一些實施例中，該 CM 以約  $100,000 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$  之速率特異性地裂解。在一些實施例中，該 CM 以約  $1 \times 10^2$  至約  $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$  (亦即，約  $1 \times 10^2$  至約  $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ ) 之速率特異性地裂解。

【0312】 關於藉由酶實現之特異性裂解，在該酶與 CM 之間實現接觸。當包含偶合至 MM 及 CM 之 Ab (例如抗體或 EpCAM 結合抗體片段) 之可活化抗體係在標靶及充足酶活性存在下時，該 CM 可裂解。充足酶活性可指該酶與該 CM 進行接觸且實現裂解之能力。可容易地設想，酶可處於該 CM 附近，但由於其他細胞因子或該酶之蛋白質修飾而無法裂解。

## 5. 細胞毒性劑(D)或細胞毒性劑-連接體化合物(式(I))化合物

【0313】 在某些實施例中，關於本文所述之方法(例如，第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九或第十實施例或其中所述之任何實施例之方法)中的步驟(c)，CysCBA (例如 CysAb 或其抗原結合片段)與式(I)化合物：



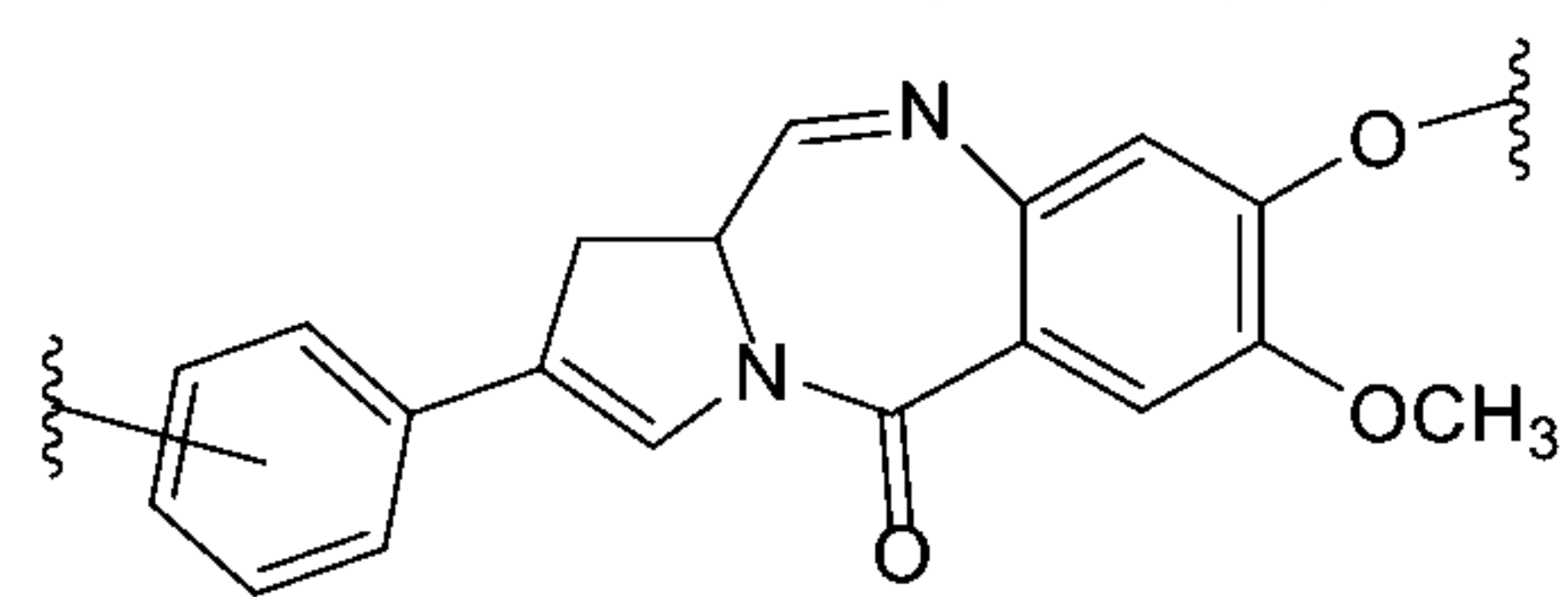
或其醫藥學上可接受之鹽反應，由此形成結合物，其中 D 為細胞毒性劑，且 L 為連接體。

【0314】 在某些實施例中，D 為苯并二氮呋化合物，諸如吡咯并苯并二氮呋(PBD)、呔啉并苯并二氮呋(OBD)或吲哚啉并苯并二氮呋(IGN)化合物。

【0315】 如本文所用，「苯并二氮呋」化合物係具有苯并二氮呋核心結構之化合物。該苯并二氮呋核心可經取代或未經取代，及/或與一或多個環結構稠合。其亦包括具有藉由連接體連接之兩個苯并二氮呋核心之化合物。作為苯并二氮呋核心之一部分之亞胺官能基(-C=N-)可經還原。

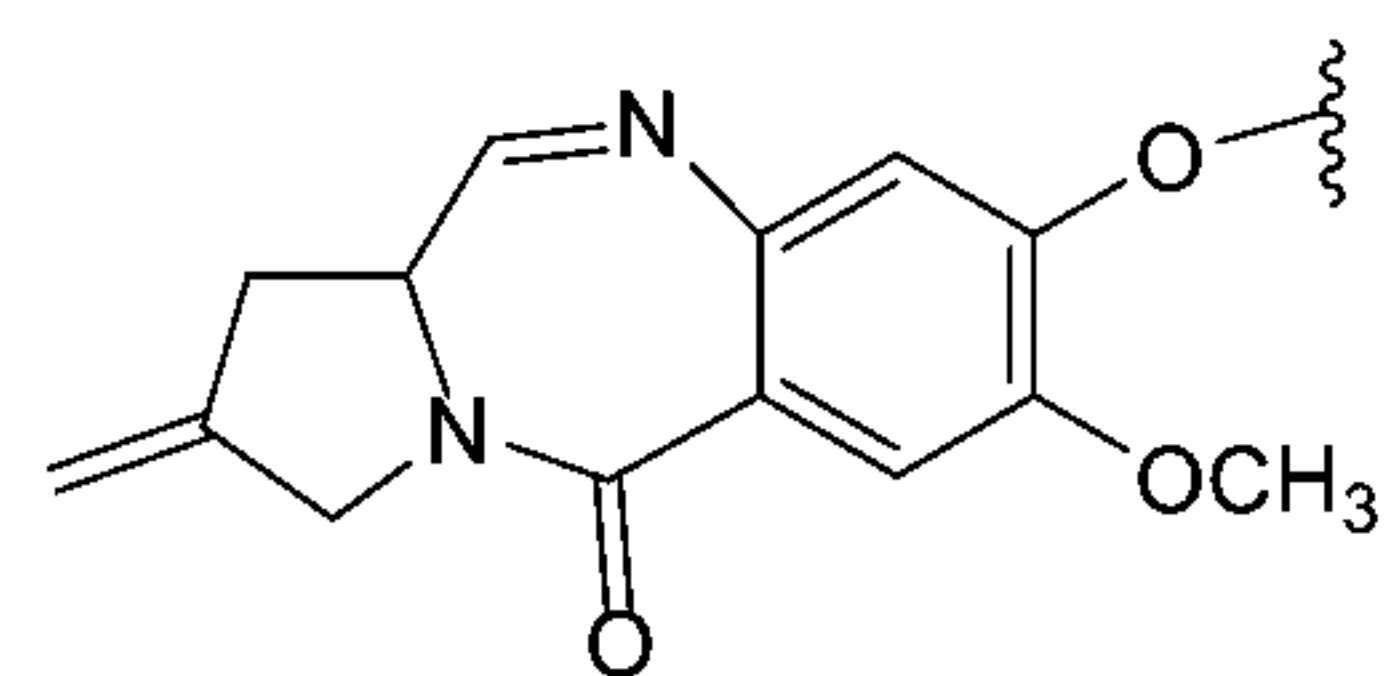
【0316】 如本文所用，「吡咯并苯并二氮呋」(PBD)化合物係具有吡咯并苯并二氮呋核心結構之化合物。吡咯并苯并二氮呋可經取代或未經取代。其亦包括具有藉由連接體連接之兩個吡咯并苯并二氮呋核心之化合物。作為吲哚啉并苯并二氮呋核心之一部分之亞胺官能基(-C=N-)可經還原。

【0317】 在某些實施例中，該吡咯并苯并二氮呋化合物包含由



表示之核心結構，其可視情況經取代。

【0318】 在某些實施例中，該等吡咯并苯并二氮呋化合物包含由

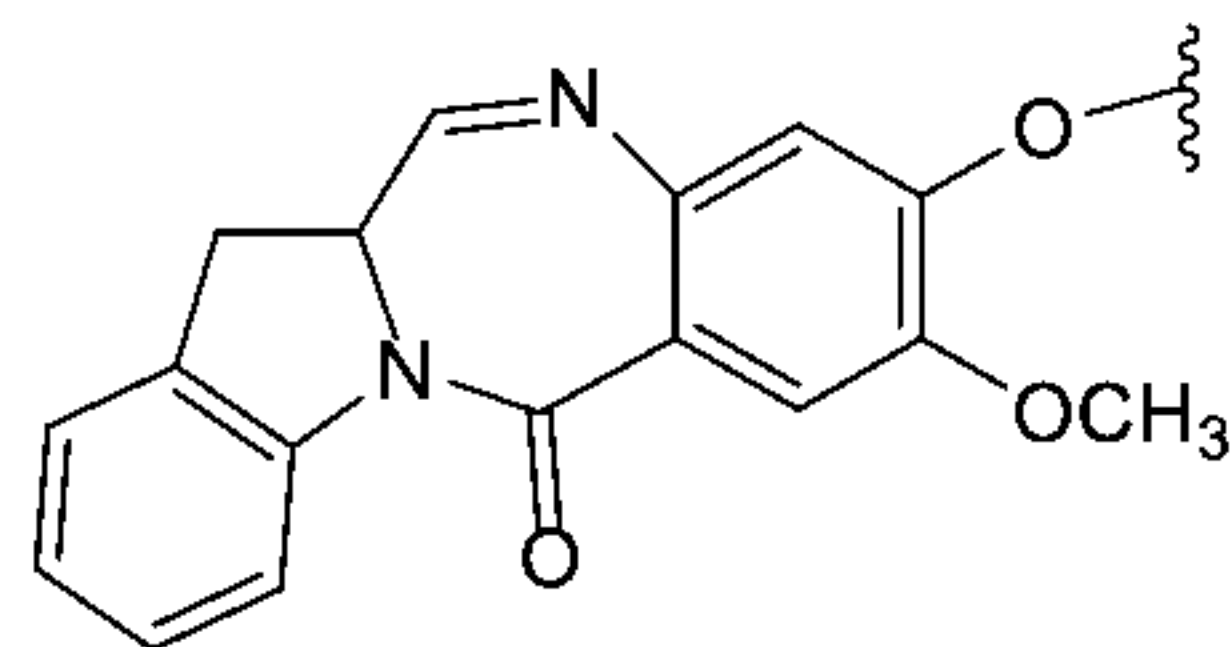


表示之核心結構，其可視情況經取代。

【0319】 如本文所用，「吲哚啉并苯并二氮呋」(IGN)化合物係具有吲哚啉并苯并二氮呋核心結構之化合物。吲哚啉并苯并二氮呋可經取代或未經取代。其亦包括具有藉由連接體連接之兩個吲哚啉并苯并二氮呋核心之化合物。作為吲

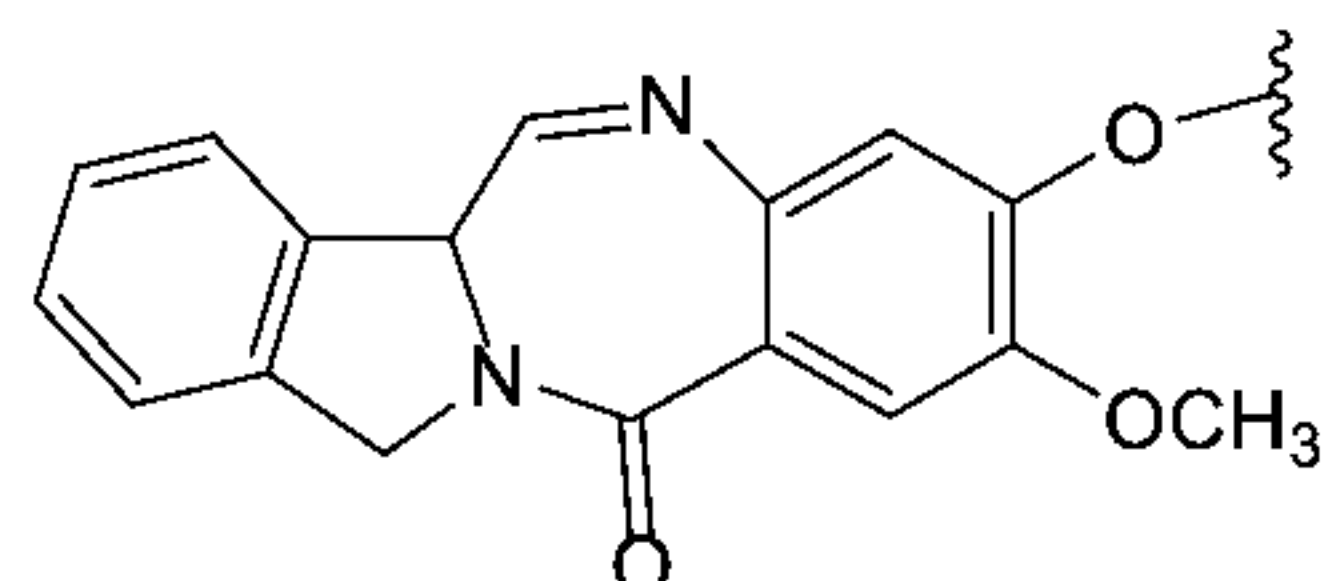
喹啉并苯并二氮呋核心之一部分之亞胺官能基(-C=N-)可經還原。

【0320】 在某些實施例中，該喹啉并苯并二氮呋化合物包含由



表示之核心結構，其可視情況經取代。

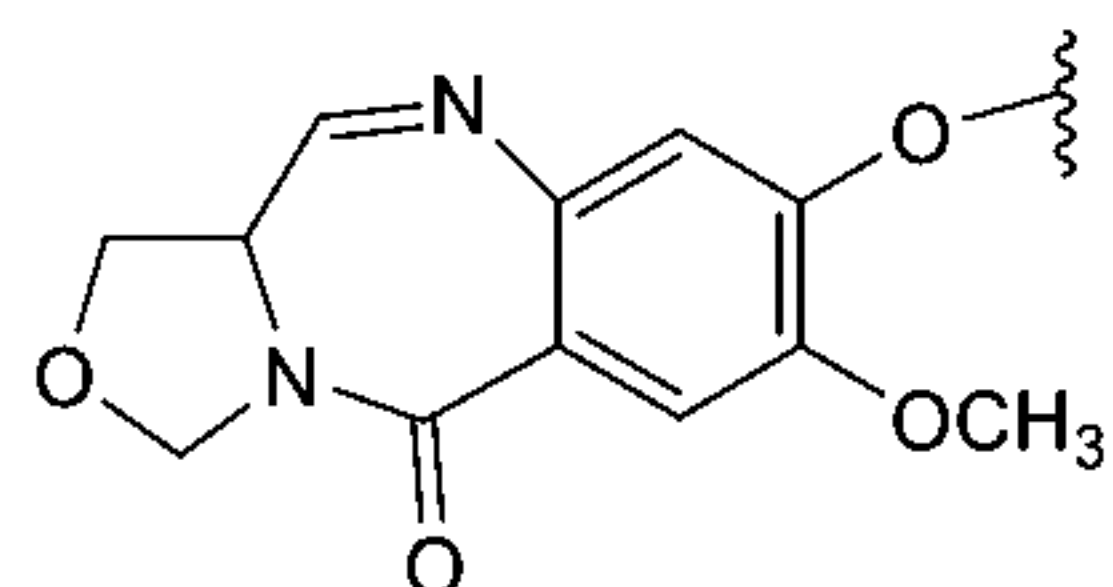
【0321】 在一些實施例中，該喹啉并苯并二氮呋化合物包含由



表示之核心結構，其可視情況經取代。

【0322】 如本文所用，「喹啉并苯并二氮呋」(OBD)化合物係具有喹啉并苯并二氮呋核心結構之化合物。喹啉并苯并二氮呋可經取代或未經取代。其亦包括具有藉由連接體連接之兩個喹啉并苯并二氮呋核心之化合物。作為喹啉并苯并二氮呋核心之一部分之亞胺官能基(-C=N-)可經還原。

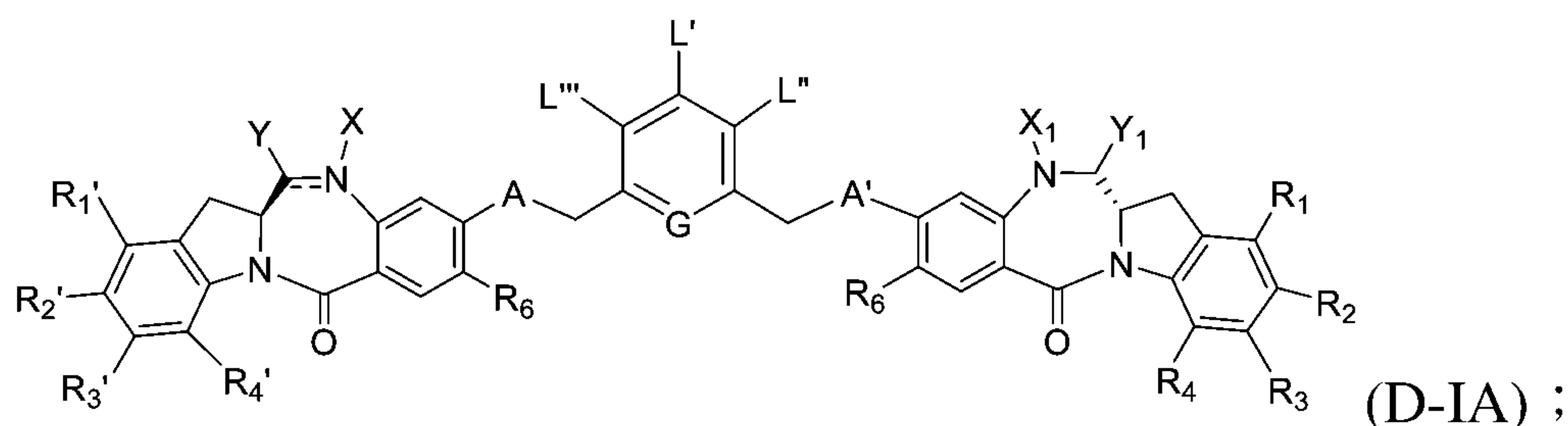
【0323】 在一些實施例中，該喹啉并苯并二氮呋化合物包含由

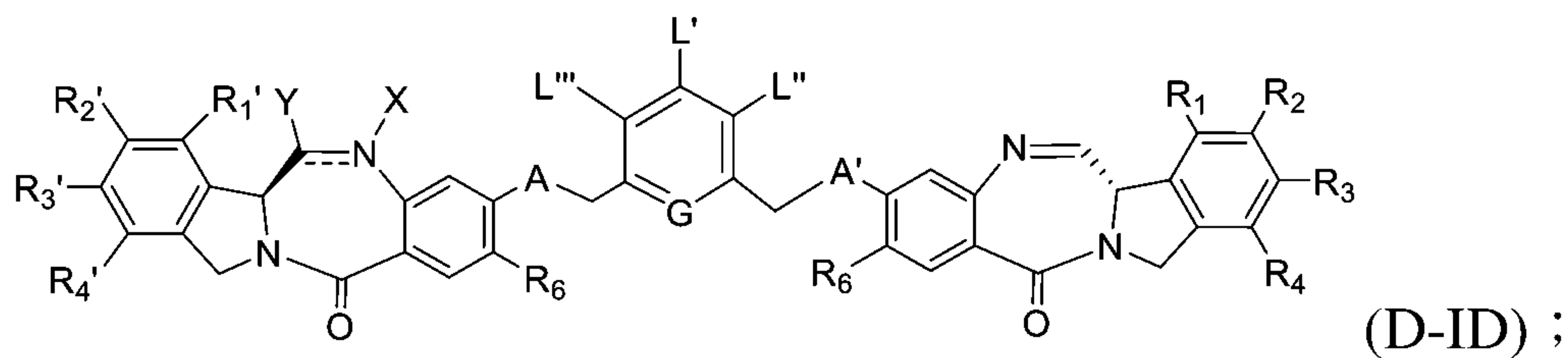
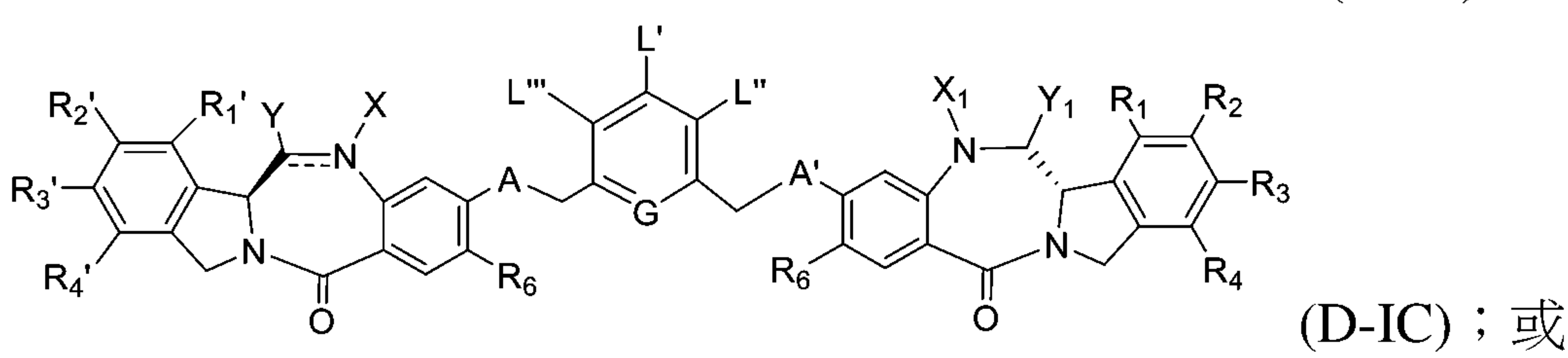
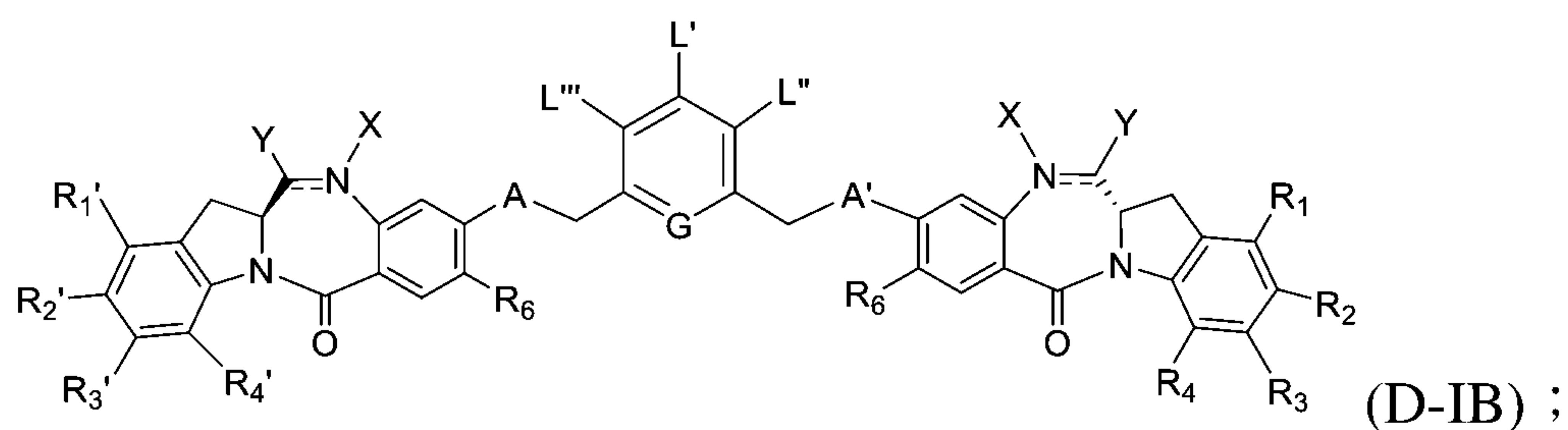


表示之核心結構，其可視情況經取代。

【0324】 在某些實施例中，D 為類美登素化合物。

【0325】 在第一特定實施例中，關於本文所述之方法(例如，第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九或第十實施例或其中所述之任何實施例之方法)中的式(I)化合物，D 係由下式或其醫藥學上可接受之鹽表示：

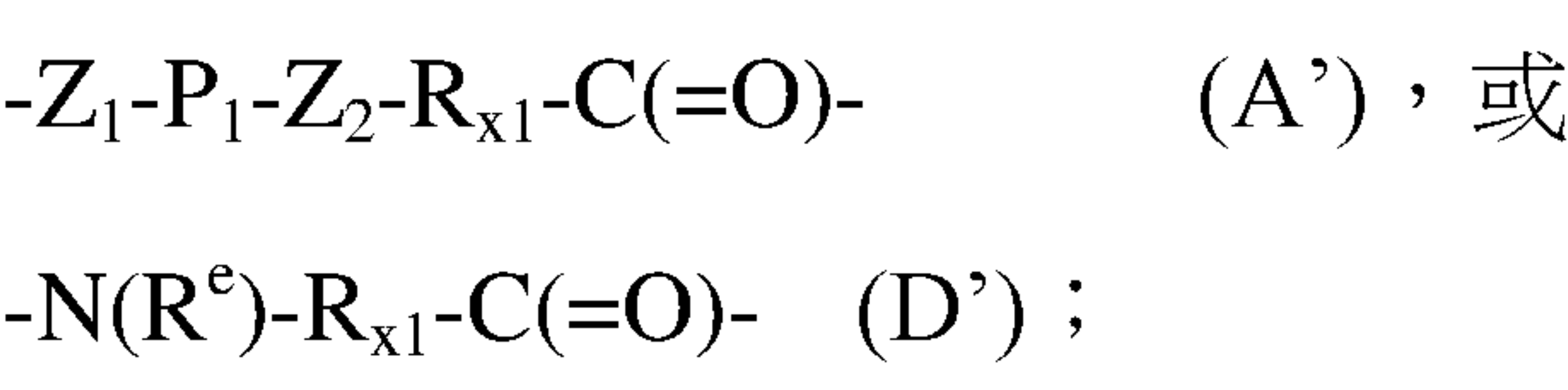




其中：

N 與 C 之間的雙線= $\equiv$ 表示單鍵或雙鍵，其限制條件在於當其為雙鍵時，X 不存在且 Y 為-H 或(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)烷基；且當其為單鍵時，X 為-H 或胺保護部分，Y 為-OH 或-SO<sub>3</sub>H 或其醫藥學上可接受之鹽；

L'、L''及 L'''之一係由下式表示：



且另兩者各自獨立地選自-H、視情況經取代之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基、聚乙二醇單元-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>e</sup>、鹵素、胍鹽[-NH(C=NH)NH<sub>2</sub>]、-OR、-NR'R''、-NO<sub>2</sub>、-NR'COR''、-SR、-SOR'、-SO<sub>2</sub>R'、-SO<sub>3</sub>H、-OSO<sub>3</sub>H、-SO<sub>2</sub>NR'R''、氰基、疊氮基、-COR'、-OCOR'及-OCONR'R''；

Z<sub>1</sub>及 Z<sub>2</sub>之一為-C(=O)-，且另一者為-NR<sub>5</sub>-；

P<sub>1</sub>為胺基酸殘基或含有 2 至 20 個胺基酸殘基之肽；

R<sub>x1</sub>為視情況經取代之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；

$R^e$  為-H、直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基或 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$ ，其中  $R^k$  為-H、具有 1 至 6 個碳原子、視情況攜帶二級胺基(例如-NHR<sup>101</sup>)或三級胺基 $(-NR^{101}R^{102})$ 之直鏈、分支鏈環狀烷基、或 5 員或 6 員含氮雜環，其中  $R^{101}$  及  $R^{102}$  各自獨立地為直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；

$R$  在每次出現時係獨立地選自由-H、視情況經取代之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基、聚乙二醇單元 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$ 、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獨立地選自氮、氧及硫之一或多個雜原子之 5 員至 18 員雜芳基環或視情況經取代的含有獨立地選自 O、S、N 及 P 之 1 至 6 個雜原子之 3 員至 18 員雜環組成之群；

$R'$  及  $R''$  係各自獨立地選自-H、-OH、-OR、-NHR、-NR<sub>2</sub>、-COR、視情況經取代之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基、聚乙二醇單元 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$  及視情況經取代的具有獨立地選自 O、S、N 及 P 之 1 至 6 個雜原子之 3 員至 18 員雜環；

$R^c$  為-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；

$n$  為整數 1 至 24；

$X_1$  係選自-H、胺保護基、視情況經取代之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基、聚乙二醇單元 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$ 、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獨立地選自氮、氧及硫之一或多個雜原子之 5 員至 18 員雜芳基環及視情況經取代的含有獨立地選自 O、S、N 及 P 之 1 至 6 個雜原子之 3 員至 18 員雜環；

$Y_1$  係選自-H、側氧基、視情況經取代之直鏈、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獨立地選自氮、氧及硫之一或多個雜原子之 5 員至 18 員雜芳基環、視情況經取代的具有 1 至 6 個雜原

子之 3 員至 18 員雜環；

$R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_1'$ 、 $R_2'$ 、 $R_3'$ 及  $R_4'$ 係各自獨立地選自由-H、視情況經取代之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基、聚乙二醇單元- $(CH_2CH_2O)_n-R^c$ 、鹵素、胍鹽 $[-NH(C=NH)NH_2]$ 、-OR、-NR'R''、-NO<sub>2</sub>、-NCO、-NR'COR''、-SR、-SOR'、-SO<sub>2</sub>R'、-SO<sub>3</sub>H、-OSO<sub>3</sub>H、-SO<sub>2</sub>NR'R''、氰基、疊氮基、-COR'、-OCOR'及 -OCONR'R''組成之群；

$R_6$ 為-H、-R、-OR、-SR、-NR'R''、-NO<sub>2</sub>或鹵素；

G為-CH-或-N-；

A及 A'為相同或不同的，且係獨立地選自-O-、側氧基(-C(=O)-)、-CRR'O-、-CRR'-、-S-、-CRR'S-、-NR<sub>5</sub>及-CRR'N(R<sub>5</sub>)-；且

$R_5$ 在每次出現時獨立地為-H或視情況經取代之直鏈或分支鏈烷基。

【0326】 在某些實施例中，D係由式(D-IA)或其醫藥學上可接受之鹽表示。

【0327】 在某些實施例中，關於式(D-IA)、(D-IB)、(D-IC)或(D-ID)， $X_1$ 為-H、-OH、(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基、鹵基(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基或苯基； $Y_1'$ 為-H、側氧基、(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基或鹵基(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基，且剩餘變數係如第一特定實施例或其中所述之任何實施例所述。更特定言之， $X_1$ 為-H、-OH或-Me；且  $Y_1$ 為-H或側氧基。甚至更特定言之， $X_1$ 為-H；且  $Y_1$ 為-H。

【0328】 在某些實施例中，關於式(D-IA)、(D-IB)、(D-IC)或(D-ID)，A及 A'為相同或不同的，且係選自-O-及-S-，且剩餘變數係如第一特定實施例或其中所述之任何實施例所述。更特定言之，A及 A'為-O-。

【0329】 在某些實施例中，關於式(D-IA)、(D-IB)、(D-IC)或(D-ID)， $R_6$ 為-OMe，且剩餘變數係如第一特定實施例或其中所述之任何實施例所述。

【0330】 在某些實施例中，關於式(D-IA)、(D-IB)、(D-IC)或(D-ID)， $R_1$ 、 $R_2$ 、

$R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_1'$ 、 $R_2'$ 、 $R_3'$ 及 $R_4'$ 係獨立地為-H、鹵素、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{OH}$ 、 $(\text{C}_1\text{-C}_3)$ 烷基、鹵基 $(\text{C}_1\text{-C}_3)$ 烷基或 $(\text{C}_1\text{-C}_3)$ 烷氧基，且剩餘變數係如第一特定實施例或其中所述之任何實施例所述。更特定言之， $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_1'$ 、 $R_2'$ 、 $R_3'$ 及 $R_4'$ 均為-H。

【0331】 在某些實施例中，關於式(D-IA)、(D-IB)、(D-IC)或(D-ID)， $R$ 、 $R'$ 、 $R''$ 及 $R_5$ 各自獨立地為-H或 $(\text{C}_1\text{-C}_3)$ 烷基，且剩餘變數係如第一特定實施例或其中所述之任何實施例所述。

【0332】 在某些實施例中，關於式(D-IA)、(D-IB)、(D-IC)或(D-ID)， $G$ 為-CH-。

【0333】 在某些實施例中， $D$ 係由式(D-IA)、(D-IB)、(D-IC)或(D-ID)表示，其中：

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

$R_6$ 為-OMe；

$X_1$ 及 $Y_1$ 均為-H；

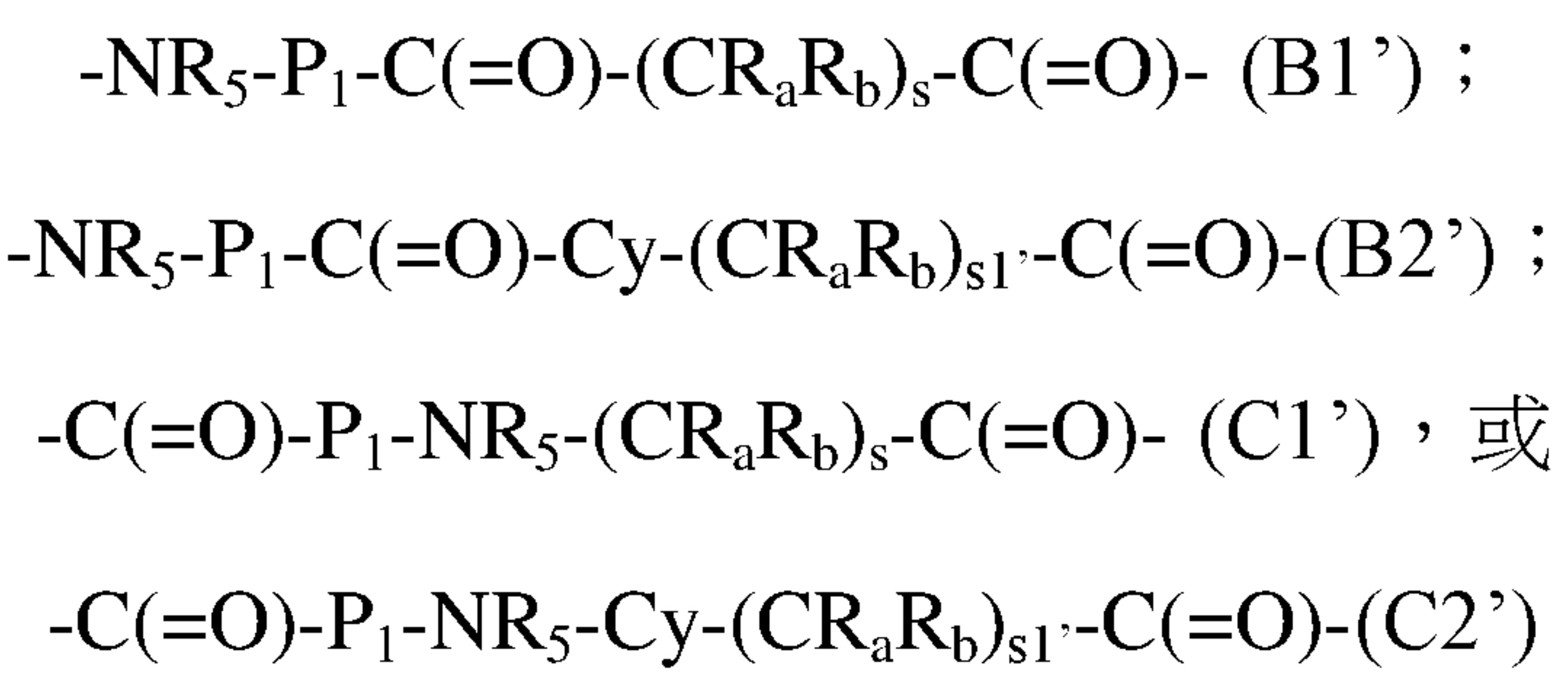
$A$ 及 $A'$ 為-O-；且剩餘變數係如第一特定實施例或其中所述之任何實施例所述。

在某些實施例中， $G$ 為-CH-；且剩餘變數係如上文所述。

【0334】 在第二特定實施例中，關於式(D-IA)、(D-IB)、(D-IC)或(D-ID)， $L'$ 、 $L''$ 及 $L'''$ 之一係由式(A')或(D')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、 $-\text{OH}$ 、 $(\text{C}_1\text{-C}_6)$ 烷氧基或 $-\text{NO}_2$ ，且剩餘變數係如第一特定實施例或其中所述之任何實施例所述。在某些實施例中， $L'$ 係由式(A')表示；且 $L''$ 及 $L'''$ 均為-H。在其他實施例中， $L'$ 係由式(D')表示；且 $L''$ 及 $L'''$ 均為-H。

【0335】 在某些實施例中，式(A')或(D')中之 $R_{x1}$ 為具有1至6個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基，其視情況經鹵素、 $-\text{OH}$ 、 $(\text{C}_1\text{-C}_3)$ 烷基、 $(\text{C}_1\text{-C}_3)$ 烷氧基、鹵基 $(\text{C}_1\text{-C}_3)$ 烷基或帶電取代基或可離子化基團 $Q$ 取代；且剩餘變數係如第一或第二特定實施例或其中所述之任何實施例所述。

【0336】 在第三特定實施例中，關於第一或第二特定實施例或其中所述之任何實施例中所述之式(D-IA)、(D-IB)、(D-IC)或(D-ID)，L'係由下式表示：



其中：

R<sub>a</sub> 及 R<sub>b</sub> 在每次出現時各自獨立地為-H、(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基或帶電取代基或可離子化基團 Q；

s 為整數 1 至 6；

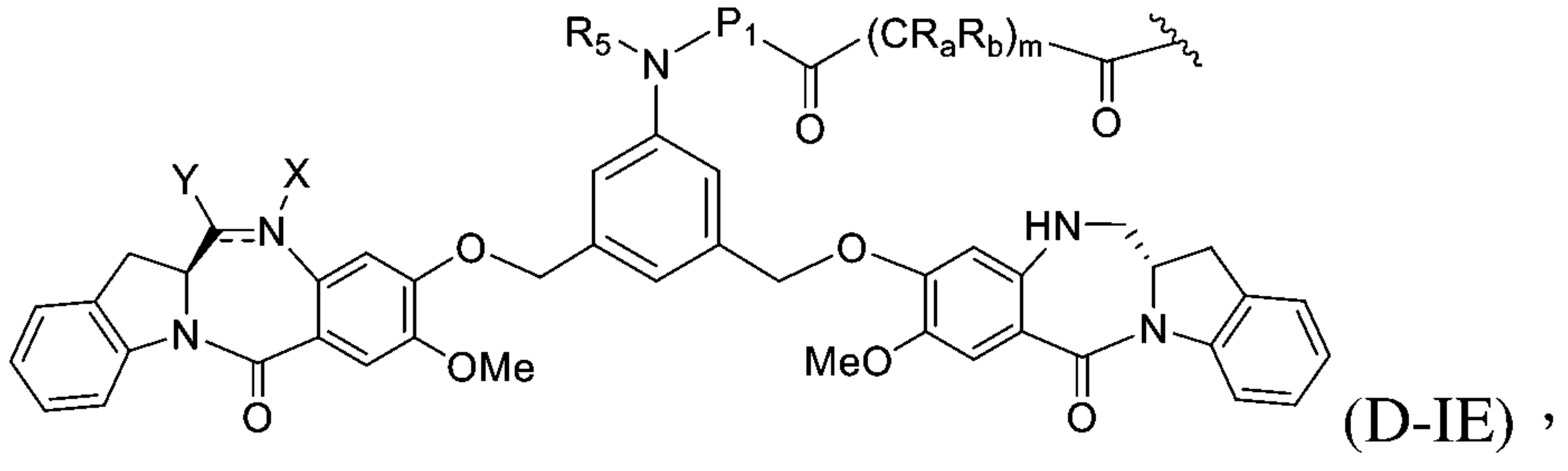
s1' 為 0 或整數 1 至 6；

Cy 為具有 5 或 6 個環碳原子之環狀烷基，其視情況經鹵素、-OH、(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基、(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷氧基或鹵基(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基取代；且

剩餘變數係如第一或第二特定實施例或其中所述之任何實施例所述。

【0337】 在某些實施例中，式(B2')及(C2')中之 Cy 為環己烷；且 s1' 為 0 或 1。

【0338】 在第四特定實施例中，關於式(I)化合物，D 係由下式或其醫藥學上可接受之鹽表示：



且剩餘變數係如第三特定實施例或其中所述之任何實施例所述。

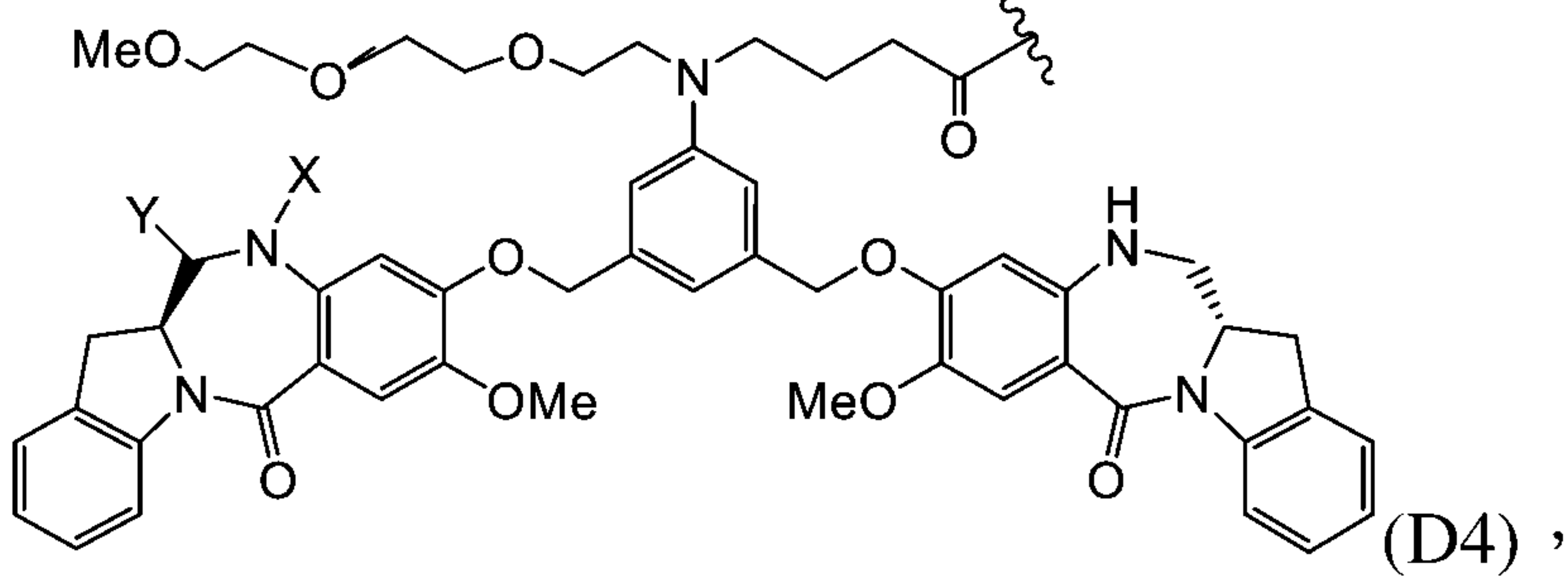
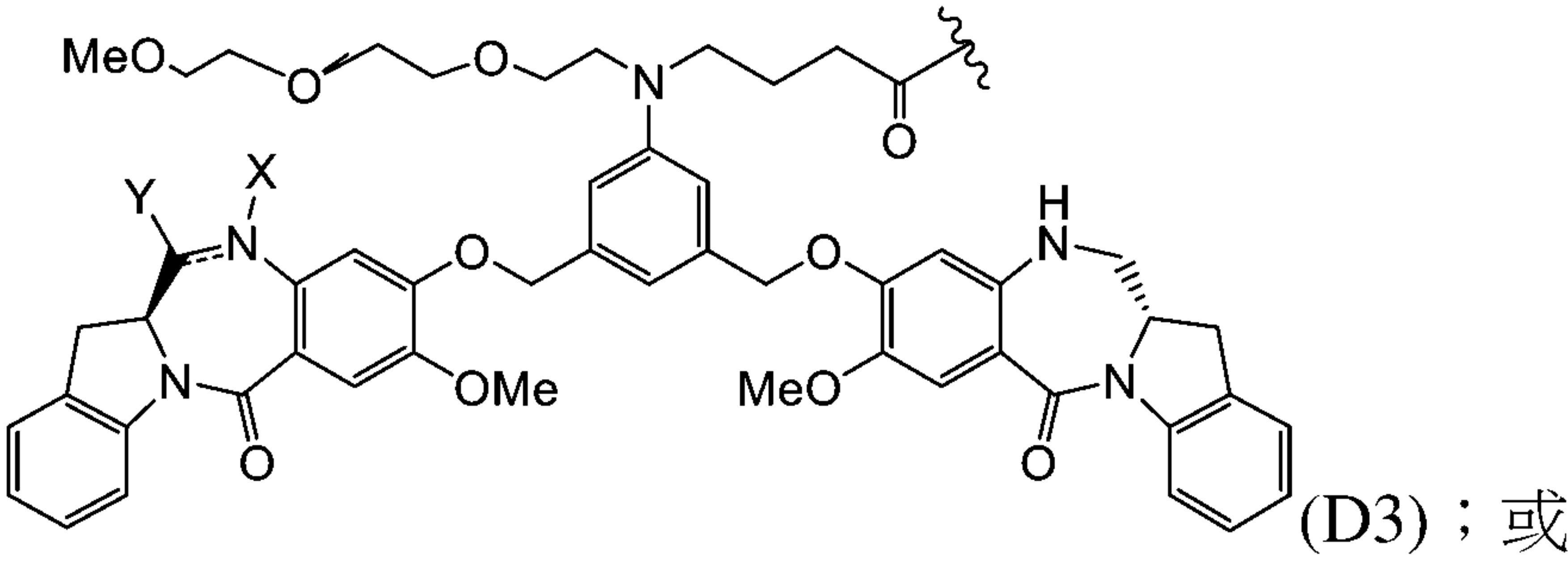
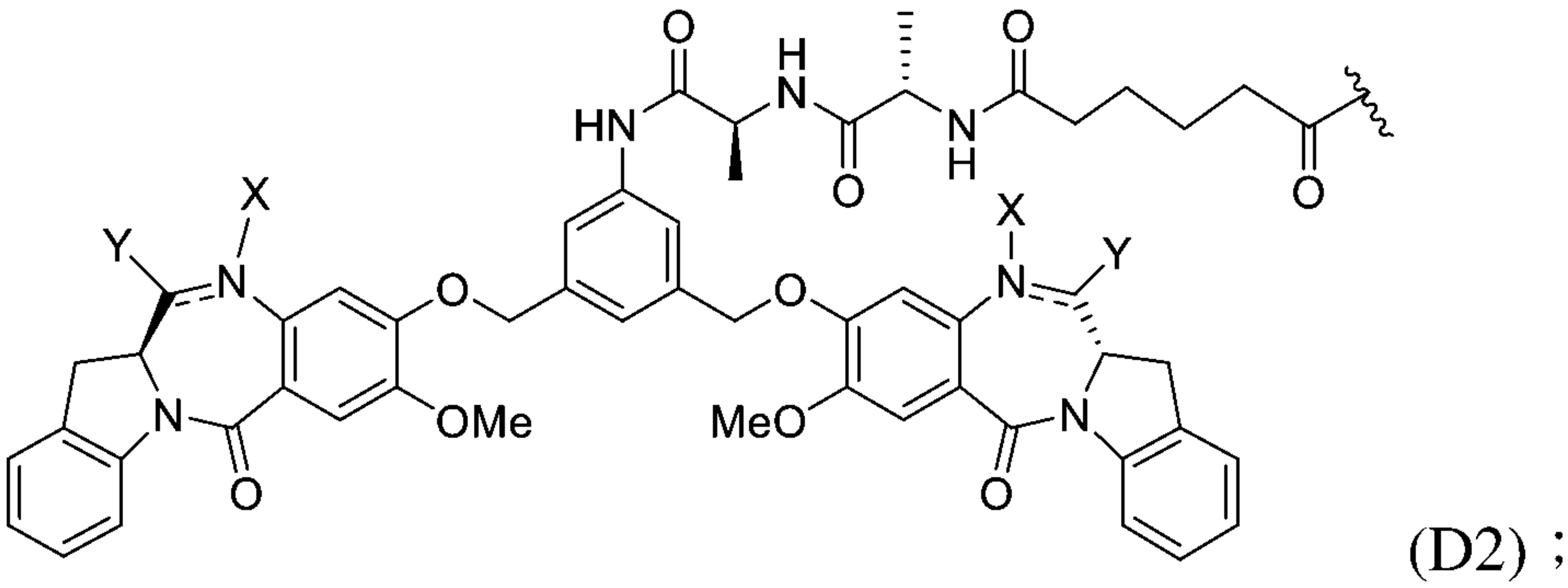
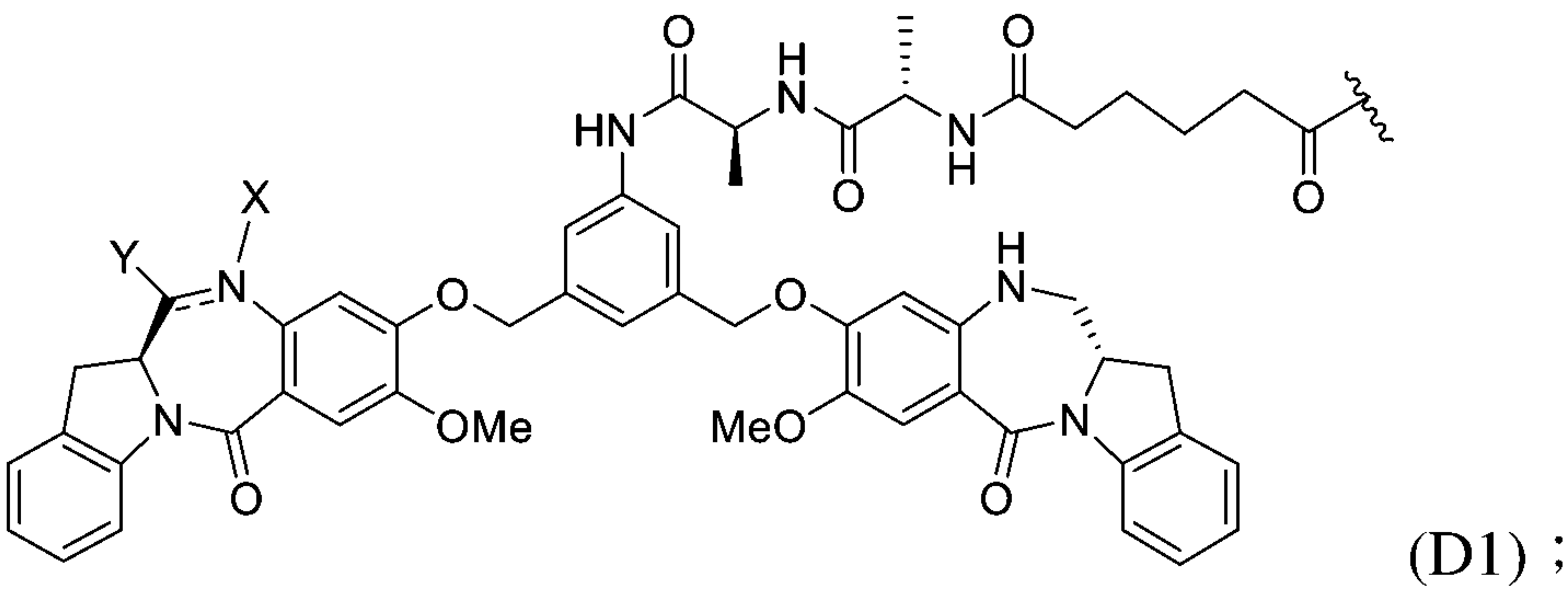
【0339】 在第五特定實施例中，關於式(D-IA)、(D-IB)、(D-IC)、(D-ID)或(D-IE)，R<sub>a</sub> 及 R<sub>b</sub> 均為 H；且 R<sub>5</sub> 為 H 或 Me，且剩餘變數係如第三或第四特定實施例或其

中所述之任何實施例所述。

【0340】 在某些實施例中，關於第一、第二、第三或第四特定實施例或其中所述之任何實施例所述的化合物，該帶電取代基或可離子化基團 Q 為 i)  $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{Z}'-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{OPO}_3\text{H}_2$ 、 $-\text{Z}'-\text{OPO}_3\text{H}_2$ 、 $-\text{PO}_3\text{H}_2$ 、 $-\text{Z}'-\text{PO}_3\text{H}_2$ 、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{Z}'-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NR}_{11}\text{R}_{12}$  或  $-\text{Z}'-\text{NR}_{11}\text{R}_{12}$  或其醫藥學上可接受之鹽；或者，ii)  $-\text{N}^+\text{R}_{14}\text{R}_{15}\text{R}_{16}\text{X}^-$  或  $-\text{Z}'-\text{N}^+\text{R}_{14}\text{R}_{15}\text{R}_{16}\text{X}^-$ ；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； $\text{R}_{14}$  至  $\text{R}_{16}$  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。更特定言之，Q 為  $-\text{SO}_3\text{H}$  或其醫藥學上可接受之鹽。

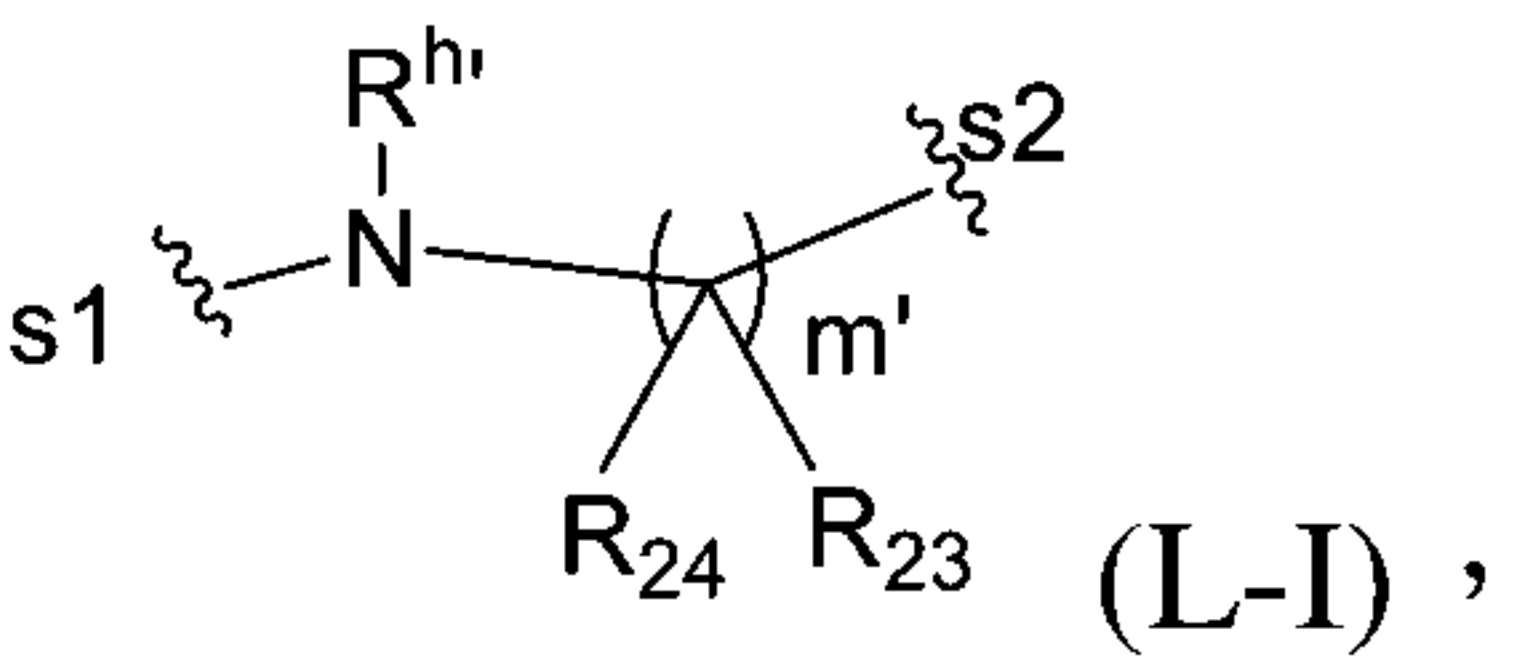
【0341】 在第六特定實施例中，關於式(D-IA)、(D-IB)、(D-IC)、(D-ID)或(D-IE)， $\text{P}_1$  為含有 2 至 10 個胺基酸殘基之肽，且剩餘變數係如第一、第二、第三、第四或第五特定實施例或其中所述之任何實施例所述。在某些實施例中， $\text{P}_1$  為含有 2 至 5 個胺基酸殘基之肽。在某些實施例中， $\text{P}_1$  為可藉由蛋白酶裂解之肽。更特定言之， $\text{P}_1$  為可藉由在腫瘤組織中表現之蛋白酶裂解之肽。在某些實施例中， $\text{P}_1$  為 Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe- $\text{N}^9$ -甲苯磺醯基-Arg、Phe- $\text{N}^9$ -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 (SEQ ID NO: 56)、 $\beta$ -Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 57)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 58)、Val-Arg、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、Gln-Val、Asn-Ala、Gln-Phe 及 Gln-Ala。更特定言之， $\text{P}_1$  為 Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala 或 D-Ala-D-Ala。

【0342】 在第七特定實施例中，關於式(I)化合物，D 係由以下結構式表示：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中 N 與 C 之間的雙線＝表示單鍵或雙鍵，其限制條件在於當其為雙鍵時，X 不存在且 Y 為-H；且當其為單鍵時，X 為-H，Y 為-SO<sub>3</sub>H 或其醫藥學上可接受之鹽，且剩餘變數係如第一特定實施例或其中所述之任何實施例所述。

【0343】 在第八特定實施例中，關於本文所述之方法(例如，第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九或第十實施例或其中所述之任何實施例之方法)中的式(I)化合物，-L-係由以下結構式表示：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

s1 為共價連接至 D 之位點；s2 為共價連接至順丁烯二醯亞胺基之位點；

R<sub>23</sub> 及 R<sub>24</sub> 在每次出現時獨立地為 H 或視情況經取代之烷基；

m' 為 0 與 10 之間的整數；

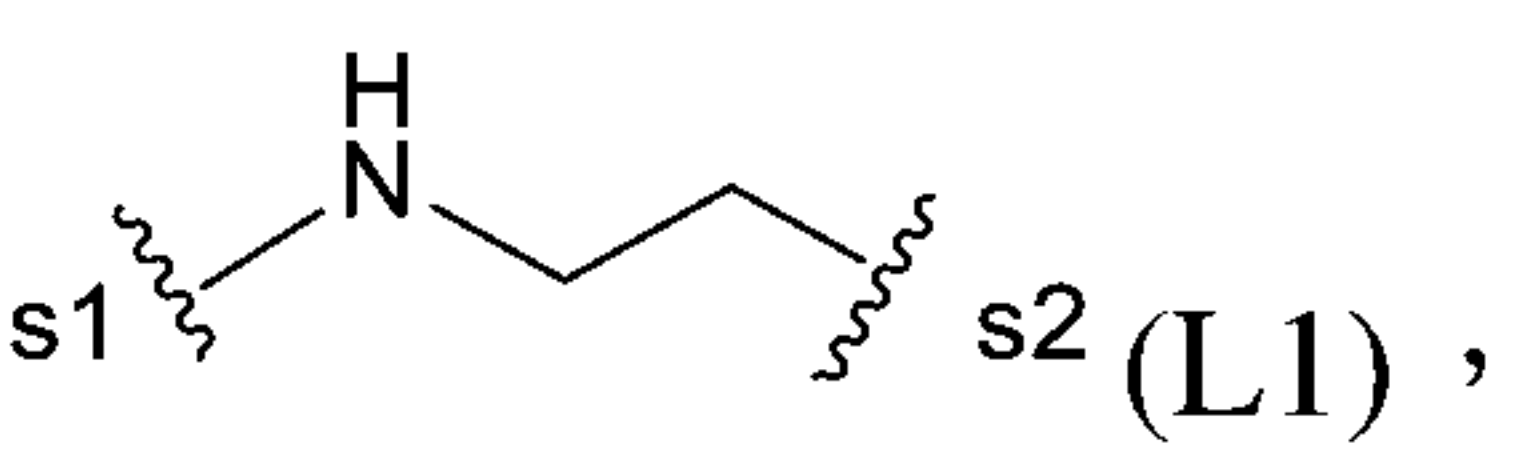
R<sup>h'</sup> 為 H 或視情況經取代之烷基；

且剩餘變數係如第一、第二、第三、第四、第五、第六或第七特定實施例或其中所述之任何實施例所述。

【0344】 在某些實施例中，R<sub>23</sub> 及 R<sub>24</sub> 均為 H；且 m' 為 1 與 6 之間的整數，且剩餘變數係如第八特定實施例或其中所述之任何實施例所述。

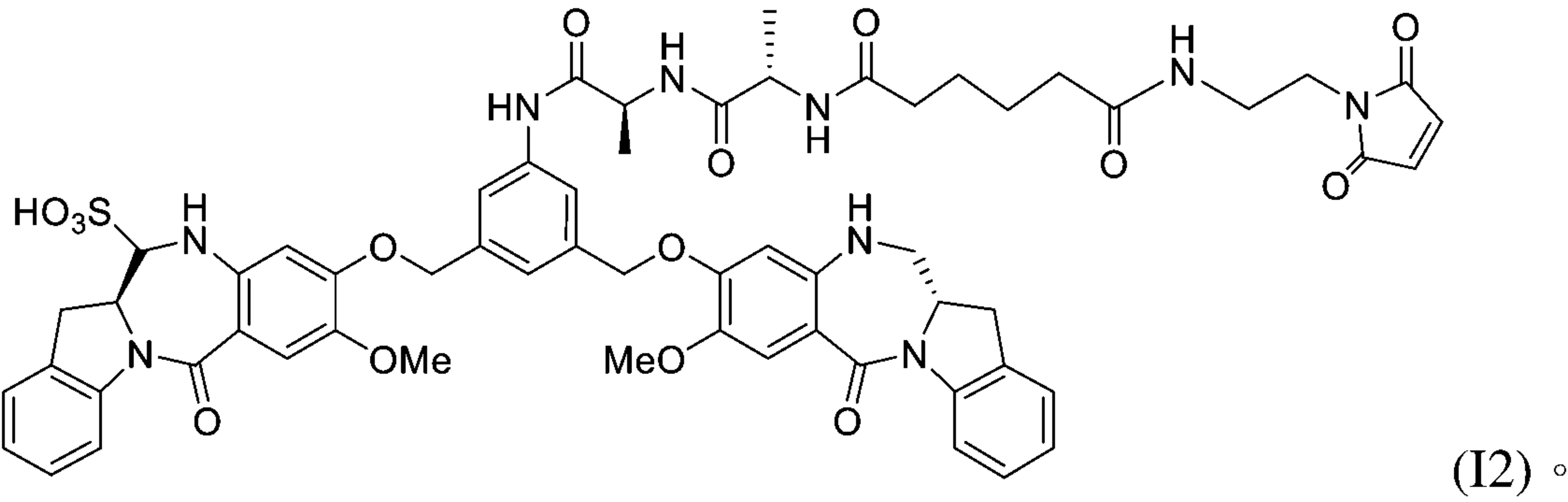
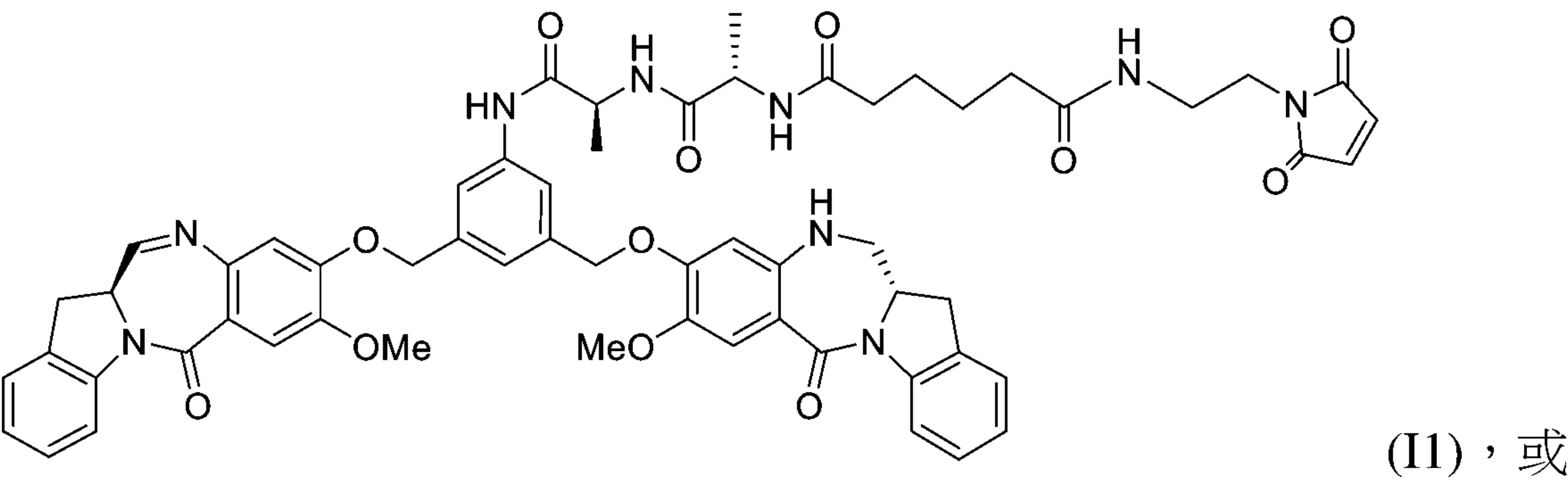
【0345】 在某些實施例中，R<sup>h'</sup> 為 H，且剩餘變數係如第八特定實施例或其中所述之任何實施例所述。

【0346】 在第九特定實施例中，關於本文所述之方法(例如，第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九或第十實施例或其中所述之任何實施例之方法)中的式(I)化合物，-L-係由以下結構式表示：

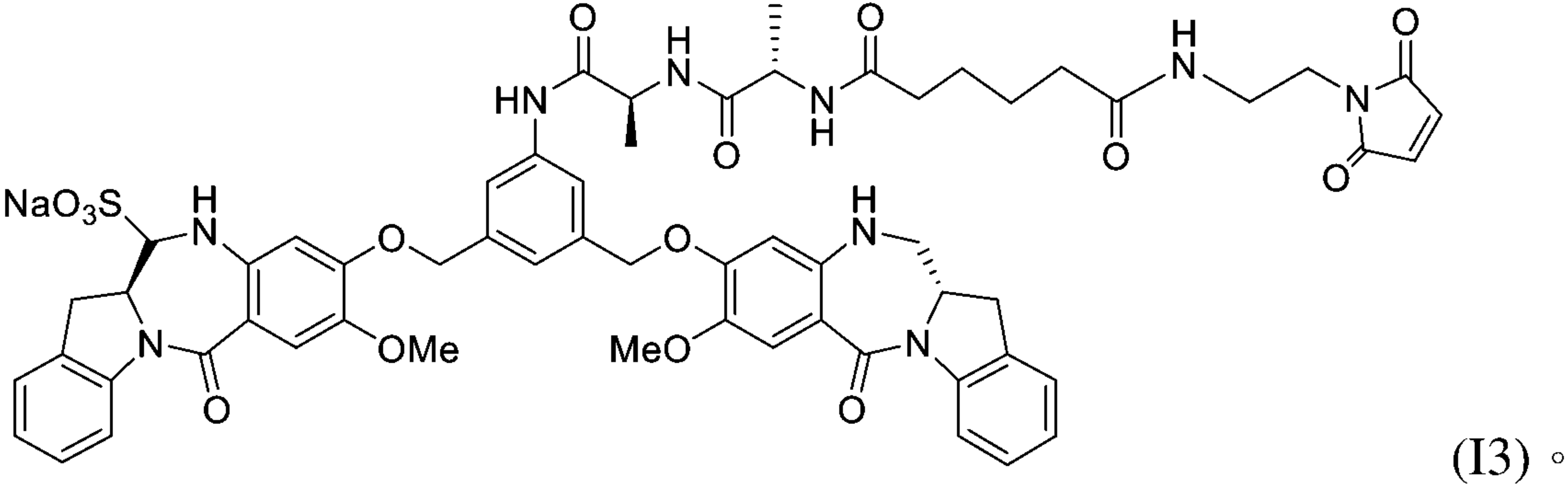


或其醫藥學上可接受之鹽，且剩餘變數係如第一、第二、第三、第四、第五、第六或第七特定實施例或其中所述之任何實施例所述。

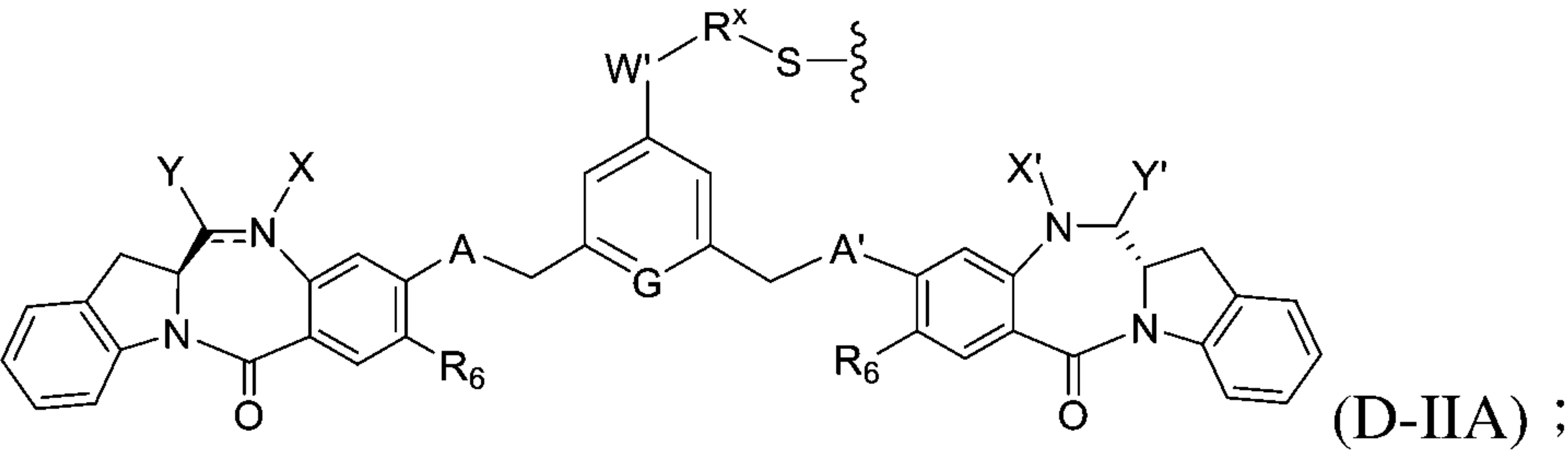
【0347】 在第十特定實施例中，本文所述之方法(例如，第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九或第十實施例或其中所述之任何實施例之方法)中的式(I)化合物係由下式或其醫藥學上可接受之鹽表示：

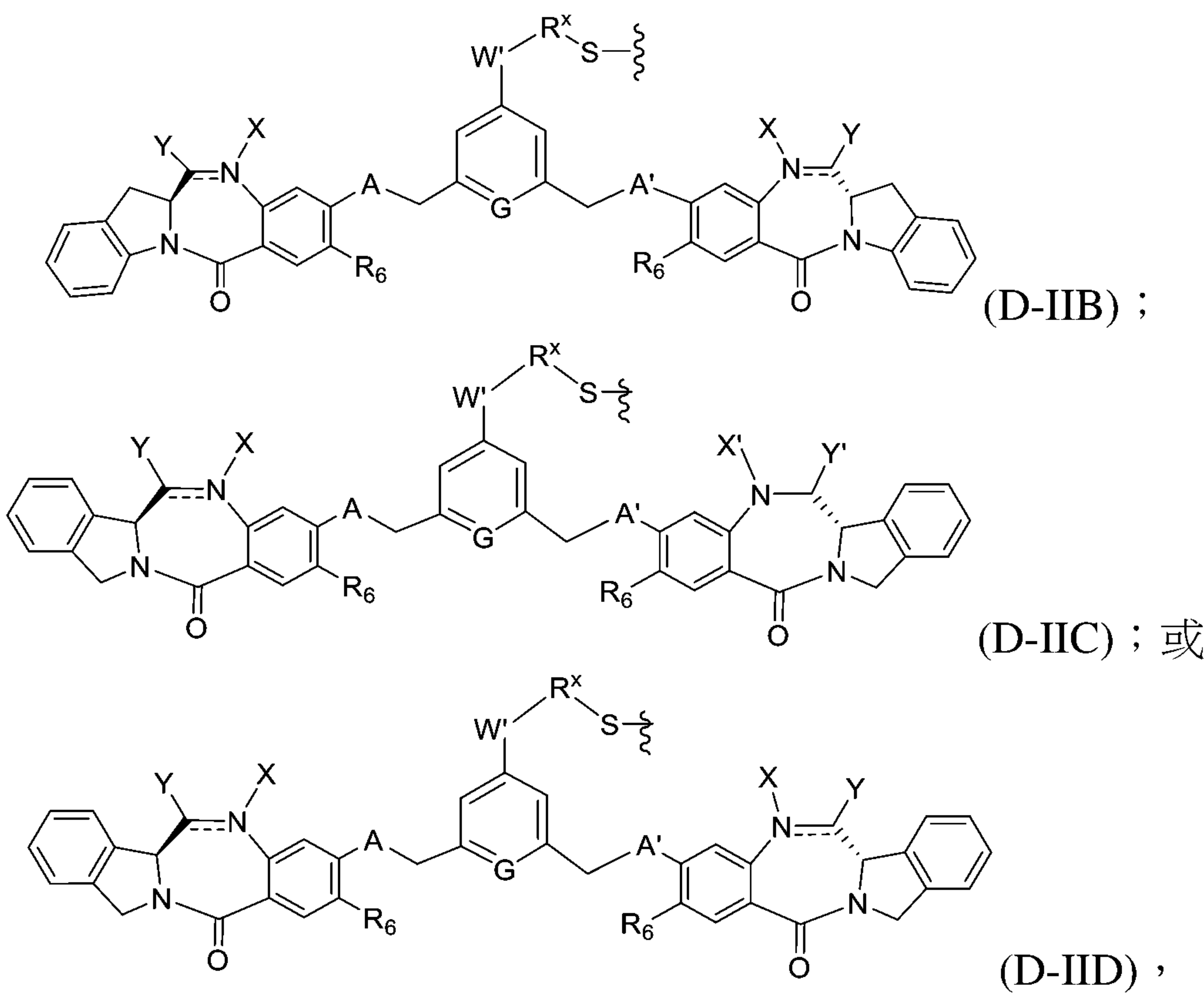


【0348】 在某些實施例中，式(I)化合物係由下式表示：



【0349】 在第十一特定實施例中，關於本文所述之方法(例如，第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九或第十實施例或其中所述之任何實施例之方法)中的式(I)化合物，D 係由下式或其醫藥學上可接受之鹽表示：





其中：

N 與 C 之間的雙線=表示單鍵或雙鍵，其限制條件在於當其為雙鍵時，X 不存在且 Y 為-H 或(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)烷基；且當其為單鍵時，X 為-H 或胺保護部分，Y 為-OH 或-SO<sub>3</sub>H 或其醫藥學上可接受之鹽；

X'係選自由-H、-OH、經取代或未經取代之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基、苯基及胺保護基組成之群；

Y'係選自由-H、側氧基、經取代或未經取代之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基組成之群；

A 及 A'係選自-O-及-S-；

W'不存在，或係選自-O-、-N(R<sup>e</sup>)-、-N(R<sup>e</sup>)-C(=O)-、-N(C(=O)R<sup>e</sup>)-、-S-或-CH<sub>2</sub>-S-、-CH<sub>2</sub>NR<sup>e</sup>-；

R<sup>x</sup>不存在或係選自直鏈、分支鏈或環狀烷基；

R<sup>e</sup> 為-H、直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基或-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>，其中 R<sup>k</sup>

為-H、具有 1 至 6 個碳原子、視情況攜帶二級胺基(例如-NHR<sup>101</sup>)或三級胺基(-NR<sup>101</sup>R<sup>102</sup>)之直鏈、分支鏈環狀烷基、或 5 員或 6 員含氮雜環，其中 R<sup>101</sup> 及 R<sup>102</sup> 各自獨立地為直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；

n 為整數 1 至 24；

G 係選自-CH-或-N-；

R<sub>6</sub> 為-H、-R、-OR、-SR、-NR'R''、-NO<sub>2</sub>或鹵素；且

R 在每次出現時係獨立地選自由-H、視情況經取代之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基、聚乙二醇單元-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>、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獨立地選自氮、氧及硫之一或多個雜原子之 5 員至 18 員雜芳基環或視情況經取代的含有獨立地選自 O、S、N 及 P 之 1 至 6 個雜原子之 3 員至 18 員雜環組成之群；

R'及 R''係各自獨立地選自-H、-OH、-OR、-NHR、-NR<sub>2</sub>、-COR、視情況經取代之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基、聚乙二醇單元-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>及視情況經取代的具有獨立地選自 O、S、N 及 P 之 1 至 6 個雜原子之 3 員至 18 員雜環；

R<sup>c</sup> 為-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；且 L 為連接體。

【0350】 在某些實施例中，D 係由式(D-IIA)或其醫藥學上可接受之鹽表示。

【0351】 在某些實施例中，D 係由式(D-IIA)、(D-IIB)、(D-IIC)或(D-IID)表示，其中：

X'及 Y'均為-H；

A 及 A'均為-O-；

R<sub>6</sub> 為-OMe；

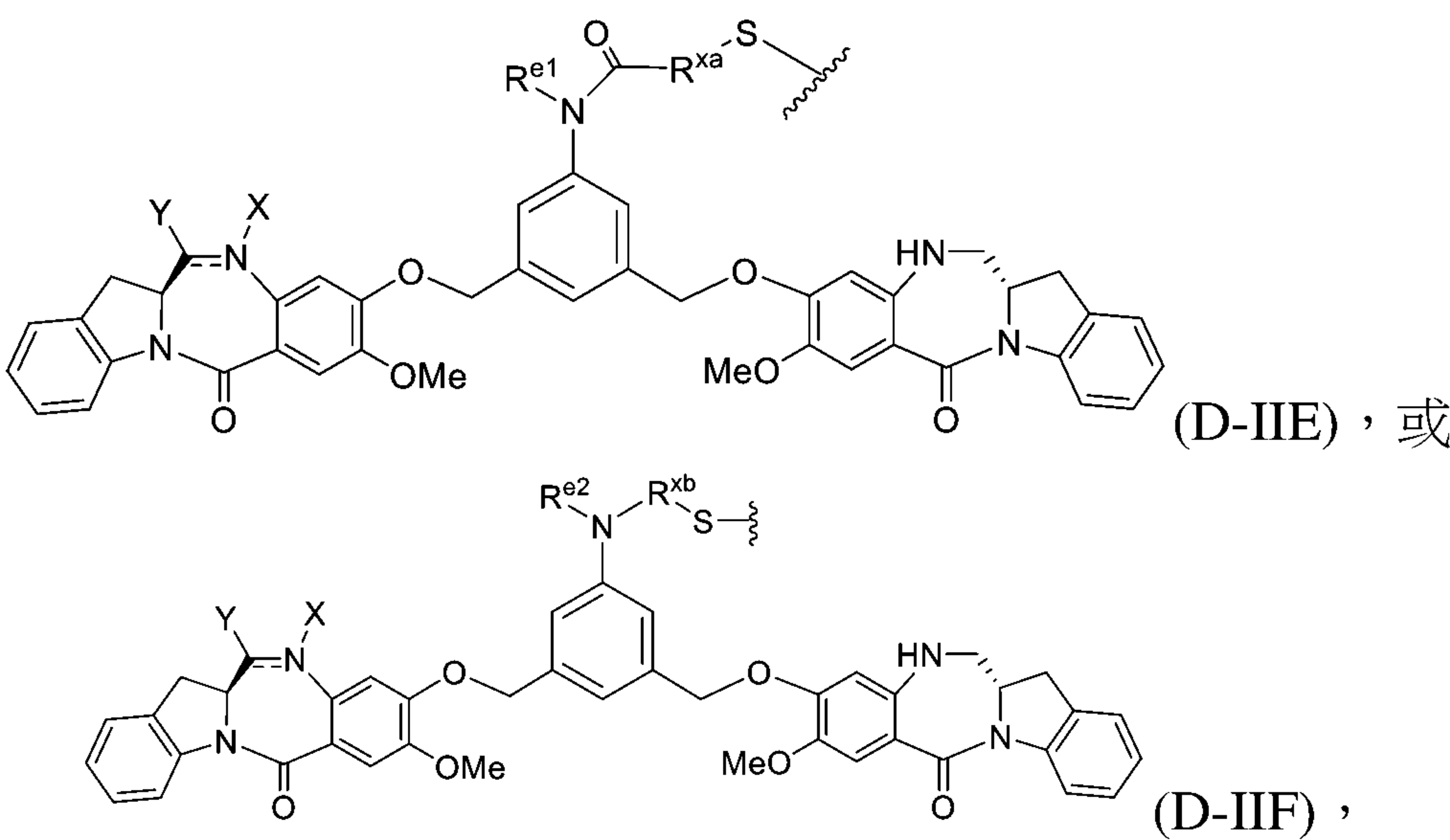
W' 為-N(R<sup>e</sup>)-或-N(R<sup>e</sup>)-C(=O)- ；

R<sup>e</sup> 為-H、具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支鏈烷基或-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>，其中 R<sup>k</sup> 為-H、具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支鏈烷基；

n 為整數 2 至 6；

R<sup>x</sup> 為具有 1 至 6 個碳原子之直鏈或分支鏈烷基；且剩餘變數係如第十一特定實施例或其中所述之任何實施例所述。

【0352】 在第十二特定實施例中，關於式(I)化合物，D 係由以下結構式表示：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

R<sup>e1</sup> 為 H 或(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基；

R<sup>xa</sup> 為(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基；

R<sup>e2</sup> 為-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>；

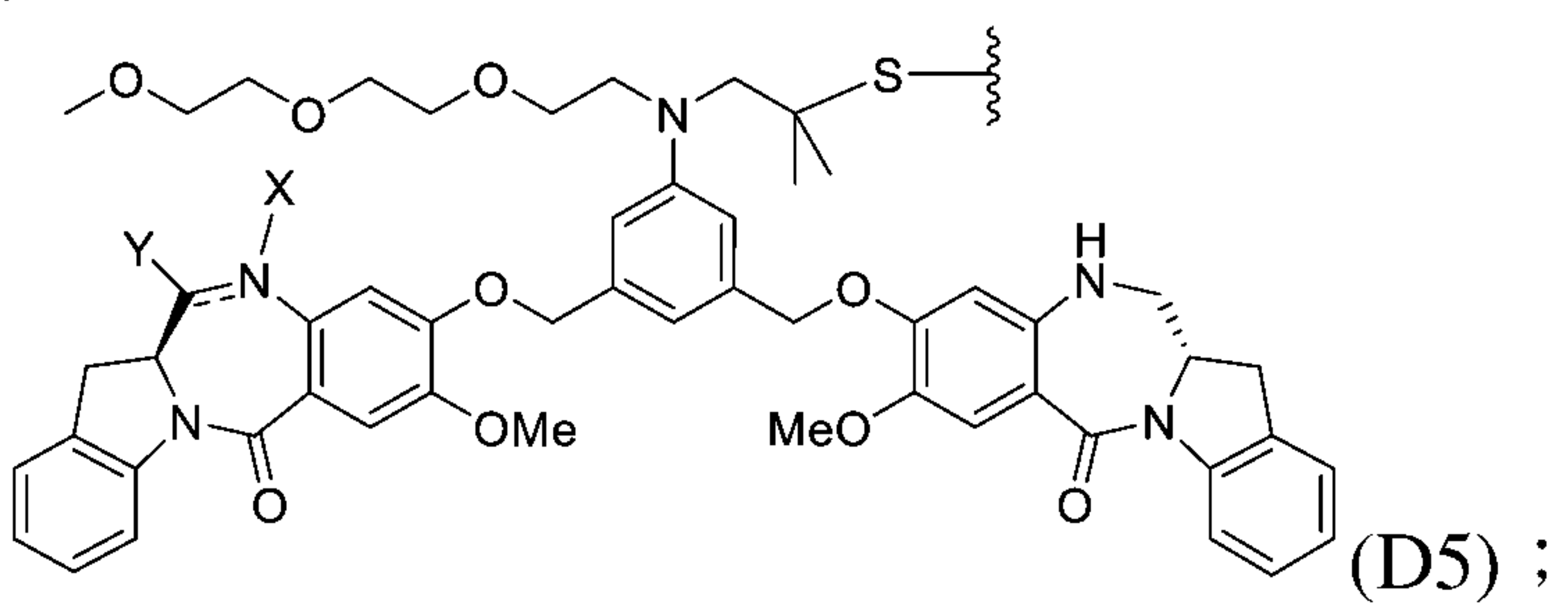
n 為整數 2 至 6；

R<sup>k</sup> 為-H 或-Me；

R<sup>xb</sup> 為(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基；且剩餘變數係如第十一特定實施例或其中所述之任何實施例所述。

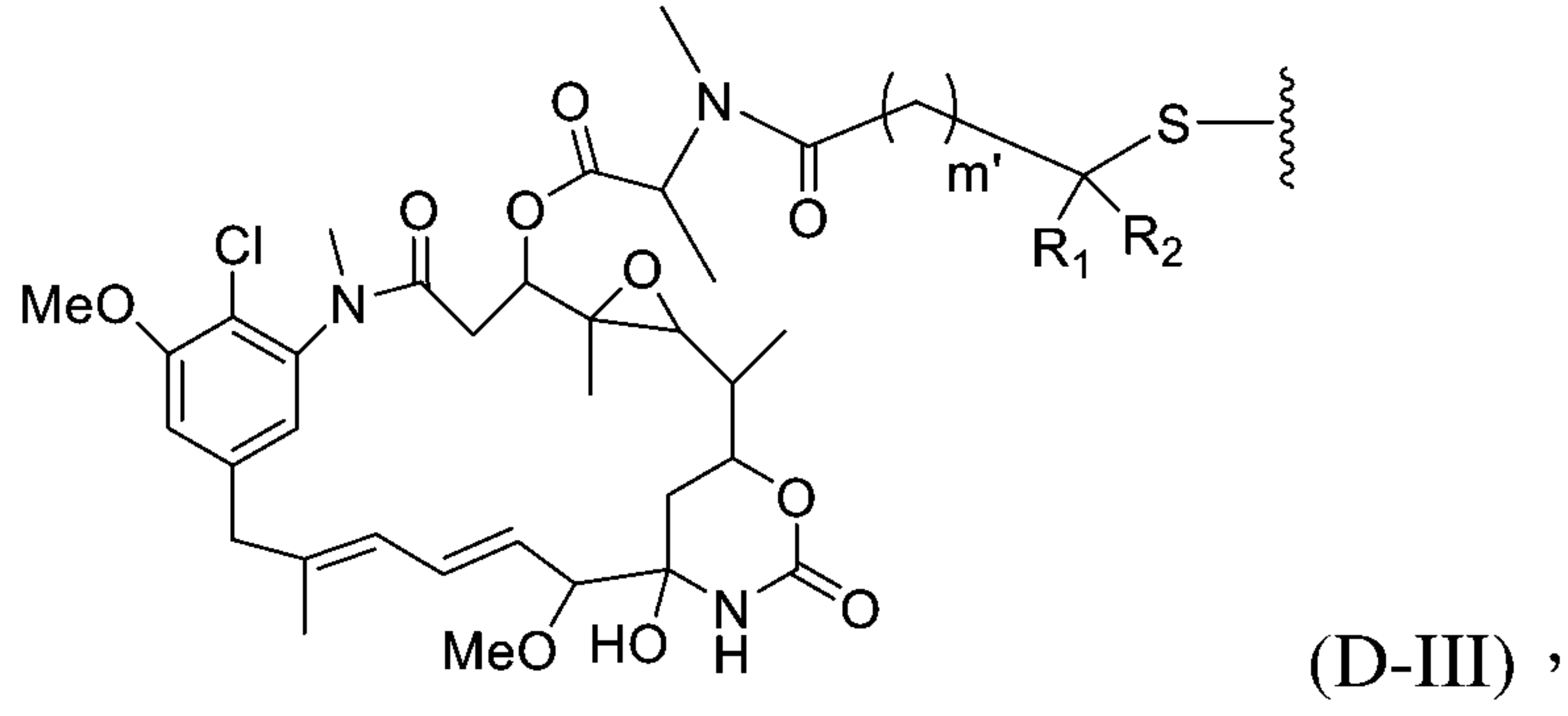
【0353】 在第十三特定實施例中，關於式(I)化合物，D 係由下式或其醫藥學

上可接受之鹽表示：



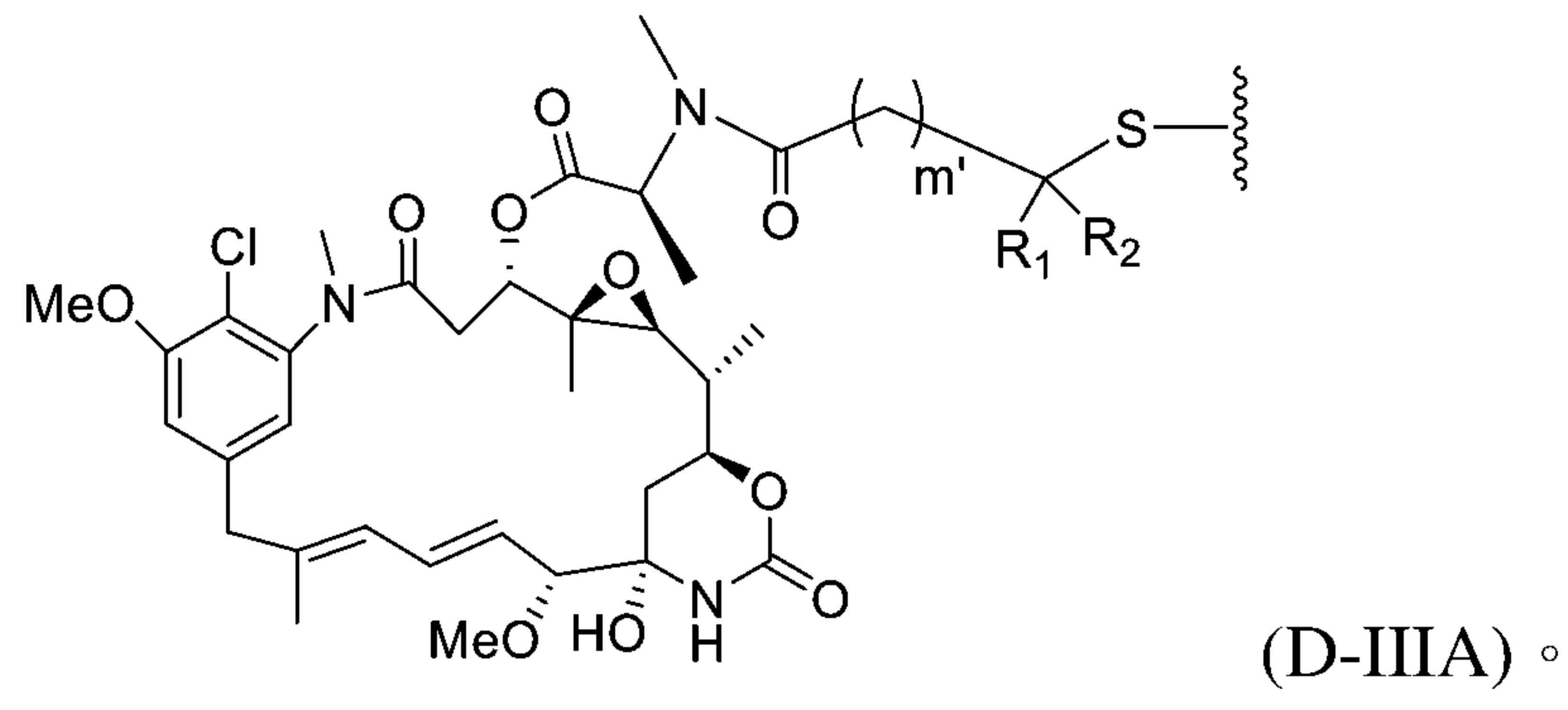
且剩餘變數係如第十一特定實施例或其中所述之任何實施例所述。

【0354】 在第十四特定實施例中，關於本文所述之方法(例如，第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九或第十實施例或其中所述之任何實施例之方法)中的式(I)化合物，D 係由下式表示：

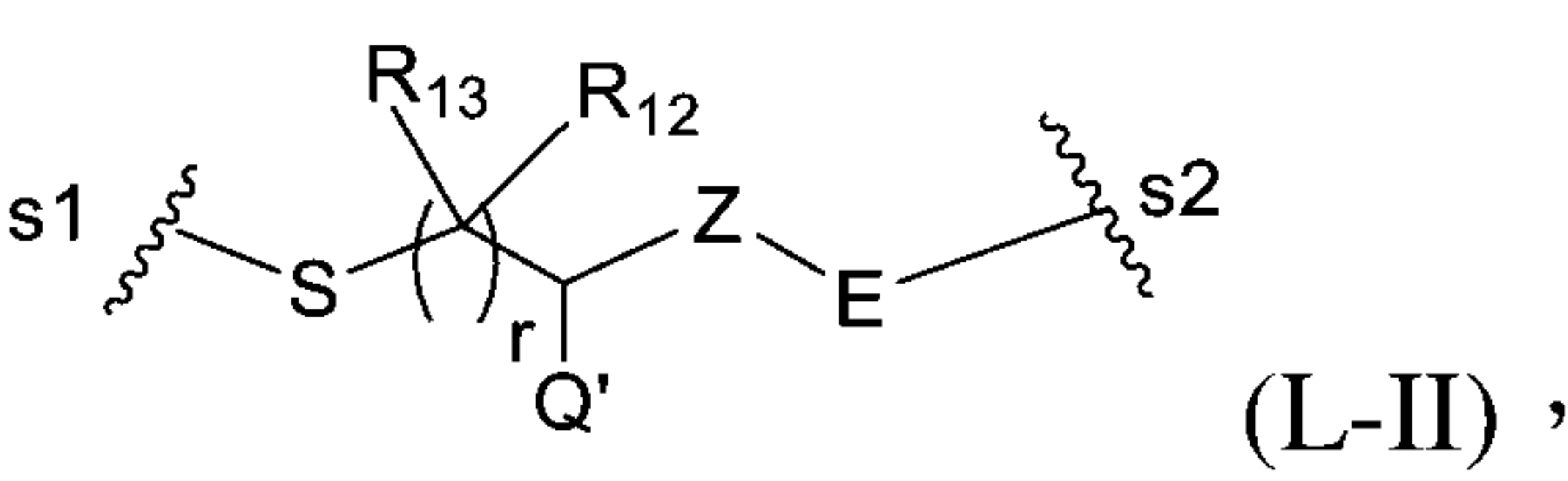


其中 m' 為 1 或 2；R<sub>1</sub> 及 R<sub>2</sub> 各自獨立地為-H 或(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基；且 L 為連接體。

【0355】 在某些實施例中，D 係由下式表示：



【0356】 在第十五特定實施例中，關於本文所述之方法(例如，第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九或第十實施例或其中所述之任何實施例之方法)中的式(I)化合物，L 係由以下結構式表示：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

s1 為共價連接至 D 之位點，且 s2 為共價連接至順丁烯二醯亞胺基之位點；

E 為-(CR<sub>10</sub>R<sub>11</sub>)<sub>q</sub>-、環烷基或環烷基烷基；

Z 係不存在、-SO<sub>2</sub>NR<sub>9</sub>-、-NR<sub>9</sub>SO<sub>2</sub>-、-C(=O)-NR<sub>9</sub>-、-NR<sub>9</sub>-C(=O)-、-C(=O)-O-、  
-O-C(=O)-、-C(=O)-NR<sub>9</sub>-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>p</sub>-、-NR<sub>9</sub>-C(=O)-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>p</sub>-、  
-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-C(=O)NR<sub>9</sub>-或-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-NR<sub>9</sub>-C(=O)-；

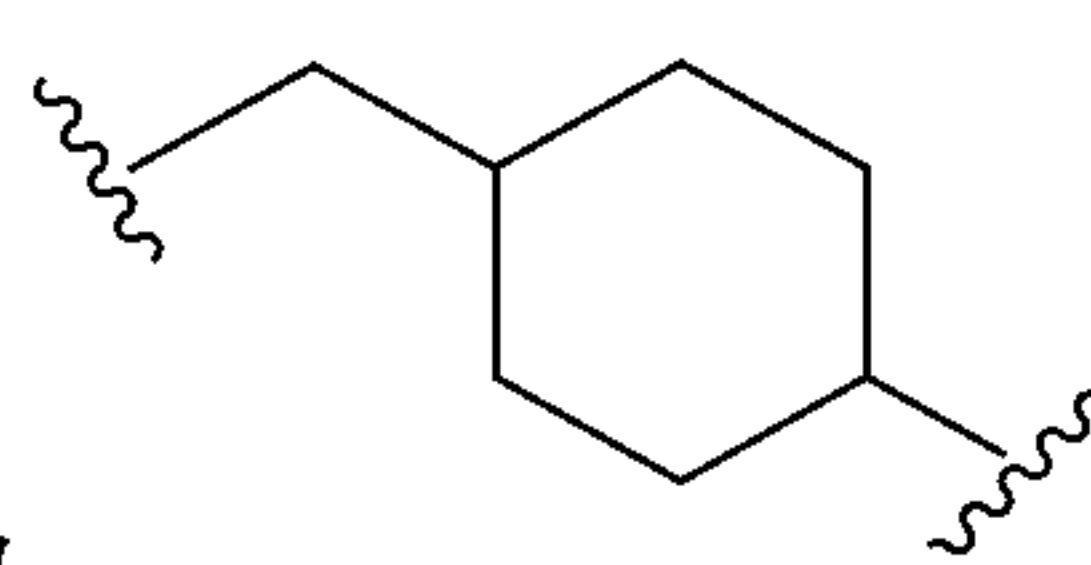
p 為整數 1 至 24；

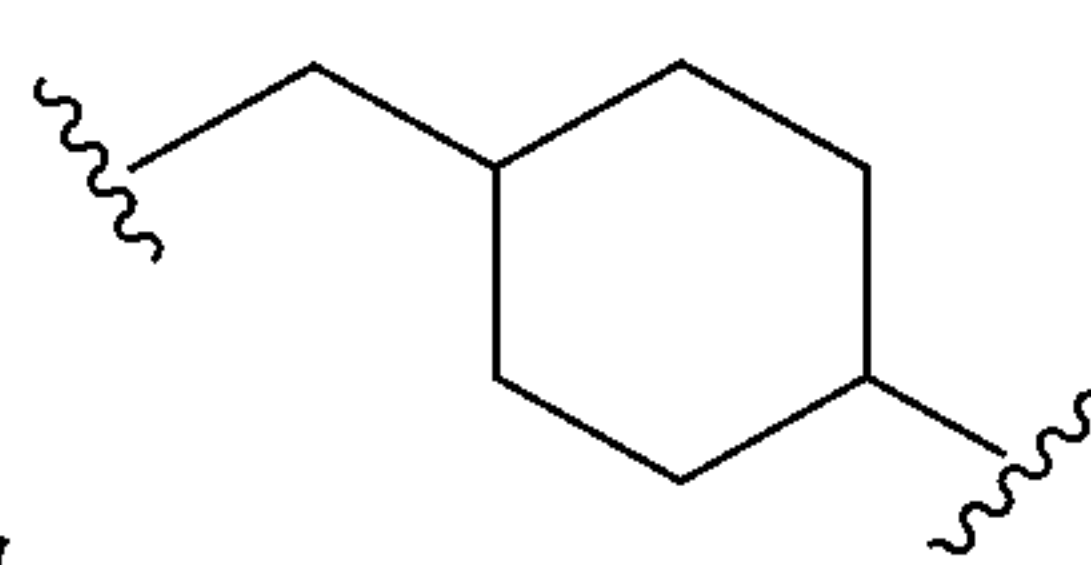
Q 為 H、帶電取代基或可離子化基團；

R<sub>9</sub>、R<sub>10</sub>、R<sub>11</sub>、R<sub>12</sub>及 R<sub>13</sub>在每次出現時獨立地為 H 或視情況經取代之烷基；

q 及 r 在每次出現時獨立地為 0 與 10 之間的整數；且剩餘變數係如第十一、第十二、第十三或第十四特定實施例或其中所述之任何實施例所述。

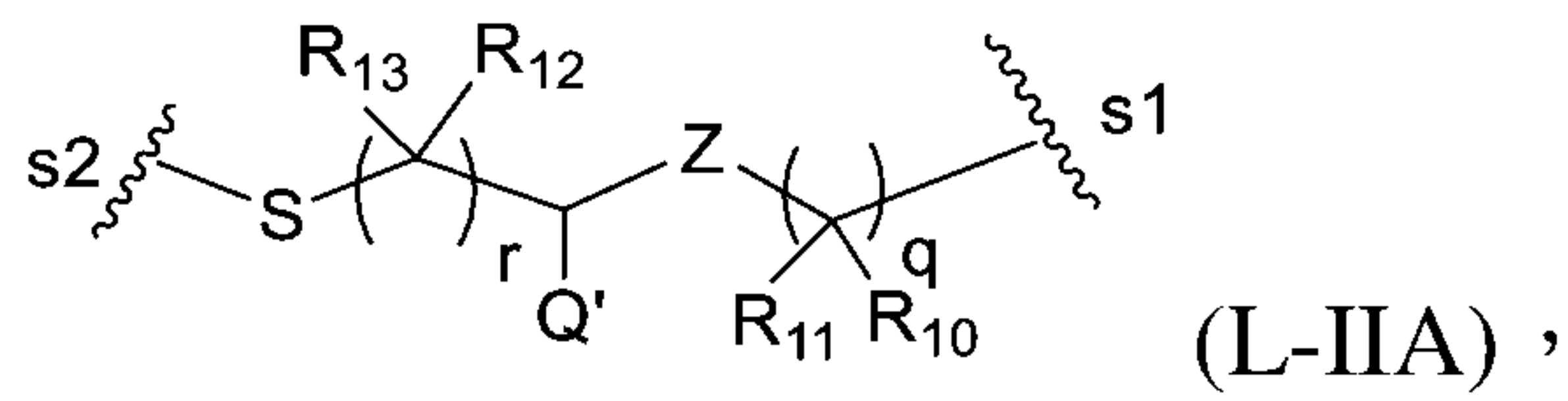
【0357】 在某些實施例中，E 為-(CR<sub>10</sub>R<sub>11</sub>)<sub>q</sub>-，且剩餘變數係如第十五特定實施例所述。



【0358】 在某些實施例中，E 為 ，且剩餘變數係如第十五特定實施例所述。

【0359】 在某些實施例中，Z 為-C(=O)-NR<sub>9</sub>-或-NR<sub>9</sub>-C(=O)-，且剩餘變數係如第十五特定實施例或其中所述之任何實施例所述。

【0360】 在第十六特定實施例中，關於式(I)化合物，L 係由以下結構式表示：



其中 R<sub>9</sub>、R<sub>10</sub>、R<sub>11</sub>、R<sub>12</sub>及 R<sub>13</sub>在每次出現時獨立地為-H 或(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基；且剩餘

變數係如第十五特定實施例或其中所述之任何實施例所述。

【0361】 在某些實施例中， $R_9$  為  $-H$ ，且剩餘變數係如第十六特定實施例所述。

【0362】 在某些實施例中， $Q'$  為：

i)  $H$ ；

ii)  $-SO_3H$ 、 $-Z'-SO_3H$ 、 $-OPO_3H_2$ 、 $-Z'-OPO_3H_2$ 、 $-PO_3H_2$ 、 $-Z'-PO_3H_2$ 、 $-CO_2H$ 、 $-Z'-CO_2H$ 、 $-NR_{11}R_{12}$  或  $-Z'-NR_{14}R_{15}$  或其醫藥學上可接受之鹽；或者，

iii)  $-N^+R_{14}R_{15}R_{16}X^-$  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；

$R_{14}$ 、 $R_{15}$  及  $R_{16}$  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，且剩餘變數係如第十六特定實施例或其中所述之任何實施例所述。

【0363】 在某些實施例中， $Q'$  為  $H$  或  $-SO_3H$  或其醫藥學上可接受之鹽，且剩餘變數係如第十六特定實施例或其中所述之任何實施例所述。

【0364】 在某些實施例中， $R_9$ 、 $R_{10}$ 、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$  及  $R_{13}$  均為  $H$ ；且  $q$  及  $r$  各自獨立地為 1 與 6 之間的整數，且剩餘變數係如第十六特定實施例或其中所述之任何實施例所述。

【0365】 在某些實施例中， $L$  係由式(L-IIA)表示，其中：

$R_{12}$  及  $R_{13}$  在每次出現時各自獨立地為  $H$  或  $(C_1-C_3)$  烷基；

$Q$  為  $H$  或  $-SO_3H$  或其醫藥學上可接受之鹽

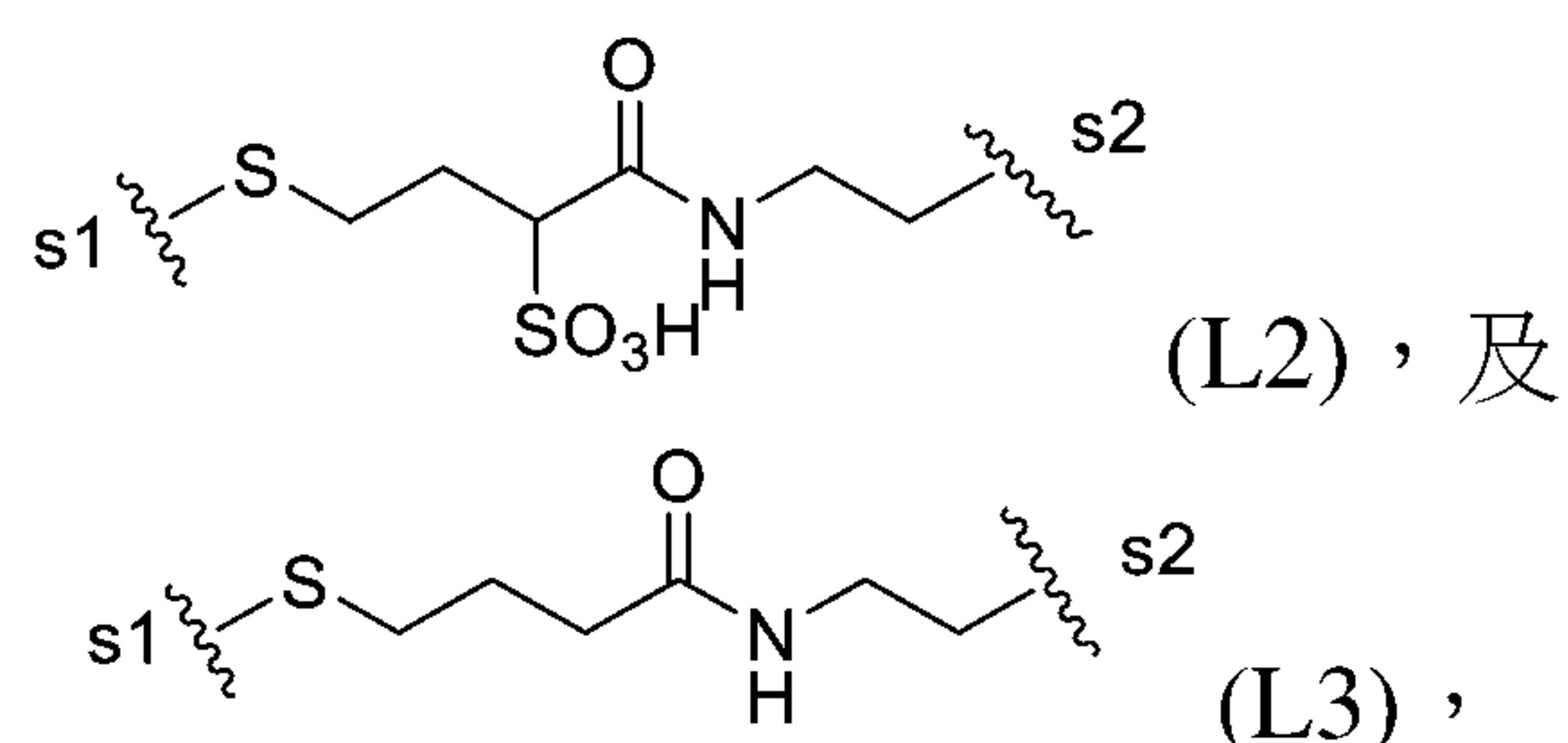
$Z$  為  $-C(=O)-NR_9-$  或  $-NR_9-C(=O)-$ ；

$R_9$  為  $H$  或  $(C_1-C_3)$  烷基；

$R_{10}$  及  $R_{11}$  在每次出現時獨立地為  $H$  或  $(C_1-C_3)$  烷基；且

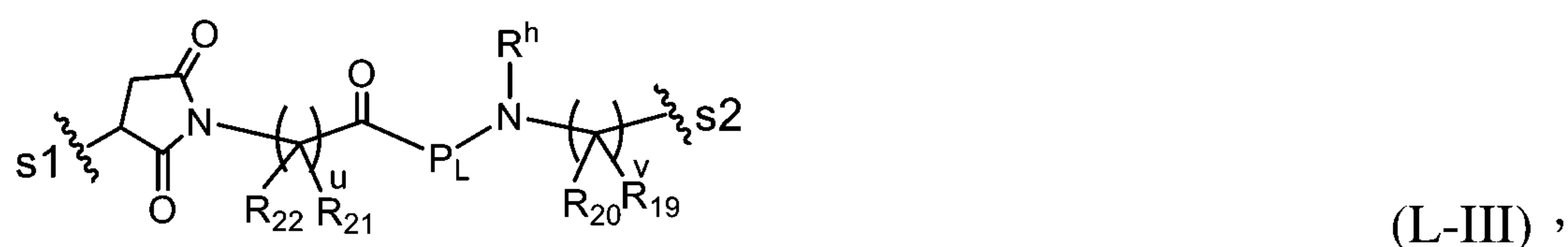
q 及 r 各自為整數 1 至 5；且剩餘變數係如第十六特定實施例或其中所述之任何實施例所述。

【0366】 在第十七特定實施例中，關於式(I)化合物，L 係由以下結構式中之任一者表示：



或其醫藥學上可接受之鹽，且剩餘變數係如第十一、第十二、第十三或第十四特定實施例或其中所述之任何實施例所述。

【0367】 在第十八特定實施例中，關於式(I)化合物，L 係由以下結構式表示：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

s1 為共價連接至 D 之位點；s2 為共價連接至順丁烯二醯亞胺基之位點；

R<sub>19</sub>、R<sub>20</sub>、R<sub>21</sub> 及 R<sub>22</sub> 在每次出現時獨立地為 H 或視情況經取代之烷基；

u 及 v 各自獨立地為 0 與 10 之間的整數；

R<sup>h</sup> 為 H 或視情況經取代之烷基；

P<sub>L</sub> 為視情況經取代之伸烷基、-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>j</sub>- (其中氧原子連接至與 P<sub>L</sub> 連接之 -(C=O)-基團)、胺基酸殘基或含有 2 至 20 個胺基酸殘基之肽；且

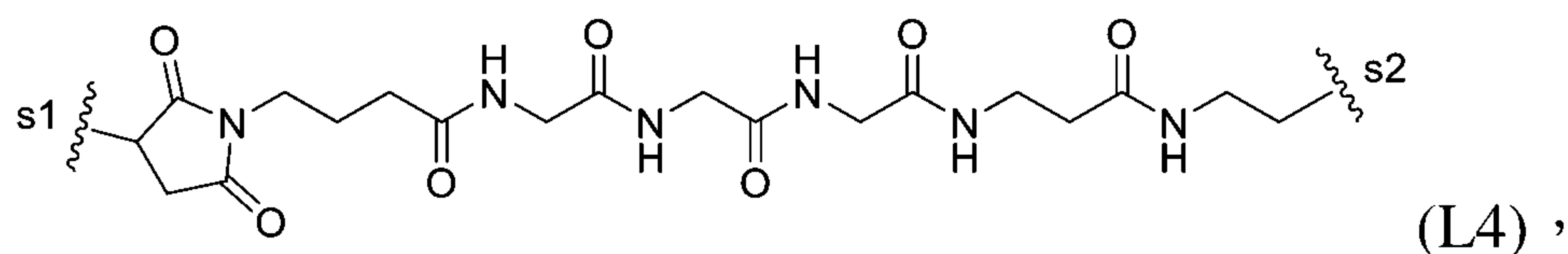
j 為整數 1 至 24；且剩餘變數係如第十一、第十二、第十三或第十四特定實施例或其中所述之任何實施例所述。

【0368】 在某些實施例中，R<sub>19</sub>、R<sub>20</sub>、R<sub>21</sub> 及 R<sub>22</sub> 各自為 H；且 u 及 v 各自獨立

地為 1 與 6 之間的整數；且剩餘變數係如上文第十八特定實施例所述。

【0369】 在某些實施例中， $P_L$  為胺基酸殘基或含有 2 至 10 個胺基酸殘基之肽且剩餘變數係如上文第十八特定實施例或其中所述之任何實施例所述。更特定言之， $P_L$  為含有 2 至 5 個胺基酸殘基之肽。在另一更特定實施例中， $P_L$  係選自由以下組成之群：Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Cit-Val、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 (SEQ ID NO:55)、 $\beta$ -Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:56)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:57)、Val-Arg、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、Gln-Val、Asn-Ala、Gln-Phe、Gln-Ala、Gly-Gly-Gly、Ala-Ala-Ala、D-Ala-Ala-Ala、Ala-D-Ala-Ala、Ala-Ala-D-Ala、Ala-Val-Cit、Ala-Val-Ala 及  $\beta$ -Ala-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO:58)。甚至更特定言之， $P_L$  為 Gly-Gly-Gly、Ala-Ala-Ala、D-Ala-Ala-Ala、Ala-D-Ala-Ala、Ala-Val-Ala 或  $\beta$ -Ala-Gly-Gly-Gly。

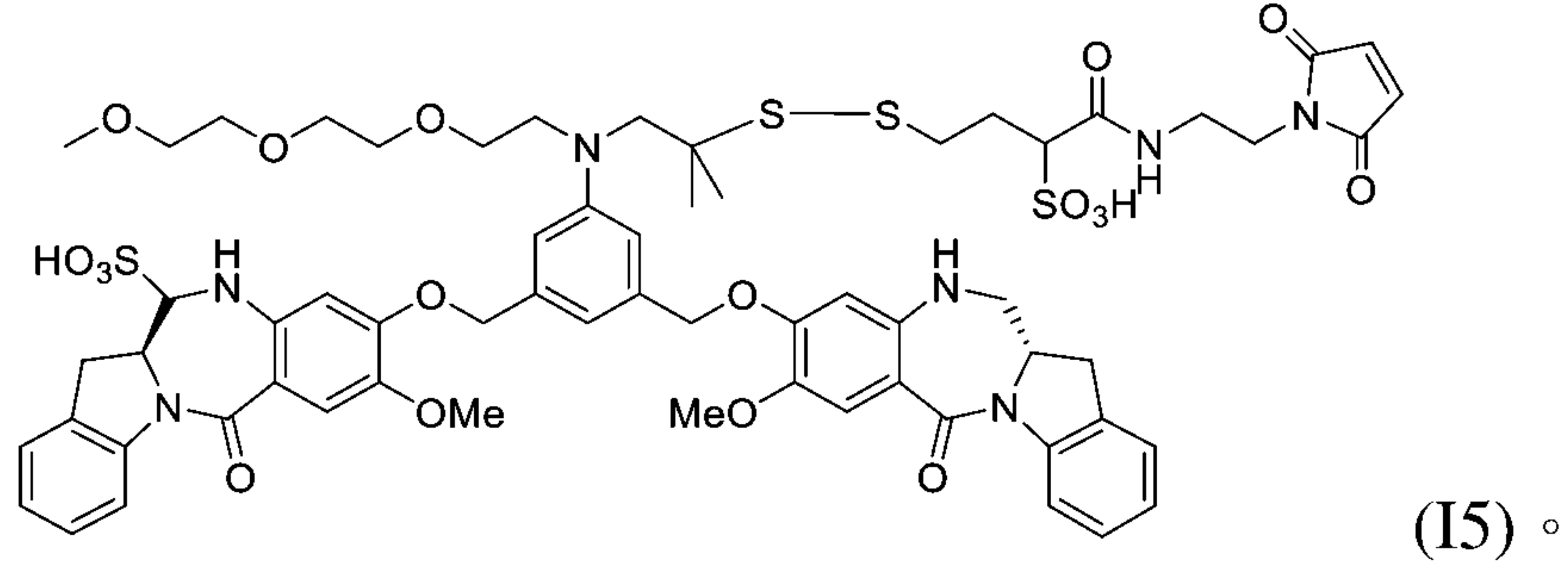
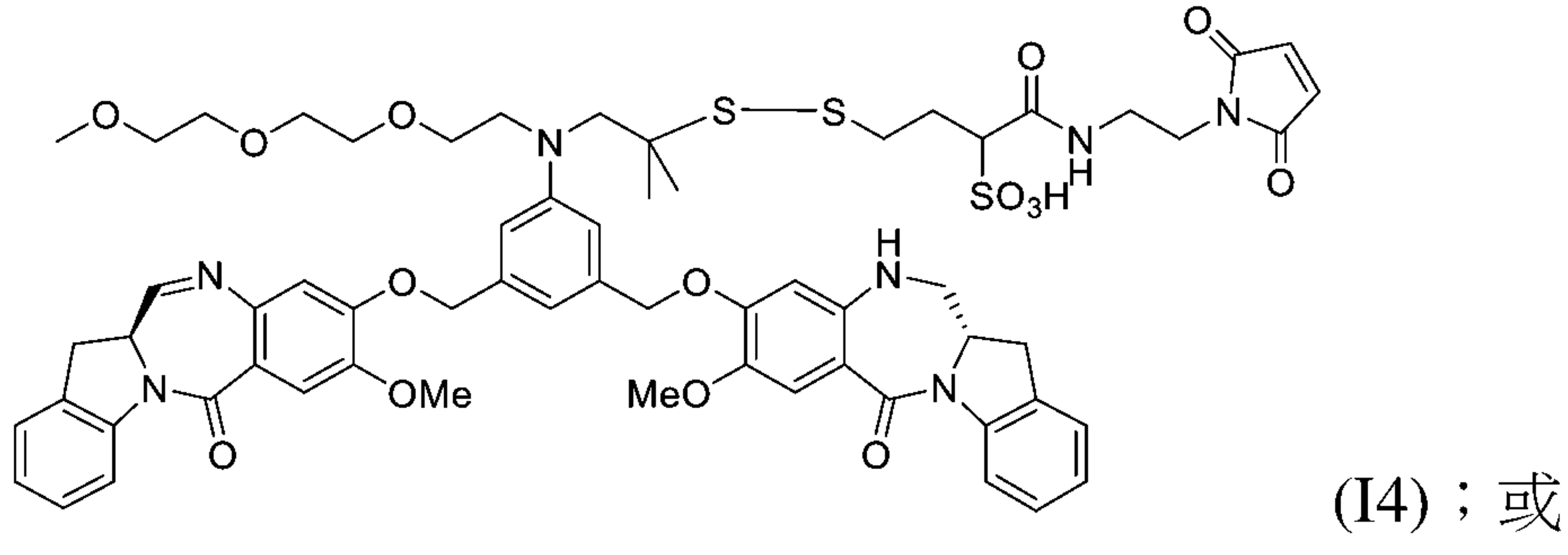
【0370】 在第十九特定實施例中，關於式(I)化合物，L 係由以下結構式表示：



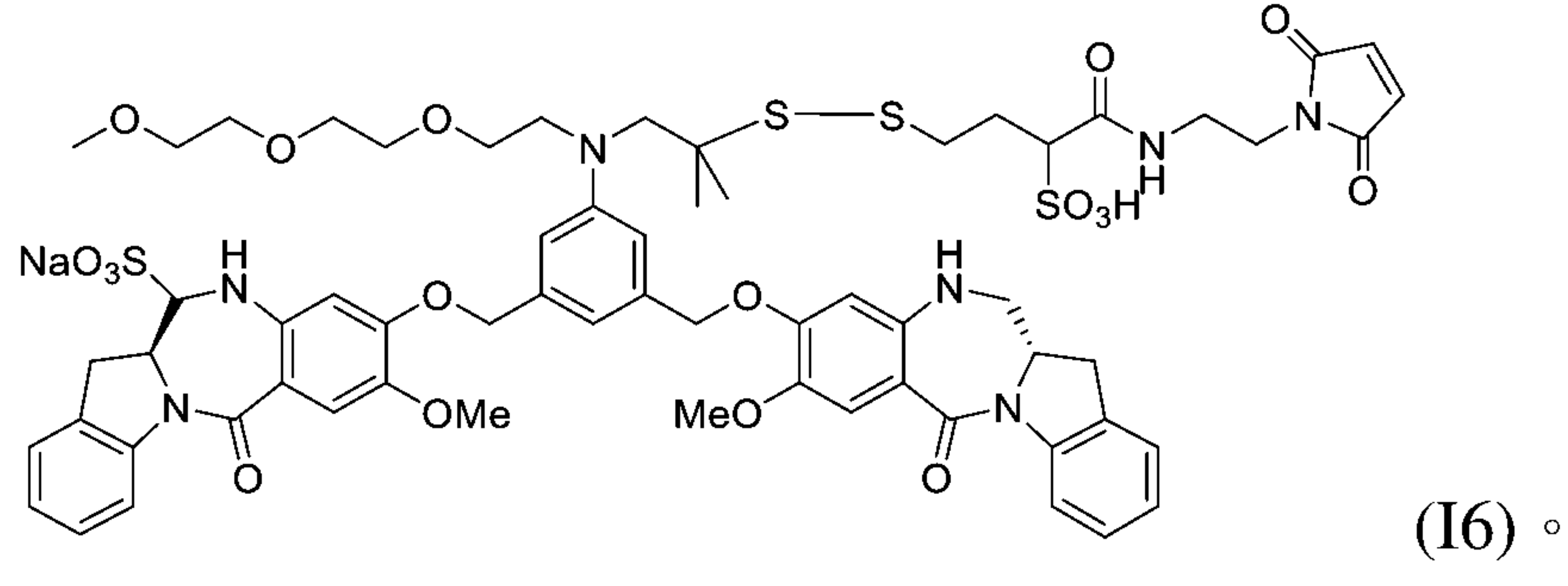
或其醫藥學上可接受之鹽，且剩餘變數係如第十一、第十二、第十三或第十四特定實施例或其中所述之任何實施例所述。

【0371】 在第二十特定實施例中，本文所述之方法(例如，第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九或第十實施例或其中所述之任何實施例

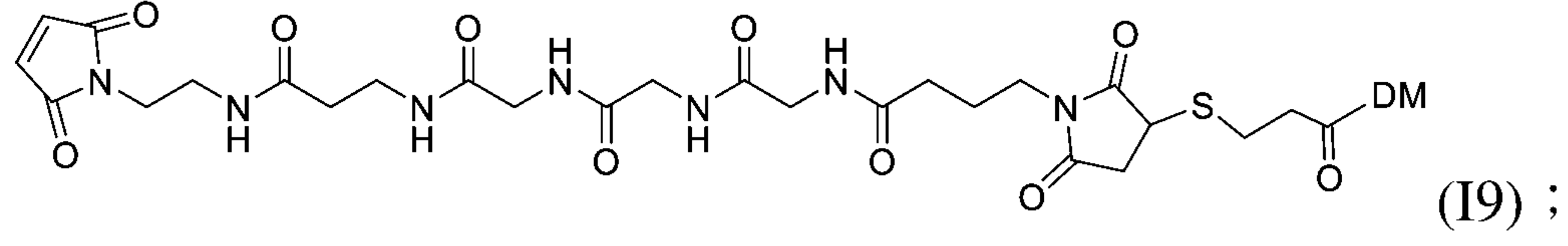
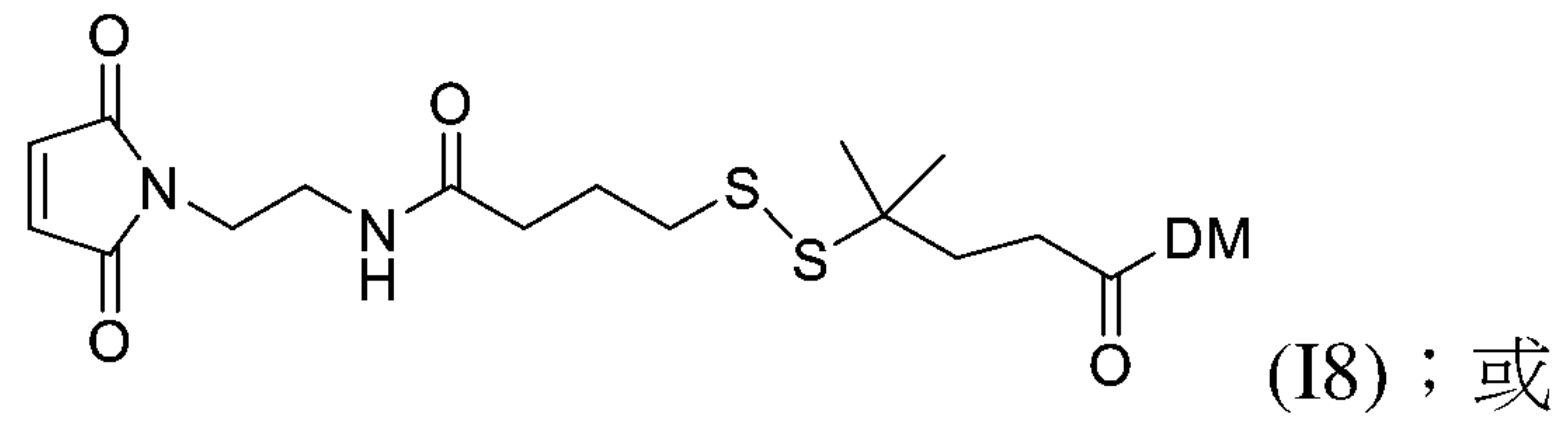
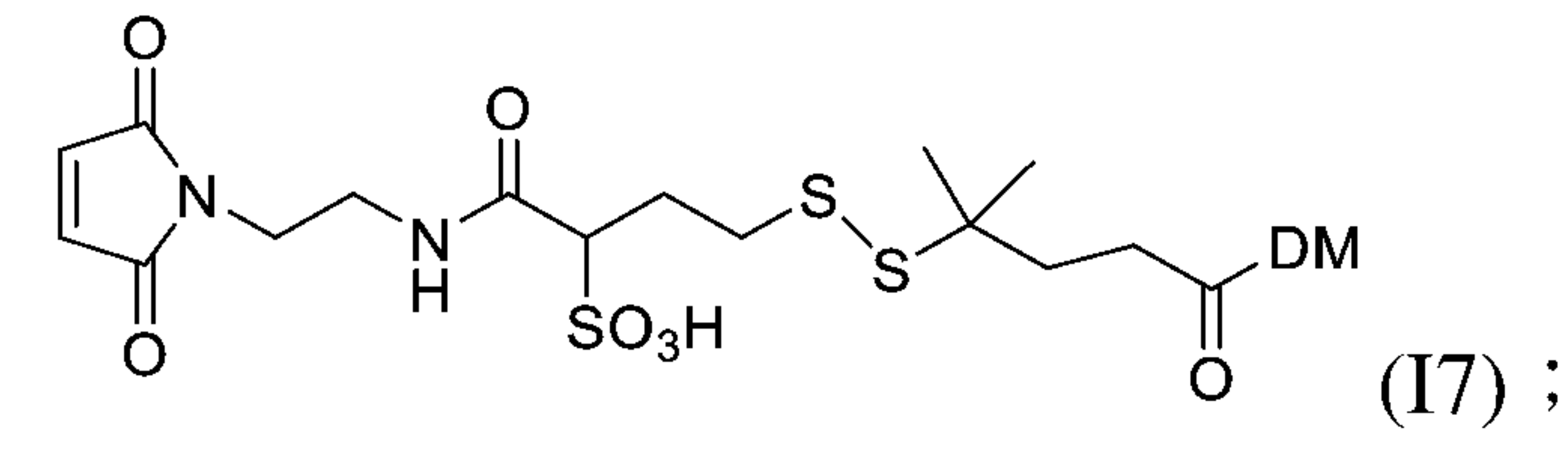
之方法)中的式(I)化合物係由下式或其醫藥學上可接受之鹽表示：



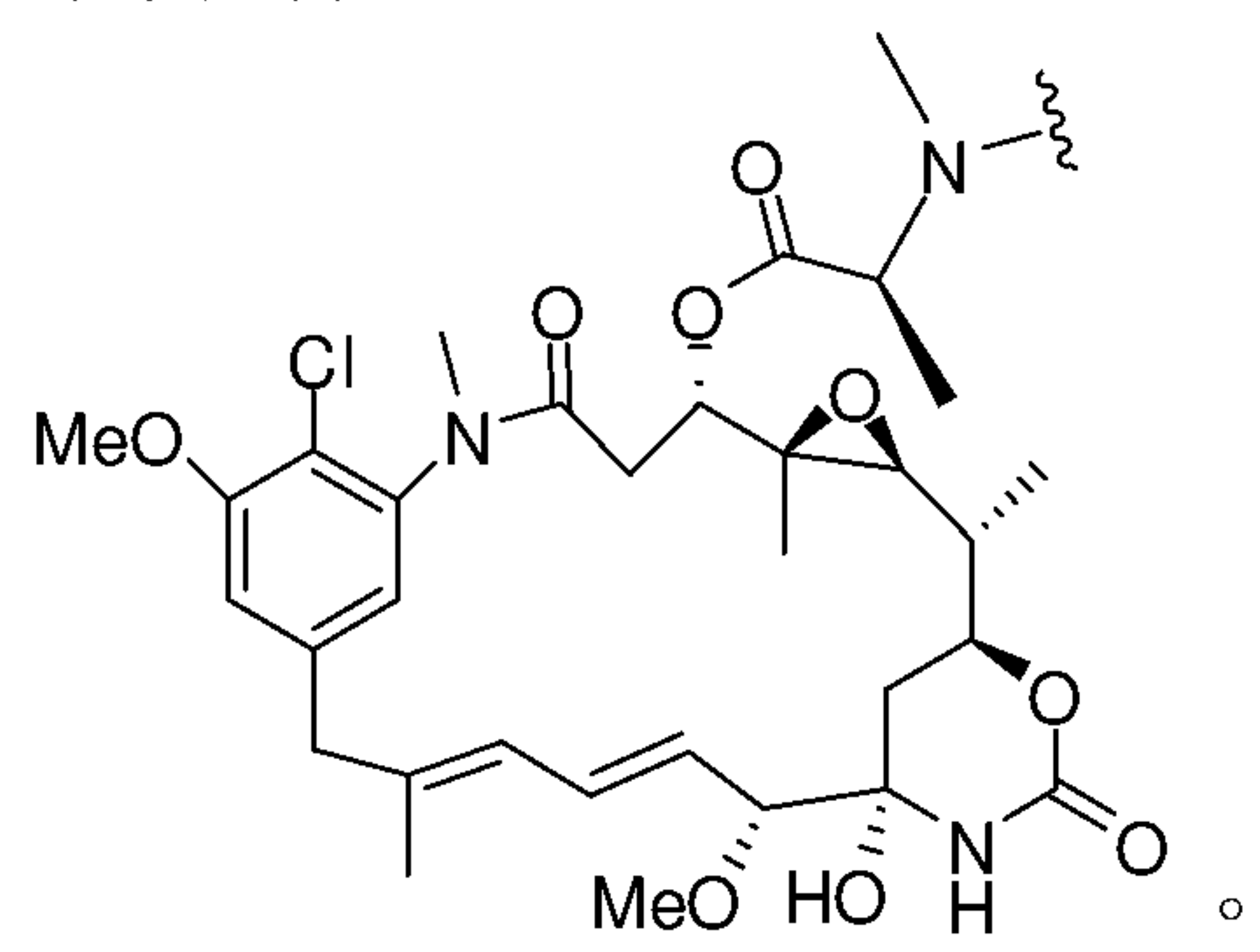
【0372】 在某些實施例中，第二十特定實施例中之式(I)化合物係由下式表示：



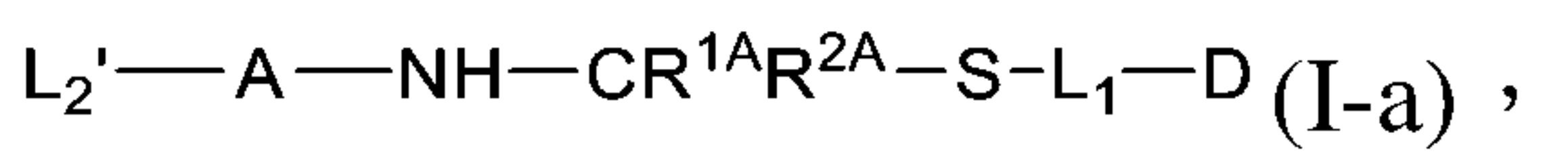
【0373】 在第二十一特定實施例中，本文所述之方法(例如，第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九或第十實施例或其中所述之任何實施例之方法)中的式(I)化合物係由下式或其醫藥學上可接受之鹽表示：



其中 DM 係由下式表示之藥物部分：



【0374】 在第二十二特定實施例中，本文所述之方法(例如，第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九或第十實施例或其中所述之任何實施例之方法)中的式(I)化合物係由下式或其醫藥學上可接受之鹽表示：



其中：

$L_2'$  為攜帶順丁烯二醯亞胺部分之間隔體；

A 為胺基酸或包含 2 至 20 個胺基酸之肽；

$R^{1A}$  及  $R^{2A}$  各自獨立地為 H 或  $C_{1-3}$  烷基；

$L_1$  為間隔體；且

D- $L_1$ -SH 為細胞毒性劑。

【0375】 在某些實施例中， $R^{1A}$  及  $R^{2A}$  中之至少為 H，且剩餘變數係如第二十二特定實施例所述。

【0376】 在某些實施例中， $R^{1A}$  及  $R^{2A}$  各自獨立地為 H 或 Me，且剩餘變數係如第二十二特定實施例所述。

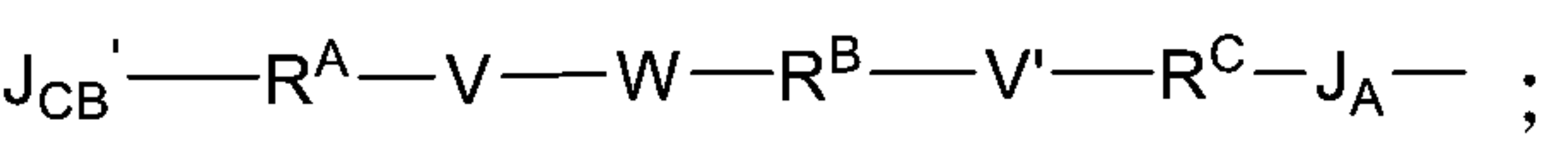
【0377】 在某些實施例中， $R^{1A}$  及  $R^{2A}$  為 H；且另一者為 Me，且剩餘變數係如第二十二特定實施例所述。

【0378】 在某些實施例中， $R^{1A}$  及  $R^{2A}$  均為 H，且剩餘變數係如第二十二特定實施例所述。

【0379】 在某些實施例中， $L_1$  為  $-L_1'-C(=O)-$ ；且  $L_1'$  為伸烷基或伸環烷基，且剩餘變數係如第二十二特定實施例或其中所述之任何實施例所述。更特定言之， $L_1'$  為  $C_{1-10}$  伸烷基。甚至更特定言之， $L_1$  為  $-CR^{3A}R^{4A}-(CH_2)_{1-8}-C(=O)-$ ； $R^{3A}$  及  $R^{4A}$  各自獨立地為 H 或 Me。在另一更特定實施例中， $L_1$  為  $-CR^{3A}R^{4A}-(CH_2)_{3-5}-C(=O)-$ 。在一甚至更特定實施例中， $R^{3A}$  及  $R^{4A}$  均為 Me。

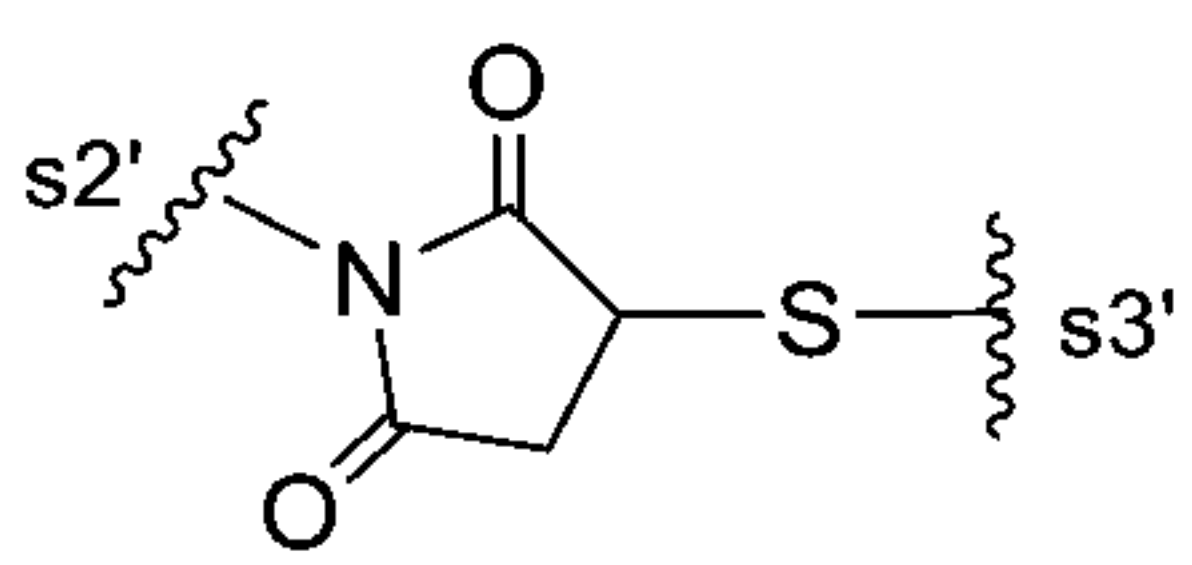
【0380】 在某些實施例中， $L_1$  為  $-(CH_2)_{4-6}-C(=O)-$ ，且剩餘變數係如第二十二特定實施例或其中所述之任何實施例所述。

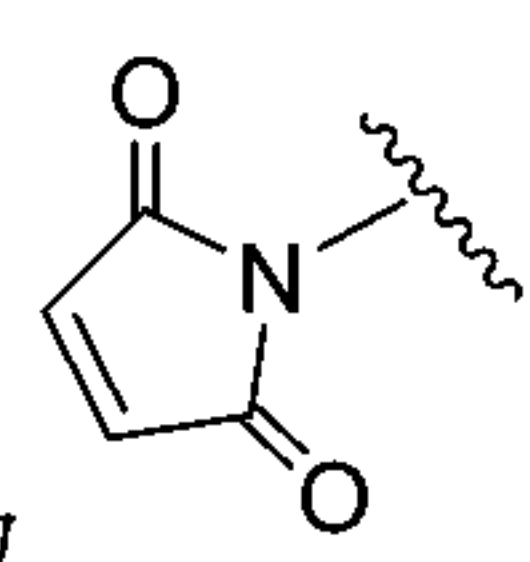
【0381】 在第二十三特定實施例中，關於式(I-a)， $L_2'$ 係由以下結構式表示：



其中：

$R^A$  為伸烷基、環烷基伸烷基或伸芳基；  
 $R^B$  及  $R^C$  係各自獨立地不存在、伸烷基、伸環烷基或伸芳基；  
 $V$  及  $V'$  各自獨立地為  $-(O-CH_2-CH_2)_{p1}-$  或  $-(CH_2-CH_2-O)_{p1}-$ ；  
 $p1$  為 0 或整數 1 至 10；

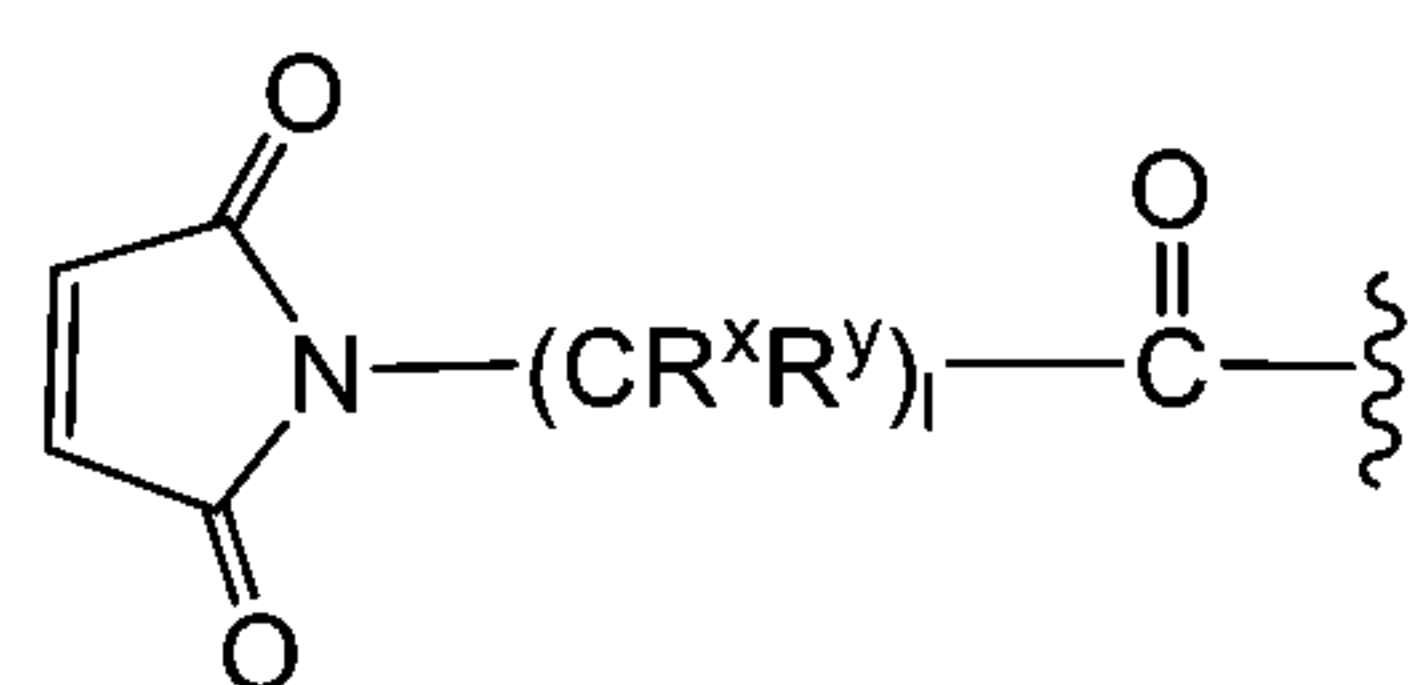
$W$  係不存在、、 $s2', \begin{matrix} O \\ || \\ -C- \end{matrix} -N-\begin{matrix} \text{---} \\ | \end{matrix} s3'$  或  $s2', \begin{matrix} \text{---} \\ | \end{matrix} N-\begin{matrix} O \\ || \\ -C- \end{matrix} -\begin{matrix} \text{---} \\ | \end{matrix} s3'$ ，其中  $s2'$  指示連接至  $V$ 、 $R^A$  或  $J_{CB}'$  之位點且  $s3'$  指示連接至  $R^B$ 、 $V'$ 、 $R^C$  或  $J_A$  之位點；

$J_{CB}'$  為 ；且

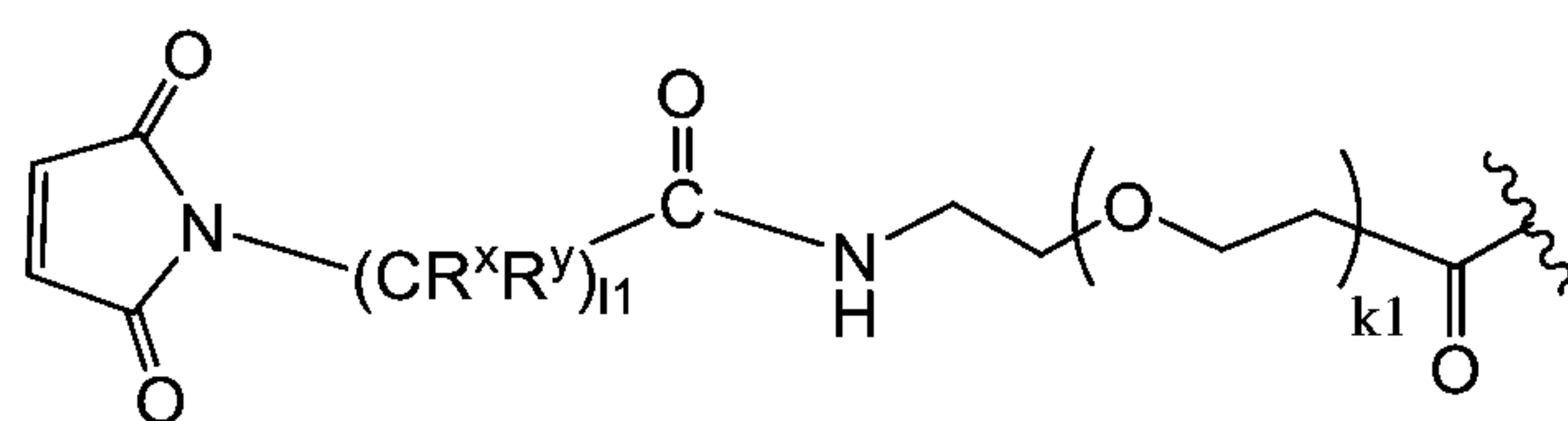
$J_A$  為  $-C(=O)-$ ；且剩餘變數係如第二十二特定實施例或其中所述之任何實施例所述。

【0382】 在某些實施例中， $p1$  為 0 且  $R^C$  不存在，且剩餘變數係如第二十三特定實施例所述。

【0383】 在第二十四特定實施例中，關於式(I-a)， $L_2'$ 係由以下結構式表示：



(L2a') ; 或



(L2b') ,

其中：

$R^x$  及  $R^y$  在每次出現時獨立地為 H、OH、鹵素、 $-O-(C_{1-4} \text{ 烷基})$ 、 $-SO_3H$ 、 $-NR_{40}R_{41}R_{42}^+$  或視情況經-OH、鹵素、 $-SO_3H$  或  $NR_{40}R_{41}R_{42}^+$  取代之  $C_{1-4}$  烷基，其中  $R_{40}$ 、 $R_{41}$  及  $R_{42}$  各自獨立地為 H 或  $C_{1-4}$  烷基；

$l$  及  $l_1$  各自獨立地為整數 1 至 10；

$k_1$  為整數 1 至 12；且剩餘變數係如第二十二特定實施例或其中所述之任何實施例所述。

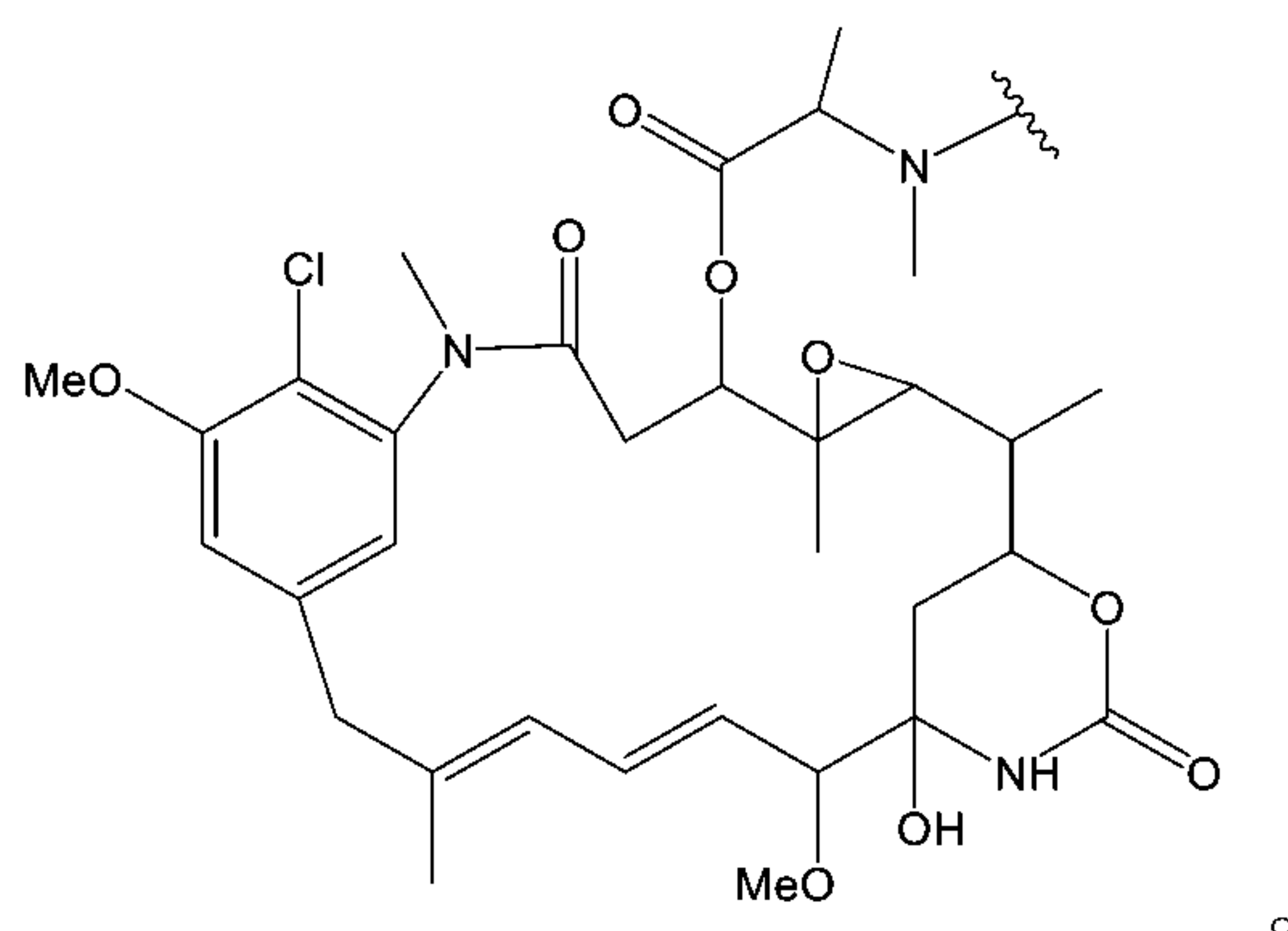
【0384】 在某些實施例中， $R^x$  及  $R^y$  均為 H，且剩餘變數係如上文第二十四特定實施例所述。

【0385】 在某些實施例中， $l$  及  $l_1$  各自為整數 2 至 6，且剩餘變數係如上文第二十四特定實施例或其中所述之任何實施例所述。

【0386】 在第二十五特定實施例中，關於式(I-a)，A 為可藉由蛋白酶裂解之肽，且剩餘變數係如第二十二、第二十三或第二十四特定實施例或其中所述之任何實施例所述。更特定言之，A 係可藉由在腫瘤組織中表現之蛋白酶裂解之肽。在另一更特定實施例中，A 係具有與  $-NH-CR^1R^2-S-L_1-D$  共價連接之胺基酸的肽，該胺基酸選自由 Ala、Arg、Asn、Asp、Cit、Cys、硒代-Cys、Gln、Glu、Gly、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr 及 Val 組成之群，各自獨立地呈 L 或 D 異構體。更特定言之，與  $-NH-CR^1R^2-S-L_1-D$  連接之胺基酸為 L 胺基酸。

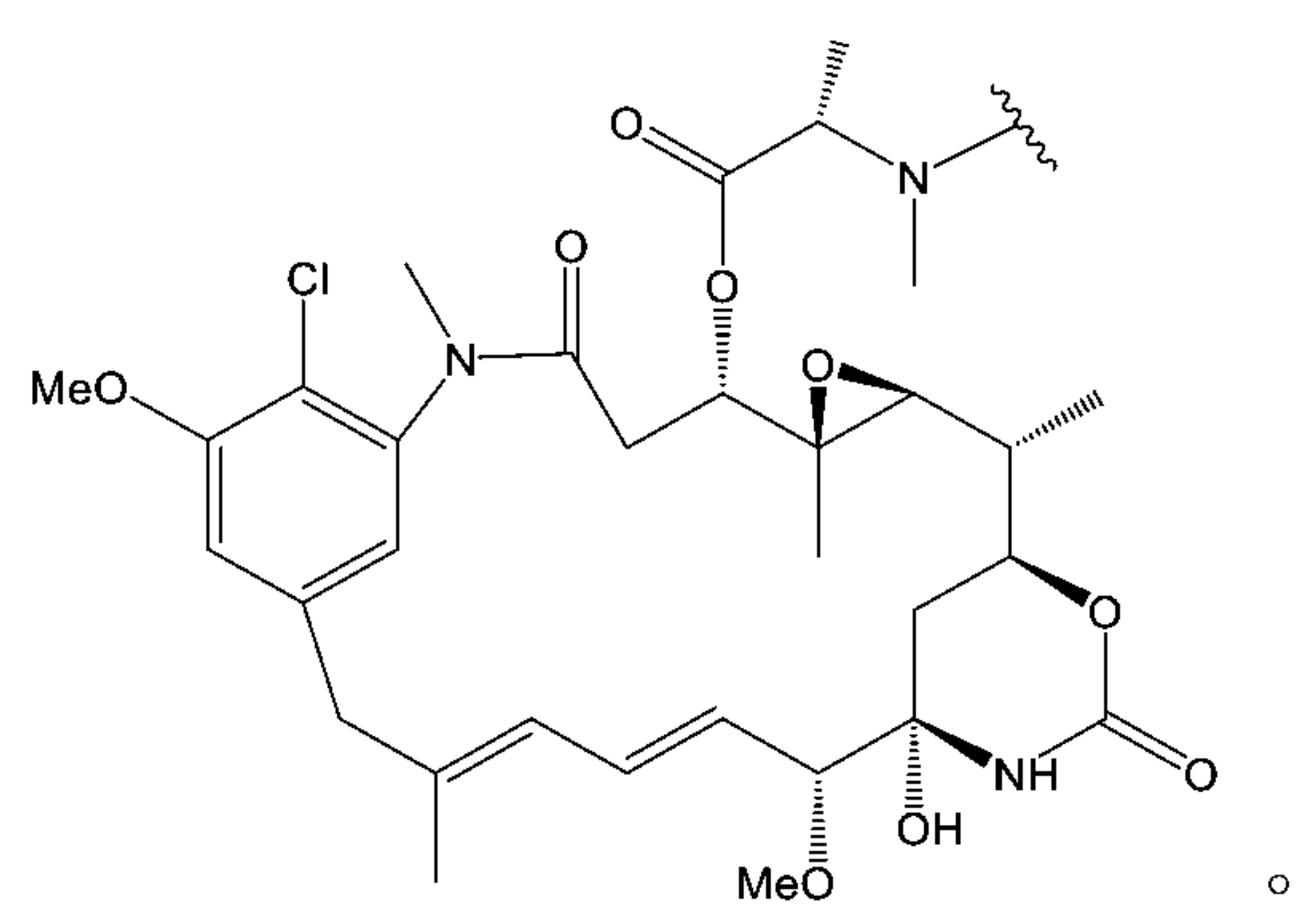
【0387】 在某些實施例中，A 係含有 2 至 5 個胺基酸殘基之肽，且剩餘變數係如第二十五特定實施例或其中所述之任何實施例所述。更特定言之，A 係選自由 Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、D-Val-Ala、Val-Cit、D-Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Phe-Ala、Phe-N<sup>9</sup>-甲苯磺醯基-Arg、Phe-N<sup>9</sup>-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Ala-Ala、D-Ala-Ala-Ala、Ala-D-Ala-Ala、Ala-Ala-D-Ala、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:55)、β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:56)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:57)、Val-Arg、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、Gln-Val、Asn-Ala、Gln-Phe、Gln-Ala、D-Ala-Pro 及 D-Ala-tBu-Gly 組成之群，其中各肽中之第一個胺基酸連接至 L<sub>2</sub> 基團且各肽中之最後一個胺基酸連接至 -NH-CR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>-S-L<sub>1</sub>-D。甚至更特定言之，A 為 Ala-Ala-Ala、Ala-D-Ala-Ala、Ala-Ala、D-Ala-Ala、Val-Ala、D-Val-Ala、D-Ala-Pro 或 D-Ala-tBu-Gly。

【0388】 在第二十六特定實施例中，關於式(I-a)，D 為類美登素且剩餘變數係如第二十二、第二十三、第二十四或第二十五特定實施例或其中所述之任何實施例所述。更特定言之，D 係由下式表示：

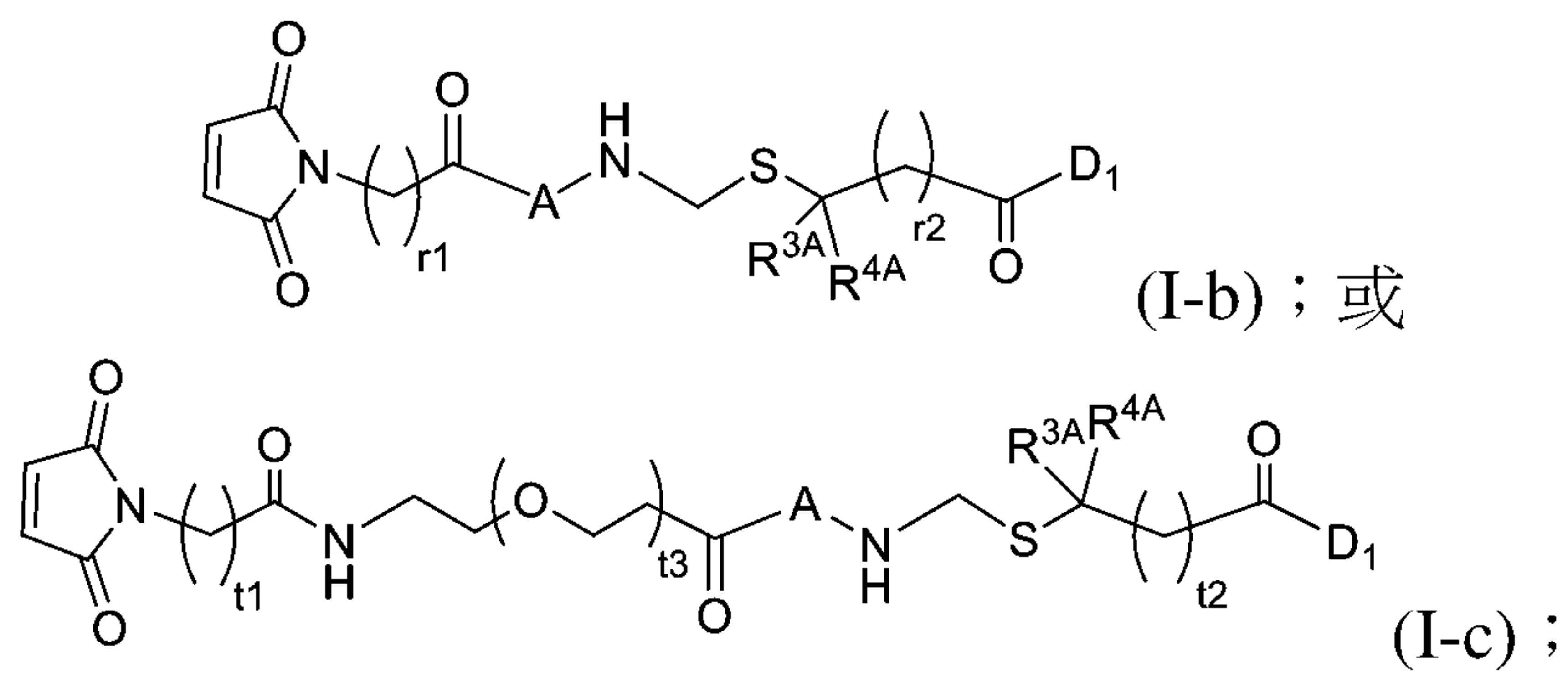


【0389】 甚至更特定言之，D 係由下式表示：

第 129 頁(發明說明書)



【0390】 在第二十七特定實施例中，本文所述之方法(例如，第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九或第十實施例或其中所述之任何實施例之方法)中的式(I)化合物係由下式或其醫藥學上可接受之鹽表示：



其中：

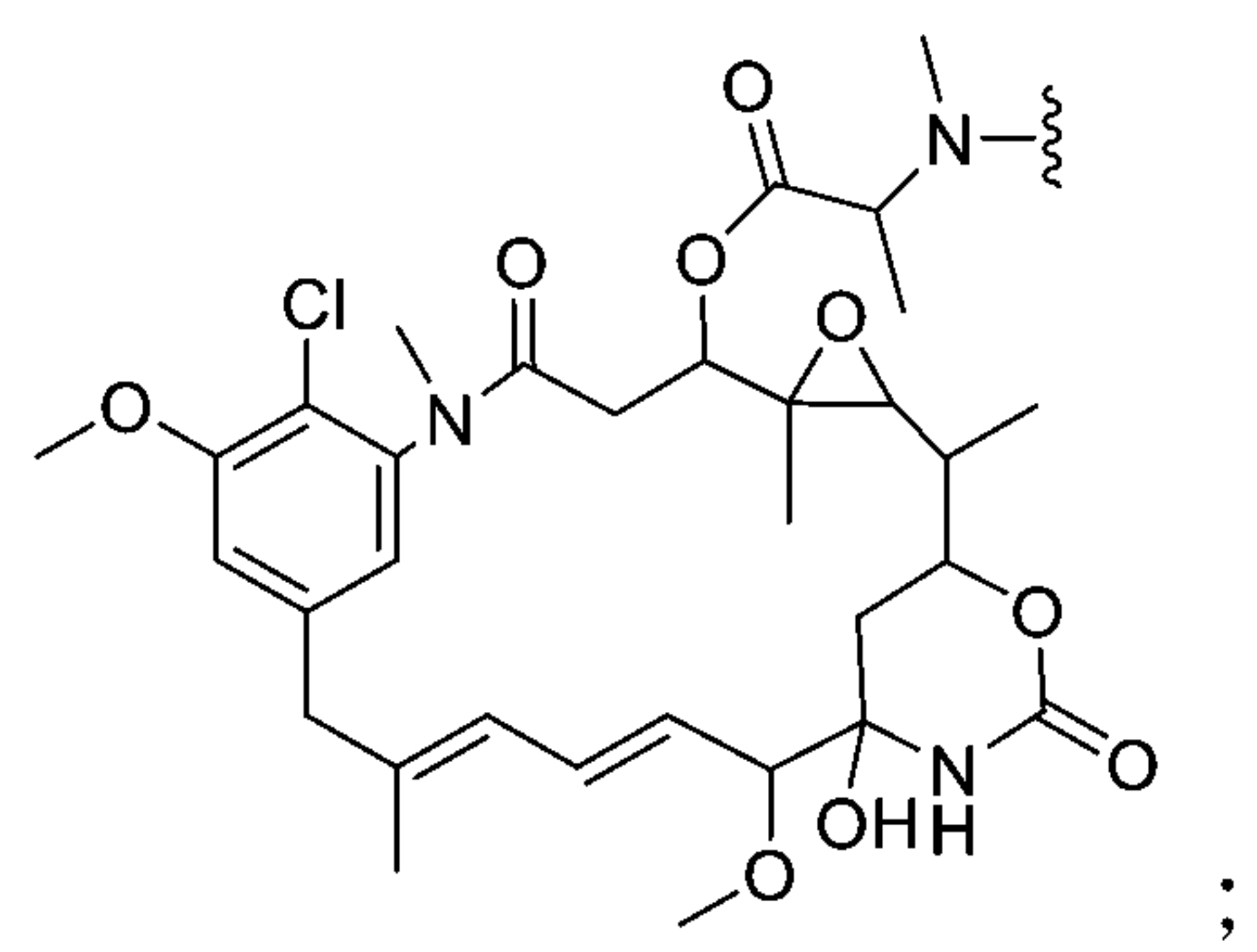
R<sup>3A</sup> 及 R<sup>4A</sup> 各自獨立地為 H 或 Me ；

r1 及 t1 各自獨立地為整數 1 至 6 ；

r2 及 t2 各自獨立地為整數 1 至 7 ；

t3 為整數 1 至 12 ；

D<sub>1</sub> 係由下式表示：



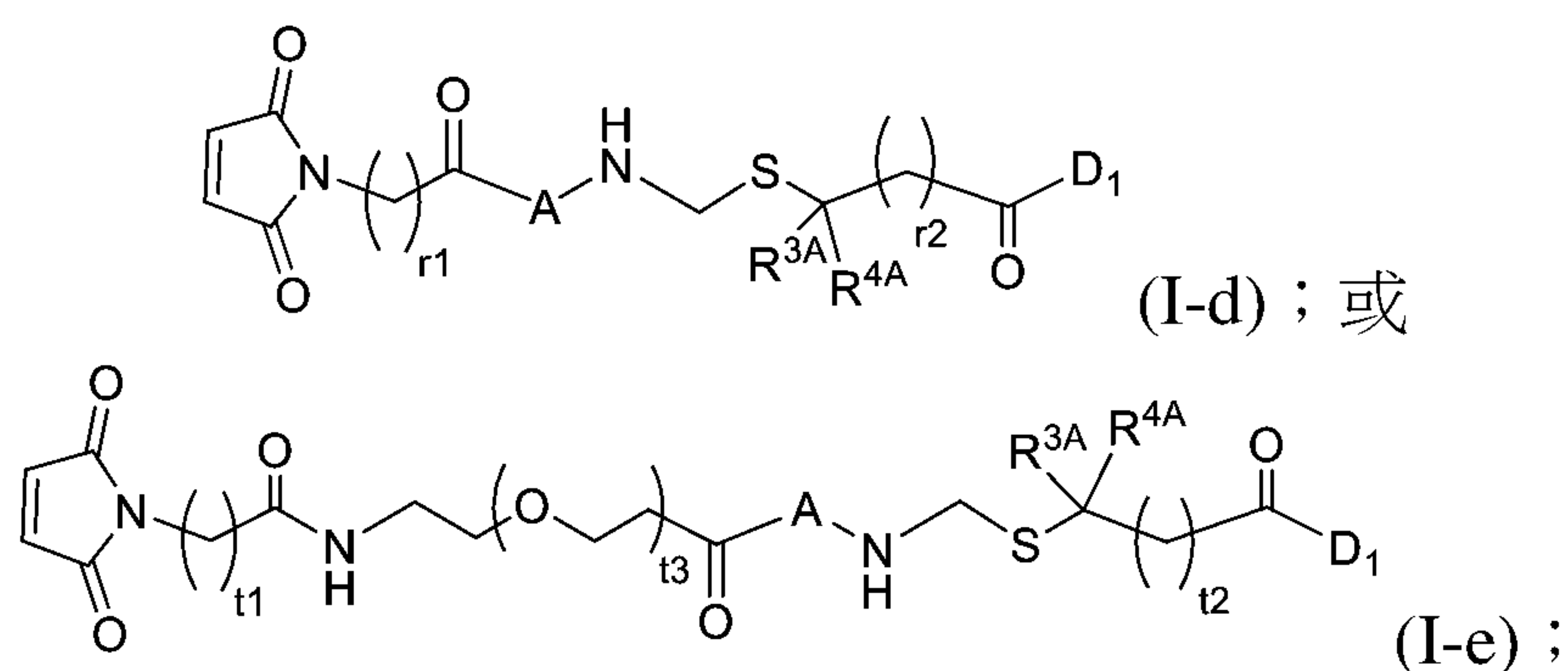
且剩餘變數係如第二十五或第二十六特定實施例或其中所述之任何實施例所

述。

【0391】 在某些實施例中，A 為 Ala-Ala-Ala、Ala-D-Ala-Ala、Ala-Ala、D-Ala-Ala、Val-Ala、D-Val-Ala、D-Ala-Pro 或 D-Ala-tBu-Gly，且剩餘變數係如第二十八特定實施例所述。

【0392】 在某些實施例中，r1 為整數 2 至 4；且 r2 為整數 3 至 5，且剩餘變數係如第二十七特定實施例或其中所述之任何實施例所述。

【0393】 在第二十八特定實施例中，本文所述之方法(例如，第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九或第十實施例或其中所述之任何實施例之方法)中的式(I)化合物係由下式表示：



其中：

r1 及 t1 各自為整數 2 至 6；

r2 及 t2 各自為整數 2 至 5；且

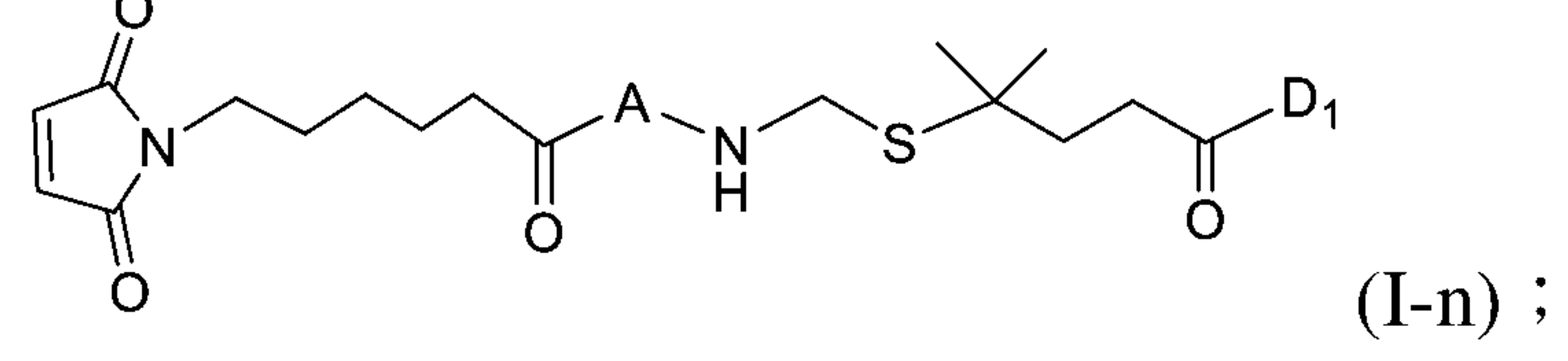
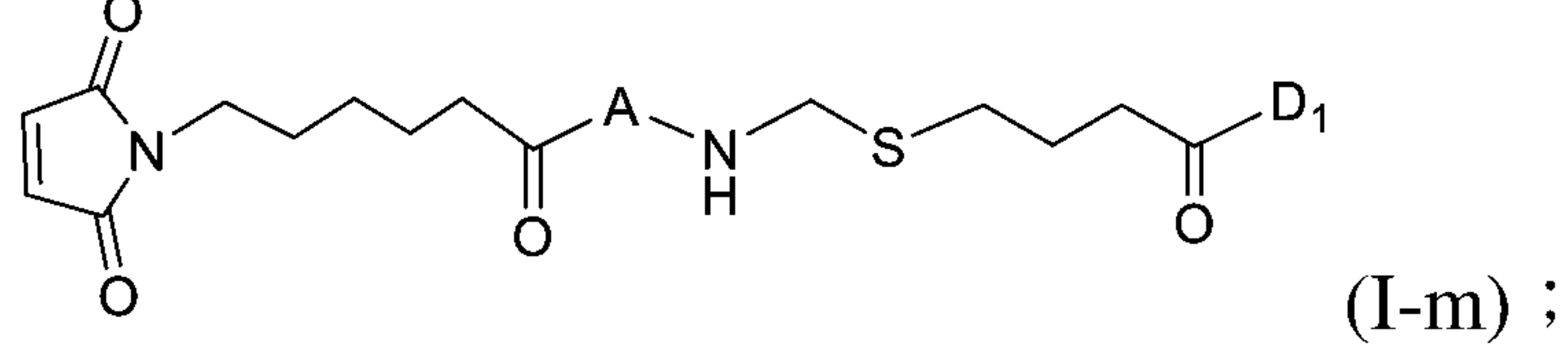
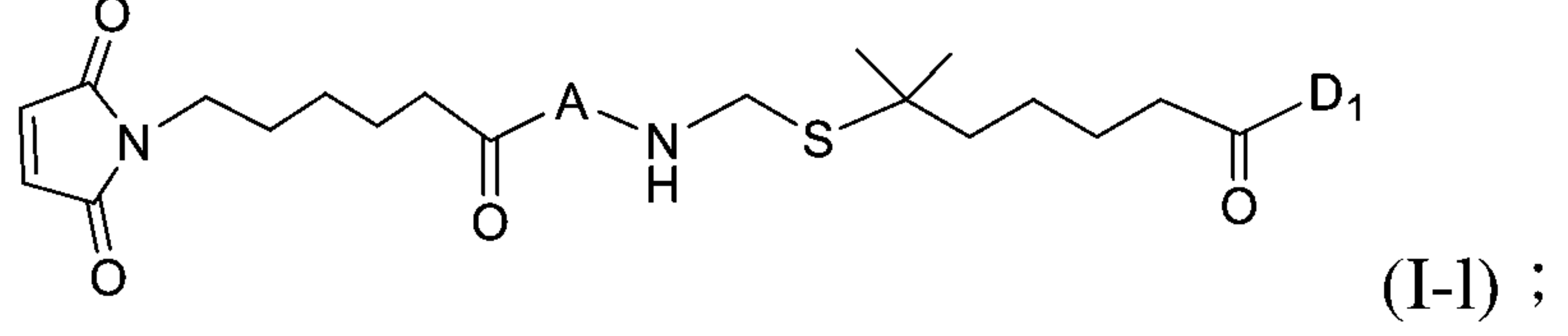
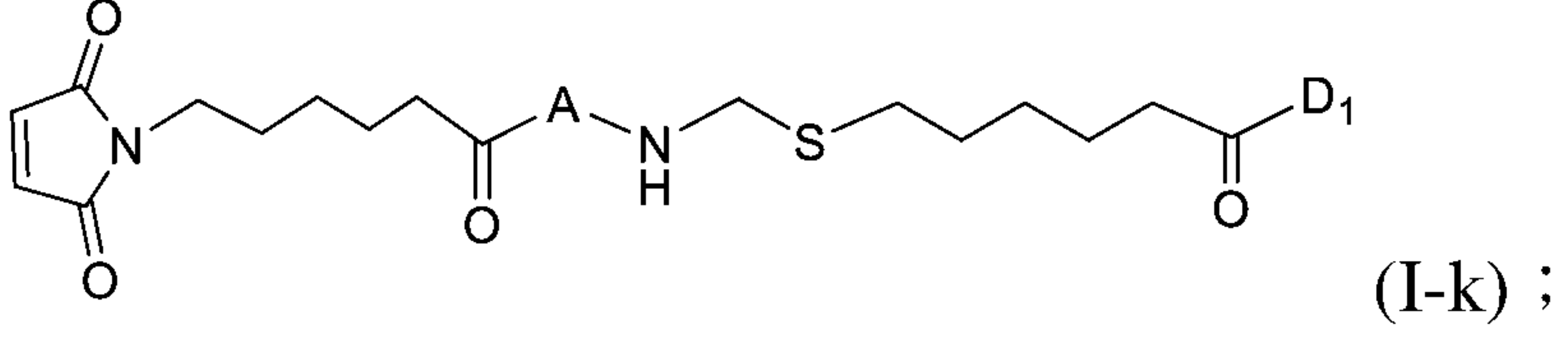
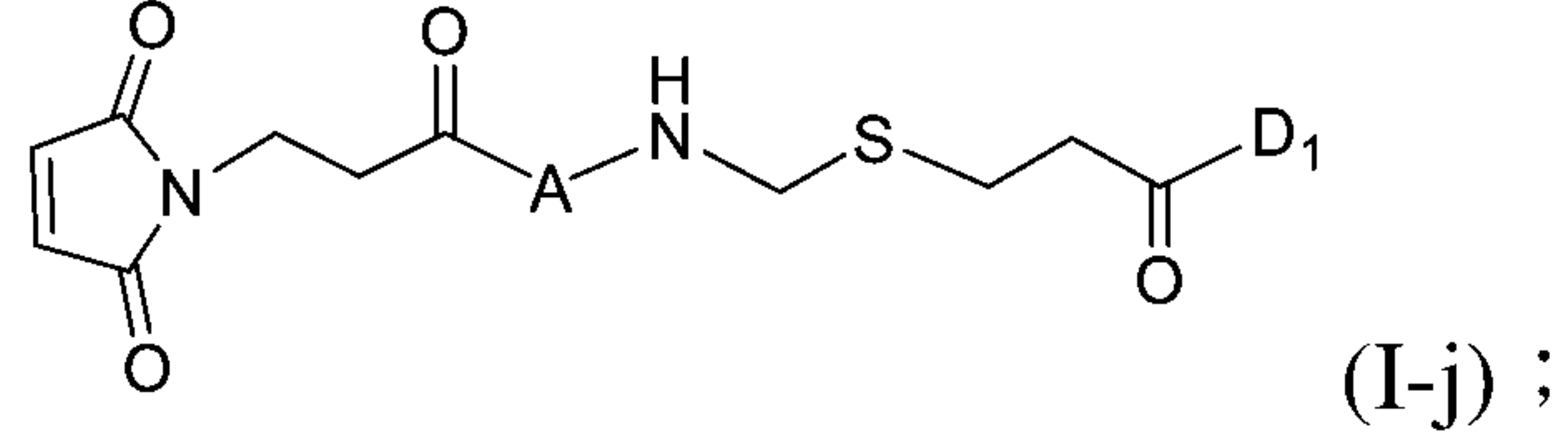
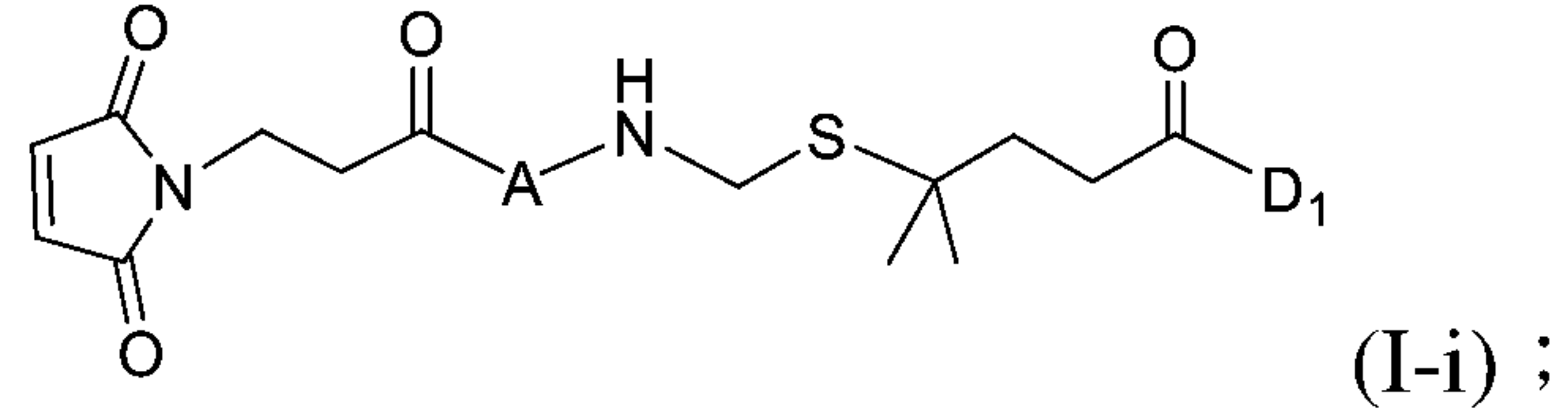
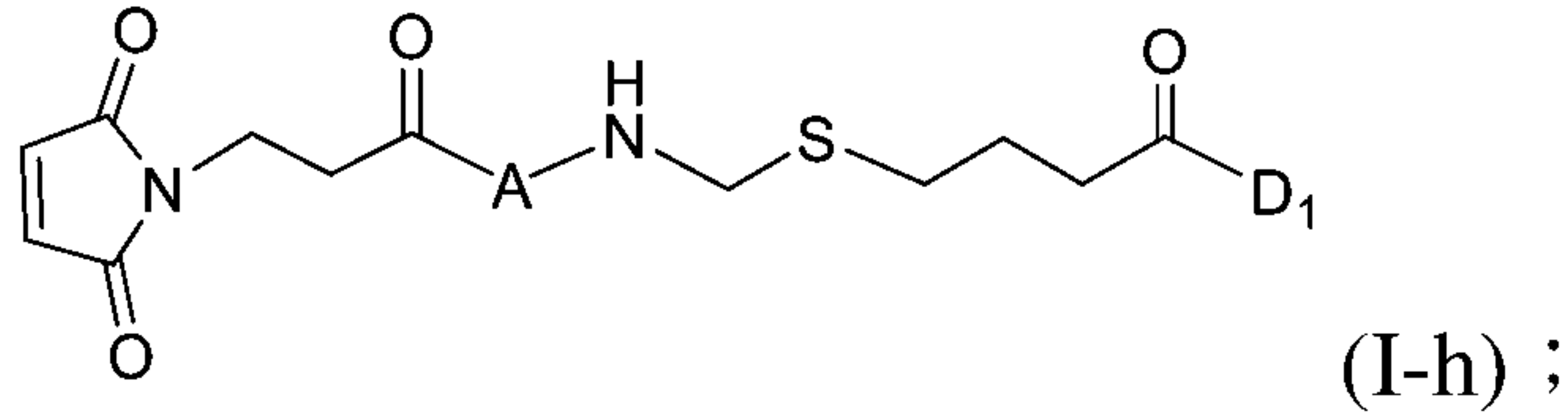
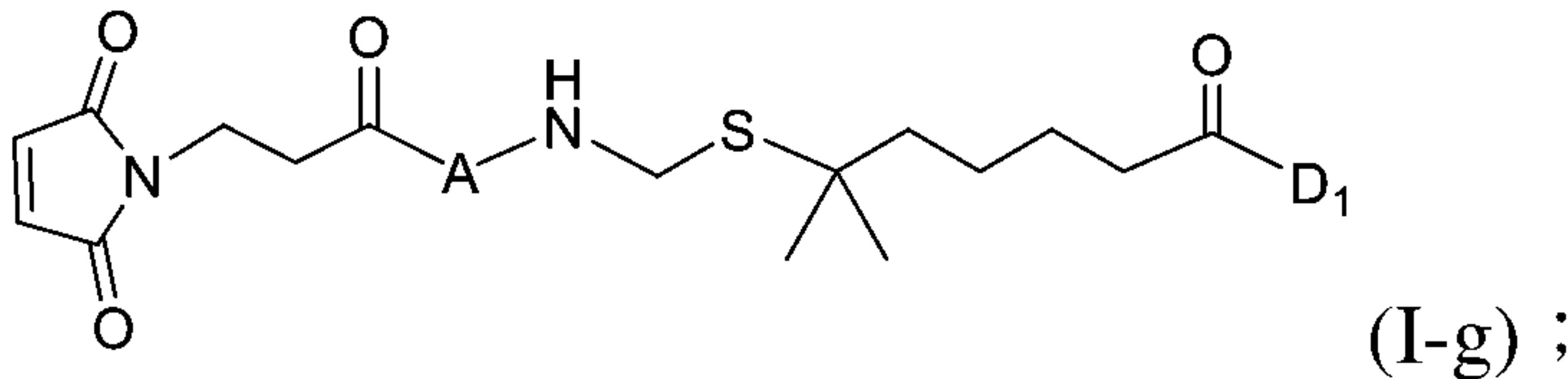
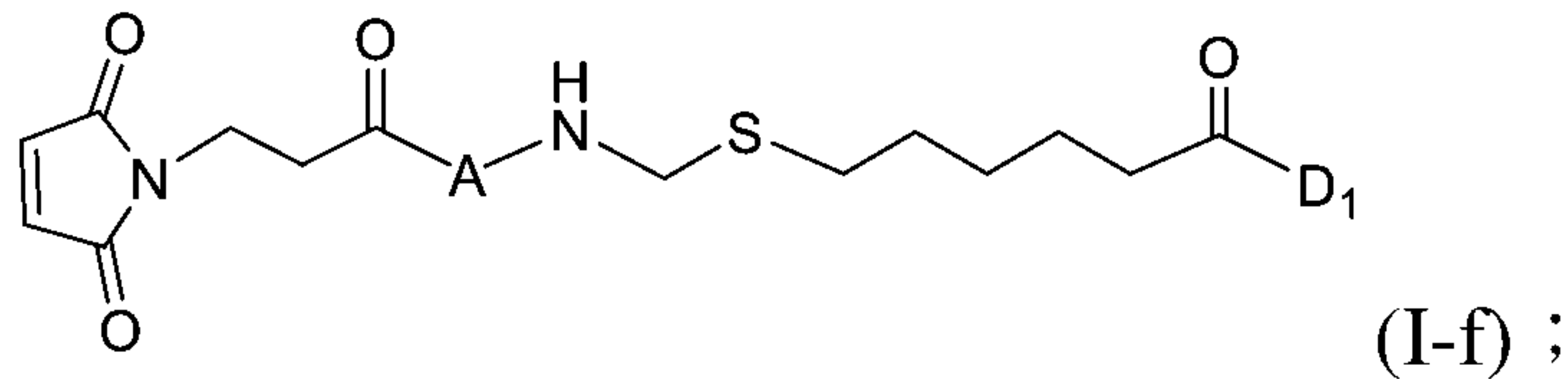
t3 為整數 2 至 12；且剩餘變數係如第二十七特定實施例或其中所述之任何實施例所述。

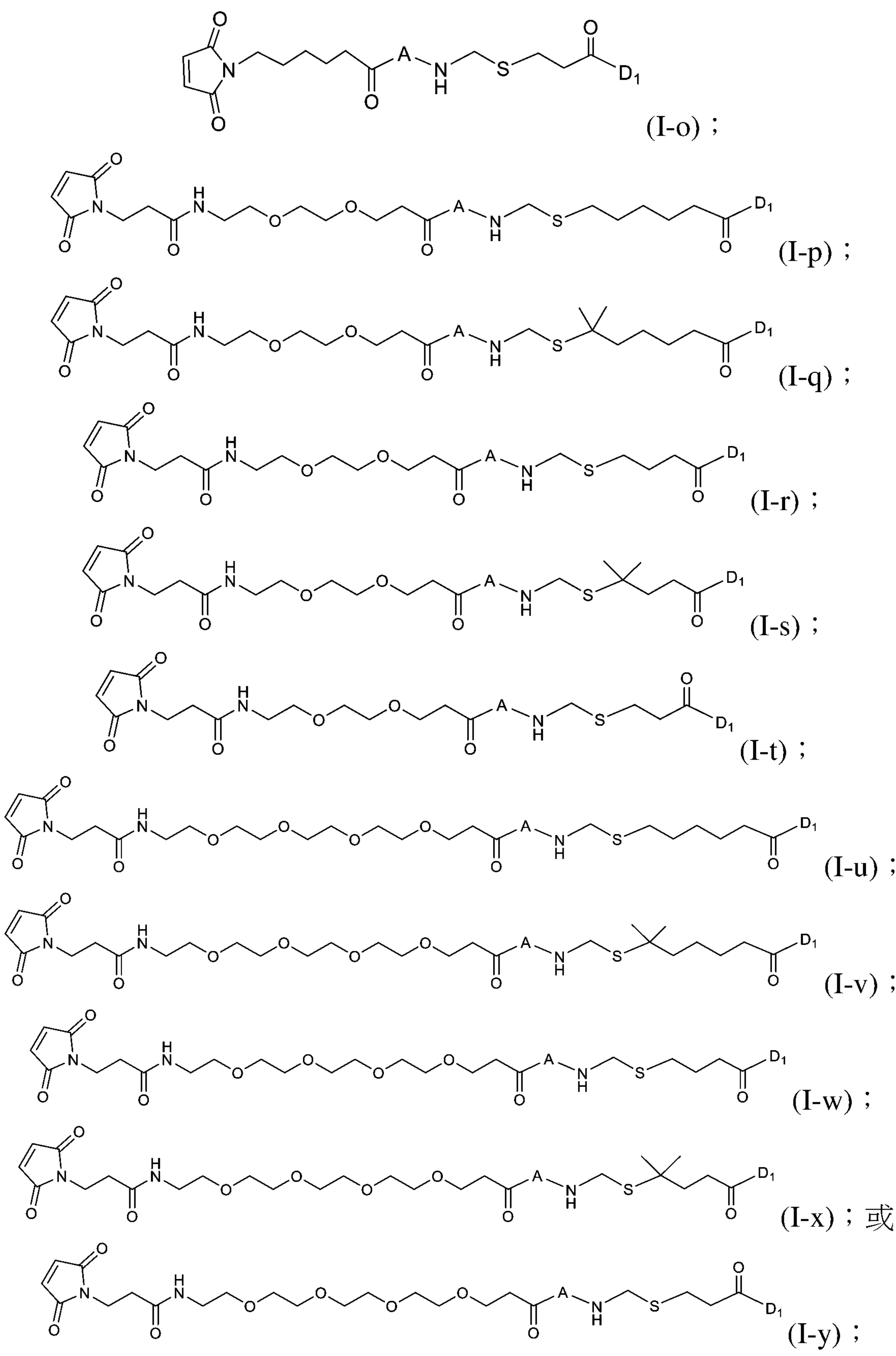
【0394】 在某些實施例中，R<sup>3A</sup>及 R<sup>4A</sup>均為 Me，且剩餘變數係如第二十八特定實施例所述。

【0395】 在某些實施例中，R<sup>3A</sup>及 R<sup>4A</sup>均為 H，且剩餘變數係如第二十八特定實施例所述。

【0396】 在第二十九特定實施例中，本文所述之方法(例如，第一、第二、第

三、第四、第五、第六、第七、第八、第九或第十實施例或其中所述之任何實施例之方法)中的式(I)化合物係由下式或其醫藥學上可接受之鹽表示：



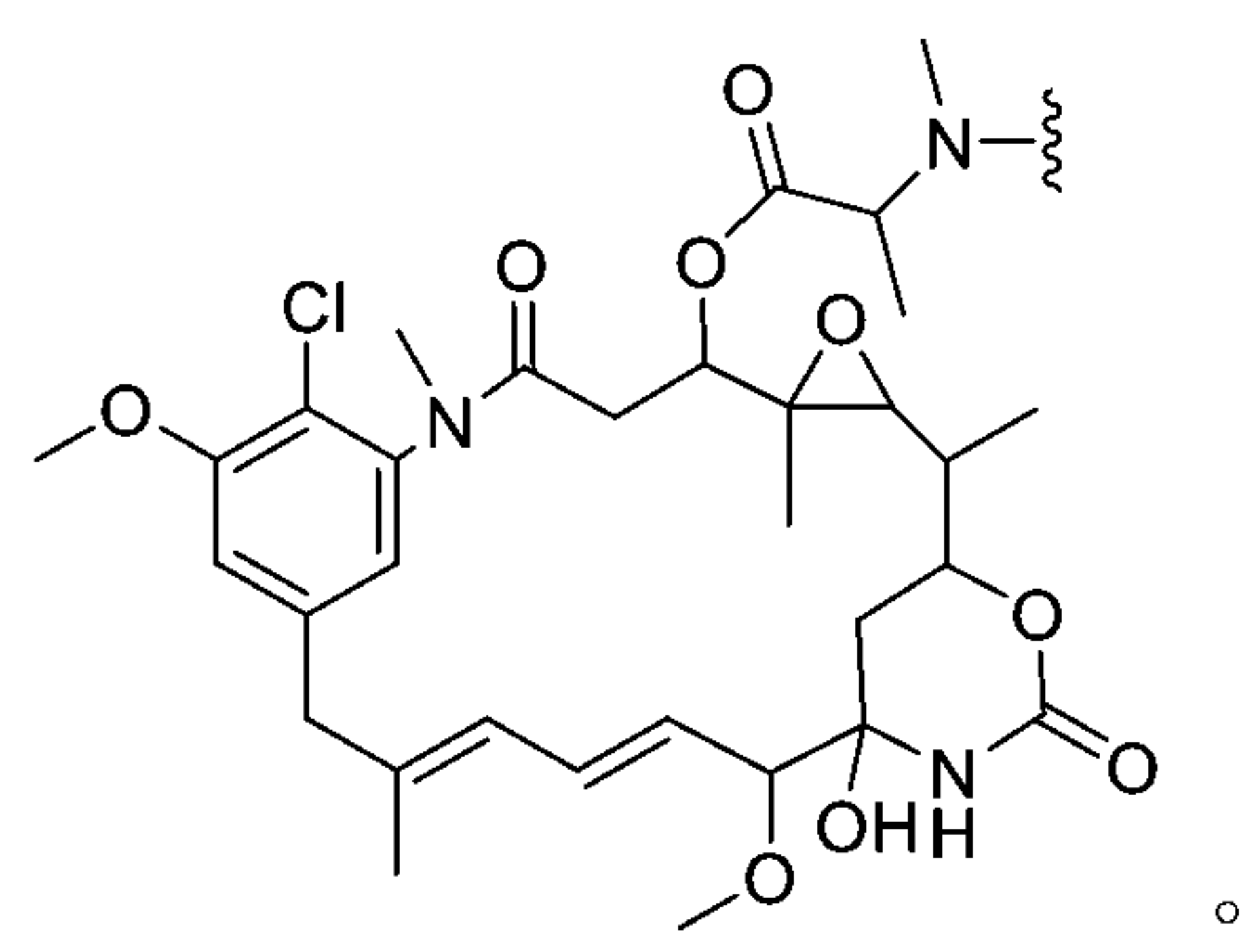


其中：

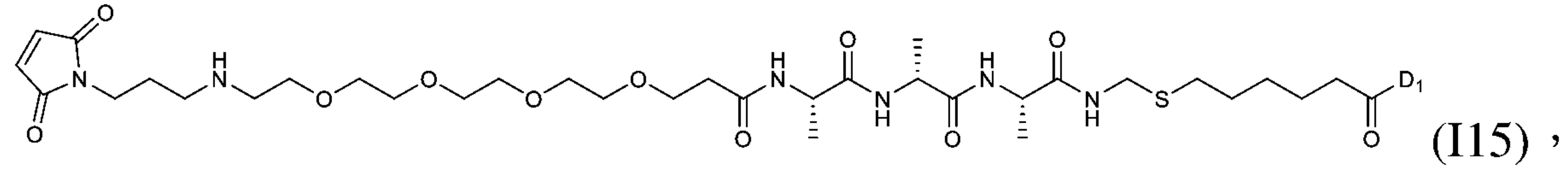
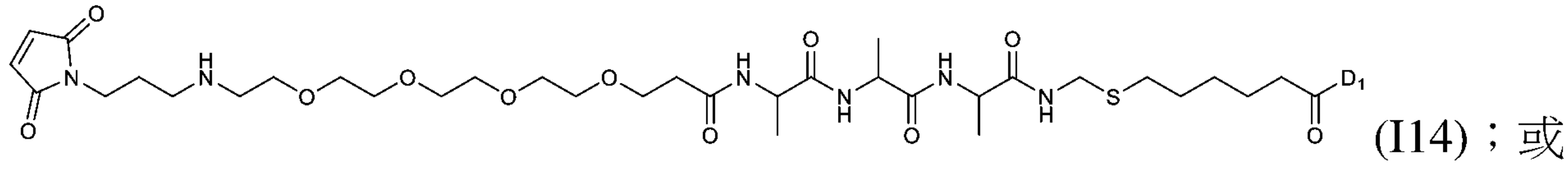
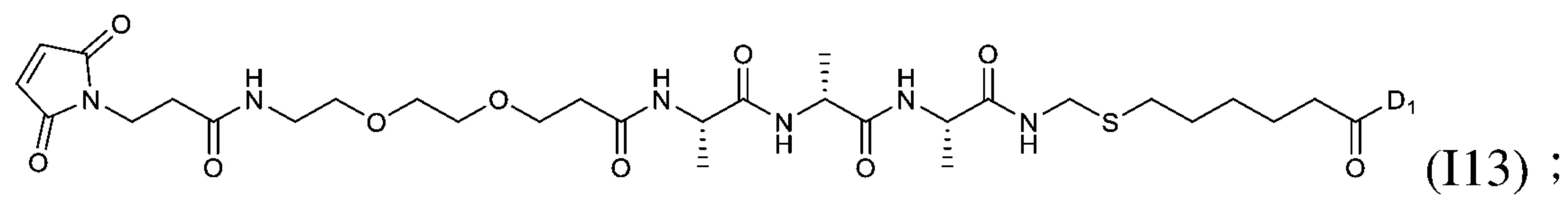
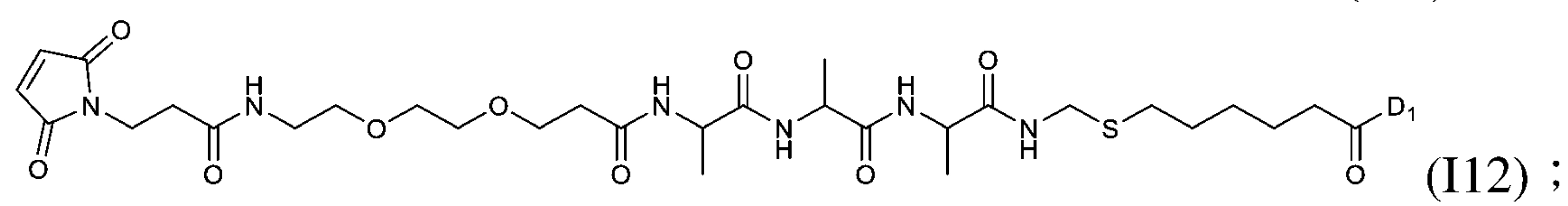
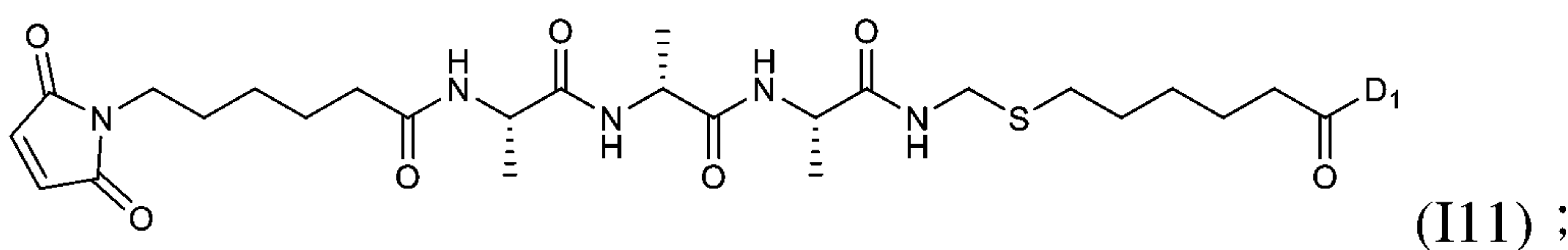
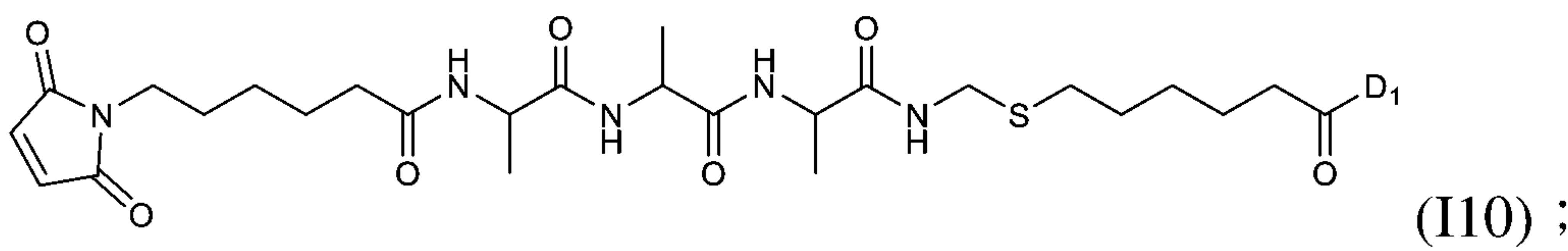
A 為 Ala-Ala-Ala、Ala-D-Ala-Ala、Ala-Ala、D-Ala-Ala、Val-Ala、D-Val-Ala、

D-Ala-Pro 或 D-Ala-tBu-Gly；且

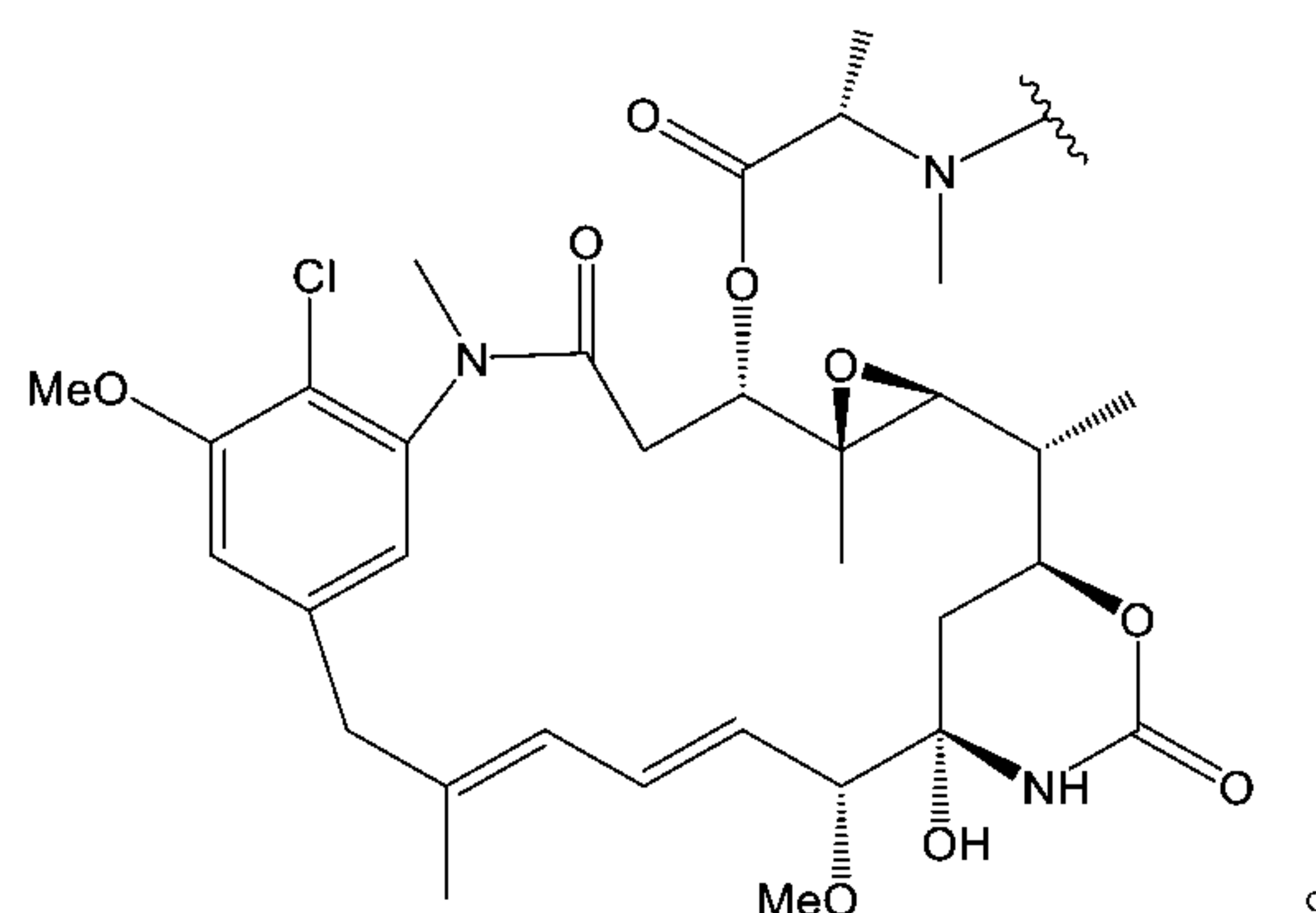
D<sub>1</sub> 係由下式表示：



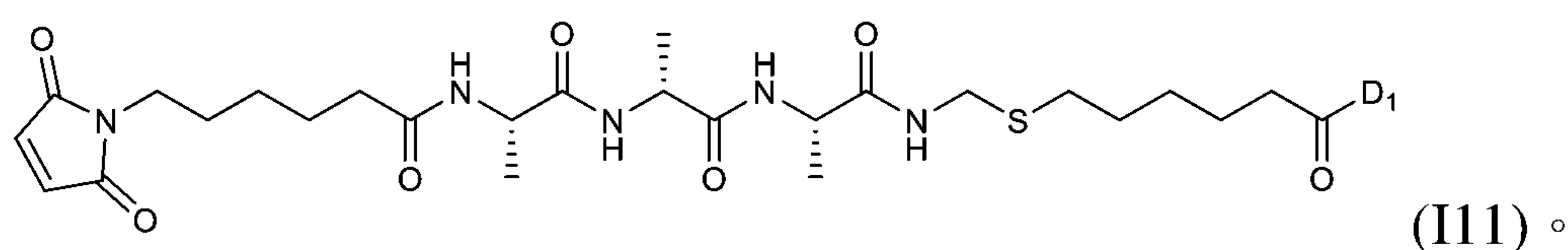
【0397】 在第三十特定實施例中，本文所述之方法(例如，第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九或第十實施例或其中所述之任何實施例之方法)中的式(I)化合物係由下式表示：



其中 D<sub>1</sub> 係由下式表示：



【0398】 在某些實施例中，式(I)化合物係由式(I11)表示：



式(I11)化合物亦稱作 DM21-C 或 Mal-LDL-DM 或 MalC5-LDL-DM。

【0399】 在某些實施例中，關於上文所述之式(I)化合物，該醫藥學上可接受之鹽為鈉鹽或鉀鹽。在某些實施例中，關於上文所述之式(I)化合物，該醫藥學上可接受之鹽為鈉鹽。

## 5. 免疫結合物、醫藥組合物及使用方法

【0400】 本發明亦提供藉由本發明方法製備之本文所述之結合物。亦提供包含本文所述之結合物之醫藥組合物。

【0401】 本文所述之醫藥組合物可以多種方式經投與以用於局部或全身性治療。投與可為表面(諸如至黏膜，包括陰道及直腸遞送)，諸如經皮貼片、軟膏、洗劑、乳膏、凝膠、滴劑、栓劑、噴霧劑、液體及散劑；肺(例如藉由散劑或氣霧劑之吸入或吹入，包括藉由噴霧器；氣管內、鼻內、表皮及經皮)；經口；或非經腸，包括靜脈內、動脈內、皮下、腹膜內或肌肉內注射或輸注；或顱內(例如鞘內或室內)投與。在一些特定實施例中，該投與為靜脈內。本文所述之醫藥組合物亦可活體外或離體使用。

【0402】 本發明包括一種抑制哺乳動物(例如人類)中之異常細胞生長或治療增生性病徵之方法，其包括向該哺乳動物投與治療有效量的本發明之免疫結合

物或醫藥組合物。

【0403】 在某些實施例中，哺乳動物中之異常細胞生長或增生性病症為癌症，包括血液癌症、白血病或淋巴瘤。在某些實施例中，該增生性病症為淋巴器官之癌症，或血液惡性腫瘤。

【0404】 例如，該癌症可選自由以下組成之群：急性骨髓白血病(AML，包括 CD33 低 AML、P-醣蛋白陽性 AML、復發性 AML 或難治性 AML)、慢性骨髓性白血病(CML) (包括 CML 之母細胞危象及與 CML 相關之 Abelson 致癌基因 (Bcr-ABL 易位))、骨髓發育不良症候群(MDS)、急性淋巴母細胞性白血病(ALL) (包括但不限於急性 B 淋巴母細胞性白血病或 B 細胞急性淋巴母細胞性白血病 (B-ALL))、慢性淋巴球性白血病(CLL) (包括 Richter 氏症候群或 Richter 氏 CLL 轉化)、毛細胞白血病(HCL)、急性早幼粒細胞性白血病(APL)、B 細胞慢性淋巴增生性疾病(B-CLPD)、非典型慢性淋巴球性白血病(較佳地具有經標記 CD11c 表現)、彌漫性大 B 細胞淋巴瘤(DLBCL)、母細胞性漿細胞樣樹突狀細胞贅瘤(BPDCN)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)，包括套細胞白血病(MCL)及小淋巴球性淋巴瘤(SLL)、霍奇金氏淋巴瘤、全身性肥大細胞增生症及伯基特氏淋巴瘤。

【0405】 在某些實施例中，該癌症具有至少一種陰性預後因子，例如 P-醣蛋白之過表現、EVI1 之過表現、p53 變化、DNMT3A 突變、FLT3 內部串聯重複。

【0406】 在某些實施例中，該癌症可選自由肺癌(例如非小細胞肺癌)、結腸直腸癌、膀胱癌、胃癌、胰臟癌、腎細胞癌、前列腺癌、食道癌、乳癌、頭頸部癌、子宮癌、卵巢癌、肝癌、子宮頸癌、甲狀腺癌、睪丸癌、骨髓癌、黑色素瘤及淋巴癌組成之群。在某些實施例中，該癌症為非小細胞肺癌、結腸直腸癌、胃癌、乳癌(例如三陰性乳癌(TNBC))或胰臟癌。在其他實施例中，本發明之免疫結合物可用於治療非小細胞肺癌(鱗狀細胞癌、非鱗狀細胞癌、腺癌或大細胞

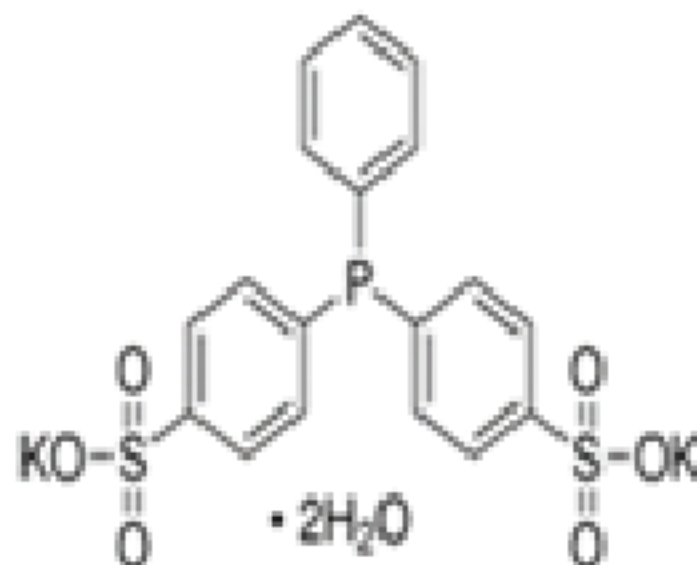
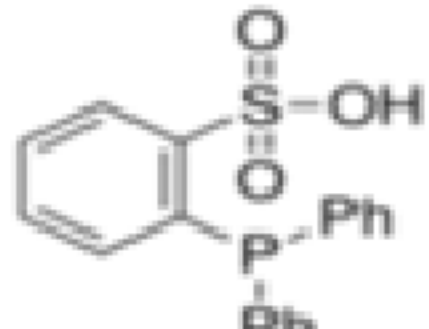
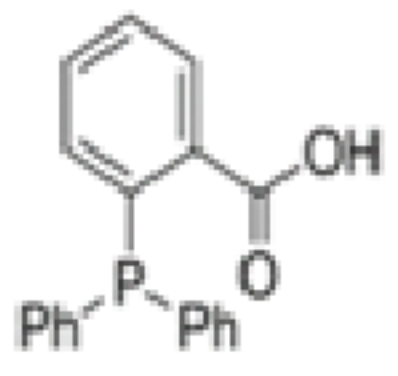
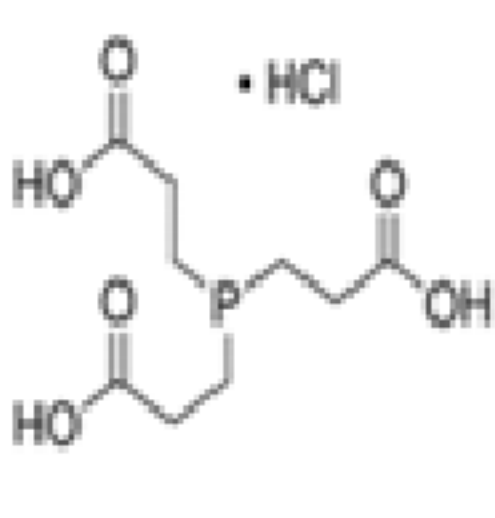
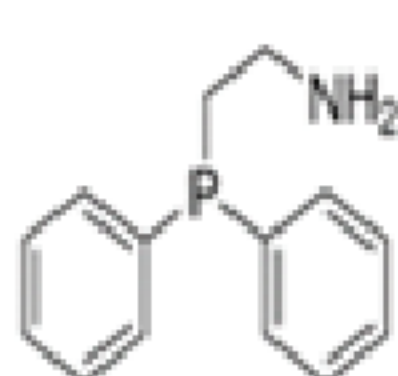
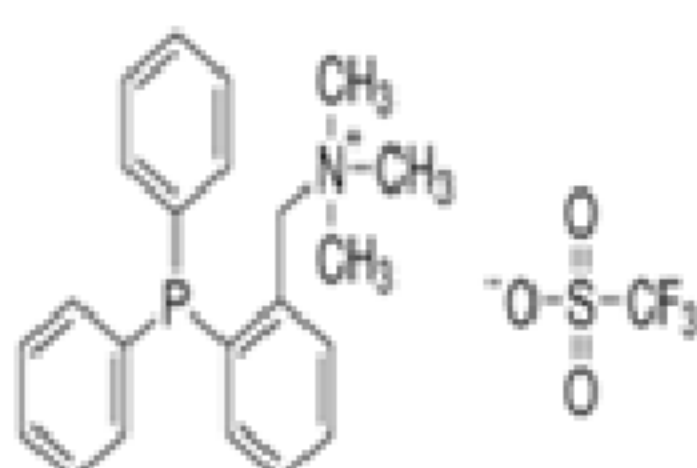
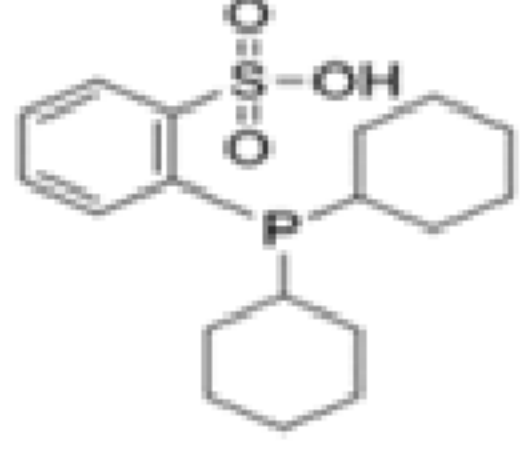
未分化癌)、結腸直腸癌(腺癌、胃腸類癌腫瘤、胃腸基質腫瘤、原發性結腸直腸淋巴瘤、平滑肌肉瘤或鱗狀細胞癌)或乳癌(例如三陰性乳癌(TNBC))

實例 1. 還原劑篩選及抗體預加工

還原劑篩選

【0407】 多種還原劑針對還原含有位點特異性結合位點之抗 CD123 抗體中的經工程改造之半胱胺酸之能力經篩選。關於所有反應，抗體於 20 mM 組胺酸(pH 6.0)中之 50 mg/mL 儲備溶液經稀釋至磷酸鉀 pH 6.0 緩衝液中以實現 50 mM 之最終磷酸鉀濃度。所需體積之 DMA 及溶解於 DMA 中之適當磷儲備液隨後添加至反應溶液中以實現 2.0 mg/mL 抗體濃度、10% (v/v) DMA 及相對於該抗體經指示數目之當量的磷(mol:mol)。隨後使反應混合物在 25°C下反應持續 4 h。在該還原反應完成時，使用 Alexa Fluor 488 順丁烯二醯亞胺於 DMA 中之 10 mM 儲備液將相對於該抗體 40 (mol:mol)當量之 Alexa Fluor 488-順丁烯二醯亞胺引入至反應中。在 25°C下培育隔夜之後，藉由 SEC 層析使用該抗體在 280 nm 下之已知消光係數及 AF488-mal 在 280 nm 及 493 nm 下之已知消光係數來測定標記之程度。結果顯示於下表 A 中。

表 A

| 磷當量 | 雙(對磺酸根基苯基)苯基磷二水合物<br> | 2-(二苯基磷基)苯磺酸<br> | 2-(二苯基磷基)苯甲酸<br> | TCEP<br> | 2-(二苯基磷基)乙胺<br> | 三氟甲磺酸2-(二苯基磷基)-N,N,N-三甲基苯甲基銨<br> | 2-(二環己基磷基)苯磺酸<br> |
|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 0   | 0.5                                                                                                      | 0.5                                                                                                 | 0.5                                                                                                  | 0.5                                                                                           | 0.5                                                                                                  | 0.5                                                                                                                   | 0.5                                                                                                    |
| 2   | 0.835                                                                                                    | 0.78                                                                                                | 2.08                                                                                                 | 2.41                                                                                          | 1.97                                                                                                 | 0.514                                                                                                                 | 0.69                                                                                                   |
| 3   | 0.845                                                                                                    | 0.74                                                                                                | 2.605                                                                                                | 3.36                                                                                          | 2.14                                                                                                 | 0.48                                                                                                                  | 0.86                                                                                                   |
| 5   | 0.88                                                                                                     | N/A                                                                                                 | 4.5                                                                                                  | 3.94                                                                                          | 2.62                                                                                                 | 0.51                                                                                                                  | 0.63                                                                                                   |
| 10  | 1.02                                                                                                     | 0.65                                                                                                | 7.1                                                                                                  | 7.24                                                                                          | 5.16                                                                                                 | 0.633                                                                                                                 | 0.05                                                                                                   |

【0408】 來自此等數據之結果指示磷 2-(二苯基磷基)苯甲酸、TCEP 及 2-(二苯基磷基)乙胺能夠還原該抗體之二硫化物，從而使其可用於後續經 AF488 順丁烯二醯亞胺標記。

【0409】 在一獨立實驗中，兩種特定磷針對其還原含有位點特異性結合位點之抗 CD123 抗體中的經工程改造之半胱胺酸之能力經篩選。該抗體首先經稀釋至 50 mM 磷酸鉀緩衝液(pH 6.0)中。向此溶液中添加相對於該抗體適當數目之當量(mol:mol)的所指示還原劑及 DMA 以實現 5 mg/mL 之最終抗體濃度及 5% (v/v) DMA。使此混合物在 25°C 下反應持續 4 h。在此步驟完成時，移出該經還原抗體之等分試樣，用 pH 6.0 磷酸鉀緩衝液稀釋且使其與 20 mol:mol 當量之 AF488-mal 對抗體在 2.5 mg/mL 抗體及 10% (v/v) DMA 下反應。在使該混合物在 25°C 下反應持續 18 h 之後，藉由 SEC 在 280 nm 及 493 nm 下監測標記之程度。該還原溶液之剩餘部分亦用維持 50 mM 緩衝液濃度之 pH 6.0 磷酸鉀緩衝液稀釋。DMA 及 DHAA (作為 DMA 儲備溶液)在 1.5:1 之 DHAA:還原劑莫耳比率下接著添加至該溶液中。該再氧化反應混合物之最終組成為 2.5 mg/mL 抗體，具有所指示數目之 DHAA 當量，及 5% (v/v) DMA。在 25°C 下培育此溶液持續 18 h 之後，建立結合反應。該反應混合物用維持 50 mM 緩衝液濃度之 pH 6.0 磷酸鉀稀釋。向此溶液中添加 DMA 及相對於該抗體 10 莫耳當量之 AF488-mal。該結合反應混合物之最終組成為 2.0 mg/mL 抗體、10 莫耳當量之 AF488-mal 及 10% (v/v) DMA。使此反應混合物在 25°C 下反應持續 18 h。在該反應完成時，藉由 SEC 層析使用該抗體在 280 nm 下之已知消光係數及 AF488-mal 在 280 nm 及 493 nm 下之已知消光係數來測定用 AF488-mal 標記之程度。此研究之結果顯示於下表 B 中。

表 B

|       | 2-(二苯基膦基)乙胺          |                                   | 3-(二苯基膦基)丙胺          |                                |
|-------|----------------------|-----------------------------------|----------------------|--------------------------------|
| 當量數   | 還原DAR<br>(20當量Alexa) | 結合後DAR<br>(1.5倍DHAA；<br>5當量Alexa) | 還原DAR<br>(20當量Alexa) | 結合後DAR (1.5倍<br>DHAA；5當量Alexa) |
| 5     | 3.25                 | 0.93                              | 6.82                 | 1.62                           |
| 10    | 5.96                 | 1.49                              | 9.38                 | 2.26                           |
| 16/15 | 7.17                 | 1.88                              | 9.49                 | 2.39                           |

【0410】 此等研究指示 2-(二苯基膦基)乙胺及 3-(二苯基膦基)丙胺均為能夠還原該抗體之原生鏈間二硫化物及經工程改造之半胱胺酸二硫化物的有效還原劑。另外，在一鍋反應中使用過量 DHAA 進行再氧化時，可獲得預期之 DAR 2 結合物。

【0411】 在一獨立實驗中，藉由在 pH 7.5 下使用膦及非膦還原劑進行還原來測試該過程。抗 CD123 抗體首先經稀釋至 50 mM 磷酸鉀緩衝液(pH 7.5)中。向此溶液中添加相對於該抗體適當數目之當量(mol:mol)的所指示還原劑及 DMA 以實現 5 mg/mL 之最終抗體濃度及 5% (v/v) DMA。使此混合物在 25°C下反應持續 4 h。在此步驟完成時，該反應溶液進一步用維持 50 mM 緩衝液濃度之 pH 7.5 磷酸鉀緩衝液稀釋。DMA 及 DHAA (作為 DMA 儲備溶液)在 1.5:1 之 DHAA:還原劑莫耳比率下接著添加至該溶液中。該再氧化反應混合物之最終組成為 2.5 mg/mL 抗體、所指示數目之 DHAA 當量及 5% (v/v) DMA。在 25°C下培育此溶液持續 18 h 之後，建立結合反應。反應混合物 pH 藉由用維持 50 mM 緩衝液濃度之 pH 6.0 磷酸鉀稀釋而降低。向此溶液中添加 DMA 及相對於該抗體 10 莫耳當量之 AF488-mal。該結合反應混合物之最終組成為 2.0 mg/mL 抗體、10 莫耳當量之 AF488-mal 及 10% (v/v) DMA。使此反應混合物在 25°C下反應持續 18 h。在該反應完成時，藉由 SEC 層析使用該抗體在 280 nm 下之已知消光係數及 AF488-mal 在 280 nm 及 493 nm 下之已知消光係數來測定用 AF488-mal 標記之程

度。此研究之結果顯示於下表 C 中。

表 C

| 反應 | 還原劑         | DTT (相對於 Ab 之當量數) | DHAA (相對於 DTT 之當量數) | AF488-mal (相對於 Ab 之當量數) | AF488 標記 /Ab |
|----|-------------|-------------------|---------------------|-------------------------|--------------|
| 1  | DTT         | 5                 | 1.5                 | 10                      | 1.3          |
| 2  | DTT         | 10                | 1.5                 | 10                      | 1.6          |
| 3  | DTT         | 20                | 1.5                 | 10                      | 1.4          |
| 4  | TCEP        | 10                | 1.5                 | 10                      | 1.7          |
| 5  | TCEP        | 15                | 1.5                 | 10                      | 1.8          |
| 6  | TCEP        | 20                | 1.5                 | 10                      | 2.0          |
| 7  | 2-(二苯基膦基)乙胺 | 5                 | 1.5                 | 10                      | 1.3          |
| 8  | 2-(二苯基膦基)乙胺 | 10                | 1.5                 | 10                      | 1.7          |
| 9  | 2-(二苯基膦基)乙胺 | 15                | 1.5                 | 10                      | 1.8          |
| 10 | 3-(二苯基膦基)丙胺 | 5                 | 1.5                 | 10                      | 2.0          |
| 11 | 3-(二苯基膦基)丙胺 | 10                | 1.5                 | 10                      | 1.6          |
| 12 | 3-(二苯基膦基)丙胺 | 15                | 1.5                 | 10                      | 2.1          |

氧化劑及還原劑濃度及對 DAR 之影響

【0412】 檢測 DHAA:2-二苯基膦基乙胺之比率對 DAR 之影響。抗 CD123 抗體首先經稀釋至 50 mM 磷酸鉀緩衝液(pH 6.0)中。向此溶液中添加相對於該抗體適當數目之當量(mol:mol)的 2-(二苯基膦基)乙胺及 DMA 以實現 5 mg/mL 之最終抗體濃度及 5% (v/v) DMA。使此混合物在 25°C下反應持續 4 h。在此步驟完成時，移出該經還原抗體之等分試樣，用 pH 6.0 磷酸鉀緩衝液稀釋且使其與 20 mol:mol 當量之 AF488-mal 對抗體在 2.5 mg/mL 抗體及 10% (v/v) DMA 下反應。在使該混合物在 25°C下反應持續 18 h 之後，藉由 SEC 在 280 nm 及 493 nm 下監測標記之程度。該還原溶液之剩餘部分亦用維持 50 mM 緩衝液濃度之 pH 6.0 磷酸鉀緩衝液稀釋。DMA 及 DHAA (作為 DMA 儲備溶液)在所指示之 DHAA:還原劑莫耳比率下接著添加至該溶液中。該再氧化反應混合物之最終組成為 2.5 mg/mL 抗體，具有所指示數目之 DHAA 當量，及 5% (v/v) DMA。在 25°C下培

育此溶液持續 18 h 之後，建立結合反應。該反應混合物用維持 50 mM 緩衝液濃度之 pH 6.0 磷酸鉀稀釋。向此溶液中添加 DMA 及相對於該抗體 10 莫耳當量之 AF488-mal。該結合反應混合物之最終組成為 2.0 mg/mL 抗體、10 莫耳當量之 AF488-mal 及 10% (v/v) DMA。使此反應混合物在 25°C下反應持續 18 h。在該反應完成時，藉由 SEC 層析使用該抗體在 280 nm 下之已知消光係數及 AF488-mal 在 280 nm 及 493 nm 下之已知消光係數來測定用 AF488-mal 標記之程度。此研究之結果顯示於下表 D 及圖 1 中。

表 D

| 2-二苯基膦基<br>乙胺之當量 | DAR (還原後；<br>20當量AF488-Mal) |
|------------------|-----------------------------|
| 0                | 0.53                        |
| 5                | 3.25                        |
| 6                | 4.19                        |
| 8                | 5.51                        |
| 10               | 5.96                        |
| 12               | 6.44                        |
| 16               | 7.17                        |

【0413】 此等數據指示使用 2-(二苯基膦基)乙胺發生有效結合。特定言之，當膦之當量增加時，觀察到較高程度之 AF-488 標記。另外，在 1.0-2.0 mol:mol 過量之 DHAA:膦中，未觀察到 AF-488 標記之顯著差異，指示該抗體之原生鏈間二硫鍵之完全再氧化。

抗體濃度研究

【0414】 使用一鍋結合方法評估高抗體濃度對 DAR 之影響。抗 ADAM9 抗體首先經稀釋至 50 mM 磷酸鉀緩衝液(pH 6.0)中。向此溶液中添加相對於該抗體 25 當量(mol:mol)之所指示之膦及 DMA 以實現 10 mg/mL 之最終抗體濃度及 5%

(v/v) DMA。使此混合物在 25°C下反應持續 4 h。在此步驟完成時，移出該經還原抗體之等分試樣，用 pH 6.0 磷酸鉀緩衝液稀釋且使其與 25 mol:mol 當量之 AF488-mal 對抗體在 4.0 或 7.5 mg/mL 抗體(分別針對低及高濃度反應)及 10% (v/v) DMA 下反應。在使該混合物在 25°C下反應持續 4 h 之後，藉由 SEC 在 280 nm 及 493 nm 下監測標記之程度。該還原溶液之剩餘部分亦用維持 50 mM 緩衝液濃度之 pH 6.0 磷酸鉀緩衝液稀釋。DMA 及 DHAA (作為 DMA 儲備溶液)在 1:1 之 DHAA:還原劑莫耳比率下接著添加至該溶液中。該再氧化反應混合物之最終組成為如所指示之 4 或 7.5 mg/mL 抗體，相對於抗體具有 25 mol:mol 當量 DHAA，及 7.5% (v/v) DMA。在 25°C下培育此溶液持續 18 h 之後，建立結合反應。該反應混合物用維持 50 mM 緩衝液濃度之 pH 6.0 磷酸鉀稀釋。向此溶液中添加 DMA 及相對於該抗體 5 莫耳當量之 AF488-mal。該結合反應混合物之最終組成為分別針對低及高濃度反應之 3.5 或 7 mg/mL 抗體、5 莫耳當量之 AF488-mal 及 10% (v/v) DMA。使此反應混合物在 25°C下反應持續 18 h。在該反應完成時，藉由 SEC 層析使用該抗體在 280 nm 下之已知消光係數及 AF488-mal 在 280 nm 及 493 nm 下之已知消光係數來測定用 AF488-mal 標記之程度。此研究之結果顯示於下表 E 中。

表 E

| 反應 | 膦           | 還 原 濃<br>度<br>(mg/mL) | 再氧化濃<br>度<br>(mg/mL) | 結 合 濃<br>度<br>(mg/mL) | 還 原 反 應<br>之 後 的<br>AF488-mal<br>標記 | 最 終 結<br>合 物 之<br>AF488-<br>mal 標記 |
|----|-------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| 1  | TCEP        | 10                    | 4                    | 3.5                   | 8.45                                | 1.53                               |
| 2  | 參(羥基丙基)膦    | 10                    | 4                    | 3.5                   | 9.72                                | 1.88                               |
| 3  | 參(羥基丙基)膦    | 10                    | 7.5                  | 7                     | 9.63                                | 1.97                               |
| 4  | 2-(二苯基膦基)乙胺 | 10                    | 4                    | 3.5                   | 8.76                                | 1.93                               |

|   |              |    |     |     |      |      |
|---|--------------|----|-----|-----|------|------|
| 5 | 2-(二苯基磷基)乙胺  | 10 | 7.5 | 7   | 8.67 | 1.85 |
| 6 | 3-(二苯基磷基)丙胺  | 10 | 4   | 3.5 | 9.37 | 1.94 |
| 7 | 3-(二苯基磷基)丙胺  | 10 | 7.5 | 7   | 8.98 | 2.15 |
| 8 | 雙(3-胺基丙基)苯基磷 | 10 | 4   | 3.5 | 9.51 | 1.91 |
| 9 | 雙(3-胺基丙基)苯基磷 | 10 | 7.5 | 7   | 8.28 | 2.05 |

【0415】 在低或高濃度下用不同的磷進行還原、再氧化及結合之後，所有反應均顯示逼近 2.0 個標記/抗體之目標的 AF488-mal 標記。

時間及溫度對 TCEP 還原之影響

【0416】 使用一鍋結合方法檢測時間及溫度對 TCEP 還原之影響。在 10 mg/mL 抗 ADAM9 抗體濃度下在具有 5% DMA 之 pH 6.0 25 mM 丁二酸鹽中執行還原反應。反應用 25 mol:mol 當量之 TCEP 建立且在 25°C、30°C或 35°C下執行 2、4、6、8 或 20 小時。在 7 mg/mL 抗體濃度下在具有 8% DMA 之 pH 6.0 25 mM 丁二酸鹽中執行再氧化反應。反應用相對於 TCEP 1.5 倍過量之 DHAA 建立且在 25°C下執行 16-20 小時。經再氧化之抗體直接用於建立具有 AF488-mal 有效載荷之結合反應。在 5 mg/mL 抗體濃度下在具有 10% DMA 之 pH 6.0 25 mM 丁二酸鹽中執行此等結合反應。反應用 5.0 mol:mol 當量之 AF488-mal 建立且在 25°C下執行 16-20 h。在各 AF488-mal 反應結束時，經由 SEC 分析樣品之單體及 AF488-mal 標記之程度。藉由使用該抗體在 280 nm 下之已知消光係數及 AF488-mal 在 280 nm 及 493 nm 下之已知消光係數來測定用 AF488-mal 標記之程度。此等反應之詳情顯示於表 F 及圖 2 及圖 3 中。

表 F

| 樣品 | 還原時間(h) | 還原溫度(C) | 單體%   | SEC DAR |
|----|---------|---------|-------|---------|
| 1  | 2       | 25      | 96.30 | 1.53    |

|    |    |    |       |      |
|----|----|----|-------|------|
| 2  | 4  | 25 | 97.44 | 1.86 |
| 3  | 6  | 25 | 97.74 | 1.92 |
| 4  | 8  | 25 | 98.20 | 2.05 |
| 5  | 20 | 25 | 97.13 | 2.28 |
| 6  | 2  | 30 | 97.32 | 1.75 |
| 7  | 4  | 30 | 98.17 | 2.01 |
| 8  | 6  | 30 | 98.41 | 2.13 |
| 9  | 8  | 30 | 98.46 | 2.19 |
| 10 | 20 | 30 | 93.36 | 2.34 |
| 11 | 2  | 35 | 97.79 | 1.97 |
| 12 | 4  | 35 | 98.45 | 2.18 |
| 13 | 6  | 35 | 94.81 | 2.24 |
| 14 | 8  | 35 | 93.51 | 2.29 |
| 15 | 20 | 35 | 85.99 | 2.42 |

【0417】 此研究證明了 TCEP 還原反應時間及溫度對最終結合物標記程度具有影響，其中最短反應時間轉化成用 AF488-mal 標記之較低程度。在升高溫度下觀察到對結合物穩定性之額外影響，其中發現該結合物之單體%隨時間降低。

TCEP 當量篩選

【0418】 使用一鍋結合方法及抗 ADAM9 抗體檢測 TCEP 濃度對半胱胺酸還原之影響。在 10 mg/mL 抗體濃度下在具有 5% DMA 之 pH 6.0 25 mM 丁二酸鹽中執行還原反應。此等還原反應用相對於該抗體 8、10、15、20 或 25 當量之 TCEP 建立且在 25°C 下執行 8 小時。在 7 mg/mL 抗體濃度下在具有 8% DMA 之 pH 6.0 25 mM 丁二酸鹽中在相對於 TCEP 1.5 倍過量之 DHAA 存在下執行再氧化反應且在 25°C 下執行 16-20 小時。經再氧化之抗體反應混合物直接用於建立具有 AF-488Mal 標記之結合反應。在 5 mg/mL 抗體濃度下在具有 10% DMA 之 pH 6.0 25 mM 丁二酸鹽中執行此等結合反應。反應用相對於該抗體 5 莫耳當量之 AF-488Mal 建立且在 25°C 下執行 16-20 h。在該反應完成時，藉由 SEC 層析使用該抗體在 280 nm 下之已知消光係數及 AF488-mal 在 280 nm 及 493 nm 下之已知消光係數來測定用 AF488-mal 標記之程度。此研究之結果顯示於下表 G 及圖 4 中。

表 G

| 樣品 | TCEP 當量 | 還原時間(h) | SEC DAR |
|----|---------|---------|---------|
| 1  | 8       | 8       | 1.62    |
| 2  | 10      | 8       | 1.73    |
| 3  | 15      | 8       | 1.91    |
| 4  | 20      | 8       | 1.95    |
| 5  | 25      | 8       | 2.03    |

【0419】 此等數據指示最終結合物有效載荷負載取決於莫耳過量之膦。在 pH 6.0 下使用 TCEP，需要 15 或更大當量之還原劑來實現大於 1.9 之標記程度。

**實例 2：使用 TCEP 及 3-(二苯基膦基)丙胺(DPPA)之一鍋結合過程之比較**

【0420】 設計此等實驗以確認及比較以 25 mg Ab 規模使用抗 ADAM9 抗體進行之 pH 7.5 TCEP 還原及 pH 6.0 DPPA 還原之功效。

【0421】 關於 TCEP 一鍋過程，在 12 mg/mL 抗體濃度下在具有 5% DMA 之 pH 7.5 50 mM KPi 中執行還原反應。該反應用相對於抗體 27 莫耳當量之 TCEP 建立且在 25°C 下執行 4 小時。使用此經還原抗體來建立再氧化反應，該再氧化反應在 10 mg/mL 抗體濃度下在具有 7.5% DMA 之 pH 7.5 50 mM KPi 中執行。該再氧化反應用 1:1 莫耳比率之 DHAA:TCEP 建立且在 25°C 下執行 4 小時。經再氧化之抗體在結合之前用 1 M 乙酸調節 pH 至 6.0。在 8 mg/mL 抗體濃度下在具有 15% DMA 之 pH 6.0 50 mM KPi 中執行結合反應。該結合反應用相對於抗體 5.4 莫耳當量之 DM21-C 建立且在 25°C 下執行 8-12 小時。

【0422】 關於 DPPA 一鍋過程，在 12 mg/mL 抗體濃度下在具有 5% DMA 之 pH 6.0 25 mM 丁二酸鹽中在相對於抗體 16 莫耳當量之 DPPA 存在下執行還原反應且在 25°C 下執行 4 小時。使用此經還原抗體來建立再氧化反應，該再氧化反應在 10 mg/mL 抗體濃度下在具有 7.5% DMA 之 pH 6.0 25 mM 丁二酸鹽中執行。該再氧化反應用 1:1 莫耳比率之 DHAA:DPPA 建立且在 25°C 下執行 13 小時。在 8 mg/mL 抗體濃度下在具有 15% DMA 之 pH 6.0 25 mM 丁二酸鹽中執行結合反

應。該結合反應用相對於抗體 5.4 莫耳當量之 DM21-C 建立且在 25°C 下執行 8-12 小時。經由 SEC 分析粗結合物之單體及 DAR。使用 TCEP 及 DPPA 之一鍋結合過程之結果詳述於表 H 中。

表 H

| 樣品 | 還原劑  | 還原 pH | 再氧化 pH | 結合 pH | 磷當量   | 單體%  | SEC DAR |
|----|------|-------|--------|-------|-------|------|---------|
| 1  | TCEP | 7.5   | 7.5    | 6     | 27.17 | 98.0 | 1.82    |
| 2  | DPPA | 6     | 6      | 6     | 16.30 | 97.7 | 1.98    |

【0423】 此數據支持先前反應集合之發現，從而確認在 pH 6.0 DPPA 還原下之結合導致高於提供 pH 7.5 TCEP 還原之結合之 DAR 值。此兩種還原條件下之單體水準可相當，其中 pH 7.5 TCEP 還原產生高 0.3% 之單體水準。

實例 3：針對使用 TCEP 作為還原劑之一鍋過程之還原反應 pH 篩選

【0424】 設計此實驗以針對使用作為還原劑之 TCEP、抗 ADAM9 抗體及 DM21-C 有效載荷之一鍋過程篩選還原反應 pH。

【0425】 引入之抗 ADAM9 抗體溶液(含 25 mg/mL 抗體之 10 mM 乙酸鈉，pH 5.0，9%蔗糖)用適當 pH 200 mM 磷酸鉀緩衝液稀釋以製備具有 50 mM 之最終磷酸鉀濃度的不同 pH 抗體儲備溶液，該等儲備溶液為 pH 7.0、8.0 及 8.5。隨後使用此等抗體溶液來建立相應 pH 還原反應。在 10 mg/mL 抗體濃度下在 pH 7.0、8.0 或 8.5 之 50 mM 磷酸鉀及 5% DMA 中執行還原反應。反應用相對於抗體 27 莫耳當量之 TCEP 建立且在 25°C 下執行 4 小時。經還原抗體溶液使用 1M 乙酸調節 pH 至 6.0 且接著未經純化即用於建立再氧化反應，該等再氧化反應在 9 mg/mL 抗體濃度下在具有 8% DMA 之 pH 6.0 50 mM 磷酸鉀中執行。反應用相對於 TCEP 1.5 倍莫耳過量之 DHAA 建立且在 25°C 下執行 12-16 小時。經再氧化之抗體接著直接用於建立結合反應，該等結合反應在 8 mg/mL 抗體濃度下在含有 15% DMA 之 pH 6.0 50 mM 磷酸鉀中執行。反應用 5.4 當量之 DM21-C 建立且在

25°C下執行 8 小時。經由 SEC 分析粗結合物之單體%及 DAR。

【0426】 此實驗之結果顯示於下表 I 中。詳言之，此等結果指示將還原反應 pH 自 7.0 增加至 8.5 不會顯著地影響最終結合物。

| 表 I |       |        |       |       |         |
|-----|-------|--------|-------|-------|---------|
| 反應  | 還原 pH | 再氧化 pH | 結合 pH | 單體%   | SEC DAR |
| 1   | 7.0   | 6.0    | 6.0   | 97.39 | 1.81    |
| 2   | 8.0   | 6.0    | 6.0   | 96.42 | 1.76    |
| 3   | 8.5   | 6.0    | 6.0   | 96.00 | 1.78    |

實例 4：關於抗 ADAM9 藥物結合物之結合之一鍋結合過程開發

在 pH 5.0 下而無 pH 調節之一鍋過程

【0427】 設計此實驗以測定在含有 9%蔗糖之 pH 5.0 10 mM 乙酸鹽緩衝液中 之 25 mg/mL 抗 ADAM9 抗體是否適用於一鍋過程中在 pH 5.0 下而無 pH 調節之 直接結合。

【0428】 在 12 mg/mL 抗體濃度下在具有 5% DMA 之 pH 5 10 mM 乙酸鹽+ 9% 蔗糖中執行還原反應。反應用相對於該抗體所指示之莫耳過量之 DPPA 建立且 在 25°C下執行 10 小時。經還原抗體未經純化即用於建立再氧化反應，該等再氧 化反應在 10 mg/mL 下在含有 7.5% DMA 之 pH 5.0 10 mM 乙酸鹽+ 9%蔗糖中執 行。反應用 1:1 莫耳比率之 DHAA:DPPA 磷建立且在 25°C下執行 12 小時。經再 氧化之抗體未經純化即用於建立使用 DM21-C 之結合反應。在 8 mg/mL 抗體濃 度下在含有 15% DMA 之 pH 5 10 mM 乙酸鹽+ 9%蔗糖中執行此等結合反應。反 應用 5.4 當量之 DM21-C 建立且在 25°C下執行 12 h。在結合反應結束時，經由 SEC 分析樣品之單體%及 DAR。

【0429】 此實驗之結果顯示於下表 J 中。詳言之，此等結果指示 DPPA 可在 一鍋過程中在 pH 5.0 下用作還原劑以製備 DAR 2 結合物。

表 J

| 反應 | 還原劑  | DPPA 當量 | 單體%   | SEC DAR |
|----|------|---------|-------|---------|
| 1  | DPPA | 11      | 98.12 | 2.11    |
| 2  | DPPA | 16      | 97.54 | 2.07    |
| 3  | DPPA | 22      | 97.05 | 2.17    |
| 4  | DPPA | 27      | 95.72 | 2.26    |

針對使用 DPPA 之一鍋過程之反應溫度篩選

【0430】 設計此實驗以針對使用作為還原劑之 DPPA、抗 ADAM9 抗體及 DM21-C 有效載荷之一鍋過程篩選反應溫度。

【0431】 關於所有反應，引入之抗 ADAM9 抗體(含約 25 mg/mL 抗體之 10 mM 乙酸鈉，pH 5.0，具有 9%蔗糖)經稀釋至 pH 6.5 磷酸鉀緩衝液中以生成 50 mM 之最終磷酸鉀緩衝液濃度。隨後使用此等抗體溶液來建立在 4.1 mg/mL 抗體之最終抗體濃度下的還原反應。相對於該抗體 16 莫耳當量之 DPPA 膦添加至具有 5% 之最終 DMA 共溶劑濃度之抗體溶液中。使還原反應在所指示之溫度下繼續進行 4 h。該反應溫度維持於所指示之值下，持續該一鍋過程之持續時間。經還原抗體溶液接著未經純化即用於建立再氧化反應。在 3.7 mg/mL 之最終抗體濃度、相對於 DPPA 1.5 倍莫耳過量之 DHAA 氧化劑及 7%之最終 DMA 共溶劑濃度下執行再氧化反應。使再氧化反應繼續進行 8 h，隨後起始結合反應。在用額外 50 mM pH 6.5 磷酸鉀稀釋之後，向經再氧化之抗體溶液中添加相對於在 2.8 mg/mL 濃度下之抗體 5.4 莫耳當量之 DM21-C。在 15%之最終 DMA 濃度下反應持續 8 h 之後，經由 SEC 分析粗反應混合物之單體%及 DAR。此等實驗之結果顯示於下表 K 中。基於此等數據，發現該一鍋過程中在 18°與 27°C之間之溫度不會對 DAR 及單體%具有影響。

表 K

| 反應 | 溫度(C) | DAR (SEC) | 單體%   |
|----|-------|-----------|-------|
| 1  | 27    | 1.97      | 98.46 |
| 2  | 25    | 1.96      | 98.47 |
| 3  | 23    | 1.98      | 98.46 |
| 4  | 21    | 2.00      | 98.45 |

|   |    |      |       |
|---|----|------|-------|
| 5 | 22 | 2.04 | 98.52 |
| 6 | 20 | 2.01 | 98.44 |
| 7 | 18 | 2.02 | 98.56 |

針對使用 DPPA 之一鍋過程之 pH 篩選

【0432】 設計此實驗以在 25°C下針對使用作為還原劑之 DPPA、抗 ADAM9 抗體及 DM21-C 有效載荷之一鍋過程篩選反應 pH。

【0433】 關於所有反應，引入之抗 ADAM9 抗體(含約 25 mg/mL 抗體之 10 mM 乙酸鈉，pH 5.0，具有 9%蔗糖)經稀釋至所指示之 pH 磷酸鉀緩衝液中以生成 50 mM 之最終磷酸鉀緩衝液濃度。隨後使用此等抗體溶液來建立在 4.1 mg/mL 抗體之最終抗體濃度下的還原反應。相對於該抗體 16 莫耳當量之 DPPA 膦添加至具有 5%之最終 DMA 共溶劑濃度之抗體溶液中。使還原反應繼續進行 4 h。該反應 pH 維持於所指示之值下，持續該一鍋過程之持續時間而無 pH 調節。經還原抗體溶液接著未經純化即用於建立再氧化反應。在 3.7 mg/mL 之最終抗體濃度、相對於 DPPA 1.5 倍莫耳過量之 DHAA 氧化劑及 7%之最終 DMA 共溶劑濃度下執行再氧化反應。適當 pH 之磷酸鉀儲備緩衝液用於反應之稀釋以實現標靶抗體濃度。使再氧化反應繼續進行 8 h，隨後起始結合反應。在用額外 50 mM 適當 pH 之磷酸鉀緩衝液稀釋之後，向經再氧化之抗體溶液中添加相對於在 2.8 mg/mL 濃度下之抗體 5.4 莫耳當量之 DM21-C。在 15%之最終 DMA 濃度下反應持續 8 h 之後，經由 SEC 分析粗反應混合物之單體%及 DAR。此等實驗之結果顯示於下表 L 中。

表 L

| 反應 | pH  | DAR (SEC) | 單體%   |
|----|-----|-----------|-------|
| 1  | 6.6 | 1.98      | 98.43 |
| 2  | 6.5 | 1.96      | 98.47 |
| 3  | 6.4 | 1.99      | 98.47 |
| 4  | 6.3 | 1.99      | 98.53 |

針對使用 DPPA 之一鍋過程之膦濃度篩選

【0434】 設計此實驗以在 25°C下在使用作為還原劑之 DPPA、抗 ADAM9 抗體及 DM21-C 有效載荷之一鍋過程中篩選磷之量。

【0435】 關於所有反應，引入之抗 ADAM9 抗體(含約 25 mg/mL 抗體之 10 mM 乙酸鈉，pH 5.0，具有 9%蔗糖)經稀釋至 pH 6.5 磷酸鉀緩衝液中以生成 50 mM 之最終磷酸鉀緩衝液濃度。隨後使用此等抗體溶液來建立在 4.1 mg/mL 抗體之最終抗體濃度下的還原反應。相對於該抗體所指示數目之莫耳當量之 DPPA 磷添加至具有 5%之最終 DMA 共溶劑濃度之抗體溶液中。使還原反應繼續進行 4 h，且反應 pH 維持於 6.5 下，持續該一鍋過程之持續時間而無 pH 調節。經還原抗體溶液接著未經純化即用於建立再氧化反應。在 3.7 mg/mL 之最終抗體濃度、相對於 DPPA 1.5 倍莫耳過量之 DHAA 氧化劑及 7%之最終 DMA 共溶劑濃度下執行再氧化反應。pH 6.5 磷酸鉀儲備緩衝液用於反應之稀釋以實現標靶抗體濃度。使再氧化反應繼續進行 8 h，隨後起始結合反應。在用額外 50 mM pH 6.5 磷酸鉀緩衝液稀釋之後，向經再氧化之抗體溶液中添加相對於在 2.8 mg/mL 濃度下之抗體 5.4 莫耳當量之 DM21-C。在 15%之最終 DMA 濃度下反應持續 8 h 之後，經由 SEC 分析粗反應混合物之單體%及 DAR。此等實驗之結果顯示於下表 M 中。

表 M

| 反應 | DPPA 當量 | DAR (SEC) | 單體%   |
|----|---------|-----------|-------|
| 1  | 19      | 2.03      | 98.44 |
| 2  | 16      | 1.96      | 98.47 |
| 3  | 14      | 1.95      | 98.43 |

針對使用 DPPA 之一鍋過程之 DHAA 氧化劑濃度篩選

【0436】 設計此實驗以在 25°C下在使用作為還原劑之 DPPA、抗 ADAM9 抗體及 DM21-C 有效載荷之一鍋過程中篩選 DHAA 氧化劑之量。

【0437】 關於所有反應，引入之抗 ADAM9 抗體(含約 25 mg/mL 抗體之 10 mM 乙酸鈉，pH 5.0，具有 9%蔗糖)經稀釋至 pH 6.5 磷酸鉀緩衝液中以生成 50 mM

之最終磷酸鉀緩衝液濃度。隨後使用此等抗體溶液來建立在 4.1 mg/mL 抗體之最終抗體濃度下的還原反應。相對於該抗體 16 莫耳當量之 DPPA 膦添加至具有 5% 之最終 DMA 共溶劑濃度之抗體溶液中。使還原反應繼續進行 4 h，且反應 pH 維持於 6.5 下，持續該一鍋過程之持續時間而無 pH 調節。經還原抗體溶液接著未經純化即用於建立再氧化反應。在 3.7 mg/mL 之最終抗體濃度、相對於 DPPA 所指示倍數之莫耳過量之 DHAA 氧化劑及 7% 之最終 DMA 共溶劑濃度下執行再氧化反應。pH 6.5 磷酸鉀儲備緩衝液用於反應之稀釋以實現標靶抗體濃度。使再氧化反應繼續進行 8 h，隨後起始結合反應。在用額外 50 mM pH 6.5 磷酸鉀緩衝液稀釋之後，向經再氧化之抗體溶液中添加相對於在 2.8 mg/mL 濃度下之抗體 5.4 莫耳當量之 DM21-C。在 15% 之最終 DMA 濃度下反應持續 8 h 之後，經由 SEC 分析粗反應混合物之單體%及 DAR。此等實驗之結果顯示於下表 N 中。

表 N

| 反應 | DHAA 當量(相對於 DPPA) | DAR (SEC) | 單體%   |
|----|-------------------|-----------|-------|
| 1  | 1.7               | 1.96      | 98.43 |
| 2  | 1.5               | 1.96      | 98.47 |
| 3  | 1.4               | 1.98      | 98.43 |

針對使用 DPPA 之一鍋過程之有效載荷濃度篩選

【0438】 設計此實驗以在 25°C 下在使用作為還原劑之 DPPA、抗 ADAM9 抗體之一鍋過程中篩選 DM21-C 有效載荷之所需量。

【0439】 關於所有反應，引入之抗 ADAM9 抗體(含約 25 mg/mL 抗體之 10 mM 乙酸鈉，pH 5.0，具有 9% 蔗糖)經稀釋至 pH 6.5 磷酸鉀緩衝液中以生成 50 mM 之最終磷酸鉀緩衝液濃度。隨後使用此等抗體溶液來建立在 4.1 mg/mL 抗體之最終抗體濃度下的還原反應。相對於該抗體 16 莫耳當量之 DPPA 膦添加至具有 5% 之最終 DMA 共溶劑濃度之抗體溶液中。使還原反應繼續進行 4 h，且反應 pH 維持於 6.5 下，持續該一鍋過程之持續時間而無 pH 調節。經還原抗體溶液接著

未經純化即用於建立再氧化反應。在 3.7 mg/mL 之最終抗體濃度、相對於 DPPA 1.5 倍莫耳過量之 DHAA 氧化劑及 7%之最終 DMA 共溶劑濃度下執行再氧化反應。pH 6.5 磷酸鉀儲備緩衝液用於反應之稀釋以實現標靶抗體濃度。使再氧化反應繼續進行 8 h，隨後起始結合反應。在用額外 50 mM pH 6.5 磷酸鉀緩衝液稀釋之後，向經再氧化之抗體溶液中添加相對於在 2.8 mg/mL 濃度下之抗體所指示莫耳當量之 DM21-C。在 15%之最終 DMA 濃度下反應持續 8 h 之後，經由 SEC 分析粗反應混合物之單體%及 DAR。此等實驗之結果顯示於下表 O 中。

表 O

| 反應 | DM21-C 當量(相對於 Ab) | DAR (SEC) | 單體%   |
|----|-------------------|-----------|-------|
| 1  | 5.4               | 1.96      | 98.47 |
| 2  | 5.2               | 1.94      | 98.48 |
| 3  | 5.0               | 1.93      | 98.50 |
| 4  | 4.8               | 1.96      | 98.45 |
| 5  | 4.6               | 1.93      | 98.46 |
| 6  | 4.3               | 1.93      | 98.44 |
| 7  | 4.1               | 1.92      | 98.40 |
| 8  | 3.9               | 2.00      | 98.52 |
| 9  | 3.7               | 2.01      | 98.47 |
| 10 | 3.5               | 2.01      | 98.44 |

針對使用 DPPA 之一鍋過程之結合反應時間篩選

【0440】 設計此實驗以在 25°C下在使用作為還原劑之 DPPA、抗 ADAM9 抗體之一鍋過程中篩選所需結合反應時間。

【0441】 關於此反應，引入之抗 ADAM9 抗體(含約 25 mg/mL 抗體之 10 mM 乙酸鈉，pH 5.0，具有 9%蔗糖)經稀釋至 pH 6.5 磷酸鉀緩衝液中以生成 50 mM 之最終磷酸鉀緩衝液濃度。隨後使用此抗體溶液來建立在 4.1 mg/mL 抗體之最終抗體濃度下的還原反應。相對於該抗體 16 莫耳當量之 DPPA 磷添加至具有 5% 之最終 DMA 共溶劑濃度之抗體溶液中。使還原反應繼續進行 4 h，且反應 pH 維持於 6.5 下，持續該一鍋過程之持續時間而無 pH 調節。經還原抗體溶液接著

未經純化即用於建立再氧化反應。在 3.7 mg/mL 之最終抗體濃度、相對於 DPPA 1.5 倍莫耳過量之 DHAA 氧化劑及 7%之最終 DMA 共溶劑濃度下執行此再氧化反應。pH 6.5 磷酸鉀儲備緩衝液用於反應之稀釋以實現標靶抗體濃度。使再氧化反應繼續進行 8 h，隨後起始結合反應。在用額外 50 mM pH 6.5 磷酸鉀緩衝液稀釋之後，向經再氧化之抗體溶液中添加相對於在 2.8 mg/mL 濃度下之抗體 5.4 莫耳當量之 DM21-C。用於結合反應之最終 DMA 濃度為 15%。藉由在 25°C 下在儀器樣品室中保持 1.5-10.5 h 之反應之重複 SEC 層析反應來監測反應進展。收集 SEC 單體%及結合物 DAR 數據且概述於下表 P 中。

表 P

| 反應 | 結合時間(h) | DAR (SEC) | 單體%   |
|----|---------|-----------|-------|
| 1  | 1.5     | 1.86      | 98.58 |
| 2  | 2.5     | 1.90      | 98.56 |
| 3  | 3.5     | 1.93      | 98.50 |
| 4  | 4.5     | 1.91      | 98.52 |
| 5  | 5.5     | 1.93      | 98.51 |
| 6  | 6.5     | 1.95      | 98.54 |
| 7  | 7.5     | 1.97      | 98.53 |
| 8  | 8.5     | 1.96      | 98.50 |
| 9  | 9.5     | 1.95      | 98.47 |
| 10 | 10.5    | 1.94      | 98.46 |

針對使用 DPPA 之一鍋過程之有機共溶劑條件篩選

【0442】 設計此實驗以在 25°C之恆定溫度下在使用作為還原劑之 DPPA、抗 ADAM9 抗體及 DHAA 氧化劑之一鍋過程之最終結合步驟期間篩選有機共溶劑含量%。

【0443】 關於所有反應，引入之抗 ADAM9 抗體(含約 25 mg/mL 抗體之 10 mM 乙酸鈉，pH 5.0，具有 9%蔗糖)經稀釋至 pH 6.5 磷酸鉀緩衝液中以生成 50 mM 之最終磷酸鉀緩衝液濃度。隨後使用此等抗體溶液來建立在 4.1 mg/mL 抗體之最終抗體濃度下的還原反應。相對於該抗體 16 莫耳當量之 DPPA 膦添加至具有 5%

之最終 DMA 共溶劑濃度之抗體溶液中。使還原反應繼續進行 4 h，且反應 pH 維持於 6.5 下，持續該一鍋過程之持續時間而無 pH 調節。經還原抗體溶液接著未經純化即用於建立再氧化反應。在 3.7 mg/mL 之最終抗體濃度、相對於 DPPA 1.5 倍莫耳過量之 DHAA 氧化劑及 7%之最終 DMA 共溶劑濃度下執行再氧化反應。pH 6.5 磷酸鉀儲備緩衝液用於反應之稀釋以實現標靶抗體濃度。使再氧化反應繼續進行 8 h，隨後起始結合反應。在用額外 50 mM pH 6.5 磷酸鉀緩衝液稀釋之後，向經再氧化之抗體溶液中添加相對於在 2.8 mg/mL 濃度下之抗體 5.4 莫耳當量之 DM21-C。在所指示之最終 DMA 濃度下反應持續 8 h 之後，經由 SEC 分析粗反應混合物之單體%及 DAR。此等實驗之結果顯示於下表 Q 中。

表 Q

| 反應 | 結合反應 DMA 含量(%) | DAR (SEC) | 單體%   |
|----|----------------|-----------|-------|
| 1  | 16             | 1.97      | 98.44 |
| 2  | 15             | 1.96      | 98.47 |
| 3  | 13             | 1.98      | 98.48 |
| 4  | 12             | 1.97      | 98.47 |
| 5  | 11             | 1.97      | 98.47 |
| 6  | 10             | 1.96      | 98.46 |
| 7  | 9              | 1.96      | 98.46 |

針對使用 DPPA 之一鍋過程之還原反應時間篩選

【0444】 設計此實驗以在 23°C之恆定溫度下針對使用作為還原劑之 DPPA、抗 ADAM9 抗體及 DHAA 氧化劑之一鍋過程之還原反應步驟篩選所需時間。

【0445】 關於所有反應，引入之抗 ADAM9 抗體(含約 25 mg/mL 抗體之 10 mM 乙酸鈉，pH 5.0，具有 9%蔗糖)經稀釋至 pH 6.5 磷酸鉀緩衝液中以生成 30 mM 之最終磷酸鉀緩衝液濃度。隨後使用此等抗體溶液來建立在 4.5 mg/mL 抗體之最終抗體濃度下的還原反應。相對於該抗體 16 莫耳當量之 DPPA 膾添加至具有 5% 之最終 DMA 共溶劑濃度之抗體溶液中。使還原反應繼續進行在 1 h 與 5 h 之間的所指示時間，且反應 pH 維持於 6.5 下，持續該一鍋過程之持續時間而無 pH

調節。經還原抗體溶液接著未經純化即用於建立再氧化反應。在 4.0 mg/mL 之最終抗體濃度、相對於 DPPA 1.5 倍莫耳過量之 DHAA 氧化劑及 7%之最終 DMA 共溶劑濃度下執行再氧化反應。pH 6.5 磷酸鉀儲備緩衝液用於反應之稀釋以實現標靶抗體濃度。使再氧化反應繼續進行 6 h，隨後起始結合反應。在用額外 30 mM pH 6.5 磷酸鉀緩衝液稀釋之後，向經再氧化之抗體溶液中添加相對於在 3.5 mg/mL 濃度下之抗體 4.6 莫耳當量之 DM21-C。在 10%之最終 DMA 濃度下反應持續 13 h 之後，經由 SEC 分析粗反應混合物之單體%及 DAR。此等實驗之結果顯示於下表 R 中。

表 R

| 反應 | 還原時間(h) | DAR (SEC) | 單體%   |
|----|---------|-----------|-------|
| 1  | 1       | 1.96      | 98.74 |
| 2  | 2       | 1.97      | 98.73 |
| 3  | 3       | 2.00      | 98.66 |
| 4  | 4       | 2.05      | 98.70 |
| 5  | 5       | 2.03      | 98.65 |

針對使用 DPPA 之一鍋過程之再氧化反應時間篩選

【0446】 設計此實驗以在 23°C之恆定溫度下針對使用作為還原劑之 DPPA、抗 ADAM9 抗體及 DHAA 氧化劑之一鍋過程之再氧化反應步驟篩選所需時間。

【0447】 關於所有反應，引入之抗 ADAM9 抗體(含約 25 mg/mL 抗體之 10 mM 乙酸鈉，pH 5.0，具有 9%蔗糖)經稀釋至 pH 6.5 磷酸鉀緩衝液中以生成 30 mM 之最終磷酸鉀緩衝液濃度。隨後使用此等抗體溶液來建立在 4.5 mg/mL 抗體之最終抗體濃度下的還原反應。相對於該抗體 16 莫耳當量之 DPPA 膦添加至具有 5% 之最終 DMA 共溶劑濃度之抗體溶液中。使還原反應繼續進行 4 h，且反應 pH 維持於 6.5 下，持續該一鍋過程之持續時間而無 pH 調節。經還原抗體溶液接著未經純化即用於建立再氧化反應。在 4.0 mg/mL 之最終抗體濃度、相對於 DPPA 1.5 倍莫耳過量之 DHAA 氧化劑及 7%之最終 DMA 共溶劑濃度下執行再氧化反

應。pH 6.5 磷酸鉀儲備緩衝液用於反應之稀釋以實現標靶抗體濃度。使再氧化反應繼續進行在 1 h 與 7 h 之間的所指示時間，隨後起始結合反應。在用額外 30 mM pH 6.5 磷酸鉀緩衝液稀釋之後，向經再氧化之抗體溶液中添加相對於在 3.5 mg/mL 濃度下之抗體 4.6 莫耳當量之 DM21-C。在 10%之最終 DMA 濃度下反應持續 13 h 之後，經由 SEC 分析粗反應混合物之單體%及 DAR。此等實驗之結果顯示於下表 S 中。

表 S

| 反應 | 再氧化時間(h) | DAR (SEC) | 單體%   |
|----|----------|-----------|-------|
| 1  | 1        | 2.02      | 98.69 |
| 2  | 2        | 2.05      | 97.88 |
| 3  | 3        | 2.03      | 98.65 |
| 4  | 4        | 2.01      | 98.08 |
| 5  | 5        | 1.97      | 98.09 |
| 6  | 6        | 1.98      | 98.61 |
| 7  | 7        | 1.96      | 98.65 |

針對使用 DPPA 之一鍋過程之按比例增加條件

【0448】 設計此實驗以在 23°C之恆定溫度下測試以 1.2 g 抗體規模使用作為還原劑之 DPPA、抗 ADAM9 抗體及 DHAA 氧化劑之一鍋反應過程之效能。

【0449】 關於此反應，引入之抗 ADAM9 抗體(含約 25 mg/mL 抗體之 10 mM 乙酸鈉，pH 5.0，具有 9%蔗糖)經稀釋至 pH 6.5 磷酸鉀緩衝液中以生成 30 mM 之最終磷酸鉀緩衝液濃度。隨後使用該抗體溶液來建立在 4.5 mg/mL 抗體之最終抗體濃度下的還原反應。相對於該抗體 16 莫耳當量之 DPPA 磷添加至具有 5% 之最終 DMA 共溶劑濃度之抗體溶液中。使還原反應繼續進行 5 h，且反應 pH 維持於 6.5 下，持續該一鍋過程之持續時間而無 pH 調節。經還原抗體溶液接著未經純化即用於建立再氧化反應。在 4.0 mg/mL 之最終抗體濃度、相對於 DPPA 1.5 倍莫耳過量之 DHAA 氧化劑及 7%之最終 DMA 共溶劑濃度下執行再氧化反應。pH 6.5 磷酸鉀儲備緩衝液用於反應之稀釋以實現標靶抗體濃度。使再氧化

反應繼續進行 6 h，隨後起始結合反應。在用額外 30 mM pH 6.5 磷酸鉀緩衝液稀釋之後，向經再氧化之抗體溶液中添加相對於在 3.5 mg/mL 濃度下之抗體 4.6 莫耳當量之 DM21-C。在 10% 之最終 DMA 濃度下反應持續 12 h 之後，粗反應混合物經純化且經調配。在反應完成時，均質反應混合物首先經 0.5/0.2  $\mu\text{m}$  雙層聚醚砜過濾器過濾。在過濾之後，該反應混合物藉由 TFF 經純化，針對含有 9 w/v% 蔗糖之 10 mM 丁二酸鈉 pH 4.7 緩衝液持續 14 個置換體積。在回收之後，經緩衝液交換之結合物經 0.5/0.2  $\mu\text{m}$  雙層聚醚砜過濾器過濾且在具有 9 w/v% 蔗糖及 0.01% 聚山梨醇酯-20 之 10 mM 丁二酸鈉 pH 4.7 中以 7 mg/mL 結合物之最終濃度經調配。在 1.2 g 規模下該過程之總體產率為 93%。使用最終結合物之 SEC 層析測定單體%及 DAR 分別為 98.71% 及 1.99。

#### 實例 5：使用 DPPA 之一鍋結合過程及使用 TCEP 之多步驟過程的比較

**【0450】** 關於在 500 mg 抗體規模下之多步驟過程，在 37°C 下在 50 mM pH 7.6 磷酸鉀還原緩衝液中以 10 mg/mL 抗 ADAM9 抗體及相對於該抗體 27 (mol:mol) 當量之 TCEP 執行還原，持續 1 h。在還原之後，執行 TFF，其中針對 50 mM pH 7.6 磷酸鉀還原緩衝液透濾持續 10 個置換體積以移除殘餘磷、氧化磷及含小分子硫醇之封端分子。此經純化、經還原抗體未經進一步處理即用於準備選擇性再氧化反應。在 25°C 下以 7 mg/mL 之最終抗體濃度、相對於抗體 15 (mol:mol) 當量之 DHAA 及 1% (v/v) DMA 執行再氧化，持續 4 h。在 4°C 下保留經再氧化之反應溶液隔夜之後，準備使用 DM21-C 之結合反應，而未對經再氧化之抗體溶液進行任何額外加工。在 25°C 下在具有相對於該抗體 4.4 (mol:mol) 當量之 DM21-C 有效載荷及 10% (v/v) DMA 之 50 mM pH 7.6 磷酸鉀中以 6 mg/mL 之最終抗體濃度執行結合，持續 18 h。在結合之後，粗反應混合物藉由 TFF 經純化，其中針對含有 9% (w/v) 蔗糖之 10 mM 丁二酸鈉 pH 5.0 緩衝液透濾，持續 12 個

置換體積。

【0451】 關於在 500 mg 抗體規模下之一鍋過程，在 25°C下在 25 mM pH 6.0 丁二酸鈉緩衝液及 5% (v/v) DMA 中以 12 mg/mL 抗 ADAM9 抗體及相對於該抗體 16 (mol:mol)當量之 3-(二苯基膦基)丙胺(DPPA)執行還原，持續 4 h。粗經還原抗體溶液接著未經純化即轉入選擇性再氧化反應中。在 25°C下以 10 mg/mL 抗體及相對於該抗體 16 (mol:mol)當量之 DHAA 及 7.5% (v/v) DMA 進行再氧化，持續 23 h。粗經再氧化之抗體溶液接著未經純化即轉入結合反應中。在 25°C下在具有相對於該抗體 5.4 (mol:mol)當量之 DM21-C 之 25 mM pH 6.0 丁二酸鈉緩衝液中以 8 mg/mL 之最終抗體濃度執行結合，持續 20 h。在結合之後，粗反應混合物藉由 TFF 經純化，其中針對含有 9% (w/v)蔗糖之 10 mM 丁二酸鈉 pH 5.0 緩衝液透濾，持續 12 個置換體積。

【0452】 藉由最終結合物之 SEC 層析來測定兩個反應之單體及 DAR 值。DAR 值係使用該抗體在 280 nm 下之消光係數、該抗體之 252:280 nm 吸光度比率及在 252 nm 下之有效載荷消光係數經計算。此研究之結果在表 T 中給出。

表 T

| 反應          | 單體%  | SEC DAR |
|-------------|------|---------|
| 多步驟 TCEP 過程 | 86.2 | 1.7     |
| 一鍋 DPPA 過程  | 98.2 | 1.9     |

實例 6：連續一鍋結合過程

【0453】 端對端整合連續製造運轉經證明用於該一鍋過程。G4723A 抗體用於該研究。經證明之運轉係經設計以整合連續攪拌槽反應器(CSTR)及塞流反應器(PFR)，作為概念驗證用於按比例增加該一鍋連續過程。

【0454】 連續使用 CSTR 及 PFR 之優勢係減少總體積需求、改良反應物流之間的混合且增加風險緩解能力(包括較寬滯留時間分佈)。在各反應步驟中針對

CSTR 及 PFR 測定反應體積：還原、再氧化及結合。產生各反應之動力學數據且規定各反應之所需標靶轉化。基於此等結果，各反應之 CSTR 及 PFR 體積係基於所用管之內徑及實現各反應步驟之所需滯留時間所需的體積流動速率經規定。連續一鍋結合過程之反應示意圖顯示於圖 5 中。

【0455】 首先，以 50 mg/mL 經調配之經調配 G4723A 抗體用 30 mM 磷酸鉀 pH 6.5 稀釋至 4 mg/mL 之標靶還原反應濃度。此進料流藉由蠕動幫浦經進給至還原 CSTR 中。平行地，在 DMA 中以 8.77 mM 製備之 DPPA 儲備溶液藉由注射幫浦經進給至還原 CSTR 中。此兩個進料流之體積流動速率經設定以致該還原反應在 16 倍莫耳過量之 DPPA:Ab 下實現 4.0 mg/mL 濃度。另外，該還原反應中之 DMA 之體積濃度為 5% (v/v)。

【0456】 使用蠕動幫浦以與進入還原反應 CSTR 中之組合流動速率(由 Ab 及 DPPA 進料流構成)相同之體積流動速率自還原反應 CSTR 抽出材料。進入及離開 CSTR 之流動速率經匹配以使還原反應 CSTR 之液體水準及滯留時間保持恆定用於穩態操作。自還原反應 CSTR 抽取之材料經進給通過還原 PFR。用於 PFR 之管之長度係基於標靶所需反應轉化經確定。使用標靶轉化來設定滯留時間且通過 PFR 之總體積流動速率係經測定以針對 PFR 反應器設定固定長度。該還原 PFR 經浸沒於控制溫度之水浴中以確保反應溫度始終恆定。

【0457】 該還原 PFR 以與藉由蠕動幫浦自還原 CSTR 反應器抽出之材料相同之體積流動速率直接地經進給至再氧化 CSTR 中。此進料流與在 DMA 中製備之 DHAA 儲備溶液混合，該 DHAA 儲備溶液亦藉由注射幫浦經進給至再氧化 CSTR。該 DHAA 儲備溶液在 DMA 中以 55 mM 製備且經進給至反應器中以致再氧化反應之最終反應參數為：3.9 mg/mL 抗體濃度、24 倍莫耳過量之 DHAA:Ab 及 6.5% DMA (v/v)。

【0458】 進入再氧化 CSTR 中之兩個進料流的組合流動速率係經測定且用於設定用於以相同流動速率自再氧化 CSTR 移出材料之額外蠕動幫浦之體積流動速率。與還原 CSTR 相似，選擇進入及離開 CSTR 之經匹配流動速率，以致液體水準及滯留時間在穩態操作期間為一致的。藉由幫浦自再氧化 CSTR 移出之材料直接地經進給至再氧化 PFR 中。再氧化反應 PFR 設計方法與先前論述之還原 PFR 相同。基於動力學數據之所需反應轉化設定反應滯留時間。此滯留時間與通過再氧化反應之體積流動速率相結合用於計算 PFR 設計準則。該再氧化 PFR 亦浸沒(與還原 PFR 相似)於溫度控制之水浴中。

【0459】 再氧化反應 PFR 之輸出直接地經進給至結合 CSTR 中。DM21-C 儲備溶液在 DMA 中以 3.20 mM 製備且藉由注射幫浦添加至結合 CSTR 中。該兩個入口流在 CSTR 中混合，使最終反應條件達到 3.8 mg/mL 抗體濃度、4.6 莫耳過量之 DM21:Ab 及 10% DMA (v/v)。蠕動幫浦以再氧化反應及 DM21-C 儲備溶液之組合體積流動速率移出結合反應混合物。此蠕動幫浦匹配該流動速率以維持該容器中之液體水準且直接地經進給至結合反應 PFR 中。該結合反應 PFR 基於動力學反應數據靶向反應轉化。使用此標靶轉化來定義滯留時間。使用結合之滯留時間及體積流動速率來定義結合 PFR 之條件。與還原及再氧化 PFR 兩者相似，該結合反應 PFR 浸沒於溫度控制之水浴中。

【0460】 該結合反應 PFR 溶離未純化之結合反應混合物。此流經進給至逆流 TFF 純化單元中。引入之粗反應係在大約 3.8 mg/mL 之濃度及 10% DMA (v/v) 下。透濾緩衝液(10 mM 丁二酸鈉、9% (w/v)蔗糖，pH 4.7)之流與引入的未純化之結合反應混合物組合以稀釋引入之進料流。此進料流與來自如圖 6 所示之模塊 2 之滲透物流組合，從而進一步稀釋進入模塊 1 之結合物的進料濃度。關於模塊 1 及模塊 2，使用 Pall Cadence 在線濃縮器(ILC)膜。

【0461】 來自模塊 1 之滲餘物直接地經進給至模塊 2 中。DF 緩衝液之額外進料在模塊 2 之入口前面與來自模塊 1 之滲餘物組合。來自模塊 1 之滲透物經選路以廢棄處置。自模塊 2 之滲餘物回收經純化結合物。來自模塊 2 之滲透物經再循環且與如上文所述之模塊 1 之進料組合(參見圖 6)。此逆流設置有效地自粗反應混合物移除雜質且將該結合物緩衝液交換至 DF 緩衝液中。為了在逆流 TFF 純化期間確保有效載荷雜質之移除，藉由游離藥物方法表徵 TFF 前及經純化樣品。結果顯示該兩個單元中來自引入之未純化進料流之雜質的高度有效移除(>99%)。最終經純化結合物關於連續運轉及分批控制之結果顯示於表 S 中。

表 S：整合 DS 製造運轉之產物品質概述

| 產物品質屬性               | 連續結合 ( 逆流 TFF) | 分批控制 (NAP 純化) |
|----------------------|----------------|---------------|
| HMW (%，藉由 SEC)       | 0.3            | 0.3           |
| 單體(%，藉由 SEC)         | 99.7           | 99.7          |
| 游離藥物移除(%)            | 99.89          | N/A           |
| 經純化游離藥物(ug/mL)       | <LOQ           | N/A           |
| DAR (藉由 UV)          | 1.95           | N/A           |
| DAR (藉由 SEC-MS)      | 1.9            | N/A           |
| 粗反應 DAR (藉由 SEC)     | 2.0            | 2.1           |
| HL (%，藉由 Gel Chip)   | 3              | 4             |
| H2L2 (%，藉由 Gel Chip) | 81             | 82            |

實例 7. 在惰性氛圍下之一鍋結合過程

【0462】 為了測試在 N<sub>2</sub> 淨化系統中執行整個一鍋結合過程之影響以較佳模擬 GMP 製造期間之預期條件。還原及再氧化反應之效能係藉由比較在 N<sub>2</sub> 下及在正常空氣氛圍下之一致反應經測試。在 4.5 mg/mL 抗體濃度下在具有 5% DMA 之 pH 6.5 30 mL 磷酸鉀中執行還原。該反應用 16 當量之 DPPA 建立且在 23°C 下執行 5 小時。在 4.0 mg/mL 抗體濃度下在具有 7% DMA 之 pH 6.5 30 mM 磷酸鉀中執行再氧化。該反應用 24 當量之 DHAA 建立且在 23°C 下執行 6 小時。在 3.5

mg/mL 抗體濃度下在具有 10% DMA 之 pH 6.5 30 mM 磷酸鉀中執行結合。該反應應用 4.6 當量之 DM21-C 建立且在 23°C下執行 12 小時。在 EasyMax 系統中建立在 175 mg 規模下之兩個反應，其中內部溫度控制至 23.0°C且以 70 rpm 進行頂部混合。一個反應之頂部空間連續地經 N<sub>2</sub> 淨化，持續該實驗之持續時間。另外，關於此反應，水及 30 mM 磷酸鉀緩衝溶液經 N<sub>2</sub> 鼓泡持續 15-30 分鐘，接著將其添加至該反應中。

【0463】 如表 T 所示，在經氮氣淨化之系統中運轉該反應與使結合反應容器向大氣開放之間未存在顯著差異。在氮氣下之反應運轉之所有分析數據(SEC 單體、SEC DAR、HIC DAR、GelChip)均與使用相同原材料之對照及先前按比例增加運轉一致。

表 T. 產物品質之概述

|         | N2 反應(粗物質) | 空氣反應(粗物質) | 先前按比例增加運轉* |
|---------|------------|-----------|------------|
| SEC DAR | 2.04       | 2.01      | 2.04       |
| HIC DAR | 1.98       | 1.97      | 1.98       |
| 單體%     | 98.35      | 98.35     | 98.71      |
| HMW%    | 1.47       | 1.54      | 1.22       |
| LMW%    | 0.18       | 0.11      | 0.07       |
| D0%     | 未發現        | 未發現       | 0.02       |
| D1%     | 2.56       | 2.96      | 2.82       |
| D2%     | 97.32      | 97.04     | 96.90      |
| D4%     | 0.12       | 未發現       | 0.26       |
| HL%     | 6.18       | 5.14      | 5.84       |
| H2L2%   | 78.36      | 80.92     | 78.54      |
| 總體產率%   | NA         | NA        | 93.60      |

\*先前按比例增加運轉使用與此處所述之反應相同之 Ab 批次、DPPA 及有效載荷批次

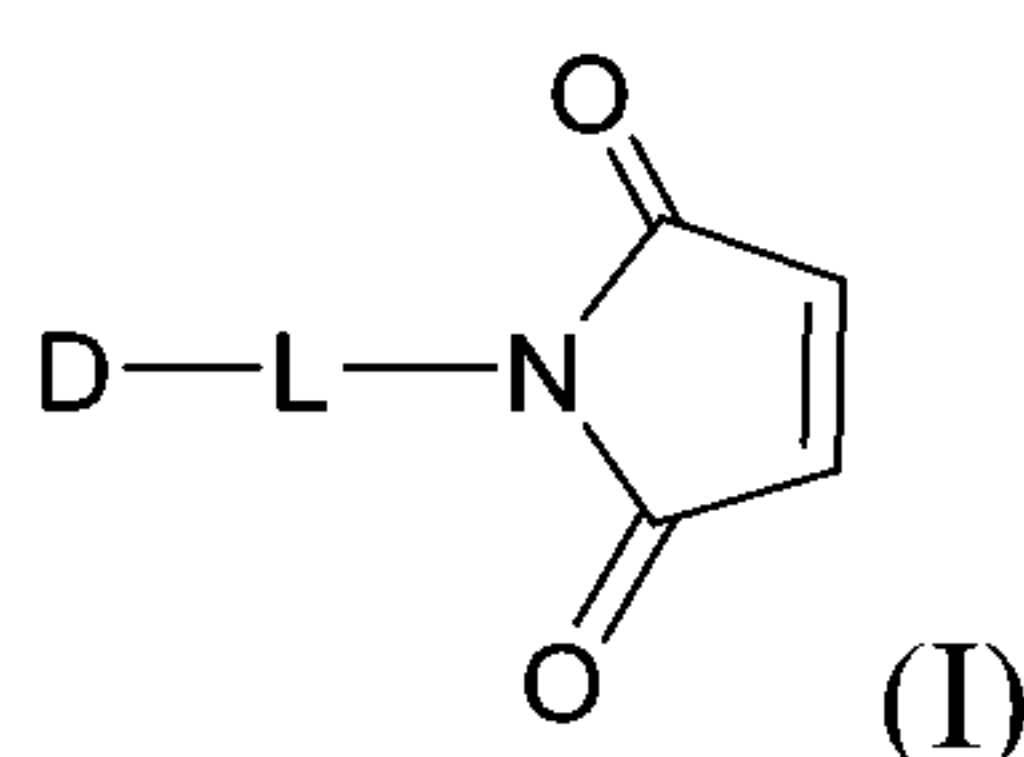
# 【發明申請專利範圍】

【請求項 1】 一種製備細胞結合劑-細胞毒性劑結合物之方法，該細胞結合劑-細胞毒性劑結合物包含具有共價連接至細胞毒性劑的一或多個未配對半胱胺酸殘基之細胞結合劑(CysCBA)，其中該方法包括以下步驟：

(a) 使還原劑與具有經封端劑封端之一或多個未配對半胱胺酸殘基之經封端細胞結合劑(cCysCBA)反應以形成經還原細胞結合劑，其中該封端劑經移除以在該經還原細胞結合劑中形成游離硫醇(-SH)基；

(b) 使該經還原細胞結合劑與選擇性氧化劑反應以形成該 CysCBA，其中該未配對半胱胺酸殘基中的該游離硫醇基未經氧化；及

(c) 使該 CysCBA 與式(I)化合物：



或其醫藥學上可接受之鹽反應，由此形成該結合物，其中步驟(a)中之該經還原細胞結合劑未經純化即用於步驟(b)；且步驟(b)中之該 CysCBA 未經純化即用於步驟(c)，其中：

D 為細胞毒性劑；且

L 為連接體。

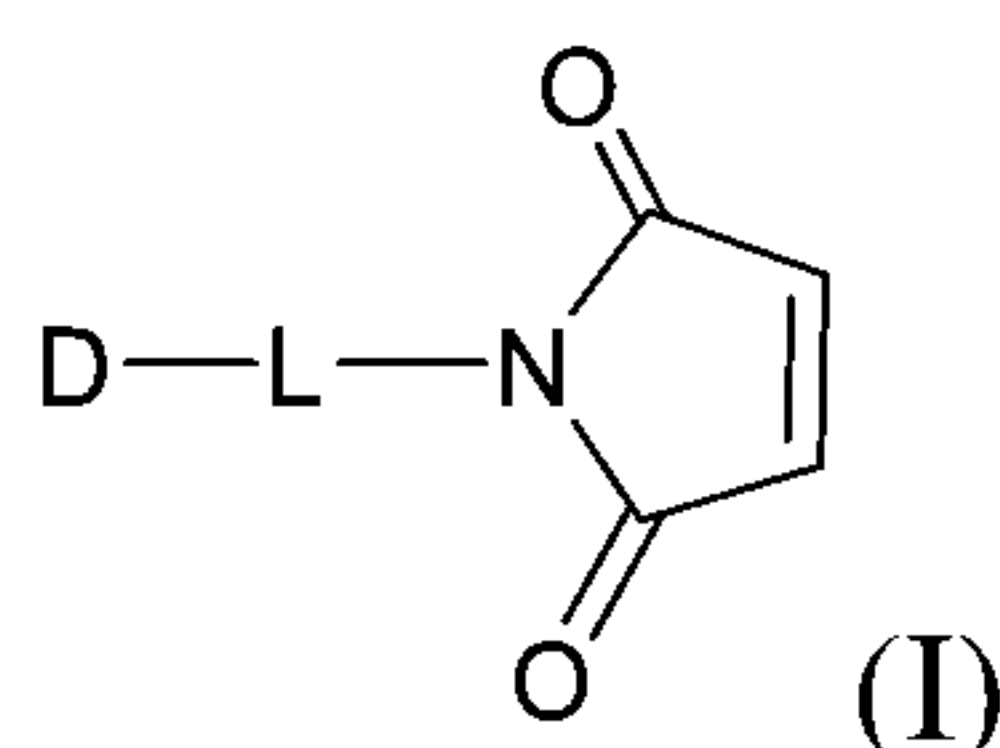
【請求項 2】 一種製備細胞結合劑-細胞毒性劑結合物(ADC)之連續方法，該細胞結合劑-細胞毒性劑結合物(ADC)包含具有共價連接至細胞毒性劑的一或多個未配對半胱胺酸殘基之細胞結合劑(CysCBA)，其中該方法包括以下步驟：

(a) 使還原劑與具有經封端劑封端之一或多個未配對半胱胺酸殘基之經封端細胞結合劑(cCysCBA)反應以形成經還原細胞結合劑，其中該封端劑經移

除以在該經還原細胞結合劑中形成游離硫醇(-SH)基；

(b) 使該經還原細胞結合劑與選擇性氧化劑反應以形成該 CysCBA，其中該未配對半胱胺酸殘基中的該游離硫醇基未經氧化；及

(c) 使該 CysCBA 與式(I)化合物：



或其醫藥學上可接受之鹽反應，由此形成該結合物，

其中步驟(a)中之該經還原細胞結合劑未經純化即用於步驟(b)；步驟(b)中之該 CysCBA 未經純化即用於步驟(c)，且選自步驟(a)至(c)之任一或多個步驟係連續地執行，其中：

D 為細胞毒性劑；且

L 為連接體。

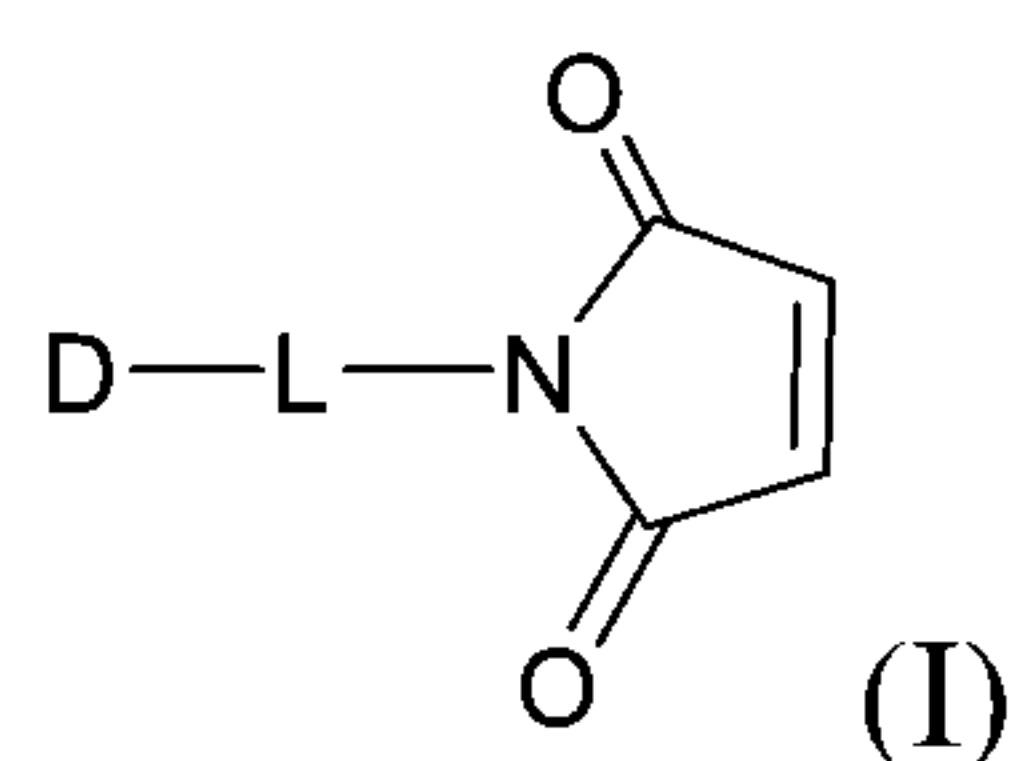
【請求項 3】 如請求項 2 之方法，其中步驟(a)至(c)係連續地執行。

【請求項 4】 一種製備細胞結合劑-細胞毒性劑結合物(ADC)之連續方法，該細胞結合劑-細胞毒性劑結合物(ADC)包含具有共價連接至細胞毒性劑之一或多個未配對半胱胺酸殘基之細胞結合劑(CysCBA)，其中該方法包括以下步驟：

(a) 使還原劑與具有經封端劑封端之一或多個未配對半胱胺酸殘基之經封端細胞結合劑(cCysCBA)反應以形成經還原細胞結合劑，其中該封端劑經移除以在該經還原細胞結合劑中形成游離硫醇(-SH)基；

(b) 使該經還原細胞結合劑與選擇性氧化劑反應以形成該 CysCBA，其中該未配對半胱胺酸殘基中的該游離硫醇基未經氧化；及

(c) 使該 CysCBA 與式(I)化合物：



或其醫藥學上可接受之鹽反應，由此形成該結合物；及

(d) 移除未結合之式(I)化合物；

其中步驟(a)中之該經還原細胞結合劑未經純化即用於步驟(b)；步驟(b)中之該 CysCBA 未經純化即用於步驟(c)，選自步驟(a)至(d)之任一或多個步驟係連續地執行；且其中：

D 為細胞毒性劑；且

L 為連接體。

【請求項 5】 如請求項 4 之方法，其中步驟(a)至(d)係連續地執行。

【請求項 6】 如請求項 4 或 5 之方法，其中該方法進一步包括步驟(e)將該結合物交換至穩定緩衝液中。

【請求項 7】 如請求項 6 之方法，其中步驟(e)係連續地執行。

【請求項 8】 如請求項 4 至 7 中任一項之方法，其中使用單程切向流過濾(SPTFF)及/或逆流透濾來移除該未結合之式(I)化合物及/或將該 ADC 交換至該穩定緩衝液中。

【請求項 9】 如請求項 2 至 8 中任一項之方法，其中在步驟(a)中，當該反應繼續進行時及在已形成至少一種產物之後，該 cCysCBA 及/或該還原劑連續地添加至反應容器中。

【請求項 10】 如請求項 9 之方法，其中該 cCysCBA 及該還原劑連續地添加至該反應容器中，同時該反應混合物連續地經抽出且經由流式反應器進給。

【請求項 11】 如請求項 10 之方法，其中自該反應容器抽出該反應混合物之體積流動速率係與正在添加至該反應容器中的該還原劑及該 cCysCBA 之組合

流動速率相同。

【請求項 12】 如請求項 2 至 11 中任一項之方法，其中在步驟(b)中，當該反應繼續進行時及在已形成至少一種產物之後，該經還原細胞結合劑及該選擇性氧化劑連續地添加至反應容器中。

【請求項 13】 如請求項 12 之方法，其中該經還原細胞結合劑及該選擇性氧化劑連續地添加至該反應容器中，同時該反應混合物連續地經抽出且經由流式反應器進給。

【請求項 14】 如請求項 13 之方法，其中自該反應容器抽出該反應混合物之體積流動速率係與正在添加至該反應容器中的該經還原細胞結合劑及該選擇性氧化劑之組合流動速率相同。

【請求項 15】 如請求項 2 至 14 中任一項之方法，其中在步驟(c)中，當該反應繼續進行時及在已形成至少一種產物之後，該 CysCBA 及該式(I)化合物連續地添加至反應容器中。

【請求項 16】 如請求項 15 之方法，其中該 CysCBA 及該式(I)化合物連續地添加至反應容器中，該反應混合物連續地經抽出且經由流式反應器進給。

【請求項 17】 如請求項 16 之方法，其中自該反應容器抽出該反應混合物之體積流動速率係與正在添加至該反應容器中的該 CysCBA 及該式(I)化合物之組合流動速率相同。

【請求項 18】 如請求項 9 至 17 中任一項之方法，其中該反應容器為連續攪拌槽反應器(CSTR)。

【請求項 19】 如請求項 10、11、13、14 及 16 至 18 中任一項之方法，其中該流式反應器為塞流反應器(PFR)。

【請求項 20】 如請求項 3 至 19 中任一項之方法，其中使用單程切向流過濾

(SPTFF)來移除該未結合之藥物。

【請求項 21】 如請求項 3 至 19 中任一項之方法，其中使用逆流透濾來移除該未結合之藥物。

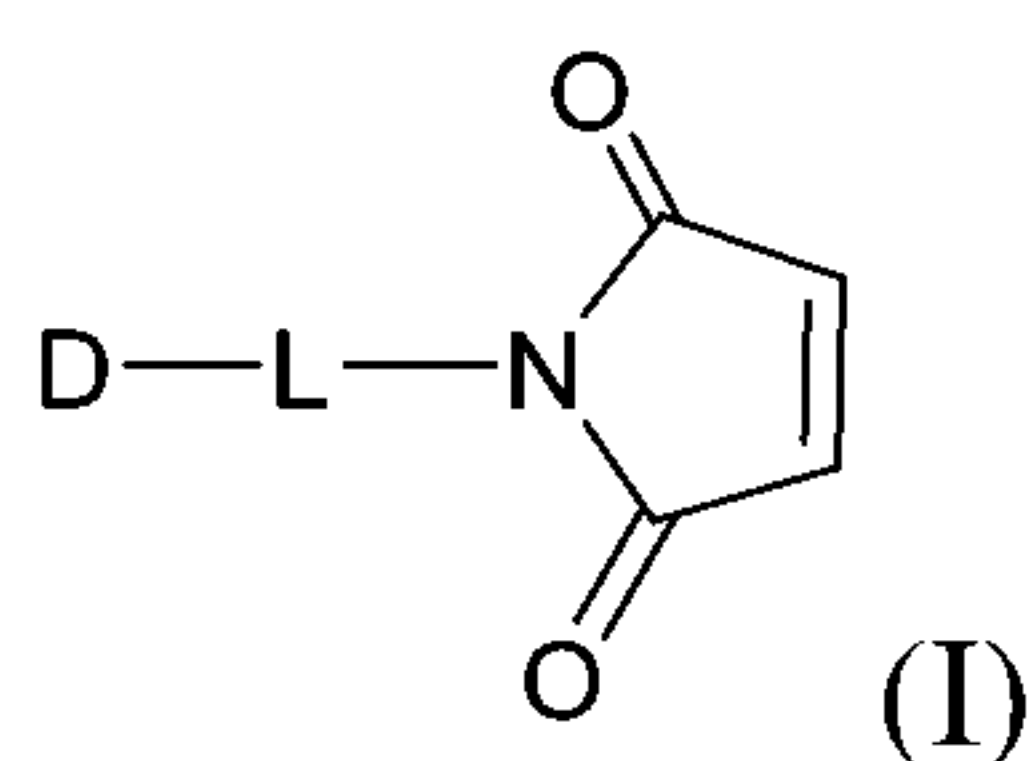
【請求項 22】 如請求項 6 至 21 中任一項之方法，其中使用 SPTFF 及/或逆流透濾將該 ADC 交換至該穩定緩衝液中。

【請求項 23】 如請求項 1 至 22 中任一項之方法，其中該 CysCBA 係經半胱胺酸工程改造之抗體(CysAb)或其抗原結合片段且該方法包括以下步驟：

(a) 使還原劑與具有經封端劑封端之一或多個經工程改造之半胱胺酸殘基之經封端的半胱胺酸工程改造之抗體(cCysAb)或其抗原結合片段反應以形成經還原抗體或其抗原結合片段，其中該封端劑經移除以在該經還原抗體或其抗原結合片段中形成游離硫醇(-SH)基；

(b) 使該經還原抗體或其抗原結合片段與選擇性氧化劑反應以形成該 CysAb，其中該經工程改造之半胱胺酸殘基中的該游離硫醇基未經氧化；及

(c) 使該 CysAb 與該式(I)化合物：



或其醫藥學上可接受之鹽反應，由此形成該抗體-細胞毒性劑結合物(ADC)，其中步驟(a)中之該經還原抗體或其抗原結合片段未經純化即用於步驟(b)；且步驟(b)中之該 CysAb 或其抗原結合片段未經純化即用於步驟(c)，其中：

D 為細胞毒性劑；且

L 為連接體。

【請求項 24】 如請求項 1 或 23 之方法，其中該等步驟(a)、(b)及(c)係在同一反應容器中進行。

【請求項 25】 如請求項 1 至 24 中任一項之方法，其中該經封端的半胱胺酸工程改造之抗體(cCysAb)或其抗原結合片段中之一或多個鏈間二硫鍵係在步驟(a)中經還原。

【請求項 26】 如請求項 25 之方法，其中該一或多個鏈間二硫鍵係在步驟(b)中再形成。

【請求項 27】 如請求項 1 至 26 中任一項之方法，其中該還原劑為參(2-羧基乙基)膦鹽酸鹽(TCEP)、參羥基丙基膦(THPP)、參(2-氰基乙基)膦、二硫蘇糖醇(DTT)、二環己基膦基)苯磺酸、雙(對磺酸根基苯基)苯基膦、(二苯基膦基)苯磺酸、(二苯基膦基)苯甲酸、三氟甲磺酸 2-(二苯基膦基)-N,N,N-三甲基苯甲基銨、(二苯基膦基)乙胺、2-(二異丙基膦基)乙胺或 3-(二苯基膦基)丙胺(DPPA)。

【請求項 28】 如請求項 27 之方法，其中該還原劑為 TCEP 或 DPPA。

【請求項 29】 如請求項 1 至 28 中任一項之方法，其中該氧化劑為去氫抗壞血酸(DHAA)、硫酸銅、氧氣或空氣。

【請求項 30】 如請求項 29 之方法，其中該氧化劑為 DHAA。

【請求項 31】 如請求項 1 至 30 中任一項之方法，其中步驟(a)之反應係在 5.0 與 8.5 之間的 pH 下進行。

【請求項 32】 如請求項 31 之方法，其中步驟(a)之反應係在 6.0 與 7.5 之間的 pH 下進行。

【請求項 33】 如請求項 1 至 32 中任一項之方法，其中步驟(b)之反應係在 5.0 與 8.5 之間的 pH 下進行。

【請求項 34】 如請求項 33 之方法，其中步驟(b)之反應係在 6.0 與 7.5 之間的 pH 下進行。

【請求項 35】 如請求項 1 至 34 中任一項之方法，其中步驟(c)之反應係在 5.0 與 8.5 之間的 pH 下進行。

【請求項 36】 如請求項 35 之方法，其中步驟(c)之反應係在 6.0 與 7.5 之間的 pH 下進行。

【請求項 37】 如請求項 1 至 34 中任一項之方法，其中步驟(c)之反應係在 5.5 與 6.5 之間的 pH 下進行。

【請求項 38】 如請求項 37 之方法，其中步驟(c)之反應係在 pH 6.0 下進行。

【請求項 39】 如請求項 1 至 38 中任一項之方法，其中該方法進一步包括在步驟(c)中使該 CysCBA 與該細胞毒性劑反應之前調節步驟(b)之後的該反應混合物之 pH。

【請求項 40】 如請求項 1 至 38 中任一項之方法，其中步驟(b)之後的該反應混合物之 pH 未在步驟(c)中使該 CysCBA 與該細胞毒性劑反應之前經調節。

【請求項 41】 如請求項 1 至 26 中任一項之方法，其中該還原劑為 TCEP 且步驟(a)之反應係在 6.0 與 8.0 之間的 pH 下進行。

【請求項 42】 如請求項 1 至 26 中任一項之方法，其中該還原劑為 TCEP 且步驟(a)之反應係在 pH 7.5 下進行。

【請求項 43】 如請求項 41 或 42 之方法，其中該氧化劑為 DHAA 且步驟(b)之反應係在 pH 7.5 下進行。

【請求項 44】 如請求項 41 至 43 中任一項之方法，其中步驟(b)之後的該反應混合物之 pH 係在步驟(c)中使該 CysCBA 與該細胞毒性劑反應之前自 pH 7.5 經調節至 pH 6.0。

【請求項 45】 如請求項 1 至 26 中任一項之方法，其中該還原劑為 DPPA 且步驟(a)之反應係在 6.0 與 8.0 之間的 pH 下進行。

【請求項 46】 如請求項 1 至 26 中任一項之方法，其中該還原劑為 DPPA 且步驟(a)之反應係在 pH 6.5 下進行。

【請求項 47】 如請求項 45 或 46 之方法，其中該氧化劑為 DHAA 且步驟(b)之反應係在 pH 6.5 下進行。

【請求項 48】 如請求項 1 至 47 中任一項之方法，其中該結合物係藉由切向流過濾(TFF)、吸附層析、非吸附層析、吸附過濾、選擇性沈澱或其組合經純化。

【請求項 49】 如請求項 48 之方法，其中該結合物係藉由切向流過濾經純化。

【請求項 50】 如請求項 1 至 49 中任一項之方法，其中相對於該 cCysCBA 過量之該還原劑用於步驟(a)中。

【請求項 51】 如請求項 50 之方法，其中該還原劑與其 cCysCBA 之莫耳比率係在 1:1 與 50:1 之間、2:1 與 30:1 之間或 5:1 與 25:1 之間。

【請求項 52】 如請求項 51 之方法，其中該還原劑與其 cCysCBA 之莫耳比率係在 15:1 與 20:1 之間。

【請求項 53】 如請求項 1 至 52 中任一項之方法，其中步驟(a)中之該還原劑與步驟(b)中之該氧化劑的莫耳比率係在 2:1 與 1:2 之間。

【請求項 54】 如請求項 53 之方法，其中該還原劑與該氧化劑之莫耳比率係在 1.2:1 與 1:1.5 之間。

【請求項 55】 如請求項 53 之方法，其中該還原劑與該氧化劑之莫耳比率係在 1:1 與 1:1.5 之間。

【請求項 56】 如請求項 55 之方法，其中該還原劑與該氧化劑之莫耳比率為 1:1。

【請求項 57】 如請求項 55 之方法，其中該還原劑與該氧化劑之莫耳比率為

1:1.5。

【請求項 58】 如請求項 1 至 57 中任一項之方法，其中相對於其 CysCBA 過量之該式(I)化合物用於步驟(c)中。

【請求項 59】 如請求項 58 之方法，其中對於每一當量之 CysCBA，使用 2 與 5 之間莫耳當量的該式(I)化合物。

【請求項 60】 如請求項 23 至 59 中任一項之方法，其中該 CysAb 係在一或多個位置處具有經工程改造之半胱胺酸殘基的抗體，該一或多個位置選自該抗體之重鏈的 EU/OU 編號位置 40、43、84、88、103、112、113、114、115、131、132、133、134、135、136、137、138、139、161、168、172、234、235、236、237、238、239、244、245、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、260、262、265、267、270、272、274、279、280、282、283、284、285、286、288、289、293、295、297、298、303、305、307、308、309、311、312、313、314、315、316、317、318、325、326、327、328、329、330、332、334、338、339、340、341、343、345、360、361、362、375、376、377、378、380、382、384、385、386、387、389、390、391、413、422、423、424、427、428、430、431、433、434、435、436、437、438、440、442、443 及 446。

【請求項 61】 如請求項 23 至 59 中任一項之方法，其中該 CysAb 為如下抗體，其在該抗體之重鏈之 EU/OU 編號位置 442 處具有經工程改造之半胱胺酸殘基。

【請求項 62】 如請求項 61 之方法，其中該 CysAb 係在兩條重鏈之 EU/OU 編號位置 442 處均具有經工程改造之半胱胺酸殘基的抗體。

【請求項 63】 如請求項 1 至 62 中任一項之方法，其中該封端劑為半胱胺酸、

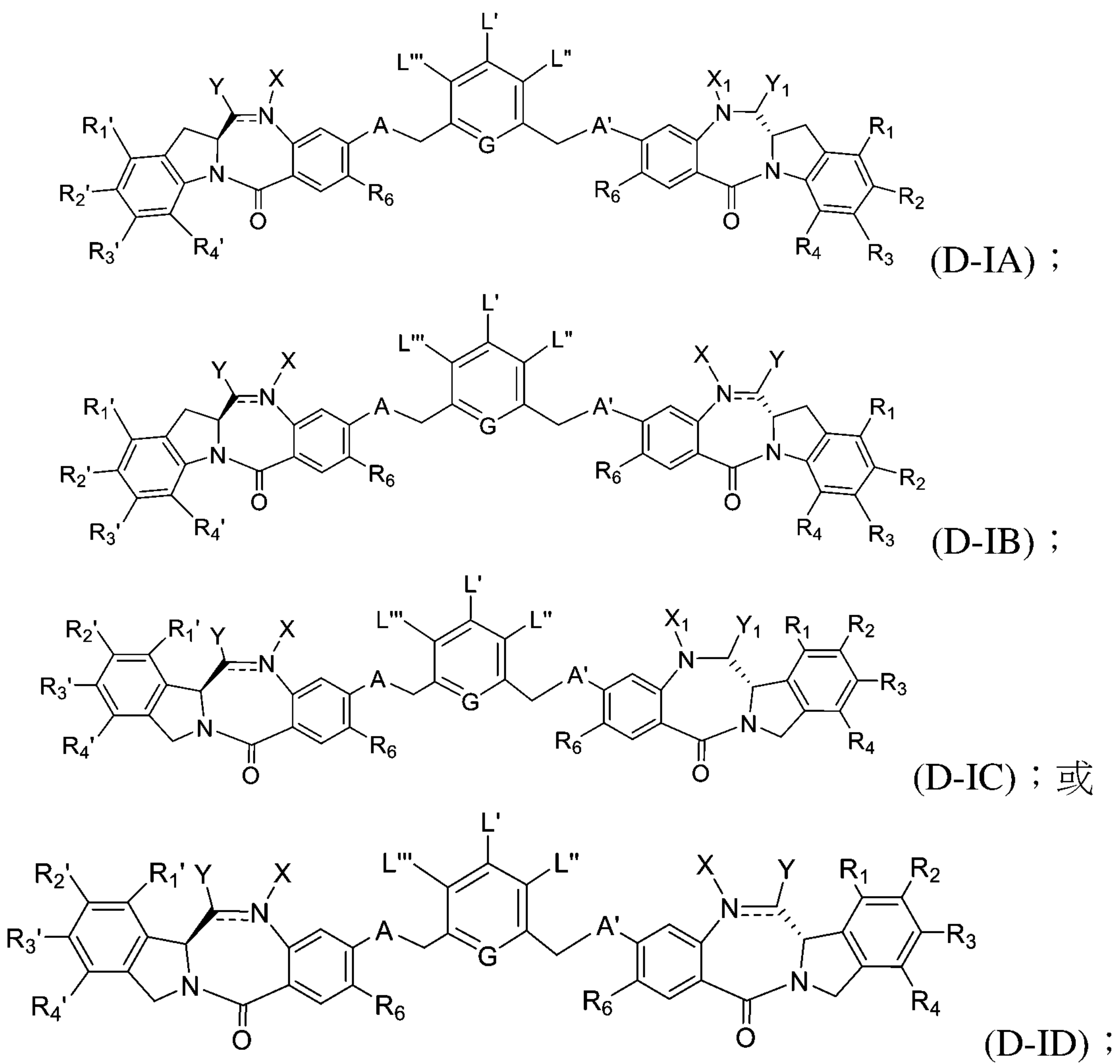
高半胱胺酸、麩胱甘肽或其組合。

【請求項 64】 如請求項 1 至 63 中任一項之方法，其中該結合物之大於 95%、96%、97%、98%、99%或 99.5%為單體。

【請求項 65】 如請求項 1 至 64 中任一項之方法，其中 D 為苯并二氮呿化合物。

【請求項 66】 如請求項 1 至 64 中任一項之方法，其中 D 為類美登素化合物。

【請求項 67】 如請求項 1 至 64 中任一項之方法，其中 D 係由下式或其醫藥學上可接受之鹽表示：

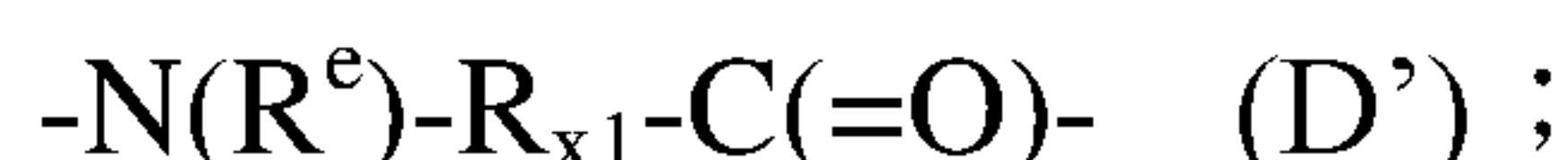


其中：

N 與 C 之間的雙線=表示單鍵或雙鍵，其限制條件在於當其為雙鍵時，X 不存在且 Y 為-H 或(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)烷基；且當其為單鍵時，X 為-H 或胺保護部分，

Y 為-OH 或-SO<sub>3</sub>H 或其醫藥學上可接受之鹽；

L'、L''及 L'''之一係由下式表示：



且另兩者各自獨立地選自-H、視情況經取代之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基、聚乙二醇單元-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>、鹵素、胍鹽[-NH(C=NH)NH<sub>2</sub>]、-OR、-NR'R''、-NO<sub>2</sub>、-NR'COR''、-SR、-SOR'、-SO<sub>2</sub>R'、-SO<sub>3</sub>H、-OSO<sub>3</sub>H、-SO<sub>2</sub>NR'R''、氰基、疊氮基、-COR'、-OCOR'及-CONR'R''；

Z<sub>1</sub>及 Z<sub>2</sub>之一為-C(=O)-，且另一者為-NR<sub>5</sub>-；

P<sub>1</sub>為胺基酸殘基或含有 2 至 20 個胺基酸殘基之肽；

R<sub>x1</sub>為視情況經取代之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；

R<sup>e</sup>為-H、直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基或-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>，其中 R<sup>k</sup>為-H、具有 1 至 6 個碳原子、視情況攜帶二級胺基(例如-NHR<sup>101</sup>)或三級胺基(-NR<sup>101</sup>R<sup>102</sup>)之直鏈、分支鏈環狀烷基、或 5 員或 6 員含氮雜環，其中 R<sup>101</sup>及 R<sup>102</sup>各自獨立地為直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；

R 在每次出現時係獨立地選自由-H、視情況經取代之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基、聚乙二醇單元-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>、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獨立地選自氮、氧及硫之一或多個雜原子之 5 員至 18 員雜芳基環或視情況經取代的含有獨立地選自 O、S、N 及 P 之 1 至 6 個雜原子之 3 員至 18 員雜環組成之群；

R'及 R''係各自獨立地選自-H、-OH、-OR、-NHR、-NR<sub>2</sub>、-COR、視情況經取代之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基、聚乙二醇單元-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>及視情況經取代的具有獨立地選自 O、S、N 及 P 之 1 至 6

個雜原子之 3 員至 18 員雜環；

$R^c$  為-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；

$n$  為整數 1 至 24；

$X_1$  係選自-H、胺保護基、視情況經取代之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基、聚乙二醇單元- $(CH_2CH_2O)_n-R^c$ 、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獨立地選自氮、氧及硫之一或多個雜原子之 5 員至 18 員雜芳基環及視情況經取代的含有獨立地選自 O、S、N 及 P 之 1 至 6 個雜原子之 3 員至 18 員雜環；

$Y_1$  係選自-H、側氧基、視情況經取代之直鏈、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獨立地選自氮、氧及硫之一或多個雜原子之 5 員至 18 員雜芳基環、視情況經取代的具有 1 至 6 個雜原子之 3 員至 18 員雜環；

$R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_1'$ 、 $R_2'$ 、 $R_3'$ 及  $R_4'$ 係各自獨立地選自由-H、視情況經取代之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基、聚乙二醇單元- $(CH_2CH_2O)_n-R^c$ 、鹵素、胍鹽 $[-NH(C=NH)NH_2]$ 、-OR、-NR'R''、-NO<sub>2</sub>、-NCO、-NR'COR''、-SR、-SOR'、-SO<sub>2</sub>R'、-SO<sub>3</sub>H、-OSO<sub>3</sub>H、-SO<sub>2</sub>NR'R''、氰基、疊氮基、-COR'、-OCOR'及-CONR'R''組成之群；

$R_6$  為-H、-R、-OR、-SR、-NR'R''、-NO<sub>2</sub>或鹵素；

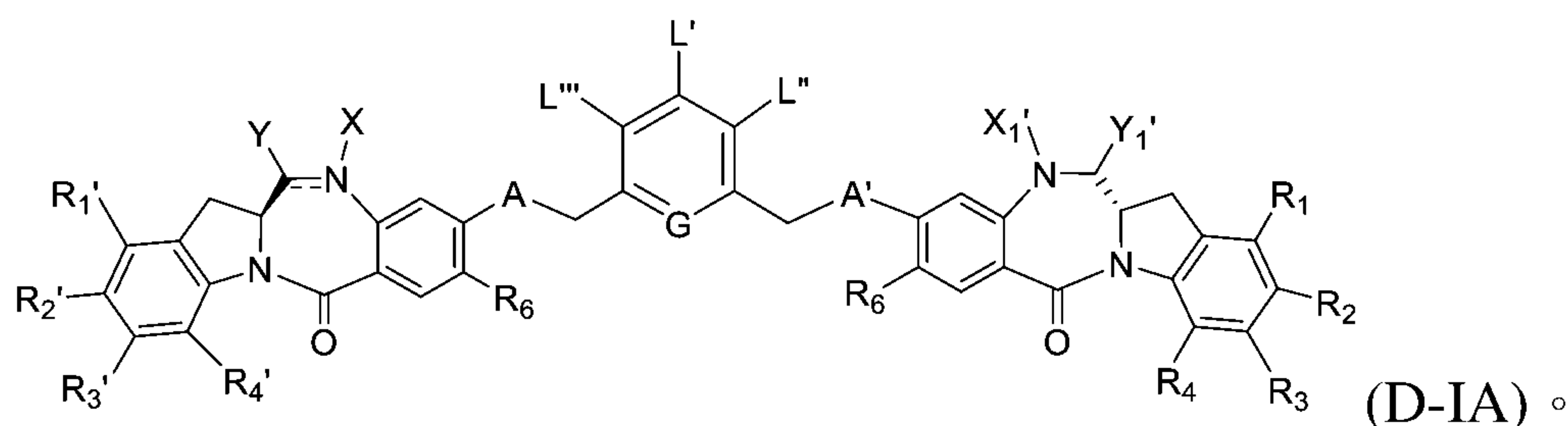
G 為-CH-或-N-；

A 及 A'為相同或不同的，且係獨立地選自-O-、側氧基(-C(=O)-)、-CRR'O-、-CRR'-、-S-、-CRR'S-、-NR<sub>5</sub>及-CRR'N(R<sub>5</sub>)-；且

$R_5$ 在每次出現時獨立地為-H 或視情況經取代之直鏈或分支鏈烷基。

【請求項 68】 如請求項 67 之方法，其中 D 係由下式或其醫藥學上可接受之鹽

表示：



【請求項 69】 如請求項 67 或 68 之方法，其中  $X_1$  為-H、-OH、 $(C_1-C_3)$ 烷基、鹵基 $(C_1-C_3)$ 烷基或苯基；且  $Y_1'$  為-H、側氧基、 $(C_1-C_3)$ 烷基或鹵基 $(C_1-C_3)$ 烷基。

【請求項 70】 如請求項 69 之方法，其中  $X_1$  為-H、-OH 或-Me；且  $Y_1$  為-H 或側氧基。

【請求項 71】 如請求項 69 之方法，其中  $X_1$  為-H；且  $Y_1$  為-H。

【請求項 72】 如請求項 67 至 71 中任一項之方法，其中 A 及 A' 為相同或不同的，且係選自-O-及-S-。

【請求項 73】 如請求項 72 之方法，其中 A 及 A' 為-O-。

【請求項 74】 如請求項 67 至 73 中任一項之方法，其中  $R_6$  為-OMe。

【請求項 75】 如請求項 67 至 74 中任一項之方法，其中  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_1'$ 、 $R_2'$ 、 $R_3'$ 及  $R_4'$ 係獨立地為-H、鹵素、-NO<sub>2</sub>、-OH、 $(C_1-C_3)$ 烷基、鹵基 $(C_1-C_3)$ 烷基或 $(C_1-C_3)$ 烷氧基。

【請求項 76】 如請求項 75 之方法，其中  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_1'$ 、 $R_2'$ 、 $R_3'$ 及  $R_4'$ 均為-H。

【請求項 77】 如請求項 67 至 76 中任一項之方法，其中 R、R'、R''及  $R_5$ 各自獨立地為-H 或 $(C_1-C_3)$ 烷基。

【請求項 78】 如請求項 67 或 68 之方法，其中：

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

$R_6$  為 -OMe；

$X_1$  及  $Y_1$  均為 -H；且

A 及 A' 為 -O-。

【請求項 79】 如請求項 67 至 78 中任一項之方法，其中  $L'$ 、 $L''$  及  $L'''$  之一係由式(A')或(D')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、(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷氧基或-NO<sub>2</sub>。

【請求項 80】 如請求項 79 之方法，其中  $L'$  係由式(A')表示；且  $L''$  及  $L'''$  均為 -H。

【請求項 81】 如請求項 79 之方法， $L'$  係由式(D')表示；且  $L''$  及  $L'''$  均為 -H。

【請求項 82】 如請求項 67 至 81 中任一項之方法，其中  $R_{x1}$  為具有 1 至 6 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基，其視情況經鹵素、-OH、(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基、(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷氧基、鹵基(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基或帶電取代基或可離子化基團 Q 取代。

【請求項 83】 如請求項 67 至 82 中任一項之方法，其中  $L'$  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<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基或帶電取代基或可離子化基團 Q；

s 為整數 1 至 6；

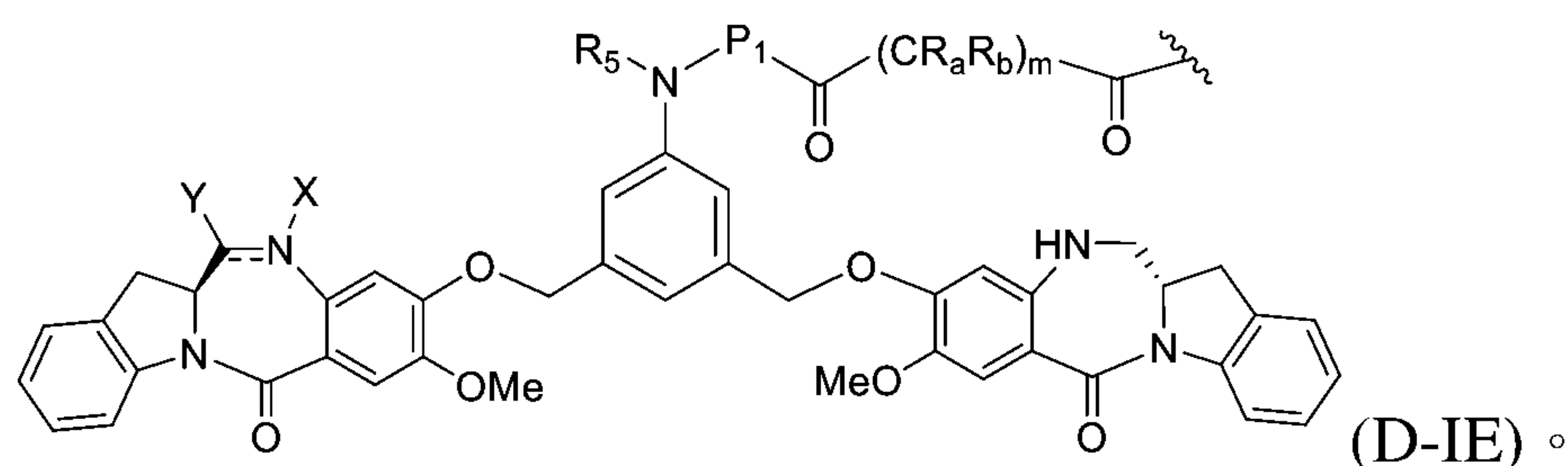
$s1'$  為 0 或整數 1 至 6；且

Cy 為具有 5 或 6 個環碳原子之環狀烷基，其視情況經鹵素、-OH、(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)

烷基、(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷氧基或鹵基(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基取代。

【請求項 84】 如請求項 83 之方法，其中式(B2')及(C2')中之 Cy 為環己烷；且 s1' 為 0 或 1。

【請求項 85】 如請求項 83 之方法，其中 D 係由下式或其醫藥學上可接受之鹽表示：



【請求項 86】 如請求項 83 至 85 中任一項之方法，其中 R<sub>a</sub>及 R<sub>b</sub>均為 H；且 R<sub>5</sub> 為 H 或 Me。

【請求項 87】 如請求項 67 至 85 中任一項之方法，其中該帶電取代基或可離子化基團 Q 為 i) -SO<sub>3</sub>H、-Z'-SO<sub>3</sub>H、-OPO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>、-Z'-OPO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>、-PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>、-Z'-PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>、-CO<sub>2</sub>H、-Z'-CO<sub>2</sub>H、-NR<sub>11</sub>R<sub>12</sub>或-Z'-NR<sub>11</sub>R<sub>12</sub>或其醫藥學上可接受之鹽；或者，ii) -N<sup>+</sup>R<sub>14</sub>R<sub>15</sub>R<sub>16</sub>X<sup>-</sup>或-Z'-N<sup>+</sup>R<sub>14</sub>R<sub>15</sub>R<sub>16</sub>X<sup>-</sup>；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<sub>14</sub>至 R<sub>16</sub>各自獨立地為視情況經取代之烷基；且 X<sup>-</sup>為醫藥學上可接受之陰離子。

【請求項 88】 如請求項 87 之方法，其中 Q 為-SO<sub>3</sub>H 或其醫藥學上可接受之鹽。

【請求項 89】 如請求項 67 至 88 中任一項之方法，其中 P<sub>1</sub>為含有 2 至 10 個胺基酸殘基之肽。

【請求項 90】 如請求項 89 之方法，其中 P<sub>1</sub>為含有 2 至 5 個胺基酸殘基之肽。

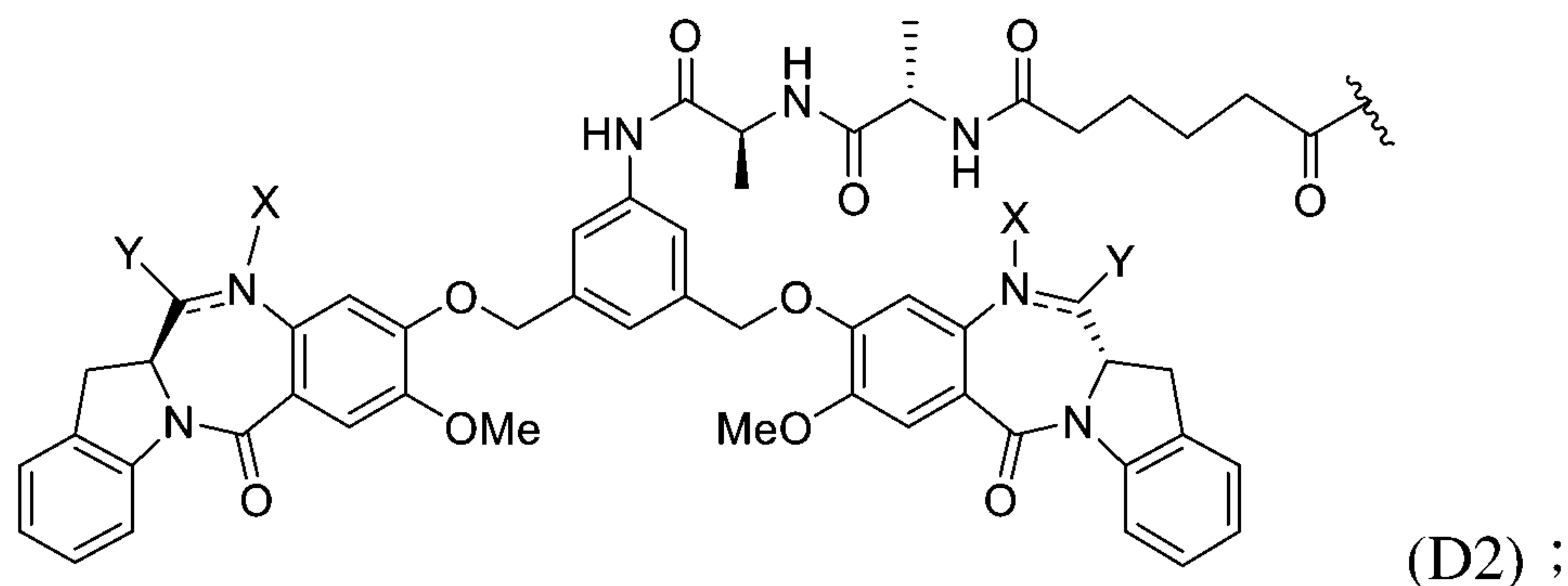
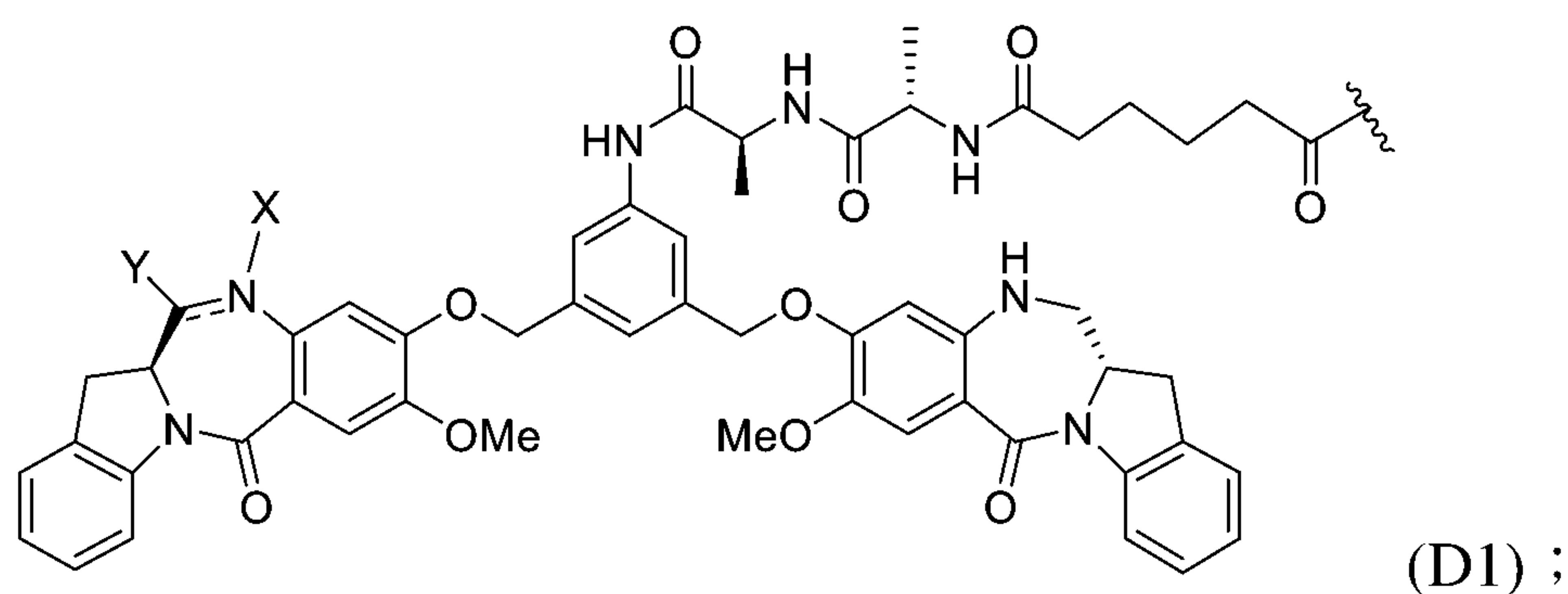
【請求項 91】 如請求項 89 或 90 之方法，其中 P<sub>1</sub>為可藉由蛋白酶裂解之肽。

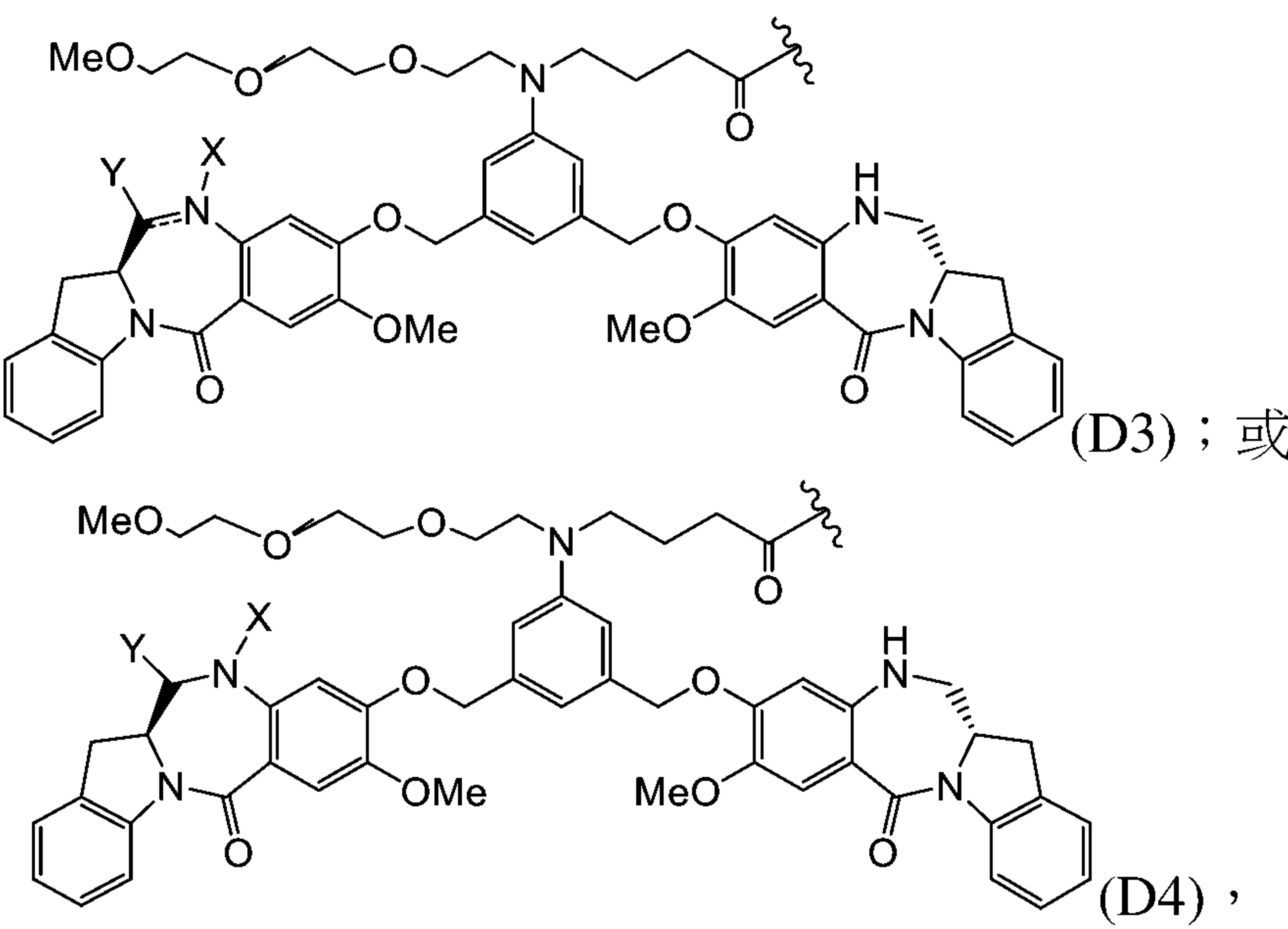
【請求項 92】 如請求項 89 之方法，其中 P<sub>1</sub>為可藉由在腫瘤組織中表現之蛋白酶裂解之肽。

【請求項 93】 如請求項 67 至 88 中任一項之方法，其中  $P_1$  為 Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-N<sup>9</sup>-甲苯磺醯基-Arg、Phe-N<sup>9</sup>-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 (SEQ ID NO: 56)、 $\beta$ -Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 57)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 58)、Val-Arg、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、Gln-Val、Asn-Ala、Gln-Phe 及 Gln-Ala。

【請求項 94】 如請求項 93 之方法，其中  $P_1$  為 Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala 或 D-Ala-D-Ala。

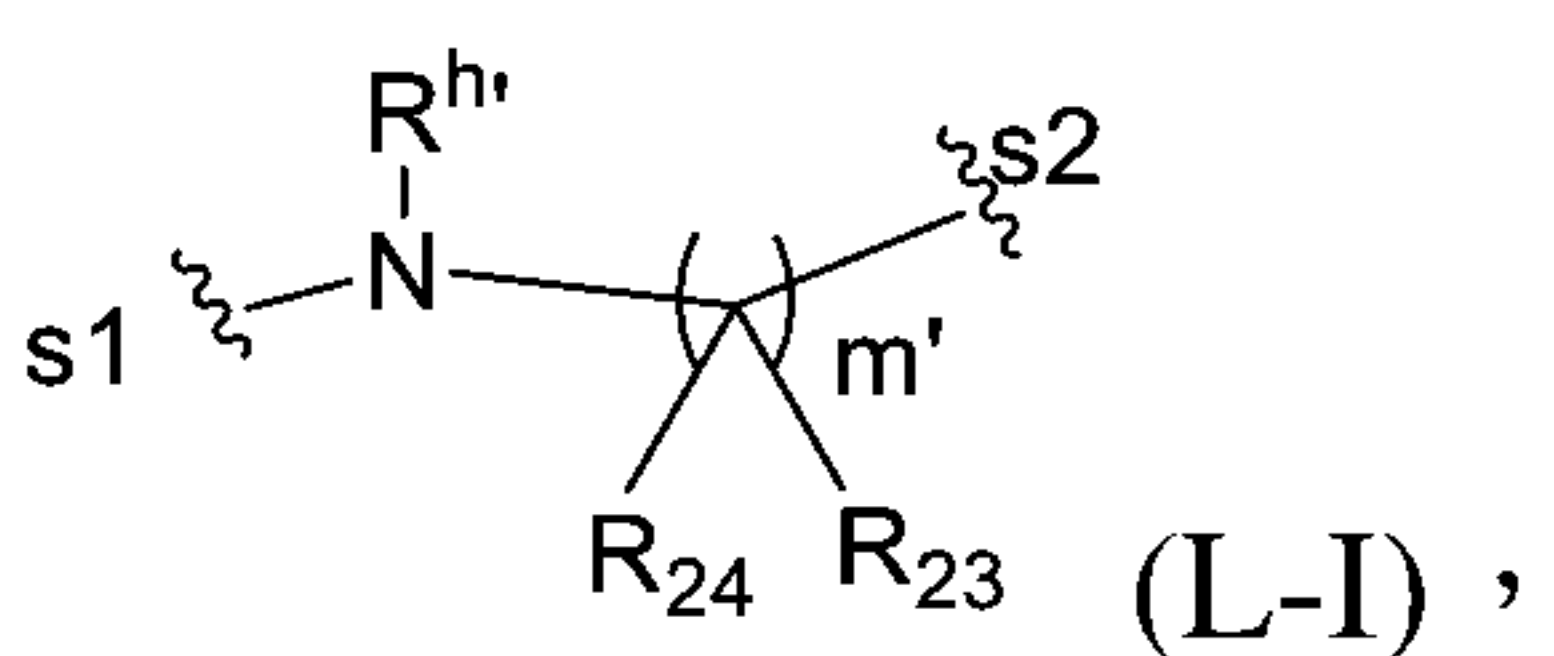
【請求項 95】 如請求項 67 之方法，其中 D 係由以下結構式或其醫藥學上可接受之鹽表示：





其中 N 與 C 之間的雙線=表示單鍵或雙鍵，其限制條件在於當其為雙鍵時，X 不存在且 Y 為-H；且當其為單鍵時，X 為-H，Y 為-SO<sub>3</sub>H 或其醫藥學上可接受之鹽。

【請求項 96】 如請求項 67 至 95 中任一項之方法，其中-L係由以下結構式或其醫藥學上可接受之鹽表示：



其中：

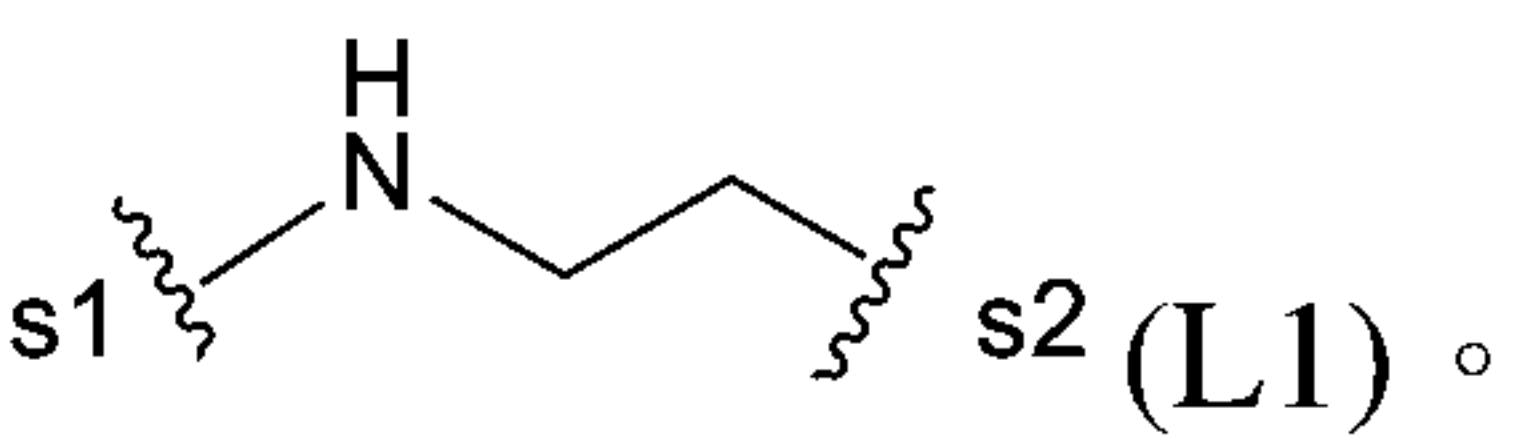
- s1 為共價連接至 D 之位點；s2 為共價連接至順丁烯二醯亞胺基之位點；
- R<sub>23</sub> 及 R<sub>24</sub> 在每次出現時獨立地為 H 或視情況經取代之烷基；
- m' 為 0 與 10 之間的整數；且
- R<sup>h'</sup> 為 H 或視情況經取代之烷基。

【請求項 97】 如請求項 96 之方法，其中 R<sub>23</sub> 及 R<sub>24</sub> 均為 H；且 m' 為 1 與 6 之間的整數。

【請求項 98】 如請求項 96 或 97 之方法，其中 R<sup>h'</sup> 為 H。

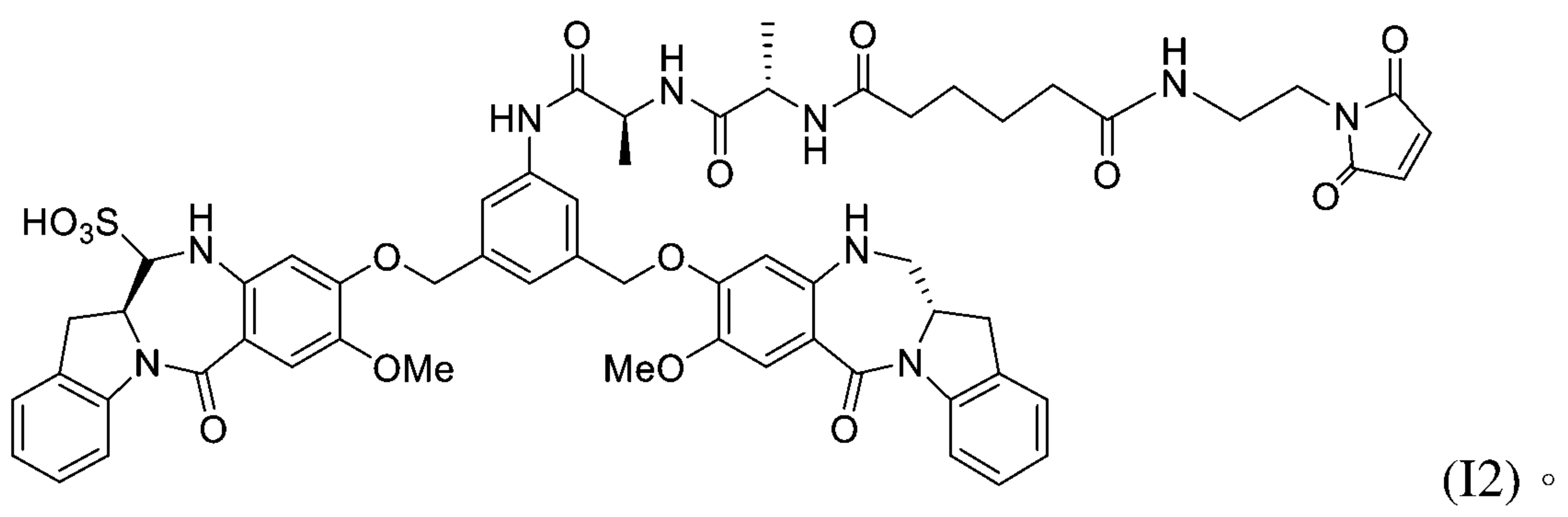
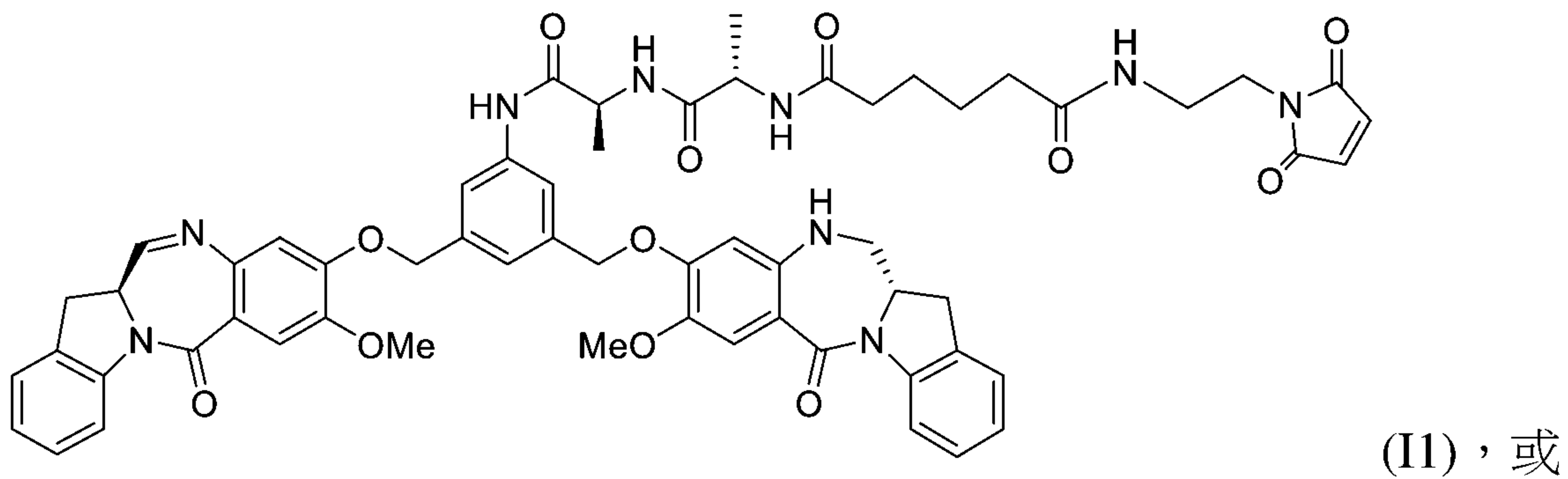
【請求項 99】 如請求項 96 之方法，其中 L 係由以下結構式或其醫藥學上可接

受之鹽表示：

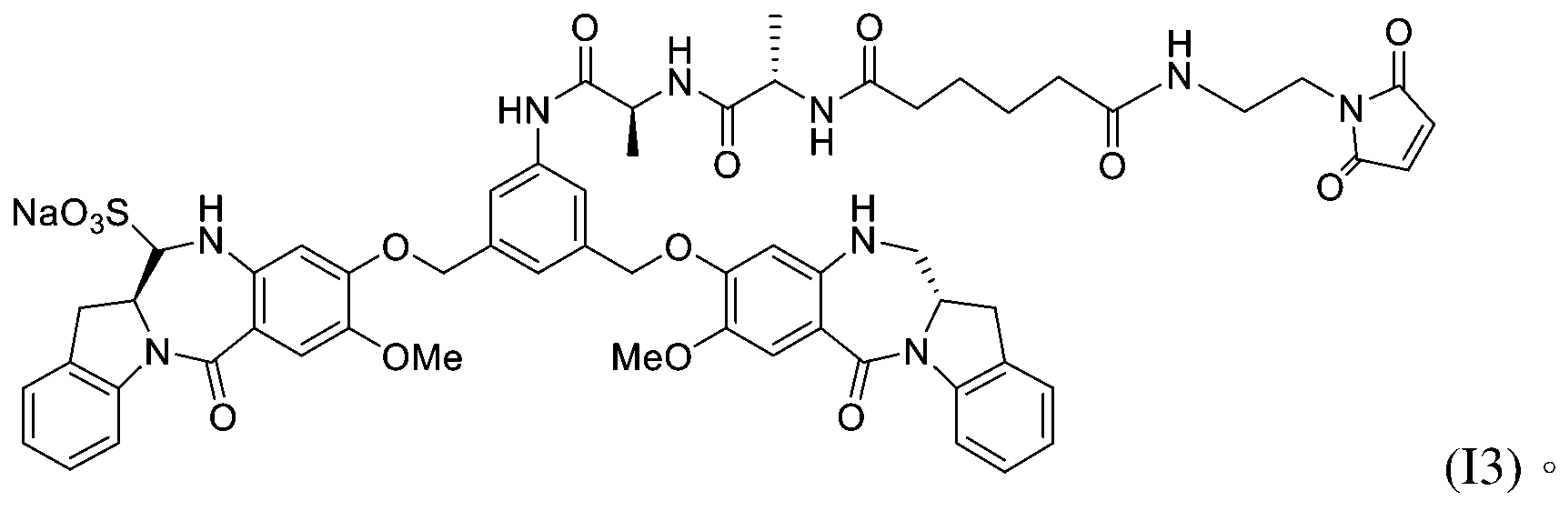


【請求項 100】 如請求項 67 至 99 中任一項之方法，其中該醫藥學上可接受之鹽為鈉鹽或鉀鹽。

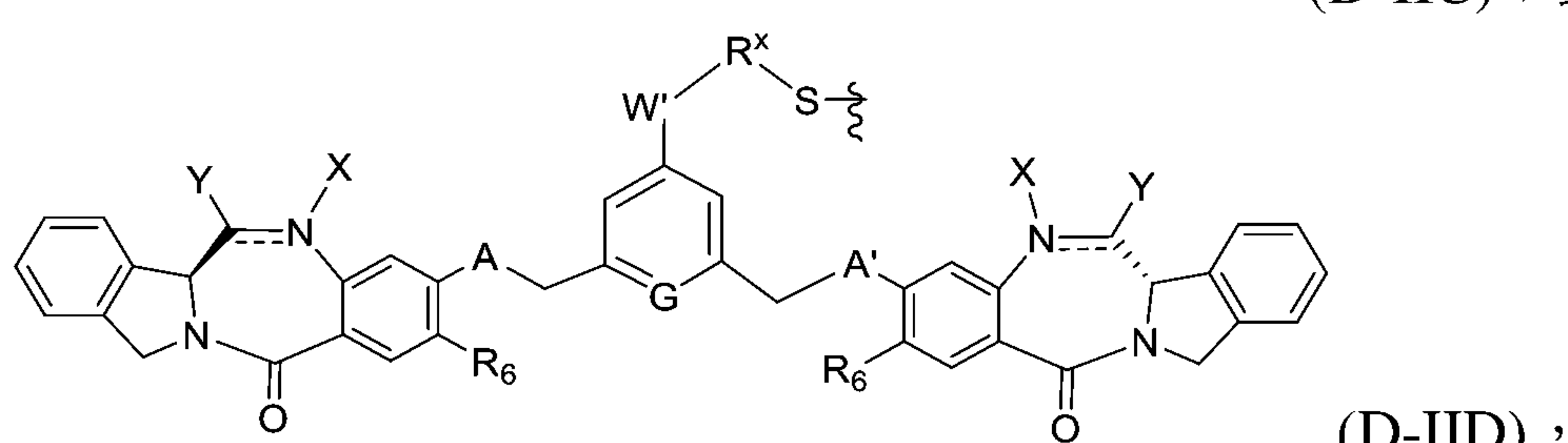
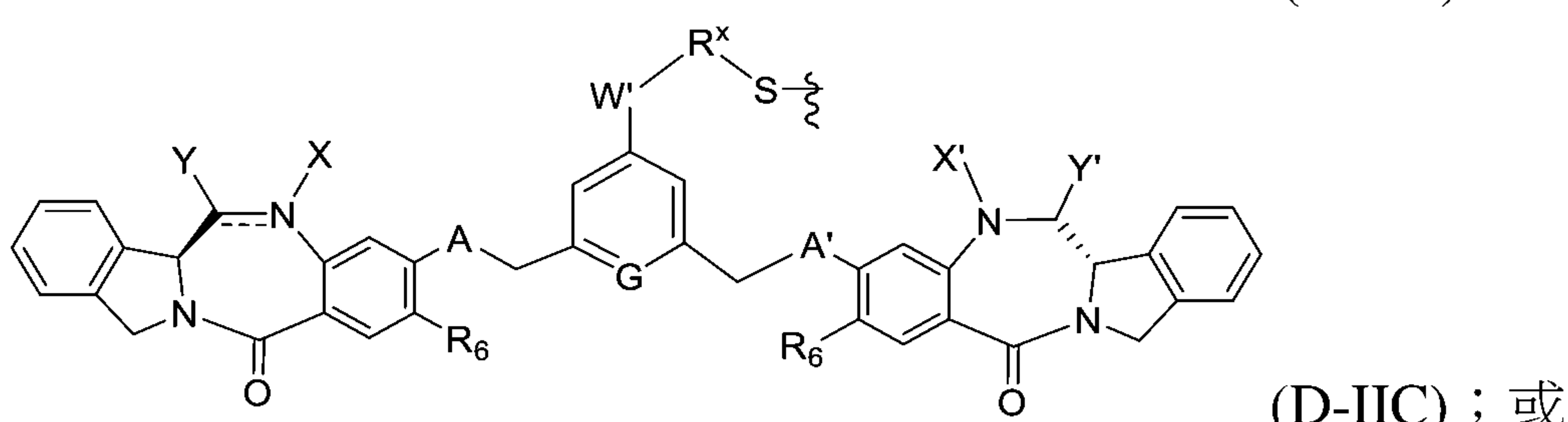
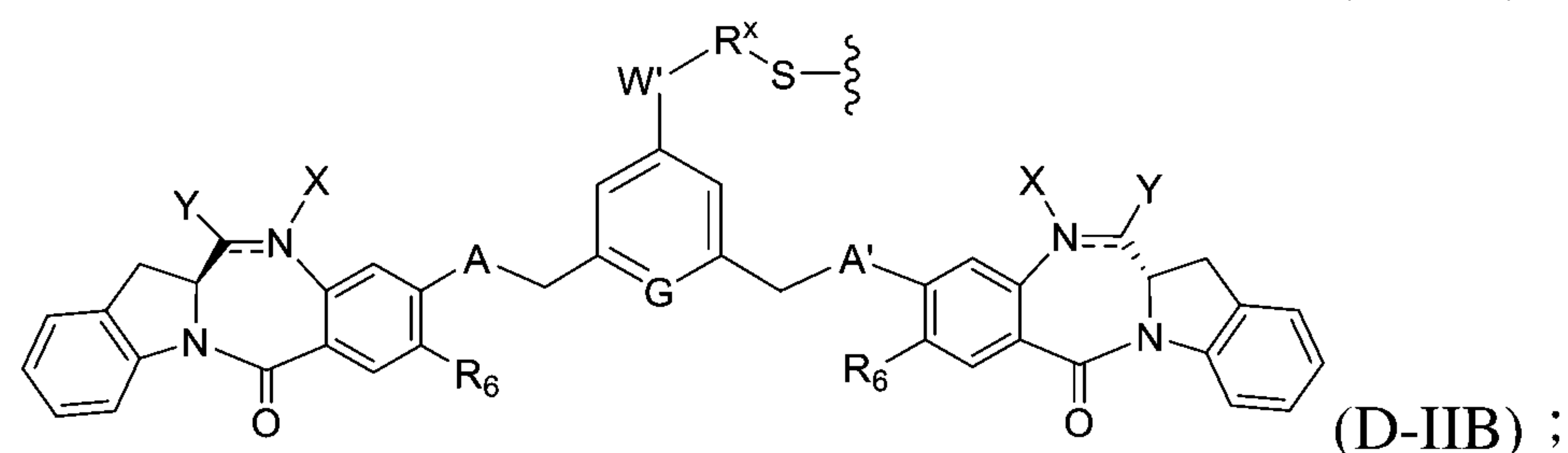
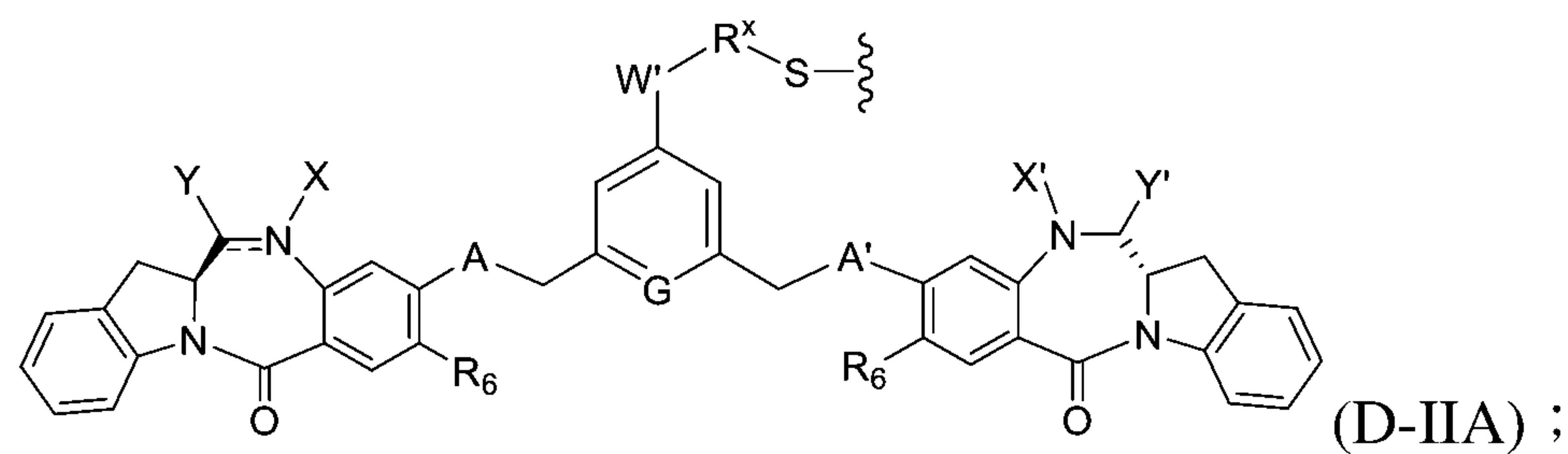
【請求項 101】 如請求項 1 至 64 中任一項之方法，其中該化合物係由下式或其醫藥學上可接受之鹽表示：



【請求項 102】 如請求項 101 之方法，其中該化合物係由下式表示：



【請求項 103】 如請求項 1 至 64 中任一項之方法，其中 D 係由下式或其醫藥學上可接受之鹽表示：



其中：

N 與 C 之間的雙線=表示單鍵或雙鍵，其限制條件在於當其為雙鍵時，X 不存在且 Y 為-H 或(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)烷基；且當其為單鍵時，X 為-H 或胺保護部分，Y 為-OH 或-SO<sub>3</sub>H 或其醫藥學上可接受之鹽；

X'係選自由-H、-OH、經取代或未經取代之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基、苯基及胺保護基組成之群；

Y'係選自由-H、側氧基、經取代或未經取代之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基組成之群；

A 及 A'係選自-O-及-S-；

W'不存在，或係選自-O-、-N(R<sup>e</sup>)-、-N(R<sup>e</sup>)-C(=O)-、-N(C(=O)R<sup>e</sup>)-、-S-或

$-\text{CH}_2-\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{NR}^e-$ ；

$\text{R}^x$  不存在或係選自直鏈、分支鏈或環狀烷基；

$\text{R}^e$  為  $-\text{H}$ 、直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基或  $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{R}^k$ ，其中  $\text{R}^k$  為  $-\text{H}$ 、具有 1 至 6 個碳原子、視情況攜帶二級胺基(例如  $-\text{NHR}^{101}$ )或三級胺基( $-\text{NR}^{101}\text{R}^{102}$ )之直鏈、分支鏈環狀烷基、或 5 員或 6 員含氮雜環，其中  $\text{R}^{101}$  及  $\text{R}^{102}$  各自獨立地為直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；

$n$  為整數 1 至 24；

$\text{G}$  係選自  $-\text{CH}-$  或  $-\text{N}-$ ；

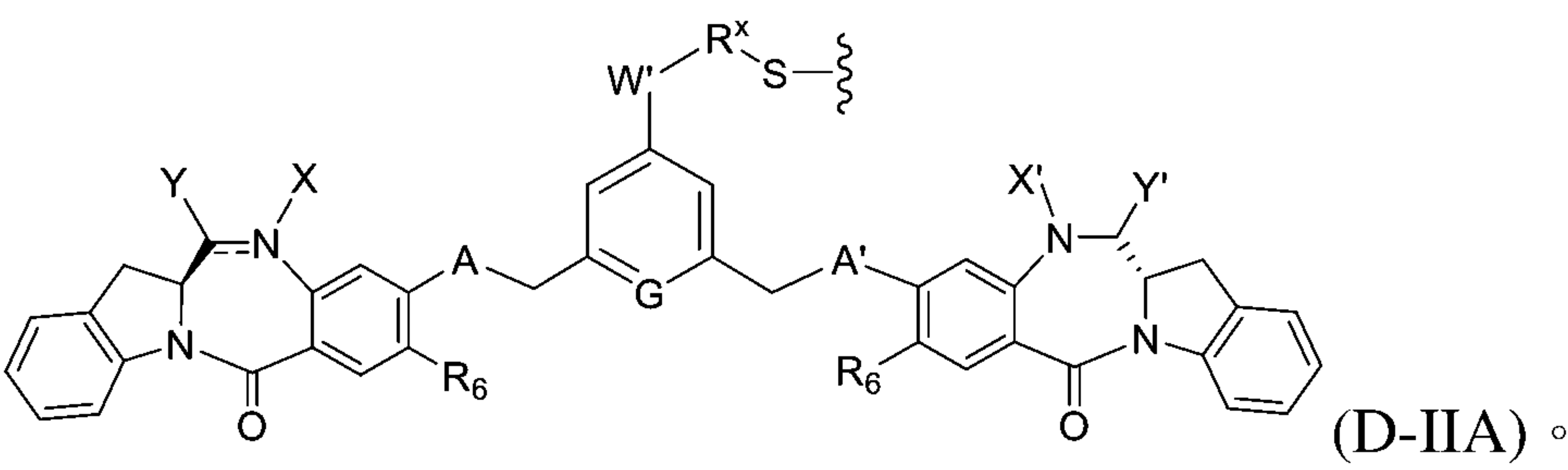
$\text{R}_6$  為  $-\text{H}$ 、 $-\text{R}$ 、 $-\text{OR}$ 、 $-\text{SR}$ 、 $-\text{NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{NO}_2$  或鹵素；且

$\text{R}$  在每次出現時係獨立地選自由  $-\text{H}$ 、視情況經取代之直鏈、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獨立地選自氮、氧及硫之一或多個雜原子之 5 員至 18 員雜芳基環或視情況經取代的含有獨立地選自  $\text{O}$ 、 $\text{S}$ 、 $\text{N}$  及  $\text{P}$  之 1 至 6 個雜原子之 3 員至 18 員雜環組成之群；

$\text{R}'$  及  $\text{R}''$  係各自獨立地選自  $-\text{H}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{OR}$ 、 $-\text{NHR}$ 、 $-\text{NR}_2$ 、 $-\text{COR}$ 、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獨立地選自  $\text{O}$ 、 $\text{S}$ 、 $\text{N}$  及  $\text{P}$  之 1 至 6 個雜原子之 3 員至 18 員雜環；

$\text{R}^c$  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。

【請求項 104】如請求項 103 之方法，其中  $\text{D}$  係由以下結構式或其醫藥學上可接受之鹽表示：



【請求項 105】 如請求項 103 或 104 之方法，其中：

X'及 Y'均為-H；

A 及 A'均為-O-；

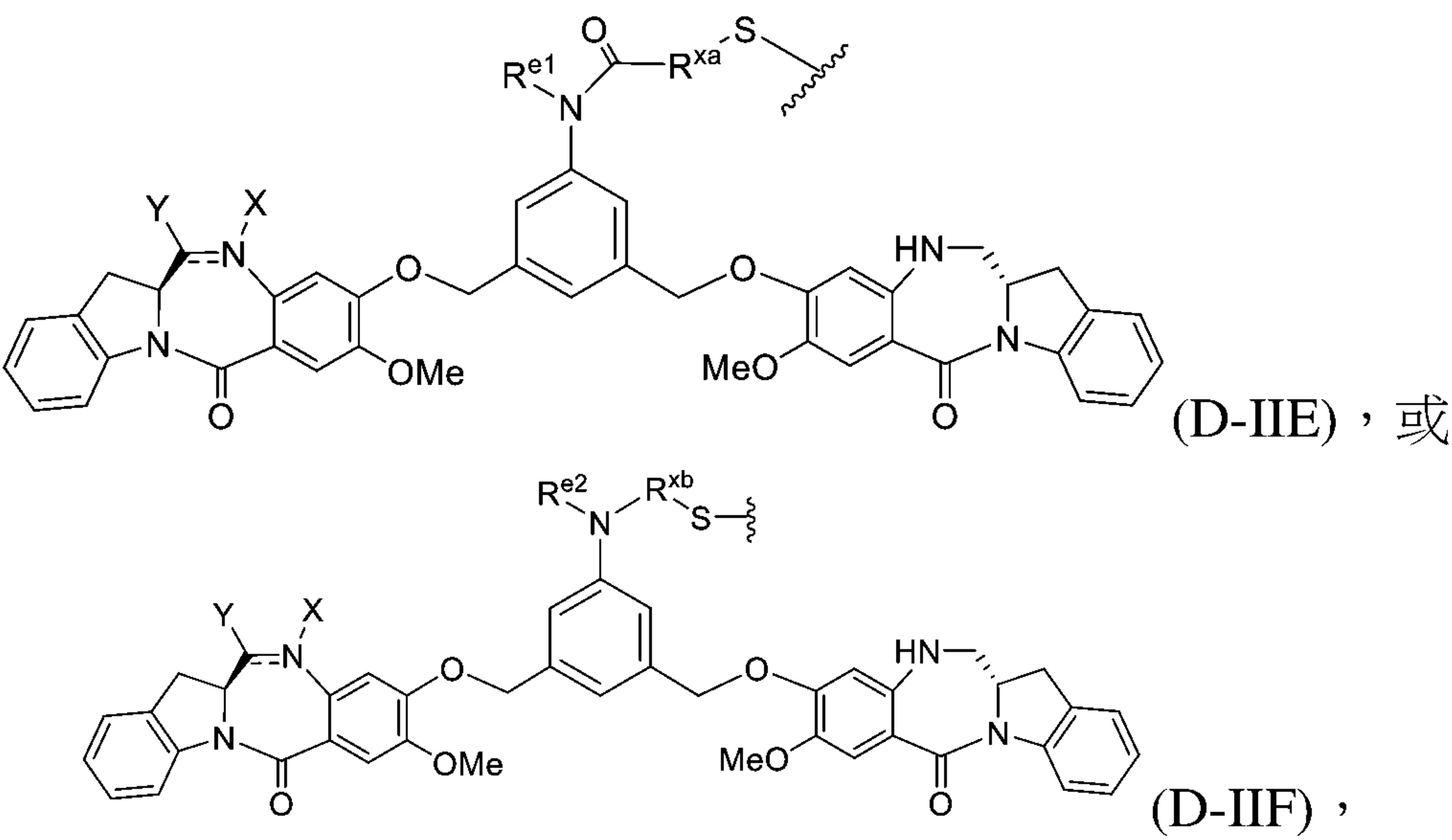
R<sub>6</sub> 為-OMe；

W'為-N(R<sup>e</sup>)-或-N(R<sup>e</sup>)-C(=O)-；

R<sup>e</sup>為-H、具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支鏈烷基或-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>，  
其中 R<sup>k</sup>為-H、具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支鏈烷基；  
n 為整數 2 至 6；且

R<sup>x</sup> 為具有 1 至 6 個碳原子之直鏈或分支鏈烷基。

【請求項 106】 如請求項 103 之方法，其中 D 係由以下結構式或其醫藥學上可接受之鹽表示：

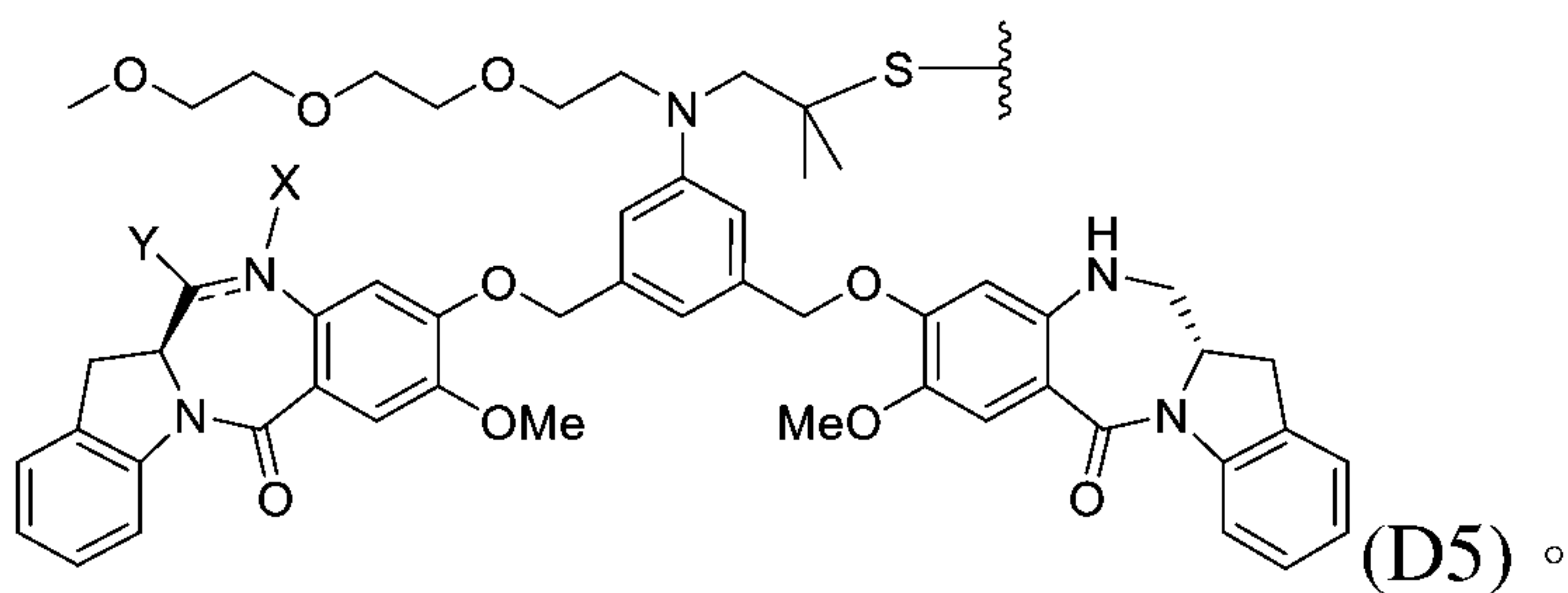


其中：

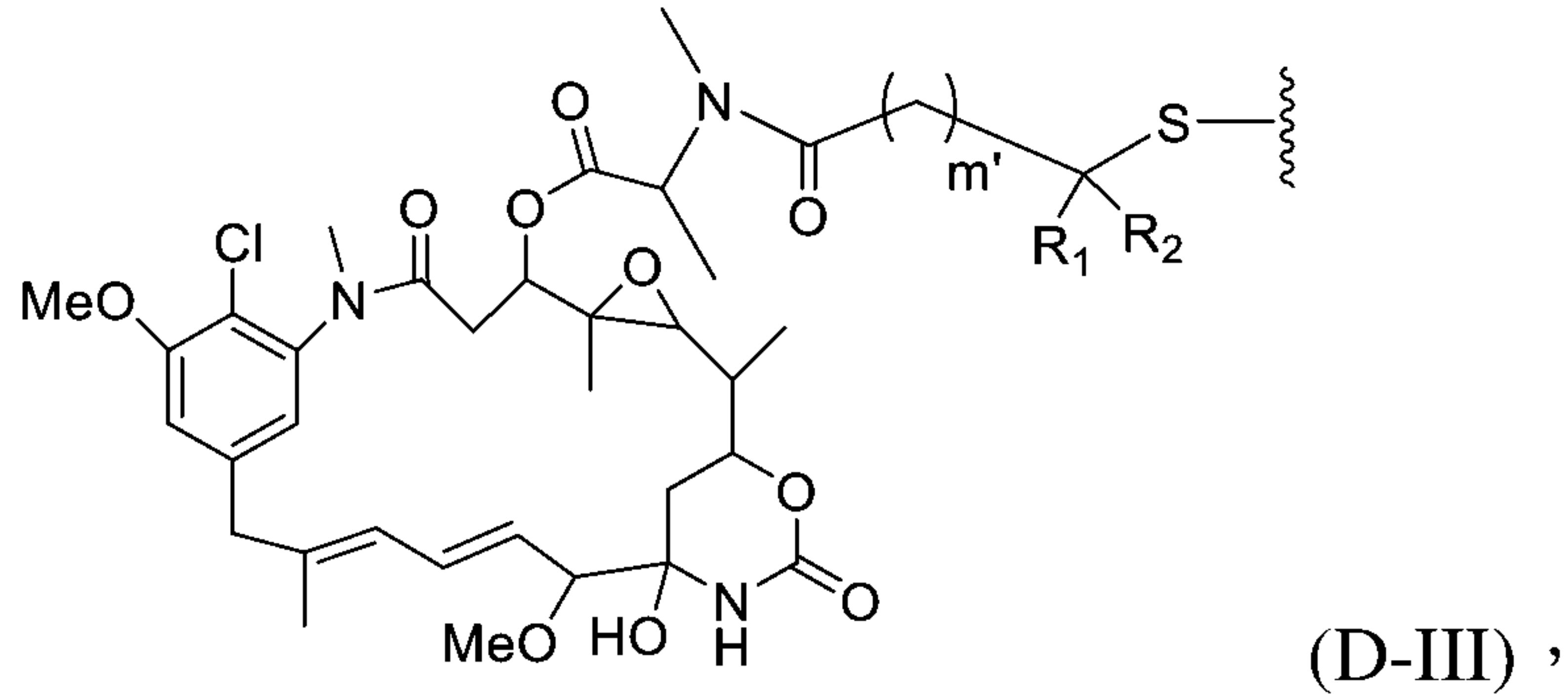
R<sup>e1</sup> 為 H 或(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基；

$R^{xa}$  為(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基；  
 $R^{e2}$  為-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>；  
n 為整數 2 至 6；  
 $R^k$  為-H 或-Me；且  
 $R^{xb}$  為(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基。

【請求項 107】 如請求項 106 之方法，其中 D 係由下式或其醫藥學上可接受之鹽表示：

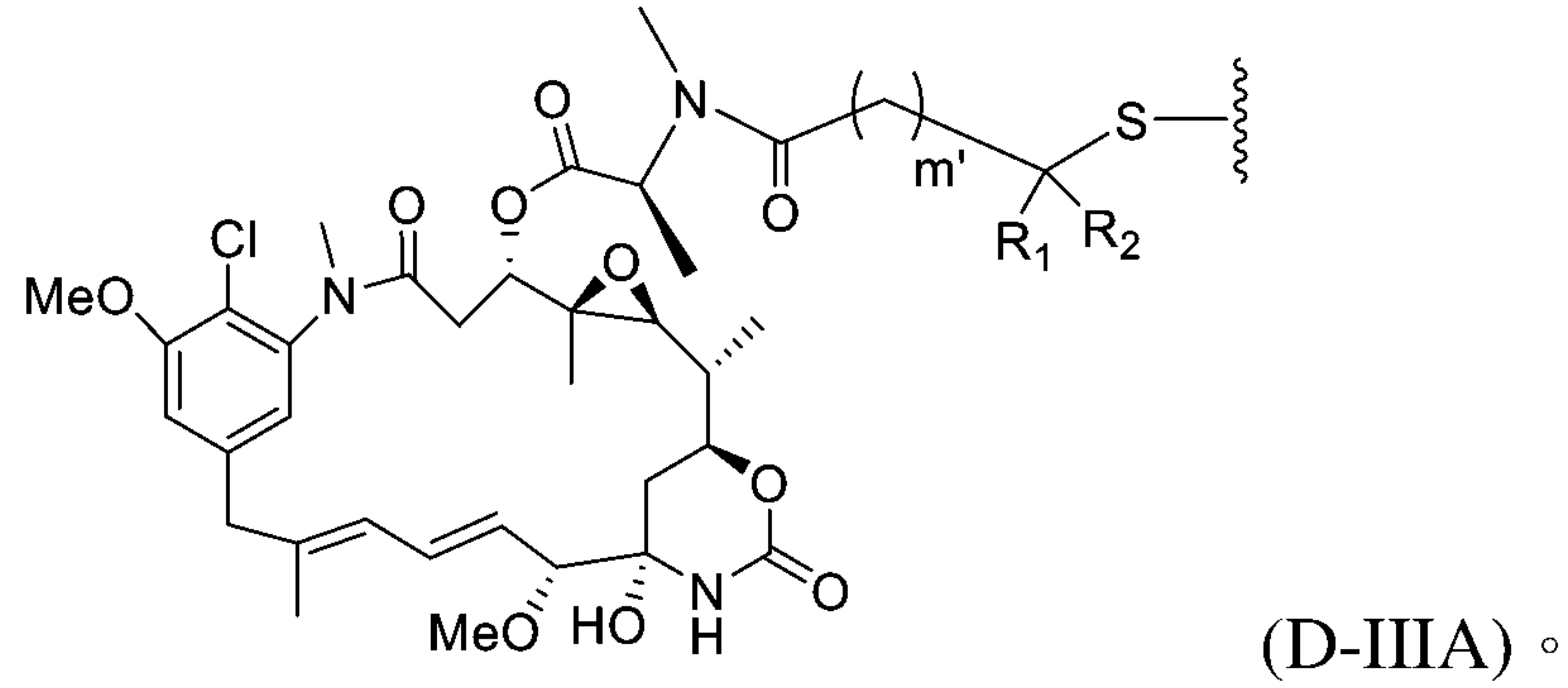


【請求項 108】 如請求項 1 至 64 中任一項之方法，其中 D 係由下式表示：



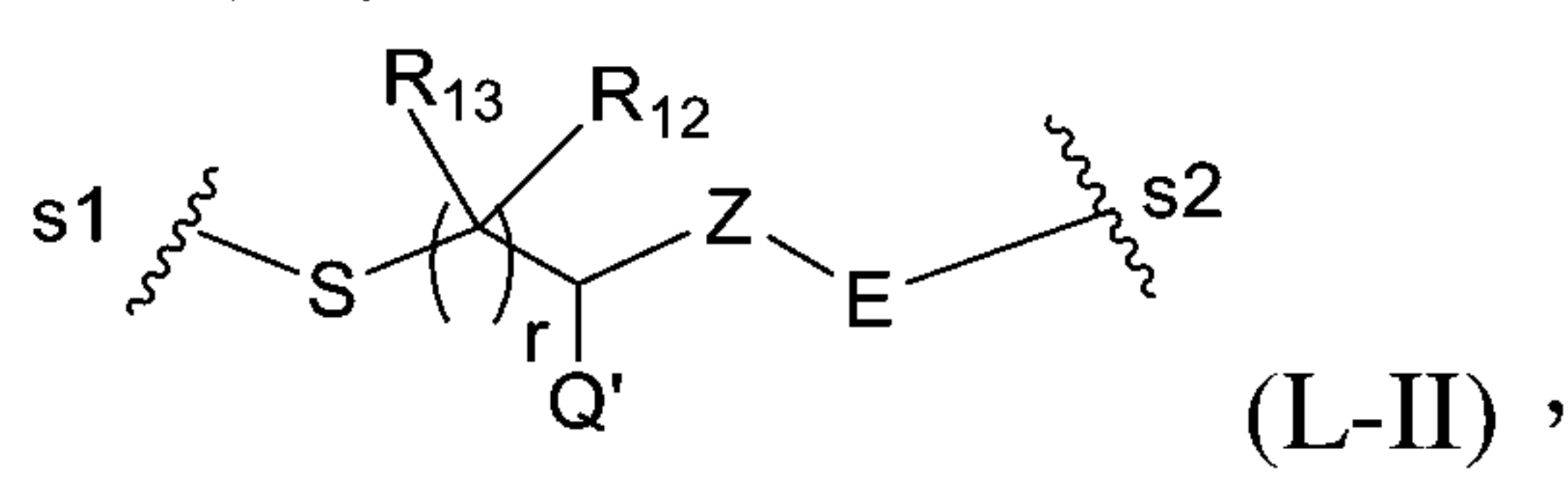
其中 m' 為 1 或 2；且 R<sub>1</sub> 及 R<sub>2</sub> 各自獨立地為-H 或(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基。

【請求項 109】 如請求項 108 之方法，其中 D 係由下式表示：



【請求項 110】 如請求項 103 至 109 中任一項之方法，其中 L 係由以下結構式或

其醫藥學上可接受之鹽表示：



其中：

s1 為共價連接至 D 之位點，且 s2 為共價連接至順丁烯二醯亞胺基之位點；

E 為 $-(CR_{10}R_{11})_q-$ 、環烷基或環烷基烷基；

Z 係不存在  $-\text{SO}_2\text{NR}_9-$ 、 $-\text{NR}_9\text{SO}_2-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{NR}_9-$ 、 $-\text{NR}_9-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{NR}_9-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_p-$ 、 $-\text{NR}_9-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_p-$ 、 $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_p-\text{C}(=\text{O})\text{NR}_9-$ 或 $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_p-\text{NR}_9-\text{C}(=\text{O})-$ ；

p 為整數 1 至 24；

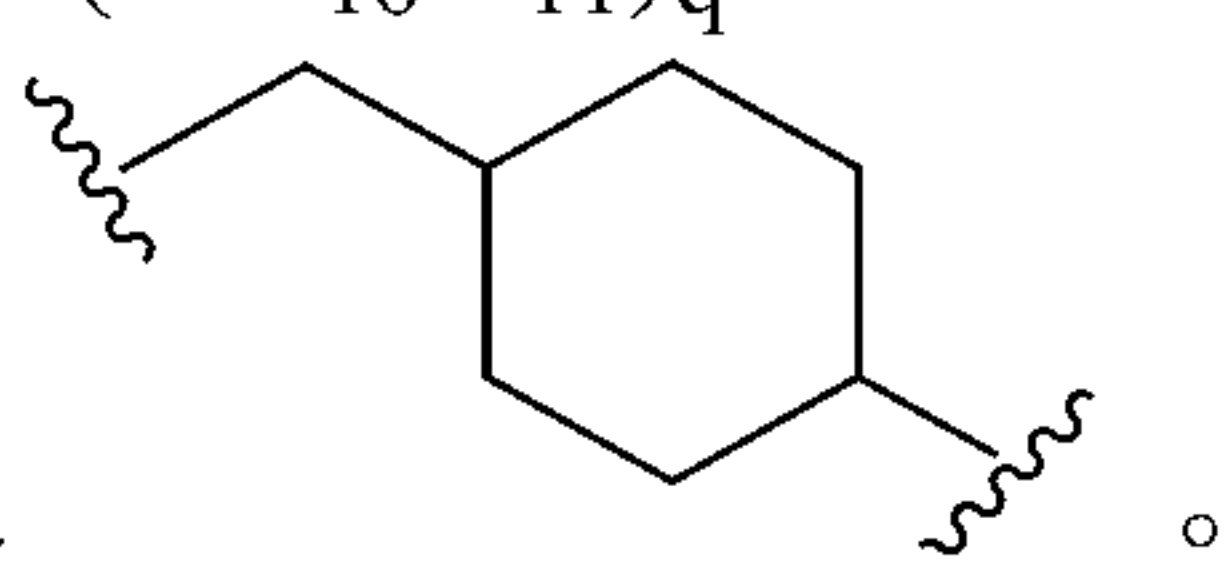
Q 為 H、帶電取代基或可離子化基團；

$R_9$ 、 $R_{10}$ 、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$  及  $R_{13}$  在每次出現時獨立地為 H 或視情況經取代之烷基；

且

q 及 r 在每次出現時獨立地為 0 與 10 之間的整數。

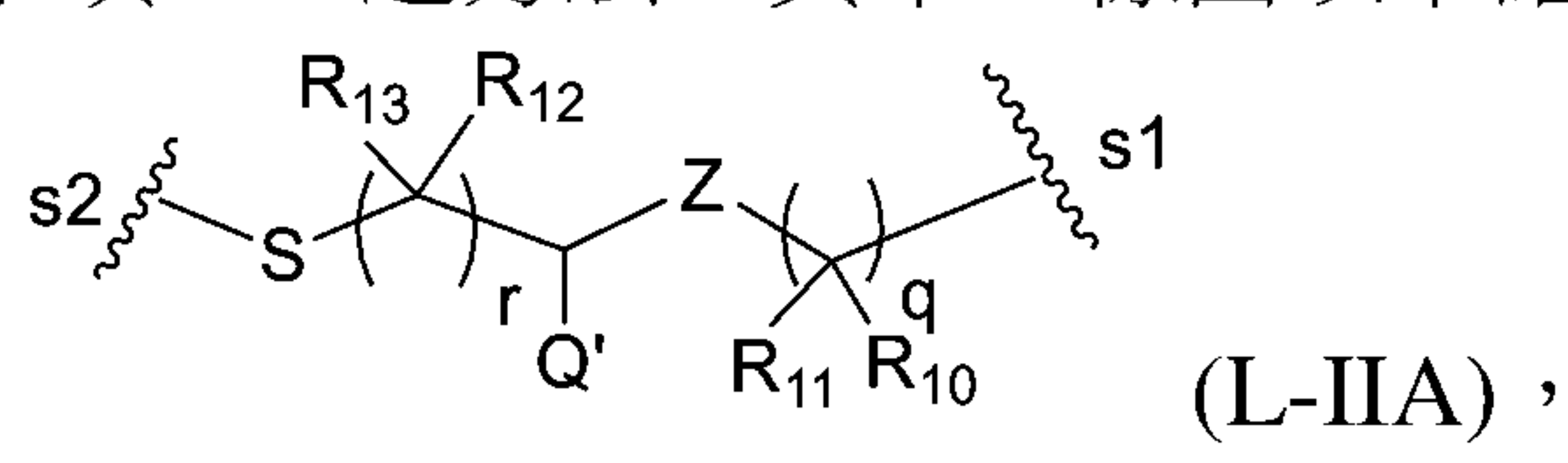
【請求項 111】 如請求項 110 之方法，其中 E 為 $-(CR_{10}R_{11})_q-$ 。



【請求項 112】 如請求項 111 之方法，其中 E 為

【請求項 113】 如請求項 110 至 112 中任一項之方法，其中 Z 為 $-\text{C}(=\text{O})-\text{NR}_9-$ 或 $-\text{NR}_9-\text{C}(=\text{O})-$ 。

【請求項 114】 如請求項 110 之方法，其中 L 係由以下結構式表示：



其中  $R_9$ 、 $R_{10}$ 、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$  及  $R_{13}$  在每次出現時獨立地為-H 或 $(C_1-C_3)$ 烷基。

【請求項 115】 如請求項 110 至 114 中任一項之方法，其中  $R_9$  為-H。

【請求項 116】如請求項 110 至 115 中任一項之方法，其中 Q' 為：

i) H；

ii)  $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{Z}'-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{OPO}_3\text{H}_2$ 、 $-\text{Z}'-\text{OPO}_3\text{H}_2$ 、 $-\text{PO}_3\text{H}_2$ 、 $-\text{Z}'-\text{PO}_3\text{H}_2$ 、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{Z}'-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NR}_{11}\text{R}_{12}$  或  $-\text{Z}'-\text{NR}_{14}\text{R}_{15}$  或其醫藥學上可接受之鹽；或者，

iii)  $-\text{N}^+\text{R}_{14}\text{R}_{15}\text{R}_{16}\text{X}^-$  或  $-\text{Z}'-\text{N}^+\text{R}_{14}\text{R}_{15}\text{R}_{16}\text{X}^-$ ；

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；

$\text{R}_{14}$ 、 $\text{R}_{15}$  及  $\text{R}_{16}$  各自獨立地為視情況經取代之烷基；且

$\text{X}^-$  為醫藥學上可接受之陰離子。

【請求項 117】如請求項 116 之方法，其中 Q' 為 H 或  $-\text{SO}_3\text{H}$  或其醫藥學上可接受之鹽。

【請求項 118】如請求項 110 至 117 中任一項之方法，其中  $\text{R}_9$ 、 $\text{R}_{10}$ 、 $\text{R}_{11}$ 、 $\text{R}_{12}$  及  $\text{R}_{13}$  均為 H；且 q 及 r 各自獨立地為 1 與 6 之間的整數。

【請求項 119】如請求項 114 之方法，其中：

$\text{R}_{12}$  及  $\text{R}_{13}$  在每次出現時各自獨立地為 H 或  $(\text{C}_1-\text{C}_3)$  烷基；

Q 為 H 或  $-\text{SO}_3\text{H}$  或其醫藥學上可接受之鹽

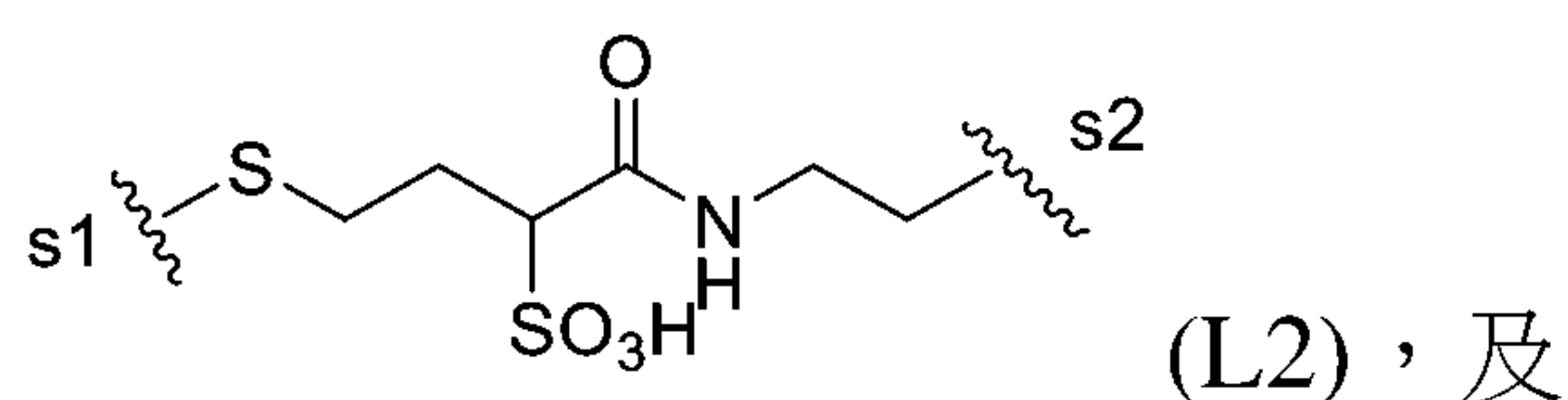
Z 為  $-\text{C}(=\text{O})-\text{NR}_9-$  或  $-\text{NR}_9-\text{C}(=\text{O})-$ ；

$\text{R}_9$  為 H 或  $(\text{C}_1-\text{C}_3)$  烷基；

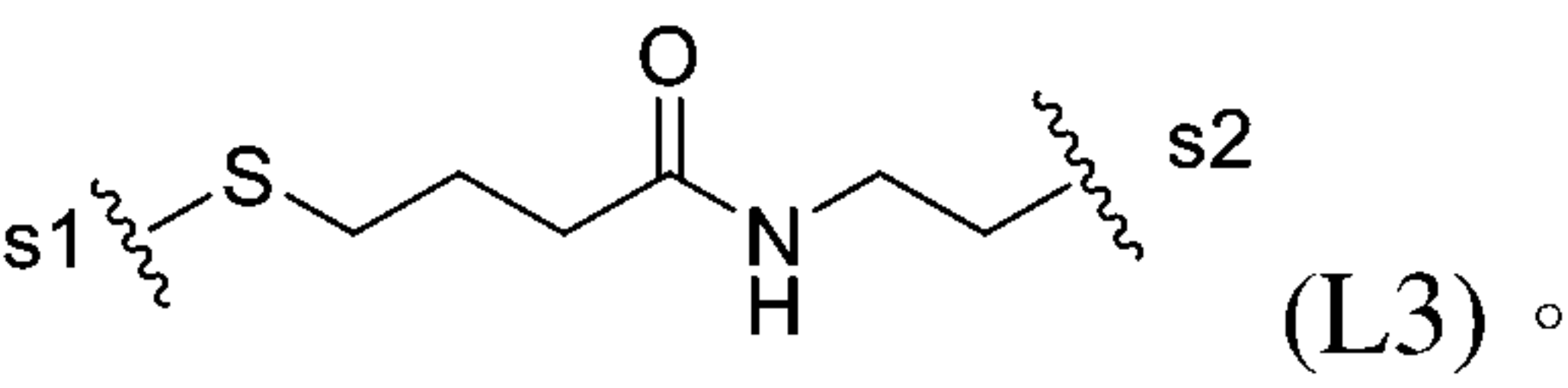
$\text{R}_{10}$  及  $\text{R}_{11}$  在每次出現時獨立地為 H 或  $(\text{C}_1-\text{C}_3)$  烷基；且

q 及 r 各自為整數 1 至 5。

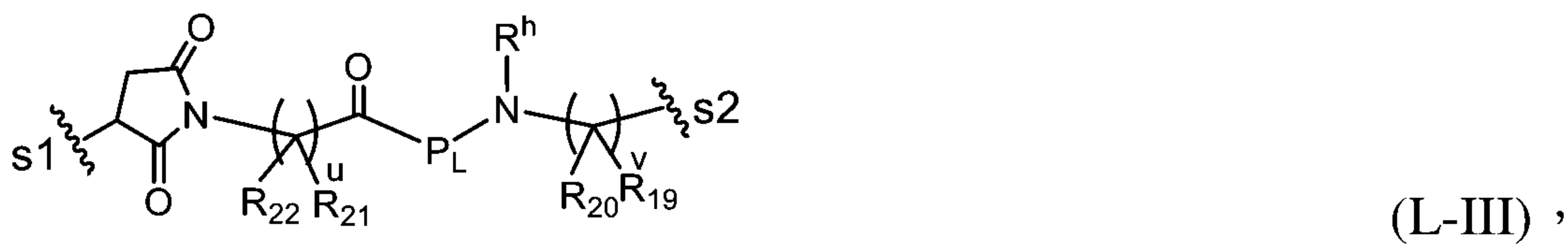
【請求項 120】如請求項 119 之方法，其中 L 係由以下結構式中之任一者或其醫藥學上可接受之鹽表示：



第 24 頁(發明申請專利範圍)



【請求項 121】 如請求項 103 至 109 中任一項之方法，其中 L 係由以下結構式或其醫藥學上可接受之鹽表示：



其中：

s1 為共價連接至 D 之位點；s2 為共價連接至順丁烯二醯亞胺基之位點；

R<sub>19</sub>、R<sub>20</sub>、R<sub>21</sub> 及 R<sub>22</sub> 在每次出現時獨立地為 H 或視情況經取代之烷基；

u 及 v 各自獨立地為 0 與 10 之間的整數；

R<sup>h</sup> 為 H 或視情況經取代之烷基；

P<sub>L</sub> 為視情況經取代之伸烷基、-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>j</sub>-（其中氧原子連接至與 P<sub>L</sub> 連接之-(C=O)-基團）、胺基酸殘基或含有 2 至 20 個胺基酸殘基之肽；且

j 為整數 1 至 24。

【請求項 122】 如請求項 121 之方法，其中 R<sub>19</sub>、R<sub>20</sub>、R<sub>21</sub> 及 R<sub>22</sub> 各自為 H；且 u 及 v 各自獨立地為 1 與 6 之間的整數。

【請求項 123】 如請求項 121 或 122 之方法，其中 P<sub>L</sub> 為胺基酸殘基或含有 2 至 10 個胺基酸殘基之肽。

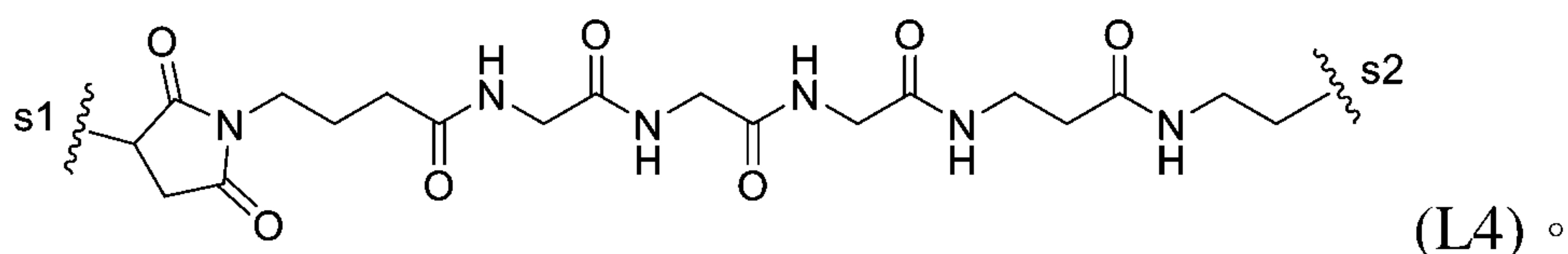
【請求項 124】 如請求項 123 之方法，其中 P<sub>L</sub> 為含有 2 至 5 個胺基酸殘基之肽。

【請求項 125】 如請求項 110 之方法，其中 P<sub>L</sub> 係選自由以下組成之群：Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Cit-Val、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp-Cit、Phe-Ala、Phe-N<sup>9</sup>-甲苯磺醯基-Arg、Phe-N<sup>9</sup>-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、

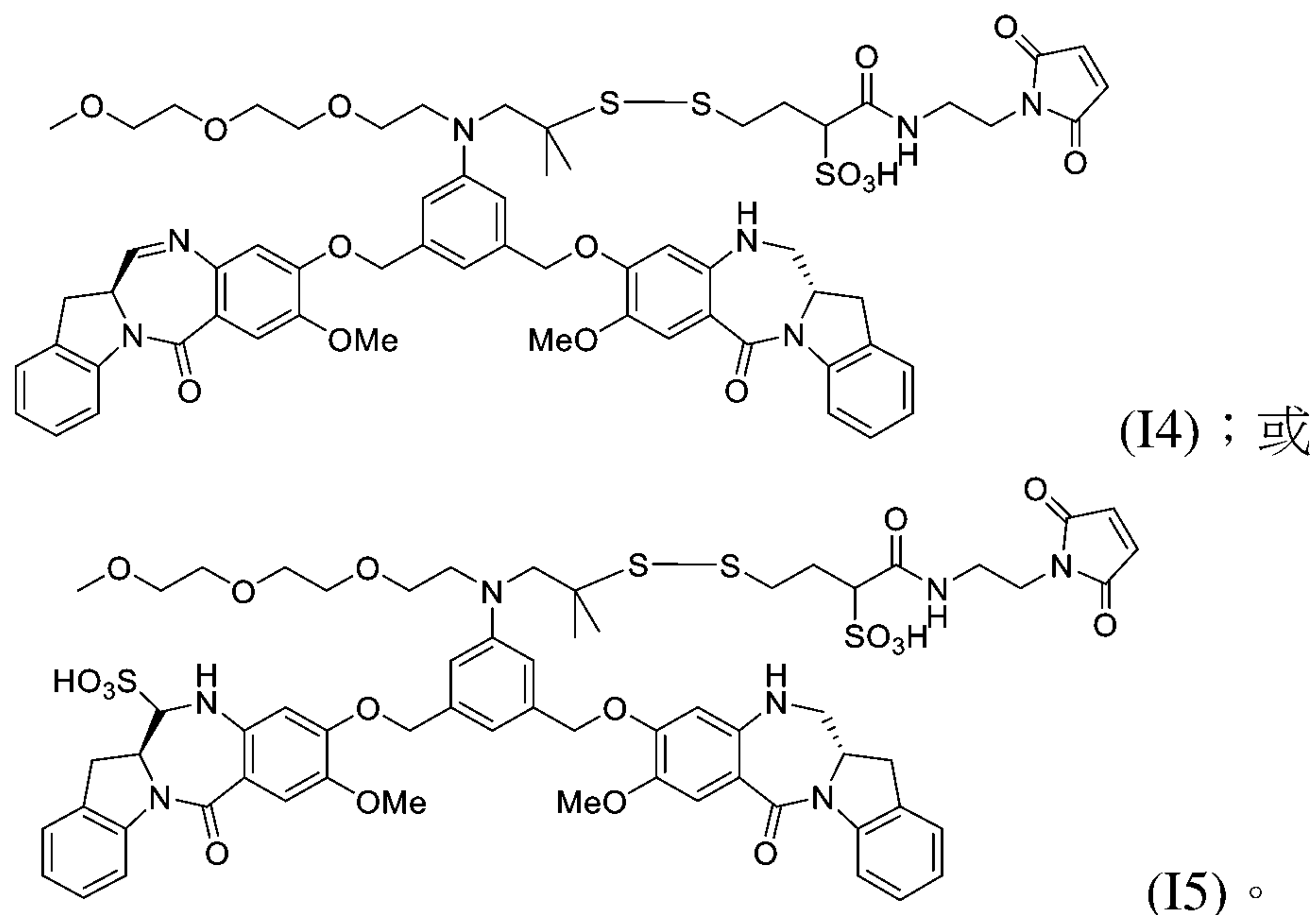
Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:55)、 $\beta$ -Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:56)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:57)、Val-Arg、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met、Met-Ala、Gln-Val、Asn-Ala、Gln-Phe、Gln-Ala、Gly-Gly-Gly、Ala-Ala-Ala、D-Ala-Ala-Ala、Ala-D-Ala-Ala、Ala-Ala-D-Ala、Ala-Val-Cit、Ala-Val-Ala 及  $\beta$ -Ala-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO:58)。

【請求項 126】如請求項 125 之方法，其中  $P_L$  為 Gly-Gly-Gly、Ala-Ala-Ala、D-Ala-Ala-Ala、Ala-D-Ala-Ala、Ala-Val-Ala 或  $\beta$ -Ala-Gly-Gly-Gly。

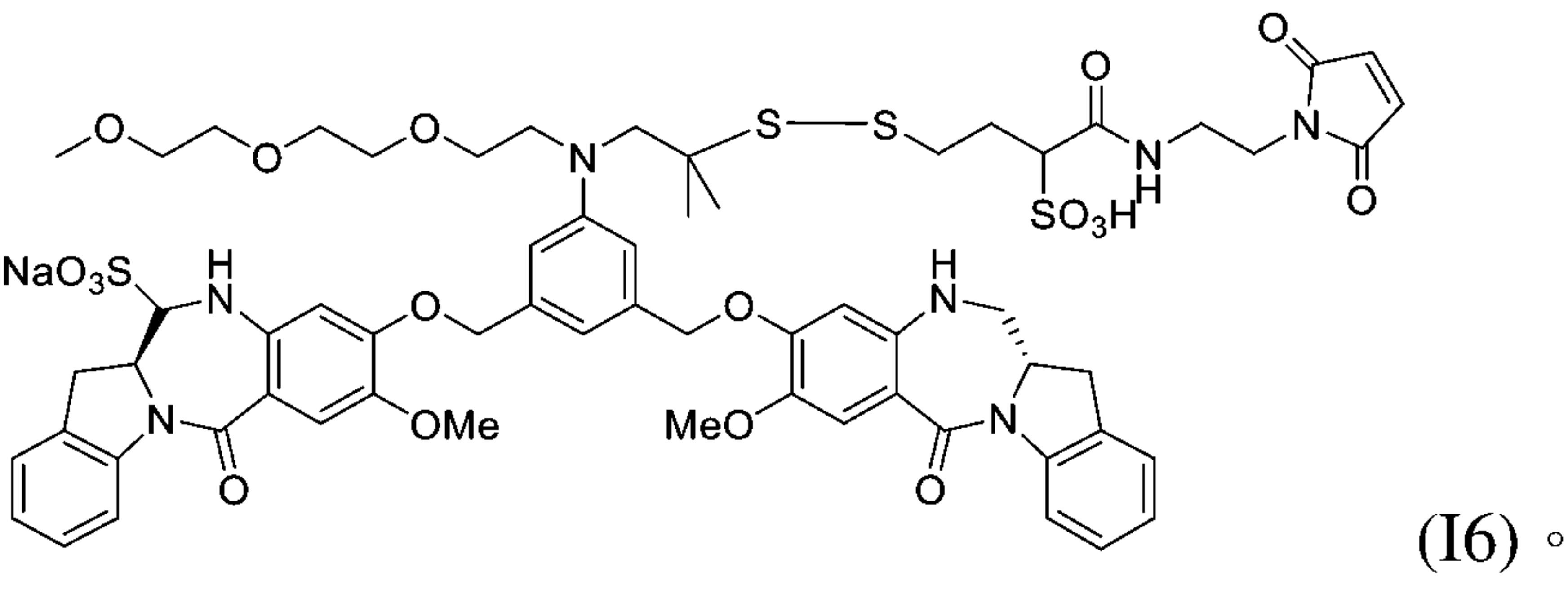
【請求項 127】如請求項 121 之方法，其中 L 係由以下結構式或其醫藥學上可接受之鹽表示：



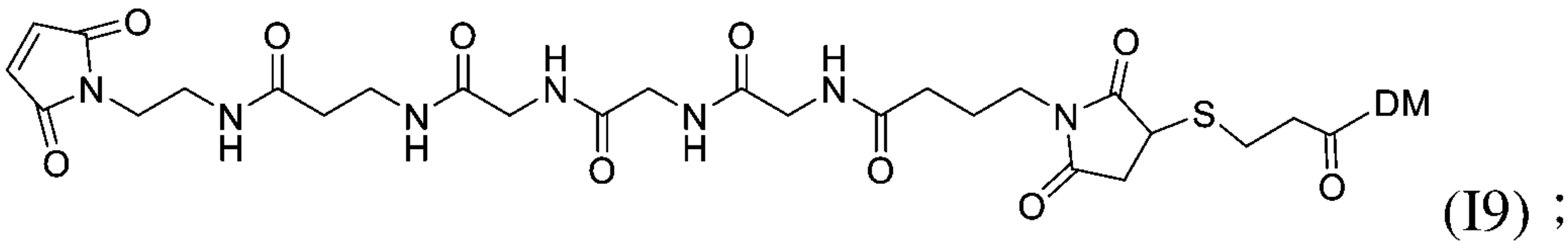
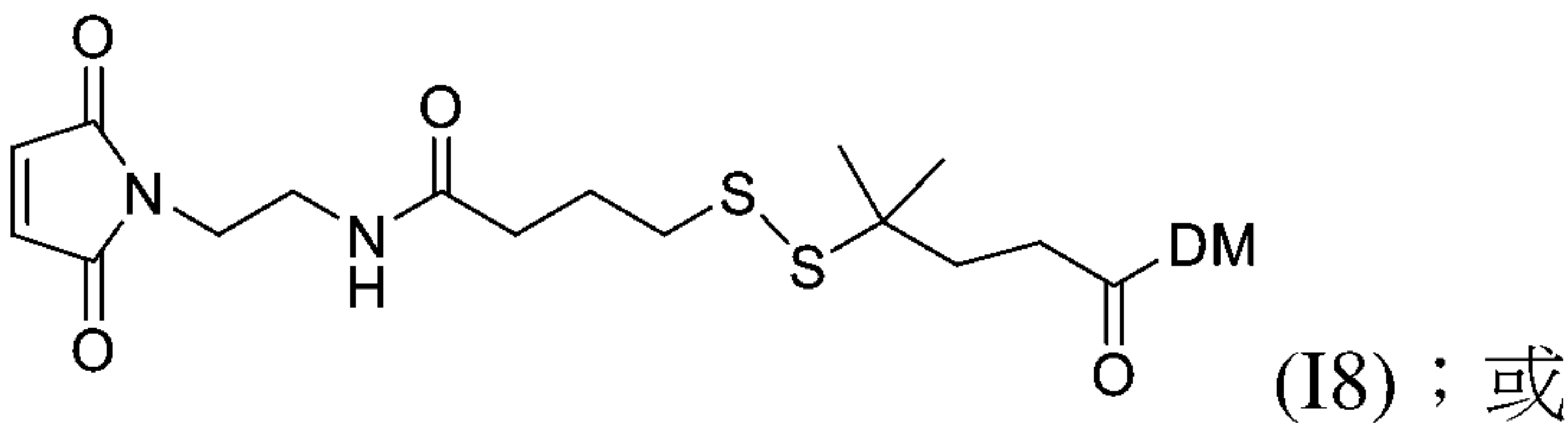
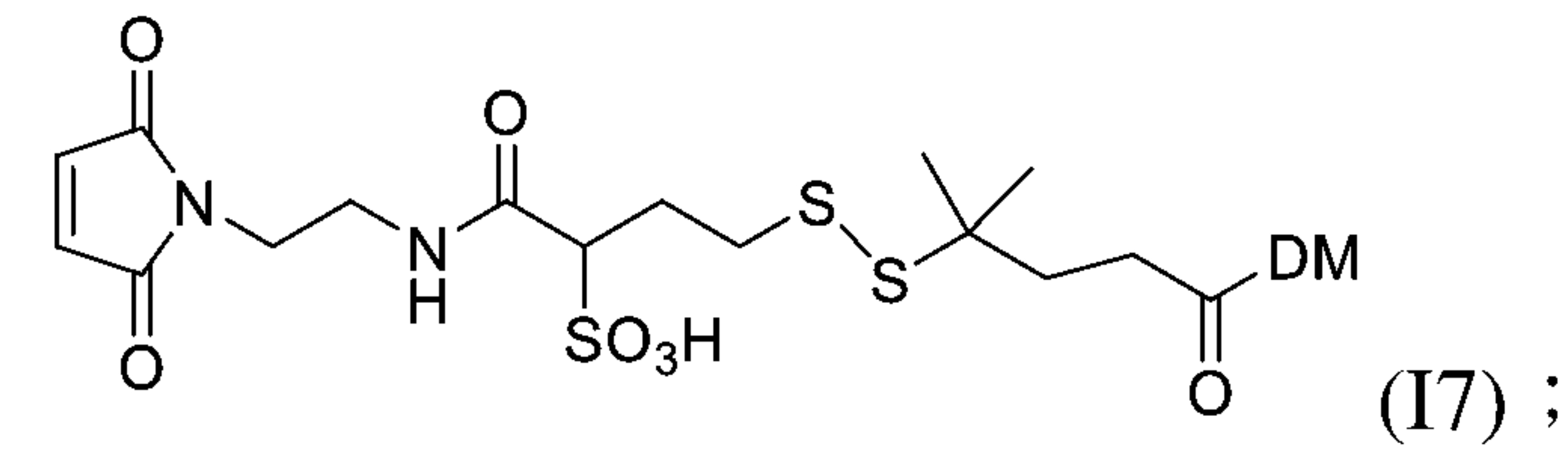
【請求項 128】如請求項 1 至 64 中任一項之方法，其中該式(I)化合物係由下式或其醫藥學上可接受之鹽表示：



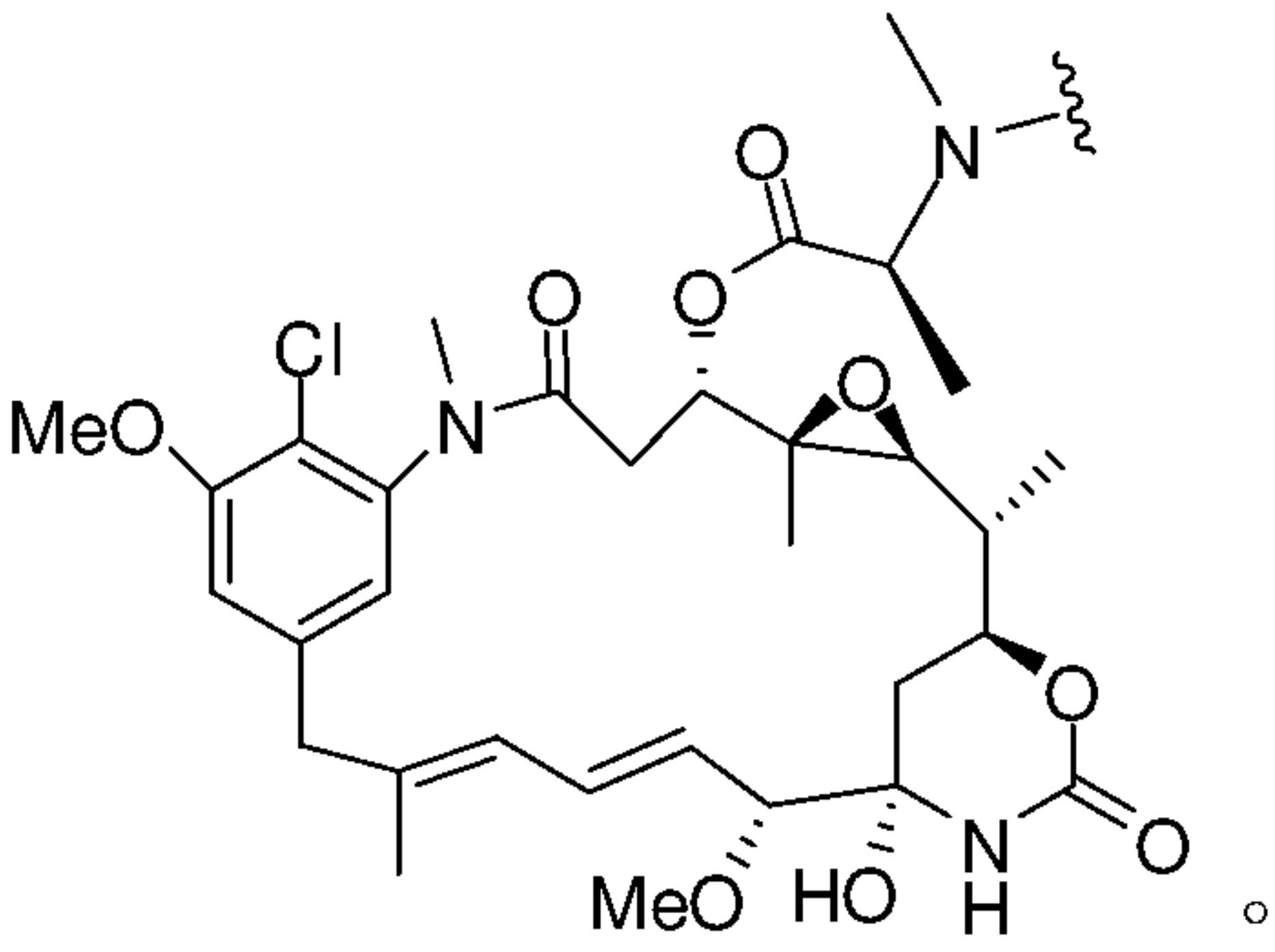
【請求項 129】如請求項 128 之方法，其中該化合物係由下式表示：



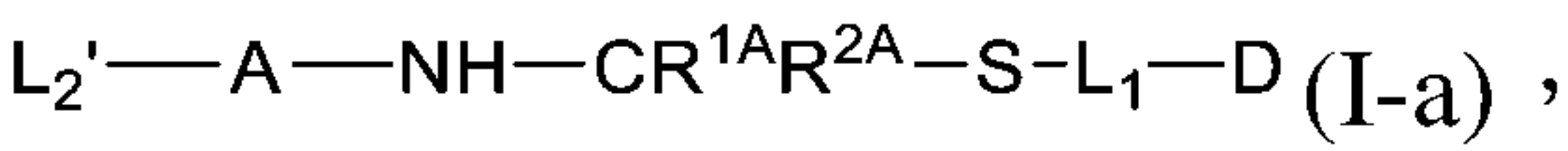
【請求項 130】 如請求項 1 至 64 中任一項之方法，其中該式(I)化合物係由下式或其醫藥學上可接受之鹽表示：



其中 DM 係由下式表示之藥物部分：



【請求項 131】 如請求項 1 至 64 中任一項之方法，其中該式(I)化合物係由下式或其醫藥學上可接受之鹽呈現：



其中：

$L_2'$  為攜帶順丁烯二醯亞胺部分之間隔體；

A 為胺基酸或包含 2 至 20 個胺基酸之肽；

$R^{1A}$  及  $R^{2A}$  各自獨立地為 H 或  $C_{1-3}$  烷基；

$L_1$  為間隔體；且

D- $L_1$ -SH 為細胞毒性劑。

【請求項 132】如請求項 131 之方法，其中  $R^{1A}$  及  $R^{2A}$  中之至少為 H。

【請求項 133】如請求項 131 之方法，其中  $R^{1A}$  及  $R^{2A}$  各自獨立地為 H 或 Me。

【請求項 134】如請求項 131 之方法，其中  $R^{1A}$  及  $R^{2A}$  中之一者為 H；且另一者為 Me。

【請求項 135】如請求項 133 之方法，其中  $R^{1A}$  及  $R^{2A}$  均為 H。

【請求項 136】如請求項 131 至 135 中任一項之方法，其中  $L_1$  為  $-L_1'-C(=O)-$ ；且  $L_1'$  為伸烷基或伸環烷基。

【請求項 137】如請求項 136 之方法，其中  $L_1'$  為  $C_{1-10}$  伸烷基。

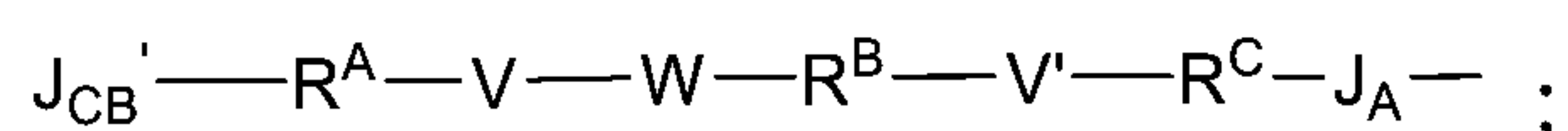
【請求項 138】如請求項 137 之方法，其中  $L_1$  為  $-CR^{3A}R^{4A}-(CH_2)_{1-8}-C(=O)-$ ； $R^{3A}$  及  $R^{4A}$  各自獨立地為 H 或 Me。

【請求項 139】如請求項 138 之方法，其中  $L_1$  為  $-CR^{3A}R^{4A}-(CH_2)_{3-5}-C(=O)-$ 。

【請求項 140】如請求項 138 或 139 之方法，其中  $R^{3A}$  及  $R^{4A}$  均為 Me。

【請求項 141】如請求項 139 之方法，其中  $L_1$  為  $-(CH_2)_{4-6}-C(=O)-$ 。

【請求項 142】如請求項 131 至 141 中任一項之方法，其中  $L_2'$  係由以下結構式表示：



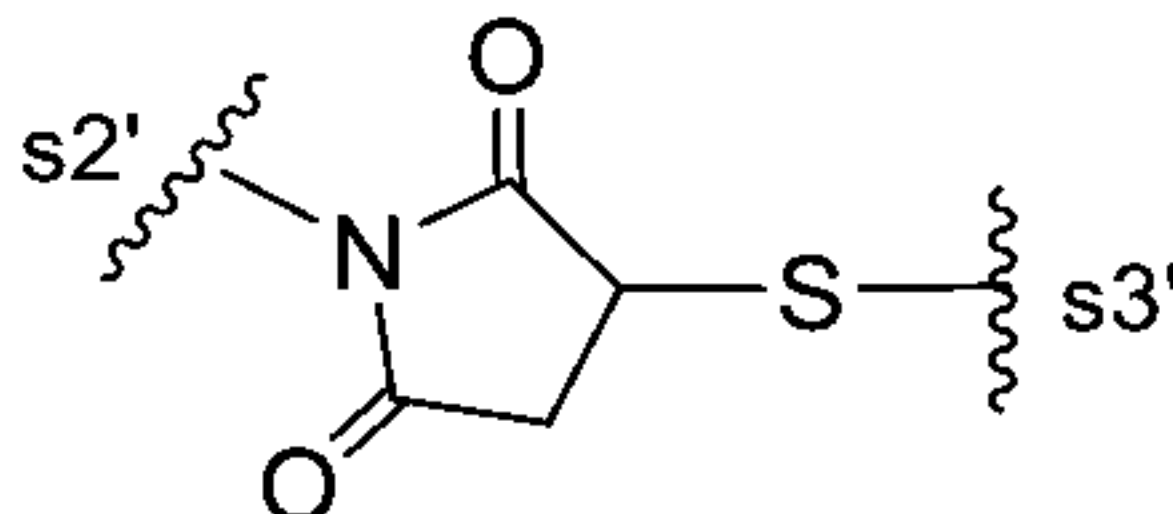
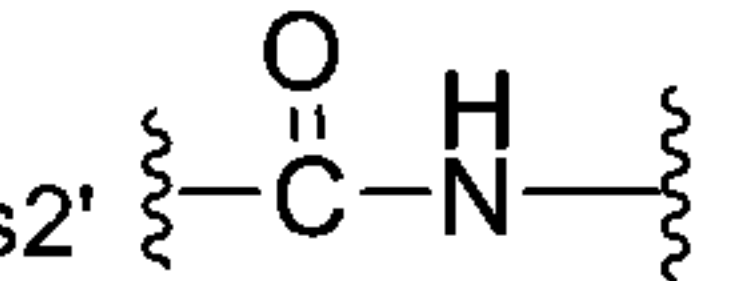
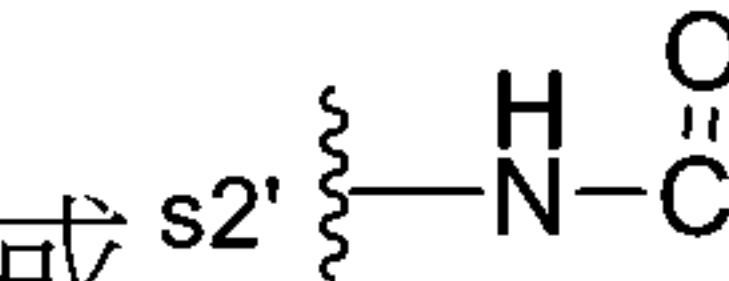
其中：

$R^A$  為伸烷基、環烷基伸烷基或伸芳基；

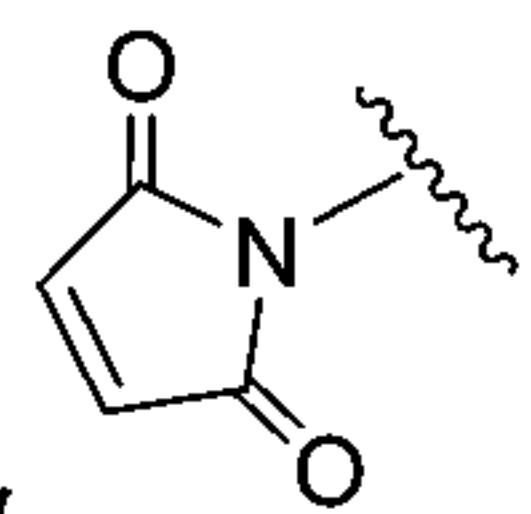
$R^B$  及  $R^C$  係各自獨立地不存在、伸烷基、伸環烷基或伸芳基；

V 及 V'各自獨立地為-(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>p1</sub>-或-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>p1</sub>-；

p1 為 0 或整數 1 至 10；

W 係不存在、、s2'  s3' 或 s2'  s3'，其中 s2'，

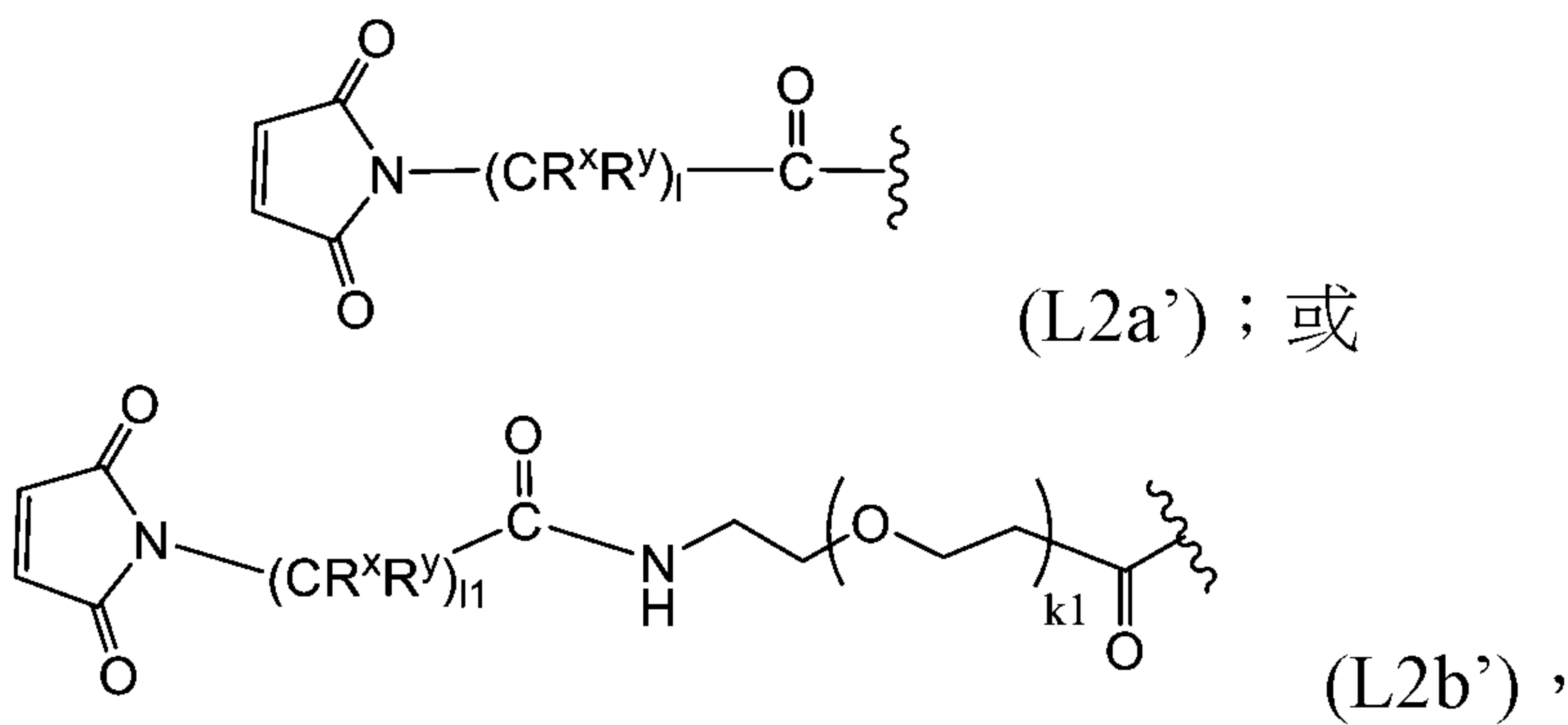
指示連接至 V、R<sup>A</sup>或 J<sub>CB</sub>'之位點且 s3'指示連接至 R<sup>B</sup>、V'、R<sup>C</sup>或 J<sub>A</sub>之位點；

J<sub>CB</sub>' 為 ；且

J<sub>A</sub> 為-C(=O)-。

【請求項 143】 如請求項 142 之方法，其中 p1 為 0 且 R<sup>C</sup>不存在。

【請求項 144】 如請求項 131 至 142 中任一項之方法，其中 L<sub>2</sub>'係由以下結構式表示：



其中：

R<sup>x</sup> 及 R<sup>y</sup>在每次出現時獨立地為 H、-OH、鹵素、-O-(C<sub>1-4</sub>烷基)、-SO<sub>3</sub>H、-NR<sub>40</sub>R<sub>41</sub>R<sub>42</sub><sup>+</sup>或視情況經-OH、鹵素、-SO<sub>3</sub>H 或 NR<sub>40</sub>R<sub>41</sub>R<sub>42</sub><sup>+</sup>取代之 C<sub>1-4</sub>烷基，其中 R<sub>40</sub>、R<sub>41</sub>及 R<sub>42</sub>各自獨立地為 H 或 C<sub>1-4</sub>烷基；

l 及 11 各自獨立地為整數 1 至 10；

k1 為整數 1 至 12。

【請求項 145】 如請求項 144 之方法，其中 R<sup>x</sup>及 R<sup>y</sup>均為 H。

【請求項 146】 如請求項 144 或 145 之方法，其中 l 及 11 各自為整數 2 至 6。

【請求項 147】如請求項 131 至 146 中任一項之方法，其中 A 為可藉由蛋白酶裂解之肽。

【請求項 148】如請求項 126 之方法，其中 A 為可藉由在腫瘤組織中表現之蛋白酶裂解之肽。

【請求項 149】如請求項 131 至 146 中任一項之方法，其中 A 係具有與  $-\text{NH}-\text{CR}^1\text{R}^2-\text{S}-\text{L}_1-\text{D}$  共價連接之胺基酸的肽，該胺基酸選自由 Ala、Arg、Asn、Asp、Cit、Cys、硒代-Cys、Gln、Glu、Gly、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr 及 Val 組成之群，各自獨立地呈 L 或 D 異構體。

【請求項 150】如請求項 131 至 149 中任一項之方法，其中該與  $-\text{NH}-\text{CR}^1\text{R}^2-\text{S}-\text{L}_1-\text{D}$  連接之胺基酸為 L 胺基酸。

【請求項 151】如請求項 147 至 150 中任一項之方法，其中 A 為含有 2 至 5 個胺基酸殘基之肽。

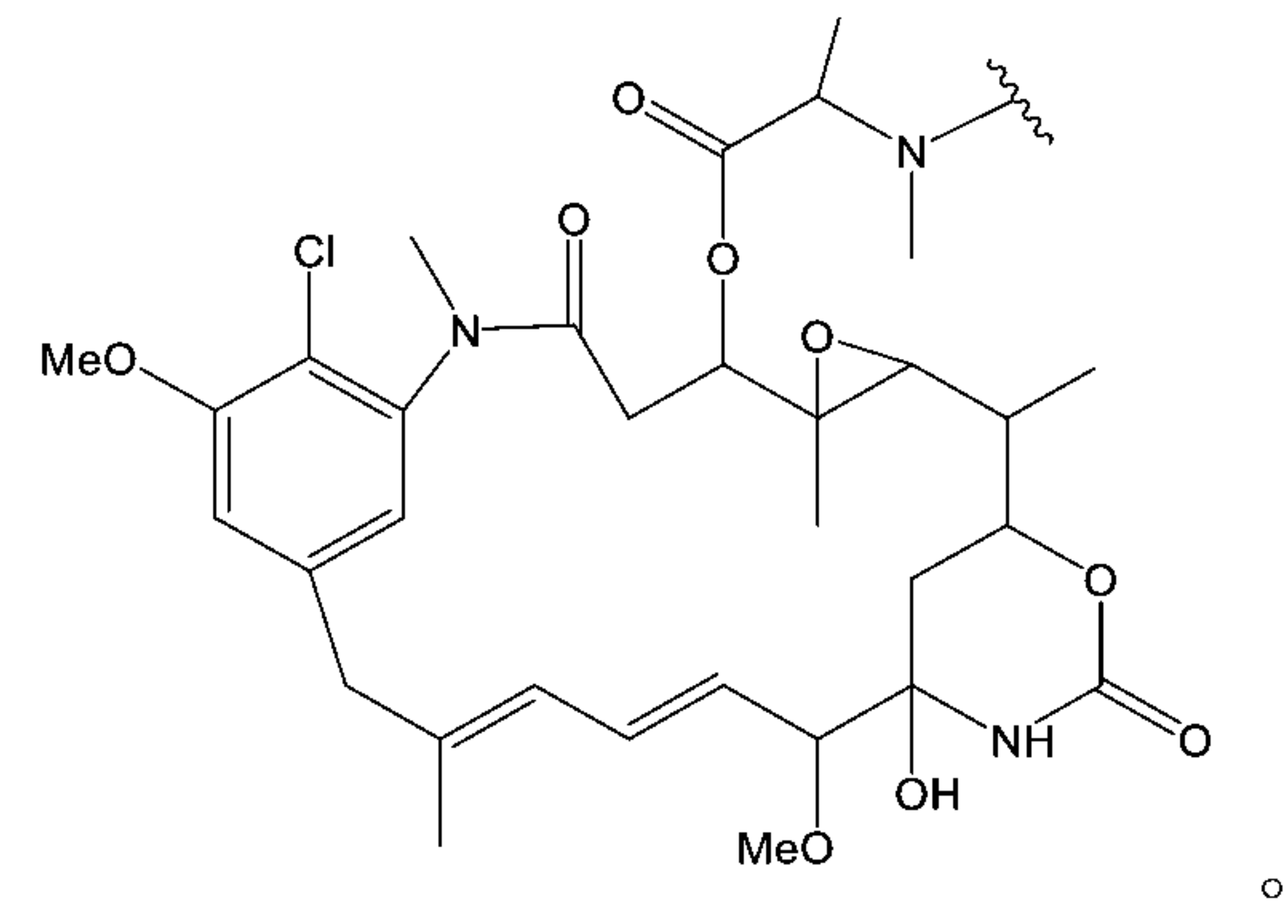
【請求項 152】如請求項 131 至 147 中任一項之方法，其中 A 係選自由 Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、D-Val-Ala、Val-Cit、D-Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Phe-Ala、Phe-N<sup>9</sup>-甲苯磺醯基-Arg、Phe-N<sup>9</sup>-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Ala-Ala、D-Ala-Ala-Ala、Ala-D-Ala-Ala、Ala-Ala-D-Ala、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:56)、β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:57)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:58)、Val-Arg、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、Gln-Val、Asn-Ala、Gln-Phe、Gln-Ala、D-Ala-Pro 及 D-Ala-tBu-Gly 組成之

群，其中各肽中之第一個胺基酸連接至 L<sub>2</sub> 基團且各肽中之最後一個胺基酸連接至-NH-CR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>-S-L<sub>1</sub>-D。

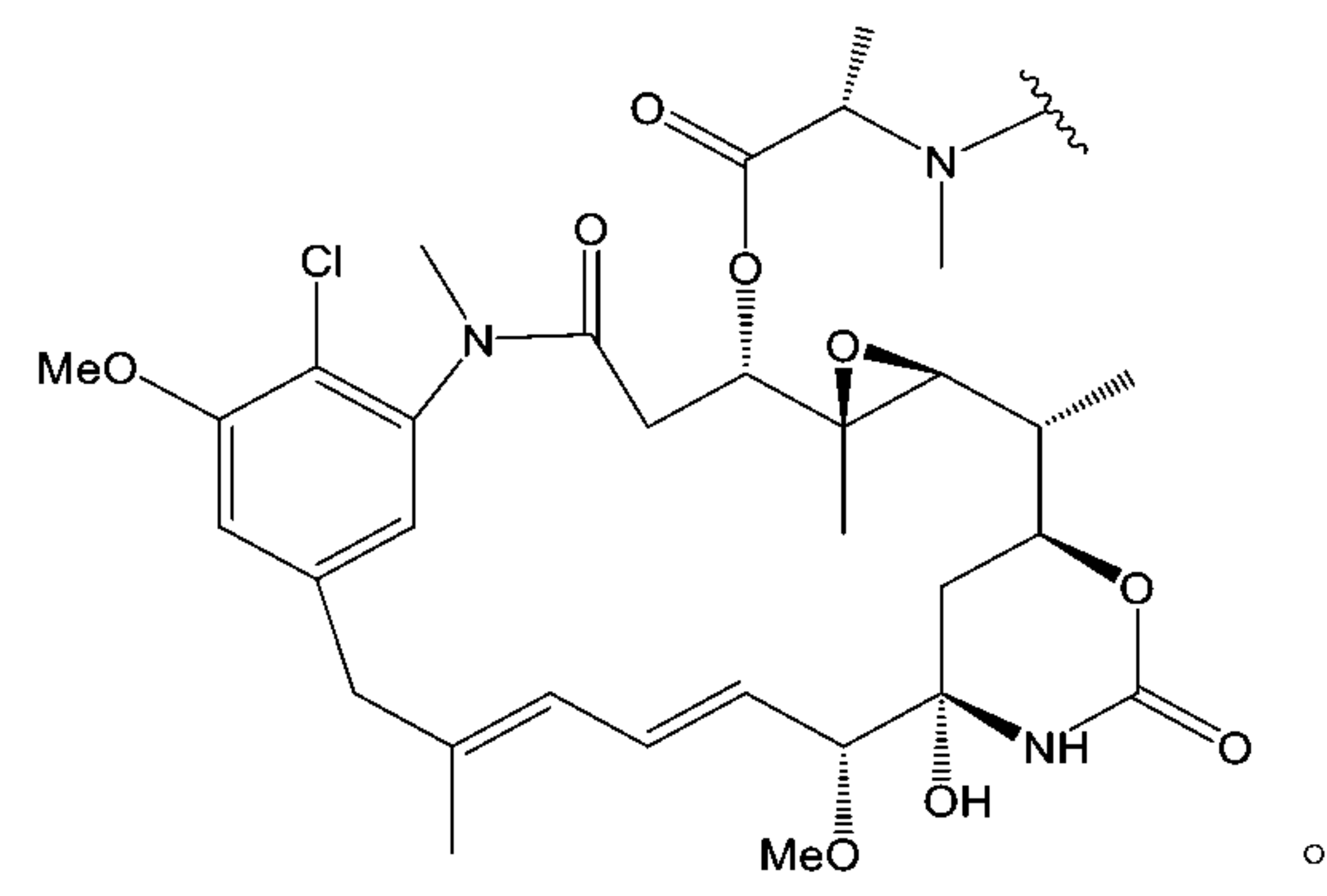
【請求項 153】 如請求項 152 之方法，其中 A 為 Ala-Ala-Ala、Ala-D-Ala-Ala、Ala-Ala、D-Ala-Ala、Val-Ala、D-Val-Ala、D-Ala-Pro 或 D-Ala-tBu-Gly。

【請求項 154】 如請求項 131 至 153 中任一項之方法，其中 D 為類美登素。

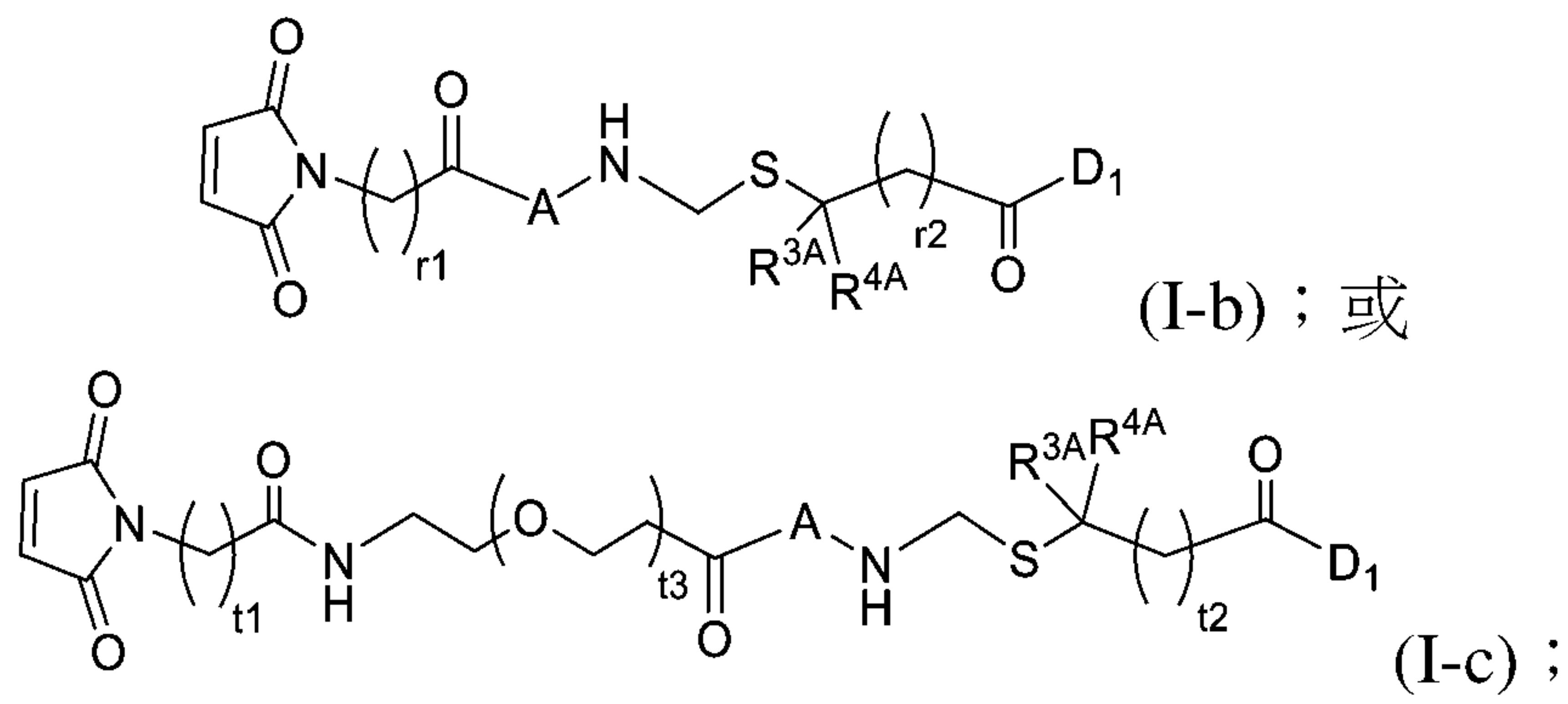
【請求項 155】 如請求項 154 之方法，其中 D 係由下式表示：



【請求項 156】 如請求項 155 之方法，其中 D 係由下式表示：



【請求項 157】 如請求項 131 至 154 中任一項之方法，其中該式(I)化合物係由下式或其醫藥學上可接受之鹽表示：



其中：

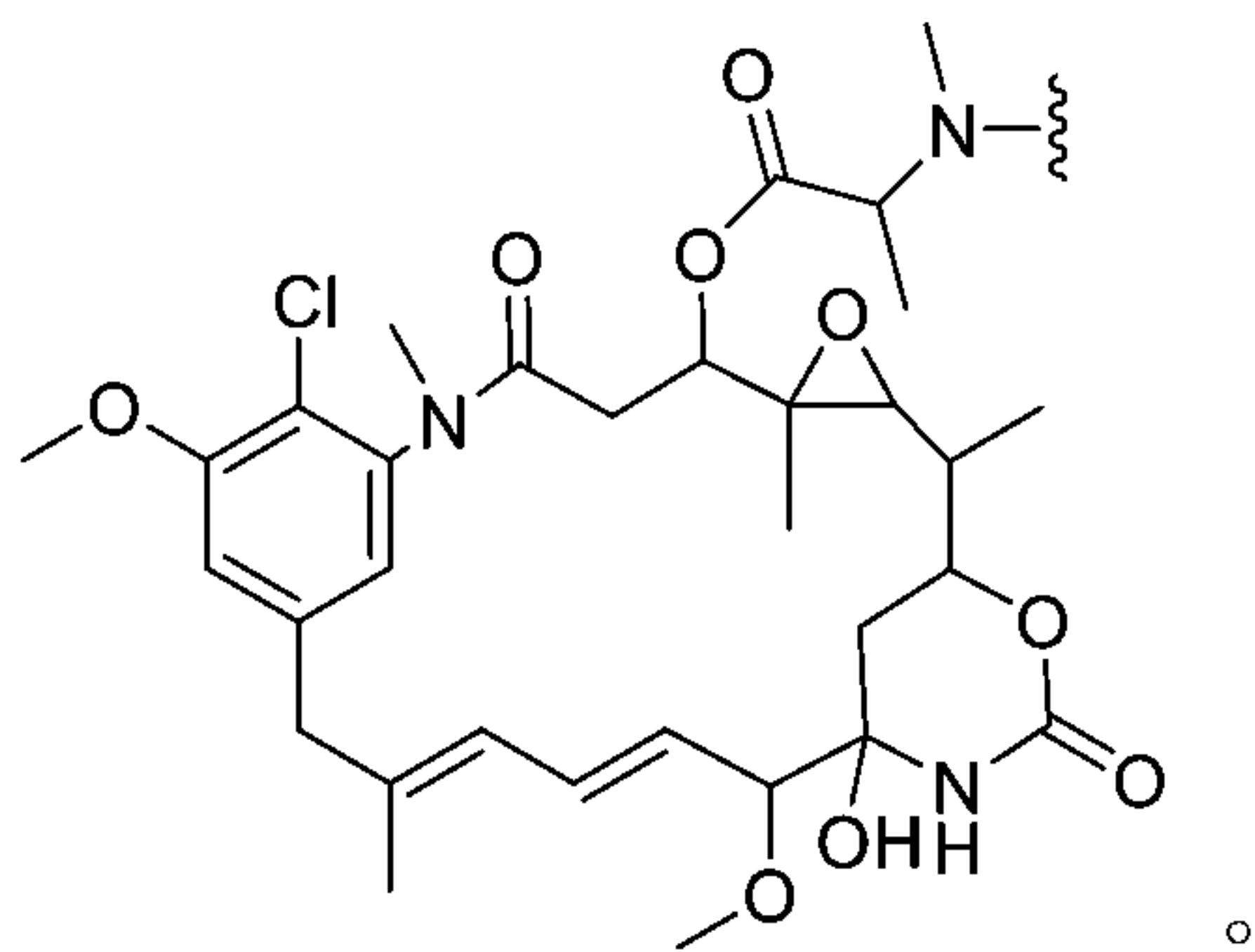
$R^{3A}$  及  $R^{4A}$  各自獨立地為 H 或 Me；

$r_1$  及  $t_1$  各自獨立地為整數 1 至 6；

$r_2$  及  $t_2$  各自獨立地為整數 1 至 7；

$t_3$  為整數 1 至 12；

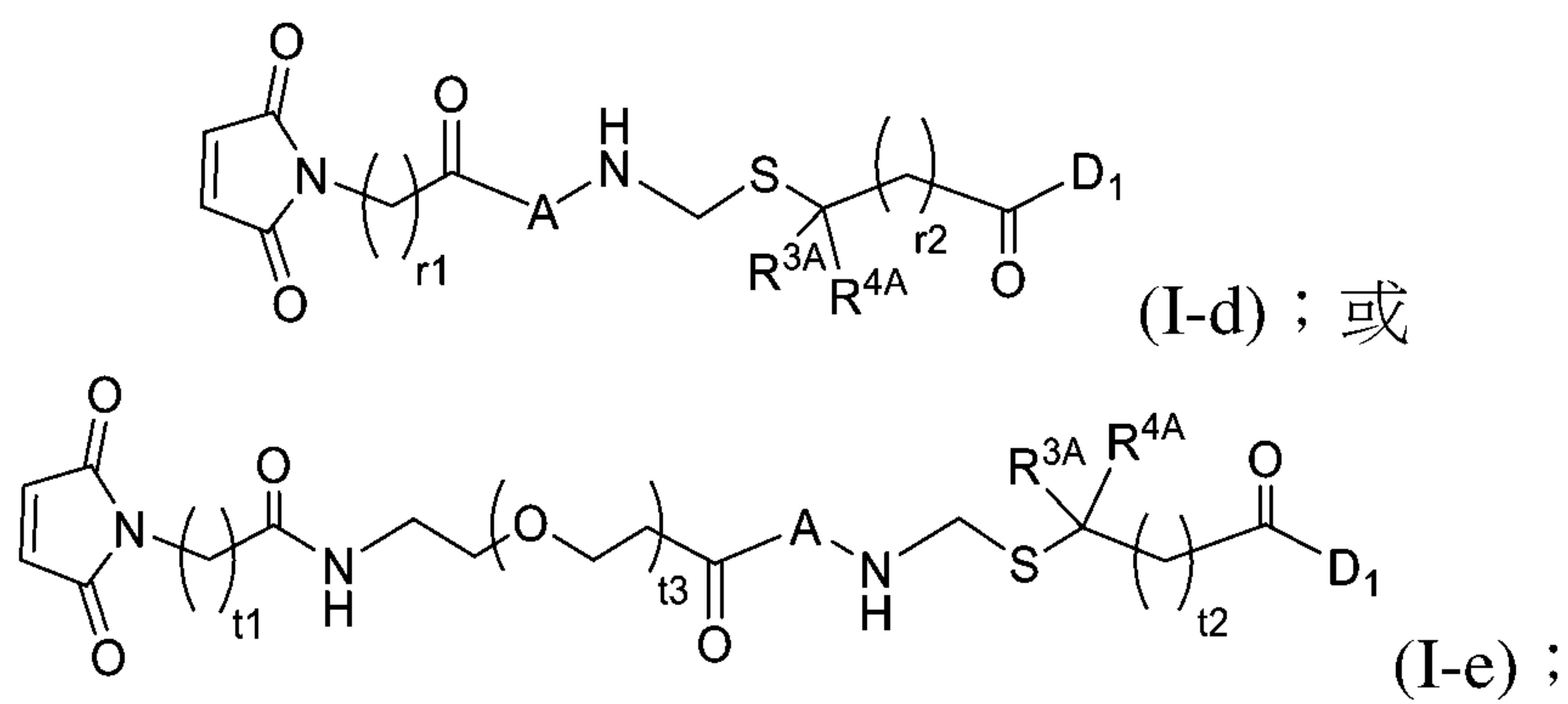
$D_1$  係由下式表示：



【請求項 158】如請求項 157 之方法，其中 A 為 Ala-Ala-Ala、Ala-D-Ala-Ala、Ala-Ala、D-Ala-Ala、Val-Ala、D-Val-Ala、D-Ala-Pro 或 D-Ala-tBu-Gly。

【請求項 159】如請求項 157 或 158 之方法，其中  $r_1$  為整數 2 至 4；且  $r_2$  為整數 3 至 5。

【請求項 160】如請求項 159 之方法，其中該式(I)化合物係由下式表示：



其中：

$r_1$  及  $t_1$  各自為整數 2 至 6；

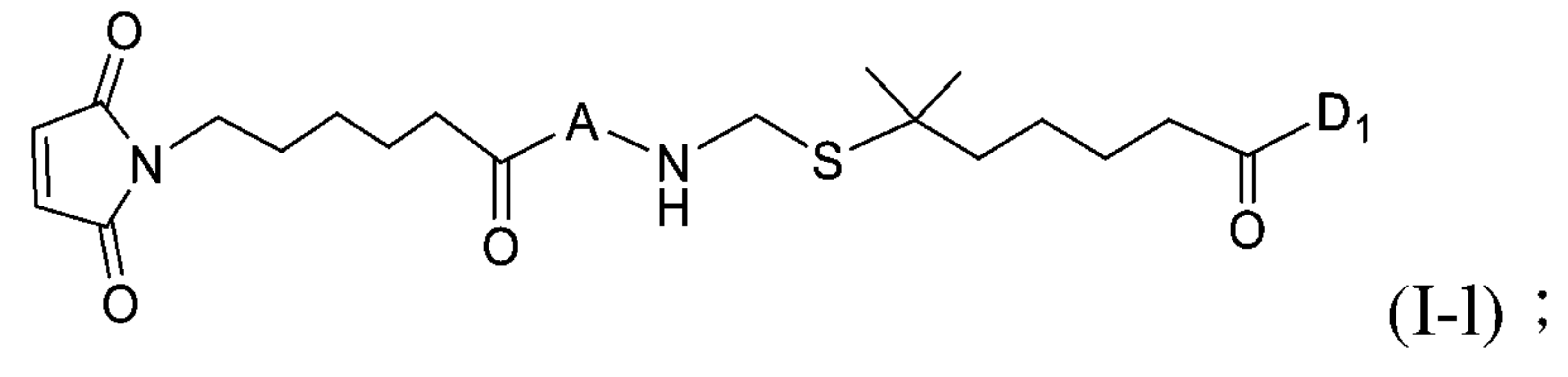
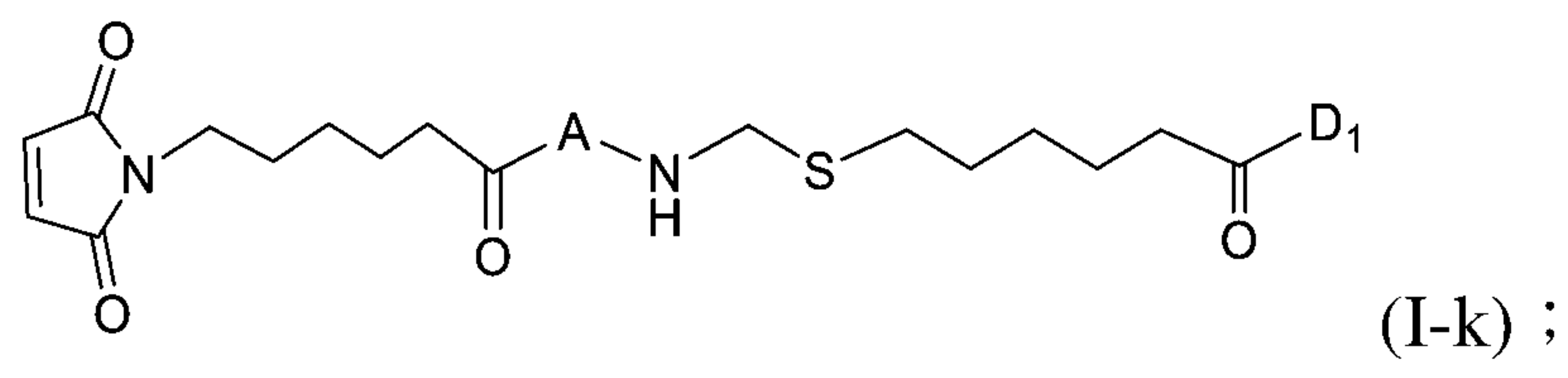
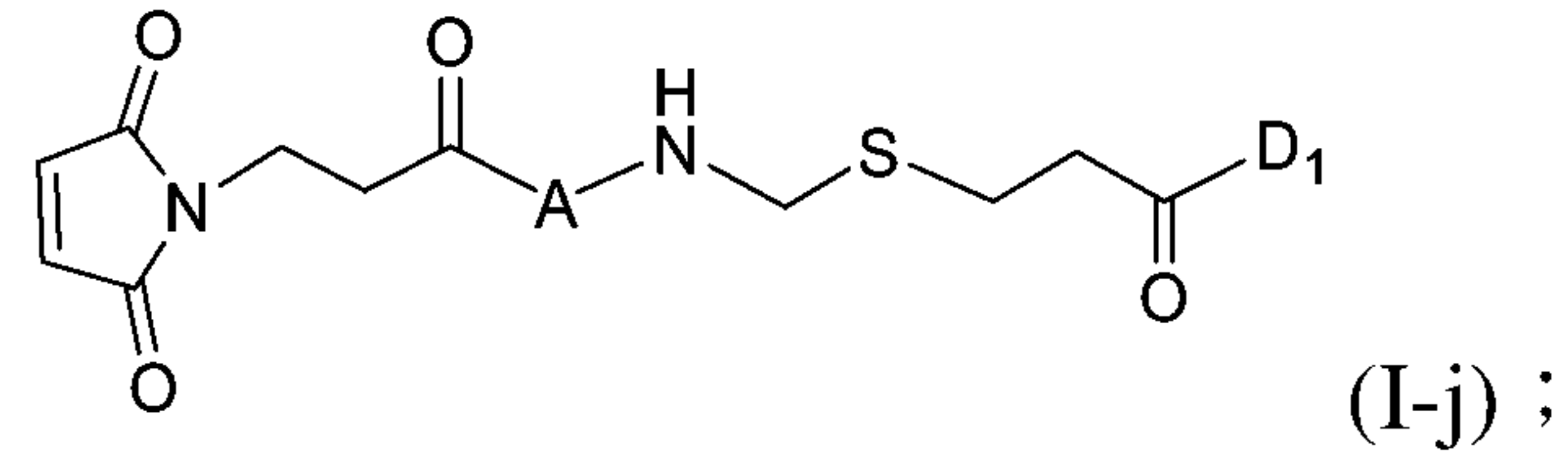
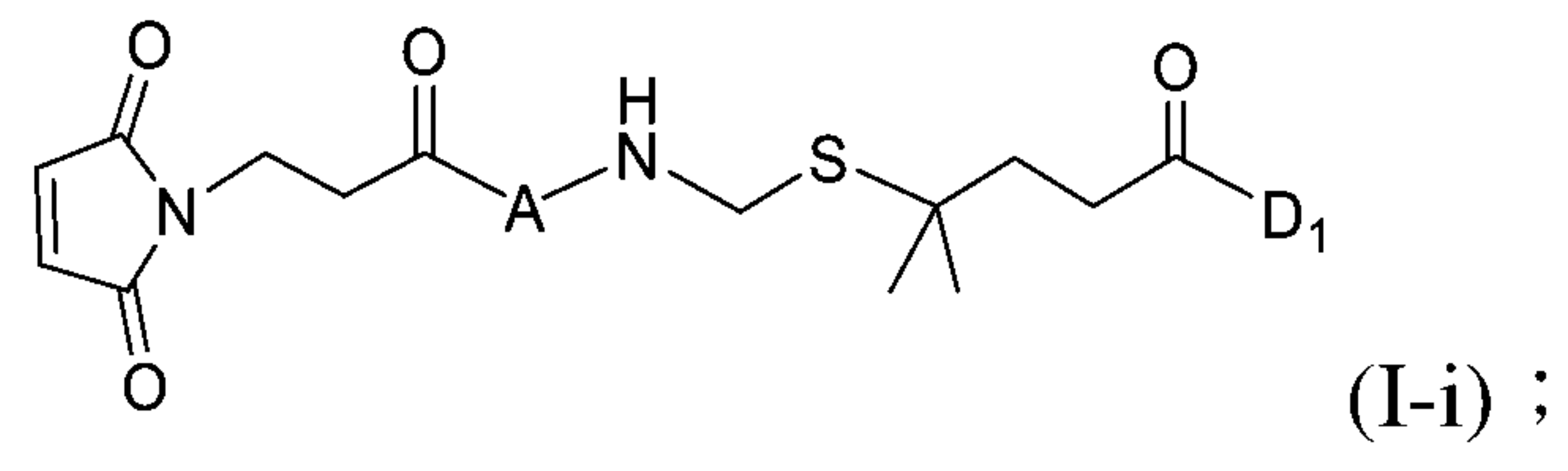
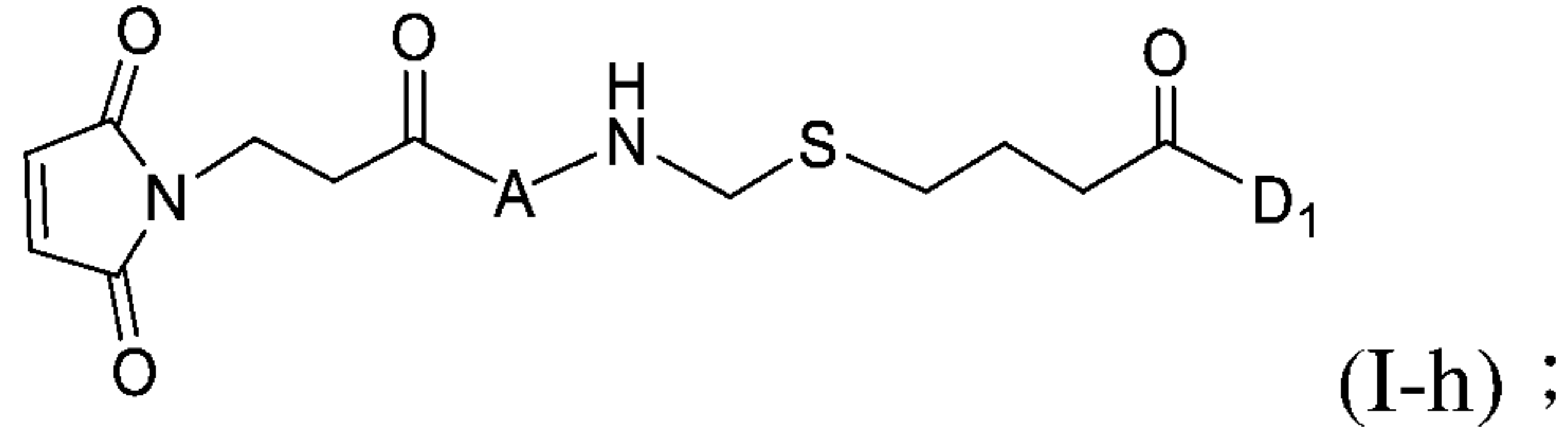
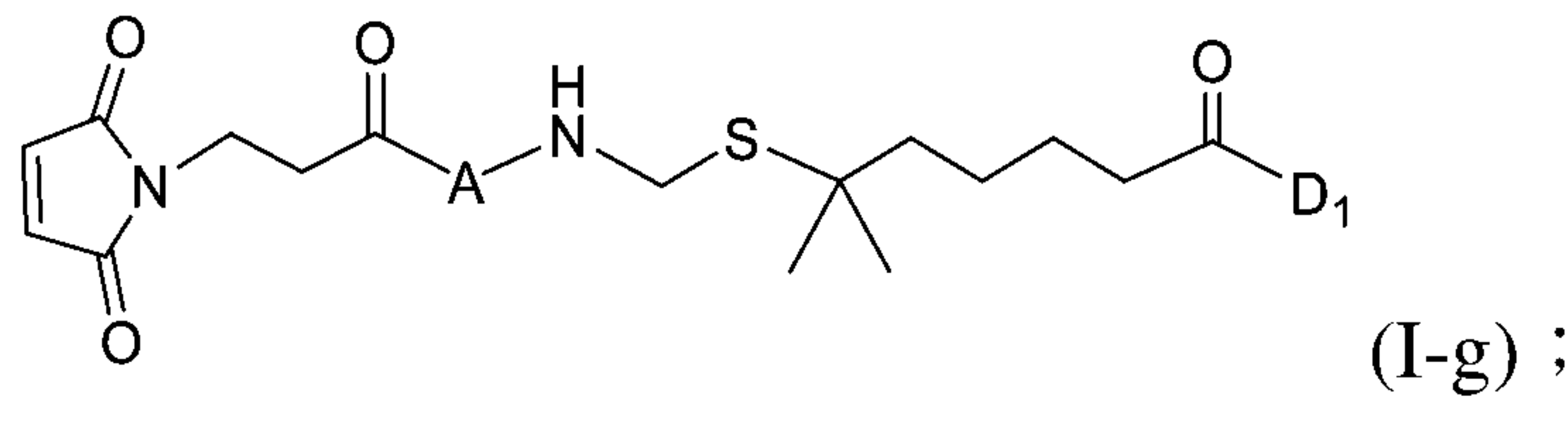
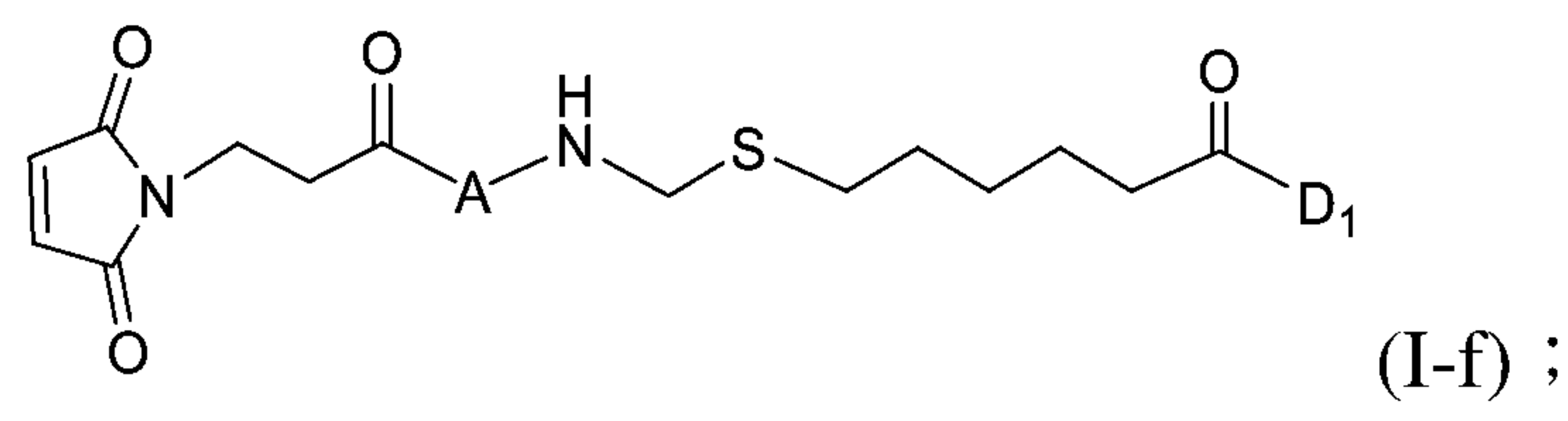
$r_2$  及  $t_2$  各自為整數 2 至 5；且

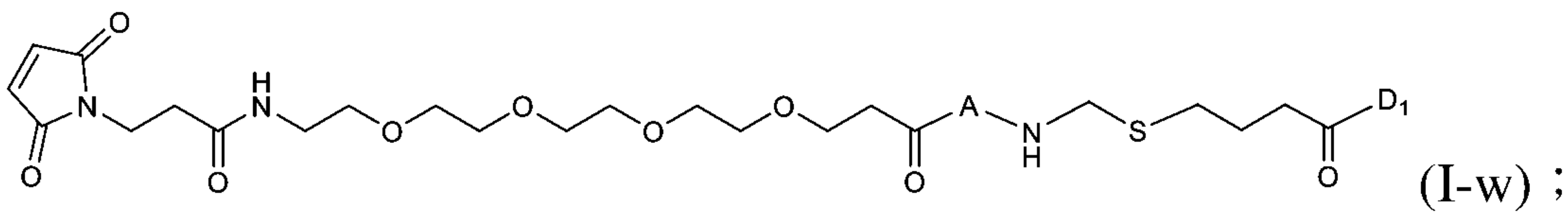
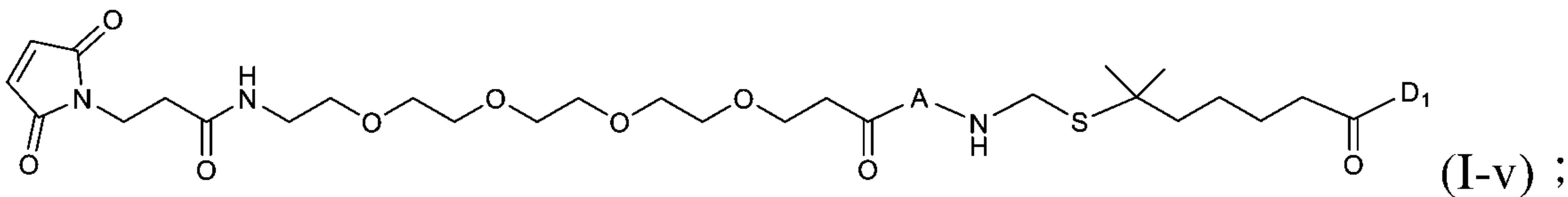
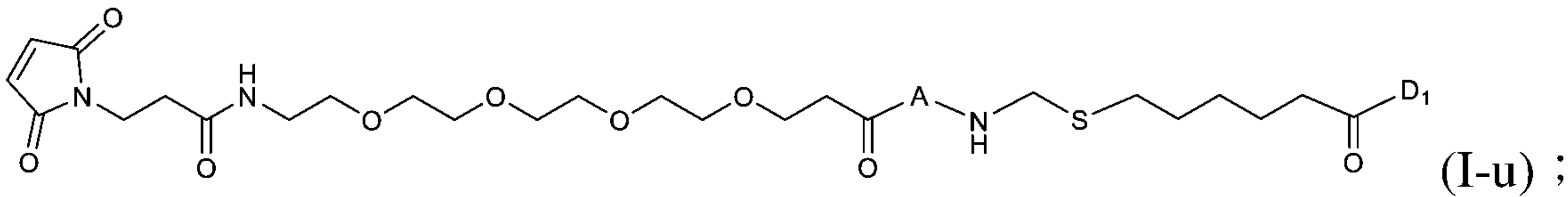
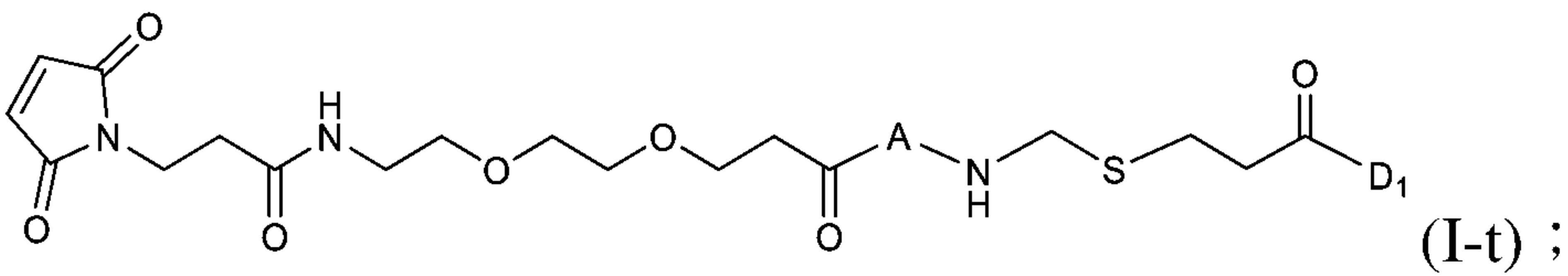
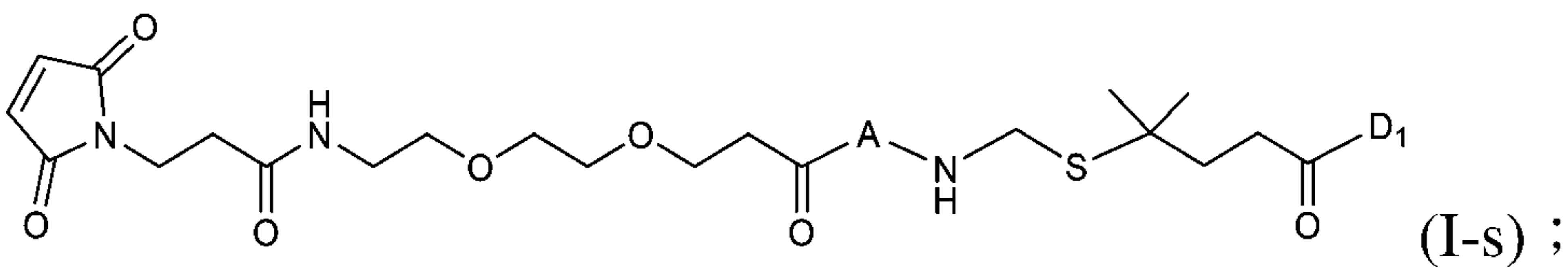
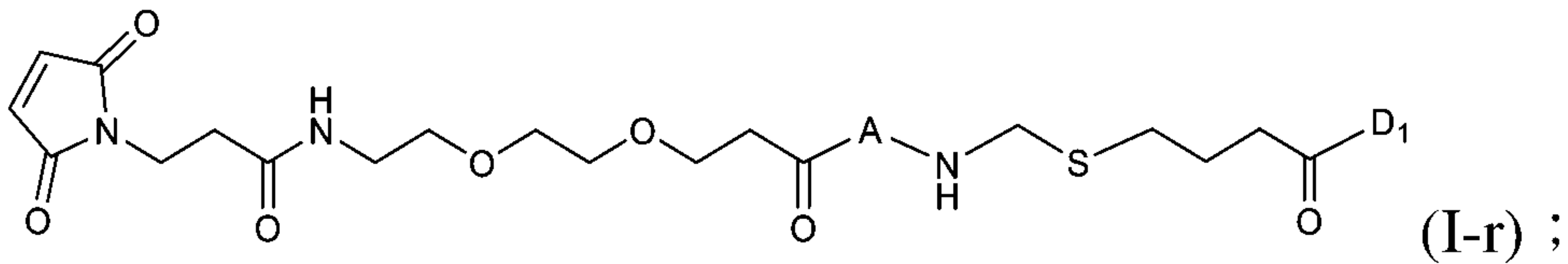
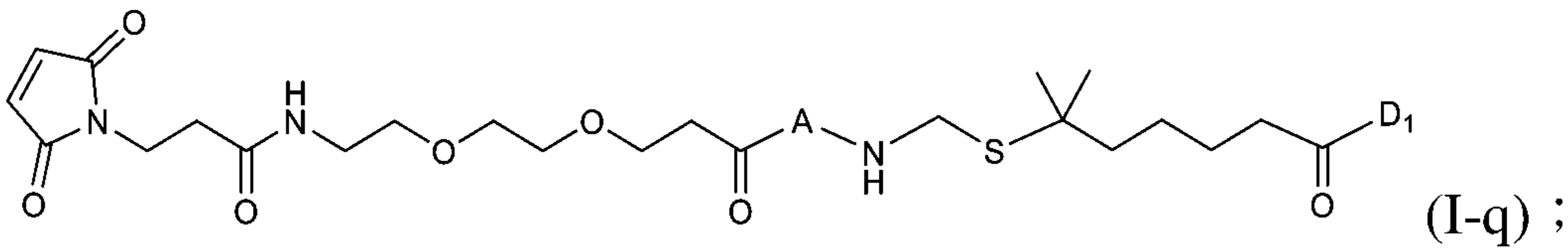
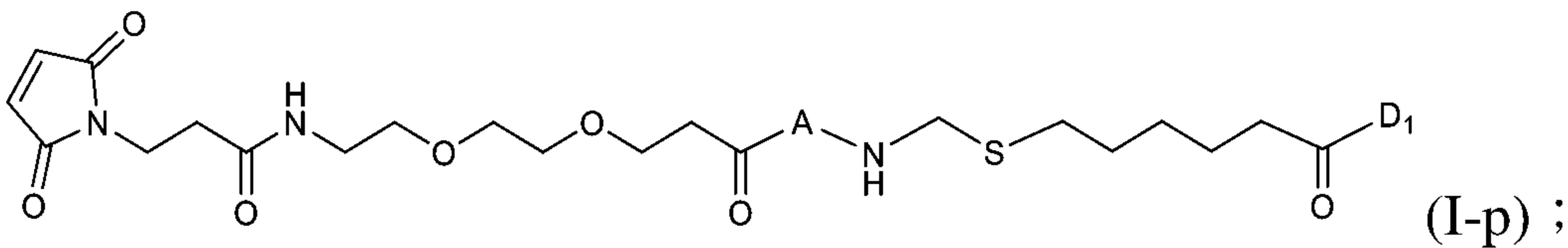
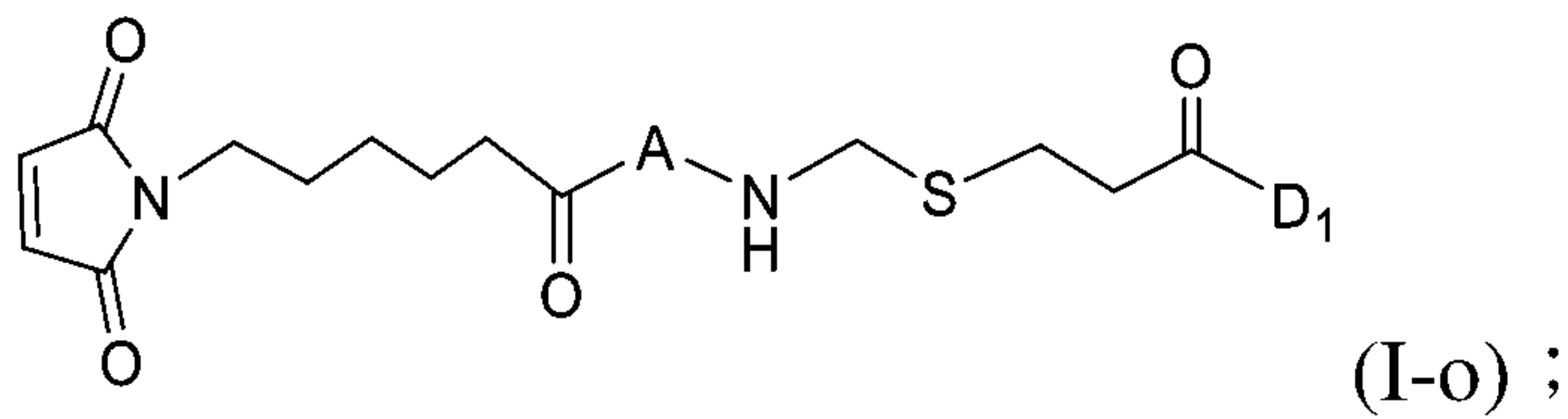
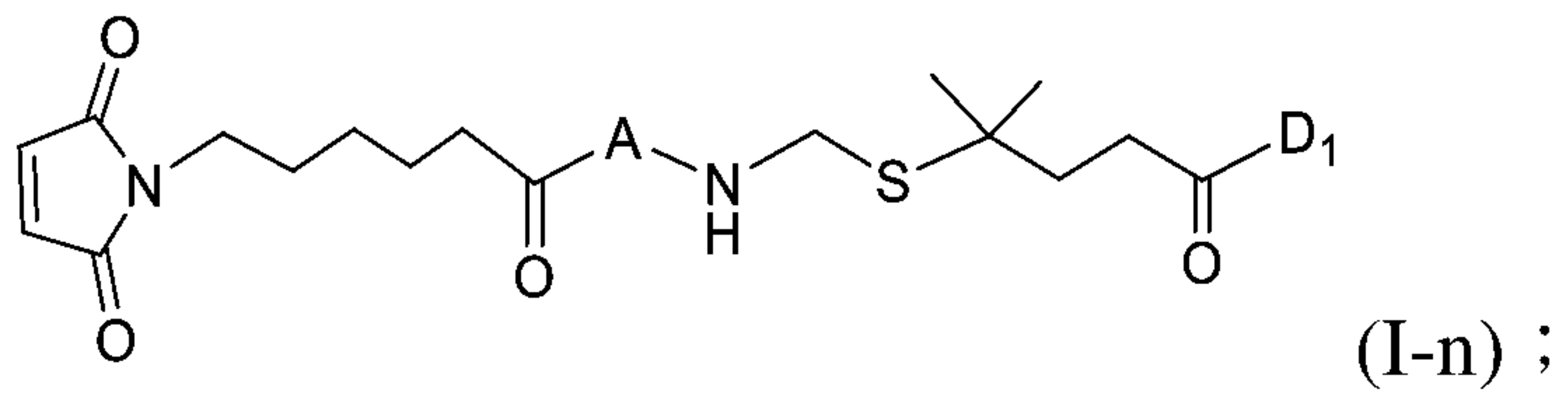
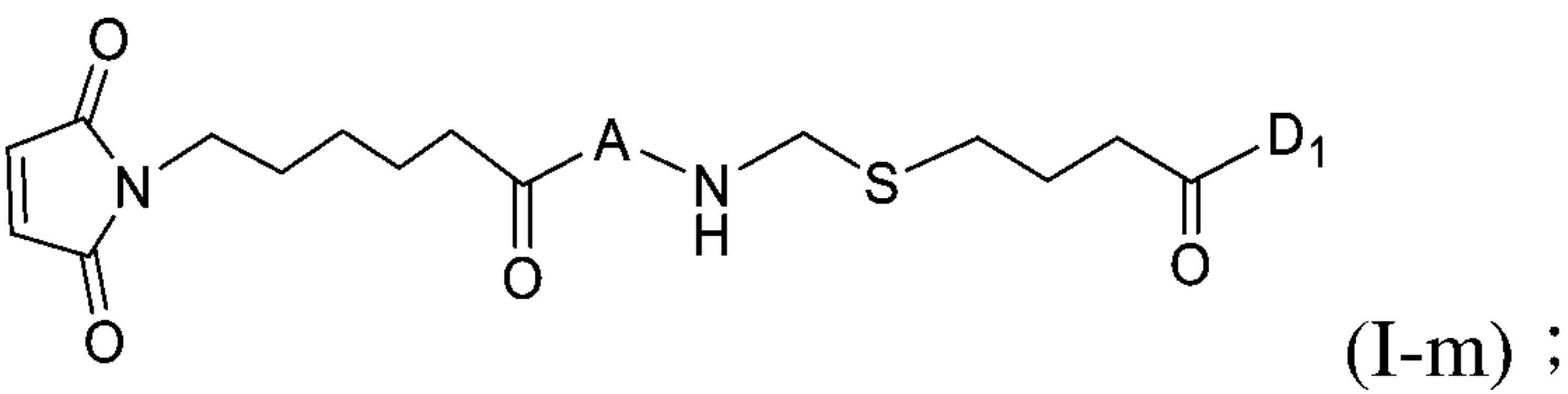
t3 為整數 2 至 12。

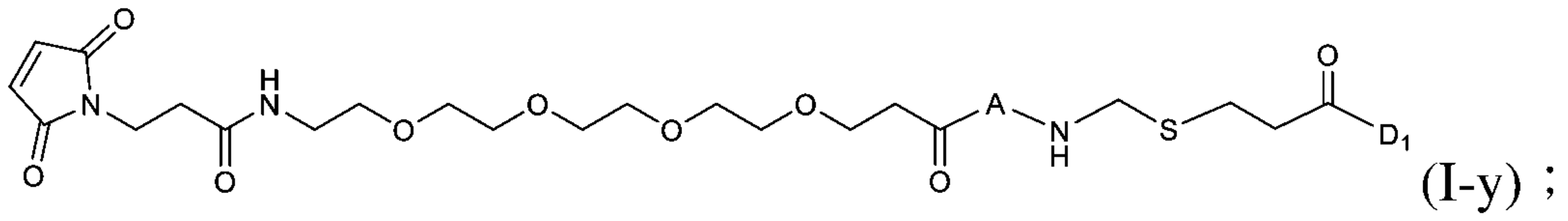
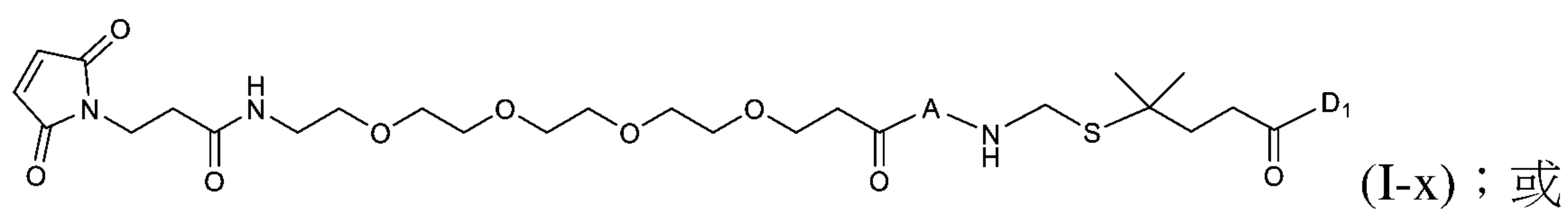
【請求項 161】 如請求項 157 至 160 中任一項之化合物，其中  $R^{3A}$  及  $R^{4A}$  均為 Me。

【請求項 162】 如請求項 157 至 160 中任一項之化合物，其中  $R^{3A}$  及  $R^{4A}$  均為 H。

【請求項 163】 如請求項 157 之化合物，其中該化合物係由下式或其醫藥學上可接受之鹽表示：



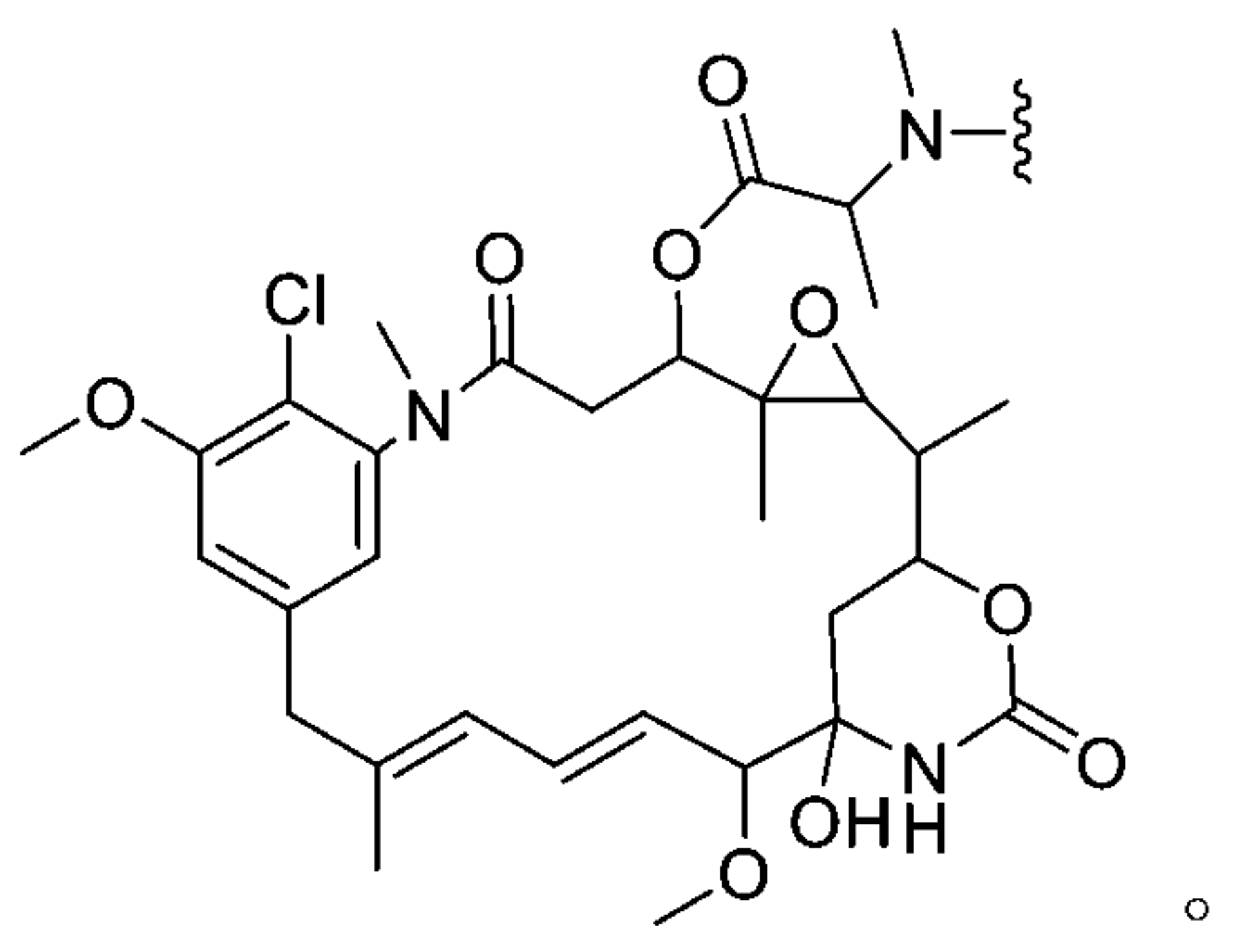




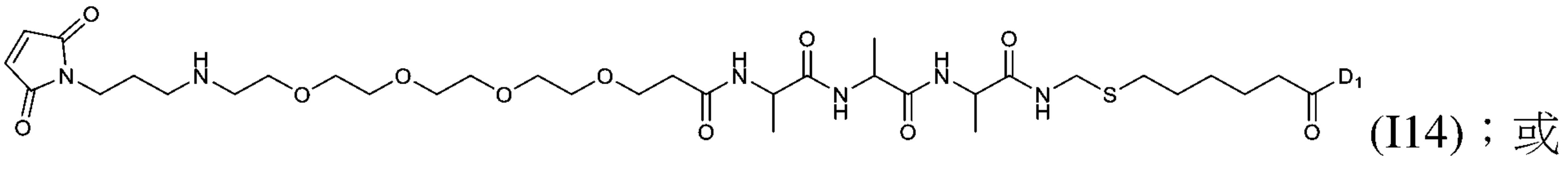
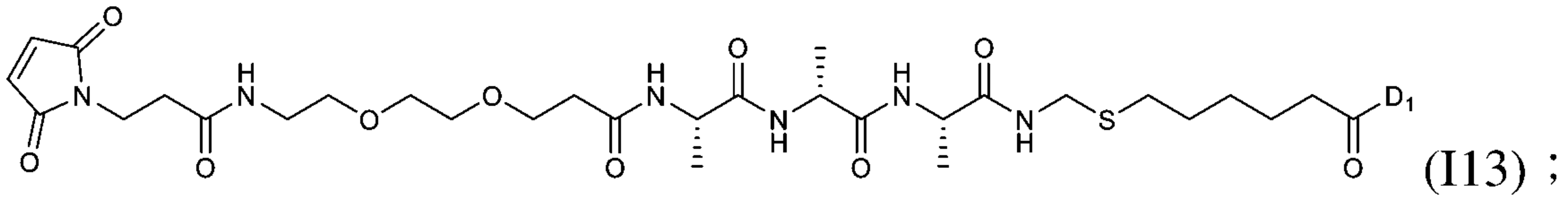
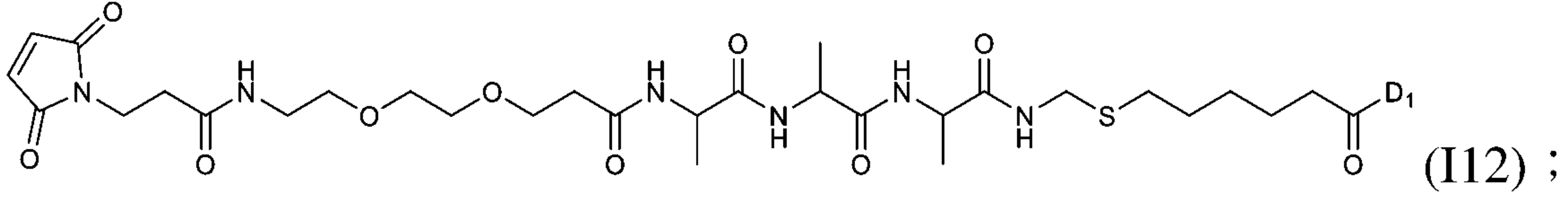
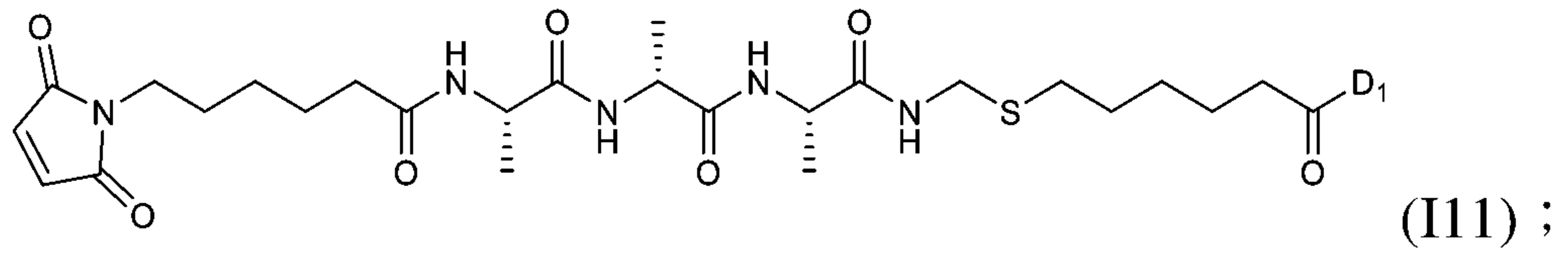
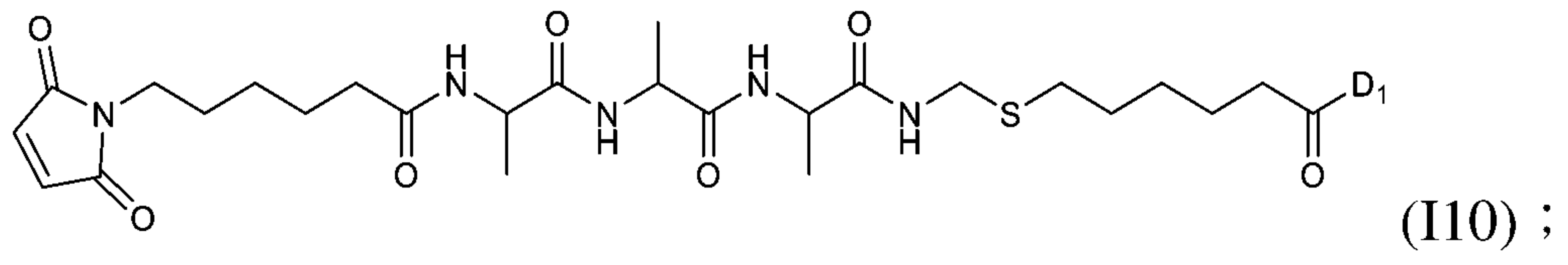
其中：

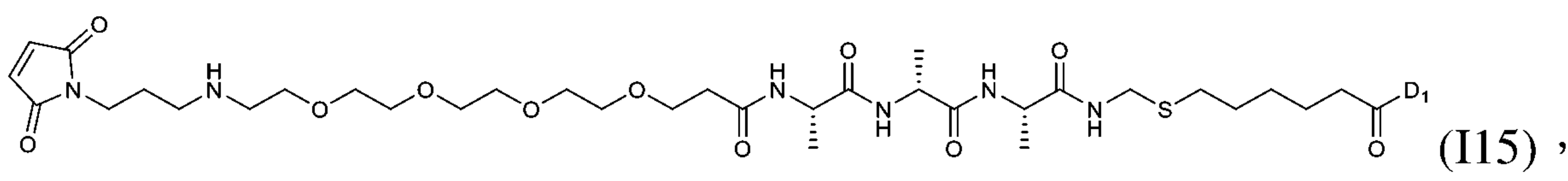
A 為 Ala-Ala-Ala、Ala-D-Ala-Ala、Ala-Ala、D-Ala-Ala、Val-Ala、D-Val-Ala、D-Ala-Pro 或 D-Ala-tBu-Gly；且

D<sub>1</sub> 係由下式表示：

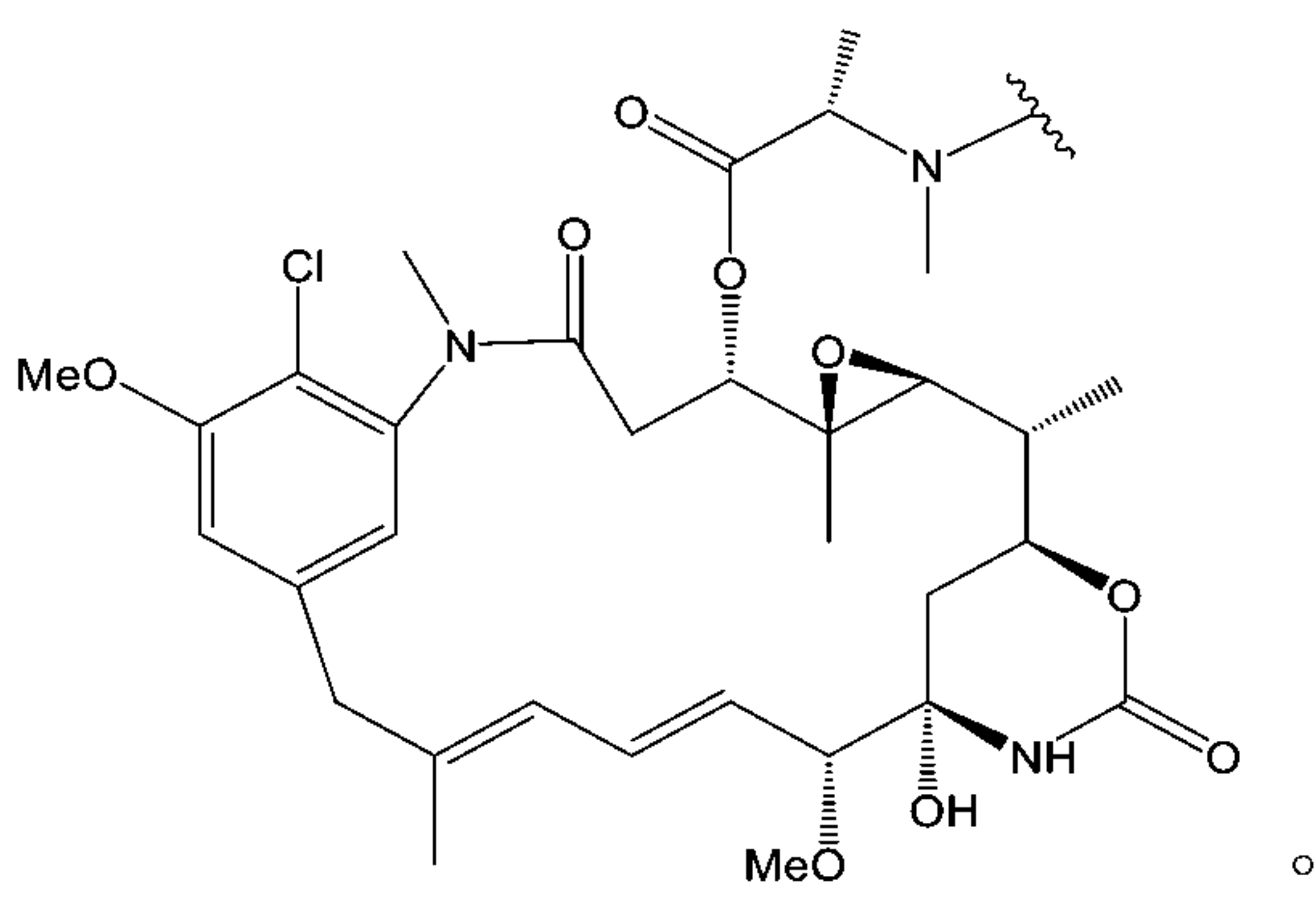


【請求項 164】 如請求項 163 之方法，其中該化合物係由下式表示：

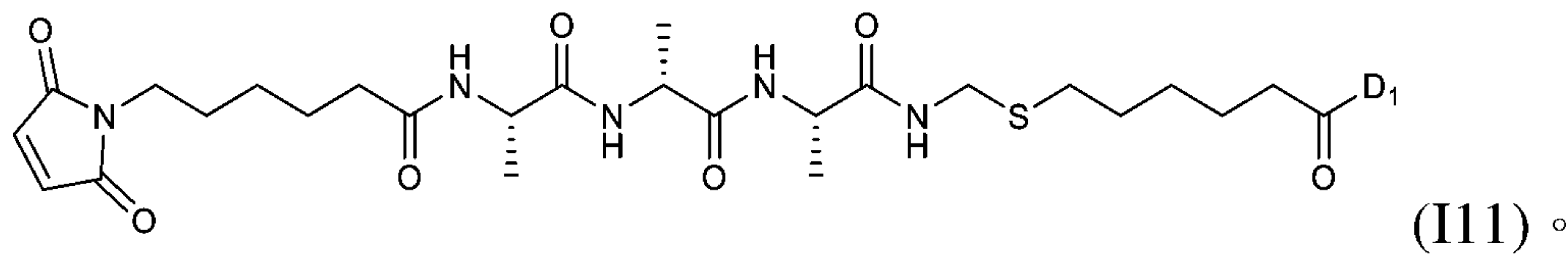




其中 D<sub>1</sub> 係由下式表示：



【請求項 165】 如請求項 164 之方法，其中該式(I)化合物係由下式表示：



【請求項 166】 如請求項 23 至 165 中任一項之方法，其中該經半胱胺酸工程改造之抗體或其抗原結合片段為抗葉酸鹽受體抗體或其抗原結合片段、抗 EGFR 抗體或其抗原結合片段、抗 CD33 抗體或其抗原結合片段、抗 CD19 抗體或其抗原結合片段、抗 Muc1 抗體或其抗原結合片段、抗 CD37 抗體或其抗原結合片段、抗 cMet 抗體或其抗原結合片段或抗 EpCAM 抗體或其抗原結合片段。

【請求項 167】 如請求項 23 至 165 中任一項之方法，其中該經半胱胺酸工程改造之抗體或抗原結合片段為抗 CD123 抗體或其抗原結合片段。

【請求項 168】 如請求項 167 之方法，其中該抗 CD123 抗體或其抗原結合片段包含 a)免疫球蛋白重鏈可變區，其包含具有以 SEQ ID NO:4 陳述之胺基酸序列的CDR<sub>H</sub>1、具有以SEQ ID NO:5陳述之胺基酸序列的CDR<sub>H</sub>2 及具有以 SEQ ID NO:6 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>H</sub>3；及 b)免疫球蛋白輕鏈可變區，其包含具有以 SEQ ID NO:1 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>L</sub>1、具有以 SEQ ID NO:2 陳

述之胺基酸序列的 CDR<sub>L</sub>2 及具有以 SEQ ID NO:3 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>L</sub>3。

【請求項 169】如請求項 167 之方法，其中該抗 CD123 抗體或其抗原結合片段包含 V<sub>H</sub>序列 SEQ ID NO:7 及 V<sub>L</sub>序列 SEQ ID NO:9。

【請求項 170】如請求項 167 之方法，其中該抗 CD123 抗體包含：(a)具有以 SEQ ID NO:8 陳述之胺基酸序列的免疫球蛋白重鏈；及

b) 具有以 SEQ ID NO:10 陳述之胺基酸序列的免疫球蛋白輕鏈。

【請求項 171】如請求項 23 至 165 中任一項之方法，其中該經半胱胺酸工程改造之抗體或其抗原結合片段為抗 ADAM9 抗體或其抗原結合片段。

【請求項 172】如請求項 171 之方法，其中該抗 ADAM9 抗體或其抗原結合片段係特異性地結合於人類 ADAM9 及 cyno ADAM9 之人類化抗 ADAM9 抗體或其抗原結合片段。

【請求項 173】如請求項 172 之方法，其中該人類化抗 ADAM9 抗體或其抗原結合片段包含 a)免疫球蛋白重鏈可變區，其包含具有以 SEQ ID NO:24 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>H</sub>1、具有以 SEQ ID NO:25 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>H</sub>2 及具有以 SEQ ID NO:26 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>H</sub>3；及 b)免疫球蛋白輕鏈可變區，其包含具有以 SEQ ID NO:21 陳述之胺基酸序列的 CD<sub>L</sub>R1、具有以 SEQ ID NO:22 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>L</sub>2 及具有以 SEQ ID NO:23 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>L</sub>3。

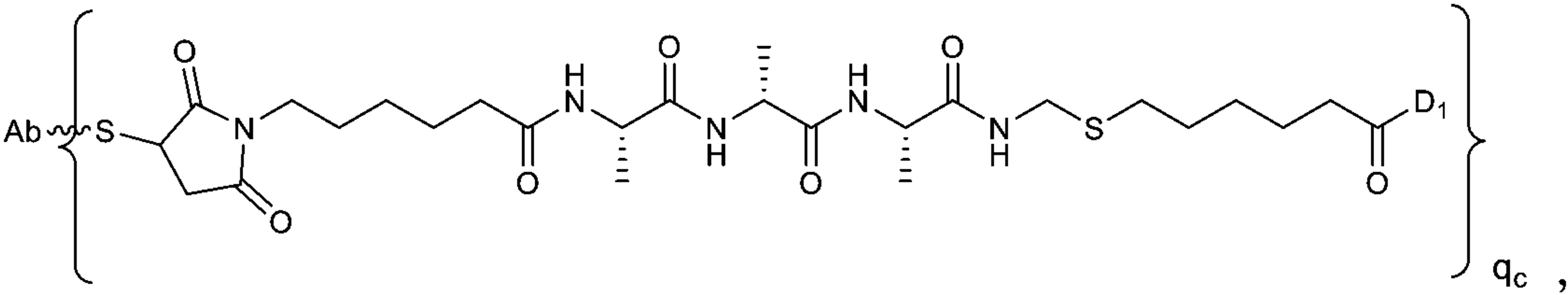
【請求項 174】如請求項 172 或 173 之方法，其中該人類化抗 ADAM9 抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變域(V<sub>H</sub>)序列 SEQ ID NO:27 及輕鏈可變域(V<sub>L</sub>)序列 SEQ ID NO:28。

【請求項 175】如請求項 174 之方法，其中該人類化抗 ADAM9 抗體或其抗原結

合片段包含具有以 SEQ ID NO:29 陳述之胺基酸序列的重鏈；及具有以 SEQ ID NO:30 陳述之胺基酸序列的輕鏈。

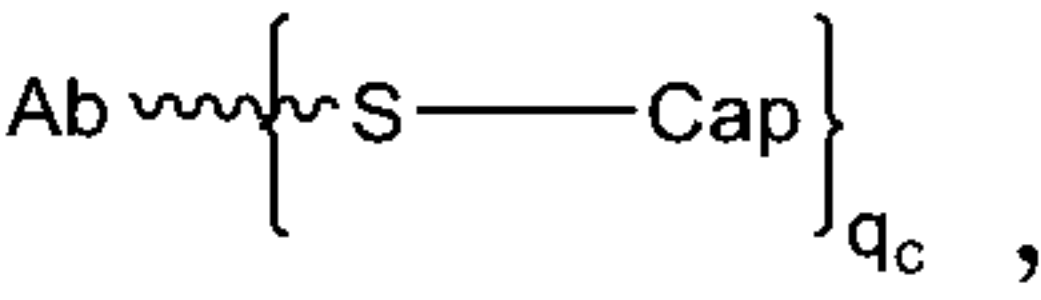
【請求項 176】如請求項 171 至 175 中任一項之方法，其中該人類化抗 ADAM9 抗體或其 ADAM9 結合片段係經最佳化以具有對 cyno ADAM9 之結合親和力的至少 100 倍增強且如與嵌合或鼠科動物親本抗體相比，保持對人類 ADAM9 之高親和力結合。

【請求項 177】一種製備抗體-細胞毒性劑結合物(ADC)之方法，該抗體-細胞毒性劑結合物(ADC)由下式表示：



該方法包括以下步驟：

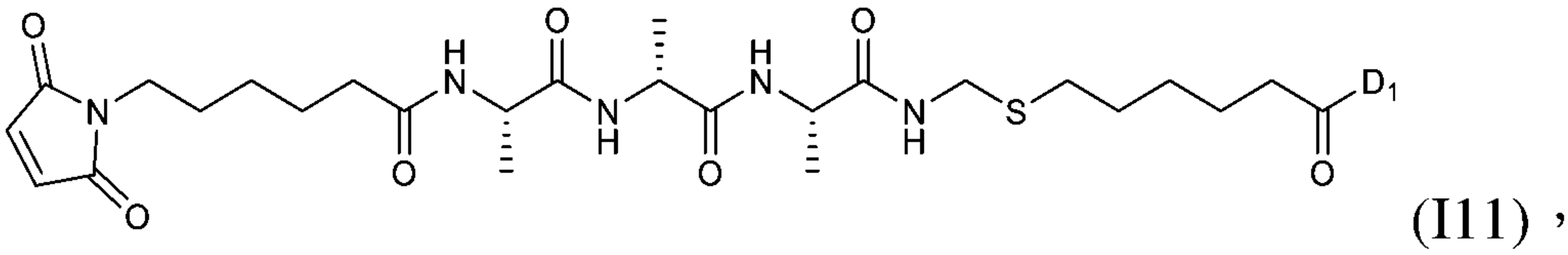
(a) 使還原劑與由下式表示之經封端的半胱胺酸工程改造之抗體(cCysAb)反應：



以形成經還原抗體或其抗原結合片段，其中該封端劑(Cap)經移除以在該經還原抗體或其抗原結合片段中形成游離硫醇(-SH)基；

(b) 使該經還原抗體或其抗原結合片段與選擇性氧化劑反應以形成 CysAb，其中該經工程改造之半胱胺酸殘基中的該游離硫醇基未經氧化；及

(c) 使該 CysAb 與由下式表示之化合物：



或其醫藥學上可接受之鹽反應，由此形成該 ADC，其中步驟(a)中之該經

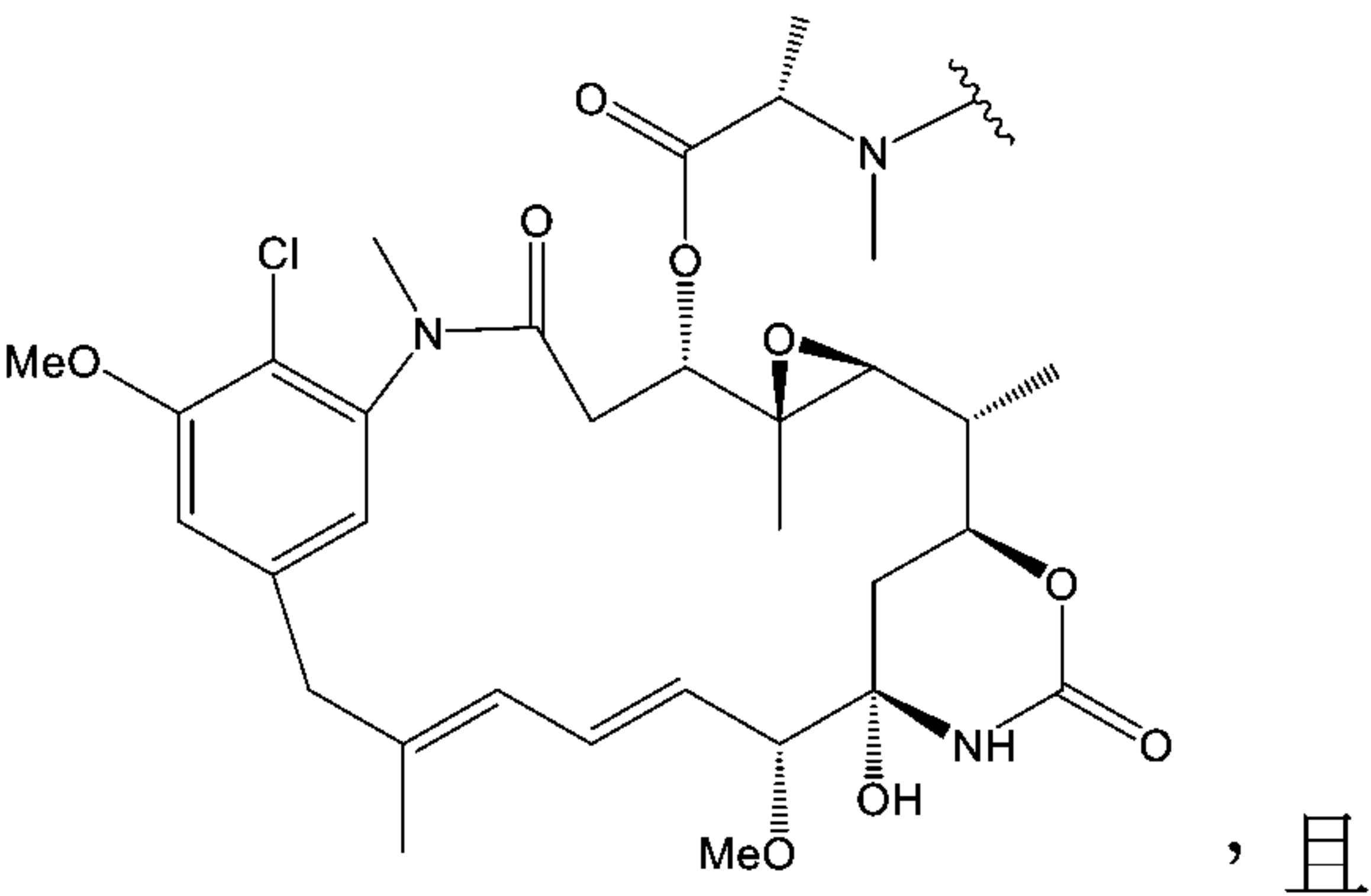
還原抗體或其抗原結合片段未經純化即用於步驟(b)，且步驟(b)之該 CysAb 或其抗原結合片段未經純化即用於步驟(c)，

其中：

Ab~S 一係經由位於該經工程改造之半胱胺酸殘基上的該硫醇基共價連接至該細胞毒性劑之經半胱胺酸工程改造之抗體(CysAb)或其抗原結合片段；且其中該 CysAb 或其抗原結合片段係包含 CDR<sub>H</sub>1 域、CDR<sub>H</sub>2 域及 CDR<sub>H</sub>3 域以及 CDR<sub>L</sub>1 域、CDR<sub>L</sub>2 域及 CDR<sub>L</sub>3 域之人類化抗 ADAM9 抗體或其 ADAM9 結合片段，該等域分別具有序列 SEQ ID NO: 24、25 及 26 以及 SEQ ID NO: 21、22、23；

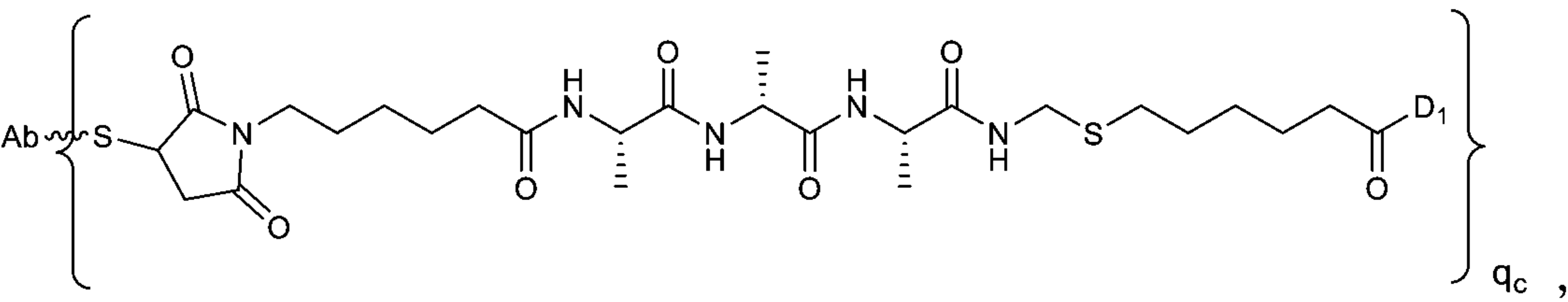
q<sub>c</sub> 為 1 或 2；

D<sub>1</sub> 係由下式表示：



Cap 為封端劑。

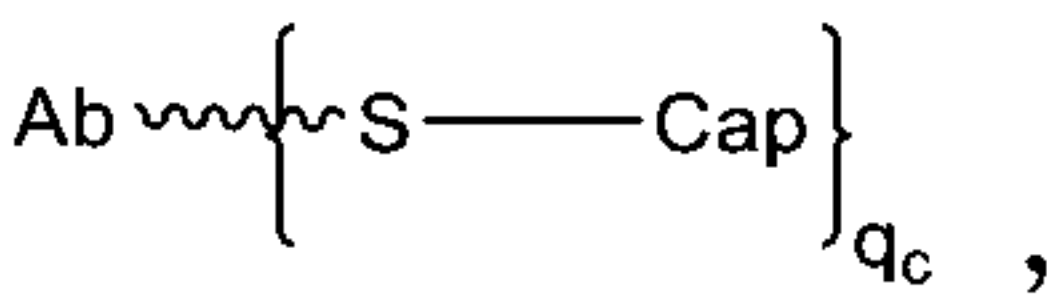
【請求項 178】一種製備抗體-細胞毒性劑結合物(ADC)之連續方法，該抗體-細胞毒性劑結合物(ADC)由下式表示：



該方法包括以下步驟：

(a) 使還原劑與由下式表示之經封端的半胱胺酸工程改造之抗體(cCysAb)

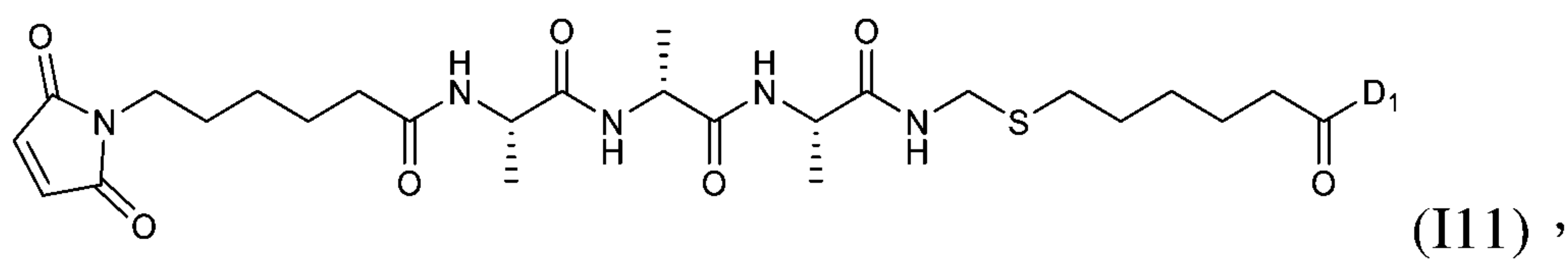
反應：



以形成經還原抗體或其抗原結合片段，其中該封端劑(Cap)經移除以在該經還原抗體或其抗原結合片段中形成游離硫醇(-SH)基；

(b) 使該經還原抗體或其抗原結合片段與選擇性氧化劑反應以形成 CysAb，其中該經工程改造之半胱胺酸殘基中的該游離硫醇基未經氧化；及

(c) 使該 CysAb 與由下式表示之化合物：

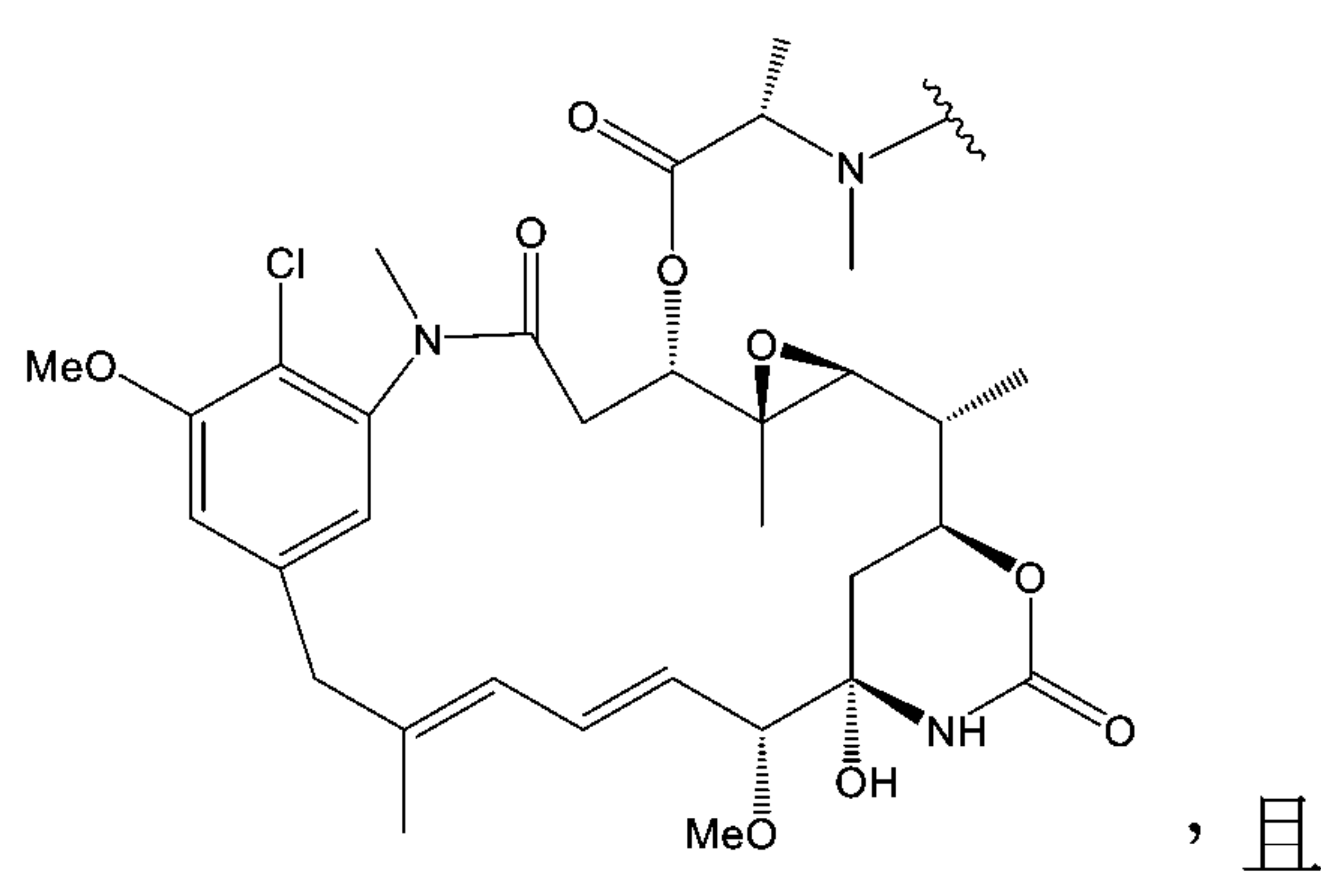


或其醫藥學上可接受之鹽反應，由此形成該 ADC，其中步驟(a)中之該經還原抗體或其抗原結合片段未經純化即用於步驟(b)，且步驟(b)之該 CysAb 或其抗原結合片段未經純化即用於步驟(c)，步驟(a)至(c)係連續地執行，且其中：

Ab~S—係經由位於該經工程改造之半胱胺酸殘基上的該硫醇基共價連接至該細胞毒性劑之經半胱胺酸工程改造之抗體(CysAb)或其抗原結合片段；且其中該 CysAb 或其抗原結合片段係包含 CDR<sub>H</sub>1 域、CDR<sub>H</sub>2 域及 CDR<sub>H</sub>3 域以及 CDR<sub>L</sub>1 域、CDR<sub>L</sub>2 域及 CDR<sub>L</sub>3 域之人類化抗 ADAM9 抗體或其 ADAM9 結合片段，該等域分別具有序列 SEQ ID NO: 24、25 及 26 以及 SEQ ID NO: 21、22、23；

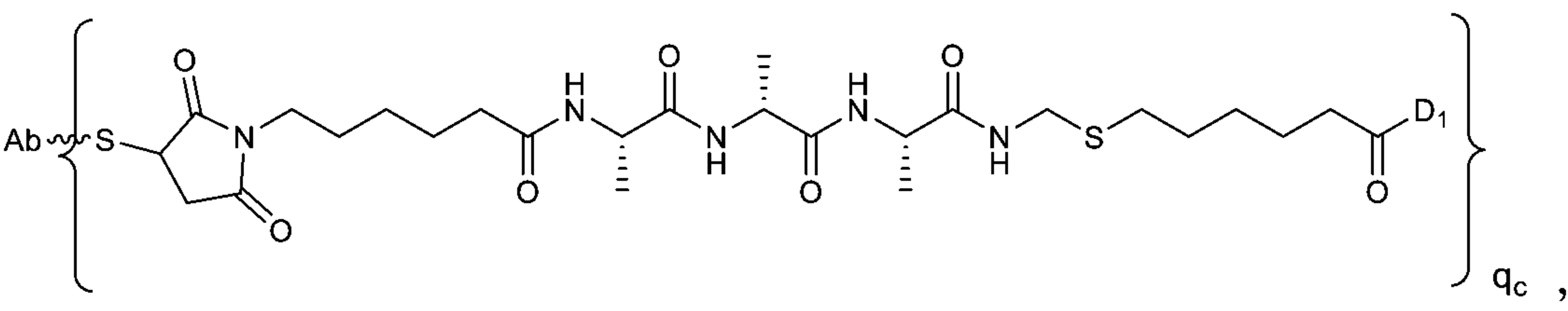
q<sub>c</sub> 為 1 或 2；

D<sub>1</sub> 係由下式表示：



Cap 為封端劑。

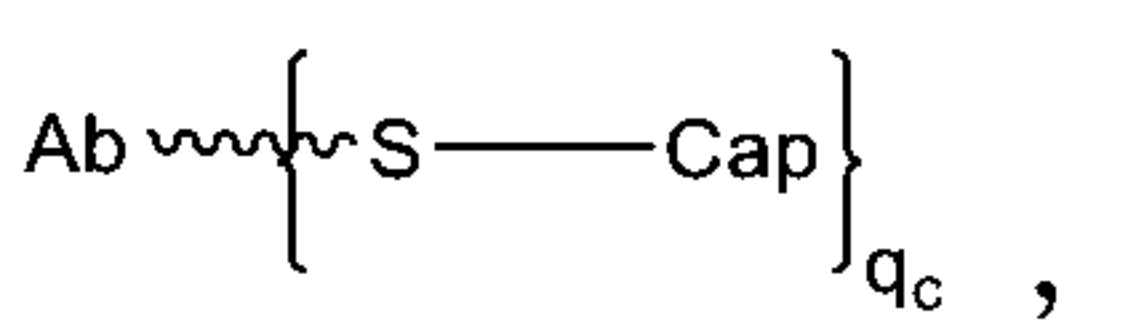
【請求項 179】一種製備抗體-細胞毒性劑結合物(ADC)之連續方法，該抗體-細胞毒性劑結合物(ADC)由下式表示：



該方法包括以下步驟：

(a) 使還原劑與由下式表示之經封端的半胱胺酸工程改造之抗體(cCysAb)

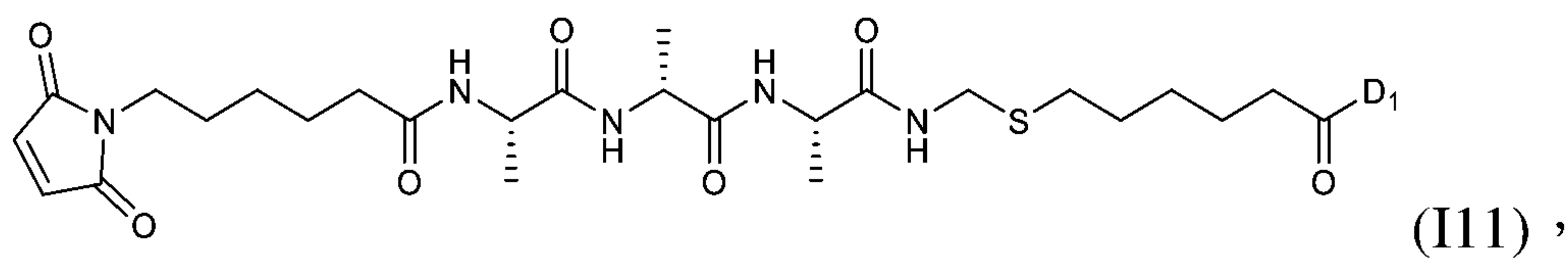
反應：



以形成經還原抗體或其抗原結合片段，其中該封端劑(Cap)經移除以在該經還原抗體或其抗原結合片段中形成游離硫醇(-SH)基；

(b) 使該經還原抗體或其抗原結合片段與選擇性氧化劑反應以形成 CysAb，其中該經工程改造之半胱胺酸殘基中的該游離硫醇基未經氧化；

(c) 使該 CysAb 與由下式表示之化合物：



或其醫藥學上可接受之鹽反應，由此形成該 ADC；及

(d) 移除未結合之式(II11)化合物；

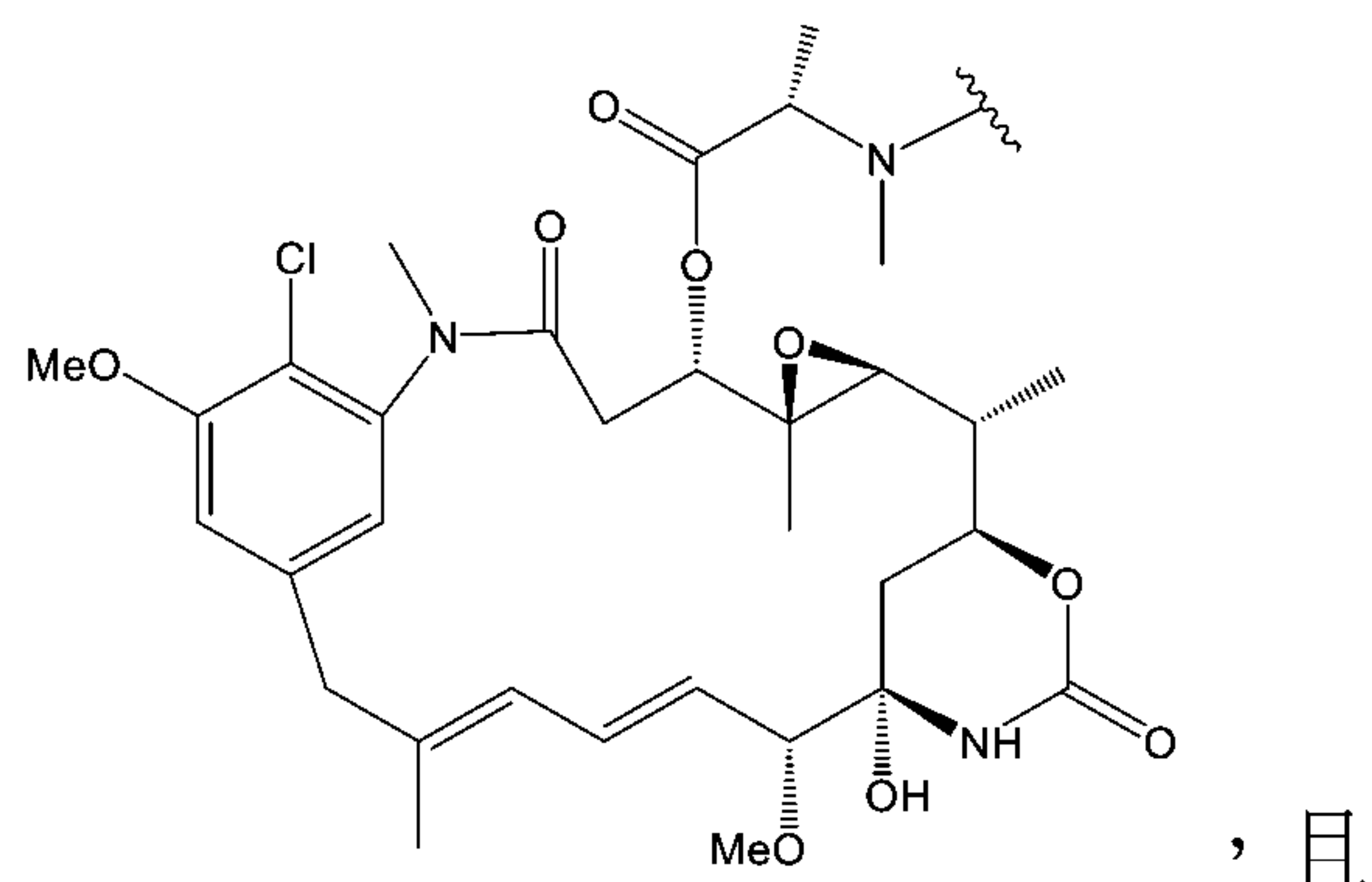
其中步驟(a)中之該經還原抗體或其抗原結合片段未經純化即用於步驟(b)，且步驟(b)之該 CysAb 或其抗原結合片段未經純化即用於步驟(c)，步驟(a)至(d)係連續地執行，且

其中：

Ab $\sim$ S—係經由位於該經工程改造之半胱胺酸殘基上的該硫醇基共價連接至該細胞毒性劑之經半胱胺酸工程改造之抗體(CysAb)或其抗原結合片段；且其中該 CysAb 或其抗原結合片段係包含 CDR<sub>H</sub>1 域、CDR<sub>H</sub>2 域及 CDR<sub>H</sub>3 域以及 CDR<sub>L</sub>1 域、CDR<sub>L</sub>2 域及 CDR<sub>L</sub>3 域之人類化抗 ADAM9 抗體或其 ADAM9 結合片段，該等域分別具有序列 SEQ ID NO: 24、25 及 26 以及 SEQ ID NO: 21、22、23；

q<sub>c</sub> 為 1 或 2；

D<sub>1</sub> 係由下式表示：



Cap 為封端劑。

【請求項 180】如請求項 179 之方法，其中該方法進一步包括步驟(e)將該結合物交換至穩定緩衝液中。

【請求項 181】如請求項 180 之方法，其中步驟(e)係連續地執行。

【請求項 182】如請求項 179 至 181 中任一項之方法，其中使用單程切向流過濾(SPTFF)及/或逆流透濾來移除該未結合之式(I)化合物及/或將該 ADC 交換至該穩定緩衝液中。

【請求項 183】如請求項 179 至 182 中任一項之方法，其中在步驟(d)中使用逆流透濾來移除該未結合之式(I)化合物。

【請求項 184】如請求項 178 至 183 中任一項之方法，其中在步驟(a)中，該 cCysAb 及該還原劑連續地添加至反應容器中，同時反應混合物連續地經抽出且經由流式反應器進給。

【請求項 185】如請求項 184 之方法，其中自該反應容器抽出該反應混合物之體積流動速率係與正在添加至該反應容器中的該還原劑及該 cCysAb 之組合流動速率相同。

【請求項 186】如請求項 178 至 185 中任一項之方法，其中在步驟(b)中，該經還原抗體及該選擇性氧化劑連續地添加至該反應容器中，同時該反應混合物連續地經抽出且經由流式反應器進給。

【請求項 187】如請求項 186 之方法，其中自該反應容器抽出該反應混合物之體積流動速率係與正在添加至該反應容器中的該經還原抗體及該選擇性氧化劑之組合流動速率相同。

【請求項 188】如請求項 178 至 187 中任一項之方法，其中在步驟(c)中，該 CysAb 及該式(I11)化合物連續地添加至反應容器中且該反應混合物連續地自該反應容器抽出且經由流式反應器進給。

【請求項 189】如請求項 188 之方法，其中自該反應容器抽出該反應混合物之體積流動速率係與正在添加至該反應容器中的該 CysAb 及該式(I11)化合物之組合流動速率相同。

【請求項 190】如請求項 182 至 189 中任一項之方法，其中該反應容器為連續攪拌槽反應器(CSTR)。

【請求項 191】如請求項 182 至 190 中任一項之方法，其中該流式反應器為塞流

反應器(PFR)。

【請求項 192】如請求項 177 至 191 中任一項之方法，其中該人類化抗 ADAM9 抗體或其 ADAM9 結合片段包含分別具有序列 SEQ ID NO:27 及 SEQ ID NO:28 之重鏈可變域( $V_H$ )及輕鏈可變域( $V_L$ )。

【請求項 193】如請求項 177 至 191 中任一項之方法，其中該人類化抗 ADAM9 抗體包含分別具有序列 SEQ ID NO:29 及 SEQ ID NO:30 之重鏈及輕鏈。

【請求項 194】如請求項 177 至 193 中任一項之方法，其中該還原劑為 DPPA。

【請求項 195】如請求項 194 之方法，其中在步驟(a)中，對於每一當量之 cCysAb，使用 10 與 20 之間莫耳當量之 DPPA。

【請求項 196】如請求項 194 之方法，其中在步驟(a)中，對於每一當量之 cCysAb，使用 15 與 17 之間莫耳當量之 DPPA。

【請求項 197】如請求項 194 之方法，其中在步驟(a)中，對於每一當量之 cCysAb，使用 16 莫耳當量之 DPPA。

【請求項 198】如請求項 177 至 197 中任一項之方法，其中步驟(a)中之反應係在 6.0 與 7.0 之間的 pH 或 6.3 與 6.7 之間的 pH 下進行。

【請求項 199】如請求項 198 之方法，其中步驟(a)中之反應係在 pH 6.5 下進行。

【請求項 200】如請求項 177 至 199 中任一項之方法，其中該氧化劑為 DHAA。

【請求項 201】如請求項 200 之方法，其中在步驟(b)中，對於每一當量之 cCysAb，使用 20 與 30 之間莫耳當量之 DHAA。

【請求項 202】如請求項 200 之方法，其中在步驟(b)中，對於每一當量之 cCysAb，使用 23 與 25 之間莫耳當量之 DHAA。

【請求項 203】如請求項 200 之方法，其中在步驟(b)中，對於每一當量之 cCysAb，使用 24 莫耳當量之 DHAA。

【請求項 204】如請求項 177 至 203 中任一項之方法，其中步驟(b)中之反應係在 6.0 與 7.0 之間的 pH 或 6.3 與 6.7 之間的 pH 下進行。

【請求項 205】如請求項 204 之方法，其中步驟(b)中之反應係在 pH 6.5 下進行。

【請求項 206】如請求項 177 至 205 中任一項之方法，其中步驟(c)中之反應係在 6.0 與 7.0 之間的 pH 或 6.3 與 6.7 之間的 pH 下進行。

【請求項 207】如請求項 206 之方法，其中步驟(c)中之反應係在 pH 6.5 下進行。

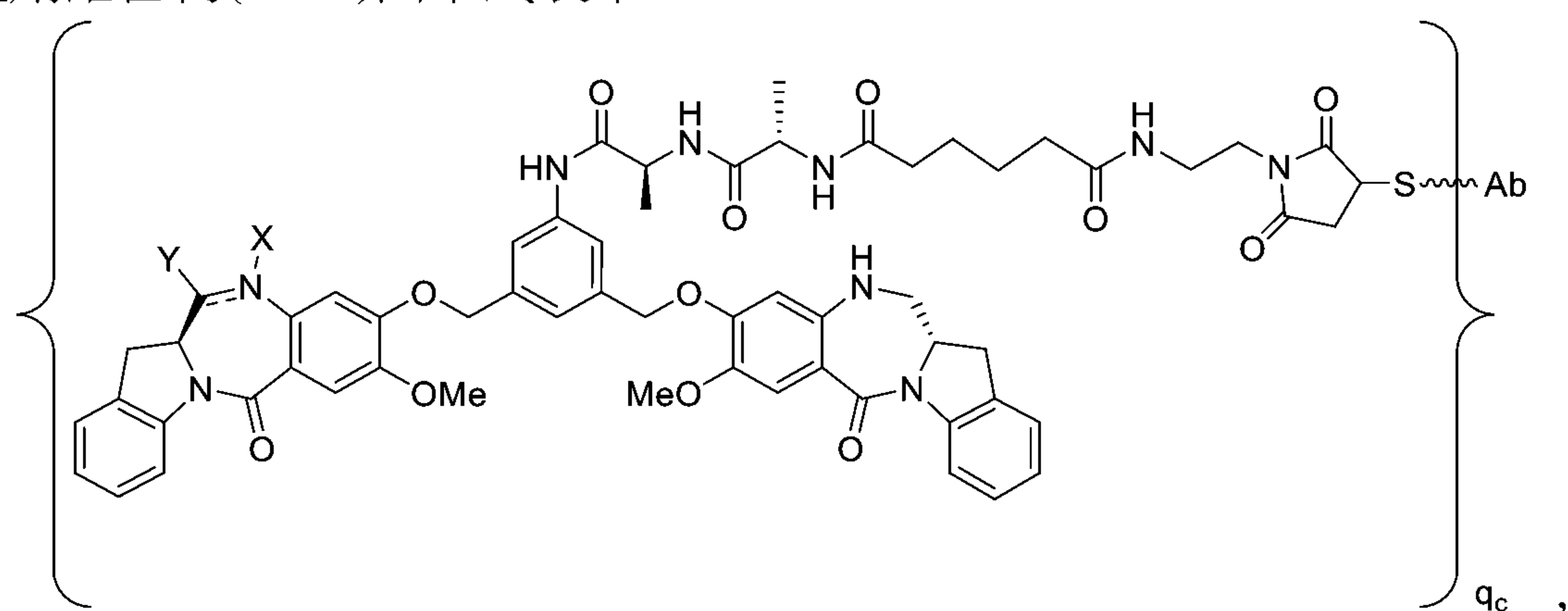
【請求項 208】如請求項 177 至 207 中任一項之方法，其中在步驟(c)中，對於每一當量之 CysAb，使用 2 至 10 之間莫耳當量的該式(I11)化合物。

【請求項 209】如請求項 208 之方法，其中對於每一當量之 CysAb，使用 4.6 莫耳當量之該式(I11)化合物。

【請求項 210】如請求項 177 至 209 中任一項之方法，其中 Cap 為半胱胺酸、麩胱甘肽或其組合。

【請求項 211】如請求項 177 至 210 中任一項之方法，其中  $q_c$  為 2。

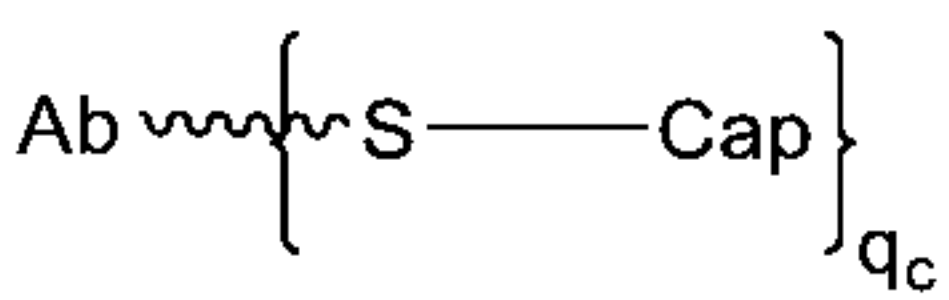
【請求項 212】一種製備抗體-細胞毒性劑結合物(ADC)之方法，該抗體-細胞毒性劑結合物(ADC)由下式表示：



該方法包括以下步驟：

(a) 使還原劑與由下式表示之經封端的半胱胺酸工程改造之抗體(cCysAb)

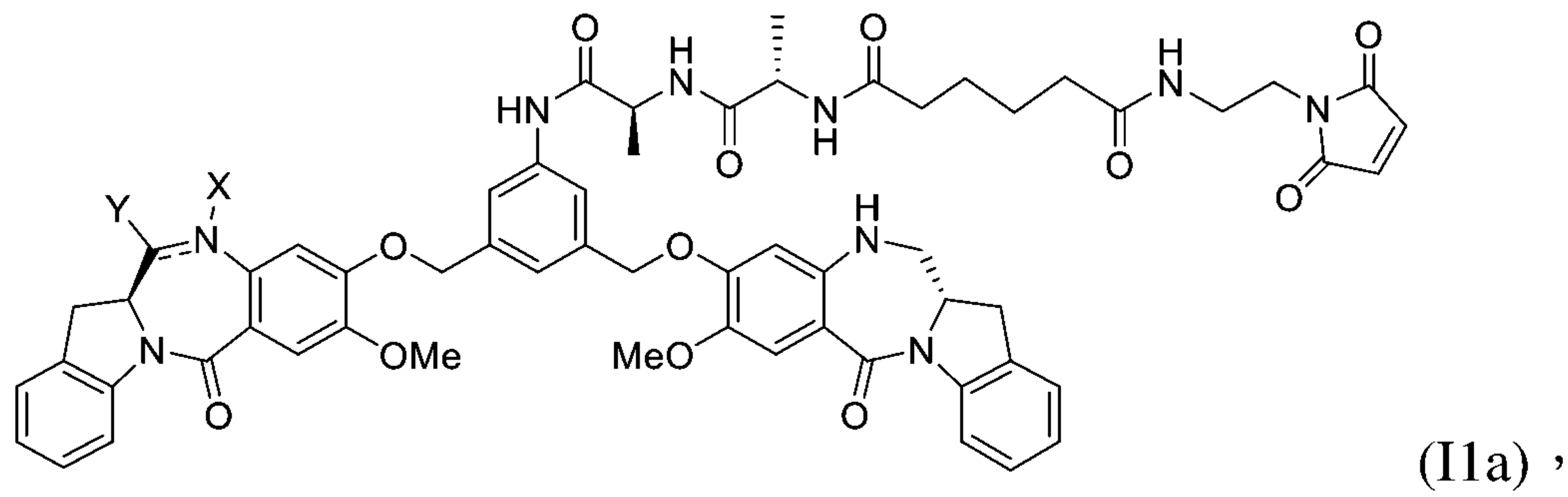
反應：



以形成經還原抗體或其抗原結合片段，其中該封端劑經移除以在該經還原抗體或其抗原結合片段中形成游離硫醇(-SH)基；

(b) 使該經還原抗體或其抗原結合片段與選擇性氧化劑反應以形成 CysAb，其中該經工程改造之半胱氨酸殘基中的該游離硫醇基未經氧化；及

(c) 使該 CysAb 與由下式表示之化合物：



或其醫藥學上可接受之鹽反應，由此形成該 ADC，其中步驟(a)中之該經還原抗體或其抗原結合片段未經純化即用於步驟(b)，且步驟(b)之該 CysAb 或其抗原結合片段未經純化即用於步驟(c)，其中：

N 與 C 之間的雙線 $\equiv$ 表示單鍵或雙鍵，其限制條件在於當其為雙鍵時，X 不存在且 Y 為-H，且當其為單鍵時，X 為-H，且 Y 為-SO<sub>3</sub>M，且 M 為 H<sup>+</sup>或陽離子；

Ab $\sim$ S—係經由位於該經工程改造之半胱氨酸殘基上的該硫醇基共價連接至該細胞毒性劑之該經半胱氨酸工程改造之抗體或其抗原結合片段；其中該經半胱氨酸工程改造之抗體係抗 CD123 抗體或抗原結合片段，其包含：

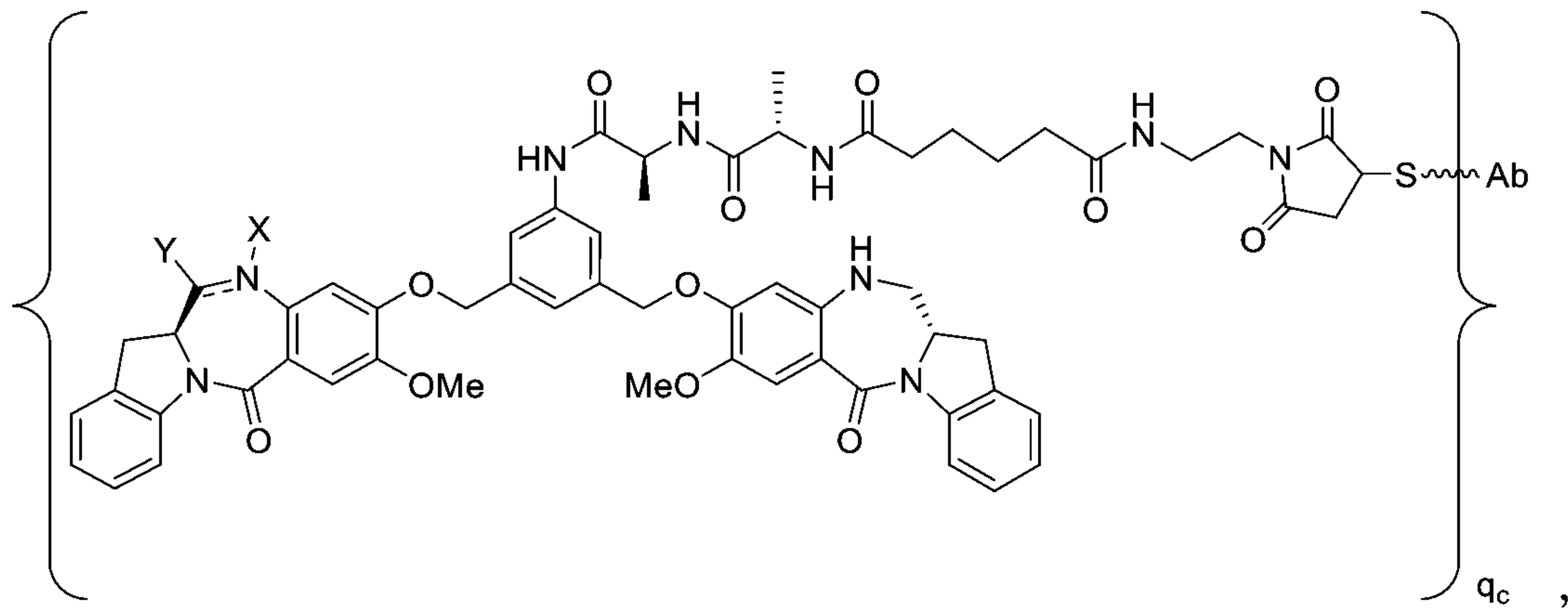
a) 免疫球蛋白重鏈可變區，其包含具有以 SEQ ID NO:4 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>H</sub>1、具有以 SEQ ID NO:5 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>H</sub>2 及具有以 SEQ ID NO:6 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>H</sub>3；及

b) 免疫球蛋白輕鏈可變區，其包含具有以 SEQ ID NO:1 陳述之胺基酸序列

的 CDR<sub>L</sub>1、具有以 SEQ ID NO:2 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>L</sub>2 及具有以 SEQ ID NO:3 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>L</sub>3；

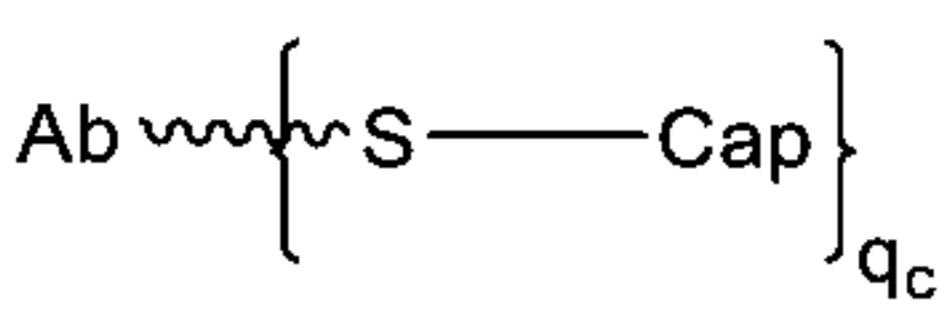
q<sub>c</sub> 為 1 或 2；且  
Cap 為封端劑。

【請求項 213】一種製備抗體-細胞毒性劑結合物(ADC)之連續方法，該抗體-細胞毒性劑結合物(ADC)由下式表示：



該方法包括以下步驟：

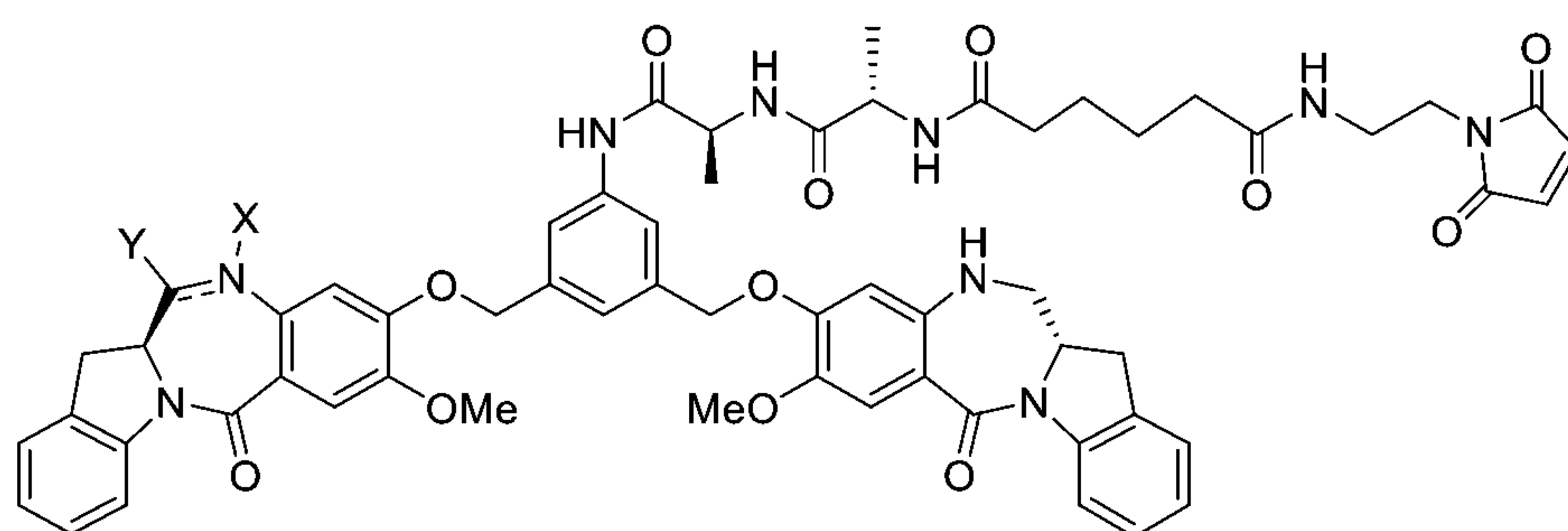
(a) 使還原劑與由下式表示之經封端的半胱胺酸工程改造之抗體(cCysAb)反應：



以形成經還原抗體或其抗原結合片段，其中該封端劑經移除以在該經還原抗體或其抗原結合片段中形成游離硫醇(-SH)基；

(b) 使該經還原抗體或其抗原結合片段與選擇性氧化劑反應以形成 CysAb，其中該經工程改造之半胱胺酸殘基中的該游離硫醇基未經氧化；及

(c) 使該 CysAb 與由下式表示之化合物：



(I1a) ,

或其醫藥學上可接受之鹽反應，由此形成該 ADC，其中步驟(a)中之該經還原抗體或其抗原結合片段未經純化即用於步驟(b)，且步驟(b)之該 CysAb 或其抗原結合片段未經純化即用於步驟(c)；且步驟(a)至(c)係連續地執行，

其中：

N 與 C 之間的雙線= 表示單鍵或雙鍵，其限制條件在於當其為雙鍵時，X 不存在且 Y 為-H，且當其為單鍵時，X 為-H，且 Y 為-SO<sub>3</sub>M，且 M 為 H<sup>+</sup>或陽離子；

Ab~S—係經由位於該經工程改造之半胱胺酸殘基上的該硫醇基共價連接至該細胞毒性劑之該經半胱胺酸工程改造之抗體或其抗原結合片段；其中該經半胱胺酸工程改造之抗體係抗 CD123 抗體或抗原結合片段，其包含：

a) 免疫球蛋白重鏈可變區，其包含具有以 SEQ ID NO:4 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>H</sub>1、具有以 SEQ ID NO:5 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>H</sub>2 及具有以 SEQ ID NO:6 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>H</sub>3；及

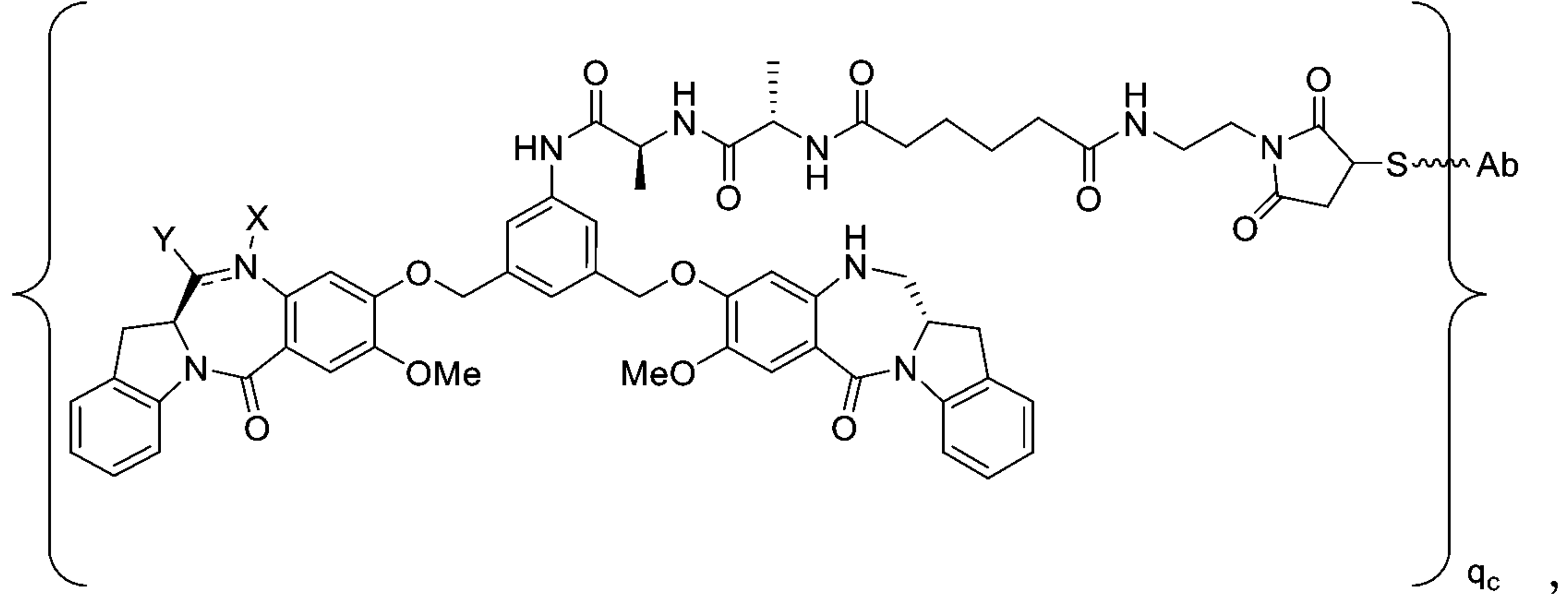
b) 免疫球蛋白輕鏈可變區，其包含具有以 SEQ ID NO:1 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>L</sub>1、具有以 SEQ ID NO:2 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>L</sub>2 及具有以 SEQ ID NO:3 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>L</sub>3；

q<sub>c</sub> 為 1 或 2；且

Cap 為封端劑。

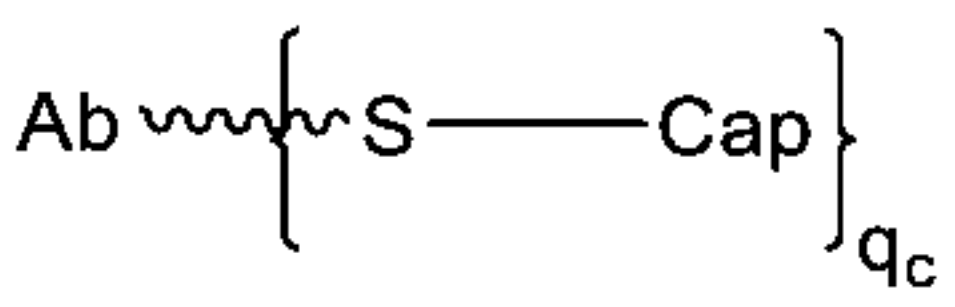
【請求項 214】一種製備抗體-細胞毒性劑結合物(ADC)之連續方法，該抗體-細

胞毒性劑結合物(ADC)由下式表示：



該方法包括以下步驟：

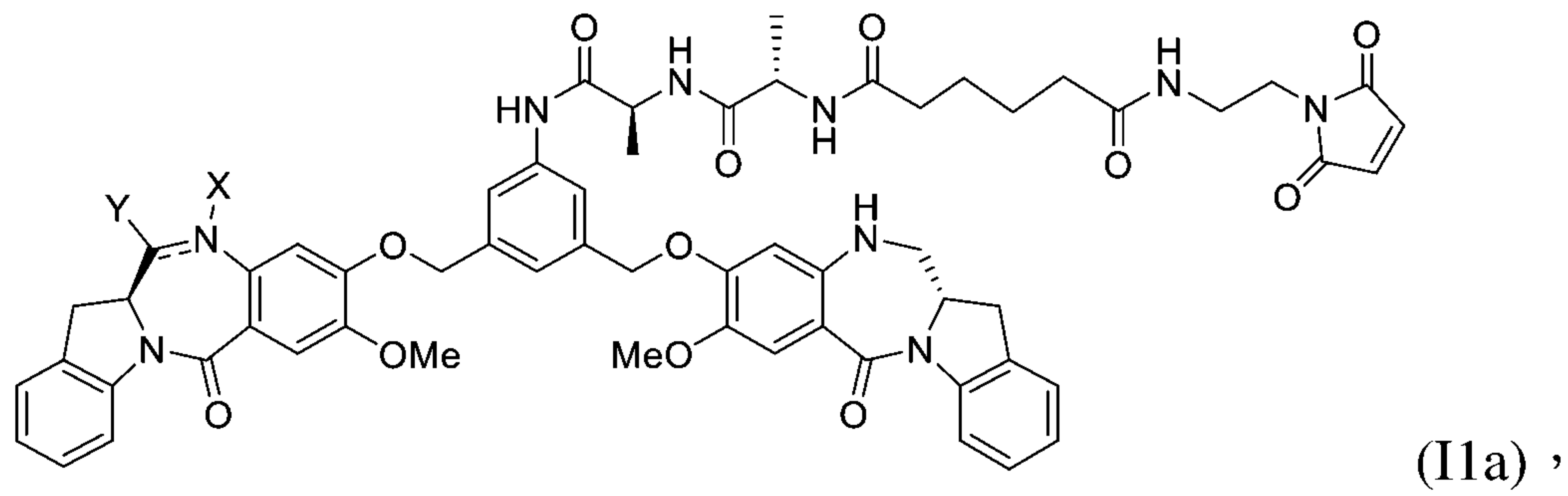
(a) 使還原劑與由下式表示之經封端的半胱氨酸工程改造之抗體(cCysAb)反應：



以形成經還原抗體或其抗原結合片段，其中該封端劑經移除以在該經還原抗體或其抗原結合片段中形成游離硫醇(-SH)基；

(b) 使該經還原抗體或其抗原結合片段與選擇性氧化劑反應以形成 CysAb，其中該經工程改造之半胱氨酸殘基中的該游離硫醇基未經氧化；及

(c) 使該 CysAb 與由下式表示之化合物：



或其醫藥學上可接受之鹽反應，由此形成該 ADC；及

(d) 移除未結合之式(IIa)化合物，其中步驟(a)中之該經還原抗體或其抗原結合片段未經純化即用於步驟(b)，且步驟(b)之該 CysAb 或其抗原結合片段未經純化即用於步驟(c)；且步驟(a)至(d)係連續地執行，

其中：

N 與 C 之間的雙線= 表示單鍵或雙鍵，其限制條件在於當其為雙鍵時，X 不存在且 Y 為-H，且當其為單鍵時，X 為-H，且 Y 為-SO<sub>3</sub>M，且 M 為 H<sup>+</sup>或陽離子；

Ab<sup>~</sup>S— 係經由位於該經工程改造之半胱胺酸殘基上的該硫醇基共價連接至該細胞毒性劑之該經半胱胺酸工程改造之抗體或其抗原結合片段；其中該經半胱胺酸工程改造之抗體係抗 CD123 抗體或抗原結合片段，其包含：

a) 免疫球蛋白重鏈可變區，其包含具有以 SEQ ID NO:4 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>H</sub>1、具有以 SEQ ID NO:5 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>H</sub>2 及具有以 SEQ ID NO:6 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>H</sub>3；及

b) 免疫球蛋白輕鏈可變區，其包含具有以 SEQ ID NO:1 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>L</sub>1、具有以 SEQ ID NO:2 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>L</sub>2 及具有以 SEQ ID NO:3 陳述之胺基酸序列的 CDR<sub>L</sub>3；

q<sub>c</sub> 為 1 或 2；且

Cap 為封端劑。

【請求項 215】如請求項 214 之方法，其中該方法進一步包括步驟(e)將該結合物交換至穩定緩衝液中。

【請求項 216】如請求項 215 之方法，其中步驟(e)係連續地執行。

【請求項 217】如請求項 214 至 216 中任一項之方法，其中使用單程切向流過濾 (SPTFF)及/或逆流透濾來移除該未結合之式(I)化合物及/或將該 ADC 交換至該穩定緩衝液中。

【請求項 218】如請求項 214 至 216 中任一項之方法，其中在步驟(d)中使用逆流透濾來移除該未結合之式(I)化合物。

【請求項 219】如請求項 213 至 218 中任一項之方法，其中在步驟(a)中，該 cCysAb 及該還原劑連續地添加至反應容器中，同時反應混合物連續地經抽出且經由流式反應器進給。

【請求項 220】如請求項 219 之方法，其中自該反應容器抽出該反應混合物之體積流動速率係與正在添加至該反應容器中的該還原劑及該 cCysAb 之組合流動速率相同。

【請求項 221】如請求項 213 至 220 中任一項之方法，其中在步驟(b)中，該經還原抗體及該選擇性氧化劑連續地添加至該反應容器中，同時該反應混合物連續地經抽出且經由流式反應器進給。

【請求項 222】如請求項 221 之方法，其中自該反應容器抽出該反應混合物之體積流動速率係與正在添加至該反應容器中的該經還原抗體及該選擇性氧化劑之組合流動速率相同。

【請求項 223】如請求項 213 至 222 中任一項之方法，其中在步驟(c)中，該 CysAb 及該式(I1a)化合物連續地添加至反應容器中且該反應混合物連續地自該反應容器抽出且經由流式反應器進給。

【請求項 224】如請求項 223 之方法，其中自該反應容器抽出該反應混合物之體積流動速率係與正在添加至該反應容器中的該 CysAb 及該式(I1a)化合物之組合流動速率相同。

【請求項 225】如請求項 219 至 224 中任一項之方法，其中該反應容器為連續攪拌槽反應器(CSTR)。

【請求項 226】如請求項 219 至 225 中任一項之方法，其中該流式反應器為塞流反應器(PFR)。

【請求項 227】如請求項 212 至 214 中任一項之方法，其中該抗 CD123 抗體或

其抗原結合片段包含 V<sub>H</sub>序列 SEQ ID NO: 7 及 V<sub>L</sub>序列 SEQ ID NO:9。

【請求項 228】如請求項 212 至 214 中任一項之方法，其中該抗 CD123 抗體包含：

a) 具有以 SEQ ID NO:8 陳述之胺基酸序列的重鏈；及

b) 具有以 SEQ ID NO:10 陳述之胺基酸序列的輕鏈。

【請求項 229】如請求項 212 至 228 中任一項之方法，其中該還原劑為 DPPA 或 TCEP。

【請求項 230】如請求項 229 之方法，其中該還原劑為 TCEP。

【請求項 231】如請求項 212 至 230 中任一項之方法，其中步驟(a)中之反應係在 5.0 與 8.5 之間、7.0 與 8.0 之間或 7.5 與 7.7 之間的 pH 下進行。

【請求項 232】如請求項 231 之方法，其中步驟(a)之反應係在 pH 7.5 下進行。

【請求項 233】如請求項 212 至 232 中任一項之方法，其中該氧化劑為 DHAA。

【請求項 234】如請求項 212 至 233 中任一項之方法，其中步驟(b)中之反應係在 5.0 與 8.5 之間、7.0 與 8.0 之間或 7.5 與 7.7 之間的 pH 下進行。

【請求項 235】如請求項 233 之方法，其中步驟(b)中之反應係在 pH 7.5 下進行。

【請求項 236】如請求項 212 至 235 中任一項之方法，其中步驟(c)之反應係在 5.0 與 8.5 之間、5.5 與 6.5 之間或 5.8 與 6.2 之間的 pH 下進行。

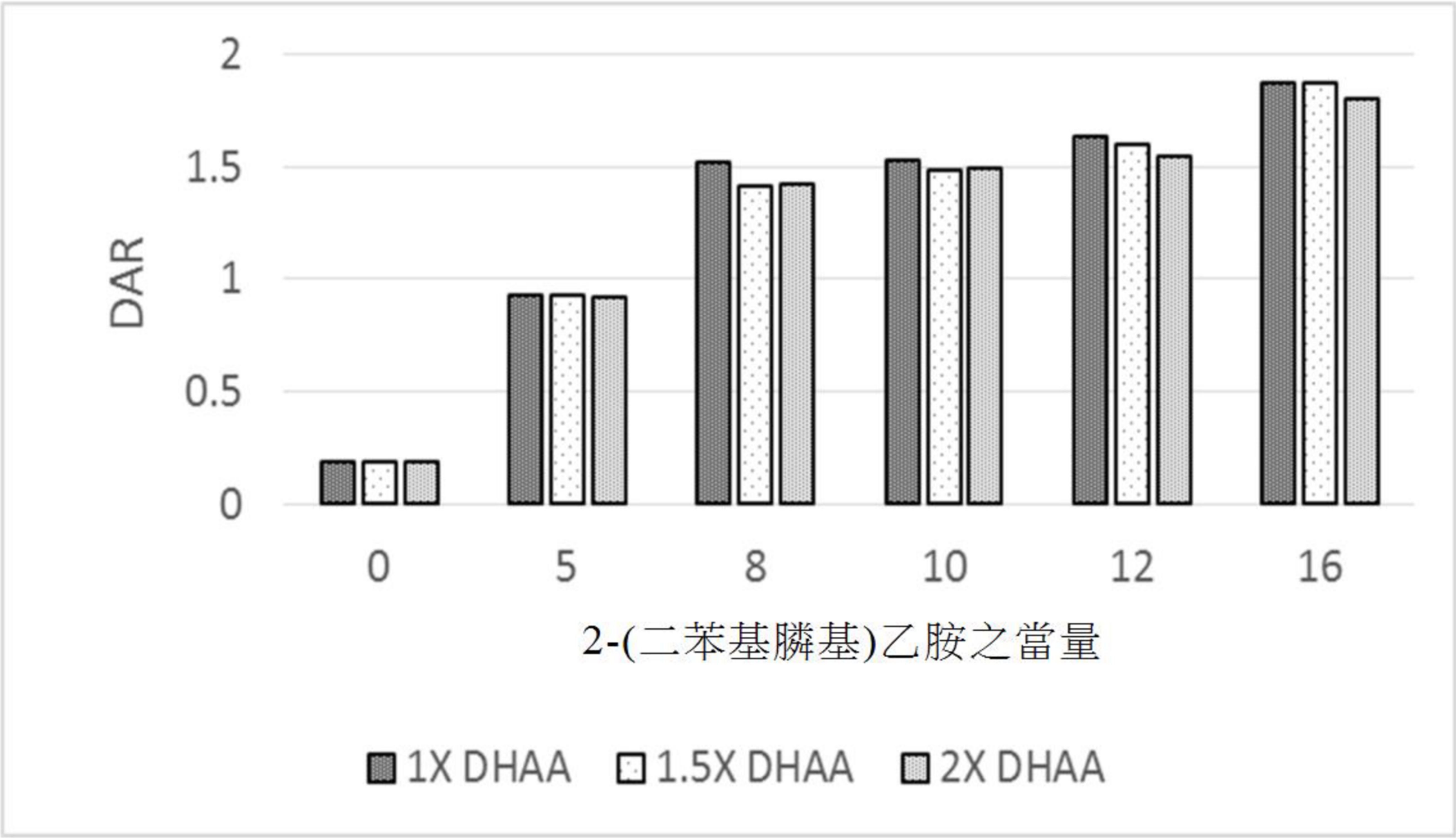
【請求項 237】如請求項 236 之方法，其中步驟(c)之反應係在 pH 6.0 下進行。

【請求項 238】如請求項 212 至 237 中任一項之方法，其中該還原劑為 TCEP；步驟(a)中之反應係在 pH 7.5 下進行；該氧化劑為 DHAA；步驟(b)中之反應係在 pH 7.5 下進行；且步驟(b)之後的該反應混合物之 pH 係在步驟(c)中使該 CysAb 與該細胞毒性劑反應之前自 pH 7.5 經調節至 pH 6.0。

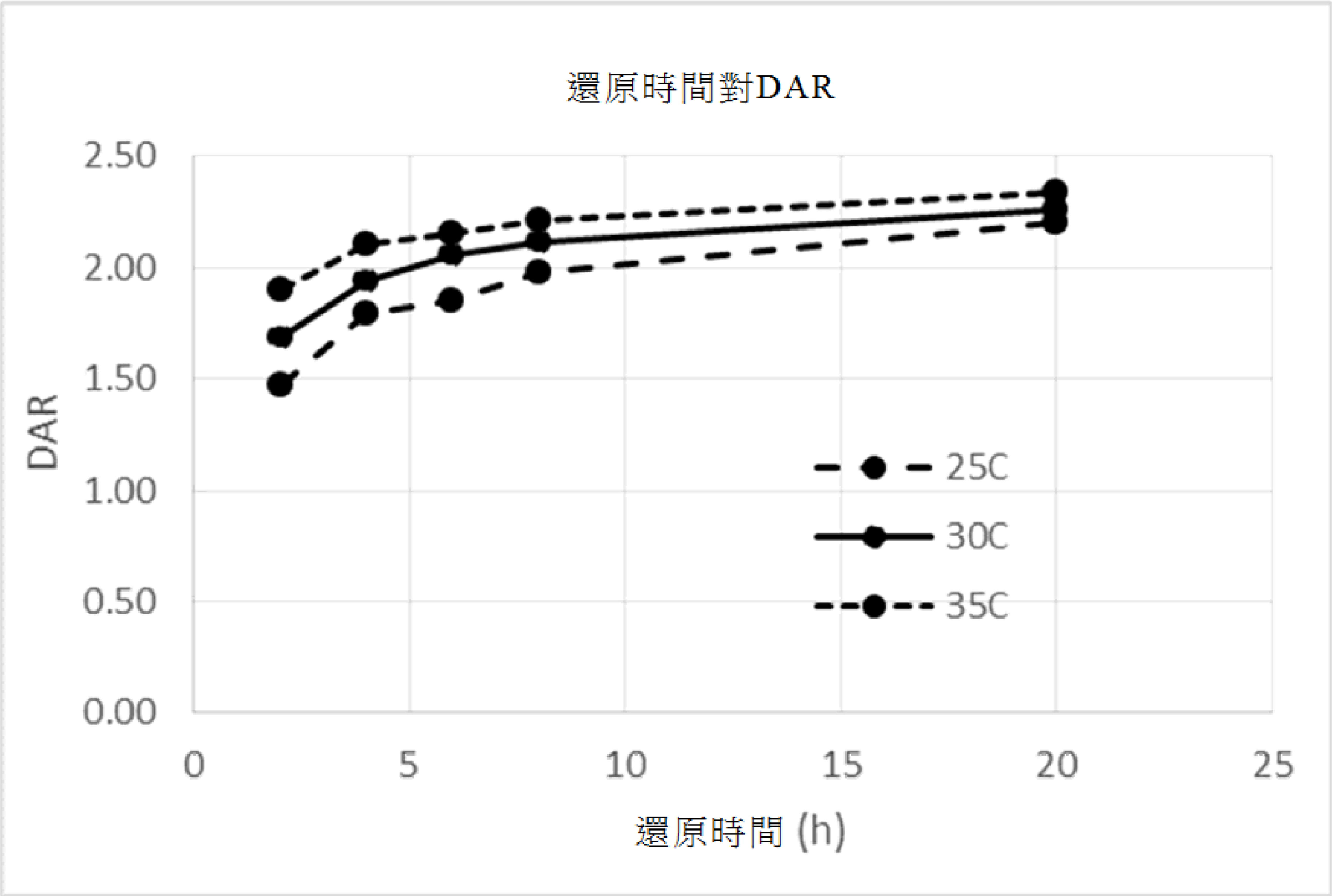
【請求項 239】如請求項 212 至 238 中任一項之方法，其中該封端試劑為半胱胺

酸、高半胱胺酸、麩胱甘肽或其組合。

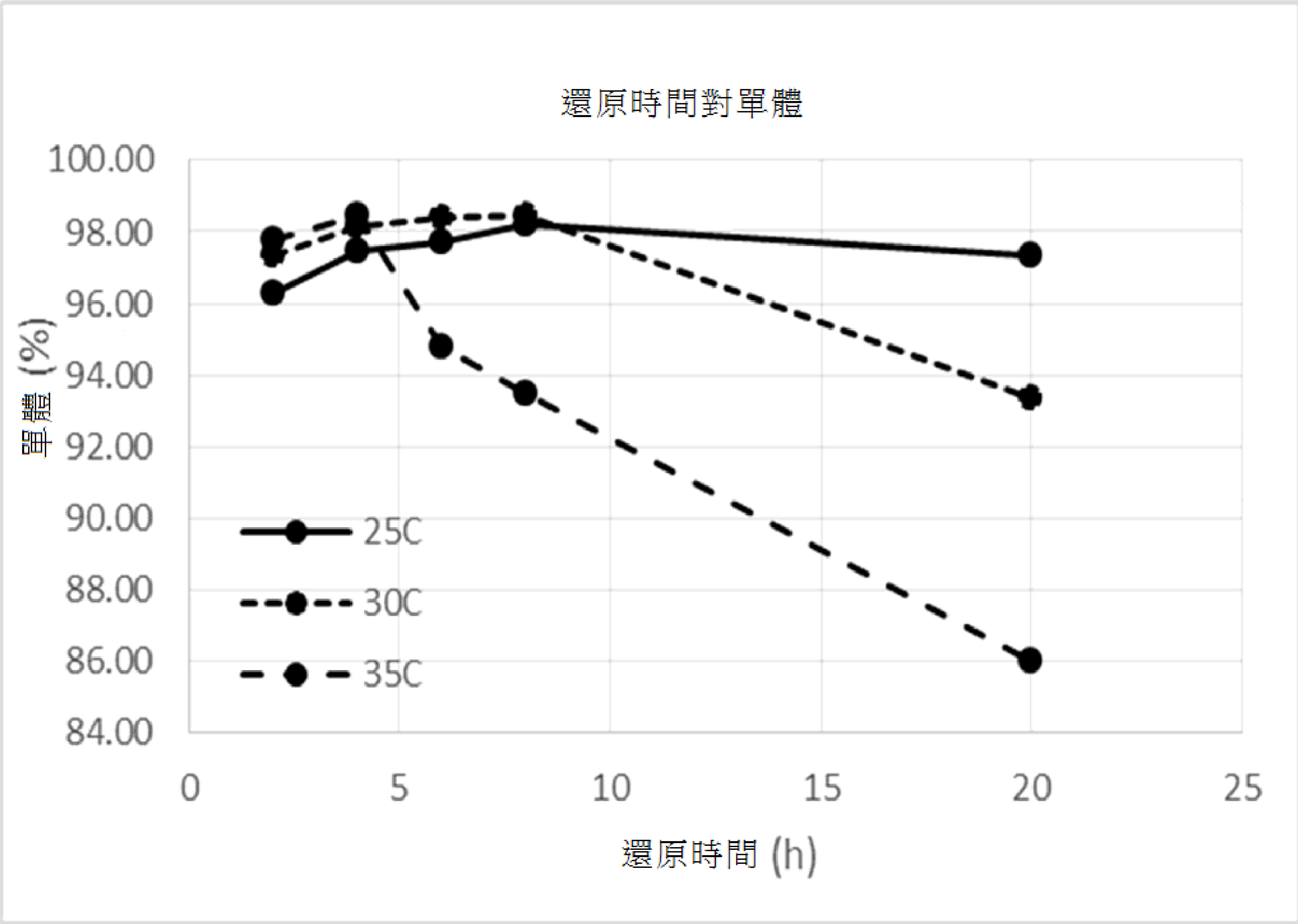
【發明圖式】



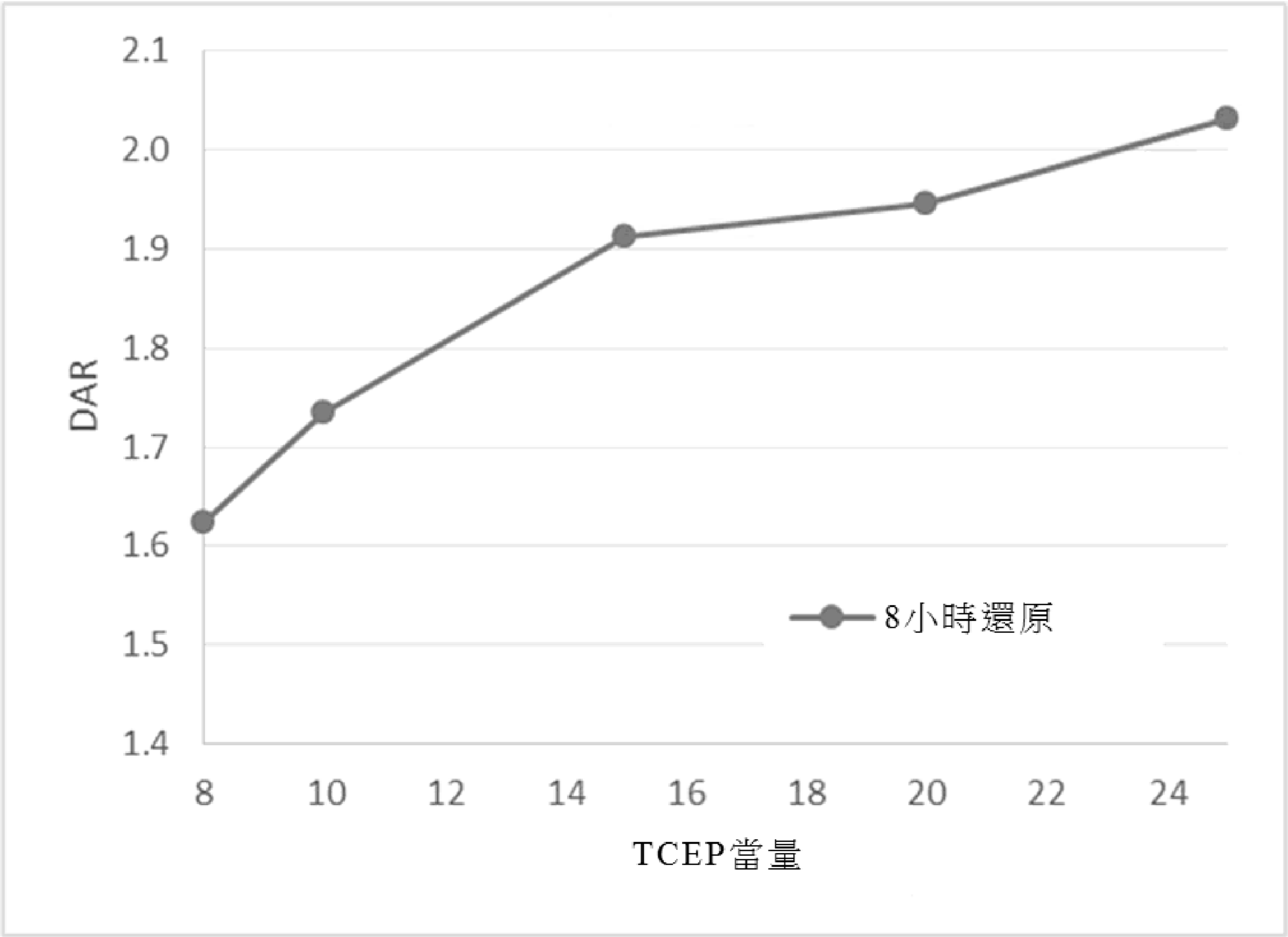
【圖 1】



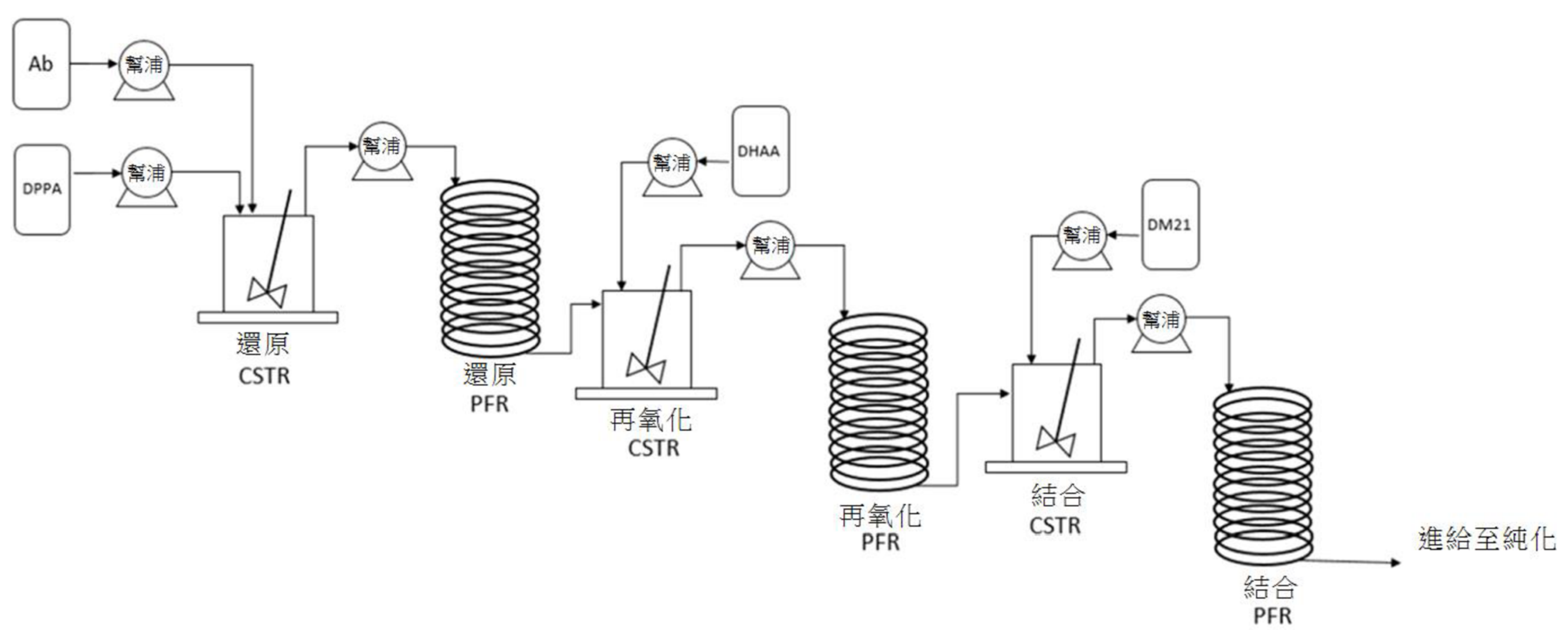
【圖 2】



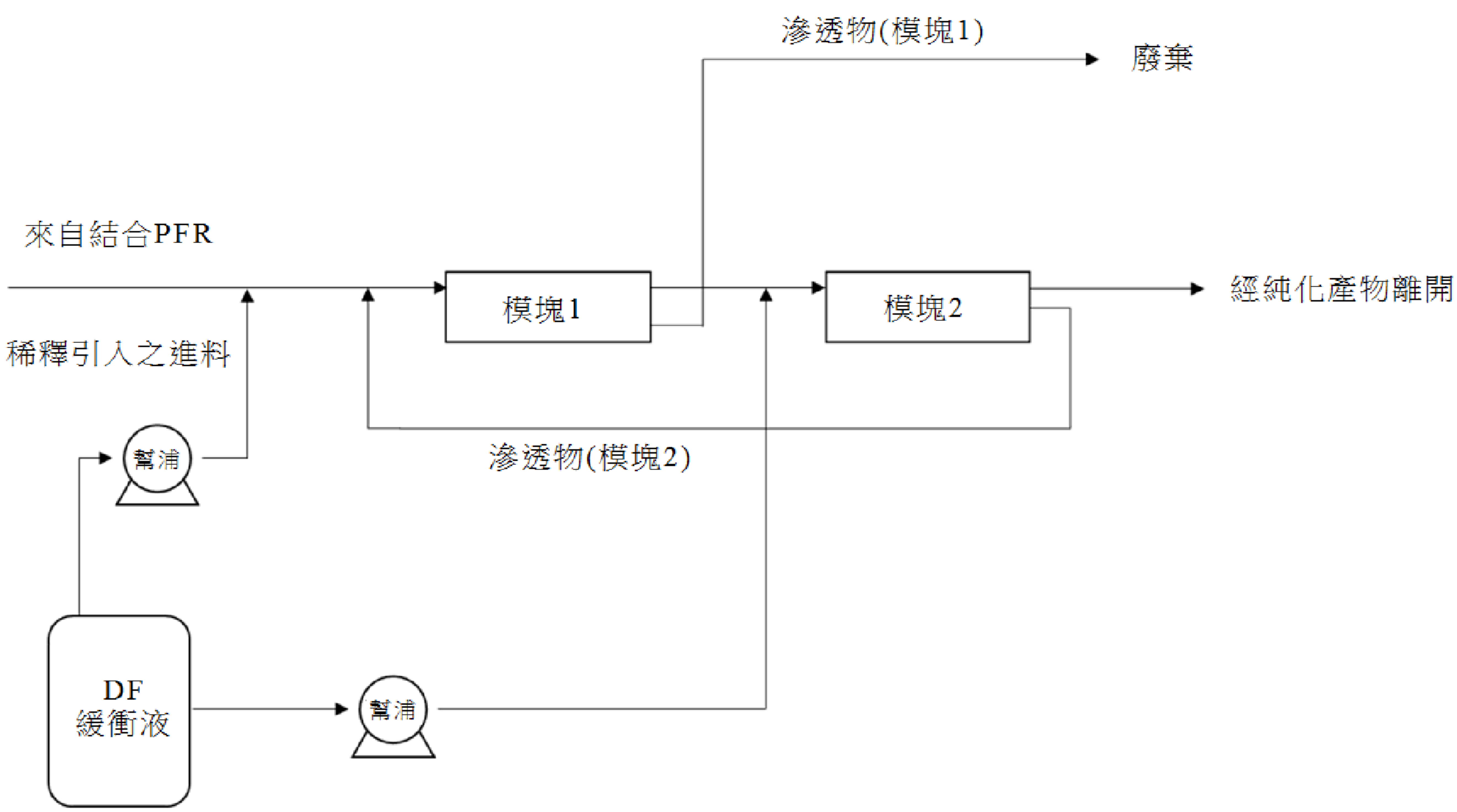
【圖 3】



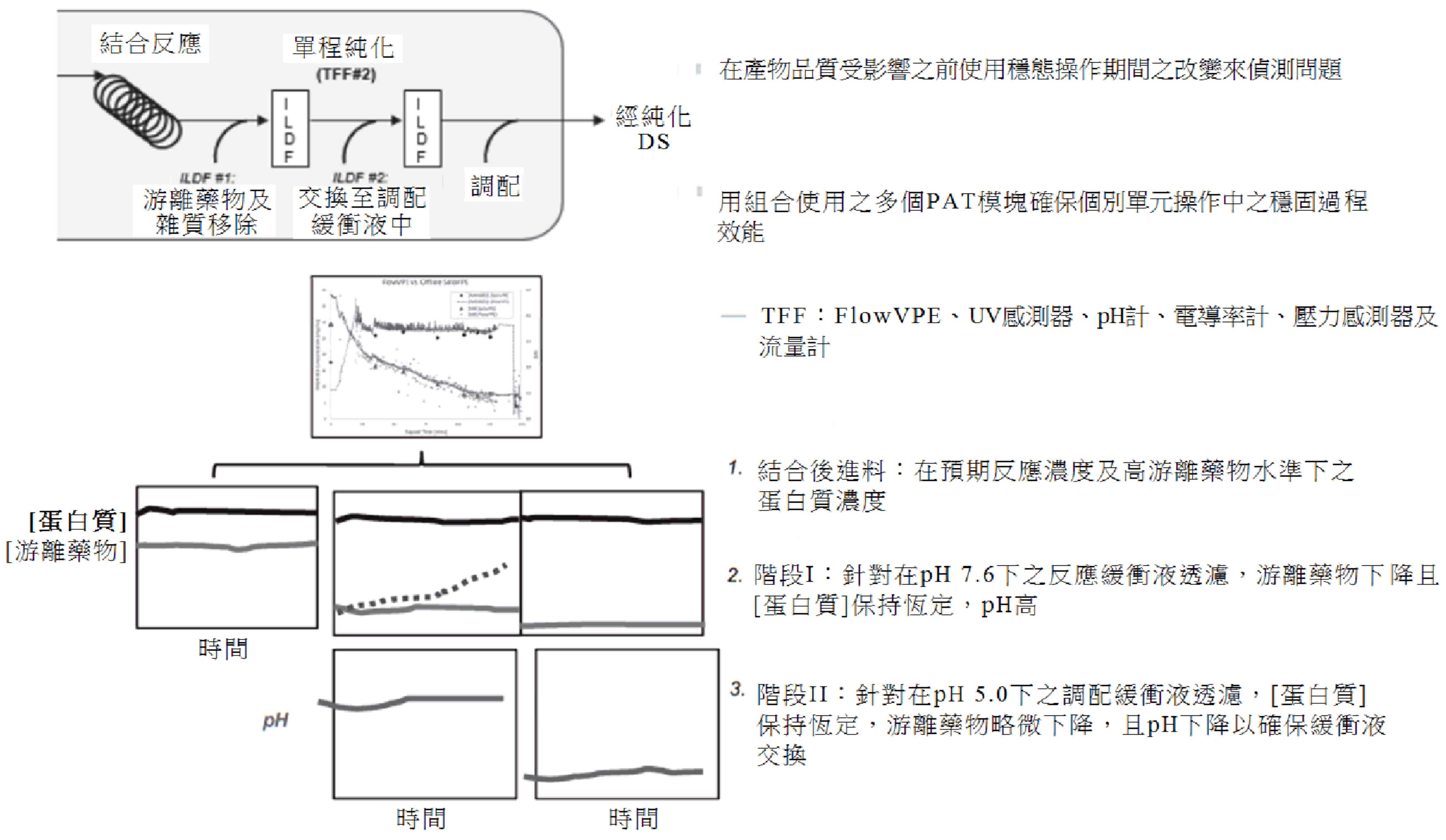
【圖 4】



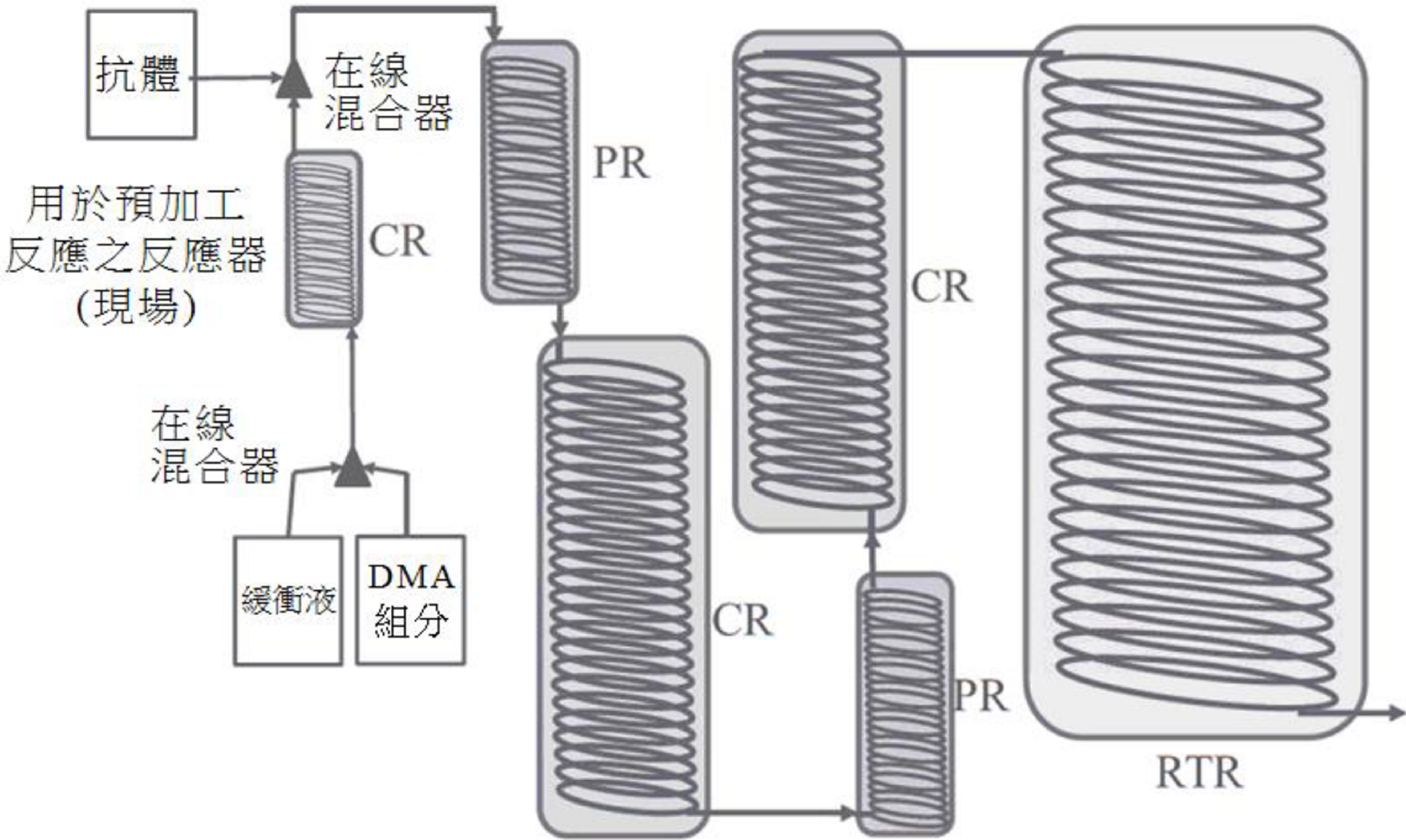
【圖 5】



【圖 6】



【圖 7】



【圖 8】

補充序列表

<110> 美商伊繆諾金公司( IMMUNOGEN, INC.)

<120> 製備細胞結合劑-藥物結合物之方法

<140> 109109506

<141> 2020-03-20

<150> 62/856,942

<151> 2019-06-04

<150> 62/821,707

<151> 2019-03-21

<160> 66

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 來源

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 1

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr Leu Ser

1 5 10

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 來源

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 2

Arg Val Asn Arg Leu Val Asp

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 來源

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 3

Leu Gln Tyr Asp Ala Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 來源

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 4

Ser Ser Ile Met His

1 5

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 來源

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 5

Tyr Ile Lys Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 來源

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 6

Glu Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Asp Thr Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 7

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 來源

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 7

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ile Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Lys Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Arg Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Asp Thr Met Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 8  
<211> 450  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成  
多肽」

<400> 8  
Gln Val GlnLeu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

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

Ile Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Tyr Ile Lys Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe  
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Arg Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Asp Thr Met Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
115 120 125

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

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

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Val | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val |  |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |  |
| Pro | Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His |  |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |
| Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys |  |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |
| Asp | Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly |  |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |
| Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met |  |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |
| Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His |  |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |  |
| Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val |  |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |  |
| His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr |  |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |  |
| Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly |  |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |  |
| Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile |  |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |  |
| Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val |  |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |  |
| Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Arg | Asp | Glu | Leu | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser |  |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |  |
| Leu | Thr | Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu |  |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |  |
| Trp | Glu | Ser | Asn | Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro |  |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |  |
| Val | Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val |  |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |  |
| Asp | Lys | Ser | Arg | Trp | Gln | Gln | Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met |  |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |  |
| His | Glu | Ala | Leu | His | Asn | His | Tyr | Thr | Gln | Lys | Ser | Leu | Cys | Leu | Ser |  |
|     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |  |
| Pro | Gly |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |

450

<210> 9  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
  
<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」  
  
<400> 9  
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 Ser Tyr  
                  20                  25                  30  
  
Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile  
          35                  40                  45  
  
Tyr Arg Val Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
          50                  55                  60  
  
Ser Gly Ser Gly Asn Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65                  70                  75                  80  
  
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Ala Phe Pro Tyr  
                  85                  90                  95  
  
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
          100                  105

<210> 10  
<211> 214  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
  
<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」  
  
<400> 10  
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 Ser Tyr  
                  20                  25                  30  
  
Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile  
          35                  40                  45  
  
Tyr Arg Val Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
          50                  55                  60  
  
Ser Gly Ser Gly Asn Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Glu | Asp | Phe | Ala | Thr | Tyr | Tyr | Cys | Leu | Gln | Tyr | Asp | Ala | Phe | Pro | Tyr |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Thr | Phe | Gly | Gln | Gly | Thr | Lys | Val | Glu | Ile | Lys | Arg | Thr | Val | Ala | Ala |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Pro | Ser | Val | Phe | Ile | Phe | Pro | Pro | Ser | Asp | Glu | Gln | Leu | Lys | Ser | Gly |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Thr | Ala | Ser | Val | Val | Cys | Leu | Leu | Asn | Asn | Phe | Tyr | Pro | Arg | Glu | Ala |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| 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> 11  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
  
<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」  
  
<400> 11  
Lys Ser Ser Gln Ser Val Phe Phe Ser Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu  
1 5 10 15

Ala

<210> 12  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
  
<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」  
  
<400> 12  
Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

15

<210> 13  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 13  
His Gln Tyr Leu Ser Ser Arg Thr  
15

<210> 14  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 14  
Ser Tyr Tyr Ile His  
15

<210> 15  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 15  
Val Ile Tyr Pro Gly Asn Asp Asp Ile Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Gln  
15105

Gly

<210> 16  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 16  
Glu Val Arg Leu Arg Tyr Phe Asp Val  
15

<210> 17  
<211> 118  
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 17  
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  
115

<210> 18  
<211> 447  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<220>  
<221> 變異體  
<222> (443)..(443)  
<223> /置換="Cys"

<220>  
<221> 位點  
<222> (1)..(447)  
<223> /註釋=「序列中給出之變異體殘基相對於針對變異體位置的註解中之彼等不具有偏好」

<400> 18  
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 |  |
|     |     |     | 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  
435 440 445

<210> 19  
<211> 113  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 19  
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

<210> 20  
<211> 219  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 20  
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> 21  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成  
肽」

<400> 21  
Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ser Gly Asp Ser Tyr Met Asn  
1 5 10 15

<210> 22  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成  
肽」

<400> 22  
Ala Ala Ser Asp Leu Glu Ser  
1 5

<210> 23  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成  
肽」

<400> 23  
Gln Gln Ser His Glu Asp Pro Phe Thr  
1 5

<210> 24  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成  
肽」

<400> 24  
Ser Tyr Trp Met His  
1 5

<210> 25  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成  
肽」

<400> 25  
Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
1 5 10 15  
  
Ser

<210> 26  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成  
肽」

<400> 26  
Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Pro Arg Gln Gly Phe Leu Asp Tyr  
1 5 10

<210> 27  
<211> 123  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成  
多肽」

<400> 27  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
1 5 10 15  
  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30  
  
Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
  
Gly Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe  
50 55 60  
  
Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Leu Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80  
  
Leu Gln Met Gly Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
  
Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Pro Arg Gln Gly Phe Leu Asp Tyr  
100 105 110  
  
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

第 13 頁(序列表)

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 115                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 120 |
| <div>&lt;210&gt; 28</div> <div>&lt;211&gt; 111</div> <div>&lt;212&gt; PRT</div> <div>&lt;213&gt; 人工序列(Artificial Sequence)</div> <div>&lt;220&gt;</div> <div>&lt;221&gt; 來源</div> <div>&lt;223&gt; /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」</div> <div>&lt;400&gt; 28</div> <div>Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly<br/>1 5 10 15</div> <div>Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ser<br/>20 25 30</div> <div>Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro<br/>35 40 45</div> <div>Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asp Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala<br/>50 55 60</div> <div>Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser<br/>65 70 75 80</div> <div>Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His<br/>85 90 95</div> <div>Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys<br/>100 105 110</div> |     |
| <div>&lt;210&gt; 29</div> <div>&lt;211&gt; 452</div> <div>&lt;212&gt; PRT</div> <div>&lt;213&gt; 人工序列(Artificial Sequence)</div> <div>&lt;220&gt;</div> <div>&lt;221&gt; 來源</div> <div>&lt;223&gt; /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」</div> <div>&lt;400&gt; 29</div> <div>Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly<br/>1 5 10 15</div> <div>Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr<br/>20 25 30</div> <div>Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val<br/>35 40 45</div> <div>Gly Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe<br/>50 55 60</div> <div>Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Leu Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr</div>                                                                                                                                                                                                |     |

|            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 65         |            |            |            |            | 70         |            |            |            |            | 75         |            |            |            |            | 80         |
| Leu        | Gln        | Met        | Gly        | Ser<br>85  | Leu        | Arg        | Ala        | Glu        | Asp<br>90  | Thr        | Ala        | Val        | Tyr        | Tyr<br>95  | Cys        |
| Ala        | Arg        | Gly        | Gly<br>100 | Tyr        | Tyr        | Tyr        | Tyr        | Pro<br>105 | Arg        | Gln        | Gly        | Phe        | Leu<br>110 | Asp        | Tyr        |
| Trp        | Gly        | Gln<br>115 | Gly        | Thr        | Thr        | Val        | Thr<br>120 | Val        | Ser        | Ser        | Ala        | Ser<br>125 | Thr        | Lys        | Gly        |
| Pro        | Ser<br>130 | Val        | Phe        | Pro        | Leu        | Ala<br>135 | Pro        | Ser        | Ser        | Lys        | Ser<br>140 | Thr        | Ser        | Gly        | Gly        |
| Thr<br>145 | Ala        | Ala        | Leu        | Gly        | Cys<br>150 | Leu        | Val        | Lys        | Asp        | Tyr<br>155 | Phe        | Pro        | Glu        | Pro        | Val<br>160 |
| Thr        | Val        | Ser        | Trp        | Asn<br>165 | Ser        | Gly        | Ala        | Leu        | Thr<br>170 | Ser        | Gly        | Val        | His        | Thr<br>175 | Phe        |
| Pro        | Ala        | Val<br>180 | Leu        | Gln        | Ser        | Ser        | Gly        | Leu<br>185 | Tyr        | Ser        | Leu        | Ser        | Ser<br>190 | Val        | Val        |
| Thr        | Val<br>195 | Pro        | Ser        | Ser        | Ser        | Leu        | Gly<br>200 | Thr        | Gln        | Thr        | Tyr        | Ile<br>205 | Cys        | Asn        | Val        |
| Asn<br>210 | His        | Lys        | Pro        | Ser        | Asn        | Thr<br>215 | Lys        | Val        | Asp        | Lys        | Arg<br>220 | Val        | Glu        | Pro        | Lys        |
| Ser<br>225 | Cys        | Asp        | Lys        | Thr        | His<br>230 | Thr        | Cys        | Pro        | Pro        | Cys<br>235 | Pro        | Ala        | Pro        | Glu        | Leu<br>240 |
| Leu        | Gly        | Gly        | Pro        | Ser<br>245 | Val        | Phe        | Leu        | Phe        | Pro<br>250 | Pro        | Lys        | Pro        | Lys        | Asp<br>255 | Thr        |
| Leu        | Tyr        | Ile<br>260 | Thr        | Arg        | Glu        | Pro        | Glu        | Val<br>265 | Thr        | Cys        | Val        | Val        | Val<br>270 | Asp        | Val        |
| Ser        | His<br>275 | Glu        | Asp        | Pro        | Glu        | Val        | Lys<br>280 | Phe        | Asn        | Trp        | Tyr        | Val<br>285 | Asp        | Gly        | Val        |
| Glu<br>290 | Val        | His        | Asn        | Ala        | Lys        | Thr<br>295 | Lys        | Pro        | Arg        | Glu        | Glu<br>300 | Gln        | Tyr        | Asn        | Ser        |
| Thr<br>305 | Tyr        | Arg        | Val        | Val        | Ser<br>310 | Val        | Leu        | Thr        | Val        | Leu<br>315 | His        | Gln        | Asp        | Trp        | Leu<br>320 |
| Asn        | Gly        | Lys        | Glu        | Tyr<br>325 | Lys        | Cys        | Lys        | Val        | Ser<br>330 | Asn        | Lys        | Ala        | Leu        | Pro<br>335 | Ala        |
| Pro        | Ile        | Glu        | Lys<br>340 | Thr        | Ile        | Ser        | Lys        | Ala<br>345 | Lys        | Gly        | Gln        | Pro        | Arg<br>350 | Glu        | Pro        |

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

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

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

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

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Cys  
435 440 445

Leu Ser Pro Gly  
450

<210> 30  
<211> 218  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 30  
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
1 5 10 15

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

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asp Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala  
50 55 60

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His  
85 90 95

Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Gln 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> 31  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成  
肽」

<400> 31  
Arg Ser Ser Arg Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Tyr  
1 5 10 15

<210> 32  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成  
肽」

<400> 32  
Gln Thr Ser Asn Leu Ala Ser  
1 5

<210> 33  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成  
肽」

<400> 33  
Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Asn Thr  
1 5

<210> 34  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
  
<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」  
  
<400> 34  
Asn Tyr Tyr Ile His  
1 5  
  
<210> 35  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
  
<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」  
  
<400> 35  
Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Val Tyr Ile Gln Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
1 5 10 15  
  
Gly  
  
<210> 36  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
  
<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」  
  
<400> 36  
Asp Gly Pro Trp Phe Ala Tyr  
1 5  
  
<210> 37  
<211> 116  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
  
<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」  
  
<400> 37  
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15  
  
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
20 25 30  
  
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Tyr Ile

354045

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Val Tyr Ile Gln Tyr Asn Glu Lys Phe  
505560

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

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

Ala Arg Asp Gly Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
100105110

Thr Val Ser Ser  
115

<210> 38  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 38  
Asp Ile Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly  
151015  
  
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Ser Leu Leu His Ser  
202530  
  
Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
354045  
  
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
505560  
  
Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65707580  
  
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn  
859095  
  
Leu Glu Leu Pro Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100105110

<210> 39  
<211> 445  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成

多肽」

<220>  
<221> 變異體  
<222> (441)..(441)  
<223> /置換=「Cys」  
  
<220>  
<221> 位點  
<222> (1)..(445)  
<223> /註釋=「序列中給出之變異體殘基  
相對於針對變異體位置的註解中之彼等  
不具有偏好」

<400> 39  
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1                  5                  10                  15  
  
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
          20                  25                  30  
  
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Tyr Ile  
          35                  40                  45  
  
Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Val Tyr Ile Gln Tyr Asn Glu Lys Phe  
  50                  55                  60  
  
Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr  
65                  70                  75                  80  
  
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
          85                  90                  95  
  
Ala Arg Asp Gly Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr 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> 40  
<211> 219  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 40  
Asp Ile Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |  |
| Gln | Pro | Ala | Ser | Ile | Ser | Cys | Arg | Ser | Ser | Arg | Ser | Leu | Leu | His | Ser |  |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |  |
| Asp | Gly | Phe | Thr | Tyr | Leu | Tyr | Trp | Phe | Leu | Gln | Lys | Pro | Gly | Gln | Ser |  |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |  |
| Pro | Gln | Leu | Leu | Ile | Tyr | Gln | Thr | Ser | Asn | Leu | Ala | Ser | Gly | Val | Pro |  |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |  |
| Asp | Arg | Phe | Ser | Ser | Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe | Thr | Leu | Lys | Ile |  |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |  |
| Ser | Arg | Val | Glu | Ala | Glu | Asp | Val | Gly | Val | Tyr | Tyr | Cys | Ala | Gln | Asn |  |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |  |
| Leu | Glu | Leu | Pro | Asn | 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> 41  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
  
<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」  
  
<400> 41  
Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala Gly Thr Ser Leu Met His  
1 5 10 15

<210> 42<211> 7<212> PRT<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220><221> 來源<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 42Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala15

<210> 43<211> 9<212> PRT<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220><221> 來源<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 43Gln Gln Ser Arg Glu Tyr Pro Tyr Thr15

<210> 44<211> 5<212> PRT<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220><221> 來源<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 44Gly Tyr Phe Met Asn15

<210> 45<211> 17<212> PRT<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220><221> 來源<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 45Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Gln151015

Gly

<210> 46<211> 9<212> PRT<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 來源

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 46

Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr

15

<210> 47

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 來源

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 47

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Phe Met Asn

1510

<210> 48

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 來源

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 48

Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe

1510

<210> 49

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 來源

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 49

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

151015

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

202530

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

354045

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

505560

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

65707580

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> 50  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 50  
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> 51  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 51  
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> 52  
<211> 448  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<220>  
<221> 變異體  
<222> (443)..(443)  
<223> /置換=「Ser」

<220>  
<221> 變異體  
<222> (448)..(448)  
<223> /置換=「」

<220>  
<221> 位點  
<222> (1)..(448)  
<223> /註釋=「序列中給出之變異體殘基相對於針對變異體位置的註解中之彼等不具有偏好」

<400> 52  
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<br>85  | Leu        | Thr        | Ser        | Glu        | Asp<br>90  | Phe        | Ala        | Val        | Tyr        | Tyr<br>95  | Cys        |  |
| Thr        | Arg        | Tyr        | Asp<br>100 | Gly        | Ser        | Arg        | Ala        | Met<br>105 | Asp        | Tyr        | Trp        | Gly        | Gln<br>110 | Gly        | Thr        |  |
| Thr        | Val        | Thr<br>115 | Val        | Ser        | Ser        | Ala        | Ser<br>120 | Thr        | Lys        | Gly        | Pro        | Ser<br>125 | Val        | Phe        | Pro        |  |
| Leu        | Ala<br>130 | Pro        | Ser        | Ser        | Lys        | Ser<br>135 | Thr        | Ser        | Gly        | Gly        | Thr<br>140 | Ala        | Ala        | Leu        | Gly        |  |
| Cys<br>145 | Leu        | Val        | Lys        | Asp        | Tyr<br>150 | Phe        | Pro        | Glu        | Pro        | Val<br>155 | Thr        | Val        | Ser        | Trp        | Asn<br>160 |  |
| Ser        | Gly        | Ala        | Leu        | Thr<br>165 | Ser        | Gly        | Val        | His        | Thr<br>170 | Phe        | Pro        | Ala        | Val        | Leu<br>175 | Gln        |  |
| Ser        | Ser        | Gly        | Leu<br>180 | Tyr        | Ser        | Leu        | Ser        | Ser<br>185 | Val        | Val        | Thr        | Val        | Pro<br>190 | Ser        | Ser        |  |
| Ser        | Leu        | Gly<br>195 | Thr        | Gln        | Thr        | Tyr        | Ile<br>200 | Cys        | Asn        | Val        | Asn        | His<br>205 | Lys        | Pro        | Ser        |  |
| Asn        | Thr<br>210 | Lys        | Val        | Asp        | Lys        | Lys<br>215 | Val        | Glu        | Pro        | Lys        | Ser<br>220 | Cys        | Asp        | Lys        | Thr        |  |
| His<br>225 | Thr        | Cys        | Pro        | Pro        | Cys<br>230 | Pro        | Ala        | Pro        | Glu        | Leu<br>235 | Leu        | Gly        | Gly        | Pro        | Ser<br>240 |  |
| Val        | Phe        | Leu        | Phe        | Pro<br>245 | Pro        | Lys        | Pro        | Lys        | Asp<br>250 | Thr        | Leu        | Met        | Ile        | Ser<br>255 | Arg        |  |
| Thr        | Pro        | Glu        | Val<br>260 | Thr        | Cys        | Val        | Val        | Val<br>265 | Asp        | Val        | Ser        | His        | Glu<br>270 | Asp        | Pro        |  |
| Glu        | Val        | Lys<br>275 | Phe        | Asn        | Trp        | Tyr        | Val<br>280 | Asp        | Gly        | Val        | Glu        | Val<br>285 | His        | Asn        | Ala        |  |
| Lys        | Thr<br>290 | Lys        | Pro        | Arg        | Glu        | Glu<br>295 | Gln        | Tyr        | Asn        | Ser        | Thr<br>300 | Tyr        | Arg        | Val        | Val        |  |
| Ser<br>305 | Val        | Leu        | Thr        | Val        | Leu<br>310 | His        | Gln        | Asp        | Trp        | Leu<br>315 | Asn        | Gly        | Lys        | Glu        | Tyr<br>320 |  |
| Lys        | Cys        | Lys        | Val        | Ser<br>325 | Asn        | Lys        | Ala        | Leu        | Pro<br>330 | Ala        | Pro        | Ile        | Glu        | Lys<br>335 | Thr        |  |
| Ile        | Ser        | Lys        | Ala<br>340 | Lys        | Gly        | Gln        | Pro        | Arg<br>345 | Glu        | Pro        | Gln        | Val        | Tyr<br>350 | Thr        | Leu        |  |
| Pro        | Pro        | Ser<br>355 | Arg        | Asp        | Glu        | Leu        | Thr<br>360 | Lys        | Asn        | Gln        | Val        | Ser<br>365 | Leu        | Thr        | Cys        |  |

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 Cys Leu Ser Pro Gly Lys  
435 440 445

<210> 53  
<211> 218  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 53  
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

|                                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|---------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 145                             |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Gly                             | Asn | Ser | Gln | Glu | Ser | Val | Thr | Glu | Gln | Asp | Ser | Lys | Asp | Ser | Thr |
|                                 |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Tyr                             | Ser | Leu | Ser | Ser | Thr | Leu | Thr | Leu | Ser | Lys | Ala | Asp | Tyr | Glu | Lys |
|                                 |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| His                             | Lys | Val | Tyr | Ala | Cys | Glu | Val | Thr | His | Gln | Gly | Leu | Ser | Ser | Pro |
|                                 |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Val                             | Thr | Lys | Ser | Phe | Asn | Arg | Gly | Glu | Cys |     |     |     |     |     |     |
|                                 | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <210> 54                        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <211> 218                       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <212> PRT                       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <213> 人工序列(Artificial Sequence) |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <220>                           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <221> 來源                        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <400> 54                        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 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> 55  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成  
肽」

<400> 55  
Ala Leu Ala Leu  
1

<210> 56  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成  
肽」

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223>  $\beta$ -Ala

<400> 56  
Xaa Leu Ala Leu  
1

<210> 57  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成  
肽」

<400> 57  
Gly Phe Leu Gly  
1

<210> 58  
<211> 4  
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223>  $\beta$ -Ala

<400> 58  
Xaa Gly Gly Gly  
1

<210> 59  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 59  
Gly Ser Gly Gly Ser  
1 5

<210> 60  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 60  
Gly Gly Gly Ser  
1

<210> 61  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 61  
Gly Gly Ser Gly  
1

<210> 62  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<221> 來源

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 62  
Gly Gly Ser Gly Gly  
1 5

<210> 63  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 63  
Gly Ser Gly Ser Gly  
1 5

<210> 64  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 64  
Gly Ser Gly Gly Gly  
1 5

<210> 65  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 65  
Gly Gly Gly Ser Gly  
1 5

<210> 66  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 66  
Gly Ser Ser Ser Gly  
1 5