



## (19) 中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201609152 A

(43)公開日：中華民國 105(2016)年 03 月 16 日

(21)申請案號：104128984

(22)申請日：中華民國 104(2015)年 09 月 02 日

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

A61K39/395 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30) 優先權 : 2014/09/03 美國 62/045,264

2014/12/03 美國 62/086 986

2015/04/17 美國 62/149 379

2015/06/29 美國 62/186,235

(7)申請人：兔疫原公司(美國)IMMUNOGEN INC. (US)

美國

(72)發明人：哈利思 路克 B HARRIS, LUKE B. (CA)；塔法瑞 丹尼爾 TAVARES, DANIEL (US)；路林元 RUI, LINGYUN (CN)；費雪金 納森 艾利特 FISHKIN, NATHAN ELLIOTT (US)；席斯卡 馬納迷 SHIZUKA, MANAMI (US)；米勒 麥克 路易斯 MILLER, MICHAEL LOUIS (US)；洽里 拉維 V J CHARI, RAVI V. J. (US)

(74)代理人：閻啟泰；林景郁

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：169 項 圖式數：31 共 398 頁

(54)名稱

## 包含細胞結合劑及細胞毒性劑之偶聯物

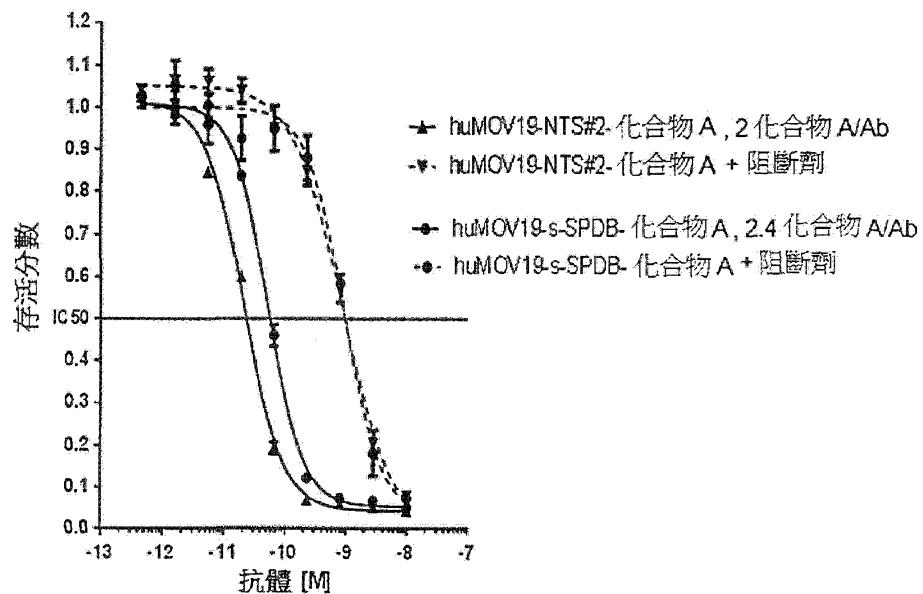
# CONJUGATES COMPRISING CELL-BINDING AGENTS AND CYTOTOXIC AGENTS

### (57)摘要

本發明係關於新穎的細胞結合劑-細胞毒性劑偶聯物，其中該細胞結合劑(CBA)經由自該CBA上2-羥基乙胺部分之氧化得到的醛基共價連接至該細胞毒性劑。本發明亦提供製備本發明之偶聯物之方法。本發明進一步提供可用於使用本發明之偶聯物在哺乳動物中抑制異常細胞生長或治療增生性病症的組成物及方法。

The invention relates to novel cell-binding agent-cytotoxic agent conjugates, wherein the cell-binding agent (CBA) is covalently linked to the cytotoxic agent through an aldehyde group obtained from oxidation of a 2-hydroxyethylamine moiety on the CBA. The invention also provides methods of preparing the conjugates of the present invention. The invention further provides composition and methods useful for inhibiting abnormal cell growth or treating a proliferative disorder in a mammal using the conjugates of the invention.

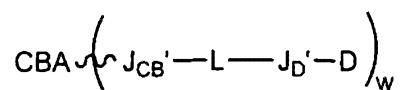
### 指定代表圖：



治療 Ab IC50	無阻斷劑	阻斷劑
huMOV19-NTS#2-化合物 A	2e-11 M	1e-9 M
huMOV19-s-SPDB 化合物 A	6e-11 M	1e-9 M

圖 9A

特徵化學式：



# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

## 【發明名稱】(中文/英文)

包含細胞結合劑及細胞毒性劑之偶聯物

CONJUGATES COMPRISING CELL-BINDING AGENTS AND  
CYTOTOXIC AGENTS

## 相關申請案之引用

【0001】 本申請案依據 35 U.S.C. §119(e)要求在 2014 年 9 月 3 日提交之美國臨時申請案號 62/045,264、2014 年 12 月 3 日提交之美國臨時申請案號 62/086,986、2015 年 4 月 17 日提交之美國臨時申請案號 62/149,379 及 2015 年 6 月 29 日提交之美國臨時申請案號 62/186,235 之提交日之權益，各案之完整內容，包括所有附圖、化學式、說明書及申請專利範圍，均以引用之方式併入本文中。

## 【發明背景】

【0002】 抗體-藥物偶聯物(ADC)及細胞結合劑-藥物偶聯物係作為對多種癌症具有功效的一類有效抗腫瘤劑而出現。細胞結合劑-藥物偶聯物(諸如 ADC)常常由三種不同成分構成：細胞結合劑(例如抗體)；連接子；及細胞毒性部分。通常，細胞毒性藥物部分係共價附接至抗體上之離胺酸，產生偶聯物，該等偶聯物為在抗體分子上不同位置處附接不同數量藥物之



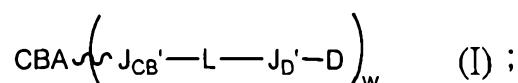
ADC 的非均質混合物。

### 【發明概述】

**【0003】** 意外地發現，細胞結合劑(諸如抗體)上之 N 末端絲氨酸殘基的 2-羥基乙胺部分可選擇性氧化成醛基，同時抗體不會過度氧化。所得到的具有醛基之抗體能夠與具有醛反應性基團之細胞毒性藥物或經由具有醛反應性基團之連接子化合物進行位點特異性偶聯。所得抗體-藥物偶聯物意外地保持與未偶聯抗體類似之抗原結合親和力，不過事實上，偶聯位點係位於抗體之 N 末端。此外，所得偶聯物儘管每個抗體僅連接有兩個分子之藥物負載，但出乎意料地展現出高效力，且耐受性優於離胺酸連接之偶聯物。

**【0004】** 在某些實施例中，該細胞結合劑，諸如抗體，係經由肟鍵聯(-C=N-O-)共價連接至細胞毒性劑。意外的是，相比最近公開之發現(參見 Agarwal 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110:46-51, 2013)，肟鍵聯在活體內具有高度穩定性。

**【0005】** 本發明提供一種由以下結構式表示之細胞結合劑-細胞毒性劑偶聯物：

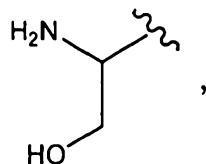


或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

CBA 係共價連接至  $\text{J}_{\text{CB}'}$  基團之細胞結合劑；

$\text{J}_{\text{CB}'}$  係藉由使該 CBA 上之醛基與連接至基團 L 之醛反應性基團反應所形成的部分，其中該醛基係衍生自由以下結構式表示之 2-羥基乙胺部分的

氧化：



其中該 2-羥基乙胺部分係絲氨酸、蘇氨酸、羥基離氨酸、4-羥基鳥氨酸或 2,4-二胺基-5-羥基戊酸殘基之一部分；

L 係間隔子或鍵；

$J_D'$  係將該細胞毒性劑 D 與基團 L 連接之連接部分，或當 L 係鍵時不存在；

D 係經由該連接部分  $J_D'$  共價連接至 L 或當 L 係鍵時經由  $J_{CB'}$  連接至 CBA 之細胞毒性劑；且

w 係 1、2、3 或 4。

**【0006】** 本發明亦提供一種重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分，其包含具有 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列的異源信號肽。

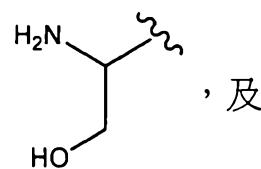
**【0007】** 本發明進一步提供一種重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分，其包含緊鄰該重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分之信號肽之最後一個殘基之 C 末端的 Ser 或 Thr 殘基。

**【0008】** 亦提供一種經修飾抗體，其係由在該重鏈、輕鏈或其抗原結合部分之成熟加工序列上具有 N 末端 Ser 或 Thr 的抗體氧化得到，其中在該經修飾抗體中，該 N 末端 Ser 或 Thr 已氧化成醛基。

**【0009】** 本發明亦包括編碼本文所描述之重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分的多聚核苷酸及產生本文所描述之重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分的方法。

【0010】 在一個實施例中，本發明係針對一種製備細胞結合劑-細胞毒性劑偶聯物之方法，該方法包括以下步驟：

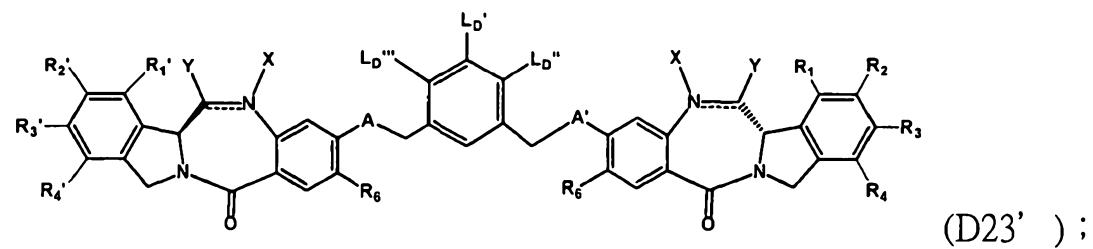
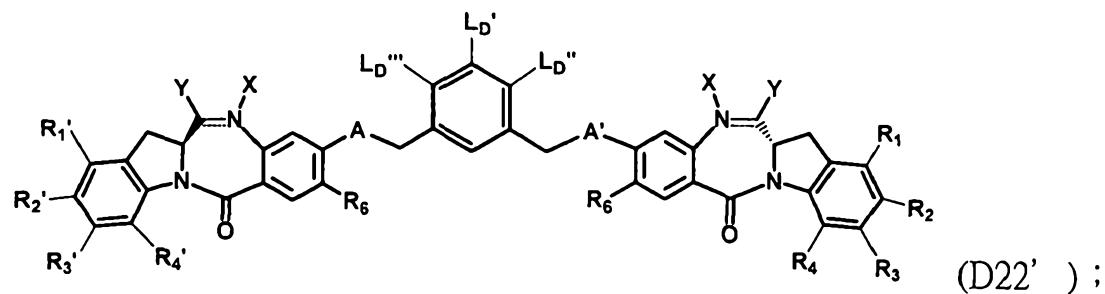
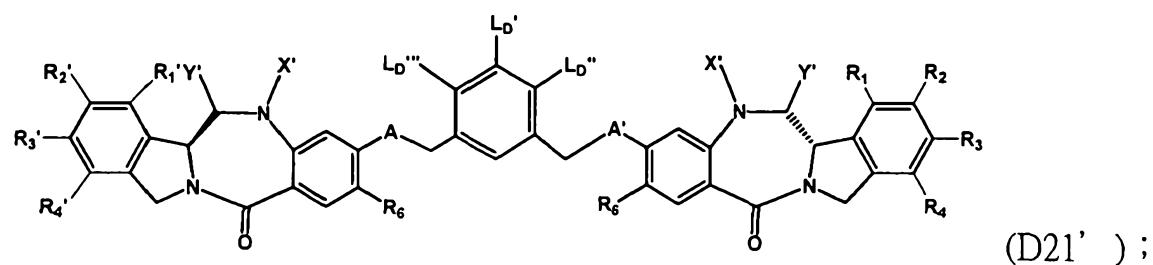
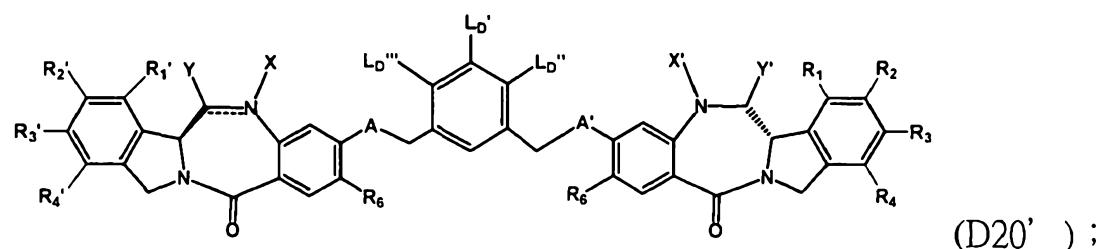
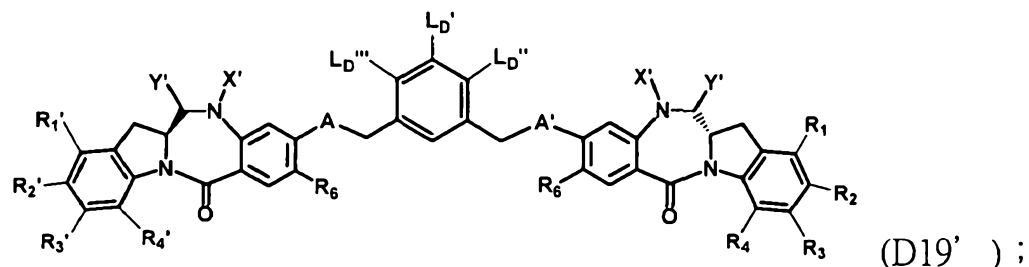
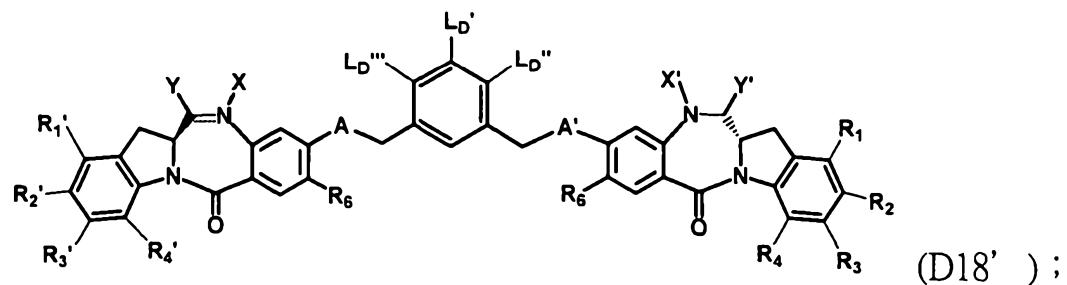
(a) 用氧化劑將細胞結合劑之 2-羥基乙胺部分氧化以形成具有醛基之經氧化細胞結合劑；其中該 2-羥基乙胺部分為絲氨酸、蘇氨酸、羥基離氨酸、4-羥基鳥氨酸或 2,4-二胺基-5-羥基戊酸殘基之一部分，且由以下結構式表示：



(b) 使該經氧化細胞結合劑：

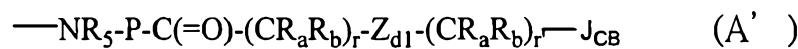
- (i) 與具有醛反應性基團之細胞毒性劑-連接子化合物或具有醛反應性基團之細胞毒性劑接觸，由此形成該細胞結合劑-細胞毒性劑偶聯物；或
- (ii) 與具有醛反應性基團之連接子化合物接觸，由此形成與連接子結合之經修飾抗體或其經修飾抗原結合部分，隨後使該經修飾抗體或其經修飾抗原結合部分與細胞毒性劑反應，以形成該細胞結合劑-細胞毒性劑偶聯物；或
- (iii) 與細胞毒性劑接觸，隨後添加具有醛反應性基團及可與該細胞毒性劑形成共價鍵之反應性基團的連接子化合物，以形成該細胞結合劑-細胞毒性劑偶聯物。

【0011】 在一個實施例中，本發明係針對一種由下式表示之細胞毒性化合物：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

$L_D'$ 、 $L_D''$  及  $L_D'''$  之一係由下式表示：



且其餘兩個相同或不同，且獨立地選自-H；視情況經取代的具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；聚乙二醇單元-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>；鹵素；胍鎓[-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；疊氨基；-COR' ；-OCOR' ；及-OCONR' R' '；  
 $Z_{d1}$  為不存在、-C(=O)-NR<sub>9</sub>-或 - NR<sub>9</sub>-C(=O)-；  
 $P$  為胺基酸殘基或含有介於 2 至 20 個之間之胺基酸殘基的肽；  
 $R_a$  及  $R_b$  在每次出現時獨立地為 - H、(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基或帶電荷之取代基，或可離子化之基團 Q；  
 $r$  及  $r'$  獨立地為 1 至 6 之整數；

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

Y 為選自以下之離去基團：-OR、-OCOR' 、-OCOOR' 、-OCONR' R' '、-NR' R' '、-NR' COR' '、-NR' NR' R' '、視情況經取代之 5 脫或 6 脫含氮雜環(例如，經由氮原子附接之哌啶、四氫吡咯、吡唑、嗎啉等)、由-NR' (C=NH)NR' R' ' 表示之胍鎓、胺基酸或由-NRCOP' 表示之肽、-SR、-SOR' 、鹵素、氰基、疊氨基、-OSO<sub>3</sub>H、亞硫酸酯基(-SO<sub>3</sub>H 或-SO<sub>2</sub>H)、偏亞硫酸酯(H<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)、單-、二-、三-及四-硫代磷酸酯(PO<sub>3</sub>SH<sub>3</sub>、PO<sub>2</sub>S<sub>2</sub>H<sub>2</sub>、POS<sub>3</sub>H<sub>2</sub>、PS<sub>4</sub>H<sub>2</sub>)、硫代磷酸酯(R<sup>i</sup>O)<sub>2</sub>PS(OR<sup>i</sup>)、R<sup>i</sup>S-、R<sup>i</sup>SO、R<sup>i</sup>SO<sub>2</sub>、R<sup>i</sup>SO<sub>3</sub>、硫代硫酸酯(HS<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)、連二亞硫酸酯(HS<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)、二硫代磷酸酯

(P(=S)(OR<sup>k</sup>)(S)(OH))、羥肟酸(R<sup>k</sup>C(=O)NOH)及甲醛次硫酸根(HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>)，或其混合物，其中 R<sup>i</sup> 為具有 1 至 10 個碳原子之直鏈或分支鏈烷基，且經至少一個選自-N(R)<sub>2</sub>、-CO<sub>2</sub>H、-SO<sub>3</sub>H 及-PO<sub>3</sub>H 之取代基取代；R<sup>j</sup> 可進一步視情況經本文關於烷基所描述之取代基取代；R<sup>j</sup> 為具有 1 至 6 個碳原子之直鏈或分支鏈烷基；R<sup>k</sup> 為具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基、芳基、雜環基或雜芳基；

P' 為胺基酸殘基或含有介於 2 至 20 個之間之胺基酸殘基的肽；

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

R' 及 R'' 各自獨立地選自-H；-OH；-OR；-NHR；-NR<sub>2</sub>；-COR；視情況經取代的具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；聚乙二醇單元-(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 1 至 6 個獨立地選自 O、S、N 及 P 之雜原子的 3 賡至 18 賡雜環；

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；

n 為 1 至 24 之整數；

X' 係選自-H；胺保護基；視情況經取代的具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；聚乙二醇單元-(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一個或多個

獨立地選自氮、氧及硫之雜原子的 5 員至 18 員雜芳基環；及視情況經取代的含有 1 至 6 個獨立地選自 O、S、N 及 P 之雜原子的 3 員至 18 員雜環；

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

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>1</sub>'、R<sub>2</sub>'、R<sub>3</sub>' 及 R<sub>4</sub>' 各自獨立地選自由以下各物組成之群：-H；視情況經取代的具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；聚乙二醇單元 -(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>；鹵素；胍鎘 [-NH(C=NH)NH<sub>2</sub>]；-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；疊氨基；-COR'；-OCOR'；及-OCONR' R'；

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

A 與 A' 相同或不同，且獨立地選自-O-、側氨基(-C(=O)-)、-CRR' O-、-CRR' -、-S-、-CRR' S-、-NR<sub>5</sub>及-CRR' N(R<sub>5</sub>)-；

R<sub>5</sub>及 R<sub>9</sub>各自獨立地為-H，或視情況經取代的具有 1 至 10 個碳原子之直鏈或分支鏈烷基；

J<sub>CB</sub>係醛反應性基團。

**【0012】** 本發明中亦包括一種醫藥組成物，其包含式(I)之偶聯物或式(D18')-(D23')之細胞毒性化合物或其醫藥學上可接受之鹽，及醫藥學上可接受之載劑。

**【0013】** 該醫藥組成物可進一步包括第二治療劑(例如化學治療劑)。

**【0014】** 本發明亦包括一種在哺乳動物(例如人類)中抑制異常細胞生長或治療增生性病症、破壞性骨病、自體免疫病症、移植植物抗宿主疾病、移植排斥反應、免疫缺陷、炎症性疾病、感染性疾病、病毒疾病、纖維化疾病、神經退化性病症、胰腺炎或腎病之方法，該方法包括向該哺乳動物施用治療有效量的式(I)之偶聯物或式(D18')-(D23')表示之細胞毒性化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

**【0015】** 在一相關實施例中，上述方法進一步包括向該哺乳動物依序或連續施用第二治療劑(例如化學治療劑)。

#### **【圖式簡單說明】**

**【0016】** 圖 1 顯示了使用工程改造的含 N 末端 Ser 之人類化單株抗體 huMOV19-NTS#2 合成 huMOV19-NTS#2-連接子 1-化合物 A ADC 的方案 1。

**【0017】** 圖 2 為完整 huMOV19-NTS#2-連接子 1-化合物 A 之 Q-ToF 質譜(MS)資料。很明顯，反應產物係每個抗體併有兩個化合物 A 分子之均質 ADC。

**【0018】** 圖 3 顯示了使用工程改造的含 N 末端 Ser 之人類化單株抗體 huMOV19-NTS#2 合成 huMOV19-NTS#2-胺氨基-乙醯基-MayNMA ADC 的方案 2。

**【0019】** 圖 4 為完整 huMOV19-NTS#2-胺氨基-乙醯基-MayNMA 之 Q-ToF 質譜(MS)資料。很明顯，反應產物係每個抗體併有兩個 MayNMA 分子之均質 ADC。

**【0020】** 圖 5 顯示了使用工程改造的含 N 末端 Ser 之人類化單株抗體(例如 huMOV19-NTS#1)合成抗體(諸如 huMOV19-NTS#1)-連接子 1-化合物 A

ADC 的方案 3。

**【0021】** 圖 6 顯示了完整 huMOV19-NTS#1-連接子 1-化合物 A 之 Q-ToF 質譜(MS)資料。

**【0022】** 圖 7A 證實，N 末端 Ser 特異性偶聯不會明顯地影響抗體與抗原之結合。huMOV19-NTS#2-MayNMA (或 SeriMab-May) 及 huMOV19-NTS#2-化合物 A (或 SeriMab-sDGN462) 為包含分別經由工程改造之 N 末端 Ser 殘基連接至類美登素及細胞毒性化合物 A (或礦酸化 DGN462 (sDGN462)) 之人類化 IgG 單株抗體 huMOV19 的 ADC。藉由 FACS 偵測結合至 T47D 表面上任何 ADC (或對照 Ab) 的 FITC 偶聯之山羊抗人類 IgG-Fc  $\gamma$  二次抗體來量測 T47D (亦即，該表面上之 FR  $\alpha$  抗原) 與 ADC (或對照抗體或 FACS 緩衝液對照物) 之間的結合。

**【0023】** 圖 7B 顯示了 huMOV19-NTS#2-連接子 1-化合物 A 與表現 FR  $\alpha$  抗原之 T47D 細胞的 FACS 結合資料。離胺酸裝載之 huMOV19-sSPDB-化合物 A 與 N 末端修飾之 huMOV19-NTS#2-連接子 1-化合物 A 具有類似之細胞結合，該結合亦類似於未偶聯之天然 huMOV19 及工程改造之 huMOV19-NTS#2 的細胞結合(參見表中的 EC<sub>50</sub> 值)。

**【0024】** 圖 8A 顯示，N 末端 Ser 特異性修飾或偶聯不會明顯地影響抗體與抗原之結合。如以上圖 7A 及 7B 中所示，如藉由 FACS 所量測，野生型抗 FR  $\alpha$  抗體 huMOV19、其 N 末端 Ser 修飾形式 huMOV19-NTS#2 (「SeriMab」)，及其各自與類美登素之偶聯物，即 Ab-SMCC-DM1 (野生型 huMOV19 之離胺酸殘基經由 SMCC 連接子連接至 DM1) 及 SeriMab-May (huMOV19-NTS#2 經由工程改造之 N 末端 Ser 連接至類美登素)，與帶有 FR  $\alpha$

之 T47D 細胞具有基本上相同之結合親和力。

**【0025】** 圖 8B 顯示，N 末端 Ser 特異性修飾或偶聯不會明顯地影響抗體與抗原之結合。如以上圖 7A 及 7B 中所示，如藉由 FACS 所量測，野生型抗 FR $\alpha$  抗體 huMOV19、其 N 末端 Ser 修飾形式 huMOV19-NTS#2 (「SeriMab」)及其與細胞毒性化合物 A 之偶聯物(SeriMab-sDGN462)與帶有 FR $\alpha$  之 T47D 細胞具有基本上相同之結合親和力。

**【0026】** 圖 9A 顯示出 ADC 偶聯物 MOV19-NTS#2-連接子 1-化合物 A 對 KB 子宮頸細胞株之細胞毒性之評估的結果。資料顯示，本發明之位點特異性 N 末端 Ser 連接之 SERIMab-化合物 A 偶聯物的效力以抗體濃度計為離胺酸偶聯之 sSPDB-化合物 A 的約 3 倍，且以化合物 A 之濃度計為約 5 倍。兩種偶聯物具有相同的不依賴於抗原之活性，因為在 1  $\mu\text{M}$  未偶聯之 huMOV19 存在下，該兩種所測試之偶聯物阻斷 KB 細胞上之抗原結合位點的效力大致相同。

**【0027】** 圖 9B 顯示出 ADC 偶聯物 SeriMab-May 對 KB 子宮頸細胞株之細胞毒性之評估的結果。資料顯示，SeriMab-May 偶聯物在較高 DAR(細胞毒性化合物與抗體比率)下具有與離胺酸偶聯物 Ab-SMCC-DM1 相同之效力。

**【0028】** 圖 10 及 11 顯示出可用於製備本發明之偶聯物的示例性細胞毒性化合物。

**【0029】** 圖 12A-12D 顯示出用於製備本發明之偶聯物的示例性方案。

**【0030】** 圖 13 顯示了在帶有 NCI-H2110 之 SCID 小鼠中 huMOV19-NTS#2-連接子 1-化合物 A 之活體內功效。

**【0031】** 圖 14A 顯示了具有二硫化物連接子之 SeriMab-sDGN462 偶聯物的結構。虛線指示產生所觀察之靶細胞分解代謝物的裂解位點之位置。圖 14B 顯示了在 KB 子宮頸癌細胞中活體外形成之 SeriMab-sDGN462 偶聯物之分解代謝物的孵育、純化及分離方案。顯示出由 LC-MS 鑑別之四種分解代謝物以及  $m/z$  比率之計算值及觀測值。

**【0032】** 圖 15A 顯示了具有不可裂解連接子之 SeriMab-May 偶聯物的結構。虛線指示產生所觀察之靶細胞分解代謝物的裂解位點之位置。圖 15B 顯示了在 KB 子宮頸癌細胞中活體外形成之 SeriMab-May 偶聯物的分解代謝物的孵育、純化及分離方案。顯示出由 LC-MS 鑑別之兩種分解代謝物以及  $m/z$  比率之計算值及觀測值。

**【0033】** 圖 16 顯示了有關 SeriMab-sDGN462 及相應 Lys 連接之 Ab-sSPDB-sDGN462 偶聯物之旁觀者殺滅分析(bystander killing assay)的結果。

**【0034】** 圖 17 顯示了使用工程改造的含 N 末端 Ser 之人類化單株抗體合成 huCD123-sD8 偶聯物之示例性方案。

**【0035】** 圖 18 顯示了用於合成帶有連接子 1 殘基之 huCD123-6-SeriMab-sD1 偶聯物的示例性方案。

**【0036】** 圖 19 顯示了用於合成 huMOV19NTS2S3-SeriMab-DGN462 偶聯物或具有 4 DAR 之 huMOV19NTS2S3-SeriMab-sDGN462 偶聯物(huMov19NTS2S3-SeriMab-sDGN462)之示例性方案，該偶聯物帶有連接子 1 殘基。

**【0037】** 圖 20 顯示了具有 4 DAR 之 huMOV19NTS2S3-SeriMab-sDGN462 偶聯物

(huMov19NTS2S3-SeriMab-sDGN462)的 Q-ToF 質譜(MS)資料。

**【0038】** 圖 21A 顯示了用於合成具有 4 DAR 之 huMOV19NTS2S3-SeriMab-MayNMA 偶聯物的示例性方案。圖 21B 顯示了具有 4 DAR 之 Ser 連接之 huMOV19-SeriMab-MayNMA 偶聯物的 Q-ToF 質譜(MS) 資料。

**【0039】** 圖 22A-22C 顯示，在 AML 細胞株 SHI-1 (圖 22A) 及 HNT-34 (圖 22B)，以及 CML 細胞株 MOLM-1 (圖 22C) 中，huCD123-6 (huCD123-6Rv1.1S2-SeriMab-D8，實心黑色圓圈) 中之 SeriMab 的活性至少與同一抗體之離胺酸連接之偶聯物(huCD123-6Rv1.1-D2，實心黑色三角形)相同。在每個圖中連接空心資料點之虛線曲線表示在阻斷濃度(500 nM)之未偶聯 huCD123-6 抗體存在下對應偶聯物(亦即，huCD123-6Rv1.1S2-SeriMab-D8 為空心圓圈，及 huCD123-6Rv1.1-D2 為空心倒三角形)之活性。有關 Lys 連接之抗體-D2 偶聯物之結構，參見實例 28 (示出 huMOV19-D2 結構，而且 huCD123-6Rv1.1-D2 偶聯物具有相同結構)。

**【0040】** 圖 23 顯示，N 末端 Ser 特異性修飾或偶聯不會明顯地影響抗體與抗原之結合。如藉由 FACS 所量測，野生型抗 FR  $\alpha$  huMOV19 抗體、其 N 末端 Ser 修飾形式 huMOV19-NTS2 (「huMOV19-SeriMab 抗體」) 及其與細胞毒性化合物 D8 之偶聯物(huMOV19-SeriMab-D8)與帶有 FR  $\alpha$  之 T47D 細胞具有基本上相同之結合親和力。

**【0041】** 圖 24 顯示，huCD123-6Gv4.7S3-SeriMab-sD1 偶聯物(參見圖 18)在 EOL-1 細胞中顯示出與 huCD123-6Gv4.7S2(或 S3)-SeriMab-D8 偶聯物類似的效力。亦示出了 Lys 連接之 huCD123-6Gv4.7S3-sSPDB-D1 及

huCD123-6Gv4.7S3-D2 偶聯物之結果。

【0042】 圖 25 顯示了在較高 DAR 下，經 Ser 連接 huCD123 抗體之 DGN462 化合物針對 EOL-1 細胞的抗原特異性效力為離胺酸連接形式之 3 倍。

【0043】 圖 26A-26C 顯示，SeriMab-D8 (huMOV19-NTS#2-SeriMab-D8) 偶聯物具有與離胺酸偶聯物(huMOV19-D2)類似的抗原特異性效力及靶結合。

【0044】 圖 27 顯示了有關 huMOV19-SeriMab-D8 及相應 Lys 連接之 huMOV19-D2 偶聯物之旁觀者殺滅分析的結果。

【0045】 圖 28 顯示了在 huMOV19-NTS#2-胺氨基-乙醯基 MayNMA 偶聯物中肟鍵聯之活體內穩定性。

【0046】 圖 29 顯示了用 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  或 150  $\mu\text{g}/\text{kg}$  離胺酸連接之 huMOV19-D2 偶聯物或者 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  huMOV19-SeriMab-D8 處理之雌性 CD-1 小鼠之個體體重變化百分比。

【0047】 圖 30 顯示了用於合成本發明之偶聯物之示例性方案。

【0048】 圖 31A 及 31B 顯示了用於合成本發明之偶聯物的示例性方案。

### 【發明詳述】

【0049】 現將更詳細地提及本發明某些實施例，其實例以所附結構及化學式說明。儘管本發明將結合所列舉之實施例進行描述，但應瞭解，其不意欲將本發明局限於該等實施例。正相反，本發明意欲涵蓋可包括在由申請專利範圍所界定之本發明之範圍內的所有替代方案、修改及等效內

容。熟習此項技術者將認識到與本文所描述之方法及材料類似或等效的許多方法及材料，其可用於實踐本發明。

**【0050】** 應瞭解，除非清楚地否定或不恰當，否則本文所描述之任何實施例，包括在本發明不同態樣及本說明書不同部分(包括僅在實例中描述之實施例)下描述之該等實施例(例如化合物、偶聯物、組成物、製備及使用方法)可與本發明之一個或多個其他實施例組合。實施例組合不限於經由多個附屬申請專利範圍要求之該等具體實施例。

### 定義

**【0051】** 如本文所使用，「直鏈或分支鏈烷基」係指具有一至二十個碳原子之飽和直鏈或分支鏈單價烴基。烷基之實例包括但不限於，甲基、乙基、1-丙基、2-丙基、1-丁基、2-甲基-1-丙基、-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、2-丁基、2-甲基-2-丙基、1-戊基、2-戊基、3-戊基、2-甲基-2-丁基、3-甲基-2-丁基、3-甲基-1-丁基、2-甲基-1-丁基、1-己基、2-己基、3-己基、2-甲基-2-戊基、3-甲基-2-戊基、4-甲基-2-戊基、3-甲基-3-戊基、2-甲基-3-戊基、2,3-二甲基-2-丁基、3,3-二甲基-2-丁基、1-庚基、1-辛基及類似基團。較佳地，烷基具有  
一至十個碳原子。更佳地，烷基具有一至四個碳原子。

**【0052】** 「直鏈或分支鏈烯基」係指具有兩個至二十個碳原子及至少一個不飽和位點(亦即，碳-碳雙鍵)之直鏈或分支鏈單價烴基，其中烯基包括具有「順式」及「反式」取向，或替代地具有「E」及「Z」取向之基團。  
實例包括但不限於，乙烯基(-CH=CH<sub>2</sub>)、丙烯基(-CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>)及類似基團。  
較佳地，烯基具有兩個至十個碳原子。更佳地，烯基具有兩個至四個碳原子。

**【0053】** 「直鏈或分支鏈炔基」係指具有兩個至二十個碳原子及至少一個不飽和位點(亦即，碳-碳參鍵)之直鏈或分支鏈單價烴基。實例包括但不限於，乙炔基、丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、1-戊炔基、2-戊炔基、3-戊炔基、己炔基及類似基團。較佳地，炔基具有兩個至十個碳原子。更佳地，炔基具有兩個至四個碳原子。

**【0054】** 術語「碳環」、「碳環基」及「碳環狀環」係指具有 3 至 12 個碳原子(單環形式)或具有 7 至 12 個碳原子(雙環形式)的單價非芳族飽和或部分不飽和環。具有 7 至 12 個碳原子之雙環碳環可例如按雙環[4,5]、[5,5]、[5,6]或[6,6]系統形式佈置，且具有 9 或 10 個環原子之雙環碳環可按雙環[5,6]或[6,6]系統形式佈置，或按橋接系統形式佈置，諸如雙環[2.2.1]庚烷、雙環[2.2.2]辛烷及雙環[3.2.2]壬烷。單環碳環之實例包括但不限於，環丙基、環丁基、環戊基、1-環戊-1-烯基、1-環戊-2-烯基、1-環戊-3-烯基、環己基、1-環己-1-烯基、1-環己-2-烯基、1-環己-3-烯基、環己二烯基、環庚基、環辛基、環壬基、環癸基、環十一烷基、環十二烷基及類似基團。

**【0055】** 術語「環狀烷基」及「環烷基」可互換使用。該等術語係指單價飽和碳環基團。較佳地，環狀烷基為 3 貫至 7 貫單環基團。更佳地，環狀烷基為環己基。

**【0056】** 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。

**【0057】** 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。

**【0058】** 「芳基」意思指藉由自母體芳族環系統之單一碳原子移除一

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

**【0059】** 術語「雜環」、「雜環基」及「雜環狀環」在本文中可互換使用，且指至少一個環原子為選自氮、氧、磷及硫之雜原子且其餘環原子為 C 的具有 3 至 18 個環原子之飽和或部分不飽和(亦即，在環內具有一個或多個雙鍵及/或參鍵)碳環基團，其中一個或多個環原子視情況獨立地經一個或多個以下描述之取代基取代。雜環可為具有 3 至 7 個環成員(2 至 6 個碳原子及 1 至 4 個選自 N、O、P 及 S 之雜原子)之單環，或具有 7 至 10 個環成員(4 至 9 個碳原子及 1 至 6 個選自 N、O、P 及 S 之雜原子)之雙環，例如：雙環 [4,5]、[5,5]、[5,6] 或 [6,6] 系統。雜環描述於 Paquette, Leo A.; 「Principles of Modern Heterocyclic Chemistry」 (W. A. Benjamin, New York, 1968)，具體言之，第 1、3、4、6、7 及 9 章；「The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs」 (John Wiley & Sons, New York, 1950 至今)，具體言之，第 13、14、16、19 及 28 卷；及 J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566 中。「雜環基」亦包括雜環基團與飽和、部分不飽和環或芳族碳環或雜環稠合的基團。雜環之實例包括但不限於，吡咯啶基、四氫呋喃基、二氫呋喃基、四氫噻吩基、四氫哌喃基、二氫哌喃基、四氫硫代哌喃基、N-哌啶基(piperidino)、N-嗎啉基(morpholino)、硫代嗎啉基、氧硫雜環己基、哌嗪基、高哌嗪基、吖丁啶基、氧雜環丁基、硫雜環丁基、高哌啶基、氧雜環庚基、硫雜環庚基、氧

氮呴基、二氮呴基、硫氮呴基(thiazepinyl)、2-吡咯啉基、3-吡咯啉基、吲哚啉基、2H-哌喃基、4H-哌喃基、二噁烷基、1,3-二氳雜環戊基、吡唑啉基、二硫雜環己基、二硫雜環戊烯基、二氳哌喃基、二氳噻吩基、二氳呋喃基、吡唑啶基、咪唑啉基、咪唑啶基、3-氮雜雙環[3.1.0]己基、3-氮雜雙環[4.1.0]庚基及氮雜雙環[2.2.2]己基。在此定義之範圍內亦包括螺部分。環原子經側氧基(=O)部分取代之雜環基團的實例有嘧啶酮基及1,1-二側氧基-硫嗎啉基。

**【0060】** 術語「雜芳基」係指含有一個或多個獨立地選自氮、氳及硫之雜原子的具有5員或6員環之單價芳族基團，且包括具有5-18個原子之稠環系統(其中至少一個為芳族環)。雜芳基之實例為吡啶基(包括例如，2-羥基吡啶基)、咪唑基、咪唑并吡啶基、嘧啶基(包括例如，4-羥基嘧啶基)、吡唑基、三唑基、吡嗪基、四唑基、呋喃基、噻吩基、異噁唑基、噁唑基、噁唑基、異噁唑基、吡咯基、喹啉基、異喹啉基、吲哚基、苯并咪唑基、苯并呋喃基、噌啉基、吲唑基、吲哚嗪基、呔嗪基、噠嗪基、三嗪基、異吲哚基、噠啶基、嘌呤基、噁二唑基、三唑基、噁二唑基、呋咗基、苯并呋咗基、苯并噻吩基、苯并噁唑基、苯并噁唑基、喹唑啉基、喹喏啉基、萘啶基及呋喃并吡啶基。

**【0061】** 若可能，雜環或雜芳基可為碳附接的(碳連接的)或氮附接的(氮連接的)。舉例而言且非限制，碳鍵結之雜環或雜芳基係在吡啶之2、3、4、5或6位鍵結，在噠嗪之3、4、5或6位鍵結，在嘧啶之2、4、5或6位鍵結，在吡嗪之2、3、5或6位鍵結，在呋喃、四氳呋喃、硫代呋喃、噻吩、吡咯或四氳吡咯之2、3、4或5位鍵結，在噁唑、咪唑或噁唑之2、4或5位鍵結，在異噁唑、吡唑或異噁唑之3、4或5位鍵結，在氮丙啶之2

或 3 位鍵結，在吖丁啶之 2、3 或 4 位鍵結，在喹啉之 2、3、4、5、6、7 或 8 位鍵結，或在異喹啉之 1、3、4、5、6、7 或 8 位鍵結。

**【0062】** 舉例而言且非限制，氮鍵結之雜環或雜芳基係在氮丙啶、吖丁啶、吡咯、吡咯啶、2-吡咯啉、3-吡咯啉、咪唑、咪唑啶、2-咪唑啉、3-咪唑啉、吡唑、吡唑啉、2-吡唑啉、3-吡唑啉、哌啶、哌嗪、吲哚、吲哚啉、1H-吲唑之 1 位；異吲哚或異吲哚啉之 2 位；嗎啉之 4 位；及咔唑或 O-咔啉之 9 位處鍵結。

**【0063】** 雜芳基或雜環基中存在之雜原子包括氧化形式，諸如 NO、SO 及 SO<sub>2</sub>。

**【0064】** 術語「鹵基」或「鹵素」係指 F、Cl、Br 或 I。

**【0065】** 上述烷基、烯基、炔基、環狀烷基、環狀烯基、環狀炔基、碳環基、芳基、雜環基及雜芳基可視情況經超過一個(例如 2、3、4、5、6 或更多個)取代基取代。

**【0066】** 若取代基被描述為「經取代」，則非氫取代基係在該取代基之碳、氧、硫或氮上氫取代基之位置。因此，例如，經取代之烷基取代基係至少一個非氫取代基處於烷基取代基上氫取代基之位置的烷基取代基。為了說明，單氟烷基係經氟取代基取代之烷基，且二氟烷基係經兩個氟取代基取代之烷基。應認識到，若在一個取代基上存在超過一個取代，則每一非氫取代基可相同或不同(除非另作陳述)。

**【0067】** 若一個取代基被描述為「視情況經取代」，則該取代基可為(1)未經取代，或(2)經取代的。若取代基之碳被描述為視情況經取代基清單中之一個或多個取代，則該碳上之一個或多個氫(其範圍為存在之任何數量)

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

**【0068】** 本說明書使用了可互換之術語「取代基」、「基團(radical)」及「基團(group)」。

**【0069】** 若一組取代基共同地描述為視情況經取代基清單中之一個或多個取代，則該組可包括：(1)不可取代之取代基；(2)未經視情況存在之取代基取代的可取代之取代基；及/或(3)經一個或多個視情況存在之取代基取代的可取代之取代基。

**【0070】** 若一個取代基被描述為視情況經特定數量之非氫取代基取代，則該取代基可(1)未經取代；或(2)經至多該特定數量之非氫取代基或經至多該取代基上最大數量之可取代位置取代，以數量較小的為準。因此，例如，若一個取代基被描述為視情況經至多 3 個非氫取代基取代之雜芳基，則具有少於 3 個可取代位置之任何雜芳基將視情況經至多僅該雜芳基所具有之可取代位置之數量的非氫取代基取代。在非限制性實例中，此類取代基可選自具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；芳基；雜芳基；雜環基；鹵素；胍鎘[-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>；以-SOR<sup>101</sup>表示之亞礦；以-SO<sub>2</sub>R<sup>101</sup>表示之礦；a 磺酸酯基-SO<sub>3</sub>M；硫酸酯基-OSO<sub>3</sub>M；以-SO<sub>2</sub>NR<sup>101</sup>R<sup>102</sup>表示之磺醯胺；氰基；疊氮基；-COR<sup>101</sup>；-OCOR<sup>101</sup>；-OCONR<sup>101</sup>R<sup>102</sup>；及聚乙二醇單元(-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>R<sup>101</sup>，其中M為H或陽離子(諸如Na<sup>+</sup>或K<sup>+</sup>)，R<sup>101</sup>、R<sup>102</sup>及R<sup>103</sup>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(-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sup>104</sup>，其中n係1至24之整數；具有6至10個碳原子之芳基；具有3至10個碳原子之雜環，及具有5至10個碳原子之雜芳基，且R<sup>104</sup>為H，或具有1至4個碳原子之直鏈或分支鏈烷基，其中以R<sup>100</sup>、R<sup>101</sup>、R<sup>102</sup>、R<sup>103</sup>及R<sup>104</sup>表示之基團中的烷基、烯基、炔基、芳基、雜芳基及雜環基視情況經一個或多個(例如2、3、4、5、6或更多個)獨立地選自以下之取代基取代：鹵素、-OH、-CN、-NO<sub>2</sub>，及具有1至4個碳原子之未經取代之直鏈或分支鏈烷基。較佳地，上述視情況經取代之烷基、烯基、炔基、環狀烷基、環狀烯基、環狀炔基、碳環基、芳基、雜環基及雜芳基的取代基包括鹵素、-CN、-NR<sup>102</sup>R<sup>103</sup>、-CF<sub>3</sub>、-OR<sup>101</sup>、芳基、雜芳基、雜環基、-SR<sup>101</sup>、-SOR<sup>101</sup>、-SO<sub>2</sub>R<sup>101</sup>及-SO<sub>3</sub>M。

**【0071】** 術語「化合物」或「細胞毒性化合物」、「細胞毒性二聚體」及「細胞毒性二聚體化合物」可互換使用。其意欲包括結構或化學式或其任何衍生物已在本發明中揭示，或結構或化學式或其任何衍生物已以引用之方式併入的化合物。該術語亦包括本發明中所揭示之所有化學式之化合物的立體異構體、幾何異構體、互變異構體、溶劑化物、代謝物、鹽(例如醫藥學上可接受之鹽)及前藥，以及前藥鹽。該術語亦包括前述任一種之任何溶劑化物、水合物及多晶形物。在本申請案中所描述的本發明之某些態



樣中，有關「立體異構體」、「幾何異構體」、「互變異構體」、「溶劑化物」、「代謝物」、「鹽」、「前藥」、「前藥鹽」、「偶聯物」、「偶聯物鹽」、「溶劑化物」、「水合物」或「多晶形物」之具體陳述不應解釋為意圖在未使用該等其他形式陳述術語「化合物」的本發明之其他態樣中省略該等形式。

**【0072】** 如本文所使用，術語「免疫偶聯物」或「偶聯物」係指連接至細胞結合劑(亦即，抗 CD123/IL-3R  $\alpha$  抗體或抗 FR  $\alpha$  抗體，或其片段)之化合物或其衍生物，且其由以下通式定義：A-L-C，其中 C=細胞毒素，L=連接子，且 A=細胞結合劑(CBA)，諸如抗 CD123/IL-3R  $\alpha$  抗體或抗 FR  $\alpha$  抗體，或抗體片段。免疫偶聯物亦可藉由顛倒次序之通式表示：C-L-A。

**【0073】** 如本文所使用，術語「可連接至細胞結合劑」係指包含至少一個適於將化合物或其衍生物鍵結至細胞結合劑之連接基團或其前驅物的本文所描述之化合物或其衍生物。

**【0074】** 術語給定基團之「前驅物」係指可藉由任何脫保護、化學改質或偶合反應而產生該基團的任何基團。

**【0075】** 術語「連接至細胞結合劑」係指包含經由適合連接基團或其前驅物結合至細胞結合劑的本文所描述之細胞毒性劑化合物或細胞毒性劑-連接子化合物(例如式(D1')-(D29')之化合物及式(II)之細胞毒性劑-連接子化合物)或其衍生物中至少一種的偶聯物分子。

**【0076】** 術語「手性」係指具有鏡像搭配物不可重疊性之特性的分子，而術語「非手性」係指在其鏡像搭配物可重疊上之分子。

**【0077】** 術語「立體異構體」係指具有相同化學構造及連接性，但其原子在空間中之取向不同且無法藉由關於單鍵旋轉而互變的化合物。

**【0078】** 「非對映異構體」係指具有兩個或更多個手性中心且分子間不呈鏡像之立體異構體。非對映異構體具有不同的物理特性，例如熔點、沸點、光譜特性及反應性。非對映異構體混合物可依據高解析度分析程序，諸如結晶、電泳及層析法分離。

**【0079】** 「對映異構體」係指一種化合物的具有彼此不可重疊之鏡像的兩種立體異構體。

**【0080】** 本文所使用之立體化學定義及慣例一般遵循 S. P. Parker 編輯，McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York；以及 Eliel, E. 及 Wilen, S., 「Stereochemistry of Organic Compounds」, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994。本發明之化合物可含有不對稱或手性中心，且因此以不同立體異構形式存在。預期本發明化合物之所有立體異構形式，包括但不限於，非對映異構體、對映異構體及構型異構體，以及其混合物，諸如外消旋混合物，形成本發明之一部分。許多有機化合物以光學活性形式存在，亦即，其能夠旋轉平面偏振光之平面。在描述光學活性化合物時，使用了前綴 D 及 L，或 R 及 S 來指示該分子關於其手性中心之絕對構型。前綴 d 及 I 或 (+) 及 (-) 用於指示化合物旋轉平面偏振光之標記，其中 (-) 或 I 意味著該化合物為左旋的。具有前綴 (+) 或 d 之化合物為右旋的。對於指定化學結構，該等立體異構體係相同的，不過其彼此呈鏡像。特定立體異構體亦可稱為對映異構體，且此類異構體之混合物常稱為對映異構體混合物。對映異構體之 50:50 混合物稱為外消旋混合物或外消旋物，其可在化學反應過程中無立體選擇性或立體特異性情況下出現。術語「外消旋混合物」及「外消旋物」係指兩種對映異構物質之等莫耳量

混合物，不管光學活性如何。

**【0081】** 術語「互變異構體」或「互變異構形式」係指可經由低能量障壁互變的具有不同能量之結構異構體。舉例而言，質子互變異構體(亦稱為質子轉移互變異構體)包括經由質子移動引起之互變，諸如酮-烯醇及醯亞胺-烯胺異構。價鍵異構體包括由一些鍵結電子再組織引起的互變。

**【0082】** 如本申請案中所使用，術語「前藥」係指能夠酶促或水解活化或者轉化成更具活性之活性母體形式的本發明化合物之前驅物或衍生物形式。參見例如，Wilman, 「Prodrugs in Cancer Chemotherapy」, *Biochemical Society Transactions*, 14:375-382, 615<sup>th</sup> Meeting Belfast (1986)；及 Stella 等人, 「Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery」, *Directed Drug Delivery*, Borchardt 等人(編輯), 第 247-267 頁, Humana Press (1985)。本發明之前藥包括但不限於，含酯前藥、含磷酸酯前藥、含硫代磷酸酯前藥、含硫酸酯前藥、含肽前藥、D-氨基酸修飾之前藥、糖基化前藥、含  $\beta$ -內醯胺之前藥、含視情況經取代之苯氧基乙醯胺的前藥、含視情況經取代之苯基乙醯胺的前藥、5-氟胞嘧啶及其他 5-氟尿嘧啶前藥，其可轉化成更具活性之細胞毒性游離藥物。可衍生化用於本發明中之前藥形式的細胞毒性藥物之實例包括但不限於，本發明之化合物及化學治療劑，如以上所描述。

**【0083】** 術語「前藥」亦意欲包括在生物條件(活體外或活體內)下可水解、氧化或其他方式反應而提供本發明化合物的化合物之衍生物。前藥可能僅在生物條件下反應時變得有活性，或其可在呈其未反應形式時具有活性。本發明所涵蓋之前藥的實例包括但不限於，具有本文所揭示之任一化學式之化合物的類似物或衍生物，其包含可生物水解部分，諸如可生

物水解之醯胺、可生物水解之酯、可生物水解之氨基甲酸酯、可生物水解之碳酸酯、可生物水解之醯脲及可生物水解之磷酸酯類似物。前藥之其他實例包括了包含-NO、NO<sub>2</sub>、-ONO 或-ONO<sub>2</sub>部分的具有本文所揭示之任一化學式之化合物的衍生物。前藥可典型地使用熟知方法製備，諸如 *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery* (1995) 172-178, 949-982 (Manfred E. Wolff 編輯, 第 5 版) 所描述之方法；亦參見 Goodman 及 Gilman, *The Pharmacological basis of Therapeutics*, 第 8 版, McGraw-Hill, Int.編輯, 1992, 「Biotransformation of Drugs」。

**【0084】** 本發明前藥之一種較佳形式包括含本發明之化合物/偶聯物之亞胺鍵與亞胺反應性試劑之間形成之加合物的本發明化合物(存在或不存在連接基團)及偶聯物。本發明前藥之另一較佳形式包括諸如具有式(I) - (IV)之化合物，其中當 N 與 C 之間之雙線=表示單鍵時，X 為 H 或胺保護基，且該化合物變為前藥。本發明之前藥可含有本文所述前藥之一種或兩種形式(例如含有在化合物/偶聯物之亞胺鍵與亞胺反應性試劑之間形成的加合物，及/或當 X 為-H 時含有 Y 離去基團)。

**【0085】** 術語「亞胺反應性試劑」係指能夠與亞胺基團反應之試劑。亞胺反應性試劑之實例包括但不限於，亞硫酸鹽(H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>、H<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>，或HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>、SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>或HSO<sub>2</sub><sup>-</sup>與陽離子形成之鹽)；偏亞硫酸氫鹽(H<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>，或S<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>2-</sup>與陽離子形成之鹽)；單-、二-、三-及四-硫代磷酸鹽(PO<sub>3</sub>SH<sub>3</sub>、PO<sub>2</sub>S<sub>2</sub>H<sub>3</sub>、POS<sub>3</sub>H<sub>3</sub>、PS<sub>4</sub>H<sub>3</sub>，或 PO<sub>3</sub>S<sup>3-</sup>、PO<sub>2</sub>S<sub>2</sub><sup>3-</sup>、POS<sub>3</sub><sup>3-</sup>或 PS<sub>4</sub><sup>3-</sup>與陽離子形成之鹽)；硫代磷酸酯((R<sup>i</sup>O)<sub>2</sub>PS(OR<sup>j</sup>)、R<sup>i</sup>SH、R<sup>i</sup>SOH、R<sup>i</sup>SO<sub>2</sub>H、R<sup>i</sup>SO<sub>3</sub>H)；各種胺(羥胺(例如 NH<sub>2</sub>OH)、肼(例如 NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>)、NH<sub>2</sub>O-R<sup>i</sup>、R<sup>i</sup>-NH-R<sup>j</sup>、NH<sub>2</sub>-R<sup>i</sup>)、NH<sub>2</sub>-CO-NH<sub>2</sub>、NH<sub>2</sub>-C(=S)-NH<sub>2</sub>；

硫代硫酸鹽( $\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ，或  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 與陽離子形成之鹽)；連二亞硫酸鹽( $\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ，或  $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ 與陽離子形成之鹽)；二硫代磷酸鹽( $\text{P}(\text{=S})(\text{OR}')(\text{SH})(\text{OH})$ ，或其與陽離子形成之鹽)；異羥肟酸( $\text{R}^k\text{C}(\text{=O})\text{NHOH}$ ，或與陽離子形成之鹽)；醯肼( $\text{R}^k\text{CONHNH}_2$ )；甲醛次硫酸鹽( $\text{HOCH}_2\text{SO}_2\text{H}$ ，或  $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ 與陽離子形成之鹽，諸如  $\text{HOCH}_2\text{SO}_2\text{Na}^+$ )；糖化核苷酸(諸如 GDP-甘露糖)；氟達拉濱(fludarabine)；或其混合物，其中  $\text{R}^i$  及  $\text{R}'^i$  各自獨立地為具有 1 至 10 個碳原子之直鏈或分支鏈烷基且經至少一個選自  $-\text{N}(\text{R}')_2$ 、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$  及  $-\text{PO}_3\text{H}$  之取代基取代； $\text{R}^i$  及  $\text{R}'^i$  可進一步視情況本文所述之烷基取代基取代； $\text{R}^j$  級具有 1 至 6 個碳原子之直鏈或分支鏈烷基；且  $\text{R}^k$  級具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；芳基；雜環基；或雜芳基(較佳  $\text{R}^k$  級具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支鏈烷基；更佳  $\text{R}^k$  為甲基、乙基或丙基)。較佳地，該陽離子為單價陽離子，諸如  $\text{Na}^+$  或  $\text{K}^+$ 。較佳地，亞胺反應性試劑係選自亞硫酸鹽、羥胺、尿素及肼。更佳地，亞胺反應性試劑為  $\text{NaHSO}_3$  或  $\text{KHSO}_3$ 。

**【0086】** 如本文所使用且除非另作指示，否則術語「可生物水解之醯胺」、「可生物水解之酯」、「可生物水解之氨基甲酸酯」、「可生物水解之碳酸酯」、「可生物水解之醯脲」及「可生物水解之磷酸酯類似物」分別意謂這樣一種醯胺、酯、氨基甲酸酯、碳酸酯、醯脲或磷酸酯類似物，其 1)不會破壞該化合物之生物活性且賦予該化合物有利的活體內特性，諸如吸收、作用持續時間或作用起始；2)本身不具生物活性，但在活體內轉化成生物活性化合物。可生物水解之醯胺的實例包括但不限於，低級烷基醯胺、 $\alpha$ -氨基酸醯胺、烷氧基醯基醯胺及烷基氨基烷基羧基醯胺。可生物水解之

酯之實例包括但不限於，低級烷基酯、烷氧基醯基酯、烷基醯胺基烷基酯及膽鹼酯。可生物水解之氨基甲酸酯之實例包括但不限於，低級烷基胺、經取代之仲乙基二胺、胺基酸、羥基烷基胺、雜環及雜芳族胺，及聚醚胺。特別有益之前藥及前藥鹽係當將本發明化合物施用給哺乳動物時，增加該等化合物之生物利用率者。

**【0087】** 如本文所使用，短語「醫藥學上可接受之鹽」係指本發明化合物之醫藥學上可接受之有機或無機鹽。示例性鹽包括但不限於，硫酸鹽、檸檬酸鹽、乙酸鹽、草酸鹽、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸鹽、硫酸氫鹽、磷酸鹽、酸式磷酸鹽、異煙鹼酸鹽、乳酸鹽、水楊酸鹽、酸式檸檬酸鹽、酒石酸鹽、油酸鹽、丹寧酸鹽、泛酸鹽、酒石酸氫鹽、抗壞血酸鹽、琥珀酸鹽、順丁烯二酸鹽、龍膽酸鹽、反丁烯二酸鹽、葡萄糖酸鹽、葡萄醛酸鹽、糖酸鹽、甲酸鹽、苯甲酸鹽、麴胺酸鹽、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-萘酸鹽))、鹼金屬(例如鈉及鉀)鹽、鹼土金屬(例如鎂)鹽，及銨鹽。醫藥學上可接受之鹽可涉及包含另一分子，諸如乙酸根離子、琥珀酸根離子或其他相對離子。該相對離子可為使母體化合物上之電荷穩定的任何有機或無機部分。另外，醫藥學上可接受之鹽可在其結構中具有超過一個帶電原子。多個帶電原子作為該醫藥學上可接受之鹽之一部分的情形可具有多個相對離子。因此，醫藥學上可接受之鹽可具有一個或多個帶電原子及/或一個或多個相對離子。

**【0088】** 若本發明之化合物為一種鹼，則所需醫藥學上可接受之鹽可藉由此項技術中可用之任何適合方法製備，例如，用諸如鹽酸、氫溴酸、

硫酸、硝酸、甲烷磺酸、磷酸及類似物之無機酸，或用諸如乙酸、順丁烯二酸、琥珀酸、扁桃酸、反丁烯二酸、丙二酸、酮戊酸、草酸、乙醇酸、水楊酸、哌喃糖苷酸(諸如葡萄糖醛酸或半乳糖醛酸)、 $\alpha$  羥基酸(諸如檸檬酸或酒石酸)、胺基酸(諸如天冬胺酸或麴胺酸)、芳族酸(諸如苯甲酸或肉桂酸)、磺酸(諸如對甲苯磺酸或乙烷磺酸)或類似物處理游離鹼。

**【0089】** 若本發明之化合物為一種酸，則所需醫藥學上可接受之鹽可藉由任何適合方法製備，例如，用無機或有機鹼，諸如胺(一級胺、二級胺或三級胺)、鹼金屬氫氧化物或鹼土金屬氫氧化物，或類似物處理游離酸。適合鹽的說明性實例包括但不限於，衍生自胺基酸(諸如甘胺酸及精胺酸)、氨、一級胺、二級胺及三級胺，以及環狀胺(諸如哌啶、嗎啉及哌嗪)之有機鹽，以及衍生自鈉、鈣、鉀、鎂、錳、鐵、銅、鋅、鋁及鋰之無機鹽。

**【0090】** 如本文所使用，術語「溶劑化物」意思指進一步包括藉由非共價分子間力結合的化學計算量或非化學計算量之溶劑的化合物，該溶劑為諸如水、異丙醇、丙酮、乙醇、甲醇、DMSO、乙酸乙酯、乙酸及乙醇胺、二氯甲烷、2-丙醇或類似物。化合物之溶劑化物或水合物易於藉由向該化合物中添加至少一莫耳當量羥基溶劑(諸如甲醇、乙醇、1-丙醇、2-丙醇或水)以引起亞胺部分之溶劑化或水合作用來製備。

**【0091】** 術語「異常細胞生長」及「增生性病症」在本申請案中可互換使用。除非另作指示，否則如本文中所使用，「異常細胞生長」係指獨立於正常調控機制(例如喪失接觸抑制作用)的細胞生長。此包括例如以下各物之異常生長：(1)藉由表現突變之酪胺酸激酶或過表現受體酪胺酸激酶來增殖的腫瘤細胞(腫瘤)；(2)發生異常酪胺酸激酶活化之其他增生性疾病之良性

及惡性細胞；(3)在受體酪胺酸激酶作用下增殖之任何腫瘤；(4)藉由異常絲氨酸/蘇氨酸激酶活化而增殖之任何腫瘤；及(5)發生異常絲氨酸/蘇氨酸激酶活化之其他增生性疾病的良性及惡性細胞。

**【0092】** 術語「癌症」及「癌」係指或描述哺乳動物中典型地以不受調控之細胞生長為特徵的生理病狀。「腫瘤」包含一個或多個癌細胞，及/或良性或癌變前細胞。

**【0093】** 「治療劑」涵蓋生物試劑，諸如抗體、肽、蛋白質、酶或化學治療劑。

**【0094】** 「化學治療劑」係可用於治療癌症之化合物。

**【0095】** 「代謝產物」係經由特定化合物、其衍生物或其偶聯物，或其鹽在體內代謝產生的產物。化合物、其衍生物或其偶聯物之代謝產物可使用此項技術中已知之常規技術鑑別，且其活性可使用多項測試(諸如本文所描述之該等測試)測定。此類產物可例如由所施用之化合物的氧化、羥基化、還原、水解、醯胺化、脫醯胺、酯化、去酯化、酶促裂解及類似反應產生。因此，本發明包括本發明之化合物、其衍生物或其偶聯物的代謝產物，包括藉由使本發明之化合物、其衍生物或其偶聯物與哺乳動物接觸一段足以得到其代謝產物之時間的方法產生的化合物、其衍生物或其偶聯物。

**【0096】** 短語「醫藥學上可接受」指示，該物質或組成物必須在化學上及/或毒理學上與構成配製物之其他成分及/或用其治療之哺乳動物相容。

**【0097】** 術語「保護基」或「保護部分」係指在化合物、其衍生物或其偶聯物上之其他官能基反應時，常用於阻斷或保護特定官能基之取代基。舉例而言，「胺保護基」或「胺保護部分」係附接至氨基以阻斷或保護

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

**【0098】** 術語「離去基團」係指在取代或置換期間離開的帶電荷基團或不帶電荷部分。此類離去基團為此項技術中熟知的且包括但不限於, 鹵素、酯、烷氧基、羥基、甲苯磺酸酯基、三氟甲磺酸酯基、甲磺酸酯基、腈、疊氮化物、胺基甲酸酯基、二硫化物、硫酯及重氮鎘化合物。

**【0099】** 術語「雙官能交聯劑」、「雙官能連接子」、「交聯劑」或「連接子化合物」係指具有兩個反應性基團之改質劑；其中一個反應性基團能夠與細胞結合劑反應，而另一個與細胞毒性化合物反應，由此將兩個部分連接在一起。此類雙官能交聯劑為此項技術中熟知的(參見例如, Isalm 及 Dent, *Bioconjugation*, 第 5 章, 第 218-363 頁, Groves Dictionaries Inc. New York, 1999)。舉例而言，能夠經由硫酯鍵來鏈聯的雙官能交聯劑包括用以引入順丁烯二醯亞胺基的 *N*-琥珀醯亞胺基-4-(*N*-順丁烯二醯亞胺基甲基)-環己烷-1-甲酸酯(SMCC)，或用以引入碘代乙醯基的 *N*-琥珀醯亞胺基-4-(碘代乙醯基)-胺基苯甲酸酯(SIAB)。在細胞結合劑上引入順丁烯二醯亞胺基或鹵代乙醯基

之其他雙官能交聯劑係此項技術中熟知的(參見美國專利申請案號2008/0050310、20050169933，自 Pierce Biotechnology Inc. P.O. Box 117、Rockland、IL 61105、USA 獲得)，且包括但不限於，雙-順丁烯二醯亞胺基聚乙二醇(BMPEO)、BM(PEO)<sub>2</sub>、BM(PEO)<sub>3</sub>、N-( $\beta$ -順丁烯二醯亞胺基丙氧基)琥珀醯亞胺酯(BMPS)、 $\gamma$ -順丁烯二醯亞胺基丁酸 N-琥珀醯亞胺基酯(GMBS)、 $\epsilon$ -順丁烯二醯亞胺基己酸 N-羥基琥珀醯亞胺酯(EMCS)、5-順丁烯二醯亞胺基戊酸 NHS、HBVS、N-琥珀醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)-環己烷-1-羧基-(6-醯胺基己酸酯)(其為 SMCC 之「長鏈」類似物(LC-SMCC))、間順丁烯二醯亞胺基苯甲醯基-N-羥基琥珀醯亞胺酯(MBS)、4-(4-N-順丁烯二醯亞胺基苯基)-丁酸醯肼或鹽酸鹽(MPBH)、N-琥珀醯亞胺基 3-(溴代乙醯胺基)丙酸酯(SBAP)、N-琥珀醯亞胺基碘代乙酸酯(SIA)、 $\kappa$ -順丁烯二醯亞胺基十一烷酸 N-琥珀醯亞胺基 酯(KMUA)、N-琥珀醯亞胺基 4-(p-順丁烯二醯亞胺基苯基)-丁酸酯(SMPB)、琥珀醯亞胺基-6-( $\beta$ -順丁烯二醯亞胺基丙醯胺基)己酸酯(SMPH)、琥珀醯亞胺基-(4-乙烯基磺醯基)苯甲酸酯(SVSB)、二硫代雙-順丁烯二醯亞胺基乙烷(DTME)、1,4-雙-順丁烯二醯亞胺基丁烷(BMB)、1,4-雙順丁烯二醯亞胺基-2,3-二羥基丁烷(BMDB)、雙-順丁烯二醯亞胺基己烷(BMH)、雙-順丁烯二醯亞胺基乙烷(BMOE)、磺基琥珀醯亞胺基 4-(N-順丁烯二醯亞胺基-甲基)環己烷-1-甲酸酯(磺基-SMCC)、磺基-琥珀醯亞胺基(4-碘-乙醯基)胺基苯甲酸酯(磺基-SIAB)、間順丁烯二醯亞胺基苯甲醯基-N-羥基磺基琥珀醯亞胺酯(磺基-MBS)、N-( $\gamma$ -順丁烯二醯亞胺基丁氧基)磺基琥珀醯亞胺酯(磺基-GMBS)、N-( $\epsilon$ -順丁烯二醯亞胺基辛醯氧基)磺基琥珀醯亞胺酯(磺基-EMCS)、N-( $\kappa$ -順丁烯二醯亞胺基十一烷醯氧基)磺基琥珀醯亞胺酯(磺基

-KMUS)及礦基琥珀醯亞胺基 4-(對順丁烯二醯亞胺基苯基)丁酸酯(礦基-SMPB)。

**【0100】** 雜雙官能交聯劑為具有兩個不同反應性基團之雙官能交聯劑。含有胺反應性 *N*-羥基琥珀醯亞胺基(NHS 基團)及羰基反應性肼基之雜雙官能交聯劑亦可用於連接本文所描述之細胞毒性化合物與細胞結合劑(例如抗體)。此類可商購之雜雙官能交聯劑的實例包括琥珀醯亞胺基 6-肼基煙鹼醯胺丙酮腙(SANH)、琥珀醯亞胺基 4-肼基對苯二甲酸酯鹽酸鹽(SHTH)及琥珀醯亞胺基肼煙鹼酸酯鹽酸鹽(SHNH)。帶有酸不穩定性鍵聯之偶聯物亦可使用本發明之帶有肼之苯并二氮呑衍生物製備。可使用之雙官能交聯劑的實例包括琥珀醯亞胺基-對甲醯基苯甲酸酯(SFB)及琥珀醯亞胺基-對甲醯基苯氧基乙酸酯(SFPA)。

**【0101】** 能夠經由二硫鍵連接細胞結合劑與細胞毒性化合物的雙官能交聯劑係此項技術中已知的且包括用以引入二硫代吡啶基的 *N*-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)、*N*-琥珀醯亞胺基-4-(2-吡啶基二硫基)戊酸酯(SPP)、*N*-琥珀醯亞胺基-4-(2-吡啶基二硫基)丁酸酯(SPDB)、*N*-琥珀醯亞胺基-4-(2-吡啶基二硫基)2-礦基丁酸酯(礦基-SPDB)。可用於引入二硫基團之其他雙官能交聯劑係此項技術中已知的且揭示於美國專利 6,913,748、6,716,821，及美國專利公開案 20090274713 及 20100129314 中，全部以引用之方式併入本文中。或者，亦可使用引入硫醇基團之交聯劑，諸如 2-亞胺基硫雜環戊烷、高半胱氨酸硫代內酯或 S-乙醯基琥珀酸酐。

**【0102】** 如本文所定義，「連接子」、「連接部分」或「連接基團」係指將兩個基團(諸如細胞結合劑及細胞毒性化合物)連接在一起的部分。典型

地，該連接子在連接其所連接之兩個基團的條件下基本上呈惰性。雙官能交聯劑可包含兩個反應性基團，連接部分之每一端一個，由此使一個反應性基團可首先與細胞毒性化合物反應以提供帶有連接部分及第二反應性基團之化合物，接著該第二反應性基團可與細胞結合劑反應。或者，雙官能交聯劑之一端可首先與細胞結合劑反應以提供帶有連接部分及第二反應性基團之細胞結合劑，接著該第二反應性基團可與細胞毒性化合物反應。連接部分可含有允許該細胞毒性部分在特定位點釋放的化學鍵。適合化學鍵係此項技術中熟知的且包括二硫鍵、硫醚鍵、酸不穩定性鍵、光不穩定性鍵、肽酶不穩定性鍵及酯酶不穩定性鍵(參見例如，美國專利 5,208,020、5,475,092、6,441,163、6,716,821、6,913,748、7,276,497、7,276,499、7,368,565、7,388,026 及 7,414,073)。較佳為二硫鍵、硫醚鍵及肽酶不穩定性鍵。可用於本發明中之其他連接子包括不可裂解之連接子，諸如美國公開案號 20050169933 中詳細描述的該等連接子；或帶電荷之連接子或親水性連接子，其描述於 US 2009/0274713、US 2010/01293140 及 WO 2009/134976，各專利以引用之方式明確地併入本文中。

**【0103】** 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。其可由  $\text{NH}_2\text{-C}(\text{R}^{\text{aa}'} \text{ R}^{\text{aa}})\text{-C}(=\text{O})\text{OH}$  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  $\text{R}^{\text{aa}}$  與 N 末端氮原子一起可形成雜環(例如在脯胺酸中)。術語「胺基酸殘基」係指當自胺基酸之胺端及/或羧基端移除一個氫原子時的相應殘基，諸如- $\text{NH-C}(\text{R}^{\text{aa}'} \text{ R}^{\text{aa}})\text{-C}(=\text{O})\text{O-}$ 。

**【0104】** 術語「陽離子」係指帶有正電荷之離子。陽離子可為單價的

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

**【0105】** 術語「治療有效量」意思指，在受試者體內引起所希望之生物反應的活性化合物或偶聯物之量。此類反應包括相較於不存在該治療，或預防、抑制或延遲疾病症狀或疾病本身之發展的情況，減輕所治療之疾病或病症的症狀，預防、抑制或延遲疾病症狀或疾病本身之復發，增加受試者之壽命。有效量之確定恰在熟習此項技術者之能力範圍內，尤其是依據本文所提供之詳細揭示內容。化合物 I 之毒性及治療功效可藉由在細胞培養及實驗動物中進行的標準醫藥程序確定。本發明化合物或偶聯物或者擬施用給受試者之其他治療劑的有效量將取決於多發性骨髓瘤之分期、類別及狀態，以及受試者之特徵，諸如一般健康狀況、年齡、性別、體重及耐藥性。本發明化合物或偶聯物或者擬施用之其他治療劑的有效量亦將取決於施用途徑及劑型。可單獨地調整劑量及時間間隔以提供足以維持所希望之治療效果的活性化合物之血漿含量。

**【0106】** 術語「人類化抗體」係指非人類(例如鼠類)抗體之形式，其為特定免疫球蛋白鏈、嵌合免疫球蛋白或其含有最少非人類(例如鼠類)序列之片段。典型地，人類化抗體係來自互補決定區(CDR)之殘基經來自具有所希望之特異性、親和力及能力之非人類物種(例如小鼠、大鼠、兔、倉鼠)之 CDR 之殘基置換的人類免疫球蛋白(Jones 等人, Nature 321:522-525, 1986；Riechmann 等人, Nature 332:323-327, 1988；Verhoeyen 等人, Science 239:1534-1536, 1988)。

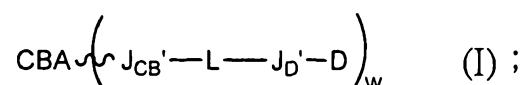
**【0107】** 在一些情況下，人類免疫球蛋白之  $F_v$  構架區(FR)殘基係經來

自具有所希望之特異性、親和力及能力之非人類物種之抗體中的相應殘基置換。人類化抗體可進一步藉由取代 F<sub>v</sub> 構架區中及/或經置換非人類殘基內之其他殘基進行修飾以精製並優化抗體特異性、親和力及/或能力。一般而言，人類化抗體將包含至少一個，且典型地兩個或三個可變結構域之基本上全部，該等結構域含有所有或基本上所有的與非人類免疫球蛋白對應之 CDR 區，而所有或基本上所有的 FR 區為人類免疫球蛋白序列之 FR 區。人類化抗體亦可包含免疫球蛋白恆定區(F<sub>c</sub>)之至少一部分，典型地為人類免疫球蛋白恆定區之至少一部分。用於產生人類化抗體之方法的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 (全部以引用之方式併入本文中)中。在一些實施例中，「人類化抗體」為表面重塑之抗體。在一些實施例中，「人類化抗體」為 CDR 移植之抗體。

#### 細胞結合劑-細胞毒性劑偶聯物

**【0108】** 本發明提供細胞結合劑-細胞毒性劑偶聯物，其包含經由多種連接子，包括但不限於，二硫化物連接子、硫醚連接子、醯胺鍵結之連接子、酸不穩定性連接子及酯酶不穩定性連接子，共價連接至一個或多個本發明細胞毒性劑分子的本文所描述之細胞結合劑。

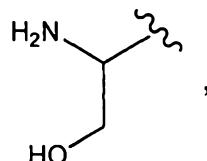
**【0109】** 在第一實施例中，本發明提供一種具有結構式(I)之細胞結合劑-細胞毒性劑偶聯物：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：



CBA 係共價連接至  $J_{CB'}$  基團之細胞結合劑；  
 $J_{CB'}$  係藉由使該 CBA 上之醛基與連接至基團 L 之醛反應性基團反應所形成的部分，其中該醛係衍生自由以下結構式表示之 2-羥基乙胺部分的氧化：



其中該 2-羥基乙胺部分係絲氨酸、蘇氨酸、羥基離氨酸、4-羥基鳥氨酸或 2,4-二氨基-5-羥基戊酸殘基之一部分；

L 係間隔子或鍵；

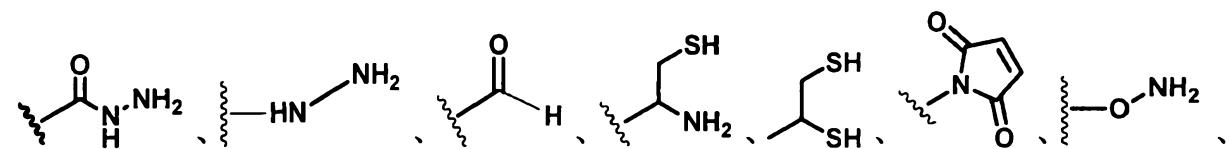
$J_D'$  係連接細胞毒性劑 D 與基團 L 之連接部分；  
D 係經由該連接部分  $J_D'$  共價連接至 L 或當 L 係鍵時連接至 CBA 之細胞毒性劑；且

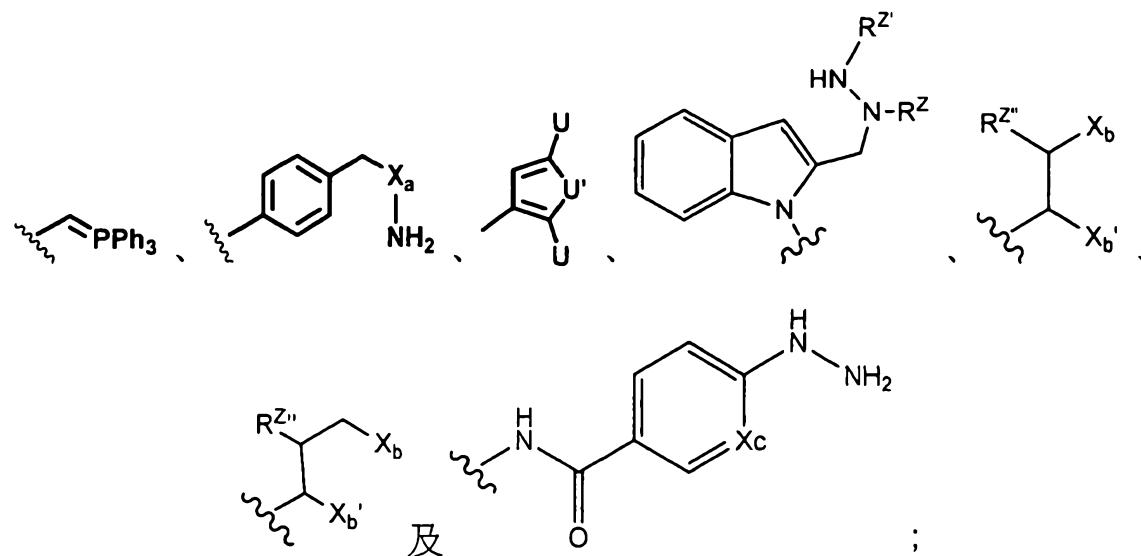
w 係 1、2、3 或 4。

**【0110】** 任何醛反應性基團均可用於本發明中。示例性醛反應性基團包括但不限於，R.C. Larock, 1999, *Comprehensive Organic Transformations*, 第 2 版, Wiley-VCH 中描述之該等基團。

**【0111】** 在一個實施例中，醛反應性基團為肼、醯肼或羥基胺。

**【0112】** 在另一實施例中，醛反應性基團係選自：

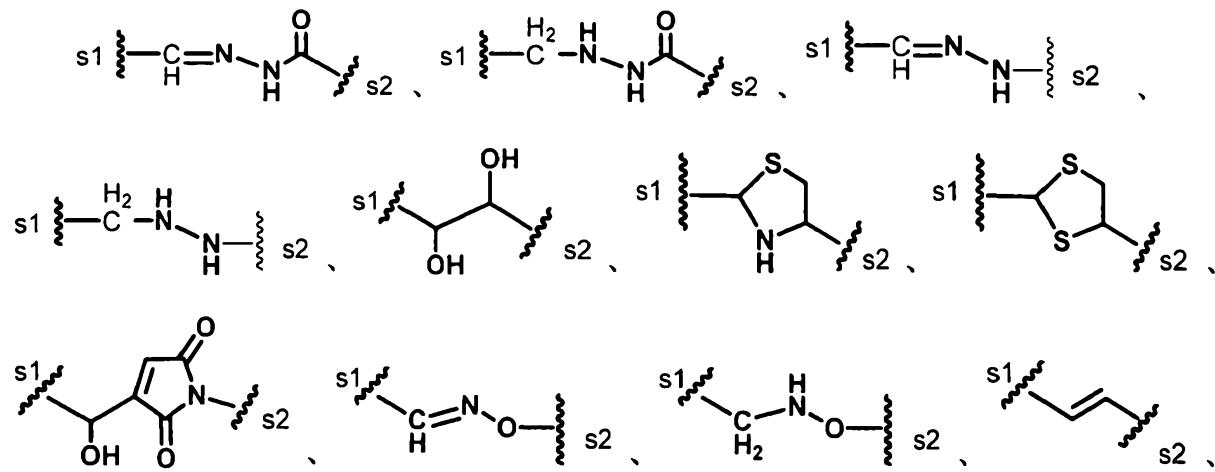


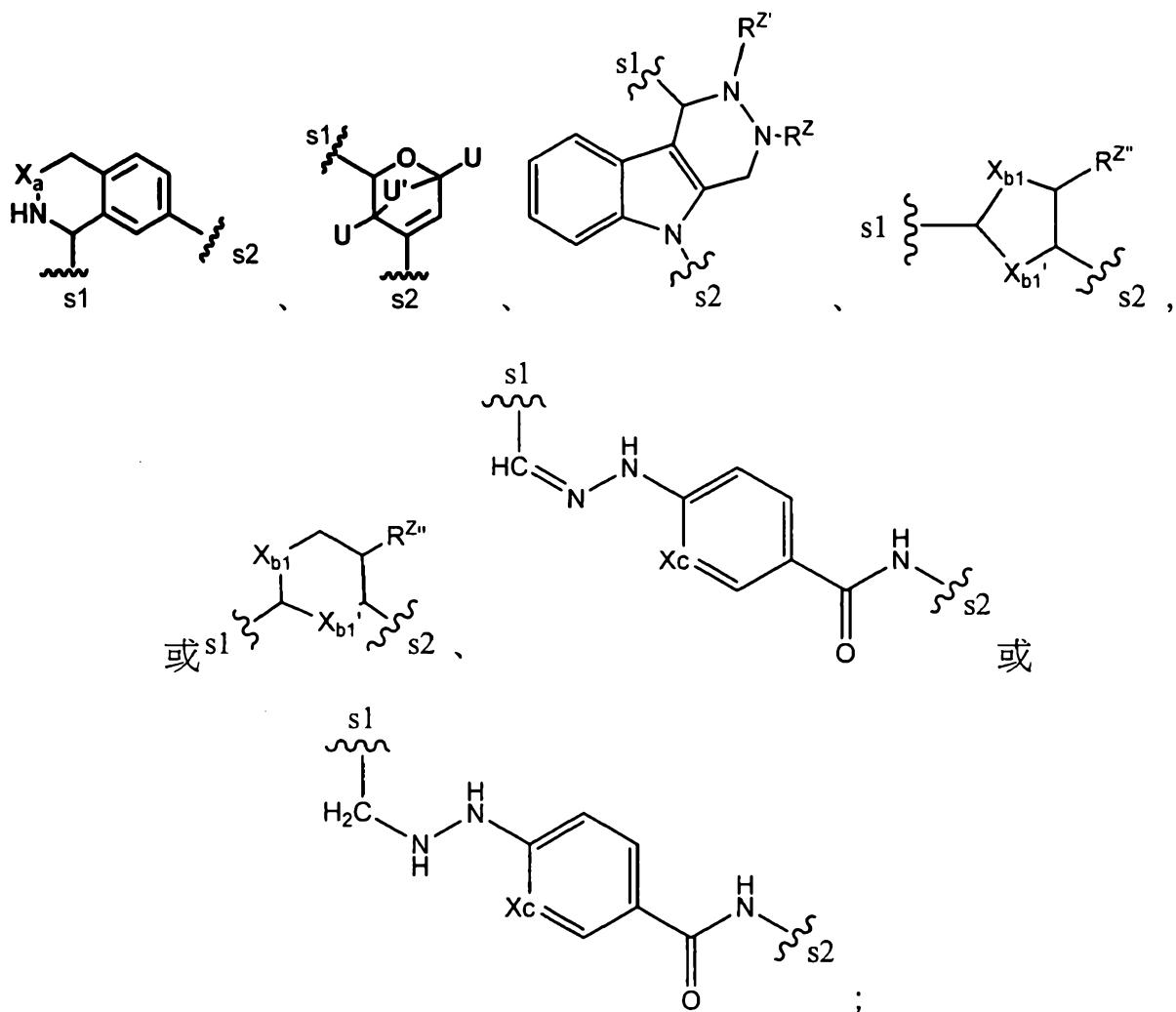


其中： $X_a$  為  $\text{CH}_2$ 、 $\text{O}$  或  $\text{NCH}_3$ ； $U'$  為  $\text{NH}$ 、 $\text{O}$ 、 $\text{S}$  或  $\text{CH}_2$ ； $U$  為  $\text{H}$  或供電子基團； $X_b$  及  $X_b'$  各自獨立地為  $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$  或  $-\text{NH}_2$ ； $R^z$  及  $R^{z'}$  各自獨立地為  $\text{H}$  或烷基(較佳為  $-\text{Me}$ )； $R^{z''}$  為  $\text{H}$  或烷基；及  $X_c$  為  $\text{N}$  或  $\text{CH}$ 。更具體言

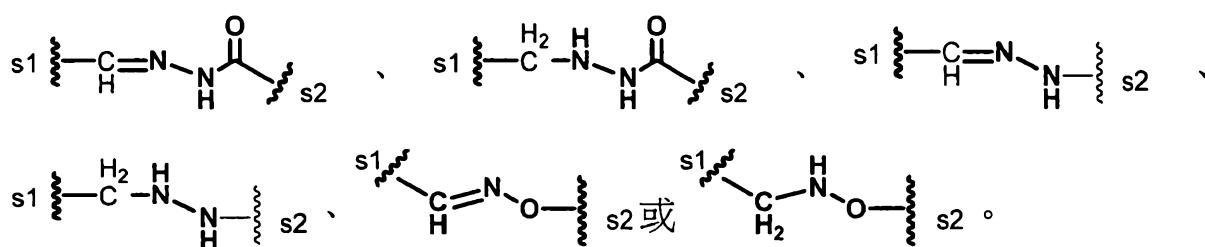
之，該醛反應性基團為  $\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{HN}-\text{NH}_2$  或  $-\text{O}-\text{NH}_2$ 。

**【0113】** 在第 1 個具體實施例中，對於具有結構式(I)之偶聯物或其醫藥學上可接受之鹽， $J_{CB'}$  係由以下結構式之一表示：

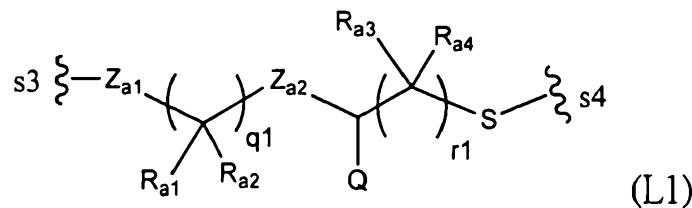




其中： $X_a$  為  $\text{CH}_2$ 、 $\text{O}$  或  $\text{NCH}_3$ ； $U'$  為  $\text{NH}$ 、 $\text{O}$ 、 $\text{S}$  或  $\text{CH}_2$ ； $U$  為  $\text{H}$  或供電子基團； $X_{b1}$  及  $X_{b1}'$  各自獨立地為  $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$  或  $-\text{NH}-$ ； $R^Z$  及  $R^{Z'}$  各自獨立地為  $\text{H}$  或烷基(較佳為  $-\text{Me}$ )；且  $R^{Z'}$  為  $\text{H}$  或烷基； $s1$  為共價連接至該細胞結合劑之位點；且  $s2$  為共價連接至基團  $L$  之位點。更具體言之， $J_{CB'}$  為



【0114】 在第 2 個具體實施例中，對於具有式(I)之偶聯物或其醫藥學上可接受之鹽， $-L-J_D'$  - 係由以下結構式表示：



其中：

s3 為共價連接至基團  $J_{CB}'$  之位點；

s4 為共價連接至基團 D 之位點；

$Z_{a1}$  為不存在、 $-SO_2NR_9-$ 、 $-NR_9SO_2-$ 、 $-C(=O)-NR_9-$ 、 $-NR_9-C(=O)-$ 、 $-(CH_2CH_2)_p-$

$NR_9-C(=O)-$  、 $-C(=O)-NR_9(CH_2CH_2)_p-$  、 $-(CH_2CH_2)_p-C(=O)NR_9-$  、

$-NR_9C(=O)(CH_2CH_2)_p-$  、 $-C(=O)-O-$  或  $-O-C(=O)-$  ；

$R_{a2}$  為不存在、 $-SO_2NR_9-$ 、 $-NR_9SO_2-$ 、 $-C(=O)-NR_9-$ 、 $-NR_9-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-O-$  、

$-O-C(=O)-$  、 $-C(=O)-NR_9-(CH_2CH_2O)_p-$  、 $-NR_9-C(=O)-(CH_2CH_2O)_p-$  、

$-(OCH_2CH_2)_p-C(=O)NR_9-$  或  $-(OCH_2CH_2)_p-NR_9-C(=O)-$  ；

$R_9$  為 H 或視情況經取代之烷基；

p 及 p' 各自獨立地為 1 至 10 之整數；

Q 為 H、帶電荷之取代基或可離子化之基團；

$R_{a1}$ 、 $R_{a2}$ 、 $R_{a3}$ 、 $R_{a4}$  在每次出現時獨立地為 H 或視情況經取代之烷基；

q1 及 r1 各自獨立地為 0 至 10 之整數，條件為 q1 及 r1 不同時為 0；且

其餘變數係如以上第一實施例或第 1 個具體實施例，或其中所描述之任何

更具體之實施例中所描述。

**【0115】** 在一個實施例中，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  $-Z'$   $-NR_{11}R_{12}$ ，  
 或其醫藥學上可接受之鹽；或 iii)  $-N^+R_{14}R_{15}R_{16}X^-$  或  $-Z'$   $-N^+R_{14}R_{15}R_{16}X^-$ ； $Z'$  為視

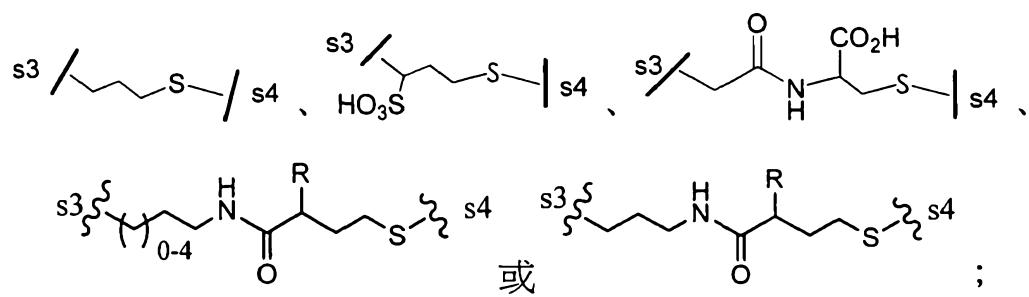
情況經取代之伸烷基、視情況經取代之伸環烷基或視情況經取代之伸苯基； $R_{14}$ 至 $R_{16}$ 各自獨立地為視情況經取代之烷基； $X$ 為醫藥學上可接受之陰離子；且其餘變數係如以上在第2個具體實施例中所描述。更具體言之， $Q$ 為 $-SO_3H$ 或 $-CO_2H$ ，或其醫藥學上可接受之鹽。

**【0116】** 在另一實施例中， $Z_{a1}$ 不存在； $Z_{a2}$ 為 $-C(=O)-NR_9-$ 或 $-NR_9-C(=O)-$ ；且其餘變數係如以上在第2個具體實施例之任何實施例中所描述。更具體言之， $R_9$ 為H。

**【0117】** 在又另一實施例中， $Z_{a1}$ 及 $Z_{a2}$ 均不存在；且其餘變數係如以上在第2個具體實施例之任何實施例中所描述。

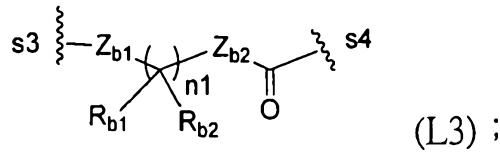
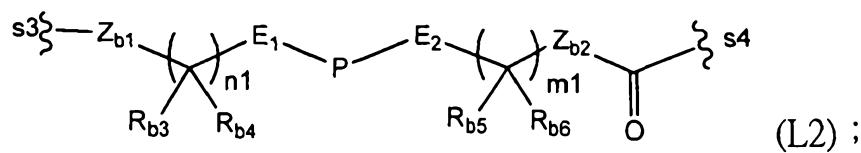
**【0118】** 在另一實施例中， $R_{a1}$ 、 $R_{a2}$ 、 $R_{a3}$ 及 $R_{a4}$ 均為-H； $q$ 及 $r$ 各自獨立地為0至4之整數；且其餘變數係如以上在第2個具體實施例之任何實施例中所描述。

**【0119】** 在又另一實施例中，對於具有式(I)之偶聯物或其醫藥學上可接受之鹽， $-L-J_D'$ -係由以下結構式表示：



或其醫藥學上可接受之鹽；且其餘變數係如以上第一實施例或第1個具體實施例，或其中所描述之任何更具體之實施例中所描述。

**【0120】** 在第3個具體實施例中，對於具有式(I)之偶聯物或其醫藥學上可接受之鹽， $-L-J_D'$ -係由以下結構式表示：



其中：

s3 為共價連接至基團  $J_{CB}'$  之位點；

s4 為共價連接至基團 D 之位點；

$Z_{b1}$  及  $Z_{b2}$  各自獨立地為不存在、 $-SO_2NR_9-$ 、 $-NR_9SO_2-$ 、 $-C(=O)-NR_9-$ 、  
 $-NR_9-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-O-$ 、 $-O-C(=O)-$ 、 $-CH_2-O-$ 、 $-O-CH_2-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_p-$   
 或  $-(OCH_2CH_2)_p-$ 、 $-NR_9-C(=O)-CH_2-$  或  $-CH_2-C(=O)-NR_9-$ ，其中 p 及 p' 獨立  
 地為 1 至 1000 之整數；

$E_1$  及  $E_2$  之一為  $-C(=O)-$ ，且另一個為  $-NR_9-$ ；或  $E_1$  及  $E_2$  之一為  $-C(=O)-$   
 或  $-NR_9-$ ，且另一個不存在；

$R_9$  為 H 或視情況經取代之烷基；

P 為  $[XX]_{1-10}$ ，其中每個 XX 為獨立選擇之胺基酸之殘基，或 P 為  
 $-(NR^m-CH_2CH_2)_s-$ ；

s 為 1 至 5 之整數；

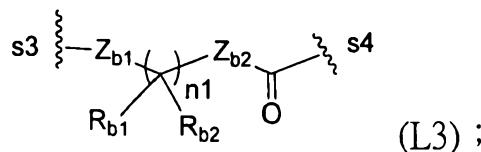
$R^m$  為 H，或視情況經帶電荷之取代基或可離子化之基團取代的烷基；

$R_{b1}$ 、 $R_{b2}$ 、 $R_{b3}$ 、 $R_{b4}$ 、 $R_{b5}$  及  $R_{b6}$  在每次出現時獨立地為 H 或視情況經取代  
 之烷基；

m1 及 n1 在每次出現時獨立地為 0 至 10 之整數；且其餘變數係如以上  
 第一實施例或第 1 個具體實施例，或其中所描述之任何更具體之實施例中

所描述。

【0121】 在一個實施例中，對於具有式(I)之偶聯物或其醫藥學上可接受之鹽，-L-J<sup>b</sup>-L'-係由以下結構式表示：

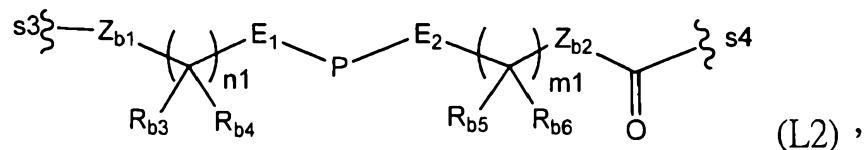


其中：

$Z_{b1}$  及  $Z_{b2}$  不存在，或  $Z_{b1}$  及  $Z_{b2}$  之一不存在且另一個為-CH<sub>2</sub>-O-或-O-CH<sub>2</sub>-；

$n_1$  為 1 至 6 之整數；且其餘變數係如以上第一實施例或第 1 個具體實施例，或其中所描述之任何更具體之實施例中所描述。更具體言之， $R_{b1}$  及  $R_{b2}$  均為 H。

【0122】 在另一個實施例中，對於具有式(I)之偶聯物或其醫藥學上可接受之鹽，-L-J<sub>D</sub>' - 絲由以下結構式表示：



其中：

$Z_{b1}$  及  $Z_{b2}$  各自獨立地為不存在、 $-\text{CH}_2\text{-O-}$ 、 $-\text{O-CH}_2-$ 、 $-\text{NR}_9\text{-C(=O)-CH}_2-$ 或 $-\text{CH}_2\text{-C(=O)-NR}_9-$ ；

$n_1$  及  $m_1$  各自獨立地為 1 至 6 之整數；且  
其餘變數係如以上第一實施例或第 1 個具體實施例，或其中所描述之  
任何更具體之實施例中所描述。

【0123】 在一個更具體之實施例中，對於以上任何實施例中所描述之式(1.2)， $Z_{b1}$  及  $Z_{b2}$  均不存在。在又另一更具體之實施例中，對於上述式(1.2)，

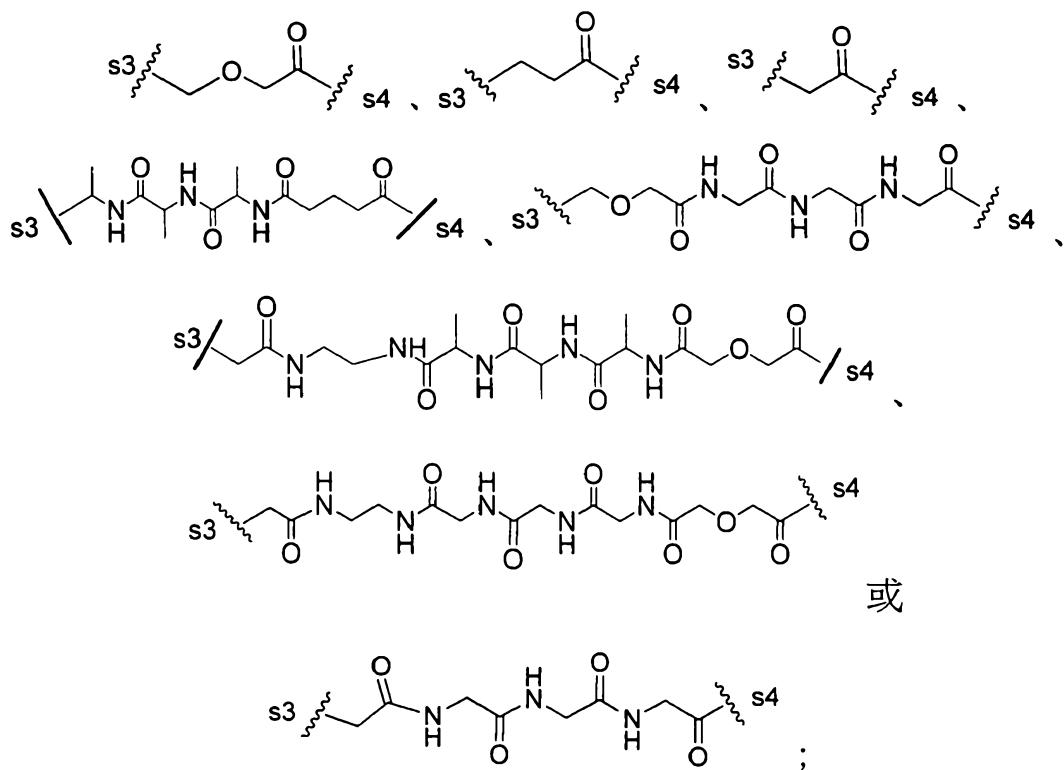
$Z_{b1}$  為-CH<sub>2</sub>-O-；且  $Z_{b2}$  不存在。或者，對於上述式(L2)， $Z_{b1}$  為-CH<sub>2</sub>-C(=O)-NR<sub>9</sub>-；且  $Z_{b2}$  為-O-CH<sub>2</sub>-或不存在。甚至更具體言之，R<sub>9</sub>為-H。

**【0124】** 在一個實施例中，對於以上任何實施例中所描述之式(L2)，P 為[XX]<sub>2-4</sub>。在又另一個實施例中，對於以上任何實施例中所描述之式(L2)，P 為[XX]<sub>2</sub>或[XX]<sub>3</sub>。如本文所使用，每一 XX 為獨立選擇之胺基酸的殘基。

**【0125】** 在另一個實施例中，對於以上任何實施例中所描述之式(L2)，P 為蛋白酶可裂解之肽。更具體言之，P 為腫瘤組織中表現之蛋白酶可裂解之肽。在又另一個更具體之實施例中，P 為溶酶體蛋白酶可裂解之肽。

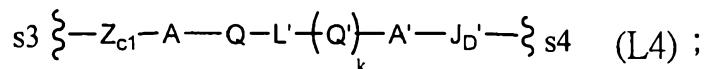
**【0126】** 在又另一個實施例中，對於以上任何實施例中所描述之式(L2)，P 係選自由以下各物組成之群：Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Lle-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-N<sup>9</sup>-甲苯磺醯基-Arg、Phe-N<sup>9</sup>-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 17)、 $\beta$ -Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 18)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 19)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、and D-Ala-D-Ala、Gly-Gly-Gly、Ala-Ala-Ala、d-Ala-Ala-Ala、Ala-d-Ala-Ala、Ala-Ala-d-Ala、Ala-Val-Cit 及 Ala-Val-Ala。更具體言之，P 為 Gly-Gly-Gly、Ala-Ala-Ala、d-Ala-Ala-Ala、Ala-d-Ala-Ala、Ala-Val-Ala、Gly-Gly 或 Ala-Ala。

**【0127】** 在另一個實施例中，對於具有式(I)之偶聯物或其醫藥學上可接受之鹽，-L-J<sub>D'</sub>-係由以下結構式表示：



且其餘變數係如以上第一實施例或第 1 個具體實施例，或其中所描述之任何更具體之實施例中所描述。

**【0128】** 在第 4 個具體實施例中，對於具有式(I)之偶聯物或其醫藥學上可接受之鹽，-L-J<sub>D'</sub>- 係由以下結構式表示：

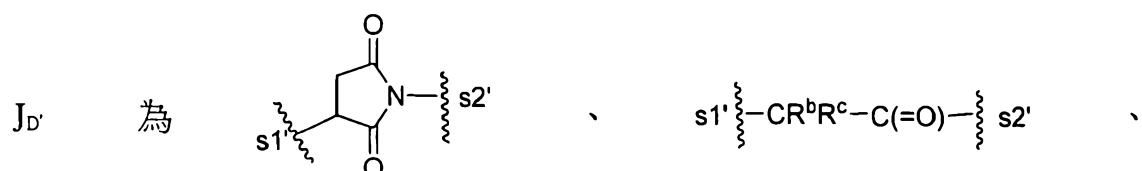


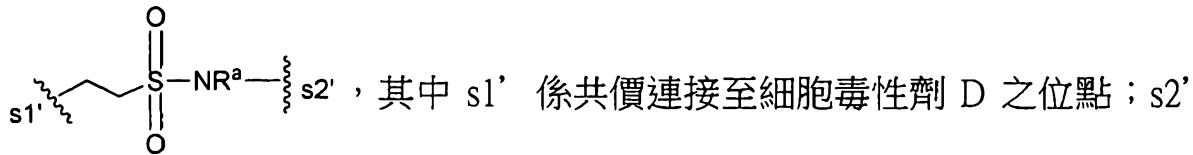
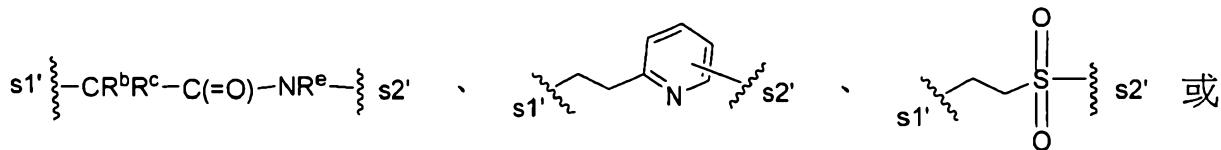
s3 為共價連接至基團 J<sub>CB'</sub> 之位點；

s4 為共價連接至基團 D 之位點；

Z<sub>c1</sub> 為不存在、-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)-、-CH<sub>2</sub>-O-、-O-CH<sub>2</sub>-、-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>p</sub>-或 -(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>p'</sub>-，

其中 p 及 p' 獨立地為 1 至 1000 之整數；





係共價連接至基團 A' 之位點；

A 及 A' 各自獨立地為視情況經取代之伸烷基、視情況經取代之伸烯基、視情況經取代之伸炔基、視情況經取代之伸環烷基、視情況經取代之伸環烯基或視情況經取代之伸環炔基；

Q 為-Z<sub>1</sub>-P-Z<sub>2</sub>-；

Q' 為-Z<sub>1</sub>'-P'-Z<sub>2</sub>'-；

Z<sub>1</sub> 及 Z<sub>2</sub> 之一為-C(=O)-，且另一個為-NR<sup>b</sup>-；

Z<sub>1</sub>' 及 Z<sub>2</sub>' 之一為-C(=O)-，且另一個為-NR<sup>b</sup>'-；

P 及 P' 各自獨立地為不存在、視情況經取代之伸烷基、-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>j</sub>-、-(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>-或[XX]<sub>1-10</sub>，其中每個 XX 為獨立選擇之胺基酸的殘基；

j 為介於 1 與 500 之間之整數；

k 為 0 或 1；

L 為-(CR<sub>5</sub>R<sub>6</sub>)<sub>v</sub>-、-(CR<sub>7</sub>R<sub>8</sub>)<sub>q</sub>-N(R<sup>g</sup>)-(CR<sub>9</sub>R<sub>10</sub>)<sub>r</sub>-、-(CR<sub>7</sub>R<sub>8</sub>)<sub>q</sub>-C(R<sup>a</sup>)(R<sup>g</sup>)-(CR<sub>9</sub>R<sub>10</sub>)<sub>r</sub> 或-(CR<sub>11</sub>R<sub>12</sub>)<sub>s</sub>-N(R<sup>g</sup>)-(CR<sub>13</sub>R<sub>14</sub>)<sub>t</sub>-N(R<sup>g'</sup>)-(CR<sub>15</sub>R<sub>16</sub>)<sub>u</sub>-；

R<sup>g</sup> 及 R<sup>g'</sup> 各自獨立地為-(CR<sub>17</sub>R<sub>18</sub>)<sub>p</sub>-Z-V；

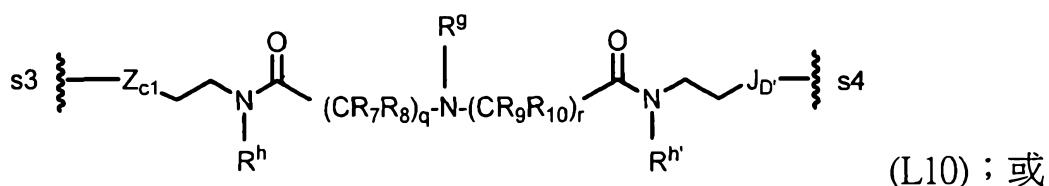
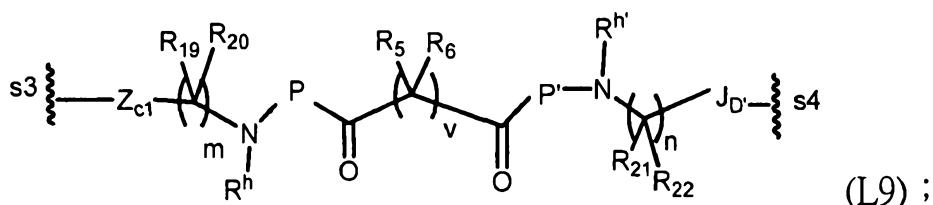
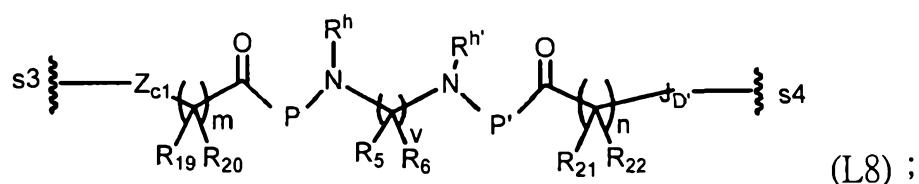
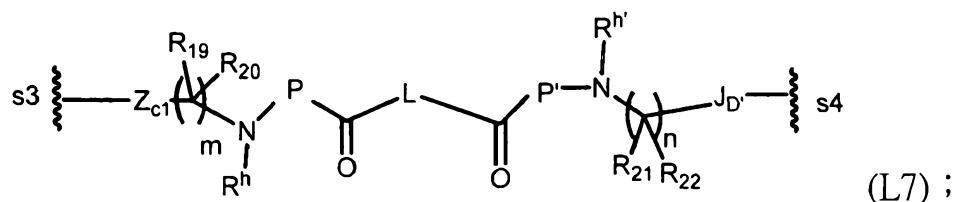
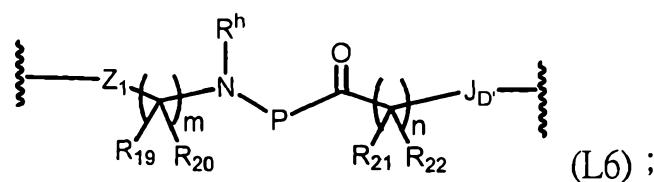
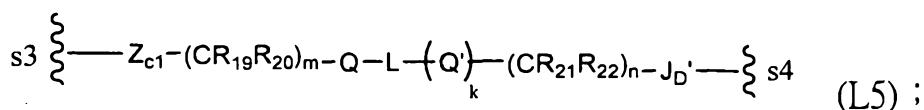
p 為介於 1 與 5 之間之整數；

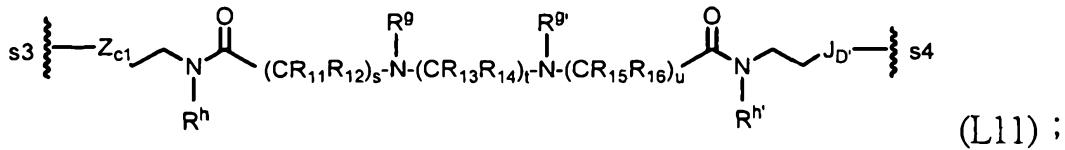
V 為 H、帶電荷之取代基或可離子化之基團；

Z 為不存在、-C(=O)NR<sup>b</sup>-伸烷基-或-NR<sup>b</sup>-C(=O)-伸烷基-；

$R^h$  及  $R^{h'}$  在每次出現時獨立地為 H 或視情況經取代之烷基；  
 $R_s$  至  $R_{18}$  在每次出現時獨立地為 H 或視情況經取代之烷基；  
 $q$ 、 $r$ 、 $s$ 、 $t$ 、 $u$  及  $v$  各自獨立地為介於 0 與 10 之間之整數；且其餘變數  
 係如以上第一實施例或第 1 個具體實施例，或其中所描述之任何更具體之  
 實施例中所描述。

【0129】 在一個實施例中，對於具有式(I)之偶聯物或其醫藥學上可接  
 受之鹽，-L-J<sub>D'</sub>- 係由以下結構式表示：





其中：

$R_{19}$  至  $R_{22}$  在每次出現時獨立地為 H 或視情況經取代之烷基；  
 $m$  及  $n$  各自獨立地為 0 至 10；且其餘變數係如以上在第一實施例或第 1 個具體實施例中所描述。更具體言之， $R_{19}$  至  $R_{22}$  各自為 H； $R_5$  及  $R_6$  各自為 H； $R_7$  至  $R_{10}$  各自為 H；且  $R_{11}$  至  $R_{16}$  各自為 H。

【0130】 在一個實施例中，對於式(L4)-(L11)，P 及 P' 在每次出現時獨立地為  $[XX]_{1-10}$ 。更具體言之，P 及 P' 在每次出現時獨立地為  $[XX]_{2-5}$ ；且其餘變數係如以上所描述。

【0131】 在另一個實施例中，對於式(L4)-(L11)，P 及 P' 各自為可經蛋白酶裂解之肽。在又另一個實施例中，P 及 P' 各自為腫瘤組織中表現之蛋白酶可裂解之肽。或者，P 及 P' 各自為溶酶體蛋白酶可裂解之肽。

【0132】 在另一個實施例中，對於式(L4)-(L11)，P 及 P' 各自選自由以下各物組成之群：Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Lle-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: 17)、 $\beta$ -Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 18)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 19)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala 及 D-Ala-D-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。更具體言之，P 及 P' 各自為 Gly-Gly-Gly、Ala-Ala-Ala、D-Ala-Ala-Ala、Ala-D-Ala-Ala、Ala-Val-Ala 或  $\beta$ -Ala-Gly-Gly-Gly。

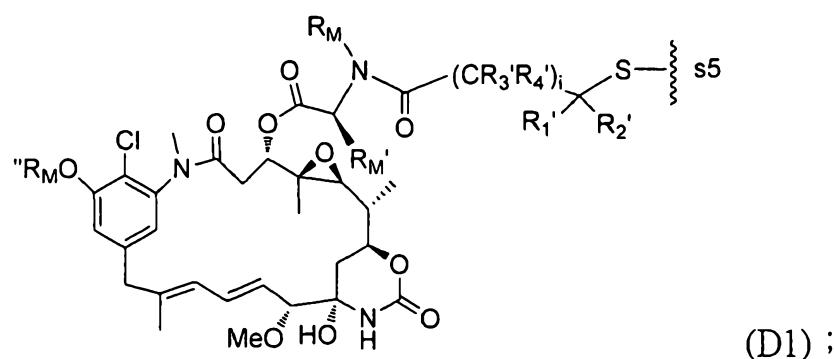
**【0133】** 在某些實施例中，以上所描述之任何實施例中之[XX]在每次出現時為獨立選擇之胺基酸的殘基，該胺基酸係選自：天然存在之胺基酸、合成胺基酸、胺基酸類似物，或以與該等天然存在之胺基酸類似之方式起作用的胺基酸模擬物。

**【0134】** 在某些實施例中，以上所描述之任何實施例中之[XX]在每次出現時為獨立選擇之胺基酸的殘基，該胺基酸係選自由以下各物組成之群：組胺酸、丙胺酸、異白胺酸、精胺酸、白胺酸、天冬醯胺酸、離胺酸、天冬胺酸、甲硫胺酸、半胱胺酸、苯丙胺酸、麩胺酸、蘇胺酸、麩醯胺酸、色胺酸、甘胺酸、纈胺酸、脯胺酸、絲胺酸、酪胺酸、N-甲基-組胺酸、N-甲基-丙胺酸、N-甲基-異白胺酸、N-甲基-精胺酸、N-甲基-白胺酸、N-甲基-天冬醯胺酸、N-甲基-離胺酸、N-甲基-天冬胺酸、N-甲基-甲硫胺酸、N-甲基-半胱胺酸、N-甲基-苯丙胺酸、N-甲基-麩胺酸、N-甲基-蘇胺酸、N-甲基-麩醯胺酸、N-甲基-色胺酸、N-甲基-甘胺酸、N-甲基-纈胺酸、N-甲基-脯胺酸、N-甲基-絲胺酸、N-甲基-酪胺酸、羥基脯胺酸、 $\gamma$ -羧基麩胺酸、硒代半胱胺酸、O-磷酸絲胺酸、高絲胺酸、正白胺酸、甲硫胺酸亞礦、甲硫胺酸甲基銻、瓜胺酸、鳥胺酸、半胱胺酸礦酸、半胱胺酸亞礦酸、3-胺基丙胺酸、3-二甲基胺基丙胺酸、2-胺基-4-(二甲基胺基)丁酸、2,4-二胺基丁酸、2-胺基-6-(二甲基胺基)己酸、2-胺基-5-(二甲基胺基)戊酸及  $\beta$ -丙胺酸，其各自獨立地為 L 或 D 異構體。更具體言之，每個 XX 獨立地為甘胺酸或丙胺酸。

的殘基。

**【0135】** 在第 5 個具體實施例中，對於具有式(I)之偶聯物，D 為類美登素；且其餘變數係如以上在第一實施例或第 1、2、3 或 4 個實施例，或其中所描述之任何更具體之實施例中所描述。

**【0136】** 在一個更具體之實施例中，D 係由以下結構式表示之類美登素：



其中：

$R_M$ 、 $R_{M'}$  及  $R_{M''}$  在每次出現時獨立地為 H 或視情況經取代之烷基；

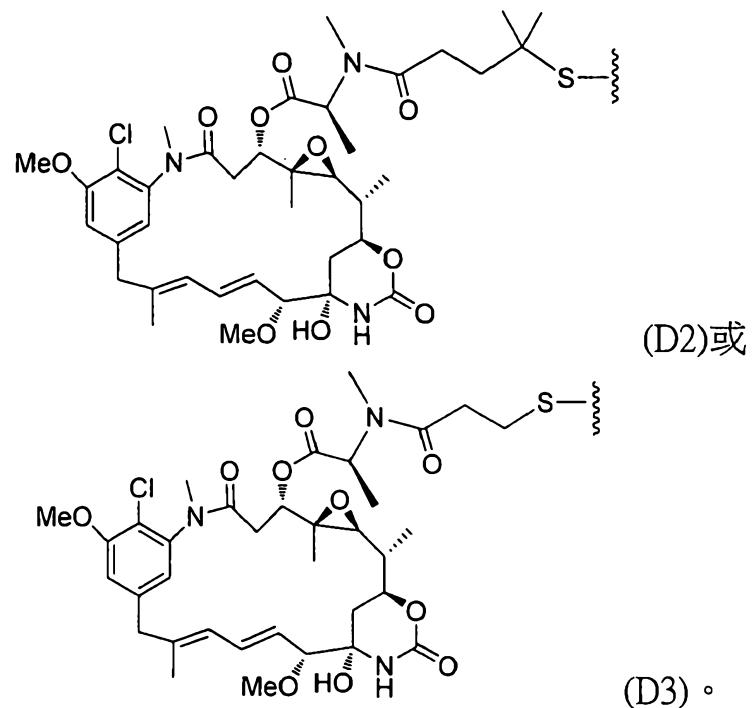
$R_1'$ 、 $R_2'$ 、 $R_3'$  及  $R_4'$  在每次出現時獨立地為 H、視情況經取代之烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之環烷基、視情況經取代之雜環基、視情況經取代之芳基或視情況經取代之雜芳基；

$i$  為介於 0 與 15 之間之整數；且

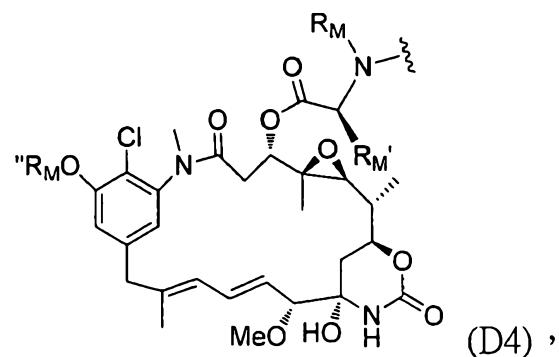
$s5$  為共價連接至基團  $J_D'$  之位點；

-L- $J_D'$  -係如以上在第一實施例或第 2 或 4 個具體實施例，或其中所描述之更具體之實施例中所描述。

**【0137】** 更具體言之，D 係由以下結構式表示：

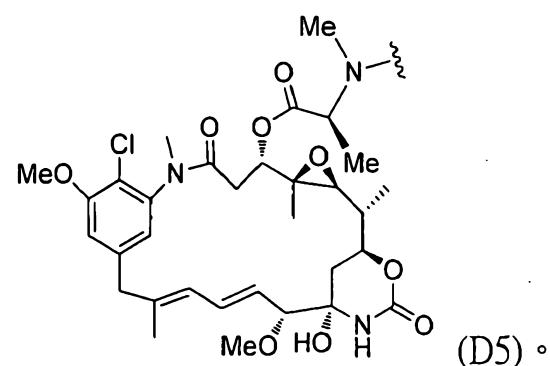


【0138】 在又另一具體實施例中，D 係由以下結構式表示：



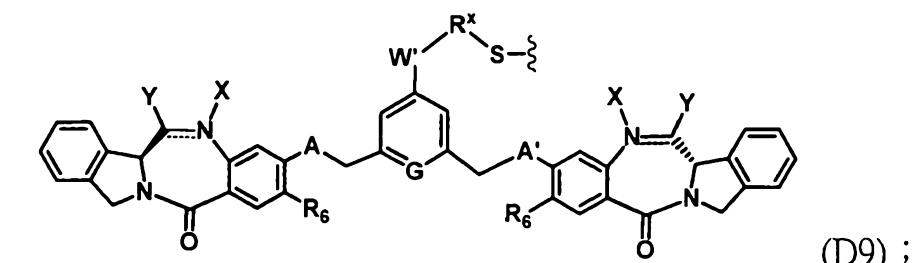
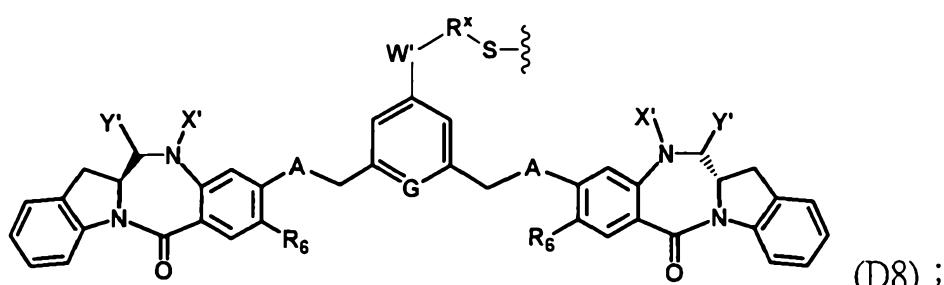
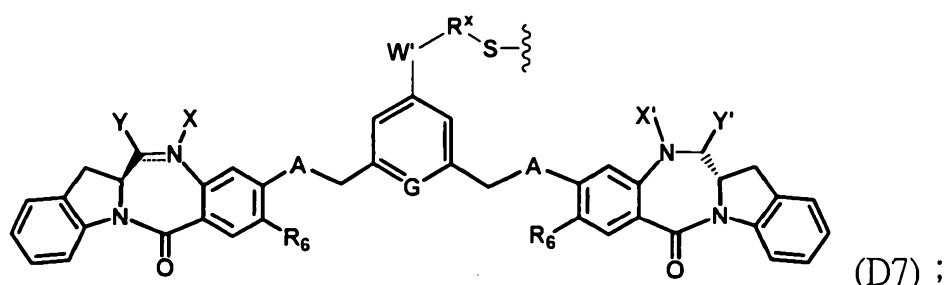
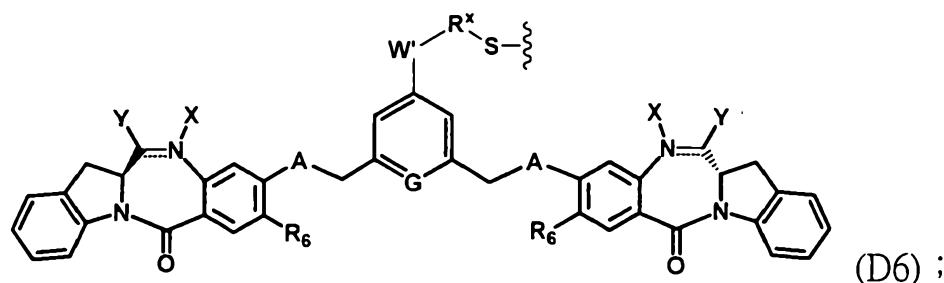
其中： $R_M$ 、 $R_M'$  及  $R_M''$  在每次出現時獨立地為 H 或視情況經取代之烷基； $s_5$  為共價連接至基團  $J_D'$  之位點；且-L- $J_D'$ -係如以上在第一實施例或第 3 個具體實施例，或其中所描述之任何更具體之實施例中所描述。

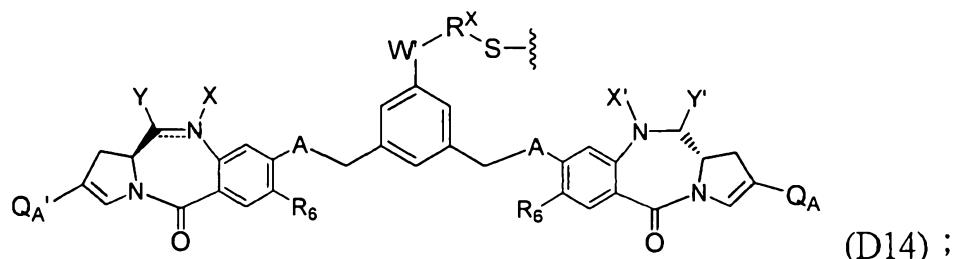
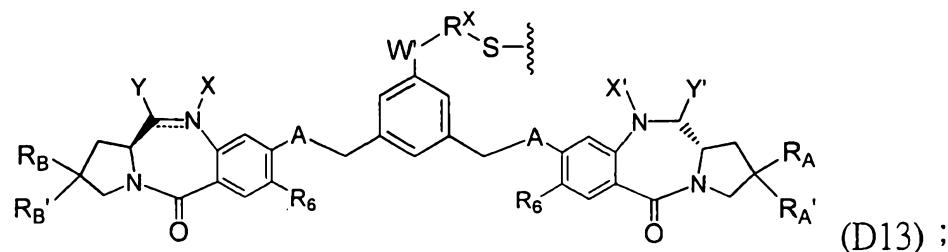
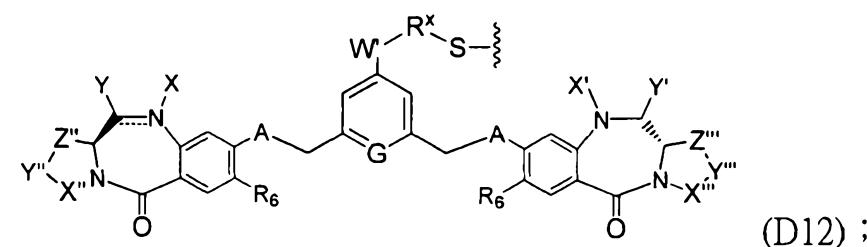
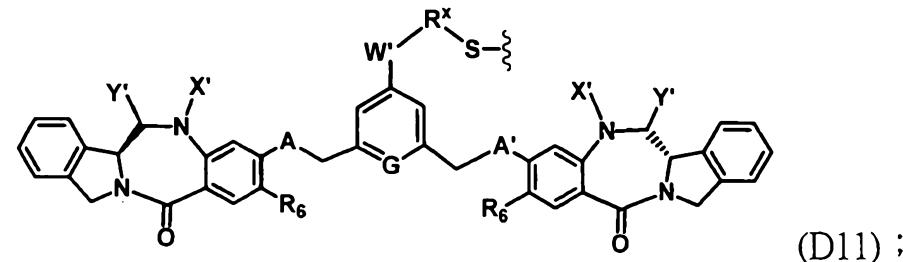
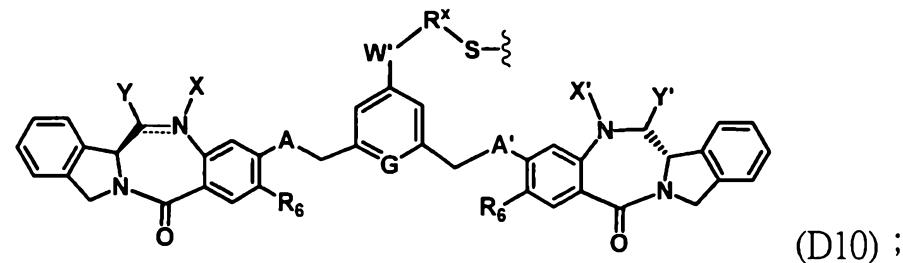
【0139】 更具體言之，D 係由以下結構式表示：



【0140】 在第 6 個具體實施例中，D 為苯并二氮呴化合物；且其餘變數係如以上在第一實施例或第 1、2、3 或 4 實施例，或其中所描述之任何更具體之實施例中所描述。示例性苯并二氮呴化合物包括但不限於，美國專利號 8,765,740、8,426,402、US2014/0088089、WO2011/130613、WO2011/130616、WO2010/091150 及 WO2009/016516 中所描述之該等化合物。該等參考文獻之完整教示內容以引用之方式併入本文中。

【0141】 在一個更具體之實施例中，D 係由以下結構式表示之苯并二氮呴：





其中：

在 N 與 C 之間之雙線=表示單鍵或雙鍵，條件為當其為雙鍵時，X 不存在且 Y 為-H，並且當其為單鍵時，X 係選自-H、鍵結至該反應性基團之連接基團或胺保護基(較佳 X 為-H)；

Y 係選自-H、-OR、-OCOR'、-SR、-NR' R''、-SO<sub>3</sub>M、-SO<sub>2</sub>M 或-OSO<sub>3</sub>M，其中 M 為-H 或陽離子，諸如 Na<sup>+</sup>或 K<sup>+</sup>；

R 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，或 PEG 基團-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>，其中 n 為 1 至 24 之整數，且 R<sup>c</sup>為具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支鏈烷基；

R' 與 R" 相同或不同，且選自-H；-OH；-OR；-NRR<sup>g</sup>；-COR；視情況經取代的具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；視情況經取代的具有 6 至 18 個碳原子之芳基；視情況經取代的具有 1 至 6 個選自 O、S、N 及 P 之雜原子之 3 員至 18 員雜環；PEG 基團-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>，其中 n 為 1 至 24 之整數，較佳 n 為 2、4 或 8；且 R<sup>g</sup> 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；或 PEG 基團-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>；

X' 係選自由以下各物組成之群：-H；-OH；經取代或未經取代的具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；苯基；及胺保護基；

Y' 係選自由以下各物組成之群：-H；側氨基；經取代或未經取代的具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；

A 及 A' 係選自-O-及-S-；

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

R<sup>1</sup>不存在，或選自具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基；

R<sup>c</sup>為-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；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 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基，視情況帶有二級胺基(例如-NHR<sup>101</sup>)或三級胺基(-NR<sup>101</sup>R<sup>102</sup>)；

或者 5 員或 6 員含氮雜環，諸如哌啶或嗎啉，其中  $R^{101}$  及  $R^{102}$  各自獨立地為具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；且

$G$  係選自-CH-或-N-；

$X'$  與  $X''$  相同或不同，且獨立地選自-( $CH_2$ ) $n'$ -、-NR'-、-CO-、-BH-、-SO-或-SO<sub>2</sub>-；

$Y'$  與  $Y''$  相同或不同，且獨立地選自-O-、-( $CH_2$ ) $n''$ -、-NR'-或-S-；

$Z'$  與  $Z''$  相同或不同，且獨立地選自-( $CH_2$ ) $n'''$ -、-CR<sub>7</sub>' R<sub>8</sub>'-、-NR<sub>9</sub>'-、-O-及-S-；

$n'$  係選自 0、1、2 及 3；

$R_7'$  與  $R_8'$  相同或不同，並且各自獨立地選自-H、-OH、-SH、-COOH、-NHR'、聚乙二醇單元-( $OCH_2CH_2$ ) $n$ -、胺基酸、帶有 2 至 6 個胺基酸之肽單元、視情況經取代的具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基；

$R_9'$  獨立地選自-H；視情況經取代的具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基；聚乙二醇單元-( $OCH_2CH_2$ ) $n$ -；

$R_A$ 、 $R_{A'}$ 、 $R_B$  及  $R_{B'}$  相同或不同，並且各自獨立地選自由以下各物組成之群：-H、鹵基，或視情況經取代的具有 1 至 10 個碳原子之分支鏈、直鏈或環狀烷基；或  $R_A$  與  $R_{A'}$  及/或  $R_B$  與  $R_{B'}$  一起分別形成含有雙鍵之基團=B 及 =B'；

=B 與=B' 相同或不同，且獨立地選自視情況經取代的分支鏈或直鏈烯基或羰基；

$Q_A$  為  $Q_{A1}$ -Ar- $Q_{A2}$ ；

$Q_{A'}$  為  $Q_{A1}'$ -Ar'- $Q_{A2}'$ ；

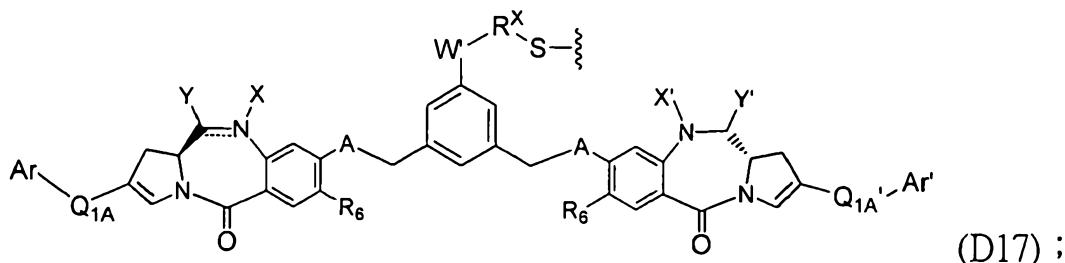
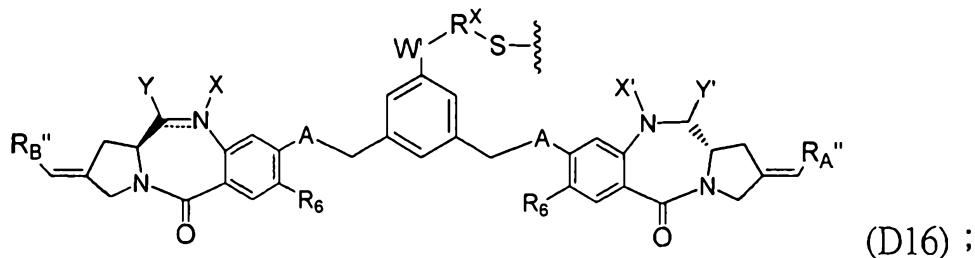
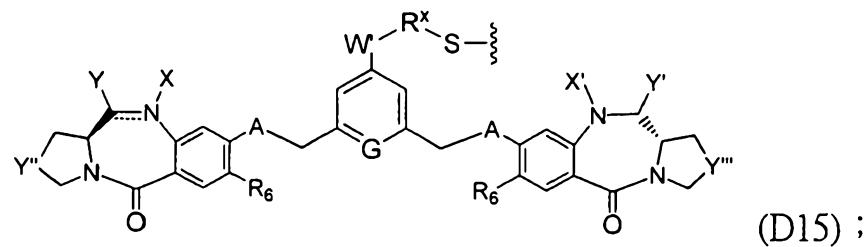
$Q_{A1}$  及  $Q_{A1}'$  各自獨立地為不存在、具有 1 至 6 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基，或 $-CH=CH$  單元；

$Ar$  及  $Ar'$  各自獨立地不存在，或表示芳基；

$Q_{A2}$  及  $Q_{A2}'$  各自獨立地選自-H；與該反應性基團鍵結之連接基團；經取代或未經取代的具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；聚乙二醇單元- $R^c$   $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$ ；或選自鹵素、胍鎓[-NH(C=NH)NH<sub>2</sub>]、-OR、-NR'  $R'$  '、-NO<sub>2</sub>、-NCO、-NR' COR' '、-SR、由-SOR' 表示之亞碸、由-SO<sub>2</sub>R' 表示之碸、磺酸酯基-SO<sub>3</sub>M、硫酸酯基-OSO<sub>3</sub>M、由SO<sub>2</sub>NR'  $R'$  ' 表示之磺醯胺、氰基、疊氮基、-COR' '、-OCOR' 或-OCONR'  $R'$  ' 之取代基；且

$R^c$  不存在，或選自具有 1 至 5 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基。

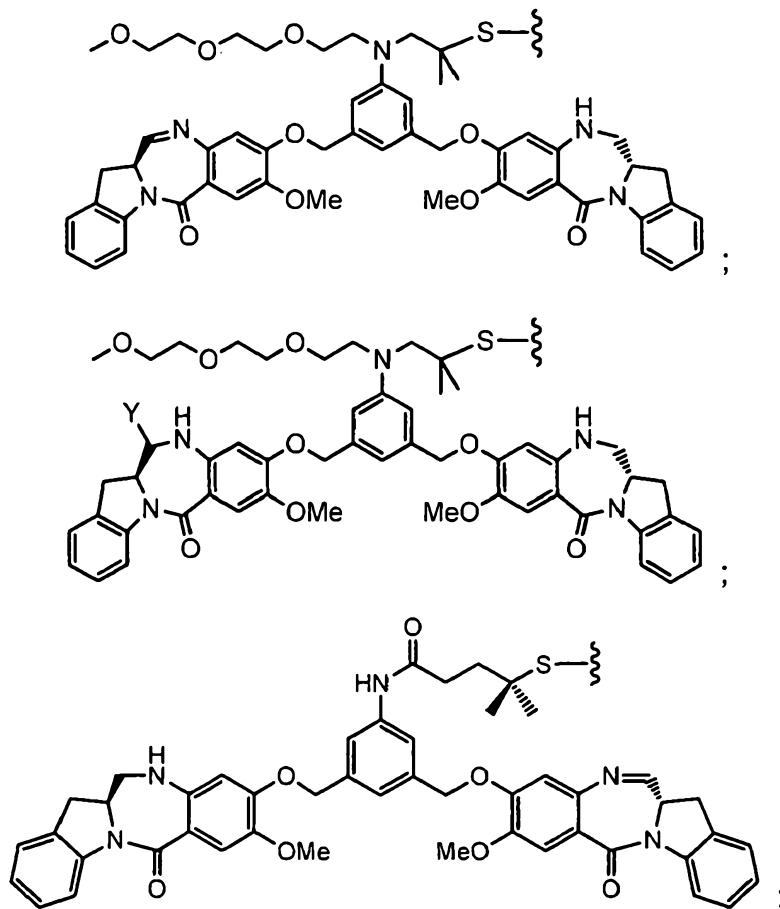
【0142】 在又另一更具體之實施例中，D 係由以下結構式表示：

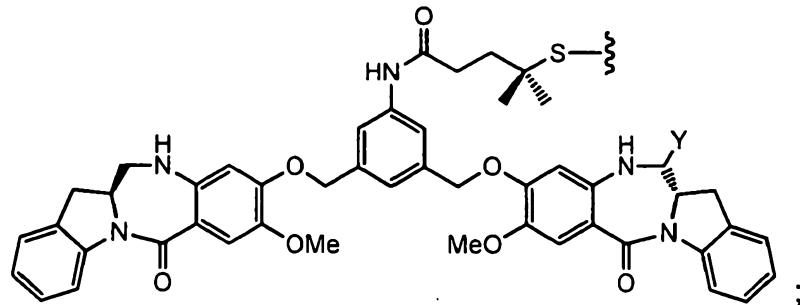


或其醫藥學上可接受之鹽，其中  $R_A''$  與  $R_B''$  相同或不同，且選自-H 及-Me；且其餘變數係如以上所描述。

**【0143】** 在某些實施例中，對於式(D6)-(D17)，在 N 與 C 之間之雙線=表示單鍵或雙鍵，條件為當其為雙鍵時，X 不存在且 Y 為-H，且當其為單鍵時，X 為-H；Y 為-OH 或-SO<sub>3</sub>M；M 為-H 或醫藥學上可接受之陽離子(例如 Na<sup>+</sup>)；X' 及 Y' 均為-H；A 及 A' 均為-O-；R<sub>6</sub> 為-OMe；且 R<sup>x</sup> 為具有 1 至 6 個碳原子之直鏈或分支鏈烷基。

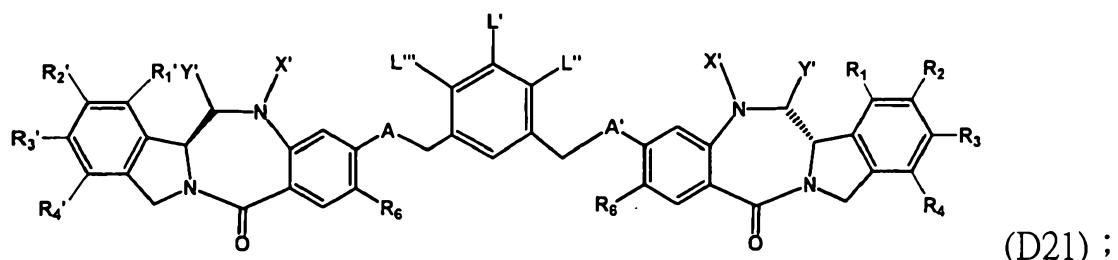
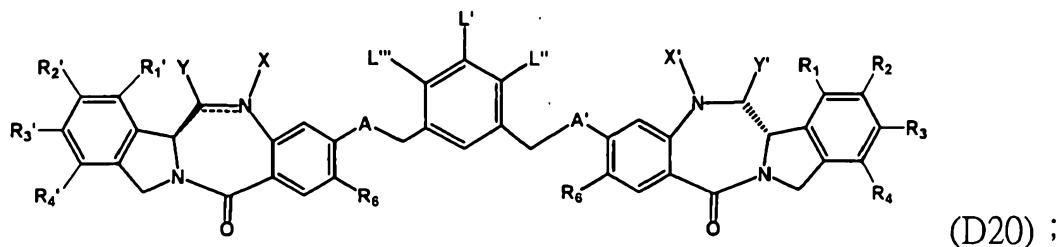
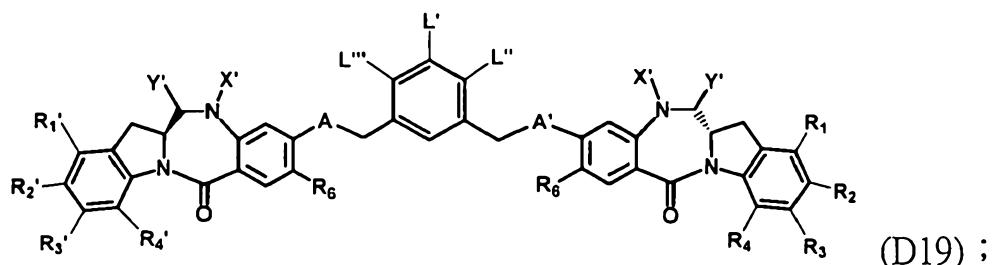
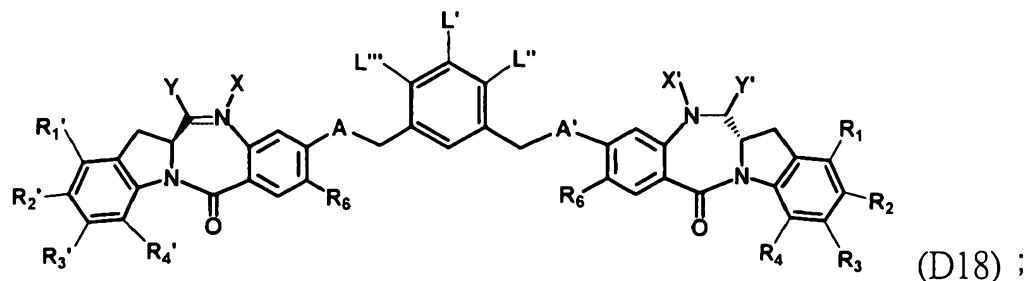
**【0144】** 在一個更具體之實施例中，D 係由以下結構式表示：

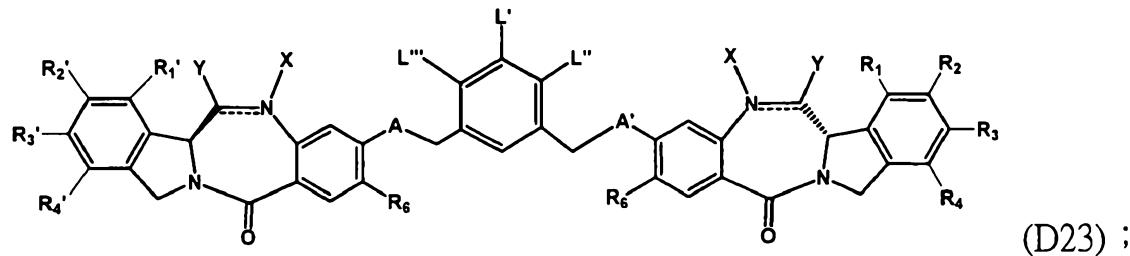
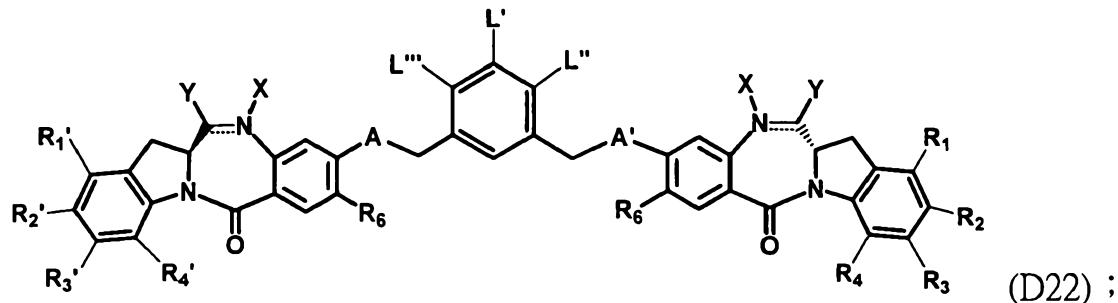




或其醫藥學上可接受之鹽，其中 Y 為 -H 或  $\text{-SO}_3\text{M}$ ，且 M 為  $\text{H}^+$ 或陽離子。甚至更具體言之，Y 為  $\text{-SO}_3\text{M}$ ，且 M 為  $\text{H}^+$ 、 $\text{Na}^+$ 或  $\text{K}^+$ 。

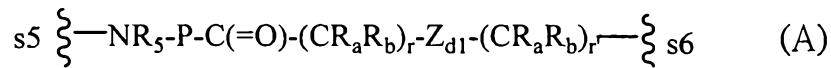
**【0145】** 在第 7 個具體實施例中，對於具有式(I)之偶聯物， $-\text{L}-\text{J}_D-$ 為鍵；且 D 係由以下結構式表示：





或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

$L'$ 、 $L''$  及  $L'''$  之一係由下式表示：



且其餘兩個相同或不同，且獨立地選自-H；視情況經取代的具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；聚乙二醇單元  $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$ ；鹵素；胍鎘[-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；疊氨基；-COR' ；-OCOR' ；及-OCONR' R' '；

$Z_{d1}$  為不存在、-C(=O)-NR<sub>9</sub>-或 -NR<sub>9</sub>-C(=O)-；

P 為胺基酸殘基或含有介於 2 至 20 個之間之胺基酸殘基的肽；

$R_a$  及  $R_b$  在每次出現時獨立地為 -H、(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基或帶電荷之取代基，或可離子化之基團 Q；

r 及 r' 獨立地為 1 至 6 之整數；

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

時，X 為-H 或胺保護基；

Y 為選自以下之離去基團：-OR'、-OCOR'、-OCOOR'、-OCONR' R'、-NR' R'、-NR' COR'、-NR' NR' R'，視情況經取代之 5 賁或 6 賁含氮雜環(例如，經由氮原子附接之哌啶、四氫吡咯、吡唑、嗎啉等)、由-NR' (C=NH)NR' R' 表示之胍鎰、胺氨基酸或由-NRCOP' 表示之肽、-SR'、-SOR'、鹵素、氰基、疊氨基、-OSO<sub>3</sub>H、亞硫酸酯基(-SO<sub>3</sub>H 或-SO<sub>2</sub>H)、偏亞硫酸酯(H<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)、單-、二-、三-及四-硫代磷酸酯(PO<sub>3</sub>SH<sub>3</sub>、PO<sub>2</sub>S<sub>2</sub>H<sub>2</sub>、POS<sub>3</sub>H<sub>2</sub>、PS<sub>4</sub>H<sub>2</sub>)、硫代磷酸酯(R<sup>i</sup>O)<sub>2</sub>PS(OR<sup>j</sup>)、R<sup>i</sup>S-、R<sup>i</sup>SO、R<sup>i</sup>SO<sub>2</sub>、R<sup>i</sup>SO<sub>3</sub>、硫代硫酸酯(HS<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)、連二亞硫酸酯(HS<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)、二硫代磷酸酯(P(=S)(OR<sup>k</sup>)(S)(OH))、羥肟酸(R<sup>k</sup> C(=O)NOH)及甲醛次硫酸根(HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>)，或其混合物，其中 R<sup>i</sup> 為具有 1 至 10 個碳原子之直鏈或分支鏈烷基，且經至少一個選自-N(R<sup>j</sup>)<sub>2</sub>、-CO<sub>2</sub>H、-SO<sub>3</sub>H 及-PO<sub>3</sub>H 之取代基取代；R<sup>j</sup> 可進一步視情況經本文關於烷基所描述之取代基取代；R<sup>j</sup> 為具有 1 至 6 個碳原子之直鏈或分支鏈烷基；R<sup>k</sup> 為具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基、芳基、雜環基或雜芳基；

P' 為胺氨基酸殘基或含有介於 2 至 20 個之間之胺氨基酸殘基的肽；

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

$R'$  及  $R''$  各自獨立地選自-H；-OH；-OR；-NHR；-NR<sub>2</sub>；-COR；視情況經取代的具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；聚乙二醇單元-(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 1 至 6 個獨立地選自 O、S、N 及 P 之雜原子的 3 員至 18 員雜環；

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

$n$  為 1 至 24 之整數；

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

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

$R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R'_1$ 、 $R'_2$ 、 $R'_3$  及  $R'_4$  各自獨立地選自由以下各物組成之群：-H；視情況經取代的具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；聚乙二醇單元 -(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>；鹵素；脲鎔[-NH(C=NH)NH<sub>2</sub>]；-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；疊氨基；-COR'；-OCOR'；及-OCONR' R'；

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

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

R<sub>s</sub>及 R<sub>9</sub>各自獨立地為-H 或視情況經取代的具有 1 至 10 個碳原子之直鏈或分支鏈烷基；且其餘變數係如以上在第一實施例或第 1 個具體實施例，或其中所描述之任何更具體之實施例中所描述。

**【0146】** 在一個更具體之實施例中，對於式(D18)-(D23)，L' 係由式(A)表示，且 L'' 及 L''' 均為 -H。

**【0147】** 在另一個更具體之實施例中，對於式(D18)-(D23)：

在 N 與 C 之間之雙線=表示單鍵或雙鍵，條件為當其為雙鍵時，X 不存在且 Y 為-H，且當其為單鍵時，X 為-H，Y 為-OH 或-SO<sub>3</sub>M；

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>1</sub>'、R<sub>2</sub>'、R<sub>3</sub>' 及 R<sub>4</sub>' 均為-H；

R<sub>6</sub> 為-OMe；

X' 及 Y' 均為-H；

A 及 A' 為-O-；且

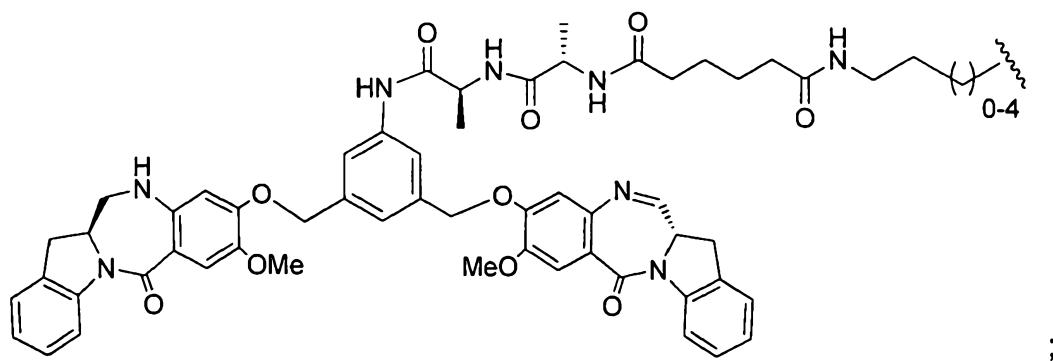
M 為 H<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>或 K<sup>+</sup>；且其餘變數係如以上第 7 個具體實施例或以上所描述之任何更具體之實施例中所描述。

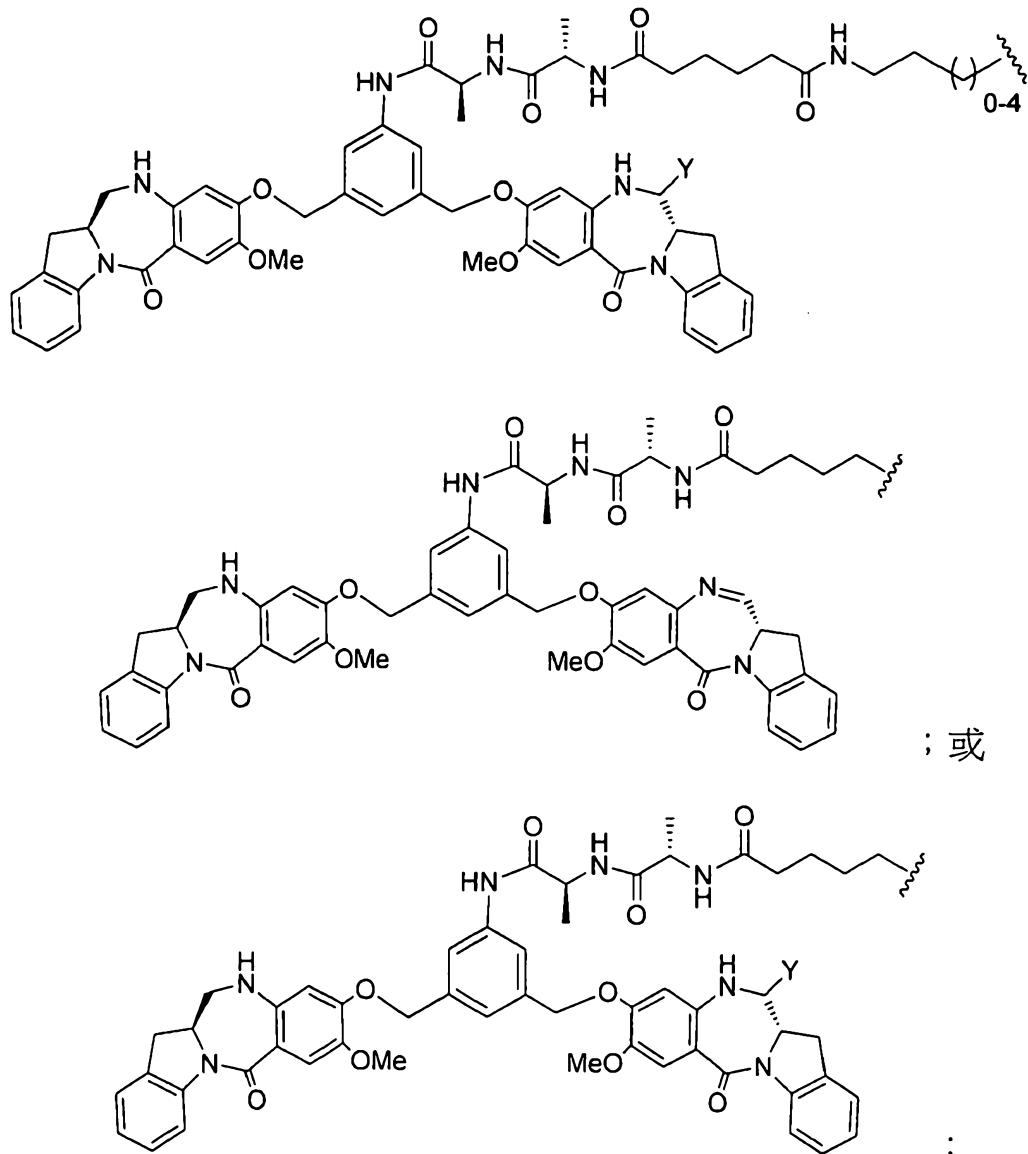
**【0148】** 在又另一更具體之實施例中，對於式(D18)-(D23)，R<sub>a</sub> 及 R<sub>b</sub> 均為 H；且其餘變數係如以上第 7 個具體實施例或以上所描述之任何更具體之實施例中所描述。

**【0149】** 在另一更具體之實施例中，對於式(D18)-(D23)，R<sub>s</sub> 及 R<sub>9</sub> 各自獨立地為 H 或 Me；且其餘變數係如以上第 7 個具體實施例或以上所描述之任何更具體之實施例中所描述。更具體言之，R<sub>s</sub> 及 R<sub>9</sub> 均為 H。

**【0150】** 在另一更具體之實施例中，對於式(D18)-(D23)，P 為含有 2 至 10 個胺基酸殘基之肽；且其餘變數係如以上第 7 個具體實施例或以上所描述之任何更具體之實施例中所描述。更具體言之，P 為含有 2 至 5 個胺基酸殘基之肽。甚至更具體言之，P 係選自 Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Lle-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-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: 17)、β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 18) 及 Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 19)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala 及 D-Ala-D-Ala。

**【0151】** 在另一更具體之實施例中，對於具有式(I)之偶聯物，-L-J<sub>b</sub>' -D 係由以下結構式表示：

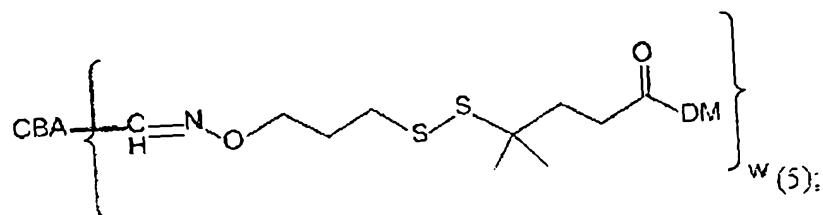
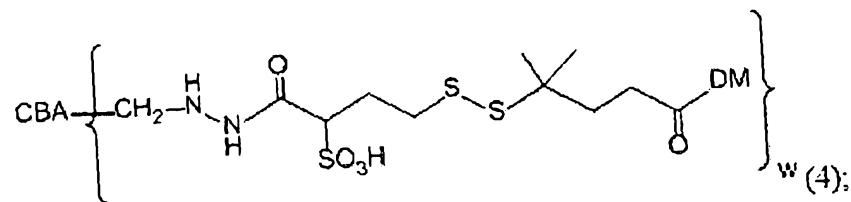
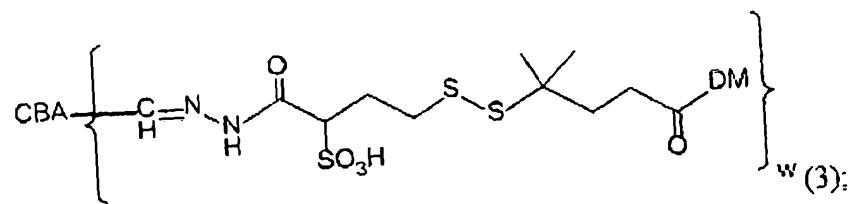
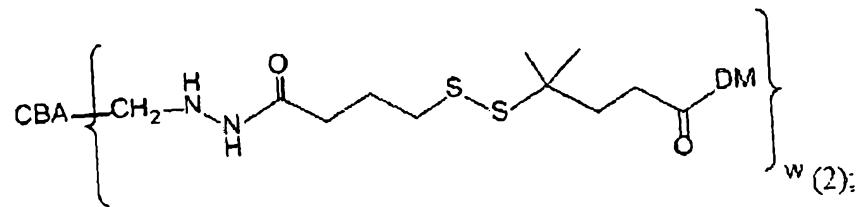
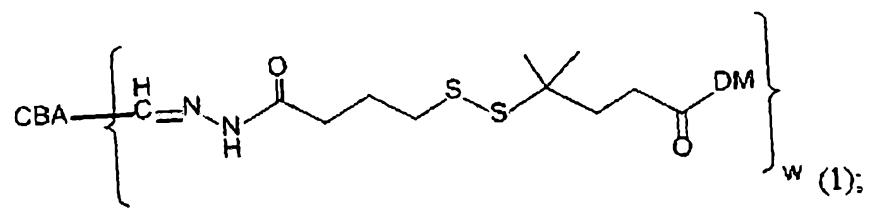


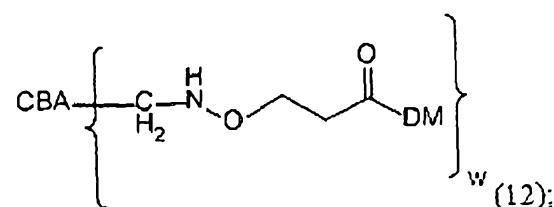
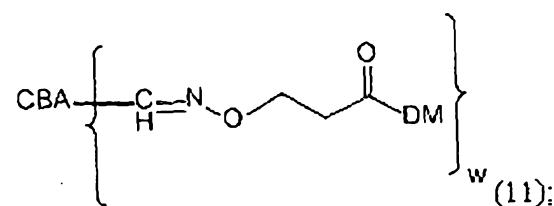
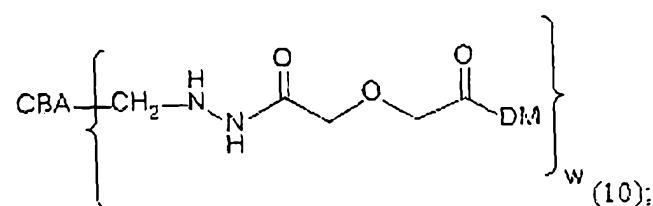
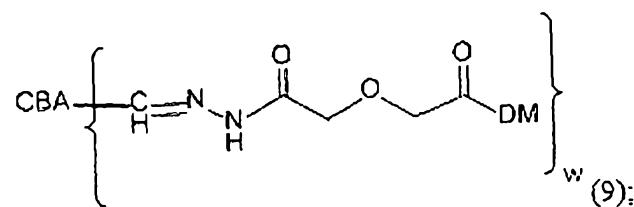
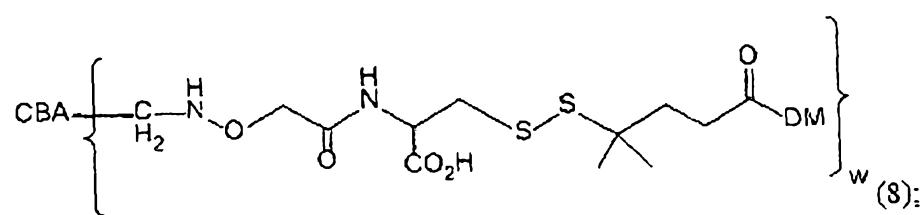
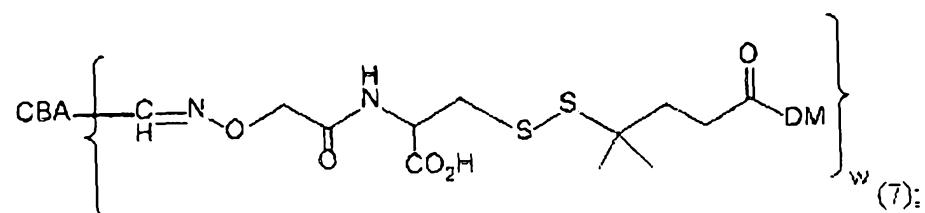
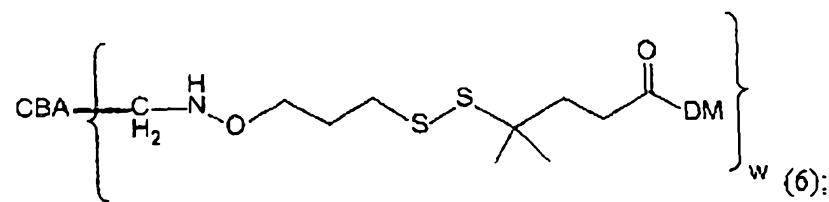


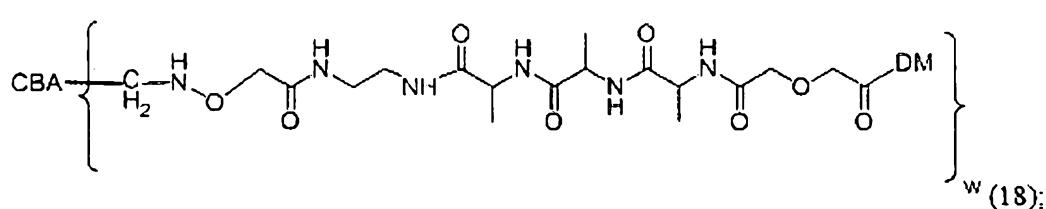
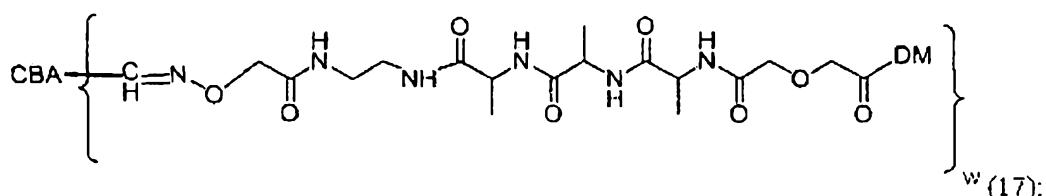
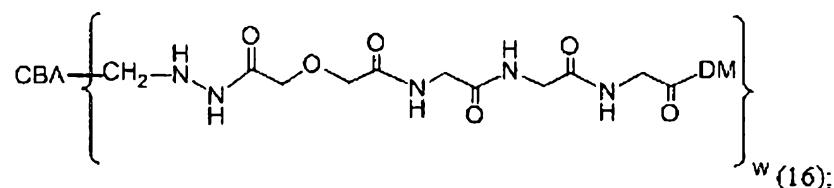
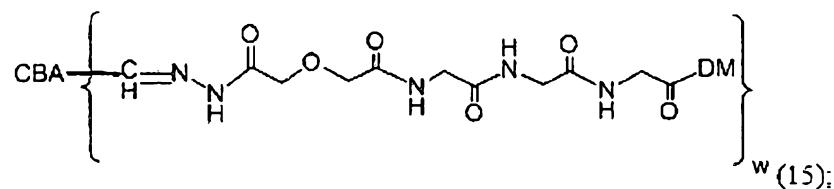
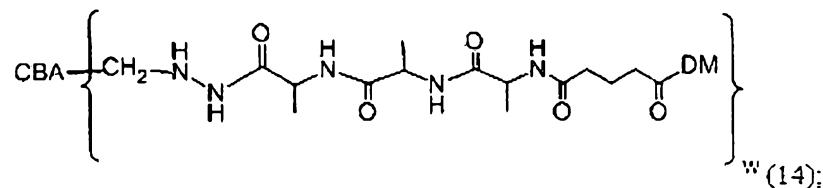
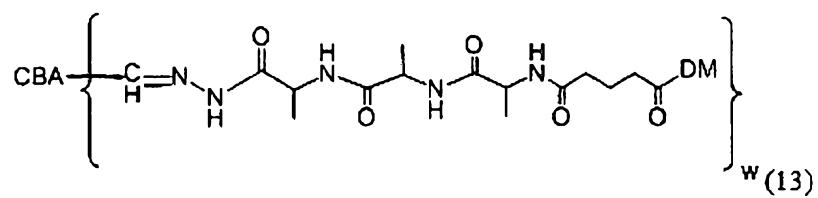
或其醫藥學上可接受之鹽，其中 Y 為 -H 或-SO<sub>3</sub>M，且 M 為 H<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>

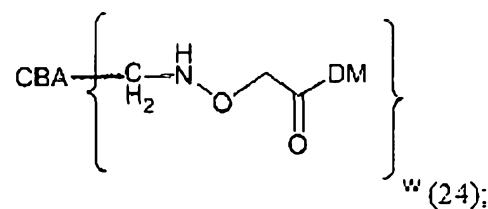
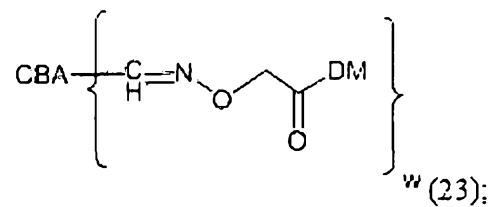
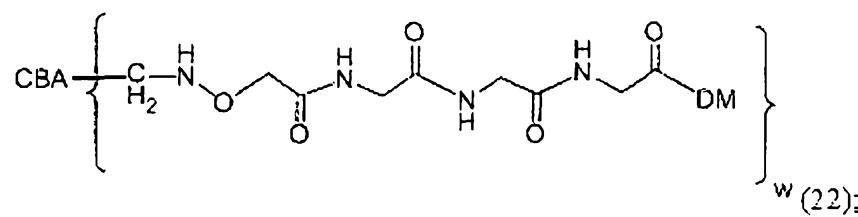
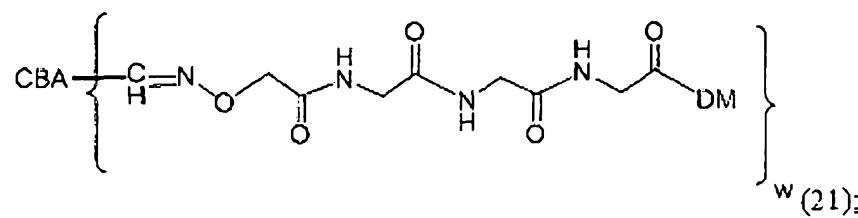
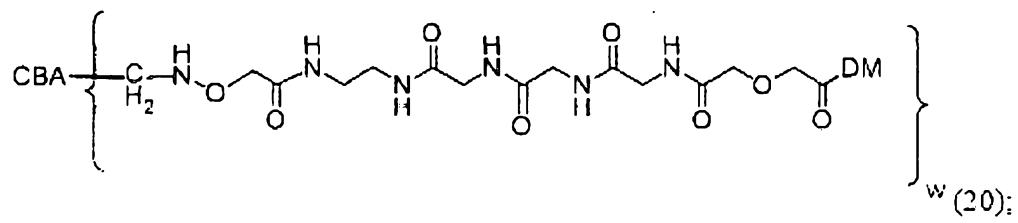
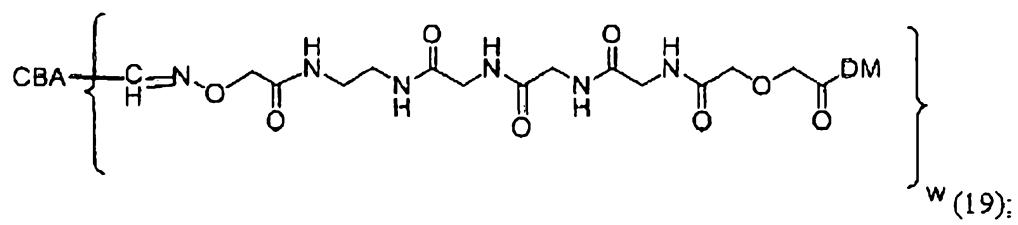
或  $K^+$ 。

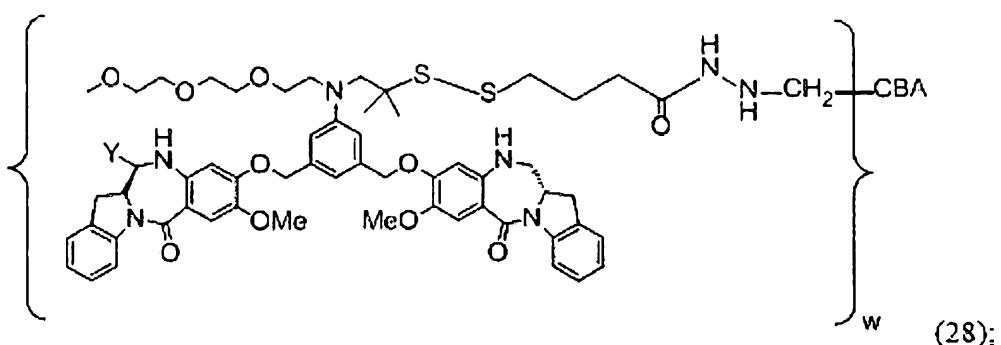
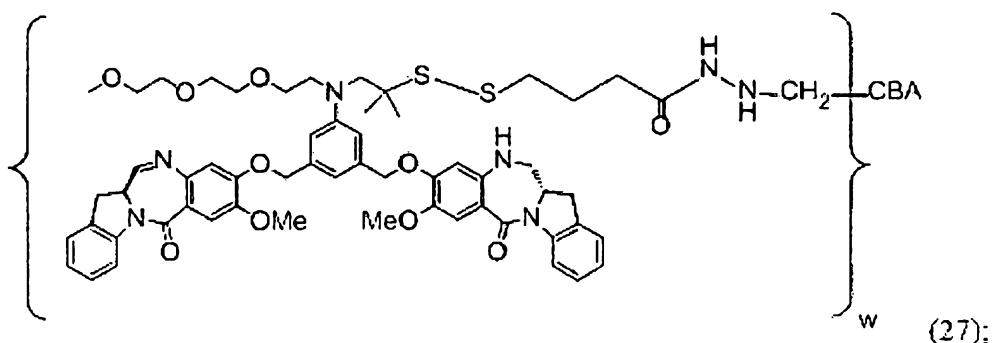
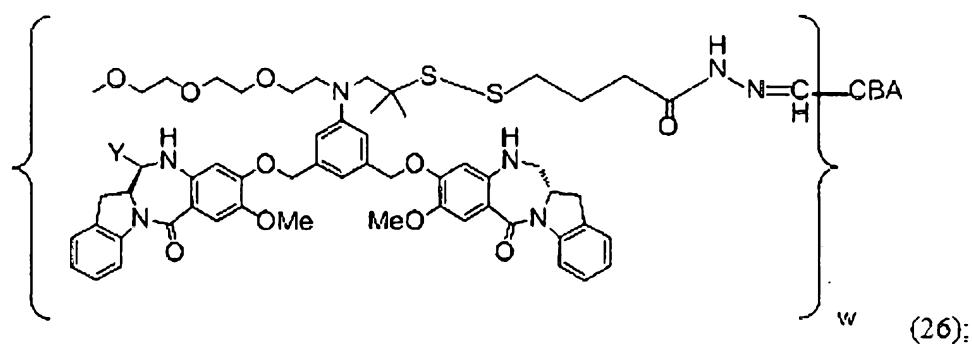
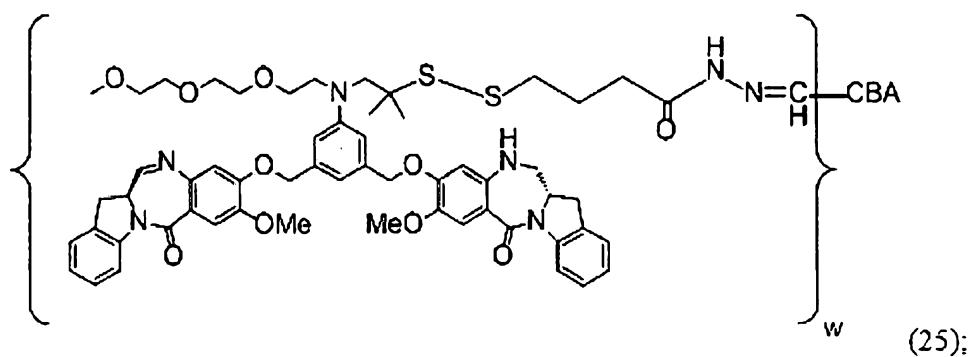
【0152】 在第 8 個具體實施例中，式(I)之偶聯物係由以下結構式表示：

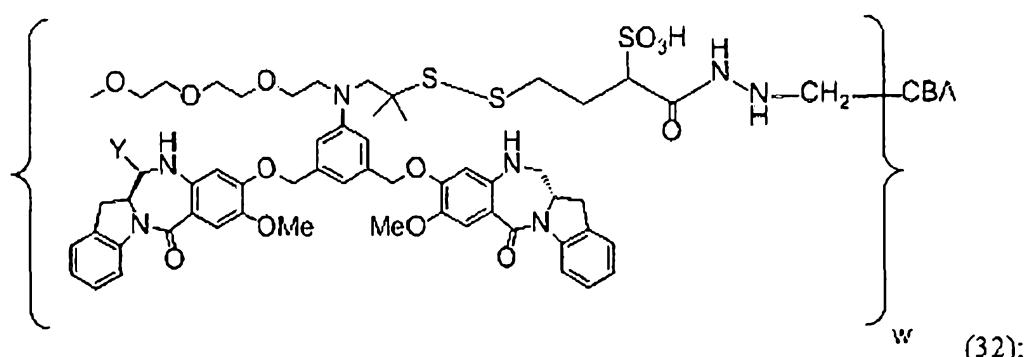
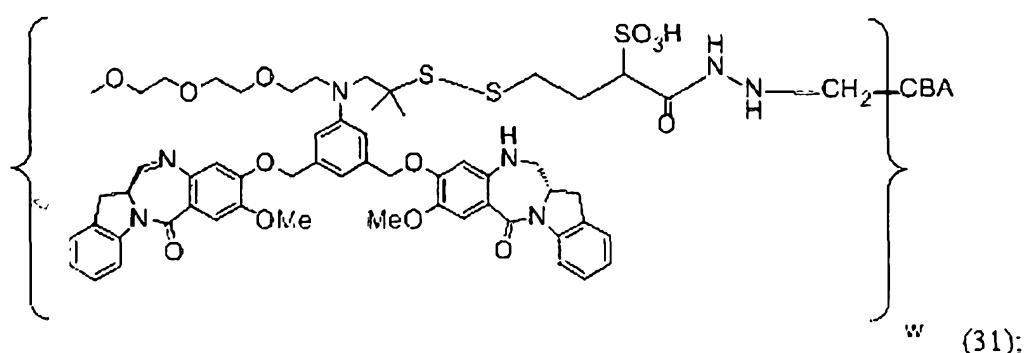
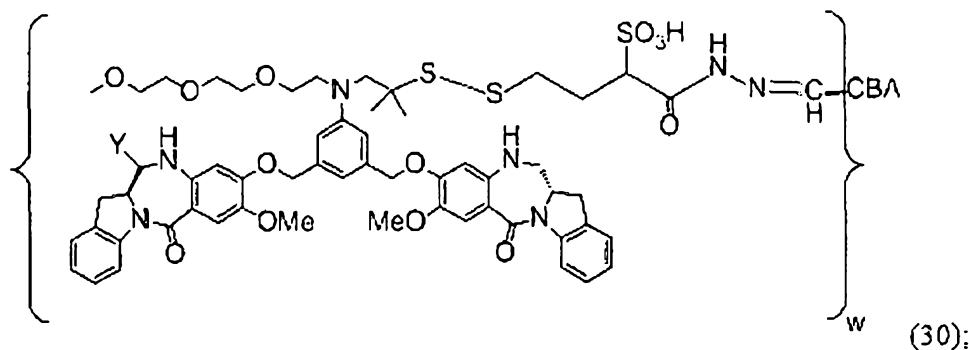
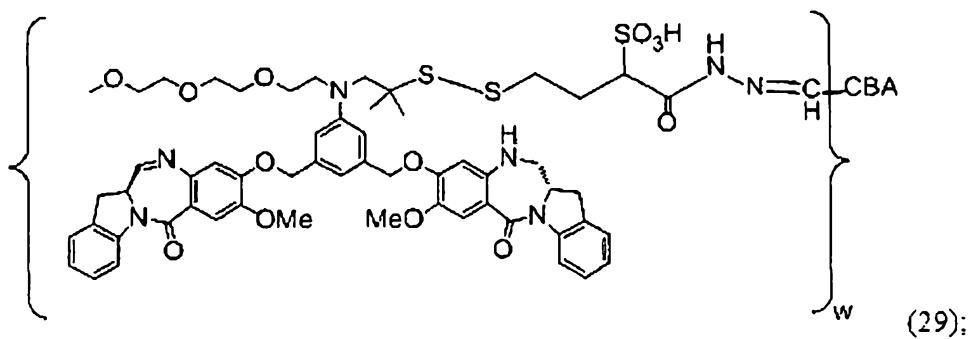


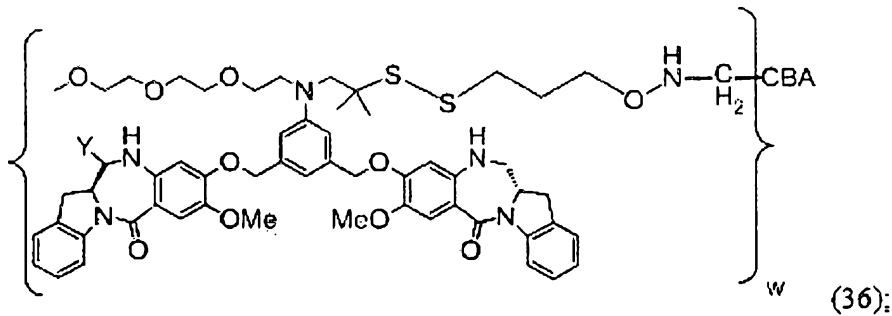
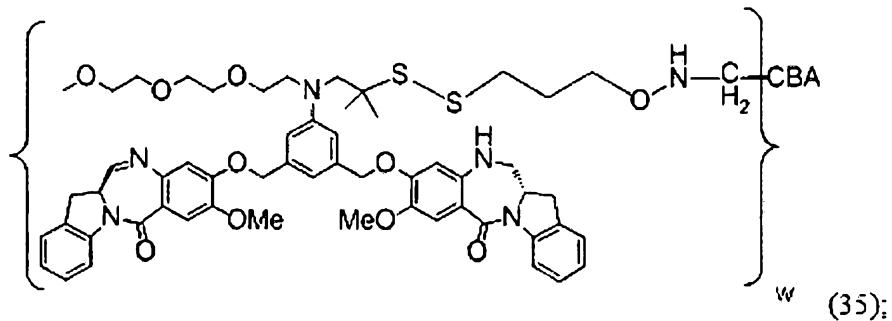
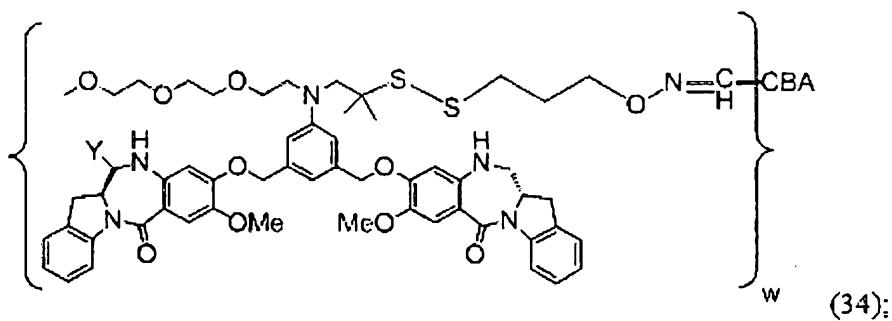
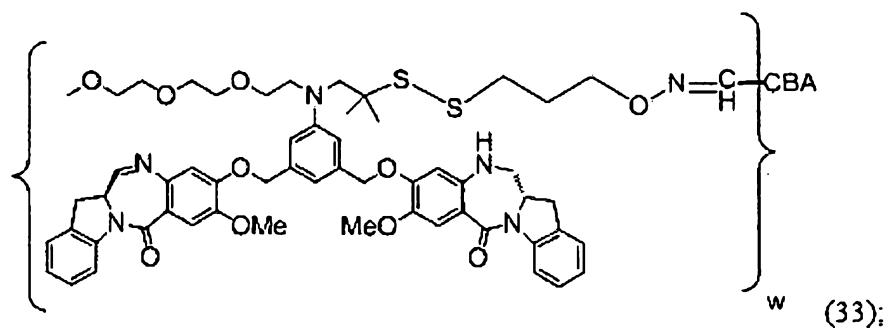


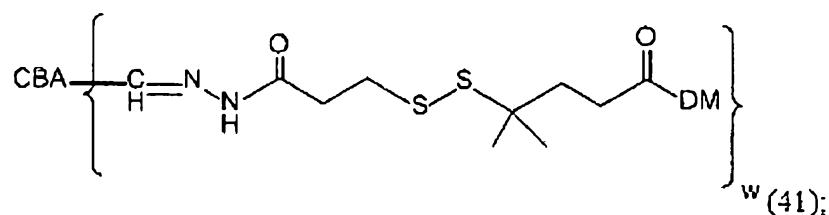
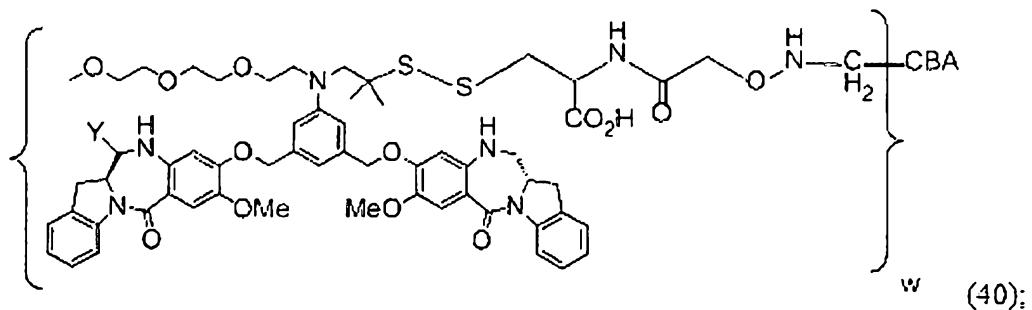
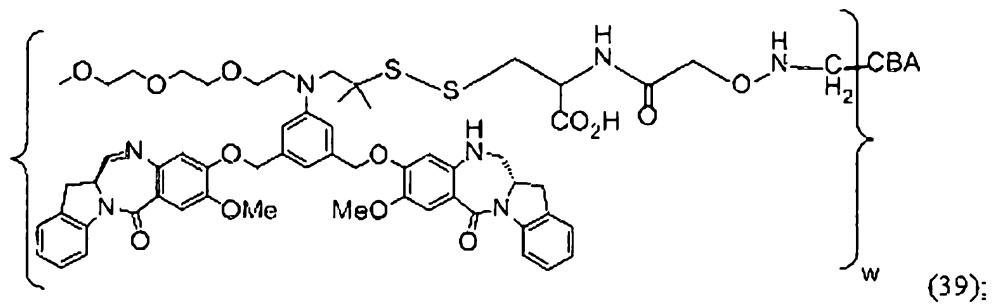
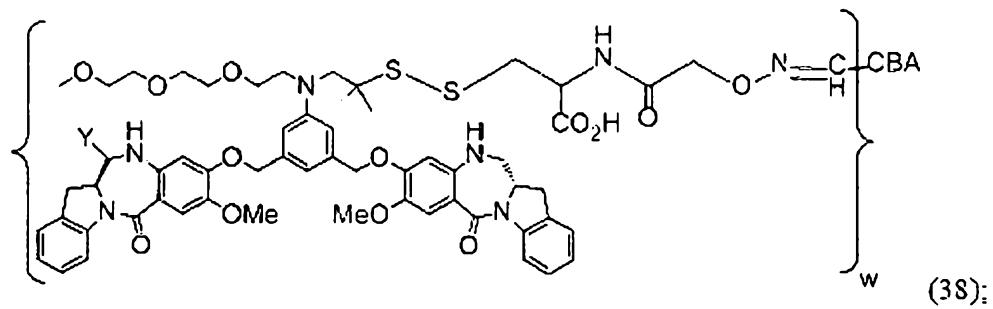
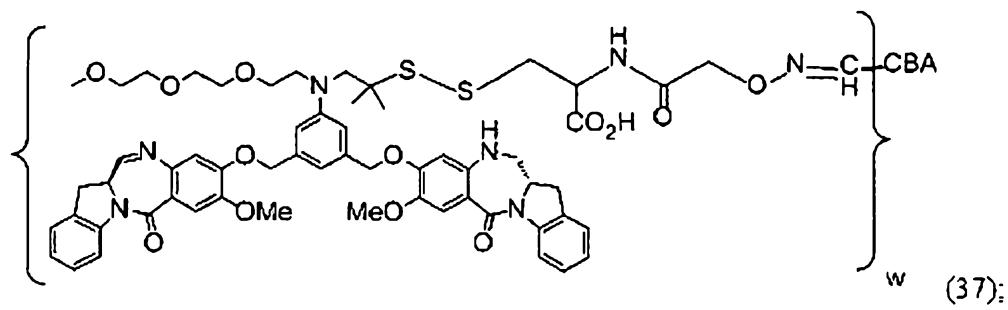


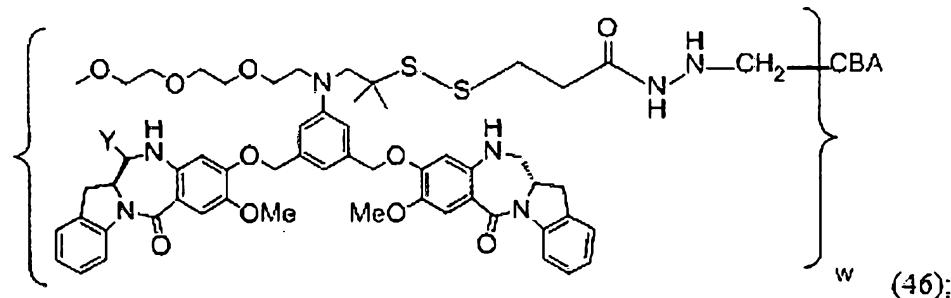
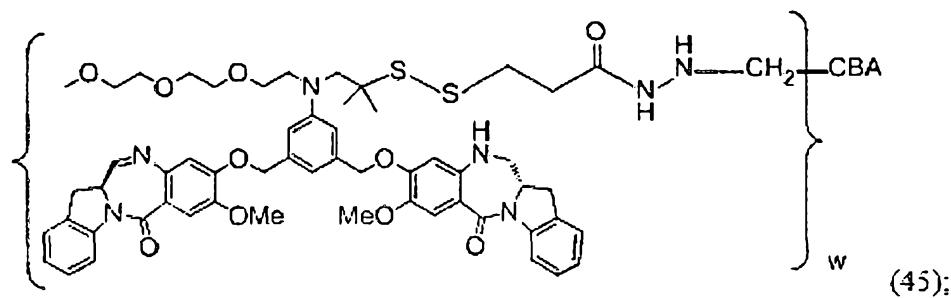
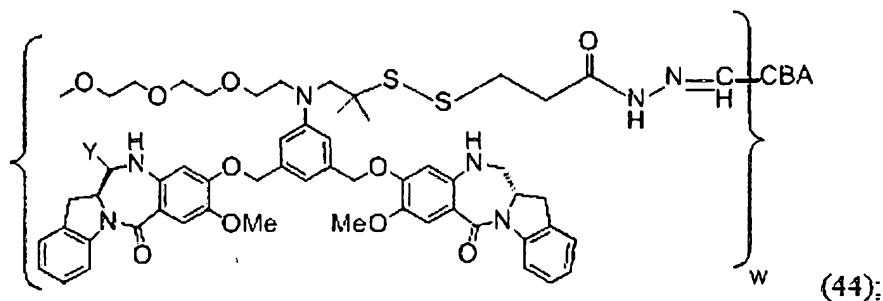
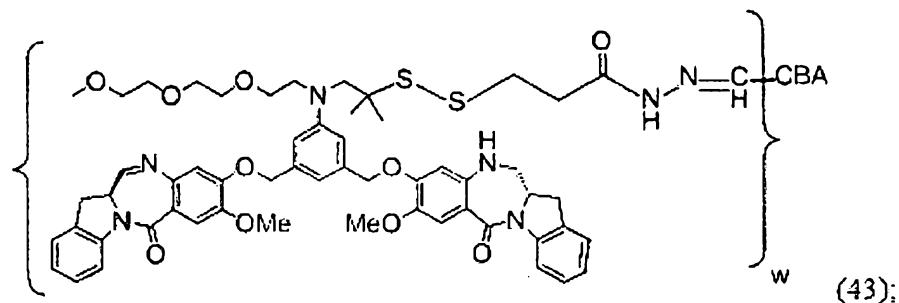
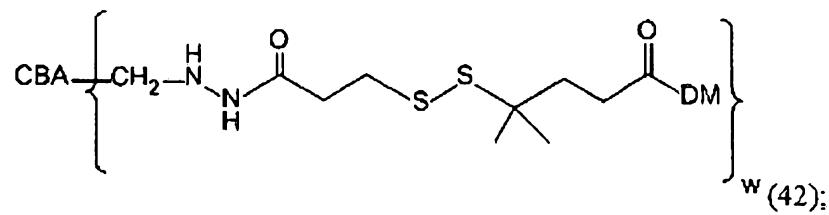


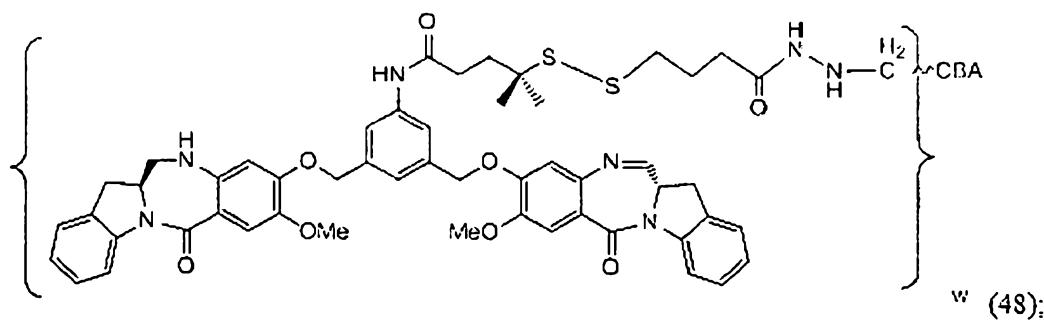
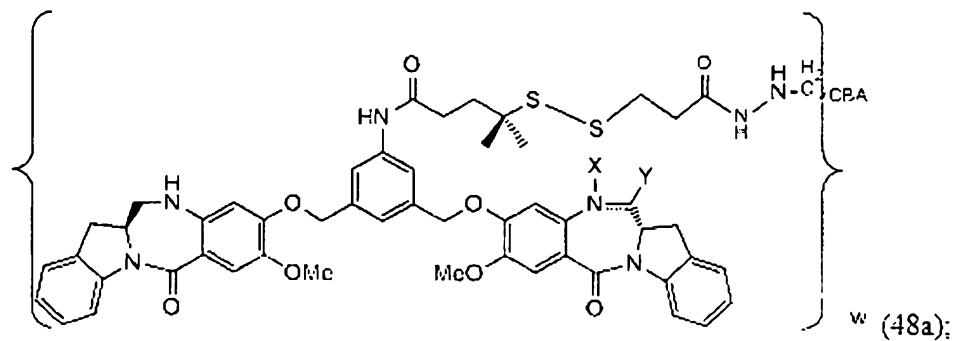
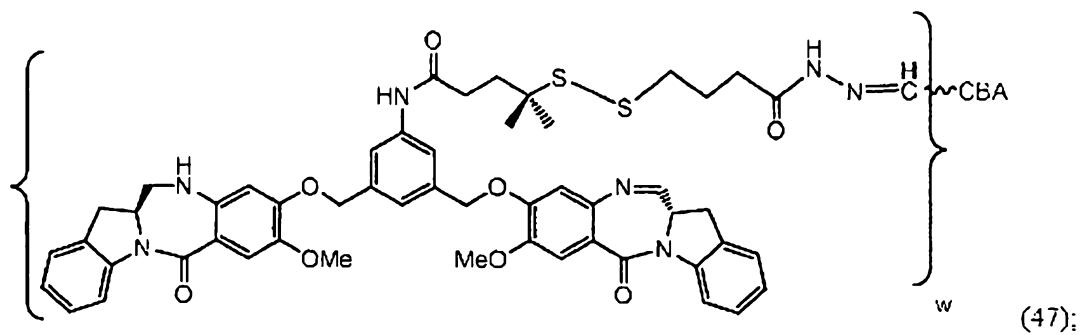
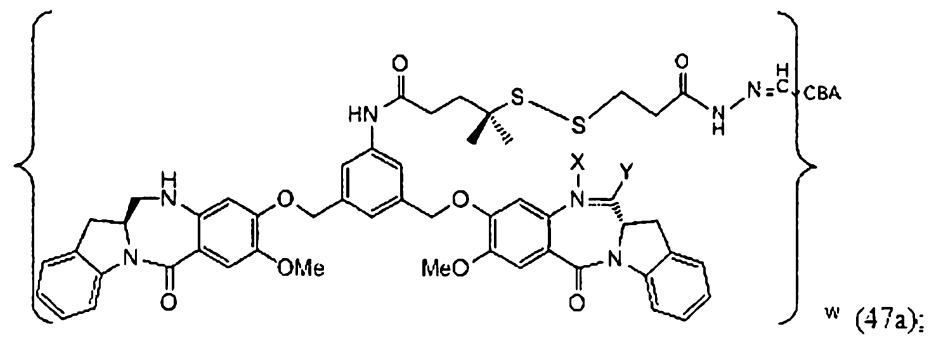


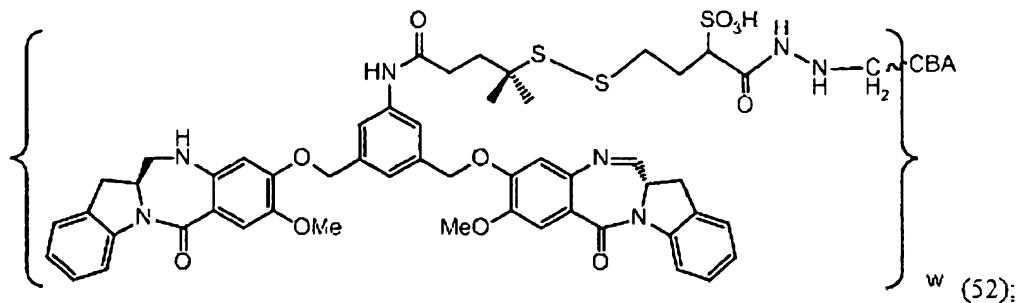
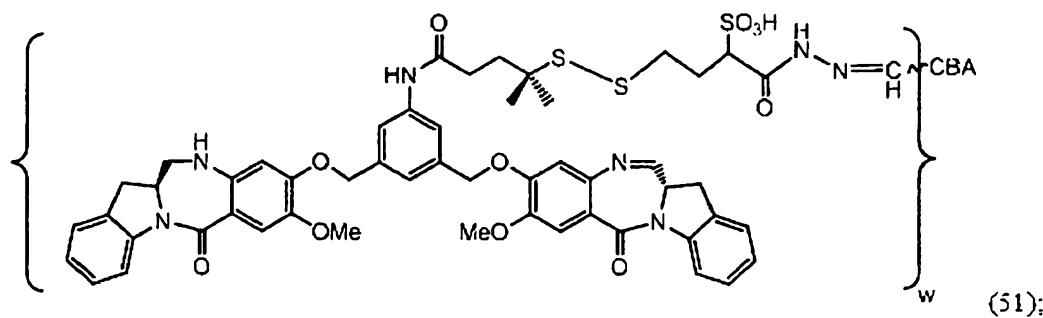
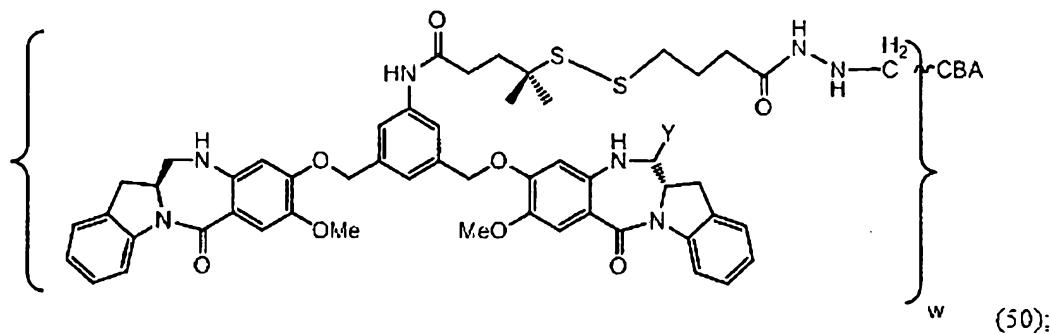
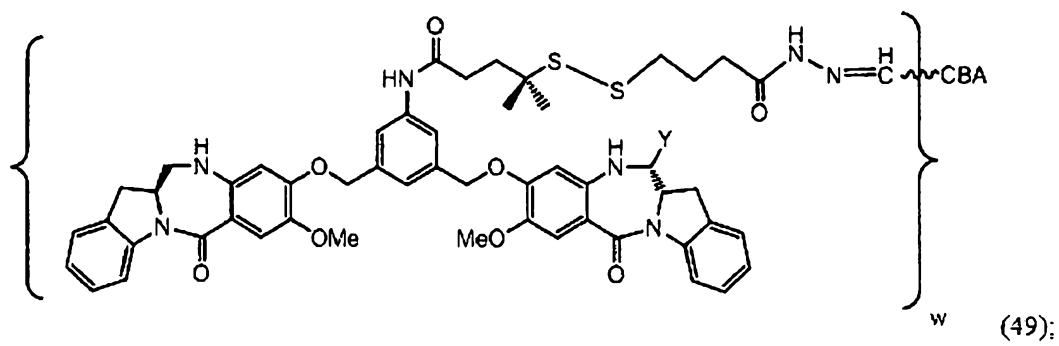


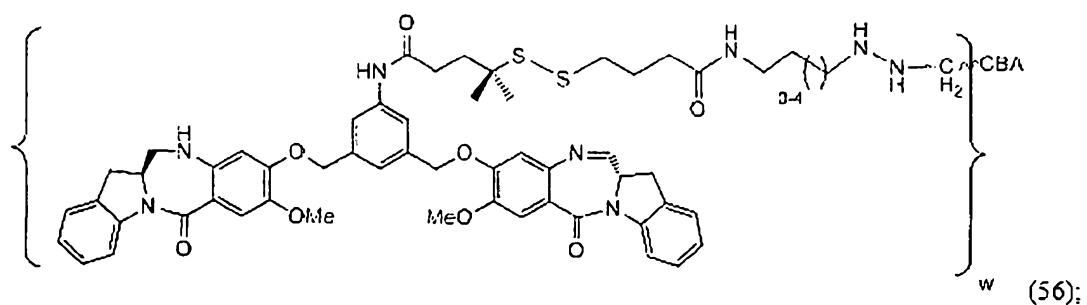
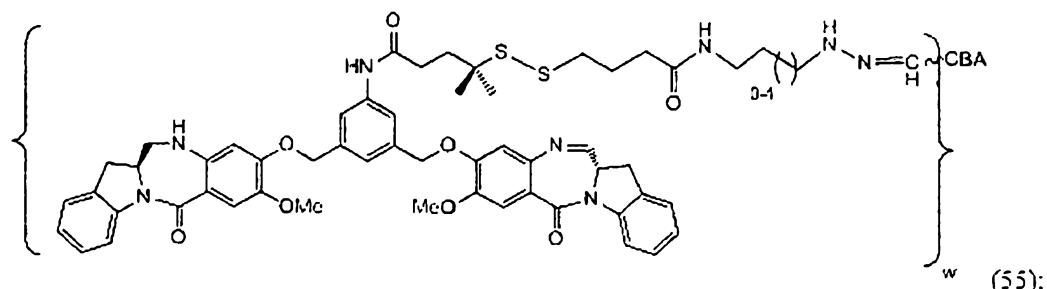
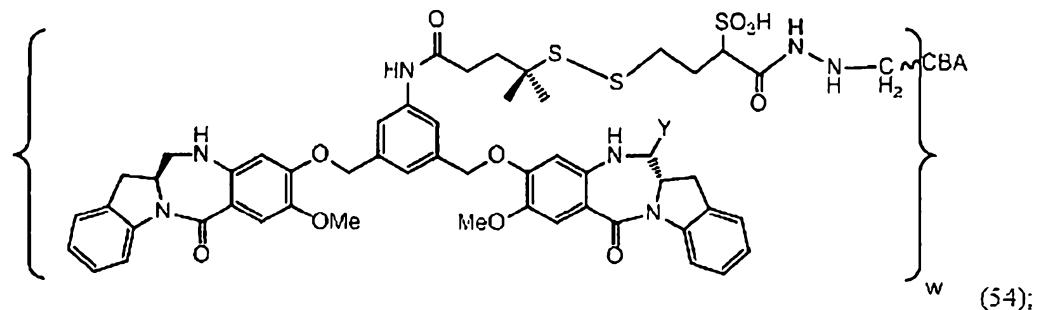
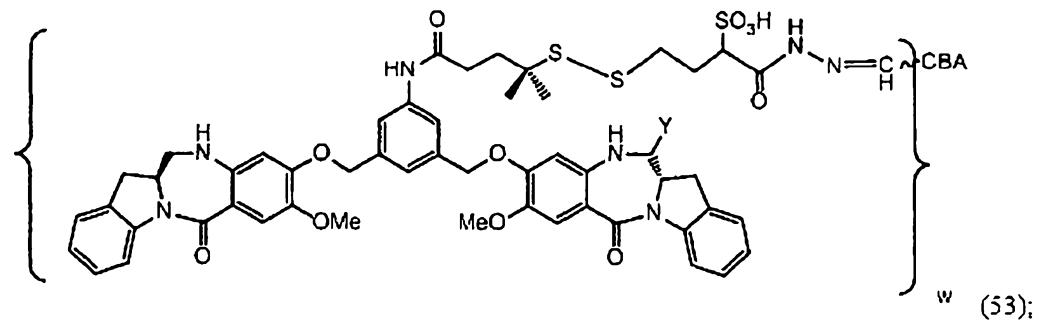


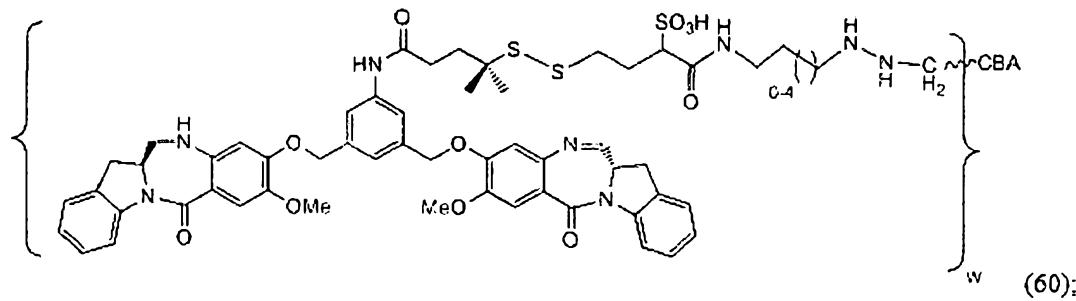
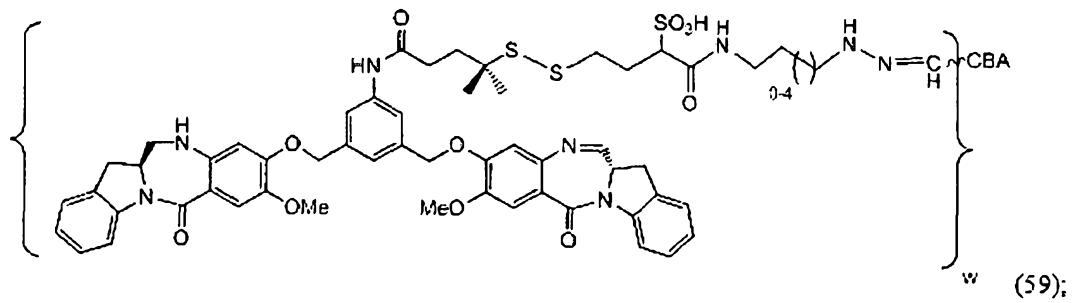
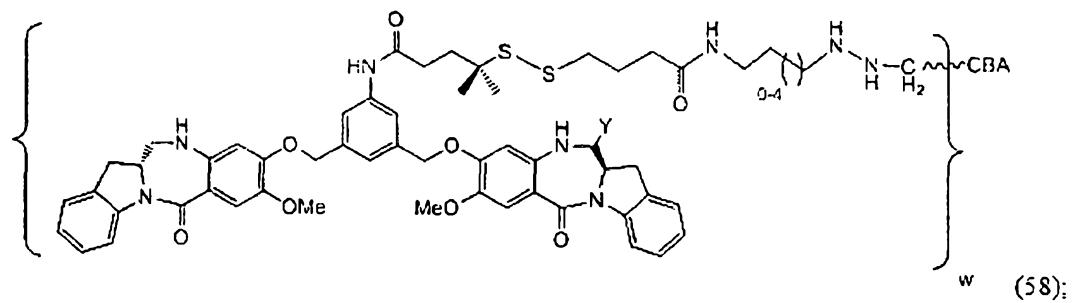
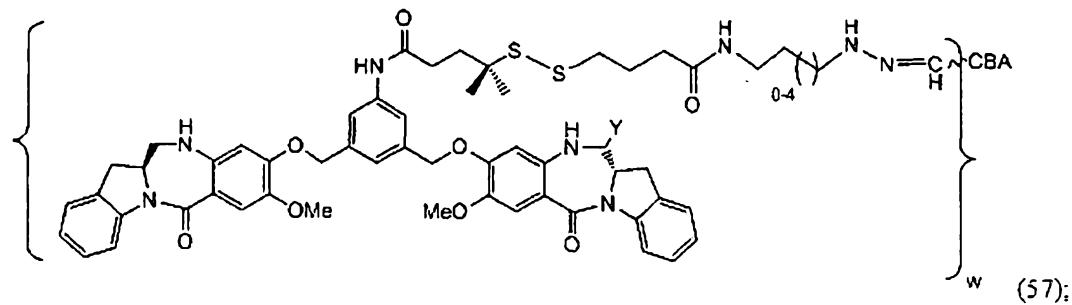


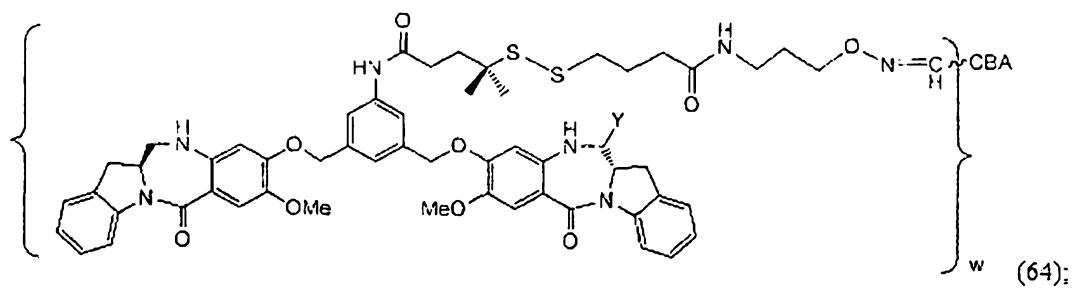
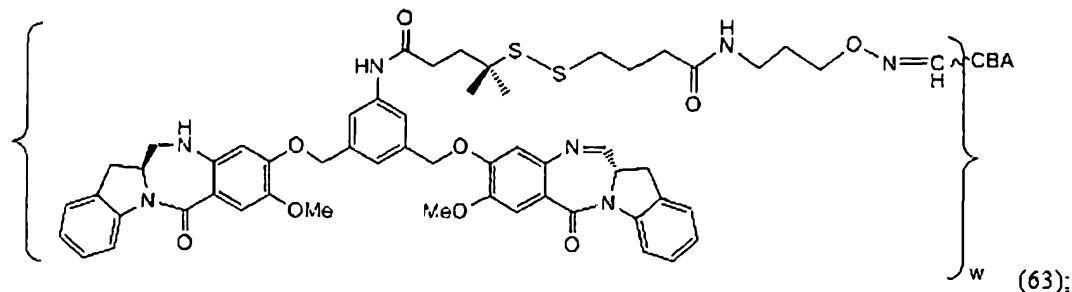
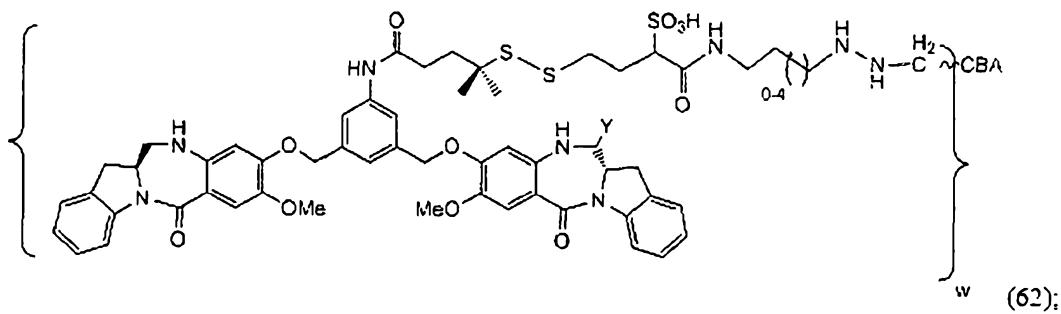
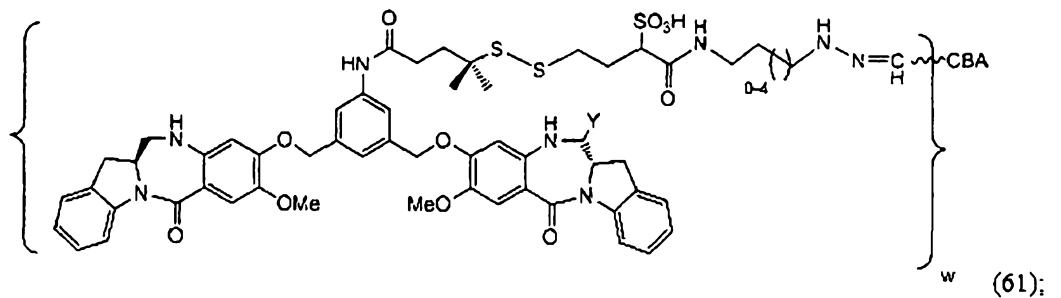


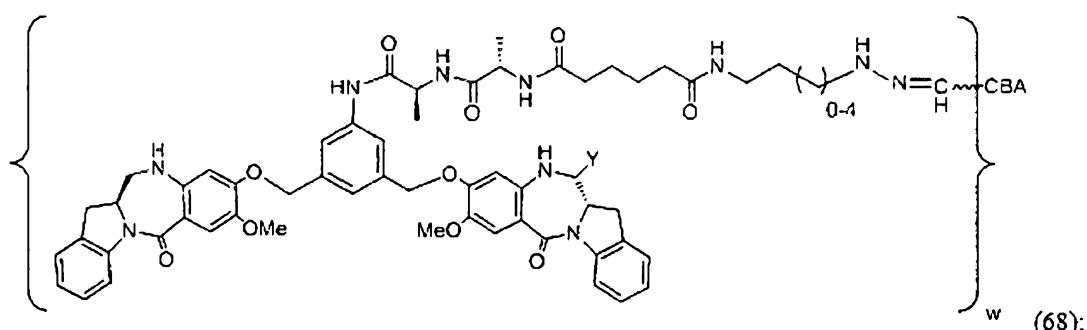
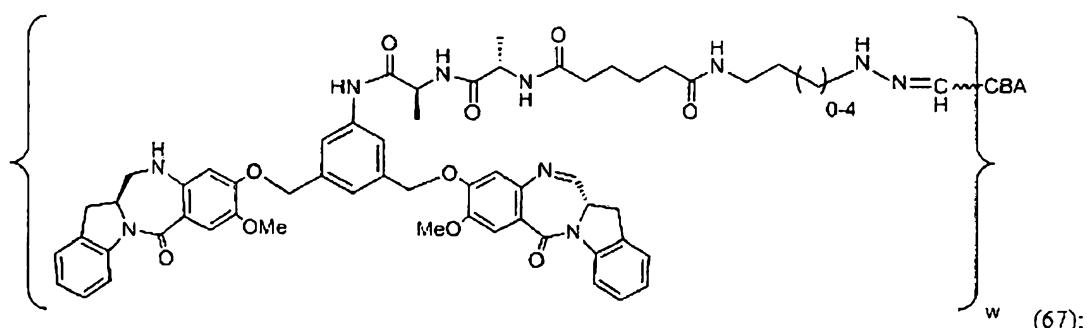
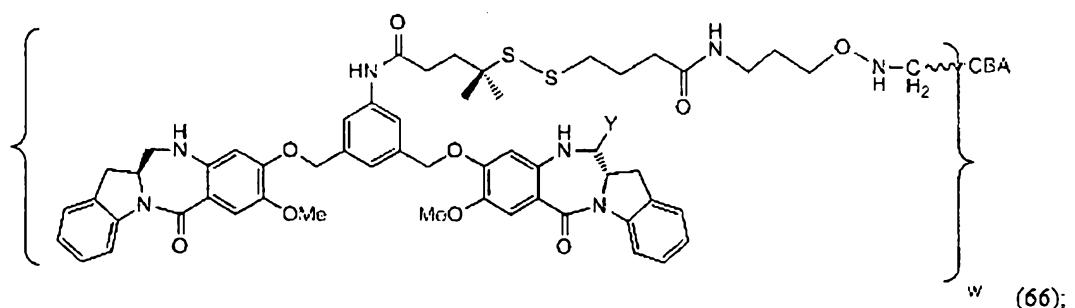
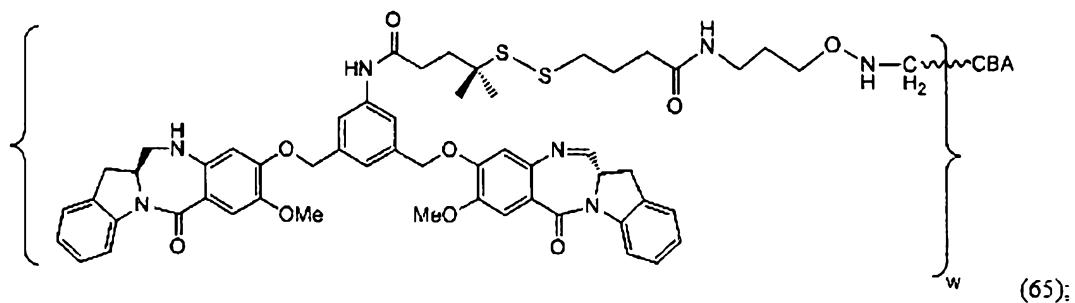


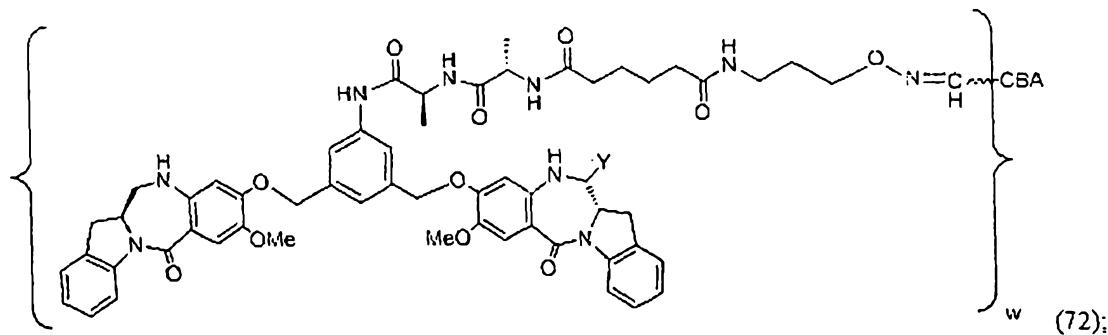
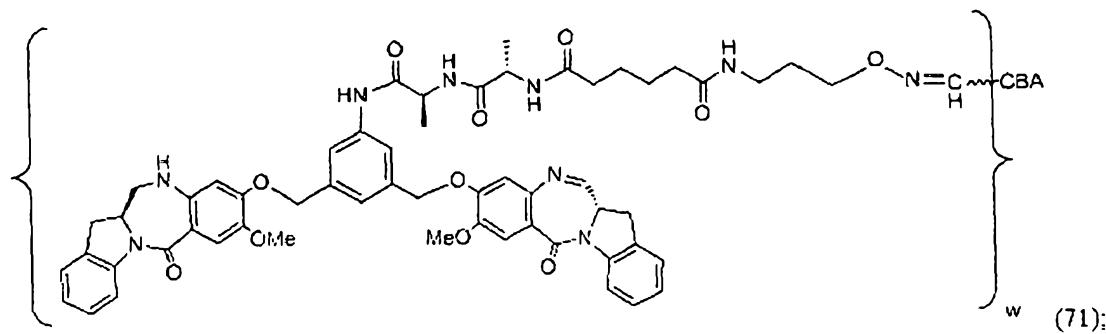
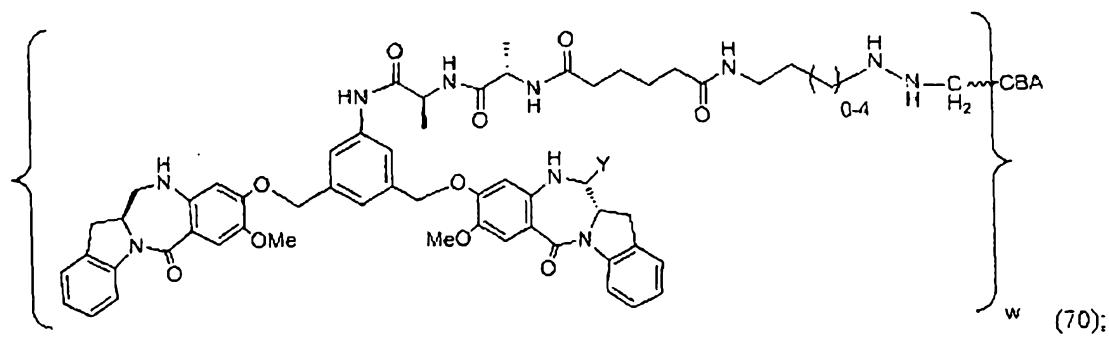
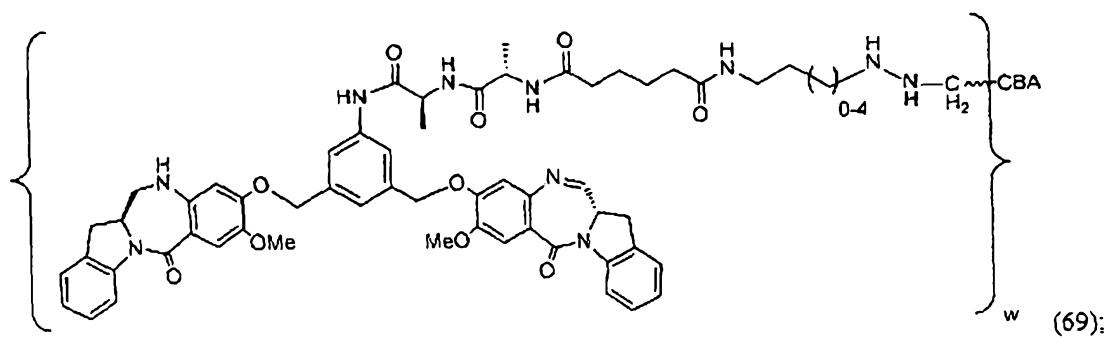


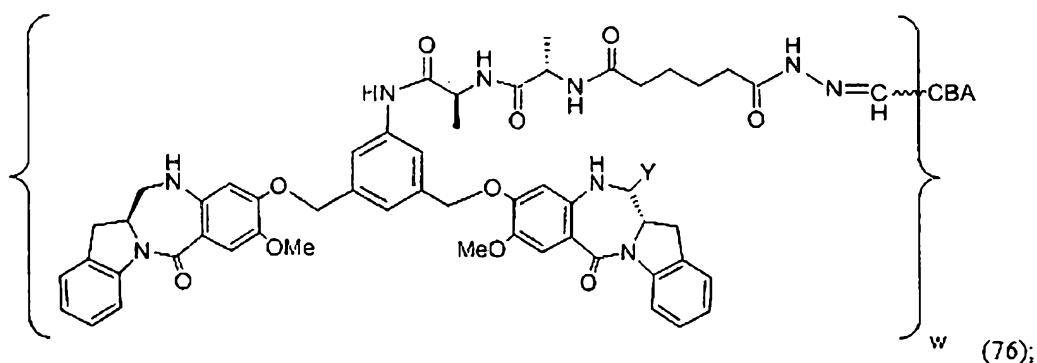
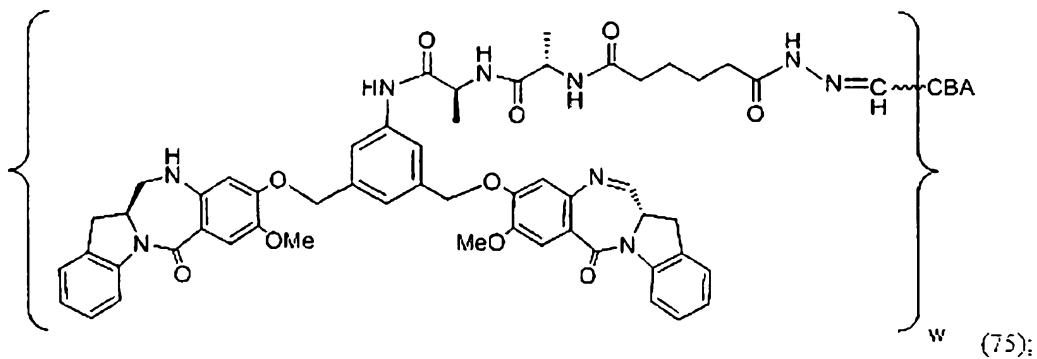
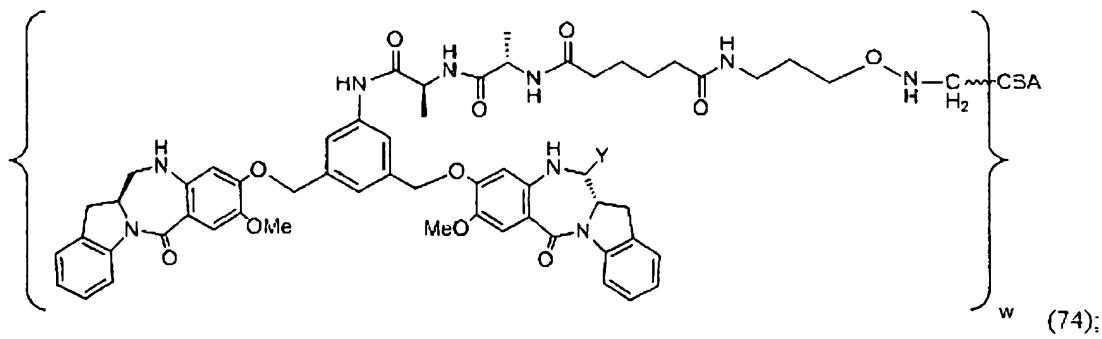
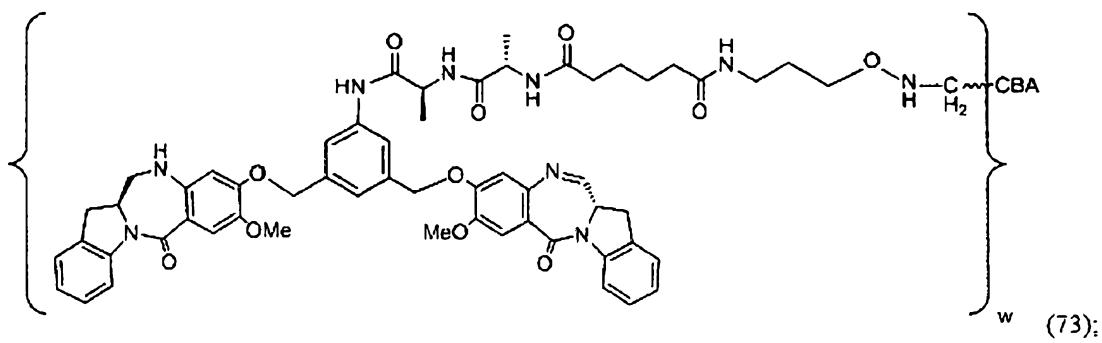


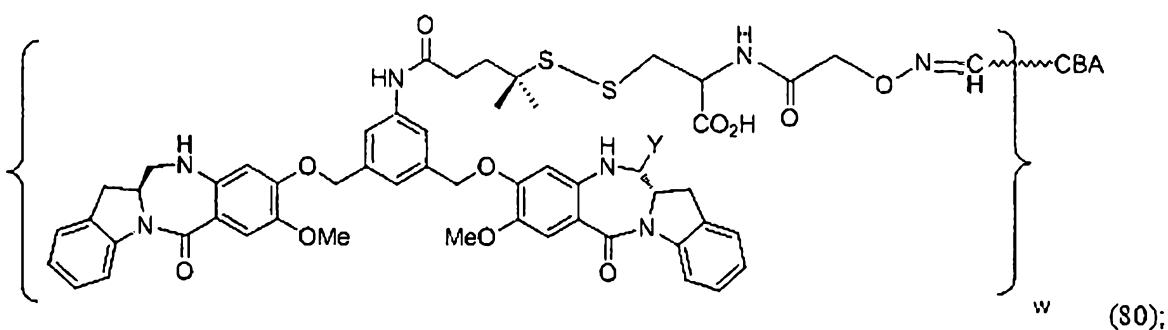
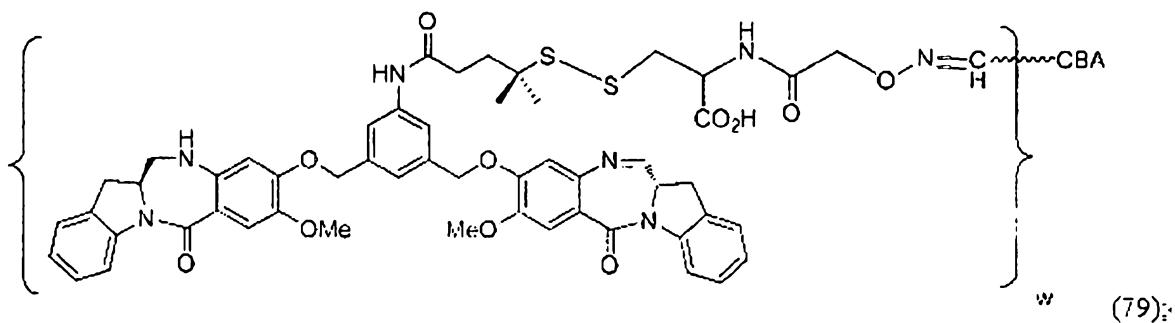
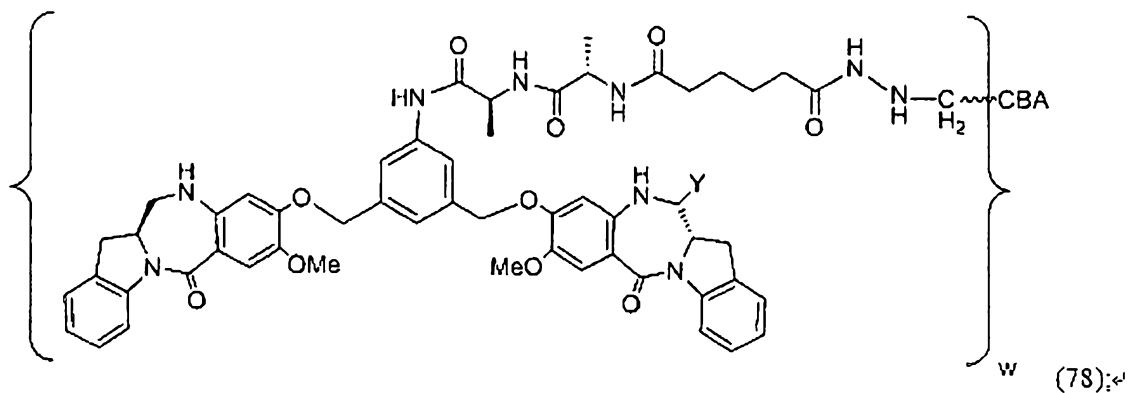
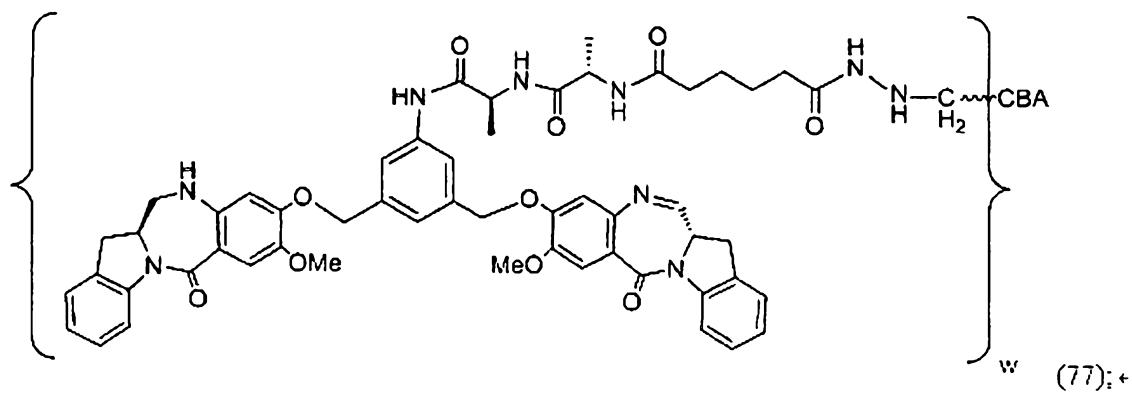


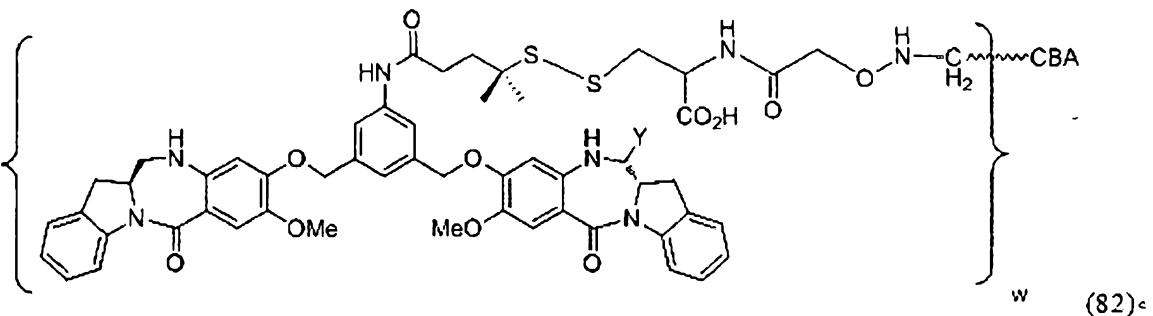
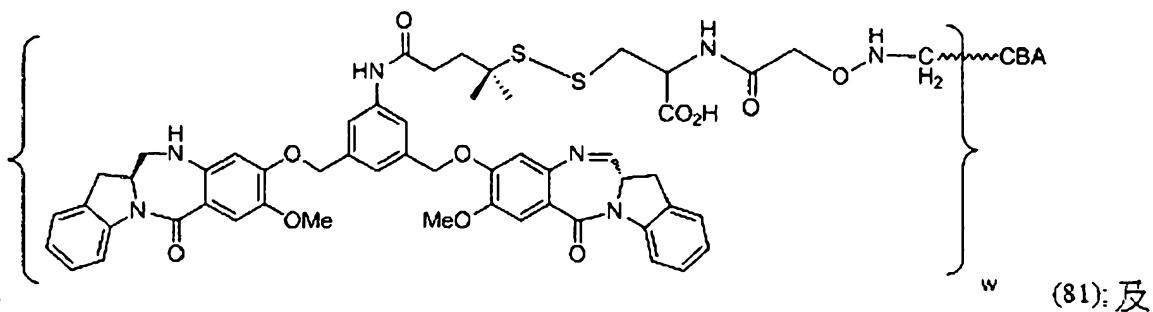












**【0153】** 以上所描述之任一實施例(諸如第一實施例或第 1 至 8 個具體實施例，或其中所描述之任何更具體之實施例)之偶聯物中的 CBA 可為本文所描述之任何細胞結合劑，諸如以下第二實施例中所描述之該等細胞結合劑。

**【0154】** 在某些實施例中，以上所描述之任一實施例(諸如第一實施例或第 1 至 8 個具體實施例，或其中所描述之任何更具體之實施例)之偶聯物可包含每個細胞結合劑(例如抗體)分子結合之 1-4 個細胞毒性劑分子。在某些實施例中，該等偶聯物可包含每個細胞結合劑分子 2 或 4 個細胞毒性劑分子。每個細胞結合劑(例如抗體)分子所結合之細胞毒性劑分子的數量可經光譜法，藉由量測類美登素化合物在 280 nm 與 252 nm 下之吸光度比率，及苯并二氮呴化合物在 280 nm 與 330 nm 下之吸光度比率來確定。或者，每個細胞結合劑(例如抗體)分子所結合之細胞毒性劑分子的數量可藉由質譜法確定。

**【0155】** 本發明進一步提供一種組成物，其包含以上所描述之任一實

施例(諸如第一實施例或第 1 至 8 個具體實施例，或其中所描述之任何更具體之實施例)之偶聯物。在某些實施例中，該組成物中至少約 50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、99.5%、99.9% 或更高百分比之偶聯物具有 2 或 4 個細胞毒性劑共價連接至每一 CBA。在某些實施例中，在以上所描述之組成物中，不超過約 20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5% 或 0.1% 之偶聯物僅具有 1 個細胞毒性劑共價連接至每一 CBA。

### 細胞結合劑

**【0156】** 在第二實施例中，本發明提供一種用於製備本文所描述之細胞結合劑-細胞毒性劑偶聯物之細胞結合劑(CBA)。此類 CBA 可為一種蛋白質(例如自然界中所發現之蛋白質，或者工程改造的或重組蛋白質)，諸如抗體、其抗原結合部分(其可包括抗體衍生物)或抗體模擬蛋白。此類蛋白質 CBA 之 N 末端可包含 2-羥基乙胺部分，其可為絲氨酸、蘇氨酸、羥基離氨酸、4-羥基鳥氨酸或 2,4-二氨基-5-羥基戊酸殘基之一部分。2-羥基乙胺部分可使用本發明之方法氧化而變為醛基，醛基可接著與醛反應性基團反應以形成主題偶聯物。

**【0157】** 在一相關態樣中，本發明亦提供某些工程改造之蛋白質 CBA，諸如工程改造之抗體、其抗原結合部分(或抗體衍生物)，或抗體模擬蛋白，其可具有 Ser 或 Thr 作為 N 末端殘基，與此類抗體、其抗原結合部分(或抗體衍生物)或抗體模擬蛋白之無 Ser、無 Thr 天然序列相對。

**【0158】** 可藉由緊接著信號肽序列之後插入 Ser/Thr 密碼子來添加 N 末端 Ser/Thr。該信號肽序列可為抗體、其抗原結合部分(或抗體衍生物)或抗

體類比蛋白之天然信號肽，或可為 N 末端與該抗體、其抗原結合部分(或抗體衍生物)或抗體模擬蛋白之成熟加工序列融合之異源信號肽。

**【0159】** 此處，「成熟加工序列(例如重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分之成熟加工序列)」係指某些分泌蛋白，諸如該重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分之經過加工的序列，該分泌蛋白經合成而具有 N 末端信號肽(天然存在之信號肽，或使用重組技術 N 末端融合之異源信號肽)。在包括信號肽裂解在內之正常成熟過程之後，所得到的成熟加工序列一般缺乏所有信號肽序列。

**【0160】** SEQ ID NO: 1 及 6 可用作此類天然或異源信號肽。抗體、其抗原結合部分(或抗體衍生物)或抗體模擬蛋白之成熟加工序列中的 N 末端殘基可能存在另外的序列變化，只要在信號肽裂解之後，N 末端殘基為 Ser/Thr 即可。

**【0161】** 具體言之，可藉由使用自鼠類抗 FOLR1 抗體 FR1-2.1 (由 2013 年 4 月 16 日保藏於 ATCC 且 ATCC 保藏號為 PTA-120197 之雜交瘤產生)之輕鏈信號肽獲得的特定信號肽序列來添加 N 末端 Ser/Thr，該信號肽係由 SEQ ID NO: 1 表示。已意外地發現，此信號肽序列以獨特方式進行加工而留下其最後一個 Ser 作為蛋白質之成熟加工序列的 N 末端殘基。

**【0162】** 不管 N 末端 Ser/Thr 係天然存在於 CBA 中，抑或使用本文所描述之任何重組技術工程改造的，本發明之另一態樣進一步提供一種經修飾之 CBA (例如經修飾抗體、其抗原結合部分(或抗體衍生物)或抗體模擬蛋白)，其中其 N 末端 Ser/Thr 已氧化成醛基。在某些實施例中，醛係衍生自抗體或其抗原結合部分之重鏈上 N 末端 Ser/Thr 之氧化。該氧化可使用本文所

描述的本發明之任何方法進行。該經修飾 CBA 可與帶有醛反應性基團(諸如本文所描述之該等基團)之連接子反應以形成本發明之偶聯物。

**【0163】** 因此，本發明亦提供一種使用本發明之經修飾 CBA (例如，抗體、其抗原結合部分(或抗體衍生物)或抗體模擬蛋白)製備本文所描述之本發明偶聯物的方法。本發明進一步提供一種編碼任何經工程改造之 CBA (例如，抗體、其抗原結合部分(或抗體衍生物)或抗體模擬蛋白)之多聚核苷酸，其產生具有 N 末端 Ser/Thr 之 CBA 的成熟加工序列。

**【0164】** 在某些實施例中，醛基係位於蛋白質 CBA(例如抗體或其抗原結合部分)之 N 末端。舉例而言，N 末端醛基可衍生自 N 末端絲氨酸或蘇氨酸之氧化。

**【0165】** 在一個實施例中，N 末端絲氨酸或蘇氨酸可天然存在於蛋白質 CBA(例如抗體或其抗原結合部分)中。舉例而言，該抗體或其抗原結合部分可包含 SEQ ID NO:3 之輕鏈序列，或源自於編碼 SEQ ID NO:1 之信號肽之相同小鼠生殖系序列的輕鏈序列。在一相關實施例中，該抗體或其抗原結合部分係包含 SEQ ID NO: 3 之輕鏈序列，或源自於編碼 SEQ ID NO:1 之信號肽之相同小鼠生殖系序列之輕鏈序列的鼠類抗體或其抗原結合部分之嵌合抗體、人類化抗體或人類抗體，或其抗原結合部分。

**【0166】** 類似地，該抗體或其抗原結合片段可包含源自於鼠類 IGKV6-32\*01 序列 (亦即，SIVMTQTPKFLLVSAGDRVITCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPKLLIYYAS NR YTGV PDRFTGSGY GTDFTFTISTVQAEDLAVYFCQQDYSSP，SEQ ID NO: 20)之輕鏈序列。在一相關實施例中，該抗體或其抗原結合部分係包含源自

於 IGKV6-32\*01 序列 SEQ ID NO: 20 之輕鏈序列的鼠類抗體或其抗原結合部分之嵌合抗體、人類化抗體或人類抗體，或其抗原結合部分。

【0167】 此外，該抗體或其抗原結合部分可包含源自於以下所列人類  $\lambda$  V3 家族 V 基因序列(亦即，SEQ ID NO: 21-41)中任一個的輕鏈序列。在一相關實施例中，該抗體或其抗原結合部分係包含源自於以下所列人類  $\lambda$  V3 家族 V 基因序列之輕鏈序列的鼠類抗體或其抗原結合部分之嵌合抗體、人類化抗體或人類抗體，或其抗原結合部分。

#### 人類 $\lambda$ V3 家族 V 基因序列

IGLV3-1\*01

SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQQKPGQS PVLVIYQDSKRPSGIPERFSGS  
NSGNNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSS TA (SEQ ID NO: 21)

IGLV3-10\*01

SYELTQPPSVSVPQGTARITCGDALPKYAYWYQQKSGQAPVLVIYEDSKRPSGIPERFSGS  
SSGTMATLTISGAQVEDEADYYCYSTDSSGNHX (SEQ ID NO: 22)

IGLV3-10\*02

SYELTQPPSVSVPQGTARITCGDALPKYAYWYQQKSGQAPVLVIYKDSKRPSCIPERFSGS  
SSGTMATLTISGAQVEDEDDYCYSDYSGN (SEQ ID NO: 23)

IGLV3-12\*01

SYELTQPHSVSVATAQMARIITCGGNNIGSKAVHWYQQKPGQDPVLVIYSDSNRPSGIPERFSGS  
NPGNTTLTISRIEAGDEADYYCQVWDSSSDHP (SEQ ID NO: 24)

IGLV3-12\*02

SYELTQPHSVSVATAQMARIITCGGNNIGSKAVHWYQQKPGQDPVLVIYSDSNRPSGIPERFSGS  
NPGNTATLTISRIEAGDEADYYCQVWDSSSDHP (SEQ ID NO: 25)

IGLV3-13\*01

SYELTQPPAVSVSPQGTARISCGDVLRDNYADWYPKPGQAPVLVIYKDGEPSCIPERFSGS  
TSGNTTALTISRVLTKGGADYYCFSGD\*NNL (SEQ ID NO: 26)

IGLV3-16\*01

SYELTQPPSVSVLGQMARIITCSGEALPKYAYWYQQKPGQFPVLVIYKDSERPSCIPERFSGS  
SSGTIVTLTISGVQAEDEADYYCLSADSSGTYP (SEQ ID NO: 27)

IGLV3-19\*01

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCGDSSLRSYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGS  
SSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNHL (SEQ ID NO: 28)

IGLV3-21\*01

SYVLTQPPSVSVPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVIYDDSDRPSGIPERFSGS  
NSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHP (SEQ ID NO: 29)

IGLV3-21\*02

SYVLTQPPSVSVPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVYDDSDRPSGIPERFSGS  
NSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHP (SEQ ID NO: 30)

IGLV3-21\*03

SYVLTQPPSVSVPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVYDDSDRPSGIPERFSGS  
NSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHP (SEQ ID NO: 31)

IGLV3-22\*01

SYELTQLPSVSPGQTARITCSGDVLGENYADWYQQKPGQAPELVIYEDSERPGIPERFSGS  
TSGNTTTLTISRVLTEDEADYYCLSGDEDNP (SEQ ID NO: 32)

IGLV3-25\*01

SYELMQPPSVSPGQTARITCSGDALPKQYAYWYQQKPGQAPVLVIYKDSERPSGIPERFSGS  
SSGTTVTLTISGVQAEDeadYYCQSADS SGTYP (SEQ ID NO: 33)

IGLV3-25\*02

SYELTQPPSVSPGQTARITCSGDALPKQYAYWYQQKPGQAPVLVIYKDSERPSGIPERFSGS  
SSGTTVTLTISGVQAEDeadYYCQSADS SGTYP (SEQ ID NO: 34)

IGLV3-25\*03

SYELTQPPSVSPGQTARITCSGDALPKQYAYWYQQKPGQAPVLVIYKDSERPSGIPERFSGS  
SSGTTVTLTISGVQAEDeadYYCQSADS SG (SEQ ID NO: 35)

IGLV3-27\*01

SYELTQPSSVSPGQTARITCSGDVLAKKYARWFQQKPGQAPVLVIYKDSERPSGIPERFSGS  
SSGTTVTLTISGAQVEDeadYYCYSAADNNL (SEQ ID NO: 36)

IGLV3-31\*01

SSELSQEPAVSVALG\*TARITCQGDSIEDSVVNWYKQKPSQAPGLVI\*LNSVQSSGIPKKFSGS  
SSGNMATALTITGIQVEDKADYYCQSWDSSRTHS (SEQ ID NO: 37)

IGLV3-31\*02

SSELSQEPAVSVALG\*TARITCQGDSIEDSVVNWYKQKPSQAPGLVI\*LNSVQSSGIPKKFSGS  
SSGNMATALTITGIQVEDKADYYCQSWDSSRTHS (SEQ ID NO: 38)

IGLV3-32\*01

SSGPTQPAVSVALGQMARI TCQGDSMEGSYEHWYQQKPGQAPVLVIYDSSDRPSRIPERFSGS  
KSGNTTTLTITGAQAEDEADYYYQLIDNHAT (SEQ ID NO: 39)

IGLV3-9\*01

SYELTQPLSVSVALGQTARITCGGNNIGSKNVHWYQQKPGQAPVLVIYRDSNRPSGIPERFSGS  
NSGNTATLTISRAQAGDEADYYCQVWDSSTA (SEQ ID NO: 40)

IGLV3-9\*02

SYELTQPLSVSVALGQAARI TCGGNNLGYSVHWYQQKPGQAPVLVIYRDNNRPSGIPERFSGS  
NSGNTATLTISRAQAGDEADYYCQVWDSSTAHP (SEQ ID NO: 41)

【0168】 人類化抗體或其抗原結合部分可為表面重塑或 CDR 移植之抗體，或其抗原結合部分。

【0169】 在另一個實施例中，N 末端絲氨酸或蘇氨酸可經工程改造至蛋白質 CBA(例如抗體或其抗原結合部分)中。舉例而言，該抗體或其抗原結合部分可為本文所描述的本發明重組抗體中之任一種(參見下文)。

【0170】 在某些實施例中，N 末端醛基係位於該抗體或其抗原結合部分之一條或兩條重鏈上，或該抗體或其抗原結合部分之一條或兩條輕鏈上，或其組合上。

【0171】 在某些實施例中，CBA 為抗體或其抗原結合部分。在某些實施例中，抗原結合部分可為 Fab、F(ab)<sub>2</sub>、F(ab')<sub>2</sub>、F(ab')<sub>3</sub>、Fd、Fv、二硫鍵連接之 Fv、dAb 或 sdAb (或奈米抗體)、CDR、scFv、(scFv)<sub>2</sub>、di-scFv、bi-scFv、tascFv (串聯 scFv)、AVIBODY (例如雙鏈抗體、三鏈抗體、四鏈抗體)、T 細胞接合物(BiT)、scFv-Fc、Fcab、mAb2、小模組免疫藥物(SMIP)、Genmab/單抗體或 duobody、V-NAR 結構域、IgNAR、微型抗體、IgG $\Delta$ CH2、DVD-Ig、probody、內抗體或多特異性抗體。在某些具體實施例中，抗原結合部分可為單結構域抗體(sdAb)或奈米抗體。

【0172】 在某些實施例中，CBA 為抗體模擬物，諸如 DARPin、Centyrin、親和體、人類泛素、affitin、抗運載蛋白、高親和性多聚體、Fynomer、Kunitz 結構域肽、單抗體(或 adnectin)、三鏈抗體或 nanofitin。在某些具體實施例中，CBA 為 DARPin。在其他具體實施例中，CBA 為 Centyrin。在又另一具體實施例中，CBA 為單抗體或 adnectin。在某些實施例中，CBA 為雙受體重靶向(dual receptor retargeting，DART)分子(P.A. Moore 等人, *Blood*, 2011; 117(17):4542-4551；Veri MC 等人, *Arthritis Rheum.*, 2010 年 3 月 30 日; 62(7):1933-43；Johnson, S 等人, *J. Mol. Biol.*, 2010 Apr 9;399(3):436-49)或細胞穿透超荷電蛋白(cell penetrating supercharged protein)(*Methods in Enzymol.* 502, 293-319 (2012))。

【0173】 在另一態樣中，本發明提供一種重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)

或其抗原結合部分，其包含具有 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列的異源信號肽。

**【0174】** 本發明之這一態樣部分係基於意外地發現，SEQ ID NO: 1，即抗體 FR1-2.1 之輕鏈信號肽可剛好在 SEQ ID NO: 1 中最後一個 Ser 之前天然地裂解，由此在所得到的加工多肽(例如，以 SEQ ID NO: 1 作為信號肽表現之重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分)中留下 N 末端絲胺酸。因此，SEQ ID NO: 1 之信號肽可與異源多肽(例如重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分)重組融合，且用於通用方法中以產生具有 N 末端 Ser 之多肽。

**【0175】** 在某些實施例中，異源信號肽係與重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分之成熟加工序列的 N 末端融合。

**【0176】** 在某些實施例中，異源信號肽係與重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分之成熟加工序列 N 末端之第 2 個胺基酸殘基融合。因此，在該實施例中，該加工多肽因 SEQ ID NO: 1 中之 N 末端 Ser 而不具有一個額外的胺基酸殘基。在其他相關實施例中，異源信號肽係與重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分之成熟加工序列 N 末端部分之任何殘基(例如第 3 個殘基、第 4 個殘基、第 5 個殘基等)融合，引起一個或多個 N 末端殘基之「缺失」，只要該抗體或其抗原結合部分之結合能力基本上不受影響即可。或者或另外，可在 N 末端 Ser 之後添加一個或多個另外的殘基，只要 N 末端殘基係 Ser，諸如來自 SEQ ID NO: 1 最後一個殘基之 Ser。

**【0177】** 在一相關態樣中，本發明提供一種重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分，其包含緊鄰該重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分之(天然)信號肽最後一個殘基之 C 末端的 Ser 或 Thr 殘基。此可藉由緊接

著該天然信號肽之編碼序列之後插入 Ser 或 Thr 之密碼子來實現。舉例而言，可在緊接著單株抗體 huMov19 輕鏈或重鏈之天然信號肽序列之後插入 Ser 殘基，以產生序列 MGWSCIILFLVATATGVHSS(SEQ ID NO: 42)。在天然信號肽序列之天然加工(裂解)之後，預期所得到的 N 末端殘基為 Ser。

**【0178】** 舉例而言，在某些實施例中，Ser 或 Thr 殘基可緊鄰該重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分之成熟加工序列第一個殘基之 N 末端。

**【0179】** 在另一個實施例中，Ser 或 Thr 殘基置換該重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分之成熟加工序列之一個或多個 N 末端胺基酸殘基。或者或另外，可添加、缺失或置換另外的胺基酸殘基，只要在信號肽加工後得到的多肽之第 1 個殘基為 Ser/Thr。

**【0180】** 示例性重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分可具有序列：SEQ ID NO: 10 或 14。其他可包括包含 SEQ ID NO: 42 之序列。

**【0181】** 本發明之又另一態樣提供一種重組抗體，其包含源自於本文所描述之主題重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分之重鏈、輕鏈或其抗原結合部分的成熟加工序列。

**【0182】** 舉例而言，該重組抗體可為或可包含 Fab、F(ab)<sub>2</sub>、F(ab')<sub>2</sub>、F(ab')<sub>3</sub>、Fd、Fv、二硫鍵連接之 Fv、dAb 或 sdAb (或奈米抗體)、CDR、scFv、(scFv)<sub>2</sub>、di-scFv、bi-scFv、tascFv (串聯 scFv)、AVIBODY (例如雙鏈抗體、三鏈抗體、四鏈抗體)、T 細胞接合物(BiTE)、scFv-Fc、Fcab、mAb2、小模組免疫藥物(SMIP)、Genmab/單抗體或 duobody、V-NAR 結構域、IgNAR、微型抗體、IgG $\Delta$ CH2、DVD-Ig、probody、內抗體或多特異性抗體。在某些

具體實施例中，抗原結合部分可為單結構域抗體(sdAb)或奈米抗體。

**【0183】** 在某些實施例中，該重組抗體可包含 1、2、3 或 4 個分別源自於本文所描述之主題重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分之重鏈、輕鏈或其抗原結合部分的成熟加工序列。

**【0184】** 在某些實施例中，該重組抗體可為異二聚體抗體，其包含第一重鏈多肽及第二重鏈多肽，其中該第一重鏈多肽之 Fc 區及該第二重鏈多肽之 Fc 區在界面處接觸，且該第二重鏈多肽之 Fc 區的界面包含凸起，該凸起可定位於該第一重鏈多肽 Fc 區之界面中的空腔中。在某些實施例中，可基於例如 Genentech/Roche 之 CrossMab 技術，例如藉由交換 CH1 及  $\kappa$  恒定區以進一步減少或消除輕鏈錯配對來進一步改進結進孔(knob-into-hole)技術，該技術用以促進雙特異性抗體中重鏈之特異性配對。

**【0185】** 或者，亦可使用 LC 異二聚體，諸如 Zymeworks AZYMETRIC<sup>TM</sup>異二聚 IgG 輕鏈平臺技術來達到類似結果，該技術在開發完整雙特異性抗體時完整地補充了多種其他生物方法，包括共有輕鏈、結構域抗體及單鏈形式。

**【0186】** 在某些實施例中，第二重鏈多肽之 Fc 區已自模板/原始多肽改變以編碼凸起，或第一重鏈多肽之 Fc 區已自模板/原始多肽改變以編碼空腔，或兩者。

**【0187】** 在某些實施例中，該凸起及該空腔各自包含天然存在之胺基酸殘基。

**【0188】** 在某些實施例中，構成凸起之第二重鏈多肽之 Fc 區係藉由用側鏈體積大於原始殘基之輸入殘基置換模板/原始多肽之界面中的原始殘

基來產生。

**【0189】** 在某些實施例中，構成凸起之第二重鏈多肽之 Fc 區係藉由以下方法產生，該方法包括以下步驟，其中用編碼側鏈體積大於原始殘基之輸入殘基的核酸置換編碼該多肽之界面中之原始殘基的核酸。

**【0190】** 本發明之又另一態樣提供一種經修飾抗體，其係由在重鏈、輕鏈或其抗原結合部分之成熟加工序列上具有 N 末端 Ser 或 Thr 的抗體氧化得到，其中在該經修飾抗體中，該 N 末端 Ser 或 Thr 已氧化成醛基。

**【0191】** 在某些實施例中，該抗體係源自於重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分，其包含：(1)具有 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列的異源信號肽；(2)緊鄰該重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分之成熟加工序列第一個殘基之 N 末端的 Ser 或 Thr 殘基；或(3)置換該重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分之成熟加工序列之一個或多個 N 末端胺基酸殘基的 Ser 或 Thr 殘基。

**【0192】** 在某些實施例中，該抗體為包含 SEQ ID NO: 3 之輕鏈序列的鼠類抗體或其抗原結合部分。

**【0193】** 在某些實施例中，該抗體為包含 SEQ ID NO: 3 之輕鏈序列的鼠類抗體或其抗原結合部分之嵌合抗體、人類化抗體或人類抗體，或其抗原結合部分。人類化抗體或其抗原結合部分可為表面重塑或 CDR 移植之抗體，或其抗原結合部分。

**【0194】** 本發明之另一態樣提供一種編碼本文所描述之主題重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分的多聚核苷酸。

**【0195】** 在某些實施例中，該多聚核苷酸經密碼子優化以在哺乳動物



表現系統中表現。

**【0196】** 本發明之另一態樣提供一種產生主題重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分之方法，該方法包括在表現系統，諸如哺乳動物表現系統中表現本文所描述之主題多聚核苷酸。

**【0197】** 如本文所使用，術語「細胞結合劑」或「CBA」係指可結合細胞(例如，在細胞表面配體上)或結合與細胞相連或鄰近細胞之配體(較佳以一種特異性方式結合)之化合物。在某些實施例中，與細胞或者細胞上或細胞附近之配體結合係特異性的。CBA 可包括肽及非肽。對於具有凸起性質之 CBA，若天然 N 末端殘基不為 Ser 或 Thr，則可使用本文所描述之任何重組方法，例如藉由使用 SEQ ID NO: 1 之異源信號肽，或藉由插入 Ser/Thr 密碼子以編碼 N 末端殘基，對該 N 末端殘基進行工程改造。

**【0198】** 適當細胞結合劑之選擇係一個選擇問題，其部分取決於欲靶向之特定細胞群，而在許多(但非全部)情形中，人類化單株抗體係良好的選擇，若適當抗體係可獲得的。舉例而言，單株抗體 MY9 係特異性結合至 CD33 抗原之鼠類 IgG<sub>1</sub> 抗體(J.D. Griffin 等人, *Leukemia Res.*, 8:521 (1984))，且在靶細胞表現 CD33，如在急性骨髓性白血病(AML)中時可使用。

**【0199】** 在某些實施例中，細胞結合劑不為蛋白質。舉例而言，在某些實施例中，細胞結合劑可為結合至維生素受體(諸如細胞表面受體)之維生素。就此而言，維生素 A 結合至視黃醇結合蛋白(RBP)，形成複合物，該複合物又以高親和力結合 STRA6 受體且增加維生素 A 之攝入。在另一實例中，葉酸/葉酸鹽/維生素 B<sub>9</sub> 以高親和力結合細胞表面葉酸受體(FR)，例如 FR α。可使用葉酸或結合至 FR α 之抗體靶向在卵巢腫瘤及其他腫瘤(包括

過表現 FR  $\alpha$  之實體腫瘤，包括非小細胞肺癌(NSCLC)上表現之葉酸受體。

此外，維生素 D 及其類似物結合至維生素 D 受體。

**【0200】** 在其他實施例中，細胞結合劑為一種蛋白質或多肽，或包含蛋白質或多肽的化合物，包括抗體、非抗體蛋白質或多肽。

**【0201】** 舉例而言，GM-CSF，一種結合至骨髓細胞之配體/生長因子因子，可用作針對來自急性骨髓性白血病之患病細胞的細胞結合劑。結合至活化 T 細胞之 IL-2 可用於預防移植植物排斥反應，用於治療及預防移植植物抗宿主疾病，及用於治療急性 T 細胞白血病。結合至黑素細胞之 MSH 及可針對黑素瘤之抗體可用於治療黑素瘤。表皮生長因子可用於靶向鱗狀細胞癌，諸如肺及頭頸部之鱗狀細胞癌。生長抑素可用於靶向神經母細胞瘤及其他腫瘤類型。雌激素(或雌激素類似物)可用於靶向乳癌。雄激素(或雄激素類似物)可用於靶向睪丸。

**【0202】** 因此，在某些實施例中，細胞結合劑可為淋巴因子、激素、生長因子、集落刺激因子或養分轉運分子。

**【0203】** 在某些實施例中，細胞結合劑為抗體模擬物，諸如錨蛋白重複序列蛋白、Centyrin、或 adnectin/單抗體。

**【0204】** 在其他實施例中，細胞結合劑為抗體、單鏈抗體、特異性結合至靶細胞之抗體片段、單株抗體、單鏈單株抗體、特異性結合至靶細胞之單株抗體片段(或「抗原結合部分」)、嵌合抗體、特異性結合至靶細胞之嵌合抗體片段(「抗原結合部分」)、結構域抗體(例如 sdAb)，或特異性結合至靶細胞之結構域抗體片段。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」)。

**【0205】** 在另一實施例中，細胞結合劑為抗 CD33 抗體或其片段，諸如美國專利號 7,557,189、7,342,110、8,119,787 及 8,337,855 以及 WO2004/043344(以引用之方式併入本文中)中所描述之抗體或其片段。在一具體實施例中，人類化抗體為 huMy9-6 或另一相關抗體，如美國專利號 7,342,110 及 7,557,189 中所描述。在另一實施例中，抗 CD33 抗體為 huMy9-6 抗體。

**【0206】** 如本文所使用，帶雙底線之序列表示重鏈或輕鏈序列之可變區(亦即，重鏈可變區或 HCVR，及輕鏈可變區或 LCVR)，而粗體序列表示 CDR 區(亦即，自 N 末端至 C 末端，分別為來自重鏈或輕鏈序列之 CDR1、CDR2 及 CDR3)。

**【0207】** 在一個實施例中，抗 CD33 抗體包含具有胺基酸序列

QVQLQQPGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYYIHWIKQTPGQGLEWVGVI  
YPGNDDISYNQKFQGKATLTADKSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLR  
YFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV  
 TVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS  
 NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT  
 CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH  
 QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ  
 VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS  
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:43) 之免疫球蛋白  
 重鏈區，及具有胺基酸序列

EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQSPRLLI

YWASTRESGPDRFTGSGSGTDFLTISSVQPEDLAIYYCHQYLSSRTFGQGT  
KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL  
QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT  
KSFNRGEC (SEQ ID NO:44)之免疫球蛋白輕鏈區。

**【0208】** 在又另一實施例中，抗 CD33 抗體包含 SEQ ID NO: 43 之重鏈 CDR1-CDR3，及/或 SEQ ID NO: 44 之輕鏈 CDR1-CDR3，且較佳特異性結合 CD33。

**【0209】** 在又另一實施例中，抗 CD33 抗體包含與 SEQ ID NO: 43 具有至少約 90%、95%、97%、99%或 100%同一性之重鏈可變區(HCVR)序列，及/或與 SEQ ID NO: 44 具有至少約 90%、95%、97%、99%或 100%同一性之輕鏈可變區(LCVR)序列，且較佳特異性結合 CD33。

**【0210】** 在另一具體實施例中，人類化抗體為本文所描述之抗葉酸受體抗體。在另一具體實施例中，該抗體為美國專利號 8,577,966 中所描述之抗葉酸受體抗體。更具體言之，抗葉酸受體抗體為特異性結合人葉酸受體 1 之人類化抗體或其抗原結合片段。除非另外指示，否則如本文所使用，術語「人葉酸受體 1」、「FOLR1」或「葉酸受體  $\alpha$  (FR- $\alpha$ )」係指任何天然人 FOLR1。因此，所有該等術語均可指如本文所指示之蛋白質或核酸序列。術語「FOLR1」涵蓋「全長」未加工之 FOLR1 以及由在細胞中加工得到的任何 FOLR1 形式。FOLR1 抗體包含：(a)包含 GYFMN (SEQ ID NO: 45)之重鏈 CDR1、包含 RIHPYDGDTFYNNQXaa<sub>1</sub>FXaa<sub>2</sub>Xaa<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 46)之重鏈 CDR2，及包含 YDGSRAMDY (SEQ ID NO: 47) 之重鏈 CDR3；及 (b) 包含 KASQSVSFAGTSLMH (SEQ ID NO: 48)之輕鏈 CDR1、包含 RASNLEA (SEQ ID

NO: 49)之輕鏈 CDR2，及包含 QQSREYPYT (SEQ ID NO: 50)之輕鏈 CDR3；其中 Xaa<sub>1</sub>係選自 K、Q、H 及 R；Xaa<sub>2</sub>係選自 Q、H、N 及 R；且 Xaa<sub>3</sub>係選自 G、E、T、S、A 及 V。較佳地，重鏈 CDR2 序列包含 RIHPYDGDTFYNQKFQG (SEQ ID NO: 51)。

**【0211】** 在另一實施例中，抗葉酸受體抗體為特異性結合人葉酸受體 1 之人類化抗體或其抗原結合片段，該人葉酸受體 1 包含具有胺基酸序列 QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSLEWIGRI HPYDGDTFYNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYDGS RAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 52)之重鏈。

**【0212】** 在另一實施例中，抗葉酸受體抗體係由 2010 年 4 月 7 日保藏在 ATCC 且 ATCC 保藏號為 PTA-10772 及 PTA-10773 或 PTA-10774 之質體 DNA 編碼的人類化抗體或其抗原結合片段。

**【0213】** 在另一實施例中，抗葉酸受體抗體為特異性結合人葉酸受體 1 之人類化抗體或其抗原結合片段，該人葉酸受體 1 包含具有胺基酸序列 DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPRLLIY RASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGT

KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL  
 QSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT  
 KSFNRGEC (SEQ ID NO: 53) ; 或  
 DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPRLLIY  
 RASNLEAGVPDRFSGGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGT  
 KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL  
 QSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT  
 KSFNRGEC (SEQ ID NO: 54) 之輕鏈。

**【0214】** 在另一實施例中，抗葉酸受體抗體為特異性結合人葉酸受體 1 之人類化抗體或其抗原結合片段，該人葉酸受體 1 包含具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 52 之重鏈，及具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 53 或 SEQ ID NO: 54 之輕鏈。較佳地，該抗體包含具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 52 之重鏈及具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 54 之輕鏈(hu FOLR1)。

**【0215】** 在另一實施例中，抗葉酸抗體係由 2010 年 4 月 7 日保藏在 ATCC 且 ATCC 保藏號為 PTA-10772 及 PTA-10773 或 10774 之質體 DNA 編碼的人類化抗體或其抗原結合片段。

**【0216】** 在另一實施例中，抗葉酸受體抗體係特異性結合人葉酸受體 1 且包含與 QVQLVQSGAEVVKGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSLEWIGRI HPYDGDTFYQNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYDGS RAMDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 55) 具有至少約 90%、95%、99% 或 100% 同一性之重鏈可變結構域，及與

DIVLTQSPSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPRLLIY  
RASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGT

KLEIKR (SEQ ID NO: 56) 或

DIVLTQSPSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPRLLIY  
RASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGT

KLEIKR (SEQ ID NO: 57) 具有至少約 90%、95%、99%或 100% 同一性之輕鏈可變結構域的人類化抗體或其抗原結合片段。

**【0217】** 在另一實施例中，抗葉酸受體抗體為 huMov19 或 M9346A (參見例如，美國專利號 8,709,432、美國專利號 8,557,966，及 WO2011106528，均以引用之方式併入本文中)。

**【0218】** 在某些實施例中，人類化抗體為美國專利號 8,765,917 中所描述之抗 CD37 抗體(例如抗 CD37-3)。在另一實施例中，細胞結合劑為抗 CD37 抗體或其抗原結合片段，如美國專利號 8,765,917 及 WO 2011/112978(以引用之方式併入本文中)中所描述之該等抗體。在一個實施例中，抗 CD37 抗體為 huCD37-3 抗體。

**【0219】** 在一個實施例中，抗 CD37 抗體包含具有胺基酸序列  
DIQMTQSPSSLSVSGERVTITCRASENIRSNLAWYQQKPGKSPKLLNVATN  
LADGVPSRFSGSGTGYSLKINSLQPEDFGTYYCQHYWGTTWTFGQGTKLE  
IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG  
NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFR  
NRGEC(SEQ ID NO: 58) 之免疫球蛋白輕鏈區，及具有胺基酸序列  
QVQVQESGPGLVAPSQTLSITCTVSGFSLTTSGVSWVRQPPGKGLEWLGVIW

GDGSTNYHPSLKSRLSIKKDHSKSQVFLKLNLTAAADTATYYCAKGGSYSLAH

WGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSW

NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV

DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV

DVSHEDEPKFNWYVDGVEVHNAAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL

NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC

LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ

GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 59)之免疫球蛋白重鏈

區，或具有胺基酸序列

QVQVQESGPGLVAPSQTLSITCTVSGFSLTTSGVSWVRQPPGKGLEWLGVIW

GDGSTNYHSSLKSRLSIKKDHSKSQVFLKLNLTAAADTATYYCAKGGSYSLAH

WGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSW

NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV

DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV

DVSHEDEPKFNWYVDGVEVHNAAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL

NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC

LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ

GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 60)之免疫球蛋白重鏈

區。

【0220】 在另一實施例中，抗 CD37 抗體包含具有 SEQ ID NO:58 中陳述之胺基酸序列之免疫球蛋白輕鏈區，及具有 SEQ ID NO: 59 中陳述之胺基酸序列之免疫球蛋白重鏈區。

**【0221】** 在又另一實施例中，抗 CD37 抗體包含具有 SEQ ID NO:58 中陳述之胺基酸序列之免疫球蛋白輕鏈區，及具有 SEQ ID NO: 60 中陳述之胺基酸序列之免疫球蛋白重鏈區。

**【0222】** 在又另一實施例中，抗 CD37 抗體包含 SEQ ID NO: 59 或 60 之重鏈 CDR1-CDR3，及/或 SEQ ID NO: 58 之輕鏈 CDR1-CDR3，且較佳特異性結合 CD37。

**【0223】** 在又另一實施例中，抗 CD37 抗體包含與 SEQ ID NO: 59 或 60 具有至少約 90%、95%、97%、99%或 100%同一性之重鏈可變區(HCVR)序列，及/或與 SEQ ID NO: 58 具有至少約 90%、95%、97%、99%或 100%同一性之輕鏈可變區(LCVR)序列，且較佳特異性結合 CD37。

**【0224】** 在又另一實施例中，抗 CD37 抗體包含具有胺基酸序列  
EIVLTQSPATMSASPGERVTMTCSATSSVTYMHWYQQKPGQSPKRWIYDTSN  
LPYGVPARFSGSGSGTYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSDNPPTFGQGTKLEI  
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN  
SQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR  
GEC (SEQ ID NO: 61) 之免疫球蛋白輕鏈區，及具有胺基酸序列  
QVQLQESGPGLLKPSQSLSLTCTVSGYSITSGFAWHWIRQHPGNKLEWMGYI  
LYSGSTVYSPSLKSRISITRDTSKNHFFLQLNSVTAADTATYYCARGYYGYGA  
WFAYWGQGTLTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV  
TVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSLGTQTYICNVNHKPS  
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT  
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLH

QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPQQPREPVYTLPPSRDELTQNQ  
 VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS  
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 62)之免疫球蛋白重鏈區。

**【0225】** 在又另一實施例中，抗 CD37 抗體包含 SEQ ID NO: 62 之重鏈 CDR1-CDR3，及/或 SEQ ID NO: 61 之輕鏈 CDR1-CDR3，且較佳特異性結合 CD37。

**【0226】** 在又另一實施例中，抗 CD37 抗體包含與 SEQ ID NO: 62 具有至少約 90%、95%、97%、99%或 100%同一性之重鏈可變區(HCVR)序列，及/或與 SEQ ID NO: 61 具有至少約 90%、95%、97%、99%或 100%同一性之輕鏈可變區(LCVR)序列，且較佳特異性結合 CD37。

**【0227】** 在又另一實施例中，抗 CD37 抗體為 huCD37-50 抗體。

**【0228】** 在某些實施例中，人類化抗體為美國專利號 8,790,649 中所描述之抗 EGFR 抗體。在另一實施例中，該抗體為抗 EGFR 抗體。在一個實施例中，該抗 EGFR 抗體為非拮抗劑抗體，包括例如 WO2012058592(以引用之方式併入本文中)中所描述之抗體。在另一實施例中，抗 EGFR 抗體為非功能性抗體，例如人類化 ML66 或 EGFR-8。更具體言之，抗 EGFR 抗體為 huML66。所有該等申請案之教示內容以引用之方式整體併入本文中。

**【0229】** 在又另一實施例中，抗 EGFR 抗體包含具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 63 之重鏈及具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 64 之輕鏈。

抗體	全長重鏈/輕鏈胺基酸序列
huML66HC	<u>QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGSLASNSVSWIRQPPGKGLEW</u> <u>MGVIWNHGGTDYNPSIKSRLSISRDTSKSQVFLKMNSLTAADTAMYF</u> <u>CVRKGGIYFDYWGQGVLT</u> <u>VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL</u> GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTIASKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 63)
huML66LC	<u>DTVLTQSPLAVSPGERATISCRASESVSTLMHWYQQKPGQQPKLLI</u> <u>YLASHRESGVPARFSGSGSGTDFTLTIDPMEAEDTATYYCQQSRNDP</u> <u>WTFGQGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPRE</u> AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 64)

【0230】 在又另一實施例中，抗 EGFR 抗體包含 SEQ ID NO: 63 之重鏈 CDR1-CDR3，及/或 SEQ ID NO: 64 之輕鏈 CDR1-CDR3，且較佳特異性結合 EGFR 。

【0231】 在又另一實施例中，抗 EGFR 抗體包含與 SEQ ID NO: 63 具有至少約 90%、95%、97%、99% 或 100% 同一性之重鏈可變區(HCVR)序列，及/或與 SEQ ID NO: 64 具有至少約 90%、95%、97%、99% 或 100% 同一性之輕鏈可變區(LCVR)序列，且較佳特異性結合 EGFR 。

【0232】 在另一實施例中，抗 EGFR 抗體為 8,790,649 及 WO 2012/058588(以引用之方式併入本文中)所描述之抗體。在一個實施例中，抗 EGFR 抗體為 huEGFR-7R 抗體。

【0233】 在一個實施例中，抗 EGFR 抗體包含具有胺基酸序列 QVQLVQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMQWVKQRPGQGLECIGTI  
YPGDGDTTYTQKFQGKATLTADKSSSTAYMQLSSLRSEDSAVYYCARYDAP

GYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPE  
PVTWSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK  
PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV  
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL  
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN  
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVD  
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 65)之免疫  
 球蛋白重鏈區，及具有胺基酸序列  
DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQDINNYLAWYQHKPGKGPKLIHYTST  
LHPGIPSREFSGSGSGRDYSFSISSLPEPEDIATYYCLQYDNLLYTFGQGTKLEIKR  
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDSTYSLSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG  
 EC (SEQ ID NO: 66)之免疫球蛋白輕鏈區，或具有胺基酸序列  
DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCKASQDINNYLAWYQHKPGKGPKLIHYTST  
LHPGIPSREFSGSGSGRDYSFSISSLPEPEDIATYYCLQYDNLLYTFGQGTKLEIKR  
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDSTYSLSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG  
 EC (SEQ ID NO: 67)之免疫球蛋白輕鏈區。

【0234】 在另一實施例中，抗 EGFR 抗體包含具有 SEQ ID NO:65 中陳述之胺基酸序列之免疫球蛋白重鏈區，及具有 SEQ ID NO: 66 中陳述之胺基酸序列之免疫球蛋白重鏈區。

【0235】 在另一實施例中，抗 EGFR 抗體包含具有 SEQ ID NO:65 中

陳述之胺基酸序列之免疫球蛋白重鏈區，及具有 SEQ ID NO: 67 中陳述之胺基酸序列之免疫球蛋白重鏈區。

**【0236】** 在又另一實施例中，抗 EGFR 抗體包含 SEQ ID NO: 65 之重鏈 CDR1-CDR3，及/或 SEQ ID NO: 66 或 67 之輕鏈 CDR1-CDR3，且較佳特異性結合 EGFR。

**【0237】** 在又另一實施例中，抗 EGFR 抗體包含與 SEQ ID NO: 65 具有至少約 90%、95%、97%、99%或 100%同一性之重鏈可變區(HCVR)序列，及/或與 SEQ ID NO: 66 或 67 具有至少約 90%、95%、97%、99%或 100%同一性之輕鏈可變區(LCVR)序列，且較佳特異性結合 EGFR。

**【0238】** 在另一實施例中，細胞結合劑為抗 CD19 抗體，諸如美國專利號 8,435,528 及 WO2004/103272(以引用之方式併入本文中)中所描述之該等抗體。在一個實施例中，抗 CD19 抗體包含具有胺基酸序列 QVQLVQPGAEVVKPGASVKLSCKTSGYTFTSNWMHWVKQAPGQGLEWIGE IDPSDSYTNYNQNQFQGKAKLTVDKSTSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCARGSNP YYYAMDYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTWSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKEPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 68)之免疫球蛋白重鏈區，及具有胺基酸序列

EIVLTQSPAAMSASPGERVMTCSASSGVNYMHWYQQKPGTSPRRWIYDTSKL  
 LASGVPARFSGSGTDYSLTISSMEPEDAATYYCHQRGSYTFGGTKLEIKRT  
 TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
 ESVTEQDSKDSTYSLSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG  
 EC (SEQ ID NO: 69)之免疫球蛋白輕鏈區。

**【0239】** 在另一實施例中，抗 CD19 抗體為 huB4 抗體。

**【0240】** 在又另一實施例中，抗 CD19 抗體包含 SEQ ID NO: 68 之重鏈 CDR1-CDR3，及/或 SEQ ID NO: 69 之輕鏈 CDR1-CDR3，且較佳特異性結合 CD19。

**【0241】** 在又另一實施例中，抗 CD19 抗體包含與 SEQ ID NO: 68 具有至少約 90%、95%、97%、99%或 100%同一性之重鏈可變區(HCVR)序列，及/或與 SEQ ID NO: 69 具有至少約 90%、95%、97%、99%或 100%同一性之輕鏈可變區(LCVR)序列，且較佳特異性結合 CD19。

**【0242】** 在又另一實施例中，細胞結合劑為抗 Muc1 抗體，諸如美國專利號 7,834,155、WO 2005/009369 及 WO 2007/024222(以引用之方式併入本文中)中所描述之該等抗體。在一個實施例中，抗 Muc1 抗體包含具有胺基酸

序

列

QAQLVQSGAEVVKGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGY  
IYPGNGATNYNQKFQGKATLTADTSSSTAYMQISSLTSEDSAVYFCARGDSV  
PFAYWGQGTLTVSAASTKGPSVPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPV  
 TVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSLGTQTYICNVNHKPS  
 NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT

CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLH  
 QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ  
 VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS  
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 70)之免疫球蛋白  
 重鏈區，及具有胺基酸序列  
EIVLTQSPATMSASPGERVTITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSSLA  
SGVPARFGGSGSGTSYSLTISSEMEAEDAATYYCQQRSSFPLTFGAGTKLELKR  
 TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
 ESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG  
 EC (SEQ ID NO:71)之免疫球蛋白輕鏈區。

【0243】 在另一實施例中，抗 Muc1 抗體為 huDS6 抗體。

【0244】 在又另一實施例中，抗 Muc1 抗體包含 SEQ ID NO: 70 之重鏈 CDR1-CDR3，及/或 SEQ ID NO: 71 之輕鏈 CDR1-CDR3，且較佳特異性結合 Muc1 。

【0245】 在又另一實施例中，抗 Muc1 抗體包含與 SEQ ID NO: 70 具有至少約 90%、95%、97%、99%或 100%同一性之重鏈可變區(HCVR)序列，及/或與 SEQ ID NO: 71 具有至少約 90%、95%、97%、99%或 100%同一性之輕鏈可變區(LCVR)序列，且較佳特異性結合 Muc1 。

【0246】 在某些實施例中，細胞結合劑為表面重塑之抗體、表面重塑之單鏈抗體、表面重塑之抗體片段(或「抗原結合部分」)或雙特異性抗體。

【0247】 在某些實施例中，細胞結合劑為微型抗體、avibody、雙鏈抗體、三鏈抗體、四鏈抗體、奈米抗體、probody、結構域抗體或單抗體。

【0248】換言之，示例性細胞結合劑可包括抗體、單鏈抗體、特異性結合至靶細胞之抗體片段、單株抗體、單鏈單株抗體、特異性結合至靶細胞之單株抗體片段、嵌合抗體、特異性結合至靶細胞之嵌合抗體片段、雙特異性抗體、結構域抗體、特異性結合至靶細胞之結構域抗體片段、干擾素、淋巴因子(例如 IL-2、IL-3、IL-4 及 IL-6)、激素(例如胰島素、促甲狀腺激素釋放激素、黑素細胞刺激激素及類固醇激素(例如雄激素及雌激素))、維生素(例如葉酸)、生長因子(例如 EGF、TGF- $\alpha$ 、FGF、VEGF)、集落刺激因子、養分轉運分子(例如轉鐵蛋白；參見 O'Keefe 等人(1985) *J. Biol. Chem.* 260:932-937，以引用之方式併入本文中)、Centyrin (基於 III 型纖維連接蛋白(FN3)重複序列之共同序列的蛋白質支架；參見美國專利公開案 2010/0255056、2010/0216708 及 2011/0274623，以引用之方式併入本文中)、錨蛋白重複序列蛋白(例如經設計之錨蛋白重複序列蛋白，稱為 DARPin；參見美國專利公開案號 2004/0132028、2009/0082274、2011/0118146 及 2011/0224100，以引用之方式併入本文中；且亦參見 C. Zahnd 等人, *Cancer Res.* (2010) 70:1595-1605；Zahnd 等人, *J. Biol. Chem.* (2006) 281(46):35167-35175；及 Binz, H.K., Amstutz, P. & Pluckthun, A., *Nature Biotechnology* (2005) 23:1257-1268，以引用之方式併入本文中)、錨蛋白樣重複序列蛋白或合成肽(參見例如，參見美國專利公開案號 2007/0238667；美國專利號 7,101,675；WO 2007/147213；及 WO 2007/062466，以引用之方式併入本文中)、Adnectin (纖維連接蛋白結構域支架蛋白；參見美國專利公開案號 2007/0082365、2008/0139791，以引用之方式併入本文中)、Avibody (包括雙鏈抗體、三鏈抗體及四鏈抗體；參見美國公開案號 2008/0152586 及 2012/0171115)，及其他

細胞結合分子或物質。

**【0249】** 在某些實施例中，細胞結合劑可為結合至靶細胞上之部分(諸如細胞表面受體)之配體。舉例而言，該配體可為生長因子或其結合至生長因子受體之片段，或可為細胞因子或其結合至細胞因子受體之片段。在某些實施例中，該生長因子受體或細胞因子受體為細胞表面受體。

**【0250】** 在細胞結合劑為抗體或其抗原結合部分(包括抗體衍生物)，或某些抗體模擬物之某些實施例中，CBA 可結合至靶細胞上之配體，諸如細胞表面配體，包括細胞表面受體。

**【0251】** 具體示例性抗原或配體可包括腎素；生長激素(例如人生長激素及牛生長激素)；生長激素釋放因子；副甲狀腺激素；促甲狀腺激素；脂蛋白； $\alpha$ -1-抗胰蛋白酶；胰島素 A 鏈；胰島素 B 鏈；胰島素原；促卵泡激素；降鈣素；促黃體激素；胰高血糖素；凝血因子(例如因子 vmc、因子 IX、組織因子及血管性血友病因子)；抗凝血因子(例如蛋白質 C)；心房利鈉肽；肺表面活性物質；纖溶酶原活化物(例如尿激酶、人尿或組織型纖溶酶原活化物)；蛙皮素；凝血酶；造血生長因子；腫瘤壞死因子- $\alpha$  及腫瘤壞死因子- $\beta$ ；腦啡肽酶；RANTES (亦即，正常 T 細胞表現及分泌之活性調控蛋白)；人巨噬細胞炎性蛋白-1- $\alpha$ ；血清白蛋白(人血清白蛋白)；苗勒抑制物質(Muellerian-inhibiting substance)；鬆弛素 A 鏈；鬆弛素 B 鏈；鬆弛素原；小鼠促性腺激素相關肽；微生物蛋白( $\beta$ -內醯胺酶)；DNA 酶；IgE；細胞毒性 T-淋巴細胞相關抗原(例如 CTLA-4)；抑制素；活化素；血管內皮生長因子；激素或生長因子受體；蛋白質 A 或 D；類風濕因子；神經營養因子(例如骨源性神經營養因子、神經營養素-3、神經營養素-4、神經營養素-5 或神

經營養素-6)、神經生長因子(例如 NGF- $\beta$ )；血小板源性生長因子；纖維母細胞生長因子(例如 aFGF 及 bFGF)；纖維母細胞生長因子受體 2；表皮生長因子；轉化生長因子(例如 TGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2、TGF- $\beta$ 3、TGF- $\beta$ 4 及 TGF- $\beta$ 5)；胰島素樣生長因子-I 及胰島素樣生長因子-II；des(1-3)-IGF-I (腦 IGF-I)；胰島素樣生長因子結合蛋白；黑素轉鐵蛋白；EpCAM；GD3；FLT3；PSMA；PSCA；MUC1；MUC16；STEAP；CEA；TENB2；EphA 受體；EphB 受體；葉酸受體；FOLR1；間皮素；cripto； $\alpha$ 、 $\beta$ ；整合素；VEGF；VEGFR；EGFR；轉鐵蛋白受體；IRTA1；IRTA2；IRTA3；IRTA4；IRTA5；CD 蛋白(例如 CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD8、CD11、CD14、CD19、CD20、CD21、CD22、CD25、CD26、CD28、CD30、CD33、CD36、CD37、CD38、CD40、CD44、CD52、CD55、CD56、CD59、CD70、CD79、CD80 CD81、CD103、CD105、CD123、CD134、CD137、CD138 及 CD152)、一種或多種腫瘤相關抗原或細胞表面受體(參見美國公開案號 20080171040 或美國公開案號 20080305044，以引用之方式整體併入)；紅細胞生成素；骨誘導因子；免疫毒素；骨形態發生蛋白；干擾素(例如干擾素- $\alpha$ 、干擾素- $\beta$  及干擾素- $\gamma$ )；集落刺激因子(例如 M-CSF、GM-CSF 及 G-CSF)；介白素(例如 IL-1 至 IL-10)；超氧化物歧化酶；T 細胞受體；表面膜蛋白；衰變加速因子；病毒抗原(例如 HIV 包膜蛋白之一部分)；轉運蛋白、歸巢受體；地址素；調控蛋白；整合素(例如 CD11a、CD11b、CD11c、CD18、ICAM、VLA-4 及 VCAM)；腫瘤相關抗原(例如 HER2、HER3 及 HER4 受體)；內皮素；c-Met；c-kit；1GF1R；PSGR；NGEP；PSMA；PSCA；TMEFF2；LGR5；B7H4；及以上所列多肽中任一種之片段。

**【0252】** 如本文所使用，術語「抗體」包括免疫球蛋白(Ig)分子。在某些實施例中，該抗體為全長抗體，其包含四條多肽鏈，即，藉由二硫鍵互連之兩條重鏈(HC)及兩條輕鏈(LC)。每一重鏈包含重鏈可變區(HCVR 或 VH)及重鏈恆定區(CH)。重鏈恆定區包含三個結構域，即 CH1、CH2 及 CH3。每一輕鏈包含輕鏈可變區(LCVR 或 VL)及輕鏈恆定區(CL)，該輕鏈恆定區包含一個結構域，即 CL。VH 區及 VL 區可進一步細分為高變區，稱為互補決定區(CDR)。在該等區域中間雜有保守性較強之構架區(FR)。每一 VH 及 VL 係由自氨基末端至羧基末端按以下次序排列之三個 CDR 及四個 FR 構成：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 及 FR4。

**【0253】** 在某些實施例中，該抗體為 IgG、IgA、IgE、gD 或 IgM。在某些實施例中，該抗體為 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4；或 IgA1 或 IgA2。

**【0254】** 在某些實施例中，細胞結合劑為單株抗體之「抗原結合部分」，其共有對於抗原與抗體結合至關重要之序列(諸如美國專利號 7,342,110 及 7,557,189 中所描述之 huMy9-6 或其相關抗體，該等專利以引用之方式併入本文中)。

**【0255】** 如本文所使用，術語抗體之「抗原結合部分」(或有時可互換稱為「抗體片段」)包括抗體之保持特異性結合至抗原之能力的一個或多個片段。經顯示，抗體之抗原結合功能可由全長抗體之某些片段執行。術語抗體之「抗原結合部分」內所涵蓋之結合片段的實例包括(但不限於)：(i) Fab 片段，一種由 VL、VH、CL 及 CH1 結構域組成之單價片段(例如，由木瓜蛋白酶消化之抗體得到三個片段：兩個抗原結合 Fab 片段，及一個不結合抗原之 Fc 片段)；(ii) F(ab')<sub>2</sub> 片段，一種包含在鉸鏈區藉由二硫橋連接之

兩個 Fab 片段的二價片段(例如，由胃蛋白酶消化之抗體得到兩個片段：二價抗原結合  $F(ab')$ <sub>2</sub> 片段，及不結合抗原之  $pFc'$  片段)及其相關  $F(ab')$  單價單元；(iii)由 VH 及 CH1 結構域組成之 Fd 片段(亦即，重鏈中包括在 Fab 中之部分)；(iv)由抗體單一臂之 VL 及 VH 結構域組成之 Fv 片段，及相關二硫鍵連接之 Fv；(v) dAb (結構域抗體)或 sdAb (單結構域抗體)片段(Ward 等人, Nature 341:544-546, 1989)，其由 VH 結構域組成；及(vi)分離之互補決定區(CDR)。在某些實施例中，該抗原結合部分為 sdAb (單結構域抗體)。

**【0256】** 在某些實施例中，抗原結合部分亦包括某些工程改造或重組之衍生物(或「衍生物抗體」)，該等衍生物除可能未見於天然存在之抗體中之元件或序列外，亦包括抗體中保持特異性結合至抗原之能力的一個或多個片段。

**【0257】** 舉例而言，儘管 Fv 片段之兩個結構域 VL 及 VH 係由獨立基因編碼，但其可使用重組法由合成連接子接合，該連接子能夠使其製造成 VL 區與 VH 區配對形成單價分子之單一蛋白鏈(稱為單鏈 Fv (scFv)；參見例如，Bird 等人, Science 242:423-426, 1988；及 Huston 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988)。

**【0258】** 在本文所描述之所有實施例中，scFv 之 N 末端可為 VH 結構域(亦即，N-VH-VL-C)或 VL 結構域(亦即，N-VL-VH-C)。

**【0259】** 二價(或雙價)單鏈可變片段(di-scFv、bi-scFv)可藉由連接兩個 scFv 進行工程改造。由此產生具有兩個 VH 區及兩個 VL 區之單一肽鏈，得到串聯 scFv (tascFv)。可藉由以頭至尾之方式連接三個或更多個 scFv，類似地產生更多串聯重複序列，諸如 tri-scFv。

**【0260】** 在某些實施例中，scFv 可經由連接肽連接，該等連接肽過短(約五個胺基酸)而無法使兩個可變區折疊在一起，迫使 scFv 二聚合，並形成雙鏈抗體(參見例如，Holliger 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448, 1993；Poljak 等人, *Structure* 2:1121-1123, 1994)。雙鏈抗體可為雙特異性或單特異性的。經顯示，雙鏈抗體之解離常數比相應 scFv 低 40 倍，即對於靶具有高得多的親和力。

**【0261】** 又，較短之連接子(一個或兩個胺基酸)導致形成三聚體，或所謂的三鏈抗體(triabody/tribody)。四鏈抗體亦以類似之方式產生。其對其靶之親和力甚至高於雙鏈抗體。雙鏈抗體、三鏈抗體及四鏈抗體有時統稱為「AVIBODY™」細胞結合劑(或簡稱為「AVIBODY」)。即，具有兩個、三個或四個靶結合區(TBR)之 AVIBODY 常稱為雙鏈抗體、三鏈抗體及四鏈抗體。有關詳情，參見例如，美國公開案號 2008/0152586 及 2012/0171115，其完整教示內容以引用之方式併入本文中。

**【0262】** 所有該等形式均可由對兩種或更多種不同抗原具有特異性之可變片段構成，在此情形中，其為雙特異性或多特異性抗體類型。舉例而言，某些雙特異性串聯 di-scFv 稱為雙特異性 T 細胞接合物(BiTE)。

**【0263】** 在某些實施例中，串聯 scFv 或雙鏈抗體/三鏈抗體/四鏈抗體中之每個 scFv 可具有相同或不同之結合特異性，且各自可獨立地具有 N 末端 VH 或 N 末端 VL。

**【0264】** 單鏈 Fv(scFv)亦可與 Fc 部分，諸如人 IgG Fc 部分融合以獲得類 IgG 特性，但儘管如此，其仍由單一基因編碼。由於此類 scFv-Fc 蛋白質在哺乳動物體內之短暫產生可易於達到毫克量，故此衍生物抗體形式特

別適合於許多研究應用。

**【0265】** Fcab 為由抗體之 Fc 恒定區工程改造之抗體片段。Fcab 可表現為可溶性蛋白質，或其可重新工程改造成全長抗體，諸如 IgG，由此產生 mAb2 $\circ$ mAb2 係 Fcab 代替正常 Fc 區之全長抗體。利用該等另外之結合位點，mAb2 雙特異性單株抗體可同時結合兩種不同靶。

**【0266】** 在某些實施例中，該等工程改造之抗體衍生物具有減小之大小的抗原結合 Ig 源性重組蛋白(「微型化」之完整大小 mAb)，其係藉由移除認為對功能不重要之結構域而產生。一個最佳實例為 SMIP。

**【0267】** 小模組免疫藥物或 SMIP 係主要由抗體(免疫球蛋白)之部分構建的人工蛋白質且擬用作藥物。SMIP 具有與抗體類似之生物半衰期，但小於抗體，且因此可具有更佳之組織滲透特性。SMIP 係包含一個結合區、作為連接子之一個鉸鏈區及一個效應子結構域之單鏈蛋白質。該結合區包含經修飾之單鏈可變片段(scFv)，且該蛋白質之其餘部分可由抗體(諸如 IgG1)之 Fc(諸如 CH2 及作為效應子結構域之 CH3)及鉸鏈區構造。經遺傳修飾之細胞產生呈抗體樣二聚體形式之 SMIP，其比實際抗體小約 30%。

**【0268】** 此類工程改造之微型化抗體的另一實例為「單抗體」，其中鉸鏈區已自 IgG4 分子移除。IgG4 分子不穩定且可彼此交換輕鏈-重鏈異二聚體。鉸鏈區之缺失防止重鏈-重鏈完全配對，留下高度特異性之單價輕鏈/重鏈異二聚體，同時保持 Fc 區以確保活體內穩定性及半衰期。

**【0269】** 單結構域抗體(sdAb，包括但不限於 Ablynx 稱為奈米抗體之該等抗體)係由單一單體可變抗體結構域組成之抗體片段。與完整抗體相同，其能夠選擇性結合至特定抗原，但由於其分子量僅為 12-15 kDa 而小得

多。在某些實施例中，單結構域抗體係由重鏈抗體(hcIgG)工程改造得到。首例此類 sdAb 係基於在駱駝中發現之 hcIgG 工程改造得到，稱為 V<sub>H</sub>H 片段。在某些實施例中，單結構域抗體係使用 V<sub>NAR</sub> 片段，由 IgNAR (「免疫球蛋白新抗原受體」，參見下文)工程改造得到。軟骨魚類(諸如鯊魚)具有此類重鏈 IgNAR 抗體。在某些實施例中，sdAb 係藉由將來自常見免疫球蛋白 G (IgG)，諸如來自人類或小鼠之免疫球蛋白 G 的二聚體可變結構域分離成單體來進行工程改造。在某些實施例中，奈米抗體係衍生自重鏈可變結構域。在某些實施例中，奈米抗體係衍生自輕鏈可變結構域。在某些實施例中，sdAb 係藉由針對與靶抗原之結合篩選單結構域重鏈序列(例如人單結構域 HC)文庫來獲得。

**【0270】 單一可變新抗原受體結構域抗體片段(V<sub>NAR</sub>，或 V<sub>NAR</sub> 結構域)**  
 係衍生自軟骨魚類(例如鯊魚)免疫球蛋白新抗原受體抗體(IgNAR)。作為已知最小的基於免疫球蛋白之蛋白質支架之一，此類單結構域蛋白質展現出有利的大小及隱蔽表位識別特性。成熟 IgNAR 抗體由一個可變新抗原受體(V<sub>NAR</sub>)結構域及五個恆定新抗原受體(C<sub>NAR</sub>)結構域之同二聚體組成。此分子具有高度穩定性，且具有高效之結合特徵。其固有穩定性可能歸因於(i)潛在的 Ig 支架，相較於鼠類抗體中所見之習知抗體 VH 及 VL 結構域，其呈現相當大數量的帶電荷及親水性表面暴露殘基；及(ii)使包括環間二硫橋及環內氫鍵模式在內之互補決定區(CDR)環中的結構特徵穩定。

**【0271】 微型抗體係包含連接至 CH 結構域，諸如 CH3 γ 1 (IgG1 之 CH3 結構域)或 CH4 ε (IgE 之 CH4 結構域)之 scFv 的工程改造之抗體片段。**  
 舉例而言，癌胚抗原(CEA)特異性 scFv 連接至 CH3 γ 1，產生微型抗體，先

前已證實，其結合活體內快速清除作用而具有優良的腫瘤靶向性(Hu 等人, *Cancer Res.* 56:3055 – 3061, 1996)。scFv 可具有 N 末端 VH 或 VL。連接可為產生非共價、無鉸鏈之微型抗體的短肽(例如，兩個胺基酸之連接子，諸如 ValGlu)。或者，該連接可為產生共價、鉸鏈-微型抗體之 IgG1 鉸鏈及 GlySer 連接肽。

**【0272】** 天然抗體為單特異性但二價的，因為其表現兩個相同的抗原結合結構域。相比之下，在某些實施例中，某些工程改造之抗體衍生物為雙特異性或多特異性分子，其具有兩個或更多個不同的抗原結合結構域，各自具有不同的靶特異性。雙特異性抗體可藉由融合兩個抗體產生細胞來產生，其各自具有不同的特異性。該等「四源雜交瘤」產生多種分子物質，因為兩個不同的輕鏈與兩個不同的重鏈在四源雜交瘤中以多種配置自由重組。自此，已使用多種技術(參見上文)產生雙特異性 Fab、scFvs 及完整大小之 mAb。

**【0273】** 雙可變結構域免疫球蛋白(DVD-Ig)係一類同時靶向兩個抗原/表位之雙特異性 IgG (DiGiammarino 等人, *Methods Mol Biol.* 899:145-56, 2012)。該分子含有 Fc 區及恆定區，其配置類似於習知 IgG。然而，DVD-Ig 蛋白之獨特性在於，該分子之每個臂均含有兩個可變結構域(VD)。一個臂內的 VD 係串聯連接且可具有不同結合特異性。

**【0274】** DuoBody®係一種雙特異性經修飾 IgG1 抗體異二聚體。IgG1 鉸鏈區一般包括(i)含有 CPPC 序列且不容許在活體內交換 Fab 臂之穩定鉸鏈區；及(ii)經修飾以含有 F405L 及 K409R 殘基之 IgG4 樣 CH3 結構域，該修飾使其容許在活體內交換 Fab 臂。(參見例如，WO2008119353 及

WO2011131746)。

**【0275】** 亦可藉由例如表現具有兩個不同 Fab 及一個 Fc 之雙特異性抗體來產生三特異性抗體衍生物分子。一個實例為小鼠 IgG2a 抗 Ep-CAM、大鼠 IgG2b 抗 CD3 四源雜交瘤(稱為 BiUII)，其被認為容許表現 Ep-CAM 之腫瘤細胞、表現 CD3 之 T 細胞及表現 FC  $\gamma$  RI 之巨噬細胞共定位，由此增強免疫細胞之共刺激及抗腫瘤功能。

**【0276】** Probody 為在健康組織中保持惰性，但在疾病環境中特異性活化(例如，經由疾病環境中富集或特有之蛋白酶的蛋白酶裂解)的完全重組之經掩蔽單株抗體。參見 Desnoyers 等人, *Sci. Transl. Med.*, 5:207ra144, 2013。可對本文所描述之任何抗體或其抗原結合部分使用類似掩蔽技術。

**【0277】** 內抗體係經修飾以在細胞內定位，在細胞內作用以結合至細胞內抗原之抗體。內抗體可保留在細胞質中，或可具有核定位信號，或可具有供 ER 靶向之 KDEL 序列。內抗體可為單鏈抗體(scFv)、具有超穩定性之經修飾免疫球蛋白 VL 結構域、選擇的對還原性較強之細胞內環境具有抗性之抗體，或以與麥芽糖結合蛋白或其他穩定細胞內蛋白質之融合蛋白形式表現。此類優化使內抗體之穩定性及結構得到改善，且可大體上適用於本文所描述之任何抗體或其抗原結合部分。

**【0278】** 本發明之抗原結合部分或衍生物抗體與衍生/工程改造得到其之抗體相比較，可具有基本上相同或同一的(1)輕鏈及/或重鏈 CDR3 區；(2)輕鏈及/或重鏈 CDR1、CDR2 及 CDR3 區；或(3)輕鏈及/或重鏈區。在該等區域內之序列可含有保守性胺基酸取代，包括在 CDR 區內之取代。在某些實施例中，存在不超過 1、2、3、4 或 5 個保守性取代。在一替代方案中，

該等抗原結合部分或衍生物抗體具有與衍生/工程改造得到其之抗體至少約 90%、95%、99% 或 100% 同一的輕鏈區及/或重鏈區。相較於該抗體，該等抗原結合部分或衍生物抗體可對靶抗原具有基本上相同之特異性及/或親和力。在某些實施例中，該等抗原結合部分或衍生物抗體之  $K_d$  及/或  $k_{off}$  值在本文所描述之抗體的 10 倍(更高或更低)、5 倍(更高或更低)、3 倍(更高或更低)或 2 倍(更高或更低)內。

**【0279】** 在某些實施例中，該等抗原結合部分或衍生物抗體可衍生自/工程改造自完全人類抗體、人類化抗體或嵌合抗體，且可根據任何技術認可之方法製備。

**【0280】** 單株抗體技術允許產生特異性極高的呈特異性單株抗體形式之細胞結合劑。此項技術中尤其熟知的是藉由用所關注之抗原，諸如完整靶細胞、自靶細胞分離之抗原、完整病毒、減毒之完整病毒及病毒蛋白(諸如病毒外殼蛋白)使小鼠、大鼠、倉鼠或任何其他哺乳動物免疫來產生單株抗體的技術。亦可使用敏化之人類細胞。產生單株抗體之另一方法係使用 scFv(單鏈可變區)，尤其是人 scFv 之噬菌體文庫(參見例如，美國專利號 5,885,793 及 5,969,108；McCafferty 等人，WO 92/01047；Liming 等人，WO 99/06587)。此外，亦可使用美國專利號 5,639,641 中所揭示之表面重塑抗體，以及嵌合抗體及人類化抗體。

**【0281】** 細胞結合劑亦可為由噬菌體呈現技術(參見例如，Wang 等人,*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2011) 108(17), 6909-6914)或肽文庫技術(參見例如，Dane 等人,*Mol. Cancer. Ther.* (2009) 8(5):1312-1318)得到之肽。

**【0282】** 在某些實施例中，本發明之 CBA 亦包括抗體模擬物，諸如

DARPin、親和體、人類泛素、affitin、抗運載蛋白、高親和性多聚體、Fynomer、Kunitz 結構域肽、單抗體或 nanofitin。

【0283】如本文所使用，術語「DARPin」及「(經設計)錨蛋白重複序列蛋白」可互換使用，指典型地展現優先(有時特異性)靶結合的某些遺傳工程改造之抗體模擬蛋白。該靶可為蛋白質、碳水化合物或其他化學實體，且結合親和力可相當高。DARPin 可衍生自含天然錨蛋白重複序列之蛋白質，且較佳由該等蛋白質之至少三個、通常四個或五個錨蛋白重複基元(典型地，每一錨蛋白重複基元中約 33 個殘基)組成。在某些實施例中，DARPin 含有約四個或五個重複序列，且分子質量可分別為約 14 或 18 kDa。可在 DNA 層面上，使用多種技術，諸如核糖體呈現或信號識別顆粒(SRP)噬菌體呈現來產生具有隨機化潛在靶相互作用殘基及超過  $10^{12}$  個變異體之多樣性的 DARPin 文庫，以用於選擇以皮莫耳濃度之親和力及特異性結合所希望靶之 DARPin (例如，充當受體促效劑或拮抗劑、反促效劑、酶抑制劑或簡單的靶蛋白結合劑)。有關 DARPin 製備，參見例如美國專利公開案號 2004/0132028、2009/0082274、2011/0118146 及 2011/0224100；WO 02/20565 及 WO 06/083275 (其完整教示內容以引用之方式併入本文中)，且亦參見 C. Zahnd 等人(2010) *Cancer Res.*, 70:1595-1605；Zahnd 等人 (2006) *J. Biol. Chem.*, 281(46):35167-35175；及 Binz, H.K., Amstutz, P. & Pluckthun, A. (2005) *Nature Biotechnology*, 23:1257-1268 (皆以引用之方式併入本文中)。有關相關錨蛋白樣重複序列蛋白或合成肽，亦參見美國專利公開案號 2007/0238667；美國專利號 7,101,675；WO 2007/147213；及 WO 2007/062466 (其完整教示內容以引用之方式併入本文中)。

**【0284】** 親和體分子係工程改造成以高親和力結合至大量靶蛋白或肽，由此模擬單株抗體的小蛋白質。親和體由含 58 個胺基酸之三個  $\alpha$  螺旋組成且莫耳質量為約 6 kDa。經顯示，其可經受住高溫(90°C)或酸性及鹼性條件(pH 2.5 或 pH 11)，且已藉由原生文庫選擇獲得親和力低至亞奈莫耳濃度範圍之結合劑，且已在親和力成熟後獲得具有皮莫耳濃度親和力之結合劑。在某些實施例中，親和體與弱親電子試劑偶聯以共價結合至靶。

**【0285】** 單抗體(又稱為 Adnectin)係能夠結合至抗原的遺傳工程改造之抗體模擬蛋白。在某些實施例中，單抗體由 94 個胺基酸組成且分子質量為約 10 kDa。其係基於人纖連蛋白之結構，更具體言之基於其 III 型第十個細胞外結構域，其結構類似於抗體可變結構域，具有形成桶狀之七個  $\beta$  折疊且在每一側上具有對應於三個互補決定區的三個暴露之環。可藉由修飾環 BC (在第二個  $\beta$  折疊與第三個  $\beta$  折疊之間)及 FG (在第六個折疊與第七個折疊之間)來定制對不同蛋白質具有特異性的單抗體。

**【0286】** 三鏈抗體係基於小鼠及人軟骨基質蛋白(CMP)之 C 末端捲曲螺旋區設計的自組裝抗體模擬物，其自組裝成為平行的三聚體複合物。其係藉由使特定靶結合部分與衍生自 CMP 之三聚化結構域融合而產生的高度穩定之三聚體靶向配體。所得融合蛋白可高效地自組裝成為充分確定的具有高穩定性之平行同源三聚體。關於該等三聚體靶向配體之表面電漿共振(SPR)分析證實相較於相應單體明顯增強之靶結合強度。細胞結合研究確定，此類三鏈抗體對於其對應受體具有優良結合強度。

**【0287】** Centyrin 係可使用基於共同 FN3 結構域序列之構架構建之文庫獲得的另一抗體模擬物(Diem 等人, *Protein Eng. Des. Sel.*, 2014)。該文庫採

用 FN3 結構域之 C 鏈、CD 環、F 鏈及 FG 環內之各種位置，且可針對特定靶選擇高親和力 Centyrin 變異體。

**【0288】** 用於引入 N 末端 Ser/Thr 且隨後氧化得到醛基以與醛反應性基團反應的所有方法均適用於作為抗體及不為抗體之細胞結合劑，包括例如，centyrin、Darpin、Avibody、adnectin、抗體片段、微型抗體、雙鏈抗體、三鏈抗體、四鏈抗體、奈米抗體、probody、duobody、結構域抗體或單抗體等。

**【0289】** 以下某些實例提及各種人類化抗 CD123 抗體，該等抗體之命名法在此簡要描述。一類 huCD123-6 抗體係藉由移植來自鼠類抗 CD123 抗體 muCD123-6 之重鏈及輕鏈之 6 個 CDR 進行人類化。在該等抗體中，字母「G」緊接著純系名稱(亦即，huCD123-6)之後，該純系名稱又繼之以版本號，其指定人輕鏈及重鏈可變區序列之起源。因此，huCD123-6Gv4.6 係指基於將來自相應 muCDR123-6 抗體之 6 個 CDR 區移植(「G」)至人輕鏈可變區 Gv4 及重鏈可變區 Gv6 上的人類化 CD123 抗體。類似地，-6-Gv4.7 包含人輕鏈可變區 Gv4 及重鏈可變區 Gv7。

**【0290】** 另一類 huCD123-6 抗體係藉助於表面重塑進行人類化。具有表面重塑之重鏈序列 huCD123-6rhv1.1 及表面重塑之輕鏈序列 huCD123-6rlv1.0 的表面重塑抗體為 huCD123-6Rv1.1。

**【0291】** 如本文所使用，NTS#2 或簡稱「S2」係指在重鏈 N 末端處具有工程改造之 Ser 的抗體。因此，huCD123-6Gv4.7 抗體之 S2 變異體稱為 huCD123-6Gv4.7S2。同樣，NTS#3 或簡稱「S3」係指在輕鏈 N 末端處具有工程改造之 Ser 的抗體。huCD123-6Gv4.7 抗體之 S3 變異體稱為

huCD123-6Gv4.7S3。

**【0292】** 當包含工程改造之 N 末端 Ser (S2 或 S3) 之抗體經由氧化之 N 末端 Ser 與細胞毒性藥物/細胞毒性劑偶聯時，該偶聯物之名稱可含有「SeriMab」名稱。舉例而言，huCD123-6Gv4.7S3-SeriMab-D8 係指 D8 (有關 D8 或 sD8 結構，參見圖 17) 與人類化 CD123 抗體 huCD123-6Gv4.7S3 之間經由輕鏈上經氧化之 N 末端 Ser 形成的偶聯物。

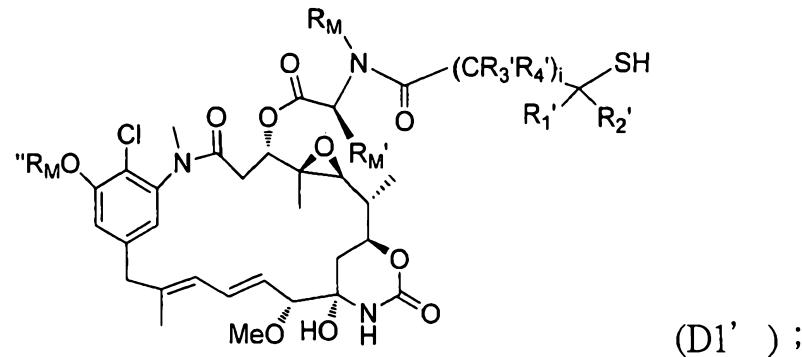
**【0293】** 應注意，實例 23-30，以及圖 17、18、22A-24、26A-26C 及 29 中所使用之細胞毒性劑，諸如「D8」及其礦酸化形式「sD8」及相關「D2」、「D1」及其礦酸化形式「sD1」可在主題偶聯物中不遵循藥物分子「D」之通式，但該等細胞毒性劑之結構係以相關附圖及文本描繪。

**【0294】** 某些人類化抗 CD123 抗體描述於 2015 年 6 月 29 日提交的題為「ANTI-CD123 ANTIBODIES AND CONJUGATES AND DERIVATIVES THEREOF」之美國臨時申請案號 62/186,161 中，該 62/186,161 申請案之完整教示內容以引用之方式整體併入本文中，包括所有蛋白質(例如，抗體及其 CDR、HCVR、LCVR、全長 HC 及 LC 序列)及核酸序列，以及相關 SEQ ID NO，特別是具有一個或多個工程改造之 N 末端 Ser/Thr 殘基之 CD123-SeriMab 之該等序列。

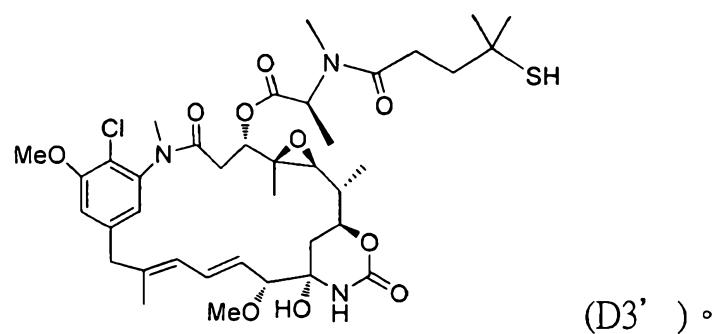
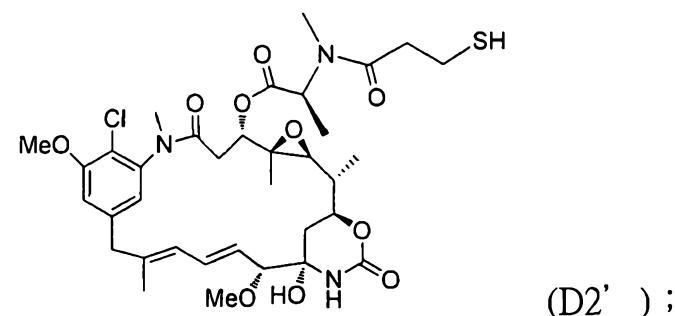
### 細胞毒性劑

**【0295】** 在第三實施例中，本發明提供可共價連接至本文所描述之細胞結合劑以形成本發明之偶聯物的細胞毒性劑(以 D' 表示)。

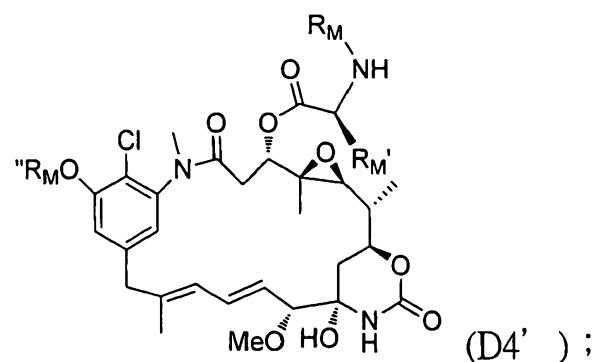
**【0296】** 在一個實施例中，該細胞毒性劑為類美登素。更具體言之，該細胞毒性劑 D' 係由以下結構式表示：



其中該等變數係如第一實施例之第 5 個具體實施例中關於式(D1)所描述。更具體言之，細胞毒性劑 D' 為 DM1 (D2') 或 DM4 (D3')：



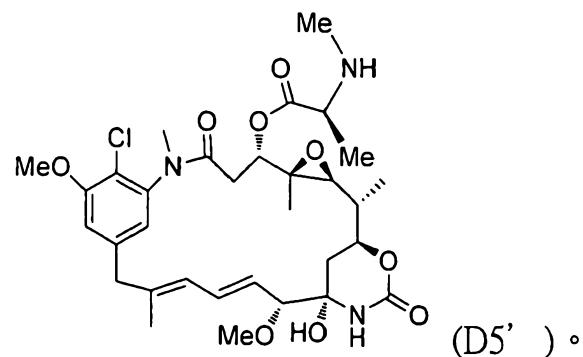
【0297】 在另一更具體之實施例中，該細胞毒性劑 D' 係由下式表示：



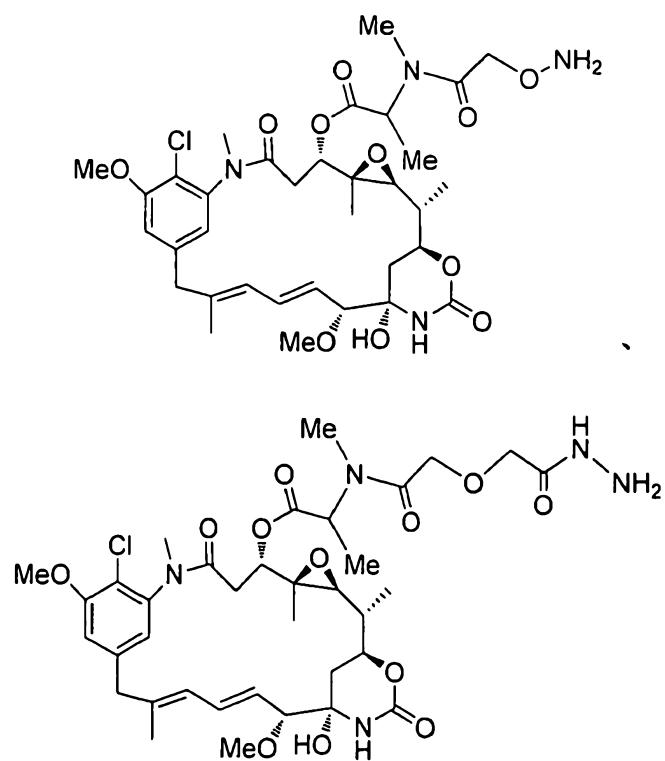
其中該等變數係如以上第一實施例之第 5 個具體實施例中關於式(D4)

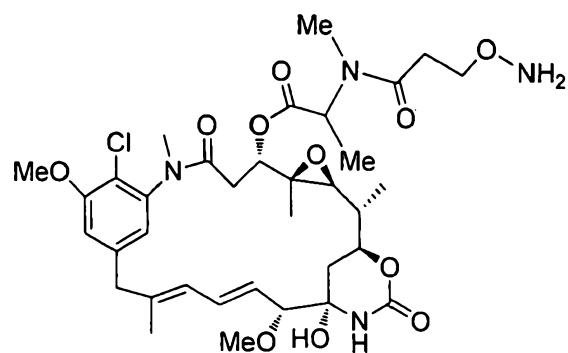
所描述。

【0298】 在又另一更具體之實施例中，該細胞毒性劑 D' 係由下式表示：



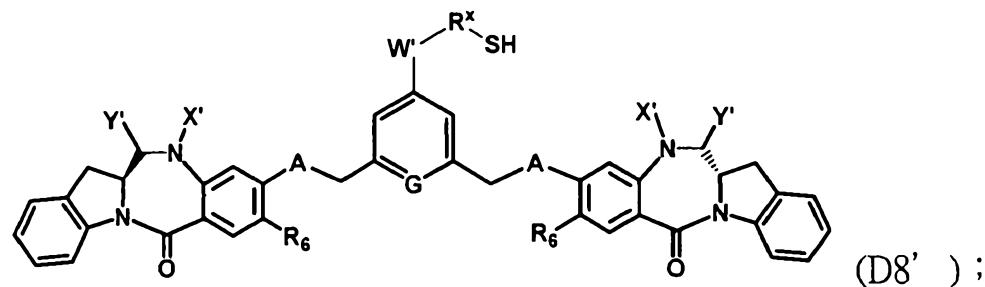
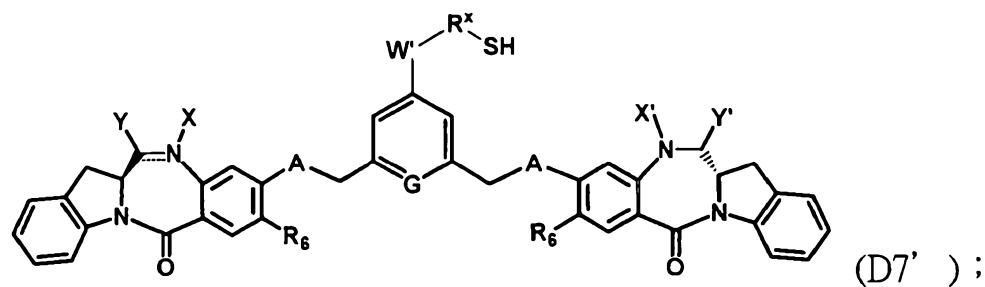
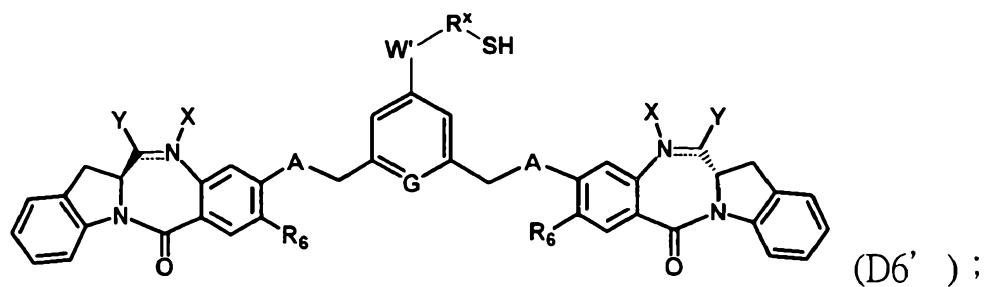
【0299】 在另一具體實施例中，細胞毒性劑 D' 係包含醛反應性基團之類美登素化合物，其可直接連接至細胞結合劑。更具體言之，該類美登素化合物係由下式表示：

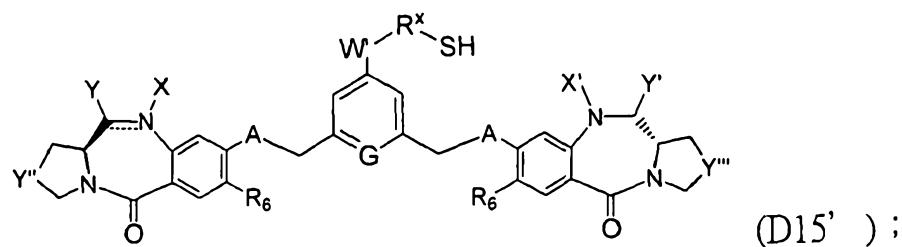
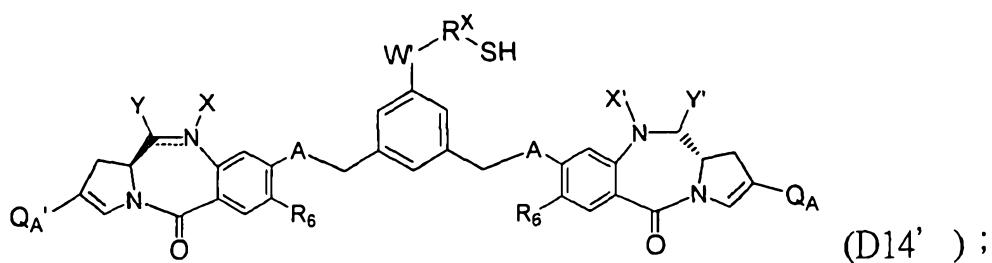
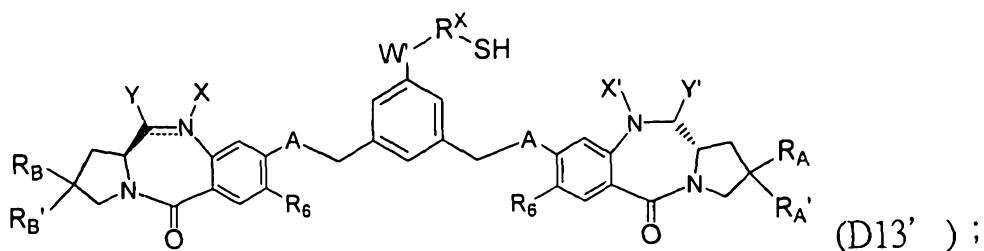
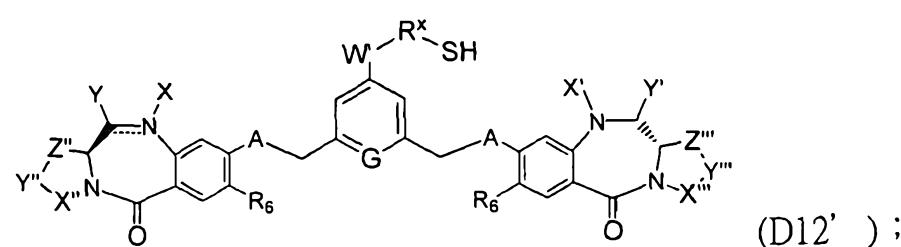
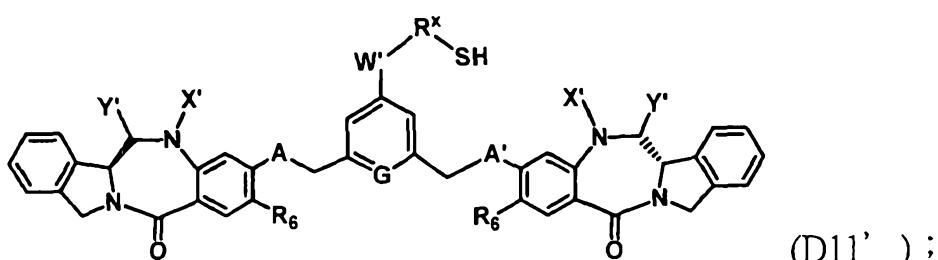
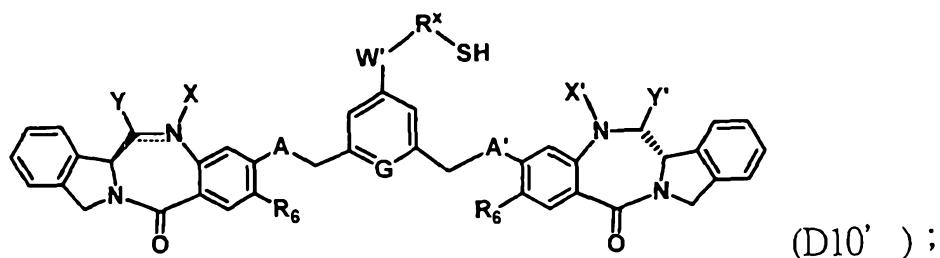
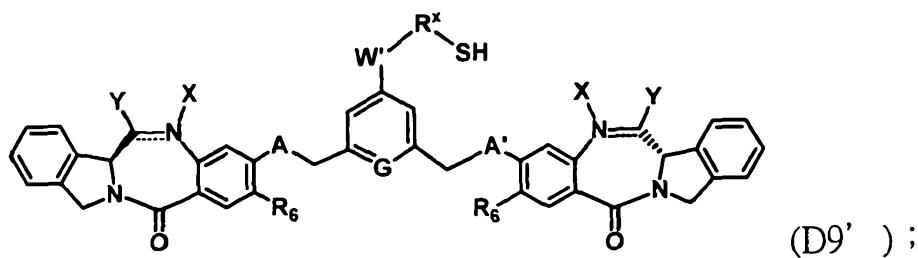


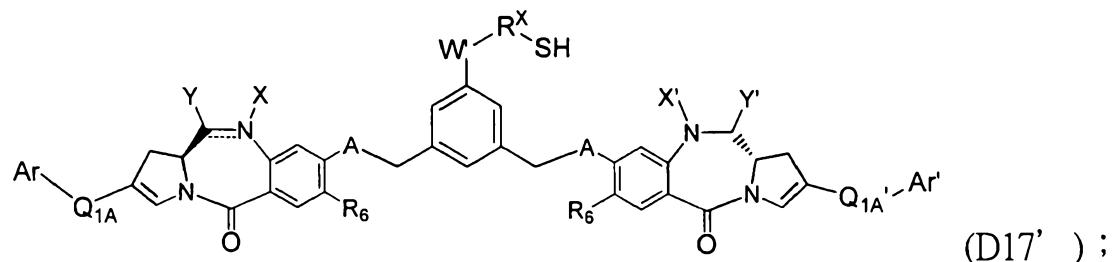
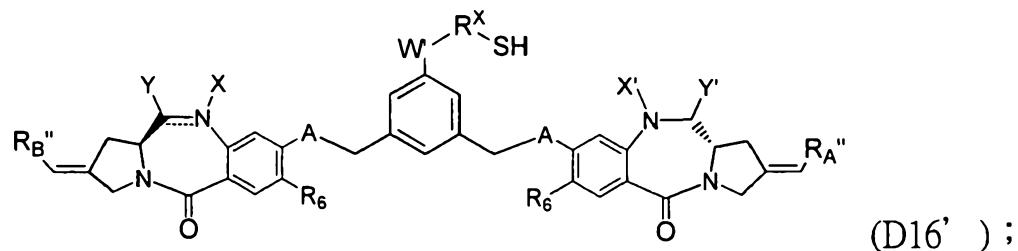


【0300】 在另一實施例中，該細胞毒性劑為苯并二氮呴化合物。示例性苯并二氮呴化合物包括但不限於，美國專利號 8,765,740、8,426,402、US2014/0088089、WO2011/130613、WO2011/130616、WO2010/091150 及 WO2009/016516 中所描述之該等化合物。

【0301】 在一個更具體之實施例中，細胞毒性劑 D' 經由以下結構式表示之苯并二氮呴化合物：

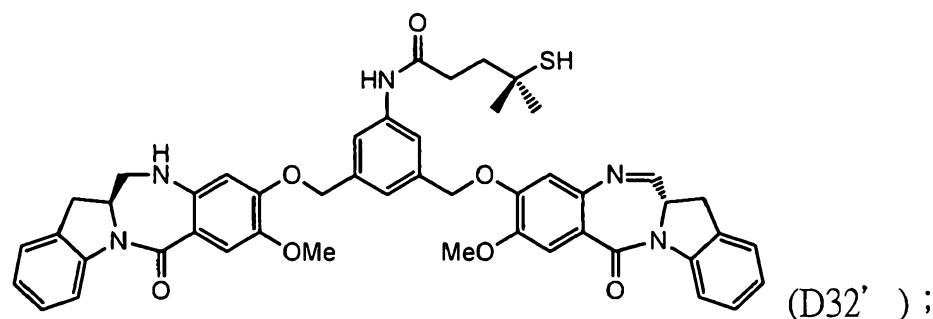
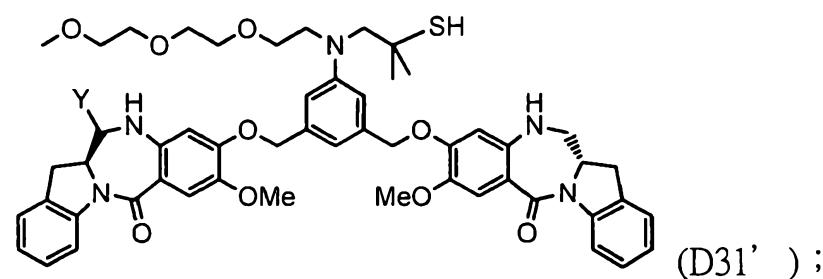
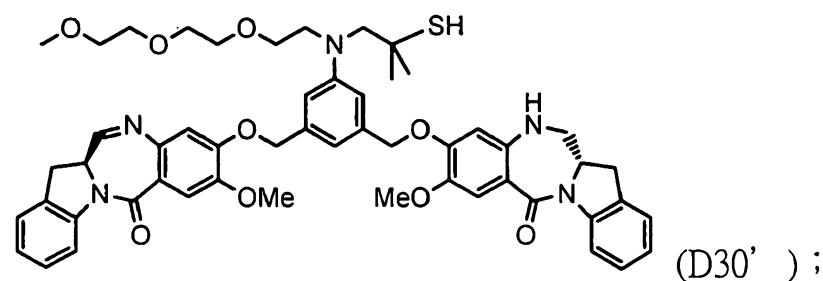


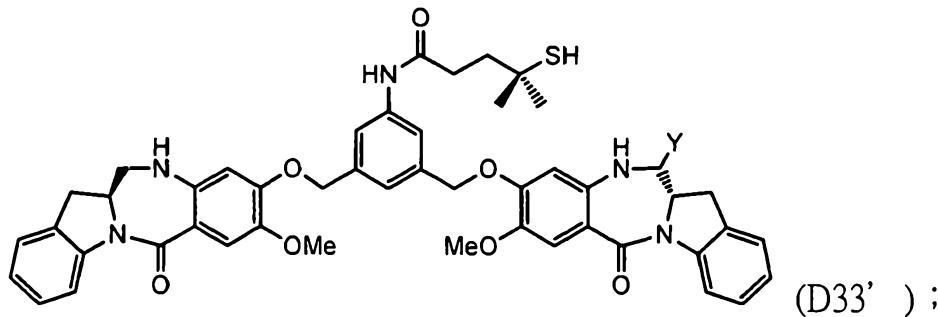




或其醫藥學上可接受之鹽，其中該等變數係如以上第一實施例之第 6 個具體實施例中關於式(D6)-(D17)所描述。

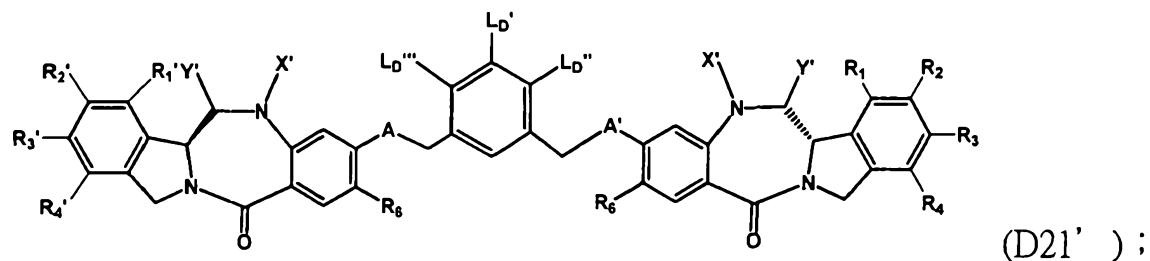
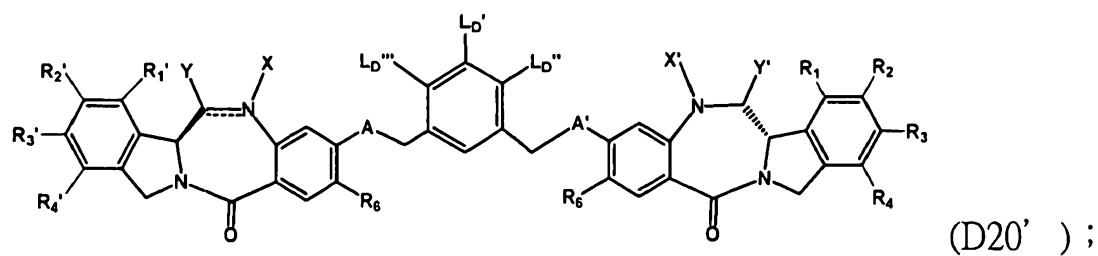
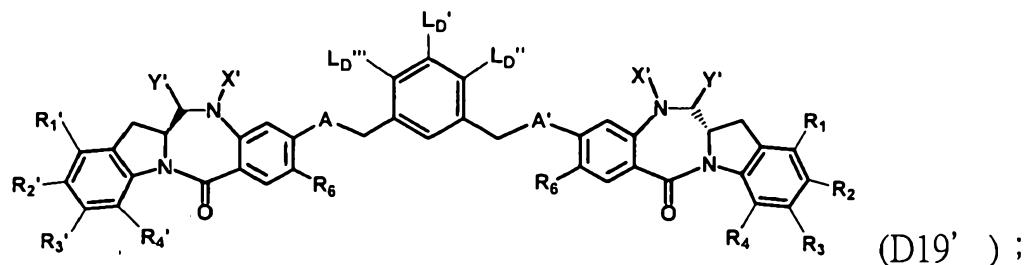
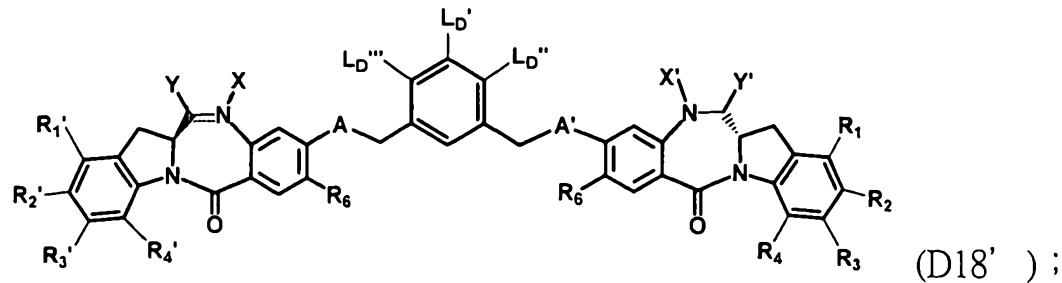
**【0302】** 在一個更具體之實施例中，D' 係由以下結構式表示：

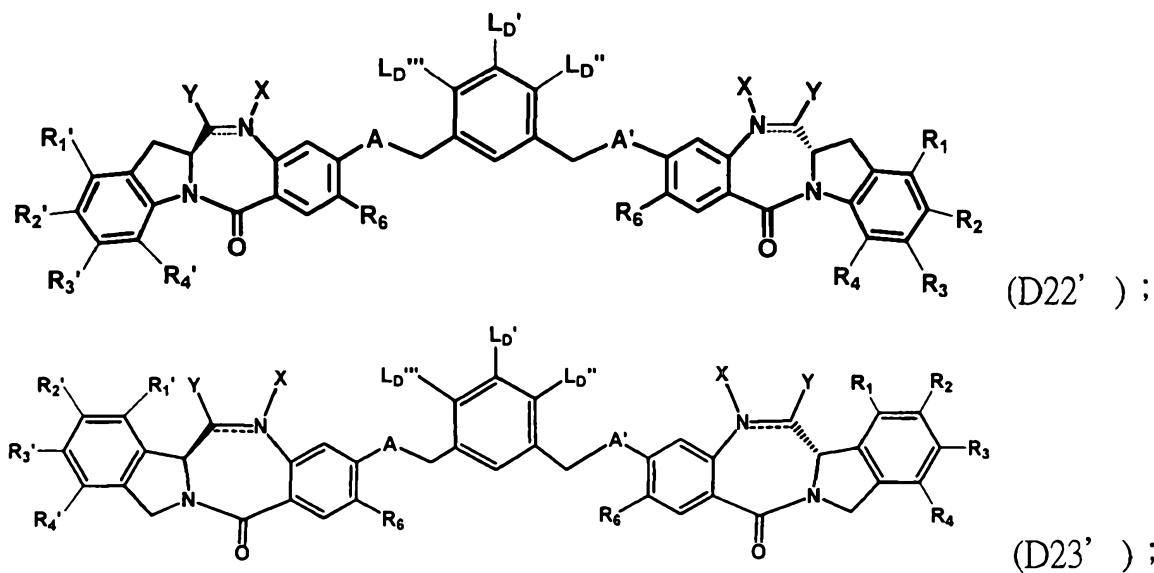




或其醫藥學上可接受之鹽，其中 Y 為 -H 或-SO<sub>3</sub>M，且 M 為 H<sup>+</sup>或陽離子。甚至更具體言之，Y 為 -SO<sub>3</sub>M，且 M 為 H<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>或 K<sup>+</sup>。

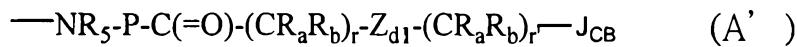
**【0303】** 在另一更具體之實施例中，細胞毒性劑 D' 係包含醛反應性基團之苯并二氮呴化合物，其可直接連接至細胞結合劑。更具體言之，苯并二氮呴化合物係由以下結構式表示：



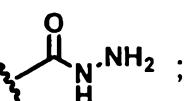


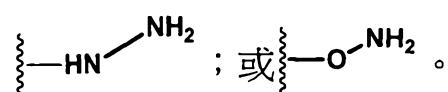
或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

$L_D'$  、  $L_D''$  及  $L_D'''$  之一係由下式表示：



且其餘兩個相同或不同，且獨立地選自-H；視情況經取代的具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；聚乙二醇單元  $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{-R}^c$ ；鹵素；胍鎘[-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' '；  
J<sub>CB</sub> 係如以上在第一實施例中所描述之醛反應性基團；且其餘變數係如以上在第一實施例之第 7 個具體實施例及其中所描述之任何更具體之實施例中關於結構式(D18')-(D23')中所描述。

【0304】 更具體言之，對於式(D18')-(D23')，J<sub>CB</sub> 為  ；



【0305】 在另一更具體之實施例中，對於式(D18')-(D23')，L' 係

由式(A)表示，且 L” 及 L”’ 均為 -H；且其餘變數係如以上任何實施例中所描述。

**【0306】** 在另一個更具體之實施例中，對於式(D18’)-(D23’ )：

在 N 與 C 之間之雙線=表示單鍵或雙鍵，條件為當其為雙鍵時，X 不存在且 Y 為-H，且當其為單鍵時，X 為-H，Y 為-OH 或-SO<sub>3</sub>M；

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>1</sub>’、R<sub>2</sub>’、R<sub>3</sub>’ 及 R<sub>4</sub>’ 均為-H；

R<sub>6</sub> 為-OMe；

X’ 及 Y’ 均為-H；

A 及 A’ 為-O-；且

M 為 H<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>或 K<sup>+</sup>；且其餘變數係如以上任何實施例中所描述。

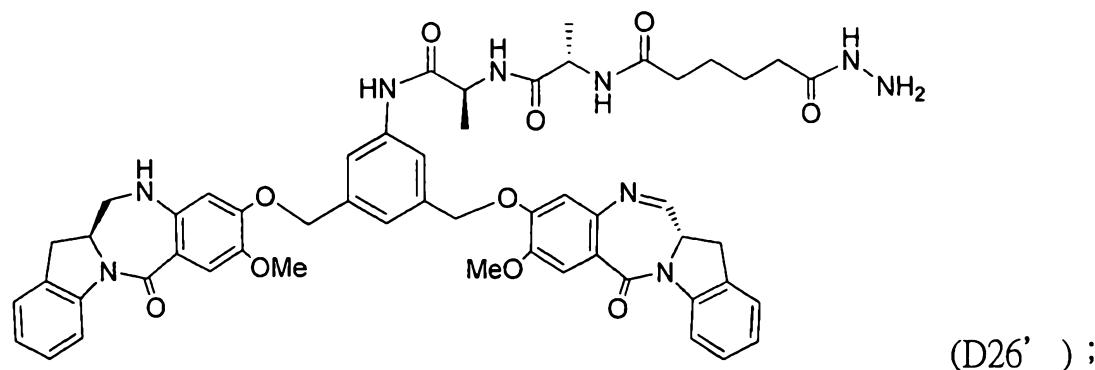
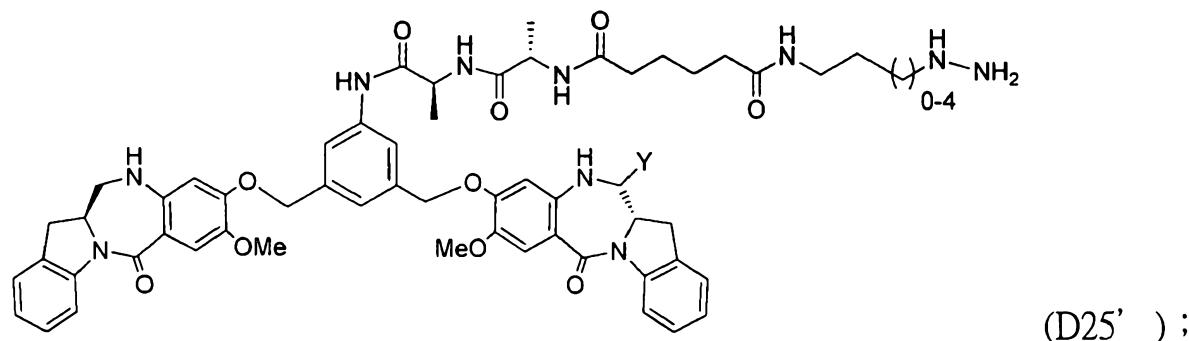
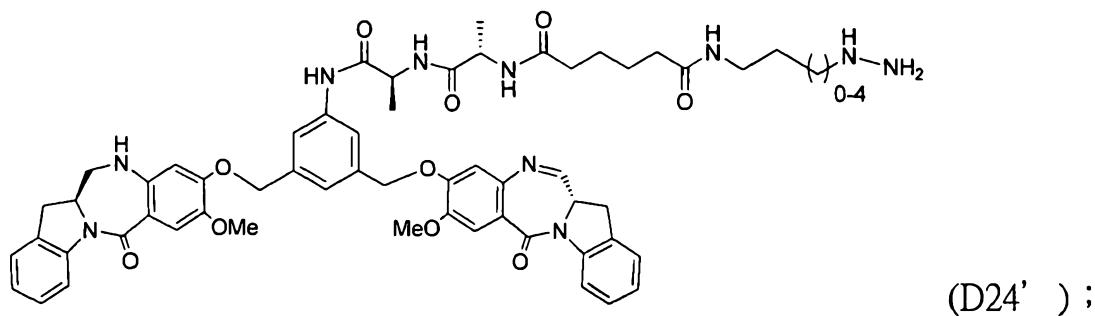
**【0307】** 在又另一更具體之實施例中，對於式(D18’)-(D23’ )，R<sub>a</sub> 及 R<sub>b</sub> 均為 H；且其餘變數係如以上任何實施例中所描述。

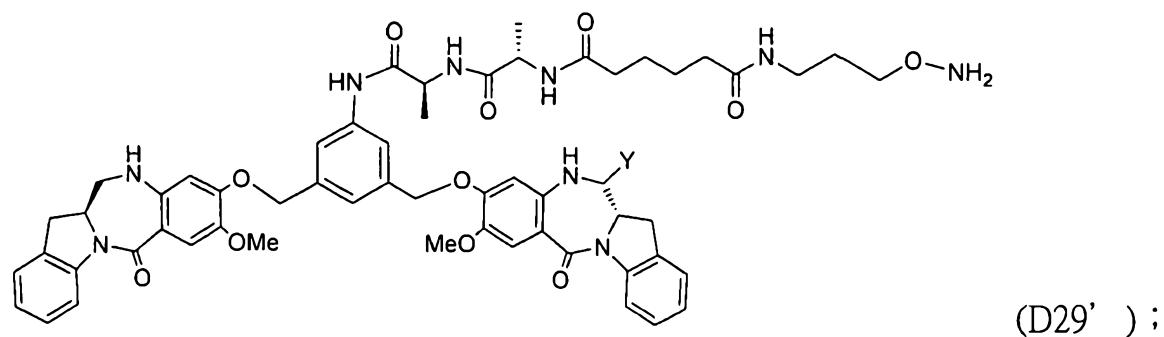
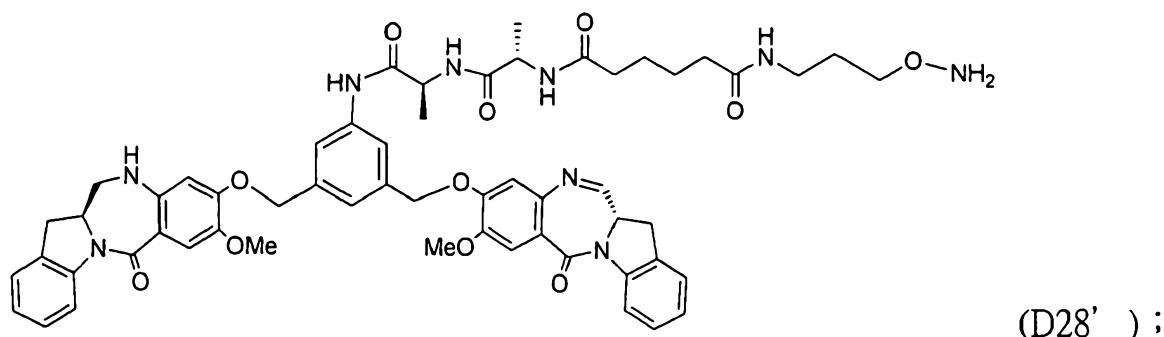
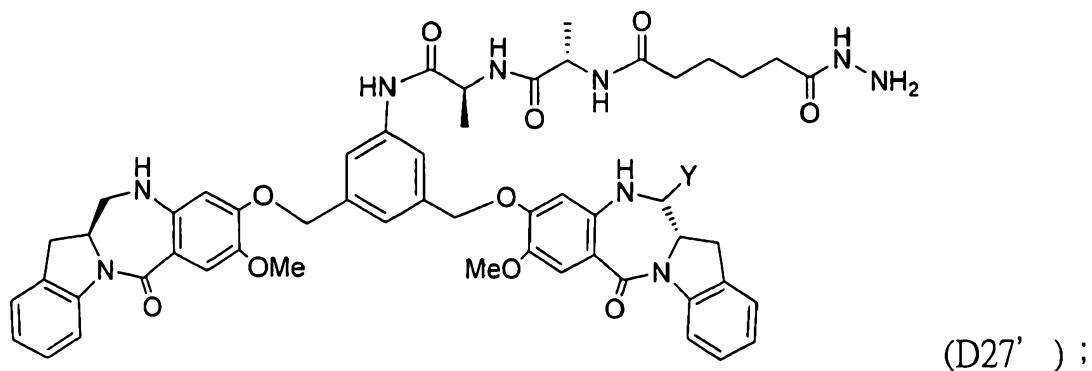
**【0308】** 在另一更具體之實施例中，對於式(D18’)-(D23’ )，R<sub>s</sub> 及 R<sub>g</sub> 各自獨立地為 H 或 Me；且其餘變數係如以上任何實施例中所描述。更具體言之，R<sub>s</sub> 及 R<sub>g</sub> 均為 H。

**【0309】** 在另一更具體之實施例中，對於式(D18’)-(D23’ )，P 為含有 2 至 10 個胺基酸殘基之肽；且其餘變數係如以上任何實施例中所描述。更具體言之，P 為含有 2 至 5 個胺基酸殘基之肽。甚至更具體言之，P 係選自 Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Lle-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-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: 17)、β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:

18) 及 Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 19)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala 及 D-Ala-D-Ala。

【0310】 在另一更具體之實施例中，該細胞毒性劑 D' 緣由以下結構式表示：



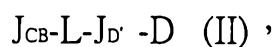


或其醫藥學上可接受之鹽，其中 Y 為 -H 或-SO<sub>3</sub>M，且 M 為 H<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>或 K<sup>+</sup>。

### 細胞毒性劑-連接子化合物

**【0311】** 在第四實施例中，本發明提供具有醛反應性基團之細胞毒性劑-連接子化合物，其可共價連接至本文所描述之細胞結合劑。

**【0312】** 在某些實施例中，細胞毒性劑-連接子化合物係由下式表示：

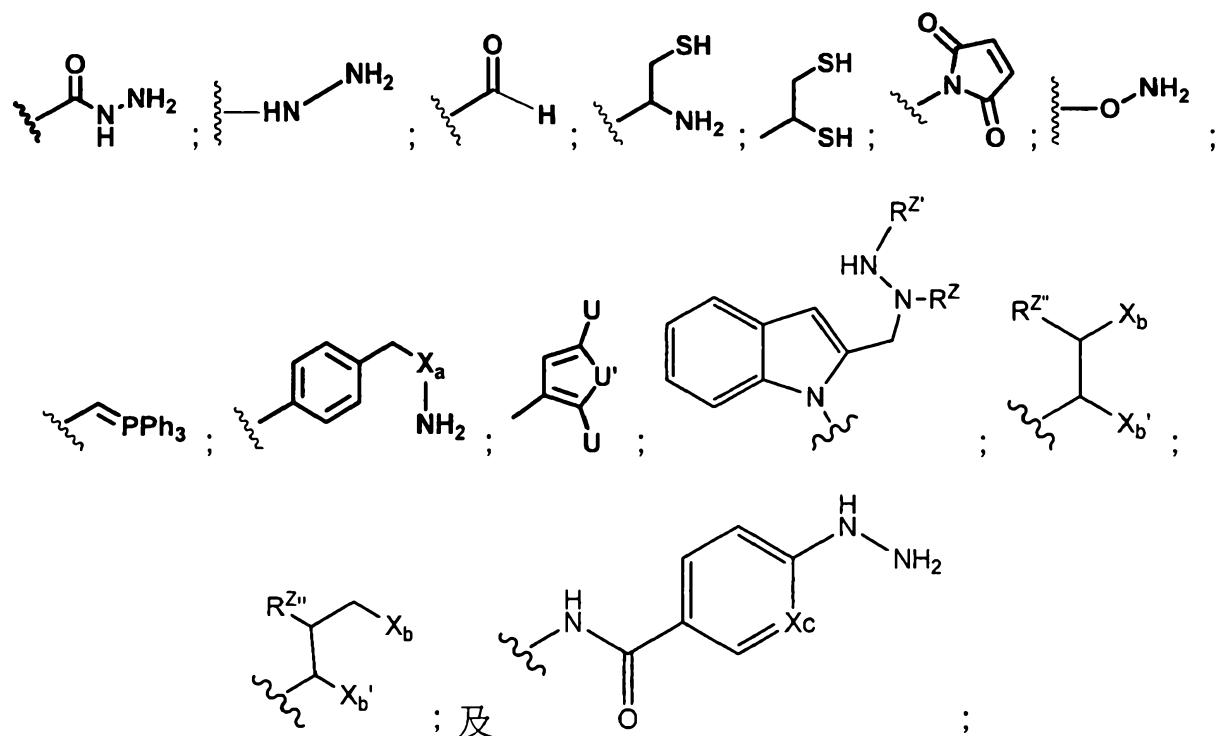


其中 J<sub>CB</sub> 係第一實施例中所描述之醛反應性基團；且其餘變數係如以上在第一實施例或第一實施例之第 2 或 6 個具體實施例，或其中所描述之任

何更具體之實施例中所描述。

【0313】 更具體言之， $J_{CB}$  為肼、醯肼或羥基胺。

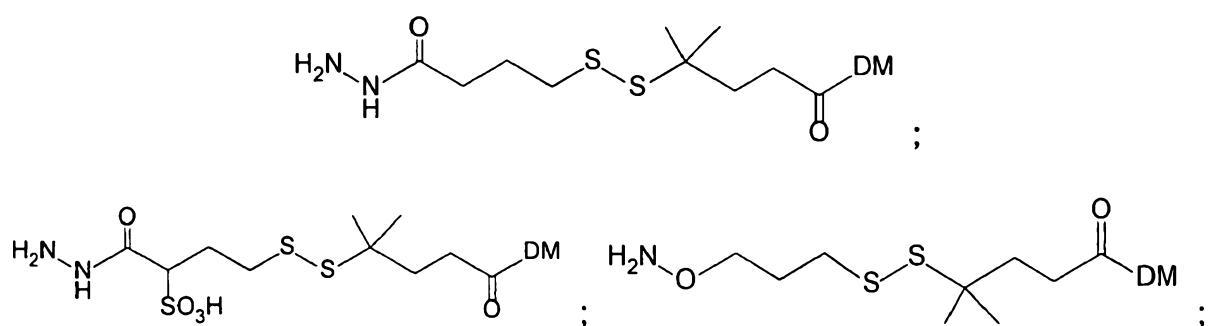
【0314】 在另一實施例中， $J_{CB}$  選自：

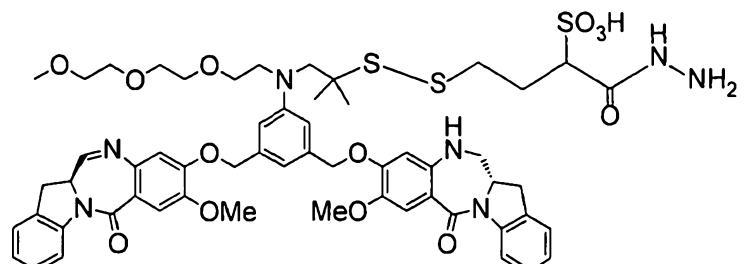
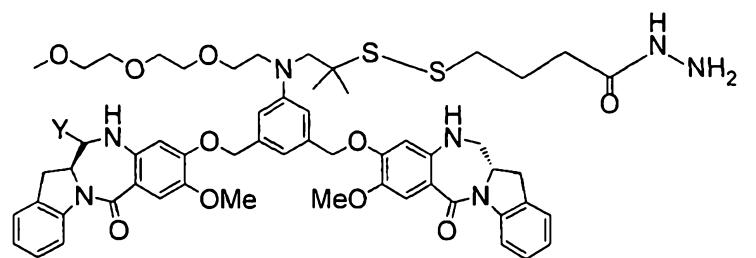
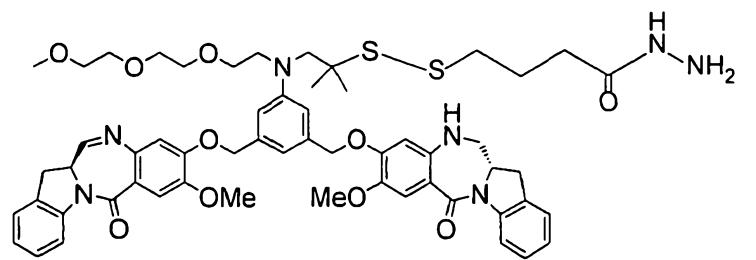
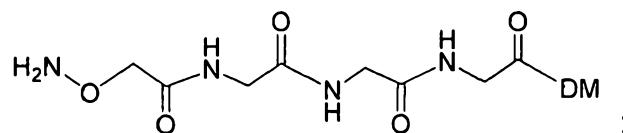
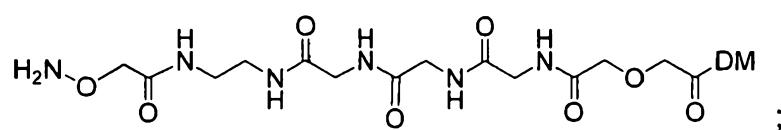
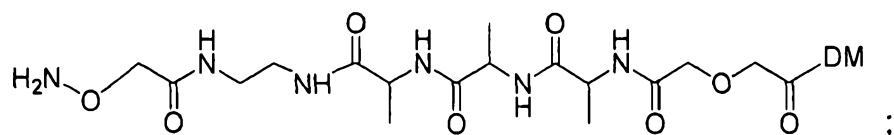
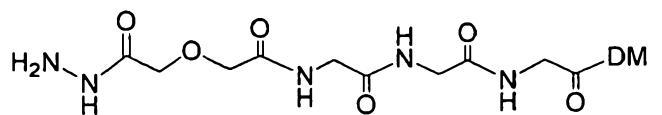
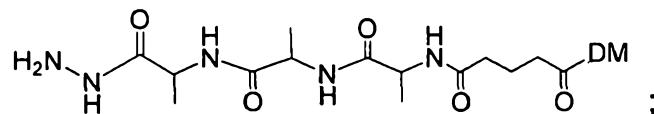
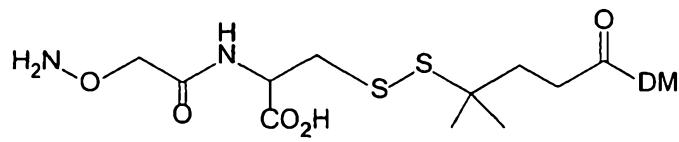


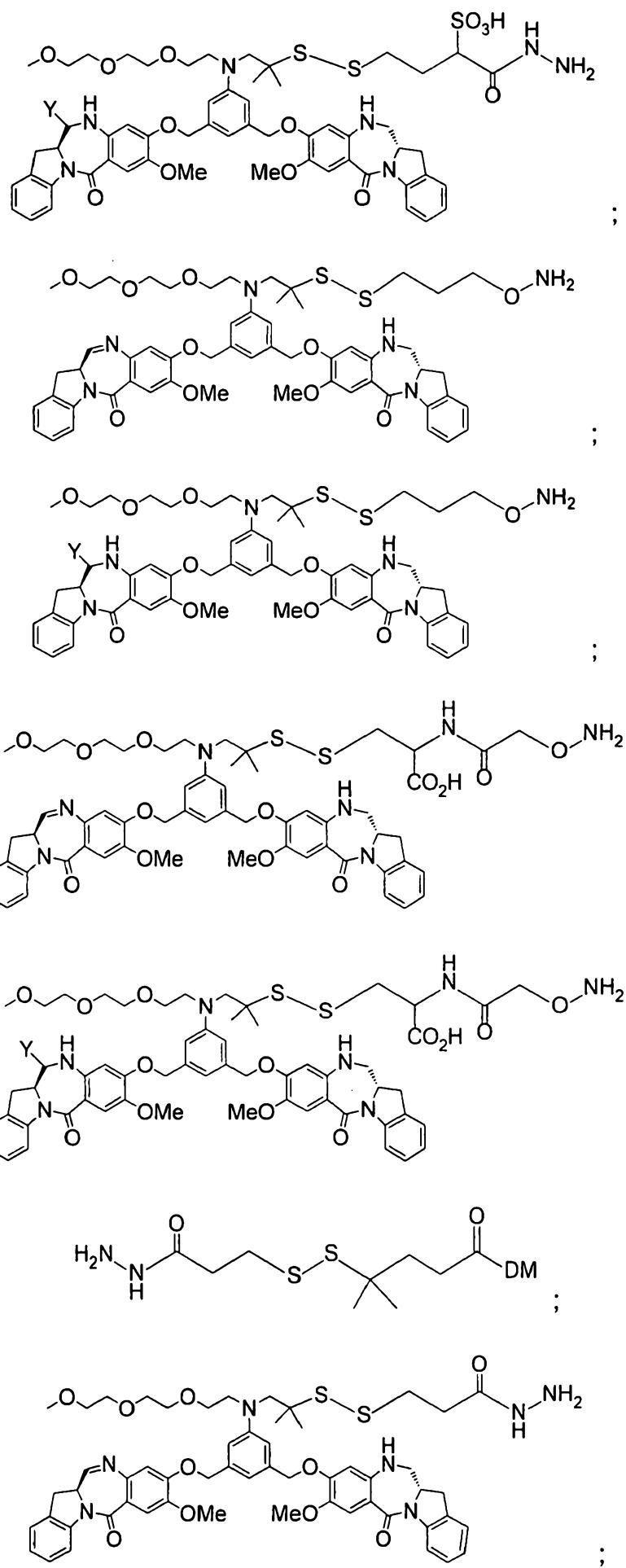
其中： $X_a$  為  $\text{CH}_2$ 、 $\text{O}$  或  $\text{NCH}_3$ ； $U'$  為  $\text{NH}$ 、 $\text{O}$ 、 $\text{S}$  或  $\text{CH}_2$ ； $U$  為  $\text{H}$  或供電子基團； $X_b$  及  $X_b'$  各自獨立地為  $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$  或  $-\text{NH}_2$ ； $R^Z$  及  $R^{Z'}$  各自獨立地為  $\text{H}$  或烷基(較佳為  $-\text{Me}$ )； $R^{Z''}$  為  $\text{H}$  或烷基；及  $X_c$  為  $\text{N}$  或  $\text{CH}$ 。更具體言

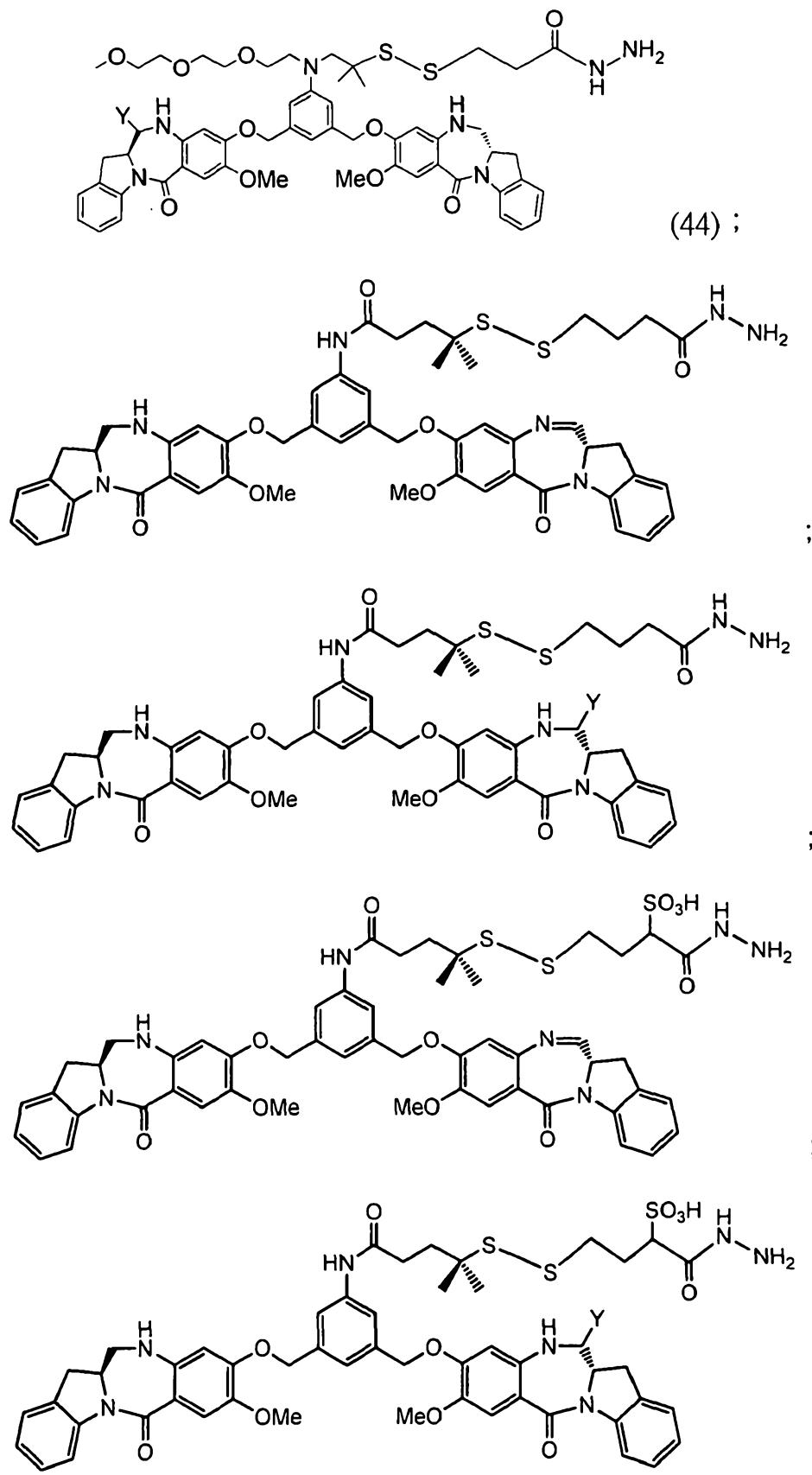
之，該醛反應性基團為  $\begin{array}{c} \text{O} \\ || \\ \text{H}-\text{N}-\text{H}_2 \end{array}$ 、 $\begin{array}{c} \text{HN}-\text{H}_2 \\ | \\ \text{O} \end{array}$  或  $\begin{array}{c} \text{O}-\text{H}_2 \\ | \\ \text{N} \end{array}$ 。

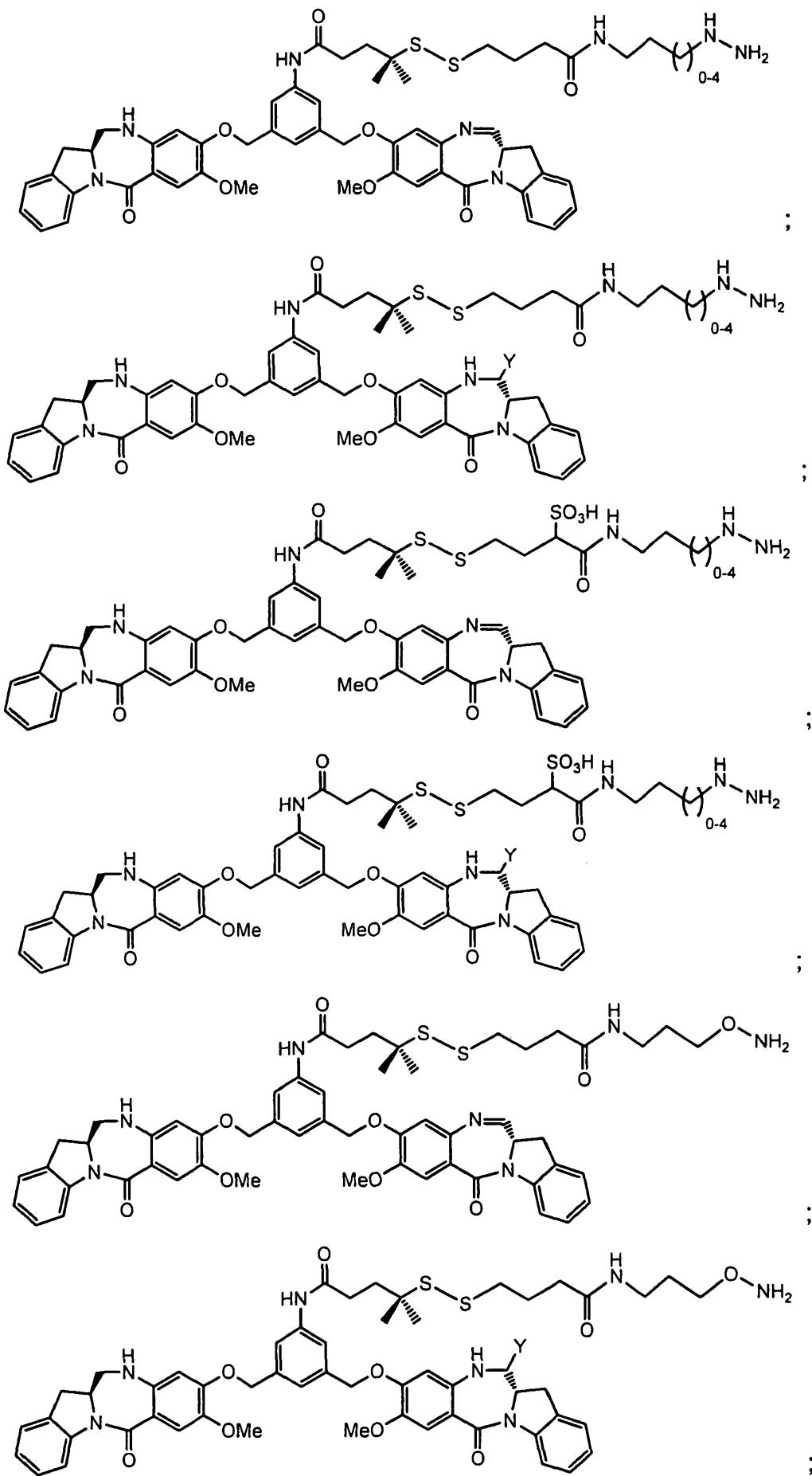
【0315】 在一個實施例中，細胞毒性劑-連接子化合物係由以下結構式表示：

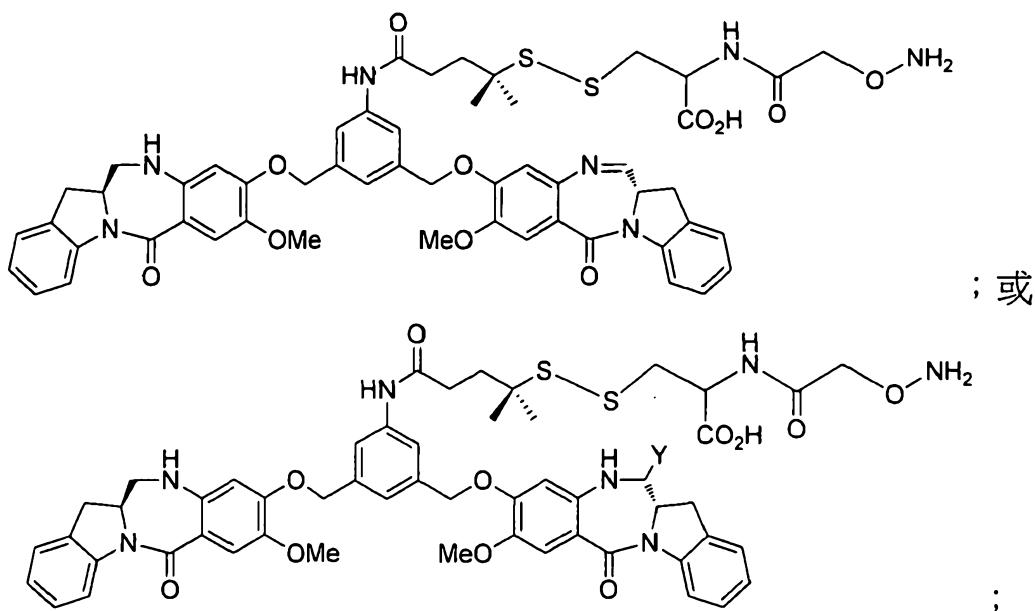










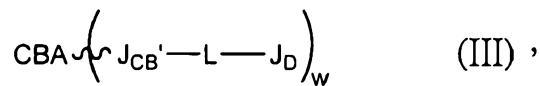


或其醫藥學上可接受之鹽，且 Y 為 -H 或-SO<sub>3</sub>M，且 M 為 H<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>或 K<sup>+</sup>。

### 經修飾之細胞結合劑

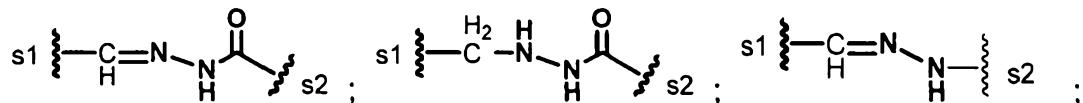
**【0316】** 在第五實施例中，本發明提供藉由使本文所描述之細胞結合劑與具有醛反應性基團之連接子化合物反應所形成的經修飾之細胞結合劑。

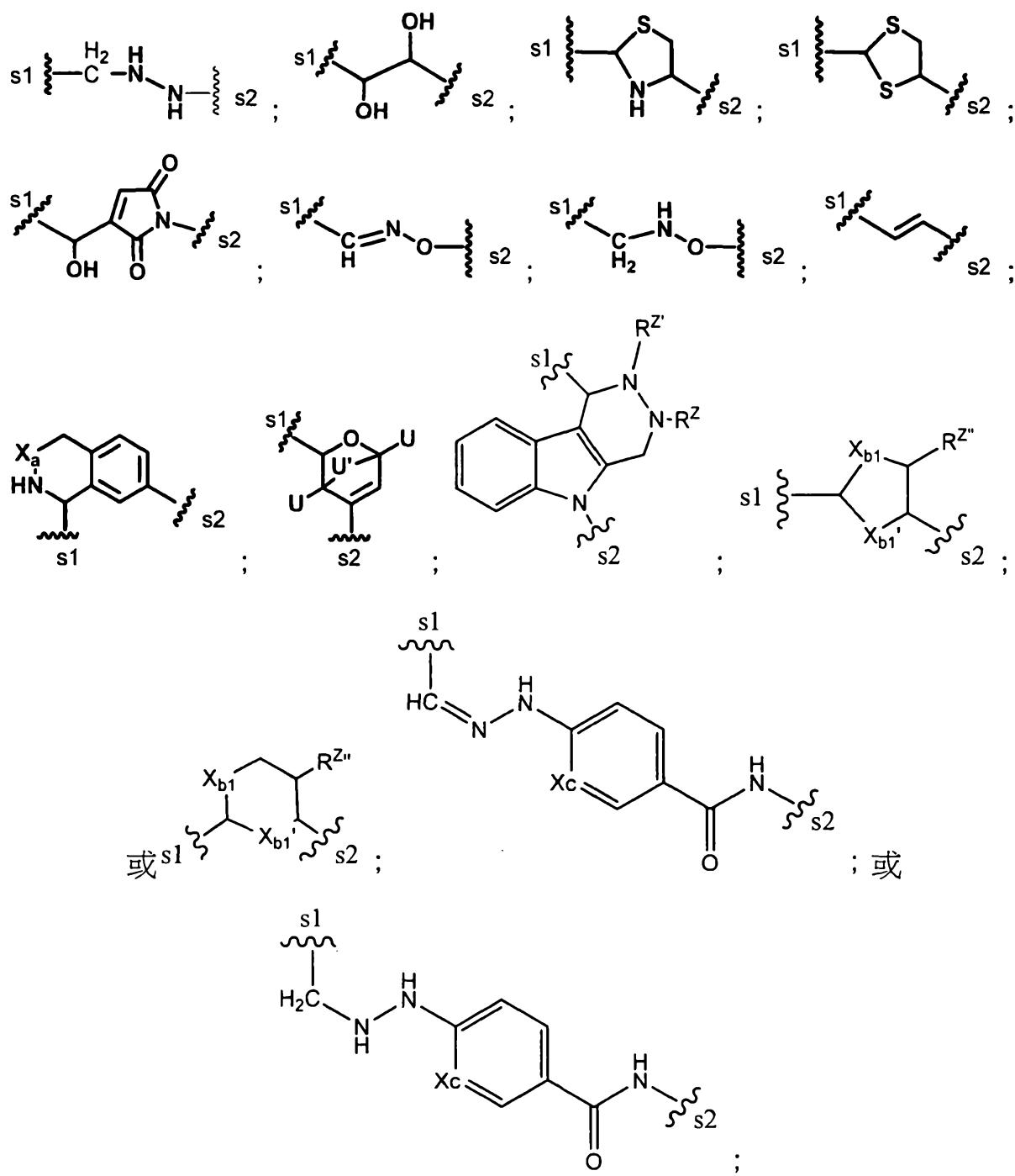
**【0317】** 在某些實施例中，該經修飾之細胞結合劑係由下式表示：



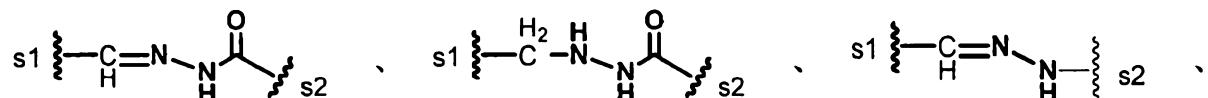
其中 J<sub>D</sub> 係可與細胞毒性劑 D' 形成共價鍵之反應性基團；且其餘變數係如以上在第一實施例或其中所描述之任何更具體之實施例中所描述。

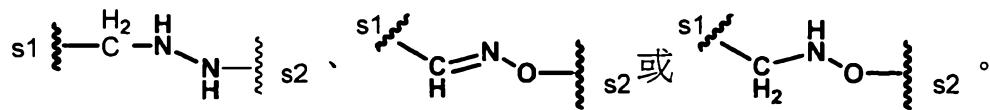
**【0318】** 在第 1 個具體實施例中，對於具有結構式(III)之經修飾細胞結合劑或其醫藥學上可接受之鹽，J<sub>CB'</sub> 係由以下結構式之一表示：



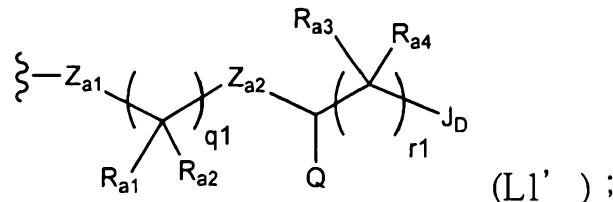


其中： $X_a$  為  $\text{CH}_2$ 、 $\text{O}$  或  $\text{NCH}_3$ ； $U'$  為  $\text{NH}$ 、 $\text{O}$ 、 $\text{S}$  或  $\text{CH}_2$ ； $U$  為  $\text{H}$  或供電子基團； $X_{b1}$  及  $X_{b1}'$  各自獨立地為  $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$  或  $-\text{NH}-$ ； $R^2$  及  $R^{Z'}$  各自獨立地為  $\text{H}$  或烷基(較佳為  $-\text{Me}$ )；且  $R^{Z'}$  為  $\text{H}$  或烷基； $s1$  為共價連接至該細胞結合劑之位點；且  $s2$  為共價連接至基團  $L$  之位點。更具體言之， $J_{CB'}$  為



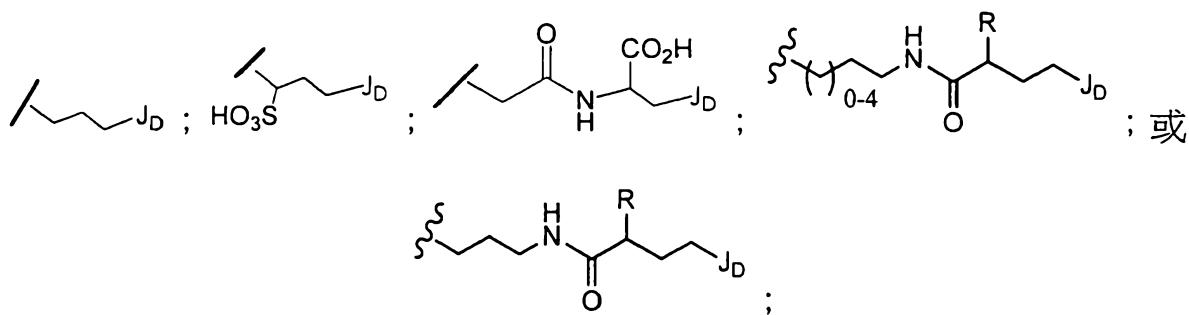


【0319】 在第 2 具體實施例中，對於式(III)， $-L-J_D$  係由下式表示：



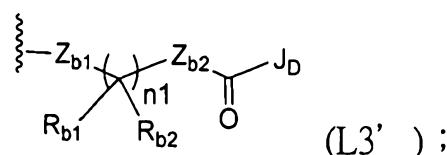
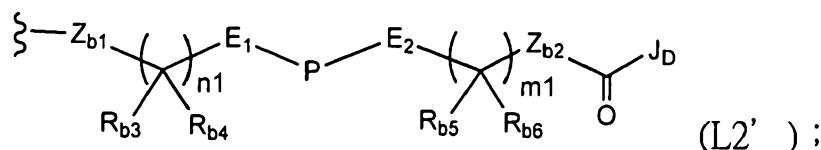
其中  $J_D$  為  $-\text{SH}$ 、 $-\text{SSR}^d$  或  $-\text{SC}(=\text{O})\text{R}^g$ ，其中  $R^d$  為苯基、硝基苯基、二硝基苯基、羧基硝基苯基、吡啶基或硝基吡啶基；且  $R^g$  為烷基； $J_{CB}'$  係如以上在第 1 個具體實施例中所描述；且其餘變數係如以上在第一實施例之第 2 個具體實施例及其中所描述之任何更具體之實施例中關於式(L1)所描述。更具體言之， $J_D$  為  $-\text{SH}$  或  $-\text{SSR}^d$  。

【0320】 在一更具體之實施例中， $-L-J_D$  係由以下結構式表示：



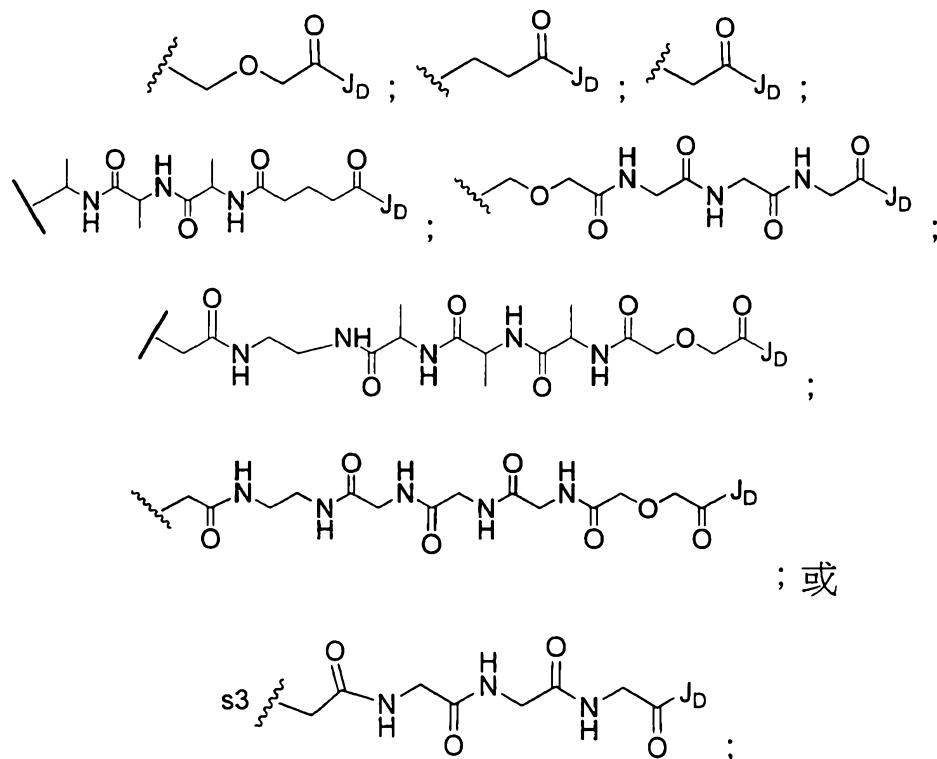
或其醫藥學上可接受之鹽，其中  $J_{CB}'$  及  $J_D$  係如以上在第 2 個具體實施例中所描述。更具體言之， $J_D$  為  $-\text{SH}$  或  $-\text{SSR}^d$  。

【0321】 在第 3 具體實施例中，對於式(III)， $-L-J_D$  係由下式表示：



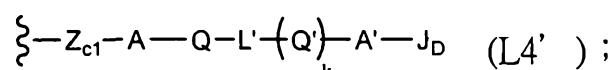
其中  $J_D$  為  $-OH$  或鹵素；或  $-C(=O)-J_D$  為反應性酯； $J_{CB}'$  係如以上在第 1 個具體實施例中所描述；且其餘變數係如以上在第一實施例之第 3 個具體實施例及其中所描述之任何更具體之實施例中關於式(L2)及(L3)所描述。更具體言之， $-C(=O)-J_D$  為 N-羥基琥珀醯亞胺酯。

**【0322】** 在一更具體之實施例中， $-L-J_D$  係由以下結構式表示：

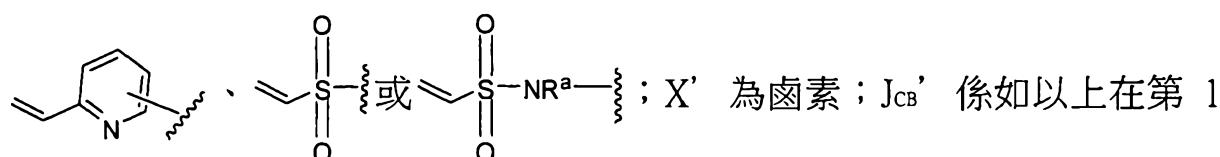


其中  $J_{CB}'$  及  $J_D$  係如以上在第 3 個具體實施例中所描述。更具體言之， $-C(=O)-J_D$  為 N-羥基琥珀醯亞胺酯。

**【0323】** 在第 4 個具體實施例中，對於式(III)， $-L-J_D$  係由下式表示：



其中  $J_D$  為順丁烯二醯亞胺、 $X' - CR^b R^c - C(=O) -$ 、 $X' - CR^b R^c - C(=O) - NR^e -$ 、



個具體實施例中所描述；且其餘變數係如以上在第一實施例之第 4 個具體

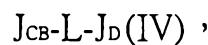
實施例及其中所描述之任何更具體之實施例中關於結構式(L4)所描述。

**【0324】** 在某些實施例中，對於以上任一實施例(諸如第五實施例或第五實施例之第1至4個具體實施例，或其中所描述之任何更具體之實施例)中所描述之式(III)，CBA可為第二實施例中所描述之任何細胞結合劑。

#### 雙官能交聯劑(或連接子化合物)

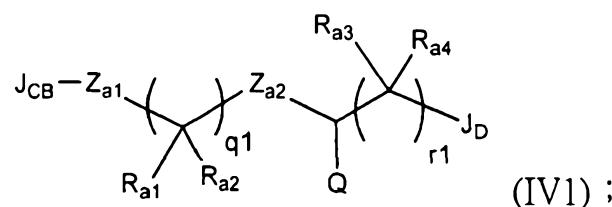
**【0325】** 在第六實施例中，本發明提供具有醛反應性基團之雙官能交聯劑(亦即，連接子化合物)，其可與本文所描述之細胞毒性劑形成共價鍵。

**【0326】** 在一個實施例中，該連接子化合物係由下式表示：

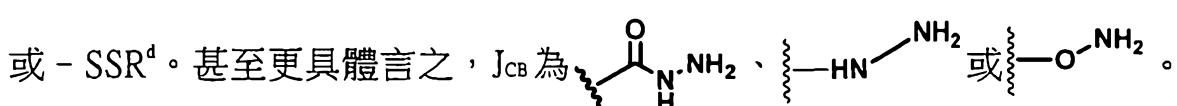


其中該等變數係如以上式(I)、(II)及(III)所描述。

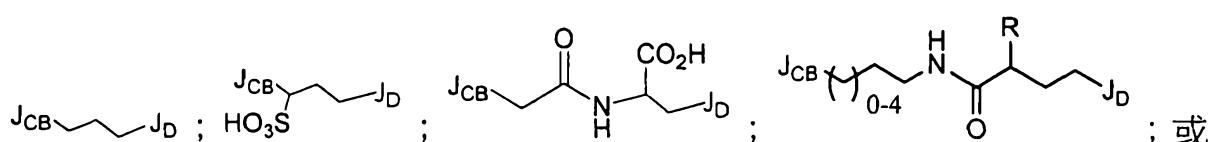
**【0327】** 在一個實施例中，該連接子化合物係由下式表示：

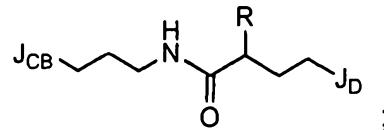


或其醫藥學上可接受之鹽，其中  $J_{CB}$  係第一實施例中所描述之醛反應性基團；且其餘變數係如以上關於結構式(L1')所描述。更具體言之， $J_D$  為-SH 或-SSR<sup>d</sup>。甚至更具體言之， $J_{CB}$  為



**【0328】** 在一更具體之實施例中，該雙官能交聯劑係由以下結構式表示：

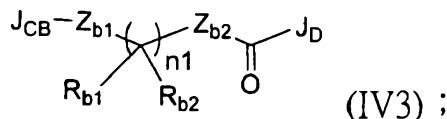
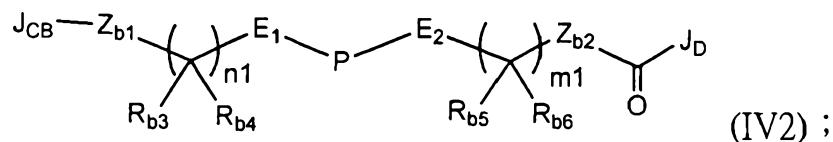




或其醫藥學上可接受之鹽，其中  $\text{J}_{\text{CB}}$  及  $\text{J}_D$  係如以上所描述。更具體言之，

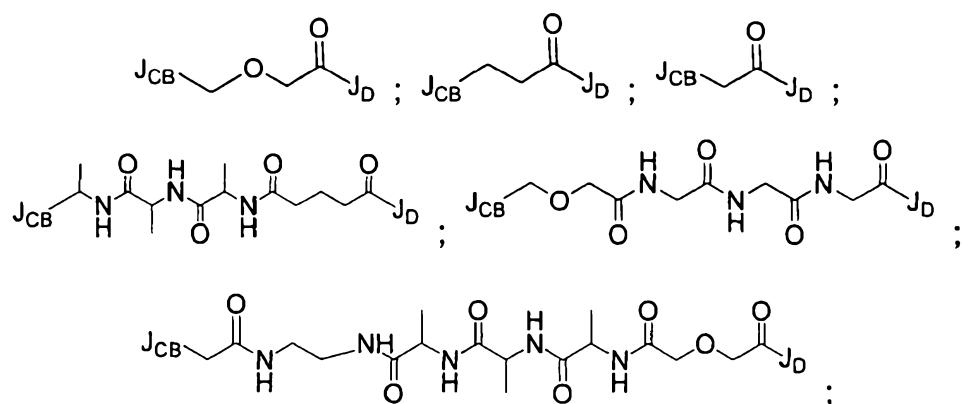
$\text{J}_D$  為  $-\text{SH}$  或  $-\text{SSR}^d$ 。甚至更具體言之， $\text{J}_{\text{CB}}$  為 、 或 。

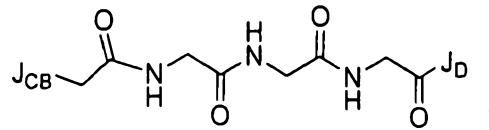
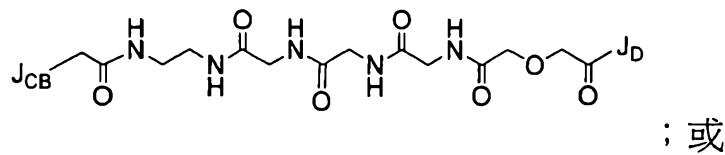
【0329】 在另一實施例中，該連接子化合物係由以下結構式表示：

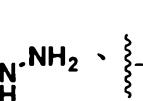
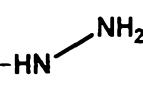


其中  $\text{J}_{\text{CB}}$  係第一實施例中所描述之醛反應性基團；且其餘變數係如以上關於結構式(L2')及(L3')所描述。更具體言之， $-\text{C}(=\text{O})-\text{J}_D$  為 N-羥基琥珀醯亞胺酯。甚至更具體言之， $\text{J}_{\text{CB}}$  為 、 或 。

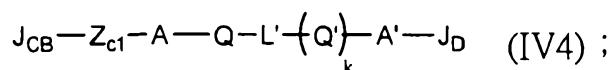
【0330】 在一更具體之實施例中，該雙官能交聯劑係由以下結構式表示：

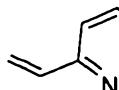
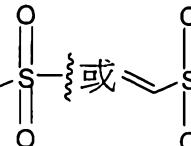
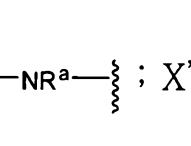
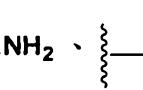
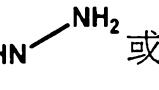




其中  $\text{J}_{\text{CB}}$  及  $\text{J}_D$  係如以上所描述。更具體言之， $-\text{C}(=\text{O})-\text{J}_D$  為 N-羥基琥珀醯亞胺酯。甚至更具體言之， $\text{J}_{\text{CB}}$  為 、 或 。

**【0331】** 在另一實施例中，該雙官能交聯劑係由以下結構式表示：



其中  $\text{J}_D$  為順丁烯二醯亞胺、 $\text{X}'-\text{CR}^b\text{R}^c-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $\text{X}'-\text{CR}^b\text{R}^c-\text{C}(=\text{O})-\text{NR}^e-$ 、  
、 或 ； $\text{X}'$  為鹵素；且其餘變數係如以上關於結構式(L4')所描述。更具體言之， $\text{J}_D$  為順丁烯二醯亞胺。甚至更具體言之， $\text{J}_{\text{CB}}$  為 、 或 。

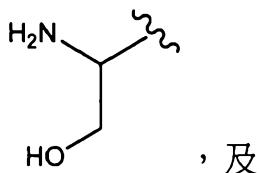
### 細胞結合劑-藥物偶聯物之製備

**【0332】** 在第七實施例中，本發明提供用於製備本文所描述之細胞結合劑-細胞毒性劑偶聯物之方法。

**【0333】** 在一個實施例中，本發明提供一種製備本文所描述之細胞結合劑-細胞毒性劑偶聯物之方法，該方法包括以下步驟：

(a) 用氧化劑將細胞結合劑之 2-羥基乙胺部分氧化以形成具有醛基之經氧化細胞結合劑；其中該 2-羥基乙胺部分為絲胺酸、蘇胺酸、羥基離胺酸、4-羥基鳥胺酸或 2,4-二胺基-5-羥基戊酸殘基之一部分，且由以下結構式

表示：



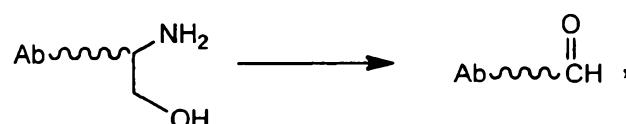
，及

(b) 使該經氧化細胞結合劑：

- (i) 與具有醛反應性基團之細胞毒性劑-連接子化合物或具有醛反應性基團之細胞毒性劑接觸，由此形成該細胞結合劑-細胞毒性劑偶聯物；或
- (ii) 與具有醛反應性基團之連接子化合物接觸，由此形成與連接子結合之經修飾抗體或其經修飾抗原結合部分，隨後使該經修飾抗體或其經修飾抗原結合部分與細胞毒性劑反應，以形成該細胞結合劑-細胞毒性劑偶聯物；或
- (iii) 與細胞毒性劑接觸，隨後添加具有醛反應性基團及可與該細胞毒性劑形成共價鍵之反應性基團的連接子化合物，以形成該細胞結合劑-細胞毒性劑偶聯物。

**【0334】** 在第 1 個具體實施例中，該細胞結合劑係抗體或其抗原結合部分且該方法包括以下步驟：

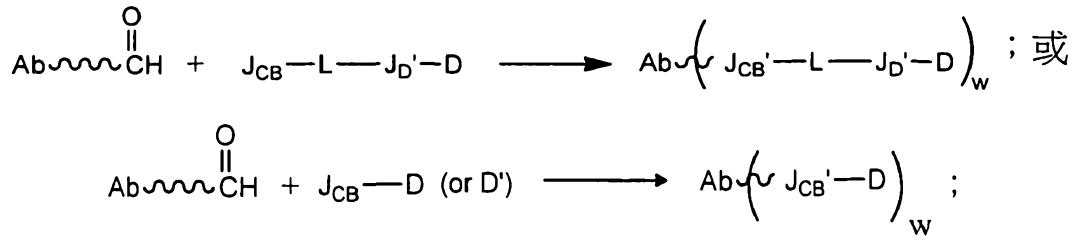
- (a) 用氧化劑氧化抗體或其抗原結合部分之 2-羥基乙胺部分，以形成具有醛基之經氧化抗體或其經氧化抗原結合部分，



其中該 2-羥基乙胺部分係 N 末端絲氨酸、蘇氨酸、羥基離氨酸、4-羥基鳥氨酸或 2,4-二胺基-5-羥基戊酸殘基之一部分；及

- (b) 使該經氧化抗體或其經氧化抗原結合部分與具有醛反應性基團之

細胞毒性劑-連接子化合物或具有醛反應性基團之細胞毒性劑反應，以形成該抗體-細胞毒性劑偶聯物



其中：

Ab 係本文所描述之抗體或其抗原結合部分；

$\text{J}_{\text{CB}}$  係如以上所描述之醛反應性基團；

L 係如以上所描述之間隔子或鍵；

$\text{J}_{\text{D}'}$  係將該細胞毒性劑 D 與基團 L 連接之連接部分，或當 L 係鍵時不存在；

D 係經由該連接部分  $\text{J}_{\text{D}'}$  共價連接至 L 之細胞毒性劑；且

w 係 1、2、3 或 4。

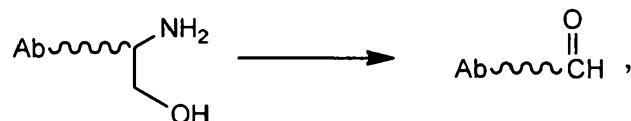
**【0335】** 在某些實施例中，對於以上第 1 個具體實施例中所描述之方法，可使用以上第四實施例中所描述之任何細胞毒性劑-連接子化合物或第三實施例中所描述之細胞毒性劑。

**【0336】** 在某些實施例中，對於以上第 1 個具體實施例中所描述之方法，在步驟(b)中與經氧化抗體或其經氧化抗原結合部分反應之前，使具有亞胺官能基(-C=N-)之細胞毒性劑-連接子化合物或細胞毒性劑與亞胺反應性試劑反應，以形成經修飾之細胞毒性劑-連接子化合物或經修飾之細胞毒性劑。在一個實施例中，經修飾之細胞毒性劑-連接子化合物或經修飾之細胞毒性劑係原位產生，且在不純化情況下與經氧化抗體或其經氧化抗原結

合部分反應。

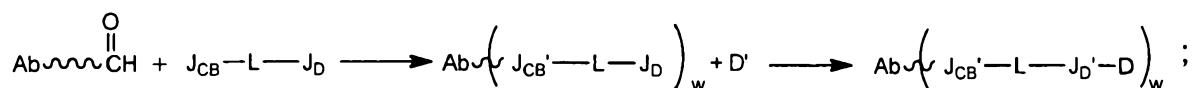
**【0337】** 在第 2 個具體實施例中，該細胞結合劑係抗體或其抗原結合部分且該方法包括以下步驟：

(a) 用氧化劑氧化抗體或其抗原結合部分之 N 末端 2-羥基乙胺部分，以形成具有 N 末端醛基之經氧化抗體或其經氧化抗原結合部分，



其中該 2-羥基乙胺部分係 N 末端絲氨酸、蘇氨酸、羥基離氨酸、4-羥基鳥氨酸或 2,4-二胺基-5-羥基戊酸殘基之一部分；及

(b) 使該經氧化抗體或其經氧化抗原結合部分與具有醛反應性基團之連接子化合物反應以形成與連接子結合之經修飾抗體或其經修飾抗原結合部分，隨後使該經修飾抗體或其經修飾抗原結合部分與細胞毒性劑反應，以形成該抗體-細胞毒性劑偶聯物，



其中 D' 為細胞毒性劑；J<sub>D</sub>為可與細胞毒性劑 D' 形成共價鍵之反應性基團；且其餘變數係如第 1 個具體實施例中所描述。

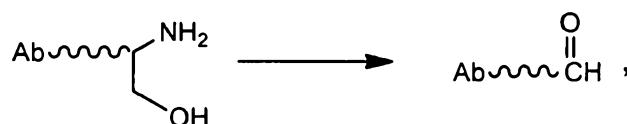
**【0338】** 在某些實施例中，對於以上第 2 個具體實施例中所描述之方法，可使用以上第六實施例中所描述之任何連接子。

**【0339】** 在某些實施例中，對於第 2 個具體實施例中所描述之方法，在步驟(b)中與結合至連接子之經修飾抗體或其經修飾抗原結合部分反應之前，使具有亞胺官能基(-C=N-)之細胞毒性劑與亞胺反應性試劑反應，以形成經修飾之細胞毒性劑。在一個實施例中，經修飾細胞毒性劑係原位產生

且在與結合至連接子之經修飾抗體或其經修飾抗原結合部分反應之前未經純化。

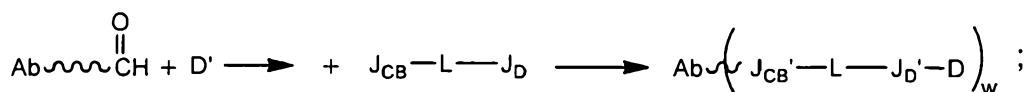
**【0340】** 在第 3 個具體實施例中，該細胞結合劑係抗體或其抗原結合部分且該方法包括以下步驟：

(a) 用氧化劑氧化抗體或其抗原結合部分之 N 末端 2-羥基乙胺部分，以形成具有 N 末端醛基之經氧化抗體或其經氧化抗原結合部分，



其中該 2-羥基乙胺部分係 N 末端絲氨酸、蘇氨酸、羥基離氨酸、4-羥基鳥氨酸或 2,4-二胺基-5-羥基戊酸殘基之一部分；及

(b) 使該經氧化抗體或其經氧化抗原結合部分與細胞毒性劑反應，隨後添加具有醛反應性基團之連接子化合物，以形成該抗體-細胞毒性劑偶聯物，



其中該等變數係如以上在第 1 及 2 個具體實施例中所描述。

**【0341】** 在某些實施例中，對於以上第 3 個具體實施例中所描述之方法，可使用以上第六實施例中所描述之任何連接子化合物或第三實施例中所描述之細胞毒性劑。

**【0342】** 任何適合氧化劑均可用於以上所描述之方法之步驟(a)中。在某些實施例中，氧化劑為過碘酸鹽。更具體言之，氧化劑為過碘酸鈉。

**【0343】** 可使用相對於細胞結合劑(例如抗體)莫耳當量過量之氧化劑。在某些實施例中，可使用約 2-100、5-80、10-50、1-10 或 5-10 莫耳當量之氧化劑。在某些實施例中，可使用約 10 或約 50 當量之氧化劑。當使用大

量氧化劑時，使用較短反應時間來避免過度氧化。舉例而言，當使用 50 當量氧化劑時，氧化反應進行約 5 至約 60 分鐘。或者，當使用 10 當量氧化劑時，氧化反應進行約 30 分鐘至約 24 小時。在一個實施例中，使用 5-10 莫耳當量之氧化劑且反應時間進行約 5 至約 60 分鐘(例如約 10 至約 30 分鐘、約 20 至約 30 分鐘)。

**【0344】** 在某些實施例中，氧化反應不會導致顯著非靶向氧化。舉例而言，在 N 末端絲氨酸氧化產生具有 N 末端醛基之經氧化 CD123/IL-3R  $\alpha$ -結合劑之氧化過程期間，無顯著量(例如，低於 20%、低於 10%、低於 5%、低於 3%、低於 2%或低於 1%)甲硫氨酸及/或聚糖經氧化。

**【0345】** 在某些實施例中，在以上所描述之方法中步驟(b)之反應中存在催化劑。此項技術中之任何適合催化劑均可使用。在一個實施例中，該催化劑為苯胺或經取代苯胺。示例性苯胺催化劑包括但不限於，丙氨酸、鄰仲苯基二胺、間仲苯基二胺、3,5-二胺基苯甲酸、對仲苯基二胺、2-甲基-對仲苯基二胺、N-甲基-對仲苯基二胺、鄰胺基苯酚、間胺基苯酚、對胺基苯酚、對甲氧基苯胺、5-甲氧基-鄰胺基苯甲酸、鄰胺基苯甲酸及 4-胺基苯乙醇。在一個實施例中，該催化劑為 4-胺基苯乙醇。在某些實施例中，步驟(b)之反應係在約 pH 5.0 至約 pH 6.5 下進行。在某些實施例中，步驟(b)之反應係在約 pH 5.0 下進行。

**【0346】** 在某些實施例中，對於本文所描述之方法之步驟(b)，所使用的具有醛反應性基團之化合物(例如，本文所描述之細胞毒性劑-連接子化合物、細胞毒性劑或連接子化合物)係相對於經氧化細胞結合劑(例如經氧化抗體或經氧化抗原結合部分)莫耳過量。在某些實施例中，具有醛反應性基

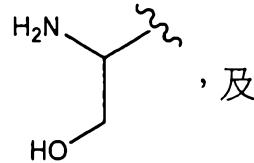
團之化合物與經氧化細胞結合劑之比率介於約 10:1 與約 1.1:1 之間，介於約 5:1 至約 2:1 之間。在一個實施例中，該比率為約 4:1。

**【0347】** 在某些實施例中，對於以上所描述之方法，諸如第三實施例或第 1 至 3 個具體實施例中之該等方法，可藉由本文所描述之任何方法獲得細胞結合劑，諸如抗體或其抗原結合部分。

**【0348】** 在第 4 個具體實施例中，本發明提供一種製備抗體-細胞毒性劑偶聯物之方法，該方法包括以下步驟：

(a) 用氧化劑氧化抗體或其抗原結合部分之 N 末端絲氨酸或蘇氨酸殘基的 2-羥基乙胺部分，以形成具有 N 末端醛基之經氧化抗體或其經氧化抗

原結合部分，其中該 2-羥基乙胺部分係由以下結構式表示：



(b) 使該經氧化抗體或其經氧化抗原結合部分：(i)與具有醛反應性基團之細胞毒性劑-連接子化合物接觸，以形成抗體-細胞毒性劑偶聯物；或(ii)與具有醛反應性基團之連接子化合物接觸，以形成結合至連接子之經修飾抗體或其經修飾抗原結合部分，隨後使該經修飾抗體或其經修飾抗原結合部分與細胞毒性劑反應以形成抗體-細胞毒性劑偶聯物；或(iii)與細胞毒性劑接觸，隨後添加具有醛反應性基團及可與細胞毒性劑形成共價鍵之反應性基團的連接子化合物，以形成抗體-細胞毒性劑偶聯物。

**【0349】** 在某些實施例中，對於以上所描述之任何方法，諸如第七實施例或第 1 至 4 個具體實施例或任何更具體之實施例中之該等方法，抗體或其抗原結合部分係藉由表現編碼重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分之多聚核苷酸來獲得，該重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合

部分包含：(1)具有 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列的異源信號肽；(2)緊鄰該重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分之成熟加工序列第一個殘基之 N 末端的 Ser 或 Thr 殘基；或(3)置換該重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分之成熟加工序列之一個或多個 N 末端胺基酸殘基的 Ser 或 Thr 殘基。

**【0350】** 在某些實施例中，對於以上所描述之任何方法，諸如第七實施例或第 1 至 4 個具體實施例或任何更具體之實施例中之該等方法，該抗體或其抗原結合部分包含 SEQ ID NO: 3 之輕鏈序列。

**【0351】** 在某些實施例中，對於以上所描述之任何方法，諸如第七實施例或第 1 至 4 個具體實施例或任何更具體之實施例中之該等方法，該抗體或其抗原結合部分係包含 SEQ ID NO: 3 之輕鏈序列之鼠類抗體或其抗原結合部分的嵌合抗體、人類化抗體或人類抗體，或其抗原結合部分。人類化抗體或其抗原結合部分可為表面重塑或 CDR 移植之抗體，或其抗原結合部分。

**【0352】** 在某些實施例中，根據以上所描述之任何方法製備的偶聯物可接著經純化。此項技術中已知的任何純化方法均可用於純化本發明之偶聯物(參見例如, *Bioconjugate Techniques*, 第 2 版, Greg T. Hermanson, Academic Press, Inc.出版, 2008)。在一個實施例中，本發明之偶聯物可使用切向流過濾(TFF)、非吸附層析法、吸附層析法、吸附過濾法、選擇性沈澱法、高效液相層析法(HPLC)、透析或任何其他適合純化方法，以及其組合來進行純化。

**【0353】** 任何適合之 TFF 系統均可用於純化，包括 Pellicon 型系統(Millipore, Billerica, MA)、Sartocon Cassette 系統(Sartorius AG, Edgewood, NY)

及 Centrasette 型系統(Pall Corp., East Hills, NY)。

**【0354】** 任何適合吸附層析樹脂均可用於純化。較佳之吸附層析樹脂包括羥基磷灰石層析、疏水電荷誘導層析(HCIC)、疏水相互作用層析(HIC)、離子交換層析、混合型離子交換層析、固定化金屬親和層析(IMAC)、染料配體層析、親和層析、反相層析及其組合。適合羥基磷灰石樹脂之實例包括羥基磷灰石陶瓷(I型及II型 CHT；Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)、HA Ultrogel 羥基磷灰石(Pall Corp., East Hills, NY)及氟磷灰石陶瓷(I型及II型 CFT；Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)。適合 HCIC 樹脂之實例為 MEP Hypercel 樹脂(Pall Corp., East Hills, NY)。適合 HIC 樹脂之實例包括丁基-瓊脂糖、己基-瓊脂糖、苯基-瓊脂糖及辛基瓊脂糖樹脂(均購自 GE Healthcare, Piscataway, NJ)，以及 Macro-prep 甲基樹脂及 Macro-Prep 第三丁基樹脂(Biorad Laboratories, Hercules, CA)。適合離子交換樹脂之實例包括 SP-瓊脂糖、CM-瓊脂糖及 Q-瓊脂糖樹脂(均購自 GE Healthcare, Piscataway, NJ)，及 Unosphere S 樹脂(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)。適合混合型離子交換劑之實例包括 Bakerbond ABx 樹脂(JT Baker, Phillipsburg NJ)。適合 IMAC 樹脂之實例包括螯合性瓊脂糖樹脂(Chelating Sepharose resin；GE Healthcare, Piscataway, NJ)及 Profinity IMAC 樹脂(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)。適合染料配體樹脂之實例包括藍色瓊脂糖樹脂(Blue Sepharose resin；GE Healthcare, Piscataway, NJ)及 Affi-gel 藍色樹脂(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)。適合親和樹脂之實例包括蛋白質 A 瓊脂糖樹脂(例如，MabSelect, GE Healthcare, Piscataway, NJ)、His 標記之金屬親和樹脂、抗 FLAG 親和樹脂，及卵磷脂親和樹脂，例如 Lentil 卵磷脂親和樹脂(GE Healthcare, Piscataway, NJ)，其中抗體帶有適當卵磷脂結

合位點。適合反相樹脂之實例包括 C4、C8 及 C18 樹脂(Grace Vydac, Hesperia, CA)。

**【0355】** 任何適合非吸附性層析樹脂均可用於純化。舉例而言，可使用尺寸排阻層析法純化本發明之偶聯物。適合非吸附性層析樹脂之實例包括但不限於，SEPHADEX™ G-10、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)。

**【0356】** 在一個實施例中，當細胞結合劑為表位點標記之 Avibody 時，可使用羥基磷灰石層析、尺寸排阻層析、切向流過濾、凝膠電泳、透析及親和層析，較佳使用親和層析，更佳使用 His 標記之金屬親和樹脂及抗 FLAG M2 親和樹脂來純化偶聯物(參見例如，US 2008/0152586 及 US 2012/0171115)。

**【0357】** 在另一實施例中，當細胞結合劑為 centyrin 時，可使用蛋白質 A 純化、硫酸銨或乙醇沈澱、酸萃取、陰離子或陽離子交換層析、磷酸纖維素層析、疏水相互作用層析、尺寸排阻層析、切向流過濾、親和層析、羥基磷灰石層析及卵磷脂層析法來純化偶聯物。或者，可使用 HPLC 來純化偶聯物。較佳地，可藉由使用親和層析，更佳使用 His 標記之金屬親和層析來純化偶聯物。參見例如，美國專利公開案號 US 2010/0255056、US 2010/0216708 及 US 2011/0274623。

**【0358】** 在另一實施例中，當細胞結合劑為 DARPin 時，可藉由親和層析、尺寸排阻層析、羥基磷灰石層析、切向流過濾，較佳藉由親和層析，更佳藉由 His 標記之親和層析來純化偶聯物。參見例如，美國專利公開案號

20040132028、2009/0082274、2011/0118146 及 2011/0224100；WO 02/20565 及 WO 06/083275。

### 細胞毒性之活體外評價

**【0359】** 可對本發明之細胞毒性化合物及細胞結合劑-藥物偶聯物在活體外抑制各種癌細胞增殖之能力進行評價。可使待評價之細胞暴露於該等化合物或偶聯物 1-5 天，且藉由已知方法在直接分析中量測細胞之存活分數。接著，可由該等分析之結果計算  $IC_{50}$  值。或者或另外，可使用活體外細胞株敏感性篩選，諸如美國國家癌症協會(U.S. National Cancer Institute)所描述之篩選法(參見 Voskoglou-Nomikos 等人, 2003, *Clinical Cancer Res.* 9: 42227-4239, 以引用之方式併入本文中)作為一種指導以確定可能對本發明之化合物或偶聯物治療敏感的癌症類型。

### 組成物及使用方法

**【0360】** 本發明包括一種組成物(例如醫藥組成物)，其包含本文所描述之新穎苯并二氮呡化合物(例如，吲哚啉并苯并二氮呡或噁唑啶并苯并二氮呡)、其衍生物或其偶聯物(及/或其溶劑化物、水合物及/或鹽)及載劑(醫藥學上可接受之載劑)。本發明亦包括一種組成物(例如醫藥組成物)，其包含本文所描述之新穎苯并二氮呡化合物、其衍生物或其偶聯物(及/或其溶劑化物、水合物及/或鹽)及載劑(醫藥學上可接受之載劑)，另外包含第二治療劑。本發明之組成物可用於在哺乳動物(例如人類)中抑制異常細胞生長或治療增生性病症。本發明之組成物亦可用於治療哺乳動物(例如人類)之抑鬱症、焦慮症、應激症、恐怖症、驚慌、煩躁、心理障礙、疼痛及炎性疾病。本發明包括一種在哺乳動物(例如人類)中抑制異常細胞生長或治療增生性病

症之方法，該方法包括向該哺乳動物施用單獨或與第二治療劑組合的治療有效量之本文所描述之新穎苯并二氮呑化合物(例如，吲哚琳并苯并二氮呑或噁唑啶并苯并二氮呑)、其衍生物或其偶聯物(及/或其溶劑化物、水合物及/或鹽)或其組成物及載劑(醫藥學上可接受之載劑)。

**【0361】** 在一個實施例中，該增生性病症為癌症。癌症可包括血液科癌症或實體腫瘤。更具體言之，該癌症為白血病(例如急性骨髓性白血病(AML)；急性單核細胞白血病、早幼粒細胞性白血病、嗜伊紅性白血病、急性淋巴母細胞性白血病(ALL)，諸如急性 B 淋巴母細胞性白血病(B-ALL)；慢性骨髓性白血病(CML)；慢性淋巴細胞性白血病(CLL))或淋巴瘤(例如非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma))、骨髓增生異常症候群(MDS)、黑素瘤、肺癌(例如非小細胞肺癌(NSCLC))、卵巢癌、子宮內膜癌、腹膜癌、胰腺癌、乳癌、前列腺癌、頭頸部鱗狀細胞癌及子宮頸癌。

**【0362】** 本發明亦提供治療方法，該方法包括向需要治療之受試者施用有效量的以上所描述之任何偶聯物。類似地，本發明提供一宗用於誘導所選細胞群中細胞死亡之方法，該方法包括使靶細胞或含有靶細胞之組織與有效量的本發明之包含細胞毒性劑之任何細胞毒性化合物-結合劑(例如連接至細胞結合劑之吲哚琳并苯并二氮呑或噁唑啶并苯并二氮呑二聚體)、其鹽或溶劑化物接觸。靶細胞係細胞結合劑能結合之細胞。

**【0363】** 必要時，可與該偶聯物一起施用其他活性劑，諸如其他抗腫瘤劑。

**【0364】** 適合醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑及賦形劑係熟知的且可由熟習此項技術者依據臨床情況所允許來確定。適合載劑、稀釋劑及/或賦

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

**【0365】** 用於誘導所選細胞群中細胞死亡之方法可在活體外、活體內或離體實行。

**【0366】** 活體外應用之實例包括自體骨髓移在植入同一患者體內之前進行處理以便殺死患病細胞或惡性細胞；骨髓在移植之前進行處理以便殺死勝任 T 細胞且防止移植物抗宿主疾病(GVHD)；處理細胞培養物以便殺死除所需變異體外的不表現靶抗原之所有細胞；或殺死表現非所需抗原之變異體。非臨床活體外應用之條件易於由熟悉此項技術者決定。

**【0367】** 臨床上離體應用之實例係在自體移植以治療癌症或治療自體免疫疾病之前自骨髓移除腫瘤細胞或淋巴樣細胞，或在移植之前由自體或異體骨髓移除 T 細胞及其他淋巴樣細胞以便防止 GVHD。治療可進行如下。自患者或其他個體採集骨髓，且接著在約 37°C 下，在添加有濃度範圍為約 10 μM 至 1 pM 之本發明細胞毒性劑的含血清培養基中孵育約 30 分鐘至約 48 小時。濃度及孵育時間(亦即，劑量)之確切條件易於由熟習此項技術者決定。在孵育之後，用含血清之培養基洗滌骨髓細胞且根據已知方法，將其經靜脈內回輸給患者。在患者接受在骨髓採集時間與經處理細胞回輸之間接受其他治療，諸如消融性化學療法或全身照射療程之情況下，使用標準醫療設備將經處理骨髓細胞冷凍儲存在液氮中。

**【0368】** 對於臨床上活體內應用，所供應的本發明之細胞毒性劑將係

針對無菌性及內毒素含量進行測試之溶液或凍乾粉。適合施用偶聯物之方案的實例如下。偶聯物係每週一次以靜脈內推注給與，持續 4 周。推注劑量係在添加有 5 至 10 mL 人血清白蛋白之 50 至 1000 mL 標準生理食鹽水中給與。每次靜脈內施用的劑量將為 10  $\mu\text{g}$  至 2000 mg(在每天 100 ng 至 20 mg/kg 範圍內)。治療四周之後，患者可每週繼續接受治療。關於施用途徑、賦形劑、稀釋劑、劑量、時間等具體臨床方案可由熟習此項技術者依據臨床情況所允許決定。可根據誘導所選細胞群中細胞死亡之活體內或離體方法治療的醫療病況之實例包括任何類型之惡性疾病，包括例如，癌症；自體免疫疾病；諸如全身性狼瘡、類風濕性關節炎及多發性硬化；移植物排斥，諸如腎移植排斥反應、肝移植排斥反應、肺移植排斥反應、心臟移植排斥反應及骨髓移植排斥反應；移植物抗宿主疾病；病毒感染，諸如 CMV 感染、HIV 感染、AIDS 等；及寄生蟲感染，諸如賈第鞭毛蟲病、阿米巴病、血吸蟲病及普通熟習此項技術者所確定之其他疾病。

**【0369】** 癌症療法及其劑量、施用途徑及推薦劑量係此項技術中已知的且已描述於如 Physician's Desk Reference (PDR) 之文獻中。PDR 揭示了用於治療各種癌症之藥劑的劑量。該等以上提及的在治療上有效之化學治療藥物之給藥方案及劑量將取決於所治療之特定癌症、疾病程度及熟習此項技術之醫師所熟悉之其他因素，且可由醫師決定。PDR 之內容係以引用之方式清楚地整體併入本文中。熟習此項技術者可評述 PDR，使用以下一個或多個參數來確定可根據本發明之教示內容使用的化學治療藥物及偶聯物之給藥方案及劑量。該等參數包括：

- 綜合指數

- 製造商
- 產品(公司或商標藥物名)
- 種類索引
- 通用名/化學物質索引(非商標通用藥物名)
- 藥物之彩色圖像
- 產品資訊，與 FDA 標貼相符
- 化學特性資訊
- 功能/作用
- 適應症與禁忌症
- 試驗研究、副作用、警告

#### 類似物及衍生物

**【0370】** 熟習細胞毒性劑領域之技術人員將易於瞭解，本文所描述之每一細胞毒性劑可藉由使所得化合物仍保持起始化合物之特異性及/或活性之方式進行修飾。熟練技術人員亦應瞭解，該等化合物中有許多可代替本文所描述之細胞毒性劑使用。因此，本發明之細胞毒性劑包括本文所描述之偶聯劑的類似物及衍生物。

**【0371】** 本文及以下實例中引用之所有參考文獻均以引用之方式清楚地整體併入本文中。

#### 實例

##### 實例 1 構建帶有 N 末端 Ser/Thr 之重組抗體

**【0372】** 先前已描述帶有 N 末端絲胺酸之鼠類抗葉酸受體  $\alpha$  抗體 FR1-2.1 輕鏈(LC)之序列(美國專利申請案號 61/872,407，2013 年 8 月 30 日提



交；61/875,475，2013年9月9日提交；及61/940,184，2014年2月14日提交；及主張其優先權之WO 2015/031815，全部以引用之方式併入)。此N末端Ser係利用獲得FR1-2.1輕鏈之IGKV1-99\*01鼠類生殖系序列(登錄號CAB46122；SEQ ID NO: 2)之信號肽中的常用裂解位點，由信號肽酶得到。不同於在抗體表現期間裂解時完全移除之典型抗體信號肽，IGKV1-99\*信號肽之最後一個絲氨酸(Kabat之1位)保留在FR1-2.1輕鏈之N末端。經證實，FR1-2.1抗體係用於評價本文所描述之絲氨酸氧化修飾方法的一種有用工具，且此外，FR1-2.1信號肽(表1；SEQ ID NO: 1)提供一種用於產生在輕鏈或重鏈N末端具有絲氨酸之重組抗體的可能機制。使用天然抗體信號肽併入N末端絲氨酸能夠避免抗體工程改造可能存在之負面結果，包括但不限於，可能由非天然構建體引起之表現問題及裂解位點異質性。

**【0373】** 為了展示FR1-2.1信號肽在經轉染哺乳動物細胞株中表現之重組抗體的N末端留下絲氨酸殘基，利用FR1-2.1輕鏈信號肽合成新抗體表現構建體。將先前在美國專利號8,557,966中描述之人類化Mov19輕鏈(LC)之可變區氨基酸序列(表1：SEQ ID NO: 3)與FR1-2.1信號肽組合以代替標準抗體信號肽(SEQ ID NO: 6)，產生huMov19 LC NTS1序列(SEQ ID NO: 10)。接著將該輕鏈序列提供至Blue Heron Biotechnology，在此處對其進行密碼子優化，合成且將其選殖至含有人 $\kappa$ 恆定區序列之pAbKZeo哺乳動物表現質體的EcoRI及BsiWI位點中。

**【0374】** 產生在N末端具有絲氨酸/蘇氨酸殘基之重組抗體的一種替代性方法係用絲氨酸或蘇氨酸置換N末端殘基(Kabat之+1位)。為了展示這一技術，用絲氨酸置換人類化Mov19重鏈(HC)(SEQ ID NO: 8)N末端殘基(麩

醯胺酸)以產生 huMov19 HC NTS2 序列(SEQ ID NO: 11)。接著對重鏈序列進行密碼子優化，合成且藉由 Blue Heron Biotechnology 與人 IgG1 恒定區同框選殖至 pAbG1Neo 質體之 HindIII 及 Apa1 位點。

**【0375】** 使用以上描述的 N 末端絲氨酸添加與 N 末端絲氨酸置換方案之各種組合來產生帶有至多 4 個 N 末端絲氨酸(例如，2 個在重鏈上且 2 個在輕鏈上)之另外的重組抗體。合成以上所描述之構建體之反向序列，以使得人類化 Mov19 輕鏈(LC)之 N 末端天冬氨酸經絲氨酸置換(huMov19LC NTS3，SEQ ID NO: 12)，或相反，合成 FR1-2.1 信號肽添加 N 末端絲氨酸之人類化 Mov19 重鏈(huMov19HC NTS4；SEQ ID NO: 14)。此外，將該等輕鏈及重鏈構建體混合在一起以產生在兩個 N 末端帶有絲氨酸之重組抗體，每個抗體總計帶有 4 個 N 末端絲氨酸(例如 huMov19LC NTS3 及 huMov19HC NTS4)。該等構建體局限於 2 個(輕鏈 N 末端絲氨酸)或 4 個(兩條鏈均帶有 N 末端絲氨酸)併入位點，而且利用異二聚體抗體技術，諸如「結進孔」突變(WO 2005/063816 A2，以引用之方式併入)。亦可能構建帶有 1 或 3 個 N 末端絲氨酸之抗體。

**【0376】** 最後，儘管可遵循產生帶有 N 末端絲氨酸之重組抗體的另外方法，諸如多胺基酸 N 末端附接或 N 末端截短，但所述方法提供附加益處，即，其不太可能影響至關重要之抗體屬性，諸如結合特異性或結構完整性。

**【0377】** 除絲氨酸外，可藉由用蘇氨酸簡單地置換 N 末端殘基(Kabat 之+1 位)產生在 N 末端帶有蘇氨酸殘基之重組抗體，以便藉由本文所描述之方法偶聯該等抗體。舉例而言，用蘇氨酸置換人類化 Mov19 輕鏈(LC)之 N

末端天冬胺酸(huMov19 LC NTT1，SEQ ID NO: 15)，或用蘇胺酸置換人類化Mov19 重鏈(HC)之 N 末端麩醯胺酸(huMov19 HC NTT2，SEQ ID NO: 16)。接著，如以上所描述，將該等構建體選殖至對應哺乳動物表現質體中。表 1. 所選序列

抗體	序列
FR1-2.1 輕鏈 信號肽(NCBI CAB46122)	MKLPVLLVVLLLFTSPASSS (SEQ ID NO: 1)
IGKV1-99*01 登 記 號 CAB46122	MKLPVLLVVLLLFTSPASSSDVVLQTPLSLPVNIGDQASISCKSTK SLLNSDGFTYLDWYLQKPGQSPQLLIYLVSNRFSGVPDRFSGSGSG TDFTLKRVEAEDLGVYYCFQSNYLP (SEQ ID NO: 2)
IGKV1-99*01 登 記 號 CAB46122	MKLPVLLVVLLLFTSPASSSDVVLQTPLSLPVNIGDQASISCKSTK SLLNSDGFTYLDWYLQKPGQSPQLLIYLVSNRFSGVPDRFSGSGSG TDFTLKRVEAEDLGVYYCFQSNYLP (SEQ ID NO: 2)
FR1-2.1 輕鏈(呈表現之形式)	SDVVLQTPLSLPVNIGDQASISCKSSKSSLNSDGFTYLDWYLQKP GQSPQLLIYLVSNHFGSGVPDRFSGSGSGTDFTLKRVEAEDLGVYY CFQSNYLPPLTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVC FLNNFYPKDINVWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTL TLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC (SEQ ID NO: 3)
帶有信號肽 之 FR1-2.1 全長輕鏈	MKLPVLLVVLLLFTSPASSSDVVLQTPLSLPVNIGDQASISCKSSK SLLNSDGFTYLDWYLQKPGQSPQLLIYLVSNHFGSGVPDRFSGSGSG TDFTLKRVEAEDLGVYYCFQSNYLPPLTFGGGTKLEIKRADAAPT VSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVWKIDGSERQNGVL NSWTDQDSKDSTYSMSSTLTKEYERHNSYTCEATHKTSTSPIV KSFNRNEC (SEQ ID NO: 4)
FR1-2.1 重鏈	QVQLQQSGPELVKPGASVRISCKASGYTFTNSYIHVKRPGQGL EWIGWIYPESLNTQYNEKFKAATLTADKSSSTSMLQLSSLTSEDK CRVNSAAFPAPIEKTKGRPQVYTIAPPKEQMAKDKVSLTC MITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIIMNTNGSYFVYSKLN QKSNWEAGNTFTCSVHLHEGLHNHTEKSLSHSPGK (SEQ ID NO: 5)
huMov19 LC 及 HC 信號肽	MGWSCILFLVATATGVHS (SEQ ID NO: 6)
huMov19 LC	DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQ QPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFLTISPVEAEDAATYYCQ QSREYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 7)
huMov19 HC	QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQS LEWIGRIHPYDGDFTYNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSED FAVYYCTRYDGSRAMDYWQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS

	TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPALQSSGL YSLSSVTVPSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 8)
huMov19 LC NTS1 (呈表現之形式)	SDIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQ QPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQ QSREYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 9)
帶有 FR1-2.1 輕鏈信號肽之 huMov19 LC NTS1	MKLPVLLVVLLFTSPASSSDIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQS VSFAGTSLMHWYHQKPGQQPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKT DFTLTISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC (SEQ ID NO: 10)
huMov19 HC NTS2	SVQLVQSGAEVVKGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSL EWIGRIHPYDGDTFYQNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDF AVYYCTRYDGSRAMDYWQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLY YSLSSVTVPSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC CPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 11)
huMov19 LC NTS3	SIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQ PRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQQ SREYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 12)
huMov19 HC NTS4 (呈表現之形式)	SQVQLVQSGAEVVKGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQS LEWIGRIHPYDGDTFYQNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSED FAVYYCTRYDGSRAMDYWQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPALQSSGL YSLSSVTVPSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 13)

帶有 FR1-2.1 輕鏈信號肽 之 huMov19 HC NTS4	MKLPVLLVLLLFTSPASSSQVQLVQSGAEVVKGASVKISCKASG YTFTGYFMNWVKQSPGQSLEWIGRIHPYDGDFTYNQKFQGKATLT VDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDYWQGTTVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQOPEN NYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 14)
huMov19 LC NTT1	TIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQ QPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFLTISPVEAEDAATYYCQ QSREYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 15)
huMov19 HC NTT2	TVQLVQSGAEVVKGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGSQL EWIGRIHPYDGDFTYNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSED AVYYCTRYDGSRAMDYWQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQOPENNYKTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 16)

#### 實例 1A. 構建帶有 N 末端 Ser/Thr 之重組抗體

【0378】 使用與以上實例 1 中所描述基本上相同之方法，使用 SEQ ID NO: 6 作為其天然 huMov19 LC 及 HC 之信號肽，或作為異源 LC 或 HC 之信號肽，其修飾在於緊接著 SEQ ID NO: 6 之後插入 Ser 或 Thr 殘基，以使得在加工信號肽之裂解產物之後，插入的 Ser/Thr 成為成熟 LC 或 HC 加工序列之第一個(N 末端)殘基。

## 實例 2 重組抗體表現

【0379】 在搖瓶中，在懸浮適應之 HEK-293T 細胞中，使用修改的 PEI 程序(Durocher Y, Perret S, & Kamen A High-level and high-throughput recombinant

protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res.* 2002 年 1 月 15 日;30(2):E9)短暫地產生嵌合抗體構建體及人類化抗體構建體。如先前所描述(Durocher, 見上文)進行 PEI 短暫轉染，不過使 HEK-293T 細胞在 Freestyle 293 (Invitrogen)中生長，且培養物體積在添加 PEI-DNA 複合物後保持未稀釋。將貼壁及懸浮之短暫轉染物孵育一周，接著依序藉由如下文所描述之蛋白質 A 管柱及 CM 管柱離子交換層析法純化澄清之上清液。

### 實例 3 重組抗體純化

**【0380】** 使用標準方法，諸如蛋白質 A 或蛋白質 G 層析法(HiTrap 蛋白質 A 或蛋白質 G HP, 1 mL, Amersham Biosciences)從澄清之細胞培養物上清液中純化得到抗體。簡言之，藉由添加 1/10 體積之 1 M Tris/HCl 緩衝液(pH 8.0)來製備用於層析法之上清液。使 pH 經調整之上清液濾過 0.22  $\mu$ m 濾膜且將其裝載至用結合緩衝液(PBS, pH 7.3)平衡之管柱上。用結合緩衝液洗滌管柱，直至獲得在 280 nm 下無吸光度之穩定基線。用含 0.15 M NaCl 之 0.1M 乙酸緩衝液(pH 2.8)，使用流速 0.5 mL/min 對抗體進行溶離。收集約 0.25 mL 溶離份且藉由添加 1/10 體積之 1 M Tris/HCl 緩衝液(pH 8.0)進行中和。針對 1× PBS 將峰溶離份透析隔夜兩次，且藉由濾過 0.2  $\mu$ m 濾膜進行滅菌。藉由在 A280 下之吸光度對純化抗體進行定量。

**【0381】** 使用離子交換層析法(IEX)及羧甲基(CM)層析法進一步純化經蛋白質 A 純化之溶離份。簡言之，將由蛋白質 A 純化得到的樣品緩衝液交換成起始緩衝液(10 mM 磷酸鉀、10 mM 氯化鈉，pH 7.5)並使其濾過 0.22  $\mu$ m 篩檢程序。接著將所製備之樣品以 120 cm/hr 流速裝載至經起始緩衝器

平衡之 CM fast flow 樹脂(GE Lifesciences)上。所選管柱大小應具有足夠容量以結合樣品中之所有抗體。接著用結合緩衝液洗滌管柱，直至獲得在 280 nm 下無吸光度之穩定基線。藉由以 20 個管柱體積(CV)起始 10 mM 至 500 mM 氯化鈉梯度來溶離抗體。收集 UV 讀數高於 50 mAU 主峰之溶離份。使用 Agilent HPLC 1100 系統(Agilent, Santa Clara, CA)，在 TSK 凝膠 G3000SWXL 7.8 × 300 mm 及 SWXL guard 管柱 6.0 × 40 mm (Tosoh Bioscience, Montgomeryville, PA) 上以尺寸排阻層析法評估純度(單體及可溶性高分子聚集體之百分含量)。彙集具有所需純度(>95%)之溶離份，使用 TFF 系統緩衝液交換成 PBS (pH 7.4)且藉由濾過 0.2 μm 濾膜進行滅菌。藉由 SEC 進一步測試純化抗體之純度且使用消光係數 1.47，藉由在 280 nm 下之吸光度量測值來測定 IgG 濃度。必要時，進行稀釋。或者，可使用羥基磷灰石陶瓷(HTC)對具有改善之選擇性的鼠類及人類化抗體進行精製。應用細微性為 40 μm 之 II 型 HTC 樹脂(Bio-Rad Laboratories)，以與 IEX 層析法類似之方案精製抗體。HTC 之起始緩衝液為 20 mM 磷酸鈉(pH 7.0)，且用 20-160 mM 磷酸鈉梯度經 20 CV 溶離抗體。

#### 實例 4 N 末端抗體偶聯—兩步法

**【0382】** 用 5 mM 過碘酸鈉水溶液處理(50 當量，25°C，30 分鐘)工程改造成在重鏈上帶有 N 末端絲氨酸之 huMOV19-NTS#2 抗體([1]，如圖 1 中所示之方案 1; 3mg/mL 於 pH7.4 之 PBS 中)。接著，經由 NAP 脫鹽管柱(Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare)將混合物緩衝液交換成乙酸鈉緩衝液，pH5.0。

**【0383】** 在反應容器中，用含有 10% v/v DMA (N,N-二甲基乙醯胺)共

溶劑之 4-胺基苯乙醇(100 mM 於 DMA [N,N-二甲基乙醯胺]中)處理所得溶液，達到 10 mM 濃度。隨後引入連接子 1 ([3]，方案 1；4 或 5 當量)，且密封反應容器，並在 37°C 下孵育 24 小時。

**【0384】** 接著，經由 NAP 脫鹽管柱(Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare)將混合物緩衝液交換成 HEPES (4-(2-羥乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸)緩衝液，pH8.5。接著用 DMA (N,N-二甲基乙醯胺)共溶劑(10% v/v)調整溶液，且在 25°C 下用化合物 A(或磺酸化 DGN462 (sDGN462)或磺酸化 D1 (或 sD1))([5]，方案 1；游離硫醇；5 當量)處理 6 小時。

**【0385】** 使用 NAP 過濾柱(Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare)將所得偶聯物緩衝液交換成 250 mM 甘氨酸、10 mM 組氨酸、1% 蔗糖、0.01% Tween-20、50 μM 亞硫酸氫鈉配製緩衝液(pH 6.2)。在 25°C 下，利用 Slide-a-Lyzer 透析盒(ThermoScientific 10,000 MWCO)以相同緩衝液透析 4 小時。

**【0386】** 發現純化之偶聯物([6]，方案 1)每個抗體均勻地平均連接有兩個化合物 A 分子(經由 Q-ToF 質譜法，圖 2)，具有>98%單體(經由尺寸排阻層析法)、<2%游離藥物(經由丙酮沈澱之反相 HPLC 分析)及 0.14 mg/mL 之最終蛋白質濃度(經由 UV-Vis，對於 huMOV19-NTS#2 抗體，使用莫耳消光係數  $\epsilon_{280}=201400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )。

#### 實例 5 N 末端抗體偶聯—DMx 直接連接

**【0387】** 在 25°C 下，用 5 mM 過碘酸鈉水溶液(50 莫耳當量)處理工程改造的含 N 末端 Ser 之 huMOV19-NTS#2 抗體 ([1]，方案 2，圖 3；3mg/mL 於 PBS 中，pH7.4)達 30 分鐘。接著，經由 NAP 脫鹽管柱(Illustra Sephadex G-25

DNA Grade, GE Healthcare)將混合物緩衝液交換成乙酸鈉緩衝液，pH5.0。

**【0388】** 在反應容器中，用含有 10% v/v DMA (N,N-二甲基乙醯胺)共溶劑之 4-胺基苯乙醇(100 mM 於 DMA [N,N-二甲基乙醯胺]中)處理所得溶液，達到 10 mM 濃度。隨後引入胺氨基-乙醯基 MayNMA ([3]，方案 2；4 或 5 莫耳當量)，且密封反應容器，並在 37°C 下孵育 24 小時。

**【0389】** 接著，經由 NAP 脫鹽管柱(Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare)將混合物緩衝液交換成 250 mM 甘胺酸、10 mM 組胺酸、1% 蔗糖緩衝液，pH6.2。在 25°C 下，利用 Slide-a-Lyzer 透析盒(ThermoScientific 10,000 MWCO)以相同緩衝液透析 4 小時。

**【0390】** 發現純化之偶聯物([4]，方案 2)每個抗體均勻地平均連接有兩個 MayNMA 分子(經由 Q-ToF 質譜法，圖 4)，具有>98%單體(經由尺寸排阻層析法)、<2%游離藥物(經由 HISEP 反相 HPLC 分析)及 0.31 mg/mL 之最終蛋白質濃度(經由 UV-Vis，對於 huMov19-NTS#2 抗體，使用莫耳消光係數  $\epsilon_{280}=201400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )。

#### 實例 6 N 末端抗體偶聯—針對 MOV19-NTS#1 之兩步方案

**【0391】** 在 25°C 下，用 5 mM 過碘酸鈉水溶液(50 莫耳當量)處理經由前導肽序列工程改造成在輕鏈上含 N 末端絲胺酸之 huMov19-NTS#1 抗體 ([1]，方案 3，圖 5；3mg/mL 於 PBS 中，pH7.4)達 30 分鐘。接著，經由 NAP 脫鹽管柱(Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare)將混合物緩衝液交換成乙酸鈉緩衝液，pH5.0。

**【0392】** 在反應容器中，用含有 10% v/v DMA (N,N-二甲基乙醯胺)共溶劑之 4-胺基苯乙醇(100 mM 於 DMA [N,N-二甲基乙醯胺]中)處理所得溶

液，達到 10 mM 濃度。隨後引入連接子 1 ([3]，方案 3；4 或 5 莫耳當量)，且密封反應容器，並在 37°C 下孵育 24 小時。

**【0393】** 接著，經由 NAP 脫鹽管柱(Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare)將混合物緩衝液交換成 HEPES (4-(2-羥乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸)緩衝液，pH8.5。接著用 DMA (N,N-二甲基乙醯胺)共溶劑(10% v/v)調整溶液，且在 25°C 下用化合物 A([5]，方案 3；游離硫醇；5 莫耳當量)處理 6 小時。

**【0394】** 使用 NAP 過濾柱(Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare)將所得偶聯物緩衝液交換成 250 mM 甘氨酸、10 mM 組氨酸、1% 蔗糖、0.01% Tween-20、50 μM 亞硫酸氫鈉配製緩衝液(pH 6.2)。在 25°C 下，利用 Slide-a-Lyzer 透析盒(ThermoScientific 10,000 MWCO)以相同緩衝液透析 4 小時。

**【0395】** 發現純化之偶聯物([6]，方案 3)每個抗體平均連接有 1.4 個化合物 A 分子(經由 Q-ToF 質譜法，圖 6)，具有>98%單體(經由尺寸排阻層析法)、<2%游離藥物(經由丙酮沈澱之反相 HPLC 分析)及 0.14 mg/mL 之最終蛋白質濃度(經由 UV-Vis，對於 huMov19-NTS#1 抗體，使用莫耳消光係數  $\epsilon_{280}=201400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )。

#### 實例 7 T47D 細胞上 N 末端 Ser 偶聯物之結合與對照物相當

**【0396】** 使用 T47D 細胞分析 N 末端 Ser-藥物偶聯物(SERIMab ADC)之結合親和力，先前已顯示，該等細胞每個細胞結合約  $1\times10^5$  個葉酸受體  $\alpha$  (FR- $\alpha$ )抗原。人類化單株抗體 huMOV19 特異性結合 FR  $\alpha$ 。

**【0397】** 為了評價結合親和力，在 96 孔盤(Falcon，圓底)中，一式兩份以 FACS 緩衝液(1% BSA, 1× PBS)稀釋起始濃度為約  $3\times10^{-8} \text{ M}$  的每孔約 100

$\mu\text{l}$  之 ADC 或對照抗體(例如未偶聯之天然 huMOV19，或 M9346A)，隨後在 4 °C 下以 FACS 緩衝液進行連續 3 倍稀釋。使人乳癌細胞株 T47D 細胞在補充有熱滅活 10% FBS (Life Technologies)、0.1 mg/mL 慶大黴素(gentamycin)(Life Technologies)及 0.2 IU 牛胰島素/mL (Sigma) 之 RPMI-1640 (Life Technologies) 中生長，且在 PBS 中洗滌一次，隨後用 Versene (Life Technologies) 移除。接著將 T47D 細胞再懸浮於生長培養基(參見上文)中以中和胰蛋白酶，並在 Coulter 計數器上計數。接著在冷 FACS 緩衝液中洗滌細胞兩次，在每次洗滌之間以 1200 rpm 離心 5 分鐘。

**【0398】** 將約 100  $\mu\text{l}/\text{mL}$  之  $2 \times 10^4$  個細胞/孔添加至含 ADC、抗體或僅含 FACS 緩衝液之孔中，且在 4°C 下孵育 2 小時。孵育之後，如先前所述對細胞進行離心，且在每孔 200  $\mu\text{L}$  之冷 FACS 緩衝液中洗滌一次。接著，在 4 °C 下用每孔 200  $\mu\text{L}$  偶聯 FITC 之山羊抗人 IgG-Fc  $\gamma$  二次抗體(所包括之對照物為未染色細胞及僅用二次抗體染色之該等細胞)對細胞染色，保持 40 分鐘，離心且在每孔 200  $\mu\text{L}$  之冷 PBS-D 中洗滌一次。將細胞固定於每孔 200  $\mu\text{L}$  之 1% 甲醛/PBS-D 中且在 4°C 下儲存。

**【0399】** 儲存之後，使用流動式細胞測量術，在 FACS Calibur (BD Biosciences) 上偵測偶聯物或抗體之細胞表面染色。使用 GraphPad Prism 將幾何平均值對 ADC 或抗體之對數濃度作圖，且經由非線性 4 參數邏輯斯蒂回歸分析(non-linear 4-parameter logistic regression analysis)計算 EC<sub>50</sub>。參見圖 8。

**【0400】** 亦使用以下各物進行類似實驗：(1) huMOV19-NTS#2-連接子 1-化合物 A (又稱為「SeriMab-sDGN462」)，每個 Ab 具有平均兩個化合物 A 分子；(2) 經由礦基-SPDB 連接子連接至 huMOV-19 上離胺酸殘基之  $\epsilon$ -胺

基的 huMOV19-sSPDB-化合物 A，每個 huMOV19 具有平均 2.4 個化合物 A 分子；(3)未偶聯之天然 huMOV19 抗體(M9346A)；及(4)具有工程改造之 N 末端 Ser 的未偶聯工程改造之 huMOV19-NTS#2 抗體。參見圖 7A。

**【0401】** 如圖 7A 及 7B 中所示，SERIMAb ADC 以與未偶聯抗體 (M9346A) 對照物類似之方式結合至表現靶抗原之 T47D 細胞的表面。參見例如，圖 7B 中之 EC<sub>50</sub> 值。在圖 8A 及 8B 中所示之類似實驗中獲得基本上相同之結果。該等實驗展示，抗原結合不受在 N 末端絲胺酸殘基處之偶聯過程影響。

**【0402】** 對於 huMOV19-NTS#2-D8 偶聯物亦觀察到類似結果。該偶聯物以與未偶聯對照物(M9346A 抗體)或未偶聯工程改造之 huMOV19-NTS#2 抗體(或 SeriMab)類似之方式結合至表現靶抗原之 T47D 細胞的表面。參見圖 23。

**實例 8 huMOV19NTS#2-連接子 1-化合物 A 對 KB 子宮頸細胞株之細胞毒性的評價**

**【0403】** 本實驗展示，與工程改造之 N 末端 Ser 之位點特異性抗體偶聯不僅提供可預測且可靠的每個抗體之藥物負載，而且亦意外地賦予所得 ADC 偶聯物比抗體連接至 Lys 側鏈之偶聯物高的效力。

**【0404】** 在環境溫度下，在 96 孔盤(Corning，平底)中，一式三份用補充有熱滅活 10% FBS (Life Technologies) 及 0.1 mg/ml 慶大黴素(Life Technologies)之 RPMI-1640 (Life Technologies)稀釋起始濃度為  $3.5 \times 10^{-9}$  M 至  $3.5 \times 10^{-8}$  M 的每孔 100  $\mu$ l/各 ADC，並在上述培養基中進行 3 倍連續稀釋。在 PBS 中洗滌在補充有熱滅活 10% FBS (Life Technologies) 及 0.1 mg/ml 慶大

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

**【0405】** 圖 9A 中之資料顯示，化合物 A 可連接至工程改造之 N 末端 Ser，且得到每一抗體分子精確地具有兩個化合物 A 分子的 ADC。相比之下，經由 Lys 側鏈連接至相同 huMOV19 抗體之化合物 A 得到每一抗體具有平均 2.4 個化合物 A 分子之 ADC，表明連接不同數量化合物 A 的相對不均勻之 ADC 群。

**【0406】** 圖 7A 及 7B 先前已顯示，不管所用鍵聯(經由工程改造之 N 末端 Ser，或經由天然 Lys 側鏈)如何，所得 ADC 對抗原具有與未偶聯抗體基本上相同之結合親和力。

【0407】 然而，儘管在 Lys 偶聯之 ADC 中具有較高藥物負載(亦即，2.4 對比 2.0 個化合物 A)，但帶有 N 末端 Ser 鍵聯之 ADC 之效力基於抗體濃度比離胺酸偶聯之 ADC 高約 3 倍，且基於化合物 A 之濃度比離胺酸偶聯之 ADC 高約 5 倍。參見圖 9A 之  $IC_{50}$  量測值。

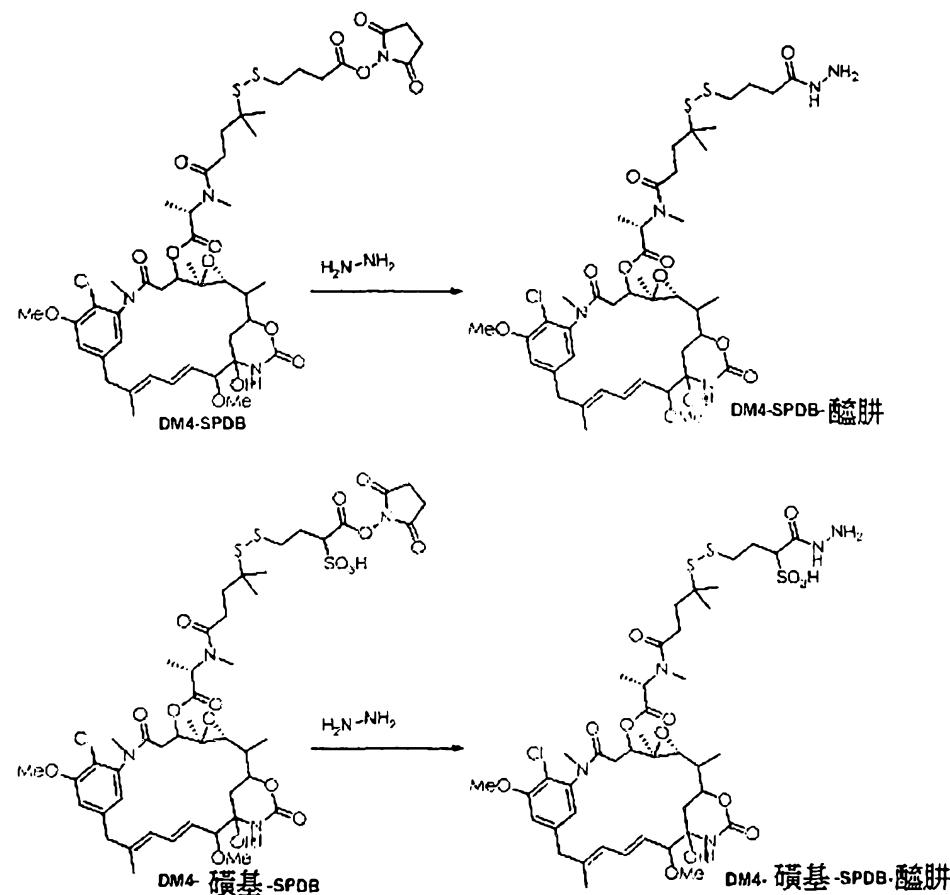
【0408】 另外，添加過量( $1 \mu\text{M}$ )未偶聯之 huMOV19 可阻斷所觀察之殺滅作用，不僅表明所觀察之細胞毒性為特異性的且取決於 huMOV19 與靶細胞上其抗原之結合，而且亦表明兩種 ADC 對靶細胞具有相同的不依賴於抗原之活性。

【0409】 對於與 huMOV19 偶聯之不同細胞毒素及其帶有 N 末端 Ser 偶聯之工程改造形式亦獲得類似結果。參見圖 9B 中之類美登素偶聯物。帶有 N 末端 Ser 鍵聯之 ADC 具有與 Lys 偶聯之 ADC 類似的效力，不過事實是 Lys 偶聯之 ADC 具有較高藥物負載(3.5 對比 2)。

【0410】 對於 huMOV19 亦觀察到與不相關抗體類似的結果，如以上所描述。

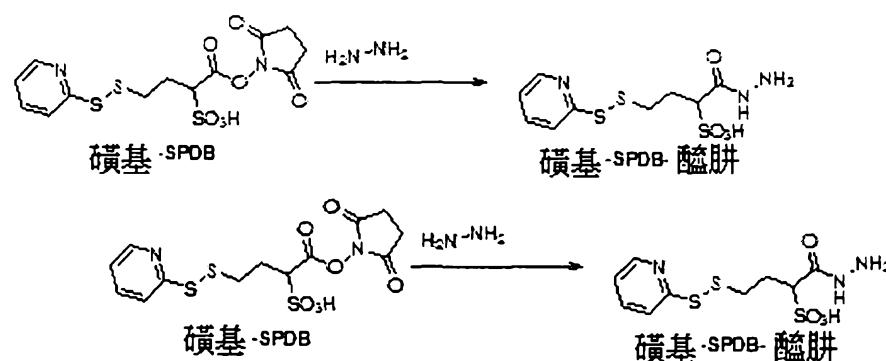
### 實例 9.





【0411】 DM4-SPDB- 鹽胼 及 DM4- 磺基-SPDB- 鹽胼 將藉由使 DM4-SPDB 或 DM4- 磺基-SPDB 與胼反應來製備，如以上所示。

#### 實例 10.



【0412】 可使先前所述之磺基-SPDB (美國專利號 8,236,319)與胼反應以得到磺基-SPDB-胼連接子。

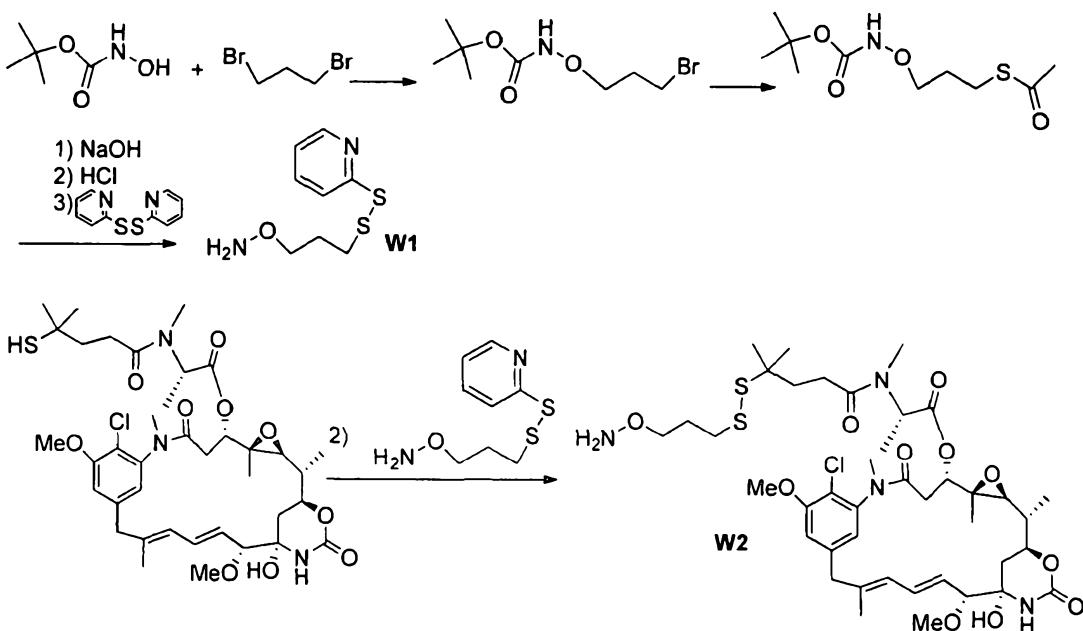
【0413】 室溫下，在快速攪拌下，向胼(0.015 ml, 0.242 mmol)於 DMA

中之 0.24M 溶液中逐滴添加 1-((2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)氧基)-1-側氧基-4-(吡啶-2-基二硫基)丁烷-2-磺酸(25.9 mg, 0.0635 mmol)於 DMA 中之 0.06M 溶液。在 50°C 下，在氮氣下攪拌 40 分鐘之後，藉由反相 HPLC (C18, 21.2 x 250 mm)，以含有 0.1% 甲酸之去離子水，使用 5-25% 之乙腈梯度經 30 分鐘溶離來純化粗反應混合物。合併含有所需產物之溶離份，冷凍且凍乾，得到 3.1 mg (15% 產率) 呈白色固體狀之所需產物。MS ( $M+1$ )<sup>+</sup> 實驗值：324.05，計算值：324.01。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d6)  $\delta$  2.13 – 2.26 (m, 2H), 2.82 – 2.91 (m, 2H), 3.52 (t,  $J$  = 7.8, 6.1 Hz, 1H), 7.24 (t,  $J$  = 7.3, 4.7 Hz, 1H), 7.76 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H), 7.83 (t, 1H), 8.45 (d,  $J$  = 3.5, 2.0 Hz, 1H)。

**【0414】** 可使所得化合物與帶有醛或酮之細胞結合劑反應，接著可視情況還原醯肼鍵聯。可使所得連接子與帶有醛或酮之細胞結合劑反應，接著與帶有硫醇之類美登素(諸如 DM1 或 DM4)反應，得到偶聯物。

**【0415】** 或者，一旦連接子與細胞結合劑反應，即可使用諸如二硫蘇糖醇或 TCEP 之試劑還原所得分子之反應性二硫化物，得到硫醇，可使硫醇與帶有類美登素之反應性二硫化物，諸如 PyS-DM1 或 PyS-DM4 反應。

### 實例 11.

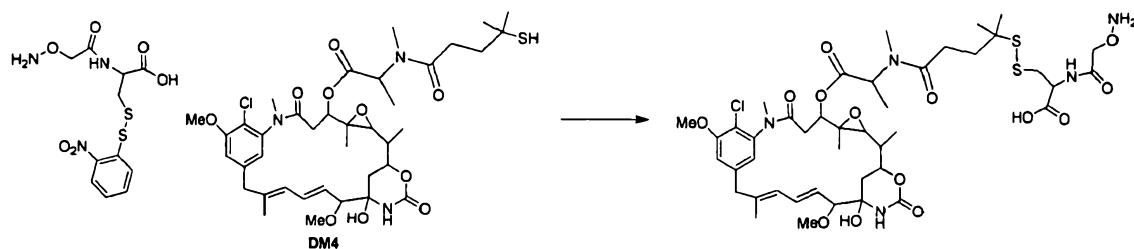


【0416】 Boc-羥基胺將與 1,3-二溴丙烷反應，接著與硫代乙酸反應。

藉由依序用 NaOH 及 HCl 處理來使硫醇及胺脫保護，接著使硫醇部分與 2,2' -二吡啶基二硫化物反應，得到 W1。使 DM4 與 W1 反應，得到 W2。1,3-二溴丙烷可經其他對稱性二溴化物置換，得到在 DM 與二硫化物部分之間的具有其他長度之間隔子。

【0417】 連接子 W1 亦可用於使帶有酮或醛之細胞結合劑衍生化，以引入反應性二硫化物。肟亦可視情況經還原。任一方法均允許添加帶有硫醇之類美登素，諸如 DM1 或 DM4 以完成偶聯。

### 實例 12.



【0418】 將烷氧胺基乙醯基-Cys(S-2-NO<sub>2</sub>-苯基)-OH (1 mg, 2.88 μ mol, 如先前 *Org. Biomol. Biochem.* 2006, 4:1313 – 1419 中所描述製備) 及









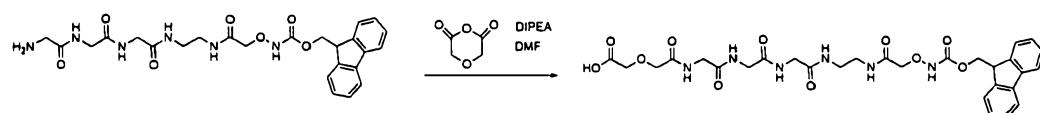




## 【0427】 在 25 mL 圓底燒瓶中裝入

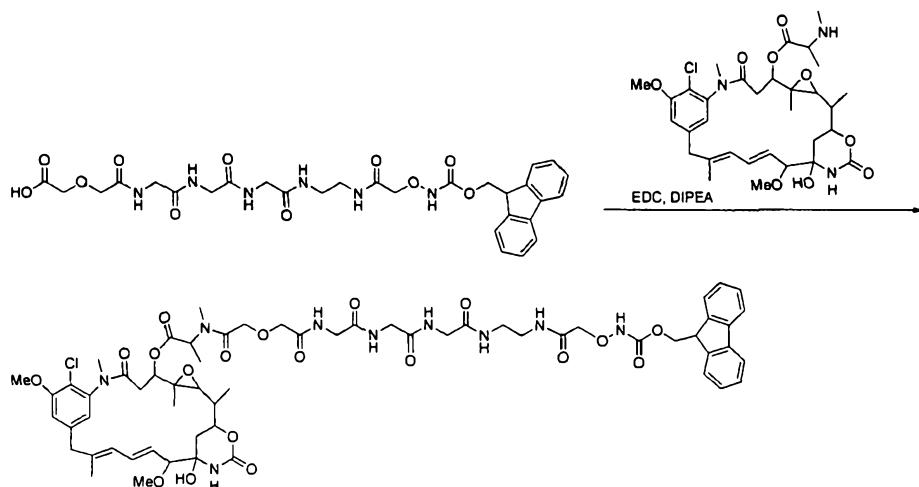
Boc-Gly<sub>3</sub>-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHCOCH<sub>2</sub>-O-NH-FMoc (76 mg, 0.122 mmol) 且將其溶解於 95/5 三氟乙酸水溶液(10 mL)中。在室溫下磁力攪拌反應 1 小時。在真空中減少反應物體積且將粗殘餘物再溶解於 1:1 的二氯甲烷與甲苯之混合物(10 mL)中，接著真空濃縮。重複共蒸發三次且所得產物(37b)不經進一步純化即使用。MS (m + H<sup>+</sup>) 實驗值：527.4，計算值 527.2; (m-1)。

## 合成化合物 38b



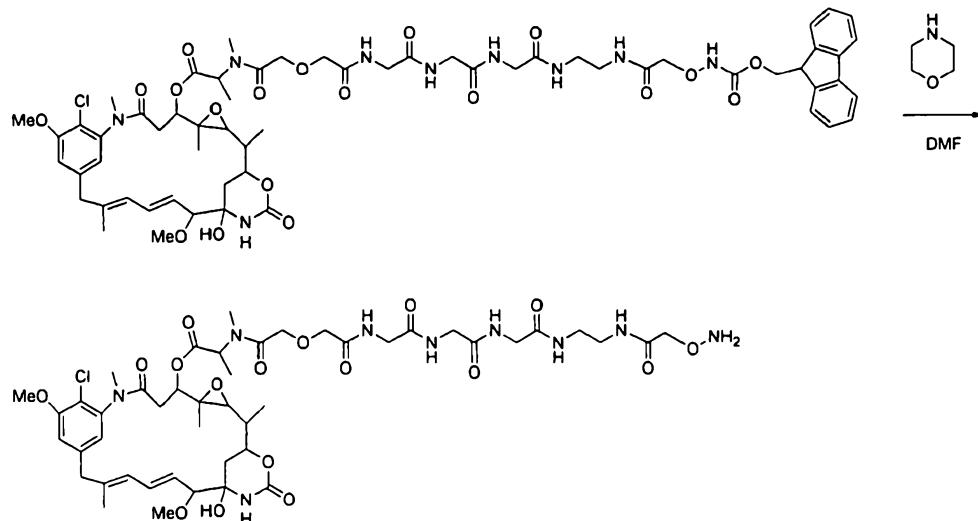
【0428】 在 10 mL 圓底燒瓶中裝入第三丁基保護之 H-Gly<sub>3</sub>-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHCOCH<sub>2</sub>ONH-Fmoc (64 mg, 0.122 mmol) 及 DMF (3 mL)。攪拌該溶液，同時依序添加二甘醇酐(15.52 mg, 0.134 mmol)及 *N,N*-二異丙基乙胺(0.042 mL, 0.243 mmol)。該燒瓶裝備有隔膜且在室溫下磁力攪拌 1 小時。所需產物藉由半製備型 C18 HPLC，用含 0.1% 甲酸之去離子水及 5 - 95% 乙腈之線性梯度經 25 分鐘溶離來進行分離。合併含產物之溶離份且真空濃縮，得到 40 mg (0.062 mmol, 51.2% 產率) 呈白色殘餘物形式之所需產物 (38b)。MS (m + H<sup>+</sup>) 實驗值：643.4，計算值 643.2；(m-1) 實驗值：641.2，計算值：641.2。

## 合成化合物 38c



**【0429】** 在 10 mL 圓底燒瓶中裝入 May-NMA (5.06 mg, 7.78 μmol) 於乙酸乙酯(1.500 mL) 中之溶液。接著添加 *N*-(3-二甲基胺基丙基)-*N'*-乙基碳化二亞胺鹽酸鹽(EDC, 3.73 mg, 0.019 mmol) 及 *N,N*-二異丙基乙胺(3.39 μl, 0.019 mmol)，隨後添加 HOOCCH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CO-Gly<sub>3</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHCOCH<sub>2</sub>ONH-FMoc (10 mg, 0.016 mmol) 於 *N,N*-二甲基甲醯胺(1.5 mL) 中之溶液。在室溫下攪拌反應 1 小時。將反應物體積在真空中減少一半且產物藉由半製備型 C18 HPLC，用含 0.1% 甲酸之去離子水及 5 - 95% 乙腈之線性梯度經 25 分鐘溶離來進行分離。合併含產物之溶離份，冷凍並凍乾，得到 1.4 mg (13% 產率) 呈白色固體狀之所需產物(38c)。MS (m + Na<sup>+</sup>) 實驗值：1296.7，計算值：1296.5。

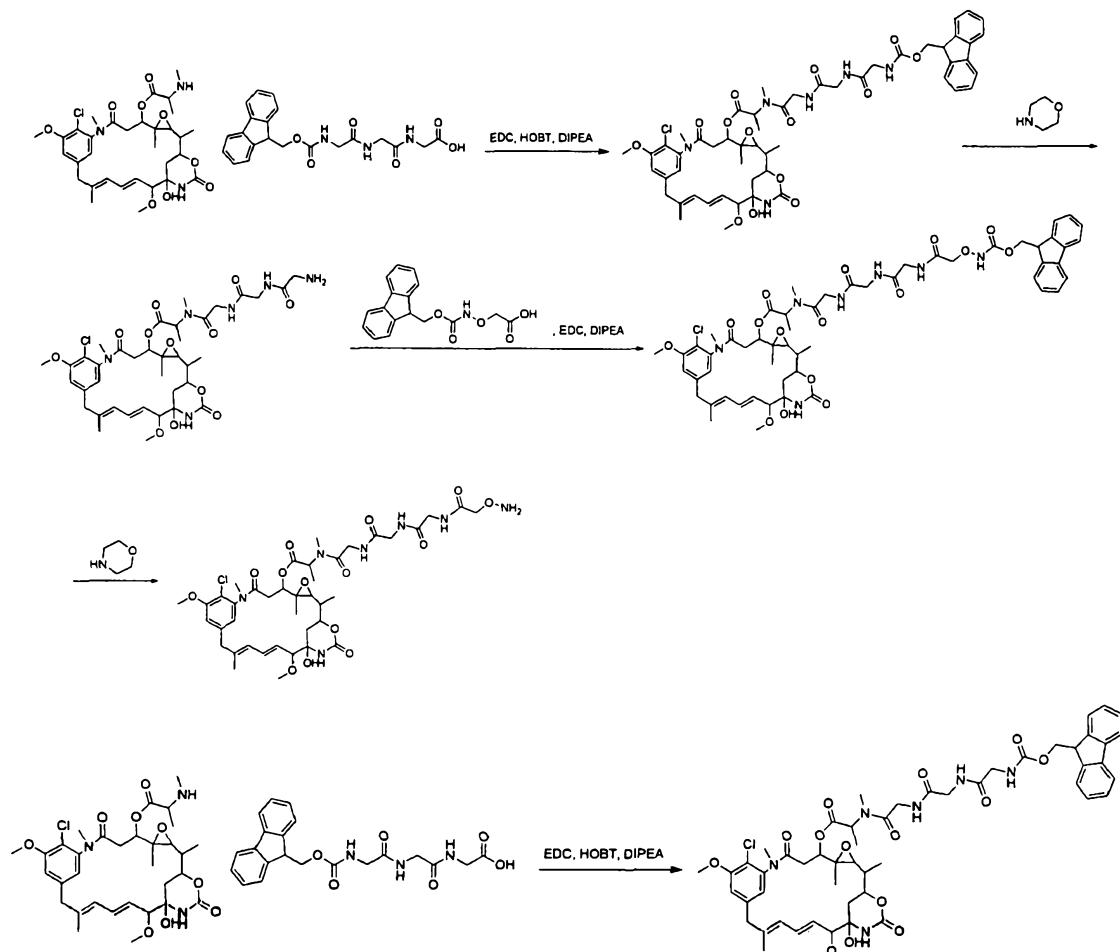
### 合成化合物 39b



【0430】 將 May-NMA-COCH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CO-Gly<sub>3</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>ONH-Fmoc

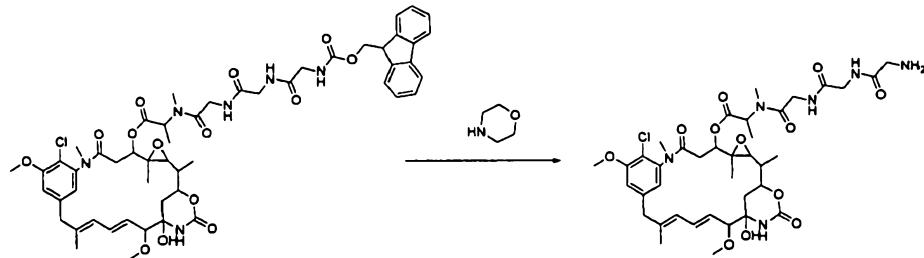
(1.4 mg, 1.098 μmol)溶解於 *N,N*-二甲基甲醯胺(1.5 mL)中且將其轉移至裝備有攪拌棒之 3 mL 玻璃小瓶中。攪拌溶液，同時提交 20% v/v 嘴啉(300 μL, 3.44 mmol)。反應在室溫下在攪拌下進行，直至確定完成。粗反應混合物藉由半製備型 C18 HPLC，經 3 次注射來純化。合併含產物之溶離份，將其轉移至閃爍小瓶中，在乾冰及丙酮浴中冷凍並凍乾，得到 1.1 mg (95% 產率) 所需產物(39b)。MS ( $m + Na^+$ ) 實驗值：1074.7，計算值：1074.4；高解析度 MS ( $m+H$ )<sup>+</sup> 實驗值：1052.4331，計算值：1052.4338；( $m + Cl^-$ ) 實驗值：1086.5，計算值：1086.4。

### 實例 18.

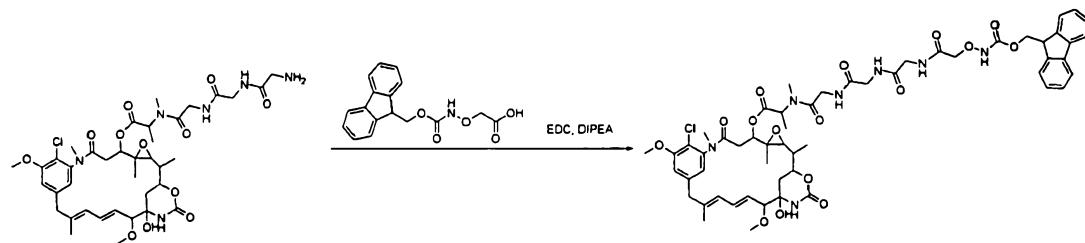


### Fmoc-Gly<sub>3</sub>-MayNMA

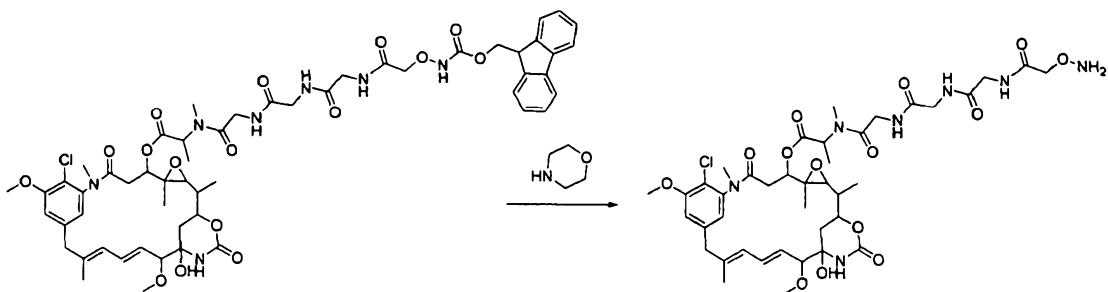
**【0431】** 在 100 mL 燒瓶中裝入 MayNMA (200 mg, 0.308 mmol) 於乙酸乙酯(19 mL)中之溶液。真空濃縮反應燒瓶以移除 EtOAC。將該物質再溶解於 DMSO (10 mL)中，用 FMoc-Gly<sub>3</sub>-OH (165 mg, 0.400 mmol)、HOBT (12.25 mg, 0.080 mmol)、EDC (77 mg, 0.400 mmol) 及 DIPEA (53.7 μL, 0.308 mmol) 處理。在室溫下，在氫氣下進行反應。1 小時之後，反應物使用 Combiflash Rf 200i，使用 C18 高效金 30g 管柱以 35 mL/min 進行純化。用含 0.1% 甲酸之去離子水及 5 - 95% 乙腈梯度經 20 分鐘溶離。合併含所需產物之溶離份，冷凍並凍乾，得到所需產物 296 mg (93% 產率)。MS (M)<sup>+</sup> 實驗值 1043.4；計算值：1043.4

**H-Gly<sub>3</sub>-MayNMA**

【0432】 將 FMoc-Gly<sub>3</sub>-MayNMA (37.7 mg, 0.036 mmol) 溶解於 20% 酮之 DMSO 溶液 (5 mL) 中且磁力攪拌 1 小時。反應物使用 Combiflash Rf 200i，使用 C18 高效金 30 g 管柱以 35 mL/min 進行純化。用含 0.1% 甲酸之去離子水及 2-95% 乙腈梯度經 25 分鐘溶離。合併含所需產物之溶離份，冷凍並凍乾，得到所需產物 20 mg (75% 產率)。LRMS (M)<sup>+</sup> 實驗值 821.40，計算值：821.34

**Fmoc-胺氨基-Gly<sub>3</sub>-MayNMA**

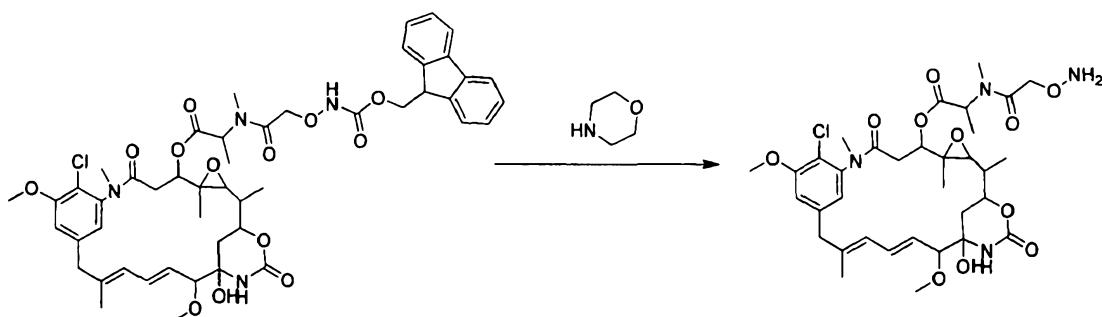
【0433】 將 H-Gly<sub>3</sub>-MayNMA (15 mg, 0.018 mmol) 溶解於 DMSO (2 mL) 中，向其中添加 FMoc-胺氨基乙酸 (11.44 mg, 0.037 mmol)、DIPEA (3.19 μL, 0.018 mmol) 及 EDC (7.0 mg, 0.037 mmol)。1 小時之後，粗物質藉由半製備型 C18 HPLC，使用 XB-C18 21.2x150 mm, 5 μm 管柱以 21.2 mL/min 流速進行純化。用含 0.1% 甲酸及 5% 乙腈之去離子水溶離 3 分鐘，接著在 5 - 25 分鐘內以 5% - 95% 乙腈之線性梯度溶離。合併含所需產物之溶離份，冷凍並凍乾，得到 2 mg (8% 產率) 所需產物。MS (M+Na)<sup>+</sup> 實驗值 1138.6，計算值：1138.4



### 胺氨基-Gly<sub>3</sub>-MayNMA

【0434】 在室溫下，在磁力攪拌下用 20% 嘴啉之 DMSO 溶液(1 mL)處理 FMoc-胺氨基-Gly<sub>3</sub>-MayNMA (2 mg, 18 μmol) 2 小時。反應物藉由半製備型 C18 HPLC，使用 XB-C18 21.2x150 mm, 5 μm 管柱以 21.2 mL/min 流速進行純化。用含 0.1% 甲酸及 5% 乙腈之去離子水溶離 5 分鐘，接著在 5 分鐘 - 25 分鐘內用 5% - 95% 乙腈之線性梯度溶離。立即收集含所需產物之溶離份，冷凍並凍乾，得到胺氨基-Gly<sub>3</sub>-MayNMA (0.2 mg, 0.224 μmol)。LRMS (M+Na)<sup>+</sup> 實驗值 916.60，計算值：916.36；HRMS (M+Na)<sup>+</sup> 實驗值：916.3466；計算值：916.3466。

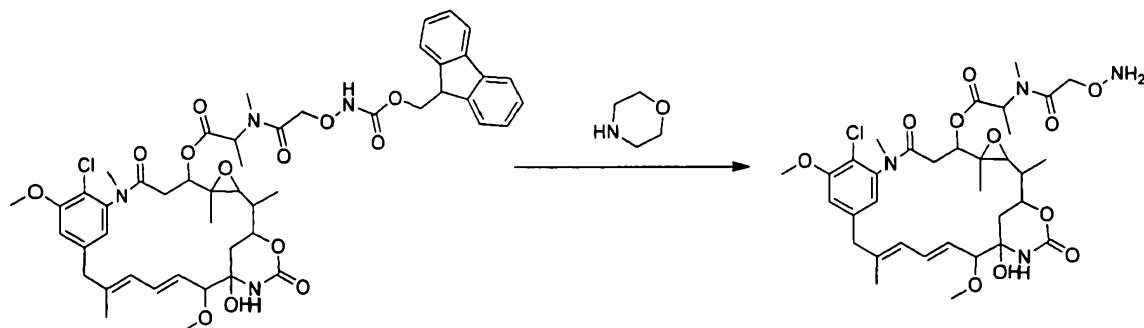
### 實例 19.



### FMoc 保護之胺氨基 MayNMA

【0435】 在 100 mL 燒瓶中裝入溶於乙酸乙酯(35 mL)中之 MayNMA (150 mg, 0.231 mmol)。真空濃縮反應燒瓶以移除 EtOAC。在磁力攪拌下，將該物質再溶解於 DMF (5 mL) 中，用 FMoc-胺氨基乙酸(72.3 mg, 0.231

mmol)，隨後 EDC (44.2 mg, 0.231 mmol) 處理。使反應在氰氣下在室溫下進行 4 小時，接著藉由半製備型 C18 HPLC，使用 XB-C18 21.2x150 mm, 5 μm 管柱以 21.2 mL/min 流速純化。前 5 分鐘用含 0.1% 甲酸之去離子水及 5% 乙腈梯度溶離，接著自 5 分鐘至 25 分鐘用 5% - 95% 乙腈梯度溶離。合併含所需產物之溶離份，冷凍並凍乾，得到 24.2 mg (11% 產率) 所需產物。LRMS (M)<sup>+</sup> 實驗值 945.35，計算值：945.36



胺氨基-MayNMA

【0436】用 20% 嘴啉之 DMF 溶液(2 mL)處理 FMoc 保護之胺氨基 MayNMA (24.2mg, 0.026mmol)。1 小時之後，在磁力攪拌下，反應物藉由半製備型 C18 HPLC，使用 XB-C18 21.2x150 mm, 5 μm 管柱以 21.2mL/min 流速進行純化。前 5 分鐘用含 0.1% 甲酸之去離子水及 5% 乙腈梯度溶離，接著用 5% - 95% 線性梯度經 25 分鐘溶離。合併含所需產物之溶離份，冷凍並凍乾，得到 10 mg (54.0% 產率) 所需產物。MS (M)<sup>+</sup> 實驗值：723.3，計算值：723.3；高解析度 MS 實驗值：723.2995；計算值：723.3003。

**實例 20.** 單次劑量之 SeriMab 位點特異性 huMOV19NTS#2-連接子 1-化合物 A 針對雌性 SCID 小鼠中 NCI-H2110 NSCLC 異種移植物之抗腫瘤活性

【0437】自 Charles River Laboratories 獲得 6 周齡之雌性 CB.17 SCID 小鼠。藉由在右側腹中皮下注射，用懸浮於 0.1 ml 50% 基質膠/無血清培養

基中之  $1 \times 10^7$  個 NCI-H2110 腫瘤細胞接種小鼠。當腫瘤體積達到約  $100 \text{ mm}^3$  (接種後第 7 天)時，基於腫瘤體積將動物隨機分入 4 個組中，每組 6 只小鼠。第 1 天(接種後第 8 天)，小鼠接受單次靜脈內施用的媒劑對照物(每只小鼠  $0.2 \text{ ml}$ )或基於化合物 A 濃度之  $10$ 、 $25$  或  $50 \mu\text{g/kg}$  之 huMOV19NTS#2-連接子 1-化合物 A ([6]，方案 1)偶聯物。

**【0438】** 每週兩到三次使用測徑器以三個尺寸量測腫瘤大小。腫瘤體積係使用式  $V = \text{長度} \times \text{寬度} \times \text{高度} \times \frac{1}{2}$  計算，以  $\text{mm}^3$  表示。當腫瘤體積減小  $50\%$  或更多時，認為小鼠具有部分消退(PR)，當無法偵測到明顯腫瘤時，認為具有完全腫瘤消退(CR)。腫瘤體積係藉由 StudyLog 軟體測定。

**【0439】** 腫瘤生長抑制(T/C 值)係使用下式測定：

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

**【0440】** 當媒劑對照組之腫瘤體積達到預定大小  $1000 \text{ mm}^3$  時，同時測定治療組(T)及媒劑對照組(C)之腫瘤體積。測定每一治療組之每日中值腫瘤體積，包括無腫瘤小鼠( $0 \text{ mm}^3$ )。根據 NCI 標準， $\text{T/C} \leq 42\%$  為抗腫瘤活性之最低水準。 $\text{T/C} < 10\%$  被視為高抗腫瘤活性水準。

**【0441】** 如圖 13 中所示，偶聯物在  $25 \mu\text{g/kg}$  及  $50 \mu\text{g/kg}$  劑量下具有高活性。

#### 實例 21. 藉由用蛋白質 A 樹脂親和力捕獲來富集分解代謝物

**【0442】** 在  $5 \times \text{T150}$  組織培養盤中培養表現葉酸受體  $\alpha$  (FR  $\alpha$ )之 KB 細胞。 $37^\circ\text{C}$  下，在用  $5\% \text{ CO}_2$  緩衝之潮濕恆溫箱中將飽和量的 FR  $\alpha$  靶向性 huMOV19NTS#2-連接子 1-化合物 A (或 SeriMab-sDGN462)偶聯物與 KB 細胞一起孵育 24 小時。24 小時之後，採集含有細胞流出之分解代謝物之培養基

且彙集用於隨後分析。

**【0443】** 藉由在 4°C 下孵育隔夜，使飽和量之抗異吲哚啉並苯并二氮  
呴化合物抗體結合至蛋白質 A 樹脂之漿液。在端至端旋轉器(end-to-end  
rotator)上，用 25 ml 培養基孵育 1 ml 預先結合之蛋白質 A/抗苯并二氮呴化  
合物抗體複合物數小時。以 1000 rpm 輕柔地離心樹脂且傾析上清液。用 PBS  
(5x)洗滌結合至 IGN 分解代謝物之蛋白質 A/抗 IGN 抗體樹脂，以移除培養  
基組分。藉由丙酮萃取將分解代謝物釋放至有機相中。將分解代謝物真空  
乾燥隔夜，直至有機溶液完全蒸發。分解代謝物用 20% 乙腈水溶液複水，  
且藉由 LC-MS 進行分析。

**【0444】** 在 5 x T150 組織培養盤中培養表現葉酸受體  $\alpha$  (FR  $\alpha$ )之 KB  
細胞。37°C 下，在用 5% CO<sub>2</sub> 緩衝之潮濕恆溫箱中將飽和量的 FR  $\alpha$  靶向性  
huMOV19-NTS#2-胺氨基-乙醯基-MayNMA (又稱「SeriMab-May」)偶聯物與  
KB 細胞一起孵育 24 小時。24 小時之後，採集含有細胞流出之分解代謝物  
之培養基且彙集用於隨後分析。

**【0445】** 藉由在 4°C 下孵育隔夜，使飽和量之抗美登素抗體結合至蛋  
白質 A 樹脂之漿液。在端至端旋轉器上，用 20 ml 培養基孵育 1 ml 預先結  
合之蛋白質 A/抗美登素抗體複合物數小時。以 1000 rpm 輕柔地離心樹脂且  
傾析上清液。用 PBS (5x)洗滌結合至類美登素分解代謝物之蛋白質 A/抗美  
登素抗體樹脂，以移除培養基組分。藉由丙酮萃取將分解代謝物釋放至有  
機相中。將分解代謝物真空乾燥隔夜，直至有機溶液完全蒸發。分解代謝  
物用 20% 乙腈水溶液複水，且藉由 LC-MS 進行分析。

## MS 分析

【0446】 藉由完整質量分析，使用 Waters LCT ESI-TOF 表徵 huMOV19-NTS#2 偶聯物之藥物分佈特徵。藉由 LC/MS/MS，使用 Waters QTOF 進行該偶聯物之胰蛋白酶解肽譜定位(樣品經還原，烷基化，隨後以胰蛋白酶消化)。藉由 UHPLC/MS/MS，使用 Q-Exactive 高解析度質譜儀(Thermo) 鑑別細胞分解代謝物。使用萃取離子層析圖(XIC)鑑別並表徵靶細胞分解代謝物。對含有特徵性美登森( $547\text{ m/z}$ )及 DGN ( $286\text{ m/z}$ )質量特徵的所有分解代謝物質進行鑑別。

【0447】 在 24 小時處理之後，SeriMab-sDGN462 及 SeriMab-May 偶聯物均產生由靶細胞流出之分解代謝物。含有末端羧酸的 DGN 及類美登素代謝物與在抗體重鏈上之 N 末端絲氨酸或相鄰纈氨酸是殘基之蛋白水解一致。該等分解代謝物為 SeriMab 偶聯平臺所特有的，因為預期由半胱氨酸或離胺酸偶聯得到的代謝產物將為兩性的。sDGN462 偶聯物產生另外的分解代謝物，與硫醇基(DGN-苯胺)之二硫鍵裂解(sDGN462)及自降解一致。離胺酸連接之 DGN462 偶聯物亦產生該等代謝產物。

## 實例 22. 旁觀者活性

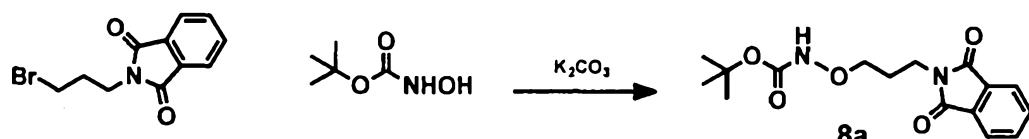
【0448】 在 96 孔盤(Falcon, 圓底)中，一式六份在補充有熱滅活之 10% FBS (Life Technologies)、0.1 mg/ml 慶大黴素(Life Technologies)及  $\beta$  ME (Life Technologies)之 RPMI-1640 (Life Technologies)中分別稀釋濃度為  $1\text{e-}10\text{ M}$  及  $4\text{e-}10\text{ M}$  的每孔  $50\text{ }\mu\text{l}$  偶聯物。在血細胞計數器上對表現重組 FOLR1(FR1#14) 或無表現載體(親本)之 300.19 細胞(小鼠)進行計數。將  $50\text{ }\mu\text{l/ml}$  每孔 1000 個 FR1#14 細胞添加至含有 ADC 或僅含培養基之孔中，將  $50\text{ }\mu\text{l/ml}$  每孔 2000 個親本細胞體積至含有 ADC 或僅含培養基之孔中且將 FR1#14 與親本細胞

一起添加至含有 ADC 或僅含培養基之孔中。所有盤在含 5% CO<sub>2</sub> 之 37°C 恒溫箱中孵育 4 天。總體積為每孔 150 μl。孵育之後，藉由添加每孔 75 μl Cell Titer Glo (Promega) 且使其顯影 30 分鐘來分析細胞活力。在光度計上讀取發光度且自所有值減去僅含培養基之孔的背景值。使用 Graph Pad Prism 繪製每一細胞處理之平均值的直條圖。

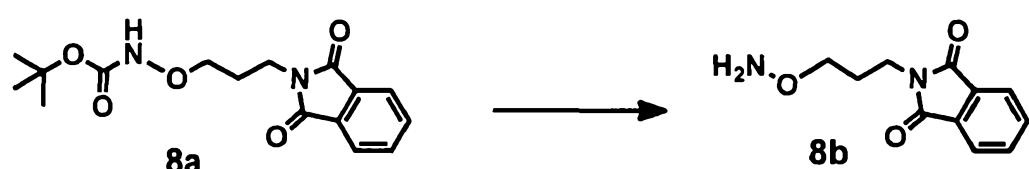
【0449】 如圖 16 中所示，經由離胺酸或 N 末端絲氨酸偶聯的二硫鍵連接之 sDGN462 ADC 顯示對鄰近抗原陰性細胞有效的旁觀者殺滅作用。

【0450】 對於絲氨酸連接之 D8 偶聯物觀察到類似結果。參看圖 27。

### 實例 23. 合成化合物 D8

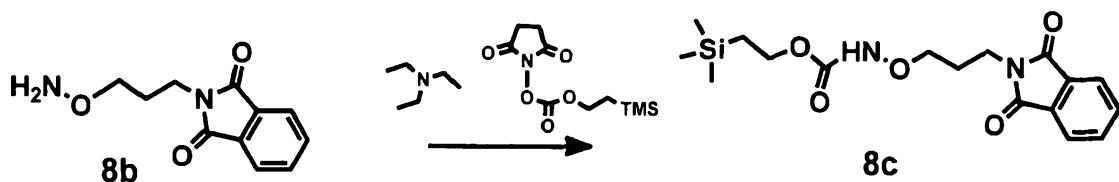


【0451】 步驟 1：將羥基氨基甲酸第三丁酯(1.490 g, 11.19 mmol)溶解於無水 DMF (22.38 mL) 中。添加 2-(3-溴丙基)異吲哚啉-1,3-二酮(3 g, 11.19 mmol) 及碳酸鉀(3.09 g, 22.38 mmol) 且在室溫下攪拌反應隔夜。將其用冷水稀釋且用 EtOAc 萃取。有機物用鹽水洗滌，經硫酸鈉乾燥且粗殘餘物藉由矽膠急驟層析法(EtOAc/Hex, 梯度 0% 至 45%)純化，得到呈黏稠固體狀之化合物 8a (2.41 g, 67% 產率)。LCMS = 4.99 min (8 分鐘方法)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.86-7.83 (m, 2H), 7.73-7.77 (m, 2H), 7.28 (bs, 1H), 3.92 (t, 2H, *J* = 6.0 Hz), 3.82 (t, 2H, 6.9Hz), 2.05-1.98 (m, 2H), 1.47 (s, 9H)。

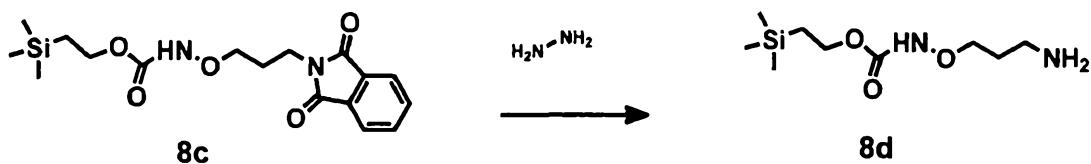


【0452】 步驟 2：將化合物 8a (2.41g, 7.52 mmol) 溶解於無水 DCM

(18.81 mL)中且在冰浴中冷卻至 0°C。添加 DCM (9.40 mL)與 TFA (9.40 mL)的新鮮混合之溶液。在室溫下攪拌反應 1 小時且用 DCM 稀釋，並用飽和碳酸氫鈉洗滌。有機層用鹽水洗滌，乾燥，過濾並濃縮，得到化合物 8b (1.32 g，80% 產率)。粗物質不經進一步純化即使用。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.85-7.82 (m, 2H), 7.72-7.69 (m, 2H), 3.78 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz), 3.72 (t, 2H, 6.0 Hz), 1.99-1.93 (m, 2H)。

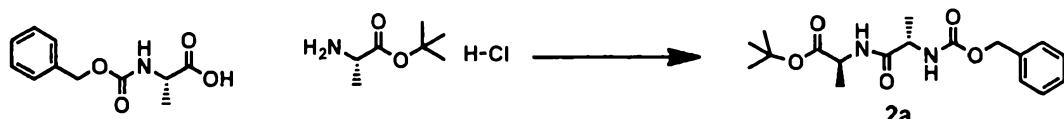


**【0453】步驟 3：**將化合物 8b (100 mg, 0.454 mmol)溶解於無水 DCM (4.5 mL)中。添加 TEA (127 μL, 0.908 mmol)及(2-(三甲基矽烷基)乙基)碳酸 2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯(177 mg, 0.681 mmol)且在室溫下攪拌反應隔夜。反應物用 DCM 稀釋，用鹽水洗滌，乾燥，過濾並蒸發。粗殘餘物藉由矽膠急驟層析法(EtOAc/Hex，梯度 0% 至 40%)純化，得到化合物 8c (148 mg, 89% 產率)。LCMS = 5.91 min (8 分鐘方法)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.86-7.83 (m, 2H), 7.73-7.69 (m, 2H), 7.39 (bs, 1H), 4.26-4.20 (m, 2H), 3.94 (t, 2H, *J* = 6.0 Hz), 3.83 (t, 2H, 6.9 Hz), 2.06-1.98 (m, 2H), 1.05-0.98 (m, 2H), 0.04 (s, 9H)。

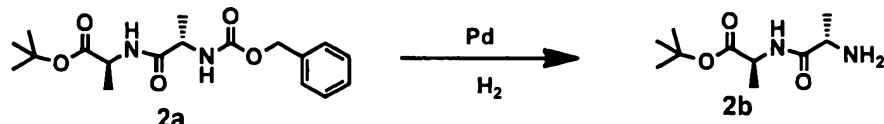


**【0454】步驟 4：**將化合物 8c (148 mg, 0.406 mmol)溶解於乙醇(2.7 mL)中且攪拌直至完全溶解。添加肼(63.7 μL, 2.030 mmol)且在室溫下攪拌反應，直至在 1 小時之時迅速形成白色沈澱。使反應物濾過矽藻土且再用乙醇沖

\* 洗。蒸發濾液且藉由矽膠急驟層析法(A= MeOH, B= EtOAc 梯度，100%至10%)純化。藉由質量偵測產物溶離份且蒸發，得到呈黏稠固體狀之化合物8d (67.5 mg, 71%產率)。 $^1\text{H}$ NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  4.27-4.21 (m, 2H), 3.98 (t, 2H,  $J$ = 5.9 Hz), 2.92-2.87 (m, 2H), 1.85-1.77 (m, 2H), 1.06-0.99 (m, 2H), 0.04 (s, 9H)。

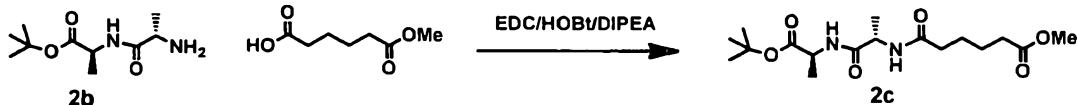


**【0455】步驟 5：**將(*S*)-2-(((苯甲氧基)羰基)氨基)丙酸(5 g, 22.40 mmol)及(*S*)-2-氨基丙酸第三丁基酯鹽酸鹽(4.48 g, 24.64 mmol)溶解於無水 DMF (44.8 mL)中。添加 EDC·HCl (4.72 g, 24.64 mmol)、HOBr (3.43 g, 22.40 mmol) 及 DIPEA (9.75 mL, 56.0 mmol)。在氰氣下，在室溫下攪拌反應隔夜。反應混合物用二氯甲烷稀釋且接著用飽和氯化銨、飽和碳酸氫鈉、水及鹽水洗滌。有機層經硫酸鈉乾燥且濃縮。粗油狀物經由矽膠層析法(己烷/乙酸乙酯)純化，得到化合物 2a (6.7 g, 85%產率)。 $^1\text{H}$ NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.38-7.31 (m, 5H), 6.53-6.42 (m, 1H), 5.42-5.33 (m, 1H), 5.14 (s, 2H), 4.48-4.41 (m, 1H), 4.32-4.20 (m, 1H), 1.49 (s, 9H), 1.42 (d, 3H,  $J$ = 6.8 Hz), 1.38 (d, 3H,  $J$ = 7.2 Hz)。

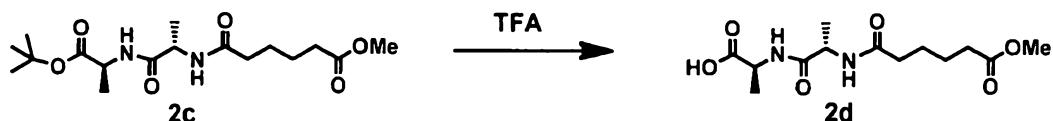


**【0456】步驟 6：**將化合物 2a (6.7 g, 19.12 mmol)溶解於甲醇(60.7 mL)及水(3.03 mL)中。用氰氣淨化溶液五分鐘。緩慢添加鉀/碳(潮濕, 10%) (1.017 g, 0.956 mmol)。在氰氣氛圍下攪拌反應隔夜。使溶液濾過矽藻土，用甲醇沖洗並濃縮。將其與甲醇和乙腈共沸，且將所得油狀物直接放於高真空下，

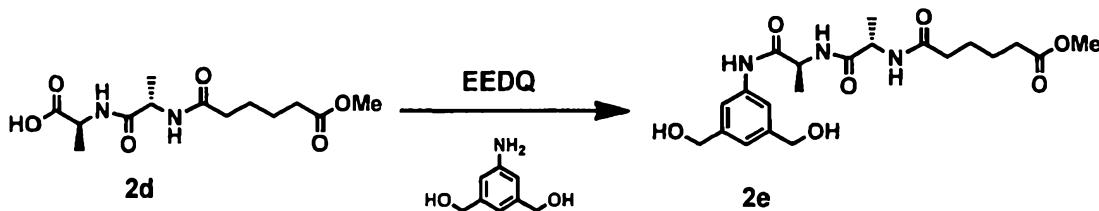
得到化合物 2b (4.02 g, 97% 產率)，直接用於下一步驟。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.78-7.63 (m, 1H), 4.49-4.42 (m, 1H), 3.55-3.50 (m, 1H), 1.73 (s, 2H), 1.48 (s, 9H), 1.39 (d, 3H, J = 7.2 Hz), 1.36 (d, 3H, J = 6.8 Hz)。



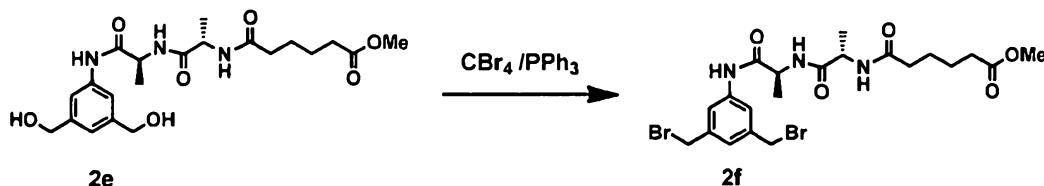
【0457】步驟 7：將化合物 2b (4.02 g, 18.59 mmol) 及己二酸單甲酯(3.03 mL, 20.45 mmol)溶解於無水 DMF (62.0 mL) 中。添加 EDC·HCl (3.92 g, 20.45 mmol)、HOBr (2.85 g, 18.59 mmol) 及 DIPEA (6.49 mL, 37.2 mmol)。在室溫下，攪拌混合物隔夜。反應物用二氯甲烷/甲醇(150 mL, 5:1)稀釋並用飽和氯化銨、飽和碳酸氫鈉及鹽水洗滌。其經硫酸鈉乾燥，過濾並汽提。使化合物與乙腈共沸(5x)，接著在高真空下在 35°C 下泵浦，得到化合物 2c (6.66 g, 100% 產率)。粗物質不經純化即用於下一步驟。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.75 (d, 1H, J = 6.8 Hz), 6.44 (d, 1H, J = 6.8 Hz), 4.52-4.44 (m, 1H), 4.43-4.36 (m, 1H), 3.65 (s, 3H), 2.35-2.29 (m, 2H), 2.25-2.18 (m, 2H), 1.71-1.60 (m, 4H), 1.45 (s, 9H), 1.36 (t, 6H, J = 6.0 Hz)。



【0458】步驟 8：在室溫下，將化合物 2c (5.91 g, 16.5 mmol) 在 TFA (28.6 mL, 372 mmol) 及去離子水(1.5 mL)中攪拌三小時。反應混合物在乙腈存在下濃縮且放於高真空下，得到呈黏稠固體狀之粗化合物 2d(5.88 g, 100% 產率)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.21 (d, 1H, J = 6.8 Hz), 6.81 (d, 1H, J = 7.6 Hz), 4.69-4.60 (m, 1H), 4.59-4.51 (m, 1H), 3.69 (s, 3H), 2.40-2.33 (m, 2H), 2.31-2.24 (m, 2H), 1.72-1.63 (m, 4H), 1.51-1.45 (m, 3H), 1.42-1.37 (m, 3H)。

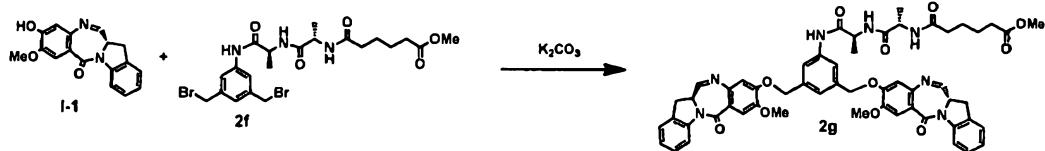


【0459】步驟 9：將化合物 **2d** (5.6 g, 18.52 mmol)溶解於無水二氯甲烷(118 mL)及無水甲醇(58.8 mL)中。添加(5-胺基-1,3-伸苯基)二甲醇(2.70 g, 17.64 mmol)及 EEDQ (8.72 g, 35.3 mmol)且在室溫下攪拌反應隔夜。汽提溶劑且添加乙酸乙酯。過濾所得漿液，用乙酸乙酯洗滌且在真空/ $N_2$  下乾燥，得到化合物 **2e** (2.79 g, 36%產率)。 $^1H$ NMR (400 MHz, DMSO-*d*6):  $\delta$  9.82 (s, 1H), 8.05, (d, 1H, *J* = 9.2 Hz), 8.01 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz), 7.46 (s, 2H), 6.95 (s, 1H), 5.21-5.12 (m, 2H), 4.47-4.42 (m, 4H), 4.40-4.33 (m, 1H), 4.33-4.24 (m, 1H), 3.58 (s, 3H), 2.33-2.26 (m, 2H), 2.16-2.09 (m, 2H), 1.54-1.46 (m, 4H), 1.30 (d, 3H, *J* = 7.2 Hz), 1.22 (d, 3H, *J* = 4.4 Hz)。

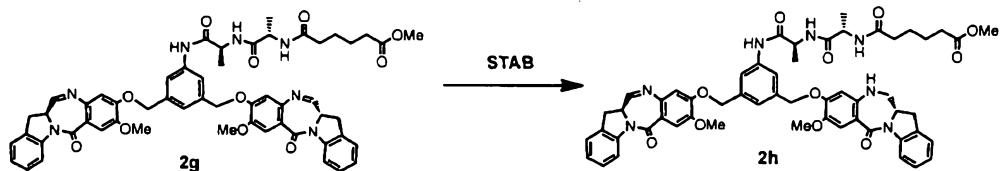


【0460】步驟 10：將化合物 **2e** (0.52 g, 1.189 mmol)及四溴化碳(1.183 g, 3.57 mmol)溶解於無水 DMF (11.89 mL)中。添加三苯基膦(0.935 g, 3.57 mmol)且在氮氣下攪拌反應四小時。反應混合物用 DCM/MeOH (10:1)稀釋且用水及鹽水洗滌，經硫酸鈉乾燥，過濾且濃縮。粗物質藉由矽膠層析法(DCM/MeOH)純化，得到化合物 **2f** (262 mg, 39%產率)。 $^1H$ NMR (400 MHz, DMSO-*d*6):  $\delta$  10.01 (s, 1H), 8.11 (d, 1H, *J* = 6.8 Hz), 8.03 (d, 1H, *J* = 6.8 Hz), 7.67 (s, 2H), 7.21 (s, 1H), 4.70-4.64 (m, 4H), 4.40-4.32 (m, 1H), 4.31-4.23 (m, 1H), 3.58 (s, 3H), 2.34-2.26 (m, 2H), 2.18-2.10 (m, 2H), 1.55-1.45 (m, 4H), 1.31 (d, 3H, *J* = 7.2 Hz),

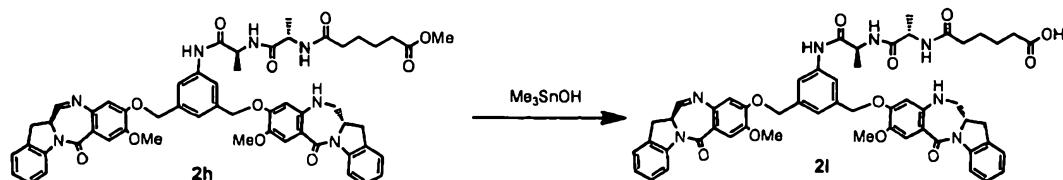
1.21 (d, 3H,  $J = 7.2$  Hz)。



**【0461】步驟 11：**將二溴化物化合物 2f 及 IGN 單體化合物 I-1 溶解於 DMF 中。添加碳酸鉀且在室溫下攪拌隔夜。向反應混合物中添加水以移出產物。漿液在室溫下攪拌 5 分鐘且接著過濾，並在真空/ $\text{N}_2$  下乾燥 1 小時。粗物質藉由矽膠層析法(二氯甲烷/甲醇)純化，得到化合物 2g (336 mg, 74% 產率)。LCMS = 5.91 min (15 分鐘方法)。MS ( $m/z$ ): 990.6 ( $M + 1$ )<sup>+</sup>。

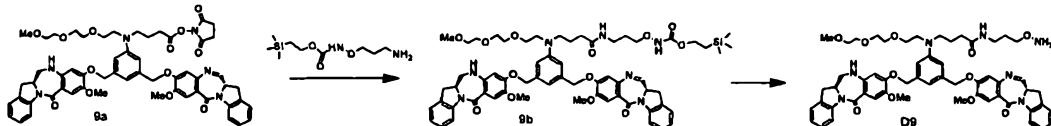


**【0462】步驟 12：**將二亞胺化合物 2g 溶解於 1,2-二氯乙烷中。向反應混合物中添加  $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$  且在室溫下攪拌 1 小時。反應物用  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  稀釋且  $\text{NH}_4\text{Cl}$  飽和水溶液淬滅。分離各層且用鹽水洗滌，經  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  乾燥並濃縮。粗物質經由 RPHPLC (C18 管柱，乙腈/水)純化，得到化合物 2h (85.5 mg, 25% 產率)。LCMS = 6.64 min (15 分鐘方法)。MS ( $m/z$ ): 992.6 ( $M + 1$ )<sup>+</sup>。



**【0463】步驟 13：**將甲酯化合物 2h 溶解於 1,2-二氯乙烷中。向反應混合物中添加三甲基氫氧化錫且在 80°C 下加熱隔夜。將反應混合物冷卻至室溫且用水稀釋。用 1 M HCl 將水層酸化至約 pH 4。混合物用  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (10:1, 3 x 20 mL) 萃取。合併之有機層用鹽水洗滌且經  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  乾燥，並濃縮。





**【0466】步驟 1：**將化合物 9a (17mg, 0.016 mmol)溶解於 DCM (328  $\mu$ l) 中。在室溫下添加化合物 8d (5.76 mg, 0.025 mmol)及 DIPEA (5.71  $\mu$ l, 0.033 mmol)，且攪拌反應直至完成。將其用 10:1 DCM:MeOH 稀釋且用鹽水洗滌。乾燥有機物並濃縮，得到化合物 9b，將其直接使用。

**【0467】步驟 2：**化合物 D9 係以與實例 23 中化合物 D8 類似地方式製備。粗物質經由 RPHPLC (C18 管柱，乙腈/水)純化，得到化合物 D9 (5 mg，經 2 個步驟 31% 產率)。LCMS = 5.68 min (8 分鐘方法)。MS (m/z): 1012.5 ( $M + 1$ )<sup>+</sup>。

### 實例 25. 製備 huCD123-6 抗體之 SeriMab 偶聯物

#### a) N 末端抗體偶聯—兩步法

**【0468】**用 5 mM 過碘酸鈉水溶液(50 當量，25°C，30 分鐘)處理 huCD123-6Gv4.6/7S3 抗體([1]，方案 3，如圖 5 中所示；3mg/mL 於 PBS 中，pH7.4)。接著，經由 NAP 脫鹽管柱(Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare)將混合物緩衝液交換成乙酸鈉緩衝液，pH5.0。

**【0469】**用含有 10% v/v 共溶劑之 4-胺基苯乙醇(100 mM 於 DMA [N,N-二甲基乙醯胺]中)處理所得溶液。隨後引入異雙官能連接子 1 ([3]，方案 3；5 當量)，且密封反應容器，並在 37°C 下孵育 24 小時。

**【0470】**接著，經由 NAP 脫鹽管柱(Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare)將混合物緩衝液交換成 HEPES (4-(2-羥乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸)緩衝液，pH8.5。接著用 DMA (N,N-二甲基乙醯胺)共溶劑(10% v/v)調整溶液，

且在 25°C 下用礦酸化 DGN462 (sDGN462)([5]，方案 3；游離硫醇；5 當量) 處理 6 小時。

**【0471】** 使用 NAP 過濾柱(Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare)將所得偶聯物緩衝液交換成 250 mM 甘胺酸、10 mM 組胺酸、1% 蔗糖、0.01% Tween-20、50 μM 亞硫酸氫鈉配製緩衝液(pH 6.2)。在 25°C 下，利用 Slide-a-Lyzer 透析盒(ThermoScientific 10,000 MWCO)以相同緩衝液透析 4 小時。

**【0472】** 發現純化之偶聯物([6]，方案 3)每個抗體均勻地平均連接有兩個 DGN462 分子(經由 Q-ToF 質譜法)，具有>98%單體(經由尺寸排阻層析法)、<2%游離藥物(經由丙酮沈澱之反相 HPLC 分析)及 0.18 mg/mL 之最終蛋白質濃度(經由 UV-Vis，對於 huCD123-6Gv4.6/7S3 抗體，使用莫耳消光係數  $\epsilon_{280}=213320 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )。

#### b) N 末端抗體偶聯—IGN 直接連接

**【0473】** 在 25°C 下，用 5 mM 過碘酸鈉水溶液(50 莫耳當量)處理工程改造成在重鏈上具有 N 末端絲氨酸的工程改造之含 N 末端 Ser 之 huCD123-6Gv4.7S2 抗體 ([1]，方案 4，圖 17；3 mg/mL 於 PBS 中，pH7.4)達 30 分鐘。接著，經由 NAP 脫鹽管柱(Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare)將混合物緩衝液交換成乙酸鈉緩衝液，pH5.0。

**【0474】** 用含有 10% v/v 共溶劑之對伸苯基二胺(100 mM 於 DMA [N,N-二甲基乙醯胺]中)處理所得溶液。隨後引入原位礦酸化-D8 (或 sD8)([3]，方案 4；5 莫耳當量)，且密封反應容器，並在 37°C 下孵育 24 小時。

**【0475】** 接著，經由 NAP 脫鹽管柱(Illustra Sephadex G-25 DNA Grade,

GE Healthcare)將混合物緩衝液交換成 250 mM 甘胺酸、10 mM 組胺酸、1% 蔗糖緩衝液，pH6.2。在 25°C 下，利用 Slide-a-Lyzer 透析盒(ThermoScientific 10,000 MWCO)以相同緩衝液透析 4 小時。

**【0476】** 發現純化之偶聯物([4]，方案 4)每個抗體均勻地平均連接有兩個 D8 分子(經由 Q-ToF 質譜法)，具有>96% 單體(經由尺寸排阻層析法)、<3% 游離藥物(經由 HISEP 反相 HPLC 分析)及 1.4 mg/mL 之最終蛋白質濃度(經由 UV-Vis，對於 huCD123-6Gv4.7S2 抗體，使用莫耳消光係數  $\epsilon_{280}=213320 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )。

**【0477】** 以上描述之原位礦酸化-D8(或 sD8)係根據以下程序製備：將凍乾呈白色固體形式之 D8 試劑溶解於 DMA (N,N-二甲基乙醯胺)中，達到 10-20 mM 儲備液濃度。添加新制的亞硫酸氫鈉(500 mM 水溶液，5 莫耳當量)且使所得溶液在 25°C 下反應 4-6 小時，隨後在 4°C 保持 15 小時。引入另一等分試樣之新制亞硫酸氫鈉(500 mM 水溶液，2 莫耳當量)且使其在 25°C 下反應 4 小時，隨後在 -80°C 下儲存待用。

### c) N 末端抗體偶聯—對於 CD123-6Gv4.7S3 或 S2 之兩步方案

**【0478】** 在 25°C 下，用 5 mM 過碘酸鈉水溶液(50 莫耳當量)處理工程改造成在具有 N 末端絲氨酸之 huCD123-6Gv4.7S3 (或 S2 - Ab 之示意圖係關於 S3，但該方案亦適用於 S2)抗體([1]，方案 5，圖 18；3 mg/mL 於 PBS 中，pH7.4)達 30 分鐘。接著，經由 NAP 脫鹽管柱(Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare)將混合物緩衝液交換成乙酸鈉緩衝液，pH5.0。

**【0479】** 用含有 10% v/v 共溶劑之 4-胺基苯乙醇(100 mM 於 DMA [N,N-二甲基乙醯胺]中)處理所得溶液。隨後引入異雙官能連接子 1 ([3]，方

案 5；5 莫耳當量)，且密封反應容器，並在 37°C 下孵育 24 小時。

**【0480】** 接著，經由 NAP 脫鹽管柱(Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare)將混合物緩衝液交換成 HEPES (4-(2-羥乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸)緩衝液，pH8.5。接著用 DMA (N,N-二甲基乙醯胺)共溶劑(10% v/v)調整溶液，且在 25°C 下用磺酸化-D1 (或 sD1)([5]，方案 5；游離硫醇；5 莫耳當量)處理 6 小時。

**【0481】** 使用 NAP 過濾柱(Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare)將所得偶聯物緩衝液交換成 250 mM 甘氨酸、10 mM 組氨酸、1% 蔗糖、0.01% Tween-20、50 μM 亞硫酸氫鈉配製緩衝液(pH 6.2)。在 25°C 下，利用 Slide-a-Lyzer 透析盒(ThermoScientific 10,000 MWCO)以相同緩衝液透析 4 小時。

**【0482】** 發現純化之偶聯物([6]，方案 5)每個抗體平均連接有 2.0 個 sD1 分子(經由 Q-ToF 質譜法)，具有>96% 單體(經由尺寸排阻層析法)、<3% 游離藥物(經由丙酮沈澱之反相 HPLC 分析)及 0.4 mg/mL 之最終蛋白質濃度(經由 UV-Vis，對於 huCD123-6Gv4.7S3 抗體，使用莫耳消光係數  $\epsilon_{280}=213320 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )。

### 實例 26 用於製備帶有 4 個 DAR 之偶聯物的 N 末端抗體偶聯

#### (a)兩步法

**【0483】** 用 5 mM 過碘酸鈉水溶液處理(50 當量，25°C，30 分鐘)工程改造成在重鏈及輕鏈上帶有 N 末端絲氨酸之 huMOV19-NTS2S3 抗體([1]，如圖 19 中所示之方案 6；3 mg/mL 於 pH7.4 之 PBS 中)。接著，經由 NAP 脫鹽管柱(Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare)將混合物緩衝液交換成

乙酸鈉緩衝液，pH5.0。

**【0484】** 在反應容器中，用含有 10% v/v DMA (N,N-二甲基乙醯胺)共溶劑之 4-胺基苯乙醇處理所得溶液，達到 10 mM 濃度。隨後引入連接子 1 ([3]，方案 6；10 當量)，且密封反應容器，並在 37°C 下孵育 24 小時。

**【0485】** 接著，經由 NAP 脫鹽管柱(Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare)將混合物緩衝液交換成 HEPES (4-(2-羥乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸)緩衝液，pH8.5。接著用 DMA (N,N-二甲基乙醯胺)共溶劑(10% v/v)調整溶液，且在 25°C 下用化合物 A(或磺酸化 DGN462 (sDGN462))([5]，方案 6；游離硫醇；10 當量)處理 6 小時。

**【0486】** 使用 NAP 過濾柱(Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare)將所得偶聯物緩衝液交換成 250 mM 甘氨酸、10 mM 組氨酸、1% 蔗糖、0.01% Tween-20、50 μM 亞硫酸氫鈉配製緩衝液(pH 6.2)。在 25°C 下，利用 Slide-a-Lyzer 透析盒(ThermoScientific 10,000 MWCO)以相同緩衝液透析 4 小時。

**【0487】** 發現純化之偶聯物([6]，方案 6)每個抗體均勻地平均連接有四個化合物 A 分子(經由 Q-ToF 質譜法，圖 20)，具有>93%單體(經由尺寸排阻層析法)、<2%游離藥物(經由丙酮沈澱之反相 HPLC 分析)及 0.1 mg/mL 之最終蛋白質濃度(經由 UV-Vis，對於 huMOV19-NTS2S3 抗體，使用莫耳消光係數  $\epsilon_{280}=201400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )。

### (b) DMx 直接連接

**【0488】** 在 25°C 下，用 5 mM 過碘酸鈉水溶液(50 莫耳當量)處理工程改造的含 N 末端 Ser 之 huMOV19-NTS2S3 抗體 ([1]，方案 7，圖 21A；3 mg/mL

於 PBS 中, pH7.4)達 30 分鐘。接著, 經由 NAP 脫鹽管柱(Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare)將混合物緩衝液交換成乙酸鈉緩衝液, pH5.0。

**【0489】** 在反應容器中, 用含有 10% v/v DMA (N,N-二甲基乙醯胺)共溶劑之 4-胺基苯乙醇處理所得溶液, 達到 10 mM 濃度。隨後引入胺氨基乙醯基 MayNMA ([3], 方案 7; 10 莫耳當量), 且密封反應容器, 並在 37°C 下孵育 24 小時。

**【0490】** 接著, 經由 NAP 脫鹽管柱(Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare)將混合物緩衝液交換成 250 mM 甘胺酸、10 mM 組胺酸、1% 蔗糖緩衝液, pH6.2。在 25°C 下, 利用 Slide-a-Lyzer 透析盒(ThermoScientific 10,000 MWCO)以相同緩衝液透析 4 小時。

**【0491】** 發現純化之偶聯物([4], 方案 7)每個抗體均勻地平均連接有四個 MayNMA 分子(經由 Q-ToF 質譜法, 圖 21B), 具有>95% 單體(經由尺寸排阻層析法)、<2% 游離藥物(經由 HISEP 反相 HPLC 分析)及 0.2 mg/mL 之最終蛋白質濃度(經由 UV-Vis, 對於 huMov19-NTS2S3 抗體, 使用莫耳消光係數  $\epsilon_{280}=201400\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )。

#### 實例 27 huCD123-6 抗體之位點特異性偶聯物之活體外細胞毒性

**【0492】** 使用活體外細胞毒性分析, 將 huCD123-6 與各種 IGN 化合物之位點特異性偶聯物(huCD123-6Rv1.1S2-SeriMab-D8)殺死在細胞表面上表現 CD123 之細胞的能力與含有相配抗體及有效負載之離胺酸連接之偶聯物(huCD123-6Rv1.1-D2)殺死該等細胞之能力相比較。如以下所描述, 進行並分析細胞毒性分析法。

**【0493】** 在由細胞供應商(ATCC 或 DSMZ)所推薦之細胞培養基中培

養細胞株。將細胞以  $100 \mu\text{L}$  培養基中 2,000 至 10,000 個添加至平底 96 孔盤之每個孔中。為了阻斷細胞表面上之 Fc 受體，細胞培養基補充有 100 nM chKTI 抗體(屬於相同同型之抗體)。使用 3 倍連續稀釋在培養基中稀釋偶聯物，且每孔添加  $100 \mu\text{L}$ 。為了確定不依賴於 CD123 之細胞毒性貢獻，在測試偶聯物之前，向一些孔中添加 CD123 阻斷抗體(100 nM chCD123-6 抗體)。在每一分析盤中納入含有細胞及培養基但無偶聯物之對照孔，以及僅含培養基之孔。對於每一資料點，一式三份進行分析。在  $37^\circ\text{C}$  下，在含 6%  $\text{CO}_2$  之潮濕恆溫箱中孵育該等盤 4 至 7 天。接著，使用基於 WST-8 之 Cell Counting Kit-8 (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Rockville, MD) 測定每個孔中存活細胞之相對數量。藉由首先針對培養基背景吸光度校正，且接著用每一值除以對照孔(未處理孔)中該等值之平均值來計算每個孔中細胞之表觀存活分數。將細胞存活分數針對偶聯物濃度以半對數曲線作圖。

**【0494】** 在多個細胞株上，huCD123-6Rv1.1S2-SeriMab-D8 偶聯物保持靶(CD123)結合，且活性至少與離胺酸連接之 huCD123-6Rv1.1-D2 偶聯物相同。使用 AML 細胞株 SHI-1 及 HNT-34，以及 CML 細胞株 MOLM-1 進行細胞毒性分析之若干實例分別顯示於圖 22A-22C 中。兩種偶聯物均以劑量依賴性方式殺死細胞，且 SHI-1 細胞、HNT-34 細胞及 MOLM-1 細胞之  $\text{IC}_{50}$  值分別為約 0.01 nM、0.002 nM 及 0.03 nM。殺滅作用係 CD123 依賴性的，因為當 CD123 抗原經未偶聯之 huCD123-6 抗體阻斷時，該等偶聯物對於該等細胞之毒性低至少 100 倍。

**【0495】** 在另一實驗中，帶有連接子 1 殘基之 huCD123-6-Gv4.7S3-SeriMab-sD1 偶聯物(參見圖 18)在 EOL-1 細胞中顯示出與

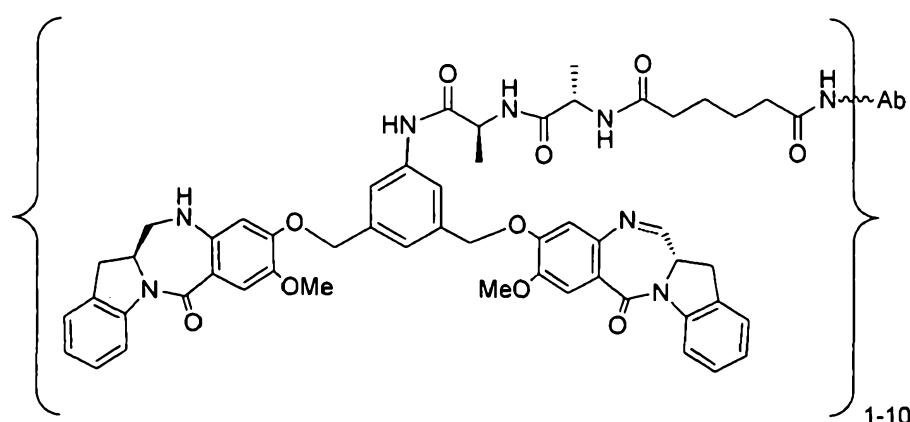
huCD123-6Gv4.7S2(或 S3)-SeriMab-D8 偶聯物(圖 24)類似的效力。

**【0496】** 在另一實驗中，發現在較高 DAR 下，經 Ser 連接 huCD123 抗體之 DGN462 化合物針對 EOL-1 細胞的抗原特異性效力為離胺酸連接形式之 3 倍(參見圖 25)。離胺酸連接之偶聯物之 DAR 為 2.9；而 Ser 連接之偶聯物之 DAR 為 2.0。相比之下，當使用抗原陰性 Namalwa 細胞時，離胺酸連接之偶聯物與絲胺酸連接之偶聯物均展現明顯較低之活性，指示在 EOL-1 細胞中之抗原特異性活性。

#### 實例 28. SeriMab-D8 偶聯物之活體外效力

**【0497】** 使用與實例 8 中所描述類似之分析方案，在 KB 細胞(圖 26A)、Ishikawa 細胞(人子宮內膜腺癌細胞)(圖 26B)及 HEC-1B 細胞(人子宮內膜腺癌細胞)(圖 26C)上測試 SeriMab-D8 偶聯物(huMOV19-NTS#2-SeriMab-D8)之活體外效力。

**【0498】** 如圖 26A-26C 中所示，SeriMab-D8 偶聯物具有與離胺酸偶聯物(huMOV19-D2)相當之抗原特異性效力及靶結合。



huMOV19-D2

#### 實例 29. 具有肟鍵聯之 SeriMab 偶聯物的活體內穩定性

##### 親和力捕獲 LC-MS

【0499】用洗滌緩衝液(50 mM Tris·HCl，0.15 M NaCl，pH 8.0)洗滌可商購之 xMag-Streptavidin Microparticles (Biochain, CA)兩次且將其再懸浮於相同緩衝液中達到其初始體積。接著，將生物素化之 Fc-FR  $\alpha$  (2.6 個生物素/Fc-FR  $\alpha$ ；約 114  $\mu$ g)添加至抗生蛋白鏈菌素顆粒(200  $\mu$ L)中且在室溫下旋轉 2 小時。用洗滌緩衝液洗滌珠粒 3 次，且將其再懸浮於含 0.4% Tween 20 之洗滌緩衝液中，達到其初始體積。

【0500】從在 2 分鐘、1 天及 3 天時給與 10 mg/kg huMOV19-NTS#2-胺氧基-乙醯基-MayNMA 偶聯物之 CD-1 小鼠收集血漿樣品，且將其連同最終 20%洗滌緩衝液及 0.2% Tween-20 一起添加至抗生蛋白鏈菌素-生物素-FR  $\alpha$ -Fc 顆粒(每一樣品 200  $\mu$ L)中。在室溫下輕柔振盪 2 小時之後，用 1 mL 洗滌緩衝液洗滌樹脂 3 次且使用 50  $\mu$ L 的 0.1 M 檸檬酸/檸檬酸鈉(pH 3.0)、50%乙二醇溶離。含有純化之 huMOV19 偶聯物質的溶離物立即用 9  $\mu$ L 1 M Tris·HCl(pH 8.5)中和，且接著如先前所描述(Lazar, Wang 等人, 2005)，藉由 SEC 或 SEC-LC/MS 進行分析。

【0501】如圖 28 中所示，在小鼠循環中，肟鍵聯經 3 天仍穩定。標為 D2 之峰對應於完整偶聯物。標為 A 及 B 之峰為由肟水解及美登森消除得到的裂解產物。在約 17 天之半衰期下，亦觀察到利用離胺酸連接之 Ab-SMCC-DM1 偶聯物已觀察到的少量美登素消除。

### 實例 30. 活體內耐受性研究

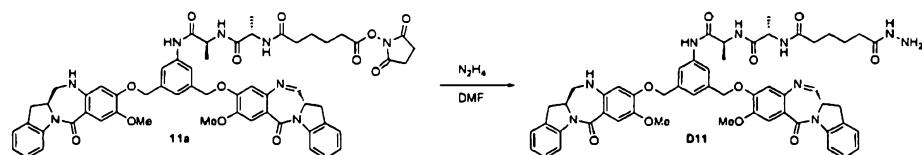
【0502】自 Charles River Laboratories 獲得雌性 CD-1 小鼠(7 周齡)。接收後，在研究開始之前，觀察動物 8 天。動物在到達後或在治療之前未顯示疾病或不適跡象。



【0503】根據體重，將小鼠隨機分成三組。體重在 25.6 至 24.1 公克範圍內，且平均值為 25 公克。基於個體體重，八隻小鼠給與  $100 \mu\text{g}/\text{kg}$  及  $150 \mu\text{g}/\text{kg}$  (D2 藥物劑量)之 huMOV19-D2，且 2 只小鼠給與  $200 \mu\text{g}/\text{kg}$  (D8 藥物劑量)之 huMOV19-SeriMab-D8。所有偶聯物之施用均以配備有 27 號½吋針之 1.0 ml 注射器經靜脈內進行。在指定時間點量測個體之體重(圖 29)且將變化%對時間(天)作圖。每條線表示一隻小鼠之體重變化。將瀕死或體重減輕>20%之動物處死，因為此被定義為不可耐受之劑量。

【0504】如圖 29 中所示，離胺酸連接之 huMOV19-D2 具有約  $100 \mu\text{g}/\text{kg}$  之最大耐受劑量(MTD)；而絲胺酸連接之偶聯物 huMOV19-SeriMab-D8 在  $200 \mu\text{g}/\text{kg}$  下耐受性良好，且經 2 周具有極少體重減輕跡象。

### 實例 31. 合成化合物 D11



【0505】將 NHS 酯 11a ( $10.5 \text{ mg}$ ,  $9.47 \mu\text{mol}$ )溶解於 DMF( $0.316 \text{ mL}$ )中。在室溫下將肼( $1.2 \mu\text{L}$ ,  $38 \mu\text{mol}$ )添加至該溶液中且攪拌 2 小時。粗反應混合物直接藉由 RPHPLC (C18 管柱,  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ , 40%至 55%梯度)純化，得到呈白色固體狀之醯肼 D11 ( $6.5 \text{ mg}$ ， $68\%$ 產率)。LCMS = 4.923 min (8 分鐘方法)。質量觀測值(ESI $^+$ )：992.70 ( $\text{M}+\text{H}$ )。

### 實例 32.

【0506】可使用與實例 25 中所描述類似的程序，製備 huMOV19NTS2 抗體與 sD11 或 sD1 之偶聯物(參見圖 30、31A 及 31B)。

【0507】本文引用之所有出版物、專利、專利申請、網際網站及登錄

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

### 【符號說明】

無

201609152

52758.seq.txt

序列表

<110> 免疫原公司

<120> 包含細胞結合劑及細胞毒性劑之偶聯物

<130> 121162-02020

<150> 62/045264

<151> 2014-09-03

<150> 62/086,986

<151> 2014-12-03

<150> 62/149,379

<151> 2015-04-17

<150> 62/186,235

<151> 2015-06-29

<160> 71

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FR1-2.1抗體輕鏈信號肽(NCBI CAB46122)

<400> 1

Met Lys Leu Pro Val Leu Leu Val Val Leu Leu Leu Phe Thr Ser Pro  
1 5 10 15

Ala Ser Ser Ser  
20

<210> 2

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> IGKV1-99\*01登錄號CAB46122

<400> 2

Met Lys Leu Pro Val Leu Leu Val Val Leu Leu Leu Phe Thr Ser Pro  
1 5 10 15

201609152

52758.seq.txt

Ala Ser Ser Ser Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro  
20 25 30

Val Asn Ile Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Thr Lys Ser  
35 40 45

Leu Leu Asn Ser Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys  
50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Arg Phe  
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe  
85 90 95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr  
100 105 110

Cys Phe Gln Ser Asn Tyr Leu Pro  
115 120

<210> 3  
<211> 220

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>  
<223> FR1-2.1輕鏈(呈表現之形式)

<400> 3

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

Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn  
20 25 30

Ser Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln  
35 40 45

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn His Phe Ser Gly Val  
50 55 60

201609152

52758.seq.txt

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

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln  
85 90 95

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

Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser  
115 120 125

Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn  
130 135 140

Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu  
145 150 155 160

Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp  
165 170 175

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

Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr  
195 200 205

Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys  
210 215 220

<210> 4  
<211> 239

<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 帶有信號肽之FR1-2.1全長輕鏈

<400> 4

Met Lys Leu Pro Val Leu Leu Val Val Leu Leu Leu Phe Thr Ser Pro  
1 5 10 15

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

201609152

52758.seq.txt

20

25

30

Val Asn Ile Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Lys Ser  
35 40 45

Leu Leu Asn Ser Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys  
50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn His Phe  
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe  
85 90 95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr  
100 105 110

Cys Phe Gln Ser Asn Tyr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys  
115 120 125

Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro  
130 135 140

Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe  
145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp  
165 170 175

Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp  
180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys  
195 200 205

Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys  
210 215 220

Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys  
225 230 235

201609152

52758.seq.txt

<210> 5

<211> 446

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FR1-2.1重鏈

<400> 5

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

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

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Glu Ser Leu Asn Thr Gln Tyr Asn Glu Lys Phe  
50 55 60

Lys Ala Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ser Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Gly Ile Tyr Tyr Ser Pro Tyr Ala Leu Asp His Trp  
100 105 110

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

Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met  
130 135 140

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

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

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

201609152

52758.seq.txt

180

185

190

Pro Ser Ser Met Arg Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His  
195 200 205

Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys  
210 215 220

Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe  
225 230 235 240

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

Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val  
260 265 270

Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr  
275 280 285

Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu  
290 295 300

Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys  
305 310 315 320

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

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

Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile  
355 360 365

Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly  
370 375 380

Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn Thr Asn  
385 390 395 400

201609152

52758.seq.txt

Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp  
405 410 415

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

Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys  
435 440 445

<210> 6

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> huMov19 LC及HC信號肽

<400> 6

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly  
1 5 10 15

Val His Ser

<210> 7

<211> 218

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> huMov19 LC

<400> 7

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

201609152

52758.seq.txt

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 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> 8

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> huMov19 HC

<400> 8

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

201609152

52758.seq.txt

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

201609152

52758.seq.txt

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> 9  
<211> 219

201609152

52758.seq.txt

<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> huMov19 LC NTS1 (呈表現之形式)

<400> 9

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

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

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

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

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

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

Arg Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly 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

201609152

52758.seq.txt

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> 10  
<211> 238  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 帶有FR1-2.1輕鏈信號肽之huMov19 LC NTS1

<400> 10

Met Lys Leu Pro Val Leu Leu Val Val Leu Leu Leu Phe Thr Ser Pro  
1 5 10 15

Ala Ser Ser Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala  
20 25 30

Val Ser Leu Gly Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser  
35 40 45

Val Ser Phe Ala Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro  
50 55 60

Gly Gln Gln Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala  
65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr  
85 90 95

Leu Thr Ile Ser Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys  
100 105 110

Gln Gln Ser Arg Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu  
115 120 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro  
130 135 140

201609152

52758.seq.txt

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu  
145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn  
165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser  
180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala  
195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly  
210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
225 230 235

<210> 11

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> huMov19 HC NTS2

<400> 11

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

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

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

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

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

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

201609152

52758.seq.txt

85

90

95

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

201609152

52758.seq.txt

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> 12  
<211> 218  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> huMov19 LC NTS3

<400> 12

Ser 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

## 52758.seq.txt

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 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> 13

<211> 448

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> huMov19 HC NTS4 (呈表現之形式)

201609152

52758.seq.txt

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys

## 52758.seq.txt

210

215

220

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

201609152

52758.seq.txt

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

<210> 14  
<211> 467  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 帶有FR1-2.1輕鏈信號肽之huMov19 HC NTS4

<400> 14

Met Lys Leu Pro Val Leu Leu Val Val Leu Leu Leu Phe Thr Ser Pro  
1 5 10 15

Ala Ser Ser Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val  
20 25 30

Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr  
35 40 45

Phe Thr Gly Tyr Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Ser  
50 55 60

Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr  
65 70 75 80

Asn Gln Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser  
85 90 95

Asn Thr Ala His Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Phe Ala  
100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr Trp  
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
130 135 140

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr  
145 150 155 160

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr

201609152

52758.seq.txt

165

170

175

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
180 185 190

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr  
195 200 205

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn  
210 215 220

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser  
225 230 235 240

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu  
245 250 255

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
260 265 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
275 280 285

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
290 295 300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr  
305 310 315 320

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
325 330 335

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro  
340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
355 360 365

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val  
370 375 380

201609152

52758.seq.txt

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
405 410 415

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
420 425 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
450 455 460

Ser Pro Gly  
465

<210> 15  
<211> 218  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> huMov19 LC NTT1

<400> 15

Thr 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

201609152

52758.seq.txt

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> 16

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> huMov19 HC NTT2

<400> 16

Thr 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

201609152

52758.seq.txt

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val 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

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 肽

201609152

52758.seq.txt

<400> 17

Ala Leu Ala Leu  
1

<210> 18

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<220>

<221> X

<222> (1)..(1)

<223>  $\beta$ -ala

<400> 18

Xaa Leu Ala Leu  
1

<210> 19

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<400> 19

Gly Phe Leu Gly  
1

<210> 20

<211> 95

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 源自于鼠類IGKV6-32\*01序列之輕鏈序列

<400> 20

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

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

## 52758.seq.txt

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

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
 50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Thr Val Gln Ala  
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro  
 85 90 95

<210> 21

<211> 95

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人 λ V3家族V基因序列IGLV3-1\*01

<400> 21

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala  
 20 25 30

Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 35 40 45

Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met  
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Ala  
 85 90 95

<210> 22

<211> 97

<212> PRT

201609152

52758.seq.txt

<213> 人工序列

<220>

<223> 人 λ V3家族V基因序列IGLV3-10\*01

<220>

<221> X

<222> (97)..(97)

<400> 22

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Lys Tyr Ala  
20 25 30

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

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Ser Ser Gly Thr Met Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Val Glu  
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Tyr Ser Thr Asp Ser Ser Gly Asn His  
85 90 95

Xaa

<210> 23

<211> 95

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人 λ V3家族V基因序列IGLV3-10\*02

<400> 23

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Lys Tyr Ala

201609152

52758.seq.txt

20

25

30

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

Lys Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Ser Ser Gly Thr Met Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Val Glu  
65 70 75 80

Asp Glu Asp Asp Tyr Tyr Cys Tyr Ser Ala Asp Tyr Ser Gly Asn  
85 90 95

<210> 24

<211> 97

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人 λ V3家族V基因序列IGLV3-12\*01

<400> 24

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Val Ala Thr Ala Gln  
1 5 10 15

Met Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ala Val  
20 25 30

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

Ser Asp Ser Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Asn Pro Gly Asn Thr Thr Leu Thr Ile Ser Arg Ile Glu Ala Gly  
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His  
85 90 95

Pro

201609152

52758.seq.txt

<210> 25  
<211> 97  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人 λ V3家族V基因序列IGLV3-12\*02

<400> 25

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Val Ala Thr Ala Gln  
1 5 10 15

Met Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ala Val  
20 25 30

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

Ser Asp Ser Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Asn Pro Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Ile Glu Ala Gly  
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His  
85 90 95

Pro

<210> 26  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人 λ V3家族V基因序列IGLV3-13\*01

<220>  
<221> X  
<222> (92)..(92)

<400> 26

## 52758.seq.txt

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

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

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

Lys Asp Gly Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Thr Ser Gly Asn Thr Thr Ala Leu Thr Ile Ser Arg Val Leu Thr Lys  
 65 70 75 80

Gly Gly Ala Asp Tyr Tyr Cys Phe Ser Gly Asp Xaa Asn Asn Leu  
 85 90 95

<210> 27

<211> 97

<212> PRT

<213> IGLV3-16\*01

<400> 27

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

Met Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Glu Ala Leu Pro Lys Lys Tyr Ala  
 20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Phe Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 35 40 45

Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Ser Ser Gly Thr Ile Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu  
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Ser Ala Asp Ser Ser Gly Thr Tyr  
 85 90 95

201609152

52758.seq.txt

Pro

<210> 28  
<211> 97  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人 λ V3家族V基因序列IGLV3-19\*01

<400> 28

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

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

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

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu  
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His  
85 90 95

Leu

<210> 29  
<211> 97  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人 λ V3家族V基因序列IGLV3-21\*01

<400> 29

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

201609152

52758.seq.txt

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val  
20 25 30

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

Tyr Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly  
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His  
85 90 95

Pro

<210> 30

<211> 97

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人λ V3家族V基因序列IGLV3-21\*02

<400> 30

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val  
20 25 30

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

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly  
65 70 75 80

201609152

52758.seq.txt

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His  
85 90 95

Pro

<210> 31  
<211> 97  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人 λ V3家族V基因序列IGLV3-21\*03

<400> 31

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val  
20 25 30

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

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly  
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His  
85 90 95

Pro

<210> 32  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人 λ V3家族V基因序列IGLV3-22\*01

<400> 32

## 52758.seq.txt

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Val Leu Gly Glu Asn Tyr Ala  
 20 25 30

Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Glu Leu Val Ile Tyr  
 35 40 45

Glu Asp Ser Glu Arg Tyr Pro Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Thr Ser Gly Asn Thr Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Leu Thr Glu  
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Ser Gly Asp Glu Asp Asn Pro  
 85 90 95

<210> 33

<211> 97

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人 λ V3家族V基因序列IGLV3-25\*01

<400> 33

Ser Tyr Glu Leu Met Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala  
 20 25 30

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

Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu  
 65 70 75 80

201609152

52758.seq.txt

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Ser Ser Gly Thr Tyr  
85 90 95

Pro

<210> 34  
<211> 97  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人 λ V3家族V基因序列IGLV3-25\*02

<400> 34

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala  
20 25 30

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

Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu  
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Ser Ser Gly Thr Tyr  
85 90 95

Pro

<210> 35  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人 λ V3家族V基因序列IGLV3-25\*03

<400> 35

## 52758.seq.txt

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala  
 20 25 30

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

Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu  
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Ser Ser Gly  
 85 90

<210> 36

<211> 95

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人 λ V3家族V基因序列IGLV3-27\*01

<400> 36

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Val Leu Ala Lys Lys Tyr Ala  
 20 25 30

Arg Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 35 40 45

Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Val Glu  
 65 70 75 80

201609152

52758.seq.txt

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Tyr Ser Ala Ala Asp Asn Asn Leu  
85 90 95

<210> 37  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人 λ V3家族V基因序列IGLV3-31\*01

<400> 37

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

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

Trp Tyr Lys Gln Lys Pro Ser Gln Ala Pro Gly Leu Val Ile Leu Asn  
35 40 45

Ser Val Gln Ser Ser Gly Ile Pro Lys Lys Phe Ser Gly Ser Ser Ser  
50 55 60

Gly Asn Met Ala Thr Leu Thr Ile Thr Gly Ile Gln Val Glu Asp Lys  
65 70 75 80

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

<210> 38  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人 λ V3家族V基因序列IGLV3-31\*02

<400> 38

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

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

## 52758.seq.txt

Trp Tyr Lys Gln Lys Pro Ser Gln Ala Pro Gly Leu Val Ile Leu Asn  
 35 40 45

Ser Val Gln Ser Ser Gly Ile Pro Lys Lys Phe Ser Gly Ser Ser Ser  
 50 55 60

Gly Asn Met Ala Thr Leu Thr Ile Thr Gly Ile Gln Val Glu Asp Lys  
 65 70 75 80

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

<210> 39

<211> 95

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人 λ V3家族V基因序列IGLV3-32\*01

<400> 39

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

Met Ala Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Met Glu Gly Ser Tyr Glu  
 20 25 30

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

Asp Ser Ser Asp Arg Pro Ser Arg Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Lys Ser Gly Asn Thr Thr Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu  
 65 70 75 80

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

<210> 40

<211> 95

<212> PRT

<213> 人工序列

## 52758.seq.txt

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人 λ V3家族V基因序列IGLV3-9\*01

&lt;400&gt; 40

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Asn Val  
 20                           25                           30

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

Arg Asp Ser Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50                   55                           60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Ala Gln Ala Gly  
 65                   70                           75                           80

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

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 97

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人 λ V3家族V基因序列IGLV3-9\*02

&lt;400&gt; 41

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

Ala Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Leu Gly Tyr Lys Ser Val  
 20                   25                           30

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

Arg Asp Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50                   55                           60

201609152

52758.seq.txt

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Ala Gln Ala Gly  
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Thr Ala His  
85 90 95

Pro

<210> 42

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 經修飾之huMov19輕鏈或重鏈信號肽

<400> 42

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly  
1 5 10 15

Val His Ser Ser

20

<210> 43

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD33抗體重鏈

<400> 43

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

201609152

52758.seq.txt

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

201609152

52758.seq.txt

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> 44

<211> 219

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD33抗體輕鏈

<400> 44

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

201609152

52758.seq.txt

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> 45  
<211> 5  
<212> PRT

## 52758.seq.txt

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; FOLR1抗體重鏈CDR1

&lt;400&gt; 45

Gly	Tyr	Phe	Met	Asn
1				5

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; FOLR1抗體重鏈CDR2

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; X

&lt;222&gt; (14)..(14)

&lt;223&gt; Lys、Gln、His或Arg

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; X

&lt;222&gt; (16)..(16)

&lt;223&gt; Gln、His、Asn或Arg

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; X

&lt;222&gt; (17)..(17)

&lt;223&gt; Gly、Glu、Thr、Ser、Ala或Val

&lt;400&gt; 46

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

Xaa

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; FOLR1抗體重鏈CDR3

&lt;400&gt; 47

201609152

52758.seq.txt

Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr  
1 5

<210> 48  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> FOLR1抗體輕鏈CDR1

<400> 48

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

<210> 49  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> FOLR1抗體輕鏈CDR2

<400> 49

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala  
1 5

<210> 50  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> FOLR1抗體輕鏈CDR2

<400> 50

Gln Gln Ser Arg Glu Tyr Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 51  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> FOLR1抗體重鏈CDR2

<400> 51

## 52758.seq.txt

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

Gly

<210> 52  
 <211> 448  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> FOLR1抗體重鏈

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

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

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

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

201609152

52758.seq.txt

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

201609152

52758.seq.txt

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

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

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

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

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

<210> 53

<211> 218

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FOLR1抗體輕鏈

<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

201609152

52758.seq.txt

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

<220>

<223> FOLR1抗體輕鏈

<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

## 52758.seq.txt

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 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> 118  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> FOLR1抗體重鏈可變結構域

<400> 55

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

201609152

52758.seq.txt

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

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

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

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

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 56  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> FOLR1抗體輕鏈可變結構域

<400> 56

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

## 52758.seq.txt

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 Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105 110

<210> 57

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FOLR1抗體輕鏈可變結構域

<400> 57

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 Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105 110

<210> 58

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

## 52758.seq.txt

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 抗CD37抗體免疫球蛋白輕鏈

&lt;400&gt; 58

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

Glu	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Asn	Ile	Arg	Ser	Asn
						25						30			

Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Val
						40					45				

Asn	Val	Ala	Thr	Asn	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
					55					60					

Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ser	Leu	Lys	Ile	Asn	Ser	Leu	Gln	Pro
					70				75					80	

Glu	Asp	Phe	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Tyr	Trp	Gly	Thr	Thr	Trp
							90					95			

Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala
						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
							135				140				

Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln
						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> 59  
<211> 444  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 抗CD37抗體免疫球蛋白重鏈

&lt;400&gt; 59

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

Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Ser  
20 25 30

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

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

Ser Arg Leu Ser Ile Lys Lys Asp His Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Lys Gly Gly Tyr Ser Leu Ala His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
100 105 110

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val  
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala  
145 150 155 160

201609152

52758.seq.txt

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

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

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

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

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu  
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln

## 52758.seq.txt

370 375 380

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

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

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

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

<210> 60  
 <211> 444  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 抗CD37抗體免疫球蛋白重鏈  
 <400> 60

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

Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Ser  
 20 25 30

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

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

Ser Arg Leu Ser Ile Lys Lys Asp His Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu  
 65 70 75 80

Lys Leu Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95

Lys Gly Gly Tyr Ser Leu Ala His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110

201609152

52758.seq.txt

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val  
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala  
145 150 155 160

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

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

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

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

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu  
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

## 52758.seq.txt

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

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

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

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

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

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

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

<210> 61  
 <211> 213  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 抗CD37抗體免疫球蛋白輕鏈區

<400> 61

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

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Thr Tyr Met  
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr  
 35 40 45

Asp Thr Ser Asn Leu Pro Tyr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

201609152

52758.seq.txt

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu  
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 62

<211> 449

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD37抗體免疫球蛋白重鏈區

<400> 62

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly

20

25

30

Phe Ala Trp His Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp  
 35                    40                    45

Met Gly Tyr Ile Leu Tyr Ser Gly Ser Thr Val Tyr Ser Pro Ser Leu  
 50                    55                    60

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

Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 85                    90                    95

Ala Arg Gly Tyr Tyr Gly Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln  
 100                    105                    110

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

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

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

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

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

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

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

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

201609152

52758.seq.txt

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly

201609152

52758.seq.txt

<210> 63  
<211> 445  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> huML66HC全長重鏈

<400> 63

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

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

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

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

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

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

Arg Lys Gly Gly Ile Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val Leu Val  
100 105 110

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

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

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

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

201609152

52758.seq.txt

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

## 52758.seq.txt

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> 64

<211> 213

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> huML66LC全長輕鏈

<400> 64

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

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

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

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

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

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

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

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

201609152

52758.seq.txt

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 65

<211> 448

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗EGFR抗體免疫球蛋白重鏈

<400> 65

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

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

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

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

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

201609152

52758.seq.txt

85

90

95

Ala Arg Tyr Asp Ala Pro Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

201609152

52758.seq.txt

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 66

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗EGFR抗體免疫球蛋白輕鏈

<400> 66

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro Lys Leu Leu Ile

## 52758.seq.txt

35

40

45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 67

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗EGFR抗體免疫球蛋白輕鏈

<400> 67

201609152

52758.seq.txt

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## 52758.seq.txt

<210> 68  
<211> 450  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 抗CD19抗體免疫球蛋白重鏈  
<400> 68

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Asn  
20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Asn Phe  
50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

201609152

52758.seq.txt

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

201609152

52758.seq.txt

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

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

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

Gly Lys  
450

<210> 69  
<211> 211  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 抗CD19抗體免疫球蛋白輕鏈  
<400> 69

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

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Gly Val Asn Tyr Met  
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Arg Arg Trp Ile Tyr  
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

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

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg Gly Ser Tyr Thr Phe Gly  
85 90 95

Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val  
100 105 110

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser

201609152

52758.seq.txt

115 120 125

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

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

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

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

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg  
195 200 205

Gly Glu Cys  
210

<210> 70

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗Muc1抗體免疫球蛋白重鏈

<400> 70

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

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

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

201609152

52758.seq.txt

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

Ala Arg Gly Asp Ser Val Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

201609152

52758.seq.txt

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 71  
<211> 213  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 抗Muc1抗體免疫球蛋白輕鏈  
<400> 71

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

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

## 52758.seq.txt

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

Ser Thr Ser Ser Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Gly Gly Ser  
 50                  55                  60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu  
 65                  70                  75                  80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr  
 85                  90                  95

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

## 201609152 發明摘要

※ 申請案號：104128984

A61K 47/48 (2006.01)

※ 申請日：104.9.2

※IPC 分類：

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

## 【發明名稱】(中文/英文)

包含細胞結合劑及細胞毒性劑之偶聯物

CONJUGATES COMPRISING CELL-BINDING AGENTS AND  
CYTOTOXIC AGENTS

## 【中文】

本發明係關於新穎的細胞結合劑-細胞毒性劑偶聯物，其中該細胞結合劑(CBA)經由自該 CBA 上 2-羥基乙胺部分之氧化得到的醛基共價連接至該細胞毒性劑。本發明亦提供製備本發明之偶聯物之方法。本發明進一步提供可用於使用本發明之偶聯物在哺乳動物中抑制異常細胞生長或治療增生性病症的組成物及方法。

## 【英文】

The invention relates to novel cell-binding agent-cytotoxic agent conjugates, wherein the cell-binding agent (CBA) is covalently linked to the cytotoxic agent through an aldehyde group obtained from oxidation of a 2-hydroxyethylamine moiety on the CBA. The invention also provides methods of preparing the conjugates of the present invention. The invention further provides composition and methods useful for inhibiting abnormal cell growth or treating a proliferative disorder in a mammal using the conjugates of the invention.

201609152

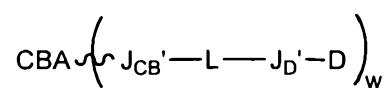
**【代表圖】**

**【本案指定代表圖】：**第（ 9A ）圖。

**【本代表圖之符號簡單說明】：**

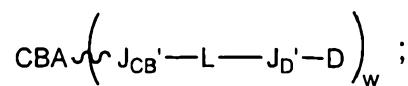
無

**【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：**



## 申請專利範圍

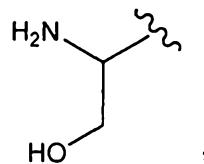
1. 一種由以下結構式表示的細胞結合劑-細胞毒性劑偶聯物，



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

CBA 係共價連接至  $\text{J}_{\text{CB}'}$  基團之細胞結合劑；

$\text{J}_{\text{CB}'}$  係藉由使該 CBA 上之醛基與連接至基團 L 之醛反應性基團反應所形成的部分，其中該醛基係衍生自由以下結構式表示之 2-羥基乙胺部分的氧化：



其中該 2-羥基乙胺部分係絲氨酸、蘇氨酸、羥基離氨酸、4-羥基鳥氨酸或 2,4-二胺基-5-羥基戊酸殘基之一部分；

L 係間隔子或鍵；

$\text{J}_{\text{D}'}$  係將該細胞毒性劑 D 與該基團 L 連接之連接部分，或當 L 係鍵時不存在；

D 係經由該連接部分  $\text{J}_{\text{D}'}$  共價連接至 L 或當 L 係鍵時經由  $\text{J}_{\text{CB}'}$  連接至 CBA 之細胞毒性劑；且

w 係 1、2、3 或 4。

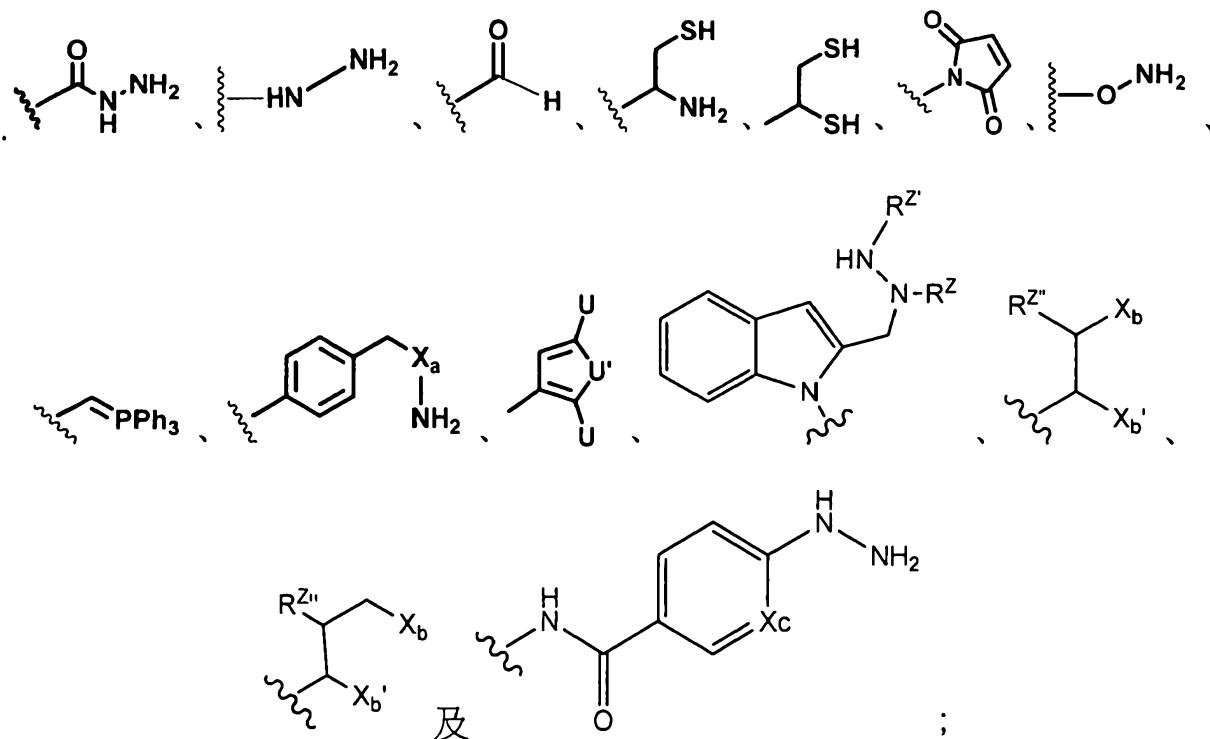
2. 如申請專利範圍第 1 項之偶聯物，其中該細胞結合劑為抗體或其抗原結合部分，或抗體模擬物，諸如 DARPin、Centyrin、親和體、人類泛素

(affilin)、affitin、抗運載蛋白、高親和性多聚體(avimer)、Fynomer、Kunitz  
結構域肽、單抗體(或 adnectin)、三鏈抗體或 nanofitin。

3. 如申請專利範圍第 1 項之偶聯物，其中該細胞結合劑為抗體或其抗原結合部分，諸如 Fab、 $F(ab)_2$ 、 $F(ab')$ 、 $F(ab')_2$ 、 $F(ab')_3$ 、Fd、Fv、二硫鍵連接之 Fv、dAb 或 sdAb (或奈米抗體)、CDR、scFv、 $(scFv)_2$ 、di-scFv、bi-scFv、tascFv (串聯 scFv)、AVIBODY (例如雙鏈抗體、三鏈抗體、四鏈抗體)、T 細胞接合物(BiTE)、scFv-Fc、Fcab、mAb2、小模組免疫藥物(SMIP)、Genmab/單抗體或 duobody、V-NAR 結構域、IgNAR、微型抗體、 $IgG\Delta CH2$ 、DVD-Ig、probody、內抗體或多特異性抗體。
4. 如申請專利範圍第 3 項之偶聯物，其中該醛基係位於該抗體或其抗原結合部分之 N 末端。
5. 如申請專利範圍第 4 項之偶聯物，其中該 N 末端醛基係衍生自 N 末端絲胺酸之氧化。
6. 如申請專利範圍第 5 項之偶聯物，其中該 N 末端絲胺酸係工程改造至該抗體或其抗原結合部分中。
7. 如申請專利範圍第 6 項之偶聯物，其中該抗體或其抗原結合部分係如申請專利範圍第 90 項至第 93 項中任一項之重組抗體中的任一種。
8. 如申請專利範圍第 4 項之偶聯物，其中該 N 末端絲胺酸天然存在於該抗體或其抗原結合部分中。
9. 如申請專利範圍第 3 項之偶聯物，其中該抗體或其抗原結合部分包含 SEQ ID NO: 3 之輕鏈序列。
10. 如申請專利範圍第 3 項之偶聯物，其中該抗體或其抗原結合部分係包

含 SEQ ID NO: 3 之輕鏈序列的鼠類抗體或其抗原結合部分之嵌合抗體、人類化抗體或人類抗體，或其抗原結合部分。

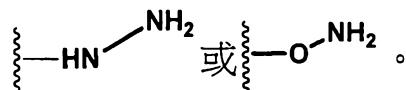
11. 如申請專利範圍第 10 項之偶聯物，其中該人類化抗體或其抗原結合部分係表面重塑或 CDR 移植之抗體，或其抗原結合部分。
12. 如申請專利範圍第 4 項至第 11 項中任一項之偶聯物，其中該 N 末端醛基係位於該抗體或其抗原結合部分之一條或兩條重鏈上，或該抗體或其抗原結合部分之一條或兩條輕鏈上，或其組合上。
13. 如申請專利範圍第 1 項至第 12 項中任一項之偶聯物，其中該醛反應性基團為胼、醯胼或羥基胺。
14. 如申請專利範圍第 1 項至第 13 項中任一項之偶聯物，其中該醛反應性基團係選自：



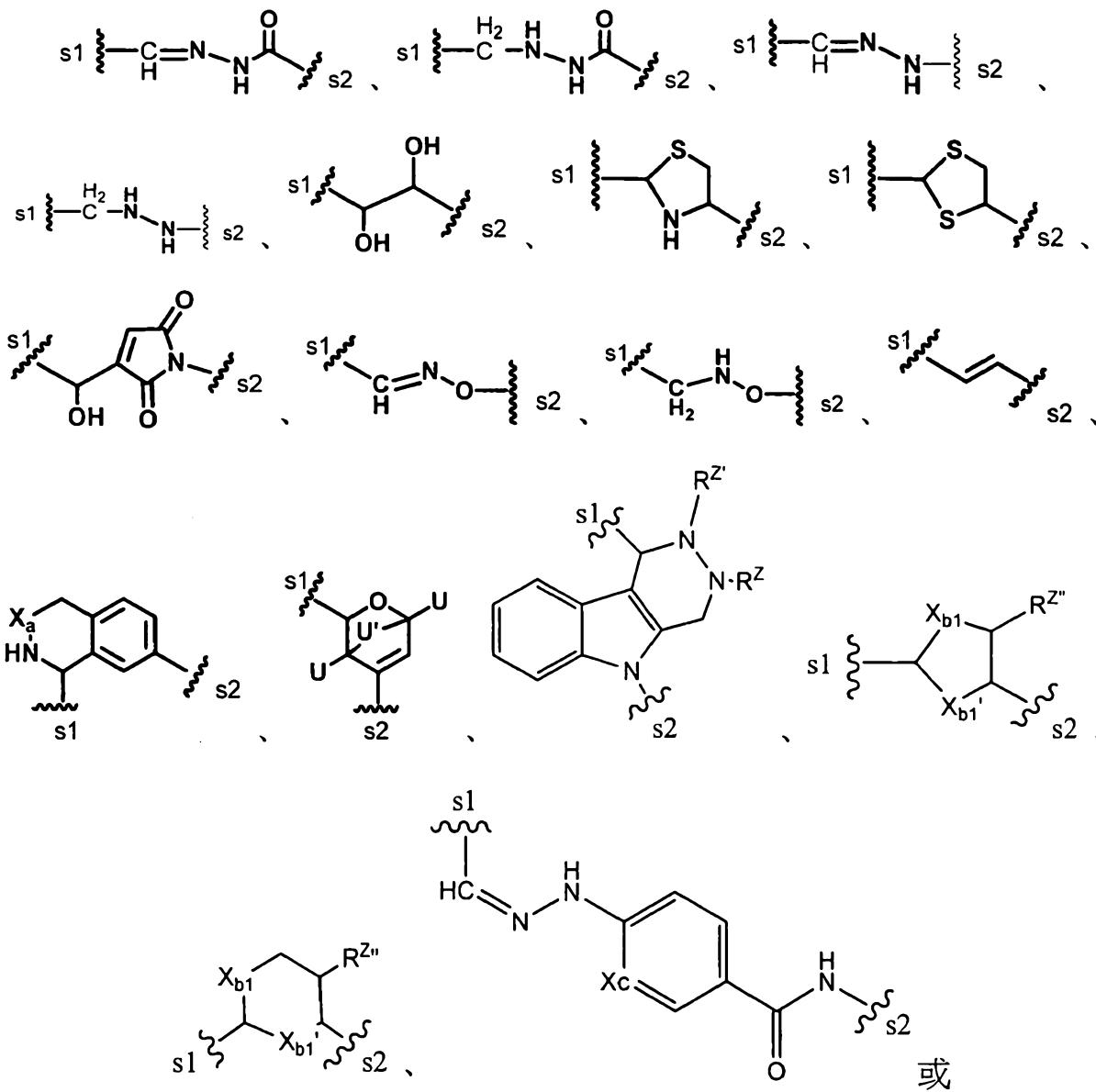
其中  $X_a$  為  $\text{CH}_2$ 、 $\text{O}$  或  $\text{NCH}_3$ ； $U'$  為  $\text{NH}$ 、 $\text{O}$ 、 $\text{S}$  或  $\text{CH}_2$ ； $U$  為  $\text{H}$  或供電子基團； $X_b$  及  $X_b'$  各自獨立地為  $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$  或  $-\text{NH}_2$ ； $R^z$  及  $R^{z'}$  各自獨立

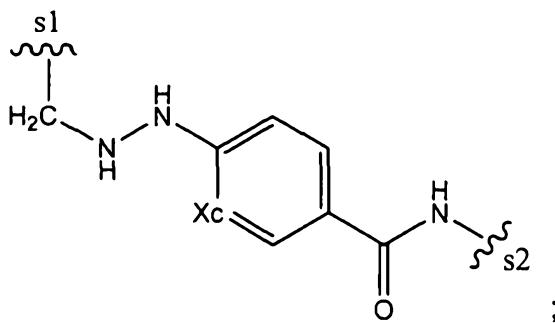
地為 H 或烷基(較佳為 -Me)；R<sup>Z</sup>為 H 或烷基；及 X<sub>c</sub>為 N 或 CH。

15. 如申請專利範圍第 14 項之偶聯物，其中該醛反應性基團為 、



16. 如申請專利範圍第 1 項至第 13 項中任一項之偶聯物，其中  $J_{CB}$  經由以下結構式中的任一個表示：

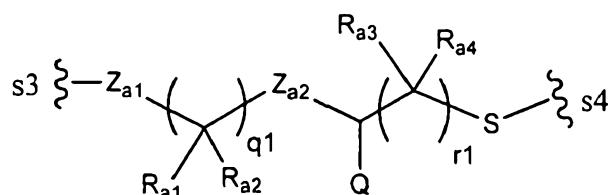




其中  $X_c$  為  $\text{CH}_2$ 、 $\text{O}$  或  $\text{NCH}_3$ ； $U'$  為  $\text{NH}$ 、 $\text{O}$ 、 $\text{S}$  或  $\text{CH}_2$ ； $U$  為  $\text{H}$  或供電子基團； $X_{b1}$  及  $X_{b1}'$  各自獨立地為  $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$  或  $-\text{NH}-$ ； $R^2$  及  $R^2'$  各自獨立地為  $\text{H}$  或烷基(較佳為  $-\text{Me}$ )；且  $R^2$  為  $\text{H}$  或烷基； $s1$  為共價連接至該細胞結合劑之位點；且  $s2$  為共價連接至該基團  $L$  之位點。

17. 如申請專利範圍第 16 項之偶聯物，其中  $J_{CB}'$  為  $s1 \begin{cases} \text{---} & \text{C}=\text{N} \\ \text{H} & \text{---} \end{cases} \text{---} \begin{cases} \text{O} \\ \text{H} \end{cases} \text{---} s2$ 、  
 $s1 \begin{cases} \text{---} & \text{C}=\text{N} \\ \text{H} & \text{---} \end{cases} \text{---} \begin{cases} \text{---} \\ \text{H} \end{cases} \text{---} s2$ 、 $s1 \begin{cases} \text{---} & \text{C}=\text{N} \\ \text{H} & \text{---} \end{cases} \text{---} \begin{cases} \text{---} \\ \text{H} \end{cases} \text{---} s2$ 、  
 $s1 \begin{cases} \text{---} & \text{C}=\text{N} \\ \text{H} & \text{---} \end{cases} \text{---} \begin{cases} \text{---} \\ \text{O} \end{cases} \text{---} s2$  或  $s1 \begin{cases} \text{---} & \text{C}=\text{N} \\ \text{H} & \text{---} \end{cases} \text{---} \begin{cases} \text{---} \\ \text{H} \end{cases} \text{---} \begin{cases} \text{---} \\ \text{O} \end{cases} \text{---} s2$ 。

18. 如申請專利範圍第 1 項至第 17 項中任一項之偶聯物，其中  $-L-J_D'-D$  係由以下結構式表示：



其中：

$s3$  為共價連接至該基團  $J_{CB}'$  之位點；

$s4$  為共價連接至該基團  $D$  之位點；

$Z_{a1}$  為不存在、 $-\text{SO}_2\text{NR}_9-$ 、 $-\text{NR}_9\text{SO}_2-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{NR}_9-$ 、 $-\text{NR}_9-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_p-$   
 $\text{NR}_9-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{NR}_9(\text{CH}_2\text{CH}_2)_p-$ 、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_p-\text{C}(=\text{O})\text{NR}_9-$ 、

-NR<sub>9</sub>C(=O)(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-、-C(=O)-O-或-O-C(=O)-；

Z<sub>a2</sub>為不存在、-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)-；

R<sub>9</sub>為H或視情況經取代之烷基；

p及p'各自獨立地為1至10之整數；

Q為H、帶電荷之取代基或可離子化之基團；

R<sub>a1</sub>、R<sub>a2</sub>、R<sub>a3</sub>、R<sub>a4</sub>在每次出現時獨立地為H或視情況經取代之烷基；

q<sub>1</sub>及r<sub>1</sub>各自獨立地為0至10之整數，條件為q<sub>1</sub>及r<sub>1</sub>不同時為0。

19. 如申請專利範圍第18項之偶聯物，其中Q為i) H；ii) -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iii) -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。

20. 如申請專利範圍第19項之偶聯物，其中Q為-SO<sub>3</sub>H或-CO<sub>2</sub>H，或其醫藥學上可接受之鹽。

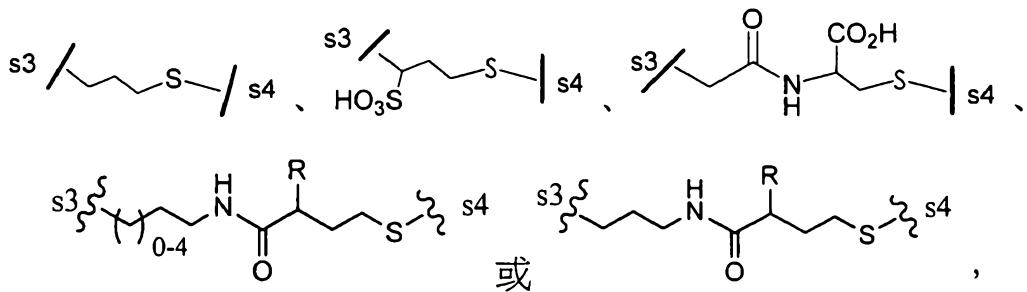
21. 如申請專利範圍第18項至第20項中任一項之偶聯物，其中Z<sub>a1</sub>不存在；且Z<sub>a2</sub>為-C(=O)-NR<sub>9</sub>-或-NR<sub>9</sub>-C(=O)-。

22. 如申請專利範圍第21項之偶聯物，其中R<sub>9</sub>為H。

23. 如申請專利範圍第18項至第20項中任一項之偶聯物，其中Z<sub>a1</sub>及Z<sub>a2</sub>均不存在。

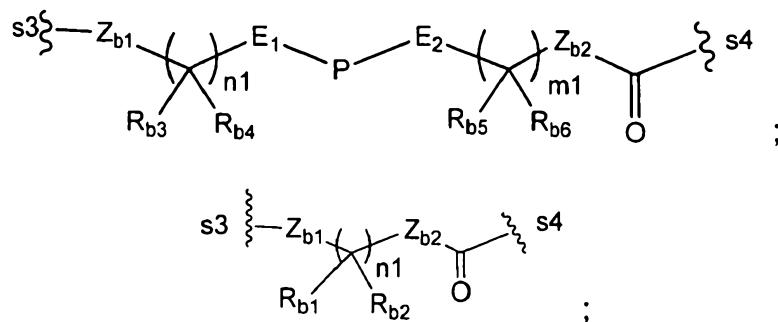
24. 如申請專利範圍第 18 項至第 23 項中任一項之偶聯物，其中  $R_{a1}$ 、 $R_{a2}$ 、 $R_{a3}$  及  $R_{a4}$  均為 -H；且  $q$  及  $r$  各自獨立地為 0 至 4 之整數。

25. 如申請專利範圍第 18 項之偶聯物，其中-L-J<sub>D'</sub>-係由以下結構式表示：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中 R 為 H 或 -SO<sub>3</sub>H。

26. 如申請專利範圍第 1 項至第 17 項中任一項之偶聯物，其中-L-J<sub>D'</sub>-係由以下結構式表示：



其中：

s3 為共價連接至該基團 J<sub>CB'</sub> 之位點；

s4 為共價連接至該基團 D 之位點；

$Z_{b1}$  及  $Z_{b2}$  各自獨立地為不存在、-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)-、-CH<sub>2</sub>-O-、-O-CH<sub>2</sub>-、-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>p</sub>-

或 -(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>p'</sub>-、-NR<sub>9</sub>-C(=O)-CH<sub>2</sub>-或 -CH<sub>2</sub>-C(=O)-NR<sub>9-</sub>，其中 p 及 p'

獨立地為 1 至 1000 之整數；

E<sub>1</sub> 及 E<sub>2</sub> 之一為-C(=O)-，且另一個為-NR<sub>9-</sub>；或 E<sub>1</sub> 及 E<sub>2</sub> 之一為 -C(=O)-

或  $-NR_9-$ ，且另一個不存在；

$R_9$  為 H 或視情況經取代之烷基；

P 為  $[XX]_{1-10}$ ，其中每個 XX 為獨立選擇之胺基酸之殘基，或 P 為  $-(NR^m-CH_2CH_2)_s-$ ；

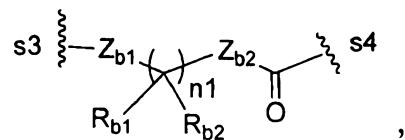
s 為 1 至 5 之整數；

$R^m$  為 H，或視情況經帶電荷之取代基或可離子化之基團取代的烷基；

$R_{b1}$ 、 $R_{b2}$ 、 $R_{b3}$ 、 $R_{b4}$ 、 $R_{b5}$  及  $R_{b6}$  在每次出現時獨立地為 H 或視情況經取代之烷基；

$m_1$  及  $n_1$  在每次出現時獨立地為 0 至 10 之整數。

27. 如申請專利範圍第 26 項之偶聯物，其中-L-J<sub>D'</sub>-係由以下結構式表示：



其中：

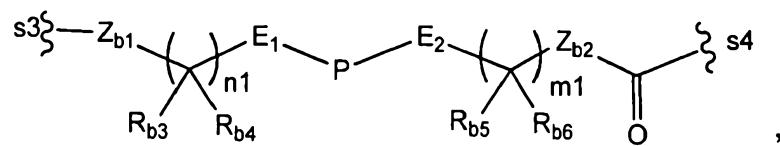
$Z_{b1}$  及  $Z_{b2}$  不存在，或  $Z_{b1}$  及  $Z_{b2}$  之一不存在且另一個為  $-CH_2-O-$  或  $-O-CH_2-$ ；

且

$n_1$  為 1 至 6 之整數。

28. 如申請專利範圍第 27 項之偶聯物，其中  $R_{b1}$  及  $R_{b2}$  均為 H。

29. 如申請專利範圍第 26 項之偶聯物，其中-L-J<sub>D'</sub>-係由以下結構式表示：



其中：

$Z_{b1}$  及  $Z_{b2}$  各自獨立地為不存在、 $-CH_2-O-$ 、 $-O-CH_2-$ 、 $-NR_9-C(=O)-CH_2-$

或 - CH<sub>2</sub>-C(=O)-NR<sub>9-</sub>；且

n<sub>1</sub> 及 m<sub>1</sub> 各自獨立地為 1 至 6 之整數。

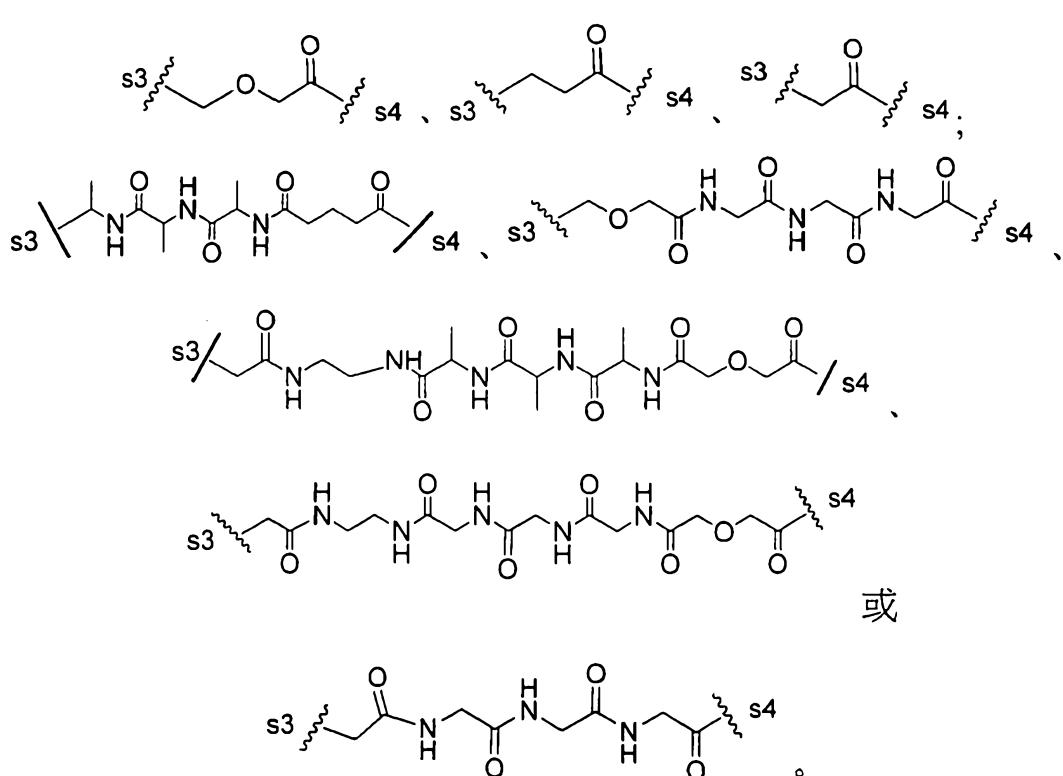
30. 如申請專利範圍第 29 項之偶聯物，其中 Z<sub>b1</sub> 及 Z<sub>b2</sub> 均不存在。
31. 如申請專利範圍第 29 項之偶聯物，其中 Z<sub>b1</sub> 為 - CH<sub>2</sub>-O-；且 Z<sub>b2</sub> 不存在。
32. 如申請專利範圍第 29 項之偶聯物，其中 Z<sub>b1</sub> 為 -CH<sub>2</sub>-C(=O)-NR<sub>9-</sub>；且 Z<sub>b2</sub> 為 -O-CH<sub>2</sub>- 或不存在。
33. 如申請專利範圍第 26 項、第 29 項或第 32 項之偶聯物，其中 R<sub>9</sub> 為 -H。
34. 如申請專利範圍第 26 項及第 29 項至第 33 項中任一項之偶聯物，其中 P 為 [XX]<sub>2-4</sub>。
35. 如申請專利範圍第 34 項之偶聯物，其中 P 為 [XX]<sub>2</sub> 或 [XX]<sub>3</sub>。
36. 如申請專利範圍第 26 項及第 29 項至第 35 項之偶聯物，其中每個 XX 為獨立選擇之胺基酸的殘基，該胺基酸選自：天然存在之胺基酸、合成胺基酸、胺基酸類似物，或以與該等天然存在之胺基酸類似之方式起作用的胺基酸模擬物。
37. 如申請專利範圍第 36 項之偶聯物，其中每個 XX 為獨立選擇之胺基酸的殘基，該胺基酸選自由以下各物組成之群：組胺酸、丙胺酸、異白胺酸、精胺酸、白胺酸、天冬醯胺酸、離胺酸、天冬胺酸、甲硫胺酸、半胱胺酸、苯丙胺酸、麩胺酸、蘇胺酸、麩醯胺酸、色胺酸、甘胺酸、纈胺酸、脯胺酸、絲胺酸、酪胺酸、N-甲基-組胺酸、N-甲基-丙胺酸、N-甲基-異白胺酸、N-甲基-精胺酸、N-甲基-白胺酸、N-甲基-天冬醯胺酸、N-甲基-離胺酸、N-甲基-天冬胺酸、N-甲基-甲硫胺酸、N-甲基-半胱胺酸、N-甲基-苯丙胺酸、N-甲基-麩胺酸、N-甲基-蘇胺酸、N-甲基-

麴醯胺酸、N-甲基-色胺酸、N-甲基-甘胺酸、N-甲基-纈胺酸、N-甲基-脯胺酸、N-甲基-絲胺酸、N-甲基-酪胺酸、羥基脯胺酸、 $\gamma$ -羧基麴胺酸、硒代半胱胺酸、O-磷酸絲胺酸、高絲胺酸、正白胺酸、甲硫胺酸亞礦、甲硫胺酸甲基鎓、瓜胺酸、鳥胺酸、半胱胺酸磺酸、半胱胺酸亞磺酸、3-胺基丙胺酸、3-二甲基胺基丙胺酸、2-胺基-4-(二甲基胺基)丁酸、2,4-二胺基丁酸、2-胺基-6-(二甲基胺基)己酸、2-胺基-5-(二甲基胺基)戊酸及  $\beta$ -丙胺酸，其各自獨立地為 L 或 D 異構體。

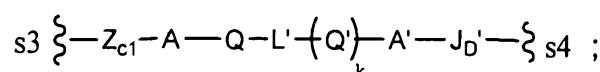
38. 如申請專利範圍第 37 項之偶聯物，其中每個 XX 獨立地為甘胺酸或丙胺酸之殘基。
39. 如申請專利範圍第 26 項及第 29 項至第 38 項之偶聯物，其中 P 為蛋白酶可裂解之肽。
40. 如申請專利範圍第 39 項之偶聯物，其中 P 為腫瘤組織中表現之蛋白酶可裂解之肽。
41. 如申請專利範圍第 39 項之偶聯物，其中 P 為溶酶體蛋白酶可裂解之肽。
42. 如申請專利範圍第 26 項、第 29 項至第 34 項及第 36 項至第 41 項之偶聯物，其中 P 選自由以下各物組成之群：Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Lle-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-N<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: 17)、 $\beta$ -Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 18)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 19)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、

D-Val-D-Arg 、 D-Arg-D-Arg 、 Ala-Ala 、 Ala-D-Ala 、 D-Ala-Ala 及  
D-Ala-D-Ala 、 Gly-Gly-Gly 、 Ala-Ala-Ala 、 d-Ala-Ala-Ala 、 Ala-d-Ala-Ala 、  
Ala-Ala-d-Ala 、 Ala-Val-Cit 及 Ala-Val-Ala 。

43. 如申請專利範圍第 26 項及第 28 項至第 41 項之偶聯物，其中 P 為  
Gly-Gly-Gly 、 Ala-Ala-Ala 、 d-Ala-Ala-Ala 、 Ala-d-Ala-Ala 、 Ala-Val-Ala 、  
Gly-Gly 或 Ala-Ala 。
44. 如申請專利範圍第 26 項及第 34 項至第 43 項中任一項之偶聯物，其中  
-L-J<sub>D'</sub>- 級由以下結構式表示：



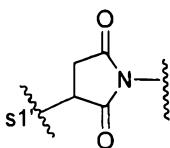
45. 如申請專利範圍第 1 項至第 17 項中任一項之偶聯物，其中-L-J<sub>D'</sub>- 級由  
以下結構式表示：

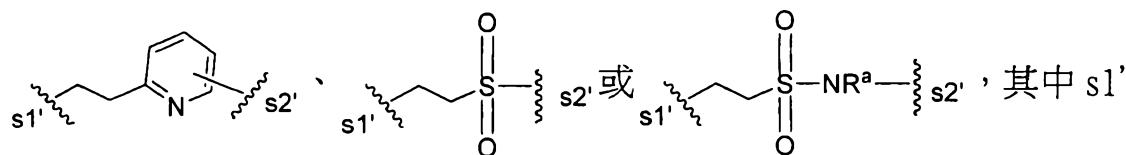


s3 為共價連接至該基團 J<sub>CB'</sub> 之位點；

s4 為共價連接至該基團 D 之位點；

$Z_{c1}$  為不存在、 $-SO_2NR_9-$ 、 $-NR_9SO_2-$ 、 $-C(=O)-NR_9-$ 、 $-NR_9-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-O-$ 、 $-O-C(=O)-$ 、 $-CH_2-O-$ 、 $-O-CH_2-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_p-$ 或 $-(OCH_2CH_2)_p-$ ，其中  $p$  及  $p'$  獨立地為 1 至 1000 之整數；

$J_D$  為   $s1' \text{---} CR^bR^c-C(=O) \text{---} s2'$ 、 $s1' \text{---} CR^bR^c-C(=O)-NR^e \text{---} s2'$ 、



為共價連接至該細胞毒性劑 D 之位點， $s2'$  為共價連接至基團 A' 之位點；

A 及 A' 各自獨立地為視情況經取代之伸烷基、視情況經取代之伸烯基、視情況經取代之伸炔基、視情況經取代之伸環烷基、視情況經取代之伸環烯基或視情況經取代之伸環炔基；

Q 為 $-Z_1-P-Z_2-$ ；

Q' 為 $-Z'_1-P'-Z'_2-$ ；

$Z_1$  及  $Z_2$  之一為 $-C(=O)-$ ，且另一個為 $-NR^h-$ ；

$Z'_1$  及  $Z'_2$  之一為 $-C(=O)-$ ，且另一個為 $-NR^{h'}-$ ；

P 及 P' 各自獨立地為不存在、視情況經取代之伸烷基、 $-(CH_2-CH_2-O)_j-$ 、 $-(O-CH_2-CH_2)_j-$ 或 $[XX]_{1-10}$ ，其中每個 XX 為獨立選擇之胺基酸的殘基；

j 為介於 1 與 500 之間之整數；

k 為 0 或 1；

L 為 $-(CR_5R_6)_v-$ 、 $-(CR_7R_8)_q-N(R^g)-(CR_9R_{10})_r-$ 、 $-(CR_7R_8)_q-C(R^a)(R^g)-(CR_9R_{10})_r$  或 $-(CR_{11}R_{12})_s-N(R^g)-(CR_{13}R_{14})_t-N(R^{g'})-(CR_{15}R_{16})_u-$ ；

$R^g$  及  $R^{g'}$  各自獨立地為 $-(CR_{17}R_{18})_p-Z-V$ ；

$p$  為介於 1 與 5 之間之整數；

$V$  為 H、帶電荷之取代基或可離子化之基團；

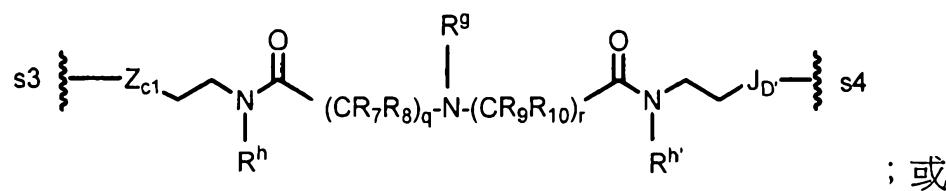
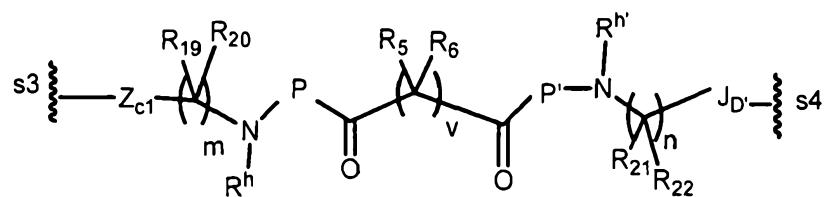
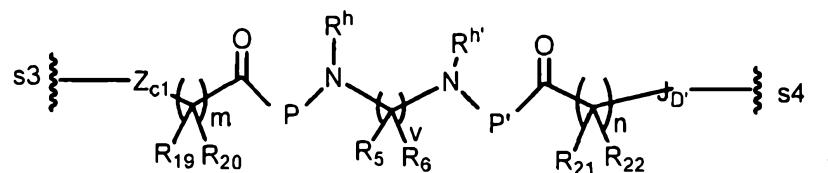
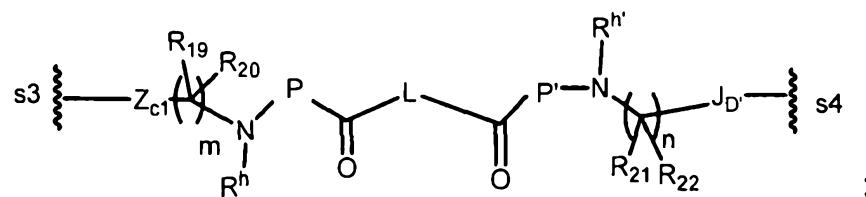
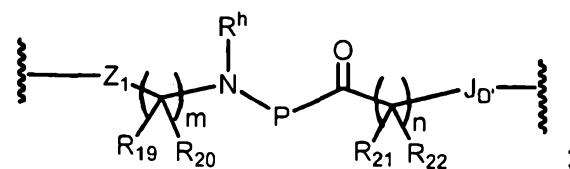
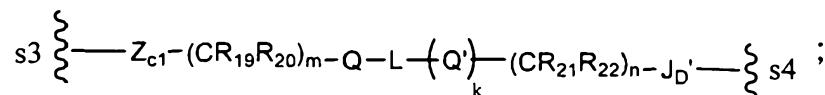
$Z$  為不存在、 $-C(=O)NR^h$ -伸烷基-或 $-NR^h-C(=O)$ -伸烷基-；

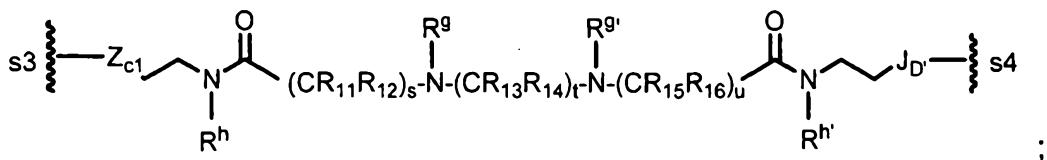
$R^h$  及  $R^{h'}$  在每次出現時獨立地為 H 或視情況經取代之烷基；

$R_s$  至  $R_{18}$  在每次出現時獨立地為 H 或視情況經取代之烷基；

$q$ 、 $r$ 、 $s$ 、 $t$ 、 $u$  及  $v$  各自獨立地為介於 0 與 10 之間之整數。

46. 如申請專利範圍第 45 項之偶聯物，其中 $-L-J_D'$  -係由以下結構式表示：





其中：

$R_{19}$  至  $R_{22}$  在每次出現時獨立地為 H 或視情況經取代之烷基，

m 及 n 各自獨立地為 0 至 10。

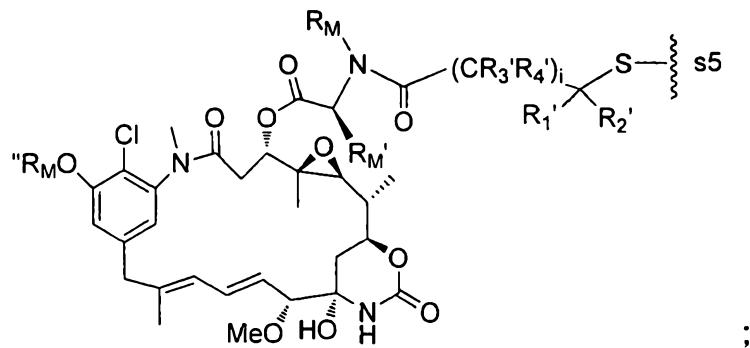
47. 如申請專利範圍第 46 項之偶聯物，其中  $R_{19}$  至  $R_{22}$  各自為 H； $R_5$  及  $R_6$  各自為 H； $R_7$  至  $R_{10}$  各自為 H；且  $R_{11}$  至  $R_{16}$  各自為 H。
48. 如申請專利範圍第 45 項至第 47 項之偶聯物，其中 P 及 P' 在每次出現時獨立地為  $[XX]_{1-10}$ 。
49. 如申請專利範圍第 45 項至第 48 項之偶聯物，其中每個 XX 為獨立選擇之胺基酸的殘基，該胺基酸選自：天然存在之胺基酸、合成胺基酸、胺基酸類似物，或以與該等天然存在之胺基酸類似之方式起作用的胺基酸模擬物。
50. 如申請專利範圍第 49 項之偶聯物，其中每個 XX 為獨立選擇之胺基酸的殘基，該胺基酸選自由以下各物組成之群：組胺酸、丙胺酸、異白胺酸、精胺酸、白胺酸、天冬醯胺酸、離胺酸、天冬胺酸、甲硫胺酸、半胱胺酸、苯丙胺酸、麩胺酸、蘇胺酸、麩醯胺酸、色胺酸、甘胺酸、纈胺酸、脯胺酸、絲胺酸、酪胺酸、N-甲基-組胺酸、N-甲基-丙胺酸、N-甲基-異白胺酸、N-甲基-精胺酸、N-甲基-白胺酸、N-甲基-天冬醯胺酸、N-甲基-離胺酸、N-甲基-天冬胺酸、N-甲基-甲硫胺酸、N-甲基-半胱胺酸、N-甲基-苯丙胺酸、N-甲基-麩胺酸、N-甲基-蘇胺酸、N-甲基-麩醯胺酸、N-甲基-色胺酸、N-甲基-甘胺酸、N-甲基-纈胺酸、N-甲基-

脯胺酸、N-甲基-絲胺酸、N-甲基-酪胺酸、羥基脯胺酸、 $\gamma$ -羧基麩胺酸、硒代半胱胺酸、O-磷酸絲胺酸、高絲胺酸、正白胺酸、甲硫胺酸亞礦、甲硫胺酸甲基鎂、瓜胺酸、鳥胺酸、半胱胺酸礦酸、半胱胺酸亞礦酸、3-胺基丙胺酸、3-二甲基胺基丙胺酸、2-胺基-4-(二甲基胺基)丁酸、2,4-二胺基丁酸、2-胺基-6-(二甲基胺基)己酸、2-胺基-5-(二甲基胺基)戊酸及  $\beta$ -丙胺酸，其各自獨立地為 L 或 D 異構體。

51. 如申請專利範圍第 50 項之偶聯物，其中每個 XX 為獨立選擇之甘胺酸或丙胺酸之殘基。
52. 如申請專利範圍第 45 項至第 51 項中任一項之偶聯物，其中 P 及 P' 各自為蛋白酶可裂解之肽。
53. 如申請專利範圍第 52 項之偶聯物，其中 P 及 P' 各自為腫瘤組織中表現之蛋白酶可裂解之肽。
54. 如申請專利範圍第 52 項之偶聯物，其中 P 及 P' 各自為溶酶體蛋白酶可裂解之肽。
55. 如申請專利範圍第 45 項至第 54 項中任一項之偶聯物，其中 P 及 P' 各自選自由以下各物組成之群：Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Lle-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-N<sup>9</sup>-甲苯礦醯基-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: 17)、 $\beta$ -Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 18)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 19)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、

D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala 及 D-Ala-D-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。

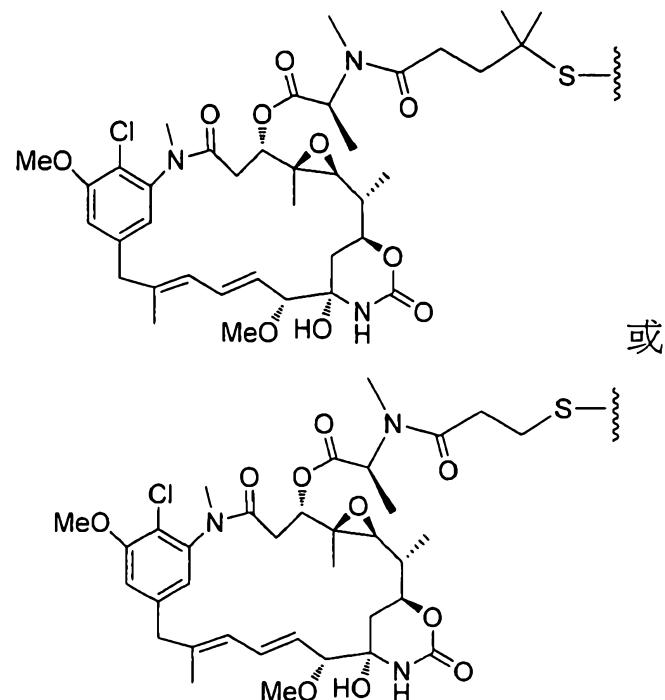
56. 如申請專利範圍第 45 項至第 54 項中任一項之偶聯物，其中 P 及 P' 各自為 Gly-Gly-Gly、Ala-Ala-Ala、D-Ala-Ala-Ala、Ala-D-Ala-Ala、Ala-Val-Ala 或  $\beta$ -Ala-Gly-Gly-Gly。
57. 如申請專利範圍第 1 項至第 56 項中任一項之偶聯物，其中 D 為類美登素。
58. 如申請專利範圍第 1 項至第 25 項及第 45 項至第 56 項中任一項之偶聯物，其中 D 為由以下結構式表示之類美登素：



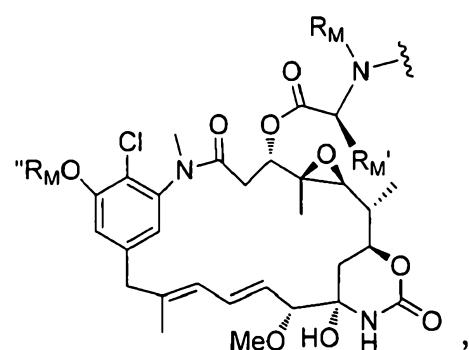
其中：

$R_M$ 、 $R_M'$  及  $R_M''$  在每次出現時獨立地為 H 或視情況經取代之烷基；  
 $R_1'$ 、 $R_2'$ 、 $R_3'$  及  $R_4'$  在每次出現時獨立地為 H、視情況經取代之烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之環烷基、視情況經取代之雜環基、視情況經取代之芳基或視情況經取代之雜芳基；  
*i* 為介於 0 與 15 之間之整數；且  
 s5 為共價連接至該基團  $J_b'$  之位點。

59. 如申請專利範圍第 58 項之偶聯物，其中 D 係由以下結構式表示：

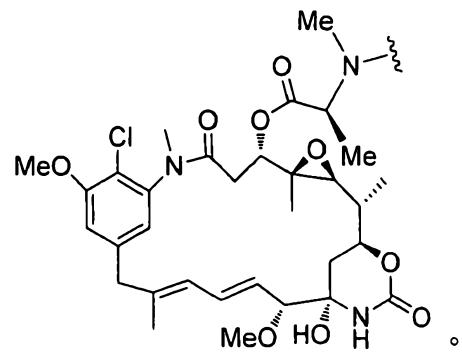


60. 如申請專利範圍第 1 項至第 17 項及第 26 項至第 44 項中任一項之偶聯物，其中 D 為由以下結構式表示之類美登素：

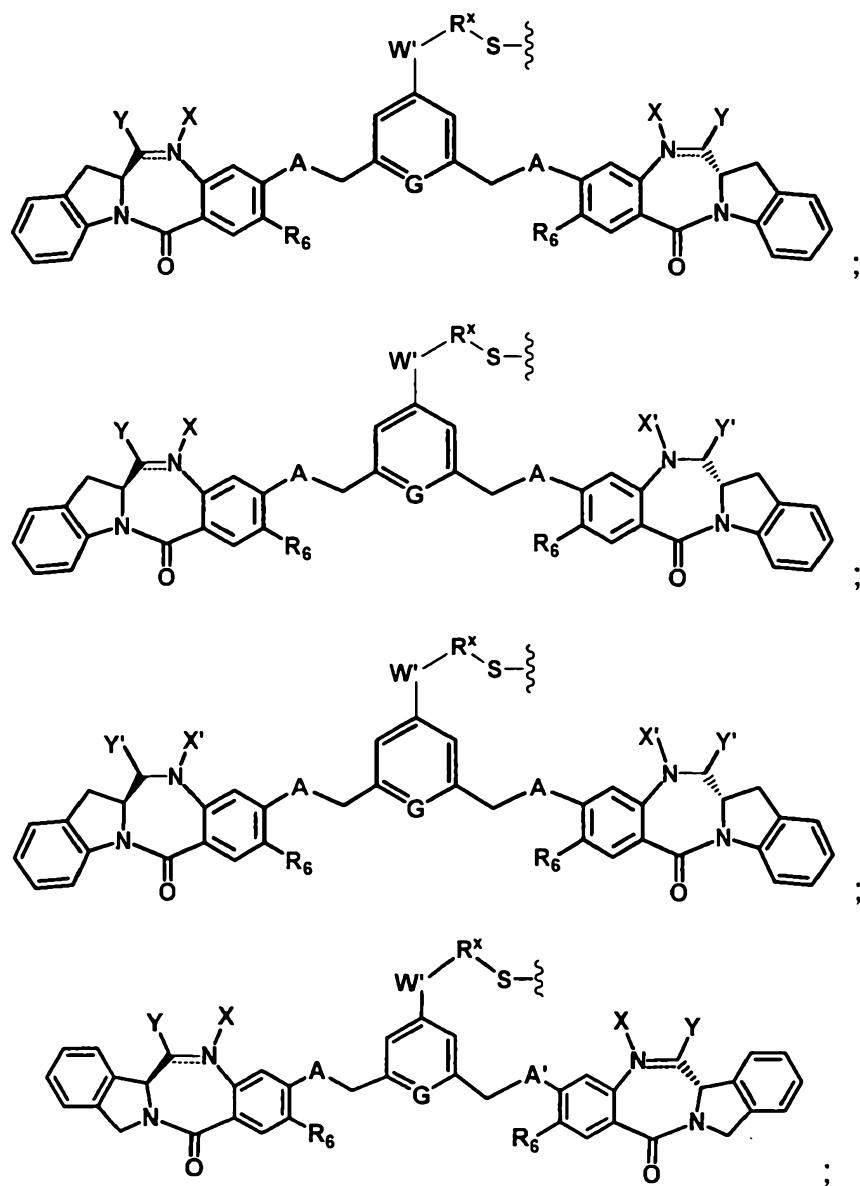


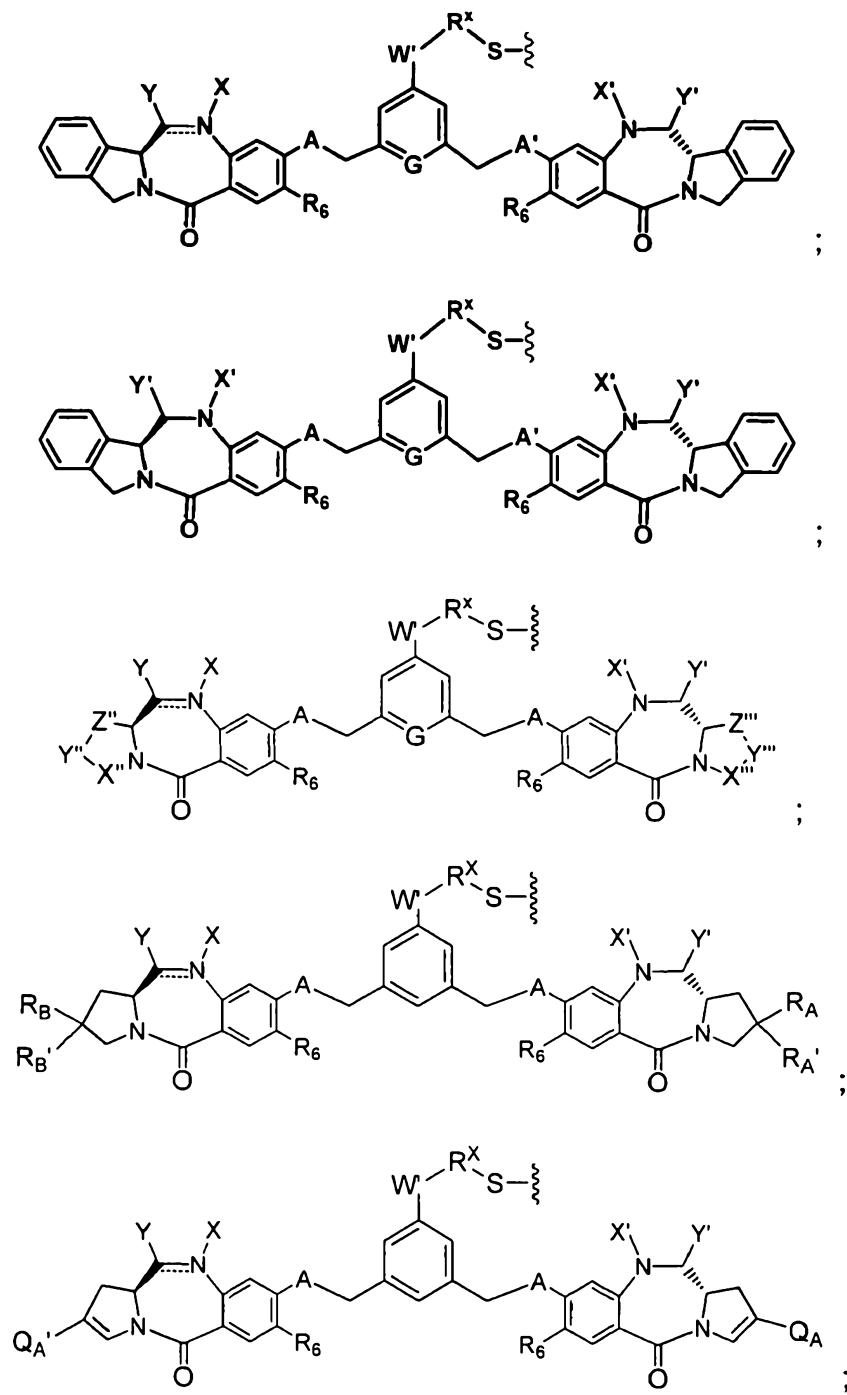
其中： $R_M$ 、 $R_M'$  及  $R_M''$  在每次出現時獨立地為 H 或視情況經取代之烷基；且  $s5$  為共價連接至該基團  $J_D'$  之位點。

61. 如申請專利範圍第 60 項之偶聯物，其中 D 係由以下結構式表示：



62. 如申請專利範圍第 1 項至第 56 項中任一項之偶聯物，其中 D 為苯并二氮呑化合物。
63. 如申請專利範圍第 1 項至第 17 項及第 45 項至第 56 項中任一項之偶聯物，其中 D 係由以下結構式表示：





其中：

在 N 與 C 之間之雙線=表示單鍵或雙鍵，條件為當其為雙鍵時，X 不存在且 Y 為-H，並且當其為單鍵時，X 係選自-H、鍵結至該反應性基團之連接基團或胺保護基(較佳 X 為-H)；

Y 係選自-H、-OR、-OCOR'、-SR、-NR'、R''、-SO<sub>3</sub>M、-SO<sub>2</sub>M 或-OSO<sub>3</sub>M，其中 M 為-H 或陽離子，諸如 Na<sup>+</sup>或 K<sup>+</sup>；

R 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，或 PEG 基團-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>，其中 n 為 1 至 24 之整數，且 R<sup>c</sup>為具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或分支鏈烷基；

R' 與 R" 相同或不同，且選自-H；-OH；-OR；-NRR<sup>e</sup>；-COR；視情況經取代的具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；視情況經取代的具有 6 至 18 個碳原子之芳基；視情況經取代的具有 1 至 6 個選自 O、S、N 及 P 之雜原子之 3 頁至 18 頁雜環；PEG 基團-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>，其中 n 為 1 至 24 之整數，較佳 n 為 2、4 或 8；且 R<sup>e</sup>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；或 PEG 基團-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>；

X' 紣選自由以下各物組成之群：-H；-OH；經取代或未經取代的具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；苯基；及胺保護基；

Y' 索選自由以下各物組成之群：-H；側氧基；經取代或未經取代的具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；

A 及 A' 紴選自-O-及-S-；

W' 不存在，或選自-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，或選自具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基；R<sup>e</sup>為-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；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 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基，視情況帶有二級胺基(例如-NHR<sup>101</sup>)或三級胺基

( $-NR^{101}R^{102}$ )；或者 5 員或 6 員含氮雜環，諸如哌啶或嗎啉，其中  $R^{101}$  及  $R^{102}$  各自獨立地為具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；且

$G$  係選自-CH-或-N-；

$X'$ ，與  $X''$ ，相同或不同，且獨立地選自- $(CH_2)_n-$ 、 $-NR'-$ 、 $-CO-$ 、 $-BH-$ 、 $-SO-$ 或 $-SO_2-$ ；

$Y'$ ，與  $Y''$ ，相同或不同，且獨立地選自-O、 $-(CH_2)_n-$ 、 $-NR'-$ 或-S-；

$Z'$ ，與  $Z''$ ，相同或不同，且獨立地選自- $(CH_2)_n-$ 、 $-CR_7'R_8'-$ 、 $-NR_9'-$ 、 $-O-$ 及-S-；

$n'$  係選自 0、1、2 及 3；

$R_7'$  與  $R_8'$  相同或不同，並且各自獨立地選自-H、-OH、-SH、-COOH、 $-NHR'$ 、聚乙二醇單元- $(OCH_2CH_2)_n-$ 、胺基酸、帶有 2 至 6 個胺基酸之肽單元、視情況經取代的具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基；

$R_9'$  獨立地選自-H；視情況經取代的具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基；聚乙二醇單元- $(OCH_2CH_2)_n-$ ；

$R_A$ 、 $R_{A'}$ 、 $R_B$  及  $R_{B'}$  相同或不同，並且各自獨立地選自由以下各物組成之群：-H、鹵基，或視情況經取代的具有 1 至 10 個碳原子之分支鏈、直鏈或環狀烷基；或  $R_A$  與  $R_{A'}$  及/或  $R_B$  與  $R_{B'}$  一起分別形成含有雙鍵之基團=B 及=B'；

=B 與=B' 相同或不同，且獨立地選自視情況經取代的分支鏈或直鏈烯基或羰基；

$Q_A$  為  $Q_{A1}$ -Ar- $Q_{A2}$ ；

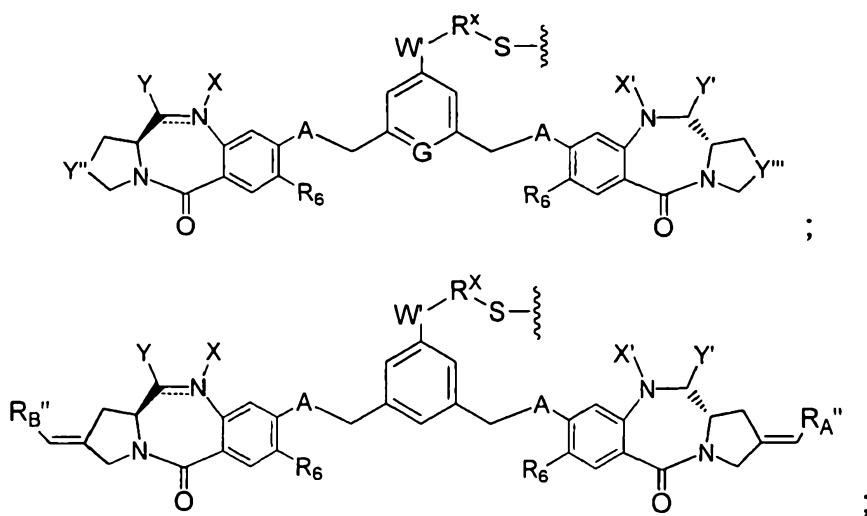
$Q_A'$  為  $Q_{A1}'$ -Ar'- $Q_{A2}'$ ；

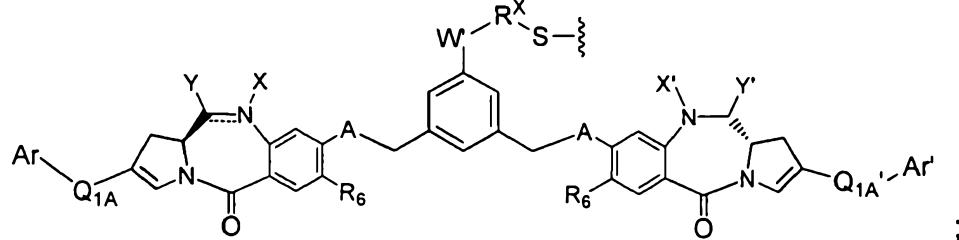
$Q_{A1}$  及  $Q_{A1}'$  各自獨立地為不存在、具有 1 至 6 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基，或-CH=CH 單元；

Ar 及 Ar' 各自獨立地不存在，或表示芳基；

$Q_{A2}$  及  $Q_{A2}'$  各自獨立地選自-H；與該反應性基團鍵結之連接基團；經取代或未經取代的具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；聚乙二醇單元- $R^c$ -(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- $R^c$ ；或選自鹵素、胍鎘[-NH(C=NH)NH<sub>2</sub>]、-OR、-NR' R' '、-NO<sub>2</sub>、-NCO、-NR' COR' '、-SR、由-SOR' 表示之亞礦、由-SO<sub>2</sub>R' 表示之礦、礦酸酯基-SO<sub>3</sub>M、硫酸酯基-OSO<sub>3</sub>M、由 SO<sub>2</sub>NR' R' ' 表示之礦醯胺、氰基、疊氨基、-COR' '、-OCOR' 或-OCONR' R' ' 之取代基；且  $R^c$  不存在，或選自具有 1 至 5 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基。

64. 如申請專利範圍第 63 項之偶聯物，其中 D 級由以下結構式表示：





或其醫藥學上可接受之鹽，其中  $R_A''$  與  $R_B''$  相同或不同，且選自-H 及 -Me。

65. 如申請專利範圍第 63 項之偶聯物，其中：

在 N 與 C 之間之雙線=表示單鍵或雙鍵，條件為當其為雙鍵時，X 不存在且 Y 為-H，且當其為單鍵時，X 為-H；Y 為-OH 或-SO<sub>3</sub>M；

M 為-H 或醫藥學上可接受之陽離子(例如 Na<sup>+</sup>)；

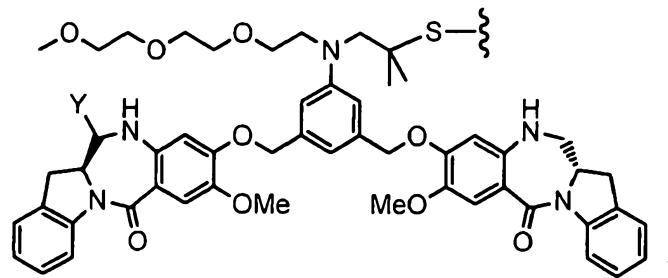
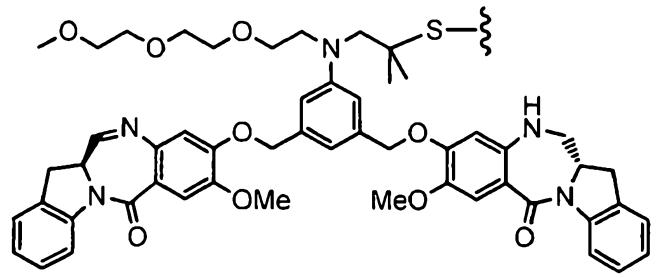
X' 及 Y' 均為-H；

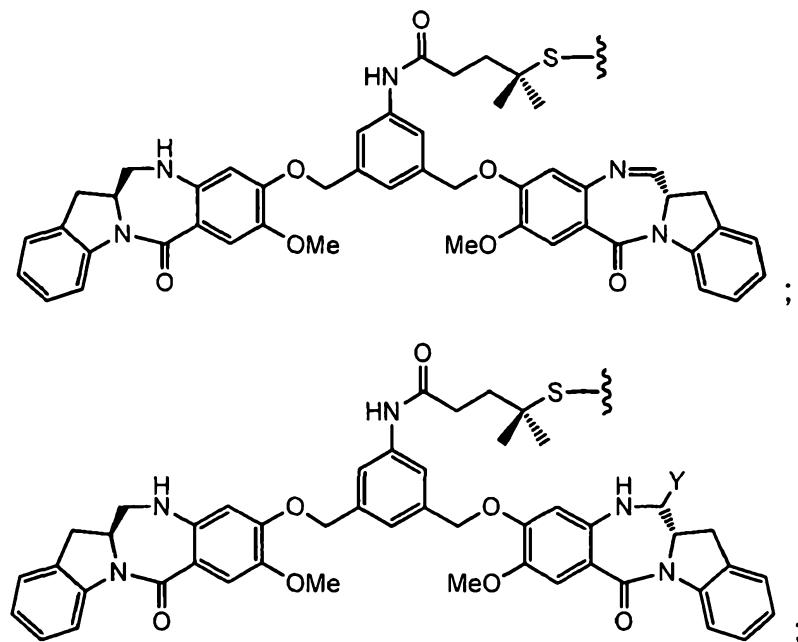
A 及 A' 均為-O-；

$R_6$  為-OMe；且

$R^x$  為具有 1 至 6 個碳原子之直鏈或分支鏈烷基。

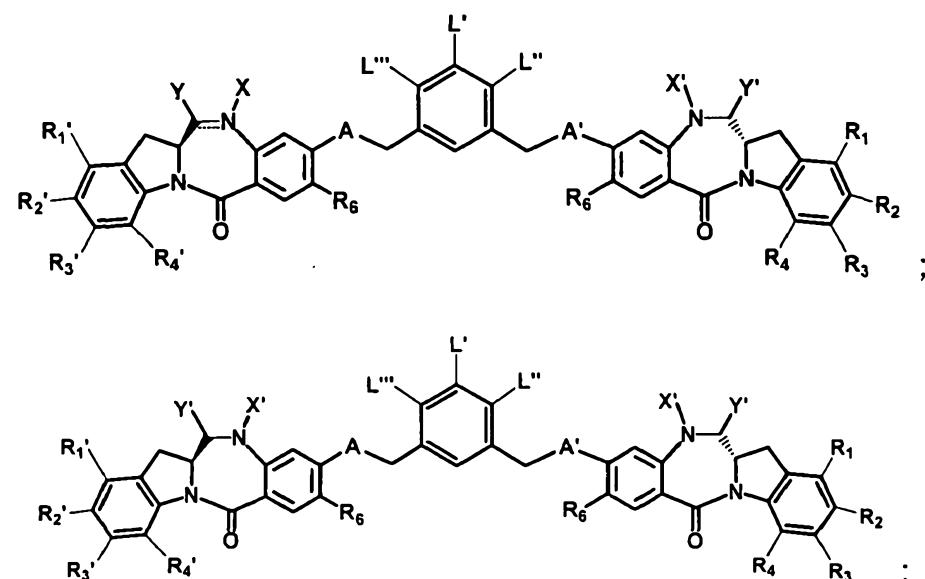
66. 如申請專利範圍第 65 項之偶聯物，其中 D 係由以下結構式表示：

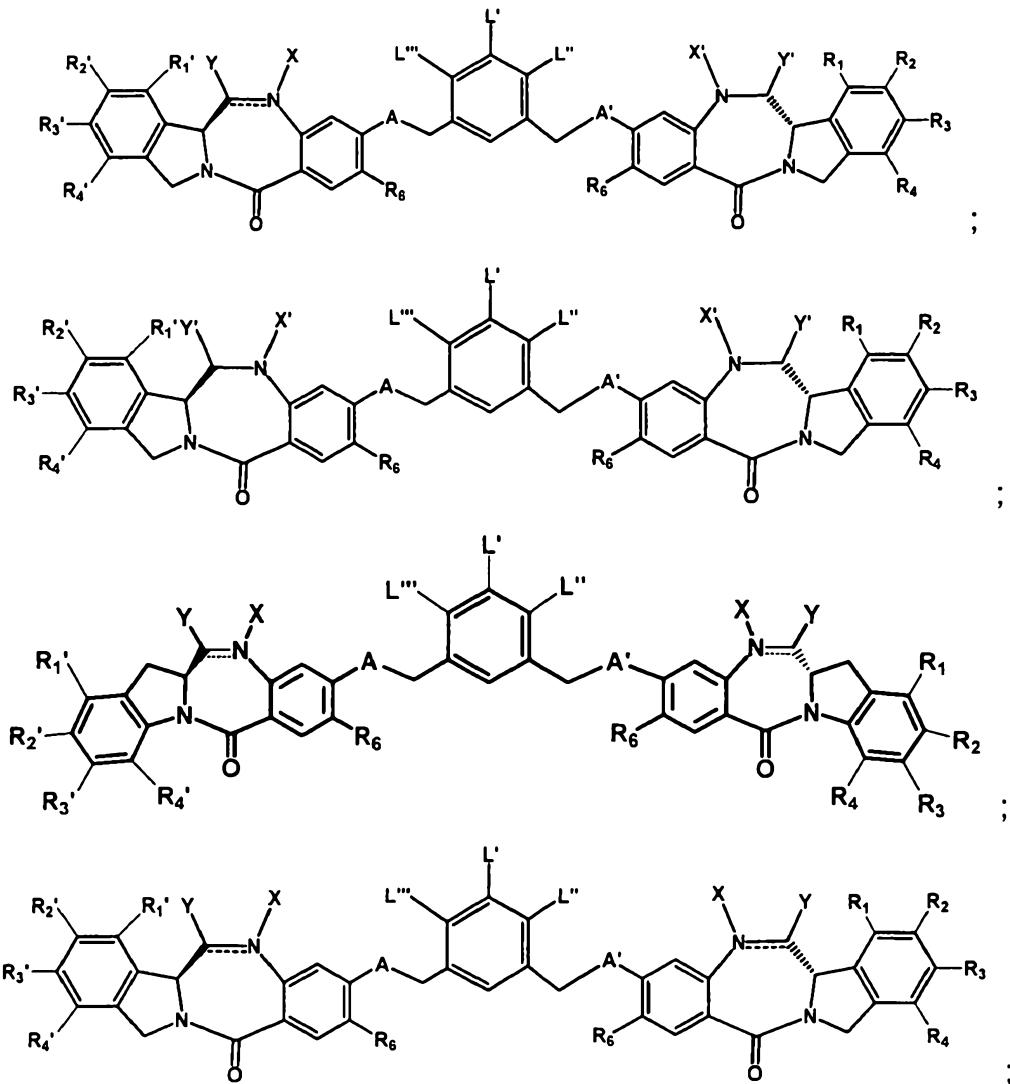




或其醫藥學上可接受之鹽，其中 Y 為 -H 或-SO<sub>3</sub>M，且 M 為 H<sup>+</sup>或陽離子。

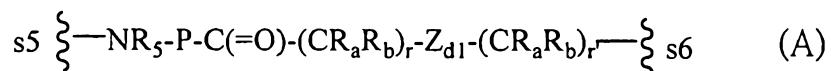
67. 如申請專利範圍第 63 項至第 66 項中任一項之偶聯物，其中 Y 為-SO<sub>3</sub>M，且 M 為 H<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>或 K<sup>+</sup>。
68. 如申請專利範圍第 1 項至第 17 項中任一項之偶聯物，其中-L-J<sub>D</sub>-為鍵，且 D 係由以下結構式表示：





或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

$L'$ 、 $L''$ 及 $L'''$ 之一係由下式表示：



且其餘兩個相同或不同，且獨立地選自-H；視情況經取代的具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；聚乙二醇單元  $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$ ；鹵素；胍鎓  $[-NH(C=NH)NH_2]$ ； $-OR$ ； $-NR' R''$ ； $-NO_2$ ； $-NR' COR''$ ； $-SR$ ； $-SOR'$ ； $-SO_2R'$ ； $-SO_3H$ ； $-OSO_3H$ ； $-SO_2NR' R''$ ；氰基；疊氮基； $-COR'$ ； $-OCOR'$ ；及 $-OCONR' R''$ ； $Z_{d1}$ 為不存在、 $-C(=O)-NR_9-$ 或 $-NR_9-C(=O)-$ ；

P 為胺基酸殘基或含有介於 2 至 20 個之間之胺基酸殘基的肽；

R<sub>a</sub> 及 R<sub>b</sub> 在每次出現時獨立地為 -H、(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基或帶電荷之取代基，或可離子化之基團 Q；

r 及 r' 獨立地為 1 至 6 之整數；

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

Y 為選自以下之離去基團：-OR、-OCOR'、-OCOOR'、-OCONR' R'、-NR' R'、-NR' COR'、-NR' NR' R'、視情況經取代之 5 脫或 6 脫含氮雜環(例如，經由氮原子附接之哌啶、四氫吡咯、吡唑、嗎啉等)、由-NR' (C=NH)NR' R' 表示之胍鎓、胺基酸或由-NRCOP' 表示之肽、-SR、-SOR'、鹵素、氰基、疊氮基、-OSO<sub>3</sub>H、亞硫酸酯基(-SO<sub>3</sub>H 或-SO<sub>2</sub>H)、偏亞硫酸酯(H<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)、單-、二-、三-及四-硫代磷酸酯(PO<sub>3</sub>SH<sub>3</sub>、PO<sub>2</sub>S<sub>2</sub>H<sub>2</sub>、POS<sub>3</sub>H<sub>2</sub>、PS<sub>4</sub>H<sub>2</sub>)、硫代磷酸酯(R<sup>i</sup>O)<sub>2</sub>PS(OR<sup>j</sup>)、RS-、R<sup>i</sup>SO、R<sup>i</sup>SO<sub>2</sub>、R<sup>i</sup>SO<sub>3</sub>、硫代硫酸酯(HS<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)、連二亞硫酸酯(HS<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)、二硫代磷酸酯(P(=S)(OR<sup>k</sup>)(S)(OH))、羥肟酸(R<sup>k</sup> C(=O)NOH)及甲醛次硫酸根(HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub><sup>-</sup>)，或其混合物，其中 R<sup>i</sup> 為具有 1 至 10 個碳原子之直鏈或分支鏈烷基，且經至少一個選自-N(R<sup>j</sup>)<sub>2</sub>、-CO<sub>2</sub>H、-SO<sub>3</sub>H 及-PO<sub>3</sub>H 之取代基取代；R<sup>i</sup> 可進一步視情況經本文關於烷基所描述之取代基取代；R<sup>j</sup> 為具有 1 至 6 個碳原子之直鏈或分支鏈烷基；R<sup>k</sup> 為具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基，芳基、雜環基或雜芳基；

P' 為胺基酸殘基或含有介於 2 至 20 個之間之胺基酸殘基的肽；  
 R 在每次出現時獨立地選自由以下各物組成之群：-H；視情況經取代的具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；聚乙二醇單元-(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一個或多個獨立地選自氮、氧及硫之雜原子的 5 員至 18 員雜芳基環；或視情況經取代的含有 1 至 6 個獨立地選自 O、S、N 及 P 之雜原子的 3 員至 18 員雜環；  
 R' 及 R'' 各自獨立地選自-H；-OH；-OR；-NHR；-NR<sub>2</sub>；-COR；視情況經取代的具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；聚乙二醇單元-(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 1 至 6 個獨立地選自 O、S、N 及 P 之雜原子的 3 員至 18 員雜環；  
 R<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；  
 n 為 1 至 24 之整數；  
 X' 係選自-H；胺保護基；視情況經取代的具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；聚乙二醇單元-(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一個或多個獨立地選自氮、氧及硫之雜原子的 5 員至 18 員雜芳基環；及視情況經取代的含有 1 至 6 個獨立地選自 O、S、N 及 P 之雜原子的 3 員至 18 員雜環；  
 Y' 係選自-H；側氧基；視情況經取代的具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；視情況經取代之 6 員至 18 員芳基；視情況經取代的含有一個或多個獨立地選自氮、氧及硫之雜原子的 5 員

至 18 員雜芳基環；視情況經取代的含有 1 至 6 個雜原子之 3 員至 18 員雜環；

$R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_1'$ 、 $R_2'$ 、 $R_3'$  及  $R_4'$  各自獨立地選自由以下各物組成之群：-H；視情況經取代的具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；聚乙二醇單元-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>；鹵素；胍鎘[-NH(C=NH)NH<sub>2</sub>]；-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；疊氨基；-COR'；-OCOR'；及-OCONR' R'；

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

A 與 A' 相同或不同，且獨立地選自-O-、側氨基(-C(=O)-)、-CRR' O-、-CRR' -、-S-、-CRR' S-、-NR<sub>s</sub> 及-CRR' N(R<sub>s</sub>)-；且 R<sub>s</sub> 及 R<sub>9</sub> 各自獨立地為-H 或視情況經取代的具有 1 至 10 個碳原子之直鏈或分支鏈烷基；且其餘變數係如以上在第二實施例或第 1 個具體實施例中所描述。

69. 如申請專利範圍第 68 項之偶聯物，其中 L' 由式(A)表示，且 L'' 及 L''' 均為-H。

70. 如申請專利範圍第 68 項或第 69 項之偶聯物，其中：

在 N 與 C 之間之雙線=表示單鍵或雙鍵，條件為當其為雙鍵時，X 不存在且 Y 為-H，且當其為單鍵時，X 為-H，Y 為-OH 或-SO<sub>3</sub>M；

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

$R_6$  為-OMe；

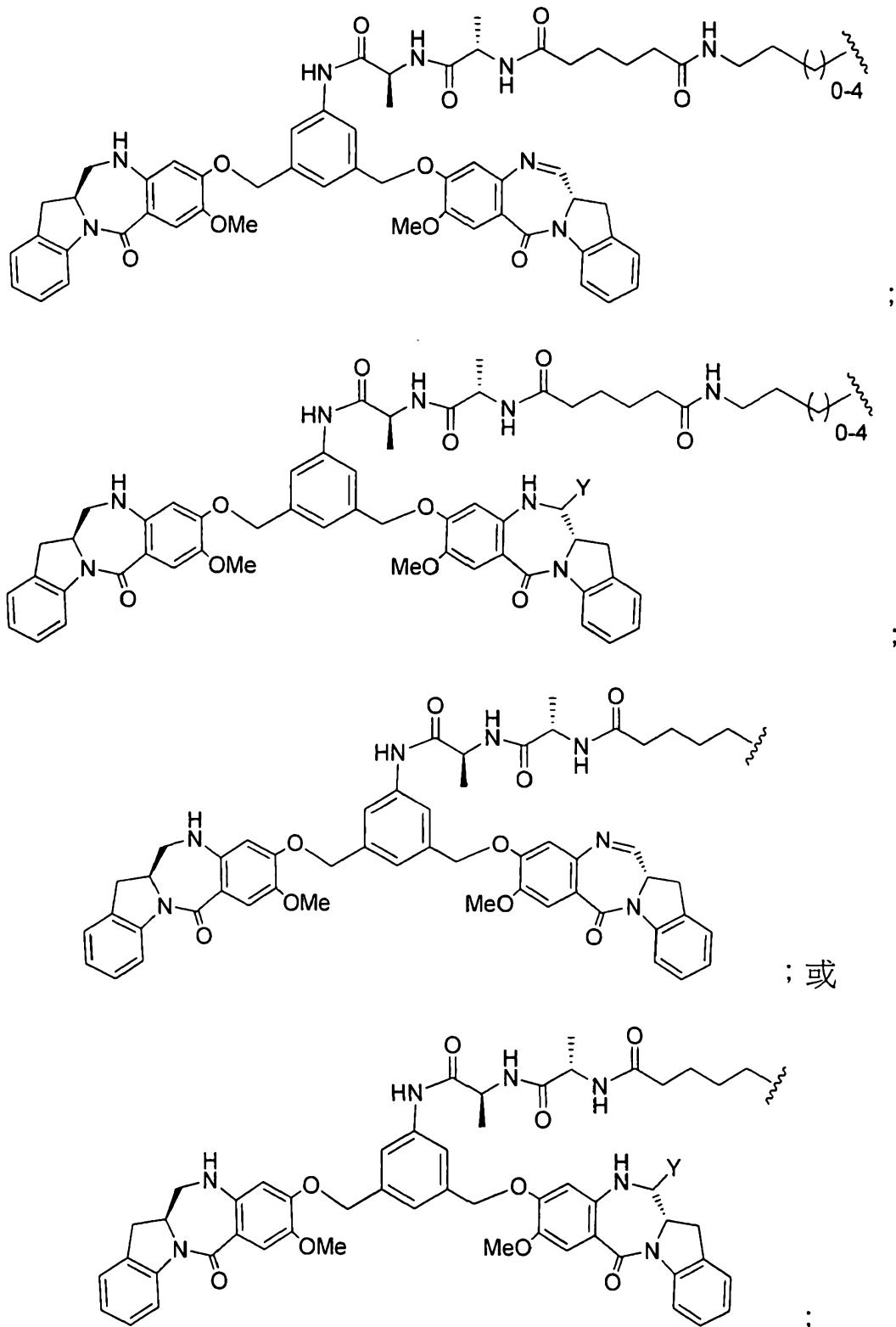
X' 及 Y' 均為-H；

A 及 A' 為-O-；且

M 為 H<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>或 K<sup>+</sup>。

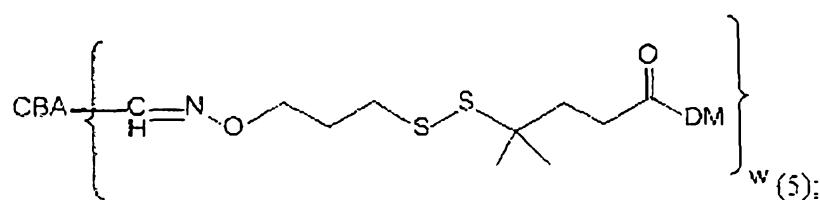
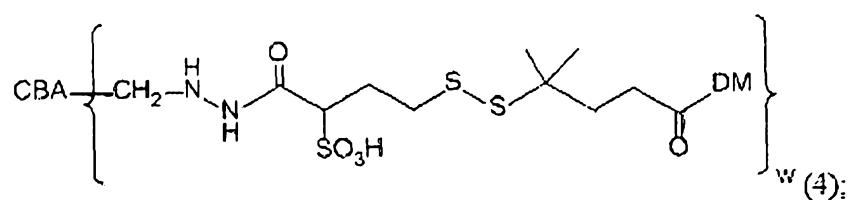
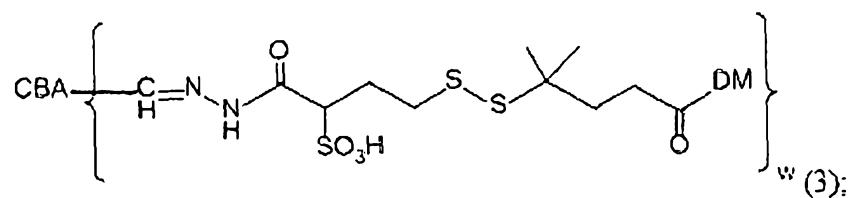
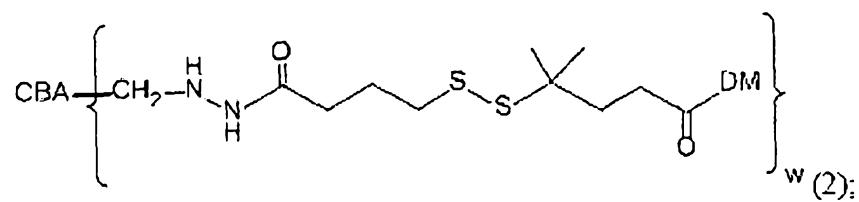
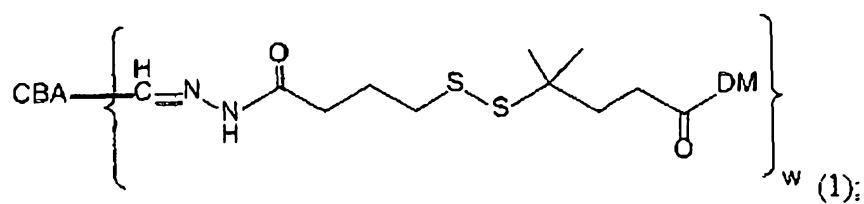
71. 如申請專利範圍第 68 項至第 70 項中任一項之偶聯物，其中 R<sub>a</sub>及 R<sub>b</sub>均為-H。
72. 如申請專利範圍第 68 項至第 71 項中任一項之偶聯物，其中 R<sub>s</sub>及 R<sub>o</sub>各自獨立地為 H 或 Me。
73. 如申請專利範圍第 72 項之偶聯物，其中 R<sub>s</sub>及 R<sub>o</sub>均為 H。
74. 如申請專利範圍第 68 項至第 73 項中任一項之偶聯物，其中 P 為含有 2 至 10 個胺基酸殘基之肽。
75. 如申請專利範圍第 74 項之偶聯物，其中 P 為含有 2 至 5 個胺基酸單元之肽。
76. 如申請專利範圍第 75 項之偶聯物，其中 P 係選自 Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-N<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: 17)、β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 18) 及 Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 19)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala 及 D-Ala-D-Ala。
77. 如申請專利範圍第 76 項之偶聯物，其中 P 為 Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala 及 D-Ala-D-Ala。

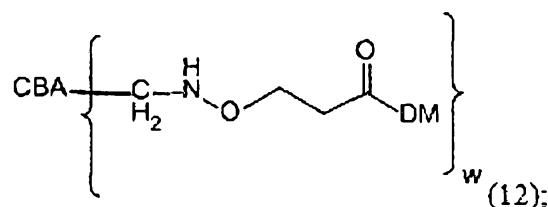
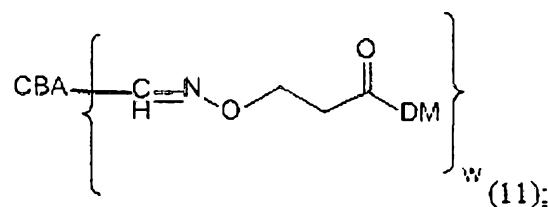
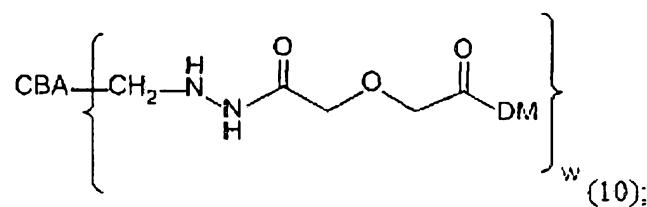
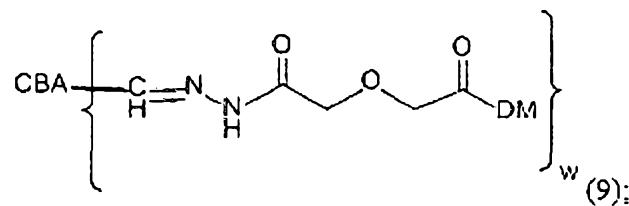
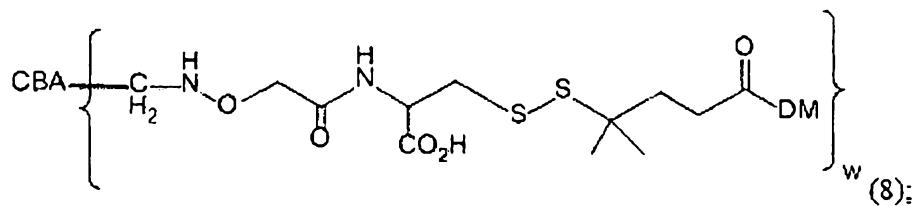
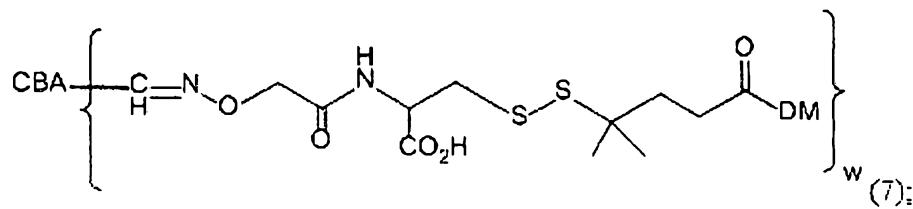
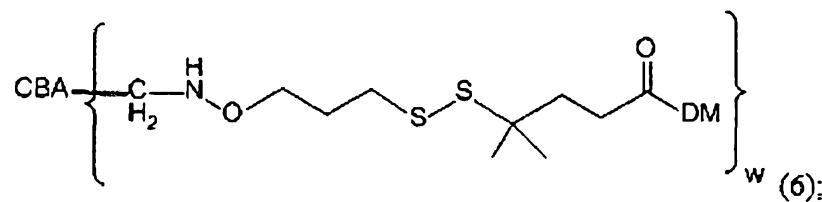
78. 如申請專利範圍第 68 項之偶聯物，其中 - L-J<sub>D</sub> - D 係由以下結構式表示：

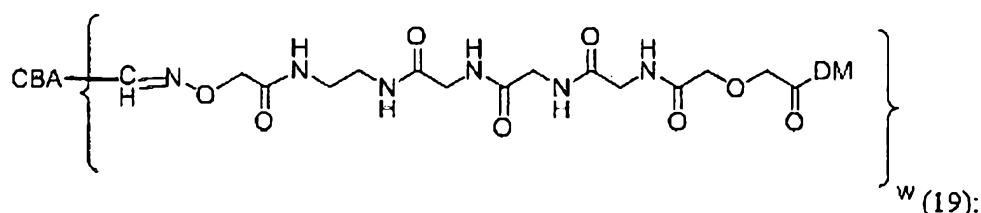
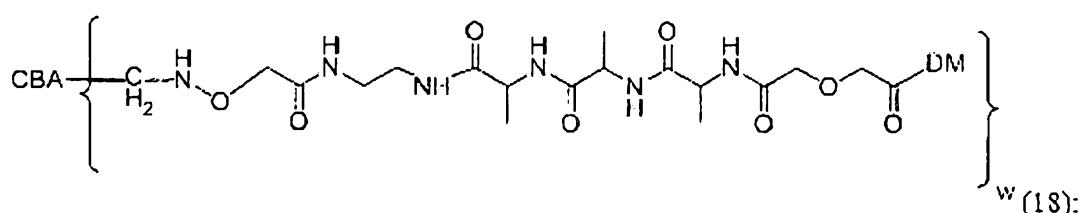
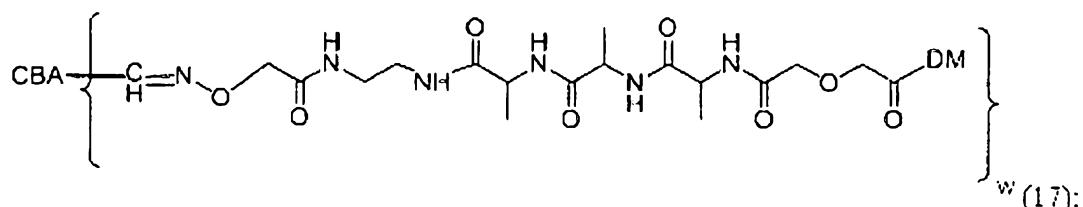
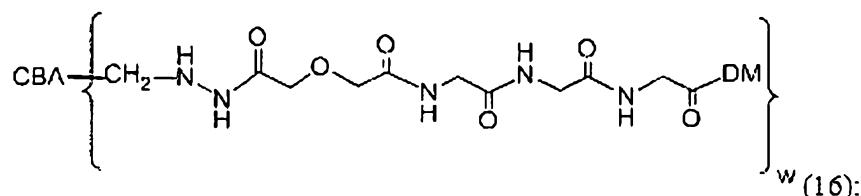
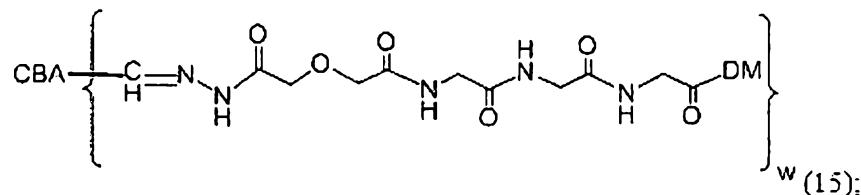
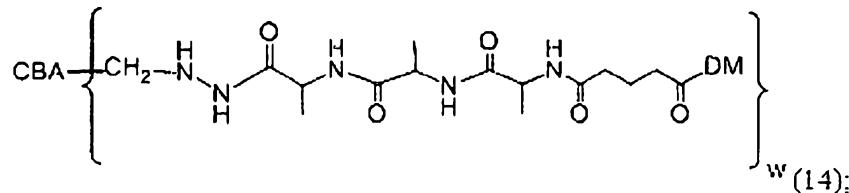
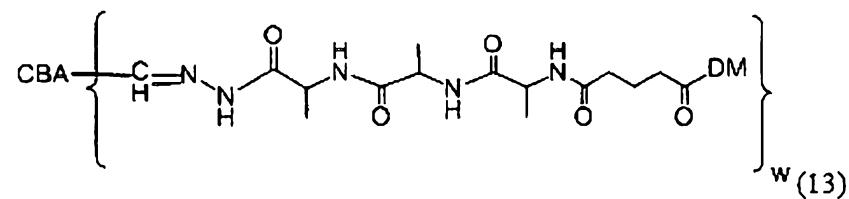


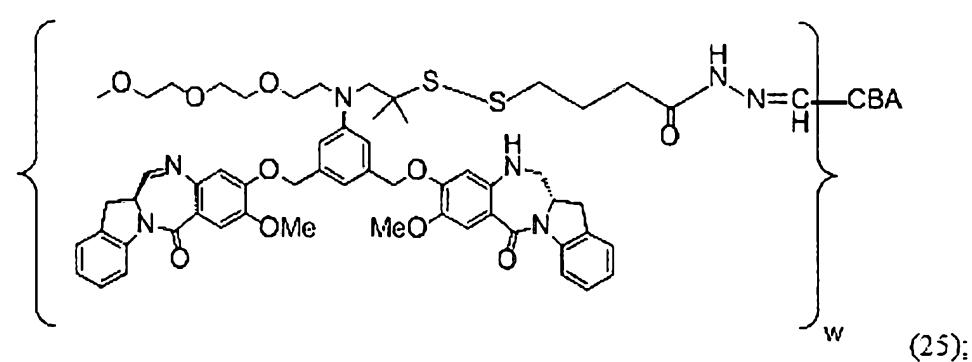
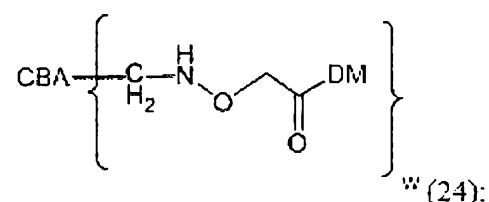
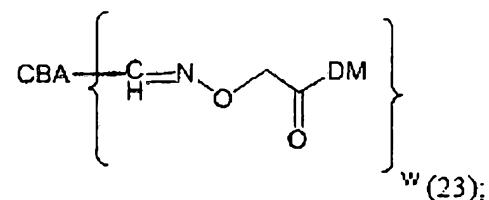
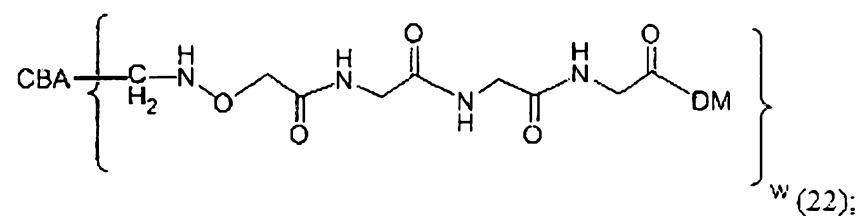
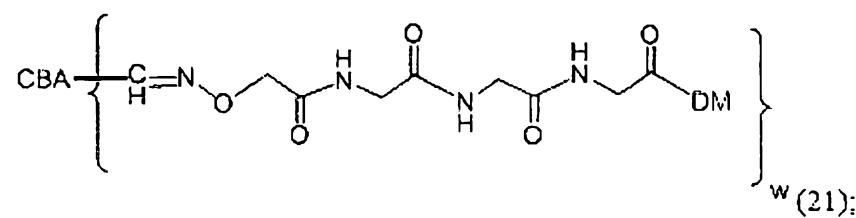
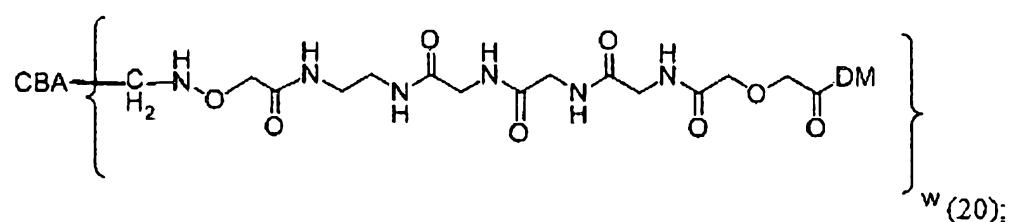
或其醫藥學上可接受之鹽，其中 Y 為 - H 或 -SO<sub>3</sub>M，且 M 為 H<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>或 K<sup>+</sup>。

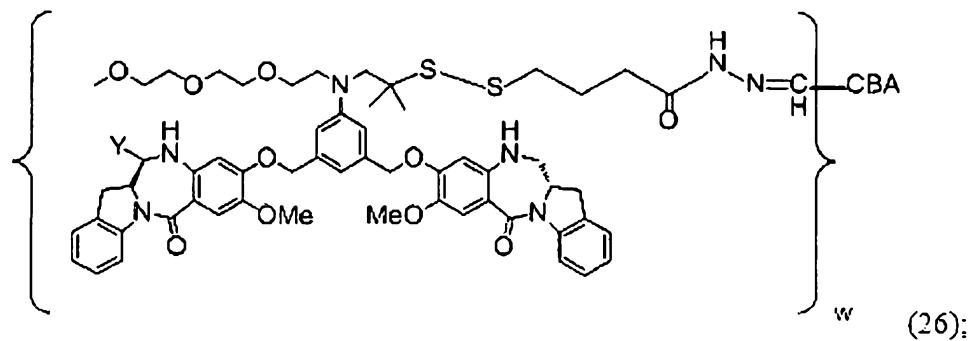
79. 如申請專利範圍第1項之偶聯物，其中該偶聯物係由以下結構式表示：



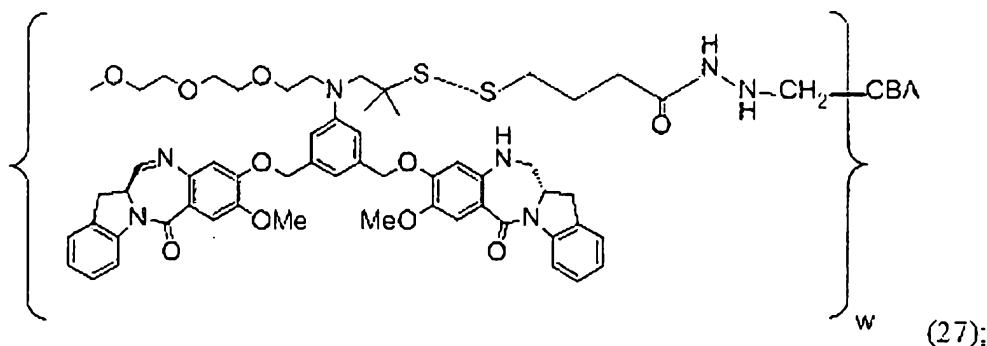




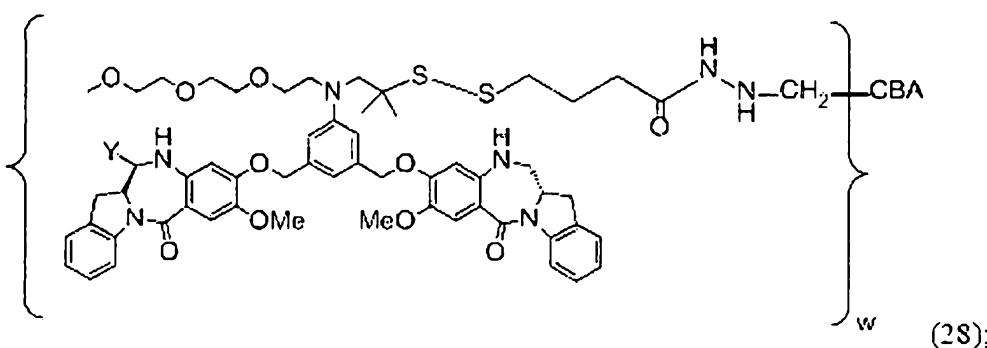




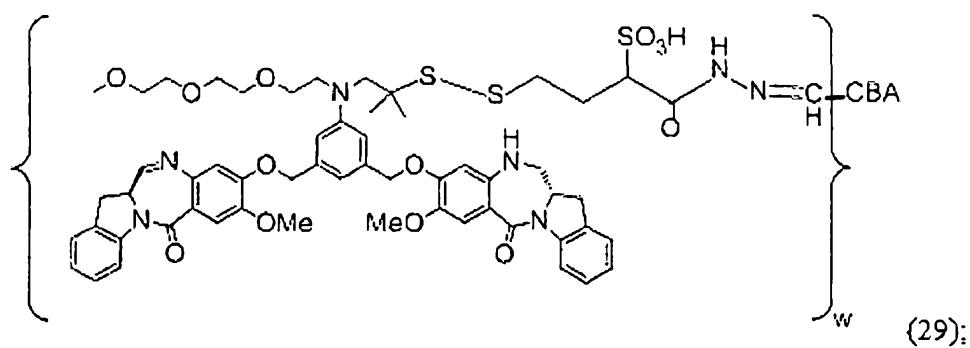
(26);



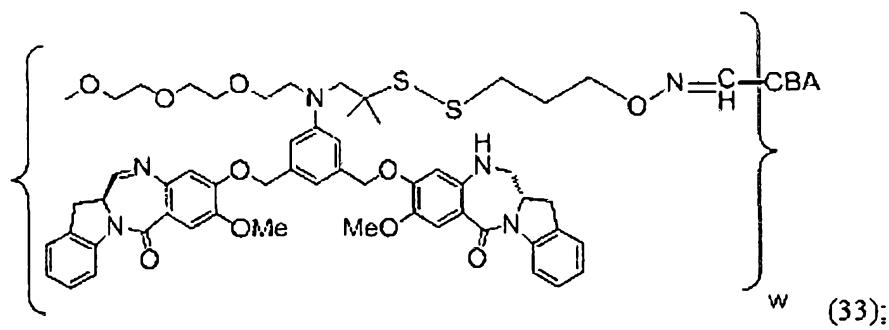
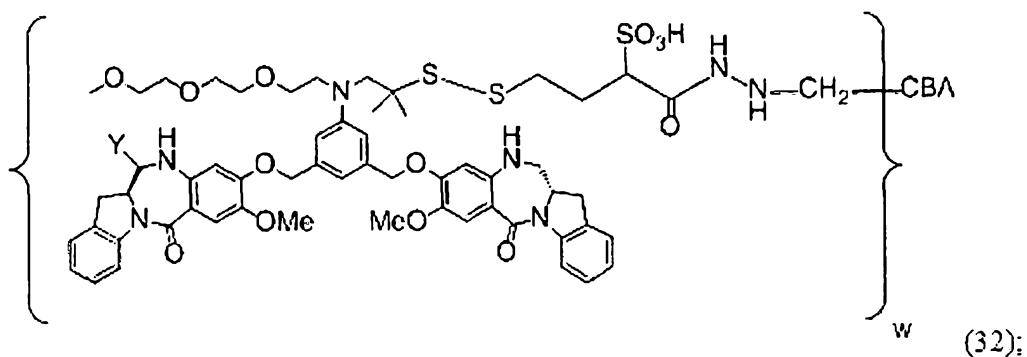
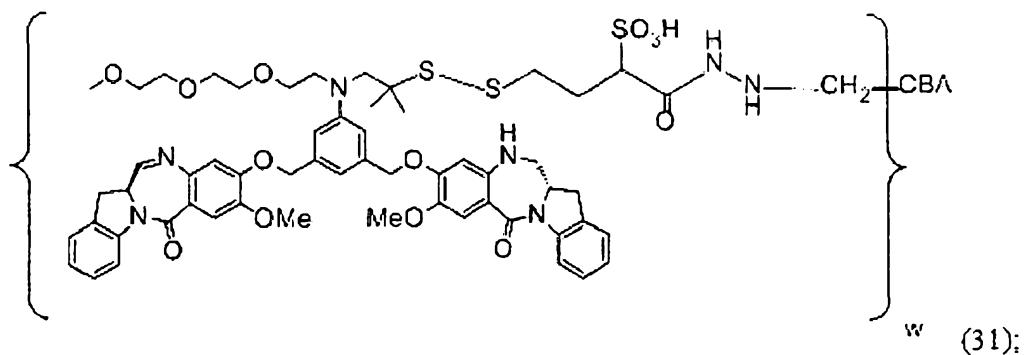
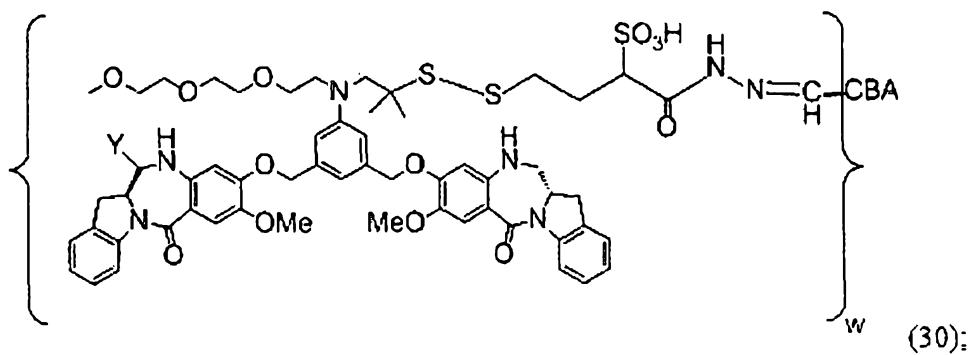
(27);

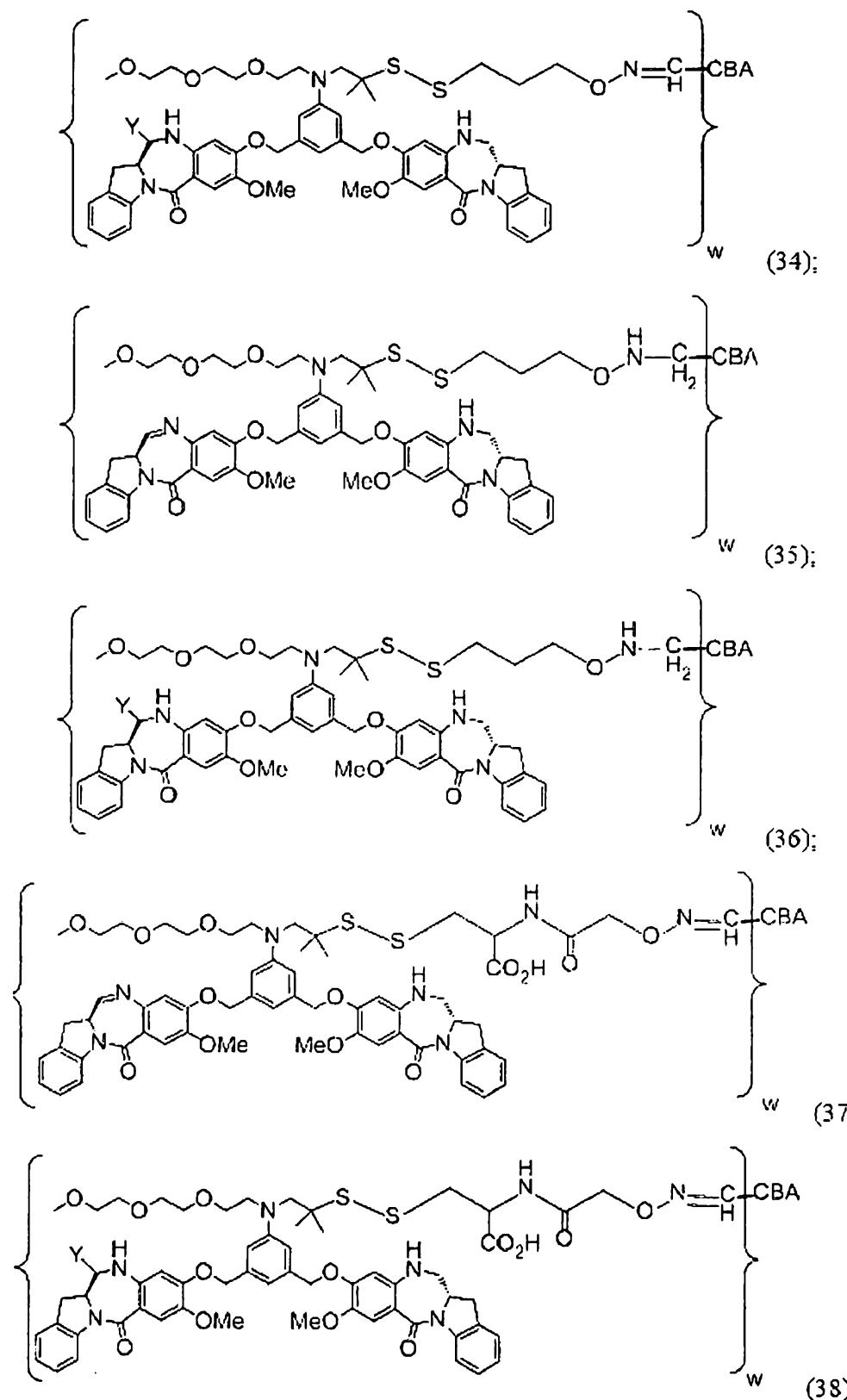


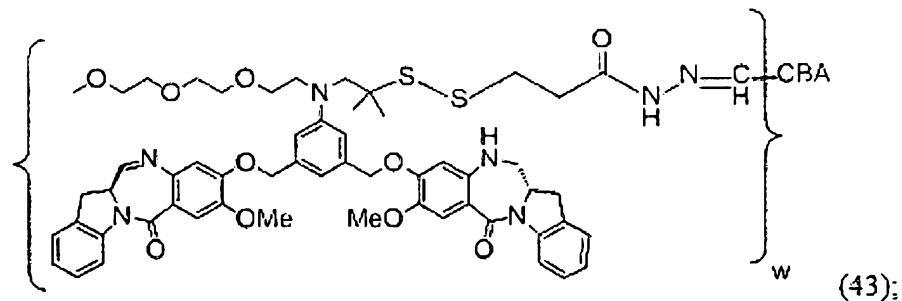
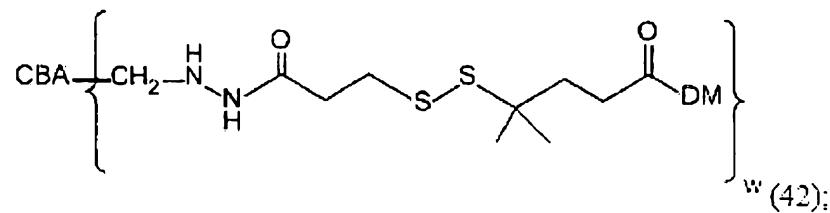
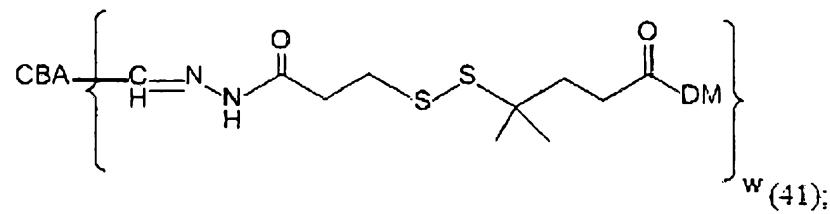
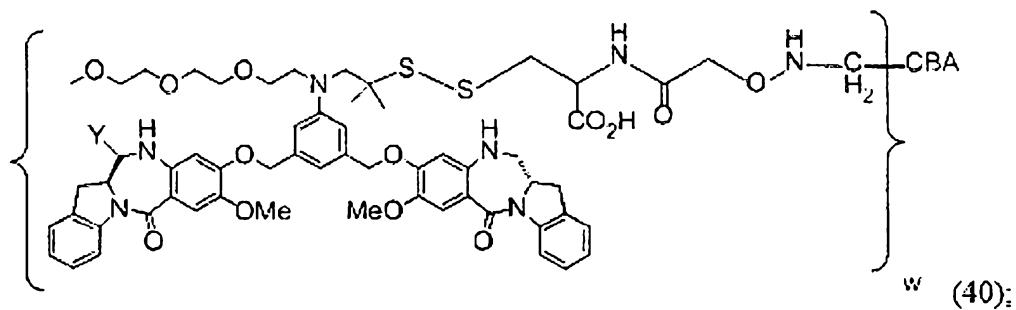
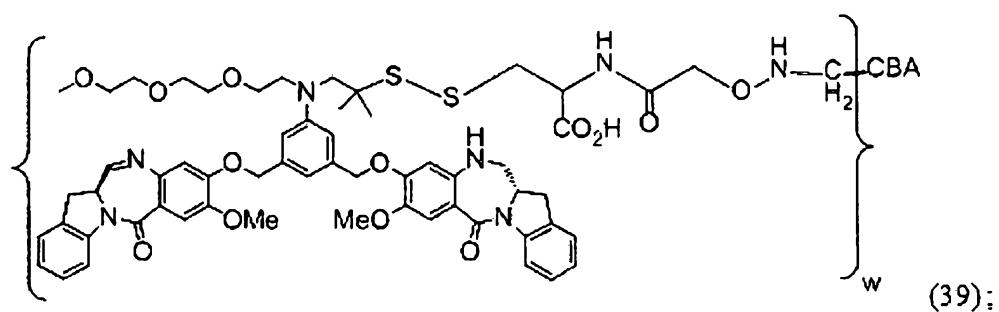
(28);

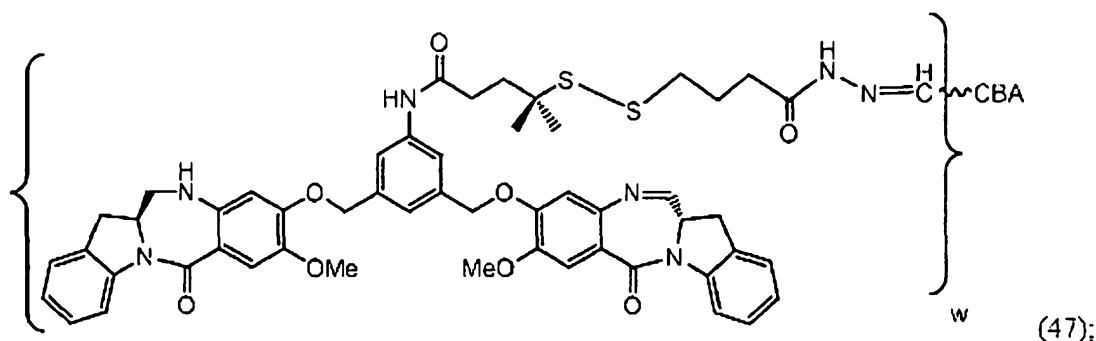
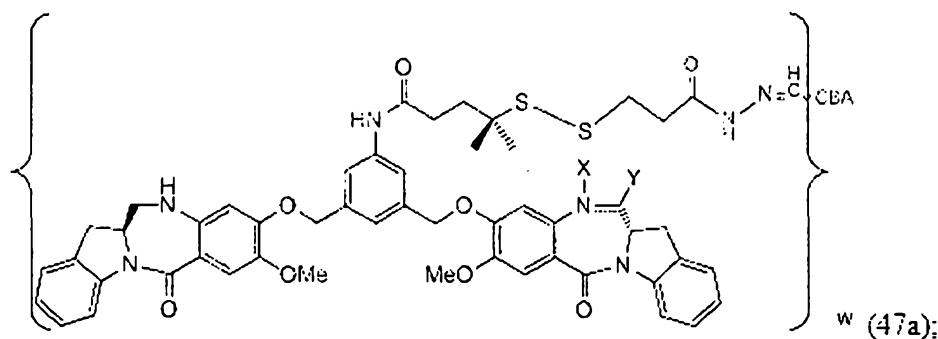
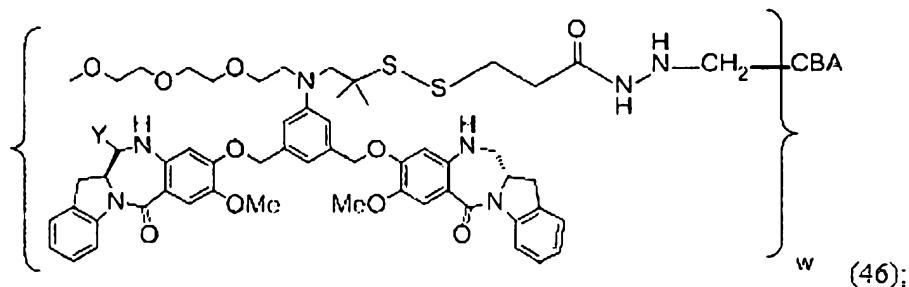
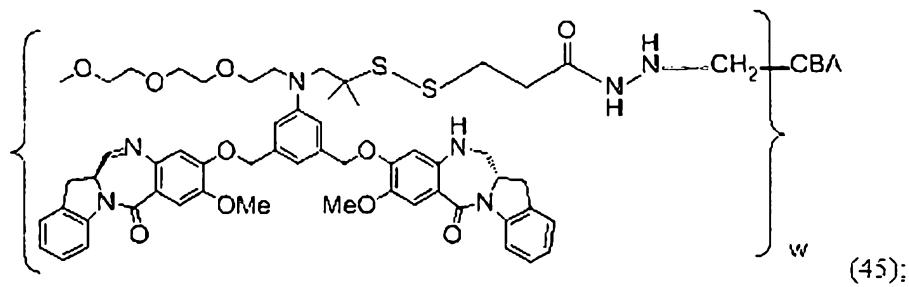
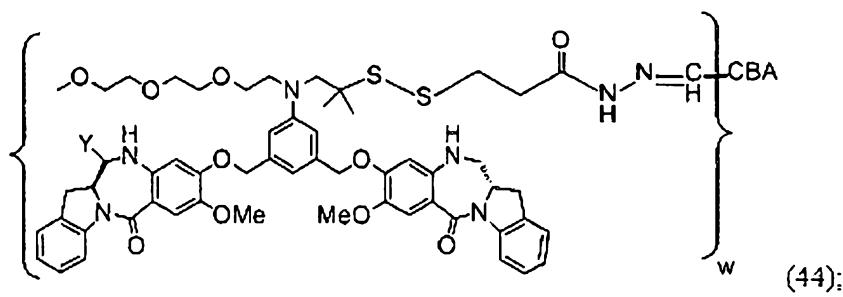


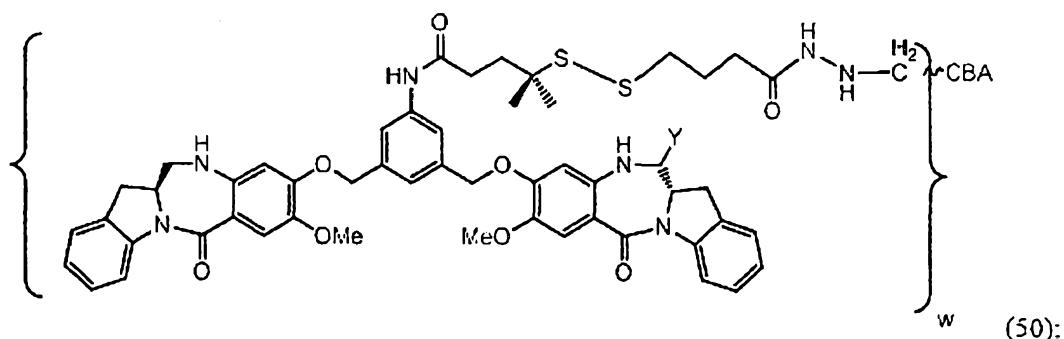
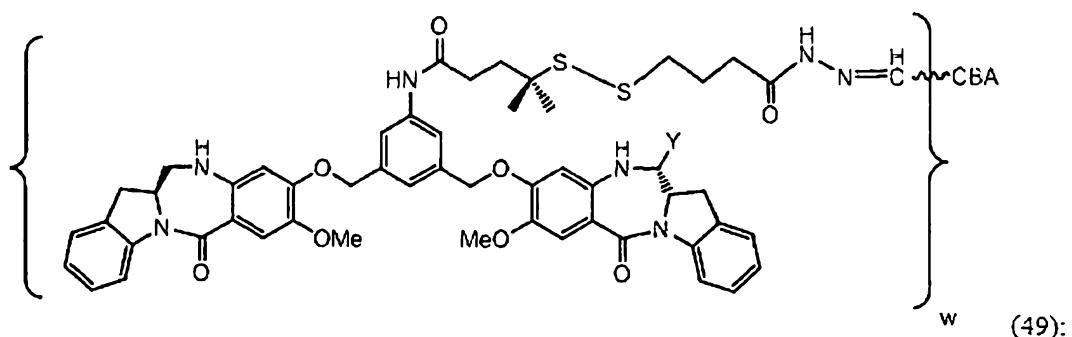
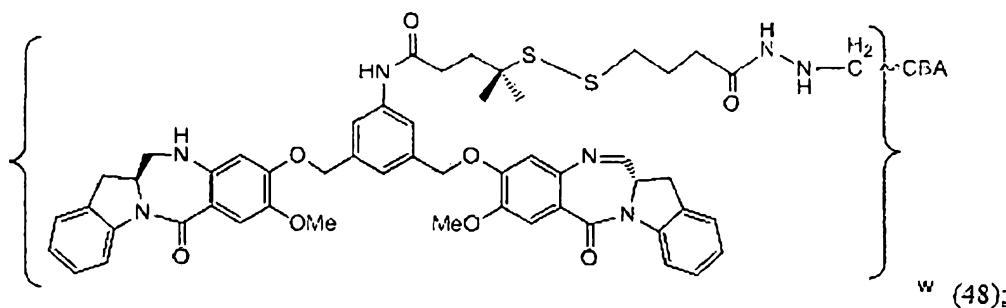
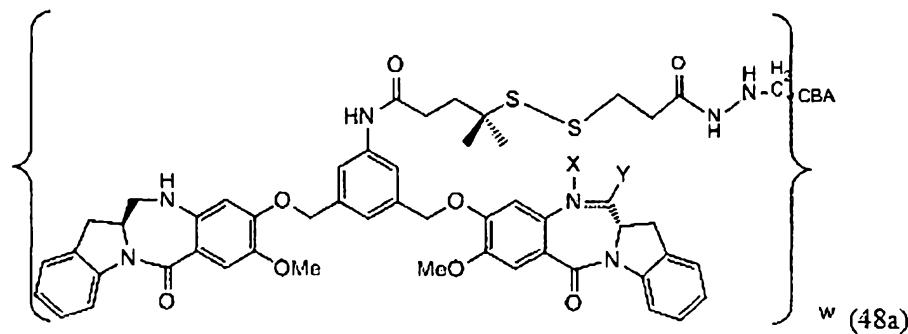
(29);

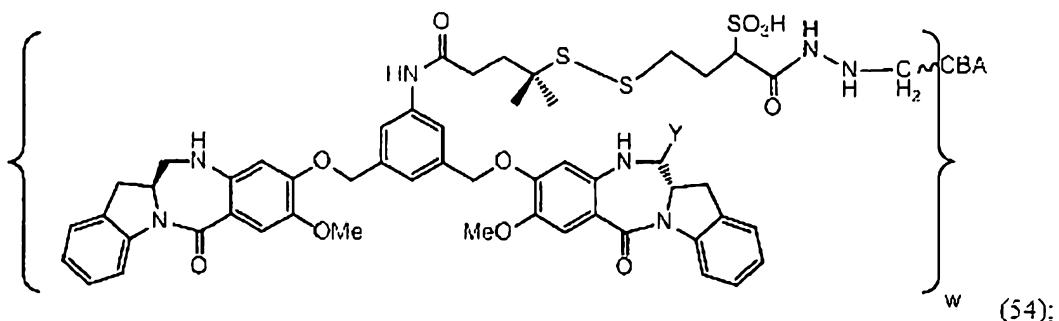
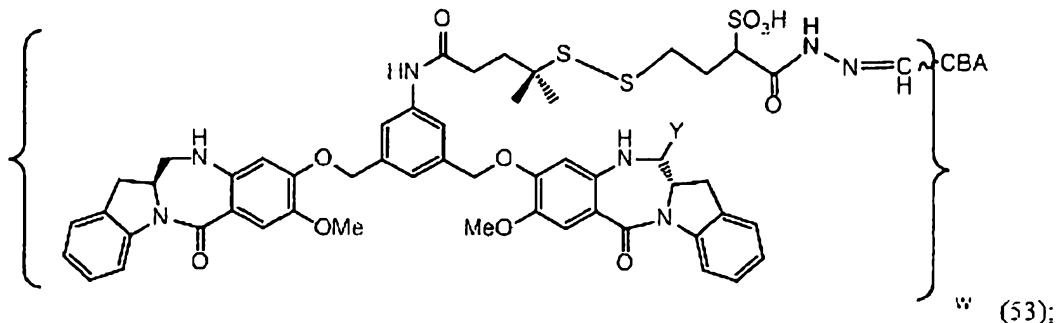
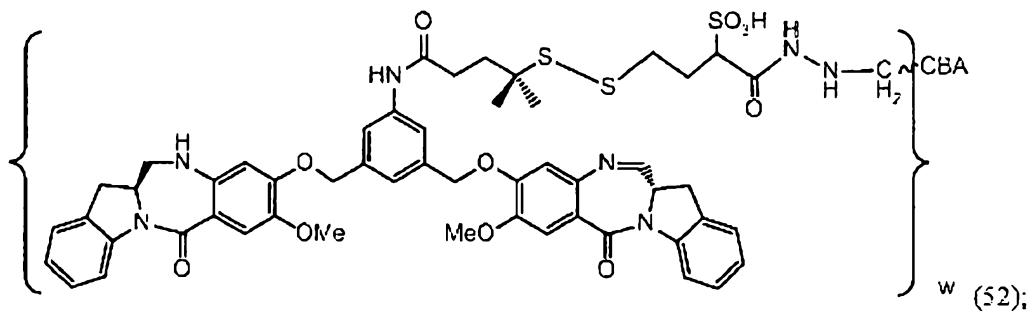
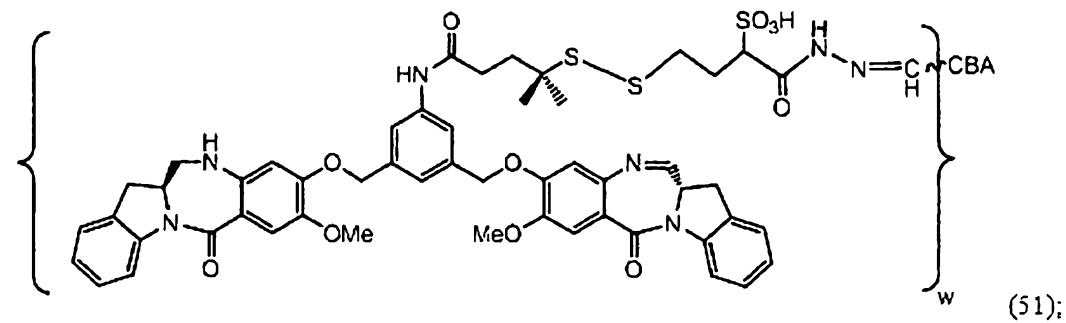


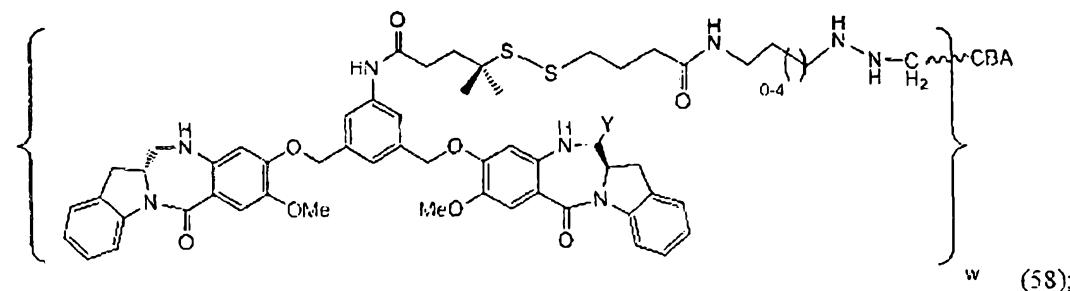
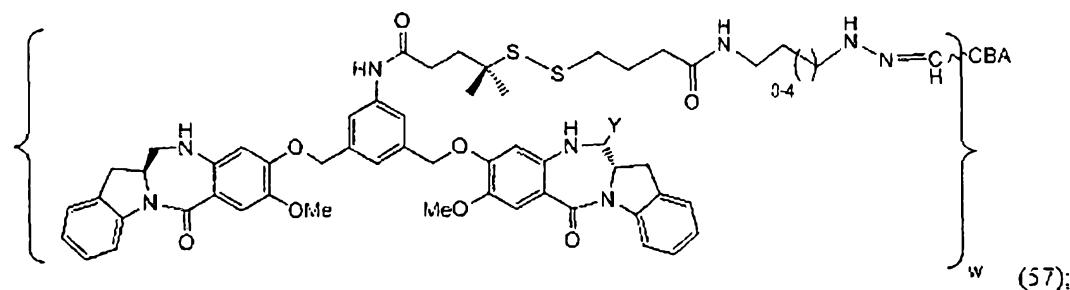
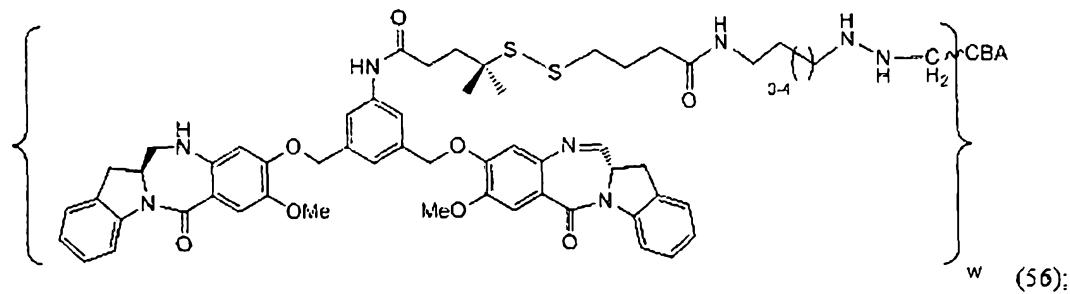
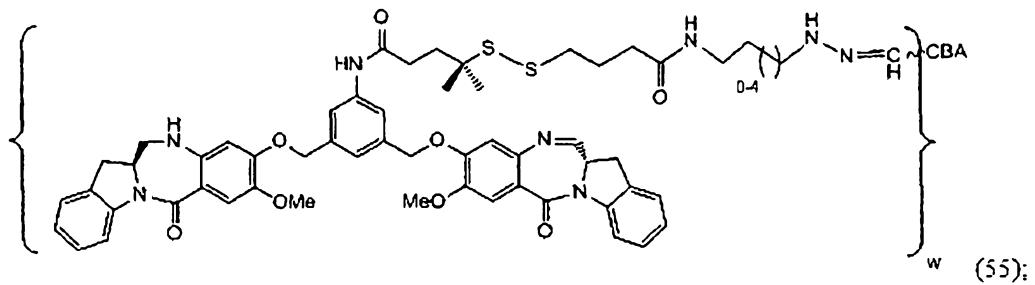


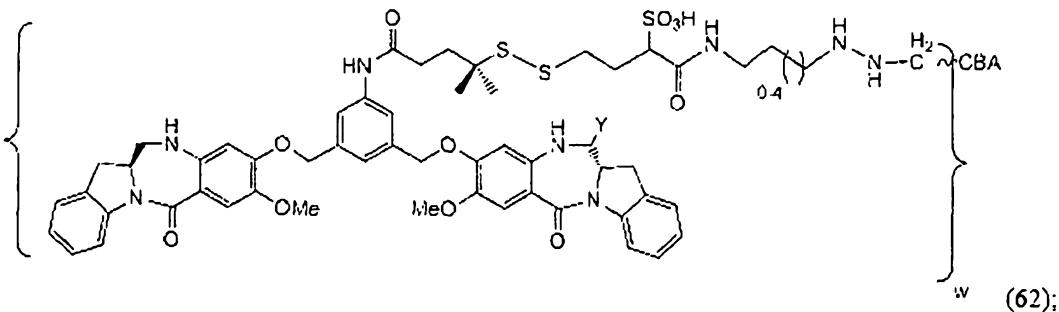
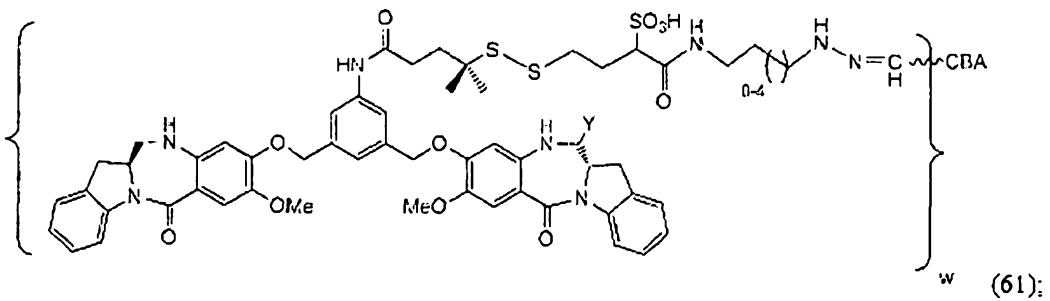
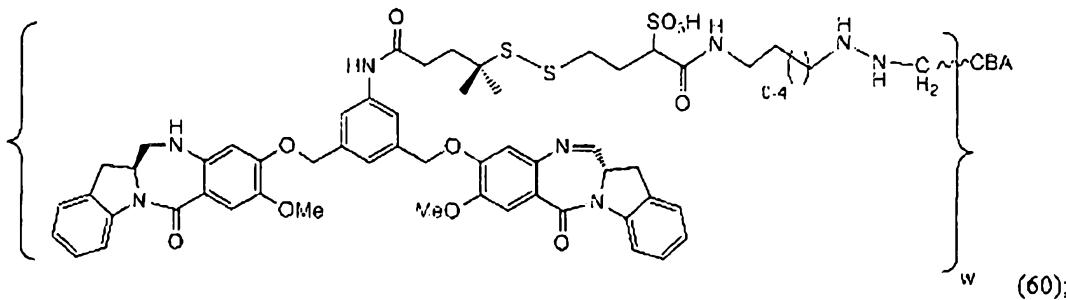
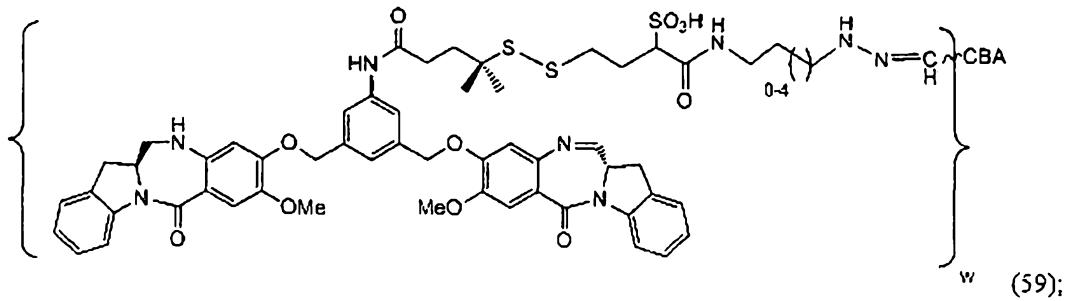


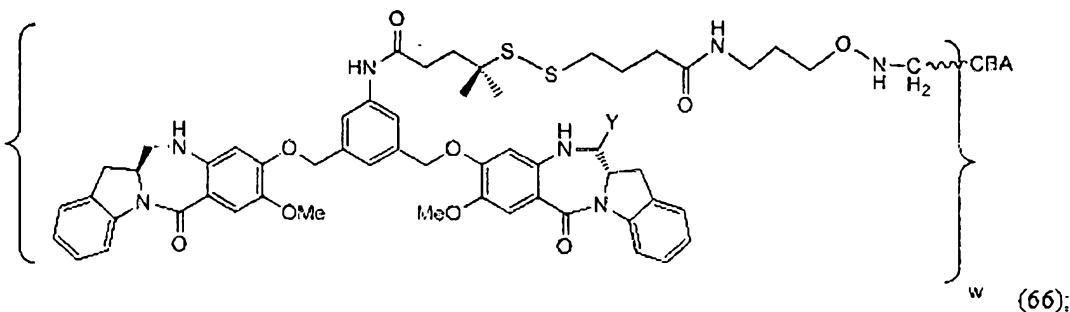
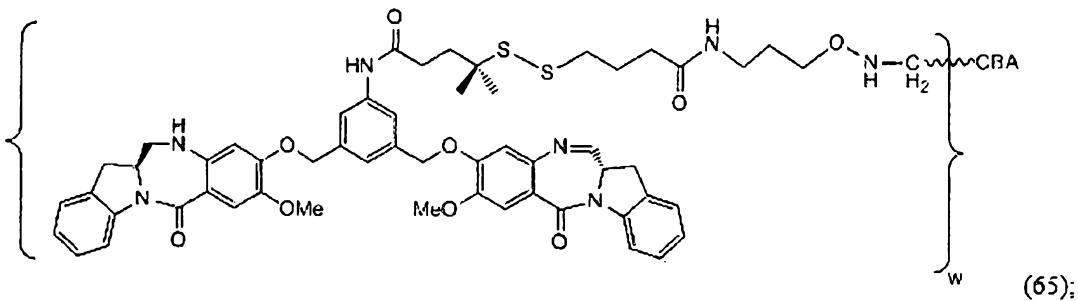
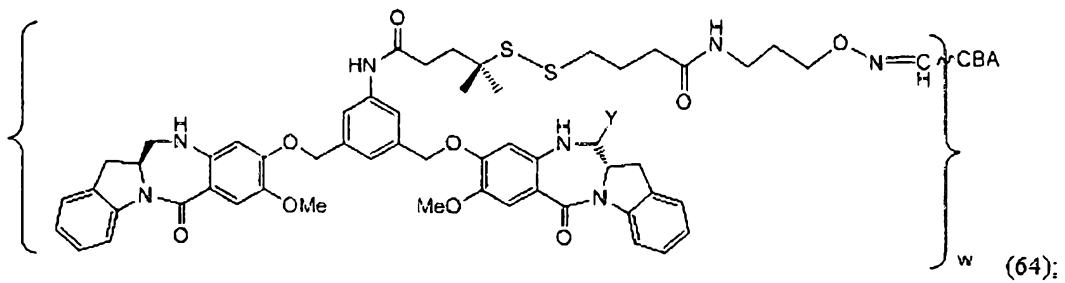
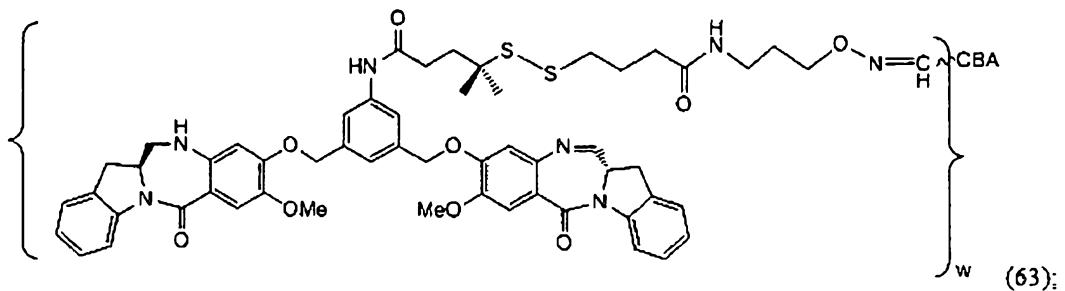


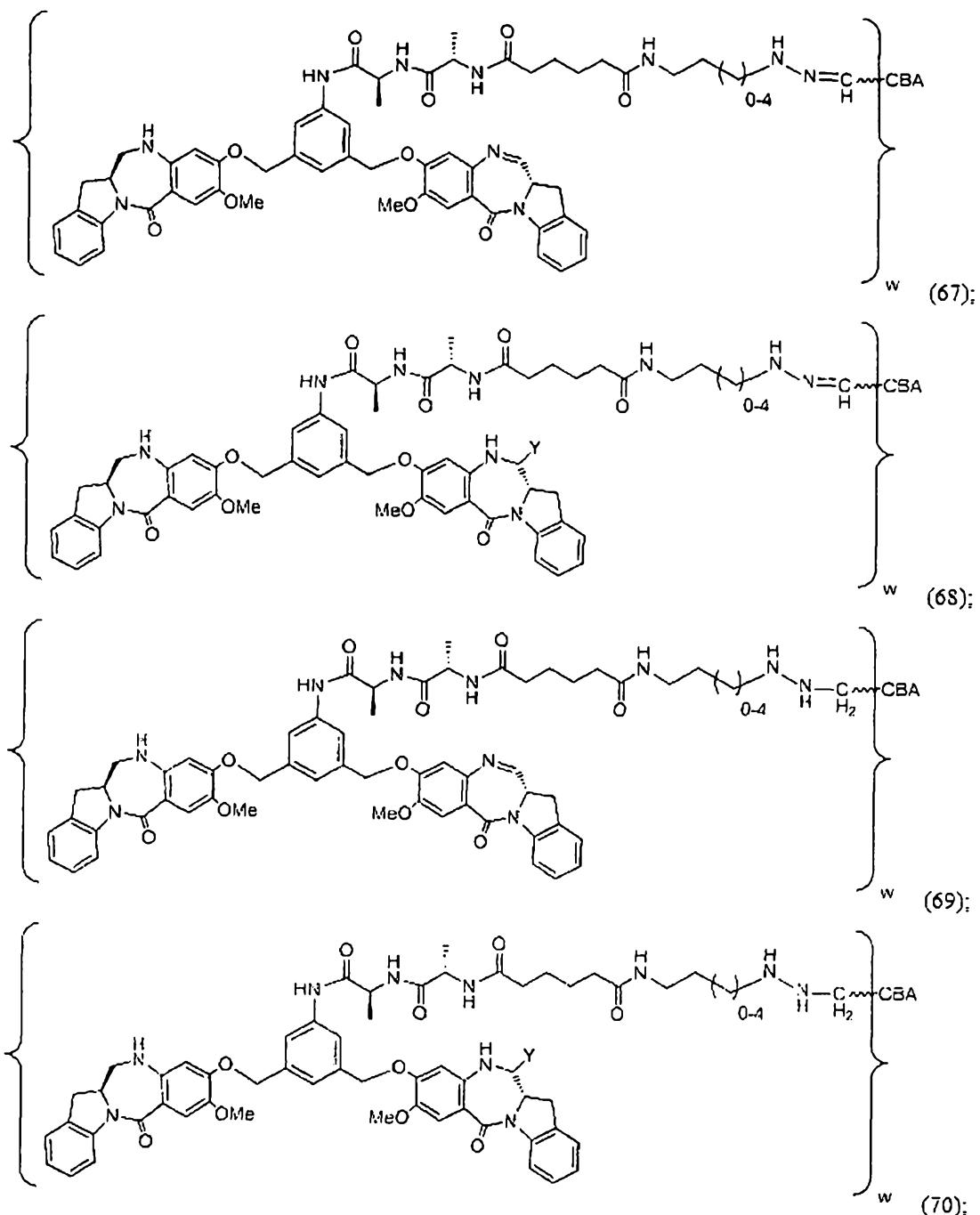


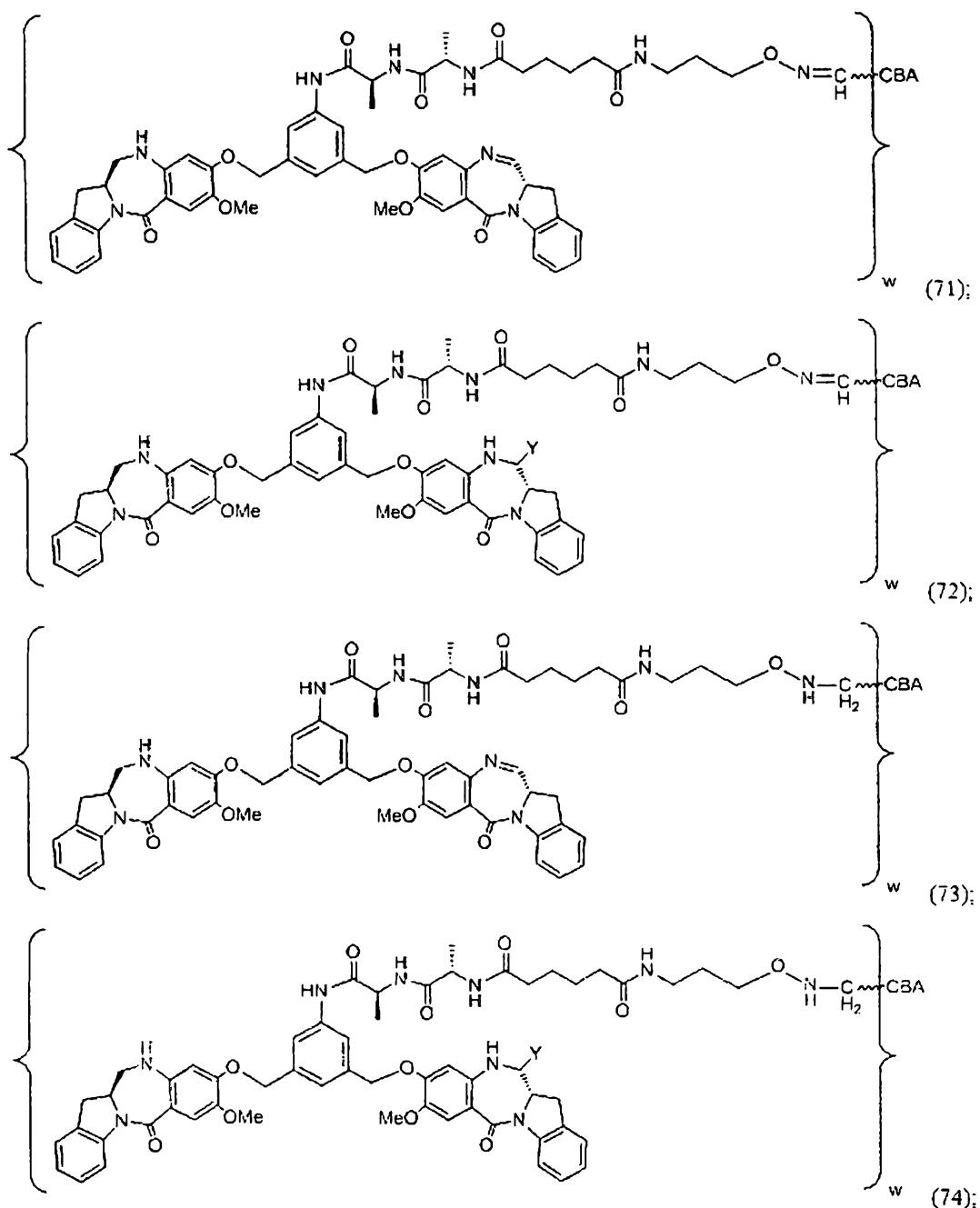


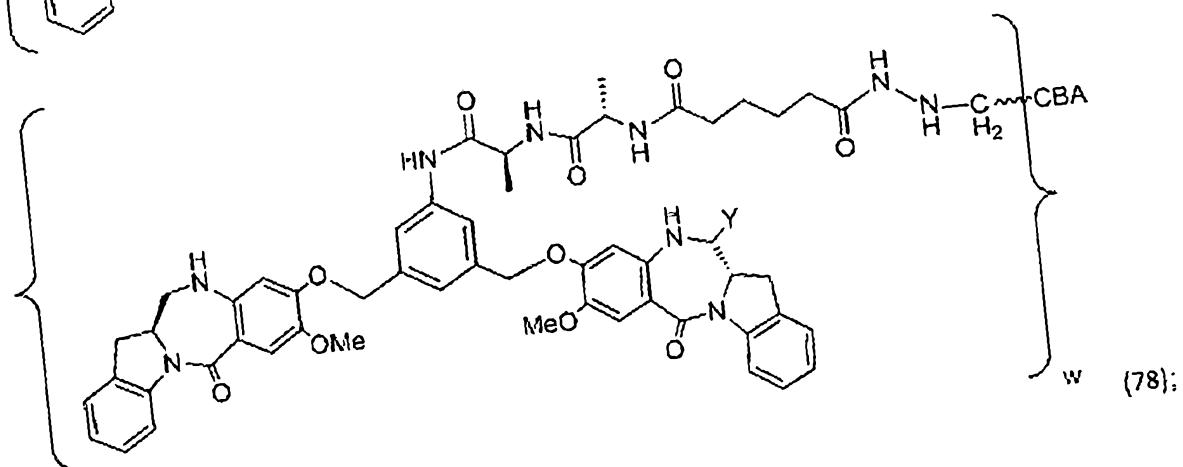
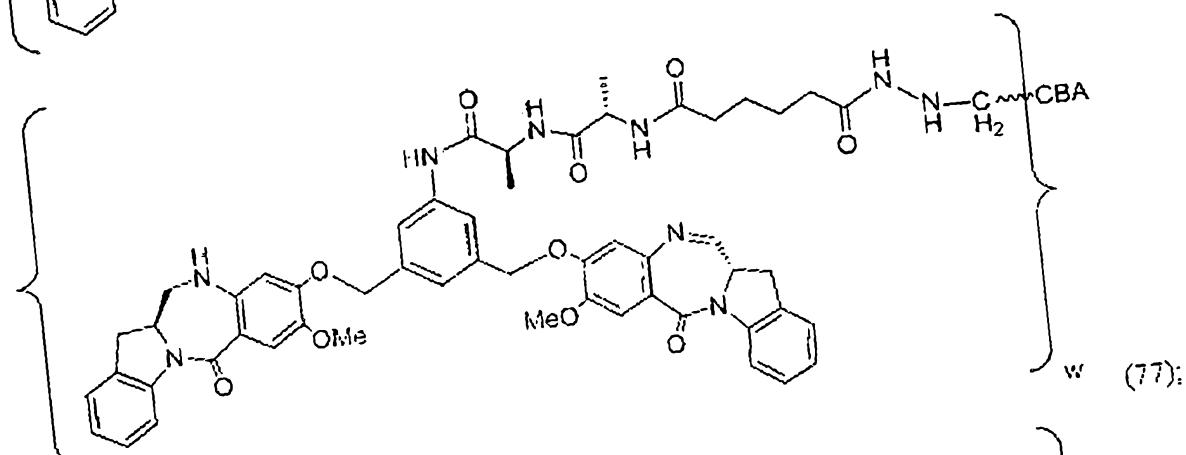
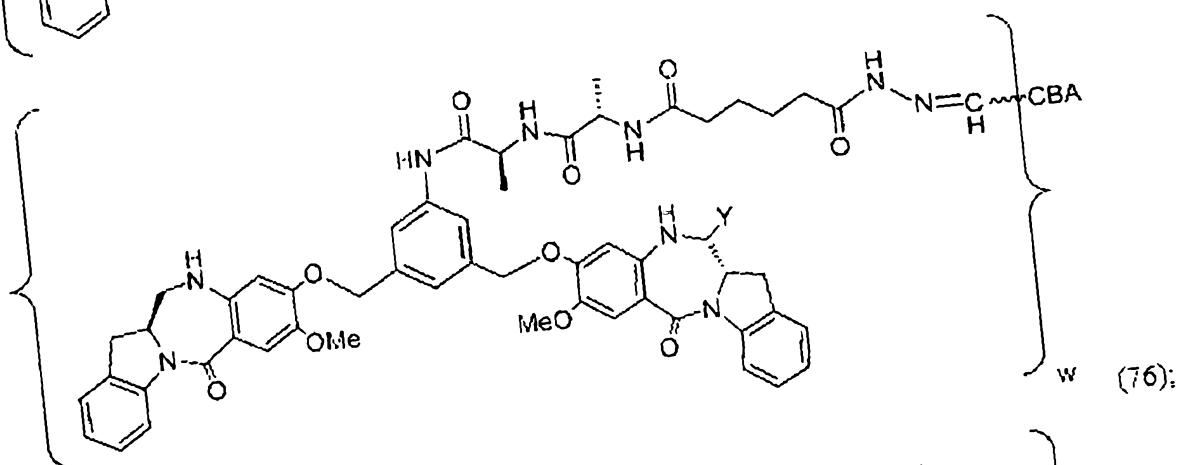
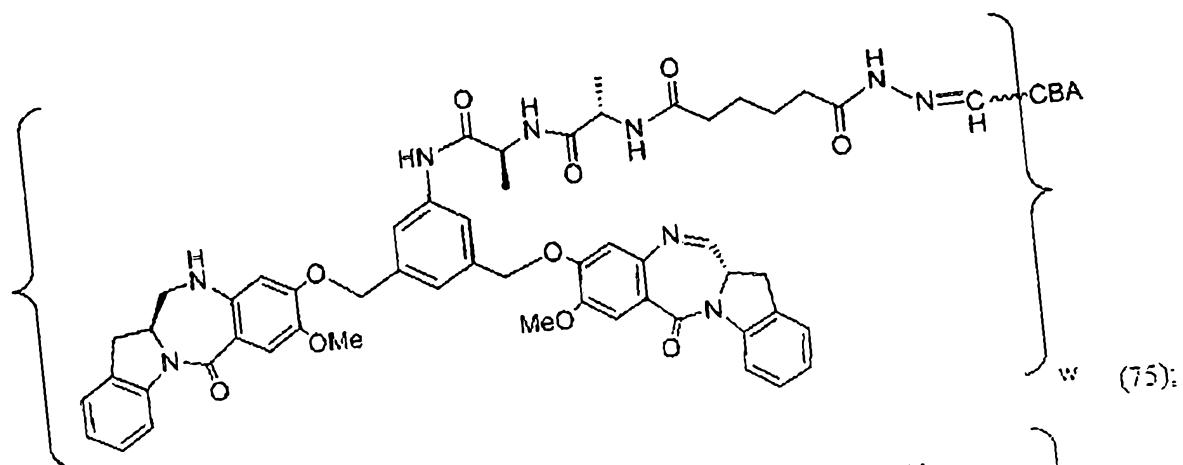


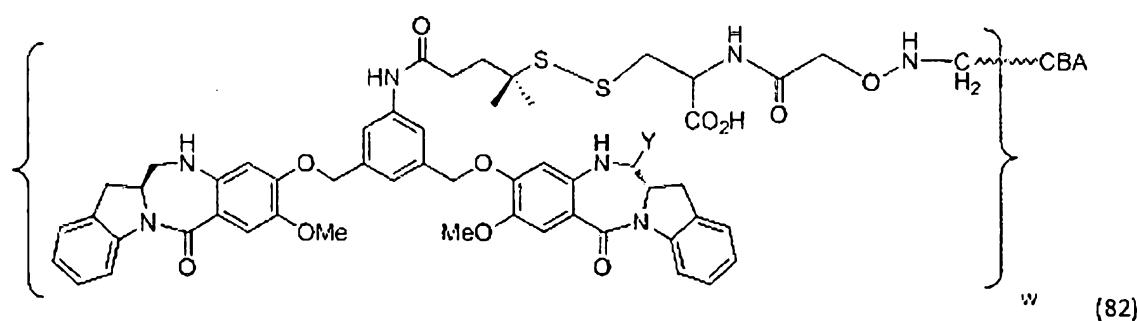
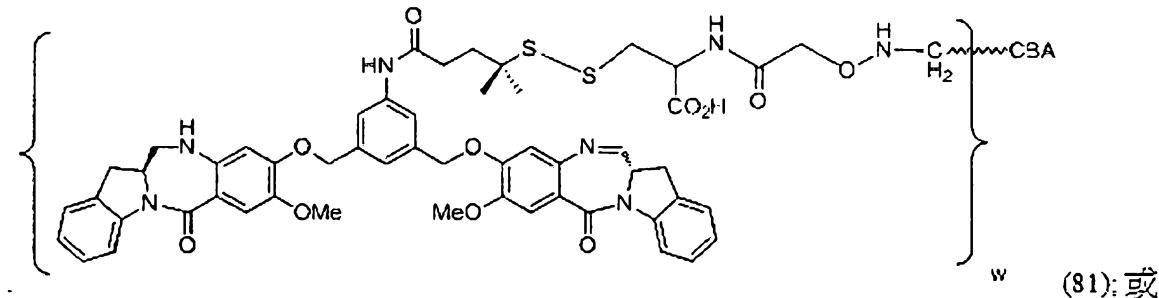
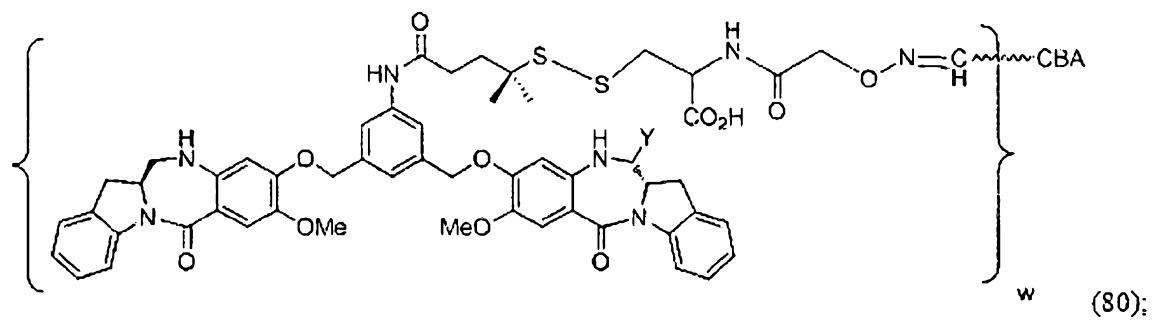
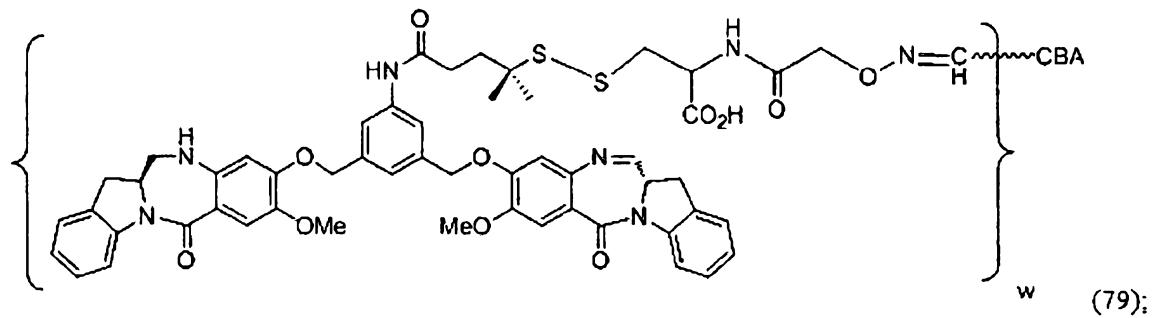




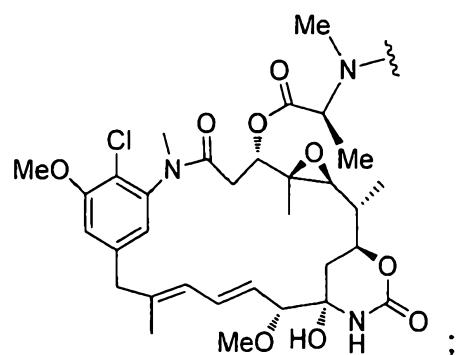








或其醫藥學上可接受之鹽，其中 DM 級由以下結構式表示：



且 Y 為 H 或  $-SO_3M$ ，且 M 為  $H^+$ 、 $Na^+$ 或  $K^+$ 。

80. 如申請專利範圍第 1 項至第 79 項中任一項之偶聯物，其中 w 為 2 或 4。
81. 一種組成物，其包含如申請專利範圍第 1 項至第 79 項中任一項之抗體-細胞毒性劑偶聯物，其中在至少約 70%、80%、90%、95%或更高百分比之該等偶聯物中，w 為 2 或 4。
82. 如申請專利範圍第 81 項之組成物，其中在不超過約 10%或 5%之該等偶聯物中，w 為 1。
83. 一種重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分，其包含具有 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列的異源信號肽。
84. 如申請專利範圍第 83 項之重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分，其中該異源信號肽係與該重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分之成熟加工序列之 N 末端融合。
85. 如申請專利範圍第 83 項之重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分，其中該異源信號肽係與該重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分之成熟加工序列之 N 末端的第 2 個胺基酸殘基融合。
86. 一種重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分，其包含緊鄰該重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分之信號肽之最後一個殘基之 C 末端的 Ser 或 Thr 殘基。
87. 如申請專利範圍第 86 項之重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分，其中該 Ser 或 Thr 殘基係緊鄰該重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分之成熟加工序列之第一個殘基的 N 末端。
88. 如申請專利範圍第 86 項之重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分，其中該 Ser 或 Thr 殘基置換該重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其

抗原結合部分之成熟加工序列之一個或多個 N 末端胺基酸殘基。

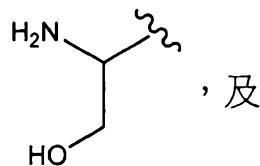
89. 如申請專利範圍第 86 項之重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分，其具有 SEQ ID NO: 10 或 14 之序列。
90. 一種重組抗體，其包含源自於如申請專利範圍第 86 項至第 89 項中任一項之重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分之重鏈、輕鏈或其抗原結合部分的成熟加工序列。
91. 如申請專利範圍第 90 項之重組抗體，其為 Fab、F(ab)<sub>2</sub>、F(ab')<sub>2</sub>、F(ab')<sub>3</sub>、Fd、Fv、二硫鍵連接之 Fv、dAb 或 sdAb (或奈米抗體)、CDR、scFv、(scFv)<sub>2</sub>、di-scFv、bi-scFv、tascFv (串聯 scFv)、AVIBODY (例如雙鏈抗體、三鏈抗體、四鏈抗體)、T 細胞接合物(BiTE)、scFv-Fc、Fcab、mAb2、小模組免疫藥物(SMIP)、Genmab/單抗體或 duobody、V-NAR 結構域、IgNAR、微型抗體、IgG Δ CH2、DVD-Ig、probody、內抗體或多特異性抗體。
92. 如申請專利範圍第 91 項之重組抗體，其為 sdAb (單結構域抗體或奈米抗體)。
93. 如申請專利範圍第 90 項之重組抗體，其包含分別源自於如申請專利範圍第 86 項至第 89 項中任一項之重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分之重鏈、輕鏈或其抗原結合部分的 1、2、3 或 4 個成熟加工序列。
94. 一種經修飾抗體，其係由在重鏈、輕鏈或其抗原結合部分之成熟加工序列上具有 N 末端 Ser 或 Thr 的抗體氧化得到，其中在該經修飾抗體中，該 N 末端 Ser 或 Thr 已氧化成醛基。

95. 如申請專利範圍第 94 項之經修飾抗體，其中該抗體係源自於重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分，該重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分包含：
- (1) 具有 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列的異源信號肽；
  - (2) 繫鄰該重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分之成熟加工序列第一個殘基之 N 末端的 Ser 或 Thr 殘基；或
  - (3) 置換該重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分之成熟加工序列之一個或多個 N 末端胺基酸殘基的 Ser 或 Thr 殘基。
96. 如申請專利範圍第 94 項之經修飾抗體，其中該抗體為包含 SEQ ID NO: 3 之輕鏈序列的鼠類抗體或其抗原結合部分。
97. 如申請專利範圍第 94 項之經修飾抗體，其中該抗體為包含 SEQ ID NO: 3 之輕鏈序列的鼠類抗體或其抗原結合部分之嵌合抗體、人類化抗體或人類抗體，或其抗原結合部分。
98. 如申請專利範圍第 97 項之經修飾抗體，其中該人類化抗體或其抗原結合部分係表面重塑或 CDR 移植之抗體，或其抗原結合部分。
99. 一種編碼如申請專利範圍第 86 項至第 89 項中任一項之重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分的多聚核苷酸。
100. 如申請專利範圍第 99 項之多聚核苷酸，其經密碼子優化以在哺乳動物表現系統中表現。
101. 一種產生重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分之方法，該方法包括在表現系統中表現如申請專利範圍第 99 項之多聚核苷酸。
102. 如申請專利範圍第 101 項之方法，其中該表現系統為哺乳動物表現系

統。

103. 一種製備細胞結合劑-細胞毒性劑偶聯物之方法，該方法包括以下步驟：

(a) 用氧化劑將細胞結合劑之 2-羥基乙胺部分氧化以形成具有醛基之經氧化細胞結合劑；其中該 2-羥基乙胺部分為絲氨酸、蘇氨酸、羥基離氨酸、4-羥基鳥氨酸或 2,4-二胺基-5-羥基戊酸殘基之一部分，且由以下結構式表示：



(b) 使該經氧化細胞結合劑：

(i) 與具有醛反應性基團之細胞毒性劑-連接子化合物或具有醛反應性基團之細胞毒性劑接觸，由此形成該細胞結合劑-細胞毒性劑偶聯物；

或

(ii) 與具有醛反應性基團之連接子化合物接觸，由此形成與連接子結合之經修飾抗體或其經修飾抗原結合部分，隨後使該經修飾抗體或其經修飾抗原結合部分與細胞毒性劑反應，以形成該細胞結合劑-細胞毒性劑偶聯物；或

(iii) 與細胞毒性劑接觸，隨後添加具有醛反應性基團及可與該細胞毒性劑形成共價鍵之反應性基團的連接子化合物，以形成該細胞結合劑-細胞毒性劑偶聯物。

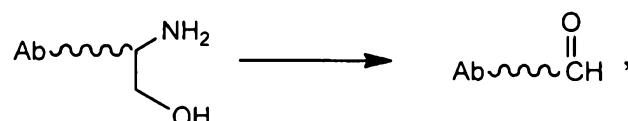
104. 如申請專利範圍第 103 項之方法，其中該細胞結合劑為抗體或其抗原結合部分，或抗體模擬物，諸如 DARPin、Centyrin、親和體、人類泛素、affitin、抗運載蛋白、高親和性多聚體、Fynomer、Kunitz 結構域肽、單

抗體(或 adnectin)、三鏈抗體或 nanofitin。

105. 如申請專利範圍第 103 項之方法，其中該細胞結合劑為抗體或其抗原結合部分，諸如 Fab、 $F(ab)_2$ 、 $F(ab')$ 、 $F(ab')_2$ 、 $F(ab')_3$ 、Fd、Fv、二硫鍵連接之 Fv、dAb 或 sdAb (或奈米抗體)、CDR、scFv、 $(scFv)_2$ 、di-scFv、bi-scFv、tascFv (串聯 scFv)、AVIBODY (例如雙鏈抗體、三鏈抗體、四鏈抗體)、T 細胞接合物 (BiTE)、scFv-Fc、Fcab、mAb2、小模組免疫藥物(SMIP)、Genmab/單抗體或 duobody、V-NAR 結構域、IgNAR、微型抗體、 $IgG \Delta CH2$ 、DVD-Ig、probody、內抗體或多特異性抗體。

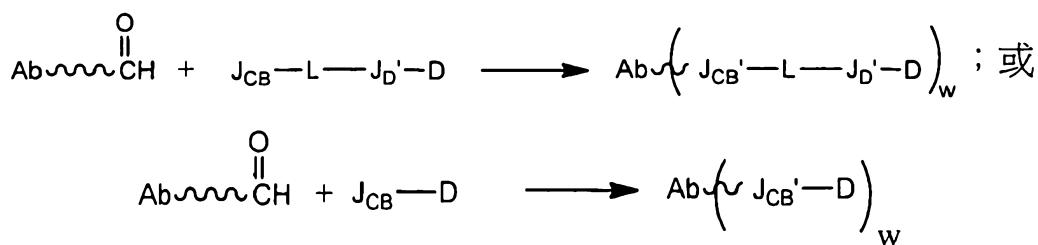
106. 如申請專利範圍第 103 項之方法，其中該方法包括以下步驟：

(a) 用氧化劑氧化抗體或其抗原結合部分之 2-羥基乙胺部分，以形成具有醛基之經氧化抗體或其經氧化抗原結合部分，



其中該 2-羥基乙胺部分係 N 末端絲胺酸、蘇胺酸、羥基離胺酸、4-羥基鳥胺酸或 2,4-二胺基-5-羥基戊酸殘基之一部分；及

(b) 使該經氧化抗體或其經氧化抗原結合部分與具有醛反應性基團之細胞毒性劑-連接子化合物或具有醛反應性基團之細胞毒性劑反應，以形成該抗體-細胞毒性劑偶聯物



其中：

$J_{CB}$  係醛反應性基團；

$L$  係間隔子或鍵；

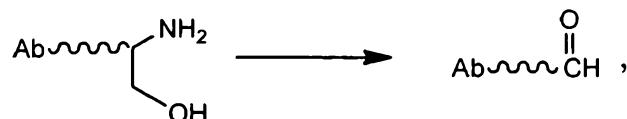
$J_D'$  係將該細胞毒性劑  $D$  與該基團  $L$  連接之連接部分，或當  $L$  係鍵時不存在；

$D$  係經由該該連接部分  $J_D'$  共價連接至  $L$  之細胞毒性劑；且

$w$  係 1、2、3 或 4。

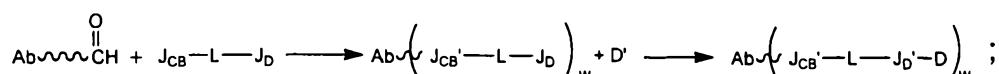
107. 如申請專利範圍第 103 項之方法，其中該方法包括以下步驟：

(a) 用氧化劑氧化抗體或其抗原結合部分之 N 末端 2-羥基乙胺部分，以形成具有 N 末端醛基之經氧化抗體或其經氧化抗原結合部分，



其中該 2-羥基乙胺部分係 N 末端絲氨酸、蘇氨酸、羥基離氨酸、4-羥基鳥氨酸或 2,4-二胺基-5-羥基戊酸殘基之一部分；

(b) 使該經氧化抗體或其經氧化抗原結合部分與具有醛反應性基團之連接子化合物反應以形成與連接子結合之經修飾抗體或其經修飾抗原結合部分，隨後使該經修飾抗體或其經修飾抗原結合部分與細胞毒性劑反應，以形成該抗體-細胞毒性劑偶聯物



其中：

$J_{CB}$  係醛反應性基團；

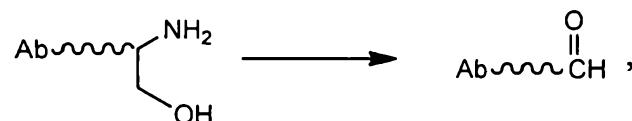
$L$  係間隔子或鍵；

$D'$  係細胞毒性劑；

$J_D$  為可與該細胞毒性劑  $D'$  形成共價鍵之反應性基團；  
 $J_D'$  為藉由使該連接基團  $J_D$  與該細胞毒性劑  $D'$  反應所形成的連接部分；  
 $D$  係經由該連接部分  $J_D'$  共價連接至  $L$  之細胞毒性劑；且  
 $w$  係 1、2、3 或 4。

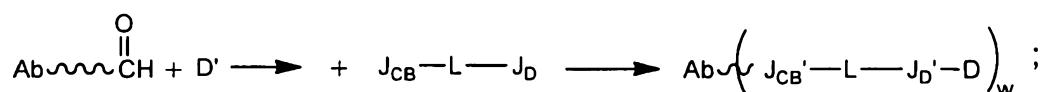
108. 如申請專利範圍第 103 項之方法，其中該方法包括以下步驟：

(a) 用氧化劑氧化抗體或其抗原結合部分之 N 末端 2-羥基乙胺部分，以形成具有 N 末端醛基之經氧化抗體或其經氧化抗原結合部分，



其中該 2-羥基乙胺部分係 N 末端絲氨酸、蘇氨酸、羥基離氨酸、4-羥基鳥氨酸或 2,4-二氨基-5-羥基戊酸殘基之一部分；及

(b) 使該經氧化抗體或其經氧化抗原結合部分與細胞毒性劑反應，隨後添加具有醛反應性基團之連接子化合物，以形成該抗體-細胞毒性劑偶聯物



其中：

$J_{CB}$  係醛反應性基團；

$L$  係間隔子或鍵；

$D'$  係細胞毒性劑；

$J_D$  為可與該細胞毒性劑  $D'$  形成共價鍵之反應性基團；

$J_D'$  為藉由使該連接基團  $J_D$  與該細胞毒性劑  $D'$  反應所形成的連接部分

分；

D 係經由該連接部分  $J_D'$  共價連接至 L 之細胞毒性劑；且

w 係 1、2、3 或 4。

109. 如申請專利範圍第 105 項至第 108 項中任一項之方法，其中該 2-羥基乙胺部分為 N 末端絲氨酸或蘇氨酸之一部分。

110. 如申請專利範圍第 109 項之方法，其中該 N 末端絲氨酸天然存在於該抗體或其抗原結合部分中。

111. 如申請專利範圍第 109 項之方法，其中該 N 末端絲氨酸係工程改造至該抗體或其抗原結合部分中。

112. 如申請專利範圍第 111 項之方法，其中該抗體或其抗原結合部分係如申請專利範圍第 90 項至第 93 項中任一項之重組抗體中的任一種。

113. 如申請專利範圍第 103 項至第 108 項中任一項之方法，其中該抗體或其抗原結合部分係藉由表現編碼重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分之多聚核苷酸獲得，該重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分包含：

(1) 具有 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列的異源信號肽；

(2) 緊鄰該重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分之成熟加工序列第一個殘基之 N 末端的 Ser 或 Thr 殘基；或

(3) 置換該重組抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分之成熟加工序列之一個或多個 N 末端胺基酸殘基的 Ser 或 Thr 殘基。

114. 如申請專利範圍第 103 項至第 108 項中任一項之方法，其中該抗體或其抗原結合部分包含 SEQ ID NO: 3 之輕鏈序列。

115. 如申請專利範圍第 103 項至第 108 項中任一項之方法，其中該抗體或其抗原結合部分係包含 SEQ ID NO: 3 之輕鏈序列的鼠類抗體或其抗原結合部分之嵌合抗體、人類化抗體或人類抗體，或其抗原結合部分。
116. 如申請專利範圍第 115 項之方法，其中該人類化抗體或其抗原結合部分係表面重塑或 CDR 移植之抗體，或其抗原結合部分。
117. 如申請專利範圍第 103 項至第 116 項中任一項之方法，其中該步驟(b)之反應係在苯胺催化劑存在下進行。
118. 如申請專利範圍第 117 項之方法，其中該苯胺催化劑為 4-胺基苯乙醇。
119. 如申請專利範圍第 103 項至第 118 項中任一項之方法，其中該醛反應性基團與該經氧化抗體或其經氧化抗原結合部分之莫耳比為約 4:1。
120. 如申請專利範圍第 103 項至第 119 項中任一項之方法，其中步驟(a)中之該氧化劑為過碘酸鹽。
121. 如申請專利範圍第 103 項至第 120 項中任一項之方法，其中步驟(b)係在 pH5-6 或 pH5 下進行。
122. 如申請專利範圍第 103 項至第 121 項中任一項之方法，其中該細胞結合劑-細胞毒性劑偶聯物為如申請專利範圍第 1 項至第 80 項中任一項之偶聯物。
123. 一種醫藥組成物，其包含如申請專利範圍第 1 項至第 80 項中任一項之偶聯物及醫藥學上可接受之載劑。
124. 一種在哺乳動物中抑制異常細胞生長或治療增生性病症、自體免疫病症、破壞性骨病、感染性疾病、病毒疾病、纖維化疾病、神經退化性疾病、胰腺炎或腎病之方法，該方法包括向該哺乳動物施用治療有效

量的如申請專利範圍第 1 項至第 80 項中任一項之偶聯物及視情況使用之化學治療劑。

125. 如申請專利範圍第 124 項之方法，其中該方法係用於治療選自由以下組成之群之病狀：癌症、類風濕性關節炎、多發性硬化、移植抗宿主疾病(GVHD)、移植排斥反應、狼瘡、肌炎、感染及免疫缺陷。

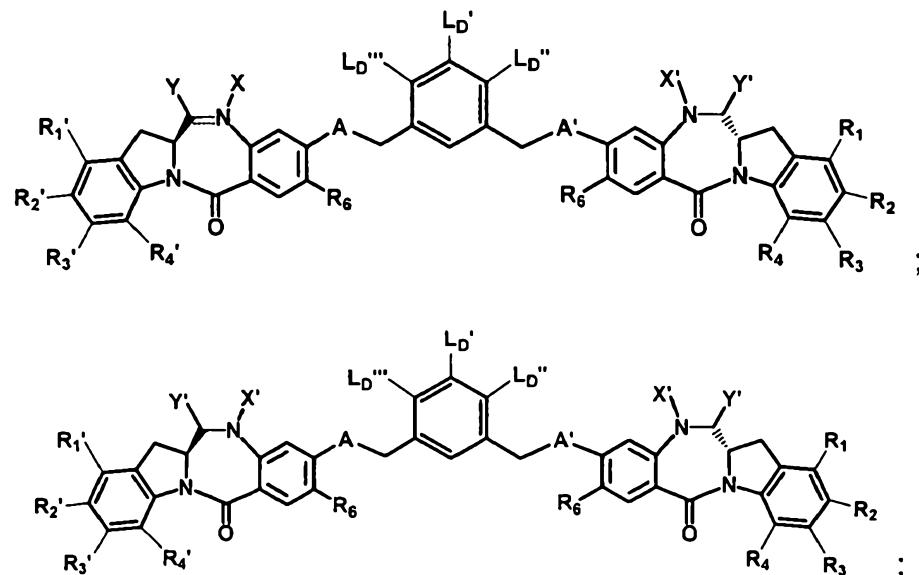
126. 如申請專利範圍第 125 項之方法，其中該方法係用於治療癌症。

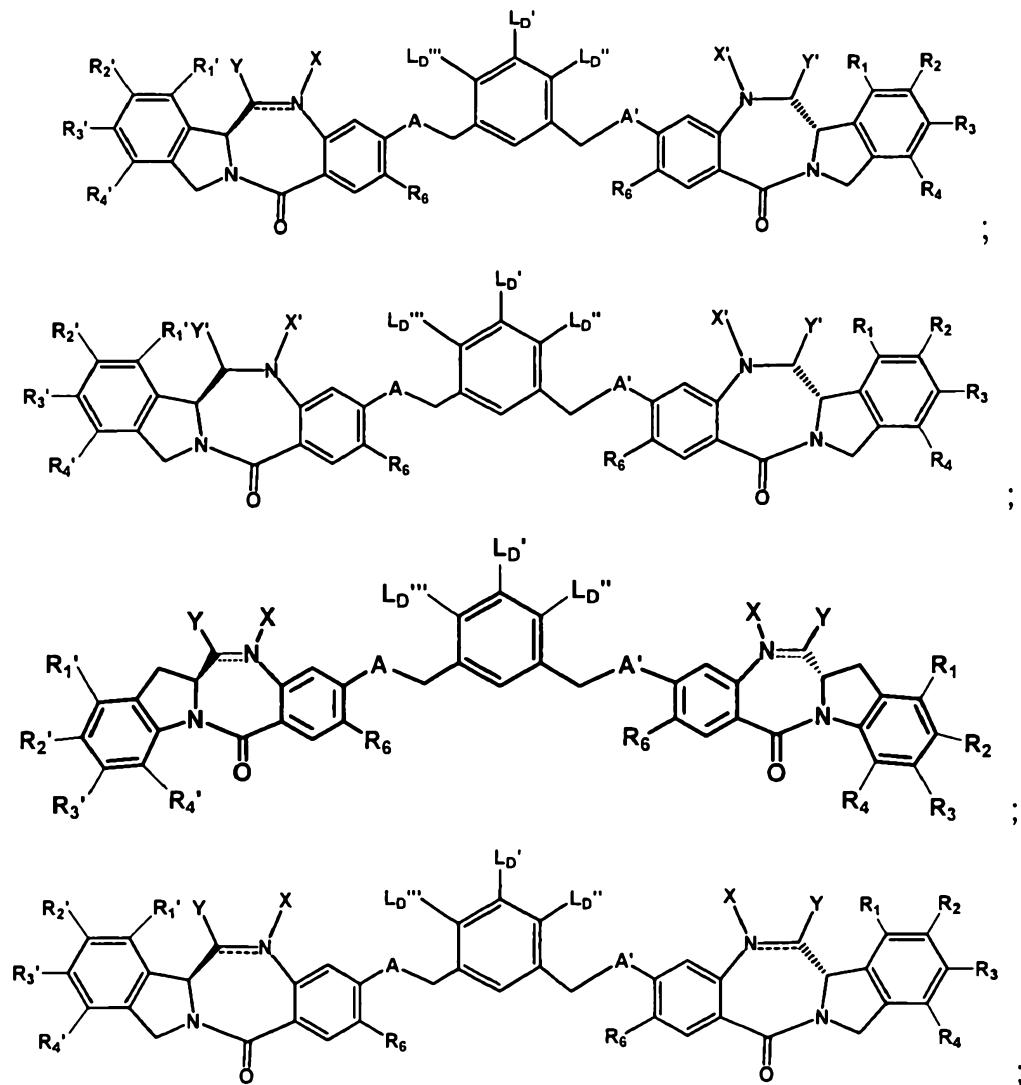
127. 如申請專利範圍第 126 項之方法，其中該癌症為白血病、淋巴瘤、黑色瘤、肺癌(諸如 NSCLC)、前列腺癌、卵巢癌、子宮內膜癌、胰腺癌、乳癌、腹膜癌、頭頸部鱗狀細胞癌、骨髓增生異常症候群(MDS)及子宮頸癌。

128. 如申請專利範圍第 126 項之方法，其中該癌症為急性骨髓性白血病(AML)。

129. 如申請專利範圍第 126 項之方法，其中該癌症為非小細胞肺癌。

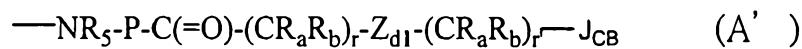
130. 一種由以下結構式表示之細胞毒性化合物，





或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

$L_D'$ 、 $L_D''$  及  $L_D'''$  之一係由下式表示：



且其餘兩個相同或不同，且獨立地選自-H；視情況經取代的具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；聚乙二醇單元  $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{-R}^c$ ；鹵素；胍鎓  $[-\text{NH}(\text{C=NH})\text{NH}_2]$ ；-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'；  
 $Z_{d1}$  為不存在、-C(=O)-NR<sub>9</sub>-或 -NR<sub>9</sub>-C(=O)-；

P 為胺基酸殘基或含有介於 2 至 20 個之間之胺基酸殘基的肽；

R<sub>a</sub> 及 R<sub>b</sub> 在每次出現時獨立地為 -H、(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基或帶電荷之取代基，或可離子化之基團 Q；

r 及 r' 獨立地為 1 至 6 之整數；

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

Y 為選自以下之離去基團：-OR、-OCOR'、-OCOOR'、-OCONR' R'、-NR' R'、-NR' COR'、-NR' NR' R'、視情況經取代之 5 員或 6 員含氮雜環(例如，經由氮原子附接之哌啶、四氫吡咯、吡唑、嗎啉等)、由-NR' (C=NH)NR' R' 表示之胍鎓、胺基酸或由-NRCOP' 表示之肽、-SR、-SOR'、鹵素、氰基、疊氨基、-OSO<sub>3</sub>H、亞硫酸酯基(-SO<sub>3</sub>H 或-SO<sub>2</sub>H)、偏亞硫酸酯(H<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)、單-、二-、三-及四-硫代磷酸酯(PO<sub>3</sub>SH<sub>3</sub>、PO<sub>2</sub>S<sub>2</sub>H<sub>2</sub>、POS<sub>3</sub>H<sub>2</sub>、PS<sub>4</sub>H<sub>2</sub>)、硫代磷酸酯(R<sup>i</sup>O)<sub>2</sub>PS(OR<sup>j</sup>)、R<sup>i</sup>S-、R<sup>i</sup>SO、R<sup>i</sup>SO<sub>2</sub>、R<sup>i</sup>SO<sub>3</sub>、硫代硫酸酯(HS<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)、連二亞硫酸酯(HS<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)、二硫代磷酸酯(P(=S)(OR<sup>k</sup>)(S)(OH))、羥肟酸(R<sup>k</sup> C(=O)NOH)及甲醛次硫酸根(HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub><sup>-</sup>)，或其混合物，其中 R<sup>i</sup> 為具有 1 至 10 個碳原子之直鏈或分支鏈烷基，且經至少一個選自-N(R<sup>j</sup>)<sub>2</sub>、-CO<sub>2</sub>H、-SO<sub>3</sub>H 及-PO<sub>3</sub>H 之取代基取代；R<sup>j</sup> 可進一步視情況經本文關於烷基所描述之取代基取代；R<sup>j</sup> 為具有 1 至 6 個碳原子之直鏈或分支鏈烷基；R<sup>k</sup> 為具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基、芳基、雜環基或雜芳基；

P' 為胺基酸殘基或含有介於 2 至 20 個之間之胺基酸殘基的肽；  
 R 在每次出現時獨立地選自由以下各物組成之群：-H；視情況經取代的具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；聚乙二醇單元-(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一個或多個獨立地選自氮、氧及硫之雜原子的 5 員至 18 員雜芳基環；或視情況經取代的含有 1 至 6 個獨立地選自 O、S、N 及 P 之雜原子的 3 員至 18 員雜環；  
 R' 及 R'' 各自獨立地選自-H；-OH；-OR；-NHR；-NR<sub>2</sub>；-COR；視情況經取代的具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；聚乙二醇單元-(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 1 至 6 個獨立地選自 O、S、N 及 P 之雜原子的 3 員至 18 員雜環；  
 R<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；  
 n 為 1 至 24 之整數；  
 X' 係選自-H；胺保護基；視情況經取代的具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；聚乙二醇單元-(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一個或多個獨立地選自氮、氧及硫之雜原子的 5 員至 18 員雜芳基環；及視情況經取代的含有 1 至 6 個獨立地選自 O、S、N 及 P 之雜原子的 3 員至 18 員雜環；  
 Y' 係選自-H；側氧基；視情況經取代的具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；視情況經取代之 6 員至 18 員芳基；視情況經取代的含有一個或多個獨立地選自氮、氧及硫之雜原子的 5 員



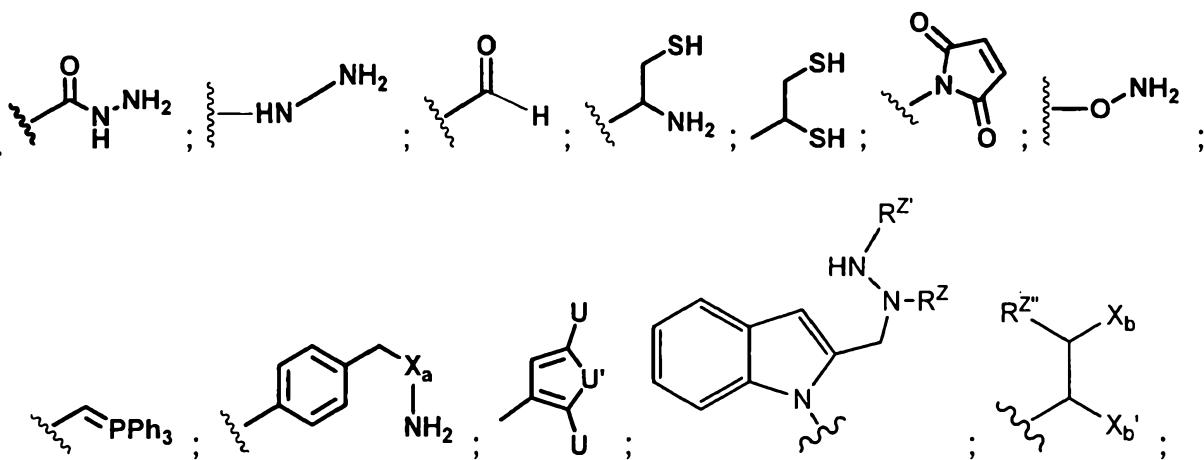
至 18 員雜芳基環；視情況經取代的含有 1 至 6 個雜原子之 3 員至 18 員雜環；

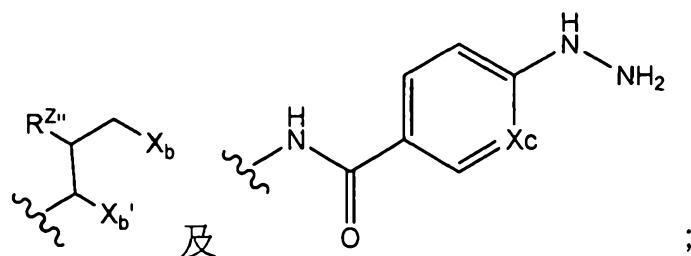
$R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_1'$ 、 $R_2'$ 、 $R_3'$  及  $R_4'$  各自獨立地選自由以下各物組成之群：-H；視情況經取代的具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；聚乙二醇單元- $(OCH_2CH_2)_nR^c$ ；鹵素；胍鎰 $[-NH(C=NH)NH_2]$ ；-OR；-NR' R' '；-NO<sub>2</sub>；-NCO；-NR' COR' '；-SR；-SOR' ；-SO<sub>2</sub>R' ；-SO<sub>3</sub>H；-OSO<sub>3</sub>H；-SO<sub>2</sub>NR' R' '；氰基；疊氨基；-COR' ；-OCOR' ；及-OCONR' R' '；  
 $R_6$ 為-H、-R、-OR、-SR、-NR' R' '、-NO<sub>2</sub>或鹵素；  
A 與 A' 相同或不同，且獨立地選自-O-、側氨基(-C(=O)-)、-CRR' O-、-CRR' -、-S-、-CRR' S-、-NR<sub>5</sub>及-CRR' N(R<sub>5</sub>)-；  
R<sub>5</sub>及 R<sub>9</sub>各自獨立地為-H，或視情況經取代的具有 1 至 10 個碳原子之直鏈或分支鏈烷基；

$J_{CB}$ 係醛反應性基團。

131. 如申請專利範圍第 130 項之化合物，其中  $J_{CB}$  為肼、醯肼或羥基胺。

132. 如申請專利範圍第 130 項之化合物，其中  $J_{CB}$  係選自：





其中  $X_a$  為  $\text{CH}_2$ 、 $\text{O}$  或  $\text{NCH}_3$ ； $U'$  為  $\text{NH}$ 、 $\text{O}$ 、 $\text{S}$  或  $\text{CH}_2$ ； $U$  為  $\text{H}$  或供電子基團； $X_b$  及  $X_b'$  各自獨立地為  $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$  或  $-\text{NH}_2$ ； $R^Z$  及  $R^{Z'}$  各自獨立地為  $\text{H}$  或烷基(較佳為  $-\text{Me}$ )； $R^Z'$  為  $\text{H}$  或烷基；及  $X_c$  為  $\text{N}$  或  $\text{CH}$ 。

133. 如申請專利範圍第 132 項之化合物，其中  $J_{\text{CB}}$  為 或

134. 如申請專利範圍第 130 項至第 133 項中任一項之化合物， $L_D'$ 、 $L_D''$  及  $L_D'''$  之一係由式(A)表示，且其餘各自獨立地為  $-\text{H}$ 、具有 1 至 6 個碳原子之直鏈或分支鏈烷基、鹵素、 $-\text{OH}$ 、 $(\text{C}_1\text{-}\text{C}_6)$  烷氧基或  $-\text{NO}_2$ 。

135. 如申請專利範圍第 134 項之化合物，其中  $L_D'$ 、 $L_D''$  及  $L_D'''$  之一係由式(A)表示，且其餘為  $-\text{H}$ 。

136. 如申請專利範圍第 135 項之化合物，其中  $L_D'$  係由式(A)表示，且其餘為  $-\text{H}$ 。

137. 如申請專利範圍第 130 項至第 136 項中任一項之化合物，其中在  $\text{N}$  與  $\text{C}$  之間之雙線 = 表示單鍵， $X$  為  $-\text{H}$  或胺保護基；且  $Y$  係選自  $-\text{H}$ 、 $-\text{OR}$ 、 $-\text{OCOR}'$ 、 $-\text{SR}$ 、 $-\text{NR}'\text{R}''$ 、視情況經取代之 5 員或 6 員含氮雜環、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{H}$  及  $-\text{OSO}_3\text{H}$ 。

138. 如申請專利範圍第 137 項之化合物，其中  $Y$  係選自  $-\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3\text{M}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{OMe}$ 、 $-\text{OEt}$  或  $-\text{NHOH}$ ，其中  $\text{M}$  為  $-\text{H}$ 、 $\text{Na}^+$  或  $\text{K}^+$ 。

139. 如申請專利範圍第 138 項之化合物，其中 Y 為-H、-SO<sub>3</sub>M 或-OH。
140. 如申請專利範圍第 130 項至第 139 項中任一項之化合物，其中 X' 係選自由以下各物組成之群：-H；-OH；視情況經取代的具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基；及苯基。
141. 如申請專利範圍第 140 項之化合物，其中 X' 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。
142. 如申請專利範圍第 141 項之化合物，其中 X' 為-H、-OH 或-Me。
143. 如申請專利範圍第 142 項之化合物，其中 X' 為-H。
144. 如申請專利範圍第 130 項至第 143 項中任一項之化合物，其中 Y' 係選自由以下各物組成之群：-H；側氧基；視情況經取代的具有 1 至 10 個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基。
145. 如申請專利範圍第 144 項之化合物，其中 Y' 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。
146. 如申請專利範圍第 144 項之化合物，其中 Y' 為-H 或側氧基。
147. 如申請專利範圍第 144 項之化合物，其中 Y' 為-H。
148. 如申請專利範圍第 130 項至第 147 項中任一項之化合物，其中 A 與 A' 相同或不同，且選自-O-、-S-、-NR<sub>5</sub>-及側氧基-(C=O)-。
149. 如申請專利範圍第 148 項之化合物，其中 A 與 A' 相同或不同，且選自-O-及-S-。
150. 如申請專利範圍第 149 項之化合物，其中 A 及 A' 為-O-。
151. 如申請專利範圍第 130 項至第 150 項中任一項之化合物，其中 R<sub>6</sub> 為 - OMe。

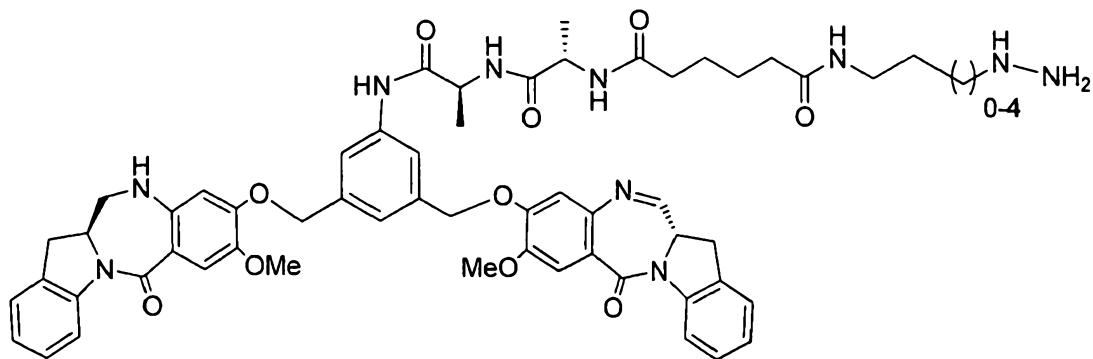
152. 如申請專利範圍第 130 項至第 151 項中任一項之化合物，其中  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_1'$ 、 $R_2'$ 、 $R_3'$  及  $R_4'$  獨立地為 -H、鹵素、-NO<sub>2</sub>、-OH、(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基、鹵基(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基或(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷氧基。
153. 如申請專利範圍第 152 項之化合物，其中  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_1'$ 、 $R_2'$ 、 $R_3'$  及  $R_4'$  均為-H。
154. 如申請專利範圍第 130 項至第 153 項中任一項之化合物，其中  $R$ 、 $R'$ 、 $R''$  及  $R_5$  各自獨立地為 -H 或(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基。
155. 如申請專利範圍第 130 項至第 136 項中任一項之化合物，其中：  
在 N 與 C 之間之雙線=表示單鍵或雙鍵，條件為當其為雙鍵時，X 不存在且 Y 為-H，且當其為單鍵時，X 為-H，Y 為-OH 或-SO<sub>3</sub>M；  
 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_1'$ 、 $R_2'$ 、 $R_3'$  及  $R_4'$  均為-H；  
 $R_6$  為-OMe；  
 $X'$  及  $Y'$  均為-H；  
 $A$  及  $A'$  為-O-；且  
 $M$  為 H、Na<sup>+</sup>或 K<sup>+</sup>。
156. 如申請專利範圍第 130 項至第 155 項中任一項之化合物，其中  $R_a$  及  $R_b$  均為 H。
157. 如申請專利範圍第 130 項至第 156 項中任一項之化合物，其中  $R_s$  及  $R_t$  各自獨立地為 H 或 Me。
158. 如申請專利範圍第 157 項之化合物，其中  $R_s$  及  $R_t$  均為 H。
159. 如申請專利範圍第 130 項至第 158 項中任一項之化合物，其中 P 為含有 2 至 10 個胺基酸殘基之肽。

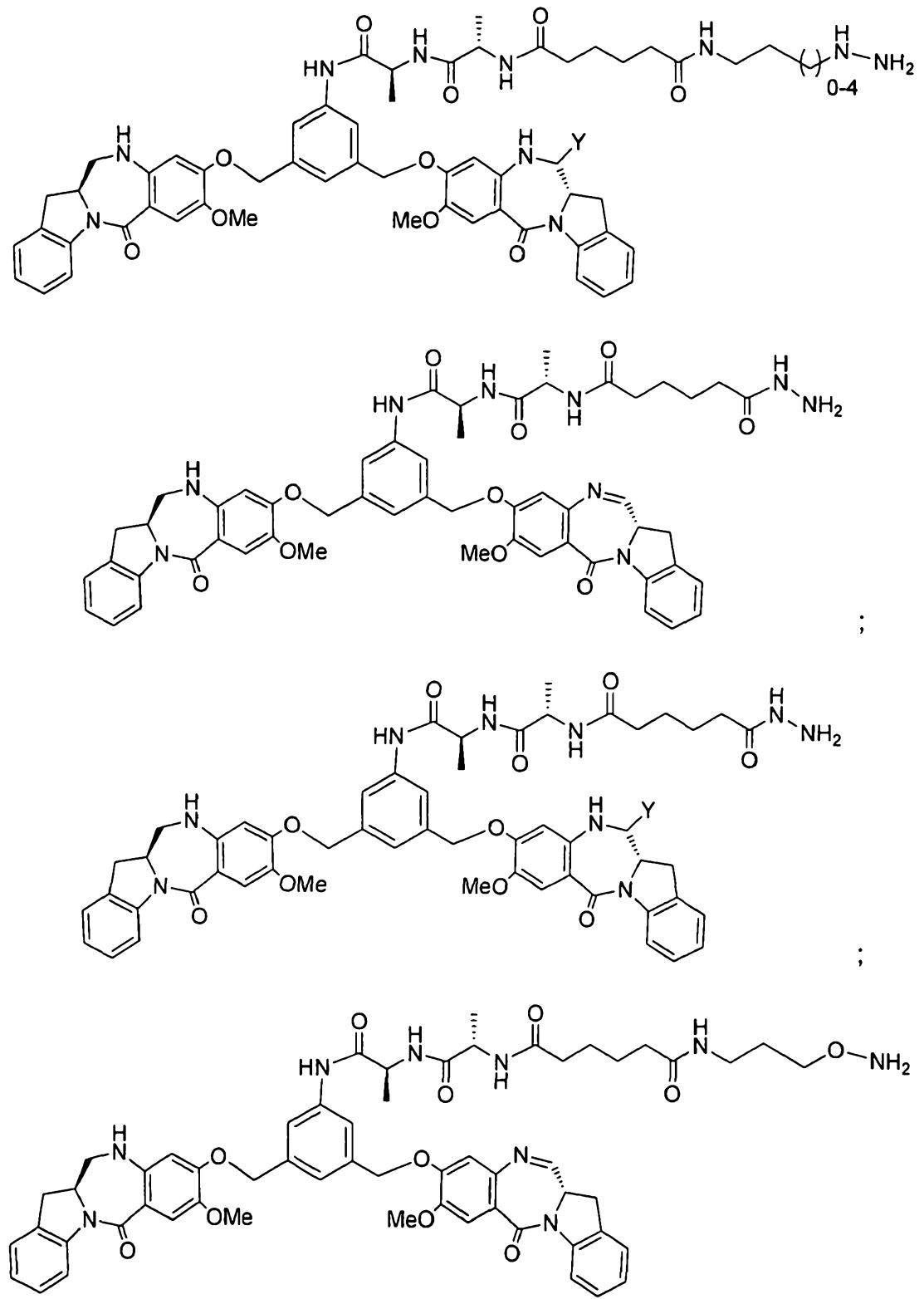
160. 如申請專利範圍第 159 項之化合物，其中 P 為含有 2 至 5 個胺基酸殘基之肽。

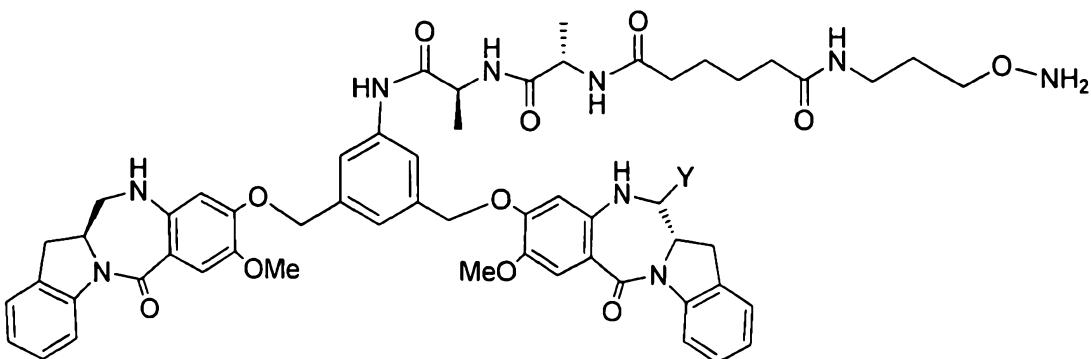
161. 如申請專利範圍第 160 項之化合物，其中 P 係選自 Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Lle-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-N<sup>9</sup>-甲苯磺醯基-Arg、Phe-N<sup>9</sup>-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 17)、 $\beta$ -Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 18) 及 Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 19)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala 及 D-Ala-D-Ala。

162. 如申請專利範圍第 160 項之化合物，其中 P 為 Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala 及 D-Ala-D-Ala。

163. 如申請專利範圍第 130 項之化合物，其中該化合物係由以下結構式表示：







或其醫藥學上可接受之鹽，其中 Y 為 - H 或-SO<sub>3</sub>M，且 M 為 H<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>或 K<sup>+</sup>。

164. 如申請專利範圍第 126 項之方法，其中該癌症為卵巢癌。
165. 如申請專利範圍第 1 項至第 6 項及第 13 項至第 80 項中任一項之偶聯物，其中該細胞結合劑(CBA)係特異性結合至 FOLR1、CD37、EGFR、CD19、CD33、CD123 或 Muc1 抗原之抗體或其抗原結合部分，其中 Ser 或 Thr 置換該抗體重鏈(HC)、輕鏈(LC)或其抗原結合部分之一個或多個 N 末端胺基酸殘基。
166. 如申請專利範圍第 1 項至第 6 項及第 13 項至第 80 項中任一項之偶聯物，其中該抗體包含選自由以下組成之群之抗體的 6 個 CDR 或重鏈可變區(HCVR)或輕鏈可變區(LCVR)序列：huMOV19、huCD37-3、huCD37-50、huEGFR-7R、huML66、huB4、huMy9-6 及 huDS6。
167. 如申請專利範圍第 165 項之偶聯物，其中特異性結合至 FOLR1 之抗葉酸受體抗體包含：
  - a) SEQ ID NO:45 之重鏈 CDR1、SEQ ID NO:46 之重鏈 CDR2 及 SEQ ID NO:47 之重鏈 CDR3；及
  - b) SEQ ID NO:48 之輕鏈 CDR1、SEQ ID NO:49 之輕鏈 CDR2 及 SEQ ID

NO:50 之輕鏈 CDR3。

168. 如申請專利範圍第 165 項之偶聯物，其中該特異性結合至 FOLR1 之抗葉酸受體抗體包含：

- a) 具有與 SEQ ID NO:55 至少約 90%、95%、99%或 100%同一之胺基酸序列之重鏈可變區(HCVR)；及
- b) 具有與 SEQ ID NO:56 或 SEQ ID NO:57 至少約 90%、95%、99%或 100%同一之胺基酸序列之輕鏈可變區(LCVR)。

169. 如申請專利範圍第 167 項或第 168 項之偶聯物，其中該特異性結合至 FOLR1 之抗葉酸受體抗體為 huMOV19 抗體。



















































































# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

## 【發明名稱】(中文/英文)

包含細胞結合劑及細胞毒性劑之偶聯物

CONJUGATES COMPRISING CELL-BINDING AGENTS AND  
CYTOTOXIC AGENTS

## 相關申請案之引用

【0001】 本申請案依據 35 U.S.C. §119(e)要求在 2014 年 9 月 3 日提交之美國臨時申請案號 62/045,264、2014 年 12 月 3 日提交之美國臨時申請案號 62/086,986、2015 年 4 月 17 日提交之美國臨時申請案號 62/149,379 及 2015 年 6 月 29 日提交之美國臨時申請案號 62/186,235 之提交日之權益，各案之完整內容，包括所有附圖、化學式、說明書及申請專利範圍，均以引用之方式併入本文中。

## 【技術領域】

本發明係關於新穎的細胞結合劑-細胞毒性劑偶聯物，製備該偶聯物之方法，以及使用該偶聯物在哺乳動物中抑制異常細胞生長或治療增生性病症的組成物及方法。

## 【先前技術】

【0002】 抗體-藥物偶聯物(ADC)及細胞結合劑-藥物偶聯物係作為對多種癌症具有功效的一類有效抗腫瘤劑而出現。細胞結合劑-藥物偶聯物(諸如 ADC)常常由三種不同成分構成：細胞結合劑(例如抗體)；連接子；及細胞毒性部分。通常，細胞毒性藥物部分係共價附接至抗體上之離胺酸，產生偶聯物，該等偶聯物為在抗體分子上不同位置處附接不同數量藥物之

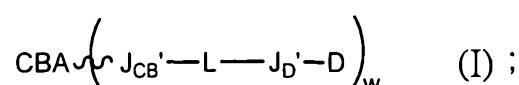
ADC 的非均質混合物。

### 【發明內容】

**【0003】** 意外地發現，細胞結合劑(諸如抗體)上之 N 末端絲氨酸殘基的 2-羥基乙胺部分可選擇性氧化成醛基，同時抗體不會過度氧化。所得到的具有醛基之抗體能夠與具有醛反應性基團之細胞毒性藥物或經由具有醛反應性基團之連接子化合物進行位點特異性偶聯。所得抗體-藥物偶聯物意外地保持與未偶聯抗體類似之抗原結合親和力，不過事實上，偶聯位點係位於抗體之 N 末端。此外，所得偶聯物儘管每個抗體僅連接有兩個分子之藥物負載，但出乎意料地展現出高效力，且耐受性優於離胺酸連接之偶聯物。

**【0004】** 在某些實施例中，該細胞結合劑，諸如抗體，係經由肟鍵聯(-C=N-O-)共價連接至細胞毒性劑。意外的是，相比最近公開之發現(參見 Agarwal 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110:46-51, 2013)，肟鍵聯在活體內具有高度穩定性。

**【0005】** 本發明提供一種由以下結構式表示之細胞結合劑-細胞毒性劑偶聯物：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

CBA 係共價連接至  $\text{J}_{\text{CB}'}$  基團之細胞結合劑；

$\text{J}_{\text{CB}'}$  係藉由使該 CBA 上之醛基與連接至基團 L 之醛反應性基團反應所形成的部分，其中該醛基係衍生自由以下結構式表示之 2-羥基乙胺部分的

(huMov19NTS2S3-SeriMab-sDGN462)的 Q-ToF 質譜(MS)資料。

**【0038】** 圖 21A 顯示了用於合成具有 4 DAR 之 huMOV19NTS2S3-SeriMab-MayNMA 偶聯物的示例性方案。圖 21B 顯示了具有 4 DAR 之 Ser 連接之 huMOV19-SeriMab-MayNMA 偶聯物的 Q-ToF 質譜(MS)資料。

**【0039】** 圖 22A-22C 顯示，在 AML 細胞株 SHI-1 (圖 22A) 及 HNT-34 (圖 22B)，以及 CML 細胞株 MOLM-1 (圖 22C) 中， huCD123-6 (huCD123-6Rv1.1S2-SeriMab-D8，實心黑色圓圈) 中之 SeriMab 的活性至少與同一抗體之離胺酸連接之偶聯物(huCD123-6Rv1.1-D2，實心黑色三角形)相同。在每個圖中連接空心資料點之虛線曲線表示在阻斷濃度(500 nM)之未偶聯 huCD123-6 抗體存在下對應偶聯物(亦即，huCD123-6Rv1.1S2-SeriMab-D8 為空心圓圈，及 huCD123-6Rv1.1-D2 為空心倒三角形)之活性。有關 Lys 連接之抗體-D2 偶聯物之結構，參見實例 28 (示出 huMOV19-D2 結構，而且 huCD123-6Rv1.1-D2 偶聯物具有相同結構)。

**【0040】** 圖 23 顯示，N 末端 Ser 特異性修飾或偶聯不會明顯地影響抗體與抗原之結合。如藉由 FACS 所量測，野生型抗 FR  $\alpha$  huMOV19 抗體、其 N 末端 Ser 修飾形式 huMOV19-NTS2 (「huMOV19-SeriMab 抗體」) 及其與細胞毒性化合物 D8 之偶聯物(huMOV19-SeriMab-D8)與帶有 FR  $\alpha$  之 T47D 細胞具有基本上相同之結合親和力。

**【0041】** 圖 24 顯示，huCD123-6Gv4.7S3-SeriMab-sD1 偶聯物(參見圖 18)在 EOL-1 細胞中顯示出與 huCD123-6Gv4.7S2(或 S3)-SeriMab-D8 偶聯物類似的效力。亦示出了 Lys 連接之 huCD123-6Gv4.7S3-sSPDB-D1 及 s

huCD123-6Gv4.7S3-D2 偶聯物之結果。

【0042】 圖 25 顯示了在較高 DAR 下，經 Ser 連接 huCD123 抗體之 DGN462 化合物針對 EOL-1 細胞的抗原特異性效力為離胺酸連接形式之 3 倍。

【0043】 圖 26A-26C 顯示，SeriMab-D8 (huMOV19-NTS#2-SeriMab-D8) 偶聯物具有與離胺酸偶聯物(huMOV19-D2)類似的抗原特異性效力及靶結合。

【0044】 圖 27 顯示了有關 huMOV19-SeriMab-D8 及相應 Lys 連接之 huMOV19-D2 偶聯物之旁觀者殺滅分析的結果。

【0045】 圖 28 顯示了在 huMOV19-NTS#2-胺氨基-乙醯基 MayNMA 偶聯物中肟鍵聯之活體內穩定性。

【0046】 圖 29 顯示了用 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  或 150  $\mu\text{g}/\text{kg}$  離胺酸連接之 huMOV19-D2 偶聯物或者 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  huMOV19-SeriMab-D8 處理之雌性 CD-1 小鼠之個體體重變化百分比。

【0047】 圖 30 顯示了用於合成本發明之偶聯物之示例性方案。

【0048】 圖 31A 及 31B 顯示了用於合成本發明之偶聯物的示例性方案。

### 【實施方式】

【0049】 現將更詳細地提及本發明某些實施例，其實例以所附結構及化學式說明。儘管本發明將結合所列舉之實施例進行描述，但應瞭解，其不意欲將本發明局限於該等實施例。正相反，本發明意欲涵蓋可包括在由申請專利範圍所界定之本發明之範圍內的所有替代方案、修改及等效內