



(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 202304520 A

(43)公開日：中華民國 112 (2023) 年 02 月 01 日

(21)申請案號：111111409

(22)申請日：中華民國 111 (2022) 年 03 月 25 日

(51)Int. Cl.：

*A61K47/68 (2017.01)**C07D403/08 (2006.01)**C07K16/28 (2006.01)**A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2021/03/26

美國

63/166,710

(71)申請人：美商博特生物治療公司 (美國) BOLT BIOTHERAPEUTICS, INC. (US)

美國

(72)發明人：布蘭特 蓋瑞 BRANDT, GARY (US)；庫迪爾卡 羅瑪斯 KUDIRKA, ROMAS

(US)；薩菲納 布萊恩 SAFINA, BRIAN (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：41 項 圖式數：0 共 205 頁

(54)名稱

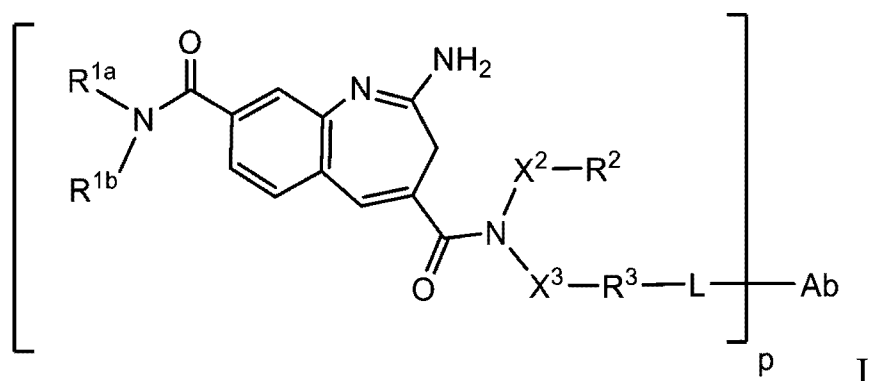
2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋免疫結合物及其用途

(57)摘要

本發明提供式 I 之免疫結合物，其包含藉由與一或多個 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋衍生物結合而連接之抗體。本發明亦提供 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋衍生物中間物組合物，其包含反應性官能基。此類中間物組合物為適用於透過連接子或連接部分形成該等免疫結合物之受質。本發明進一步提供用該等免疫結合物治療癌症之方法。

The invention provides immunoconjugates of Formula I comprising an antibody linked by conjugation to one or more 2-amino-4-carboxamide-benzazepine derivatives. The invention also provides 2-amino-4-carboxamide-benzazepine derivative intermediate compositions comprising a reactive functional group. Such intermediate compositions are suitable substrates for formation of the immunoconjugates through a linker or linking moiety. The invention further provides methods of treating cancer with the immunoconjugates.

特徵化學式：



【發明摘要】

【中文發明名稱】2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋免疫結合物及其用途

【英文發明名稱】2-AMINO-4-CARBOXAMIDE-BENZAZEPINE

IMMUNOCONJUGATES, AND USES THEREOF

【中文】

本發明提供式 I 之免疫結合物，其包含藉由與一或多個 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋衍生物結合而連接之抗體。本發明亦提供 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋衍生物中間物組合物，其包含反應性官能基。此類中間物組合物為適用於透過連接子或連接部分形成該等免疫結合物之受質。本發明進一步提供用該等免疫結合物治療癌症之方法。

【英文】

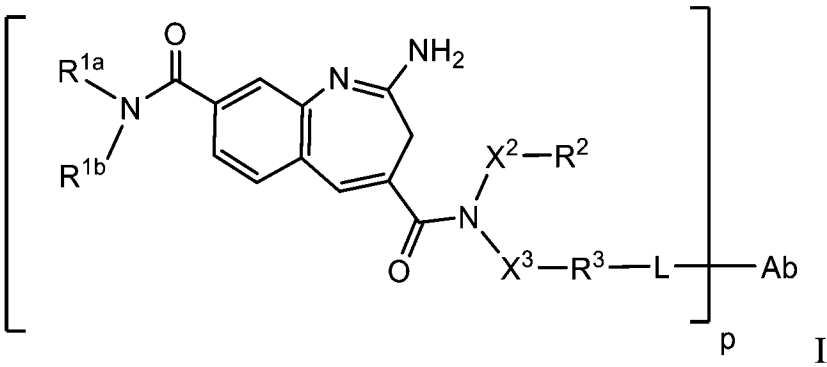
The invention provides immunoconjugates of Formula I comprising an antibody linked by conjugation to one or more 2-amino-4-carboxamide-benzazepine derivatives. The invention also provides 2-amino-4-carboxamide-benzazepine derivative intermediate compositions comprising a reactive functional group. Such intermediate compositions are suitable substrates for formation of the immunoconjugates through a linker or linking moiety. The invention further provides methods of treating cancer with the immunoconjugates.

【指定代表圖】無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】



【發明說明書】

【中文發明名稱】 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋免疫結合物及其用途

【英文發明名稱】 2-AMINO-4-CARBOXAMIDE-BENZAZEPINE

IMMUNOCONJUGATES, AND USES THEREOF

【技術領域】

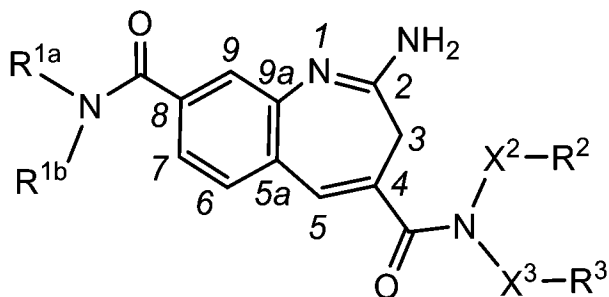
【0001】 本發明一般而言係關於一種免疫結合物，其包含結合至一或多個 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋分子之抗體。

【先前技術】

【0002】 為了達至不可及之腫瘤及/或擴大癌症患者及其他個體之治療選擇，需要用於遞送抗體及樹突細胞/髓系細胞佐劑之新組合物及方法。本發明提供此類組合物及方法。

【發明內容】

【0003】 本發明一般而言係關於免疫結合物，其包含藉由與一或多個 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋衍生物結合而連接之抗體。本發明進一步係關於 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋衍生物中間物組合物，其包含反應性官能基。此類中間物組合物為適合於形成免疫結合物之受質，其中抗體可藉由連接子 L 共價結合至具有下式之 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋部分的 4 位置：



【0004】 其中 R³ 連接至連接子 L。3H-苯并[b]氮呋結構之位置根據 IUPAC 慣例編號。X²⁻³ 及 R¹⁻³ 取代基在本文中定義。

【0005】 該抗體結合至選自由 PD-L1、HER2、TROP2 及 CEA 組成之群的標

靶。

【0006】 本發明進一步係關於此種免疫結合物用於治療疾病、特別是癌症之用途。

【0007】 本發明之一態樣為一種包含抗體之免疫結合物，該抗體共價連接至連接子，該連接子共價連接至一或多個 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋部分。

【0008】 本發明之另一態樣為一種 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋-連接子化合物。

【0009】 本發明之另一態樣為一種用於治療癌症之方法，該方法包含投與治療有效量之免疫結合物，該免疫結合物包含藉由與一或多個 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋部分結合而連接之抗體。

【0010】 本發明之另一態樣為免疫結合物用於治療癌症之用途，該免疫結合物包含藉由與一或多個 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋部分結合而連接之抗體。

【0011】 本發明之另一態樣為一種製備免疫結合物之方法，該方法係藉由使一或多個 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋部分與抗體結合來進行。

【實施方式】

相關申請案之交叉引用

【0012】 本非臨時申請案主張 2021 年 3 月 26 日申請之美國臨時申請案第 63/166,710 號之優先權益，該美國臨時申請案以引用方式整體併入本文中。

序列表

【0013】 本申請案含有序列表，該序列表已以 ASCII 格式以電子方式提交且由此以引用之方式整體併入。該 ASCII 副本創建於 2022 年 3 月 23 日，名為 17019_015TW1_SL.txt 且大小為 80,911 位元組。

【0014】 現將詳細參照本發明之某些實施例，該等實施例之實例以所附結構及式予以說明。雖然本發明將聯合所列舉之實施例來描述，但應理解其不意欲將

本發明局限於彼等實施例。相反地，本發明意欲涵蓋可包括在如由申請專利範圍限定的本發明之範疇內的所有替代、修改、及等效物。

【0015】 熟習此項技術者應認識到與本文所述之彼等相似或相等之多種方法及材料，其可能用於本發明之實踐。本發明決不限於所述方法及材料。

定義

【0016】 術語「類鐸受體(Toll-like receptor)」及「TLR」係指識別病原體相關分子模式且在先天免疫中充當主要傳訊元件之高度保守哺乳動物蛋白質家族之任何成員。TLR 多肽共享一特徵結構，該特徵結構包括具有富白胺酸重複之細胞外域、跨膜域及參與 TLR 傳訊之細胞內域。

【0017】 術語「類鐸受體 7」及「TLR7」係指與公眾可獲得之 TLR7 序列共享至少約 70%、約 80%、約 90%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99% 或更大序列一致性之核酸或多肽，該公眾可獲得之 TLR7 序列例如人類 TLR7 多肽之 GenBank 登錄號 AAZ99026 或鼠類 TLR7 多肽之 GenBank 登錄號 AAK62676。

【0018】 術語「類鐸受體 8」及「TLR8」係指與公眾可獲得之 TLR7 序列共享至少約 70%、約 80%、約 90%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99% 或更大序列一致性之核酸或多肽，該公眾可獲得之 TLR7 序列例如人類 TLR8 多肽之 GenBank 登錄號 AAZ95441 或鼠類 TLR8 多肽之 GenBank 登錄號 AAK62677。

【0019】 「TLR 促效劑」為直接或間接結合至 TLR (例如，TLR7 及/或 TLR8) 以誘導 TLR 傳訊之物質。任何可偵測之 TLR 傳訊差異均可表明促效劑刺激或活化 TLR。傳訊差異可表現為例如以下各項之改變：靶基因之表現、信號轉導組分之磷酸化、下游元件(諸如核因子- κ B (NF- κ B))之細胞內定位、某些組分(諸如 IL-1 受體相關激酶(IRAK))與其他蛋白質或細胞內結構之締合或諸如激酶(諸如

促分裂原活化之蛋白激酶(MAPK))之組分的生化活性。

【0020】 「抗體」係指包含來自免疫球蛋白基因或其片段之抗原結合區(包括互補決定區(CDR))的多肽。術語「抗體」特定而言涵蓋單株抗體(包括全長單株抗體)、多株抗體、多特異性抗體(例如雙特異性抗體)及展現所需生物活性之抗體片段。示範性免疫球蛋白(抗體)結構單元包括四聚體。各四聚體主要由兩對相同的多肽鏈組成，每一對具有藉由二硫鍵連接之一個「輕鏈」(約 25 kDa)及一個「重鏈」(約 50-70 kDa)。各鏈由結構域組成，該等結構域稱為免疫球蛋白域。此等域根據大小及功能分類為不同類別，例如輕鏈及重鏈上之可變域或可變區(分別為 V_L 及 V_H)及輕鏈及重鏈上之恆定域或恆定區(分別為 C_L 及 C_H)。各鏈之 N 端界定主要負責抗原識別(亦即，抗原結合域)的具有約 100 個至 110 個或更多個胺基酸之可變區，其稱為互補位。輕鏈被分類為 κ (kappa)或 λ (lambda)。重鏈被分類為 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ，其又分別定義免疫球蛋白類別 IgG、IgM、IgA、IgD 及 IgE。IgG 抗體為約 150 kDa 之大分子，由四條肽鏈組成。IgG 抗體含有兩條約 50 kDa 之一致 γ 類重鏈及兩條約 25 kDa 之一致輕鏈，因此為四聚四級結構。兩條重鏈彼此連接且各自藉由二硫鍵連接至輕鏈。所得四聚體具有一致之兩半，其一起形成 Y 樣形狀。叉形物之各末端含有一致之抗原結合域。人類中存在四個 IgG 子類(IgG1、IgG2、IgG3 及 IgG4)，以其在血清中之豐度順序命名(亦即，IgG1 最豐富)。典型地，在結合於癌細胞之特異性及親和力中抗體之抗原結合域將最為關鍵。

【0021】 「雙特異性」抗體(bsAb)為結合癌症之兩個不同表位之抗體(Suurs F.V.等人(2019) *Pharmacology & Therapeutics* 201: 103-119)。雙特異性抗體可接合免疫細胞以破壞腫瘤細胞、將有效負荷遞送至腫瘤且/或阻斷腫瘤傳訊途徑。靶向特定抗原之抗體包括具有靶向該特定抗原之至少一個抗原結合區之雙特異性或多特異性抗體。在一些實施例中，靶向性單株抗體為具有靶向腫瘤細胞之至

少一個抗原結合區之雙特異性抗體。此類抗原包括但不限於：間皮素、前列腺特異性膜抗原(PSMA)、HER2、TROP2、CEA、EGFR、5T4、Nectin4、CD19、CD20、CD22、CD30、CD70、B7H3、B7H4 (亦稱為 08E)、蛋白酪氨酸激酶 7 (PTK7)、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 (glypican-3)、RG1、岩藻糖基-GM1、CTLA-4 及 CD44 (WO 2017/196598)。

【0022】 靶向特定抗原之抗體包括具有靶向該特定抗原之至少一個抗原結合區之雙特異性或多特異性抗體。在一些實施例中，靶向性單株抗體為具有靶向腫瘤細胞之至少一個抗原結合區之雙特異性抗體。此類抗原包括 CD47、SIRP α 、Dectin-2、PD-1 及 PD-L1。

【0023】 「抗體構築體」係指包含(i)抗原結合域及(ii) Fc 域之抗體或融合蛋白。

【0024】 術語「免疫結合物」係指藉由連接子共價鍵結至佐劑部分之抗體構築體。免疫結合物允許靶向性遞送活性佐劑部分，同時結合靶抗原。

【0025】 「佐劑」係指能夠在暴露於佐劑之個體中引發免疫反應之物質。片語「佐劑部分」係指例如如本文所描述通過連接子共價鍵結至抗體構築體之佐劑。佐劑部分可在鍵結至抗體構築體時或在向個體投與免疫結合物後自抗體構築體裂解(例如酶促裂解)後引發免疫反應。

【0026】 在一些實施例中，結合劑為抗原結合抗體「片段」，其為至少包含單獨或與一起構成抗原結合構築體之其他組分一起的抗體之抗原結合區的構築體。許多不同類型之抗體「片段」為此項技術中已知的，包括例如(i) Fab 片段，其為由 V_L、V_H、C_L 及 CH₁ 域組成之單價片段；(ii) F(ab')₂ 片段，其為包含在鉸鏈區藉由二硫橋連接之兩個 Fab 片段的二價片段；(iii) Fv 片段，其由抗體之單一臂之 V_L 及 V_H 域組成；(iv) Fab' 片段，其由使用適度還原條件破壞 F(ab')₂ 片段之二硫橋產生；(v) 二硫鍵穩定之 Fv 片段(dsFv)；及(vi) 單鏈 Fv (scFv)，其為由藉由合

成連接子連接之 Fv 片段之兩個域(亦即, V_L 及 V_H)組成之單價分子, 該合成連接子能夠將兩個域合成為單一多肽鏈。

【0027】 抗體或抗體片段可為較大構築體(例如抗體片段與其他區域之結合物或融合構築體)之一部分。舉例而言, 在一些實施例中, 抗體片段可融合至如本文所描述之 Fc 區。在其他實施例中, 抗體片段(例如 Fab 或 scFv)可為例如藉由融合至跨膜域(視情況具有中間連接子或「莖」(例如鉸鏈區))及視情況存在之細胞間傳訊域而得到的嵌合抗原受體或嵌合 T 細胞受體之一部分。舉例而言, 抗體片段可融合至 t 細胞受體之 γ 及/或 δ 鏈, 以便提供結合 PD-L1 之 T 細胞受體樣構築體。在另一實施例中, 抗體片段為包含 CD1 或 CD3 結合域及連接子之雙特異性 T 細胞接合器(BiTE)之一部分。

【0028】 「半胱胺酸突變抗體」為其中抗體之一或多個胺基酸殘基經半胱胺酸殘基取代之抗體。半胱胺酸突變抗體可藉由抗體工程化方法由母體抗體製備(Junutula 等人, (2008b) *Nature Biotech.*, 26(8):925-932; Dornan 等人(2009) *Blood* 114(13):2721-2729; US 7521541; US 7723485; US 2012/0121615; WO 2009/052249)。半胱胺酸殘基提供佐劑諸如 TLR 促效劑於抗體透過工程化之半胱胺酸位點處之反應性半胱胺酸硫醇基團進行之位點特異性結合, 但不會干擾免疫球蛋白折疊及組裝或改變抗原結合及效應功能。半胱胺酸突變抗體可以免疫結合物之均勻化學計量結合至 TLR 促效劑-連接子化合物(例如在具有單一工程化之突變半胱胺酸位點之抗體中每個抗體至多兩個 TLR 促效劑部分)。TLR 促效劑-連接子化合物具有反應性親電基團, 以與半胱胺酸突變抗體之遊離半胱胺酸硫醇基團特異性反應。

【0029】 「表位」意指抗原之與抗原結合域(亦即, 在抗原結合域之互補位處)結合的任何抗原決定位或表位決定位。抗原決定位通常由化學活性表面成組之分子(諸如胺基酸或糖側鏈)組成, 且通常具有特定三維結構特徵, 以及特定電荷

特徵。

【0030】術語「Fc 受體」或「FcR」係指結合於抗體之 Fc 區的受體。存在三種主要類別之 Fc 受體：(1) Fc γ R，其結合於 IgG，(2) Fc α R，其結合於 IgA，及 (3) Fc ϵ R，其結合於 IgE。Fc γ R 家族包括若干成員，諸如 Fc γ I (CD64)、Fc γ RIIA (CD32A)、Fc γ RIIB (CD32B)、Fc γ RIIIA (CD16A)及 Fc γ RIIIB (CD16B)。Fc γ 受體對 IgG 之親和力不同且亦對 IgG 子類(例如 IgG1、IgG2、IgG3 及 IgG4)具有不同親和力。

【0031】如本文所用，片語「免疫檢查點抑制劑」係指抑制免疫檢查點分子之活性的任何調節劑。免疫檢查點抑制劑可包括但不限於免疫檢查點分子結合蛋白、小分子抑制劑、抗體(包括具有靶向免疫檢查點蛋白之至少一個抗原結合區之雙特異性及多特異性抗體，例如不會專門靶向免疫檢查點蛋白之雙特異性或多特異性抗體，以及作為雙重免疫調節劑之抗體(同時靶向兩種免疫調節標靶)，其導致抑制性標靶阻斷、抑制性細胞耗盡及/或效應細胞活化；腫瘤靶向免疫調節劑(藉由靶向腫瘤抗原及共刺激分子諸如 CD40 或 4-1BB 來引導對腫瘤浸潤性免疫細胞之強效共刺激)；NK-細胞重定向劑(藉由靶向腫瘤抗原及 CD16A 來將 NK 細胞重定向到惡性細胞)；或 T-細胞重定向劑(藉由靶向腫瘤抗原及 CD3 來將 T 細胞重定向到惡性細胞))、抗體衍生物(包括 Fc 融合物、Fab 片段及 scFv)、抗體-藥物結合物、反股寡核苷酸、siRNA、適體、肽及肽模擬物。

【0032】如本文所提及，核酸或胺基酸序列「一致性」可藉由將相關核酸或胺基酸序列與參考核酸或胺基酸序列相比較來確定。一致性百分比為最佳比對之相關序列與參考序列之間相同(亦即，一致)之核苷酸或胺基酸殘基數目除以最長序列之長度(亦即，相關序列或參考序列之長度，以較長者為準)。序列之比對及一致性百分比之計算可使用可獲得之軟體程式來進行。此等程式之實例包括 CLUSTAL-W、T-Coffee 及 ALIGN (用於比對核酸及胺基酸序列)、BLAST 程式

(例如 BLAST 2.1、BL2SEQ、BLASTp、BLASTn 及類似程式)及 FASTA 程式(例如 FASTA3x、FASTM 及 SSEARCH)(用於序列比對及序列相似性檢索)。序列比對算法亦揭示於例如 Altschul 等人, *J. Molecular Biol.*, 215(3): 403-410 (1990); Beigert 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106(10): 3770-3775 (2009); Durbin 等人編, *Biological Sequence Analysis: Probabilistic Models of Proteins and Nucleic Acids*, Cambridge University Press, Cambridge, UK (2009); Soding, *Bioinformatics*, 21(7): 951-960 (2005); Altschul 等人, *Nucleic Acids Res.*, 25(17): 3389-3402 (1997); 及 Gusfield, *Algorithms on Strings, Trees and Sequences*, Cambridge University Press, Cambridge UK (1997))。序列一致性百分比(%)亦可例如經計算為 $100 \times [(一致位置)/\min(TG_A, TG_B)]$, 其中 TG_A 及 TG_B 為在使 TG_A 及 TG_B 最小化之比對中肽序列 A 及 B 中之殘基及內部空隙位置之數目的總和。參見例如 Russell 等人, *J. Mol Biol.*, 244: 332-350 (1994)。

【0033】 結合劑包含一起形成抗原結合位點之 Ig 重鏈及輕鏈可變區多肽。重鏈及輕鏈可變區中之每一者為包含藉由構架區連接之三個互補決定區(CDR1、CDR2 及 CDR3)的多肽。結合劑可為此項技術中已知的包含 Ig 重鏈及輕鏈之多種類型結合劑中之任一者。舉例而言, 結合劑可為抗體、抗原結合抗體「片段」或 T 細胞受體。

【0034】 「生物類似物」係指經批准之抗體構築體, 其活性特性類似於例如先前經批准之靶向 PD-L1 之抗體構築體, 諸如阿特珠單抗(atezolizumab) (TECENTRIQ™, Genentech, Inc.)、德瓦魯單抗(durvalumab) (IMFINZI™, AstraZeneca)及阿維單抗(avelumab) (BAVENCIO™, EMD Serono, Pfizer); 先前經批准之靶向 HER2 之抗體構築體, 諸如曲妥珠單抗(trastuzumab) (HERCEPTIN™, Genentech, Inc.)及帕妥珠單抗(pertuzumab) (PERJETA™, Genentech, Inc.); 或靶向 CEA 之抗體, 諸如拉貝珠單抗(labetuzumab) (CEA-

CIDE™、MN-14、hMN14，Immunomedics) CAS 登記號 219649-07-7)。

【0035】 「生物改良物(Biobetter)」係指經批准之抗體構築體，其為諸如阿特珠單抗、德瓦魯單抗、阿維單抗、曲妥珠單抗、帕妥珠單抗及拉貝珠單抗之先前批准之抗體構築體的改良。生物改良物可相較於先前批准之抗體構築體具有一或多個修飾(例如改變之聚醣型態，或獨特表位)。

【0036】 「胺基酸」係指可併入肽、多肽或蛋白質中之任何單體單元。胺基酸包括天然存在之 α -胺基酸及其立體異構物，以及非天然(非天然存在之)胺基酸及其立體異構物。給定胺基酸之「立體異構物」係指分子式及分子內鍵相同但鍵及原子之三維排列不同之異構物(例如 L-胺基酸及對應 D-胺基酸)。胺基酸可經醣基化(例如 N-連接之聚醣、O-連接之聚醣、磷酸聚醣、C-連接之聚醣或糖基磷脂醯肌醇化(glypication))或去醣基化。在本文中可藉由通常已知之三字母符號或藉由 IUPAC-IUB 生物化學命名委員會建議之一字母符號提及胺基酸。

【0037】 天然存在之胺基酸為由遺傳密碼編碼之彼等胺基酸，以及隨後經修飾之彼等胺基酸，例如羥基脯胺酸、 γ -羧基麩胺酸鹽及 O-磷酸絲胺酸。天然存在之 α -胺基酸包括但不限於丙胺酸(Ala)、半胱胺酸(Cys)、天冬胺酸(Asp)、麩胺酸(Glu)、苯丙胺酸(Phe)、甘胺酸(Gly)、組胺酸(His)、異白胺酸(Ile)、精胺酸(Arg)、離胺酸(Lys)、白胺酸(Leu)、甲硫胺酸(Met)、天冬醯胺(Asn)、脯胺酸(Pro)、麩醯胺(Gln)、絲胺酸(Ser)、蘇胺酸(Thr)、纈胺酸(Val)、色胺酸(Trp)、酪胺酸(Tyr)及其組合。天然存在之 α -胺基酸之立體異構物包括但不限於 D-丙胺酸(D-Ala)、D-半胱胺酸(D-Cys)、D-天冬胺酸(D-Asp)、D-麩胺酸(D-Glu)、D-苯丙胺酸(D-Phe)、D-組胺酸(D-His)、D-異白胺酸(D-Ile)、D-精胺酸(D-Arg)、D-離胺酸(D-Lys)、D-白胺酸(D-Leu)、D-甲硫胺酸(D-Met)、D-天冬醯胺(D-Asn)、D-脯胺酸(D-Pro)、D-麩醯胺(D-Gln)、D-絲胺酸(D-Ser)、D-蘇胺酸(D-Thr)、D-纈胺酸(D-Val)、D-色胺酸(D-Trp)、D-酪胺酸(D-Tyr)及其組合。

【0038】 天然存在之胺基酸包括在蛋白質中藉由轉譯後修飾形成之彼等胺基酸，諸如瓜胺酸(Cit)。

【0039】 非天然(非天然存在之)胺基酸包括但不限於呈 L-組態或 D-組態之胺基酸類似物、胺基酸模擬物、合成胺基酸、*N*-取代甘胺酸及 *N*-甲基胺基酸，其以類似於天然存在之胺基酸的方式發揮功能。舉例而言，「胺基酸類似物」可為非天然胺基酸，其與天然存在之胺基酸具有相同基本化學結構(亦即，鍵結至氫、羧基、胺基之碳)，但具有經修飾之側鏈基團或經修飾之肽骨架，例如高絲胺酸、正白胺酸、甲硫胺酸亞砷及甲硫胺酸甲基銻。「胺基酸模擬物」係指結構不同於胺基酸之一般化學結構，但以類似於天然存在之胺基酸的方式發揮功能的化合物。

【0040】 「連接子」係指共價鍵結化合物或材料中之兩個或更多個部分之官能基。舉例而言，連接部分可用以在免疫結合物中使佐劑部分共價鍵結至抗體構築體。

【0041】 「連接部分」係指共價鍵結化合物或材料中之兩個或更多個部分的官能基。舉例而言，連接部分可用以在免疫結合物中使佐劑部分共價鍵結至抗體。適合用於將連接部分連接至蛋白質及其他材料之鍵包括但不限於醯胺、胺、酯、胺基甲酸酯、尿素、硫醚、硫代胺基甲酸酯、硫代碳酸酯及硫脲。

【0042】 「二價」係指含有用於連接兩個官能基之兩個連接點的化學部分；多價連接部分可具有用於連接進一步官能基之額外連接點。二價基團可用後綴「二基」表示。舉例而言，二價連接部分包括二價聚合物部分，諸如二價聚(乙二醇)、二價環烷基、二價雜環烷基、二價芳基及二價雜芳基。「二價環烷基、雜環烷基、芳基或雜芳基」係指具有用於共價連接分子或材料中之兩個部分之兩個連接點的環烷基、雜環烷基、芳基或雜芳基。環烷基、雜環烷基、芳基或雜芳基可經取代或未經取代。環烷基、雜環烷基、芳基或雜芳基可經選自以下之一或

多個基團取代：鹵基、羥基、胺基、烷基胺基、醯胺基、醯基、硝基、氰基及烷氧基。

【0043】 波浪線(「」)表示指定化學部分之連接點。若指定化學部分有兩個波浪線(「」)存在，則應瞭解該化學部分可雙向使用，亦即，如自左至右或自右至左讀取。在一些實施例中，指定部分有兩個波浪線(「」)存在被視為如自左至右讀取進行使用。

【0044】 「烷基」係指具有所指示之碳原子數目的直鏈(線性)或分支鏈、飽和、脂族基。烷基可包括任何數目之碳，例如一個至十二個。烷基之實例包括但不限於甲基(Me, -CH₃)、乙基(Et, -CH₂CH₃)、1-丙基(n-Pr, 正丙基, -CH₂CH₂CH₃)、2-丙基(i-Pr, 異丙基, -CH(CH₃)₂)、1-丁基(n-Bu, 正丁基, -CH₂CH₂CH₂CH₃)、2-甲基-1-丙基(i-Bu, 異丁基, -CH₂CH(CH₃)₂)、2-丁基(s-Bu, 第二丁基, -CH(CH₃)CH₂CH₃)、2-甲基-2-丙基(t-Bu, 第三丁基, -C(CH₃)₃)、1-戊基(正戊基, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃)、2-戊基(-CH(CH₃)CH₂CH₂CH₃)、3-戊基(-CH(CH₂CH₃)₂)、2-甲基-2-丁基(-C(CH₃)₂CH₂CH₃)、3-甲基-2-丁基(-CH(CH₃)CH(CH₃)₂)、3-甲基-1-丁基(-CH₂CH₂CH(CH₃)₂)、2-甲基-1-丁基(-CH₂CH(CH₃)CH₂CH₃)、1-己基(-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃)、2-己基(-CH(CH₃)CH₂CH₂CH₂CH₃)、3-己基(-CH(CH₂CH₃)(CH₂CH₂CH₃))、2-甲基-2-戊基(-C(CH₃)₂CH₂CH₂CH₃)、3-甲基-2-戊基(-CH(CH₃)CH(CH₃)CH₂CH₃)、4-甲基-2-戊基(-CH(CH₃)CH₂CH(CH₃)₂)、3-甲基-3-戊基(-C(CH₃)(CH₂CH₃)₂)、2-甲基-3-戊基(-CH(CH₂CH₃)CH(CH₃)₂)、2,3-二甲基-2-丁基(-C(CH₃)₂CH(CH₃)₂)、3,3-二甲基-2-丁基(-CH(CH₃)C(CH₃)₃)、1-庚基、1-辛基及類似基團。烷基可經取代或未經取代。「經取代之烷基」可經選自以下之一或多個基團取代：鹵基、羥基、胺基、側氧基(=O)、烷基胺基、醯胺基、醯基、硝基、氰基及烷氧基。

【0045】 術語「烷基二基」係指二價烷基。烷基二基之實例包括但不限於亞甲

基(-CH₂-)、伸乙基(-CH₂CH₂-)、伸丙基(-CH₂CH₂CH₂-)及類似基團。烷基二基基團亦可稱為「伸烷基」。

【0046】 「烯基」係指具有所指示之碳原子數目及至少一個碳-碳雙鍵(*sp*²)之直鏈(線性)或分支鏈、不飽和、脂族基。烯基可包括兩個至約 12 個或更多個碳原子。烯基為具有「順式」及「反式」取向或者「E」及「Z」取向之基團。實例包括但不限於乙烯基(ethylenyl/vinyl) (-CH=CH₂)、烯丙基(-CH₂CH=CH₂)、丁烯基、戊烯基及其異構物。烯基可經取代或未經取代。「經取代之烯基」可經選自以下之一或多個基團取代：鹵基、羥基、胺基、側氧基(=O)、烷基胺基、醯胺基、醯基、硝基、氰基及烷氧基。

【0047】 術語「伸烯基」或「烯基二基」係指直鏈或分支鏈二價烯基。實例包括但不限於伸乙烯基(ethylenylene/vinylene) (-CH=CH-)、烯丙基(-CH₂CH=CH-)及類似基團。

【0048】 「炔基」係指具有所指示之碳原子數目及至少一個碳-碳三鍵(*sp*)之直鏈(線性)或分支鏈、不飽和、脂族基。炔基可包括兩個至約 12 個或更多個碳原子。舉例而言，C₂-C₆ 炔基包括但不限於乙炔基(-C≡CH)、丙炔基(炔丙基，-CH₂C≡CH)、丁炔基、戊炔基、己炔基及其異構物。炔基可經取代或未經取代。

「經取代之炔基」可經選自以下之一或多個基團取代：鹵基、羥基、胺基、側氧基(=O)、烷基胺基、醯胺基、醯基、硝基、氰基及烷氧基。

【0049】 術語「伸炔基」或「炔基二基」係指二價炔基。

【0050】 術語「碳環(carbocycle)」、「碳環基」、「碳環(carbocyclic ring)」及「環烷基」係指含有 3 至 12 個環原子或所指示之原子數目的飽和或部分不飽和、單環、稠合雙環或橋接多環組件。飽和單環碳環包括例如環丙基、環丁基、環戊基、環己基及環辛基。飽和雙環及多環碳環包括例如降莰烷(norbornane)、[2.2.2]二環辛烷、十氫萘及金剛烷。碳環基亦可為部分不飽和的，環中具有一或多個雙

鍵或三鍵。代表性部分不飽和之碳環基包括但不限於環丁烯、環戊烯、環己烯、環己二烯(1,3-異構物及 1,4-異構物)、環庚烯、環庚二烯、環辛烯、環辛二烯(1,3-異構物、1,4-異構物及 1,5-異構物)、降莧烯及降莧二烯。

【0051】 術語「環烷基二基」係指二價環烷基。

【0052】 「芳基」係指藉由自母體芳族環系統之單一碳原子移除一個氫原子衍生而來之 6-20 個碳原子(C_6-C_{20})的單價芳族烴基。芳基可為單環，經稠合形成雙環或三環基團，或由鍵連接形成二芳基。代表性芳基包括苯基、萘基及聯苯基。其他芳基包括苯甲基，其具有亞甲基連接基團。一些芳基具有 6 至 12 個環成員，諸如苯基、萘基或聯苯基。其他芳基具有 6 至 10 個環成員，諸如苯基或萘基。

【0053】 術語「伸芳基」或「芳基二基」意謂藉由自母體芳族環系統之兩個碳原子移除兩個氫原子衍生而來之 6-20 個碳原子(C_6-C_{20})的二價芳族烴基。一些芳基二基在示範性結構中表示為「Ar」。芳基二基包括包含稠合至飽和、部分不飽和環或芳族碳環之芳族環的雙環基團。典型芳基二基包括但不限於衍生自苯之基團(苯基二基)、經取代苯、萘、蒽、伸聯苯基、伸茛基、伸茛滿基、1,2-二氫萘、1,2,3,4-四氫萘基及類似基團。芳基二基亦稱為「伸芳基」，且視情況經本文所描述之一或多個取代基取代。

【0054】 術語「雜環(heterocycle)」、「雜環基」及「雜環(heterocyclic ring)」在本文中可互換使用且係指 3 至約 20 個環原子之飽和或部分不飽和(亦即，環內具有一或多個雙鍵及/或三鍵)碳環基團，其中至少一個環原子為選自氮、氧、磷及硫之雜原子，剩餘環原子為 C，其中一或多個環原子視情況獨立地經下文所描述之一或多個取代基取代。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), 尤其第 1、3、4、6、7 及 9 章；
「The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs」(John Wiley & Sons, New York, 1950 至現在), 特別為第 13、14、16、19 及 28 章；及 J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566。「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之基團。雜環之實例包括但不限於嗎啉-4-基、哌啶-1-基、哌嗪基、哌嗪-4-基-2-酮、哌嗪-4-基-3-酮、吡咯啉-1-基、硫代嗎啉-4-基、S-二側氧基硫代嗎啉-4-基、氮雜環辛烷-1-基、氮雜環丁烷-1-基、八氫吡啶并 [1,2-a]吡嗪-2-基、[1,4]二氮雜環庚烷-1-基、吡咯啉基、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、四氫噻喃基、N-哌啶基、N-嗎啉基、N-硫代嗎啉基、噻噁烷基、哌嗪基、高哌嗪基、氮雜環丁烷基、氧雜環丁烷基、硫雜環丁烷基、高哌啶基、氧雜環庚烷基、硫雜環庚烷基、氧氮呋基、二氮呋基、噻氮呋基、2-吡咯啉基、3-吡咯啉基、吡啶基、2H-哌喃基、4H-哌喃基、二氧雜環己烷基、1,3-二氧雜環戊烷基、吡啶基、二硫雜環己烷基、二硫雜環戊烷基、二氫哌喃基、二氫噻吩基、二氫呋喃基、吡啶基咪啶基、咪啶基、3-氮雜雙環[3.1.0]己基、3-氮雜雙環[4.1.0]庚基、氮雜雙環[2.2.2]己基、3H-吡啶基噻嗪基及 N-吡啶基脒。螺雜環基部分亦包括在此定義之範疇內。螺雜環基部分之實例包括氮雜螺[2.5]辛基及氮雜螺[2.4]庚基。其中 2 個環原子經側氧基(=O)部分取代之雜環基之實例為嘧啶酮基及 1,1-二側氧基-硫代嗎啉基。本文之雜環基團視情況獨立地經本文所描述之一或多個取代基取代。

【0055】 術語「雜環基二基」係指 3 至約 20 個環原子之二價、飽和或部分不飽和(亦即，環內具有一或多個雙鍵及/或三鍵)碳環基團，其中至少一個環原子為選自氮、氧、磷及硫之雜原子，剩餘環原子為 C，其中一或多個環原子視情況獨立地經如所描述之一或多個取代基取代。5-員及 6-員雜環基二基之實例包括嗎啉基二基、哌啶基二基、哌嗪基二基、吡咯啉基二基、二氧雜環己烷基二基、硫

代嗎啉基二基及 S-二側氧基硫代嗎啉基二基。

【0056】 術語「雜芳基」係指 5-員、6-員或 7-員環之單價芳族基團，且包括 5-20 個原子之稠環系統(其中之至少一者為芳族環)，其含有獨立地選自氮、氧及硫之一或多個雜原子。雜芳基之實例為吡啶基(包括例如 2-羥基吡啶基)、咪唑基、咪唑并吡啶基、嘧啶基(包括例如，4-羥基嘧啶基)、吡唑基、三唑基、吡嗪基、四唑基、呋喃基、噻吩基、異噁唑基、噻唑基、噁二唑基、噁唑基、異噻唑基、吡咯基、喹啉基、異喹啉基、四氫異喹啉基、吲哚基、苯并咪唑基、苯并呋喃基、噌啉基、吲唑基、吲哚嗪基、酞嗪基、噻嗪基、三嗪基、異吲哚基、喋啶基、嘌呤基、噁二唑基、噻二唑基、噻二唑基、呋呔基、苯并呋呔基、苯并噻吩基、苯并噻唑基、苯并噁唑基、喹唑啉基、喹啉基、蔡啶基及呋喃并吡啶基。雜芳基視情況獨立地經本文所描述之一或多個取代基取代。

【0057】 術語「雜芳基二基」係指 5-員、6-員或 7-員環之二價芳族基團，且包括 5-20 個原子之稠環系統(其中之至少一者為芳族環)，其含有獨立地選自氮、氧及硫之一或多個雜原子。5-員及 6-員雜芳基二基之實例包括吡啶基二基、咪唑基二基、嘧啶基二基、吡唑基二基、三唑基二基、吡嗪基二基、四唑基二基、呋喃基二基、噻吩基二基、異噁唑基二基、噻唑基二基、噁二唑基二基、噁唑基二基、異噻唑基二基及吡咯基二基。

【0058】 雜環或雜芳基可在可能之情況下為碳(碳連接)或氮(氮連接)鍵結的。舉例而言且不限於，碳鍵結之雜環或雜芳基係鍵結於吡啶之位置 2、3、4、5 或 6；噻嗪之位置 3、4、5 或 6；嘧啶之位置 2、4、5 或 6；吡嗪之位置 2、3、5 或 6；呋喃、四氫呋喃、硫呋喃(thiofuran)、噻吩(thiophene)、吡咯或四氫吡咯之位置 2、3、4 或 5；噁唑、咪唑或噻唑之位置 2、4 或 5；異噁唑、吡唑或異噻唑之位置 3、4 或 5；氮雜環丙烷之位置 2 或 3；氮雜環丁烷之位置 2、3 或 4；喹啉之位置 2、3、4、5、6、7 或 8；或異喹啉之位置 1、3、4、5、6、7 或 8。

【0059】 舉例而言且不限於，氮鍵結之雜環或雜芳基係鍵結於氮雜環丙烷、氮雜環丁烷、吡咯、吡咯啉、2-吡咯啉、3-吡咯啉、咪唑、咪唑啉、2-咪唑啉、3-咪唑啉、吡唑、吡唑啉、2-吡唑啉、3-吡唑啉、哌啶、哌嗪、吡啶、二氫吡啶、1H-吡啶之位置 1；異吡啶或異吡啶啉之位置 2；嗎啉之位置 4；及呋唑或 β -呋啉之位置 9。

【0060】 術語「鹵基」及「鹵素」單獨或作為另一取代基之一部分係指氟、氯、溴或碘原子。

【0061】 術語「羰基」單獨或作為另一取代基之一部分係指 $C(=O)$ 或 $-C(=O)-$ ，亦即，碳原子雙鍵鍵結至氧且結合於具有羰基之部分中之兩個其他基團。

【0062】 如本文所用，片語「四級銨鹽」係指已經烷基取代基(例如 C_1 - C_4 烷基，諸如甲基、乙基、丙基或丁基)四級化之三級胺。

【0063】 術語「治療(treat/treatment/treating)」係指成功治療或改善損傷、病變、疾患(例如癌症)或症狀(例如認知損傷)之任何標誌，包括任何客觀或主觀參數，諸如消除；緩和；症狀減少或使症狀、損傷、病變或疾患對患者而言更可容忍；症狀進展速率降低；症狀或疾患之頻率降低或持續時間縮短；或者在一些情況下，防止症狀發作。症狀之治療或改善可基於任何客觀或主觀參數，包括例如身體檢查之結果。

【0064】 術語「癌症」、「贅瘤」及「腫瘤」在本文中用於指如下細胞，該等細胞展現自發、不受調控的生長，使得細胞展現以明顯失去對細胞增殖之控制為特徵的異常生長表型。在本發明之情形中用於偵測、分析及/或處理之相關細胞包括癌細胞(例如來自患有癌症之個體的癌細胞)、惡性癌細胞、轉移前癌細胞、轉移性癌細胞及非轉移性癌細胞。幾乎每個組織之癌症皆為已知的。片語「癌症負荷」係指個體中癌細胞之量或癌症體積。因此，降低癌症負荷係指降低個體中癌細胞數目或癌細胞體積。如本文所用之術語「癌細胞」係指作為癌細胞(例如

來自可對個體進行治療之癌症中之任一者的癌細胞，例如自患有癌症之個體分離的癌細胞)或衍生自癌細胞(例如癌細胞純系)的任何細胞。舉例而言，癌細胞可來自已建立之癌細胞株，可為自患有癌症之個體分離的原代細胞，可為來自自患有癌症之個體分離的原代細胞之後代細胞，及類似情況。在一些實施例中，該術語亦可指癌細胞之一部分，諸如亞細胞部分、細胞膜部分或癌細胞之細胞溶解產物。許多類型之癌症為熟習此項技術者已知的，包括實體腫瘤，諸如癌瘤、肉瘤、膠質母細胞瘤、黑色素瘤、淋巴瘤及骨髓瘤；及循環癌症，諸如白血病。

【0065】 如本文所用，術語「癌症」包括任何形式之癌症，包括但不限於實體腫瘤癌症(例如皮膚癌、肺癌、前列腺癌、乳癌、胃癌、膀胱癌、結腸癌、卵巢癌、胰腺癌、腎癌、肝癌、膠質母細胞瘤、神經管母細胞瘤、平滑肌肉瘤、頭頸鱗狀細胞癌、黑色素瘤及神經內分泌癌)及液體癌(例如血液癌)；癌瘤；軟組織腫瘤；肉瘤；畸胎瘤；黑色素瘤；白血病；淋巴瘤；及腦癌，包括微小殘留病，且包括原發性腫瘤與轉移性腫瘤兩者。

【0066】 「PD-L1 表現」係指在細胞表面上具有 PD-L1 受體之細胞。如本文所用，「PD-L1 過表現」係指與對應非癌細胞相比具有更多 PD-L1 受體之細胞。

【0067】 「HER2」係指蛋白質人類表皮生長因子受體 2。

【0068】 「HER2 表現」係指在細胞表面上具有 HER2 受體之細胞。舉例而言，細胞可在細胞表面上具有約 20,000 至約 50,000 個 HER2 受體。如本文所用，「HER2 過表現」係指具有多於約 50,000 個 HER2 受體之細胞。舉例而言，與對應非癌細胞(例如約 1 或 2 百萬個 HER2 受體)相比，細胞具有 2、5、10、100、1,000、10,000、100,000 或 1,000,000 倍數目之 HER2 受體。據估計，在約 25%至約 30%之乳癌中 HER2 過表現。

【0069】 「TROP2 表現」係指在細胞表面上具有 TROP2 受體之細胞。如本文所用，「TROP2 表現」係指與對應正常非癌細胞相比具有更多 TROP2 受體之細

胞。據估計，TROP2 在約 74%乳癌、72%結腸直腸癌及 64%肺癌以及其他器官類型之癌症中過表現。

【0070】 癌症之「病變」包括損害患者健康之所有現象。這包括但不限於異常或不可控制之細胞生長；轉移；干擾相鄰細胞之正常功能；細胞介素或其他分泌產物之異常水準之釋放；炎性或免疫反應之抑制或加重；瘤形成；癌前病變；惡性腫瘤；及侵入周圍或遠處組織或器官，諸如淋巴結。

【0071】 如本文所用，片語「癌症復發」及「腫瘤復發」及其語法變化型式係指在癌症診斷之後贅生性細胞或癌性細胞之進一步生長。特定而言，當癌組織中發生進一步癌性細胞生長時可發生復發。類似地，當腫瘤細胞播散至局部或遠處組織及器官中時，發生「腫瘤擴散」，因此，腫瘤擴散涵蓋腫瘤轉移。當腫瘤生長局部擴散從而藉由壓製、破壞或阻止正常器官功能損害累及組織之功能時，發生「腫瘤侵入」。

【0072】 如本文所用，術語「轉移」係指不直接連接至原始癌性腫瘤器官之器官或身體部位中之癌性腫瘤生長。轉移將被理解為包括微轉移，其為在不直接連接至原始癌性腫瘤器官之器官或身體部位中存在不可偵測量之癌性細胞。轉移亦可定義為若干步驟之過程，諸如癌細胞偏離原始腫瘤位點及癌細胞遷移至及/或侵入身體之其他部位。

【0073】 片語「有效量」及「治療有效量」係指諸如免疫結合物之物質產生投與所要達成之治療效應的劑量或量。確切劑量將視治療目的而定，且將可由熟習此項技術者使用已知技術確定(參見例如 Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (第 1-3 卷, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); Pickar, *Dosage Calculations* (1999); Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 第 11 版(McGraw-Hill, 2006); 及 Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 第 22 版, (Pharmaceutical Press,

London, 2012))。在癌症之情況下，治療有效量之免疫結合物可降低癌細胞數目；減小腫瘤尺寸；抑制(亦即，在某種程度上減慢且較佳阻止)癌細胞浸潤至外周器官中；抑制(亦即，在某種程度上減慢且較佳阻止)腫瘤轉移；在某種程度上抑制腫瘤生長；及/或在某種程度上緩解與癌症相關之症狀中之一或多者。在免疫結合物可阻止生長及/或殺死現有癌細胞之情況下，其可為細胞抑制性的及/或細胞毒性的。在癌症治療中，可例如藉由評估疾病進展時間(TTP)及/或確定反應率(RR)來量測功效。

【0074】 「接受者」、「個體(individual/subject)」、「宿主」及「患者」可互換使用且係指需要診斷、治療或療法之任何哺乳動物個體(例如人類)。用於治療目的之「哺乳動物」係指分類為哺乳動物之任何動物，包括人類、家養動物及農場動物以及動物園動物、運動動物或寵物動物，諸如狗、馬、貓、牛、綿羊、山羊、豬、駱駝等。在某些實施例中，哺乳動物為人類。

【0075】 片語「協同佐劑」或「協同組合」在本發明之背景下包括兩種免疫調節劑(諸如受體促效劑、細胞介素及佐劑多肽)之組合，該兩種免疫調節劑相對於單獨投與任一者而言在組合中引發對免疫性之協同效應。特定而言，本文所揭示之免疫結合物包含所主張之佐劑及抗體構築體之協同組合。例如相對於當不存在另一部分之情況下投與抗體構築體或佐劑時，此等協同組合在投與後對免疫性引發更大的效應。另外，與單獨投與抗體構築體或佐劑時相比，可投與降低量之免疫結合物(如藉由作為免疫結合物之一部分而投與之抗體構築體的總數目或佐劑的總數目所量測)。

【0076】 如本文所用，術語「投與」係指向個體非經腸、靜脈內、腹膜內、肌內、瘤內、病損內、鼻內或皮下投與、經口投與、作為栓劑投與、局部接觸、鞘內投與或植入緩釋裝置，例如微型滲透泵。

【0077】 如本文用於修飾數值之術語「約」及「大約」表示數值周圍近距離之

範圍。因此，若「X」為該值，則「約 X」或「大約 X」表示 0.9X 至 1.1X，例如 0.95X 至 1.05X 或 0.99X 至 1.01X 之值。提及「約 X」或「大約 X」特定而言至少表示值 X、0.95X、0.96X、0.97X、0.98X、0.99X、1.01X、1.02X、1.03X、1.04X 及 1.05X。因此，「約 X」及「大約 X」旨在教示且為例如「0.98X」之請求項限制提供書面描述支持。

抗體

【0078】 本發明之免疫結合物包含抗體。本發明實施例之範疇內包括本文所描述之抗體構築體或抗原結合域之功能性變異體。如本文所用，術語「功能性變異體」係指抗原結合域與母體抗體構築體或抗原結合域具有實質性或顯著序列一致性或相似性之抗體構築體，該功能性變異體保留作為其變異體之抗體構築體或抗原結合域之生物活性。功能性變異體涵蓋例如本文所描述之抗體構築體或抗原結合域(母體抗體構築體或抗原結合域)之彼等變異體，其保留在與母體抗體構築體或抗原結合域類似之程度上、在相同程度上或在更高程度上識別表現 PD-L1、HER2、CEA 或 TROP2 之靶細胞的能力。

【0079】 關於抗體構築體或抗原結合域，功能性變異體之胺基酸序列可例如與抗體構築體或抗原結合域具有至少約 30%、約 50%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 91%、約 92%、約 93%、約 94%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99% 或更大一致性。

【0080】 功能性變異體可例如包含具有至少一個保守胺基酸取代之母體抗體構築體或抗原結合域之胺基酸序列。或者或另外，功能性變異體可包含具有至少一個非保守胺基酸取代之母體抗體構築體或抗原結合結構域之胺基酸序列。在此情況下，非保守胺基酸取代較佳不干擾或抑制功能性變異體之生物活性。非保守胺基酸取代可增強功能性變異體之生物活性，使得功能性變異體之生物活性與母體抗體構築體或抗原結合域相比有所增加。

【0081】 本發明抗體構築體或抗原結合域之胺基酸取代較佳為保守性胺基酸取代。保守胺基酸取代為此項技術中已知的，且包括如下情況的胺基酸取代，其中具有某些物理及/或化學特性之一個胺基酸換成具有相同或類似化學或物理特性之另一胺基酸。舉例而言，保守胺基酸取代可為酸性/帶負電荷之極性胺基酸取代另一酸性/帶負電荷之極性胺基酸(例如 Asp 或 Glu)、具有非極性側鏈之胺基酸取代另一具有非極性側鏈之胺基酸(例如 Ala、Gly、Val、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Trp、Cys、Val 等)、鹼性/帶正電荷之極性胺基酸取代另一鹼性/帶正電荷之極性胺基酸(例如 Lys、His、Arg 等)、具有極性側鏈之不帶電荷之胺基酸取代另一具有極性側鏈之不帶電荷之胺基酸(例如 Asn、Gln、Ser、Thr、Tyr 等)、具有 β -分支鏈側鏈之胺基酸取代另一具有 β -分支鏈側鏈之胺基酸(例如 Ile、Thr 及 Val)、具有芳族側鏈之胺基酸取代另一具有芳族側鏈之胺基酸(例如 His、Phe、Trp 及 Tyr)等。

【0082】 抗體構築體或抗原結合域可基本上由本文所述之一或多個指定胺基酸序列組成，使得其他組分(例如其他胺基酸)不會實質上改變抗體構築體或抗原結合域功能性變異體之生物活性。

【0083】 在一些實施例中，免疫結合物中之抗體含有經修飾之 Fc 區，其中該修飾調節 Fc 區與一或多個 Fc 受體之結合。

【0084】 在一些實施例中，免疫結合物中之抗體(例如結合至至少兩個佐劑部分之抗體)在 Fc 區中含有一或多個修飾(例如胺基酸插入、缺失及/或取代)，從而與 Fc 區中缺乏該突變之天然抗體相比，產生與一或多個 Fc 受體(例如 Fc γ RI (CD64)、Fc γ RIIA (CD32A)、Fc γ RIIB (CD32B)、Fc γ RIIIA (CD16a)及/或 Fc γ RIIIB (CD16b))的經調節之結合(例如增加之結合或減少之結合)。在一些實施例中，免疫結合物中之抗體在 Fc 區中含有一或多個修飾(例如胺基酸插入、缺失及/或取代)，從而減少抗體之 Fc 區與 Fc γ RIIB 之結合。在一些實施例中，免疫結合物中

之抗體在抗體之 Fc 區中含有一或多個修飾(例如胺基酸插入、缺失及/或取代)，從而與 Fc 區中缺乏該突變之天然抗體相比，減少抗體與 FcγRIIB 之結合，而對 FcγRI (CD64)、FcγRIIA (CD32A)及/或 FcγRIIA (CD16a)維持相同結合或具有增加之結合。在一些實施例中，免疫結合物中之抗體在 Fc 區中含有一或多個修飾，從而增加抗體之 Fc 區與 FcγRIIB 之結合。

【0085】 在一些實施例中，經調節之結合由抗體之 Fc 區中相對於抗體之天然 Fc 區之突變提供。突變可位於 CH2 域、CH3 域或其組合中。「天然 Fc 區」與「野生型 Fc 區」同義，且包含與在自然界中發現之 Fc 區之胺基酸序列一致或與在天然抗體(例如西妥昔單抗(cetuximab))中發現之 Fc 區之胺基酸序列一致的胺基酸序列。天然序列人類 Fc 區包括天然序列人類 IgG1 Fc 區、天然序列人類 IgG2 Fc 區、天然序列人類 IgG3 Fc 區及天然序列人類 IgG4 Fc 區，以及其天然存在之變異體。天然序列 Fc 包括 Fc 之各種同種異型(allotype)(Jefferis 等人，(2009) mAbs，1(4):332-338)。

【0086】 在一些實施例中，Fc 區中產生經調節之與一或多個 Fc 受體之結合的突變可包括以下突變中之一或多者：SD (S239D)、SDIE (S239D/I332E)、SE (S267E)、SELF (S267E/L328F)、SDIE (S239D/I332E)、SDIEAL (S239D/I332E/A330L)、GA (G236A)、ALIE (A330L/I332E)、GASDALIE (G236A/S239D/A330L/I332E)、V9 (G237D/P238D/P271G/A330R)及 V11 (G237D/P238D/H268D/P271G/A330R)，及/或以下胺基酸處之一或多個突變：E233、G237、P238、H268、P271、L328 及 A330。用於調節 Fc 受體結合之額外 Fc 區修飾描述於例如 US 2016/0145350 及 US 7416726 及 US 5624821 中，該等專利以全文引用之方式併入本文中。

【0087】 在一些實施例中，免疫結合物之抗體之 Fc 區經修飾以與天然非修飾 Fc 區相比具有改變之 Fc 區糖基化模式。

【0088】 人類免疫球蛋白在各重鏈之 Cγ2 域中之 Asn297 殘基處糖基化。此

N-連接寡糖由核心七糖 N-乙醯基葡萄糖胺 4 甘露糖 3 (GlcNAc4Man3)組成。已知用內切糖苷酶或 PNG 酶 F 移除七糖引起抗體 Fc 區中之構象變化，此可顯著降低對活化性 FcγR 之抗體結合親和力且引起降低之效應功能。核心七糖常常帶有半乳糖、二等分 GlcNAc、岩藻糖或唾液酸，該等組分差異地影響 Fc 與活化性及抑制性 FcγR 之結合。另外，已證實 α2,6-唾液酸化增強活體內消炎活性，同時去岩藻糖基化引起改良之 FcγRIIIa 結合及抗體依賴性細胞毒性與抗體依賴性噬菌作用之 10 倍增加。因此，特定糖基化模式可用於控制炎性效應功能。

【0089】 在一些實施例中，用於改變糖基化模式之修飾為突變。舉例而言，在 Asn297 處之取代。在一些實施例中，Asn297 經突變為麩醯胺(N297Q)。用調節 FcγR 調控之傳訊之抗體控制免疫反應之方法描述於例如美國專利 7,416,726 及美國專利申請公開案 2007/0014795 及 2008/0286819 中，該等專利以全文引用之方式併入本文中。

【0090】 在一些實施例中，免疫結合物之抗體經修飾以含有具有非天然存在之糖基化模式的工程化 Fab 區。舉例而言，雜交瘤可經基因工程化以分泌具有能夠增加 FcγRIIIa 結合及效應功能之特定突變的無岩藻糖基化 mAb、去唾液酸化 mAb 或去糖基化 Fc。在一些實施例中，免疫結合物之抗體經工程化為無岩藻糖基化的。

【0091】 在一些實施例中，免疫結合物中抗體之整個 Fc 區經交換成不同 Fc 區，使得抗體之 Fab 區結合至非天然 Fc 區。舉例而言，西妥昔單抗之通常包含 IgG1 Fc 區之 Fab 區可結合至 IgG2、IgG3、IgG4 或 IgA，或納武單抗(nivolumab)之通常包含 IgG4 Fc 區之 Fab 區可結合至 IgG1、IgG2、IgG3、IgA1 或 IgG2。在一些實施例中，具有非天然 Fc 域之 Fc 經修飾之抗體亦包含調節所描述之 Fc 域之穩定性的一或多個胺基酸修飾，諸如 IgG4 Fc 內之 S228P 突變。在一些實施例中，具有非天然 Fc 結構域之 Fc 經修飾之抗體亦包含本文所描述之調節 Fc 與

FcR 之結合之一或多個胺基酸修飾。

【0092】 在一些實施例中，當與天然非修飾抗體相比時，調節 Fc 區與 FcR 之結合的修飾不改變抗體之 Fab 區與其抗原之結合。在其他實施例中，當與天然非修飾抗體相比時，調節 Fc 區與 FcR 之結合的修飾亦增加抗體之 Fab 區與其抗原之結合。

【0093】 在一示範性實施例中，本發明之免疫結合物包含抗體構築體，該抗體構築體包含特異性識別及結合 PD-L1 之抗原結合域。

【0094】 程式化死亡配體 1 (PD-L1、分化簇 274、CD274、B7-同源物 1 或 B7-H1)屬於 B7 蛋白質超家族，且為程式化細胞死亡蛋白 1 (PD-1、PDCD1、分化簇 279 或 CD279)之配體。PD-L1 亦可與 B7.1 (CD80)相互作用且該相互作用咸信抑制 T 細胞啟動。PD-L1/PD-1 軸在抑制適應性免疫反應中發揮巨大作用。更特定而言，咸信 PD-L1 與其受體 PD-1 之接合遞送抑制 T 細胞活化及增殖之信號。結合於 PD-L1 且防止配體結合於 PD-1 受體之劑防止此免疫抑制，且因此，可在需要時(諸如在癌症或感染之治療中)增強免疫反應。PD-L1/PD-1 途徑亦促進阻止自體免疫且因此針對 PD-L1 之促效劑或遞送免疫抑制性有效負荷之劑可幫助治療自體免疫病症。

【0095】 已研發若干靶向 PD-L1 之抗體用於治療癌症，包括阿特珠單抗 (TECENTRIQ™)、德瓦魯單抗(IMFINZI™)及阿維單抗(BAVENCIO™)。然而，持續需要新的 PD-L1 結合劑，包括以高親和力結合 PD-L1 且有效阻止 PD-L1/PD-1 傳訊之劑及可將治療有效負荷遞送至表現 PD-L1 之細胞之劑。此外，對用於治療自體免疫病症及感染之新的 PD-L1 結合劑存在需要。

【0096】 提供一種將 TLR 促效劑 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋有效負荷遞送至表現 PD-L1 之細胞的方法，該方法包括向該細胞或包含該細胞之哺乳動物投與免疫結合物，該免疫結合物包含共價連接至連接子之抗 PD-L1 抗體，該連接子

共價連接至一或多個 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋。

【0097】 亦提供一種用於增強或降低或抑制哺乳動物中之免疫反應的方法，及一種用於治療哺乳動物之對 PD-L1 抑制有反應之疾病、病症或疾患的方法，該等方法包括向哺乳動物投與其 PD-L1 免疫結合物。

【0098】 本發明提供一種包含免疫球蛋白重鏈可變區多肽及免疫球蛋白輕鏈可變區多肽之 PD-L1 抗體。PD-L1 抗體特異性結合 PD-L1。抗體之結合特異性允許靶向表現 PD-L1 之細胞，例如將治療有效負荷遞送至此等細胞。在一些實施例中，PD-L1 抗體結合於人類 PD-L1。然而，亦涵蓋結合於任何 PD-L1 片段、同源物或旁系同源物之抗體。

【0099】 在一些實施例中，PD-L1 抗體結合 PD-L1 而不實質上抑制或阻止 PD-L1 結合於其受體 PD-1。然而，在其他實施例中，PD-L1 抗體可完全或部分阻斷(抑制或阻止)PD-L1 結合至其受體 PD-1，使得抗體可用於抑制 PD-L1/PD-1 傳訊(例如出於治療目的)。抗體或抗原結合抗體片段可對 PD-L1 具單特異性，或可為雙特異性或多特異性的。舉例而言，在二價或多價抗體或抗體片段中，結合域可為不同的，靶向相同抗原之不同表位或靶向不同抗原。構築多價結合構築體之方法為此項技術中已知的。雙特異性及多特異性抗體為此項技術中已知的。此外，可提供雙抗體、三抗體或四抗體，其為多肽鏈之二聚體、三聚體或四聚體，其各自包含藉由肽連接子連接至 V_L 之 V_H ，該肽連接子太短而不允許相同多肽鏈上之 V_H 與 V_L 之間配對，由此驅使不同 V_H - V_L 多肽鏈上之互補域之間配對，從而產生具有兩個、三個或四個功能性抗原結合位點的多聚分子。另外，可產生作為具有兩個不同可變域之小 scFv 片段的雙 scFv 片段，以產生能夠結合兩個不同表位之雙特異性雙 scFv 片段。Fab 二聚體(Fab2)及 Fab 三聚體(Fab3)可使用基因工程化方法形成基於 Fab 片段之多特異性構築體來產生。

【0100】 PD-L1 抗體可為或可獲自人類抗體、非人類抗體、人類化抗體或嵌合

抗體或對應抗體片段。「嵌合」抗體為典型地包含人類恆定區及非人類可變區之抗體或其片段。「人類化」抗體為典型地包含人類抗體支架但在至少一個 CDR (例如 1、2、3、4、5 或所有六個 CDR)中具有非人類來源胺基酸或序列之單株抗體。

【0101】 PD-L1 抗體可為內化的，如 WO 2021/150701 中所述且以引用方式併入本文中，或 PD-L1 抗體可為非內化的，如 WO 2021/150702 中所述且以引用方式併入本文中。

【0102】 在一示範性實施例中，本發明之免疫結合物包含抗體構築體，該抗體構築體包含特異性識別及結合 HER2 之抗原結合域。

【0103】 許多抗-HER2 單株抗體已獲批准且正在臨床開發中(Costa, RLB 等人(2020) *Breast Cancer* 6(10):1-11)。

【0104】 在某些實施例中，本發明之免疫結合物包含抗 HER2 抗體，諸如藉由實例 201 之方法製備之彼等者。在本發明之一個實施例中，本發明之免疫結合物之抗 HER2 抗體包含如 US 5821337 之表 3 中所描述的人類化抗 HER2 抗體，例如 huMAb4D5-1、huMAb4D5-2、huMAb4D5-3、huMAb4D5-4、huMAb4D5-5、huMAb4D5-6、huMAb4D5-7 及 huMAb4D5-8，該專利特定地以引用之方式併入本文中。彼等抗體含有人類構架區與結合於 HER2 之鼠抗體(4D5)之互補決定區。人類化抗體 huMAb4D5-8 亦稱為曲妥珠單抗，可以商標名 HERCEPTIN™ (Genentech, Inc.)商購獲得。

【0105】 曲妥珠單抗(CAS 180288-69-1、HERCEPTIN®、huMAb4D5-8、rhuMAb HER2, Genentech)為重組 DNA 衍生之 IgG1 κ 單株抗體，其為在基於細胞之檢定中以高親和力($K_d = 5$ nM)選擇性結合至 HER2 之細胞外域的鼠抗 HER2 抗體(4D5)之人類化型式(US 5677171；US 5821337；US 6054297；US 6165464；US 6339142；US 6407213；US 6639055；US 6719971；US 6800738；

US 7074404 ; Coussens 等人(1985) Science 230:1132-9 ; Slamon 等人(1989) Science 244:707-12 ; Slamon 等人(2001) New Engl. J. Med. 344:783-792)。

【0106】 在本發明之一實施例中，抗體構築體或抗原結合域包含曲妥珠單抗之 CDR 區。在本發明之一實施例中，抗 HER2 抗體進一步包含曲妥珠單抗之構架區。在本發明之一實施例中，抗 HER2 抗體進一步包含曲妥珠單抗之一個或兩個可變區。

【0107】 在本發明之另一實施例中，本發明之免疫結合物之抗 HER2 抗體包含如 US 7862817 中所描述之人類化抗 HER2 抗體，例如人類化 2C4。示範性人類化 2C4 抗體為帕妥珠單抗(CAS 登記號 380610-27-5)，PERJETA™ (Genentech, Inc.)。帕妥珠單抗為 HER 二聚化抑制劑(HDI)且用以抑制 HER2 與其他 HER 受體(諸如 EGFR/HER1、HER2、HER3 及 HER4)形成活性異二聚體或均二聚體之能力。參見例如 Harari 及 Yarden, Oncogene 19:6102-14 (2000) ; Yarden 及 Sliwkowski. Nat Rev Mol Cell Biol 2:127-37 (2001) ; Sliwkowski Nat Struct Biol 10:158-9 (2003) ; Cho 等人 Nature 421:756-60 (2003) ; 及 Malik 等人 Pro Am Soc Cancer Res 44:176-7 (2003)。PERJETA™經批准用於治療乳癌。

【0108】 在本發明之一實施例中，抗體構築體或抗原結合域包含帕妥珠單抗之 CDR 區。在本發明之一實施例中，抗 HER2 抗體進一步包含帕妥珠單抗之構架區。在本發明之一實施例中，抗 HER2 抗體進一步包含帕妥珠單抗之一個或兩個可變區。

【0109】 馬吉妥昔單抗 (Margetuximab) (MGAH22, MARGENZA™, MacroGenics, Inc.)，CAS 登記號 1350624-75-7，為經 FDA 批准之抗 HER2 單株抗體。馬吉妥昔單抗之 Fc 區經最佳化以增加與活化性 FcγR 之結合，但降低與免疫效應細胞上之抑制性 FcγR 之結合(Nordstrom, JL 等人(2011) *Breast Cancer Res.*13(6):R123 ; Rugo, HS 等人 (2021) *JAMA Oncol.*;7(4):573-584 ; Markham, A.

(2021) *Drugs* 81:599–604)。馬吉妥昔單抗經 FDA 批准用於治療患有復發性或難治性晚期乳癌之患者，該患者藉由免疫組織化學被確定其腫瘤表現 2+水準之 HER2 且藉由 FISH 被確定缺乏 HER2 基因擴增證據。

【0110】 HT-19 為另一種抗 HER2 單株抗體，其結合至人類 HER2 中與曲妥珠單抗或帕妥珠單抗之表位不同之表位。HT-19 已顯示與曲妥珠單抗相當地抑制 HER2 傳訊且與曲妥珠單抗或帕妥珠單抗組合增強 HER2 降解。XMT-1522 為包含 HT-19 抗體之抗體-藥物結合物(Bergstrom D. A.等人，(2015) *Cancer Res.*; 75:LB-231)。

【0111】 在一示範性實施例中，本發明之免疫結合物包含抗體構築體，該抗體構築體包含特異性識別及結合 CEA 之抗原結合域。癌胚抗原相關細胞黏附分子 5 (CEACAM5)亦稱為 CD66e (分化簇 66e)，為癌胚抗原(CEA)基因家族之成員。

【0112】 在瘤形成之各種生物態樣中，尤其在腫瘤細胞黏附、轉移、阻斷細胞免疫機制及具有抗凋亡功能方面，已涉及癌胚抗原(CEA、CD66e、CEACAM5)之表現升高。CEA 為細胞表面抗原且亦用作許多癌瘤之血液標誌物。拉貝珠單抗(CEA-CIDE™，Immunomedics，CAS 登記號 219649-07-7)亦稱為 MN-14 及 hMN14，為人類化 IgG1 單株抗體且已針對治療結腸直腸癌進行了研究(Blumenthal，R.等人(2005) *Cancer Immunology Immunotherapy* 54(4):315-327)。結合至喜樹鹼類似物之拉貝珠單抗(拉貝珠單抗戈維替康(labetuzumab govitecan)，IMMU-130)靶向 CEA 且正在患有復發性或難治性轉移性結腸直腸癌之患者中進行研究(Sharkey，R.等人 (2018)，*Molecular Cancer Therapeutics* 17(1):196-203；Dotan，E.等人 (2017)，*Journal of Clinical Oncology* 35(9):3338-3346)。此外，已在臨床試驗中評估了與 ¹³¹I 結合之拉貝珠單抗對於結腸癌及其他實體惡性腫瘤之治療(Sharkey，R.等人(1995)，*Cancer Research* (增補版) 55(23):5935s-5945s；

Liersch , T.等人(2005) , *Journal of Clinical Oncology* 23(27):6763-6770 ; Sahlmann , C.-O.等人(2017) , *Cancer* 123(4):638-649) 。

【0113】 在本發明之一實施例中，靶向 CEA 之抗體構築體或抗原結合域包含如 US 6676924 中揭示之 hMN-14/拉貝珠單抗之可變輕鏈(VL κ) SEQ ID NO. 1，該專利出於此目的以引用方式併入本文。

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTSVAWYQQKPGKAPKLLIYWTS
TRHTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDATYYCQQYSLYRSFGQGGTKVEIK
SEQ ID NO. 1

【0114】 在本發明之一實施例中，靶向 CEA 之抗體構築體或抗原結合域包含 hMN-14/拉貝珠單抗之輕鏈 CDR (互補決定區)或輕鏈構架(LFR)序列 SEQ ID NO. 2-8 (US 6676924)(全長序列揭示為 SEQ ID NO: 1)。

區域	序列片段	殘基	長度	SEQ ID NO.
LFR1	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC	1 - 23	23	2
CDR-L1	KASQDVGTSVA	24 – 34	11	3
LFR2	WYQQKPGKAPKLLIY	35 – 49	15	4
CDR-L2	WTSTRHT	50 – 56	7	5
LFR3	GVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDATYYC	57 – 88	32	6
CDR-L3	QQYSLYRS	89 – 96	8	7
LFR4	FGQGGTKVEIK	97 – 106	10	8

【0115】 在本發明之一實施例中，靶向 CEA 之抗體構築體或抗原結合域包含如 US 6676924 中揭示之 hMN-14/拉貝珠單抗之可變重鏈(VH) SEQ ID NO. 9，該專利出於此目的以引用方式併入本文。

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFDFTTYWMSWVRQAPGKGLEWVAEI
HPDSSTINYAPSLKDRFTISRDN SKNTLFLQMDSL RPEDTGVYFCASLYFGFP
WFAYWGQGTPVTVSS SEQ ID NO. 9

【0116】 在本發明之一實施例中，靶向 CEA 之抗體構築體或抗原結合域包含 hMN-14/拉貝珠單抗之重鏈 CDR (互補決定區)或重鏈構架(HFR)序列 SEQ ID

NO. 10-16 (US 6676924)(全長序列揭示為 SEQ ID NO: 9)。

區域	序列片段	殘基	長度	SEQ ID NO.
HFR1	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFDFT	1 – 30	30	10
CDR-H1	TYWMS	31 – 35	5	11
HFR2	WVRQAPGKGLEWVA	36 – 49	14	12
CDR-H2	EIHPDSSTINYAPSLKD	50 – 66	17	13
HFR3	RFTISRDN SKNTLFLQMDSL RPEDTG VYFCAS	67 – 98	32	14
CDR-H3	LYFGFPWFAY	99 – 108	10	15
HFR4	WGQGTPVTVSS	109 – 119	11	16

【0117】 在本發明之一實施例中，靶向 CEA 之抗體構築體或抗原結合域包含如 US 8642742 中揭示之 hPR1A3 之可變輕鏈(VL κ) SEQ ID NO. 17，該專利出於此目的以引用方式併入本文。

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASAAVGTYVAWYQQKPGKAPKLLIYSAS
YRKRGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKL
EIK SEQ ID NO. 17

【0118】 在本發明之一實施例中，靶向 CEA 之抗體構築體或抗原結合域包含 hPR1A3 之輕鏈 CDR (互補決定區)或輕鏈構架(LFR)序列 SEQ ID NO. 18-24 (US 8642742)(全長序列揭示為 SEQ ID NO: 17)。

區域	序列片段	殘基	長度	SEQ ID NO.
LFR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	1 - 23	23	18
CDR-L1	KASAAVGTYVA	24 - 34	11	19
LFR2	WYQQKPGKAPKLLIY	35 - 49	15	20
CDR-L2	SASYRKR	50 - 56	7	21
LFR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	57 - 88	32	22
CDR-L3	HQYYTYPLFT	89 - 98	10	23
LFR4	FGQGTKLEIK	99 - 108	10	24

【0119】 在本發明之一實施例中，靶向 CEA 之抗體構築體或抗原結合域包含 hPR1A3 之重鏈 CDR (互補決定區)或重鏈構架(HFR)序列 SEQ ID NO. 25-31 (US 8642742)(全長序列揭示為 SEQ ID NO: 130)。

區域	序列片段	殘基	長度	SEQ ID NO.
----	------	----	----	------------

HFR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	1 - 30	30	25
CDR-H1	EFGMN	31 - 35	5	26
HFR2	WVRQAPGQGLEWMG	36 - 49	14	27
CDR-H2	WINTKTGEATYVEEFKG	50 - 66	17	28
HFR3	RVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR	67 - 98	32	29
CDR-H3	WDFAYYVEAMDY	99 - 110	12	30
HFR4	WGQGTTVTVSS	111 - 121	11	31

【0120】 在本發明之一實施例中，靶向 CEA 之抗體構築體或抗原結合域包含如 US 7232888 中揭示之 hMFE-23 之可變輕鏈(VL κ) SEQ ID NO. 32，該專利出於此目的以引用方式併入本文。

ENVLTQSPSSMSASVGDRVNIACSAASSSVSYMHWFQQKPGKSPKLWIYSTSN
LASGVPSRFSGSGSGTDYSLTISSMQPEDAATYYCQQRSSYPLTFGGGGTKLEI
K SEQ ID NO. 32

【0121】 在本發明之一實施例中，靶向 CEA 之抗體構築體或抗原結合域包含 hMFE-23 之輕鏈 CDR (互補決定區)或輕鏈構架(LFR)序列 SEQ ID NO. 33-40 (US 7232888)。該實施例包括 LFR1 之兩個變異體 SEQ ID NO.:33 及 SEQ ID NO.:34 (全長序列按出現順序分別揭示為 SEQ ID NO 32 及 172)。

區域	序列片段	殘基	長度	SEQ ID NO.
LFR1	ENVLTQSPSSMSASVGDRVNIAC	1 – 23	23	33
LFR1	EIVLTQSPSSMSASVGDRVNIAC	1 – 23	23	34
CDR-L1	SASSSVSYMH	24 – 33	10	35
LFR2	WFQQKPGKSPKLWIY	34 – 48	15	36
CDR-L2	STSNLAS	49 – 55	7	37
LFR3	GVPSRFSGSGSGTDYSLTISSMQPEDA ATYYC	56 – 87	32	38
CDR-L3	QQRSSYPLT	88 – 96	9	39
LFR4	FGGGGTKLEIK	97 – 106	10	40

【0122】 在本發明之一實施例中，靶向 CEA 之抗體構築體或抗原結合域包含 hMFE-23 之可變重鏈(VH) SEQ ID NO. 41 (US 7232888)。

QVKLEQSGAEVVKPGASVKLSCKASGFNIKDSYMHWLRQGPGQRLEWIGWI
DPENGDTHEYAPKFQGKATFTTDT SANTAYLGLSSLRPEDTAVYYCNEGTPTG

PYYFDYWGQGTLLTVSS SEQ ID NO. 41

【0123】 在本發明之一實施例中，靶向 CEA 之抗體構築體或抗原結合域包含 hMFE-23 之重鏈 CDR (互補決定區)或重鏈構架(HFR)序列 SEQ ID NO. 42-49 (US 7232888)。該實施例包括 HFR1 之兩個變異體 SEQ ID NO.:42 及 SEQ ID NO.:43 (全長序列按出現順序分別揭示為 SEQ ID NO 41 及 173)。

區域	序列片段	殘基	長度	SEQ ID NO.
HFR1	QVKLEQSGAEVVKPGASVKLSCKASGFNIK	1 – 30	30	42
HFR1	QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGFNIK	1 – 30	30	43
CDR-H1	DSYMH	31 – 35	5	44
HFR2	WLRQGPGQRLEWIG	36 - 49	14	45
CDR-H2	WIDPENGDT EYAPKFQG	50 - 66	17	46
HFR3	KATFTTDT SANTAYLGLSSLRPEDTAVYYCNE	67 - 98	32	47
CDR-H3	GTPTGPYYFDY	99 - 109	11	48
HFR4	WGQGTLLTVSS	110 - 120	11	49

【0124】 在本發明之一實施例中，靶向 CEA 之抗體構築體或抗原結合域包含 SM3E 之可變輕鏈(VL κ) SEQ ID NO. 50 (US 7232888)。

ENVLTQSPSSMSVSVGDRV TIACSASSSVPYMHWLQQKPGKSPKLLIYLT SNL
ASGVPSRFSGSGSGTDYSLTISSVQPEDAATYYCQQRSSYPLTFGGG TKLEIK
SEQ ID NO. 50

【0125】 在本發明之一實施例中，靶向 CEA 之抗體構築體或抗原結合域包含 SM3E 之輕鏈 CDR (互補決定區)或輕鏈構架(LFR)序列 SEQ ID NO. 51-56 及 38-39 (US 7232888)。該實施例包括 LFR1 之兩個變異體 SEQ ID NO.:51 及 SEQ ID NO.:52 (全長序列按出現順序分別揭示為 SEQ ID NO 50 及 174)。

區域	序列片段	殘基	長度	SEQ ID NO.
LFR1	ENVLTQSPSSMSVSVGDRV TIAC	1 - 23	23	51
LFR1	EIVLTQSPSSMSVSVGDRV TIAC	1 - 23	23	52
CDR-L1	SASSSVPYMH	24 - 33	10	53
LFR2	WLQQKPGKSPKLLIY	34 - 48	15	54

CDR-L2	LTSNLAS	49 - 55	7	55
LFR3	GVPSRFGSGSGTDYSLTISSVQPEDA ATYYC	56 - 87	32	56
CDR-L3	QQRSSYPLT	88 - 96	9	39
LFR4	FGGGTKLEIK	97 - 106	10	40

【0126】 在本發明之一實施例中，靶向 CEA 之抗體構築體或抗原結合域包含 NP-4/阿西莫單抗(arcitumomab)之可變輕鏈 SEQ ID NO. 57。

QTVLSQSPAILSASPGEKVTMTTCRASSSVTYIHWYQQKPGSSPKSWIYATSNL
ASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQHWSSKPPTFGGGTKLEIK
SEQ ID NO. 57

【0127】 在本發明之一實施例中，靶向 CEA 之抗體構築體或抗原結合域包含 NP-4/阿西莫單抗之輕鏈 CDR (互補決定區)或輕鏈構架(LFR)序列 SEQ ID NO. 58-64 (全長序列揭示為 SEQ ID NO: 57)。

區域	序列片段	殘基	長度	SEQ ID NO.
LFR1	QTVLSQSPAILSASPGEKVTMTTC	1 – 23	23	58
CDR-L1	RASSSVTYIH	24 – 33	10	59
LFR2	WYQQKPGSSPKSWIY	34 – 48	15	60
CDR-L2	ATSNLAS	49 – 55	7	61
LFR3	GVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYC	56 – 87	32	62
CDR-L3	QHWSSKPPT	88 – 96	9	63
LFR4	FGGGTKLEIK	97 – 106	10	64

【0128】 在本發明之一實施例中，靶向 CEA 之抗體構築體或抗原結合域包含 NP-4/阿西莫單抗之可變重鏈(VH) SEQ ID NO. 65。

EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFTDYYMNWVRQPPGKALEWLGFI
GNKANGYTTEYSASVKGRFTISRDKSQSILYLQMNTLRAEDSATYYCTRDRG
LRFYFDYWGGGTTTLTVSS SEQ ID NO. 65。

【0129】 在本發明之一實施例中，靶向 CEA 之抗體構築體或抗原結合域包含 NP-4 之重鏈 CDR (互補決定區)或重鏈構架(HFR)序列 SEQ ID NO. 66-72 (全長序列揭示為 SEQ ID NO: 65)。

區域	序列片段	殘基	長度	SEQ ID NO.
----	------	----	----	------------

HFR1	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFT	1 – 30	30	66
CDR-H1	DYYMN	31 – 35	5	67
HFR2	WVRQPPGKALEWLG	36 – 49	14	68
CDR-H2	FIGNKANGYTTTEYSASVKG	50 – 68	19	69
HFR3	RFTISRDKSQSILYLQMNTLRAEDSATYYCTR	69 – 100	32	70
CDR-H3	DRGLRFYFDY	101 – 110	10	71
HFR4	WGQGTTTLTVSS	111 – 121	11	72

【0130】 在本發明之一實施例中，靶向 CEA 之抗體構築體或抗原結合域包含如 US 7776330 中揭示之 M5A/hT84.66 之可變輕鏈(VL κ) SEQ ID NO. 73，該專利出於此目的以引用方式併入本文。

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRAGESVDIFGVGFLHWYQQKPGKAPKLLIY
RASNLESGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTNEDPYTFGQGT
KVEIK SEQ ID NO. 73

【0131】 在本發明之一實施例中，靶向 CEA 之抗體構築體或抗原結合域包含 M5A/hT84.66 之輕鏈 CDR (互補決定區)或輕鏈構架(LFR)序列 SEQ ID NO. 74-80 (US 7776330) (全長序列揭示為 SEQ ID NO: 73)。

區域	序列片段	殘基	長度	SEQ ID NO.
LFR1	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC	1 - 23	23	74
CDR-L1	RAGESVDIFGVGFLH	24 - 38	15	75
LFR2	WYQQKPGKAPKLLIY	39 - 53	15	76
CDR-L2	RASNLES	54 - 60	7	77
LFR3	GVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDFATYYC	61 - 92	32	78
CDR-L3	QQTNEDPYT	93 - 101	9	79
LFR4	FGQGTKVEIK	102 - 111	10	80

【0132】 在本發明之一實施例中，靶向 CEA 之抗體構築體或抗原結合域包含 M5A/hT84.66 之可變重鏈(VH) SEQ ID NO. 81 (US 7776330)。

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYMHWVRQAPGKGLEWVARI
DPANGNSKYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAPFGYY
VSDYAMAYWGQGTLVTVSS SEQ ID NO. 81

【0133】 在本發明之一實施例中，靶向 CEA 之抗體構築體或抗原結合域包含 M5A/hT84.66 之重鏈 CDR (互補決定區)或重鏈構架(HFR)序列 SEQ ID NO. 82-88 (US 7776330) (全長序列揭示為 SEQ ID NO: 81)。

區域	序列片段	殘基	長度	SEQ ID NO.
HFR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGPNIK	1 - 30	30	82
CDR-H1	DTYMH	31 - 35	5	83
HFR2	WVRQAPGKGLEWVA	36 - 49	14	84
CDR-H2	RIDPANGNSKYADSVKG	50 - 66	17	85
HFR3	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAP	67 - 98	32	86
CDR-H3	FGYYVSDYAMAY	99 - 110	12	87
HFR4	WGQGTLVTVSS	111 - 121	11	88

【0134】 在本發明之一實施例中，靶向 CEA 之抗體構築體或抗原結合域包含如 US 9617345 中揭示之 hAb2-3 之可變輕鏈(VL κ) SEQ ID NO. 89，該專利出於此目的以引用方式併入本文。

DIQMTQSPASLSASVGDRVTITCRASENIFSYLAWYQQKPGKSPKLLVYNTRT
LAEGVPSRFSGSGSGTDFSLTISSLQPEDFATYYCQHHYGTPFTFGSGTKLEIK
SEQ ID NO. 89

【0135】 在本發明之一實施例中，靶向 CEA 之抗體構築體或抗原結合域包含 hAb2-3 之輕鏈 CDR (互補決定區)或輕鏈構架(LFR)序列 SEQ ID NO. 90-96 (US 9617345)(全長序列揭示為 SEQ ID NO: 89)。

區域	序列片段	殘基	長度	SEQ ID NO.
LFR1	DIQMTQSPASLSASVGDRVTITC	1 - 23	23	90
CDR-L1	RASENIFSYLA	24 - 34	11	91
LFR2	WYQQKPGKSPKLLVY	35 - 49	15	92
CDR-L2	NTRLAE	50 - 56	7	93
LFR3	GVPSRFSGSGSGTDFSLTISSLQPEDFATYYC	57 - 88	32	94
CDR-L3	QHHYGTPFT	89 - 97	9	95
LFR4	FGSGTKLEIK	98 - 107	10	96

【0136】 在本發明之一實施例中，靶向 CEA 之抗體構築體或抗原結合域包含可變重鏈(VH) SEQ ID NO. 97 (US 9617345)。

EVQLQESGPGGLVKPGGSLSLSCAASGFVFSYDMSWVRQTPERGLEWVAYIS
SGGGITYAPSTVKGRFTVSRDNAKNTLYLQMNSLTSEDTAVYYCAAHYFGSS
GPFAYWGQGTLVTVSS SEQ ID NO. 97

【0137】 在本發明之一實施例中，靶向 CEA 之抗體構築體或抗原結合域包含 hAb2-3 之重鏈 CDR (互補決定區)或重鏈構架(HFR)序列 SEQ ID NO. 98-104 (全長序列揭示為 SEQ ID NO: 97)。

區域	序列片段	殘基	長度	SEQ ID NO.
HFR1	EVQLQESGPGGLVKPGGSLSLSCAASGFVFS	1 - 30	30	98
CDR-H1	SYDMS	31 - 35	5	99
HFR2	WVRQTPERGLEWVA	36 - 49	14	100
CDR-H2	YISSGGGITYAPSTVKG	50 - 66	17	101
HFR3	RFTVSRDNAKNTLYLQMNSLTSEDTAVYYCAA	67 - 98	32	102
CDR-H3	HYFGSSGPFAY	99 - 109	11	103
HFR4	WGQGTLVTVSS	110 - 120	11	104

【0138】 在本發明之一實施例中，靶向 CEA 之抗體構築體或抗原結合域包含如 US 9982063 中揭示之 A240VL-B9VH/AMG-211 之可變輕鏈(VL κ) SEQ ID NO. 105，該專利出於此目的以引用方式併入本文。

QAVLTQPASLSASPGASASLTCTLRRGINVGAYSIYWYQQKPGSPQYLLRY
KSDSDKQQGSGVSSRFSASKDASANAGILLISGLQSEDEADYYCMIWHSGAS
AVFGGGTKLTVL SEQ ID NO. 105

【0139】 在本發明之一實施例中，靶向 CEA 之抗體構築體或抗原結合域包含 A240VL-B9VH/AMG-211 之輕鏈 CDR (互補決定區)或輕鏈構架(LFR)序列 SEQ ID NO. 106-112 (US 9982063)(全長序列揭示為 SEQ ID NO: 105)。

區域	序列片段	殘基	長度	SEQ ID NO.
LFR1	QAVLTQPASLSASPGASASLTC	1 - 22	22	106
CDR-L1	TLRRGINVGAYSIY	23 - 36	14	107
LFR2	WYQQKPGSPQYLLR	37 - 51	15	108
CDR-L2	YKSDSDKQQGS	52 - 62	11	109
LFR3	GVSSRFSASKDASANAGILLISGLQSEDEADYYC	63 - 96	34	110

CDR-L3	MIWHSGASAV	97 - 106	10	111
LFR4	FGGGTKLTVL	107 - 116	10	112

【0140】 在本發明之一實施例中，靶向 CEA 之抗體構築體或抗原結合域包含 B9VH 之可變重鏈(VH) SEQ ID NO. 113 (US 9982063)。

【 0141 】

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTVSSYWMHWVRQAPGKGLEW
VGFIRNKANGGTTEYAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARDRGLRFYFDYWGQGTTVTVSS SEQ ID NO. 113

【0142】 在本發明之一實施例中，靶向 CEA 之抗體構築體或抗原結合域包含重鏈 CDR (互補決定區)或重鏈構架(HFR)序列 SEQ ID NO. 114-121 (US 9982063)。該實施例包括 CDR-H2 之兩個變異體 SEQ ID NO.:117 及 SEQ ID NO.:118 (全長序列按出現順序分別揭示為 SEQ ID NO 113 及 175)。

區域	序列片段	殘基	長度	SEQ ID NO.
HFR1	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTVS	1 – 30	30	114
CDR-H1	SYWMH	31 – 35	5	115
HFR2	WVRQAPGKGLEWVG	36 – 49	14	116
CDR-H2	FIRNKANGGTTEYAASVKG	50 – 68	19	117
CDR-H2	FIRNKANS GTTEYAASVKG	50 – 68	19	118
HFR3	RFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	69 – 100	32	119
CDR-H3	DRGLRFYFDY	101 - 110	10	120
HFR4	WGQGTTVTVSS	111 - 121	11	121

【0143】 在本發明之一實施例中，靶向 CEA 之抗體構築體或抗原結合域包含 E12VH 之可變重鏈(VH) SEQ ID NO. 122 (US 9982063)。

【 0144 】

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTVSSYWMHWVRQAPGKGLEW
VGFILNKANGGTTEYAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARDRGLRFYFDYWGQGTTVTVSS SEQ ID NO. 122

【0145】 在本發明之一實施例中，靶向 CEA 之抗體構築體或抗原結合域包含重鏈 CDR (互補決定區)或重鏈構架(HFR)序列 SEQ ID NO. 123-129 (US 9982063)(全長序列揭示為 SEQ ID NO: 122)。

區域	序列片段	殘基	長度	SEQ ID NO.
HFR1	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTVS	1 – 30	30	123
CDR-H1	SYWMH	31 - 35	5	124
HFR2	WVRQAPGKGLEWVG	36 - 49	14	125
CDR-H2	FILNKANGGTTEYAASVKG	50 - 68	19	126
HFR3	RFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	69 - 100	32	127
CDR-H3	DRGLRFYFDY	101 - 110	10	128
HFR4	WGQGTTVTVSS	111 - 121	11	129

【0146】 在本發明之一實施例中，靶向 CEA 之抗體構築體或抗原結合域包含 PR1A3 VH 之可變重鏈(VH) SEQ ID NO. 130 (US 8642742)。

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMG
WINTKTGEATYVEEFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWD
FAYYVEAMDYWGQGTTVTVSS SEQ ID NO. 130

【0147】 在一示範性實施例中，本發明之免疫結合物包含抗體構築體，該抗體構築體包含特異性識別及結合 TROP2 之抗原結合域。

【0148】 腫瘤相關鈣信號轉導蛋白 2 (TROP2)為經 TACSTD2 基因編碼之跨膜醣蛋白 (Linnenbach AJ 等人(1993) *Mol Cell Biol.* 13(3):1507–15；Calabrese G 等人 (2001) *Cytogenet Cell Genet.*92(1–2):164–5)。其為在許多癌症中不同地表現之細胞內鈣信號轉導蛋白。它向細胞發自我更新、增殖、侵入及存活之信號。它具有幹細胞樣品質。TROP2 在許多正常組織中表現，儘管相比之下，其在許多癌症中過表現(Ohmachi T 等人，(2006) *Clin.Cancer Res.*，12(10)，3057-3063；Muhlmann G 等人，(2009) *J. Clin.Pathol.*，62(2)，152-158；Fong D 等人，(2008) *Br. J. Cancer*，99(8)，1290-1295；Fong D 等人，(2008) *Mod. Pathol.*，21(2)，186-

191；Ning S 等人，(2013) *Neurol. Sci.*，34(10)，1745-1750)。TROP2 之過表現具有預後意義。已提出與 TROP2 相互作用之若干配體。TROP2 藉由不同途徑向細胞發信號且其藉由若干轉錄因子之複雜網絡來轉錄調控。

【0149】 人類 TROP2 (TACSTD2：腫瘤相關性鈣信號轉導蛋白 2，GA733-1，EGP-1，MIS1；在下文中稱為 hTROP2)為由 323 個胺基酸殘基組成之單次跨膜 1 型細胞膜蛋白。雖然先前已表明存在參與免疫抗性且為人類滋養層及癌症細胞常見之細胞膜蛋白(Faulk W P 等人 (1978)，*Proc.Natl. Acad.Sci.* 75(4):1947-1951)，但鑑定了在人類絨毛膜癌細胞株中由針對細胞膜蛋白之單株抗體識別之抗原分子並將其指定為 TROP2 作為在人類滋養層中表現的分子之一 (Lipinski M 等人 (1981)，*Proc.Natl. Acad.Sci.* 78(8)，5147-5150)。該分子亦經指定為經藉由用胃癌細胞株免疫來獲得之小鼠單株抗體 GA733 識別的腫瘤抗原 GA733-1 (Linnenbach A J 等人，(1989) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86(1)，27-31)或經藉由用非小細胞肺癌細胞免疫來獲得之小鼠單株抗體 RS7-3G11 識別的上皮醣蛋白(EGP-1；Basu A 等人，*Int. J. Cancer*，62 (4)，472-479 (1995))。然而，在 1995 年，對 TROP2 基因進行選殖，且確認所有此等分子為相同分子(Fornaro M 等人，(1995) *Int. J. Cancer*，62(5)，610-618)。hTROP2 之 DNA 序列及胺基酸序列在公共資料庫上可獲得且可例如以登錄號 NM_002353 及 NP_002344 (NCBI)提及。

【0150】 回應於表明與癌症相關之此類資訊，迄今已建立多種抗 hTROP2 抗體且研究了其抗腫瘤作用。在此等抗體中，揭示了例如一種本身在裸小鼠異種移植模型中表現出抗腫瘤活性之未經結合抗體(WO 2008/144891；WO 2011/145744；WO 2011/155579；WO 2013/077458)以及一種作為具有細胞毒性藥物之 ADC 表現出抗腫瘤活性的抗體(WO 2003/074566；WO 2011/068845；WO 2013/068946；US 7,999,083)。然而，其活性之強度或覆蓋率仍不足，且對於作為治療標靶之 hTROP2 存在尚未滿足之醫學需求。

【0151】 癌細胞中之 TROP2 表現已與藥物抗性相關聯。若干策略靶向癌細胞上之 TROP2，該等策略包括抗體、抗體融合蛋白、化學抑制劑、納米粒子等。使用此等各種治療性治療進行之活體外研究及臨床前研究導致在小鼠中腫瘤細胞生長在活體外及活體內均受到顯著抑制。臨床研究已探索 Trop2 作為預後生物標誌物及作為逆轉抗性之治療性標靶二者的潛在應用。

【0152】 戈沙妥組單抗 (Sacituzumab govitecan，TRODELVY®，Immunomedics，IMMU-132)為包含連接至拓撲異構酶抑制劑藥物之 TROP2 定向抗體的抗體-藥物結合物，經指示用於治療已接受至少兩種先前療法之成人患者之轉移性三陰性乳癌(mTNBC)。戈沙妥組單抗中之 TROP2 抗體結合至伊立替康(irinotecan)之活性代謝物 SN-38 (US 2016/0297890；WO 2015/098099)。

【0153】 在本發明之一實施例中，靶向 TROP2 之抗體構築體或抗原結合域包含 hRS7 (人類化 RS7)之輕鏈 CDR (互補決定區)序列 SEQ ID NO:131-133 (US 7238785；US 7420040，其以引用方式併入本文)。

區域	CDR 序列片段	SEQ ID NO:
CDR-L1	KASQDVSIAVA	131
CDR-L2	SASYRYT	132
CDR-L3	QQHYITPLT	133

【0154】 在本發明之一實施例中，靶向 TROP2 之抗體構築體或抗原結合域包含 hRS7 (人類化 RS7)之輕鏈 CDR (互補決定區)序列 SEQ ID NO:134-136 (US 7238785；US 9797907；US 9382329；WO 2020/142659，其各自以引用方式併入本文)。

區域	CDR 序列片段	SEQ ID NO:
CDR-H1	NYGMN	134
CDR-H2	WINTYTGEPTYTDDFKG	135
CDR-H3	GGFGSSYWYFDV	136

【0155】 在本發明之一實施例中，靶向 TROP2 之抗體構築體或抗原結合域包含 AR47A6.4.2 之重鏈 CDR (互補決定區)序列 SEQ ID NO:134、137、138 (US

7420040，其以引用方式併入本文)。

區域	CDR 序列片段	SEQ ID NO:
CDR-H1	NYGMN	134
CDR-H2	WINTKTGEPTYAEEFKG	137
CDR-H3	GGYGSSYWYFDV	138

【0156】 在本發明之一實施例中，靶向 TROP2 之抗體構築體或抗原結合域包含人類化 KM4097 之輕鏈 CDR (互補決定區)序列 SEQ ID NO:139-141 (US 2012/0237518，其以引用方式併入本文)。

區域	CDR 序列片段	SEQ ID NO:
CDR-L1	KSSQSLLNSGNQQNYLA	139
CDR-L2	GASTRES	140
CDR-L3	QSDHIYPYT	141

【0157】 在本發明之一實施例中，靶向 TROP2 之抗體構築體或抗原結合域包含人類化 KM4097 之重鏈 CDR (互補決定區)序列 SEQ ID NO:142-144 (US 2012/0237518，其以引用方式併入本文)。

區域	CDR 序列片段	SEQ ID NO:
CDR-H1	IYWLG	142
CDR-H2	NIFPGSAYINYNEKFKG	143
CDR-H3	EGSNSGY	144

【0158】 在本發明之一實施例中，靶向 TROP2 之抗體構築體或抗原結合域包含 hTINA1-H1L1 之輕鏈 CDR (互補決定區)序列 SEQ ID NO:132、133、145 (US 10,227,417，其以引用方式併入本文)。

區域	CDR 序列片段	SEQ ID NO:
CDR-L1	KASQDVSTAVA	145
CDR-L2	SASYRYT	132
CDR-L3	QQHYITPLT	133

【0159】 在本發明之一實施例中，靶向 TROP2 之抗體構築體或抗原結合域包含 hTINA1-H1L1 之重鏈 CDR (互補決定區)序列 SEQ ID NO:146-148 (US 10,227,417，其以引用方式併入本文)。

區域	CDR 序列片段	SEQ ID NO:
CDR-H1	TAGMQ	146
CDR-H2	WINTHSGVPKYAEDFKG	147

CDR-H3	SGFGSSYWYFDV	148
--------	--------------	-----

【0160】 在本發明之一實施例中，靶向 TROP2 之抗體構築體或抗原結合域包含 hTINA1-H1L1 之輕鏈 CDR (互補決定區)序列 SEQ ID NO:149-151 (US 8871908，其以引用方式併入本文)。

區域	CDR 序列片段	SEQ ID NO:
CDR-L1	RASKSVSTS(X1)YSYMH 其中 X1 為 G、L 或 N	149
CDR-L2	LASNLES	150
CDR-L3	QHSRELPYT	151

【0161】 在本發明之一實施例中，靶向 TROP2 之抗體構築體或抗原結合域包含 hTINA1-H1L1 之重鏈 CDR (互補決定區)SEQ ID NO:152-157 (US 8871908，其以引用方式併入本文)。

區域	CDR 序列片段	SEQ ID NO:
CDR-H1	SYGVH	152
CDR-H1	GGSISSY	153
CDR-H1	GGSISSYGVH	154
CDR-H2	VIWT(X1)G(X2)TDYNSALM(X3) 其中 X1 為 G 或 S；X2 為 S 或 V；X3 為 S 或 G	155
CDR-H2	WT(X1)G(X2) 其中 X1 為 G 或 S；X2 為 S 或 V	156
CDR-H3	DGDYDRYTMDY	157

【0162】 在本發明之一實施例中，靶向 TROP2 之抗體構築體或抗原結合域包含 hTINA1-H1L1 之輕鏈 CDR (互補決定區)序列 SEQ ID NO:150、151、158(US 8871908，其以引用方式併入本文)。

區域	CDR 序列片段	SEQ ID NO:
CDR-L1	RASKSVSTSGYSYMH	158
CDR-L2	LASNLES	150
CDR-L3	QHSRELPYT	151

【0163】 在本發明之一實施例中，靶向 TROP2 之抗體構築體或抗原結合域包含 hTINA1-H1L1 之重鏈 CDR (互補決定區)序列 SEQ ID NO:152-154、157、159、160(US 8871908，其以引用方式併入本文)。

區域	CDR 序列片段	SEQ ID NO:
CDR-H1	SYGVH	152

CDR-H1	GGSISSY	153
CDR-H1	GGSISSYGVH	154
CDR-H2	VIWTSGVTDYNSALMG	159
CDR-H2	WTSGV	160
CDR-H3	DGDYDRYTMDY	157

【0164】 在本發明之一實施例中，免疫結合物包含具有選自 SEQ ID NO:161-163 之輕鏈序列的半胱胺酸突變抗體。

序列：	突變位點	SEQ ID NO:
KADYECHKVYA	LC K188C	161
YEKHKCYACEV	LC V191C	162
QLKSGCASVVC	LC T129C	163

【0165】 在本發明之一實施例中，半胱胺酸突變的靶向 TROP2 之抗體包含 SEQ ID NO:164 之重鏈(HC)。

QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGQGLKWMG
WINTYTGEPTYTDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCARGGF
GSSYWYFDVWGQGSLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV
NHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO. 164

【0166】 在本發明之一實施例中，靶向 TROP2 之抗體之輕鏈(LC)選自 SEQ ID NO:165-167。

重鏈	Cys 突變位點	SEQ ID NO:
DIQLTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSIAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQHYYITPLTFGAGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYECHKVYACEV	LC K188C	165

THQGLSSPVTKSFNRGEC		
DIQLTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSIAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQHYITPLTFGAGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKCYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	LC V191C	166
DIQLTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSIAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQHYITPLTFGAGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGCASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	LC T129C	167

【0167】 在本發明之一實施例中，免疫結合物包含具有選自 SEQ ID NO:168 之重鏈序列的半胱胺酸突變抗體。

序列：	Cys 突變位點	SEQ ID NO:
TVSSACTKGPS	HC S119C	168

【0168】 在本發明之一實施例中，半胱胺酸突變的靶向 TROP2 之抗體之輕鏈 (LC)具有序列 SEQ ID NO:169。

DIQLTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSIAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQHYITPLTFGAGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:169

【0169】 在本發明之一實施例中，半胱胺酸突變的靶向 TROP2 之抗體之重鏈 (HC)具有序列 SEQ ID NO:170。

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGDTFTNHMHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGHTGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCAREAVAGPMDVWGQGTTVTVSSACTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT

PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:170

【0170】 在一些實施例中，抗體構築體進一步包含 Fc 域。在某些實施例中，抗體構築體為抗體。在某些實施例中，抗體構築體為融合蛋白。抗原結合域可為單鏈可變區片段(scFv)。單鏈可變區片段(scFv)為包括經由合成肽連接至抗體輕鏈之可變(V)域的抗體重鏈之 V 域的截短 Fab 片段，可使用常規重組 DNA 技術產生。類似地，二硫鍵穩定之可變區片段(dsFv)可藉由重組 DNA 技術製備。抗體構築體或抗原結合域可包含抗 PD-L1 抗體、抗 HER2 抗體或抗 CEA 抗體之抗原結合域之一或多個可變區(例如兩個可變區)，各可變區包含 CDR1、CDR2 及 CDR3。

【0171】 在一些實施例中，免疫結合物中之抗體含有經修飾之 Fc 區，其中該修飾調節 Fc 區與一或多個 Fc 受體之結合。

【0172】 在一些實施例中，藉由包括能夠結合轉型生長因子 $\beta 1$ (TGF $\beta 1$)之 TGF $\beta 1$ 受體或其片段來修飾 Fc 區。舉例而言，受體可為 TGF β 受體 II (TGF β RII)。在一些實施例中，TGF β 受體為人類 TGF β 受體。在一些實施例中，如併入本文中之 US 9676863 中所描述，IgG 具有融合至 TGF β RII 細胞外域(ECD)之 C 端。

「Fc 連接子」可用於將 IgG 連接至 TGF β RII 細胞外域，例如 G₄S₄G Fc 連接子 (SEQ ID NO: 171)。Fc 連接子可為允許分子之適當三維摺疊同時維持對標靶之結合特異性的短撓性肽。在一些實施例中，TGF β 受體之 N 端融合至抗體構築體之 Fc (在存在或不存在 Fc 連接子之情況下)。在一些實施例中，抗體構築體重鏈之 C 端融合至 TGF β 受體(在存在或不存在 Fc 連接子之情況下)。在一些實施例中，

抗體構築體重鏈之 C 端離胺酸殘基突變為丙胺酸。

【0173】 在一些實施例中，免疫結合物中之抗體為醣基化的。

【0174】 在一些實施例中，免疫結合物之抗體為半胱胺酸工程化之抗體，其通過在經工程化半胱胺酸對於結合為可用的且反應性的但不擾亂免疫球蛋白摺疊及組裝或改變抗原結合及效應功能之位點處的半胱胺酸取代，提供佐劑與抗體之位點特異性結合(Junutula 等人，2008b Nature Biotech.，26(8):925-932；Dornan 等人 (2009) Blood 114(13):2721-2729；US 7521541；US 7723485；US 2012/0121615；WO 2009/052249)。「半胱胺酸工程化之抗體」或「半胱胺酸工程化之抗體變異體」為其中抗體之一或多個殘基經半胱胺酸殘基取代之抗體。半胱胺酸工程化之抗體可以均一化學計量結合至 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋-連接子化合物(式 II)之硫醇反應性親電基團諸如順丁烯二醯亞胺(例如在具有單一經工程化半胱胺酸位點之抗體中每個抗體至多兩個 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋部分)。

【0175】 在一些實施例中，半胱胺酸工程化之抗體用於製備免疫結合物。免疫結合物可具有在輕鏈上之位點諸如 149-離胺酸位點(LC K149C)或重鏈上之位點諸如 122-絲氨酸位點(HC S122C)處引入的反應性半胱胺酸硫醇殘基，如藉由 Kabat 編號來編號。在其他實施例中，半胱胺酸工程化之抗體具有在重鏈之 118-丙胺酸位點(EU 編號)處引入之半胱胺酸殘基(HC A118C)。此位點或者藉由順序編號而編號為 121 或藉由 Kabat 編號而編號為 114。在其他實施例中，半胱胺酸工程化之抗體具有在以下各項中引入之半胱胺酸殘基：(i)根據 Kabat 編號的輕鏈上之 G64C、R142C、K188C、L201C、T129C、S114C 或 E105C 處；(ii)根據 Kabat 編號的重鏈上之 D101C、V184C、T205C 或 S122C 處；或(iii)其他半胱胺酸突變抗體，且如 Bhakta，S.等人，(2013)「Engineering THIOMABs for Site-Specific Conjugation of Thiol-Reactive Linkers」，Laurent Ducry (編)，Antibody-Drug

Conjugates, Methods in Molecular Biology, 第 1045 卷, 第 189-203 頁; WO 2011/156328; US 9000130 中所述。

2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋佐劑化合物

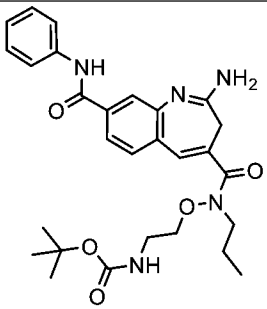
【0176】 本發明之免疫結合物包含 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋佐劑部分。本文所描述之佐劑部分為引發免疫反應之化合物(亦即, 免疫刺激劑)。通常, 本文所描述之佐劑部分為 TLR 促效劑。TLR 為在脊椎動物中負責起始先天免疫反應之 I 型跨膜蛋白。TLR 識別來自細菌、病毒及真菌之多種病原體相關分子模式且充當防禦入侵病原體之第一線。TLR 歸因於細胞表現及其起始之傳訊途徑的差異而引發重疊又獨特之生物反應。在接合(例如藉由天然刺激或合成 TLR 促效劑)後, TLR 起始信號轉導級聯反應, 引起經由銜接子蛋白髓系分化主要反應基因 88 (MyD88)對核因子- κ B (NF- κ B)之活化及 IL-1 受體相關激酶(IRAK)之募集。IRAK 之磷酸化然後導致 TNF-受體相關因子 6 (TRAF6)之募集, 這導致 NF- κ B 抑制劑 I- κ B 之磷酸化。因此, NF- κ B 進入細胞核且起始啟動子含有 NF- κ B 結合位點之基因(諸如細胞介素)之轉錄。其他 TLR 傳訊調控方式包括 TNF-受體相關因子 6 (TRAF6)之含 TIR 域銜接子誘導干擾素- β (TRIF)依賴性誘導及經由 TRIF 及 TRAF3 對 MyD88 非依賴性途徑之活化, 從而引起干擾素反應因子 3 (IRF3)之磷酸化。類似地, MyD88 依賴性途徑亦活化若干 IRF 家族成員, 包括 IRF5 及 IRF7, 而 TRIF 依賴性途徑亦活化 NF- κ B 途徑。

【0177】 典型地, 本文所描述之佐劑部分為 TLR7 及/或 TLR8 促效劑。TLR7 及 TLR8 均在單核球及樹突細胞中表現。在人類中, TLR7 亦在漿細胞樣樹突細胞(pDC)及 B 細胞中表現。TLR8 主要在髓系來源之細胞(亦即, 單核球、顆粒球及髓系樹突細胞)中表現。TLR7 及 TLR8 能夠偵測細胞內「外來」單股 RNA 之存在, 作為對病毒入侵作出反應之手段。用 TLR8 促效劑處理表現 TLR8 之細胞可使得產生高水準之 IL-12、IFN- γ 、IL-1、TNF- α 、IL-6 及其他炎性細胞介素。

類似地，用 TLR7 促效劑刺激表現 TLR7 之細胞(諸如 pDC)可使得產生高水準之 IFN- α 及其他炎性細胞介素。TLR7/TLR8 接合及所得細胞介素產生可活化樹突細胞及其他抗原呈遞細胞，驅動各種先天性及後天性免疫反應機制，從而引起腫瘤破壞。

【0178】 本發明之示範性化合物(2Am4CBza)展示於表 1 中。各化合物藉由質譜法表徵且顯示具有所指示之質量。根據實例 203 量測針對表現人類 TLR7 或人類 TLR8 之 HEK293 NFKB 報導細胞之活性。

表 1 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋喃化合物(2Am4CBza)

2Am4CBza 編號	結構	MW
2Am4CBza-1		521.6

2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋喃-連接子化合物

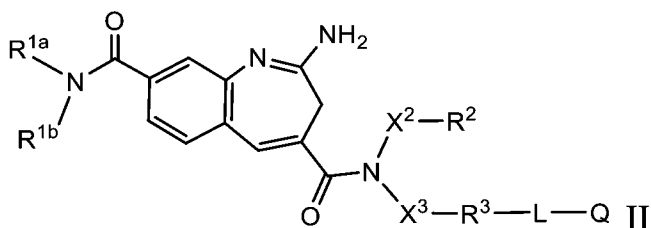
【0179】 本發明之免疫結合物藉由抗體與 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋喃-連接子化合物之結合來製備。2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋喃-連接子化合物包含共價連接至連接子單元 L 及反應性親電基團 Q 之 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋喃(2Am4CBza)部分。連接子單元包含影響免疫結合物之穩定性、滲透性、溶解度及其他藥物動力學、安全性及功效特性的功能性基團及亞基。連接子單元包括與抗體之反應性官能基反應(亦即結合)之反應性官能基。舉例而言，抗體之親核基團(諸如離胺酸側鏈胺基)與 2Am4CBza-連接子化合物之親電反應性官能基反應以形成免疫結合物(IC)。另外，舉例而言，抗體之半胱胺酸硫醇與 2Am4CBza-連接子化合物之順丁烯二醯亞胺或溴乙醯胺基團反應以形成免疫結合物。

【0180】 適用於 2Am4CBza-連接子化合物之反應性親電官能基(式 II 中之 Q)

包括但不限於 N-羥基丁二醯亞胺基(NHS)酯及 N-羥基磺基丁二醯亞胺基(磺基-NHS)酯(胺反應性)；碳二亞胺(胺及羧基反應性)；羥甲基磷(胺反應性)；順丁烯二醯亞胺(硫醇反應性)；鹵化乙醯胺，諸如 N-碘乙醯胺(硫醇反應性)；芳基疊氮化物(一級胺反應性)；氟化芳基疊氮化物(經由碳-氫(C-H)插入之反應性)；五氟苯基(PFP)酯(胺反應性)；四氟苯基(TFP)或磺基四氟苯基(SulfoTFP)酯(胺反應性)；亞胺酸酯(胺反應性)；異氰酸酯(羥基反應性)；乙烯砜(硫醇、胺及羥基反應性)；吡啶基二硫化物(硫醇反應性)；及二苯基酮衍生物(經由 C-H 鍵插入之反應性)。其他試劑包括但不限於 Hermanson, *Bioconjugate Techniques* 第2版, Academic Press, 2008 中所描述之彼等試劑。

【0181】 本發明提供對設計、製備及使用免疫結合物之限制及挑戰的解決方案。一些連接子在血流中可為不穩定的，由此在靶細胞中內化之前釋放不可接受量之佐劑/藥物(Khot, A.等人(2015) *Bioanalysis* 7(13):1633–1648)。其他連接子可在血流中提供穩定性，但細胞內釋放有效性可能受到負面影響。提供所需細胞內釋放之連接子典型地在血流中具有不良穩定性。或者陳述為，血流穩定性與細胞內釋放典型地逆相關。此外，在標準結合方法中，加載於抗體上之佐劑/藥物部分之量(亦即藥物加載量)、結合反應中形成之聚集物之量及可獲得之最終經純化結合物之產率為相互聯繫的。舉例而言，聚集物形成通常與結合至抗體之佐劑/藥物部分及其衍生物之當量數目正相關。在高藥物加載量下，必須移除所形成之聚集物以用於治療應用。因此，藥物加載介導之聚集物形成降低免疫結合物產率且會使製程難以放大。

【0182】 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋-連接子化合物之示範性實施例包括式 II：



其中

X^2 及 X^3 獨立地選自由以下組成之群：鍵、 $C(=O)$ 、 $C(=O)N(R^5)$ 、 O 、 $N(R^5)$ 、 S 、 $S(O)_2$ 及 $S(O)_2N(R^5)$ ；

R^{1a} 、 R^{1b} 及 R^2 獨立地選自由以下組成之群： H 、 C_1 - C_{12} 烷基、 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基、 C_3 - C_{12} 碳環基、 C_6 - C_{20} 芳基、 C_2 - C_9 雜環基及 C_1 - C_{20} 雜芳基；

R^3 選自由以下組成之群：

$-(C_1-C_{12} \text{ 烷基二基})-N(R^5)-*$ ；

$-(C_1-C_{12} \text{ 烷基二基})-N(R^5)-C(=O)*$ ；

$-(C_1-C_{12} \text{ 烷基二基})-N(R^5)-C(=O)O-(C_3-C_{12} \text{ 碳環基二基})-*$ ；

$-(C_1-C_{12} \text{ 烷基二基})-N(R^5)-(C_1-C_{20} \text{ 雜芳基二基})-*$ ；

$-(C_1-C_{12} \text{ 烷基二基})-N(R^5)-(C_1-C_{20} \text{ 雜芳基二基})-(C_1-C_{12} \text{ 烷基二基})-*$ ；

$-(C_1-C_{12} \text{ 烷基二基})-N(R^5)-S(O_2)-*$ ；

$-(C_1-C_{12} \text{ 烷基二基})-OC(=O)-(C_2-C_9 \text{ 雜環基二基})-*$ ；

$-(C_1-C_{12} \text{ 烷基二基})-O-*$ ；

$-(C_1-C_{12} \text{ 烷基二基})-(C_3-C_{12} \text{ 碳環基二基})-*$ ；

$-(C_1-C_{12} \text{ 烷基二基})-(C_6-C_{20} \text{ 芳基二基})-*$ ；

$-(C_1-C_{12} \text{ 烷基二基})-(C_6-C_{20} \text{ 芳基})-(C_1-C_{12} \text{ 烷基二基})-N(R^5)-*$ ；

$-(C_1-C_{12} \text{ 烷基二基})-(C_6-C_{20} \text{ 芳基})-(C_1-C_{12} \text{ 烷基二基})-N(R^5)-*$ ；

$-(C_1-C_{12} \text{ 烷基二基})-(C_2-C_9 \text{ 雜環基二基})-(C_1-C_{12} \text{ 烷基二基})-N(R^5)-*$ ；

$-(C_1-C_{12} \text{ 烷基二基})-(C_1-C_{20} \text{ 雜芳基二基})-N(R^5)-*$ ；

$-(C_1-C_{12} \text{ 烷基二基})-(C_1-C_{20} \text{ 雜芳基二基})-*$ ；

$-(C_1-C_{12} \text{ 烷基二基})-(C_1-C_{20} \text{ 雜芳基二基})-(C_1-C_{12} \text{ 烷基二基})-*$ ；

$-(C_1-C_{12} \text{ 烷基二基})-(C_1-C_{20} \text{ 雜芳基二基})-(C_1-C_{12} \text{ 烷基二基})-N(R^5)-*$ ；

$-(C_3-C_{12} \text{ 碳環基二基})-*$ ；

$-(C_3-C_{12} \text{ 碳環基二基})-(C_1-C_{12} \text{ 烷基二基})-N(R^5)-*$;
 $-(C_3-C_{12} \text{ 碳環基二基})-(C_1-C_{12} \text{ 烷基二基})-N(R^5)-*$;
 $-(C_3-C_{12} \text{ 碳環基二基})-NR^5-C(=NR^{5a})-N(R^5)-*$;
 $-(C_6-C_{20} \text{ 芳基二基})-*$;
 $-(C_6-C_{20} \text{ 芳基二基})-N(R^5)-*$;
 $-(C_6-C_{20} \text{ 芳基二基})-(C_1-C_{12} \text{ 烷基二基})-N(R^5)-*$;
 $-(C_6-C_{20} \text{ 芳基二基})-(C_1-C_{12} \text{ 烷基二基})-(C_2-C_{20} \text{ 雜環基二基})-*$;
 $-(C_6-C_{20} \text{ 芳基二基})-(C_1-C_{12} \text{ 烷基二基})-N(R^5)-C(=NR^{5a})-N(R^5)-*$;
 $-(C_2-C_{20} \text{ 雜環基二基})-*$;
 $-(C_2-C_9 \text{ 雜環基二基})-(C_1-C_{12} \text{ 烷基二基})-N(R^5)-*$;
 $-(C_2-C_9 \text{ 雜環基二基})-N(R^5)-C(=NR^{5a})-N(R^5)-*$;
 $-(C_1-C_{20} \text{ 雜芳基二基})-*$;
 $-(C_1-C_{20} \text{ 雜芳基二基})-(C_1-C_{12} \text{ 烷基二基})-N(R^5)-*$;
 $-(C_1-C_{20} \text{ 雜芳基二基})-(C_1-C_{12} \text{ 烷基二基})-O-*$; 及
 $-(C_1-C_{20} \text{ 雜芳基二基})-N(R^5)-C(=NR^{5a})-N(R^5)-*$;

其中星號*指示該連接子 L 之連接位點；

R^5 選自由以下組成之群：H、 C_6-C_{20} 芳基及 C_1-C_{12} 烷基，或兩個 R^5 基團一起形成 5-員或 6-員雜環基環；

R^{5a} 選自由 C_6-C_{20} 芳基及 C_1-C_{20} 雜芳基組成之群；

L-Q 選自由以下組成之群：

$Q-C(=O)-PEG-$ ；

$Q-C(=O)-PEG-C(=O)N(R^6)-(C_1-C_{12} \text{ 烷基二基})-C(=O)-Gluc-$ ；

$Q-C(=O)-PEG-O-$ ；

$Q-C(=O)-PEG-O-C(=O)-$ ；

Q-C(=O)-PEG-C(=O)- ;

Q-C(=O)-PEG-C(=O)-PEP- ;

Q-C(=O)-PEG-N(R⁶)- ;

Q-C(=O)-PEG-N(R⁶)-C(=O)- ;

Q-C(=O)-PEG-N(R⁶)-PEG-C(=O)-PEP- ;

Q-C(=O)-PEG-N⁺(R⁶)₂-PEG-C(=O)-PEP- ;

Q-C(=O)-PEG-C(=O)-PEP-N(R⁶)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)- ;

Q-C(=O)-PEG-C(=O)-PEP-N(R⁶)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)N(R⁶)C(=O)-(C₂-C₅ 單雜環基二基)- ;

Q-C(=O)-PEG-SS-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-OC(=O)- ;

Q-C(=O)-PEG-SS-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-C(=O)- ;

Q-C(=O)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-C(=O)-PEP- ;

Q-C(=O)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-C(=O)-PEP-N(R⁶)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)- ;

Q-C(=O)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-C(=O)-PEP-N(R⁶)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-N(R⁵)-C(=O) ;

Q-C(=O)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-C(=O)-PEP-N(R⁶)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-N(R⁶)C(=O)-(C₂-C₅ 單雜環基二基)- ;

Q-(CH₂)_m-C(=O)N(R⁶)-PEG- ;

Q-(CH₂)_m-C(=O)N(R⁶)-PEG-C(=O)N(R⁶)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-C(=O)-Gluc- ;

Q-(CH₂)_m-C(=O)N(R⁶)-PEG-O- ;

Q-(CH₂)_m-C(=O)N(R⁶)-PEG-O-C(=O)- ;

Q-(CH₂)_m-C(=O)N(R⁶)-PEG-C(=O)- ;

Q-(CH₂)_m-C(=O)N(R⁶)-PEG-N(R⁵)- ;

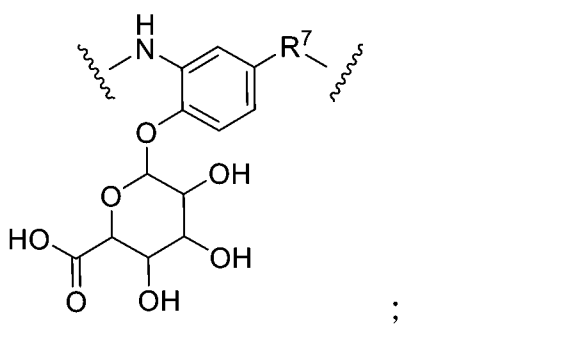
Q-(CH₂)_m-C(=O)N(R⁶)-PEG-N(R⁵)-C(=O)- ;

Q-(CH₂)_m-C(=O)N(R⁶)-PEG-C(=O)-PEP- ;

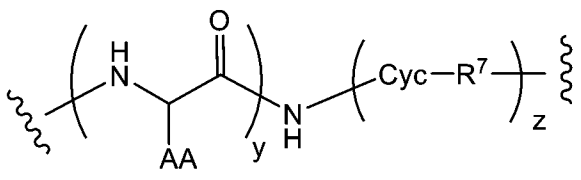
$Q-(CH_2)_m-C(=O)N(R^6)-PEG-SS-(C_1-C_{12} \text{ 烷基二基})-OC(=O)-$ ；
 $Q-(CH_2)_m-C(=O)-PEP-N(R^6)-(C_1-C_{12} \text{ 烷基二基})-$ ；
 $Q-(CH_2)_m-C(=O)-PEP-N(R^6)-(C_1-C_{12} \text{ 烷基二基})N(R^6)C(=O)-$ ；及
 $Q-(CH_2)_m-C(=O)-PEP-N(R^6)-(C_1-C_{12} \text{ 烷基二基})N(R^6)C(=O)-(C_2-C_5 \text{ 單雜環基二基})-$ ；
 R^6 獨立地為 H 或 C_1-C_6 烷基 ；

PEG 具有式 $-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_m-$ ；其中 m 為 1 至 5 之整數，且 n 為 2 至 50 之整數 ；

Gluc 具有下式 ：

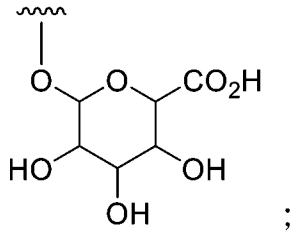


PEP 具有下式 ：



其中 AA 獨立地選自天然或非天然胺基酸側鏈，或者一或多個 AA 及相鄰氮原子形成 5 員環脯胺酸胺基酸，且波浪線指示連接點 ；

Cyc 選自 C_6-C_{20} 芳基二基及 C_1-C_{20} 雜芳基二基，其視情況經一或多個選自以下各項之基團取代：F、Cl、 NO_2 、 $-OH$ 、 $-OCH_3$ 、及具有以下結構之葡糖醛酸 ：



R^7 選自由 $-\text{CH}(R^8)\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{N}(R^8)-$ 及 $-\text{CH}(R^8)\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$ 組成之群，其中 R^8 選自 H 、 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基、 $\text{C}(=\text{O})-\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基及 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(R^9)_2$ ，其中 R^9 獨立地選自由 H 、 $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ 烷基及 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-(\text{CH}_2)_m-\text{OH}$ 組成之群，其中 m 為 1 至 5 之整數，且 n 為 2 至 50 之整數，或兩個 R^9 基團一起形成 5 員或 6 員雜環基環；

y 為 2 至 12 之整數；

z 為 0 或 1；

Q 選自由以下組成之群： N -羥基丁二醯亞胺基、 N -羥基磺基丁二醯亞胺基、順丁烯二醯亞胺及經一或多個獨立地選自 F 、 Cl 、 NO_2 及 SO_3^- 之基團取代之苯氧基；
且

烷基、烷基二基、烯基、烯基二基、炔基、炔基二基、芳基、芳基二基、碳環基、碳環基二基、雜環基、雜環基二基、雜芳基及雜芳基二基獨立地且視情況經獨立地選自以下之一或多個基團取代： F 、 Cl 、 Br 、 I 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}_2$ 、 $-\text{C}\equiv\text{CH}$ 、 $-\text{C}\equiv\text{CCH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CF}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CN}$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CN}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CN}$ 、 $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{NHSO}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{NHCH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{COCH}_3$ 、 $-\text{CO}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{COCH}(\text{OH})\text{CH}_3$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{CONHCH}_3$ 、 $-\text{CON}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHCH}_3$ 、 $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{NHCOCH}_3$ 、 $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{COCH}_3$ 、 $-\text{NHS}(\text{O})_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CONH}_2$ 、 $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}(\text{O})_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{NHC}(=\text{NH})\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(=\text{NH})\text{CH}_3$ 、 $-\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $=\text{O}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ 、 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-(\text{CH}_2)_m\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、

OP(O)(OH)₂、-S(O)₂N(CH₃)₂、-SCH₃、-S(O)₂CH₃及-S(O)₃H。

【0183】 式 II 之 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋-連接子化合物之示範性實施例包括如下情況，其中 R^{1a} 及 R^{1b} 獨立地選自由以下組成之群：視情況經取代之 C₆-C₂₀ 芳基、C₂-C₉ 雜環基及 C₁-C₂₀ 雜芳基。

【0184】 式 II 之 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋-連接子化合物之示範性實施例包括如下情況，其中 R^{1a} 為視情況經取代之 C₆-C₂₀ 芳基且 R^{1b} 為 H。

【0185】 式 II 之 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋-連接子化合物之示範性實施例包括如下情況，其中 X² 及 X³ 各自為鍵，且 R² 及 R³ 獨立地選自 C₁-C₈ 烷基、-O-(C₁-C₁₂ 烷基)、-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-OR⁵、-(C₁-C₈ 烷基二基)-N(R⁵)CO₂R⁵、-(C₁-C₁₂ 烷基)-OC(O)N(R⁵)₂、-O-(C₁-C₁₂ 烷基)-N(R⁵)CO₂R⁵ 及 -O-(C₁-C₁₂ 烷基)-OC(O)N(R⁵)₂。

【0186】 式 II 之 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋-連接子化合物之示範性實施例包括如下情況，其中 X² 為鍵，且 R² 為 C₁-C₁₂ 烷基。

【0187】 式 II 之 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋-連接子化合物之示範性實施例包括如下情況，其中 X³ 為 O 且 R³ 為 -(C₁-C₁₂ 烷基二基)-N(R⁵)-*。

【0188】 式 II 之 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋-連接子化合物之示範性實施例包括如下情況，其中 R³ 為 -CH₂CH₂CH₂NH-。

【0189】 式 II 之 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋-連接子化合物之示範性實施例包括如下情況，其中 L 為 -C(=O)-PEG-C(=O)-。

【0190】 式 II 之 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋-連接子化合物之示範性實施例包括如下情況，其中 AA₁ 及 AA₂ 獨立地選自天然存在之胺基酸之側鏈。

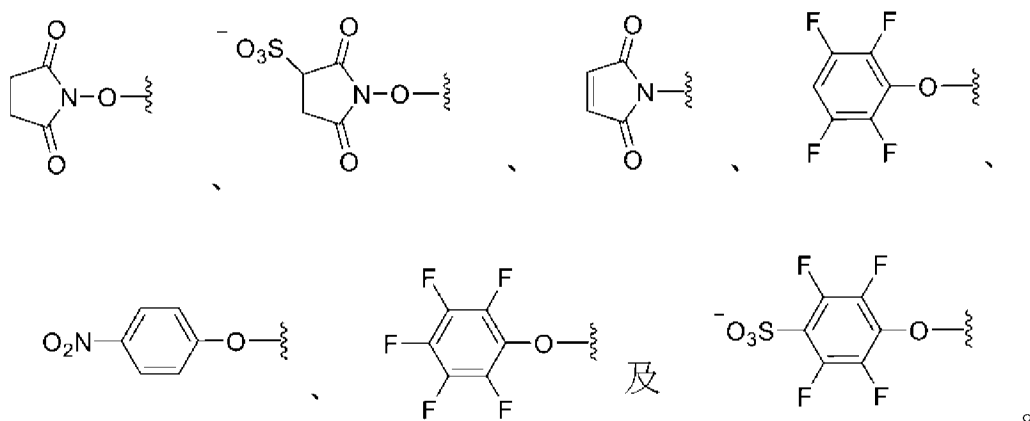
【0191】 式 II 之 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋-連接子化合物之示範性實施例包括如下情況，其中 AA₁ 或 AA₂ 與相鄰氮原子形成 5 員環脯氨酸胺基酸。

【0192】 式 II 之 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋-連接子化合物之示範性實施例包括如下情況，其中 AA₁ 及 AA₂ 獨立地選自 H、-CH₃、-CH(CH₃)₂、-CH₂(C₆H₅)、

-CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂、-CH₂CH₂CH₂NHC(NH)NH₂、-CHCH(CH₃)CH₃、-CH₂SO₃H
及-CH₂CH₂CH₂NHC(O)NH₂。

【0193】 式 II 之 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋-連接子化合物之示範性實施例包括如下情況，其中 AA₁ 為-CH(CH₃)₂，且 AA₂ 為-CH₂CH₂CH₂NHC(O)NH₂。

【0194】 式 II 之 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋-連接子化合物之示範性實施例包括如下情況，其中 Q 選自：

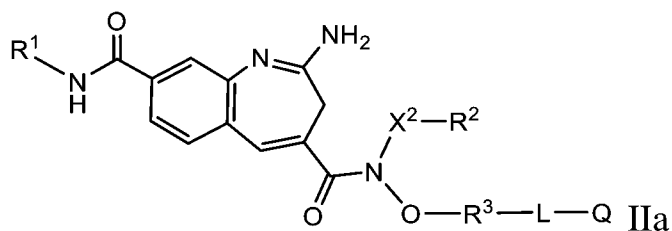


【0195】 式 II 之 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋-連接子化合物之示範性實施例包括如下情況，其中 Q 為經一或多個 F 取代之苯氧基。

【0196】 式 II 之 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋-連接子化合物之示範性實施例包括如下情況，其中 Q 為 2,3,5,6-四氟苯氧基。

【0197】 式 II 之 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋-連接子化合物之示範性實施例包括如下情況，其中 Q 為 2,3,5,6-四氟，4-磺酸基-苯氧基。

【0198】 式 II 之 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋-連接子化合物之示範性實施例具有式 IIa：



【0199】 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋-連接子化合物之示範性實施例選自表 2。

各化合物藉由質譜法表徵且顯示具有所指示之質量。

表 2a 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋-連接子(2Am4CBza-L)式 II 化合物

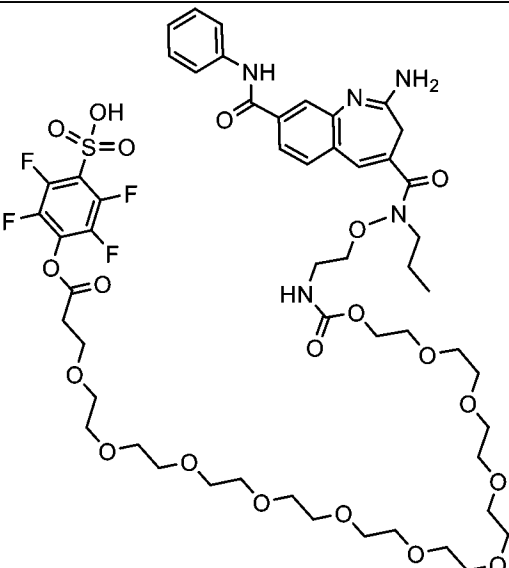
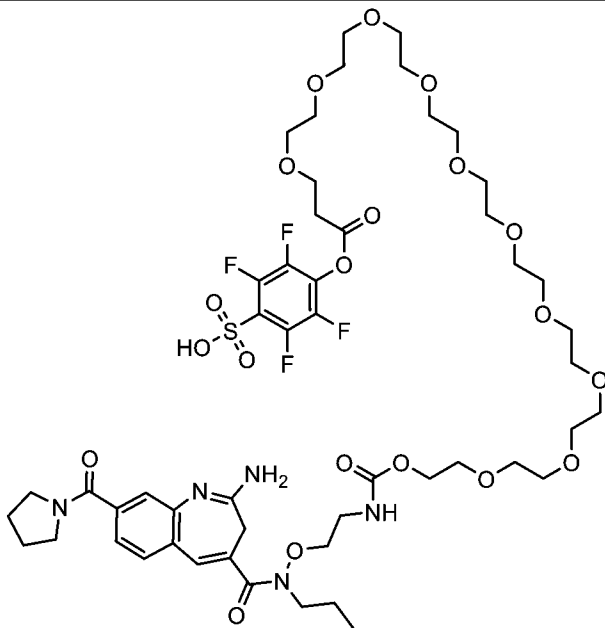
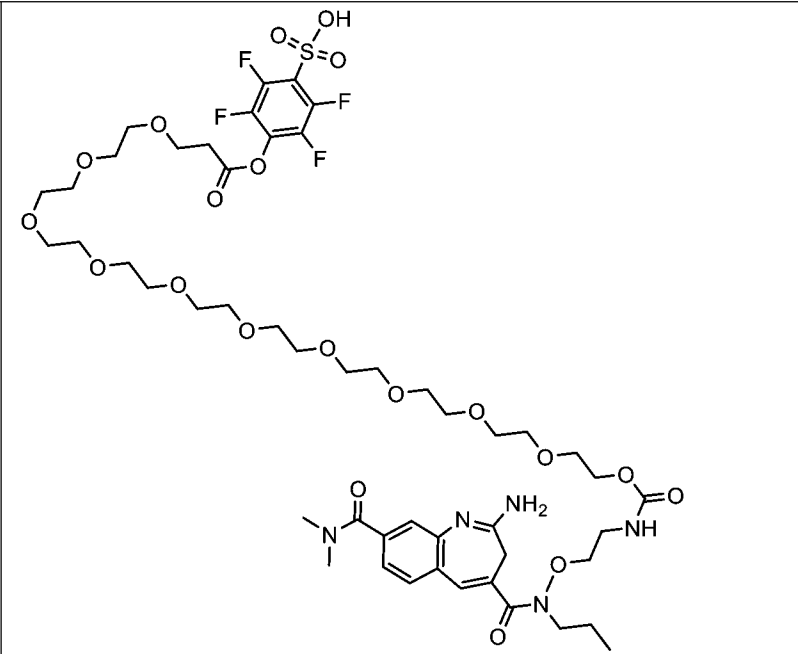
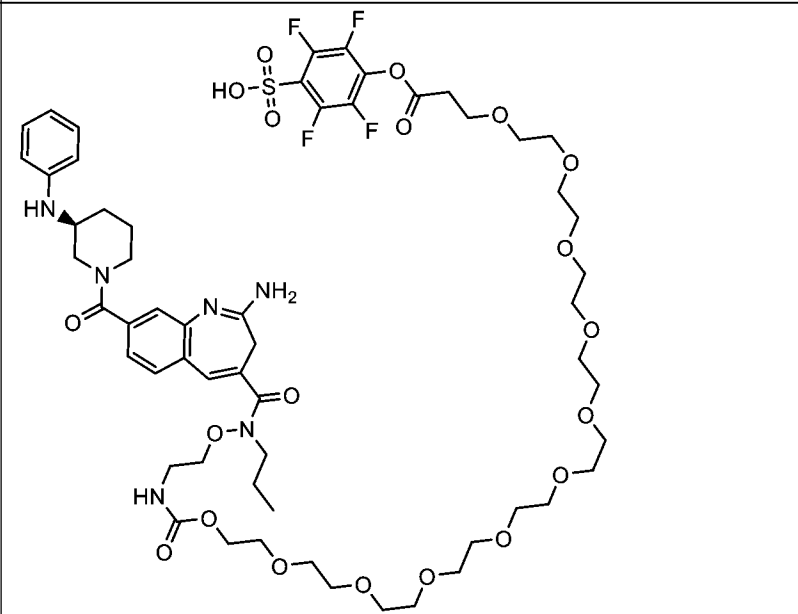
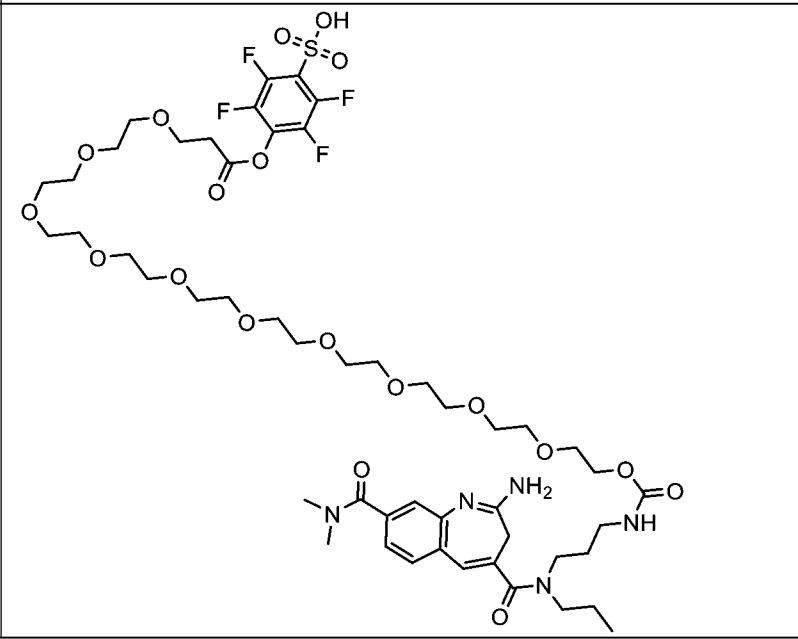
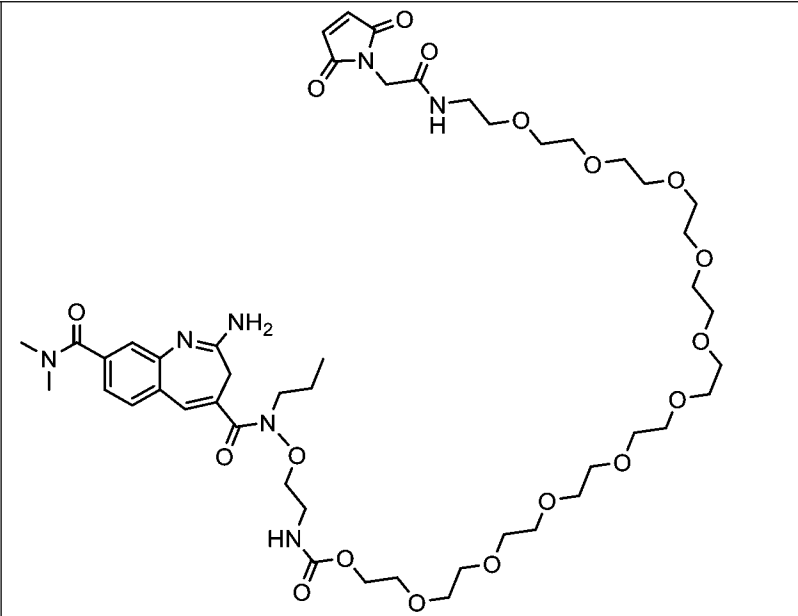
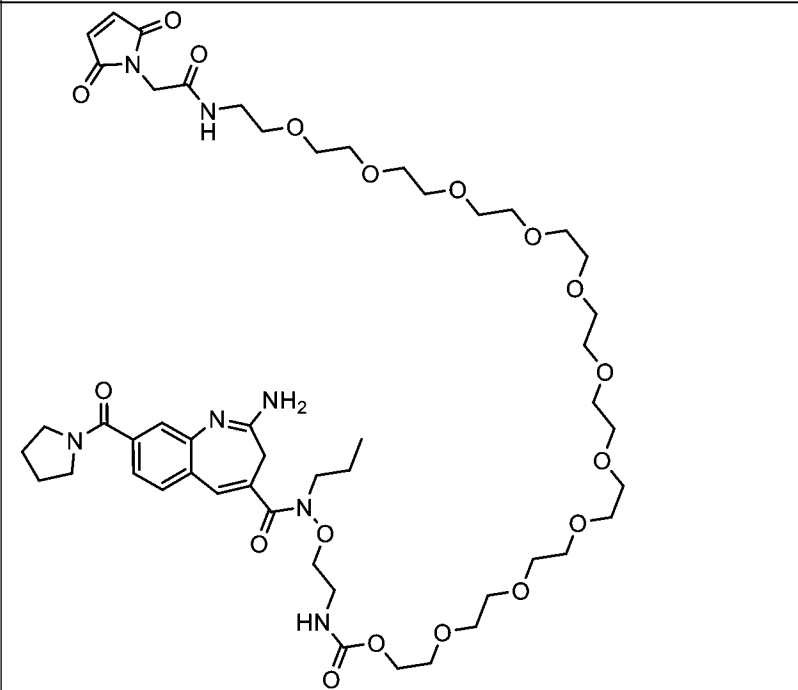
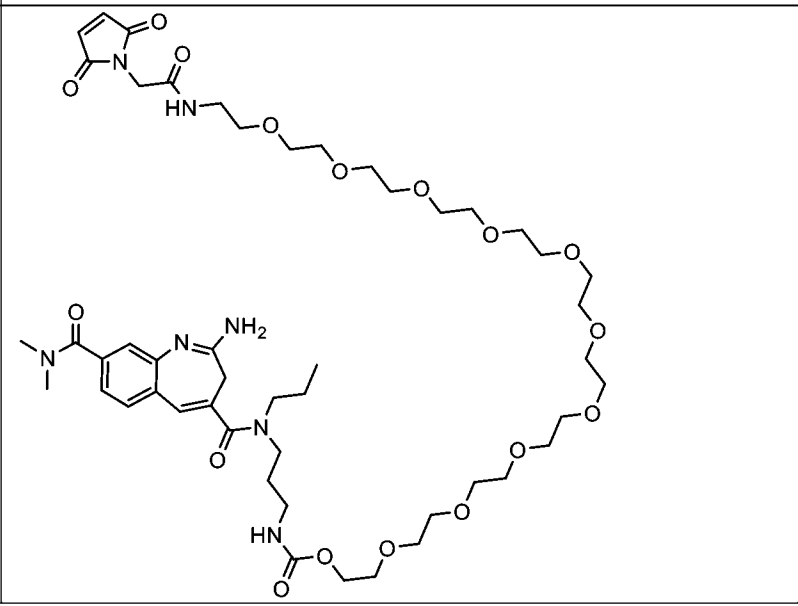
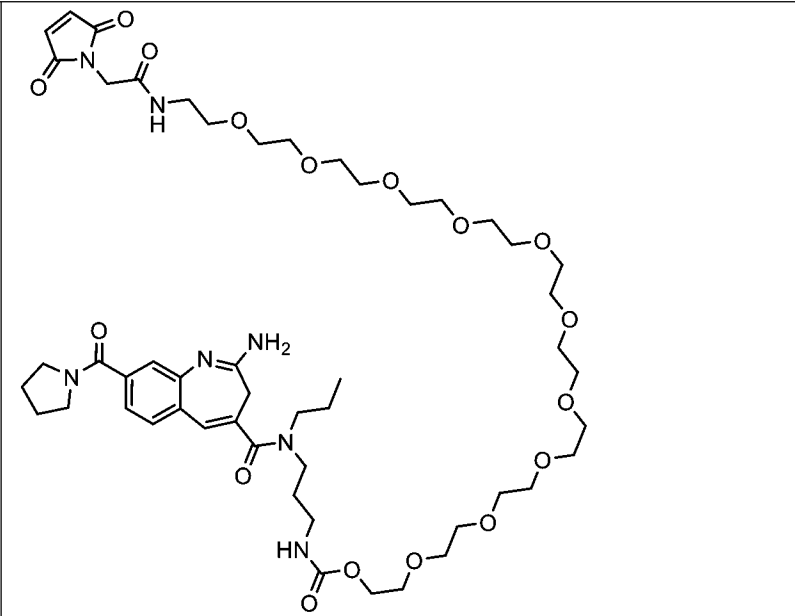
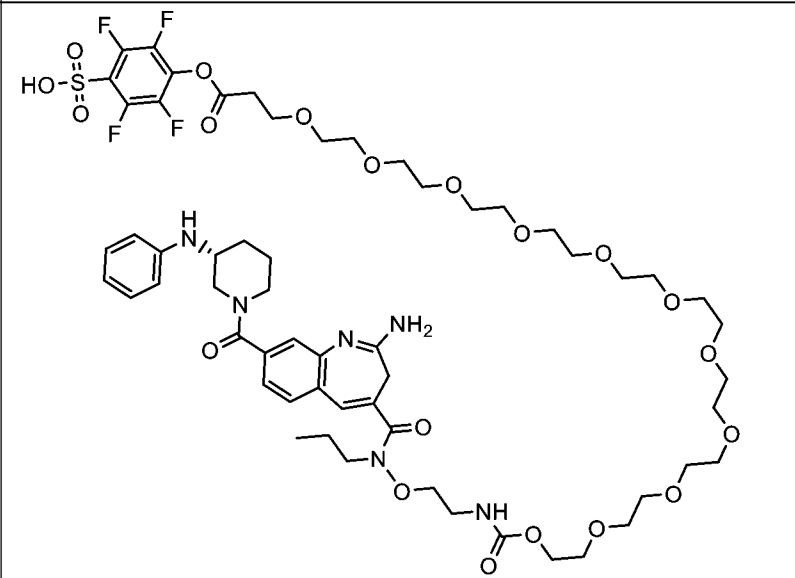
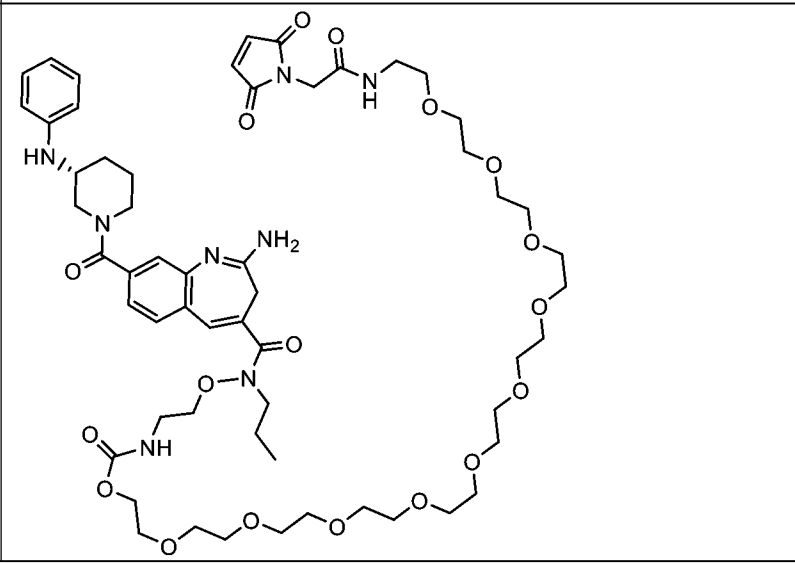
2Am4CBza-L	結構	MW
2Am4CBza-L-1		1206.2

表 2b 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋-連接子(2Am4CBza-L)式 II 化合物

2Am4CBza-L	結構	MW
2Am4CBza-L-2		1184.2

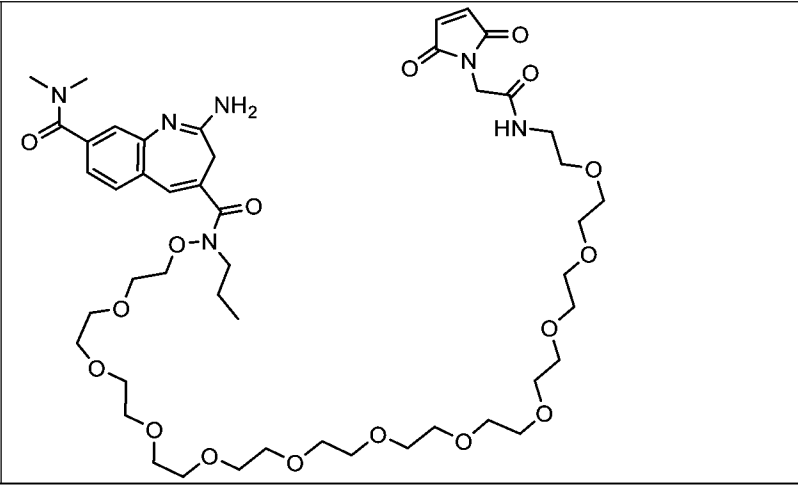
2Am4CBza-L-3	 The chemical structure of 2Am4CBza-L-3 features a central 2-amino-4,7-bis(methylamino)quinoline core. This core is substituted with a long, flexible polyether chain (HO-(CH2CH2O)10-H) at the 6-position. The 8-position is substituted with a 2,4,6-trifluorophenyl group, which is further linked via an ester bond to another polyether chain (HO-(CH2CH2O)10-H).	1158.2
2Am4CBza-L-4	 The chemical structure of 2Am4CBza-L-4 features a central 2-amino-4,7-bis(methylamino)quinoline core. The 6-position is substituted with a 4-phenylpiperidine-1-yl group. The 8-position is substituted with a 2,4,6-trifluorophenyl group, which is linked via an ester bond to a long polyether chain (HO-(CH2CH2O)10-H).	1289.3
2Am4CBza-L-5	 The chemical structure of 2Am4CBza-L-5 features a central 2-amino-4,7-bis(methylamino)quinoline core. The 6-position is substituted with a 2,4,6-trifluorophenyl group, which is linked via an ester bond to a long polyether chain (HO-(CH2CH2O)10-H). The 8-position is substituted with a 2,4,6-trifluorophenyl group, which is linked via an ester bond to another long polyether chain (HO-(CH2CH2O)10-H).	1156.2

2Am4CBza-L-6	 The chemical structure of 2Am4CBza-L-6 features a central quinoxaline core. At the 2-position, there is a dimethylamino group (-N(CH₃)₂). At the 3-position, there is a diethylamino group (-N(CH₂CH₃)₂). At the 8-position, there is a long, flexible polyether chain consisting of 10 repeating -CH₂-CH₂-O- units, terminated by a 2-oxo-2H-pyridine-5-ylmethyl group.	1038.2
2Am4CBza-L-7	 The chemical structure of 2Am4CBza-L-7 features a central quinoxaline core. At the 2-position, there is a dimethylamino group (-N(CH₃)₂). At the 3-position, there is a diethylamino group (-N(CH₂CH₃)₂). At the 8-position, there is a long, flexible polyether chain consisting of 10 repeating -CH₂-CH₂-O- units, terminated by a 2-oxo-2H-pyridine-5-ylmethyl group.	1064.2
2Am4CBza-L-8	 The chemical structure of 2Am4CBza-L-8 features a central quinoxaline core. At the 2-position, there is a dimethylamino group (-N(CH₃)₂). At the 3-position, there is a diethylamino group (-N(CH₂CH₃)₂). At the 8-position, there is a long, flexible polyether chain consisting of 10 repeating -CH₂-CH₂-O- units, terminated by a 2-oxo-2H-pyridine-5-ylmethyl group.	1036.2

2Am4CBza-L-9		1062.2
2Am4CBza-L-10		1289.3
2Am4CBza-L-11		1169.3

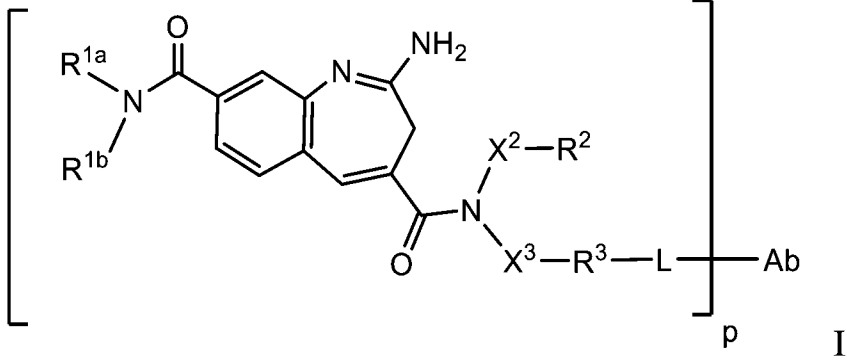
[illegible]

第 62 頁(發明說明書)

2Am4CBza-L-19		995.1
---------------	--	-------

免疫結合物

【0200】 免疫結合物之示範性實施例包含藉由連接子共價連接至一或多個 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋(2Am4CBza)部分之抗體，且具有式 I：



或其醫藥學上可接受之鹽，

其中：

Ab 係該抗體，其中該抗體結合至選自 PD-L1、HER2、CEA 及 TROP2 之靶標；

p 為 1 至 8 之整數；

X² 及 X³ 獨立地選自由以下組成之群：鍵、C(=O)、C(=O)N(R⁵)、O、N(R⁵)、S、S(O)₂ 及 S(O)₂N(R⁵)；

R^{1a}、R^{1b} 及 R² 獨立地選自由以下組成之群：H、C₁-C₁₂ 烷基、C₂-C₆ 烯基、C₂-C₆ 炔基、C₃-C₁₂ 碳環基、C₆-C₂₀ 芳基、C₂-C₉ 雜環基及 C₁-C₂₀ 雜芳基，或 R^{1a} 及 R^{1b} 形成五-員或六-員雜環基環；

R³ 選自由以下組成之群：

- (C₁-C₁₂ 烷基二基)-N(R⁵)-* ;
- (C₁-C₁₂ 烷基二基)-N(R⁵)-C(=O)* ;
- (C₁-C₁₂ 烷基二基)-N(R⁵)-C(=O)O-(C₃-C₁₂ 碳環基二基)-* ;
- (C₁-C₁₂ 烷基二基)-N(R⁵)-(C₁-C₂₀ 雜芳基二基)-* ;
- (C₁-C₁₂ 烷基二基)-N(R⁵)-(C₁-C₂₀ 雜芳基二基)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-* ;
- (C₁-C₁₂ 烷基二基)-N(R⁵)-S(O₂)-* ;
- (C₁-C₁₂ 烷基二基)-OC(=O)-(C₂-C₉ 雜環基二基)-* ;
- (C₁-C₁₂ 烷基二基)-O-* ;
- (C₁-C₁₂ 烷基二基)-(C₃-C₁₂ 碳環基二基)-* ;
- (C₁-C₁₂ 烷基二基)-(C₆-C₂₀ 芳基二基)-* ;
- (C₁-C₁₂ 烷基二基)-(C₆-C₂₀ 芳基)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-N(R⁵)-* ;
- (C₁-C₁₂ 烷基二基)-(C₂-C₉ 雜環基二基)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-N(R⁵)-* ;
- (C₁-C₁₂ 烷基二基)-(C₁-C₂₀ 雜芳基二基)-N(R⁵)-* ;
- (C₁-C₁₂ 烷基二基)-(C₁-C₂₀ 雜芳基二基)-* ;
- (C₁-C₁₂ 烷基二基)-(C₁-C₂₀ 雜芳基二基)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-* ;
- (C₁-C₁₂ 烷基二基)-(C₁-C₂₀ 雜芳基二基)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-N(R⁵)-* ;
- (C₃-C₁₂ 碳環基二基)-* ;
- (C₃-C₁₂ 碳環基二基)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-N(R⁵)-* ;
- (C₃-C₁₂ 碳環基二基)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-N(R⁵)-* ;
- (C₃-C₁₂ 碳環基二基)-NR⁵-C(=NR^{5a})-N(R⁵)-* ;
- (C₆-C₂₀ 芳基二基)-* ;
- (C₆-C₂₀ 芳基二基)-N(R⁵)-* ;
- (C₆-C₂₀ 芳基二基)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-N(R⁵)-* ;
- (C₆-C₂₀ 芳基二基)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-(C₂-C₂₀ 雜環基二基)-* ;

-(C₆-C₂₀ 芳基二基)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-N(R⁵)-C(=NR^{5a})-N(R⁵)-*；

-(C₂-C₂₀ 雜環基二基)-*；

-(C₂-C₉ 雜環基二基)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-N(R⁵)-*；

-(C₂-C₉ 雜環基二基)-N(R⁵)-C(=NR^{5a})-N(R⁵)-*；

-(C₁-C₂₀ 雜芳基二基)-*；

-(C₁-C₂₀ 雜芳基二基)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-N(R⁵)-*；

-(C₁-C₂₀ 雜芳基二基)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-O-*；及

-(C₁-C₂₀ 雜芳基二基)-N(R⁵)-C(=NR^{5a})-N(R⁵)-*；

其中星號*指示該連接子 L 之連接位點；

或 R² 及 R³ 一起形成 5-員或 6-員雜環基環；

R⁵ 獨立地選自由以下組成之群：H、C₆-C₂₀ 芳基、C₃-C₁₂ 碳環基、C₆-C₂₀ 芳基二基、C₁-C₁₂ 烷基及 C₁-C₁₂ 烷基二基，或兩個 R⁵ 基團一起形成 5 員或 6 員雜環基環；

R^{5a} 選自由 C₆-C₂₀ 芳基及 C₁-C₂₀ 雜芳基組成之群；

L 選自由以下組成之群：

-C(=O)-PEG-；

-C(=O)-PEG-C(=O)N(R⁶)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-C(=O)-Gluc-；

-C(=O)-PEG-O-；

-C(=O)-PEG-O-C(=O)-；

-C(=O)-PEG-C(=O)-；

-C(=O)-PEG-C(=O)-PEP-；

-C(=O)-PEG-N(R⁶)-；

-C(=O)-PEG-N(R⁶)-C(=O)-；

-C(=O)-PEG-N(R⁶)-PEG-C(=O)-PEP-；

- C(=O)-PEG-N⁺(R⁶)₂-PEG-C(=O)-PEP- ；
- C(=O)-PEG-C(=O)-PEP-N(R⁶)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)- ；
- C(=O)-PEG-C(=O)-PEP-N(R⁶)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)N(R⁶)C(=O)-(C₂-C₅ 單雜環基二基)- ；
- C(=O)-PEG-SS-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-OC(=O)- ；
- C(=O)-PEG-SS-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-C(=O)- ；
- C(=O)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-C(=O)-PEP- ；
- C(=O)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-C(=O)-PEP-N(R⁶)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)- ；
- C(=O)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-C(=O)-PEP-N(R⁶)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-N(R⁵)-C(=O) ；
- C(=O)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-C(=O)-PEP-N(R⁶)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-N(R⁶)C(=O)-(C₂-C₅ 單雜環基二基)- ；
- 丁二醯亞胺基-(CH₂)_m-C(=O)N(R⁶)-PEG- ；
- 丁二醯亞胺基-(CH₂)_m-C(=O)N(R⁶)-PEG-C(=O)N(R⁶)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-C(=O)-G
luc- ；
- 丁二醯亞胺基-(CH₂)_m-C(=O)N(R⁶)-PEG-O- ；
- 丁二醯亞胺基-(CH₂)_m-C(=O)N(R⁶)-PEG-O-C(=O)- ；
- 丁二醯亞胺基-(CH₂)_m-C(=O)N(R⁶)-PEG-C(=O)- ；
- 丁二醯亞胺基-(CH₂)_m-C(=O)N(R⁶)-PEG-N(R⁵)- ；
- 丁二醯亞胺基-(CH₂)_m-C(=O)N(R⁶)-PEG-N(R⁵)-C(=O)- ；
- 丁二醯亞胺基-(CH₂)_m-C(=O)N(R⁶)-PEG-C(=O)-PEP- ；
- 丁二醯亞胺基-(CH₂)_m-C(=O)N(R⁶)-PEG-SS-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-OC(=O)- ；
- 丁二醯亞胺基-(CH₂)_m-C(=O)-PEP-N(R⁶)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)- ；
- 丁二醯亞胺基-(CH₂)_m-C(=O)-PEP-N(R⁶)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)N(R⁶)C(=O)- ；及
- 丁二醯亞胺基-(CH₂)_m-C(=O)-PEP-N(R⁶)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)N(R⁶)C(=O)-(C₂-C₅ 單

z 為 0 或 1；且

烷基、烷基二基、烯基、烯基二基、炔基、炔基二基、芳基、芳基二基、碳環基、碳環基二基、雜環基、雜環基二基、雜芳基及雜芳基二基獨立地且視情況經獨立地選自以下之一或多個基團取代：F、Cl、Br、I、-CN、-CH₃、-CH₂CH₃、-CH=CH₂、-C≡CH、-C≡CCH₃、-CH₂CH₂CH₃、-CH(CH₃)₂、-CH₂CH(CH₃)₂、-CH₂OH、-CH₂OCH₃、-CH₂CH₂OH、-C(CH₃)₂OH、-CH(OH)CH(CH₃)₂、-C(CH₃)₂CH₂OH、-CH(OH)CH₂OH、-CH₂CH₂SO₂CH₃、-CH₂OP(O)(OH)₂、-CH₂F、-CHF₂、-CF₃、-CH₂CF₃、-CH₂CHF₂、-CH(CH₃)CN、-C(CH₃)₂CN、-CH₂CN、-CH₂NH₂、-CH₂NHSO₂CH₃、-CH₂NHCH₃、-CH₂N(CH₃)₂、-CO₂H、-COCH₃、-CO₂CH₃、-CO₂C(CH₃)₃、-COCH(OH)CH₃、-CONH₂、-CONHCH₃、-CON(CH₃)₂、-C(CH₃)₂CONH₂、-NH₂、-NHCH₃、-N(CH₃)₂、-NHCOCH₃、-N(CH₃)COCH₃、-NHS(O)₂CH₃、-N(CH₃)C(CH₃)₂CONH₂、-N(CH₃)CH₂CH₂S(O)₂CH₃、-NHC(=NH)H、-NHC(=NH)CH₃、-NHC(=NH)NH₂、-NHC(=O)NH₂、-NO₂、=O、-OH、-OCH₃、-OCH₂CH₃、-OCH₂CH₂OCH₃、-OCH₂CH₂OH、-OCH₂CH₂N(CH₃)₂、-O(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_mCO₂H、-O(CH₂CH₂O)_nH、-OCH₂F、-OCHF₂、-OCF₃、-OP(O)(OH)₂、-S(O)₂N(CH₃)₂、-SCH₃、-S(O)₂CH₃ 及 -S(O)₃H。

【0201】 式 I 之免疫結合物之示範性實施例包括如下情況，其中抗體為抗體構築體，該抗體構築體具有結合 PD-L1 之抗原結合域。

【0202】 式 I 之免疫結合物之示範性實施例包括如下情況，其中抗體選自由以下組成之群：阿特珠單抗、德瓦魯單抗及阿維單抗或其生物類似物或生物改良物。

【0203】 式 I 之免疫結合物之示範性實施例包括如下情況，其中抗體為抗體構築體，該抗體構築體具有結合 HER2 之抗原結合域。

【0204】 式 I 之免疫結合物之示範性實施例包括如下情況，其中抗體選自由

曲妥珠單抗及帕妥珠單抗或其生物類似物或生物改良物組成之群。

【0205】 式 I 之免疫結合物之示範性實施例包括如下情況，其中抗體為抗體構築體，該抗體構築體具有結合 CEA 之抗原結合域。

【0206】 式 I 之免疫結合物之示範性實施例包括如下情況，其中抗體為拉貝珠單抗或其生物類似物或生物改良物。

【0207】 式 I 之免疫結合物之示範性實施例包括如下情況，其中抗體為抗體構築體，該抗體構築體具有結合 TROP2 之抗原結合域。

【0208】 式 I 之免疫結合物之示範性實施例包括如下情況，其中該 Trop2 抗體為單株抗體。

【0209】 式 I 之免疫結合物之示範性實施例包括如下情況，其中 R^{1a} 及 R^{1b} 獨立地選自由以下組成之群：視情況經取代之 C_6-C_{20} 芳基、 C_2-C_9 雜環基及 C_1-C_{20} 雜芳基。

【0210】 式 I 之免疫結合物之示範性實施例包括如下情況，其中 R^{1a} 為視情況經取代之 C_6-C_{20} 芳基且 R^{1b} 為 H。

【0211】 式 I 之免疫結合物之示範性實施例包括如下情況，其中 X^2 及 X^3 各自為鍵，且 R^2 及 R^3 獨立地選自 C_1-C_8 烷基、 $-O-(C_1-C_{12}$ 烷基)、 $-(C_1-C_{12}$ 烷基二基)- OR^5 、 $-(C_1-C_8$ 烷基二基)- $N(R^5)CO_2R^5$ 、 $-(C_1-C_{12}$ 烷基)- $OC(O)N(R^5)_2$ 、 $-O-(C_1-C_{12}$ 烷基)- $N(R^5)CO_2R^5$ 及 $-O-(C_1-C_{12}$ 烷基)- $OC(O)N(R^5)_2$ 。

【0212】 式 I 之免疫結合物之示範性實施例包括如下情況，其中 X^2 為鍵，且 R^2 為 C_1-C_{12} 烷基。

【0213】 式 I 之免疫結合物之示範性實施例包括如下情況，其中 X^3 為 O 且 R^3 為 $-(C_1-C_{12}$ 烷基二基)- $N(R^5)-*$ 。

【0214】 式 I 之免疫結合物之示範性實施例包括如下情況，其中 R^3 為 $-CH_2CH_2CH_2NH-$ 。

【0215】 式 I 之免疫結合物之示範性實施例包括如下情況，其中 L 為-C(=O)-PEG-C(=O)-。

【0216】 式 I 之免疫結合物之示範性實施例包括如下情況，其中 L 包含 PEG 且其中 n 為 10 且 m 為 1。

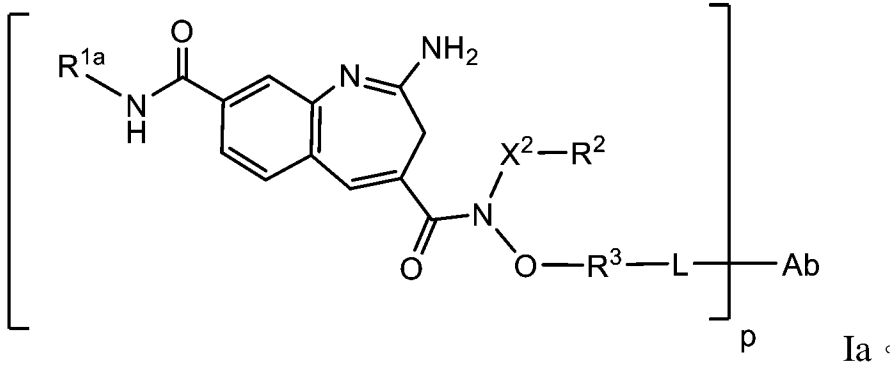
【0217】 式 I 之免疫結合物之示範性實施例包括如下情況，其中 AA₁ 及 AA₂ 獨立地選自天然存在之胺基酸之側鏈。

【0218】 式 I 之免疫結合物之示範性實施例包括如下情況，其中 AA₁ 或 AA₂ 與相鄰氮原子形成 5 員環脯氨酸胺基酸。

【0219】 式 I 之免疫結合物之示範性實施例包括如下情況，其中 AA₁ 及 AA₂ 獨立地選自 H、-CH₃、-CH(CH₃)₂、-CH₂(C₆H₅)、-CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂、-CH₂CH₂CH₂NHC(NH)NH₂、-CHCH(CH₃)CH₃、-CH₂SO₃H 及-CH₂CH₂CH₂NHC(O)NH₂。

【0220】 式 I 之免疫結合物之示範性實施例包括如下情況，其中 AA₁ 為-CH(CH₃)₂，且 AA₂ 為-CH₂CH₂CH₂NHC(O)NH₂。

免疫結合物之示範性實施例具有式 Ia：



【0221】 式 Ia 之免疫結合物之示範性實施例包括如下情況，其中 R^{1a} 為選自以下各項之基團：視情況經取代之 C₆-C₂₀ 芳基、C₂-C₉ 雜環基及 C₁-C₂₀ 雜芳基。

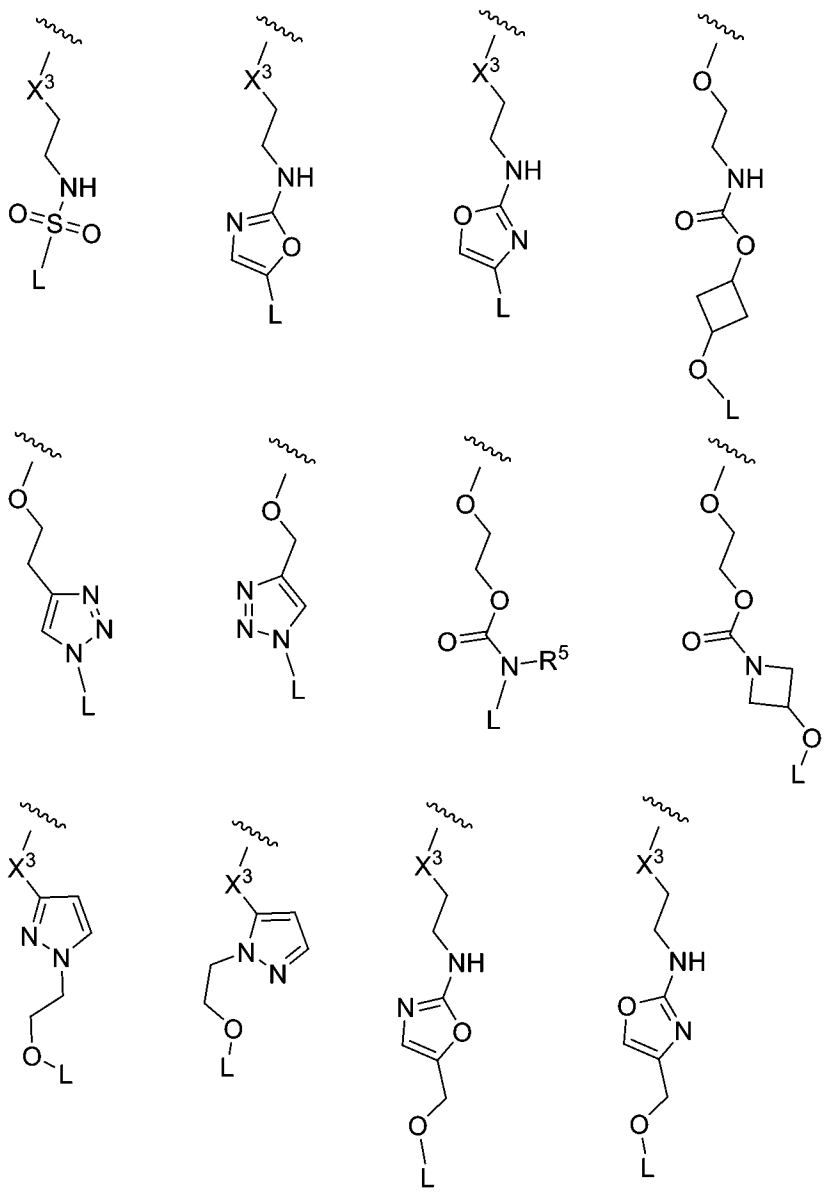
【0222】 式 Ia 之免疫結合物之示範性實施例包括如下情況，其中 R^{1a} 為嘧啶基或吡啶基。

【0223】 式 Ia 之免疫結合物之示範性實施例包括如下情況，其中 X² 為鍵，且

R² 為 C₁-C₁₂ 烷基。

【0224】 式 Ia 之免疫結合物之示範性實施例包括如下情況，其中 R³ 為-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-N(R⁵)-*。

式 Ia 之免疫結合物之示範性實施例包括如下情況，其中 X³-R³-L 選自由以下組成之群：



其中波浪線指示與 N 之連接點。

【0225】 本發明包括式 I 實施例之特徵之所有合理及可操作組合及排列。

【0226】 在某些實施例中，本發明之免疫結合物化合物包括具有免疫刺激活性之彼等者。本發明之抗體-藥物結合物將有效劑量之 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮

呼藥物選擇性遞送至腫瘤組織，藉此相對於未經結合之 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呼可在增加治療指數(「治療窗」)之同時達成更大選擇性(亦即，更低有效劑量)。

【0227】 藥物加載量由 p (式 I 之免疫結合物中每個抗體之 2Am4CBza 部分數目)表示。藥物(2Am4CBza)加載量可在每個抗體 1 至約 8 個藥物部分(D)範圍內。式 I 之免疫結合物包括與 1 至約 8 範圍之藥物部分結合的抗體之混合物或集合。在一些實施例中，可結合至抗體之藥物部分之數目受限於反應性或可用胺基酸側鏈殘基(諸如離胺酸及半胱胺酸)之數目。在一些實施例中，藉由本文所描述之方法將遊離半胱胺酸殘基引入到抗體胺基酸序列中。在此等態樣中， p 可為 1、2、3、4、5、6、7 或 8 及其範圍，諸如 1 至 8 或 2 至 5。在任何此等態樣中， p 與 n 相等(亦即， $p = n = 1、2、3、4、5、6、7$ 或 8，或其間之某個範圍)。式 I 之示範性抗體-藥物結合物包括但不限於具有 1、2、3 或 4 個經工程化半胱胺酸胺基酸之抗體(Lyon，R.等人(2012) *Methods in Enzym.* 502:123-138)。在一些實施例中，在未使用工程化之情況下，一或多個遊離半胱胺酸殘基已存在於抗體中，形成鏈內二硫鍵，在此情況下現有遊離半胱胺酸殘基可用於使抗體結合至藥物。在一些實施例中，在抗體結合之前使抗體暴露於還原條件，以產生一或多個遊離半胱胺酸殘基。

【0228】 對於一些免疫結合物， p 可受抗體上連接位點之數目限制。舉例而言，如在本文所描述之某些示範性實施例中，在連接為半胱胺酸硫醇時，抗體可具有僅一個或有限數目之半胱胺酸硫醇基，或可具有僅一個或有限數目之充足反應性硫醇基，藥物可與該等基團連接。在其他實施例中，對於與式 II 之 2Am4CBza-連接子化合物結合而言，抗體中之一或多個離胺酸胺基可為可用的及反應性的。在某些實施例中，較高藥物加載量(例如 $p > 5$)可引起某些抗體-藥物結合物之聚集、不可溶性、毒性或細胞滲透性損失。在某些實施例中，免疫結合物之平均藥物加載量在 1 至約 8；約 2 至約 6；或約 3 至約 5 範圍內。在某些實施例中，抗

體經受變性條件以揭示反應性親核基團，諸如離胺酸或半胱胺酸。

【0229】 免疫結合物之加載量(藥物/抗體比)可以不同方式加以控制，且例如藉由以下控制：(i)限制 2Am4CBza-連接子中間物化合物相對於抗體之莫耳過量，(ii)限制結合反應時間或溫度，及(iii)部分或有限之還原變性條件以獲得最佳化之抗體反應性。

【0230】 應瞭解，若抗體之多於一個親核基團與藥物反應，則所得產物為具有一或多個連接至抗體之藥物部分之分佈的抗體-藥物結合物化合物之混合物。每個抗體所對應之藥物之平均數目可藉由對抗體具有特異性且對藥物具有特異性之雙重 ELISA 抗體檢定自混合物計算。可藉由質譜分析鑑定混合物中之個別免疫結合物分子且藉由 HPLC (例如疏水相互作用層析)分離(參見例如 McDonagh 等人(2006) *Prot. Engr. Design 及 Selection* 19(7):299-307；Hamblett 等人(2004) *Clin. Cancer Res.* 10:7063-7070；Hamblett, K.J.等人「Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate」，摘要編號 624，American Association for Cancer Research，2004 Annual Meeting，2004 年 3 月 27-31 日，*Proceedings of the AACR*，第 45 卷，2004 年 3 月；Alley, S.C.,等人「Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates,」摘要編號 627，American Association for Cancer Research，2004 Annual Meeting，2004 年 3 月 27-31 日，*Proceedings of the AACR*，第 45 卷，2004 年 3 月)。在某些實施例中，可藉由電泳或層析自結合混合物分離具有單一加載值之均質免疫結合物。

【0231】 式 I 之免疫結合物之示範性實施例選自表 3a 及 3b 免疫結合物。在癌細胞與富含 cDC 之原代細胞分離物之共培養中，表 3a 及 3b 之某些免疫結合物誘導細胞介素 IL-12p70 之分泌，該細胞介素與產生對癌症之免疫反應有關。已研究具有 bezlotox (貝佐洛單抗(bezlotoxumab))且靶向困難梭狀芽孢桿菌

(*Clostridium difficile*)毒素 B 之免疫結合物 IC-28 及 IC-33 作為同型非腫瘤結合對照。活體外免疫結合物活性之評估根據實例 203 之方法進行。

表 3a 免疫結合物(IC)

IC 編號	2Am4CBza-連接子 表 2a	Ab 抗原	DAR	cDC 活化(IL-12p70 分泌) – EC ₅₀ (nM)
IC-1	2Am4CBzaL-1	CEA.9-G1fhL2 CEA	2.7	
IC-2	2Am4CBzaL-1	曲妥珠單抗 HER2	2.5	1.3

表 3b 免疫結合物(IC)

IC 編號	2Am4CBza-連接子 表 2a-2b	Ab 抗原	DAR	cDC 活化(IL- 12p70 分泌) – EC ₅₀ (nM)
IC-3	2Am4CBzaL-1	阿維單抗 PD-L1	1.8	
IC-4	2Am4CBzaL-1	PDL1.107-G1f PD-L1	2.0	
IC-5	2Am4CBzaL-1	PDL1.53-IgG1f PD-L1	1.8	
IC-6	2Am4CBzaL-1	PDL1.96-G1f PD-L1	2.1	
IC-7	2Am4CBzaL-1	PDL1.110-G1f PD-L1	2.0	
IC-8	2Am4CBzaL-1	PDL1.116-G1f PD-L1	2.1	
IC-9	2Am4CBzaL-1	曲妥珠單抗 HER2	2.4	1.5
IC-10	2Am4CBzaL-5	曲妥珠單抗 HER2	2.4	
IC-11	2Am4CBzaL-4	曲妥珠單抗 HER2	2.6	
IC-12	2Am4CBzaL-7	曲妥珠單抗 HER2	4.1	1.2
IC-13	2Am4CBzaL-8	曲妥珠單抗 HER2	4.2	
IC-14	2Am4CBzaL-9	曲妥珠單抗 HER2	4.1	
IC-15	2Am4CBzaL-6	曲妥珠單抗 HER2	4.2	1.8
IC-16	2Am4CBzaL-3	曲妥珠單抗 HER2	2.6	2.0
IC-17	2Am4CBzaL-10	曲妥珠單抗 HER2	2.2	
IC-18	2Am4CBzaL-11	曲妥珠單抗 HER2	3.9	5.1

IC-19	2Am4CBzaL-12	曲妥珠單抗 HER2	3.8-4.1	1.5
IC-20	2Am4CBzaL-14	曲妥珠單抗 HER2	3.2	
IC-21	2Am4CBzaL-6	TROP2.1-G1f TROP2	3.2 , 4.1	0.9
IC-22	2Am4CBzaL-12	TROP2.1-G1f TROP2	3.3	
IC-23	2Am4CBzaL-1	TROP2.1-G1f TROP2	2.3	
IC-24	2Am4CBzaL-15	TROP2.1-G1f TROP2	2.4	
IC-25	2Am4CBzaL-16	TROP2.1-G1f TROP2	2.4	
IC-26	2Am4CBzaL-18	TROP2.1-G1f TROP2	4.1	
IC-27	2Am4CBzaL-17	TROP2.1-G1f TROP2	3.4 , 4.2	1.8
IC-28	2Am4CBzaL-6	bezlotox-G1f 困難梭狀芽孢桿菌	4.5	
IC-29	2Am4CBzaL-6	TROP2.3-G1f TROP2	4.1	0.7
IC-30	2Am4CBzaL-6	TROP2.5-G1f TROP2	3.3	1.1
IC-31	2Am4CBzaL-19	TROP2.5-G1f TROP2	3.2	
IC-32	2Am4CBzaL-13	PDL1.110-G1f PD-L1	3.1	0.6
IC-33	2Am4CBzaL-13	bezlotox-G1f 困難梭狀芽孢桿菌	3.9	

免疫結合物之醫藥組合物

【0232】 本發明提供一種組合物，例如醫藥學上或藥理學上可接受之組合物或調配物，其包含複數種如本文所描述之免疫結合物及視情況存在之用於其之載劑，例如醫藥學上或藥理學上可接受之載劑。組合物中之免疫結合物可為相同或不同的，亦即，組合物可包含具有連接至抗體構築體上相同位置之相同數目之佐劑的免疫結合物及/或具有連接至抗體構築體上不同位置之相同數目之2Am4CBza 佐劑、具有連接至抗體構築體上相同位置之不同數目之佐劑或具有連接至抗體構築體上不同位置之不同數目之佐劑的免疫結合物。

【0233】 在一示範性實施例中，包含免疫結合物化合物之組合物包含免疫結

合物化合物之混合物，其中免疫結合物化合物之混合物中每個抗體之平均藥物(2Am4CBza)加載量為約 2 至約 5。

【0234】 本發明之免疫結合物之組合物可具有約 0.4 至約 10 之平均佐劑與抗體構築體比。熟習此項技術者將認識到，在包含多種本發明之免疫結合物的組合物中結合至抗體構築體之 2Am4CBza 佐劑之數目在免疫結合物間可不同，且因此佐劑與抗體構築體(例如抗體)比可量測為可稱為藥物與抗體比(DAR)之平均值。佐劑與抗體構築體(例如抗體)比可藉由任何合適的方法評估，該等方法中許多為此項技術中已知的。

【0235】 在由結合反應製備免疫結合物時每個抗體之平均佐劑部分數目(DAR)可藉由諸如質譜法、ELISA 檢定及 HPLC 之習知手段來表徵。亦可測定就 p 而言組合物中免疫結合物之定量分佈。在一些情況下，其中 p 為來自具有其他藥物加載量之免疫結合物的某一值之均質免疫結合物的分離、純化及表徵可藉由諸如逆相 HPLC 或電泳之手段來達成。

【0236】 在一些實施例中，組合物進一步包含一或多種醫藥學上或藥理學上可接受之賦形劑。舉例而言，本發明之免疫結合物可經調配用於非經腸投與，諸如靜脈內投與或投與至體腔或器官管腔中。或者，可腫瘤內注射免疫結合物。用於注射之組合物將通常包含免疫結合物溶解於醫藥學上可接受之載劑中之溶液。在可接受之媒劑及溶劑中，可採用水及一或多種鹽(諸如氯化鈉)之等張溶液，例如林格氏溶液(Ringer's solution)。此外，可習知採用無菌固定油作為溶劑或懸浮介質。出於此目的，可採用任何溫和固定油，包括合成單甘油酯或二甘油酯。此外，諸如油酸之脂肪酸同樣可用於製備可注射劑。此等組合物理想地為無菌的且通常不含不希望之物質。此等組合物可藉由習知之熟知滅菌技術進行滅菌。組合物可按需要含有醫藥學上可接受之助劑物質以接近生理條件，諸如 pH 調節及緩衝劑、毒性調節劑，例如乙酸鈉、氯化鈉、氯化鉀、氯化鈣、乳酸鈉及類似物。

【0237】 組合物可含有任何適合之濃度之免疫結合物。組合物中免疫結合物之濃度可廣泛地改變，且將根據所選之特定投與方式及患者之需要主要基於流體體積、黏度、體重及類似因素加以選擇。在某些實施例中，用於注射之溶液調配物中免疫結合物之濃度將在約 0.1% (w/w) 至約 10% (w/w) 範圍內。

用免疫結合物治療癌症之方法

【0238】 本發明提供一種用於治療癌症之方法。該方法包括向有需要之個體(例如患有癌症且需要治療癌症之個體)投與治療有效量之如本文所描述之免疫結合物(例如如本文所描述呈組合物形式)。該方法包括投與治療有效量之選自表 3 之免疫結合物(IC)。

【0239】 預期本發明之免疫結合物可用於治療例如以腫瘤抗原之過表現為特徵的各種過度增殖性疾病或病症。示範性過度增殖性病症包括良性或惡性實體瘤及血液學病症，諸如白血病及淋巴系惡性腫瘤。

【0240】 在另一態樣中，提供一種用作藥劑之免疫結合物。在某些實施例中，本發明提供一種用於治療個體之方法中的免疫結合物，該方法包括向該個體投與有效量之免疫結合物。在一個此種實施例中，該方法進一步包括向個體投與有效量之至少一種例如如本文所描述之其他治療劑。

【0241】 在另一態樣中，本發明提供免疫結合物在藥劑之製造或製備中之用途。在一個實施例中，該藥劑用於治療癌症，該方法包括向患有癌症之個體投與有效量之該藥劑。在一個此種實施例中，該方法進一步包括向個體投與有效量之至少一種例如如本文所描述之其他治療劑。

【0242】 癌瘤為起源於上皮組織之惡性腫瘤。上皮細胞覆蓋身體之外表面、襯於內部空腔且形成腺組織之內襯。癌瘤之實例包括但不限於腺癌(在腺(分泌)細胞中開始之癌症，諸如乳癌、胰腺癌、肺癌、前列腺癌、胃癌、胃食管連接部癌及結腸癌)；腎上腺皮質癌；肝細胞癌；腎細胞癌；卵巢癌；原位癌；導管癌；

乳癌；基底細胞癌；鱗狀細胞癌；移行細胞癌；結腸癌；鼻咽癌；多室性囊性腎細胞癌；燕麥狀細胞癌；大細胞肺癌；小細胞肺癌；非小細胞肺癌；及諸如此類。癌瘤可見於前列腺、胰臟、結腸、腦(通常呈繼發性轉移形式)、肺、乳房及皮膚中。在一些實施例中，用於治療非小細胞肺癌之方法包括投與含有能夠結合 PD-L1 之抗體構築體(例如阿特珠單抗、德瓦魯單抗、阿維單抗、其生物類似物或其生物改良物)的免疫結合物。在一些實施例中，用於治療乳癌之方法包括投與含有能夠結合 PD-L1 之抗體構築體(例如阿特珠單抗、德瓦魯單抗、阿維單抗、其生物類似物或其生物改良物)的免疫結合物。在一些實施例中，用於治療三陰性乳癌之方法包括投與含有能夠結合 PD-L1 之抗體構築體(例如阿特珠單抗、德瓦魯單抗、阿維單抗、其生物類似物或其生物改良物)的免疫結合物。

【0243】 軟組織腫瘤為衍生自結締組織之高度多樣化之罕見腫瘤群。軟組織腫瘤之實例包括但不限於肺泡軟部分肉瘤；血管瘤樣纖維組織細胞瘤；軟骨黏液樣纖維瘤；骨骼軟骨肉瘤；骨外黏液樣軟骨肉瘤；透明細胞肉瘤；促結締組織增生小圓細胞腫瘤；隆凸性皮膚纖維肉瘤；子宮內膜基質瘤；尤文氏肉瘤(Ewing's sarcoma)；纖維瘤病(硬纖維瘤)；嬰兒型纖維肉瘤；胃腸道基質瘤；骨骼巨細胞腫瘤；腱鞘巨細胞腫瘤；炎性肌纖維母細胞腫瘤；子宮平滑肌瘤；平滑肌肉瘤；脂母細胞瘤；典型脂肪瘤；紡錘形細胞或多形性脂肪瘤；非典型性脂肪瘤；軟骨樣脂肪瘤；分化良好型脂肪肉瘤；黏液樣/圓細胞脂肪肉瘤；多形性脂肪肉瘤；黏液樣惡性纖維組織細胞瘤；高惡性纖維組織細胞瘤；黏液纖維肉瘤；惡性周圍神經鞘腫瘤；間皮瘤；神經母細胞瘤；骨軟骨瘤；骨肉瘤；原始神經外胚層腫瘤；腺泡狀橫紋肌肉瘤；胚胎性橫紋肌肉瘤；良性或惡性神經鞘瘤；滑膜肉瘤；伊凡氏腫瘤(Evan's tumor)；結節性筋膜炎；硬纖維瘤型纖維瘤病；孤立性纖維腫瘤；隆凸性皮膚纖維肉瘤(DFSP)；血管肉瘤；上皮樣血管內皮瘤；腱鞘巨細胞腫瘤(TGCT)；色素沈著絨毛結節性滑膜炎(PVNS)；纖維組織發育異常；黏液纖維肉

瘤；纖維肉瘤；滑膜肉瘤；惡性周圍神經鞘腫瘤；神經纖維瘤；軟組織多形性腺瘤；及源自纖維母細胞、肌纖維母細胞、組織細胞、維管細胞/內皮細胞及神經鞘細胞之瘤形成。

【0244】 肉瘤為一種罕見類型之癌症，其產生於間充質來源之細胞中，例如骨骼中或身體之軟組織中，包括軟骨、脂肪、肌肉、血管、纖維組織或其他結締組織或支持組織。不同類型之肉瘤係基於癌症形成於何處。舉例而言，骨肉瘤形成於骨骼中，脂肪肉瘤形成於脂肪中，且橫紋肌肉瘤形成於肌肉中。肉瘤之實例包括但不限於皮膚腫瘤；葡萄樣肉瘤；軟骨肉瘤；尤文氏肉瘤；惡性血管內皮細胞瘤；惡性神經鞘瘤；骨肉瘤；及軟組織肉瘤(例如肺泡軟部分肉瘤；血管肉瘤；囊性肉瘤葉狀柄隆凸性皮膚纖維肉瘤(DFSP)；硬纖維瘤腫瘤；促結締組織增生小圓細胞腫瘤；上皮樣肉瘤；骨外軟骨肉瘤；骨外骨肉瘤；纖維肉瘤；胃腸道基質瘤(GIST)；血管外皮瘤；血管肉瘤(hemangiosarcoma) (更通常稱為「血管肉瘤(angiosarcoma)」)；卡波西氏肉瘤(kaposi's sarcoma)；平滑肌肉瘤；脂肪肉瘤；淋巴管肉瘤；惡性周圍神經鞘腫瘤(MPNST)；神經纖維肉瘤；滑膜肉瘤；及未分化多形性肉瘤)。

【0245】 畸胎瘤為一類生殖細胞腫瘤，其可含有若干不同類型之組織(例如可包括衍生自任何及/或所有三個胚層(內胚層、中胚層及外胚層)之組織)，包括例如毛髮、肌肉及骨骼。畸胎瘤最常發生於女性之卵巢、男性之睪丸及兒童之尾骨中。

【0246】 黑色素瘤為一種開始於黑色素細胞(產生黑色素之細胞)中之癌症形式。黑色素瘤可開始於痣(皮膚黑色素瘤)中，但亦可開始於其他色素沈著組織中，諸如眼睛中或腸道中。

【0247】 默克細胞癌(Merkel cell carcinoma)為一種罕見類型之皮膚癌，其通常表現為面部、頭部或頸部之肉色或藍紅色結節。默克細胞癌亦稱為皮膚之神經內

分泌癌。在一些實施例中，用於治療默克細胞癌之方法包括投與含有能夠結合 PD-L1 之抗體構築體(例如阿特珠單抗、德瓦魯單抗、阿維單抗、其生物類似物或其生物改良物)的免疫結合物。在一些實施例中，當進行投與時默克細胞癌已轉移。

【0248】 白血病為開始於血液形成組織(諸如骨髓)中之癌症且引起大量異常血細胞產生且進入血流。舉例而言，白血病可起源於通常在血流中成熟之骨髓源性細胞。白血病係針對疾病多麼快速發展及進展(例如急性相較於慢性)且針對受影響之白血細胞類型(例如髓系相較於淋巴系)而命名。髓系白血病亦稱為骨髓性或髓母細胞性白血病。淋巴系白血病亦稱為淋巴母細胞性或淋巴球性白血病。淋巴系白血病細胞可在可變得腫脹之淋巴結中收集。白血病之實例包括但不限於急性髓系白血病(AML)、急性淋巴母細胞性白血病(ALL)、慢性髓系白血病(CML)及慢性淋巴球性白血病(CLL)。

【0249】 淋巴瘤為開始於免疫系統之細胞中之癌症。舉例而言，淋巴瘤可起源於通常在淋巴系統中成熟之骨髓源性細胞。存在兩種基本類別之淋巴瘤。一種類別之淋巴瘤為霍奇金淋巴瘤(Hodgkin lymphoma, HL)，其以一類稱為里德-斯特恩伯格細胞(Reed-Sternberg cell)之細胞之存在為標誌。當前存在 6 種已識別之 HL 類型。霍奇金淋巴瘤之實例包括結節性硬化經典霍奇金淋巴瘤(CHL)、混合細胞性 CHL、淋巴球耗盡型 CHL、富淋巴球 CHL 及結節性淋巴球優勢型 HL。

【0250】 其他類別之淋巴瘤為非霍奇金淋巴瘤(NHL)，其包括免疫系統細胞之一大群各種癌症。非霍奇金淋巴瘤可進一步分成具有惰性(生長遲緩)過程之癌症及具有侵襲性(快速生長)過程之彼等癌症。當前存在 61 種已識別之 NHL 類型。非霍奇金淋巴瘤之實例包括但不限於 AIDS 相關淋巴瘤、間變性大細胞淋巴瘤、血管免疫母細胞性淋巴瘤、母細胞性 NK-細胞淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、伯基特氏樣淋巴瘤(小非核裂細胞淋巴瘤)、慢性淋巴球性白血病/小

淋巴球性淋巴瘤、皮膚 T 細胞淋巴瘤、彌漫性大 B 細胞淋巴瘤、腸病型 T 細胞淋巴瘤、濾泡性淋巴瘤、肝脾性 γ - δ T 細胞淋巴瘤、T 細胞白血病、淋巴母細胞性淋巴瘤、套細胞淋巴瘤、邊緣區淋巴瘤、鼻 T 細胞淋巴瘤、兒科淋巴瘤、外周 T 細胞淋巴瘤、原發性中樞神經系統淋巴瘤、轉型淋巴瘤、治療相關 T 細胞淋巴瘤及沃爾德斯特羅姆氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)。

【0251】 腦癌包括腦組織之任何癌症。腦癌之實例包括但不限於神經膠質瘤(例如膠質母細胞瘤、星形細胞瘤、寡樹突神經膠質瘤、室管膜瘤及諸如此類)、腦膜瘤、垂體腺瘤及前庭神經鞘瘤、原始神經外胚層腫瘤(神經管母細胞瘤)。

【0252】 本發明之免疫結合物可單獨或與療法中之其他劑組合使用。舉例而言，免疫結合物可與至少一種其他治療劑(諸如化學治療劑)共投與。此等組合療法涵蓋組合投與(其中兩種或更多種治療劑包括於同一或單獨調配物中)及分開投與，在此情況下，投與免疫結合物可在投與其他治療劑及/或佐劑之前、同時及/或之後進行。免疫結合物亦可與放射療法組合使用。

【0253】 本發明之免疫結合物(及任何其他治療劑)可藉由任何合適之方法投與，包括非經腸、肺內及鼻內方法，且若需要局部治療，則為病損內投與。非經腸輸注包括肌內、靜脈內、動脈內、腹膜內或皮下投與。給藥可藉由任何適合之途徑例如藉由注射(諸如靜脈內或皮下注射)進行，這部分取決於投與為短暫的抑或長期的。本文涵蓋各種給藥排程，包括但不限於在各個時間點單次或多次投與、推注投與及脈衝輸注。

【0254】 阿特珠單抗、德瓦魯單抗、阿維單抗、其生物類似物及其生物改良物已知適用於治療癌症，特定而言乳癌，尤其三陰性(針對雌激素受體、孕激素受體及過量 HER2 蛋白測試為陰性)乳癌、膀胱癌及默克細胞癌。本文所描述之免疫結合物可用於治療與阿特珠單抗、德瓦魯單抗、阿維單抗、其生物類似物及其生物改良物相同類型之癌症，特定而言乳癌，尤其三陰性(針對雌激素受體、孕

激素受體及過量 HER2 蛋白測試為陰性)乳癌、膀胱癌及默克細胞癌。

【0255】 免疫結合物係使用任何適合之給藥方案(諸如關於阿特珠單抗、德瓦魯單抗、阿維單抗、其生物類似物及其生物改良物所用之給藥方案)以任何治療有效量向有需要之個體投與。舉例而言,該等方法可包括投與免疫結合物以向個體提供約 100 ng/kg 至約 50 mg/kg 之劑量。免疫結合物劑量可在約 5 mg/kg 至約 50 mg/kg、約 10 µg/kg 至約 5 mg/kg 或約 100 µg/kg 至約 1 mg/kg 範圍內。免疫結合物劑量可為約 100、200、300、400 或 500 µg/kg。免疫結合物劑量可為約 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 mg/kg。視特定結合物以及所治療癌症之類型及嚴重程度而定,免疫結合物劑量亦可在此等範圍之外。投與頻率可在每週單個劑量至多個劑量範圍內,或更頻繁。在一些實施例中,約每月一次至約每週五次投與免疫結合物。在一些實施例中,每週一次投與免疫結合物。

【0256】 在另一態樣中,本發明提供一種用於預防癌症之方法。該方法包括向個體投與治療有效量之免疫結合物(例如如上文所描述呈組合物形式)。在某些實施例中,個體易患某一所要預防之癌症。舉例而言,該等方法可包括投與免疫結合物以向個體提供約 100 ng/kg 至約 50 mg/kg 之劑量。免疫結合物劑量可在約 5 mg/kg 至約 50 mg/kg、約 10 µg/kg 至約 5 mg/kg 或約 100 µg/kg 至約 1 mg/kg 範圍內。免疫結合物劑量可為約 100、200、300、400 或 500 µg/kg。免疫結合物劑量可為約 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 mg/kg。視特定結合物以及所治療癌症之類型及嚴重程度而定,免疫結合物劑量亦可在此等範圍之外。投與頻率可在每週單個劑量至多個劑量範圍內,或更頻繁。在一些實施例中,約每月一次至約每週五次投與免疫結合物。在一些實施例中,每週一次投與免疫結合物。

【0257】 本發明之一些實施例提供如上文所描述之用於治療癌症之方法,其中癌症為乳癌。乳癌可來源於乳房中之不同區域,且已表徵許多不同類型之乳癌。舉例而言,本發明之免疫結合物可用於治療導管原位癌;侵入性導管癌瘤(例

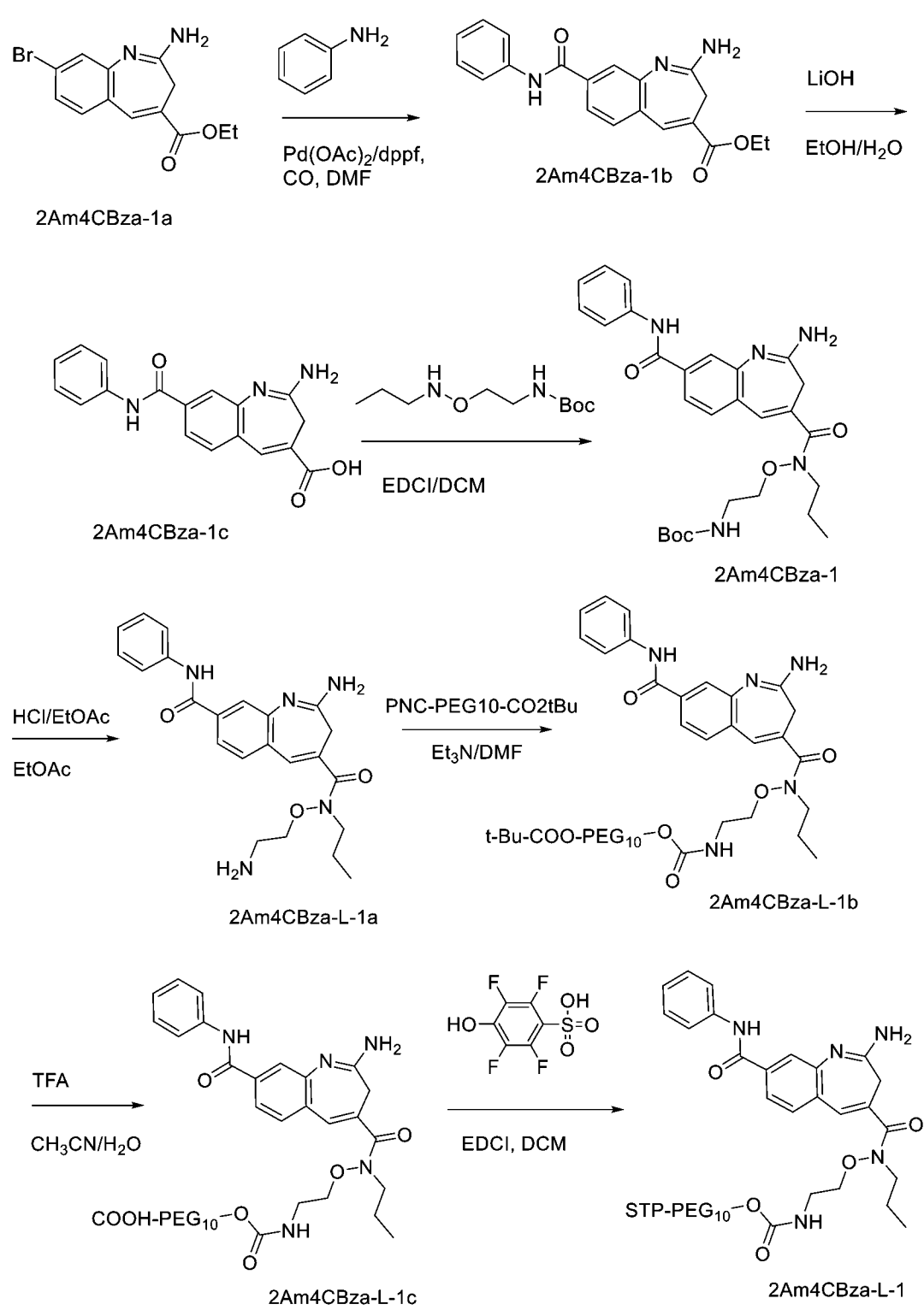
如小管癌；髓樣癌；黏液癌；乳頭狀癌；或乳房篩狀癌)；小葉原位癌；侵入性小葉癌；炎性乳癌；及其他形式之乳癌，諸如三陰性(針對雌激素受體、孕激素受體及過量 HER2 蛋白測試為陰性)乳癌。在一些實施例中，用於治療乳癌之方法包括投與含有能夠結合 HER2 (例如曲妥珠單抗、帕妥珠單抗、其生物類似物或生物改良物)及 PD-L1 (例如阿特珠單抗、德瓦魯單抗、阿維單抗、其生物類似物或生物改良物)之抗體構築體的免疫結合物。在一些實施例中，用於治療結腸癌、肺癌、腎癌、胰腺癌、胃癌及食管癌之方法包括投與含有能夠結合 CEA 或過表現 CEA 之腫瘤之抗體構築體(例如拉貝珠單抗、其生物類似物或生物改良物)的免疫結合物。

【0258】 在一些實施例中，癌症易受由 TLR7 及/或 TLR8 誘導之促炎性反應影響。

實例

2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋化合物(2Am4CBza)及中間物之製備

實例 1 4-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-胺基-8-(苯基胺甲醯基)-3H-1-苯并氮呋-4-羧基]-丙基-胺基]氧基乙基胺甲醯基氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙醯基氧基]-2,3,5,6-四氟-苯磺酸 2Am4CBza-L-1 之合成



2-氨基-8-(苯基胺甲酰基)-3H-苯并 [b]氮呋-4-羧酸乙酯 2Am4CBza-1b 之製備

【0259】 在 N₂ 下向 2-氨基-8-溴-3H-1-苯并氮呋-4-羧酸乙酯、2Am4CBza-1a(2 g , 6.47 mmol(毫莫耳) , 1 eq)及苯胺(3.01 g , 32.3 mmol , 2.95 mL , 5eq) 於 DMF (20 mL)中的溶液中添加 Pd(OAc)₂(218 mg , 970 umol (微莫耳) 、 0.15 eq) 、 DPPF (610 mg , 1.10 mmol , 0.17 eq)及 TEA (3.27 g , 32.3 mmol , 4.50 mL , 5 eq) 。 將

懸浮液真空脫氣且用一氧化碳氣體(CO)吹掃若干次。將混合物在 CO (50 psi)下在 80°C下攪拌 12 h。將反應混合物過濾且在減壓下濃縮。將殘餘物用 H₂O (60 mL) 稀釋且用 EtOAc (50 mL x 3)萃取。將經合併之有機層用鹽水(30 mL x 3)洗滌，經 Na₂SO₄乾燥，過濾且在減壓下濃縮。將殘餘物藉由管柱層析(SiO₂，石油醚/乙酸乙酯= 1/0 至 0/1，接著(SiO₂，EtOAc/MeOH= 1/0 至 10/1))純化，得到呈黃色固體之 2Am4CBza-1b(0.82 g，2.35 mmol，36.28%產率)。

2 2-胺基-8-(苯基胺甲醯基)-3H-1-苯并氮呋-4-羧酸 2Am4CBza-1c 之製備

【0260】 向 2Am4CBza-1b (810 mg，2.32 mmol，1 eq)於 EtOH (8 mL)中之溶液中添加 LiOH.H₂O (486.40 mg，11.59 mmol，5 eq)於 H₂O (2 mL)中之溶液。將混合物在 20°C下攪拌 3 h，然後用 1N HCl 調節至 pH = 6-7 且真空濃縮。將殘餘物藉由製備型 HPLC(管柱：Phenomenex luna C18 250*50mm*10 um；流動相：[水(0.05%HCl)-ACN]；B%：5%-35%，10min)純化，得到呈白色固體之 2Am4CBza-1c (180 mg，560.17 umol，24.16%產率)。¹H NMR (DMSO-d₄，400MHz) δ12.43 (s，1H)，10.49 (s，1H)，10.09 (s，1H)，9.07 (br s，1H)，7.99 (d，J = 8.4 Hz，1H)，7.96-7.93 (m，2H)，7.87-7.83 (m，1H)，7.79 (d，J = 7.6 Hz，2H)，7.38 (t，J = 7.6 Hz，2H)，7.16-7.11 (m，1H)，3.52 (s，2H)。

N-[2-[[2-胺基-8-(苯基胺甲醯基)-3H-1-苯并氮呋-4-羰基]-丙基-胺基]氧基乙基]胺甲酸三級丁酯 2Am4CBza-1 之製備

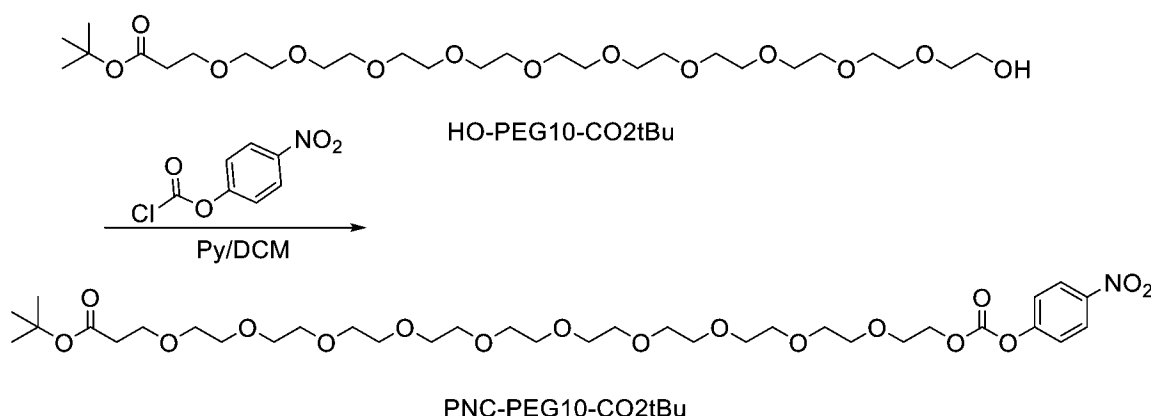
【0261】 在 N₂ 下、25°C下向 2Am4CBza-1c (100 mg，311 umol，1 eq)及 N-[2-(丙基胺基氧基)乙基]胺甲酸三級丁酯 (88.3 mg，405 umol，1.3 eq)於 DCM (3 mL)及 DMA (1.5mL)中之混合物中添加 EDCI (238 mg，1.24 mmol，4 eq)，然後在 25°C攪拌 1 小時。將混合物在真空中濃縮以移除 DCM，將殘餘物用 H₂O(10 mL)稀釋，然後用 NaHCO₃ 水溶液將混合物之 pH 值調節至約 8，用乙酸乙酯(20 mL*3)萃取。將經合併之有機相用鹽水(20 mL)洗滌，經無水 Na₂SO₄乾燥，過濾且在真

空中濃縮。將殘餘物藉由製備型 HPLC (管柱：Phenomenex Luna 80*30mm*3um；流動相：[水(0.1%TFA)-ACN]；B%：15%-45%，8 min)純化，得到呈白色固體之 2Am4CBza-1 (80 mg，153 umol，49.28%產率)。¹H NMR (MeOD，400MHz) δ8.03-7.93 (m，2H)，7.77 (d，J = 8.0 Hz，1H)，7.74-7.67 (m，2H)，7.52 (s，1H)，7.39 (t，J = 8.0 Hz，2H)，7.24-7.14 (m，1H)，3.95 (t，J = 5.2 Hz，2H)，3.76 (t，J = 7.2 Hz，2H)，3.43 (s，2H)，3.27 (t，J = 5.2 Hz，2H)，1.78 (sxt，J = 7.2 Hz，2H)，1.37 (s，9H)，1.00 (t，J = 7.2 Hz，3H)。

2-胺基-N4-(2-胺基乙氧基)-N8-苯基-N4-丙基-3H-苯并[b]氮呋-4,8-二羧醯胺 2Am4CBza-L-1a 之製備

【0262】 在 25°C下向 2Am4CBza-1 (80 mg，153 umol，1 eq)於 EtOAc (1 mL)中之混合物中以一份添加 HCl/EtOAc (4 M，3 mL，78.0 eq)，然後在 25°C攪拌 1 小時。將混合物在真空中濃縮，得到呈白色固體之 2Am4CBza-L-1a(70 mg，152.85 umol，99.66%產率，HCl)。

3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(4-硝基苯氧基)羰基氧基乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酸三級丁酯 PNC-PEG10-CO₂tBu 之製備



【0263】 在 0°C下向 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-羥基乙氧基)乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酸三級丁酯 HO-

PEG10-CO₂tBu (1 g, 1.70 mmol, 1.0 eq)及(4-硝基苯基)氯甲酸酯(378 mg, 1.87 mmol, 1.1 eq)於 DCM (20 mL)中之混合物中添加吡啶(202 mg, 2.56 mmol, 206 μ L, 1.5 eq)。將混合物在 25°C下攪拌 2 h。將混合物之 pH 用 1M HCl 調節至約 4。將殘餘物倒入冰水(w/w = 1/1) (100 mL)中且攪拌 10 min。將水相用 DCM (50 mL x 3)萃取。將經合併之有機相用無水 Na₂SO₄乾燥，過濾且在真空中濃縮。將殘餘物藉由矽膠層析(管柱高度：250 mm，直徑：100 mm，100-200 目矽膠，石油醚/乙酸乙酯=1/0:0/1，乙酸乙酯/甲醇=1/0:2/1)純化，得到呈無色油狀之 PNC-PEG10-CO₂tBu (650 mg, 865 μ mol, 50.73%產率)。¹H NMR (MeOD, 400MHz) δ 8.38-8.27 (m, 2H), 7.54-7.45 (m, 2H), 4.47-4.42 (m, 2H), 3.80-3.53 (m, 40H), 2.53-2.44 (m, 2H), 1.50-1.41 (m, 9H)。

3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[2-胺基-8-(苯基胺甲醯基)-3H-1-苯并氮呋-4-羰基]-丙基-胺基]氧基乙基胺甲醯基氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酸三級丁酯 2Am4CBza-L-1b 之製備

【0264】 在 N₂ 下、25°C 下向 2Am4CBza-L-1a (70 mg, 153 μmol, 1 eq, HCl) 及 PNC-PEG10-CO₂tBu (126 mg, 168 μmol, 1.1 eq) 於 DMF (2.5 mL) 中之混合物中添加 Et₃N (38.7 mg, 382 μmol, 2.5 eq), 然後在 25°C 攪拌 1 小時。將混合物過濾且藉由製備型 HPLC (管柱: Phenomenex luna C18 100*40mm*5 μm; 流動相: [水(0.1% TFA)-ACN]; B%: 15%-55%, 8 min) 純化, 得到呈無色油狀之 2Am4CBza-L-1b (70 mg, 67.7 μmol, 44.28% 產率)。

3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[2-胺基-8-(苯基胺甲醯基)-3H-1-苯并氮呋-4-羰基]-丙基-胺基]氧基乙基胺甲醯基氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酸 2Am4CBza-L-1c 之製備

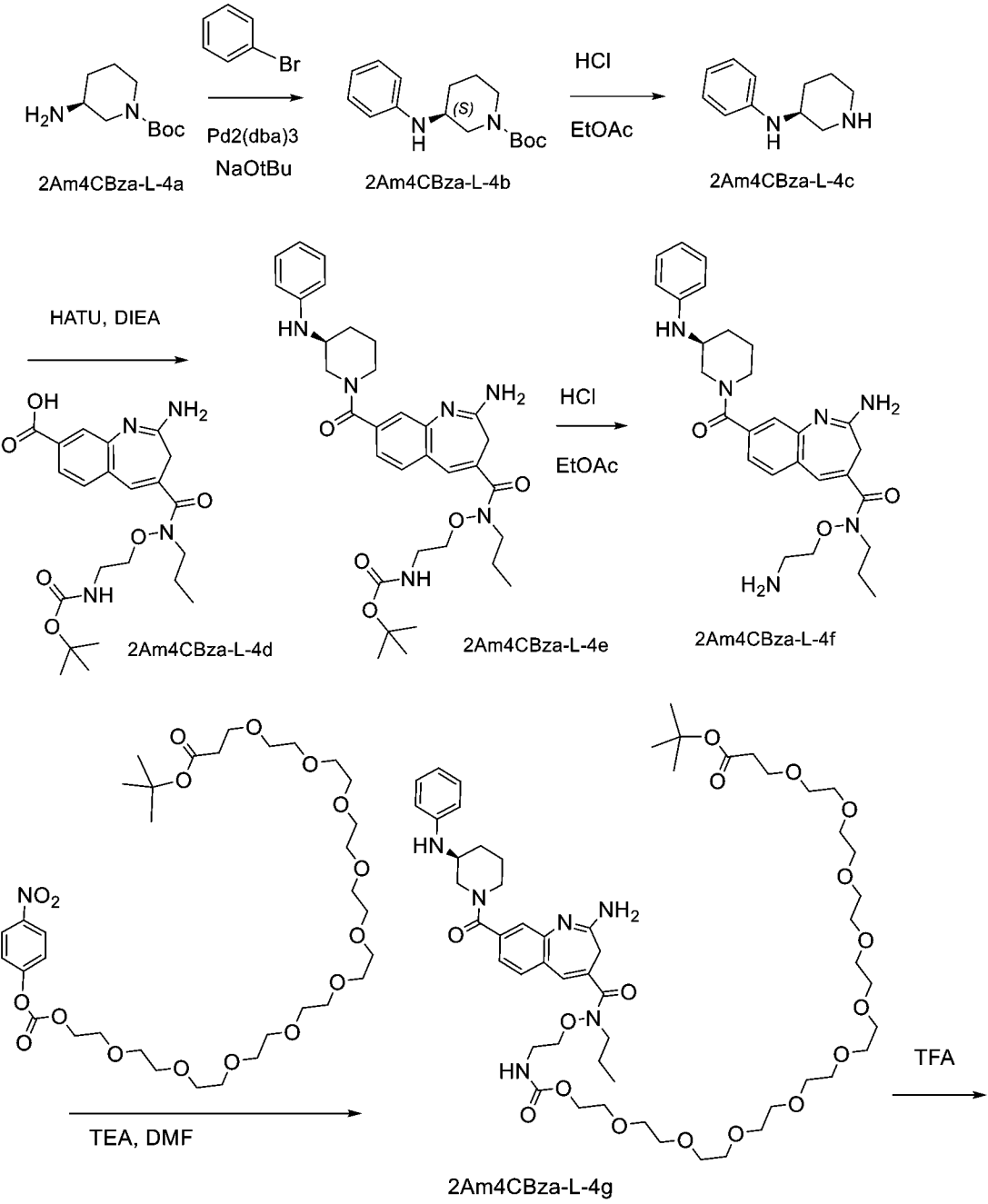
【0265】 在 N₂ 下、25℃ 下向 2Am4CBza-L-1b (70 mg, 67.7 μmol, 1 eq) 於 CH₃CN (1 mL) 及 H₂O (1 mL) 中之混合物中添加 TFA (77.2 mg, 677 μmol, 10 eq), 然後

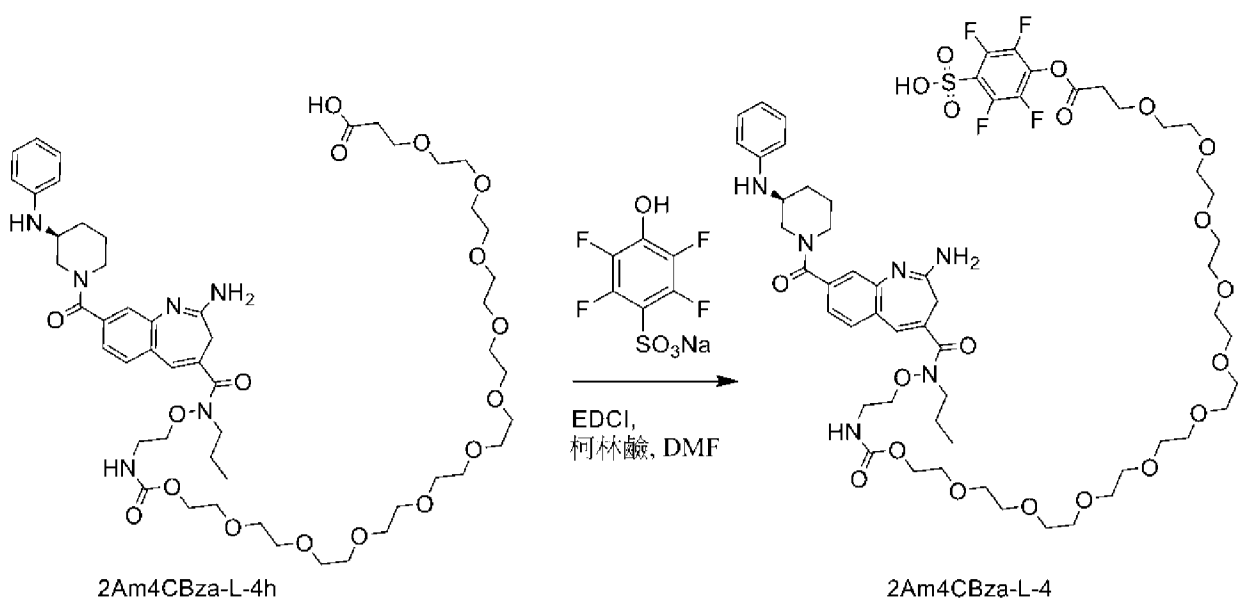
在 80°C 攪拌 1 小時。在 0°C 下用 NaHCO_3 水溶液將混合物之 pH 值調節至約 5，然後用 $\text{DCM}/i\text{-PrOH}=3/1(10\text{ mL}\times 3)$ 萃取。將經合併之有機相用無水 Na_2SO_4 乾燥，過濾且在真空中濃縮，得到呈淡黃色油狀之 2Am4CBza-L-1c (65 mg, 66.46 μmol ，98.18% 產率)。

2Am4CBza-L-1 之製備

【0266】 在 N_2 下、25°C 下向 2Am4CBza-L-1c (60 mg, 61.34 μmol ，1 eq) 及 2,3,5,6-四氟-4-羥基-苯磺酸鈉、STP (49.3 mg, 184 μmol ，3 eq) 於 DCM (2 mL) 及 DMA (0.5 mL) 中之混合物中添加 EDCI (35.3 mg, 184 μmol (微莫耳)，3 eq)，然後在 25°C 攪拌 1 小時。將混合物在真空中濃縮，然後藉由製備型 HPLC (管柱：Phenomenex Luna 80*30mm*3 μm ；流動相：[水(0.1%TFA)-ACN]；B%：15%-40%，8 min) 純化，得到呈白色固體之 2Am4CBza-L-1 (40 mg, 33.16 μmol ，54.06% 產率)。 ^1H NMR (MeOD ，400MHz) δ 8.06-7.95 (m, 2H)，7.73 (dd, $J=5.0$ ，7.6 Hz，3H)，7.49-7.43 (m, 1H)，7.45 (s, 1H)，7.38 (t, $J=8.0$ Hz，2H)，7.23-7.13 (m, 1H)，3.98 (t, $J=5.0$ Hz，2H)，3.85 (t, $J=5.6$ Hz，2H)，3.80 (br d, $J=4.4$ Hz，2H)，3.75 (t, $J=7.2$ Hz，2H)，3.66-3.54 (m, 38H)，3.51-3.42 (m, 4H)，2.96 (t, $J=6.0$ Hz，2H)，1.77 (sxt, $J=7.2$ Hz，2H)，1.00 (t, $J=7.2$ Hz，3H)。HPLC：99.47% (220 nm)，99.31% (254 nm)。LC/MS $[\text{M}+\text{H}]$ 1206.4 (計算值)；LC/MS $[\text{M}+\text{H}]$ 1206.7 (觀測值)。LC/MS $[\text{M}+\text{H}]$ 1206.4 (計算值)；LC/MS $[\text{M}+\text{H}]$ 1206.7 (觀測值)。

實例 44-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[2-胺基-8-[(3S)-3-苯胺基哌啶-1-羰基]-3H-1-苯并氮呋-4-羰基]-丙基-胺基]氧基乙基胺甲醯基氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙醯基氧基]-2,3,5,6-四氟-苯磺酸 2Am4CBza-L-4 之合成





(3S)-3-苯胺基哌啶-1-羧酸三級丁酯 2Am4CBza-L-4b 之製備

【0267】 在 N₂ 下、20°C 下向 (3S)-3-胺基哌啶-1-羧酸三級丁酯 2Am4CBza-L-4a (1.00 g, 4.99 mmol, 1.0 eq) 及 溴苯 (780 mg, 4.99 mmol, 526 uL, 1.0 eq) 於 甲苯 (10.0 mL) 中之溶液中添加三級丁醇鈉、NaOtBu (580 mg, 5.99 mmol, 1.2 eq)、2-(2-二環己基磷烷基苯基)-N,N-二甲基-苯胺 (140 mg, 349 umol, 0.07 eq) 及 參(二亞苄基丙酮)二鈹(0) Pd₂(dba)₃ (CAS 登記號 51364-51-3) (230 mg, 249 umol, 0.05 eq)。將混合物在 100°C 下攪拌 24 h。將該混合物用水 (30 mL) 稀釋且用 EtOAc (30 mL × 3) 萃取。將有機層用鹽水 (20 mL) 洗滌，經 Na₂SO₄ 乾燥，過濾且濃縮。將殘餘物藉由急速矽膠層析 (ISCO; 12 g SepaFlash Silica Flash Column, 溶離液為 0 至 50% 乙酸乙酯/石油醚梯度; 45 mL/min) 純化，得到呈淡黃色固體之 2Am4CBza-L-4b (1.2 g, 4.34 mmol, 86.9% 產率)。¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.18 (dd, J = 7.6, 8.4 Hz, 2H), 6.77-6.60 (m, 3H), 4.09-3.95 (m, 1H), 3.83-3.62 (m, 2H), 3.45-3.33 (m, 1H), 3.09 (br d, J = 9.6 Hz, 1H), 2.98-2.78 (m, 1H), 2.04-1.94 (m, 1H), 1.80-1.71 (m, 1H), 1.65-1.53 (m, 2H), 1.46 (s, 9H)。LC/MS [M+H] 277.2 (計算值); LC/MS [M+H] 277.2 (觀測值)。

(3S)-N-苯基哌啶-3-胺 2Am4CBza-L-4c 之製備

【0268】 向 2Am4CBza-L-4b (1.20 g, 4.34 mmol, 1.0 eq) 於 EtOAc (5.00 mL) 中之溶液中添加 HCl/EtOAc (4 M, 18.0 mL, 17.0 eq)。將混合物在 20°C 下攪拌 1 h。將混合物濃縮，得到呈白色固體之 2Am4CBza-L-4c (900 mg, 3.61 mmol, 83.1% 產率, 2 HCl)。¹H NMR (MeOD, 400 MHz) δ 7.59-7.52 (m, 2H), 7.49-7.41 (m, 3H), 3.94 (tt, J = 4.0, 10.8 Hz, 1H), 3.62-3.54 (m, 1H), 3.40 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 3.20 (t, J = 11.6 Hz, 1H), 3.04 (dt, J = 3.2, 12.4 Hz, 1H), 2.26-2.07 (m, 2H), 1.93-1.78 (m, 2H)。LC/MS [M+H] 177.2 (計算值); LC/MS [M+H] 177.2 (觀測值)。

2Am4CBza-L-4e 之製備

【0269】 向 2-胺基-4-[2-(三級丁氧基羰基胺基)乙氧基-丙基-胺甲醯基]-3H-1-苯并氮呋-8-羧酸 2Am4CBza-L-4d (250 mg, 559 μmol, 1.0 eq) 於 DMF (1.00 mL) 中之溶液中添加 HATU (210 mg, 559 μmol, 1.0 eq)、DIEA (290 mg, 2.24 mmol, 390 μL, 4.0 eq) 及 (3S)-N-苯基哌啶-3-胺 2Am4CBza-L-4c (130 mg, 603 μmol, 1.08 eq, HCl)，然後在 0°C 攪拌 1 h。將混合物過濾且藉由製備型 HPLC (管柱: Phenomenex Luna 80*30mm*3μm; 流動相: [水(0.1%TFA)-ACN]; B%: 5%-50%, 8 min) 純化，得到呈白色固體之 2Am4CBza-L-4e (160 mg, 222 μmol, 39.7% 產率, TFA)。¹H NMR (MeOD, 400 MHz) δ 7.76-7.38 (m, 3H), 7.36-7.15 (m, 2H), 7.11-6.90 (m, 2H), 6.63-6.42 (m, 2H), 3.95-3.92 (m, 2H), 3.89-3.61 (m, 4H), 3.60-3.32 (m, 4H), 3.28-3.23 (m, 2H), 3.08-2.96 (m, 1H), 2.20-1.94 (m, 2H), 1.84-1.67 (m, 4H), 1.38 (s, 9H), 0.99 (t, J = 7.6 Hz, 3H)。LC/MS [M+H] 605.3 (計算值); LC/MS [M+H] 605.3 (觀測值)。

2-胺基-N-(2-胺基乙氧基)-8-[(3S)-3-苯胺基哌啶-1-羰基]-N-丙基-3H-1-苯并氮呋-4-羧醯胺 2Am4CBza-L-4f 之製備

【0270】 向 2Am4CBza-L-4e (90.0 mg, 125 μmol, 1.0 eq, TFA) 於 EtOAc (5.00

mL)中之溶液中添加 HCl/EtOAc (4 M , 10.0 mL , 319.0 eq) 。將混合物在 20°C攪拌 1h , 然後濃縮 , 得到呈白色固體之 2Am4CBza-L-4f (78.0 mg , 粗品 , 2HCl) 。
LC/MS [M+H] 505.3 (計算值) ; LC/MS [M+H] 505.3 (觀測值) 。

3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-胺基-8-[(3S)-3- 苯胺基哌啶-1-羰基]-3H-1-苯并氮呋-4-羰基]-丙基-胺基]氧基乙基胺甲醯基氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酸三級丁酯 2Am4CBza-L-4g 之製備

【0271】 向 2Am4CBza-L-4f (70.0 mg , 121 umol , 1.0 eq , 2HCl)於 DMF (1.00 mL)中之溶液中添加 Et₃N (50.0 mg , 484 umol , 70.0 uL , 4.0 eq)及 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(4-硝基苯氧基)羰基氧基乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酸三級丁酯(90.0 mg , 121 umol , 1.0 eq) 。然後將混合物在 0°C下攪拌 1h , 然後用水(10 mL)稀釋且用 EtOAc (20 mL x 3)萃取。將有機層用鹽水(10 mL)洗滌 , 經 Na₂SO₄乾燥 , 過濾且濃縮 , 得到呈淡黃色油狀之 2Am4CBza-L-4g(200 mg , 粗品) 。LC/MS [M+H] 1117.6 (計算值) ; LC/MS [M+H] 1117.6 (觀測值) 。

3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-胺基-8-[(3S)-3-苯胺基哌啶 -1-羰基]-3H-1-苯并氮呋-4-羰基]-丙基-胺基]氧基乙基胺甲醯基氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酸 2Am4CBza-L-4h 之製備

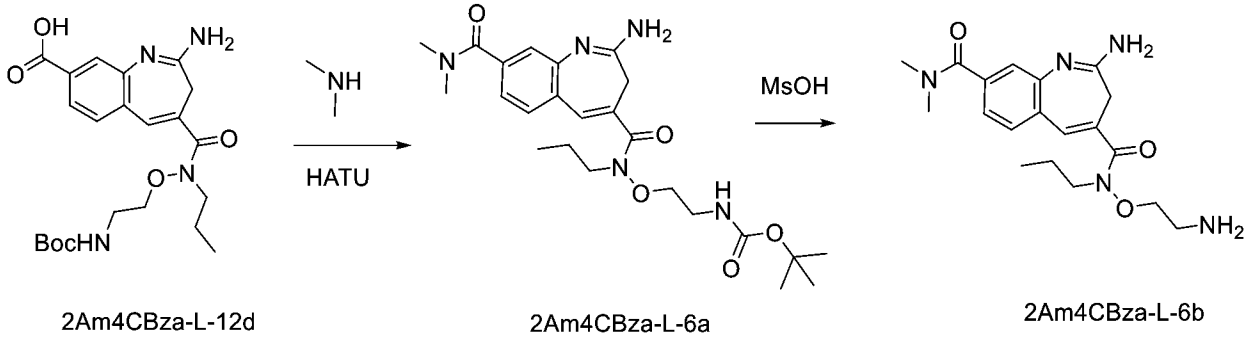
【0272】 向 2Am4CBza-L-4g (200 mg , 179 umol , 1.0 eq) 於 CH₃CN (1.00 mL) 及 H₂O (1.00 mL)中之溶液中添加 TFA (200 mg , 1.79 mmol , 130 uL , 10.0 eq) , 然後在 80°C下攪拌 1 h。將混合物濃縮 , 得到殘餘物。將殘餘物藉由製備型 HPLC (管柱 : Phenomenex Luna 80*30mm*3um ; 流動相 : [水(0.1%TFA)-ACN] ; B% : 5%-40% , 8 min)純化 , 得到呈無色油狀之 2Am4CBza-L-4h (50 mg , 42.5 umol , 23.7%產率 , TFA) 。LC/MS [M+H] 1061.5 (計算值) ; LC/MS [M+H] 1061.5 (觀測

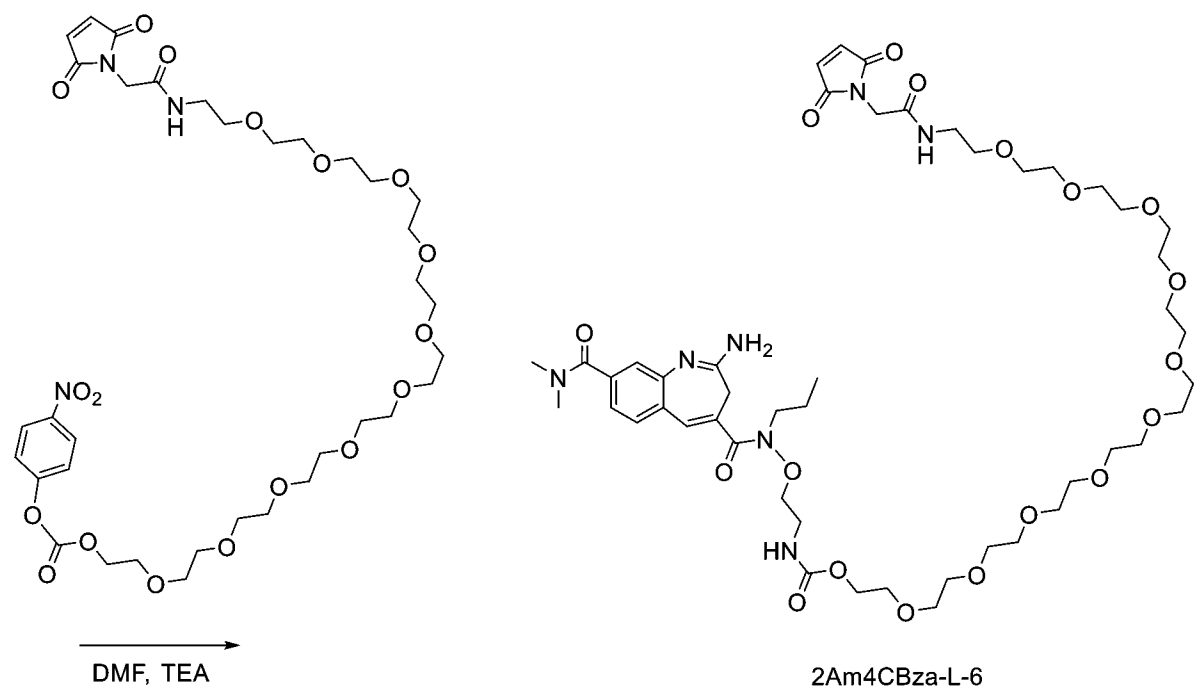
值)。

2Am4CBza-L-4 之製備

【0273】 向 2Am4CBza-L-4h (40.0 mg , 34.0 μ mol , 1.0 eq , TFA)及 2,3,5,6-四
氟-4-羥基-苯磺酸(33.5 mg , 136 μ mol , 4.0 eq)於 DCM (2.00 mL)及 DMA (0.20 mL)
中之溶液中添加 EDCI (30.0 mg , 136 μ mol , 4.0 eq) , 然後在 20°C下攪拌 1 h。將
混合物濃縮, 得到殘餘物。將殘餘物藉由製備型 HPLC(管柱: Phenomenex Luna
80*30mm*3 μ m; 流動相: [水(0.1%TFA)-ACN]; B%: 15%-50%, 8 min)純化, 得
到呈白色固體之 2Am4CBza-L-4 (21 mg , 14.9 μ mol , 43.9%產率, TFA)。¹H NMR
(MeOD , 400 MHz) δ 7.67-7.24 (m , 5H) , 7.17-6.96 (m , 2H) , 6.71-6.41 (m , 2H) ,
3.99-3.94 (m , 2H) , 3.90-3.80 (m , 6H) , 3.77-3.71 (m , 4H) , 3.65-3.58 (m , 38H) ,
3.54-3.47 (m , 4H) , 2.97 (t , J = 6.0 Hz , 2H) , 2.22-1.95 (m , 2H) , 1.85-1.68 (m ,
4H) , 1.03-0.97 (m , 3H) 。 LC/MS [M+H] 1289.5 (計算值); LC/MS [M+H] 1289.5
(觀測值)。

實例 6 1-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-2-側氧基-6,9,12,15,18,21,24,27,3
0,33-十氧雜-3-氮雜三十五烷-35-基 (2-((2-胺基-8-(二甲基胺甲醯基)-N-丙基-3H-
苯并[b]氮呋-4-羧醯胺基)氧基)乙基)胺甲酸酯 2Am4CBza-L-6 之合成





(2-((2-胺基-8-(二甲基胺甲醯基)-N-丙基-3H-苯并[b]氮呋-4-羧醯胺基)氧基)乙基)胺甲酸三級丁酯 2Am4CBza-L-6a 之製備

【0274】 使 2-胺基-4-((2-((三級丁氧基羰基)胺基)乙氧基)(丙基)胺甲醯基)-3H-苯并[b]氮呋-8-羧酸 2Am4CBza-L-12d 與二甲胺及 HATU 反應，得到 2Am4CBza-L-6a。LC/MS [M+H] 474.27 (計算值)；LC/MS [M+H] 474.45 (觀測值)。

【0275】 2-胺基-N4-(2-胺基乙氧基)-N8,N8-二甲基-N4-丙基-3H-苯并[b]氮呋-4,8-二羧醯胺 2Am4CBza-L-6b 之製備

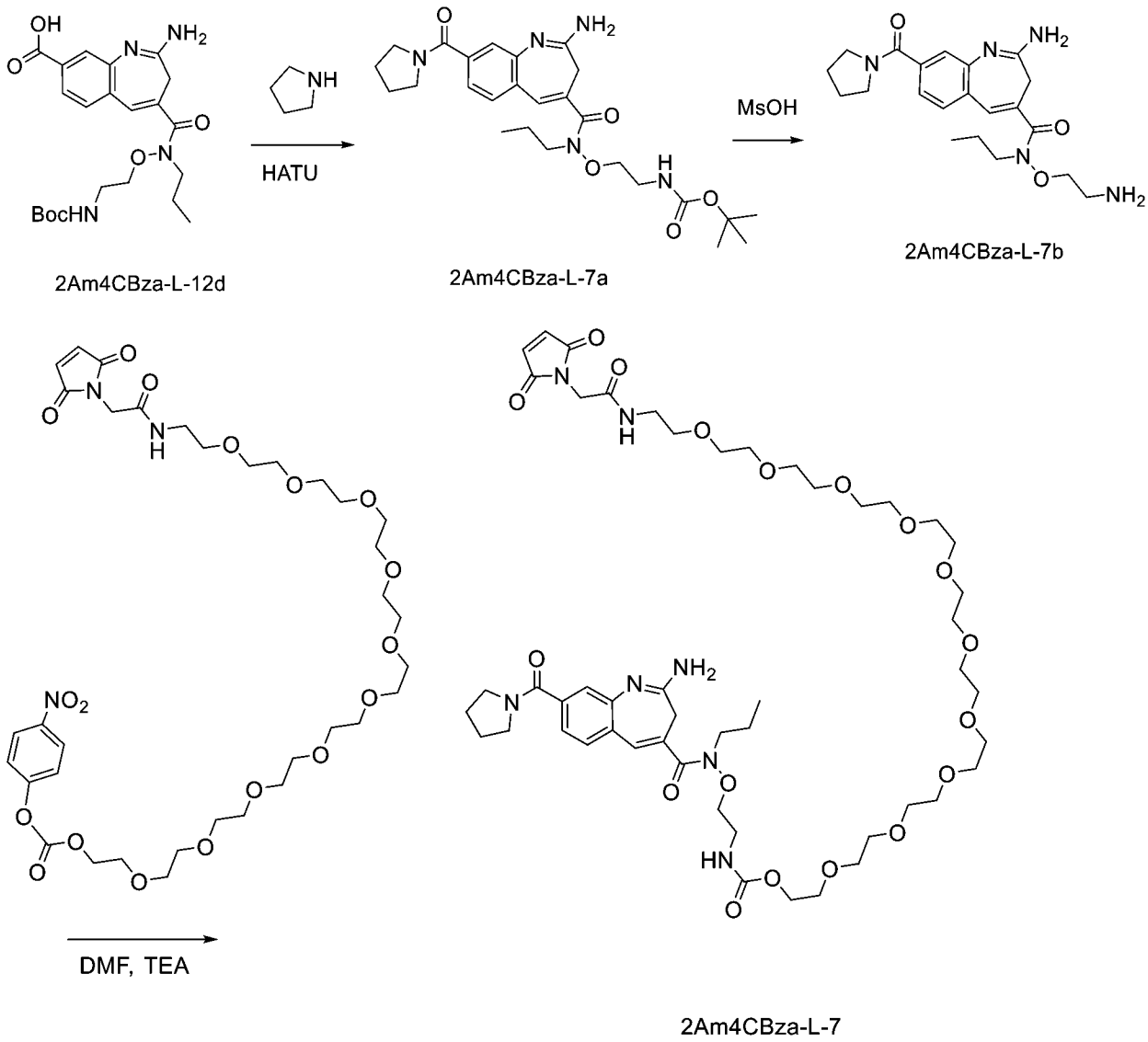
【0276】 使 2Am4CBza-L-6a 與甲烷磺酸反應，得到 2Am4CBza-L-6b。LC/MS [M+H] 374.22 (計算值)；LC/MS [M+H] 374.36 (觀測值)。

2Am4CBza-L-6 之製備

【0277】 向 2Am4CBza-L-6b 於 DMF 中之溶液中添加 DIEA 及 2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2,5-二側氧基吡咯-1-基)乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙基 (4-硝基苯基)碳酸酯，然後在 25°C 下攪拌 1 h。將混合物用 TFA 淬滅，直到 pH = 約 6。然後，將混合物過濾且藉由製備型 HPLC(管柱：Phenomenex Luna 80*30mm*3um；流動

相：[水(TFA)-ACN]；B%：5%-35%，8 min)純化，得到 2Am4CBza-L-6。LC/MS [M+H] 1038.52 (計算值)；LC/MS [M+H] 1038.63 (觀測值)。

實例 7 1-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-2-側氧基-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-十氧雜-3-氮雜三十五烷-35-基 (2-((2-胺基-N-丙基-8-(吡咯啉-1-羰基)-3H-苯并[b]氮呋-4-羧醯胺基)氧基)乙基)胺甲酸酯 2Am4CBza-L-7 之合成



(2-((2-胺基-N-丙基-8-(吡咯啉-1-羰基)-3H-苯并[b]氮呋-4-羧醯胺基)氧基)乙基)胺甲酸三級丁酯 2Am4CBza-L-7a 之製備

【0278】 使 2-胺基-4-((2-((三級丁氧基羰基)胺基)乙氧基)(丙基)胺甲醯基)-3H-苯并[b]氮呋-8-羧酸 2Am4CBza-L-12d 與吡咯啉及 HATU 反應，得到 2Am4CBza-

L-7a。LC/MS [M+H] 500.29 (計算値)；LC/MS [M+H] 500.48 (觀測值)。

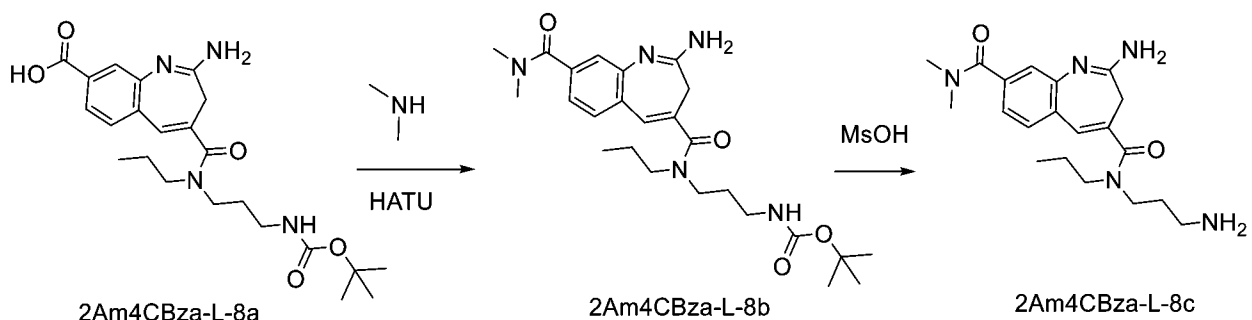
2-氨基-N-(2-氨基乙氧基)-N-丙基-8-(吡咯啉-1-羰基)-3H-苯并[b]氮呋-4-羧酰胺
2Am4CBza-L-7b 之製備

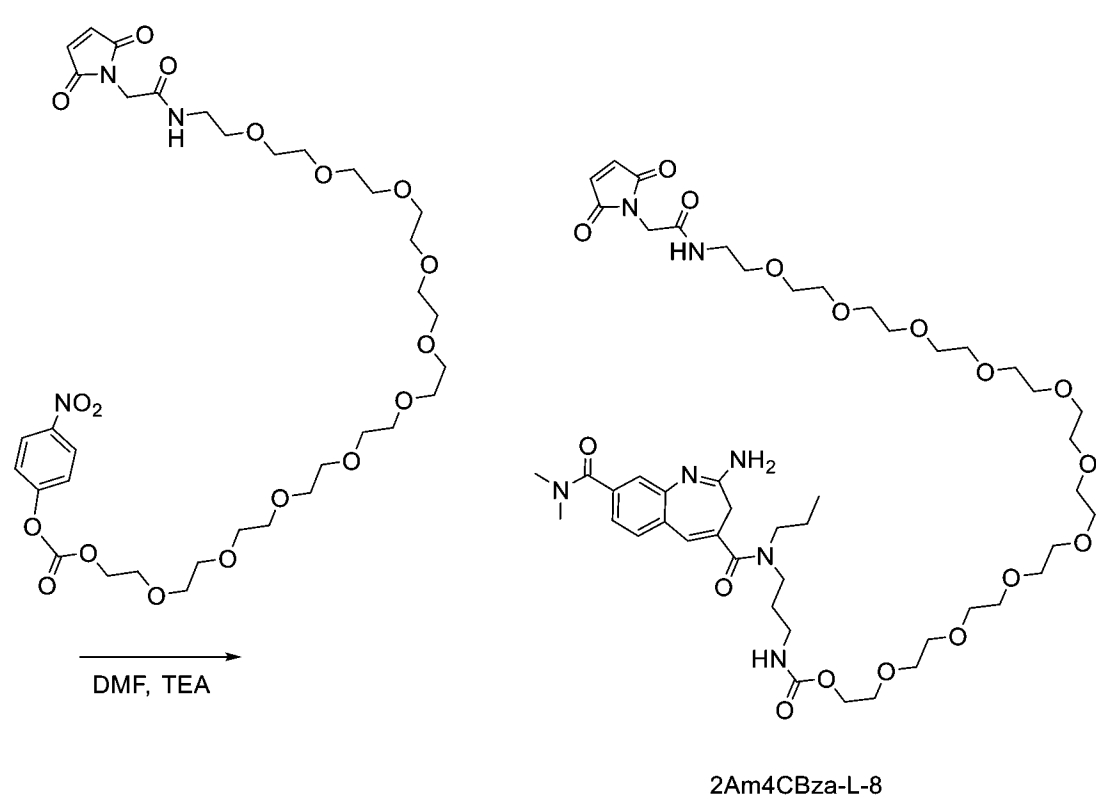
【0279】 使 2Am4CBza-L-7a 與甲烷磺酸反應，得到 2Am4CBza-L-7b。LC/MS [M+H] 400.23 (計算值)；LC/MS [M+H] 400.39 (觀測值)。

2Am4CBza-L-7 之製備

【0280】 向 2Am4CBza-L-7b 於 DMF 中之溶液中添加 DIEA 及 2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2,5-二側氧基吡咯-1-基)乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙基 (4-硝基苯基)碳酸酯，然後在 25°C下攪拌 1 h。將混合物用 TFA 淬滅，直到 pH =約 6。然後，將混合物過濾且藉由製備型 HPLC(管柱：Phenomenex Luna 80*30mm*3um；流動相：[水(TFA)-ACN]；B%：5%-35%，8 min)純化，得到 2Am4CBza-L-7。LC/MS [M+H]⁺ 1064.54 (計算值)；LC/MS [M+H]⁺ 1064.67 (觀測值)。

實例 8 1-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-2-側氧基-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-十氧雜-3-氮雜三十五烷-35-基 (3-(2-胺基-8-(二甲基胺甲醯基)-N-丙基-3H-苯并[b]氮呋-4-羧醯胺基)丙基)胺甲酸酯 2Am4CBza-L-8 之合成





(3-(2-胺基-8-(二甲基胺甲醯基)-N-丙基-3H-苯并[b]氮呋-4-羧醯胺基)丙基)胺甲
酸三級丁酯 2Am4CBza-L-8b 之製備

【0281】 使 2-胺基-4-((3-((三級丁氧基羰基)胺基)丙基)(丙基)胺甲醯基)-3H-苯
并[b]氮呋-8-羧酸 2Am4CBza-L-8a 與二甲胺及 HATU 反應，得到 2Am4CBza-L-
8b。LC/MS [M+H] 472.29 (計算值)；LC/MS [M+H] 472.56 (觀測值)。

2-胺基-N4-(3-胺基丙基)-N8,N8-二甲基-N4-丙基-3H-苯并[b]氮呋-4,8-二羧醯胺
2Am4CBza-L-8c 之製備

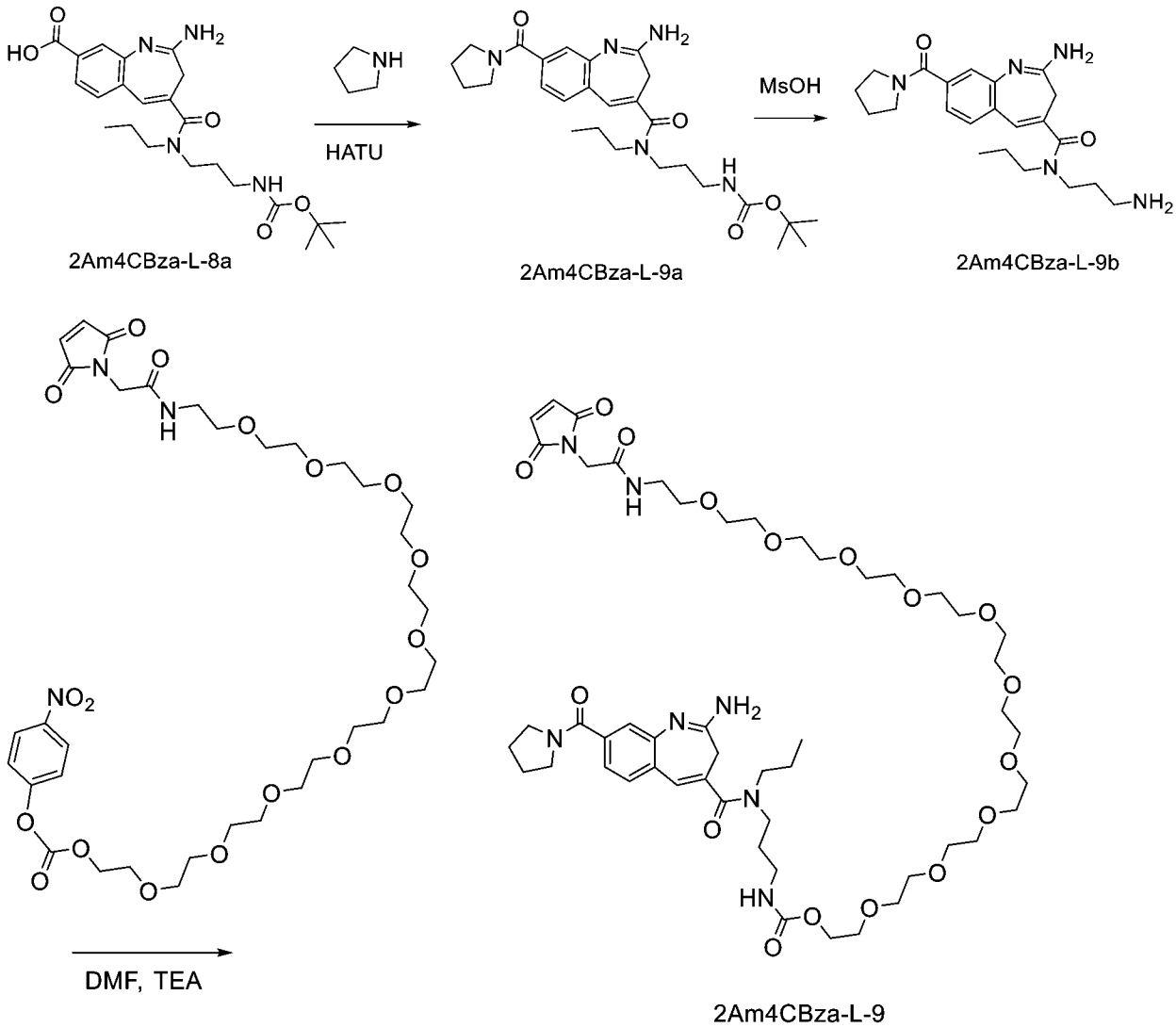
【0282】 使 2Am4CBza-L-8b 與甲烷磺酸反應，得到 2Am4CBza-L-8c。LC/MS
[M+H] 372.24 (計算值)；LC/MS [M+H] 372.34 (觀測值)。

2Am4CBza-L-8 之製備

【0283】 向 2Am4CBza-L-8c 於 DMF 中之溶液中添加 DIEA 及 2-[2-[2-[2-[2-
[2-[2-[2-[2-[2-[[2-(2,5-二側氧基吡咯-1-基)乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙氧
基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙基 (4-硝基苯基)碳酸
酯，然後在 25°C 下攪拌 1 h。將混合物用 TFA 淬滅，直到 pH =約 6。然後，將

混合物過濾且藉由製備型 HPLC(管柱：Phenomenex Luna 80*30mm*3um；流動相：[水(TFA)-ACN]；B%：5%-35%，8 min)純化，得到 2Am4CBza-L-8。LC/MS [M+H] 1036.54 (計算值)；LC/MS [M+H] 1036.60 (觀測值)。

實例 9 1-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-2-側氧基-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-十氧雜-3-氮雜三十五烷-35-基 (3-(2-胺基-N-丙基-8-(吡咯啉-1-羰基)-3H-苯并[b]氮呋-4-羧醯胺基)丙基)胺甲酸酯 2Am4CBza-L-9 之合成



(3-(2-胺基-N-丙基-8-(吡咯啉-1-羰基)-3H-苯并[b]氮呋-4-羧醯胺基)丙基)胺甲酸三級丁酯 2Am4CBza-L-9a 之製備

【0284】 使 2-胺基-4-((3-((三級丁氧基羰基)胺基)丙基)(丙基)胺甲醯基)-3H-苯并[b]氮呋-8-羧酸 2Am4CBza-L-8a 與吡咯啉及 HATU 反應，得到 2Am4CBza-L-

9a。LC/MS [M+H] 498.31 (計算値)；LC/MS [M+H] 498.44 (觀測值)。

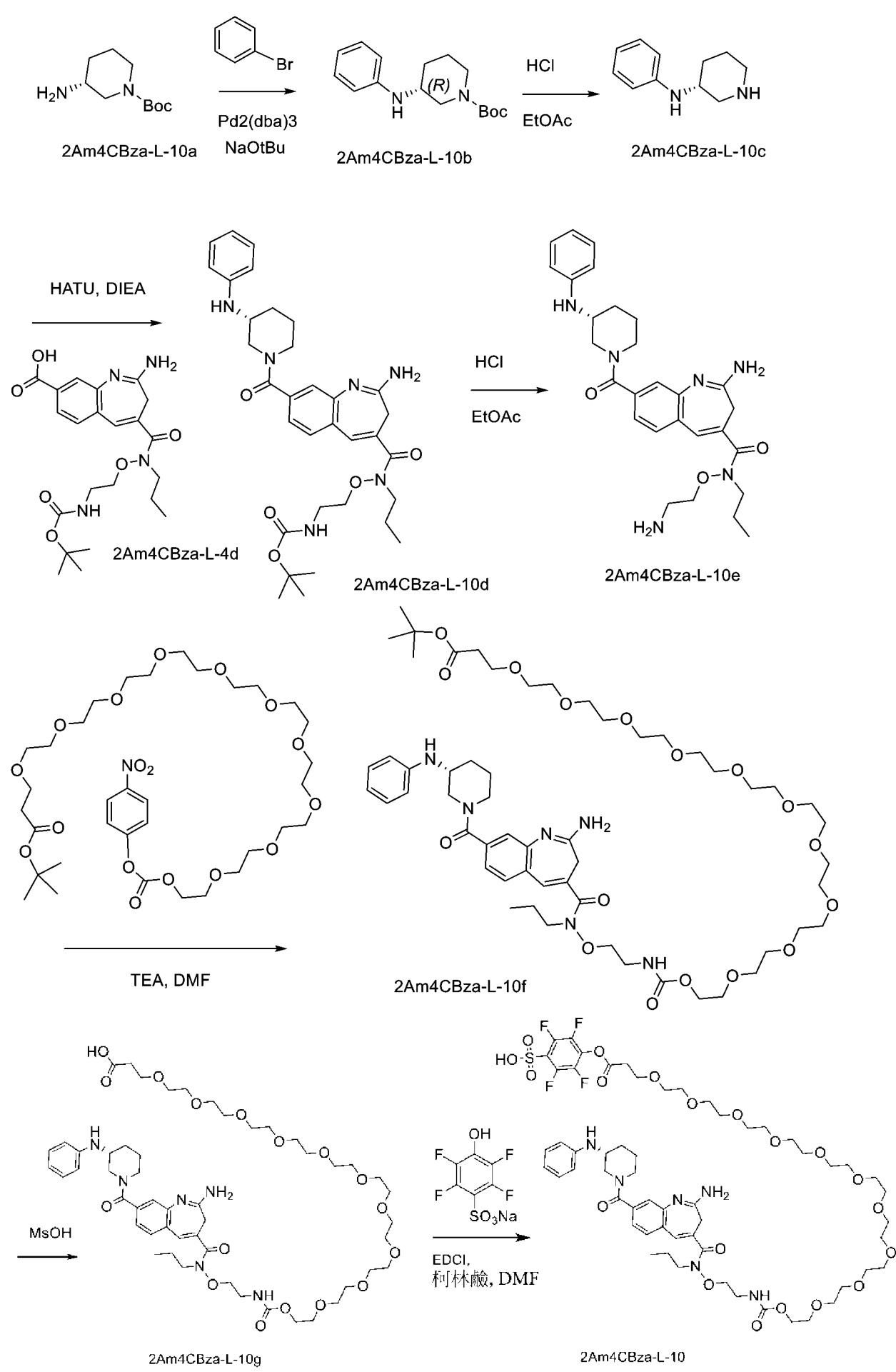
2-胺基-N-(3-胺基丙基)-N-丙基-8-(吡咯啉-1-羰基)-3H-苯并[b]氮呋-4-羧醯胺
2Am4CBza-L-9b 之製備

【0285】 使 2Am4CBza-L-9a 與甲烷磺酸反應，得到 2Am4CBza-L-9b。LC/MS [M+H]⁺ 398.26 (計算值)；LC/MS [M+H]⁺ 398.37 (觀測值)。

1-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-2-側氧基-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-十
氧雜-3-氮雜三十五烷-35-基 (3-(2-胺基-N-丙基-8-(吡咯啉-1-羰基)-3H-苯并[b]氮
呋-4-羧醯胺基)丙基)胺甲酸酯之製備

【0286】 向 2Am4CBza-L-9b 於 DMF 中之溶液中添加 DIEA 及 2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2,5-二側氧基吡咯-1-基)乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙基 (4-硝基苯基)碳酸酯，然後在 25°C 下攪拌 1 h。將混合物用 TFA 淬滅，直到 pH = 約 6。然後，將混合物過濾且藉由製備型 HPLC (管柱：Phenomenex Luna 80*30mm*3um；流動相：[水(TFA)-ACN]；B%：5%-35%，8 min) 純化，得到 2Am4CBza-L-9。LC/MS [M+H] 1062.56 (計算值)；LC/MS [M+H] 1062.20 (觀測值)。

實例 10 4-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[2-胺基-8-[(3R)-3-苯胺基哌啶-1-羰
基]-3H-1-苯并氮呋-4-羰基]-丙基-胺基]氧基乙基胺甲醯基氧基]乙氧基]乙氧基]
乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙醯基氧基]-
2,3,5,6-四氟-苯磺酸 2Am4CBza-L-10 之合成



(3R)-3-苯胺基哌啶-1-羧酸三級丁酯 2Am4CBza-L-10b 之製備

【0287】 在 N₂ 下向(3R)-3-胺基哌啶-1-羧酸三級丁酯 2Am4CBza-L-10a (1 g, 4.99 mmol, 1.0 *eq*)及溴苯 (784 mg, 4.99 mmol, 526 μ L, 1.0 *eq*)於甲苯 (10 mL)中之溶液中添加 2-(2-二環己基磷烷基苯基)-N,N-二甲基苯胺 (138 mg, 349 μ mol, 0.07 *eq*)、2-甲基丙-2-醇鈉、三級丁醇鈉 (576 mg, 5.99 mmol, 1.2 *eq*)及 Pd₂(dba)₃ (228 mg, 250 μ mol, 0.05 *eq*)。將懸浮液真空脫氣且用 N₂吹掃若干次，且接著在 100°C 下攪拌 10h。在減壓下濃縮反應混合物，得到殘餘物，將殘餘物用 H₂O (30 mL)稀釋且用 EtOAc (30 mL x 3)萃取，將經合併之有機相用鹽水(15 mL)洗滌，經無水 Na₂SO₄ 乾燥，過濾且真空濃縮。將粗產物藉由用石油醚: 乙酸乙酯=1:0-0:1 溶離之矽膠層析純化，得到呈無色油狀之 2Am4CBza-L-10b (900 mg, 3.26 mmol, 65.2% 產率)。¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.22-7.17 (m, 2H), 6.77-6.67 (m, 3H), 4.09-3.96 (m, 1H), 3.77-3.70 (m, 1H), 3.42-3.34 (m, 1H), 3.12-2.82 (m, 1H), 3.02-2.82 (m, 1H), 2.04-1.98 (m, 1H), 1.79-1.71 (m, 1H), 1.63-1.52 (m, 4H), 1.46 (s, 9H)。LC/MS [M+H] 277.2 (計算值)；LC/MS [M+H] 277.2 (觀測值)。

(3R)-N-苯基哌啶-3-胺 2Am4CBza-L-10c 之製備

【0288】 向 2Am4CBza-L-10b (900 mg, 3.26 mmol, 1.0 *eq*) 於 EtOAc (5 mL)中之溶液中添加 HCl/EtOAc (4 M, 16.3 mL, 20.0 *eq*)，然後在 20°C 下攪拌 2 h。將反應混合物在真空中濃縮，得到呈白色固體之 2Am4CBza-L-10c (650 mg, 2.61 mmol, 80.1% 產率, 2 HCl)。¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.52-7.47 (m, 2H), 7.43-7.32 (m, 3H), 3.96-3.85 (m, 1H), 3.56 (br d, J = 12.0 Hz, 1H), 3.43-3.36 (m, 1H), 3.19-3.10 (m, 1H), 3.03 (dt, J = 2.8, 12.2 Hz, 1H), 2.25-2.08 (m, 2H), 1.92-1.77 (m, 2H)。

N-[2-[[2-胺基-8-[(3R)-3-苯胺基哌啶-1-羰基]-3H-1-苯并氮呋-4-羰基]-丙基-胺基]

氧基乙基]胺甲酸三級丁酯 2Am4CBza-L-10d 之製備

【0289】 在 N₂ 下、0°C 下向 2-胺基-4-[2-(三級丁氧基羰基胺基)乙氧基-丙基-胺甲醯基]-3H-1-苯并氮呋-8-羧酸 2Am4CBza-L-4d (250 mg, 560 μ mol, 1.0 *eq*)、HATU (234 mg, 616 μ mol, 1.1 *eq*) 及 DIEA (290 mg, 2.24 mmol, 390 μ L, 4.0 *eq*) 於 DMF (3 mL) 中之溶液中添加 (3*R*)-*N*-苯基哌啶-3-胺 (209 mg, 840 μ mol, 1.5 *eq*, 2 HCl)。將混合物在 20°C 下攪拌 3 h。將反應混合物過濾且真空濃縮。將殘餘物藉由製備型 HPLC (管柱: Phenomenex Luna 80*30mm*3 μ m; 流動相: [水(0.1%TFA)-ACN]; B%: 10%-45%, 8 min) 純化, 得到呈白色固體之 2Am4CBza-L-10d (220 mg, 306 μ mol, 54.7% 產率, TFA)。¹H NMR (MeOD, 400 MHz) δ 7.58-7.52 (m, 1H), 7.52-7.43 (m, 1H), 7.43-7.38 (m, 1H), 7.36-7.30 (m, 1H), 7.24-7.16 (m, 1H), 6.97 (br t, J = 7.2 Hz, 1H), 6.91-6.76 (m, 1H), 6.58-6.49 (m, 1H), 6.44 (br d, J = 7.4 Hz, 1H), 3.93 (br s, 2H), 3.84-3.57 (m, 4H), 3.55-3.35 (m, 4H), 3.28-3.23 (m, 2H), 3.07-2.97 (m, 1H), 2.22-1.97 (m, 2H), 1.86-1.65 (m, 4H), 1.38 (s, 9H), 1.01-0.96 (m, 3H)。LC/MS [M+H] 605.3 (計算值); LC/MS [M+H] 605.3 (觀測值)。

2-胺基-N-(2-胺基乙氧基)-8-[(3*R*)-3-苯胺基哌啶-1-羰基]-*N*-丙基-3H-1-苯并氮呋-4-羧醯胺 2Am4CBza-L-10e 之製備

【0290】 向 2Am4CBza-L-10d (220 mg, 364 μ mol, 1.0 *eq*) 於 EtOAc (3 mL) 中之溶液中添加 HCl/EtOAc (4 M, 1.82 mL, 20.0 *eq*) , 然後在 20°C 下攪拌 2 h。將反應混合物在真空中濃縮, 得到呈白色固體之 2Am4CBza-L-10e (170 mg, 294 μ mol, 80.9% 產率, 2HCl)。LC/MS [M+H] 505.3 (計算值); LC/MS [M+H] 505.2 (觀測值)。

3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-胺基-8-[(3*R*)-3-苯胺基哌啶-1-羰基]-3H-1-苯并氮呋-4-羰基]-丙基-胺基]氧基乙基胺甲醯基氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酸三級丁酯 2Am4CBza-L-

10f 之製備

【0291】 在 0°C 下向 2Am4CBza-L-10e (90 mg, 156 μmol , 1.0 *eq*, 2 HCl) 及 DIEA (80.6 mg, 623 μmol , 109 μL , 4.0 *eq*) 於 DMF (2 mL) 中之溶液中添加 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(4-硝基苯氧基)羰基氧基乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酸三級丁酯 (117 mg, 156 μmol , 1.0 *eq*)，然後在 20°C 攪拌 2 h。將反應混合物過濾且在真空中濃縮，殘餘物用 H₂O (10 mL) 稀釋且用 EtOAc (10 mL x 3) 萃取，將經合併之有機相用鹽水 (10 mL x 3) 洗滌，用無水 Na₂SO₄ 乾燥，且真空濃縮，得到呈白色固體之 2Am4CBza-L-10f (160 mg, 143 μmol , 91.9% 產率)。LC/MS [M+H] 1117.6 (計算值)；LC/MS [M+H] 1117.6 (觀測值)。

3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[2-氨基-8-[(3R)-3-苯胺基哌啶 -1-羰基]-3H-1-苯并氮呋-4-羰基]-丙基-胺基]氧基乙基胺甲酯基氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酸 2Am4CBza-L-10g 之製備

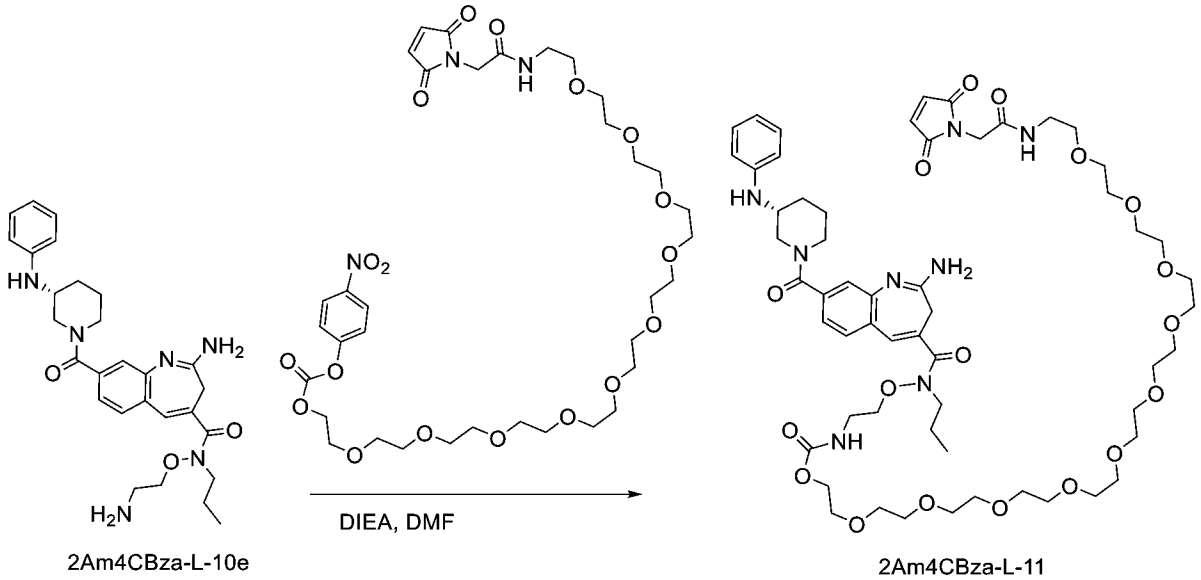
【0292】 向 2Am4CBza-L-10f (130 mg, 116 μ mol, 1.0 *eq*)於 DCM (2 mL)中之溶液中添加甲磺酸(111 mg, 1.16 mmol, 82.8 μ L, 10.0 *eq*), 然後在 N₂ 氣氛下、20°C下攪拌 2h。將反應混合物過濾且在減壓下濃縮得到殘餘物, 將殘餘物藉由製備型 HPLC(管柱: Phenomenex Luna 80*30mm*3 μ m; 流動相: [水(0.1%TFA)-ACN]; B%: 15%-45%, 8 min)純化, 得到呈淡無色油狀之 2Am4CBza-L-10g (80 mg, 75.4 μ mol, 64.8%產率)。LC/MS [M+H]⁺ 1061.6(計算值); LC/MS [M+H]⁺ 1061.6(觀測值)。

2Am4CBza-L-10 之製備

【0293】 向 2Am4CBza-L-10g (70 mg , 65.9 μ mol , 1.0 *eq*)及 2,3,5,6-四氟-4-羥基-苯磺酸鈉(70.7 mg , 264 μ mol , 4.0 *eq*)於 DCM (1.5 mL)及 DMA (0.5 mL) 中之溶液中添加 EDCI (50.6 mg , 264 μ mol , 4.0 *eq*) , 然後在 20°C下攪拌 1 h。將反應

混合物過濾且在減壓下濃縮，得到殘餘物。將殘餘物藉由製備型 HPLC (管柱：Phenomenex Luna 80*30mm*3um；流動相：[水(TFA)-ACN]；B%：15%-45%，8 min)純化，得到呈白色固體之 2Am4CBza-L-10 (25.1 mg，19.5 umol，29.5%產率)。¹H NMR (MeOD-d₄，400 MHz) δ7.73-7.63 (m，1H)，7.60-7.42 (m，3H)，7.41-7.25 (m，3H)，7.15-7.03 (m，1H)，6.72-6.60 (m，1H)，4.00-3.94 (m，2H)，3.90-3.82 (m，4H)，3.74 (br t，J = 7.2 Hz，2H)，3.65-3.57 (m，40H)，3.51 (br d，J = 4.0 Hz，2H)，3.45-3.38 (m，2H)，3.27-3.14 (m，2H)，3.00-2.96 (m，2H)，2.21-2.08 (m，1H)，1.81-1.69 (m，4H)，0.99 (t，J = 7.6 Hz，3H)。LC/MS [M+H]⁺ 1289.5(計算值)；LC/MS [M+H]⁺ 1289.5(觀測值)。

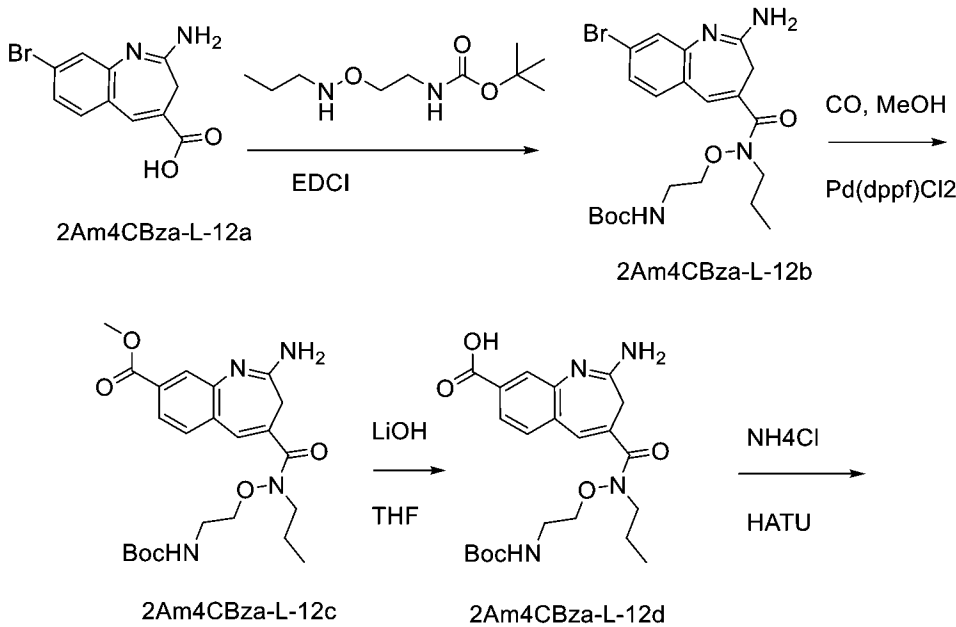
實例 11 2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2,5-二側氧基吡咯-1-基)乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙基 N-[2-[[2-胺基-8-[(3R)-3-苯胺基哌啶-1-羰基]-3H-1-苯并氮呋-4-羰基]-丙基-胺基]氧基乙基]胺甲酸酯 2Am4CBza-L-11 之合成

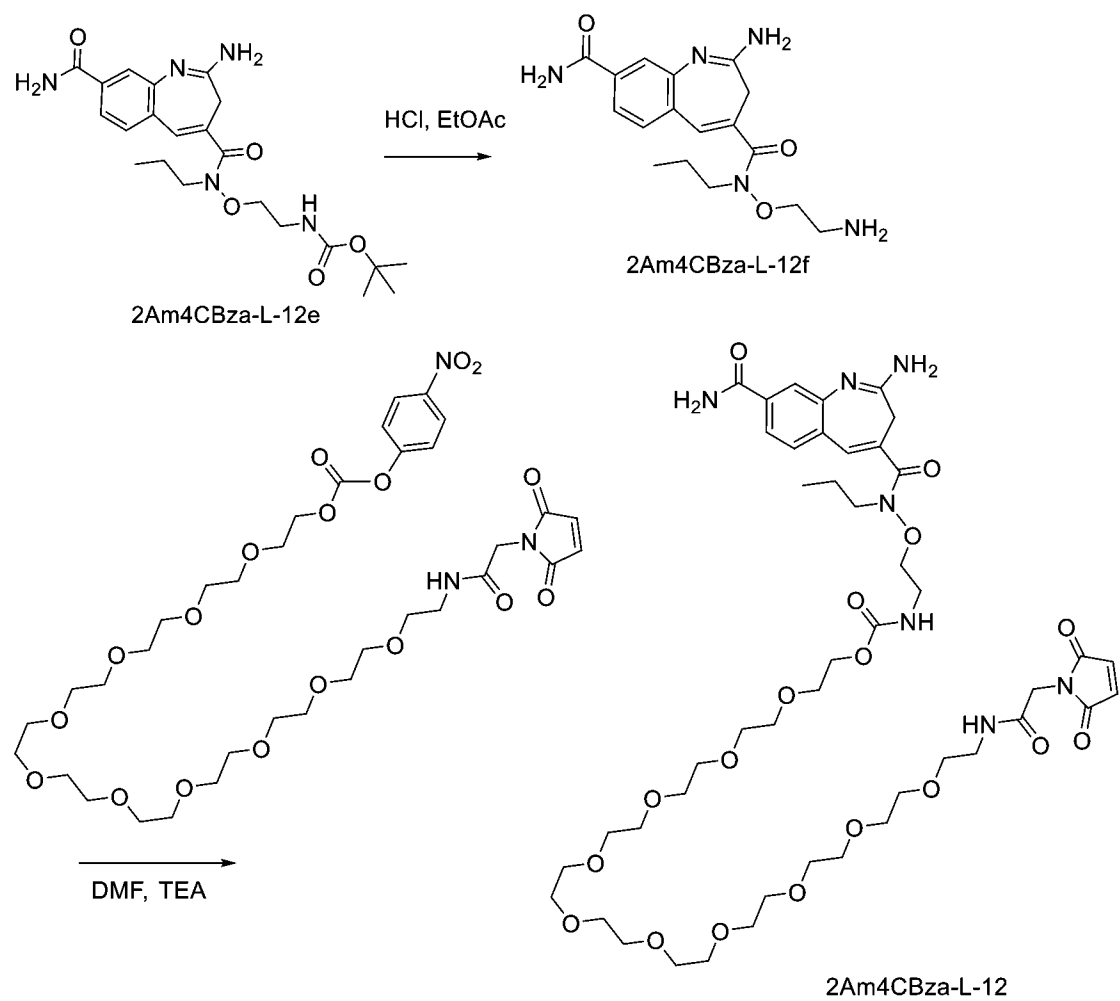


【0294】 向 2-胺基-N-(2-胺基乙氧基)-8-[(3R)-3-苯胺基哌啶-1-羰基]- N-丙基-3H-1-苯并氮呋-4-羧醯胺 2Am4CBza-L-10e (50.0 mg，86.5 umol，1.0 eq，2HCl) 於 DMF (1.00 mL)中之溶液中添加 DIEA (50.0 mg，346 umol，60.0 uL，4.0 eq)及

2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2,5-二側氧基吡咯-1-基)乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙基 (4-硝基苯基)碳酸酯(70.0 mg , 86.5 μ mol , 1.0 eq) , 然後在 20°C下攪拌 1 h 。將混合物過濾且藉由製備型 HPLC(管柱：Phenomenex Luna 80*30mm*3 μ m；流動相：[水(TFA)-ACN]；B%：15%-40%，8 min)純化，得到呈淡黃色油狀之 2Am4CBza-L-11 (23 mg , 17.9 μ mol , 20.7%產率，TFA)。¹H NMR (MeOD , 400 MHz) δ 7.75-7.16 (m , 4H) , 7.07-6.79 (m , 4H) , 6.62-6.39 (m , 2H) , 4.17 (s , 2H) , 4.04-3.85 (m , 4H) , 3.81-3.72 (m , 4H) , 3.72-3.56 (m , 38H) , 3.56-3.51 (m , 4H) , 3.48-3.34 (m , 6H) , 3.17-3.05 (m , 1H) , 2.26-1.93 (m , 2H) , 1.85-1.65 (m , 4H) , 1.00 (t , J = 7.6 Hz , 3H) 。LC/MS [M+H] 1169.6 (計算值)；LC/MS [M+H] 1169.6 (觀測值)。

實例 12 1-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-2-側氧基-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-十氧雜-3-氮雜三十五烷-35-基 (2-((2-胺基-8-胺甲醯基-N-丙基-3H-苯并[b]氮呋-4-羧醯胺基)氧基)乙基)胺甲酸酯 2Am4CBza-L-12 之合成





N-[2-[(2-胺基-8-溴-3H-1-苯并氮呋-4-羰基)-丙基-胺基]氧基乙基]胺甲酸三級丁酯 2Am4CBza-L-12b 之製備

【0295】 在 N₂ 下、0°C 下向 2-胺基-8-溴-3H-1-苯并氮呋-4-羧酸、2Am4CBza-L-12a (8.08 g, 28.7 mmol, 1.0 eq) 於 DCM (50 mL) 及 DMA (50 mL) 中之混合物中添加甲烷磺酸 (2.76 g, 28.7 mmol, 2.05 mL, 1.0 eq)、N-[2-(丙基胺基氧基)乙基]胺甲酸三級丁酯 (6.9 g, 31.6 mmol, 1.1 eq) 及 EDCI (22.0 g, 115 mmol, 4.0 eq), 然後在該溫度下攪拌 2 h。將混合物濃縮以移除 DCM 且用水 (100 mL) 稀釋。然後添加 Na₂CO₃ 水溶液將混合物之 pH 調節至約 8。將水相用 EtOAc (100 mL x 3) 萃取。將有機層用鹽水洗滌, 經 Na₂SO₄ 乾燥, 過濾且濃縮。在 0°C 下將粗產物與 MTBE (15 mL) 及石油醚 (100 mL) 研磨 0.5 h, 得到呈黃色固體之 2Am4CBza-L-12b (11 g, 22.85 mmol, 79.52% 產率)。¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ 7.27

(d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.14 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.08-7.01 (m, 2H), 7.01-6.87 (m, 2H), 6.85-6.82 (m, 1H), 3.80 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 3.57 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.09-3.05 (m, 2H), 2.76 (s, 2H), 1.67-1.56 (m, 2H), 1.31 (s, 9H), 0.87 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H)。LC/MS [M+H] 481.1 (計算值); LC/MS [M+H] 481.1 (觀測值)。

2-胺基-4-[2-(三級丁氧基羰基胺基)乙氧基-丙基-胺甲醯基]-3H-1-苯并氮呋-8-羧酸甲酯、2Am4CBza-L-12c 之製備

【0296】 在 N_2 下, 向 2Am4CBza-L-12b (8 g, 16.6 mmol, 1.0 *eq*) 於 MeOH (100 mL) 中之溶液中添加 Pd(dppf)Cl₂ (1.22 g, 1.66 mmol, 0.1 *eq*) 及 Et₃N (5.04 g, 49.9 mmol, 6.94 mL, 3.0 *eq*)。將懸浮液真空脫氣且用 CO 吹掃若干次。將混合物在 CO (50 psi) 下在 80°C 攪拌 12 小時。將混合物過濾且濃縮。將殘餘物藉由矽膠層析(管柱高度: 250 mm, 直徑: 100 mm, 100-200 目矽膠, 乙酸乙酯/MeOH=1/0, 10/1)純化, 得到呈黃色固體之 2Am4CBza-L-12c (5 g, 10.86 mmol, 65.33% 產率)。¹H NMR (MeOD, 400 MHz) δ 7.81 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.63 (dd, $J = 1.6, 8.0$ Hz, 1H), 7.46 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.27 (s, 1H), 3.94-3.86 (m, 5H), 3.73-3.69 (m, 2H), 3.31 (s, 2H), 3.23 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H), 1.81-1.70 (m, 2H), 1.35 (s, 9H), 0.97 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H)。LC/MS [M+H] 461.2 (計算值); LC/MS [M+H] 461.1 (觀測值)。

2-胺基-4-[2-(三級丁氧基羰基胺基)乙氧基-丙基-胺甲醯基]-3H-1-苯并氮呋-8-羧酸 2Am4CBza-L-12d 之製備

【0297】 在 25°C 下向 2Am4CBza-L-12c (4 g, 8.69 mmol, 1.0 *eq*) 於 THF (30 mL) 及 H₂O (30 mL) 中之混合物中以一份添加 LiOH·H₂O (547 mg, 13.0 mmol, 1.5 *eq*)，然後在該溫度下攪拌 2 h。將混合物用 HCl 水溶液 (1 M) 淬滅，直到 pH = 約 6。然後將混合物用水 (30 mL) 稀釋且用 EtOAc (50 mL $\times$ 3) 萃取。將有機層用鹽水洗滌，經 Na₂SO₄ 乾燥，過濾且濃縮。將混合物藉由製備型 HPLC (管柱：

(2-((2-胺基-8-胺甲醯基-N-丙基-3H-苯并[b]氮呿-4-羧醯胺基)氧基)乙基)胺甲酸三級丁酯 2Am4CBza-L-12e 之製備

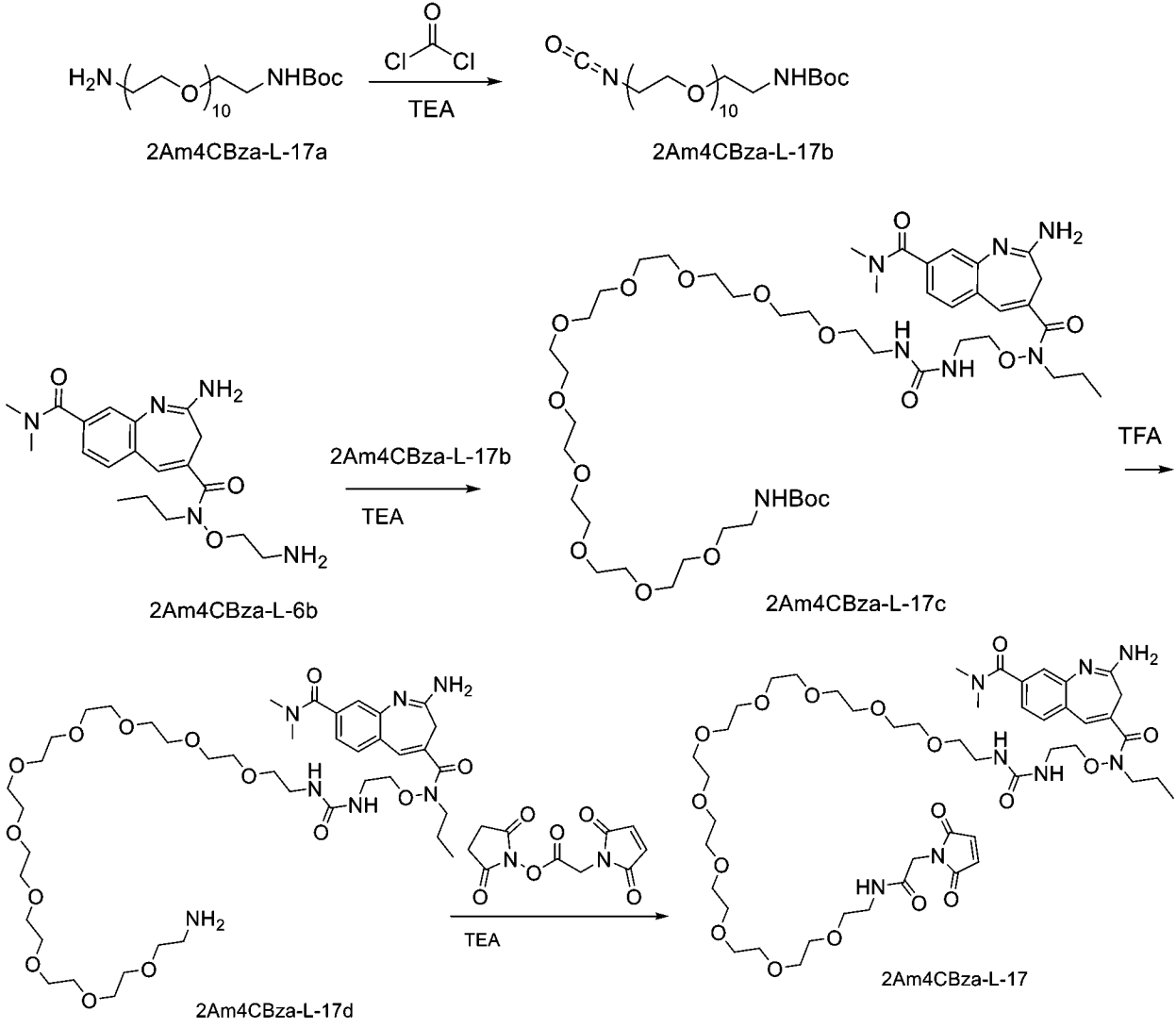
2-氨基-N4-(2-氨基乙氧基)-N4-丙基-3H-苯并[b]氮呋-4,8-二羧醯胺 2Am4CBza-L-12f 之製備

2Am4CBza-L-12 之製備

實例 13 1-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-2-側氧基-6,9,12,15,18,21,24,27,

基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙基 (4-硝基苯基)碳酸酯，然後在 25°C下攪拌 1 h。將混合物用 TFA 淬滅直至 pH 為約 6。然後，將混合物過濾且藉由製備型 HPLC(管柱：Phenomenex Luna 80*30mm*3um；流動相：[水(TFA)-ACN]；B%：5%-35%，8 min)純化，得到 2Am4CBza-L-13。LC/MS [M+H]⁺ 1086.52 (計算值)；LC/MS [M+H]⁺ 1086.73 (觀測值)。

實例 17 2-胺基-N4-((40-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-4,39-二側氧基-8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-十氧雜-3,5,38-三氮雜四十基)氧基)-N8,N8-二甲基-N4-丙基-3H-苯并[b]氮呋-4,8-二羧醯胺 2Am4CBza-L-17 之合成



(32-異氰酸基-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-十氧雜三十二基)胺甲酸三級丁酯 2Am4CBza-L-17b 之製備

【0303】 向(32-胺基-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-十氧雜三十二基)胺甲酸三級丁酯 2Am4CBza-L-17a (0.15 g, 0.25 mmol, 1 eq)於 DCM 中之溶液中添加 TEA (0.348 ml, 2.5 mmol, 10 eq), 隨後添加光氣(0.892 ml, 作為甲苯中之 1.4 M 溶液, 0.25 mmol, 1 eq)。藉由 LCMS 監測反應混合物, 濃縮, 且藉由反相 HPLC 純化, 得到 2Am4CBza-L-17b (78 mg, 0.125 mmol, 50%)。LC/MS [M+H] 627.37 (計算值); LC/MS [M+H] 627.64 (觀測值)。

(39-(2-胺基-8-(二甲基胺甲醯基)-3H-苯并[b]氮呋-4-羰基)-34-側氧基-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,38-十一氧雜-33,35,39-三氮雜四十二基)胺甲酸三級丁酯 2Am4CBza-L-17c 之製備

【0304】 向 2-胺基-N4-(2-胺基乙氧基)-N8,N8-二甲基-N4-丙基-3H-苯并[b]氮呋-4,8-二羧醯胺 2Am4CBza-L-6b (1 eq)及 2Am4CBza-L-17b (1 eq)於 DMF 中之混合物中添加 TEA (10 eq)。將反應物在室溫下攪拌, 然後用水稀釋且藉由反相 HPLC 純化, 得到 2Am4CBza-L-17c。LC/MS [M+H] 1000.58 (計算值); LC/MS [M+H] 1000.91 (觀測值)。

2-胺基-N4-((37-胺基-4-側氧基-8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-十氧雜-3,5-二氮雜三十七基)氧基)-N8,N8-二甲基-N4-丙基-3H-苯并[b]氮呋-4,8-二羧醯胺 2Am4CBza-L-17d 之製備

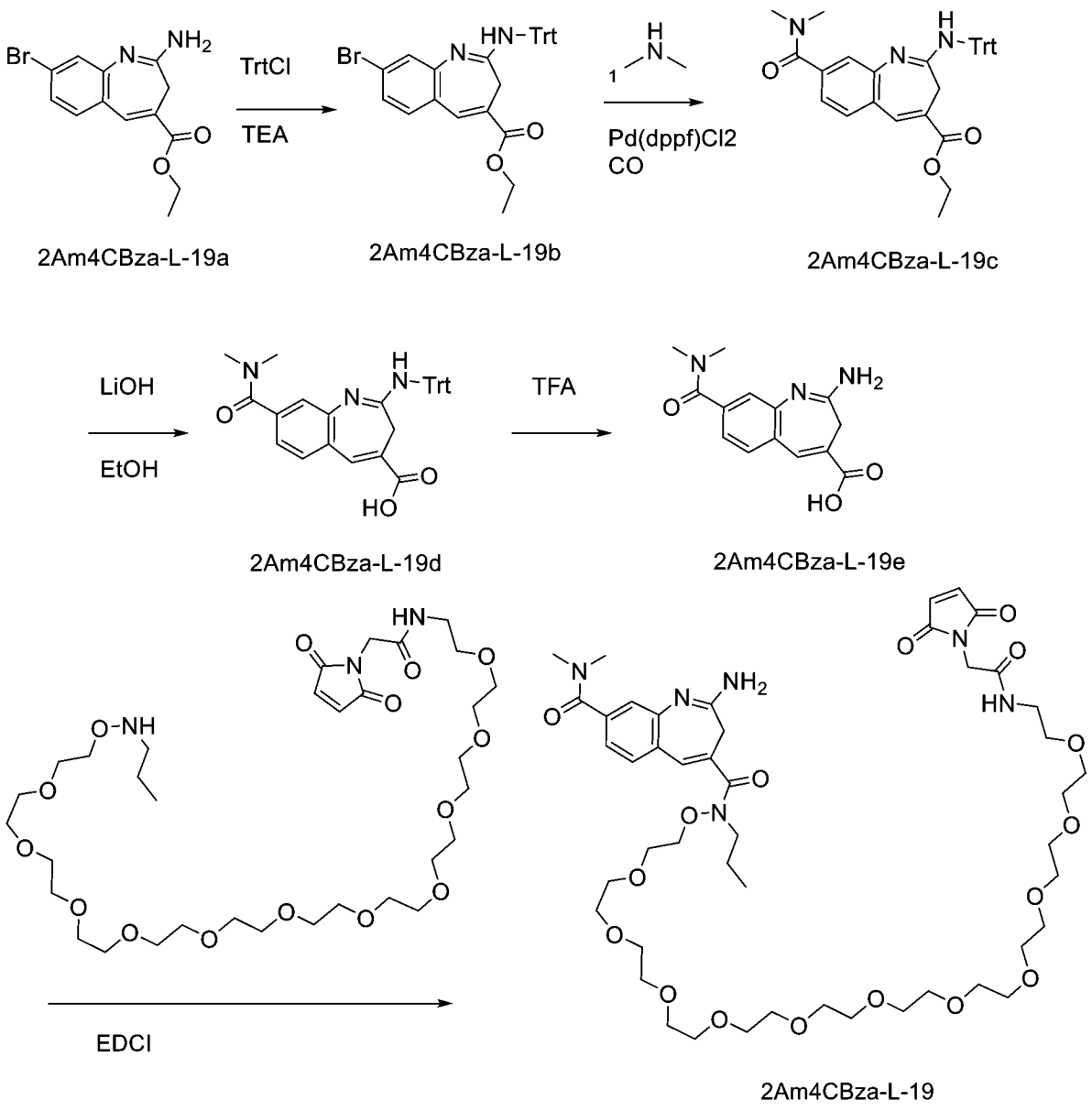
【0305】 將 2Am4CBza-L-17c (48 mg, 0.052 mmol, 1 eq)溶解於極少量 TFA 中。15 分鐘後, 將反應混合物濃縮, 得到呈 TFA 鹽之 2Am4CBza-L-17d。LC/MS [M+H] 900.53 (計算值); LC/MS [M+H] 900.83 (觀測值)。

2Am4CBza-L-17 之製備

【0306】 向 2Am4CBza-L-17c (1 eq)於 DMF 中之溶液中添加 TEA (12.8 eq), 隨後添加 2,5-二側氧基吡咯啉-1-基 2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙酸酯(1.28 eq)。將反應混合物濃縮, 用水中之 1% TFA 稀釋, 且藉由反相 HPLC 純

化，得到2Am4CBza-L-17。LC/MS [M+H] 1037.54 (計算值)；LC/MS [M+H] 1037.84 (觀測值)。

實例 19 2-胺基-N4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2,5-二側氧基吡咯-1-基)乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]-N8,N8-二甲基-N4-丙基-3H-1-苯并氮呋-4,8-二羧醯胺 2Am4CBza-L-19 之合成



8-溴-2-(三苯甲基胺基)-3H-1-苯并氮呋-4-羧酸乙酯 2Am4CBza-L-19b 之製備

【0307】 向 2-胺基-8-溴-3H-1-苯并氮呋-4-羧酸乙酯 2Am4CBza-L-19a (3 g，9.70 mmol，1 eq)於 DCM (20 mL)中之溶液中添加 TrtCl (4.06 g，14.6 mmol，1.5

eq)及 Et_3N (2.95 g, 29.1 mmol, 4.05 mL, 3 eq)。將混合物在 50°C 下攪拌 12 h。將所得混合物倒入冰水(w/w = 1/1) (30 mL)中且攪拌 10 min。將水相用 DCM (20 mL x 3)萃取。將經合併之有機相用無水 Na_2SO_4 乾燥，過濾且在真空中濃縮。將粗產物與 MTBE 在 25°C 下研磨 5 min，得到呈黃色固體之 2Am4CBza-L-19b (4 g, 7.25 mmol, 74.75% 產率)。LC/MS [M+H] 551.1 (計算值)；LC/MS [M+H] 551.1 (觀測值)。

8-(二甲基胺甲醯基)-2-(三苯甲基胺基)-3H-1-苯并氮呋-4-羧酸乙酯 2Am4CBza-L-19c 之製備

【0308】 將 2Am4CBza-L-19b (2 g, 3.63 mmol, 1 eq)、N-甲基甲胺，二甲胺 (1.48 g, 18.2 mmol, 1.66 mL, 5 eq, HCl)、 Et_3N (3.67 g, 36.3 mmol, 5.05 mL, 10 eq)、 $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ (266 mg, 363 μmol , 0.1 eq)於 DMF (30 mL)中之混合物脫氣且用一氧化碳 CO (3.63 mmol, 1 eq)吹掃 3 次，然後將混合物在 CO (50 psi)氣氛下在 80°C 攪拌 12 h。將混合物倒入冰水(w/w = 1/1) (30 mL)中且攪拌 10 min。將水相用乙酸乙酯(20 mL x 3)萃取。將經合併之有機相用鹽水(20 mL x 3)洗滌，經無水 Na_2SO_4 乾燥，過濾且真空濃縮。將殘餘物藉由矽膠層析(管柱高度：250 mm，直徑：100 mm，100-200 目矽膠，石油醚/乙酸乙酯=1/0，1/1)純化，得到呈黃色固體之 2Am4CBza-L-19c (900 mg, 1.66 mmol, 45.61% 產率)。LC/MS [M+H] 544.2 (計算值)；LC/MS [M+H] 544.4 (觀測值)

8-(二甲基胺甲醯基)-2-(三苯甲基胺基)-3H-1-苯并氮呋-4-羧酸 2Am4CBza-L-19d 之製備

【0309】 向 2Am4CBza-L-19c (800 mg, 1.47 mmol, 1 eq)於 EtOH (15 mL)及 H_2O (8 mL)中之溶液中添加 $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (247 mg, 5.89 mmol, 4 eq)。將混合物在 20°C 下攪拌 12 h。用 HCl (1M)將混合物之 pH 值調節至約 6，然後真空濃縮以移除 EtOH。添加水(20 mL)且所需之白色固體自混合物中析出，過濾，得到呈白色

固體之 2Am4CBza-L-19d (750 mg, 1.45 mmol, 98.85%產率)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.19 (s, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.35 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.29-7.19 (m, 12H), 7.17-7.09 (m, 3H), 6.83 (dd, J = 1.6, 1.6 Hz, 1H), 6.35 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 3.00 (s, 2H), 2.91 (s, 3H), 2.80 (s, 3H)。LC/MS [M+H] 516.2 (計算值); LC/MS [M+H] 516.4 (觀測值)。

2-胺基-8-(二甲基胺甲醯基)-3H-1-苯并氮呋-4-羧酸 2Am4CBza-L-19e 之製備

【0310】 向 2Am4CBza-L-19d (750 mg, 1.45 mmol, 1 eq)於 DCM (10 mL)中之溶液中添加 TFA (1.66 g, 14.6 mmol, 1.08 mL, 10 eq), 然後在 50°C下攪拌 12 h。在真空中濃縮混合物。將粗產物與 MTBE 在 20°C下研磨 5 min, 得到呈白色固體之 2Am4CBza-L-19e (550 mg, 1.42 mmol, 97.62% 產率, TFA)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.90 (s, 1H), 7.73 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.44-7.36 (m, 2H), 3.50 (s, 2H), 3.00 (s, 3H), 2.93 (s, 3H)。LC/MS [M+H] 274.1 (計算值); LC/MS [M+H] 274.1 (觀測值)。

2Am4CBza-L-19 之製備

【0311】 向 2Am4CBza-L-19e (52.3 mg, 191 μmol, 0.8 eq)及 2-(2,5-二側氧基吡咯-1-基)-N-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(丙基胺基氧基)乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙基]乙醯胺 (200 mg, 239 μmol, 1.0 eq, MsOH)於 DCM (3 mL)及 DMA (1 mL)中之溶液中添加 EDCI (229 mg, 1.20 mmol, 5.0eq)。將混合物在 25°C下攪拌 0.5 h。將反應混合物在減壓下濃縮以移除 DCM。將殘餘物藉由製備型 HPLC (TFA 條件; 管柱: Phenomenex Luna 80*30mm*3μm; 流動相: [水(TFA)-ACN]; B%: 10%-35%, 8 min)純化, 得到呈淡黃色油狀之 2Am4CBza-L-19 (59.3 mg, 59.6 μmol, 24.9% 產率)。¹H NMR (MeOD, 400 MHz) δ 7.65 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.48-7.44 (m, 2H), 7.36 (s, 1H), 6.89 (s, 2H), 4.17 (s, 2H), 4.07-4.03 (m, 2H), 3.75 (t, J =

7.2 Hz, 2H), 3.68-3.53 (m, 40H), 3.50-3.45 (m, 2H), 3.44-3.35 (m, 4H), 3.28-3.23 (m, 2H), 3.13 (s, 3H), 3.05 (s, 3H), 1.78 (sxt, J = 7.2 Hz, 2H), 1.01 (t, J = 7.6 Hz, 3H)。LC/MS [M+H] 995.5 (計算值); LC/MS [M+H] 995.5 (觀測值)。

實例 201 免疫結合物(IC)之製備

【0312】 為了製備離胺酸結合之免疫結合物，使用 G-25 SEPHADEX™ 脫鹽管柱(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)或 Zeba™ Spin 脫鹽管柱(Thermo Fisher Scientific)將抗體緩衝液交換至含有 100 mM 硼酸、50 mM 氯化鈉、1 mM 乙二胺四乙酸之結合緩衝液(pH 8.3)中。然後使用緩衝液將析出液各自調節至約 1-10 mg/ml 之濃度且然後無菌過濾。將抗體預升溫至 20-30°C 並與在二甲亞砜(DMSO)或二甲基乙醯胺(DMA)中溶解至濃度為 5 至 20 mM 的 2-20 (例如 7-10)莫耳當量之式 II 之 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋-連接子(2Am4CBza-L)化合物之四氟苯基(TFP)或磺酸四氟苯基(sulfoTFP)酯快速混合。使反應在 30°C 下進行約 16 小時，且然後藉由在以 pH 7.2 磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)平衡之兩個連續 G-25 脫鹽管柱或 Zeba™ Spin 脫鹽管柱上運行，將免疫結合物(IC)自反應物分離，提供表 3a 及 3b 之免疫結合物(IC)。在連接至 XEVO™ G2-XS TOF 質譜儀(Waters Corporation)之 ACQUITY™ UPLC H 級(Waters Corporation, Milford, MA)上使用 C4 反相管柱藉由液相層析質譜分析確定佐劑-抗體比(DAR)。

【0313】 為了製備經半胱胺酸結合之免疫結合物，使用 Zeba™ Spin 脫鹽管柱(Thermo Fisher Scientific)將抗體緩衝液交換到含有 PBS pH 7.2 及 2 mM EDTA 之結合緩衝液中。使用 2 至 4 莫耳過量之三(2-羧乙基)膦(TCEP)或二硫蘇糖醇(DTT)在 37°C 下還原鏈間二硫鍵達 30 min – 2 小時。使用以結合緩衝液預平衡之 Zeba™ Spin 脫鹽管柱移除過量 TCEP 或 DTT。使用結合緩衝液將經緩衝液交換之抗體之濃度調節至大約 5 至 20 mg/ml 且進行無菌過濾。將順丁烯二醯亞胺-2Am4CBza-L 化合物溶解於二甲基亞砜(DMSO)或二甲基乙醯胺(DMA)中，至 5

至 20 mM 濃度。對於結合，將抗體與 10 至 20 莫耳當量之順丁烯二醯亞胺-2Am4CBza-L 混合。在一些情況下，添加多至 20% (v/v)之額外 DMA 或 DMSO 以提高順丁烯二醯亞胺-2Am4CBza-L 於結合緩衝液中之溶解度。使反應在 20°C 下進行大約 30 min 至 4 小時。使用兩個連續 Zeba™ Spin 脫鹽管柱將所得結合物自未經反應之順丁烯二醯亞胺-2Am4CBza-L 中純化。將該等管柱用 pH 7.2 磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)預平衡。在連接至 XEVO™ G2-XS TOF 質譜儀(Waters Corporation)之 ACQUITY™ UPLC H 級(Waters Corporation, Milford, MA)上使用 C4 反相管柱藉由液相層析質譜分析評估佐劑與抗體比(DAR)。

【0314】 對於結合，可將抗體溶解於此項技術中已知不會不利地影響抗體之穩定性或抗原結合特異性之水性緩衝系統中。可使用磷酸鹽緩衝鹽水。將 2Am4CBza-L 化合物溶解於包含如本文別處所描述之至少一種極性非質子溶劑的溶劑系統中。在一些此等態樣中，將 2Am4CBza-L 在 pH 8 Tris 緩衝液(例如 50 mM Tris)中溶解至濃度為約 5 mM、約 10 mM、約 20 mM、約 30 mM、約 40 mM 或約 50 mM，及其範圍，諸如約 5 mM 至約 50 mM 或約 10 mM 至約 30 mM。在一些態樣中，將 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋-連接子中間物溶解於 DMSO (二甲亞砜)、DMA (二甲基乙醯胺)、乙腈或另一種適合的偶極非質子溶劑中。

【0315】 或者，在結合反應中，可將當量過量之 2Am4CBza-L 溶液稀釋且與抗體溶液組合。可將 2Am4CBza-L 溶液適當地用至少一種極性非質子溶劑及至少一種極性質子溶劑稀釋，該等溶劑之實例包括水、甲醇、乙醇、正丙醇及乙酸。2Am4CBza-L 中間物與抗體之莫耳當量可為約 1.5:1、約 3:1、約 5:1、約 10:1、約 15:1 或約 20:1，及其範圍，諸如約 1.5:1 至約 20:1、約 1.5:1 至約 15:1、約 1.5:1 至約 10:1、約 3:1 至約 15:1、約 3:1 至約 10:1、約 5:1 至約 15:1 或約 5:1 至約 10:1。可適當地藉由此項技術中已知之方法(諸如 LC-MS)監測反應是否完成。結合反應通常在約 1 小時至約 16 小時範圍內完成。反應完成後，可將試劑添加至

反應混合物中以淬滅反應。若抗體硫醇基與 2Am4CBza-L 連接子中間物之硫醇-反應性基團(諸如順丁烯二醯亞胺)反應，則未反應之抗體硫醇基可與封端試劑反應。適合封端試劑之實例為乙基順丁烯二醯亞胺。

【0316】 結合後，免疫結合物可藉由此項技術中已知之純化方法自未結合反應物及/或結合物聚集物純化及分離，該等純化方法諸如例如且不限於尺寸排阻層析、疏水性相互作用層析、離子交換層析、聚焦層析、超濾、離心超濾、切向流過濾及其組合。例如，純化之前可在 20 mM 丁二酸鈉 pH 5 中稀釋免疫結合物。將稀釋溶液施加到陽離子交換管柱，隨後用例如至少 10 個管柱體積之 20 mM 丁二酸鈉 pH 5 洗滌。結合物可適合地用緩衝液諸如 PBS 溶析。

實例 202 HEK 報導子檢定

【0317】 表現人類 TLR7 或人類 TLR8 之 HEK293 報導細胞係購自 Invivogen 且在細胞繁殖及實驗中遵循廠商協議。簡單來說，使細胞在 5% CO₂ 下在補充有 10% FBS、吉歐黴素(Zeocin)及殺稻瘟菌素(Blasticidin)之 DMEM 中生長至 80-85% 匯合。然後將細胞以 4×10^4 個細胞/孔接種於具有含有 HEK 偵測培養基及免疫刺激性 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋化合物(諸如表 1 之彼等者)之受質的 96 孔平板中。使用讀板儀在 620-655 nm 波長下量測活性。

實例 203 活體外免疫結合物活性之評估

【0318】 此實例顯示本發明之免疫結合物(包括表 3a 及 3b 之彼等者)有效引發免疫活化，且因此可用於治療癌症。

a) 人類抗原呈遞細胞之分離：人類髓系抗原呈遞細胞(APC)係藉由密度梯度離心使用含有針對 CD14、CD16、CD40、CD86、CD123 及 HLA-DR 之單株抗體的 ROSETTESEP™ 人類單核球富集混合物(Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada)自獲自健康供血者之人類外周血(Stanford Blood Center, Palo Alto, California)負向選擇。隨後經由負向選擇使用無 CD16 耗盡且含有針對 CD14、

CD16、CD40、CD86、CD123 及 HLA-DR 之單株抗體的 EASYSEP™ 人類單核球富集套組(Stem Cell Technologies)將不成熟 APC 純化至>90%純度。

b) 髓系 APC 活化檢定：將 2×10^5 個 APC 在含有伊斯科夫改良杜爾貝科氏培養基(iscove's modified dulbecco's medium, IMDM) (Lonza)之 96 孔板(Corning, Corning, NY)中溫育，該培養基補充有 10% FBS、100 U/mL 青黴素、100 µg/mL (每毫升微克數)鏈黴素、2 mM L-麩醯胺、丙酮酸鈉、非必需胺基酸及(在指出的情況下)各種濃度之未經結合之(裸)抗體及本發明之免疫結合物(IC)(包括表 3a 及 3b 之彼等者)(如根據以上實例所製備)。18 小時後經由 ELISA 對無細胞上清液進行分析，以量測 TNF α 分泌作為促炎性反應之讀出。

c) PBMC 活化檢定：藉由密度梯度離心自獲自健康獻血者之人類外周血(Stanford Blood Center, Palo Alto, California)中分離人類外周血單核細胞。將 PBMC 在 96 孔板(Corning, Corning, NY)中在與表現 CEA 之腫瘤細胞(例如 MKN-45、HPAF-II)以 10:1 效應細胞與靶細胞比率之共培養物中溫育。用不同濃度之未經結合之(裸)抗體及本發明之免疫結合物(如根據以上實例所製備)刺激細胞。根據製造商指南，使用 LegendPlex™套組(BioLegend®, San Diego, CA)藉由細胞介素珠粒陣列分析無細胞上清液。

d) 人類常規樹突細胞之分離：人類常規樹突細胞(cDC)係藉由密度梯度離心自獲自健康獻血者之人類外周血(Stanford Blood Center, Palo Alto, California)負向選擇。簡言之，首先藉由使用 ROSETTESEP™ 人類 CD3 耗盡混合物(Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada)自細胞製備物中移除 T 細胞來富集細胞。然後藉由負向選擇使用 EASYSEP™ 人類髓系 DC 富集套組(Stem Cell Technologies)進一步富集 cDC。

e) cDC 活化檢定：將 8×10^4 個 APC 與表現 ISAC 靶抗原之腫瘤細胞以 10:1 效應物(cDC)與靶(腫瘤細胞)之比率共培養。將細胞在含有 RPMI-1640 培養基之 96 孔板

(Corning, Corning, NY)中溫育，該培養基補充有 10% FBS 及(在所指示之情況下)不同濃度之本發明之指定免疫結合物(如根據以上實例製備)。在隔夜溫育約 18 小時後，收集無細胞上清液並使用 BioLegend LEGENDPLEX 細胞介素珠粒陣列分析細胞介素分泌(包括 $\text{TNF}\alpha$)。

【0319】 除了所描述之利用不同髓系細胞群之檢定以外，亦可使用各種篩選檢定來量測髓系細胞類型之活化。此等細胞可包括以下：自健康供體血液中分離之單核球、經 M-CSF 分化之巨噬球、經 GM-CSF 分化之巨噬球、GM-CSF+IL-4 單核球衍生性樹突細胞、自健康供體血液中分離之常規樹突細胞(cDC)，及極化至免疫抑制狀態之髓系細胞(亦稱為髓系來源之抑制細胞或 MDSC)。MDSC 極化細胞之實例包括向免疫抑制狀態分化之單核球，例如 M2a M Φ (IL4/IL13)、M2c M Φ (IL10/TGFb)、GM-CSF/IL6 MDSC 及腫瘤馴化(tumor-educated)單核球(TEM)。可使用腫瘤條件培養基(例如 786.O、MDA-MB-231、HCC1954)進行 TEM 分化。原代腫瘤相關髓系細胞亦可包括存在於離散(dissociated)腫瘤細胞懸液中的原代細胞(Discovery Life Sciences)。

【0320】 所描述髓系細胞群之活化評估可作為單一培養物或作為與表現相關抗原之細胞之共培養物進行，免疫結合物(IC)可藉由抗體之 CDR 區結合該相關抗原。在溫育 18-48 小時後，可藉由使用流動式細胞測量術上調細胞表面共刺激分子或藉由量測經分泌之促炎細胞介素來評估活化。對於細胞介素量測，收穫無細胞上清液且藉由細胞介素珠粒陣列(例如來自 Biolegend 之 LegendPlex)使用流動式細胞測量術進行分析。

【0321】 本文中引用之所有參考文獻(包括公開案、專利申請及專利)皆以引用方式併入本文，達到如同逐一個別地及特別地指出之將各參考文獻以引用方式將各參考文獻併入本文以及並且在本文中全部闡述之相同程度。

【序列表】

<110> 美商博特生物治療公司(BOLT BIOTHERAPEUTICS, INC.)

<120> 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋免疫結合物及其用途

<130> 17019.015TW1

<140>

<141>

<150> 63/166,710

<151> 2021-03-26

<160> 175

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 1

Asp Ile Gln Leu 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 Val Gly Thr Ser
 20 25 30

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

Tyr Trp Thr Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Leu Tyr Arg Ser

859095

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100105

<210> 2
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 2
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
151015

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 3
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 3
Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ser Val Ala
1510

<210> 4
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 4
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

151051

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 5
Trp Thr Ser Thr Arg His Thr
15

<210> 6
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 6
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
151015

Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys
202530

<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 7
Gln Gln Tyr Ser Leu Tyr Arg Ser
15

<210> 8

<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 8
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 9
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 9
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ser Ser Gly Phe Asp Phe Thr Thr Tyr
20 25 30

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

Ala Glu Ile His Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu
50 55 60

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Ser Leu Tyr Phe Gly Phe Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 10
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 10
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ser Ser Gly Phe Asp Phe Thr
20 25 30

<210> 11
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 11
Thr Tyr Trp Met Ser
1 5

<210> 12
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 12
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

<210> 13
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 13
Glu Ile His Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 14
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 14
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe Leu Gln
1 5 10 15

Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys Ala Ser
 20 25 30

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 15
Leu Tyr Phe Gly Phe Pro Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 16
Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 17
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 17
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100105

<210> 18
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 18
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
151015

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 19
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 19
Lys Ala Ser Ala Ala Val Gly Thr Tyr Val Ala
1510

<210> 20
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 20
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
151015

<210> 21

<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 21
Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg
1 5

<210> 22
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 22
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 23
His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu Phe Thr
1 5 10

<210> 24
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 24
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 25
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 25
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

<210> 26
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 26
Glu Phe Gly Met Asn
1 5

<210> 27
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 27
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 28
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 28
Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 29
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 29
Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 30
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 30
Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 31
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
 肽

<400> 31
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 32
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
 多肽

<400> 32
Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Leu Thr

859095

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100105

<210> 33
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 33
Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Ala Ser Val Gly
151015

Asp Arg Val Asn Ile Ala Cys
20

<210> 34
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 34
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Ala Ser Val Gly
151015

Asp Arg Val Asn Ile Ala Cys
20

<210> 35
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成

肽

<400> 35
Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
1 5 10

<210> 36
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 36
Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 37
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 37
Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 38
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 38
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Met Gln Pro Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys

202530

<210> 39
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 39
Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Leu Thr
15

<210> 40
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 40
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1510

<210> 41
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 41
Gln Val Lys Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
151015

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Ser
202530

Tyr Met His Trp Leu Arg Gln Gly Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Asn Glu Gly Thr Pro Thr Gly Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 42
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 42
Gln Val Lys Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
20 25 30

<210> 43
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 43
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
20 25 30

<210> 44
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 44
Asp Ser Tyr Met His
1 5

<210> 45
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 45
Trp Leu Arg Gln Gly Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 46
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 46
Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 47
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 47
Lys Ala Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr Leu Gly
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Glu
 20 25 30

<210> 48
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 48
Gly Thr Pro Thr Gly Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 49
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 49
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 50
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 50
Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ala Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Met
 20 25 30

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

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Pro Glu
65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 51
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 51
Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ala Cys
20

<210> 52
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 52
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ala Cys
20

<210> 53
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 53
Ser Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Met His
1 5 10

<210> 54
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 54
Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

151051

<210> 55
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 55
Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser
15

<210> 56
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 56
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser
151015

Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Pro Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
202530

<210> 57
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 57
Gln Thr Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
151015

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Ile

202530

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Ser Trp Ile Tyr
354045

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
505560

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
65707580

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Trp Ser Ser Lys Pro Pro Thr
859095

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100105

<210> 58
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 58
Gln Thr Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
151015

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys
20

<210> 59
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 59
Arg Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Ile His
1 5 10

<210> 60
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 60
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Ser Trp Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 61
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 61
Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 62
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 62
Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser
1 5 10 15

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

<210> 63
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 63
Gln His Trp Ser Ser Lys Pro Pro Thr
1 5

<210> 64
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 64
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 65
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 65
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Phe Ile Gly Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala
50 55 60

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

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Arg Asp Arg Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 66
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 66
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr
20 25 30

<210> 67
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 67
Asp Tyr Tyr Met Asn

15

<210> 68
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 68
Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Gly
1510

<210> 69
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 69
Phe Ile Gly Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala Ser
151015

Val Lys Gly

<210> 70
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 70
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Lys Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln
151015

Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Thr Arg

202530

<210> 71
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 71
Asp Arg Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr
1510

<210> 72
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 72
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
1510

<210> 73
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 73
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
151015

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Gly Glu Ser Val Asp Ile Phe
202530

Gly Val Gly Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

35 40 45

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

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

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 74
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 74
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 75
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 75
Arg Ala Gly Glu Ser Val Asp Ile Phe Gly Val Gly Phe Leu His
1 5 10 15

<210> 76
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 76
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 77
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 77
Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 78
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 78
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 79
<211> 9
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 79

Gln Gln Thr Asn Glu Asp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 80

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 80

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 81

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 81

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 82
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 82
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
20 25 30

<210> 83
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 83
Asp Thr Tyr Met His
1 5

<210> 84

<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 84
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

<210> 85
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 85
Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 86
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 86
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Pro
20 25 30

<210> 87

<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 87
Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr
1 5 10

<210> 88
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 88
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 89
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 89
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Val
35 40 45

Tyr Asn Thr Arg Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

505560

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65707580

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Phe
859095

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100105

<210> 90
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 90
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
151015

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 91
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 91
Arg Ala Ser Glu Asn Ile Phe Ser Tyr Leu Ala
1510

<210> 92
<211> 15
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 92

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Val Tyr
1 5 10 15

<210> 93

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 93

Asn Thr Arg Thr Leu Ala Glu
1 5

<210> 94

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 94

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 95

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列之描述：合成

肽

<400> 95
Gln His His Tyr Gly Thr Pro Phe Thr
1 5

<210> 96
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 96
Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 97
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 97
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Val Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Arg Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ile Thr Tyr Ala Pro Ser Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Ala His Tyr Phe Gly Ser Ser Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 98
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 98
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Val Phe Ser
20 25 30

<210> 99
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 99
Ser Tyr Asp Met Ser
1 5

<210> 100
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 100
Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Arg Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

<210> 101
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 101
Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ile Thr Tyr Ala Pro Ser Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 102
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 102
Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25 30

<210> 103
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 103

His Tyr Phe Gly Ser Ser Gly Pro Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 104

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 104

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 105

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 105

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

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

Tyr Ser Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr
 35 40 45

Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys Gln Gln Gly Ser Gly Val
 50 55 60

Ser Ser Arg Phe Ser Ala Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile

65707580

Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
859095

Met Ile Trp His Ser Gly Ala Ser Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys
100105110

Leu Thr Val Leu
115

<210> 106
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 106
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala
151015

Ser Ala Ser Leu Thr Cys
20

<210> 107
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 107
Thr Leu Arg Arg Gly Ile Asn Val Gly Ala Tyr Ser Ile Tyr
1510

<210> 108
<211> 15
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 108

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr Leu Leu Arg
1 5 10 15

<210> 109

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 109

Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys Gln Gln Gly Ser
1 5 10

<210> 110

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 110

Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Ala Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala
1 5 10 15

Gly Ile Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Cys

<210> 111

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 111

Met Ile Trp His Ser Gly Ala Ser Ala Val
1 5 10

<210> 112

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 112

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
1 5 10

<210> 113

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 113

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Gly Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
 50 55 60

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

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 114
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 114
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser
20 25 30

<210> 115
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 115
Ser Tyr Trp Met His
1 5

<210> 116

<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 116
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
1 5 10

<210> 117
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 117
Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Gly Thr Thr Glu Tyr Ala Ala Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 118
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 118
Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Ser Gly Thr Thr Glu Tyr Ala Ala Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 119

<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 119
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 120
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 120
Asp Arg Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 121
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 121
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 122
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 122

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Phe Ile Leu Asn Lys Ala Asn Gly Gly Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
 50 55 60

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

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 123

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 123

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser
20 25 30

<210> 124
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 124
Ser Tyr Trp Met His
1 5

<210> 125
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 125
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
1 5 10

<210> 126
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 126
Phe Ile Leu Asn Lys Ala Asn Gly Gly Thr Thr Glu Tyr Ala Ala Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 127
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 127
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 128
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 128
Asp Arg Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 129
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 129
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 130
<211> 121
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 130

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

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

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 131

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 131

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Ala Val Ala

1510

<210> 132
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 132
Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
15

<210> 133
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 133
Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Leu Thr
15

<210> 134
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 134
Asn Tyr Gly Met Asn
15

<210> 135
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 135
Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Asp Asp Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 136
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 136
Gly Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 137
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 137
Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 138
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 138

Gly Gly Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 139

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 139

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Gln Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 140

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 140

Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 141

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 141
Gln Ser Asp His Ile Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 142
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 142
Ile Tyr Trp Leu Gly
1 5

<210> 143
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 143
Asn Ile Phe Pro Gly Ser Ala Tyr Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 144
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 144
Glu Gly Ser Asn Ser Gly Tyr
1 5

<210> 145
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 145
Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 146
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 146
Thr Ala Gly Met Gln
1 5

<210> 147
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 147
Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala Glu Asp Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 148
<211> 12
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 148

Ser Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 149

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列之描述：合成
肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> G, L, or N

<400> 149

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Xaa Tyr Ser Tyr Met His
1 5 10 15

<210> 150

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 150

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 151

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 151
Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 152
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 152
Ser Tyr Gly Val His
1 5

<210> 153
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 153
Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5

<210> 154
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 154
Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr Gly Val His
1 5 10

<210> 155
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> G or S

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> S or V

<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> S or G

<400> 155
Val Ile Trp Thr Xaa Gly Xaa Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Met Xaa
1 5 10 15

<210> 156
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> G or S

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> S or V

<400> 156
Trp Thr Xaa Gly Xaa
1 5

<210> 157
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 157
Asp Gly Asp Tyr Asp Arg Tyr Thr Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 158
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 158
Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His
1 5 10 15

<210> 159
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 159
Val Ile Trp Thr Ser Gly Val Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Met Gly
1 5 10 15

<210> 160
<211> 5

<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 160
Trp Thr Ser Gly Val
1 5

<210> 161
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 161
Lys Ala Asp Tyr Glu Cys His Lys Val Tyr Ala
1 5 10

<210> 162
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 162
Tyr Glu Lys His Lys Cys Tyr Ala Cys Glu Val
1 5 10

<210> 163
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 163

Gln Leu Lys Ser Gly Cys Ala Ser Val Val Cys
1 5 10

<210> 164
<211> 451
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 164
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

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

Pro Gly Lys
450

<210> 165
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 165
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Leu
85 90 95

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

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

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

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

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

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Cys 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> 166
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 166

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Leu
 85 90 95

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

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

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

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

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

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Cys 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> 167
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 167
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Leu
85 90 95

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

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

Cys 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> 168
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 168
Thr Val Ser Ser Ala Cys Thr Lys Gly Pro Ser
1 5 10

<210> 169
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 169																	
Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly		
1				5					10					15			
Asp	Arg	Val	Ser	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser	Ile	Ala		
		20						25					30				
Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile		
	35						40					45					
Tyr	Ser	Ala	Ser	Tyr	Arg	Tyr	Thr	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly		
	50					55					60						
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro		
65					70					75				80			
Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	His	Tyr	Ile	Thr	Pro	Leu		
				85					90					95			
Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala		
		100						105					110				
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly		
		115					120					125					
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala		
	130					135					140						
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln		
145					150					155				160			
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser		
			165						170					175			
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr		
		180						185					190				

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 170
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 170
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Asp Thr Phe Thr Asn His
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly His Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Ala Val Ala Gly Pro Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

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

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

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

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

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

<210> 171
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
肽

<400> 171
Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ser Ser Gly
1 5

<210> 172
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 172
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Gln Pro Glu
65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 173
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 173
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Asn Glu Gly Thr Pro Thr Gly Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 174
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 174
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ala Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Met
20 25 30

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

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Pro Glu
65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 175
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列之描述：合成
多肽

<400> 175
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Ser Gly Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
50 55 60

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

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

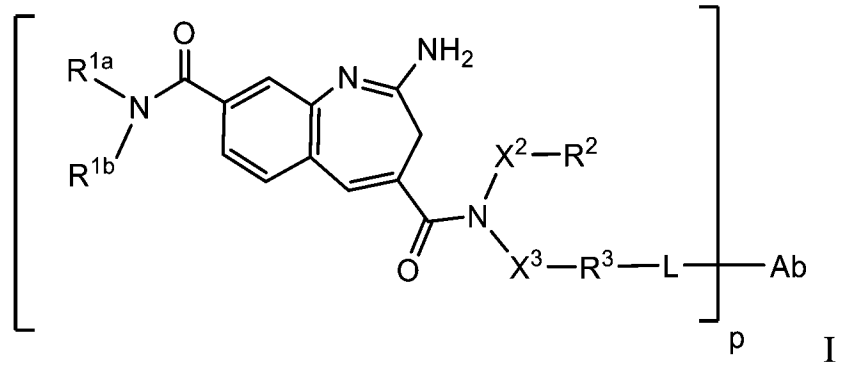
Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

202304520

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

【發明申請專利範圍】

【請求項 1】 一種免疫結合物，其包含藉由連接子共價連接至一或多個 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋部分之抗體，且具有式 I：



或其醫藥學上可接受之鹽，

其中：

Ab 係該抗體，其中該抗體結合至選自 PD-L1、HER2、CEA 及 TROP2 之靶標；

p 為 1 至 8 之整數；

X² 及 X³ 獨立地選自由以下組成之群：鍵、C(=O)、C(=O)N(R⁵)、O、N(R⁵)、S、S(O)₂ 及 S(O)₂N(R⁵)；

R^{1a}、R^{1b} 及 R² 獨立地選自由以下組成之群：H、C₁-C₁₂ 烷基、C₂-C₆ 烯基、C₂-C₆ 炔基、C₃-C₁₂ 碳環基、C₆-C₂₀ 芳基、C₂-C₉ 雜環基及 C₁-C₂₀ 雜芳基，或 R^{1a} 及 R^{1b} 形成五-員或六-員雜環基環；

R³ 選自由以下組成之群：

- (C₁-C₁₂ 烷基二基)-N(R⁵)-*；
- (C₁-C₁₂ 烷基二基)-N(R⁵)-C(=O)*；
- (C₁-C₁₂ 烷基二基)-N(R⁵)-C(=O)O-(C₃-C₁₂ 碳環基二基)-*；
- (C₁-C₁₂ 烷基二基)-N(R⁵)-(C₁-C₂₀ 雜芳基二基)-*；
- (C₁-C₁₂ 烷基二基)-N(R⁵)-(C₁-C₂₀ 雜芳基二基)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-*；

- (C₁-C₁₂ 烷基二基)-N(R⁵)-S(O₂)-* ;
- (C₁-C₁₂ 烷基二基)-OC(=O)-(C₂-C₉ 雜環基二基)-* ;
- (C₁-C₁₂ 烷基二基)-O-* ;
- (C₁-C₁₂ 烷基二基)-(C₃-C₁₂ 碳環基二基)-* ;
- (C₁-C₁₂ 烷基二基)-(C₆-C₂₀ 芳基二基)-* ;
- (C₁-C₁₂ 烷基二基)-(C₆-C₂₀ 芳基)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-N(R⁵)-* ;
- (C₁-C₁₂ 烷基二基)-(C₂-C₉ 雜環基二基)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-N(R⁵)-* ;
- (C₁-C₁₂ 烷基二基)-(C₁-C₂₀ 雜芳基二基)-N(R⁵)-* ;
- (C₁-C₁₂ 烷基二基)-(C₁-C₂₀ 雜芳基二基)-* ;
- (C₁-C₁₂ 烷基二基)-(C₁-C₂₀ 雜芳基二基)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-* ;
- (C₁-C₁₂ 烷基二基)-(C₁-C₂₀ 雜芳基二基)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-N(R⁵)-* ;
- (C₃-C₁₂ 碳環基二基)-* ;
- (C₃-C₁₂ 碳環基二基)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-N(R⁵)-* ;
- (C₃-C₁₂ 碳環基二基)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-N(R⁵)-* ;
- (C₃-C₁₂ 碳環基二基)-NR⁵-C(=NR^{5a})-N(R⁵)-* ;
- (C₆-C₂₀ 芳基二基)-* ;
- (C₆-C₂₀ 芳基二基)-N(R⁵)-* ;
- (C₆-C₂₀ 芳基二基)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-N(R⁵)-* ;
- (C₆-C₂₀ 芳基二基)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-(C₂-C₂₀ 雜環基二基)-* ;
- (C₆-C₂₀ 芳基二基)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-N(R⁵)-C(=NR^{5a})-N(R⁵)-* ;
- (C₂-C₂₀ 雜環基二基)-* ;
- (C₂-C₉ 雜環基二基)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-N(R⁵)-* ;
- (C₂-C₉ 雜環基二基)-N(R⁵)-C(=NR^{5a})-N(R⁵)-* ;
- (C₁-C₂₀ 雜芳基二基)-* ;

-(C₁-C₂₀ 雜芳基二基)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-N(R⁵)-* ；

-(C₁-C₂₀ 雜芳基二基)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-O-* ； 及

-(C₁-C₂₀ 雜芳基二基)-N(R⁵)-C(=NR^{5a})-N(R⁵)-* ；

其中星號*指示該連接子 L 之連接位點；

或 R² 及 R³ 一起形成 5-員或 6-員雜環基環；

R⁵ 獨立地選自由以下組成之群：H、C₆-C₂₀ 芳基、C₃-C₁₂ 碳環基、C₆-C₂₀ 芳基二基、C₁-C₁₂ 烷基及 C₁-C₁₂ 烷基二基，或兩個 R⁵ 基團一起形成 5 員或 6 員雜環基環；

R^{5a} 選自由 C₆-C₂₀ 芳基及 C₁-C₂₀ 雜芳基組成之群；

L 選自由以下組成之群：

-C(=O)-PEG- ；

-C(=O)-PEG-C(=O)N(R⁶)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-C(=O)-Gluc- ；

-C(=O)-PEG-O- ；

-C(=O)-PEG-O-C(=O)- ；

-C(=O)-PEG-C(=O)- ；

-C(=O)-PEG-C(=O)-PEP- ；

-C(=O)-PEG-N(R⁶)- ；

-C(=O)-PEG-N(R⁶)-C(=O)- ；

-C(=O)-PEG-N(R⁶)-PEG-C(=O)-PEP- ；

-C(=O)-PEG-N⁺(R⁶)₂-PEG-C(=O)-PEP- ；

-C(=O)-PEG-C(=O)-PEP-N(R⁶)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)- ；

-C(=O)-PEG-C(=O)-PEP-N(R⁶)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)N(R⁶)C(=O)-(C₂-C₅ 單雜環基二基)- ；

-C(=O)-PEG-SS-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-OC(=O)- ；

- C(=O)-PEG-SS-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-C(=O)- ；
- C(=O)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-C(=O)-PEP- ；
- C(=O)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-C(=O)-PEP-N(R⁶)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)- ；
- C(=O)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-C(=O)-PEP-N(R⁶)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-N(R⁵)-C(=O) ；
- C(=O)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-C(=O)-PEP-N(R⁶)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-N(R⁶)C(=O)-(C₂-C₅ 單雜環基二基)- ；
- 丁二醯亞胺基-(CH₂)_m-C(=O)N(R⁶)-PEG- ；
- 丁二醯亞胺基-(CH₂)_m-C(=O)N(R⁶)-PEG-C(=O)N(R⁶)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-C(=O)-Gluc- ；
- 丁二醯亞胺基-(CH₂)_m-C(=O)N(R⁶)-PEG-O- ；
- 丁二醯亞胺基-(CH₂)_m-C(=O)N(R⁶)-PEG-O-C(=O)- ；
- 丁二醯亞胺基-(CH₂)_m-C(=O)N(R⁶)-PEG-C(=O)- ；
- 丁二醯亞胺基-(CH₂)_m-C(=O)N(R⁶)-PEG-N(R⁵)- ；
- 丁二醯亞胺基-(CH₂)_m-C(=O)N(R⁶)-PEG-N(R⁵)-C(=O)- ；
- 丁二醯亞胺基-(CH₂)_m-C(=O)N(R⁶)-PEG-C(=O)-PEP- ；
- 丁二醯亞胺基-(CH₂)_m-C(=O)N(R⁶)-PEG-SS-(C₁-C₁₂ 烷基二基)-OC(=O)- ；
- 丁二醯亞胺基-(CH₂)_m-C(=O)-PEP-N(R⁶)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)- ；
- 丁二醯亞胺基-(CH₂)_m-C(=O)-PEP-N(R⁶)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)N(R⁶)C(=O)- ；

及

- 丁二醯亞胺基-(CH₂)_m-C(=O)-PEP-N(R⁶)-(C₁-C₁₂ 烷基二基)N(R⁶)C(=O)-(C₂-C₅ 單雜環基二基)- ；

R⁶獨立地為 H 或 C₁-C₆ 烷基；

PEG 具有式-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_m- ； m 為 1 至 5 之整數，且 n 為 2 至 50 之

z 為 0 或 1；且

烷基、烷基二基、烯基、烯基二基、炔基、炔基二基、芳基、芳基二基、碳環基、碳環基二基、雜環基、雜環基二基、雜芳基及雜芳基二基獨立地且視情況經獨立地選自以下之一或多個基團取代：F、Cl、Br、I、-CN、-CH₃、-CH₂CH₃、-CH=CH₂、-C≡CH、-C≡CCH₃、-CH₂CH₂CH₃、-CH(CH₃)₂、-CH₂CH(CH₃)₂、-CH₂OH、-CH₂OCH₃、-CH₂CH₂OH、-C(CH₃)₂OH、-CH(OH)CH(CH₃)₂、-C(CH₃)₂CH₂OH、-CH(OH)CH₂OH、-CH₂CH₂SO₂CH₃、-CH₂OP(O)(OH)₂、-CH₂F、-CHF₂、-CF₃、-CH₂CF₃、-CH₂CHF₂、-CH(CH₃)CN、-C(CH₃)₂CN、-CH₂CN、-CH₂NH₂、-CH₂NHSO₂CH₃、-CH₂NHCH₃、-CH₂N(CH₃)₂、-CO₂H、-COCH₃、-CO₂CH₃、-CO₂C(CH₃)₃、-COCH(OH)CH₃、-CONH₂、-CONHCH₃、-CON(CH₃)₂、-C(CH₃)₂CONH₂、-NH₂、-NHCH₃、-N(CH₃)₂、-NHCOCH₃、-N(CH₃)COCH₃、-NHS(O)₂CH₃、-N(CH₃)C(CH₃)₂CONH₂、-N(CH₃)CH₂CH₂S(O)₂CH₃、-NHC(=NH)H、-NHC(=NH)CH₃、-NHC(=NH)NH₂、-NHC(=O)NH₂、-NO₂、=O、-OH、-OCH₃、-OCH₂CH₃、-OCH₂CH₂OCH₃、-OCH₂CH₂OH、-OCH₂CH₂N(CH₃)₂、-O(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_mCO₂H、-O(CH₂CH₂O)_nH、-OCH₂F、-OCHF₂、-OCF₃、-OP(O)(OH)₂、-S(O)₂N(CH₃)₂、-SCH₃、-S(O)₂CH₃及-S(O)₃H。

【請求項 2】 如請求項 1 之免疫結合物，其中該抗體為具有結合 PD-L1 之抗原結合域之抗體構築體。

【請求項 3】 如請求項 2 之免疫結合物，其中該抗體選自由以下組成之群：阿特珠單抗(atezolizumab)、德瓦魯單抗(durvalumab)及阿維單抗(avelumab)或其生物類似物或生物改良物。

【請求項 4】 如請求項 1 之免疫結合物，其中該抗體為具有結合 HER2 之抗原

結合域之抗體構築體。

【請求項 5】 如請求項 4 之免疫結合物，其中該抗體選自由以下組成之群：曲妥珠單抗(trastuzumab)及帕妥珠單抗(pertuzumab)或其生物類似物或生物改良物。

【請求項 6】 如請求項 1 之免疫結合物，其中該抗體為具有結合 CEA 之抗原結合域之抗體構築體。

【請求項 7】 如請求項 6 之免疫結合物，其中該抗體為拉貝珠單抗(labetuzumab)或其生物類似物或生物改良物。

【請求項 8】 如請求項 1 之免疫結合物，其中該抗體為具有結合 TROP2 之抗原結合域之抗體構築體。

【請求項 9】 如請求項 8 之免疫結合物，其中該 TROP2 抗體為單株抗體。

【請求項 10】 如請求項 1 至 9 中任一項之免疫結合物，其中 R^{1a} 及 R^{1b} 獨立地選自由以下組成之群：視情況經取代之 C_6-C_{20} 芳基、 C_2-C_9 雜環基及 C_1-C_{20} 雜芳基。

【請求項 11】 如請求項 1 至 9 中任一項之免疫結合物，其中 R^{1a} 為視情況經取代之 C_6-C_{20} 芳基且 R^{1b} 為 H。

【請求項 12】 如請求項 1 至 9 中任一項之免疫結合物，其中 R^{1a} 及 R^{1b} 形成五員或六員雜環基環。

【請求項 13】 如請求項 1 至 9 中任一項之免疫結合物，其中 X^2 及 X^3 各自為鍵，且 R^2 及 R^3 獨立地選自由以下組成之群： C_1-C_8 烷基、 $-O-(C_1-C_{12}$ 烷基)、 $-(C_1-C_{12}$ 烷基二基)- OR^5 、 $-(C_1-C_8$ 烷基二基)- $N(R^5)CO_2R^5$ 、 $-(C_1-C_{12}$ 烷基)- $OC(O)N(R^5)_2$ 、 $-O-(C_1-C_{12}$ 烷基)- $N(R^5)CO_2R^5$ 及 $-O-(C_1-C_{12}$ 烷基)- $OC(O)N(R^5)_2$ 。

【請求項 14】 如請求項 1 至 9 中任一項之免疫結合物，其中 X^2 為鍵，且 R^2 為 C_1-C_{12} 烷基。

【請求項 15】 如請求項 1 至 9 中任一項之免疫結合物，其中 X^3 為 O 且 R^3 為 $-(C_1-C_{12} \text{ 烷基二基})-N(R^5)-*$ 。

【請求項 16】 如請求項 15 之免疫結合物，其中 R^3 為 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ 。

【請求項 17】 如請求項 15 之免疫結合物，其中 L 為 $-\text{C}(=\text{O})-\text{PEG}-\text{C}(=\text{O})-$ 。

【請求項 18】 如請求項 1 至 9 中任一項之免疫結合物，其中 L 包含 PEG。

【請求項 19】 如請求項 18 之免疫結合物，其中 n 為 10 且 m 為 1。

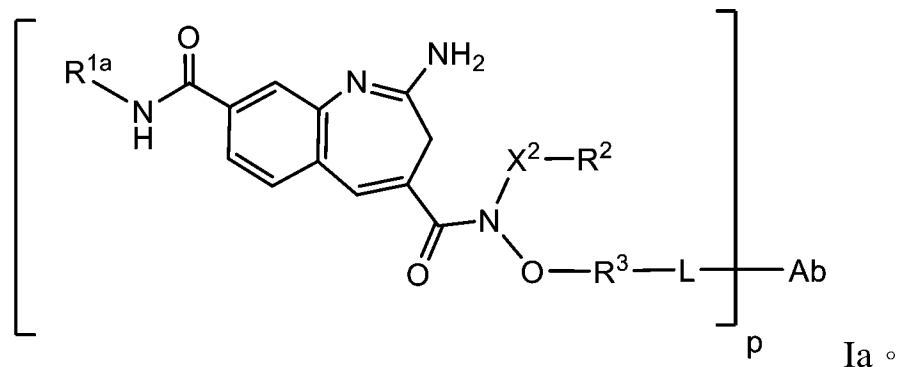
【請求項 20】 如請求項 1 至 9 中任一項之免疫結合物，其中 AA_1 及 AA_2 獨立地選自天然存在之胺基酸之側鏈。

【請求項 21】 如請求項 20 之免疫結合物，其中 AA_1 或 AA_2 與相鄰氮原子形成 5-員環脯胺酸胺基酸。

【請求項 22】 如請求項 20 之免疫結合物，其中 AA_1 及 AA_2 獨立地選自由以下組成之群： H 、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{CH}_2(\text{C}_6\text{H}_5)$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $-\text{CHCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$ 及 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 。

【請求項 23】 如請求項 22 之免疫結合物，其中 AA_1 為 $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ，且 AA_2 為 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 。

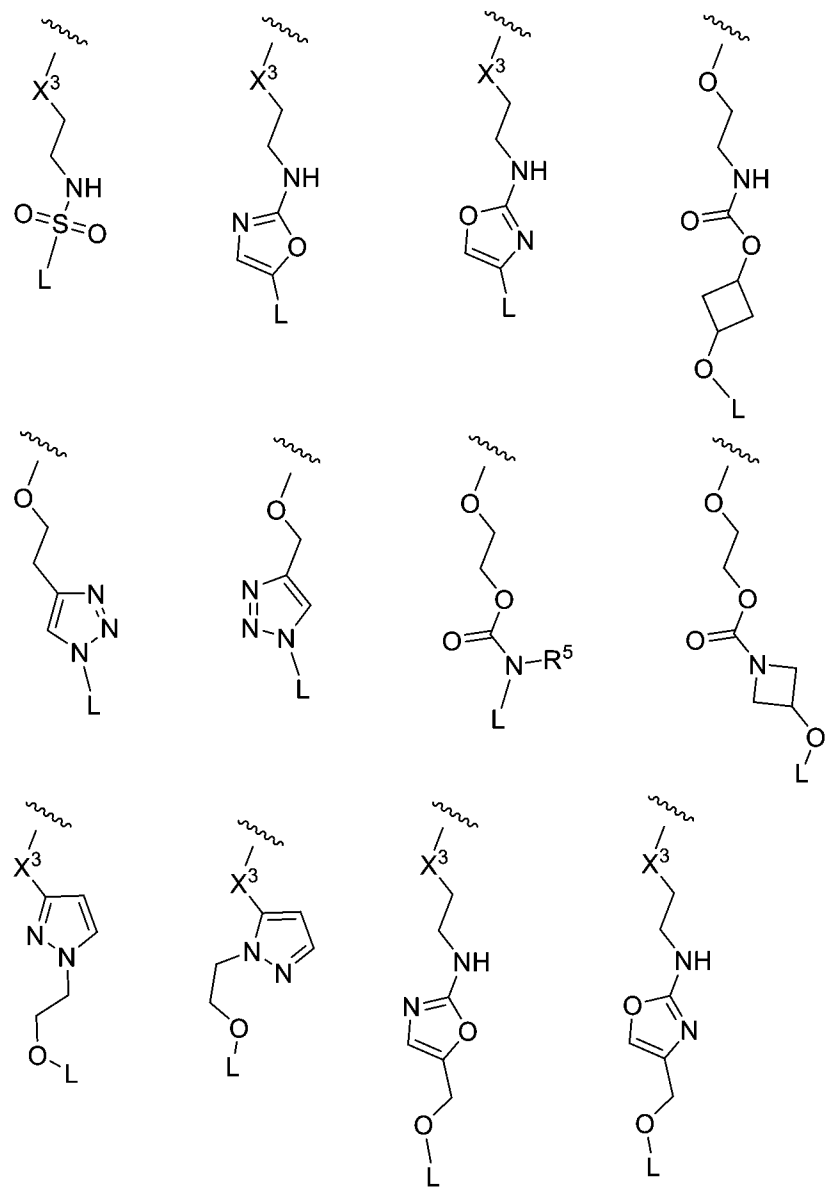
【請求項 24】 如請求項 1 至 9 中任一項之免疫結合物，其具有式 Ia：



【請求項 25】 如請求項 24 之免疫結合物，其中 R^{1a} 為選自以下各項之基團：視情況經取代之 C_6-C_{20} 芳基、 C_2-C_9 雜環基及 C_1-C_{20} 雜芳基。

- 【請求項 26】 如請求項 25 之免疫結合物，其中 R^{1a} 為嘧啶基或吡啶基。
- 【請求項 27】 如請求項 24 之免疫結合物，其中 X^2 為鍵，且 R^2 為 C_1 - C_{12} 烷基。
- 【請求項 28】 如請求項 24 之免疫結合物，其中 R^3 為 $-(C_1$ - C_{12} 烷基二基)- $N(R^5)-$
*。

【請求項 29】 如請求項 1 至 9 中任一項之免疫結合物，其中 X^3 - R^3 - L 選自由以下組成之群：



其中波浪線指示與 N 之連接點。

- 【請求項 30】 如請求項 29 之免疫結合物，其中 L 包含 PEG。
- 【請求項 31】 如請求項 30 之免疫結合物，其中 n 為 10 且 m 為 1。

- 【請求項 32】 一種選自表 2a 及 2b 之 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋-連接子化合物。
- 【請求項 33】 一種免疫結合物，其藉由將抗體與選自表 2a 及 2b 之 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋-連接子化合物結合而製備。
- 【請求項 34】 一種醫藥組合物，其包含治療有效量之如請求項 1 至 9 中任一項之免疫結合物及一或多種醫藥學上可接受之稀釋劑、媒劑、載劑或賦形劑。
- 【請求項 35】 一種用於治療癌症之方法，其包含向有需要之患者投與治療有效量之如請求項 1 至 9 中任一項之免疫結合物，其中該癌症選自膀胱癌、泌尿道癌、尿路上皮癌、肺癌、非小細胞肺癌、默克細胞癌(Merkel cell carcinoma)、結腸癌、結腸直腸癌、胃癌及乳腺。
- 【請求項 36】 如請求項 35 之方法，其中該癌症易受由 TLR7 及/或 TLR8 促效作用誘導之促炎性反應影響。
- 【請求項 37】 如請求項 35 之方法，其中該乳癌為三陰性乳癌。
- 【請求項 38】 如請求項 35 之方法，其中該默克細胞癌為轉移性默克細胞癌。
- 【請求項 39】 如請求項 35 之方法，其中該癌症為胃食管連接部腺癌。
- 【請求項 40】 一種製備如請求項 1 至 9 中任一項之式 I 之免疫結合物的方法，其中使如請求項 32 之 2-胺基-4-羧醯胺-苯并氮呋-連接子與該抗體結合。
- 【請求項 41】 如請求項 1 至 9 中任一項之免疫結合物用於治療選自以下之癌症的用途：膀胱癌、泌尿道癌、尿路上皮癌、肺癌、非小細胞肺癌、默克細胞癌、結腸癌、結腸直腸癌、胃癌及乳癌。