



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I660741 B

(45)公告日：中華民國 108 (2019) 年 06 月 01 日

(21)申請案號：105135455

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 11 月 02 日

(51)Int. Cl. : A61K47/50 (2017.01)

C07K1/107 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2015/11/03 美國

62/250,107

(71)申請人：財團法人工業技術研究院(中華民國) INDUSTRIAL TECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE (TW)

新竹縣竹東鎮中興路4段195號

(72)發明人：柯怡如 KO, YI JU (TW)；李政憲 LI, JHENG SIAN (TW)；呂瑞梅 LU, MAGGIE (TW)；李昂 LEE, ON (TW)；鄭平福 CHENG, PING FU (TW)；劉俊旻 LIU, CHUN MIN (TW)

(74)代理人：洪澄文；顏錦順

(56)參考文獻：

CN 101490087B

CN 101573384B

AAPS J. 2015 Mar: 17(2):339-351

審查人員：張榮興

申請專利範圍項數：項 圖式數： 共頁

(54)名稱

抗體藥物複合物及其製造方法

ANTIBODY-DRUG CONJUGATE (ADC) AND METHOD FOR FORMING THE SAME

(57)摘要

本揭露提供一種具有化學式(I)之抗體藥物複合物(ADC)或其藥學上可接受鹽類或溶劑化物。於化學式(I)中，p為介於1~26之整數，A為一抗體，且-(L-D)為一連接子-藥物單元。其中，L為一具有醣胜肽的連接子單元，且D為一藥物單元。其中，抗體藉由抗體之一半胱氨酸殘基連接至連接子單元。本揭露也提供一種抗體藥物複合物(ADC)的製造方法。

A-(L-D)<sub>p</sub> (I)

An antibody-drug conjugate (ADC) of formula (I) or a pharmaceutically acceptable salt or solvate thereof is provided. In formula (I), p is an integer ranging from 1 to 26, A is an antibody, and -(L-D) is a linker-drug unit. L is a linker unit having a glycopeptide, and D is a drug unit. The antibody is conjugated to the linker unit through a cysteine residue of the antibody. A method for forming an antibody-drug conjugate (ADC) is also provided.

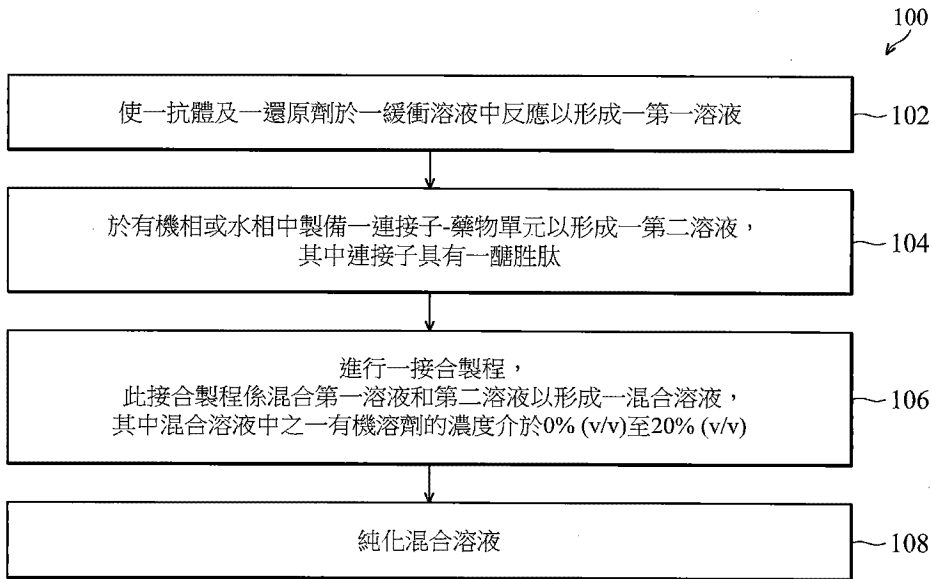
A-(L-D)<sub>p</sub> (I)

指定代表圖：

符號簡單說明：

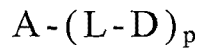
100 . . . 方法流程圖

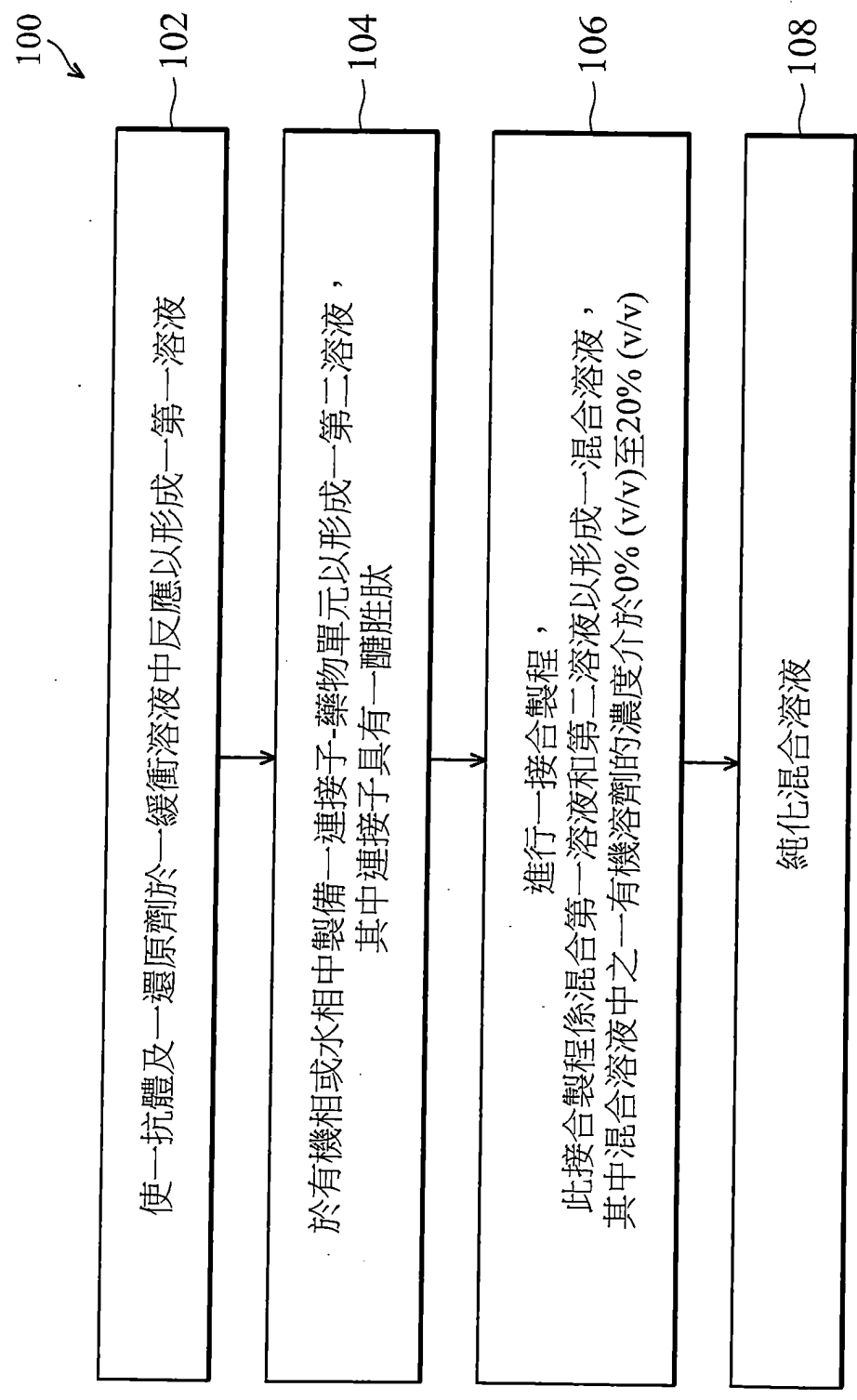
102-108 . . . 步驟



第 1 圖

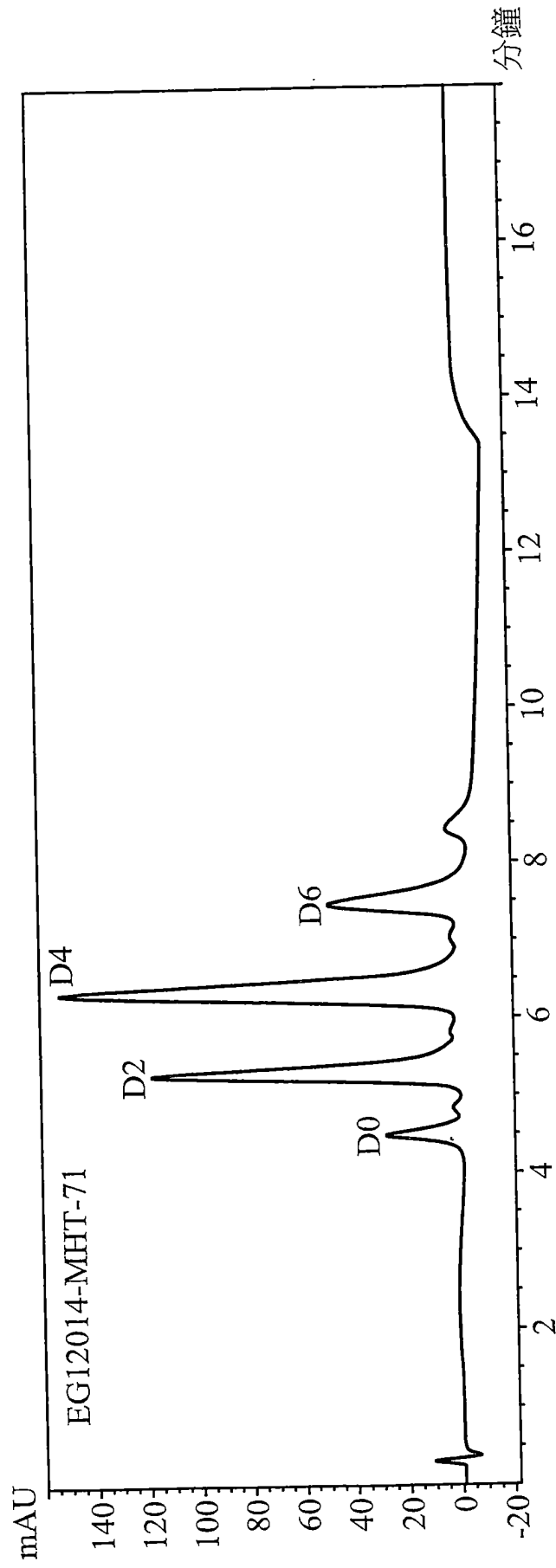
特徵化學式：



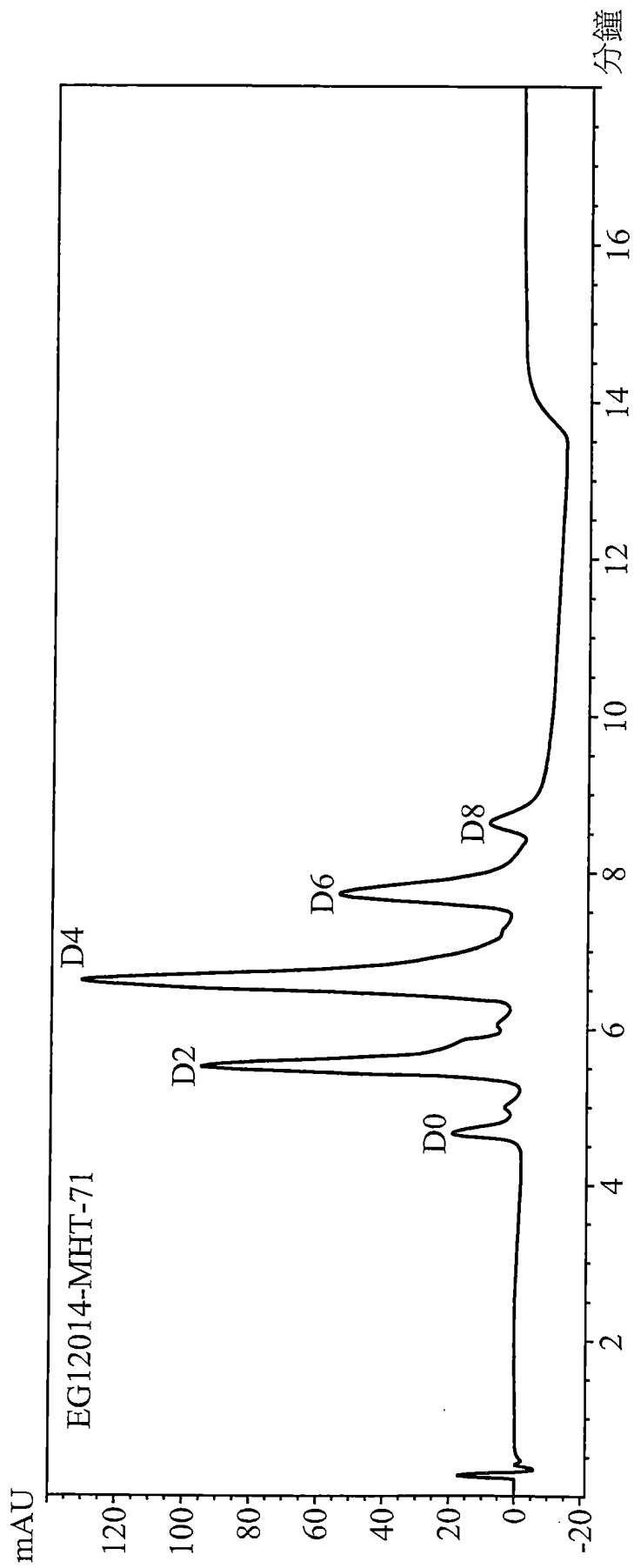


圖式

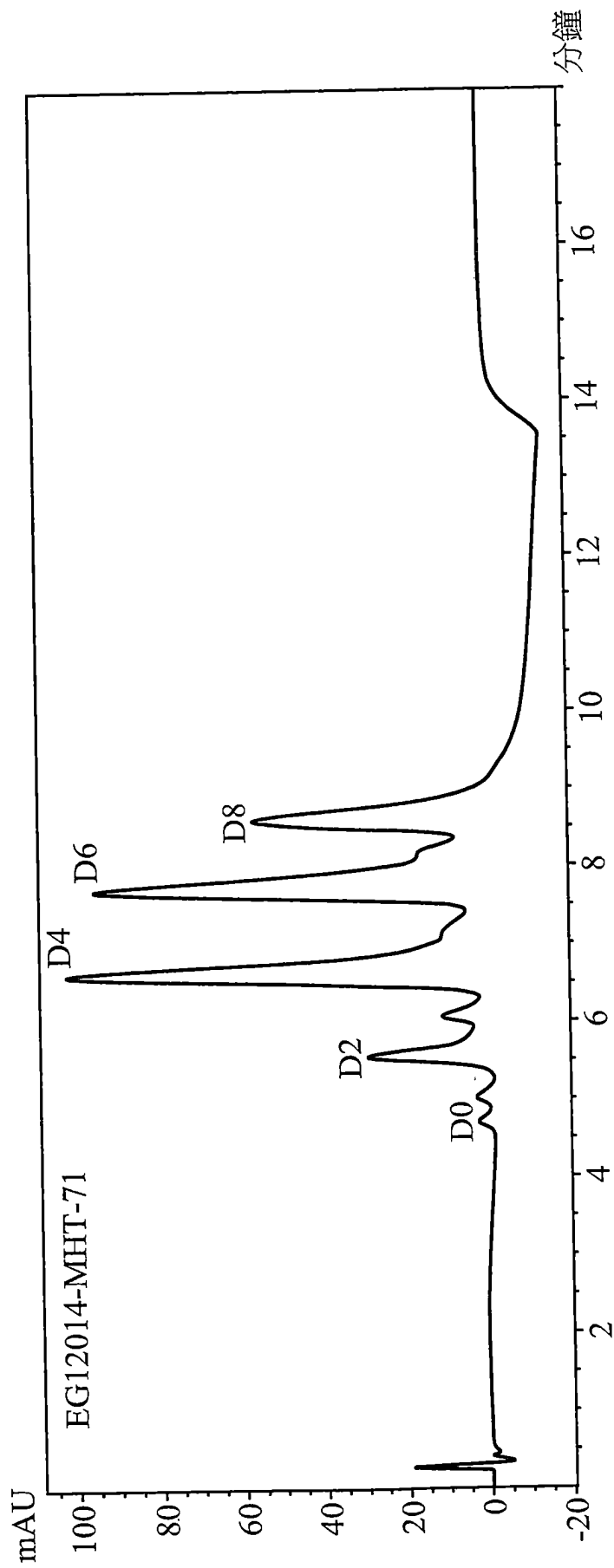
第1圖



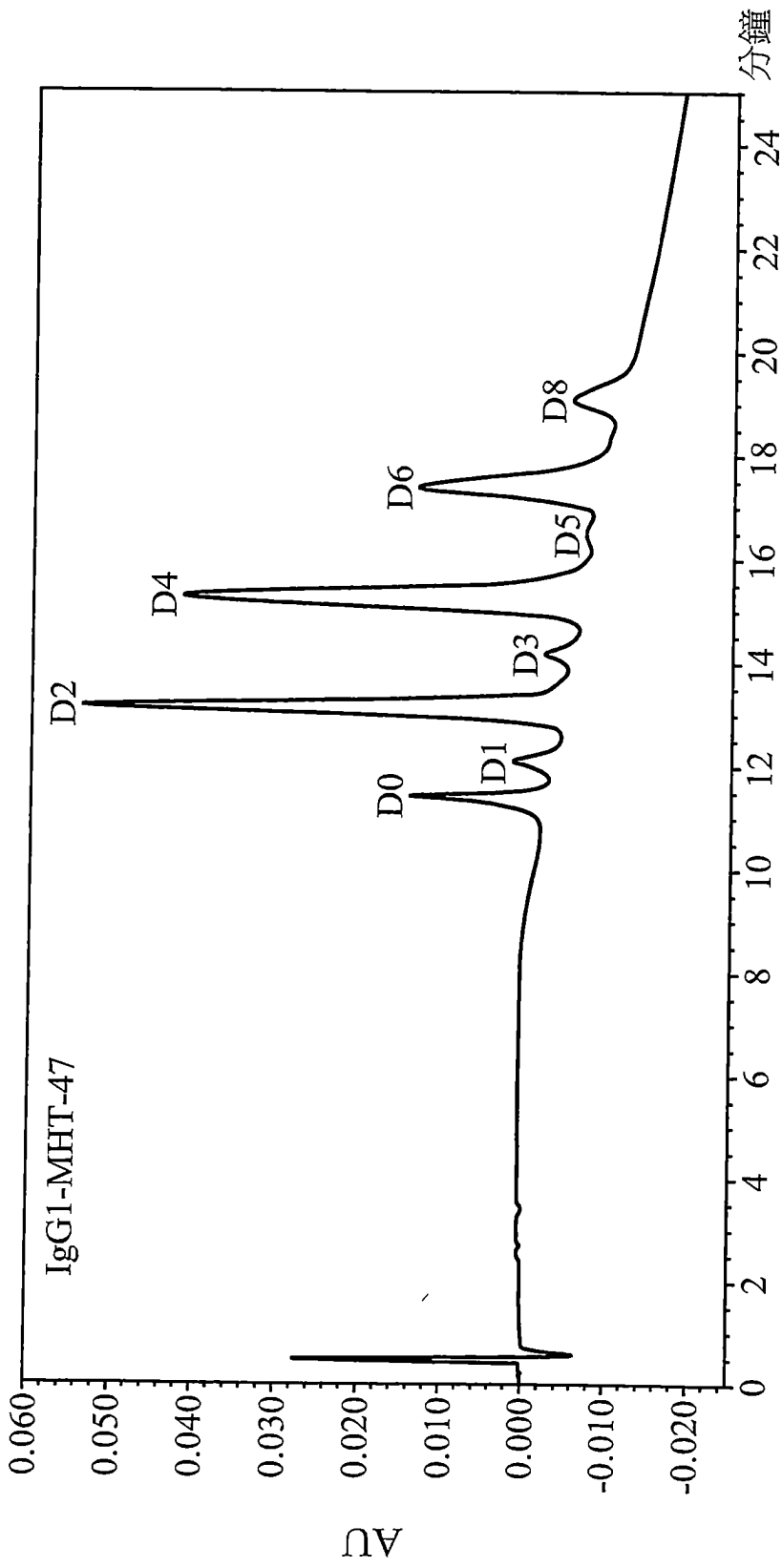
第 2 圖



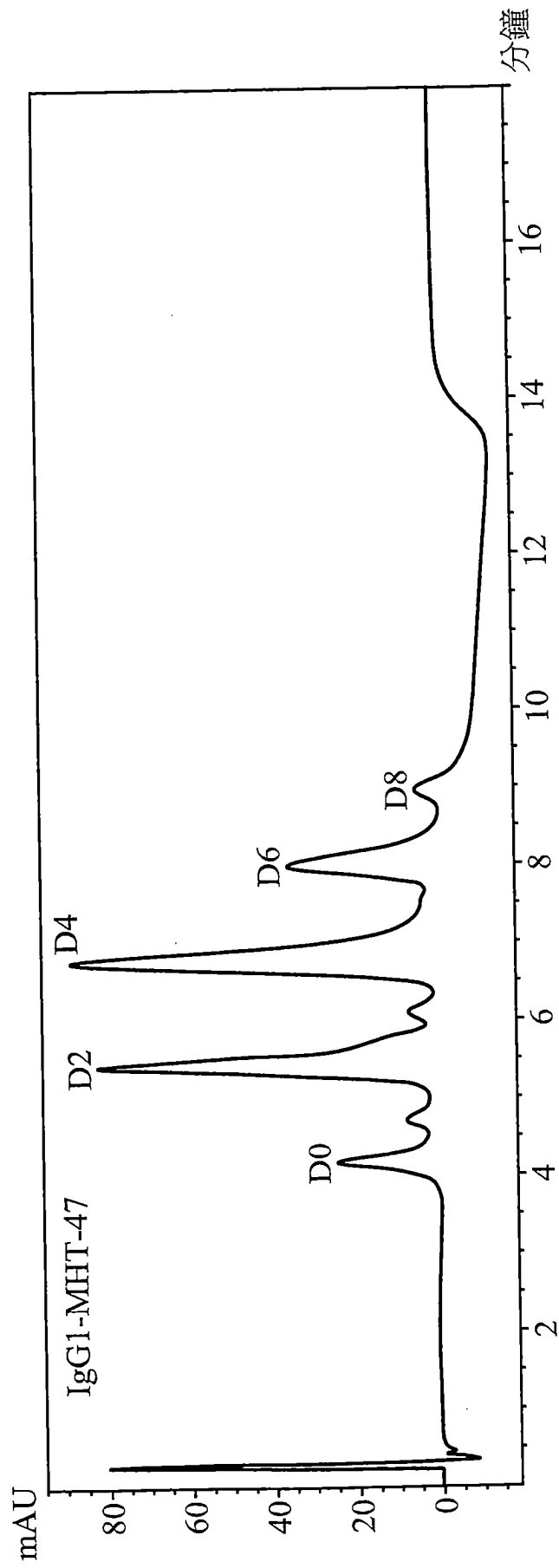
第 3A 圖



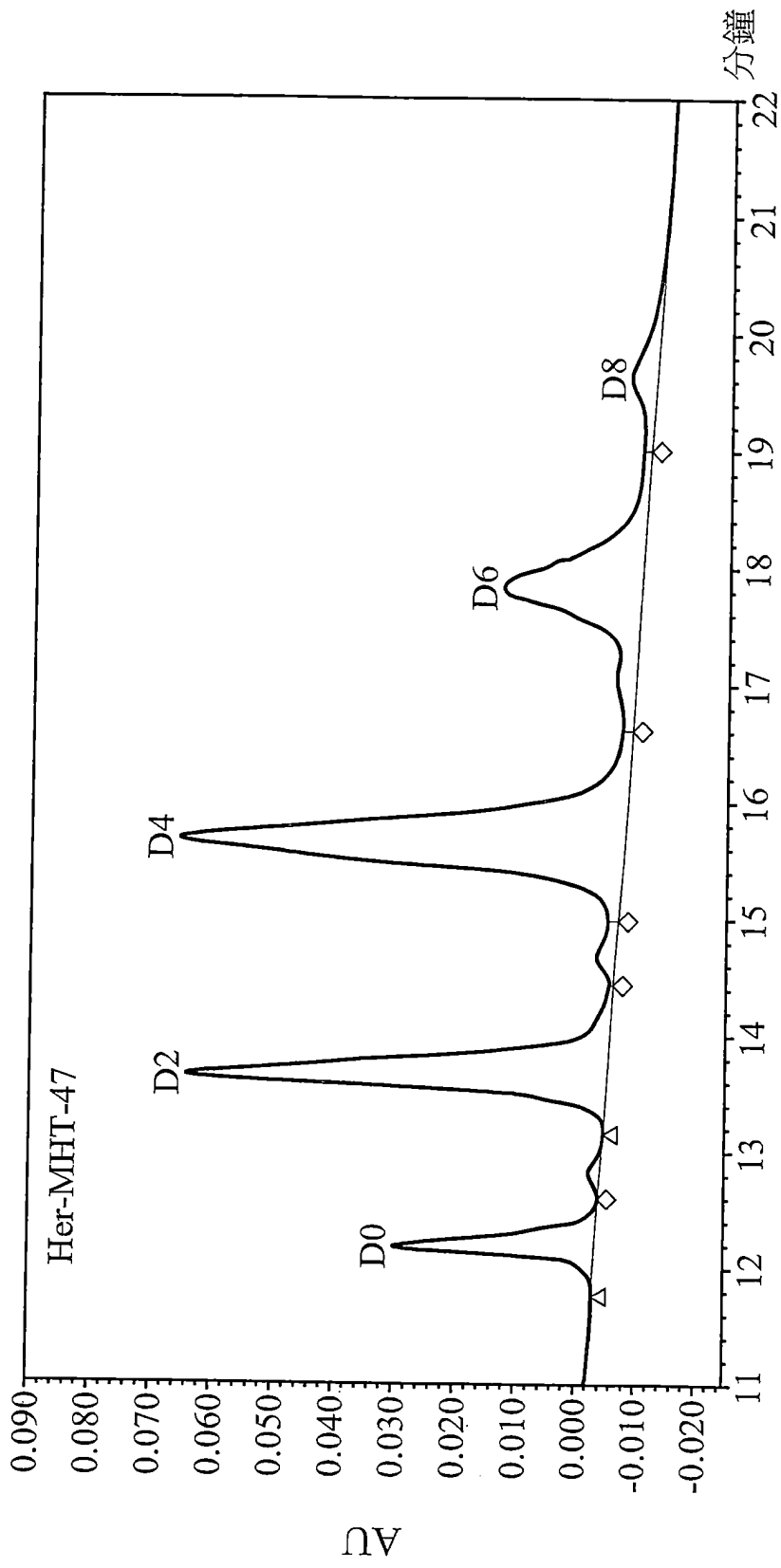
第 3B 圖



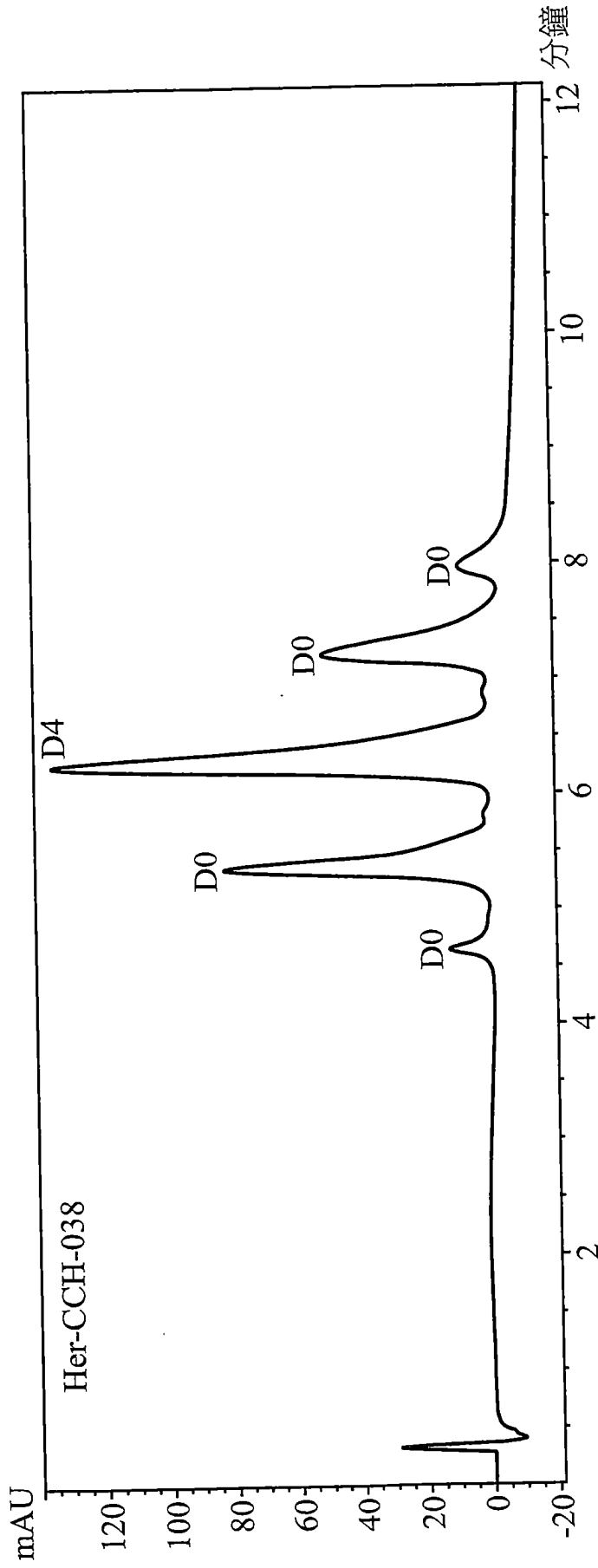
第4圖



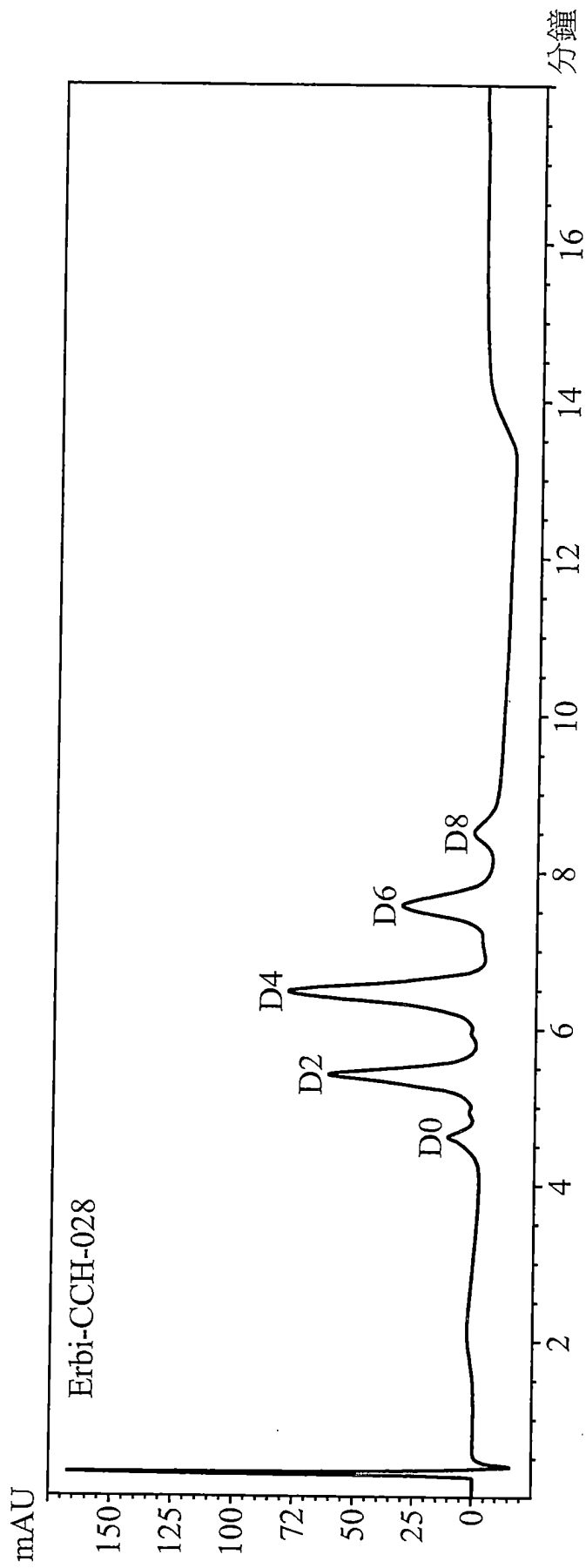
第5圖



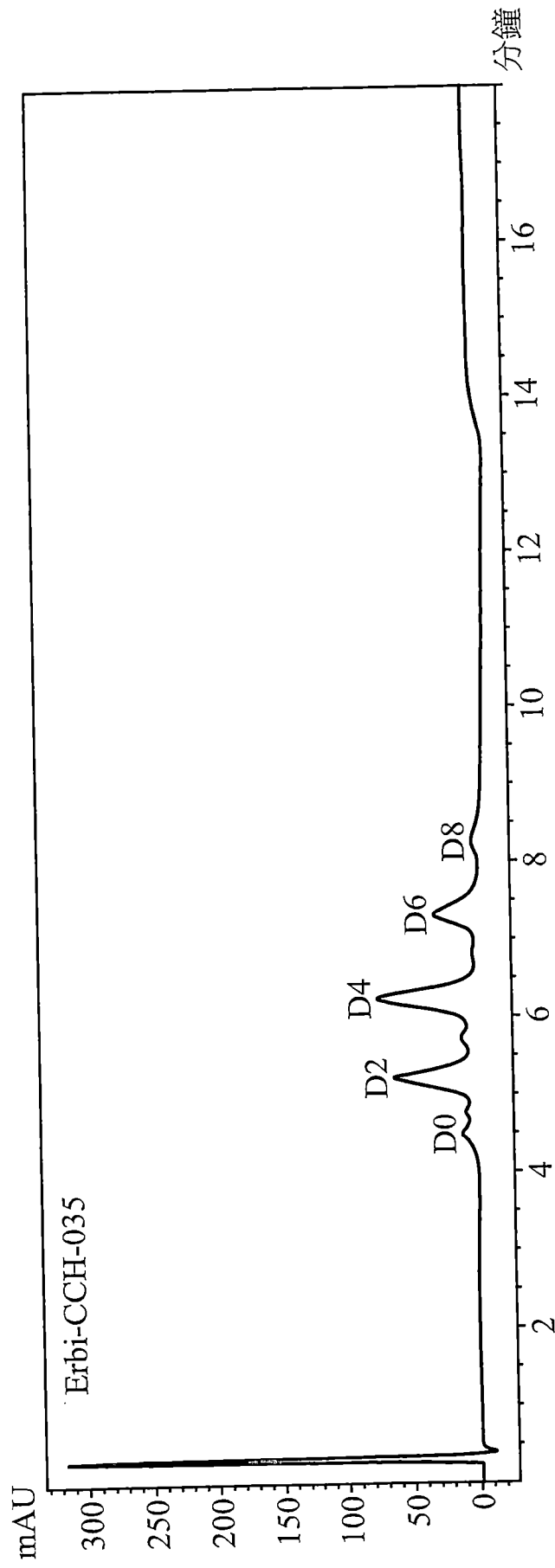
第6圖



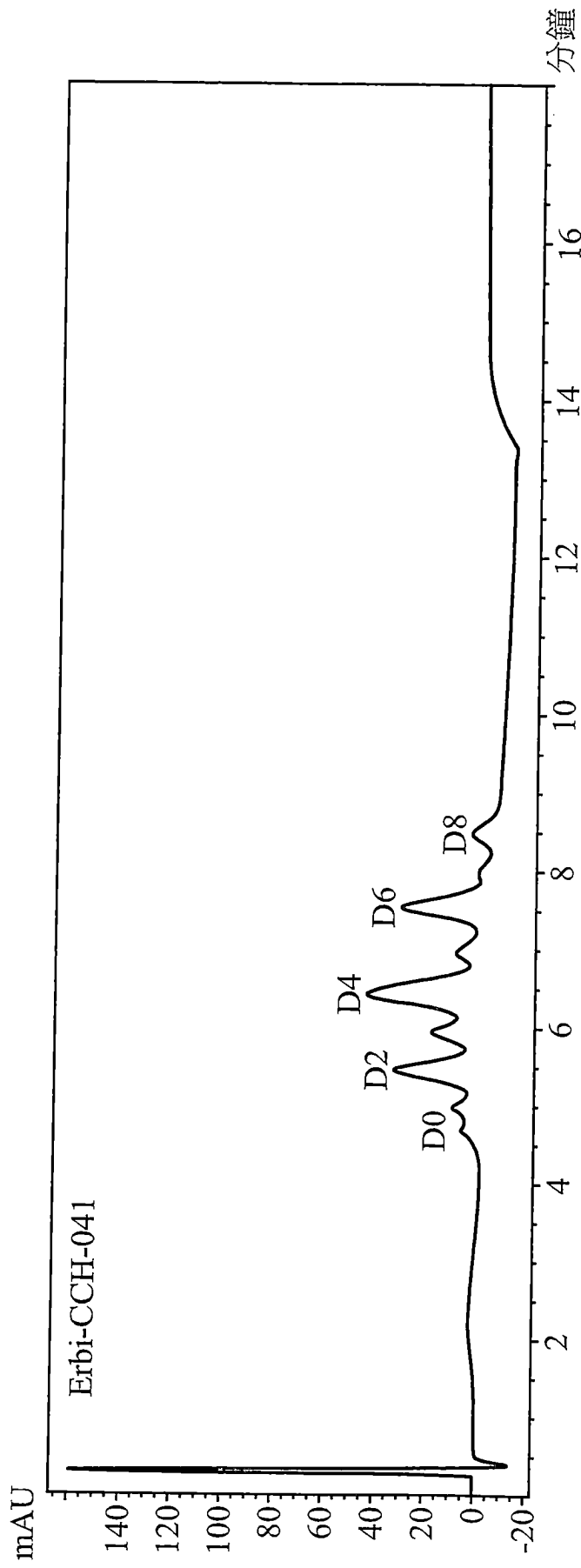
第7圖



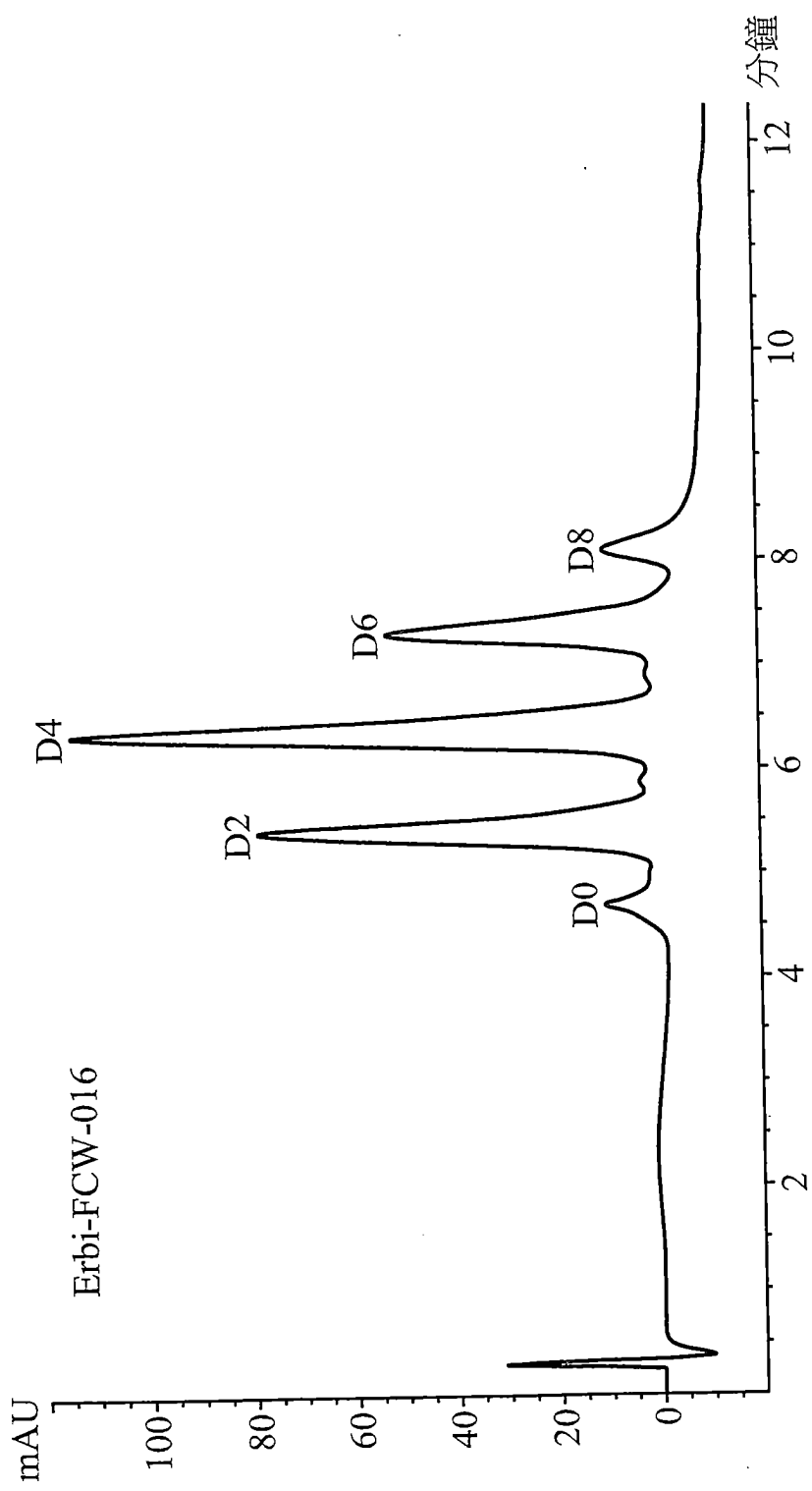
第8圖



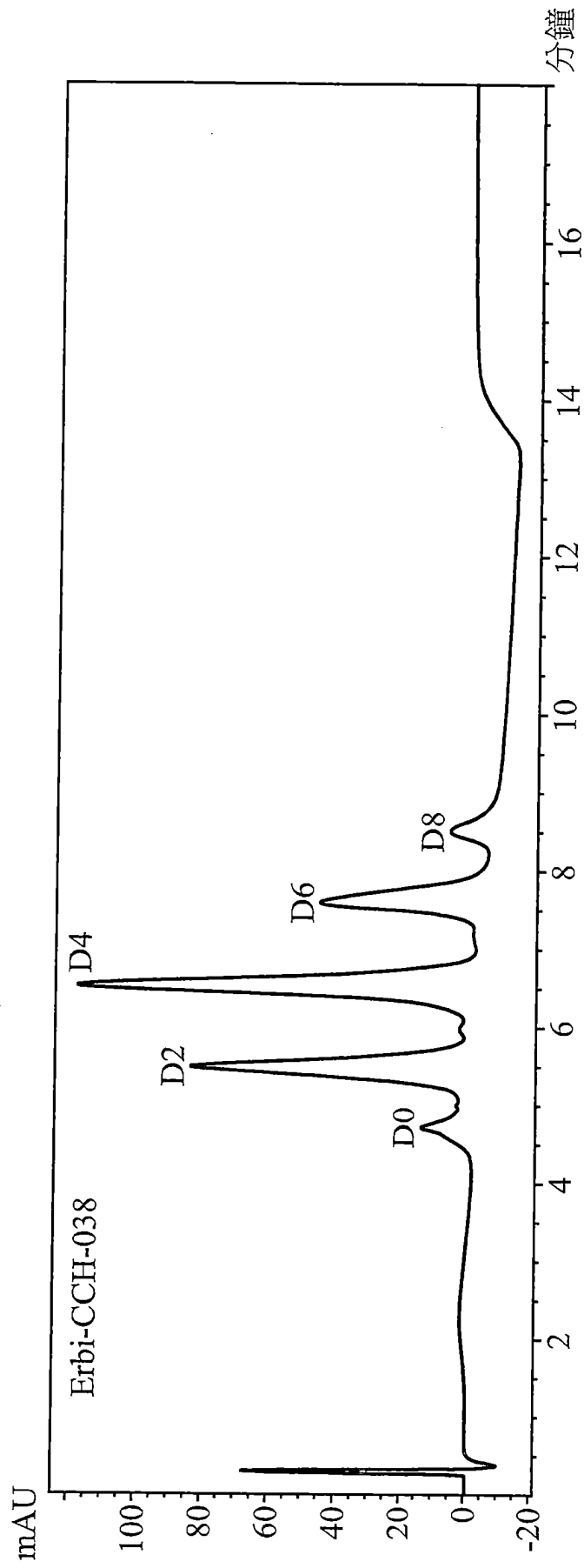
第9圖



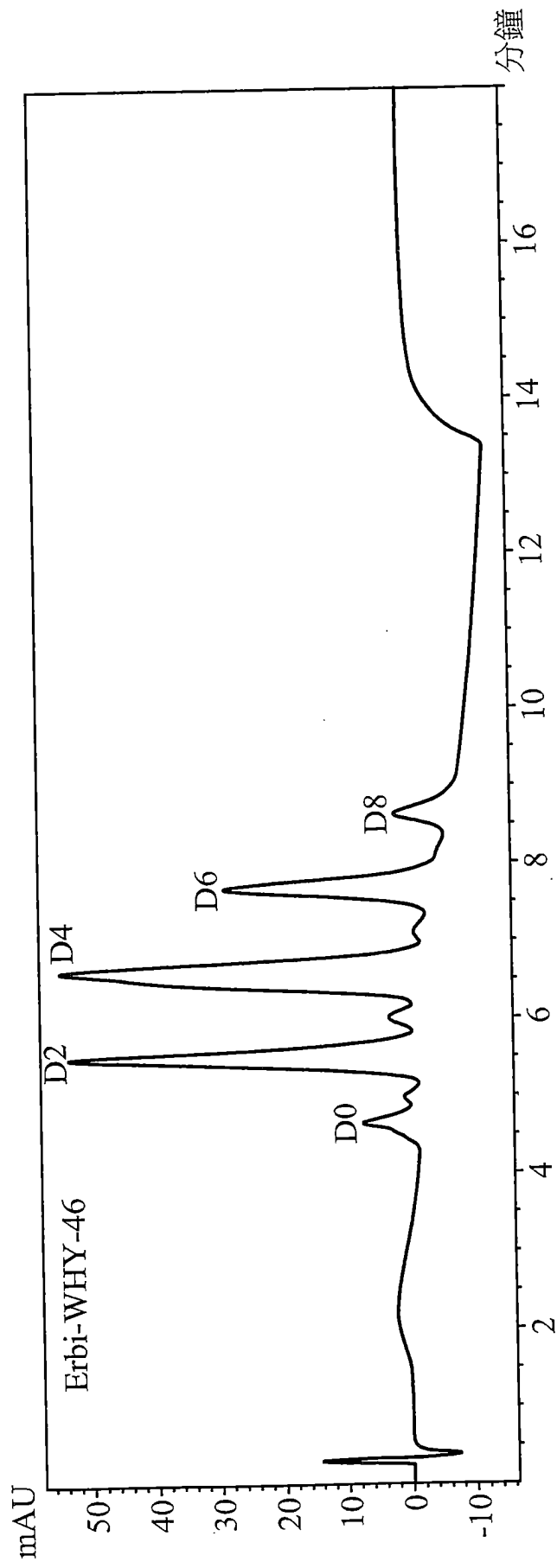
第10圖



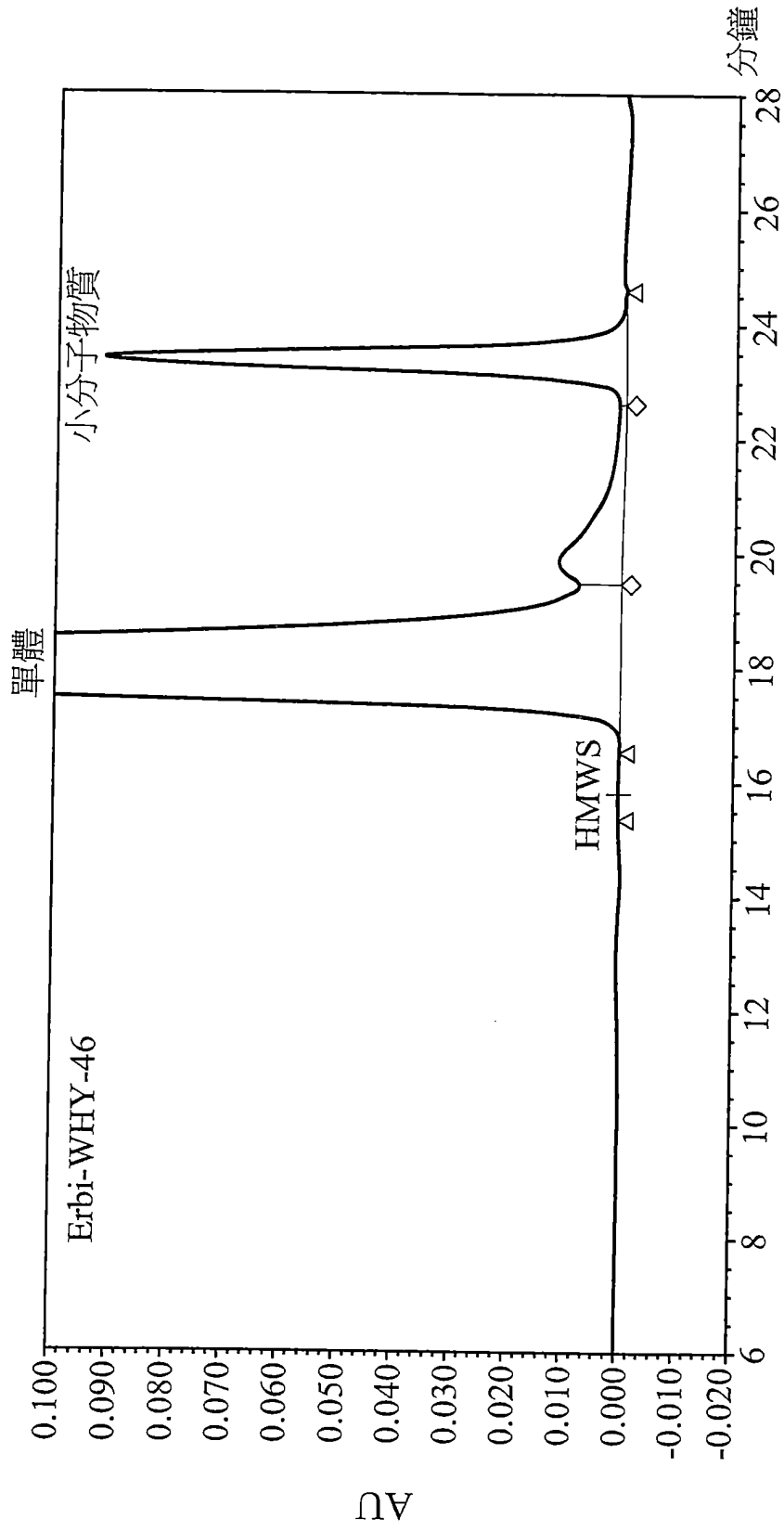
第11圖



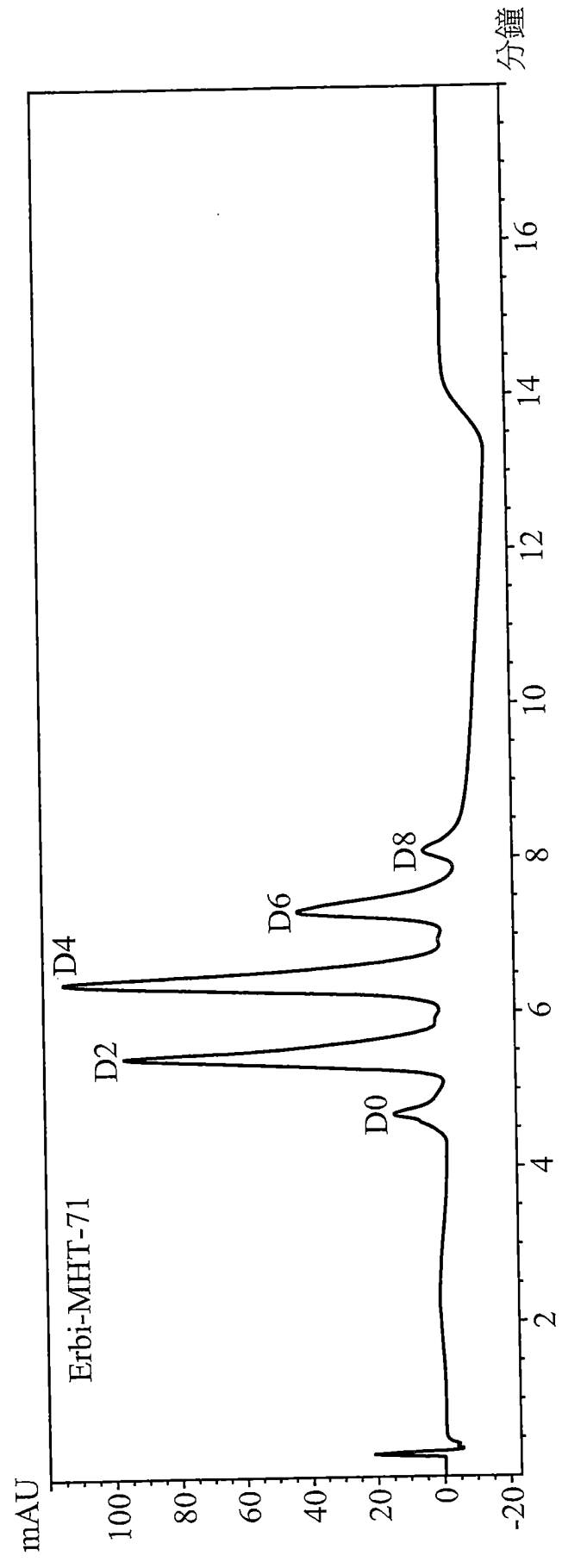
第12圖



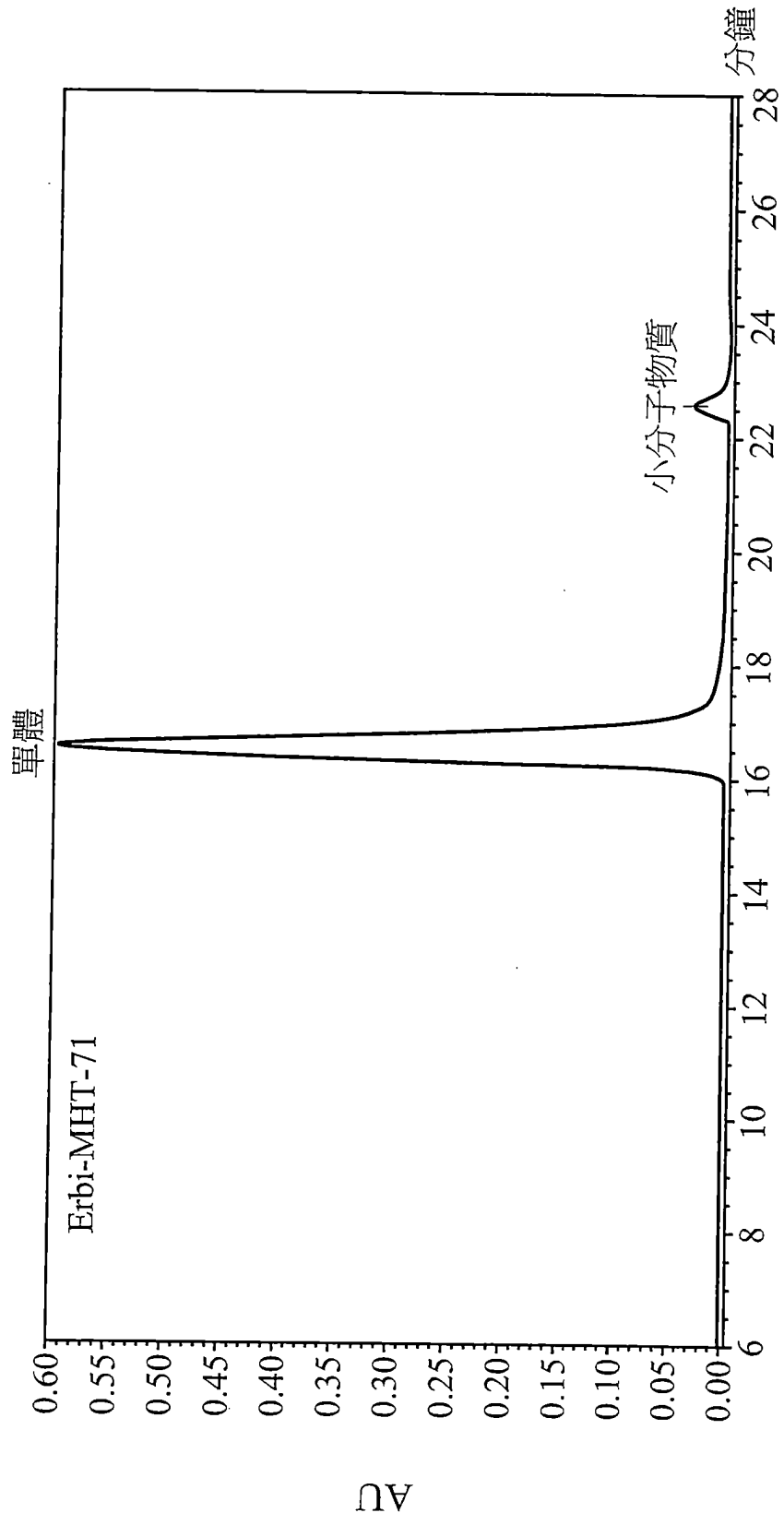
第 13A 圖



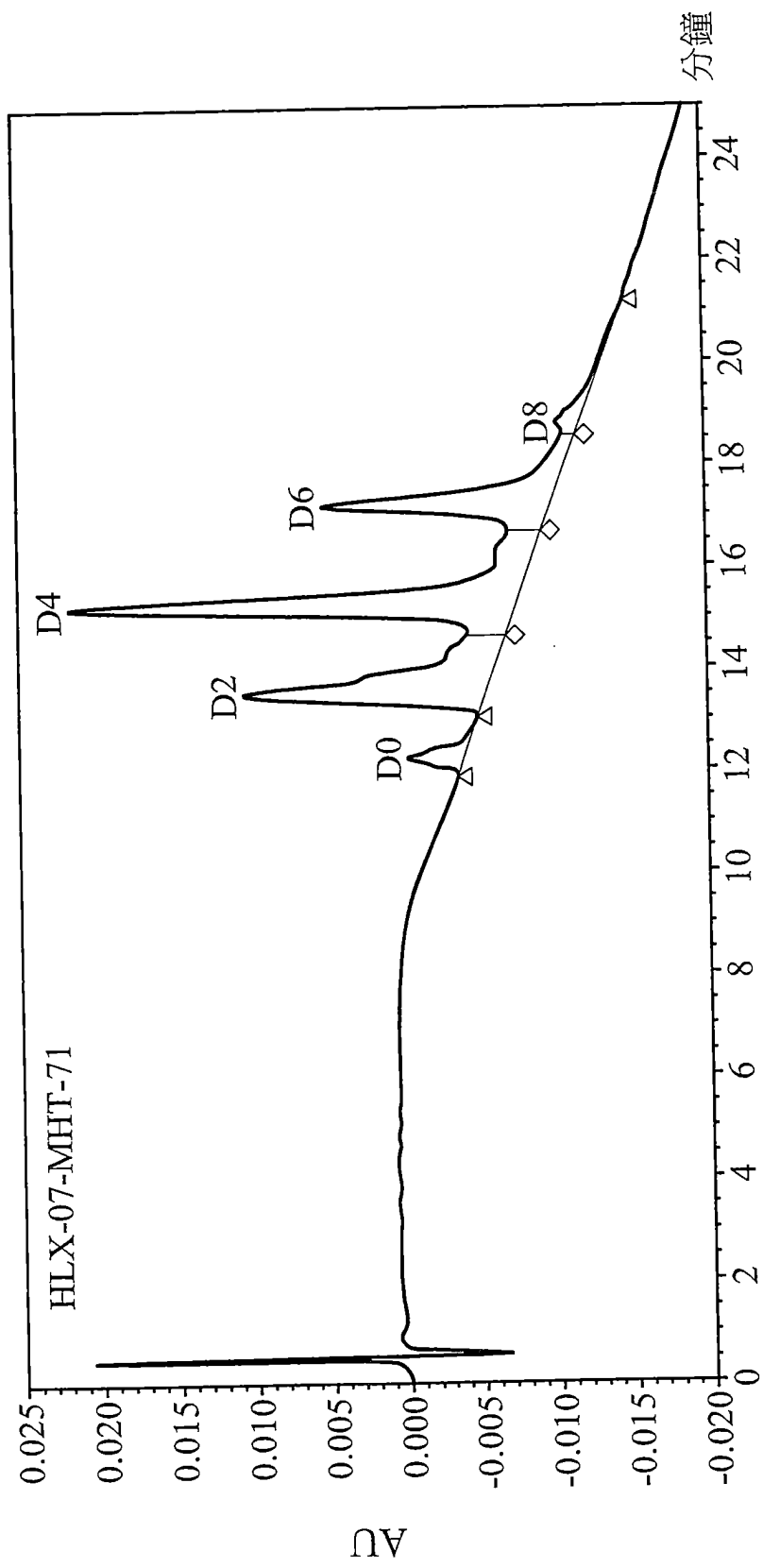
第 13B 圖



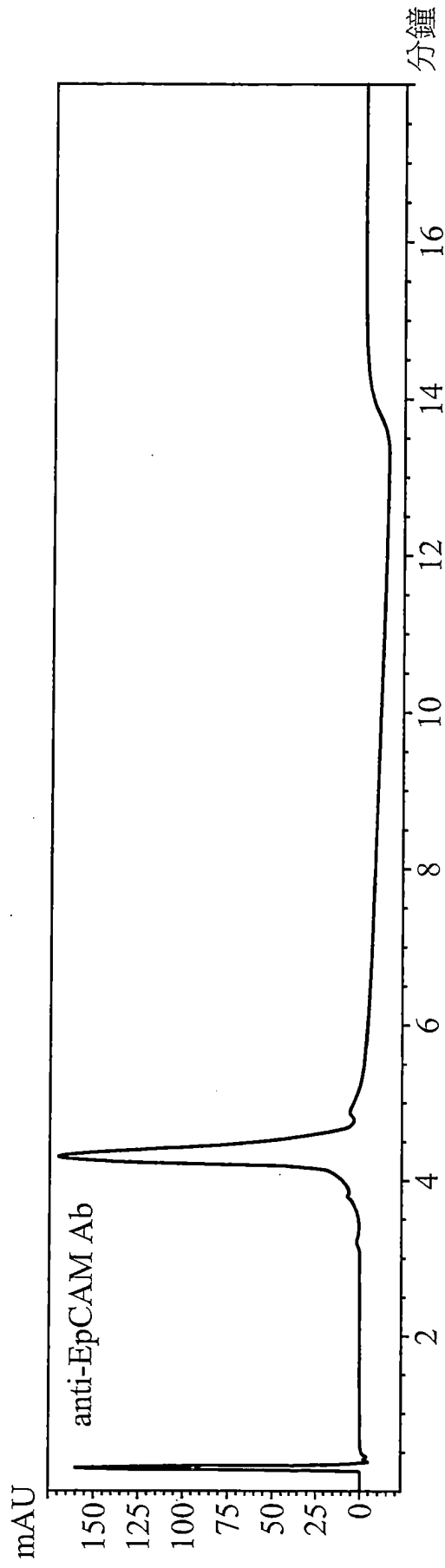
第 14A 圖



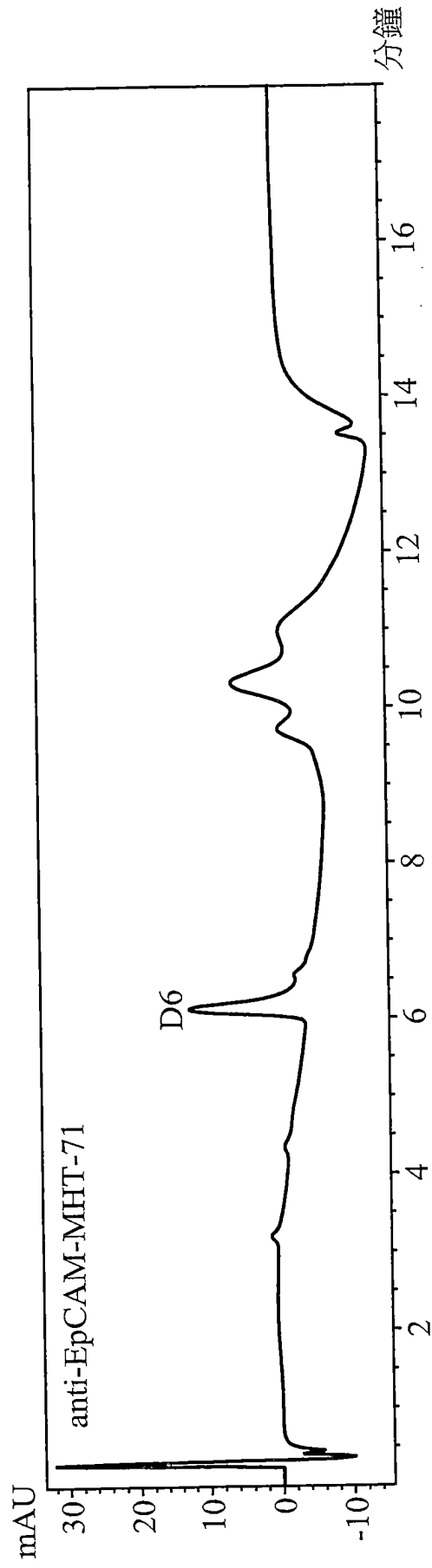
第 14B 圖



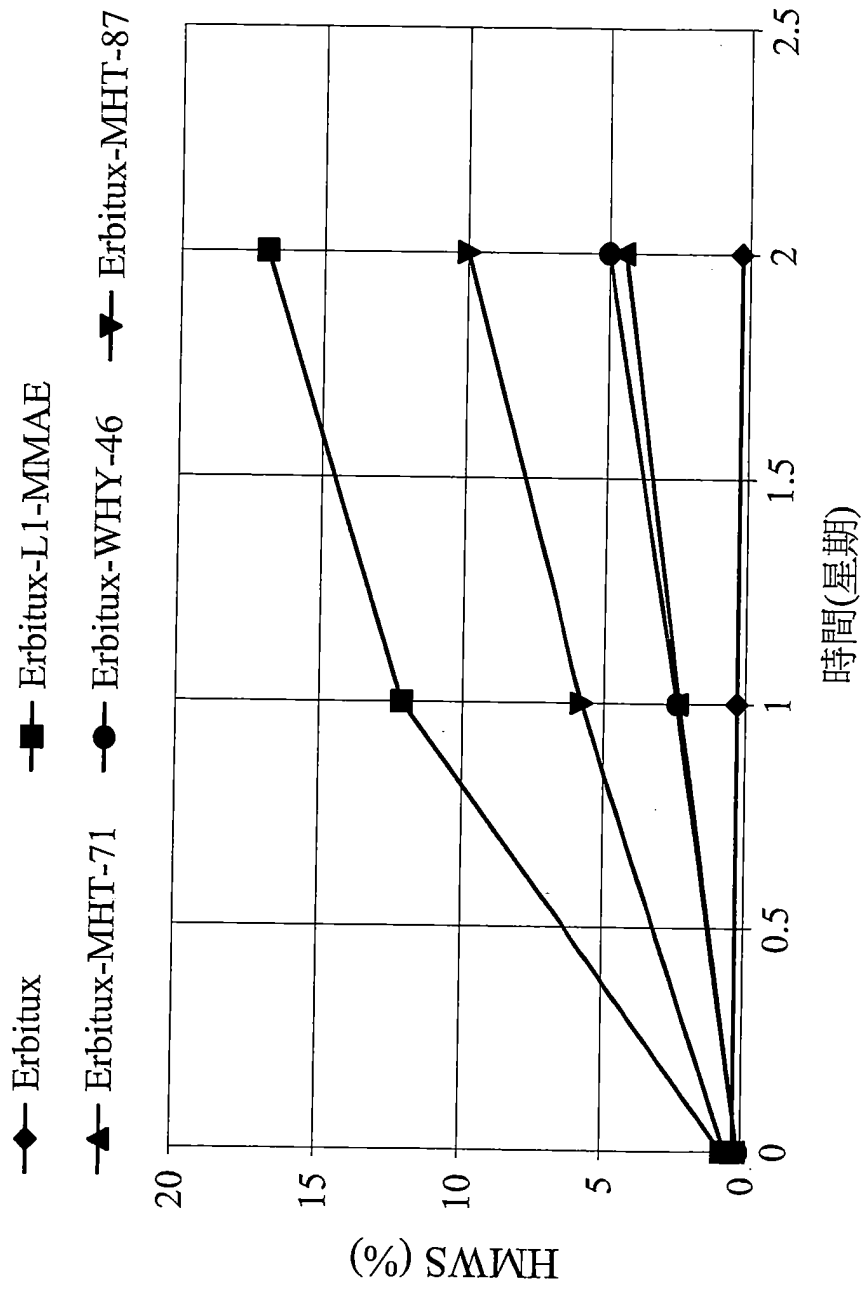
第15圖



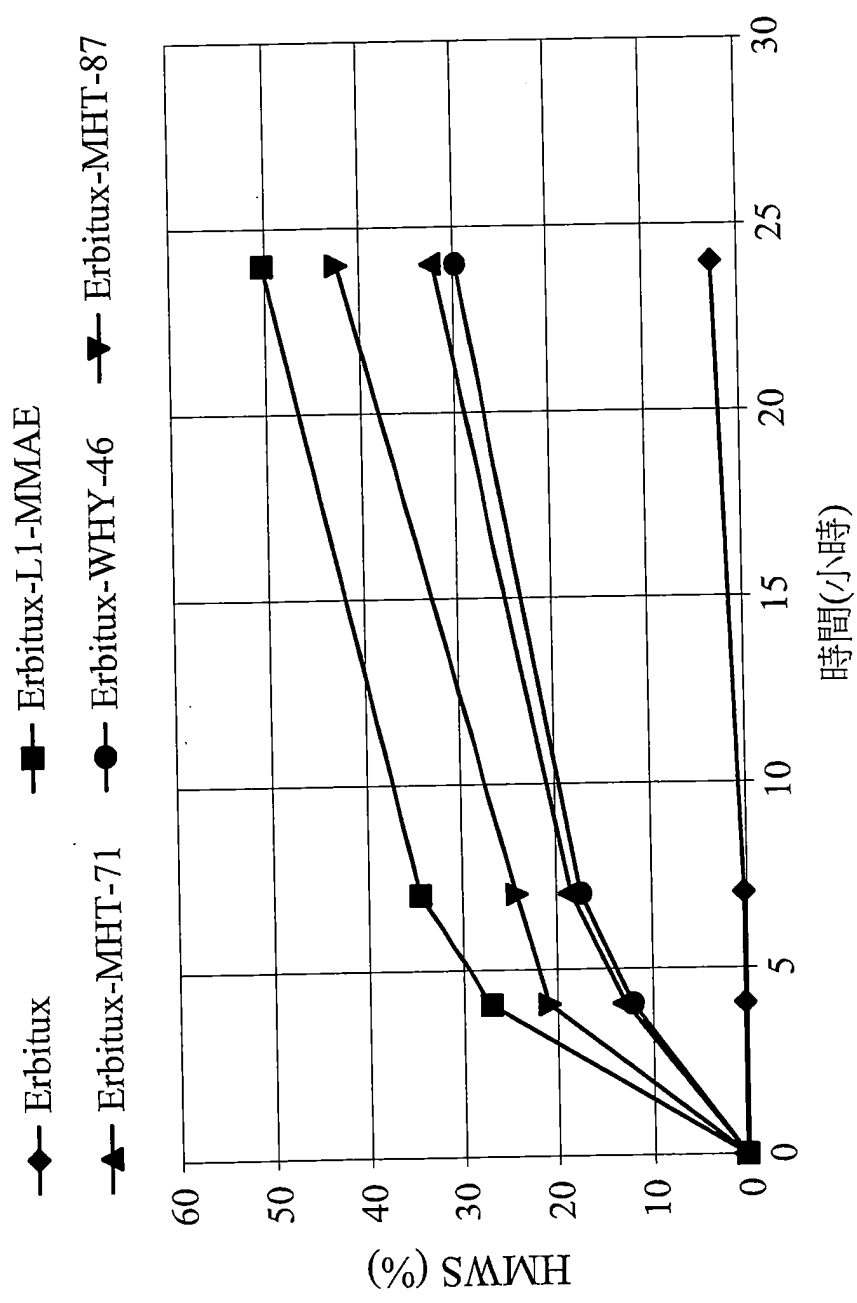
第 16A 圖



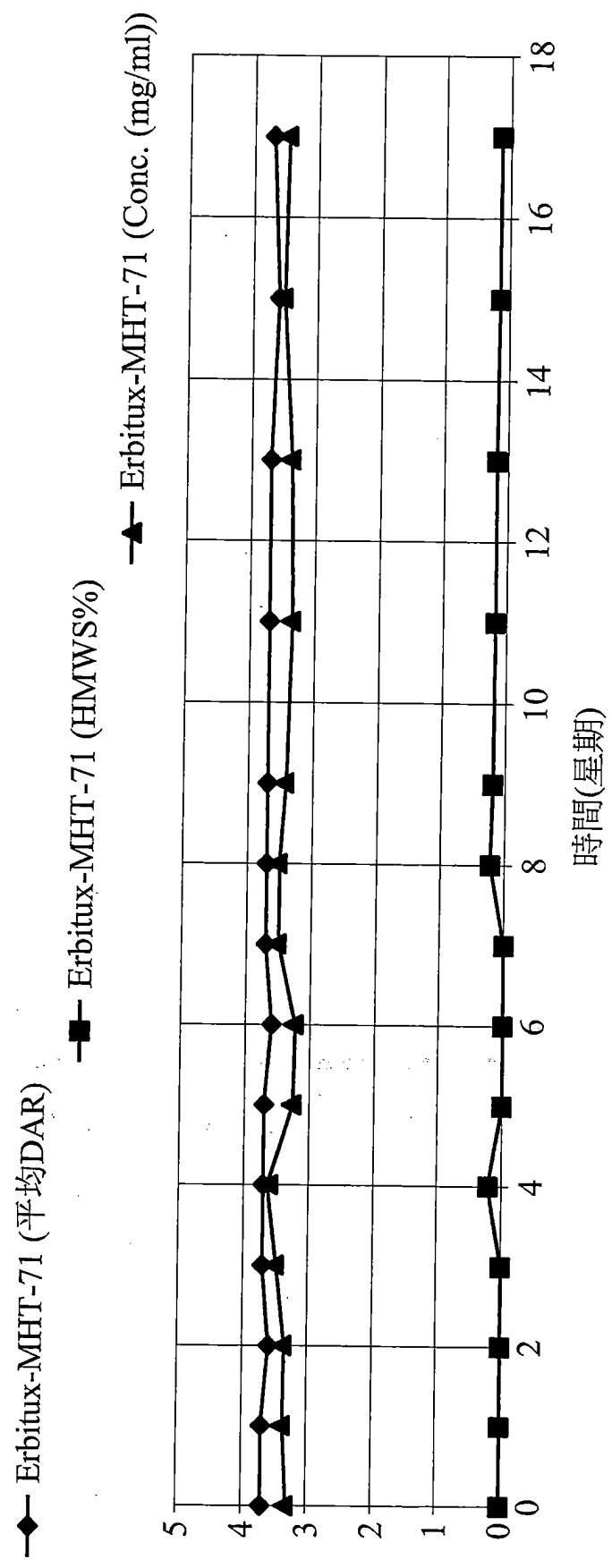
第 16B 圖



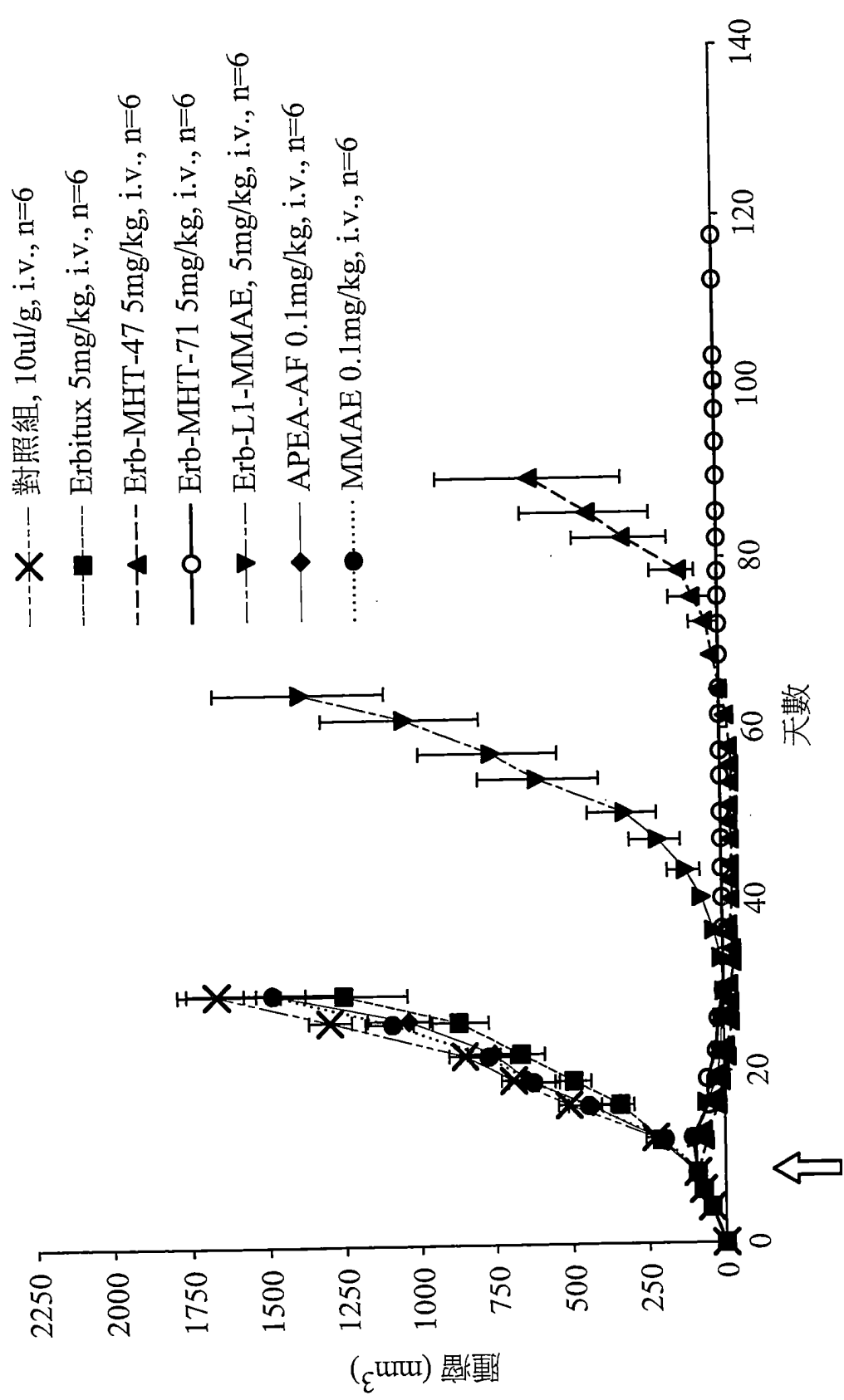
第17A圖



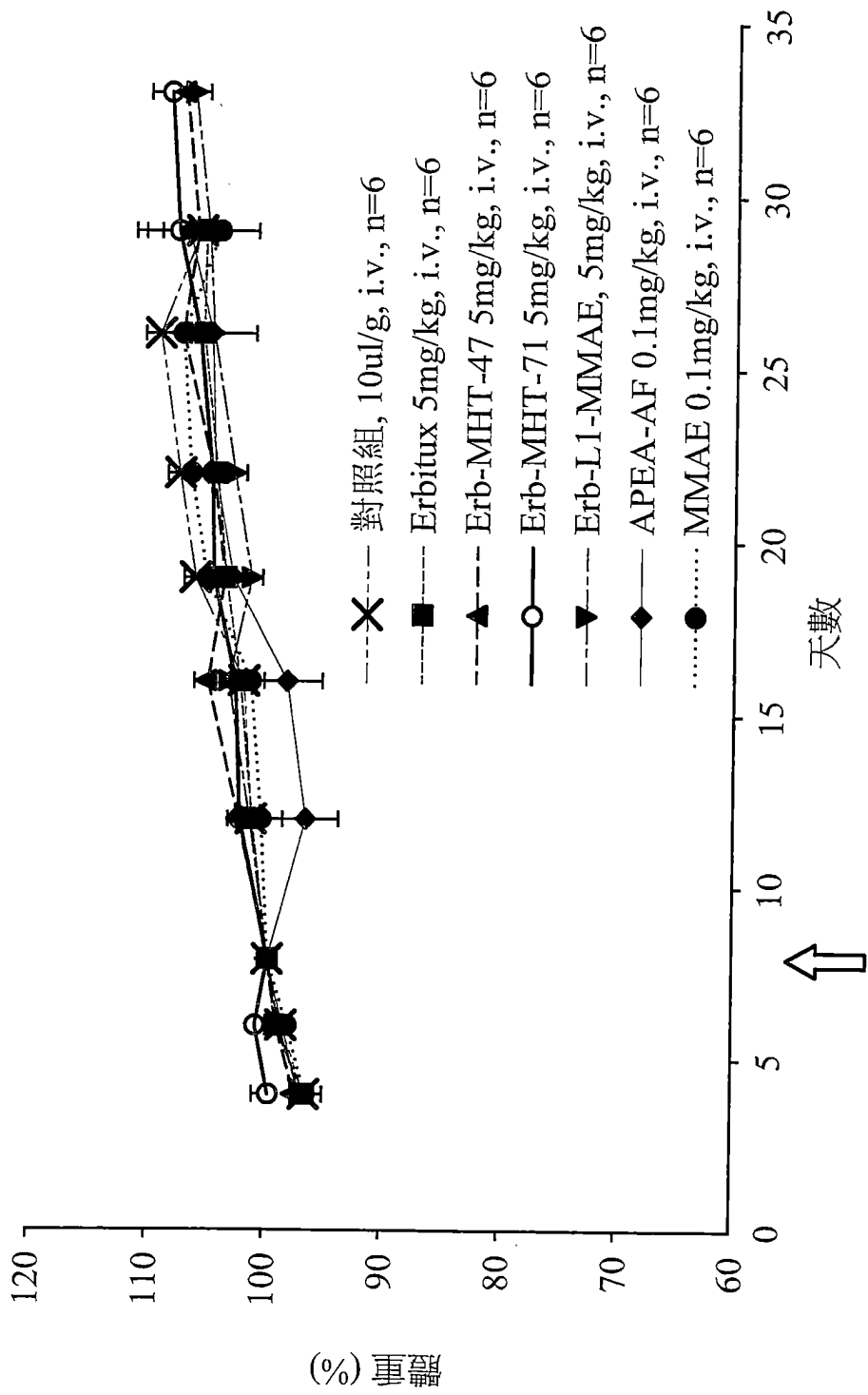
第 17B 圖



第18圖



第19圖



第20圖

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

## 【發明名稱】 抗體藥物複合物及其製造方法

Antibody-drug conjugate (ADC) and method for forming the same

## 【技術領域】

【0001】 本揭露係有關於一種抗體藥物複合物及其製造方法，特別係有關於一種具有醯肼肽連接子單元之抗體藥物複合物及其製造方法。

## 【先前技術】

【0002】 抗體對於相應的抗原具有高度辨識能力，且許多細胞毒性藥物分子因為無法選擇性地毒殺癌細胞而無法用於癌症治療。因此，抗體和高毒性藥物(像是毒素)之間的連接成為具有高度選擇性及專一性的複合藥物。

【0003】 抗體藥物複合物(ADC)是由抗體、連接子和藥物(像是毒素)所組成。然而，由於需以高劑量施予，這些毒素在細胞內的毒性極高( $IC_{50} < 1 \text{ nM}$ )。常用於ADC的毒素之一為海兔毒素(auristatin)衍生物，像是MMAE和MMAF。

【0004】 常用於ADC的連接子之一是MC-Val-Cit。其中，又由Seattle Genetics公司所開發的MC-Val-Cit-PAB系統應用最廣泛。ADC的藥物(像是毒素)都是藉由組織蛋白酶(Cathepsin B)切斷連接子與藥物間的鍵結以釋放出藥物。然而，這些連接子系統的缺點之一是水溶性不佳，導致ADC的接合製程須加入高達20%的有機溶劑作為共溶劑(co-solvent)以溶解連接子-毒素

(linker-toxin)，使得接合製程得以在均相中完成。

【0005】 但是，有機溶劑的引入可能造成抗體變性或聚集，進而導致ADC產率下降或ADC產品失效。此外，有機溶劑去除不完全也可能是最終ADC產品無法通過品質控管的潛在原因之一。

【0006】 因此，發展新穎的藥物抗體複合物(ADC)將有助於達到人類對於抗癌藥物的需求。

### 【發明內容】

【0007】 根據一實施例，本揭露提供一種具有化學式(I)： $A-(L-D)_p$ 之抗體藥物複合物(ADC)或其藥學上可接受鹽類或溶劑化物。於化學式(I)中， $p$ 為介於1~26之整數， $A$ 為一抗體，且 $-(L-D)$ 為一連接子-藥物單元。其中， $L$ 為一具有醯肼肽的連接子單元，且 $D$ 為一藥物單元。其中，抗體藉由抗體之一半胱氨酸殘基連接至連接子單元。

【0008】 根據另一實施例，本揭露提供一種抗體藥物複合物(ADC)的製造方法，包括：使一抗體及一還原劑於一緩衝溶液中反應以形成一第一溶液；於有機相或水相中製備一連接子-藥物單元以形成一第二溶液，其中連接子具有一醯肼肽；進行一接合製程，此接合製程係混合第一溶液和第二溶液以形成一混合溶液，其中混合溶液中之一有機溶劑的濃度介於0% (v/v) 至20% (v/v)；以及純化混合溶液。

【0009】 為讓本揭露之上述和其他目的、特徵與優點能更明顯易懂，下文特舉出較佳實施例，並配合所附圖式，作詳細說明如下：

**【圖式簡單說明】****【0010】**

第1圖為根據本揭露一些實施例顯示抗體藥物複合物(ADC)的製造方法流程圖。

第2圖為根據本揭露一實施例顯示EG12014 -MHT-71的HIC圖譜。

第3A~3B圖為根據本揭露一些實施例顯示EG12014 -MHT-71的HIC圖譜。

第4圖為根據本揭露一實施例顯示IgG1-MHT-47的HIC圖譜。

第5圖為根據本揭露一實施例顯示IgG1-MHT-47的HIC圖譜。

第6圖為根據本揭露一實施例顯示Herceptin®-MHT-47的HIC圖譜。

第7圖為根據本揭露一實施例顯示Herceptin®-CCH-038的HIC圖譜。

第8圖為根據本揭露一實施例顯示Erbixux-CCH-028的HIC圖譜。

第9圖為根據本揭露一實施例顯示Erbixux-CCH-035的HIC圖譜。

第10圖為根據本揭露一實施例顯示Erbixux-CCH-041的HIC圖譜。

第11圖為根據本揭露一實施例顯示Erbixux-FCW-016的HIC圖譜。

第12圖為根據本揭露一實施例顯示Erbitux-CCH-038的HIC圖譜。

第13A圖為根據本揭露一實施例顯示Erbitux-WHY-46的HIC圖譜。

第13B圖為根據本揭露一實施例顯示Erbitux-WHY-46的SEC圖譜。

第14A圖為根據本揭露一實施例顯示Erbitux-MHT-71的HIC圖譜。

第14B圖為根據本揭露一實施例顯示Erbitux-MHT-71的SEC圖譜。

第15圖為根據本揭露一實施例顯示HLX-07-MHT-71的HIC圖譜。

第16A圖為根據本揭露一實施例顯示未接合之抗-EpCAM 抗體的HIC圖譜。

第16B圖為根據本揭露一實施例顯示接合之抗-EpCAM-MHT-71的HIC圖譜。

第17A圖為根據本揭露一些實施例顯示Erbitux和Erbitux-ADCs於40°C進行熱穩定性測試的結果。

第17B圖為根據本揭露一些實施例顯示顯示Erbitux和Erbitux-ADCs於50°C進行熱穩定性測試的結果。

第18圖為根據本揭露一些實施例顯示液態Erbitux- MHT-71於4°C進行儲存安定性測試的結果。

第 19 圖為根據本揭露一些實施例顯示經注射 Erbitux、Erbitux-ADCs、APEA-AF、及 MMAE 小鼠之腫瘤生長抑制測試的結果。

第 20 圖為根據本揭露一些實施例顯示經注射 Erbitux、Erbitux-ADCs、APEA-AF、及 MMAE 小鼠之體重變化結果。

### 【實施方式】

【0011】 本揭露提供一種具有較高水溶性之新穎連接子-毒素的抗體藥物複合物(ADC)。在抗體藥物複合物(ADC)的接合製程中，大幅降低或甚至避免有機溶劑的使用，進而降低抗體藥物複合物(ADC)的聚集作用並改善有機溶劑殘留的問題。因此，本揭露提供之抗體藥物複合物(ADC)的穩定性提高。

【0012】 上述之新穎連接子-毒素經設計將醣基團像是五碳醣(例如：核糖、木糖、阿拉伯糖)及六碳糖(例如：胺醣或葡萄糖)導入雙胜肽連接子中，例如：Val-Cit、Phe-Cit等組織蛋白酶(Cathepsin B)可辨識之雙胜肽連接子。換句話說，新穎的連接子-毒素包括具有醣胺基酸的連接子，其C端具有組織蛋白酶(Cathepsin B)可辨識之雙胜肽，其N端具有高度親水性的醣胺基酸以提升連接子或包含此連接子物質的水溶性。連接子C端的羧基和N端的胺基酸基團可作為連接間隔基(attaching spacers)、連接子、配體、藥物、毒素、成像分子(imaging molecules)、抗體、胜肽、或傳遞分子的連接點。

【0013】 在本揭露中，將數種抗體與具有醣胺基酸的連接子-毒素進行接合以形成新穎的抗體藥物複合物(ADC)。於一實

施例中，本揭露提供一種具有化學式(I)之抗體藥物複合物(ADC)或其藥學上可接受鹽類或溶劑化物。

【0014】  $A-(L-D)_p$  (I)

【0015】 於化學式(I)中，A代表一抗體。於一些實施例中，所述抗體可為一全長抗體或一抗體片段。於一些實施例中，所述抗體可為一嵌合抗體或其功能活性片段、一人類化抗體或其功能活性片段、一人類抗體或其功能活性片段、或一小鼠抗體或其功能活性片段。於其他實施例中，所述抗體亦可為上述物種以外之其他物種之抗體或其其功能活性片段，例如：大鼠抗體或其功能活性片段、羊抗體或其功能活性片段、兔子抗體或其功能活性片段。於一些實施例中，所述抗體藉由所述抗體之半胱氨酸殘基連接至一連接子單元(L)。在一些實施例中，所述抗體可為一治療性抗體，用以治療腫瘤、慢性淋巴球性白血病(chronic lymphocytic leukemia; CLL)、或急性骨髓性白血病(acute myeloid leukemia; AML)。於一些特定的實施例中，所述抗體可包括如 Herceptin、Erbix、HLX-07、EG12014、抗-EpCAM 抗體、IgG1、Rituximab、Ibritumomab tiuxetan、Tositumomab、Alemtuzumab、IGN101、Adecatumumab、Labetuzumab、huA33、Pemtumomab、Oregovomab、CC49 (minretumomab)、cG250、J591、MOv18、MORAb-003 (farletuzumab)、3F8、ch14.18、KW-2871、hu3S193、IgN311、Bevacizumab、IM-2C6、CDP791、Etaracizumab、Volociximab、Cetuximab、Panitumumab、Nimotuzumab、806、Trastuzumab、Pertuzumab、MM-121、AMG 102、METMAB、SCH 900105、

AVE1642、IMC-A12、MK-0646、R1507、CP 751871、KB004、IIIA4、Mapatumumab (HGS-ETR1)、HGS-ETR2、CS-1008、Denosumab、Sibrotuzumab、F19、或 81C6。然而，應注意的是，上述抗體僅為示例，而非用於限制本揭露之範疇。只要抗體的鏈間雙硫鍵可被還原成游離硫醇(free thiols)以與連接子接合，任何合適的抗體都可用於本揭露。

【0016】於一實施例中，抗體可為多株抗體或單株抗體。抗體可為特定的抗原決定位，包括例如：癌症細胞抗原、病毒抗原、微生物抗原、蛋白質、胜肽、碳水化合物、化學物質、核酸、或其片段。多株抗體的製造方法為本技術領域所習知。單株抗體(mAb)至感興趣的抗原可利用任何本技術領域習知的技術製備而成。這些技術包括但不限於例如最初由Köhler和Milstein所描述的融合瘤技術(1975, Nature 256, 495-497)、人類B細胞融合瘤技術(Kozbor et al., 1983, Immunology Today 4:72)、EBV-融合瘤技術(Cole et al., 1985, 單株抗體及癌症療法, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96)。這種抗體可為任何一種免疫球蛋白類型，包括IgG、IgM、IgE、IgA、及IgD，及其任何亞型。本揭露中由融合瘤所產生之單株抗體(mAb)可於體外(*in vitro*)或體內(*in vivo*)進行培養。

【0017】單株抗體可為例如：人類單株抗體、人類化單株抗體、抗體片段、或嵌合抗體(例如：人類-小鼠抗體)。人類單株抗體可由任何本技術領域習知的技術製造(例如：Teng et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:7308-7312; Kozbor et al., 1983, Immunology Today 4:72-79; and Olsson et al., 1982, Meth.

Enzymol. 92:3-16)。

【0018】 抗體也可為一雙特異性抗體。雙特異性抗體的製造方法為本技術領域所習知。全長雙特異性抗體的傳統製造方法是基於兩個免疫球蛋白的重鏈-輕鏈對的共現性(coexpression)，其中這兩個鏈具有不同的特異性(參見例如：Milstein et al., 1983, Nature 305:537-539; 國際公開號No. WO 93/08829, Traunecker et al., 1991, EMBO J. 10:3655-3659)。

【0019】 根據不同的方式(approach)，具有結合特異性的抗體變異區域(抗體-抗原結合位)融合至免疫球蛋白恆定區域的序列所述融合較佳具有一免疫球蛋白重鏈恆定區域，包括至少一部份的鉸鏈區域、CH2區域、及CH3區域。較佳具有第一重鏈恆定區域(CH1)，其包含輕鏈結合所必須的位點，存在於至少一個融合中。具有編碼免疫球蛋白重鏈融合以及，若需要，免疫球輕鏈的核酸，被插入至單獨的表現載體中，並且共同轉染至合適的宿主生物(organism)。當使用了比例不均等的三個多胜肽鏈之構築提供最佳產量時，其提供了調整三個多胜肽片段於實施例中相互比例的彈性。然而，當至少兩個多胜肽鏈的表現為相等比例導致高產量或當各比例沒有特別明顯時，有可能在一個表現載體中插入兩個或所有三個多胜肽鏈的編碼序列。

【0020】 例如，雙特異性抗體可具有一雜交免疫球蛋白鏈，在其中一臂中具有第一結合特異性，且在另外一臂中具有一雜交免疫球蛋白重鏈-輕鏈對(提供第二結合特異性)。這種不對稱的結構有助於所期望的雙特異性化合物從不想要的免疫球蛋

白鏈結合中分離，由僅存在於一個半的雙特異性分子中的免疫球蛋白輕鏈提供容易的分離方式(國際公開號 No.WO 94/04690)，其整體併入本文做為參考。

【0021】更詳細之雙特異性抗體的產生可參見例如 Suresh et al., 1986, *Methods in Enzymology* 121:210; Rodrigues et al., 1993, *J. Immunology* 151:6954-6961; Carter et al., 1992, *Bio/Technology* 10:163-167; Carter et al., 1995, *J. Hematotherapy* 4:463-470; Merchant et al., 1998, *Nature Biotechnology* 16:677-681。利用這些技術，可製備出雙特異性抗體用於治療或避免本文所述之疾病。

【0022】雙功能抗體也被描述於歐洲專利公開號 EPA 0105 360。如此參考文獻所揭露，雜交或雙功能抗體可生物性地(即，藉由細胞融合技術)或化學性地衍生，特別係透過交聯劑或是二硫化橋鍵形成試劑，且可包括整個抗體或其片段。獲得這種雜交抗體的方法揭露於例如：國際公開號 WO 83/03679 及歐洲專利公開號 EPA 0217577，兩者皆在此併入本文作為參考。

【0023】抗體也可為功能性活性片段、抗體的衍生物或類似物，其中該抗體免疫特異性地結合至目標抗原(例如：癌症抗原、病毒抗原、微生物抗原、或其他結合至細胞或基質的抗體)。在此，“功能性活性”代表所述片段、衍生物或類似物可辨認相同的抗原，辨認衍生自抗原的片段、衍生物或類似物的抗體。特別地，於一實施例中，免疫球蛋白分子的遺傳性型(idiotype)的抗原性可藉由刪除框架及 CDR 序列而提升，所述 CDR 序列為 C-端的 CDR 序列，其專一性地辨認抗原。為了判斷

哪一個 CDR 序列結合至抗原，可在結合試驗(binding assay)中使用包含 CDR 序列的合成胜肽，以及任何結合試驗中本技術領域所習知的抗原(例如：BIA core assay)(參見例如：Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md.; Kabat et al., 1980, J. Immunology 125(3):961-969)。

【0024】 其他有用的抗體包括抗體的片段，例如但不限於：F(ab')<sub>2</sub> 片段、Fab 片段、Fab'、Fv 片段及抗體的重鏈及輕鏈二聚體、或其任何最小片段像是 Fvs 或單鏈抗體(SCAs) (例如：U.S. Pat. No. 4,946,778; Bird, 1988, Science 242:423-42; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; and Ward et al., 1989, Nature 334:544-54 中所述)。

【0025】 也可使用重組抗體，像是嵌合或人類化單株抗體，包括人類和非人類蛋白質，皆可利用標準重組 DNA 技術製備(參見例如 U.S. Pat. No. 4,816,567; 及 U.S. Pat. No. 4,816,397)。

人類化抗體為來自非人類物種的抗體分子，具有來自非人類物種的一或多種互補決定區(complementarity determining regions; CDRs)以及來自人類免疫球蛋白分子的框架區域(參見例如 U.S. Pat. No. 5,585,089)。嵌合和人類化單株抗體可藉由本技術領域習知的重組 DNA 技術產生，例如使用國際公開號 WO 87/02671；歐洲專利公開號 0184187；歐洲專利公開號 0171496；歐洲專利公開號 0173494；國際公開號 WO 86/01533；U.S. Pat. No. 4,816,567；歐洲專利公開號 012023；Berter et al., 1988, Science 240:1041-1043; Liu et al., 1987, Proc. Natl. Acad.

Sci. USA 84:3439-3443; Liu et al., 1987, J. Immunol. 139:3521-3526; Sun et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimura et al., 1987, Cancer. Res. 47:999-1005; Wood et al., 1985, Nature 314:446-449; Shaw et al., 1988, J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559; Morrison, 1985, Science 229:1202-1207; Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214; U.S. Pat. No. 5,225,539; Jones et al., 1986, Nature 321:552-525; Verhoeyan et al., 1988, Science 239:1534; and Beidler et al., 1988, J. Immunol. 141:4053-4060所述的方法。

【0026】 也可使用完整的人類抗體。人類抗體可利用例如無法表現內源性免疫球蛋白重鏈和輕鏈基因的轉基因小鼠，但其可以表現人類重鏈和輕鏈基因。轉基因小鼠在常態下(in the normal fashion)以經選擇之抗原免疫，例如：本揭露全部或部分的多胜肽。直接對抗抗原的單株抗體可利用傳統融合瘤技術獲得。轉基因小鼠包含的人類免疫球蛋白轉基因在B細胞分化時重新排序(rearrange)，且接著進行類型轉換及體細胞突變。因此，利用這種技術，將可能產生有治療效果的IgG、IgA、IgM及IgE抗體。綜觀產生人類抗體的技術可參見Lonberg and Huszar (1995, Int. Rev. Immunol. 13:65-93)。關於產生人類抗體的技術及產生此種抗體的規定之更詳細討論可參見例如：U.S. Pat. Nos. 5,625,126; 5,633,425; 5,569,825; 5,661,016;以及5,545,806。其他人類抗體可藉由商業上獲得，例如來自Abgenix, Inc. (Freemont, Calif.)以及Genpharm (San Jose, Calif.)。

【0027】 可利用稱為“定向選擇(guided selection)”的技

術產生辨認經選擇的抗原決定位(epitope)的人類抗體。在此方式中，經選擇的非人類單株抗體，例如：小鼠抗體，用來定向(guide)會辨認相同抗原決定位的完整人類抗體的選擇(參見例如：Jespers et al., 1994, *Biotechnology* 12:899-903)。也可利用各種本技術領域習知的技術產生人類抗體，包括噬菌體展示庫(參見例如：Hoogenboom and Winter, 1991, *J. Mol. Biol.* 227:381; Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.* 222:581; Quan and Carter, 2002, “The rise of monoclonal antibodies as therapeutics,” in *Anti-IgE and Allergic Disease*, Jardieu, P. M. and Fick Jr., R. B, eds., Marcel Dekker, New York, N.Y., Chapter 20, pp. 427-469)。

**【0028】** 於其他實施例中，抗體為抗體的融合蛋白、或其功能性活性片段。例如，抗體可藉由非抗體的另一個蛋白質(或其部分，像是蛋白質的至少10、20或50個胺基酸)的胺基酸序列的N-端或C-端共價鍵進行融合(例如：胜肽鍵)。

**【0029】** 抗體也包括經修飾或未經修飾(亦即，藉由任何分子的共價連接)的類似物和衍生物，只要這樣的共價連接允許抗體保留其抗原結合免疫特異性。例如但不限於：抗體的類似物和衍生物，包括經過進一步修飾，例如：醣基化、乙醯化、聚乙二醇化、磷酸化、醯胺化、藉由習知的保護/阻隔基衍生化、蛋白酶切割、連接至細胞抗體單元或其他蛋白質等。可利用習知技術實現任何大量的化學修飾，包括但不限於專一性化學切割、乙醯化、甲醯化、衣黴素存在下的代謝合成等。此外，類似物或衍生物可包括一種或多種非天然胺基酸。

【0030】 抗體可在與Fc受體作用的胺基酸殘基中具有修飾(例如：取代、刪除或增加)。特別地，抗體包括在胺基酸殘基中具有修飾的抗體，經辨認為包含在抗Fc區域和FcRn受體之間的交互作用中(參見例如：國際公開號WO 97/34631，其整體在此併入本文作為參考)。對於目標抗原的抗體免疫特異性可從商業上獲得或是來自其他來源或利用本技術領域具有通常知識者所習知的方法產生，像是例如：化學合成或重組表現技術。編碼對於癌症抗原具有抗體特異性的核苷酸序列可經由例如：GenBank數據庫或類似的數據庫、公開文獻、或是例行的基因選殖(cloning)及定序而獲得。

【0031】 可用於治療癌症的抗體例子包括但不限於：人類化抗HER2單株抗體、HERCEPTIN® (trastuzumab; Genentech)、用於治療具有非何杰金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)的病患之嵌合抗CD20單株抗體RITUXAN® (rituximab; Genentech)、用於治療卵巢癌的小鼠抗體OvaRex (AltaRex Corporation, MA)、用於治療大腸直腸癌的小鼠IgG2a抗體Panorex (Glaxo Wellcome, NC)、用於治療表皮生長因子陽性癌(像是頭頸癌)的抗-EGFR IgG嵌合抗體Cetuximab Erbitux (Imclone Systems Inc., NY)、用於治療肉瘤(sarcoma)的人類化抗體Vitaxin (Medimmune, Inc., MD)、用於治療慢性淋巴球性白血病(chronic lymphocytic leukemia; CLL)的人類化IgG1抗體Campath I/H (Leukosite, MA)、用於治療急性骨髓性白血病(acute myeloid leukemia; AML)的人類化抗-CD33 IgG抗體Smart MI95 (Protein Design Labs, Inc., CA)、用於治療非何杰

金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)之人類化抗-CD22 IgG抗體 LymphoCide (Immunomedics, Inc., NJ)、用於治療非何杰金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)之人類化抗-HLA-DR抗體 Smart ID10 (Protein Design Labs, Inc., CA)、用於治療非何杰金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)之放射性標記小鼠抗-HLA-Dr10抗體 Oncolym (Techniclone, Inc., CA)、用於治療何杰金氏淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)或非何杰金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)之人類化抗-CD2單株抗體(mAb) Allomune (BioTransplant, CA)、用於治療肺癌及大腸直腸癌的抗-VEGF人類化抗體 Avastin (Genentech, Inc., CA)、用於治療非何杰金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)之抗-CD22抗體 Epratuzamab (Immunomedics, Inc., NJ and Amgen, CA)、及用於治療大腸直腸癌的人類化抗-CEA抗體 CEAcide (Immunomedics, NJ)。

【0032】 其他可用於治療癌症的抗體包括但不限於對抗下述抗原的抗體(在括號中指出示例性癌症): CA125 (卵巢癌)、CA15-3 (癌; carcinomas)、CA19-9 (癌)、L6 (癌)、Lewis Y (癌)、Lewis X (癌)、 $\alpha$ -胎兒蛋白(癌)、CA 242 (大腸直腸癌)、胎盤鹼性磷酸酶(癌)、前列腺癌特異性膜抗原(前列腺癌)、前列腺酸性磷酸酶(前列腺癌)、表皮生長因子(癌)、MAGE-1 (癌)、MAGE-2 (癌)、MAGE-3 (癌)、MAGE-4 (癌)、抗輸鐵蛋白受體(癌)、p97 (黑色素瘤)、MUC1-KLH (乳癌)、CEA (大腸直腸癌)、gp100 (黑色素瘤)、MART1 (黑色素瘤)、前列腺特異性抗體(PSA)(前列腺癌)、IL-2受體(T-cell白血病和淋巴瘤)、CD20 (非

何杰金氏淋巴瘤)、CD52 (白血病)、CD33 (白血病)、CD22 (淋巴瘤)、人絨毛膜促性腺激素(癌)、CD38 (多發性骨髓瘤)、CD40 (淋巴瘤)、黏蛋白(癌)、P21 (癌)、MPG (黑色素瘤)、及Neu癌基因產物(癌)。一些專一性、有用的抗體包括但不限於：BR96 單株抗體(mAb)(Trail et al., 1993, Science 261:212-215)、BR64 (Trail et al., 1997, Cancer Research 57:100-105)、對抗CD40抗原的單株抗體(mAbs)像是S2C6單株抗體(mAb)(Francisco et al., 2000, Cancer Res. 60:3225-3231)r及其嵌合及人類化變異體、對抗CD33抗原的單株抗體(mAbs)、對抗EphA2抗原的單株抗體(mAbs)、對抗CD70抗原的單株抗體(mAbs)像是1F6單株抗體(mAb)和2F2單株抗體(mAb) 及其嵌合及人類化變異體、及對抗CD30抗原的單株抗體(mAbs)像是AC10 (Bowen et al., 1993, J. Immunol. 151:5896-5906; Wahl et al., 2002, Cancer Res. 62(13):3736-42)及其嵌合及人類化變異體。可使用許多其他與腫瘤相關抗原結合的內化抗體(參見例如：Franke et al., 2000, Cancer Biother. Radiopharm. 15:459 76; Murray, 2000, Semin. Oncol. 27:64 70; Breitling et al., Recombinant Antibodies, John Wiley, and Sons, New York, 1998)。

**【0033】** 於一些實施例中，根據本揭露的組合物和方法使用用於治療或預防自體免疫疾病的習知抗體。對於回應自體免疫抗體產生的細胞抗原的抗體免疫特異性可經市售或其他來源或以任何本技術領域具有通常知識者習知的方法產生，像是例如：化學合成或重組表現技術。

**【0034】** 於一些實施例中，抗體對於自體免疫疾病的治療

具有免疫特異性，像是例如：抗-雙股DNA；抗-單股DNA；抗-心磷脂抗體IgM、IgG；抗-磷脂抗體IgM、IgG；抗-SM抗體；抗-粒線體抗體；甲狀腺抗體；微粒體抗體；甲狀腺球蛋白抗體；抗-SCL 70；抗-Jo；抗-U1 RNP；抗-La/SSB；抗-SSA；抗-SSB；抗-壁細胞抗體(anti-periteal cells)；抗-組蛋白；抗-RNP；C ANCA；P ANCA；抗中心粒；抗纖維蛋白；及抗-GBM抗體。於一實施例中，結合至活化淋巴球的配體(ligand)與自體免疫疾病相關。

**【0035】** 於特定實施例中，抗體可結合至表現在目標細胞上的抗體或抗體複合物(例如：活化的淋巴球)。抗體或抗體複合物可包括免疫球蛋白基因超家族成員、TNF受體超家族成員、整合蛋白(integrin)、細胞激素受體、化學激素受體、主要組織相容性複合物、紅血球凝集素(lectin)、或補體控制蛋白。合適的免疫球蛋白基因超家族成員包括但不限於：CD2、CD3、CD4、CD8、CD19、CD22、CD28、CD79、CD90、CD152/CTLA 4、PD 1、及ICOS。合適的TNF受體超家族成員包括但不限於：CD27、CD40、CD95/Fas、CD134/OX40、CD137/4 1BB、TNF R1、TNFR2、RANK、TACI、BCMA、蝕骨細胞抑制因子(osteoprotegerin)、Apo2/TRAIL R1、TRAIL R2、TRAIL R3、TRAIL R4、及APO 3。合適的整合蛋白(integrin)包括但不限於：CD11a、CD11b、CD11c、CD18、CD29、CD41、CD49a、CD49b、CD49c、CD49d、CD49e、CD49f、CD103、及CD104。合適的紅血球凝集素(lectin)包括但不限於：C型、S型、及I型紅血球凝集素。

【0036】 於另一個特定的實施例中，對於病毒或微生物抗原具有免疫特異性的有用的抗體為單株抗體。抗體可為嵌合、人類化、或人類單株抗體。此處所使用的用詞“病毒抗原”包括但不限於：可誘發免疫反應之任何病毒胜肽、多胜肽蛋白(例如：HIV gp120、HIV nef、RSV F 醣蛋白、流感病毒神經胺酸酶、流感病毒血球凝集素、HTL tax、單純疱疹病毒醣蛋白(例如：gB, gC, gD,及gE)以及B型肝炎表面抗原)。此處所使用的用詞“微生物抗原”包括但不限於：可誘發免疫反應之任何微生物胜肽、多胜肽、蛋白質、醣類、多醣類、或脂質分子(例如：細菌、真菌、致病原生生物、或酵母多胜肽包括例如：LPS和莢膜多醣體5/8)。

【0037】 對於病毒或微生物抗原的抗體免疫特異性可由商業上獲得，例如來自BD Biosciences (San Francisco, Calif.)、Chemicon International, Inc. (Temecula, Calif.)、或 Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, Calif.)、或由任何本技術領域具有通常知識者習知的方法產生，像是例如：化學合成或重組表現技術。編碼對於病毒或微生物抗原具有抗體特異性的核苷酸序列可由例如：GenBank數據庫或類似的數據庫、公開文獻、或是例行的基因選殖(cloning)及定序而獲得。

【0038】 於一特定的實施例中，根據本揭露的組合物和方法，有用的抗體為對於病毒感染或微生物感染的治療或預防有用的抗體。對於病毒感染或微生物感染的治療有用的抗體包括但不限於：對於治療RSV感染的病患有用的人類化抗-呼吸道合胞病毒(RSV)單株抗體SYNAGIS (Medimmune, Inc., MD)；對於

治療 HIV 感染有效的 CD4 融合抗體 PRO542 (Progenics)；對於治療 B 型肝炎病毒有效的人類抗體 OSTAVIR (Protein Design Labs, Inc., CA)；對於治療巨細胞病毒 (CMV) 有效的人類化 IgG1 抗體 PROTOVIR (Protein Design Labs, Inc., CA)；及抗-LPS 抗體。

【0039】 其他可用於治療感染性疾病的抗體包括但不限於對抗來自致病菌株抗原的抗體 (例如：化膿性鏈球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、肺炎鏈球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、奈瑟氏球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、腦膜炎雙球菌 (*Neisseria meningitidis*)、白喉棒狀桿菌 (*Corynebacterium diphtheria*)、肉毒桿菌 (*Clostridium botulinum*)、產氣莢膜芽胞梭菌 (*Clostridium perfringens*)、破傷風芽胞梭菌 (*Clostridium tetani*)、流行性感嗜血桿菌 (*Hemophilus influenza*)、克雷伯氏肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、克雷伯氏臭鼻桿菌 (*Klebsiella ozaenas*)、克雷伯氏鼻硬結桿菌 (*Klebsiella rhinoscleromatis*)、金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、霍亂弧菌 (*Vibrio cholerae*)、大腸桿菌 (*Escherichia coli*)、綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、胎兒彎曲桿菌 (弧菌) (*Campylobacter (Vibrio) fetus*)、親水性產氣單胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)、蠟狀芽孢桿菌 (*Bacillus cereus*)、愛德華氏菌 (*Edwardsiella tarda*)、小腸大腸炎耶氏桿菌 (*Yersinia enterocolitica*)、鼠疫耶氏桿菌 (*Yersinia pestis*)、假性結核病耶氏桿菌 (*Yersinia pseudotuberculosis*)、痢疾桿菌 (*Shigella dysenteriae*)、副痢疾桿菌 (*Shigella flexneri*)、宋內氏桿菌 (*Shigella sonnei*)、沙門氏桿菌 (*Salmonella typhimurium*)、梅毒

螺旋體 (*Treponema pallidum*)、細弱螺旋體 (*Treponema pertenue*)、斑點病密螺旋體 (*Treponema carateum*)、(*Borrelia vincentii*)、包柔疏螺旋體 (*Borrelia burgdorferi*)、出血黃疸鉤端螺旋體 (*Leptospira icterohaemorrhagiae*)、肺結核桿菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、卡氏肺囊蟲 (*Pneumocystis carinii*)、土拉文氏桿菌 (*Francisella tularensis*)、牛布氏桿菌 (*Brucella abortus*)、豬布氏桿菌 (*Brucella suis*)、地中海熱布氏桿菌 (*Brucella melitensis*)、黴漿菌屬 (*Mycoplasma spp.*)、斑疹傷寒立克次體 (*Rickettsia prowazeki*)、恙蟲病立克次體 (*Rickettsia tsutsugumushi*)、披衣菌屬 (*Chlamydia spp.*)；致病真菌 (例如：粗球孢子菌 (*Coccidioides immitis*)、煙麴黴 (*Aspergillus fumigatus*)、白色念珠球菌 (*Candida albicans*)、皮炎芽生菌 (*Blastomyces dermatitidis*)、新型隱球菌 (*Cryptococcus neoformans*)、荚膜組織胞漿菌 (*Histoplasma capsulatum*)；原生生物 (赤痢變形蟲 (*Entamoeba histolytica*)、弓形蟲 (*Toxoplasma gondii*)、腸道鞭毛滴蟲 (*Trichomonas tenax*)、人毛滴蟲 (*Trichomonas hominis*)、陰道滴蟲 (*Trichomonas vaginalis*)、剛比亞錐蟲 (*Trypanosoma gambiense*)、德西亞錐蟲 (*Trypanosoma rhodesiense*)、克氏錐蟲 (*Trypanosoma cruzi*)、黑熱病利什曼原蟲 (*Leishmania donovani*)、熱帶利什曼原蟲 (*Leishmania tropica*)、巴西利什曼原蟲 (*Leishmania braziliensis*)、肺孢子菌肺炎 (*Pneumocystis pneumonia*)、間日瘧原蟲 (*Plasmodium vivax*)、惡性瘧原蟲 (*Plasmodium falciparum*)、瘧原蟲 (*Plasmodium malariae*)；或蠕蟲 (蟯蟲 (*Enterobius*

vermicularis)、鞭蟲 (*Trichuris trichiura*)、蛔蟲 (*Ascaris lumbricoides*)、旋毛蟲 (*Trichinella spiralis*)、糞擬圓蟲 (*Strongyloides stercoralis*)、住血吸蟲 (*Schistosoma ijaponicum*)、曼森氏住血吸蟲 (*Schistosoma mansoni*)、埃及住血吸蟲 (*Schistosoma haematobium*)、及鉤蟲 (hookworms)。

【0040】 本揭露中其他可用於治療病毒性疾病的抗體包括但不限於對抗致病病毒抗原的抗體，例如：痘病毒科 (*Poxviridae*)、疱疹病毒科 (*Herpesviridae*)、單純疱疹病毒第一型 (*Herpes Simplex virus 1*)、單純疱疹病毒第二型 (*Herpes Simplex virus 2*)、腺病毒科 (*Adenoviridae*)、乳多瘤病毒科 (*Papovaviridae*)、腸道病毒科 (*Enteroviridae*)、小核糖核酸病毒科 (*Picornaviridae*)、小DNA病毒科 (*Parvoviridae*)、呼腸孤病毒科 (*Reoviridae*)、反轉錄病毒科 (*Retroviridae*)、流感病毒 (*influenza viruses*)、副流感病毒 (*parainfluenza viruses*)、流行性腮腺炎 (mumps)、麻疹 (measles)、呼吸道細胞融合病毒 (*respiratory syncytial virus*)、德國麻疹 (rubella)、蟲媒病毒科 (*Arboviridae*)、桿狀病毒科 (*Rhabdoviridae*)、沙粒病毒科 (*Arenaviridae*)、A型肝炎病毒 (*Hepatitis A virus*)、B型肝炎病毒 (*Hepatitis B virus*)、C型肝炎病毒 (*Hepatitis C virus*)、E型肝炎病毒 (*Hepatitis E virus*)、非A型/非B型肝炎病毒 (*Non A/Non B Hepatitis virus*)、鼻病毒 (*Rhinoviridae*)、冠狀病毒 (*Coronaviridae*)、輪狀病毒 (*Rotoviridae*)、及人類免疫缺陷病毒 (*Human Immunodeficiency Virus*)。

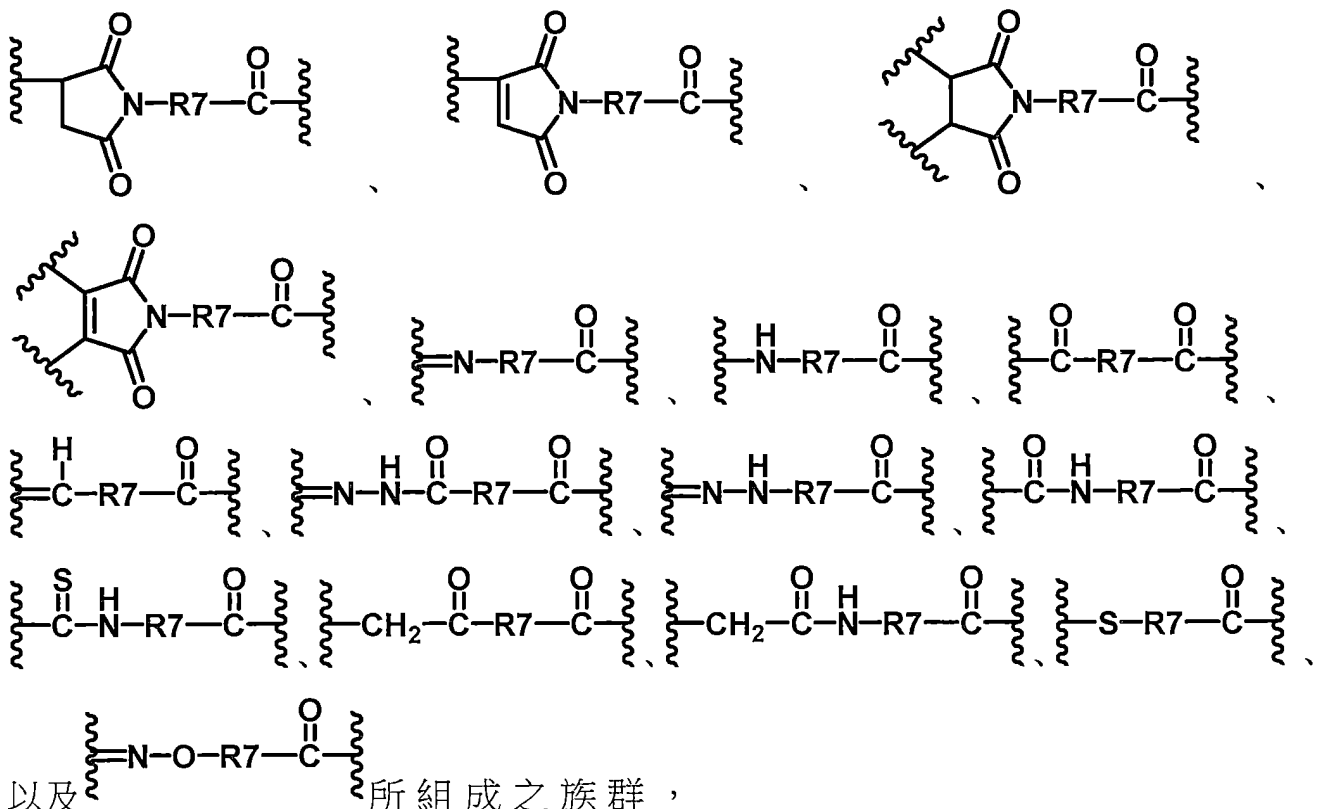
【0041】 抗體也可為存在於目標細胞或目標細胞群上的抗

體。例如：相較於一個或多個正常細胞(例如：非癌細胞)，可特異性表現在一個或多個特定類型的目標細胞(例如：癌細胞)表面上的跨膜多胜肽及其他標記分子。相較於正常細胞表面上的標記分子，這些標記分子經常豐富表現在目標細胞表面上、或顯現更佳的免疫原性。這種細胞表面抗原多胜肽的辨識透過抗體療法對特定的目標細胞具有破壞能力。因此，於一些實施例中，抗體包括但不限於對抗腫瘤相關抗原(TAA)的抗體。這種腫瘤相關抗原為本技術領域所習知，且可用於製備本技術領域習知的用於產生抗體的方法。

**【0042】** 於化學式(I)中，-(L-D)為一連接子-藥物單元，其中L代表一具有醯胜肽之連接子單元，且D代表一藥物單元。於化學式(I)中，P可為介於1~26的整數，取決於化學式(I)中抗體A之鏈間雙硫鍵的數目。於一實施例中，P可為介於2~8的整數，或可為整數4。於一實施例中，P可為介於2~12的整數，或可為整數8。於一實施例中，P可為介於2~26的整數，或可為整數12。於一實施例中，P可為整數26。

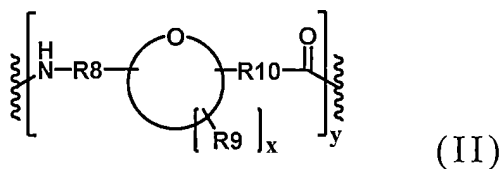
**【0043】** 於一些實施例中，本揭露之連接子單元(-L-)可包括一醯胺基酸單元(-SAAs-)及一胜肽單元(-AAs-)。於一些實施例中，胜肽單元可為雙肽、三肽、四肽、五肽、六肽、七肽、八肽、九肽、十肽、十一肽、或十二肽。

**【0044】** 於其他實施例中，本揭露之連接子單元(-L-)可具有化學式-C-SAAs-AAs-。於此化學式中，C-可為一複合單元，選自由

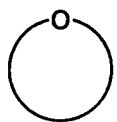


其中R7選自由-C1-C10亞烷基-、-C3-C8環碳基-、-O-(C1-C8烷基)-、-亞芳基-、-C1-C10亞烷基-亞芳基-、-亞芳基-C1-C10亞烷基-、-C1-C10亞烷基-(C3-C8環碳基)-、-(C3-C8環碳基)-C1-C10亞烷基-、-C3-C8雜環基-、-C1-C10亞烷基-(C3-C8雜環基)-、-(C3-C8雜環基)-C1-C10亞烷基-、-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-、以及-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-CH<sub>2</sub>-所組成之族群，其中r為介於1-10之整數。

【0045】於此化學式中，本揭露之醯胺基酸單元(-SAAs-)可藉由化學式(II)表示：



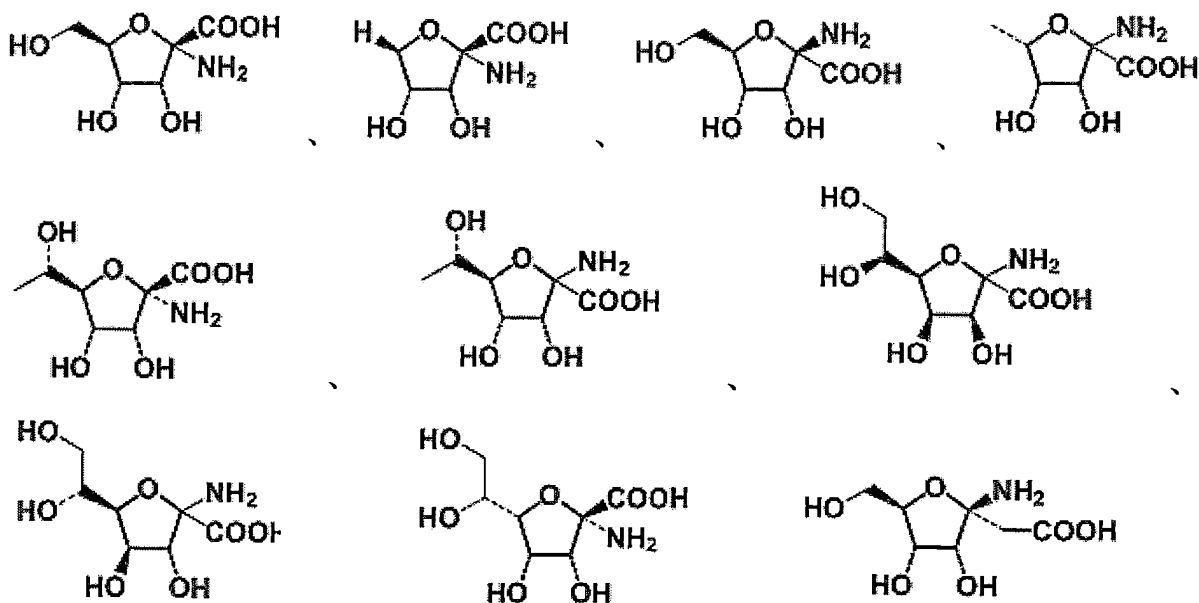
【0046】化學式(II)其中x為介於1-8之整數，y為介於1-4之整數，

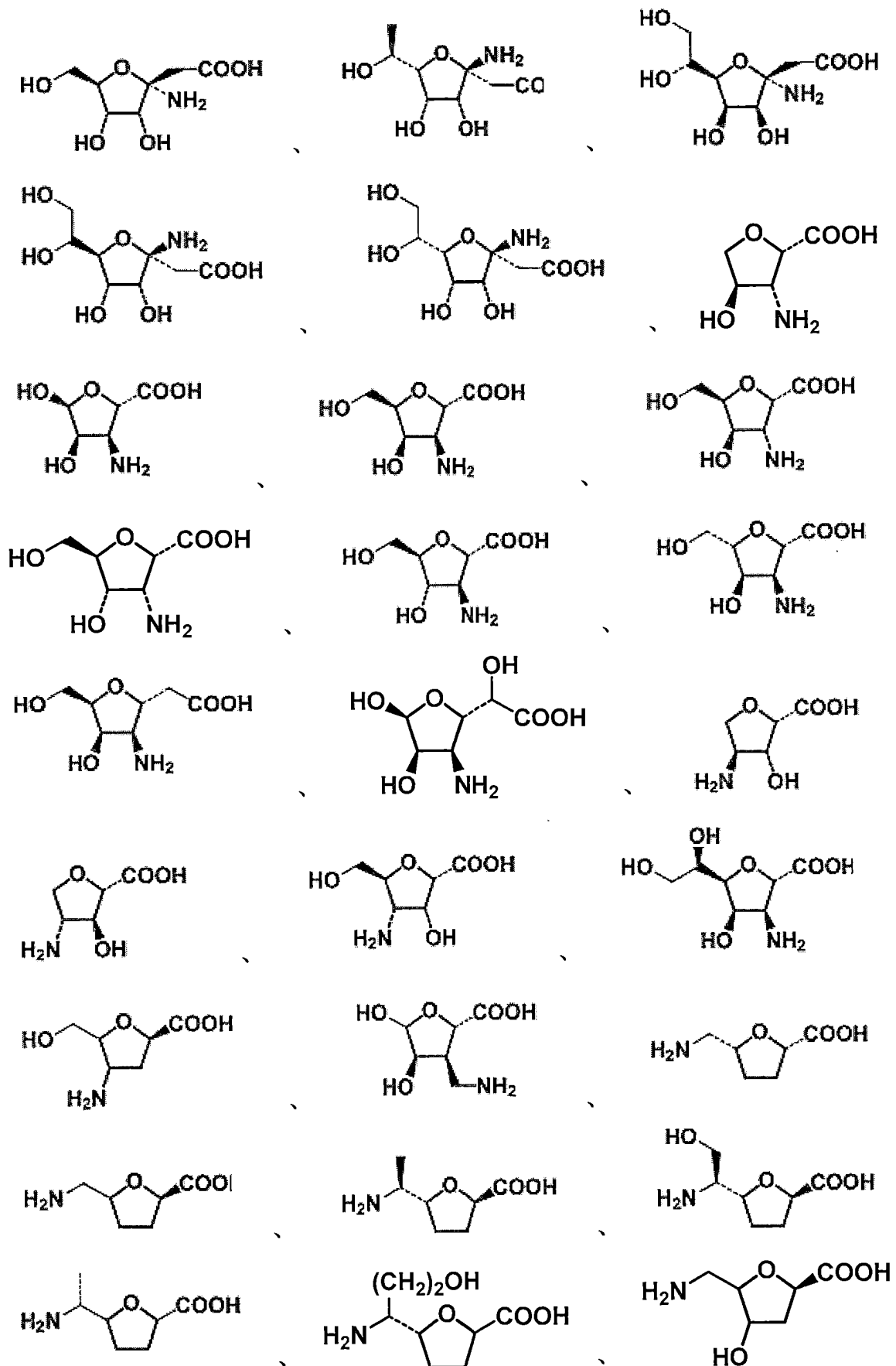


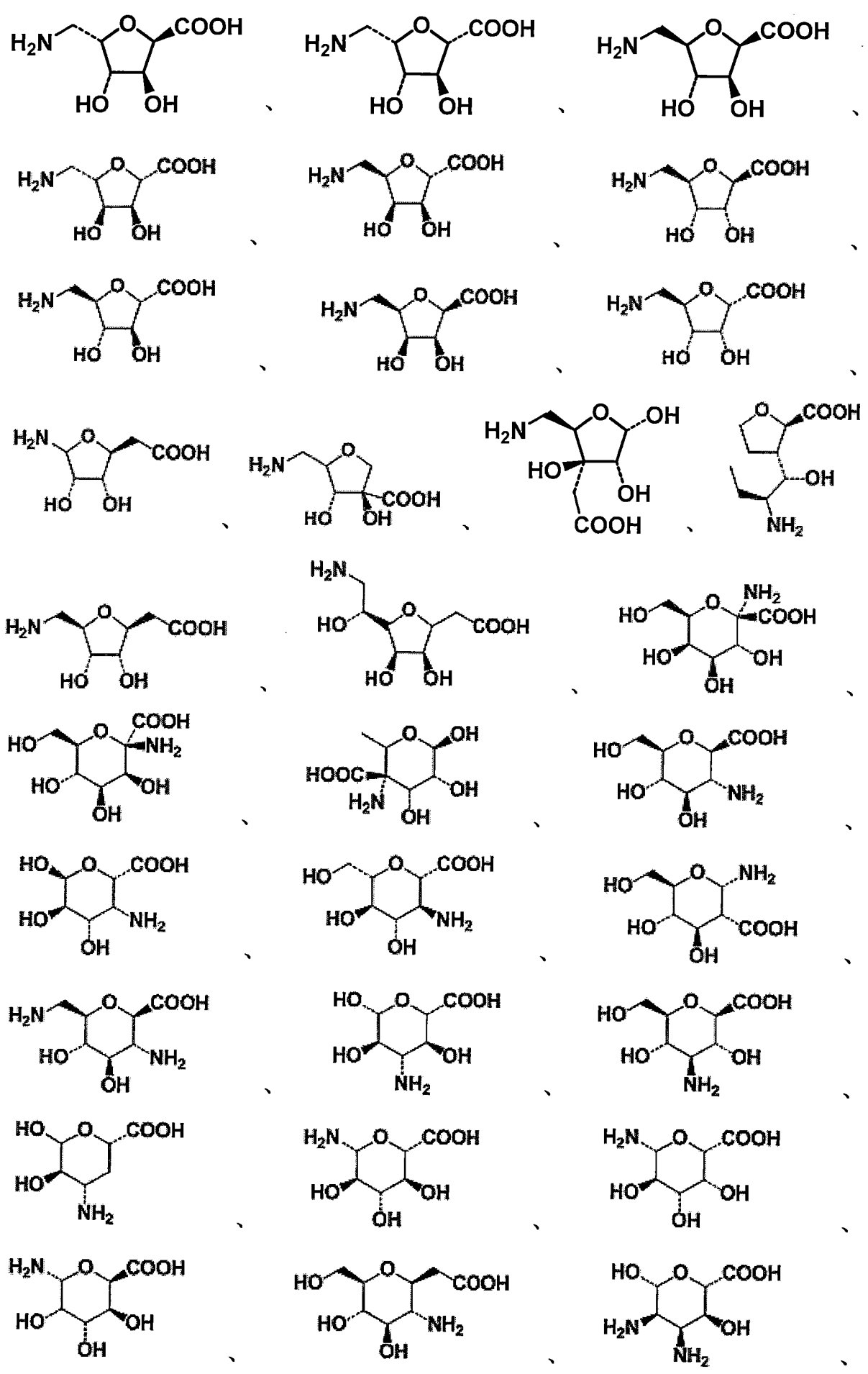
為四氫呋喃、二氫呋喃、四氫哌喃或二氫哌喃，每一R8

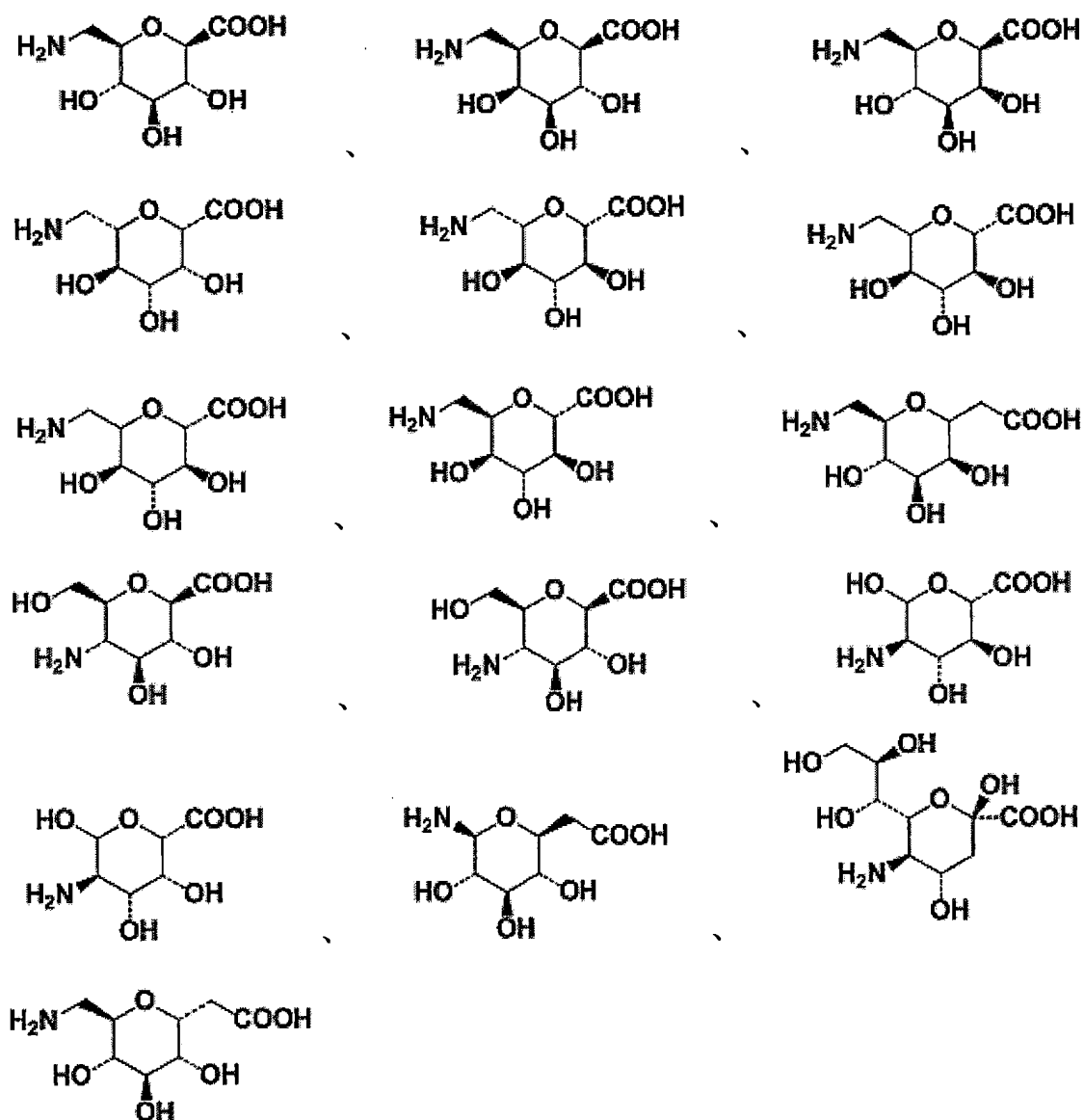
與 R10 獨立地為單鍵、亞甲基、羥基亞甲基、伸乙基、亞乙基、羥基伸乙基、羥基亞乙基、二羥基伸乙基、二羥基亞乙基、伸乙烯基、亞乙烯基、伸丙基(propylene)、亞丙基、伸丙基(trimethylene)、羥基伸丙基(hydroxypropylene)、羥基亞丙基、羥基伸丙基(hydroxytrimethylene)、二羥基伸丙基(dihydroxypropylene)、二羥基亞丙基、二羥基伸丙基(dihydroxytrimethylene)、三羥基伸丙基(trihydroxypropylene)、三羥基亞丙基或三羥基伸丙基(trihydroxytrimethylene)，每一 R9 獨立地為羥基、甲基、羥甲基、乙基、羥乙基、二羥乙基、丙基、羥丙基、二羥丙基、或三羥丙基、或同一環中任意兩 R9 與其連接之碳原子形成羰基、或任意兩 R9、R8 與任意一 R9、或 R10 與任意一 R9 形成與原四氫呋喃、二氫呋喃、四氫吡喃或二氫吡喃融合之第二四氫呋喃、二氫呋喃、四氫吡喃或二氫吡喃、或任意兩 R9、R8 與任意一 R9、或 R10 與任意一 R9 與一亞甲基、亞乙基、1-亞丙基、2-亞丙基或苯亞甲基形成與原四氫呋喃、二氫呋喃、四氫吡喃或二氫吡喃融合之環狀縮醛或縮酮。

【0047】 於本揭露中，醣胺基酸包括但不限於：



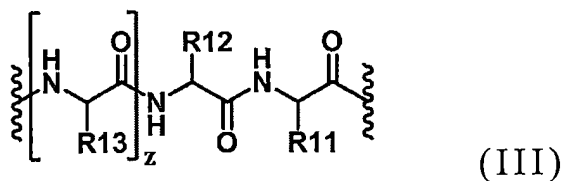






【0048】 於此化學式中，胜肽單元(-AAs-)可藉由化學式(III)

表示：

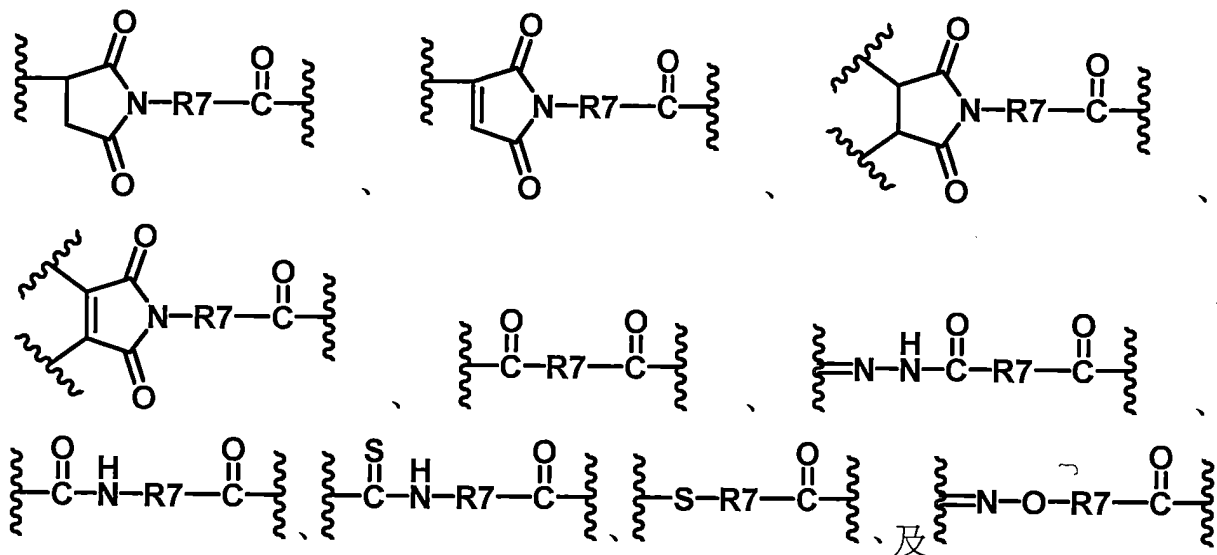


【0049】 於化學式(III)中， $z$ 為介於0~10之整數， $R11$ 可為  $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$ 、 $-(CH_2)_3NH_2$ 、 $-(CH_2)_3NHCONH_2$ 、 $-(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$ 、 $-(CH_2)_4NH_2$ 或 $-(CH_2)_4NHCONH_2$ ， $R12$ 為氫、甲基、乙基、丙基、異丙基、環丙基、丁基、第二丁基、

異丁基、第三丁基、環丁基、苯基或苯甲基，R13為氫、甲基、異丙基、環丙基、丁基、第二丁基、異丁基、第三丁基、環丁基、環己基、苯基、苯甲基、p-羥基苯甲基、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{COOH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_3$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCHO}$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCOCH}_3$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCHO}$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCONH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、2-吡啶甲基、3-吡啶甲基、或4-吡啶甲基。

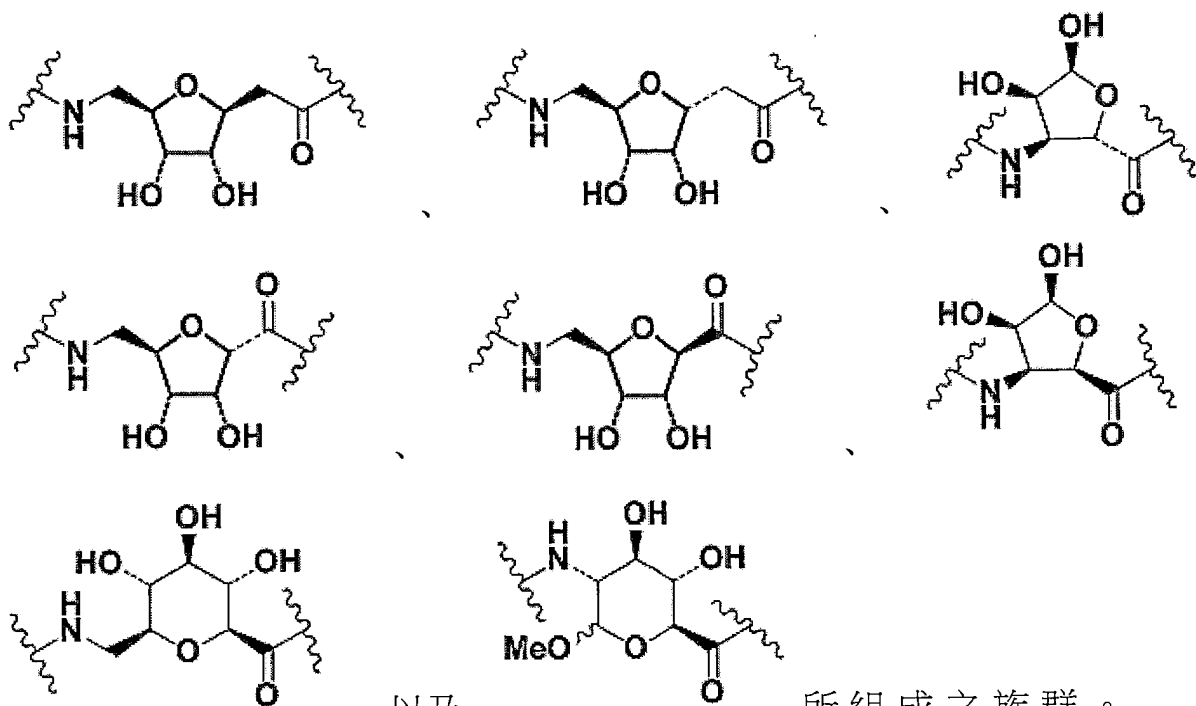
【0050】於一些實施例中，胜肽單元(-AAs-)可經一或多個酵素切割，例如：藉由腫瘤相關蛋白酶切割以釋放出藥物單元(-D-)。

【0051】於另一實施例中，C-可為一複合單元，選自由



所組成之族群，其中R7選自由-1,5-伸戊基-、-1,6-伸己基-、-1,4-伸環己基-、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r-\text{CH}_2-$ 、以及 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 所組成之族群，其中r為介於2~5之整數。

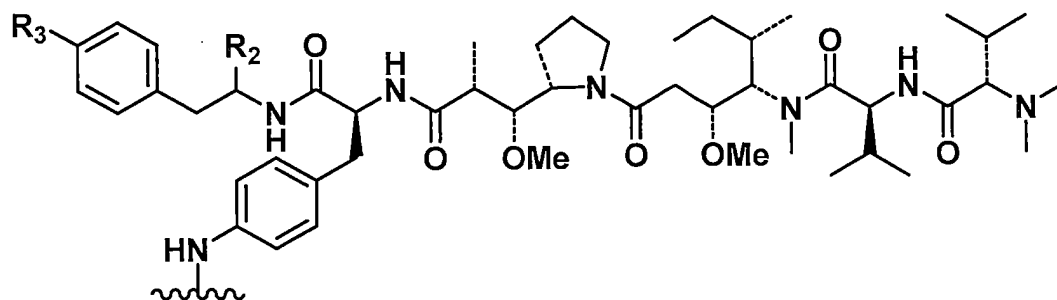
【0052】於另一實施例中，醯胺基酸單元(-SAAs-)可選自由

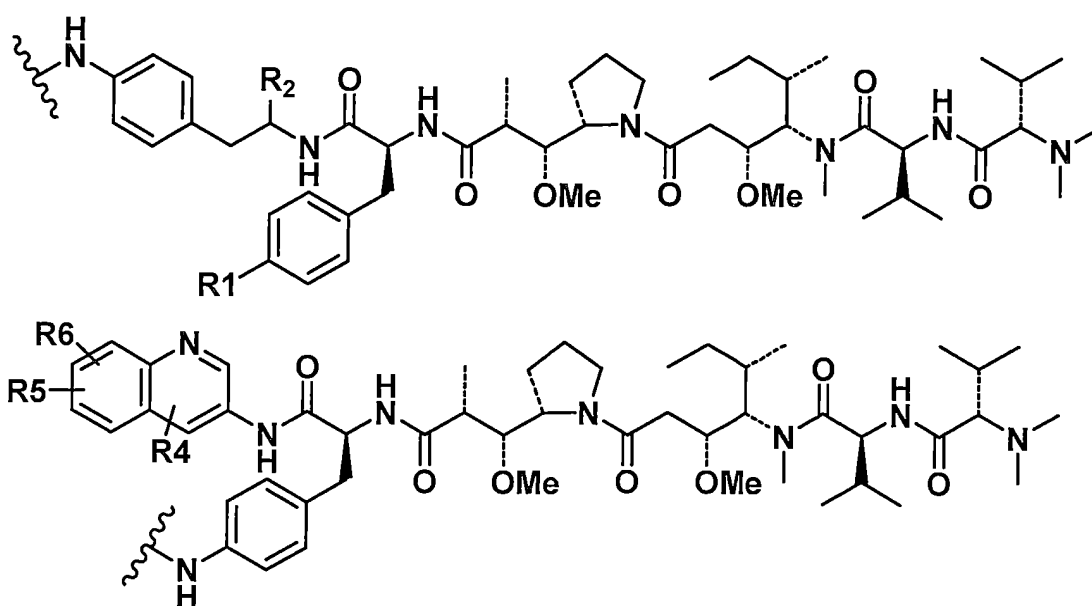


【0053】 於一實施例中，胜肽單元(-AAs-)可選自由-纈胺酸-瓜胺酸(-Val-Cit-)、-纈胺酸-離胺酸(-Val-Lys-)、-纈胺酸-魚精胺酸(-Val-Arg-)、-苯丙胺酸-瓜胺酸(-Phe-Cit-)、-苯丙胺酸-離胺酸(-Phe-Lys-)、以及-苯丙胺酸-魚精胺酸(-Phe-Arg-)所組成之族群。

【0054】 然而，應注意的是，上述結構僅為示例，而非用於限定本揭露之範疇。

【0055】 於一實施例中，藥物單元(-D-)為一細胞毒性劑，可選自由





、以及

所組成之族群，其中其中每一 R1、R2、R3、R4、R5 與 R6 獨立地為氫、胺基、硝基、鹵素、羥基、甲氧基、乙氧基、羧基、甲氧基羰基、乙氧基羰基、甲基胺基、二甲基胺基、乙基胺基、二乙基胺基、1-吡咯啉基、1-哌啉基、1-哌嗪基、胺基羰基、甲基胺基羰基、二甲基胺基羰基、乙基胺基羰基、二乙基胺基羰基、1-吡咯啉基羰基、1-哌啉基羰基、1-哌嗪基羰基、甲基、乙基、丙基、異丙基或苯基。

【0056】 於一實施例中，藥物單元(-D-)為一細胞毒性劑，選自由瓢菌素(amanitins)、蒽環類物(anthracyclines)、海兔毒素(auristatins)、漿果赤黴素(baccatins)、加利車黴素(calicheamicins)、喜樹鹼(camptothecins)、西地黴素(cemadotins)、秋水仙鹼(colchicines)、秋水仙胺(colcimids)、考布他汀(combretastatins)、隱花素(cryptophysins)、(discodermolides)、多卡黴素(duocarmycins)、棘黴素(echinomycins)、艾榴塞洛素(eleutherobins)、埃博黴素(epothilones)、雌莫司汀(estramustines)、偏端黴素(lexitropsins)、

美登木素生物鹼(maytansinoids)、紡錘菌素(netropsins)、嘌呤黴素(puromycins)、吡咯並苯並二氮雜(pyrrolobenzodiazepines)、根瘤菌素(rhizoxins)、紫杉烷(taxanes)、微管蛋白素(tubulysins)、以及長春花生物鹼(vinca alkaloids)所組成之族群。

【0057】 於一些實施例中，藥物單元(-D-)可為加利車黴素(calicheamicin)、喜樹鹼(camptothecin)、美登木素生物鹼(maytansinoid)、或蔥環類物(anthracycline)。於一些實施例中，藥物單元(-D-)可為紫杉烷(taxanes)、拓撲異構酶抑制劑(topoisomerase inhibitor)、長春花生物鹼(vinca alkaloids)、或其類似物。於一些實施例中，合適的細胞毒性劑包括例如：DNA小溝結合劑(例如：烯二炔和偏端黴素、CBI化合物；也可參見U.S. Pat. No. 6,130,237)、多卡黴素(duocarmycins)、紫杉烷(taxanes)(例如：紫杉醇和多烯紫杉醇)、嘌呤黴素(puromycins)、及長春花生物鹼(vinca alkaloids)。其他細胞毒殺試劑包括例如：CC-1065、SN-38、托普樂肯(topotecan)、阿黴素(doxorubicin)、根瘤菌素(rhizoxin)、氰基嗎啉基(cyanomorpholino-doxorubicin)、棘黴素(echinomycin)、考布他汀(combretastatin)、紡錘菌素(netropsin)、埃博黴素(epothilone)、雌莫司汀(estramustine)、隱花素(cryptophysin)、西地黴素(cemadotin)、美登木素生物鹼(maytansinoid)、蒂克黴素(discodermolide)、艾榴塞洛素(eleutherobins)、或雙羥蔥醌(mitoxantrone)。

【0058】 於一些實施例中，藥物單元可為一抗微管素試劑(anti-tubulin agent)。抗微管素試劑的例子包括：海兔毒素

(auristatin)、紫杉烷(taxane)、及長春花生物鹼(vinca alkaloid)。其他抗微管素試劑的例子包括如：漿果赤黴素(baccatin)衍生物、西地黴素(cemadotin)、秋水仙鹼(colchicine)、秋水仙胺(colcimid)、考布他汀(combretastatins)、念珠藻素(cryptophycins)、(discodermolide)、(eleutherobin)、(estramustine)、(maytansinoid)、(nocodazole)、或(taxane)之類似物。

【0059】 於一些特定的實施例中，細胞毒性劑可為美登木素生物鹼(maytansinoids)或其他抗微管素試劑。例如，於一些特定的實施例中，美登木素生物鹼(maytansinoids)為美登素(maytansine)或DM-1 (ImmunoGen, Inc.;也可參見 Chari et al., 1992, Cancer Res. 52:127-131)。

【0060】 於一些特定的實施例中，細胞毒性劑可為尾海兔素(dolastatin)。於一些特定的實施例中，細胞毒性或細胞抑制劑為海兔毒素類型。因此，於一特定的實施例中，細胞毒性或細胞抑制劑為MMAE。

【0061】 於另一實施例中，本揭露也提供一種抗體藥物複合物(ADC)的製造方法100。第1圖為根據本揭露一些實施例顯示抗體藥物複合物(ADC)的製造方法流程圖100。

【0062】 首先，方法100進行至步驟102，形成一第一溶液。第一溶液係使一抗體及一還原劑於一緩衝溶液中反應而形成。於一些實施例中，所述抗體可為一全長抗體或一抗體片段。於一些實施例中，所述抗體可為一嵌合抗體或其功能活性片段、一人類化抗體或其功能活性片段、一人類抗體或其功能活性片

段、或一小鼠抗體或其功能活性片段。於其他實施例中，所述抗體亦可為上述物種以外之其他物種之抗體或其其功能活性片段，例如：大鼠抗體或其功能活性片段、羊抗體或其功能活性片段、兔子抗體或其功能活性片段。在一些實施例中，所述抗體可為一治療性抗體，用以治療腫瘤、慢性淋巴球性白血病 (chronic lymphocytic leukemia; CLL)、或急性骨髓性白血病 (acute myeloid leukemia; AML)。於一些實施例中，所述抗體可為任何前述之合適抗體。於一些特定的實施例中，所述抗體可包括如 Herceptin、Erbix、HLX-07、EG12014、抗-EpCAM抗體、IgG1、抗-EpCAM抗體、IgG1、Rituximab、Ibritumomab tiuxetan、Tositumomab、Alemtuzumab、IGN101、Adecatumumab、Labetuzumab、huA33、Pemtumomab、Oregovomab、CC49 (minretumomab)、cG250、J591、MOv18、MORAb-003 (farletuzumab)、3F8、ch14.18、KW-2871、hu3S193、IgN311、Bevacizumab、IM-2C6、CDP791、Etaracizumab、Volociximab、Cetuximab、Panitumumab、Nimotuzumab、806、Trastuzumab、Pertuzumab、MM-121、AMG 102、METMAB、SCH 900105、AVE1642、IMC-A12、MK-0646、R1507、CP 751871、KB004、IIIA4、Mapatumumab (HGS-ETR1)、HGS-ETR2、CS-1008、Denosumab、Sibrotuzumab、F19、或81C6。有關其他抗體的描述可參照相關段落之敘述，未避免不必要的重複，不在此贅述。

**【0063】** 於步驟102中，抗體的初始濃度可小於20 mg/mL。例如，抗體的初始濃度可介於1~20 mg/mL。然而，抗體的初始

濃度並不限於此。根據需要，抗體的濃度亦可大於 20 mg/mL。

【0064】 於一實施例中，還原劑可選自由三(2-羧乙基)膦(tris(2-carboxyethyl)phosphine; TCEP)、2-氨基乙硫醇(2-aminoethanethiol)、二硫蘇糖醇(dithiothreitol; DTT)、2-巰基乙胺鹽酸鹽(2-mercaptoethylamine hydrochloride; 2-MEA)、以及其他合適的還原劑所組成之族群。於一實施例中，緩衝液可為由 25 mM 硼酸鈉、25 mM NaCl、及 1 mM 二亞乙基三乙酸(diethylenetriaminepentaacetic acid; DTPA)(pH 8)組成之硼酸鹽(borate)緩衝液，或是由 2.67 mM KCl、1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、137.93 mM NaCl、及 8.06 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (pH 7.4)組成之 PBS 緩衝液、或其他具有合適 pH 值的緩衝液。

【0065】 於步驟 102，還原劑和抗體的莫耳當量比例可根據實際需求進行調整，例如：所需游離硫醇的數量及抗體藥物複合物(ADC)所需的性質(像是 DAR 值)。

【0066】 理論上，DAR 值與經還原的抗體所提供之游離硫醇數量相應。此外，還原劑和抗體的莫耳當量比例也會受到還原劑的還原能力所影響。因此，本揭露中選擇適當的還原劑和還原條件，使得抗體中存在的鏈間雙硫鍵轉變為所需的游離硫醇數量。

【0067】 理論上，1 莫耳當量的 TCEP 可在抗體中產生 2 莫耳當量的游離硫醇。因此，為達到所需之平均 DAR 值(如 3.5-4.0)，可使用 1.75-2 莫耳當量的 TCEP 以在抗體中產生平均數量為 3.5~4.0 的游離硫醇。然而，應了解的是，反應中所使用之 TCEP 實際莫耳當量值可能會大於前述之理論值。

【0068】 例如，為達到26的平均DAR值，理論上TCEP和抗體的莫耳當量比例可調整為13以在抗體中產生平均數量為26的游離硫醇。然而，反應中所使用之TCEP實際莫耳當量值可能會大於13莫耳當量。類似地，為達到12的平均DAR值，TCEP和抗體的莫耳當量比例可調整為6以在抗體中產生平均數量為12的游離硫醇。然而，反應中所使用之TCEP實際莫耳當量值可能會大於6莫耳當量。

【0069】 於本揭露一實施例中，為達到3.5-4.0的平均DAR值，TCEP和抗體的莫耳當量比例可調整為介於1.8-2.8以在抗體中產生平均數量為3.5~4.0的游離硫醇。於另一實施例中，為達到3.5-4.0的平均DAR值，TCEP和抗體的莫耳當量比例可介於2.1-2.5。於本揭露之另一實施例中，為達到大於4.0的平均DAR值(像是5.4)，TCEP和抗體的莫耳當量比例為約3.4。

【0070】 於步驟102中，可於室溫(如15-25°C)至40°C下進行反應約1-3小時。反應完成後，抗體被還原並產生游離硫醇。

【0071】 接下來，方法100進行至步驟104，於有機相或水相中製備一連接子-藥物單元以形成一第二溶液，其中連接子具有一醯肼肽。於一實施例中，有機相可包括二甲基亞砜(dimethyl sulfoxide; DMSO)、乙腈(acetonitrile; ACN)、二甲基乙醯胺(N, N-dimethylacetamide; DMA)、丙二醇(propylene glycol; PG)等。用來製備連接子-藥物單元之有機溶劑濃度可介於0%(v/v)至100%(v/v)，像是0%、10%、20%、30%、50%、75%、或100% (v/v)。

【0072】 於一些實施例中，醯肼肽可包括單醯、雙醯、或

多醣。於一些實施例中，具有醣胜肽之連接子-藥物單元可選自由MHT-47、MHT-71、MHT-81a、MHT-93、MHT-98a、CCH-028、CCH-035、CCH-038、FCW-016、WHY-46、以及CCH-041所組成之族群。於一些實施例中，具有醣胜肽之連接子-藥物單元可為前述任何合適的連接子-藥物單元。有關其他連接子-藥物單元的描述可參照相關段落之敘述，未避免不必要的重複，不在此贅述。

**【0073】** 接下來，方法100進行至步驟106，進行一接合製程，此接合製程係混合前述第一溶液和前述第二溶液以形成一混合溶液。

**【0074】** 於一些實施例中，混合溶液中之有機溶劑濃度可介於0%(v/v)至20%(v/v)。例如，混合溶液中之有機溶劑濃度可介於0~2%(v/v)、0~2%(v/v)、2~5%(v/v)、5~7%(v/v)、7~10%(v/v)、10~15%(v/v)、10~15%(v/v)、或15~20%(v/v)。於步驟106中，第一溶液中經還原的抗體於共溶劑系統中與連接子-藥物單元接合，所述共溶劑系統包括0~20%(v/v)的有機溶劑以形成抗體藥物複合物(ADC)。於步驟106中，接合製成可於0~10℃下進行約0.5~2小時。例如，於一實施例中，接合製程可於4℃下進行約0.5小時。

**【0075】** 應注意的是，雖然先前研究已發展出各種抗體藥物複合物(ADC)，然而，在接合製程中，仍需要包含高含量有機溶劑的共溶劑系統。例如，於Seattle Genetics提供的接合製程中使用了2.75莫耳當量的三(2-羧乙基)膦(TCEP)作為還原劑以將單株抗體中的鏈間雙硫鍵還原成游離硫醇。然而，經還原

的抗體於含有 20% 有機溶劑的共溶劑系統中接合至 MC-Val-Cit-PAB 中的馬來醯亞胺 (maleimide)。在此篇研究中，若共溶劑系統中的有機溶劑含量下降，則連接子-毒素無法完全均相溶解並與抗體接合，導致接合效率很低。

**【0076】** 相反地，本揭露使用具有高水溶性的新穎連接子-毒素還形成抗體藥物複合物 (ADC)。連接子經設計為具有糖胺基酸以提高連接子的親水性並增加最中抗體藥物複合物的穩定性。因此，有效的降低在抗體藥物複合物 (ADC) 的接合製程中所使用的有機溶劑含量，並且達到抗體藥物複合物 (ADC) 的高接合效率。此外，由於有機溶劑的含量降低，使得後續的純化和分析變得容易。並且，連接子-毒素經改良的親水性也降低了抗體藥物複合物 (ADC) 的聚集作用，進而提高抗體藥物複合物 (ADC) 的穩定性。對於樣品存放與配方設計皆有明顯效益。相較於包含不具有醯肼肽連接子單元之抗體藥物複合物，包含具有醯肼肽連接子單元之抗體藥物複合物具有較佳的穩定性。

**【0077】** 相較於 Seattle Genetics 所開發須使用高達 20% 的有機溶劑的 MC-Val-Cit-PAB，本揭露證實具有醯胺基酸的連接子-毒素可大幅降低抗體藥物複合物的接合製程中有機溶劑的使用。此外，本揭露也證實有些特定的連接子-毒素可在純水相中進行接合反應，且在純水相中進行接合的抗體藥物複合物 (ADC) 僅有少量的高分子量物質產生，經 SEC 分析測量到的 HMWS 少於 0.1% (參照實施例 20、21，以及第 13B 圖、第 14B 圖)。

**【0078】** 此外，目前市售的 ADC 藥物，如 Kadcyła® 和

Adcetris®都以凍晶劑型保存，而且回溶後必須在一天內使用完畢。然而，本揭露所製得之抗體藥物複合物(ADC)具有極佳的安定性，且以液態於4°C可保存超過四個月(參照實施例19以及第18圖)。

【0079】此外，於本揭露中，抗體和連接子-藥物單元莫耳當量比例經選擇以使抗體藥物複合物的平均DAR介於約3.5-4.0。應了解的是，抗體藥物複合物的平均DAR可根據實際需求進行調整。例如，於一些實施例中，抗體藥物複合物的平均DAR可大於4.0。

【0080】最後，方法100進行至步驟108，純化混合溶液。於一些實施例中，可使用脫鹽管柱或切向流過濾(tangential flow filtration; TFF)純化混和溶液以移除未接合的連接子-毒素並獲得純化的抗體藥物複合物(ADC)。在沖提期間，緩衝液可置換為另一個合適的緩衝溶液，例如：PBS緩衝液(2.67 mM KCl、1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、137.93 mM NaCl、8.06 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O、pH 7.4)、或其他製劑溶液像是SGN (20 mM檸檬酸鈉、6.3% (w/v)海藻糖、0.2 mg/mL聚山梨醇酯80、pH 6.0)。

【0081】根據疏水作用層析(HIC)法的分析結果可知，本揭露所製得之抗體藥物複合物(ADC)的平均DAR(藥物-抗體比例)約為3.5-4.0，且接合效率大於90%，像是92%、93%、94%、95%、96%。根據粒徑篩析層析(SEC)法的分析結果可知，在接合製程中並沒有明顯的高分子量物質(HMWS)產生。此外，本揭露所製得之抗體藥物複合物(ADC)具有良好的熱穩定性、儲存安定性、及腫瘤抑制生長能力。

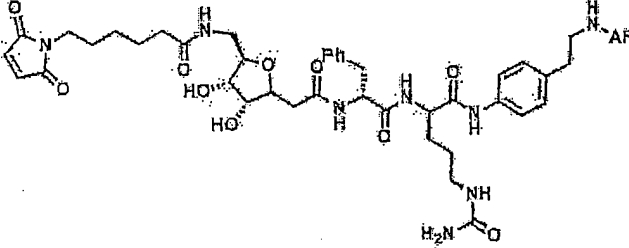
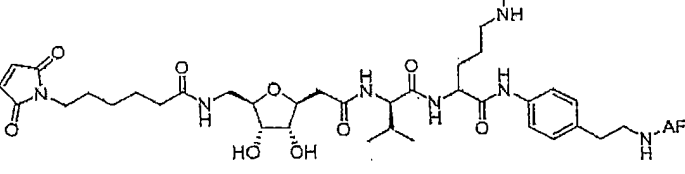
【0082】 以下描述各製備例和實施例顯示連接子-毒素和抗體藥物複合物的形成方法、以及抗體藥物複合物的性質。

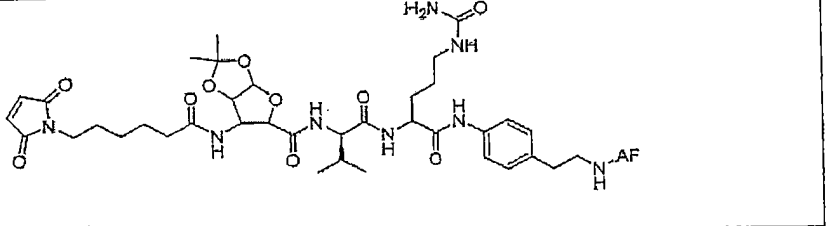
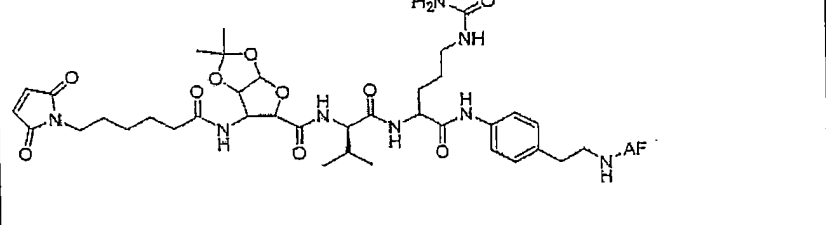
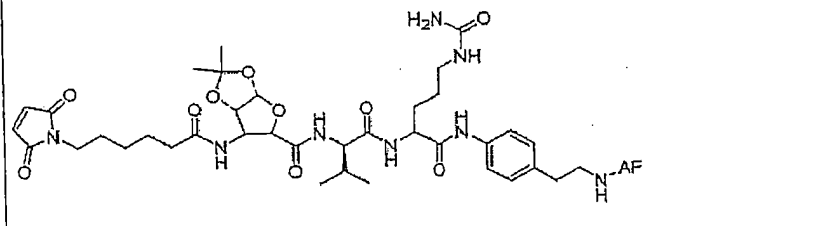
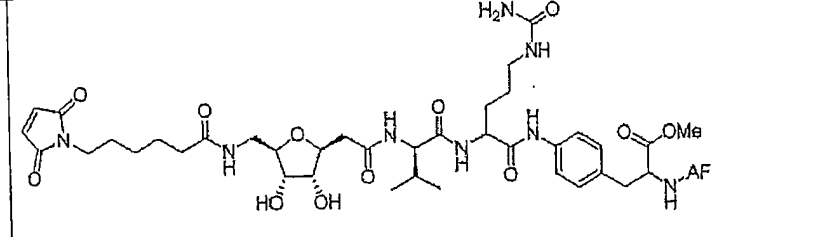
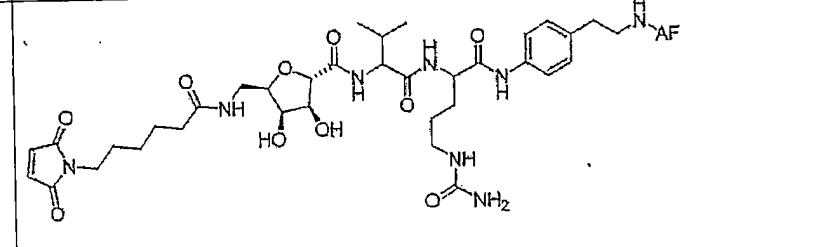
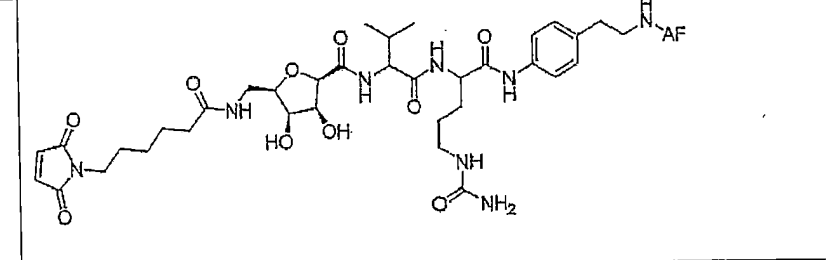
### 製備例及實施例

【0083】 本揭露藉由以下實施例做更詳細說明。MMAE (已知的毒素)、海兔毒素F (AF, 已知的毒素)與vedotin MMAE (已知的毒素)、海兔毒素F (AF, 已知的毒素)購自 Concorthis Biotherapeutics。根據文獻合成Z-Val-Cit-OH及各種醣胺基酸。上述各化合物的結構為本技術領域具有通常知識者習知，為達簡潔目的，不在此贅述。

【0084】 用於連接子-毒素的縮寫及其相對應的化學結構列於表1。

表1

MHT-47	 <p>The structure of MHT-47 shows a central MMAE moiety (a cyclohexane ring with a methyl group and a methylamino group) linked via amide bonds to a vedotin moiety (a cyclohexane ring with a methyl group and a methylamino group) and an AF toxin moiety (a cyclohexane ring with a methyl group and a methylamino group). The MMAE moiety is also linked to a linker chain consisting of a succinimide ring, a hexyl chain, and a methylamino group.</p>
MHT-71	 <p>The structure of MHT-71 shows a central MMAE moiety (a cyclohexane ring with a methyl group and a methylamino group) linked via amide bonds to a vedotin moiety (a cyclohexane ring with a methyl group and a methylamino group) and an AF toxin moiety (a cyclohexane ring with a methyl group and a methylamino group). The MMAE moiety is also linked to a linker chain consisting of a succinimide ring, a hexyl chain, and a methylamino group.</p>

MHT-81a	
MHT-93	
MHT-98a	
CCH-028	
CCH-035	
CCH-038	

CCH-041	
FCW-016	
WHY-46	
MHT-87	

表 2

抗體	廠商名稱
EG12014	EirGenix
Human IgG1	Sigma
Erbix® (Cetuximab)	Merck
Herceptin®(trastuzumab)	Roch

第 105135455 號

修正日期:107.12.10

修正頁

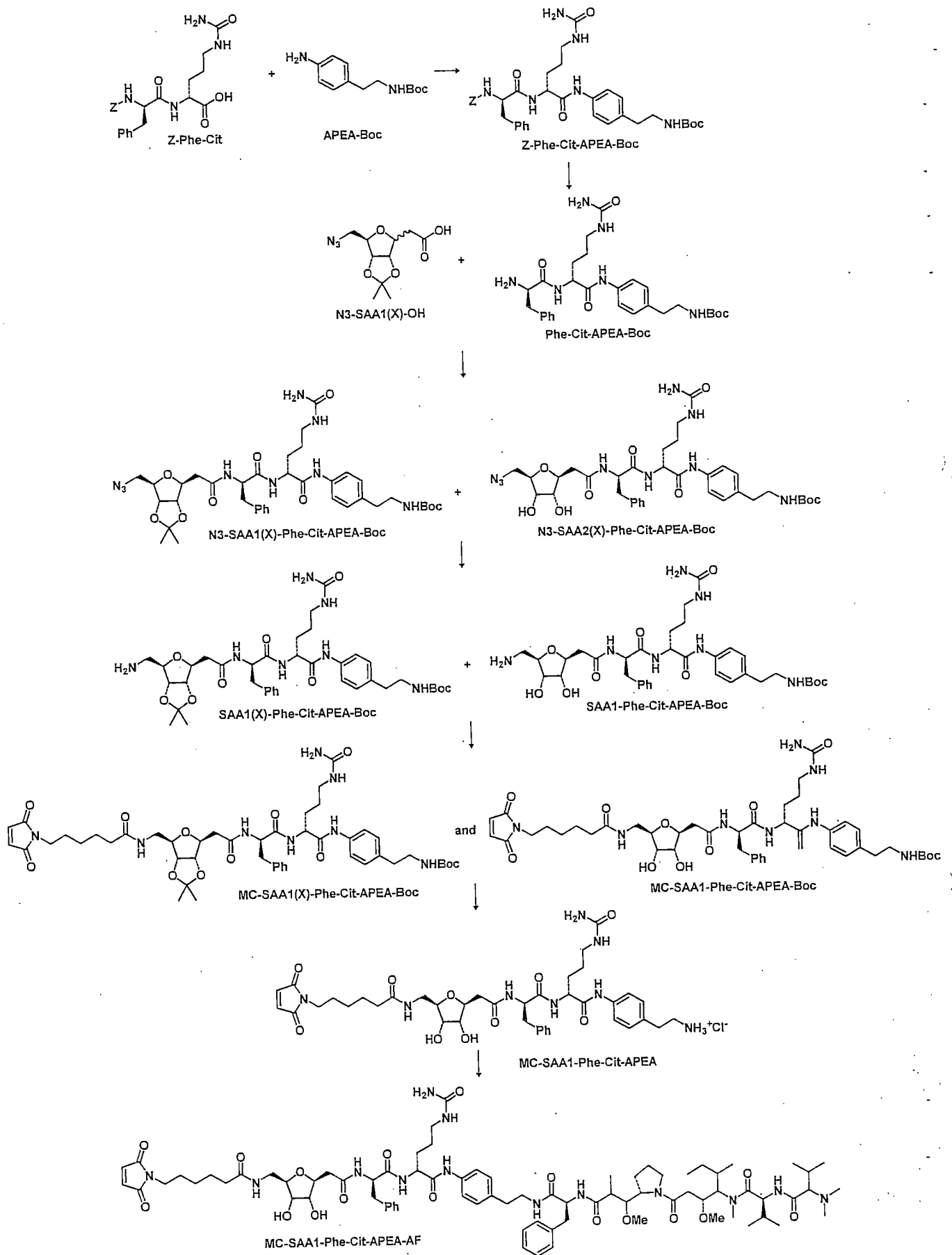
HLX-07	Henlix Inc.
Anti-EpCAM	吳漢忠博士實驗室生產

&lt;連接子-毒素&gt;

製備例 1

【0085】 MHT-47[MC-SAA1-Phe-Cit-APEA-AF]之合成

【0086】 連接子-毒素 MHT-47 根據以下所示步驟和以下示意圖合成。



【0087】 將 Z-Phe-Cit (9.13g, 20mmol) 加入二氯甲烷 (750mL)

及異丙醇(250mL)的混合液中，並攪拌直至雙肽完全溶解。之後，加入 APEA-Boc (7.09g, 30mmol) 及 EEDQ (7.42g, 30mmol)，並於室溫攪拌混合物 3 天。於減壓環境下，移除溶劑，並加入乙醚(300mL)於殘留物中。過濾混合物，並將粗產物再懸浮於乙醚(300mL)中。上述步驟重複 3 次。於真空環境下，對收集的固體產物進行乾燥，以獲得 Z-Phe-Cit-APEA-Boc (9.53g, 產率 70.6%)。產物以 PMR 進行鑑定。

【0088】 將 Z-Phe-Cit-APEA-Boc (2.02g, 3mmol) 溶於 THF (250mL) 與甲醇(50mL)的混合液中。於加入催化量的 Pd/C (10%) 後，將反應混合物導入氫氣球，並攪拌過夜。以矽藻土墊將催化劑濾除後，於減壓環境下，蒸餾濾液，以獲得白色固體的 Phe-Cit-APEA-Boc (1.61g, 99%)。

【0089】 將 HBTU (1.118g) 與 DIPEA (1.02mL) 加入 N3-SAA1(X)-OH (633mg) 與 Phe-Cit-APEA-Boc (1.33g) 溶於 DCM 與 DMF (10:1, 110mL) 的混合液中。於 17 小時後，於減壓環境下，移除 DCM。於剩餘的粗 DMF 溶液中，加入水與乙醚，於過濾後，獲得米色固體。以濃檸檬酸水溶液清洗固體數次，以移除大部分的 HOBt 與 DMF。以製備型 HPLC (50% 乙腈 / 水 / 0.1% TFA; UV 210nm; ODS-3 管柱 30\*250mm) 對 N3-SAA1(X)-Phe-Cit-APEA-Boc 進行純化。於減壓環境下，蒸餾乙腈，並對剩餘的水溶液進行冷凍乾燥，以獲得含有 N3-SAA1(X)-Phe-Cit-APEA-Boc 與 N3-SAA1-Phe-Cit-APEA-Boc 的白色固體 (1g)。LC-MS: N3-SAA1(X)-Phe-Cit-APEA-Boc ( $C_{38}H_{53}N_9O_9$ ) 所需  $[MH^+] = 80.9$ ,

所得  $[MH^+] = 781.8$ ; N3-SAA1-Phe-Cit-APEA-Boc ( $C_{35}H_{49}N_9O_9$ ) 所需  $[MH^+] = 740.8$ , 所得  $[MH^+] = 741.7$ 。

【0090】 將 N3-SAA1(X)-Phe-Cit-APEA-Boc 與 N3-SAA1-Phe-Cit-APEA-Boc 的混合物 (100mg) 溶於甲醇 (50mL)。於加入催化量的 Pd/C (10%) 後，將反應混合物導入氫氣球，並攪拌過夜。以矽藻土墊將催化劑濾除後，於減壓環境下，移除甲醇，以獲得含有 SAA1(X)-Phe-Cit-APEA-Boc 與 SAA1-Phe-Cit-APEA-Boc 的白色固體 (78mg)。

【0091】 將 MC-OPFP (103mg) 加入 SAA1(X)-Phe-Cit-APEA-Boc/SAA1-Phe-Cit-APEA-Boc (210mg)/甲醇 (50mL) 的溶液中，之後，加入 DIPEA (0.047mL)。於 17 小時後，對反應混合物進行濃縮。以製備型 HPLC (50% 乙腈 / 水 / 0.1% TFA; UV 210nm; ODS-3 管柱 30x500mm; 流速 40mL/min) 對粗產物進行純化，以獲得 MC-SAA1(X)-Phe-Cit-APEA-Boc 與 MC-SAA1-Phe-Cit-APEA-Boc 的溶液。

【0092】 以濃鹽酸 (10eq.) 對 MC-SAA1(X)-Phe-Cit-APEA-Boc 與 MC-SAA1-Phe-Cit-APEA-Boc 的溶液進行處理。反應由分析型 HPLC 進行監測，直至水解完成。於減壓環境下，移除乙腈，並於水溶液進行冷凍乾燥後，獲得固體的 MC-SAA1-Phe-Cit-APEA。LC-MS: MC-SAA1-Phe-Cit-APEA ( $C_{40}H_{54}N_8O_{10}$ ) 所需  $[MH^+] = 807.4$ , 所得  $[MH^+] = 809.1$ 。

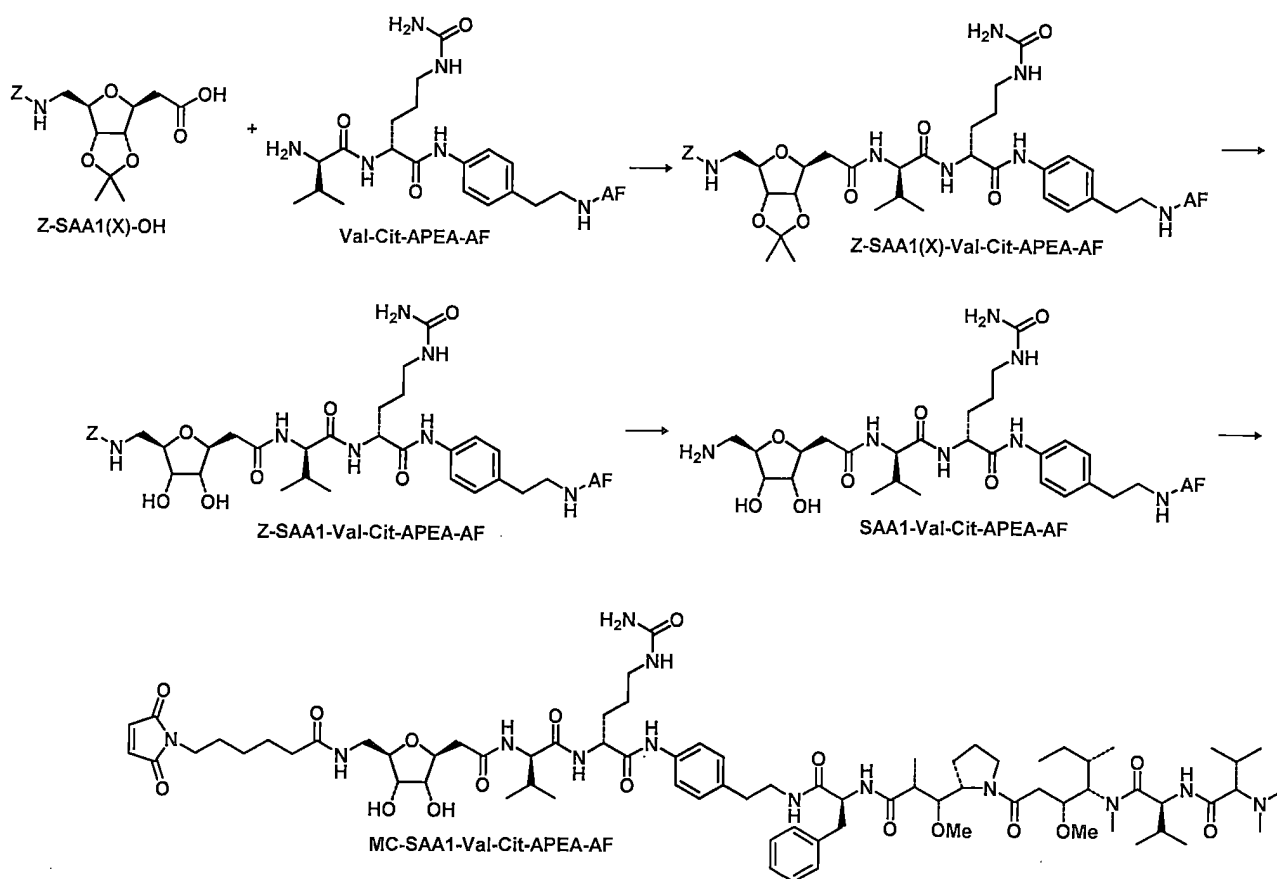
【0093】 將 MC-SAA1-Phe-Cit-APEA (110mg) 溶於 DCM 與

DMF (10:1, 10mL)的混合液中，並分別加入海兔毒素F (93mg)、HBTU (55mg)與DIPEA (0.077mL)。於17小時後，於減壓環境下，移除DCM、DMF及DIPEA。以製備型HPLC (35%乙腈/水/0.1% TFA; UV 210nm; ODS-3管柱30x250mm; 流速40mL/min)對粗產物進行純化。於減壓環境下，移除標的分餾物中的乙腈，並對剩餘的水溶液進行冷凍乾燥，以獲得白色固體的**MHT-47** (20mg)。LC-MS: **MC-SAA1-Phe-Cit-APEA-AF (MHT-47)** ( $C_{80}H_{119}N_{13}O_{17}$ ) 所需 $[MH^+] = 1534.9$ ，所得 $[MH^+] = 1538.0$ 。

## 製備例 2

【0094】 **MHT-71[MC-SAA1-Val-Cit-APEA-AF]**之合成

【0095】 連接子-毒素MHT-71根據以下所示步驟和以下示意圖合成。



【0096】 將 HBTU (32.5mg)與 DIPEA (0.029mL)分別加入 Z-SAA1(X)-OH (26.1mg)與 Val-Cit-APEA-AF (80mg)溶於 DCM 與 DMF (10:1, 4.4mL)的混合液中。於 18 小時後，於減壓環境下，移除溶劑，並以製備型 HPLC (45%乙腈/水/0.1% TFA; UV 210nm; ODS-3管柱 30x500mm; 流速 65mL/min; RT 11min)對粗產物進行純化。於移除乙腈後，將水溶液置於冰箱中過夜，直至 Z-SAA1(X)-Val-Cit-APEA-AF 完全轉變為 Z-SAA1-Val-Cit-APEA-AF。對水溶液進行冷凍乾燥，以獲得白色固體的 Z-SAA1-Val-Cit-APEA-AF (63mg, 兩步驟以上的產率 63%)。

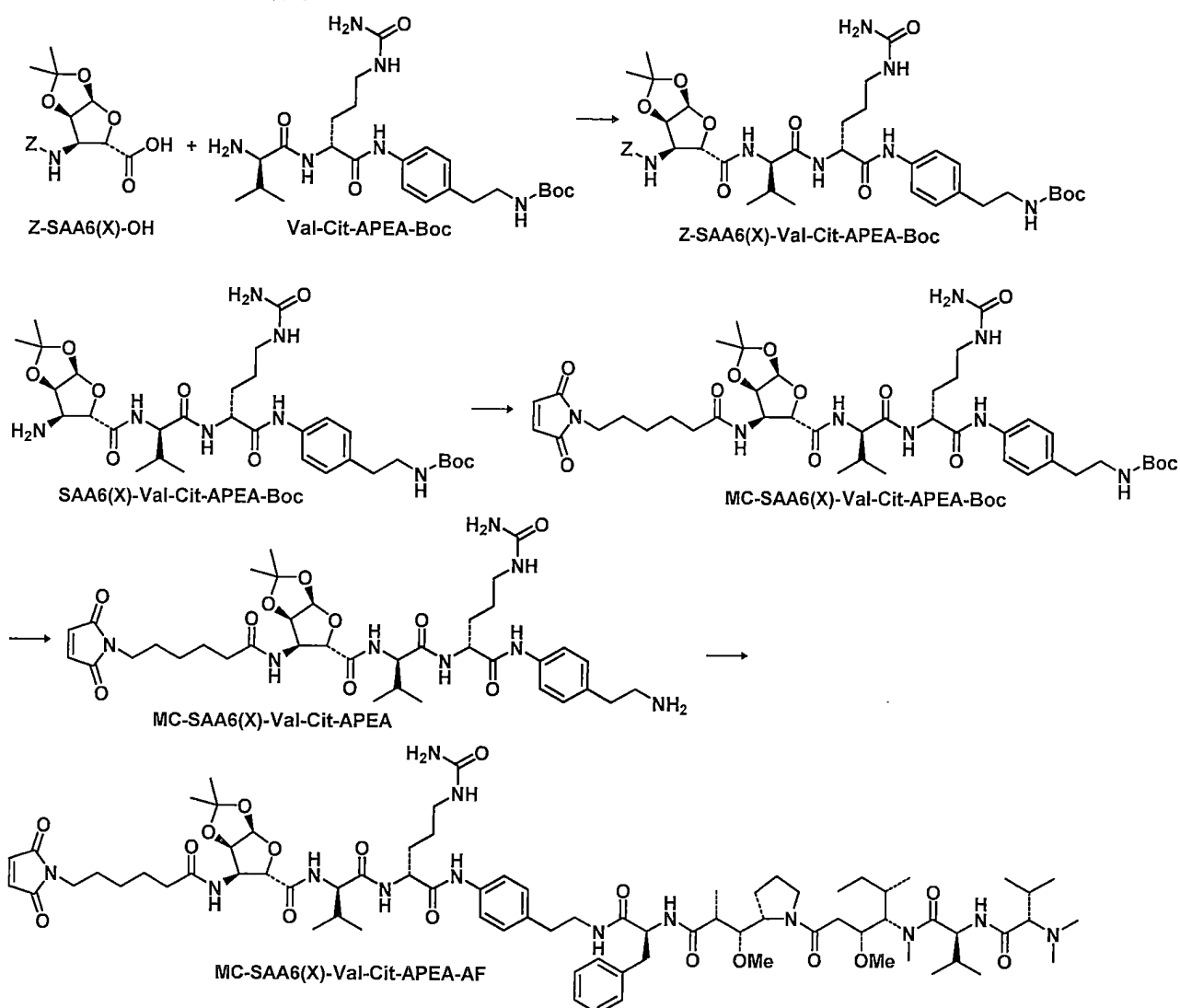
【0097】 將 Z-SAA1-Val-Cit-APEA-AF (63mg)溶於甲醇 (5mL)，之後，加入催化劑 Pd/C。將反應混合物導入氫氣球，並攪拌 3 小時。以矽藻土墊將 Pd/C 濾除後，於減壓環境下，蒸餾濾液，以獲得白色固體的 SAA1-Val-Cit-APEA-AF (52.5mg)。

【0098】 將 DIPEA (0.0056mL)加入 SAA1-Val-Cit-APEA-AF (40mg)/MC-OPFP (11.6mg)/甲醇 (4mL)的溶液中。反應攪拌過夜，並於減壓環境下，進行蒸餾。以製備型 HPLC (35%乙腈/水/0.1% TFA; UV 210nm; ODS-3管柱 30x500mm; 流速 70mL/min; RT 18min)對粗產物進行純化，以獲得白色固體的 MC-SAA1-Val-Cit-APEA-AF (MHT-71)(27mg, 47%)。LC-MS: MC-SAA1-Val-Cit-APEA-AF (MHT-71)(C<sub>76</sub>H<sub>120</sub>N<sub>13</sub>O<sub>17</sub>)所需 [MH<sup>+</sup>]=1486.9，所得 [MH<sup>+</sup>]=1487.2。

## 製備例 3

【0099】 MHT-81a[MC-SAA6-Val-Cit-APEA-AF]之合成

【0100】 連接子-毒素MHT-81a根據以下所示步驟和以下示意圖合成。



【0101】 將質子海綿 (63mg) 與 HBTU (170mg) 加入 Z-SAA6(X)-OH (100mg)/二氯甲烷(10mL)的溶液中。之後，加入 Val-Cit-APEA-Boc (150mg)/DMF (1mL)溶液，並靜置過夜。於移除溶劑後，以製備型 HPLC (50%乙腈/水/0.1% TFA; UV 210nm; ODS-3管柱 30\*500mm; 流速 70mL/min; RT 15min)對粗產物進行純化。於移除乙腈後，將水溶液於室溫靜置過夜，直

至丙酮基完全移除。將水溶液予以冷凍乾燥，以獲得白色固體的 Z-SAA6(X)-Val-Cit-APEA-Boc (122.1mg)。LC-MS: Z-SAA6(X)-Val-Cit-APEA-Boc ( $C_{40}H_{57}N_7O_{11}$ ) 所需  $[MH^+] = 812.42$ ，所得  $[MH^+] = 813.2$ 。

【0102】 將 Z-SAA6(X)-Val-Cit-APEA-Boc (50mg) 溶於甲醇 (2mL)，之後，加入催化劑 Pd/C。將反應混合物導入氫氣球，並靜置 17 小時。以矽藻土墊將催化劑 Pd/C 濾除，並於減壓環境下，蒸餾甲醇，以獲得白色固體的 SAA6(X)-Val-Cit-APEA-Boc (37.4mg)。

【0103】 將 SAA6(X)-Val-Cit-APEA-Boc (47mg) 與 MC-OPFP (28mg) 溶於 DMF (4mL)。加入 DIPEA (0.0141mL) 於反應混合物中。於 5 小時後，於減壓環境下，移除 DMF 與 DIPEA。以製備型 HPLC (50% 乙腈 / 水 / 0.1% TFA; UV 210nm; ODS-3 管柱 30\*500mm; 流速 45-50mL/min; RT 10.8min) 對粗產物進行純化，以獲得白色固體的 MC-SAA6(X)-Val-Cit-APEA-Boc (42.5mg)。LC-MS: MC-SAA6(X)-Val-Cit-APEA-Boc ( $C_{42}H_{62}N_8O_{12}$ ) 所需  $[MH^+] = 871.46$ ，所得  $[MH^+] = 871.5$ 。

【0104】 以 TFA (0.1mL) 於室溫對 MC-SAA6(X)-Val-Cit-APEA-Boc (42.5mg)/DCM (10mL) 進行處理。於 17 小時後，於減壓環境下，移除 DCM 與 TFA，以獲得淡黃色固體的 [00358] MC-SAA6(X)-Val-Cit-APEA (40mg)。LC-MS: MC-SAA6(X)-Val-Cit-APEA ( $C_{37}H_{54}N_8O_{10}$ ) 所需  $[MH^+] = 771.40$ ，所得  $[MH^+] = 771.9$ 。

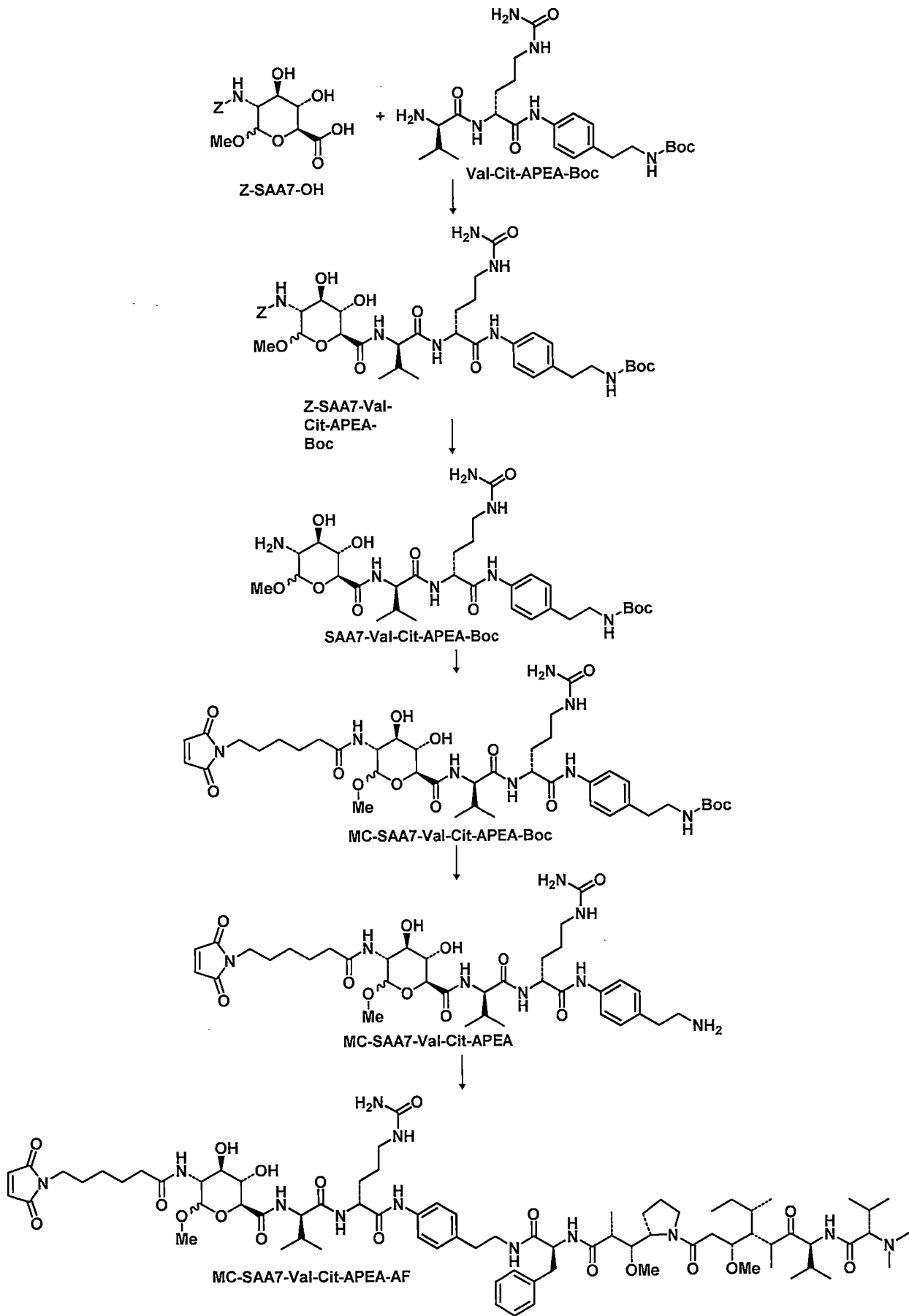
【0105】 將 MC-SAA6(X)-Val-Cit-APEA (32mg) 與海兔毒素

F (27mg) 溶於 DCM 與 DMF (10:1, 12mL) 的混合液中。之後，分別加入 HBTU (20.5mg) 與 DIPEA (0.022mL)。於 17 小時後，於減壓環境下，移除 DCM 與 DMF。以製備型 HPLC (40% 乙腈 / 水 / 0.1% TFA; UV 210nm; ODS-3 管柱 30\*500mm; 流速 30mL/min) 對粗產物進行純化，以獲得白色固體的 **MC-SAA6(X)-Val-Cit-APEA-AF** (15mg)。LC-MS: **MC-SAA6(X)-Val-Cit-APEA-AF** ( $C_{77}H_{119}N_{13}O_{17}$ ) 所需  $[MH^+]$  = 1498.89，所得  $[MH^+]$  = 1500.7。

#### 製備例 4

**【0106】 MHT-93[MC-SAA7-Val-Cit-APEA-AF] 之合成**

**【0107】 連接子-毒素 MHT-93 根據以下所示步驟和以下示意圖合成。**



【0108】 將 Val-Cit-APEA-Boc (2.46g , 5mmol) 與

Z-SAA7-OH (1.71g, 5mmol) 溶於 DMF (100mL)。之後，將 DIPEA (646.2mg, 5mmol) 與 HATU (1.90g, 5mmol) 加入反應混合物中。於室溫攪拌混合物 16 小時後，於減壓環境下，蒸餾溶劑。以乙酸乙酯 (200mL) 攪拌殘留物數小時，直至細白色粉末形成。濾除固體產物。以水 (200mL) 煮沸白色粉末 15 分鐘，並同時過濾。以熱水 (50mL) 清洗產物 2 次，並於真空下乾燥，以獲得 Z-SAA7-Val-Cit-APEA-Boc。

【0109】 將 Z-SAA7-Val-Cit-APEA-Boc (200mg) 溶於甲醇 (50mL)，之後，加入催化劑 Pd/C。將反應導入氫氣球，並靜置 17 小時。以矽藻土墊將催化劑濾除，並於減壓環境下，蒸餾甲醇，以獲得白色固體的 SAA7-Val-Cit-APEA-Boc (148mg)。

【0110】 將 SAA7-Val-Cit-APEA-Boc (240mg)、MC-OPFP (144mg) 與 DIPEA (0.072mL) 溶於 DMF (20mL)。於 5 小時後，於減壓環境下，移除 DMF 與 DIPEA。將殘留物與 45% 乙腈/水 (20mL) 混合，並進行離心。於移除液體部分後，獲得白色固體的 MC-SAA7-Val-Cit-APEA-Boc (200mg)。LC-MS: MC-SAA7-Val-Cit-APEA-Boc ( $C_{41}H_{62}N_8O_{13}$ ) 所需  $[MH^+]=875.5$ ，所得  $[MH^+]=875.8$ 。

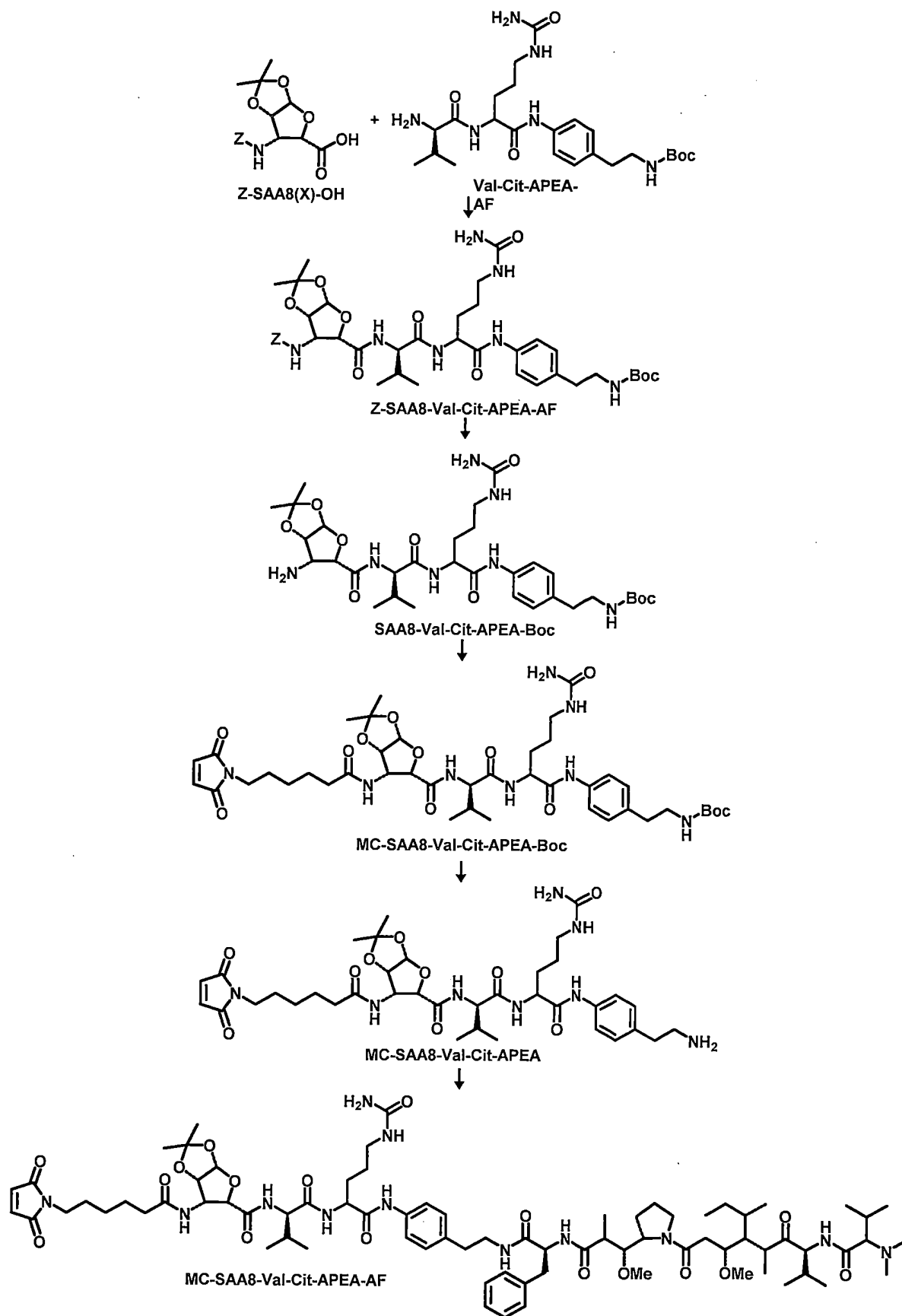
【0111】 以 TFA (0.5mL) 於室溫對 MC-SAA7-Val-Cit-APEA-Boc (200mg)/DCM (30mL) 進行處理。於 17 小時後，於減壓環境下，移除 DCM 與 TFA，以獲得淡黃色固體的 MC-SAA7-Val-Cit-APEA (180mg)。LC-MS: MC-SAA7-Val-Cit-APEA ( $C_{36}H_{54}N_8O_{11}$ ) 所需  $[MH^+]=775.4$ ，所得  $[MH^+]=776.0$ 。

**【0112】** 將 MC-SAA7-Val-Cit-APEA (80mg) 與海兔毒素 F (77mg) 溶於 DCM 與 DMF (10:1, 16.6mL) 的混合液中。之後，分別加入 HBTU (64mg) 與 DIPEA (0.064mL)。於 17 小時後，於減壓環境下，移除 DCM 與 DMF。以製備型 HPLC (40% 乙腈 / 水 / 0.1% TFA; UV 210nm; ODS-3 管柱 30\*250mm; 流速 25mL/min; RT 10.42min) 對粗產物進行純化，以獲得白色固體的 **MC-SAA7-Val-Cit-APEA-AF (MHT-93)** (50.9mg)。LC-MS: **MC-SAA7-Val-Cit-APEA-AF (MHT-93)** ( $C_{77}H_{120}N_{12}O_{18}$ ) 所需  $[MH^+]=1503.0$ ，所得  $[MH^+]=1504.1$ 。

#### 製備例 5

**【0113】 MHT-98a[MC-SAA8-Val-Cit-APEA-AF]之合成**

**【0114】** 連接子-毒素 MHT-98a 根據以下所示步驟和以下示意圖合成。



【0115】 將質子海綿 (63mg) 與 HBTU (170mg) 加入 Z-SAA8(X)-OH (100mg)/DCM (10mL) 的溶液中。之後，加入

Val-Cit-APEA-Boc (150mg)/DMF (1mL)溶液，並將反應混合物靜置過夜。於移除溶劑後，以製備型HPLC (55%乙腈/水/0.1% TFA; UV 210nm; ODS-3管柱 30\*500mm; 流速 60mL/min; RT 13min) 對殘留物進行純化，以獲得白色固體的 Z-SAA8(X)-Val-Cit-APEA-Boc (144.6mg)。LC-MS: Z-SAA8(X)-Val-Cit-APEA-Boc ( $C_{40}H_{57}N_7O_{11}$ ) 所需  $[MH^+]=812.4$ ，所得  $[MH^+]=813.4$ 。

【0116】 將 Z-SAA8(X)-Val-Cit-APEA-Boc (70mg) 溶於甲醇 (10mL)，之後，加入催化劑 Pd/C。將反應導入氫氣球，並靜置 17 小時。以矽藻土墊將催化劑濾除，並於減壓環境下，蒸餾濾液，以獲得白色固體的 SAA8(X)-Val-Cit-APEA-Boc (54mg)。

【0117】 將 SAA8(X)-Val-Cit-APEA-Boc (44mg) 與 MC-OPFP (24.2mg) 溶於 DMF (4mL)。之後，加入 DIPEA (0.0141mL)。於 5 小時後，於減壓環境下，移除 DMF 與 DIPEA。以製備型 HPLC (45%乙腈/水/0.1% TFA; UV 210nm; ODS-3管柱 30\*250mm; 流速 35-40mL/min; RT 13min) 對殘留物進行純化，以獲得白色固體的 MC-SAA8(X)-Val-Cit-APEA-Boc (40mg)。LC-MS: MC-SAA8(X)-Val-Cit-APEA-Boc ( $C_{42}H_{62}N_8O_{12}$ ) 所需  $[MH^+]=871.5$ ，所得  $[MH^+]=872.0$ 。

【0118】 以 TFA (0.1mL) 於室溫對 MC-SAA8(X)-Val-Cit-APEA-Boc (40mg)/DCM (2mL) 進行處理。於 17 小時後，於減壓環境下，移除 DCM 與 TFA，以獲得淡黃色固體的 MC-SAA8(X)-Val-Cit-APEA (40mg)。LC-MS: MC-SAA8(X)-Val-Cit-APEA ( $C_{37}H_{54}N_8O_{10}$ ) 所需  $[MH^+]=771.4$ ，

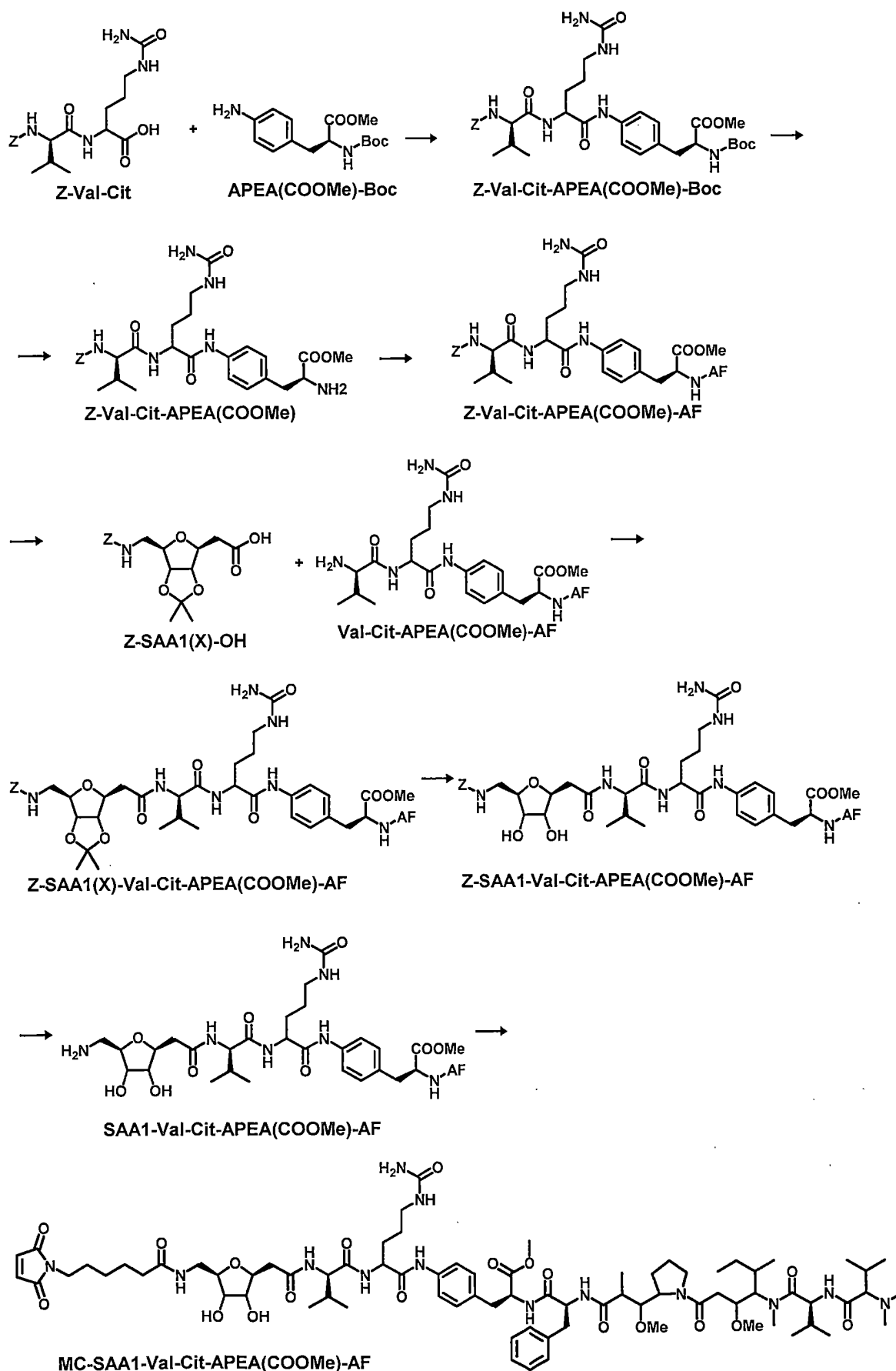
所得  $[MH^+] = 771.9$ 。

【0119】 將 MC-SAA8(X)-Val-Cit-APEA (25.6mg) 與海兔毒素 F (24.5mg) 溶於 DCM 與 DMF (10:1, 5.5mL) 的混合液中。之後，分別加入 HBTU (20.5mg) 與 DIPEA (0.022mL)。於 17 小時後，於減壓環境下，移除 DCM 與 DMF。以製備型 HPLC (40% 乙腈 / 水 / 0.1% TFA; UV 210nm; ODS-3 管柱 30\*250mm; 流速 35-40mL/min) 對殘留物進行純化，以獲得白色固體的 MC-SAA8(X)-Val-Cit-APEA-AF (3.3mg)。LC-MS: MC-SAA8(X)-Val-Cit-APEA-AF ( $C_{78}H_{120}N_{12}O_{17}$ ) 所需  $[MH^+] = 1497.9$ ，所得  $[MH^+] = 1500.5$ 。

#### 製備例 6

【0120】 CCH-028[MC-SAA1-Val-Cit-APEA(COOMe)-AF] 之合成

【0121】 連接子-毒素 CCH-028 根據以下所示步驟和以下示意圖合成。



【0122】 將 Z-Val-Cit-OH (3.24g, 7.93mmol) 加入二氯甲烷與甲醇的混合液 (3:1, 80mL) 中。於加入 APEA(COOMe)-Boc

(2.8g, 9.52mmol)後，加入偶聯劑EEDQ (2.47g, 9.52mmol)，並於室溫對混濁溶液進行攪拌。未溶的Z-Val-Cit逐漸消失，溶液逐漸清澈。於48小時後，以HPLC測試反應完成。於減壓環境下，蒸餾反應混合物，直至形成厚的糊狀物。對混合物進行過濾，並以正己烷(50mL)清洗2次，以水(50mL)清洗2次，以乙醚(50mL)清洗2次。於真空環境下，對固體產物進行乾燥，以獲得棕色粉末的Z-Val-Cit-APEA(COOMe)-Boc (75.0mg, 1.4%)。

● **【0123】** 將 Z-Val-Cit-APEA(COOMe)-Boc (75.0mg, 0.11mmol)加入二氯甲烷(8mL)中，並於室溫以三氟乙酸(0.09mL)進行處理。於4小時後，於減壓環境下，蒸餾溶劑。將殘留物與水(10mL)混合，並予以冷凍乾燥，以獲得白色粉末的Z-Val-Cit-APEA(COOMe)(96.0mg)。

● **【0124】** 將海兔毒素F (80.0mg, 0.102mmol)溶於少量DMF(1mL)，並以DCM(10mL)進行稀釋。將溶液浸於冰浴中，並加入Z-Val-Cit-APEA(COOMe)(71.4mg, 0.102mmol)及HATU(43.0mg, 0.113mmol)。於加入DIPEA(0.071mL)後，移開冰浴。於室溫攪拌混合物4小時後，於減壓環境下，蒸餾溶劑，並以製備型HPLC(43%乙腈/水/0.1% TFA; UV 210nm; ODS-3管柱30\*250mm; 流速24mL/min)對殘留物進行純化，以獲得白色固體的Z-Val-Cit-APEA(COOMe)-AF(82.0mg, 61%)。

**【0125】** 將 Z-Val-Cit-APEA(COOMe)-AF (82.0mg, 0.062mmol)溶於包含鹽酸(0.24mmol)的乙醇(10mL)。於加入Pd/C(10%, 10mg)後，將反應混合物導入氫氣球，並攪拌過夜。

以矽藻土墊將催化劑Pd/C濾除，並於減壓環境下，蒸餾濾液。將殘留物與水(10mL)混合，並予以冷凍乾燥，以獲得白色粉末的 Val-Cit-APEA(COOMe)-AF (72.8mg, 96%)。LC-MS: Val-Cit-APEA(COOMe)-AF (C<sub>61</sub>H<sub>99</sub>N<sub>11</sub>O<sub>12</sub>)所需[MH<sup>+</sup>]=1178.8，所得[MH<sup>+</sup>]=1179.7。

**【0126】** 將 Z-SAA1(X)-OH (22.0mg, 0.06mmol)溶於二氯甲烷(10mL)。於加入 HATU (25.3mg, 0.066mmol)後，將反應混合物浸於冰浴中，之後，加入 DIPEA (0.032mL, 0.06mmol)。於 10分鐘後，移開冰浴，並將 Val-Cit-APEA(COOMe)-AF (72.8mg, 0.06mmol)/DMF (3mL)溶液於室溫加入反應混合物中。於 3小時後，於減壓環境下，蒸餾溶劑，並以製備型 HPLC (45%乙腈/水 /0.1% TFA; UV 210nm; ODS-3 管柱 30\*250mm; 流速 24mL/min)對粗產物進行純化。於移除乙腈後，將水溶液於室溫靜置過夜，以使 Z-SAA1(X)-Val-Cit-APEA(COOMe)-AF 完全水解。將水溶液予以冷凍乾燥，以獲得白色固體的 Z-SAA1-Val-Cit-APEA(COOMe)-AF (43.5mg, 兩步驟以上的產率 49%)。LC-MS: Z-SAA1-Val-Cit-APEA(COOMe)-AF (C<sub>79</sub>H<sub>120</sub>N<sub>12</sub>O<sub>18</sub>)所需[MH<sup>+</sup>]=1525.9，所得[MH<sup>+</sup>]=1526.8。

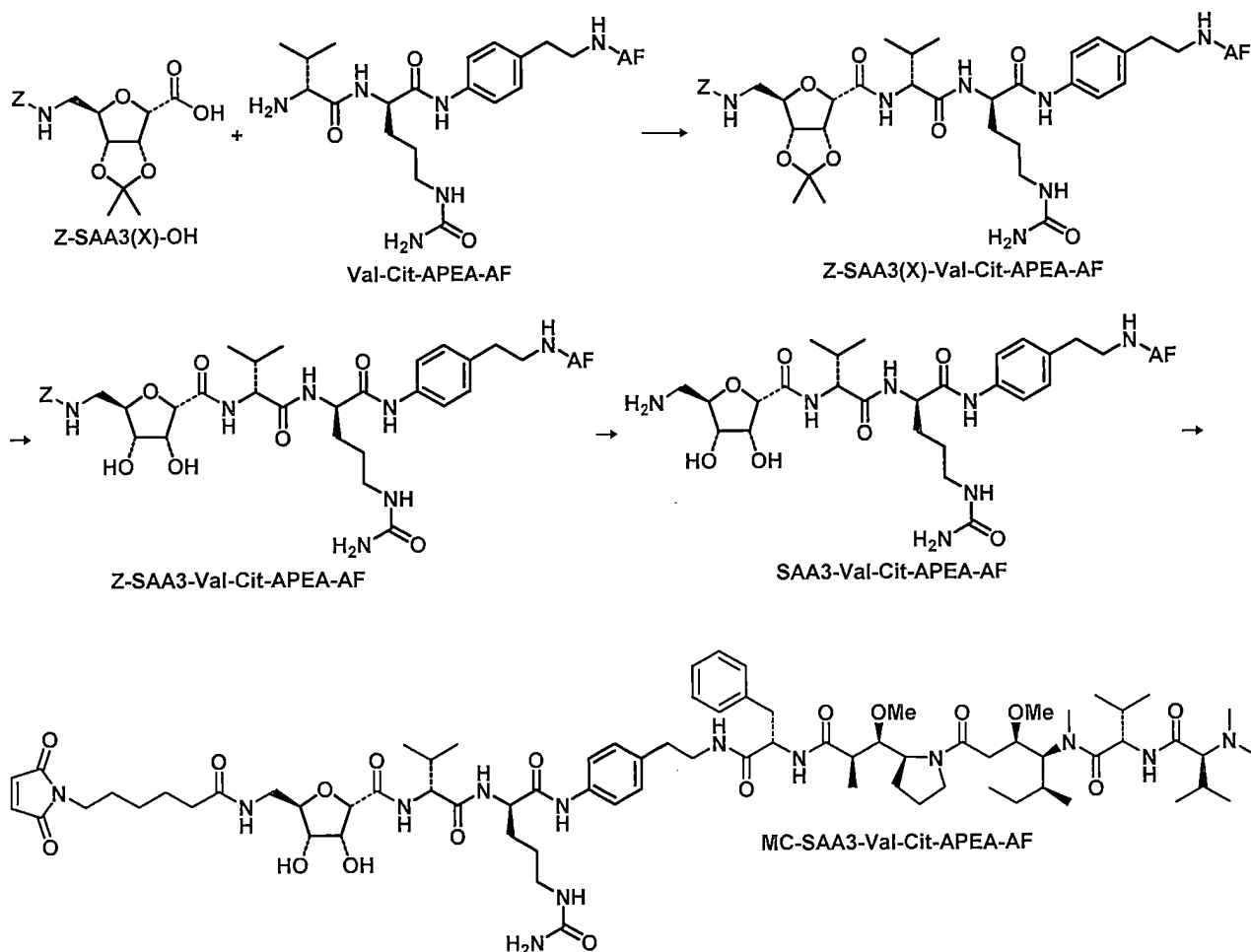
**【0127】** 將 Z-SAA1-Val-Cit-APEA(COOMe)-AF (43.5mg, 0.029mmol)溶於包含鹽酸(0.06mmol)的乙醇(5mL)。於加入 Pd/C (10%, 4.7mg)後，將反應混合物導入氫氣球，並攪拌過夜。以矽藻土墊將催化劑Pd/C濾除，並於減壓環境下，蒸餾濾液。將殘留物與水(5mL)混合，並予以冷凍乾燥，以獲得白色粉末的 SAA1-Val-Cit-APEA(COOMe)-AF (38.4mg, 94%)。

【0128】 將 DIPEA (0.004mL) 加入 SAA1-Val-Cit-APEA(COOMe)-AF (15.0mg, 0.011mmol)/MC-OPFP (4.5mg, 0.012mmol)/DMF (4mL)的溶液中。於室溫攪拌混合物1小時，並於減壓環境下，進行蒸餾。以製備型HPLC (36%乙腈/水/0.1% TFA; UV 210nm; ODS-3管柱 30x250mm; 流速24mL/min)對粗產物進行純化，以獲得白色固體的 MC-SAA1-Val-Cit-APEA(COOMe)-AF (CCH-028) (10.0mg, 60%)。LC-MS: MC-SAA1-Val-Cit-APEA(COOMe)-AF (CCH-028)( $C_{78}H_{121}N_{13}O_{19}$ ) 所需  $[MH^+]=1544.9$ ，所得  $[MH^+]=1545.8$ 。

#### 製備例 7

【0129】 CCH-035[MC-SAA3-Val-Cit-APEA-AF]之合成

【0130】 連接子-毒素CCH-035根據以下所示步驟和以下示意圖合成。



【0131】 將 HATU (22.0mg, 0.0572mmol) 與 DIPEA (0.027mL, 0.156mmol) 分別加入 Z-SAA3(X)-OH (18.2mg, 0.052mmol) 與 Val-Cit-APEA-AF (60.0mg, 0.052mmol) 溶於 DCM 與 DMF (10:1, 6mL) 的混合液中。於 18 小時後，於減壓環境下，移除溶劑，並以製備型 HPLC (43% 乙腈/水/0.1% TFA; UV 210nm; ODS-3 管柱 30\*250mm; 流速 24mL/min) 對粗產物進行純化。於移除乙腈後，將水溶液於室溫靜置過夜，直至縮丙酮基完全移除。將水溶液予以冷凍乾燥，以獲得白色固體的 Z-SAA3-Val-Cit-APEA-AF (48.0mg, 兩步驟以上的產率 65%)。

【0132】 將 Z-SAA3-Val-Cit-APEA-AF (48.0mg, 0.034mmol) 溶於包含鹽酸 (0.014mL) 的乙醇 (5mL)。於加入 Pd/C (10%, 4.7mg) 後，將反應混合物導入氫氣球，並攪拌 5 小時。以矽藻

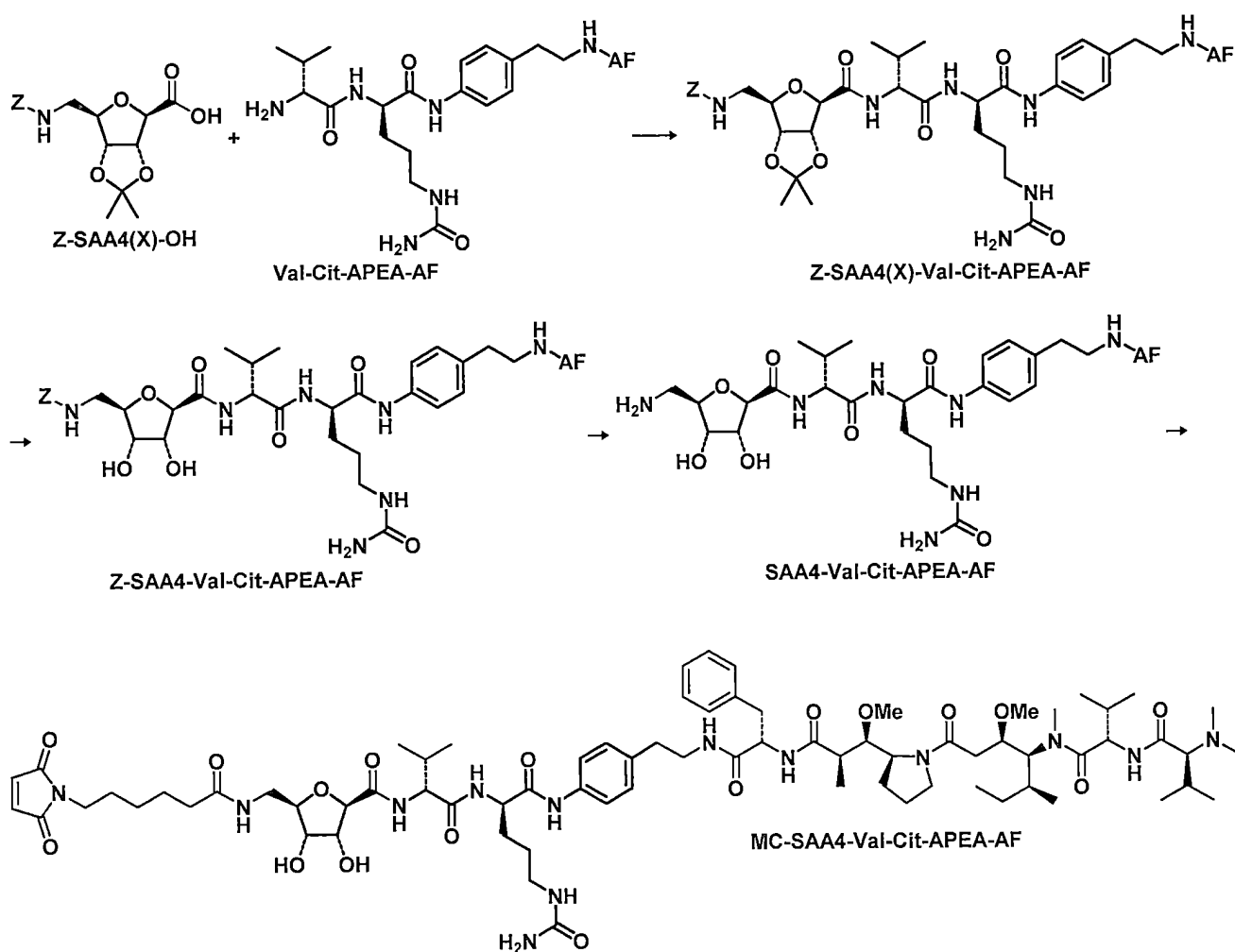
土墊將催化劑Pd/C濾除，並於減壓環境下，蒸餾濾液。將產物與水(5mL)混合，並予以冷凍乾燥，以獲得白色固體的SAA3-Val-Cit-APEA-AF(42.0mg，94%)。

【0133】 將DIPEA(0.006mL)加入SAA3-Val-Cit-APEA-AF(20.0mg，0.015mmol)/MC-OPFP(6.3mg，0.0165mmol)/DMF(4mL)的溶液中。反應於室溫攪拌1小時，並於減壓環境下，進行蒸餾。以製備型HPLC(36%乙腈/水/0.1% TFA; UV 210nm; ODS-3管柱30x250mm; 流速24mL/min)對粗產物進行純化，以獲得白色固體的MC-SAA3-Val-Cit-APEA-AF(CCH-035)(12.2mg，55%)。LC-MS: MC-SAA3-Val-Cit-APEA-AF(CCH-035)(C<sub>75</sub>H<sub>117</sub>N<sub>13</sub>O<sub>17</sub>)所需[MH<sup>+</sup>]=1473.8，所得[MH<sup>+</sup>]=1473.6。

#### 製備例8

【0134】 CCH-038[MC-SAA4-Val-Cit-APEA-AF]之合成

【0135】 連接子-毒素CCH-038根據以下所示步驟和以下示意圖合成。



【0136】 將 HATU (18.1mg, 0.0473mmol) 與 DIPEA (0.023mL, 0.129mmol) 分別加入 Z-SAA4(X)-OH (15.2mg, 0.043mmol) 與 Val-Cit-APEA-AF (50.0mg, 0.043mmol) 溶於 DCM 與 DMF (10:1, 6mL) 的混合液中。於 18 小時後，於減壓環境下，移除溶劑，並以製備型 HPLC (43% 乙腈 / 水 / 0.1% TFA; UV 210nm; ODS-3 管柱 30\*250mm; 流速 24mL/min) 對粗產物進行純化。於移除乙腈後，將水溶液於室溫靜置過夜，直至丙酮基完全移除。將水溶液予以冷凍乾燥，以獲得白色固體的 Z-SAA3-Val-Cit-APEA-AF (32.4mg, 兩步驟以上的產率 53%)。

【0137】 將 Z-SAA3-Val-Cit-APEA-AF (32.4mg, 0.0229mmol) 溶於包含鹽酸 (0.09mmol) 的乙醇 (5mL)。於加入 Pd/C (10%,

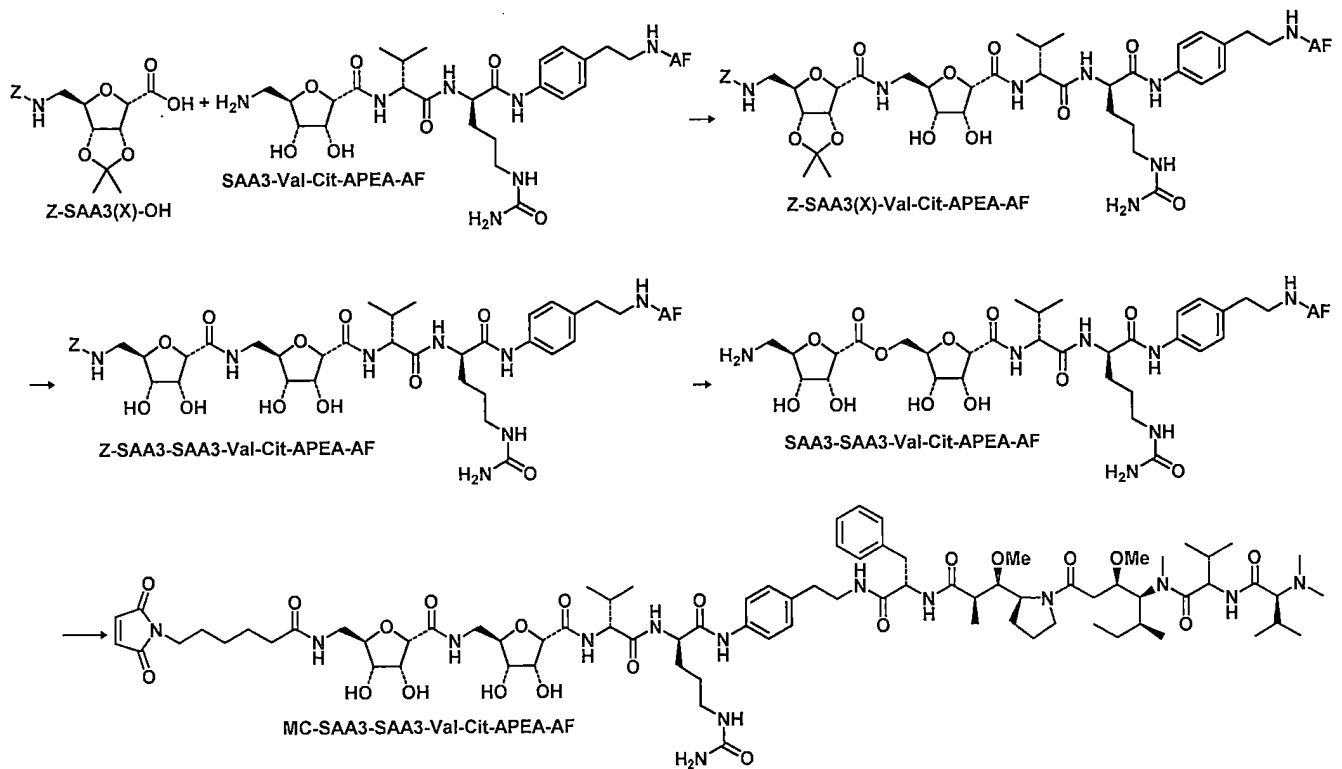
4.0mg)後，將反應混合物導入氫氣球，並攪拌5小時。以矽藻土墊將催化劑Pd/C濾除，並於減壓環境下，蒸餾濾液。將產物與水(5mL)混合，並予以冷凍乾燥，以獲得白色固體的SAA4-Val-Cit-APEA-AF (30.0mg, 98%)。

【0138】 將DIPEA (0.006mL)加入SAA4-Val-Cit-APEA-AF (20.0mg, 0.015mmol)/MC-OPFP (6.3mg, 0.0165mmol)/DMF (4mL)的溶液中。反應於室溫攪拌1小時，並於減壓環境下，進行蒸餾。以製備型HPLC (36%乙腈/水/0.1% TFA; UV 210nm; ODS-3管柱30x250mm; 流速24mL/min)對粗產物進行純化，以獲得白色固體的MC-SAA4-Val-Cit-APEA-AF (CCH-038) (15.6mg, 70%)。LC-MS: MC-SAA4-Val-Cit-APEA-AF (CCH-038)(C<sub>75</sub>H<sub>117</sub>N<sub>13</sub>O<sub>17</sub>) 所需 [MH<sup>+</sup>]=1473.8，所得 [MH<sup>+</sup>]=1473.6。

### 製備例9

【0139】 CCH-041[MC-SAA3-SAA3-Val-Cit-APEA-AF] 之合成

【0140】 連接子-毒素CCH-041根據以下所示步驟和以下示意圖合成。



【0141】 將 HATU (17.3mg, 0.045mmol) 與 DIPEA (0.02mL, 0.123mmol) 分別加入 Z-SAA3(X)-OH (14.5mg, 0.041mmol) 與 SAA3-Val-Cit-APEA-AF (54.5mg, 0.041mmol) 溶於 DCM 與 DMF (10:1, 6mL) 的混合液中。於 18 小時後，於減壓環境下，蒸餾溶劑，並以製備型 HPLC (41% 乙腈/水/0.1% TFA; UV 210nm; ODS-3 管柱 30\*250mm; 流速 24mL/min) 對粗產物進行純化。於移除乙腈後，將水溶液於室溫靜置過夜，直至縮酮基完全移除。將水溶液予以冷凍乾燥，以獲得白色固體的 Z-SAA3-SAA3-Val-Cit-APEA-AF (21.3mg, 兩步驟以上的產率 33%)。

【0142】 將 Z-SAA3-SAA3-Val-Cit-APEA-AF (21.3mg, 0.0135mmol) 溶於包含鹽酸 (0.052mmol) 的乙醇 (5mL)。於加入 Pd/C (10%, 2.5mg) 後，將反應混合物導入氫氣球，並攪拌 5 小時。以矽藻土墊將催化劑 Pd/C 濾除，並於減壓環境下，蒸餾濾

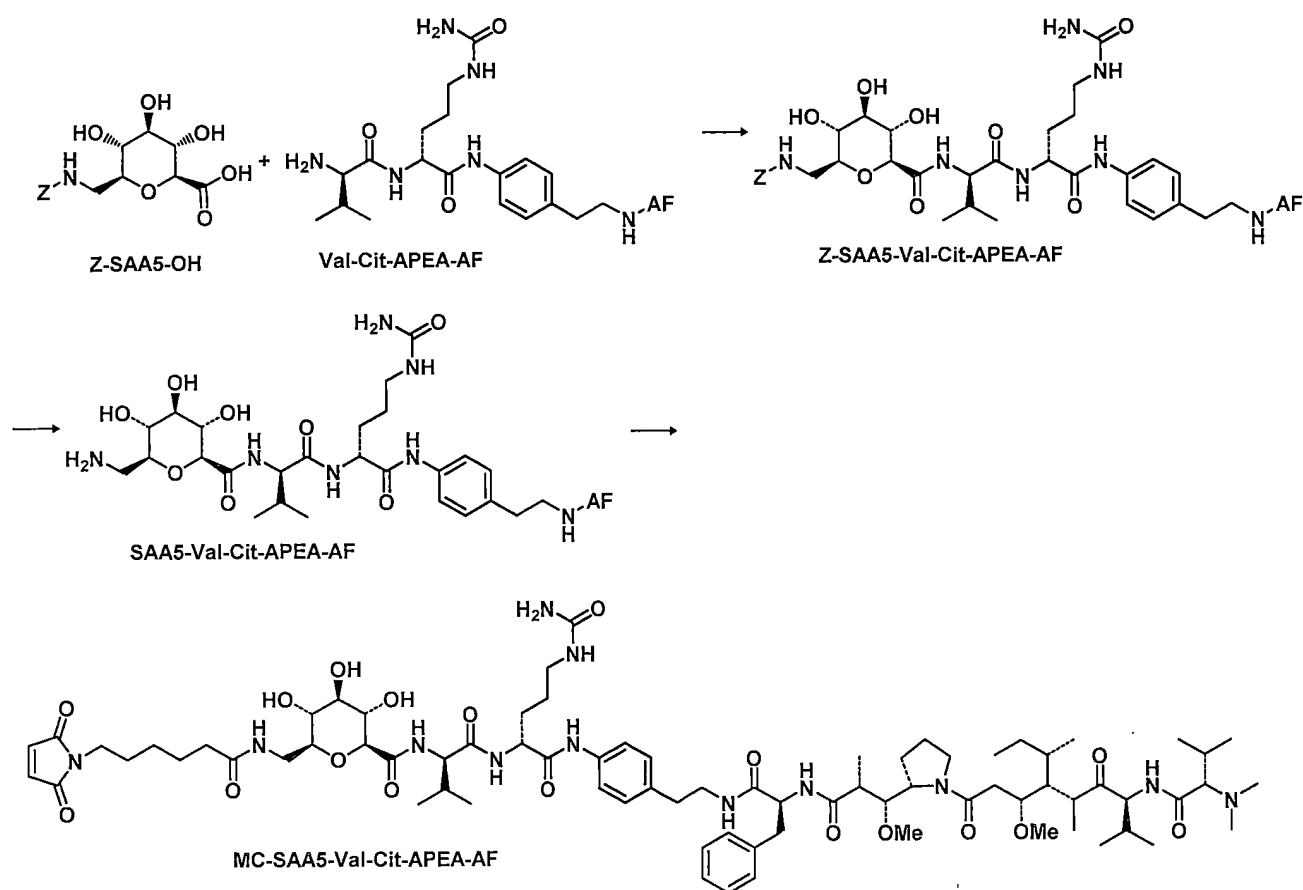
液。將產物與水(5mL)混合，並予以冷凍乾燥，以獲得白色固體的SAA3-SAA3-Val-Cit-APEA-AF (16.1mg，81%)。

【0143】將 DIPEA (0.004mL) 加入 SAA3-SAA3-Val-Cit-APEA-AF (16.1mg，0.0109mmol)/MC-OPFP (4.5mg，0.012mmol)/DMF (5mL)的溶液中。於室溫攪拌反應混合物1小時，並於減壓環境下，進行蒸餾。以製備型HPLC (33%乙腈/水/0.1% TFA; UV 210nm; ODS-3管柱30x250mm; 流速24mL/min)對粗產物進行純化，以獲得白色固體的 **MC-SAA3-SAA3-Val-Cit-APEA-AF (CCH-041)**(9.2mg，52%)。LC-MS: **MC-SAA3-SAA3-Val-Cit-APEA-AF (CCH-041)** ( $C_{81}H_{126}N_{14}O_{21}$ ) 所需  $[MH^+]=1633.0$ ，所得  $[MH^+]=1633.2$ 。

#### 製備例 10

【0144】 **FCW-016[MC-SAA5-Val-Cit-APEA-AF]**之合成

【0145】 連接子-毒素FCW-016根據以下所示步驟和以下示意圖合成。



【0146】 將 HATU (40mg , 0.1060mmol) 加入 Val-Cit-APEA-AF (99mg , 0.0884mmol)、Z-SAA5-OH (36mg , 0.1060mmol)與 DIPEA (0.046mL , 0.2651mmol)溶於 DMF (2mL) 與二氯甲烷(20mL)的攪拌溶液中。於室溫攪拌12小時後，蒸餾溶劑，並以製備型HPLC (43%乙腈/水/0.1% TFA; UV 210nm; ODS-3管柱 30\*250mm; 流速 24mL/min)對殘留物進行純化。於移除乙腈後，將水溶液於室溫靜置過夜，直至丙酮基完全移除。將水溶液予以冷凍乾燥，以獲得白色粉末的 Z-SAA5-Val-Cit-APEA-AF (33mg , 26%)。LC-MS: Z-SAA5-Val-Cit-APEA-AF (C<sub>75</sub>H<sub>115</sub>N<sub>11</sub>O<sub>17</sub>) 所需 [M+2H]<sup>2+</sup> = 721.9，所得 [M+2H]<sup>2+</sup> = 723.6。

【0147】 將 Z-SAA5-Val-Cit-APEA-AF (35.0mg , 0.024mmol)

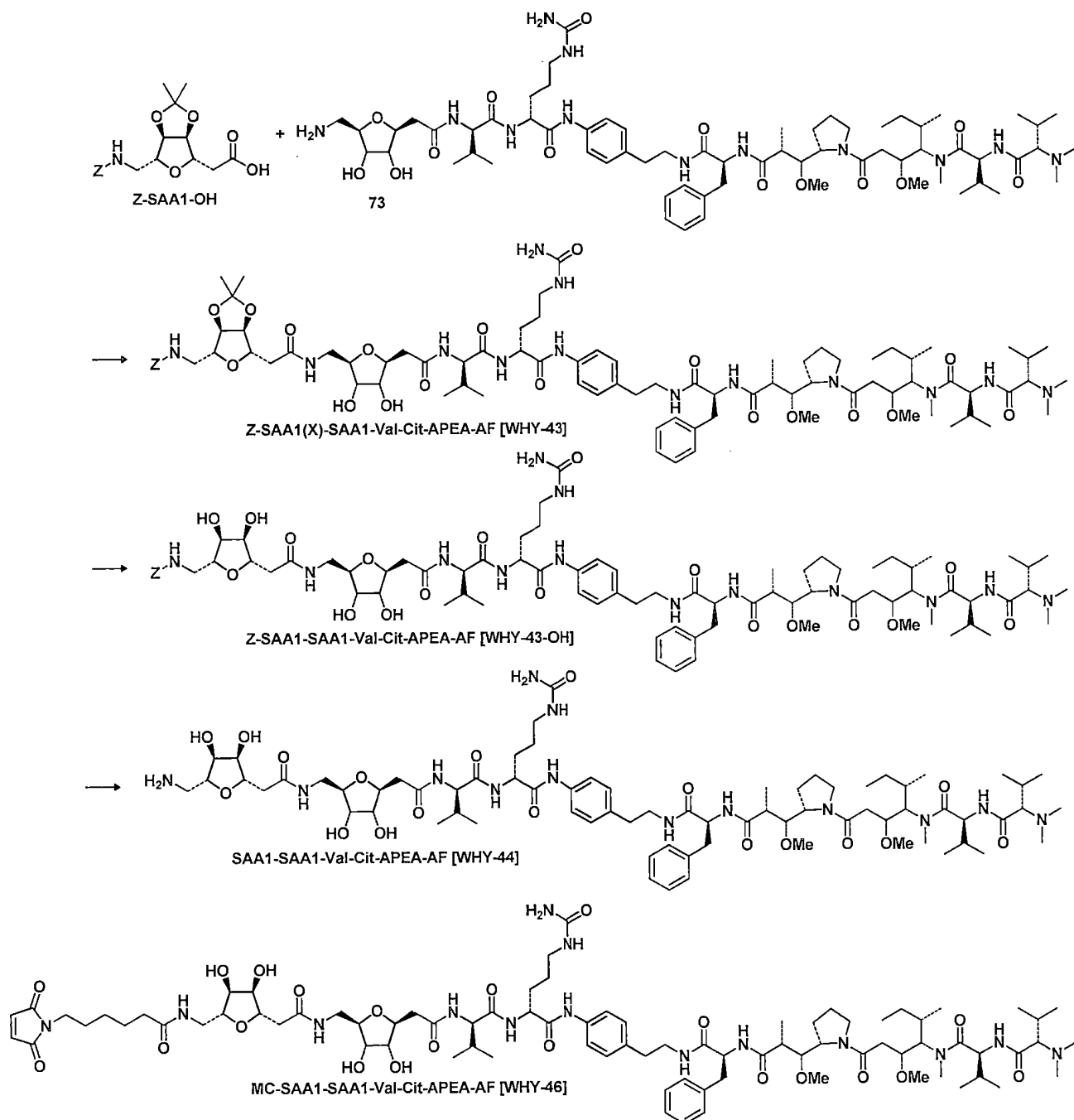
溶於包含鹽酸(0.048mmol)的乙醇(8mL)。於加入Pd/C (10%，2.6mg)後，將反應混合物導入氫氣球，並攪拌16小時。以矽藻土墊將催化劑Pd/C濾除，並於減壓環境下，蒸餾濾液。將產物與水(10mL)混合，並予以冷凍乾燥，以獲得白色固體的SAA5-Val-Cit-APEA-AF (30.0mg，95%)。LC-MS: SAA5-Val-Cit-APEA-AF (C<sub>67</sub>H<sub>109</sub>N<sub>11</sub>O<sub>15</sub>) 所需 [M+2H]<sup>2+</sup> = 654.9，所得 [M+2H]<sup>2+</sup> = 656.6。

【0148】將 DIPEA (0.0066mL，0.0378mmol) 加入 SAA5-Val-Cit-APEA-AF (16.5mg，0.0126mmol)/MC-OPFP (5.7mg，0.0151mmol)/DMF (3mL)的溶液中。反應於室溫攪拌3小時，並於減壓環境下，進行蒸餾。以製備型HPLC (36%乙腈/水/0.1% TFA; UV 210nm; ODS-3 管柱 30x250mm; 流速 24mL/min) 對粗產物進行純化，以獲得白色固體的MC-SAA5-Val-Cit-APEA-AF (FCW-016) (12.0mg，63%)。LC-MS: MC-SAA5-Val-Cit-APEA-AF (FCW-016) (C<sub>77</sub>H<sub>120</sub>N<sub>12</sub>O<sub>18</sub>) 所需 [M+2H]<sup>2+</sup> = 751.4，所得 [M+2H]<sup>2+</sup> = 753.1。

### 製備例 11

【0149】 WHY-46[MC-SAA1-SAA1-Val-Cit-APEA-AF] 之合成

【0150】 連接子-毒素 WHY-46 根據以下所示步驟和以下示意圖合成。



【0151】 將 Z-SAA1(X)-OH (28.0mg, 0.076mmol) 溶於二氯甲烷(1mL)。於加入 HATU (23.4mg, 0.061mmol) 後，將反應混合物浸於冰浴中，之後，加入 DIPEA (7.9mg, 0.061mmol)。於 10 分鐘後，移開冰浴，並將 SAA1-Val-Cit-APEA-AF (70.0mg, 0.051mmol)/DMF (3mL) 溶液於室溫加入反應混合物中。於 1 小時後，於減壓環境下，蒸餾溶劑，並以製備型 HPLC (39% 乙腈

/水 /0.1% TFA; UV 210nm; ODS-3 管柱 30\*250mm; 流速 25mL/min)對粗產物進行純化。於移除乙腈後，將水溶液於室溫靜置過夜，以使 Z-SAA1(X)-SAA1-Val-Cit-APEA-AF 完全水解。將水溶液予以冷凍乾燥，以獲得白色固體的 Z-SAA1-SAA1-Val-Cit-APEA-AF (64mg，兩步驟以上的產率 78%)。LC-MS: Z-SAA1-SAA1-Val-Cit-APEA-AF ( $C_{81}H_{125}N_{13}O_{20}$ ) 所需  $[MH^+]=1602.0$ ，所得  $[MH^+]=1601.5$ 。

【0152】 將 Z-SAA1-SAA1-Val-Cit-APEA-AF (64.0mg，0.042mmol) 溶於包含鹽酸 (0.136mmol) 的乙醇 (20mL)。於加入 Pd/C (10%，6.5mg) 後，將反應混合物導入氫氣球，並攪拌過夜。以矽藻土墊將催化劑 Pd/C 濾除，並於減壓環境下，蒸餾濾液。將產物與水 (10mL) 混合，並予以冷凍乾燥，以獲得白色固體的 SAA1-SAA1-Val-Cit-APEA-AF (60.0mg，97%)。LC-MS: SAA1-SAA1-Val-Cit-APEA-AF ( $C_{73}H_{119}N_{13}O_{18}$ ) 所需  $[MH^+]=1466.9$ ，所得  $[MH^+]=1467.5$ 。

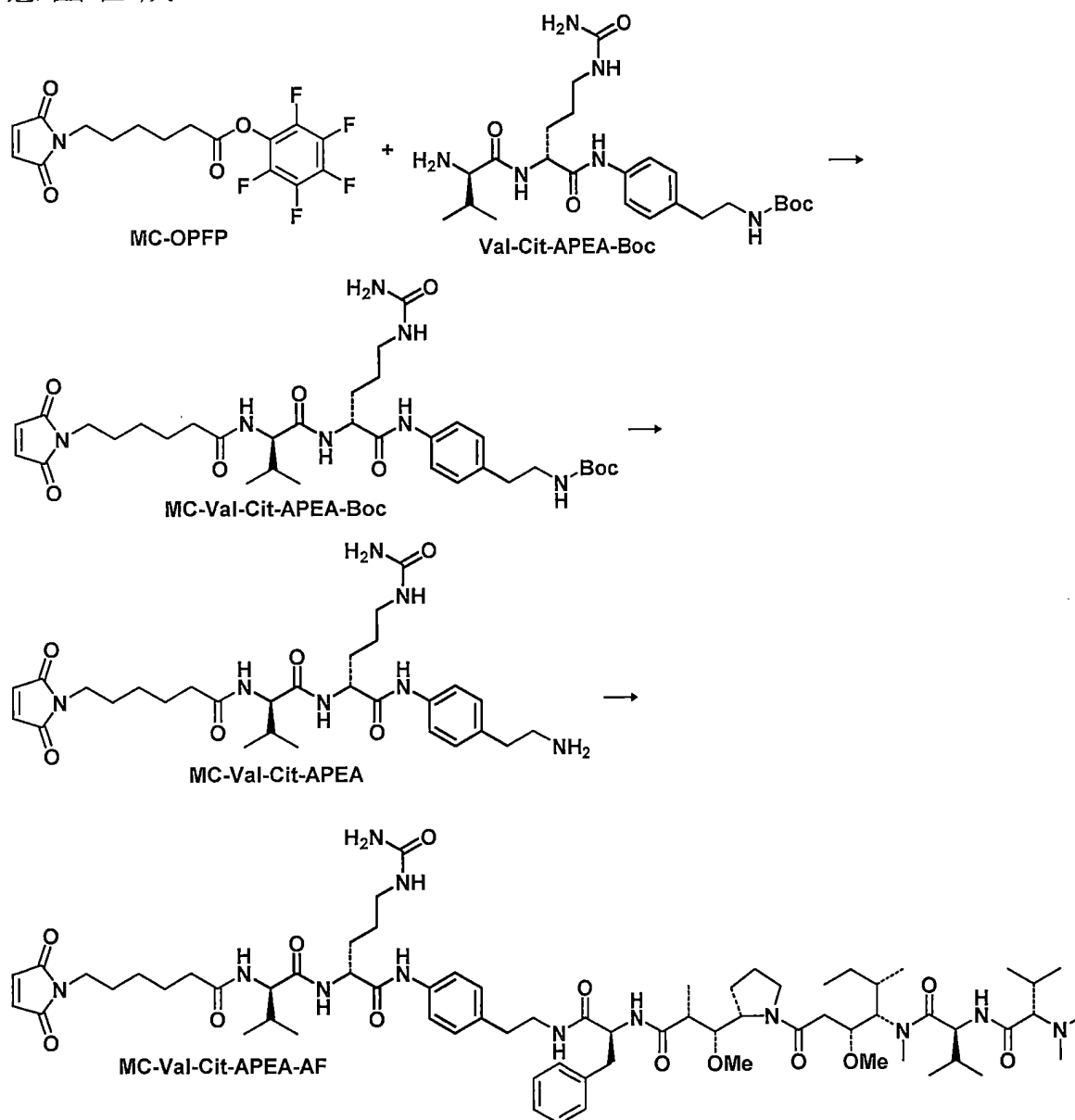
【0153】 將 SAA1-SAA1-Val-Cit-APEA-AF (30.0mg，0.019mmol) 與 DIPEA (7.4mg，0.057mmol) 溶於 DMF (2mL)。將反應混合物浸於冰浴後，加入 MC-OPFP (9.0mg，0.023mmol)。於 10 分鐘後，移開冰浴，並於室溫攪拌混合物 1 小時。於減壓環境下，蒸餾溶劑，並以製備型 HPLC (33% 乙腈 / 水 / 0.1% TFA; UV 210nm; ODS-3 管柱 30\*250mm; 流速 25mL/min) 對粗產物進行純化，以獲得白色固體的 MC-SAA1-SAA1-Val-Cit-APEA-AF (WHY-46) (18.5mg，53%)。LC-MS: MC-SAA1-SAA1-Val-Cit-APEA-AF (WHY-46) ( $C_{83}H_{130}N_{14}O_{21}$ )

所需  $[MH^+] = 1660.0$ ，所得  $[MH^+] = 1660.7$ 。

### 比較製備例 12

#### 【0154】 MHT-87[MC-Val-Cit-APEA-AF]之合成

【0155】 連接子-毒素 MHT-87 根據以下所示步驟和以下示意圖合成。



【0156】 將 Val-Cit-APEA-Boc (65mg) 與 MC-OPFP (50mg) 溶於 DMF (5mL)，並加入 DIPEA (0.023mL)。於 5 小時後，於減壓環境下，移除 DMF 與 DIPEA。以製備型 HPLC (50% 乙腈 / 水 / 0.1%

TFA; UV 210nm; ODS-3管柱 50x500mm; 流速 80mL/min; RT 13.60min) 對粗產物進行純化，以獲得白色固體的 MC-Val-Cit-APEA-Boc (40mg)。LC-MS: MC-Val-Cit-APEA-Boc ( $C_{34}H_{51}N_7O_8$ ) 所需  $[MH^+] = 686.4$ ，所得  $[MH^+] = 687.3$ 。

【0157】 於室溫，將 MC-Val-Cit-APEA-Boc (40mg)/DCM (5mL) 以 TFA (300L) 進行處理。於 17 小時後，於減壓環境下，移除 DCM 與 TFA，以獲得淡黃色固體的 MC-Val-Cit-APEA (46mg)。LC-MS: MC-Val-Cit-APEA ( $C_{29}H_{43}N_7O_6$ ) 所需  $[MH^+] = 586.3$ ，所得  $[MH^+] = 586.7$ 。

【0158】 將 MC-Val-Cit-APEA (37mg) 與海兔毒素 F (47mg) 溶於 DCM 與 DMF (10:1, 3.7mL) 的混合液中。之後，加入 HBTU (37mg) 與 DIPEA (0.037mL)。於 17 小時後，於減壓環境下，移除 DCM 與 DMF 以製備型 HPLC (40% 乙腈 / 水 / 0.1% TFA; UV 210nm; ODS-3管柱 30\*250mm; 流速 25mL/min; RT 14min) 對粗產物進行純化，以獲得白色固體的 MC-Val-Cit-APEA-AF (MHT-87) (9mg)。LC-MS: MC-Val-Cit-APEA-AF (MHT-87) ( $C_{70}H_{109}N_{11}O_{13}$ ) 所需  $[MH^+] = 1312.8$ ，所得  $[MH^+] = 1315.2$ 。

<抗體藥物複合物(ADC)>

<抗體-連接子-毒素>

實施例 1：

【0159】 於含有 6.7% 有機溶劑之共溶劑系統中接合 EG12014-MHT-71

【0160】 取 12 mL 的 EG12014 (EirGenix Inc. 生產)(初始濃度：

12.5 mg/mL)加入 269  $\mu$ L的 10 mM TCEP (2.5莫耳當量)，溶於硼酸鹽 (borate)緩衝液中，混合攪拌於 37°C 反應兩小時。接著，再將 3.55 mL、3 mM配製於 30% (v/v) DMSO中的連接子-毒素 MHT-71 (9.9莫耳當量)加入上述抗體溶液中於 4°C 反應 30分鐘 (此混合溶液中之有機溶劑最終濃度為約 6.7%)。加入 1.5 mL的 0.1 M 半胱氨酸 (cysteine) 以終止反應。使用脫鹽管柱 (ThermoFisher Scientific, MWCO: 40K) 將製得的 EG12014-MHT-71進行純化。在沖提的過程中，將緩衝液置換為 PBS緩衝液 (2.67 mM KCl, 1.47 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 137.93 mM NaCl, 8.06 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )。使用疏水作用層析 (HIC)法 (如下所述)和粒徑篩析層析 (SEC)法 (如下所述)分別鑑定平均藥物抗體比例 (drug-to-antibody ratio; DAR) 及高分子量物質 (high molecular weight species; HMWS)。

【0161】 第 2 圖顯示所製得的 ADC (EG12014-MHT-71) 的 DAR 多分佈在 2 和 4。所製得的 EG12014-MHT-71 的平均 DAR 約為 3.7，接合效率約為 95%。

### 疏水作用層析法 (Hydrophobic Interaction Chromatography analysis; HIC analysis)

【0162】 使用具有 Butyl NPR (4.6 $\times$ 35 mm) TOSOH 管柱的 Agilent HPLC 分析藥物抗體比例 (DAR) 圖譜。移動相 A 包括 25 mM 的磷酸鈉、1.5 M 硫酸銨、pH 6.95，且移動相 B 包括 25 mM 磷酸鈉、25% 異丙醇、pH 6.95。將 15  $\mu$ L 的樣品以 0.8 mL/min 的流速注入管柱，並在梯度模式 (gradient mode) 下進行分離：

0~100%移動相B，12分鐘內。偵測在波長280 nm的吸收值。

### 粒徑篩析層析法 (Size-Exclusion Chromatography analysis; SEC analysis)

【0163】 使用具有 Yarra 3 $\mu$ m SEC-3000 (300 x 7.8mm)管柱的 Waters PDA 996 HPLC，依據尺寸分離抗體單體和產物聚集物。移動相包括0.020M的磷酸鉀、0.025 M氯化鉀、及異丙醇5%(v/v)、pH 6.95。將30  $\mu$ L的樣品以0.5 mL/min的流速注入管柱，並在等度條件(isocratic conditions)下分離。偵測在波長280 nm的吸收值。將主要波峰出現之前所沖提出來的物質收集在一起，稱之為高分子量物質(HMWS)。

### 實施例 2：

【0164】 於水相中接合 **EG12014-MHT-71**

【0165】 取0.14 mL的EG12014 (EirGenix Inc.生產)(初始濃度：7.5 mg/mL)加入3.4  $\mu$ L的5 mM TCEP (2.4莫耳當量)，溶於硼酸鹽(borate)緩衝液中，混合攪拌於37 $^{\circ}$ C反應兩小時。接著，再將13.9  $\mu$ L、5 mM配製於二次去離子水中的連接子-毒素MHT-71 (9.9莫耳當量)加入上述抗體溶液中於4 $^{\circ}$ C反應30分鐘(此混合溶液為純水相)。加入15  $\mu$ L的0.2 M半胱氨酸(cysteine)以終止反應。使用脫鹽管柱(ThermoFisher Scientific, MWCO: 40K)將製得的EG12014-MHT-71進行純化。在沖提的過程中，將緩衝液置換為PBS緩衝液(2.67 mM KCl, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137.93 mM NaCl, 8.06 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O)。使用疏水作用層析

法和粒徑篩析層析法分別鑑定平均 DAR 及 HMWS。

【0166】 第 3A 圖顯示所製得的 ADC(EG12014-MHT-71) 的 DAR 多分佈在 2 和 4。所製得的 EG12014-MHT-71 的平均 DAR 約為 3.9，接合效率約為 96%。

### 實施例 3：

【0167】 於水相中接合 **EG12014-MHT-71**

【0168】 取 0.14 mL 的 EG12014 (EirGenix Inc. 生產)(初始濃度：7.5 mg/mL) 加入 4.8  $\mu$ L 的 5 mM TCEP (3.4 莫耳當量)，溶於硼酸鹽(borate)緩衝液中，混合攪拌於 37°C 反應兩小時。接著，再將 13.9  $\mu$ L、5 mM 配製於二次去離子水中的連接子-毒素 MHT-71 (9.9 莫耳當量) 加入上述抗體溶液中於 4°C 反應 30 分鐘(此混合溶液為純水相)。加入 15  $\mu$ L 的 0.2 M 半胱氨酸(cysteine) 以終止反應。使用脫鹽管柱(ThermoFisher Scientific, MWCO: 40K) 將製得的 EG12014-MHT-71 進行純化。在沖提的過程中，將緩衝液置換為 PBS 緩衝液(2.67 mM KCl, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137.93 mM NaCl, 8.06 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O)。使用疏水作用層析法和粒徑篩析層析法分別鑑定平均 DAR 及 HMWS。

【0169】 第 3B 圖顯示所製得的 ADC(EG12014-MHT-71) 的 DAR 多分佈在 4 和 6。所製得的 EG12014-MHT-71 的平均 DAR 約為 5.4，接合效率約為 99%。

### 實施例 4：

【0170】 於含有 16.7% 有機溶劑之共溶劑系統中接合

**IgG1-MHT-47**

【0171】 取 0.1 mL 的人類 IgG1 (Sigma)(初始濃度：2.6 mg/mL)加入 1.6  $\mu$ L 的 2.5 mM TCEP (2.4 莫耳當量)，溶於硼酸鹽 (borate) 緩衝液中，混合攪拌於 37°C 反應兩小時。接著，再將 29.0  $\mu$ L、363  $\mu$ M 配製於 75%(v/v)DMSO 中的連接子-毒素 MHT-47 (9.9 莫耳當量) 加入上述抗體溶液中於 4°C 反應 30 分鐘 (此混合溶液中之有機溶劑最終濃度為約 16.7%)。加入 5  $\mu$ L 的 0.1 M 半胱氨酸 (cysteine) 以終止反應。使用脫鹽管柱 (ThermoFisher Scientific, MWCO: 40K) 將製得的 IgG1-MHT-47 進行純化。在沖提的過程中，將緩衝液置換為 PBS 緩衝液 (2.67 mM KCl, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137.93 mM NaCl, 8.06 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O)。使用疏水作用層析法和粒徑篩析層析法分別鑑定平均 DAR 及 HMWS。

【0172】 第 4 圖顯示所製得的 ADC(IgG1-MHT-47) 的 DAR 多分佈在 2 和 4。所製得的 IgG1-MHT-47 的平均 DAR 約為 3.7，接合效率約為 93%。

**實施例 5：**

【0173】 於含有 2% 有機溶劑之共溶劑系統中接合  
**IgG1-MHT-47**

【0174】 取 60  $\mu$  L 的人類 IgG1 (Sigma)(初始濃度：5.7 mg/mL)加入 1.2  $\mu$ L 的 10 mM TCEP (2.2 莫耳當量)，溶於硼酸鹽 (borate) 緩衝液中，混合攪拌於 37°C 反應兩小時。接著，再將 4.6  $\mu$ L、3 mM 配製於 30%(v/v)DMSO 中的連接子-毒素 MHT-47

(6莫耳當量)加入上述抗體溶液中於4°C反應30分鐘(此混合溶液中之有機溶劑最終濃度為約2%)。加入0.5 μL的0.2 M半胱氨酸(cysteine)以終止反應。使用脫鹽管柱(ThermoFisher Scientific, MWCO: 40K)將製得的IgG1-MHT-47進行純化。在沖提的過程中，將緩衝液置換為PBS緩衝液(2.67 mM KCl, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137.93 mM NaCl, 8.06 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O)。使用疏水作用層析法和粒徑篩析層析法分別鑑定平均DAR及HMWS。

【0175】 第5圖顯示所製得的ADC(IgG1-MHT-47)的DAR多分佈在2和4。所製得的IgG1-MHT-47的平均DAR約為3.7，接合效率約為93%。

#### 實施例6：

【0176】 於含有5.5%有機溶劑之共溶劑系統中接合 **Herceptin®-MHT-47**

【0177】 取0.3 mL的Herceptin®(trastuzumab)(Roche)(初始濃度：10.3 mg/mL)加入5.2 μL的10 mM TCEP (2.5莫耳當量)，溶於硼酸鹽(borate)緩衝液中，混合攪拌於37°C反應兩小時。接著，再將69.1 μL、3 mM配製於30%(v/v)DMSO中的連接子-毒素MHT-47 (9.9莫耳當量)加入上述抗體溶液中於4°C反應30分鐘(此混合溶液中之有機溶劑最終濃度為約5.5%)。加入20 μL的0.1 M半胱氨酸(cysteine)以終止反應。使用脫鹽管柱(ThermoFisher Scientific, MWCO: 40K)將製得的Herceptin®-MHT-47進行純化。在沖提的過程中，將緩衝液置

換為PBS緩衝液(2.67 mM KCl, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137.93 mM NaCl, 8.06 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O)。使用疏水作用層析法和粒徑篩析層析法分別鑑定平均DAR及HMWS。

【0178】 第6圖顯示所製得的ADC(Herceptin®-MHT-47)的DAR多分佈在2和4。所製得的Herceptin®-MHT-47的平均DAR約為3.7，接合效率約為92%。

#### 實施例7：

【0179】 於水相中接合Herceptin®-CCH-038

【0180】 取0.22 mL的Herceptin®(trastuzumab)(Roche)(初始濃度：11.3 mg/mL)加入4.2 μL的10 mM TCEP (2.5莫耳當量)，溶於硼酸鹽(borate)緩衝液中，混合攪拌於37°C反應兩小時。接著，再將55.4 μL、3 mM配製於二次去離子水中的連接子-毒素CCH-038 (9.9莫耳當量)加入上述抗體溶液中於4°C反應30分鐘(此混合溶液為純水相)。加入2 μL的0.2 M半胱氨酸(cysteine)以終止反應。使用脫鹽管柱(ThermoFisher Scientific, MWCO: 40K)將製得的Herceptin®-CCH-038進行純化。在沖提的過程中，將緩衝液置換為PBS緩衝液(2.67 mM KCl, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137.93 mM NaCl, 8.06 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O)。使用疏水作用層析法和粒徑篩析層析法分別鑑定平均DAR及HMWS。

【0181】 第7圖顯示所製得的ADC(Herceptin®-CCH-038)的DAR多分佈在2和4。所製得的Herceptin®-CCH-038的平均DAR約為4.0，接合效率約為97%。

**實施例 8：**

**【0182】** 於含有 1.6% 有機溶劑之共溶劑系統中接合 **Erbitux®-CCH-028**

**【0183】** 取 0.6 mL 的 Erbitux®(Cetuximab)(Merck)(初始濃度：4.2 mg/mL)加入 3.8  $\mu$ L 的 10 mM TCEP (2.2 莫耳當量)，溶於硼酸鹽 (borate) 緩衝液中，混合攪拌於 37°C 反應兩小時。接著，再將 34.2  $\mu$ L、3 mM 配製於 30%(v/v) DMSO 中的連接子-毒素 CCH-028 (6 莫耳當量) 加入上述抗體溶液中於 4°C 反應 30 分鐘 (此混合溶液中之有機溶劑最終濃度為約 1.6%)。加入 100  $\mu$ L 的 0.1 M 半胱氨酸 (cysteine) 以終止反應。使用脫鹽管柱 (ThermoFisher Scientific, MWCO: 40K) 將製得的 Erbitux®-CCH-028 進行純化。在沖提的過程中，將緩衝液置換為 PBS 緩衝液 (2.67 mM KCl, 1.47 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 137.93 mM NaCl, 8.06 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )。使用疏水作用層析法和粒徑篩析層析法分別鑑定平均 DAR 及 HMWS。

**【0184】** 第 8 圖顯示所製得的 ADC(Erbitux®-CCH-028) 的 DAR 多分佈在 2 和 4。所製得的 Erbitux®-CCH-028 的平均 DAR 約為 3.8，接合效率約為 95%。

**實施例 9：**

**【0185】** 於含有 1.7% 有機溶劑之共溶劑系統中接合 **Erbitux®-CCH-035**

**【0186】** 取 0.6 mL 的 Erbitux®(Cetuximab)(Merck)(初始濃度：4.3 mg/mL) 加入 3.9  $\mu$ L 的 10 mM TCEP (2.2 莫耳當量)，溶

於硼酸鹽(borate)緩衝液中，混合攪拌於37°C反應兩小時。接著，再將35.2 μL、3 mM配製於30%(v/v)DMSO中的連接子-毒素CCH-035 (6莫耳當量)加入上述抗體溶液中於4°C反應30分鐘(此混合溶液中之有機溶劑最終濃度為約1.7%)。加入50 μL的0.2 M半胱氨酸(cysteine)以終止反應。使用脫鹽管柱(ThermoFisher Scientific, MWCO: 40K)將製得的Erbitux®-CCH-035進行純化。在沖提的過程中，將緩衝液置換為PBS緩衝液(2.67 mM KCl, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137.93 mM NaCl, 8.06 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O)。使用疏水作用層析法和粒徑篩析層析法分別鑑定平均DAR及HMWS。

【0187】 第9圖顯示所製得的ADC(Erbitux®-CCH-035)的DAR多分佈在2和4。所製得的Erbitux®-CCH-035的平均DAR約為3.6，接合效率約為94%。

#### 實施例 10：

【0188】 於含有1.5%有機溶劑之共溶劑系統中接合Erbitux®-CCH-041

【0189】 取0.85 mL的Erbitux®(Cetuximab)(Merck)(初始濃度：3.8 mg/mL)加入4.9 μL的10 mM TCEP (2.2莫耳當量)，溶於硼酸鹽(borate)緩衝液中，混合攪拌於37°C反應兩小時。接著，再將44.5 μL、3 mM配製於30%(v/v)DMSO中的連接子-毒素CCH-041 (6莫耳當量)加入上述抗體溶液中於4°C反應30分鐘(此混合溶液中之有機溶劑最終濃度為約1.5%)。加入80 μL的0.2 M半胱氨酸(cysteine)以終止反應。使用脫鹽管柱

(ThermoFisher Scientific, MWCO: 40K) 將製得的 Erbitux®-CCH-041 進行純化。在沖提的過程中，將緩衝液置換為 PBS 緩衝液 (2.67 mM KCl, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137.93 mM NaCl, 8.06 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O)。使用疏水作用層析法和粒徑篩析層析法分別鑑定平均 DAR 及 HMWS。

【0190】 第 10 圖顯示所製得的 ADC(Erbitux®-CCH-041) 的 DAR 多分佈在 2 和 4。所製得的 Erbitux®-CCH-041 的平均 DAR 約為 3.9，接合效率約為 96%。

#### 實施例 11：

【0191】 於含有 1.4% 有機溶劑之共溶劑系統中接合 Erbitux®-FCW-016

【0192】 取 0.4 mL 的 Erbitux®(Cetuximab)(Merck)(初始濃度：3.5 mg/mL) 加入 4.0 μL 的 5 mM TCEP (2.1 莫耳當量)，溶於硼酸鹽 (borate) 緩衝液中，混合攪拌於 37°C 反應兩小時。接著，再將 5.7 μL、10 mM 配製於 100%(v/v) DMSO 中的連接子-毒素 FCW-016 (6 莫耳當量) 加入上述抗體溶液中於 4°C 反應 30 分鐘 (此混合溶液中之有機溶劑最終濃度為約 1.4%)。加入 15 μL 的 0.1 M 半胱氨酸 (cysteine) 以終止反應。使用脫鹽管柱 (ThermoFisher Scientific, MWCO: 40K) 將製得的 Erbitux®-FCW-016 進行純化。在沖提的過程中，將緩衝液置換為 PBS 緩衝液 (2.67 mM KCl, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137.93 mM NaCl, 8.06 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O)。使用疏水作用層析法和粒徑篩析層析法分別鑑定平均 DAR 及 HMWS。

【0193】 第 11 圖顯示所製得的 ADC(Erbitux®-FCW-016)的 DAR 多分佈在 2 和 4。所製得的 Erbitux®-FCW-016 的平均 DAR 約為 4.0，接合效率約為 96%。

#### 實施例 12：

【0194】 於水相中接合 Erbitux®-CCH-038

【0195】 取 2 mL 的 Erbitux®(Cetuximab)(Merck)(初始濃度：4.5 mg/mL)加入 13.6  $\mu$ L 的 10 mM TCEP (2.1 莫耳當量)，溶於硼酸鹽 (borate) 緩衝液中，混合攪拌於 37°C 反應兩小時。接著，再將 123.2  $\mu$ L、3 mM 配製於二次去離子水中的連接子-毒素 CCH-038 (6 莫耳當量)加入上述抗體溶液中於 4°C 反應 30 分鐘 (此混合溶液為純水相)。加入 20  $\mu$ L 的 0.2 M 半胱氨酸 (cysteine) 以終止反應。使用脫鹽管柱 (ThermoFisher Scientific, MWCO: 40K) 將製得的 Erbitux®-CCH-038 進行純化。在沖提的過程中，將緩衝液置換為 PBS 緩衝液 (2.67 mM KCl, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137.93 mM NaCl, 8.06 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O)。使用疏水作用層析法和粒徑篩析層析法分別鑑定平均 DAR 及 HMWS。

【0196】 第 12 圖顯示所製得的 ADC(Erbitux®-CCH-038)的 DAR 多分佈在 2 和 4。所製得的 Erbitux®-CCH-038 的平均 DAR 約為 3.8，接合效率約為 95%。

#### 實施例 13：

【0197】 於水相中接合 Erbitux®-WHY-46

【0198】 取 2.3 mL 的 Erbitux®(Cetuximab)(Merck)(初始濃

度：4.3 mg/mL)加入 14.5  $\mu$ L 的 10 mM TCEP (2.2 莫耳當量)，溶於硼酸鹽 (borate) 緩衝液中，混合攪拌於 37°C 反應兩小時。接著，再將 131.5  $\mu$ L、3 mM 配製於二次去離子水中的連接子-毒素 WHY-46 (6 莫耳當量) 加入上述抗體溶液中於 4°C 反應 30 分鐘 (此混合溶液為純水相)。加入 250  $\mu$ L 的 0.2 M 半胱氨酸 (cysteine) 以終止反應。使用脫鹽管柱 (ThermoFisher Scientific, MWCO: 40K) 將製得的 Erbitux®-WHY-46 進行純化。在沖提的過程中，將緩衝液置換為 PBS 緩衝液 (2.67 mM KCl, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137.93 mM NaCl, 8.06 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O)。使用疏水作用層析法和粒徑篩析層析法分別鑑定平均 DAR 及 HMWS。

**【0199】** 第 13A 圖顯示所製得的 ADC (Erbitux®-WHY-46) 的 DAR 多分佈在 2 和 4。所製得的 Erbitux®-WHY-46 的平均 DAR 約為 3.9，接合效率約為 96%。第 13B 圖顯示僅有 0.1% 的 HMWS 產生。

#### 實施例 14：

**【0200】** 於水相中接合 Erbitux®-MHT-71

**【0201】** 取 23.5 mL 的 Erbitux® (Cetuximab) (Merck) (初始濃度：4.7 mg/mL) 加入 159  $\mu$ L 的 10 mM TCEP (2.1 莫耳當量)，溶於硼酸鹽 (borate) 緩衝液中，混合攪拌於 37°C 反應兩小時。接著，再將 1.52 mL、3 mM 配製於二次去離子水中的連接子-毒素 MHT-71 (6 莫耳當量) 加入上述抗體溶液中於 4°C 反應 30 分鐘 (此混合溶液為純水相)。加入 127  $\mu$ L 的 0.2 M 半胱氨酸 (cysteine) 以終止反應。使用脫鹽管柱 (ThermoFisher Scientific, MWCO: 40K)

將製得的 Erbitux®-MHT-71 進行純化。在沖提的過程中，將緩衝液置換為 PBS 緩衝液 (2.67 mM KCl, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137.93 mM NaCl, 8.06 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O)。使用疏水作用層析法和粒徑篩析層析法分別鑑定平均 DAR 及 HMWS。

【0202】 第 14A 圖顯示所製得的 ADC(Erbitux®-MHT-71) 的 DAR 多分佈在 2 和 4。所製得的 Erbitux®-MHT-71 的平均 DAR 約為 3.6，接合效率約為 95%。第 14B 圖顯示沒有明顯的 HMWS 產生。

#### 實施例 15：

【0203】 於水相中接合 HLX-07-MHT-71

【0204】 取 0.5 mL 的 HLX-07 (Henlix Inc. 生產) (Merck) (初始濃度：4.4 mg/mL) 加入 3.6 μL 的 10 mM TCEP (2.4 莫耳當量)，溶於硼酸鹽 (borate) 緩衝液中，混合攪拌於 37°C 反應兩小時。接著，再將 140 μL、755 μM 配製於二次去離子水中的連接子-毒素 MHT-71 (7 莫耳當量) 加入上述抗體溶液中於 4°C 反應 30 分鐘 (此混合溶液為純水相)。加入 20 μL 的 0.1 M 半胱氨酸 (cysteine) 以終止反應。使用脫鹽管柱 (ThermoFisher Scientific, MWCO: 40K) 將製得的 HLX-07-MHT-71 進行純化。在沖提的過程中，將緩衝液置換為 PBS 緩衝液 (2.67 mM KCl, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137.93 mM NaCl, 8.06 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O)。使用疏水作用層析法和粒徑篩析層析法分別鑑定平均 DAR 及 HMWS。

【0205】 第 15 圖顯示所製得的 ADC (HLX-07-MHT-71) 的 DAR 多分佈在 2 和 4。所製得的 HLX-07-MHT-71 的平均 DAR 約為

3.8，接合效率約為96%。

### 實施例 16：

**【0206】** 於水相中接合抗-EpCAM-MHT-71

**【0207】** 取 60  $\mu\text{L}$  的抗-EpCAM抗體(clone EpAb3-5, IgG2b) (由吳漢忠博士實驗室生產)(初始濃度：3.9 mg/mL)加入 3.3  $\mu\text{L}$  的 5 mM TCEP (8莫耳當量)，溶於硼酸鹽(borate)緩衝液中，混合攪拌於 37°C 反應 5 小時。接著，再將 10.4  $\mu\text{L}$ 、3 mM 配製於二次去離子水中的連接子-毒素 MHT-71 (15莫耳當量)加入上述抗體溶液中於 4°C 反應 30 分鐘(此混合溶液為純水相)。加入 0.5  $\mu\text{L}$  的 0.2 M 半胱氨酸(cysteine)以終止反應。使用脫鹽管柱(ThermoFisher Scientific, MWCO: 40K)將製得的抗-EpCAM-MHT-71進行純化。在沖提的過程中，將緩衝液置換為 PBS 緩衝液(2.67 mM KCl, 1.47 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 137.93 mM NaCl, 8.06 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )。使用疏水作用層析法鑑定所製得抗-EpCAM-MHT-71的接合圖譜。未接合的抗-EpCAM抗體波峰消失，顯示所有的抗-EpCAM抗體都與連接子-毒素 MHT-71 接合。

**【0208】** 第 16A 圖顯示未接合的抗-EpCAM抗體的 HIC 圖譜。第 16B 圖顯示與連接子-毒素 MHT-71 接合的抗-EpCAM抗體的 HIC 圖譜。

### <熱應力穩定性測試>

### 實施例 17：

【0209】 500  $\mu$ L 的 3 mg/mL Erbitux、Erbitux-L1-MMAE (市售連接子-毒素 MC-Val-Cit-PAB-MMAE(L1-MMAE); Concoctis Biotherapeutics)、Erbitux-MHT-87、Erbitux-MHT-71、或 Erbitux-WHY-46 於 PBS 中培養在 40°C 水浴中，並在第 0、1、2 週取樣進行 SEC 分析。使用具有 Yarra 3  $\mu$ m SEC-3000 (300 x 7.8 mm) 管柱的 Waters PDA 996 HPLC，依據尺寸分離抗體單體和產物聚集物。移動相包括 0.020M 的磷酸鉀、0.025 M 氯化鉀、及異丙醇 5%(v/v)、pH 6.95。將 30  $\mu$ L 的樣品以 0.5 mL/min 的流速注入管柱，並在等度條件 (isocratic conditions) 下分離。偵測在波長 280 nm 的吸收值。將主要波峰出現之前所沖提出來的物質收集在一起，稱之為高分子量物質 (HMWS)。

【0210】 第 17A 圖顯示連接子包含醯胺基單元酸的 Erbitux-MHT-71 和 Erbitux-WHY-46 相較於連接子不包含任何醯胺基酸單元的 Erbitux-L1-MMAE 和 Erbitux-MHT-87 具有低比例的 HMWS。因此，此實驗證實具有醯胺基酸單元的連接子不只增加連接子的親水性，也顯著地提升抗體藥物複合物 (ADC) 的熱穩定度。

#### 實施例 18：

【0211】 500  $\mu$ L 的 3 mg/mL Erbitux、Erbitux-L1-MMAE (市售連接子-毒素 MC-Val-Cit-PAB-MMAE(L1-MMAE); Concoctis Biotherapeutics)、Erbitux-MHT-87、Erbitux-MHT-71、及 Erbitux-WHY-46 於 PBS 中培養在 50°C 水浴中。接著，抗體和抗體藥物複合物 (ADC) 於第 0、4、7 和 24 小時取樣進行 SEC 分析。

使用具有 Yarra 3 $\mu$ m SEC-3000 (300 x 7.8 mm)管柱的 Waters PDA 996 HPLC，依據尺寸分離抗體單體和產物聚集物。移動相包括 0.020M 的磷酸鉀、0.025 M 氯化鉀、及異丙醇 5%(v/v)、pH 6.95。將 30  $\mu$ L 的樣品以 0.5 mL/min 的流速注入管柱，並在等度條件 (isocratic conditions) 下分離。偵測在波長 280 nm 的吸收值。將主要波峰出現之前所沖提出來的物質收集在一起，稱之為高分子量物質 (HMWS)。

【0212】 第 17B 圖顯示連接子包含醯胺基單元酸的 Erbitux-MHT-71 和 Erbitux-WHY-46 相較於連接子不包含任何醯胺基酸單元的 Erbitux-L1-MMAE 和 Erbitux-MHT-87 具有低比例的 HMWS。因此，此實驗證實具有醯胺基酸單元的連接子不只增加連接子的親水性，也顯著地提升抗體藥物複合物 (ADC) 的熱穩定度。

### <儲存安定性測試>

#### 實施例 19：

【0213】 於水相中接合的 Erbitux-MHT-71 利用脫鹽管柱進行純化。在沖提期間，緩衝液置換為 20 mM 的檸檬酸鈉、6.3% (w/v) 的海藻糖、0.2 mg/mL 的聚山梨醇酯 80、pH 6.0 (SGN)。將 Erbitux-MHT-71 以 100  $\mu$ L/管分裝後放置於 4 $^{\circ}$ C 進行儲存安定性測試。每週或每兩週取樣進行抗體濃度、HIC 與 SEC 分析，持續觀察 17 週。

【0214】 第 18 圖顯示 Erbitux-MHT-71 的抗體濃度經過四個月仍沒有顯著變化 (<10%)、Erbitux-MHT-71 的平均 DAR 經過四

個月仍沒有顯著變化(<5%)、Erbitux-MHT-71的HMWS產生經過四個月後仍然非常低( $\leq 0.2\%$ )。

### <效價測試>

#### 實施例 20：

【0215】 針對表現EGFR之頭頸癌細胞株FaDu以及不表現EGFR之頭頸癌細胞株RPMI 2650進行具有九種醣胜肽連接子之抗體藥物複合物(ADC)給藥，以分析對不同EGFR表現的腫瘤細胞之選擇性毒殺效果。

【0216】 將FaDu和RPMI 2650細胞分別以 $2.5 \times 10^3$ 和 $4 \times 10^3$ 細胞/孔的密度培養於CellBIND的96孔盤中，並放置於 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 培養箱中培養24小時。之後，取出舊培養液並加入序列稀釋之不同濃度( $10^{-7}$ 至 $10^{-13}$  M)的抗體藥物複合物(ADC)至FaDu細胞中、或加入序列稀釋之不同濃度( $10^{-6}$ 至 $10^{-12}$  M)的抗體藥物複合物(ADC)至RPMI 2650細胞中。接著將細胞放置於 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 培養箱中作用120小時。經過120小時的培養後，洗滌細胞1次後加入含有0.5 mg/mL MTT試劑的培養液至每一孔中。於 $37^\circ\text{C}$ 作用4小時之後，取出MTT試劑並加入DMSO以溶解MTT試劑造成的沉澱物。利用微盤分析儀(Multiskan Ascent, Thermo Labsystems)偵測細胞在波長570 nm的吸收值。藉由下式計算細胞存活率。

【0217】 細胞存活率( $\%$ )= $(\text{Ins}-\text{Inb})/(\text{Inc}-\text{Inb}) \times 100\%$

【0218】 於此式中，“Ins”為培養於毒素中的細胞之光度強度，“Inb”為沒有細胞的空白孔的光度強度，“Inc”為僅

培養於培養液中的細胞之光度強度(正對照)。

【0219】 在曝露於不同藥物濃度(n=6)的毒素120小時之後，紀錄FaDu細胞於體外(*in vitro*)的存活率，以及利用Origin軟體的Sigmoidal模式獲得IC50值。

【0220】 表3顯示上述具有九種醣胜肽連接子之抗體藥物複合物(ADC)在表現EGFR之頭頸癌細胞株FaDu細胞的IC50值明顯小於0.5 nM。上述具有九種醣胜肽連接子之抗體藥物複合物(ADC)對FaDu細胞的效價(potency)都相當高。除了Erbix-MHT-93外，具有其他八種醣胜肽連接子之抗體藥物複合物(ADC)對腫瘤細胞都具有高度選擇性毒殺作用。對表現EGFR之FaDu細胞和不表現EGFR之RPMI 2650細胞的選擇性毒殺作用大於2000倍，優於由市售連接子-毒素MC-Val-Cit-PAB-MMAE接合的Erbix-L1-MMAE(約1246倍)以及連接子不包含任何醣胺基酸單元的Erbix-MHT-87(約366倍)。

表3

IC50 (nM)	RPMI 2650	FaDu	體外( <i>In vitro</i> )選擇性毒殺作用
EGFR 表現	0	2+	
Erbix-L1-MMAE	107.2	0.086	1246
Erbix-MHT-87	27.1	0.074	366
Erbix-MHT-47	80.0	0.037	2162
Erbix-MHT-71	247	0.074	3337

Erbitux-MHT-93	57.0	0.16	356
Erbitux-FCW-016	>200	0.068	>2941
Erbitux-CCH-028	>1000	0.148	>6756
Erbitux-CCH-035	>1000	0.176	>5681
Erbitux-CCH-038	>1000	0.137	>7299
Erbitux-WHY-46	>200	0.091	>2197
Erbitux-CCH-041	>1000	0.120	>8333

### <腫瘤生長抑制試驗>

#### 實施例 21 :

【0221】 第0天將  $1 \times 10^6$  之 FaDu 細胞植入 C.B-17 SCID 小鼠皮下，以游標卡尺量測腫瘤長及寬，並以長 x 寬 x 寬 x 1/2 ( $\text{mm}^3$ ) 進行估算及記錄腫瘤大小。觀測至第8天，當平均腫瘤大小達約  $100 \text{ mm}^3$  時進行對照組 (DPBS)、5 mg/kg Erbitux®、5 mg/kg Erbitux-MHT-47、5 mg/kg Erbitux-MHT-71、5 mg/kg Erbitux-L1-MMAE (市售連接子-毒素 MC-Val-Cit-PAB-MMAE(L1-MMAE) ; Concortis Biotherapeutics)、0.1 mg/kg AF-PEA (市售 AF ; Concortis Biotherapeutics)、0.1 mg/kg MMAE (Concortis Biotherapeutics) 之單次靜脈注射 (10 mL/kg B.W. 注射體積) 藥效實驗 (n=6)。每週兩次進行觀測小鼠體重及皮下腫瘤大小。腫瘤生長抑制率 (Tumor Growth Inhibition; TGI) 計算公式為  $\text{TGI} (\%) = [1 - (\Delta \text{藥物處理組腫瘤體積} / \Delta \text{對照組腫瘤體積})] \times 100$ 。實驗期間，若腫瘤

大於小鼠體重的10%、腫瘤體積大於1500 mm<sup>3</sup>、或併發其他不良反應，依人道考量主動以二氧化碳將小鼠進行犧牲。

【0222】 實驗結果顯示於第8天給藥(Erbitux、Erbitux-ADCs、APEA-AF、及MMAE)後，Erbitux-MHT-47、Erbitux-MHT-71及Erbitux-L1-MMAE組的腫瘤有明顯生長抑制。第29天，Erbitux-MHT-47、Erbitux-MHT-71及Erbitux-L1-MMAE組的TGI分別為106±1%、106±1%及105±8%，而Erbitux組僅有部分藥效，其TGI為27±14% (參見下表4)。

表 4

TGI (%)±SEM	
第 8-29 天	
對照組 (DPBS)	0
Erbitux® (5 mg/kg)	27±14
Erbitux-MHT-47 (5 mg/kg)	106±1
Erbitux-MHT-71 (5 mg/kg)	106±1
Erbitux-L1-MMAE (5 mg/kg)	105±8
APEA-AF (0.1 mg/kg)	11±17
MMAE (0.1 mg/kg)	12±6

【0223】 第19圖顯示Erbitux-L1-MMAE組在第36天開始復發。Erbitux-MHT-47組在第54-61天有腫瘤復發。然而，Erbitux-MHT-71組觀測至第117天仍無腫瘤復發。第20圖顯示給藥(Erbitux、Erbitux-ADCs、APEA-AF、及MMAE)後各組沒

有體重下降及其他明顯異常臨床症狀。

表 5

BW (%)±SEM	
第 8-29 天	
對照組 (DPBS)	106±5
Erbix® (5 mg/kg)	106±1
Erbix-MHT-47 (5 mg/kg)	106±1
Erbix-MHT-71 (5 mg/kg)	108±2
Erbix-L1-MMAE (5 mg/kg)	106±1
APEA-AF (0.1 mg/kg)	108±4
MMEA (0.1 mg/kg)	106±4

【0224】 雖然本揭露已以數個較佳實施例揭露如上，然其並非用以限定本揭露，任何所屬技術領域中具有通常知識者，在不脫離本揭露之精神和範圍內，當可作任意之更動與潤飾，因此本揭露之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。

【符號說明】

【0225】

100~方法流程圖

102-108~步驟

I660741

## 發明摘要

公告本

※ 申請案號：105 135 455

※ 申請日：105.11.2

※IPC 分類：

A61K 47/50; C07K 1/07;  
A61P 35/60

【發明名稱】 抗體藥物複合物及其製造方法

Antibody-drug conjugate (ADC) and method for  
forming the same

## 【中文】

本揭露提供一種具有化學式(I)之抗體藥物複合物(ADC)或其藥學上可接受鹽類或溶劑化物。於化學式(I)中，p為介於1~26之整數，A為一抗體，且-(L-D)為一連接子-藥物單元。其中，L為一具有醣胜肽的連接子單元，且D為一藥物單元。其中，抗體藉由抗體之一半胱氨酸殘基連接至連接子單元。本揭露也提供一種抗體藥物複合物(ADC)的製造方法。



## 【英文】

An antibody-drug conjugate (ADC) of formula (I) or a pharmaceutically acceptable salt or solvate thereof is provided. In formula (I), p is an integer ranging from 1 to 26, A is an antibody, and -(L-D) is a linker-drug unit. L is a linker unit having a glycopeptide, and D is a drug unit. The antibody is conjugated to the linker unit through a cysteine residue of the antibody. A method for forming an antibody-drug conjugate (ADC) is also provided.



**【代表圖】**

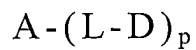
**【本案指定代表圖】**：第（ 1 ）圖。

**【本代表圖之符號簡單說明】**：

100~方法流程圖；

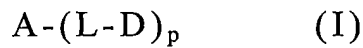
102-108~步驟。

**【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】**：



## 申請專利範圍

1. 一種具有化學式 (I) 之抗體藥物複合物 (ADC) 或其藥學上可接受鹽類：



其中

p 為介於 1~26 之整數；

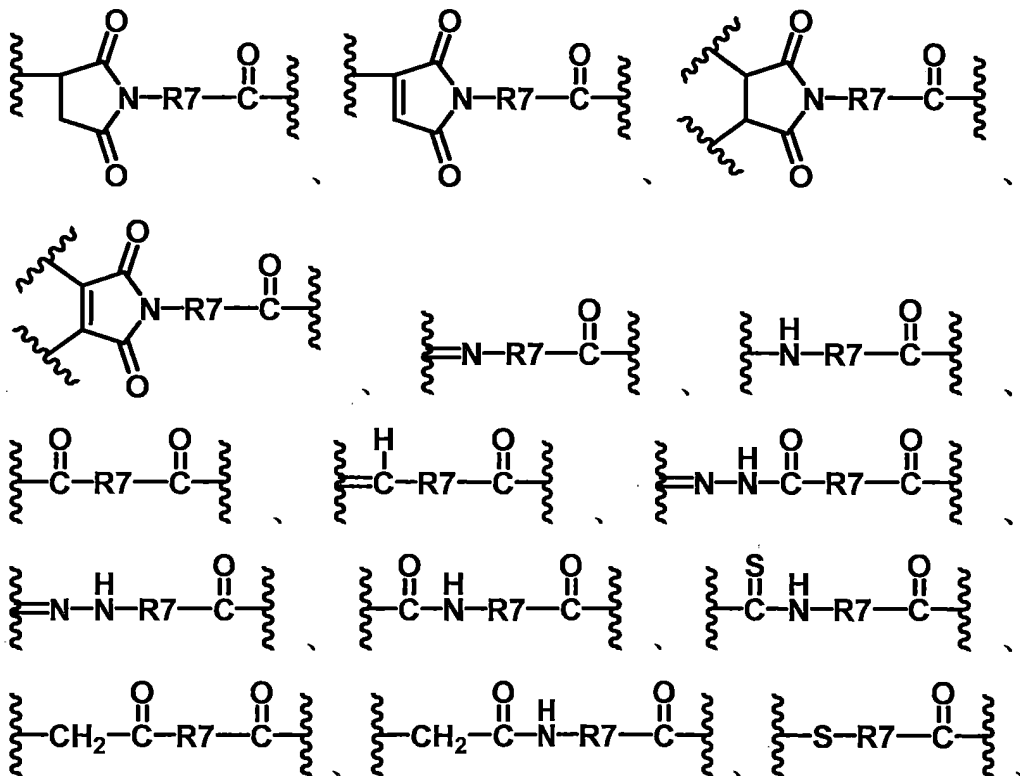
A 為一抗體；以及

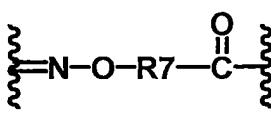
-(L-D) 為一連接子-藥物單元；

其中 L 為一具有醯肟肽的連接子單元，且 D 為一藥物單元，

其中該連接子單元為 -C-SAAs-AAs-，

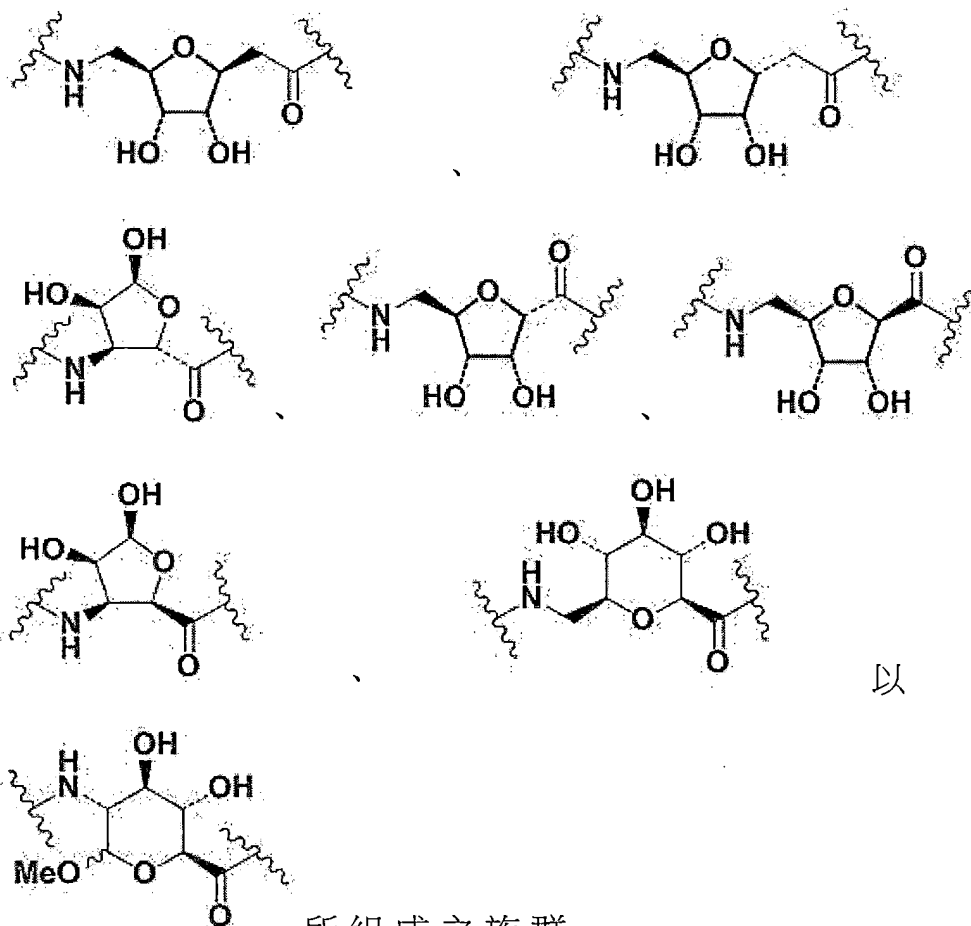
其中 C- 為一複合單元，選自由



以及  所組成之族群，其中 R7 選自由 -C1-C10 亞烷基-、-C3-C8 環碳基-、-O-(C1-C8 烷基)-、

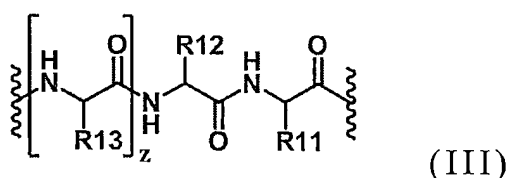
-亞芳基-、-C1-C10亞烷基-亞芳基-、-亞芳基-C1-C10亞烷基-、-C1-C10亞烷基-(C3-C8環碳基)-、-(C3-C8環碳基)-C1-C10亞烷基-、-C3-C8雜環基-、-C1-C10亞烷基-(C3-C8雜環基)-、-(C3-C8雜環基)-C1-C10亞烷基-、-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-、以及-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-CH<sub>2</sub>-所組成之族群，其中r為介於1-10之整數；

-SAAs- 為一 醣 胺 基 酸 單 元 ， 選 自 由



所組成之族群，

-AAs-為一 胜 肽 單 元 ， 具 有 化 學 式 (III)：



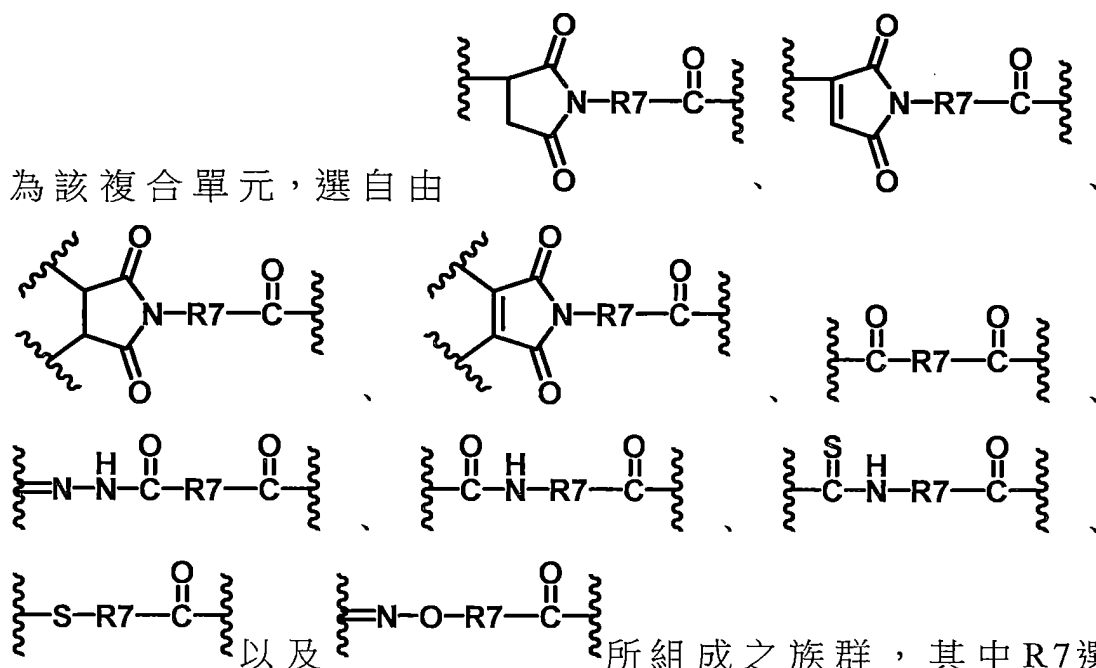
其中  $z$  為介於 0~10 之整數， $R_{11}$  為  
 $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$ 、 $-(CH_2)_3NH_2$ 、  
 $-(CH_2)_3NHCONH_2$ 、 $-(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$ 、  
 $-(CH_2)_4NH_2$  或  $-(CH_2)_4NHCONH_2$ ， $R_{12}$  為氫、甲基、  
 乙基、丙基、異丙基、環丙基、丁基、第二丁基、  
 異丁基、第三丁基、環丁基、苯基或苯甲基， $R_{13}$  為  
 氫、甲基、異丙基、環丙基、丁基、第二丁基、異  
 丁基、第三丁基、環丁基、環己基、苯基、苯甲基、  
 $p$ -羥基苯甲基、 $-CH_2OH$ 、 $-CH(OH)CH_3$ 、 $-CH_2CH_2SCH_3$ 、  
 $-CH_2CONH_2$ 、 $-CH_2COOH$ 、 $-CH_2CH_2CONH_2$ 、  
 $-CH_2CH_2COOH$ 、 $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$ 、 $-(CH_2)_3NH_2$ 、  
 $-(CH_2)_3NHCOCH_3$ 、 $-(CH_2)_3NHCHO$ 、 $-(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$ 、  
 $-(CH_2)_4NH_2$ 、 $-(CH_2)_4NHCOCH_3$ 、  
 $-(CH_2)_4NHCHO$ 、 $-(CH_2)_3NHCONH_2$ 、  
 $-(CH_2)_4NHCONH_2$ 、 $-CH_2CH_2CH(OH)CH_2NH_2$ 、2-吡啶  
 甲基、3-吡啶甲基、或4-吡啶甲基，

又其中該抗體藉由該抗體之一半胱氨酸殘基連接至該連接子單元。

2. 如申請專利範圍第1項所述之抗體藥物複合物，其中該抗體為一全長抗體或一抗體片段。
3. 如申請專利範圍第1項所述之抗體藥物複合物，其中該抗體為一嵌合抗體或其功能活性片段、一人類化抗體或其

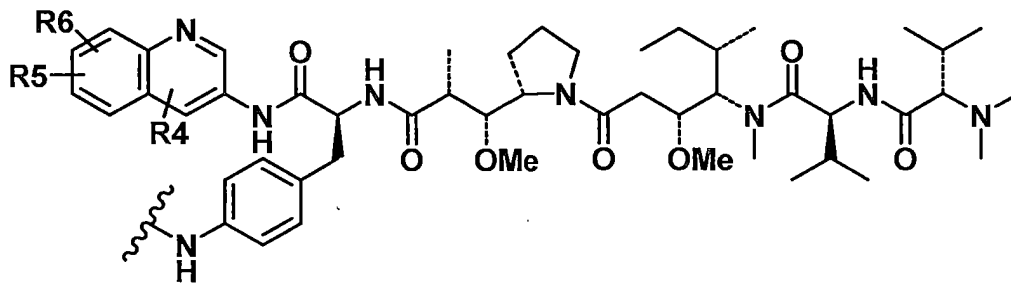
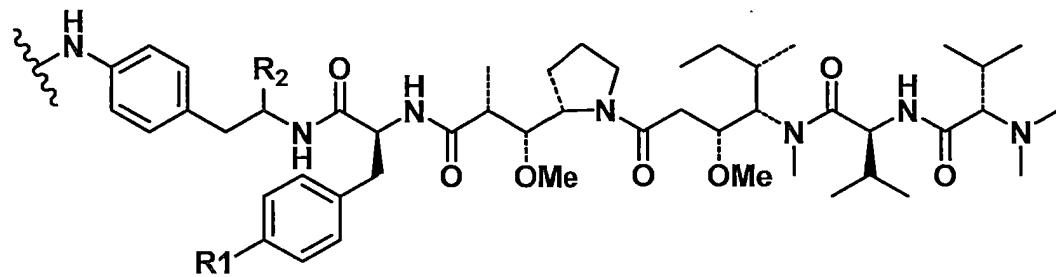
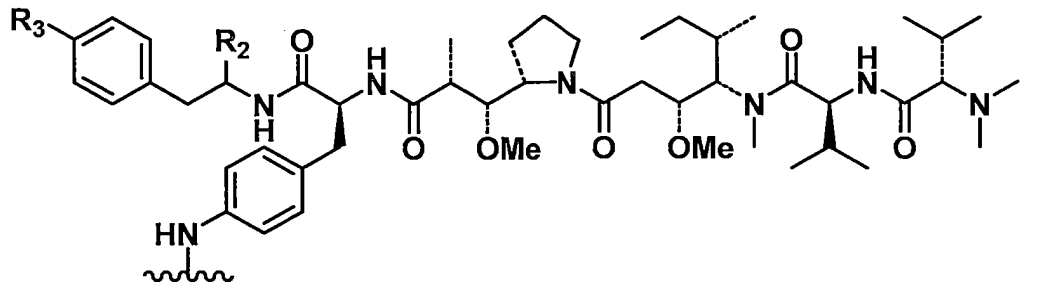
功能活性片段、一人類抗體或其功能活性片段、一小鼠抗體或其功能活性片段、一大鼠抗體或其功能活性片段、一羊抗體或其功能活性片段、或一兔子抗體或其功能活性片段。

4. 如申請專利範圍第1項所述之抗體藥物複合物，其中該抗體為一治療性抗體，用以治療腫瘤、慢性淋巴球性白血病(chronic lymphocytic leukemia; CLL)、或急性骨髓性白血病(acute myeloid leukemia; AML)。
5. 如申請專利範圍第1項所述之抗體藥物複合物，其中該抗體包括 Herceptin、Erbix、HLX-07、EG12014、抗-EpCAM 抗體、IgG1、Rituximab、Ibritumomab tiuxetan、Tositumomab、Alemtuzumab、IGN101、Adecatumumab、Labetuzumab、huA33、Pemtumomab、Oregovomab、CC49 (minretumomab)、cG250、J591、MOv18、MORAb-003 (farletuzumab)、3F8、ch14.18、KW-2871、hu3S193、IgN311、Bevacizumab、IM-2C6、CDP791、Etaracizumab、Volociximab、Cetuximab、Panitumumab、Nimotuzumab、806、Trastuzumab、Pertuzumab、MM-121、AMG 102、METMAB、SCH 900105、AVE1642、IMC-A12、MK-0646、R1507、CP 751871、KB004、IIIA4、Mapatumumab (HGS-ETR1)、HGS-ETR2、CS-1008、Denosumab、Sibrotuzumab、F19、或 81C6。
6. 如申請專利範圍第1項所述之抗體藥物複合物，其中 C-



所組成之族群，其中R7選自由 -1,5-伸戊基-、-1,6-伸己基-、-1,4-伸環己基-、  
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r-\text{CH}_2-$ 、以及  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 所組成之  
 族群，其中r為介於2~5之整數。

7. 如申請專利範圍第1項所述之抗體藥物複合物，其中  
 -AAs-為該胜肽單元，選自由-纈胺酸-瓜胺酸-(-Val-Cit-)、  
 -纈胺酸-離胺酸-(-Val-Lys-)、-纈胺酸-魚精胺酸  
 -(-Val-Arg-)、-苯丙胺酸-瓜胺酸-(-Phe-Cit-)、-苯丙胺酸  
 -離胺酸-(-Phe-Lys-)、以及-苯丙胺酸-魚精胺酸  
 -(-Phe-Arg-)所組成之族群。
8. 如申請專利範圍第1項所述之抗體藥物複合物，其中該藥  
 物單元為一細胞毒性劑，選自由



及 所  
組成之族群，其中每一 R1、R2、R3、R4、R5 與 R6 獨立地為氫、胺基、硝基、鹵素、羥基、甲氧基、乙氧基、羧基、甲氧基羰基、乙氧基羰基、甲基胺基、二甲基胺基、乙基胺基、二乙基胺基、1-吡咯啉基、1-哌啉基、1-哌嗪基、胺基羰基、甲基胺基羰基、二甲基胺基羰基、乙基胺基羰基、二乙基胺基羰基、1-吡咯啉基羰基、1-哌啉基羰基、1-哌嗪基羰基、甲基、乙基、丙基、異丙基或苯基。

9. 如申請專利範圍第1項所述之抗體藥物複合物，其中該藥物單元為一細胞毒性劑，選自由瓢菌素(amanitins)、蔥

環類物 (anthracyclines)、海兔毒素 (auristatins)、漿果赤黴素 (baccatins)、加利車黴素 (calicheamicins)、喜樹鹼 (camptothecins)、西地黴素 (cemadotins)、秋水仙鹼 (colchicines)、秋水仙胺 (colcimids)、考布他汀 (combretastatins)、隱花素 (cryptophysins)、(discodermolides)、多卡黴素 (duocarmycins)、棘黴素 (echinomycins)、艾榴塞洛素 (eleutherobins)、埃博黴素 (epothilones)、雌莫司汀 (estramustines)、偏端黴素 (lexitropsins)、美登木素生物鹼 (maytansinoids)、紡錘菌素 (netropsins)、嘌呤黴素 (puromycins)、吡咯並苯並二氮雜 (pyrrolobenzodiazepines)、根瘤菌素 (rhizoxins)、紫杉烷 (taxanes)、微管蛋白素 (tubulysins)、以及長春花生物鹼 (vinca alkaloids) 所組成之族群。

10. 一種如申請專利範圍第1項所述之具有化學式(I)之抗體藥物複合物(ADC)的製造方法，包括：

使一抗體及一還原劑於一緩衝溶液中反應以形成一第一溶液，其中該抗體具有至少一半胱胺酸殘基與至少一鏈間雙硫鍵；

於有機相或水相中製備一連接子-藥物單元以形成一第二溶液，其中該連接子具有一醯肼肽；

進行一接合製程，該接合製程係混合該第一溶液和該第二溶液以形成一混合溶液，其中該混合溶液中之一有機溶劑的濃度介於0% (v/v)至20% (v/v)；以及

純化該混合溶液，

其中該抗體包括 Herceptin、Erbitux、HLX-07、EG12014、抗-EpCAM抗體、IgG1、Rituximab、Ibritumomab tiuxetan、Tositumomab、Alemtuzumab、IGN101、Adecatumumab、Labetuzumab、huA33、Pemtumomab、Oregovomab、CC49 (minretumomab)、cG250、J591、MOv18、MORAb-003 (farletuzumab)、3F8、ch14.18、KW-2871、hu3S193、IgN311、Bevacizumab、IM-2C6、CDP791、Etaracizumab、Volociximab、Cetuximab、Panitumumab、Nimotuzumab、806、Trastuzumab、Pertuzumab、MM-121、AMG 102、METMAB、SCH 900105、AVE1642、IMC-A12、MK-0646、R1507、CP 751871、KB004、IIIA4、Mapatumumab (HGS-ETR1)、HGS-ETR2、CS-1008、Denosumab、Sibrotuzumab、F19、或81C6，

其中該還原劑選自由三(2-羧乙基)膦(tris(2-carboxyethyl)phosphine; TCEP)、2-氨基乙硫醇(2-aminoethanethiol)、二硫蘇糖醇(dithiothreitol; DTT)、以及2-巯基乙胺鹽酸鹽(2-mercaptoethylamine hydrochloride; 2-MEA)所組成之族群，

其中該有機溶劑包括二甲基亞砜(dimethyl sulfoxide; DMSO)、乙腈(acetonitrile; ACN)、二甲基乙醯胺(N,N-dimethylacetamide; DMA)、丙二醇(propylene glycol; PG)、或前述之組合。

11.如申請專利範圍第10項所述之抗體藥物複合物(ADC)的製造方法，其中該抗體藉由該抗體之該至少一半胱氨酸

殘基連接至該連接子單元。

- 12.如申請專利範圍第10項所述之抗體藥物複合物(ADC)的製造方法，其中該抗體為一全長抗體或一抗體片段。
- 13.如申請專利範圍第10項所述之抗體藥物複合物(ADC)的製造方法，其中該抗體為一嵌合抗體或其功能活性片段、一人類化抗體或其功能活性片段、一人類抗體或其功能活性片段、一小鼠抗體或其功能活性片段、一大鼠抗體或其功能活性片段、一羊抗體或其功能活性片段、或一兔子抗體或其功能活性片段。
- 14.如申請專利範圍第10項所述之抗體藥物複合物(ADC)的製造方法，其中該還原劑和還原條件經選擇以使存在於該抗體中的該至少一鏈間雙硫鍵轉變為一對游離硫醇(free thiols)。
- 15.如申請專利範圍第10項所述之抗體藥物複合物(ADC)的製造方法，其中該抗體和該連接子-藥物單元的一莫耳當量比例經選擇以使該抗體藥物複合物的一平均藥物抗體比(drug to antibody ratio; DAR)介於3.5~5.5。