(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107029242 A
(43)申请公布日 2017.08.11

(21)申请号 201610949210.4
(22)申请日 2016.11.02
(30)优先权数据
62/250,107 2015.11.03 US
(71)申请人 财团法人工业技术研究院
地址 中国台湾新竹县
(72)发明人 柯怡如 李政宪 吕瑞梅 李昂 郑平福 刘俊旻
(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
代理人 曹立莉 何伟
(51)Int.Cl.
A61K 47/65(2017.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61K 38/05(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

权利要求书6页 说明书51页 附图25页

(54)发明名称

抗体药物复合物及其制造方法

(57)摘要

本揭露提供一种具有化学式(I)之抗体药物复合物(ADC)或其药学上可接受盐类或溶剂化物。于化学式(I)中,p为介于1～26之整数,A为一抗体,且-(L-D)为一连接子-药物单元。其中,L为一具有醣胜肽的连接子单元,且D为一药物单元。其中,抗体藉由抗体之一半胱氨酸残基连接至复合单元。本揭露也提供一种抗体药物复合物(ADC)的制造方法。$A-(L-D)_p$ (I)。



CN 107029242 A

1.一种具有化学式(I)之抗体药物复合体(ADC)或其药学上可接受盐类或溶剂化物：

$A-(L-D)_p$　(I)

其中

p为介于1～26之整数；

A为一抗体；以及

-(L-D)为一连接子-药物单元；

其中L为一具有醣胜肽的连接子单元，且D为一药物单元，

其中该抗体藉由该抗体之一半胱氨酸残基连接至该复合单元。

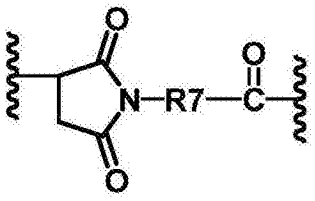
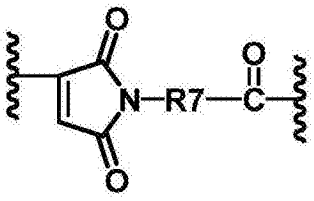
2.如权利要求第1项所述之抗体药物复合体，其中该抗体为一全长抗体或一抗体片段。

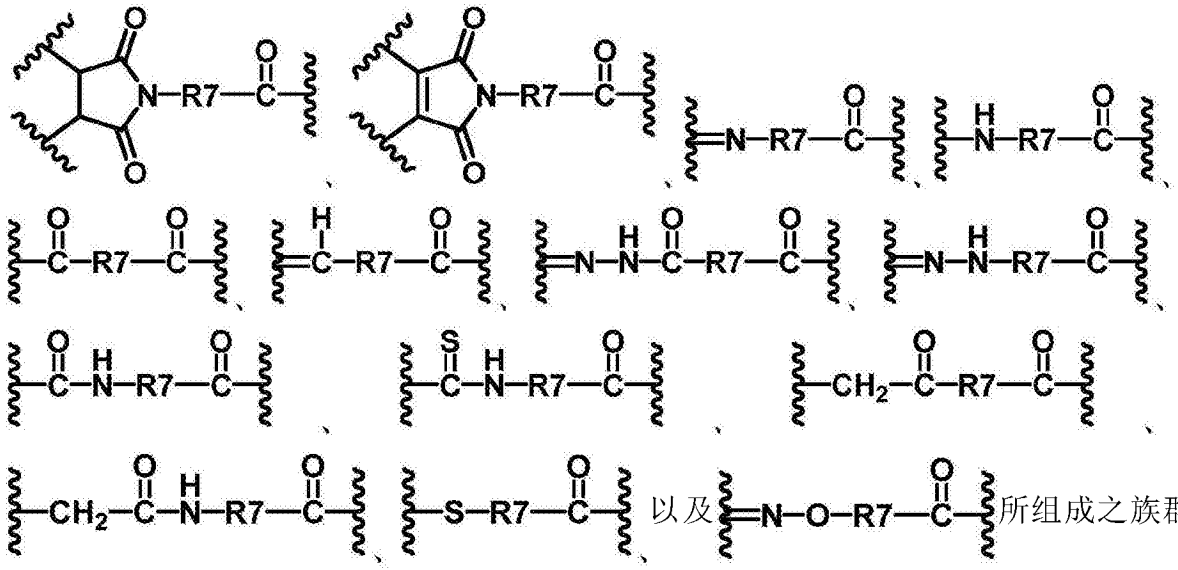
3.如权利要求第1项所述之抗体药物复合体，其中该抗体为一嵌合抗体或其功能活性片段、一人类化抗体或其功能活性片段、一人类抗体或其功能活性片段、一小鼠抗体或其功能活性片段、一大鼠抗体或其功能活性片段、一羊抗体或其功能活性片段、或一兔子抗体或其功能活性片段。

4.如权利要求第1项所述之抗体药物复合体，其中该抗体为一治疗性抗体，用以治疗肿瘤、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.如权利要求第1项所述之抗体药物复合体，其中该抗体包括Herceptin、Erbitux、HLX-07、EG12014、抗-EpCAM抗体、IgG1、Rituximab、Ibritumomab tiuxetan、Tositumomab、Brentuximab vedotin、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。

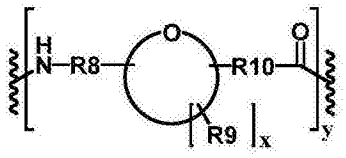
6.如权利要求第1项所述之抗体药物复合体，其中该连接单元为-C-SAAs-AAs-，其中

C-为一复合单元，选自由、、

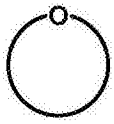


所组成之族群，其中R7选自由-C1-C10亚烷基-、-C3-C8环碳基-、-O-(C1-C8烷基)-、-亚芳基-、-C1-C10亚烷基-亚芳基-、-亚芳基-C1-C10亚烷基-、-C1-C10亚烷基-(C3-C8环碳基)-、-(C3-C8环碳基)-C1-C10亚烷基-、-C3-C8杂环基-、-C1-C10亚烷基-(C3-C8杂环基)-、-(C3-C8杂环基)-C1-C10亚烷基-、-$(CH_2CH_2O)_r$-、以及-$(CH_2CH_2O)_r$-CH2-所组成之族群，其中r为介于1-10之整数；

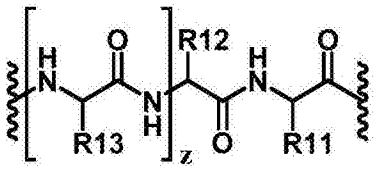
-SAAs-为一醣胺基酸单元，具有化学式(II)：



(II)

其中x为介于1-8之整数，y为介于1-4之整数，为四氢呋喃、二氢呋喃、四氢哌喃或二氢哌喃，每一R8与R10独立地为单键、亚甲基、羟基亚甲基、伸乙基、亚乙基、羟基伸乙基、羟基亚乙基、二羟基伸乙基、二羟基亚乙基、伸乙烯基、亚乙烯基、伸丙基(propylene)、亚丙基、伸丙基(trimethylene)、羟基伸丙基(hydroxypropylene)、羟基亚丙基、羟基伸丙基(hydroxytrimethylene)、二羟基伸丙基(dihydroxypropylene)、二羟基亚丙基、二羟基伸丙基(dihydroxytrimethylene)、三羟基伸丙基(trihydroxypropylene)、三羟基亚丙基或三羟基伸丙基(trihydroxytrimethylene)，每一R9独立地为羟基、甲基、羟甲基、乙基、羟乙基、二羟乙基、丙基、羟丙基、二羟丙基、或三羟丙基、或同一环中任意两R9与其连接之碳原子形成羰基、或任意两R9、R8与任意一R9、或R10与任意一R9形成与原四氢呋喃、二氢呋喃、四氢哌喃或二氢哌喃融合之第二四氢呋喃、二氢呋喃、四氢哌喃或二氢哌喃、或任意两R9、R8与任意一R9、或R10与任意一R9与一亚甲基、亚乙基、1-亚丙基、2-亚丙基或苯亚甲基形成与原四氢呋喃、二氢呋喃、四氢哌喃或二氢哌喃融合之环状缩醛或缩酮；以及

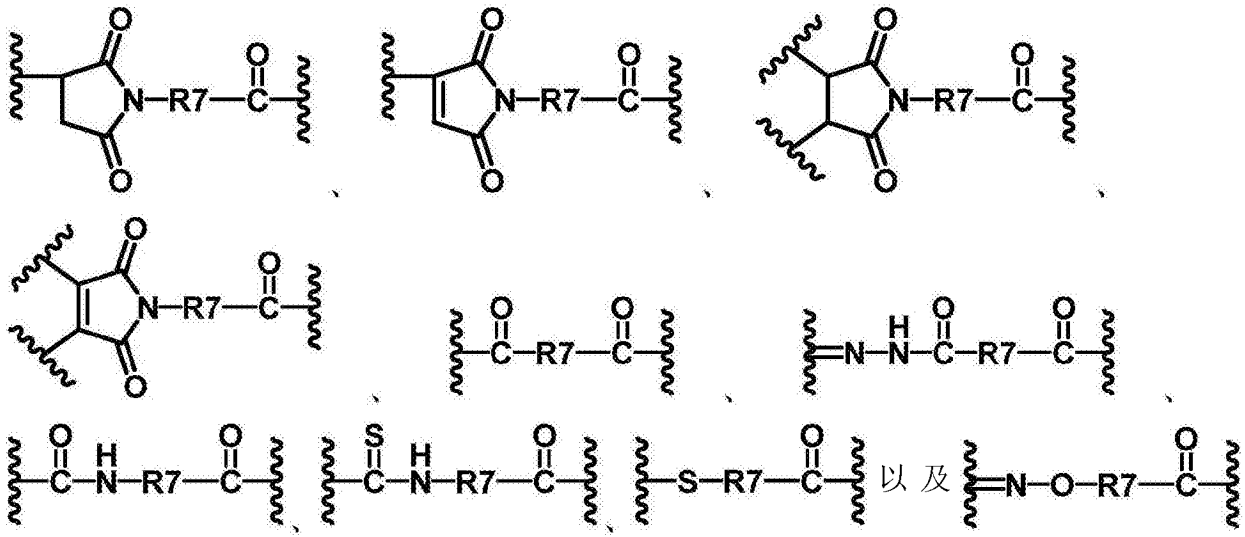
-AAs-为一胜肽单元，具有化学式(III)：



(III)

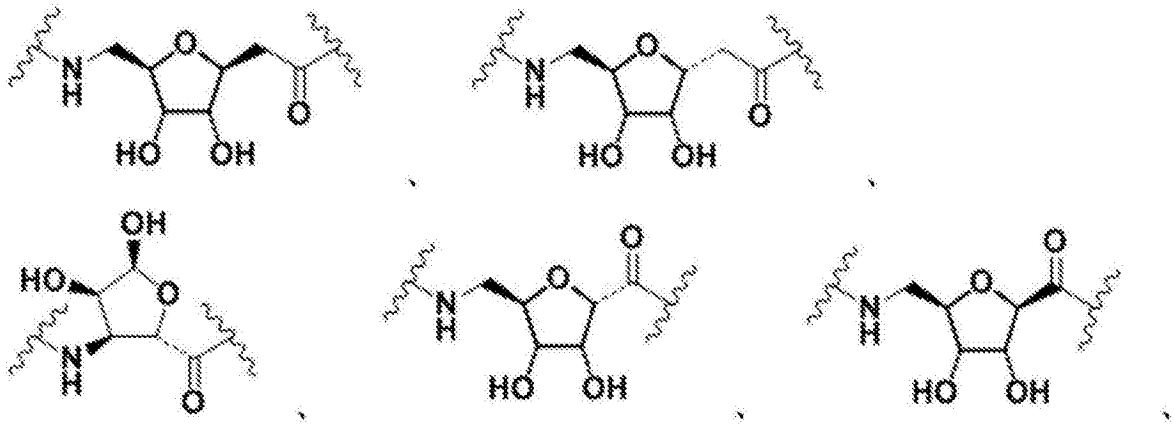
其中z为介于0～10之整数，R11为-(CH2)3NHC(=NH)NH2、-(CH2)3NH2、-(CH2)3NHCONH2、-(CH2)4NHC(=NH)NH2、-(CH2)4NH2或-(CH2)4NHCONH2，R12为氢、甲基、乙基、丙基、异丙基、环丙基、丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、环丁基、苯基或苯甲基，R13为氢、甲基、异丙基、环丙基、丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、环丁基、环己基、苯基、苯甲基、p-羟基苯甲基、-CH2OH、-CH(OH)CH3、-CH2CH2SCH3、-CH2CONH2、-CH2COOH、-CH2CH2CONH2、-CH2CH2COOH、-(CH2)3NHC(=NH)NH2、-(CH2)3NH2、-(CH2)3NHCOCH3、-(CH2)3NHCHO、-(CH2)4NHC(=NH)NH2、-(CH2)4NH2、-(CH2)4NHCOCH3、-(CH2)4NHCHO、-(CH2)3NHCONH2、-(CH2)4NHCONH2、-CH2CH2CH(OH)CH2NH2、2-吡啶甲基、3-吡啶甲基、或4-吡啶甲基。

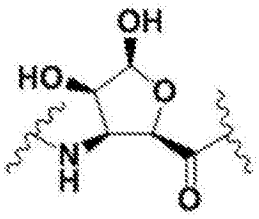
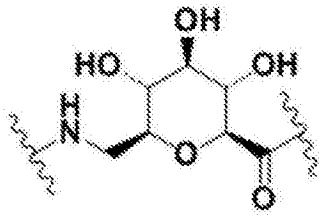
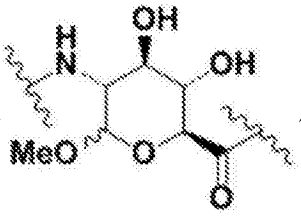
7.如权利要求第6项所述之抗体药物复合体，其中C-为该复合单元，选自由



所组成之族群，其中R7选自由-1,5-伸戊基-、-1,6-伸己基-、-1,4-伸环己基-、-(CH2CH2O)r-CH2-、以及-(CH2CH2O)r-CH2-CH2-所组成之族群，其中r为介于2～5之整数。

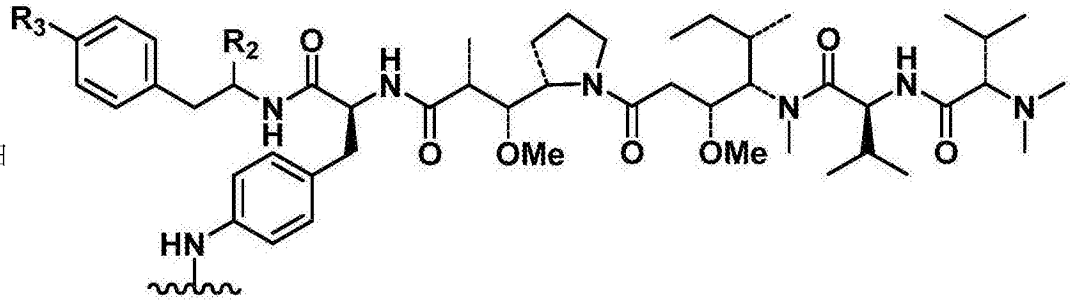
8.如权利要求第6项所述之抗体药物复合体，其中-SAAs-为该醣胺基酸单元，选自由

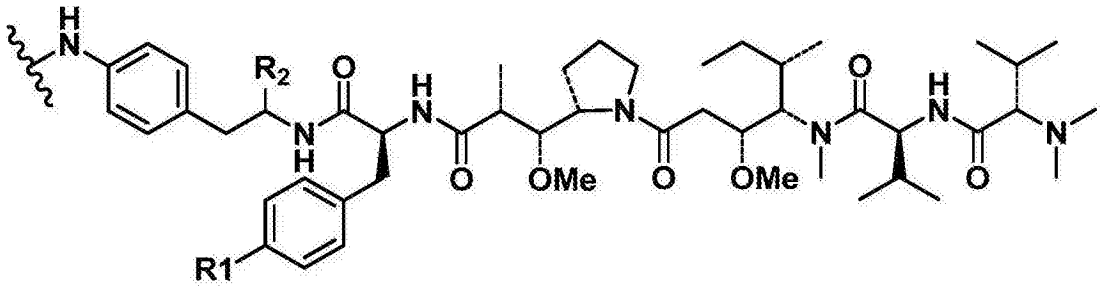


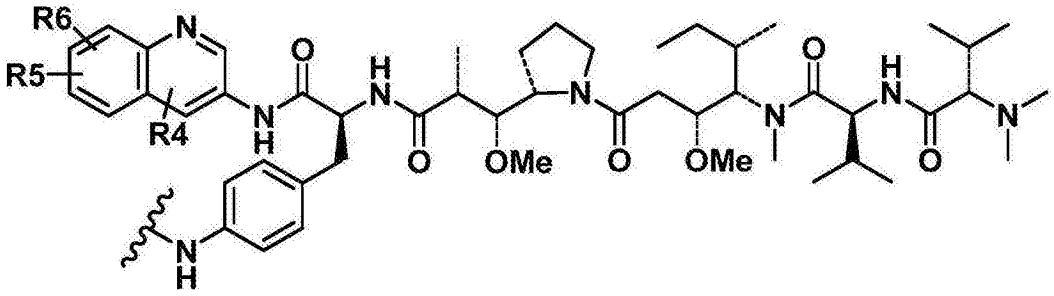


以及

所组成之族群。

9.如权利要求第6项所述之抗体药物复合体，其中-AAs-为该胜肽单元，选自由-缬胺酸-瓜胺酸-(-Val-Cit-)、-缬胺酸-离胺酸-(-Val-Lys-)、-缬胺酸-鱼精胺酸-(-Val-Arg-)、-苯丙胺酸-瓜胺酸-(-Phe-Cit-)、-苯丙胺酸-离胺酸-(-Phe-Lys-)、以及-苯丙胺酸-鱼精胺酸-(-Phe-Arg-)所组成之族群。

10.如权利要求第1项所述之抗体药物复合体，其中该药物单元为一细胞毒性剂，选自由


、


以及


所组成之族群，其中每一R1、R2、R3、R4、R5与R6独立地为氢、胺基、硝基、卤素、羟基、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-吡咯啶基、1-哌啶基、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-吡咯啶基羰基、1-哌啶基羰基、1-哌嗪基羰基、甲基、乙基、丙基、异丙基或苯基。

11.如权利要求第1项所述之抗体药物复合体，其中该药物单元对于一目标细胞具有一细胞抑制或细胞毒性活性。

12.如权利要求第1项所述之抗体药物复合体，其中该药物单元为一细胞毒性剂，选自由瓢菌素(amanitins)、蒽环类物(anthracyclines)、海兔毒素(auristatins)、浆果赤霉素(baccatins)、加利车霉素(calicheamicins)、喜树碱(camptothecins)、西地霉素(cemadotins)、秋水仙碱(colchicines)、秋水仙胺(colcimids)、考布他汀

(combretastatins)、隐花素(cryptophysins)、(discodermolides)、多卡霉素(duocarmycins)、棘霉素(echinomycins)、艾榴塞洛素(eleutherobins)、埃博霉素(epothilones)、雌莫司汀(estramustines)、偏端霉素(lexitropsins)、美登木素生物碱(maytansinoids)、纺锤菌素(netropsins)、嘌呤霉素(puromycins)、吡咯并苯并二氮杂(pyrrolobenzodiazepines)、根瘤菌素(rhizoxins)、紫杉烷(taxanes)、微管蛋白素(tubulysins)、以及长春花生物碱(vinca alkaloids)所组成之族群。

13.一种抗体药物复合体(ADC)的制造方法,包括:

使一抗体及一还原剂于一缓冲溶液中反应以形成一第一溶液;

于有机相或水相中制备一连接子-药物单元以形成一第二溶液,其中该连接子具有一醣胜肽;

进行一接合制程,该接合制程系混合该第一溶液和该第二溶液以形成一混合溶液,其中该混合溶液中之一有机溶剂的浓度介于0%(v/v)至20%(v/v);以及

纯化该混合溶液。

14.如权利要求第13项所述之抗体药物复合物(ADC)的制造方法,其中该抗体藉由该抗体之一半胱氨酸残基连接至该复合单元。

15.如权利要求第13项所述之抗体药物复合物(ADC)的制造方法,其中该抗体为一全长抗体或一抗体片段。

16.如权利要求第13项所述之抗体药物复合物(ADC)的制造方法,其中该抗体为一嵌合抗体或其功能活性片段、一人类化抗体或其功能活性片段、一人类抗体或其功能活性片段、一小鼠抗体或其功能活性片段、一大鼠抗体或其功能活性片段、一羊抗体或其功能活性片段、或一兔子抗体或其功能活性片段。

17.如权利要求第13项所述之抗体药物复合物(ADC)的制造方法,其中该抗体包括Herceptin、Erbitux、HLX-07、EG12014、抗-EpCAM抗体、IgG1、Rituximab、Ibritumomab tiuxetan、Tositumomab、Brentuximab vedotin、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。

18.如权利要求第13项所述之抗体药物复合物(ADC)的制造方法,其中该还原剂和还原条件经选择以使存在于该抗体中的至少一链间双硫键转变为一对游离硫醇(free thiols)。

19.如权利要求第13项所述之抗体药物复合物(ADC)的制造方法,其中该还原剂选自由三(2-羧乙基)膦(tris(2-carboxyethyl)phosphine;TCEP)、2-氨基乙硫醇(2-aminoethanethiol)、二硫苏糖醇(dithiothreitol;DTT)、以及2-巯基乙胺盐酸盐(2-mercaptoethylamine hydrochloride;2-MEA)所组成之族群。

20.如权利要求第13项所述之抗体药物复合物(ADC)的制造方法,其中该抗体和该连接子-药物单元的一莫耳当量比例经选择以使该抗体药物复合体的一平均药物抗体比(drug

to antibody ratio;DAR)介于3.5～5.5。

21.如权利要求第13项所述之抗体药物复合物(ADC)的制造方法,其中该有机溶剂包括二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide;DMSO)、乙腈(acetonitrile;ACN)、二甲基乙酰胺(N,N-dimethylacetamide;DMA)、丙二醇(propylene glycol;PG)、或前述之组合。

抗体药物复合物及其制造方法

【技术领域】

[0001] 本揭露系有关于一种抗体药物复合物及其制造方法，特别系有关于一种具有醣胜肽连接子单元之抗体药物复合物及其制造方法。

[0002] 【先前技术】

[0003] 抗体对于相应的抗原具有高度辨识能力，且许多细胞毒性药物分子因为无法选择性地毒杀癌细胞而无法用于癌症治疗。因此，抗体和高毒性药物(像是毒素)之间的连接成为具有高度选择性及专一性的复合药物。

[0004] 抗体药物复合物(ADC)是由抗体、连接子和药物(像是毒素)所组成。然而，由于需以高剂量施予，这些毒素在细胞内的毒性极高(IC50<1nM)。常用于ADC的毒素之一为海兔毒素(auristatin)衍生物，像是MMAE和MMAF。

[0005] 常用于ADC的连接子之一是MC-Val-Cit。其中，又以由Seattle Genetics公司所开发的MC-Val-Cit-PAB系统应用最广泛。ADC的药物(像是毒素)都是藉由组织蛋白酶(Cathepsin B)切断连接子与药物间的键结以释放出药物。然而，这些连接子系统的缺点之一是水溶性不佳，导致ADC的接合制程须加入高达20％的有机溶剂作为共溶剂(co-solvent)以溶解连接子-毒素(linker-toxin)，使得接合制程得以在均相中完成。

[0006] 但是，有机溶剂的引入可能造成抗体变性或聚集，进而导致ADC产率下降或ADC产品失效。此外，有机溶剂去除不完全也可能是最终ADC产品无法通过质量控管的潜在原因之一。

[0007] 因此，发展新颖的药物抗体复合物(ADC)将有助于达到人类对于抗癌药物的需求。

【发明内容】

[0008] 根据一实施例，本揭露提供一种具有化学式(I)：A-(L-D)$_p$之抗体药物复合物(ADC)或其药学上可接受盐类或溶剂化物。于化学式(I)中，p为介于1～26之整数，A为一抗体，且-(L-D)为一连接子-药物单元。其中，L为一具有醣胜肽的连接子单元，且D为一药物单元。其中，抗体藉由抗体之一半胱氨酸残基连接至复合单元。

[0009] 根据另一实施例，本揭露提供一种抗体药物复合物(ADC)的制造方法，包括：使一抗体及一还原剂于一缓冲溶液中反应以形成一第一溶液；于有机相或水相中制备一连接子-药物单元以形成一第二溶液，其中连接子具有一醣胜肽；进行一接合制程，此接合制程系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机溶剂的浓度介于0％(v/v)至20％(v/v)；以及纯化混合溶液。

[0010] 为让本揭露之上述和其他目的、特征与优点能更明显易懂，下文特举出较佳实施例，并配合所附图式，作详细说明如下：

[0011] 【图式简单说明】

[0012] 图1为根据本揭露一些实施例显示抗体药物复合物(ADC)的制造方法流程图。

[0013] 图2为根据本揭露一实施例显示EG12014-MHT-71的HIC图谱。

[0014] 图3A～图3B为根据本揭露一些实施例显示EG12014-MHT-71的HIC图谱。

[0015] 图4为根据本揭露一实施例显示IgG1-MHT-47的HIC图谱。

[0016] 图5为根据本揭露一实施例显示IgG1-MHT-47的HIC图谱。

[0017] 图6为根据本揭露一实施例显示Herceptin®-MHT-47的HIC图谱。

[0018] 图7为根据本揭露一实施例显示Herceptin®-CCH-038的HIC图谱。

[0019] 图8为根据本揭露一实施例显示Erbitux-CCH-028的HIC图谱。

[0020] 图9为根据本揭露一实施例显示Erbitux-CCH-035的HIC图谱。

[0021] 图10为根据本揭露一实施例显示Erbitux-CCH-041的HIC图谱。

[0022] 图11为根据本揭露一实施例显示Erbitux-FCW-016的HIC图谱。

[0023] 图12为根据本揭露一实施例显示Erbitux-CCH-038的HIC图谱。

[0024] 图13A为根据本揭露一实施例显示Erbitux-WHY-46的HIC图谱。

[0025] 图13B为根据本揭露一实施例显示Erbitux-WHY-46的SEC图谱。

[0026] 图14A为根据本揭露一实施例显示Erbitux-MHT-71的HIC图谱。

[0027] 图14B为根据本揭露一实施例显示Erbitux-MHT-71的SEC图谱。

[0028] 图15为根据本揭露一实施例显示HLX-07-MHT-71的HIC图谱。

[0029] 图16A为根据本揭露一实施例显示未接合之抗-EpCAM抗体的HIC图谱。

[0030] 图16B为根据本揭露一实施例显示接合之抗-EpCAM-MHT-71的HIC图谱。

[0031] 图17A为根据本揭露一些实施例显示Erbitux和Erbitux-ADCs于40℃进行热稳定性测试的结果。

[0032] 图17B为根据本揭露一些实施例显示显示Erbitux和Erbitux-ADCs于50℃进行热稳定性测试的结果。

[0033] 图18为根据本揭露一些实施例显示液态Erbitux-MHT-71于4℃进行储存安定性测试的结果。

[0034] 图19为根据本揭露一些实施例显示经注射Erbitux、Erbitux-ADCs、APEA-AF、及MMAE小鼠之肿瘤生长抑制测试的结果。

[0035] 图20为根据本揭露一些实施例显示经注射Erbitux、Erbitux-ADCs、APEA-AF、及MMAE小鼠之体重变化结果。

[0036] 【实施方式】

[0037] 本揭露提供一种具有较高水溶性之新颖连接子-毒素的抗体药物复合物(ADC)。在抗体药物复合物(ADC)的接合制程中，大幅降低或甚至避免有机溶剂的使用，进而降低抗体药物复合物(ADC)的聚集作用并改善有机溶剂残留的问题。因此，本揭露提供之抗体药物复合物(ADC)的稳定性提高。

[0038] 上述之新颖连接子-毒素经设计将醣基团像是五碳醣(例如：核糖、木糖、阿拉伯糖)及六碳糖(例如：胺醣或葡萄糖)导入双胜肽连接子中，例如：Val-Cit、Phe-Cit等组织蛋白酶(Cathepsin B)可辨识之双胜肽连接子。换句话说，新颖的连接子-毒素包括具有醣胺基酸的连接子，其C端具有组织蛋白酶(Cathepsin B)可辨识之双胜肽，其N端具有高度亲水性的醣胺基酸以提升连接子或包含此连接子物质的水溶性。连接子C端的羧基和N端的胺基酸基团可作为连接间隔基(attaching spacers)、连接子、配体、药物、毒素、成像分子(imaging molecules)、抗体、胜肽、或传递分子的连接点。

[0039] 在本揭露中，将数种抗体与具有醣胺基酸的连接子-毒素进行接合以形成新颖的

抗体药物复合物(ADC)。于一实施例中,本揭露提供一种具有化学式(I)之抗体药物复合物(ADC)或其药学上可接受盐类或溶剂化物。

[0040] $A-(L-D)_p$ (I)

[0041] 于化学式(I)中,A代表一抗体。于一些实施例中,所述抗体可为一全长抗体或一抗体片段。于一些实施例中,所述抗体可为一嵌合抗体或其功能活性片段、一人类化抗体或其功能活性片段、一人类抗体或其功能活性片段、或一小鼠抗体或其功能活性片段。于其他实施例中,所述抗体亦可为上述物种以外之其他物种之抗体或其其功能活性片段,例如:大鼠抗体或其功能活性片段、羊抗体或其功能活性片段、兔子抗体或其功能活性片段。于一些实施例中,所述抗体藉由所述抗体之半胱氨酸残基连接至一复合单元(L)。在一些实施例中,所述抗体可为一治疗性抗体,用以治疗肿瘤、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)。于一些特定的实施例中,所述抗体可包括如Herceptin、Erbitux、HLX-07、EG12014、抗-EpCAM抗体、IgG1、Rituximab、Ibritumomab tiuxetan、Tositumomab、Brentuximab vedotin、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,应注意的是,上述抗体仅为示例,而非用于限制本揭露之范畴。只要抗体的链间双硫键可被还原成游离硫醇(free thiols)以与连接子接合,任何合适的抗体都可用于本揭露。

[0042] 于一实施例中,抗体可为多株抗体或单株抗体。抗体可为特定的抗原决定位,包括例如:癌症细胞抗原、病毒抗原、微生物抗原、蛋白质、胜肽、碳水化合物、化学物质、核酸、或其片段。多株抗体的制造方法为本技术领域所习知。单株抗体(mAb)至感兴趣的抗原可利用任何本技术领域习知的技术制备而成。这些技术包括但不限于例如最初由Köhler和Milstein所描述的融合瘤技术(1975,Nature 256,495-497)、人类B细胞融合瘤技术(Kozbor et al.,1983,Immunology Today 4:72)、EBV-融合瘤技术(Cole et al.,1985,单株抗体及癌症疗法,Alan R.Liss,Inc.,pp.77-96)。这种抗体可为任何一种免疫球蛋白类型,包括IgG、IgM、IgE、IgA、及IgD,及其任何亚型。本揭露中由融合瘤所产生之单株抗体(mAb)可于体外(in vitro)或体内(in vivo)进行培养。

[0043] 单株抗体可为例如:人类单株抗体、人类化单株抗体、抗体片段、或嵌合抗体(例如:人类-小鼠抗体)。人类单株抗体可由任何本技术领域习知的技术制造(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)。

[0044] 抗体也可为一双特异性抗体。双特异性抗体的制造方法为本技术领域所习知。全长双特异性抗体的传统制造方法是基于两个免疫球蛋白的重链-轻链对的共现性(coexpression),其中这两个链具有不同的特异性(参见例如:Milstein et al.,1983,Nature 305:537-539;国际公开号No.WO 93/08829,Traunecker et al.,1991,EMBO J.10:3655-3659)。

[0045] 根据不同的方式(approach)，具有结合特异性的抗体变异区域(抗体-抗原结合位)融合至免疫球蛋白恒定区域的序列所述融合较佳具有一免疫球蛋白重链恒定区域，包括至少一部份的铰链区域、CH2区域、及CH3区域。较佳具有第一重链恒定区域(CH1)，其包含轻链结合所必须的位点，存在于至少一个融合中。具有编码免疫球蛋白重链融合以及，若需要，免疫球轻链的核酸，被插入至单独的表现载体中，并且共同转染至合适的宿主生物(organism)。当使用了比例不均等的三个多胜肽链之构筑提供最佳产量时，其提供了调整三个多胜肽片段于实施例中相互比例的弹性。然而，当至少两个多胜肽链的表现为相等比例导致高产量或当各比例没有特别明显时，有可能在一个表现载体中插入两个或所有三个多胜肽链的编码序列。

[0046] 例如，双特异性抗体可具有一杂交免疫球蛋白链，在其中一臂中具有第一结合特异性，且在另外一臂中具有一杂交免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)。这种不对称的结构有助于所期望的双特异性化合物从不想要的免疫球蛋白链结合中分离，由仅存在于一个半的双特异性分子中的免疫球蛋白轻链提供容易的分离方式(国际公开号No.WO 94/04690)，其整体并入本文做为参考。

[0047] 更详细之双特异性抗体的产生可参见例如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。利用这些技术，可制备出双特异性抗体用于治疗或避免本文所述之疾病。

[0048] 双功能抗体也被描述于欧洲专利公开号EPA 0105 360。如此参考文献所揭露，杂交或双功能抗体可生物性地(即，藉由细胞融合技术)或化学性地衍生，特别系透过交联剂或是二硫化桥键形成试剂，且可包括整个抗体或其片段。获得这种杂交抗体的方法揭露于例如：国际公开号WO 83/03679及欧洲专利公开号EPA 0217577，两者皆在此并入本文作为参考。

[0049] 抗体也可为功能性活性片段、抗体的衍生物或类似物，其中该抗体免疫特异性地结合至目标抗原(例如：癌症抗原、病毒抗原、微生物抗原、或其他结合至细胞或基质的抗体)。在此，“功能性活性”代表所述片段、衍生物或类似物可辨认相同的抗原，辨认衍生自抗原的片段、衍生物或类似物的抗体。特别地，于一实施例中，免疫球蛋白分子的遗传性型(idiotype)的抗原性可藉由删除框架及CDR序列而提升，所述CDR序列为C-端的CDR序列，其专一性地辨认抗原。为了判断哪一个CDR序列结合至抗原，可在结合试验(binding assay)中使用包含CDR序列的合成胜肽，以及任何结合试验中本技术领域所习知的抗原(例如：BIAcore assay)(参见例如：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)。

[0050] 其他有用的抗体包括抗体的片段，例如但不限于：F(ab')2片段、Fab片段、Fab'、Fv片段及抗体的重链及轻链二聚体、或其任何最小片段像是Fvs或单链抗体(SCAs)(例如：U.S.Pat.No.4,946,778;Bird,1988,Science242:423-42;Huston et al.,1988,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883;and Ward et al.,1989,Nature 334:544-54中所述)。

[0051] 也可使用重组抗体，像是嵌合或人类化单株抗体，包括人类和非人类蛋白质，皆可利用标准重组DNA技术制备(参见例如U.S.Pat.No.4,816,567；及U.S.Pat.No.4,816,397)。人类化抗体为来自非人类物种的抗体分子，具有来自非人类物种的一或多种互补决定区(complementarity determining regions;CDRs)以及来自人类免疫球蛋白分子的框架区域(参见例如U.S.Pat.No.5,585,089)。嵌合和人类化单株抗体可藉由本技术领域习知的重组DNA技术产生，例如使用国际公开号WO 87/02671；欧洲专利公开号0184187；欧洲专利公开号0171496；欧洲专利公开号0173494；国际公开号WO 86/01533；U.S.Pat.No.4,816,567；欧洲专利公开号012023；Berter et al.,1988,Science240:1041-1043；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。

[0052] 也可使用完整的人类抗体。人类抗体可利用例如无法表现内源性免疫球蛋白重链和轻链基因的转基因小鼠，但其可以表现人类重链和轻链基因。转基因小鼠在常态下(in the normal fashion)以经选择之抗原免疫，例如：本揭露全部或部分的多胜肽。直接对抗抗原的单株抗体可利用传统融合瘤技术获得。转基因小鼠包含的人类免疫球蛋白转基因在B细胞分化时重新排序(rearrange)，且接着进行类型转换及体细胞突变。因此，利用这种技术，将可能产生有治疗效果的IgG、IgA、IgM及IgE抗体。综观产生人类抗体的技术可参见Lonberg and Huszar(1995,Int.Rev.Immunol.13:65-93)。关于产生人类抗体的技术及产生此种抗体的规定之更详细讨论可参见例如：U.S.Pat.Nos.5,625,126；5,633,425；5,569,825；5,661,016；以及5,545,806。其他人类抗体可藉由商业上获得，例如来自Abgenix,Inc.(Freemont,Calif.)以及Genpharm(San Jose,Calif.)。

[0053] 可利用称为“定向选择(guided selection)”的技术产生辨认经选择的抗原决定位(epitope)的人类抗体。在此方式中，经选择的非人类单株抗体，例如：小鼠抗体，用来定向(guide)会辨认相同抗原决定位的完整人类抗体的选择(参见例如：Jespers et al.,1994,Biotechnology 12:899-903)。也可利用各种本技术领域习知的技术产生人类抗体，包括噬菌体展示库(参见例如：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)。

[0054] 于其他实施例中，抗体为抗体的融合蛋白、或其功能性活性片段。例如，抗体可藉由非抗体的另一个蛋白质(或其部分，像是蛋白质的至少10、20或50个胺基酸)的胺基酸序列的N-端或C-端共价键进行融合(例如：胜肽键)。

[0055] 抗体也包括经修饰或未经修饰(亦即，藉由任何分子的共价连接)的类似物和衍生物，只要这样的共价连接允许抗体保留其抗原结合免疫特异性。例如但不限于：抗体的类似物和衍生物，包括经过进一步修饰，例如：醣基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、藉

由习知的保护/阻隔基衍生化、蛋白酶切割、连接至细胞抗体单元或其他蛋白质等。可利用习知技术实现任何大量的化学修饰，包括但不限于专一性化学切割、乙酰化、甲酰化、衣霉素存在下的代谢合成等。此外，类似物或衍生物可包括一种或多种非天然胺基酸。

[0056] 抗体可在与Fc受体作用的胺基酸残基中具有修饰(例如：取代、删除或增加)。特别地，抗体包括在胺基酸残基中具有修饰的抗体，经辨认为包含在抗Fc区域和FcRn受体之间的交互作用中(参见例如：国际公开号WO97/34631，其整体在此并入本文作为参考)。对于目标抗原的抗体免疫特异性可从商业上获得或是来自其他来源或利用本技术领域具有通常知识者所习知的方法产生，像是例如：化学合成或重组表现技术。编码对于癌症抗原具有抗体特异性的核苷酸序列可经由例如：GenBank数据库或类似的数据库、公开文献、或是例行的基因选殖(cloning)及定序而获得。

[0057] 可用于治疗癌症的抗体例子包括但不限于：人类化抗HER2单株抗体、HERCEPTIN® (trastuzumab;Genentech)、用于治疗具有非何杰金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)的病患之嵌合抗CD20单株抗体RITUXAN® (rituximab;Genentech)、用于治疗卵巢癌的小鼠抗体OvaRex(AltaRex Corporation,MA)、用于治疗大肠直肠癌的小鼠IgG2a抗体Panorex(Glaxo Wellcome,NC)、用于治疗表皮生长因子阳性癌(像是头颈癌)的抗-EGFR IgG嵌合抗体Cetuximab Erbitux(Imclone Systems Inc.,NY)、用于治疗肉瘤(sarcoma)的人类化抗体Vitaxin(Medimmune,Inc.,MD)、用于治疗慢性淋巴球性白血病(chronic lymphocytic leukemia;CLL)的人类化IgG1抗体Campath I/H(Leukosite,MA)、用于治疗急性骨髓性白血病(acute myeloid leukemia;AML)的人类化抗-CD33IgG抗体Smart MI95(Protein Design Labs,Inc.,CA)、用于治疗非何杰金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)之人类化抗-CD22IgG抗体LymphoCide(Immunomedics,Inc.,NJ)、用于治疗非何杰金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)之人类化抗-HLA-DR抗体Smart ID10(Protein Design Labs,Inc.,CA)、用于治疗非何杰金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)之放射性标记小鼠抗-HLA-Dr10抗体Oncolym(Techniclone,Inc.,CA)、用于治疗何杰金氏淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)或非何杰金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)之人类化抗-CD2单株抗体(mAb)Allomune(BioTransplant,CA)、用于治疗肺癌及大肠直肠癌的抗-VEGF人类化抗体Avastin(Genentech,Inc.,CA)、用于治疗非何杰金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)之抗-CD22抗体Epratuzamab(Immunomedics,Inc.,NJ and Amgen,CA)、及用于治疗大肠直肠癌的人类化抗-CEA抗体CEAcide(Immunomedics,NJ)。

[0058] 其他可用于治疗癌症的抗体包括但不限于对抗下述抗原的抗体(在括号中指出示例性癌症)：CA125(卵巢癌)、CA15-3(癌;carcinomas)、CA19-9(癌)、L6(癌)、Lewis Y(癌)、Lewis X(癌)、α-胎儿蛋白(癌)、CA 242(大肠直肠癌)、胎盘碱性磷酸酶(癌)、前列腺癌特异性膜抗原(前列腺癌)、前列腺酸性磷酸酶(前列腺癌)、表皮生长因子(癌)、MAGE-1(癌)、MAGE-2(癌)、MAGE-3(癌)、MAGE-4(癌)、抗输铁蛋白受体(癌)、p97(黑色素瘤)、MUC1-KLH(乳癌)、CEA(大肠直肠癌)、gp100(黑色素瘤)、MART1(黑色素瘤)、前列腺特异性抗体(PSA)(前列腺癌)、IL-2受体(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)、人绒毛膜促性腺激素(癌)、CD38(多发性骨髓瘤)、CD40(淋巴瘤)、黏蛋白(癌)、P21(癌)、MPG(黑色素瘤)、及Neu癌基因产物(癌)。一些专一性、有用的抗体包括但不限于：BR96单株抗体(mAb)(Trail et al.,1993,Science 261:212-215)、BR64

(Trail et al.,1997,Cancer Research 57:100-105)、对抗CD40抗原的单株抗体(mAbs)像是S2C6单株抗体(mAb)(Francisco et al.,2000,Cancer Res.60:3225-3231)r及其嵌合及人类化变异体、对抗CD33抗原的单株抗体(mAbs)、对抗EphA2抗原的单株抗体(mAbs)、对抗CD70抗原的单株抗体(mAbs)像是1F6单株抗体(mAb)和2F2单株抗体(mAb)及其嵌合及人类化变异体、及对抗CD30抗原的单株抗体(mAbs)像是AC10(Bowen et al.,1993,J.Immunol.151:5896-5906;Wahl et al.,2002,Cancer Res.62(13):3736-42)及其嵌合及人类化变异体。可使用许多其他与肿瘤相关抗原结合的内化抗体(参见例如: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)。

[0059] 于一些实施例中,根据本揭露的组合物和方法使用用于治疗或预防自体免疫疾病的习知抗体。对于响应自体免疫抗体产生的细胞抗原的抗体免疫特异性可经市售或其他来源或以任何本技术领域具有通常知识者习知的方法产生,像是例如:化学合成或重组表现技术。

[0060] 于一些实施例中,抗体对于自体免疫疾病的治疗具有免疫特异性,像是例如:抗-双股DNA;抗-单股DNA;抗-心磷脂抗体IgM、IgG;抗-磷脂抗体IgM、IgG;抗-SM抗体;抗-粒线体抗体;甲状腺抗体;微粒体抗体;甲状腺球蛋白抗体;抗-SCL 70;抗-Jo;抗-U1RNP;抗-La/SSB;抗-SSA;抗-SSB;抗-壁细胞抗体(anti-periteal cells);抗-组蛋白;抗-RNP;C ANCA;P ANCA;抗中心粒;抗纤维蛋白;及抗-GBM抗体。于一实施例中,结合至活化淋巴球的配体(ligand)与自体免疫疾病相关。

[0061] 于特定实施例中,抗体可结合至表现在目标细胞上的抗体或抗体复合物(例如:活化的淋巴球)。抗体或抗体复合物可包括免疫球蛋白基因超家族成员、TNF受体超家族成员、整合蛋白(integrin)、细胞激素受体、化学激素受体、主要组织兼容性复合物、红血球凝集素(lectin)、或补体控制蛋白。合适的免疫球蛋白基因超家族成员包括但不限于:CD2、CD3、CD4、CD8、CD19、CD22、CD28、CD79、CD90、CD152/CTLA 4、PD 1、及ICOS。合适的TNF受体超家族成员包括但不限于:CD27、CD40、CD95/Fas、CD134/OX40、CD137/4 1BB、TNF R1、TNFR2、RANK、TACI、BCMA、蚀骨细胞抑制因子(osteoprotegerin)、Apo2/TRAIL R1、TRAIL R2、TRAIL R3、TRAIL R4、及APO 3。合适的整合蛋白(integrin)包括但不限于:CD11a、CD11b、CD11c、CD18、CD29、CD41、CD49a、CD49b、CD49c、CD49d、CD49e、CD49f、CD103、及CD104。合适的红血球凝集素(lectin)包括但不限于:C型、S型、及I型红血球凝集素。

[0062] 于另一个特定的实施例中,对于病毒或微生物抗原具有免疫特异性的有用的抗体为单株抗体。抗体可为嵌合、人类化、或人类单株抗体。此处所使用的用词“病毒抗原”包括但不限于:可诱发免疫反应之任何病毒胜肽、多胜肽蛋白(例如:HIV gp120、HIV nef、RSV F醣蛋白、流感病毒神经胺酸酶、流感病毒血球凝集素、HTL tax、单纯疱疹病毒醣蛋白(例如:gB,gC,gD,及gE)以及B型肝炎表面抗原)。此处所使用的用词“微生物抗原”包括但不限于:可诱发免疫反应之任何微生物胜肽、多胜肽、蛋白质、醣类、多醣类、或脂质分子(例如:细菌、真菌、致病原生生物、或酵母多胜肽包括例如:LPS和荚膜多醣体5/8)。

[0063] 对于病毒或微生物抗原的抗体免疫特异性可由商业上获得,例如来自BD Biosciences(San Francisco,Calif.)、Chemicon International,Inc.(Temecula,

Calif.)、或Vector Laboratories,Inc.(Burlingame,Calif.)、或由任何本技术领域具有通常知识者习知的方法产生,像是例如:化学合成或重组表现技术。编码对于病毒或微生物抗原具有抗体特异性的核苷酸序列可由例如:GenBank数据库或类似的数据库、公开文献、或是例行的基因选殖(cloning)及定序而获得。

[0064] 于一特定的实施例中,根据本揭露的组合物和方法,有用的抗体为对于病毒感染或微生物感染的治疗或预防有用的抗体。对于病毒感染或微生物感染的治疗有用的抗体包括但不限于:对于治疗RSV感染的病患有用的人类化抗-呼吸道合胞病毒(RSV)单株抗体SYNAGIS(Medimmune,Inc.,MD);对于治疗HIV感染有效的CD4融合抗体PRO542(Progenics);对于治疗B型肝炎病毒有效的人类抗体OSTAVIR(Protein Design Labs,Inc.,CA);对于治疗巨细胞病毒(CMV)有效的人类化IgG1抗体PROTOVIR(Protein Design Labs,Inc.,CA);及抗-LPS抗体。

[0065] 其他可用于治疗感染性疾病的抗体包括但不限于对抗来自致病菌株抗原的抗体(例如:化脓性链球杆菌(Streptococcus pyogenes)、肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)、奈瑟氏球菌(Neisseria gonorrheae)、脑膜炎双球菌(Neisseria meningitides)、白喉棒状杆菌(Corynebacterium diphtheria)、肉毒杆菌(Clostridium botulinum)、产气荚膜芽胞梭菌(Clostridium perfringens)、破伤风芽孢梭菌(Clostridium tetani)、流行性感冒嗜血杆菌(Hemophilus influenza)、克雷伯氏肺炎杆菌(Klebsiella pneumoniae)、克雷伯氏臭鼻杆菌(Klebsiella ozaenas)、克雷伯氏鼻硬结杆菌(Klebsiella rhinoscleromotis)、金黄色葡萄球菌(Staphylococc aureus)、霍乱弧菌(Vibrio colerae)、大肠杆菌(Escherichia coli)、绿脓杆菌(Pseudomonas aeruginosa)、胎儿弯曲杆菌(弧菌)(Campylobacter(Vibrio)fetus)、亲水性产气单胞菌(Aeromonas hydrophila)、蜡状芽孢杆菌(Bacillus cereus)、爱德华氏菌(Edwardsiella tarda)、小肠大肠炎耶氏杆菌(Yersinia enterocolitica)、鼠疫耶氏杆菌(Yersinia pestis)、假性结核病耶氏杆菌(Yersinia pseudotuberculosis)、痢疾杆菌(Shigella dysenteriae)、副痢疾杆菌(Shigella flexneri)、宋内氏杆菌(Shigella sonnei)、沙门氏杆菌(Salmonella typhimurium)、梅毒螺旋体(Treponema pallidum)、细弱螺旋体(Treponema pertenue)、斑点病密螺旋体(Treponema carateum)、(Borrelia vincentii)、包柔疏螺旋体(Borrelia burgdorferi)、出血黄疸钩端螺旋体(Leptospira icterohaemorrhagiae)、肺结核杆菌(Mycobacterium tuberculosis)、卡氏肺囊虫(Pneumocystis carinii)、土拉文氏杆菌(Francisella tularensis)、牛布氏杆菌(Brucella abortus)、猪布氏杆菌(Brucella suis)、地中海热布氏杆菌(Brucella melitensis)、霉浆菌属(Mycoplasma spp.)、斑疹伤寒立克次体(Rickettsia prowazeki)、恙虫病立克次体(Rickettsia tsutsugumushi)、披衣菌属(Chlamydia spp.));致病真菌(例如:粗球孢子菌(Coccidioides immitis)、烟曲霉(Aspergillus fumigatus)、白色念珠球菌(Candida albicans)、皮炎芽生菌(Blastomyces dermatitidis)、新型隐球菌(Cryptococcus neoformans)、荚膜组织胞浆菌(Histoplasma capsulatum));原生生物(赤痢变形虫(Entomoeba histolytica)、弓形虫(Toxoplasma gondii)、肠道鞭毛滴虫(Trichomonas tenax)、人毛滴虫(Trichomonas hominis)、阴道滴虫(Trichomonas vaginalis)、刚比亚锥虫(Tryanosoma gambiense)、德西亚锥虫(Trypanosoma

rhodesiense)、克氏锥虫(Trypanosoma cruzi)、黑热病利什曼原虫(Leishmania donovani)、热带利什曼原虫(Leishmania tropica)、巴西利什曼原虫(Leishmania braziliensis)、肺孢子菌肺炎(Pneumocystis pneumonia)、间日疟原虫(Plasmodium vivax)、恶性疟原虫(Plasmodium falciparum)、疟原虫(Plasmodium malaria));或蠕虫(蛲虫(Enterobius vermicularis)、鞭虫(Trichuris trichiura)、蛔虫(Ascaris lumbricoides)、旋毛虫(Trichinella spiralis)、粪拟圆虫(Strongyloides stercoralis)、ijaponicum住血吸虫(Schistosoma ijaponicum)、曼森氏住血吸虫(Schistosoma mansoni)、埃及住血吸虫(Schistosoma haematobium)、及钩虫(hookworms))。

[0066] 本揭露中其他可用于治疗病毒性疾病的抗体包括但不限于对抗致病病毒抗原的抗体,例如:痘病毒科(Poxviridae)、疱疹病毒科(Herpesviridae)、单纯疱疹病毒第一型(Herpes Simplex virus 1)、单纯疱疹病毒第二型(Herpes Simplex virus 2)、腺病毒科(Adenoviridae)、乳多瘤病毒科(Papovaviridae)、肠道病毒科(Enteroviridae)、小核醣核酸病毒科(Picornaviridae)、小DNA病毒科(Parvoviridae)、呼肠孤病毒科(Reoviridae)、反转录病毒科(Retroviridae)、流感病毒(influenza viruses)、副流感病毒(parainfluenza viruses)、流行性腮腺炎(mumps)、麻疹(measles)、呼吸道细胞融合病毒(respiratory syncytial virus)、德国麻疹(rubella)、虫媒病毒科(Arboviridae)、杆状病毒科(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)、冠状病毒(Coronaviridae)、轮状病毒(Rotoviridae)、及人类免疫缺陷病毒(Human Immunodeficiency Virus)。

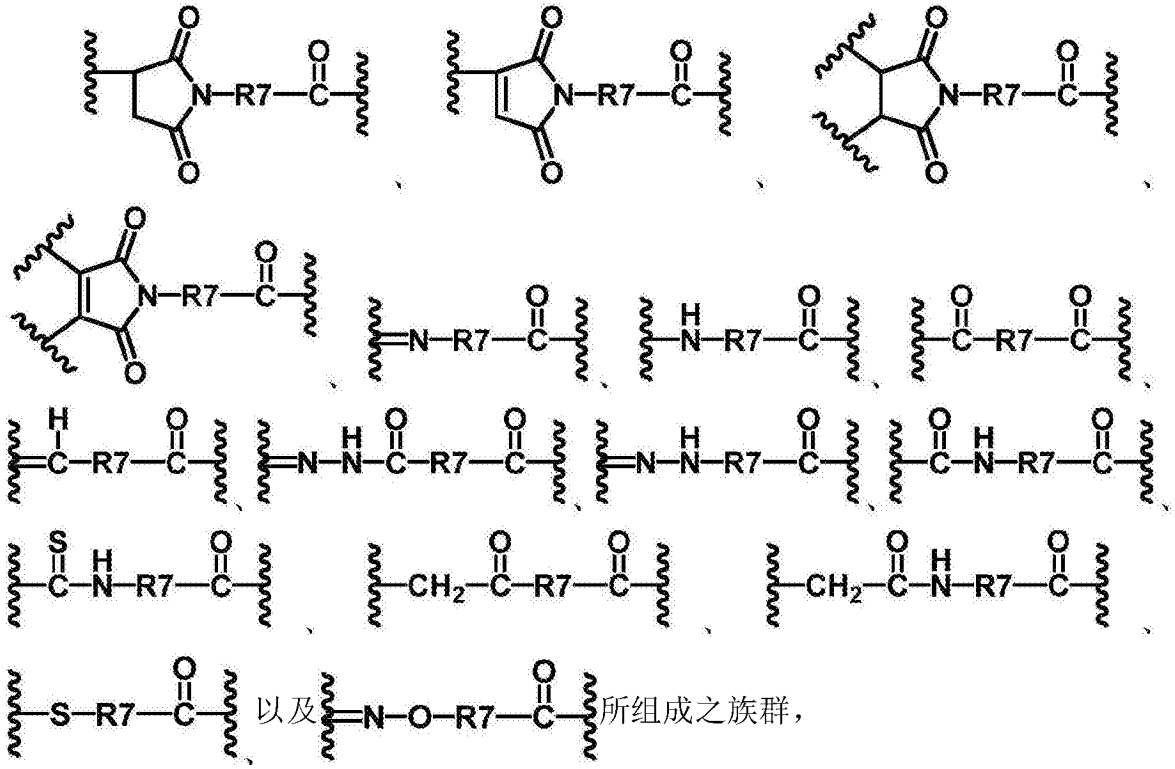
[0067] 抗体也可为存在于目标细胞或目标细胞群上的抗体。例如:相较于一个或多个正常细胞(例如:非癌细胞),可特异性表现在一个或多个特定类型的目标细胞(例如:癌细胞)表面上的跨膜多胜肽及其他标记分子。相较于正常细胞表面上的标记分子,这些标记分子经常丰富表现在目标细胞表面上、或显现更佳的免疫原性。这种细胞表面抗原多胜肽的辨识透过抗体疗法对特定的目标细胞具有破坏能力。因此,于一些实施例中,抗体包括但不限于对抗肿瘤相关抗原(TAA)的抗体。这种肿瘤相关抗原为本技术领域所习知,且可用于制备本技术领域习知的用于产生抗体的方法。

[0068] 于化学式(I)中,-(L-D)为一连接子-药物单元,其中L代表一具有醣胜肽之连接子单元,且D代表一药物单元。于化学式(I)中,P可为介于1～26的整数,取决于化学式(I)中抗体A之链间双硫键的数目。于一实施例中,P可为介于2～8的整数,或可为整数4。于一实施例中,P可为介于2～12的整数,或可为整数8。于一实施例中,P可为介于2～26的整数,或可为整数12。于一实施例中,P可为整数26。

[0069] 于一些实施例中,本揭露之连接子单元(-L-)可包括一醣胺基酸单元(-SAAs-)及一胜肽单元(-AAs-)。于一些实施例中,胜肽单元可为双肽、三肽、四肽、五肽、六肽、七肽、八肽、九肽、十肽、十一肽、或十二肽。

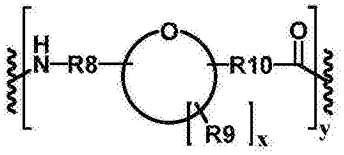
[0070] 于其他实施例中,本揭露之连接子单元(-L-)可具有化学式-C-SAAs-AAs-。于此化学式中,C-可为一复合单元,选自由

[0071]

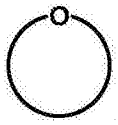


[0072] 其中R7选自由-C1-C10亚烷基-、-C3-C8环碳基-、-O-(C1-C8烷基)-、-亚芳基-、-C1-C10亚烷基-亚芳基-、-亚芳基-C1-C10亚烷基-、-C1-C10亚烷基-(C3-C8环碳基)-、-(C3-C8环碳基)-C1-C10亚烷基-、-C3-C8杂环基-、-C1-C10亚烷基-(C3-C8杂环基)-、-(C3-C8杂环基)-C1-C10亚烷基-、-$(CH_2CH_2O)_r$-、以及-$(CH_2CH_2O)_r$-CH_2-所组成之族群,其中r为介于1-10之整数。

[0073] 于此化学式中,本揭露之醣胺基酸单元(-SAAs-)可藉由化学式(II)表示:

[0074]  (II)

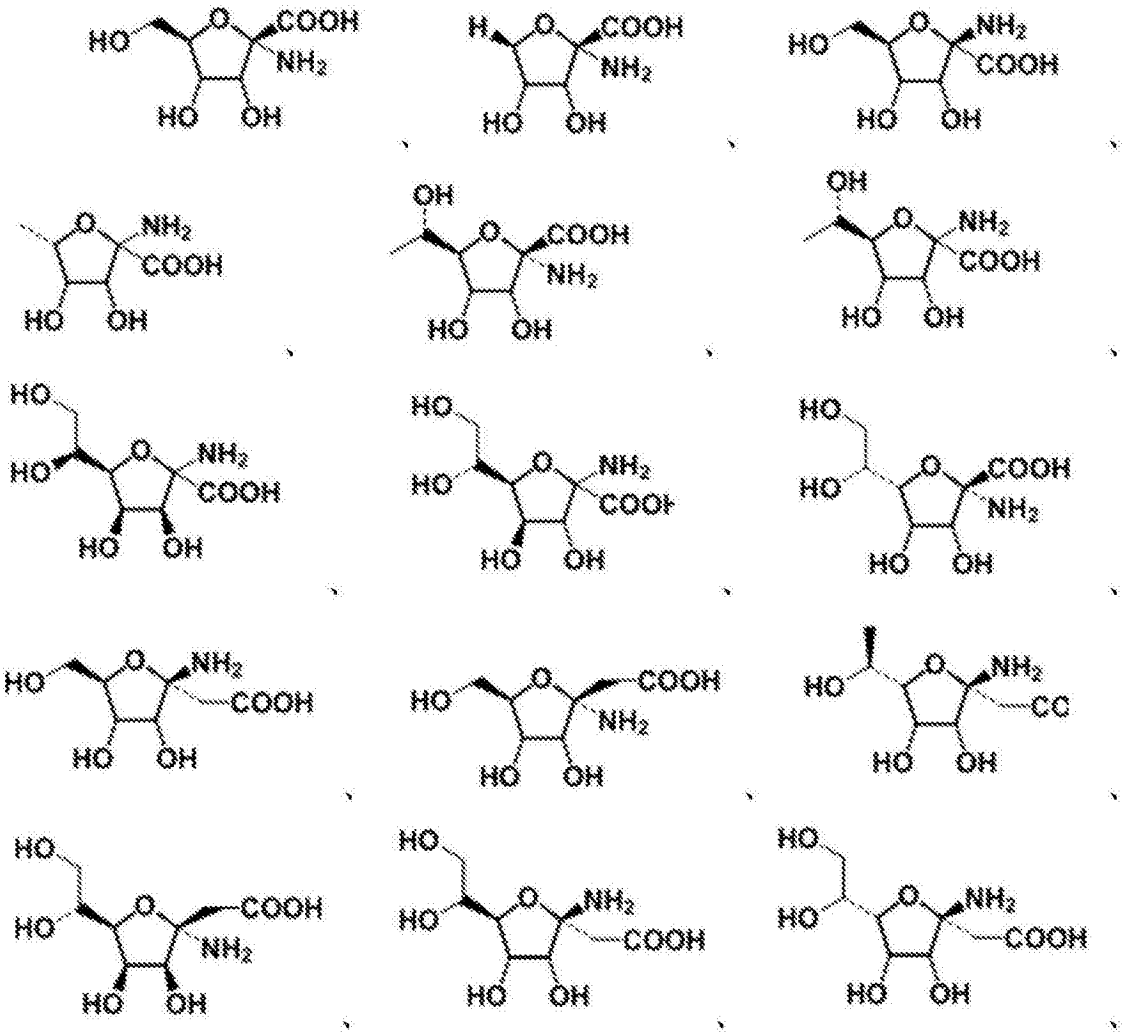
[0075] 化学式(II)其中x为介于1-8之整数,y为介于1-4之整数,

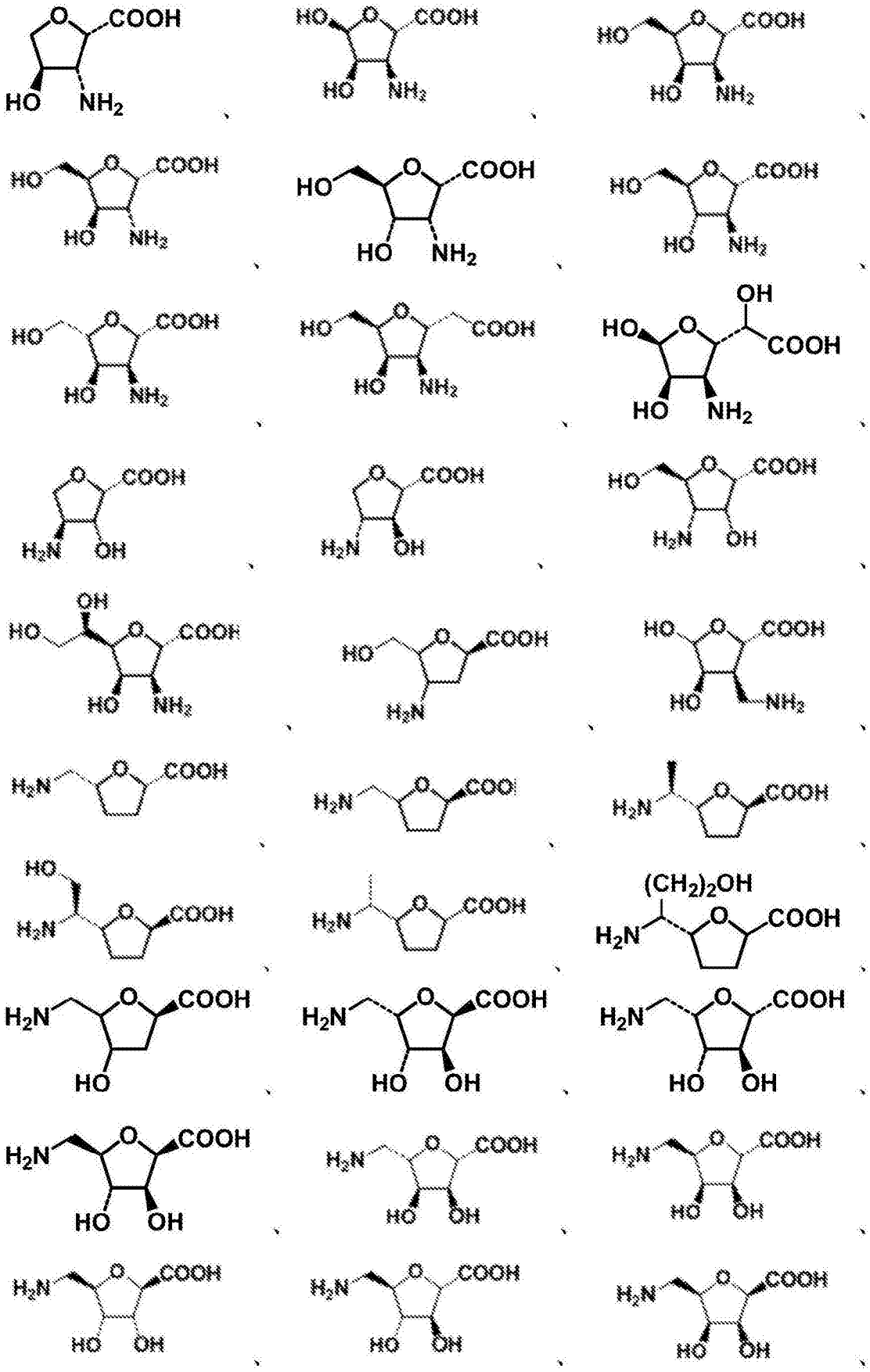
[0076] 为四氢呋喃、二氢呋喃、四氢哌喃或二氢哌喃,每一R8与R10独立地为单键、亚甲基、羟基亚甲基、伸乙基、亚乙基、羟基伸乙基、羟基亚乙基、二羟基伸乙基、二羟基亚乙基、伸乙烯基、亚乙烯基、伸丙基(propylene)、亚丙基、伸丙基(trimethylene)、羟基伸丙基(hydroxypropylene)、羟基亚丙基、羟基伸丙基(hydroxytrimethylene)、二羟基伸丙基(dihydroxypropylene)、二羟基亚丙基、二羟基伸丙基(dihydroxytrimethylene)、三羟基伸丙基(trihydroxypropylene)、三羟基亚丙基或三羟基伸丙基(trihydroxytrimethylene),每一R9独立地为羟基、甲基、羟甲基、乙基、羟乙基、二羟乙基、丙基、羟丙基、二羟丙基、或三羟丙基、或同一环中任意两R9与其连接之碳原子形成羰基、或任意两R9、R8与任意一R9、或R10与任意一R9形成与原四氢呋喃、二氢呋喃、四氢哌喃或二氢

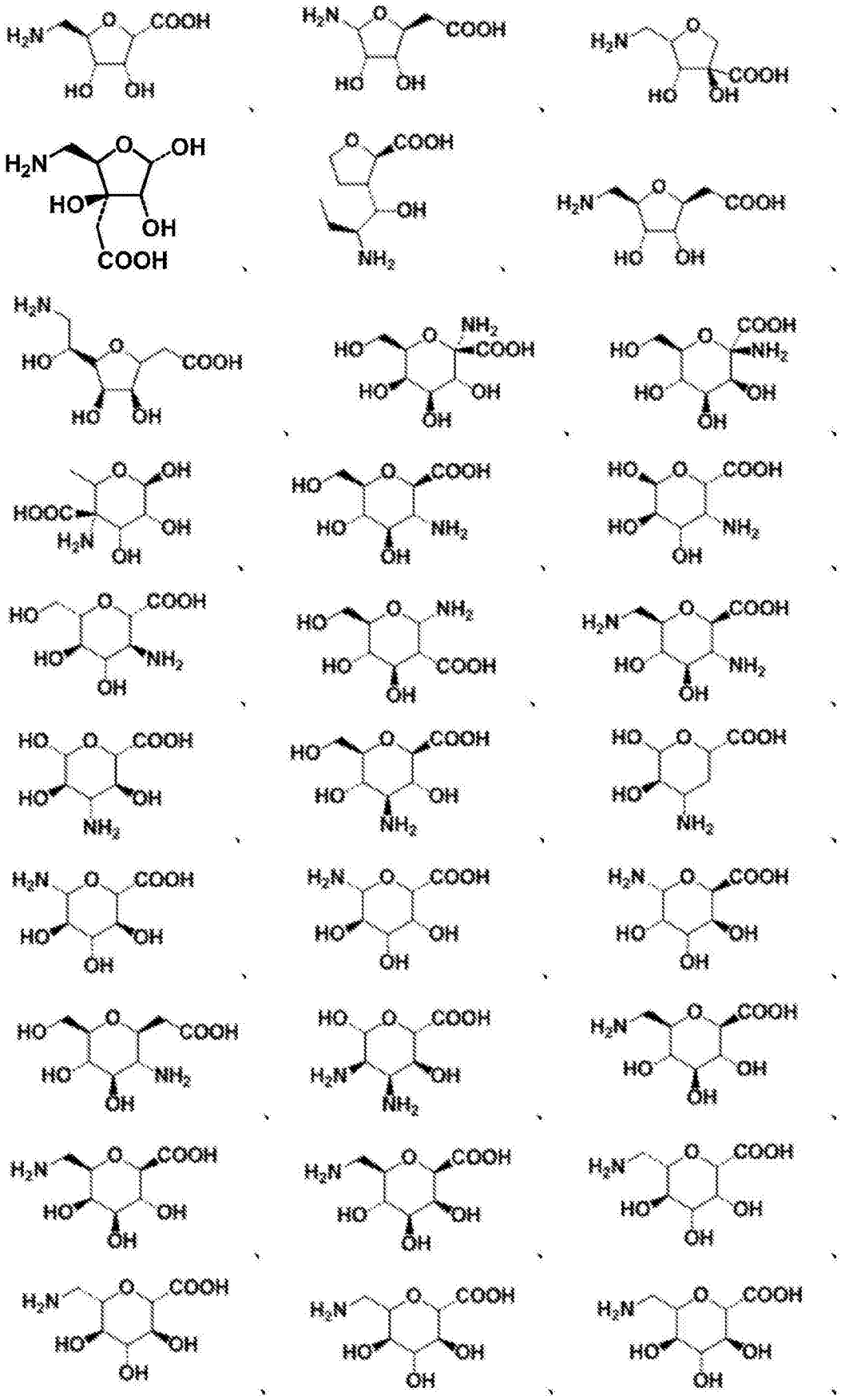
哌喃融合之第二四氢呋喃、二氢呋喃、四氢哌喃或二氢哌喃、或任意两R9、R8与任意一R9、或R10与任意一R9与一亚甲基、亚乙基、1-亚丙基、2-亚丙基或苯亚甲基形成与原四氢呋喃、二氢呋喃、四氢哌喃或二氢哌喃融合之环状缩醛或缩酮。

[0077] 于本揭露中，醣胺基酸包括但不限于：

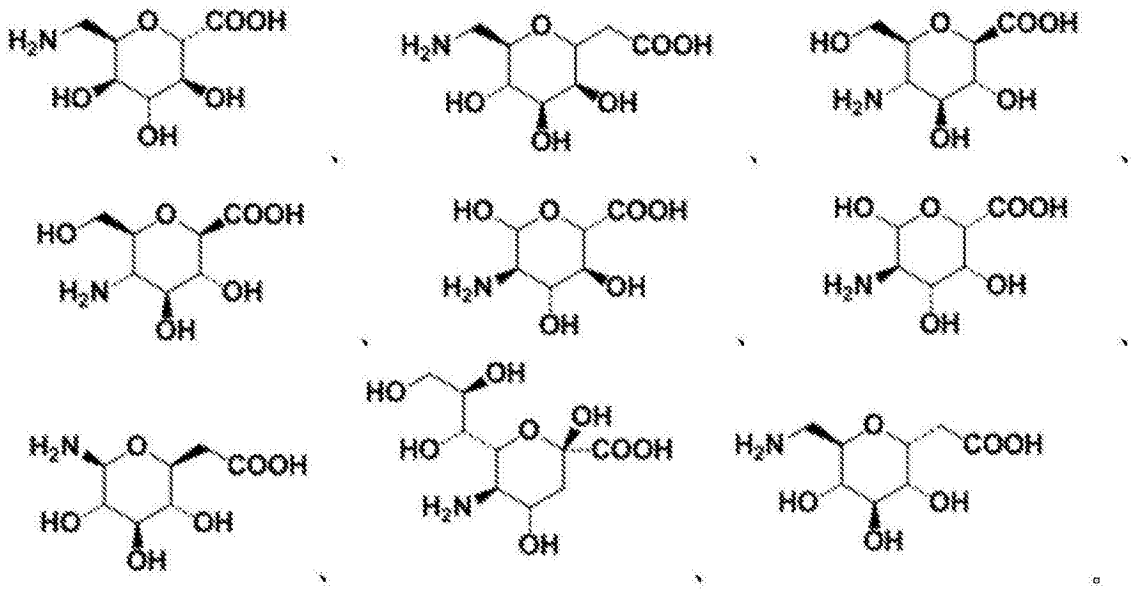
[0078]



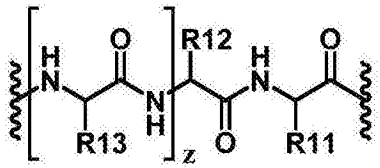
[0079] 

[0080] 

[0081]



[0082] 于此化学式中，胜肽单元(-AAs-)可藉由化学式(III)表示：

[0083] 

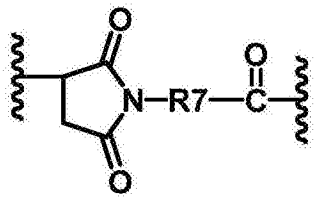
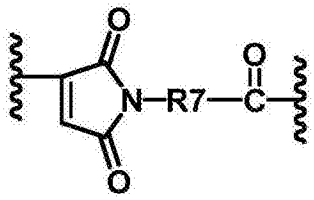
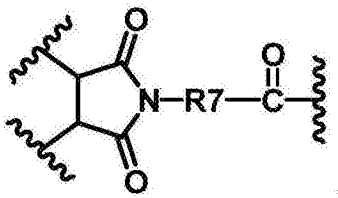
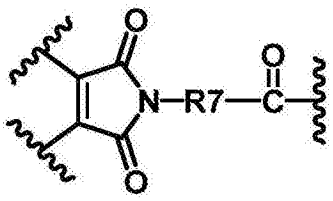
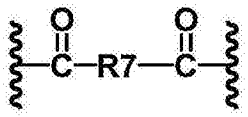
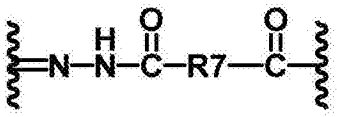
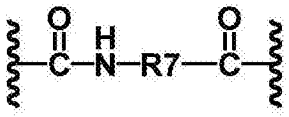
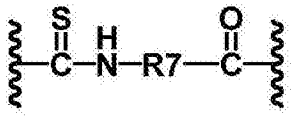
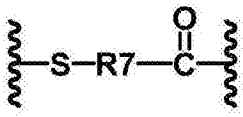
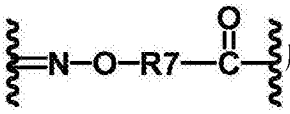
(III)

[0084] 于化学式(III)中，z为介于0～10之整数，R11可为-(CH2)3NHC(=NH)NH2、-(CH2)3NH2、-(CH2)3NHCONH2、-(CH2)4NHC(=NH)NH2、-(CH2)4NH2或-(CH2)4NHCONH2，R12为氢、甲基、乙基、丙基、异丙基、环丙基、丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、环丁基、苯基或苯甲基，R13为氢、甲基、异丙基、环丙基、丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、环丁基、环己基、苯基、苯甲基、p-羟基苯甲基、-CH2OH、-CH(OH)CH3、-CH2CH2SCH3、-CH2CONH2、-CH2COOH、-CH2CH2CONH2、-CH2CH2COOH、-(CH2)3NHC(=NH)NH2、-(CH2)3NH2、-(CH2)3NHCOCH3、-(CH2)3NHCHO、-(CH2)4NHC(=NH)NH2、-(CH2)4NH2、-(CH2)4NHCOCH3、-(CH2)4NHCHO、-(CH2)3NHCONH2、-(CH2)4NHCONH2、-CH2CH2CH(OH)CH2NH2、2-吡啶甲基、3-吡啶甲基、或4-吡啶甲基。

[0085] 于一些实施例中，胜肽单元(-AAs-)可经一或多个酵素切割，例如：藉由肿瘤相关蛋白酶切割以释放出药物单元(-D-)。

[0086] 于另一实施例中，C-可为一复合单元，选自由

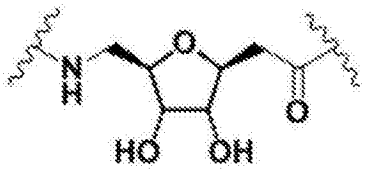
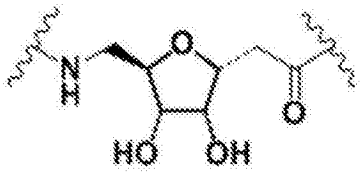
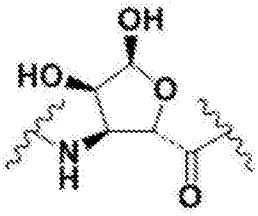
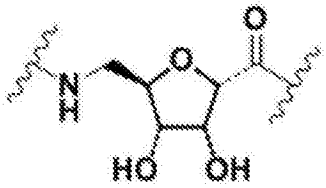
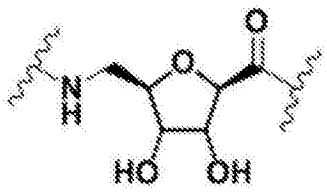
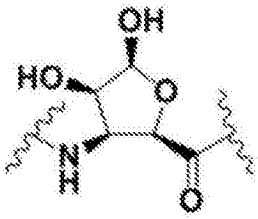
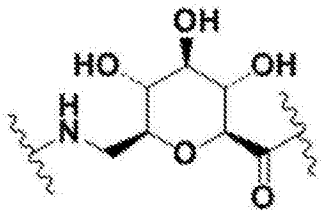
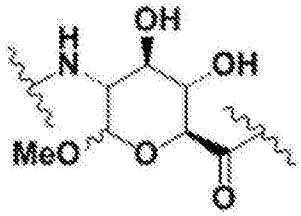
[0087]










及

所组成之族群，

[0088] 其中R7选自由-1,5-伸戊基-、-1,6-伸己基-、-1,4-伸环己基-、-$(CH_2CH_2O)_r$-CH_2-、以及-$(CH_2CH_2O)_r$-CH_2-CH_2-所组成之族群，其中r为介于2～5之整数。

[0089] 于另一实施例中，醣胺基酸单元(-SAAs-)可选自由

[0090]

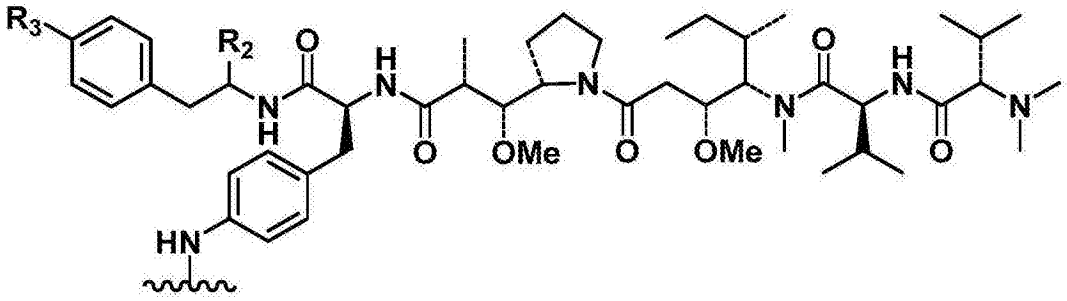







以及

所组成之族群。

[0091] 于一实施例中，胜肽单元(-AAs-)可选自由-缬胺酸-瓜胺酸-(-Val-Cit-)、-缬胺酸-离胺酸-(-Val-Lys-)、-缬胺酸-鱼精胺酸-(-Val-Arg-)、-苯丙胺酸-瓜胺酸-(-Phe-Cit-)、-苯丙胺酸-离胺酸-(-Phe-Lys-)、以及-苯丙胺酸-鱼精胺酸-(-Phe-Arg-)所组成之族群。

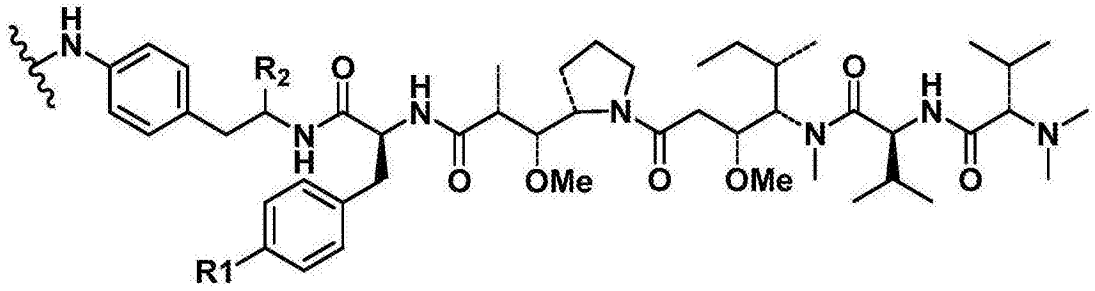
[0092] 然而，应注意的是，上述结构仅为示例，而非用于限定本揭露之范畴。

[0093] 于一实施例中，药物单元(-D-)为一细胞毒性剂，可选自由

[0094]

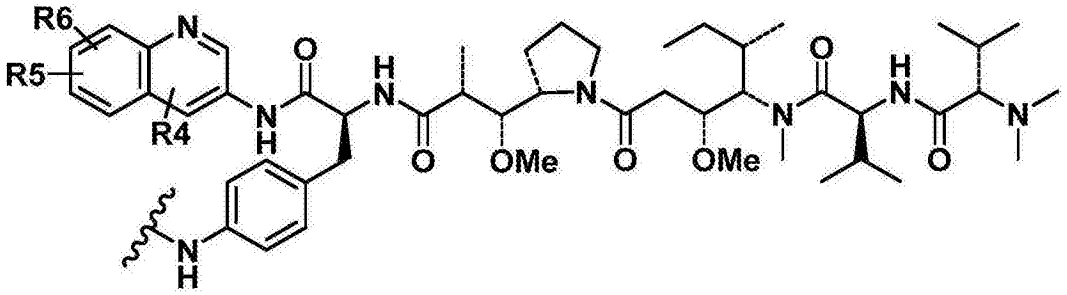


、



以及

、



[0095] 所组成之族群，其中其中每一R1、R2、R3、R4、R5与R6独立地为氢、胺基、硝基、卤素、羟基、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-吡咯啶基、1-哌啶基、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-吡咯啶基羰基、1-哌啶基羰基、1-哌嗪基羰基、甲基、乙基、丙基、异丙基或苯基。

[0096] 于一实施例中，药物单元(-D-)为一细胞毒性剂，选自由瓢菌素(amanitins)、蒽环类物(anthracyclines)、海兔毒素(auristatins)、浆果赤霉素(baccatins)、加利车霉素(calicheamicins)、喜树碱(camptothecins)、西地霉素(cemadotins)、秋水仙碱(colchicines)、秋水仙胺(colcimids)、考布他汀(combretastatins)、隐花素(cryptophysins)、(discodermolides)、多卡霉素(duocarmycins)、棘霉素(echinomycins)、艾榴塞洛素(eleutherobins)、埃博霉素(epothilones)、雌莫司汀(estramustines)、偏端霉素(lexitropsins)、美登木素生物碱(maytansinoids)、纺锤菌素(netropsins)、嘌呤霉素(puromycins)、吡咯并苯并二氮杂(pyrrolobenzodiazepines)、根瘤菌素(rhizoxins)、紫杉烷(taxanes)、微管蛋白素(tubulysins)、以及长春花生物碱(vinca alkaloids)所组成之族群。

[0097] 于一些实施例中，药物单元(-D-)可为加利车霉素(calicheamicin)、喜树碱(camptothecin)、美登木素生物碱(maytansinoid)、或蒽环类物(anthracycline)。于一些实施例中，药物单元(-D-)可为紫杉烷(taxanes)、拓扑异构酶抑制剂(topoisomerase

inhibitor)、长春花生物碱(vinca alkaloids)、或其类似物。于一些实施例中,合适的细胞毒性剂包括例如:DNA小沟结合剂(例如:烯二炔和偏端霉素、CBI化合物;也可参见U.S.Pat.No.6,130,237)、多卡霉素(duocarmycins)、紫杉烷(taxanes)(例如:紫杉醇和多烯紫杉醇)、嘌呤霉素(puromycins)、及长春花生物碱(vinca alkaloids)。其他细胞毒杀试剂包括例如:CC-1065、SN-38、托普乐肯(topotecan)、阿霉素(doxorubicin)、根瘤菌素(rhizoxin)、氰基吗啉基(cyanomorpholino-doxorubicin)、棘霉素(echinomycin)、考布他汀(combretastatin)、纺锤菌素(netropsin)、埃博霉素(epothilone)、雌莫司汀(estramustine)、隐花素(cryptophysin)、西地霉素(cemadotin)、美登木素生物碱(maytansinoid)、蒂克霉素(discodermolide)、艾榴塞洛素(eleutherobins)、或双羟蒽醌(mitoxantrone)。

[0098] 于一些实施例中,药物单元可为一抗微管素试剂(anti-tubulin agent)。抗微管素试剂的例子包括:海兔毒素(auristatin)、紫杉烷(taxane)、及长春花生物碱(vinca alkaloid)。其他抗微管素试剂的例子包括如:浆果赤霉素(baccatin)衍生物、西地霉素(cemadotin)、秋水仙碱(colchicine)、秋水仙胺(colcimid)、考布他汀(combretastatins)、念珠藻素(cryptophycins)、(discodermolide)、(eleutherobin)、(estramustine)、(maytansinoid)、(nocodazole)、或(taxane)之类似物。

[0099] 于一些特定的实施例中,细胞毒性剂可为美登木素生物碱(maytansinoids)或其他抗微管素试剂。例如,于一些特定的实施例中,美登木素生物碱(maytansinoids)为美登素(maytansine)或DM-1(ImmunoGen,Inc.;也可参见Chari et al.,1992,Cancer Res.52:127-131)。

[0100] 于一些特定的实施例中,细胞毒性剂可为尾海兔素(dolastatin)。于一些特定的实施例中,细胞毒性或细胞抑制剂为海兔毒素类型。因此,于一特定的实施例中,细胞毒性或细胞抑制剂为MMAE。

[0101] 于另一实施例中,本揭露也提供一种抗体药物复合物(ADC)的制造方法100。第1图为根据本揭露一些实施例显示抗体药物复合物(ADC)的制造方法流程图100。

[0102] 首先,方法100进行至步骤102,形成一第一溶液。第一溶液系使一抗体及一还原剂于一缓冲溶液中反应而形成。于一些实施例中,所述抗体可为一全长抗体或一抗体片段。于一些实施例中,所述抗体可为一嵌合抗体或其功能活性片段、一人类化抗体或其功能活性片段、一人类抗体或其功能活性片段、或一小鼠抗体或其功能活性片段。于其他实施例中,所述抗体亦可为上述物种以外之其他物种之抗体或其其功能活性片段,例如:大鼠抗体或其功能活性片段、羊抗体或其功能活性片段、兔子抗体或其功能活性片段。在一些实施例中,所述抗体可为一治疗性抗体,用以治疗肿瘤、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)。于一些实施例中,所述抗体可为任何前述之合适抗体。于一些特定的实施例中,所述抗体可包括如Herceptin、Erbitux、HLX-07、EG12014、抗-EpCAM抗体、IgG1、抗-EpCAM抗体、IgG1、Rituximab、Ibritumomab tiuxetan、Tositumomab、Brentuximab vedotin、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。有关其他抗体的描述可参照相关段落之叙述，未避免不必要的重复，不在此赘述。

[0103] 于步骤102中，抗体的初始浓度可小于20mg/mL。例如，抗体的初始浓度可介于1～20mg/mL。然而，抗体的初始浓度并不限于此。根据需要，抗体的浓度亦可大于20mg/mL。

[0104] 于一实施例中，还原剂可选自由三(2-羧乙基)膦(tris(2-carboxyethyl)phosphine;TCEP)、2-氨基乙硫醇(2-aminoethanethiol)、二硫苏糖醇(dithiothreitol;DTT)、2-巯基乙胺盐酸盐(2-mercaptoethylamine hydrochloride;2-MEA)、以及其他合适的还原剂所组成之族群。于一实施例中，缓冲液可为由25mM硼酸钠、25mM NaCl、及1mM二亚乙基三乙酸(diethylenetriaminepentaacetic acid;DTPA)(pH 8)组成之硼酸盐(borate)缓冲液，或是由2.67mM KCl、1.47mM KH_2PO_4、137.93mM NaCl、及8.06mM Na_2HPO_4-$7H_2O$(pH 7.4)组成之PBS缓冲液、或其他具有合适pH值的缓冲液。

[0105] 于步骤102，还原剂和抗体的莫耳当量比例可根据实际需求进行调整，例如：所需游离硫醇的数量及抗体药物复合物(ADC)所需的性质(像是DAR值)。

[0106] 理论上，DAR值与经还原的抗体所提供之游离硫醇数量相应。此外，还原剂和抗体的莫耳当量比例也会受到还原剂的还原能力所影响。因此，本揭露中选择适当的还原剂和还原条件，使得抗体中存在的链间双硫键转变为所需的游离硫醇数量。

[0107] 理论上，1莫耳当量的TCEP可在抗体中产生2莫耳当量的游离硫醇。因此，为达到所需之平均DAR值(如3.5-4.0)，可使用1.75-2莫耳当量的TCEP以在抗体中产生平均数量为3.5～4.0的游离硫醇。然而，应了解的是，反应中所使用之TCEP实际莫耳当量值可能会大于前述之理论值。

[0108] 例如，为达到26的平均DAR值，理论上TCEP和抗体的莫耳当量比例可调整为13以在抗体中产生平均数量为26的游离硫醇。然而，反应中所使用之TCEP实际莫耳当量值可能会大于13莫耳当量。类似地，为达到12的平均DAR值，TCEP和抗体的莫耳当量比例可调整为6以在抗体中产生平均数量为12的游离硫醇。然而，反应中所使用之TCEP实际莫耳当量值可能会大于6莫耳当量。

[0109] 于本揭露一实施例中，为达到3.5-4.0的平均DAR值，TCEP和抗体的莫耳当量比例可调整为介于1.8-2.8以在抗体中产生平均数量为3.5～4.0的游离硫醇。于另一实施例中，为达到3.5-4.0的平均DAR值，TCEP和抗体的莫耳当量比例可介于2.1-2.5。于本揭露之另一实施例中，为达到大于4.0的平均DAR值(像是5.4)，TCEP和抗体的莫耳当量比例为约3.4。

[0110] 于步骤102中，可于室温(如15-25℃)至40℃下进行反应约1-3小时。反应完成后，抗体被还原并产生游离硫醇。

[0111] 接下来，方法100进行至步骤104，于有机相或水相中制备一连接子-药物单元以形成一第二溶液，其中连接子具有一醣胜肽。于一实施例中，有机相可包括二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide;DMSO)、乙腈(acetonitrile;ACN)、二甲基乙酰胺(N,N-dimethylacetamide;DMA)、丙二醇(propylene glycol;PG)等。用来制备连接子-药物单元之有机溶剂浓度可介于0％(v/v)至100％(v/v)，像是0％、10％、20％、30％、50％、75％、或100％(v/v)。

[0112] 于一些实施例中，醣胜肽可包括单醣、双醣、或多醣。于一些实施例中，具有醣胜肽之连接子-药物单元可选自由MHT-47、MHT-71、MHT-81a、MHT-93、MHT-98a、CCH-028、CCH-035、CCH-038、FCW-016、WHY-46、以及CCH-041所组成之族群。于一些实施例中，具有醣胜肽之连接子-药物单元可为前述任何合适的连接子-药物单元。有关其他连接子-药物单元的描述可参照相关段落之叙述，未避免不必要的重复，不在此赘述。

[0113] 接下来，方法100进行至步骤106，进行一接合制程，此接合制程系混合前述第一溶液和前述第二溶液以形成一混合溶液。

[0114] 于一些实施例中，混合溶液中之有机溶剂浓度可介于0％(v/v)至20％(v/v)。例如，混合溶液中之有机溶剂浓度可介于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)。于步骤106中，第一溶液中经还原的抗体于共溶剂系统中与连接子-药物单元接合，所述共溶剂系统包括0～20％(v/v)的有机溶剂以形成抗体药物复合物(ADC)。于步骤106中，接合制成可于0～10℃下进行约0.5～2小时。例如，于一实施例中，接合制程可于4℃下进行约0.5小时。

[0115] 应注意的是，虽然先前研究已发展出各种抗体药物复合物(ADC)，然而，在接合制程中，仍需要包含高含量有机溶剂的共溶剂系统。例如，于Seattle Genetics提供的接合制程中使用了2.75莫耳当量的三(2-羧乙基)膦(TCEP)作为还原剂以将单株抗体中的链间双硫键还原成游离硫醇。然而，经还原的抗体于含有20％有机溶剂的共溶剂系统中接合至MC-Val-Cit-PAB中的马来酰亚胺(maleimide)。在此篇研究中，若共溶剂系统中的有机溶剂含量下降，则连接子-毒素无法完全均相溶解并与抗体接合，导致接合效率很低。

[0116] 相反地，本揭露使用具有高水溶性的新颖连接子-毒素还形成抗体药物复合物(ADC)。连接子经设计为具有糖胺基酸以提高连接子的亲水性并增加最中抗体药物复合物的稳定性。因此，有效的降低在抗体药物复合物(ADC)的接合制程中所使用的有机溶剂含量，并且达到抗体药物复合物(ADC)的高接合效率。此外，由于有机溶剂的含量降低，使得后续的纯化和分析变得容易。并且，连接子-毒素经改良的亲水性也降低了抗体药物复合物(ADC)的聚集作用，进而提高抗体药物复合物(ADC)的稳定性。对于样品存放与配方设计皆有明显效益。相较于包含不具有醣胜肽连接子单元之抗体药物复合物，包含具有醣胜肽连接子单元之抗体药物复合物具有较佳的稳定性。

[0117] 相较于Seattle Genetics所开发须使用高达20％的有机溶剂的MC-Val-Cit-PAB，本揭露证实具有醣胺基酸的连接子-毒素可大幅降低抗体药物复合物的接合制程中有机溶剂的使用。此外，本揭露也证实有些特定的连接子-毒素可在纯水相中进行接合反应，且在纯水相中进行接合的抗体药物复合物(ADC)仅有少量的高分子量物质产生，经SEC分析测量到的HMWS少于0.1％(参照实施例20、21，以及第13B图、第14B图)。

[0118] 此外，目前市售的ADC药物，如Kadcyla®和Adcetris®都以冻晶剂型保存，而且回溶后必须在一天内使用完毕。然而，本揭露所制得之抗体药物复合物(ADC)具有极佳的安定性，且以液态于4℃可保存超过四个月(参照实施例19以及第18图)。

[0119] 此外，于本揭露中，抗体和连接子-药物单元莫耳当量比例经选择以使抗体药物复合物的平均DAR介于约3.5-4.0。应了解的是，抗体药物复合物的平均DAR可根据实际需求进行调整。例如，于一些实施例中，抗体药物复合物的平均DAR可大于4.0。

[0120] 最后，方法100进行至步骤108，纯化混合溶液。于一些实施例中，可使用脱盐管柱

或切向流过滤(tangential flow filtration;TFF)纯化混和溶液以移除未接合的连接子-毒素并获得纯化的抗体药物复合物(ADC)。在冲提期间,缓冲液可置换为另一个合适的缓冲溶液,例如:PBS缓冲液(2.67mM KCl、1.47mM KH_2PO_4、137.93mM NaCl、8.06mM Na_2HPO_4-$7H_2O$、pH 7.4)、或其他制剂溶液像是SGN(20mM柠檬酸钠、6.3%(w/v)海藻糖、0.2mg/mL聚山梨醇酯80、pH 6.0)。

[0121] 根据疏水作用层析(HIC)法的分析结果可知,本揭露所制得之抗体药物复合物(ADC)的平均DAR(药物-抗体比例)约为3.5-4.0,且接合效率大于90%,像是92%、93%、94%、95%、96%。根据粒径筛析层析(SEC)法的分析结果可知,在接合制程中并没有明显的高分子量物质(HMWS)产生。此外,本揭露所制得之抗体药物复合物(ADC)具有良好的热稳定性、储存安定性、及肿瘤抑制生长能力。

[0122] 以下描述各制备例和实施例显示连接子-毒素和抗体药物复合物的形成方法、以及抗体药物复合物的性质。

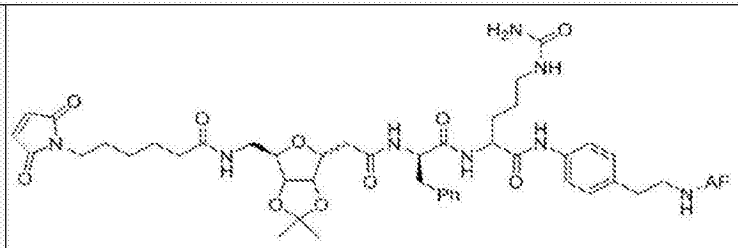
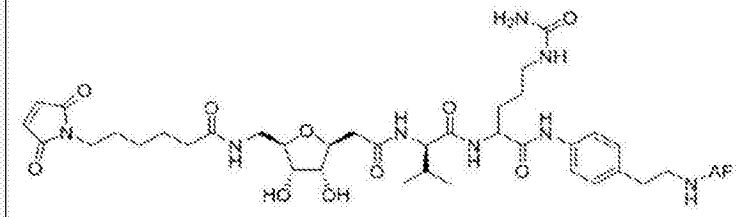
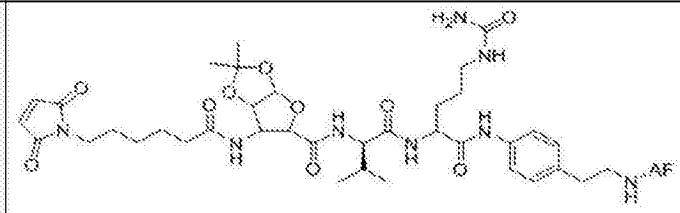
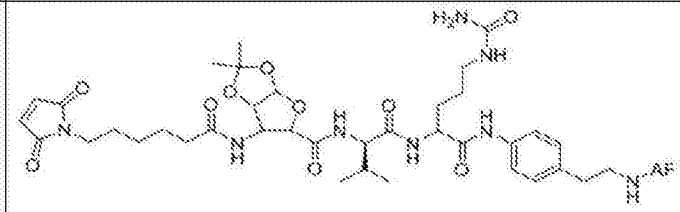
[0123] 制备例及实施例

[0124] 本揭露藉由以下实施例做更详细说明。MMAE(已知的毒素)、海兔毒素F(AF,已知的毒素)与vedotin MMAE(已知的毒素)、海兔毒素F(AF,已知的毒素)购自Concortis Biotherapeutics。根据文献合成Z-Val-Cit-OH及各种醣胺基酸。上述各化合物的结构为本技术领域具有通常知识者习知,为达简洁目的,不在此赘述。

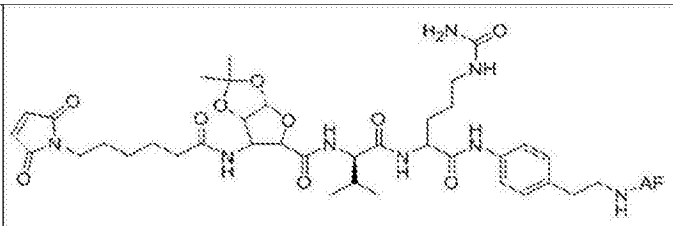
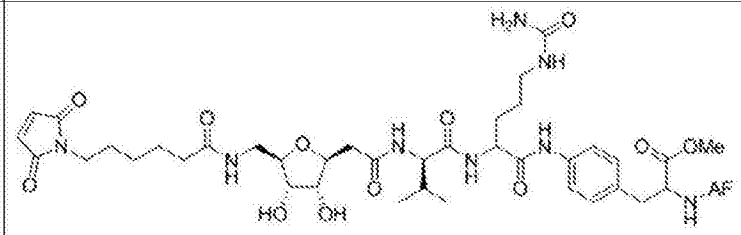
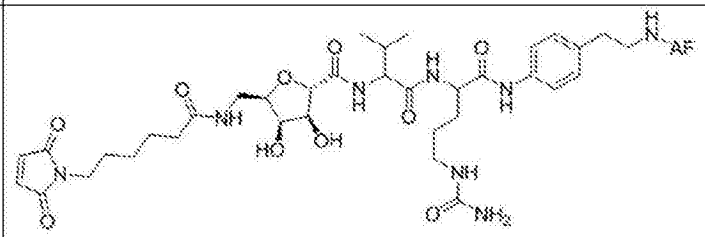
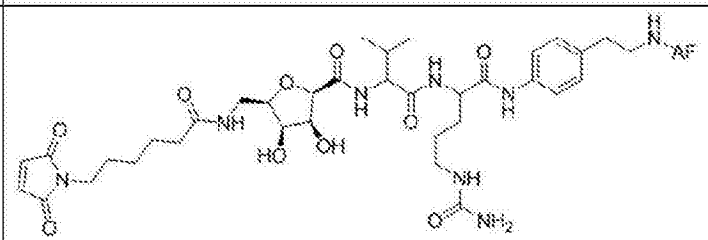
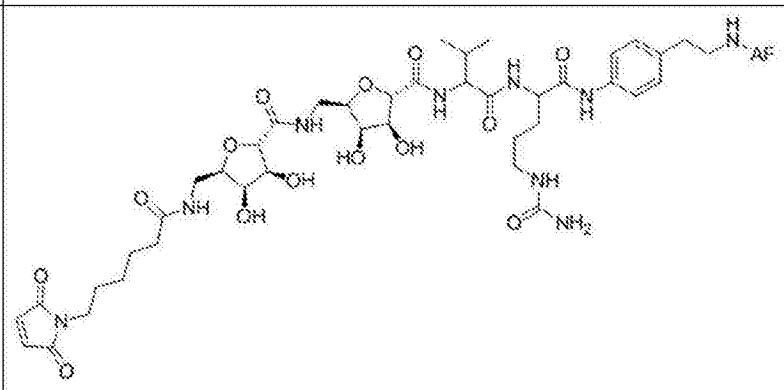
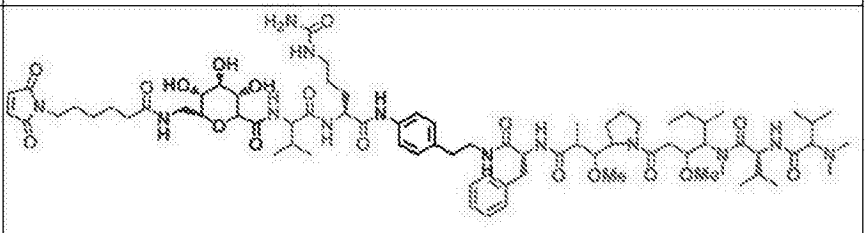
[0125] 用于连接子-毒素的缩写及其相对应的化学结构列于表1。

[0126] 表1

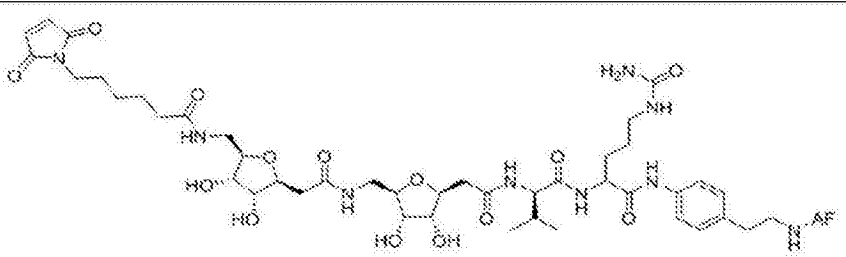
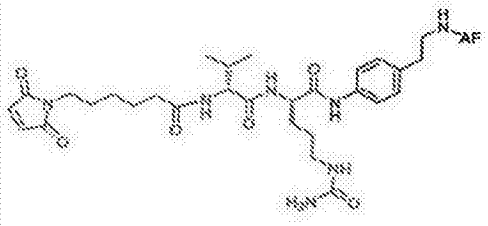
[0127]

MHT-47	
MHT-71	
MHT-81a	
MHT-93	

[0128]

MHT-98a	
CCH-028	
CCH-035	
CCH-038	
CCH-041	
FCW-016	

[0129]

WHY-46	
MHT-87	

[0130] 表2

[0131]

抗体	**厂商名称**
EG12014	EirGenix
Human IgG1	Sigma
Erbitux® (Cetuximab)	Merck
Herceptin®(trastuzumab)	Roch
HLX-07	Henlix Inc.
Anti-EpCAM	吴汉忠博士实验室生产

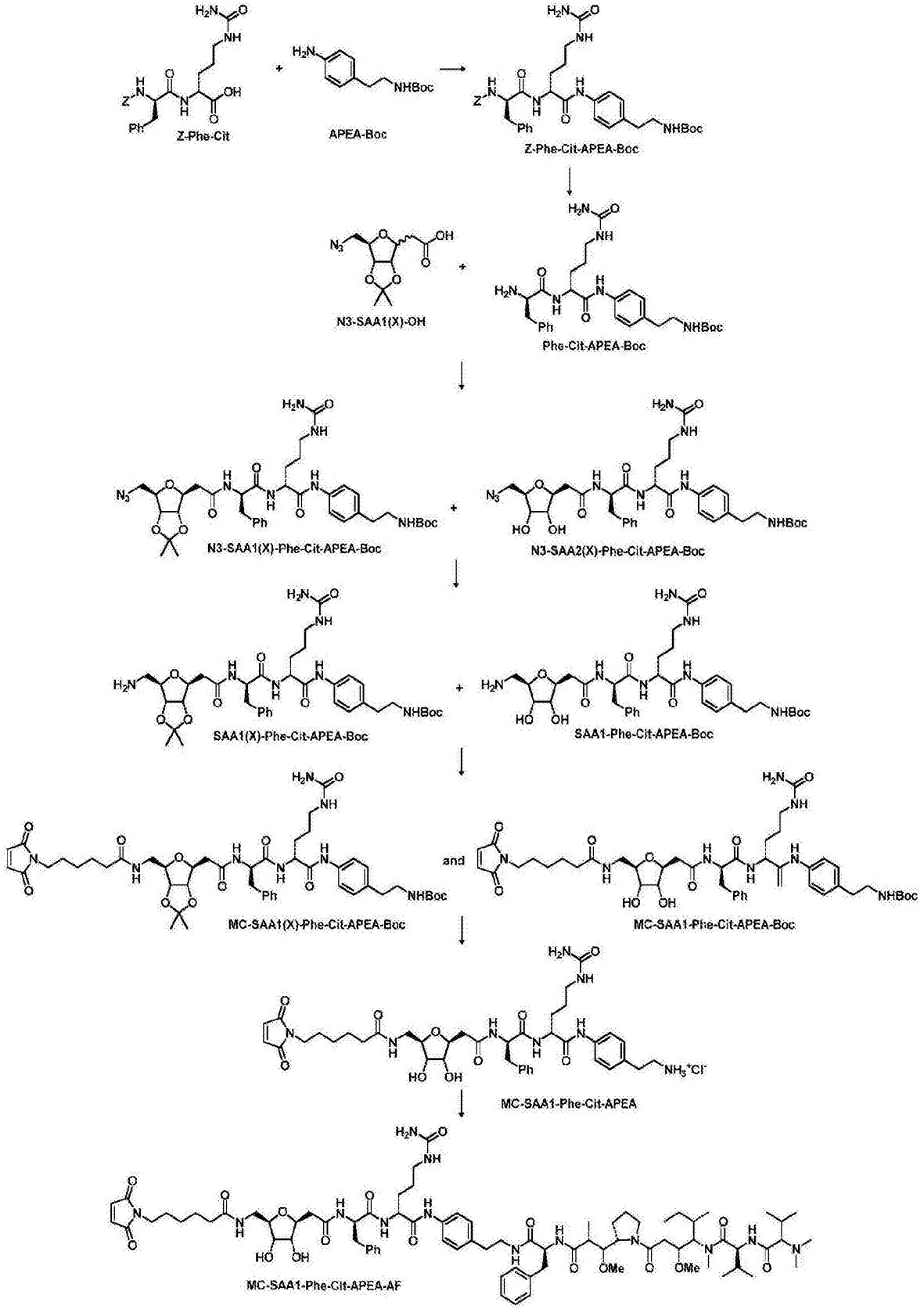
[0132] <连接子-毒素>

[0133] 制备例1

[0134] MHT-47[MC-SAA1-Phe-Cit-APEA-AF]之合成

[0135] 连接子-毒素MHT-47根据以下所示步骤和以下示意图合成。

[0136]



[0137] 将Z-Phe-Cit(9.13g,20mmol)加入二氯甲烷(750mL)及异丙醇(250mL)的混合液中,并搅拌直至双肽完全溶解。之后,加入APEA-Boc(7.09g,30mmol)及EEDQ(7.42g,30mmol),并于室温搅拌混合物3天。于减压环境下,移除溶剂,并加入乙醚(300mL)于残留物

中。过滤混合物，并将粗产物再悬浮于乙醚(300mL)中。上述步骤重复3次。于真空环境下，对收集的固体产物进行干燥，以获得Z-Phe-Cit-APEA-Boc(9.53g，产率70.6%)。产物以PMR进行鉴定。

[0138] 将Z-Phe-Cit-APEA-Boc(2.02g，3mmol)溶于THF(250mL)与甲醇(50mL)的混合液中。于加入催化量的Pd/C(10%)后，将反应混合物导入氢气球，并搅拌过夜。以硅藻土垫将催化剂滤除后，于减压环境下，蒸馏滤液，以获得白色固体的Phe-Cit-APEA-Boc(1.61g，99%)。

[0139] 将HBTU(1.118g)与DIPEA(1.02mL)加入N3-SAA1(X)-OH(633mg)与Phe-Cit-APEA-Boc(1.33g)溶于DCM与DMF(10:1，110mL)的混合液中。于17小时后，于减压环境下，移除DCM。于剩余的粗DMF溶液中，加入水与乙醚，于过滤后，获得米色固体。以浓柠檬酸水溶液清洗固体数次，以移除大部分的HOBt与DMF。以制备型HPLC(50%乙腈/水/0.1%TFA；UV 210nm；ODS-3管柱30*250mm)对N3-SAA1(X)-Phe-Cit-APEA-Boc进行纯化。于减压环境下，蒸馏乙腈，并对剩余的水溶液进行冷冻干燥，以获得含有N3-SAA1(X)-Phe-Cit-APEA-Boc与N3-SAA1-Phe-Cit-APEA-Boc的白色固体(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。

[0140] 将N3-SAA1(X)-Phe-Cit-APEA-Boc与N3-SAA1-Phe-Cit-APEA-Boc的混合物(100mg)溶于甲醇(50mL)。于加入催化量的Pd/C(10%)后，将反应混合物导入氢气球，并搅拌过夜。以硅藻土垫将催化剂滤除后，于减压环境下，移除甲醇，以获得含有SAA1(X)-Phe-Cit-APEA-Boc与SAA1-Phe-Cit-APEA-Boc的白色固体(78mg)。

[0141] 将MC-OPFP(103mg)加入SAA1(X)-Phe-Cit-APEA-Boc/SAA1-Phe-Cit-APEA-Boc(210mg)/甲醇(50mL)的溶液中，之后，加入DIPEA(0.047mL)。于17小时后，对反应混合物进行浓缩。以制备型HPLC(50%乙腈/水/0.1%TFA；UV 210nm；ODS-3管柱30x500mm；流速40mL/min)对粗产物进行纯化，以获得MC-SAA1(X)-Phe-Cit-APEA-Boc与MC-SAA1-Phe-Cit-APEA-Boc的溶液。

[0142] 以浓盐酸(10eq.)对MC-SAA1(X)-Phe-Cit-APEA-Boc与MC-SAA1-Phe-Cit-APEA-Boc的溶液进行处理。反应由分析型HPLC进行监测，直至水解完成。于减压环境下，移除乙腈，并于水溶液进行冷冻干燥后，获得固体的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。

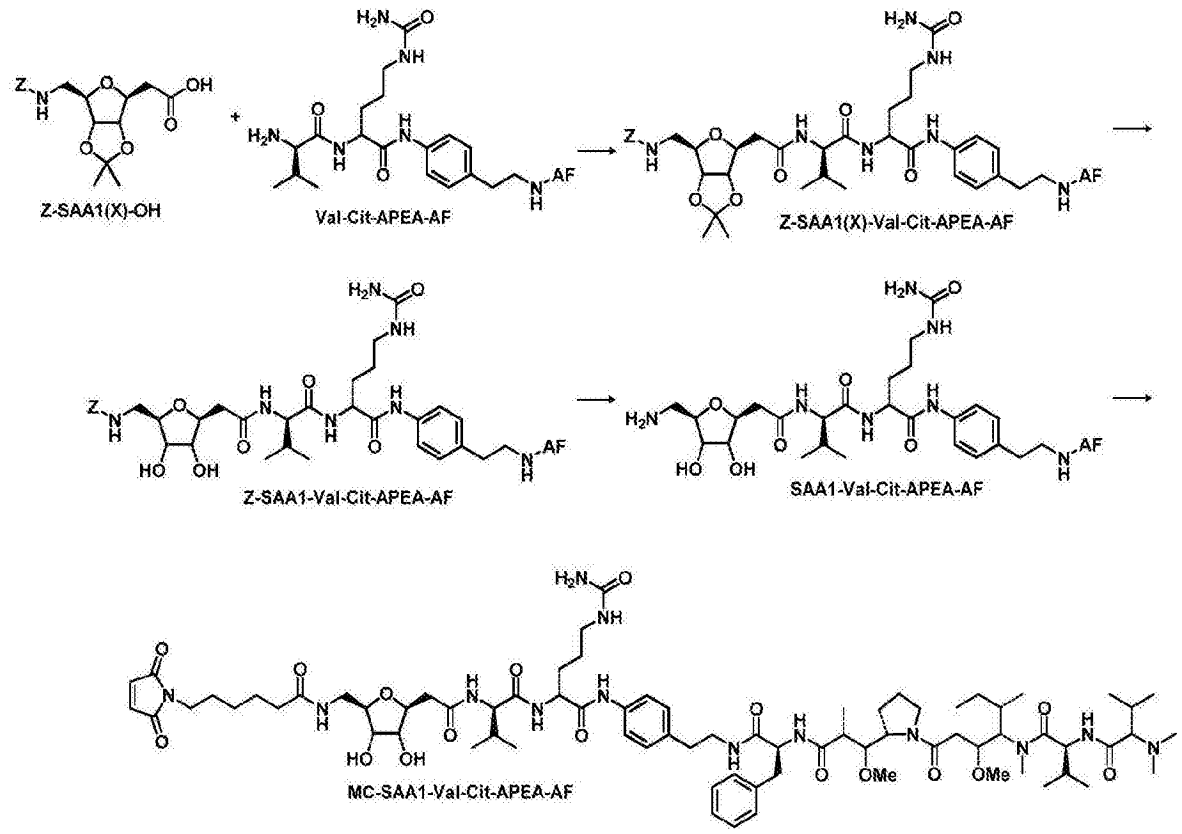
[0143] 将MC-SAA1-Phe-Cit-APEA(110mg)溶于DCM与DMF(10:1，10mL)的混合液中，并分别加入海兔毒素F(93mg)、HBTU(55mg)与DIPEA(0.077mL)。于17小时后，于减压环境下，移除DCM、DMF及DIPEA。以制备型HPLC(35%乙腈/水/0.1%TFA；UV 210nm；ODS-3管柱30x250mm；流速40mL/min)对粗产物进行纯化。于减压环境下，移除目标分馏物中的乙腈，并对剩余的水溶液进行冷冻干燥，以获得白色固体的MHT-47(20mg)。LC-MS：MC-SAA1-Phe-Cit-APEA-AF(MHT-47)($C_{80}H_{119}N_{13}O_{17}$)所需[$MH^+$]＝1534.9，所得[$MH^+$]＝1538.0。

[0144] 制备例2

[0145] MHT-71[MC-SAA1-Val-Cit-APEA-AF]之合成

[0146] 连接子-毒素MHT-71根据以下所示步骤和以下示意图合成。

[0147]



[0148] 将HBTU(32.5mg)与DIPEA(0.029mL)分别加入Z-SAA1(X)-OH(26.1mg)与Val-Cit-APEA-AF(80mg)溶于DCM与DMF(10:1,4.4mL)的混合液中。于18小时后,于减压环境下,移除溶剂,并以制备型HPLC(45%乙腈/水/0.1%TFA;UV 210nm;ODS-3管柱30x500mm;流速65mL/min;RT 11min)对粗产物进行纯化。于移除乙腈后,将水溶液置于冰箱中过夜,直至Z-SAA1(X)-Val-Cit-APEA-AF完全转变为Z-SAA1-Val-Cit-APEA-AF。对水溶液进行冷冻干燥,以获得白色固体的Z-SAA1-Val-Cit-APEA-AF(63mg,两步骤以上的产率63%)。

[0149] 将Z-SAA1-Val-Cit-APEA-AF(63mg)溶于甲醇(5mL),之后,加入催化剂Pd/C。将反应混合物导入氢气球,并搅拌3小时。以硅藻土垫将Pd/C滤除后,于减压环境下,蒸馏滤液,以获得白色固体的SAA1-Val-Cit-APEA-AF(52.5mg)。

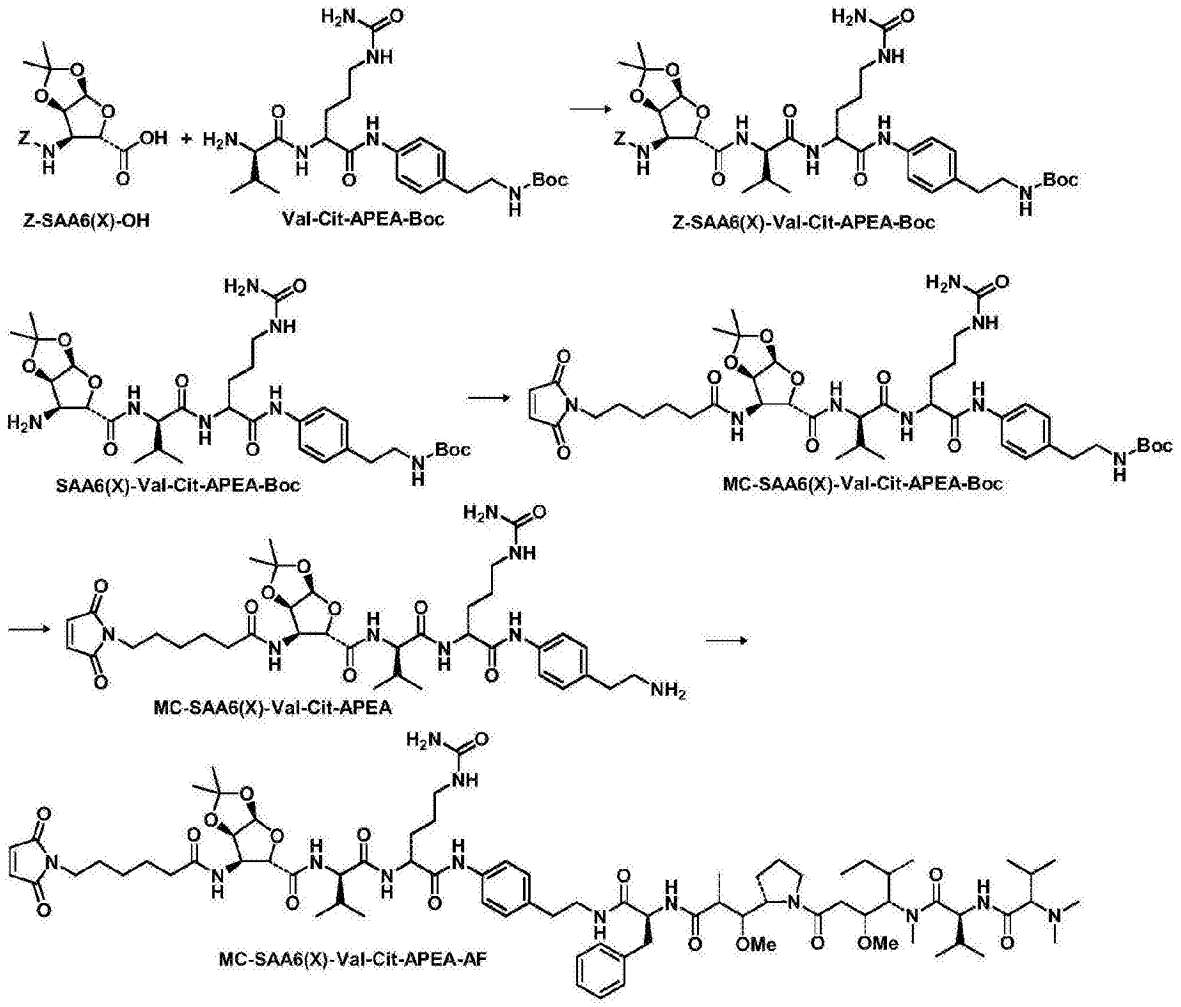
[0150] 将DIPEA(0.0056mL)加入SAA1-Val-Cit-APEA-AF(40mg)/MC-OPFP(11.6mg)/甲醇(4mL)的溶液中。反应搅拌过夜,并于减压环境下,进行蒸馏。以制备型HPLC(35%乙腈/水/0.1%TFA;UV 210nm;ODS-3管柱30x500mm;流速70mL/min;RT 18min)对粗产物进行纯化,以获得白色固体的MC-SAA1-Val-Cit-APEA-AF(MHT-71)(27mg,47%)。LC-MS:MC-SAA1-Val-Cit-APEA-AF(MHT-71)($C_{76}H_{120}N_{13}O_{17}$)所需[$MH^+$]=1486.9,所得[$MH^+$]=1487.2。

[0151] 制备例3

[0152] MHT-81a[MC-SAA6-Val-Cit-APEA-AF]之合成

[0153] 连接子-毒素MHT-81a根据以下所示步骤和以下示意图合成。

[0154]



[0155] 将质子海绵(63mg)与HBTU(170mg)加入Z-SAA6(X)-OH(100mg)/二氯甲烷(10mL)的溶液中。之后,加入Val-Cit-APEA-Boc(150mg)/DMF(1mL)溶液,并静置过夜。于移除溶剂后,以制备型HPLC(50%乙腈/水/0.1%TFA;UV210nm;ODS-3管柱30*500mm;流速70mL/min;RT 15min)对粗产物进行纯化。于移除乙腈后,将水溶液于室温静置过夜,直至丙酮基完全移除。将水溶液予以冷冻干燥,以获得白色固体的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。

[0156] 将Z-SAA6(X)-Val-Cit-APEA-Boc(50mg)溶于甲醇(2mL),之后,加入催化剂Pd/C。将反应混合物导入氢气球,并静置17小时。以硅藻土垫将催化剂Pd/C滤除,并于减压环境下,蒸馏甲醇,以获得白色固体的SAA6(X)-Val-Cit-APEA-Boc(37.4mg)。

[0157] 将SAA6(X)-Val-Cit-APEA-Boc(47mg)与MC-OPFP(28mg)溶于DMF(4mL)。加入DIPEA(0.0141mL)于反应混合物中。于5小时后,于减压环境下,移除DMF与DIPEA。以制备型HPLC(50%乙腈/水/0.1%TFA;UV 210nm;ODS-3管柱30*500mm;流速45-50mL/min;RT 10.8min)对粗产物进行纯化,以获得白色固体的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。

[0158] 以TFA(0.1mL)于室温对MC-SAA6(X)-Val-Cit-APEA-Boc(42.5mg)/DCM(10mL)进行处理。于17小时后,于减压环境下,移除DCM与TFA,以获得淡黄色固体的[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。

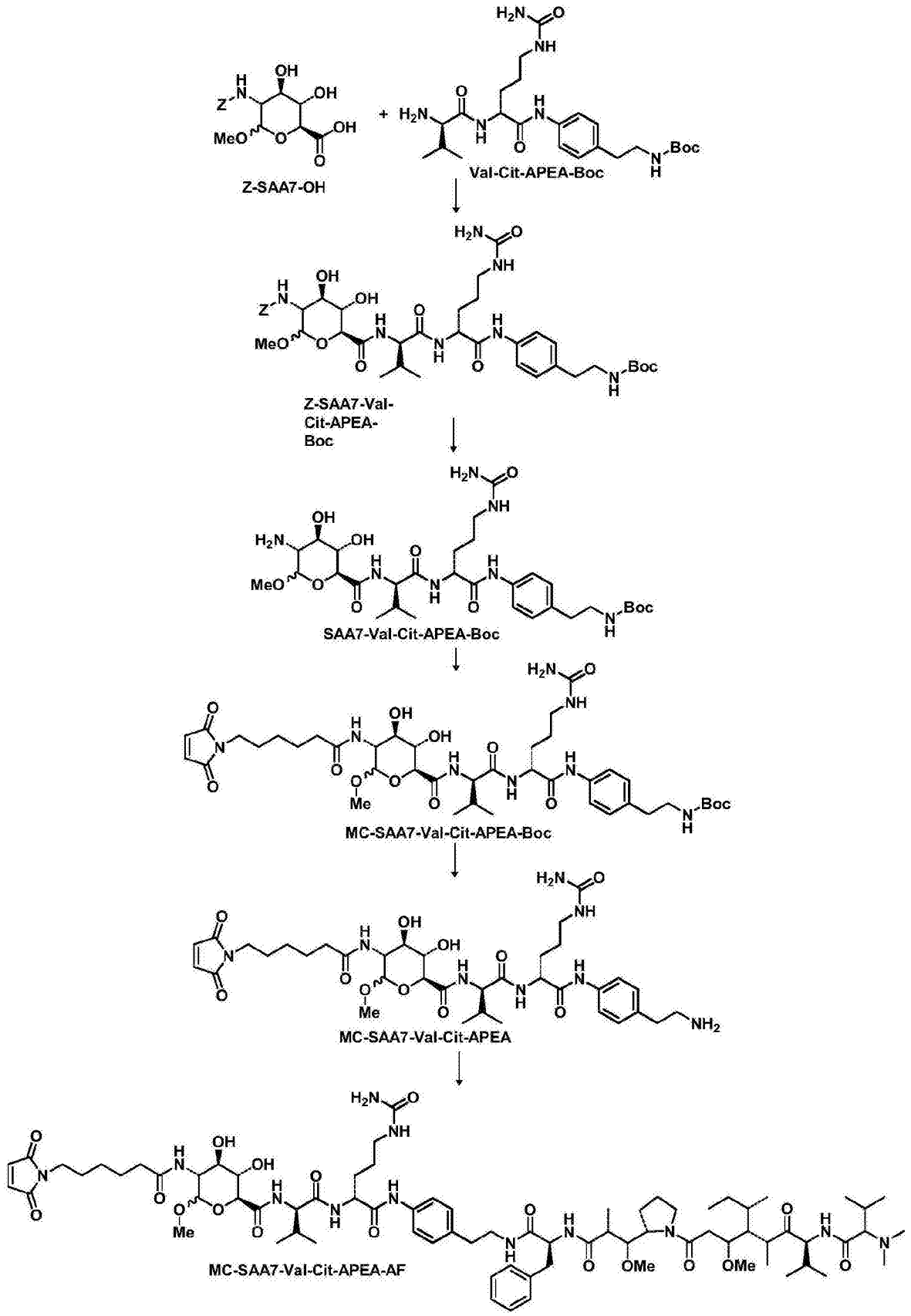
[0159] 将MC-SAA6(X)-Val-Cit-APEA(32mg)与海兔毒素F(27mg)溶于DCM与DMF(10:1,12mL)的混合液中。之后,分别加入HBTU(20.5mg)与DIPEA(0.022mL)。于17小时后,于减压环境下,移除DCM与DMF。以制备型HPLC(40％乙腈/水/0.1％TFA;UV 210nm;ODS-3管柱30*500mm;流速30mL/min)对粗产物进行纯化,以获得白色固体的MC-SAA6(X)-Val-Cit-APEA-AF(15mg)。LC-MS:MC-SAA6(X)-Val-Cit-APEA-AF($C_{77}H_{119}N_{13}O_{17}$)所需[$MH^+$]＝1498.89,所得[$MH^+$]＝1500.7。

[0160] 制备例4

[0161] MHT-93[MC-SAA7-Val-Cit-APEA-AF]之合成

[0162] 连接子-毒素MHT-93根据以下所示步骤和以下示意图合成。

[0163]



[0164] 将Val-Cit-APEA-Boc(2.46g,5mmol)与Z-SAA7-OH(1.71g,5mmol)溶于DMF(100mL)。之后,将DIPEA(646.2mg,5mmol)与HATU(1.90g,5mmol)加入反应混合物中。于室温

搅拌混合物16小时后，于减压环境下，蒸馏溶剂。以乙酸乙酯(200mL)搅拌残留物数小时，直至细白色粉末形成。滤除固体产物。以水(200mL)煮沸白色粉末15分钟，并同时过滤。以热水(50mL)清洗产物2次，并于真空下干燥，以获得Z-SAA7-Val-Cit-APEA-Boc。

[0165] 将Z-SAA7-Val-Cit-APEA-Boc(200mg)溶于甲醇(50mL)，之后，加入催化剂Pd/C。将反应导入氢气球，并静置17小时。以硅藻土垫将催化剂滤除，并于减压环境下，蒸馏甲醇，以获得白色固体的SAA7-Val-Cit-APEA-Boc(148mg)。

[0166] 将SAA7-Val-Cit-APEA-Boc(240mg)、MC-OPFP(144mg)与DIPEA(0.072mL)溶于DMF(20mL)。于5小时后，于减压环境下，移除DMF与DIPEA。将残留物与45％乙腈/水(20mL)混合，并进行离心。于移除液体部分后，获得白色固体的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。

[0167] 以TFA(0.5mL)于室温对MC-SAA7-Val-Cit-APEA-Boc(200mg)/DCM(30mL)进行处理。于17小时后，于减压环境下，移除DCM与TFA，以获得淡黄色固体的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。

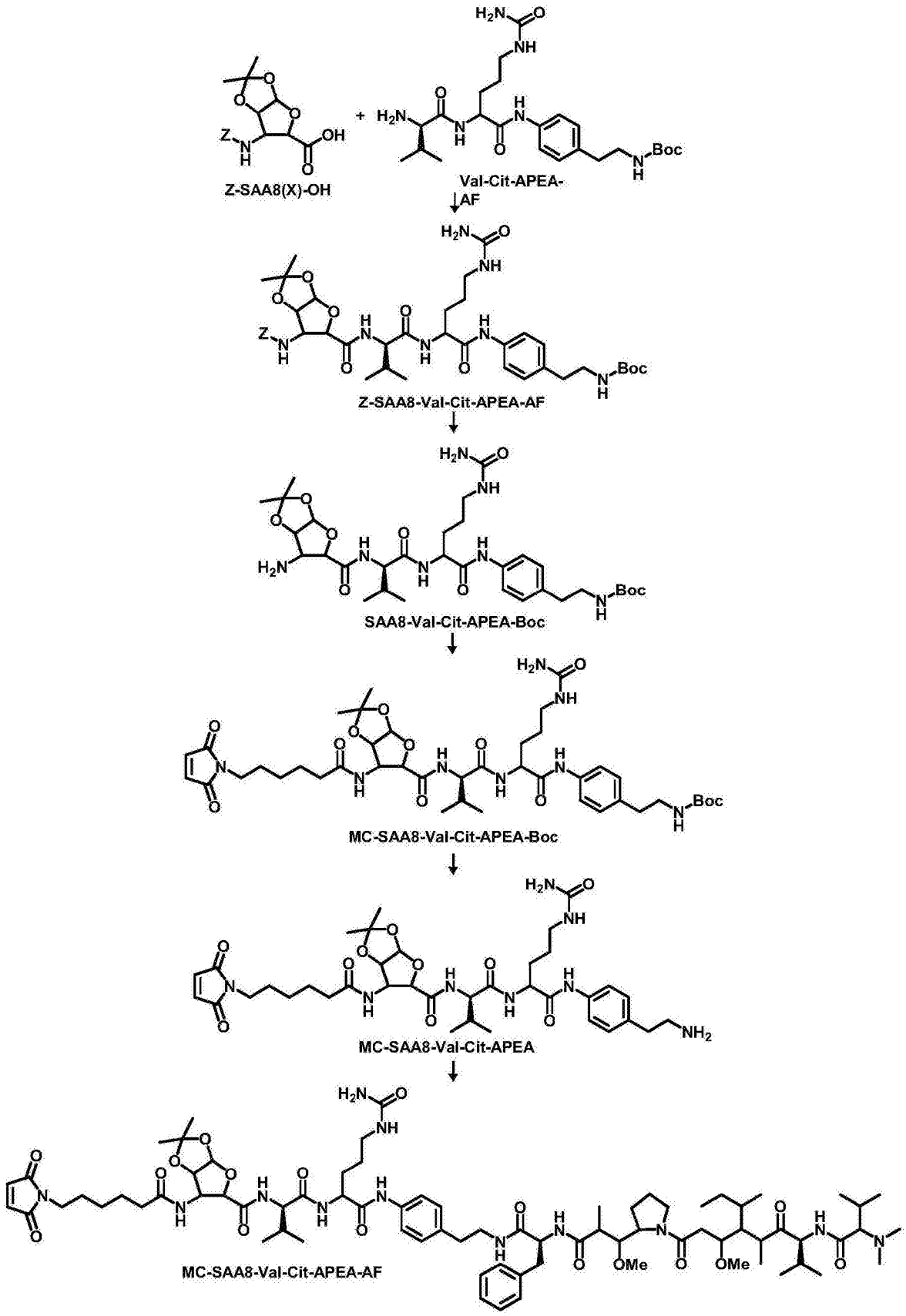
[0168] 将MC-SAA7-Val-Cit-APEA(80mg)与海兔毒素F(77mg)溶于DCM与DMF(10:1，16.6mL)的混合液中。之后，分别加入HBTU(64mg)与DIPEA(0.064mL)。于17小时后，于减压环境下，移除DCM与DMF。以制备型HPLC(40％乙腈/水/0.1％TFA;UV 210nm;ODS-3管柱30*250mm;流速25mL/min;RT 10.42min)对粗产物进行纯化，以获得白色固体的MC-SAA7-Val-Cit-APEA-AF(MHT-93)(50.9mg)。LC-MS:MC-SAA7-Val-Cit-APEA-AF(MHT-93)($C_{77}H_{120}N_{12}O_{18}$)所需[$MH^+$]＝1503.0，所得[$MH^+$]＝1504.1。

[0169] 制备例5

[0170] MHT-98a[MC-SAA8-Val-Cit-APEA-AF]之合成

[0171] 连接子-毒素MHT-98a根据以下所示步骤和以下示意图合成。

[0172]



[0173] 将质子海绵(63mg)与HBTU(170mg)加入Z-SAA8(X)-OH(100mg)/DCM(10mL)的溶液中。之后,加入Val-Cit-APEA-Boc(150mg)/DMF(1mL)溶液,并将反应混合物静置过夜。于移

除溶剂后，以制备型HPLC(55％乙腈/水/0.1％TFA;UV 210nm;ODS-3管柱30*500mm;流速60mL/min;RT 13min)对残留物进行纯化，以获得白色固体的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。

[0174] 将Z-SAA8(X)-Val-Cit-APEA-Boc(70mg)溶于甲醇(10mL)，之后，加入催化剂Pd/C。将反应导入氢气球，并静置17小时。以硅藻土垫将催化剂滤除，并于减压环境下，蒸馏滤液，以获得白色固体的SAA8(X)-Val-Cit-APEA-Boc(54mg)。

[0175] 将SAA8(X)-Val-Cit-APEA-Boc(44mg)与MC-OPFP(24.2mg)溶于DMF(4mL)。之后，加入DIPEA(0.0141mL)。于5小时后，于减压环境下，移除DMF与DIPEA。以制备型HPLC(45％乙腈/水/0.1％TFA;UV 210nm;ODS-3管柱30*250mm;流速35-40mL/min;RT 13min)对残留物进行纯化，以获得白色固体的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。

[0176] 以TFA(0.1mL)于室温对MC-SAA8(X)-Val-Cit-APEA-Boc(40mg)/DCM(2mL)进行处理。于17小时后，于减压环境下，移除DCM与TFA，以获得淡黄色固体的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。

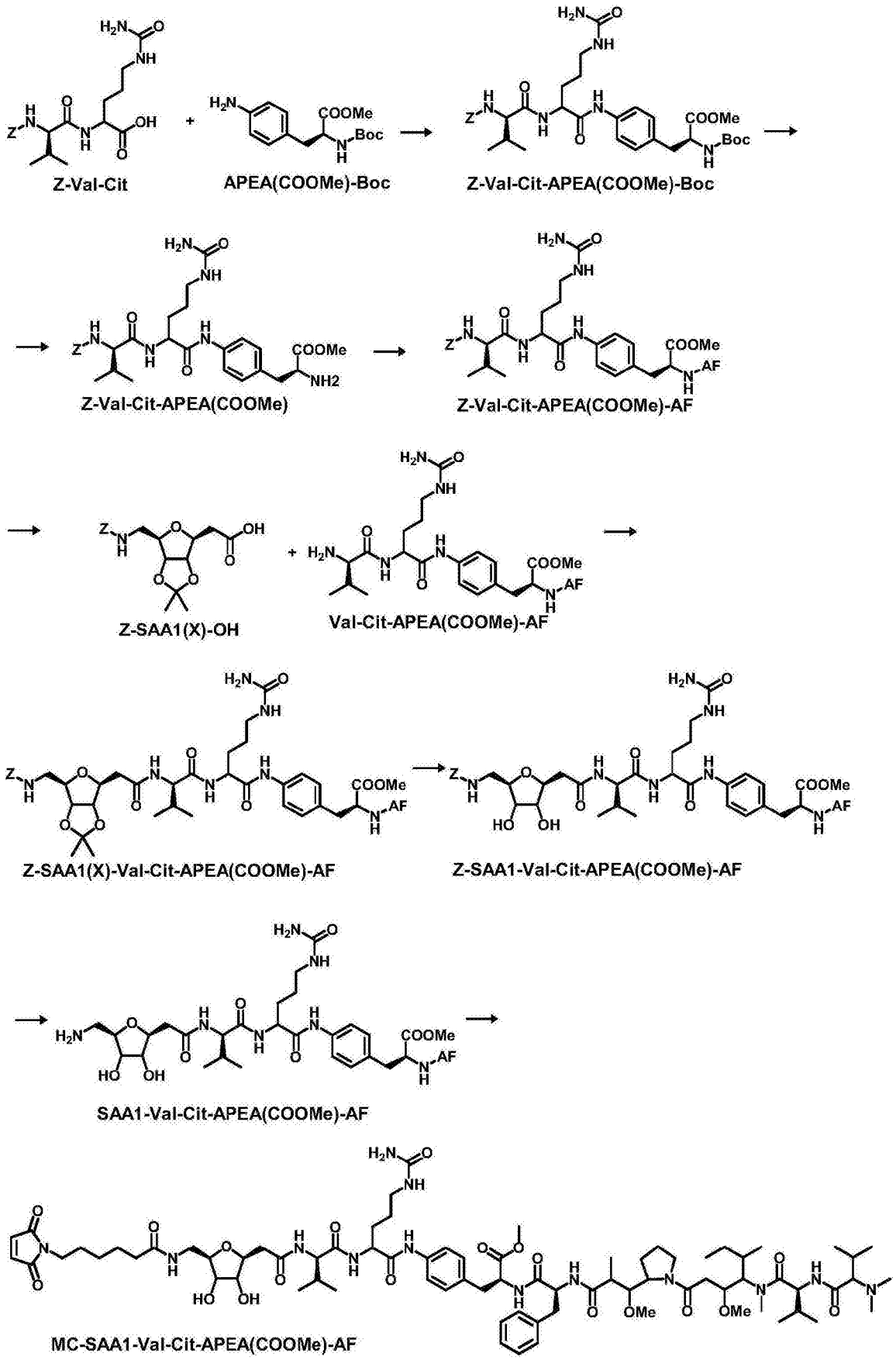
[0177] 将MC-SAA8(X)-Val-Cit-APEA(25.6mg)与海兔毒素F(24.5mg)溶于DCM与DMF(10:1,5.5mL)的混合液中。之后，分别加入HBTU(20.5mg)与DIPEA(0.022mL)。于17小时后，于减压环境下，移除DCM与DMF。以制备型HPLC(40％乙腈/水/0.1％TFA;UV 210nm;ODS-3管柱30*250mm;流速35-40mL/min)对残留物进行纯化，以获得白色固体的MC-SAA8(X)-Val-Cit-APEA-AF(3.3mg)。LC-MS:MC-SAA8(X)-Val-Cit-APEA-AF($C_{78}H_{120}N_{12}O_{17}$)所需[$MH^+$]＝1497.9，所得[$MH^+$]＝1500.5。

[0178] 制备例6

[0179] CCH-028[MC-SAA1-Val-Cit-APEA(COOMe)-AF]之合成

[0180] 连接子-毒素CCH-028根据以下所示步骤和以下示意图合成。

[0181]



[0182] 将Z-Val-Cit-OH(3.24g,7.93mmol)加入二氯甲烷与甲醇的混合液(3:1,80mL)中。

于加入APEA(COOMe)-Boc(2.8g,9.52mmol)后,加入偶联剂EEDQ(2.47g,9.52mmol),并于室温对混浊溶液进行搅拌。未溶的Z-Val-Cit逐渐消失,溶液逐渐清澈。于48小时后,以HPLC测试反应完成。于减压环境下,蒸馏反应混合物,直至形成厚的糊状物。对混合物进行过滤,并以正己烷(50mL)清洗2次,以水(50mL)清洗2次,以乙醚(50mL)清洗2次。于真空环境下,对固体产物进行干燥,以获得棕色粉末的Z-Val-Cit-APEA(COOMe)-Boc(75.0mg,1.4%)。

[0183] 将Z-Val-Cit-APEA(COOMe)-Boc(75.0mg,0.11mmol)加入二氯甲烷(8mL)中,并于室温以三氟乙酸(0.09mL)进行处理。于4小时后,于减压环境下,蒸馏溶剂。将残留物与水(10mL)混合,并予以冷冻干燥,以获得白色粉末的Z-Val-Cit-APEA(COOMe)(96.0mg)。

[0184] 将海兔毒素F(80.0mg,0.102mmol)溶于少量DMF(1mL),并以DCM(10mL)进行稀释。将溶液浸于冰浴中,并加入Z-Val-Cit-APEA(COOMe)(71.4mg,0.102mmol)及HATU(43.0mg,0.113mmol)。于加入DIPEA(0.071mL)后,移开冰浴。于室温搅拌混合物4小时后,于减压环境下,蒸馏溶剂,并以制备型HPLC(43%乙腈/水/0.1%TFA;UV 210nm;ODS-3管柱30*250mm;流速24mL/min)对残留物进行纯化,以获得白色固体的Z-Val-Cit-APEA(COOMe)-AF(82.0mg,61%)。

[0185] 将Z-Val-Cit-APEA(COOMe)-AF(82.0mg,0.062mmol)溶于包含盐酸(0.24mmol)的乙醇(10mL)。于加入Pd/C(10%,10mg)后,将反应混合物导入氢气球,并搅拌过夜。以硅藻土垫将催化剂Pd/C滤除,并于减压环境下,蒸馏滤液。将残留物与水(10mL)混合,并予以冷冻干燥,以获得白色粉末的Val-Cit-APEA(COOMe)-AF(72.8mg,96%)。LC-MS:Val-Cit-APEA(COOMe)-AF($C_{61}H_{99}N_{11}O_{12}$)所需[MH^+]=1178.8,所得[MH^+]=1179.7。

[0186] 将Z-SAA1(X)-OH(22.0mg,0.06mmol)溶于二氯甲烷(10mL)。于加入HATU(25.3mg,0.066mmol)后,将反应混合物浸于冰浴中,之后,加入DIPEA(0.032mL,0.06mmol)。于10分钟后,移开冰浴,并将Val-Cit-APEA(COOMe)-AF(72.8mg,0.06mmol)/DMF(3mL)溶液于室温加入反应混合物中。于3小时后,于减压环境下,蒸馏溶剂,并以制备型HPLC(45%乙腈/水/0.1%TFA;UV 210nm;ODS-3管柱30*250mm;流速24mL/min)对粗产物进行纯化。于移除乙腈后,将水溶液于室温静置过夜,以使Z-SAA1(X)-Val-Cit-APEA(COOMe)-AF完全水解。将水溶液予以冷冻干燥,以获得白色固体的Z-SAA1-Val-Cit-APEA(COOMe)-AF(43.5mg,两步骤以上的产率49%)。LC-MS:Z-SAA1-Val-Cit-APEA(COOMe)-AF($C_{79}H_{120}N_{12}O_{18}$)所需[$MH^+$]=1525.9,所得[$MH^+$]=1526.8。

[0187] 将Z-SAA1-Val-Cit-APEA(COOMe)-AF(43.5mg,0.029mmol)溶于包含盐酸(0.06mmol)的乙醇(5mL)。于加入Pd/C(10%,4.7mg)后,将反应混合物导入氢气球,并搅拌过夜。以硅藻土垫将催化剂Pd/C滤除,并于减压环境下,蒸馏滤液。将残留物与水(5mL)混合,并予以冷冻干燥,以获得白色粉末的SAA1-Val-Cit-APEA(COOMe)-AF(38.4mg,94%)。

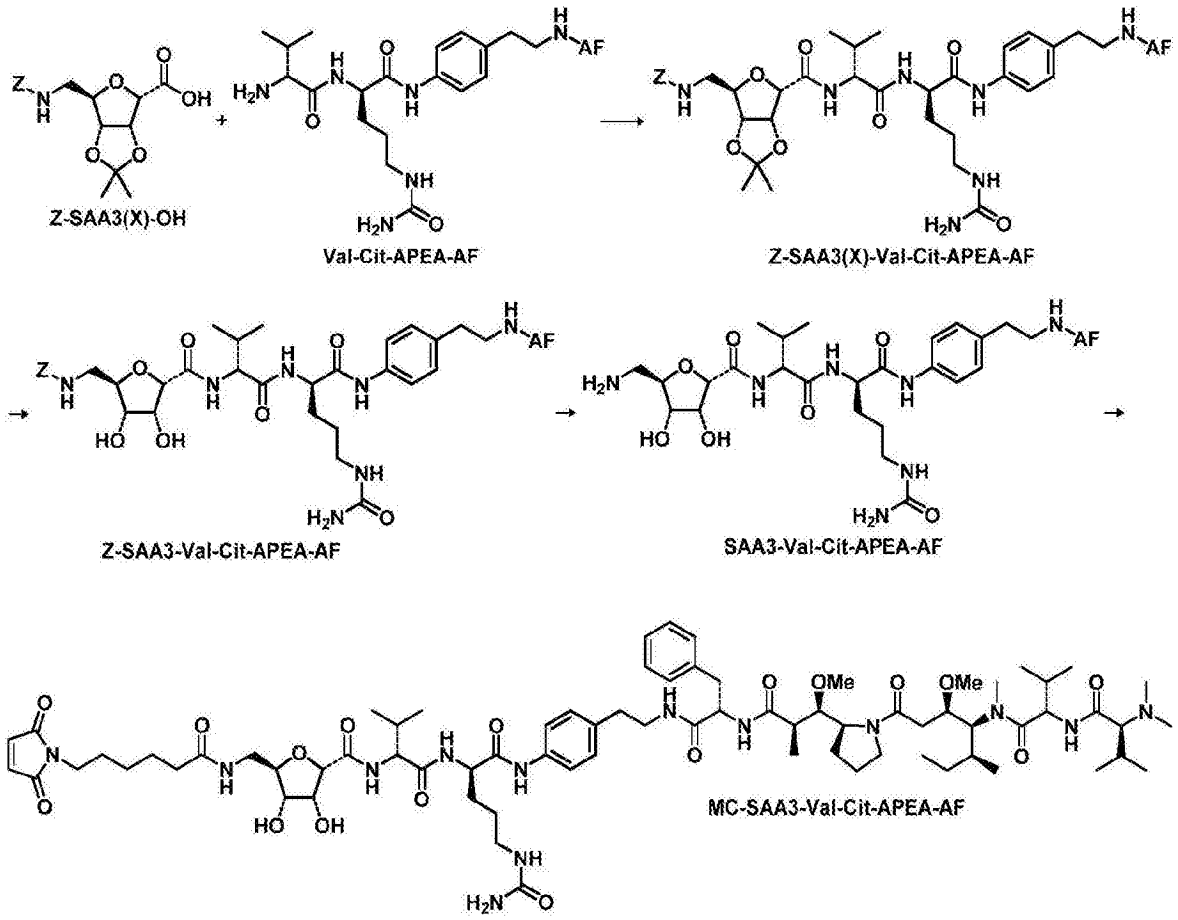
[0188] 将DIPEA(0.004mL)加入SAA1-Val-Cit-APEA(COOMe)-AF(15.0mg,0.011mmol)/MC-OPFP(4.5mg,0.012mmol)/DMF(4mL)的溶液中。于室温搅拌混合物1小时,并于减压环境下,进行蒸馏。以制备型HPLC(36%乙腈/水/0.1%TFA;UV 210nm;ODS-3管柱30x250mm;流速24mL/min)对粗产物进行纯化,以获得白色固体的MC-SAA1-Val-Cit-APEA(COOMe)-AF(CCH-028)(10.0mg,60%)。LC-MS:MC-SAA1-Val-Cit-APEA(COOMe)-AF(CCH-028)($C_{78}H_{121}N_{13}O_{19}$)所需[$MH^+$]=1544.9,所得[$MH^+$]=1545.8。

[0189] 制备例7

[0190] CCH-035[MC-SAA3-Val-Cit-APEA-AF]之合成

[0191] 连接子-毒素CCH-035根据以下所示步骤和以下示意图合成。

[0192]



[0193] 将HATU(22.0mg,0.0572mmol)与DIPEA(0.027mL,0.156mmol)分别加入Z-SAA3(X)-OH(18.2mg,0.052mmol)与Val-Cit-APEA-AF(60.0mg,0.052mmol)溶于DCM与DMF(10:1,6mL)的混合液中。于18小时后,于减压环境下,移除溶剂,并以制备型HPLC(43%乙腈/水/0.1%TFA;UV 210nm;ODS-3管柱30*250mm;流速24mL/min)对粗产物进行纯化。于移除乙腈后,将水溶液于室温静置过夜,直至缩丙酮基完全移除。将水溶液予以冷冻干燥,以获得白色固体的Z-SAA3-Val-Cit-APEA-AF(48.0mg,两步骤以上的产率65%)。

[0194] 将Z-SAA3-Val-Cit-APEA-AF(48.0mg,0.034mmol)溶于包含盐酸(0.014mL)的乙醇(5mL)。于加入Pd/C(10%,4.7mg)后,将反应混合物导入氢气球,并搅拌5小时。以硅藻土垫将催化剂Pd/C滤除,并于减压环境下,蒸馏滤液。将产物与水(5mL)混合,并予以冷冻干燥,以获得白色固体的SAA3-Val-Cit-APEA-AF(42.0mg,94%)。

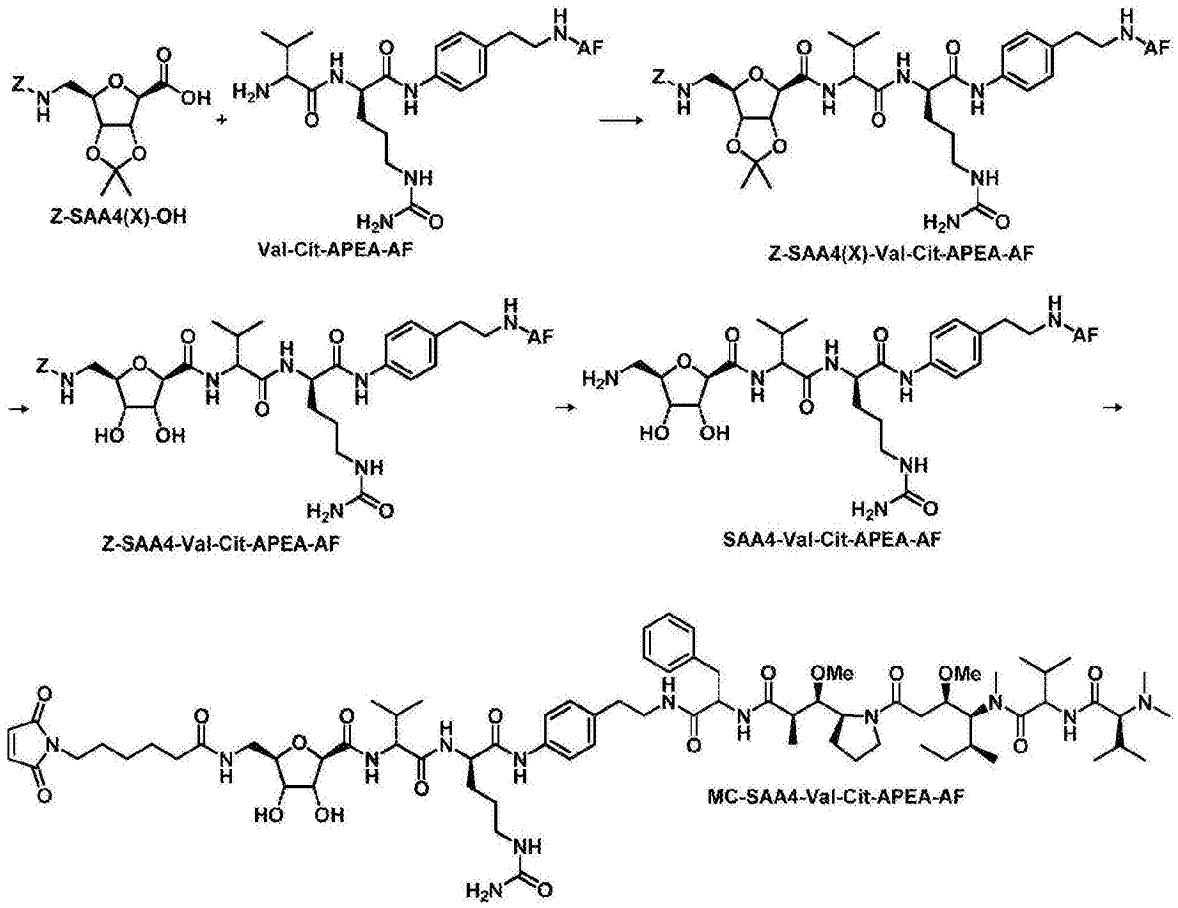
[0195] 将DIPEA(0.006mL)加入SAA3-Val-Cit-APEA-AF(20.0mg,0.015mmol)/MC-OPFP(6.3mg,0.0165mmol)/DMF(4mL)的溶液中。反应于室温搅拌1小时,并于减压环境下,进行蒸馏。以制备型HPLC(36%乙腈/水/0.1%TFA;UV 210nm;ODS-3管柱30x250mm;流速24mL/min)对粗产物进行纯化,以获得白色固体的MC-SAA3-Val-Cit-APEA-AF(CCH-035)(12.2mg,55%)。LC-MS:MC-SAA3-Val-Cit-APEA-AF(CCH-035)($C_{75}H_{117}N_{13}O_{17}$)所需[$MH^+$]=1473.8,所得[$MH^+$]=1473.6。

[0196] 制备例8

[0197] CCH-038[MC-SAA4-Val-Cit-APEA-AF]之合成

[0198] 连接子-毒素CCH-038根据以下所示步骤和以下示意图合成。

[0199]



[0200] 将HATU(18.1mg,0.0473mmol)与DIPEA(0.023mL,0.129mmol)分别加入Z-SAA4(X)-OH(15.2mg,0.043mmol)与Val-Cit-APEA-AF(50.0mg,0.043mmol)溶于DCM与DMF(10:1,6mL)的混合液中。于18小时后,于减压环境下,移除溶剂,并以制备型HPLC(43%乙腈/水/0.1%TFA;UV 210nm;ODS-3管柱30*250mm;流速24mL/min)对粗产物进行纯化。于移除乙腈后,将水溶液于室温静置过夜,直至丙酮基完全移除。将水溶液予以冷冻干燥,以获得白色固体的Z-SAA3-Val-Cit-APEA-AF(32.4mg,两步骤以上的产率53%)。

[0201] 将Z-SAA3-Val-Cit-APEA-AF(32.4mg,0.0229mmol)溶于包含盐酸(0.09mmol)的乙醇(5mL)。于加入Pd/C(10%,4.0mg)后,将反应混合物导入氢气球,并搅拌5小时。以硅藻土垫将催化剂Pd/C滤除,并于减压环境下,蒸馏滤液。将产物与水(5mL)混合,并予以冷冻干燥,以获得白色固体的SAA4-Val-Cit-APEA-AF(30.0mg,98%)。

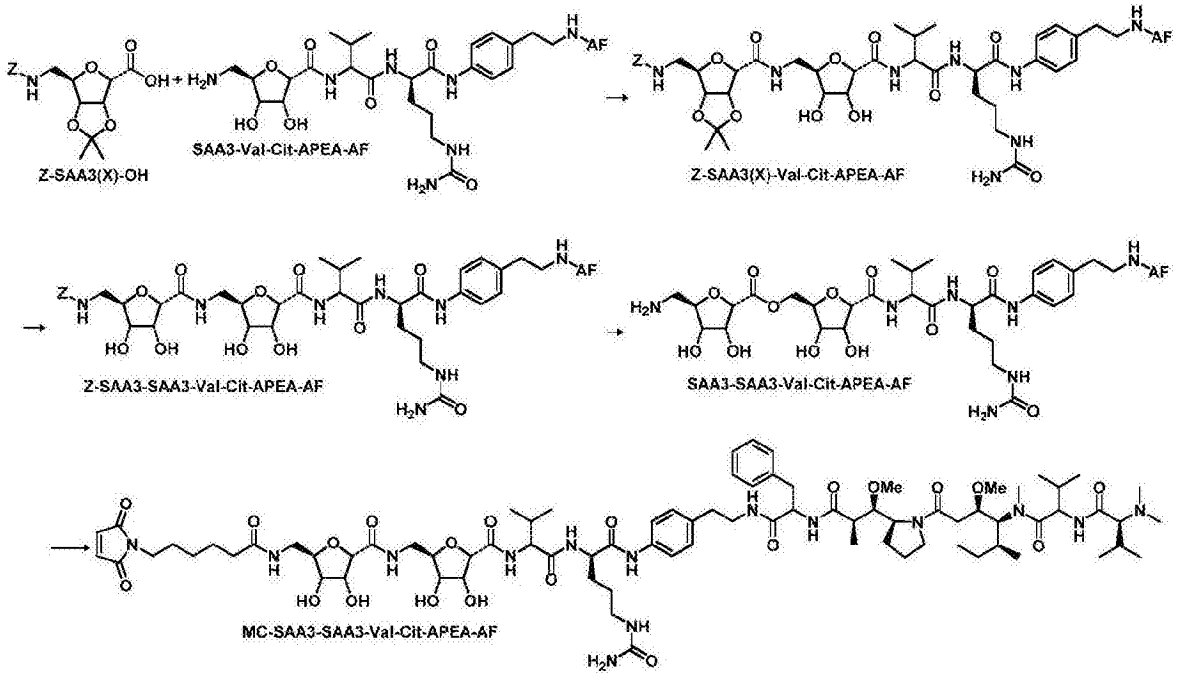
[0202] 将DIPEA(0.006mL)加入SAA4-Val-Cit-APEA-AF(20.0mg,0.015mmol)/MC-OPFP(6.3mg,0.0165mmol)/DMF(4mL)的溶液中。反应于室温搅拌1小时,并于减压环境下,进行蒸馏。以制备型HPLC(36%乙腈/水/0.1%TFA;UV 210nm;ODS-3管柱30x250mm;流速24mL/min)对粗产物进行纯化,以获得白色固体的MC-SAA4-Val-Cit-APEA-AF(CCH-038)(15.6mg,70%)。LC-MS:MC-SAA4-Val-Cit-APEA-AF(CCH-038)($C_{75}H_{117}N_{13}O_{17}$)所需[$MH^+$]=1473.8,所得[$MH^+$]=1473.6。

[0203] 制备例9

[0204] CCH-041[MC-SAA3-SAA3-Val-Cit-APEA-AF]之合成

[0205] 连接子-毒素CCH-041根据以下所示步骤和以下示意图合成。

[0206]



[0207] 将HATU(17.3mg,0.045mmol)与DIPEA(0.02mL,0.123mmol)分别加入Z-SAA3(X)-OH(14.5mg,0.041mmol)与SAA3-Val-Cit-APEA-AF(54.5mg,0.041mmol)溶于DCM与DMF(10:1,6mL)的混合液中。于18小时后,于减压环境下,蒸馏溶剂,并以制备型HPLC(41%乙腈/水/0.1%TFA;UV 210nm;ODS-3管柱30*250mm;流速24mL/min)对粗产物进行纯化。于移除乙腈后,将水溶液于室温静置过夜,直至缩酮基完全移除。将水溶液予以冷冻干燥,以获得白色固体的Z-SAA3-SAA3-Val-Cit-APEA-AF(21.3mg,两步骤以上的产率33%)。

[0208] 将Z-SAA3-SAA3-Val-Cit-APEA-AF(21.3mg,0.0135mmol)溶于包含盐酸(0.052mmol)的乙醇(5mL)。于加入Pd/C(10%,2.5mg)后,将反应混合物导入氢气球,并搅拌5小时。以硅藻土垫将催化剂Pd/C滤除,并于减压环境下,蒸馏滤液。将产物与水(5mL)混合,并予以冷冻干燥,以获得白色固体的SAA3-SAA3-Val-Cit-APEA-AF(16.1mg,81%)。

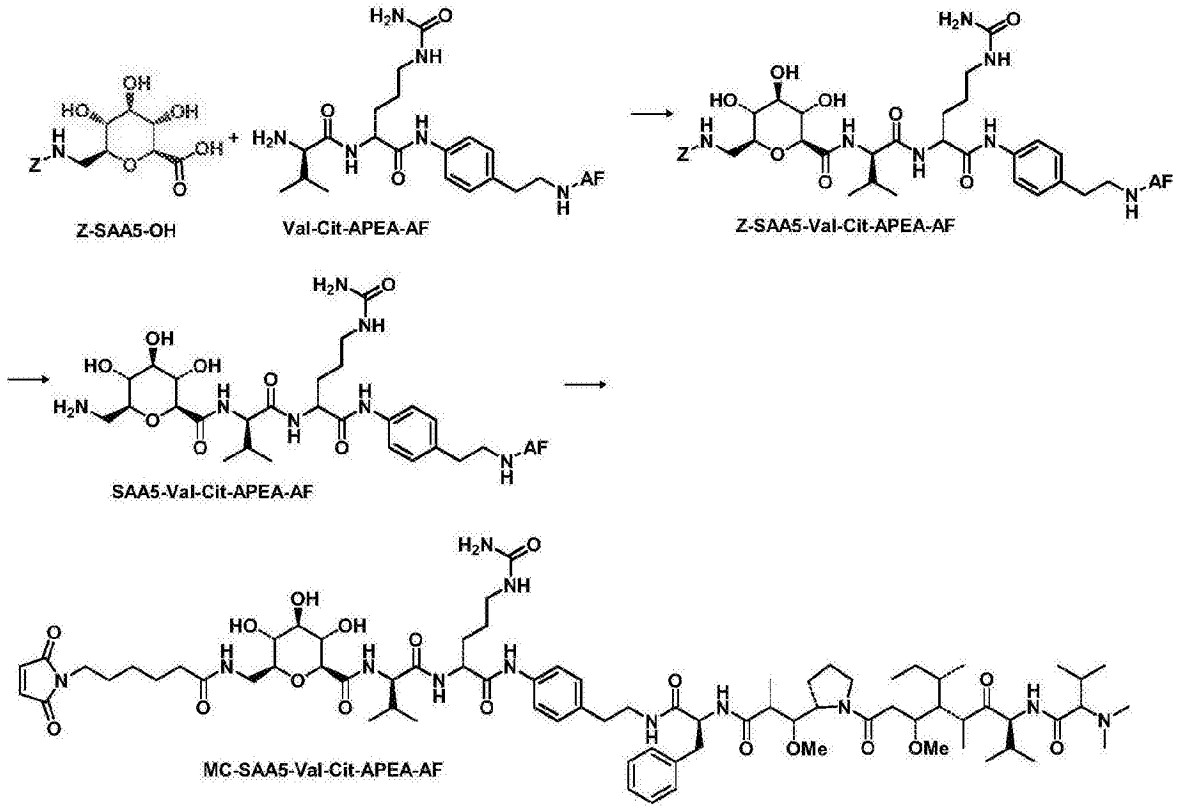
[0209] 将DIPEA(0.004mL)加入SAA3-SAA3-Val-Cit-APEA-AF(16.1mg,0.0109mmol)/MC-OPFP(4.5mg,0.012mmol)/DMF(5mL)的溶液中。于室温搅拌反应混合物1小时,并于减压环境下,进行蒸馏。以制备型HPLC(33%乙腈/水/0.1%TFA;UV 210nm;ODS-3管柱30x250mm;流速24mL/min)对粗产物进行纯化,以获得白色固体的MC-SAA3-SAA3-Val-Cit-APEA-AF(CCH-041)(9.2mg,52%)。LC-MS:MC-SAA3-SAA3-Val-Cit-APEA-AF(CCH-041)($C_{81}H_{126}N_{14}O_{21}$)所需[$MH^+$]=1633.0,所得[$MH^+$]=1633.2。

[0210] 制备例10

[0211] FCW-016[MC-SAA5-Val-Cit-APEA-AF]之合成

[0212] 连接子-毒素FCW-016根据以下所示步骤和以下示意图合成。

[0213]



[0214] 将HATU(40mg,0.1060mmol)加入Val-Cit-APEA-AF(99mg,0.0884mmol)、Z-SAA5-OH(36mg,0.1060mmol)与DIPEA(0.046mL,0.2651mmol)溶于DMF(2mL)与二氯甲烷(20mL)的搅拌溶液中。于室温搅拌12小时后,蒸馏溶剂,并以制备型HPLC(43%乙腈/水/0.1%TFA;UV 210nm;ODS-3管柱30*250mm;流速24mL/min)对残留物进行纯化。于移除乙腈后,将水溶液于室温静置过夜,直至丙酮基完全移除。将水溶液予以冷冻干燥,以获得白色粉末的Z-SAA5-Val-Cit-APEA-AF(33mg,26%)。LC-MS:Z-SAA5-Val-Cit-APEA-AF($C_{75}H_{115}N_{11}O_{17}$)所需[M+2H]2+=721.9,所得[M+2H]2+=723.6。

[0215] 将Z-SAA5-Val-Cit-APEA-AF(35.0mg,0.024mmol)溶于包含盐酸(0.048mmol)的乙醇(8mL)。于加入Pd/C(10%,2.6mg)后,将反应混合物导入氢气球,并搅拌16小时。以硅藻土垫将催化剂Pd/C滤除,并于减压环境下,蒸馏滤液。将产物与水(10mL)混合,并予以冷冻干燥,以获得白色固体的SAA5-Val-Cit-APEA-AF(30.0mg,95%)。LC-MS:SAA5-Val-Cit-APEA-AF($C67H_{109}N_{11}O_{15}$)所需[M+2H]2+=654.9,所得[M+2H]2+=656.6。

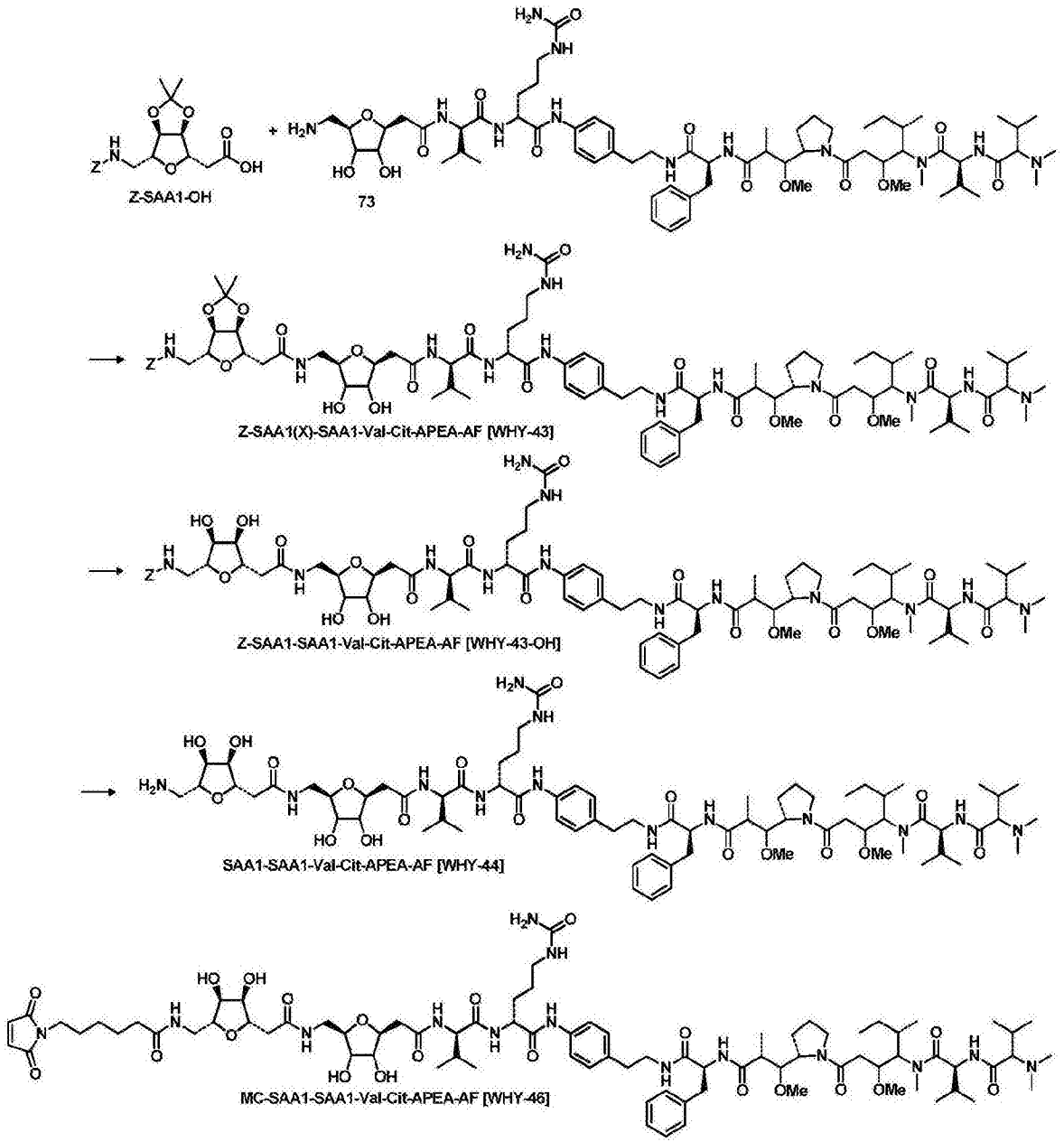
[0216] 将DIPEA(0.0066mL,0.0378mmol)加入SAA5-Val-Cit-APEA-AF(16.5mg,0.0126mmol)/MC-OPFP(5.7mg,0.0151mmol)/DMF(3mL)的溶液中。反应于室温搅拌3小时,并于减压环境下,进行蒸馏。以制备型HPLC(36%乙腈/水/0.1%TFA;UV 210nm;ODS-3管柱30x250mm;流速24mL/min)对粗产物进行纯化,以获得白色固体的MC-SAA5-Val-Cit-APEA-AF(FCW-016)(12.0mg,63%)。LC-MS:MC-SAA5-Val-Cit-APEA-AF(FCW-016)($C_{77}H_{120}N_{12}O_{18}$)所需[M+2H]2+=751.4,所得[M+2H]2+=753.1。

[0217] 制备例11

[0218] WHY-46[MC-SAA1-SAA1-Val-Cit-APEA-AF]之合成

[0219] 连接子-毒素WHY-46根据以下所示步骤和以下示意图合成。

[0220]



[0221] 将Z-SAA1(X)-OH(28.0mg,0.076mmol)溶于二氯甲烷(1mL)。于加入HATU(23.4mg,0.061mmol)后,将反应混合物浸于冰浴中,之后,加入DIPEA(7.9mg,0.061mmol)。于10分钟后,移开冰浴,并将SAA1-Val-Cit-APEA-AF(70.0mg,0.051mmol)/DMF(3mL)溶液于室温加入反应混合物中。于1小时后,于减压环境下,蒸馏溶剂,并以制备型HPLC(39%乙腈/水/0.1%TFA;UV210nm;ODS-3管柱30*250mm;流速25mL/min)对粗产物进行纯化。于移除乙腈后,将水溶液于室温静置过夜,以使Z-SAA1(X)-SAA1-Val-Cit-APEA-AF完全水解。将水溶液予以冷冻干燥,以获得白色固体的Z-SAA1-SAA1-Val-Cit-APEA-AF(64mg,两步骤以上的产率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。

[0222] 将Z-SAA1-SAA1-Val-Cit-APEA-AF(64.0mg,0.042mmol)溶于包含盐酸(0.136mmol)的乙醇(20mL)。于加入Pd/C(10%,6.5mg)后,将反应混合物导入氢气球,并搅

拌过夜。以硅藻土垫将催化剂Pd/C滤除，并于减压环境下，蒸馏滤液。将产物与水(10mL)混合，并予以冷冻干燥，以获得白色固体的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。

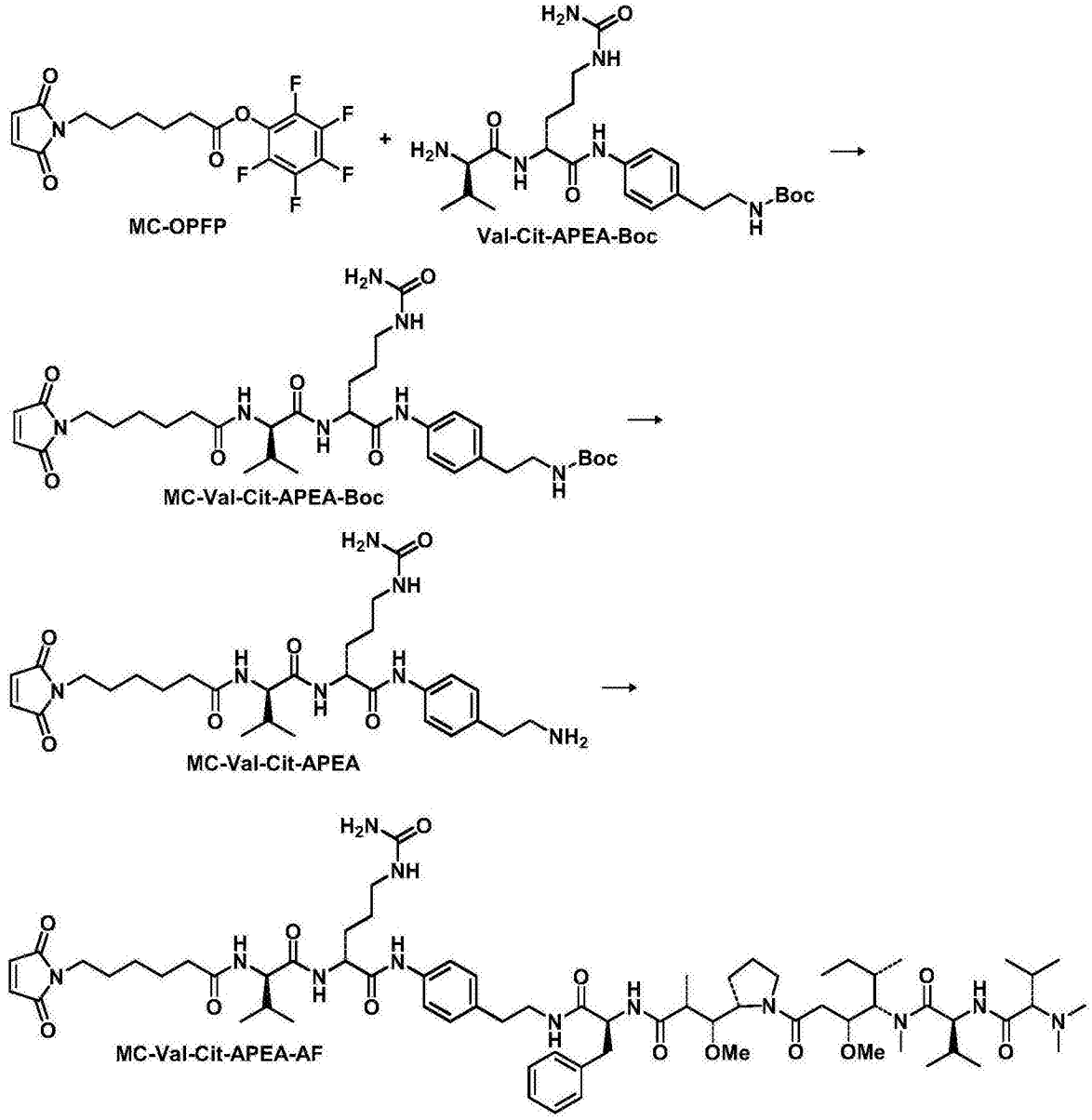
[0223] 将SAA1-SAA1-Val-Cit-APEA-AF(30.0mg，0.019mmol)与DIPEA(7.4mg，0.057mmol)溶于DMF(2mL)。将反应混合物浸于冰浴后，加入MC-OPFP(9.0mg，0.023mmol)。于10分钟后，移开冰浴，并于室温搅拌混合物1小时。于减压环境下，蒸馏溶剂，并以制备型HPLC(33％乙腈/水/0.1％TFA；UV210nm；ODS-3管柱30*250mm；流速25mL/min)对粗产物进行纯化，以获得白色固体的MC-SAA1-SAA1-Val-Cit-APEA-AF(WHY-46)(18.5mg，53％)。LC-MS:MC-SAA1-SAA1-Val-Cit-APEA-AF(WHY-46)($C_{83}H_{130}N_{14}O_{21}$)所需[$MH^+$]＝1660.0，所得[$MH^+$]＝1660.7。

[0224] 比较制备例12

[0225] MHT-87[MC-Val-Cit-APEA-AF]之合成

[0226] 连接子-毒素MHT-87根据以下所示步骤和以下示意图合成。

[0227]



[0228] 将Val-Cit-APEA-Boc(65mg)与MC-OPFP(50mg)溶于DMF(5mL)，并加入DIPEA

(0.023mL)。于5小时后,于减压环境下,移除DMF与DIPEA。以制备型HPLC(50%乙腈/水/0.1%TFA;UV 210nm;ODS-3管柱50x500mm;流速80mL/min;RT 13.60min)对粗产物进行纯化,以获得白色固体的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。

[0229] 于室温,将MC-Val-Cit-APEA-Boc(40mg)/DCM(5mL)以TFA(300L)进行处理。于17小时后,于减压环境下,移除DCM与TFA,以获得淡黄色固体的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。

[0230] 将MC-Val-Cit-APEA(37mg)与海兔毒素F(47mg)溶于DCM与DMF(10:1,3.7mL)的混合液中。之后,加入HBTU(37mg)与DIPEA(0.037mL)。于17小时后,于减压环境下,移除DCM与DMF以制备型HPLC(40%乙腈/水/0.1%TFA;UV 210nm;ODS-3管柱30*250mm;流速25mL/min;RT 14min)对粗产物进行纯化,以获得白色固体的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。

[0231] <抗体药物复合物(ADC)>

[0232] <抗体-连接子-毒素>

[0233] 实施例1:

[0234] 于含有6.7%有机溶剂之共溶剂系统中接合EG12014-MHT-71

[0235] 取12mL的EG12014(EirGenix Inc.生产)(初始浓度:12.5mg/mL)加入269μL的10mM TCEP(2.5莫耳当量),溶于硼酸盐(borate)缓冲液中,混合搅拌于37℃反应两小时。接着,再将3.55mL、3mM配制于30%(v/v)DMSO中的连接子-毒素MHT-71(9.9莫耳当量)加入上述抗体溶液中于4℃反应30分钟(此混合溶液中之有机溶剂最终浓度为约6.7%)。加入1.5mL的0.1M半胱氨酸(cysteine)以终止反应。使用脱盐管柱(ThermoFisher Scientific,MWCO:40K)将制得的EG12014-MHT-71进行纯化。在冲提的过程中,将缓冲液置换为PBS缓冲液(2.67mM KCl,1.47mM KH_2PO_4,137.93mM NaCl,8.06mM Na_2HPO_4-$7H_2O$)。使用疏水作用层析(HIC)法(如下所述)和粒径筛析层析(SEC)法(如下所述)分别鉴定平均药物抗体比例(drug-to-antibody ratio;DAR)及高分子量物质(high molecular weight species;HMWS)。

[0236] 第2图显示所制得的ADC(EG12014-MHT-71)的DAR多分布在2和4。所制得的EG12014-MHT-71的平均DAR约为3.7,接合效率约为95%。

[0237] 疏水作用层析法(Hydrophobic Interaction Chromatography analysis;HIC analysis)

[0238] 使用具有Butyl NPR(4.6×35mm)TOSOH管柱的Agilent HPLC分析药物抗体比例(DAR)图谱。移动相A包括25mM的磷酸钠、1.5M硫酸铵、pH6.95,且移动相B包括25mM磷酸钠、25%异丙醇、pH 6.95。将15μL的样品以0.8mL/min的流速注入管柱,并在梯度模式(gradient mode)下进行分离:0~100%移动相B,12分钟内。侦测在波长280nm的吸收值。

[0239] 粒径筛析层析法(Size-Exclusion Chromatography analysis;SEC analysis)

[0240] 使用具有Yarra 3μm SEC-3000(300x 7.8mm)管柱的Waters PDA 996HPLC,依据尺寸分离抗体单体和产物聚集物。移动相包括0.020M的磷酸钾、0.025M氯化钾、及异丙醇5%(v/v)、pH 6.95。将30μL的样品以0.5mL/min的流速注入管柱,并在等度条件(isocratic conditions)下分离。侦测在波长280nm的吸收值。将主要波峰出现之前所冲提出来的物质

收集在一起，称之为高分子量物质(HMWS)。

[0241] 实施例2：

[0242] 于水相中接合EG12014-MHT-71

[0243] 取0.14mL的EG12014(EirGenix Inc.生产)(初始浓度：7.5mg/mL)加入3.4μL的5mM TCEP(2.4莫耳当量)，溶于硼酸盐(borate)缓冲液中，混合搅拌于37℃反应两小时。接着，再将13.9μL、5mM配制于二次去离子水中的连接子-毒素MHT-71(9.9莫耳当量)加入上述抗体溶液中于4℃反应30分钟(此混合溶液为纯水相)。加入15μL的0.2M半胱氨酸(cysteine)以终止反应。使用脱盐管柱(ThermoFisher Scientific,MWCO:40K)将制得的EG12014-MHT-71进行纯化。在冲提的过程中，将缓冲液置换为PBS缓冲液(2.67mM KCl,1.47mM KH_2PO_4,137.93mM NaCl,8.06mM Na_2HPO_4-$7H_2O$)。使用疏水作用层析法和粒径筛析层析法分别鉴定平均DAR及HMWS。

[0244] 第3A图显示所制得的ADC(EG12014-MHT-71)的DAR多分布在2和4。所制得的EG12014-MHT-71的平均DAR约为3.9，接合效率约为96％。

[0245] 实施例3：

[0246] 于水相中接合EG12014-MHT-71

[0247] 取0.14mL的EG12014(EirGenix Inc.生产)(初始浓度：7.5mg/mL)加入4.8μL的5mM TCEP(3.4莫耳当量)，溶于硼酸盐(borate)缓冲液中，混合搅拌于37℃反应两小时。接着，再将13.9μL、5mM配制于二次去离子水中的连接子-毒素MHT-71(9.9莫耳当量)加入上述抗体溶液中于4℃反应30分钟(此混合溶液为纯水相)。加入15μL的0.2M半胱氨酸(cysteine)以终止反应。使用脱盐管柱(ThermoFisher Scientific,MWCO:40K)将制得的EG12014-MHT-71进行纯化。在冲提的过程中，将缓冲液置换为PBS缓冲液(2.67mM KCl,1.47mM KH_2PO_4,137.93mM NaCl,8.06mM Na_2HPO_4-$7H_2O$)。使用疏水作用层析法和粒径筛析层析法分别鉴定平均DAR及HMWS。

[0248] 第3B图显示所制得的ADC(EG12014-MHT-71)的DAR多分布在4和6。所制得的EG12014-MHT-71的平均DAR约为5.4，接合效率约为99％。

[0249] 实施例4：

[0250] 于含有16.7％有机溶剂之共溶剂系统中接合IgG1-MHT-47

[0251] 取0.1mL的人类IgG1(Sigma)(初始浓度：2.6mg/mL)加入1.6μL的2.5mM TCEP(2.4莫耳当量)，溶于硼酸盐(borate)缓冲液中，混合搅拌于37℃反应两小时。接着，再将29.0μL、363μM配制于75％(v/v)DMSO中的连接子-毒素MHT-47(9.9莫耳当量)加入上述抗体溶液中于4℃反应30分钟(此混合溶液中之有机溶剂最终浓度为约16.7％)。加入5μL的0.1M半胱氨酸(cysteine)以终止反应。使用脱盐管柱(ThermoFisher Scientific,MWCO:40K)将制得的IgG1-MHT-47进行纯化。在冲提的过程中，将缓冲液置换为PBS缓冲液(2.67mM KCl,1.47mM KH_2PO_4,137.93mM NaCl,8.06mM Na_2HPO_4-$7H_2O$)。使用疏水作用层析法和粒径筛析层析法分别鉴定平均DAR及HMWS。

[0252] 第4图显示所制得的ADC(IgG1-MHT-47)的DAR多分布在2和4。所制得的IgG1-MHT-47的平均DAR约为3.7，接合效率约为93％。

[0253] 实施例5：

[0254] 于含有2％有机溶剂之共溶剂系统中接合IgG1-MHT-47

[0255] 取60μL的人类IgG1(Sigma)(初始浓度:5.7mg/mL)加入1.2μL的10mM TCEP(2.2莫耳当量),溶于硼酸盐(borate)缓冲液中,混合搅拌于37℃反应两小时。接着,再将4.6μL、3mM配制于30%(v/v)DMSO中的连接子-毒素MHT-47(6莫耳当量)加入上述抗体溶液中于4℃反应30分钟(此混合溶液中之有机溶剂最终浓度为约2%)。加入0.5μL的0.2M半胱氨酸(cysteine)以终止反应。使用脱盐管柱(ThermoFisher Scientific,MWCO:40K)将制得的IgG1-MHT-47进行纯化。在冲提的过程中,将缓冲液置换为PBS缓冲液(2.67mM KCl,1.47mM KH_2PO_4,137.93mM NaCl,8.06mM Na_2HPO_4-$7H_2O$)。使用疏水作用层析法和粒径筛析层析法分别鉴定平均DAR及HMWS。

[0256] 第5图显示所制得的ADC(IgG1-MHT-47)的DAR多分布在2和4。所制得的IgG1-MHT-47的平均DAR约为3.7,接合效率约为93%。

[0257] 实施例6:

[0258] 于含有5.5%有机溶剂之共溶剂系统中接合**Herceptin®**-MHT-47

[0259] 取0.3mL的**Herceptin®**(trastuzumab)(Roche)(初始浓度:10.3mg/mL)加入5.2μL的10mM TCEP(2.5莫耳当量),溶于硼酸盐(borate)缓冲液中,混合搅拌于37℃反应两小时。接着,再将69.1μL、3mM配制于30%(v/v)DMSO中的连接子-毒素MHT-47(9.9莫耳当量)加入上述抗体溶液中于4℃反应30分钟(此混合溶液中之有机溶剂最终浓度为约5.5%)。加入20μL的0.1M半胱氨酸(cysteine)以终止反应。使用脱盐管柱(ThermoFisher Scientific,MWCO:40K)将制得的**Herceptin®**-MHT-47进行纯化。在冲提的过程中,将缓冲液置换为PBS缓冲液(2.67mM KCl,1.47mM KH_2PO_4,137.93mM NaCl,8.06mM Na_2HPO_4-$7H_2O$)。使用疏水作用层析法和粒径筛析层析法分别鉴定平均DAR及HMWS。

[0260] 第6图显示所制得的ADC(**Herceptin®**-MHT-47)的DAR多分布在2和4。所制得的**Herceptin®**-MHT-47的平均DAR约为3.7,接合效率约为92%。

[0261] 实施例7:

[0262] 于水相中接合**Herceptin®**-CCH-038

[0263] 取0.22mL的**Herceptin®**(trastuzumab)(Roche)(初始浓度:11.3mg/mL)加入4.2μL的10mM TCEP(2.5莫耳当量),溶于硼酸盐(borate)缓冲液中,混合搅拌于37℃反应两小时。接着,再将55.4μL、3mM配制于二次去离子水中的连接子-毒素CCH-038(9.9莫耳当量)加入上述抗体溶液中于4℃反应30分钟(此混合溶液为纯水相)。加入2μL的0.2M半胱氨酸(cysteine)以终止反应。使用脱盐管柱(ThermoFisher Scientific,MWCO:40K)将制得的**Herceptin®**-CCH-038进行纯化。在冲提的过程中,将缓冲液置换为PBS缓冲液(2.67mM KCl,1.47mM KH_2PO_4,137.93mM NaCl,8.06mM Na_2HPO_4-$7H_2O$)。使用疏水作用层析法和粒径筛析层析法分别鉴定平均DAR及HMWS。

[0264] 第7图显示所制得的ADC(**Herceptin®**-CCH-038)的DAR多分布在2和4。所制得的**Herceptin®**-CCH-038的平均DAR约为4.0,接合效率约为97%。

[0265] 实施例8:

[0266] 于含有1.6%有机溶剂之共溶剂系统中接合**Erbitux®**-CCH-028

[0267] 取0.6mL的**Erbitux®**(Cetuximab)(Merck)(初始浓度:4.2mg/mL)加入3.8μL的

10mM TCEP(2.2莫耳当量)，溶于硼酸盐(borate)缓冲液中，混合搅拌于37℃反应两小时。接着，再将34.2μL、3mM配制于30％(v/v)DMSO中的连接子-毒素CCH-028(6莫耳当量)加入上述抗体溶液中于4℃反应30分钟(此混合溶液中之有机溶剂最终浓度为约1.6％)。加入100μL的0.1M半胱氨酸(cysteine)以终止反应。使用脱盐管柱(ThermoFisher Scientific,MWCO:40K)将制得的Erbitux®-CCH-028进行纯化。在冲提的过程中，将缓冲液置换为PBS缓冲液(2.67mM KCl,1.47mM KH_2PO_4,137.93mM NaCl,8.06mM Na_2HPO_4-$7H_2O$)。使用疏水作用层析法和粒径筛析层析法分别鉴定平均DAR及HMWS。

[0268] 第8图显示所制得的ADC(Erbitux®-CCH-028)的DAR多分布在2和4。所制得的Erbitux®-CCH-028的平均DAR约为3.8，接合效率约为95％。

[0269] 实施例9：

[0270] 于含有1.7％有机溶剂之共溶剂系统中接合Erbitux®-CCH-035

[0271] 取0.6mL的Erbitux®(Cetuximab)(Merck)(初始浓度：4.3mg/mL)加入3.9μL的10mM TCEP(2.2莫耳当量)，溶于硼酸盐(borate)缓冲液中，混合搅拌于37℃反应两小时。接着，再将35.2μL、3mM配制于30％(v/v)DMSO中的连接子-毒素CCH-035(6莫耳当量)加入上述抗体溶液中于4℃反应30分钟(此混合溶液中之有机溶剂最终浓度为约1.7％)。加入50μL的0.2M半胱氨酸(cysteine)以终止反应。使用脱盐管柱(ThermoFisher Scientific,MWCO:40K)将制得的Erbitux®-CCH-035进行纯化。在冲提的过程中，将缓冲液置换为PBS缓冲液(2.67mM KCl,1.47mM KH_2PO_4,137.93mM NaCl,8.06mM Na_2HPO_4-$7H_2O$)。使用疏水作用层析法和粒径筛析层析法分别鉴定平均DAR及HMWS。

[0272] 第9图显示所制得的ADC(Erbitux®-CCH-035)的DAR多分布在2和4。所制得的Erbitux®-CCH-035的平均DAR约为3.6，接合效率约为94％。

[0273] 实施例10：

[0274] 于含有1.5％有机溶剂之共溶剂系统中接合Erbitux®-CCH-041

[0275] 取0.85mL的Erbitux®(Cetuximab)(Merck)(初始浓度：3.8mg/mL)加入4.9μL的10mM TCEP(2.2莫耳当量)，溶于硼酸盐(borate)缓冲液中，混合搅拌于37℃反应两小时。接着，再将44.5μL、3mM配制于30％(v/v)DMSO中的连接子-毒素CCH-041(6莫耳当量)加入上述抗体溶液中于4℃反应30分钟(此混合溶液中之有机溶剂最终浓度为约1.5％)。加入80μL的0.2M半胱氨酸(cysteine)以终止反应。使用脱盐管柱(ThermoFisher Scientific,MWCO:40K)将制得的Erbitux®-CCH-041进行纯化。在冲提的过程中，将缓冲液置换为PBS缓冲液(2.67mM KCl,1.47mM KH_2PO_4,137.93mM NaCl,8.06mM Na_2HPO_4-$7H_2O$)。使用疏水作用层析法和粒径筛析层析法分别鉴定平均DAR及HMWS。

[0276] 第10图显示所制得的ADC(Erbitux®-CCH-041)的DAR多分布在2和4。所制得的Erbitux®-CCH-041的平均DAR约为3.9，接合效率约为96％。

[0277] 实施例11：

[0278] 于含有1.4％有机溶剂之共溶剂系统中接合Erbitux®-FCW-016

[0279] 取0.4mL的Erbitux®(Cetuximab)(Merck)(初始浓度：3.5mg/mL)加入4.0μL的5mM TCEP(2.1莫耳当量)，溶于硼酸盐(borate)缓冲液中，混合搅拌于37℃反应两小时。接着，再将5.7μL、10mM配制于100％(v/v)DMSO中的连接子-毒素FCW-016(6莫耳当量)加入上述抗体

溶液中于4℃反应30分钟(此混合溶液中之有机溶剂最终浓度为约1.4%)。加入15μL的0.1M半胱氨酸(cysteine)以终止反应。使用脱盐管柱(ThermoFisher Scientific,MWCO:40K)将制得的Erbitux®-FCW-016进行纯化。在冲提的过程中,将缓冲液置换为PBS缓冲液(2.67mM KCl,1.47mM KH_2PO_4,137.93mM NaCl,8.06mM Na_2HPO_4-$7H_2O$)。使用疏水作用层析法和粒径筛析层析法分别鉴定平均DAR及HMWS。

[0280] 第11图显示所制得的ADC(Erbitux®-FCW-016)的DAR多分布在2和4。所制得的Erbitux®-FCW-016的平均DAR约为4.0,接合效率约为96%。

[0281] 实施例12:

[0282] 于水相中接合Erbitux®-CCH-038

[0283] 取2mL的Erbitux®(Cetuximab)(Merck)(初始浓度:4.5mg/mL)加入13.6μL的10mM TCEP(2.1莫耳当量),溶于硼酸盐(borate)缓冲液中,混合搅拌于37℃反应两小时。接着,再将123.2μL、3mM配制于二次去离子水中的连接子-毒素CCH-038(6莫耳当量)加入上述抗体溶液中于4℃反应30分钟(此混合溶液为纯水相)。加入20μL的0.2M半胱氨酸(cysteine)以终止反应。使用脱盐管柱(ThermoFisher Scientific,MWCO:40K)将制得的Erbitux®-CCH-038进行纯化。在冲提的过程中,将缓冲液置换为PBS缓冲液(2.67mM KCl,1.47mM KH_2PO_4,137.93mM NaCl,8.06mM Na_2HPO_4-$7H_2O$)。使用疏水作用层析法和粒径筛析层析法分别鉴定平均DAR及HMWS。

[0284] 第12图显示所制得的ADC(Erbitux®-CCH-038)的DAR多分布在2和4。所制得的Erbitux®-CCH-038的平均DAR约为3.8,接合效率约为95%。

[0285] 实施例13:

[0286] 于水相中接合Erbitux®-WHY-46

[0287] 取2.3mL的Erbitux®(Cetuximab)(Merck)(初始浓度:4.3mg/mL)加入14.5μL的10mM TCEP(2.2莫耳当量),溶于硼酸盐(borate)缓冲液中,混合搅拌于37℃反应两小时。接着,再将131.5μL、3mM配制于二次去离子水中的连接子-毒素WHY-46(6莫耳当量)加入上述抗体溶液中于4℃反应30分钟(此混合溶液为纯水相)。加入250μL的0.2M半胱氨酸(cysteine)以终止反应。使用脱盐管柱(ThermoFisher Scientific,MWCO:40K)将制得的Erbitux®-WHY-46进行纯化。在冲提的过程中,将缓冲液置换为PBS缓冲液(2.67mM KCl,1.47mM KH_2PO_4,137.93mM NaCl,8.06mM Na_2HPO_4-$7H_2O$)。使用疏水作用层析法和粒径筛析层析法分别鉴定平均DAR及HMWS。

[0288] 第13A图显示所制得的ADC(Erbitux®-WHY-46)的DAR多分布在2和4。所制得的Erbitux®-WHY-46的平均DAR约为3.9,接合效率约为96%。第13B图显示仅有0.1%的HMWS产生。

[0289] 实施例14:

[0290] 于水相中接合Erbitux®-MHT-71

[0291] 取23.5mL的Erbitux®(Cetuximab)(Merck)(初始浓度:4.7mg/mL)加入159μL的10mM TCEP(2.1莫耳当量),溶于硼酸盐(borate)缓冲液中,混合搅拌于37℃反应两小时。接着,再将1.52mL、3mM配制于二次去离子水中的连接子-毒素MHT-71(6莫耳当量)加入上述抗体溶液中于4℃反应30分钟(此混合溶液为纯水相)。加入127μL的0.2M半胱氨酸(cysteine)

以终止反应。使用脱盐管柱(ThermoFisher Scientific,MWCO:40K)将制得的Erbitux®-MHT-71进行纯化。在冲提的过程中,将缓冲液置换为PBS缓冲液(2.67mM KCl,1.47mM KH_2PO_4,137.93mM NaCl,8.06mM Na_2HPO_4-$7H_2O$)。使用疏水作用层析法和粒径筛析层析法分别鉴定平均DAR及HMWS。

[0292] 第14A图显示所制得的ADC(Erbitux®-MHT-71)的DAR多分布在2和4。所制得的Erbitux®-MHT-71的平均DAR约为3.6,接合效率约为95%。第14B图显示没有明显的HMWS产生。

[0293] 实施例15:

[0294] 于水相中接合HLX-07-MHT-71

[0295] 取0.5mL的HLX-07(Henlix Inc.生产)(Merck)(初始浓度:4.4mg/mL)加入3.6μL的10mM TCEP(2.4莫耳当量),溶于硼酸盐(borate)缓冲液中,混合搅拌于37℃反应两小时。接着,再将140μL、755μM配制于二次去离子水中的连接子-毒素MHT-71(7莫耳当量)加入上述抗体溶液中于4℃反应30分钟(此混合溶液为纯水相)。加入20μL的0.1M半胱氨酸(cysteine)以终止反应。使用脱盐管柱(ThermoFisher Scientific,MWCO:40K)将制得的HLX-07-MHT-71进行纯化。在冲提的过程中,将缓冲液置换为PBS缓冲液(2.67mM KCl,1.47mM KH_2PO_4,137.93mM NaCl,8.06mM Na_2HPO_4-$7H_2O$)。使用疏水作用层析法和粒径筛析层析法分别鉴定平均DAR及HMWS。

[0296] 第15图显示所制得的ADC(HLX-07-MHT-71)的DAR多分布在2和4。所制得的HLX-07-MHT-71的平均DAR约为3.8,接合效率约为96%。

[0297] 实施例16:

[0298] 于水相中接合抗-EpCAM-MHT-71

[0299] 取60μL的抗-EpCAM抗体(clone EpAb3-5,IgG2b)(由吴汉忠博士实验室生产)(初始浓度:3.9mg/mL)加入3.3μL的5mM TCEP(8莫耳当量),溶于硼酸盐(borate)缓冲液中,混合搅拌于37℃反应5小时。接着,再将10.4μL、3mM配制于二次去离子水中的连接子-毒素MHT-71(15莫耳当量)加入上述抗体溶液中于4℃反应30分钟(此混合溶液为纯水相)。加入0.5μL的0.2M半胱氨酸(cysteine)以终止反应。使用脱盐管柱(ThermoFisher Scientific,MWCO:40K)将制得的抗-EpCAM-MHT-71进行纯化。在冲提的过程中,将缓冲液置换为PBS缓冲液(2.67mM KCl,1.47mM KH_2PO_4,137.93mM NaCl,8.06mM Na_2HPO_4-$7H_2O$)。使用疏水作用层析法鉴定所制得抗-EpCAM-MHT-71的接合图谱。未接合的抗-EpCAM抗体波峰消失,显示所有的抗-EpCAM抗体都与连接子-毒素MHT-71接合。

[0300] 第16A图显示未接合的抗-EpCAM抗体的HIC图谱。第16B图显示与连接子-毒素MHT-71接合的抗-EpCAM抗体的HIC图谱。

[0301] <热应力稳定性测试>

[0302] 实施例17:

[0303] 500μL的3mg/mL Erbitux、Erbitux-L1-MMAE(市售连接子-毒素MC-Val-Cit-PAB-MMAE(L1-MMAE);Concortis Biotherapeutics)、Erbitux-MHT-87、Erbitux-MHT-71、或Erbitux-WHY-46于PBS中培养在40℃水浴中,并在第0、1、2周取样进行SEC分析。使用具有Yarra 3μm SEC-3000(300x 7.8mm)管柱的Waters PDA996HPLC,依据尺寸分离抗体单体和产物聚集物。移动相包括0.020M的磷酸钾、0.025M氯化钾、及异丙醇5%(v/v)、pH 6.95。将

30μL的样品以0.5mL/min的流速注入管柱，并在等度条件(isocratic conditions)下分离。侦测在波长280nm的吸收值。将主要波峰出现之前所冲提出来的物质收集在一起，称之为高分子量物质(HMWS)。

[0304] 第17A图显示连接子包含醣胺基单元酸的Erbitux-MHT-71和Erbitux-WHY-46相较于连接子不包含任何醣胺基酸单元的Erbitux-L1-MMAE和Erbitux-MHT-87具有低比例的HMWS。因此，此实验证实具有醣胺基酸单元的连接子不只增加连接子的亲水性，也显著地提升抗体药物复合物(ADC)的热稳定度。

[0305] 实施例18：

[0306] 500μL的3mg/mL Erbitux、Erbitux-L1-MMAE(市售连接子-毒素MC-Val-Cit-PAB-MMAE(L1-MMAE)；Concortis Biotherapeutics)、Erbitux-MHT-87、Erbitux-MHT-71、及Erbitux-WHY-46于PBS中培养在50℃水浴中。接着，抗体和抗体药物复合物(ADC)于第0、4、7和24小时取样进行SEC分析。使用具有Yarra 3μm SEC-3000(300x 7.8mm)管柱的Waters PDA996HPLC，依据尺寸分离抗体单体和产物聚集物。移动相包括0.020M的磷酸钾、0.025M氯化钾、及异丙醇5％(v/v)、pH 6.95。将30μL的样品以0.5mL/min的流速注入管柱，并在等度条件(isocratic conditions)下分离。侦测在波长280nm的吸收值。将主要波峰出现之前所冲提出来的物质收集在一起，称之为高分子量物质(HMWS)。

[0307] 第17B图显示连接子包含醣胺基单元酸的Erbitux-MHT-71和Erbitux-WHY-46相较于连接子不包含任何醣胺基酸单元的Erbitux-L1-MMAE和Erbitux-MHT-87具有低比例的HMWS。因此，此实验证实具有醣胺基酸单元的连接子不只增加连接子的亲水性，也显著地提升抗体药物复合物(ADC)的热稳定度。

[0308] <储存安定性测试>

[0309] 实施例19：

[0310] 于水相中接合的Erbitux-MHT-71利用脱盐管柱进行纯化。在冲提期间，缓冲液置换为20mM的柠檬酸钠、6.3％(w/v)的海藻糖、0.2mg/mL的聚山梨醇酯80、pH 6.0(SGN)。将Erbitux-MHT-71以100μL/管分装后放置于4℃进行储存安定性测试。每周或每两周取样进行抗体浓度、HIC与SEC分析，持续观察17周。

[0311] 第18图显示Erbitux-MHT-71的抗体浓度经过四个月仍没有显著变化(<10％)、Erbitux-MHT-71的平均DAR经过四个月仍没有显著变化(<5％)、Erbitux-MHT-71的HMWS产生经过四个月后仍然非常低(≤0.2％)。

[0312] <效价测试>

[0313] 实施例20：

[0314] 针对表现EGFR之头颈癌细胞株FaDu以及不表现EGFR之头颈癌细胞株RPMI 2650进行具有九种醣胜肽连接子之抗体药物复合物(ADC)给药，以分析对不同EGFR表现的肿瘤细胞之选择性毒杀效果。

[0315] 将FaDu和RPMI 2650细胞分别以2.5×10^3和4×10^3细胞/孔的密度培养于CellBIND的96孔盘中，并放置于37℃、5％CO_2培养箱中培养24小时。之后，取出旧培养液并加入序列稀释之不同浓度(10^{-7}至10^{-13}M)的抗体药物复合物(ADC)至FaDu细胞中、或加入序列稀释之不同浓度(10^{-6}至10^{-12}M)的抗体药物复合物(ADC)至RPMI 2650细胞中。接着将细胞放置于37℃、5％CO_2培养箱中作用120小时。经过120小时的培养后，洗涤细胞1次后加入含有0.5mg/

mL MTT试剂的培养液至每一孔中。于37℃作用4小时之后，取出MTT试剂并加入DMSO以溶解MTT试剂造成的沉淀物。利用微盘分析仪(Multiskan Ascent,Thermo Labsystems)侦测细胞在波长570nm的吸收值。藉由下式计算细胞存活率。

[0316] 细胞存活率(%)＝(Ins-Inb)/(Inc-Inb)×100%

[0317] 于此式中，“Ins”为培养于毒素中的细胞之亮度强度，“Inb”为没有细胞的空白孔的亮度强度，“Inc”为仅培养于培养液中的细胞之亮度强度(正对照)。

[0318] 在曝露于不同药物浓度(n＝6)的毒素120小时之后，纪录FaDu细胞于体外(in vitro)的存活率，以及利用Origin软件的Sigmodial模式获得IC50值。

[0319] 表3显示上述具有九种醣胜肽连接子之抗体药物复合物(ADC)在表现EGFR之头颈癌细胞株FaDu细胞的IC50值明显小于0.5nM。上述具有九种醣胜肽连接子之抗体药物复合物(ADC)对FaDu细胞的效价(potency)都相当高。除了Erbitux-MHT-93外，具有其他八种醣胜肽连接子之抗体药物复合物(ADC)对肿瘤细胞都具有高度选择性毒杀作用。对表现EGFR之FaDu细胞和不表现EGFR之RPMI 2650细胞的选择性毒杀作用大于2000倍，优于由市售连接子-毒素MC-Val-Cit-PAB-MMAE接合的Erbitux-L1-MMAE(约1246倍)以及连接子不包含任何醣胺基酸单元的Erbitux-MHT-87(约366倍)。

[0320] 表3

[0321]

IC50 (nM)	RPMI 2650	FaDu	体外*(In vitro)*选择性毒杀作用
EGFR 表现	0	2+	
Erbitux-L1-MMAE	107.2	0.086	1246
Erbitux-MHT-87	27.1	0.074	366
Erbitux-MHT-47	80.0	0.037	2162
Erbitux-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

[0322] <肿瘤生长抑制试验>

[0323] 实施例21：

[0324] 第0天将1x10^{6}之FaDu细胞植入C.B-17SCID小鼠皮下，以游标卡尺量测肿瘤长及宽，并以长x宽x宽x1/2(mm^3)进行估算及记录肿瘤大小。观测至第8天，当平均肿瘤大小达约100mm^{3}时进行对照组(DPBS)、5mg/kg Erbitux®、5mg/kg Erbitux-MHT-47、5mg/kg Erbitux-MHT-71、5mg/kg Erbitux-L1-MMAE(市售连接子-毒素MC-Val-Cit-PAB-MMAE(L1-MMAE)；Concortis Biotherapeutics)、0.1mg/kg AF-PEA(市售AF；Concortis Biotherapeutics)、0.1mg/kg MMAE(Concortis Biotherapeutics)之单次静脉注射(10mL/kg B.W.注射体积)药效实验(n=6)。每周两次进行观测小鼠体重及皮下肿瘤大小。肿瘤生长抑制率(Tumor Growth Inhibition;TGI)计算公式为TGI(%)=[1-(△药物处理组肿瘤体积/△对照组肿瘤体积)]x100。实验期间，若肿瘤大于小鼠体重的10%、肿瘤体积大于1500mm^3、或并发其他不良反应，依人道考虑主动以二氧化碳将小鼠进行牺牲。

[0325] 实验结果显示于第8天给药(Erbitux、Erbitux-ADCs、APEA-AF、及MMAE)后，

Erbitux-MHT-47、Erbitux-MHT-71及Erbirux-L1-MMAE组的肿瘤有明显生长抑制。第29天，Erbitux-MHT-47、Erbitux-MHT-71及Erbirux-L1-MMAE组的TGI分别为106±1%、106±1%及105±8%，而Erbitux组仅有部分药效，其TGI为27±14%(参见下表4)。

[0326] 表4

[0327]

TGI (%)±SEM	
第 8-29 天	
对照组 (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
MMEA (0.1 mg/kg)	12±6

[0328] 第19图显示Erbitux-L1-MMAE组在第36天开始复发。Erbitux-MHT-47组在第54-61天有肿瘤复发。然而，Erbitux-MHT-71组观测至第117天仍无肿瘤复发。第20图显示给药(Erbitux、Erbitux-ADCs、APEA-AF、及MMAE)后各组没有体重下降及其他明显异常临床症状。

[0329] 表5

[0330]

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

[0331] 虽然本揭露已以数个较佳实施例揭露如上，然其并非用以限定本揭露，任何所属技术领域中具有通常知识者，在不脱离本揭露之精神和范围内，当可作任意之更动与润饰，因此本揭露之保护范围当视后附之权利要求所界定者为准。

[0332] 【符号说明】

[0333] 100～方法流程图

[0334] 102-108～步骤

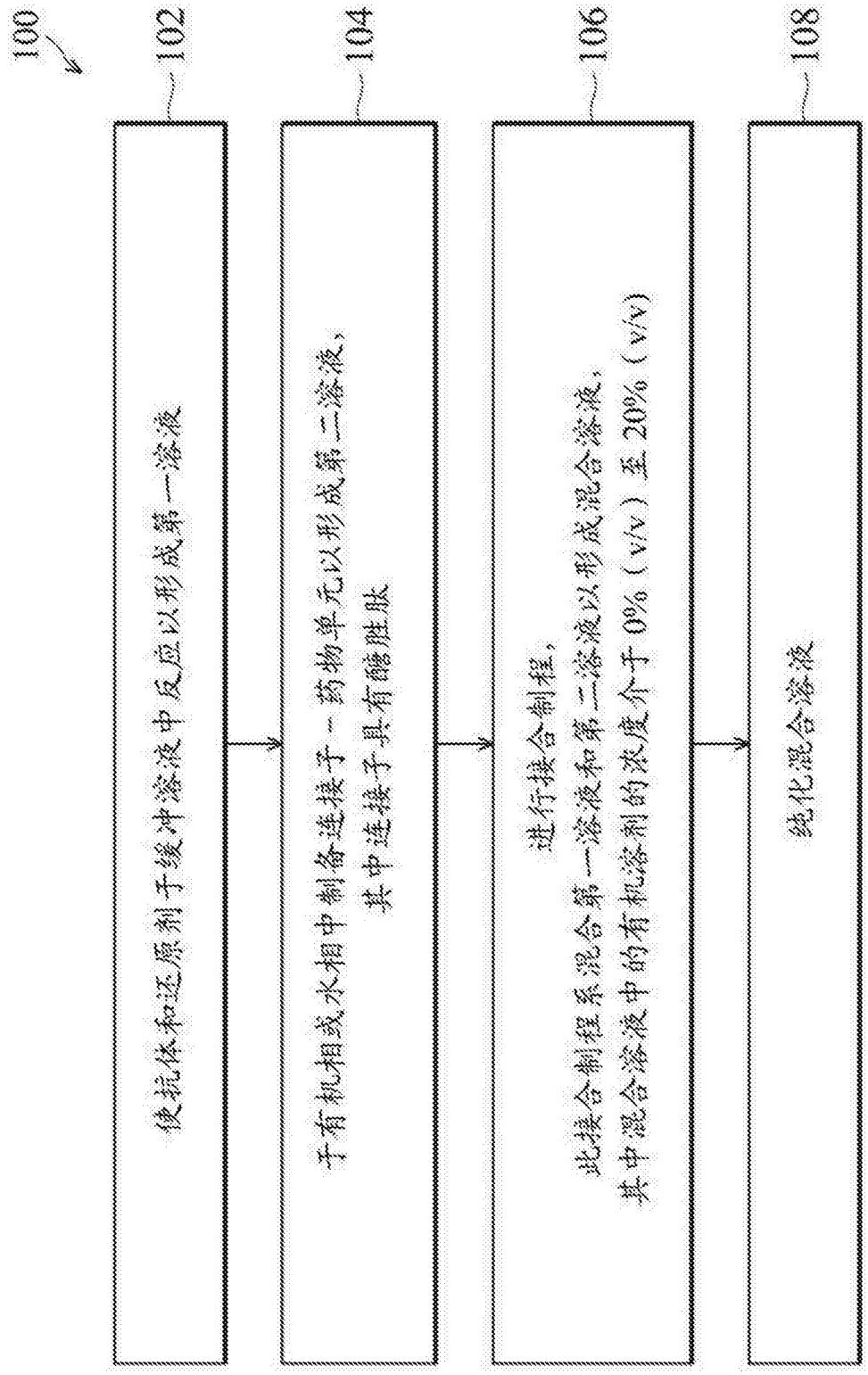

100
102
使抗体和还原剂于缓冲溶液中反应以形成第一溶液
104
于有机相或水相中制备连接子－药物单元以形成第二溶液，
其中连接子具有酪胺肽
106
进行接合制程，
此接合制程系混合第一溶液和第二溶液以形成混合溶液，
其中混合溶液中的有机溶剂的浓度介于0%（v/v）至20%（v/v）
108
纯化混合溶液

图1

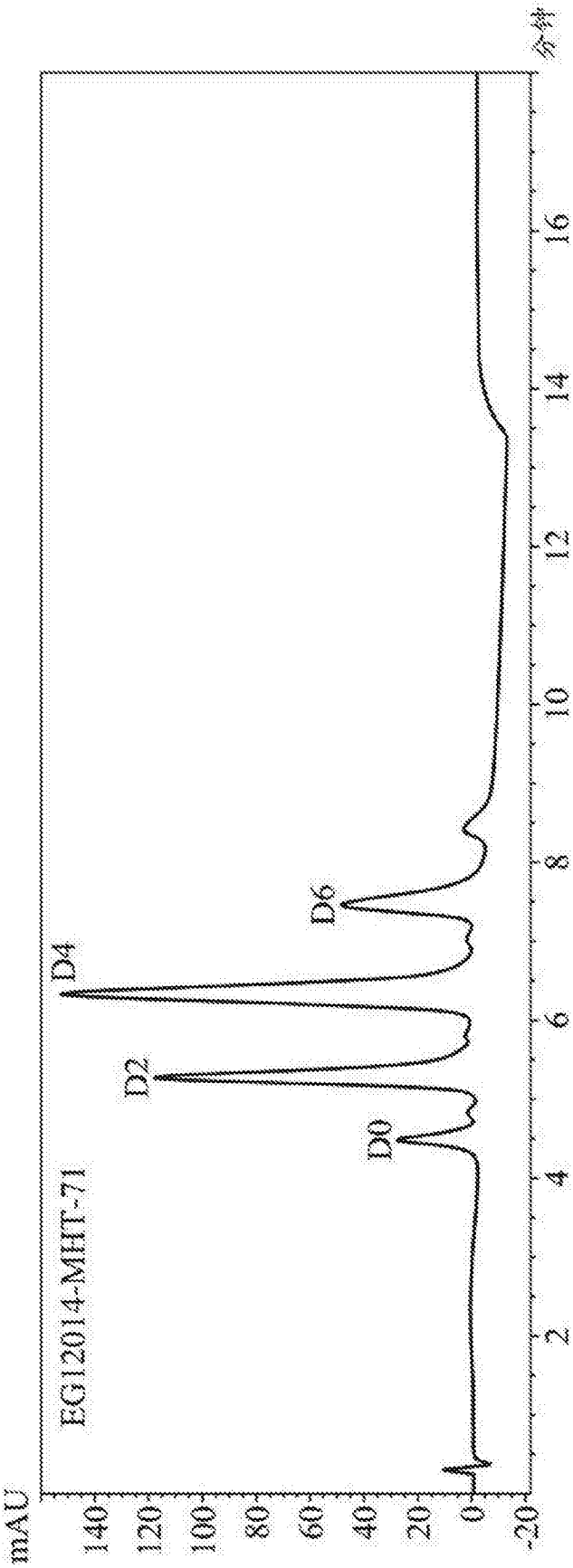

mAU
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
EG12014-MHT-71
D0
D2
D4
D6
2
4
6
8
10
12
14
16
分钟

图2

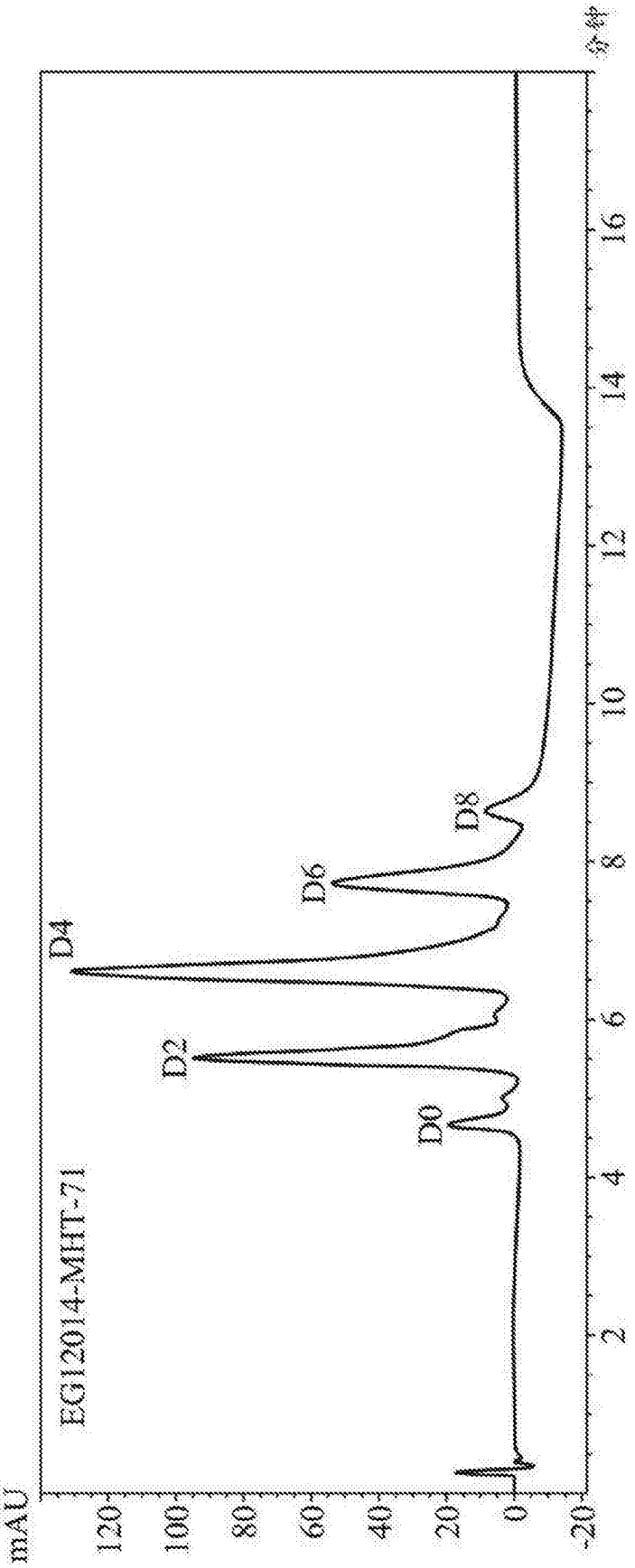

mAU
120
100
80
60
40
20
0
-20
EG12014-MHT-71
D0
D2
D4
D6
D8
2
4
6
8
10
12
14
16
分钟

图3A

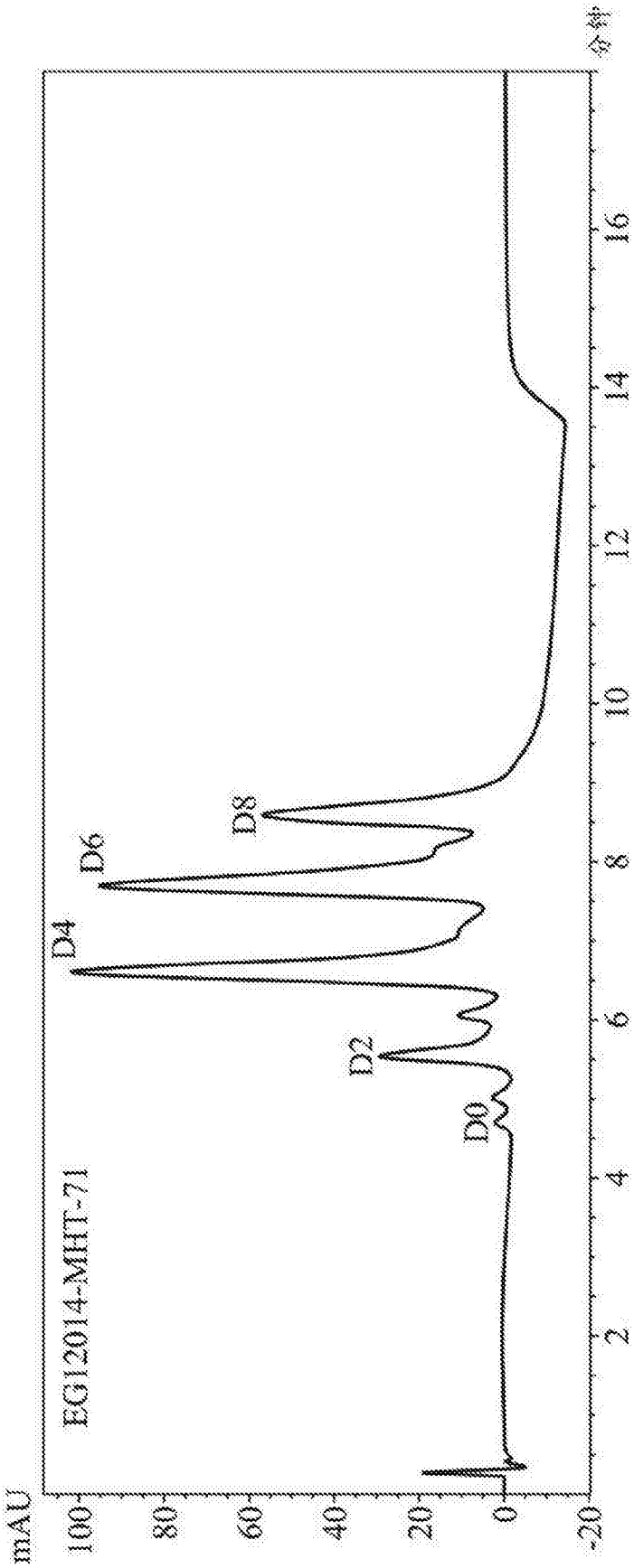

mAU
100
80
60
40
20
0
-20
EG12014-MHT-71
D0
D2
D4
D6
D8
2
4
6
8
10
12
14
16
分钟

图3B

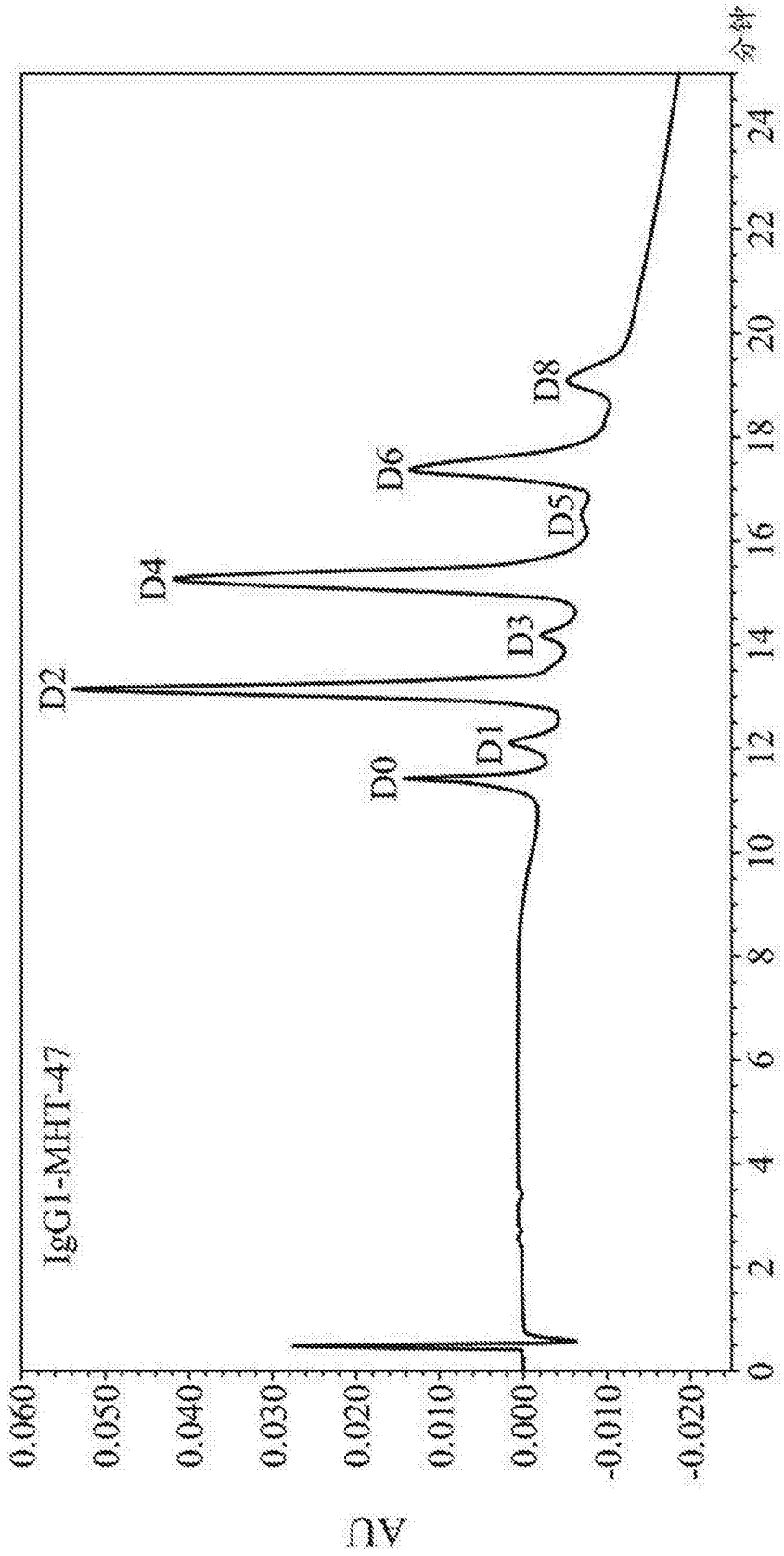

IgG1-MHT-47
D0
D1
D2
D3
D4
D5
D6
D8
0.060
0.050
0.040
0.030
0.020
0.010
0.000
-0.010
-0.020
AU
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
分钟

图4

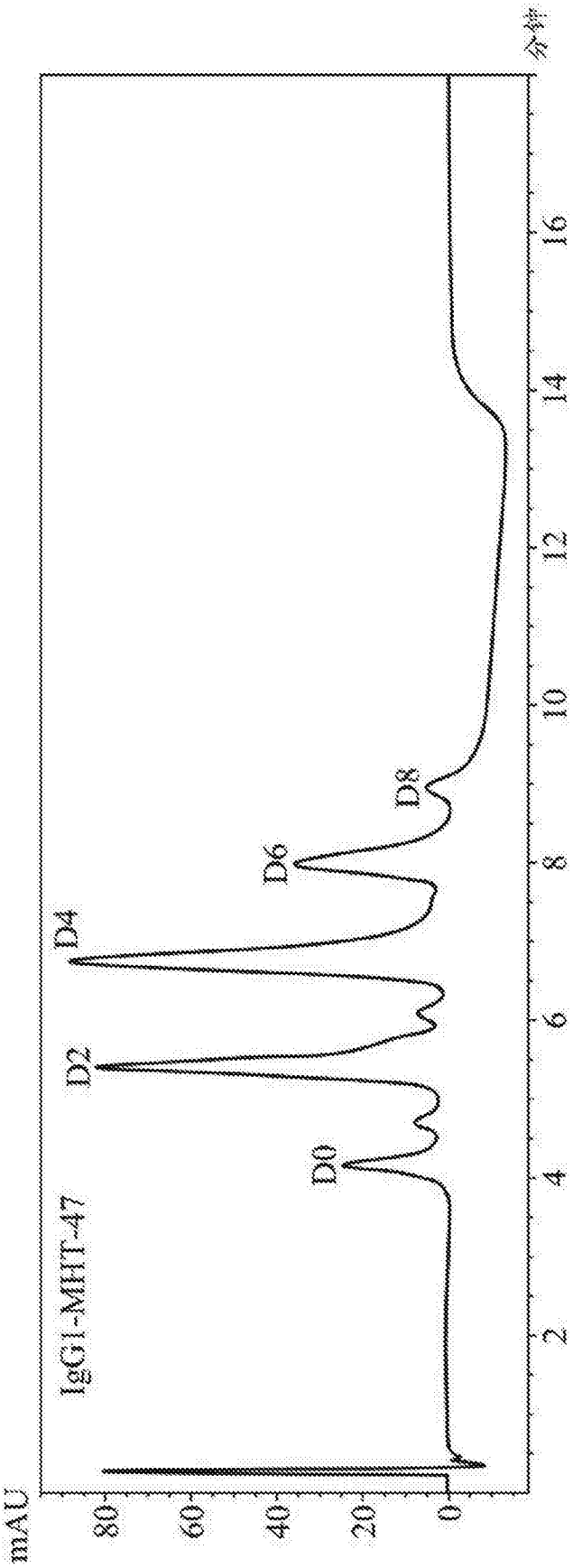


图5

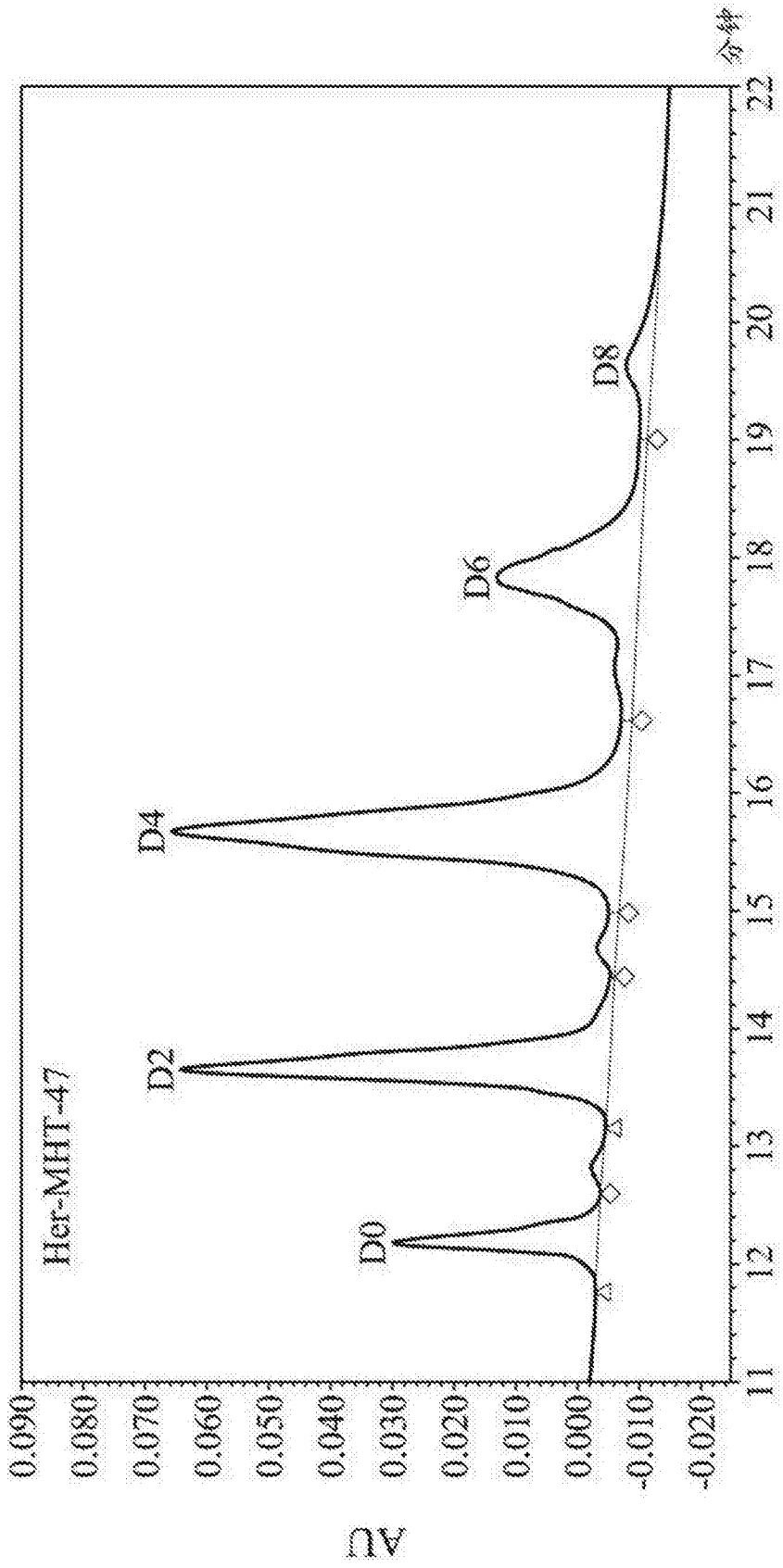

AU
0.090
0.080
0.070
0.060
0.050
0.040
0.030
0.020
0.010
0.000
-0.010
-0.020
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
分钟
Her-MHT-47
D0
D2
D4
D6
D8

图6

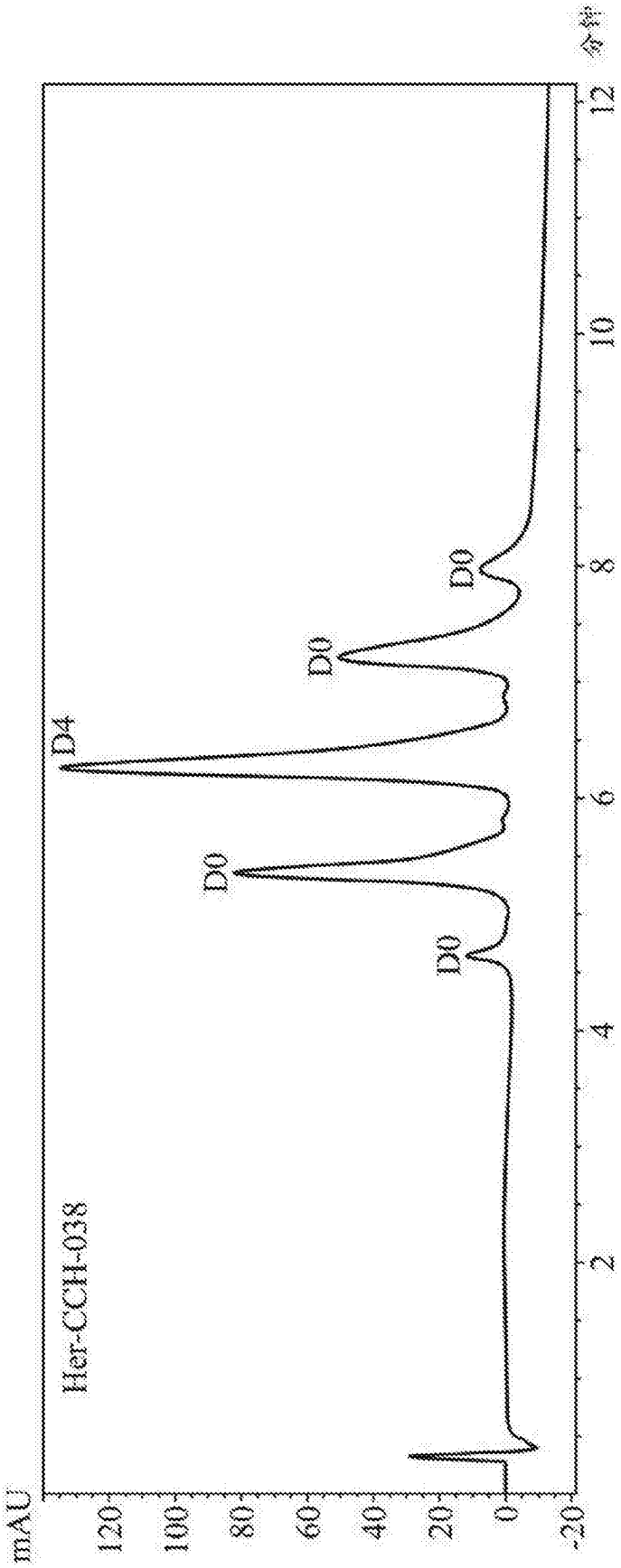


图7

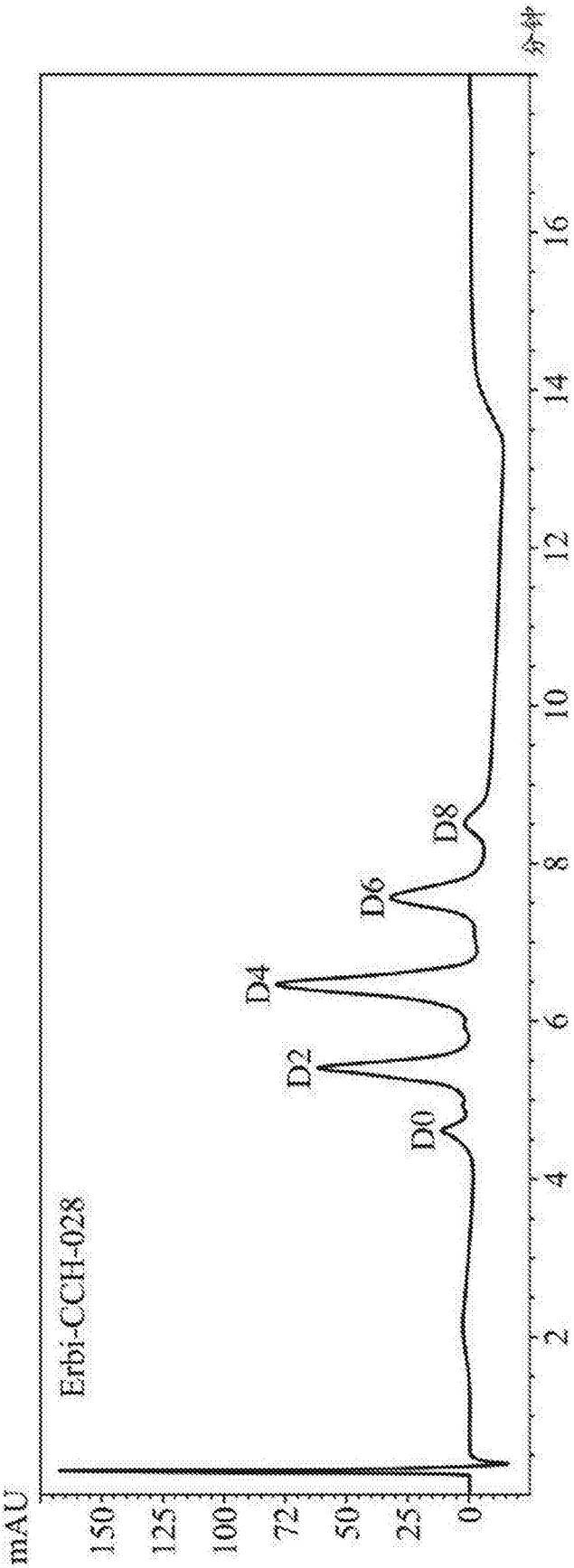

mAU
150
125
100
72
50
25
0
Erbi-CCH-028
D0
D2
D4
D6
D8
2
4
6
8
10
12
14
16
分钟

图8

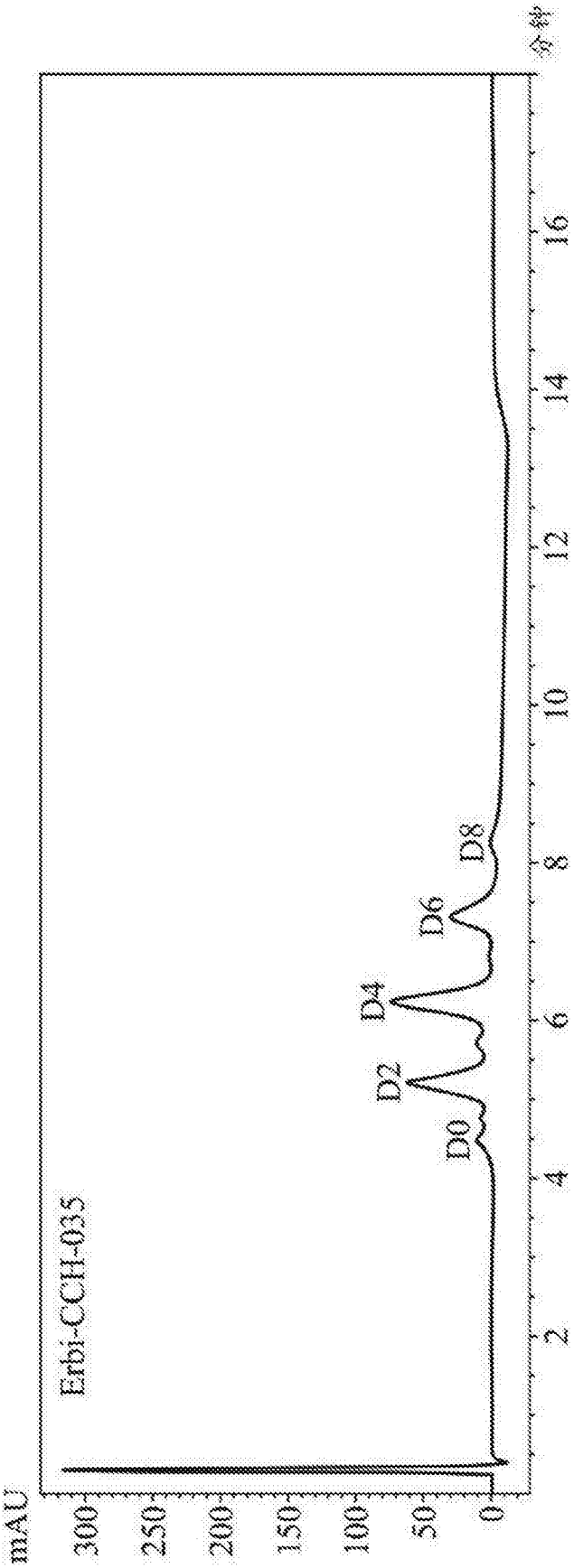

mAU
300
250
200
150
100
50
0
Erbi-CCH-035
D0
D2
D4
D6
D8
2
4
6
8
10
12
14
16
分钟

图9

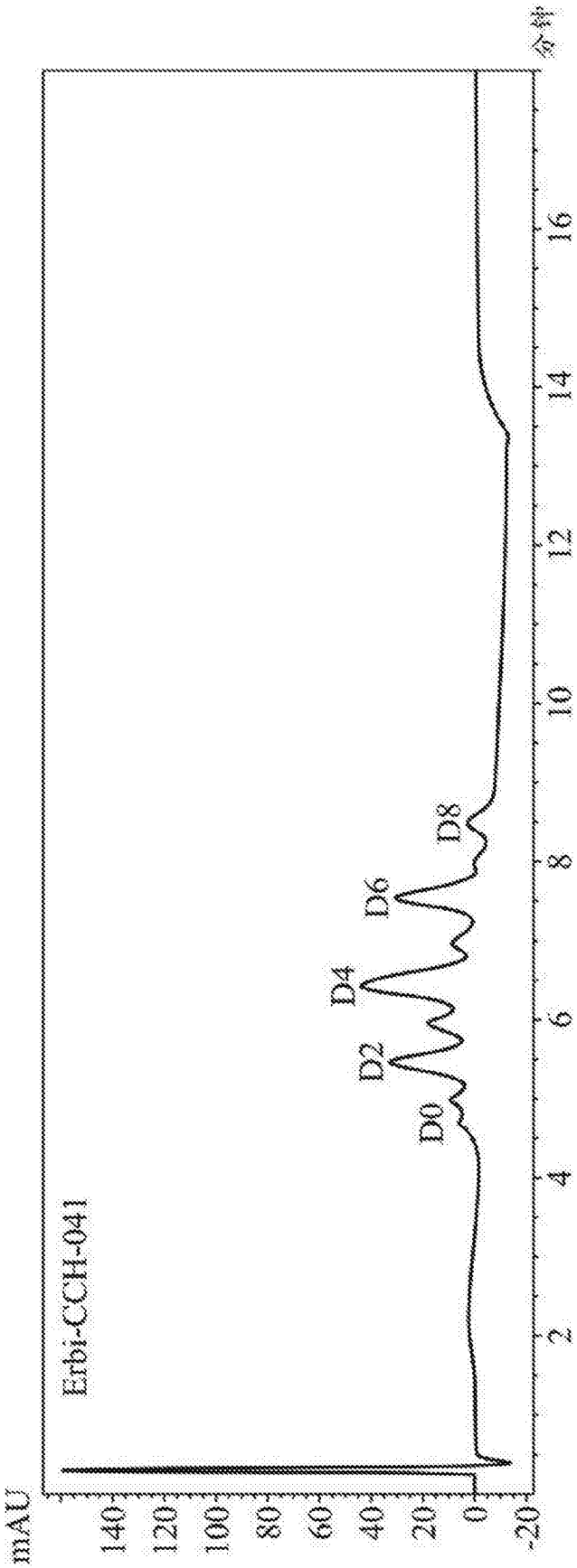

mAU
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
Erbi-CCH-041
D0
D2
D4
D6
D8
2
4
6
8
10
12
14
16
分钟

图10

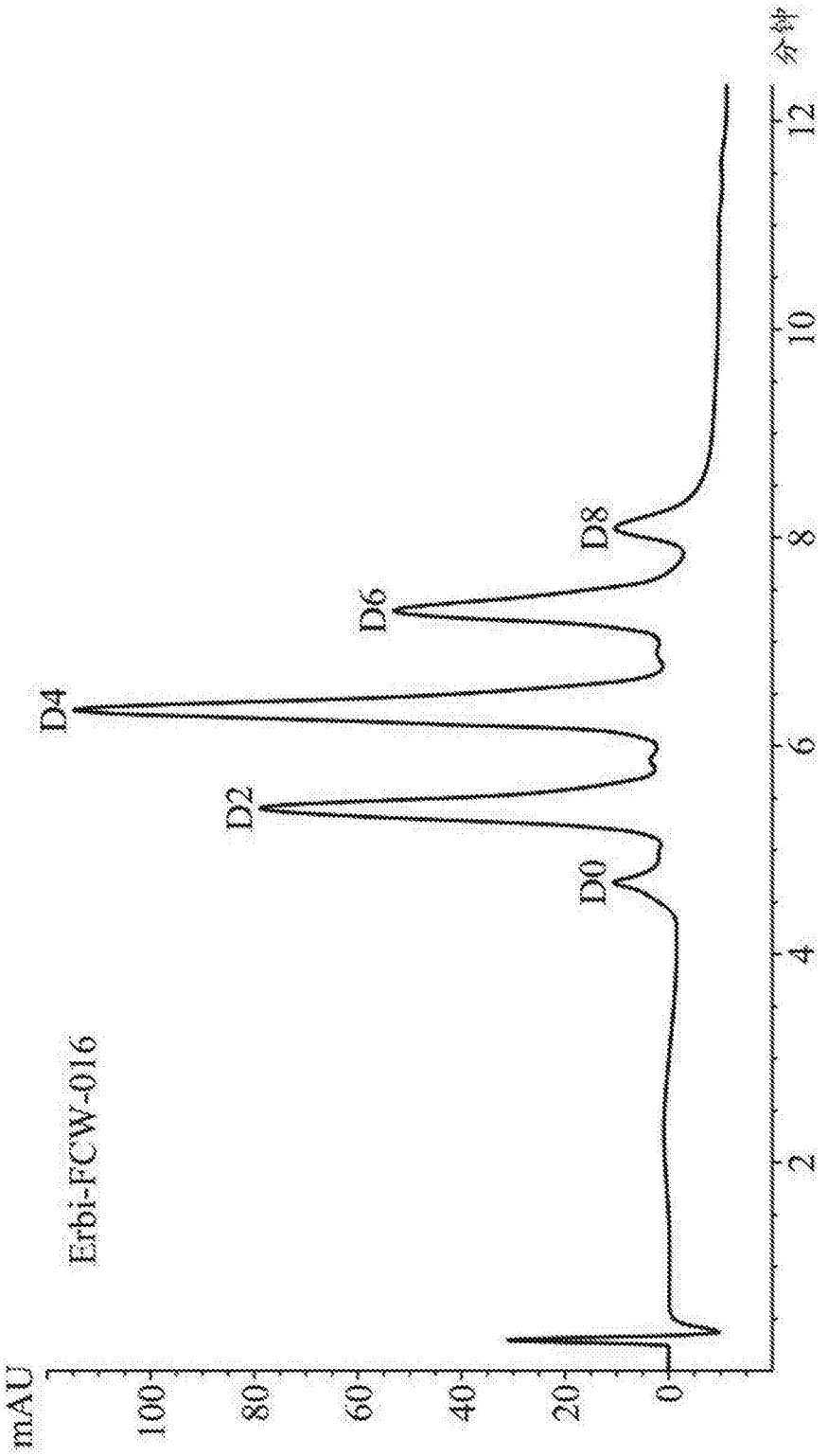


图11

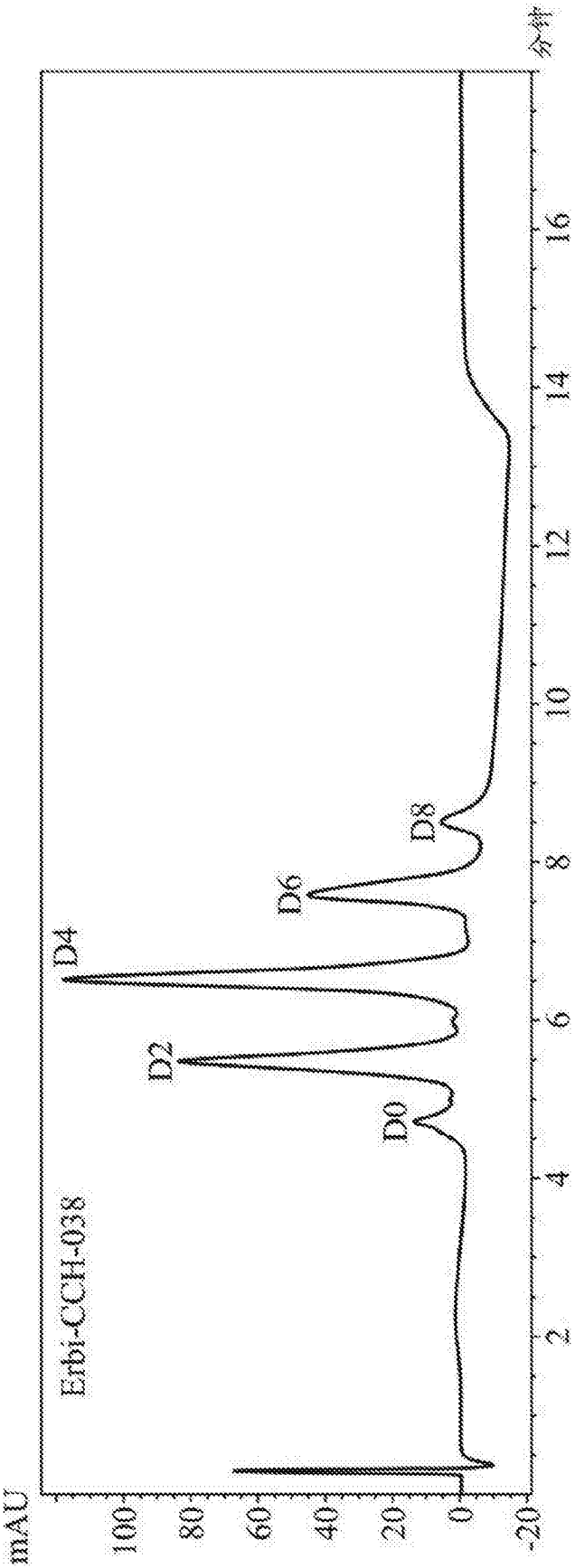

mAU
100
80
60
40
20
0
-20
Erbi-CCH-038
D0
D2
D4
D6
D8
2
4
6
8
10
12
14
16
分钟

图12

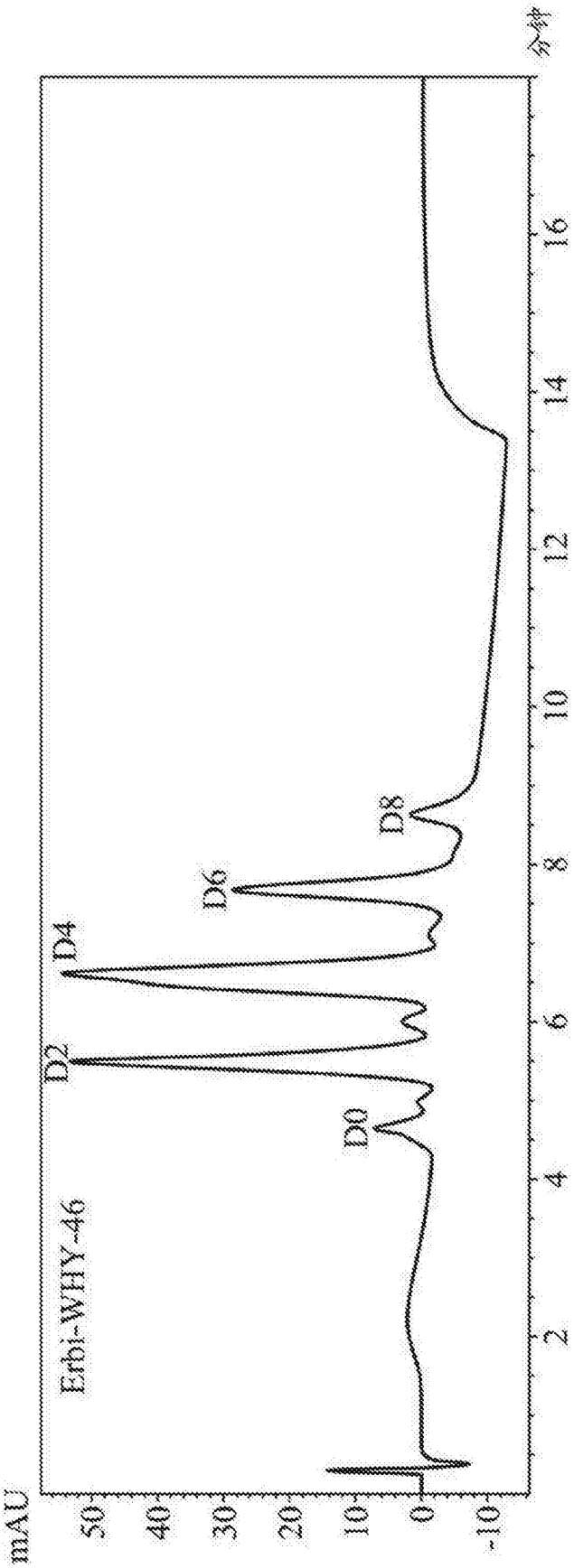


图13A

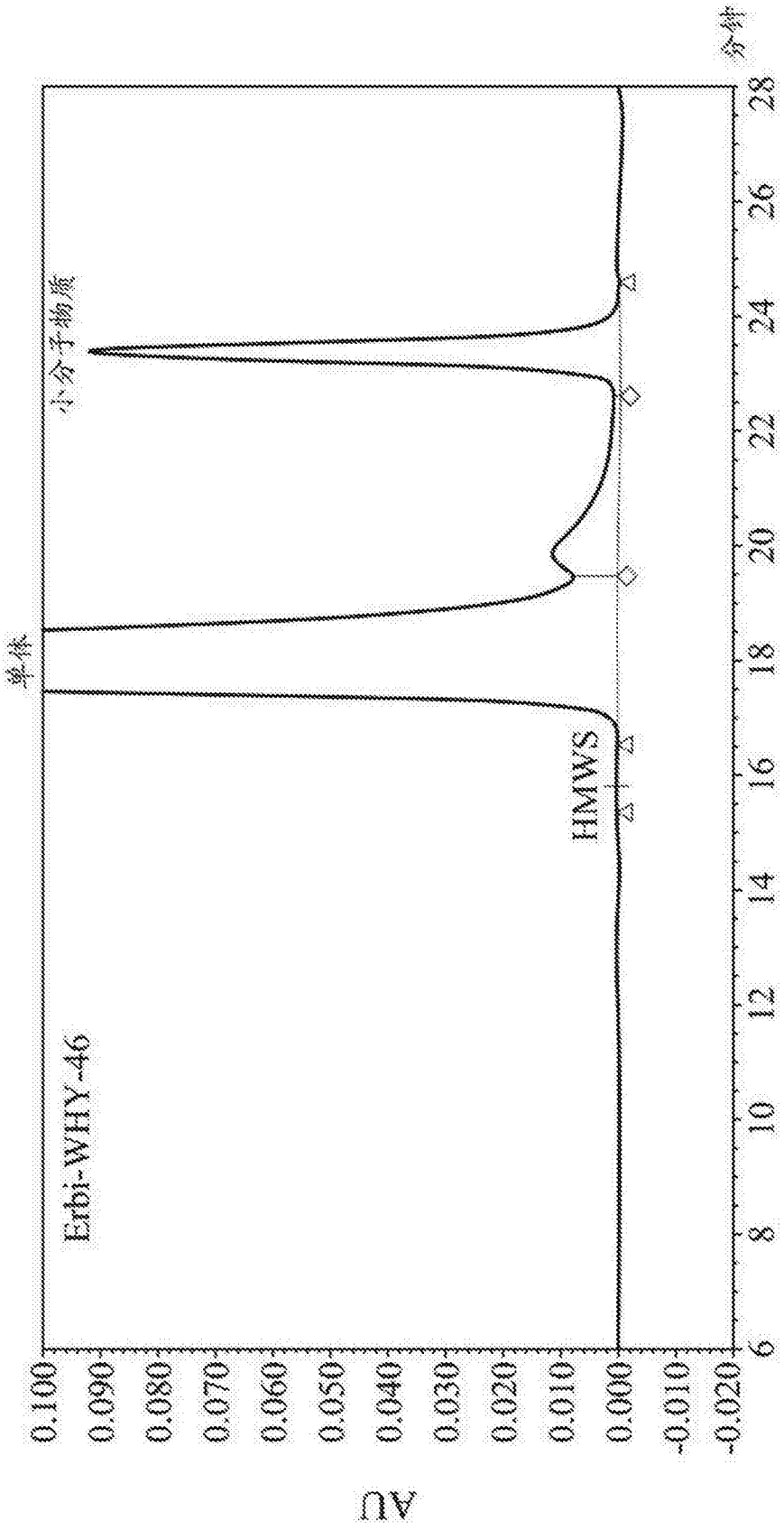

分钟
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
0.100
0.090
0.080
0.070
0.060
0.050
0.040
0.030
0.020
0.010
0.000
-0.010
-0.020
AU
Erbi-WHY-46
单体
HMWS
小分子物质

图13B

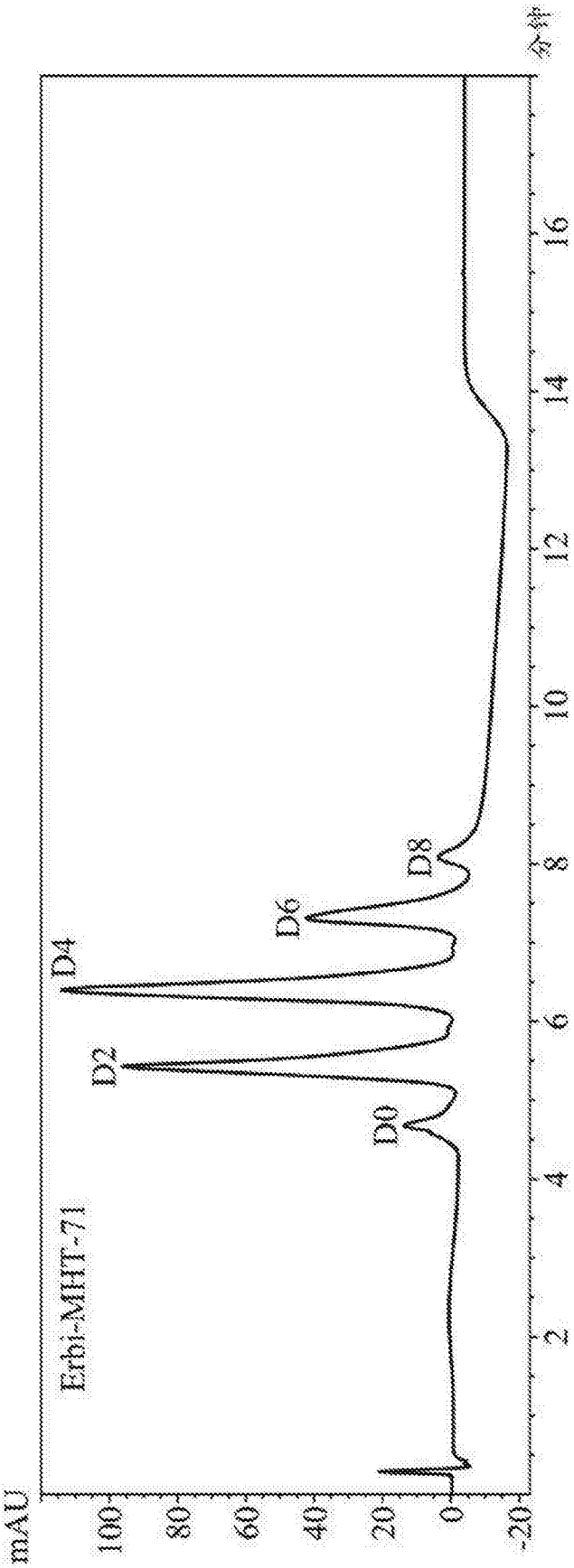

mAU
100
80
60
40
20
0
-20
Erbi-MHT-71
D0
D2
D4
D6
D8
2
4
6
8
10
12
14
16
分钟

图14A

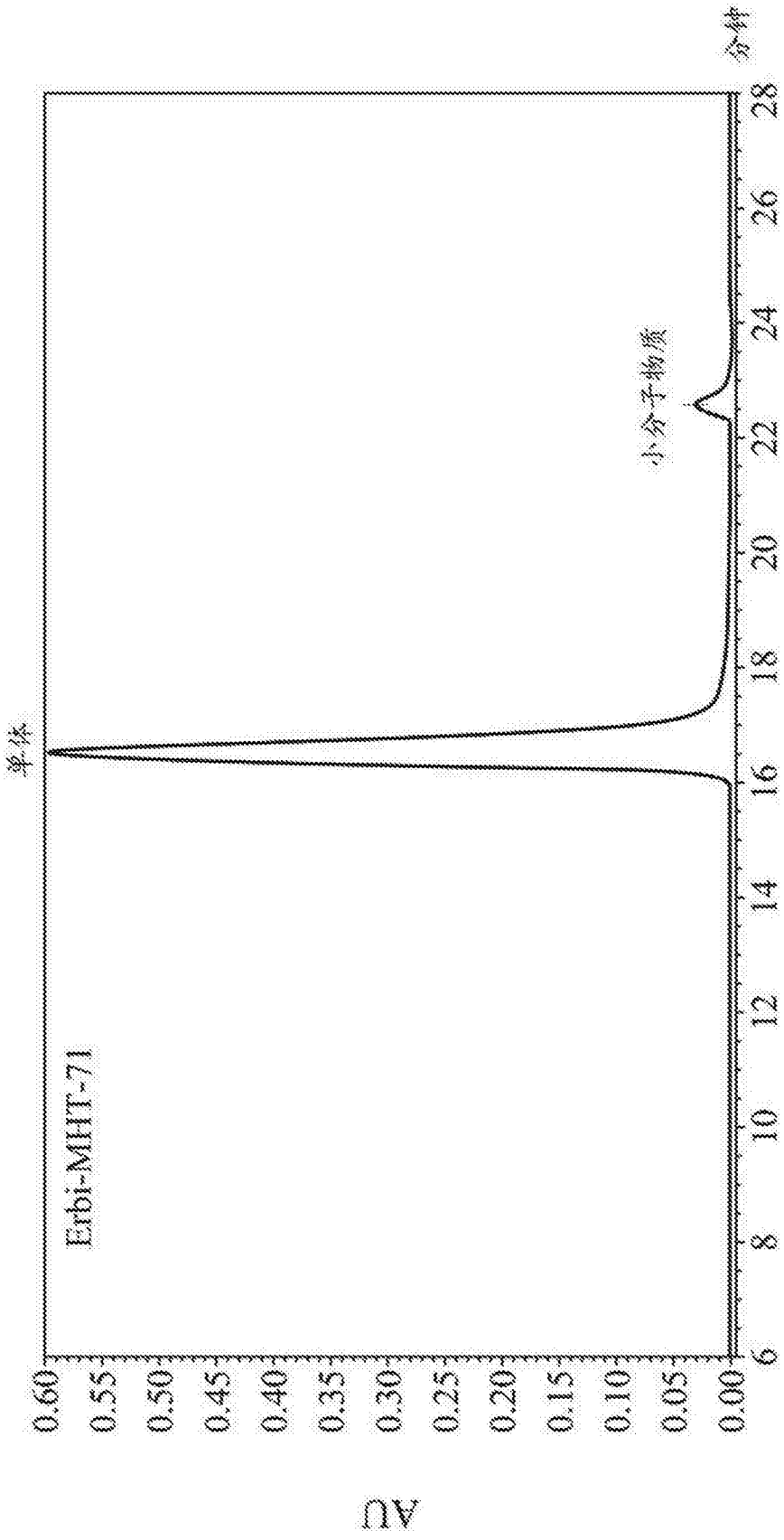

分钟
28
26
24
22
20
18
16
14
12
10
8
6
小分子物质
单体
Erbi-MHT-71
0.60
0.55
0.50
0.45
0.40
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
AU

图14B

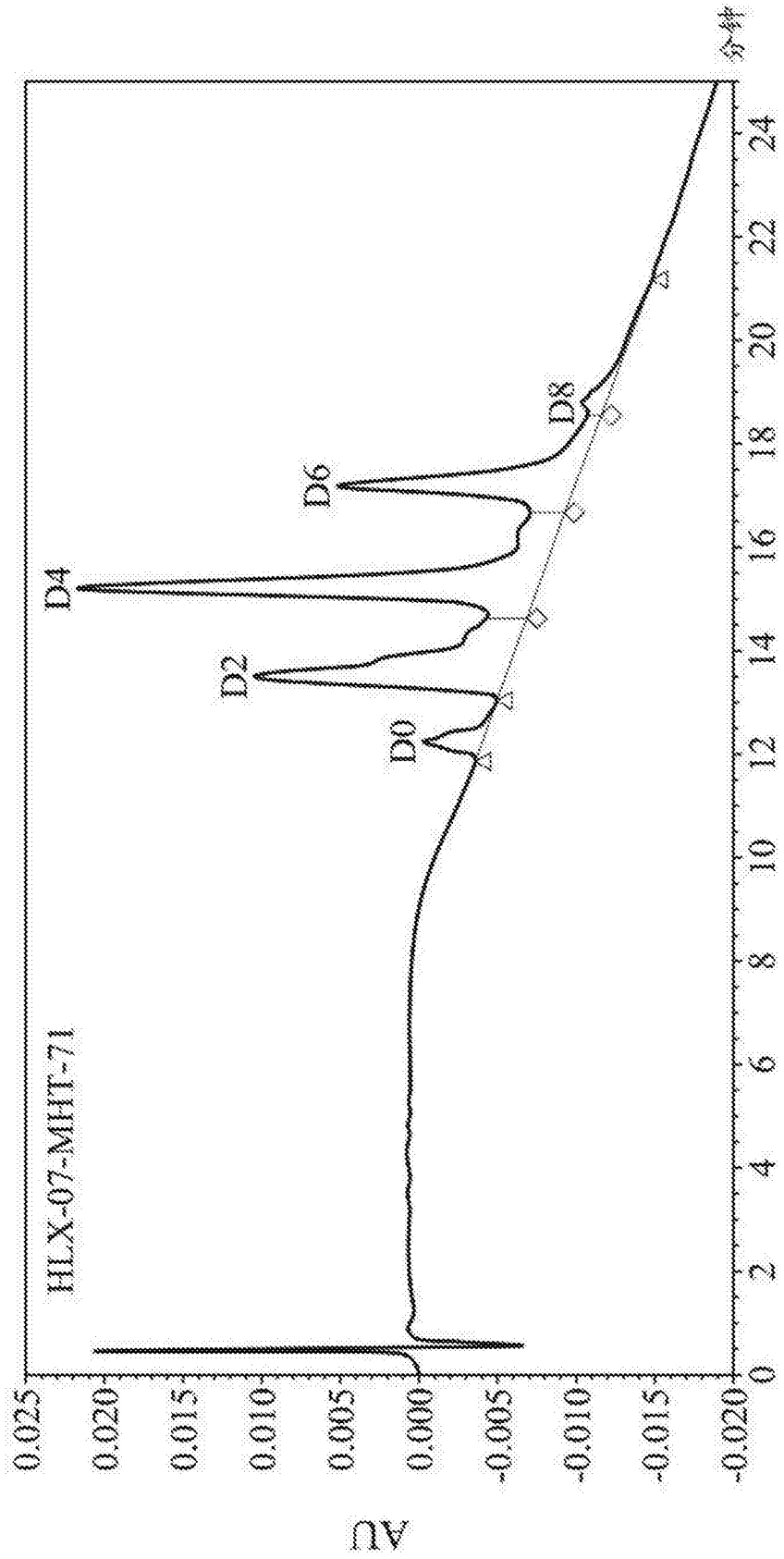

HLX-07-MHT-71
D0
D2
D4
D6
D8
0.025
0.020
0.015
0.010
0.005
0.000
-0.005
-0.010
-0.015
-0.020
AU
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
分钟

图15

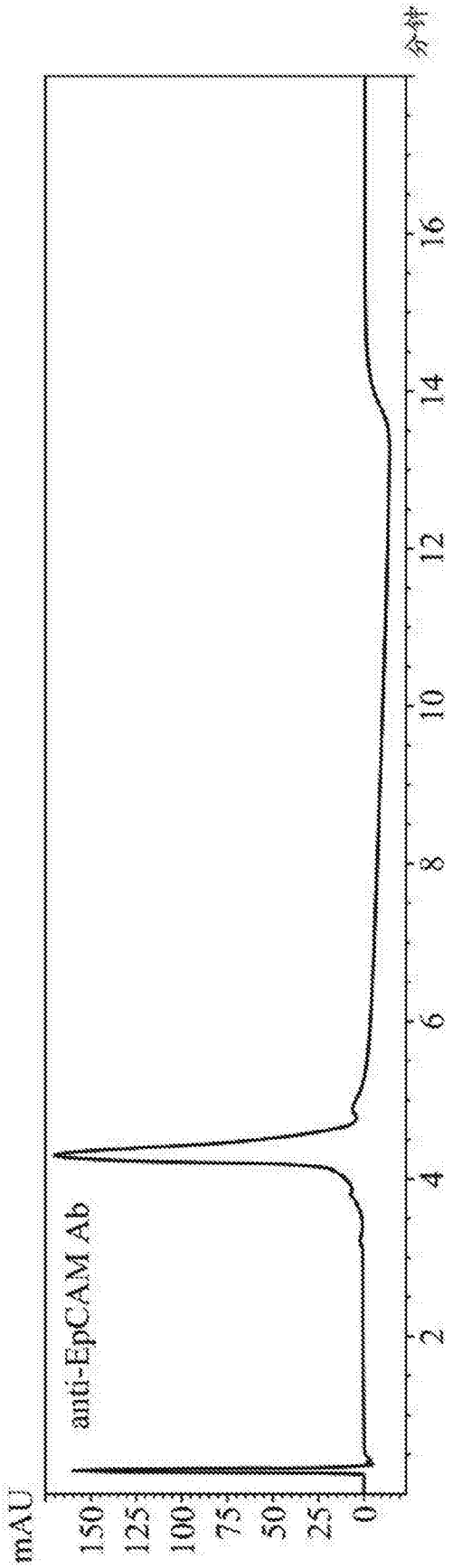


图16A

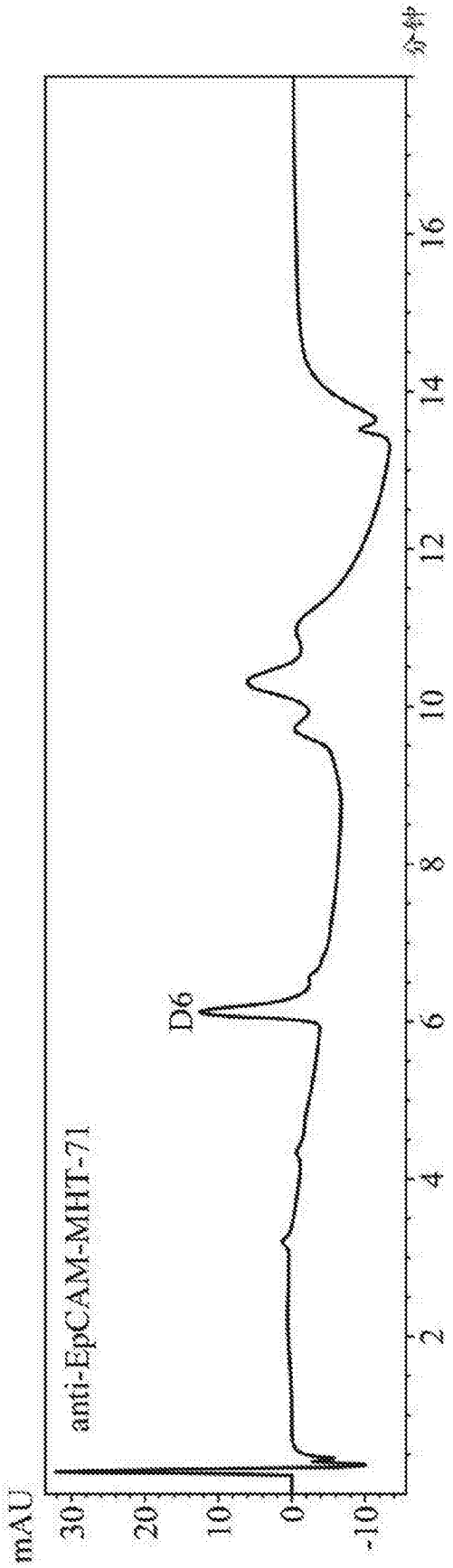


图16B

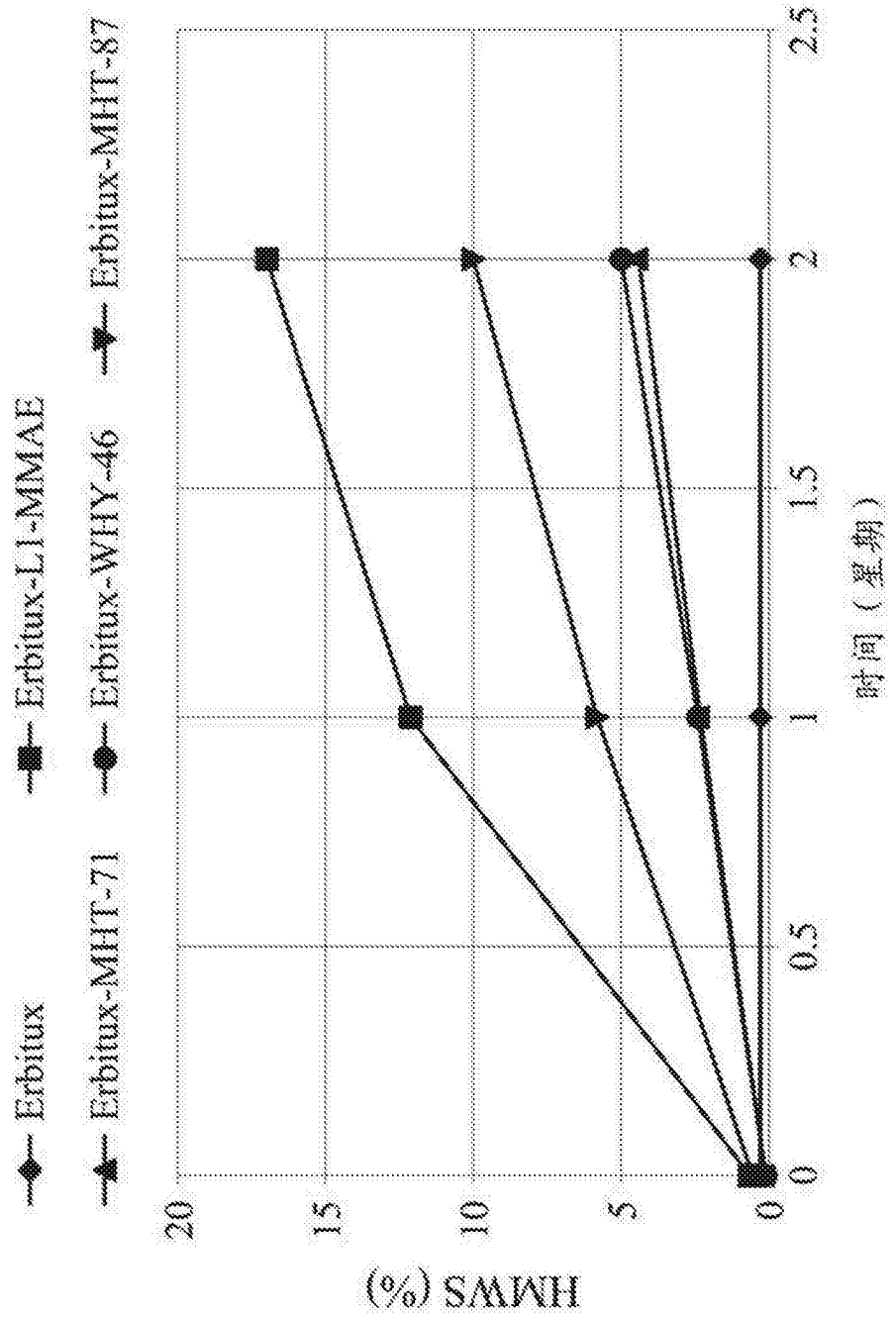

Erbitux
Erbitux-LI-MMAE
Erbitux-MHT-71
Erbitux-WHY-46
Erbitux-MHT-87
HMWS (%)
20
15
10
5
0
0
0.5
1
1.5
2
2.5
时间（星期）

图17A

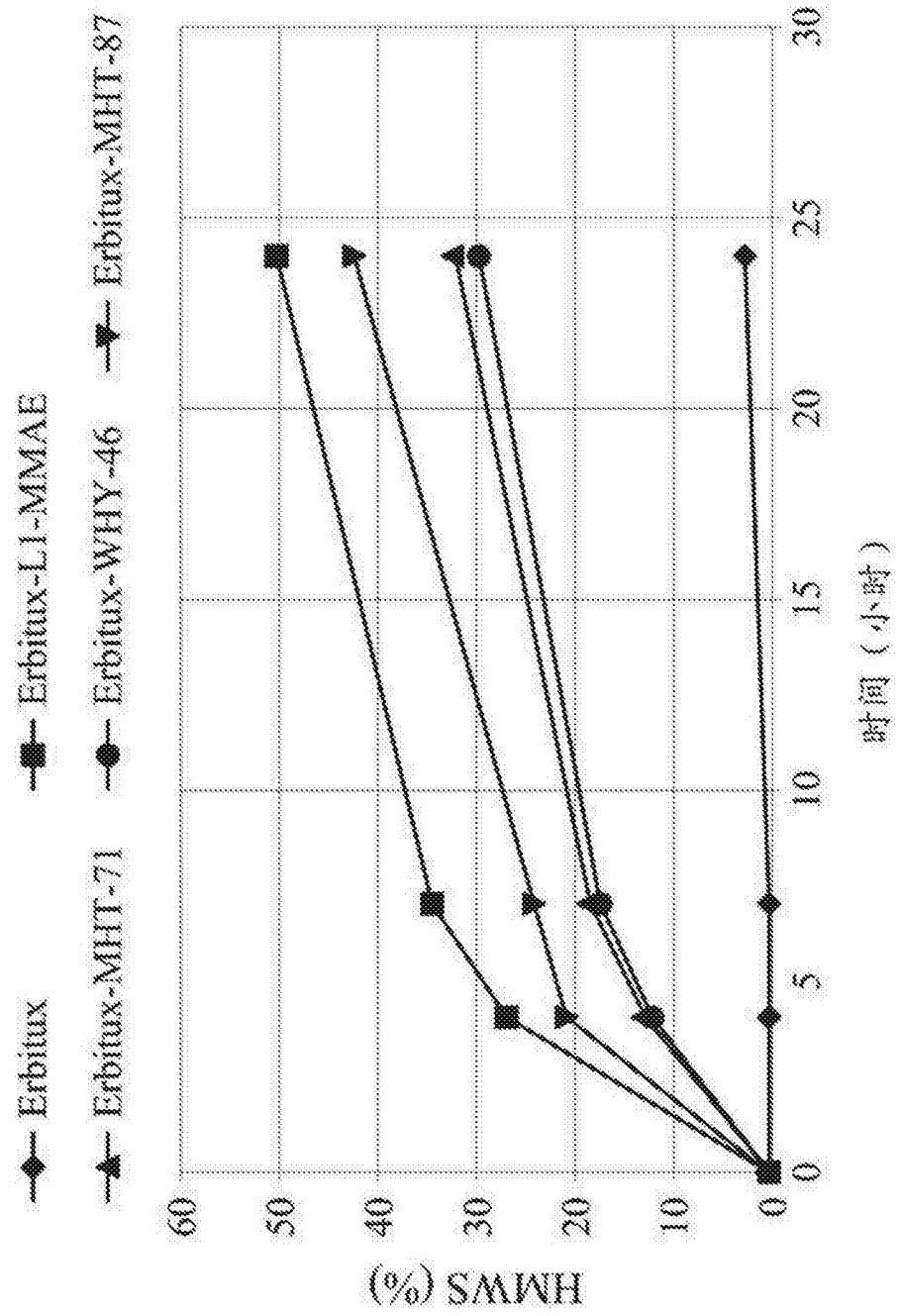

Erbitux
Erbitux-L1-MMAE
Erbitux-MHT-71
Erbitux-WHY-46
Erbitux-MHT-87
HMWS (%)
60
50
40
30
20
10
0
0
5
10
15
20
25
30
时间（小时）

图17B

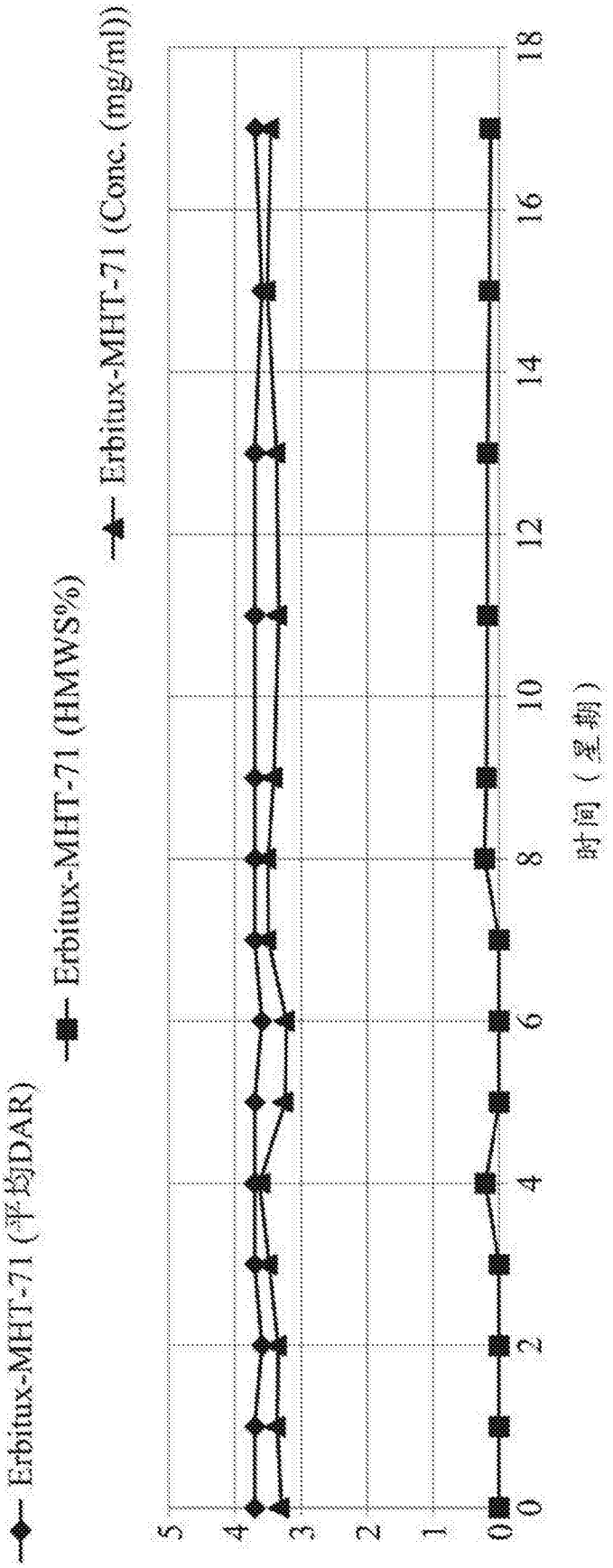

Erbitux-MHT-71 (平均DAR)
Erbitux-MHT-71 (HMWS%)
Erbitux-MHT-71 (Conc. (mg/ml))
0
1
2
3
4
5
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
时间（多种）

图18

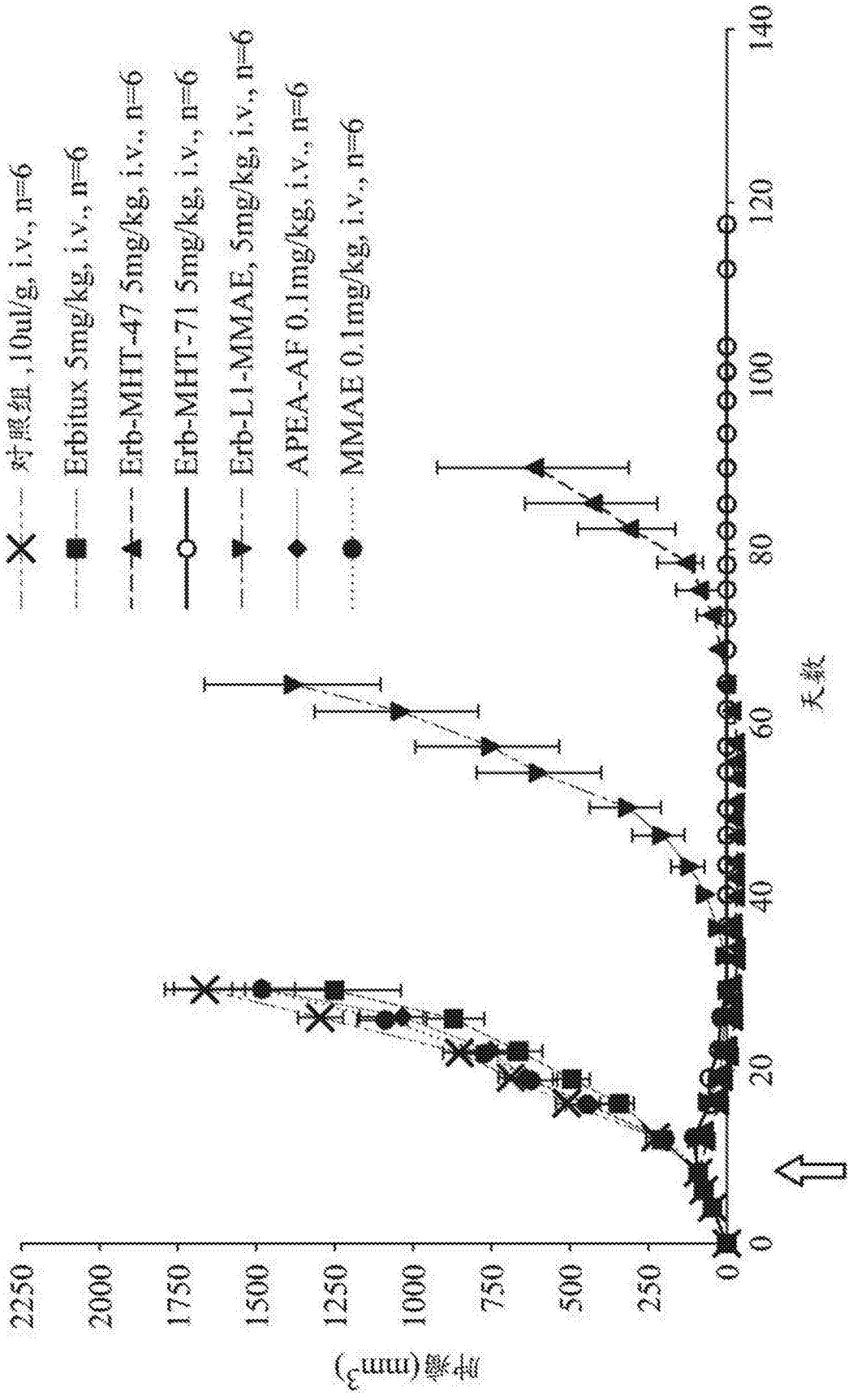

对照组 ,10ul/g, i.v., n=6
Erbitux 5mg/kg, i.v., n=6
Erb-MHT-47 5mg/kg, i.v., n=6
Erb-MHT-71 5mg/kg, i.v., n=6
Erb-L1-MMAE, 5mg/kg, i.v., n=6
APEA-AF 0.1mg/kg, i.v., n=6
MMAE 0.1mg/kg, i.v., n=6
肿瘤(mm³)
2250
2000
1750
1500
1250
1000
750
500
250
0
0
20
40
60
80
100
120
140
天数

图19

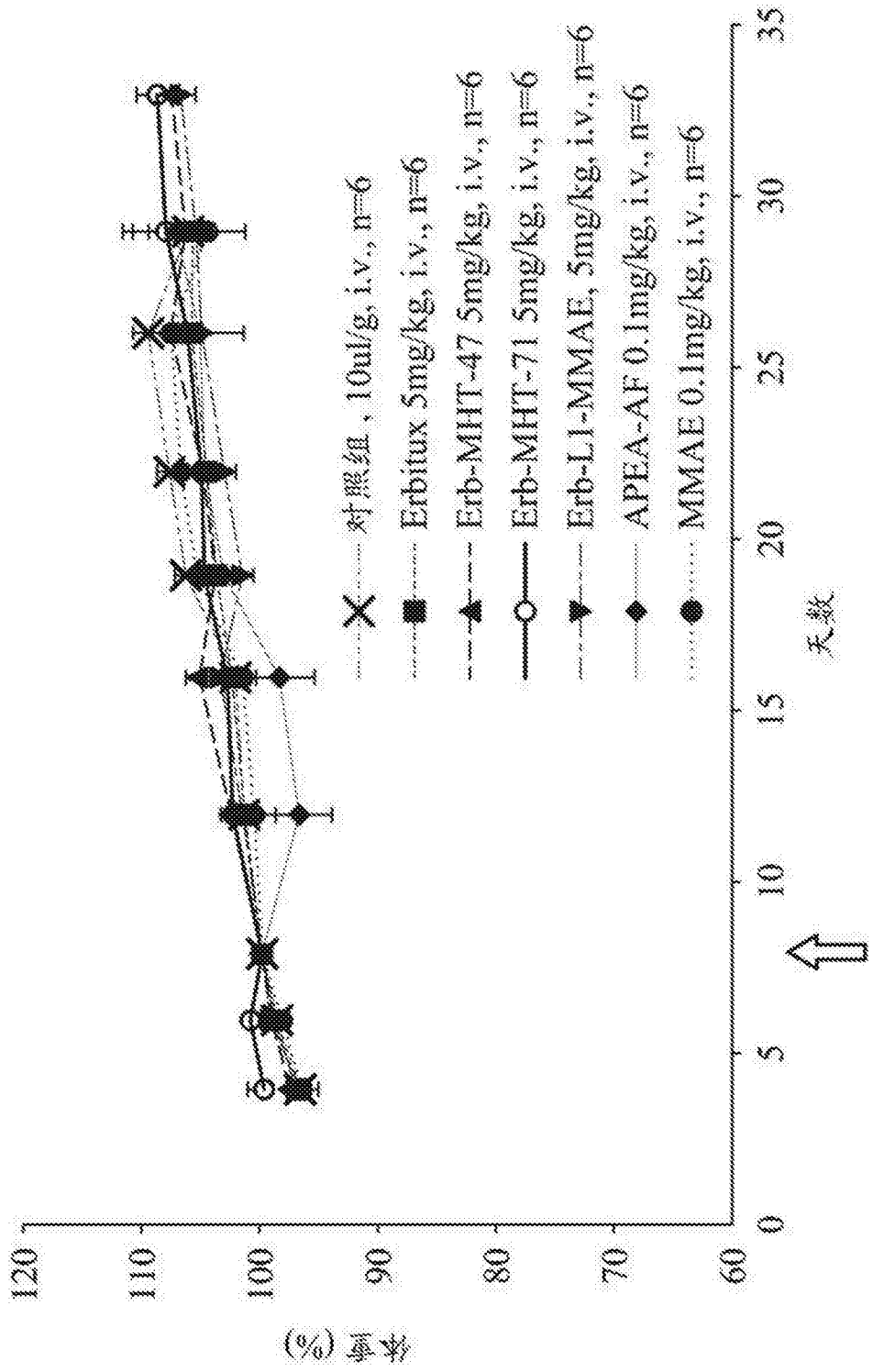

对照组，10ul/g, i.v., n=6
Erbitux 5mg/kg, i.v., n=6
Erb-MHT-47 5mg/kg, i.v., n=6
Erb-MHT-71 5mg/kg, i.v., n=6
Erb-L1-MMAE, 5mg/kg, i.v., n=6
APEA-AF 0.1mg/kg, i.v., n=6
MMAE 0.1mg/kg, i.v., n=6
体重 (%)
天数
120
110
100
90
80
70
60
0
5
10
15
20
25
30
35

图20