202227449

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202227449 A

(43)公開日： 中華民國 111 (2022) 年 07 月 16 日

(21)申請案號：110130967 (22)申請日： 中華民國 110 (2021) 年 08 月 20 日

(51)Int. Cl.： *C07D487/04 (2006.01)* *A61K47/60 (2017.01)*
A61K47/68 (2017.01) *A61P37/00 (2006.01)*
A61P29/00 (2006.01) *A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2020/08/20 美國 63/068,342
2020/11/25 美國 63/118,365

(71)申請人：美商ＡＭＢＲＸ 公司 (美國) AMBRX, INC. (US)
美國

(72)發明人：文 盛柱 MOON, SUNG-JU (US)；里昂 布萊恩 LEON, BRIAN (US)；康名超 KANG, MINGCHAO (CN)；克努森 尼可拉斯 KNUDSEN, NICKOLAS (US)；坂村 蘇庫瑪爾 SAKAMURI, SUKUMAR (US)；田 豐 TIAN, FENG (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：51 項 圖式數：30 共 470 頁

(54)名稱

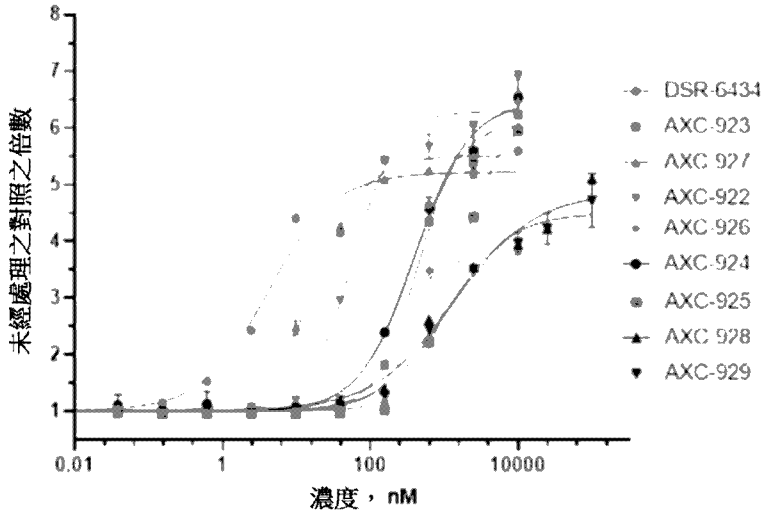
抗體－ＴＬＲ促效劑偶聯物、其方法及用途

(57)摘要

本文揭示 TLR-促效劑化合物、抗體-TLR-促效劑偶聯物、醫藥組成物及該等化合物或偶聯物作為治療劑用於治療諸如癌症等疾病或疾患之使用方法。

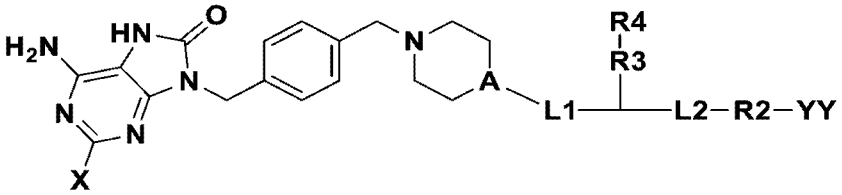
Disclosed herein are TLR-agonists compounds, antibody-TLR agonist conjugates, pharmaceutical composition, and methods of use of such compounds or conjugates as therapeutics for treating a disease or condition such as cancer.

指定代表圖：


未經處理之對照之倍數
濃度，nM
0.01
1
100
10000
DSR-6434
AXC-923
AXC-927
AXC-922
AXC-926
AXC-924
AXC-925
AXC-928
AXC-929

【圖 2】

特徵化學式：


H2N
HN
O
N
N
N
N
X
N
A
L1
R4
R3
L2
R2
YY

(I)

【發明摘要】

【中文發明名稱】抗體-TLR 促效劑偶聯物、其方法及用途

【英文發明名稱】ANTIBODY-TLR AGONIST CONJUGATES, METHODS, AND USES THEREOF

【中文】

本文揭示 TLR-促效劑化合物、抗體-TLR-促效劑偶聯物、醫藥組成物及該等化合物或偶聯物作為治療劑用於治療諸如癌症等疾病或疾患之使用方法。

【英文】

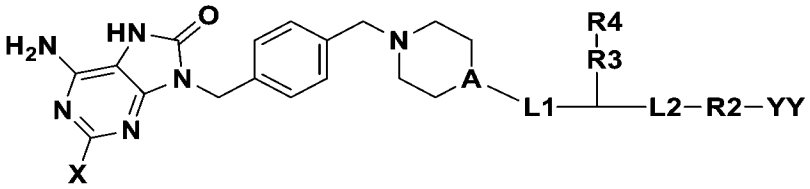
Disclosed herein are TLR-agonists compounds, antibody-TLR agonist conjugates, pharmaceutical composition, and methods of use of such compounds or conjugates as therapeutics for treating a disease or condition such as cancer.

【指定代表圖】圖 2

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】



(I)

【發明說明書】

【中文發明名稱】抗體-TLR 促效劑偶聯物、其方法及用途

【英文發明名稱】ANTIBODY-TLR AGONIST CONJUGATES, METHODS, AND USES THEREOF

【技術領域】

【先前技術】

【0001】 靶向分子或多肽(諸如抗體及其片段)及 TLR-促效劑化合物可偶聯在一起以產生 TLR-促效劑偶聯物(TC)。TC 可用於治療疾病。

以引用方式併入

【0002】 本說明書中所提及之所有公開案、專利及專利申請案皆以引用方式併入本文中，其併入程度如同特定地及個別地指示將每一個別公開案、專利或專利申請案以引用方式併入。

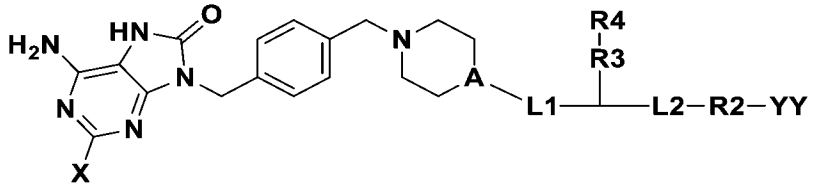
【發明內容】

【0003】 本發明係關於具有一或多種非天然編碼之胺基酸之靶向多肽，該等胺基酸與包括但不限於 TLR7 及/或 TLR8 在內之 TLR 之促效劑化合物偶聯。該等偶聯物在本文中稱為 TLR-促效劑偶聯物(TC)。本發明之 TC 包括靶向生物分子或多肽及 TLR-促效劑化合物，該等靶向生物分子或多肽及 TLR-促效劑化合物係使用非天然編碼之胺基酸，藉由位點特異性偶聯而偶聯在一起以產生新穎生物 TLR-促效劑偶聯物(BTC)。靶向性生物分子或多肽可為腫瘤靶向性生物生物分子或多肽。

【0004】 在額外實施例中，本發明進一步係關於進一步與水溶性聚合物偶聯之 TC，該水溶性聚合物形成穩定之二聚物或多聚物。本發明提供設計、工程改造或構築成增強、增加或改良其藥物動力學及治療特徵之新穎 TC。本發明之 TC 設計成藉由使用 PEG 屏蔽及前藥設計在非預期靶位點阻斷對於 TLR 之暴露來提

供額外靶特異性，例如，其中在腫瘤微環境中 PEG 屏蔽物(shield)或前藥之裂解釋放活性酬載(payload)，進一步增強特異性。在一些實施例中，TC 設計包含親水性藥物-連接體或酬載-連接體設計。在一些實施例中，TC 設計包含 PEG 屏蔽。在一些實施例中，包含 PEG 屏蔽之 TC 設計包含一或多種直鏈或具支鏈 PEG 分子。在一些實施例中，TC 設計包含具有蛋白水解可裂解連接體設計之前藥方法。在一些實施例中，TC 設計包含蛋白水解可裂解連接體設計及 PEG 屏蔽。

【0005】　在一個態樣中，本揭示案提供式(I)化合物：



(I)

或其醫藥學上可接受之鹽、溶劑合物、立體異構物或互變異構物，其中

A 係 CH 或 N；

X 係 O-R1、NH-R1、S-R1 或 H；

YY 係-ONH_2、-N_3、-OH、馬來醯亞胺、-COOH 或-$C(=O)CH_2Y1$，其中 Y1 係鹵化物；

L1 及 L2 中之每一者皆獨立地為$(CH_2)_m$、$(CH_2)_mC(=O)$、$(CH_2)_m$-$NH(CH_2)_n$、$(CH_2)_m$-$C(=O)NH(CH_2)_n$、$(CH_2)_m$-$OC(=O)$-NH-$(CH_2)_n$、$(CH_2)_m$-$NHC(=O)$-NH-$(CH_2)_n$、$(CH_2)_m$-NH、$(CH_2)_m$-$NHC(=O)$、$(CH_2)_m$-$NHC(=O)$-$(CH_2)_n$-$NHC(=O)$-$(CH_2)_p$、$C(=O)$-$(CH_2)_n$、C_3-C_8 雜環或缺失；其中 m、n 及 p 中之每一者皆獨立地為 0 至 12 之整數；

R1 係 H、C_1-C_{12} 烷基、經取代之 C_1-C_{12} 烷基、含氧之 C_1-C_{12} 烷基、C_3-C_8 雜環烷基、經取代之 C_3-C_8 雜環烷基、C_3-C_8 環烷基、經取代之 C_3-C_8 環烷基、經-N_3 末端取代之 C_1-C_{12} 烷基、$(CH_2)_q$-$(OCH_2CH_2)_r$-OMe，其中 q 及 r 中之每一者皆獨立地為 0 至 12 之整數；

R2 係 C_1-C_6 伸烷基、C_1-C_{12} 經取代之伸烷基、C_3-C_8 伸環烷基、C_3-C_8 經取代之伸環烷基、伸芳基、經取代之 C_6-C_{10} 伸芳基、包含 1-3 個雜原子之 5-12 員伸雜芳基、包含 1-3 個雜原子之經取代之 5-12 員伸雜芳基或 $(OCH_2CH_2)_{ss}$ 或其組合，或 R2 缺失；其中 ss 係 1 至 12 之整數，其中每一雜原子皆獨立地為 N、O 或 S；

R3 係胺基酸之側鏈、C_1-C_6 伸烷基、C_1-C_6 經取代之伸烷基、C_3-C_8 伸環烷基、C_3-C_8 伸雜環烷基、經取代之 C_3-C_8 伸環烷基、伸芳基、經取代之伸芳基、包含 1-3 個雜原子之 5-12 員伸雜芳基、包含 1-3 個雜原子之經取代之 5-12 員伸雜芳基、含胺基之 C_1-C_{12} 伸烷基、含羰基之 C_1-C_{12} 伸烷基、含氧之 C_1-C_{12} 伸烷基、-N_3 末端 C_1-C_6 伸烷基、-CCH 末端 C_1-C_6 伸烷基、-SH 末端 C_1-C_6 伸烷基、-OH 末端 C_1-C_6 伸烷基、含氮之 C_1-C_6 伸烷基、-OPO_3H_2 末端 C_1-C_6 伸烷基、-OPO_3H_2 末端伸芳基、葡萄糖醛酸苷末端 C_1-C_6 伸烷基、-N_3 末端伸芳基、乙炔末端伸芳基、胺末端伸芳基、$(CH_2)_s$、$(CH_2)_s$-C(=O)、$(CH_2)_s$-$NH(CH_2)_t$、$(CH_2)_s$-C(=O)$NH(CH_2)_t$、$(CH_2)_s$-OC(=O)-NH-$(CH_2)_t$、$(CH_2)_s$-NHC(=O)-NH-$(CH_2)_t$ 或其組合；或 R3 缺失；其中每一 s 及 t 皆獨立地為 0 至 6 之整數；

R4 係 H、C_3-C_8 環烷基、C_3-C_8 雜環烷基、C_3-C_8 經取代之雜環烷基、芳基、經取代之芳基、$(CH_2)_u$-$(OCH_2CH_2)_v$-OMe、具兩條/三條支鏈之$(CH_2)_u$-$(OCH_2CH_2)_v$-OMe 或其組合；或 R4 缺失；其中每一 u 及 v 皆獨立地為 1 至 48 之整數。

【0006】 在一些實施例中，R4 包含 PEG 部分。在一些實施例中，PEG 部分係直鏈的、具支鏈的或多臂的。在一些實施例中，R4 包含 $(CH_2)_u$-$(OCH_2CH_2)_v$-OMe。在一些實施例中，v 係 1 至 48 之整數，u 係 1 至 12 之整數，且 ss 獨立地為 1 至 12 之整數。在一些實施例中，v 係 1 至 12 之整數，u 係 1 至 12 之整數，且 ss 獨立地為 1 至 12 之整數。在一些實施例中，R3 包含連接體。在一些實施例中，連接體包含各自具有(CH_2)m-(OCH_2CH_2)n-之-ONH_2 末端或馬來醯亞胺末端或 COOH 末端或鹵代乙醯基末端，中 m 及 n 中之每一者皆

獨立地為 1 至 12 之整數。在一些實施例中，PEG 部分具有 0.1 kDa 至 100 kDa 或 1 kDa 至 100 kDa 之分子量。在一些實施例中，PEG 部分具有 0.1 kDa 至 50 kDa 或 1 kDa 至 50 kDa 之分子量。

【0007】 在一些實施例中，化合物或其鹽係選自表 4。在一些實施例中，化合物係根據表 4 之化合物 185、化合物 186、化合物 187、化合物 188、化合物 189、化合物 190、化合物 191、化合物 213、化合物 214、化合物 216、化合物 217、化合物 218、化合物 219、化合物 220、化合物 221、化合物 222、化合物 223、化合物 224、化合物 230、化合物 233、化合物 235、化合物 238、化合物 239、化合物 240、化合物 242、化合物 244、化合物 245、化合物 246、化合物 248、化合物 251、化合物 252、化合物 253、化合物 254、化合物 255、化合物 256、化合物 257、化合物 258、化合物 259、化合物 260、化合物 261、化合物 263、化合物 265、化合物 266、化合物 267、化合物 268、化合物 269、化合物 272、化合物 273、化合物 275、化合物 278、化合物 279、化合物 281、化合物 282、化合物 283、化合物 284、化合物 285、化合物 286、化合物 287、化合物 296、化合物 297、化合物 299、化合物 300、化合物 301、化合物 302、化合物 303 或化合物 304。

【0008】 該化合物係選自以下化合物之群：3-胺基-N-(2-(1-(4-((4-胺基-6-丁氧基-2-側氧基-2,3-二氫-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-1-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)苯甲醯胺(185)；N-(2-(1-(4-((4-胺基-6-丁氧基-2-側氧基-2,3-二氫-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-1-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-4-(2-胺基乙基)苯甲醯胺(186)；4-胺基-N-(2-(1-(4-((4-胺基-6-丁氧基-2-側氧基-2,3-二氫-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-1-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)苯甲醯胺苯甲醯胺(187)；3-胺基-N-(2-(1-(4-((4-胺基-6-丁氧基-2-側氧基-2,3-二氫-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-1-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-4-氟苯甲醯胺(188)；N-(2-(1-(4-((4-胺基-6-丁氧基

-2-側氧基-2,3-二氫-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-1-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-4-(2-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)乙基)苯甲醯胺(189)；6-胺基-9-(4-((4-(4-胺基苯基)六氫吡啶-1-基)甲基)苄基)-2-丁氧基-7H-嘌呤-8(9H)-酮；6-胺基-9-(4-((1'-(3-(2-(胺基氧基)乙氧基)丙醯基)-4,4'-聯六氫吡啶-1-基)甲基)苄基)-2-丁氧基-7H-嘌呤-8(9H)-酮(191)；N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-4-羥基苯甲醯胺(213)；N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-3-(4-羥基苯基)丙醯胺(214)；(S)-2-胺基-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-6-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)己醯胺(216)；(S)-N-(5-胺基-6-(1'-(4-((4-胺基-6-丁氧基-2-側氧基-2,3-二氫-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-1-基)甲基)苄基)-4,4'-聯六氫吡啶-1-基)-6-側氧基己基)-2-(胺基氧基)乙醯胺(217)；5-胺基-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)菸鹼醯胺(218)；5-胺基-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)吡啉-2-甲醯胺(219)；6-胺基-2-丁氧基-9-(4-((1'-(4-羥基苯甲醯基)-[4,4'-聯六氫吡啶]-1-基)甲基)苄基)-7,9-二氫-8H-嘌呤-8-酮(220)；(S)-2-胺基-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-3-(4-胺基苯基)丙醯胺(221)；6-胺基-9-(4-((1'-(5-胺基吡啉-2-羰基)-4,4'-聯六氫吡啶-1-基)甲基)苄基)-2-丁氧基-7H-嘌呤-8(9H)-酮(222)；(S)-2-胺基-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-3-(4-(疊氮基甲基)苯基)丙烯醯胺(223)；(S)-2-胺基-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-6-疊氮基己醯胺(224)；N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-4-((S)-2-((S)-2-(2-(胺基

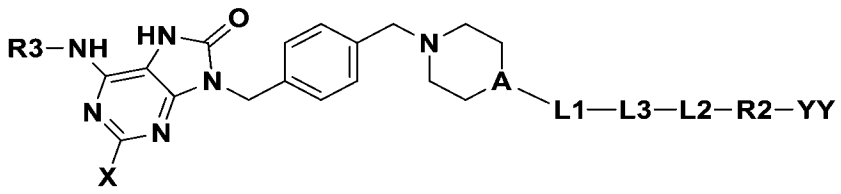
氧基)乙醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)丙醯胺基)苯甲醯胺(230)；(S)-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-2-((S)-2-((S)-2-胺基-3-甲基丁醯胺基)丙醯胺基)-6-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)己醯胺(233)；(S)-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-6-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-2-PEG24-醯胺基己醯胺(235)；((S)-1-((2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)胺基)-6-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-1-側氧基己-2-基)胺基甲酸 4-((S)-2-((S)-3-甲基-2-PEG24-醯胺基丁醯胺基)丙醯胺基)苄基酯(238)；((S)-1-((2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)胺基)-6-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-1-側氧基己-2-基)胺基甲酸 4-((S)-2-((S)-2-乙醯胺基-3-甲基丁醯胺基)丙醯胺基)苄基酯(239)；(S)-2-胺基-N-(2-(1-(4-((4-胺基-6-丁氧基-2-側氧基-2,3-二氫-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-1-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-3-疊氮基丙醯胺(240)；(S)-2-胺基-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-3-(4-((4-((胺基氧基)甲基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)甲基)苯基)丙醯胺(242)；(S)-2-胺基-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-3-(4-((胺基氧基)甲基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)丙醯胺(244)；(S)-2-胺基-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-3-羥基丙醯胺(245)；(S)-2-胺基-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-3-(4-羥基苯基)丙醯胺(246)；(S)-2-胺基-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-6-(4-((胺基氧基)甲基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺(248)；(S)-N1-(1-((2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)胺基)-6-(2-(胺基氧基)乙醯胺

基)-1-側氧基已-2-基)-N5-(PEG48)-戊二醯胺(251)；(S)-2-PEG8-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-6-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)己醯胺(252)；(S)-N1-(1-((2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)胺基)-6-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-1-側氧基已-2-基)-N5-mPEG4-(PEG4)3-戊二醯胺(253)；(S)-2-PEG4-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-6-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)己醯胺(254)；(S)-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-6-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-2-PEG12-醯胺基己醯胺(255)；(S)-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-6-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-2-PEG37-醯胺基己醯胺(256)；(S)-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-6-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-2-(4-苯基丁醯胺基)己醯胺(257)；(S)-N-(1-(2-(1-(4-((4-胺基-6-丁氧基-2-側氧基-2,3-二氫-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-1-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基胺基)-6-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-1-側氧基已-2-基)油酸醯胺(258)；(S)-N-(1-((2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)胺基)-6-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-1-側氧基已-2-基)辛醯胺(259)；(S)-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-6-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-2-dPEG4-(m-dPEG8)3-醯胺基己醯胺(260)；(S)-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-6-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-2-dPEG4-(m-dPEG12)3-醯胺基己醯胺(261)；(S)-6-胺基-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-2-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)己醯胺(263)；(S)-N-(2-(1-(4-((6-胺基

-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-2-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-6-PEG24-醯胺基己醯胺(265)；(S)-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-2-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-6-PEG8-醯胺基己醯胺(266)；(S)-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-2-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-6-(PEG37)己醯胺(267)；(S)-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-2-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-6-(dPEG4-(m-dPEG8)3)己醯胺(268)；(S)-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-2-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-3-(4-羥基苯基)丙醯胺(269)；(9-(4-((4-(2-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)乙基)六氫吡啶-1-基)甲基)苄基)-2-丁氧基-8-側氧基-8,9-二氫-7H-嘌呤-6-基)胺基甲酸丁酯(272)；N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-3-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)丙醯胺(273)；(S)-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-2-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-3-(4-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-三羥基-6-(羥基甲基)四氫-2H-哌喃-2-基)氧基)苯基)丙醯胺(275)；(R)-6-胺基-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-2-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)己醯胺(278)；(R)-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-2-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-6-PEG24-醯胺基己醯胺(279)；磷酸二氫(S)-4-(3-((2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)胺基)-2-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-3-側氧基丙基)苯基酯(281)；(R)-N1-(6-((2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)胺基)-5-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-6-側

氧基己基)-N5-(dPEG4)-(mPEG8)3-戊二醯胺(282)；(R)-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-2-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-6-(PEG8)醯胺基己醯胺(283)；N-(9-(4-((4-(2-胺基乙基)六氫吡啶-1-基)甲基)苄基)-2-丁氧基-8-側氧基-8,9-二氫-7H-嘌呤-6-基)己醯胺(284)；N-(9-(4-((4-(2-胺基乙基)六氫吡啶-1-基)甲基)苄基)-2-丁氧基-8-側氧基-8,9-二氫-7H-嘌呤-6-基)乙醯胺(285)；N-(9-(4-((4-(2-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)乙基)六氫吡啶-1-基)甲基)苄基)-2-丁氧基-8-側氧基-8,9-二氫-7H-嘌呤-6-基)己醯胺(286)；N-(2-(1-(4-((6-乙醯胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-2-(胺基氧基)乙醯胺(287)；N-(9-(4-((4-(2-(胺基氧基)乙基)六氫吡啶-1-基)甲基)苄基)-2-丁氧基-8-側氧基-8,9-二氫-7H-嘌呤-6-基)乙醯胺(296)；6-胺基-9-(4-((4-(2-(胺基氧基)乙基)六氫吡啶-1-基)甲基)苄基)-2-丁氧基-7H-嘌呤-8(9H)-酮(297)；N-(9-(4-(4,4'-聯六氫吡啶-1-基甲基)苄基)-2-丁氧基-8-側氧基-8,9-二氫-7H-嘌呤-6-基)乙醯胺(299)；N-(9-(4-((1'-(2-(胺基氧基)乙醯基)-4,4'-聯六氫吡啶-1-基)甲基)苄基)-2-丁氧基-8-側氧基-8,9-二氫-7H-嘌呤-6-基)乙醯胺(300)；N-(9-(4-((4-(2-胺基乙基)六氫吡啶-1-基)甲基)苄基)-2-丁氧基-8-側氧基-8,9-二氫-7H-嘌呤-6-基)-3-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)丙烯醯胺(301)；N-(9-(4-((4-(2-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)乙基)六氫吡啶-1-基)甲基)苄基)-2-丁氧基-8-側氧基-8,9-二氫-7H-嘌呤-6-基)-3-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)丙醯胺(302)；N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-1-(胺基氧基)-3,6,9,12-四氧雜十五烷-15-醯胺(303)、或N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7H-嘌呤-9(8H)-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-3-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)丙烯醯胺(304)。

【0009】　在另一態樣中，本揭示案提供式(II)化合物：



(II)

或其醫藥學上可接受之鹽、溶劑合物、立體異構物或互變異構物，其中

A 係 CH 或 N；

X 係 O-R1、NH-R1、S-R1 或 H；

YY 係 H、$-ONH_2$、$-N_3$、-OH、馬來醯亞胺、-COOH 或$-C(=O)CH_2Y1$，其中 Y1 係鹵化物；

L1 及 L2 中之每一者皆獨立地為$(CH_2)_m$、$(CH_2)_mC(=O)$、$(CH_2)_m$-$NH(CH_2)_n$、$(CH_2)_m$-$C(=O)NH(CH_2)_n$、$(CH_2)_m$-$OC(=O)$-NH-$(CH_2)_n$、$(CH_2)_m$-$NHC(=O)$-NH-$(CH_2)_n$、$(CH_2)_m$-NH、$(CH_2)_m$-$NHC(=O)$、$(CH_2)_m$-$NHC(=O)$-$(CH_2)_n$-$NHC(=O)$-$(CH_2)_p$、$C(=O)$-$(CH_2)_n$、伸芳基、經取代之伸芳基、包含 1-3 個雜原子之 5-12 員伸雜芳基、包含 1-3 個雜原子之經取代之 5-12 員伸雜芳基、包含 1-3 個雜原子之 C_3-C_8 雜環或缺失；其中 m、n 及 p 中之每一者皆獨立地為 0 至 6 之整數，其中每一雜原子皆獨立地為 N、O 或 S；

L3 係 C(=O)、-CH(R5)-、$-(AA)_i$-或伸芳基或其組合，或 L3 缺失；其中每一 AA 皆獨立地為胺基酸，其中 i 係 1 至 6 之整數；

R5 係 NH-L4-Y2 或 CH_2-L4-Y2，其中 Y2 係 H 或缺失；

L4 係 C(=O)、C(=O)O-、-OC(=O)-、$-C(CH_2O)_3$-、$-C(CH_2CH_2O)_3$-、$-(AA)_j$-、伸芳基、經取代之伸芳基、C_3-C_8 伸環烷基、經 C_3-C_8 取代之伸環烷基、伸芳基、經取代之伸芳基、包含 1-3 個雜原子之 5-12 員伸雜芳基、包含 1-3 個雜原子之經取代之 5-12 員伸雜芳基、包含 1-3 個雜原子之 5-12 員伸雜環烷基、包含 1-3 個雜原子之經取代之 5-12 員伸雜環烷基、C_1-C_{12} 伸烷基、-O-、-NH-、-S-、經取代之 C_1-C_{12} 伸烷基、$-(CH_2)_s$-$(OCH_2CH_2)_t$-$(CH_2)_u$-、$(CH_2)_s$-$(OCH_2CH_2)_t$-OMe、$-N_3$、

-SH、-OH、-NH_2、-OPO_3H_2、葡萄糖醛酸苷、乙炔或其組合，或 L4 缺失；其中每一 AA 皆獨立地為胺基酸，其中 j 係 1 至 6 之整數，其中 s 及 u 中之每一者皆獨立地為 0 至 12 之整數，其中 t 獨立地為 0 至 48 之整數，其中每一雜原子皆獨立地為 N、O 或 S；

R1 係 H、C_1-C_{12} 烷基、經取代之 C_1-C_{12} 烷基、含氧之 C_1-C_{12} 烷基、C_3-C_8 雜環烷基、經取代之 C_3-C_8 雜環烷基、C_3-C_8 環烷基、經取代之 C_3-C_8 環烷基、經-N_3 末端取代之 C_1-C_{12} 烷基、$(CH_2)_q$-$(OCH_2CH_2)_r$-OMe，其中 q 及 r 中之每一者皆獨立地為 0 至 12 之整數；

R2 係 C_1-C_6 伸烷基、C_1-C_{12} 經取代之伸烷基、C_3-C_8 伸環烷基、C_3-C_8 經取代之伸環烷基、伸芳基、經取代之伸芳基、包含 1-3 個雜原子之 5-12 員伸雜芳基、包含 1-3 個雜原子之經取代之 5-12 員伸雜芳基、包含 1-3 個雜原子之 5-12 員伸雜環烷基、包含 1-3 個雜原子之經取代之 5-12 員伸雜環烷基或 $(OCH_2CH_2)_r$ 或其組合，或 R2 缺失；其中 r 係 1 至 12 之整數，其中每一雜原子皆獨立地為 N、O 或 S；

R3 係 H 或-C(=O)R6、-C(=O)OR6；

R6 係 C_1-C_{12} 烷基、經取代之烷基、經取代之芳基、CH_3-$(CH_2)_s$-$(OCH_2CH_2)_t$-$(CH_2)_u$-，其中 s、t 及 u 中之每一者皆獨立地為 0 至 12 之整數。

【0010】　在一些實施例中，化合物包含 PEG 部分。在一些實施例中，PEG 部分係直鏈的、具支鏈的或多臂的。在一些實施例中，L3 係-CH(R5)-，其中 R5 係 NH-L4-Y2 或 CH_2-L4-Y2，其中 Y2 缺失，其中 L4 包含 $(CH_2)_s$-$(OCH_2CH_2)_t$-OMe，其中 s 係 1 至 12 之整數，其中 t 係 1 至 48 之整數。在一些實施例中，t 係 1 至 12 之整數。在一些實施例中，YY 係-ONH_2、馬來醯亞胺、-COOH 或-C(=O)CH_2Y1，其中 Y1 係鹵化物。在一些實施例中，R2 係 $(CH_2)_m(OCH_2CH_2)_r$，其中 m 及 r 中之每一者皆獨立地為 1 至 12 之整數。在一些

實施例中，PEG 部分具有 0.1 kDa 至 100 kDa 或 1 kDa 至 100 kDa 之分子量。在一些實施例中，PEG 部分具有 0.1 kDa 至 50 kDa 或 1 kDa 至 50 kDa 之分子量。

【0011】　在一些實施例中，本發明提供一種免疫偶聯物，其包含 a)抗體或抗體片段；b)包含與抗體或抗體片段化合物偶聯之 TLR 促效劑，其中 TLR 促效劑包含如技術方案 1 至 21 中任一項之化合物或化合物之衍生物，其中化合物之衍生物直接經由化合物之部分 YY 或經由連接體 XX 與抗體或抗體片段偶聯，其中連接體 XX 係親水連接體、可裂解 連接體或不可裂解連接體。在一些實施例中，連接體 XX 包含伸烷基、伸烯基、伸炔基、聚醚、聚酯、聚醯胺、聚胺基酸、多肽、可裂解肽或胺基苄基胺基甲酸酯或其組合。

【0012】　在一些實施例中，抗體或抗體片段結合至細胞之抗原。在一些實施例中，抗體或抗體片段結合至細胞表面靶標或腫瘤細胞靶標。在一些實施例中，抗體或抗體片段包含 Fc 融合蛋白質。在一些實施例中，抗體或抗體片段係單特異性的、雙特異性的或多特異性的。在一些實施例中，抗體或抗體片段結合至選自由以下組成之群之靶標：HER2、HER3、B7-H3、連接素-4、PD-1、PDL-1、EGFR、TROP2、FOLR1、PSMA、BCMA、FLT3、VEGFR、CTLA-4、EpCAM、MUC1、MUC16、NaPi2b、c-Met、GPC3、ENPP3、TIM-3、VISTA、VEGF、密連蛋白(Claudin) 18.2、FGFR2、FOLR1、STEAP1、間皮素、5T4、CEA、CA9、鈣黏蛋白 6、ROR1、LIV-1、LILRB-1、LRP-1、SLC34A2、SLC39A6、SLC44A4、LY6E、DLL3、ePhA2、TGFbR、PRLR、GPNMB、SLITRK6、SIRPa、CD3、CD19、CD20、CD22、CD24、CD25、CD30、CD33、CD37、CD38、CD44、CD47、CD52、CD56、CD70、CD79b、CD96、CD97、CD99、CD117、CD123、CD179、CD223 及 CD276。在一些實施例中，抗體或抗體片段係抗 HER2 抗體、抗 CD70 抗體或抗 PSMA 抗體或抗 TROP2 抗體或片段。

【0013】　在一些實施例中，抗 HER2 抗體或抗體片段包含 a)選自 SEQ ID

NO:1、2、3、4、16、17 或 18 之重鏈可變區；及 b)選自 SEQ ID NO: 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 之輕鏈可變區。在一些實施例中，抗體或抗體片段包含一或多個 Fc 突變。在一些實施例中，抗體或抗體片段包含一或多種併入重鏈、輕鏈或重鏈及輕鏈二者中之非天然編碼之胺基酸。在一些實施例中，一或多種非天然編碼之胺基酸係對乙醯基苯丙胺酸、對硝基苯丙胺酸、對磺基酪胺酸、對羧基苯丙胺酸、鄰硝基苯丙胺酸、間硝基苯丙胺酸、對硼醯基苯丙胺酸、鄰硼醯基苯丙胺酸、間硼醯基苯丙胺酸、對胺基苯丙胺酸、鄰胺基苯丙胺酸、間胺基苯丙胺酸、對醯基苯丙胺酸、鄰醯基苯丙胺酸、間醯基苯丙胺酸、對-OMe 苯丙胺酸、鄰-OMe 苯丙胺酸、間-OMe 苯丙胺酸、對磺基苯丙胺酸、鄰磺基苯丙胺酸、間磺基苯丙胺酸、5-硝基 His、3-硝基 Tyr、2-硝基 Tyr、硝基取代之 Leu、硝基取代之 His、硝基取代之 De、硝基取代之 Trp、2-硝基 Trp、4-硝基 Trp、5-硝基 Trp、6-硝基 Trp、7-硝基 Trp、3-胺基酪胺酸、2-胺基酪胺酸、O-磺基酪胺酸、2-磺氧基苯丙胺酸、3-磺氧基苯丙胺酸、鄰羧基苯丙胺酸、間羧基苯丙胺酸、對乙醯基-L-苯丙胺酸、對炔丙基-苯丙胺酸、O-甲基-L-酪胺酸、L-3-(2-萘基)丙胺酸、3-甲基-苯丙胺酸、O-4-烯丙基-L-酪胺酸、4-丙基-L-酪胺酸、三-O-乙醯基-GlcNAcβ-絲胺酸、L-多巴、氟化苯丙胺酸、異丙基-L-苯丙胺酸、對疊氮基-L-苯丙胺酸、對醯基-L-苯丙胺酸、對苯甲醯基-L-苯丙胺酸、L-磷酸絲胺酸、膦醯基絲胺酸、膦醯基酪胺酸、對碘-苯丙胺酸、對溴苯丙胺酸、對胺基-L-苯丙胺酸、異丙基-L-苯丙胺酸及對-炔丙氧基-L-苯丙胺酸。在一些實施例中，一或多種非天然編碼之胺基酸係對乙醯基-苯丙胺酸、4-疊氮基-L-苯丙胺酸、對疊氮基乙氧基苯丙胺酸或對疊氮基甲基-苯丙胺酸。在一些實施例中，一或多種非天然編碼之胺基酸係經位點特異性地併入。

【0014】　在一些實施例中，TLR 促效劑係 TLR7 促效劑、TLR8 促效劑或 TLR7/TLR8 雙重促效劑。在一些實施例中，TLR 促效劑包含一或多種 PEG 分子。

【0015】　在一些實施例中，一或多種 PEG 分子係直鏈的、具支鏈的、多臂的。在一些實施例中，一或多種 PEG 分子介於 0.1 kDa 與 100 kDa 之間。在一些實施例中，一或多種 PEG 分子介於 0.1 kDa 與 50 kDa 之間。

【0016】　在一些實施例中，連接體係雙官能或多官能連接體。在一些實施例中，連接體與一或多種併入抗體或抗體片段中之非天然編碼之胺基酸偶聯。在一些實施例中，連接體係親水連接體、可裂解連接體或不可裂解連接體。

【0017】　在一個實施例中，本發明提供治療患有疾病或疾患之個體或患者之方法，其包括向個體或患者投與治療有效量之式(I)或式(II)之偶聯物。在一些實施例中，疾病或疾患係自體免疫疾病、慢性炎性疾病或癌症。在一些實施例中，癌症係乳癌、小細胞肺癌、卵巢癌、前列腺癌、胃癌、胃腸胰臟腫瘤、子宮頸癌、食道癌、結腸癌、結腸直腸癌、上皮來源之癌症或腫瘤、腎癌、腦癌、神經膠質母細胞瘤、胰臟癌、骨髓性白血病、甲狀腺癌、子宮內膜癌、淋巴瘤、胰臟癌、頭頸癌或皮膚癌。在一些實施例中，治療方法進一步包括投與額外治療劑。在一些實施例中，額外治療劑係化學治療劑、激素劑、抗腫瘤劑、免疫刺激劑、免疫調節劑、免疫治療劑或其組合。

【0018】　在一些實施例中，本揭示案提供醫藥組成物，其包含治療有效量之上述免疫偶聯物及醫藥學上可接受之載劑或賦形劑。在一些實施例中，本揭示案提供用作藥劑之包含上述化合物或上述免疫偶聯物之醫藥組成物。在一些實施例中，本揭示案提供上述免疫偶聯物在製備藥劑中之用途。

【0019】　本發明提供抑制或減緩腫瘤或癌症生長之方法，其包括使腫瘤與有效量之本發明之 TC 接觸以刺激患者之鄰近腫瘤之免疫系統。本發明提供抑制或減緩腫瘤或癌症之生長之方法，其包括使腫瘤與有效量之聚乙二醇化 TC、或本發明之 TC 之穩定二聚物或多聚物接觸。在一個實施例中，TC 係非聚乙二醇化的或單聚乙二醇化的。在一個實施例中，TC 係二聚乙二醇化的。在一個實施例

中，TC 具有超過一種及/或不同的附著至其上之 TLR 促效劑分子。在一個實施例中，TC 具有超過一種及/或相同的附著至其上之 TLR 促效劑分子。本發明之另一實施例提供使用本發明之 TC 調節對腫瘤細胞之免疫反應之方法。在某些實施例中，將 TC 與至少一種化學治療劑及/或至少一種免疫治療劑共投與。化學治療劑可選自由以下組成之群：替莫唑胺(temozolomide)、吉西他濱(gemictabine)、多柔比星(doxorubicin)、環磷醯胺、太平洋紫杉醇(paclitaxel)、順鉑、氟嘧啶、紫杉烷(taxane)、蒽環類抗生素(anthracycline)、拉帕替尼(lapatinib)、卡培他濱(capecitabine)、來曲唑(letrozole)、帕妥珠單抗(pertuzumab)、多西他賽(docetaxel)、IFN-α。在本發明之另一實施例中，將 TC 與至少一種化學治療劑和/或至少一種免疫治療劑共投與。

【0020】　在一些實施例中，TC 包含靶向多肽，包括但不限於包含一或多個非天然編碼胺基酸之抗原結合多肽(ABP)。在一些實施例中，ABP 包含完整抗體重鏈。在一些實施例中，ABP 包含完整抗體輕鏈。在一些實施例中，ABP 包含抗體輕鏈之可變區。在一些實施例中，ABP 包含抗體重鏈之可變區。在一些實施例中，ABP 包含抗體輕鏈之至少一個 CDR。在一些實施例中，ABP 包含抗體重鏈之至少一個 CDR。在一些實施例中，ABP 包含輕鏈之至少一個 CDR 及重鏈之至少一個 CDR。在一些實施例中，ABP 包含一個 Fab。在一些實施例中，ABP 包含兩個或更多個 Fab。在一些實施例中，ABP 包含一個(Fab')2。在一些實施例中，ABP 包含兩個或更多個(Fab')2。在一些實施例中，ABP 包含一個 scFv。在一些實施例中，ABP 包含兩個或更多個 scFv。在一些實施例中，ABP 包含一種微小抗體(minibody)。在一些實施例中，ABP 包含兩種或更多種微小抗體。在一些實施例中，ABP 包含一種雙鏈抗體(diabody)。在一些實施例中，ABP 包含兩種或更多種雙鏈抗體。在一些實施例中，ABP 包含輕鏈之可變區及重鏈之可變區。在一些實施例中，ABP 包含完整輕鏈及完整重鏈。在一些實施例中，ABP

包含一或多個 Fc 結構域或其部分。在一些實施例中，ABP 包含任何上述實施例之組合。在一些實施例中，ABP 包含任何上述實施例之同二聚物、異二聚物、同多聚物或異多聚物。在一些實施例中，ABP 包含結合至結合配偶體之多肽，其中結合配偶體包含抗原、多肽、核酸分子、聚合物或另一分子或物質。在一些實施例中，ABP 與非抗體支架分子或物質締合。在一些實施例中，抗原係腫瘤抗原。

【0021】 Toll 樣受體(TLR)偵測寬範圍之保守病原體相關分子模式(PAMP)。其在感測入侵病原體及隨後起始先天免疫反應方面發揮重要作用。人類有 10 個已知的 TLR 家族成員，其係特徵在於細胞外富含白胺酸之結構域及含有保守 Toll/介白素(IL)-1 受體(TIR)結構域之細胞質尾部的 I 型跨膜蛋白質。在該家族內，TLR3、TLR7、TLR8 及 TLR9 位於內體內。TLR7 及 TLR8 可藉由結合至特異性小分子配位體(即 TLR7 促效劑或 TLR8 促效劑)或其天然配位體(亦即單鏈 RNA、ssRNA)而被活化。在促效劑結合至 TLR7 或 TLR8 後，鹼信呈二聚形式之受體經歷結構變化，導致隨後在其細胞質結構域處募集銜接蛋白，包括骨髓樣分化初級反應基因 88 (MyD88)。在經由 MyD88 途徑起始受體信號傳導級聯後，諸如干擾素調節因子 7 (IRF-7)及核因子 κB (NF-κB)等細胞質轉錄因子受到活化。接著該等轉錄因子易位至細胞核且起始各種基因(例如，IFN-α 及其他抗病毒細胞介素基因)之轉錄。TLR7 主要在漿細胞樣細胞及 B 細胞上表現。免疫細胞之改變反應性可能有助於降低癌症患者之先天免疫反應。因此，與諸如抗體或其片段等靶向部分偶聯之 TLR7 及/或 TLR8 之經促效劑誘導的活化可代表用於癌症之新穎方法。用包含 TLR7 或 TLR8 促效劑之 TC 進行治療代表提供更大功效與更佳耐受性之有前景之解決方案。用於本發明中以製備 TC 之適宜 TLR7 及/或 TLR8 促效劑見於以下美國專利中：美國專利第 6,825,350 號；美國專利第 6,656,389 號；美國專利第 6,656,398 號；美國專利第 6,683,088 號；美國

專利第 6,756,382 號；美國專利第 6,825,350 號；美國專利第 6,667,312 號；美國專利第 6,677,347 號；美國專利第 7,598,382 號；美國專利第 8,673,932 號，該等美國專利中之每一者皆以引用方式併入本文中。

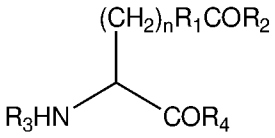
【0022】　在一些實施例中，TC 包含靶向多肽，該靶向多肽進一步包含胺基酸取代、添加或缺失，當與無取代、添加或缺失之對應野生型 TC 之相容性比較時，該胺基酸取代、添加或缺失增加了 TC 多肽與醫藥防腐劑(例如，間甲酚、苯酚、苯甲醇)之相容性。該增加之相容性將使得能夠製備在儲存期間維持蛋白質之生理化學性質及生物活性的經保存之醫藥調配物。

【0023】　在一些實施例中，利用一或多種非天然胺基酸產生一個或多個經工程改造之鍵。分子內鍵可以多種方式產生，包括但不限於蛋白質中兩種胺基酸之間在適宜條件下之反應(一或兩種胺基酸可為非天然胺基酸)；兩種胺基酸與連接體、聚合物或另一分子在適宜條件下之反應，每一胺基酸可為天然編碼的或非天然編碼的；等。

【0024】　在一些實施例中，TC 多肽中之一或多個胺基酸取代可利用一或多種天然存在或非天然存在之胺基酸進行。在一些實施例中，TC 中之胺基酸取代可利用天然存在或非天然存在之胺基酸進行，條件係至少一個取代係利用非天然編碼之胺基酸進行。在一些實施例中，TC 多肽中之一或多個胺基酸取代可利用一或多種天然存在之胺基酸進行，且另外至少一個取代係利用非天然編碼之胺基酸進行。在一些實施例中，TC 多肽可為抗體或抗體片段。在一些實施例中，TC 多肽可為腫瘤靶向多肽。

【0025】　在一些實施例中，非天然編碼之胺基酸包含羰基、乙醯基、胺基氧基、肼基、醯肼基、胺基脲基、疊氮基或炔基。

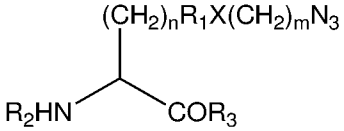
【0026】　在一些實施例中，非天然編碼之胺基酸包含羰基。在一些實施例中，非天然編碼之胺基酸具有以下結構：



其中 n 係 0-10；R_1 係烷基、芳基、經取代之烷基或經取代之芳基；R_2 係 H、烷基、芳基、經取代之烷基及經取代之芳基；且 R_3 係 H、胺基酸、多肽或胺基末端修飾基團，且 R_4 係 H、胺基酸、多肽或羧基末端修飾基團。

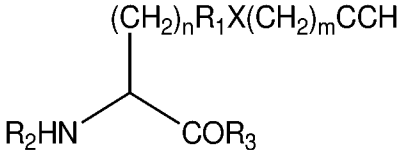
【0027】　在一些實施例中，非天然編碼之胺基酸包含胺基氧基。在一些實施例中，非天然編碼之胺基酸包含醯肼基。在一些實施例中，非天然編碼之胺基酸包含肼基。在一些實施例中，非天然編碼之胺基酸殘基包含胺基脲基。

【0028】　在一些實施例中，非天然編碼之胺基酸殘基包含疊氮基。在一些實施例中，非天然編碼之胺基酸具有以下結構：



其中 n 係 0-10；R_1 係烷基、芳基、經取代之烷基、經取代之芳基或不存在；X 係 O、N、S 或不存在；m 係 0-10；R_2 係 H、胺基酸、多肽或胺基末端修飾基團，且 R_3 係 H、胺基酸、多肽或羧基末端修飾基團。

【0029】　在一些實施例中，非天然編碼之胺基酸包含炔基。在一些實施例中，非天然編碼之胺基酸具有以下結構：



其中 n 係 0-10；R_1 係烷基、芳基、經取代之烷基或經取代之芳基；X 係 O、N、S 或不存在；m 係 0-10，R_2 係 H、胺基酸、多肽或胺基末端修飾基團，且 R_3 係 H、胺基酸、多肽或羧基末端修飾基團。

【0030】　在一些實施例中，多肽係包含連接至水溶性聚合物之非天然編碼之胺基酸的 TC。在一些實施例中，水溶性聚合物包含聚(乙二醇)部分。在一些實施例中，TC 包含非天然編碼之胺基酸及一或多種轉譯後修飾、連接體、聚合物

或生物活性分子。

【0031】 本發明亦提供包含編碼 TC 之靶向多肽之多核苷酸的分離核酸，且本發明提供包含在嚴格條件下與多核苷酸雜交之多核苷酸之分離核酸。本發明亦提供包含編碼靶向多肽之多核苷酸之分離核酸，其中多核苷酸包含至少一個選擇密碼子(selector codon)。熟習此項技術者容易明瞭，大量不同的多核苷酸可編碼本發明之任一多肽。

【0032】 在一些實施例中，選擇密碼子係選自由以下組成之群：琥珀密碼子、赭石密碼子、蛋白石密碼子(opal codon)、獨特密碼子、稀有密碼子、五鹼基密碼子及四鹼基密碼子。

【0033】 本發明亦提供製備連接至水溶性聚合物或連接至一或多種 TC 多肽以形成同二聚物或同多聚物之 TC 多肽之方法。在一些實施例中，該方法包括使包含非天然編碼之胺基酸之經分離 TC 多肽與包含與非天然編碼之胺基酸反應之部分的水溶性聚合物或連接體接觸。在一些實施例中，併入 TC 多肽中之非天然編碼之胺基酸對原本對 20 種常見胺基酸中之任一種無反應性之水溶性聚合物或連接體具有反應性。在一些實施例中，併入 TC 多肽中之非天然編碼之胺基酸對原本對 20 種常見胺基酸中之任一種無反應性之連接體、聚合物或生物活性分子具有反應性。

【0034】 在一些實施例中，藉由使包含含羰基之胺基酸之 TC 多肽與包含胺基氧基、肼基、醯肼基或胺基脲基之聚(乙二醇)分子或連接體反應來製備連接至水溶性聚合物或連接體之 TC 多肽。在一些實施例中，胺基氧基、肼基、醯肼基或胺基脲基藉助醯胺鍵聯連接至聚(乙二醇)分子或連接體。在一些實施例中，胺基氧基、肼基、醯肼基或胺基脲基藉助胺基甲酸酯鍵聯連接至聚(乙二醇)分子或連接體。

【0035】 在一些實施例中，藉由使包含羰基之聚(乙二醇)分子或連接體與包含

包括胺基氧基、肼基、醯肼基或胺基脲基之非天然編碼之 胺基酸的多肽反應來製備連接至水溶性聚合物之 TC 多肽。

【0036】 在一些實施例中，藉由使包含含炔烴之胺基酸之 TC 與包含疊氮化物部分之聚(乙二醇)分子反應來製備連接至水溶性聚合物或連接體之 TC 多肽。在一些實施例中，疊氮基或炔基藉助醯胺鍵聯連接至聚(乙二醇)分子或連接體。

【0037】 在一些實施例中，藉由使包含含疊氮化物之胺基酸之 TC 多肽與包含炔烴部分之聚(乙二醇)分子反應來製備連接至水溶性聚合物或連接體之 TC 多肽。在一些實施例中，疊氮基或炔基藉助醯胺鍵聯連接至聚(乙二醇)分子或連接體。

【0038】 在一些實施例中，聚(乙二醇)分子或連接體具有介於約 0.1 kDa 與約 100 kDa 之間之分子量。在一些實施例中，聚(乙二醇)分子或連接體具有介於 0.1 kDa 與 50 kDa 之間之分子量。在一些實施例中，聚(乙二醇)分子或連接體係具支鏈聚合物或具支鏈連接體。在一些實施例中，聚(乙二醇)支鏈聚合物或支鏈連接體之每一支鏈皆具有介於 1 kDa 與 100 kDa 之間或介於 1 kDa 與 50 kDa 之間之分子量。

【0039】 在一些實施例中，連接至 TC 多肽之水溶性聚合物包含聚伸烷基二醇部分。在一些實施例中，併入 TC 中之非天然編碼之胺基酸殘基包含羰基、胺基氧基、醯肼基、肼基、胺基脲基、疊氮基或炔基。在一些實施例中，併入 TC 多肽中之非天然編碼之胺基酸殘基包含羰基部分且水溶性聚合物包含胺基氧基、醯肼、肼或胺基脲部分。在一些實施例中，併入 TC 多肽中之非天然編碼之胺基酸殘基包含炔烴部分且水溶性聚合物包含疊氮化物部分。在一些實施例中，併入 TC 多肽中之非天然編碼之胺基酸殘基包含疊氮化物部分且水溶性聚合物包含炔烴部分。本發明亦提供包含含有非天然編碼之胺基酸之 TC 多肽及醫藥學上可接受之載劑之組成物。在一些實施例中，非天然編碼之胺基酸連接至水溶性

聚合物。

【0040】 本發明亦提供包含編碼 TC 之靶向多肽之多核苷酸之細胞，該多核苷酸包含選擇密碼子。在一些實施例中，細胞包含正交 RNA 合成酶及/或用於將非天然編碼之胺基酸替換至 TC 之靶向多肽中之正交 tRNA。

【0041】 本發明亦提供製備包含非天然編碼之胺基酸之 TC 之靶向多肽的方法。在一些實施例中，該等方法包括在容許 TC 之靶向多肽或其變異體表現之條件下培養包含編碼 TC 之靶向多肽之一或多種多核苷酸、正交 RNA 合成酶及/或正交 tRNA 之細胞；自該等細胞及/或培養基中純化 TC 多肽。

【0042】 本發明亦提供增加 TC 之治療半衰期、血清半衰期或循環時間之方法。本發明亦提供調節 TC 之免疫原性之方法。在一些實施例中，該等方法包括用非天然編碼之胺基酸取代 TC 之天然存在之靶向多肽中之任一或多種胺基酸及/或將靶向多肽連接至連接體、聚合物、水溶性聚合物或生物活性分子。

【0043】 本發明亦提供用有效量之本發明之 TC 分子治療需要該治療之患者之方法。在一些實施例中，該等方法包括向患者投與治療有效量之醫藥組成物，該醫藥組成物包含含有非天然編碼之胺基酸之 TC 及醫藥學上可接受之載劑。在一些實施例中，非天然編碼之胺基酸連接至水溶性聚合物。在一些實施例中，TC 係糖基化的。在一些實施例中，TC 不是糖基化的。

【0044】 本發明亦提供包含藉由共價鍵於單一胺基酸處連接至 TC 之水溶性聚合物或連接體之 TC。在一些實施例中，水溶性聚合物包含聚(乙二醇)部分。在一些實施例中，共價連接至水溶性聚合物或連接體之胺基酸係存在於 TC 之靶向多肽中之非天然編碼的胺基酸。

【0045】 本發明提供包含至少一種連接體、聚合物或生物活性分子之 TC 多肽，其中該連接體、聚合物或生物活性分子藉助經核糖體併入 TC 之靶向多肽中之非天然編碼胺基酸的官能基附著至多肽。在 TC 偶聯物中，PEG 或另一水溶性

聚合物、另一 TC、多肽或生物活性分子可經由連接體直接與 TC 偶聯。在一個實施例中，連接體足夠長以容許撓性且容許二聚物形成。在一個實施例中，連接體之長度為至少 3 個胺基酸或 18 個原子以容許形成二聚物。在一些實施例中，多肽連接至連接體以容許形成多聚物。在一些實施例中，連接體係雙官能連接體。在一些實施例中，本發明之組成物及/或 TC 可包含多種連接體。在其他實施例中，每一連接體可包括一或多種附著之化合物。連接體亦可包含一或多個伸烷基、伸烯基、伸炔基、聚醚、聚酯、聚醯胺基團，亦及聚胺基酸、多肽、可裂解肽或胺基苄基胺基甲酸酯。在一些實施例中，連接體可為相同或不同的連接體。適宜連接體包括例如可裂解連接體及不可裂解連接體。適宜可裂解連接體包括例如可由細胞內蛋白酶(諸如溶酶體蛋白酶或內體蛋白酶)裂解之肽連接體。可裂解連接體可包含纈胺酸-瓜胺酸(Val-Cit)連接體或纈胺酸-丙胺酸(Val-Ala)肽或纈胺酸-離胺酸(Val-Lys)或纈胺酸-精胺酸(Vla-Arg)，或 Val-Cit、Val-Ala、Val-Lys 或 Val-Arg 中任一者之類似物。在一些實施例中，連接體可為二肽連接體，諸如纈胺酸-瓜胺酸或苯丙胺酸-離胺酸連接體。含有纈胺酸-瓜胺酸或纈胺酸-丙胺酸之連接體可含有馬來醯亞胺或琥珀醯亞胺基團。含有纈胺酸-瓜胺酸或纈胺酸-丙胺酸之連接體可含有對胺基苯甲醇(PABA)基團或對胺基苄基胺基甲酸酯(PABC)。其他適宜連接體包括可在小於 5.5 之 pH 下水解之連接體，諸如腙連接體。額外適宜可裂解連接體包括二硫化物連接體。在一些實施例中，可裂解連接體可包括於腫瘤微環境(諸如腫瘤浸潤性 T 細胞)處裂解之連接體。在一些實施例中，不可裂解連接體包括但不限於馬來醯亞胺基己醯基連接體。馬來醯亞胺基己醯基連接體可包含 N-馬來醯亞胺基甲基環己烷-1-甲酸酯、琥珀醯亞胺基團、五氟苯基及/或一或多種 PEG 分子，但不限於此。在一些實施例中，本發明之組成物、化合物或其鹽中之任一者可藉由連接體之方式連接至多肽。在一些實施例中，本文表 3、4、5、6 及 7 中所揭示化合物或其鹽中之任

一者可藉由連接體之方式連接至多肽。在一些實施例中，多肽係靶向多肽或生物靶向多肽或腫瘤靶向多肽。在一些實施例中，靶向多肽係抗體或抗體片段。

【0046】　在一些實施例中，TC 多肽係單 PEG 化的。本發明亦提供包含附著至一或多種非天然編碼之胺基酸之連接體、聚合物或生物活性分子之 TC，其中該非天然編碼之胺基酸係於預選位點處經核糖體併入多肽中。

【0047】　在一些實施例中，本發明提供包含一或多種併入了一或多種非天然編碼之胺基酸之靶向多肽的組成物，其中至少一種多肽經由共價鍵結至多肽之非天然編碼之胺基酸之連接體連接至 TLR 促效劑分子。

【0048】　在另一實施例中，本發明提供一種組成物，其中一或多種靶向多肽係相同或不同的靶向多肽。在另一實施例中，本發明提供一種組成物，其中一或多種靶向多肽結合至細胞表面靶標、或腫瘤細胞靶標、或癌細胞靶標。在另一實施例中，一或多種靶向多肽係單特異性、雙特異性或多特異性的靶向多肽。

【0049】　在其他實施例中，單特異性、雙特異性或多特異性的靶向多肽包含藥物偶聯物或檢查點抑制劑。涵蓋用於與本發明之組成物或 TC 一起使用之任一適宜免疫檢查點抑制劑。在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑降低一或多種免疫檢查點蛋白質之表現或活性。在另一實施例中，免疫檢查點抑制劑降低一或多種免疫檢查點蛋白質與其配位體之間之相互作用。降低免疫檢查點分子之表現及/或活性之抑制性核酸亦可用於本發明中。在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑係 CTLA4、TIGIT、糖皮質激素誘導之 TNFR 相關蛋白(GITR)、誘導型 T 細胞共刺激(ICOS)、CD96、脊髓灰白質炎病毒受體相關 2 (PVRL2)、PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG-3、B7-H4、殺傷免疫球蛋白受體(KIR)、OX40、OX40-L 吲哚胺 2,3-二氧酶 1 (IDO-1)、吲哚胺 2,3-二氧酶 2 (IDO-2)、CEACAM1、CD272、TEVI3、腺苷 A2A 受體及 VISTA 蛋白。在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑係 CTLA4、PD-1 或 PD-L1 之抑制劑。

【0050】 在另一實施例中，靶向多肽包含抗體或抗體片段。在其他實施例中，靶向多肽係結合至細胞之抗原之抗體或抗體片段。在另一實施例中，靶向多肽係結合至選自由以下組成之群之靶標的抗體或抗體片段：HER2、HER3、PD-1、PDL-1、EGFR、TROP2、PSMA、VEGFR、CTLA-4、EpCAM、MUC1、MUC16、c-met、GPC3、ENPP3、TIM-1、FOLR1、STEAP1、間皮素、5T4、CEA、CA9、鈣黏蛋白 6、ROR1、SLC34A2、SLC39A6、SLC44A4、LY6E、DLL3、ePhA2、GPNMB、SLITRK6、CD3、CD19、CD22、CD24、CD25、CD30、CD33、CD38、CD44、CD47、CD52、CD56、CD70、CD96、CD97、CD99、CD117、CD123、CD179、CD223 及 CD276。在一些實施例中，靶向多肽包含結合至 HER2 之抗體或抗體片段。在另一實施例中，靶向多肽係曲妥珠單抗(trastuzumab)。

【0051】 在另一實施例中，抗體或抗體片段包含 IgG、Fab、(Fab')2、Fv 或單鏈 Fv (scFv)。在一些實施例中，抗體或抗體片段包含一或多個欽 Fab、(Fab')2、Fv 或單鏈 Fv (scFv)突變。在一些實施例中，抗體或抗體片段包含一或多個 Fc 突變。在其他實施例中，抗體或抗體片段包含一至六個 Fc 突變。在一些實施例中，抗體或抗體片段包含兩個或更多個 Fc 突變。在其他實施例中，抗體或抗體片段包含三個或更多個 Fc 突變。在一些實施例中，抗體或抗體片段包含四個或更多個 Fc 突變。在其他實施例中，抗體或抗體片段包含五個或更多個 Fc 突變。在其他實施例中，抗體或抗體片段包含六個 Fc 突變。

【0052】 在另一實施例中，抗體或抗體片段包含併入重鏈、輕鏈或重鏈及輕鏈二者中之一或多種非天然編碼之胺基酸。在另一實施例中，抗體或抗體片段包含併入重鏈及輕鏈中之一或多種非天然編碼之胺基酸。在另一實施例中，抗體或抗體片段包含併入重鏈、輕鏈或重鏈及輕鏈二者中之一或多種非天然編碼之胺基酸且進一步包含一或多種 Fc 突變。在另一實施例中，抗體或抗體片段包含併入重鏈及輕鏈中之每一者中之一或多種非天然編碼之胺基酸，該抗體或抗

體片段進一步包含一或多個 Fc 突變。在另一實施例中，抗體或抗體片段包含併入重鏈、輕鏈或重鏈及輕鏈二者中之一或多種非天然編碼之胺基酸且進一步包含至少兩個 Fc 突變。在另一實施例中，抗體或抗體片段包含併入重鏈及輕鏈中之每一者中之一或多種非天然編碼之胺基酸，該抗體或抗體片段進一步包含至少兩個 Fc 突變。在另一實施例中，抗體或抗體片段包含併入重鏈、輕鏈或重鏈及輕鏈二者中之一或多種非天然編碼之胺基酸且進一步包含至少三個 Fc 突變。在另一實施例中，抗體或抗體片段包含併入重鏈及輕鏈中之每一者中之一或多種非天然編碼之胺基酸，該抗體或抗體片段進一步包含至少三個 Fc 突變。在另一實施例中，抗體或抗體片段包含併入重鏈、輕鏈或重鏈及輕鏈二者中之一或多種非天然編碼之胺基酸且進一步包含至少四個 Fc 突變。在另一實施例中，抗體或抗體片段包含併入重鏈及輕鏈中之每一者中之一或多種非天然編碼之胺基酸，該抗體或抗體片段進一步包含至少四個 Fc 突變。在另一實施例中，抗體或抗體片段包含併入重鏈、輕鏈或重鏈及輕鏈二者中之一或多種非天然編碼之胺基酸且進一步包含至少五個 Fc 突變。在另一實施例中，抗體或抗體片段包含併入重鏈及輕鏈中之每一者中之一或多種非天然編碼之胺基酸，該抗體或抗體片段進一步包含至少五個 Fc 突變。在另一實施例中，抗體或抗體片段包含併入重鏈、輕鏈或重鏈及輕鏈二者中之一或多種非天然編碼之胺基酸且進一步包含至少六個 Fc 突變。在另一實施例中，抗體或抗體片段包含併入重鏈及輕鏈中之每一者中之一或多種非天然編碼之胺基酸，該抗體或抗體片段進一步包含至少六個 Fc 突變。

【0053】　在另一實施例中，靶向多肽包含一或多種選自以下之群之非天然編碼之胺基酸：對乙醯基苯丙胺酸、*對*硝基苯丙胺酸、*對*磺基酪胺酸、*對*羧基苯丙胺酸、鄰硝基苯丙胺酸、間硝基苯丙胺酸、*對*硼醯基苯丙胺酸、鄰硼醯基苯丙胺酸、間硼醯基苯丙胺酸、*對*胺基苯丙胺酸、鄰胺基苯丙胺酸、間胺基苯丙

胺酸、鄰醯基苯丙胺酸、間醯基苯丙胺酸、*對* OMe 苯丙胺酸、鄰 OMe 苯丙胺酸、間 OMe 苯丙胺酸、*對*磺基苯丙胺酸、鄰磺基苯丙胺酸、間磺基苯丙胺酸、5-硝基 His、3-硝基 Tyr、2-硝基 Tyr、硝基取代之 Leu、硝基取代之 His、硝基取代之 De、硝基取代之 Trp、2-硝基 Trp、4-硝基 Trp、5-硝基 Trp、6-硝基 Trp、7-硝基 Trp、3-胺基酪胺酸、2-胺基酪胺酸、O-磺基酪胺酸、2-磺氧基苯丙胺酸、3-磺氧基苯丙胺酸、鄰羧基苯丙胺酸、間羧基苯丙胺酸、*對*乙醯基-L-苯丙胺酸、*對*炔丙基-苯丙胺酸、O-甲基-L-酪胺酸、L-3-(2-萘基)丙胺酸、3-甲基-苯丙胺酸、O-4-烯丙基-L-酪胺酸、4-丙基-L-酪胺酸、三-O-乙醯基-GlcNAcβ-絲胺酸、L-多巴、氟化苯丙胺酸、異丙基-L-苯丙胺酸、*對*疊氮基-L-苯丙胺酸、*對*醯基-L-苯丙胺酸、*對*苯甲醯基-L-苯丙胺酸、L-磷酸絲胺酸、膦醯基絲胺酸、膦醯基酪胺酸、*對*碘-苯丙胺酸、*對*溴苯丙胺酸、*對*胺基-L-苯丙胺酸、*對*炔丙氧基-L-苯丙胺酸、4-疊氮基-L-苯丙胺酸、對疊氮基乙氧基苯丙胺酸及對疊氮基甲基-苯丙胺酸。在另一實施例中，非天然胺基酸係選自由對乙醯基-苯丙胺酸、4-疊氮基-L-苯丙胺酸、對疊氮基乙氧基苯丙胺酸或對疊氮基甲基-苯丙胺酸組成之群。在其他實施例中，將非天然編碼之胺基酸位點特異性地併入一種或多種靶向多肽中。

【0054】　在另一實施例中，TLR 促效劑係 TLR7 促效劑、TLR8 促效劑或 TLR7/TLR8 雙重促效劑。在其他實施例中，TLR 促效劑係包含根據圖 1 之式(I)或式(II)之分子結構之 TLR 促效劑。在另一實施例中，TLR 促效劑係選自根據本發明之表 3、4、5、6、7 之結構之群之 TLR 促效劑中的任一種。

【0055】　在其他實施例中，靶向多肽與一或多種連接體、聚合物或生物活性分子偶聯。在一些實施例中，靶向多肽直接或間接與一或種連接體、聚合物或生物活性分子偶聯。在一些實施例中，一或多種連接體係可裂解或不可裂解連接體。

【0056】　在一些實施例中，一或多種連接體係 0.1 kDa 至 50 kDa。在其他實

施例中，一或多種連接體係 0.1 kDa 至 10 kDa。在其他實施例中，一或多種連接體或聚合物係直鏈的、具支鏈的、多聚的或樹枝狀的。在另一實施例中，一或多種連接體或聚合物係雙官能或多官能連接體或雙官能或多官能聚合物。

【0057】 在其他實施例中，一或多種聚合物係水溶性聚合物。在其他實施例中，水溶性聚合物係聚乙二醇(PEG)。在一些實施例中，PEG 具有介於 0.1 kDa 與 100 kDa 之間之分子量。在其他實施例中，PEG 具有介於 0.1 kDa 與 50 kDa 之間之分子量。在其他實施例中，PEG 具有介於 0.1 kDa 與 40 kDa 之間之分子量。在其他實施例中，PEG 具有介於 0.1 kDa 與 30 kDa 之間之分子量。在其他實施例中，PEG 具有介於 0.1 kDa 與 20 kDa 之間之分子量。在其他實施例中，PEG 具有介於 0.1 kDa 與 10 kDa 之間之分子量。在一些實施例中，聚(乙二醇)分子具有介於約 0.1 kDa 與約 100 kDa 之間之分子量。在一些實施例中，聚(乙二醇)分子具有介於 0.1 kDa 與 50 kDa 之間之分子量。在一些實施例中，聚(乙二醇)具有介於 1 kDa 與 25 kDa 之間、或介於 2 kDa 與 22 kDa 之間或介於 5 kDa 與 20 kDa 之間之分子量。舉例而言，聚(乙二醇)聚合物之分子量可為約 5 kDa、或約 10 kDa、或約 20 kDa 或約 30 kDa。舉例而言，聚(乙二醇)聚合物之分子量可為 5 kDa 或 10 kDa 或 20 kDa 或 30 kDa。在一些實施例中，聚(乙二醇)分子係具支鏈 PEG。在一些實施例中，聚(乙二醇)分子係具支鏈 5 K PEG。在一些實施例中，聚(乙二醇)分子係具支鏈 10 K PEG。在一些實施例中，聚(乙二醇)分子係具支鏈 20 K PEG。在一些實施例中，聚(乙二醇)分子係直鏈 PEG。在一些實施例中，聚(乙二醇)分子係直鏈 5 K PEG。在一些實施例中，聚(乙二醇)分子係直鏈 10 K PEG。在一些實施例中，聚(乙二醇)分子係直鏈 20 K PEG。在一些實施例中，聚(乙二醇)分子係直鏈 30 K PEG。在一些實施例中，聚(乙二醇)聚合物之分子量係平均分子量。在某些實施例中，平均分子量係數均分子量(Mn)。可使用 GPC 或 SEC、SDS/PAGE 分析、RP-HPLC、質譜或毛細管電泳來確定或量測平均分子量。

【0058】 在另一實施例中，至少一種連接體、聚合物或生物活性分子連接至至少一種非天然編碼之胺基酸。在一些實施例中，連接體係 PEG。在其他實施例中，連接體係分子量介於 0.1 kDa 與 50 kDa 之間之 PEG。在其他實施例中，連接體係分子量介於 0.1 kDa 與 40 kDa 之間之 PEG。在其他實施例中，連接體係分子量介於 0.1 kDa 與 30 kDa 之間之 PEG。在其他實施例中，連接體係分子量介於 0.1 kDa 與 20 kDa 之間之 PEG。在其他實施例中，連接體係分子量介於 0.1 kDa 與 10 kDa 之間之 PEG。在其他實施例中，連接體係分子量介於 0.1 kDa 與 5 kDa 之間之 PEG。

【0059】 在另一實施例中，靶向多肽包含一或多個增加組成物之穩定性或溶解性之胺基酸取代、添加或缺失。在另一實施例中，靶向多肽包含一或多個增強/降低 ADCP 或 ADCC 活性之胺基酸取代、添加或缺失。在另一實施例中，靶向多肽包含一或多個增加組成物之藥物動力學之胺基酸取代、添加或缺失。在其他實施例中，該組成物包含一個或多個增加靶向多肽在重組或體外合成之宿主細胞中表達之胺基酸取代、添加或缺失。

【0060】 在另一實施例中，非天然編碼之胺基酸對原本對多肽中 20 種常見胺基酸中之任一種無反應性之連接體、聚合物或生物活性分子具有反應性。在另一實施例中，非天然編碼之胺基酸包含羰基、胺基氧基、肼基、醯肼基、胺基脲基、疊氮基或炔基。在其他實施例中，非天然編碼之胺基酸包含羰基。

【0061】 在另一實施例中，靶向多肽連接至細胞毒劑或免疫刺激劑。在另一實施例中，本發明之 TC 或 BTC 連接至細胞毒劑或免疫刺激劑。在另一實施例中，靶向多肽包含細胞毒劑或免疫刺激劑。在另一實施例中，本發明之 TC 或 BTC 包含細胞毒劑或免疫刺激劑。

【0062】 在另一實施例中，本發明提供包含與 TLR 促效劑偶聯之抗 HER2 抗體或抗體片段之 TLR 促效劑偶聯物(TC)，該 TLR 促效劑包含根據圖 1 之任一結

構之結構，其中該 TLR 促效劑經由共價鍵結至一或多種併入抗體或抗體片段中之非天然編碼之胺基酸的連接體與抗體或抗體片段偶聯。在另一實施例中，TLR 促效劑係 TLR7 促效劑、TLR8 促效劑或 TLR7/TLR8 雙重促效劑。在另一實施例中，TLR 促效劑包含根據圖 1 之式 I 或式 II 之結構。在另一實施例中，TLR 促效劑包含根據式 I 或式 II 之結構，該結構進一步包含連接體。

【0063】　在另一實施例中，抗 HER2 抗體或抗體片段包含併入重鏈、輕鏈或重鏈及輕鏈二者中之一或多種非天然編碼之胺基酸。在另一實施例中，一或多種非天然編碼之胺基酸係選自以下之群：對乙醯基苯丙胺酸、*對*硝基苯丙胺酸、*對*磺基酪胺酸、*對*羧基苯丙胺酸、鄰硝基苯丙胺酸、間硝基苯丙胺酸、*對*硼醯基苯丙胺酸、鄰硼醯基苯丙胺酸、間硼醯基苯丙胺酸、*對*胺基苯丙胺酸、鄰胺基苯丙胺酸、間胺基苯丙胺酸、鄰醯基苯丙胺酸、間醯基苯丙胺酸、*對* OMe 苯丙胺酸、鄰 OMe 苯丙胺酸、間 OMe 苯丙胺酸、*對*磺基苯丙胺酸、鄰磺基苯丙胺酸、間磺基苯丙胺酸、5-硝基 His、3-硝基 Tyr、2-硝基 Tyr、硝基取代之 Leu、硝基取代之 His、硝基取代之 De、硝基取代之 Trp、2-硝基 Trp、4-硝基 Trp、5-硝基 Trp、6-硝基 Trp、7-硝基 Trp、3-胺基酪胺酸、2-胺基酪胺酸、O-磺基酪胺酸、2-磺氧基苯丙胺酸、3-磺氧基苯丙胺酸、鄰羧基苯丙胺酸、間羧基苯丙胺酸、*對*乙醯基-L-苯丙胺酸、*對*炔丙基-苯丙胺酸、O-甲基-L-酪胺酸、L-3-(2-萘基)丙胺酸、3-甲基-苯丙胺酸、O-4-烯丙基-L-酪胺酸、4-丙基-L-酪胺酸、三-O-乙醯基-GlcNAcβ-絲胺酸、L-多巴、氟化苯丙胺酸、異丙基-L-苯丙胺酸、*對*疊氮基-L-苯丙胺酸、*對*醯基-L-苯丙胺酸、*對*苯甲醯基-L-苯丙胺酸、L-磷酸絲胺酸、膦醯基絲胺酸、膦醯基酪胺酸、*對*碘-苯丙胺酸、*對*溴苯丙胺酸、*對*胺基-L-苯丙胺酸、*對*炔丙氧基-L-苯丙胺酸、4-疊氮基-L-苯丙胺酸、對疊氮基乙氧基苯丙胺酸及對疊氮基甲基-苯丙胺酸。在其他實施例中，非天然胺基酸係對乙醯基-苯丙胺酸、4-疊氮基-L-苯丙胺酸、對疊氮基甲基-苯丙胺酸或對疊氮基乙氧基苯丙胺酸。

【0064】 在另一實施例中，抗 HER2 抗體或抗體片段進一步包含 Fc 區中之一或多個突變。在另一實施例中，抗 HER2 抗體或抗體片段進一步包含 Fc 區中之兩個或更多個突變。在另一實施例中，抗 HER2 抗體或抗體片段進一步包含 Fc 區中之三個或更多個突變。在另一實施例中，抗 HER2 抗體或抗體片段進一步包含 Fc 區中之四個或更多個突變。在另一實施例中，抗 HER2 抗體或抗體片段進一步包含 Fc 區中之五個或更多個突變。在另一實施例中，抗 HER2 抗體或抗體片段進一步包含 Fc 區中之六個或更多個突變。在另一實施例中，抗 HER2 抗體或抗體片段進一步包含 Fc 區中之六個突變。

【0065】 在另一實施例中，一或多種連接體係可裂解或不可裂解連接體。在其他實施例中，一或多種連接體係雙官能或多官能連接體。

【0066】 在其他實施例中，TLR 促效劑係包含根據圖 1 之分子結構之 TLR 促效劑，其進一步包含聚乙二醇(PEG)屏蔽物以增強或改良本發明之 TC 之親水性。在一些實施例中，PEG 屏蔽物係直鏈 PEG。在其他實施例中，直鏈 PEG 係 PEG4、PEG8、PEG12、PEG24 或 PEG48。在其他實施例中，直鏈 PEG 係 PEG4。在其他實施例中，直鏈 PEG 係 PEG8。在其他實施例中，直鏈 PEG 係 PEG12。在其他實施例中，直鏈 PEG 係 PEG24。在其他實施例中，直鏈 PEG 係 PEG48。在一些實施例中，PEG 屏蔽物係具支鏈 PEG。在其他實施例中，具支鏈 PEG 係 $(PEG4)_{nn}$、$(PEG8)_{nn}$、$(PEG12)_{nn}$、$(PEG24)_{nn}$ 或$(PEG48)_{nn}$。在其他實施例中，具支鏈 PEG 係$(PEG4)_{nn}$。在其他實施例中，具支鏈 PEG 係$(PEG8)_{nn}$。在其他實施例中，具支鏈 PEG 係$(PEG12)_{nn}$。在其他實施例中，具支鏈 PEG 係$(PEG24)_{nn}$。在其他實施例中，具支鏈 PEG 係$(PEG48)_{nn}$。在一些實施例中，nn 係大於 1 之整數。在一些實施例中，nn 係 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 或更大。在一些實施例中，nn 係 2。在一些實施例中，nn 係 3。在一些實施例中，nn 係 4。在一些實施例中，nn 係 5。在一些實

施例中，nn 係 6。在一些實施例中，nn 係 7。在一些實施例中，nn 係 8。在一些實施例中，nn 係 9。在一些實施例中，nn 係 10。在一些實施例中，TC PEG 屏蔽物改良或增強藥物或酬載之藥物動力學或治療特徵。在另一實施例中，TLR 促效劑係選自根據本發明之表 3、4、5、6、7 之結構之群之 TLR 促效劑中的任一種。

【0067】 在另一實施例中，包含根據式 I 或式 II 之結構之 TLR 促效劑進一步包含 PEG 屏蔽物。

【0068】 在另一實施例中，抗 HER2 抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 1-18 中至少一者之胺基酸序列。在另一實施例中，抗 HER2 抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 1-18 中至少二者之胺基酸序列。在另一實施例中，抗 HER2 抗體或抗體片段包含 a) SEQ ID NO: 1、2、3、4、16、17 或 18；以及 b) SEQ ID NO: 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 及 15 中之任一者。在另一實施例中，抗 HER2 抗體或抗體片段包含 a) SEQ ID NO: 1、2、3、4、16、17 或 18 之重鏈；以及 b) SEQ ID NO: 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 及 15 中之任一者之輕鏈。在另一實施例中，抗 HER2 抗體或抗體片段包含 a) SEQ ID NO: 1；以及 b) SEQ ID NO: 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 及 15 中之任一者。在另一實施例中，抗 HER2 抗體或抗體片段包含 a) SEQ ID NO: 2；以及 b) SEQ ID NO: 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 及 15 中之任一者。在另一實施例中，抗 HER2 抗體或抗體片段包含 a) SEQ ID NO: 3；以及 b) SEQ ID NO: 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 及 15 中之任一者。在另一實施例中，抗 HER2 抗體或抗體片段包含 a) SEQ ID NO: 4；以及 b) SEQ ID NO: 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 及 15 中之任一者。在另一實施例中，抗 HER2 抗體或抗體片段包含 a) SEQ ID NO: 16；以及 b) SEQ ID NO: 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 及 15 中之任一者。在另一實施例中，抗 HER2 抗體或抗體片段包含 a) SEQ ID NO: 17；以及 b) SEQ ID

NO: 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 及 15 中之任一者。在另一實施例中，抗 HER2 抗體或抗體片段包含 a) SEQ ID NO: 18；以及 b) SEQ ID NO: 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 及 15 中之任一者。在另一實施例中，抗 HER2 抗體或抗體片段包含表 9A 中所揭示之重鏈中之突變；以及 b) SEQ ID NO: 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 及 15 中之任一者。在另一實施例中，抗 HER2 抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 1 及 SEQ ID NO: 5。在另一實施例中，抗 HER2 抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 1 及 SEQ ID NO: 6。在另一實施例中，抗 HER2 抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 1 及 SEQ ID NO: 7。在另一實施例中，抗 HER2 抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 1 及 SEQ ID NO: 8。在另一實施例中，抗 HER2 抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 1 及 SEQ ID NO: 9。在另一實施例中，抗 HER2 抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 1 及 SEQ ID NO: 10。在另一實施例中，抗 HER2 抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 1 及 SEQ ID NO: 11。在另一實施例中，抗 HER2 抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 1 及 SEQ ID NO: 12。在另一實施例中，抗 HER2 抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 1 及 SEQ ID NO: 13。在另一實施例中，抗 HER2 抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 1 及 SEQ ID NO: 14。在另一實施例中，抗 HER2 抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 1 及 SEQ ID NO: 15。在另一實施例中，抗 HER2 抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 2 及 SEQ ID NO: 5。在另一實施例中，抗 HER2 抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 2 及 SEQ ID NO: 6。在另一實施例中，抗 HER2 抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 2 及 SEQ ID NO: 7。在另一實施例中，抗 HER2 抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 2 及 SEQ ID NO: 8。在另一實施例中，抗 HER2 抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 2 及 SEQ ID NO: 9。在另一實施例中，抗 HER2 抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 2 及 SEQ ID NO: 10。在另一實施例中，抗 HER2 抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 2 及 SEQ ID NO: 11。在另一實施例中，抗 HER2 抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 2 及 SEQ ID NO: 12。在另一實施例中，抗 HER2

抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 2 及 SEQ ID NO: 13。在另一實施例中，抗 HER2

抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 2 及 SEQ ID NO: 14。在另一實施例中，抗 HER2

抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 2 及 SEQ ID NO: 15。在另一實施例中，抗 HER2

抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 3 及 SEQ ID NO: 5。在另一實施例中，抗 HER2

抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 3 及 SEQ ID NO: 6。在另一實施例中，抗 HER2

抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 3 及 SEQ ID NO: 7。在另一實施例中，抗 HER2

抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 3 及 SEQ ID NO: 8。在另一實施例中，抗 HER2

抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 3 及 SEQ ID NO: 9。在另一實施例中，抗 HER2

抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 3 及 SEQ ID NO: 10。在另一實施例中，抗 HER2

抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 3 及 SEQ ID NO: 11。在另一實施例中，抗 HER2

抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 3 及 SEQ ID NO: 12。在另一實施例中，抗 HER2

抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 3 及 SEQ ID NO: 13。在另一實施例中，抗 HER2

抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 3 及 SEQ ID NO: 14。在另一實施例中，抗 HER2

抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 3 及 SEQ ID NO: 15。在另一實施例中，抗 HER2

抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 4 及 SEQ ID NO: 5。在另一實施例中，抗 HER2

抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 4 及 SEQ ID NO: 6。在另一實施例中，抗 HER2

抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 4 及 SEQ ID NO: 7。在另一實施例中，抗 HER2

抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 4 及 SEQ ID NO: 8。在另一實施例中，抗 HER2

抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 4 及 SEQ ID NO: 9。在另一實施例中，抗 HER2

抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 4 及 SEQ ID NO: 10。在另一實施例中，抗 HER2

抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 4 及 SEQ ID NO: 11。在另一實施例中，抗 HER2

抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 4 及 SEQ ID NO: 12。在另一實施例中，抗 HER2

抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 4 及 SEQ ID NO: 13。在另一實施例中，抗 HER2

抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 4 及 SEQ ID NO: 14。在另一實施例中，抗 HER2

抗體或抗體片段包含 SEQ ID NO: 4 及 SEQ ID NO: 15。在另一實施例中，本發明提供抗 HER2 抗體或抗體片段，其中將非天然編碼之胺基酸位點特異性地併入根據 Kabat 編號之 114 位處。在另一實施例中，本發明提供抗 HER2 抗體或抗體片段，其中該抗體或抗體片段包含根據表 9A 之 Fc 突變。

【0069】 在另一實施例中，本發明提供包含與 TLR 促效劑偶聯之抗 HER2 抗體或抗體片段之 TLR 促效劑偶聯物(TC)，該 TLR 促效劑包含根據圖 1 之結構，其中該 TLR 促效劑經由共價鍵結至一或多種併入抗體或抗體片段中之非天然編碼之胺基酸的連接體與抗體或抗體片段偶聯，該 TC 進一步包含化學治療劑或免疫治療劑。在另一實施例中，本發明提供包含與 TLR 促效劑偶聯之抗 HER2 抗體或抗體片段之 TLR 促效劑偶聯物(TC)，該 TLR 促效劑選自表 3-7 之任一化合物，其中該 TLR 促效劑經由共價鍵結至一或多種併入抗體或抗體片段中之非天然編碼之胺基酸的連接體與抗體或抗體片段偶聯。在另一實施例中，本發明提供包含與 TLR 促效劑偶聯之抗 HER2 抗體或抗體片段之 TLR 促效劑偶聯物(TC)，該 TLR 促效劑選自表 3-7 之任一化合物，其中該 TLR 促效劑經由共價鍵結至一或多種併入抗體或抗體片段中之非天然編碼之胺基酸的連接體與抗體或抗體片段偶聯，該 TC 進一步包含化學治療劑或免疫治療劑。

【0070】 在另一實施例中，本發明提供包含與 TLR 促效劑偶聯之抗 HER2 抗體或抗體片段之 TLR 促效劑偶聯物(TC)，該 TLR 促效劑包含根據圖 1 之結構，其中該 TLR 促效劑經由共價鍵結至一或多種併入抗體或抗體片段中之非天然編碼之胺基酸的連接體與抗體或抗體片段偶聯，該 TC 進一步包含藥物偶聯物。在其他實施例中，藥物偶聯物係抗體藥物偶聯物。在另一實施例中，本發明提供包含與 TLR 促效劑偶聯之抗 HER2 抗體或抗體片段之 TLR 促效劑偶聯物(TC)，該 TLR 促效劑選自表 3-7 之任一化合物，其中該 TLR 促效劑經由共價鍵結至一或多種併入抗體或抗體片段中之非天然編碼之胺基酸的連接體與抗體或抗體片

段偶聯。在另一實施例中，本發明提供包含與 TLR 促效劑偶聯之抗 HER2 抗體或抗體片段之 TLR 促效劑偶聯物(TC)，該 TLR 促效劑選自表 3-7 之任一化合物，其中該 TLR 促效劑經由共價鍵結至一或多種併入抗體或抗體片段中之非天然編碼之胺基酸的連接體與抗體或抗體片段偶聯，該 TC 進一步包含藥物偶聯物。在其他實施例中，藥物偶聯物係抗體藥物偶聯物。在其他實施例中，TC 進一步包含細胞介素或細胞毒素。

【0071】　在另一實施例中，本發明提供治療患有癌症或疾病或疾患或適應症或病症之個體或患者之方法，其包括向個體或患者投與治療有效量之本發明之組成物或 TC。在某些實施例中，腫瘤或癌症係 HER2 陽性腫瘤或癌症。在某些實施例中，腫瘤、癌症、適應症、疾病、病症或疾患係 HER2 陽性腫瘤、癌症、適應症、疾病、病症或疾患。在某些實施例中，腫瘤或癌症係選自由以下組成之群：結腸癌、卵巢癌、乳癌、黑色素瘤、肺癌、神經膠質母細胞瘤、前列腺癌、膀胱癌、子宮頸癌、胰臟癌、腎癌、食道癌、陰道癌、胃癌及白血病。

【0072】　在另一實施例中，本發明提供治療患有癌症或疾病或疾患之個體或患者之方法，其包括向個體或患者投與治療有效量之本發明之組成物或 TC，該組成物或 TC 進一步包含化學治療劑或免疫治療劑。在某些實施例中，將 TC 與至少一種化學治療劑共投與。化學治療劑可選自由以下組成之群：替莫唑胺、吉西他濱、多柔比星、環磷醯胺、太平洋紫杉醇、順鉑、氟嘧啶、紫杉烷、蒽環類抗生素、拉帕替尼、卡培他濱、來曲唑、帕妥珠單抗、多西他賽、IFN-α。在本發明之另一實施例中，將 TC 與至少一種化學治療劑共投與。

【0073】　在另一實施例中，本發明提供治療患有癌症或疾病或疾患之個體或患者之方法，其包括向個體或患者投與治療有效量之本發明之組成物或 TC，該組成物或 TC 進一步包含抗體藥物偶聯物、細胞毒劑或檢查點抑制劑。

【0074】　在另一實施例中，本發明提供殺傷細胞之方法，其包括使細胞與本

發明之 TC 接觸。在其他實施例中，細胞係腫瘤或癌細胞。在某些實施例中，腫瘤或癌細胞係結腸癌細胞、卵巢癌細胞、乳癌細胞、黑色素瘤細胞、肺癌細胞、神經膠質母細胞瘤細胞、前列腺癌細胞、膀胱癌細胞、子宮頸癌細胞、胰臟癌細胞、腎癌細胞、食道癌細胞、陰道癌細胞、胃癌細胞或白血病癌細胞。在某些實施例中，腫瘤或癌症係 HER2 陽性腫瘤或癌症。在某些實施例中，欲治療之腫瘤、癌症、適應症、疾病、病症或疾患係 HER2 陽性腫瘤、癌症、適應症、疾病、病症或疾患。

【0075】　本發明提供抑制或減緩腫瘤或癌症生長之方法，其包括使腫瘤與有效量之本發明之 TC 接觸以刺激患者之鄰近腫瘤之免疫系統。本發明提供抑制或減緩腫瘤或癌症之生長之方法，其包括使腫瘤與有效量之聚乙二醇化 TC、或本發明之 TC 之穩定二聚物或多聚物接觸。在一個實施例中，TC 係非聚乙二醇化的或單聚乙二醇化的。在一個實施例中，TC 係二聚乙二醇化的。在一個實施例中，TC 具有超過一種及/或不同的附著至其上之 TLR 促效劑分子。本發明之另一實施例提供使用本發明之 TC 調節對腫瘤細胞之免疫反應之方法。

【0076】　在一些實施例中，本發明提供使用 TC 治療癌症之方法。在一些實施例中，本發明之 TC 可用於治療或預防癌症相關疾病、病症及疾患，包括與癌症直接或間接相關之疾患，例如血管生成及癌前疾患，諸如發育不良。在一些實施例中，腫瘤係液體瘤或實體瘤。在一些實施例中，欲治療之疾患係癌症。癌症可為但不限於乳癌、腦癌、胰臟癌、皮膚癌、肺癌、肝癌、膽囊癌、結腸癌、卵巢癌、前列腺癌、子宮癌、骨癌及血癌(白血病)癌症或與該等癌症中之任一種相關之癌症或疾病或疾患。癌瘤係始於上皮細胞之癌症，上皮細胞係覆蓋機體表面、產生激素且構成腺體之細胞。作為非限制性實例，癌瘤乳癌、胰臟癌、肺癌、結腸癌、結腸直腸癌、直腸癌、腎癌、膀胱癌、胃癌、前列腺癌、肝癌、卵巢癌、腦癌、陰道癌、陰門癌、子宮癌、口腔癌、陰莖癌、睪丸癌、食道癌、

皮膚癌、輸卵管癌、頭頸癌、胃腸基質癌、腺癌、皮膚或眼內黑色素瘤、肛區癌、小腸癌、內分泌系統癌、甲狀腺癌、副甲狀腺癌、腎上腺癌、尿道癌、腎盂癌、輸尿管癌、子宮內膜癌、子宮頸癌、腦垂腺癌、中樞神經系統(CNS)贅瘤、原發性 CNS 淋巴瘤、腦幹神經膠瘤及脊柱軸瘤。在一些情況下，癌症係皮膚癌，諸如基底細胞癌、鱗狀細胞癌、黑色素瘤、非黑色素瘤或光化性(日光性)角化症。在一些實施例中，本發明亦係關於用於治療哺乳動物之急性白血病之方法，其包括向該哺乳動物投與治療有效量之本發明之 TC。本發明亦提供用於抑制急性白血病母細胞增殖之方法，其包括向罹患急性白血病之哺乳動物投與治療有效劑量之本發明之 TC。

【0077】　在另一實施例中，本文所揭示之 TC 可用於調節免疫反應。免疫反應之調節可包含刺激、活化、增加、增強或上調免疫反應。免疫反應之調節可包含阻抑、抑制、預防、降低或下調免疫反應。

【0078】　在另一實施例中，本發明提供一種醫藥組成物，其包含治療有效量之本發明之組成物或 TC 及醫藥學上可接受之載劑或賦形劑。

【0079】　在另一實施例中，本發明提供本發明之組成物在製造藥劑中之用途。

【0080】　在另一實施例中，本發明提供包含根據圖 1 中任一式之 TLR-促效劑之免疫刺激性抗體偶聯物(ISAC)。在另一實施例中，本發明提供包含根據表 3、4、5、6、7 之任一化合物之 TLR-促效劑之免疫刺激性抗體偶聯物(ISAC)。在另一實施例中，本發明提供聚乙二醇化 ISAC，其中 TLR-促效劑包含選自表 3、4、5、6、7 之群之化合物，其進一步包含 PEG 屏蔽物。在其他實施例中，本發明提供 ISAC，其中 TLR 促效劑包含選自表 4 化合物之群之化合物。在另一實施例中，本發明提供聚乙二醇化 ISAC，其中 TLR 促效劑包含選自表 4 化合物之群之化合物，其進一步包含 PEG 屏蔽物。

【0081】　在另一實施例中，本發明提供具有根據圖 1 之結構之任一化合物之

鹽。在另一實施例中，本發明提供表 3、4、5、6、7 之任一化合物之 鹽。在另一實施例中，本發明提供 表 4 中任一種化合物之鹽。在另一實施例中，本發明提供根據發明揭示案之組成物、化合物 及 TC 之醫藥組成物或其鹽。在其他實施例中，醫藥組成物或鹽進一步包含醫藥學上可接受之賦形劑。

【圖式簡單說明】

【0082】

圖 1 描繪 TLR 促效劑之一般結構

圖 2 描繪具有 PEG 分子之各種 TLR7 促效劑之 TLR7 活性。

圖 3A-圖 3B 描繪具有直鏈 PEG (圖 3A)及具支鏈 PEG (圖 3B)之各種 TLR7 促效劑之 TLR7 活性。

圖 4 描繪用於 HER2 ISAC 之 SKBR3-RAWBlue 共培養體外分析。

圖 5 描繪 Fc 區對 HER2 ISAC 活性之作用。

圖 6 描繪偶聯位點對 HER2 ISAC 活性之作用。

圖 7A-圖 7C 顯示在 RAW-Blue 共培養分析中 AXC-879 衍生物(圖 7A)、額外 HER2 ISAC (圖 7B)及具有支鏈修飾之 AXC-879 衍生物(圖 7C)之體外活性。

圖 8A-圖 8C 顯示在 RAW-Blue 共培養分析中具有 PEG 屏蔽物之 AXC-879 衍生物(圖 8A)、(圖 8B)及具有 PEG 屏蔽物之額外 AXC-879 衍生物(圖 8C)之體外活性的比較。

圖 9A-圖 9B 顯示在 RAW-Blue 共培養分析中具有 D-Lys 嵌段或 L-Lys 嵌段之 AXC-879 衍生物之體外活性的比較。

圖 10 顯示在 PBMC 共培養分析中在 HER2 mAb 與 HER2-AXC879 ISAC 之間就 ADCC 活性之比較。

圖 11 顯示在 PBMC 共培養分析中在 HER2 mAb 與 HER2-AXC879 ISAC 之間就其對骨髓樣細胞上之 HLA-DR 標記物之誘導的比較。

圖 12 顯示在 PBMC 共培養分析中在 HER2 mAb 與 HER2-AXC879 ISAC 之間就其對 CD86/DC-SIGN+雙陽性細胞之誘導的比較。

圖 13A-圖 13C 顯示具有前藥設計之 HER2 ISAC 在(圖 13A) HER2 高 SKBR3/ PBMC 共培養分析、(圖 13B) HER2 低 HCC1806/ PBMC 共培養分析及(圖 13C) HER2 陰性 MDA-MB-468/ PBMC 共培養分析中之 ADCC 效應。

圖 14A-圖 14B 顯示 HER2-AXC879 在(圖 14A) HER2 高 N87/PBMC 共培養分析及(圖 14B) HER2 陰性 MDA-MB-468/PBMC 共培養分析中對 TNF-α 細胞介素之誘導。

圖 15A-圖 15D 顯示 HER2 ISAC 在 HER2 高 SKBR3/PBMC 共培養分析 (圖 15A)及 HER2 低 HCC1806/PBMC 共培養分析(圖 15B)中對 IFNγ 細胞介素之誘導；以及在 HER2 高 SKBR3/PBMC 共培養分析(圖 15C)及 HER2 低 HCC1806/PBMC 共培養分析(圖 15D)中對 TNF-α 細胞介素之誘導。

圖 16A-圖 16D 顯示具有前藥設計之 HER2 ISAC 在 HER2 高 SKBR3/PBMC 共培養分析(圖 16A)、HER2 低 HCC1806/PBMC 共培養分析(圖 16B)、HER2 陰性 MDA-MB-468/PBMC 共培養分析(圖 16C)及 PBMC (圖 16D)中對 IFNγ 細胞介素之誘導。

圖 17A-圖 17D 顯示具有前藥設計之 HER2 ISAC 在 HER2 高 SKBR3/PBMC 共培養分析(圖 17A)、HER2 低 HCC1806/PBMC 共培養分析(圖 17B)、HER2 陰性 MDA-MB-468/PBMC 共培養分析(圖 17C)及 PBMC (圖 17D)中對 TNF-α 細胞介素之誘導。

圖 18A-圖 18C 顯示具有靶向不同腫瘤抗原 TROP-2 (圖 18A)、PSMA (圖 18B)及 CD70 (圖 18C)之其他抗體之 AXC879。

圖 19A-圖 19B 顯示不同細胞株上之 Trop2 表現水準(圖 19A)及不同腫瘤細胞株上之 Trop2-AXC879 表現水準(圖 19B)。

圖 20A-圖 20B 藉由 Raw-Blue 共培養分析顯示在 Trop2 陽性 HCC1806 (圖 20A)及 Trop2 陰性 HCC1395 (圖 20B)細胞株中之額外 Trop2 ISAC 體外活性。

圖 21A-圖 21B 藉由 PBMC 共培養分析顯示在 Trop2 陽性 SKBR3 (圖 21A)及 Trop2 陰性 HCC1395 (圖 21B)細胞株中 Trop2 ISAC 對 TNF-α 細胞介素之誘導

圖 22A-22B 顯示，在 PBMC 共培養分析中，Trop2-AXC879 展示與未偶聯之 Trop2 抗體相比在 Trop2 陽性 BxPC-3 中增強之 ADCC 效應(圖 22A)以及 在 Trop2 陰性 HCC1395 中之非特異性殺傷(圖 22B)。

圖 23 顯示 C57/B6 小鼠在單一劑量後之 HER2-AXC879 之 PK 特徵

圖 24A-圖 24C 顯示在 MC38-hHER2 同基因模型中 HER2-AXC879 之活體內功效(圖 24A)以及 HER2-AXC863 組(圖 24B)及 HER2-AXC879 組(圖 24C)之個體腫瘤生長曲線。

圖 25 顯示 HER2-AXC879 與抗 PD-1 抗體之間之體內功效協同性。

圖 26A-圖 26B 顯示小鼠中在給予重複劑量後 HER2-AXC879 (圖 26A)及 HER2-AXC863 (圖 26B)C57/B6 之 PK 特徵。

圖 27 顯示 HER2-AXC879 在 MC38-hHER2 同基因模型中之劑量滴定

圖 28 顯示不同 HER2 ISAC 在 MC38-hHER2 同基因模型中之體內功效比較

圖 29A-圖 29B 顯示在具有完全腫瘤消退之經 ISAC 治療小鼠中及幼稚(naïve)小鼠中對 MC38-hHER2 腫瘤(圖 29A)及 MC38 親代腫瘤(圖 29B)之再攻擊。

圖 30A-圖 30B 顯示在 JIMT-1 異種移植物模型中 Trop2-AXC879 之體內功效(圖 30A) 及隨時間之體重變化(圖 30B)。

【實施方式】

相關申請案之參考

【0083】 本申請案主張 2020 年 8 月 20 日提出申請之美國臨時申請案第 63/068,342 號及 2020 年 11 月 25 日提出申請之第 63/118,365 號之權益，每一臨

時申請案之內容全文以引用方式併入本文。

序列表

【0084】　本申請案含有序列表，其係以 ASCII 格式提交，且其特此全文以引用方式併入。該創建於 2021 年_____之 ASCII 副本命名為_____.txt 且大小為_____位元組。

【0085】　本文揭示包含諸如抗體等靶向部分及一或多種 TLR 促效劑之 TC。TLR 促效劑可進一步包含一或多種連接體。本發明之 TC 可以包含連接至靶向部分中之非天然胺基酸之 TLR 促效劑。亦包括用於製備包含併入靶向部分多肽中之非天然胺基酸之該等 TC 的方法。

【0086】　在某些實施例中，提供包含所述任何化合物及醫藥學上可接受之載劑、賦形劑或黏合劑之醫藥組成物。

【0087】　在其他或替代實施例中係用於偵測患者中多肽之存在之方法，該方法包括投與包含至少一種含雜環之非天然胺基酸之多肽，且所得含雜環之非天然胺基酸多肽相對於天然存在之同源胺基酸多肽，調節該多肽之免疫原性。

【0088】　應理解，本文所述之方法及組成物不限於本文所述之特定方法、方案、細胞株、構築體及試劑，且因此可變化。亦應理解，本文所用之術語僅出於闡述特定實施例之目的，且並不意欲限制本文所述方法及組成物之範圍，該範圍將僅受限於隨附申請專利範圍。

【0089】　除非上下另有明確指示，否則如本文及隨附申請專利範圍中所用之單數形式「一(a, an)」及「該」包括複數個指示物。

【0090】　除非另有定義，否則本文所用之所有技術及科學術語皆具有與熟習本文所述本發明所屬技術者通常所理解的含義相同之含義。儘管任何類似於或等效於本文所述之彼等方法、裝置及材料者皆可用於本文所述發明之實踐或測試中，但現在闡述較佳方法、裝置及材料。

【0091】　本文所提及之所有出版物及專利皆全文以引用方式併入本文中，以達成闡述並揭示例如可結合本文所述本發明使用之出版物中所述之構築體及方法的目的。本文所討論之公開案僅因其揭示內容先於本申請案之申請日期而提供。絕不能由於揭示內容為先前發明或任何其他原因而理解為承認本文所述之本發明無權先於該揭示內容。

【0092】　術語「基於醛醇之鍵聯」或「基於混合醛醇之鍵聯」係指一種羰基化合物與另一羰基化合物之烯醇鹽/烯醇(其可相同或不同)經酸或鹼催化之縮合，以生成 β-羥基羰基化合物——醛醇。

【0093】　如本文所用之術語「親和標記」係指可逆地或不可逆地結合另一分子以修飾其、破壞其或與其形成化合物之標記。舉例而言，親和標記包括酶及其受質，或抗體及其抗原。

【0094】　術語「烷氧基」、「烷基胺基」及「烷硫基」(或硫代烷氧基)係以其習用含義使用且分別係指彼等經由氧原子、胺基或硫原子連接至分子之烷基。

【0095】　除非另有說明，否則術語「烷基」本身或作為另一分子之一部分，意指具有指定碳原子數之直鏈或具支鏈或環狀烴基或其組合，其可為完全飽和的、單不飽和的或多不飽和的且可包括二價及多價基團(*亦即* C_1-C_{10} 意指 1 至 10 個碳)。飽和烴基之實例包括但不限於諸如以下等基團：甲基、乙基、正丙基、異丙基、正丁基、第三丁基、異丁基、第二丁基、環己基、(環己基)甲基、環丙基甲基，例如，正戊基、正己基、正庚基、正辛基之同系物及異構物，及諸如此類。不飽和烷基係具有一或多個雙鍵或三鍵之烷基。不飽和烷基之實例包括但不限於乙烯基、2-丙烯基、丁烯基、2-異戊烯基、2-(丁二烯基)、2,4-戊二烯基、3-(1,4-戊二烯基)、乙炔基、1-丙炔基及 3-丙炔基、3-丁炔基以及高級同系物及異構物。除非另有說明，否則術語「烷基」亦意在包括本文更詳細定義之烷基之彼等衍生物，諸如「雜烷基」、「鹵代烷基」及「同烷基(homoalkyl)」。

【0096】 術語「伸烷基」本身或作為另一分子之一部分，意指衍生自烷烴之二價基團，如藉由$(-CH_2-)_n$所例示，其中 n 可為 1 至約 24。僅舉例而言，該等基團包括但不限於具有 10 個或更少碳原子之基團，諸如結構$–CH_2CH_2–$及$–CH_2CH_2CH_2CH_2–$。「低碳烷基」或「低碳伸烷基」係通常具有八個或更少碳原子之較短鏈之烷基或伸烷基。除非另有說明，否則術語「伸烷基」亦意在包括本文中闡述為「伸雜烷基」之彼等基團。

【0097】 術語「胺基酸」係指天然存在之胺基酸及非天然之胺基酸，以及以類似於天然存在之胺基酸之方式起作用之胺基酸類似物及胺基酸模擬物。天然編碼之胺基酸係 20 種常見胺基酸(丙胺酸、精胺酸、天冬醯胺酸、天冬胺酸、半胱胺酸、麩醯胺酸、麩胺酸、甘胺酸、組胺酸、異白胺酸、白胺酸、離胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、脯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、色胺酸及纈胺酸)以及吡咯離胺酸(pyrolysine)及硒代半胱胺酸。胺基酸類似物係指具有與天然存在之胺基酸相同之基本化學結構之化合物，僅舉例而言，、結合至氫、羧基、胺基及 R 基團之 α-碳。該等類似物可具有修飾之 R 基團(例如正白胺酸)或可具有修飾之肽骨架，同時仍保留與天然存在之胺基酸相同之基本化學結構。胺基酸類似物之非限制性實例包括高絲胺酸、正白胺酸、甲硫胺酸亞碸、甲硫胺酸甲基銃。

【0098】 胺基酸在本文中可由其名稱(其習知三字母符號)或由 IUPAC-IUB 生物化學命名委員會(IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission)推薦之單字母符號提及。另外，核苷酸可由其普遍接受之單字母代碼來提及。

【0099】 「胺基末端修飾基團」係指可以附著至末端胺基之任一分子。舉例而言，該等末端胺基可位於聚合分子之末端，其中該等聚合分子包括但不限於多肽、多核苷酸及多糖。末端修飾基團包括但不限於、各種水溶性聚合物、肽或蛋白質。僅舉例而言中，末端修飾基團包括聚乙二醇或血清白蛋白。末端修飾基團可用於修飾聚合物分子之治療特徵，包括但不限於增加肽之血清半衰期。

【0100】 「抗體」在本文中意指由實質上由全部或部分抗體基因編碼之一或多種多肽組成之蛋白質。免疫球蛋白基因包括但不限於 κ、λ、α、γ (IgG1、IgG2、IgG3 及 IgG4)、δ、ε 及 μ 恆定區基因，以及無數免疫球蛋白可變區基因。本文中之抗體意在包括全長抗體及抗體片段，且包括天然存在於任何生物體中或經過工程改造(例如為變異體)之抗體。

【0101】 「抗體片段」意指除全長形式之外之任一形式之抗體。本文中之抗體片段包括作為存在於全長抗體中之較小組分之抗體，以及已經過工程改造之抗體。抗體片段包括但不限於 Fv、Fc、Fab 及(Fab')2、單鏈 Fv (scFv)、雙鏈抗體、三鏈抗體(triabody)、四鏈抗體(tetrabody)、雙功能雜交抗體、CDR1、CDR2、CDR3、CDR 之組合、可變區、框架區、恆定區、重鏈、輕鏈及可變區，以及替代框架非抗體分子、雙特異性抗體及諸如此類(Maynard 及 Georgiou，2000, Annu. Rev. Biomed. Eng. 2:339-76; Hudson, 1998, Curr. Opin. Biotechnol. 9:395-402)。另一種功能性次結構係單鏈 Fv (scFv)，其包含免疫球蛋白重鏈及輕鏈之由肽連接體共價連接之可變區(S-z Hu 等，1996, Cancer Research, 56, 3055-3061)。該等小(Mr 25,000)蛋白質通常保留對單一多肽中之抗原之特異性及親和力，且可為較大之抗原特異性分子提供便利之建構組元。除非另有明確說明，否則使用術語「抗體」或「多種抗體」之陳述及申請專利範圍特別包括「抗體片段」及「多個抗體片段」。

【0102】 如本文所用，「抗體-藥物偶聯物或「ADC」係指共價鍵結至一或多種生物活性分子之抗體分子或其片段。生物活性分子可藉助連接體、聚合物或另一共價鍵與抗體偶聯。

【0103】 如本文所用之術語「芳族」或「芳基」係指具有至少一個具有共軛 π 電子系統之環之閉環結構且包括碳環芳基及雜環芳基(或「雜芳基」或「雜芳族」)基團二者。碳環或雜環芳族基團可含有 5 至 20 個環原子。該術語包括共價連接

之單環或稠環多環(即共享毗鄰碳原子對之環)基團。芳族基團可未經取代或經取代。「芳族」或「芳基」基團之非限制性實例包括苯基、1-萘基、2-萘基、4-聯苯基、蒽基及菲基。用於上述芳基及雜芳基環系統中之每一者之取代基係選自本文所述之可接受之取代基之群。

【0104】 為簡潔起見，當與其他術語(包括但不限於芳氧基、芳基硫氧基、芳烷基)組合使用時，術語「芳族」或「芳基」包括如上文所定義之芳基環及雜芳基環二者。因此，術語「芳烷基」或「烷芳基」意在包括其中芳基附著至烷基之彼等基團(包括但不限於苄基、苯乙基、吡啶基甲基及諸如此類)，該等烷基包括其中碳原子(包括但不限於亞甲基)已由雜原子置換(僅舉例而言，由氧原子置換)之彼等烷基。該等芳基之實例包括但不限於苯氧基甲基、2-吡啶基氧基甲基、3-(1-萘基氧基)丙基及諸如此類。

【0105】 如本文所用之術語「伸芳基」係指二價芳基。「伸芳基」之非限制性實例包括伸苯基、伸吡啶基、伸嘧啶基及伸噻吩基。用於伸芳基之取代基係選自本文所述之可接受之取代基之群。

【0106】 「雙官能聚合物」(亦稱為「雙官能連接體」)係指包含兩個能夠與其他部分特異性反應以形成共價或非共價鍵聯之官能基之聚合物。該等部分可包括但不限於天然或非天然胺基酸或含有該等天然或非天然胺基酸之肽上之側基。可連接至雙官能連接體或雙官能聚合物之其他部分可為相同或不同之部分。僅舉例而言，雙官能連接體可具有與第一肽上之基團反應之官能基及與第二肽上之基團反應之另一官能基，藉此形成包括第一肽、雙官能連接體及第二肽之偶聯物。已知用於將各種化合物附著至肽之許多程序及連接體分子。參見例如歐洲專利申請案第 188,256 號；美國專利第 4,671,958 號、第 4,659,839 號、第 4,414,148 號、第 4,699,784 號；第 4,680,338 號；及第 4,569,789 號，其全文以引用方式併入本文中。「多官能聚合物」(亦稱為「多官能連接體」)係指包含兩

個或更多個能夠與其他部分反應之官能基之聚合物。該等部分可包括但不限於天然或非天然胺基酸或含有該等天然或非天然胺基酸之肽上之側基(包括但不限於胺基酸側基)以形成共價或非共價鍵聯。雙官能聚合物或多官能聚合物可為任一期望之長度或分子量，且可選擇為在一或多個連接至化合物之分子與其結合之分子或該化合物之間提供特定期望間距或構形。

【0107】 如本文所用之術語「生物利用度」係指物質或其活性部分自醫藥劑型遞送且在作用位點或在全身循環中變得可利用之速率及程度。生物利用度之增加係指增加物質或其活性部分自醫藥劑型遞送且在作用位點或在全身循環中變得可利用之速率及程度。舉例而言，生物利用度之增加可表示為血液中物質或其活性部分之濃度在與其他物質或活性部分相比時之增加。評價生物利用度增加之方法係此項技術中已知的，且可用於評價任一多肽之生物利用度。

【0108】 術語「生物活性分子」、「生物活性部分」或「生物活性劑」在本文中使用時意指可影響與生物體(包括但不限於病毒、細菌、噬菌體、轉位子、普裡昂蛋白(prion)、昆蟲、真菌、植物、動物及人類)有關之生物系統、途徑、分子或相互作用之任何物理或生物化學性質的任一物質。具體而言，如本文所用，生物活性分子包括但不限於意欲用於診斷、治癒、減輕、治療或預防人類或其他動物之疾病或以其他方式增強人類或動物之身體或精神健康之任一物質。生物活性分子之實例包括但不限於肽、蛋白質、酶、小分子藥物、硬藥物、軟藥物、前藥、碳水化合物、無機原子或分子、染料、脂質、核苷、放射性核種、寡核苷酸、毒素、細胞、病毒、脂質體、微粒及膠束。適用於本文所述方法及組成物之生物活性劑之類別包括但不限於藥物、前藥、放射性核種、成像劑、聚合物、抗生素、殺真菌劑、抗病毒劑、抗炎劑、抗腫瘤劑、心血管劑、抗焦慮劑、激素、生長因子、類固醇劑、微生物來源之毒素及諸如此類。

【0109】 「調節生物活性」意指增加或降低多肽之反應性、改變多肽之選擇

性、增強或降低多肽之受質選擇性。可藉由比較非天然多肽之生物活性與天然多肽之生物活性來實施經修飾生物活性之分析。

【0110】 如本文所用之術語「生物材料」係指生物來源之材料，包括但不限於自生物反應器及/或自重組方法及技術獲得之材料。

【0111】 如本文所用之術語「生物物理探針」係指可偵測或監測分子中之結構變化之探針。該等分子包括但不限於蛋白質，且「生物物理探針」可用於偵測或監測蛋白質與其他大分子之相互作用。生物物理探針之實例包括但不限於自旋標記、螢光團及可光活化基團。

【0112】 如本文所用之術語「生物合成」係指利用轉譯系統(細胞或非細胞)之任一方法，包括使用以下組分中之至少一種：多核苷酸、密碼子、tRNA 及核糖體。舉例而言，可使用闡述於 WO 2002/085923 (其全文以引用方式併入本文中)中之方法及技術將非天然胺基酸「生物合成地併入」至非天然胺基酸多肽中。另外，用於選擇可「生物合成地併入」至非天然胺基酸多肽中的可用非天然胺基酸之方法闡述於 WO 2002/085923 (其全文以引用方式併入本文中)中。

【0113】 如本文所用之術語「生物素類似物」(或亦稱為「生物素模擬物」)係除生物素之外以高親和力結合至抗生物素蛋白及/或鏈黴抗生物素蛋白之任一分子。

【0114】 如本文所用之術語「羰基」係指含有至少一個選自由以下組成之群之部分的基團：-C(O)-、-S(O)-、-S(O)2-及-C(S)-，包括但不限於含有至少一個酮基及/或至少一個醛基及/或至少一個酯基及/或至少一個羧酸基及/或至少一個硫酯基之基團。該等羰基包括酮、醛、羧酸、酯及硫酯。此外，該等基團可為直鏈分子、具支鏈分子或環狀分子之部分。

【0115】 術語「羧基末端修飾基團」係指可附著至末端羧基之任一分子。舉例而言，該等末端羧基可位於聚合分子之末端，其中該等聚合分子包括但不限

於多肽、多核苷酸及多糖。末端修飾基團包括但不限於各種水溶性聚合物、肽或蛋白質。僅舉例而言中，末端修飾基團包括聚乙二醇或血清白蛋白。末端修飾基團可用於修飾聚合物分子之治療特徵，包括但不限於增加肽之血清半衰期。

【0116】 如本文所用之術語「化學可裂解基團」(亦稱為「化學不穩定基團」)係指在暴露於酸、鹼、氧化劑、還原劑、化學起始劑或自由基起始劑後斷裂或裂解之基團。

【0117】 如本文所用，「共摺疊」係指採用至少兩種彼此相互作用且導致未摺疊或不正確摺疊之分子轉變為正確摺疊之分子之再摺疊過程、反應或方法。僅舉例而言，「共摺疊」採用至少兩種彼此相互作用且導致未摺疊或不正確摺疊之多肽轉化為天然、正確摺疊之多肽之多肽。該等多肽可含有天然胺基酸及/或至少一種非天然胺基酸。

【0118】 如本文所用，「偶聯物」係指直接或藉助連接體連接(例如共價連接)至本文所述之化合物或化合物-連接體，例如根據圖 1 之任一結構或表 3-7 之任一結構之化合物或鹽。「靶向部分」係指相對於其他非靶分子對靶分子具有選擇性親和力之結構。本發明之靶向部分結合至靶分子。靶向部分可包括例如抗體、肽、配位體、受體或其結合部分。靶標生物分子可為細胞之生物受體或另一結構，諸如腫瘤抗原。如本文所用之術語「本發明之偶聯物」、「靶向部分偶聯物」、「靶向偶聯物」、「靶向部分-活性分子偶聯物」或「TC」係指與生物活性分子、其部分或其類似物(包括但不限於 TLR7 及/或 TLR8 促效劑)偶聯的結合至存在於細胞上之靶標或其次單元之靶向多肽或其部分、類似物或衍生物。如本文所用之術語「腫瘤-靶向部分偶聯物」、「腫瘤-靶向部分-生物活性分子偶聯物」或「BTC」係指與生物活性分子、其部分或其類似物(包括但不限於 TLR7 及/或 TLR8 促效劑)偶聯的結合至存在於腫瘤細胞上之靶標或其次單元之腫瘤靶向多肽或其部分、類似物或衍生物。除非另外指明，否則術語「本發

明之化合物」及「本發明之組成物」用作術語「本發明之偶聯物」之替代。

【0119】 術語「保守修飾之變異體」適用於天然及非天然胺基酸以及天然及非天然核酸序列，以及其組合。關於特定核酸序列，「經保守修飾之變異體」係指彼等編碼一致或基本上一致之天然及非天然胺基酸序列之天然及非天然核酸，或在該天然及非天然核酸不編碼天然及非天然胺基酸序列之情況下係指基本上一致之序列。舉例而言，由於遺傳密碼之簡並性，大量功能相同之核酸編碼任一給定之蛋白質。例如，密碼子 GCA、GCC、GCG 及 GCU 皆編碼胺基酸丙胺酸。因此，在丙胺酸由密碼子規定之每一情形下，可在不改變所編碼多肽下將該密碼子改變成所述之任一對應密碼子。該等核酸變異係「沈默變異」，其係一種保守修飾之變異。因此，舉例而言，本文中編碼天然或非天然多肽之每一天然或非天然核酸序列亦闡述該天然或非天然核酸之每一可能之沈默變異。熟習此項技術者將認識到，天然或非天然核酸中之每一密碼子(AUG (其通常為甲硫胺酸之唯一密碼子)及 TGG (其通常為色胺酸之唯一密碼子)除外)可經修飾以產生功能相同之分子。因此，編碼天然及非天然多肽之天然及非天然核酸之每一沈默變異皆隱含在每一所述序列中。

【0120】 對於胺基酸序列而言，對核酸、肽、多肽或蛋白質序列之改變、添加或缺失所編碼序列中單一天然及非天然胺基酸或小百分比之天然及非天然胺基酸的個別取代、缺失或添加係「經保守修飾之變異體」，其中該改變導致胺基酸之缺失、胺基酸之添加、天然及非天然胺基酸經化學上類似之胺基酸取代。提供功能類似天然胺基酸之保守取代表為此項技術中所熟知。該等保守修飾之變異體另外包括且不排除本文所述方法及組成物之多態變異體、種間同系物及對偶基因。

【0121】 提供功能相似胺基酸之保守取代表為熟習此項技術者已知。以下八個組各自含有互為保守取代之胺基酸：1) 丙胺酸(A)、甘胺酸(G)；2) 天冬胺酸

(D)、麩胺酸(E)；3) 天冬醯胺酸(N)、麩醯胺酸(Q)；4) 精胺酸(R)、離胺酸(K)；5) 異白胺酸(I)、白胺酸(L)、甲硫胺酸(M)、纈胺酸(V)；6) 苯丙胺酸(F)、酪胺酸(Y)、色胺酸(W)；7) 絲胺酸(S)、蘇胺酸(T)；及 8) 半胱胺酸(C)、甲硫胺酸(M)。(參見例如 Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W H Freeman & Co.；第 2 版(1993 年 12 月)。

【0122】　除非另有說明，否則術語「環烷基」及「雜環烷基」本身或與其他術語組合，分別表示「烷基」及「雜烷基」之環狀形式。因此，環烷基或雜環烷基包括飽和、部分不飽和及完全不飽和之環鍵聯。另外，對於雜環烷基，雜原子可佔據雜環附著至分子之其餘部分之位置。雜原子可包括但不限於氧、氮或硫。環烷基之實例包括但不限於環戊基、環己基、1-環己烯基、3-環己烯基、環庚基及諸如此類。雜環烷基之實例包括但不限於 1–(1,2,5,6-四氫吡啶基)、1-六氫吡啶基、2-六氫吡啶基、3-六氫吡啶基、4-嗎啉基、3-嗎啉基、四氫呋喃-2-基、四氫呋喃-3-基、四氫噻吩-2-基、四氫噻吩-3-基、1–六氫吡嗪基、2-六氫吡嗪基及諸如此類。另外，該術語涵蓋多環結構，包括但不限於二環及三環結構。類似地，術語「伸雜環烷基」本身或作為另一分子之一部分，意指衍生自雜環烷基之二價基團，且術語「伸環烷基」本身或作為另一分子之一部分，意指衍生自環烷基之二價基團。

【0123】　如本文所用之術語「環糊精」係指由至少六至八個葡萄糖分子以環形式組成之環狀碳水化合物。環之外部含有水溶性基團；環之中心係能夠容納小分子之相對非極性之空腔。

【0124】　如本文所用之術語「細胞毒性」係指損害細胞之化合物。

【0125】　如本文所用之「變性劑」(「Denaturing agent」或「denaturant」)係指將引起聚合物之可逆解摺疊之任一化合物或材料。僅舉例而言，「變性劑」(「denaturing agent」或「denaturant」)可引起蛋白質之可逆解摺疊。變性劑

(denaturing agent 或 denaturant)之強度將取決於特定變性劑之性質及濃度二者。舉例而言，變性劑(denaturing agent 或 denaturant)包括但不限於離液劑、去污劑、有機水混溶性溶劑、磷脂或其組合。離液劑之非限制性實例包括但不限於脲、胍及硫氰酸鈉。去污劑之非限制性實例可包括但不限於強去污劑，諸如十二烷基硫酸鈉或聚氧乙烯醚(例如 Tween 或 Triton 去污劑)、十二烷基肌胺酸鈉(Sarkosyl)，溫和非離子去污劑(例如，毛地黃皂苷)，溫和陽離子去污劑，諸如N-[1-(2,3-二油基氧基)-丙基-N,N,N-三甲基銨，溫和離子去污劑(例如膽酸鈉或去氧膽酸鈉)或兩性離子去污劑，包括但不限於硫代甜菜鹼(Zwittergent)、3-(3-膽醯胺基丙基)二甲基銨基-1-丙烷硫酸鹽(CHAPS)及 3-(3-膽醯胺基丙基)二甲基銨基-2-羥基-1-丙烷磺酸鹽(CHAPSO)。有機水可混溶性溶劑之非限制性實例包括但不限於乙腈、低碳烷醇(尤其 C2-C4 烷醇，諸如乙醇或異丙醇)或低碳烷二醇(C2-C4 烷二醇，諸如乙二醇)可用作變性劑。磷脂之非限制性實例包括但不限於天然存在之磷脂，諸如磷脂醯乙醇胺、磷脂醯膽鹼、磷脂醯絲胺酸及磷脂醯肌醇或合成之磷脂衍生物或變異體，諸如二己醯基磷脂醯膽鹼或二庚醯基磷脂醯膽鹼。

【0126】 如本文所用之術語「二胺」係指包含至少兩個胺官能基之基團/分子，包括但不限於肼基、脒基、亞胺基、1,1-二胺基、1,2-二胺基、1,3-二胺基及 1,4-二胺基。此外，該等基團可為直鏈分子、具支鏈分子或環狀分子之部分。

【0127】 如本文所用之術語「可偵測標記」係指可使用分析技術觀測之標記，該等分析技術包括但不限於螢光、化學發光、電子自旋共振、紫外/可見吸收光譜、質譜、核磁共振、磁共振及電化學方法。

【0128】 如本文所用之術語「二羰基」係指含有至少兩個選自由以下組成之群之部分的基團：-C(O)-、-S(O)-、$-S(O)_2-$及-C(S)-，包括但不限於 1,2-二羰基、1,3-二羰基及 1,4-二羰基，以及含有至少一個酮基及/或至少一個醛基及/或至少

一個酯基及/或至少一個羧酸基及/或至少一個硫酯基之基團。該等二羰基包括二酮、酮醛、酮酸、酮酯及酮硫酯。此外，該等基團可為直鏈分子、具支鏈分子或環狀分子之部分。二羰基中之兩個部分可相同或不同，且可包括將在兩個部分中之任一者上產生(僅舉例而言)酯、酮、醛、硫酯或醯胺之取代基。

【0129】　如本文所用之術語「藥物」係指用於預防、診斷、緩解、治療或治癒疾病或疾患之任何物質。

【0130】　如本文所用之術語「有效量」係指足以將在一定程度上減輕所治療疾病或病患之一或多種症狀之所投與劑或化合物的量。結果可為疾病體徵、症狀或病因之減輕及/或緩解或生物系統之任一其他期望改變。舉例而言，所投與之劑或化合物包括但不限於天然胺基酸多肽、非天然胺基酸多肽、經修飾之天然胺基酸多肽或經修飾之非胺基酸多肽。可投與含有該等天然胺基酸多肽、非天然胺基酸多肽、經修飾之天然胺基酸多肽或經修飾之非天然胺基酸多肽之組成物，用於預防、增強及/或治療性治療。任一個別情形下之適當「有效」量皆可使用諸如劑量遞增研究等技術來確定。

【0131】　術語「增強」(「enhance」或「enhancing」)意指增加或延長期望效應之效力或持續時間。舉例而言，「增強」治療劑之效應係指增加治療劑在治療疾病、病症或疾患期間之效應的效力或延長其持續時間的能力。如本文所用，「增強有效量」係指足以增強治療劑在治療疾病、病症或疾患中之效應之量。當用於患者時，對於該用途有效之量將取決於疾病、病症或疾患之嚴重程度及病程、先前療法、患者之健康狀態及藥物反應以及治療醫師之判斷。

【0132】　如本文所用之術語「真核生物」係指屬於真核生物系統發生域真核生物域之生物體，包括但不限於動物(包括但不限於哺乳動物、昆蟲、爬蟲類、鳥類等)、纖毛蟲、植物(包括但不限於不限於單子葉植物、雙子葉植物及藻類)、真菌、酵母、鞭毛蟲、微胞子蟲目(microsporidia)及原生生物。

【0133】 如本文所用之術語「脂肪酸」係指具有約 C6 或更長烴側鏈之羧酸。

【0134】 如本文所用之術語「螢光團」係指在激發後發射光子且由此發螢光之分子。

【0135】 如本文所用之術語「官能基」、「活性部分」、「活化基團」、「離去基團」、「反應位點」、「化學反應基團」及「化學反應部分」係指分子發生化學反應之部分或單元。該等術語在化學領域中稍有同義，且在本文中用於指示執行某些功能或活性並與其他分子反應之分子部分。

【0136】 術語「鹵素」包括氟、氯、碘及溴。

【0137】 如本文所用之術語「鹵基」係指含有鹵素部分之醯基，包括但不限於-C(O)CH_3、-C(O)CF_3、-C(O)CH_2OCH_3及諸如此類。

【0138】 如本文所用之術語「鹵代烷基」係指含有鹵素部分之烷基，包括但不限於-CF_3及–CH_2CF_3及諸如此類。

【0139】 如本文所用之術語「雜烷基」係指由烷基及至少一個選自由 O、N、Si 及 S 組成之群之雜原子組成的直鏈或具支鏈或環狀烴基或其組合，且其中氮及硫原子可視情況經氧化，且氮雜原子可視情況經四級銨化。一或多個雜原子 O、N 及 S 及 Si 可位於雜烷基之任一內部位置，或烷基附著至分子其餘部分之位置。實例包括但不限於-CH_2-CH_2-O-CH_3、-CH_2-CH_2-NH-CH_3、-CH_2-CH_2-N(CH_3)-CH_3、-CH_2-S-CH_2-CH_3、-CH_2-CH_2,-S(O)-CH_3、-CH_2-CH_2-$S(O)_2$-CH_3、-CH=CH-O-CH_3、-$Si(CH_3)_3$、-CH_2-CH=N-OCH_3及–CH=CH-N(CH_3)-CH_3。此外，最多兩個雜原子可連續，諸如，舉例而言，-CH_2-NH-OCH_3及-CH_2-O-$Si(CH_3)_3$。

【0140】 術語「基於雜環之鍵聯」或「雜環鍵聯」係指由二羰基與二胺基反應形成之部分。所得反應產物係雜環，包括雜芳基或雜環烷基。所得雜環基用作非天然胺基酸或非天然胺基酸多肽與另一官能基之間之化學鍵連。在一個實施例中，雜環鍵聯包括含氮之雜環鍵聯，包括(僅舉例而言)吡唑鍵聯、吡咯鍵聯、

吲哚鍵聯、苯并二氮雜卓鍵聯及吡唑酮鍵聯。

【0141】 類似地，術語「伸雜烷基」係指衍生自雜烷基之二價基團，如藉由但不限於-CH_2-CH_2-S-CH_2-CH_2-及-CH_2-S-CH_2-CH_2-NH-CH_2-所例示。對於伸雜烷基，相同或不同之雜原子亦可佔據一個或兩個鏈末端(包括但不限於伸烷基氧基、伸烷基二氧基、伸烷基胺基、伸烷基二胺基、胺基氧基伸烷基及諸如此類)。更進一步，對於伸烷基及伸雜烷基連接基團而言，書寫連接基團之式之方向並不暗示連接基團之取向。舉例而言，式-$C(O)_2R'$-表示-$C(O)_2R'$-及-$R'C(O)_2$-二者。

【0142】 如本文所用之術語「雜芳基」或「雜芳族」係指含有至少一個選自N、O及S之雜原子之芳基；其中氮原子及硫原子可視情況經氧化，且一或多個氮原子可視情況經四級銨化。雜芳基可經取代或未經取代。雜芳基可藉助雜原子附著至分子之其餘部分。雜芳基之非限制性實例包括1-吡咯基、2-吡咯基、3-吡咯基、3-吡唑基、2-咪唑基、4-咪唑基、吡嗪基、2-噁唑基、4-噁唑基、2-苯基-4-噁唑基、5-噁唑基、3-異噁唑基、4-異噁唑基、5-異噁唑基、2-噻唑基、4-噻唑基、5-噻唑基、2-呋喃基、3-呋喃基、2-噻吩基、3-噻吩基、2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基、2-嘧啶基、4-嘧啶基、5-苯并噻唑基、嘌呤基、2-苯并咪唑基、5-吲哚基、1-異喹啉基、5-異喹啉基、2-喹喔啉基、5-喹喔啉基、3-喹啉基及6-喹啉基。

【0143】 如本文所用之術語「同烷基」係指為烴基之烷基。

【0144】 如本文所用之術語「一致」係指兩個或更多個一致之序列或子序列。此外，如本文所用之術語「實質上一致」係指當在比較窗口或指定區域內比較及比對以獲得最大對應(如使用比較算法中或藉由人工比對及目視檢查所量測)時，兩個或更多個具有一定百分比之相同連續單元之序列。僅舉例而言，若連續單元在指定區域內約60%一致、約65%一致、約70%一致、約75%一致、約80%一致、約85%一致、約90%一致或約95%一致，則兩個或更多個序列可「實

質上一致」。該等百分比用於闡述兩個或更多個序列之「一致性百分比」。序列之一致性可存在於長度為至少約 75-100 個連續單元之區域內，長度為約 50 個連續單元之區域內，或在未指定之情況下，存在於整個序列內。該定義亦係指測試序列之補體。僅舉例而言，當胺基酸殘基相同時，兩個或更多個多肽序列一致，而若胺基酸殘基在指定區域內約 60%一致、約 65%一致、約 70%一致、約 75%一致、約 80%一致、約 85%一致、約 90%一致或約 95%一致，則兩個或更多個多肽序列「實質上一致」。一致性可存在於長度為至少約 75 至約 100 個胺基酸之區域內，長度為約 50 個胺基酸之區域內，或在未指定之情況下，存在於多肽序列之整個序列內。此外，僅舉例而言，當核酸殘基相同時，兩個或更多個多核苷酸序列一致，而若核酸殘基在指定區域內約 60%一致、約 65%一致、約 70%一致、約 75%一致、約 80%一致、約 85%一致、約 90%一致或約 95%一致，則兩個或更多個多核苷酸序列「實質上一致」。一致性可存在於長度為至少約 75 至約 100 個核酸之區域內，長度為約 50 個核酸之區域內，或在未指定之情況下，存在於多核苷酸序列之整個序列內。

【0145】　就序列對比而言，一個序列通常充當與測試序列進行比較之參考序列。在使用序列對比算法時，將測試序列及參考序列輸入電腦中，必要時指定子序列坐標，並指定序列算法程式參數。可使用預設程式參數，或者可指定替代參數。接著，序列對比算法將基於程式參數計算測試序列相對於參考序列之序列一致性百分比。

【0146】　如本文所用之術語「免疫原性」係指對治療藥物投與之抗體反應。對治療性非天然胺基酸多肽之免疫原性可使用用於偵測生物流體中之抗非天然胺基酸多肽抗體之定量及定性分析來獲得。該等分析包括但不限於放射免疫分析(RIA)、酶聯免疫吸附分析(ELISA)、發光免疫分析(LIA)及螢光免疫分析(FIA)。對治療性非天然胺基酸多肽之免疫原性分析涉及比較投與治療性非天然

胺基酸多肽後之抗體反應與投與治療性天然胺基酸多肽後之抗體反應。

【0147】 如本文所用之術語「經分離」係指自非所關注組分中分離及去除所關注組分。經分離之物質可處於乾燥或半乾燥狀態，或處於溶液(包括但不限於水溶液)中。經分離之組分可為均質狀態，或者經分離之組分可為包含額外醫藥學上可接受之載劑及/或賦形劑之醫藥組成物之一部分。純度及均質性可使用分析化學技術(包括但不限於聚丙烯醯胺凝膠電泳或高效液相層析)來確定。此外，當所關注組分被分離且係製劑中存在之主要物質時，該組分在本文中被闡述為實質上純化的。如本文所用之術語「經純化」可指至少 85%純、至少 90%純、至少 95%純、至少 99%或更高純度之所關注組分。僅舉例而言，當核酸或蛋白質不含至少一些在天然狀態下與之締合的細胞組分，或者核酸或蛋白質已濃縮至大於其在體內或體外產生之濃度之水準時，該等核酸或蛋白質係「分離的」。此外，舉例而言，當與側接基因且編碼除所關注基因之外之蛋白質之開讀框分離時，基因係分離的。

【0148】 如本文所用之術語「標記」係指併入化合物中且易於偵測之物質，藉此可偵測及/或監測其物理分佈。

【0149】 如本文所用之術語「鍵聯」或「連接體」係指由連接體之官能基與另一分子之間之化學反應形成的鍵或化學部分。該等鍵可包括但不限於共價鍵聯及非共價鍵，而該等化學部分可包括但不限於酯、碳酸酯、亞胺磷酸酯、腙、縮醛、原酸酯、肽鍵聯及寡核苷酸鍵聯。水解穩定之鍵聯意指鍵聯在水中實質上穩定且在可用之 pH 值下(包括但不限於在生理條件下)持續延長時段、可能甚至無限期地不與水反應。水解不穩定或可降解之鍵聯意指鍵聯在水中或在水溶液(包括例如血液)中可降解。酶促不穩定或可降解之鍵聯意指鍵聯可被一或多種酶降解。僅舉例而言，PEG 及相關聚合物可在聚合物主鏈中或在聚合物主鏈與聚合物分子之一或多個末端官能基之間之連接體基團中包括可降解之鍵聯。該

等可降解鍵聯包括但不限於由 PEG 羧酸或活化之 PEG 羧酸與生物活性劑上之醇基反應形成之酯鍵聯，其中該等酯基通常在生理條件下水解以釋放生物活性劑。其他水解可降解之鍵聯包括但不限於碳酸酯鍵聯；亞胺鍵聯，其由胺與醛反應產生；磷酸酯鍵聯，其藉由使醇與磷酸基團反應形成；腙鍵聯，其係醯肼與醛之反應產物；縮醛鍵聯，其係醛與醇之反應產物；原酸酯鍵聯，其係甲酸酯與醇之反應產物；肽鍵聯，其藉由胺基(包括但不限於諸如 PEG 等聚合物之末端處)與肽之羧基形成；及寡核苷酸鍵聯，其藉由亞磷醯胺基團(包括但不限於聚合物之末端處)與寡核苷酸之 5'羥基形成。連接體包括但不限於短的直鏈、具支鏈、多臂或樹枝狀分子，諸如聚合物。在本發明之一些實施例中，連接體可為具支鏈的。在其他實施例中，連接體可雙官能連接體。在一些實施例中，連接體可為三官能連接體。大量不同的可裂解連接體為熟習此項技術者已知。參見美國專利第 4,618,492 號；第 4,542,225 號及第 4,625,014 號。自該等連接體基團釋放劑之機制包括例如光不穩定鍵之輻照及酸催化水解。美國專利第 4,671,958 號例如包括對包含連接體之免疫偶聯物之闡述，該等連接體在體內靶位點處由患者補體系統之蛋白水解酶裂解。連接體之長度可根據多肽及與其連接之分子之間期望之空間關係預先確定或選擇。鑒於已報導的用於將多種放射診斷化合物、放射治療化合物、藥物、毒素及其他劑附著至抗體之大量方法，熟習此項技術者將能夠確定用於將給定劑或分子附著至多肽之適宜方法。

【0150】　如本文所用之術語「經修飾」係指天然胺基酸、非天然胺基酸、天然胺基酸多肽或非天然胺基酸多肽存在變化。該等變化或修飾可藉由天然胺基酸、非天然胺基酸、天然胺基酸多肽或非天然胺基酸多肽之合成後修飾，或藉由天然胺基酸、非天然胺基酸、天然胺基酸多肽或非天然胺基酸多肽之共轉譯或轉譯後修飾獲得。「經修飾或未經修飾」形式意指所討論之天然胺基酸、非天然胺基酸、天然胺基酸多肽或非天然胺基酸多肽視情況經修飾，亦即所討論

之天然胺基酸、非天然胺基酸、天然胺基酸多肽或非天然胺基酸多肽可經修飾或未經修飾。

【0151】 如本文所用之術語「經調節之血清半衰期」係指經修飾之生物活性分子相對於其非修飾形式之循環半衰期的正或負變化。舉例而言，經修飾之生物活性分子包括但不限於天然胺基酸、非天然胺基酸、天然胺基酸多肽或非天然胺基酸多肽。舉例而言，血清半衰期係藉由在投與生物活性分子或經修飾之生物活性分子後之不同時間點獲取血液樣品並確定每一樣品中該分子之濃度來量測。血清濃度與時間之相關性容許計算血清半衰期。舉例而言，經調節之血清半衰期可為血清半衰期之增加，此可使得能夠改良給藥方案或避免毒性效應。該等血清之增加可為至少約兩倍、至少約三倍、至少約五倍或至少約十倍。評價任一多肽之血清半衰期增加之方法為熟習此項技術者所熟知。

【0152】 如本文所用之術語「經調節之治療半衰期」係指治療有效量之經修飾之生物活性分子相對於其非修飾形式之半衰期的正或負變化。舉例而言，經修飾之生物活性分子包括但不限於天然胺基酸、非天然胺基酸、天然胺基酸多肽或非天然胺基酸多肽。舉例而言，治療半衰期係藉由量測分子在投與後於不同時間點之藥物動力學及/或之藥效學性質來量測。增加之治療半衰期使得能夠達成特別有益之給藥方案、特別有益之總劑量，或避免不期望之效應。舉例而言，增加之治療半衰期可能係由增加之效力、經修飾分子與其靶標之增加或減少之結合、未經修飾分子之另一參數或作用機制之增加或減少、或酶(諸如僅舉例而言蛋白酶)對分子之增加或減少之分解引起。評價任一多肽之治療半衰期增加之方法為熟習此項技術者所熟知。

【0153】 「非天然胺基酸」係指不為20種常見胺基酸或吡咯離胺酸或硒代半胱胺酸中一者之胺基酸。可與術語「非天然胺基酸」同義使用之其他術語係「非天然編碼之胺基酸」、「非天然胺基酸」、「非天然存在之胺基酸」以及其各

種帶連字符及不帶連字符之形式。術語「非天然胺基酸」包括但不限於藉由修飾天然編碼之胺基酸(包括但不限於 20 種常見胺基酸或吡咯離胺酸及硒代半胱胺酸)而天然存在、但自身並未藉由轉譯複合物併入增長之多肽鏈中之胺基酸。該等胺基酸之實例包括但不限於 N-乙醯基葡糖胺基-L-絲胺酸、N-乙醯基葡糖胺基-L-蘇胺酸及 O-磷酸酪胺酸。此外，術語「非天然胺基酸」包括但不限於非天然存在且可合成獲得或可藉由修飾非天然基酸獲得之胺基酸。在一些實施例中，非天然胺基酸包含離胺酸類似物，例如，N6-疊氮基乙氧基-L-離胺酸(AzK)、N6-炔丙基乙氧基-L-離胺酸(PraK)、BCN-L-離胺酸、降莰烯離胺酸、TCO-離胺酸、甲基四嗪離胺酸或烯丙氧基羰基離胺酸。在一些實施例中，非天然胺基酸包含糖部分。該等胺基酸之實例包括 *N*-乙醯基-L-葡糖胺基-L-絲胺酸、*N*-乙醯基-L-半乳糖胺基-L-絲胺酸、*N*-乙醯基-L-葡糖胺基-L-蘇胺酸、*N*-乙醯基-L-葡糖胺基-L-天冬醯胺酸及 *O*-甘露糖胺基-L-絲胺酸。該等胺基酸之實例亦包括胺基酸與糖之間天然存在之 N-或 O-鍵聯由自然界中不常見之共價鍵聯(包括但不限於烯烴、肟、硫醚、醯胺及諸如此類)置換之實例。該等胺基酸之實例亦包括在天然存在之蛋白質中不常見之糖，諸如 2-去氧-葡萄糖、2-去氧半乳糖及諸如此類。非天然胺基酸之特定實例包括但不限於*對*乙醯基-L-苯丙胺酸、*對*炔丙氧基苯丙胺酸、O-甲基-L-酪胺酸、L-3-(2-萘基)丙胺酸、3-甲基-苯丙胺酸、O-4-烯丙基-L-酪胺酸、4-丙基-L-酪胺酸、三-O-乙醯基-GlcNAcβ-絲胺酸、L-多巴、氟化苯丙胺酸、異丙基-L-苯丙胺酸、*對*疊氮基-L-苯丙胺酸、*對*醯基-L-苯丙胺酸、*對*苯甲醯基-L-苯丙胺酸、L-磷酸絲胺酸、膦醯基絲胺酸、膦醯基酪胺酸、*對*碘-苯丙胺酸、*對*溴苯丙胺酸、*對*胺基-L-苯丙胺酸、*對*炔丙氧基-L-苯丙胺酸、4-疊氮基-L-苯丙胺酸、對疊氮基乙氧基苯丙胺酸及對疊氮基甲基-苯丙胺酸及諸如此類。在一些實施例中，非天然胺基酸係選自由對乙醯基-苯丙胺酸、4-疊氮基-L-苯丙胺酸、對疊氮基乙氧基苯丙胺酸或對疊氮基甲基-苯丙胺酸組成之群。

【0154】 如本文所用之術語「核酸」係指呈單鏈或雙鏈形式之去氧核糖核苷酸、去氧核糖核苷、核糖核苷或核糖核苷酸及其聚合物。僅舉例而言，該等核酸及核酸聚合物包括但不限於：(i)具有與參考核酸相似之結合性質且以與天然存在之核苷酸相似之方式代謝之天然核苷酸之類似物；(ii)寡核苷酸類似物，包括但不限於 PNA (肽核酸)、用於反義技術中之 DNA 類似物(硫代磷酸酯、胺基磷酸酯及諸如此類)；(iii)其經保守修飾之變異體(包括但不限於簡併密碼子取代)及互補序列以及明確指示之序列。舉例而言，藉由生成其中一或多個所選(或全部)密碼子之第三位經混合鹼基及/或去氧肌苷殘基取代的序列可達成簡併密碼子取代(Batzer 等人，Nucleic Acid Res.19:5081 (1991)；Ohtsuka 等人，J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985)；及 Rossolini 等人，Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994))。

【0155】 如本文所用之術語「氧化劑」係指能夠自被氧化之化合物中去除電子之化合物或材料。舉例而言，氧化劑包括但不限於氧化之麩胱甘肽、胱胺酸、胱胺、氧化之二硫蘇糖醇、氧化之赤藓糖醇及氧。眾多種氧化劑適用於本文所述之方法及組成物中。

【0156】 如本文所用之術語「醫藥學上可接受」係指不會消除化合物之生物活性或性質且相對無毒之材料(包括但不限於鹽、載劑或稀釋劑)，亦即，可將該材料投與個體而不會造成不期望生物效應或不與含有其之組成物中的任一組分以有害方式相互作用。

【0157】 如本文所用之術語「聚伸烷基二醇」或「聚(烯烴二醇)」係指直鏈或具支鏈聚合聚醚多元醇。該等聚伸烷基二醇，包括但不限於聚乙二醇、聚丙二醇、聚丁二醇及其衍生物。其他例示性實施例列示於例如商業供應商目錄(諸如 Shearwater 公司之目錄「Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Applications」(2001))中。僅舉例而言，該等聚合聚醚多元醇具有介於約 0.1 kDa 至約 100 kDa 之間之平均分子量。舉例而言，該等聚合聚醚多元醇包括但不限於

介於約 100 Da 與約 100,000 Da 或更大之間。聚合物之分子量可介於約 100 Da 與約 100,000 Da 之間，包括但不限於約 100,000 Da、約 95,000 Da、約 90,000 Da、約 85,000 Da、約 80,000 Da、約 75,000 Da、約 70,000 Da、約 65,000 Da、約 60,000 Da、約 55,000 Da、約 50,000 Da、約 45,000 Da、約 40,000 Da、約 35,000 Da、約 30,000 Da、約 25,000 Da、約 20,000 Da、約 15,000 Da、約 10,000 Da、約 9,000 Da、約 8,000 Da、約 7,000 Da、約 6,000 Da、約 5,000 Da、約 4,000 Da、約 3,000 Da、約 2,000 Da、約 1,000 Da、約 900 Da、約 800 Da、約 700 Da、約 600 Da、約 500 Da、400 Da、約 300 Da、約 200 Da 及約 100 Da。在一些實施例中，聚合物之分子量介於約 100 Da 與約 50,000 Da 之間。在一些實施例中，聚合物之分子量介於約 100 Da 與約 40,000 Da 之間。在一些實施例中，聚合物之分子量介於約 1,000 Da 與約 40,000 Da 之間。在一些實施例中，聚合物之分子量介於約 2,000 Da 至約 50,000 Da 之間。在一些實施例中，聚合物之分子量介於約 5,000 Da 與約 40,000 Da 之間。在一些實施例中，聚合物之分子量介於約 10,000 Da 與約 40,000 Da 之間。在一些實施例中，聚(乙二醇)分子係具支鏈聚合物。具支鏈 PEG 之分子量可介於約 1,000 Da 與約 100,000 Da 之間，包括但不限於約 100,000 Da、約 95,000 Da、約 90,000 Da、約 85,000 Da、約 80,000 Da、約 75,000 Da、約 70,000 Da、約 65,000 Da、約 60,000 Da、約 55,000 Da、約 50,000 Da、約 45,000 Da、約 40,000 Da、約 35,000 Da、約 30,000 Da、約 25,000 Da、約 20,000 Da、約 15,000 Da、約 10,000 Da、約 9,000 Da、約 8,000 Da、約 7,000 Da、約 6,000 Da、約 5,000 Da、約 4,000 Da、約 3,000 Da、約 2,000 Da 及約 1,000 Da。在一些實施例中，具支鏈 PEG 之分子量介於約 1,000 Da 與約 50,000 Da 之間。在一些實施例中，具支鏈 PEG 之分子量介於約 1,000 Da 與約 40,000 Da 之間。在一些實施例中，具支鏈 PEG 之分子量介於約 5,000 Da 與約 40,000 Da 之間。在一些實施例中，具支鏈 PEG 之分子量介於約 5,000 Da 與約 20,000 Da 之間。在其他實施例中，

具支鏈 PEG 之分子量介於約 2,000 至約 50,000 Da 之間。

【0158】 如本文所用之術語「聚合物」係指由重複次單元構成之分子。該等分子包括但不限於多肽、多核苷酸或多糖或聚伸烷基二醇。

【0159】 術語「多肽」、「肽」及「蛋白質」在本文中可互換使用，係指胺基酸殘基之聚合物。亦即，針對多肽之闡述同樣適用於肽之闡述及蛋白質之闡述，且反之亦然。該等術語適用於天然存在之胺基酸聚合物以及其中一或多個胺基酸殘基係非天然胺基酸之胺基酸聚合物。此外，該等「多肽」、「肽」及「蛋白質」包括任何長度之胺基酸鏈，包括全長蛋白質，其中胺基酸殘基藉由共價肽鍵連接。

【0160】 術語「經轉譯後修飾」係指在胺基酸已經轉譯併入多肽鏈中之後發生的天然或非天然胺基酸之任一修飾。該等修飾包括但不限於共轉譯體內修飾、共轉譯體外修飾(諸如在無細胞轉譯系統中)、轉譯後體內修飾及轉譯後體外修飾。

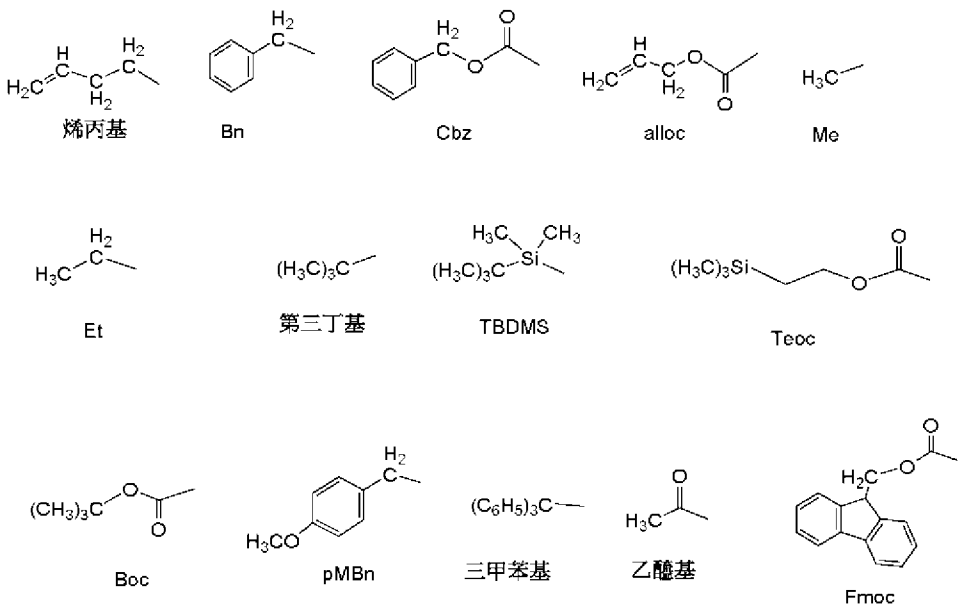
【0161】 如本文所用之術語「前藥」或「醫藥學上可接受之前藥」係指在體內或體外轉化成母體藥物之劑，其中其不會消除藥物之生物活性或性質且相對無毒，亦即，可將該材料投與個體而不會造成不期望生物效應或不與含有其之組成物中的任一組分以有害方式相互作用。前藥通常係藥物前驅物，其在投與個體並隨後吸收後，經由一些過程，諸如藉由代謝途徑加以轉化，轉化為活性物或更具活性之物質。一些前藥具有存在於前藥上之化學基團，該化學基團使得前藥之活性較低及/或賦予藥物溶解性或某另一性質。在化學基團已由前藥裂解及/或修飾後，生成活性藥物。前藥在體內藉助酶促或非酶促反應轉化為活性藥物。前藥可提供改良之物理化學性質，諸如更佳之溶解性、增強之遞送特徵，諸如特異性靶向特定細胞、組織、器官或配位體，以及藥物之改良治療價值。該等前藥之益處包括但不限於：(i)與母體藥物相比之易投與性；(ii)前藥可藉由

經口投與而係生物可利用的，而母體藥物並非如此；以及(iii)前藥與母體藥物相比亦可具有在醫藥組成物中之改進溶解度。前藥包括活性藥物之藥理學上無活性或活性降低之衍生物。前藥可設計成藉助操縱藥物之性質(諸如物理化學、生物製藥或藥物動力學性質)來調節到達期望作用位點之藥物或生物活性分子之量。前藥之非限制性實例將為非天然胺基酸多肽，其係以酯(「前藥」)形式投與以促進跨細胞膜傳送(其中水溶性對於流動性不利)，但隨後在進入細胞內後可代謝水解成羧酸(活性實體) (其中水溶性有益)。前藥可設計為可逆藥物衍生物，其用作改性劑，以增強藥物轉運至位點特異性組織。

【0162】　如本文所用之術語「預防有效量」係指預防性地施加於患者的包含至少一種非天然胺基酸多肽或至少一種經修飾之非天然胺基酸多肽之組成物之量，其將在一定程度上減輕所治療疾病、疾患或病症之一或多種症狀。在該等預防性應用中，該等量可取決於患者之健康狀況、體重及諸如此類。認為藉由常規實驗(包括但不限於劑量遞增臨床試驗)確定該等預防有效量為熟習此項技術者所熟知。

【0163】　如本文所用之術語「受保護」係指在某些反應條件下防止化學反應性官能基反應之「保護基團」或部分之存在。保護基團將取決於受保護化學反應基團之類型而變化。僅舉例而言，(i)若化學反應基團係胺或醯肼，則保護基團可選自第三丁氧基羰基(t-Boc)及 9-芴基甲氧基羰基(Fmoc)；(ii)若化學反應基團係硫醇，則保護基團可為鄰吡啶基二硫化物；且(iii)若化學反應基團係羧酸，諸如丁酸或丙酸，或羥基，則保護基團可為苄基或烷基，諸如甲基、乙基或第三丁基。

【0164】　僅舉例而言，阻斷/保護基團可選自：



此外，保護基團包括但不限於包括光不穩定基團，諸如 Nvoc 及 MeNvoc 以及此項技術中已知之其他保護基團。其他保護基團闡述於 Greene 及 Wuts，Protective Groups in Organic Synthesis，第 3 版，John Wiley & Sons, New York, NY, 1999 (其全文以引用方式併入本文中)中。

【0165】 術語「重組宿主細胞」(亦稱為「宿主細胞」)係指包括外源多核苷酸之細胞，其中用於將外源多核苷酸插入細胞中之方法包括但不限於直接攝取、轉導、f-接合(f-mating)或此項技術中已知用於產生重組宿主細胞之其他方法。僅舉例而言，該外源多核苷酸可為非整合載體，包括但不限於質體，或者可整合至宿主基因體中。

【0166】 如本文所用之術語「氧化還原活性劑」係指氧化或還原另一分子之分子，藉此該氧化還原活性劑變得還原或氧化。氧化還原活性劑之實例包括但不限於二茂鐵、醌、$Ru^{2+/3+}$錯合物、$Co^{2+/3+}$錯合物及 $Os^{2+/3+}$錯合物。

【0167】 如本文所用之術語「還原劑」係指能夠將電子添加至被還原化合物之化合物或材料。舉例而言，還原劑包括但不限於二硫蘇糖醇(DTT)、2-巯基乙醇、二硫赤蘚糖醇、半胱胺酸、半胱胺(2-胺基乙硫醇)及還原型麩胱甘肽。僅舉例而言，該等還原劑可用於將巯基維持在還原狀態並還原分子內或分子間二硫

鍵。

【0168】 如本文所用，「再摺疊」闡述將不正確摺疊或未摺疊狀態轉變為天然或正確摺疊構形之任一過程、反應或方法。僅舉例而言，再摺疊將含有二硫鍵之多肽關於二硫鍵自不正確摺疊或未摺疊狀態轉變為天然或正確摺疊之構形。該等含有二硫鍵之多肽可為天然胺基酸多肽或非天然胺基酸多肽。

【0169】 如本文所用之術語「安全性」或「安全性特徵」係指相對於已投與藥物之次數可能與藥物之投與有關的副作用。舉例而言，認為已投與多次且僅產生輕微副作用或無副作用之藥物具有極佳安全性。用於評價任何多肽之安全性特徵之方法為此項技術中已知。

【0170】 如本文所用之片語「與……選擇性地雜交」或「與……特異性地雜交」係指當特定核苷酸序列存在於複雜混合物(包括但不限於總細胞或文庫 DNA 或 RNA)中時，分子在嚴格雜交條件下與該序列之結合、形成雙鏈(duplexing)或雜交。

【0171】 片語「嚴格雜交條件」係指 DNA、RNA、PNA 或其他核酸模擬物或其組合之序列在低離子強度及高溫條件下之雜交。舉例而言，在嚴格條件下，探針將與複雜核酸混合物(包括但不限於總細胞或文庫 DNA 或 RNA)中之靶子序列雜交，但不與複雜混合物中之其他序列雜交。嚴格條件具有序列依賴性且在不同情況下將有所不同。舉例而言，較長序列在較高溫度下特異性雜交。嚴格雜交條件包括但不限於(i)低於特定序列在限定離子強度及 pH 下之熱熔點(Tm)約 5-10°C；(ii)鹽濃度在約 pH 7.0 至約 pH 8.3 下係約 0.01 M 至約 1.0 M 且溫度對於短探針(包括但不限於約 10 至約 50 個核苷酸)而言係至少約 30°C 且對於長探針(包括但不限於大於 50 個核苷酸)係至少約 60°C；(iii)包括但不限於甲醯胺在內之去穩定劑之添加；(iv) 50%甲醯胺、5X SSC 及 1% SDS，於 42°C下孵育，或 5X SSC、約 1% SDS，於 65°C下孵育，於 0.2X SSC 及約 0.1% SDS 中於 65°C下

洗滌約 5 分鐘至約 120 分鐘。僅舉例而言，選擇性或特異性雜交之偵測包括但不限於至少兩倍於背景之陽性信號。核酸雜交之詳盡指導見於 Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Probes, 「Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays」 (1993)中。

【0172】 如本文所用之術語「個體」係指作為治療、觀察或實驗之對象之動物。僅舉例而言，個體可為但不限於哺乳動物，包括但不限於人類。

【0173】 如本文所用之術語「實質上純化」係指所關注組分，其可實質上或基本上不含在純化之前通常伴隨所關注組分或與所關注組分相互作用的其他組分。僅舉例而言，當所關注組分之製劑含有小於約 30%、小於約 25%、小於約 20%、小於約 15%、小於約 10%、小於約 5%、小於約 4%、小於約 3%、小於約 2%或小於約 1% (以乾重計)之污染組分時，所關注組分可為「實質上純化」的。因此，所關注之「實質上純化」組分可具有約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%或更大之純度水準。僅舉例而言，天然胺基酸多肽或非天然胺基酸多肽可自天然細胞，或在重組產生之天然胺基酸多肽或非天然胺基酸多肽之情況下自宿主細胞純化。舉例而言，當天然胺基酸多肽或非天然胺基酸多肽之製劑含有小於約 30%、小於約 25%、小於約 20%、小於約 15%、小於約 10%、小於約 5%、小於約 4%、小於約 3%、小於約 2%或小於約 1% (以乾重計)之污染材料時，該製劑可為「實質上純化」的。舉例而言，當天然胺基酸多肽或非天然胺基酸多肽係由宿主細胞重組產生時，天然胺基酸多肽或非天然胺基酸多肽可以細胞乾重之約 30%、約 25%、約 20%、約 15%、約 10%、約 5%、約 4%、約 3%、約 2%或約 1%或更小存在。舉例而言，當天然胺基酸多肽或非天然胺基酸多肽係由宿主細胞重組產生時，天然胺基酸多肽或非天然胺基酸多肽可以細胞乾重之約 5 g/L、約 4 g/L、約 3 g/L、約 2

g/L、約 1 g/L、約 750 mg/L、約 500 mg/L、約 250 mg/L、約 100 mg/L、約 50 mg/L、約 10 mg/L 或約 1 mg/L 或更小存在於培養基中。舉例而言，「實質上純化」之天然胺基酸多肽或非天然胺基酸多肽可具有約 30%、約 35%、約 40%、約 45%、約 50%、約 55%、約 60%、約 65%、約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 99%或更大之純度水準，如藉由適當方法(包括但不限於 SDS/PAGE 分析、RP-HPLC、SEC 及毛細管電泳)所確定。

【0174】 術語「取代基」(亦稱為「非干擾取代基」)係指可用於置換分子上另一基團之基團。該等基團包括但不限於鹵基、C_1-C_{10} 烷基、C_2-C_{10} 烯基、C_2-C_{10} 炔基、C_1-C_{10} 烷氧基、C_5-C_{12} 芳烷基、C_3-C_{12} 環烷基、C_4-C_{12} 環烯基、苯基、經取代之苯基、甲苯甲醯基(toluolyl)、二甲苯基、聯苯基、C_2-C_{12} 烷氧基烷基、C_5-C_{12} 烷氧基芳基、C_5-C_{12} 芳氧基烷基、C_7-C_{12} 氧基芳氧基、C_1-C_6 烷基亞磺醯基、C_1-C_{10} 烷基磺醯基、$-(CH_2)_m-O-(C_1-C_{10}$ 烷基) (其中 m 係 1 至 8)、芳基、經取代之芳基、經取代之烷氧基、氟烷基、雜環基、經取代之雜環基、硝基烷基、$-NO_2$、-CN、$-NRC(O)-(C_1-C_{10}$ 烷基)、$-C(O)-(C_1-C_{10}$ 烷基)、C_2-C_{10} 烷基硫代烷基、$-C(O)O-(C_1-C_{10}$ 烷基)、-OH、$-SO_2$、=S、-COOH、$-NR_2$、羰基、$-C(O)-(C_1-C_{10}$ 烷基)$-CF_3$、$-C(O)-CF_3$、$-C(O)NR_2$、$-(C_1-C_{10}$ 芳基)$-S-(C_6-C_{10}$ 芳基)、$-C(O)-(C_6-C_{10}$ 芳基)、$-(CH_2)_m-O-(CH_2)_m-O-(C_1-C_{10}$ 烷基) (其中每一 m 皆為 1 至 8)、$-C(O)NR_2$、$-C(S)NR_2$、$-SO_2NR_2$、$-NRC(O)NR_2$、$-NRC(S)NR_2$、其鹽及諸如此類。前一列表中之每一 R 基團皆包括但不限於 H、烷基或經取代之烷基、芳基或經取代之芳基、或烷芳基。在取代基由其自左向右書寫之習用化學式指定之情況下，其同樣涵蓋自右向左書寫該結構會產生之化學上相同之取代基；舉例而言，$-CH_2O-$ 等效於$-OCH_2-$。

【0175】 僅舉例而言，用於烷基及雜烷基(包括稱為伸烷基、烯基、伸雜烷基、雜烯基、炔基、環烷基、雜環烷基、環烯基及雜環烯基之彼等基團)之取代基包

括但不限於：-OR、=O、=NR、=N-OR、-NR_2、-SR、-鹵素、-SiR_3、-OC(O)R、-C(O)R、-CO_2R、-$CONR_2$、-$OC(O)NR_2$、-NRC(O)R、-$NRC(O)NR_2$、-$NR(O)_2R$、-NR-$C(NR_2)$=NR、-S(O)R、-$S(O)_2R$、-$S(O)_2NR_2$、-$NRSO_2R$、-CN 及-NO_2。前一列表中之每一 R 基團皆包括但不限於氫、經取代或未經取代之雜烷基、經取代或未經取代之芳基(包括但不限於經 1-3 個鹵素取代之芳基)、經取代或未經取代之烷基、烷氧基或硫代烷氧基、或芳烷基。當兩個 R 基團附著至相同氮原子時，其可與氮原子組合以形成 5 員、6 員或 7 員環。舉例而言，-NR_2 意在包括但不限於 1-吡咯啶基及 4-嗎啉基。

【0176】 舉例而言，用於芳基及雜芳基之取代基包括但不限於-OR、=O、=NR、=N-OR、-NR_2、-SR、-鹵素、-SiR_3、-OC(O)R、-C(O)R、-CO_2R、-$CONR_2$、-$OC(O)NR_2$、-NRC(O)R、-$NRC(O)NR_2$、-$NR(O)_2R$、-NR-$C(NR_2)$=NR、-S(O)R、-$S(O)_2R$、-$S(O)_2NR_2$、-$NRSO_2R$、-CN、-NO_2、-R、-N_3、-$CH(Ph)_2$、氟(C_1-C_4)烷氧基及氟(C_1-C_4)烷基，其數目在零至芳族環系統上打開價鍵之總數之範圍內；且其中前一列表中之每一 R 基團皆包括但不限於氫、烷基、雜烷基、芳基及雜芳基。

【0177】 如本文所用之術語「治療有效量」係指投與業已罹患疾病、疾患或病症之患者的含有至少一種非天然胺基酸多肽及/或至少一種經修飾之非天然胺基酸多肽之組成物之量，其足以治癒所治療疾病、病症或疾患或在一定程度上至少部分停滯、或減輕所治療疾病、病症或疾患之一或多種症狀。該等組成物之有效性取決於疾患(包括但不限於疾病、病症或疾患之嚴重程度及病程)、先前療法、患者之健康狀態及藥物反應以及治療醫師之判斷。僅舉例而言，治療有效量可藉由包括但不限於劑量遞增臨床試驗在內之常規實驗來確定。

【0178】 如本文所用之術語「硫代烷氧基」係指經由氧原子連接至分子之含硫烷基。

【0179】 如本文所用之術語「毒性部分」或「毒性基團」係指可引起傷害、干擾或死亡之化合物。毒性部分包括但不限於奧裡斯他汀(auristatin)、DNA小溝結合劑、DNA小溝烷基化劑、烯二炔、萊克森(lexitropsin)、倍癌黴素(duocarmycin)、紫杉烷、嘌呤黴素、TLR-促效劑、類美登素(maytansinoid)、長春花生物鹼(vinca alkaloid)、AFP、MMAF、MMAE、AEB、AEVB、奧裡斯他汀E、太平洋紫杉醇、多西他賽、CC-1065、SN-38、托泊替康(topotecan)、嗎啉代-多柔比星、根黴素(rhizoxin)、氰基嗎啉代-多柔比星、TLR-促效劑-10、棘黴素(echinomycin)、考布他汀(combretatstatin)、卡裡奇黴素(chalicheamicin)、美登素(maytansine)、DM-1、紡綞菌素(netropsin)、鬼臼毒素(例如依託泊苷(etoposide)、替尼泊苷(teniposide)等)、漿果赤黴素(baccatin)及其衍生物、抗微管蛋白劑、賽託福森(cryptophysin)、考布他汀、奧裡斯他汀E、長春新鹼、長春鹼、長春地辛(vindesine)、長春瑞濱(vinorelbine)、VP-16、喜樹鹼(camptothecin)、埃博黴素(epothilone) A、埃博黴素B、諾考達唑(nocodazole)、秋水仙鹼(colchicine)、秋水仙胺(colcimid)、雌氮芥(estramustine)、西馬多丁(cemadotin)、盤形德莫利得(discodermolide)、美登素、艾榴素(eleutherobin)、甲基二(氯乙基)胺(mechlorethamine)、環磷醯胺、美法侖(melphalan)、卡莫司汀(carmustine)、洛莫司汀(lomustine)、司莫司汀(semustine)、鏈脲黴素(streptozocin)、氯脲菌素(chlorozotocin)、尿嘧啶氮芥、氮芥(chlormethine)、異環磷醯胺、氯芥苯丁酸(chlorambucil)、哌泊溴烷(pipobroman)、三伸乙基三聚氰胺(triethylenemelamine)、三伸乙基硫代磷醯胺、白消安(busulfan)、達卡巴嗪(dacarbazine)及替莫唑胺、阿糖胞苷(cytarabine)、胞嘧啶阿位伯糖苷(cytosine arabinoside)、氟尿嘧啶、氟尿苷、6-硫鳥嘌呤、6-巯嘌呤、噴司他汀(pentostatin)、5-氟尿嘧啶、胺甲喋呤(methotrexate)、10-炔丙基-5,8-二去氮葉酸鹽、5,8-二去氮四氫葉酸、甲醯四氫葉酸、磷酸氟達拉濱(fludarabine phosphate)、噴司他汀(pentostatine)、吉西他濱

(gemcitabine)、阿糖胞苷(Ara-C)、太平洋紫杉醇、多西他賽、去氧助間型黴素(deoxycoformycin)、絲裂黴素-C (mitomycin-C)、L-天冬醯胺酸酶、硫唑嘌呤、布喹那(brequinar)、抗生素(例如，蒽環類抗生素、正大黴素(gentamicin)、頭孢噻吩(cefalotin)、萬古黴素(vancomycin)、替拉萬星(telavancin)、達托黴素(daptomycin)、亞藥索黴素(azithromycin)、紅黴素、羅紅黴素(rocithromycin)、呋喃唑酮(furazolidone)、阿莫西林(amoxicillin)、安比西林(ampicillin)、卡本西林(carbenicillin)、氟氯西林(flucloxacillin)、甲氧西林(methicillin)、青黴素(penicillin)、賽普沙辛(ciprofloxacin)、莫西沙星(moxifloxacin)、氧氟沙星(ofloxacin)、去氧羥四環素(doxycycline)、米諾四環素(minocycline)、氧四環素(oxytetracycline)、四環素(tetracycline)、鏈黴素(streptomycin)、利福布丁(rifabutin)、乙胺丁醇(ethambutol)、利福昔明(rifaximin)等)、抗病毒藥物(例如，阿巴卡韋(abacavir)、阿昔洛韋(acyclovir)、安普利近(ampligen)、西多福韋(cidofovir)、地拉韋啶(delavirdine)、去羥肌苷(didanosine)、依法韋侖(efavirenz)、恩替卡韋(entecavir)、膦乙酸(fosfonet)、更昔洛韋(ganciclovir)、伊巴他濱(ibacitabine)、異丙肌苷(imunovir)、碘苷(idoxuridine)、肌苷、洛匹那韋(lopinavir)、美替沙腙(methisazone)、蕾莎瓦(nexavir)、奈韋拉平(nevirapine)、奧司他韋(oseltamivir)、噴昔洛韋(penciclovir)、司他夫定(stavudine)、曲氟尿苷(trifluridine)、舒發泰(truvada)、伐昔洛韋(valaciclovir)、紮那米韋(zanamivir)等)、鹽酸道諾黴素(daunorubicin hydrochloride)、道諾黴素(daunomycin)、紅比黴素(rubidomycin)、正定黴素(cerubidine)、伊達比星(idarubicin)、多柔比星、泛艾黴素(epirubicin)及嗎啉代衍生物、吩噁嗪酮雙環肽(phenoxizone biscyclopeptide) (例如，放線菌素(dactinomycin))、基本糖肽(例如，博萊黴素(bleomycin))、蒽醌糖苷(例如，普卡黴素(plicamycin)、光輝黴素(mithramycin))、蒽二酮(例如，米托蒽醌(mitoxantrone))、吖吮吡咯并吲哚二酮(azirinopyrrolo indoledione) (例如，絲裂黴

素(mitomycin))、大環免疫抑制劑(例如，環孢素、FK-506、他克莫司(tacrolimus)、普樂可複(prograf)、雷帕黴素(rapamycin)等)、諾維本(navelbene)、CPT-11、阿那曲唑(anastrazole)、來曲唑(letrazole)、卡培他濱(capecitabine)、雷洛昔芬(reloxafine)、環磷醯胺、異環磷醯胺、卓羅沙吩(droloxafine)、同分異構秋水仙鹼(allocolchicine)、軟海綿素 B (Halichondrin B)、秋水仙鹼、秋水仙鹼衍生物、美登素、根黴素、太平洋紫杉醇、太平洋紫杉醇衍生物、多西他賽、硫代秋水仙鹼、三苯甲基半胱胺酸(trityl cysterin)、磷酸長春鹼、磷酸長春新鹼、順鉑、卡鉑、羥基脲、N-甲肼、表鬼臼毒素、丙卡巴肼(procarbazine)、米托蒽醌、甲醯四氫葉酸及替加氟(tegafur)。「紫杉烷」包括太平洋紫杉醇，以及任一活性紫杉烷衍生物或前藥。

【0180】　如本文所用之術語「治療」(「treat」、「treating」或「treatment」)包括減輕、減少或改善疾病或疾患之症狀，預防額外症狀，改善或預防症狀之潛在代謝病因，抑制疾病或疾患，例如，阻滯疾病或疾患發生，減輕疾病或疾患、引起疾病或疾患消退，減輕由疾病或疾患而引起之疾患或終止疾病或疾患之症狀。術語「治療」(「treat」、「treating」或「treatment」)包括但不限於預防性治療及/或治療性治療。

【0181】　如本文所用之術語「水溶性聚合物」係指可溶於水性溶劑之任一聚合物。該等水溶性聚合物包括但不限於聚乙二醇、聚乙二醇丙醛、其單 C_1-C_{10} 烷氧基或芳基氧基衍生物(闡述於美國專利號 5,252,714 中，其以引用方式併入本文中)、單甲氧基-聚乙二醇、聚乙烯基吡咯啶酮、聚乙烯醇、聚胺基酸、二乙烯基醚馬來酸酐、N-(2-羥基丙基)-甲基丙烯醯胺、葡聚糖、葡聚糖衍生物(包括硫酸葡聚糖)、聚丙二醇、聚氧化丙烯/氧化乙烯共聚物、聚氧乙基化多元醇、肝素、肝素片段、多糖、寡糖、聚糖、纖維素及纖維素衍生物(包括但不限於甲基纖維素及羧甲基纖維素)、血清白蛋白、澱粉及澱粉衍生物、多肽、聚伸烷基二醇及

其衍生物、聚伸烷基二醇共聚物及其衍生物、聚乙烯基乙基醚及 α-β-聚[(2-羥基乙基)-DL-天冬醯胺及諸如此類或其混合物。僅舉例而言，該等水溶性聚合物與天然胺基酸多肽或非天然多肽之偶合可導致變化，包括但不限於增加之水溶性、增加或調節之血清半衰期、相對於經未修飾形式增加或調節之治療半衰期、增加之生物利用度、調節之生物活性、延長之循環時間、調節之免疫原性、調節之物理締合特徵，包括但不限於聚集及多聚物形成、改變之受體結合、活性調節劑或其他靶向多肽結合、改變之與一或多個結合配偶體之結合以及改變之靶向多肽受體二聚化或多聚化。此外，該等水溶性聚合物可具有或可不具有其自身生物活性，且可用作用於將靶向多肽附著至其他物質(包括但不限於一或多種靶向多肽、或一或多種生物活性分子)之連接體。

【0182】　除非另有說明，否則採用此項技術範圍內之質譜、NMR、HPLC、蛋白質化學、生物化學、重組 DNA 技術及藥理學之習用方法。

【0183】　本文所呈現之化合物(包括但不限於非天然胺基酸、非天然胺基酸多肽、經修飾之非天然胺基酸多肽及用於產生上述化合物之試劑)包括同位素標記之化合物，除一或多個原子由原子量或質量數不同於自然界中常見原子量或質量數之原子替代外，該等化合物與本文所呈現各式及結構中所述之化合物相同。可併入本發明化合物中之同位素之實例包括氫、碳、氮、氧、氟及氯之同位素，分別諸如 ^{2}H、^{3}H、^{13}C、^{14}C、^{15}N、^{18}O、^{17}O、^{35}S、^{18}F、^{36}Cl。本文所述之某些經同位素標記之化合物(例如彼等併入有諸如 ^{3}H 及 ^{14}C 等放射性同位素者)可用於藥物及/或基質組織分佈分析中。此外，用諸如氘(亦即 ^{2}H)等同位素進行取代因具有更強之代謝穩定性而可提供某些治療優勢，例如活體內半衰期增加或劑量需求減少。

【0184】　本文中之一些化合物(包括但不限於非天然胺基酸、非天然胺基酸多肽及經修飾之非天然胺基酸多肽以及用於產生上述化合物之試劑)具有不對稱碳

原子，且因此可以鏡像異構物或非鏡像異構物形式存在。非鏡像異構物混合物可基於其物理化學差異，藉由已知方法，例如藉由層析及/或分級結晶來分離成其單個非鏡像異構物。可藉由與適當旋光活性化合物(例如，醇)反應將鏡像異構物混合物轉化成非鏡像異構物混合物，分離非鏡像異構物並將單個非鏡像異構物轉化(例如，水解)成相應純鏡像異構物，而分離鏡像異構物。所有該等異構物(包括非鏡像異構物、鏡像異構物及其混合物)皆視為本文所述組成物之一部分。

【0185】　在額外或其他實施例中，本文所述之化合物(包括但不限於非天然胺基酸、非天然胺基酸多肽及經修飾之非天然胺基酸多肽以及用於產生上述化合物之試劑)係以前藥形式使用。在額外或其他實施例中，本文所述之化合物(包括但不限於非天然胺基酸、非天然胺基酸多肽及經修飾之非天然胺基酸多肽以及用於產生上述化合物之試劑)係在投與至有需要之有機體後經代謝而產生代謝物，然後使用該代謝物產生期望效應，包括期望治療效應。在另外或額外之實施例中係非天然胺基酸及「經修飾或未經修飾」之非天然胺基酸多肽之活性代謝物。

【0186】　本文所述之方法及調配物包括使用非天然胺基酸、非天然胺基酸多肽及經修飾之非天然胺基酸多肽之 N-氧化物、結晶形式(亦稱為多晶型物)或醫藥學上可接受之鹽。在某些實施例中，非天然胺基酸、非天然胺基酸多肽及經修飾之非天然胺基酸多肽可以互變異構物形式存在。所有互變異構物皆包括在本文所呈現之非天然胺基酸、非天然胺基酸多肽及經修飾之非天然胺基酸多肽之範圍內。此外，本文所述之非天然胺基酸、非天然胺基酸多肽及經修飾之非天然胺基酸多肽可以與醫藥學上可接受之溶劑(諸如水、乙醇及諸如此類)之溶劑合物形式以及非溶劑合物形式以及存在。本文所呈現之非天然胺基酸、非天然胺基酸多肽及經修飾之非天然胺基酸多肽之溶劑合物形式亦視為本文所揭示。

【0187】　本文中之一些化合物(包括但不限於非天然胺基酸、非天然胺基酸多

肽及經修飾之非天然胺基酸多肽以及用於產生上述化合物之試劑)可以若干互變異構形式存在。所有該等互變異構形式皆視為本文所述組成物之一部分。此外，舉例而言，本文中之任何化合物(包括但不限於非天然胺基酸、非天然胺基酸多肽及經修飾之非天然胺基酸多肽以及用於產生上述化合物之試劑)之所有烯醇-酮基形式皆視為本文所述組成物之一部分。

【0188】 本文中之一些化合物(包括但不限於非天然胺基酸、非天然胺基酸多肽及經修飾之非天然胺基酸多肽以及用於產生上述任一化合物之試劑)係酸性的，且可與醫藥學上可接受之陽離子形成鹽。本文中之一些化合物(包括但不限於非天然胺基酸、非天然胺基酸多肽及經修飾之非天然胺基酸多肽以及用於產生上述化合物之試劑)係鹼性的，且因此可與醫藥學上可接受之陰離子形成鹽。所有該等鹽(包括二鹽)皆在本文所述組成物之範圍內且其可藉由習用方法製備。舉例而言，可藉由使酸性及鹼性實體在水性、非水性或部分水性介質中接觸來製備鹽。藉由使用以下技術中之至少一種來回收鹽：過濾、用非溶劑沈澱接著過濾、蒸發溶劑，或者在水溶液之情況下，凍乾。

【0189】 當存在於母體非天然胺基酸多肽中之酸 性質子由金屬離子(舉例而言，鹼金屬離子、鹼土金屬離子或鋁離子)替代或與有機鹼配位時，可形成本文所揭示之非天然胺基酸多肽之醫藥學上可接受之鹽。此外，所揭示之非天然胺基酸多肽之鹽形式可使用起始材料或中間體之鹽來製備。本文所述之非天然胺基酸多肽可藉由使本文所述之非天然胺基酸多肽之游離鹼形式與醫藥學上可接受之無機酸或有機酸反應而製備為醫藥學上可接受之酸加成鹽(其係醫藥學上可接受之類型)。或者，本文所述之非天然胺基酸多肽可藉由使本文所述之非天然胺基酸多肽之游離酸形式與醫藥學上可接受之無機鹼或有機鹼反應而製備為醫藥學上可接受之鹼加成鹽(其係醫藥學上可接受之類型)。

【0190】 醫藥學上可接受之鹽包括但不限於：(1) 酸加成鹽，其由諸如鹽酸、

氫溴酸、硫酸、硝酸、磷酸及諸如此類等無機酸形成；或由諸如以下有機酸形成：乙酸、丙酸、己酸、環戊烷丙酸、乙醇酸、丙酮酸、乳酸、丙二酸、琥珀酸、蘋果酸、馬來酸、富馬酸、酒石酸、檸檬酸、苯甲酸、3-(4-羥基苯甲醯基)苯甲酸、肉桂酸、苦杏仁酸、甲烷磺酸、乙烷磺酸、1,2-乙烷二磺酸、2-羥基乙烷磺酸、苯磺酸、2-萘磺酸、4-甲基二環[2.2.2]-辛-2-烯-1-甲酸、葡萄庚酸、4,4'-亞甲基雙-(3-羥基-2-烯-1-甲酸)、3-苯基丙酸、三甲基乙酸、第三丁基乙酸、月桂基硫酸、葡萄糖酸、麩胺酸、羥基萘甲酸、水楊酸、硬脂酸、黏康酸及諸如此類；(2) 在存在於母體化合物中之酸性質子由金屬離子(例如，鹼金屬離子、鹼土金屬離子或鋁離子)替代或與有機鹼配合時形成之鹽。可接受之有機鹼包括乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、胺丁三醇、N-甲基葡糖胺及諸如此類。可接受之無機鹼包括氫氧化鋁、氫氧化鈣、氫氧化鉀、碳酸鈉、氫氧化鈉及諸如此類。

【0191】　可使用各種方法(包括但不限於離子交換層析、離子層析、毛細管電泳、感應耦合電漿、原子吸收光譜、質譜或其任一組合)來分析及鑑別非天然胺基酸多肽醫藥學上可接受之鹽之對應相對離子。此外，可使用實例中所述之技術及方法來測試該等非天然胺基酸多肽醫藥學上可接受之鹽之治療活性。

【0192】　應當理解，對鹽之提及包括其溶劑加成形式或晶體形式，尤其溶劑合物或多晶型物。溶劑合物含有化學計量或非化學計量量之溶劑，且經常用醫藥學上可接受之溶劑(諸如水、乙醇及諸如此類)結晶過程期間形成。當溶劑為水時形成水合物，或者當溶劑為醇時形成醇化物。多晶型物包括相同元素組成之化合物之不同晶體堆積排列。多晶型物通常具有不同的 X 射線繞射圖案、紅外光譜、熔點、密度、硬度、晶體形狀、光學及電學性質、穩定性及溶解性。諸如再結晶溶劑、結晶速率及儲存溫度等各種因素可使單晶形式佔主導地位。

【0193】　非天然胺基酸多肽醫藥學上可接受之鹽、多晶型物及/或溶劑合物之篩選及表徵可使用多種技術(包括但不限於熱分析、x 射線繞射、光譜、蒸氣吸

附及顯微術)來完成。熱分析方法應對熱化學降解或熱物理過程，包括但不限於多晶轉變，且該等方法用於分析多晶形式之間之關係，確定重量損失，確定玻璃轉變溫度，或者用於賦形劑相容性研究。該等方法包括但不限於示差掃描量熱法(DSC)、調製示差掃描量熱法(MDCS)、熱重分析(TGA)以及熱重及紅外線分析(TG/IR)。X 射線繞射方法包括但不限於單晶及粉末繞射儀及同步加速器源。所使用之各種光譜技術包括但不限於拉曼(Raman)、FTIR、UVIS 及 NMR (液態及固態)。各種顯微術技術包括但不限於偏振光顯微術、伴能量色散 X 射線分析(EDX)之掃描電子顯微術(SEM)、伴 EDX 之環境掃描電子顯微術(在氣體或水蒸氣氣氛中)、IR 顯微術及拉曼顯微術。

【0194】　儘管已在本文中顯示及闡述本發明之較佳實施例，但熟習此項技術者將明瞭該等實施例僅作為實例提供。熟習此項技術者現將在不背離本發明之情況下下構想出多種變化、改變及取代。應理解，可在實踐本發明時採用對本文所述之本發明實施例之各種替代方案。以下申請專利範圍意欲界定本發明之範圍且由此覆蓋該等申請專利範圍及其等效內容之範圍內之方法及結構。

TLR-促效劑連接體衍生物

【0195】　在一個層面上，本文闡述用於產生及使用包含至少一種非天然胺基酸或具有羰基、二羰基、肟或羥胺基團之經修飾之非天然胺基酸的 TC 或類似物的靶向多肽的工具(方法、組成物、技術)。包含非天然胺基酸之 TC 之該靶向多肽可含有又一官能基，包括但不限於聚合物；水溶性聚合物；聚乙二醇之衍生物；第二蛋白質或多肽或多肽類似物；抗體或抗體片段；及其任一組合。應注意，各種上述官能基並非意欲暗示不能將一種官能基之成員歸類為另一官能基之成員。實際上，取決於特定情況，會有重疊。僅舉例而言，水溶性聚合物與聚乙二醇衍生物在範圍上重疊，然而重疊並不完全，且因此上文引用了兩種官能性。

【0196】　在一個態樣中係用於選擇及設計欲使用本文所述之方法、組成物及技術修飾之 TLR-促效劑連接體衍生物及靶向多肽的方法。新 TLR-促效劑連接體衍生物及靶向多肽可重新設計，包括(僅舉例而言)作為高通量篩選過程之一部分(在此情形下，可設計、合成、表徵及/或測試多種多肽)或基於研究者之興趣。新 TLR-促效劑連接體衍生物及靶向多肽亦可基於已知或部分表徵之多肽之結構來設計。僅舉例而言，TLR-促效劑一直係科學界深入研究之主題；可基於 TLR-促效劑之結構設計新化合物。用於選擇供取代及/或修飾之一或多種胺基酸之原理在本文中單獨闡述。本文中亦闡述了對採用哪種修飾之選擇，且可將其用於滿足實驗者或最終用戶之需要。該等需求可能包括但不限於操縱多肽之治療有效性，改良多肽之安全性特徵，調整多肽之藥物動力學、藥理學及/或藥效動力學，諸如，僅舉例而言，增加水溶性、生物利用度，增加血清半衰期，增加治療半衰期，調節免疫原性，調節生物活性或延長循環時間。此外，該等修飾包括(僅舉例而言)為多肽提供額外官能性、併入抗體以及上述修飾之任何組合。

【0197】　本文亦闡述具有或可經修飾以含有肟、羰基、二羰基或羥胺基之 TLR-促效劑連接體衍生物及靶向多肽。該態樣包括用於產生、純化、表徵及使用該等 TLR-促效劑連接體衍生物及靶向多肽之方法。

【0198】　TLR-促效劑連接體衍生物或靶向多肽可含有羰基或二羰基、肟基、羥胺基或其受保護形式中之至少一種、至少兩種、至少三種、至少四種、至少五種、至少六種、至少七種、至少八種、至少九種或十種或更多種。TLR-促效劑連接體衍生物或靶向多肽可相同或不同，舉例而言，在衍生物中可存在 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 個或更多個不同的位點，該等位點包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 個或更多個不同的反應基團。

【0199】　如本文所述，本揭示案提供與具有式「靶向多肽-L-M」之另一分子

偶合之靶向多肽，其中 L 係連接基團或化學鍵，且 M 係任一其他分子，包括但不限於另一靶向多肽。在一些實施例中，L 在體內係穩定的。在一些實施例中，L 在體內係可水解的。在一些實施例中，L 在體內係準穩定的。

【0200】 可使用熟習此項技術者已知之標準連接劑及程序藉由 L 將靶向多肽及 M 連接在一起。在一些態樣中，靶向多肽及 M 直接融合且 L 係鍵。在其他態樣中，靶向多肽及 M 藉助連接基團 L 融合。舉例而言，在一些實施例中，靶向多肽及 M 經由肽鍵，視情況藉助肽或胺基酸間隔物連接在一起。在一些實施例中，靶向多肽及 M 藉助化學偶聯，視情況藉助連接基團(L)連接在一起。在一些實施例中，L 與靶向多肽及 M 中之每一者直接偶聯。

【0201】 化學偶聯可藉由使一種化合物之親核反應基團與另一化合物之親電子反應基團反應而發生。在一些實施例中，當 L 係鍵時，靶向多肽係藉由使靶向多肽上之親核反應部分與 Y 上之親電子反應部分反應，或藉由使靶向多肽上之親電子反應部分與 M 上之親核反應部分反應而與 M 偶聯。在實施例中，當 L 係將靶向多肽與 M 連接在一起之基團時，靶向多肽及/或 M 可藉由使靶向多肽及/或 M 上之親核反應部分與 L 上之親電子反應部分反應，或藉由使靶向多肽及/或 M 上之親電子反應部分與 L 上之親核反應部分反應而與 L 偶聯。親核反應基團之非限制性實例包括胺基、硫醇及羥基。親電子反應基團之非限制性實例包括羧基、醯氯、酸酐、酯、琥珀醯亞胺酯、烷基鹵、磺酸酯、馬來醯亞胺基、鹵代乙醯基及異氰酸酯。在靶向多肽及 M 藉由使羧酸與胺反應而偶聯在一起之實施例中，活化劑可用於形成羧酸之活化酯。

【0202】 羧酸之活化酯可為例如 N-羥基琥珀醯亞胺(NHS)、甲苯磺酸酯(Tos)、甲磺酸酯、三氟甲磺酸酯、碳化二亞胺或六氟磷酸酯。在一些實施例中，碳化二亞胺係 1,3-二環己基碳化二亞胺(DCC)、1,1'-羰基二咪唑(CDI)、1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳化二亞胺鹽酸鹽(EDC)或 1,3-二異丙基碳化二亞胺

(DICD)。在一些實施例中，六氟磷酸鹽係選自由以下組成之群：六氟磷酸鹽苯并三唑-1-基-氧基-三(二甲胺基)鏻六氟磷酸鹽(BOP)、苯并三唑-1-基-氧基三吡咯啶鏻六氟磷酸鹽(PyBOP)、2-(1H-7-氮雜苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基六氟磷酸鹽(HATU)及鄰苯并三唑-N,N,N',N'-四甲基-六氟磷酸鹽(HBTU)。

【0203】　在一些實施例中，靶向多肽包含能夠與 M 或 L 上之親電子反應基團偶聯的親核反應基團(例如離胺酸、半胱胺酸或絲胺酸之側鏈之胺基、硫醇基或羥基)。在一些實施例中，靶向多肽包含能夠與 M 或 L 上之親核反應基團偶聯的親電子反應基團(例如 Asp 或 Glu 之側鏈之羧酸酯基團)。在一些實施例中，靶向多肽經化學修飾以包含能夠與 M 或 L 直接偶聯之反應基團。在一些實施例中，靶向多肽在 N-末端或 C-末端處經修飾以包含具有親核側鏈之天然或非天然胺基酸。在例示性實施例中，靶向多肽之 N-末端或 C-末端胺基酸係選自由以下組成之群：離胺酸、鳥胺酸、絲胺酸、半胱胺酸及高半胱胺酸。舉例而言，靶向多肽之 N-末端或 C-末端胺基酸可經修飾以包含離胺酸殘基。在一些實施例中，靶向多肽在 N-末端或 C-末端胺基酸處經修飾以包含具有親電子側鏈之天然或非天然胺基酸，諸如例如 Asp 及 Glu。在一些實施例中，靶向多肽之內部胺基酸經具有親核側鏈之天然或非天然胺基酸取代，如本文先前所述。在例示性實施例中，靶向多肽之經取代之內部胺基酸係選自由以下組成之群：離胺酸、鳥胺酸、絲胺酸、半胱胺酸及高半胱胺酸。舉例而言，靶向多肽之內部胺基酸可經離胺酸殘基取代。在一些實施例中，靶向多肽之內部胺基酸經具有親電側鏈之天然或非天然胺基酸(諸如例如 Asp 及 Glu)取代。

【0204】　在一些實施例中，M 包含能夠與靶向多肽或 L 直接偶聯之反應基團。在一些實施例中，M 包含能夠與靶向多肽或 L 上之親電子反應基團偶聯的親核反應基團(例如胺、硫醇基、羥基)。在一些實施例中，M 包含能夠與靶向多肽或 L 上之親核反應基團偶聯的親電子反應基團(例如羧基、羧基之活化形式、具有

離去基團之化合物)。在一些實施例中，M 經化學修飾以包含能夠與靶向多肽或 L 上之親電子反應基團偶聯的親核反應基團。在一些實施例中，M 經化學修飾以包含能夠與靶向多肽或 L 上之親核反應基團偶聯的親電子反應基團。

【0205】 在一些實施例中，可藉助有機矽烷(用戊二醛處理之胺基矽烷)；對矽烷醇基團之羰基二咪唑(CDI)活化；或利用樹枝狀聚合物實施偶聯。多種樹枝狀聚合物為此項技術中已知，且包括聚(醯胺基胺) (PAMAM)樹枝狀聚合物，其係藉由發散法自氨或乙二胺起始劑核心試劑開始合成；基於三-胺基乙烯-亞胺核心之 PAMAM 樹枝狀聚合物之子類；徑向分層之聚(醯胺基胺-有機矽)樹枝狀聚合物(PAMAMOS)，其係由親水性、親核性聚醯胺基胺(PAMAM)內部及疏水性有機矽(OS)外部組成之反向單分子膠束；聚(伸丙基亞胺) (PPI)樹枝狀聚合物，其通常係具有一級胺作為端基之聚烷基胺，而樹枝狀聚合物內部由諸多第三三伸丙基胺組成；聚(伸丙基胺) (POPAM)樹枝狀聚合物；二胺基丁烷(DAB)樹枝狀聚合物；兩親樹枝狀聚合物；膠束樹枝狀聚合物係水溶性超支化聚伸苯基之單分子膠束；聚離胺酸樹枝狀聚合物；及基於聚苄基醚超支化骨架之樹枝狀聚合物。

【0206】 在一些實施例中，可藉助烯烴複分解實施偶聯。在一些實施例中，M 及靶向多肽、M 及 L、或靶向多肽及 L 二者皆包含能夠經歷複分解之烯烴或炔烴部分。在一些實施例中，使用適宜觸媒(例如銅、釕)來加速複分解反應。實施烯烴複分解反應之適宜方法在此項技術中有所闡述。參見例如 Schafmeister 等人，*J. Am. Chem. Soc.* 122: 5891-5892 (2000)；Walensky 等人，*Science* 305: 1466-1470 (2004)；及 Blackwell 等人，Angew, *Chem., Int. Ed.* 37: 3281-3284 (1998)。

【0207】 在一些實施例中，可使用點擊化學(click chemistry)實施偶聯。「點擊反應」範圍廣且容易實施，僅使用易於獲得之試劑，且對氧氣及水不敏感。在一些實施例中，點擊反應係炔基與疊氮基之間形成三唑基之環加成反應。在一些實施例中，點擊反應使用銅或釕觸媒。實施點擊反應之適宜方法在此項技

術中有所闡述。例如參見 Kolb 等人，*Drug Discovery Today* 8: 1128 (2003)；Kolb 等人，*Angew. Chem. Int. Ed.* 40:2004 (2001)；Rostovtsev 等人，*Angew. Chem. Int. Ed.* 41 :2596 (2002)；Tornoe 等人，*J. Org. Chem.* 67:3057 (2002)；Manetsch 等人，*J. Am. Chem. Soc*. 126: 12809 (2004)；Lewis 等人，*Angew. Chem. Int. Ed.* 41: 1053 (2002)；Speers, *J. Am. Chem. Soc*. 125:4686 (2003)；Chan 等人，Org. Lett. 6:2853 (2004)；Zhang 等人，*J. Am. Chem. Soc*. 127: 15998 (2005)；及 Waser 等人，*J. Am. Chem. Soc.* 127:8294 (2005)。

【0208】　亦涵蓋經由高親和力特異性結合配偶體(例如鏈黴抗生物素蛋白/生物素或抗生物素蛋白/生物素或凝集素/碳水化合物)之間接偶聯。

【0209】　在一些實施例中，將靶向多肽及/或 M 用有機衍生化劑官能化以包含親核反應基團或親電子反應基團。該衍生化劑能夠與靶向多肽上之靶向胺基酸之所選側鏈或 N 末端或 C 末端殘基及 M 上之官能基反應。靶向多肽及/或 M 上之反應基團包括例如醛基、胺基、酯基、硫醇基、α-鹵代乙醯基、馬來醯亞胺基或肼基。衍生化劑包括例如馬來醯亞胺基苯甲醯基磺基琥珀醯亞胺酯(藉助半胱胺酸殘基偶聯)、N-羥基琥珀醯亞胺(藉助離胺酸殘基)、戊二醛、琥珀酸酐或此項技術中已知之其他劑。或者，靶向多肽及/或 M 可間接藉助中間載劑(諸如多糖或多肽載劑)彼此連接。多糖載劑之實例包括胺基葡聚糖。適宜多肽載劑之實例包括聚離胺酸、聚麩胺酸、聚天冬胺酸、其共聚物以及該等胺基酸及其他胺基酸(例如絲胺酸)之混合聚合物，以賦予所得負載載劑之期望溶解度性質。

【0210】　半胱胺醯基殘基最通常與 α-鹵代乙酸根(及對應胺) (諸如氯乙酸或氯乙醯胺)反應，得到羧甲基或羧醯胺甲基衍生物。半胱胺醯基殘基亦可藉由與溴三氟丙酮、α-溴-β-(5-咪唑醯基)丙酸、氯乙醯基磷酸酯、N-烷基馬來醯亞胺、3-硝基-2-吡啶基二硫化物、甲基 2-吡啶基二硫化物、對氯汞基苯甲酸酯、2-氯汞基-4-硝基苯酚或氯-7-硝基苯并-2-氧雜-1,3-二唑反應而衍生化。

【0211】 組胺醯基殘基係藉由在 pH 5.5-7.0 下與焦碳酸二乙酯反應而衍生化，此乃因該劑對組胺醯基側鏈具有相對特異性。亦可使用對溴苯甲醯基溴；較佳在 pH 6.0 之 0.1 M 二甲胂酸鈉中實施反應。

【0212】 使離胺醯基及胺基末端殘基與琥珀酸或其他羧酸酐反應。用該等劑進行衍生化具有逆轉離胺醯基殘基之電荷之作用。用於衍生化含 α-胺基之殘基之其他適宜試劑包括亞胺基酯，諸如甲基吡啶亞胺酸甲酯(methyl picolinimidate)；磷酸吡哆醛；吡哆醛；氯硼氫化物；三硝基苯磺酸；O-甲基異脲；2,4-戊二酮；以及轉胺酶催化的與乙醛酸鹽之反應。

【0213】 精胺醯基殘基係藉由與一或若干種習用試劑反應來修飾，該等試劑包括苯基乙二醛、2,3-丁二酮、1,2-環己二酮及茚三酮。由於胍官能基之高 pKa，故精胺酸殘基之衍生化要求在鹼性條件下實施反應。此外，該等試劑可與離胺酸基團以及精胺酸 ε-胺基反應。

【0214】 可進行酪胺醯基殘基之特定修飾，所尤其關注者係藉由與芳族重氮化合物或四硝基甲烷反應將光譜標記引入酪胺醯基殘基中。最通常地，N-乙醯基咪唑及四硝基甲烷分別用於形成 O-乙醯基酪胺醯基物質及 3-硝基衍生物。

【0215】 羧基側基(天冬胺醯基或麩胺醯基)藉由與碳化二亞胺(R-N=C=N-R')(其中 R 及 R'係不同烷基，諸如 1-環己基-3-(2-嗎啉基-4-乙基)碳化二亞胺或 1-乙基-3-(4-氮雜-4,4-二甲基戊基)碳化二亞胺)反應而被選擇性修飾。此外，天冬胺醯基及麩胺醯基殘基藉由與銨離子反應而轉化為天冬醯胺醯基及麩醯胺醯基殘基。

【0216】 其他修飾包括脯胺酸及離胺酸之羥基化，絲胺醯基或蘇胺醯基殘基之羥基之磷酸化，離胺酸、精胺酸及組胺酸側鏈之 α-胺基甲基化(T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco，第 79-86 頁(1983))，天冬醯胺酸或麩醯胺酸之去醯胺，N-末端胺之乙醯化，及/

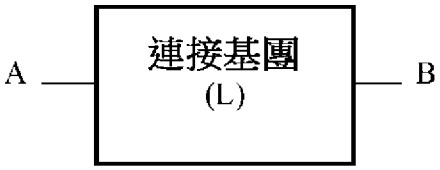
或 C-末端羧酸基團之醯胺化或酯化。

【0217】 另一共價修飾類型涉及使糖苷與肽化學或酶促偶合。一或多種糖可附著至(a)精胺酸及組胺酸，(b)游離羧基，(c)游離巯基，諸如半胱胺酸之彼等，(d)游離羥基，諸如絲胺酸、蘇胺酸或羥脯胺酸之彼等，(e)芳族殘基，諸如酪胺酸或色胺酸之彼等，或(f)麩醯胺酸之醯胺基。該等方法闡述於 WO1987/05330 以及 Aplin 及 Wriston，*CRC Crit. Rev. Biochem.*，第 259-306 頁(1981)中。

【0218】 在一些實施例中，L 係鍵。在該等實施例中，靶向多肽及 M 係藉由使靶向多肽上之親核反應部分與 M 上之親電子反應部分反應而偶聯在一起。在替代實施例中，靶向多肽及 M 係藉由使靶向多肽上之親電子反應部分與 M 上之親核部分反應而偶聯在一起。在例示性實施例中，L 係在靶向多肽上之胺(例如離胺酸殘基之 ε-胺)與 M 上之羧基反應後形成之醯胺鍵。在替代實施例中，靶向多肽及/或 M 在偶聯前經衍生化劑衍生化。

【0219】 在一些實施例中，L 係連接基團。在一些實施例中，L 係雙官能連接體且在與靶向多肽及 M 偶聯之前僅包含兩個反應基團。在靶向多肽及 M 二者皆具有親電子反應基團之實施例中，L 在與靶向多肽及 M 偶聯之前包含兩個相同或兩個不同的親核基團(例如，胺、羥基、硫醇)。在靶向多肽及 M 二者皆具有親核反應基團之實施例中，L 在與靶向多肽及 M 偶聯之前包含兩個相同或兩個不同的親電子基團(例如羧基、羧基之活化形式、具有離去基團之化合物)。在靶向多肽或 M 中之一者具有親核反應基團且靶向多肽或 M 中之另一者具有親電子反應基團之實施例中，L 在與靶向多肽及 M 偶聯之前包含一個親核反應基團及一個親電子基團。

【0220】 L 可為具有能夠與靶向多肽及 M 中之每一者反應的至少兩個反應基團(在與靶向多肽及 M 偶聯之前)之任一分子。在一些實施例中，L 僅具有兩個反應基團且係雙官能的。L (與肽偶聯之前)可由式 VI 表示：



其中 A 及 B 獨立地為親核或親電子反應基團。在一些實施例中，A 及 B 二者皆為親核基團或二者皆為親電子基團。在一些實施例中，A 或 B 中之一者係親核基團且 A 或 B 中之另一者係親電子基團。A 及 B 之非限制性組合示於下表 1 中。

表 1：親核基團及親電子基團之非限制性組合

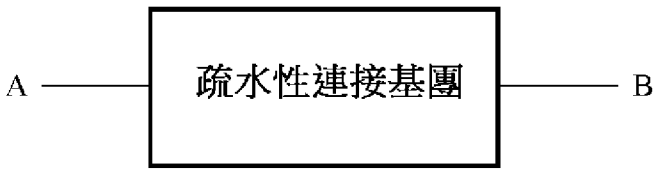
皆親核		皆親電子		親核/親電子	
A	B	A	B	A	B
胺基	胺基	羧基	羧基	胺基	羧基
胺基	硫醇	羧基	乙醯氯	胺基	乙醯氯
胺基	羥基	羧基	酸酐	胺基	酸酐
硫醇	胺基	羧基	酯	胺基	酯
硫醇	硫醇	羧基	NHS	胺基	NHS
硫醇	羥基	羧基	鹵素	胺基	鹵素
羥基	胺基	羧基	磺酸酯	胺基	磺酸酯
羥基	硫醇	羧基	馬來醯亞胺基	胺基	馬來醯亞胺基
羥基	羥基	羧基	鹵代乙醯基	胺基	鹵代乙醯基
		羧基	異氰酸酯	胺基	異氰酸酯
		乙醯氯	羧基	硫醇	羧基
		乙醯氯	乙醯氯	硫醇	乙醯氯
		乙醯氯	酸酐	硫醇	酸酐
		乙醯氯	酯	硫醇	酯
		乙醯氯	NHS	硫醇	NHS
		乙醯氯	鹵素	硫醇	鹵素
		乙醯氯	磺酸酯	硫醇	磺酸酯
		乙醯氯	馬來醯亞胺基	硫醇	馬來醯亞胺基
		乙醯氯	鹵代乙醯基	硫醇	鹵代乙醯基
		乙醯氯	異氰酸酯	硫醇	異氰酸酯
		酸酐	羧基	羥基	羧基
		酸酐	乙醯氯	羥基	乙醯氯
		酸酐	酸酐	羥基	酸酐
		酸酐	酯	羥基	酯
		酸酐	NHS	羥基	NHS
		酸酐	鹵素	羥基	鹵素
		酸酐	磺酸酯	羥基	磺酸酯
		酸酐	馬來醯亞胺基	羥基	馬來醯亞胺基
		酸酐	鹵代乙醯基	羥基	鹵代乙醯基
		酸酐	異氰酸酯	羥基	異氰酸酯
		酯	羧基		

皆親核		皆親電子		親核/親電子	
		酯	乙醯氯		
		酯	酸酐		
		酯	酯		
		酯	NHS		
		酯	鹵素		
		酯	磺酸酯		
		酯	馬來醯亞胺基		
		酯	鹵代乙醯基		
		酯	異氰酸酯		
		NHS	羧基		
		NHS	乙醯氯		
		NHS	酸酐		
		NHS	酯		
		NHS	NHS		
		NHS	鹵素		
		NHS	磺酸酯		
		NHS	馬來醯亞胺基		
		NHS	鹵代乙醯基		
		NHS	異氰酸酯		
		鹵素	羧基		
		鹵素	乙醯氯		
		鹵素	酸酐		
		鹵素	酯		
		鹵素	NHS		
		鹵素	鹵素		
		鹵素	磺酸酯		
		鹵素	馬來醯亞胺基		
		鹵素	鹵代乙醯基		
		鹵素	異氰酸酯		
		磺酸酯	羧基		
		磺酸酯	乙醯氯		
		磺酸酯	酸酐		
		磺酸酯	酯		
		磺酸酯	NHS		
		磺酸酯	鹵素		
		磺酸酯	磺酸酯		
		磺酸酯	馬來醯亞胺基		
		磺酸酯	鹵代乙醯基		
		磺酸酯	異氰酸酯		
		馬來醯亞胺基	羧基		
		馬來醯亞胺基	乙醯氯		
		馬來醯亞胺基	酸酐		
		馬來醯亞胺基	酯		
		馬來醯亞胺基	NHS		

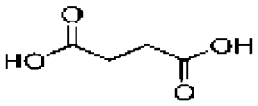
皆親核		皆親電子		親核/親電子	
		馬來醯亞胺基	鹵素		
		馬來醯亞胺基	磺酸酯		
		馬來醯亞胺基	馬來醯亞胺基		
		馬來醯亞胺基	鹵代乙醯基		
		馬來醯亞胺基	異氰酸酯		
		鹵代乙醯基	羧基		
		鹵代乙醯基	乙醯氯		
		鹵代乙醯基	酸酐		
		鹵代乙醯基	酯		
		鹵代乙醯基	NHS		
		鹵代乙醯基	鹵素		
		鹵代乙醯基	磺酸酯		
		鹵代乙醯基	馬來醯亞胺基		
		鹵代乙醯基	鹵代乙醯基		
		鹵代乙醯基	異氰酸酯		
		異氰酸酯	羧基		
		異氰酸酯	乙醯氯		
		異氰酸酯	酸酐		
		異氰酸酯	酯		
		異氰酸酯	NHS		
		異氰酸酯	鹵素		
		異氰酸酯	磺酸酯		
		異氰酸酯	馬來醯亞胺基		
		異氰酸酯	鹵代乙醯基		
		異氰酸酯	異氰酸酯		

【0221】　在一些實施例中，A 及 B 可包括適於烯烴複分解反應之烯烴及/或炔烴官能基。在一些實施例中，A 及 B 包括適於點擊化學之部分(例如烯烴、炔烴、腈、疊氮化物)。反應基團(A 及 B)之其他非限制性實例包括吡啶基二硫醇、芳基疊氮化物、二吖吮、碳化二亞胺及醯肼。

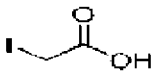
【0222】　在一些實施例中，L 係疏水的。疏水連接體為此項技術中已知。參見例如 *Bioconjugate Techniques*, G. T. Hermanson (Academic Press, San Diego, CA, 1996)，其全文以引用方式併入。此項技術中已知之適宜疏水性連接基團包括例如 8-羥基辛酸及 8-巰基辛酸。在與組成物之肽偶聯之前，疏水性連接基團包含至少兩個反應基團(A 及 B)，如本文所述及如下所示：



在一些實施例中，疏水性連接基團包含馬來醯亞胺基或碘乙醯基以及羧酸或活化之羧酸(例如 NHS 酯)作為反應基團。在該等實施例中，馬來醯亞胺基或碘乙醯基可與靶向多肽或 M 上之硫醇部分偶合，且羧酸或活化羧酸可在使用或不使用偶合劑之情況下與靶向多肽或 M 上之胺偶合。熟習此項技術者已知之任一偶合劑皆可用於將羧酸與游離胺偶合，諸如例如 DCC、DIC、HATU、HBTU、TBTU 及本文所述之其他活化劑。在特定實施例中，親水連接基團包含 2 至 100 個亞甲基之脂族鏈，其中 A 及 B 係羧基或其衍生物(例如琥珀酸)。在其他特定實施例中，L 係碘乙酸。

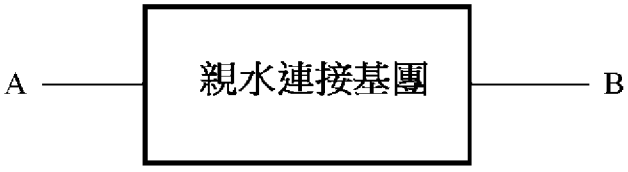


琥珀酸



碘乙酸

【0223】 在一些實施例中，連接基團係親水的，諸如例如聚伸烷基二醇。在與組成物之肽偶聯之前，親水性連接基團包含至少兩個反應基團(A 及 B)，如本文所述及如下所示：



在特定實施例中，連接基團係聚乙二醇(PEG)。在某些實施例中，PEG 具有約 100 道爾頓至約 10,000 道爾頓(例如約 500 道爾頓至約 5000 道爾頓)之分子量。在一些實施例中，PEG 具有約 10,000 道爾頓至約 40,000 道爾頓之分子量。

【0224】 在一些實施例中，親水連接基團包含馬來醯亞胺基或碘乙醯基以及羧酸或活化之羧酸(例如 NHS 酯)作為反應基團。在該等實施例中，馬來醯亞胺基或碘乙醯基可與靶向多肽或 M 上之硫醇部分偶合，且羧酸或活化羧酸可在使

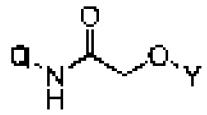
用或不使用偶合劑之情況下與靶向多肽或 M 上之胺偶合。熟習此項技術者已知之任一適當偶合劑皆可用於將羧酸與胺偶合，諸如例如 DCC、DIC、HATU、HBTU、TBTU 及本文所述之其他活化劑。在一些實施例中，連接基團係馬來醯亞胺基-聚合物(20-40 kDa)-COOH、碘乙醯基-聚合物(20-40 kDa)-COOH、馬來醯亞胺基-聚合物(20-40 kDa)-NHS 或碘乙醯基-聚合物(20-40 kDa)-NHS。

【0225】 在一些實施例中，連接基團包含胺基酸、二肽、三肽或多肽，其中胺基酸、二肽、三肽或多肽包含至少兩個活化基團，如本文所述。在一些實施例中，連接基團(L)包含選自由以下組成之群之部分：胺基、醚、硫醚、馬來醯亞胺基、二硫化物、醯胺、酯、硫酯、烯烴、環烯烴、炔烴、trizoyl、胺基甲酸酯、碳酸酯、可裂解細胞自溶酶 B 及腙。

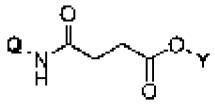
【0226】 在一些實施例中，L 包含 1 至約 60 個、或 1 至 30 個原子或更長、2 至 5 個原子、2 至 10 個原子、5 至 10 個原子或 10 至 20 個原子長之原子鏈。在一些實施例中，鏈原子皆係碳原子。在一些實施例中，連接體主鏈中之鏈原子係選自由 C、O、N 及 S 組成之群。鏈原子及連接體可根據其預期溶解性(親水性)來選擇，以便以提供更可溶之偶聯物。在一些實施例中，L 提供官能基，該官能基會被酶或另一觸媒或在靶組織或器官或細胞中發現之水解條件裂解。在一些實施例中，L 之長度足夠長以降低位阻之潛力。

【0227】 在一些實施例中，L 在諸如血液或血液級分等生物流體中係穩定的。在一些實施例中，L 在血清中穩定至少 5 分鐘，例如，當在血清中孵育 5 分鐘時段時，小於 25%、20%、15%、10%或 5%之偶聯物被裂解。在其他實施例中，L 在血清中穩定至少 10、或 20、或 25、或 30、或 60、或 90、或 120 分鐘，或 3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、18 或 24 小時。在該等實施例中，L 不包含能夠在體內經歷水解之官能基。在一些例示性實施例中，L 在血清中穩定至少約 72 小時。不能在體內經歷顯著水解之官能基之非限制性實例包括醯胺、醚及硫

醚。舉例而言，以下化合物在體內不經歷顯著水解：



在一些實施例中，L 在體內係可水解的。在該等實施例中，L 包含能夠在體內經歷水解之官能基。能夠在體內經歷水解之官能基之非限制性實例包括酯、酸酐及硫酯。舉例而言中，以下化合物能夠在體內經歷水解，此乃因其包含酯基：



在一些例示性實施例中，L 係不穩定的且在 37°C之血漿中在 3 小時內經歷實質性水解，在 6 小時內完全水解。在一些例示性實施例中，L 不是不穩定的。

【0228】　在一些實施例中，L 在體內係準穩定的。在該等實施例中，L 包含能夠在體內被化學或酶促裂解之官能基(例如，酸不穩定、還原不穩定或酶不穩定之官能基)，視情況歷經一段時間。在該等實施例中，L 可包含例如脲部分、二硫化物部分或細胞自溶酶可裂解部分。當 L 係準穩定的時，且不意欲受任何特定理論之束縛，靶向多肽-L-M 偶聯物在細胞外環境中穩定，例如在血清中穩定達上述時間段，但在細胞內環境或模擬細胞內環境之條件中不穩定，使其在進入細胞後裂解。在一些實施例中，當 L 係準穩定的時，L 在血清中穩定至少約 24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、42 或 48 小時，例如，至少約 48、54、60、66 或 72 小時，或約 24-48、48-72、24-60、36-48、36-72 或 48-72 小時。

【0229】　在另一實施例中，本發明之聚合物衍生物包含具有以下結構之聚合物主鏈：

$X\text{-}CH_2CH_2O\text{--}(CH_2CH_2O)_n\text{ --}CH_2CH_2 - O\text{-}(CH_2)_m\text{-}W\text{-}N{=}N{=}N$，其中：

W 係包含 1-10 個碳原子之脂族或芳族連接體部分；

n 係 1 至約 4000；且 X 係如上文所述之官能基；m 介於 1 與 10 之間。

【0230】 本發明之含疊氮化物之聚合物衍生物可藉由此項技術中已知及/或本文所揭示之多種方法製備。在一種如下所示之方法中，使具有約 800 Da 至約 100,000 Da 之平均分子量之水溶性聚合物主鏈(即具有鍵結至第一官能基之第一末端及鍵結至適宜離去基團之第二末端之聚合物主鏈)與疊氮化物陰離子(其可與許多適宜相對離子(包括鈉、鉀、第三丁基銨等)中之任一者配對)反應。離去基團經歷親核置換且由疊氮化物部分置換，得到期望的含疊氮化物之聚合物；

X-聚合物-LY + N_3^- → X-聚合物-L N_3

如所示，用於本發明中之適宜聚合物主鏈具有式 X-聚合物-LY，其中聚合物係聚(乙二醇)且 X 係不與疊氮基反應之官能基且 Y 係適宜離去基團。適宜官能基之實例包括但不限於羥基、受保護之羥基、縮醛、烯基、胺、胺基氧基、受保護之胺、受保護之醯肼、受保護之硫醇、羧酸、受保護之羧酸、馬來醯亞胺、二硫代吡啶及乙烯基吡啶，以及酮。適宜離去基團之實例包括但不限於氯離子、溴離子、碘離子、甲磺酸根、三氟乙磺酸根及甲苯磺酸根。

【0231】 在用於製備本發明含之聚合物衍生物之另一方法中，使帶有疊氮化物官能基之連接劑與具有約 800 Da 至約 100,000 Da 之平均分子量之水溶性聚合物主鏈接觸，其中連接劑具有化學官能基，該化學官能基將選擇性地與聚合物上之化學官能基反應以形成含疊氮化物之聚合物衍生產物，其中疊氮化物藉由連接基團與聚合物主鏈分離。

【0232】 例示性反應方案如下所示：

X-聚合物-Y + N-連接體-N=N=N → PG-X-聚合物-連接體-N=N=N，其中：

聚合物係聚(乙二醇)且 X 係封端基團，諸如烷氧基，或如上文所述之官能基；且 Y 係不與疊氮化物官能基反應但將與 N 官能基高效且選擇性地反應之官能基。

【0233】 適宜官能基之實例包括但不限於，若 N 係胺，則 Y 係羧酸、碳酸酯或活性酯；若 N 係醯肼或胺基氧基部分，則 Y 係酮；若 N 係親核劑，則 Y 係離

去基團。粗製產物之純化可藉由已知方法完成，該等方法包括但不限於使產物沈澱，接著若需要，進行層析。

【0234】 在聚合物二胺之情況下，更具體之實例如下所示，其中一種胺受諸如第三丁基-Boc 等保護基團部分保護，且使所得單保護之聚合物二胺與帶有疊氮化物官能基之連接部分反應：

BocHN-聚合物-NH_2 + HO_2C-$(CH_2)_3$-N=N=N

在該情況下，可使用多種活化劑(諸如亞硫醯氯或碳化二亞胺試劑及 N-羥基琥珀醯亞胺或 N-羥基苯并三唑)使胺基與羧酸基團偶合，以在單胺聚合物衍生物與帶有疊氮化物之連接體之間產生醯胺鍵。在成功形成醯胺鍵後，所得 N-第三丁基-Boc 保護之含疊氮化物衍生物可直接用於修飾生物活性分子，或者其可經進一步加工以安置其他有用之官能基。例如，N-t-Boc 基團可藉由用強酸處理來水解，以生成 ω-胺基-聚合物-疊氮化物。所得胺可用作合成手柄以安置其他有用之官能基，諸如馬來醯亞胺基團、活化之二硫化物、活化之酯等，用於產生有價值之異雙官能試劑。

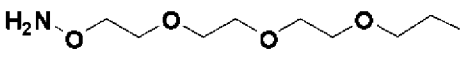
【0235】 當期望將不同分子附著至聚合物之每一末端時，異雙官能衍生物尤其有用。舉例而言，ω-N-胺基-N-疊氮基聚合物將容許將具有活化之親電子基團(諸如醛、酮、活化之酯、活化之碳酸酯等)之分子附著至聚合物之一個末端，且將具有乙炔基團之分子附著至聚合物之另一末端。

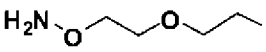
【0236】 在本發明之另一實施例中，A 係 1-10 個碳原子之脂族連接體或 6-14 個碳原子之經取代芳環。X 係不與疊氮基反應之官能基，且 Y 係適宜離去基團。

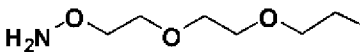
【0237】 多條靶向多肽可藉由連接體多肽接合，其中連接體多肽之長度視情況為 6-14、7-13、8-12、7-11、9-11 或 9 個胺基酸。其他連接體包括但不限於小聚合物，諸如 PEG，其可為多臂的，容許多種靶向多肽分子連接在一起。多種靶向多肽及經修飾之靶向多肽可經由其 N-末端以頭對頭構型，藉助使用該連接

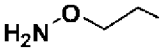
體或藉由每一多肽之各別 N-末端之間之直接化學鍵結而彼此連接。舉例而言，兩種靶向多肽可藉由其N-末端胺基或經修飾之N-末端胺基之間之化學鍵結連接以形成二聚物。此外，設計成包含用於與每一靶向多肽之 N-末端鍵結之多個化學官能基的連接分子可用於將多種靶向多肽各自在其各別的N-末端接合。此外，多種靶向多肽可藉助除N-末端胺基酸或C-末端胺基酸之外的胺基酸之間之鍵結連接。可用於形成本文所述靶向多肽之二聚物及多聚物之共價鍵的實例包括但不限於二硫鍵或縻基鍵或硫醇鍵。此外，某些酶，諸如分選酶，可用於在靶向多肽與連接體之間形成共價鍵，包括在靶向多肽之 N-末端。

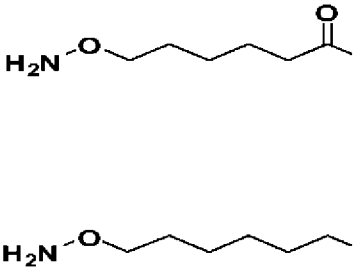
【0238】　連接體可具有寬範圍之分子量或分子長度。更大或更小分子量之連接體可用於在靶向多肽與經連接實體之間或在經連接實體與其結合配偶體(若存在)之間提供期望空間關係或構形。具有更長或更短分子長度之連接體亦可用於在靶向多肽與經連接實體之間或在經連接實體與其結合配偶體之間提供期望空間或撓性。連接體可包括但不限於以下：

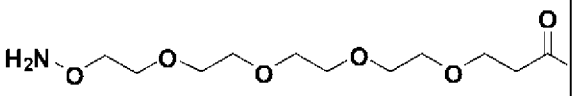


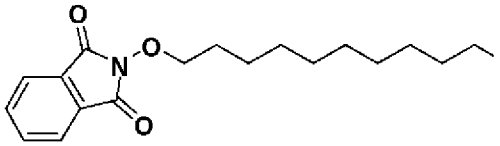


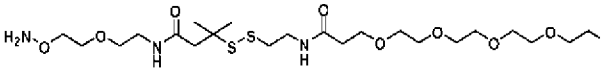


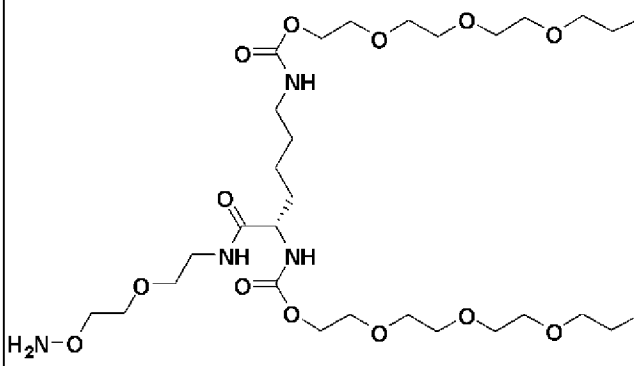


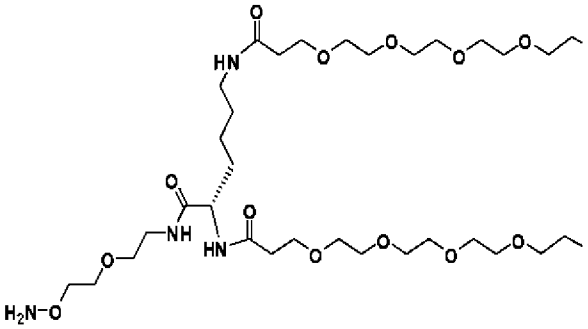


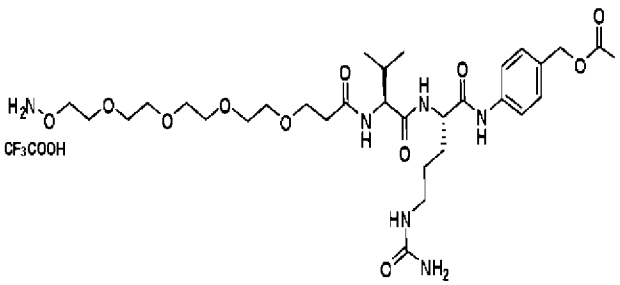


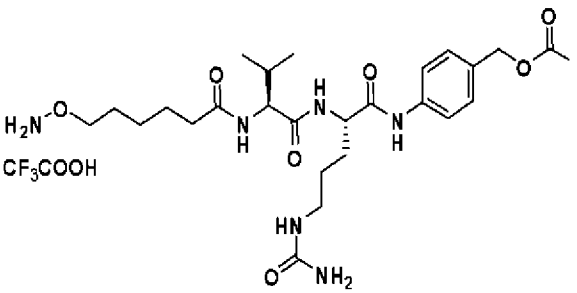


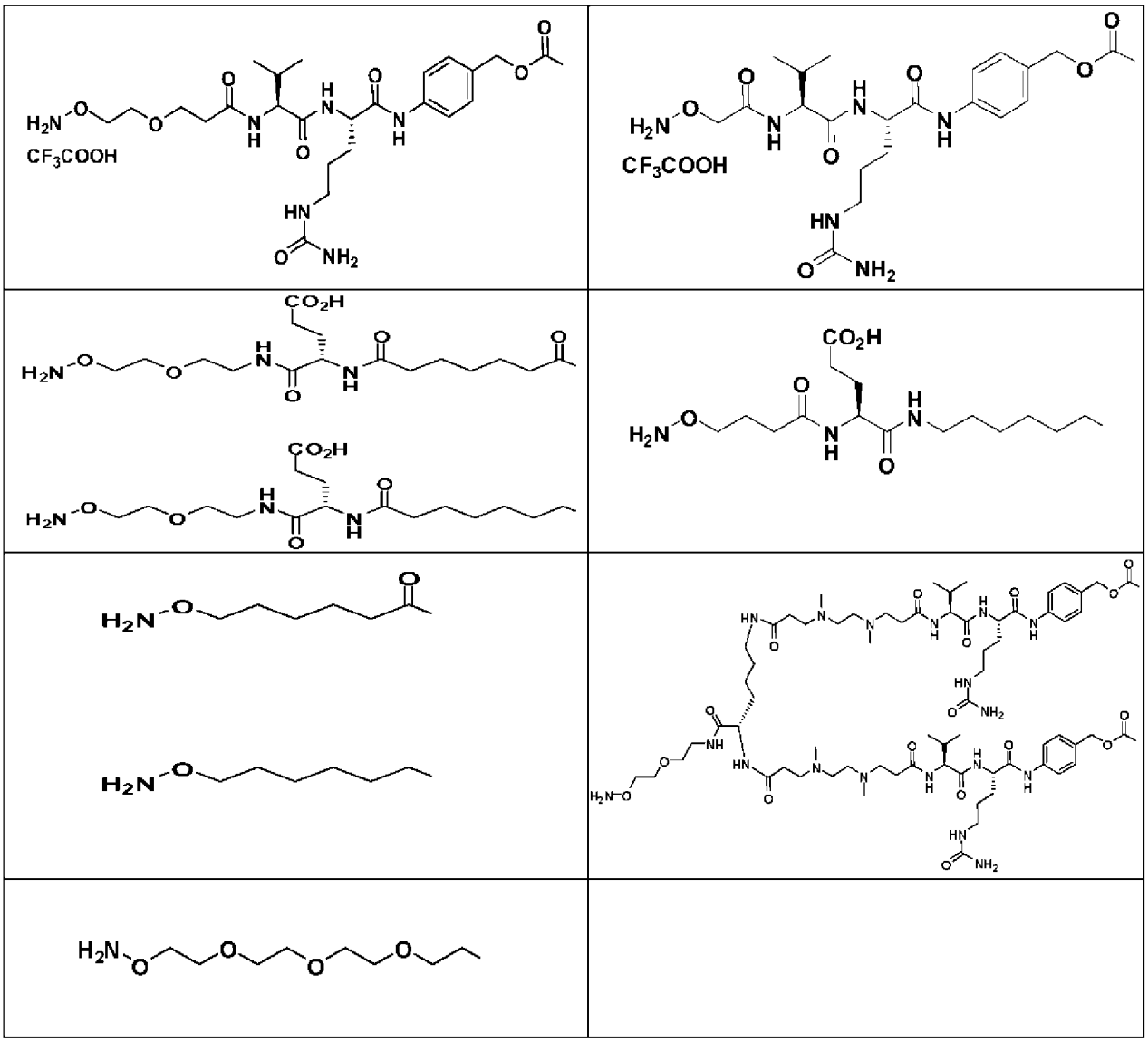












在一些實施例中，本發明提供具有啞鈴結構之水溶性雙官能連接體，該啞鈴結構包括：a)聚合物主鏈之至少第一末端上之含疊氮化物、炔烴、肼、醯肼、羥胺或羰基之部分；及 b)聚合物主鏈之第二末端上之至少第二官能基。第二官能基可與第一官能基相同或不同。在一些實施例中，第二官能基不與第一官能基反應。在一些實施例中，本發明提供包含具支鏈分子結構之至少一個臂的水溶性化合物。舉例而言，具支鏈分子結構可為樹枝狀。

【0239】 在例示性實施例中，聚合物藉助連接體連接至靶向多肽或經修飾之靶向多肽。舉例而言，連接體可包含一或兩個胺基酸，該等胺基酸在一端結合至聚合物——諸如白蛋白結合部分——且在另一端結合至多肽主鏈上之任一可

用位置。額外例示性連接體包括親水連接體，諸如包含至少 5 個非氫原子之化學部分，其中該等原子中之 30-50%係 N 或 O。可將聚合物連接至靶向多肽或經修飾之靶向多肽之額外例示性連接體揭示於 U.S. 2012/0295847 及 WO/2012/168430 中，該等專利中之每一者皆全文特此以引用方式併入。

【0240】 視情況，多種靶向多肽或經修飾之靶向多肽分子可藉由連接體多肽接合，其中該連接體多肽之長度視情況為 1、1-2、1-3、1-4、1-5、1-6、1-7、1-8、1-9、1-10、1-11、1-12 個胺基酸，及更長長度，其中視情況將一種靶向多肽之 N-末端融合至連接體多肽之 C-末端且將連接體多肽之 N-末端融合至另一靶向多肽之 N-末端。可利用之其他例示性連接體多肽揭示於 WO/2013/004607 (其全文特此以引用方式併入)中。

【0241】 如本文所用之術語「親電子基團」、「親電子劑」及諸如此類係指可接受電子對以形成共價鍵之原子或原子團。本文使用之「親電子基團」包括但不限於含鹵化物、羰基及環氧化物之化合物。常見親電子劑可為鹵化物，諸如硫代光氣、甘油二氯丙醇、苯二甲醯氯、琥珀醯氯、氯乙醯氯、氯琥珀醯氯(chlorosucciriyl chloride)等；酮，諸如氯丙酮(chloroacctone)、溴丙酮等；醛，諸如乙二醛等；異氰酸酯，諸如六亞甲基二異氰酸酯、甲伸苯基二異氰酸酯、間伸二甲苯基二異氰酸酯、環己基甲烷-4,4-二異氰酸酯等以及該等化合物之衍生物。

【0242】 如本文所用之術語「親核基團」、「親核劑」及諸如此類係指具有形成共價鍵之電子對之原子或原子團。該類型之基團可為作為陰離子基團反應之可電離基團。本文所用之「親核基團」包括但不限於羥基、一級胺、二級胺、三級胺及硫醇。

【0243】 表 2 提供可組合以產生期望官能基之各種起始親電子劑及親核劑。所提供之資訊意在係說明性的，且不限於本文所述之合成技術。

表 2：共價鍵聯及其前驅物之實例

共價鍵聯產物	親電子劑	親核劑
羧醯胺	活化酯	胺/苯胺
羧醯胺	醯基疊氮化物	胺/苯胺
羧醯胺	醯基鹵	胺/苯胺
酯	醯基鹵	醇/苯酚
酯	醯基腈	醇/苯酚
羧醯胺	醯基腈	胺/苯胺
亞胺	醛	胺/苯胺
腙	醛或酮	肼
肟	醛或酮	羥胺
烷基胺	烷基鹵	胺/苯胺
酯	烷基鹵	羧酸
硫醚	烷基鹵	硫醇
醚	烷基鹵	醇/苯酚
硫醚	磺酸烷基酯	硫醇
酯	磺酸烷基酯	羧酸
醚	磺酸烷基酯	醇/苯酚
酯	酸酐	醇/苯酚
羧醯胺	酸酐	胺/苯胺
苯硫酚	芳基鹵	硫醇
芳基胺	芳基鹵	胺
硫醚	氮丙啶(Azindine)	硫醇
硼酸酯	硼酸酯	二醇
羧醯胺	羧酸	胺/苯胺
酯	羧酸	醇
肼	醯肼	羧酸
N-醯基脲或酸酐	碳化二亞胺	羧酸
酯	重氮烷烴	羧酸
硫醚	環氧化物	硫醇
硫醚	鹵代乙醯胺類	硫醇
胺基三嗪(Ammotriazine)	鹵代三嗪	胺/苯胺
三嗪基醚	鹵代三嗪	醇/苯酚
脒	亞胺基酯	胺/苯胺
脲	異氰酸酯	胺/苯胺
胺基甲酸酯	異氰酸酯	醇/苯酚
硫脲	異硫氰酸酯	胺/苯胺
硫醚	馬來醯亞胺	硫醇
亞磷酸酯	亞磷醯胺	醇
甲矽烷基醚	甲矽烷基鹵	醇
烷基胺	磺酸酯	胺/苯胺
硫醚	磺酸酯	硫醇
酯	磺酸酯	羧酸
醚	磺酸酯	醇

磺醯胺	磺醯基鹵	胺/苯胺
磺酸酯	磺醯基鹵	苯酚/醇

【0244】 通常，碳親電子劑易於受到互補親核劑(包括碳親核劑)之攻擊，其中攻擊親核劑將電子對帶到碳親電子劑以在親核劑與碳親電子劑之間形成新鍵。

【0245】 碳親核劑之非限制性實例包括但不限於烷基、烯基、芳基及炔基格氏(Grignard)試劑，有機鋰、有機鋅、烷基-、烯基、芳基-及炔基-錫試劑(有機錫烷)，烷基-、烯基-、芳基-及炔基-硼烷試劑(有機硼烷及有機硼酸鹽)；該等碳親核劑具有在水或極性有機溶劑中動力學穩定之優勢。碳親核劑之其他非限制性實例包括磷葉立德(ylid)、烯醇及烯醇鹽試劑；該等碳親核劑具有相對容易自合成有機化學技術者所熟知之前驅物產生之優勢。碳親核劑在與碳親電子劑結合使用時，在碳親核劑與碳親電子劑之間產生新之碳-碳鍵。

【0246】 適於與碳親電子劑偶合之非碳親核劑之非限制性實例包括但不限於一級胺及二級胺、硫醇、硫醇鹽及硫醚、醇、醇鹽、疊氮化物、胺基脲及諸如此類。該等非碳親核劑在與碳親電子劑結合使用時，通常生成雜原子鍵聯(C-X-C)，其中 X 係雜原子，包括但不限於氧、硫或氮。

【0247】 在一些情況下，用於本發明中之聚合物在一端以羥基或甲氧基封端，亦即，X 係 H 或 CH_3 (「甲氧基 PEG」)。或者，聚合物可以反應基團封端，由此形成雙官能聚合物。典型反應基團可包括通常用於與 20 種常見胺基酸中發現之官能基(包括但不限於馬來醯亞胺基、活化之碳酸酯(包括但不限於對硝基苯酯)、活化之酯(包括但不限於 N-羥基琥珀醯亞胺、對硝基苯酯)及醛)以及對 20 種常見胺基酸呈惰性但與互補官能基(包括但不限於疊氮基、炔基)特異性反應之彼等官能基。應注意，在上式中以 Y 表示之聚合物之另一端將經由天然存在或非天然編碼之胺基酸直接或間接附著至靶向多肽。例如，Y 可為至多肽之胺基(包括但不限於離胺酸之 ε 胺或 *N*-末端)之醯胺、胺基甲酸酯或脲鍵聯。或者，Y 可為至硫醇基(包括但不限於半胱胺酸之硫醇基)之馬來醯亞胺鍵聯。或者，Y 可為

至通常經由 20 種常見胺基酸不可觸及之殘基之鍵聯。舉例而言，聚合物上之疊氮基可與靶向多肽上之炔基反應以形成 Huisgen [3+2]環加成產物。或者，聚合物上之炔基可與存在於靶向多肽中之疊氮基反應以形成類似產物。在一些實施例中，強親核劑(包括但不限於肼、醯肼、羥胺、胺基脲)可與存在於靶向多肽中之醛或酮基團反應以形成腙、肟或縮胺基脲(視需要)，其在有些情況可藉由用適當還原劑處理來進一步減少。或者，強親核劑可經由非天然編碼之胺基酸併入靶向多肽中，且用於優先與存在於水溶性聚合物中之酮基或醛基反應。

【0248】　可根據實際期望使用聚合物之任何分子質量，包括但不限於約 100 道爾頓(Da)至 100,000 Da 或更大(有時包括但不限於 0.1-50 kDa 或 10-40 kDa)。聚合物之分子量可具有寬範圍，包括但不限於介於約 100 Da 與約 100,000 Da 或更大之間。聚合物可介於約 100 Da 與約 100,000 Da 之間，包括但不限於 100,000 Da、95,000 Da、90,000 Da、85,000 Da、80,000 Da、75,000 Da、70,000 Da、65,000 Da、60,000 Da、55,000 Da、50,000 Da、45,000 Da、40,000 Da、35,000 Da、30,000 Da、25,000 Da、20,000 Da、15,000 Da、10,000 Da、9,000 Da、8,000 Da、7,000 Da、6,000 Da、5,000 Da、4,000 Da、3,000 Da、2,000 Da、1,000 Da、900 Da、800 Da、700 Da、600 Da、500 Da、400 Da、300 Da、200 Da 及 100 Da。在一些實施例中，聚合物介於約 100 Da 與約 50,000 Da 之間。亦可使用具支鏈聚合物，包括但不限於每條鏈之分子量在 1-100 kDa (包括但不限於 1-50 kDa 或 5-20 kDa)範圍內之聚合物分子。具支鏈聚合物之每條鏈之分子量可包括但不限於介於約 1,000 Da 與約 100,000 Da 或更大之間。具支鏈聚合物之每條鏈之分子量可介於約 1,000 Da 與約 100,000 Da 之間，包括但不限於 100,000 Da、95,000 Da、90,000 Da、85,000 Da、80,000 Da、75,000 Da、70,000 Da、65,000 Da、60,000 Da、55,000 Da、50,000 Da、45,000 Da、40,000 Da、35,000 Da、30,000 Da、25,000 Da、20,000 Da、15,000 Da、10,000 Da、9,000 Da、8,000 Da、7,000 Da、6,000 Da、5,000 Da、4,000 Da、

3,000 Da、2,000 Da 及 1,000 Da。在一些實施例中，具支鏈聚合物之每條鏈之分子量介於約 1,000 Da 與約 50,000 Da 之間。在一些實施例中，具支鏈聚合物之每條鏈之分子量介於約 1,000 Da 與約 40,000 Da 之間。在一些實施例中，具支鏈聚合物之每條鏈之分子量介於約 5,000 Da 與約 40,000 Da 之間。在一些實施例中，具支鏈聚合物之每條鏈之分子量介於約 5,000 Da 與約 20,000 Da 之間。寬範圍之聚合物分子闡述於(包括但不限於) Shearwater Polymers 公司目錄、Nektar Therapeutics 目錄(其以引用方式併入本文中)中。

【0249】 本發明在一些實施例中提供包含具有約 800 Da 至約 100,000 Da 之平均分子量之水溶性聚合物主鏈的含疊氮化物及乙炔之聚合物衍生物。水溶性聚合物之聚合物主鏈可為聚(乙二醇)。然而，應當理解，多種水溶性聚合物，包括但不限於聚(伸乙基)二醇及其他相關聚合物，包括聚(葡聚糖)及聚(丙二醇)亦適用於實施本發明，且術語 PEG 或聚(乙二醇)之用途意欲涵蓋且包括所有該等分子。術語 PEG 包括但不限於呈其任何形式之聚(乙二醇)，包括雙官能 PEG、多臂 PEG、衍生化 PEG、分叉 PEG、具支鏈 PEG、側接 PEG (即具有一或多個側接至聚合物主鏈之官能基之 PEG 或相關聚合物)、或其中具有可降解鍵聯之 PEG。

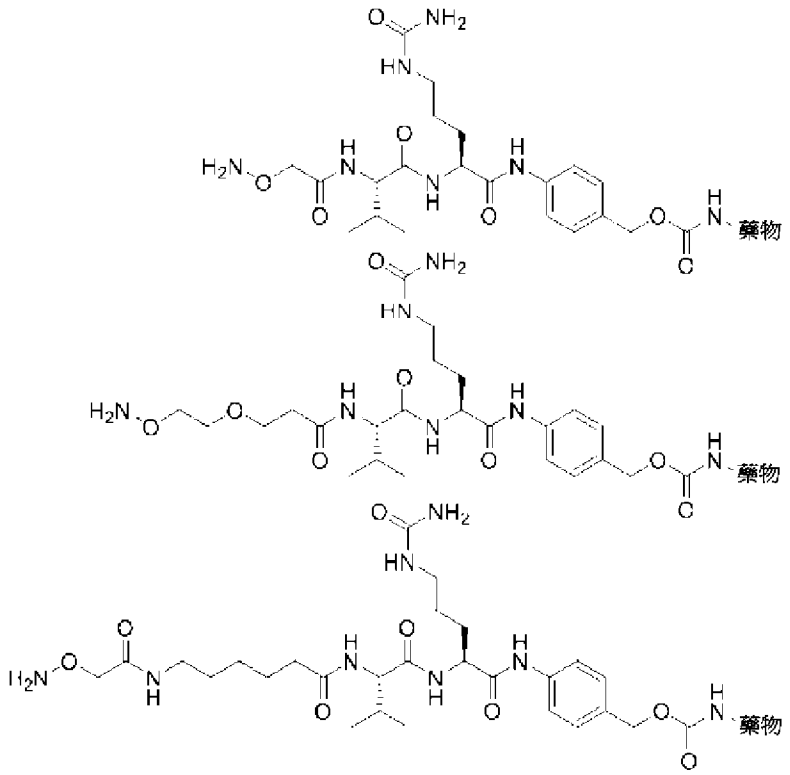
【0250】 除了該等形式之聚合物之外，聚合物亦可製備成在主鏈中具有弱的或可降解的鍵聯。舉例而言，聚合物可製備成在聚合物主鏈中具有經受水解之酯鍵聯。如下文所示，該水解導致聚合物裂解成較低分子量之片段：-聚合物-CO_2-聚合物-+H_2O→聚合物-CO_2H+HO-聚合物-。

【0251】 許多聚合物亦適用於本發明中。在一些實施例中，具有 2 至約 300 個末端之水溶性聚合物主鏈在本發明中特別有用。適宜聚合物之實例包括但不限於其他聚(伸烷基二醇)，諸如聚(丙二醇) (「PPG」)、其共聚物(包括但不限於乙二醇及丙二醇之共聚物)、其三元共聚物、其混合物及諸如此類。儘管聚合物

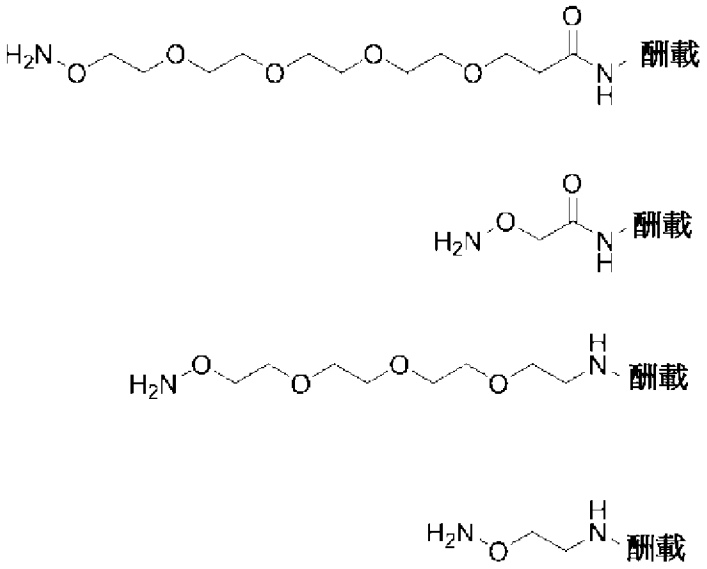
主鏈之每條鏈之分子量可變化，但其通常在約 800 Da 至約 100,000 Da 之範圍內，經常為約 6,000 Da 至約 80,000 Da。聚合物主鏈之每條鏈之分子量可介於約 100 Da 與約 100,000 Da 之間，包括但不限於 100,000 Da、95,000 Da、90,000 Da、85,000 Da、80,000 Da、75,000 Da、70,000 Da、65,000 Da、60,000 Da、55,000 Da、50,000 Da、45,000 Da、40,000 Da、35,000 Da、30,000 Da、25,000 Da、20,000 Da、15,000 Da、10,000 Da、9,000 Da、8,000 Da、7,000 Da、6,000 Da、5,000 Da、4,000 Da、3,000 Da、2,000 Da、1,000 Da、900 Da、800 Da、700 Da、600 Da、500 Da、400 Da、300 Da、200 Da 及 100 Da。在一些實施例中，聚合物主鏈之每條鏈之分子量介於約 100 Da 與約 50,000 Da 之間。在一些實施例中，聚合物主鏈之每條鏈之分子量介於約 100 Da 與約 40,000 Da 之間。在一些實施例中，聚合物主鏈之每條鏈之分子量介於約 1,000 Da 與約 40,000 Da 之間。在一些實施例中，聚合物主鏈之每條鏈之分子量介於約 5,000 Da 與約 40,000 Da 之間。在一些實施例中，聚合物主鏈之每條鏈之分子量介於約 10,000 Da 與約 40,000 Da 之間。

【0252】 在本發明之該實施例之一個特徵中，在水解之前，完整聚合物-偶聯物在投與後最低限度地降解，使得可裂解鍵之水解有效控制活性靶向多肽釋放至血流中之緩慢速率，此與靶向多肽在其釋放至體循環中之前之酶促降解相反。

【0253】 適當的生理上可裂解之鍵聯包括但不限於酯、碳酸酯、胺基甲酸酯、硫酸酯、磷酸酯、醯氧基烷基醚、縮醛及縮酮。該等偶聯物應具有在儲存及投與後穩定之生理上可裂解之鍵。例如，連接至聚合物之靶向多肽或經修飾之靶向多肽應在製造最終醫藥組成物後、在溶解於適當遞送媒劑(若採用)中後及在投與(不管途徑如何)後維持其完整性。本文所揭示之任何可裂解連接體可連接至本發明之藥物、酬載、靶向多肽或經修飾之靶向多肽。經由可裂解連接體之鍵聯之例示性實例包括但不限於：



在本發明之一些實施例中，連接體可為連接至藥物、酬載、靶向多肽或經修飾之靶向多肽之非可裂解連接體。經由非可裂解連接體之 鍵聯之例示性實例包括但不限於：



本發明亦包括用於細胞內遞送藥物偶聯物的具有可調諧穩定性之基於磷酸酯之連接體，其揭示於 US 2017/0182181 (以引用方式併入本文中)中。基於磷酸酯之連接體包含共價連接至連接體臂之遠端之單磷酸酯基、二磷酸酯基、三磷酸酯基或四磷酸酯基(磷酸酯基)，該連接體臂自遠側至近側方向包含調諧元件、視情

況存在之間隔物元件及反應性官能基。基於磷酸酯之連接體之磷酸酯基能夠與酬載偶聯且反應性官能基能夠與諸如抗體等細胞特異性靶向配位體偶聯。基於磷酸酯之連接體之一般結構係：磷酸酯基-調諧元件-視情況存在之間隔物元件-官能性反應基團。與酬載偶聯之基於磷酸酯之連接體具有一般結構：酬載-磷酸酯基-調諧元件-視情況存在之間隔物元件-官能性反應基團，且當與靶向配位體偶聯時，具有一般結構酬載-磷酸酯基-調諧元件-視情況存在之間隔物元件-靶向配位體。該等基於磷酸酯之連接體在血液中相對於細胞內環境(例如溶酶體區室)具有差異化及可調諧之穩定性。磷酸酯基在細胞內環境中裂解以釋放其天然或活性形式之酬載之速率可能受以下影響：調諧元件之結構，以及藉由磷酸酯基之取代介導之其他效應，以及磷酸酯基是單磷酸酯、二磷酸酯、三磷酸酯，還是四磷酸酯。此外，該等基於磷酸酯之連接體提供構築偶聯物(諸如抗體-藥物偶聯物)之能力，其中與使用並非如本文所揭示之基於磷酸酯之連接體將相同酬載與抗體或靶向配位體偶聯之偶聯物相比，該偶聯物形成聚集體之傾向性降低。

TLR-促效劑連接體衍生物: 親電子基團及親核基團之結構及合成

【0254】 具有含有羥胺(亦稱為胺基氧基)基團之連接體之 TLR-促效劑衍生物容許與多種親電子基團反應以形成偶聯物(包括但不限於與 PEG 或其他水溶性聚合物反應)。與肼、醯肼及胺基脲一樣，胺基氧基之增強之親核性容許其與多種含有羰基或二羰基(包括但不限於酮、醛或具有相似化學反應性之其他官能基)之分子高效地且選擇性地反應。參見例如 Shao, J.及 Tam, J.，J. Am. Chem. Soc. 117:3893-3899 (1995)；H. Hang 及 C. Bertozzi, Acc. Chem. Res. 34(9): 727-736 (2001)。雖然與肼基反應之結果係對應之腙，然而，肟通常由胺基氧基與含羰基或二羰基之基團(諸如舉例而言酮、醛或具有相似化學反應性之其他官能基)反應產生。在一些實施例中，具有包含疊氮化物、炔烴或環炔烴之連接體之 TLR-促效劑衍生物容許經由環加成反應(例如，1,3-偶極環加成、疊氮化物-炔烴 Huisgen

環加成等)連接分子。(闡述於美國專利第 7,807,619 號中，該專利在相對於反應之程度上以引用方式併入本文中)。

【0255】 因此，在本文所述之某些實施例中係具有連接體之 TLR-促效劑衍生物，該等連接體包含羥胺、醛、受保護之醛、酮、受保護之酮、硫酯、酯、二羰基、肼、脒、亞胺、二胺、酮基-胺、酮基-炔烴、及烯二酮羥胺基團、類羥胺基團(其具有與羥胺基團類似之反應性且在結構上與羥胺基團類似)、遮蔽之羥胺基團(其可容易地轉化為羥胺基團)或受保護之羥胺基團羥胺基團(其在去保護後具有類似於羥胺基團之反應性)。在一些實施例中，具有連接體之 TLR-促效劑衍生物包含疊氮化物、炔烴或環炔烴。

【0256】 該等 TLR-促效劑連接體衍生物或靶向多肽可呈鹽之形式或者可併入非天然胺基酸多肽、聚合物、多糖或多核苷酸中且視情況進行轉譯後修飾。

【0257】 在某些實施例中，式(I)-(VII)之化合物在弱酸性條件下在水溶液中穩定至少 1 個月。在某些實施例中，式(I)-(VII)之化合物在弱酸性條件下穩定至少 2 週。在某些實施例中，式(I)-(VII)之化合物在弱酸性條件下穩定至少 5 天。在某些實施例中，該等酸性條件係 pH 2 至 8。

【0258】 本文所提供及闡述之方法及組成物包括包含具有至少一個羰基或二羰基、肟基、羥胺基或其受保護或遮蔽形式之非天然胺基酸的多肽。將至少一個反應基團引入 TLR-促效劑連接體衍生物或靶向多肽中可容許應用偶聯化學，其涉及特定化學反應，包括但不限於與一或多種靶向多肽之反應，但不與通常存在之胺基酸反應。在併入後，TC 側鏈之靶向多肽亦可藉由利用本文所述或適於存在於 TLR-促效劑連接體衍生物或靶向多肽中之特定官能基或取代基的化學方法來修飾。

【0259】 本文所述之 TLR-促效劑連接體衍生物及靶向多肽方法以及組成物提供具有眾多種官能基、取代基或部分之物質與其他物質之偶聯物，其他物質

包括但不限於聚合物；水溶性聚合物；聚乙二醇之衍生物；第二蛋白質或多肽或多肽類似物；抗體或抗體片段；及其任一組合。

【0260】 在某些實施例中，本文所述之 TLR-促效劑連接體衍生物、靶向多肽、TC、連接體及試劑(包括式(I)-(VII)之化合物)在水溶液中在弱酸性條件(包括但不限於 pH 2 至 8)下穩定。在其他實施例中，該等化合物在弱酸性條件下穩定至少一個月。在其他實施例中，該等化合物在弱酸性條件下穩定至少 2 週。在其他實施例中，該等化合物在弱酸性條件下穩定至少 5 天。

【0261】 在本文所述之組成物、方法、技術及策略之另一態樣中係用於研究或使用任何上述「經修飾或未經修飾」之非天然胺基酸靶向多肽之方法。僅舉例而言，該態樣內包括將受益於包含「經修飾或未經修飾」之非天然胺基酸多肽或蛋白質之靶向多肽的治療用途、診斷用途、基於分析之用途、工業用途、化妝用途、植物生物學用途、環境用途、能源生產用途、消費品用途及/或軍事用途。

【0262】 本發明中提供包含至少一種非天然胺基酸之 TC 分子。在本發明之某些實施例中，具有至少一種非天然胺基酸之 TC 包括至少一個轉譯後修飾。在一個實施例中，至少一種轉譯後修飾包含利用熟習此項技術者已知適於特定反應基團之化學方法將包括但不限於以下之分子附著至至少一種包含第一反應基團之非天然胺基酸：包含第二反應基團之標記、染料、連接體、另一 TC 多肽、聚合物、水溶性聚合物、聚乙二醇之衍生物、光交聯劑、放射性核種、細胞毒性化合物、藥物、親和標記、光親和標記、反應性化合物、樹脂、第二蛋白質或多肽或多肽類似物、抗體或抗體片段、金屬螯合劑、輔因子、脂肪酸、碳水化合物、多核苷酸、DNA、RNA、反義多核苷酸、糖、環糊精、抑制性核糖核酸、生物材料、奈米粒子、自旋標記、螢光團、含金屬部分、放射性部分、新穎官能基、與其他分子共價或非共價相互作用之基團、光籠蔽部分(photocaged

moiety)、光化輻射可激發部分、可光異構化部分、生物素、生物素之衍生物、生物素類似物、併入重原子之部分、化學可裂解基團、可光裂解基團、延長之側鏈、碳連接之糖、氧化還原活性劑、胺基硫代酸、毒性部分、經同位素標記之部分、生物物理探針、發磷光基團、化學發光基團、電子緻密基團、磁性基團、嵌入基團、發色團、能量轉移劑、生物活性劑、可偵測標記、小分子、量子點、奈米發射體、放射性核苷酸、放射性發射體、中子俘獲劑、或上述之任一組合或任一其他期望化合物或物質。舉例而言，第一個反應基團係炔基部分(在非天然胺基酸中，包括但不限於*對*炔丙氧基苯丙胺酸，其中炔丙基有時亦稱為乙炔部分)，且第二反應基團係疊氮基部分，且利用[3+2]環加成化學方法。在另一實例中，第一反應基團係疊氮基部分(在非天然胺基酸中，包括但不限於*對*疊氮基-L-苯丙胺酸或 pAZ，此乃因其在本說明書中有時被提及)且第二反應基團係炔基部分。在本發明之經修飾之 TC 之某些實施例中，使用至少一種包含至少一個轉譯後修飾之非天然胺基酸(包括但不限於含有酮基官能基之非天然胺基酸)，其中至少一個轉譯後修飾包含糖部分。在某些實施例中，轉譯後修飾係在真核細胞或非真核細胞中體內進行。連接體、聚合物、水溶性聚合物或另一分子可將分子附著至多肽。在額外實施例中，附著至 TC 之連接體足夠長以容許形成二聚物。分子亦可直接附著至多肽。

【0263】　在某些實施例中，TC 蛋白質包括至少一個由一種宿主細胞在體內進行之轉譯後修飾，其中轉譯後修飾通常並非由另一宿主細胞類型進行。在某些實施例中，蛋白質包括至少一個由真核細胞在體內進行之轉譯後修飾，其中轉譯後修飾通常並非由非真核細胞進行。轉譯後修飾之實例包括但不限於糖基化、乙醯化、醯化、脂質修飾、棕櫚醯化、棕櫚酸鹽加成(palmitate addition)、磷酸化、糖脂-鍵聯修飾及諸如此類。

【0264】　在一些實施例中，TC 包含一或多種用於多肽之糖基化、乙醯化、醯

化、脂質修飾、棕櫚醯化、棕櫚酸鹽加成、磷酸化或糖脂鍵聯修飾之非天然編碼之胺基酸。在一些實施例中，TC 包含一或多種用於多肽糖基化之非天然編碼之胺基酸。在一些實施例中，TC 包含一或多種用於多肽之糖基化、乙醯化、醯化、脂質修飾、棕櫚醯化、棕櫚酸鹽加成、磷酸化或糖脂鍵聯修飾之天然編碼之胺基酸。在一些實施例中，TC 包含一或多種用於多肽糖基化之天然編碼之胺基酸。

【0265】　在一些實施例中，TC 包含一或多個增強多肽糖基化之非天然編碼之胺基酸添加及/或取代。在一些實施例中，TC 包含一或多個增強多肽糖基化之缺失。在一些實施例中，TC 包含一或多個增強多肽中不同胺基酸處糖基化的非天然編碼之胺基酸添加及/或取代。在一些實施例中，TC 包含一或多個增強多肽中不同胺基酸處糖基化之缺失。在一些實施例中，TC 包含一或多個增強多肽中非天然編碼之胺基酸處糖基化的非天然編碼之胺基酸添加及/或取代。在一些實施例中，TC 包含一或多個增強多肽中天然編碼之胺基酸處糖基化的非天然編碼之胺基酸添加及/或取代。在一些實施例中，TC 包含一或多個增強多肽中不同胺基酸處糖基化的天然編碼之胺基酸添加及/或取代。在一些實施例中，TC 包含一或多個增強多肽中天然編碼之胺基酸處糖基化的非天然編碼之胺基酸添加及/或取代。在一些實施例中，TC 包含一或多個增強多肽中非天然編碼之胺基酸處糖基化的非天然編碼之胺基酸添加及/或取代。

【0266】　在一個實施例中，轉譯後修飾包含藉由 GlcNAc-天冬醯胺酸鍵聯將寡糖附至天冬醯胺酸(包括但不限於，其中寡糖包含$(GlcNAc\text{-}Man)_2$-Man-GlcNAc-GlcNAc 及諸如此類)。在另一實施例中，轉譯後修飾包含藉由 GalNAc-絲胺酸、GalNAc-蘇胺酸、GlcNAc-絲胺酸或 GlcNAc-蘇胺酸鍵聯將寡糖(包括但不限於 Gal-GalNAc、Gal-GlcNAc 等)附著至絲胺酸或蘇胺酸。在某些實施例中，本發明之蛋白質或多肽可包含分泌或定位序列、抗原決定基標籤、FLAG 標籤、聚組胺

酸標籤、GST 融合物及/或諸如此類。分泌信號序列之實例包括但不限於原核分泌信號序列、真核分泌信號序列、針對細菌表現進行 5'-最佳化之真核分泌信號序列、新穎分泌信號序列、果膠酸裂解酶分泌信號序列、Omp A 分泌信號序列及噬菌體分泌信號序列。分泌信號序列之實例包括但不限於 STII (原核)、Fd GI II 及 M13 (噬菌體)、Bgl2 (酵母)及源自轉位子之信號序列 bla。任一該序列皆可經修飾以提供多肽之期望結果，包括但不限於用不同信號序列取代一個信號序列、用不同前導序列取代前導序列等。

【0267】　所關注蛋白質或多肽可含有至少一種、至少兩種、至少三種、至少四種、至少五種、至少六種、至少七種、至少八種、至少九種、或十種或更多種非天然胺基酸。非天然胺基酸可相同或不同，舉例而言，在蛋白質中可存在 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個或更多個不同位點，該等位點包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個或更多種不同的非天然胺基酸。在某些實施例中，至少一種但少於全部存在於蛋白質之天然存在形式中的特定胺基酸經非天然胺基酸取代。

【0268】　本發明提供基於包含至少一種非天然編碼之胺基酸之 TC 的方法及組成物。將至少一種非天然編碼之胺基酸引入 TC 中可容許應用偶聯化學，其涉及特定化學反應，包括但不限於與一或多種非天然編碼之胺基酸之反應，而不與通常存在之 20 種胺基酸反應。在一些實施例中，包含非天然編碼之胺基酸之 TC 經由非天然編碼之胺基酸之側鏈連接至水溶性聚合物(諸如聚乙二醇(PEG))或連接體。本發明提供用 PEG 衍生物或 TLR-連接體衍生物選擇性修飾蛋白質之高效方法，其涉及因應選擇密碼子將非遺傳編碼之胺基酸(包括但不限於彼等含有在 20 種天然併入之胺基酸中未發現之官能基或取代基(包括但不限於酮、疊氮化物或乙炔部分)之胺基酸選擇性併入蛋白質中且隨後用適宜反應性之 PEG 衍生物修飾彼等胺基酸。在併入後，接著可藉由利用熟習此項技術者已知適於存

在於非天然編碼之胺基酸中之特定官能基或取代基的化學方法來修飾胺基酸側鏈。眾多種已知化學方法適用於本發明中以將水溶性聚合物併入蛋白質中。該等方法包括但不限於分別與包括但不限於乙炔或疊氮化物衍生物之 Huisgen [3+2]環加成反應(*參見例如* Padwa, A. Comprehensive Organic Synthesis，第 4 卷 (1991) Trost, B. M.編輯，Pergamon, Oxford，第 1069-1109 頁；及 Huisgen, R. 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry, (1984) Padwa, A.編輯，Wiley, New York，第 1-176 頁)。

【0269】 由於 Huisgen [3+2]環加成方法涉及環加成而非親核取代反應，故可以極高選擇性修飾蛋白質。可在室溫下於水性條件下，藉由向反應混合物中添加催化量之 Cu(I)鹽以優良區域選擇性(1,4 > 1,5)實施反應。參見例如 Tornoe 等人，(2002) J. Org. Chem. 67:3057-3064；及 Rostovtsev 等人，(2002) Angew. Chem. Int. Ed. 41:2596-2599；及 WO 03/101972。可藉助[3+2]環加成添加至本發明之蛋白質中之分子實際上包括具有適宜官能基或取代基(包括但不限於疊氮基或乙炔衍生物)之任一分子。該等分子可分別添加至具有乙炔基之非天然胺基酸(包括但不限於對炔丙氧基苯丙胺酸)或具有疊氮基之非天然胺基酸(包括但不限於對疊氮基苯丙胺酸)中。

【0270】 由 Huisgen[3+2]環加成產生之五員環在還原環境中通常係不可逆的，且在水性環境中對水解穩定達延長時段。因此，可用本發明之活性 PEG 衍生物或 TLR-連接體衍生物在苛刻的水性條件下修改眾多種物質之物理及化學特徵。甚至更重要地，由於疊氮化物及乙炔部分彼此具有特異性(且例如不與 20 種常見遺傳編碼胺基酸中之任一種反應)，故可在一或多個特定位點以極高選擇性對蛋白質進行修飾。

【0271】 本發明亦提供具有一或多個乙炔或疊氮化物部分之 PEG 衍生物或 TLR-連接體衍生物以及相關親水聚合物之水溶性及水解穩定性衍生物。含有乙

炔部分之 PEG 聚合物衍生物對於與已因應選擇密碼子而選擇性地引入蛋白質中之疊氮化物部分偶合具有高度選擇性。類似地，含有疊氮化物部分之 PEG 聚合物衍生物對於與已因應選擇密碼子而選擇性地引入蛋白質中之乙炔部分偶合具有高度選擇性。更特定而言，疊氮化物部分包含但不限於烷基疊氮化物、芳基疊氮化物及該等疊氮化物之衍生物。烷基疊氮化物及芳基疊氮化物之衍生物可包括其他取代基，只要維持乙炔特異性反應性即可。乙炔部分包含烷基乙炔及芳基乙炔以及各自之衍生物。烷基乙炔及芳基乙炔之衍生物可包括其他取代基，只要維持疊氮化物特異性反應性即可。

【0272】　本發明提供具有眾多種官能基、取代基或部分之物質與其他物質之偶聯物，該等其他物質包括但不限於標記；染料；聚合物；水溶性聚合物；聚乙二醇之衍生物；光交聯劑；放射性核種；細胞毒性化合物；藥物；親和標記；光親和標記；反應性化合物；樹脂；第二蛋白質或多肽或多肽類似物；抗體或抗體片段；金屬螯合劑；輔因子；脂肪酸；碳水化合物；多核苷酸；DNA；RNA；反義多核苷酸；糖；水溶性樹枝狀聚合物；環糊精；抑制性核糖核酸；生物材料；奈米粒子；自旋標記；螢光團；含金屬部分；放射性部分；新穎官能基；與其他分子共價或非共價相互作用之基團；光籠蔽部分；光化輻射可激發部分；可光異構化部分；生物素；生物素之衍生物；生物素類似物；併入重原子之部分；化學可裂解基團；可光裂解基團；延長之側鏈；碳連接之糖；氧化還原活性劑；胺基硫代酸；毒性部分；經同位素標記之部分；生物物理探針；發磷光基團；化學發光基團；電子緻密基團；磁性基團；嵌入基團；發色團；能量轉移劑；生物活性劑；可偵測標記；小分子；量子點；奈米發射體；放射性核苷酸；放射性發射體；中子俘獲劑；或上述之任一組合或任一其他期望化合物或物質。本發明亦包括具有疊氮化物或乙炔部分之物質與具有對應乙炔或疊氮化物部分之 PEG 聚合物衍生物之偶聯物。舉例而言，含有疊氮基部分之 PEG 聚合

物可在蛋白質中含有帶有乙炔官能基之非遺傳編碼之胺基酸的位置處與生物活性分子偶合。PEG 與生物活性分子藉以偶合之鍵聯包括但不限於 Huisgen [3+2]環加成產物。

【0273】 在此項技術中已充分確認，PEG 可用於修飾生物材料之表面(參見例如美國專利 6,610,281；Mehvar, R., J. Pharm Pharm Sci., 3(1):125-136 (2000)，其以引用方式併入本文中)。本發明亦包括生物材料，該等生物材料包含具有一或多個反應性疊氮化物或乙炔位點之表面及一或多種經由 Huisgen [3+2]環加成鍵聯與該表面偶合的本發明之含疊氮化物或乙炔之聚合物。生物材料及其他物質亦可藉助除疊氮化物或乙炔鍵聯之外之鍵聯(諸如藉助包含羧酸、胺、醇或硫醇部分之鍵聯)與經疊氮化物或乙炔活化之聚合物衍生物偶合，以留下可用於後續反應之疊氮化物或乙炔部分。

【0274】 本發明包括合成本發明之含疊氮化物及乙炔之聚合物的方法。在含疊氮化物之 PEG 衍生物之情況下，疊氮化物可直接鍵結至聚合物之碳原子。或者，含疊氮化物之 PEG 衍生物可藉由將在一個末端具有疊氮化物部分之連接劑附著至習用活化聚合物以使得所得聚合物在其末端具有疊氮化物部分來製備。在含乙炔之 PEG 衍生物之情況下，乙炔可直接鍵結至聚合物之碳原子。或者，含乙炔之 PEG 衍生物可藉由將在一個末端具有乙炔部分之連接劑附著至習用活化聚合物以使得所得聚合物在其末端具有乙炔部分來製備。

【0275】 更特定而言，在含疊氮化物之 PEG 衍生物之情況下，具有至少一個活性羥基部分之水溶性聚合物經歷反應以產生在其上具有更具反應性之部分(諸如甲磺酸根、三氟乙磺酸根、甲苯磺酸根或鹵素離去離團)之經取代聚合物。含有磺醯鹵、鹵原子及其他離去基團之 PEG 衍生物或 TLR-連接體衍生物之製備及使用為熟習此項技術者已知。接著，所得經取代之聚合物經歷反應以取代聚合物末端更具反應性之部分(疊氮化物部分)。或者，具有至少一個活性親核或親電

子部分之水溶性聚合物經歷與在一個末端處具有疊氮化物之連接劑之反應，使得在 PEG 聚合物與連接劑之間形成共價鍵，且疊氮化物部分位於聚合物之末端處。親核部分及親電子部分(包括胺、硫醇、醯肼、肼、醇、羧酸酯、醛、酮、硫酯及諸如此類)為熟習此項技術者已知。

【0276】　更特定而言，在含乙炔之 PEG 衍生物之情況下，具有至少一個活性羥基部分之水溶性聚合物經歷反應以自包含乙炔部分之前驅物置換鹵素或另一經活化之離去基團。或者，具有至少一個活性親核或親電子部分之水溶性聚合物經歷與在一個末端處具有乙炔之連接劑之反應，使得在 PEG 聚合物與連接劑之間形成共價鍵，且乙炔部分位於聚合物之末端處。鹵素部分、活化之離去基團、親核及親電子部分在有機合成之背景下以及 PEG 衍生物或 TLR-連接體衍生物之製備及使用中之使用係熟習此項技術者已充分確認的。

【0277】　本發明亦提供用於選擇性修飾蛋白質以向經修飾之蛋白質中添加其他物質之方法，該等其他物質包括但不限於水溶性聚合物，諸如含有疊氮化物或乙炔部分之 PEG 和 PEG 衍生物或 TLR-連接體衍生物、連接體或另一 TC 多肽。含疊氮化物及乙炔之 PEG 衍生物或 TLR 連接體衍生物可用於修改其中生物相容性、穩定性、溶解性及缺乏免疫原性係重要之表面及分子之性質，同時提供比此項技術中先前已知之手段更具選擇性的將 PEG 衍生物或 TLR-連接體衍生物附著至蛋白質之手段。

用於本發明之一般重組核酸方法

【0278】　在本發明之許多實施例中，將使用重組方法分離、選殖且經常改變編碼所關注 TC 之靶向多肽之核酸。該等實施例用於(包括但不限於)用於蛋白質表現或生成源自 TC 之靶向多肽之變異體、衍生物、表現盒或其他序列期間。在一些實施例中，編碼本發明之多肽之序列與異源啟動子可操作地連接。

【0279】　可基於母體多肽之胺基酸序列肽合成編碼包含非天然編碼之胺基酸

的 TC 之靶向多肽之核苷酸序列，接著改變核苷酸序列以達成一或多個相關胺基酸殘基之引入(亦即，併入或取代)或去除(亦即缺失或取代)。可根據習用方法藉由定點誘變便利地修飾核苷酸序列。或者，核苷酸序列可藉由化學合成來製備，包括但不限於藉由使用寡核苷酸合成器，其中寡核苷酸係基於期望多肽之胺基酸序列來設計，且較佳選擇彼等在將產生重組多肽之宿主細胞中有利之密碼子。舉例而言，可藉由 PCR、連接或連接鏈反應合成及組裝若干編碼期望多肽部分之小寡核苷酸。*參見例如* Barany *等人*，*Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 189-193 (1991)；美國專利 6,521,427，其以引用方式併入本文中。

【0280】 本發明利用重組遺傳學領域之常規技術。揭示用於本發明中之一般方法之基礎教科書包括 Sambrook 等人，Molecular Cloning, A Laboratory Manual (第 3 版，2001)；Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990)；及 Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel 等人編輯，1994)。

【0281】 本發明亦係關於用於經由正交 tRNA/RS 對在體內併入非天然胺基酸之真核宿主細胞、非真核宿主細胞及生物體。將宿主細胞用本發明之多核苷酸或包含本發明多核苷酸之構築體(包括但不限於本發明之載體，其可為例如選殖載體或表現載體)進行轉型工程改造(包括但不限於轉型、轉導或轉染)。

【0282】 可利用若干眾所周知的將靶核酸引入細胞中之方法，其中之任一種皆可用於本發明中。該等方法包括：接受細胞與含有 DNA 之細菌原生質體之融合、電穿孔、射彈轟擊(projectile bombardment)及用病毒載體感染(下文進一步討論)等。細菌細胞可用於擴增含有本發明 DNA 構築體之質體之數目。使細菌生長至對數期，且可藉由此項技術中已知之多種方法來分離細菌內之質體(*參見*例如 Sambrook)。此外，用於自細菌中純化質體之套組可購得(參見例如 EasyPrep™、FlexiPrep™，二者皆來自 Pharmacia Biotech；StrataClean™，來自 Stratagene；及 QIAprep™，來自 Qiagen)。接著進一步操縱經分離及純化之質體

以產生其他質體，該等質體用於轉染細胞或併入相關載體中以感染生物體。典型載體含有轉錄及轉譯終止子、轉錄及轉譯起始序列以及可用於調節特定靶核酸表現之啟動子。載體視情況包含含有至少一種獨立終止子序列、容許盒在真核生物或原核生物或二者中複製之序列(包括但不限於穿梭載體)及用於原核及真核系統二者之選擇標記物之通用表現盒。載體適於在原核生物、真核生物或二者中複製及整合。*參見* Gillam 及 Smith, Gene 8:81 (1979)；Roberts 等人，Nature, 328:731 (1987)；Schneider, E. 等人，Protein Expr. Purif. 6(1):10-14 (1995)；Ausubel, Sambrook, Berger (全部見上文)。例如，ATCC 提供了可用於選殖之細菌及噬菌體之目錄，例如，由 ATCC 出版的細菌及噬菌體之 ATCC 目錄(The ATCC Catalogue of Bacteria and Bacteriophage) (1992) Gherna 等人(編輯)。用於測序、選殖及分子生物學之其他態樣之額外基本程序以及潛在理論考慮亦見於 Watson 等人(1992) Recombinant DNA (第二版) Scientific American Books, NY 中。此外，基本上任一核酸(以及實際上任一經標記之核酸，無論是標準的還是非標準的)皆可自諸如以下等各種商業來源中之任一者定制訂購或標準訂購：Midland Certified Reagent 公司(Midland, TX，可在萬維網上於 mcrc.com 處獲得)、Great American Gene 公司(Ramona, CA，可在萬維網上於 genco.com 處獲得)、ExpressGen 公司(Chicago, IL，可在萬維網上於 expressgen.com 處獲得)、Operon Technologies 公司(Alameda, CA)及許多其他公司。

選擇密碼子

【0283】　本發明之選擇密碼子擴展了蛋白質生物合成機器之遺傳密碼子架構。舉例而言，選擇密碼子包括但不限於獨特三鹼基密碼子、無義密碼子(諸如終止密碼子，包括但不限於琥珀密碼子(UAG)、赭石密碼子或蛋白石密碼子(UGA))、非天然密碼子、四鹼基或更多鹼基密碼子、稀有密碼子或諸如此類。熟習此項技術者容易明瞭，可引入期望基因或多核苷酸中之選擇密碼子之數目

範圍很廣，包括但不限於在編碼 TC 之至少一部分之單一多核苷酸中有一或多個、兩個或更多個、三個或更多個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個或更多個。

【0284】 在一個實施例中，該等方法涉及使用選擇密碼子，該選擇密碼子係用於在體內併入一或多種非天然胺基酸之終止密碼子。舉例而言，產生識別終止密碼子(包括但不限於 UAG)之 O-tRNA，且藉由具有期望非天然胺基酸之 O-RS 將其胺醯化。該 O-tRNA 不被天然宿主之胺醯基-tRNA 合成酶識別。習用定點誘變可用於在所關注多肽之所關注位點處引入終止密碼子，包括但不限於 TAG。*參見例如* Sayers, J.R.等人(1988)，*5'-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis.* Nucleic Acids Res, 16:791-802。當 O-RS、O-tRNA 及編碼所關注多肽之核酸在體內組合時，非天然胺基酸因應 UAG 密碼子而併入，以產生在指定位置處含有非天然胺基酸之多肽。

【0285】 可在不顯著干擾真核宿主細胞之情況下完成在體內併入非天然胺基酸。舉例而言，由於 UAG 密碼子之阻抑效率取決於 O-tRNA (包括但不限於琥珀阻抑型 tRNA)與真核釋放因子(包括但不限於 eRF) (其結合至終止密碼子且起始自核糖體釋放生長肽)，故阻抑效率可藉由(包括但不限於)增加 O-tRNA 及/或阻抑型 tRNA 之表現水準來調節。

【0286】 非天然胺基酸亦可經稀有密碼子編碼。舉例而言，當體外蛋白質合成反應中之精胺酸濃度降低時，已證明稀有精胺酸密碼子 AGG 可高效地藉由用丙胺酸醯化之合成 tRNA 插入 Ala。*參見例如* Ma 等人，Biochemistry, 32:7939 (1993)。在該情況下，合成 tRNA 與天然存在之 tRNAArg 競爭，後者在大腸桿菌(*Escherichia coli*)中以次要物質形式存在。一些生物體不使用所有三聯密碼子。藤黃微球菌(*Micrococcus luteus*)中之未分配密碼子 AGA 已用於在體外轉錄/轉譯提取中插入胺基酸。*參見例如* Kowal 及 Oliver，Nucl. Acid. Res., 25:4685 (1997)。

可生成本發明之組分以在體內使用該等稀有密碼子。

【0287】 選擇密碼子亦包含擴展密碼子，包括但不限於四鹼基或更多鹼基之密碼子，諸如四鹼基、五鹼基、六鹼基或更多鹼基之密碼子。四鹼基密碼子之實例包括但不限於 AGGA、CUAG、UAGA、CCCU 及諸如此類。五鹼基密碼子之實例包括但不限於 AGGAC、CCCCU、CCCUC、CUAGA、CUACU、UAGGC 及諸如此類。本發明之特徵包括使用基於框移阻抑之擴展密碼子。四鹼基或更多鹼基之密碼子可將包括但不限於一或多種非天然胺基酸插入同一蛋白質中。舉例而言，在突變之 O-tRNA (包括但不限於，具有反密碼子環(例如，具有至少 8-10 nt 反密碼子環)之特殊框移阻抑型 tRNA)存在下，四鹼基或更多鹼基之密碼子解讀為單一胺基酸。在其他實施例中，反密碼子環可解碼包括但不限於至少四鹼基密碼子、至少五鹼基密碼子或至少六鹼基密碼子或更多。由於存在 256 種可能的四鹼基密碼子，因此可使用四鹼基或更多鹼基密碼子在同一細胞中編碼多種非天然胺基酸。*參見* Anderson 等人，(2002) *Exploring the Limits of Codon and Anticodon Size*, Chemistry and Biology, 9:237-244；Magliery, (2001) *Expanding the Genetic Code: Selection of Efficient Suppressors of Four-base Codons and Identification of 「Shifty」 Four-base Codons with a Library Approach in Escherichia coli*, J. Mol. Biol. 307: 755-769。

【0288】 舉例而言，已使用四鹼基密碼子來使用體外生物合成方法將非天然胺基酸併入蛋白質中。*參見例如* Ma 等人，(1993) Biochemistry, 32:7939；及 Hohsaka 等人，(1999) J. Am. Chem. Soc., 121:34。CGGG 及 AGGU 用於在體外將 2-萘基丙胺酸及離胺酸之 NBD 衍生物與兩種化學醯化之框移阻抑型 tRNA 同時併入鏈黴抗生物素蛋白中。*參見例如* Hohsak 等人，(1999) J. Am. Chem. Soc., 121:12194。在體內研究中，Moore 等人檢查了具有 NCUA 反密碼子之 tRNALeu 衍生物阻抑 UAGN 密碼子(N 可為 U、A、G 或 C)之能力，且發現四聯組 UAGA

可由具有 UCUA 反密碼子之 tRNALeu 以 13%至 26%之效率解碼，在 0 或-1 框中很少解碼。*參見* Moore 等人，(2000) J. Mol. Biol., 298:195。在一個實施例中，基於稀有密碼子或無義密碼子之擴展密碼子可用於本發明中，此可減少其他不合意位點處之錯義通讀及框移阻抑。

【0289】　對於給定系統，選擇密碼子亦可包括天然三鹼基密碼子中之一種，其中內源系統不使用(或很少使用)天然鹼基密碼子。舉例而言，此包括一個缺乏識別天然三鹼基密碼子之 tRNA 之系統，及/或三鹼基密碼子係稀有密碼子之系統。

【0290】　選擇密碼子視情況包括非天然鹼基對。該等非天然鹼基對進一步擴展了現有遺傳字母表。一個額外鹼基對將三聯密碼子之數目自 64 增加至 125。第三鹼基對之性質包括穩定及選擇性的鹼基配對、藉由聚合酶以高保真度高效地酶促併入 DNA 中，以及在合成新生非天然鹼基對後高效地持續引子延伸。可適用於方法及組成物之非天然鹼基對之闡述包括例如 Hirao 等人，(2002) *An unnatural base pair for incorporating amino acid analogues into protein*, Nature Biotechnology, 20:177-182。亦參見 Wu, Y.等人，(2002) J. Am. Chem. Soc. 124:14626-14630。下文列出其他相關出版物。

【0291】　對於體內使用，非天然核苷具有膜滲透性且經磷酸化以形成對應三磷酸酯。此外，增加之遺傳資訊係穩定的，且不被細胞酶破壞。Benner 及他人之先前努力利用了不同於規範華特生-克裡克(Watson-Crick)對中之鍵結模式之氫鍵結模式，其中最值得注意之實例係異-C:異-G 對。*參見例如* Switzer 等人，(1989) J. Am. Chem. Soc., 111:8322；及 Piccirilli 等人，(1990) Nature, 343:33；Kool, (2000) Curr. Opin. Chem. Biol., 4:602。該等鹼基通常在某種程度上與天然鹼基錯配且不能酶促複製。Kool 及合作者證實，鹼基之間之疏水堆積相互作用可替代氫鍵結以驅動鹼基對之形成。*參見* Kool, (2000) Curr. Opin. Chem. Biol., 4:602；

以及 Guckian 及 Kool, (1998) Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 36, 2825。為了開發出滿足所有上述要求之非天然鹼基對，Schultz、Romesberg 及合作者已系統地合成並研究了一系列非天然疏水鹼基。發現 PICS:PICS 自身配對比天然鹼基對更穩定，且可藉由大腸桿菌 DNA 聚合酶 I (KF)之 Klenow 片段高效地併入 DNA 中。*參見例如* McMinn 等人，(1999) J. Am. Chem. Soc., 121:11585-6；及 Ogawa 等人，(2000) J. Am. Chem. Soc., 122:3274。3MN:3MN 自身對可藉由 KF 以對於生物功能足夠之效率及選擇性合成。*參見例如* Ogawa 等人，(2000) J. Am. Chem. Soc., 122:8803。然而，該兩個鹼基皆用作進一步複製之鏈終止劑。最近已演化出可用於複製 PICS 自身對之突變 DNA 聚合酶。此外，可複製 7AI 自身對。參見例如 Tae 等人，(2001) J. Am. Chem. Soc., 123:7439。亦已開發出新穎金屬鹼基對(metallobase pair) (Dipic:Py)，其在結合 Cu(II)後形成穩定對。參見 Meggers 等人，(2000) J. Am. Chem. Soc., 122:10714。由於擴展密碼子及非天然密碼子本質上係與天然密碼子正交的，故本發明之方法可利用該性質來生成用於該等密碼子之正交 tRNA。

【0292】　轉譯旁路系統亦可用於在期望多肽中併入非天然胺基酸。在轉譯旁路系統中，將大序列併入基因中，但未轉譯成蛋白質。該序列含有一種結構，該結構用作誘導核糖體躍過該序列且在插入下游恢復轉譯之提示物(cue)。

【0293】　編碼所關注蛋白質(諸如 TC 之靶向多肽)之核酸分子可容易地突變以在多肽之任一期望位置引入半胱胺酸。半胱胺酸廣泛用於將反應性分子、水溶性聚合物、蛋白質或眾多種其他分子引入所關注蛋白質上。適於將半胱胺酸併入多肽之期望位置中之方法為熟習此項技術者已知，諸如闡述於美國專利第 6,608,183 號(以引用方式併入本文中)中之彼等，及標準誘變技術。

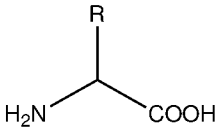
III. 非天然編碼之胺基酸

【0294】　非常廣泛之非天然編碼之胺基酸適用於本發明中。可將任一數目之

非天然編碼之胺基酸引入 TC 中。通常，所引入之非天然編碼之胺基酸對 20 種常見遺傳編碼胺基酸(亦即，丙胺酸、精胺酸、天冬醯胺酸、天冬胺酸、半胱胺酸、麩醯胺酸、麩胺酸、甘胺酸、組胺酸、異白胺酸、白胺酸、離胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、脯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、色胺酸、酪胺酸及纈胺酸)實質上係化學惰性的。在一些實施例中，非天然編碼之胺基酸包括側鏈官能基，該等官能基與 20 種常見胺基酸中未發現之官能基(包括但不限於疊氮基、酮、醛及胺基氧基)有效且選擇性地反應以形成穩定偶聯物。舉例而言，包括含有疊氮基官能基之非天然編碼之胺基酸的 TC 之靶向多肽可與聚合物(包括但不限於聚(乙二醇)，或替代地，含有炔烴部分之第二多肽或連接體)反應以形成穩定偶聯物，此係由疊氮化物與炔烴官能基選擇性反應形成 Huisgen [3+2]環加成產物所產生。

【0295】　α-胺基酸之一般結構說明如下(式 I)：

I



非天然編碼之胺基酸通常係具有上文所列式之任一結構，其中 R 基團係除了用於二十種天然胺基酸中一種之外之任一取代基，且可適用於本發明中。由於本發明之非天然編碼之胺基酸通常僅在側鏈結構上與天然胺基酸不同，故非天然編碼之胺基酸與其他胺基酸(包括但不限於天然或非天然編碼)形成醯胺鍵，形成該等醯胺鍵之方式與其在天然存在之多肽中形成之方式相同。然而，非天然編碼之胺基酸具有將其與天然胺基酸區分開之側鏈基團。舉例而言，R 視情況包含烷基-、芳基-、醯基-、酮基-、疊氮基-、羥基-、肼基、氰基-、鹵基-、醯肼基、烯基、炔基、醚基、硫醇基、硒基-、磺醯基-、硼酸基(borate)、硼酸基(boronate)、二氧磷基、膦醯基、膦基、雜環基、烯酮基、亞胺基、醛基、酯基、硫代酸基、羥胺基、胺基或諸如此類或其任一組合。可適用於本發明中之其他非天然存在

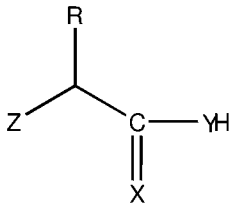
之所關注胺基酸包括但不限於包含可光活化交聯劑之胺基酸、自旋標記之胺基酸、螢光胺基酸、金屬結合胺基酸、含金屬之胺基酸、放射性胺基酸、具有新穎官能基之胺基酸、與其他分子共價或非共價相互作用之胺基酸、光籠蔽及/或可光異構化之胺基酸、包含生物素或生物素類似物之胺基酸、糖基化之胺基酸(諸如經糖取代之絲胺酸)、其他碳水化合物修飾之胺基酸、含酮基之胺基酸、包含聚乙二醇或聚醚之胺基酸、重原子取代之胺基酸、化學上可裂解及/或可光裂解之胺基酸、與天然胺基酸相比具有延長側鏈(包括但不限於聚醚或長鏈烴，包括但不限於大於約 5 個或大於約 10 個碳)之胺基酸、碳連接之含糖胺基酸、氧化還原活性胺基酸、含胺基硫代酸之胺基酸及包含一或多個毒性部分之胺基酸。

【0296】　可適用於本發明中且可用於與水溶性聚合物反應之例示性非天然編碼胺基酸包括但不限於具有羰基、胺基氧基、肼、醯肼、胺基脲、疊氮化物及炔反應基團之彼等。在一些實施例中，非天然編碼之胺基酸包含糖部分。該等胺基酸之實例包括 *N*-乙醯基-L-葡糖胺基-L-絲胺酸、*N*-乙醯基-L-半乳糖胺基-L-絲胺酸、*N*-乙醯基-L-葡糖胺基-L-蘇胺酸、*N*-乙醯基-L-葡糖胺基-L-天冬醯胺酸及 *O*-甘露糖胺基-L-絲胺酸。該等胺基酸之實例亦包括胺基酸與糖之間天然存在之 N-或 O-鍵聯由自然界中不常見之共價鍵聯(包括但不限於烯烴、肟、硫醚、醯胺及諸如此類)置換之實例。該等胺基酸之實例亦包括在天然存在之蛋白質中不常見之糖，諸如 2-去氧-葡萄糖、2-去氧半乳糖及諸如此類。

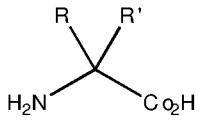
【0297】　本文所提供之許多非天然編碼之胺基酸可例如自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)、Novabiochem (EMD Biosciences, Darmstadt, Germany 分部)或 Peptech (Burlington, MA, USA)購得。非購得之彼等係視情況如本文所提供或使用熟習此項技術者已知之標準方法合成。關於有機合成技術，參見例如 Organic Chemistry，Fessendon 及 Fessendon (1982，第二版，Willard Grant Press, Boston Mass.)；Advanced Organic Chemistry，March (第三版，1985，Wiley and Sons, New

York)；及 Advanced Organic Chemistry，Carey 及 Sundberg (第三版，A 部分及 B 部分，1990, Plenum Press, New York)。*亦參見*美國專利第 7,045,337 號及第 7,083,970 號，其以引用方式併入本文中。除了含有新穎側鏈之非天然胺基酸外，可適用於本發明中之非天然胺基酸亦視情況包含經修飾之主鏈結構，包括但不限於如藉由式 II 及 III 之結構所示：

II



III



其中 Z 通常包含 OH、NH_2、SH、NH-R'或 S-R'；X 及 Y (其可相同或不同)通常包含 S 或 O，且 R 及 R' (其視情況相同或不同)通常選自上文針對具有式 I 之非天然胺基酸所述之 R 基團的相同組分列表以及氫。舉例而言，本發明之非天然胺基酸視情況包含胺基或羧基中之取代，如藉由式 II 及 III 所示。該類型之非天然胺基酸包括但不限於 α-羥基酸、α-硫代酸、α-胺基硫代羧酸，其包括但不限於具有對應於常見 20 種天然胺基酸之側鏈或非天然側鏈。此外，α-碳處之取代視情況包括但不限於 L、D 或 α-α-二取代之胺基酸，諸如 D-麩胺酸、D-丙胺酸、D-甲基-O-酪胺酸、胺基丁酸及諸如此類。其他結構替代物包括環狀胺基酸，諸如脯胺酸類似物以及 3、4、6、7、8 及 9 員環脯胺酸類似物，β 及 γ 胺基酸，諸如經取代之 β-丙胺酸及 γ-胺基丁酸。

【0298】　許多非天然胺基酸基於天然胺基酸，諸如酪胺酸、麩醯胺酸、苯丙胺酸及諸如此類，且適用於本發明中。酪胺酸類似物包括但不限於對位取代之酪胺酸、鄰位取代之酪胺酸及間位取代之酪胺酸，其中經取代之酪胺酸包括但不限於酮基(包括但不限於乙醯基)、苯甲醯基、胺基、肼、羥胺、硫醇基、羧基、異丙基、甲基、C_6-C_{20} 直鏈或具支鏈烴、飽和或不飽和烴、O-甲基、聚醚基、硝

基、炔基或諸如此類。此外，亦涵蓋經多取代之芳基環。可適用於本發明中之麩醯胺酸類似物包括但不限於 α-羥基衍生物、γ-取代衍生物、環狀衍生物及醯胺取代之麩醯胺酸衍生物。可適用於本發明中之實例性苯丙胺酸類似物包括但不限於對位取代之苯丙胺酸、鄰位取代之苯丙胺酸及間位取代之苯丙胺酸，其中取代基包含但不限於羥基、甲氧基、甲基、烯丙基、醛、疊氮基、碘、溴、酮基(包括但不限於乙醯基)、苯甲醯基、炔基或諸如此類。可適用於本發明中之非天然胺基酸之特定實例包括但不限於*對*乙醯基-L-苯丙胺酸、O-甲基-L-酪胺酸、L-3-(2-萘基)丙胺酸、3-甲基-苯丙胺酸、O-4-烯丙基-L-酪胺酸、4-丙基-L-酪胺酸、三-O-乙醯基-GlcNAcβ-絲胺酸、L-多巴、氟化苯丙胺酸、異丙基-L-苯丙胺酸、*對*疊氮基-L-苯丙胺酸、*對*醯基-L-苯丙胺酸、*對*苯甲醯基-L-苯丙胺酸、L-磷酸絲胺酸、膦醯基絲胺酸、膦醯基酪胺酸、*對*碘-苯丙胺酸、*對*溴苯丙胺酸、*對*胺基-L-苯丙胺酸、異丙基-L-苯丙胺酸及對炔丙氧基-苯丙胺酸及諸如此類。可適用於本發明中之多種非天然胺基酸之結構的實例提供於例如 WO 2002/085923 (標題為「In vivo incorporation of unnatural amino acids」)中。對於額外甲硫胺酸類似物，亦參見 Kiick 等人，(2002) *Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation*, PNAS 99:19-24，其以引用方式併入本文中。國際申請案第 PCT/US06/47822 號(標題為「Compositions Containing, Methods Involving, and Uses of Non-natural Amino Acids and Polypeptides」，其以引用方式併入本文中)闡述了芳族胺部分(包括但不限於對胺基-苯丙胺酸)之還原烷基化及還原胺化。

【0299】　在本發明之另一實施例中，具有一或多種非天然編碼之胺基酸之 TC 多肽經共價修飾。認為與生物系統之不同功能正交之選擇性化學反應係化學生物學中之重要工具。作為合成化學譜之相對新生事物(newcomer)，該等生物正交反應激發了用於化合物庫合成、蛋白質工程、功能蛋白質體學及細胞表面化學

之塑之新策略。疊氮化合物作為生物偶聯的獨特化學處理手段，已發揮突出的作用。已將許陶丁格連接(Staudinger ligation)與膦一起用於標記以代謝方式引入細胞糖偶聯物中之疊氮基糖。許陶丁格連接可在活動物中實施，而不會造成生理傷害；儘管如此，許陶丁格反應並非沒有任何影響。必需之膦易於發生空氣氧化，且已證明針對改良水溶性及增加反應速率對其之最佳化在合成上具有挑戰性。

【0300】　疊氮基具有生物正交反應性之替代模式：由 Huisgen 闡述之與炔烴之[3+2]環加成。在其經典形式下，該反應由於需要升高之溫度(或壓力)以獲得合理反應速率，而在生物系統中之適用性有限。Sharpless 及合作者利用開發在生理溫度下及豐富功能化之生物環境中容易進行的銅(I)催化形式(稱為「點擊化學」)，克服了該障礙。該發現已使得能夠自複雜組織裂解物中選擇性地修飾病毒粒子、核酸及蛋白質。遺憾地，強制性之銅觸媒對細菌細胞及哺乳動物細胞二者皆有毒，因此排除了細胞必須保持活力之應用。已報導，由吸電子取代基活化之炔烴之無觸媒 Huisgen 環加成在環境溫度下發生。然而，該等化合物經歷與生物親核劑之麥可反應(Michael reaction)。

【0301】　在一個實施例中，提供包括非天然胺基酸(諸如*對*-(炔丙氧基)-苯丙胺酸)之 TC 靶向多肽之組成物。亦提供包含*對*-(炔丙氧基)-苯丙胺酸及(包括但不限於)蛋白質及/或細胞之各種組成物。在一個態樣中，包含*對*-(炔丙氧基)-苯丙胺酸非天然胺基酸之組成物進一步包括正交 tRNA。非天然胺基酸可鍵結(包括但不限於共價)至正交 tRNA，包括但不限於藉助胺醯基鍵共價鍵結至正交 tRNA、共價鍵結至正交 tRNA 之末端核糖之 3'OH 或 2'OH 等。

【0302】　經由可併入蛋白質中之非天然胺基酸之化學部分提供蛋白質之多種優點及操作。舉例而言，酮基官能基之獨特反應性容許在體外及體內用多種含肼或羥胺之試劑中之任一種選擇性修飾蛋白質。重原子非天然胺基酸例如可用

於對 X 射線結構資料進行定相。使用非天然胺基酸對重原子進行位點特異性引入亦提供了選擇用於重原子之位置之選擇性及靈活性。光反應性非天然胺基酸(包括但不限於具有二苯甲酮及芳基疊氮化物(包括但不限於苯基疊氮化物)側鏈之胺基酸)例如容許蛋白質在體內及體外之高效光交聯。光反應性非天然胺基酸之實例包括但不限於對疊氮基-苯丙胺酸及對苯甲醯基-苯丙胺酸。接著可藉由激發提供光反應基團之時序控制來使具有光反應性非天然胺基酸之蛋白質隨意交聯。在一個實例中，非天然胺基之甲基可經作為局部結構及動力學之探針的經同位素標記之(包括但不限於)甲基取代，包括但不限於使用核磁共振及振動光譜。炔基或疊氮基官能基例如容許藉助[3+2]環加成反應，用分子對蛋白質進行選擇性修飾。

【0303】　在胺基末端處併入多肽中之非天然胺基酸可由 R 基團(其係除用於20種天然胺基酸中之取代基之外的任一取代基)及不同於通常存在於α-胺基酸中之 NH_2 基團之第二反應基團構成。類似非天然胺基酸可與不同於通常存在於 α-胺基酸中之 COOH 基之第二反應基團一起併入 C-末端處。

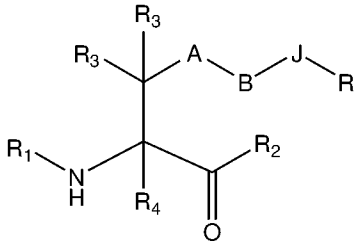
【0304】　本發明之非天然胺基酸可經選擇或設計以提供在二十種天然胺基酸中不可獲得之額外特徵。舉例而言，非天然胺基酸可視情況經設計或選擇以修改例如併入其之蛋白質之生物性質。舉例而言，可藉由將非天然胺基酸納入蛋白質中來視情況修飾以下性質：毒性、生物分佈、溶解性、穩定性(例如，熱、水解、氧化、對酶促降解之抗性及諸如此類)、純化及加工之便利性、結構性質、分光性質、化學及/或光化學性質、催化活性、氧化還原電位、半衰期、與其他分子反應之能力(例如，共價或非共價)及諸如此類。

【0305】　在一些實施例中，本發明提供藉由肟鍵連接至水溶性聚合物(例如PEG)之 TC。許多類型之非天然編碼之胺基酸適於形成肟鍵。該等胺基酸包括但不限於含有羰基、二羰基或羥胺基之非天然編碼之胺基酸。該等胺基酸闡述於

美國專利公開案第 2006/0194256 號、第 2006/0217532 號及第 2006/0217289 號以及 WO 2006/069246 (標題為「Compositions containing, methods involving, and uses of non-natural amino acids and polypeptides」)中，該等專利全文以引用方式併入本文中。非天然編碼之胺基酸亦闡述於美國專利第 7,083,970 號及美國專利第 7,045,337 號中，該等專利全文以引用方式併入本文中。

【0306】 本發明之一些實施例利用在一或多個位置處經對乙醯基苯丙胺酸胺基酸取代之 TC 多肽。對乙醯基-(+/-)-苯丙胺酸及間乙醯基-(+/-)-苯丙胺酸之合成闡述於 Zhang, Z.等人，Biochemistry 42: 6735-6746 (2003) (其以引用方式併入)中。熟習此項技術者可類似地製備其他含羰基或二羰基之胺基酸。此外，包括在本文中之非天然胺基酸之非限制性實例性合成呈現在美國專利第 7,083,970 號中，該專利全文以引用方式併入本文中。

【0307】 具有親電子反應基團之胺基酸容許多種反應以尤其經由親核加成反應來連接分子。該等親電子反應基團包括羰基(包括酮基及二羰基)、類羰基基團(其具有與羰基(包括酮基及二羰基)類似之反應性且在結構上與羰基類似)、遮蔽之羰基(其可容易地轉化為羰基(包括酮基及二羰基))或受保護之羰基(其在去保護後具有與羰基(包括酮基及二羰基)類似之反應性))。該等胺基酸包括具有式(IV)結構之胺基酸：



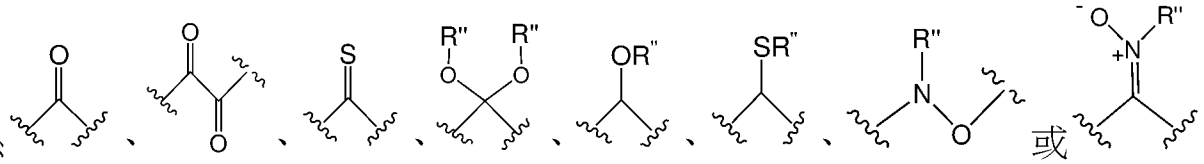
(IV)，

其中：

A 係視情況存在的，且當存在時，係低碳伸烷基、經取代之低碳伸烷基、低碳伸環烷基、經取代之低碳伸環烷基、低碳伸烯基、經取代之低碳伸烯基、伸炔基、低碳伸雜烷基、經取代之伸雜烷基、低碳伸雜環烷基、經取代之低碳伸雜

環烷基、伸芳基、經取代之伸芳基、伸雜芳基、經取代之伸雜芳基、伸烷芳基、經取代之伸烷芳基、伸芳烷基或經取代之伸芳烷基；

B 係視情況存在的，且當存在時，係選自由以下組成之群之連接體：低碳伸烷基、經取代之低碳伸烷基、低碳伸烯基、經取代之低碳伸烯基、低碳伸雜烷基、經取代之低碳伸雜烷基、-O-、-O-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-S-、-S-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、$-S(O)_k-$其中 k 係 1、2 或 3、$-S(O)_k$(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-C(O)-、-C(O)-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-C(S)-、-C(S)-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-N(R')-、-NR'-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-C(O)N(R')-、-CON(R')-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-CSN(R')-、-CSN(R')-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-N(R')CO-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-N(R')C(O)O-、$-S(O)_kN(R')-$、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(S)N(R')-、$-N(R')S(O)_kN(R')-$、-N(R')-N=、-C(R')=N-、-C(R')=N-N(R')-、-C(R')=N-N=、$-C(R')_2-N=N-$及$-C(R')_2-N(R')-N(R')-$，其中每一 R'皆獨立地為 H、烷基或經取代之烷基；

J 係  ；

R 係 H、烷基、經取代之烷基、環烷基或經取代之環烷基；

每一 R"皆獨立地為 H、烷基、經取代之烷基或保護基團，或者當存在超過一個 R"時，兩個 R"視情況形成雜環烷基；

R_1 係視情況存在的，且當存在時，係 H、胺基保護基團、樹脂、胺基酸、多肽或多核苷酸；且

R_2 係視情況存在的，且當存在時，係 OH、酯保護基團、樹脂、胺基酸、多肽或多核苷酸；

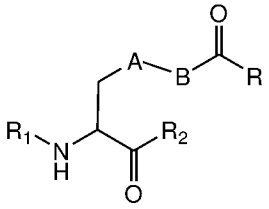
R_3 及 R_4 中之每一者皆獨立地為 H、鹵素、低碳烷基或經取代之低碳烷基，或者 R_3 及 R_4 或兩個 R_3 基團視情況形成環烷基或雜環烷基；

或-A-B-J-R 基團一起形成二環或三環環烷基或雜環烷基，其包含至少一個羰基，包括二羰基、受保護之羰基，包括受保護之二羰基，或遮蔽之羰基，包括遮蔽之二羰基；

或-J-R 基團一起形成單環或二環環烷基或雜環烷基，其包含至少一個羰基，包括二羰基、受保護之羰基，包括受保護之二羰基，或遮蔽之羰基，包括遮蔽之二羰基；

條件為當 A 係伸苯基且每一 R_3 皆為 H 時，B 存在；且當 A 係–$(CH_2)_4$-且每一 R_3 皆為 H 時，B 不為–NHC(O)(CH_2CH_2)-；且當 A 及 B 缺失且每一 R_3 皆為 H 時，R 不為甲基。

【0308】　此外，包括具有式(V)之結構：



(V)，

其中：

A 係視情況存在的，且當存在時，係低碳伸烷基、經取代之低碳伸烷基、低碳伸環烷基、經取代之低碳伸環烷基、低碳伸烯基、經取代之低碳伸烯基、伸炔基、低碳伸雜烷基、經取代之伸雜烷基、低碳伸雜環烷基、經取代之低碳伸雜環烷基、伸芳基、經取代之伸芳基、伸雜芳基、經取代之伸雜芳基、伸烷芳基、經取代之伸烷芳基、伸芳烷基或經取代之伸芳烷基；

B 係視情況存在的，且當存在時，係選自由以下組成之群之連接體：低碳伸烷基、經取代之低碳伸烷基、低碳伸烯基、經取代之低碳伸烯基、低碳伸雜烷基、經取代之低碳伸雜烷基、-O-、-O-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-S-、-S-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-$S(O)_k$-其中 k 係 1、2 或 3、-$S(O)_k$(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-C(O)-、-C(O)-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-C(S)-、-C(S)-(伸烷基或經取代之伸

烷基)-、-N(R’)-、-NR’-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-C(O)N(R’)-、-CON(R’)-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-CSN(R’)-、-CSN(R’)-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-N(R’)CO-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-N(R’)C(O)O-、-$S(O)_kN(R’)$-、-N(R’)C(O)N(R’)-、-N(R’)C(S)N(R’)-、-N(R’)$S(O)_kN(R’)$-、-N(R’)-N=、-C(R’)=N-、-C(R’)=N-N(R’)-、-C(R’)=N-N=、-$C(R’)_2$-N=N-及-$C(R’)_2$-N(R’)-N(R’)-，其中每一 R’皆獨立地為 H、烷基或經取代之烷基；

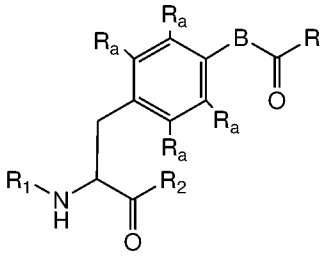
R 係 H、烷基、經取代之烷基、環烷基或經取代之環烷基；

R_1 係視情況存在的，且當存在時，係 H、胺基保護基團、樹脂、胺基酸、多肽或多核苷酸；且

R_2 係視情況存在的，且當存在時，係 OH、酯保護基團、樹脂、胺基酸、多肽或多核苷酸；

條件為當 A 係伸苯基時，B 存在，且當 A 係-$(CH_2)_4$-時，B 不為-NHC(O)(CH_2CH_2)-；且當 A 及 B 缺失時，R 不為甲基。

【0309】 此外，包括具有式(VI)之結構之胺基酸：



(VI)，

其中：

B 係選自由以下組成之群之連接體：低碳伸烷基、經取代之低碳伸烷基、低碳伸烯基、經取代之低碳伸烯基、低碳伸雜烷基、經取代之低碳伸雜烷基、-O-、-O-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-S-、-S-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-$S(O)_k$-其中 k 係 1、2 或 3、-$S(O)_k$(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-C(O)-、-C(O)-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-C(S)-、-C(S)-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-N(R’)-、-NR’-(伸烷

基或經取代之伸烷基)-、-C(O)N(R’)-、-CON(R’)-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-CSN(R’)-、-CSN(R’)-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-N(R’)CO-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-N(R’)C(O)O-、-$S(O)_kN(R')$-、-N(R’)C(O)N(R’)-、-N(R’)C(S)N(R’)-、-$N(R')S(O)_kN(R')$-、-N(R’)-N=、-C(R’)=N-、-C(R’)=N-N(R’)-、-C(R’)=N-N=、-$C(R')_2$-N=N-及-$C(R')_2$-N(R’)-N(R’)-，其中每一 R’皆獨立地為 H、烷基或經取代之烷基；

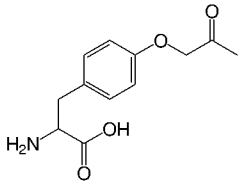
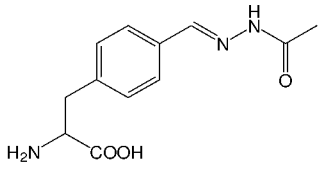
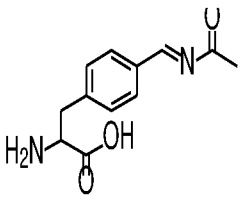
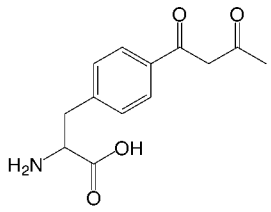
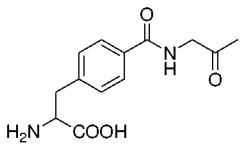
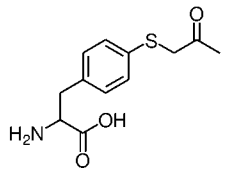
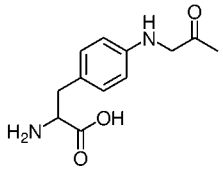
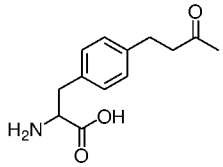
R 係 H、烷基、經取代之烷基、環烷基或經取代之環烷基；

R_1 係視情況存在的，且當存在時，係 H、胺基保護基團、樹脂、胺基酸、多肽或多核苷酸；且

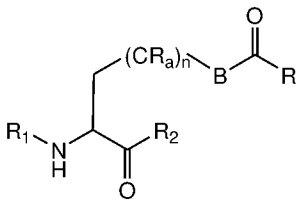
R_2 係視情況存在的，且當存在時，係 OH、酯保護基團、樹脂、胺基酸、多肽或多核苷酸；

每一 R_a 皆係獨立地選自由以下組成之群：H、鹵素、烷基、經取代之烷基、-$N(R')_2$、-$C(O)_kR'$ (其中 k 係 1、2 或 3)、-$C(O)N(R')_2$、-OR’及-$S(O)_kR'$，其中每一 R’皆獨立地為 H、烷基或經取代之烷基。

【0310】　此外，包括以下胺基酸或其鹽：


、

、

、

、

、

、

及

，其中該等化合物係視情況胺基受保護基團、羧基受保護基團。此外，可將以下非天然胺基酸中之任一者併入非天然胺基酸多肽中。

【0311】　此外，包括以下具有式(VII)之結構之胺基酸：



(VII)

其中

B 係視情況存在的，且當存在時，係選自由以下組成之群之連接體：低碳伸烷基、經取代之低碳伸烷基、低碳伸烯基、經取代之低碳伸烯基、低碳伸雜烷基、經取代之低碳伸雜烷基、-O-、-O-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-S-、-S-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-$S(O)_k$-其中 k 係 1、2 或 3、-$S(O)_k$(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-C(O)-、-C(O)-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-C(S)-、-C(S)-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-N(R')-、-NR'-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-C(O)N(R')-、-CON(R')-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-CSN(R')-、-CSN(R')-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-N(R')CO-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-N(R')C(O)O-、-$S(O)_k$N(R')-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(S)N(R')-、-N(R')$S(O)_k$N(R')-、-N(R')-N=、-C(R')=N-、-C(R')=N-N(R')-、-C(R')=N-N=、-$C(R')_2$-N=N-及-$C(R')_2$-N(R')-N(R')-，其中每一 R'皆獨立地為 H、烷基或經取代之烷基；

R 係 H、烷基、經取代之烷基、環烷基或經取代之環烷基；

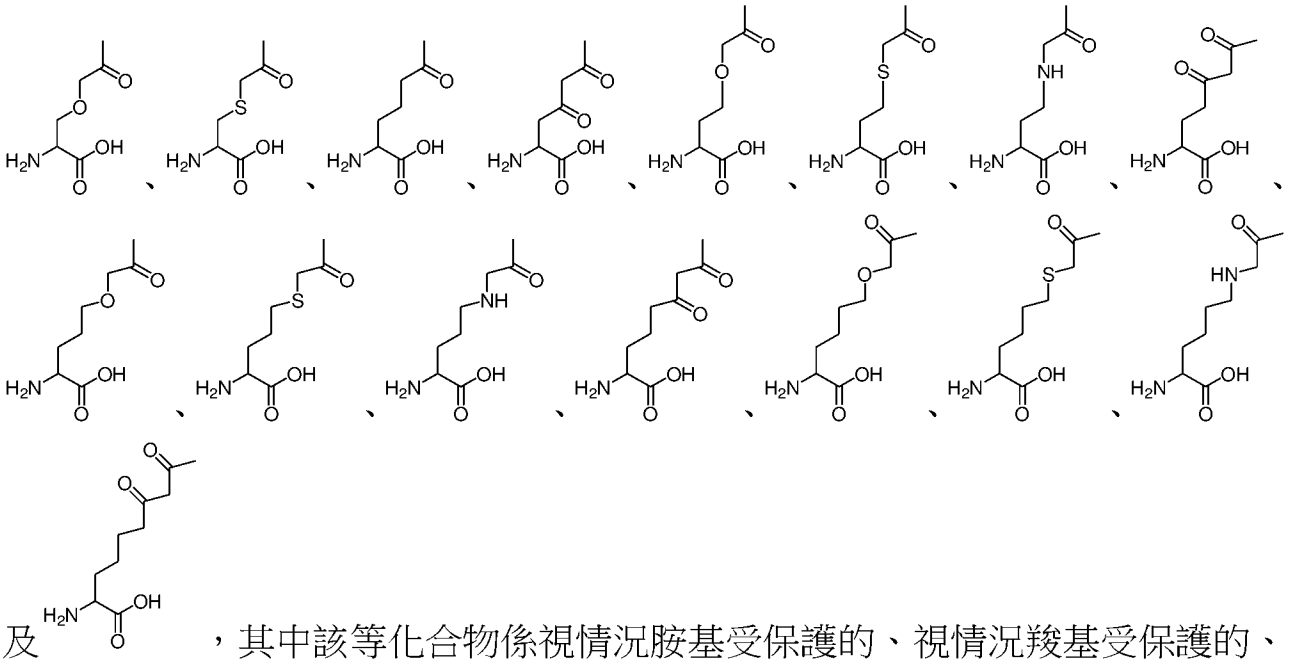
R_1 係視情況存在的，且當存在時，係 H、胺基保護基團、樹脂、胺基酸、多肽或多核苷酸；且

R_2 係視情況存在的，且當存在時，係 OH、酯保護基團、樹脂、胺基酸、多肽或多核苷酸；

每一 R_a 皆係獨立地選自由以下組成之群：H、鹵素、烷基、經取代之烷基、-$N(R')_2$、-$C(O)_k$R' (其中 k 係 1、2 或 3)、-$C(O)N(R')_2$、-OR'及-$S(O)_k$R'，其中每一 R'皆獨立地為 H、烷基或經取代之烷基；且 n 係 0 至 8；

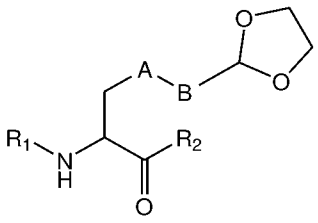
條件為當 A 係–$(CH_2)_4$-時，B 不為–NHC(O)(CH_2CH_2)-。

【0312】　此外，包括以下胺基酸或其鹽：



，其中該等化合物係視情況胺基受保護的、視情況羧基受保護的、視情況胺基受保護的及羧基受保護的。此外，可將該等非天然胺基酸及以下非天然胺基酸中之任一者併入非天然胺基酸多肽中。

【0313】　此外，包括以下具有式(VIII)之結構之胺基酸：



(VIII)，

其中 A 係視情況存在的，且當存在時，係低碳伸烷基、經取代之低碳伸烷基、低碳伸環烷基、經取代之低碳伸環烷基、低碳伸烯基、經取代之低碳伸烯基、伸炔基、低碳伸雜烷基、經取代之伸雜烷基、低碳伸雜環烷基、經取代之低碳伸雜環烷基、伸芳基、經取代之伸芳基、伸雜芳基、經取代之伸雜芳基、伸烷芳基、經取代之伸烷芳基、伸芳烷基或經取代之伸芳烷基；

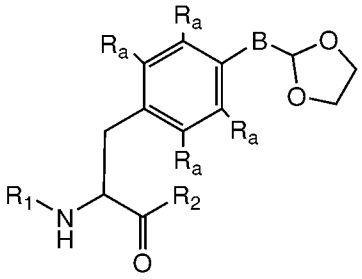
B 係視情況存在的，且當存在時，係選自由以下組成之群之連接體：低碳伸烷基、經取代之低碳伸烷基、低碳伸烯基、經取代之低碳伸烯基、低碳伸雜烷基、經取代之低碳伸雜烷基、-O-、-O-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-S-、-S-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-$S(O)_k$-其中 k 係 1、2 或 3、-$S(O)_k$(伸烷基或經取代之伸烷基)-、

-C(O)-、-C(O)-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-C(S)-、-C(S)-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-N(R’)-、-NR’-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-C(O)N(R’)-、-CON(R’)-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-CSN(R’)-、-CSN(R’)-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-N(R’)CO-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-N(R’)C(O)O-、-$S(O)_kN(R')$-、-N(R’)C(O)N(R’)-、-N(R’)C(S)N(R’)-、-$N(R')S(O)_kN(R')$-、-N(R’)-N=、-C(R’)=N-、-C(R’)=N-N(R’)-、-C(R’)=N-N=、-$C(R')_2$-N=N-及-$C(R')_2$-N(R’)-N(R’)-，其中每一 R’皆獨立地為 H、烷基或經取代之烷基；

R_1 係視情況存在的，且當存在時，係 H、胺基保護基團、樹脂、胺基酸、多肽或多核苷酸；且

R_2 係視情況存在的，且當存在時，係 OH、酯保護基團、樹脂、胺基酸、多肽或多核苷酸。

【0314】 此外，包括以下具有式(IX)之結構之胺基酸：



(IX)，

B 係視情況存在的，且當存在時，係選自由以下組成之群之連接體：低碳伸烷基、經取代之低碳伸烷基、低碳伸烯基、經取代之低碳伸烯基、低碳伸雜烷基、經取代之低碳伸雜烷基、-O-、-O-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-S-、-S-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-$S(O)_k$-其中 k 係 1、2 或 3、-$S(O)_k$(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-C(O)-、-C(O)-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-C(S)-、-C(S)-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-N(R’)-、-NR’-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-C(O)N(R’)-、-CON(R’)-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-CSN(R’)-、-CSN(R’)-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-N(R’)CO-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-N(R’)C(O)O-、-$S(O)_kN(R')$-、

-N(R’)C(O)N(R’)-、-N(R’)C(S)N(R’)-、-N(R’)S(O)$_k$N(R’)-、-N(R’)-N=、-C(R’)=N-、-C(R’)=N-N(R’)-、-C(R’)=N-N=、-C(R’)$_2$-N=N-及-C(R’)$_2$-N(R’)-N(R’)-，其中每一 R’皆獨立地為 H、烷基或經取代之烷基；

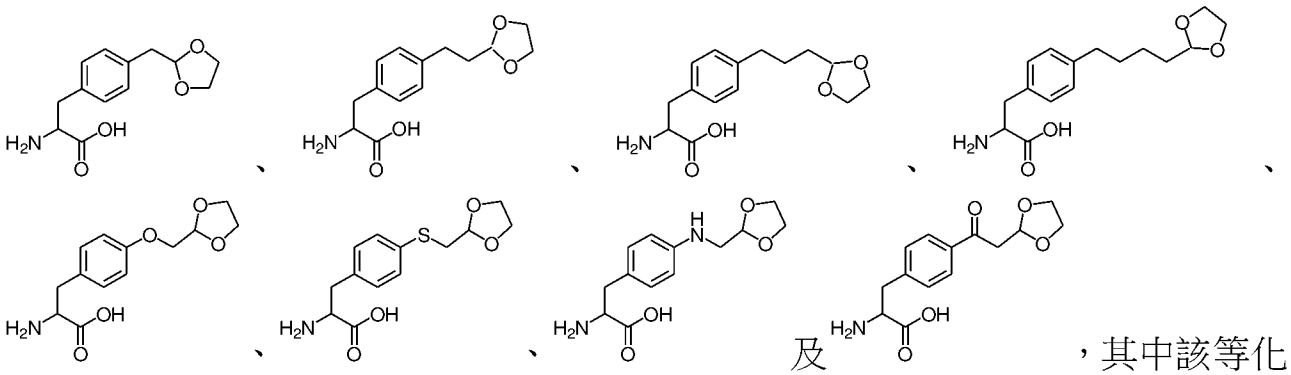
R 係 H、烷基、經取代之烷基、環烷基或經取代之環烷基；

R_1 係視情況存在的，且當存在時，係 H、胺基保護基團、樹脂、胺基酸、多肽或多核苷酸；且

R_2 係視情況存在的，且當存在時，係 OH、酯保護基團、樹脂、胺基酸、多肽或多核苷酸；

其中每一 R_a 皆係獨立地選自由以下組成之群：H、鹵素、烷基、經取代之烷基、-N(R’)$_2$、-C(O)$_k$R’ (其中 k 係 1、2 或 3)、-C(O)N(R’)$_2$、-OR’及-S(O)$_k$R’，其中每一 R’皆獨立地為 H、烷基或經取代之烷基。

【0315】 此外，包括以下胺基酸或其鹽：


、

、

、

、

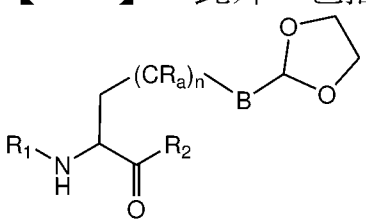
、

、

及

，其中該等化合物係視情況胺基受保護的、視情況羧基受保護的、視情況胺基受保護的及羧基受保護的。此外，可將該等非天然胺基酸及以下非天然胺基酸中之任一者併入非天然胺基酸多肽中。

【0316】 此外，包括以下具有式(X)之結構之胺基酸：


(X)，

其中 B 係視情況存在的，且當存在時，係選自由以下組成之群之連接體：低碳伸烷基、經取代之低碳伸烷基、低碳伸烯基、經取代之低碳伸烯基、低碳伸雜烷基、經取代之低碳伸雜烷基、-O-、-O-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-S-、-S-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-$S(O)_k$-其中 k 係 1、2 或 3、-$S(O)_k$(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-C(O)-、-C(O)-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-C(S)-、-C(S)-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-N(R')-、-NR'-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-C(O)N(R')-、-CON(R')-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-CSN(R')-、-CSN(R')-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-N(R')CO-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-N(R')C(O)O-、-$S(O)_k$N(R')-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(S)N(R')-、-$N(R')S(O)_k$N(R')-、-N(R')-N=、-C(R')=N-、-C(R')=N-N(R')-、-C(R')=N-N=、-$C(R')_2$-N=N-及-$C(R')_2$-N(R')-N(R')-，其中每一 R'皆獨立地為 H、烷基或經取代之烷基；

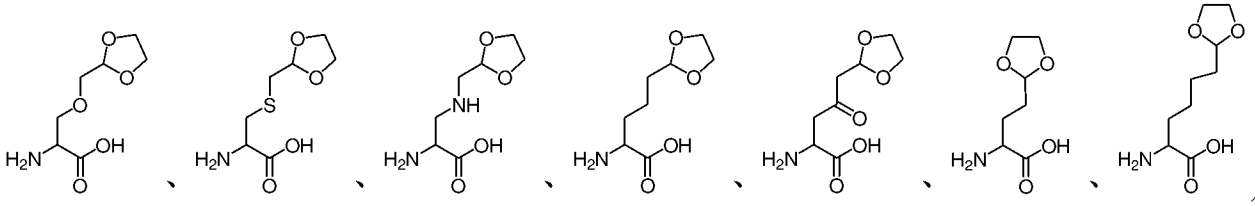
R 係 H、烷基、經取代之烷基、環烷基或經取代之環烷基；

R_1 係視情況存在的，且當存在時，係 H、胺基保護基團、樹脂、胺基酸、多肽或多核苷酸；且

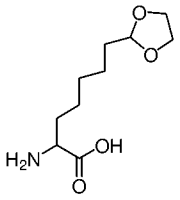
R_2 係視情況存在的，且當存在時，係 OH、酯保護基團、樹脂、胺基酸、多肽或多核苷酸；

每一 R_a 皆係獨立地選自由以下組成之群：H、鹵素、烷基、經取代之烷基、-$N(R')_2$、-$C(O)_kR'$ (其中 k 係 1、2 或 3)、-$C(O)N(R')_2$、-OR'及-$S(O)_kR'$，其中每一 R'皆獨立地為 H、烷基或經取代之烷基；且 n 係 0 至 8。

【0317】 此外，包括以下胺基酸或其鹽：



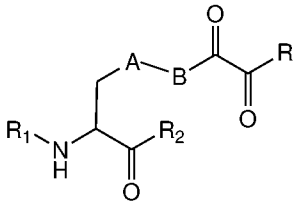
及



，其中該等化合物係視情況胺基受保護的、視情況羧基受保護的、視情況胺基受保護的及羧基受保護的。此外，可將該等非天然胺基酸及以下非天然胺基酸中之任一者併入非天然胺基酸多肽中。

【0318】　除了單羰基結構之外，本文所述之非天然胺基酸亦可包括諸如二羰基、二羰基類似物、遮蔽之二羰基及受保護二羰基等基團。

【0319】　舉例而言，包括以下具有式(XI)之結構之胺基酸：



(XI)，

其中 A 係視情況存在的，且當存在時，係低碳伸烷基、經取代之低碳伸烷基、低碳伸環烷基、經取代之低碳伸環烷基、低碳伸烯基、經取代之低碳伸烯基、伸炔基、低碳伸雜烷基、經取代之伸雜烷基、低碳伸雜環烷基、經取代之低碳伸雜環烷基、伸芳基、經取代之伸芳基、伸雜芳基、經取代之伸雜芳基、伸烷芳基、經取代之伸烷芳基、伸芳烷基或經取代之伸芳烷基；

B 係視情況存在的，且當存在時，係選自由以下組成之群之連接體：低碳伸烷基、經取代之低碳伸烷基、低碳伸烯基、經取代之低碳伸烯基、低碳伸雜烷基、經取代之低碳伸雜烷基、-O-、-O-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-S-、-S-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-$S(O)_k$-其中 k 係 1、2 或 3、-$S(O)_k$(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-C(O)-、-C(O)-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-C(S)-、-C(S)-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-N(R’)-、-NR’-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-C(O)N(R’)-、-CON(R’)-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-CSN(R’)-、-CSN(R’)-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-N(R’)CO-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-N(R’)C(O)O-、-$S(O)_k$N(R’)-、

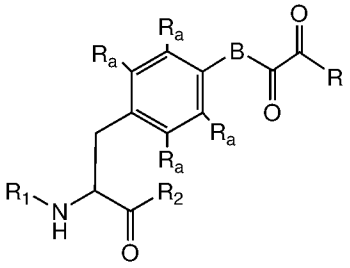
-N(R’)C(O)N(R’)-、-N(R’)C(S)N(R’)-、-N(R’)S(O)$_k$N(R’)-、-N(R’)-N=、-C(R’)=N-、-C(R’)=N-N(R’)-、-C(R’)=N-N=、-C(R’)$_2$-N=N-及-C(R’)$_2$-N(R’)-N(R’)-，其中每一R’皆獨立地為H、烷基或經取代之烷基；

R係H、烷基、經取代之烷基、環烷基或經取代之環烷基；

R_1係視情況存在的，且當存在時，係H、胺基保護基團、樹脂、胺基酸、多肽或多核苷酸；且

R_2係視情況存在的，且當存在時，係OH、酯保護基團、樹脂、胺基酸、多肽或多核苷酸。

【0320】 此外，包括以下具有式(XII)之結構之胺基酸：



(XII)，

B係視情況存在的，且當存在時，係選自由以下組成之群之連接體：低碳伸烷基、經取代之低碳伸烷基、低碳伸烯基、經取代之低碳伸烯基、低碳伸雜烷基、經取代之低碳伸雜烷基、-O-、-O-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-S-、-S-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-S(O)$_k$-其中k係1、2或3、-S(O)$_k$(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-C(O)-、-C(O)-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-C(S)-、-C(S)-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-N(R’)-、-NR’-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-C(O)N(R’)-、-CON(R’)-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-CSN(R’)-、-CSN(R’)-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-N(R’)CO-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-N(R’)C(O)O-、-S(O)$_k$N(R’)-、-N(R’)C(O)N(R’)-、-N(R’)C(S)N(R’)-、-N(R’)S(O)$_k$N(R’)-、-N(R’)-N=、-C(R’)=N-、-C(R’)=N-N(R’)-、-C(R’)=N-N=、-C(R’)$_2$-N=N-及-C(R’)$_2$-N(R’)-N(R’)-，其中每一R’皆獨立地為H、烷基或經取代之烷基；

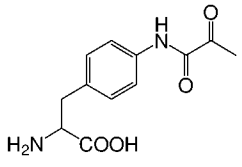
R 係 H、烷基、經取代之烷基、環烷基或經取代之環烷基；

R_1 係視情況存在的，且當存在時，係 H、胺基保護基團、樹脂、胺基酸、多肽或多核苷酸；且

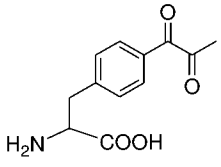
R_2 係視情況存在的，且當存在時，係 OH、酯保護基團、樹脂、胺基酸、多肽或多核苷酸；

其中每一 R_a 皆係獨立地選自由以下組成之群：H、鹵素、烷基、經取代之烷基、$-N(R')_2$、$-C(O)_kR'$ (其中 k 係 1、2 或 3)、$-C(O)N(R')_2$、-OR'及$-S(O)_kR'$，其中每一 R'皆獨立地為 H、烷基或經取代之烷基。

【0321】　此外，包括以下胺基酸或其鹽：

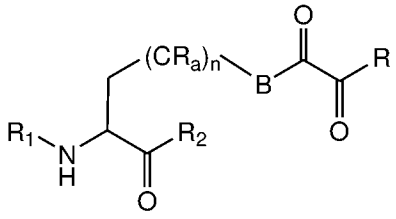


及



，其中該等化合物係視情況胺基受保護的、視情況羧基受保護的、視情況胺基受保護的及羧基受保護的。此外，可將該等非天然胺基酸及以下非天然胺基酸中之任一者併入非天然胺基酸多肽中。

【0322】　此外，包括以下具有式(XIII)之結構之胺基酸：



(XIII)，

其中 B 係視情況存在的，且當存在時，係選自由以下組成之群之連接體：低碳伸烷基、經取代之低碳伸烷基、低碳伸烯基、經取代之低碳伸烯基、低碳伸雜烷基、經取代之低碳伸雜烷基、-O-、-O-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-S-、-S-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、$-S(O)_k$-其中 k 係 1、2 或 3、$-S(O)_k$(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-C(O)-、-C(O)-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-C(S)-、-C(S)-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-N(R')-、-NR'-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-C(O)N(R')-、-CON(R')-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-CSN(R')-、-CSN(R')-(伸烷基或經取代

之伸烷基)-、-N(R’)CO-(伸烷基或經取代之伸烷基)-、-N(R’)C(O)O-、-$S(O)_kN(R’)$-、-N(R’)C(O)N(R’)-、-N(R’)C(S)N(R’)-、-$N(R’)S(O)_kN(R’)$-、-N(R’)-N=、-C(R’)=N-、-C(R’)=N-N(R’)-、-C(R’)=N-N=、-$C(R’)_2$-N=N-及-$C(R’)_2$-N(R’)-N(R’)-，其中每一 R’皆獨立地為 H、烷基或經取代之烷基；

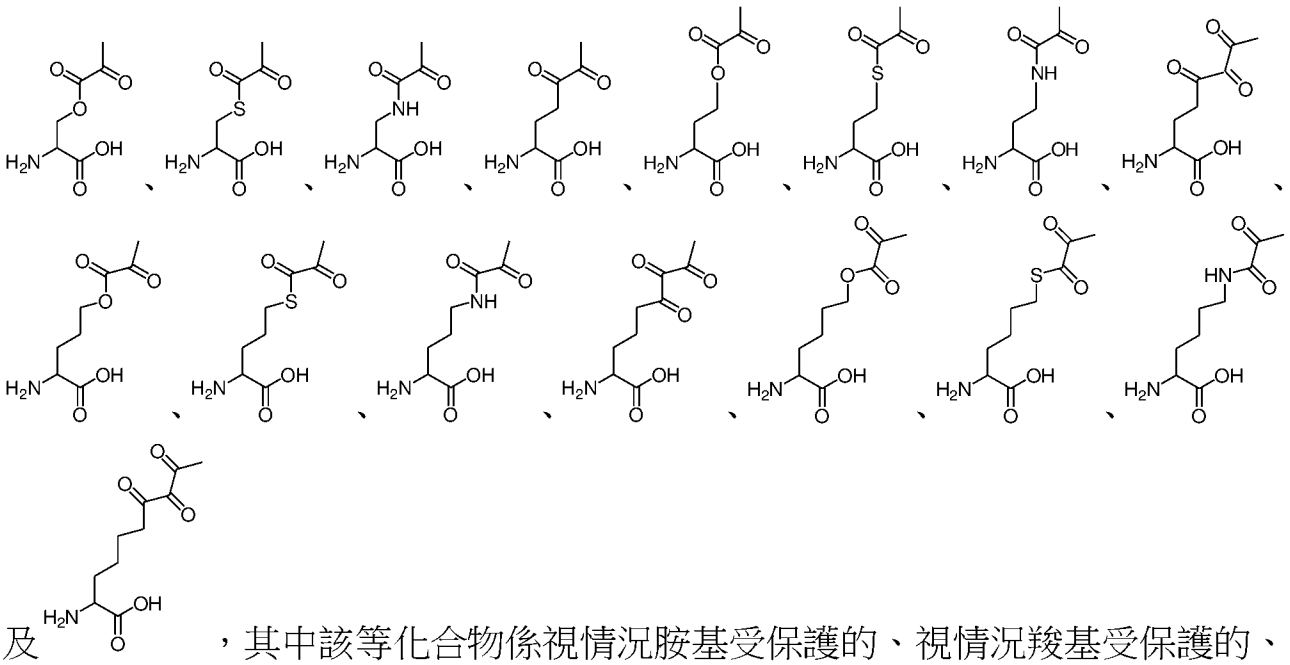
R 係 H、烷基、經取代之烷基、環烷基或經取代之環烷基；

R_1 係視情況存在的，且當存在時，係 H、胺基保護基團、樹脂、胺基酸、多肽或多核苷酸；且

R_2 係視情況存在的，且當存在時，係 OH、酯保護基團、樹脂、胺基酸、多肽或多核苷酸；

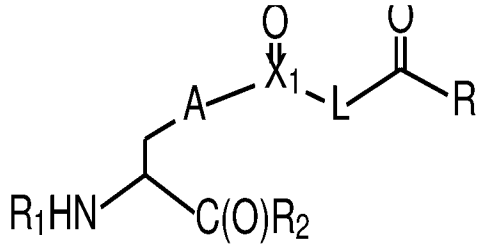
每一 R_a 皆係獨立地選自由以下組成之群：H、鹵素、烷基、經取代之烷基、-$N(R’)_2$、-$C(O)_kR’$ (其中 k 係 1、2 或 3)、-$C(O)N(R’)_2$、-OR’及-$S(O)_kR’$，其中每一 R’皆獨立地為 H、烷基或經取代之烷基；且 n 係 0 至 8。

【0323】 此外，包括以下胺基酸或其鹽：



及 ，其中該等化合物係視情況胺基受保護的、視情況羧基受保護的、視情況胺基受保護的及羧基受保護的。此外，可將該等非天然胺基酸及以下非天然胺基酸中之任一者併入非天然胺基酸多肽中。

【0324】　此外，包括以下具有式(XIV)之結構之胺基酸：



(XIV)；

其中：

A 係視情況存在的，且當存在時，係低碳伸烷基、經取代之低碳伸烷基、低碳伸環烷基、經取代之低碳伸環烷基、低碳伸烯基、經取代之低碳伸烯基、伸炔基、低碳伸雜烷基、經取代之伸雜烷基、低碳伸雜環烷基、經取代之低碳伸雜環烷基、伸芳基、經取代之伸芳基、伸雜芳基、經取代之伸雜芳基、伸烷芳基、經取代之伸烷芳基、伸芳烷基或經取代之伸芳烷基；

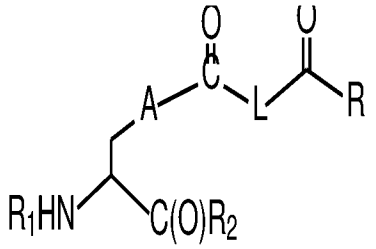
R 係 H、烷基、經取代之烷基、環烷基或經取代之環烷基；

R_1 係視情況存在的，且當存在時，係 H、胺基保護基團、樹脂、胺基酸、多肽或多核苷酸；且

R_2 係視情況存在的，且當存在時，係 OH、酯保護基團、樹脂、胺基酸、多肽或多核苷酸；

X_1 係 C、S 或 S(O)；且 L 係伸烷基、經取代之伸烷基、N(R')(伸烷基)或 N(R')(經取代之伸烷基)，其中 R'係 H、烷基、經取代之烷基、環烷基或經取代之環烷基。

【0325】　此外，包括以下具有式(XIV-A)之結構之胺基酸：



(XIV-A)

其中：

A 係視情況存在的，且當存在時，係低碳伸烷基、經取代之低碳伸烷基、低碳伸環烷基、經取代之低碳伸環烷基、低碳伸烯基、經取代之低碳伸烯基、伸炔

基、低碳伸雜烷基、經取代之伸雜烷基、低碳伸雜環烷基、經取代之低碳伸雜環烷基、伸芳基、經取代之伸芳基、伸雜芳基、經取代之伸雜芳基、伸烷芳基、經取代之伸烷芳基、伸芳烷基或經取代之伸芳烷基；

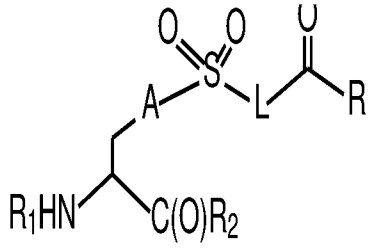
R 係 H、烷基、經取代之烷基、環烷基或經取代之環烷基；

R_1 係視情況存在的，且當存在時，係 H、胺基保護基團、樹脂、胺基酸、多肽或多核苷酸；且

R_2 係視情況存在的，且當存在時，係 OH、酯保護基團、樹脂、胺基酸、多肽或多核苷酸；

L 係伸烷基、經取代之伸烷基、N(R')(伸烷基)或 N(R')(經取代之伸烷基)，其中 R'係 H、烷基、經取代之烷基、環烷基或經取代之環烷基。

【0326】 此外，包括以下具有式(XIV-B)之結構之胺基酸：



(XIV-B)

其中：

A 係視情況存在的，且當存在時，係低碳伸烷基、經取代之低碳伸烷基、低碳伸環烷基、經取代之低碳伸環烷基、低碳伸烯基、經取代之低碳伸烯基、伸炔基、低碳伸雜烷基、經取代之伸雜烷基、低碳伸雜環烷基、經取代之低碳伸雜環烷基、伸芳基、經取代之伸芳基、伸雜芳基、經取代之伸雜芳基、伸烷芳基、經取代之伸烷芳基、伸芳烷基或經取代之伸芳烷基；

R 係 H、烷基、經取代之烷基、環烷基或經取代之環烷基；

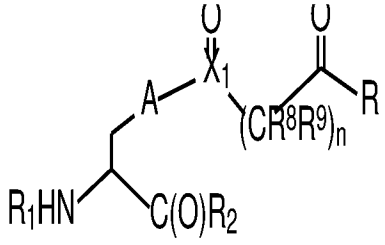
R_1 係視情況存在的，且當存在時，係 H、胺基保護基團、樹脂、胺基酸、多肽或多核苷酸；且

R_2 係視情況存在的，且當存在時，係 OH、酯保護基團、樹脂、胺基酸、多肽或

多核苷酸；

L 係伸烷基、經取代之伸烷基、N(R')(伸烷基)或 N(R')(經取代之伸烷基)，其中 R'係 H、烷基、經取代之烷基、環烷基或經取代之環烷基。

【0327】　此外，包括以下具有式(XV)之結構之胺基酸：



(XV)；

其中：

A 係視情況存在的，且當存在時，係低碳伸烷基、經取代之低碳伸烷基、低碳伸環烷基、經取代之低碳伸環烷基、低碳伸烯基、經取代之低碳伸烯基、伸炔基、低碳伸雜烷基、經取代之伸雜烷基、低碳伸雜環烷基、經取代之低碳伸雜環烷基、伸芳基、經取代之伸芳基、伸雜芳基、經取代之伸雜芳基、伸烷芳基、經取代之伸烷芳基、伸芳烷基或經取代之伸芳烷基；

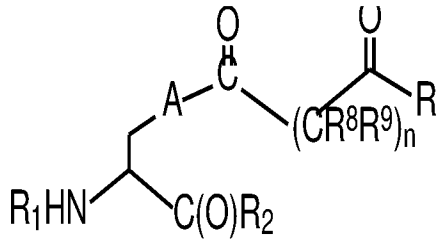
R 係 H、烷基、經取代之烷基、環烷基或經取代之環烷基；

R_1 係視情況存在的，且當存在時，係 H、胺基保護基團、樹脂、胺基酸、多肽或多核苷酸；且

R_2 係視情況存在的，且當存在時，係 OH、酯保護基團、樹脂、胺基酸、多肽或多核苷酸；

X_1 係 C、S 或 S(O)；且 n 係 0、1、2、3、4 或 5；且每一 CR^8R^9 基團上之每一 R^8 及 R^9 皆獨立地選自由 H、烷氧基、烷基胺、鹵素、烷基、芳基組成之群，或任一 R^8 及 R^9 皆可一起形成=O 或環烷基，或任兩個毗鄰 R^8 基團可一起形成環烷基。

【0328】　此外，包括以下具有式(XV-A)之結構之胺基酸：



(XV-A)

其中：

A 係視情況存在的，且當存在時，係低碳伸烷基、經取代之低碳伸烷基、低碳伸環烷基、經取代之低碳伸環烷基、低碳伸烯基、經取代之低碳伸烯基、伸炔基、低碳伸雜烷基、經取代之伸雜烷基、低碳伸雜環烷基、經取代之低碳伸雜環烷基、伸芳基、經取代之伸芳基、伸雜芳基、經取代之伸雜芳基、伸烷芳基、經取代之伸烷芳基、伸芳烷基或經取代之伸芳烷基；

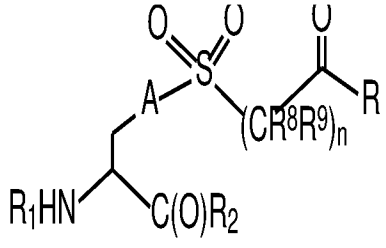
R 係 H、烷基、經取代之烷基、環烷基或經取代之環烷基；

R_1 係視情況存在的，且當存在時，係 H、胺基保護基團、樹脂、胺基酸、多肽或多核苷酸；且

R_2 係視情況存在的，且當存在時，係 OH、酯保護基團、樹脂、胺基酸、多肽或多核苷酸；

n 係 0、1、2、3、4 或 5；且每一 CR^8R^9 基團上之每一 R^8 及 R^9 皆獨立地選自由 H、烷氧基、烷基胺、鹵素、烷基、芳基組成之群，或任一 R^8 及 R^9 皆可一起形成=O 或環烷基，或任兩個毗鄰 R^8 基團可一起形成環烷基。

【0329】　此外，包括以下具有式(XV-B)之結構之胺基酸：



(XV-B)

其中：

A 係視情況存在的，且當存在時，係低碳伸烷基、經取代之低碳伸烷基、低碳伸環烷基、經取代之低碳伸環烷基、低碳伸烯基、經取代之低碳伸烯基、伸炔

基、低碳伸雜烷基、經取代之伸雜烷基、低碳伸雜環烷基、經取代之低碳伸雜環烷基、伸芳基、經取代之伸芳基、伸雜芳基、經取代之伸雜芳基、伸烷芳基、經取代之伸烷芳基、伸芳烷基或經取代之伸芳烷基；

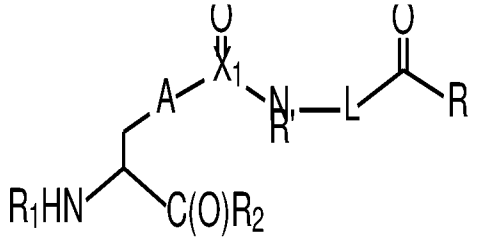
R 係 H、烷基、經取代之烷基、環烷基或經取代之環烷基；

R_1 係視情況存在的，且當存在時，係 H、胺基保護基團、樹脂、胺基酸、多肽或多核苷酸；且

R_2 係視情況存在的，且當存在時，係 OH、酯保護基團、樹脂、胺基酸、多肽或多核苷酸；

n 係 0、1、2、3、4 或 5；且每一 CR^8R^9 基團上之每一 R^8 及 R^9 皆獨立地選自由 H、烷氧基、烷基胺、鹵素、烷基、芳基組成之群，或任一 R^8 及 R^9 皆可一起形成=O 或環烷基，或任兩個毗鄰 R^8 基團可一起形成環烷基。

【0330】 此外，包括以下具有式(XVI)之結構之胺基酸：



(XVI)

其中：

A 係視情況存在的，且當存在時，係低碳伸烷基、經取代之低碳伸烷基、低碳伸環烷基、經取代之低碳伸環烷基、低碳伸烯基、經取代之低碳伸烯基、伸炔基、低碳伸雜烷基、經取代之伸雜烷基、低碳伸雜環烷基、經取代之低碳伸雜環烷基、伸芳基、經取代之伸芳基、伸雜芳基、經取代之伸雜芳基、伸烷芳基、經取代之伸烷芳基、伸芳烷基或經取代之伸芳烷基；

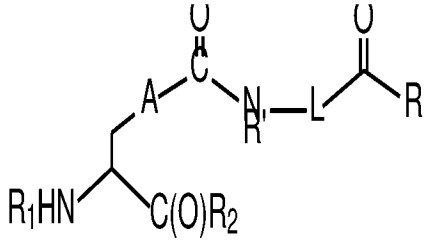
R 係 H、烷基、經取代之烷基、環烷基或經取代之環烷基；

R_1 係視情況存在的，且當存在時，係 H、胺基保護基團、樹脂、胺基酸、多肽或多核苷酸；且

R_2係視情況存在的，且當存在時，係 OH、酯保護基團、樹脂、胺基酸、多肽或多核苷酸；

X_1係 C、S 或 S(O)；且 L 係伸烷基、經取代之伸烷基、N(R')(伸烷基)或 N(R')(經取代之伸烷基)，其中 R'係 H、烷基、經取代之烷基、環烷基或經取代之環烷基。

【0331】　此外，包括以下具有式(XVI-A)之結構之胺基酸：



(XVI-A)

其中：

A 係視情況存在的，且當存在時，係低碳伸烷基、經取代之低碳伸烷基、低碳伸環烷基、經取代之低碳伸環烷基、低碳伸烯基、經取代之低碳伸烯基、伸炔基、低碳伸雜烷基、經取代之伸雜烷基、低碳伸雜環烷基、經取代之低碳伸雜環烷基、伸芳基、經取代之伸芳基、伸雜芳基、經取代之伸雜芳基、伸烷芳基、經取代之伸烷芳基、伸芳烷基或經取代之伸芳烷基；

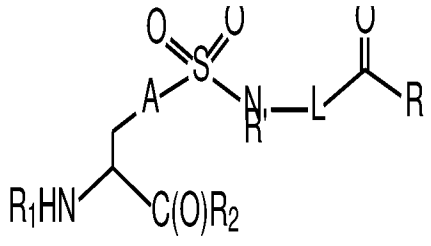
R 係 H、烷基、經取代之烷基、環烷基或經取代之環烷基；

R_1係視情況存在的，且當存在時，係 H、胺基保護基團、樹脂、胺基酸、多肽或多核苷酸；且

R_2係視情況存在的，且當存在時，係 OH、酯保護基團、樹脂、胺基酸、多肽或多核苷酸；

L 係伸烷基、經取代之伸烷基、N(R')(伸烷基)或 N(R')(經取代之伸烷基)，其中 R'係 H、烷基、經取代之烷基、環烷基或經取代之環烷基。

【0332】　此外，包括以下具有式(XVI-B)之結構之胺基酸：



(XVI-B)

其中：

A 係視情況存在的，且當存在時，係低碳伸烷基、經取代之低碳伸烷基、低碳伸環烷基、經取代之低碳伸環烷基、低碳伸烯基、經取代之低碳伸烯基、伸炔基、低碳伸雜烷基、經取代之伸雜烷基、低碳伸雜環烷基、經取代之低碳伸雜環烷基、伸芳基、經取代之伸芳基、伸雜芳基、經取代之伸雜芳基、伸烷芳基、經取代之伸烷芳基、伸芳烷基或經取代之伸芳烷基；

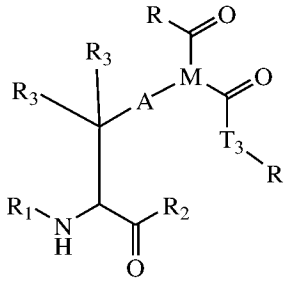
R 係 H、烷基、經取代之烷基、環烷基或經取代之環烷基；

R_1 係視情況存在的，且當存在時，係 H、胺基保護基團、樹脂、胺基酸、多肽或多核苷酸；且

R_2 係視情況存在的，且當存在時，係 OH、酯保護基團、樹脂、胺基酸、多肽或多核苷酸；

L 係伸烷基、經取代之伸烷基、N(R')(伸烷基)或 N(R')(經取代之伸烷基)，其中 R'係 H、烷基、經取代之烷基、環烷基或經取代之環烷基。

【0333】　此外，包括具有式(XVII)之結構之胺基酸：

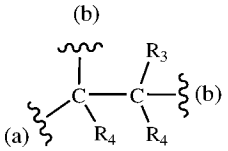
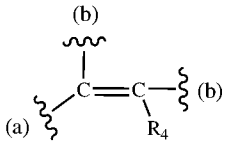
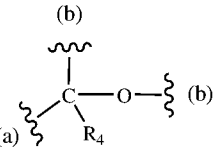
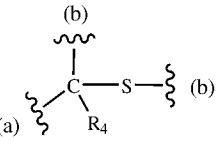
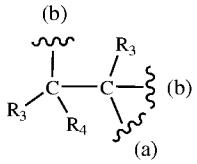
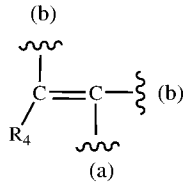
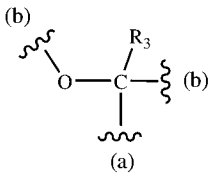
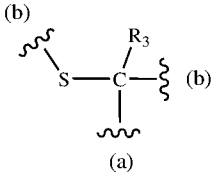


(XVII)，

其中：

A 係視情況存在的，且當存在時，係低碳伸烷基、經取代之低碳伸烷基、低碳伸環烷基、經取代之低碳伸環烷基、低碳伸烯基、經取代之低碳伸烯基、伸炔

基、低碳伸雜烷基、經取代之伸雜烷基、低碳伸雜環烷基、經取代之低碳伸雜環烷基、伸芳基、經取代之伸芳基、伸雜芳基、經取代之伸雜芳基、伸烷芳基、經取代之伸烷芳基、伸芳烷基或經取代之伸芳烷基；

M 係-C(R_3)-、  、  、  、  、  、  、  、  或，其中(a)指示與 A 基團之鍵結且(b)指示與各別羰基之鍵結，R_3及 R_4獨立地為選自 H、鹵素、烷基、經取代之烷基、環烷基或經取代之環烷基，或 R_3及 R_4或兩個 R_3基團或兩個 R_4基團視情況形成環烷基或雜環烷基；

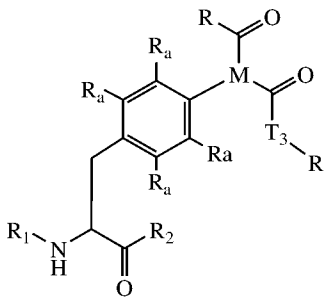
R 係 H、鹵素、烷基、經取代之烷基、環烷基或經取代之環烷基；

T_3係鍵、C(R)(R)、O 或 S，且 R 係 H、鹵素、烷基、經取代之烷基、環烷基或經取代之環烷基；

R_1係視情況存在的，且當存在時，係 H、胺基保護基團、樹脂、胺基酸、多肽或多核苷酸；且

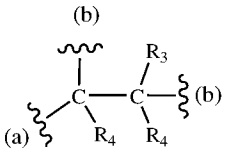
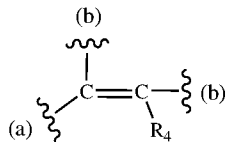
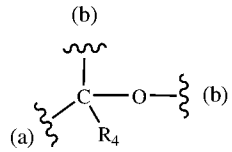
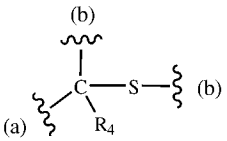
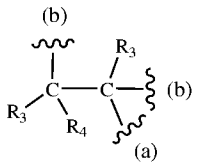
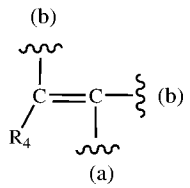
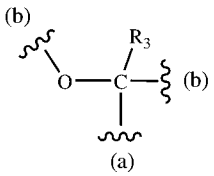
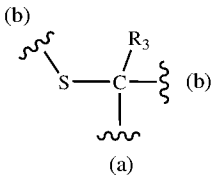
R_2係視情況存在的，且當存在時，係 OH、酯保護基團、樹脂、胺基酸、多肽或多核苷酸。

【0334】　此外，包括具有式(XVIII)之結構之胺基酸：



(XVIII)，

其中：

M 係-C(R_3)-、  、  、  、  、  、  、  、  或，其中(a)指示與 A 基團之鍵結且(b)指示與各別羰基之鍵結，R_3 及 R_4 獨立地為選自 H、鹵素、烷基、經取代之烷基、環烷基或經取代之環烷基，或 R_3 及 R_4 或兩個 R_3 基團或兩個 R_4 基團視情況形成環烷基或雜環烷基；

R 係 H、鹵素、烷基、經取代之烷基、環烷基或經取代之環烷基；

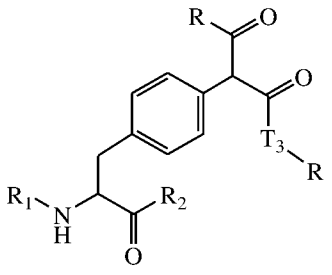
T_3 係鍵、C(R)(R)、O 或 S，且 R 係 H、鹵素、烷基、經取代之烷基、環烷基或經取代之環烷基；

R_1 係視情況存在的，且當存在時，係 H、胺基保護基團、樹脂、胺基酸、多肽或多核苷酸；且

R_2 係視情況存在的，且當存在時，係 OH、酯保護基團、樹脂、胺基酸、多肽或多核苷酸；

每一 R_a 皆係獨立地選自由以下組成之群：H、鹵素、烷基、經取代之烷基、-N(R')$_2$、-C(O)$_k$R' (其中 k 係 1、2 或 3)、-C(O)N(R')$_2$、-OR'及-S(O)$_k$R'，其中每一 R'皆獨立地為 H、烷基或經取代之烷基。

【0335】 此外，包括具有式(XIX)之結構之胺基酸：



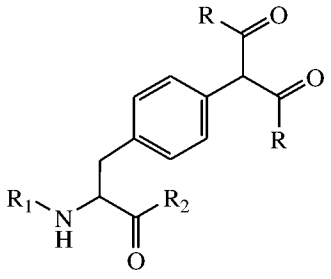
(XIX)，

其中：

R 係 H、鹵素、烷基、經取代之烷基、環烷基或經取代之環烷基；且

T_3係O或S。

【0336】　此外，包括具有式(XX)之結構之胺基酸：

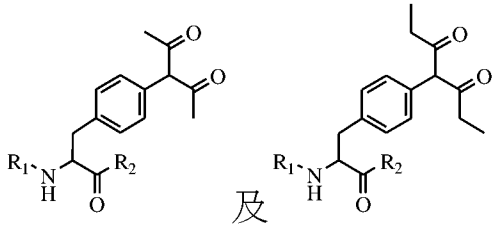


(XX)，

其中：

R係H、鹵素、烷基、經取代之烷基、環烷基或經取代之環烷基。

【0337】　此外，包括以下具有式(XXI)之結構之胺基酸：



及

。

【0338】　在一些實施例中，包含非天然胺基酸之多肽經化學修飾以生成反應性羰基或二羰基官能基。例如，可自具有毗鄰胺基及羥基之官能基生成可用於偶聯反應之醛官能基。在生物活性分子係多肽時，例如，N-末端絲胺酸或蘇胺酸(其通常可能存在或可能經由化學或酶促消化而暴露)可用於在使用高碘酸鹽之溫和氧化裂解條件下生成醛官能基。參見例如Gaertner等人，Bioconjug. Chem. 3: 262-268 (1992)；Geoghegan, K.及Stroh, J., Bioconjug. Chem. 3:138-146 (1992)；Gaertner等人，J. Biol. Chem. 269:7224-7230 (1994)。然而，此項技術中已知之方法侷限於肽或蛋白質之N-末端之胺基酸。

【0339】　在發明中，帶有毗鄰羥基及胺基之非天然胺基酸可作為「遮蔽」之醛官能基併入多肽中。舉例而言，5-羥基離胺酸帶有與ε胺毗鄰之羥基。用於生成醛之反應條件通常涉及在溫和條件下添加莫耳過量之偏高碘酸鈉以避免多肽內其他位點處之氧化。氧化反應之pH通常為約7.0。典型反應涉及將約1.5莫耳

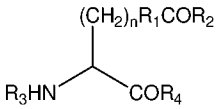
過量之偏高碘酸鈉添加至多肽之緩衝溶液中，接著在黑暗中孵育約 10 分鐘。參見例如美國專利第 6,423,685 號。

【0340】 羰基或二羰基官能基可在溫和條件下在水溶液中選擇性地與含羥胺之試劑反應，以形成在生理條件下穩定之對應肟鍵聯。參見例如 Jencks, W. P., J. Am. Chem. Soc. 81, 475-481 (1959)；Shao, J.及 Tam，J. P., J. Am. Chem. Soc. 117:3893-3899 (1995)。此外，羰基或二羰基之獨特反應性容許在其他胺基酸側鏈存在下進行選擇性修飾。參見例如 Cornish, V. W.等人，J. Am. Chem. Soc. 118:8150-8151 (1996)；Geoghegan, K. F.及 Stroh, J. G.，Bioconjug. Chem. 3:138-146 (1992)；Mahal, L. K.等人，Science 276:1125-1128 (1997)。

A. 羰基反應基團

【0341】 具有羰基反應基團之胺基酸容許尤其經由親核加成或羥醛縮合反應進行多種反應以連接分子(包括但不限於 PEG 或其他水溶性分子)。

【0342】 例示性含羰基胺基酸可表示如下：



其中 n 係 0-10；R_1 係烷基、芳基、經取代之烷基或經取代之芳基；R_2 係 H、烷基、芳基、經取代之烷基及經取代之芳基；且 R_3 係 H、胺基酸、多肽或胺基末端修飾基團，且 R_4 係 H、胺基酸、多肽或羧基末端修飾基團。在一些實施例中，n 係 1，R_1 係苯基且 R_2 係簡單烷基(亦即，甲基、乙基、或丙基)，且酮部分相對於烷基側鏈定位於*對*位。在一些實施例中，n 係 1，R_1 係苯基且 R_2 係簡單烷基(亦即，甲基、乙基、或丙基)，且酮部分相對於烷基側鏈定位於*間*位。

【0343】 *對*乙醯基-(+/-)-苯丙胺酸及*間*-乙醯基-(+/-)-苯丙胺酸之合成闡述於 Zhang, Z.等人，Biochemistry 42: 6735-6746 (2003) (其以引用方式併入本文中)中。熟習此項技術者可類似地製備其他含羰基之胺基酸。

【0344】 在一些實施例中，包含非天然編碼之胺基酸之多肽經化學修飾以生

成反應性羰基官能基。例如，可自具有毗鄰胺基及羥基之官能基生成可用於偶聯反應之醛官能基。在生物活性分子係多肽時，例如，*N*-末端絲胺酸或蘇胺酸(其通常可能存在或可能經由化學或酶促消化而暴露)可用於在使用高碘酸鹽之溫和氧化裂解條件下生成醛官能基。*參見*例如 Gaertner *等人*，*Bioconjug. Chem.* 3: 262-268 (1992)；Geoghegan, K.及 Stroh, J.，*Bioconjug. Chem.* 3:138-146 (1992)；Gaertner *等人*，*J. Biol. Chem.* 269:7224-7230 (1994)。然而，此項技術中已知之方法侷限於肽或蛋白質之 *N*-末端之胺基酸。

【0345】　在發明中，帶有毗鄰羥基及胺基之非天然編碼之胺基酸可作為「遮蔽」之醛官能基併入多肽中。舉例而言，5-羥基離胺酸帶有與 ε 胺毗鄰之羥基。用於生成醛之反應條件通常涉及在溫和條件下添加莫耳過量之偏高碘酸鈉以避免多肽內其他位點處之氧化。氧化反應之 pH 通常為約 7.0。典型反應涉及將約 1.5 莫耳過量之偏高碘酸鈉添加至多肽之緩衝溶液中，接著在黑暗中孵育約 10 分鐘。*參見例如*美國專利第 6,423,685 號，其以引用方式併入本文中。

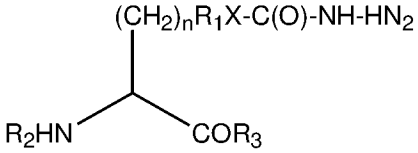
【0346】　羰基官能基可在溫和條件下在水溶液中選擇性地與含肼、醯肼、羥胺或胺基脲之試劑反應，以分別形成在生理條件下穩定之對應腙、肟或縮胺基脲鍵聯。參見例如 Jencks, W. P., J. Am. Chem. Soc. 81, 475-481 (1959)；Shao, J. 及 Tam，J. P., J. Am. Chem. Soc. 117:3893-3899 (1995)。此外，羰基之獨特反應性容許在其他胺基酸側鏈存在下進行選擇性修飾。參見例如 Cornish, V. W.等人，J. Am. Chem. Soc. 118:8150-8151 (1996)；Geoghegan, K. F.及 Stroh, J. G.，Bioconjug. Chem. 3:138-146 (1992)；Mahal, L. K.等人，Science 276:1125-1128 (1997)。

B. 肼、醯肼或胺基脲反應基團

【0347】　含有親核基團(諸如肼、醯肼或胺基脲)之非天然編碼之胺基酸容許與多種親電子基團反應以形成偶聯物(包括但不限於與 PEG 或其他水溶性聚合物

反應)。

【0348】 例示性含肼、醯肼或胺基脲之胺基酸可表示如下：



其中 n 係 0-10；R_1 係烷基、芳基、經取代之烷基或經取代之芳基或不存在；X 係 O、N 或 S 或不存在；R_2 係 H、胺基酸、多肽或胺基末端修飾基團，且 R_3 係 H、胺基酸、多肽或羧基末端修飾基團。

【0349】 在一些實施例中，n 係 4，R_1 不存在，且 X 係 N。在一些實施例中，n 係 2，R_1 不存在，且 X 不存在。在一些實施例中，n 係 1，R_1 係苯基，X 係 O，且氧原子位於芳基環上之脂族基之對位。

【0350】 含醯肼、肼及胺基脲之胺基酸可自商業來源獲得。例如，L-麩胺酸-γ-醯肼可自 Sigma Chemical (St. Louis, MO)獲得。熟習此項技術者可製備其他不可商購之胺基酸。*參見例如*美國專利第 6,281,211 號，其以引用方式併入本文中。

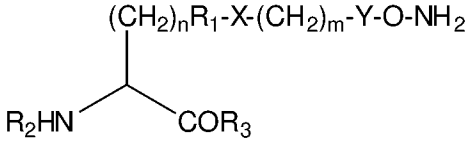
【0351】 含有帶有醯肼、肼或胺基脲官能基之非天然編碼之胺基酸的多肽可與多種含有醛或具有類似化學反應性之官能基之分子高效地及選擇性地反應。*參見例如* Shao, J.及 Tam, J.，*J. Am. Chem. Soc.* 117:3893-3899 (1995)。與存在於 20 種常見胺基酸上之親核基團(包括但不限於絲胺酸或蘇胺酸之羥基或離胺酸及 N-末端之胺基)相比，醯肼、肼及胺基脲官能基之獨特反應性使其對醛、酮及其他親電子基團之反應性顯著更強。

C. 含胺基氧基之胺基酸

【0352】 含有胺基氧基(亦稱為羥基胺)基團的非天然編碼之胺基酸容許與多種親電子基團反應以形成偶聯物(包括但不限於與 PEG 或其他水溶性聚合物反應)。與肼、醯肼及胺基脲一樣，胺基氧基之增強之親核性容許其與多種含有醛或具有相似化學反應性之其他官能基之分子高效地且選擇性地反應。*參見例如*

Shao, J.及 Tam, J. ，*J. Am. Chem. Soc.* 117:3893-3899 (1995)；H. Hang 及 C. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* 34: 727-736 (2001)。雖然與肼基反應之結果係對應之腙，然而，肟通常由胺基氧基與含羰基之基團(諸如酮)反應產生。

【0353】 例示性含胺基氧基之胺基酸可表示如下：



其中 n 係 0-10；R_1 係烷基、芳基、經取代之烷基或經取代之芳基或不存在；X 係 O、N、S 或不存在；m 係 0-10；Y = C(O)或不存在；R_2 係 H、胺基酸、多肽或胺基末端修飾基團，且 R_3 係 H、胺基酸、多肽或羧基末端修飾基團。在一些實施例中，n 係 1，R_1 係苯基，X 係 O，m 係 1，且存在 Y。在一些實施例中，n 係 2，R_1 及 X 不存在，m 係 0，且 Y 不存在。

【0354】 可自容易獲得之胺基酸前驅物(高絲胺酸、絲胺酸及蘇胺酸)製備含胺基氧基之胺基酸。*參見例如* M. Carrasco 及 R. Brown，*J. Org. Chem.* 68: 8853-8858 (2003)。已自天然源中分離出某些含胺基氧基之胺基酸，諸如 L-2-胺基-4-(胺基氧基)丁酸) (Rosenthal, G., Life Sci. 60: 1635-1641 (1997)。熟習此項技術者可製備其他含胺基氧基之胺基酸。

D. 疊氮化物及炔烴反應基團

【0355】 疊氮化物及炔烴官能基之獨特反應性使其極適用於多肽及其他生物分子之選擇性修飾。有機疊氮化物、特別是脂族疊氮化物及炔烴通常對常見反應性化學條件穩定。具體而言，疊氮化物及炔官能基二者對於天然存在之多肽中發現之 20 種常見胺基酸之側鏈(即，R 基團)皆係惰性。然而，當緊密接近時，疊氮化物及炔烴基團之「彈性加載」性質即顯現，且其經由 Huisgen [3+2]環加成反應選擇性地且高效地反應以生成對應三唑。參見例如 Chin J.等人，Science 301:964-7 (2003)；Wang, Q.等人，J. Am. Chem. Soc. 125, 3192-3193 (2003)；Chin,

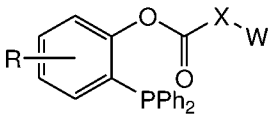
J. W.等人，J. Am. Chem. Soc. 124:9026-9027 (2002)。

【0356】 由於 Huisgen 環加成反應涉及選擇性環加成反應(*參見例如* Padwa, A., COMPREHENSIVE ORGANIC SYNTHESIS，第 4 卷，(Trost, B. M.編輯，1991)，第 1069-1109 頁；Huisgen, R., 1,3-DIPOLAR CYCLOADDITION CHEMISTRY (Padwa, A.編輯，1984)，第 1-176 頁)而非親核取代，故併入帶有含疊氮化物及炔烴之側鏈之非天然編碼之胺基酸容許在非天然編碼之胺基酸之位置處選擇性地修飾所得多肽。可於室溫下，在水性條件下，藉由添加 Cu(II) (包括但不限於催化量之 $CuSO_4$ 之形式)，在催化量的用於將 Cu(II)原位還原為 Cu(I)之還原劑存在下，實施涉及含疊氮化物或炔烴之 TC 之環加成反應。*參見例如* Wang, Q.等人，*J. Am. Chem. Soc.* 125, 3192-3193 (2003)；Tornoe, C. W.等人，*J. Org. Chem.* 67:3057-3064 (2002)；Rostovtsev 等人，*Angew. Chem. Int. Ed.* 41:2596-2599 (2002)。例示性還原劑包括但不限於抗壞血酸鹽、金屬銅、奎寧、氫醌、維生素 K、麩胱甘肽、半胱胺酸、Fe^{2+}、Co^{2+}及施加之電位。

【0357】 在一些情況下，在期望疊氮化物與炔烴之間之 Huisgen [3+2]環加成反應之情況下，TC 包含含有炔烴部分之非天然編碼之胺基酸，且欲附著至胺基酸之水溶性聚合物包含疊氮化物部分。或者，亦可實施逆反應(亦即，利用胺基酸上之疊氮化物部分及存在於水溶性聚合物上之炔烴部分實施)。

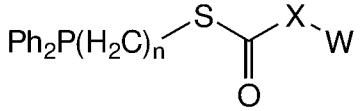
【0358】 疊氮化物官能基亦可選擇性地與含有芳基酯且經芳基膦部分適當地官能化之水溶性聚合物反應以生成醯胺鍵聯。芳基膦基團原位還原疊氮化物，且接著所得胺與鄰近之酯鍵聯高效反應以生成對應醯胺。*參見例如* E. Saxon 及 C. Bertozzi，*Science* 287, 2007-2010 (2000)。含疊氮化物之胺基酸可為烷基疊氮化物(包括但不限於 2-胺基-6-疊氮基-1-己酸)或芳基疊氮化物(對疊氮基-苯丙胺酸)。

【0359】 含有芳基酯及膦部分之例示性水溶性聚合物可表示如下：



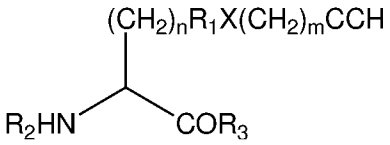
其中 X 可為 O、N、S 或不存在，Ph 係苯基，W 係水溶性聚合物且 R 可為 H、烷基、芳基、經取代之烷基及經取代之芳基。例示性 R 基團包括但不限於-CH_2、-$C(CH_3)_3$、-OR’、-NR’R”、-SR’、-鹵素、-C(O)R’、-CONR’R”、-$S(O)_2$R’、-$S(O)_2$NR’R”、-CN 及–NO_2。R’、R”、R”’及 R””各自獨立地係指氫、經取代或未經取代之雜烷基、經取代或未經取代之芳基(包括但不限於經 1-3 個鹵素取代之芳基)、經取代或未經取代之烷基、烷氧基或硫代烷氧基、或芳基烷基。當本發明之化合物包括超過一個 R 基團時，例如，每一 R 基團皆係獨立地選擇，當存在 R’、R”、R”’及 R””中之超過一者時，每一 R’、R”、R”’及 R””基團同樣皆係獨立地選擇。當 R’及 R”附著至相同氮原子時，其可與氮原子組合以形成 5 員、6 員或 7 員環。舉例而言，-NR’R”意在包括但不限於 1-吡咯啶基及 4-嗎啉基。自以上對取代基之討論，熟習此項技術者將理解術語「烷基」意在包括包含結合至除氫基之外之基團之碳原子的基團，諸如鹵代烷基(包括但不限於-CF_3 及-CH_2CF_3)及醯基(包括但不限於-$C(O)CH_3$、-$C(O)CF_3$、-$C(O)CH_2OCH_3$ 及諸如此類)。

【0360】　疊氮化物官能基亦可選擇性地與含有硫酯且經芳基膦部分適當地官能化之水溶性聚合物反應以生成醯胺鍵聯。芳基膦基團原位還原疊氮化物，且接著所得胺與硫酯鍵聯高效反應以生成對應醯胺。含有硫酯及膦部分之例示性水溶性聚合物可表示如下：



其中 n 係 1-10；X 可為 O、N、S 或不存在，Ph 係苯基，且 W 係水溶性聚合物。

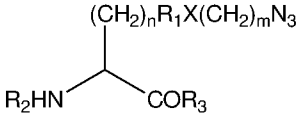
【0361】　例示性含炔烴胺基酸可表示如下：



其中 n 係 0-10；R_1 係烷基、芳基、經取代之烷基或經取代之芳基或不存在；X 係 O、N、S 或不存在；m 係 0-10，R_2 係 H、胺基酸、多肽或胺基末端修飾基團，且 R_3 係 H、胺基酸、多肽或羧基末端修飾基團。在一些實施例中，n 係 1，R_1 係苯基，X 不存在，m 係 0 且乙炔烴部分相對於烷基側鏈定位於對位。在一些實施例中，n 係 1，R_1 係苯基，X 係 O，m 係 1 且炔丙氧基相對於烷基側鏈定位於*對*位(亦即，O-炔丙基-酪胺酸)。在一些實施例中，n 係 1，R_1 及 X 不存在，且 m 係 0 (亦即，炔丙基甘胺酸)。

【0362】　含炔烴之胺基酸可購得。舉例而言，炔丙基甘胺酸可自 Peptech (Burlington, MA)購得。或者，可根據標準方法製備含炔烴之胺基酸。例如，可例如如 Deiters, A.等人，*J. Am. Chem. Soc.* 125: 11782-11783 (2003)中所述合成*對*炔丙基氧基苯丙胺酸，且可如 Kayser, B.等人，*Tetrahedron* 53(7): 2475-2484 (1997)中所述合成 4-炔基-L-苯丙胺酸。熟習此項技術者可製備其他含炔烴之胺基酸。

【0363】　例示性含疊氮化物之胺基酸可表示如下：



其中 n 係 0-10；R_1 係烷基、芳基、經取代之烷基、經取代之芳基或不存在；X 係 O、N、S 或不存在；m 係 0-10；R_2 係 H、胺基酸、多肽或胺基末端修飾基團，且 R_3 係 H、胺基酸、多肽或羧基末端修飾基團。在一些實施例中，n 係 1，R_1 係苯基，X 不存在，m 係 0 且疊氮基部分定位於烷基側鏈之*對*位。在一些實施例中，n 係 0-4 且 R_1 及 X 不存在，且 m=0。在一些實施例中，n 係 1，R_1 係苯基，X 係 O，m 係 2 且-疊氮基乙氧基部分相對於烷基側鏈定位於*對*位。

【0364】　含疊氮化物之胺基酸可自商業來源獲得。例如，4-疊氮基苯丙胺酸可自 Chem-Impex International 公司(Wood Dale, IL)獲得。對於彼等並非購得之含

疊氮化物之胺基酸，可使用熟習此項技術者已知之標準方法相對容易地製備疊氮基，該等標準方法包括但不限於經由置換適宜離去基團(包括但不限於不限於鹵離子、甲磺酸根、甲苯磺酸根)或經由打開適當保護之內酯。*參見例如* Advanced Organic Chemistry，March (第三版，1985 年，Wiley and Sons, New York)。

E. 胺基硫醇反應基團

【0365】 β-取代之胺基硫醇官能基之獨特反應性使其極適於經由形成噻唑啶對含有醛基之多肽及其他生物分子進行選擇性修飾。*參見例如* J. Shao 及 J. Tam，*J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117 (14) 3893-3899。在一些實施例中，可將 β-取代之胺基硫醇胺基酸併入 TC 多肽中，接著與包含醛官能基之水溶性聚合物反應。在一些實施例中，水溶性聚合物、藥物偶聯物或其他酬載可經由形成噻唑啶與包含 β-取代之胺基硫醇胺基酸之 TC 之靶向多肽偶合。

F. 額外反應基團

【0366】 可併入本發明之 TC 多肽中之其他反應基團及非天然編碼胺基酸(包括但不限於對胺基-苯丙胺酸)闡述於以下專利申請案(其皆全文以引用方式併入本文中)中：美國專利公開案第 2006/0194256 號、美國專利公開案第 2006/0217532 號、美國專利公開案第 2006/0217289 號、美國臨時專利第 60/755,338 號；美國臨時專利第 60/755,711 號；美國臨時專利第 60/755,018 號；國際專利申請案第 PCT/US06/49397 號；WO 2006/069246；美國臨時專利第 60/743,041 號；美國臨時專利第 60/743,040 號；國際專利申請案第 PCT/US06/47822 號；美國臨時專利第 60/882,819 號；美國臨時專利第 60/882,500 號；及美國臨時專利第 60/870,594 號。該等申請案亦討論可存在於 PEG 或其他聚合物上之反應基團，包括但不限於用於偶聯之羥胺(胺基氧基)基團。

TC 多肽中非天然胺基酸之位置

【0367】 本文所述之方法及組成物包括將一或多種非天然胺基酸併入靶向多

肽中以製備本發明之 TC。可將一或多種非天然胺基酸併入一或多個不破壞靶向多肽之活性之特定位置。此可藉由進行「保守」取代(包括但不限於用非天然或天然疏水胺基酸取代疏水胺基酸、用非天然或天然大體積胺基酸取代大體積胺基酸、用非天然或天然親水胺基酸取代親水胺基酸)及/或將非天然胺基酸插入活性所無需之位置來達成。

【0368】 可採用多種生化及結構方法來選擇期望位點，以在 TC 之靶向多肽內用非天然胺基酸進行取代。在一些實施例中，非天然胺基酸連接在 TLR-促效劑衍生物之 C-末端。在其他實施例中，非天然胺基酸連接在 TLR-促效劑衍生物之 N-末端。TC 之靶向多肽之任一位置皆適於供選擇以併入非天然胺基酸，且選擇可基於合理設計或藉由出於任何目的或沒有特定期望目的之隨機選擇。期望位點之選擇可基於產生具有任一期望性質或活性(包括但不限於受體結合調節劑、受體活性調節劑、結合至結合劑配偶體之調節劑、結合配偶體活性調節劑、結合配偶體構形調節劑、二聚物或多聚物形成、活性或性質與天然分子相比無變化)之非天然胺基酸多肽(其可經進一步修飾或保持未經修飾)，或操縱多肽之任一物理或化學性質，諸如溶解度、聚集或穩定性。或者，鑑別為對生物活性至關重要之位點亦可能係用非天然胺基酸取代之良好候選者，此亦取決於對多肽所尋求之期望活性。另一替代方案將係在多肽鏈上之每一位置簡單地用非天然胺基酸進行連續取代，且觀察對多肽之活性之作用。用於選擇用非天然胺基酸取代至任何多肽中之位置的任何手段、技術或方法皆適用於本文所述之方法、技術及組成物中。

【0369】 亦可檢查多肽之含有缺失之天然存在突變體的結構及活性，以確定可能耐受用非天然胺基酸取代之蛋白質區域。在已消除可能不耐受用非天然胺基酸取代之殘基後，可使用包括但不限於相關多肽之三維結構及任何相關配位體或結合蛋白質在內之方法檢查所提出於剩餘位置中每一者處之取代之影響。

許多多肽之 X 射線晶體學及 NMR 結構可於蛋白質資料庫(Protein Data Bank, PDB, www.rcsb.org)中獲得，該庫係含有蛋白質及核酸大分子之三維結構資料之中央資料庫，其可用於鑑別可經非天然胺基酸取代之胺基酸位置。此外，若三維結構資料不可用，則可建立研究多肽之二級及三級結構之模型。因此，可容易地獲得可經非天然胺基酸取代之胺基酸位置之特性。

【0370】 非天然胺基酸之例示性併入位點包括但不限於自潛在受體結合區中排除之彼等，或者用於結合至結合蛋白或配位體之區域可完全或部分暴露於溶劑，具有極少或沒有與附近殘基之氫鍵結相互作用，可能最低限度地暴露於附近反應殘基，且/或可位於高度撓性之區域中，如藉由特定多肽與其相關受體、配位體或結合蛋白之三維晶體結構所預測。

【0371】 眾多種非天然胺基酸可取代或併入多肽中之給定位置。舉例而言，可基於對多肽與其相關配位體、受體及/或結合蛋白之三維晶體結構(對保守取代之偏好)之檢查來選擇特定非天然胺基酸用於併入。

【0372】 在一個實施例中，本文所述之方法包括將非天然胺基酸併入 TC 之靶向多肽中，其中 TC 之靶向多肽包含第一反應基團；以及使 TC 之靶向多肽與包含第二反應基團之分子(包括但不限於第二蛋白質或多肽或多肽類似物；抗體或抗體片段；及其任一組合)接觸。在某些實施例中，第一反應基團係羥胺部分且第二反應基團係羰基或二羰基部分，藉此形成肟鍵聯。在某些實施例中，第一反應基團係羰基或二羰基部分且第二反應基團係羥胺部分，藉此形成肟鍵聯。在某些實施例中，第一反應基團係羰基或二羰基部分且第二反應基團係肟部分，藉此發生肟交換反應。在某些實施例中，第一反應基團係肟部分且第二反應基團係羰基或二羰基部分，藉此發生肟交換反應。

【0373】 在一些情況下，非天然胺基酸之一或多個 TC 併入之靶向多肽將與多肽內之其他添加、取代或缺失組合，以影響其他化學、物理、藥理學及/或生物

學特性。在一些情況下，其他添加、取代或缺失可增加多肽之穩定性(包括但不限於對蛋白水解降解之抗性)或增加多肽對其適當受體、配位體及/或結合蛋白之親和力。在一些情況下，其他添加、取代或缺失可增加多肽之溶解度(包括但不限於，當在大腸桿菌或其他宿主細胞中表現時)。在一些實施例中，除了用於併入非天然胺基酸之另一位點之外，亦選擇用天然編碼或非天然胺基酸取代之位點，目的係增加在大腸桿菌或其他重組宿主細胞中表現後之多肽溶解度。在一些實施例中，多肽包含另一添加、取代或缺失，該添加、取代或缺失調節對相關配位體、結合蛋白及/或受體之親和力，調節(包括但不限於增加或減少)受體二聚化，穩定受體二聚物，調節循環半衰期，調節釋放或生物利用度，促進純化或改良或改變特定投與途徑。類似地，非天然胺基酸多肽可包含改良多肽之偵測(包括但不限於 GFP)、純化、借助組織或細胞膜轉運、前藥釋放或活化、大小減小或其他特性的化學或酶裂解序列、蛋白酶裂解序列、反應基團、抗體結合結構域(包括但不限於 FLAG 或聚 His)或其他基於親和力之序列(包括但不限於 FLAG、聚 His、GST 等)或連接分子(包括但不限於生物素)。

作為靶向部分之範例之抗 HER2 抗體

【0374】　本文所述之方法、組成物、策略及技術不限於靶向部分多肽或蛋白質之特定類型、類別或家族。實際上，幾乎任何靶向部分多肽皆可經設計或修飾以包括至少一種含有「經修飾或未經修飾」之非天然胺基酸的本文所述 TC 之靶向多肽。僅舉例而言，靶向部分多肽可與選自由以下組成之群之治療蛋白質同源：α-1 抗胰蛋白酶、血管抑制素、抗溶血因子、抗體、抗體片段、單株抗體(例如，貝伐珠單抗(bevacizumab)、西妥昔單抗(cetuximab)、帕尼單抗(panitumumab)、英夫利昔單抗(infliximab)、阿達木單抗(adalimumab)、巴利昔單抗(basiliximab)、達克珠單抗(daclizumab)、奧馬珠單抗(omalizumab)、優特克單抗(ustekinumab)、依那西普(etanercept)、吉妥珠單抗(gemtuzumab)、阿倫單抗

(alemtuzumab)、利妥昔單抗(rituximab)、曲妥珠單抗、尼妥珠單抗(nimotuzumab)、帕利珠單抗(palivizumab)及阿昔單抗(abciximab))、脂蛋白元、缺輔基蛋白、心房利尿鈉因子、心房利尿鈉多肽、心房肽、C-X-C 趨化介素、T39765、NAP-2、ENA-78、gro-a、gro-b、gro-c、IP-10、GCP-2、NAP-4、SDF-1、PF4、MIG、降鈣素、c-kit 配位體、CC 趨化介素、單核球化學引誘蛋白-1、單核球化學引誘蛋白-2、單核球化學引誘蛋白-3、單核球炎性蛋白-1α、單核球炎性蛋白-iβ、RANTES、1309、R83915、R91733、HCC1、T58847、D31065、T64262、CD40、CD40 配位體、c-kit 配位體、膠原、集落刺激因子(CSF)、補體因子 5a、補體抑制劑、補體受體 1、細胞介素、上皮嗜中性球活化肽-78、MIP-16、MCP-1、表皮生長因子(EGF)、上皮嗜中性球活化肽、紅血球生成素(EPO)、剝落毒素、因子 IX、因子 VII、因子 VIII、因子 X、纖維母細胞生長因子(FGF)、纖維蛋白原、纖網蛋白、四螺旋束蛋白、G-CSF、glp-1、GM-CSF、葡糖腦苷脂酶、促性腺素、生長因子、生長因子受體、生長激素釋放因子、刺蝟蛋白(hedgehog protein)、血紅蛋白、肝細胞生長因子(hGF)、水蛭素、人類生長激素(hGH)、人類血清白蛋白、ICAM-1、ICAM-1 受體、LFA-1、LFA-1 受體、胰島素、胰島素樣生長因子(IGF)、IGF-I、IGF-II、干擾素(IFN)、IFN-α、IFN-β、IFN-γ、介白素(IL)、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、角質細胞生長因子(KGF)、乳鐵素、白血病抑制因子、螢光素酶、neurturin、嗜中性球抑制因子(NIF)、抑癌素 M、骨原蛋白、致癌基因產物、paracitonin、副甲狀腺素(PTH)、PD-ECGF、PDGF、肽激素、多效生長因子(pleiotropin)、蛋白 A、蛋白 G、致熱性外毒素 A、致熱性外毒素 B、致熱性外毒素 C、肽 YY (PYY)、鬆弛素、腎素、SCF、小型生物合成蛋白、可溶性補體受體 I、可溶性 I-CAM 1、可溶性介白素受體、可溶性 TNF 受體、軀體生長素、體抑素、生長激素、鏈球菌激酶、超抗原、葡萄球菌腸毒素、SEA、SEB、SEC1、SEC2、SEC3、SED、

SEE、類固醇激素受體、過氧化物歧化酶、中毒性休克症候群毒素、胸腺素 α1、組織胞漿素原活化劑、腫瘤生長因子(TGF)、腫瘤壞死因子、腫瘤壞死因子 α、腫瘤壞死因子 β、腫瘤壞死因子受體(TNFR)、VLA-4 蛋白、VCAM-1 蛋白、血管內皮生長因子(VEGF)、尿激酶、mos、ras、raf、met、p53、tat、fos、myc、jun、myb、rel、雌激素受體、助孕酮受體、睪固酮受體、醛固酮受體、LDL 受體及皮質固醇。

【0375】 在一個實施例中係用於治療過表現 HER-2 之實體瘤之方法，該實體瘤選自由以下組成之群：乳癌、小細胞肺癌、卵巢癌、子宮內膜癌、膀胱癌、頭頸癌、前列腺癌、胃癌、子宮頸癌、子宮癌、食道癌及結腸癌。在另一實施例中，實體瘤係乳癌。在又一實施例中，實體瘤係卵巢癌。

【0376】 因此，提供曲妥珠單抗之以下闡述用於說明目的且僅舉例而言，而並非作為對本文所述方法、組成物、策略及技術之範圍之限制。此外，在本申請案中對曲妥珠單抗之提及意欲使用通用術語作為任何抗體之實例。因此，應當理解，本文關於曲妥珠單抗闡述之修飾及化學物質可同等地適用於任何抗體或單株抗體，包括本文明確列出之彼等。

【0377】 曲妥珠單抗係結合至 HER2/neu 受體之細胞外區段之結構域 IV 的人類化單株抗體。HER2 基因(亦稱為 HER2/neu 及 ErbB2 基因)在 20-30%之早期乳癌中擴增，此使其過表現。此外，在癌症中，HER2 可在無促分裂原到達任一受體且與其結合之情況下發送信號，使其過度活化。

【0378】 HER2 延伸穿過細胞膜且將信號自細胞外部傳送至內部。在健康人中，稱為有絲分裂原之信號傳導化合物到達細胞膜，且結合至 HER 受體家族其他成員之外側部分。接著彼等結合之受體與 HER2 連接(二聚化)，將其活化。接著 HER2 將信號發送至細胞內部。信號藉助不同生化途徑傳送。此包括 PI3K/Akt 途徑及 MAPK 途徑。該等信號促進細胞之血管之侵入、存活及生長(血管生成)。

【0379】 用曲妥珠單抗處理之細胞在細胞週期之 G1 期期間經歷停滯，因此增殖減少。已表明曲妥珠單抗藉由下調 HER2/neu 誘導其部分效應，導致對受體二聚化及藉助下游 PI3K 級聯進行信號傳導之破壞。接著 P27Kip1 不會被磷酸化，且能夠進入細胞核並抑制 cdk2 活性，從而引起細胞週期停滯。此外，曲妥珠單抗藉由誘導抗血管生成因子及阻抑促血管生成因子來阻抑血管生成。認為對癌症中觀察到的不受調節之生長之作用可能歸因於導致細胞外結構域釋放之 HER2/neu 蛋白水解裂解。已顯示曲妥珠單抗抑制乳癌細胞中之 HER2/neu 胞外域裂解。

於非真核生物及真核生物中之表現

【0380】 為了獲得所選殖之 TC 多核苷酸之高水準表現，通常將編碼本發明 TC 多肽之靶向多肽之多核苷酸次選殖至表現載體中，該表現載體含有引導轉錄之強啟動子、轉錄/轉譯終止子及(若用於編碼蛋白質之核酸)用於轉譯起始之核糖體結合位點。適宜細菌啟動子係熟習此項技術者已知且闡述於例如 Sambrook 等人及 Ausubel 等人中。

【0381】 用於表現本發明之 TC 多肽之細菌表現系統可在(包括但不限於)大腸桿菌、芽孢桿菌屬種(*Bacillus sp.*)、螢光假單胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、銅綠假單胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、惡臭假單胞菌(*Pseudomonas putida*)及沙門氏桿菌屬(*Salmonella*)中獲得(Palva 等人，*Gene* 22:229-235 (1983)；Mosbach 等人，*Nature* 302:543-545 (1983))。用於該等表現系統之套組可購得。用於哺乳動物細胞、酵母細胞及昆蟲細胞之真核表現系統為熟習此項技術者已知且亦可購得。在正交 tRNA 及胺醯基 tRNA 合成酶(如上所述)用於表現本發明之 TC 多肽之情況下，用於表現之宿主細胞係基於其使用正交組分之能力來選擇。例示性宿主細胞包括革蘭氏陽性細菌(包括但不限於短芽孢桿菌(*B. brevis*)、枯草芽孢桿菌(*B. subtilis*)或鏈黴菌屬(*Streptomyces*))及革蘭氏陰性細菌(大腸桿菌、螢光假單

胞菌、銅綠假單胞菌、惡臭假單胞菌)，以及酵母及其他真核細胞。包含O-tRNA/O-RS 對之細胞可如本文所述使用。

【0382】　本發明之真核宿主細胞或非真核宿主細胞提供合成包含大量有用非天然胺基酸之蛋白質之能力。在一個態樣中，組成物視情況包括(包括但不限於)至少 10 微克、至少 50 微克、至少 75 微克、至少 100 微克、至少 200 微克、至少 250 微克、至少 500 微克、至少 1 毫克、至少 10 毫克、至少 100 毫克、至少 1 克或更多包含非天然胺基酸之蛋白質，或可利用體內蛋白質產生方法(關於重組蛋白質產生及純化之細節提供於本文中)達成之量。在另一態樣中，蛋白質視情況於(包括但不限於)細胞裂解物、緩衝液、醫藥緩衝液或另一液體懸浮液(包括但不限於體積(包括但不限於)介於約 1 nl 至約 100 L 或更大之間)中，以(包括但不限於)如下濃度存在於組成物中：每升至少 10 微克蛋白質、每升至少 50 微克蛋白質、每升至少 75 微克蛋白質、每升至少 100 微克蛋白質、每升至少 200 微克蛋白質、每升至少 250 微克蛋白質、每升至少 500 微克蛋白質、每升至少 1 毫克蛋白質或每升至少 10 毫克蛋白質或更大。在包括至少一種非天然胺基酸之真核細胞中大量(包括但不限於，大於利用(包括但不限於)體外轉譯在內之其他方法通常可能產生之量)產生蛋白質係本發明之特徵。

【0383】　編碼 TC 多肽之靶向多肽之核苷酸序列可包括或亦可不包括編碼信號肽之序列。當多肽欲自表現其之細胞中分泌時，存在信號肽。該信號肽可為任一序列。信號肽可為原核或真核的。Coloma, M (1992) J. Imm. Methods 152:89 104)闡述用於哺乳動物細胞中之信號肽(鼠類 Igκ 輕鏈信號肽)。其他信號肽包括但不限於來自釀酒酵母(S. cerevisiae)之 α 因子信號肽(美國專利第 4,870,008 號，其以引用方式併入本文中)、小鼠唾液澱粉酶之信號肽(O. Hagenbuchle 等人，Nature 289, 1981，第 643-646 頁)、經修飾之羧肽酶信號肽(L. A. Valls 等人，Cell 48, 1987，第 887-897 頁)、酵母 BAR1 信號肽(WO 87/02670，其以引用方式併入

本文中)及酵母天冬胺酸蛋白酶 3 (YAP3)信號肽(參見 M. Egel-Mitani 等人，Yeast 6, 1990，第 127-137 頁)。

【0384】 適宜哺乳動物宿主細胞之實例為熟習此項技術者已知。該等宿主細胞可為中國倉鼠卵巢(CHO)細胞(例如 CHO-K1; ATCC CCL-61)、綠猴細胞(COS)(例如 COS 1 (ATCC CRL-1650)、COS 7 (ATCC CRL-1651))；小鼠細胞(例如 NS/O)、幼倉鼠腎(BHK)細胞株(例如 ATCC CRL-1632 或 ATCC CCL-10)及人類細胞(例如 HEK 293 (ATCC CRL-1573))，以及組織培養中之植物細胞。該等細胞株及其他細胞株可自公共寄存機構(諸如美國典型培養物保藏中心(American Type Culture Collection, Rockville, Md))獲得。為了提供 TC 多肽之改良之糖基化，可修飾哺乳動物宿主細胞以表現唾液酸轉移酶，例如，1,6-唾液酸轉移酶，例如，如美國專利第 5,047,335 號中所述，該專利以引用方式併入本文中。

【0385】 用於將外源 DNA 引入哺乳動物宿主細胞中之方法包括但不限於磷酸鈣介導之轉染、電穿孔、DEAE-葡聚糖介導之轉染、脂質體介導之轉染、病毒載體以及由 Life Technologies Ltd, Paisley, UK 闡述之使用 Lipofectamin 2000 之轉染方法及由 Roche Diagnostics 公司，Indianapolis, USA 闡述之使用 FuGENE 6 之轉染方法。該等方法為此項技術中所熟知且由 Ausbel 等人(編輯)，1996，Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, USA 闡述。哺乳動物細胞之培育可根據例如如(Animal Cell Biotechnology, Methods and Protocols，Nigel Jenkins 編輯，1999, Human Press Inc. Totowa, N.J., USA 以及 Harrison Mass.及 Rae IF, General Techniques of Cell Culture, Cambridge University Press 1997)中所揭示之已確立之方法實施。

【0386】 I. *大腸桿菌、假單胞菌屬種及其他原核生物* 細菌表現技術為熟習此項技術者已知。眾多種載體可用於細菌宿主中。載體可為單拷貝或低或高多拷貝載體。載體可用於選殖及/或表現。鑒於關於載體之大量文獻、許多載體之商

業可用性、以及甚至闡述載體及其限制性圖譜及特徵之手冊，此處無需進行廣泛討論。眾所周知，載體通常涉及容許選擇之標記物，該等標記物可提供細胞毒性劑抗性、原養型或免疫性。通常，存在複數種提供不同特徵之標記物。

【0387】 細菌啟動子係能夠結合細菌 RNA 聚合酶並起始編碼序列(例如結構基因)下游(3')轉錄為 mRNA 之任何 DNA 序列。啟動子將具有通常鄰近編碼序列之 5'端放置之轉錄起始區。該轉錄起始區通常包括 RNA 聚合酶結合位點及轉錄起始位點。細菌啟動子亦可具有稱為操縱子之第二結構域，該結構域可與 RNA 合成開始處之毗鄰 RNA 聚合酶結合位點重疊。操縱子容許負調節(誘導型)轉錄，此乃因基因阻遏物可結合操縱子，且由此抑制特定基因之轉錄。組成型表現可在負調節元件(諸如操縱子)缺失下發生。此外，正調節可藉由基因活化蛋白結合序列達成，該序列若存在，通常位於 RNA 聚合酶結合序列之近端(5')。基因活化蛋白之實例係分解代謝物活化蛋白(CAP)，其有助於起始 lac 操縱子在大腸桿菌中之轉錄(參見 Raibaud 等人，ANNU. REV. GENET. (1984) 18:173)。因此，受調節之表現可為正的或負的，由此增強或減少轉錄。

【0388】 術語「細菌宿主」或「細菌宿主細胞」係指可用作或已用作重組載體或另一轉移 DNA 之接受體之細菌。該術語包括已受轉染之原始細菌宿主細胞之子代。應當理解，單一親代細胞之子代可因偶然或特意突變而未必在形態或基因體或總 DNA 互補上與原始親代完全相同。與親代足夠類似而欲以相關性質(諸如編碼 TC 多肽之核苷酸序列之存在)表徵的親代細胞之子代包括在該定義所欲指之子代中。

【0389】 用於表現 TC 多肽之適宜宿主細菌之選擇為熟習此項技術者已知。在選擇用於表現之細菌宿主時，適宜宿主可包括顯示尤其具有良好包涵體形成能力、低蛋白水解活性及總體穩健性之彼等。細菌宿主通常可自多種來源獲得，包括但不限於加利福尼亞大學生物物理及醫學物理系之細菌遺傳儲備中心

(Bacterial Genetic Stock Center, Department of Biophysics and Medical Physics, University of California) (Berkeley, CA)；及美國典型培養物保藏中心(「ATCC」) (Manassas, VA)。工業/醫藥發酵一般使用來源於 K 菌株之細菌(例如 W3110)或來源於 B 菌株之細菌(例如 BL21)。該等菌株尤其有用，此乃因其生長參數極為熟知且穩健。此外，該等菌株係非致病性的，出於安全及環境原因，此在商業上很重要。適宜大腸桿菌宿主之其他實例包括但不限於 BL21、DH10B 或其衍生物之菌株。在本發明方法之另一實施例中，大腸桿菌宿主係無蛋白酶之菌株，包括但不限於 OMP-及 LON-。宿主細胞菌株可為假單胞菌屬種，包括但不限於螢光假單胞菌、銅綠假單胞菌及惡臭假單胞菌。已知螢光假單胞菌變型 1 (指定為菌株 MB101)可用於重組產生且可用於治療性蛋白質生產過程。假單胞菌屬表現系統之實例包括可自 Dow Chemical 公司(Midland, MI，可在萬維網上於 dow.com 處獲得)作為宿主菌株獲得之系統。

【0390】　在已建立重組宿主細胞菌株(亦即，已將表現構築體引入宿主細胞中且分離出具有適宜表現構築體之宿主細胞)後，在適於產生 TC 多肽之條件下培養重組宿主細胞菌株。如熟習此項技術者將明瞭，重組宿主細胞株之培養方法將取決於所用表現構築體之性質及宿主細胞之特性。通常使用熟習此項技術者已知之方法培養重組宿主菌株。通常在液體培養基中培養重組宿主細胞，該液體培養基含有可同化之碳源、氮源及無機鹽源，且視情況含有維生素、胺基酸、生長因子及熟習此項技術者已知之其他蛋白質培養補充劑。用於培養宿主細胞之液體培養基可視情況含有抗生素或抗真菌劑以防止不期望微生物之生長，及/或包括但不限於抗生素之化合物，以選擇含有表現載體之宿主細胞。

【0391】　重組宿主細胞可以分批或連續形式培養，以分批或連續形式收穫細胞(在 TC 多肽在細胞內累積之情況下)或收穫培養上清液。對於在原核宿主細胞中之產生，分批培養及細胞收穫較佳。

【0392】　本發明之 TC 多肽通常在重組系統中表現後純化。可藉由此項技術中已知之多種方法自宿主細胞或培養基中純化 TC 多肽。細菌宿主細胞中產生之 TC 多肽可能係難溶或不溶的(呈包涵體之形式)。在本發明之一個實施例中，利用本文所揭示之方法以及此項技術中已知之方法，可容易地在 TC 多肽中進行胺基酸取代，該等胺基酸取代係出於增加重組產生之蛋白質之溶解度的目的而選擇。在不溶性蛋白質之情況下，可藉由離心自宿主細胞裂解物中收集蛋白質，且接著可進一步將細胞均質化。在難溶性蛋白質之情況下，可添加包括但不限於聚乙烯亞胺(PEI)之化合物以誘導部分溶解性蛋白質之沈澱。接著可藉由離心便利地收集沈澱之蛋白質。可使用熟習此項技術者已知之多種方法將重組宿主細胞破壞或均質化以自細胞內釋放包涵體。可使用眾所周知之技術(包括但不限於酶促細胞破壞、音波處理、杜恩斯(dounce)均質化或高壓釋放破壞)來實施宿主細胞破壞或均質化。在本發明方法之一個實施例中，使用高壓釋放技術來破壞大腸桿菌宿主細胞以釋放 TC 多肽之包涵體。在處置 TC 多肽之包涵體時，可能有利的是，儘量減少重複之均質化時間以最大限度地提高包涵體之產率，而不因諸如溶解、機械剪切或蛋白水解等因素造成損失。

【0393】　接著可使用此項技術中已知之若干適宜增溶劑中之任何一種來溶解不溶性或沈澱之 TC 多肽。可用脲或鹽酸胍溶解 TC 多肽。應將溶解之 TC 多肽之體積降至最小，使得可使用便利管理之批量大小進行大批量生產。該因素在重組宿主可以體積數千升之批次生長的大規模商業環境中可能至關重要。此外，在大規模商業環境中製造尤其用於人類醫藥用途之 TC 多肽時，應儘可能避免使用可損壞機器及容器或蛋白質產品本身之烈性化學品。在本發明之方法中已顯示，可使用較溫和之變性劑(脲)代替較烈性變性劑(鹽酸胍)來溶解 TC 多肽包涵體。脲之使用顯著降低了損壞用於 TC 多肽之製造及純化過程中之不銹鋼設備的風險，同時高效地溶解了 TC 多肽包涵體。

【0394】 在 TC 蛋白質之可溶性靶向多肽之情況下，TC 之靶向多肽可分泌至周質空間或培養基中。此外，可溶性 TC 可存在於宿主細胞之細胞質中。可能期望在實施純化步驟之前濃縮可溶性 TC。熟習此項技術者已知之標準技術可用於自例如細胞裂解物或培養基濃縮可溶性靶向多肽。此外，熟習此項技術者已知之標準技術可用於破壞宿主細胞且自宿主細胞之細胞質或周質空間釋放可溶性 TC。

【0395】 通常，有時期望使所表現之多肽變性及還原，接著使多肽再摺疊成較佳構形。舉例而言，可將胍、脲、DTT、DTE 及/或陪伴蛋白添加至所關注轉譯產物中。使蛋白質還原、變性及複性之方法係熟習此項技術者已知的(參見上述參考文獻，以及 Debinski 等人(1993) J. Biol. Chem., 268: 14065-14070；Kreitman 及 Pastan (1993) Bioconjug. Chem., 4: 581-585；及 Buchner 等人，(1992) Anal. Biochem., 205: 263-270)。Debinski 等人例如闡述了胍-DTE 中包涵體蛋白質之變性及還原。蛋白質可在含有包括但不限於氧化型麩胱甘肽及 L-精胺酸之氧化還原緩衝液中再摺疊。再摺疊試劑可流動或以其他方式移動至與一或多種多肽或另一表現產物接觸，或反之亦然。

【0396】 在原核產生 TC 多肽之情況下，由此產生之 TC 多肽可錯摺疊並因此缺乏生物活性或具有降低之生物活性。蛋白質之生物活性可藉由「再摺疊」來恢復。通常，藉由使用例如一或多種離液劑(例如脲及/或胍)及能夠還原二硫鍵之還原劑(例如二硫蘇糖醇、DTT 或 2-巰基乙醇、2-ME)對多肽鏈進行增溶(其中 TC 多肽亦不可溶)、解摺疊及還原而使錯摺疊之 TC 多肽再摺疊。在中等濃度之離液劑下，接著添加容許二硫鍵再形成之氧化劑(例如，氧、胱胺酸或胱胺)。可使用此項技術中已知之標準方法(諸如闡述於美國專利第 4,511,502 號、第 4,511,503 號及第 4,512,922 號(其以引用方式併入本文中))中之彼等使 TC 多肽再摺疊。亦可使 TC 多肽與其他蛋白質共摺疊以形成異二聚物或異多聚物。

【0397】 在再摺疊後，可進一步純化 TC 之靶向多肽。TC 之純化可使用熟習此項技術者已知之多種技術完成，包括疏水相互作用層析、尺寸排阻層析、離子交換層析、反相高效液相層析、親和層析及諸如此類或其任一組合。額外純化亦可包括乾燥或沈澱純化蛋白質之步驟。

【0398】 在純化後，可將 TC 之靶向多肽交換至不同緩衝液中，及/或藉由此項技術中已知之多種方法(包括但不限於滲濾及透析)中之任一種濃縮。作為單一純化蛋白質提供之 TC 可經受聚集及沈澱。

【0399】 TC 之經純化靶向多肽可為至少 90%純(如藉由反相高效液相層析、RP-HPLC 或十二烷基硫酸鈉-聚丙烯醯胺凝膠電泳、SDS-PAGE 所量測)或至少 95%純、或至少 96%純、或至少 97%純、或至少 98%純、或至少 99%純或更純。不管 TC 之靶向多肽之純度之確切數值如何，TC 之靶向多肽之純度皆足以用作醫藥產品或用於進一步處理，諸如與水溶性聚合物(諸如 PEG)偶聯。

【0400】 某些 TC 分子可在其他活性成分或蛋白質(賦形劑、載劑及穩定劑、血清白蛋白及諸如此類除外)缺失下用作治療劑，或者其可與另一蛋白質或聚合物複合。

【0401】 先前已顯示，藉由將化學胺醯化之阻抑型 tRNA 添加至用含有期望琥珀無義突變之基因程式化之蛋白質合成反應中，可在體外將非天然胺基酸位點特異性地併入蛋白質中。使用該等方法，可使用特定胺基酸營養缺陷性菌株，用結構緊密之同源物取代許多常見 20 種胺基酸，例如用氟苯丙胺酸取代苯丙胺酸。*參見例如* Noren, C.J., Anthony-Cahill, Griffith, M.C., Schultz, P.G. *A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins*, Science, 244: 182-188 (1989)；M.W. Nowak 等人，Science 268:439-42 (1995)；Bain, J.D., Glabe, C.G., Dix, T.A., Chamberlin, A.R., Diala, E.S. *Biosynthetic site-specific Incorporation of a non-natural amino acid into a polypeptide,* J. Am Chem Soc,

111:8013-8014 (1989)；N. Budisa 等人，FASEB J. 13:41-51 (1999)；Ellman, J.A., Mendel, D., Anthony-Cahill, S., Noren, C.J., Schultz, P.G. *Biosynthetic method for introducing unnatural amino acids site-specifically into proteins*, Methods in Enz.，第 202 卷，301-336 (1992)；以及 Mendel, D., Cornish, V.W.及 Schultz, P.G. *Site-Directed Mutagenesis with an Expanded Genetic Code*, Annu Rev Biophys. Biomol Struct. 24, 435-62 (1995)。

【0402】 舉例而言，製備識別終止密碼子 UAG 且用非天然胺基酸進行化學胺醯化之阻抑性 tRNA。使用習用定點誘變在蛋白質基因之所關注位點處引入終止密碼子 TAG。*參見例如* Sayers, J.R., Schmidt, W. Eckstein, F. 5'-3' *Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagensis*, Nucleic Acids Res, 16(3):791-802 (1988)。當醯化阻抑性 tRNA 及突變基因在體外轉錄/轉譯系統中組合時，非天然胺基酸因應於 UAG 密碼子而併入，此產生在指定位置處含有該胺基酸之蛋白質。使用[^{3}H]-Phe 之實驗及利用 α-羥基酸之實驗證實，僅期望胺基酸在由UAG密碼子指定之位置處併入且該胺基酸未在蛋白質中之任一其他位點處併入。*參見例如* Noren 等人，見上文；Kobayashi 等人，(2003) Nature Structural Biology 10(6):425-432；及 Ellman, J.A., Mendel, D., Schultz, P.G. *Site-specific incorporation of novel backbone structures into proteins,* Science, 255(5041):197-200 (1992)。

【0403】 可藉由任一方法或技術(包括但不限於化學或酶促胺醯化)，用期望胺基酸將 tRNA 胺醯化。

【0404】 胺醯化可藉由胺醯基 tRNA 合成酶或其他酶促分子(包括但不限於核酶)來完成。術語「核酶」可與「催化 RNA」互換。Cech 及合作者(Cech, 1987, Science, 236:1532-1539；McCorkle 等人，1987, Concepts Biochem. 64:221-226)證實了可用作催化劑(核酶)的天然存在之 RNA 之存在。然而，儘管已顯示該等天然 RNA 觸

媒僅作用於核糖核酸受質以進行裂解及剪接，但核酶人工進化之最新進展已將催化譜擴展至各種化學反應。研究已鑑別出可催化其自身(2')3'-末端上之胺醯基-RNA 鍵之 RNA 分子(Illangakekare 等人，1995 Science 267:643-647)以及可將胺基酸自一個 RNA 分子轉移至另一個 RNA 分子之 RNA 分子(Lohse 等人，1996, Nature 381:442-444)。

【0405】 美國專利申請公開案 2003/0228593 (其以引用方式併入本文中)闡述了構築核酶之方法以及其在用天然編碼及非天然編碼之胺基酸將 tRNA 胺醯化中之用途。可胺醯化 tRNA 之基質固定化形式之酶分子(包括但不限於核酶)可使得能夠實現胺醯化產物之高效親和純化。適宜基質之實例包括瓊脂糖、瓊脂糖凝膠及磁珠。用於胺醯化之基質固定化形式之核酶的產生及用途闡述於 Chemistry and Biology 2003, 10:1077-1084 及美國專利申請公開案 2003/0228593 (其以引用方式併入本文中)中。

【0406】 化學胺醯化方法包括但不限於由以下介紹之彼等：Hecht 及合作者 (Hecht, S. M. Acc. Chem. Res. 1992, 25, 545；Heckler, T. G.; Roesser, J. R.; Xu, C.; Chang, P.; Hecht, S. M. Biochemistry 1988, 27, 7254；Hecht, S. M.; Alford, B. L.; Kuroda, Y.; Kitano, S. J. Biol. Chem. 1978, 253, 4517) 以及 Schultz, Chamberlin, Dougherty 等人(Cornish, V. W.; Mendel, D.; Schultz, P. G. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1995, 34, 621；Robertson, S. A.; Ellman, J. A.; Schultz, P. G. J. Am. Chem. Soc. 1991, 113, 2722；Noren, C. J.; Anthony-Cahill, S. J.; Griffith, M. C.; Schultz, P. G. Science 1989, 244, 182；Bain, J. D.; Glabe, C. G.; Dix, T. A.; Chamberlin, A. R. J. Am. Chem. Soc. 1989, 111, 8013；Bain, J. D.等人，Nature 1992, 356, 537；Gallivan, J. P.; Lester, H. A.; Dougherty, D. A. Chem. Biol. 1997, 4, 740；Turcatti 等人，J. Biol. Chem. 1996, 271, 19991；Nowak, M. W.等人，Science, 1995, 268, 439；Saks, M. E. 等人，J. Biol. Chem. 1996, 271, 23169；Hohsaka, T.等人，J. Am. Chem. Soc. 1999,

121, 34) (其以引用方式併入本文中)，以避免在胺醯化中使用合成酶。該等方法或其他化學胺醯化方法可用於將 tRNA 分子胺醯化。

【0407】 用於生成催化 RNA 之方法可涉及生成隨機化核酶序列之單獨彙集物，對該等彙集物實施定向進化，針對所期望之胺醯化活性篩選該等彙集物，以及選擇彼等展現出所期望胺醯化活性之核酶之序列。

【0408】 亦可使用經重構之轉譯系統。亦已將經純化轉譯因子之混合物，以及裂解物或補充有經純化轉譯因子(諸如起始因子 1 (IF-1)、IF-2、IF-3 (α 或 β)、延長因子 T (EF-Tu)或終止因子)之裂解物之組合成功用於將 mRNA 轉譯成蛋白質。無細胞系統亦可為偶合之轉錄/轉譯系統，其中如 *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel 等人編輯，Wiley Interscience, 1993) (其特此以引用方式明確併入)中所述，將 DNA 引入該系統中，轉錄成 mRNA，且將 mRNA 轉譯。在真核轉錄系統中轉錄之 RNA 可呈異核 RNA (hnRNA)或 5′-末端帽(7-甲基鳥苷)及尾接 3′-末端聚 A 之成熟 mRNA 之形式，此在某些轉譯系統中可能係優勢。舉例而言，加帽之 mRNA 在網狀紅血球裂解物系統中以高效轉譯。

與 TC 多肽偶合之大分子聚合物

【0409】 可使用本文所述之組成物、方法、技術及策略來達成對本文所述之非天然胺基酸多肽之各種修飾。該等修飾包括將又一官能基併入至多肽之非天然胺基酸組分上，包括但不限於標記；染料；聚合物；水溶性聚合物；聚乙二醇之衍生物；光交聯劑；放射性核種；細胞毒性化合物；藥物；親和標記；光親和標記；反應性化合物；樹脂；第二蛋白質或多肽或多肽類似物；抗體或抗體片段；金屬螯合劑；輔因子；脂肪酸；碳水化合物；多核苷酸；DNA；RNA；反義多核苷酸；糖；水溶性樹枝狀聚合物；環糊精；抑制性核糖核酸；生物材料；奈米粒子；自旋標記；螢光團；含金屬部分；放射性部分；新穎官能基；與其他分子共價或非共價相互作用之基團；光籠蔽部分；光化輻射可激發部分；

可光異構化部分；生物素；生物素之衍生物；生物素類似物；併入重原子之部分；化學可裂解基團；可光裂解基團；延長之側鏈；碳連接之糖；氧化還原活性劑；胺基硫代酸；毒性部分；經同位素標記之部分；生物物理探針；發磷光基團；化學發光基團；電子緻密基團；磁性基團；嵌入基團；發色團；能量轉移劑；生物活性劑；可偵測標記；小分子；量子點；奈米發射體；放射性核苷酸；放射性發射體；中子俘獲劑；或上述之任一組合或任一其他期望化合物或物質。作為本文所述組成物、方法、技術及策略之說明性的非限制性實例，藉助以下理解，以下闡述將集中於向非天然胺基酸多肽中添加大分子聚合物：針對其所闡述之組成物、方法、技術及策略亦適用於(若需要且熟習此項技術者可利用本文之揭示內容做出適當之修改)添加其他官能基(包括但不限於上文所列出之彼等)。

【0410】　眾多種大分子聚合物及其他分子可連接至本發明之 TC 多肽以調節 TC 多肽之生物性質，及/或為 TC 分子提供新的生物性質。該等大分子聚合物可經由天然編碼之胺基酸，經由非天然編碼之胺基酸、或天然或非天然胺基酸之任一官能取代基、或添加至天然或非天然胺基酸之任一取代基或官能基連接至 TC 多肽。聚合物之分子量可具有寬範圍，包括但不限於介於約 100 Da 與約 100,000 Da 或更大之間。聚合物之分子量可介於約 100 Da 與約 100,000 Da 之間，包括但不限於 100,000 Da、95,000 Da、90,000 Da、85,000 Da、80,000 Da、75,000 Da、70,000 Da、65,000 Da、60,000 Da、55,000 Da、50,000 Da、45,000 Da、40,000 Da、35,000 Da、30,000 Da、25,000 Da、20,000 Da、15,000 Da、10,000 Da、9,000 Da、8,000 Da、7,000 Da、6,000 Da、5,000 Da、4,000 Da、3,000 Da、2,000 Da、1,000 Da、900 Da、800 Da、700 Da、600 Da、500 Da、400 Da、300 Da、200 Da 及 100 Da。在一些實施例中，聚合物之分子量介於約 100 Da 與約 50,000 Da 之間。在一些實施例中，聚合物之分子量介於約 100 Da 與約 40,000 Da 之間。在

一些實施例中，聚合物之分子量介於約 1,000 Da 與約 40,000 Da 之間。在一些實施例中，聚合物之分子量介於約 5,000 Da 與約 40,000 Da 之間。在一些實施例中，聚合物之分子量介於約 10,000 Da 與約 40,000 Da 之間。

【0411】　本發明提供聚合物:蛋白質偶聯物之實質上均質之製劑。如本文所用之「實質上均質」意指觀察到聚合物:蛋白質偶聯物分子大於總蛋白質之一半。聚合物:蛋白質偶聯物具有生物活性，且本文所提供之本「實質上均質」之聚乙二醇化 TC 多肽製劑係足夠同質以展示均質製劑之優點(例如，在批次間藥物動力學之可預測性方面易於臨床應用)之彼等。

【0412】　亦可選擇製備聚合物:蛋白質偶聯物分子之混合物，且本文所提供之優點在於可選擇單聚合物:蛋白質偶聯物包括在混合物中之比例。因此，若期望，可製備附著有不同數目之聚合物部分(亦即二-、三-、四-等)之各種蛋白質之混合物，且將該等偶聯物與使用本發明之方法製備之單聚合物:蛋白質偶聯物組合，且具有含預定比例之單聚合物:蛋白質偶聯物之混合物。

【0413】　所選聚合物可為水溶性的，使得其所附著之蛋白質不會在水性環境(諸如生理環境)中沈澱。聚合物可為具支鏈或不具支鏈的。對於終產物製劑之治療用途而言，聚合物將為醫藥學上可接受的。

【0414】　聚合物之實例包括但不限於聚烷基醚及其烷氧基封端之類似物(例如，聚氧乙二醇、聚氧乙二醇/丙二醇及其甲氧基或乙氧基封端之類似物，尤其聚氧乙二醇，後者亦稱為聚乙二醇或 PEG)；聚乙烯基吡咯啶酮；聚乙烯基烷基醚；聚噁唑啉、聚烷基噁唑啉及聚羥基烷基噁唑啉；聚丙烯醯胺、聚烷基丙烯醯胺及聚羥基烷基丙烯醯胺(例如，聚羥丙基甲基丙烯醯胺及其衍生物)；聚丙烯酸羥基烷基酯；聚唾液酸及其類似物；親水肽序列；多糖及其衍生物，包括葡聚糖及葡聚糖衍生物，例如，羧甲基葡聚糖、硫酸葡聚糖、胺基葡聚糖；纖維素及其衍生物，例如，羧甲基纖維素、羥基烷基纖維素；幾丁質及其衍生物，

例如，幾丁聚糖、琥珀醯基幾丁聚糖、羧甲基幾丁質、羧甲基幾丁聚糖；透明質酸及其衍生物；澱粉；海藻酸鹽；硫酸軟骨素；白蛋白；聚三葡萄糖及羧甲基聚三葡萄糖；聚胺基酸及其衍生物，例如，聚麩胺酸、聚離胺酸、聚天冬胺酸、聚天冬醯胺；馬來酸酐共聚物，諸如：苯乙烯馬來酸酐共聚物、二乙烯基乙基醚馬來酸酐共聚物；聚乙烯醇；其共聚物；其三元共聚物；其混合物；以及上述之衍生物。

【0415】　聚乙二醇分子與蛋白質分子之比例將會變化，其在反應混合物中之濃度亦將變化。通常，最佳比率(就反應效率而言，乃因存在最小過量之未反應蛋白質或聚合物)可由所選聚乙二醇之分子量及可用反應基團之數目確定。關於分子量，通常聚合物之分子量愈高，可附著至蛋白質之聚合物分子之數目愈少。類似地，在最佳化該等參數時應考慮聚合物之支化。通常，分子量愈高(或支鏈愈多)，聚合物:蛋白質比率愈高。

【0416】　如本文所用，且當涵蓋 PEG:TC 多肽偶聯物時，術語「治療有效量」係指給予患者期望益處之量。該量將隨個體不同而變化，且將取決於若干因素，包括患者之總體身體狀況及欲治療疾患之潛在病原。用於療法之 TC 多肽之量產生可接受之變化率且將期望反應維持在有益之水準。熟習此項技術者使用公開可獲得之材料及程式可容易地確定本發明組成物之治療有效量。

【0417】　水溶性聚合物可為任一結構形式，包括但不限於直鏈的、分叉的或支化的。通常，水溶性聚合物係聚(伸烷基二醇)，諸如聚(乙二醇) (PEG)，但亦可採用其他水溶性聚合物。舉例而言，使用 PEG 來闡述本發明之某些實施例。

【0418】　PEG 係眾所周知之水溶性聚合物，其可購得或可藉由根據熟習此項技術者已知之方法進行乙二醇之開環聚合來製備(Sandler 及 Karo，Polymer Synthesis, Academic Press, New York，第 3 卷，第 138-161 頁)。術語「PEG」廣泛用於涵蓋任一聚乙二醇分子，而不考慮大小或在 PEG 之末端處之修飾，且可

表示為藉由下式連接至 TC 多肽：

$XO-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-Y$

其中 n 係 2 至 10,000 且 X 係 H 或末端修飾，包括但不限於 C_{1-4} 烷基、保護基團或末端官能基。

【0419】　在一些情況下，用於本發明中之 PEG 在一端以羥基或甲氧基封端，亦即，X 係 H 或 CH_3（「甲氧基 PEG」）。或者，PEG 可以反應基團封端，由此形成雙官能聚合物。典型反應基團可包括通常用於與 20 種常見胺基酸中發現之官能基(包括但不限於馬來醯亞胺基、活化之碳酸酯(包括但不限於對硝基苯酯)、活化之酯(包括但不限於 N-羥基琥珀醯亞胺、對硝基苯酯)及醛)以及對 20 種常見胺基酸呈惰性但與存在於非天然編碼之胺基酸中之互補官能基(包括但不限於疊氮基、炔基)特異性反應之彼等官能基。應注意，在上式中以 Y 表示之 PEG 之另一端將經由天然存在或非天然編碼之胺基酸直接或間接附著至 TC 多肽。例如，Y 可為至多肽之胺基(包括但不限於離胺酸之 ε 胺或 *N*-末端)之醯胺、胺基甲酸酯或脲鍵聯。或者，Y 可為至硫醇基(包括但不限於半胱胺酸之硫醇基)之馬來醯亞胺鍵聯。或者，Y 可為至通常經由 20 種常見胺基酸不可觸及之殘基之鍵聯。舉例而言，PEG 上之疊氮基可與 TC 多肽上之炔基反應以形成 Huisgen [3+2]環加成產物。或者，PEG 上之炔基可與存在於非天然編碼之胺基酸中之疊氮基反應以形成類似產物。在一些實施例中，強親核劑(包括但不限於肼、醯肼、羥胺、胺基脲)可與存在於非天然編碼之胺基酸中之醛或酮基團反應以形成腙、肟或縮胺基脲(視需要)，其在有些情況可藉由用適當還原劑處理來進一步減少。或者，強親核劑可經由非天然編碼之胺基酸併入 TC 多肽中，且用於優先與存在於水溶性聚合物中之酮基或醛基反應。

【0420】　可根據實際期望使用 PEG 之任何分子質量，包括但不限於約 100 道爾頓(Da)至 100,000 Da 或更大(有時包括但不限於 0.1-50 kDa 或 10-40 kDa)。PEG

之分子量可具有寬範圍，包括但不限於介於約 100 Da 與約 100,000 Da 或更大之間。PEG 可介於約 100 Da 與約 100,000 Da 之間，包括但不限於 100,000 Da、95,000 Da、90,000 Da、85,000 Da、80,000 Da、75,000 Da、70,000 Da、65,000 Da、60,000 Da、55,000 Da、50,000 Da、45,000 Da、40,000 Da、35,000 Da、30,000 Da、25,000 Da、20,000 Da、15,000 Da、10,000 Da、9,000 Da、8,000 Da、7,000 Da、6,000 Da、5,000 Da、4,000 Da、3,000 Da、2,000 Da、1,000 Da、900 Da、800 Da、700 Da、600 Da、500 Da、400 Da、300 Da、200 Da 及 100 Da。在一些實施例中，PEG 介於約 100 Da 與約 50,000 Da 之間。在一些實施例中，PEG 介於約 100 Da 與約 40,000 Da 之間。在一些實施例中，PEG 介於約 1,000 Da 與約 40,000 Da 之間。在一些實施例中，PEG 介於約 5,000 Da 與約 40,000 Da 之間。在一些實施例中，PEG 介於約 10,000 Da 與約 40,000 Da 之間。亦可使用具支鏈 PEG，包括但不限於每條鏈之分子量在 1-100 kDa (包括但不限於 1-50 kDa 或 5-20 kDa)範圍內之 PEG 分子。具支鏈 PEG 之每條鏈之分子量可包括但不限於介於約 1,000 Da 與約 100,000 Da 或更大之間。具支鏈 PEG 之每條鏈之分子量可介於約 1,000 Da 與約 100,000 Da 之間，包括但不限於 100,000 Da、95,000 Da、90,000 Da、85,000 Da、80,000 Da、75,000 Da、70,000 Da、65,000 Da、60,000 Da、55,000 Da、50,000 Da、45,000 Da、40,000 Da、35,000 Da、30,000 Da、25,000 Da、20,000 Da、15,000 Da、10,000 Da、9,000 Da、8,000 Da、7,000 Da、6,000 Da、5,000 Da、4,000 Da、3,000 Da、2,000 Da 及 1,000 Da。在一些實施例中，具支鏈 PEG 之每條鏈之分子量介於約 1,000 Da 與約 50,000 Da 之間。在一些實施例中，具支鏈 PEG 之每條鏈之分子量介於約 1,000 Da 與約 40,000 Da 之間。在一些實施例中，具支鏈 PEG 之每條鏈之分子量介於約 5,000 Da 與約 40,000 Da 之間。在一些實施例中，具支鏈 PEG 之每條鏈之分子量介於約 5,000 Da 與約 20,000 Da 之間。寬範圍之 PEG 分子闡述於(包括但不限於) Shearwater Polymers 公司目錄、Nektar Therapeutics 目

錄(其以引用方式併入本文中)中。

【0421】 通常，PEG 分子之至少一個末端可用於與非天然編碼之胺基酸反應。舉例而言，帶有用於與胺基酸側鏈反應之炔烴及疊氮化物部分之 PEG 衍生物或 TLR-連接體衍生物可用於將 PEG 附著至如本文所述之非天然編碼之胺基酸。若非天然編碼之胺基酸包含疊氮化物，則 PEG 通常將含有炔烴部分以實現[3+2]環加成產物之形成，或含有膦基之經活化 PEG 物質(亦即酯、碳酸酯)以實現醯胺鍵之形成。或者，若非天然編碼之胺基酸包含炔烴，則 PEG 通常將含有疊氮化物部分以實現[3+2] Huisgen 環加成產物之形成。若非天然編碼之胺基酸包含羰基，則 PEG 通常將包含強效親核劑(包括但不限於醯肼、肼、羥胺或胺基脲官能基)以分別實現對應腙、肟及縮胺基脲鍵聯之形成。在其他替代方案中，可使用上述反應基團之相反取向，亦即，可使非天然編碼之胺基酸中之疊氮化物部分與含有炔烴之 PEG 衍生物反應。

【0422】 在一些實施例中，具有 PEG 衍生物之 TC 多肽含有與存在於非天然編碼之胺基酸側鏈上之化學官能基反應的化學官能基。

【0423】 本發明在一些實施例中提供包含具有約 800 Da 至約 100,000 Da 之平均分子量之水溶性聚合物主鏈的含疊氮化物及乙炔之聚合物衍生物。水溶性聚合物之聚合物主鏈可為聚(乙二醇)。然而，應當理解，多種水溶性聚合物，包括但不限於聚(伸乙基)二醇及其他相關聚合物，包括聚(葡聚糖)及聚(丙二醇)亦適用於實施本發明，且術語 PEG 或聚(乙二醇)之用途意欲涵蓋且包括所有該等分子。術語 PEG 包括但不限於呈其任何形式之聚(乙二醇)，包括雙官能 PEG、多臂 PEG、衍生化 PEG、分叉 PEG、具支鏈 PEG、側接 PEG (即具有一或多個側接至聚合物主鏈之官能基之 PEG 或相關聚合物)、或其中具有可降解鍵聯之 PEG。

【0424】 PEG 通常透明、無色、無味、可溶於水、對熱穩定、對許多化學試

劑呈惰性、不水解或變質，且通常無毒。認為聚乙二醇係生物相容的，亦即 PEG 能夠與活組織或生物體共存而不會造成傷害。更特定而言，PEG 係實質上非免疫原性的，亦即該 PEG 不傾向於在體內產生免疫反應。當附著至在體內具有某種期望功能之分子(諸如生物活性劑)時，PEG 趨向於遮蔽該劑且可降低或消除任何免疫反應，使得生物體可耐受該劑之存在。PEG 偶聯物傾向於不產生實質性免疫反應或引起凝血或其他不期望效應。具有式-- CH_2CH_2O--$(CH_2CH_2O)_n$ --CH_2CH_2--之 PEG 適用於本發明中，其中 n 係約 3 至約 4000，通常為約 20 至約 2000。在本發明之一些實施例中，具有約 800 Da 至約 100,000 Da 之分子量之 PEG 特別可用作聚合物主鏈。PEG 之分子量可具有寬範圍，包括但不限於介於約 100 Da 與約 100,000 Da 或更大之間。PEG 之分子量可介於約 100 Da 與約 100,000 Da 之間，包括但不限於 100,000 Da、95,000 Da、90,000 Da、85,000 Da、80,000 Da、75,000 Da、70,000 Da、65,000 Da、60,000 Da、55,000 Da、50,000 Da、45,000 Da、40,000 Da、35,000 Da、30,000 Da、25,000 Da、20,000 Da、15,000 Da、10,000 Da、9,000 Da、8,000 Da、7,000 Da、6,000 Da、5,000 Da、4,000 Da、3,000 Da、2,000 Da、1,000 Da、900 Da、800 Da、700 Da、600 Da、500 Da、400 Da、300 Da、200 Da 及 100 Da。在一些實施例中，PEG 之分子量介於約 100 Da 與約 50,000 Da 之間。在一些實施例中，PEG 之分子量介於約 100 Da 與約 40,000 Da 之間。在一些實施例中，PEG 之分子量介於約 1,000 Da 與約 40,000 Da 之間。在一些實施例中，PEG 之分子量介於約 5,000 Da 與約 40,000 Da 之間。在一些實施例中，PEG 之分子量介於約 10,000 Da 與約 40,000 Da 之間。

【0425】 聚合物主鏈可為直鏈或具支鏈的。具支鏈聚合物主鏈為此項技術中眾所周知。通常，具支鏈聚合物具有中心支鏈核心部分及複數個連接至中心支鏈核心之直鏈聚合物鏈。PEG 通常以具支鏈形式使用，該等形式可藉由將環氧乙烷加成至各種多元醇(諸如甘油、甘油寡聚物、新戊四醇及山梨糖醇)來製備。

中央支鏈部分亦可衍生自若干胺基酸，諸如離胺酸。具支鏈聚(乙二醇)可以一般形式表示為 $R(\text{-PEG-OH})_m$，其中 R 衍生自核心部分，諸如甘油、甘油寡聚物或新戊四醇，且 m 表示臂之數目。多臂 PEG 分子，諸如闡述於美國專利第 5,932,462 號、第 5,643,575 號、第 5,229,490 號、第 4,289,872 號；美國專利申請案 2003/0143596；WO 96/21469；及 WO 93/21259 (其每一者皆全文以引用方式併入本文中)中之彼等亦可用作聚合物主鏈。

【0426】 具支鏈 PEG 亦可呈由 $PEG(\text{--}YCHZ_2)_n$ 表示之分叉 PEG 形式，其中 Y 係連接基團，且 Z 係藉由限定長度之原子鏈連接至 CH 之經活化末端基團。又一具支鏈形式(側接 PEG)沿 PEG 主鏈而非 PEG 鏈之末端具有反應基團，諸如羧基。

【0427】 除了該等形式之 PEG 之外，聚合物亦可製備成在主鏈中具有弱的或可降解的鍵聯。舉例而言，PEG 可製備成在聚合物主鏈中具有經受水解之酯鍵聯。如下文所示，該水解導致聚合物裂解成較低分子量之片段：

$$\text{-PEG-CO}_2\text{-PEG-+H}_2\text{O} \rightarrow \text{PEG-CO}_2\text{H+HO-PEG-}$$

熟習此項技術者應當理解，術語聚(乙二醇)或 PEG 表示或包括此項技術中已知之所有形式，包括但不限於本文所揭示之彼等。

【0428】 許多其他聚合物亦適用於本發明中。在一些實施例中，具有 2 至約 300 個末端之水溶性聚合物主鏈在本發明中特別有用。適宜聚合物之實例包括但不限於其他聚(伸烷基二醇)，諸如聚(丙二醇) (「PPG」)、其共聚物(包括但不限於乙二醇及丙二醇之共聚物)、其三元共聚物、其混合物及諸如此類。儘管聚合物主鏈之每條鏈之分子量可變化，但其通常在約 800 Da 至約 100,000 Da 之範圍內，經常為約 6,000 Da 至約 80,000 Da。聚合物主鏈之每條鏈之分子量可介於約 100 Da 與約 100,000 Da 之間，包括但不限於 100,000 Da、95,000 Da、90,000 Da、85,000 Da、80,000 Da、75,000 Da、70,000 Da、65,000 Da、60,000 Da、55,000 Da、50,000 Da、45,000 Da、40,000 Da、35,000 Da、30,000 Da、25,000 Da、20,000 Da、

15,000 Da、10,000 Da、9,000 Da、8,000 Da、7,000 Da、6,000 Da、5,000 Da、4,000 Da、3,000 Da、2,000 Da、1,000 Da、900 Da、800 Da、700 Da、600 Da、500 Da、400 Da、300 Da、200 Da 及 100 Da。在一些實施例中，聚合物主鏈之每條鏈之分子量介於約 100 Da 與約 50,000 Da 之間。在一些實施例中，聚合物主鏈之每條鏈之分子量介於約 100 Da 與約 40,000 Da 之間。在一些實施例中，聚合物主鏈之每條鏈之分子量介於約 1,000 Da 與約 40,000 Da 之間。在一些實施例中，聚合物主鏈之每條鏈之分子量介於約 5,000 Da 與約 40,000 Da 之間。在一些實施例中，聚合物主鏈之每條鏈之分子量介於約 10,000 Da 與約 40,000 Da 之間。

【0429】 熟習此項技術者將認識到，上述實質上水溶性主鏈之列表絕非窮盡性的，而僅係說明性的，且具有上述品質之所有聚合物材料皆視為適用於本發明中。

【0430】 在本發明之一些實施例中，聚合物衍生物係「多官能的」，意味著聚合物主鏈具有經官能基官能化或活化之至少兩個末端，且可能多達約 300 個末端。多官能聚合物衍生物包括但不限於具有兩個末端之直鏈聚合物，每一末端可鍵結至相同或不同之官能基。

【0431】 術語「受保護」係指在某些反應條件下防止化學反應性官能基反應之保護基團或部分之存在。保護基團將取決於受保護化學反應基團之類型而變化。舉例而言，若化學反應基團係胺或醯肼，則保護基團可選自第三丁氧基羰基(t-Boc)及 9-芴基甲氧基羰基(Fmoc)之群。若化學反應基團係硫醇，則保護基團可為鄰吡啶基二硫化物。若化學反應基團係羧酸，諸如丁酸或丙酸，或羥基，則保護基團可為苄基或烷基，諸如甲基、乙基或第三丁基。此項技術中已知之其他保護基團亦可用於本發明中。

【0432】 文獻中之末端官能基之特定實例包括但不限於碳酸 N-琥珀醯亞胺基酯(參見例如美國專利第 5,281,698 號、第 5,468,478 號)、胺(參見例如 Buckmann

等人，Makromol. Chem. 182:1379 (1981)；Zalipsky 等人，Eur. Polym. J. 19:1177 (1983))、醯肼(參見例如 Andresz 等人，Makromol. Chem. 179:301 (1978))、丙酸琥珀醯亞胺基酯及丁酸琥珀醯亞胺基酯(參見例如 Olson 等人，Poly(ethylene glycol) Chemistry & Biological Applications，第 170-181 頁，Harris 及 Zalipsky 編輯，ACS, Washington, D.C., 1997；亦參見美國專利第 5,672,662 號)、琥珀酸琥珀醯亞胺基酯(參見例如 Abuchowski 等人，Cancer Biochem. Biophys. 7:175 (1984) 和 Joppich 等人，Makromol. Chem. 180:1381 (1979)、琥珀醯亞胺基酯(參見例如美國專利第 4,670,417 號)、苯并三唑碳酸酯(參見例如美國專利第 5,650,234 號)、縮水甘油基醚(參見例如 Pitha 等人，Eur. J Biochem. 94:11 (1979)；Elling 等人，Biotech. Appl. Biochem. 13:354 (1991)、氧基羰基咪唑(參見例如 Beauchamp 等人，Anal. Biochem. 131:25 (1983)、Tondelli 等人，J. Controlled Release 1:251 (1985))、碳酸對硝基苯基酯(參見例如 Veronese 等人，Appl. Biochem. Biotech., 11: 141 (1985)；及 Sartore 等人，Appl. Biochem. Biotech., 27:45 (1991))、醛(參見例如 Harris 等人，J. Polym. Sci. Chem. Ed. 22:341 (1984)、美國專利第 5,824,784 號、美國專利第 5,252,714 號)、馬來醯亞胺(參見例如 Goodson 等人，Biotechnology (NY) 8:343 (1990)；Romani 等人，Chemistry of Peptides and Proteins 2:29 (1984)) 及 Kogan, Synthetic Comm. 22:2417 (1992))、鄰吡啶基二硫化物(參見例如 Woghiren, 等人，Bioconj. Chem. 4:314(1993))、丙烯醯基(acrylol) (參見例如 Sawhney 等人，Macromolecules, 26:581 (1993))、乙烯基碸(參見例如美國專利第 5,900,461 號)。所有上述參考文獻及專利皆以引用方式併入本文。

【0433】 藉由任一便利方法實施含有非天然編碼之胺基酸(諸如*對*疊氮基-L-苯丙胺酸)之 TC 多肽之聚乙二醇化(亦即，添加任一水溶性聚合物)。舉例而言，用經炔烴封端之 mPEG 衍生物將 TC 多肽聚乙二醇化。簡言之，於室溫下，在攪拌下將過量之固體 mPEG(5000)-O-CH_2-C≡CH 添加至含*對*疊氮基-L-Phe 之 TC 多

肽之水溶液中。通常，用具有接近實施反應之 pH (通常約 pH 4-10)之 pK_a的緩衝液緩衝水溶液。用於在 pH 7.5 下進行聚乙二醇化之適宜緩衝液之實例例如包括但不限於 HEPES、磷酸鹽、硼酸鹽、TRIS-HCl、EPPS 及 TES。若有必要，連續監測並調整 pH。通常使反應持續約 1-48 小時。

【0434】 隨後使反應產物經受疏水相互作用層析，以將聚乙二醇化 TC 多肽與游離 mPEG(5000)-O-CH_2-C≡CH 及聚乙二醇化 TC 多肽之任何高分子量複合物分離，該等複合物可於未封閉之 PEG 在分子之兩端被活化、由此使 TC 多肽分子交聯時形成。疏水相互作用層析期間之條件使得游離 mPEG(5000)-O-CH_2-C≡CH 流過層析管柱，而任何交聯之聚乙二醇化 TC 多肽複合物皆在含有一種與一或多個 PEG 基團偶聯的 TC 多肽分子之期望形式後溶析。適宜條件取決於交聯複合物相較於期望偶聯物之相對大小而變化，且容易熟習此項技術者確定。將含有期望偶聯物之溶析液藉由超濾濃縮且藉由滲濾去鹽。

【0435】 實質上純化之 PEG-TC 可使用上文所概述之溶析方法產生，其中所產生之 PEG-TC 具有至少約 30%、至少約 35%、至少約 40%、至少約 45%、至少約 50%、至少約 55%、至少約 60%、至少約 65%、至少約 70%之純度水準，特定而言，至少約 75%、80%、85%之純度水準，且更特定而言，至少約 90%之純度水準、至少約 95%之純度水準、至少約 99%或更大之純度水準，如藉由諸如 SDS/PAGE 分析、RP-HPLC、SEC 及毛細管電泳等適當方法所確定。若需要，可藉由熟習此項技術者已知之一或多種程序進一步純化自疏水層析獲得之聚乙二醇化 TC 多肽，該等程序包括但不限於親和層析；陰離子或陽離子交換層析(使用包括但不限於 DEAE SEPHAROSE)；矽膠上之層析；反相 HPLC；凝膠過濾(使用包括但不限於 SEPHADEX G-75)；疏水相互作用層析；尺寸排阻層析，金屬螯合層析；超濾/滲濾；乙醇沈澱；硫酸銨沈澱；層析聚焦；置換層析；電泳程序(包括但不限於製備型等電聚焦)、差異溶解度(包括但不限於硫酸銨沈澱)或提

取。表觀分子量可藉由 GPC，藉由與球狀蛋白質標準品比較來估計(Preneta, AZ in PROTEIN PURIFICATION METHODS, A PRACTICAL APPROACH (Harris 及 Angal 編輯) IRL Press 1989, 293-306)。TC-PEG 偶聯物之純度可藉由蛋白水解降解(包括但不限於胰蛋白酶裂解)、接著進行質譜分析來評估。Pepinsky RB., 等人，*J. Pharmcol. & Exp. Ther.* 297(3):1059-66 (2001)。

【0436】 連接至本發明 TC 多肽之靶向多肽之胺基酸的水溶性聚合物可不受限制地進一步經衍生化或取代。

含疊氮化物之 PEG 衍生物或 TLR-連接體衍生物

【0437】 在本發明之另一實施例中，TC 之靶向多肽經 PEG 衍生物修飾，該 PEG 衍生物含有將與存在於非天然編碼胺基酸之側鏈上之炔烴部分反應的疊氮化物部分。通常，PEG 衍生物或 TLR-連接體衍生物將具有在 1-100 kDa、在一些實施例中 10-40 kDa 範圍內之平均分子量。

【0438】 在一些實施例中，疊氮化物末端 PEG 衍生物將具有以下結構：

$RO\text{-}(CH_2CH_2O)_n\text{-}O\text{-}(CH_2)_m\text{-}N_3$

其中 R 係簡單烷基(甲基、乙基、丙基等)，m 係 2-10 且 n 係 100-1,000 (亦即，平均分子量介於 5-40 kDa 之間)。

【0439】 在另一實施例中，疊氮化物末端 PEG 衍生物將具有以下結構：

$RO\text{-}(CH_2CH_2O)_n\text{-}O\text{-}(CH_2)_m\text{-}NH\text{-}C(O)\text{-}(CH_2)_p\text{-}N_3$

其中 R 係簡單烷基(甲基、乙基、丙基等)，m 係 2-10，p 係 2-10 且 n 係 100-1,000 (亦即，平均分子量介於 5-40 kDa 之間)。

【0440】 在本發明之另一實施例中，包含含炔烴之胺基酸之 TC 靶向多肽經含有末端疊氮化物部分之具支鏈 PEG 衍生物修飾，具支鏈 PEG 之每一鏈皆具有在 10-40 kDa 範圍內之分子量且可為 5-20 kDa。例如，在一些實施例中，疊氮化物末端 PEG 衍生物將具有以下結構：

$[RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)]_2CH(CH_2)_m-X-(CH_2)_pN_3$

其中 R 係簡單烷基(甲基、乙基、丙基等)，m 係 2-10，p 係 2-10，且 n 係 100-1,000，且 X 視情況係 O、N、S 或羰基(C=O)，其在每一情形下可存在或缺失。

含炔烴之 PEG 衍生物或 TLR-連接體衍生物

【0441】 在本發明之另一實施例中，TC 之靶向多肽經 PEG 衍生物修飾，該 PEG 衍生物含有將與存在於非天然編碼胺基酸之側鏈上之疊氮化物部分反應的炔烴部分。

【0442】 在一些實施例中，炔烴末端 PEG 衍生物將具有以下結構：

$RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-C\equiv CH$

其中 R 係簡單烷基(甲基、乙基、丙基等)，m 係 2-10 且 n 係 100-1,000 (亦即，平均分子量介於 5-40 kDa 之間)。

【0443】 在本發明之另一實施例中，包含含炔烴之非天然編碼胺基酸之 TC 靶向多肽經 PEG 衍生物修飾，該 PEG 衍生物含有藉助醯胺鍵聯連接至 PEG 主鏈之末端疊氮化物或末端炔烴部分。

【0444】 在一些實施例中，炔烴末端 PEG 衍生物將具有以下結構：

$RO-(CH_2CH_2O)_n\ -O-(CH_2)_m-NH-C(O)-(CH_2)_p-C\equiv CH$

其中 R 係簡單烷基(甲基、乙基、丙基等)，m 係 2-10，p 係 2-10 且 n 係 100-1,000。

【0445】 在本發明之另一實施例中，包含含疊氮化物之胺基酸之 TC 靶向多肽經含有末端炔烴部分之具支鏈 PEG 衍生物修飾，具支鏈 PEG 之每一鏈皆具有在 10-40 kDa 範圍內之分子量且可為 5-20 kDa。例如，在一些實施例中，炔烴末端 PEG 衍生物將具有以下結構：

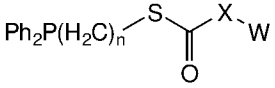
$[RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)]_2CH(CH_2)_m-X-(CH_2)_p\ C\equiv CH$

其中 R 係簡單烷基(甲基、乙基、丙基等)，m 係 2-10，p 係 2-10，且 n 係 100-1,000，且 X 視情況係 O、N、S 或羰基(C=O)，或不存在。

含膦之 PEG 衍生物或 TLR-連接體衍生物

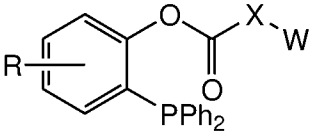
【0446】　在本發明之另一實施例中，TC 之靶向多肽經 PEG 衍生物修飾，該 PEG 衍生物含有進一步包含芳基膦基團之活化官能基(包括但不限於酯、碳酸酯)，該活化官能基將與存在於非天然編碼胺基酸之側鏈上之疊氮化物部分反應。通常，PEG 衍生物或 TLR-連接體衍生物將具有在 1-100 kDa、在一些實施例中 10-40 kDa 範圍內之平均分子量。

【0447】　在一些實施例中，PEG 衍生物將具有以下結構：



其中 n 係 1-10；X 可為 O、N、S 或不存在，Ph 係苯基，且 W 係水溶性聚合物。

【0448】　在一些實施例中，PEG 衍生物將具有以下結構：



其中 X 可為 O、N、S 或不存在，Ph 係苯基，W 係水溶性聚合物且 R 可為 H、烷基、芳基、經取代之烷基及經取代之芳基。例示性 R 基團包括但不限於-CH_2、-$C(CH_3)_3$、-OR’、-NR’R”、-SR’、-鹵素、-C(O)R’、-CONR’R”、-$S(O)_2$R’、-$S(O)_2$NR’R”、-CN 及–NO_2。R’、R”、R”’及 R””各自獨立地係指氫、經取代或未經取代之雜烷基、經取代或未經取代之芳基(包括但不限於經 1-3 個鹵素取代之芳基)、經取代或未經取代之烷基、烷氧基或硫代烷氧基、或芳基烷基。當本發明之化合物包括超過一個 R 基團時，例如，每一 R 基團皆係獨立地選擇，當存在 R’、R”、R”’及 R””中之超過一者時，每一 R’、R”、R”’及 R””基團同樣皆係獨立地選擇。當 R’及 R”附著至相同氮原子時，其可與氮原子組合以形成 5 員、6 員或 7 員環。舉例而言，-NR’R”意在包括但不限於 1-吡咯啶基及 4-嗎啉基。自以上對取代基之討論，熟習此項技術者將理解術語「烷基」意在包括包含結合至除氫基之外之基團之碳原子的基團，諸如鹵代烷基(包括但不限於-CF_3 及

-CH_2CF_3)及醯基(包括但不限於-$C(O)CH_3$、-$C(O)CF_3$、-$C(O)CH_2OCH_3$ 及諸如此類)。

其他 PEG 衍生物或 TLR-連接體衍生物及一般偶聯技術

【0449】 可連接至 TC 多肽之其他例示性 PEG 分子以及聚乙二醇化方法包括但不限於彼等闡述於例如以下專利中者：美國專利公開案第 2004/0001838 號；第 2002/0052009 號、第 2003/0162949 號、第 2004/0013637 號、第 2003/0228274 號、第 2003/0220447 號、第 2003/0158333 號、第 2003/0143596 號、第 2003/0114647 號、第 2003/0105275 號、第 2003/0105224 號、第 2003/0023023 號、第 2002/0156047 號、第 2002/0099133 號、第 2002/0086939 號、第 2002/0082345 號、第 2002/0072573 號、第 2002/0052430 號、第 2002/0040076 號、第 2002/0037949 號、第 2002/0002250 號、第 2001/0056171 號、第 2001/0044526 號、第 2001/0021763 號；美國專利第 6,646,110 號、第 5,824,778 號、第 5,476,653 號、第 5,219,564 號、第 5,629,384 號、第 5,736,625 號、第 4,902,502 號、第 5,281,698 號、第 5,122,614 號、第 5,473,034 號、第 5,516,673 號、第 5,382,657 號、第 6,552,167 號、第 6,610,281 號、第 6,515,100 號、第 6,461,603 號、第 6,436,386 號、第 6,214,966 號、第 5,990,237 號、第 5,900,461 號、第 5,739,208 號、第 5,672,662 號、第 5,446,090 號、第 5,808,096 號、第 5,612,460 號、第 5,324,844 號、第 5,252,714 號、第 6,420,339 號、第 6,201,072 號、第 6,451,346 號、第 6,306,821 號、第 5,559,213 號、第 5,747,646 號、第 5,834,594 號、第 5,849,860 號、第 5,980,948 號、第 6,004,573 號、第 6,129,912 號、WO 97/32607、EP 229,108、EP 402,378、WO 92/16555、WO 94/04193、WO 94/14758、WO 94/17039、WO 94/18247、WO 94/28024、WO 95/00162、WO 95/11924、WO95/13090、WO 95/33490、WO 96/00080、WO 97/18832、WO 98/41562、WO 98/48837、WO 99/32134、WO 99/32139、WO 99/32140、WO 96/40791、WO 98/32466、WO 95/06058、EP 439 508、WO 97/03106、WO 96/21469、WO 95/13312、EP 921 131、

WO 98/05363、EP 809 996、WO 96/41813、WO 96/07670、EP 605 963、EP 510 356、EP 400 472、EP 183 503 及 EP 154 316，該等專利全文以引用方式併入本文中。本文所述之任何 PEG 分子皆可以任一形式使用，包括但不限於單鏈、支鏈、多臂鏈、單官能、雙官能、多官能或其任一組合。

【0450】 額外聚合物及 PEG 衍生物或 TLR-連接體衍生物(包括但不限於羥胺(胺基氧基) PEG 衍生物或 TLR-連接體衍生物)闡述於以下專利申請案(其皆全文以引用方式併入本文中)中：美國專利公開案第 2006/0194256 號、美國專利公開案第 2006/0217532 號、美國專利公開案第 2006/0217289 號、美國臨時專利第 60/755,338 號；美國臨時專利第 60/755,711 號；美國臨時專利第 60/755,018 號；國際專利申請案第 PCT/US06/49397 號；WO 2006/069246；美國臨時專利第 60/743,041 號；美國臨時專利第 60/743,040 號；國際專利申請案第 PCT/US06/47822 號；美國臨時專利第 60/882,819 號；美國臨時專利第 60/882,500 號；及美國臨時專利第 60/870,594 號。

TC 多肽之糖基化

【0451】 糖基化可顯著影響諸如 TC 多肽等多肽之物理性質(例如，溶解度)，且在蛋白質穩定性、分泌及次細胞定位方面亦可能係重要的。糖基化多肽亦可展現出增強之穩定性或可改良一或多種藥物動力學性質，諸如半衰期。此外，溶解度之改良可例如使得能夠生成比包含非糖基化多肽之調配物更適於醫藥投與之調配物。

【0452】 本發明包括併入一或多種帶有糖殘基之非天然編碼胺基酸之 TC 多肽。糖殘基可為天然的(包括但不限於 N-乙醯胺基葡萄糖)或非天然的(包括但不限於 3-氟半乳糖)。糖可藉由 N-或 O-連接之糖苷鍵聯(包括但不限於 N-乙醯基半乳糖-L-絲胺酸)或非天然鍵聯(包括但不限於肟或對應 C-或 S-連接之糖苷)連接至非天然編碼之胺基酸。

【0453】 糖(包括但不限於糖基)部分可*在體內*或*體外*添加至 TC 多肽中。在本發明之一些實施例中，TC 之包含含羰基之非天然編碼胺基酸的靶向多肽經用胺基氧基衍生化之糖修飾以生成經由肟鍵聯連接之對應糖基化多肽。在附著至非天然編碼之胺基酸後，可藉由用糖基轉移酶及其他酶處理來進一步加工糖，以生成結合至 TC 多肽之寡糖。*參見例如* H. Liu 等人，*J. Am. Chem. Soc.* 125: 1702-1703 (2003)。

【0454】 在本發明之一些實施例中，包含含羰基之非天然編碼之胺基酸的 TC 多肽直接經具有製備為胺基氧基衍生物之限定結構之聚糖修飾。熟習此項技術者將認識到，其他官能基(包括疊氮化物、炔烴、醯肼、肼及胺基脲)可用於將糖連接至非天然編碼之胺基酸。

【0455】 在本發明之一些實施例中，接著，包含疊氮化物或炔基之非天然編碼之胺基酸的 TC 靶向多肽可藉由包括但不限於分別與包括但不限於炔基或疊氮化物衍生物之 Huisgen [3+2]環加成反應來修飾。該方法容許以極高選擇性修飾蛋白質。

TC 二聚物及多聚物

【0456】 本發明亦提供 TC 及 TC 類似物組合，諸如同二聚物、異二聚物、同多聚物或異多聚物(亦即，三聚物、四聚物等)，其中含有一或多種非天然編碼之胺基酸之 TC 結合至另一 TC 或任一其他並非 TC 之多肽，其係直接結合至多肽主鏈或經由連接體結合。由於分子量與單體相比增加，因此 TC 二聚物或多聚體偶聯物相對於單體 TC 可展現出新的或期望的性質，包括但不限於不同的藥理學、藥物動力學、藥效學、經調節之治療半衰期或經調節之血漿半衰期。在一些實施例中，本發明之 TC 二聚物將調節 TC 受體之信號轉導。在其他實施例中，本發明之 TC 二聚物或多聚物將用作 TC 受體拮抗劑、促效劑或調節劑。

【0457】 在一些實施例中，存在於含有二聚物或多聚體之 TC 中之一或多種

TC 分子包含連接至水溶性聚合物之非天然編碼之胺基酸。

【0458】 在一些實施例中，TC 多肽直接連接，包括但不限於經由 Asn-Lys 醯胺鍵聯或 Cys-Cys 二硫鍵聯連接。在一些實施例中，TC 多肽及/或連接之非 TC 分子將包含不同的非天然編碼之胺基酸以促進二聚化，包括但不限於，第一 TC 多肽之一種非天然編碼之胺基酸中之炔烴及第二分子之第二非天然編之碼胺基酸中之疊氮化物將經由 Huisgen [3+2]環加成偶聯。或者，包含含酮的非天然編碼之胺基酸之 TC 及/或連接之非 TC 分子可與包含含羥胺的非天然編碼之胺基酸之第二多肽偶聯，且所述多肽經由形成對應肟而反應。

【0459】 或者，兩種 TC 多肽及/或連接之非肽 TC 分子經由連接體連接。任一異或同雙官能連接體皆可用於連接兩個可具有相同或不同一級序列之分子及/或連接之非肽 TC 分子。在一些情況下，用於將 TC 及/或連接之非肽 TC 分子系連在一起之連接體可為雙功能 PEG 試劑。連接體可具有寬範圍之分子量或分子長度。更大或更小分子量之連接體可用於在 TC 與經連接實體之間或在 TC 與其受體之間或在經連接實體與其結合配偶體(若存在)之間提供期望空間關係或構形。具有更長或更短分子長度之連接體亦可用於在 TC 與經連接實體之間或在經連接實體與其結合配偶體(若存在)之間提供期望空間或撓性。

【0460】 在一些實施例中，本發明提供具有啞鈴結構之水溶性雙官能連接體，該啞鈴結構包括：a)聚合物主鏈之至少第一末端上之含疊氮化物、炔烴、肼、醯肼、羥胺或羰基之部分；及 b)聚合物主鏈之第二末端上之至少第二官能基。第二官能基可與第一官能基相同或不同。在一些實施例中，第二官能基不與第一官能基反應。在一些實施例中，本發明提供包含具支鏈分子結構之至少一個臂的水溶性化合物。舉例而言，具支鏈分子結構可為樹枝狀。

【0461】 在一些實施例中，本發明提供包含一或多種 TC 多肽之多聚物，其藉由與具有以下結構之水溶性活化聚合物反應形成：

$R-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-X$，其中 n 係約 5 至 3,000，m 係 2-10，X 可為含疊氮化物、炔烴、肼、醯肼、胺基氧基、羥胺、乙醯基或羰基之部分，且 R 係可與 X 相同或不同之封端基團、官能基或離去基團。R 可為例如選自由以下組成之群之官能基：羥基、受保護之羥基、烷氧基、N-羥基琥珀醯亞胺基酯、1-苯并三唑基酯、碳酸 N-羥基琥珀醯亞胺基酯、碳酸 1-苯并三唑基酯、縮醛、醛、醛水合物、烯基、丙烯酸根、甲基丙烯酸根、丙烯醯胺、活性碸、胺、胺基氧基、受保護之胺、醯肼、受保護之醯肼、受保護之硫醇、羧酸、受保護之羧酸、異氰酸根、異硫氰酸根、馬來醯亞胺、乙烯基碸、二硫代吡啶、乙烯基吡啶、碘乙醯胺、環氧化物、乙二醛、二酮、甲磺酸根、甲苯磺酸根及三氟乙磺酸根、烯烴及酮。

TC 多肽活性及 TC 多肽對 HER2 靶標之親和力之量測

【0462】　可使用標準或已知之體外或體內分析來確定 TC 多肽活性。可藉由此項技術中已知之適宜方法分析 TC 之生物活性。該等分析包括但不限於活化 TC 因應基因之活化、受體結合分析、抗病毒活性分析、細胞病變效應抑制分析、抗增殖分析、免疫調節分析及監測 MHC 分子誘導之分析。

【0463】　可分析 TC 多肽活化 TC 敏感信號轉導路徑之能力。一個實例係干擾素刺激反應元件(ISRE)分析。用 ISRE-螢光素酶載體(pISRE-luc, Clontech)瞬時轉染組成性表現 TC 受體之細胞。在轉染後，用 TC 之靶向多肽處理細胞。測試大量蛋白質濃度(例如 0.0001-10 ng/mL)以生成劑量反應曲線。若 TC 多肽結合且活化 TC 受體，則所產生之信號轉導級聯會誘導螢光素酶表現。可以多種方式量測發光，例如藉由使用 TopCount™ 或 Fusion™ 微板讀取器及 Steady-Glo® 螢光素酶分析系統(Promega)。

【0464】　可分析 TC 多肽結合至 TC 受體之能力。對於包含非天然胺基酸之非聚乙二醇化或聚乙二醇化之 TC 多肽，可使用 BIAcore™生物感測器(Pharmacia)量測 TC 對其受體之親和力。適宜結合分析包括但不限於 BIAcore 分析(Pearce

等人，Biochemistry 38:81-89 (1999))及 AlphaScreen™ 分析(PerkinElmer)。

【0465】 不管使用哪些方法來產生 TC 多肽，皆使 TC 多肽經受生物活性分析。通常，針對生物活性之測試應提供對期望結果之分析，諸如生物活性之增加或降低(與經修飾之 TC 相比)、不同生物活性(與經修飾之 TC 相比)、受體或結合配偶體之親和力分析、TC 本身或其受體之構形或結構變化(與經修飾之 TC 相比)、或血清半衰期分析。

效力、功能性體內半衰期及藥物動力學參數之量測

【0466】 本發明之重要態樣係延長之生物半衰期，此係藉由在多肽與水溶性聚合物部分偶聯或不偶聯之情況下構築 TC 來獲得。TC 血清濃度之投與後降低速率可能使評價對用偶聯及非偶聯 TC 多肽及其變異體治療之生物反應變得重要。本發明之偶聯及非偶聯 TC 多肽及其變異體在經由例如皮下或靜脈內投與而投與後亦可具有延長之血清半衰期，使得可藉由例如 ELISA 方法或藉由初步篩選分析加以量測。可使用來自商業來源(諸如 Invitrogen (Carlsbad, CA))之 ELISA 或 RIA 套組。如本文所述實施體內生物半衰期之量測。

【0467】 可根據熟習此項技術者已知之方案確定包含非天然編碼之胺基酸之 TC 之靶向多肽的效力及功能性體內半衰期。

【0468】 可在正常 Sprague-Dawley 雄性大鼠(每一治療組，N=5 隻動物)中評價包含非天然編碼之胺基酸之 TC 多肽之藥物動力學參數。動物將接受靜脈內 25 ug/大鼠或皮下 50 ug/大鼠之單一劑量，且將根據預定義之時程獲取大約 5-7 份血液樣品，對於未與水溶性聚合物偶聯的包含非天然編碼之胺基酸之 TC 多肽而言，通常涵蓋約 6 小時，且對於包含非天然編碼之胺基酸且與水溶性聚合物偶聯之 TC 多肽而言，通常涵蓋約 4 天。不含非天然編碼之胺基酸之 TC 之藥物動力學資料可直接與針對包含非天然編碼之胺基酸之 TC 多肽獲得之資料進行比較。

投與及醫藥組成物

【0469】 本發明之多肽或蛋白質(包括但不限於包含一或多種非天然胺基酸之 TC、合成酶、蛋白質等)視情況用於治療用途，包括但不限於與適宜醫藥載劑組合。該等組成物例如包含治療有效量之化合物及醫藥學上可接受之載劑或賦形劑。該載劑或賦形劑包括但不限於鹽水、緩衝鹽水、右旋糖、水、甘油、乙醇及/或其組合。使調配物適於投與模式。通常，投與蛋白質之方法為熟習此項技術者已知且可應用於本發明之多肽之投與。組成物可呈水溶性形式，諸如作為醫藥學上可接受之鹽存在，此意在包括酸加成鹽及鹼加成鹽。

【0470】 視情況根據熟習此項技術者已知之方法，在一或多種適當的體外及/或體內疾病動物模型中測試包含一或多種本發明多肽之治療組成物，以確認功效、組織代謝且估計劑量。具體而言，劑量最初可藉由亦即在相關分析中本文中之非天然胺基酸相對於天然胺基酸同源物之活性、穩定性或其他適宜量度(包括但不限於，經修飾以包括一或多種非天然胺基酸之 TC 之靶向多肽與天然胺基酸 TC 多肽之比較，以及經修飾以包括一或多種非天然胺基酸之 TC 之靶向多肽與當前可用之 TC 治療之比較)來確定。

【0471】 投與係藉由通常用於將分子引入成與血液或組織細胞最終接觸之任何途徑來達成。將本發明之非天然胺基酸多肽以任一適宜方式，視情況與一或多種醫藥學上可接受之載劑一起投與。在本發明之上下文中，向患者投與該等多肽之適宜方法係可用的，且儘管可使用超過一種途徑來投與特定組成物，但特定途徑通常可比另一途徑提供更直接及更有效之作用或反應。

【0472】 醫藥學上可接受之載劑部分取決於所投與之特定組成物，以及用於投與組成物之特定方法。因此，本發明之醫藥組成物有眾多種適宜調配物。

【0473】 本發明之 TC 多肽可藉由適於蛋白質或肽之任何習用途徑投與，包括但不限於非經腸，例如注射，包括但不限於皮下或靜脈內或任何其他形式之注

射或輸注。多肽組成物可藉由多種途徑投與，包括但不限於經口、靜脈內、腹膜內、肌內、經皮、皮下、局部、舌下或直腸手段。包含經修飾或未經修飾之非天然胺基酸多肽之組成物亦可藉由脂質體投與。該等投與途徑及適當調配物通常為熟習此項技術者已知。TC 多肽可單獨使用或與其他適宜組分(諸如藥物載劑)組合使用。TC 多肽可與其他劑或治療劑組合使用。

【0474】　亦可將單獨或與其他適宜組分組合的包含非天然胺基酸之 TC 多肽製成欲經由吸入投與之氣溶膠調配物(亦即，其可經「霧化」)。可將氣溶膠調配物置於經加壓之可接受推進劑(諸如二氟二氯甲烷、丙烷、氮及諸如此類)中。

【0475】　適於非經腸投與(諸如例如藉由關節內(在關節中)、靜脈內、肌內、真皮內、腹膜內及皮下途徑)之調配物包括水性及非水性等滲無菌注射溶液，其可含有抗氧化劑、緩衝液、抑菌劑及使調配物與既定接受者之血液等滲的溶質，及水性及非水性無菌懸浮液，其可包括懸浮劑、增溶劑、增稠劑、穩定劑及防腐劑。TC 之調配物可呈現於單位劑量或多劑量密封容器(諸如安瓿及小瓶)中。

【0476】　非經腸投與及靜脈內投與係較佳投與方法。具體而言，業已用於天然胺基酸同源物治療劑之投與途徑(包括但不限於通常用於 EPO、GH、G-CSF、GM-CSF、IFN (例如 TC)、介白素、抗體、FGF 及/或任一其他經醫藥遞送之蛋白質之彼等)連同當前使用之調配物一起提供用於本發明之多肽之較佳投與途徑及調配物。

【0477】　在本發明之上下文中，取決於應用，投與患者之劑量足以隨時間而在患者中產生有益之治療反應或其他適當活性。劑量係由特定載體或調配物之功效、及所用非天然胺基酸多肽之活性、穩定性或血清半衰期、及患者之狀況以及欲治療患者之體重或表面積確定。劑量大小亦取決於伴隨在特定患者中投與特定載體、調配物或諸如此類出現之任何不良副作用的存在、性質及程度。

【0478】　在確定欲投與之載體或調配物在疾病(包括但不限於嗜中性球減少

症、再生不良性貧血、週期性嗜中性球減少症、自發性嗜中性球減少症、赫門斯基-布德拉克氏症候群(Chdiak-Higashi syndrome)、全身性紅斑狼瘡(SLE)、白血病、骨髓發育不良症候群及骨髓纖維化或諸如此類)治療或預防中之有效量時，醫師評價循環血漿水準、調配物毒性及疾病進展。

【0479】 投與例如70公斤患者之劑量通常在等效於當前使用之治療性蛋白質之劑量的範圍內，該範圍針對相關組成物之改變的活性或血清半衰期加以調整。本發明之載體或醫藥調配物可藉由任一已知之習用療法來補充治療條件，包括抗體投與，疫苗投與，細胞毒性劑、天然胺基酸多肽、核酸、核苷酸類似物、生物反應調節劑之投與，及諸如此類。

【0480】 對於投與，本發明之調配物係以由相關調配物之 LD-50 或 ED-50、及/或各種濃度之非天然胺基酸多肽之任何副作用之觀測結果確定的速率來投與，包括但不限於如同應用於患者之質量及整體健康狀況一樣。投與可經由單一劑量或分次劑量完成。

【0481】 若經歷調配物輸注之患者出現發熱、發冷或肌肉疼痛，則其接受適當劑量之阿斯匹林(aspirin)、伊布洛芬(ibuprofen)、乙醯胺酚(acetaminophen)或另一疼痛/發燒控制藥物。經歷諸如發熱、肌肉疼痛及發冷等輸注反應之患者在將來輸注前 30 分鐘預先服用阿斯匹林、乙醯胺酚或(包括但不限於)苯海拉明(diphenhydramine)。得美樂(Meperidine)用於對解熱劑及抗組胺劑不快速反應的更嚴重之發冷及肌肉疼痛。取決於反應之嚴重程度，減慢或中斷細胞輸注。

【0482】 本發明之 TC 之靶向多肽之人類形式可直接投與哺乳動物個體。投與係藉由通常用於將 TC 多肽引入至個體之任何途徑來達成。根據本發明之實施例之 TC 多肽組成物包括適於經口、直腸、局部、吸入(包括但不限於經由氣溶膠)、頰(包括但不限於舌下)、陰道、非經腸(包括但不限於皮下、肌內、真皮內、關節內、胸膜內、腹膜內、大腦內、動脈內或靜脈內)、局部(亦即，皮膚及黏膜表

面二者，包括氣道表面)、肺、眼內、鼻內及經皮投與之彼等，但在任何給定情況下最適宜之途徑將取決於所治療疾患之性質及嚴重程度。投與可為局部或全身的。化合物之調配物可呈現於單位劑量或多劑量密封容器(諸如安瓿及小瓶)中。本發明之 TC 多肽可以呈單位劑量可注射形式(包括但不限於溶液、懸浮液或乳液)的與醫藥學上可接受之載劑之混合物製備。本發明之 TC 多肽亦可藉由連續輸注(使用，包括但不限於，微型幫浦，諸如滲透幫浦)、單次推注或緩釋貯積調配物來投與。

【0483】 適於投與之調配物包括水性及非水性溶液、等滲無菌溶液，其可含有抗氧化劑、緩衝液、抑菌劑及使調配物等滲之溶質，及水性及非水性無菌懸浮液，其可包括懸浮劑、增溶劑、增稠劑、穩定劑及防腐劑。溶液及懸浮液可由前述種類之無菌粉末、顆粒及錠劑製備。

【0484】 冷凍乾燥係用於呈現蛋白質之常用技術，其用於自所關注蛋白質製劑中去除水。冷凍乾燥或凍乾係首先將欲乾燥材料冷凍、接著在真空環境中藉由昇華去除冰或冷凍溶劑之過程。乾燥預凍乾調配物中可包括賦形劑以增強凍乾過程期間之穩定性及/或以改良凍乾產品在儲存時之穩定性。Pikal, M. Biopharm. 3(9)26-30 (1990)及 Arakawa 等人，Pharm. Res. 8(3):285-291 (1991)。

【0485】 醫藥之噴霧乾燥亦為熟習此項技術者已知。例如，參見 Broadhead, J. 等人，「The Spray Drying of Pharmaceuticals」，Drug Dev. Ind. Pharm, 18 (11 及 12), 1169-1206 (1992)。除了小分子醫藥外，亦已將多種生物材料噴霧乾燥，且其包括酶、血清、血漿、微生物及酵母。噴霧乾燥係一種有用技術，此乃因其可在一步式製程中將液體醫藥調配物轉化為精細、無塵或附聚之粉末。基本技術包含以下四個步驟：a)將進料溶液霧化成噴霧；b)噴霧空氣接觸；c)將噴霧乾燥；及 d)從乾燥空氣中分離乾燥產品。美國專利第 6,235,710 號及第 6,001,800 號(其以引用方式併入本文中)闡述了藉由噴霧乾燥製備重組紅血球生成素。

【0486】 本發明之醫藥組成物及調配物可包含醫藥學上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑。醫藥學上可接受之載劑部分取決於所投與之特定組成物，以及用於投與組成物之特定方法。因此，本發明之醫藥組成物(包括視情況存在之醫藥學上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑)有眾多種適宜調配物(*參見例如Remington's Pharmaceutical Sciences*，第 17 版，1985))。

【0487】 適宜載劑包括但不限於緩衝劑含有琥珀酸鹽、磷酸鹽、硼酸鹽、HEPES、檸檬酸鹽、組胺酸、咪唑、乙酸鹽、碳酸氫鹽及其他有機酸；抗氧化劑，包括但不限於抗壞血酸；低分子量多肽，包括但不限於小於約 10 個殘基之彼等；蛋白質，包括但不限於血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水聚合物，包括但不限於、聚乙烯基吡咯啶酮；胺基酸，包括但不限於、甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺酸、精胺酸、組胺酸或組胺酸衍生物、甲硫胺酸、麩胺酸鹽或離胺酸；單糖、二糖及其他碳水化合物，包括但不限於海藻糖、蔗糖、葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑，包括但不限於、EDTA 及依地酸二鈉(edentate disodium)；二價金屬離子，包括但不限於、鋅、鈷或銅；糖醇，包括但不限於甘露糖醇或山梨糖醇；形成鹽之相對離子，包括但不限於鈉及氯化鈉；填充劑，諸如微晶纖維素、乳糖、玉米及其他澱粉；結合劑；甜味劑及其他矯味劑；著色劑；及/或非離子表面活性劑，包括但不限於 Tween™ (包括但不限於 Tween 80 (聚山梨醇酯 80)及 Tween 20 (聚山梨醇酯 20)、Pluronics™及其他普羅尼克酸(pluronic acid)，包括但不限於普羅尼克酸 F68 (泊洛沙姆(Poloxamer) 188)或 PEG。適宜表面活性劑包括例如但不限於基於聚(環氧乙烷)-聚(環氧丙烷)-聚(環氧乙烷) (亦即，(PEO-PPO-PEO))、或聚(環氧丙烷)-聚(環氧乙烷)-聚(環氧丙烷) (亦即，(PPO-PEO-PPO))或其組合之聚醚。PEO-PPO-PEO 及 PPO-PEO-PPO 可以商品名 Pluronics™、R-Pluronics™、Tetronics™及 R-Tetronics™ (BASF Wyandotte 公司，Wyandotte, Mich.)購得且進一步闡述於美國專利第 4,820,352 號(其全文以引用方

式併入本文中)中。其他乙烯/聚丙烯嵌段聚合物可為適宜之表面活性劑。表面活性劑或表面活性劑之組合可用於穩定聚乙二醇化之 TC 以抵抗一或多種應力，包括但不限於由攪動引起之應力。上述中之一些可稱為「增積劑」。一些亦可稱為「張力調節劑」。抗微生物防腐劑亦可用於產品穩定性及抗微生物有效性；適宜防腐劑包括但不限於苯甲醇、羥基氯苯胺(benzalkonium chloride)、間甲酚、對羥基苯甲酸甲酯/對羥基苯甲酸丙酯、甲酚及苯酚或其組合。美國專利第 7,144,574 號(其以引用方式併入本文中)闡述可能適於本發明之醫藥組成物及調配物以及其他遞送製劑之額外材料。

【0488】　本發明之 TC 多肽(包括連接至諸如 PEG 等水溶性聚合物之彼等)亦可藉由緩釋系統或作為持續釋放系統之一部分投與。持續釋放組成物包括但不限於呈成形製品形式(包括但不限於膜或微膠囊)之半滲透性聚合物基質。持續釋放基質包括生物相容性材料，諸如聚(甲基丙烯酸 2-羥乙酯) (Langer 等人，*J. Biomed. Mater. Res.*, 15: 267-277 (1981)；Langer, *Chem. Tech.*, 12: 98-105 (1982))、乙烯-乙酸乙烯酯(Langer 等人，*見上文*)或聚-D-(-)-3-羥基丁酸(EP 133,988)、聚乳酸(polylactide, polylactic acid) (美國專利第 3,773,919 號；EP 58,481)、聚乙交酯(乙醇酸之聚合物)、聚乳酸共乙交酯(乳酸與乙醇酸之共聚物)、聚酸酐、共聚物 of L-麩胺酸與 γ-乙基-L-麩胺酸酯(Sidman 等人，*Biopolymers*, 22, 547-556 (1983)、聚(原酸)酯、多肽、透明質酸、膠原、硫酸軟骨素、羧酸、脂肪酸、磷脂、多糖、核酸、聚胺基酸、胺基酸(諸如苯丙胺酸、酪胺酸、異白胺酸)、多核苷酸、聚乙烯丙烯、聚乙烯基吡咯啶酮及聚矽氧。持續釋放組成物亦包括脂質體包裹之化合物。含有該化合物之脂質體係藉由本身已知之方法製備：DE 3,218,121；Eppstein 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82: 3688-3692 (1985)；Hwang 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77: 4030-4034 (1980)；EP 52,322；EP 36,676；美國專利第 4,619,794 號；EP 143,949；美國專利第 5,021,234 號；日本專利申請案第 83-118008

號；美國專利第 4,485,045 號及第 4,544,545 號；及 EP 102,324。所引用的所有參考文獻及專利皆以引用方式併入本文。

【0489】 脂質體包裹之 TC 多肽可藉由闡述於例如以下文獻中之方法製備：DE 3,218,121；Eppstein 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82: 3688-3692 (1985)；Hwang 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77: 4030-4034 (1980)；EP 52,322；EP 36,676；美國專利第 4,619,794 號；EP 143,949；美國專利第 5,021,234 號；日本專利申請案第 83-118008 號；美國專利第 4,485,045 號及第 4,544,545 號；及 EP 102,324。脂質體之組成物及大小眾所周知或能夠由熟習此項技術者根據經驗容易地確定。脂質體之一些實例如例如以下文獻中所述：Park JW 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:1327-1331 (1995)；Lasic D 及 Papahadjopoulos D (編輯)：MEDICAL APPLICATIONS OF LIPOSOMES (1998)；Drummond DC 等人，Liposomal drug delivery systems for cancer therapy, Teicher B (編輯)：CANCER DRUG DISCOVERY AND DEVELOPMENT (2002)；Park JW 等人，*Clin. Cancer Res.* 8:1172-1181 (2002)；Nielsen UB 等人，*Biochim. Biophys. Acta* 1591(1-3):109-118 (2002)；Mamot C 等人，*Cancer Res.* 63: 3154-3161 (2003)。所引用的所有參考文獻及專利皆以引用方式併入本文。

【0490】 在本發明上下文中，投與患者之劑量應足以隨時間在個體中引起有益治療反應。通常，每劑量非經腸投與之本發明之 TC 多肽之總醫藥有效量在約 0.01 μg/kg/天至約 100 μg/kg 或約 0.05 mg/kg 至約 1 mg/kg 患者體重之範圍內，但此取決於治療性判斷。在該實施例之特定態樣中，偶聯物可以每天大於 4 μ/kg 至每天約 20 μg/kg 之範圍內之劑量投與。在其他態樣中，偶聯物可以每天大於 4 μg/kg 至每天約 9 μg/kg 之範圍內之劑量投與。在其他態樣中，偶聯物可以每天約 4 μg/kg 至每天約 12.5 μg/kg 之範圍內之劑量投與。在特定態樣中，偶聯物可以作為無過度毒性之最大耐受劑量之劑量或低於該劑量投與。此外，偶聯物可

每週投與至少兩次，或者偶聯物可每週投與至少三次、每週至少四次、每週至少五次、每週至少六次或每週七次。在特定態樣中，當將偶聯物投與超過一次時，偶聯物可每次以每天大於 4 μg/kg 之劑量投與。具體而言，偶聯物可經兩週或更長時段投與。在某些態樣中，與參考樣品(亦即不與本發明之偶聯物接觸之細胞樣品)相比，可將表現介白素 10 受體之細胞之生長抑制至少 50%、至少 65%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%或至少 99%。在該實施例之特定態樣中，偶聯物可以每天約 5.3 μg/kg 之劑量，或以每天約 7.1 μg/kg 之劑量，或以每天約 9.4 μg/kg 之劑量，或以每天約 12.5 μg/kg 之劑量投與。給藥頻率亦取決於治療性判斷，且可能比批準用於人類中之商購 TC 多肽產品更頻繁或更不頻繁。通常，本發明之 TC 之靶向多肽、聚乙二醇化 TC 多肽、偶聯之 TC 多肽或聚乙二醇化之偶聯之 TC 多肽可藉由上述任何投與途徑投與。

本發明之 TC 之治療用途

【0491】 本發明之 TC 可用於治療寬範圍之病症。本發明亦包括治療處於因應 TC、CD8+ T 細胞刺激及/或 TC 調配物之癌症風險之下、正患該癌症及/或已患該癌症之哺乳動物的方法。TC 之投與可導致對所觀察到的若干臨床參數之短期效應(亦即，立即有益效應)，且此可能係投與後 12 或 24 小時，且另一方面，亦可導致長期效應，亦即有益減緩腫瘤生長之進展，減小腫瘤大小，及/或增加循環 CD8+T 細胞水準，且本發明之 TC 可藉由熟習此項技術者已知之任何手段投與，且可有益地經由輸注，例如藉由動脈、腹膜內或靜脈內注射及/或輸注，以足以獲得期望藥理效應之劑量投與。

【0492】 TC 劑量可在每次治療每公斤體重 10-200 mg 或 40-80 mg TC 多肽之範圍內。舉例而言，投與 TC 之劑量可為以濃注及/或以輸注給予之每公斤體重約 20-100 mg TC 多肽，持續臨床上必要之時間段，例如持續數分鐘至若干小時範圍內之時段，例如最長達 24 小時。若有必要，可重複 TC 投與一或若干次。

TC 之投與可與其他劑(諸如化學治療劑)之投與組合。此外，本發明係關於用於預防及/或治療癌症之方法，其包括向有需要之個體投與有效量之 TC。

【0493】 TC 之平均量可變化，且具體而言應基於合格醫生之建議及處方。TC 之確切量取決於諸如所治療疾患之確切類型、所治療患者之疾患以及組成物中之其他成分等因素之偏好問題。本發明亦提供治療有效量之另一活性劑之投與。熟習此項技術者基於利用 TC 之療法可容易地確定欲給定之量。

實例

【0494】 提供以下實例以闡釋而非限制所主張之本發明。

實例 1：合成 TLR 促效劑之一般方法

【0495】 本實例提供用於合成本發明之 TLR-促效劑之一般方法。

【0496】 所有市售無水溶劑皆未經進一步純化即使用且儲存於氮氣氛下。在 Merck 矽膠 60 F254 板上使用紫外光及/或用 $KMnO_4$ 水溶液染色以進行可視化來實施 TLC。使用實驗程序中詳述之條件在來自 Teledyne ISCO 之 CombiFlash Rf 上實施層析純化。在 Shimadzu 系統上，使用 Phenomenex Gemini –NX C18 5 µm 50 × 4.6 mm 管柱(將其利用於含有 0.05% TFA 之水中之乙腈線性梯度，以 1 ml/min 溶析) (移動相 A：於水中之 0.05%三氟乙酸；移動相 B：於 90%乙腈(ACN)水溶液中之 0.05%三氟乙酸)或 Waters BEH 1.7 µm v2.1×50 mm 管柱實施分析型 HPLC。分析方法 1：0% B 1 min、0-50% B 11 min、50-100% B 0.5 min、100% B 1.5 min、100-0% B 1 min、0% B 2 min；方法 2：10-20% B 1 min、20-70% B 11 min、70-100% B 0.5 min、100% B 1.5 min、100-10% B 1 min、10% B 2 min；方法 3：0-40% B 1 min、40-90% B 11 min、90-100% B 0.5 min、100% B 1.5 min、100-10% B 1 min、10% B 2 min；方法 4：5% B 0.3 min、5%至 100% B 0.3 至 1.5 min、100% B 1.5 min 至 1.8 min，0 min 至 1.8 min 之流量為 0.8 ml/min 至 1.1 min/min。

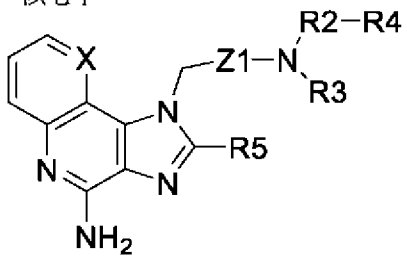
【0497】 取決於規模，使用 Gemini –NX C18 5 µm 100 × 30 mm、150 × 30 mm

或 250 × 50 mm 管柱在 Shimadzu 系統上實施製備型 HPLC。在 Shimadzu LCMS-2020 系統上記錄質譜(MS)，且使用 Shimadzu LabSolutions 軟體處理資料。將與 6230 Accurate-Mass TOFMS 系統耦合的 Agilent 1260 Infinity Binary LC 用於 HR-ESI-TOF 分析。在 500 MHz Bruker NMR 譜儀上收集 NMR 譜資料。以 ppm 報告化學位移(δ)，且參考氘溶劑信號。以赫茲(Hz)報告耦合常數(J)。將自旋多重性闡述為：s (單峰)、br (寬峰)、d (雙峰)、dd (雙重雙峰)、t (三重峰)、q (四重峰)或 m (多重峰)。彙集單體抗體，經 0.22 μM 過濾，且於≤65°C下儲存直至進一步使用。

【0498】　用於實例中之縮寫包括：- CDI：1,1'-羰基二咪唑，DIEA：*N*,*N*-二異丙基乙胺，DCM：二氯甲烷，DIAD：偶氮二甲酸二異丙酯，DMF：二甲基甲醯胺，DMTMMT：4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基嗎啉鎓四氟硼酸鹽，EtOAc：乙酸乙酯，MeOH：甲醇，TFA：三氟乙酸。

實例 2：包含以下結構–核心 1 之 TLR 促效劑之合成：

核心1



在一些實施例中，X 係 CH 或 N；

R_2 係 C_1 至 C_{12} 伸烷基、含氮之伸烷基、芳族環或–C(=NH)NH-或其組合；

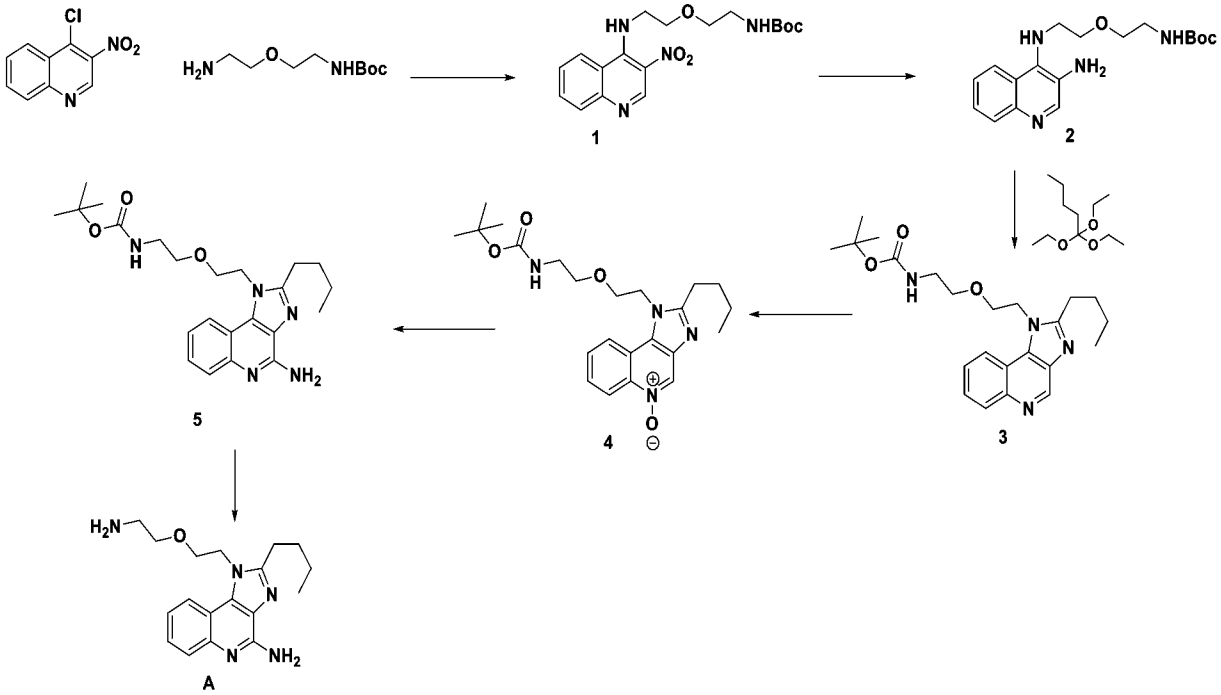
R_3 係-H、C_1 至 C_{12} 烷基、含氮之烷基、芳族環或–C(=NH)NH_2 或其組合；

或 R_2 及 R_3 係連接以形成 C_4 至 C_8 伸環烷基；

R_4 係 C_1 至 C_{12} 烷基、C_1 至 C_{12} 經取代之烷基、C_4 至 C_8 環烷基、C_4 至 C_8 經取代之環烷基、芳族環、經取代之芳族環、芳族雜環、經取代之芳族雜環、-ONH_2 末端 C_1 至 C_{12} 烷基或其組合；或 R_4 缺失；

Z_1係C_1至C_6伸烷基、C_3至C_8伸環烷基或C_3至C_8含氮之雜環或其組合；且R_5係C_1至C_{12}烷基、C_1至C_{12}經取代之烷基、含氧之C_1至C_{12}烷基、C_4至C_8環烷基、C_4至C_8經取代之環烷基或其組合。

【0499】 如以下方案中所揭示，合成具有核心1結構之TLR-促效劑。



【0500】 **2-(2-(3-硝基喹啉-4-基胺基)乙氧基)乙基胺基甲酸第三丁酯(1)**：將4-氯-3-硝基喹啉(1750 mg, 8.39 mmol)溶解於DCM (30 mL)中且用游離胺(1800 mg, 8.55 mmol)處理，接著用TEA (2.29 mL, 17.3 mmol)處理。將反應物於室溫下保持18 h，接著用H_2O (20 mL)、鹽水(10 mL)洗滌，經$MgSO_4$乾燥且於真空中濃縮。獲得呈黃色固體之靶標化合物(**1**) (3130 mg, 99%)，MS m/z 399 $(M+Na)^+$。

【0501】 **2-(2-(3-胺基喹啉-4-基胺基)乙氧基)乙基胺基甲酸第三丁酯(2)**：將硝基化合物(**1**) (3.12 g, 8.29 mmol)溶解於THF (100 mL)及水(80 mL)中。一次性添加鋅(13.55 g, 207.2 mmol)，接著添加NH_4Cl (13.3 g, 248.6 mmol)。將懸浮液於室溫下劇烈攪拌1 h (HPLC)。在過濾後，將濾餅用THF (20 mL×2)洗滌。向濾液中添加NaCl直至水相飽和。收集液相且分離THF層。用THF/EA (50 ml/50 ml)萃取水層。將有機層合併，經$MgSO_4$乾燥，且濃縮，獲得用於下一步驟之殘餘物(**2**)

(3.1 g, >100%)。MS m/z 347 $(M+H)^+$。

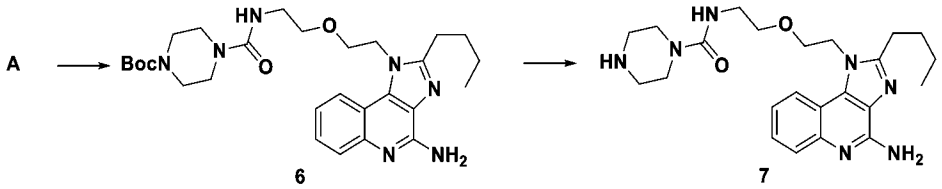
【0502】 **2-(2-(2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)乙氧基)乙基胺基甲酸第三丁酯(3)**：將胺化合物(**2**) (3.1 g，粗製物，<8.95 mmol)及原戊酸三乙酯(3.1 mL, 13.5 mmol)懸浮於甲苯(200 mL)中且加熱至 110°C。接著添加吡啶 HCl (55 mg, 0.48 mmol)。將反應物加熱 4 h。將混合物於室溫下保持 48 h。傾析液體，且將殘留固體/殘餘物與甲苯(20 mL×2)攪動，與液體合併且濃縮。將殘餘物溶解於 DCM 中且藉由管柱層析(於 DCM 中之甲醇，0-10-20%，80 g 管柱)純化，獲得靶標化合物(**3**) (1.05 g, 30%，2 步，自硝基化合物 **1** 獲得)。MS m/z 413 $(M+H)^+$。

【0503】 **1-(2-(2-(第三丁氧基羰基胺基)乙氧基)乙基)-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉 5-氧化物(4)**：將化合物 **3** (1.05 g, 2.54 mmol)溶解於 DCM (20 mL)中且用 *m*CPBA (750 mg, 2.83 mmol)處理。將反應物於室溫下保持 4 h。將混合物用 $NaHCO_3$ 飽和溶液(15 mL×3)洗滌，乾燥且濃縮，獲得用於下一步驟之粗製糖漿(**4**) (900 mg, 83%)。MS m/z 429 $(M+H)^+$。

【0504】 **2-(2-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)乙氧基)乙基胺基甲酸第三丁酯(5)**：在壓力管中，將化合物 **4** (900 mg, 2.18 mmol)溶解於二氯乙烷(25 mL)中且用濃氫氧化銨(28%, 1 mL)處理，並且使溫度達到 80°C。在冷卻後，經 5 min 向該混合物中緩慢添加甲苯磺醯基氯(470 mg, 2.46 mmol)。添加濃氫氧化銨(0.5 mL)且將管密封。將管於 80°C下加熱 4 h。在冷卻後，將混合物用 DCM (60 mL)稀釋，用水(40 mL)洗滌，乾燥且藉由矽膠管柱層析純化，獲得靶標化合物(**5**) (750 mg, 80%)。MS m/z 428 $(M+H)^+$。

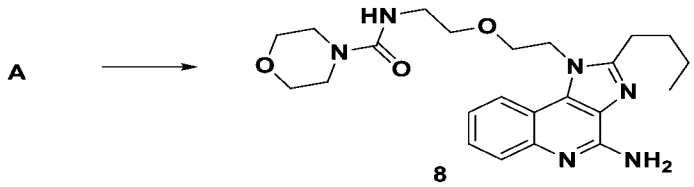
【0505】 **1-(2-(2-胺基乙氧基)乙基)-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-4-胺(A)**：將化合物 **5** (750 mg, 1.75 mmol)於室溫下用於 EtOH (20 mL)中之 1.25 M HCl 處理 17 h。接著將反應物於真空中乾燥，且將殘餘物再懸浮於 $EtOH/Et_2O$ (1/10; 20 mL)中且過濾。收集固體，獲得靶標化合物(**A**) (600 mg, 85%)。HPLC (方法 1)：5.8 min,

MS m/z 328 $(M+H)^+$。

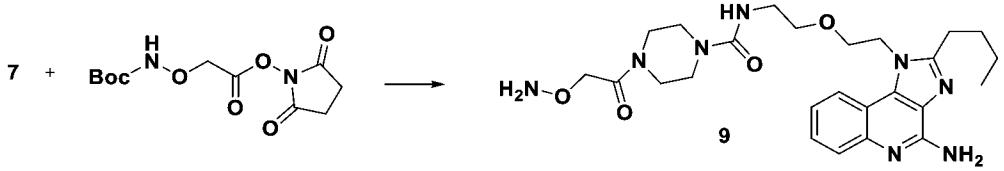


【0506】 **4-(2-(2-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)乙氧基)乙基胺基甲醯基)六氫吡嗪-1-甲酸第三丁酯 (6)**：將化合物 **A** HCl 鹽(100 mg, 0.25 mmol)溶解於 DCM (10mL)中且用 TEA (68 uL, 0.511 mmol)處理。向懸浮液中添加 4-(氯羰基)六氫吡嗪-1-甲酸第三丁酯(75 mg, 0.286 mmol)。將反應物於室溫下保持 17 h 且用 DCM/MeOH (4 mL/1 mL)稀釋，接著將溶液用鹽水洗滌。將有機相藉由矽膠管柱層析純化，獲得純產物 **6** (130 mg, 0.24 mmol, 96%)。MS m/z 540 $(M+H)^+$。

【0507】 **N-(2-(2-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)乙氧基)乙基)六氫吡嗪-1-甲醯胺(7)：**將化合物(**6**) (10 mg, 0.018 mmol)用於 EtOH 中之 HCl (約 1.5 M, 1 mL)於室溫下處理 1 h，接著於 60°C下處理 1 h 且在真空中乾燥。將殘餘物用乙醚洗滌且乾燥，獲得靶標化合物(**7**) (9 mg，0.018 mmol，定量)。MS m/z 440 $(M+H)^+$。

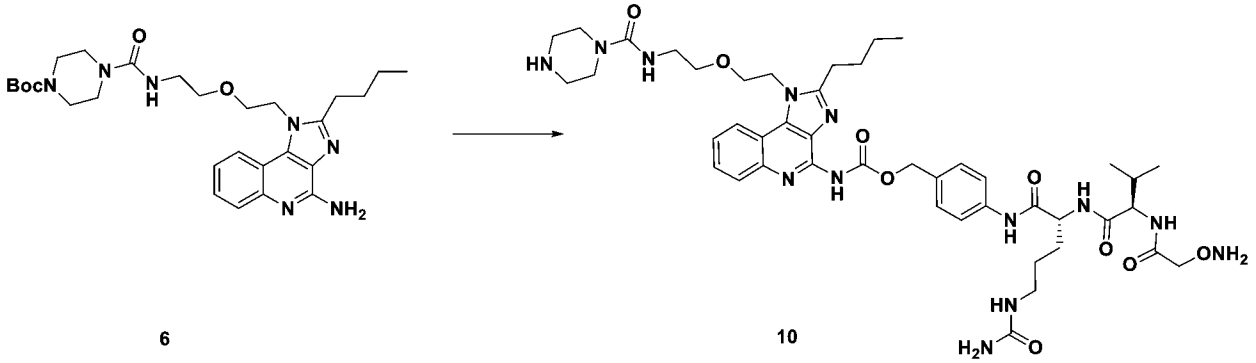


【0508】 **N-(2-(2-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)乙氧基)乙基)嗎啉-4-甲醯胺(8)：**藉由使用與針對 **6** 所述類似之程序使化合物 **A** 與嗎啉-4-羰醯氯反應來製備化合物 7，獲得靶標化合物 **7** (7 mg, 42%)。MS m/z 441 (M+H)。



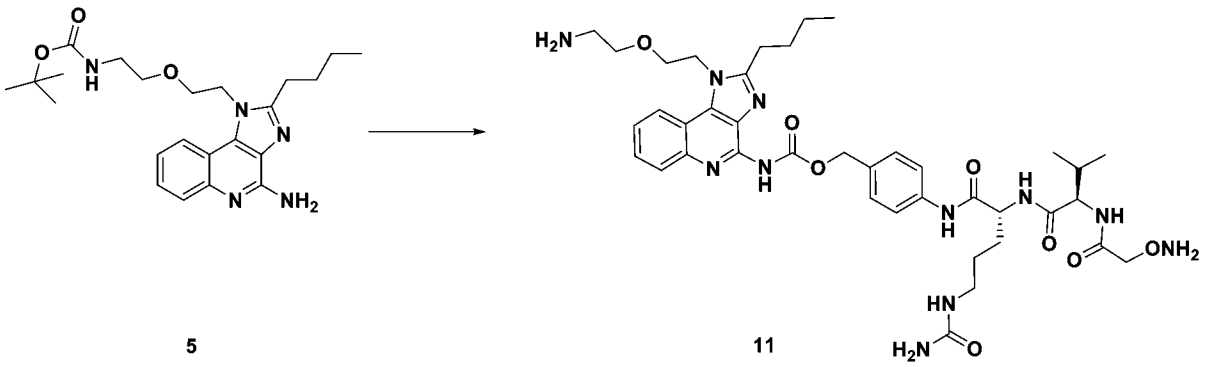
【0509】 **4-(2-(2-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)乙氧基)乙基胺基甲醯基)六氫吡嗪-1-甲酸 4-((R)-2-((R)-2-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-3-甲基丁醯胺**

基)-5-脲基戊醯胺基)苄酯(9)：將化合物 **7** (22 mg, 0.02 mmol)溶解於 DCM (1 mL)中且用 DIPEA (3.5 uL, 0.02 mmol)處理，接著用 2-(第三丁氧基羰基胺基氧基)乙酸 2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯(3.3 mg, 0.011 mmol)處理。將反應物於室溫下保持 17 h。向混合物中添加 TFA (0.3 mL)，且攪拌 15 min。於真空中乾燥後，將殘餘物藉由製備型 HPLC 純化，獲得化合物 **9** (15 mg, 22%from **7**)。MS m/z 918 $(M+H)^+$。



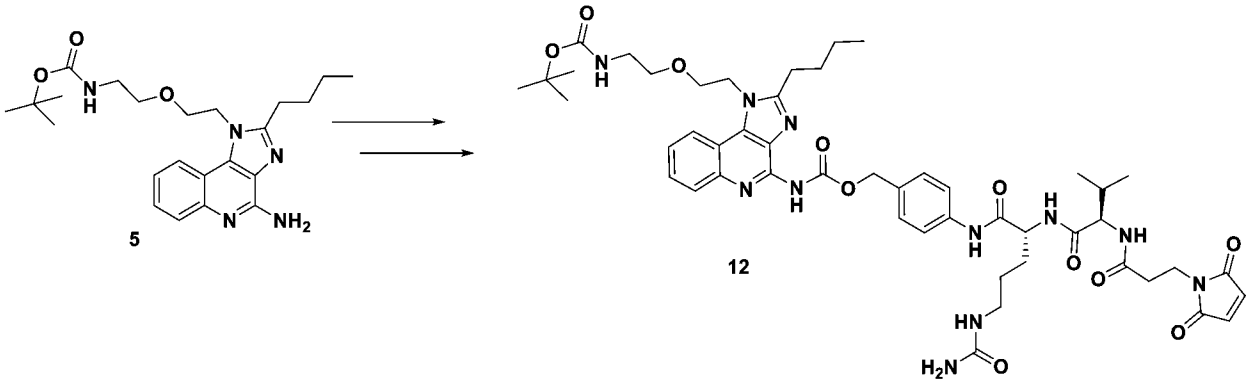
6 10

【0510】 **2-丁基-1-(2-(2-(六氫吡嗪-1-甲醯胺基)乙氧基)乙基)-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-4-基胺基甲酸 4-((R)-2-((R)-2-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苄酯(10))**：將化合物 **6** (65 mg, 0.097 mmol)溶解於 DMF (2 mL)中且用 DIPEA (34 uL, 0.194 mmol)處理，接著用 Fmoc-VC-PAB-PNP (94 mg, 0.116 mmol)處理。將反應物於室溫下保持 1 h，且添加水(10 mL)。將固體收集，用水(2 mL)洗滌，且乾燥。於室溫下將黃色固體溶解於 DMF (2mL)中且用二乙胺(100 uL, 0.97 mmol)處理 30 min。將反應混合物藉由製備型 LC 純化，得到中間體 Val-Cit-PAB-OCO-(化合物 6)。將該中間體(11 mg, 0.01 mmol)溶解於 DCM (1 mL)中且用 DIPEA (3.5 uL, 0.02 mmol)處理，接著用 2-(第三丁氧基羰基胺基氧基)乙酸 2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯(3.3 mg, 0.011 momol)處理。將反應物於室溫下保持 17 h。添加 TFA (0.3 mL)且將混合物攪拌 15 min。於真空中乾燥後，將殘餘物藉由製備型 HPLC 純化，獲得化合物 **10** (15 mg，16%來自化合物 **6**)。MS m/z 918 $(M+H)^+$。



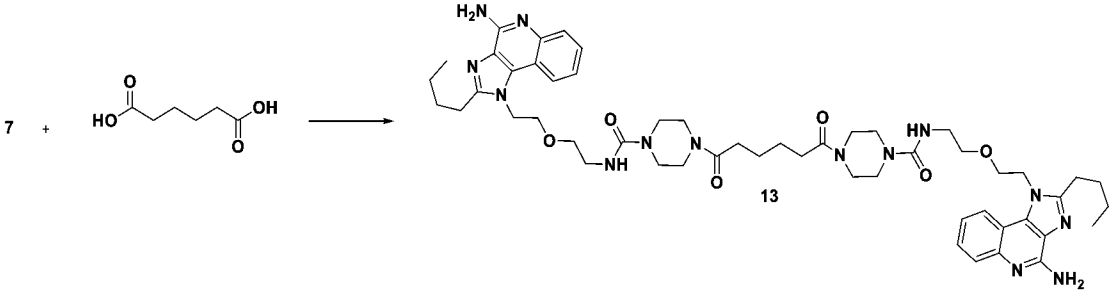
5 11

【0511】 **1-(2-(2-胺基乙氧基)乙基)-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-4-基胺基甲酸 4-((R)-2-((R)-2-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苄酯(11)**：使用 **5** 作為起始材料，利用與針對 **10** 所述類似之程序製備化合物 **11**，獲得靶標化合物 **11** (22 mg，21%來自 **5**)。MS m/z 806 $(M+H)^+$。



5 12

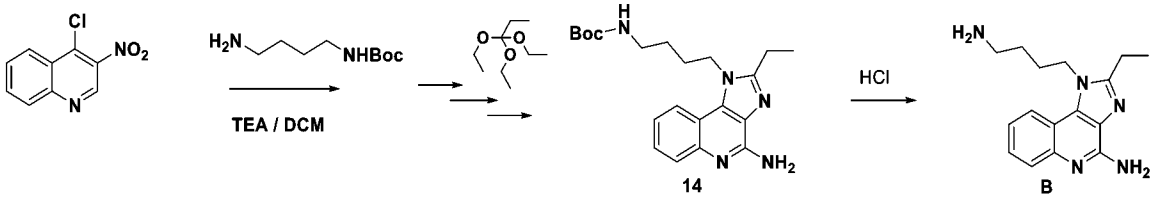
【0512】 **2-丁基-1-(2-(2-(六氫吡嗪-1-甲醯胺基)乙氧基)乙基)-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-4-基胺基甲酸 4-((R)-2-((R)-2-((2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)丙醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苄酯(12)**：使用 **5**、3-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)丙酸 2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯作為起始材料，利用與針對 **10** 所述類似之程序製備化合物 **12**，獲得靶標化合物 **12** (無 TFA 處理) (15 mg，17%來自 **5**)。MS m/z 984 $(M+H)^+$。



7 13

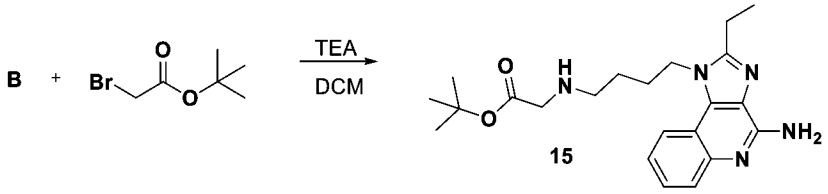
【0513】 **已二酸-雙-(N-(2-(2-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)乙氧**

基)乙基)六氫吡嗪-1-甲醯胺(13)：於 23°C下向化合物 **7** (8 mg, 0.018 mmol)及己二酸(2 mg, 0.07 mmol)於 DMF (1 mL)中之溶液中添加 EDC (3 mg, 0.016 mmol)、HOBt (1 mg, 0.018 mmol)及 DIEA (4 ul, 0.23 mmol)。在 24 h 後，將混合物藉由製備型 LC 純化，且乾燥，獲得化合物 **13** (5 mg, 0.004 mmol, 23%)。MS m/z 1217 $(M+H)^+$。

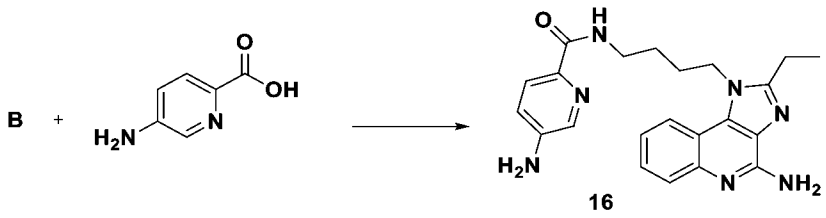


【0514】 **4-(4-胺基-2-乙基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基胺基甲酸第三丁酯(14)**：使用 Boc-1,4-丁二胺及原丙酸三乙酯作為起始材料以及與針對 **5** 所述類似之程序製備化合物 **14**，獲得靶標化合物 **14** (420 mg，1.095 mmol，14.5%來自起始材料)。MS m/z 384 $(M+H)^+$。

【0515】 **1-(4-胺基丁基)-2-乙基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-4-胺 2HCl (B)**：於 23°C下將化合物 **14** (400 mg, 1.043 mmol)添加至 DCM (0.5mL)及 4 M 於二噁烷中之 HCl (10 mL, 40 mmol)中。在 1 h 後，LCMS 顯示反應完成。於真空中去除溶劑且於高真空幫浦下乾燥 6 h，獲得呈淺黃色固體之化合物 **B** (400 mg, 1.129 mmol, 99%)。MS m/z 284 $(M+H)^+$。

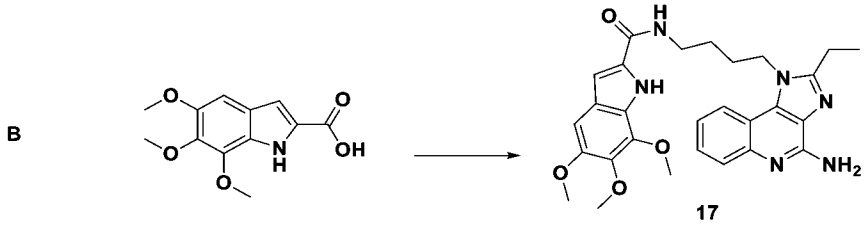


【0516】 **2-(4-(4-胺基-2-乙基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基胺基)乙酸第三丁酯(15)**：於 23°C下向化合物 **B** (31 mg 0.109 mmol)於 DCM (5 mL)中之溶液中添加溴乙酸第三丁酯(15 uL, 0.102 mmol)，接著添加 TEA (88 uL, 0.681 mmol)。在 24 h 後，將混合物藉由製備型 LC 純化，獲得呈黃色固體之 **15** (4 mg, 0.006 mmol, 6%)。MS m/z 398 $(M+H)^+$。



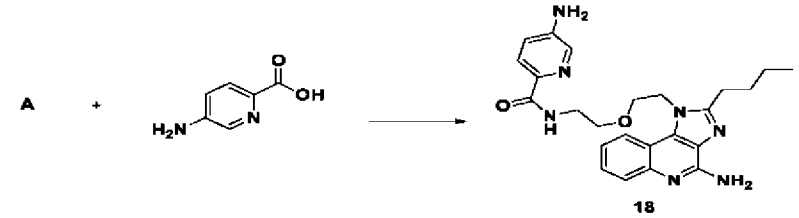
16

【0517】 **5-胺基-N-(4-(4-胺基-2-乙基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)吡啶醯胺(16)**：於 23°C下向化合物 **B** (25 mg, 0.071 mmol)及 5-胺基吡啶-2-甲酸(10 mg, 0.072 mmol)於 DMF (1 mL)中之溶液中添加 HATU (20 mg, 0.083 mmol)及 DIEA (50 uL, 0.287 mmol)。在 1 h 後，將混合物藉由製備型 LC 純化且乾燥，獲得呈白色固體之化合物 **16** (21 mg, 0.033 mmol, 46%)。MS m/z 404 $(M+H)^+$。



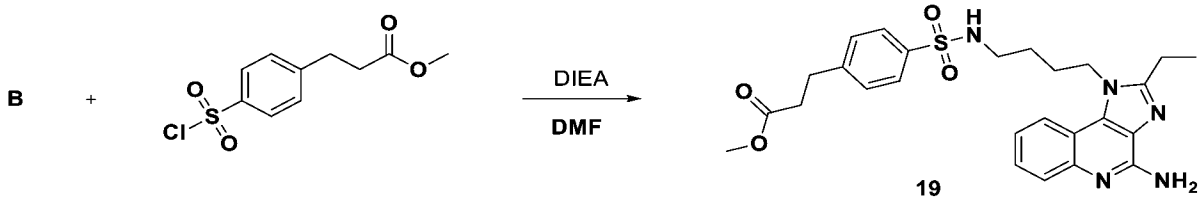
17

【0518】 **N-(4-(4-胺基-2-乙基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)-5,6,7-三甲氧基-1H-吲哚-2-甲醯胺(17)a**：使用化合物 **B** 及 5,6,7-三甲氧基-1h-吲哚-2-甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **17**，獲得靶標化合物 **17** (13 mg, 0.017 mmol, 44%)。MS m/z 517 $(M+H)^+$。



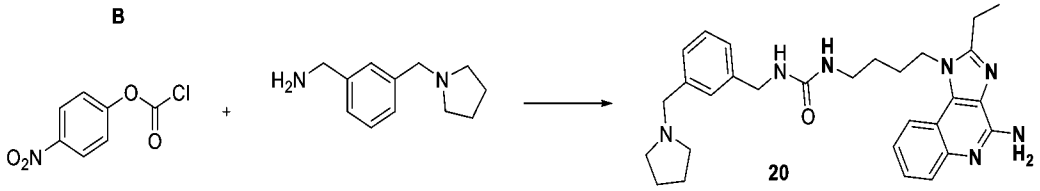
18

【0519】 **5-胺基-N-(2-(2-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)乙氧基)乙基)吡啶醯胺(18)**：使用化合物 **A** 及 5-胺基吡啶-2-甲酸作為起始材料以及與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **18**，獲得靶標化合物 **18** (24 mg, 0.036 mmol, 82%) MS m/z 448 $(M+H)^+$。

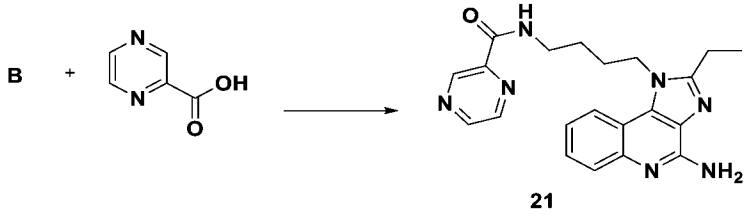


19

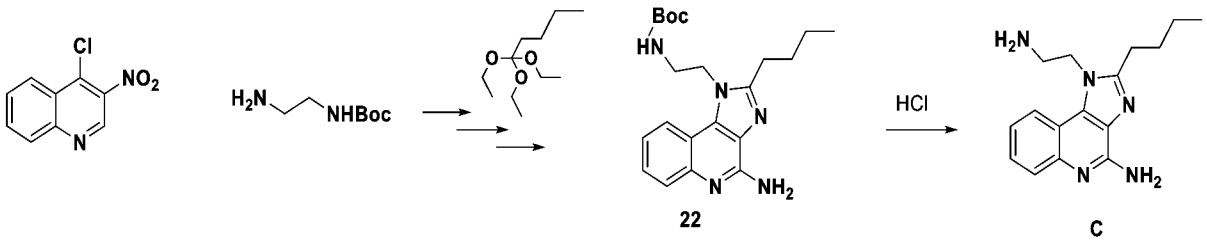
【0520】 **3-(4-(N-(4-(4-胺基-2-乙基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)胺磺醯基)苯基)丙酸甲酯(19)**：於 23°C下向化合物 **B** (14 mg, 0.035 mmol)及 5-胺基吡啶-2-甲酸(6 mg, 0.043mmol)於 DMF (1 mL)中之溶液中添加 DIEA (40 uL, 0.230 mmol)。在 30 min 後，將混合物藉由製備型 LC 純化，且乾燥，獲得呈淺黃色固體之 **19** (15 mg, 0.020 mmol, 58%)。MS m/z 510 $(M+H)^+$。



【0521】 **1-(4-(4-胺基-2-乙基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)-3-(3-(吡咯啶-1-基甲基)苄基)脲(20)**：於 23°C下向(3-(吡咯啶-1-基甲基)苯基)甲胺(19 mg, 0.100 mmol)及硝基苯基氯甲酸酯(21 mg, 0.104 mmol)於 DMF (1 mL)中之溶液中添加 DIEA (34 uL, 0.195 mmol)。在 10 min 後，LCMS 顯示硝基苯酚活化完成。向該混合物中添加化合物 **B**。在 2 h 後，將混合物藉由製備型 LC 純化且乾燥，獲得呈白色固體之 **20** (3 mg, 0.006 mmol, 6%)。

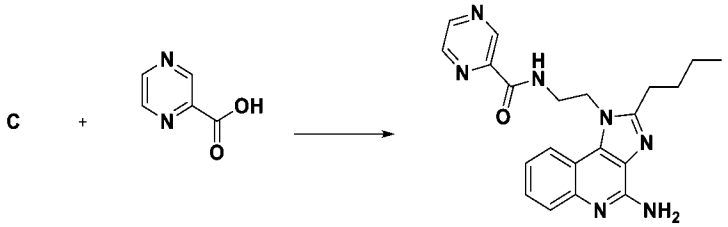


【0522】 **N-(4-(4-胺基-2-乙基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)吡嗪-2-甲醯胺(21)**：使用化合物 **B** 及吡嗪甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **28**，獲得靶標化合物 **21** (11 mg, 0.013 mmol, 23%)。MS m/z 390 $(M+H)^+$。



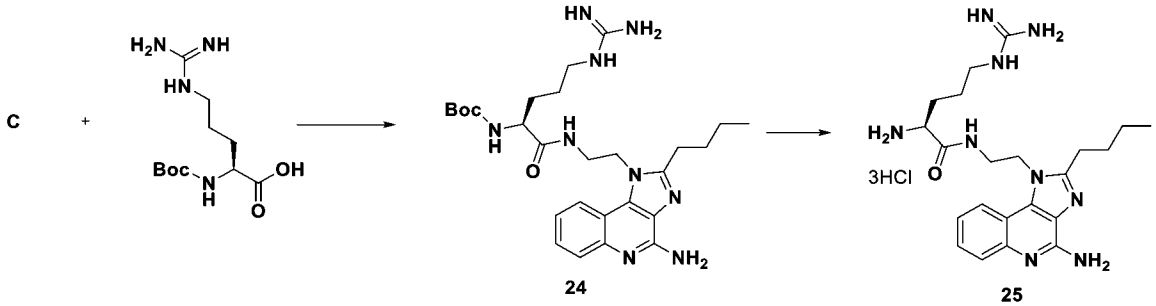
【0523】 **2-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)乙基胺基甲酸第三丁酯(22)**：使用 4-氯-3-硝基喹啉、2-胺基乙基胺基甲酸第三丁酯及原戊酸三乙酯作為起始材料，利用與針對化合物 **5** 所述類似之程序製備化合物 **22**，獲得靶標化合物 **22** (140 mg, 0.365 mmol, 33%)。MS m/z 384 $(M+H)^+$。

【0524】 **1-(4-胺基丁基)-2-乙基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-4-胺, 3 HCl (C)**：使用化合物 **22** 作為起始材料，利用與針對 **A** 所述類似之程序製備化合物 **C**，獲得靶標化合物 **C** (60 mg，0.169 mmol，定量)。MS m/z 284 $(M+H)^+$。



23

【0525】 **N-(2-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)乙基)吡嗪-2-甲醯胺(23)**：使用化合物 **C** 及吡嗪甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **23**，獲得靶標化合物 **23** (8 mg, 0.09 mmol, 29%)。MS m/z 390 $(M+H)^+$。

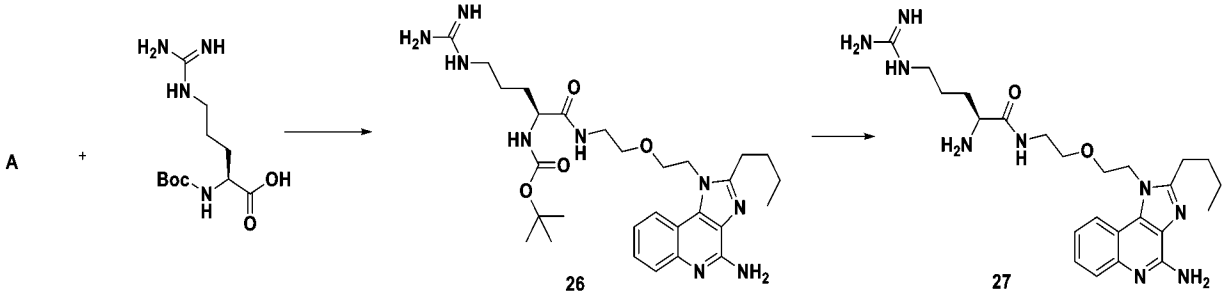


24 25

【0526】 **(S)-1-(2-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)乙基胺基)-5-胍基-1-側氧基戊-2-基胺基甲酸第三丁酯(24)**：使用化合物 **C** 及 Boc-Arg-OH 作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **24**，獲得靶標化合物 **24** (75 mg, 0.098 mmol, 79%)。MS m/z 540 $(M+H)^+$。

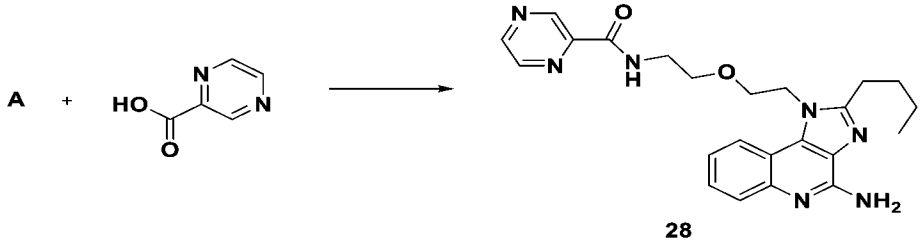
【0527】 **(S)-2-胺基-N-(2-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)乙基)-5-胍基戊醯胺 3HCl (25)**：於 23°C下向化合物 **24** (60 mg, 0.111 mmol)中添加 4 M 於二噁烷中之 HCl (1 mL, 4 mmol)。在 2 h 後，將反應物於真空中乾燥。將殘餘物

於高真空幫浦下乾燥，獲得呈白色固體之化合物 **25** (64 mg，0.110 mmol，定量)。

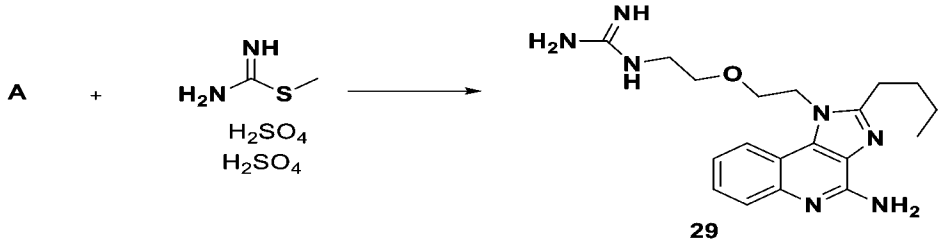


【0528】 **(S)-1-(2-(2-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)乙氧基)乙基胺基)-5-胍基-1-側氧基戊-2-基胺基甲酸第三丁酯(26)**：使用化合物 **A** 及 Boc-Arg-OH 作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **26**，獲得靶標化合物 **26** (20 mg, 0.019 mmol, 59%)。MS m/z 584 $(M+H)^+$。

【0529】 **(S)-2-胺基-N-(2-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)乙基)-5-胍基戊醯胺(27)**：使用化合物 **26** 作為起始材料，利用與針對 **25** 所述類似之程序製備化合物 **27**，獲得靶標化合物 **27** (14 mg，0.016 mmol，定量)。MS m/z 484 $(M+H)^+$。

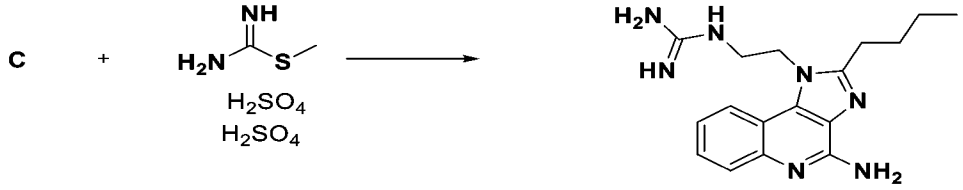


【0530】 **N-(2-(2-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)乙氧基)乙基)吡嗪-2-甲醯胺(28)**：使用化合物 **A** 及吡嗪甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **28**，獲得靶標化合物 **28** (1.3 mg, 0.001 mmol, 4%)。MS m/z 434 $(M+H)^+$。



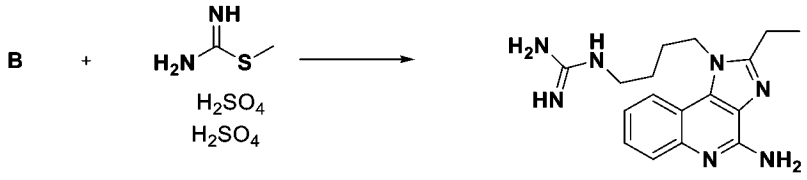
【0531】 **1-(2-(2-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)乙氧基)乙基)胍**

(29)：於 80℃下向化合物 **A** (15 mg, 0.038 mmol)及胺基甲醯胺基硫代甲酯雙(硫酸鹽) (methyl carbamimidothioate bis(sulfate)) (25 mg, 0.090 mmol)於 DMF (1 mL)及水(1 mL)中之溶液中添加 TEA (50 uL, 0.358 mmol)。在 18 h 後，將混合物藉由製備型 LC 純化，獲得化合物 **29** (12 mg, 0.017 mmol, 45%)。MS m/z 370 $(M+H)^+$。



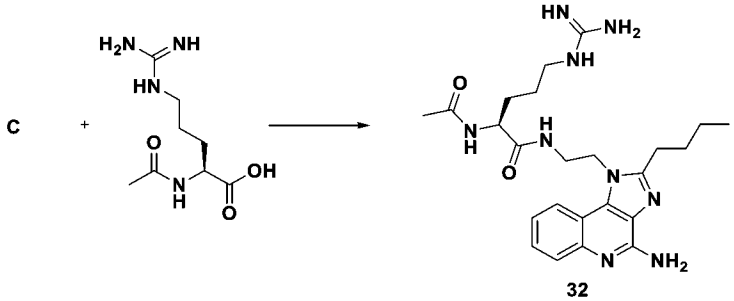
30

【0532】 **1-(2-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)乙基)胍(30)**：使用化合物 **C** 作為起始材料，利用與針對 **29** 所述類似之程序製備化合物 **30**，獲得靶標化合物 **30** (10 mg, 0.013 mmol, 29%)。MS m/z 434 $(M+H)^+$。



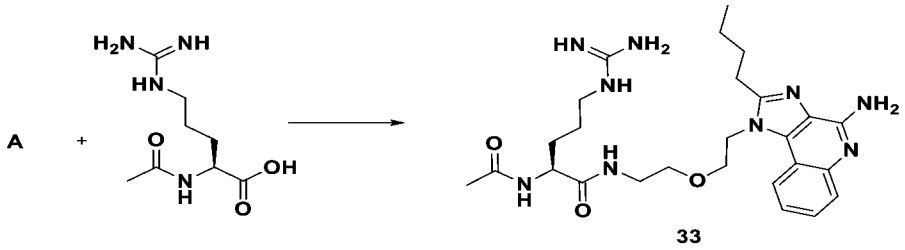
31

【0533】 **1-(4-(4-胺基-2-乙基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)胍(31)**：使用化合物 **B** 作為起始材料，利用與針對 **29** 所述類似之程序製備化合物 **31**，獲得靶標化合物 **31**(8 mg, 0.010 mmol, 29%)。MS m/z 326 $(M+H)^+$。

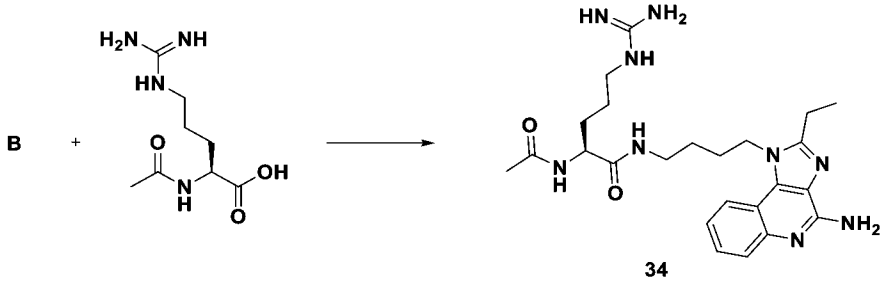


32

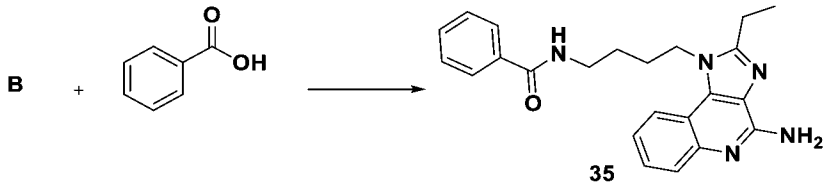
【0534】 **(S)-2-乙醯胺基-N-(2-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)乙基)-5-胍基戊醯胺(32)**：使用化合物 **C** 及乙醯基-精胺酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **32**，獲得靶標化合物 **32** (18 mg, 0.025 mmol, 69%)。MS m/z 482 $(M+H)^+$。



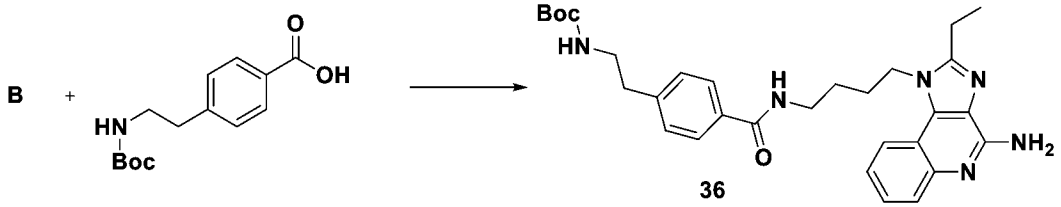
【0535】 **(S)-2-乙醯胺基-N-(2-(2-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)乙氧基)乙基)-5-胍基戊醯胺(33)**：使用化合物 **A** 及乙醯基-精胺酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **33**，獲得靶標化合物 **33** (4 mg, 0.019 mmol, 67%)。MS m/z 526 $(M+H)^+$。



【0536】 **(S)-2-乙醯胺基-N-(4-(4-胺基-2-乙基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)-5-胍基戊醯胺(34)**：使用化合物 **B** 及乙醯基-精胺酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **34**，獲得靶標化合物 **34** (5 mg, 0.007 mmol, 30%)。MS m/z 482 $(M+H)^+$。

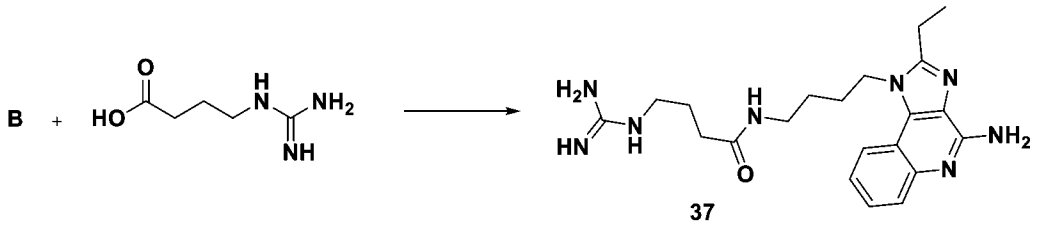


【0537】 **N-(4-(4-胺基-2-乙基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)苯甲醯胺(35)**：使用化合物 **B** 及苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **35**，獲得靶標化合物 **35** (8 mg, 0.013mmol, 53%)。MS m/z 388 $(M+H)^+$。



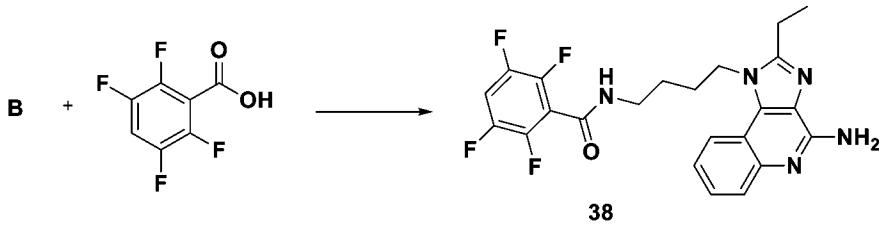
【0538】 **4-(4-(4-胺基-2-乙基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基胺基甲醯基)苯**

乙基胺基甲酸第三丁酯(36)：使用化合物 **B** 及 4-((2-boc-胺基)乙基)苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **36**，獲得靶標化合物 **36** (25 mg, 0.033 mmol, 38%)。MS m/z 531 $(M+H)^+$。



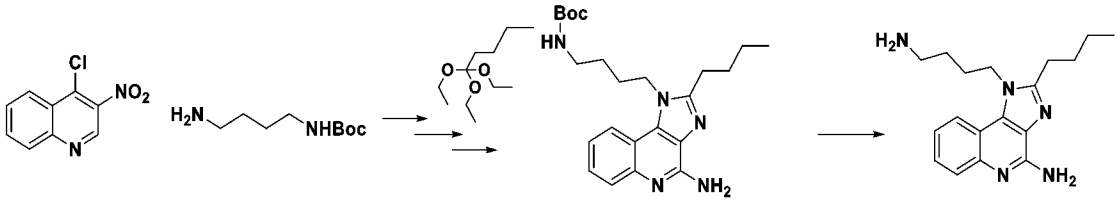
37

【0539】 **N-(4-(4-胺基-2-乙基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)-4-胍基丁醯胺(37)**：使用化合物 **B** 及 4-胍基丁酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **37**，獲得靶標化合物 **37** (10 mg, 0.016 mmol, 45%)。MS m/z 411 $(M+H)^+$。



38

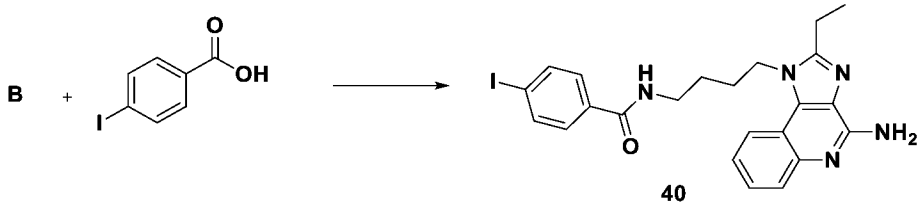
【0540】 **N-(4-(4-胺基-2-乙基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)-2,3,5,6-四氟苯甲醯胺(38)**：使用化合物 **B** 及 2,3,5,6-四氟苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **38**，獲得靶標化合物 **38** (7 mg, 0.010 mmol, 36%)。MS m/z 460 $(M+H)^+$。



39 D

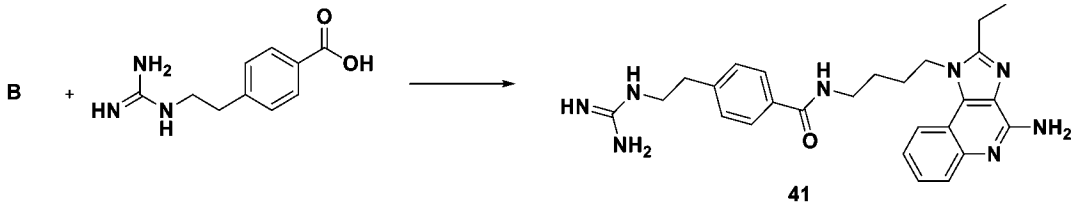
【0541】 **4-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基胺基甲酸第三丁酯(39)**：使用 4-氯-3-硝基喹啉、4-胺基丁基胺基甲酸第三丁酯及原戊酸三乙酯作為起始材料，利用與針對化合物 **5** 所述類似之程序製備化合物 **39**，獲得靶標化合物 **39** (177 mg，0.430 mmol，20%來自起始材料)。MS m/z 412 $(M+H)^+$。

【0542】 **1-(4-胺基丁基)-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-4-胺, 3 HCl (D)**：使用化合物 **39** 作為起始材料，利用與針對 **A** 所述類似之程序製備化合物 **D**，獲得靶標化合物 **D** (180 mg，0.431 mmol，定量)。MS m/z 312 $(M+H)^+$。



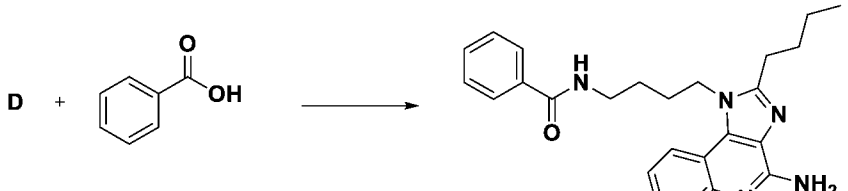
40

【0543】 **N-(4-(4-胺基-2-乙基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)-4-碘苯甲醯胺(40)**：使用化合物 **B** 及 4-碘苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **40**，獲得靶標化合物 **40** (15 mg, 0.020 mmol, 72%)。MS m/z 514 $(M+H)^+$。



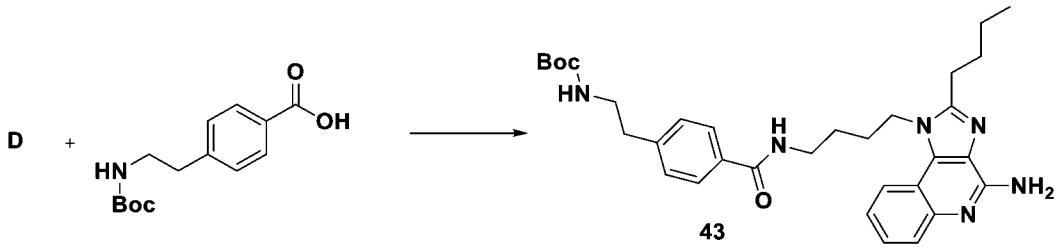
41

【0544】 **N-(4-(4-胺基-2-乙基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)-4-(2-胍基乙基)苯甲醯胺(41)**：使用化合物 **B** 及 4-(2-胍基乙基)苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **41**，獲得靶標化合物 **41** (7 mg, 0.009 mmol, 29%) MS m/z 473 $(M+H)^+$。



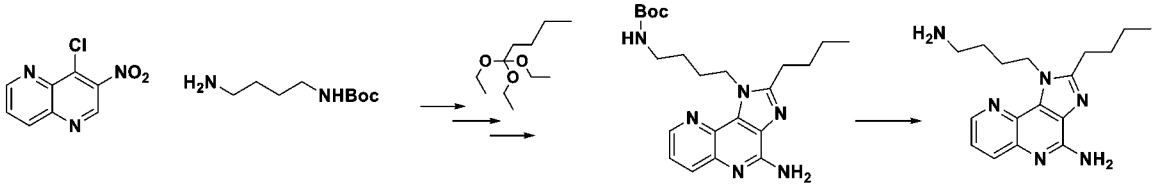
42

【0545】 **N-(4-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)苯甲醯胺(42)**：使用化合物 **D** 及苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **42**，獲得靶標化合物 **42** (6 mg, 0.012 mmol, 38%)。MS m/z 416 $(M+H)^+$。



43

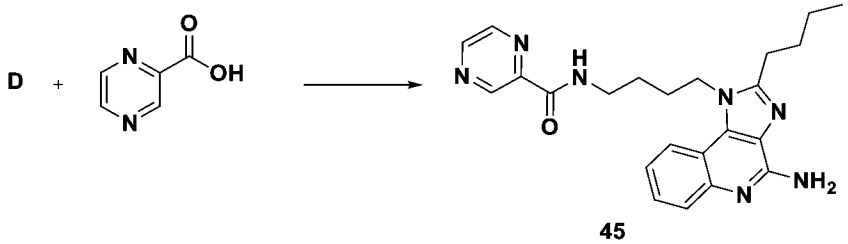
【0546】 **4-(4-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基胺基甲醯基)苯乙基胺基甲酸第三丁酯(43)**：使用化合物 **D** 及 4-((2-boc-胺基)乙基)苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **43**，獲得靶標化合物 **43** (9 mg, 0.010 mmol, 38%)。MS m/z 559 $(M+H)^+$。



44 E

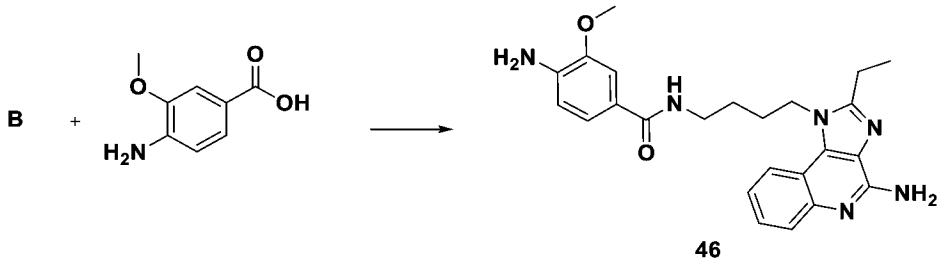
【0547】 **4-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基胺基甲酸第三丁酯(44)**：使用 4-氯-3-硝基-1,5-萘啶、4-胺基丁基胺基甲酸第三丁酯及原戊酸三乙酯作為起始材料，利用與針對 **5** 所述類似之程序製備化合物 **44**，獲得靶標化合物 **44** (120 mg，0.159 mmol，5.3%來自起始材料)。MS m/z 413 $(M+H)^+$。

【0548】 **1-(4-胺基丁基)-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c][1,5]萘啶-4-胺, 4 HCl (E)**：使用化合物 **44** 作為起始材料，利用與針對 **A** 所述類似之程序製備化合物 **E**，獲得靶標化合物 **E** (145 mg，0.296 mmol，定量)。MS m/z 313 $(M+H)^+$

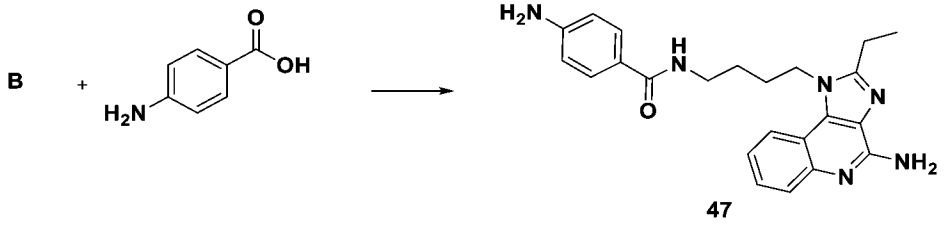


45

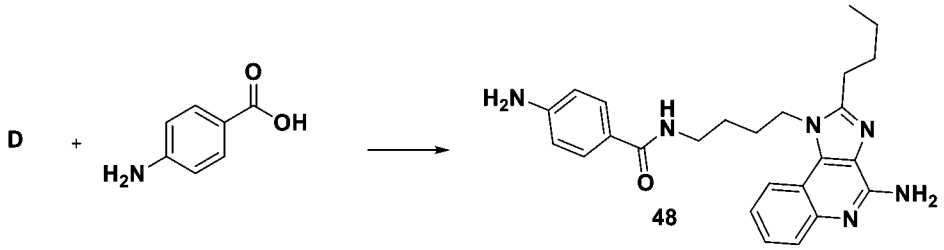
【0549】 **N-(4-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)吡嗪-2-甲醯胺(45)**：使用化合物 **D** 及吡嗪甲酸作為起始材料，利用與針對 16 所述類似之程序製備化合物 **45**，獲得靶標化合物 **45** (4 mg, 0.004 mmol, 14%) MS m/z 418 $(M+H)^+$。



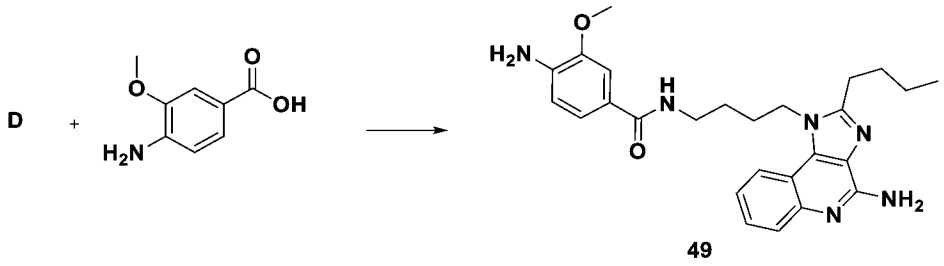
【0550】 **4-胺基-N-(4-(4-胺基-2-乙基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)-3-甲氧基苯甲醯胺(46)**：使用化合物 **B** 及 4-胺基-3-甲氧基苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **46**，獲得靶標化合物 **46** (12.1 mg, 0.014 mmol, 58%)。MS m/z 433 $(M+H)^+$。



【0551】 **4-胺基-N-(4-(4-胺基-2-乙基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)苯甲醯胺(47)**：使用化合物 **B** 及 4-胺基苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **47**，獲得靶標化合物 **47** (6 mg, 0.007 mmol, 30%)。MS m/z 403 $(M+H)^+$。

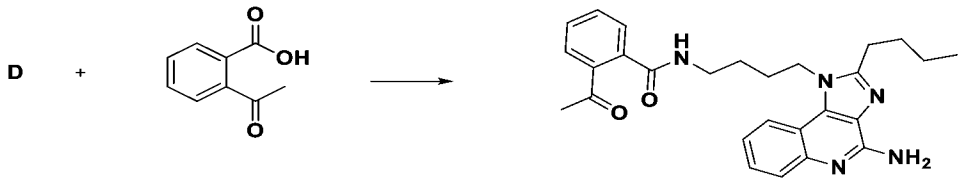


【0552】 **4-胺基-N-(4-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)苯甲醯胺(48)**：使用化合物 **D** 及 4-胺基苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **48**，獲得靶標化合物 **48** (0.4 mg, 0.0005 mmol, 2%)。MS m/z 431 $(M+H)^+$。



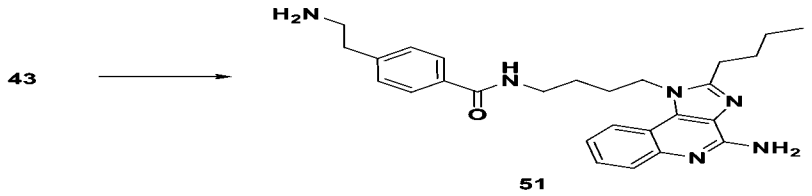
49

【0553】 **4-胺基-N-(4-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)-3-甲氧基苯甲醯胺(49)**：使用化合物 **D** 及 4-胺基-3-甲氧基苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **49**，獲得靶標化合物 **49** (4.2 mg, 0.005 mmol, 21%)。MS m/z 461 $(M+H)^+$。



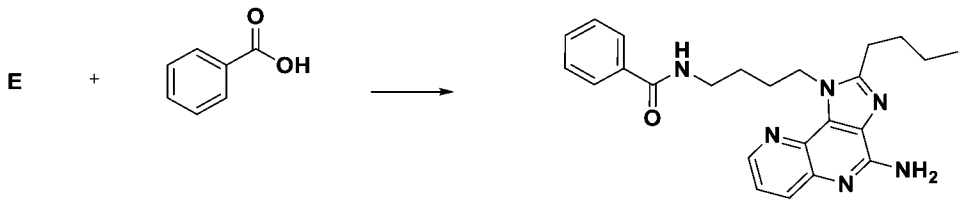
50

【0554】 **2-乙醯基-N-(4-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)苯甲醯胺(50)**：使用化合物 **D** 及 2-乙醯基苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **50**，獲得靶標化合物 **50** (7.6 mg, 0.01 mmol, 43%)。MS m/z 458 $(M+H)^+$。



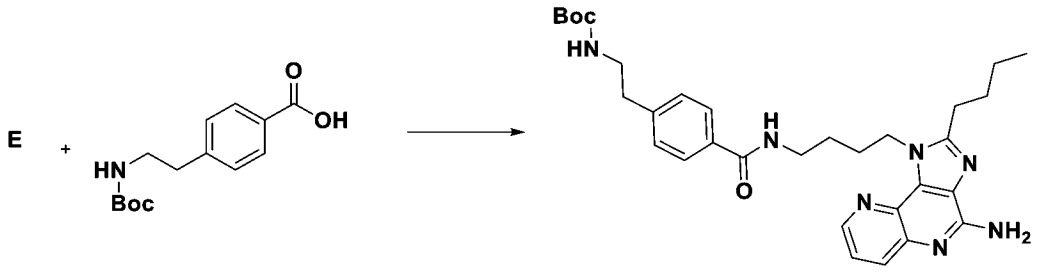
51

【0555】 **N-(4-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)-4-(2-胺基乙基)苯甲醯胺, 4 HCl (51)**：使用化合物 **43** 作為起始材料，利用與針對 **A** 所述類似之程序製備化合物 **51**，獲得靶標化合物 **51** (10 mg，0.017 mmol，定量)。MS m/z 459 $(M+H)^+$



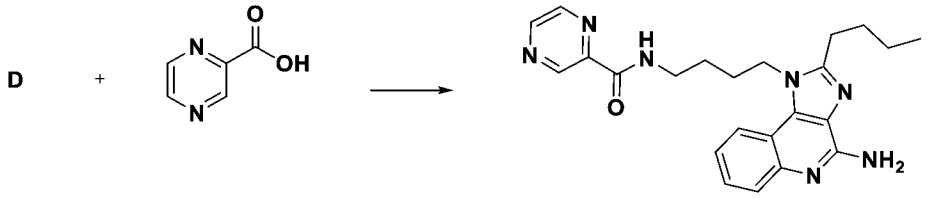
52

【0556】 **N-(4-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c][1,5]萘啶-1-基)丁基)苯甲醯胺苯甲醯胺(52)**：使用化合物 **E** 及苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **52**，獲得靶標化合物 **52** (1.5 mg, 0.002 mmol, 8%)。MS m/z 417 $(M+H)^+$。



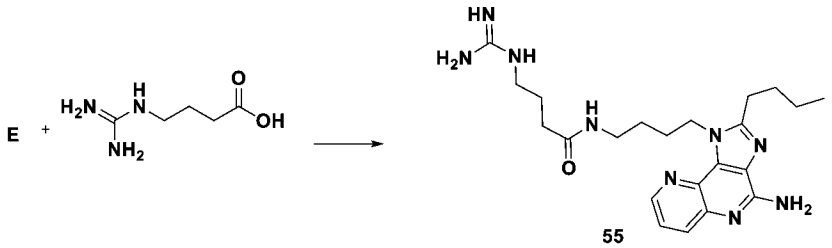
53

【0557】 **4-(4-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c][1,5]萘啶-1-基)丁基胺基甲醯基)苯乙基胺基甲酸第三丁酯(53)**：使用化合物 **E** 及 4-((2-boc-胺基)乙基)苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **53**，獲得靶標化合物 **53** (3.8 mg, 0.004 mmol, 16%)。MS m/z 560 $(M+H)^+$。



54

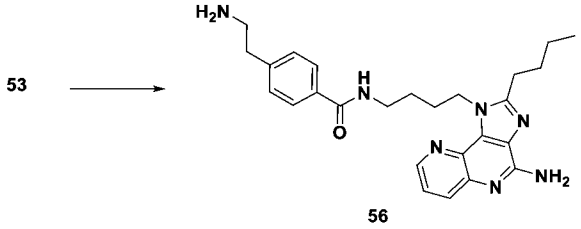
【0558】 **N-(4-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c][1,5]萘啶-1-基)丁基)吡嗪-2-甲醯胺(54)**：使用化合物 **D** 及吡嗪甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **54**，獲得靶標化合物 **54** (3 mg, 0.004mmol, 20%)。MS m/z 419 $(M+H)^+$。



55

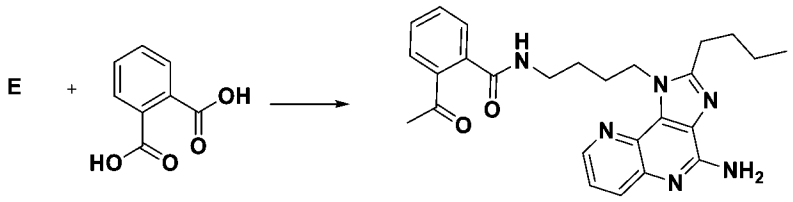
【0559】 **N-(4-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c][1,5]萘啶-1-基)丁基)-4-胍基丁醯胺(55)**：使用化合物 **E** 及 4-胍基甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似

之程序製備化合物 **55**，獲得靶標化合物 **55** (2 mg, 0.003 mmol, 12%)。MS m/z 440 $(M+H)^+$。



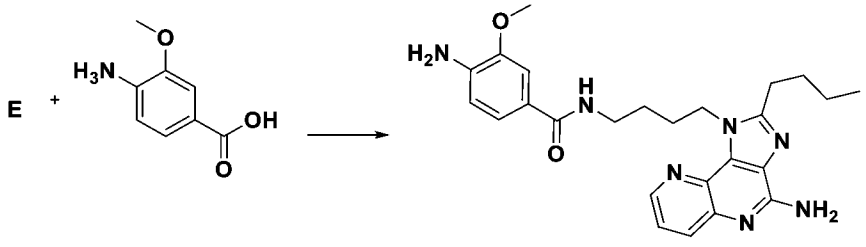
56

【0560】 **N-(4-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c][1,5]萘啶-1-基)丁基)-4-(2-胺基乙基)苯甲醯胺, 4TFA (56)**：於 23°C下向化合物 **53** (3.6 mg, 0.006 mmol)中添加 DCM (0.5 mL)及 TFA (1 ml)。在 20 min 後，將反應物於真空中乾燥，接著於高真空幫浦下乾燥隔夜，獲得靶標化合物 **56** (7 mg, 0.008 mmol, quant)。MS m/z 460 $(M+H)^+$。



57

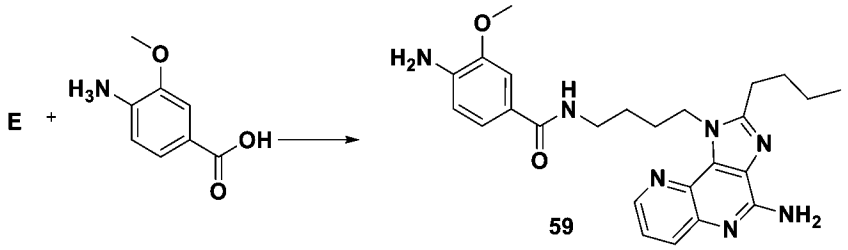
【0561】 **2-乙醯基-N-(4-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c][1,5]萘啶-1-基)丁基)苯甲醯胺(57)**：使用化合物 **E** 及 2-乙醯基苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **57**，獲得靶標化合物 **57** (5.2 mg, 0.006 mmol, 27%)。MS m/z 459 $(M+H)^+$。



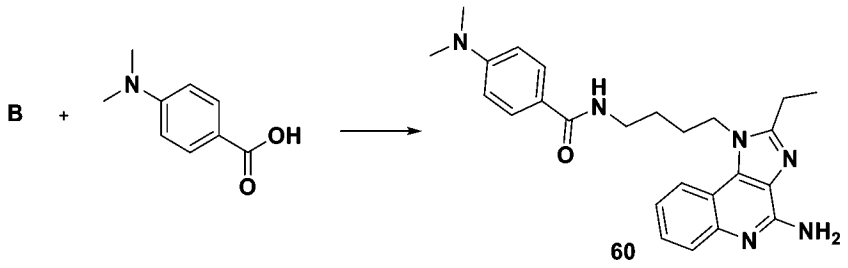
58

【0562】 **4-胺基-N-(4-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c][1,5]萘啶-1-基)丁基)-3-甲氧基苯甲醯胺(58)**：使用化合物 **E** 及 4-胺基-3-甲氧基苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **58**，獲得靶標化合物 **58** ((4.3 mg,

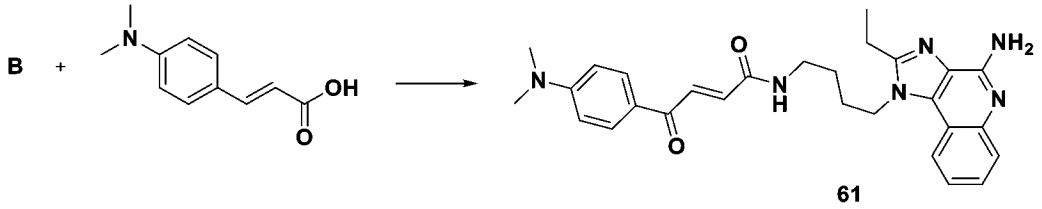
0.04 mmol, 20%) MS m/z 462 $(M+H)^+$。



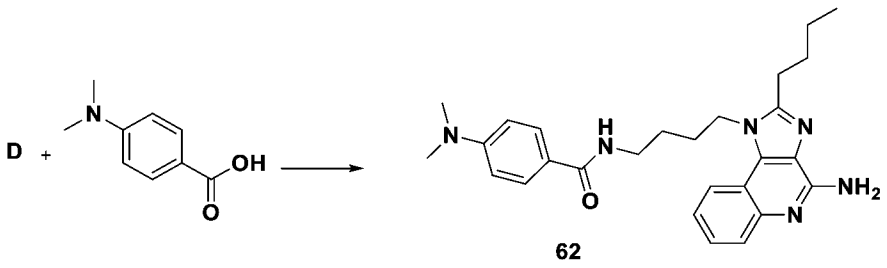
【0563】 **4-胺基-N-(4-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)苯甲醯胺(59)**：使用化合物 **E** 及 4-胺基苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **59**，獲得靶標化合物 **59** (1.6 mg, 0.002 mmol, 8%) MS m/z 432 $(M+H)^+$。



【0564】 **N-(4-(4-胺基-2-乙基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)-4-(二甲基胺基)苯甲醯胺(60)**：使用化合物 **B** 及 4-二甲基胺基苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **60**，獲得靶標化合物 **60** (1 mg, 0.001 mmol, 6%)。MS m/z 431 $(M+H)^+$。

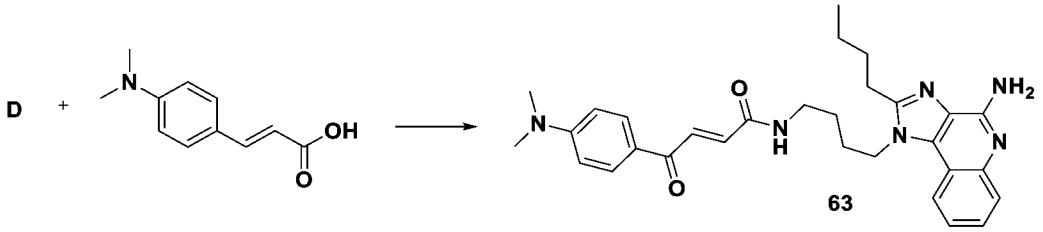


【0565】 **(E)-N-(4-(4-胺基-2-乙基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)-3-(4-(二甲基胺基)苯基)丙烯醯胺(61)**：使用化合物 **B** 及 4-二甲基胺基肉桂酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **61**，獲得靶標化合物 **61** (2 mg, 0.003 mmol, 11%)。MS m/z 457 $(M+H)^+$。



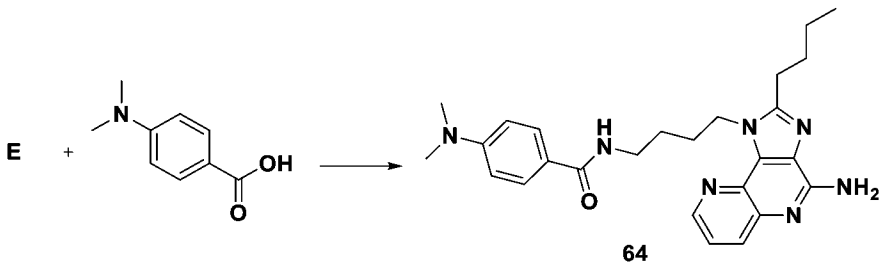
62

【0566】　N-(4-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)-4-(二甲基胺基)苯甲醯胺(62)：使用化合物 **D** 及 4-二甲基胺基苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **62**，獲得靶標化合物 **62** (3.5 mg, 0.004 mmol, 20%)。MS m/z 459 $(M+H)^+$。



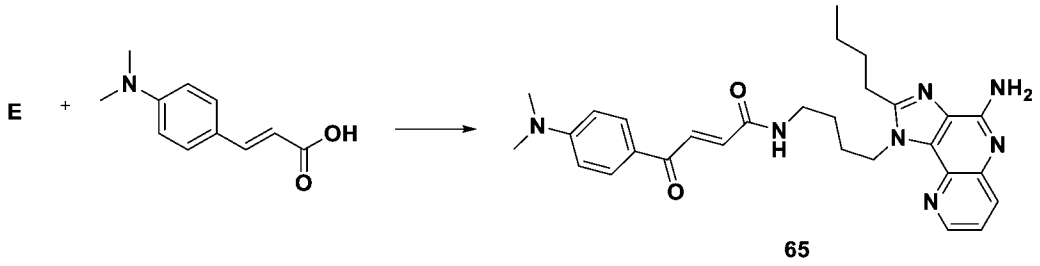
63

【0567】　(E)-N-(4-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)-3-(4-(二甲基胺基)苯基)丙烯醯胺(63)：使用化合物 **D** 及 4-二甲基胺基肉桂酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **63**，獲得靶標化合物 **63** (4.5 mg, 0.005 mmol, 25%)。MS m/z 485 $(M+H)^+$



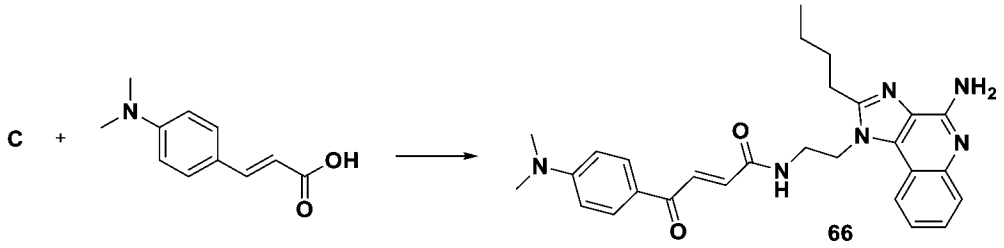
64

【0568】　N-(4-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c][1,5]萘啶-1-基)丁基)-4-(二甲基胺基)苯甲醯胺(64)：使用化合物 E 及 4-二甲基胺基苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **64**，獲得靶標化合物 **64** (0.5 mg, 0.001 mmol, 7%)。MS m/z 460 $(M+H)^+$。



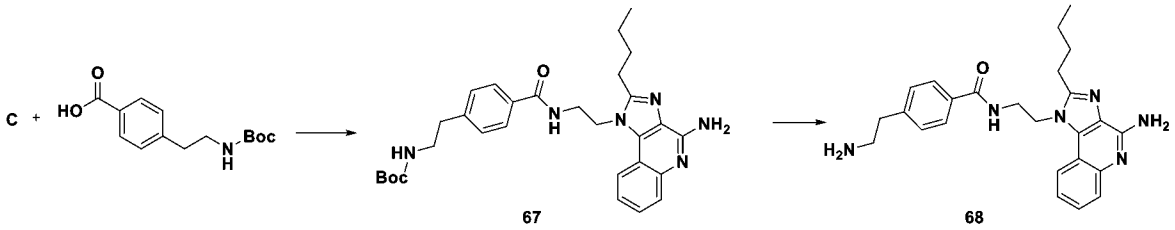
65

【0569】 **(E)-N-(4-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c][1,5]萘啶-1-基)丁基)-3-(4-(二甲基胺基)苯基)丙烯醯胺(65)**：使用化合物 **E** 及 4-二甲基胺基肉桂酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **65**，獲得靶標化合物 **65** (0.5 mg, 0.001 mmol, 7%)。MS m/z 486 $(M+H)^+$。



66

【0570】 **(E)-N-(2-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)乙基)-3-(4-(二甲基胺基)苯基)丙烯醯胺(66)**：使用化合物 **C** 及 4-二甲基胺基肉桂酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **66**，獲得靶標化合物 **66** (3 mg, 0.004 mmol, 16%)。MS m/z 457 $(M+H)^+$。

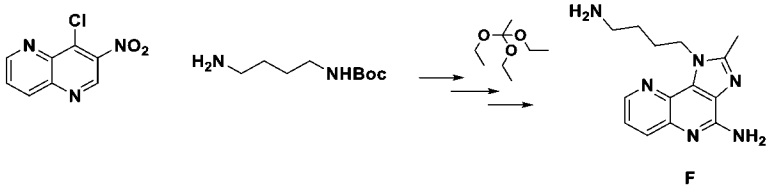


67 68

【0571】 **4-(2-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)乙基胺基甲醯基)苯乙基胺基甲酸第三丁酯(67)**：使用化合物 **C** 及 4-(2-(第三丁氧基羰基胺基)乙基)苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **67**，獲得靶標化合物 **67** (1.5 mg, 0.002 mmol, 11%)。MS m/z 457 $(M+H)^+$。

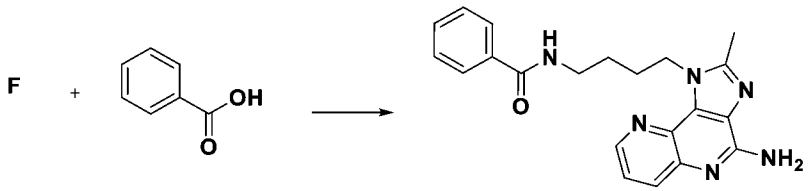
【0572】 **N-(2-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)乙基)-4-(2-胺基乙基)苯甲醯胺(68)**：使用化合物 **67** 作為起始材料，利用與針對 **56** 所述類似之程

序製備化合物 **68**，獲得靶標化合物 **68** (2.9 mg，0.003 mmol，定量)。MS m/z 431 $(M+H)^+$。



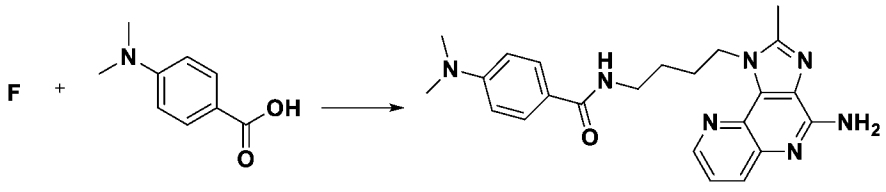
F

【0573】 **1-(4-胺基丁基)-2-乙基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-4-胺(F)**：使用 4-氯-3-硝基-1,5-萘啶、4-胺基丁基胺基甲酸第三丁酯及原乙酸三乙酯作為起始材料，利用與針對 **A** 所述類似之程序製備化合物 **F**，獲得靶標化合物 **F** (130 mg，0.316 mmol，9%來自起始材料)。MS m/z 270 $(M+H)^+$。



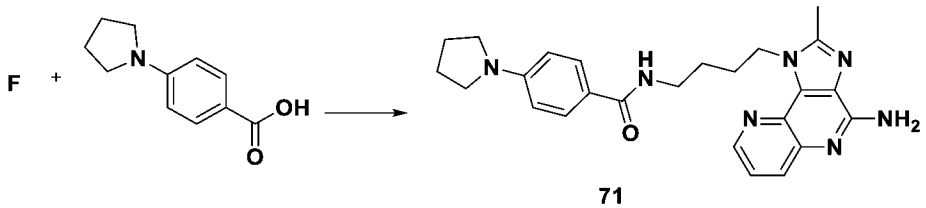
69

【0574】 **N-(4-(4-胺基-2-甲基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)苯甲醯胺(69)**：使用化合物 **F** 及苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **69**，獲得靶標化合物 **69** (6.5 mg, 0.008 mmol, 42%)。MS m/z 374 $(M+H)^+$。



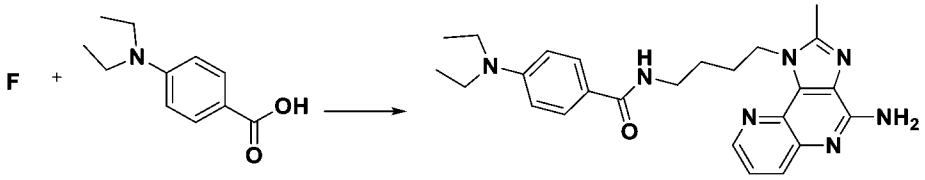
70

【0575】 **N-(4-(4-胺基-2-甲基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)-4-(二甲基胺基)苯甲醯胺(70)**：使用化合物 **F** 及 4-二甲基胺基苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **70**，獲得靶標化合物 **70** (6.5mg, 0.009 mmol, 39%)。MS m/z 417 $(M+H)^+$。



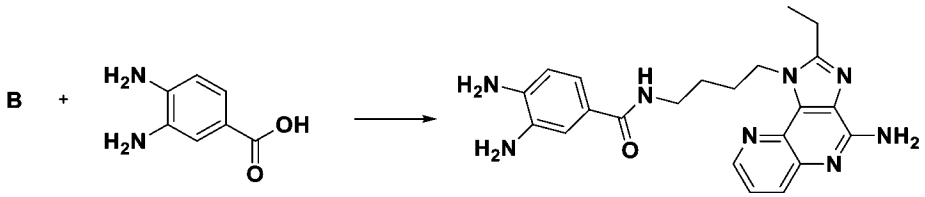
71

【0576】 **N-(4-(4-胺基-2-甲基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)-4-(吡咯啶-1-基)苯甲醯胺(71)**：使用化合物 **F** 及 4-(1-吡咯啶基苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **71**，獲得靶標化合物 **71** (3.1 mg, 0.004 mmol, 18%)。MS m/z 443 $(M+H)^+$。



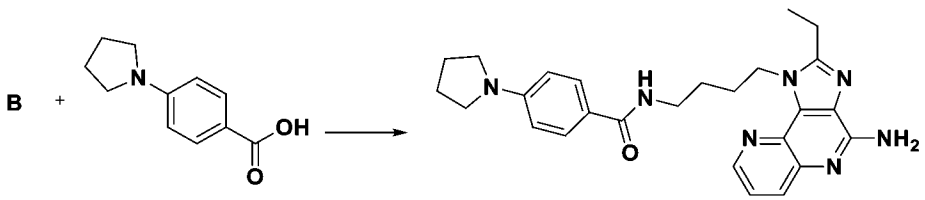
72

【0577】 **N-(4-(4-胺基-2-甲基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)-4-(二乙基胺基)苯甲醯胺(72)**：使用化合物 **F** 及 4-(二乙基胺基)苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **72**，獲得靶標化合物 **72** (6.4 mg, 0.008 mmol, 41%)。MS m/z 445 $(M+H)^+$。



73

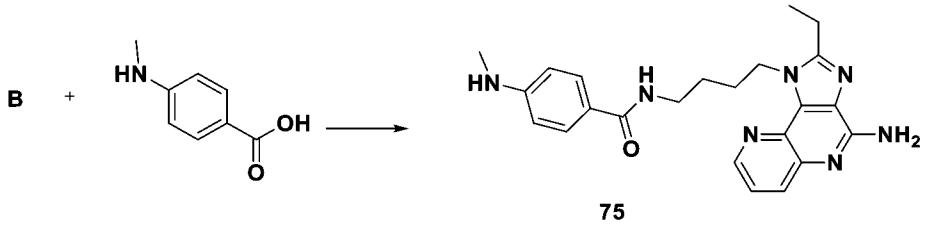
【0578】 **3,4-二胺基-N-(4-(4-胺基-2-乙基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)苯甲醯胺(73)**：使用化合物 **B** 及 3,4-二胺基苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **73**，獲得靶標化合物 **73** (1.1 mg, 0.001 mmol, 4%)。MS m/z 418 $(M+H)^+$。



74

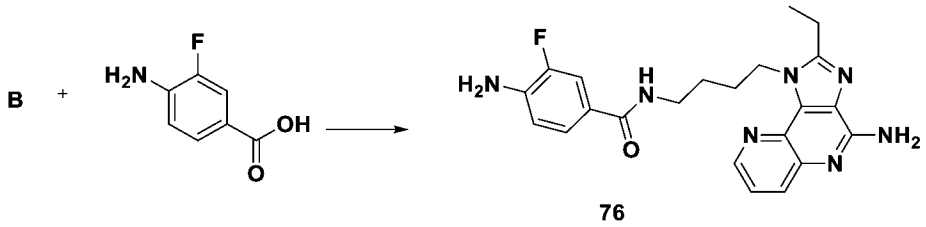
【0579】 **N-(4-(4-胺基-2-乙基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)-4-(吡咯啶-1-基)苯甲醯胺(74)**：使用化合物 **B** 及 4-(吡咯啶-1-基)苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **74**，獲得靶標化合物 **74** (4.5 mg, 0.005

mmol, 19%)。MS m/z 457 $(M+H)^+$。



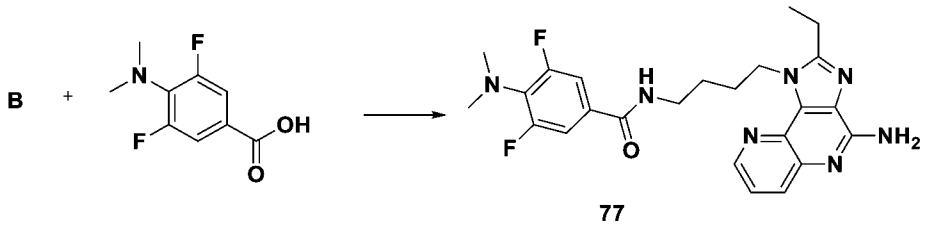
75

【0580】 **N-(4-(4-胺基-2-乙基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)-4-(甲基胺基)苯甲醯胺(75)**：使用化合物 **B** 及 4-甲基胺基苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **75**，獲得靶標化合物 **75** (7.6 mg, 0.009 mmol, 33%)。MS m/z 417 $(M+H)^+$。



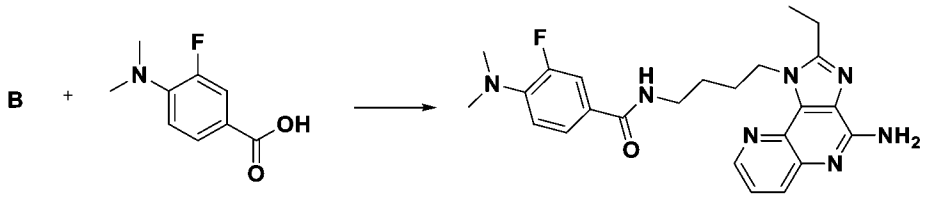
76

【0581】 **4-胺基-N-(4-(4-胺基-2-乙基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)-3-氟苯甲醯胺(76)**：使用化合物 **B** 及 3-氟-4-胺基苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **76**，獲得靶標化合物 **76** (7 mg, 0.008 mmol, 31%)。MS m/z 421 $(M+H)^+$。



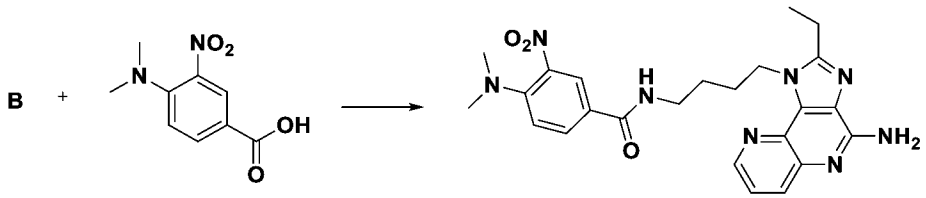
77

【0582】 **N-(4-(4-胺基-2-乙基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)-4-(二甲基胺基)-3,5-二氟苯甲醯胺(77)**：使用化合物 **B** 及 4-(二甲基胺基)-3,5-二氟苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **77**，獲得靶標化合物 **77** (9.5 mg, 0.010 mmol, 41%)。MS m/z 467 $(M+H)^+$。



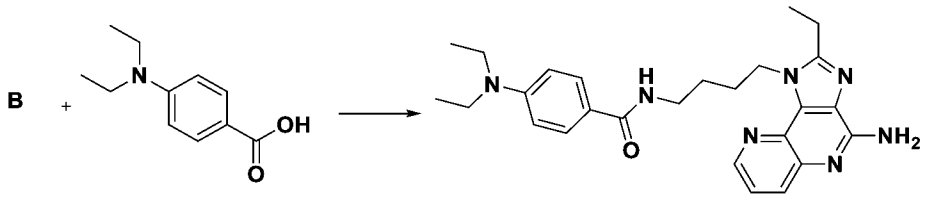
78

【0583】 **N-(4-(4-胺基-2-乙基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)-4-(二甲基胺基)-3-氟苯甲醯胺(78)**：使用化合物 **B** 及 4-(二甲基胺基)-3-氟苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **78**，獲得靶標化合物 **78** (12 mg, 0.013 mmol, 49%)。MS m/z 449 $(M+H)^+$。



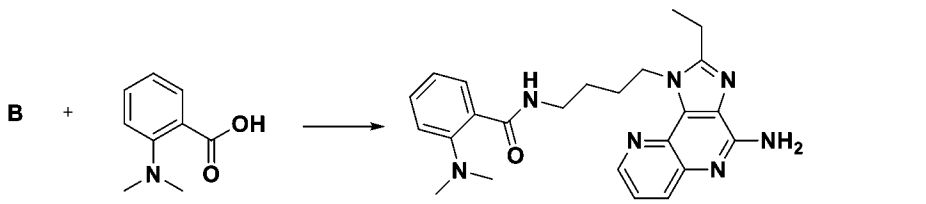
79

【0584】 **N-(4-(4-胺基-2-乙基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)-4-(二甲基胺基)-3-硝基苯甲醯胺(79)**：使用化合物 **B** 及 4-(二甲基胺基)-3-硝基苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **79**，獲得靶標化合物 **79** (11 mg, 0.012 mmol, 50%)。MS m/z 476 $(M+H)^+$。



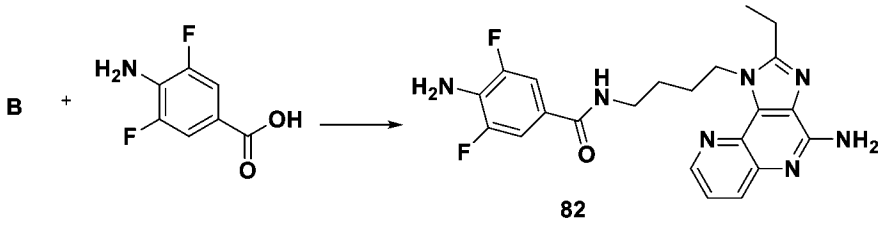
80

【0585】 **N-(4-(4-胺基-2-乙基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)-4-(二乙基胺基)苯甲醯胺(80)**：使用化合物 **B** 及 4-(二乙基胺基)苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **80**，獲得靶標化合物 **80** (10 mg, 0.011 mmol, 42%)。MS m/z 459 $(M+H)^+$。



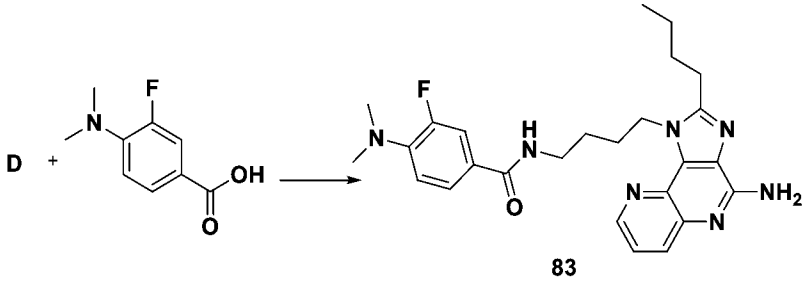
81

【0586】 **N-(4-(4-胺基-2-乙基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)-2-(二甲基胺基)苯甲醯胺(81)**：使用化合物 **B** 及 2-(二乙基胺基)苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **81**，獲得靶標化合物 **81** (12.2 mg, 0.014 mmol, 57%)。MS m/z 431 $(M+H)^+$。



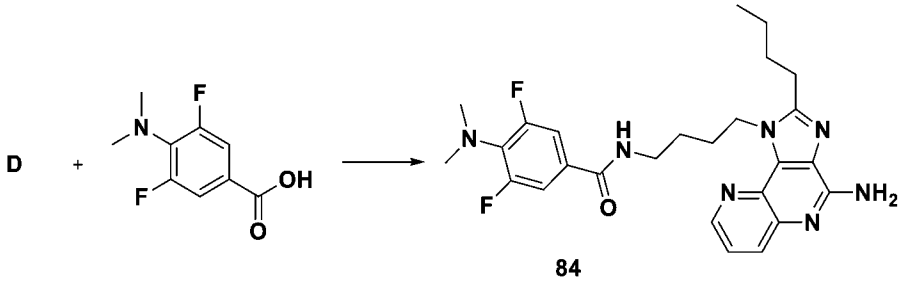
82

【0587】 **4-胺基-N-(4-(4-胺基-2-乙基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)-3,5-二氟苯甲醯胺(82)**：使用化合物 **B** 及 4-胺基-3,5-二氟苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **82**，獲得靶標化合物 **82** (10.2 mg, 0.011 mmol, 49%,)。MS m/z 439 $(M+H)^+$。



83

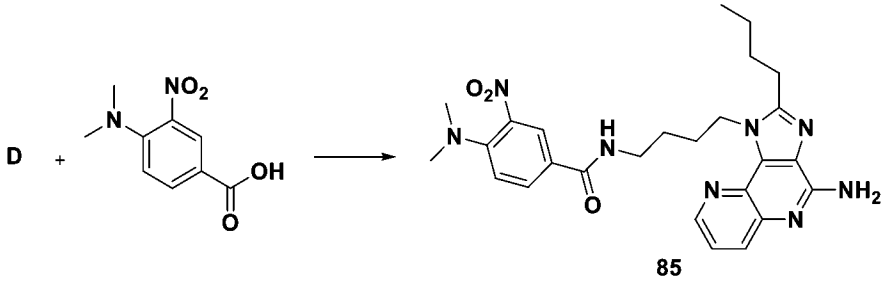
【0588】 **N-(4-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)-4-(二甲基胺基)-3-氟苯甲醯胺(83)**：使用化合物 **D** 及 4-(二甲基胺基)-3-氟苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **83**，獲得靶標化合物 **83** (9 mg, 0.011 mmol, 50%)。MS m/z 477 $(M+H)^+$。



84

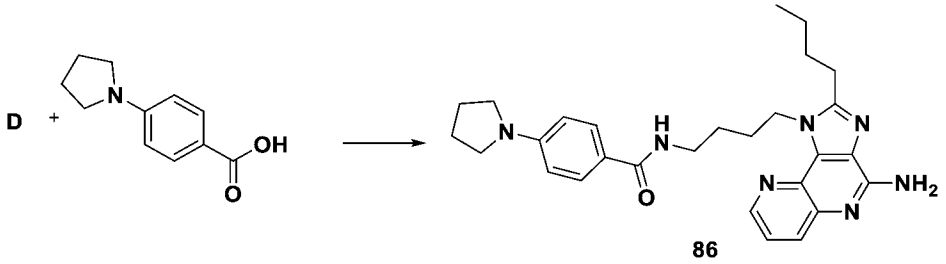
【0589】 **N-(4-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)-4-(二甲基胺基)-3,5-二氟苯甲醯胺(84)**：使用化合物 **D** 及 4-(二甲基胺基)-3,5-二氟苯甲酸作為

起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **84**，獲得靶標化合物 **84** (7 mg, 0.008 mmol, 38%)。MS m/z 495 $(M+H)^+$。



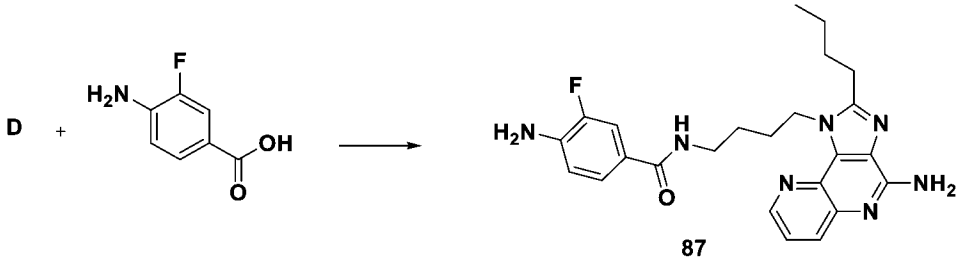
85

【0590】 **N-(4-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)-4-(二甲基胺基)-3-硝基苯甲醯胺(85)**：使用化合物 **D** 及 4-(二甲基胺基)-3-硝基苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **85**，獲得靶標化合物 **85** (10 mg, 0.012 mmol, 54%)。MS m/z 504 $(M+H)^+$。



86

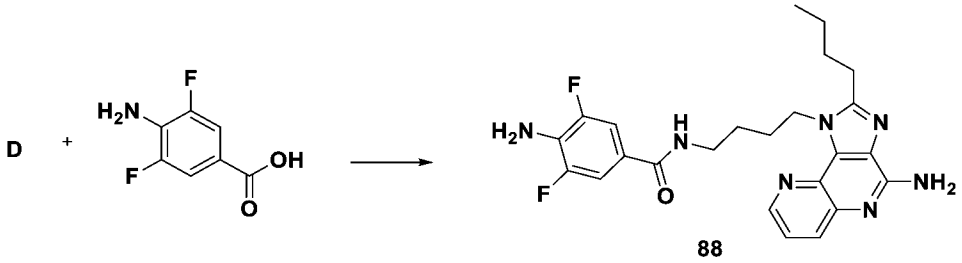
【0591】 **N-(4-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)-4-(吡咯啶-1-基)苯甲醯胺(86)**：使用化合物 **D** 及 4-(1-吡咯啶基胺基)苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **86**，獲得靶標化合物 **86** (2 mg, 0.002 mmol, 11%)。MS m/z 485 $(M+H)^+$。



87

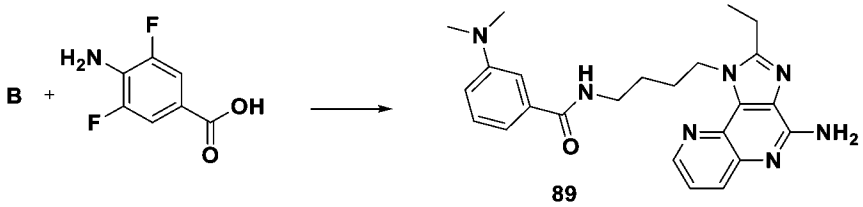
【0592】 **4-胺基-N-(4-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)-3-氟苯甲醯胺(87)**：使用化合物 **D** 及 4-胺基-3-氟-苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 87，獲得靶標化合物 **87** (6 mg, 0.008 mmol, 20%)。

MS m/z 449 $(M+H)^+$。



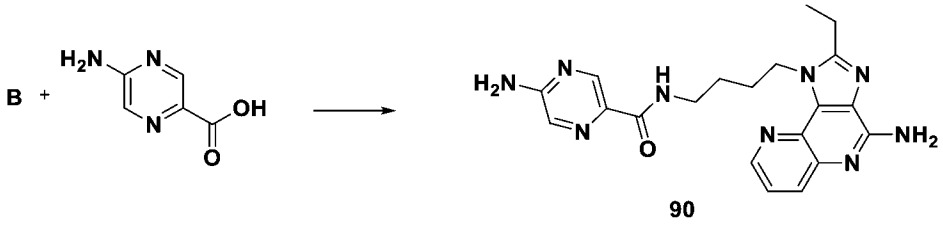
88

【0593】 **4-胺基-N-(4-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)-3,5-二氟苯甲醯胺(88)**：使用化合物 **D** 及 4-胺基-3,5-二氟-苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **88**，獲得靶標化合物 **88** (6 mg, 0.007 mmol, 34%)。MS m/z 467 $(M+H)^+$。



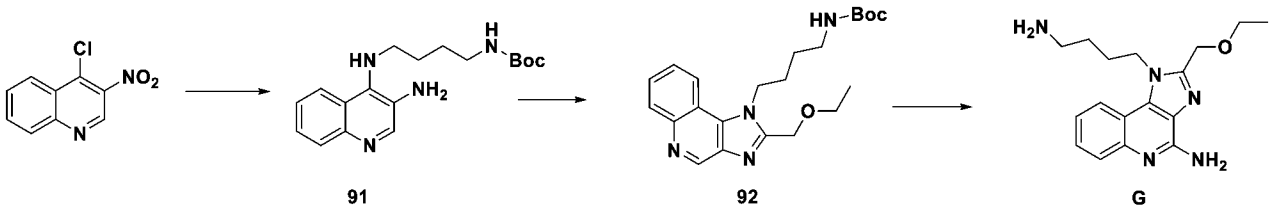
89

【0594】 **N-(4-(4-胺基-2-乙基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)-4-(二甲基胺基)苯甲醯胺(89)**：使用化合物 **B** 及 4-胺基-3,5-二氟苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **89**，獲得靶標化合物 **89** (10 mg, 0.011mmol, 27%)。MS m/z 431 $(M+H)^+$。



90

【0595】 **5-胺基-N-(4-(4-胺基-2-乙基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)吡嗪-2-甲醯胺(90)**：使用化合物 **B** 及 5-胺基吡嗪-2-甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **90**，獲得靶標化合物 **90** (8 mg, 0.009 mmol, 37%)。MS m/z 405 $(M+H)^+$。

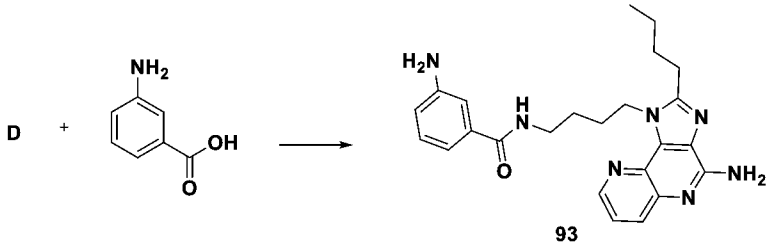


91 92 G

【0596】 **4-(3-胺基喹啉-4-基胺基)丁基胺基甲酸第三丁酯(91)**：使用 4-氯-3-硝基喹啉及 4-胺基丁基胺基甲酸第三丁酯，利用與針對 **2** 所述類似之程序製備化合物 **91**，獲得靶標化合物 **91** (5050 mg，15.284 mmol，97%來自起始材料)。MS m/z 331 $(M+H)^+$。

【0597】 **4-(2-(乙氧基甲基)-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基胺基甲酸第三丁酯(92)**：於 23°C下向 4-(3-胺基喹啉-4-基胺基)丁基胺基甲酸第三丁酯(1070 mg, 3.238 mmol)於無水 THF (12 mL)中之溶液中添加三乙胺(885 uL, 8.746 mmol)及 2-乙氧基乙醯基氯(500 mg, 4.078 mmol)。在 20 h 後，於真空中去除溶劑。將殘餘物溶解於 DCM (50 mL)中，用飽和碳酸氫鈉(50 mL)及鹽水(50 mL)洗滌，且經 $MgSO_4$ 乾燥，獲得呈粗製物之中間體(4-(3-(2-乙氧基乙醯胺基)喹啉-4-基胺基)丁基胺基甲酸第三丁酯)。於密封管中將該粗製物溶解於 MeOH (5 mL)中，接著添加氧化鈣(0.5 g)。將反應混合物於 120°C下加熱 2.5 h。在藉由過濾去除 CaO 後於真空下去除溶劑，且將殘餘物藉由製備型 LC 純化，獲得化合物 **92** (346 mg, 0.868 mmol, 27%)。MS m/z 399 $(M+H)^+$。

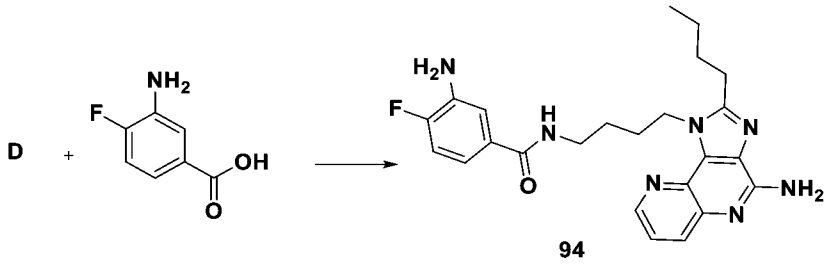
【0598】 **1-(4-胺基丁基)-2-(乙氧基甲基)-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-4-胺, 3HCl (G)**：使用化合物 **92**，利用與針對 **A** 所述類似之程序製備化合物 **G**，獲得靶標化合物 **G** (5270 mg，0.595 mmol，4%來自起始材料)。MS m/z 312 $(M+H)^+$。



93

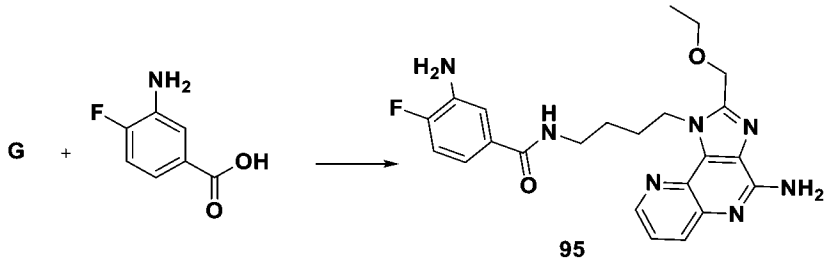
【0599】 **3-胺基-N-(4-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)苯甲醯**

胺(93)：使用化合物 **D** 及 3-胺基苯甲酸作為起始材料，利用與針對 16 所述類似之程序製備化合物 **93**，獲得靶標化合物 **93** (5 mg, 0.006 mmol, 19%) MS m/z 431 $(M+H)^+$。



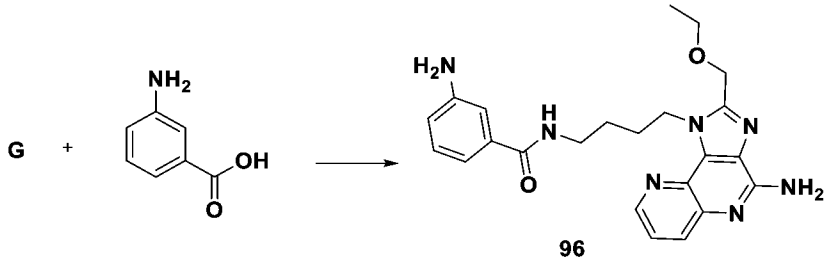
94

【0600】 **3-胺基-N-(4-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)-4-氟苯甲醯胺(94)**：於 23°C下向 **D** (10 mg, 0.024 mmol)及 3-胺基-4-氟-苯甲酸(4 mg, 0.026 mmol)於 DMF (1 ml)中之溶液中添加 4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基-嗎啉鎓四氟硼酸鹽(DMTMMT; 7 mg, 0.029 mmol)及 DIEA (30 ul, 0.172 mmol)。在 10 min 後，將混合物藉由製備型 LC 純化，獲得靶標化合物 **94** (5 mg, 0.006 mmol, 21%) MS m/z 449 $(M+H)^+$。



95

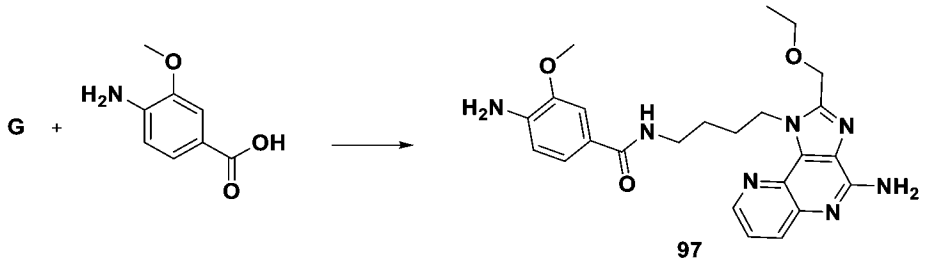
【0601】 **3-胺基-N-(4-(4-胺基-2-(乙氧基甲基)-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)-4-氟苯甲醯胺(95))**：使用化合物 **G** 及 3-胺基-4-氟-苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **94** 所述類似之程序製備化合物 **95**，獲得靶標化合物 **95** (6 mg, 0.007 mmol, 26%)。MS m/z 451 $(M+H)^+$。



96

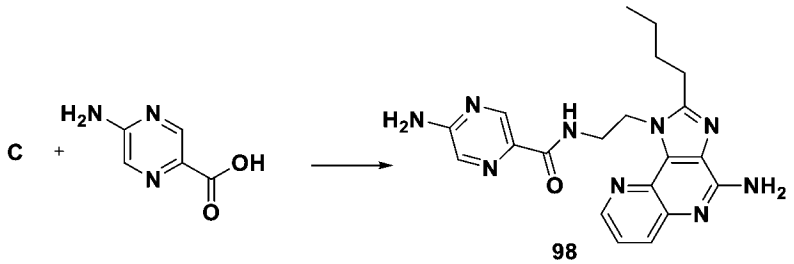
【0602】 **3-胺基-N-(4-(4-胺基-2-(乙氧基甲基)-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁**

基)-4-氟苯甲醯胺(96))：使用化合物 **G** 及 3-胺基苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **94** 所述類似之程序製備化合物 **96**，獲得靶標化合物 **96** (5 mg, 0.006 mmol, 19%)。MS m/z 433 $(M+H)^+$。



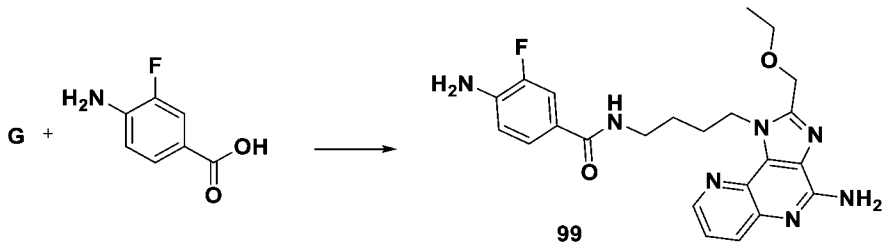
97

【0603】　3-胺基-N-(4-(4-胺基-2-(乙氧基甲基)-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)苯甲醯胺(97))：使用化合物 **G** 及 4-胺基-3-甲氧基苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **94** 所述類似之程序製備化合物 **97**，獲得靶標化合物 **97** (5 mg, 0.005 mmol, 23%)。MS m/z 463 $(M+H)^+$。



98

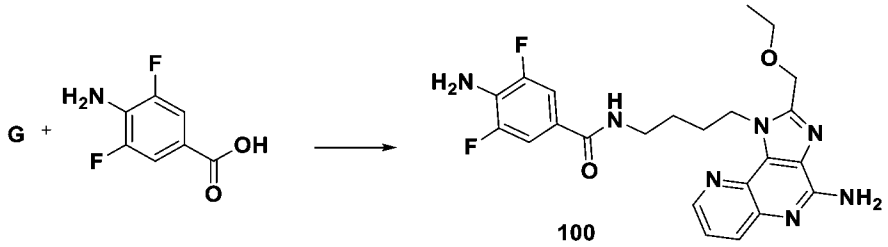
【0604】　5-胺基-N-(2-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)乙基)吡嗪-2-甲醯胺(98))：使用化合物 **C** 及 5-胺基-吡嗪-2-甲酸作為起始材料，利用與針對 **16** 所述類似之程序製備化合物 **98**，獲得靶標化合物 **98** (2.13 mg, 0.002 mmol, 11%)。MS m/z 405 $(M+H)^+$。



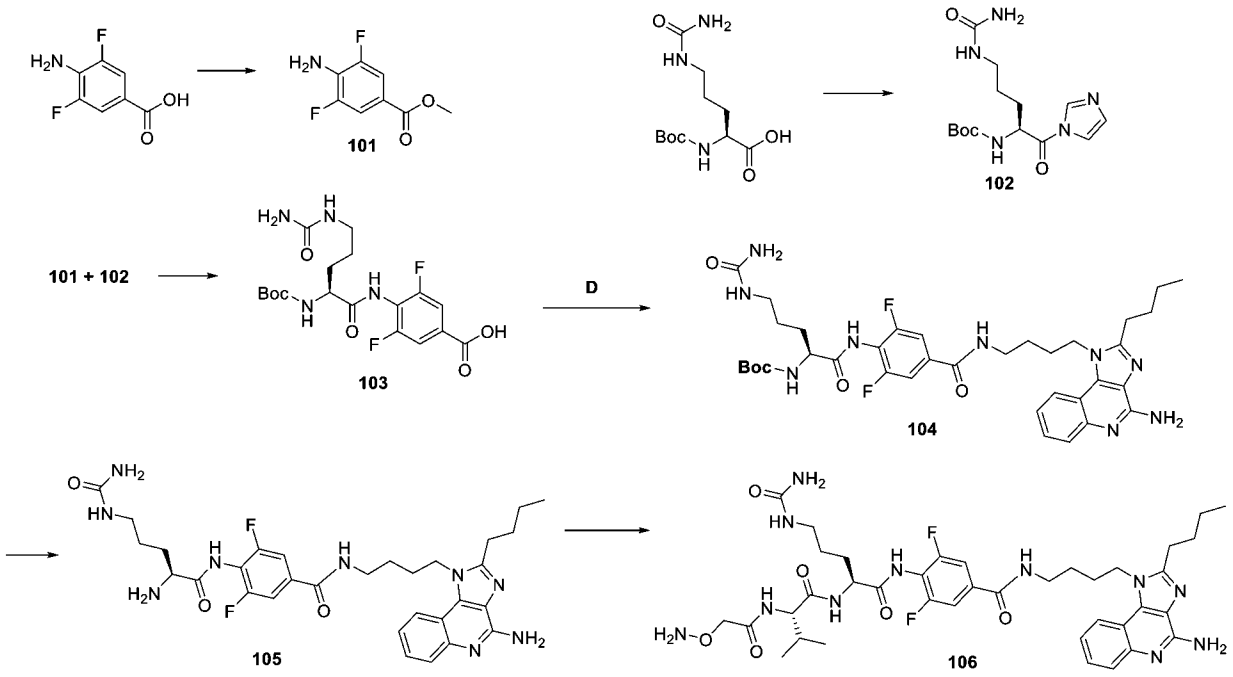
99

【0605】　4-胺基-N-(4-(4-胺基-2-(乙氧基甲基)-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)-3-氟苯甲醯胺(99)：使用化合物 **G** 及 3-氟-4-胺基苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **94** 所述類似之程序製備化合物 **99**，獲得靶標化合物 **99** (7.37 mg, 0.008

mmol, 37%)。MS m/z 451 $(M+H)^+$。



【0606】 **4-胺基-N-(4-(4-胺基-2-(乙氧基甲基)-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)-3,5-二氟苯甲醯胺(100)**：使用化合物 **G** 及 4-胺基-3,5-二氟苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **94** 所述類似之程序製備化合物 **100**，獲得靶標化合物 **100** (9.7 mg, 0.011 mmol, 51%)。MS m/z 469 $(M+H)^+$。



【0607】 **4-胺基-3,5-二氟苯甲酸甲基酯(101)**：向 4-胺基-3,5-二氟苯甲酸(2087 mg, 12.055 mmol)於乙腈(15 mL)中之溶液中添加亞硫醯氯(12 mL)，接著加熱至 80°C。在 1 h 後，於真空中去除溶劑。將甲苯(10 mL)添加至混合物中，接著於真空中蒸發。將殘餘物溶解於無水 MeOH (5 mL)中。在 0.5 h 後，於真空中去除溶劑。將殘餘物溶解於 DCM (20 mL)中，用飽和碳酸氫鈉(50 mL)及鹽水(50 mL)洗滌，接著於 $MgSO_4$ 中乾燥且過濾。於真空中去除溶劑，獲得化合物 **101** (1730 mg, 9.244 mmol, 77%)。MS m/z 188 $(M+H)^+$。

【0608】 **(S)-1-(1H-咪唑-1-基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基胺基甲酸第三丁酯(102)**：於室溫下向 Boc-Cit-OH (1150 mg, 4.177 mmol)於 DMF (5 mL)中之溶液中添加 CDI (880 mg, 5.427 mmol)，接著加熱至 60°C。在 2 h 後，向該混合物中添加 CDI (220 mg, 1.357 mmol)。將反應物於 60°C下攪拌 1 h。在 3 h 後，將反應物於真空中乾燥。將殘餘物用 EtOAc (50 mL)稀釋，且用水(50 mL)、飽和碳酸氫鈉(20 mL)及鹽水(20 mL)洗滌。將有機層用 $MgSO_4$ 乾燥，接著過濾，且於真空中去除溶劑，獲得化合物 **102** (1465 mg，4.503 mmol，粗製物)。MS m/z 326 $(M+H)^+$。

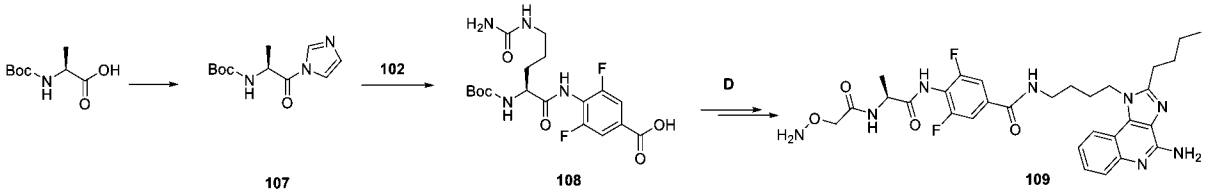
【0609】 **(S)-4-(2-(第三丁氧基羰基胺基)-5-脲基戊醯胺基)-3,5-二氟苯甲酸(103)**：於 23°C下向化合物 **103** (188 mg, 0.578 mmol)及化合物 **102** (108 mg, 0.577 mmol)於 THF (2 mL)中之溶液中添加 60% NaH (70 mg, 1.826 mmol)。在 20 h 後，添加 1 mL 水，且將混合物攪拌 10 min。於真空中去除溶劑，且將殘餘物藉由製備型 LC 純化，獲得化合物 **103** (17 mg, 0.049 mmol, 9%)。MS m/z 345 $(M+H)^+$。

【0610】 **(S)-1-(4-(4-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基胺基甲醯基)-2,6-二氟苯基胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基胺基甲酸第三丁酯(104)**：於 23°C下向化合物 **D** (20 mg, 0.044 mmol)及化合物 **103** (17 mg, 0.040 mmol)於 DMF (1 mL)中之溶液中添加 HATU (16 mg, 0.042 mmol)及 DIEA (60 uL, 0.344 mmol)。在 20 min 後，將混合物藉由製備型 LC 純化，獲得化合物 **104** (23 mg, 0.022 mmol, 55%)。MS m/z 724 $(M+H)^+$。

【0611】 **(S)-N-(4-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)-4-(2-胺基-5-脲基戊醯胺基)-3,5-二氟苯甲醯胺(105)**：於 23°C下向化合物 **104** (23 mg, 0.022 mmol)於 DCM (1 mL)中之溶液中添加 TFA (1 mL)。在 15 min 後，於真空中去除溶劑。向殘餘物中添加 10 mL 甲苯且再蒸發。將殘餘物於高真空幫浦上乾燥，獲得化合物 **105** (24 mg，0.022 mmol，定量)。MS m/z 624 $(M+H)^+$。

【0612】 **N-(4-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁**

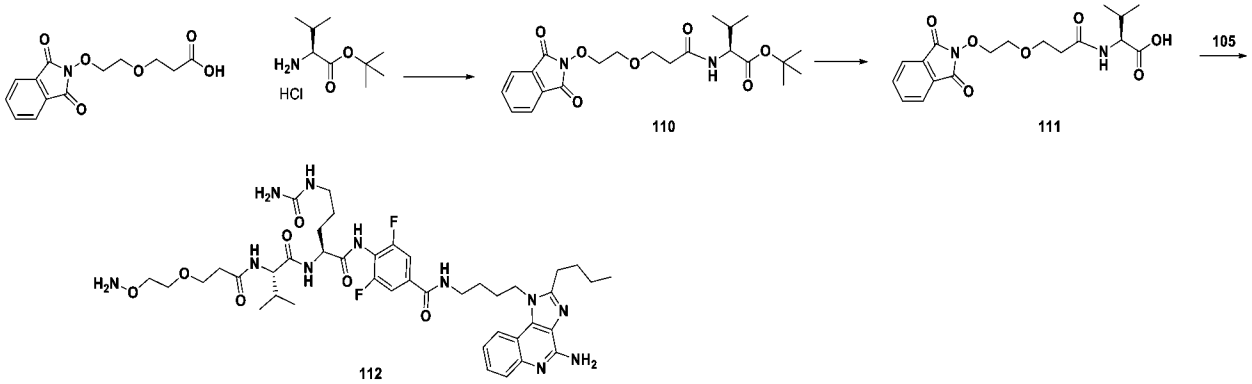
基)-4-((S)-2-((S)-2-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)-3,5-二氟苯甲醯胺(106)：於 23°C下向 Fmoc-Aoa-Val-OH (11 mg, 0.027 mmol)及化合物 **105** (24 mg, 0.022 mmol)於 DMF (1 mL)中之溶液中添加 HATU (9 mg, 0.037 mmol)及 DIEA (40 ul, 0.023 mmol)。在 10 min 後，向該混合物中添加六氫吡啶(50 uL, 5%)。在 5 min 後，將混合物藉由製備型 LC 純化，獲得化合物 **106** (9 mg, 0.007 mmol, 27%)。MS m/z 796 $(M+H)^+$。



【0613】 **(S)-1-(1H-咪唑-1-基)-1-側氧基丙-2-基胺基甲酸第三丁酯(107)**：使用 Boc-丙胺酸，利用與針對 **102** 所述類似之程序製備化合物 **107**，獲得靶標化合物 **107** (730 mg，3.051 mmol，75%粗製物)。MS m/z 326 $(M+H)^+$。

【0614】 **(S)-4-(2-(第三丁氧基羰基胺基)-5-脲基戊醯胺基)-3,5-二氟苯甲酸(108)**：使用 **107**，利用與針對 **103** 所述類似之程序製備化合物 **108**，獲得靶標化合物 **108** (17 mg, 0.049 mmol, 9%)。MS m/z 431 $(M+H)^+$。

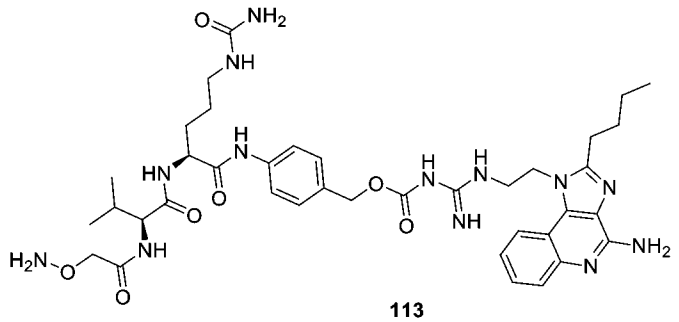
【0615】 **(S)-N-(4-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)-4-(2-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)丙醯胺基)-3,5-二氟苯甲醯胺(109)**：使用 **108** 及化合物 **D**，利用與針對 **106** 所述類似之程序製備化合物 **109**，獲得靶標化合物 **109** (9 mg, 0.007 mmol, 31% 來自 108)。MS m/z 796 $(M+H)^+$。



【0616】 **(S)-2-(3-(2-(1,3-二側氧基異吲哚啉-2-基氧基)乙氧基)丙醯胺基)-3-甲基丁酸第三丁酯(110)**：於 23°C下向 3-(2-(1,3-二側氧基異吲哚啉-2-基氧基)乙氧基)丙酸(295 mg, 1.056 mmol)及 Val-OtBu HCl (225 mg, 1.078 mmol)於 DCM (5 mL)中之溶液中添加 DMTMMT (304 mg, 1.260 mmol)及 DIEA (460 uL, 2.641 mmol)。在 1.5 h 後，將溶液用 EtOAC (100 mL)稀釋且用 1 N HCl (100 mL)、飽和碳酸氫鈉(100 mL)及鹽水(50 mL)洗滌。將有機層用 $MgSO_4$ 乾燥，過濾，且於真空中去除溶劑。將殘餘物藉由急驟層析純化，獲得化合物 **110** (379 mg, 0.872 mmol, 83%)。MS m/z 435 $(M+H)^+$。

【0617】 **(S)-2-(3-(2-(1,3-二側氧基異吲哚啉-2-基氧基)乙氧基)丙醯胺基)-3-甲基丁酸(111)**：於 23°C向化合物 **110** (379 mg, 0.872 mmol)之溶液中添加 4M 於二噁烷中之 HCl (5 mL, 20 mmol)。在 20 h 後，於真空中去除溶劑，且使用高真空幫浦乾燥，獲得化合物 **111** (320 mg, 0.846 mmol, 97%)。MS m/z 379 $(M+H)^+$。

【0618】 **N-(4-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(胺基氧基)乙氧基)丙醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)-3,5-二氟苯甲醯胺(112)**：於 23°C 下向化合物 **111** (3 mg, 0.007 mmol)及化合物 **105** (5 mg, 0.005 mmol)於 DMF (1 mL)中之溶液中添加 DMTMMT (3 mg, 0.012 mmol)及 DIEA (20 uL, 0.115 mmol)。在 1.5 h 後，向該混合物中添加肼 H_2O (2 uL, 0.506 mmol)。在 5 min 後，將混合物藉由製備型 LC 純化，獲得化合物 **112** (2 mg, 0.002 mmol, 21%)。MS m/z 855 $(M+H)^+$。

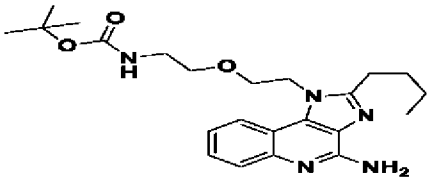
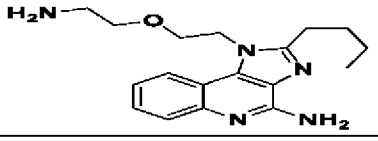
30 

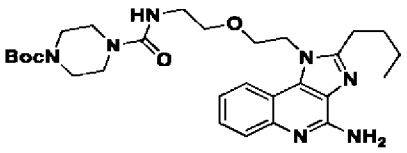
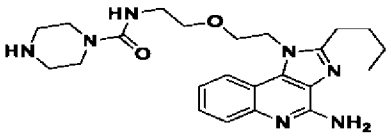
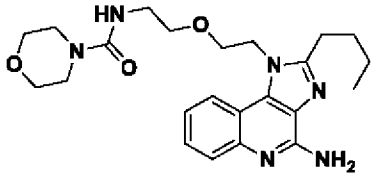
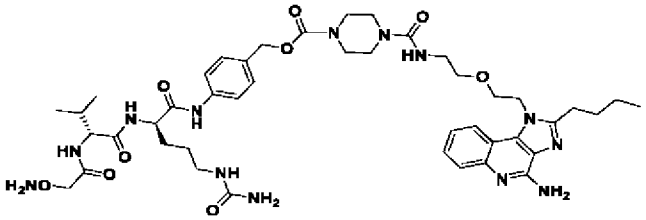
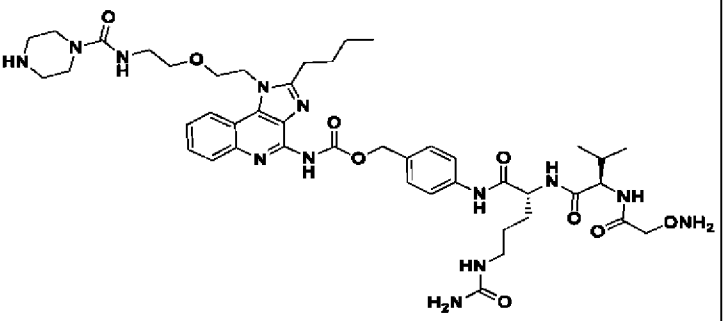
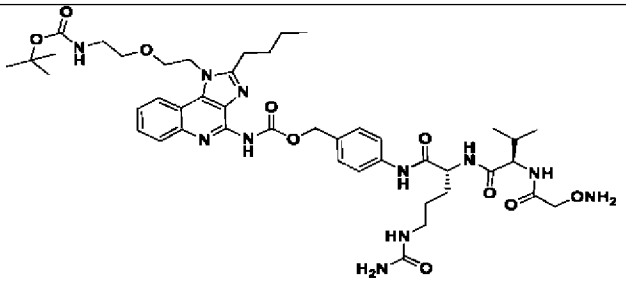
113

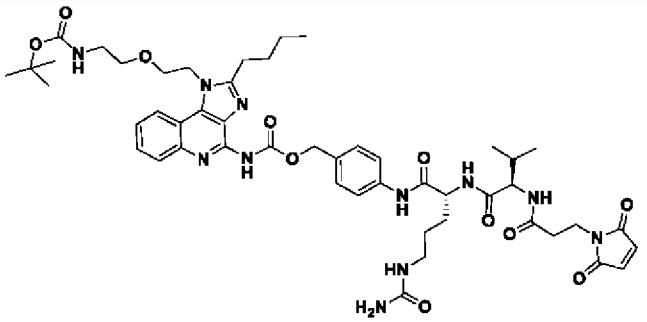
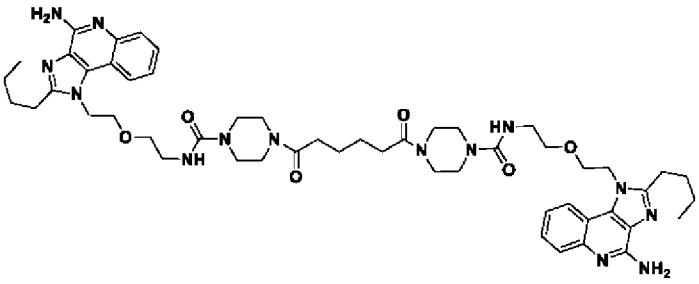
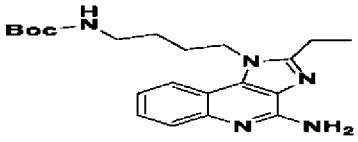
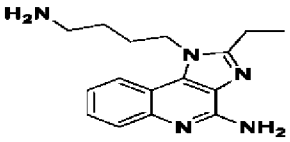
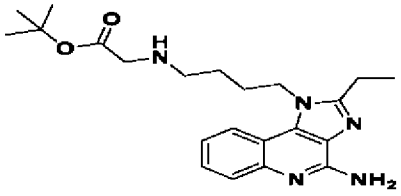
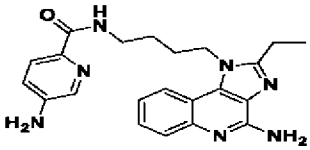
【0619】 **(S)-N-(4-((N-(2-(4-胺基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)乙基)甲**

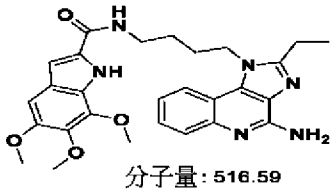
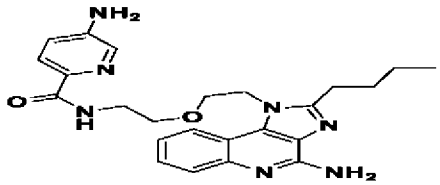
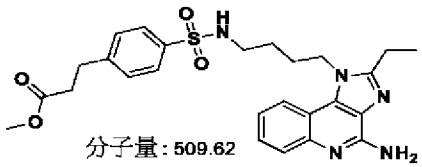
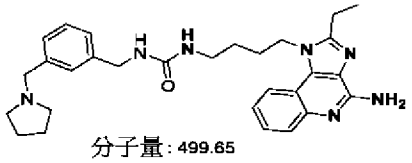
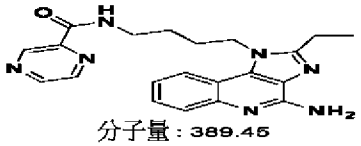
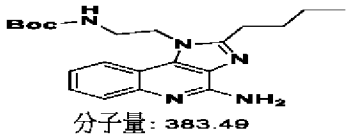
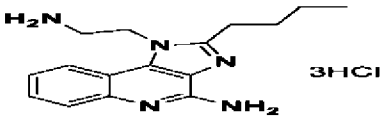
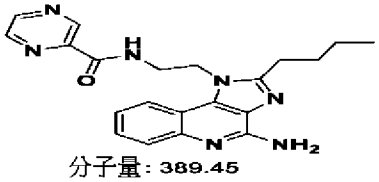
脒基胺基甲醯基氧基)甲基)苯基)-2-((S)-2-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺(113)：使用化合物 **30** 作為起始材料，利用與針對 **106** 所述類似之程序製備化合物 **113**，獲得靶標化合物 **113** (2 mg，0.001 mmol，2%來自化合物 **30**)。MS m/z 805 $(M+H)^+$。

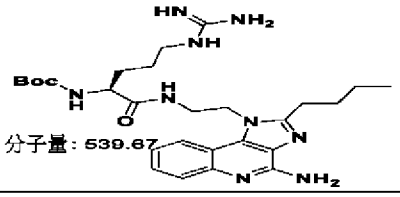
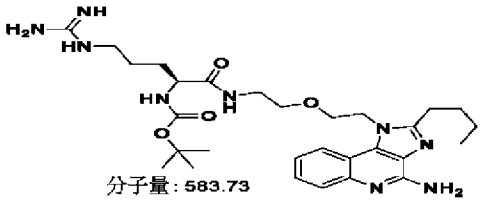
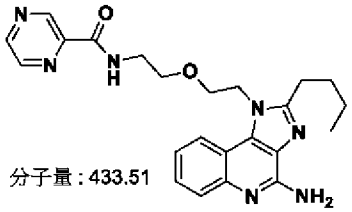
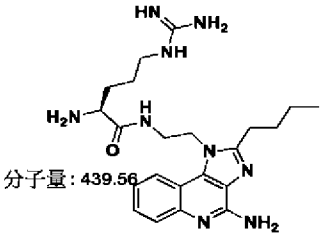
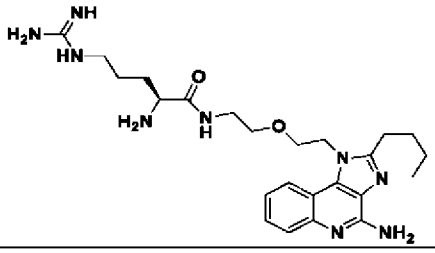
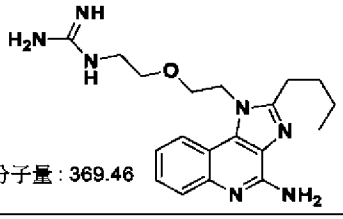
表 3 – TLR 促效劑-核心 1 化合物

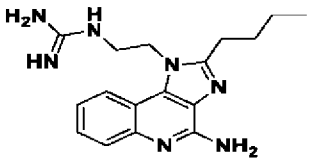
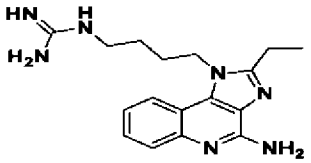
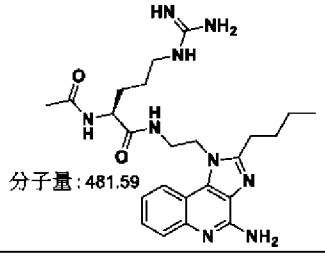
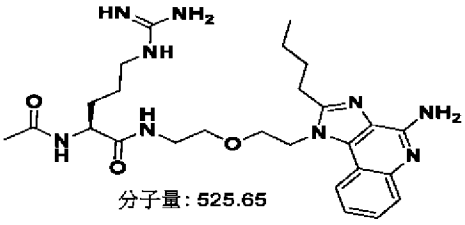
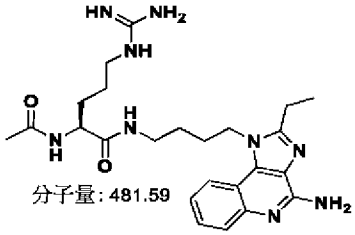
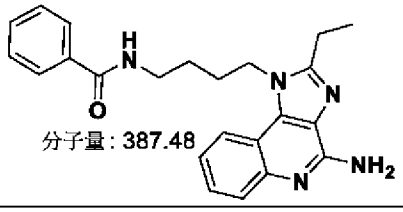
化合物編號	化合物名稱	結構-核心1化合物
5	AXC-621	
A	AXC-622	

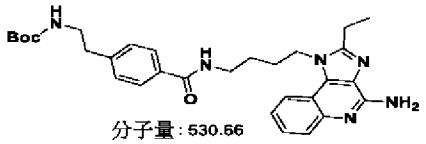
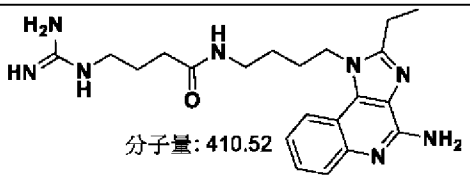
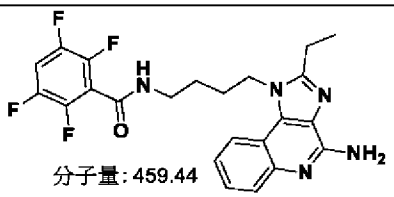
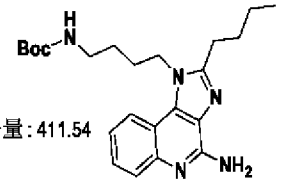
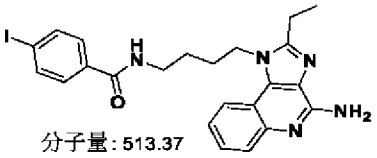
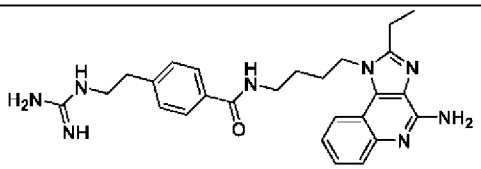
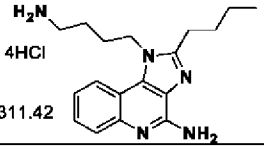
化合物編號	化合物名稱	結構-核心1化合物
6	AXC-625	
7	AXC-626	
8	AXC-627	
9	AXC-638	
10	AXC-639	
11	AXC-640	

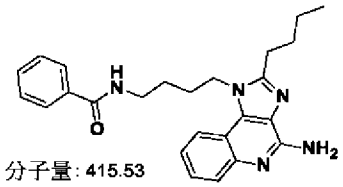
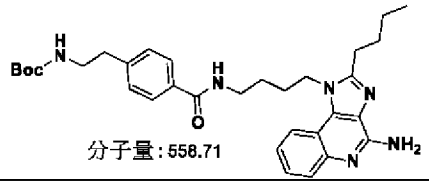
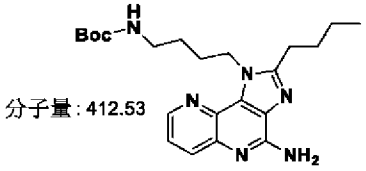
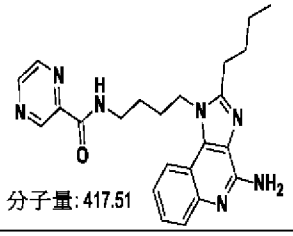
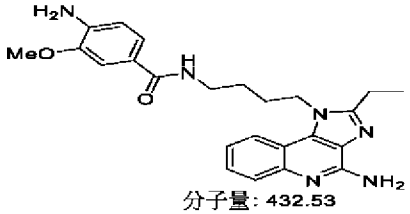
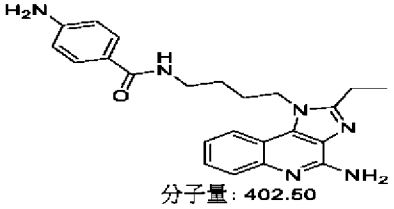
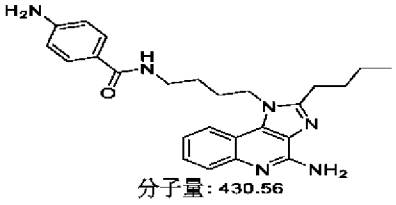
化合物編號	化合物名稱	結構-核心1化合物
12	AXC-642	
13	AXC-662	
14	AXC-665	 分子量: 383.49
B	AXC-666	 分子量: 283.37
15	AXC-667	 分子量: 397.51
16	AXC-668	 分子量: 403.48

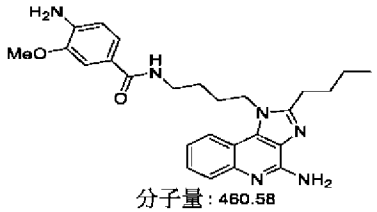
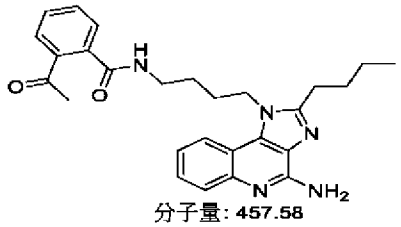
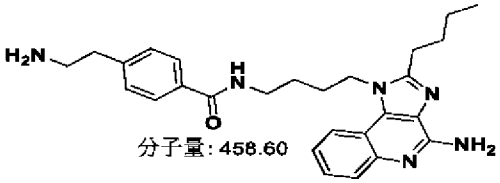
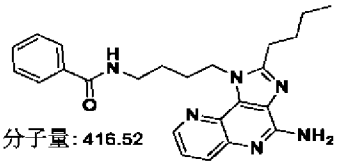
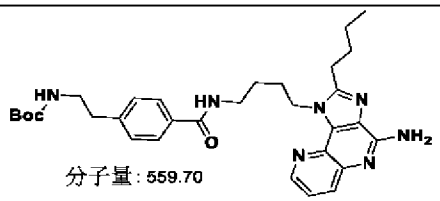
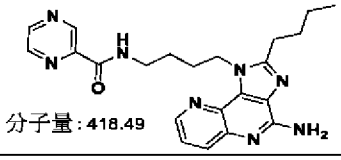
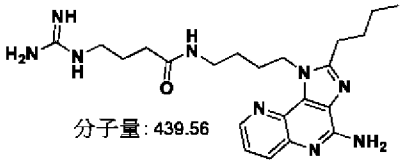
化合物編號	化合物名稱	結構-核心1化合物
17	AXC-669	 分子量：516.59
18	AXC-670	 分子量：447.53
19	AXC-671	 分子量：509.62
20	AXC-672	 分子量：499.65
21	AXC-675	 分子量：389.45
22	AXC-678	 分子量：383.49
C	AXC-679	 分子量：283.37
23	AXC-681	 分子量：389.45

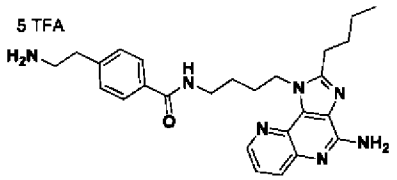
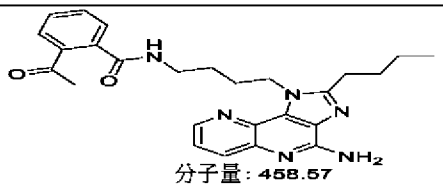
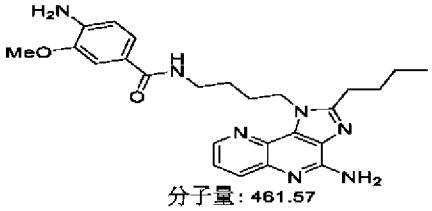
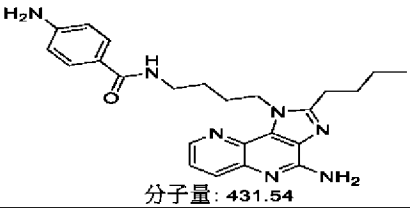
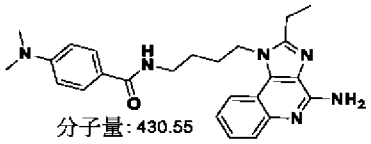
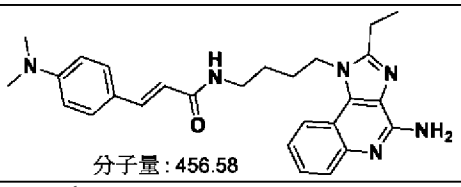
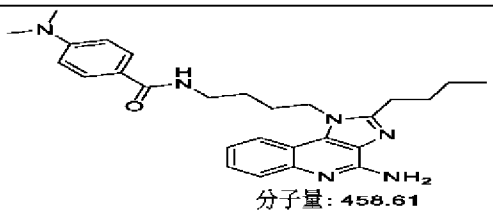
化合物編號	化合物名稱	結構-核心1化合物
24	AXC-687	
26	AXC-688	
28	AXC-689	
25	AXC-690	
27	AXC-691	
29	AXC-696	

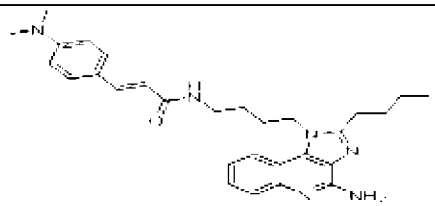
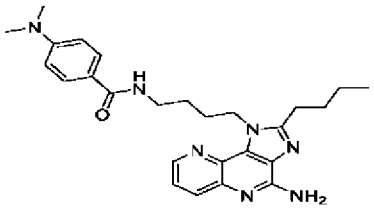
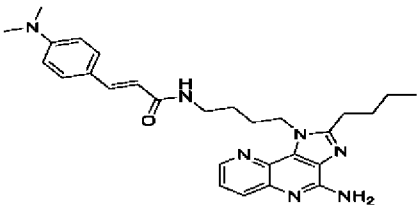
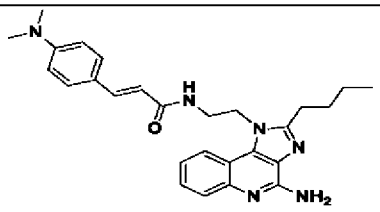
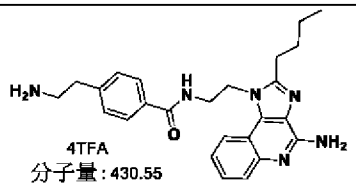
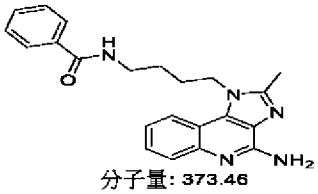
化合物編號	化合物名稱	結構-核心1化合物
30	AXC-697	 分子量: 325.41
31	AXC-698	 分子量: 325.41
32	AXC-699	 分子量: 481.59
33	AXC-700	 分子量: 525.65
34	AXC-701	 分子量: 481.59
35	AXC-702	 分子量: 387.48

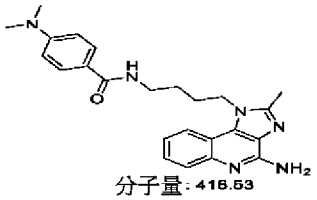
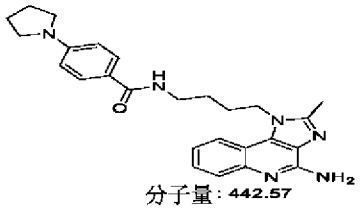
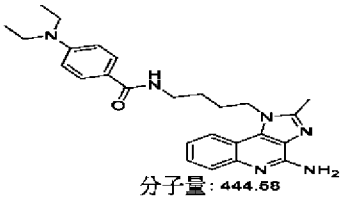
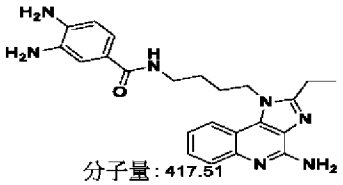
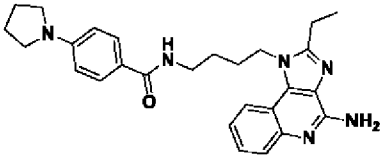
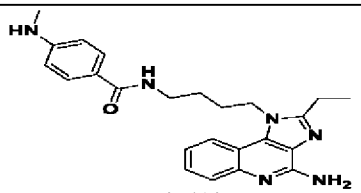
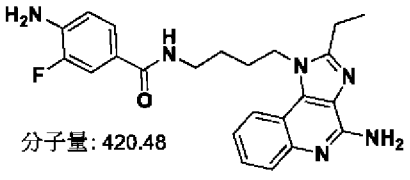
化合物編號	化合物名稱	結構-核心1化合物
36	AXC-709	 分子量: 530.66
37	AXC-710	 分子量: 410.52
38	AXC-711	 分子量: 459.44
39	AXC-712	 分子量: 411.54
40	AXC-713	 分子量: 513.37
41	AXC-714	 分子量: 472.6
D	AXC-715	 分子量: 311.42

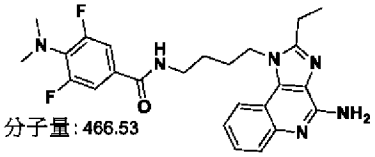
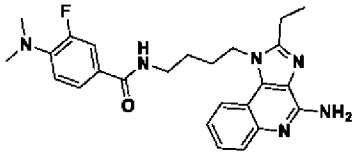
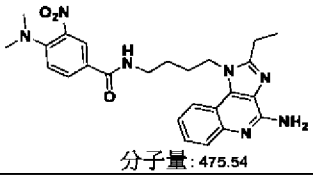
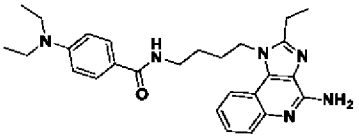
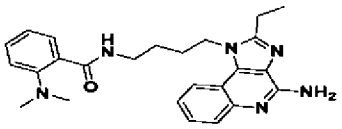
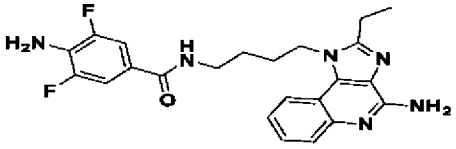
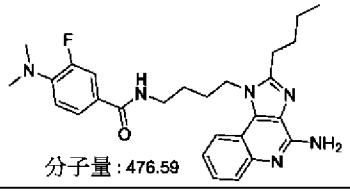
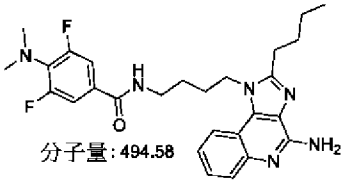
化合物編號	化合物名稱	結構-核心1化合物
42	AXC-716	
43	AXC-717	
44	AXC-718	
45	AXC-719	
46	AXC-722	
47	AXC-723	
48	AXC-724	

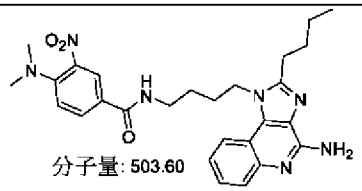
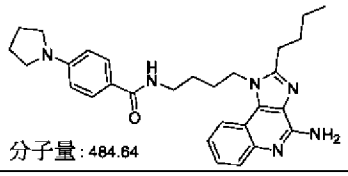
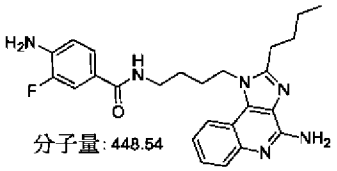
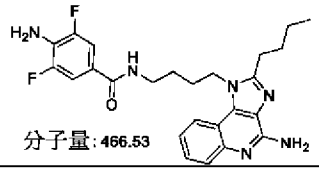
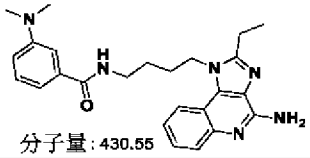
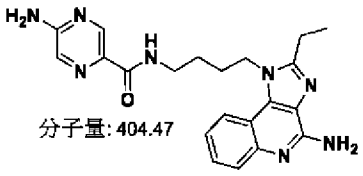
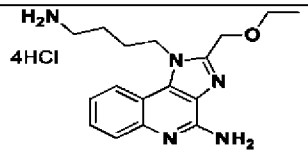
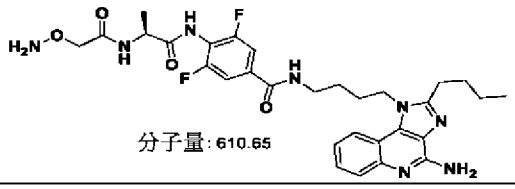
化合物編號	化合物名稱	結構-核心1化合物
49	AXC-725	 分子量：460.58
50	AXC-726	 分子量：457.58
51	AXC-727	 分子量：458.60
52	AXC-729	 分子量：416.52
53	AXC-731	 分子量：559.70
54	AXC-732	 分子量：418.49
55	AXC-733	 分子量：439.56

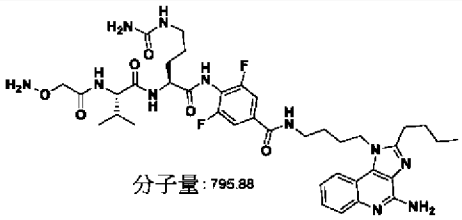
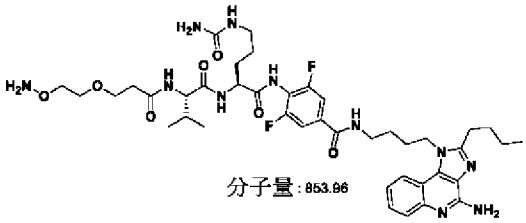
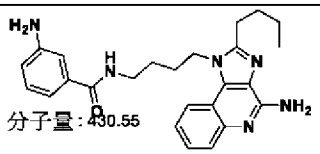
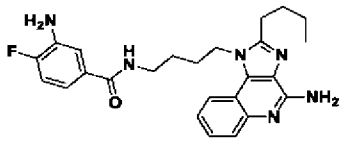
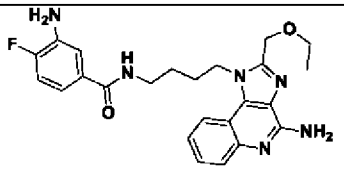
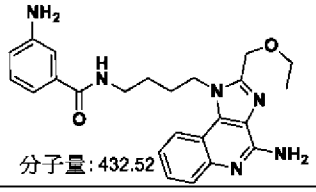
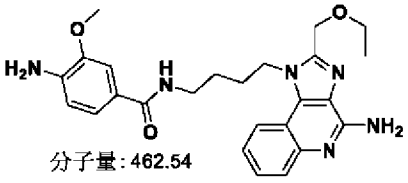
化合物編號	化合物名稱	結構-核心1化合物
56	AXC-734	 分子量: 459.59
57	AXC-735	 分子量: 458.57
58	AXC-736	 分子量: 461.57
59	AXC-737	 分子量: 431.54
60	AXC-738	 分子量: 430.55
61	AXC-739	 分子量: 456.58
62	AXC-740	 分子量: 458.61

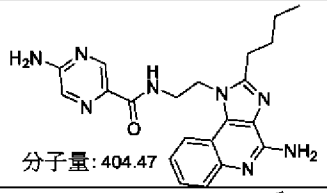
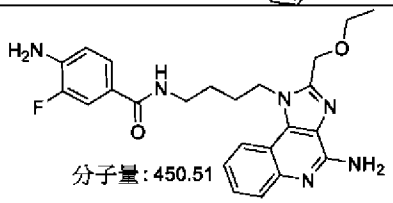
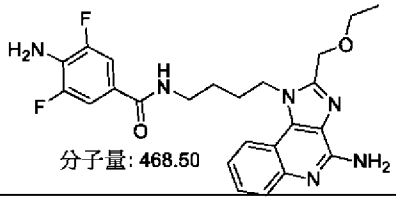
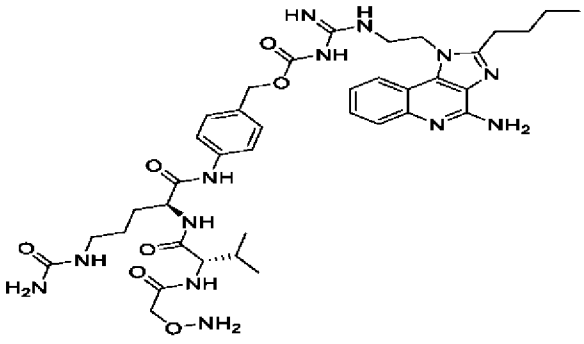
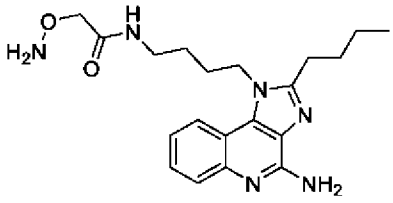
化合物編號	化合物名稱	結構-核心1化合物
63	AXC-741	 分子量：[illegible]
64	AXC-743	 分子量：459.60
65	AXC-742	 分子量：485.64
66	AXC-747	 分子量：456.58
68	AXC-748	 4TFA 分子量：430.55
69	AXC-749	 分子量：373.46

化合物編號	化合物名稱	結構-核心1化合物
70	AXC-750	 分子量: 416.53
71	AXC-751	 分子量: 442.57
72	AXC-752	 分子量: 444.58
73	AXC-754	 分子量: 417.51
74	AXC-755	 分子量: 456.58
75	AXC-756	 分子量: 416.52
76	AXC-757	 分子量: 420.48

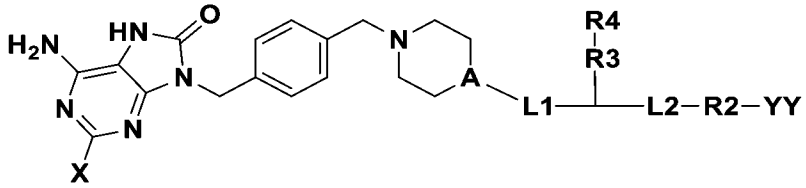
化合物編號	化合物名稱	結構-核心1化合物
77	AXC-758	 分子量: 466.53
78	AXC-759	 分子量: 448.54
79	AXC-760	 分子量: 475.54
80	AXC-761	 分子量: 458.60
81	AXC-762	 分子量: 430.55
82	AXC-764	 分子量: 438.47
83	AXC-771	 分子量: 476.59
84	AXC-772	 分子量: 494.58

化合物編號	化合物名稱	結構-核心1化合物
85	AXC-773	 分子量: 503.60
86	AXC-777	 分子量: 484.64
87	AXC-778	 分子量: 448.54
88	AXC-779	 分子量: 466.53
89	AXC-789	 分子量: 430.55
90	AXC-793	 分子量: 404.47
G	AXC-799	 分子量: 313.40
109	AXC-800	 分子量: 610.65

化合物編號	化合物名稱	結構-核心1化合物
106	AXC-801	 分子量: 795.88
112	AXC-802	 分子量: 853.96
93	AXC-803	 分子量: 430.55
94	AXC-804	 分子量: 448.54
95	AXC-805	 分子量: 450.51
96	AXC-806	 分子量: 432.52
97	AXC-807	 分子量: 462.54

化合物編號	化合物名稱	結構-核心1化合物
98	AXC-808	
99	AXC-809	
100	AXC-810	
113	AXC-831	
192	AXC-910	

實例 3: 包含式(I)及式(II) (圖 1)之以下代表性結構–核心 5 之 TLR 促效劑之合成:



(I)

或其醫藥學上可接受之鹽、溶劑合物、立體異構物或互變異構物，其中

A 係 CH 或 N；

X 係 O-R1、NH-R1、S-R1 或 H；

YY 係-ONH_2、-N_3、-OH、馬來醯亞胺、-COOH 或-$C(=O)CH_2Y1$，其中 Y1 係鹵化物；

L1 及 L2 中之每一者皆獨立地為$(CH_2)_m$、$(CH_2)_mC(=O)$、$(CH_2)_m$-$NH(CH_2)_n$、$(CH_2)_m$-$C(=O)NH(CH_2)_n$、$(CH_2)_m$-$OC(=O)$-NH-$(CH_2)_n$、$(CH_2)_m$-$NHC(=O)$-NH-$(CH_2)_n$、$(CH_2)_m$-NH、$(CH_2)_m$-$NHC(=O)$、$(CH_2)_m$-$NHC(=O)$-$(CH_2)_n$-$NHC(=O)$-$(CH_2)_p$、$C(=O)$-$(CH_2)_n$、C_3-C_8 雜環或缺失；其中 m、n 及 p 中之每一者皆獨立地為 0 至 12 之整數；

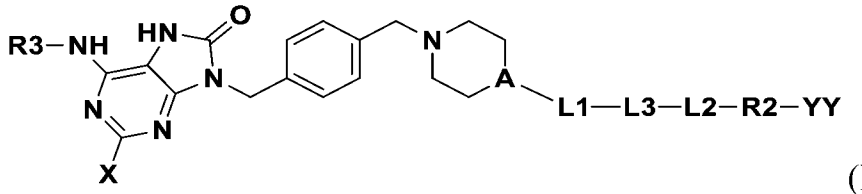
R1 係 H、C_1-C_{12} 烷基、經取代之 C_1-C_{12} 烷基、含氧之 C_1-C_{12} 烷基、C_3-C_8 雜環烷基、經取代之 C_3-C_8 雜環烷基、C_3-C_8 環烷基、經取代之 C_3-C_8 環烷基、經-N_3 末端取代之 C_1-C_{12} 烷基、$(CH_2)_q$-$(OCH_2CH_2)_r$-OMe，其中 q 及 r 中之每一者皆獨立地為 0 至 12 之整數；

R2 係 C_1-C_6 伸烷基、C_1-C_{12} 經取代之伸烷基、C_3-C_8 伸環烷基、C_3-C_8 經取代之伸環烷基、伸芳基、經取代之 C_6-C_{10} 伸芳基、包含 1-3 個雜原子之 5-12 員伸雜芳基、包含 1-3 個雜原子之經取代之 5-12 員伸雜芳基或 $(OCH_2CH_2)_{ss}$ 或其組合，或 R2 缺失；其中 ss 係 1 至 12 之整數，其中每一雜原子皆獨立地為 N、O 或 S；

R3 係胺基酸之側鏈、C_1-C_6 伸烷基、C_1-C_6 經取代之伸烷基、C_3-C_8 伸環烷基、C_3-C_8 伸雜環烷基、經取代之 C_3-C_8 伸環烷基、伸芳基、經取代之伸芳基、包含 1-3 個雜原子之 5-12 員伸雜芳基、包含 1-3 個雜原子之經取代之 5-12 員伸雜芳基、含胺基之 C_1-C_{12} 伸烷基、含羰基之 C_1-C_{12} 伸烷基、含氧之 C_1-C_{12} 伸烷基、-N_3 末端 C_1-C_6 伸烷基、-CCH 末端 C_1-C_6 伸烷基、-SH 末端 C_1-C_6 伸烷基、-OH 末端 C_1-C_6 伸烷基、含氮之 C_1-C_6 伸烷基、-OPO_3H_2 末端 C_1-C_6 伸烷基、-OPO_3H_2 末端伸芳基、葡萄糖醛酸苷末端 C_1-C_6 伸烷基、-N_3 末端伸芳基、乙炔末端伸芳基、胺末端伸芳基、$(CH_2)_s$、$(CH_2)_s$-$C(=O)$、$(CH_2)_s$-$NH(CH_2)_t$、$(CH_2)_s$-$C(=O)NH(CH_2)_t$、$(CH_2)_s$-$OC(=O)$-NH-$(CH_2)_t$、$(CH_2)_s$-$NHC(=O)$-NH-$(CH_2)_t$ 或其組合；或 R3 缺失；

其中每一 s 及 t 皆獨立地為 0 至 6 之整數；

R4 係 H、C_3-C_8 環烷基、C_3-C_8 雜環烷基、C_3-C_8 經取代之雜環烷基、芳基、經取代之芳基、$(CH_2)_u$-$(OCH_2CH_2)_v$-OMe、具兩條/三條支鏈之$(CH_2)_u$-$(OCH_2CH_2)_v$-OMe 或其組合；或 R4 缺失；其中每一 u 及 v 皆獨立地為 1 至 48 之整數



(II)

或其醫藥學上可接受之鹽、溶劑合物、立體異構物或互變異構物，其中

A 係 CH 或 N；

X 係 O-R1、NH-R1、S-R1 或 H；

YY 係 H、$-ONH_2$、$-N_3$、-OH、馬來醯亞胺、-COOH 或$-C(=O)CH_2Y1$，其中 Y1 係鹵化物；

L1 及 L2 中之每一者皆獨立地為$(CH_2)_m$、$(CH_2)_mC(=O)$、$(CH_2)_m$-$NH(CH_2)_n$、$(CH_2)_m$-$C(=O)NH(CH_2)_n$、$(CH_2)_m$-$OC(=O)$-NH-$(CH_2)_n$、$(CH_2)_m$-$NHC(=O)$-NH-$(CH_2)_n$、$(CH_2)_m$-NH、$(CH_2)_m$-$NHC(=O)$、$(CH_2)_m$-$NHC(=O)$-$(CH_2)_n$-$NHC(=O)$-$(CH_2)_p$、$C(=O)$-$(CH_2)_n$、伸芳基、經取代之伸芳基、包含 1-3 個雜原子之 5-12 員伸雜芳基、包含 1-3 個雜原子之經取代之 5-12 員伸雜芳基、包含 1-3 個雜原子之 C_3-C_8 雜環或缺失；其中 m、n 及 p 中之每一者皆獨立地為 0 至 6 之整數，其中每一雜原子皆獨立地為 N、O 或 S；

L3 係 C(=O)、-CH(R5)-、$-(AA)_i$-或伸芳基或其組合，或 L3 缺失；其中每一 AA 皆獨立地為胺基酸，其中 i 係 1 至 6 之整數；

R5 係 NH-L4-Y2 或 CH_2-L4-Y2，其中 Y2 係 H 或缺失；

L4 係 C(=O)、C(=O)O-、-OC(=O)-、$-C(CH_2O)_3$-、$-C(CH_2CH_2O)_3$-、$-(AA)_j$-、伸芳基、經取代之伸芳基、C_3-C_8 伸環烷基、經 C_3-C_8 取代之伸環烷基、伸芳基、

經取代之伸芳基、包含 1-3 個雜原子之 5-12 員伸雜芳基、包含 1-3 個雜原子之經取代之 5-12 員伸雜芳基、包含 1-3 個雜原子之 5-12 員伸雜環烷基、包含 1-3 個雜原子之經取代之 5-12 員伸雜環烷基、C_1-C_{12} 伸烷基、-O-、-NH-、-S-、經取代之 C_1-C_{12} 伸烷基、$-(CH_2)_s-(OCH_2CH_2)_t-(CH_2)_u-$、$(CH_2)_s-(OCH_2CH_2)_t-OMe$、$-N_3$、-SH、-OH、$-NH_2$、$-OPO_3H_2$、葡萄糖醛酸苷、乙炔或其組合，或 L4 缺失；其中每一 AA 皆獨立地為胺基酸，其中 j 係 1 至 6 之整數，其中 s 及 u 中之每一者皆獨立地為 0 至 12 之整數，其中 t 獨立地為 0 至 48 之整數，其中每一雜原子皆獨立地為 N、O 或 S；

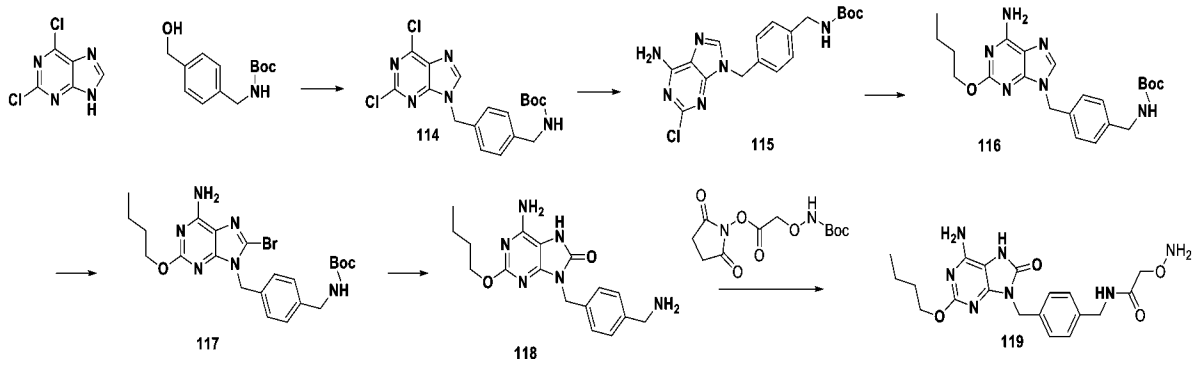
R1 係 H、C_1-C_{12} 烷基、經取代之 C_1-C_{12} 烷基、含氧之 C_1-C_{12} 烷基、C_3-C_8 雜環烷基、經取代之 C_3-C_8 雜環烷基、C_3-C_8 環烷基、經取代之 C_3-C_8 環烷基、經-N_3 末端取代之 C_1-C_{12} 烷基、$(CH_2)_q-(OCH_2CH_2)_r-OMe$，其中 q 及 r 中之每一者皆獨立地為 0 至 12 之整數；

R2 係 C_1-C_6 伸烷基、C_1-C_{12} 經取代之伸烷基、C_3-C_8 伸環烷基、C_3-C_8 經取代之伸環烷基、伸芳基、經取代之伸芳基、包含 1-3 個雜原子之 5-12 員伸雜芳基、包含 1-3 個雜原子之經取代之 5-12 員伸雜芳基、包含 1-3 個雜原子之 5-12 員伸雜環烷基、包含 1-3 個雜原子之經取代之 5-12 員伸雜環烷基或 $(OCH_2CH_2)_r$ 或其組合，或 R2 缺失；其中 r 係 1 至 12 之整數，其中每一雜原子皆獨立地為 N、O 或 S；

R3 係 H 或-C(=O)R6、-C(=O)OR6；

R6 係 C_1-C_{12} 烷基、經取代之烷基、經取代之芳基、$CH_3-(CH_2)_s-(OCH_2CH_2)_t-(CH_2)_u-$，其中 s、t 及 u 中之每一者皆獨立地為 0 至 12 之整數。

【0620】　如以下方案中所揭示，合成具有核心 5 結構之 TLR-促效劑。



【0621】 **4-((2,6-二氯-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基胺基甲酸第三丁酯,4-((2,6-二氯-7H-嘌呤-7-基)甲基)苄基胺基甲酸第三丁酯(114)**：於 23°C下向 4-(羥基甲基)苄基胺基甲酸第三丁酯(1280 mg, 5.394 mmol)及 2,6-二氯嘌呤(1050 mg, 5.556 mmol)於 THF (10 mL)中之溶液中添加 PPh_3 (1560 mg, 5.948 mmol)。在 30 min 後，於 0°C下經 5 min 添加 DIAD (1600 uL, 8.126 mmol)。於 50°C下攪拌混合物。在 2 h 後，於真空中去除溶劑。將殘餘物混合物藉由 EtOAc (100 mL)稀釋且使用半飽和碳酸氫鈉(100 mL)及鹽水(20 mL)洗滌。將有機層用 $MgSO_4$ 乾燥且過濾。於真空中去除溶劑。將殘餘物藉由急驟層析純化，獲得化合物 **114** (2268 mg，<5.555 mmol，與 PPh_3 之粗製混合物)。MS m/z 409 $(M+H)^+$。

【0622】 **4-((6-胺基-2-氯-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基胺基甲酸第三丁酯(115)**：將化合物 **114** (PPh3 之粗製混合物，2268 mg，<5.555 mmol)置於配備有攪拌棒之耐壓玻璃器皿中。向該器皿中添加於 MeOH (12 mL, 84 mmol)中之 7 N NH_3。將管密封且於 120°C下加熱。在 1 h 後，於真空中去除溶劑，且將殘餘物溶解於 DCM (100 mL)中。藉由過濾去除沈澱。將液體藉由急驟層析純化，獲得化合物 **115** (1043 mg，2.682 mmol，50%來自 2,6-二氯嘌呤)。MS m/z 400 $(M+H)^+$。

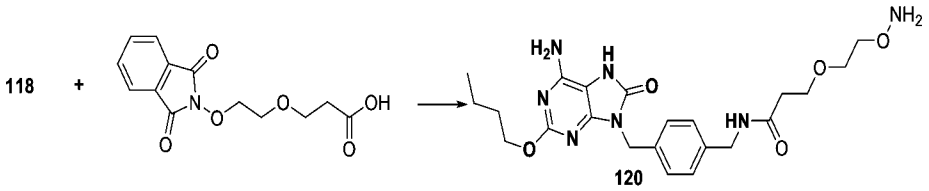
【0623】 **4-((6-胺基-2-丁氧基-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基胺基甲酸第三丁酯(116)**：於 23°C下在乾燥氮氣下將化合物 **115** (1043 mg, 2.682 mmol)溶解於 20%正丁醇鈉(5 mL, 10.4 mmol)中，且將溫度升高至 110°C。在 1.5 h 後，將 1 ml 水添加至混合物中，接著添加 Boc 酸酐(170 mg, 0.779 mmol)。在 5 min 後，於真空

中去除溶劑。將殘餘物溶解於 DCM (30 ml)中，用半飽和碳酸氫鈉(50 ml)及鹽水(50 ml)洗滌，用 $MgSO_4$ 乾燥，且過濾。於真空中去除有機溶劑。將殘餘物藉由急驟層析純化，獲得化合物 **116** (560 mg, 1.313 mmol, 49%)。MS m/z 427 $(M+H)^+$。

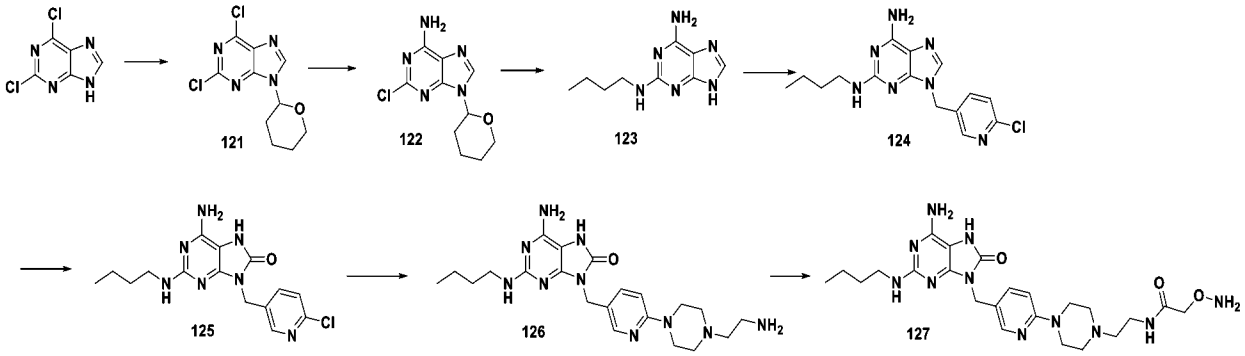
【0624】 **4-((6-胺基-8-溴-2-丁氧基-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基胺基甲酸第三丁酯(117)**：於 23°C下向化合物 **116** (560 mg, 1.313 mmol)於 DCM (10 mL)中之溶液中添加溴(135 uL, 0.507 mmol)。在 10 min 後，將反應物於真空中乾燥。將殘餘物溶解於 DCM (50 mL)中，用半飽和碳酸氫鈉(50 mL)及鹽水(50 mL)洗滌，用 $MgSO_4$ 乾燥且過濾。於真空中去除溶劑。將殘餘物藉由急驟層析純化，獲得呈 HBr 鹽之化合物 **117** (440 mg, 0.871 mmol, 66%)，MS m/z 506 $(M+H)^+$。

【0625】 **6-胺基-9-(4-(胺基甲基)苄基)-2-丁氧基-7H-嘌呤-8(9H)-酮(118)**：將化合物 **117** (240 mg, 0.410 mmol)溶解於 37%濃 HCl 溶液(10 mL)中且回流。在 4.5 h 後，於真空中去除溶劑。將水(10 mL)及 MeOH (4 mL)添加至殘餘物中，藉由添加 28% NH_3 溶液(9 mL)將其中和。於真空中去除溶劑。將殘餘物藉由製備型 LC 純化，獲得化合物 **118** (11 mg. 0.019 mmol, 5%)。MS m/z 343 $(M+H)^+$。

【0626】 **N-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7H-嘌呤-9(8H)-基)甲基)苄基)-2-(胺基氧基)乙醯胺(119)**：於 23°C下向化合物 **118** (5 mg, 0.007 mmol)及 2-(第三丁氧基羰基胺基氧基)乙酸 2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯(3 mg, 0.010 mmol)於 DMF (1 mL)中之溶液中添加 DIEA (5 uL, 0.057 mmol)。在 10 min 後，於真空中去除溶劑。於 23°C下向殘餘物中添加 DCM (1 mL)及 TFA (1 mL)。在 10 min 後，將混合物藉由製備型 LC 純化，獲得化合物 **119** (3.6 mg, 0.005 mmol, 65%)。MS m/z 416 $(M+H)^+$。



【0627】 **N-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7H-嘌呤-9(8H)-基)甲基)苄基)-3-(2-(胺基氧基)乙氧基)丙醯胺(120)**：於 23°C下向 **118** (5 mg, 0.007 mmol)及 3-(2-(1,3-二側氧基異吲哚啉-2-基氧基)乙氧基)丙酸(3 mg, 0.011 mmol)於 DMF (1 mL)中之溶液中添加 DMTMMT (3 mg, 0.012 mmol)及 DIEA (8 uL, 0.046 mmol)。在 15 min 後，向混合物中添加肼 H_2O (3 uL, 0.06 mmol)。在 20 min 後，將混合物藉由製備型 LC 純化，獲得化合物 **120** (3.5 mg, 0.004 mmol, 59%)。MS m/z 474 $(M+H)^+$。



【0628】 **2,6-二氯-9-(四氫-2H-哌喃-2-基)-9H-嘌呤(121)**：向 2,6-二氯嘌呤(2950 mg, 15.608 mmol)於乙酸乙酯(100 mL)中之磁力攪拌溶液中添加苯磺酸(30 mg, 0.19 mmol)，且於乾燥氮氣下將混合物加熱至 50°C。於 50°C下歷經 1 h 時段向攪拌混合物中添加 3,4-二氫-2H-哌喃(2200 uL, 26.153 mmol)。將溫度降低至 23°C。在 1 h 後，將混合物用半飽和 $NaHCO_3$ (50 ml)及鹽水(50 ml)洗滌，用 $MgSO_4$ 乾燥且過濾。於真空中去除有機溶劑，將殘餘物於高真空幫浦中乾燥，獲得化合物 **121** (4170 mg, 15.269 mmol, 98%)。MS m/z 274 $(M+H)^+$。

【0629】 **2-氯-9-(四氫-2H-哌喃-2-基)-9H-嘌呤-6-胺(122)**：將化合物 **121** (4170 mg, 15.269 mmol)置於配備有攪拌棒之耐壓玻璃器皿中。向該器皿中添加於 MeOH (12.84 mmol)中之 7 N NH_3。將管密封且於 110°C下加熱。在 3.5 h 後，將混合物冷卻至室溫且靜置隔夜。將沈澱過濾且用 MeOH (5 mL)洗滌。將固體於高真空幫浦上乾燥，獲得化合物 **122** (3450 mg, 13.6 mmol, 89%)。MS m/z 254

$(M+H)^+$。

【0630】 **2-氯-9-(四氫-2H-哌喃-2-基)-9H-嘌呤-6-胺(123)**：將化合物 **122** (1746 mg, 6.882 mmol)置於配備有攪拌棒之耐壓玻璃器皿中。向該器皿中添加正丁基胺(7 mL, 70.86 mmol)及 DIEA (2.3 mL, 13.25 mmol)。將管密封且於 150°C下加熱。在 5 h 後，將混合物冷卻至室溫且於真空中去除溶劑。將殘餘物溶解於 DCM (100 mL)中，用水(30 mL)及鹽水(50 mL)洗滌，用 $MgSO_4$ 乾燥且過濾。於真空中去除有機溶劑。將殘餘物(中間體)溶解於 MeOH (10 mL)及 TFA (2 mL)中，且於 23°C下攪拌隔夜。在 18 h 後，於真空中去除溶劑。向殘餘物中添加 EtOAc (10 mL)及己烷(50 mL)以使其沈澱。將沈澱藉由過濾收集且於真空幫浦中乾燥，獲得呈 2 TFA 鹽之化合物 **123** (1640 mg, 3.777 mmol, 55%)。MS m/z 207 $(M+H)^+$。

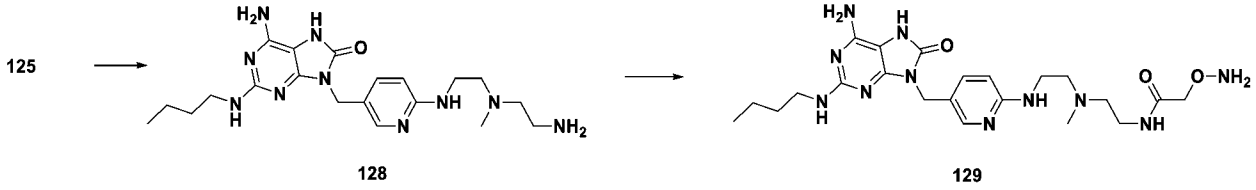
【0631】 **N2-丁基-9-((6-氯吡啶-3-基)甲基)-9H-嘌呤-2,6-二胺(124)**：向化合物 **123** (1640 mg, 3.777 mmol)及 2-氯-5-(氯甲基)吡啶(900 mg, 5.556 mmol)於 DMF (5 mL)中之溶液中添加 K_2CO_3 (2600 mg, 18.813 mmol)，且於 50°C下於氮氣下攪拌該混合物。在 24 h 後，將冰水(100 mL)添加至混合物中，且將沈澱分離。將沈澱溶解於 DCM (100 mL)中，用鹽水(50 mL)洗滌，用 $MgSO_4$ 乾燥且過濾。於真空中去除有機溶劑。將殘餘物藉由急驟層析(矽膠)用 1%至 10% MeOH/DCM 梯度純化，獲得化合物 **124** (1020 mg, 3.074 mmol, 81%)。MS m/z 332 $(M+H)^+$。

【0632】 **6-胺基-2-(丁基胺基)-9-((6-氯吡啶-3-基)甲基)-7H-嘌呤-8(9H)-酮(125)**：於 23°C下向化合物 **124** (1020 mg, 3.074 mmol)於 DCM (10 mL)中之溶液中添加溴(250 uL, 0.939 mmol)。在 1.5 h 後，於真空中去除溶劑。將殘餘物於高真空幫浦上乾燥。將 8-溴-N2-丁基-9-((6-氯吡啶-3-基)甲基)-9H-嘌呤-2,6-二胺 HBr (1500 mg, <3.074 mmol)之粗製中間體溶解於 37%濃 HCl 溶液(15 mL)中，且將溶液回流。在 8 h 後，於真空中去除溶劑。向殘餘物中添加水(10 mL)及 MeOH (4 mL)，接著藉由添加 $NH_3$28%溶液(5 mL)中和。將沈澱固體藉由離心機(5 min,

4000 rpm)分離，且用 MeOH (2 mL)及水(10 mL)洗滌。將沈澱乾燥，獲得化合物 **125** (1100 mg, 2.421 mmol, 79%)。MS m/z 348 $(M+H)^+$。

【0633】 **6-胺基-9-((6-(4-(2-胺基乙基)六氫吡嗪-1-基)吡啶-3-基)甲基)-2-(丁基胺基)-7H-嘌呤-8(9H)-酮(126)**：於 140°C下加熱化合物 **125** (30 mg, 0.086 mmol)及 2-(六氫吡嗪-1-基)乙基胺基甲酸第三丁酯(26 mg, 0.113 mmol)之混合物。在 20 h 後，將混合物冷卻至 23°C。向殘餘物中添加 DCM (0.5 mL)及 TFA (0.5 mL)。在 30 min 後，於真空中去除溶劑且將殘餘物藉由製備型 LC 純化，獲得呈 TFA 鹽之 **126** (9 mg, 0.010 mmol, 12%)。MS m/z 441 $(M+H)^+$。

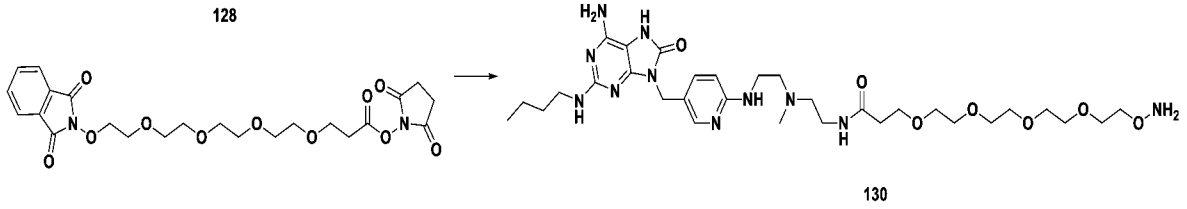
【0634】 **N-(2-(4-(5-((6-胺基-2-(丁基胺基)-8-側氧基-7H-嘌呤-9(8H)-基)甲基)吡啶-2-基)六氫吡嗪-1-基)乙基)-2-(胺基氧基)乙醯胺(127)**：於 23°C下向化合物 **126** (9 mg, 0.010 mmol)及 2-(第三丁氧基羰基胺基氧基)乙酸 2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯(2.5 mg, 0.011 mmol)於 DMF (1 mL)中之溶液中添加 DIEA (10 uL, 0.060 mmol)。在 15 min 後，於真空中去除溶劑。向殘餘物中添加 DCM (1 mL)及 TFA (1 mL)。在 5 min 後，於真空中去除溶劑。將殘餘物藉由製備型 LC 純化，獲得呈 TFA 鹽之化合物 **127** (8 mg, 0.008 mmol, 82%)。MS m/z 514 $(M+H)^+$。



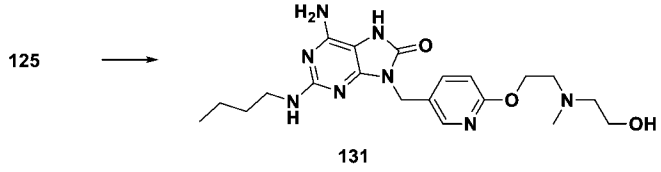
【0635】 **6-胺基-9-((6-(2-((2-胺基乙基)(甲基)胺基)乙基胺基)吡啶-3-基)甲基)-2-(丁基胺基)-7H-嘌呤-8(9H)-酮(128)**：於 130°C下加熱化合物 **125** (30 mg, 0.086 mmol)及 2,2'二胺基-N-甲基二乙基胺(100 uL, 0.853 mmol)之混合物。在 20 h 後，將混合物冷卻至 23°C，且藉由製備型 LC 純化，獲得化合物 **128** (40 mg, 0.045 mmol, 52%)。MS m/z 423 $(M+H)^+$。

【0636】 **N-(2-((2-(5-((6-胺基-2-(丁基胺基)-8-側氧基-7H-嘌呤-9(8H)-基)甲基)**

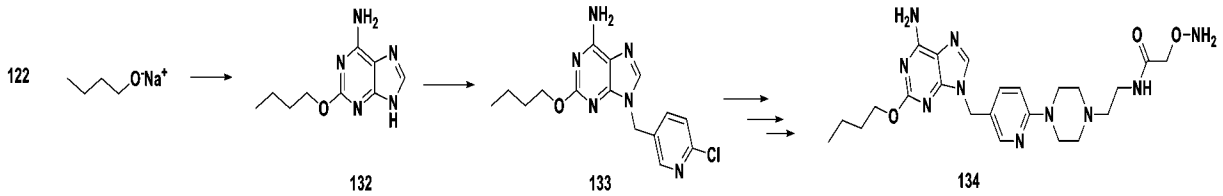
吡啶-2-基胺基)乙基)(甲基)胺基)乙基)-2-(胺基氧基)乙醯胺(129)：使用化合物 **128** 作為起始材料，利用與針對 **127** 所述類似之程序製備化合物 **129**，獲得靶標化合物 **129** (13 mg, 0.012 mmol, 54%)。MS m/z 502 $(M+H)^+$。



【0637】 **NH2O-PEG3-Pr-(6-胺基-9-((6-(2-((2-胺基乙基)(甲基)胺基)乙基胺基)吡啶-3-基)甲基)-2-(丁基胺基)-7H-嘌呤-8(9H)-酮)乙醯胺(130)**：於 23°C下向化合物 **128** (20 mg, 0.023 mmol)及 Phth-PEG4-OSu (10 mg, 0.022 mmol)於 DMF (1 mL)中之溶液中添加 DIEA (50 uL, 0.287 mmol)。在 5 min 後，於 23°C下將肼 H_2O (10 uL)添加至混合物中。在 5 min 後，將混合物藉由製備型 LC 純化，獲得化合物 **130** (20 mg, 0.016 mmol, 70%)。MS m/z 692 $(M+H)^+$。



【0638】 **6-胺基-2-(丁基胺基)-9-((6-(2-((2-羥基乙基)(甲基)胺基)乙氧基)吡啶-3-基)甲基)-7H-嘌呤-8(9H)-酮(131)**：於23°C下向化合物**125** (124 mg, 0.215 mmol)於 DMF (4 mL)中之溶液中添加 N-甲基二乙醇胺(200 uL, 1.007 mmol)及 60% NaH (350 mg, 8.750 mmol)。將混合物於 60°C下在乾燥氮氣下攪拌。在 3 h 後，將 1N HCl (4 mL)添加至混合物中且藉由製備型 LC 純化，獲得化合物 **131** (75 mg, 0.085 mmol, 39%)。MS m/z 431 $(M+H)^+$。

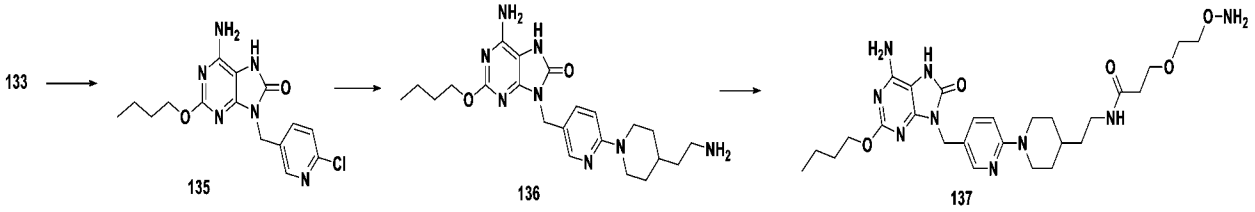


【0639】 **2-丁氧基-9H-嘌呤-6-胺(132)**：於 23°C下在乾燥氮氣下將化合物 **122**

(690 mg, 2.720 mmol)溶解於 20%正丁醇鈉(8 mL, 16.71 mmol)中。在添加後，將溫度升高至 100°C。在 20 h 後，於真空中去除溶劑。將殘餘物溶解於 DCM (30 mL)中，用半飽和碳酸氫鈉(50 mL)及鹽水(50 mL)洗滌，用 $MgSO_4$ 乾燥且過濾。於真空中去除有機溶劑。將 MeOH (5 mL)及 TFA (1 mL)添加至殘餘物中且於 23°C 下攪拌。在 18 h 後，於真空中去除溶劑。將殘餘物溶解於 DCM (30 ml)中，用碳酸氫鈉(50 mL)及鹽水(50 mL)洗滌，用 $MgSO_4$ 乾燥且過濾。於真空中去除有機溶劑，獲得呈粗製物之 2-丁氧基-9H-嘌呤-6-胺(1300 mg，2.987，定量)。MS m/z 208 $(M+H)^+$。

【0640】 **N2-丁基-9-((6-氯吡啶-3-基)甲基)-9H-嘌呤-2,6-二胺(133)**：使用化合物 **132** 作為起始材料，利用與針對 **124** 所述類似之程序製備化合物 **133**，獲得靶標化合物 **133** (468 mg, 1.406 mmol, 47%)。MS m/z 333 $(M+H)^+$。

【0641】 **N-(2-(4-(5-((6-胺基-2-丁氧基-9H-嘌呤-9-基)甲基)吡啶-2-基)六氫吡嗪-1-基)乙基)-2-(胺基氧基)乙醯胺(134)**：使用化合物 **133** 作為起始材料，利用與針對 **127** 所述類似之程序製備化合物 134，獲得靶標化合物 **134** (12 mg，0.012 mmol，10%來自化合物 **133**)。MS m/z 514 $(M+H)^+$。

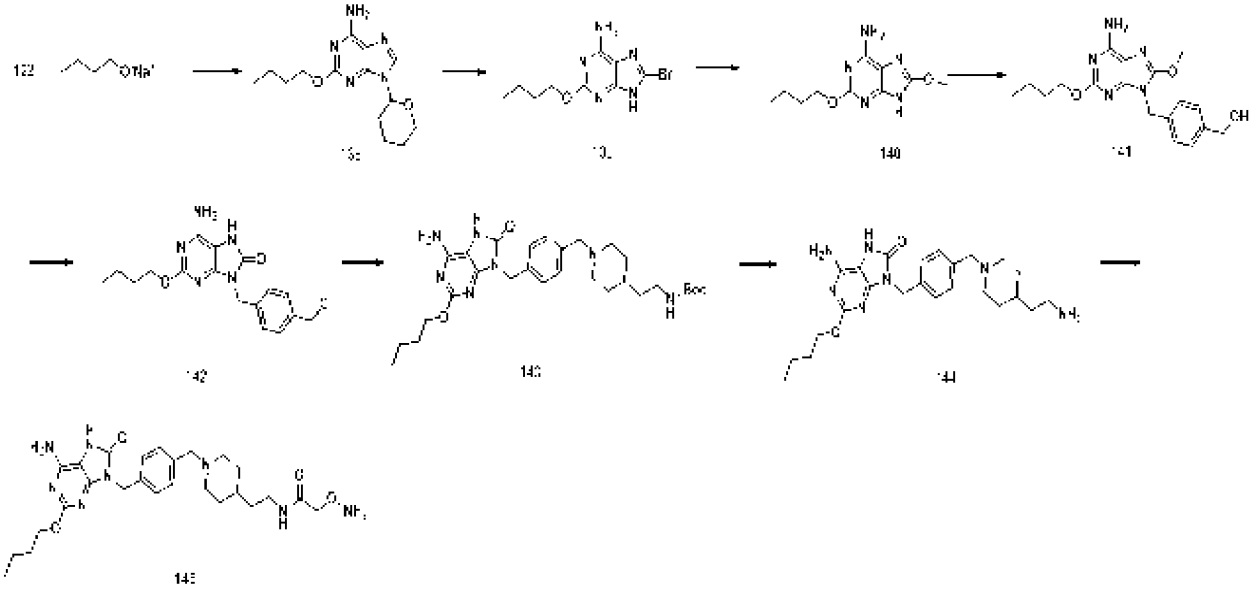


【0642】 **6-胺基-2-丁氧基-9-((6-氯吡啶-3-基)甲基)-7H-嘌呤-8(9H)-酮(135)**：於 23°C下向化合物 **133** (124 mg, 0.373 mmol)於 DCM (10 mL)中之溶液中添加溴(30 uL, 0.113 mmol)。在 2 h 後，將反應物於真空中乾燥。將 8-溴-2-丁氧基-9-((6-氯吡啶-3-基)甲基)-9H-嘌呤-6-胺 HBr 之粗製殘餘物(150 mg，<0.373 mmol，粗製物)溶解於 3N HCl 溶液(15 mL)中且回流。在 20 h 後，於真空中去除溶劑。將混合物藉由製備型 LC 純化，獲得化合物 **135** (47 mg, 0.110 mmol, 29%)。MS m/z 349

$(M+H)^+$。

【0643】 **6-胺基-9-((6-(4-(2-胺基乙基)六氫吡啶-1-基)吡啶-3-基)甲基)-2-丁氧基-7H-嘌呤-8(9H)-酮(136)**：將化合物 **135** (46 mg, 0.132 mmol)及 4-(2-boc-胺基乙基)-六氫吡啶(120 mg, 0.526 mmol)混合，且於 140°C下攪拌混合物。在 25 h 後，在冷卻至 23°C後向混合物中添加 DCM (1 mL)及 TFA (1 mL)。在 10 min 後，於真空中去除有機溶劑。將混合物藉由製備型 LC 純化，獲得化合物 **136** (11 mg, 0.014 mmol, 11%)。MS m/z 441 $(M+H)^+$。

【0644】 **N-(2-(1-(5-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7H-嘌呤-9(8H)-基)甲基)吡啶-2-基)六氫吡啶-4-基)乙基)-3-(2-(胺基氧基)乙氧基)丙醯胺(137)**：使用化合物 **136** 及 3-(2-(1,3-二側氧基異吲哚啉-2-基氧基)乙氧基)丙酸作為起始材料，利用與針對 **130** 所述類似之程序製備化合物 **137**，獲得靶標化合物 **137** (9 mg, 0.010 mmol, 70%)。MS m/z 572 $(M+H)^+$。



【0645】 **9-(4-(2-胺基乙基)苄基)-2-丁氧基-9H-嘌呤-6-胺(138)**：於 23°C下在乾燥氮氣下將化合物 **122** (3330 mg, 13.126 mmol)溶解於 20%正丁醇鈉(25 mL)中且將溫度升高至 100°C。在 1.5 h 後，於真空中去除溶劑。將殘餘物溶解於 DCM (30 mL)中，用半飽和碳酸氫鈉(50 mL)及鹽水(50 mL)洗滌，用 $MgSO_4$ 乾燥且過濾。

於真空中去除有機溶劑。將殘餘物藉由急驟層析用 1%至 4% MeOH/DCM 梯度純化，獲得化合物 **138** (2687mg, 9.224 mmol, 70%)。MS m/z 292 $(M+H)^+$。

【0646】 **8-溴-2-丁氧基-9-(四氫-2H-哌喃-2-基)-9H-嘌呤-6-胺(139)**：於 23°C下向化合物 **138** (2687 mg, 9224 mmol)於 DCM (50 ml)中之溶液中添加 N-溴琥珀醯亞胺(2000 mg, 11069 mmol)。在 1 h 後，將飽和硫代硫酸鈉(20 mL)添加至混合物中。將材料用 DCM (20 ml)萃取。將有機層用飽和碳酸氫鈉(50 mL)及鹽水(50 mL)洗滌，用 $MgSO_4$ 乾燥且過濾。於真空中去除有機溶劑。將殘餘物藉由急驟層析用 20%至 70% EtOAc/己烷梯度純化，獲得化合物 **139** (2517 mg, 6.799 mmol, 74%)。MS m/z 371 $(M+H)^+$。

【0647】 **2-丁氧基-8-甲氧基-9H-嘌呤-6-胺(140)**：於 23°C下在乾燥氮氣下將化合物 **139** (2517 mg, 6.799 mmol)溶解於 25%甲醇鈉(20 mL, 42 mmol)中。在添加後，將溫度升高至 70°C。在 2.5 h 後，將混合物於真空中濃縮，溶解於 EtOAc (100 mL)中，用水(100 mL)及鹽水(100 mL)洗滌，用 $MgSO_4$ 乾燥且過濾。將有機層收集且於真空中蒸發。向殘餘物中添加 MeOH (10 mL)及 TFA (3 mL)。在添加 TFA 48 h 後，於真空中去除溶劑。將混合物藉由製備型 LC 純化，獲得化合物 **140** (708 mg, 2.984, 44%)。MS m/z 238 $(M+H)^+$。

【0648】 **(4-((6-胺基-2-(丁基胺基)-8-甲氧基-9H-嘌呤-9-基)甲基)苯基)甲醇(141)**：於 50°C下向化合物 **140** TFA 鹽(25 mg, 0.054 mmol)於 DMF (2 mL)中之溶液中添加碳酸鉀(20 mg, 0.524 mmol)及(4-羥基甲基)苄基氯(11 mg, 0.070 mmol)且攪拌。在 2 h 後，將溶劑濃縮。向殘餘物中添加水，接著將混合物用 DCM (50 mL)萃取。將有機層用水(10 mL)及鹽水(20 mL)洗滌，接著經 $MgSO_4$ 乾燥並過濾。於真空中去除溶劑。將混合物藉由製備型 LC 純化，獲得呈 TFA 鹽之化合物 **141** (29 mg, 0.042 mmol, 77%)。MS m/z 357 $(M+H)^+$。

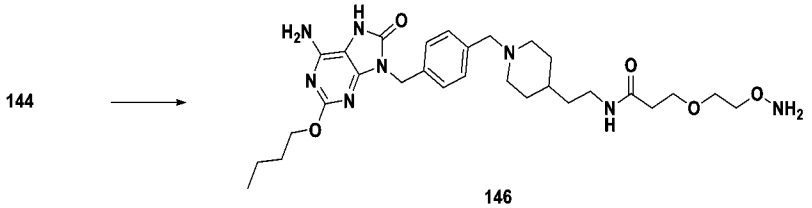
【0649】 **6-胺基-2-丁氧基-9-(4-(氯甲基)苄基)-7H-嘌呤-8(9H)-酮(142)**：向化合

物 **141** (607 mg, 1.037 mmol)中添加二氯甲烷(10 mL)。向所得懸浮液中添加亞硫醯氯(1000 uL)且將混合物於 50°C下攪拌 3 小時。將甲苯(30 mL)添加至混合物中且蒸發溶劑。再次將甲苯(100 mL)添加至殘餘物中，將溶劑蒸發且於減壓下乾燥，獲得化合物 **142** (402 mg，1.111 mmol，定量)。MS m/z 362 $(M+H)^+$。

【0650】 **2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基- 7,8-二氫-9H-嘌呤-9 -基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基胺基甲酸第三丁酯(143)**：向化合物 **142** (166 mg, 0.384 mmol)及 4-(2-boc-胺基乙基)-六氫吡啶(180 mg, 0.788 mmol)於 DMF (2 mL)中之溶液中添加 DIEA (1000 uL, 5.741 mmol)，且將溫度升高至 80°C。在 3.5 h 後，於真空中去除溶劑。將混合物藉由製備型 LC 純化，獲得化合物 **143** (205 mg, 0.229 mmol, 29%)。MS m/z 554 $(M+H)^+$。

【0651】 **6-胺基-9-(4-((4-(2-胺基乙基)六氫吡啶-1-基)甲基)苄基)-2-丁氧基-7H-嘌呤-8(9H)-酮(144)**：將化合物 **143** (41 mg, 0.052 mmol)溶解於 DCM (2 mL)及 TFA (1 mL)中。在 5 min 後，於真空中去除溶劑。將甲苯(5 ml)添加至殘餘物中且於真空中蒸發。將殘餘物於高真空幫浦上乾燥，獲得呈 TFA 鹽之化合物 **144** (41 mg，0.052 mmol，定量)。MS m/z 454 $(M+H)^+$。

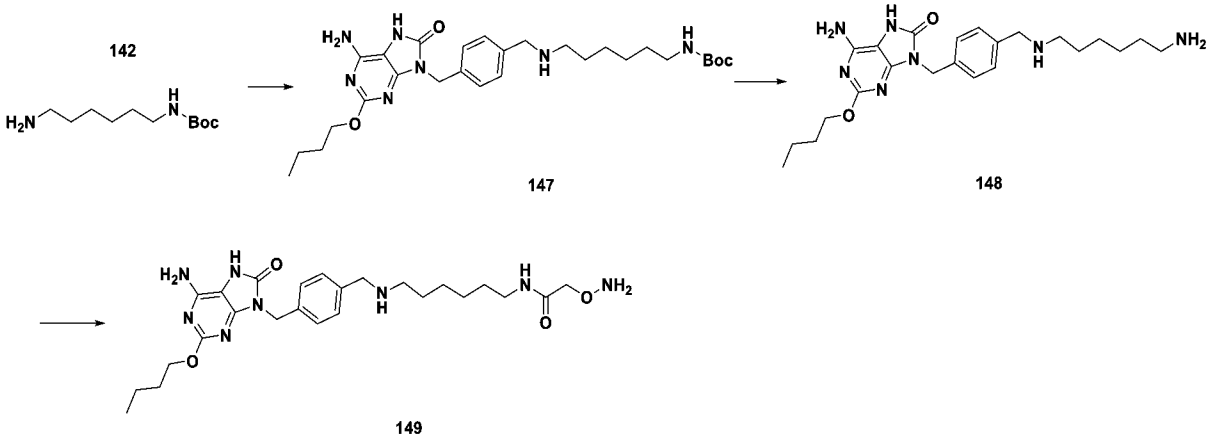
【0652】 **N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7H-嘌呤-9(8H)-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-2-(胺基氧基)乙醯胺(145)**：使用化合物 **144** 作為起始材料，利用與針對 **127** 所述類似之程序製備化合物 **145**，獲得靶標化合物 **145** (15 mg, 0.015 mmol, 87%)。MS m/z 527 $(M+H)^+$。



146

【0653】 **N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7H-嘌呤-9(8H)-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-3-(2-(胺基氧基)乙氧基)丙烯醯胺(146)**：使用化合物 **144**

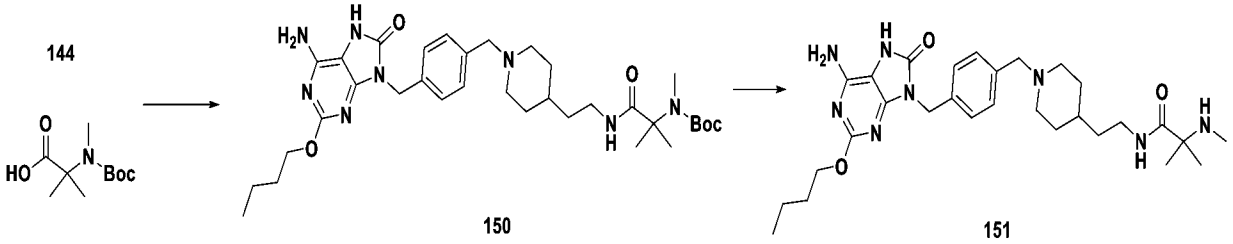
作為起始材料，利用與針對 **137** 所述類似之程序製備化合物 **146**，獲得靶標化合物 **146** (16 mg, 0.015 mmol, 87%)。MS m/z 585 $(M+H)^+$。



【0654】 **2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7H-嘌呤-9(8H)-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基胺基甲酸第三丁酯(147)**：使用化合物 **142** 及 6-胺基己基胺基甲酸第三丁酯作為起始材料，利用與針對 **143** 所述類似之程序製備化合物 **147**，獲得靶標化合物 **147** (23mg, 0.026 mmol, 14%)。MS m/z 542 $(M+H)^+$。

【0655】 **6-胺基-9-(4-((6-胺基己基胺基)甲基)苄基)-2-丁氧基-7H-嘌呤-8(9H)-酮(148)**：使用化合物 **147** 作為起始材料，利用與針對 **144** 所述類似之程序製備化合物 **148**，獲得靶標化合物 **148** (24 mg，0.027mmol，定量)。MS m/z 442 $(M+H)^+$。

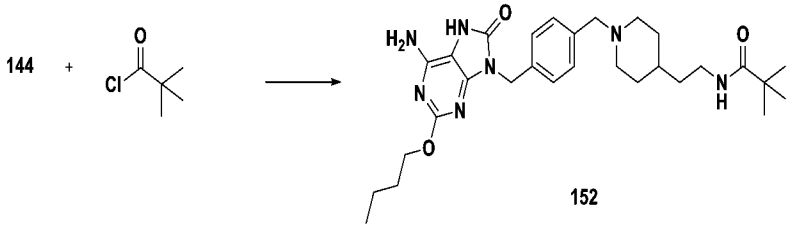
【0656】 **N-(6-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7H-嘌呤-9(8H)-基)甲基)苄基胺基)己基)-2-(胺基氧基)乙醯胺(149)**：使用化合物 **148** 作為起始材料，利用與針對 **127** 所述類似之程序製備化合物 **149**，獲得靶標化合物 **149** (7 mg, 0.008 mmol, 31%)。MS m/z 515 $(M+H)^+$。



【0657】 **N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7H-嘌呤-9(8H)-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-3-(2-(胺基氧基)乙氧基)丙醯胺(150)**：於 23°C 下向化合

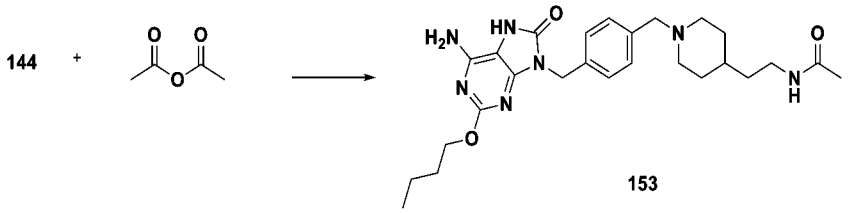
物 **144** (14 mg, 0.018 mmol)及 N-Boc-N,2-二甲基-丙胺酸(5.5 mg, 0.020 mmol)於 DMF (1 mL)中之溶液中添加 DMTMMT (5 mg, 0.021 mmol)及 DIEA (20 uL, 0.115 mmol)。在 30 min 後，將混合物藉由製備型 LC 純化，獲得化合物 **150** (7 mg, 0.007 mmol, 37%)。MS m/z 653 $(M+H)^+$。

【0658】 **N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7H-嘌呤-9(8H)-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-2-甲基-2-(甲基胺基)丙醯胺(151)**：使用化合物 **150** 作為起始材料，利用與針對 **144** 所述類似之程序製備化合物 **151**，獲得靶標化合物 **151** (5.5 mg，0.005 mmol，定量)。MS m/z 553 $(M+H)^+$。



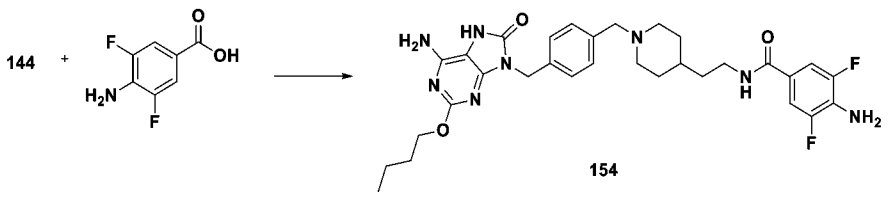
152

【0659】 **N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7H-嘌呤-9(8H)-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)新戊醯胺(152)**：於 23°C 下向化合物 **144** (14 mg, 0.018 mmol)及三甲基乙醯氯(2.8 ul, 0.022 mmol)於 DMF (1 mL)中之溶液中添加 DIEA (20 uL, 0.115 mmol)。在 1 h 後，將混合物藉由製備型 LC 純化，獲得化合物 **152** (7 mg, 0.008 mmol, 36%)。MS m/z 538 $(M+H)^+$。

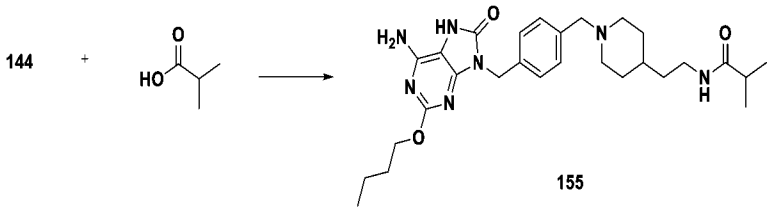


153

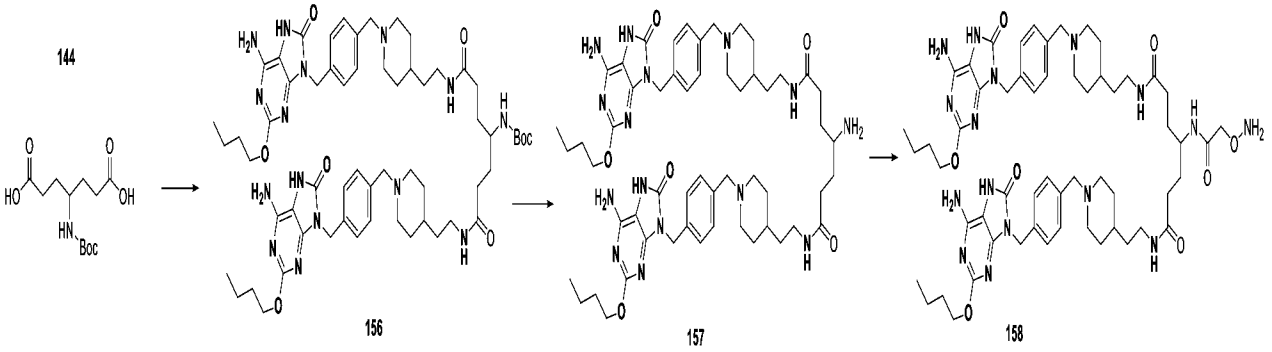
【0660】 **N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7H-嘌呤-9(8H)-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)乙醯胺(153)**：於 23°C 下向化合物 **144** (20 mg, 0.022 mmol)及乙酸酐(2.1 uL, 0.021 mmol)於 DMF (1 mL)中之溶液中添加 DIEA (20 uL, 0.115 mmol)。在 1 h 後，將混合物藉由製備型 LC 純化，獲得化合物 **153** (8 mg, 0.010 mmol, 43%)。MS m/z 496 $(M+H)^+$。



【0661】 **4-胺基-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7H-嘌呤-9(8H)-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-3,5-二氟苯甲醯胺(154)**：使用化合物 144 及 4-胺基-3,5-二氟苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **150** 所述類似之程序製備化合物 **154**，獲得靶標化合物 **154** (8 mg, 0.008 mmol, 38%)。MS m/z 609 $(M+H)^+$。



【0662】 **N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7H-嘌呤-9(8H)-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)異丁醯胺(155)**：使用化合物 **144** 及異丁酸作為起始材料，利用與針對 **150** 所述類似之程序製備化合物 **155**，獲得化合物 **155** (6 mg, 0.007 mmol, 32%)。MS m/z 524 $(M+H)^+$。

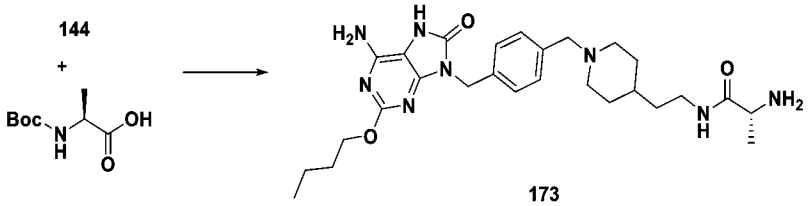


【0663】 **1,7-雙(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7H-嘌呤-9(8H)-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基胺基)-1,7-二側氧基庚-4-基胺基甲酸第三丁酯(156)**：使用化合物 **144** 及 4-(N-Boc-胺基)-1,6-庚二酸作為起始材料，利用與針對 **150** 所述類似之程序製備化合物 **156**，獲得靶標化合物 **156** (15 mg, 0.009 mmol, 34%)。MS m/z 1147 $(M+H)^+$。

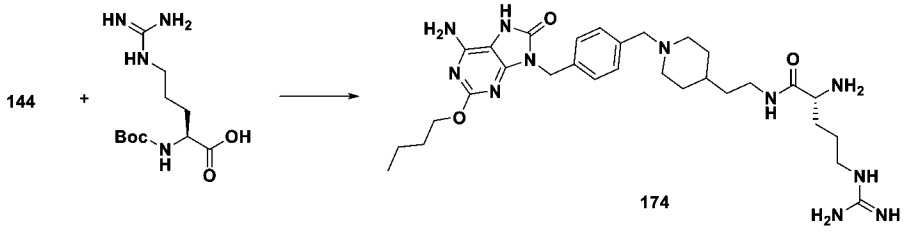
【0664】 **4-胺基-N1,N7-雙(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7H-嘌呤**

-9(8H)-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)庚烷二醯胺(157)：使用化合物 **156** 作為起始材料，利用與針對 **144** 所述類似之程序製備化合物 **157**，獲得靶標化合物 **157** (15 mg，0.01 mmol，定量)。MS m/z 1047 $(M+H)^+$。

【0665】 **N1,N7-雙(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7H-嘌呤-9(8H)-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-4-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)庚二醯胺(158)**：使用化合物 **157** 及 2-(第三丁氧基羰基胺基氧基)乙酸 2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯作為起始材料，利用與針對 **145** 所述類似之程序製備化合物 **158**，獲得靶標化合物 **158** (5 mg, 0.003 mmol, 34%)。MS m/z 1120 $(M+H)^+$。

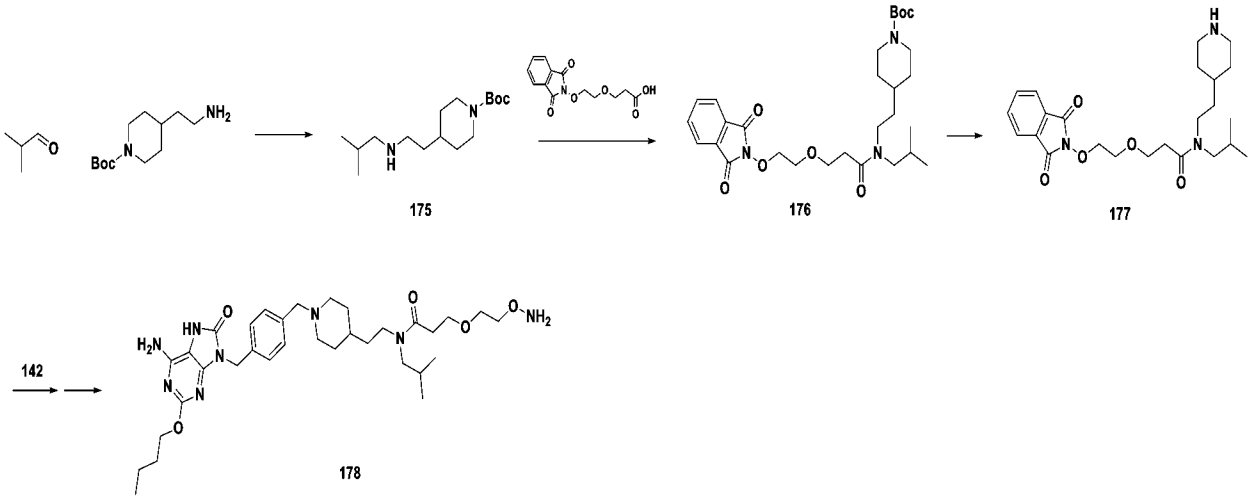


【0666】 **(S)-2-胺基-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7H-嘌呤-9(8H)-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)丙醯胺(173)**：於 23°C 下向化合物 **144** (20 mg, 0.022 mmol)及 N-Boc-丙胺酸(5 mg, 0.026 mmol)於 DMF (1 mL)中之溶液中添加 DMTMMT (6 mg, 0.025 mmol)及 DIEA (20 uL, 0.115 mmol)。在 10 min 後，於真空中去除溶劑。向殘餘物中添加 DCM (1 ml)及 TFA (1 ml)。在 10 min 後，於真空中去除溶劑，且將殘餘物藉由製備型 LC 純化，獲得化合物 **173** (8 mg, 0.009 mmol, 42%)。MS m/z 525 $(M+H)^+$。



【0667】 **(S)-2-胺基-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7H-嘌呤-9(8H)-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-5-胍基戊醯胺(174)**：使用化合物 **144** 及 N-Boc-精胺酸作為起始材料，利用與針對 **173** 所述類似之程序製備化合物 **174**，

獲得靶標化合物 **174** (10 mg, 0.011 mmol, 48%)。MS m/z 610 $(M+H)^+$。

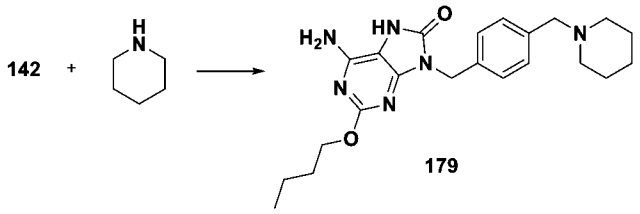


【0668】 **4-(2-(異丁基胺基)乙基)六氫吡啶-1-甲酸第三丁酯(175)**：於 23°C下將 4-(2-胺基乙基)-1-Boc-六氫吡啶(520 mg, 2.278 mmol)及異丁醛(230 ul, 3.190 mmol)溶解於甲醇(10 ml)中。在 2 h 後，將硼氫化鈉(142 mg, 3.754 mmol)添加至該混合物中。在 10 min 後，於真空中去除溶劑。將殘餘物溶解於 DCM (100 mL)中，用飽和 $NaHCO_3$ (50 mL)及鹽水(50 ml)洗滌，經 $MgSO_4$ 乾燥，且過濾。於真空中去除溶劑。將殘餘物藉由製備型-LC 純化，獲得呈玻璃狀無色固體之化合物 **175** (499 mg, 1.755 mmol, 55%)。MS m/z 285 $(M+H)^+$。

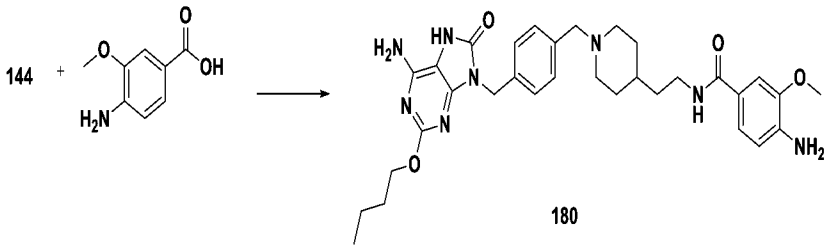
【0669】 **4-(2-(3-(2-(1,3-二側氧基異吲哚啉-2-基氧基)乙氧基)-N-異丁基丙醯胺基)乙基)六氫吡啶-1-甲酸第三丁酯(176)**：於 23°C 下向化合物 **175** (80 mg, 0.201 mmol)及 Phth-PEG1-COOH (56 mg, 0.201 mmol)於 EtOAc (10 ml)中之溶液中添加 CMPI (62 mg, 0.243 mmol)及 DIEA (70 ul, 0.402 mmol)。在 3 h 後，藉由過濾去除沈澱，且將濾液用急驟層析純化，獲得呈白色固體之化合物 **176** (65 mg, 0.119 mmol, 59%)。MS m/z 546 $(M+H)^+$。

【0670】 **3-(2-(1,3-二側氧基異吲哚啉-2-基氧基)乙氧基)-N-異丁基-N-(2-(六氫吡啶-4-基)乙基)丙醯胺(177)**：使用化合物 **176** 作為起始材料，利用與針對 **144** 所述類似之程序製備化合物 **177**，獲得靶標化合物 **177** (66 mg，0.118 mmol，定量)。MS m/z 446 $(M+H)^+$。

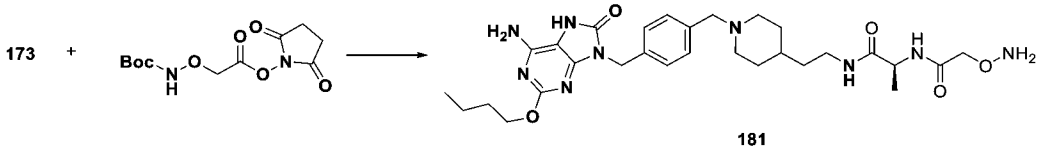
【0671】 **N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7H-嘌呤-9(8H)-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-3-(2-(胺基氧基)乙氧基)-N-異丁基丙醯胺(178)**：使用化合物 **177** 及化合物 **142** 作為起始材料，利用與針對 **143** 所述類似之程序，接著如針對 **130** 所述用肼、H_2O (10 uL)處理，製備化合物 **178**，獲得化合物 **178** (19 mg, 0.019 mmol, 7%)。MS m/z 641 $(M+H)^+$。



【0672】 **6-胺基-2-丁氧基-9-(4-(六氫吡啶-1-基甲基)苄基)-7H-嘌呤-8(9H)-酮(179)**：使用化合物 **142** 及六氫吡啶作為起始材料，利用與針對 **143** 所述類似之程序製備化合物 **179**，獲得化合物 **179** (31 mg, 0.041 mmol, 54%)。MS m/z 411 $(M+H)^+$。

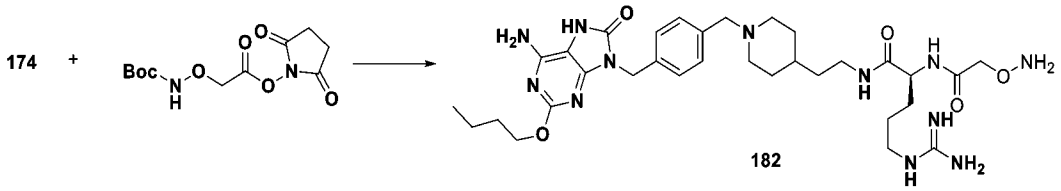


【0673】 **4-胺基-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7H-嘌呤-9(8H)-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-3-甲氧基苯甲醯胺(180)**：使用化合物 **144** 及 4-胺基-3-甲氧基苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **150** 所述類似之程序製備化合物 **180**，獲得靶標化合物 **180** (8 mg, 0.008 mmol, 39%)。MS m/z 603 $(M+H)^+$。

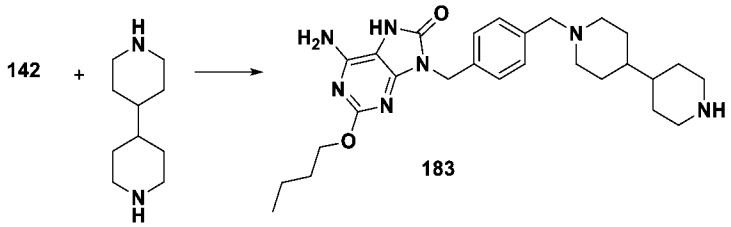


【0674】 **(S)-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7H-嘌呤-9(8H)-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-2-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)丙醯胺(181)**：使用化合物 **173** 及 2-(第三丁氧基羰基胺基氧基)乙酸 2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯作為起始材

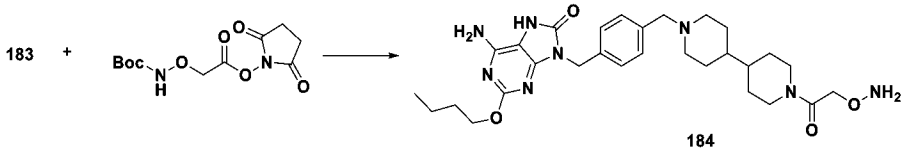
料，利用與針對 **127** 所述類似之程序製備化合物 **181**，獲得靶標化合物 **181** (5 mg, 0.005 mmol, 58%)。MS m/z 598 $(M+H)^+$。



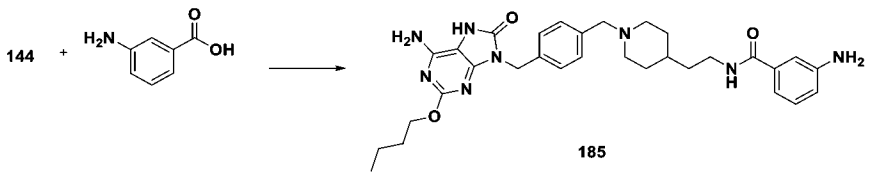
【0675】　(S)-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7H-嘌呤-9(8H)-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-2-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-5-胍基戊醯胺(182)：使用化合物 **174** 及 2-(第三丁氧基羰基胺基氧基)乙酸 2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯作為起始材料，利用與針對 **127** 所述類似之程序製備化合物 **182**，獲得靶標化合物 **182** (5 mg, 0.004 mmol, 42%)。MS m/z 683 $(M+H)^+$。



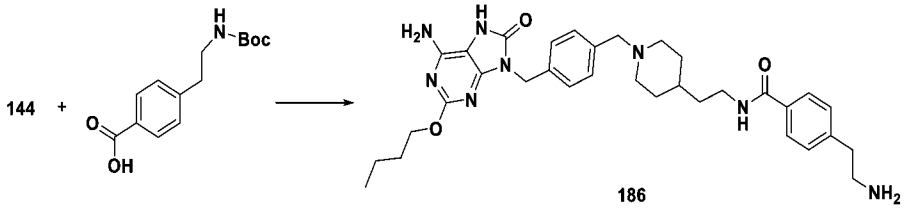
【0676】　9-(4-(4,4'-聯六氫吡啶-1-基甲基)苄基)-6-胺基-2-丁氧基-7H-嘌呤-8(9H)-酮(183)：使用化合物 **142** 及 4,4'-聯六氫吡啶作為起始材料，利用與針對 **143** 所述類似之程序製備化合物 **183**，獲得化合物 **183** (13 mg, 0.016 mmol, 7%)。MS m/z 494 $(M+H)^+$。



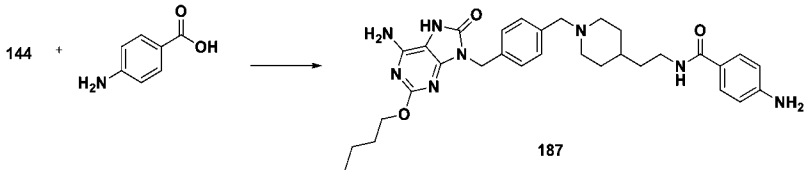
【0677】　6-胺基-9-(4-((1'-(2-(胺基氧基)乙醯基)-4,4'-聯六氫吡啶-1-基)甲基)苄基)-2-丁氧基-7H-嘌呤-8(9H)-酮(184)：使用化合物 **183** 及 2-(第三丁氧基羰基胺基氧基)乙酸 2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯作為起始材料，利用與針對 **127** 所述類似之程序製備化合物 **184**，獲得靶標化合物 **184** (5 mg, 0.005 mmol, 18%)。MS m/z 567 $(M+H)^+$。



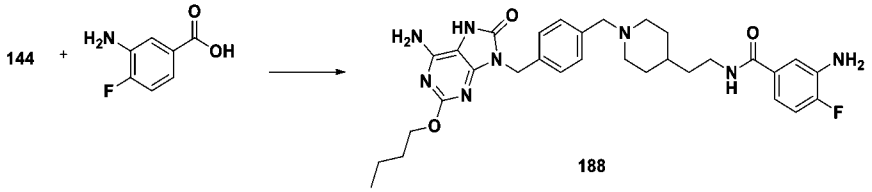
【0678】 **3-胺基-N-(2-(1-(4-((4-胺基-6-丁氧基-2-側氧基-2,3-二氫-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-1-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)苯甲醯胺(185)**：使用化合物 **144** 及 3-胺基苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **150** 所述類似之程序製備化合物 **185**，獲得靶標化合物 **185** (8 mg, 0.009 mmol, 53%)。MS m/z 572 $(M+H)^+$。



【0679】 **N-(2-(1-(4-((4-胺基-6-丁氧基-2-側氧基-2,3-二氫-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-1-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-4-(2-胺基乙基)苯甲醯胺(186)**：使用化合物 **144** 及 4-(2-Boc-胺基)乙基苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **173** 所述類似之程序製備化合物 **186**，獲得靶標化合物 **186** (9 mg, 0.010 mmol, 58%)。MS m/z 600 $(M+H)^+$。

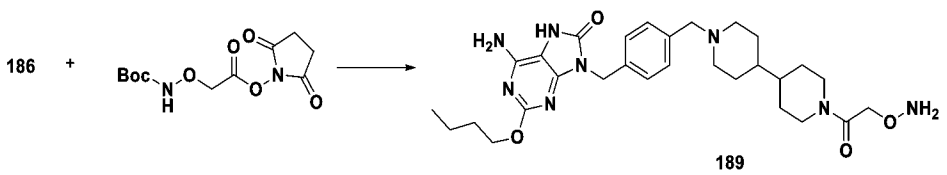


【0680】 **4-胺基-N-(2-(1-(4-((4-胺基-6-丁氧基-2-側氧基-2,3-二氫-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-1-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)苯甲醯胺苯甲醯胺(187)**：使用化合物 **144** 及 4-胺基苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **150** 所述類似之程序製備化合物 **187**，獲得靶標化合物 **187** (8 mg, 0.009 mmol, 53%)。MS m/z 572 $(M+H)^+$。

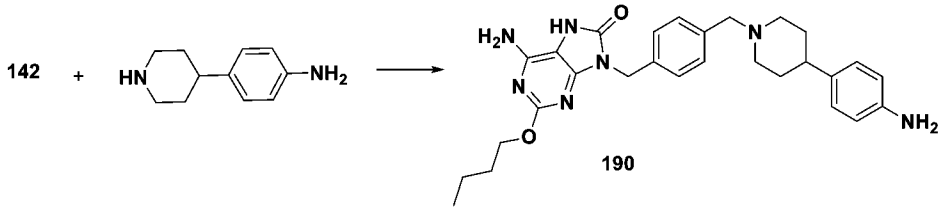


【0681】 **3-胺基-N-(2-(1-(4-((4-胺基-6-丁氧基-2-側氧基-2,3-二氫-1H-咪唑并**

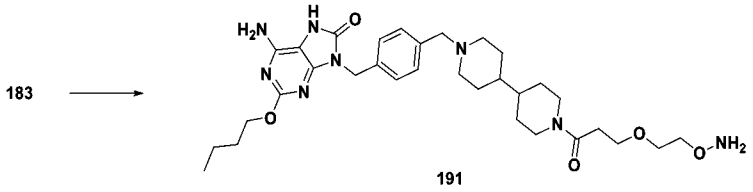
[4,5-c]吡啶-1-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-4-氟苯甲醯胺(188)：使用化合物 **144** 及 3-胺基-4-氟苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **150** 所述類似之程序製備化合物 **188**，獲得靶標化合物 **188** (11 mg, 0.011 mmol, 64%)。MS m/z 590 $(M+H)^+$。



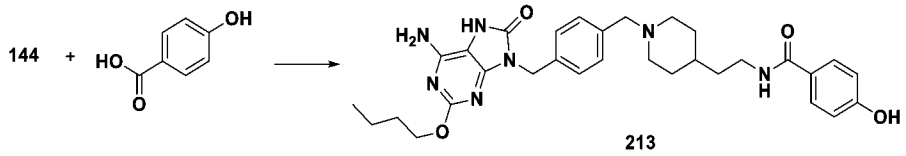
【0682】 N-(2-(1-(4-((4-胺基-6-丁氧基-2-側氧基-2,3-二氫-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-1-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-4-(2-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)乙基)苯甲醯胺(189)：使用化合物 **186** 及 2-(第三丁氧基羰基胺基氧基)乙酸 2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯作為起始材料，利用與針對 **127** 所述類似之程序製備化合物 **189**，獲得靶標化合物 **189** (11 mg, 0.010 mmol, 94%)。MS m/z 673 $(M+H)^+$。



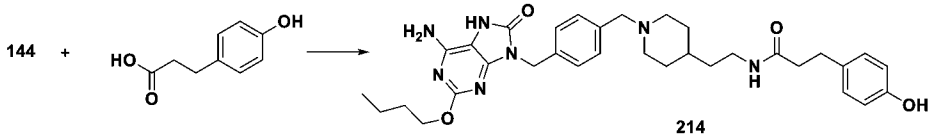
【0683】 6-胺基-9-(4-((4-(4-胺基苯基)六氫吡啶-1-基)甲基)苄基)-2-丁氧基-7H-嘌呤-8(9H)-酮(190)：使用化合物 **142** 及 4-(4-胺基苯基)-六氫吡啶作為起始材料，利用與針對 **143** 所述類似之程序製備化合物 **190**，獲得化合物 **190** (3 mg, 0.004 mmol, 5%)。MS m/z 502 $(M+H)^+$。



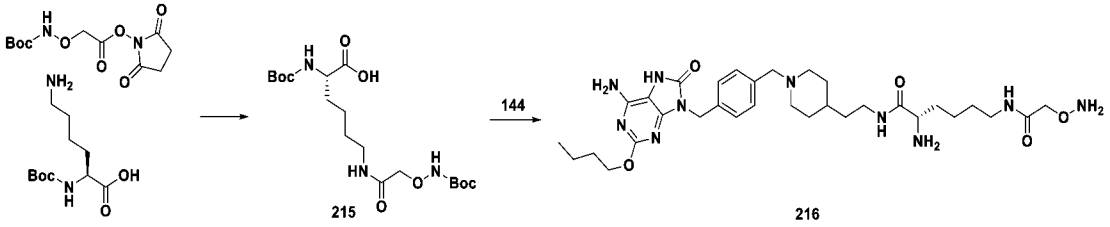
【0684】 6-胺基-9-(4-((1'-(3-(2-(胺基氧基)乙氧基)丙醯基)-4,4'-聯六氫吡啶-1-基)甲基)苄基)-2-丁氧基-7H-嘌呤-8(9H)-酮(191)：使用化合物 **183** 作為起始材料，利用與針對 **137** 所述類似之程序製備化合物 **191**，獲得靶標化合物 **191** (13 mg, 0.012 mmol, 48%)。MS m/z 625 $(M+H)^+$。



【0685】 **N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-4-羥基苯甲醯胺(213)**：使用化合物 **144** 及 4-羥基苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **150** 所述類似之程序製備化合物 **213**，獲得靶標化合物 **213** (10 mg, 0.011 mmol, 66%)。MS m/z 573 $(M+H)^+$。



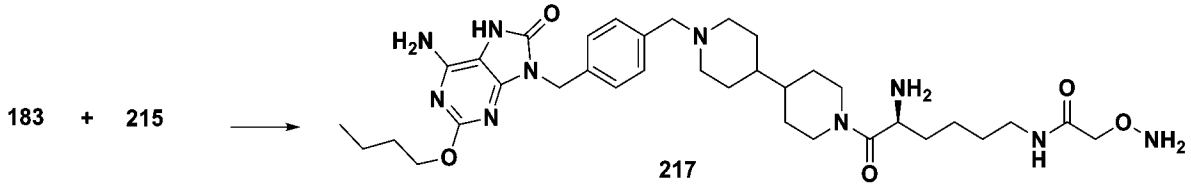
【0686】 **N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-3-(4-羥基苯基)丙醯胺(214)**：使用化合物 **144** 及 3-(4-羥基苯基)丙酸作為起始材料，利用與針對 **150** 所述類似之程序製備化合物 **214**，獲得靶標化合物 **214** (9 mg, 0.010 mmol, 58%)。MS m/z 602 $(M+H)^+$。



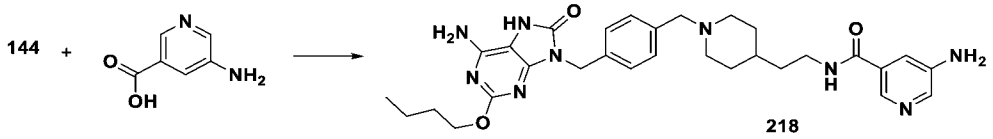
【0687】 **Boc--Lys(Boc-胺基氧基乙醯基)-OH (215)**：於 23°C下向於 DMF (5 mL)中之 2-(第三丁氧基羰基胺基氧基)乙酸 2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯(399 mg, 1.384 mmol)及 Boc-Lys-OH (335 mg, 1.360 mmol)中添加 DIEA (750 ul, 4.306 mmol)。在 2 h 後，於真空中去除溶劑。將殘餘物溶解於 EtOAc (50 ml)中，且用 1N HCl (50 ml)及鹽水(20 mL)洗滌。將有機層經 $MgSO_4$ 乾燥，接著過濾。於真空中去除溶劑。將殘餘物藉由急驟層析純化，獲得呈白色固體之化合物 **215** (480 mg, 1.144 mmol, 83%)。MS m/z 420 $(M+H)^+$。

【0688】 **(S)-2-胺基-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-6-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)己醯胺(216)**：使

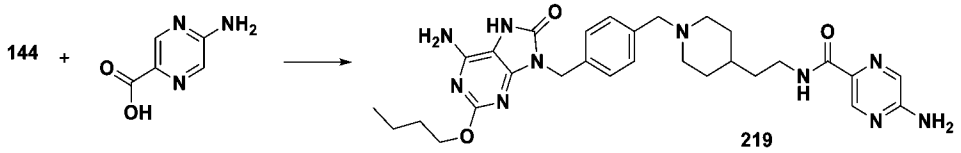
用化合物 **144** 及化合物 **215** 作為起始材料，利用與針對 **173** 所述類似之程序製備化合物**216**，獲得靶標化合物**216** (6 mg, 0.006 mmol, 37%)。MS m/z 655 $(M+H)^+$。



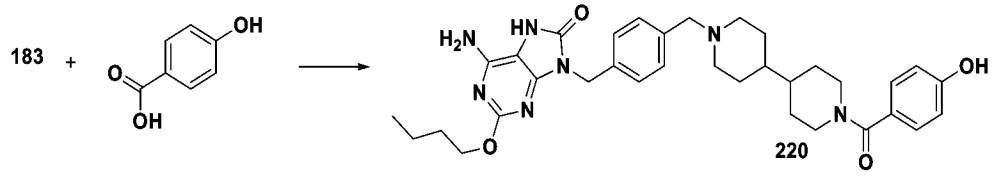
【0689】 **(S)-N-(5-胺基-6-(1'-(4-((4-胺基-6-丁氧基-2-側氧基-2,3-二氫-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-1-基)甲基)苄基)-4,4'-聯六氫吡啶-1-基)-6-側氧基己基)-2-(胺基氧基)乙醯胺(217)**：使用化合物 **183** 及化合物 **215** 作為起始材料，利用與針對 **173** 所述類似之程序製備化合物 **217**，獲得靶標化合物 **217** (6 mg, 0.006 mmol, 37%)。MS m/z 696 $(M+H)^+$。



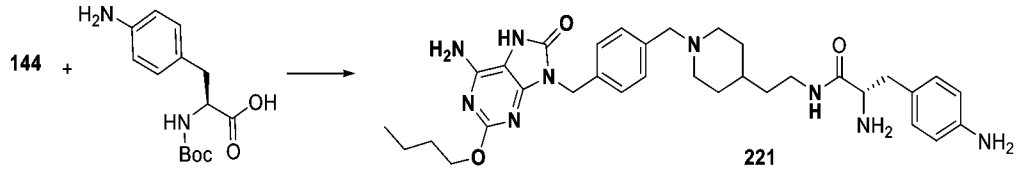
【0690】 **5-胺基-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)菸鹼醯胺(218)**：使用化合物 **144** 及 5-胺基菸酸作為起始材料，利用與針對 **150** 所述類似之程序製備化合物 **218**，獲得靶標化合物 **218** (1 mg, 0.001 mmol, 7%)。MS m/z 574 $(M+H)^+$。



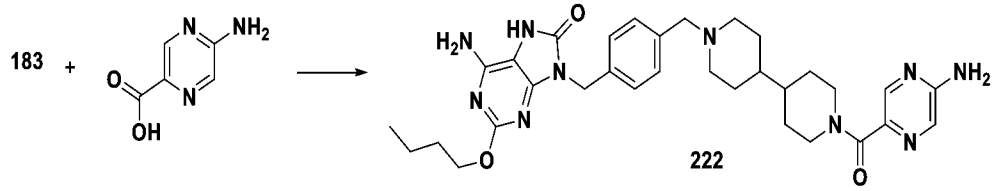
【0691】 **5-胺基-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)吡嗪-2-甲醯胺(219)**：使用化合物 **144** 及 5-胺基-吡嗪-甲酸作為起始材料，利用與針對 **150** 所述類似之程序製備化合物 **219**，獲得靶標化合物 **219** (10 mg, 0.11 mmol, 66%)。MS m/z 575 $(M+H)^+$。



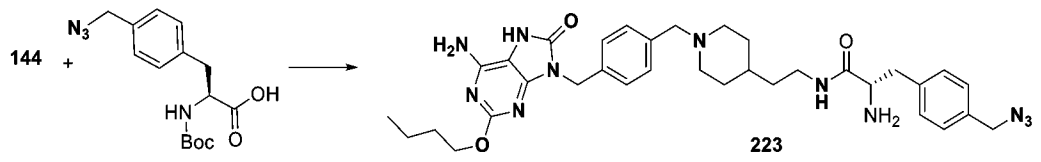
【0692】 **6-胺基-2-丁氧基-9-(4-((1'-(4-羥基苯甲醯基)-[4,4'-聯六氫吡啶]-1-基)甲基)苄基)-7,9-二氫-8H-嘌呤-8-酮(220)**：使用化合物 **183** 及 4-羥基苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **150** 所述類似之程序製備化合物 **220**，獲得靶標化合物 **220** (10 mg, 0.011 mmol, 69%)。MS m/z 614 $(M+H)^+$。



【0693】 **(S)-2-胺基-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-3-(4-胺基苯基)丙醯胺(221)**：使用化合物 **144** 及 Boc-L-4-胺基苯基丙胺酸作為起始材料，利用與針對 **173** 所述類似之程序製備化合物 **221**，獲得靶標化合物 **221** (15 mg, 0.014 mmol, 85%)。MS m/z 616 $(M+H)^+$。

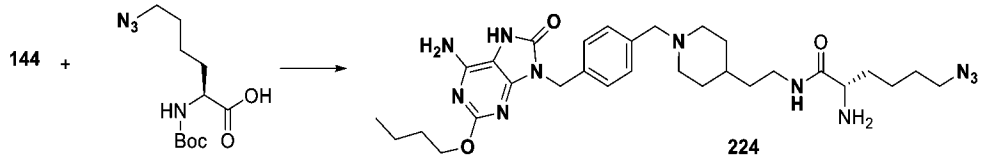


【0694】 **6-胺基-9-(4-((1'-(5-胺基吡嗪-2-羰基)-4,4'-聯六氫吡啶-1-基)甲基)苄基)-2-丁氧基-7H-嘌呤-8(9H)-酮(222)**：使用化合物 **183** 及 5-胺基-吡嗪甲酸作為起始材料，利用與針對 **150** 所述類似之程序製備化合物 **222**，獲得靶標化合物 **222** (11 mg, 0.012 mmol, 73%)。MS m/z 615 $(M+H)^+$。

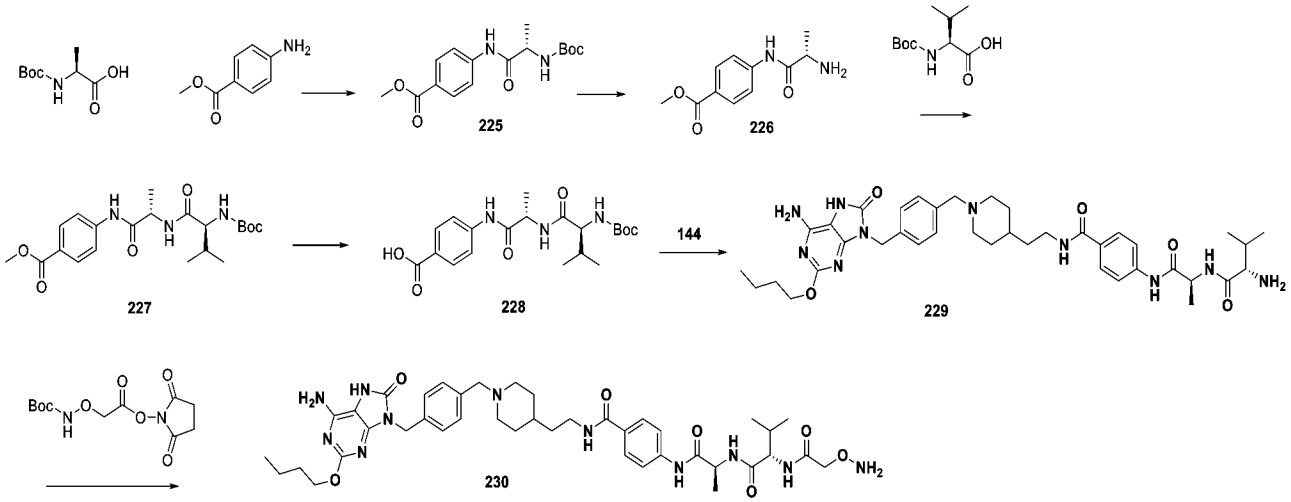


【0695】 **(S)-2-胺基-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-3-(4-(疊氮基甲基)苯基)丙烯醯胺(223)**：使用化合物 **144** 及 Boc-L-4-疊氮基甲基苯基丙胺酸作為起始材料，利用與針對 **173** 所述類似之程序製備化合物 **223**，獲得靶標化合物 **223** (11 mg, 0.010 mmol,

90%)。MS m/z 656 $(M+H)^+$。



【0696】 **(S)-2-胺基-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-6-疊氮基己醯胺(224)**：使用化合物 **144** 及 Boc-L-疊氮基離胺酸作為起始材料，利用與針對 **173** 所述類似之程序製備化合物 **224**，獲得靶標化合物 **224** (12 mg, 0.011 mmol, 93%)。MS m/z 608 $(M+H)^+$。



【0697】 **(S)-4-(2-(第三丁氧基羰基胺基)丙醯胺基)苯甲酸甲酯(225)**：於 0°C下向 Boc-Ala-OH (625 mg, 3.303 mmol)於 DMF (5 ml)中之溶液中添加 EDCI (960 mg, 5.008 mmol)及 HOBt (450 mg, 3.330 mmol)。在 30 min 後，於 23°C下向該混合物中添加 4-胺基苯甲酸甲酯(500 mg, 3.307 mmol)及 DMAP (410 mg, 3.356 mmol)。在 20 h 後，藉由旋轉蒸發將溶劑減少至約 1 ml 且用 50 ml EtOAC 稀釋。將溶液用 1N HCl (50 ml)、飽和碳酸氫鈉(50 ml)及鹽水(50 ml)洗滌，用 $MgSO_4$ 乾燥且過濾。於真空中去除有機溶劑。將殘餘物藉由急驟層析純化，獲得呈白色固體之化合物 **225** (180 mg, 0.558 mmol, 17%)。MS m/z 323 $(M+H)^+$。

【0698】 **(S)-4-(2-胺基丙醯胺基)苯甲酸甲酯(226)**：於 23°C 下向化合物 **225**

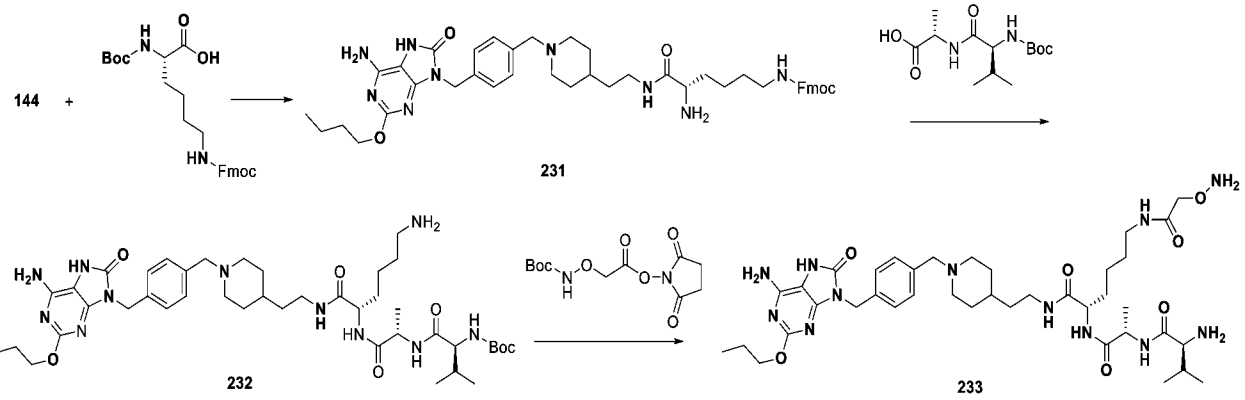
(180 mg, 0.558 mmol)於 DCM (1 ml)中之溶液中添加 TFA (1 ml)。在 20 min 後，於真空中去除溶劑。向殘餘物中添加甲苯(5 ml)且於真空中再蒸發。將殘餘物於高真空幫浦中乾燥隔夜，獲得呈褐色 TFA 鹽之化合物 **226** (200 mg，<0.595 mmol，定量)。MS m/z 223 $(M+H)^+$。

【0699】 **4-((S)-2-((S)-2-(第三丁氧基羰基胺基)-3-甲基丁醯胺基)丙醯胺基)苯甲酸甲酯(227)：**於 23°C下向化合物 **226** (200 mg, 0.595 mmol)及 Boc-Val-OH (130 mg, 0.598 mmol)於 DCM (10 ml)中之溶液中添加 DMTMMT (170 mg, 0.705 mmol)及 DIEA (350 ul, 2.009 mmol)。在 15 min 後，於真空中去除溶劑，且將殘餘物溶解於 EtOAc (50 ml)中，用 1N HCl (50 ml)、飽和碳酸氫鈉(50 ml)及鹽水(20 ml)洗滌。將有機層經 $MgSO_4$乾燥且過濾。藉由旋轉蒸發器去除溶劑。將殘餘物藉由急驟層析純化，獲得呈白色固體之化合物 **227** (202 mg, 0.479 mmol, 81%)。MS m/z 422 $(M+H)^+$。

【0700】 **4-((S)-2-((S)-2-(第三丁氧基羰基胺基)-3-甲基丁醯胺基)丙醯胺基)苯甲酸(228)：**於 23°C下向化合物 **227** (202 mg, 0.479 mmol)於 MeOH (10 ml)及水(1 mL)中之溶液中添加 LiOH (24 mg, 1.002 mmol)。在 24 h 後，於真空中去除溶劑且將殘餘物溶解於 EtOAc (50 ml)中，用 1N HCl (50 ml)及鹽水(20 ml)洗滌。將有機層經 $MgSO_4$乾燥且過濾。藉由旋轉蒸發器去除溶劑。將殘餘物藉由急驟層析純化，獲得呈白色固體之化合物 **228** (96 mg, 0.236 mmol, 49%)。MS m/z 408 $(M+H)^+$。

【0701】 **N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-4-((S)-2-((S)-2-胺基-3-甲基丁醯胺基)丙醯胺基)苯甲醯胺(229)**：使用化合物 **144** 及化合物 **228** 作為起始材料，利用與針對 **173** 所述類似之程序製備化合物 **229**，獲得靶標化合物 **229** (14 mg, 0.012 mmol, 97%)。MS m/z 743 $(M+H)^+$。

【0702】 **N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-4-((S)-2-((S)-2-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)丙醯胺基)苯甲醯胺(230)**：於 23°C下向化合物 **229** (14 mg, 0.012 mmol)及 2-(第三丁氧基羰基胺基氧基)乙酸 2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯(4 mg, 0.014 mmol)於 DMF (1 ml)中之溶液中添加 DIEA (30 ul, 0.172 mmol)。在 10 min 後，於真空中去除溶劑，且向殘餘物中添加 DCM (1 ml)及 TFA (1 ml)。在 10 min 後，於真空中去除溶劑。將殘餘物藉由製備型 LC 純化，獲得靶標化合物 **230** (11 mg, 0.009 mmol, 74%)。MS m/z 816 $(M+H)^+$。

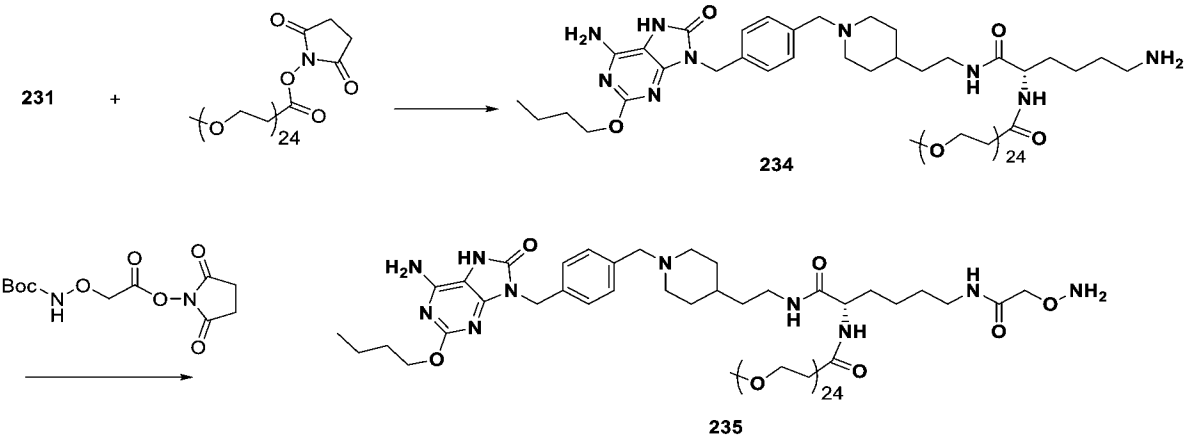


【0703】 **(S)-5-胺基-6-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7H-嘌呤-9(8H)-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基胺基)-6-側氧基已基胺基甲酸(9H-芴-9-基)甲酯(231)**：使用化合物 **144** 及 Boc-Lys(Fmoc)-OH 作為起始材料，利用與針對 **173** 所述類似之程序製備化合物 **231**，獲得靶標化合物 **231** (85 mg, 00.074 mmol, 67%)。MS m/z 804 $(M+H)^+$。

【0704】 **((S)-1-(((S)-1-(((S)-6-胺基-1-((2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)胺基)-1-側氧基已-2-基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)胺基)-3-甲基-1-側氧基丁-2-基)胺基甲酸第三丁酯(232)**：於 23°C下向化合物 **231** (24 mg, 0.019 mmol)及 Boc-Val-Ala-OH (6 mg, 0.021 mmol)於 DMF (1 ml)中之溶液中添加 DMTMMT (7 mg, 0.029 mmol)及 DIEA (30 ul, 0.172 mmol)。在 10 min 後，將六氫吡啶(100 ul)添加至混合物中。在 10 min

後，將混合物藉由製備型 LC 純化，獲得呈淺褐色固體之 **232** (24 mg, 0.018 mmol, 96%)。

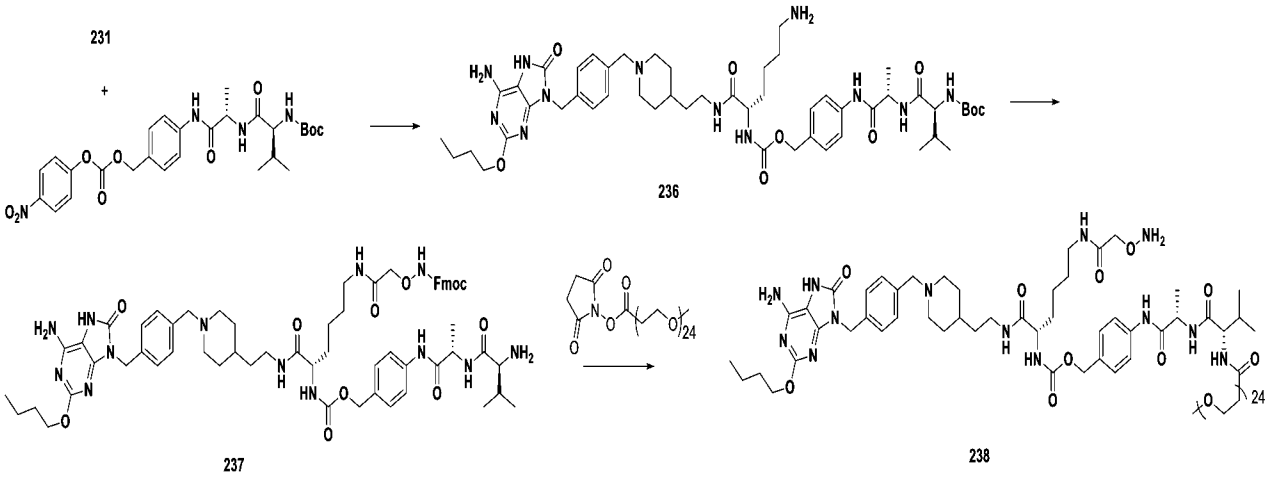
【0705】 **(S)-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-2-((S)-2-((S)-2-胺基-3-甲基丁醯胺基)丙醯胺基)-6-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)己醯胺(233)**：使用化合物 **232** 及 2-(第三丁氧基羰基胺基氧基)乙酸 2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯作為起始材料，利用與針對 **230** 所述類似之程序製備化合物 **233**，獲得靶標化合物 **233** (22 mg, 0.016 mmol, 79%)。MS m/z 825 $(M+H)^+$。



【0706】 **(S)-6-胺基-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-2-PEG24-醯胺基己醯胺(234)**：於 23°C 下向化合物 **231** (11 mg, 0.0109 mmol)及 PEG24-NHS (12 mg, 0.010 mmol)於 DMF (1 ml)中之溶液中添加 DIEA (12 ul, 0.069 mmol)。在 20 min 後，將六氫吡啶(50 ul)添加至混合物中。在 10 min 後，將混合物藉由製備型 LC 純化，獲得呈玻璃狀固體之 **234** (18 mg, 0.008 mmol, 96%)。MS m/z 1682 $(M-H)^+$。

【0707】 **(S)-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-6-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-2-PEG24-醯胺基己醯胺(235)**：使用化合物 **234** 及 2-(第三丁氧基羰基胺基氧基)乙酸 2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯作為起始材料，利用與針對 **230** 所述類似之程序製備化合物 **235**，獲得

靶標化合物 **235** (13 mg, 0.006 mmol, 66%)。MS m/z 1753 $(M-H)^+$。

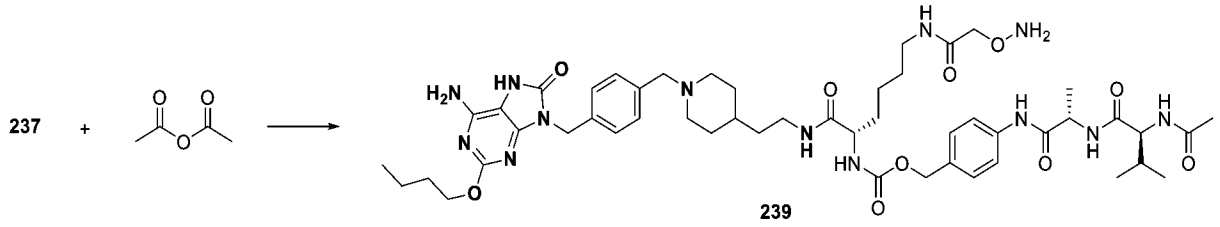


【0708】 **(S)-1-((S)-1-((S)-6-胺基-1-(2-(1-(4-((4-胺基-6-丁氧基-2-側氧基-2,3-二氫-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-1-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基胺基)-1-側氧基己-2-基胺基)-1-側氧基丙-2-基胺基)-3-甲基-1-側氧基丁-2-基胺基甲酸第三丁酯 (236)**：使用化合物 **231** 及 Boc-Val-Ala-PABC-PNP 作為起始材料，利用與針對 **232** 所述類似之程序製備化合物 **236**，獲得靶標化合物 **236** (18 mg, 0.012 mmol, 71%)。MS m/z 1001 $(M+H)^+$。

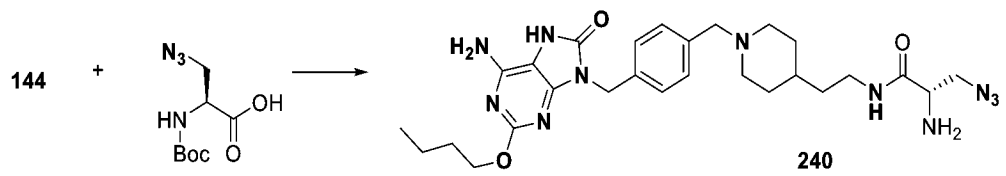
【0709】 **((S)-17-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)-1-(9H-芴-9-基)-3,7,14-三側氧基-2,5-二氧雜-4,8,15-三氮雜十七烷-13-基)胺基甲酸 4-((S)-2-((S)-2-胺基-3-甲基丁醯胺基)丙醯胺基)苄酯 (237)**：使用化合物 **236** 及 2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基胺基氧基)乙酸作為起始材料，利用與針對 **173** 所述類似之程序製備化合物 **237**，獲得靶標化合物 **237** (19 mg, 0.012 mmol, 93%)。MS m/z 1197 $(M+H)^+$。

【0710】 **((S)-1-((2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)胺基)-6-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-1-側氧基己-2-基)胺基甲酸 4-((S)-2-((S)-3-甲基-2-PEG24-醯胺基丁醯胺基)丙醯胺基)苄酯 (238)**：使用化合物 **237** 及 PEG24-NHS 作為起始材料，利用與針對 **234** 所述類似之程序製備化合物 **238**，獲得靶標化合物 **238** (8 mg, 0.003 mmol, 27%) MS m/z

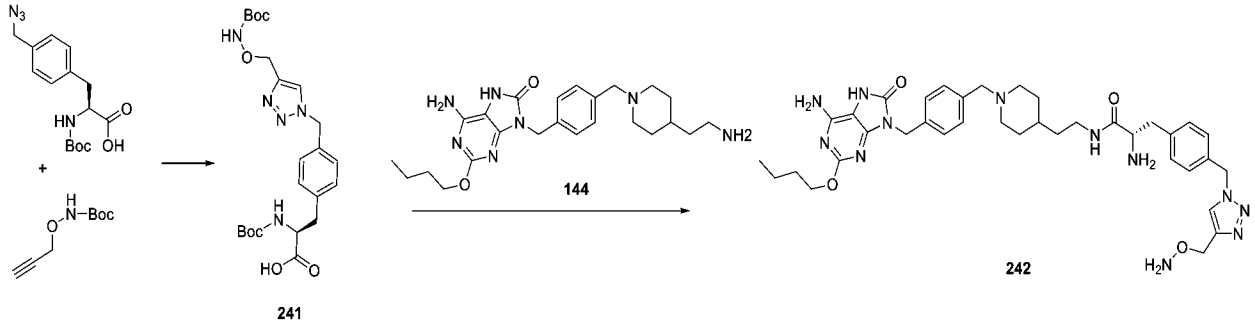
1037 $(M+2H)^+$。



【0711】 **((S)-1-((2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)胺基)-6-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-1-側氧基己-2-基)胺基甲酸 4-((S)-2-((S)-2-乙醯胺基-3-甲基丁醯胺基)丙醯胺基)苄酯(239)**：使用化合物 **237** 及乙酸酐作為起始材料，利用與針對 **234** 所述類似之程序製備化合物 **239**，獲得靶標化合物 **239** (6 mg, 0.004 mmol, 71%) MS m/z 1016 $(M+H)^+$。



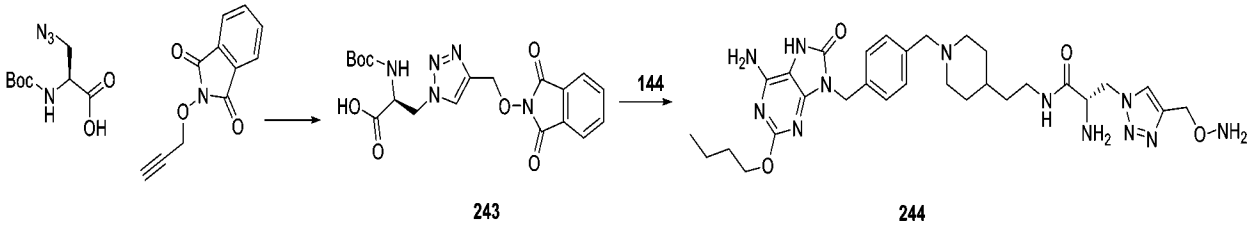
【0712】 **(S)-2-胺基-N-(2-(1-(4-((4-胺基-6-丁氧基-2-側氧基-2,3-二氫-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-1-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-3-疊氮基丙醯胺(240)**：使用化合物 **144** 及 Boc-L-疊氮基丙胺酸作為起始材料，利用與針對 **173** 所述類似之程序製備化合物 **240**，獲得靶標化合物 **240** (10 mg, 0.010 mmol, 89%)。MS m/z 566 $(M+H)^+$。



【0713】 **(S)-2-(第三丁氧基羰基胺基)-3-(4-((4-((第三丁氧基羰基胺基氧基)甲基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)甲基)苯基)丙酸(241)**：於 23°C 下向 Boc-L-疊氮基甲基-苯丙胺酸(120 mg, 0.375 mmol)及丙-2-炔氧基胺基甲酸第三丁酯(70 mg, 0.409

mmol)於 DCM (1 mL)中之溶液中添加 CuBr (55 mg, 0.383 mmol)。在 2 hr 後，將混合物藉由製備型 LC 純化，獲得呈白色固體之化合物 **241** (9 mg, 0.018 mmol, 5%)。MS m/z 492 $(M+H)^+$。

【0714】 **(S)-2-胺基-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-3-(4-((4-((胺基氧基)甲基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)甲基)苯基)丙醯胺(242)**：於 23°C 下向化合物 **144** (8 mg, 0.009 mmol)及化合物 **241** (9 mg, 0.018 mmol，粗製物)於 DMF (1 mL)中之溶液中添加 DMTMMT (5 mg, 0.021 mmol)及 DIEA (12 uL, 0.069 mmol)。在 10 min 後，於真空中去除溶劑，且將 DCM (1 mL)及 TFA (1 mL)添加至殘餘物中。在 10 min 後，LCMS 顯示去保護反應完成。將混合物藉由製備型 LC 純化，獲得化合物 **242** (6 mg, 0.004 mmol, 71%)，MS m/z 725 $(M-H)^+$。

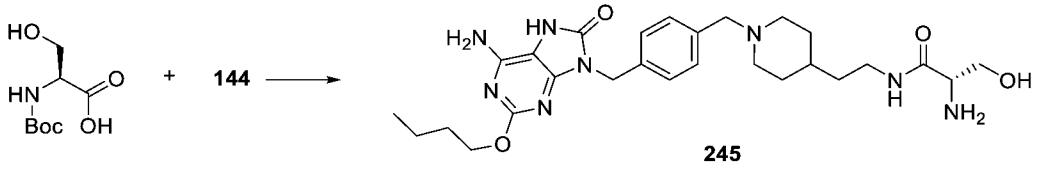


243 **244**

【0715】 **(S)-2-(第三丁氧基羰基胺基)-3-(4-((1,3-二側氧基異吲哚啉-2-基氧基)甲基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)丙酸(243)**：使用 Boc-L-疊氮基-Ala-OH 及 2-丙-2-炔氧基異吲哚啉-1,3-二酮作為起始材料，利用與針對 **242** 所述類似之程序製備化合物 **243**，獲得靶標化合物 **243** (130 mg, 0.238 mmol, 84%)。MS m/z 432 $(M+H)^+$。

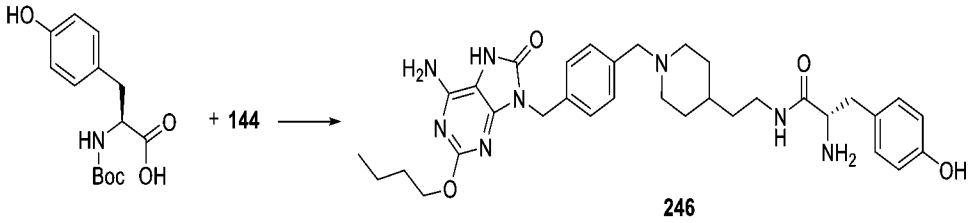
【0716】 **(S)-2-胺基-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-3-(4-((胺基氧基)甲基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)丙醯胺(244)**：於 23°C 下向化合物 **144** (10 mg, 0.011 mmol)及化合物 **243** (7 mg, 0.013 mmol)於 DMF (1 mL)中之溶液中添加 DMTMMT (5 mg, 0.021 mmol)及 DIEA (12 uL, 0.069 mmol)。在 10 min 後，於真空中去除溶劑，且將 DCM (1 mL)及 TFA (1 mL)添加至殘餘物中。在 15 min 後，於真空中去除溶劑，且將 DCM (1

mL)及水合肼(0.1 mL)添加至殘餘物中。在 2 h 後，於真空中去除溶劑，且將殘餘物藉由製備型 LC 純化，獲得呈無色玻璃狀固體之 **244** (10 mg, 0.010 mmol, 89%)。MS m/z 637 $(M+H)^+$。



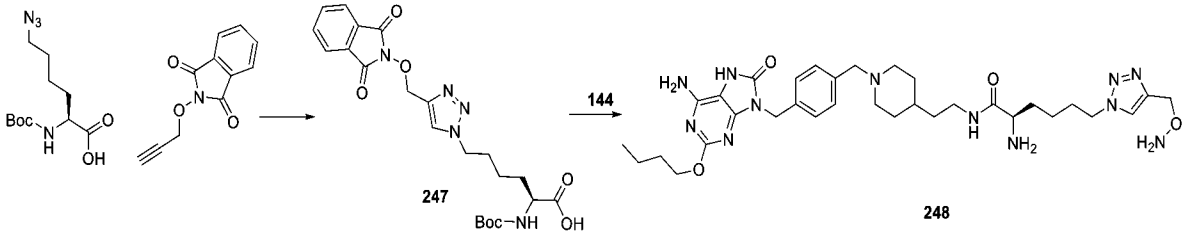
245

【0717】 (S)-2-胺基-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-3-羥基丙醯胺(245)：使用 Boc-L-Ser-OH 及化合物 **144** 作為起始材料，利用與針對 **242** 所述類似之程序製備化合物 **245**，獲得靶標化合物 **245** (7 mg, 0.007 mmol, 64%)。MS m/z 541 $(M+H)^+$。



246

【0718】 (S)-2-胺基-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-3-(4-羥基苯基)丙醯胺(246)：使用 Boc-L-Tyr-OH 及化合物 **144** 作為起始材料，利用與針對 **242** 所述類似之程序製備化合物 **246**，獲得靶標化合物 **246** (8mg, 0.007 mmol, 68%)。MS m/z 617 $(M+H)^+$。



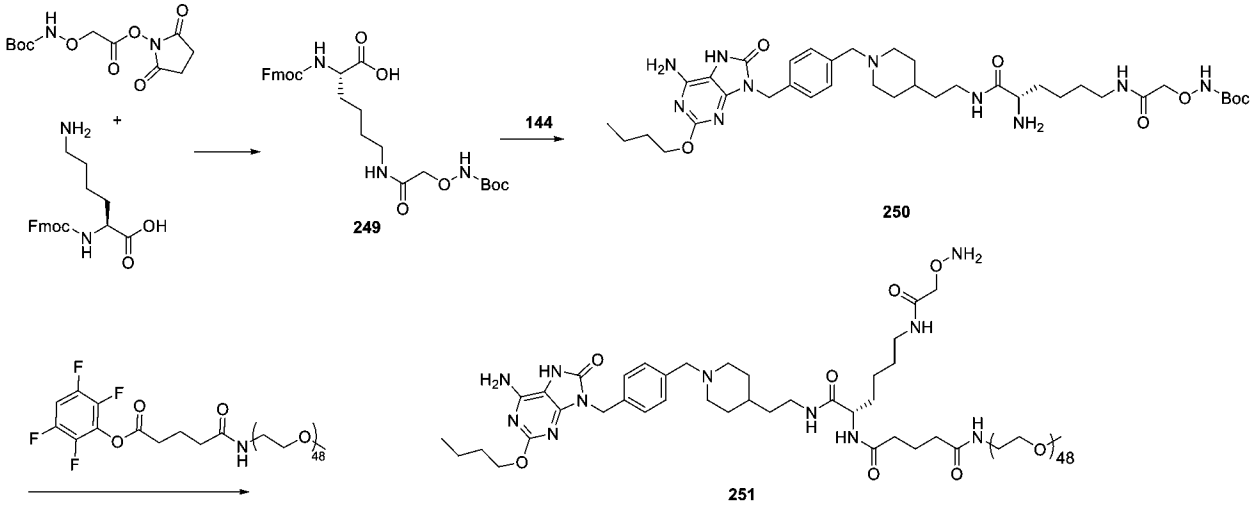
247

248

【0719】 (S)-2-(第三丁氧基羰基胺基)-6-(4-((1,3-二側氧基異吲哚啉-2-基氧基)甲基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酸(247)：使用 Boc-L-疊氮基-Lys-OH 及 2-丙-2-炔氧基異吲哚啉-1,3-二酮作為起始材料，利用與針對 **241** 所述類似之程序製備化合物 **247**，獲得靶標化合物 **247** (57 mg, 0.097 mmol, 53%)。MS m/z 474 $(M+H)^+$。

【0720】 (S)-2-胺基-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤

-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-6-(4-((胺基氧基)甲基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己醯胺(248)：使用化合物 **144** 及化合物 **247** 作為起始材料，利用與針對 **244** 所述類似之程序製備化合物 **248**，獲得靶標化合物 **248** (10 mg, 0.010 mmol, 89%)。MS m/z 679 $(M+H)^+$。

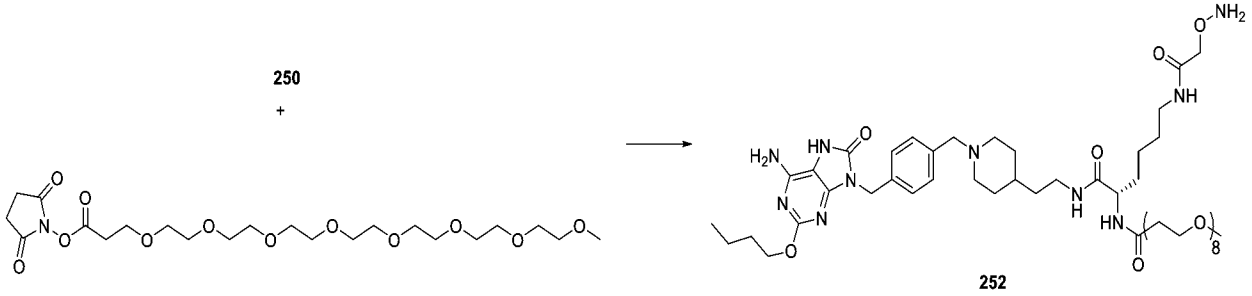


【0721】 (S)-(2-((5-胺基-6-((2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)胺基)-6-側氧基己基)胺基)-2-側氧基乙氧基)胺基甲酸第三丁酯(249)：於 50°C下向 2-(((第三丁氧基羰基)胺基)氧基)乙酸 2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯(380 mg, 1.318 mmol)及 Fmoc-L-Lys-OH (444 mg, 1.205 mmol)於 DMF (5 mL)中之溶液中添加 DIEA (660 uL, 3.789 mmol)。在 1 h 後，於真空中去除溶劑，將殘餘物溶解於 EtOAc (50 mL)中，且用 1N HCl (50 mL)及鹽水(20 mL)洗滌。將有機層經 $MgSO_4$ 乾燥接著過濾。於真空中去除溶劑。將殘餘物藉由急驟層析用 MeOH/DCM 梯度(0-10%)純化，獲得化合物 **249** (466 mg, 0.860 mmol, 65%)。MS m/z 542 $(M+H)^+$。

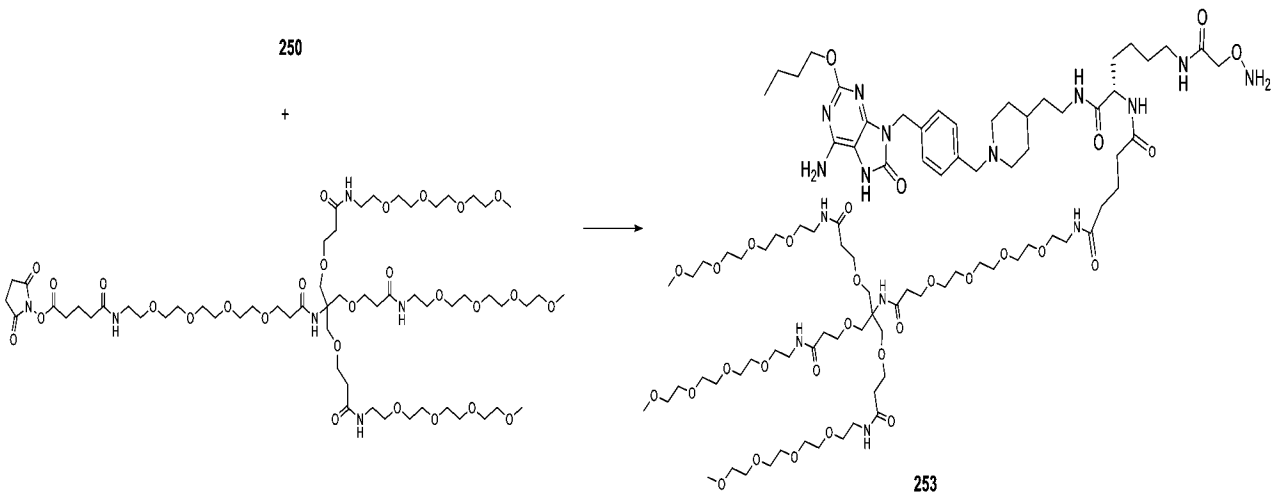
【0722】 (S)-(2-((5-胺基-6-((2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)胺基)-6-側氧基己基)胺基)-2-側氧基乙氧基)胺基甲酸第三丁酯(250)：於 23°C 下向化合物 **144** (180 mg, 0.198 mmol)及化合物 **249** (105 mg, 0.194 mmol)於 DMF (2 mL)中之溶液中添加 DMTMMT (68

mg, 0.282 mmol)及 DIEA (200 uL, 1.148 mmol)。在 10 min 後，向混合物中添加六氫吡啶(100 uL)。在 20 min 後，LCMS 顯示去保護反應完成。將混合物藉由製備型 LC 純化，獲得靶標化合物 **250** (160 mg, 0.146 mmol, 74%)。MS m/z 755 $(M+H)^+$。

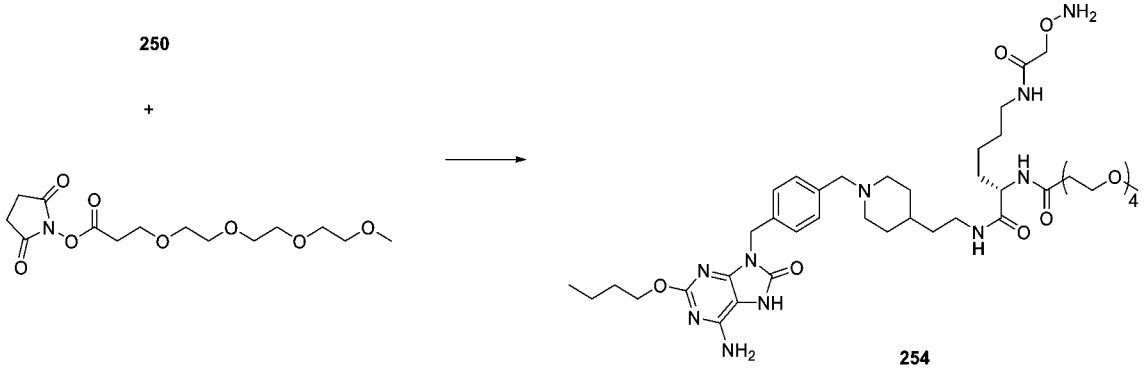
【0723】 **(S)-N1-(1-((2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)胺基)-6-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-1-側氧基己-2-基)-N5-(PEG48)-戊二醯胺(251)**：於 23°C下向化合物 **250** (10 mg, 0.009 mmol)及 PEG48-NHCO-(CH2)3-TFP 酯(22 mg, 0.009 mmol)於 DMF (0.5 mL)中之溶液中添加 DIEA (12 uL, 0.069 mmol)。在 10 min 後，於真空中去除溶劑。向殘餘物中添加 DCM (1 mL)及 TFA (1 mL)。在 10 min 後，LCMS 顯示去保護反應完成。於真空中去除溶劑。將殘餘物藉由製備型 LC 純化，獲得靶標化合物 **251** (19 mg, 0.006 mmol, 62%)。MS m/z 1449 $(M+2H)^+$。



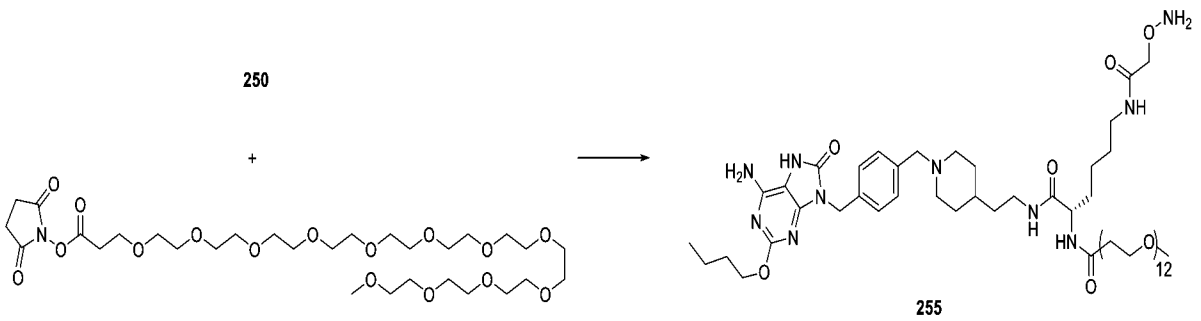
【0724】 **(S)-2-PEG8-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-6-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)己醯胺(252)**：使用化合物 **250** 及 mPEG8-NHS 作為起始材料，利用與針對 **251** 所述類似之程序製備化合物 **252**，獲得靶標化合物 **252** (9 mg, 0.006 mmol, 66%)。MS m/z 1050 $(M+H)^+$。



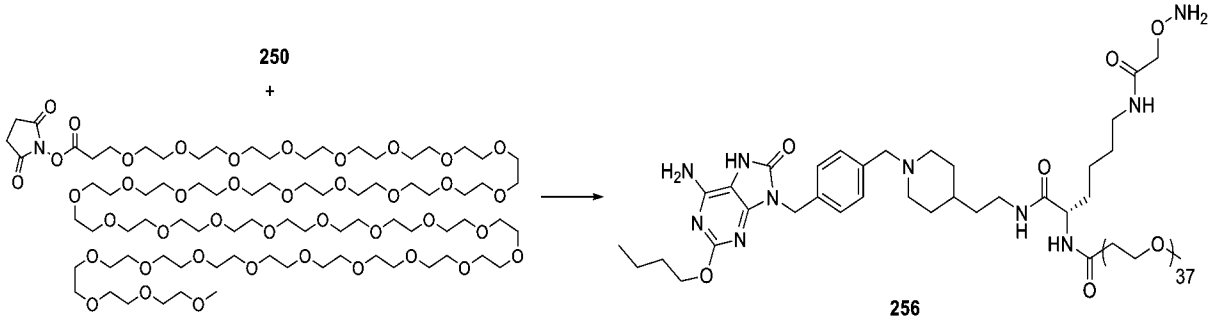
【0725】 **(S)-N1-(1-((2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)胺基)-6-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-1-側氧基己-2-基)-N5-mPEG4-(PEG4)3-戊二醯胺(253)**：使用化合物 **250** 及 mPEG4-(m-PEG4)3-NHS 作為起始材料，利用與針對 **251** 所述類似之程序製備化合物 **253**，獲得靶標化合物 **253** (20 mg, 0.008 mmol, 93%)。MS m/z 952 $(M+2H)^+$。



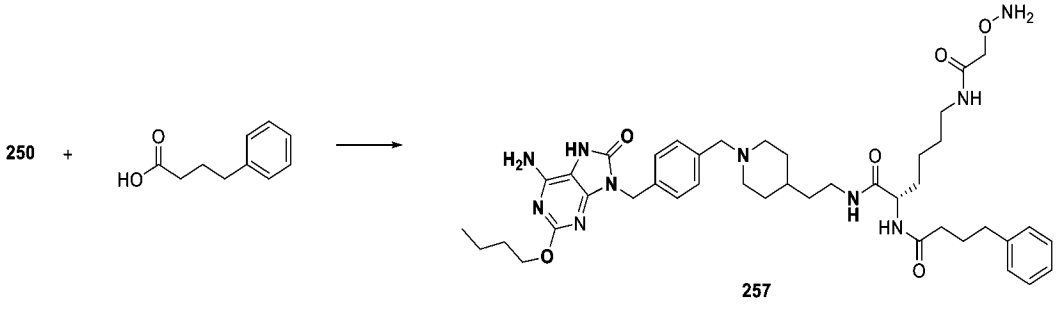
【0726】 **(S)-2-PEG4-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-6-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)己醯胺(254)**：使用化合物 **250** 及 mPEG4-NHS 作為起始材料，利用與針對 **251** 所述類似之程序製備化合物 **254**，獲得靶標化合物 **254** (9 mg, 0.007 mmol, 74%)。MS m/z 873 $(M+2H)^+$。



【0727】 **(S)-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-6-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-2-PEG12-醯胺基己醯胺(255)**：使用化合物 **250** 及 mPEG12-NHS 作為起始材料，利用與針對 **251** 所述類似之程序製備化合物 **255**，獲得靶標化合物 **255** (12 mg, 0.007 mmol, 78%)。MS m/z 1224 $(M-H)^+$。

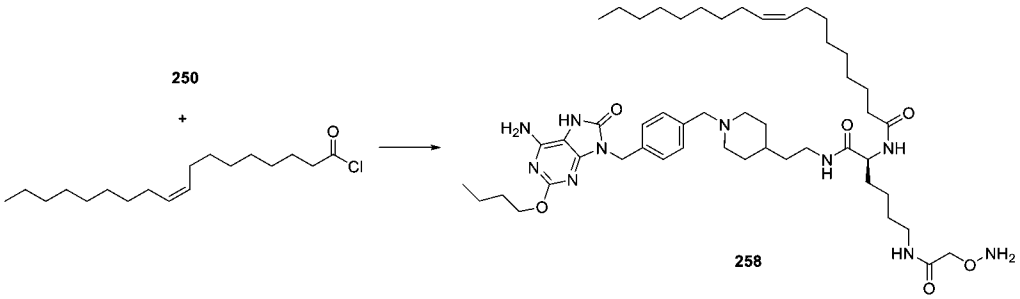


【0728】 **(S)-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-6-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-2-PEG37-醯胺基己醯胺(256)**：使用化合物 **250** 及 mPEG37-NHS 作為起始材料，利用與針對 **251** 所述類似之程序製備化合物 **256**，獲得靶標化合物 **256** (21 mg, 0.008 mmol, 83%)。MS m/z 1164 $(M+2H)^+$。

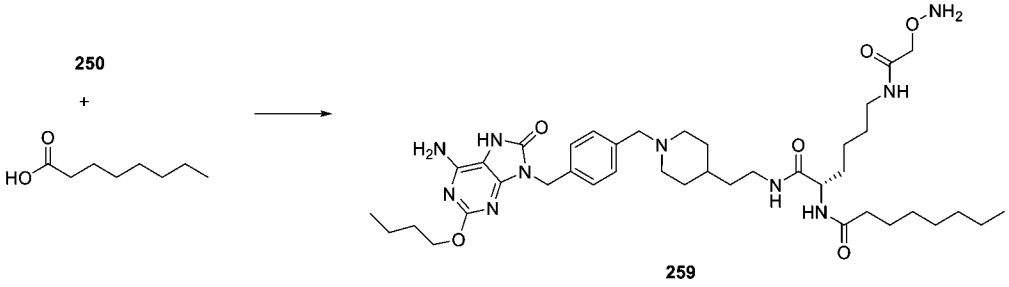


【0729】 **(S)-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-6-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-2-(4-苯基丁醯胺基)**

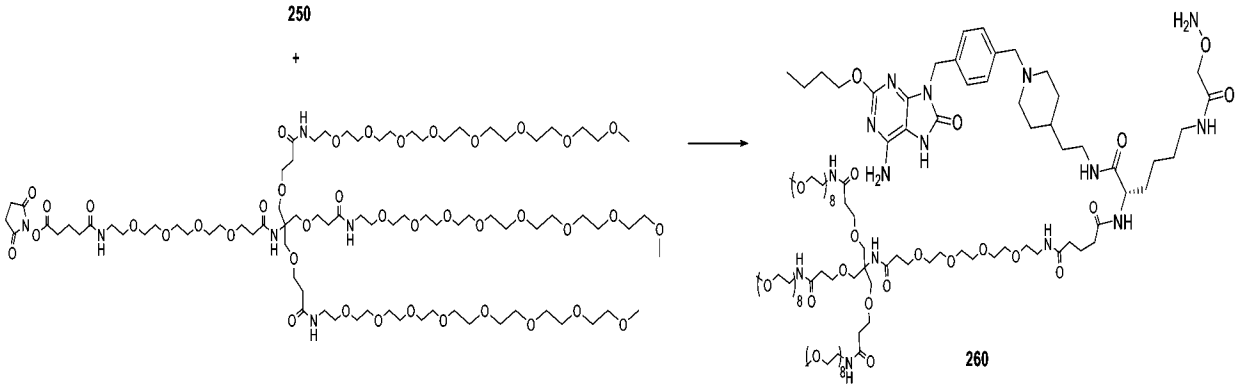
己醯胺(257)：使用化合物 **250** 及 4-苯基丁酸作為起始材料，利用與針對 **251** 所述類似之程序製備化合物 **257**，獲得靶標化合物 **257** (11 mg, 0.009 mmol, 96%)。MS m/z 801 $(M+H)^+$。



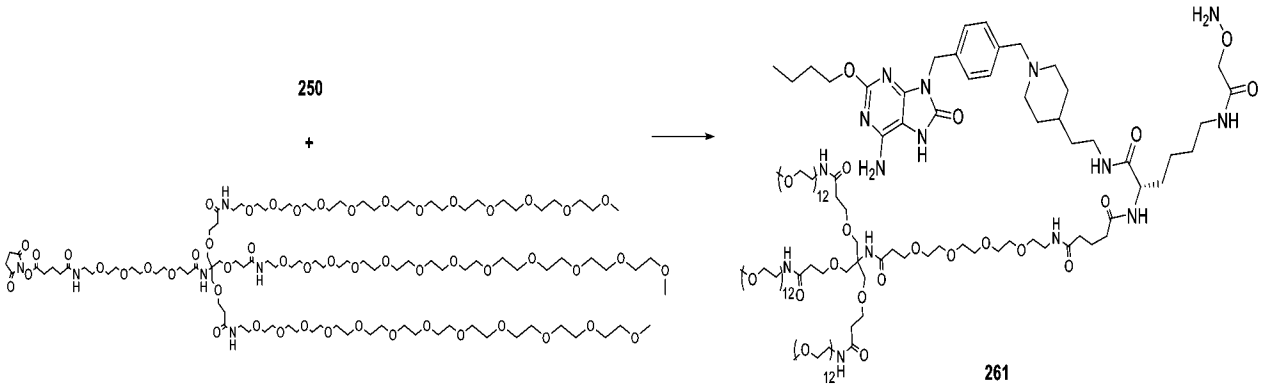
【0730】　(S)-N-(1-(2-(1-(4-((4-胺基-6-丁氧基-2-側氧基-2,3-二氫-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-1-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基胺基)-6-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-1-側氧基己-2-基)油酸醯胺(258)：使用化合物 **250** 及油基氯作為起始材料，利用與針對 **251** 所述類似之程序製備化合物 **258**，獲得靶標化合物 **258** (11 mg, 0.008 mmol, 88%)。MS m/z 920 $(M+H)^+$。



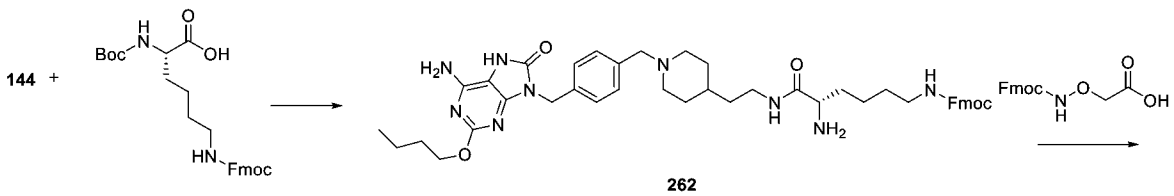
【0731】　(S)-N-(1-((2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)胺基)-6-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-1-側氧基己-2-基)辛醯胺(259)：使用化合物 **250** 及辛酸作為起始材料，利用與針對 **242** 所述類似之程序製備化合物 **259**，獲得靶標化合物 **259** (10 mg, 0.008 mmol, 89%)。MS m/z 781 $(M+H)^+$。



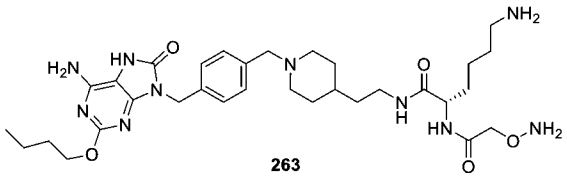
【0732】 **(S)-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-6-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-2-dPEG4-(m-dPEG8)3-醯胺基己醯胺 (260)**：使用化合物 **250** 及 dPEG4-(m-dPEG8)3-NHS 作為起始材料，利用與針對 **251** 所述類似之程序製備化合物 **260**，獲得靶標化合物 **260** (21 mg, 0.007 mmol 80%)。MS m/z 1217 $(M+2H)^+$。



【0733】 **(S)-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-6-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-2-dPEG4-(m-dPEG12)3-醯胺基己醯胺 (261)**：使用化合物 **250** 及 dPEG4-(m-dPEG12)3-NHS 作為起始材料，利用與針對 **261** 所述類似之程序製備化合物 **261**，獲得靶標化合物 **261** (25 mg, 0.007 mmol, 80%)。MS m/z 988 $(M+3H)^+$。



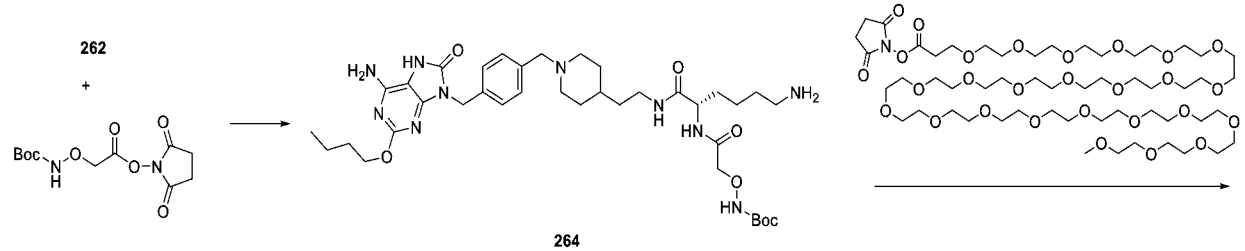
262



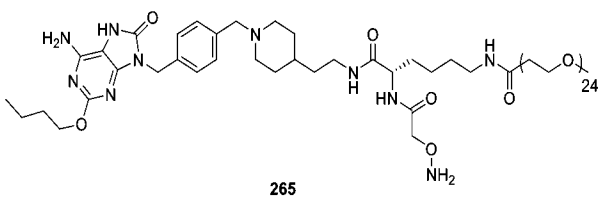
263

【0734】 **(S)-(5-胺基-6-((2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)胺基)-6-側氧基己基)胺基甲酸(9H-茀-9-基)甲酯(262)**：使用化合物 **144** 及 Boc-L-Lys(Fmoc)-OH 作為起始材料，利用與針對 **242** 所述類似之程序製備化合物 **262**，獲得靶標化合物 **262** (85 mg, 00.074 mmol, 67%)。MS m/z 804 $(M+H)^+$。

【0735】 **(S)-6-胺基-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-2-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)己醯胺(263)**：於 23°C下向化合物 **263** (15 mg, 0.015 mmol)及 Fmoc-胺基氧基乙酸酯(3 mg, 0.023 mmol)於 DMF (2 ml)中之溶液中添加 DMTMMT (5 mg, 0.021 mmol)及 DIEA (15 uL, 0.086 mmol)。在 10 min 後，向混合物中添加六氫吡啶(0.1 mL)。在 10 min 後，LCMS 顯示去保護反應完成。將混合物藉由製備型 LC 純化，獲得靶標化合物 **263** (15 mg, 0.012 mmol, 94%)。MS m/z 655 $(M+H)^+$。



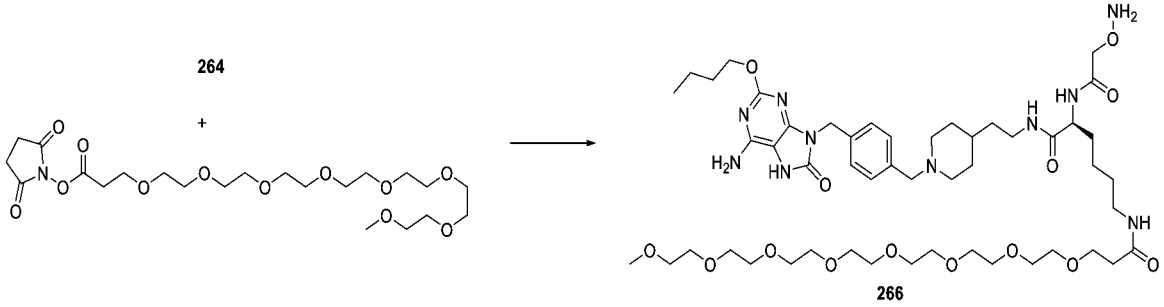
264



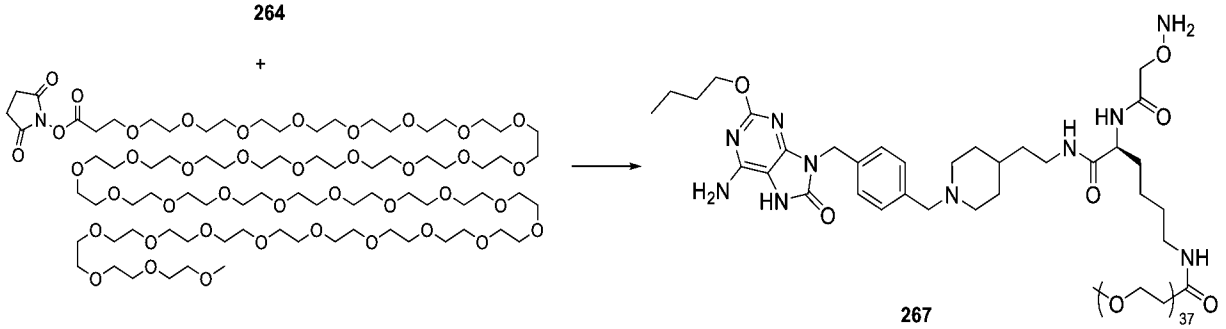
265

【0736】 **(S)-2-(6-胺基-1-(2-(1-(4-((4-胺基-6-丁氧基-2-側氧基-2,3-二氫-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-1-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基胺基)-1-側氧基己-2-基胺基)-2-側氧基乙氧基胺基甲酸第三丁酯(264)**：使用化合物 **262** 及 2-(((第三丁氧基羰基)胺基)氧基)乙酸 2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯作為起始材料，利用與針對 **250** 所述類似之程序製備化合物 **264**，獲得靶標化合物 **264** (108 mg, 0.089 mmol, 87%)。MS m/z 755 $(M+H)^+$。

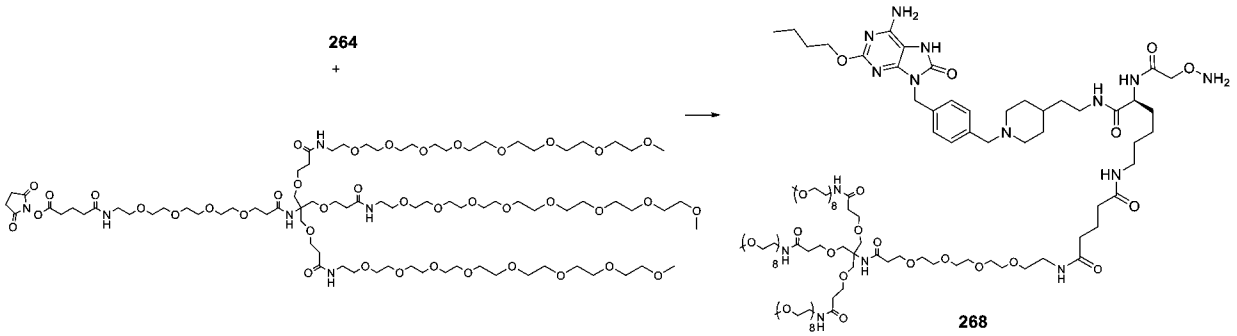
【0737】 **(S)-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-2-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-6-PEG24-醯胺基己醯胺(265)**：使用化合物 **264** 及 mPEG24-NHS 作為起始材料，利用與針對 **251** 所述類似之程序製備化合物 **265**，獲得靶標化合物 **265** (16 mg, 0.007 mmol, 88%)。MS m/z 1753 $(M-H)^+$。



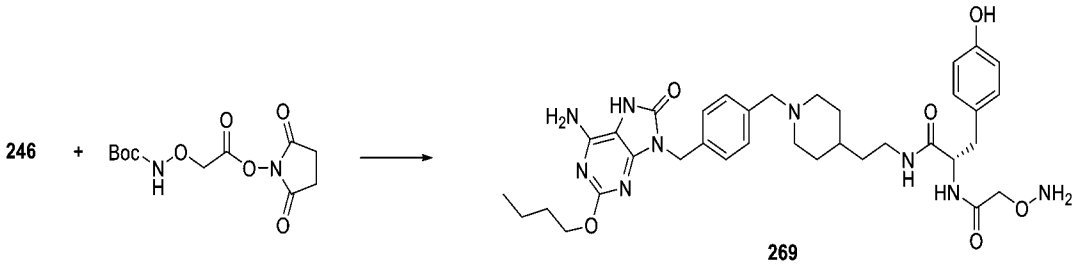
【0738】 **(S)-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-2-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-6-PEG8-醯胺基己醯胺(266)**：使用化合物 **264** 及 mPEG8-NHS 作為起始材料，利用與針對 **251** 所述類似之程序製備化合物 **266**，獲得靶標化合物 **266** (12 mg, 0.008 mmol, 97%)。MS m/z 1049 $(M+H)^+$。



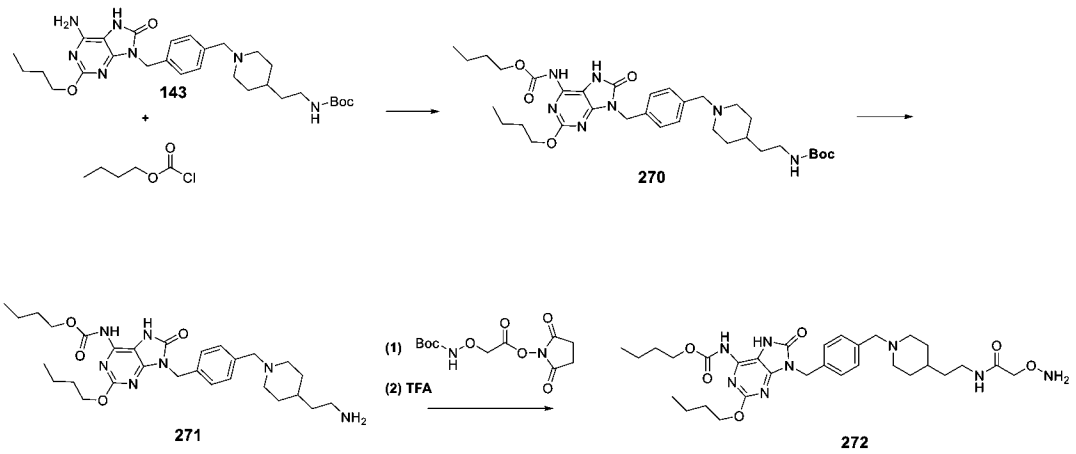
【0739】 **(S)-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-2-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-6-(PEG37)己醯胺(267)**：使用化合物 **264** 及 mPEG37-NHS 作為起始材料，利用與針對 **251** 所述類似之程序製備化合物 **267**，獲得靶標化合物 **267** (10 mg, 0.004 mmol, 43%)。MS m/z 1164$(M+2H)^+$。



【0740】 **(S)-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-2-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-6-(dPEG4-(m-dPEG8)3)己醯胺(268)**：使用化合物 **264** 及 dPEG4-(m-dPEG8)3-NHS 作為起始材料，利用與針對 **251** 所述類似之程序製備化合物 **268**，獲得靶標化合物 **268** (20 mg, 0.007 mmol 84%)。MS m/z 1217$(M+2H)^+$。



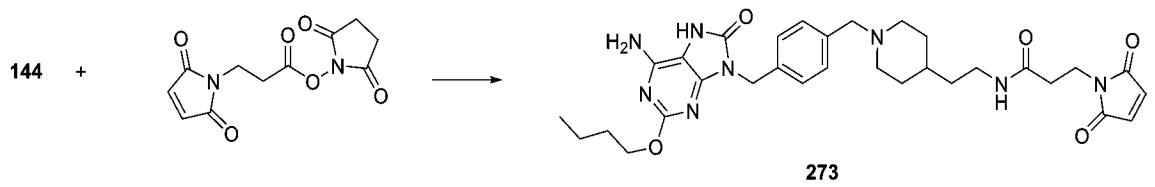
【0741】 **(S)-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-2-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-3-(4-羥基苯基)丙醯胺(269)**：使用化合物 **246** 及 2-(((第三丁氧基羰基)胺基)氧基)乙酸 2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯作為起始材料，利用與針對 **251** 所述類似之程序製備化合物 **269**，獲得靶標化合物 **269** (6 mg, 0.005 mmol, 70%)。MS m/z 689 $(M+H)^+$。



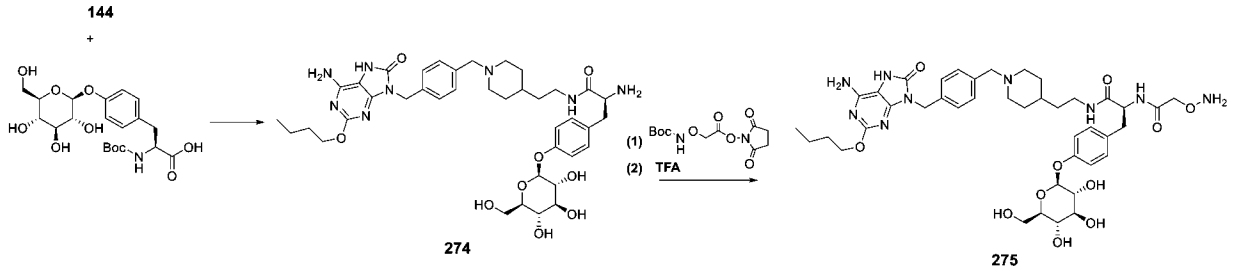
【0742】 **(2-(1-(4-((2-丁氧基-6-((丁氧基羰基)胺基)-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)胺基甲酸第三丁酯(270)**：向化合物 **143** (253 mg, 0.282 mmol)及氯甲酸正丁酯(50 uL, 0.366 mmol)於 DMF (5 mL)中之溶液中添加 DIEA (300 uL, 1.722 mmol)，且將溫度升高至 80°C。在 30 min 後，將混合物用二氯甲烷(50 mL)稀釋，用半飽和碳酸氫鈉(50 mL)及鹽水(50 mL)洗滌，經 $MgSO_4$ 乾燥且過濾。於真空中去除溶劑，獲得呈淺褐色固體之粗製化合物 **270** (160 mg，粗品)。該粗製物未經進一步純化即使用。MS m/z 654 $(M+H)^+$。

【0743】 **9-(4-((4-(2-胺基乙基)六氫吡啶-1-基)甲基)苄基)-2-丁氧基-8-側氧基-8,9-二氫-7H-嘌呤-6-基胺基甲酸丁酯(271)**：於 23°C下向化合物 **270** (160 mg，粗品)於 DCM (5 mL)中之溶液中添加 TFA (1 mL)。在 30 min 後，於真空中去除液體，且將混合物藉由製備型 LC 純化，獲得呈淺褐色固體之靶標化合物 **271** (93 mg，0.104 mmol，42%，兩個步驟)。MS m/z 554 $(M+H)^+$。

【0744】 **(9-(4-((4-(2-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)乙基)六氫吡啶-1-基)甲基)苄基)-2-丁氧基-8-側氧基-8,9-二氫-7H-嘌呤-6-基)胺基甲酸丁酯(272)**：使用化合物 **271** 及 2-(((第三丁氧基羰基)胺基)氧基)乙酸 2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯作為起始材料，利用與針對 **251** 所述類似之程序製備化合物 **272**，獲得靶標化合物 **272** (40 mg, 0.041 mmol, 82%)。MS m/z 627 $(M+H)^+$。



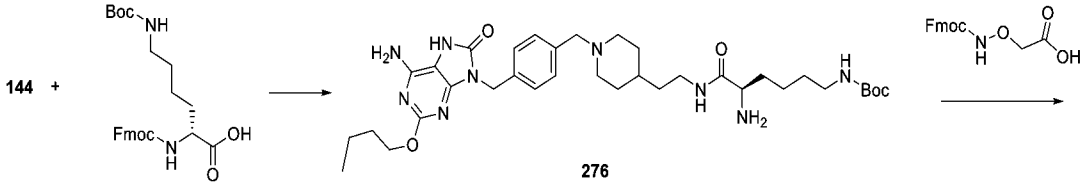
【0745】 **N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-3-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)丙醯胺(273)**：於 23℃下向化合物 **144** (10 mg, 0.011 mmol)及 3-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)丙酸 2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯(3 mg, 0.012 mmol)於 DMF (1 mL)中之溶液中添加 DIEA (12 uL, 0.069 mmol)。在 10 min 後，將混合物藉由製備型 LC 純化，獲得呈無色玻璃狀固體之 **273** (10 mg, 0.011 mmol, 96%)。MS m/z 605 $(M+H)^+$。

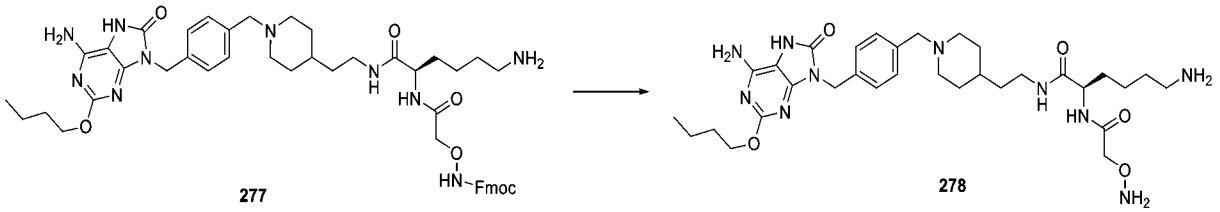


【0746】 **(S)-2-胺基-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-3-(4-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-三羥基-6-(羥基甲基)四氫-2H-哌喃-2-基)氧基)苯基)丙醯胺(274)**：使用化合物 **144** 及(S)-2-(第三丁氧基羰基胺基)-3-(4-((2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-三羥基-6-(羥基甲基)四氫-2H-哌喃-2-基氧基)苯基)丙酸作為起始材料，利用與針對 **242** 所述類似之程序製備化合物 **274**，獲得靶標化合物 **274** (47 mg, 0.038 mmol, 67%)。MS m/z 779 $(M+H)^+$。

【0747】 **(S)-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-2-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-3-(4-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-三羥基-6-(羥基甲基)四氫-2H-哌喃-2-基)氧基)苯基)丙醯胺(275)**：使用化合物 **274** 及 2-(((第三丁氧基羰基)胺基)氧基)乙酸 2,5-

二側氧基吡咯啶-1-基酯作為起始材料，利用與針對 **251** 所述類似之程序製備化合物 **275**，獲得靶標化合物 **275** (22 mg, 0.018 mmol, 91%)。MS m/z 852 $(M+H)^+$。

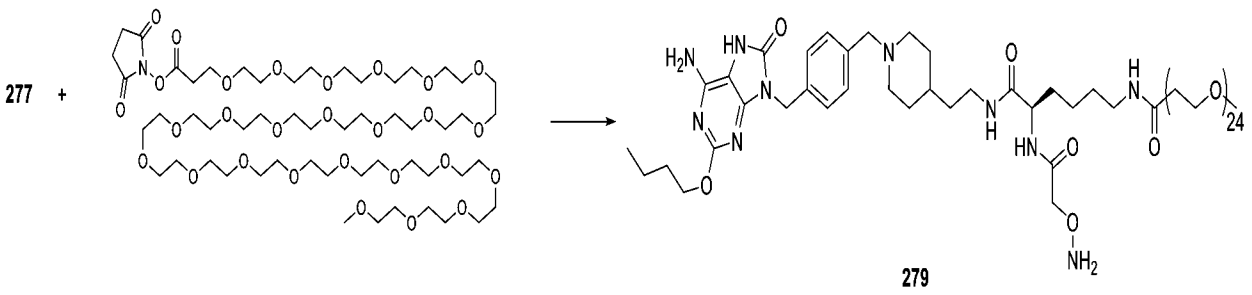




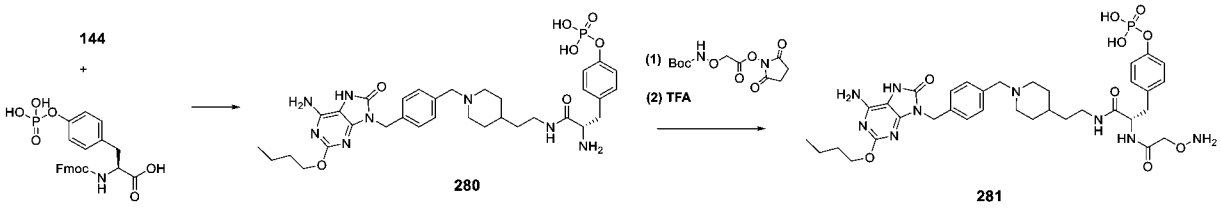
【0748】 **(R)-(5-胺基-6-((2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)胺基)-6-側氧基己基)胺基甲酸第三丁酯(276)**：使用化合物 **144** 及 Fmoc-D-Lys(Boc)-OH 作為起始材料，利用與針對 **250** 所述類似之程序製備化合物 **276**，獲得靶標化合物 **276** (110 mg, 0.097 mmol, 85%)。MS m/z 682 $(M+H)^+$。

【0749】 **(R)-(2-((6-胺基-1-((2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)胺基)-1-側氧基己-2-基)胺基)-2-側氧基乙氧基)胺基甲酸(9H-芴-9-基)甲酯(277)**：使用化合物 **276** 及 2-(((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)胺基)氧基)乙酸作為起始材料，利用與針對 **242** 所述類似之程序製備化合物 **277**，獲得靶標化合物 **277** (114 mg, 0.086 mmol,88%)。MS m/z 877 $(M+H)^+$。

【0750】 **(R)-6-胺基-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-2-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)己醯胺(278)**：於 23°C 下向化合物 **277** (14 mg, 0.011 mmol)於 DMF (0.5 mL)中之溶液中添加六氫吡啶(100 uL, 1.012 mmol)。在 10 min 後，將混合物藉由製備型 LC 純化，獲得呈淺褐色固體之 **278** (12 mg，0.011 mmol，定量)。MS m/z 655 $(M+H)^+$。

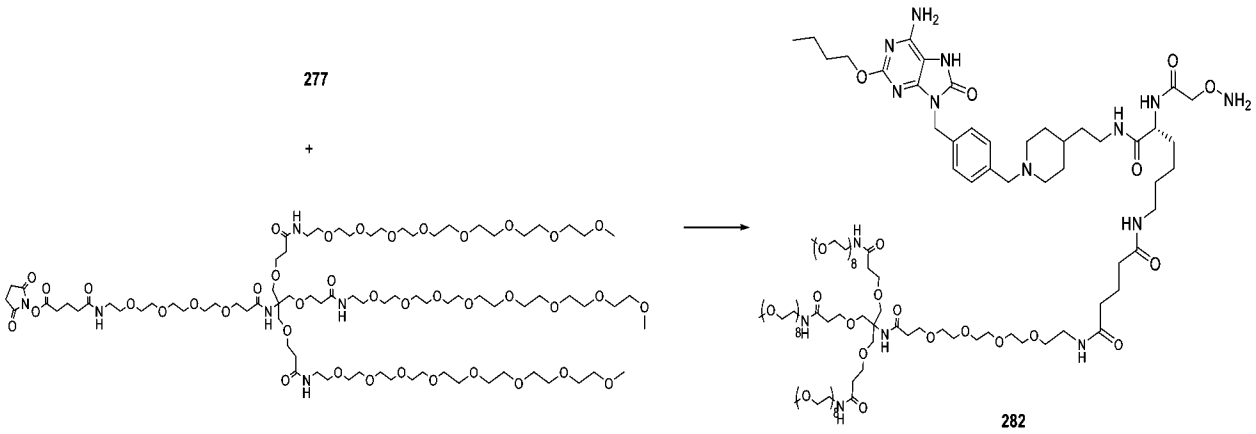


【0751】 **(R)-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-2-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-6-PEG24-醯胺基己醯胺(279)**：於 23°C下向化合物 **277** (20 mg, 0.015 mmol)及 mPEG24-NHS (18 mg, 0.015 mmol)於 DMF (1 mL)中之溶液中添加 DIEA (20 uL, 0.069 mmol)。在 20 min 後，向混合物中添加六氫吡啶(100 uL, 1.012 mmol)。在 10 min 後，LCMS 顯示去保護反應完成。於真空中去除揮發物，且將殘餘物藉由製備型 LC 純化，獲得靶標化合物 **279** (28 mg, 0.013 mmol, 84%)。MS m/z 1755 $(M+H)^+$。

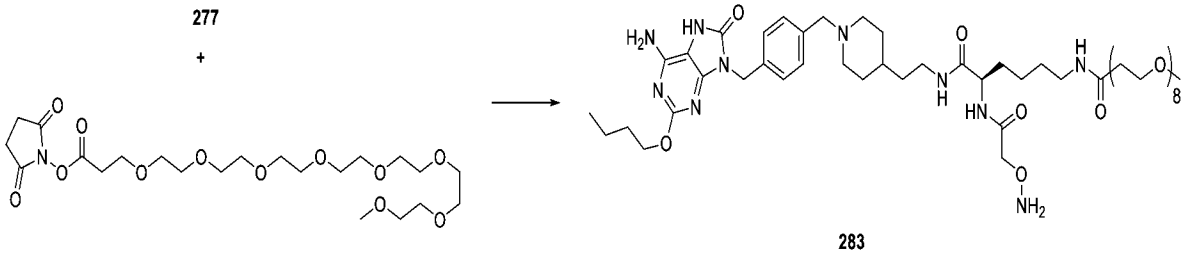


【0752】 **磷酸二氫(S)-4-(2-胺基-3-((2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)胺基)-3-側氧基丙基)苯基酯(280)**：使用化合物 **144** 及 Fmoc-L-Tyr(PO3H2)-OH 作為起始材料，利用與針對 **250** 所述類似之程序製備化合物 **280**，獲得靶標化合物 **280** (22 mg, 0.019 mmol, 30%)。MS m/z 697 $(M+H)^+$。

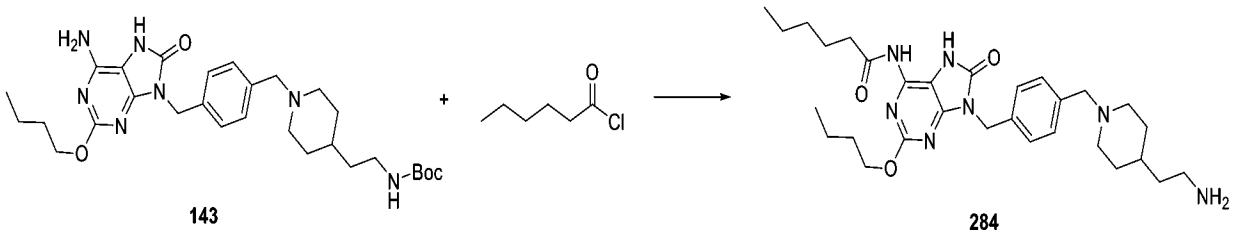
【0753】 **磷酸二氫(S)-4-(3-((2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)胺基)-2-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-3-側氧基丙基)苯基酯(281)**：使用化合物 **280** 及 2-(((第三丁氧基羰基)胺基)氧基)乙酸 2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯作為起始材料，利用與針對 **251** 所述類似之程序製備化合物 **281**，獲得靶標化合物 **281** (15 mg, 0.012 mmol, 64%)。MS m/z 770 $(M+H)^+$。



【0754】 **(R)-N1-(6-((2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)胺基)-5-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-6-側氧基己基)-N5-(dPEG4)-(mPEG8)3- 戊二醯胺 (282)**：使用化合物 **277** 及 dPEG4-(m-dPEG8)3-NHS 作為起始材料，利用與針對 **279** 所述類似之程序製備化合物 **282**，獲得靶標化合物 **282** (37 mg, 0.013 mmol 86%)。MS m/z 1217(M+2H)$^+$。

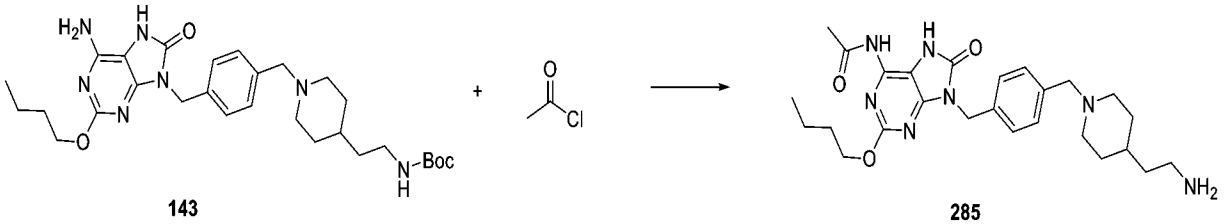


【0755】 **(R)-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-2-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)-6-(PEG8)醯胺基己醯胺(283)**：使用化合物 **277** 及 mPEG8-NHS 作為起始材料，利用與針對 **279** 所述類似之程序製備化合物 **283**，獲得靶標化合物 **283** (15 mg, 0.010 mmol, 66%)。MS m/z 1049(M+H)$^+$。

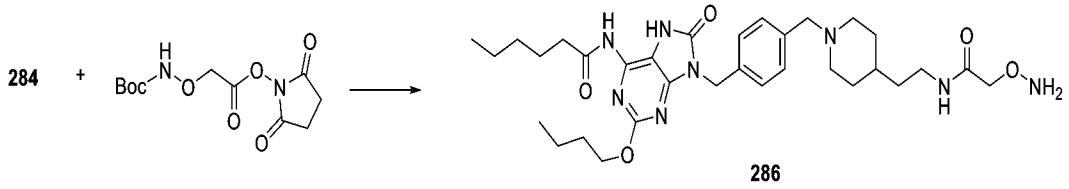


【0756】 **N-(9-(4-((4-(2-胺基乙基)六氫吡啶-1-基)甲基)苄基)-2-丁氧基-8-側氧基-8,9-二氫-7H-嘌呤-6-基)己醯胺(284)**：於 23°C下向 2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-

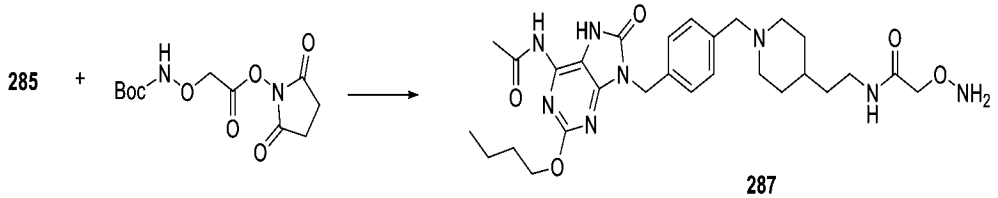
側氧基-7H-嘌呤-9(8H)-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基胺基甲酸第三丁酯、化合物 **143** (66 mg, 0.074 mmol)及正己醯氯(30 uL, 0.223 mmol)於 DCM (1 mL)中之溶液中添加 DIEA (100 uL, 0.574 mmol)。在 1.5 h 後，向該混合物中添加 TFA (1 mL)。在 10 min 後，於真空中去除揮發物，且將殘餘物藉由製備型 LC 純化，獲得呈淺褐色固體之 **284** (50 mg, 0.050 mmol, 50%)。MS m/z 552 $(M+H)^+$。



【0757】 **N-(9-(4-((4-(2-胺基乙基)六氫吡啶-1-基)甲基)苄基)-2-丁氧基-8-側氧基-8,9-二氫-7H-嘌呤-6-基)乙醯胺(285)**：使用化合物 **143** 及乙醯氯作為起始材料，利用與針對 **284** 所述類似之程序製備化合物 **285**，獲得靶標化合物 **285** (40 mg, 0.048 mmol, 99%)。MS m/z 496$(M+H)^+$。

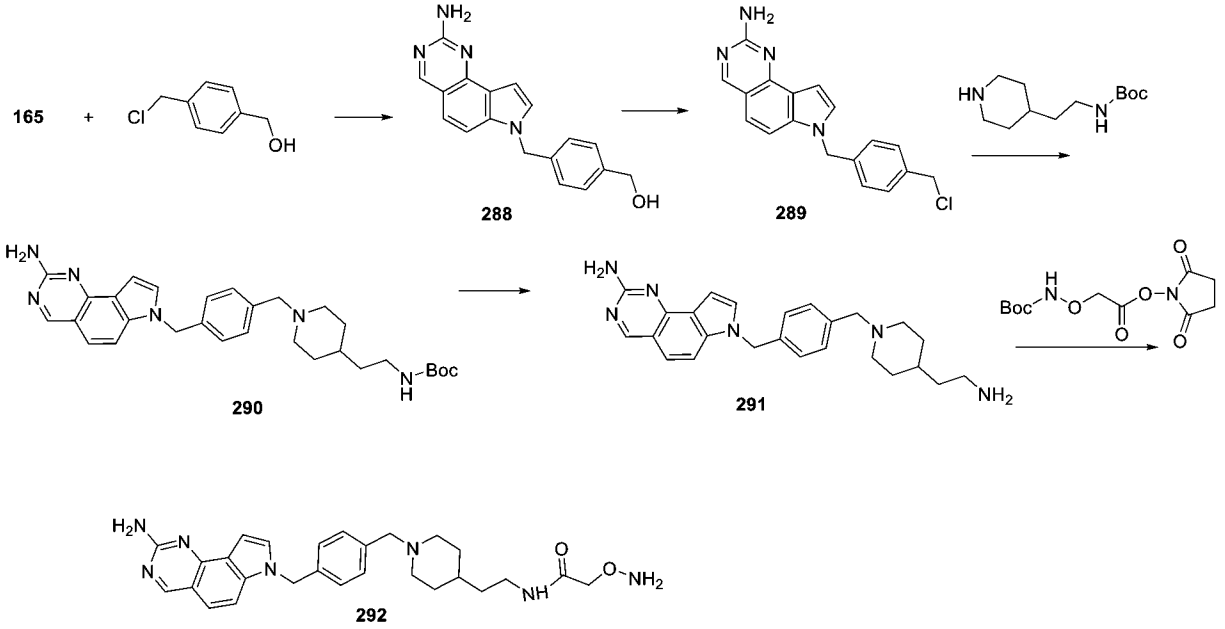


【0758】 **N-(9-(4-((4-(2-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)乙基)六氫吡啶-1-基)甲基)苄基)-2-丁氧基-8-側氧基-8,9-二氫-7H-嘌呤-6-基)己醯胺(286)**：使用化合物 **284** 及 2-(((第三丁氧基羰基)胺基)氧基)乙酸 2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯作為起始材料，利用與針對 **251** 所述類似之程序製備化合物 **286**，獲得靶標化合物 **286** (38 mg, 0.035 mmol, 79%)。MS m/z 625 $(M+H)^+$。



【0759】 **N-(2-(1-(4-((6-乙醯胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-2-(胺基氧基)乙醯胺(287)**：使用化合物 **285** 及

2-(((第三丁氧基羰基)胺基)氧基)乙酸 2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯作為起始材料，利用與針對**251**所述類似之程序製備化合物**287**，獲得靶標化合物**287** (31 mg, 0.030 mmol, 63%)。MS m/z 569 $(M+H)^+$。



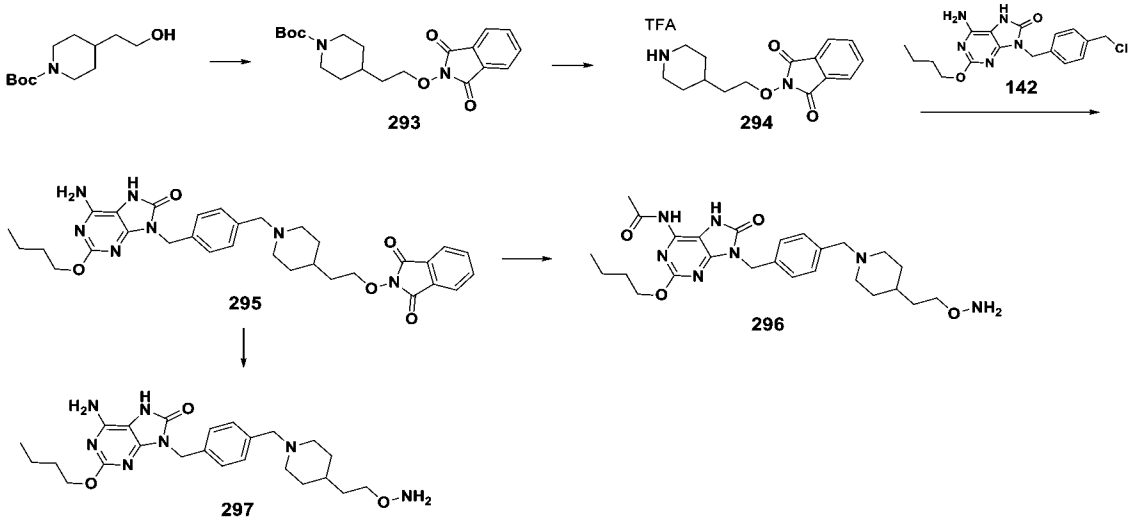
【0760】 **(4-((2-甲基-7H-吡咯并[2,3-h]喹唑啉-7-基)甲基)苯基)甲醇(288)**：於23°C下向化合物**165** (200 mg, 1.09 mmol)及4-氯甲基苄基醇(510.1 mg, 3.26 mmol)於DMSO (14.4 mL)中之溶液中添加碳酸銫(1768 mg, 5.43 mmol)。在21 hr後，將反應混合物傾倒至水(15 mL)中且用乙醚(5 mL)洗滌。接著用乙醚(3×50 mL)萃取水層。將合併之有機層用水(2×100 mL)洗滌，接著用鹽水(50 mL)洗滌。將濾液於真空中濃縮，且將殘餘物於急驟層析矽膠上純化，獲得靶標化合物**288** (31 mg, 0.030 mmol, 9%)。MS m/z 305 $(M+H)^+$。

【0761】 **7-(4-(氯甲基)苄基)-7H-吡咯并[2,3-h]喹唑啉-2-胺(289)**：向化合物**288** (22.6 mg, 0.074 mmol)中添加二氯甲烷(0.67 mL)。向所得懸浮液中添加亞硫醯氯(16 uL, 0.22 mmol)，且於50°C下攪拌混合物。在1 hr後，向混合物中添加甲苯(30 mL)，且蒸發溶劑。再次將甲苯(100 mL)添加至殘餘物中，且蒸發溶劑。將殘餘物於減壓下乾燥，獲得靶標化合物**289** (24 mg, 0.074 mmol, 100%)，其未經進一步純化即用於下一步驟。MS m/z 323 $(M+H)^+$。

【0762】 **(2-(1-(4-((2-胺基-7H-吡咯并[2,3-h]喹唑啉-7-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)胺基甲酸第三丁酯(290)**：使用化合物 **289** 及(2-(六氫吡啶-4-基)乙基)胺基甲酸第三丁酯作為起始材料，利用與針對 **143** 所述類似之程序製備化合物 **290**，獲得靶標化合物 **290** (25 mg, 0.049 mmol, 65%)。MS m/z 515 $(M+H)^+$。

【0763】 **7-(4-((4-(2-胺基乙基)六氫吡啶-1-基)甲基)苄基)-7H-吡咯并[2,3-h]喹唑啉-2-胺(291)**：使用化合物 **290** 作為起始材料，利用與針對 **144** 所述類似之程序製備化合物 **291**，獲得靶標化合物 **291** (20 mg, 0.04 mmol, 78%)。MS m/z 415 $(M+H)^+$。

【0764】 **N-(2-(1-(4-((2-胺基-7H-吡咯并[2,3-h]喹唑啉-7-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-2-(胺基氧基)乙醯胺(292)**：使用化合物 **291** 及 2-(((第三丁氧基羰基)胺基)氧基)乙酸 2,5-二側氧基環戊酯作為起始材料，利用與針對 **127** 所述類似之程序製備化合物 **292**，獲得靶標化合物 **292** (3.7 mg, 0.006 mmol, 28%)。MS m/z 488 $(M+H)^+$。



【0765】 **4-(2-(1,3-二側氧基異吲哚啉-2-基氧基)乙基)六氫吡啶-1-甲酸第三丁酯(293)**：於 23°C下向 1-Boc-4-(2-羥基乙基)六氫吡啶(405 mg, 1.766 mmol)及 N-羥基酞醯亞胺(309 mg, 1.895 mmol)於 THF (10 mL)中之溶液中添加三苯基膦(505 mg, 1.925 mmol)。在 30 min 後，將溫度降低至 0°C，且經 5 min 向混合物中添加

DIAD (400 uL, 2.032 mmol)。於 0°C下將混合物攪拌隔夜。在 20 h 後，於真空中去除溶劑且將殘餘物溶解於 EtOAc (50 mL)中，用 1 N HCl (50 mL)、飽和碳酸氫鈉(50 mL)及鹽水(50 mL)洗滌，經 $MgSO_4$ 乾燥且過濾。於真空中去除有機溶劑。將殘餘物藉由急驟層析(SiO_2)純化，獲得呈白色固體之靶標化合物 **293** (650 mg, 1.736 mmol, 98%)。MS m/z 375 $(M+H)^+$。

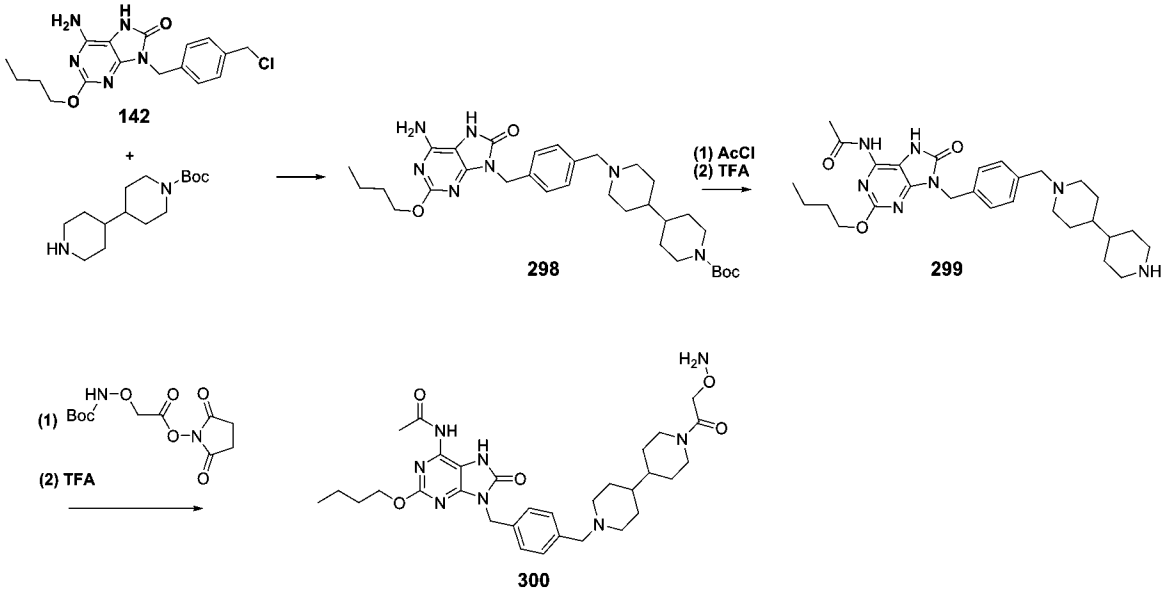
【0766】 **2-(2-(六氫吡啶-4-基)乙氧基)異吲哚啉-1,3-二酮 TFA (294)**：於 23°C 下向化合物 **293** (650 mg, 1.736 mmol)於 DCM (2 mL)中之溶液中添加 TFA (2 mL)。在 10 min 後，於真空中去除液體。將殘餘物溶解於 EtOAc (50 mL)中且用飽和碳酸氫鈉(50 mL)及鹽水(50 mL)洗滌，經 $MgSO_4$ 乾燥且過濾。於真空中去除有機溶劑且將殘餘物經高真空幫浦乾燥，獲得呈玻璃狀固體之靶標化合物 **294** (650 mg, 1.674 mmol, 96%)。MS m/z 275 $(M+H)^+$。

【0767】 **2-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7H-嘌呤-9(8H)-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙氧基)異吲哚啉-1,3-二酮(295)**：向 6-胺基-2-丁氧基-9-(4-(氯甲基)苄基)-7H-嘌呤-8(9H)-酮(化合物 **142**) (90 mg, 0.208 mmol)及化合物 **294** (90 mg, 0.328 mmol)於 DMF (2 mL)中之溶液中添加 DIEA (150 uL, 0.861 mmol)，且將溫度升高至 80°C。在 4 h 後，於真空中去除溶劑。將混合物藉由製備型-LC 純化，獲得呈淺褐色固體之靶標化合物 **295** (70 mg, 0.074 mmol, 36%)。MS m/z 600 $(M+H)^+$。

【0768】 **N-(9-(4-((4-(2-(胺基氧基)乙基)六氫吡啶-1-基)甲基)苄基)-2-丁氧基-8-側氧基-8,9-二氫-7H-嘌呤-6-基)乙醯胺(296)**：於 23°C下向化合物 **295** (30 mg, 0.032 mmol)及乙醯氯(30 uL, 0.383 mmol)於 DCM (5 mL)中之溶液中添加 DIEA (110 uL, 0.632 mmol)。在 1.5 h 後，於真空中去除液體且將 MeOH (2 mL)加水合肼(20 uL, 0.4 mmol)添加至殘餘物中。在 10 min 後，於真空中去除溶劑且將殘餘物藉由製備型 LC 純化，獲得呈無色玻璃狀固體之靶標化合物 **296** (4 mg, 0.005

mmol, 15%)。MS m/z 512 $(M+H)^+$。

【0769】 **6-胺基-9-(4-((4-(2-(胺基氧基)乙基)六氫吡啶-1-基)甲基)苄基)-2-丁氧基-7H-嘌呤-8(9H)-酮(297)**：於 23°C下向化合物 **295** (40 mg, 0.042 mmol)於 DCM (5 mL)中之溶液中添加肼 H2O (200 uL, 4 mmol)。在 5 min 後，於真空中去除液體且將殘餘物藉由製備型 LC 純化，獲得呈淺褐色固體之靶標化合物 **297** (33 mg, 0.041 mmol, 96%)。MS m/z 470 $(M+H)^+$。

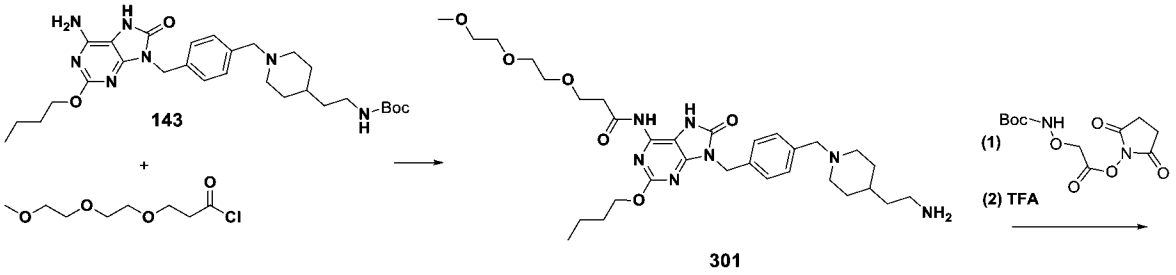


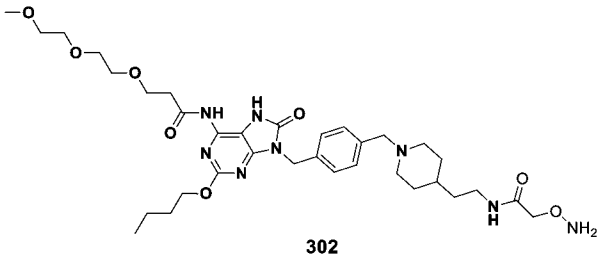
【0770】 **1'-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7H-嘌呤-9(8H)-基)甲基)苄基)-4,4'-聯六氫吡啶-1-甲酸第三丁酯(298)**：使用 N-Boc-4,4'-聯六氫吡啶及 6-胺基-2-丁氧基-9-(4-(氯甲基)苄基)-7,9-二氫-8H-嘌呤-8-酮(化合物 **142**)作為起始材料，利用與針對化合物 **295** 所述類似之程序製備化合物 **298**，獲得呈淺褐色固體之靶標化合物 **298** (50 mg, 0.053 mmol, 26%)。MS m/z 594 $(M+H)^+$。

【0771】 **N-(9-(4-(4,4'-聯六氫吡啶-1-基甲基)苄基)-2-丁氧基-8-側氧基-8,9-二氫-7H-嘌呤-6-基)乙醯胺(299)**：使用化合物 **298** 及乙醯氯作為起始材料，利用與針對 **284** 所述類似之程序製備化合物 **299**，獲得呈淺褐色固體之靶標化合物 **299** (29 mg, 0.033 mmol, 62%)。MS m/z 536 $(M+H)^+$。

【0772】 **N-(9-(4-((1'-(2-(胺基氧基)乙醯基)-4,4'-聯六氫吡啶-1-基)甲基)苄**

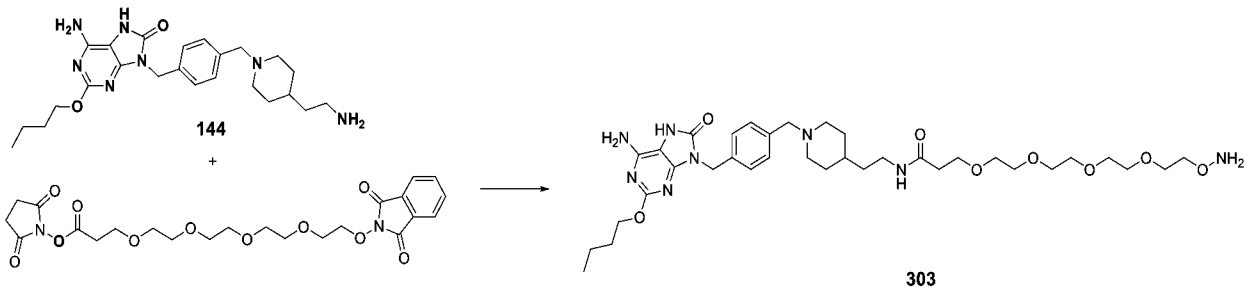
基)-2-丁氧基-8-側氧基-8,9-二氫-7H-嘌呤-6-基)乙醯胺(300)：使用化合物 **299** 及 2-(((第三丁氧基羰基)胺基)氧基)乙酸 2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯作為起始材料，利用與針對 **251** 所述類似之程序製備化合物 **300**，獲得呈淺褐色固體之靶標化合物 **300** (12 mg, 0.013 mmol, 43%)。MS m/z 609 $(M+H)^+$。



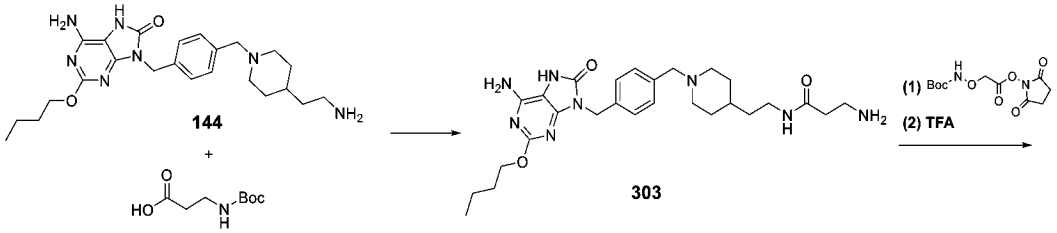


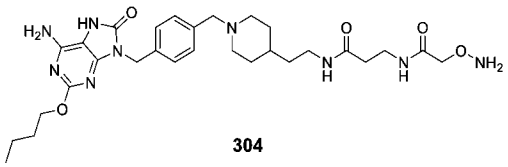
【0773】 **N-(9-(4-((4-(2-胺基乙基)六氫吡啶-1-基)甲基)苄基)-2-丁氧基-8-側氧基-8,9-二氫-7H-嘌呤-6-基)-3-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)丙醯胺(301)**：使用化合物 **143** 及 3-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)丙醯氯作為起始材料，利用與針對 **251** 所述類似之程序製備化合物 **301**，獲得呈淺褐色固體之靶標化合物 **301** (62 mg, 0.064 mmol, 92%)。MS m/z 628 $(M+H)^+$。

【0774】 **N-(9-(4-((4-(2-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)乙基)六氫吡啶-1-基)甲基)苄基)-2-丁氧基-8-側氧基-8,9-二氫-7H-嘌呤-6-基)-3-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)丙醯胺(302)**：使用化合物 **301** 及 2-(((第三丁氧基羰基)胺基)氧基)乙酸 2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯作為起始材料，利用與針對 **251** 所述類似之程序製備化合物 **302**，獲得呈淺褐色固體之靶標化合物 **302** (32 mg, 0.031 mmol, 56%)。MS m/z 701 $(M+H)^+$。



【0775】 **N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7,8-二氫-9H-嘌呤-9-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-1-(胺基氧基)-3,6,9,12-四氧雜十五烷-15-醯胺(303)**：於23°C下向 6-胺基-9-(4-((4-(2-胺基乙基)六氫吡啶-1-基)甲基)苄基)-2-丁氧基-7,9-二氫-8H-嘌呤-8-酮(化合物 **144)** (40 mg, 0.044 mmol)於 DMF (1 mL)中之溶液中添加 1-((1,3-二側氧基異吲哚啉-2-基)氧基)-3,6,9,12-四氧雜十五烷-15-酸 2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯(22 mg, 0.043 mmol)及 DIEA (40 uL, 0.23 mmol)。在 30 min 後，向該混合物中添加水合肼(100 uL, 0.66 mmol)。在 10 min 後，於真空中去除液體，且將殘餘物藉由製備型 LC 純化，獲得呈淺褐色固體之靶標化合物 **303** (45 mg, 0.038 mmol, 87%)。MS m/z 717 $(M+H)^+$。



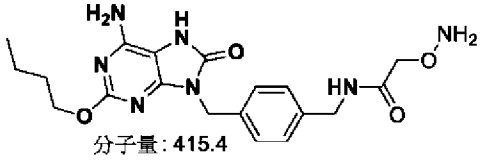
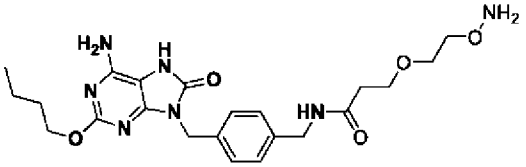


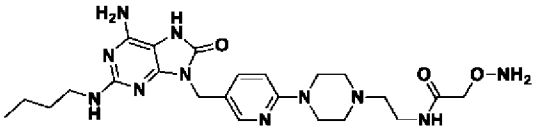
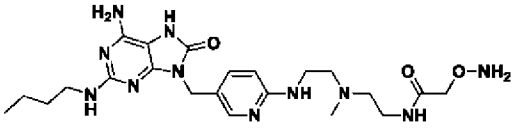
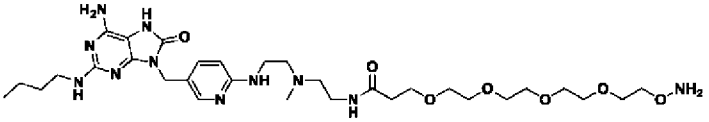
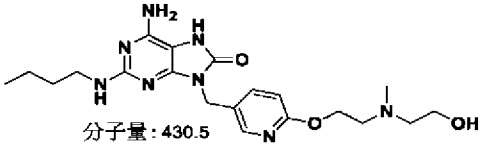
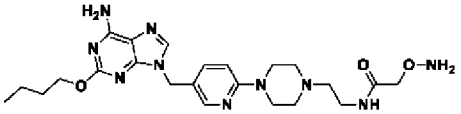
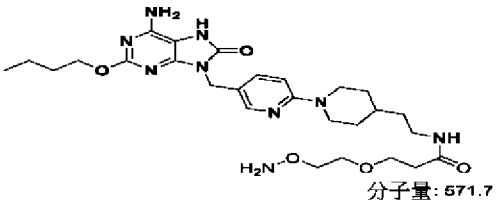
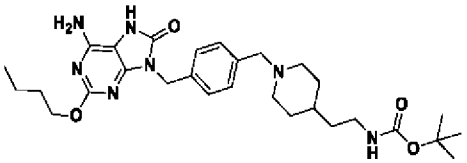
【0776】 **3-胺基-N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7H-嘌呤-9(8H)-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)丙烯醯胺(303)**：使用 Boc-β-丙胺酸及化合物 **144** 作為起始材料，利用與針對 **242** 所述類似之程序製備化合物 **303**，獲得靶標化合物 **303** (28 mg, 0.029 mmol, 26%)。MS m/z 525 $(M+H)^+$。

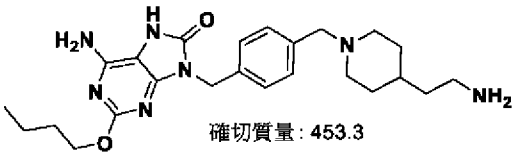
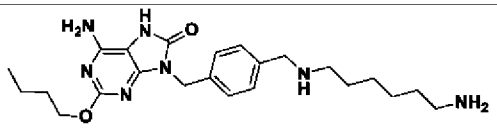
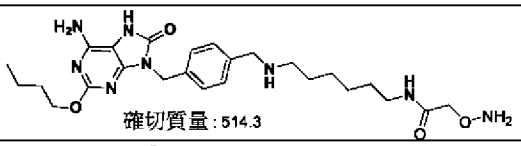
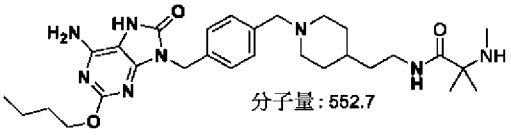
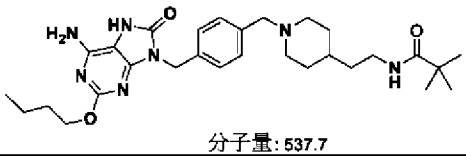
【0777】 **N-(2-(1-(4-((6-胺基-2-丁氧基-8-側氧基-7H-嘌呤-9(8H)-基)甲基)苄**

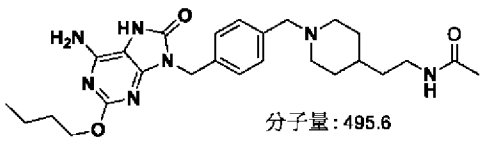
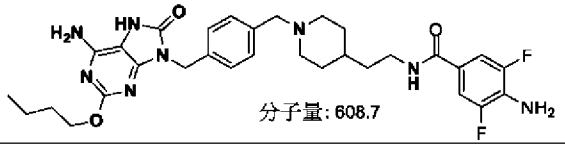
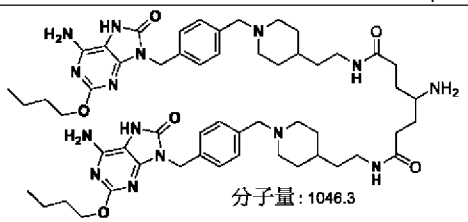
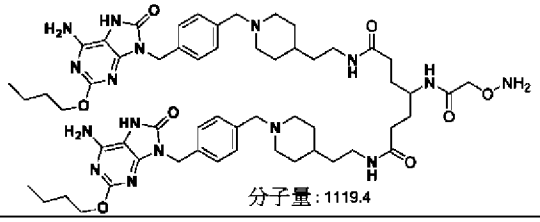
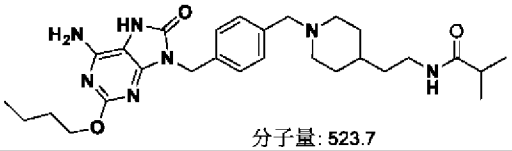
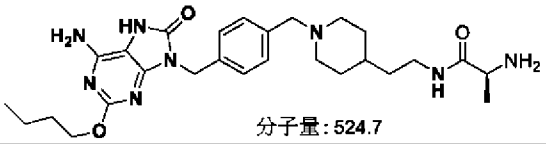
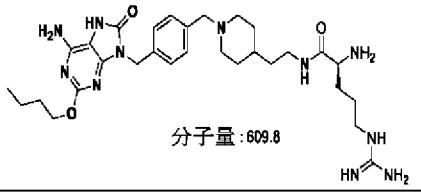
基)六氫吡啶-4-基)乙基)-3-(2-(胺基氧基)乙醯胺基)丙烯醯胺(304)：使用化合物 **303** 及 2-(((第三丁氧基羰基)胺基)氧基)乙酸 2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯作為起始材料，利用與針對 **251** 所述類似之程序製備化合物 **304**，獲得靶標化合物 **304** (20 mg, 0.019 mmol, 66%)。MS m/z 598 $(M+H)^+$。

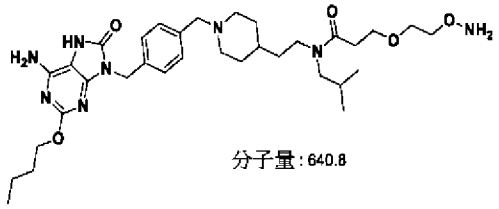
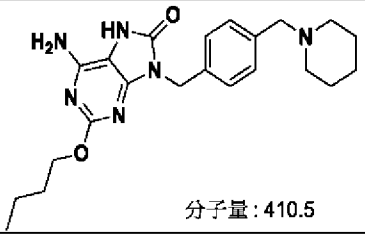
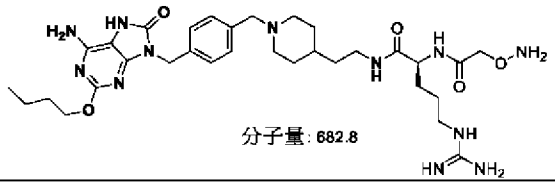
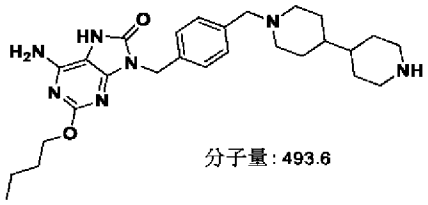
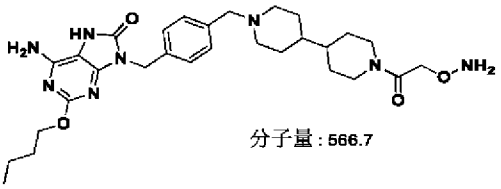
表 4 – TLR 促效劑-核心 5 化合物

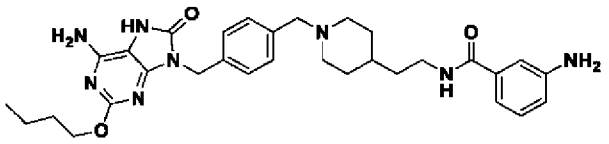
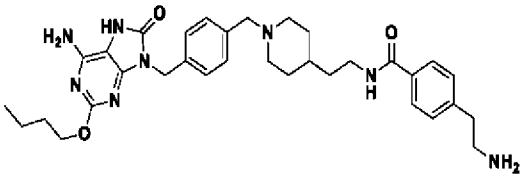
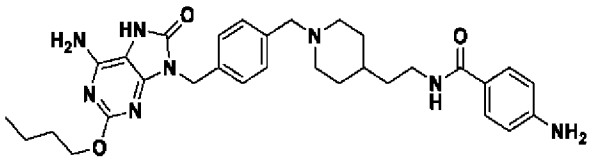
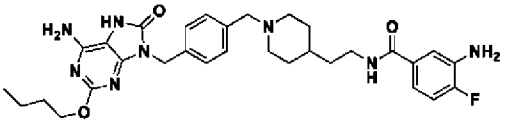
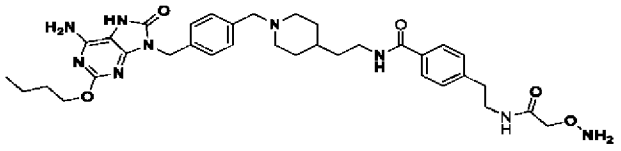
化合物編號	化合物名稱	結構-核心5化合物
119	AXC-862	 分子量 : 415.4
120	AXC-863	 分子量 : 473.5

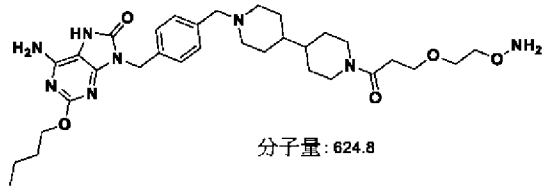
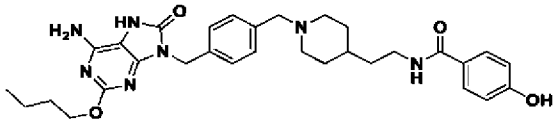
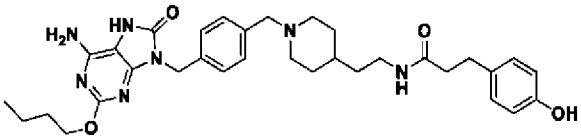
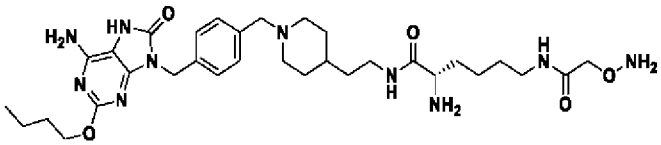
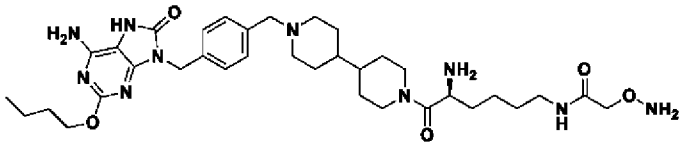
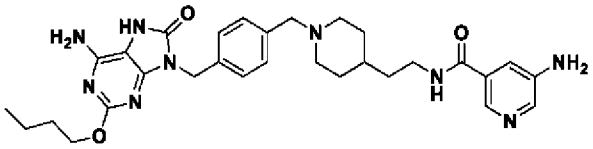
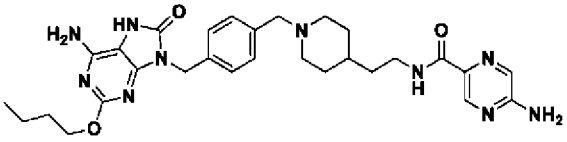
化合物編號	化合物名稱	結構-核心5化合物
127	AXC-867	 分子量: 513.6
129	AXC-868	 分子量: 501.6
130	AXC-869	 分子量: 691.8
131	AXC-872	 分子量: 430.5
134	AXC-873	 分子量: 498.6
137	AXC-876	 分子量: 571.7
143	AXC-877	 分子量: 553.7

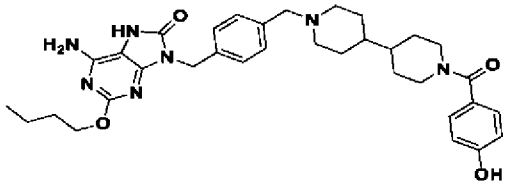
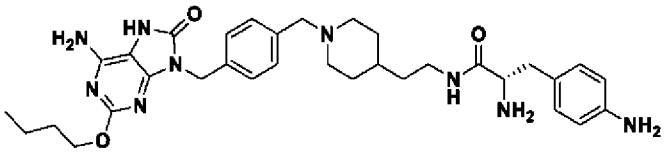
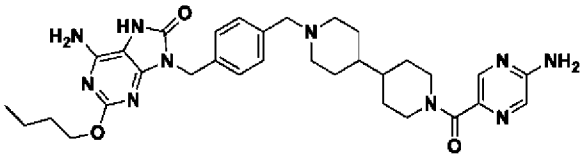
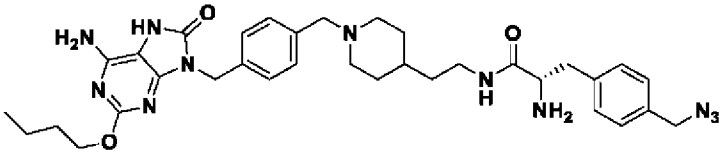
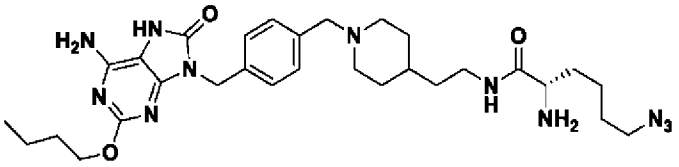
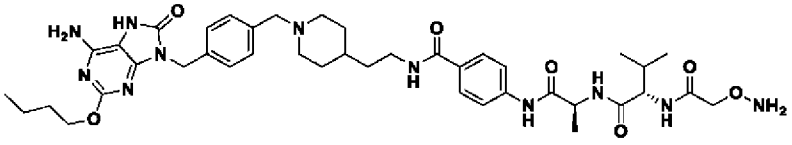
化合物編號	化合物名稱	結構-核心5化合物
144	AXC-878	 確切質量：453.3
145	AXC-879	確切質量：526.3
146	AXC-880	確切質量：584.3
148	AXC-881	 確切質量：441.3
149	AXC-882	 確切質量：514.3
150	AXC-883	分子量：652.8
151	AXC-884	 分子量：552.7
152	AXC-885	 分子量：537.7

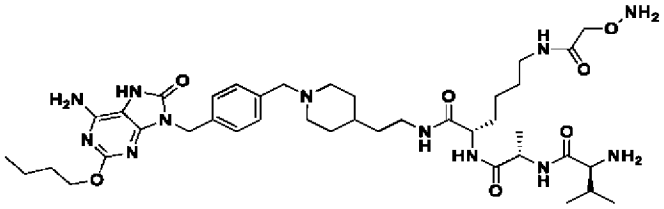
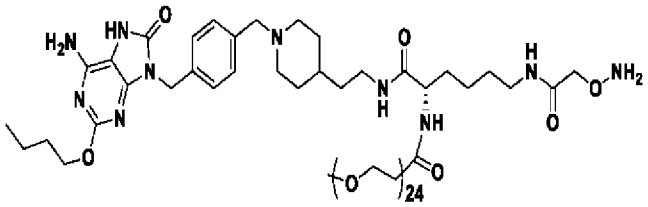
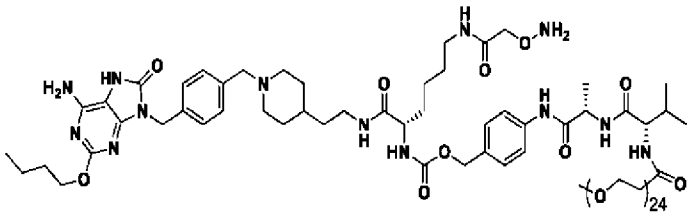
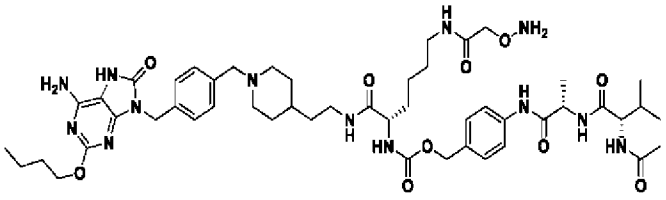
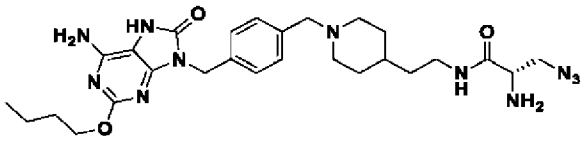
化合物編號	化合物名稱	結構-核心5化合物
153	AXC-886	 分子量: 495.6
154	AXC-887	 分子量: 608.7
157	AXC-888	 分子量: 1046.3
158	AXC-889	 分子量: 1119.4
155	AXC-890	 分子量: 523.7
173	AXC-891	 分子量: 524.7
174	AXC-892	 分子量: 609.8

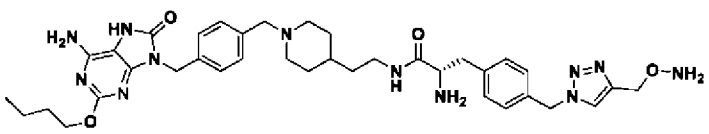
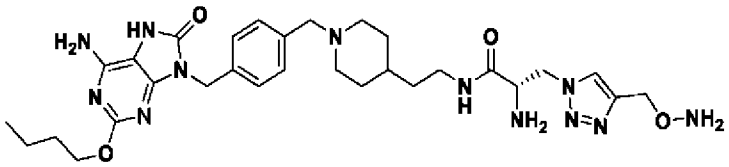
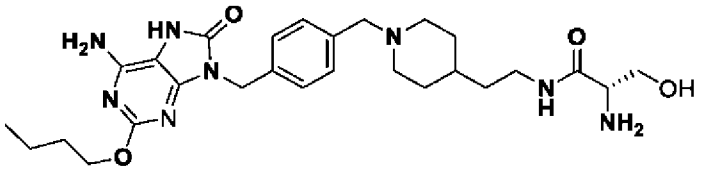
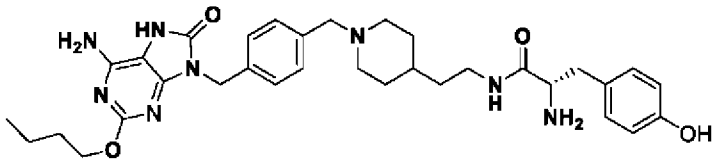
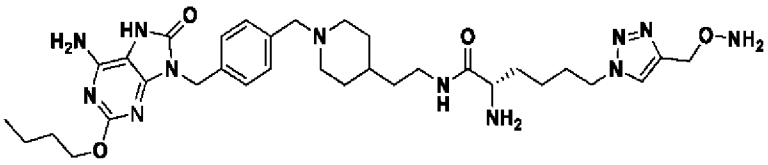
化合物編號	化合物名稱	結構-核心5化合物
178	AXC-893	 分子量: 640.8
179	AXC-894	 分子量: 410.5
180	AXC-895	分子量: 602.7
181	AXC-896	分子量: 597.7
182	AXC-897	 分子量: 682.8
183	AXC-898	 分子量: 493.6
184	AXC-901	 分子量: 566.7

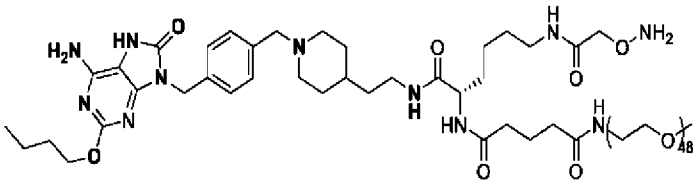
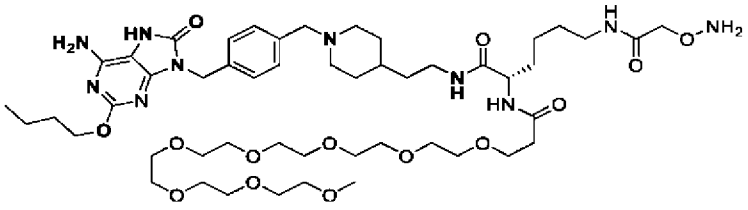
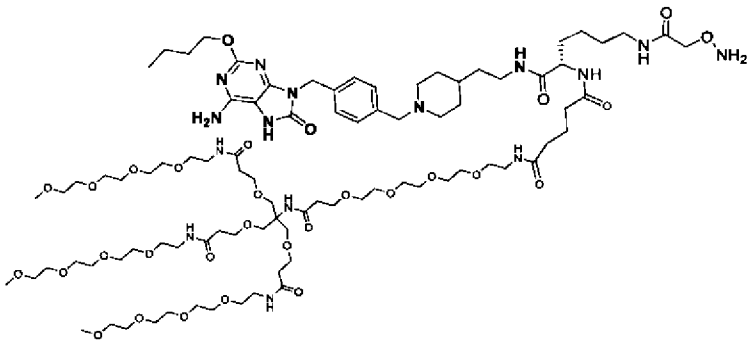
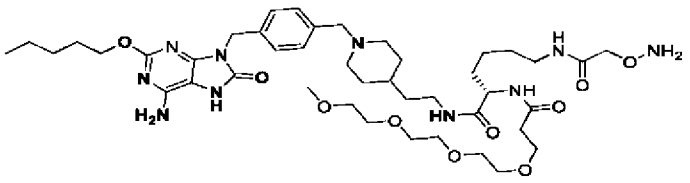
化合物編號	化合物名稱	結構-核心5化合物
185	AXC-903	
186	AXC-904	
187	AXC-905	
188	AXC-906	
189	AXC-907	
190	AXC-908	分子量 : 501.6

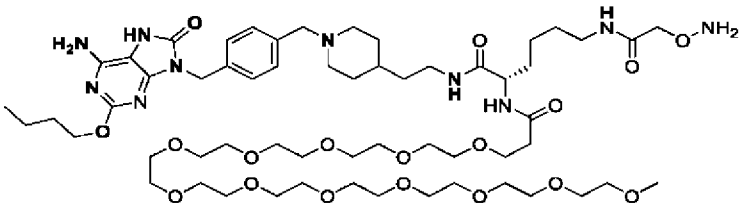
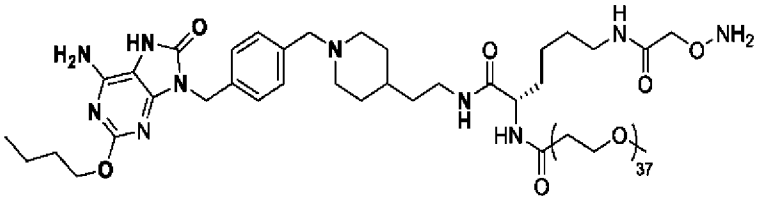
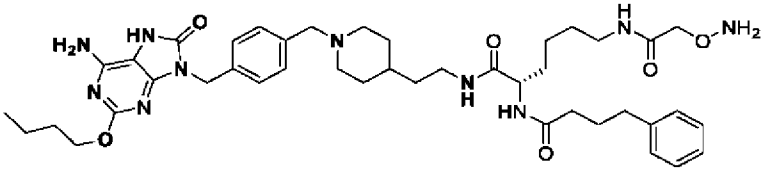
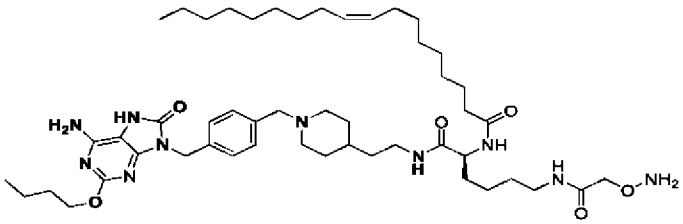
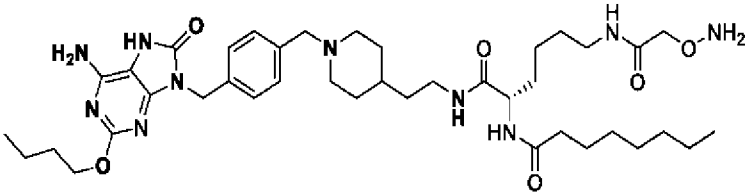
化合物編號	化合物名稱	結構-核心5化合物
191	AXC-909	 分子量: 624.8
213	AXC-911	
214	AXC-912	
216	AXC-913	
217	AXC-914	
218	AXC-915	
219	AXC-916	

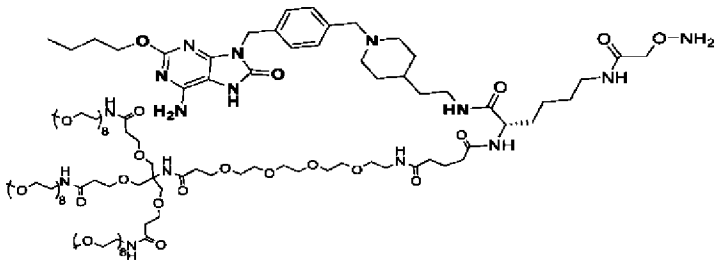
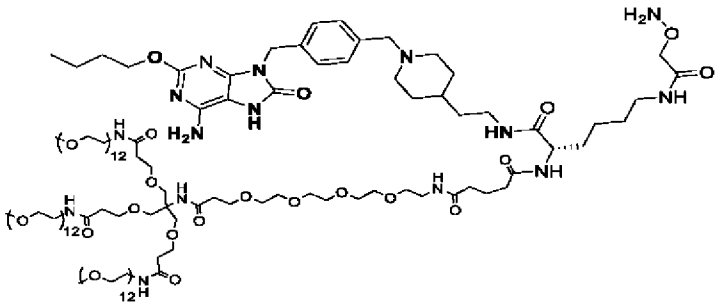
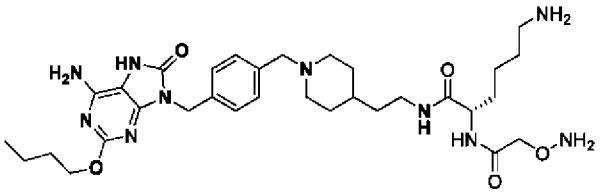
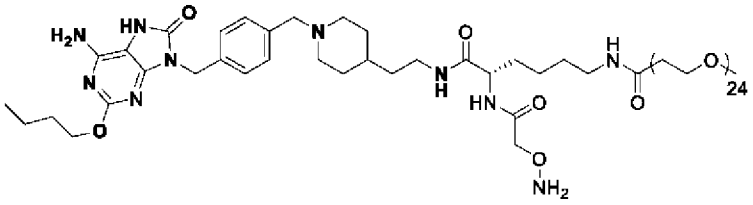
化合物編號	化合物名稱	結構-核心5化合物
220	AXC-917	
221	AXC-918	
222	AXC-919	
223	AXC-920	
224	AXC-921	
230	AXC-922	

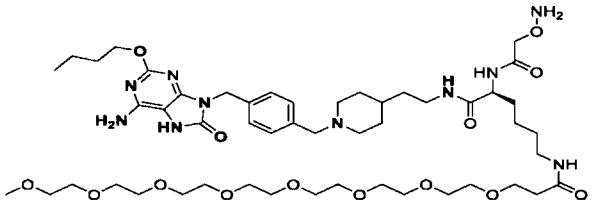
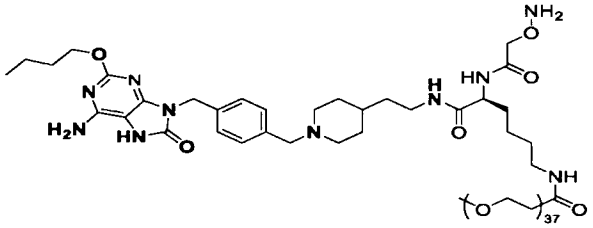
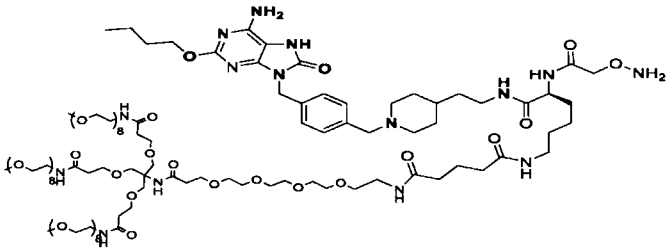
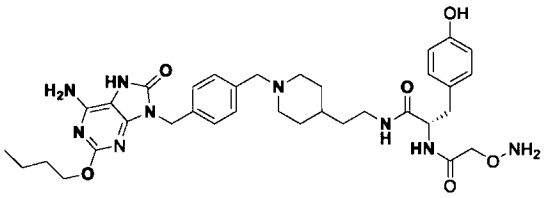
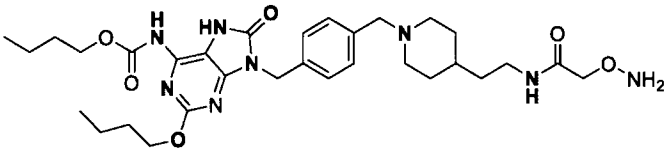
化合物編號	化合物名稱	結構-核心5化合物
233	AXC-923	
235	AXC-924	
238	AXC-925	
239	AXC-926	
240	AXC-927	

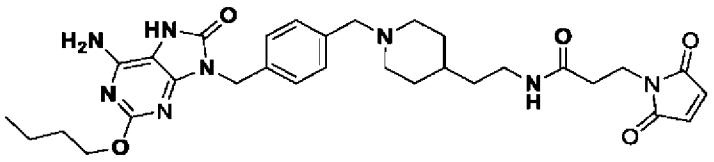
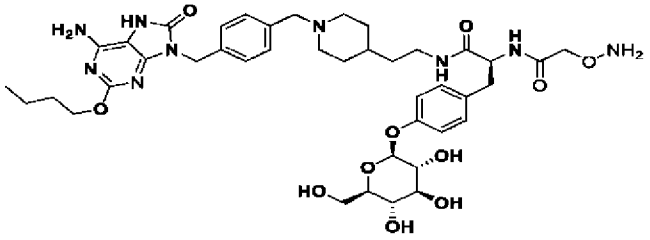
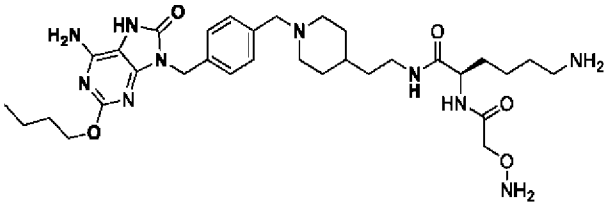
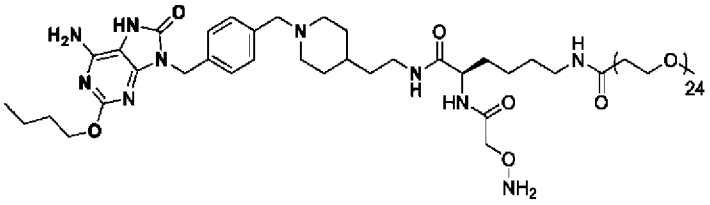
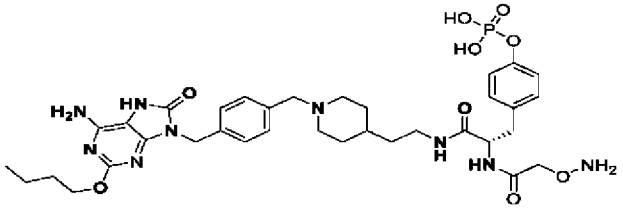
化合物編號	化合物名稱	結構-核心5化合物
242	AXC-931	
244	AXC-932	
245	AXC-933	
246	AXC-934	
248	AXC-935	

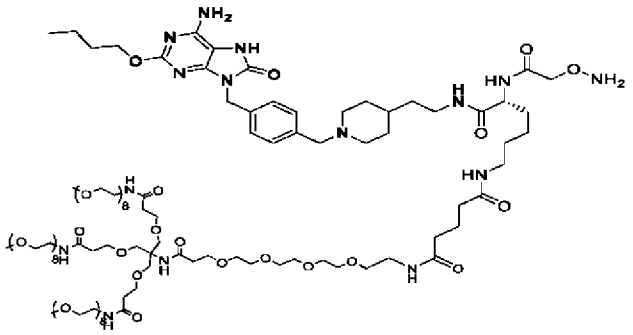
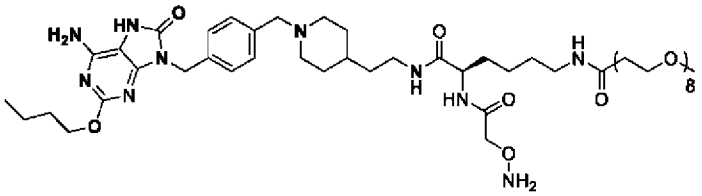
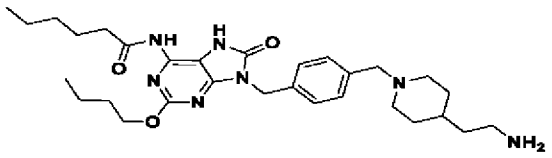
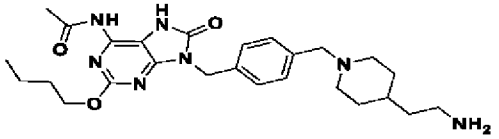
化合物編號	化合物名稱	結構-核心5化合物
251	AXC-936	
252	AXC-937	
253	AXC-938	
254	ACX-939	

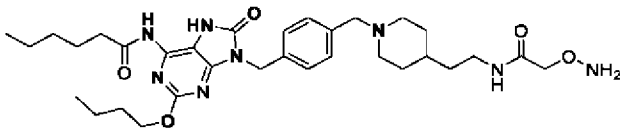
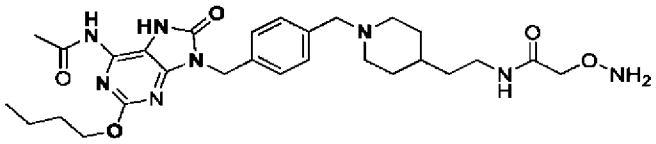
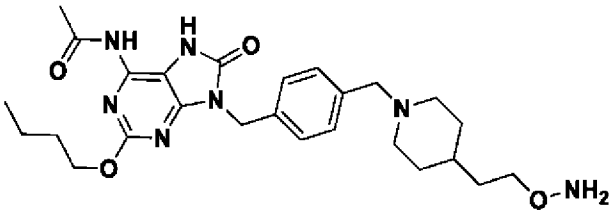
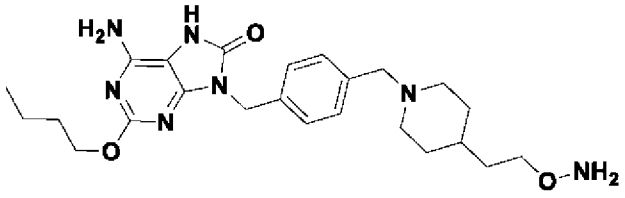
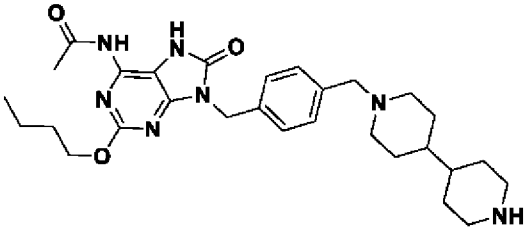
化合物編號	化合物名稱	結構-核心5化合物
255	AXC-940	
256	AXC-941	
257	AXC-942	
258	AXC-943	
259	AXC-944	

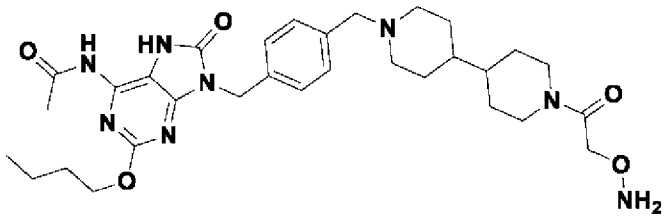
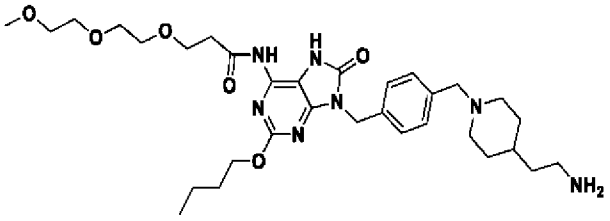
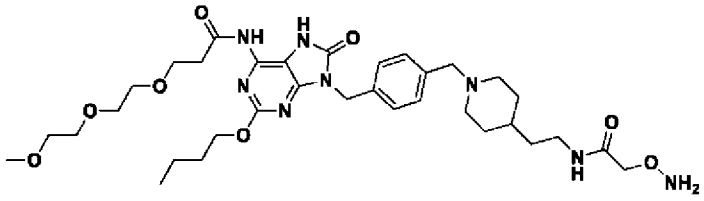
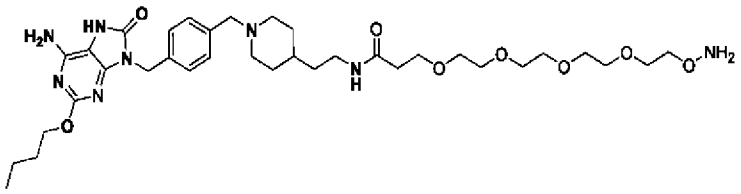
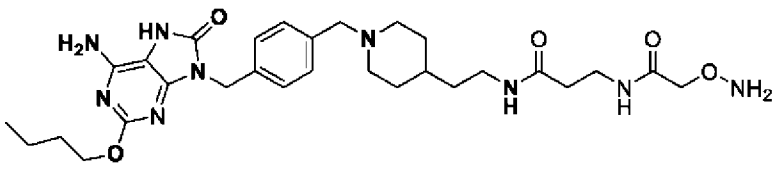
化合物編號	化合物名稱	結構-核心5化合物
260	AXC-945	
261	AXC-946	
263	AXC-947	
265	AXC-949	

化合物編號	化合物名稱	結構-核心5化合物
266	AXC-950	
267	AXC-951	
268	AXC-952	
269	AXC-953	
272	AXC-954	

化合物編號	化合物名稱	結構-核心5化合物
273	AXC-955	
275	AXC-956	
278	AXC-958	
279	AXC-959	
281	AXC-960	

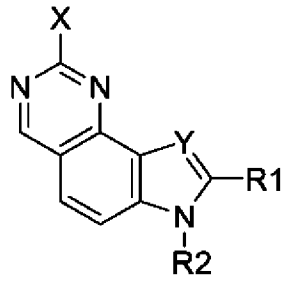
化合物編號	化合物名稱	結構-核心5化合物
282	AXC-961	
283	AXC-962	
284	AXC-963	
285	AXC-964	

化合物編號	化合物名稱	結構-核心5化合物
286	AXC-965	
287	AXC-966	
296	AXC-978	
297	AXC-979	
299	AXC-980	

化合物編號	化合物名稱	結構-核心5化合物
300	AXC-981	
301	AXC-982	
302	AXC-983	
303	AXC-984	
304	AXC-1009	

實例 4：包含以下結構–核心 3 之 TLR 促效劑之合成：

核心 3

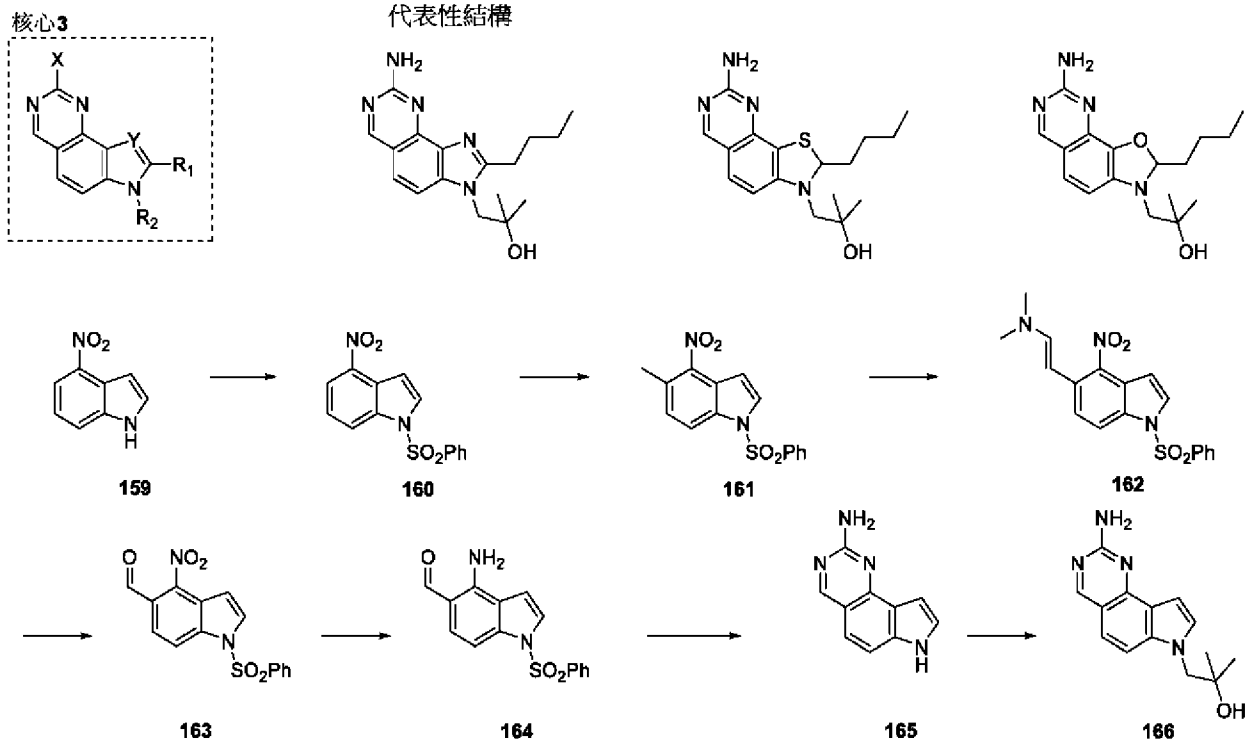


在一些實施例中，X 係 N 或 H；Y 係 C 或 N；

R_1 係 C_1 至 C_{12} 烷基、經取代之 C_1 至 C_{12} 烷基、含氧之 C_1 至 C_{12} 烷基、雜環、經取代之雜環或 H

R_2 係 C_1 至 C_{12} 烷基、C_1 至 C_{12} 經取代之烷基、C_4 至 C_8 環烷基、芳族環、經取代之芳族環、芳族雜環、經取代之芳族雜環、$-ONH_2$、末端 C_1 至 C_{12} 烷基或 H

如以下方案中所揭示，合成具有核心 3 結構之 TLR-促效劑。



【0778】 **4-硝基-1-甲苯磺醯基-1H-吲哚(160)**：將化合物 **159** (4-硝基-1H-吲哚) (2.43 g, 15.0 mmol)溶解於 THF (15 mL)中。於 0°C 下將於 THF (30 mL)中之氫化鈉(900 mg, 22.5 mmol)逐滴添加至懸浮液中。將溶液升溫至室溫且再攪拌 1 h。接著，添加緩慢於 THF (15 mL)中之甲苯磺醯基氯(3.0 g, 15.75 mmol)且將反應物

攪拌隔夜，使溶液在 $NaHCO_3$ 與 Et_2O 之間分配。將水層萃取(3×75 mL)，將合併之有機層用鹽水洗滌，經 $MgSO_4$ 乾燥，且於真空中濃縮。將所得固體吸收於 AcCN 中，進行超音波處理且過濾。不使用固體(起始材料)。將液體旋轉蒸發且將殘餘物(**160**)用於下一步驟(3.12 g)中。MS m/z NO2 未觀察到。

【0779】 **5-甲基-4-硝基-1-(苯基磺醯基)-1H-吲哚(161)**：於-15℃下將化合物 **160** (3.11 g, 9.83 mmol)溶解於 THF (98.3 ml)中。添加甲基氯化鎂(4.9 mL, 14.75 mmol)且將溶液攪拌 1 h 45 min。接著添加 DDQ (3.79 g, 16.71 mmol)，同時維持低於-10°C之溫度。將反應物升溫至室溫且攪拌隔夜。接著，將反應物用 DCM 稀釋以淬滅反應物，接著旋轉蒸發。將粗製物通過用 DCM 溶析之 SiO_2 塞。將溶析液乾燥且藉由管柱層析(於 DCM 中之己烷，0 – 40%，40 g 管柱)純化，獲得靶標化合物 **161** (2.06 g，63%，歷經兩個步驟)。MS m/z NO2 未觀察到。

【0780】 **(E)N,N-二甲基-2-(4-硝基-1-(苯基磺醯基)-1H-吲哚-5-基)乙烯-1-胺(162)：將** 5-甲基-4-硝基-1-(苯基磺醯基)-1H-吲哚(**161**) (0.83 g, 2.63 mmol)溶解於 DMF (26.3 ml)中。添加 N,N-二甲基甲醯胺二甲基縮醛(3.54 mL, 26.3 mmol)且於 115˚C 加熱反應物。藉由旋轉蒸發器蒸發反應物。將殘餘物(化合物 **162**) (0.98 g)用於下一反應中。MS m/z NO2 未觀察到。

【0781】 **4-硝基-1-(苯基磺醯基)-1H-吲哚-5-甲醛 (163)**：向化合物 **162** (0.98 g, 2.6 mmol)於 THF (13.2 ml)及水(13.2 mL)中之溶液中添加偏過碘酸鈉(1.7 g mg, 7.9 mmol)且攪拌。將反應物過濾且洗滌用 EtOAc (50 mL)洗滌。將有機層用 $NaHCO_3$ 洗滌，經 $MgSO_4$ 乾燥，過濾且藉由旋轉蒸發器蒸發。將殘餘物(化合物 **163**, 0.56 g)於真空幫浦上乾燥且用於下一反應中。MS m/z NO_2 未觀察到。

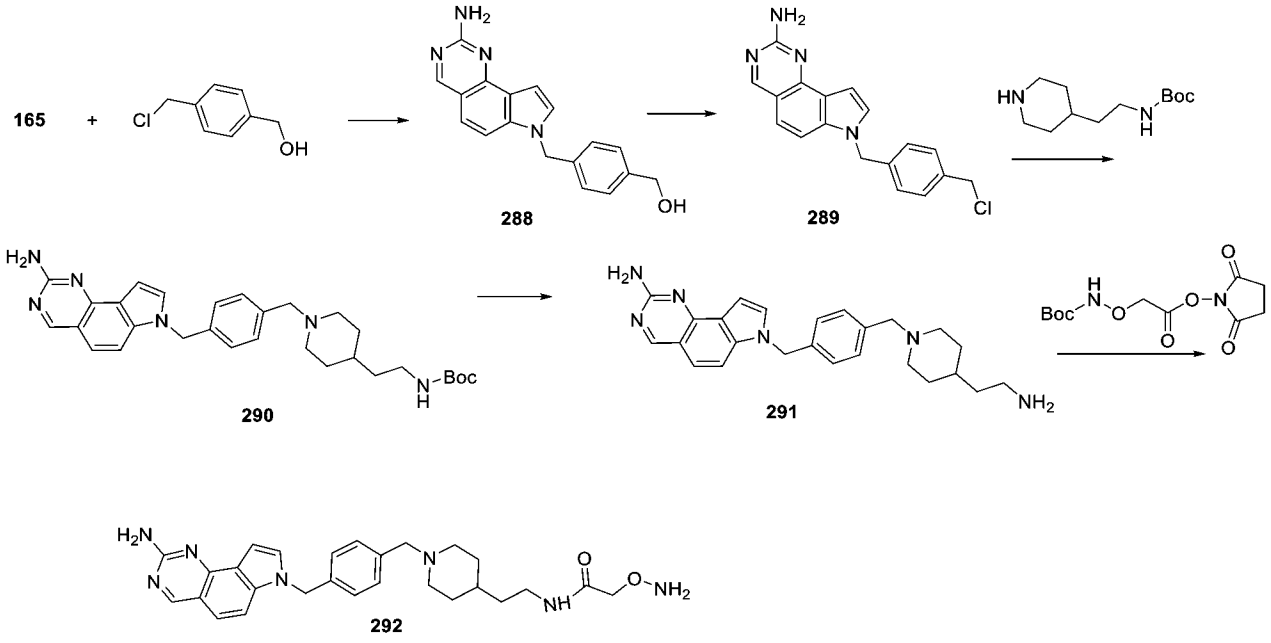
【0782】 **4-胺基-1-(苯基磺醯基)-1H-吲哚-5-甲醛 (164)**：向化合物 **163** (0.56 g, 1.7 mmol)於 MeOH (47 mL)中之溶液中添加 Pd/C (0.03 g)。在氫氣氛圍(雙氣球/1 atm)下攪拌反應物。將反應物用矽藻土過濾且用 MeOH 洗滌。將溶劑於真空中

乾燥且將殘餘物藉由管柱層析(於 EtOAc 中之己烷，0 – 50%，12 g 管柱)純化，獲得靶標化合物 **164** (93 mg，12%，歷經三個步驟)，MS m/z 301 $(M+H)^+$。

【0783】 **7H-吡咯并[2,3-h]喹唑啉-2-胺 (165)**：向化合物 **164** (0.092 g, 0.31 mmol)於 DMA (3.1 mL)中之溶液中添加碳酸胍(279 mg, 3.09 mmol)且於 150°C下攪拌。LCMS 顯示反應完成且將混合物藉由製備型 LC 純化，獲得靶標化合物 **165** (6 mg, 11%)，MS m/z 257 $(M+H)^+$。

【0784】 **1-(2-胺基-7H-吡咯并[2,3-h]喹唑啉-7-基)-2-甲基丙-2-醇 (166)**：於 0°C下向氫化鈉(60%於礦物油中之分散液，2.2 mg，0.054 mmol)溶液中添加 5 mL 己烷且攪動溶液。去除己烷以洗掉礦物油。接著，將於 DMF (1.1 mL)中之化合物 **165** (2 mg, 0.011 mmol)逐滴添加至溶液中且攪拌 1 h。接著，逐滴添加伸異丁基氧化物(1 uL, 0.011 mmol)且攪拌反應物。將反應物過濾，且將混合物藉由製備型 LC 純化，獲得靶標化合物 **166** (1.5 mg, 23%)，MS m/z 185 $(M+H)^+$。

【0785】 化合物 288-292 之合成：



【0786】 **(4-((2-甲基-7H-吡咯并[2,3-h]喹唑啉-7-基)甲基)苯基)甲醇(288)**：於 23°C下向化合物 **165** (200 mg, 1.09 mmol)及 4-氯甲基苄基醇(510.1 mg, 3.26 mmol)於 DMSO (14.4 mL)中之溶液中添加碳酸銫(1768 mg, 5.43 mmol)。在 21 hr 後，

將反應混合物傾倒至水(15 mL)中且用乙醚(5 mL)洗滌。用乙醚(3×50 mL)萃取水層。將合併之有機層用水(2×100 mL)洗滌，接著用鹽水(50 mL)洗滌。將濾液於真空中濃縮，且將殘餘物於急驟層析矽膠上純化，獲得靶標化合物 **288** (31 mg, 0.030 mmol, 9%)。MS m/z 305 $(M+H)^+$。

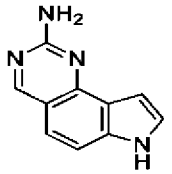
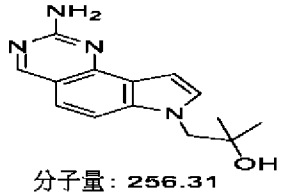
【0787】 **7-(4-(氯甲基)苄基)-7H-吡咯并[2,3-h]喹唑啉-2-胺(289)：**向化合物 **288** (22.6 mg, 0.074 mmol)中添加二氯甲烷(0.67 mL)。向所得懸浮液中添加亞硫醯氯(16 ul, 0.22 mmol)，且於 50°C下攪拌混合物。在 1 hr 後，向混合物中添加甲苯(30 ml)，且蒸發溶劑。再次將甲苯(100 ml)添加至殘餘物中，且蒸發溶劑。將殘餘物於減壓下乾燥，獲得靶標化合物 **289** (24 mg, 0.074 mmol, 100%)，其未經進一步純化即用於下一步驟。MS m/z 323 $(M+H)^+$。

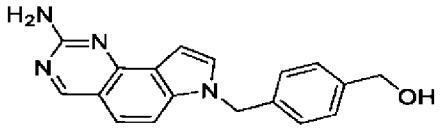
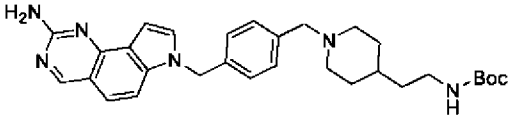
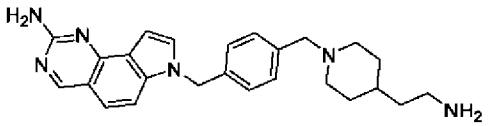
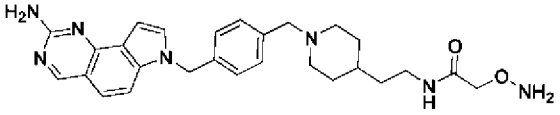
【0788】 **(2-(1-(4-((2-胺基-7H-吡咯并[2,3-h]喹唑啉-7-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)胺基甲酸第三丁酯(290)：**使用化合物 **289** 及(2-(六氫吡啶-4-基)乙基)胺基甲酸第三丁酯作為起始材料，利用與針對 **143** 所述類似之程序製備化合物 **290**，獲得靶標化合物 **290** (25 mg, 0.049 mmol, 65%)。MS m/z 515 $(M+H)^+$。

【0789】 **7-(4-((4-(2-胺基乙基)六氫吡啶-1-基)甲基)苄基)-7H-吡咯并[2,3-h]喹唑啉-2-胺(291)：**使用化合物 **290** 作為起始材料，利用與針對 **144** 所述類似之程序製備化合物 **291**，獲得靶標化合物 **291** (20 mg, 0.04 mmol, 78%)。MS m/z 415 $(M+H)^+$。

【0790】 **N-(2-(1-(4-((2-胺基-7H-吡咯并[2,3-h]喹唑啉-7-基)甲基)苄基)六氫吡啶-4-基)乙基)-2-(胺基氧基)乙醯胺(292)：**使用化合物 **291** 及 2-(((第三丁氧基羰基)胺基)氧基)乙酸 2,5-二側氧基環戊酯作為起始材料，利用與針對 **127** 所述類似之程序製備化合物 **292**，獲得靶標化合物 **292** (3.7 mg, 0.006 mmol, 28%)。MS m/z 488 $(M+H)^+$。

表 5 – TLR 促效劑-核心 3 化合物

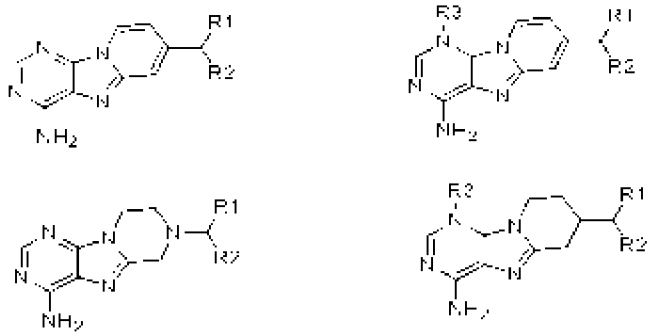
化合物編號	化合物名稱	結構-核心3化合物
165	AXC-837	 分子量: 184.20
166	AXC-847	 分子量: 256.31

化合物編號	化合物名稱	結構-核心3化合物
288	AXC-967	
290	AXC-968	
291	AXC-969	
292	AXC-970	

【0791】　包含核心 3 結構之化合物 AXC-967、AXC-968、AXC-969 及 AXC-970 中之每一者皆顯示大於 10,000 nM 之 EC_{50}。

實例 5：包含以下代表性結構–核心 2 之 TLR 促效劑之合成：

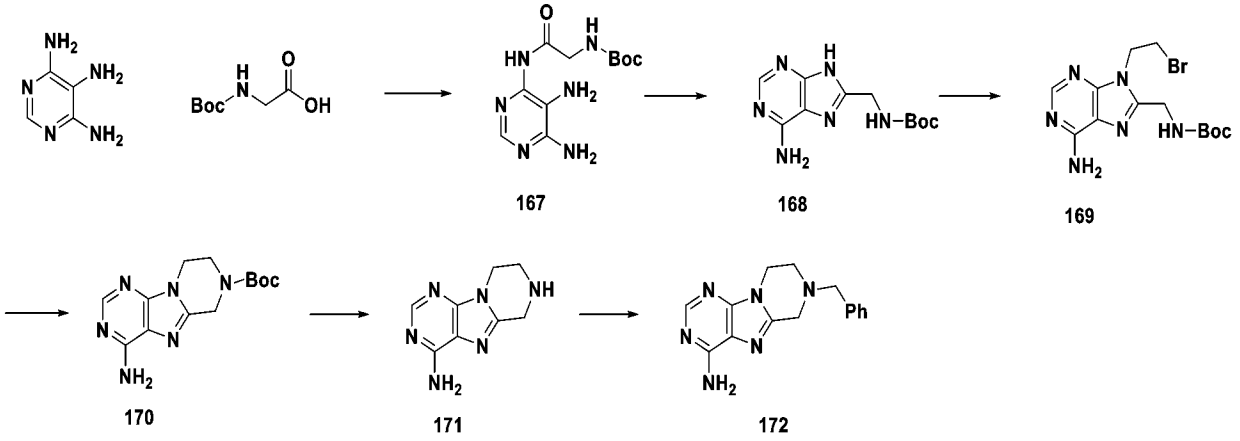
核心 2



在一些實施例中，R_1 或 R_2 各自連接以形成 C_4 至 C_8 環烷基，或獨立地為-H、C_1 至 C_{12} 烷基、含氮之烷基、芳族環或–C(NH)NH_2；

R_3 係 C_1 至 C_{12} 烷基、經取代之 C_1 至 C_{12} 烷基、含氧之 C_1 至 C_{12} 烷基、雜環、經取代之雜環或 H。

【0792】 如以下方案中所揭示，合成具有核心 2 結構之 TLR-促效劑。



【0793】 **2-(5,6-二胺基嘧啶-4-基胺基)-2-側氧基乙基胺基甲酸第三丁酯(167)**：於 23°C下向嘧啶-4,5,6-三胺(2050 mg, 16.383 mmol)及 Boc-Gly-OH(2880, 16.440 mmol)於 DCM (50 ml)中之溶液中添加 DCC (3800 mg, 18.417 mmol)及 DMAP (80 mg, 0.655 mmol)。在 3 h 後，藉由過濾去除沈澱。將混合物藉由製備型 LC 純化，獲得靶標化合物 **167** (2458 mg, 8.707 mmol, 53%)，MS m/z 283 $(M+H)^+$。

【0794】 **(6-胺基-9H-嘌呤-8-基)甲基胺基甲酸第三丁酯(168)**：於 23°C下向化合物 **167** (620 mg, 2.196 mmol)於 n-BuOH (20 ml)中之溶液中添加 25%於 MeOH 中之 NaOMe (2500 ul, 11.570 mmol)。將溫度升高至 70°C。在 1 h 後，於冰浴中

將 6N HCl (1.83 ml, 11 mmol)添加至混合物中，且將混合物用 EtOAc (50 ml)稀釋。將混合物藉由飽和碳酸氫鈉(50 ml)及鹽水(50 ml)洗滌，用 $MgSO_4$ 乾燥，且過濾。將混合物藉由急速層析純化，獲得靶標化合物 **168** (250 mg, 0.946 mmol, 43%)，MS m/z 265 $(M+H)^+$。

【0795】 **(6-胺基-9-(2-溴乙基)-9H-嘌呤-8-基)甲基胺基甲酸第三丁酯(169)**：於 23°C下向化合物 **168** (250 mg, 0.946 mmol)於 DMF (5 ml)中之溶液中添加二溴乙烷(2100 mg, 2.795 mmol)及 $CsCO_3$ (2400 mg, 1.842 mmol)。在 2.5 h 後，將混合物用 20 ml DCM 稀釋，且用飽和碳酸氫鈉(50 ml)及鹽水(50 m)洗滌。將有機層用 $MgSO_4$ 乾燥且過濾。將混合物藉由製備型 LC 純化，獲得化合物 **169** (144 mg, 0.545 mmol, 58%)，MS m/z 372 $(M+H)^+$。

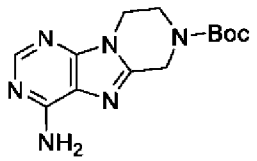
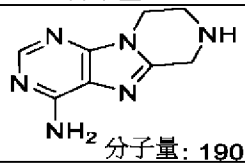
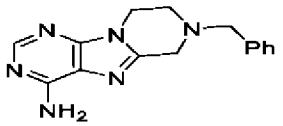
【0796】 **4-胺基-8,9-二氫吡嗪并[1,2-e]嘌呤-7(6H)-甲酸第三丁酯(170)**：向氫化鈉(60%於礦物油中之懸浮液，51.4 mg，1.286 mmol)之溶液中添加 5 mL 己烷。攪動溶液，接著去除己烷以洗掉礦物油。在攪拌下於 23°C下將於 DMF (2.9 mL)中之化合物 **169** (159.2 mg, 0.429 mmol)逐滴添加至溶液中。在 1 h 後，LCMS 顯示反應完成。將混合物藉由製備型 LC，用 5%至 60%水/90% ACN 0.05%TFA 梯度保持 20 min，藉由使用 Gemini NX, 150X30 C18 管柱純化。將含有產物之級分合併且藉由旋轉蒸發器蒸發。將殘餘物於高真空幫浦上乾燥，獲得靶標化合物 **170** (36.7 mg, 0.05 mmol, 11%)，MS m/z 291 $(M+H)^+$。

【0797】 **6,7,8,9-四氫吡嗪并[1,2-e]嘌呤-4-胺(171)**：向 **170** (35.7 mg, 0.123 mmol)之溶液中添加 1.2 mL DCM。於 23˚C 下在攪拌下逐滴添加三氟乙酸(45.7 uL, 0.615 mmol)。在 1 h 後，LCMS 顯示反應完成。將混合物藉由旋轉蒸發器，使用 PhMe 進行額外共沸加以蒸發，得到獲得化合物 **171**.(38.5 mg, 0.05 mmol, 41%)，MS m/z 191 $(M+H)^+$。

【0798】 **7-苄基-6,7,8,9-四氫吡嗪并[1,2-e]嘌呤-4-胺(172)**：向 **171** (10 mg, 0.053

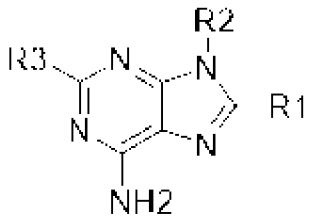
mmol)於 DMF (1.1 mL)中之溶液中添加苯甲醛(6.7 uL, 0.066 mmol)。添加 DIEA (18.3 uL, 0.105 mmol)且將反應物攪拌 15 分鐘。接著，添加硼烷-吡啶錯合物(6.7 uL, 0.067 mmol)且將反應物於 23°C下攪拌隔夜。將混合物藉由製備型 LC，用 5%至 60%水/90% ACN 0.05%TFA 梯度保持 20 min，藉由使用 Gemini NX, 150X30 C18 管柱純化。將含有產物之級分合併且藉由旋轉蒸發器蒸發。將殘餘物於高真空幫浦上乾燥，獲得化合物 **172** (1.3 mg, 0.002 mmol, 3%)，MS m/z 281 $(M+H)^+$。

表 6 – TLR 促效劑-核心 2 化合物

化合物編號	化合物名稱	結構-核心2化合物
170	AXC-745	 分子量: 290.33
171	AXC-746	 分子量: 190.21
172	AXC-753	 分子量: 280.34

實例 6：包含以下代表性結構–核心 4 之 TLR 促效劑之合成：

核心 4

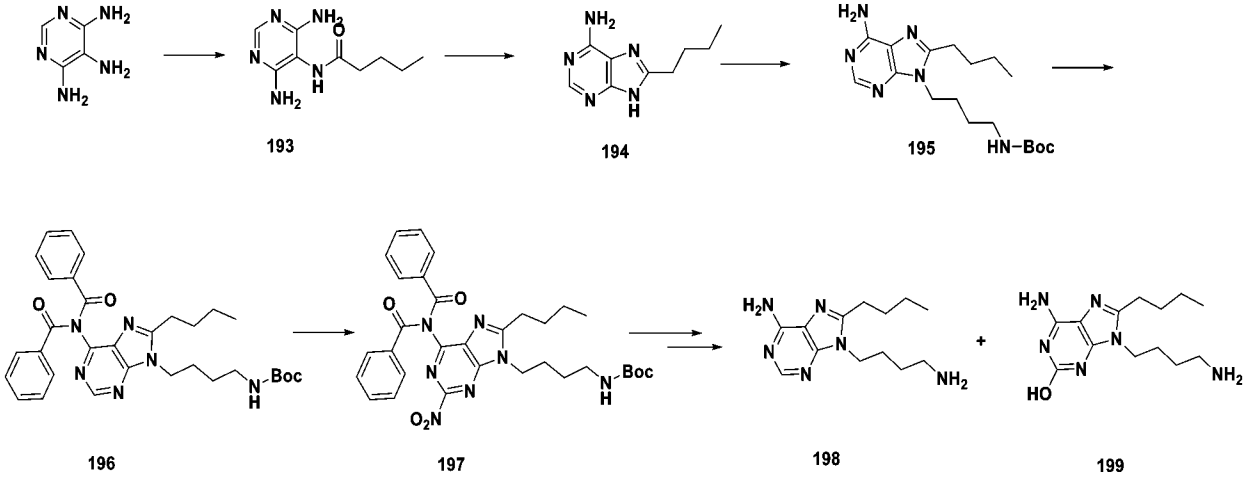


在一些實施例中，R_1 係 C_1 至 C_{12} 烷基、經取代之 C_1 至 C_{12} 烷基、含氧之 C_1 至 C_{12} 烷基、C_3 至 C_8 環烷基、雜環、經取代之雜環、鹵素或 H；

R_2 係 C_1 至 C_{12} 烷基、C_1 至 C_{12} 經取代之烷基、C_4 至 C_8 環烷基、芳族環、經取代之芳族環、芳族雜環、經取代之芳族雜環、$-ONH_2$、-NH2、羰基、末端 C_1 至 C_{12} 烷基或其組合；或 R_2 係 H；

R_3係C_1至C_{12}烷基、經取代之C_1至C_{12}烷基、含氧/氮/硫之C_1至C_{12}烷基、雜環、經取代之雜環、環烷基、經取代之環烷基、$-N_3$、-OH、末端C_1至C_{12}烷基、末端經取代之C_1至C_{12}烷基或其組合；或R_3係H。

【0799】 如以下方案中所揭示，合成具有核心4結構之TLR-促效劑。



【0800】 **N-(4,6-二胺基嘧啶-5-基)戊醯胺(193)**：於 70°C下將嘧啶-4,5,6-三胺(1015 mg, 8.112 mmol)溶解於 N-甲基-2-吡咯啶酮(10 mL)中。在溶液變得澄清後，將其冷卻至23°C。向混合物中添加戊醯氯(980 ul, 8.127mmol)且將溫度升高至50°C。在20 h後，將溫度降低至23°C，將EtOAc (50 ml，沈澱)添加至混合物中，且藉由過濾分離沈澱。將固體用EtOAc (10 ml)及丙酮(10 ml)洗滌，且乾燥，獲得呈淺褐色固體之化合物 **193** (1780 mg, 7.237 mmol, 90%)。產物未經進一步純化即用於下一步驟。MS m/z 210 $(M+H)^+$。

【0801】 **8-丁基-9H-嘌呤-6-胺(194)**：於 23°C下向粗製化合物 **193** (1780 mg, 7.273 mmol)於n-BuOH (30 mL)中之溶液中添加甲醇鈉(1570 mg, 29.063 mmol)，且將其加熱至回流。在1 h後，將溶液冷卻至室溫，用6 M HCl (3.2 ml)中和，且添加鹽水(20 ml)，獲得兩相混合物。將有機層分離，藉由$MgSO_4$乾燥，接著於真空中濃縮，獲得呈淺褐色固體之靶標化合物 **194** (1148 mg 6.003 mmol, 83%)。MS m/z 192 $(M+H)^+$。

【0802】 **4-(6-胺基-8-丁基-9H-嘌呤-9-基)丁基胺基甲酸第三丁酯(195)**：於0°C

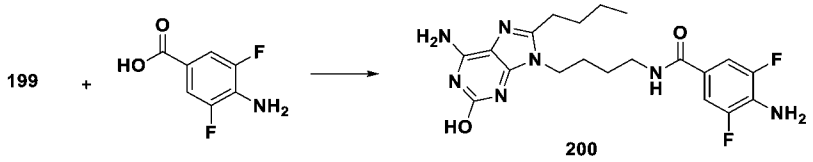
下向 N-Boc-胺基-丁醇(1520 mg, 8.032 mmol)及化合物 **194** (1420 mg, 7.426 mmol)於 THF (20 ml)中之溶液中添加 PPh_3 (2080 mg, 7.930 mmol)。在 30 min 後，於 0°C 下經 5 min 向該混合物中添加 DIAD (2200 ul, 11.174 mmol)。在 3 h 後，於真空中去除溶劑。將殘餘物藉由 DCM (100 ml)稀釋且用半飽和碳酸氫鈉(100 ml)及鹽水(20 ml)洗滌。將有機層經 $MgSO_4$ 乾燥且過濾。於真空中去除溶劑。將殘餘物藉由急驟層析純化，獲得呈淺褐色固體之化合物 **195** (1064 mg, 2.935 mmol, 37%)。MS m/z 363 $(M+H)^+$。

【0803】 **4-(6-(N-苯甲醯基苯甲醯胺基)-8-丁基-9H-嘌呤-9-基)丁基胺基甲酸第三丁酯(196)**：於 0°C下向化合物 **195** (1064 mg, 2.935 mmol)於 DCM (10 ml)中之溶液中添加苯甲醯基氯(700 ul, 4.980 mmol)及 TEA (900 ul, 17.788 mmol)，且將溫度升高至 20°C。在 2.5 h 後，將混合物用飽和碳酸氫鈉(50 ml)及鹽水(50 ml)洗滌，經 $MgSO_4$ 乾燥且過濾。於真空中去除溶劑且將殘餘物藉由急驟層析純化，獲得呈淺褐色油狀物之化合物 **196** (1650 mg, 2.891 mmol, 98%)。MS m/z 571 $(M+H)^+$。

【0804】 **4-(6-(N-苯甲醯基苯甲醯胺基)-8-丁基-2-硝基-9H-嘌呤-9-基)丁基胺基甲酸第三丁酯(197)**：於 23°C下向四甲基硝酸銨(780 mg, 5.729 mmol)於 DCM (10 ml)中之溶液中添加三氟乙酸酐(1200 ul, 17.118 mmol)。在 1 h 後，將混合物冷卻至 0°C，且添加化合物 **196** (1650 mg, 2.891 mmol)於 DCM (20 ml)中之溶液。將溫度升高至 23°C。在 2 h 後，將混合物用 DCM (20 ml)稀釋，用半飽和碳酸氫鈉(20 ml)及鹽水(20 ml)洗滌，經 $MgSO_4$ 乾燥，且過濾。於真空中去除溶劑且將殘餘物藉由急驟層析純化，獲得呈玻璃狀淺黃色固體之化合物 **197** (1067 mg, 1.733 mmol, 60%)。MS m/z 616 $(M+H)^+$。

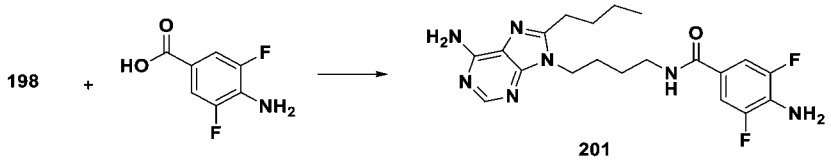
【0805】 **9-(4-胺基丁基)-8-丁基-9H-嘌呤-6-胺(198)**及 **6-胺基-9-(4-胺基丁基)-8-丁基-9H-嘌呤-2-醇(199)**：於 23°C下向 化合物 **197** (220 mg, 0.357 mmol)於

EtOH (20 ml)中之溶液中添加 Pd/C (10%, 0.1 g)，且使氫氣鼓泡。在 18 h 後，LCMS 顯示製成去硝酸化合物。添加 NaOMe (30 mg, 0.6 mmol)，且將混合物攪拌 4 h。接著，添加 TFA (3 ml)。在 20 min 後，於真空中去除溶劑且將混合物藉由製備型 LC 純化，獲得呈淺褐色固體之化合物 **198** (94 mg, 0.156 mmo, 44%) (MS m/z 263 $(M+H)^+$)及呈淺褐色固體之化合物 **199** (0.024 mmol, 7%) (MS m/z 279 $(M+H)^+$)。



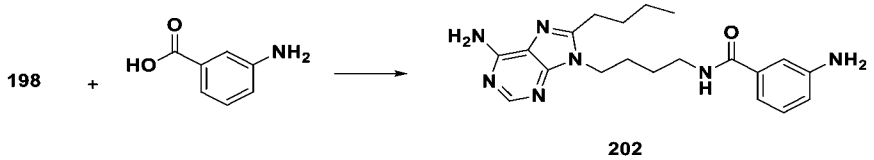
200

【0806】 **4-胺基-N-(4-(6-胺基-8-丁基-2-羥基-9H-嘌呤-9-基)丁基)-3,5-二氟苯甲醯胺(200)**：使用化合物 **199** 及 4-胺基-3,5-二氟-苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **150** 所述類似之程序製備化合物 **200**，獲得呈淺褐色固體之靶標化合物 **200** (14 mg, 0.018 mmol, 61%)，MS m/z 434 $(M+H)^+$。



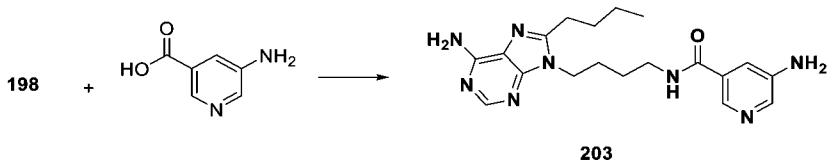
201

【0807】 **4-胺基-N-(4-(6-胺基-8-丁基-9H-嘌呤-9-基)丁基)-3,5-二氟苯甲醯胺(201)**：使用化合物 **198** 及 4-胺基-3,5-二氟-苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **150** 所述類似之程序製備化合物 **201**，獲得呈淺褐色固體之靶標化合物 **201** (13 mg, 0.017mmol, 93%)，MS m/z 418 $(M+H)^+$。



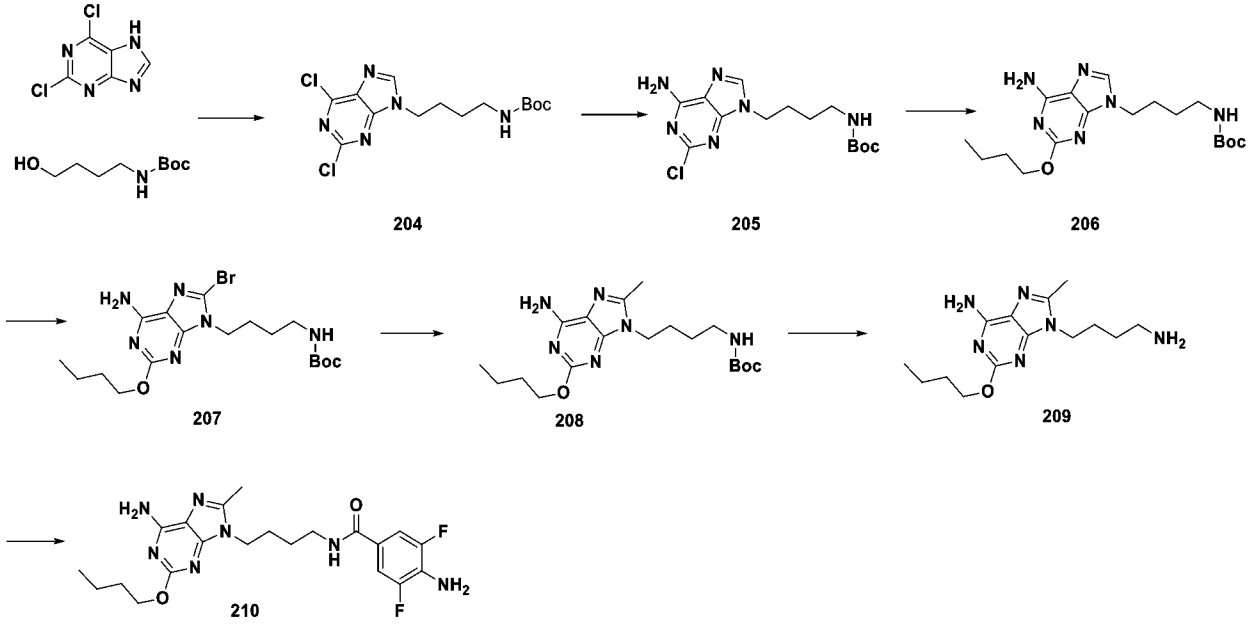
202

【0808】 **3-胺基-N-(4-(6-胺基-8-丁基-9H-嘌呤-9-基)丁基)苯甲醯胺(202)**：使用化合物 **198** 及 3-胺基苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **150** 所述類似之程序製備化合物 **202**，獲得呈淺褐色固體之靶標化合物 **202** (10 mg, 0.014 mmol, 88%)，MS m/z 382 $(M+H)^+$。



203

【0809】 **5-胺基-N-(4-(6-胺基-8-丁基-9H-嘌呤-9-基)丁基)菸鹼醯胺(203)**：使用化合物 **198** 及 5-胺基-菸酸作為起始材料，利用與針對 **150** 所述類似之程序製備化合物 **203**，獲得呈淺褐色固體之靶標化合物 **203** (14 mg，0.019 mmol，定量)，MS m/z 383 $(M+H)^+$。



204 205 206 207 208 209 210

【0810】 **4-(2,6-二氯-9H-嘌呤-9-基)丁基胺基甲酸第三丁酯(204)**：於 0°C下向 N-Boc-胺基-丁醇(1620 mg, 8.560 mmol)及 2,6-二氯嘌呤(1495 mg, 7.910 mmol)於 THF (10 ml)中之溶液中添加 PPh_3 (2280 mg, 8.693 mmol)。在 30 min 後，於 0°C 下經 5 min 添加 DIAD (2300 ul, 11.681 mmol)。於 50°C下攪拌混合物。在 6 h 後，於真空中去除溶劑。將殘餘物用 EtOAc (100 ml)稀釋，且用半飽和碳酸氫鈉(100 ml)及鹽水(20 ml)洗滌。將有機層藉由 $MgSO_4$ 乾燥且過濾。於真空中去除溶劑。將殘餘物藉由急驟層析純化，獲得呈黃色油狀物之化合物 **204** (4500 mg, <12.492 mmol, <100%) (約 20%雜質係 PPh3)。MS m/z 361 $(M+H)^+$。

【0811】 **4-(6-胺基-2-氯-9H-嘌呤-9-基)丁基胺基甲酸第三丁酯(205)**：將化合物 **204** (PPh_3 之粗製混合物，4500 mg，<12.492 mmol)置於配備有攪拌棒之耐壓

玻璃器皿中。向該器皿中添加於 MeOH (12 mL, 84 mmol)中之 7 N NH_3。將管密封，接著於 120°C下加熱。在 30 min 後，於真空中去除溶劑且將殘餘物溶解於 DCM (100 ml)中。將溶液用飽和碳酸氫鈉(100 ml)及鹽水(30 ml)洗滌。將有機層經 $MgSO_4$乾燥且過濾。於真空中去除溶劑。將殘餘物藉由急驟層析純化，獲得呈淺黃色固體之化合物 **205** (1310 mg, 3.844 mmol, 37%)。MS m/z 341 $(M+H)^+$。

【0812】 **4-(6-胺基-2-丁氧基-9H-嘌呤-9-基)丁基胺基甲酸第三丁酯(206)**：於 23°C下在乾燥氮氣下向化合物 **205** (257 mg, 0.754 mmol)於正丁醇(5 ml)中之溶液中添加鈉金屬(90 mg, 2.455 mmol)。將溫度升高至 100°C。在 18 h 後，於真空中去除溶劑。將殘餘物溶解於 DCM (50 ml)中且用半飽和碳酸氫鈉(50 ml)及鹽水(50 ml)洗滌。將有機層經 $MgSO_4$乾燥且過濾。於真空中去除溶劑。獲得呈淺褐色粗製固體之化合物 **206** (310 mg，< 0.819 mmol，定量)。MS m/z 379 $(M+H)^+$。

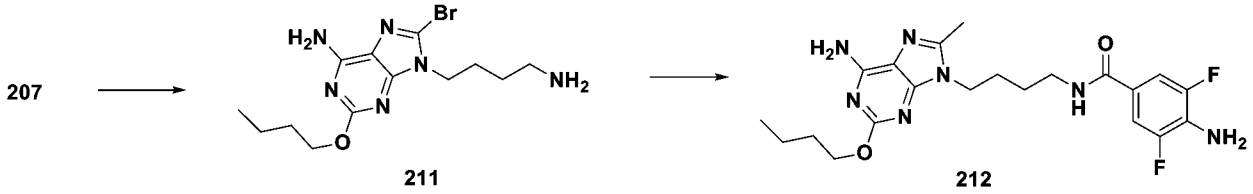
【0813】 **4-(6-胺基-8-溴-2-丁氧基-9H-嘌呤-9-基)丁基胺基甲酸第三丁酯(207)**：於 23°C下向化合物 **206** (310 mg, 0.819 mmol，粗製物)於 DCM (10 ml)中之溶液中添加溴(150 ul, 0.563 mmol)。在 1 h 後，於真空中去除溶劑。將混合物純化藉由急驟層析，獲得呈玻璃狀淺黃色固體之化合物 **207** (250 mg, 0.547 mmol, 67%)。MS m/z 458 $(M+H)^+$。

【0814】 **4-(6-胺基-2-丁氧基-8-甲基-9H-嘌呤-9-基)丁基胺基甲酸第三丁酯(208)**：於 23°C下向 化合物 **207** (82 mg, 0.179 mmol)於 無水 THF (5 ml)中之溶液中添加於 THF 中之 1 M 三甲基鋁(360 ul, 0.36 mmol)及 $PdCl_2(PPh_3)_2$ (44 mg, 0.063 mmol)。將混合物回流。在 20 h 後，將混合物藉由 20 ml DCM 稀釋且用半飽和碳酸氫鈉(20 ml)及鹽水(20 ml)洗滌。將有機層經 MgSO4 乾燥且過濾。於真空中去除溶劑。將殘餘物藉由急驟層析純化，獲得呈淺褐色固體之化合物 **208** (12 mg, 0.031 mmol, 17%)。MS m/z 393 $(M+H)^+$。

【0815】 **9-(4-胺基丁基)-2-丁氧基-8-甲基-9H-嘌呤-6-胺(209)**：於 23°C下向化

合物 **208** (12 mg, 0.031 mmol)於 DCM (0.5 ml)中之溶液中添加三氟乙酸(0.5 ml)。在 1 h 後，於真空中去除溶劑。將殘餘物於高真空幫浦上乾燥隔夜，獲得呈淺褐色固體之化合物 **209** (15 mg，0.02 mmol，定量)。MS m/z 293 $(M+H)^+$。

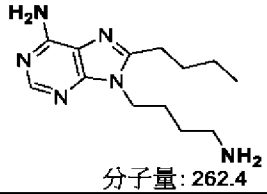
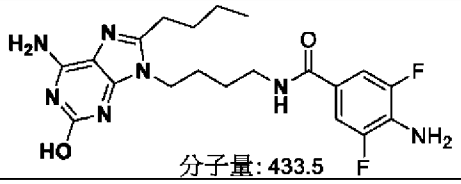
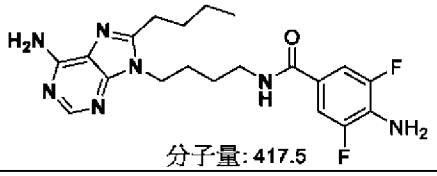
【0816】 **4-胺基-N-(4-(6-胺基-2-丁氧基-8-甲基-9H-嘌呤-9-基)丁基)-3,5-二氟苯甲醯胺(210)**：使用化合物 **209** 及 4-胺基-3,5-二氟-苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **150** 所述類似之程序製備化合物 **210**，獲得呈淺褐色固體之靶標化合物 **210** (3.5 mg, 0.004mmol, 22%)，MS m/z 469 $(M+H)^+$。

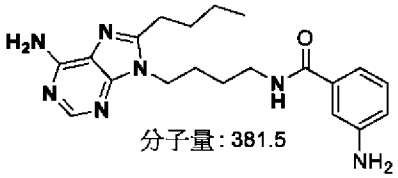
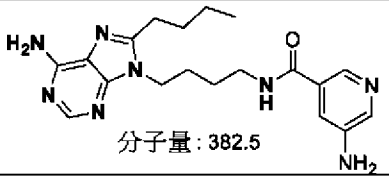
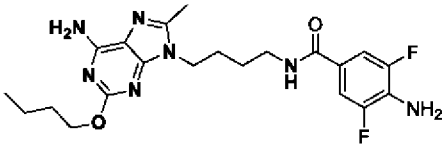
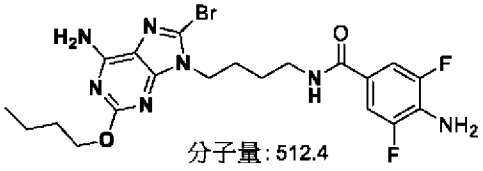


【0817】 **9-(4-胺基丁基)-8-溴-2-丁氧基-9H-嘌呤-6-胺(211)**：使用化合物 **207**，利用與針對 **209** 所述類似之程序製備化合物 **211**，獲得呈淺褐色固體之靶標化合物 **211** ((8 mg，0.011 mmol，定量)，MS m/z 358 $(M+H)^+$。

【0818】 **4-胺基-N-(4-(6-胺基-8-溴-2-丁氧基-9H-嘌呤-9-基)丁基)-3,5-二氟苯甲醯胺(212)**：使用化合物 **211** 及 4-胺基-3,5-二氟-苯甲酸作為起始材料，利用與針對 **150** 所述類似之程序製備化合物 **212**，獲得呈淺褐色固體之靶標化合物 **212** (8 mg, 0.009mmol, 82%)，MS m/z 513 $(M+H)^+$。

表 7 – TLR 促效劑-核心 4 化合物

化合物編號	化合物名稱	結構-核心4化合物
198	AXC-844	 分子量: 262.4
200	AXC-842	 分子量: 433.5
201	AXC-843	 分子量: 417.5

化合物編號	化合物名稱	結構-核心4化合物
202	AXC-845	 分子量: 381.5
203	AXC-846	 分子量: 382.5
210	AXC-836	 分子量: 447.5
212	AXC-841	 分子量: 512.4

實例 7：本實例揭示用於本發明中之各種方法及技術。

【0819】 **分子選殖 -** 自商業 DNA 合成服務(synthesis service) (IDT, San Diego, CA)獲得 CHO 細胞密碼子最佳化之抗體重鏈及輕鏈 cDNA 序列。將合成之 DNA 片段用 Hind III 及 EcoR I (二者皆來自 New England Biolabs (NEB), Ipswich, MA) 消化且藉由 PCR 純化套組(Qiagen, Valencia, CA)純化。將消化之抗體基因片段經

由快速連接套組(NEB)連接至表現載體中，得到用於表現野生型抗體重鏈及輕鏈之構築體。使所得質體在大腸桿菌中繁殖且藉由 DNA 測序服務(sequencing service) (Eton)加以驗證。

【0820】 **含琥珀密碼子突變體之生成-**基於抗 HER2 Fab 之晶體結構，選擇位於輕鏈恆定區之 10 個不同的表面可及位點以遺傳方式併入非天然胺基酸(例如，對乙醯基-丙胺酸(pAF)、或對疊氮基-苯丙胺酸或對胺基-苯丙胺酸)。彼等位點對於抗原-抗體結合並不重要。接著經由定點誘變將所選位點之每一遺傳密碼子突變為琥珀密碼子(TAG)以生成用於該抗體突變體之表現質體。引子購自 IDT。所有定點誘變實驗皆依照說明手冊(NEB)，使用 Q5 定點誘變套組來實施。使用於突變體之表現質體在大腸桿菌中繁殖且藉由 DNA 測序服務(Eton)加以驗證。表 8 提供了具有 Kabat 編號及對應胺基酸序列(SEQ ID NO: 2、3、4 及 6 至 15)之抗 HER2 Fab 之重鏈或輕鏈恆定區中之琥珀突變位點的列表。SEQ ID NO.: 1 及 5 分別顯示抗 HER2 Fab 之野生型重鏈及輕鏈。抗 HER2 Fab 包括以下重鏈及輕鏈序列：SEQ ID NO: 1 及 SEQ ID NO: 5；SEQ ID NO: 1 及 SEQ ID NO: 6；SEQ ID NO: 1 及 SEQ ID NO: 7；SEQ ID NO: 1 及 SEQ ID NO: 8；SEQ ID NO: 1 及 SEQ ID NO: 9；SEQ ID NO: 1 及 SEQ ID NO: 10；SEQ ID NO: 1 及 SEQ ID NO: 11；SEQ ID NO: 1 及 SEQ ID NO: 12；SEQ ID NO: 1 及 SEQ ID NO: 13；SEQ ID NO: 1 及 SEQ ID NO: 14；SEQ ID NO: 1 及 SEQ ID NO: 15。抗 HER2 Fab 包括以下重鏈及輕鏈序列：SEQ ID NO: 2 及 SEQ ID NO: 5；SEQ ID NO: 2 及 SEQ ID NO: 6；SEQ ID NO: 2 及 SEQ ID NO: 7；SEQ ID NO: 2 及 SEQ ID NO: 8；SEQ ID NO: 2 及 SEQ ID NO: 9；SEQ ID NO: 2 及 SEQ ID NO: 10；SEQ ID NO: 2 及 SEQ ID NO: 11；SEQ ID NO: 2 及 SEQ ID NO: 12；SEQ ID NO: 2 及 SEQ ID NO: 13；SEQ ID NO: 2 及 SEQ ID NO: 14；SEQ ID NO: 2 及 SEQ ID NO: 15。抗 HER2 Fab 包括以下重鏈及輕鏈序列：SEQ ID NO: 3 及 SEQ ID NO: 5；SEQ ID NO: 3 及 SEQ ID NO:

6；SEQ ID NO: 3 及 SEQ ID NO: 7；SEQ ID NO: 3 及 SEQ ID NO: 8；SEQ ID NO: 3 及 SEQ ID NO: 9；SEQ ID NO: 3 及 SEQ ID NO: 10；SEQ ID NO: 3 及 SEQ ID NO: 11；SEQ ID NO: 3 及 SEQ ID NO: 12；SEQ ID NO: 3 及 SEQ ID NO: 13；SEQ ID NO: 3 及 SEQ ID NO: 14；SEQ ID NO: 3 及 SEQ ID NO: 15。抗 HER2 Fab 包括以下重鏈及輕鏈序列：SEQ ID NO: 4 及 SEQ ID NO: 5；SEQ ID NO: 4 及 SEQ ID NO: 6；SEQ ID NO: 4 及 SEQ ID NO: 7；SEQ ID NO: 4 及 SEQ ID NO: 8；SEQ ID NO: 4 及 SEQ ID NO: 9；SEQ ID NO: 4 及 SEQ ID NO: 10；SEQ ID NO: 4 及 SEQ ID NO: 11；SEQ ID NO: 4 及 SEQ ID NO: 12；SEQ ID NO: 4 及 SEQ ID NO: 13；SEQ ID NO: 4 及 SEQ ID NO: 14；SEQ ID NO: 4 及 SEQ ID NO: 15。在其他實施例中，SEQ ID NO: 1、2、3、4 中之任一者皆可包括表 9A 中所揭示之 Fc 突變。

表 8. 具有用於非天然胺基酸併入之琥珀位點之抗 HER2 Fab 重鏈(HC)及輕鏈(LC)胺基酸序列。亦揭示了下表中之所有序列，其中 pAF 由任一其他非天然胺基酸置換。

SEQ ID NO.	說明	序列
1	重鏈 野生型	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISA DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAM DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG
2	重鏈 A114 突變	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISA DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAM DYWGQGTLVTVSS**X**STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA

SEQ ID NO.	說明	序列
		KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG
3	重鏈 A136突變	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISA DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAM DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT**X**A LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG
4	重鏈 L159突變	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISA DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAM DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA**X**TSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG
5	輕鏈 野生型	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
6	輕鏈 V110突變	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRT**X** AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
7	輕鏈 A112突變	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTV A**X**PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.	說明	序列
8	輕鏈 S114 突變	DIQ M TQSPSSLSASVGDRVTITCRA SQDVNTAVAWYQQKPGKAPKL LIYSASFLYSGVPSRFSGSRS GTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQHYTTPPTFGQGTKVEIKRT VAAP **X** VFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQNSSKVDNAESSSKLQSFKVQNSSKVDNAESSKLQSGT LVKVDNAESSSKLQSGTLVACE
9	輕鏈 S121 突變	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V N T A V A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S R S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q H Y T T P P T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P **X** D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C
10	輕鏈 S127 突變	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V N T A V A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S R S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q H Y T T P P T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K **X** G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C
11	輕鏈 K149 突變	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V N T A V A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S R S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q H Y T T P P T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W **X** V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C
12	輕鏈 S156 突變	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V N T A V A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S R S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q H Y T T P P T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q **X** G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C
13	輕鏈 S168 突變	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V N T A V A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S R S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q H Y T T P P T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D **X** K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C
14	輕鏈 S202 突變	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V N T A V A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S R S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q H Y T T P P T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L **X** S P V T K S F N R G E C
15	輕鏈 V205 突變	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V N T A V A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S R S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q H Y T T P P T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P **X** T K S F N R G E C

X 表示非天然胺基酸(nnAA)；加下劃線表示表 9A 中之 Fc 突變

【0821】 除了重鏈中 114 位之琥珀突變外，亦在抗 HER2 抗體或抗體片段之不同位置生成 Fc 突變，以改良藥物動力學及/或增強抗體依賴性細胞吞噬作用(ADCP)及/或抗體依賴性細胞毒性 ADCC 活性(表 9A 及表 9B)。

表 9A –抗 HER2 Fc 突變

Fc 突變	靶向 Fc 受體	目的
WT	N/A	對照
E233P/L234V/L235A	FcγRIII	ADCC 無
N434A	FcRn	經改良之 PK
M252Y/S254T/T256E	FcRn	經改良之 PK
M252Y/S254T/T256E G236A/S239D/I332E	FcRn/FcγRII/FcγRIII	PK 及 ADCP 增強
G236A/S239D/I332E	FcγRII/RIII	ADCP/ADCC 增強
G236A	FcγRII	ADCP 增強
D270E	FcγRII	ADCP 增強
Y300L	FcγRII	ADCP 增強

表 9B. 具有用於非天然胺基酸併入之琥珀位點及所用額外突變之抗 HER2 單株抗體變異體。亦揭示了下表中之所有序列，其中 pAF 由任一其他非天然胺基酸置換。

SEQ ID NO.	說明	序列
16	重鏈 A114/ADE 變異體	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIH WVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFT ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDG FYAMDYWGQGTLVTVSS**X**STKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL**A**GP**D**VF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPE**E**KTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
17	重鏈 A114/G236A 變異體	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIH WVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFT ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDG FYAMDYWGQGTLVTVSS**X**STKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL**A**GPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH

SEQ ID NO.	說明	序列
		QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEIKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
18	重鏈 A114/PVA 變異體	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIH WVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFT ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDG FYAMDYWGQGTLVTVSS**X**STKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP**PVA**GGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

X 表示非天然胺基酸(nnAA)

【0822】 用於本發明中之抗 HER2 單株抗體包括 SEQ ID NO: 16 或 SEQ ID NO: 17 或 SEQ ID NO: 18 之重鏈，及以下輕鏈序列中之任一者：SEQ ID NO: 5；SEQ ID SEQ ID NO: 6；SEQ ID NO: 7；SEQ ID NO: 8；SEQ ID NO: 9；SEQ ID NO: 10；SEQ ID NO: 11；SEQ ID NO: 12；SEQ ID NO: 13；SEQ ID NO: 14；SEQ ID NO: 15。在其他實施例中，用於本發明中之抗 HER2 Fab 包括表 9A 中所揭示之重鏈突變中之任一者及以下輕鏈序列中之任一者：SEQ ID NO: 5；SEQ ID SEQ ID NO: 6；SEQ ID NO: 7；SEQ ID NO: 8；SEQ ID NO: 9；SEQ ID NO: 10；SEQ ID NO: 11；SEQ ID NO: 12；SEQ ID NO: 13；SEQ ID NO: 14；SEQ ID NO: 15。

【0823】 **瞬時表現 -** 在補充有 3 mM L-麩醯胺酸(Gibco)及 3 mM GlutaMAX (Gibco)之 EX-Cell 302 (Sigma)中維持平臺細胞株。將細胞每 3-4 天以每 ml 40 萬個細胞之密度接種傳代。在轉染前一天，以每 ml 60 萬個細胞接種細胞。在第 0 天，依照說明手冊，使用 MaxCyte 電穿孔平臺，用編碼輕鏈及重鏈之抗體表現質體轉染細胞。在轉染後，將細胞靜置於 125 ml 空振盪燒瓶中，且在 37°C靜態孵育箱中孵育 30 分鐘。接著將經轉染細胞以 3×10^6/ml 之密度接種至振盪燒瓶中

之基礎表現培養基(50% Dynamis – 50% ExCell 302，補充有 50 μM MSX)中。將經轉染細胞在設置為 140 rpm 之定軌振盪器上於 37℃、5% CO_2 下孵育。在第 1 天將 1 mM pAF 連同 7 g/L Cell Boost 5 (GE healthcare)、120 μg/L Long R3 IGF-1 (sigma)及 2 mM GlutaMAX 一起添加至培養物中。使孵育箱內之溫度自 37℃轉變為 32℃。在第 3 天添加另一 7 g/L 之 Cell Boost 5 及 2 mM GlutaMAX，且在第 5 天收集上清液。使用葡萄糖計監測葡萄糖水準，且當葡萄糖水準低於 2 g/L 時，向培養物中添加額外葡萄糖。藉由 Vi-Cell 儀器量測活細胞計數及活力。藉由 Octet 使用蛋白質 G 感測器量測生產率。

【0824】 **穩定之大量彙集物生成 -** 使用 Pvu I (NEB)消化將表現質體線性化 6 小時。在線性化後，使用苯酚提取純化 DNA，且將其以 2.5 μg/μl 之濃度溶解在無內毒素之水中。在補充有 3 mM L-麩醯胺酸及 3 mM GlutaMAX 之 EX-Cell 302 中維持平臺細胞株 BB-117。將細胞每 3-4 天以 0.4×10^6 個/ml 之密度接種傳代。在轉染前一天，以 0.6×10^6 個/ml 接種細胞。在第 0 天，依照說明手冊，使用 MaxCyte 電穿孔平臺，用線性化抗體表現質體轉染細胞。在轉染後，將細胞靜置於 125 ml 空振盪燒瓶中，且在 37℃靜態孵育箱中孵育 30 分鐘。接著將 30 ml 恢復培養基(50% Ex-302 - 50% CD-CHO，補充有 3 mM 麩醯胺酸及 3 mM GlutaMAX)添加至燒瓶中且振盪隔夜。在第一天，將經轉染細胞計數、旋轉沈降、洗滌且再懸浮於選擇培養基(50% Ex-302 – 50% CD-CHO，具有 50-100 μM MSX)中，以生成穩定之大量彙集物。監測活細胞之數目及活力，且每 3-4 天更換培養基，直至穩定之大量彙集物之活力恢復至 90%。當選擇結束時，製備冷凍細胞原液，且將所得穩定之大量彙集物用於生成用於分批進料表現之材料。

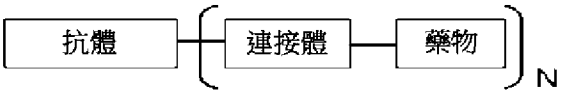
【0825】 **分批進料表現 -** 在第 0 天將先前生成之抗體穩定大量彙集物以 0.5×10^6/ml 之密度接種至振盪燒瓶中之基礎表現培養基(50% Dynamis – 50% ExCell 302，補充有 50 μM MSX)中。將經轉染細胞在設置為 140 rpm 之定軌振盪器上

於 37°C、5% CO_2 下孵育。在第 3 天將 0.5 mM pAF 連同 10 g/L Cell Boost 4 (GE health care)及 0.52 g/L Cell Boost 7b (GE health care)一起添加至培養物中。在第 5 天將 120 μg/L Long R3 IGF-1 添加至培養物中。使用葡萄糖計監測葡萄糖水準，且當葡萄糖水準低於 2 g/L 時，向培養物中添加額外葡萄糖。藉由 Vi-Cell 儀器量測活細胞計數及活力。在第 7 天收集上清液用於純化。藉由 Octet 使用蛋白質 G 感測器量測生產率。

【0826】 **來自 EuCODE 表現系統之含有 nnAA 之抗體的純化 -** 將包含含有 nnAA 之靶抗體之澄清細胞培養基加載於在 20 mM 磷酸鈉、100 mM 氯化鈉(pH 7.5)中平衡之蛋白 A ProSep Ultra 管柱(EMD Millipore)上。在加載後，用緩衝液 A (20 mM 磷酸鈉，100 mM 氯化鈉，pH 7.5)，接著用洗滌緩衝液 B (5 mM 琥珀酸，pH 5.8)洗滌管柱，以去除宿主細胞污染物。用溶析緩衝液 C (50 mM 甘胺酸，10 mM 琥珀酸，pH 3.2)自管柱溶析靶抗體。彙集靶抗體，且用 2.0 M tris 鹼將 pH 調整至 pH 5.0。藉由將條件蛋白 A 彙集物加載於 30 mM 乙酸鈉(pH 5.0)中平衡之 Capto SP Impres 管柱(GE Healthcare)上，進一步純化靶抗體。用至 100%緩衝液 B (30 mM 乙酸鈉，0.5 M 氯化鈉，pH 5.0)之線性梯度自管柱溶析靶抗體，且彙集含有單體抗體之級分，經 0.22 μM 過濾，且於≤65°C下儲存直至進一步使用。

【0827】 **TLR 促效劑連接體酬載之位點特異性偶聯** - 將含有 nnAA (例如對乙醯基苯丙胺酸)之抗體緩衝液交換為偶聯緩衝液(30 mM 乙酸鈉，pH 4.0)且濃縮至 10-20 mg/mL。將最後 100 mM 乙酸醯肼添加至抗體中，接著添加 10 莫耳當量之羥胺官能化 TLR 促效劑藥物-連接體。將偶聯反應於 25-30°C下孵育 18-20 小時，接著在 Capto SP Impres 管柱(GE Healthcare)上純化以去除過量試劑。將純化之 ADC 緩衝液交換為調配緩衝液(50 mM 組胺酸，100 mM NaCl，5%海藻糖，pH 6.0)且於≤65°C下儲存直至進一步使用。

【0828】 本發明之 TLR 促效劑藥物-連接體抗體偶聯圖解說明如下：



如所示，抗體連接至連接體，該連接體可為可裂解之胺基酸連接體或 非可裂解之連接體，且該連接體連接至藥物或酬載。連接體-藥物可為如由 N 表示之一或多種，其中 N 係 1 至 10 之整數。此外，藥物或酬載之數目可為一或多種，或者為大於 1 之整數，藥物可為 1 至 8 種。

實例 8：用於小分子 TLR 促效劑之體外功能分析

【0829】 將 HEK-Blue™ hTLR7 細胞在 HEK-Blue™偵測培養基中孵育，且用增加濃度之 TLR7 或 TLR8 或 TLR7/8 促效劑刺激。在 24 h 孵育後，藉由 Quanti-Blue 偵測試劑(Invivogen, San Diego, CA)確定 NF-kB 誘導之 SEAP 之水準，於 655 nm OD 處獲得讀數。EC_{50} 係使用 Prism 軟體由劑量反應曲線確定。以下各表及附圖顯示闡述於本文實例 1-6 中之本發明之例示性 TLR-促效劑之活性。小於 500 nM 之 EC_{50} 值表明化合物之效力高於 EC_{50} 值為 50 nM 至 1 uM 或大於 1 uM 至 3 uM 之化合物。

【0830】 在 HEK-Blue hTLR7 報告細胞株中，使用 EC_{50} 為 2.08 uM 之商業 TLR7 促效劑瑞喹莫德(Resiquimod) (R848)、EC_{50} 為 0.435 uM 之化合物 1 及 EC_{50} 為 0.153 uM 之化合物 2 進行 TLR7 促效劑刺激(資料未顯示)。

【0831】 分析上文實例 1-6 中揭示之例示性 TLR-促效劑之活性。表 10 顯示與商業對照(DSR-6434、瑞喹莫德及莫托莫德(Motolimod))相比之 EC_{50} 值。

表 10 – 例示性 TLR 促效劑之活性

化合物編號	化合物	**TLR7 EC_{50} (nM)**
N/A	對照-DSR-6434	9.203
N/A	R848 – 瑞喹莫德	519.7
88	AXC-779	242.1
60	AXC-738	11.08
49	AXC-725	249.4
54	AXC-732	255.5
58	AXC-736	213.4
62	AXC-740	115.6

86	AXC-777	910.4
87	AXC-778	83.34
89	AXC-789	71.34
109	AXC-800	>5000
106	AXC-801	>5000
112	AXC-802	>5000
93	AXC-803	331.5
94	AXC-804	260.3
97	AXC-807	412.6
61	AXC-739	28.17
59	AXC-737	18.7
64	AXC-743	56.11

【0832】 表 11 顯示所選 TLR7 促效劑之 TLR7 活性。AXC-887 及 AXC-877 顯示低於 10 nM 之 EC_{50} 值，表明該等化合物係非常強效之 TLR7 促效劑。在 TLR8 報告分析中，與 EC_{50} 為 1427 nM 之商業化合物莫托莫德相比，AXC-887 顯示出 EC_{50} 為 3733 nM 之可量測活性。此表明 ACX-887 係 TLR7/8 雙重促效劑。

表 11 – 例示性 TLR 促效劑之活性

化合物	**EC_{50} (nM)**
DSR-6434	15.8
AXC-886	16.7
AXC-887	4.6
AXC-890	15.3
AXC-885	11.3
AXC-888	467.9
AXC-878	50.4
AXC-877	5.5
AXC-881	87.3
AXC-883	19.3
AXC-884	71.3

【0833】 表 12 顯示附著至連接體之所選 TLR7 促效劑之 TLR7 活性。AXC-879 在不同 TLR-促效劑(酬載)連接體中表現出最高效力。

表 12 –例示性 TLR 促效劑及連接體之活性

化合物	**TLR 促效劑酬載+連接體**
	EC_{50} (nM)
DSR-6434	14.8
AXC-876	362.4
AXC-879	151.2
AXC-880	409.5
AXC-882	550.8
AXC-874	> 10,000
AXC-875	> 10,000

AXC-862	400.1
AXC-863	864.2
AXC-867	829.0
AXC-868	> 5,000
AXC-869	> 10,000
AXC-889	696.5

【0834】 表 13 顯示額外 TLR7 促效劑及附著至連接體之 TLR7 促效劑之 TLR7 活性。AXC-895 在所測試之不同酬載中表現出最高效力，且 AXC-901 在不同酬載連接體中表現出最高效力。

表 13 – 例示性 TLR 促效劑及連接體之活性

化合物	**EC_{50} (nM)**
DSR-6434	9
AXC-901	48
AXC-900	615
AXC-899	1302
AXC-895	11
AXC-891	47
AXC-896	325
AXC-897	330
AXC-898	50
AXC-892	73
AXC-893	3120
AXC-894	1672

【0835】 表 14 顯示額外 TLR7 促效劑及附著至連接體之 TLR7 促效劑之 TLR7 活性。所有測試之化合物皆具有 TLR7 促效劑活性。AXC-894、AXC-903、AXC-904、AXC905 及 AXC-906 表現出以低於 10 nM 之 EC_{50} 值測試的不同酬載之最高效力。

表 14 – 例示性 TLR 促效劑及連接體之活性

化合物	**TLR7 EC_{50} (nM)**
DSR-6434	10.5
AXC-903	4.3
AXC-907	51.8
AXC-894	2.1
AXC-909	71.9
AXC-904	8.1
AXC-905	2.6
AXC-906	5.4
AXC-908	11.5
AXC-860	119.5
AXC-910	2591.1

【0836】 表 15 比較了附著至連接體(藥物連接體或 DL)及含有最終代謝物之非天然胺基酸(例如 pAF) (DL-pAF)的不同 TLR7 促效劑之 TLR7 活性。在所有情況下，含有最終代謝物之 pAF 皆表現出比其具有藥物連接體之各別酬載更高之效力。AXC-879 在不同 TLR 酬載連接體中表現出最高效力。

表 15 - 例示性 TLR 促效劑+連接體在非天然胺基酸(nnAA)存在或缺失下之活性

化合物	**TLR 促效劑+連接體(DL) - EC_{50} (nM)**	**TLR 促效劑+連接體+ nnAA (DL-pAF) - EC_{50} (nM)**
AXC-879	151.2	90
AXC-880	409.5	167
AXC-882	550.8	343
AXC-876	362.4	245
AXC-863	864.2	287
AXC-862	400.1	121
AXC-867	829	283
DSR6434	15	11

DL = 藥物連接體；DL-pAF = 含有最終代謝物之 pAF

實例 9：TC 之位點特異性偶聯

【0837】 如實例 7 中所述，使用分析型反相 HPLC 進行 TC 之位點特異性偶聯。在還原條件下，在胺基酸位置 HA114 處具有非天然胺基酸(例如 pAF)之未偶聯抗 HER2 抗體之分析型反相 HPLC 層析圖。抗 HER2 抗體在胺基酸位置 HA114 處分別與 TLR 促效劑 AXC-875 及 AXC-880 偶聯(資料未顯示)。表 16 顯示來自上述標準偶聯條件之 TLR 偶聯物之藥物-抗體比(DAR)。在 TLR 偶聯物之間可見不同的 DAR 水準(0.3-2.0)，此主要歸因於相關 TLR 連接體-酬載之不同性質。

表 16. 藉由 RP-HPLC 確定之 TLR 偶聯物之藥物-抗體比(DAR)。

偶聯物	**藥物抗體比(DAR)**
HER2-HA114-AXC638	1.7
HER2-HA114-AXC800	1.7
HER2-HA114-AXC801	1.9
HER2-HA114-AXC802	1.5
HER2-HA114-AXC874	2.0
HER2-HA114-AXC875	1.9
HER2-HA114-AXC862	0.8

HER2-HA114-AXC863	1.8
HER2-HA114-AXC867	1.5
HER2-HA114-AXC868	1.2
HER2-HA114-AXC869	0.3

實例 10：與各種腫瘤細胞之體外共培養分析

【0838】 將 RAW-Blue™細胞(Invivogen, San Diego, CA)與具有不同 HER2 表現水準之人類腫瘤細胞以 1:1 E:T 比率在 96 孔板中共培養，每孔細胞總數為 100 萬個。將不同濃度之小分子 TLR7 促效劑及偶聯 ISAC (免疫刺激性抗體偶聯物)添加至共培養細胞培養基中。在 24 h 孵育後，藉由 Quanti-Blue 偵測試劑(Invivogen, San Diego, CA)確定來自 RAW-Blue™細胞之經 NF-kB 誘導之 SEAP 的水準，於 OD 655 nm 處讀數。使用 Prism 軟體生成劑量-反應曲線。

【0839】 所選酬載連接體在與抗 HER2 抗體偶聯時之腫瘤依賴性 ISAC 活性之比較。SKOV3 係 HER2 高表現之腫瘤細胞株(資料未顯示)；JIMT-1 係 HER2 中/低表現之腫瘤細胞株(資料未顯示)；且 A431 係 HER2 低表現之腫瘤細胞株(資料未顯示)。在所有腫瘤細胞株存在下，小分子 TLR7 促效劑皆顯示出強效 TLR7 活性。所有 TLR7 ISAC 在 HER2 低表現或中表現腫瘤細胞株存在下皆未顯示活性。具有酬載藥物連接體 AXC-863 之 ISAC 僅在 HER2 高表現之腫瘤細胞株存在下顯示強效劑量依賴性活性。

【0840】 額外酬載連接體在與抗 HER2 抗體偶聯時之腫瘤依賴性 ISAC 活性之比較。SKBR3 係 HER2 高表現之腫瘤細胞株(資料未顯示)，且 HCC1806 係 HER2 極低表現之腫瘤細胞株(資料未顯示)。在所有腫瘤細胞株存在下，小分子 TLR7 促效劑皆顯示出強效 TLR7 活性。而所有 TLR7 ISAC 及未偶聯之抗 HER2 抗體在 HER2 極低表現之腫瘤細胞株存在下皆未顯示活性。具有酬載藥物連接體 AXC-863 之 ISAC 僅在 HER2 高表現之腫瘤細胞株存在下顯示強效劑量依賴性活性。

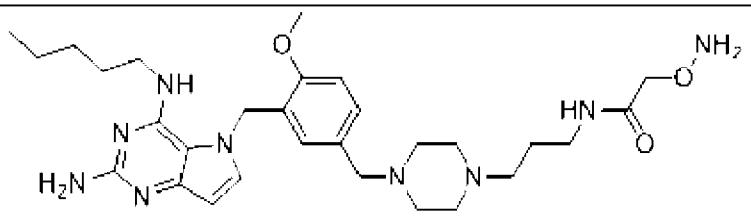
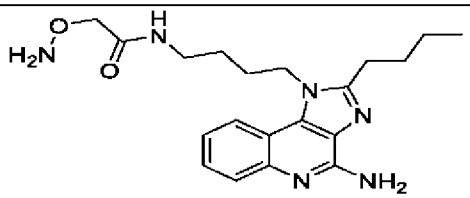
【0841】 額外酬載連接體在與抗 HER2 抗體偶聯時之腫瘤依賴性 ISAC 活性之

比較。SKBR3 係 HER2 高表現之腫瘤細胞株(資料未顯示)，且 HCC1806 係 HER2 極低表現之腫瘤細胞株(資料未顯示)。在所有腫瘤細胞株存在下，小分子 TLR7 促效劑皆顯示出強效 TLR7 活性。所有 TLR7 ISAC 及未偶聯之抗 HER2 抗體在 HER2 極低表現之腫瘤細胞株存在下皆未顯示活性。所有 ISAC 皆僅在 HER2 高表現之腫瘤細胞株存在下顯示強效劑量依賴性活性(資料未顯示)。具有酬載藥物連接體 AXC-879 之 ISAC 表現出最高之 HER2 依賴性 TLR7 活性。

【0842】　額外酬載連接體在與抗 HER2 抗體偶聯時之腫瘤依賴性 ISAC 活性之比較。SKBR3 係 HER2 高表現之腫瘤細胞株(資料未顯示)，且 HCC1806 係 HER2 極低表現之腫瘤細胞株(資料未顯示)。在所有腫瘤細胞株存在下，小分子 TLR7 促效劑皆顯示出強效 TLR7 活性。TLR7 ISAC 及未偶聯之抗 HER2 抗體在 HER2 極低表現之腫瘤細胞株存在下皆未顯示活性。所有 ISAC 皆僅在高 HER2 之腫瘤細胞株存在下顯示強效劑量依賴性活性。具有酬載藥物連接體 AXC-901 之 ISAC 表現出最高之 HER2 依賴性 TLR7 活性。

【0843】　三(3)個與抗 HER2 抗體偶聯之酬載連接體在 SKBR3 HER2 高表現之腫瘤細胞株(資料未顯示)及 HCC1806 HER2 極低表現之腫瘤細胞株(資料未顯示)中之腫瘤依賴性 ISAC 活性之比較顯示 HER2-AXC-879 與代表已知 ISAC 之 HER2-AXC-860 及 HER2-AXC-910 相比，具有最佳 ISAC 活性。表 17 描繪了用於生成所比較之 HER2-AXC ISAC 之 TLR-促效劑-連接體結構。

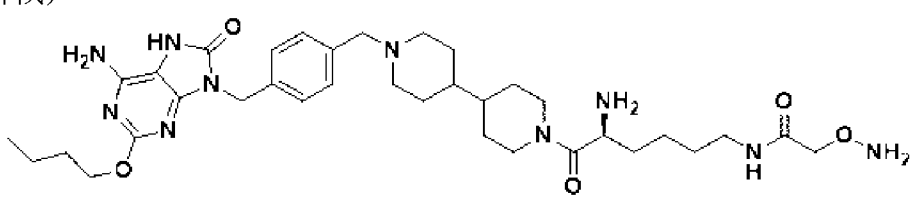
表 17 – TLR-促效劑結構

化合物名稱	結構
AXC-860	
AXC-879	確切質量：526.3
AXC-910	 分子量：384.5

實例 11：藥物-連接體設計/酬載-連接體設計

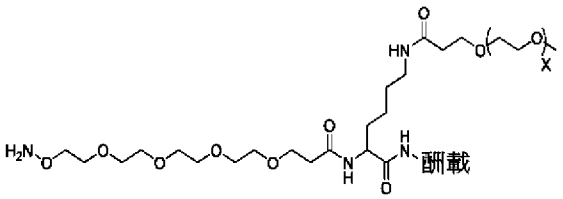
【0844】　利用藥物-連接體或酬載-連接體設計來增強、增加或改良本發明之 TLR-促效劑組成物及偶聯物之藥物動力學及治療特徵。本發明之 TC 設計成藉由使用 PEG 屏蔽及前藥設計在非預期靶位點阻斷對於 TLR 之暴露來提供額外靶特異性，例如，其中在腫瘤微環境中 PEG 屏蔽物或前藥之裂解釋放活性酬載，進一步增強特異性。

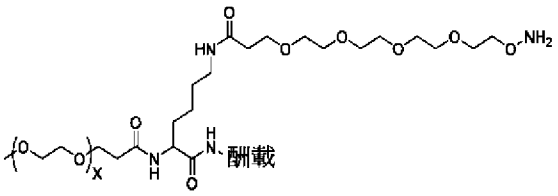
【0845】　PEG 屏蔽-一種方法利用 PEG 或 PEG 屏蔽最大限度地減少或遮蔽藥物/酬載連接體之固有疏水性。將 PEG 設計併入本發明之 TC 中，以藉由使 TC 屏蔽非預期之靶相互作用來改良或增強藥物-連接體之溶解性，由此達成更佳靶向效率，例如在腫瘤微環境中之抗腫瘤活性。下面使用以下 TLR-促效劑化合物說明具有 PEG 屏蔽的用於本發明之 TC 之藥物/酬載連接體設計策略：AXC-914 (指示為酬載)：

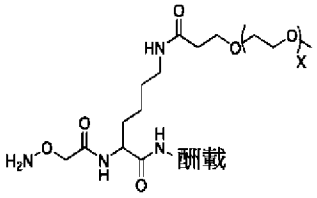


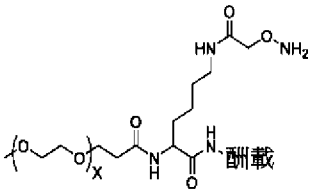
AXC-914

具有 PEG 屏蔽設計之酬載之實例：

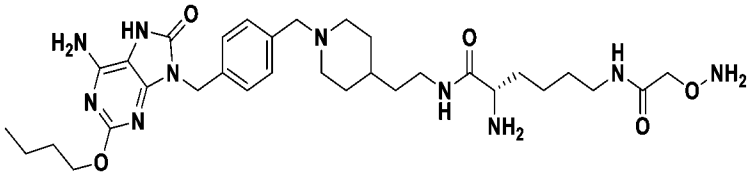




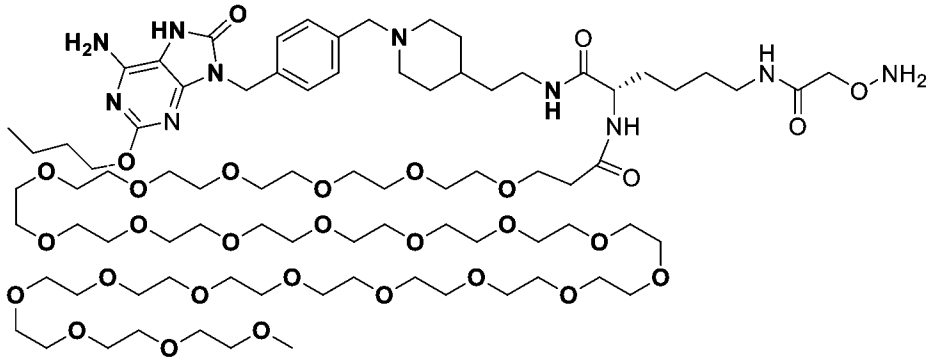




及化合物 AXC-913：



具有使用 PEG24 說明的 PEG 屏蔽設計之 AXC-913 酬載之實例：



PEG24-AXC-913

圖 2 及表 18 顯示具有 PEG 屏蔽方法之 TLR7 促效劑之 TLR7 活性。

表 18 – 具有 PEG 屏蔽之 TLR-促效劑之活性

化合物	**EC_{50} (nM)**
AXC-913	29.6
AXC-923	434
AXC-924	398
AXC-925	1591
AXC-926	824

【0846】 圖 3A-圖 3B 及表 19 顯示在用於 PEG 屏蔽方法之直鏈或具支鏈 PEG 存在下 TLR7 促效劑藥物-連接體之 TLR7 活性。使用具有 PEG 屏蔽之 AXC-913 酬載(由化合物 AXC-939 (PEG4)、AXC-937 (PEG8)、AXC-940 (PEG12)及 AXC-936 (PEG48)表示)，證實在直鏈 PEG 屏蔽下之活性。類似地，具有具支鏈

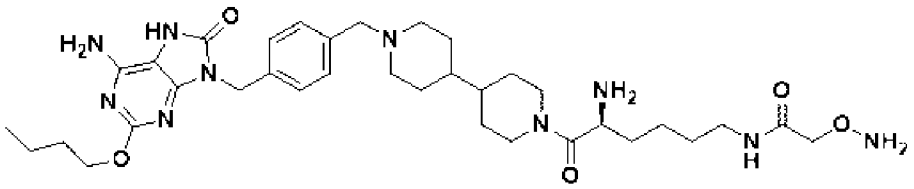
PEG 之 AXC-913 酬載(例如，$(PEG4)_3$、$(PEG8)_3$及$(PEG12)_3$，分別由 AXC-938、AXC-945 及 AXC-946 表示)顯示在 PEG 屏蔽下之活性 EC_{50}。

表 19 – 具有 PEG 屏蔽之例示性 TLR 促效劑藥物-連接體之活性

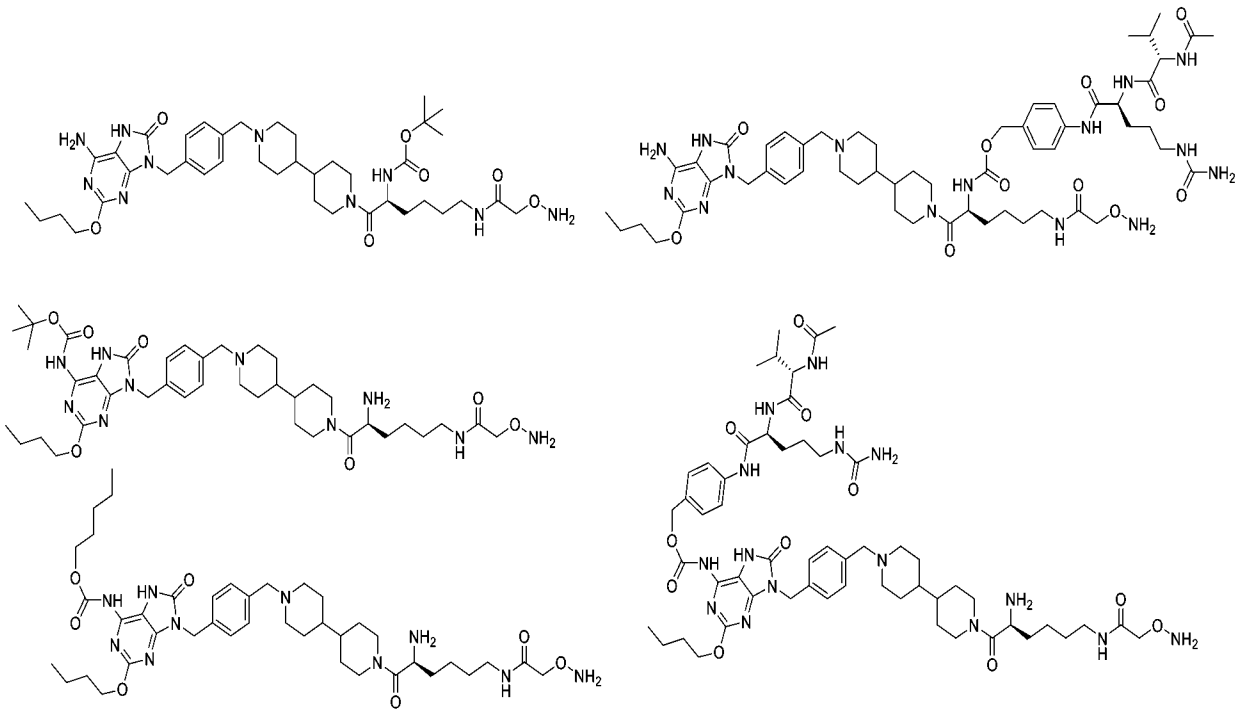
化合物	EC_{50} (nM)	化合物	EC_{50} (nM)	化合物	EC_{50} (nM)
AXC-931	490	AXC-946	1408	AXC-962	452.6
AXC-932	156	AXC-947	337	AXC-963	19.4
AXC-933	40	AXC-949	760	AXC-964	10.3
AXC-934	10.3	AXC-950	443	AXC-965	48.3
AXC-935	40	AXC-951	842	AXC-966	65.5
AXC-936	764	AXC-952	1023	AXC-978	28.9
AXC-937	456	AXC-953	200.9	AXC-979	21.7
AXC-938	644	AXC-954	111.3	AXC-980	29.6
AXC-939	303	AXC-955	172.8	AXC-981	10.1
AXC-940	644	AXC-956	157.9	AXC-982	19.1
AXC-941	699	AXC-958	39.6	AXC-983	53.3
AXC-942	387	AXC-959	550.7	DSR-6434	14
AXC-943	410	AXC-960	266.8	AXC-863	320
AXC-945	232	AXC-961	856.1		

【0847】 前藥-用於改良或增強本發明之 TLR-促效劑之藥物動力學活性的另一方法涉及在 PEG 屏蔽缺失或存在下之蛋白水解可裂解連接體設計。

AXC-914

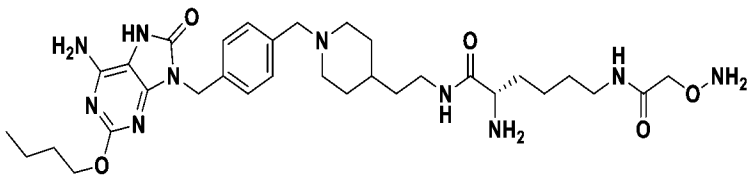


使用例示性 AXC-914 以及 Boc 及 Val-Cit-PABA 基團進行的具有蛋白水解可裂解基團之藥物連接體/酬載連接體設計的實例。Boc 及 Val-Cit-PABA 基團可用熟習此項技術者已知及本文所揭示之任一其他蛋白水解可裂解基團替換。

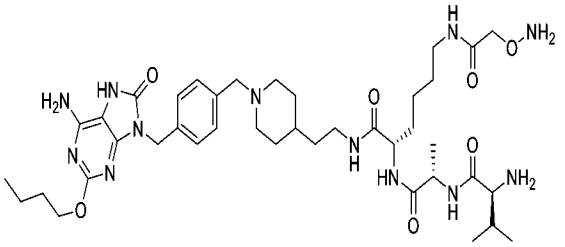


【0848】 在 PEG24 存在及缺失下使用例示性 AXC-913 及可裂解基團 Val-Ala 或 Val-Ala-PABA 基團進行的具有蛋白水解可裂解基團之藥物連接體/酬載連接體設計的實例。應注意，任何蛋白水解可裂解之基團皆可與 PEG 屏蔽一起使用。在 PEG 屏蔽存在或缺失下，使用蛋白水解可裂解基團設計之 TC 之其他實例如表 4 所示。

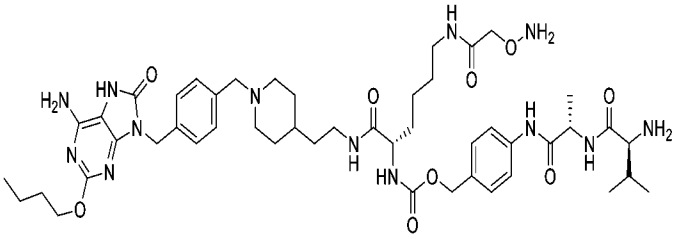
AXC-913



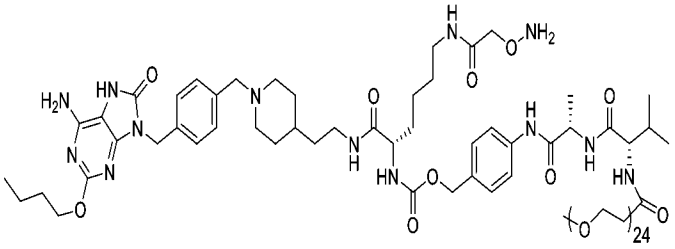
在 PEG24 存在及缺失下的代表性例示性 AXC-913 及可裂解基團 Val-Ala 或 Val-Ala-PABA 基團。



Val-Ala-AXC-913



Val-Ala-PAB-AXC-913



PEG24-Val-Ala-AXC-913

實例 12：具有 PEG 屏蔽連接體之 HER2 ISAC 之活性

【0849】　圖 4 顯示用於 HER2 ISAC 之 SKBR3-RAWBlue 共培養體外分析。圖 4 顯示 HER2-AXC879、HER2-AXC863 與 HER2-對照 TLR7 促效劑偶聯物之腫瘤依賴性 ISAC 活性。資料表明，就 HER2 陽性腫瘤特異性巨噬細胞報告細胞活化而言，HER2-AXC879 係更強效之 ISAC。

【0850】　亦確定 Fc 區對 HER2 ISAC 活性之作用。圖 5 顯示 Fc 修飾對 ISAC 活性之影響。與具有野生型 IgG1 Fc 區之 HER2 ISAC 相比，ADCC 增強形式(ADE 突變，表 9A)未顯示出改良之效力，而 Fc 無效突變(PVA 突變，表 9A)顯示出顯著降低之效力。

【0851】　亦確定偶聯位點對 HER2 ISAC 活性之作用。圖 6 顯示不同偶聯位點對 ISAC 活性之影響。在所有測試之偶聯位點中，重鏈 A114 (Kabat 編號，實際編號 A121)顯示出最高的靶標特異性 ISAC 活性。

【0852】　使用 RAWBlue 共培養體外分析測試具有 PEG 屏蔽性 TLR7 促效劑酬載之各種 HER2 ISAC 在 SKBR3 及 HCC1806 細胞株中之活性。圖 7-圖 9 及表 20A-表 20D 顯示具有 PEG 屏蔽性 TLR7 促效劑酬載之 HER2 ISAC 之 HER2 依賴性活性。與 AXC-879 相比，一些 PEG 屏蔽性 TLR7 促效劑在高濃度下展示出降

低之非特異性活性。圖 7A-圖 7B 分別顯示在 RAW-Blue 共培養分析中在 PEG 屏蔽缺失及存在下 AXC-879 衍生物之體外活性。圖 7C 顯示具有支鏈修飾之 AXC-879 衍生物之體外活性。圖 8A-圖 8C 及圖 9A-圖 9B 顯示具有 PEG 屏蔽之各種 HER2 ISAC 之體外活性。表 20A-表 20C 顯示具有 PEG 屏蔽之各種 HER2 ISAC 之活性。

【0853】 圖 9A-圖 9B 顯示具有 D-Lys 嵌段或 L-Lys 嵌段之 AXC-879 衍生物之體外活性之比較及表 20D。

表 20A – 具有 PEG 屏蔽之各種 HER2 TLR 促效劑酬載之活性

	HER2-913	HER2-924	HER2-947	HER2-949
Pos Top	2.00	3.33	3.08	3.62
EC50	1.21	0.72	0.69	0.71
Max/EC50	1.65	4.64	4.48	5.13
陰性，在 100 nM 下	2.18	1.72	1.90	1.70
陽性/陰性	0.92	1.94	1.62	2.13

表 20B – 具有 PEG 屏蔽之各種 HER2 TLR 促效劑酬載之活性

	HER2-913	HER2-924	HER2-936	HER2-937	HER2-938	HER2-939	HER2-940	HER2-941	HER2-879	HER2-945
Pos Top	2.00	3.33	3.19	2.68	3.48	3.09	3.30	3.39	4.88	3.71
EC50	1.21	0.72	0.67	0.77	0.71	0.56	0.67	0.89	0.44	0.83
Max/EC50	1.65	4.64	4.75	3.48	4.87	5.50	4.95	3.82	11.09	4.44
陰性，在 100 nM 下	2.18	1.72	1.52	1.33	1.38	1.90	1.63	1.61	2.53	1.28
陽性/陰性	0.92	1.94	2.10	2.02	2.52	1.63	2.02	2.11	1.93	2.90
PEG	0	24	48	8	4×3	4	12	37	0	8×3

表 20C – 具有 PEG 屏蔽之各種 HER2 TLR 促效劑酬載之活性

最大 100 nM	4PL		a-(PEG12)3	e-PEG8	e-PEG37	e-(PEG8)3
		HER2-879	HER2-946	HER2-950	HER2-951	HER2-952
SK-BR-3	Top	**3.92**	**3.84**	**3.74**	**3.85**	**3.86**
	EC50	0.1883	0.2517	0.2358	0.2546	0.2822
	經平方之 R	0.9896	0.9919	0.9726	0.9974	0.9892
	TOP/EC50	20.83	15.24	15.84	15.12	13.66

表 20D – 具有 PEG 屏蔽之各種 HER2 TLR 促效劑酬載之活性

	D-Lys 0 個 PEG	**D-Lys 24 個 PEG**	**D-Lys 8×3 個 PEG**	**D-Lys 8 個 PEG**	**L-Lys 0 個 PEG**	**L-Lys a-24 個 PEG**	**L-Lys a-8 個 PEG**	**L-Lys a-8×3 個 PEG**	
SK-BR-3	HER2-958	HER2-959	HER2-961	HER2-962	HER2-913	HER2-924	HER2-937	HER2-945	HER2-879

EC50	0.5973	0.2456	0.2532	0.2525	0.6486	0.2974	0.3923	0.329	0.254
Top	5.281	8.221	8.315	7.666	5.135	7.299	6.111	7.612	7.278

實例 13：與腫瘤細胞及報告細胞之活體外共培養分析

【0854】 利用腫瘤細胞及報告細胞實施實例 10 中所述之額外體外共培養分析。資料提供於本實例中。

【0855】 亦使用與腫瘤細胞及人類 PBMC 之體外共培養分析。簡言之，自人類全血(購自 ALLCELLS)中分離出新鮮人類 PBMC。將於含有 4%低 IgG 血清之 RPMI-1640 培養基中之總共 250,000 個 PBMC 及 50,000 個靶細胞(E:T 比率為 5:1)接種至 96 孔板之每一孔中，且將不同濃度之小分子 TLR 7 促效劑及偶聯之 ISAC 添加至共培養細胞培養基中。在 24 h 或 48 h 孵育後，使用來自 MesoScale 之 U-PLEX 多重偵測系統確定不同細胞介素之水準。使用 CytoTox96Non-放射性細胞毒性分析套組(Promega)，藉由 LDH 水準量測腫瘤細胞殺傷。對於樹枝狀細胞成熟，將 1×10^6 個 PBMC 及 1×10^5 個靶細胞與 10 nM HER2 mAb、HER2-ISAC 或同型對照-ISAC 一起孵育 24 h 或 48 h。收集細胞且將其與樹突狀細胞標記物(HLA-DR、DC-SIGN/CD209 及 CD86 抗體)一起孵育，以供進行流式細胞術。使用 Prism 軟體生成劑量-反應曲線。資料提供於本實例中。

【0856】 圖 10 顯示 HER2-AXC879 與未偶聯之 HER2 mAb 及 AXC-879 同型對照相比，在 HER2 高腫瘤細胞株 SKBR3 中具有增強之 ADCC 介導之腫瘤殺傷。在 HER2 低腫瘤細胞株 HCC1806 中，HER2-AXC879 展示出很少之腫瘤細胞殺傷。

【0857】 圖 11-圖 12 顯示當與 HER2 高腫瘤細胞株 SKBR3 共培養時，與未偶聯之 HER2 mAb 相比，HER2-AXC879 誘導人類 PBMC 上更高之 HLA-DR、CD86 及 CD209 表現水準。圖 11 顯示在 PBMC 共培養分析中在 HER2 mAb 與 HER2-AXC879 ISAC 之間就其對骨髓樣細胞上之 HLA-DR 標記物之誘導的比較。圖 12 (圖 A-圖 D)顯示在 PBMC 共培養分析中在 HER2 mAb 與 HER2-AXC879

ISAC 之間就其對 CD86/DC-SIGN+雙陽性細胞之誘導的比較。圖 12 之圖 A 表示無處理之 1.5% HLA-DR+/DC-SIGN+/CD86+細胞。圖 12 之圖 B 表示 HER2 mAb 18% HLA-DR+/DC-SIGN+/CD86+細胞。圖 12 之圖 C 表示 HER-AXC879 40.8% HLA-DR+/DC-SIGN+/CD86+細胞。圖 12 之圖 D 表示 PSMA-AXC879 同型對照 4.04% HLA-DR+/DC-SIGN+/CD86+細胞。資料證實 HER2-ISAC 促進人類 PBMC 中之骨髓細胞成熟及活化。

【0858】 圖 13A-圖 13C 顯示各種 HER2 ISAC 相對於未偶聯之 HER2 mAb 增強之 HER2 依賴性腫瘤細胞殺傷活性，且在 PBMC 共培養分析中比較其與 HER2-AXC879 之靶依賴性細胞毒性。在 HER2 高表現之細胞株(圖 13A)及 HER2 低表現之細胞株(圖 13B)中測試的所有偶聯物中，HER2-AXC879 係活性最高之 ISAC。在 HER2 陰性細胞株 MDA-MB-468 (圖 13C)中，所有 HER2 ISAC 皆未顯示出特異性之腫瘤細胞殺傷活性。

【0859】 圖 14A 及圖 14B 顯示在與 HER2 高表現之細胞株 NCI-N87 (圖 14A)及 HER2 陰性細胞株 MDA-MB-468 (圖 14B)之人類 PBMC 共培養分析中之 HER2 依賴性細胞介素誘導。

【0860】 圖 15-圖 17 顯示在與 HER2 高表現之細胞株 SKBR3、HER2 低細胞株 HCC1806、HER2 陰性細胞株 MDA-MB-468 之人類 PBMC 共培養分析及單獨的人類 PBMC 中之額外 HER2 依賴性細胞介素誘導。量測兩種不同促炎細胞介素(TNFα 及 IFNγ)。HER2-AXC879 在所測試之所有 HER2 ISAC 中皆顯示最高效力。與 HER2-AXC879 相比，HER2-AXC966 在 HER2 高 SKBR3 細胞株中顯示出類似的細胞介素誘導活性，但在 HER2 低 HCC1806 細胞株中顯示出顯著更低之細胞介素誘導活性。所有 HER2 ISAC 在 HER2 陰性 MDA-MB-468 細胞株及單獨之人類 PBMC 中皆未誘導可量測之細胞介素。圖 15A 顯示 HER2 ISAC 在 HER2 高 SKBR3/PBMC 共培養中對 IFNγ 細胞介素之誘導。圖 15B 顯示 HER2

ISAC 在 HER2 低 HCC1806/PBMC 共培養分析中對 IFNγ 細胞介素之誘導。圖 15C 顯示 HER2 ISAC 在 HER2 高 SKBR3/PBMC 共培養分析中對 TNFα 細胞介素之誘導。圖 15D 顯示 HER2 ISAC 在 HER2 低 HCC1806/PBMC 共培養分析中對 TNFα 細胞介素之誘導。圖 16A 顯示具有前藥設計之 HER2 ISAC 在 HER2 高 SKBR3/PBMC 共培養分析中對 IFNγ 細胞介素之誘導。圖 16B 顯示具有前藥設計之 HER2 ISAC 在 HER2 低 HCC1806/PBMC 共培養分析中對 IFNγ 細胞介素之誘導。圖 16C 顯示具有前藥設計之 HER2 ISAC 在 HER2 陰性 MDA-MB-468/PBMC 共培養分析中對 IFNγ 細胞介素之誘導。圖 16D 顯示在僅 PBMC 中具有前藥設計之 HER2 ISAC 對 IFNγ 細胞介素之誘導。圖 17A 顯示具有前藥設計之 HER2 ISAC 在 HER2 高 SKBR3/PBMC 共培養分析中對 TNFα 細胞介素之誘導。圖 17B 顯示具有前藥設計之 HER2 ISAC 在 HER2 低 HCC1806/PBMC 共培養分析中對 TNFα 細胞介素之誘導。圖 17C 顯示具有前藥設計之 HER2 ISAC 在 HER2 陰性 MDA-MB-468/PBMC 共培養分析中對 TNFα 細胞介素之誘導。圖 17D 顯示在僅 PBMC 中具有前藥設計之 HER2 ISAC 對 TNFα 細胞介素之誘導。

【0861】 為了測試本發明之 ISAC 平臺適用於其他靶標，對靶向不同腫瘤抗原之其他抗體進行 RAWBlue 共培養體外分析。圖 18A-圖 18C 使用 HCC1806 細胞(用於 TROP2 ISAC) (圖 18A)、C4-2 細胞(用於 PSMA) (圖 18B)及 786-O-細胞(用於 CD70) (圖 18C)顯示例示性 ISAC (AXC879)之作用。TROP2-AXC879、PSMA-AXC879 及 CD70-AXC879 與其未偶聯抗體相比，皆顯示出靶標依賴性 ISAC 活性。資料表明，本發明之 ISAC 平臺可用於其他腫瘤靶標。

【0862】 測試不同細胞株上之 TROP2 表現水準。圖 19A 顯示不同腫瘤細胞株上之 TROP2 靶標表現水準。圖 19B 顯示 TROP2-AXC879 體外效力與不同腫瘤細胞株上之 TROP2 表現水準相關。資料表明 TROP2-AXC879 ISAC 活性取決於

TROP2 靶標表現水準。

【0863】 將額外 TROP2 TLR7 促效劑偶聯物之 ISAC 活性與 TROP2-AXC879 進行比較。使用 RAW-Blue 共培養分析在 TROP2 陽性 HCC1806 細胞株(圖 20A)及 TROP2 陰性 HCC1395 細胞株(圖 20B)中測試額外 TROP2 ISAC。使用本文中別處所述之 PBMC 共培養分析在 TROP2 陽性 SKBR3 細胞株(圖 21A)及 TROP2 陰性 HCC1395 細胞株(圖 21B)中實施額外研究。資料顯示所有測試之 ISAC 皆具有活性，其中 TROP2-AXC879 顯示出最大活性。與 HCC1395 細胞(圖 21B)相比，在 SKBR3 細胞(圖 21A)中，由 TROP2 ISAC 與 TROP2-AXC879 對 TNFα 細胞介素之誘導更高。

【0864】 使用 PBMC 共培養分析，進一步評估 TROP2-AXC879 與未偶聯之 TROP2 mAb 及 AXC-879 同型對照(PSMA-AXC879)相比在 TROP2 陽性 BxPC-3 細胞株中之 ADCC 效應(圖 22A)以及在 TROP2 陰性 HCC1395 細胞株中之殺傷%(圖 22B)。資料顯示，TROP2-AXC879 與未偶聯之 TROP2 抗體相比，在 TROP2 陽性 BxPC-3 細胞中展示出增強之 ADCC 介導之腫瘤殺傷，且在 TROP2 陰性 HCC1395 細胞中未顯示出腫瘤細胞殺傷。

表 21. 具有用於非天然胺基酸併入之琥珀位點之抗 TROP2、抗 PSAMA 及抗 CD70 重鏈(HC)及輕鏈(LC)胺基酸序列。亦揭示了下表中之所有序列，其中 pAF 由任一其他非天然胺基酸置換。

SEQ ID NO.	說明	序列
19	TROP2 重鏈 1 (HC1)野生型(WT)	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTNYGMNWVQQAP GKGLEWMGWINTYTGEPTYTEKFQGRVTITADTSTTTAYMEL SSLRSEDTAVYYCARGGFGSSYWYFDVWGQGTMVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO.	說明	序列
20	TROP2 輕鏈 3 (LC3) WT	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQDVSIALAWYQQKPGQP PKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYY CQQHYITPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
21	TROP2 重鏈 1 (HC1) A114	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTNYGMNWVQQAP GKGLEWMGWINTYTGEPTYTEKFQGRVTITADTSTTTAYMEL SSLRSEDTAVYYCARGGFGSSYWYFDVWGQGTMVTVSSXST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
22	PSMA 重鏈 WT	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVRQAPG QRLEWMGNINPNNGGTTYNQKFEDRVTITRDTSASTAYMELS SLRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
23	PSMA 輕鏈 WT	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCKASQDVGTAVDWYQQKPGK APKLLIYWASTRHTGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATY YCQQYNSYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
24	PSMA 重鏈 A114	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVRQAPG QRLEWMGNINPNNGGTTYNQKFEDRVTITRDTSASTAYMELS SLRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGQGTTLTVSSXSTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
25	CD70 重鏈 WT	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYYMNWVQQAP GKGLEWMGIINPYNGGTHYNQKFKGRVTITADTSTDTAYMEL SSLRSEDTAVYYCATSGYDLYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY

SEQ ID NO.	說明	序列
		NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
26	CD70 輕鏈 WT	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQNVGTAVAWYQQKPGQ APRLLIYSAFNRYNGIPARFSGSGPGTDFTLTISSLQSEDFAVYY CQQYSTYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
27	CD70 重鏈 A114	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYYMNWVQQAP GKGLEWMGIINPYNGGTHYNQKFKGRVTITADTSTDTAYMEL SSLRSEDTAVYYCATSGYDLYFDYWGQGTLVTVSS**X**STKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

X 表示非天然胺基酸(nnAA)

【0865】 用於本發明中之抗 TROP2 單株抗體包括 SEQ ID NO: 19 或 SEQ ID NO: 21 之重鏈及 SEQ ID NO: 20 之輕鏈序列。用於本發明中之抗 PSMA 單株抗體包括 SEQ ID NO: 22 或 SEQ ID NO: 24 之重鏈及 SEQ ID NO: 23 之輕鏈序列。用於本發明中之抗 CD70 單株抗體包括 SEQ ID NO: 25 或 SEQ ID NO: 27 之重鏈及 SEQ ID NO: 26 之輕鏈序列。

實例 14：HER2-AXC879 之 PK 研究

【0866】 將 10 隻雌性 C57BL/6J 將小鼠分為四組，且用單一劑量(靜脈內)之 HER2-AXC879 以兩個劑量水準(1 mg/kg 及 5 mg/kg)處理，以評價其藥物動力學。在實驗開始時，將使動物在給藥前放血，接著在注射後之指定時間點放血。於以下時間點自每一小鼠尾部獲取全血樣品：2 h、6 h、24 h、48 h、72 h、4 d、7 d、10 d、14 d、21 d 及 28 d。將血液樣品以 1:10 稀釋至酪蛋白封閉緩衝液中並儲存。接著使用為量測稀釋血液樣品中之總抗體而開發的 PK 分析來評價所有

樣品。如圖 23 中所示，在 28 天時可偵測到 1 mg/kg 組及 5 mg/kg 組二者。C 最大水準自 1 mg/kg 至 5 mg/kg 大致可線性縮放。PK 資料指示 HER2-AXC879 之良好線性 PK 特徵。

實例 15：在 MC38-hHER2 結腸腫瘤同基因模型中對抗 HER2 TLR7 促效劑偶聯物之體內測試

【0867】 將藉由敲除小鼠 HER2 基因且使人類 HER2 基因在 MC38 細胞中過表現而遺傳修飾之 MC38-hHER2 細胞在 DMEM+ 10% FBS 中培養至少 2 週。在右前側腹對 C57BL/6 小鼠皮下注射含 1×10^6 個 MC38-hHER2 細胞之 0.1 ml PBS。當平均腫瘤大小達到大約 200-250 mm^3 時，將荷瘤小鼠隨機分選為 7 組。每週一次靜脈內(IV)投與所有療法，持續 4 週。每週兩次藉由卡尺量測及體重監測動物之腫瘤生長。

【0868】 如圖 24A-圖 24C 及圖 25 中所示，將群組平均腫瘤體積對時間作圖。在圖 24A 中，對照之腫瘤體積隨時間連續增加，而三個具有不同 TLR7 促效劑酬載之治療組(每週一次，以 3 mg/kg 給藥，持續 4 週)展示出不同程度之腫瘤生長抑制。在三種不同的 HER2-TLR7 促效劑偶聯物中，與其他組(諸如 HER2-AXC863) (圖 24B)相比，HER2-AXC879 顯示出最強效之抗腫瘤活性(圖 24C)。在 HER2-AXC879 組中，10 隻小鼠中之 10 隻在以 3 mg/kg 劑量治療後顯示出完全的腫瘤消退反應。

【0869】 在圖 25 中，評價了抗 PD1 抗體與 HER2-AXC879 之間之協同作用。抗小鼠 PD-1 抗體係以 1 mg/kg 給藥，每週一次，持續 4 週，且 HER2-AXC879 係以 0.3 mg/kg 給藥，每週一次，持續 4 週。兩種藥物係單獨及組合給藥。組合組與每一單一治療組相比，顯示出更佳的腫瘤生長抑制作用，且差異在統計學上顯著(p 值<0.05)。該資料說明 HER2-AXC879 可與抗 PD-1 抗體組合用於治療癌症，且與單獨之抗 PD-1 抗體治療相比，可潛在地產生更佳功效。

【0870】 為了進一步比較 HER2-AXC879 與 HER2-AXC863 之間之差異，在每一劑量注射後量測總 HER2 抗體之血清濃度。(圖 26A 及 26B)資料顯示，HER2-AXC879 可在每一治療週期中維持高藥物暴露及一致血清濃度，而 HER2-AXC863 不能在第二及第三治療週期中維持相同的暴露水準。此指示 HER2-AXC879 與 HER2-AXC863 相比具有更有利之 PK 特徵。

【0871】 為了進一步研究 HER2-AXC879 之劑量-功效關係且比較 HER2-AXC879 與其他 HER2 ISAC，在右前側腹對 C57BL/6 小鼠皮下注射含 1×10^6 個 MC38-hHER2 細胞之 0.1 ml PBS。當平均腫瘤大小達到大約 200-250 mm^3 時，將荷瘤小鼠將隨機分選為不同組。每週一次靜脈內(IV)投與所有療法，持續 4 週。每週兩次藉由卡尺量測及體重監測動物之腫瘤生長。

【0872】 如圖 27 及圖 28 中所示，將群組平均腫瘤體積對時間作圖。在圖 27 中，不同劑量之 HER2-AXC879 顯示出不同水準之腫瘤生長抑制。在 1 mg/kg 及以上劑量下，在大多數小鼠中觀察到顯著的腫瘤生長抑制及腫瘤消退，其中 3 mg/kg 劑量表現出最高水準的腫瘤消退。本實驗顯示，HER2-AXC879 之抗腫瘤功效與劑量水準及 HER2 受體佔用性相關。圖 28 顯示對照組及 HER2-AXC966 之腫瘤體積隨時間連續增加，而三個具有不同 TLR7 促效劑酬載之治療組(HER2-AXC955、HER2-AXC879 及 HER2-AXC979)展示不同程度之腫瘤生長抑制。在三種不同的 HER2-TLR7 促效劑偶聯物中，HER2-AXC955 顯示出最強效之抗腫瘤活性。

實例 16：MC38-hHER2 及 MC38 親代腫瘤對經 ISAC 治療小鼠之再攻擊

【0873】 為了確定 HER2 ISAC 治療是否誘導抗腫瘤免疫記憶及針對相同或類似腫瘤之長期保護，將先前用 HER2 ISAC 治療且顯示完全腫瘤消退之小鼠分組，且在最後一次投與藥物後 28 天，於左前側腹用 MC38-hHER2 (1×10^6 個細胞)或 MC38 親代腫瘤(5×10^5 個細胞)再攻擊。作為對照，對未接受任何先前治療之

幼稚小鼠接種相同量之腫瘤細胞。

【0874】 就平均腫瘤體積而言之腫瘤生長曲線示於圖 29A 及圖 29B 中。MC38-hHER2 及 MC38 在先前治療之小鼠中未能生長，腫瘤完全消退，而在對照幼稚小鼠中快速生長。該資料表明，HER2 ISAC 治療在小鼠中產生了長期的 MC38-hHER2 及 MC38 特異性抗腫瘤免疫反應。

實例 17：在 JIMT-1 乳房腫瘤異種移植物模型中對抗 Trop2 TLR7 促效劑偶聯物之體內測試

【0875】 將 JIMT-1 細胞在植入前在 RPMI + 10% FBS 中培養至少 2 週。將新鮮收穫之細胞懸浮於 PBS 中且以 1:1 與 Matrigel 混合。在右側腹中對 70 隻雌性 NSG 小鼠皮下植入於 0.1 ml 細胞懸液中之 5×10^6 個細胞/隻小鼠。當腫瘤達到約 180 mm^3 時，對於每一對照組及不同治療劑量組中之每一者(TROP2-HA114-AXC879 為 10 mg/kg、3 mg/kg 及 1 mg/kg，且作為同型對照之 RSV-HA114-AXC879 為 10 mg/kg)，將小鼠分選為 5 組，每組 10 隻動物。每週一次靜脈內(IV)投與所有療法，持續 4 週。每週兩次藉由卡尺量測及體重監測動物之腫瘤生長。

【0876】 如圖 30A 中所示，將群組平均腫瘤體積對時間作圖。對照組(第 1 組)及同型對照組(第 2 組)之腫瘤體積顯示出類似腫瘤生長。TROP2-AXC879 (第 3 組，1 mpk)及 TROP2-AXC879 (第 4 組，3 mpk)顯示出輕微活性，TGI 分別為 25% 及 26%。10 mpk 之 TROP2-AXC879 (第 5 組)相對於對照顯示出 59%之 TGI。此證實 TROP2 TLR7 促效劑偶聯物即使在免疫缺陷 NSG 小鼠中亦具有顯著的腫瘤生長抑制活性。每週監測動物體重兩次，且將其相對於時間繪製於圖 30B 中。當用每週以至多 10 mg/kg 給藥之 TROP2-AXC879 治療時，對照組及治療組之體重在該模型中未顯示出任何可觀測到之毒性。此表明 TROP2-AXC879 在 NSG 小鼠模型中耐受良好。

實例 18：乳癌之治療

【0877】 曲妥珠單抗連接之 TLR-促效劑衍生物用於乳癌療法之安全性及/或功效之人類臨床試驗

【0878】 目的：比較所投與包含曲妥珠單抗連接之 TLR-促效劑衍生物之組成物之安全性及藥物動力學。

【0879】 研究設計：本研究將為乳癌患者之 I 期、單中心、開放標籤之隨機化劑量遞增研究，接著係 II 期研究。在進入研究之前，患者不應暴露於曲妥珠單抗連接之 TLR-促效劑衍生物。患者必須在試驗開始後 2 週內不接受針對其癌症之治療。治療包括使用化學療法、造血生長因子及生物療法，諸如單株抗體。患者必須已自與先前治療相關之所有毒性中恢復(至 0 級或 1 級)。評價所有個體之安全性，且按計劃收集所有用於藥物動力學分析之血液收集物。所有研究皆在機構倫理委員會批準及患者同意下實施。

【0880】 I 期：患者在每個 28 天週期之第 1 天、第 8 天及第 15 天靜脈接受曲妥珠單抗連接之 TLR-促效劑衍生物。曲妥珠單抗連接之 TLR-促效劑衍生物之劑量可基於如下文所概述之評估針對毒性加以保持或修改。在不存在不可接受之毒性之情況下，每 28 天重複治療。3-6 名患者之同類群組(Cohort)接收遞增劑量之曲妥珠單抗連接之 TLR-促效劑衍生物，直至確定曲妥珠單抗連接之 TLR-促效劑衍生物之最大耐受劑量(MTD)。MTD 定義為 3 名患者中之 2 名或 6 名患者中之 2 名經歷劑量限制性毒性之前之劑量。劑量限制性毒性係根據國家癌症研究所(National Cancer Institute) (NCI)不良事件常用術語(Common Terminology for Adverse Events) (CTCAE) 3.0 版(2006 年 8 月 9 日)設定之定義及標準來確定。

【0881】 II 期：患者如 I 期中以在 I 期中確定之 MTD 接受曲妥珠單抗連接之 TLR-促效劑衍生物。在不存在疾病進展或不可接受之毒性之情況下，每 4 週重複治療，持續 2-6 個療程。在完成研究療法之 2 個療程後，達到完全或部分反應

之患者可接受額外 4 個療程。在完成研究療法之 6 個療程之後，病情維持穩定超過 2 個月之患者，只要其符合最初之合格性準則，在疾病進展時可接受額外 6 個療程。

【0882】 血液採樣：在投與曲妥珠單抗連接之 TLR-促效劑衍生物之前及之後，藉由直接靜脈穿刺抽取系列血液。在給藥前約 10 分鐘以及在給藥後大約以下時間獲得用於確定血清濃度之靜脈血液樣品(5 mL)：第 1 天、第 8 天及第 15 天。將每一血清樣品分成兩份等分試樣。所有血清樣品皆儲存在-20°C下。在乾冰上運輸血清樣品。

【0883】 藥物動力學：患者在開始治療前及在第 1 天、第 8 天及第 15 天收集血漿/血清樣品用於藥物動力學評價。在 Digital Equipment Corporation VAX 8600 電腦系統上，使用最新版本之 BIOAVL 軟體，藉由與模型無關之方法計算藥物動力學參數。確定以下藥物動力學參數：峰值血清濃度($C_{最大}$)；達到峰值血清濃度之時間($t_{最大}$)；使用線性梯形法則計算的自時間零至最後一次血液採樣時間(AUC_{0-72})之濃度-時間曲線下面積(AUC)；及自消除速率常數計算之終末消除半衰期($t_{1/2}$)。藉由對數-線性濃度-時間圖之終末線性區域中連續資料點之線性回歸來估計消除速率常數。計算每一治療之藥物動力學參數之平均值、標準差(SD)及變異係數(CV)。計算參數平均值之比率(經防腐處理之調配物/未經防腐處理之調配物)。

【0884】 對組合治療之患者反應：經由用 X 射線、CT 掃描及 MRI 成像來評估患者反應，且在開始研究前及第一週期結束時實施成像，每四週或在後續週期結束時實施一次額外成像。基於癌症類型及可行性/可用性來選擇成像方式，且將相同成像模式用於類似之癌症類型以及每一患者之整個研究過程中。使用 RECIST 準則確定反應率。(Therasse 等人，J. Natl. Cancer Inst. 2000 年 2 月 2 日；92(3):205-16; http://ctep.cancer.gov/forms/TherasseRECISTJNCI.pdf)。患者亦經受

癌症/腫瘤生檢，以藉由流式細胞術、西方墨點法(Western blotting)及 IHC 評估祖癌細胞表型及純系形成性生長之變化，且藉由 FISH 評估細胞遺傳學之變化。在完成研究治療後，定期隨訪患者，持續 4 週。

實例 19：乳癌之治療

【0885】　曲妥珠單抗連接之 TLR-促效劑衍生物用於乳癌療法之安全性及功效之人類臨床試驗

【0886】　目的：比較單獨的曲妥珠單抗連接之 TLR-促效劑衍生物、接著在疾病進展時投與曲妥珠單抗與太平洋紫杉醇之組合相對於曲妥珠單抗與太平洋紫杉醇之一線組合在過表現 HER2 之轉移性乳癌之女性中的功效及毒性。

【0887】　研究設計：本研究係隨機化之多中心研究。根據 HER2/neu 過表達程度(2+相對於 3+)、先前含蒽環類抗生素之輔助治療(無先前治療相對於無針對左胸壁之放射療法之先前治療相對於有針對左胸壁之放射療法之先前治療)、雌激素受體狀態(陽性相對於陰性相對於未知)、先前療法(一線相對於二線/三線)及中心對患者分層。將患者隨機分配至兩個治療臂(arm)中之一者。臂 I：患者每週經 30-90 分鐘接受靜脈內曲妥珠單抗連接之 TLR-促效劑衍生物。在疾病進展時，患者如臂 II 中接受靜脈內曲妥珠單抗連接之 TLR-促效劑衍生物與靜脈內太平洋紫杉醇之組合。臂 II：患者每週經 30-90 分鐘接受靜脈內曲妥珠單抗連接之 TLR-促效劑衍生物。每週經 1 小時靜脈內投與太平洋紫杉醇，持續 3 週，接著休息 1 週。

【0888】　兩個臂在無疾病進展或不可接受之毒性之情況下皆繼續治療。在基線及第 2 療程、第 3 療程、第 4 療程、第 5 療程、第 6 療程、第 8 療程、第 10 療程及第 12 療程之第 1 天評估生活品質。在第 1 個月、第 3 個月及第 6 個月對患者進行隨訪，接著每 6 個月隨訪一次。

實例 20：膀胱癌之治療

【0889】　目的：確定太平洋紫杉醇及放射療法在有或無本文所述 TLR-促效劑衍生物之情況下，在已經受過用於膀胱肌肉侵入性移行細胞癌之先前經尿道膀胱切除之患者中的急性毒性。

【0890】　疾病特徵：組織學或細胞學確認為膀胱原發性移行細胞癌(TCC)；固有肌層侵入之組織學證據；符合以下分期準則中之一者：分期 T2-4a；分期 NX、分期 N0 或分期 N1；及 M0 疾病或臨床分期 T1，等級 3/3 疾病且需要限定之局部療法；若符合以下準則，則判定腫瘤累及尿道前列腺部：腫瘤明顯完全切除；無前列腺間質侵入之證據，胸部 x 射線或 CT 掃描及腹部/骨盆 CT 掃描無遠端轉移之證據；在過去 3-8 週內已經受過經尿道膀胱切除(據安全判斷為儘可能徹底)，包括採用腫瘤標測之雙手檢查；有足夠的腫瘤組織可用於 HER2/neu 分析；並非根治性膀胱切除術之候選者。

【0891】　研究設計：本研究係非隨機化之多中心研究。根據 HER2/neu 狀態(HER2/neu 2+或 3+染色[第 1 組]相對於 HER2/neu 0 或 1+染色[第 2 組])將患者分配給兩個治療組中之一者。

【0892】　第 1 組：患者在第 1 天、第 8 天、第 15 天、第 22 天、第 29 天、第 36 天及第 43 天經 1 小時靜脈內接受太平洋紫杉醇，且在第 1 天經由靜脈內經 90 分鐘且接著在第 8 天、第 15 天、第 22 天、第 29 天、第 36 天及第 43 天經 30 分鐘接受本文所述曲妥珠單抗連接之 TLR-促效劑衍生物。患者亦在第 1-5 天、第 8-12 天、第 15-19 天、第 22-26 天、第 29-33 天、第 36-40 天、第 43-47 天及第 50 天經受每天一次之放射療法。在無疾病進展或不可接受之毒性之情況下繼續治療。

【0893】　第 2 組：患者如第 1 組中接受太平洋紫杉醇且經受放射療法。在完成研究治療後，於以下時間隨訪患者：4-5 週；每 3 個月一次，持續 1 年；每 4 個月一次，持續 1 年；每 6 個月一次，持續 3 年；接著之後每年一次。

實例 21：卵巢癌之治療

【0894】 本文所述曲妥珠單抗連接之 TLR-促效劑衍生物用於卵巢癌療法之安全性及功效之人類臨床試驗

【0895】 目的：評價包含本文所述曲妥珠單抗連接之 TLR-促效劑衍生物之組成物的為期 4 週每週一次靜脈內劑量在患有過表現 HER2 之卵巢癌之女性中之安全性特徵及功效。

【0896】 研究設計：本研究係非隨機化、開放標籤之 11 週多中心研究。本研究將評價曲妥珠單抗連接之 TLR-促效劑衍生物之四次每週一次之 IV 劑量之安全性特徵、MTD、PK 及免疫原性。將患者分配給單一組。患者每週一次接受一劑曲妥珠單抗連接之 TLR-促效劑衍生物，持續 4 週。曲妥珠單抗-連接之 TLR-促效劑衍生物將在研究第 1 天、第 8 天、第 15 天及第 22 天藉由靜脈內輸注投與。將在第 1 天及第 22 天獲取尿液樣品。

【0897】 血液採樣：在投與曲妥珠單抗連接之 TLR-促效劑衍生物之前及之後，藉由直接靜脈穿刺抽取系列血液。在給藥前約 10 分鐘以及在給藥後大約以下時間獲得用於確定血清濃度之靜脈血液樣品(5 mL)：第 1 天、第 2 天、第 4 天、第 5 天、第 8 天、第 15 天、第 22 天、第 36 天、第 43 天及第 50 天。將每一血清樣品分成兩份等分試樣。所有血清樣品皆儲存在-20°C下。在乾冰上運輸血清樣品。

【0898】 在無疾病進展或不可接受之毒性之情況下繼續治療。在基線及第 2 療程、第 3 療程、第 4 療程、第 5 療程、第 6 療程、第 8 療程、第 10 療程及第 12 療程之第 1 天評估生活品質。在第 29、36、43 及 50 天對患者進行隨訪。患者將被詢問不良事件。患者將進行成像掃描及 ECG 以評價腫瘤大小及心臟功能(第 43 天)。在研究終止時，患者將進行體格檢查(第 50 天)。具有疾病消退跡象之患者可接受繼續療法，直至記錄到疾病進展之跡象。

【0899】 應理解，本文所述實例及實施例僅出於舉例說明之目的，且鑒於其各種修改或變化應為熟習此項技術者所瞭解且欲包括在本申請案之精神及範圍內以及隨附申請專利範圍之範疇內。本申請中引用之所有出版物、專利、專利申請案及/或其他文件皆係出於所有目的皆全文以引用方式併入，併入程度如同每一個別出版物、專利、專利申請案及/或其他文件被個別指示為出於所有目的以引用方式併入一般。

【序列表】

<110> 美商AMBRX公司(AMBRX, INC.)

<120> 抗體-TLR促效劑偶聯物、其方法及用途

<130> AMBX-0234.00PCT

<150> 63/068,342
<151> 2020-08-20

<150> 63/118,365
<151> 2020-11-25

<160> 27

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 重鏈野生型

<400> 1

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

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

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

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

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

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

85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

```
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
    290                 295                 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305                 310                 315                 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
                325                 330                 335

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
        355                 360                 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
    370                 375                 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385                 390                 395                 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
                405                 410                 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
            420                 425                 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        435                 440                 445

Gly
```

<210> 2
<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 重鏈A114突變

<220>
<221> misc_feature
<222> (121)..(121)
<223> Xaa=非天然胺基酸(nnAA)

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Xaa Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly

<210> 3
<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 重鏈A136突變

<220>
<221> misc_feature
<222> (143)..(143)
<223> Xaa=非天然胺基酸(nnAA)

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
```

225 230 235 240

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly

<210> 4
<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 重鏈L159突變

<220>
<221> misc_feature
<222> (166)..(166)
<223> Xaa=非天然胺基酸(nnAA)

<400> 4

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly

<210> 5
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 輕鏈野生型

<400> 5

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
            20                  25                  30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
```

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 6
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 輕鏈V110突變

<220>
<221> misc_feature
<222> (110)..(110)
<223> Xaa=非天然胺基酸(nnAA)

<400> 6

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Xaa Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 7
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 輕鏈A112突變

<220>
<221> misc_feature
<222> (112)..(112)
<223> Xaa=非天然胺基酸(nnAA)

<400> 7

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala

20 25 30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Xaa
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 8
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 輕鏈S114突變

<220>
<221> misc_feature
<222> (114)..(114)
<223> Xaa=非天然胺基酸(nnAA)

<400> 8

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
            20                  25                  30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Xaa Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
```

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 9
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 輕鏈S121突變

<220>
<221> misc_feature
<222> (121)..(121)
<223> Xaa=非天然胺基酸(nnAA)

<400> 9

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

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

```
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Xaa Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 10
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 輕鏈S127突變

<220>
<221> misc_feature
<222> (127)..(127)
<223> Xaa=非天然胺基酸(nnAA)

<400> 10

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
            20                  25                  30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Xaa Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160
```

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 11
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 輕鏈K149突變

<220>
<221> misc_feature
<222> (149)..(149)
<223> Xaa=非天然胺基酸(nnAA)

<400> 11

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

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

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

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

65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Xaa Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 12
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 輕鏈S156突變

<220>
<221> misc_feature

<222> (156)..(156)
<223> Xaa=非天然胺基酸(nnAA)

<400> 12

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
            20                  25                  30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Xaa Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
```

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 13
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 輕鏈S168突變

<220>
<221> misc_feature
<222> (168)..(168)
<223> Xaa=非天然胺基酸(nnAA)

<400> 13

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

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

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

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

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

```
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Xaa Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 14
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 輕鏈S202突變

<220>
<221> misc_feature
<222> (202)..(202)
<223> Xaa=非天然胺基酸(nnAA)

<400> 14

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
```

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Xaa Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 15
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 輕鏈V205突變

<220>
<221> misc_feature
<222> (205)..(205)
<223> Xaa=非天然胺基酸(nnAA)

<400> 15

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Xaa Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 16
<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 輕鏈A114/ADE變異體

<220>
<221> misc_feature
<222> (121)..(121)
<223> Xaa=非天然胺基酸(nnAA)

<400> 16

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Xaa Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
        115                 120                 125

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

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

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

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

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

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

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Ala Gly
```

225 230 235 240

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu
325 330 335

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly

<210> 17
<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 輕鏈A114/G236A變異體

<220>
<221> misc_feature
<222> (121)..(121)
<223> Xaa=非天然胺基酸(nnAA)

<400> 17

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Xaa Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Ile
325 330 335

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly

<210> 18
<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 輕鏈A114/PVA變異體

<220>
<221> misc_feature
<222> (121)..(121)
<223> Xaa=非天然胺基酸(nnAA)

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Xaa Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
        115                 120                 125

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

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

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

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

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

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

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Gly
225                 230                 235                 240

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            260                 265                 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
        275                 280                 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
    290                 295                 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305                 310                 315                 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
                325                 330                 335

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
        355                 360                 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
```

370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly

<210> 19
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> Trop2重鏈1 (HC1) WT

<400> 19

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Thr Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

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

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly
450

<210> 20

<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> Trop2輕鏈3 (LC3) WT

<400> 20

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Asp Val Ser Ile Ala
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 21
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> Trop2重鏈1 (HC1) A114pAF (kabat編號，實際位置A121)

<220>
<221> misc_feature
<222> (122)..(122)
<223> Xaa=非天然胺基酸(nnAA)

<400> 21

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Xaa Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

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

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly
450

<210> 22
<211> 444
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PSMA重鏈WT

<400> 22

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

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

Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

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

Glu Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Ala Gly Trp Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
            100                 105                 110

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
    130                 135                 140

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

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

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

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

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

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225                 230                 235                 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
                245                 250                 255

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

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
        275                 280                 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
    290                 295                 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305                 310                 315                 320

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

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
            340                 345                 350

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
        355                 360                 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
```

370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

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

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

<210> 23
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PSMA1輕鏈WT

<400> 23

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 24
<211> 444
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PSMA重鏈A114pAF (kabat編號，實際位置A118)

<220>
<221> misc_feature
<222> (116)..(116)
<223> Xaa=非天然胺基酸(nnAA)

<400> 24

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

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

Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

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

Glu Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Ala Gly Trp Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
            100                 105                 110

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
    130                 135                 140

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

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

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

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
```

195 200 205

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

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255

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

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

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

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

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

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

<210> 25
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> CD70重鏈WT

<400> 25

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

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

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

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

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

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

Ala Thr Ser Gly Tyr Asp Leu Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

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

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 26
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> CD70輕鏈WT

<400> 26

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala

20 25 30

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

Tyr Ser Ala Phe Asn Arg Tyr Asn Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 27
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> CD70重鏈A114pAF (kabat編號，實際位置A119)

<220>
<221> misc_feature
<222> (119)..(119)
<223> Xaa=非天然胺基酸(nnAA)

<400> 27

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

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

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

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

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

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

Ala Thr Ser Gly Tyr Asp Leu Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Xaa Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

130 135 140

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

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

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

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

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

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

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

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

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

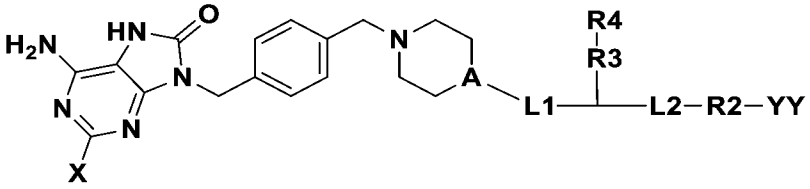
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

【發明申請專利範圍】

【請求項 1】　一種式(I)化合物，



(I)

或其醫藥學上可接受之鹽、溶劑合物、立體異構物或互變異構物，其中

A 係 CH 或 N；

X 係 O-R1、NH-R1、S-R1 或 H；

YY 係-ONH_2、-N_3、-OH、馬來醯亞胺、-COOH 或-$C(=O)CH_2Y1$，其中 Y1 係鹵化物；

L1 及 L2 中之每一者皆獨立地為$(CH_2)_m$、$(CH_2)_mC(=O)$、$(CH_2)_m$-$NH(CH_2)_n$、$(CH_2)_m$-$C(=O)NH(CH_2)_n$、$(CH_2)_m$-$OC(=O)$-NH-$(CH_2)_n$、$(CH_2)_m$-$NHC(=O)$-NH-$(CH_2)_n$、$(CH_2)_m$-NH、$(CH_2)_m$-$NHC(=O)$、$(CH_2)_m$-$NHC(=O)$-$(CH_2)_n$-$NHC(=O)$-$(CH_2)_p$、$C(=O)$-$(CH_2)_n$、C_3-C_8雜環或缺失；其中 m、n 及 p 中之每一者皆獨立地為 0 至 12 之整數；

R1 係 H、C_1-C_{12}烷基、經取代之 C_1-C_{12}烷基、含氧之 C_1-C_{12}烷基、C_3-C_8雜環烷基、經取代之 C_3-C_8雜環烷基、C_3-C_8環烷基、經取代之 C_3-C_8環烷基、經-N_3末端取代之 C_1-C_{12}烷基、$(CH_2)_q$-$(OCH_2CH_2)_r$-OMe，其中 q 及 r 中之每一者皆獨立地為 0 至 12 之整數；

R2 係 C_1-C_6伸烷基、C_1-C_{12}經取代之伸烷基、C_3-C_8伸環烷基、C_3-C_8經取代之伸環烷基、伸芳基、經取代之 C_6-C_{10}伸芳基、包含 1-3 個雜原子之 5-12 員伸雜芳基、包含 1-3 個雜原子之經取代之 5-12 員伸雜芳基或 $(OCH_2CH_2)_{ss}$或其組合，或 R2 缺失；其中 ss 係 1 至 12 之整數，其中每一雜原子皆獨立地為 N、O 或 S；

R3 係胺基酸之側鏈、C_1-C_6 伸烷基、C_1-C_6 經取代之伸烷基、C_3-C_8 伸環烷基、C_3-C_8 伸雜環烷基、經取代之 C_3-C_8 伸環烷基、伸芳基、經取代之伸芳基、包含 1-3 個雜原子之 5-12 員伸雜芳基、包含 1-3 個雜原子之經取代之 5-12 員伸雜芳基、含胺基之 C_1-C_{12} 伸烷基、含羰基之 C_1-C_{12} 伸烷基、含氧之 C_1-C_{12} 伸烷基、$-N_3$ 末端 C_1-C_6 伸烷基、-CCH 末端 C_1-C_6 伸烷基、-SH 末端 C_1-C_6 伸烷基、-OH 末端 C_1-C_6 伸烷基、含氮之 C_1-C_6 伸烷基、$-OPO_3H_2$ 末端 C_1-C_6 伸烷基、$-OPO_3H_2$ 末端伸芳基、葡萄糖醛酸苷末端 C_1-C_6 伸烷基、$-N_3$ 末端伸芳基、乙炔末端伸芳基、胺末端伸芳基、$(CH_2)_s$、$(CH_2)_s$-C(=O)、$(CH_2)_s$-NH$(CH_2)_t$、$(CH_2)_s$-C(=O)NH$(CH_2)_t$、$(CH_2)_s$-OC(=O)-NH-$(CH_2)_t$、$(CH_2)_s$-NHC(=O)-NH-$(CH_2)_t$ 或其組合；或 R3 缺失；其中每一 s 及 t 皆獨立地為 0 至 6 之整數；

R4 係 H、C_3-C_8 環烷基、C_3-C_8 雜環烷基、C_3-C_8 經取代之雜環烷基、芳基、經取代之芳基、$(CH_2)_u$-$(OCH_2CH_2)_v$-OMe、具兩條 / 三條支鏈之 $(CH_2)_u$-$(OCH_2CH_2)_v$-OMe 或其組合；或 R4 缺失；其中每一 u 及 v 皆獨立地為 1 至 48 之整數。

【請求項 2】　如請求項 1 之化合物，其中 R4 包含 PEG 部分。

【請求項 3】　如請求項 1 或 2 之化合物，其中該 PEG 部分係直鏈的、具支鏈的或多臂的。

【請求項 4】　如請求項 2 之化合物，其中 R4 包含$(CH_2)_u$-$(OCH_2CH_2)_v$-OMe。

【請求項 5】　如請求項 4 之化合物，其中 v 係 1 至 48 之整數，其中 u 係 1 至 12 之整數，且其中 ss 獨立地為 1 至 12 之整數。

【請求項 6】　如請求項 4 之化合物，其中 v 係 1 至 12 之整數，其中 u 係 1 至 12 之整數，且其中 ss 獨立地為 1 至 12 之整數。

【請求項 7】　如請求項 1 之化合物，其中 R3 包含連接體。

【請求項8】 如請求項7之化合物，其中該連接體包含各自具有(CH_2)m-(OCH_2CH_2)n-之-ONH_2末端或馬來醯亞胺末端或 COOH 末端或鹵代乙醯基末端，其中 m 及 n 中之每一者皆獨立地為 1 至 12 之整數。

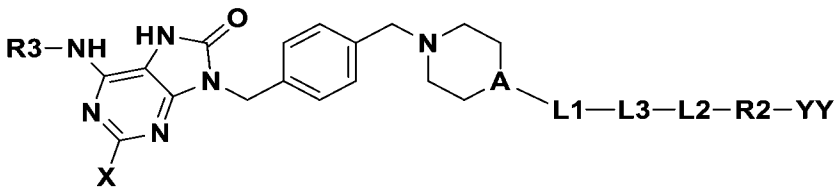
【請求項9】 如請求項2之化合物，其中該 PEG 部分具有 0.1 kDa 至 100 kDa 或 1 kDa 至 100 kDa 之分子量。

【請求項10】 如請求項2之化合物，其中該 PEG 部分具有 0.1 kDa 至 50 kDa 或 1 kDa 至 50 kDa 之分子量。

【請求項11】 如請求項1之化合物，其中該化合物係選自表4。

【請求項12】 如請求項 1 之化合物，其中該化合物係表 4 中所揭示之化合物 185、化合物 186、化合物 187、化合物 188、化合物 189、化合物 190、化合物 191、化合物 213、化合物 214、化合物 216、化合物 217、化合物 218、化合物 219、化合物 220、化合物 221、化合物 222、化合物 223、化合物 224、化合物 230、化合物 233、化合物 235、化合物 238、化合物 239、化合物 240、化合物 242、化合物 244、化合物 245、化合物 246、化合物 248、化合物 251、化合物 252、化合物 253、化合物 254、化合物 255、化合物 256、化合物 257、化合物 258、化合物 259、化合物 260、化合物 261、化合物 263、化合物 265、化合物 266、化合物 267、化合物 268、化合物 269、化合物 272、化合物 273、化合物 275、化合物 278、化合物 279、化合物 281、化合物 282、化合物 283、化合物 284、化合物 285、化合物 286、化合物 287、化合物 296、化合物 297、化合物 299、化合物 300、化合物 301、化合物 302、化合物 303 或化合物 304。

【請求項13】 一種式(II)化合物，



(II)

或其醫藥學上可接受之鹽、溶劑合物、立體異構物或互變異構物，其中

A 係 CH 或 N；

X 係 O-R1、NH-R1、S-R1 或 H；

YY 係 H、$-ONH_2$、$-N_3$、-OH、馬來醯亞胺、-COOH 或 $-C(=O)CH_2Y1$，其中 Y1 係鹵化物；

L1 及 L2 中之每一者皆獨立地為 $(CH_2)_m$、$(CH_2)_mC(=O)$、$(CH_2)_m$-$NH(CH_2)_n$、$(CH_2)_m$-$C(=O)NH(CH_2)_n$、$(CH_2)_m$-$OC(=O)$-NH-$(CH_2)_n$、$(CH_2)_m$-$NHC(=O)$-NH-$(CH_2)_n$、$(CH_2)_m$-NH、$(CH_2)_m$-$NHC(=O)$、$(CH_2)_m$-$NHC(=O)$-$(CH_2)_n$-$NHC(=O)$-$(CH_2)_p$、$C(=O)$-$(CH_2)_n$、伸芳基、經取代之伸芳基、包含 1-3 個雜原子之 5-12 員伸雜芳基、包含 1-3 個雜原子之經取代之 5-12 員伸雜芳基、包含 1-3 個雜原子之 C_3-C_8 雜環或缺失；其中 m、n 及 p 中之每一者皆獨立地為 0 至 6 之整數，其中每一雜原子皆獨立地為 N、O 或 S；

L3 係 C(=O)、-CH(R5)-、$-(AA)_i$-或伸芳基或其組合，或 L3 缺失；其中每一 AA 皆獨立地為胺基酸，其中 i 係 1 至 6 之整數；

R5 係 NH-L4-Y2 或 CH_2-L4-Y2，其中 Y2 係 H 或缺失；

L4 係 C(=O)、C(=O)O-、-OC(=O)-、$-C(CH_2O)_3$-、$-C(CH_2CH_2O)_3$-、$-(AA)_j$-、伸芳基、經取代之伸芳基、C_3-C_8 伸環烷基、經 C_3-C_8 取代之伸環烷基、伸芳基、經取代之伸芳基、包含 1-3 個雜原子之 5-12 員伸雜芳基、包含 1-3 個雜原子之經取代之 5-12 員伸雜芳基、包含 1-3 個雜原子之 5-12 員伸雜環烷基、包含 1-3 個雜原子之經取代之 5-12 員伸雜環烷基、C_1-C_{12} 伸烷基、-O-、-NH-、-S-、經取代之 C_1-C_{12} 伸烷基、$-(CH_2)_s$-$(OCH_2CH_2)_t$-$(CH_2)_u$-、(CH

$_2)_s$-$(OCH_2CH_2)_t$-OMe、-N_3、-SH、-OH、-NH_2、-OPO_3H_2、葡萄糖醛酸苷、乙炔或其組合，或 L4 缺失；其中每一 AA 皆獨立地為胺基酸，其中 j 係 1 至 6 之整數，其中 s 及 u 中之每一者皆獨立地為 0 至 12 之整數，其中 t 獨立地為 0 至 48 之整數，其中每一雜原子皆獨立地為 N、O 或 S；

R1 係 H、C_1-C_{12}烷基、經取代之 C_1-C_{12}烷基、含氧之 C_1-C_{12}烷基、C_3-C_8雜環烷基、經取代之 C_3-C_8雜環烷基、C_3-C_8環烷基、經取代之 C_3-C_8環烷基、經-N_3末端取代之 C_1-C_{12}烷基、$(CH_2)_q$-$(OCH_2CH_2)_r$-OMe，其中 q 及 r 中之每一者皆獨立地為 0 至 12 之整數；

R2 係 C_1-C_6伸烷基、C_1-C_{12}經取代之伸烷基、C_3-C_8伸環烷基、C_3-C_8經取代之伸環烷基、伸芳基、經取代之伸芳基、包含 1-3 個雜原子之 5-12 員伸雜芳基、包含 1-3 個雜原子之經取代之 5-12 員伸雜芳基、包含 1-3 個雜原子之 5-12 員伸雜環烷基、包含 1-3 個雜原子之經取代之 5-12 員伸雜環烷基或 $(OCH_2CH_2)_r$或其組合，或 R2 缺失；其中 r 係 1 至 12 之整數，其中每一雜原子皆獨立地為 N、O 或 S；

R3 係 H 或-C(=O)R6、-C(=O)OR6；

R6 係 C_1-C_{12}烷基、經取代之烷基、經取代之芳基、CH_3-$(CH_2)_s$-$(OCH_2CH_2)_t$-$(CH_2)_u$-，其中 s、t 及 u 中之每一者皆獨立地為 0 至 12 之整數。

【請求項 14】 如請求項 13 之化合物，其中該化合物包含 PEG 部分。

【請求項 15】 如請求項 14 之化合物，其中該 PEG 部分係直鏈的、具支鏈的或多臂的。

【請求項 16】 如請求項 13 之化合物，其中 L3 係-CH(R5)-，其中 R5 係 NH-L4-Y2 或 CH_2-L4-Y2，其中 Y2 缺失，其中 L4 包含$(CH_2)_s$-$(OCH_2CH_2)_t$-OMe，其中 s 係 1 至 12 之整數，其中 t 係 1 至 48 之整數。

【請求項 17】 如請求項 16 之化合物，其中 t 係 1 至 12 之整數。

【請求項 18】 如請求項 13 之化合物，其中 YY 係-ONH_2、馬來醯亞胺、-COOH 或-$C(=O)CH_2Y1$，其中 Y1 係鹵化物。

【請求項 19】 如請求項 18 之化合物，其中 R2 係$(CH_2)_m(OCH_2CH_2)_r$，其中 m 及 r 中之每一者皆獨立地為 1 至 12 之整數。

【請求項 20】 如請求項 14 之化合物，其中該 PEG 部分具有 0.1 kDa 至 100 kDa 或 1 kDa 至 100 kDa 之分子量。

【請求項 21】 如請求項 14 之化合物，其中該 PEG 部分具有 0.1 kDa 至 50 kDa 或 1 kDa 至 50 kDa 之分子量。

【請求項 22】 一種免疫偶聯物，其包含 a)抗體或抗體片段；b)包含與該抗體或抗體片段化合物偶聯之 TLR 促效劑，其中該 TLR 促效劑包含如請求項 1 至 21 中任一項之化合物或該化合物之衍生物，其中該化合物之該衍生物直接經由該化合物之部分 YY 或經由連接體 XX 與該抗體或該抗體片段偶聯，其中該連接體 XX 係親水連接體、可裂解 連接體或不可裂解連接體。

【請求項 23】 如請求項 22 之免疫偶聯物，其中該連接體 XX 包含伸烷基、伸烯基、伸炔基、聚醚、聚酯、聚醯胺、聚胺基酸、多肽、可裂解肽或胺基苄基胺基甲酸酯或其組合。

【請求項 24】 如請求項 22 之免疫偶聯物，其中該抗體或該抗體片段結合至細胞之抗原。

【請求項 25】 如請求項 22 之免疫偶聯物，其中該抗體或該抗體片段結合至細胞表面靶標或腫瘤細胞靶標。

【請求項 26】 如請求項 22 之免疫偶聯物，其中該抗體或該抗體片段包含 Fc 融合蛋白質。

【請求項 27】 如請求項 22 之免疫偶聯物，其中該抗體或抗體片段係單特異性的、雙特異性或多特異性的。

【請求項 28】 如請求項 22 之免疫偶聯物，其中該抗體或抗體片段結合至選自由以下組成之群之靶標：HER2、HER3、B7-H3、連接素-4、PD-1、PDL-1、EGFR、TROP2、FOLR1、PSMA、BCMA、FLT3、VEGFR、CTLA-4、EpCAM、MUC1、MUC16、NaPi2b、c-Met、GPC3、ENPP3、TIM-3、VISTA、VEGF、密連蛋白(Claudin) 18.2、FGFR2、FOLR1、STEAP1、間皮素、5T4、CEA、CA9、鈣黏蛋白 6、ROR1、LIV-1、LILRB-1、LRP-1、SLC34A2、SLC39A6、SLC44A4、LY6E、DLL3、ePhA2、TGFbR、PRLR、GPNMB、SLITRK6、SIRPa、CD3、CD19、CD20、CD22、CD24、CD25、CD30、CD33、CD37、CD38、CD44、CD47、CD52、CD56、CD70、CD79b、CD96、CD97、CD99、CD117、CD123、CD179、CD223 及 CD276。

【請求項 29】 如請求項 26 之免疫偶聯物，其中該抗體或抗體片段係抗 HER2 抗體、抗 CD70 抗體或抗 PSMA 抗體或抗 TROP2 抗體或片段。

【請求項 30】 如請求項 29 之免疫偶聯物，其中該抗 HER2 抗體或抗體片段包含：a)選自 SEQ ID NO:1、2、3、4、16、17 或 18 之重鏈可變區；及 b)選自 SEQ ID NO: 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 之輕鏈可變區。

【請求項 31】 如請求項 26 之免疫偶聯物，其中該抗體或抗體片段包含一或多個 Fc 突變。

【請求項 32】 如請求項 26 之免疫偶聯物，其中該抗體或抗體片段包含一或多種併入該重鏈、該輕鏈或該重鏈及輕鏈二者中之非天然編碼之胺基酸。

【請求項 33】 如請求項 22 之免疫偶聯物，其中該一或多種非天然編碼之胺基酸係對乙醯基苯丙胺酸、對硝基苯丙胺酸、對磺基酪胺酸、對羧基苯丙胺酸、鄰硝基苯丙胺酸、間硝基苯丙胺酸、對硼醯基苯丙胺酸、鄰硼醯基苯丙胺酸、間硼醯基苯丙胺酸、對胺基苯丙胺酸、鄰胺基苯丙胺酸、間胺基苯丙胺酸、對醯基苯丙胺酸、鄰醯基苯丙胺酸、間醯基苯丙胺酸、對-OMe 苯丙胺酸、

鄰-OMe 苯丙胺酸、間-OMe 苯丙胺酸、對磺基苯丙胺酸、鄰磺基苯丙胺酸、間磺基苯丙胺酸、5-硝基 His、3-硝基 Tyr、2-硝基 Tyr、硝基取代之 Leu、硝基取代之 His、硝基取代之 De、硝基取代之 Trp、2-硝基 Trp、4-硝基 Trp、5-硝基 Trp、6-硝基 Trp、7-硝基 Trp、3-胺基酪胺酸、2-胺基酪胺酸、O-磺基酪胺酸、2-磺氧基苯丙胺酸、3-磺氧基苯丙胺酸、鄰羧基苯丙胺酸、間羧基苯丙胺酸、對乙醯基-L-苯丙胺酸、對炔丙基-苯丙胺酸、O-甲基-L-酪胺酸、L-3-(2-萘基)丙胺酸、3-甲基-苯丙胺酸、O-4-烯丙基-L-酪胺酸、4-丙基-L-酪胺酸、三-O-乙醯基-GlcNAcβ-絲胺酸、L-多巴、氟化苯丙胺酸、異丙基-L-苯丙胺酸、對疊氮基-L-苯丙胺酸、對醯基-L-苯丙胺酸、對苯甲醯基-L-苯丙胺酸、L-磷酸絲胺酸、膦醯基絲胺酸、膦醯基酪胺酸、對碘-苯丙胺酸、對溴苯丙胺酸、對胺基-L-苯丙胺酸、異丙基-L-苯丙胺酸及對-炔丙氧基-L-苯丙胺酸。

【請求項 34】 如請求項 33 之免疫偶聯物，其中該一或多種非天然編碼之胺基酸係對乙醯基-苯丙胺酸、4-疊氮基-L-苯丙胺酸、對疊氮基乙氧基苯丙胺酸或對疊氮基甲基-苯丙胺酸。

【請求項 35】 如請求項 33 之免疫偶聯物，其中該一或多種非天然編碼之胺基酸係經位點特異性地併入。

【請求項 36】 如請求項 26 之免疫偶聯物，其中該 TLR 促效劑係 TLR7 促效劑、TLR8 促效劑或 TLR7/TLR8 雙重促效劑。

【請求項 37】 如請求項 26 之免疫偶聯物，其中該 TLR 促效劑包含一或多種 PEG 分子或部分。

【請求項 38】 如請求項 33 之免疫偶聯物，其中該一或多種 PEG 分子係直鏈的、具支鏈的、多臂的。

【請求項 39】 如請求項 30 之免疫偶聯物，其中該一或多種 PEG 分子介於 0.1

kDa 與 100 kDa 之間。

【請求項 40】 如請求項 33 之免疫偶聯物，其中該一或多種 PEG 分子介於 0.1 kDa 與 50 kDa 之間。

【請求項 41】 如請求項 26 之免疫偶聯物，其中該連接體係雙功能或多功能連接體。

【請求項 42】 如請求項 26 之免疫偶聯物，其中該連接體與一或多種併入該抗體或抗體片段中之非天然編碼之胺基酸偶聯。

【請求項 43】 如請求項 33 之偶聯物，其中該連接體係親水連接體、可裂解連接體或不可裂解連接體。

【請求項 44】 一種治療患有疾病或疾患之個體或患者之方法，其包括向該個體或患者投與治療有效量之如請求項 22-43 中任一項之免疫偶聯物。

【請求項 45】 如請求項 44 之方法，其中該疾病或疾患係自體免疫疾病、慢性炎性疾病或癌症。

【請求項 46】 如請求項 45 之方法，其中該癌症係乳癌、小細胞肺癌、卵巢癌、前列腺癌、胃癌、胃腸胰臟腫瘤、子宮頸癌、食道癌、結腸癌、結腸直腸癌、上皮來源之癌症或腫瘤、腎癌、腦癌、神經膠質母細胞瘤、胰臟癌、骨髓性白血病、甲狀腺癌、子宮內膜癌、淋巴瘤、胰臟癌、頭頸癌或皮膚癌。

【請求項 47】 如請求項 46 之方法，其進一步包括投與額外治療劑。

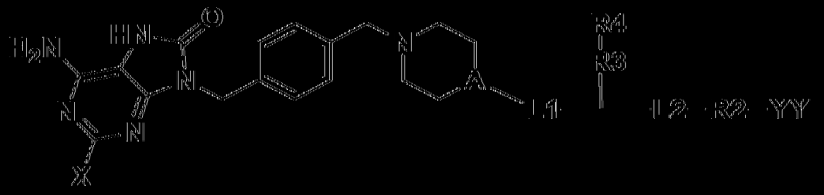
【請求項 48】 如請求項 46 之方法，其中該額外治療劑係化學治療劑、激素劑、抗腫瘤劑、免疫刺激劑、免疫調節劑、免疫治療劑或其組合。

【請求項 49】 一種醫藥組成物，其包含治療有效量之如請求項 22-43 中任一項之免疫偶聯物及醫藥學上可接受之載劑或賦形劑。

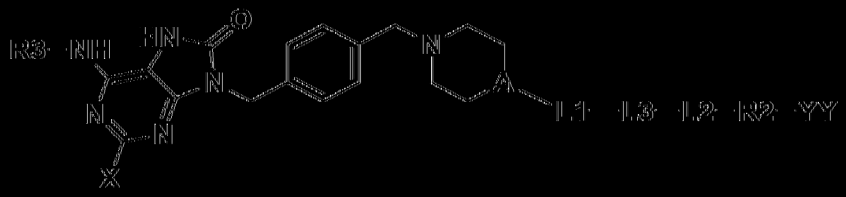
【請求項 50】 一種醫藥組成物，其包含如請求項 1-21 中任一項之化合物或如請求項 22-43 中任一項之免疫偶聯物，其用作藥劑。

【請求項 51】 一種如請求項 22-43 中任一項之免疫偶聯物之用途，其用於製備藥劑。

[發明圖式]

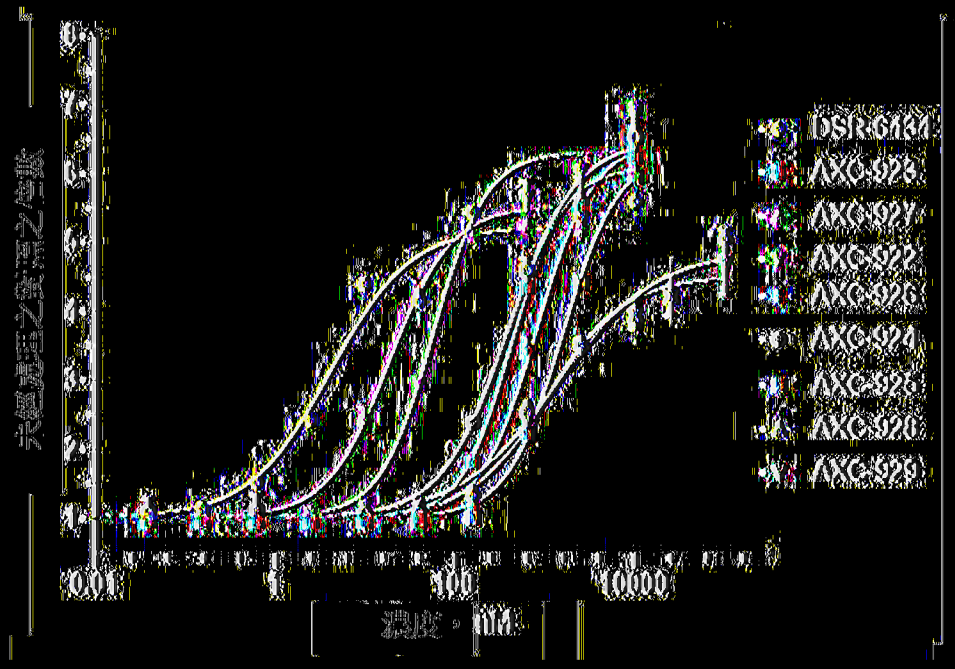


式(I)

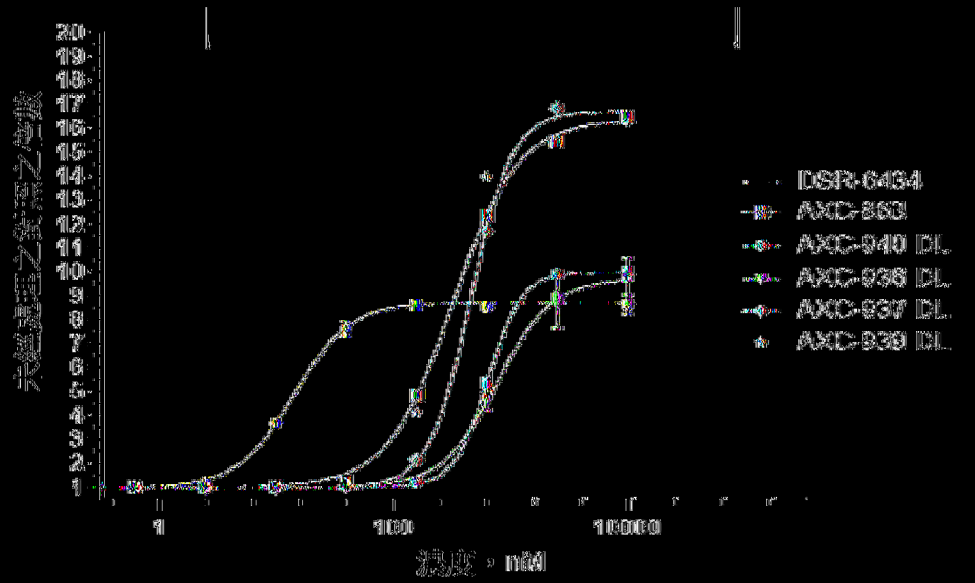


式(II)

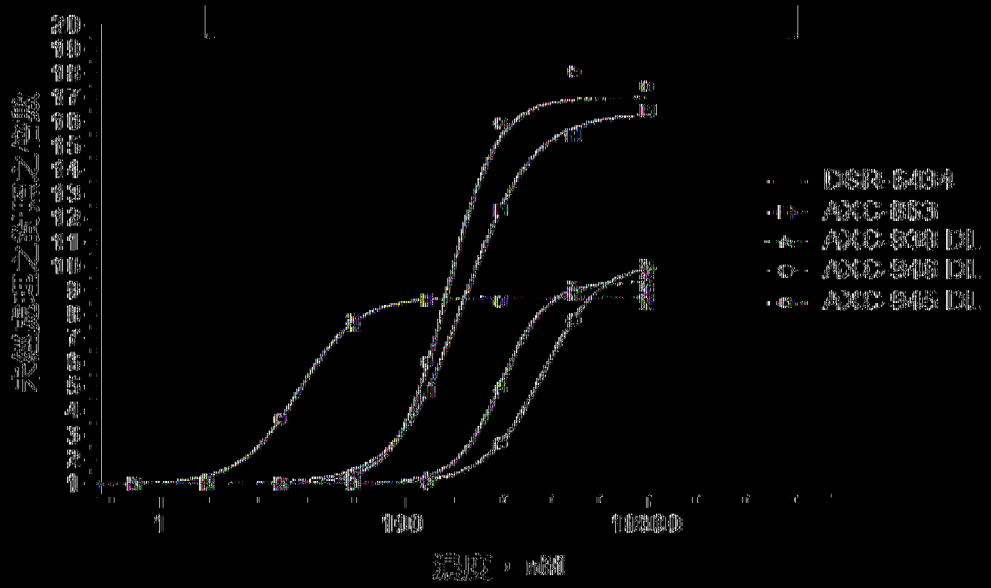
[圖 1]



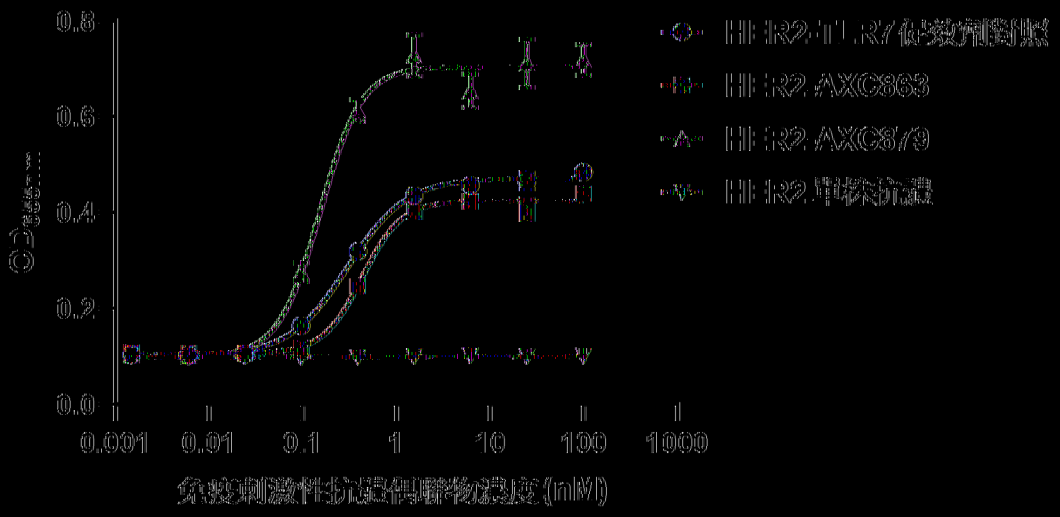
[圖 2]


DSR-6434
AXC-863
AXC-940 DL
AXC-936 DL
AXC-937 DL
AXC-939 DL
濃度，nM

[圖 3A]

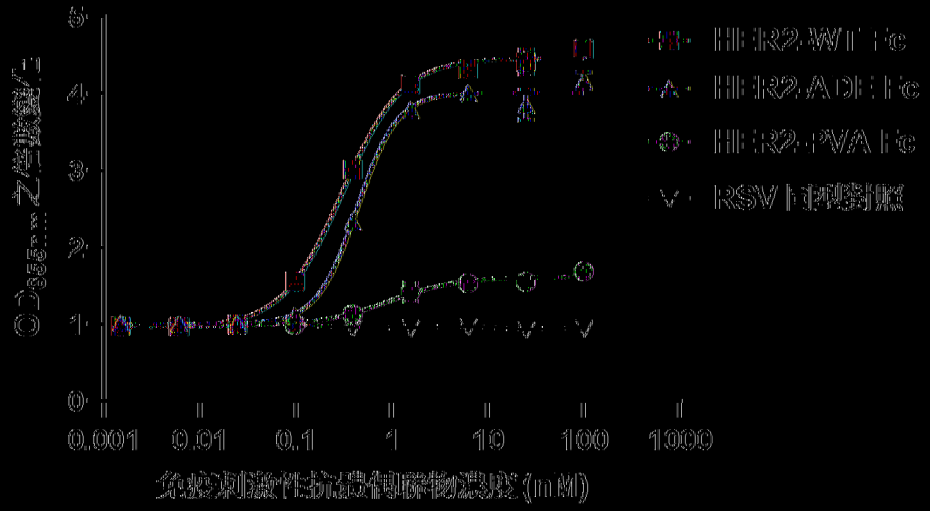

DSR-6434
AXC-863
AXC-936 DL
AXC-940 DL
AXC-946 DL
濃度，nM

[圖 3B]

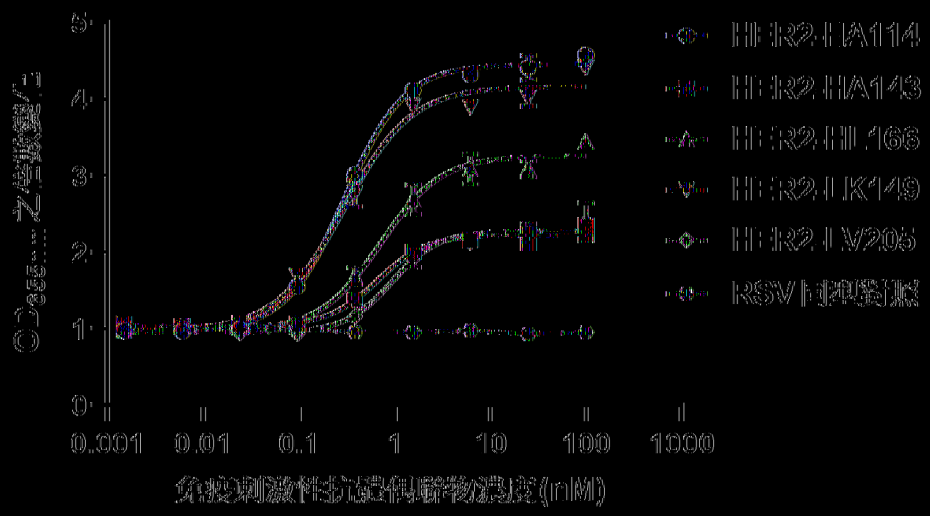


[圖4]

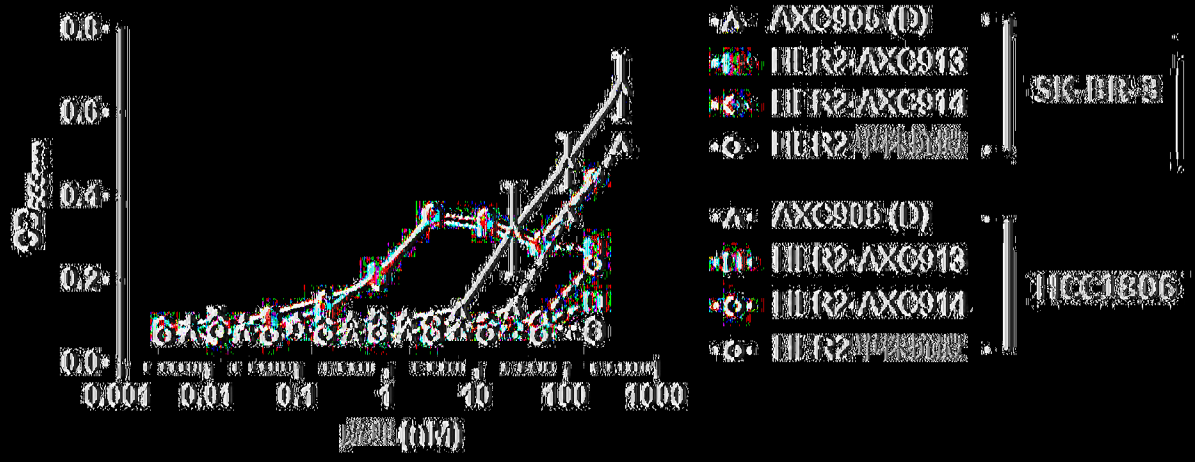
RAW Blue + SKBR3



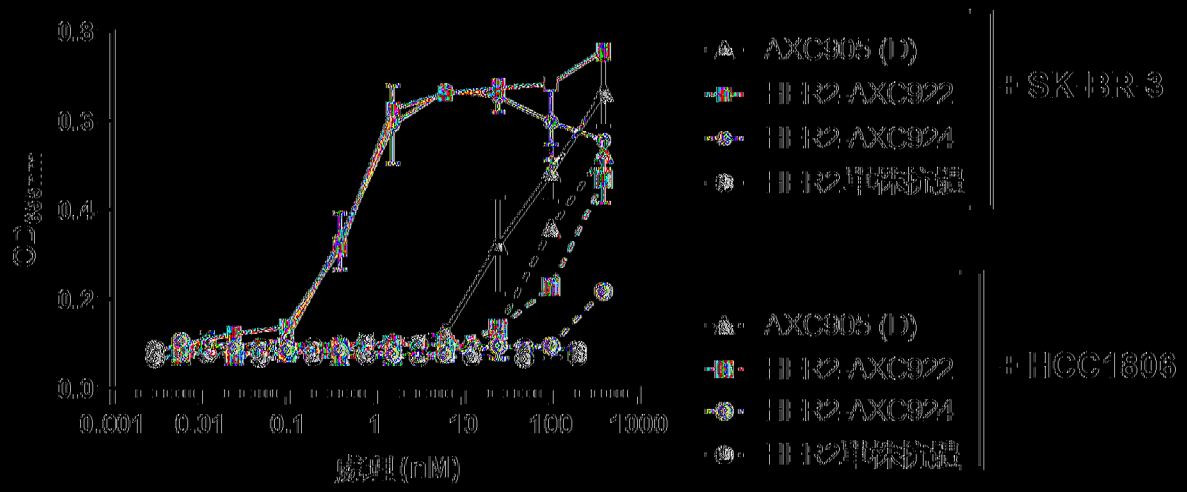
[圖5]


HER2 HA114
HER2 HA143
HER2 HL166
HER2 IK149
HER2 IV205
RSV中和抗体
0
1
2
3
4
5
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000

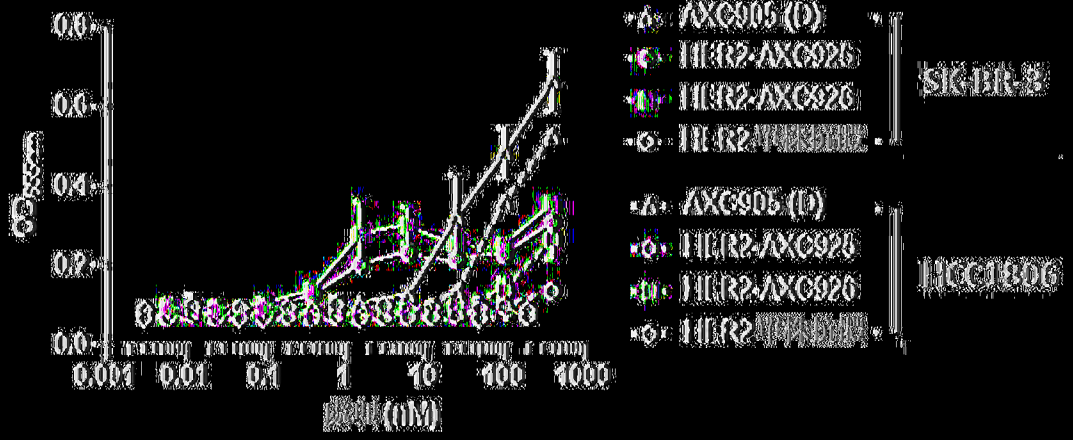
[図 6]


AXC905 (D)
HER2-AXC913
HER2-AXC914
HER2-AXC915
SIGIRR3
AXC905 (D)
HER2-AXC913
HER2-AXC914
HER2-AXC915
HCC1806
0.0
0.2
0.4
0.6
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000

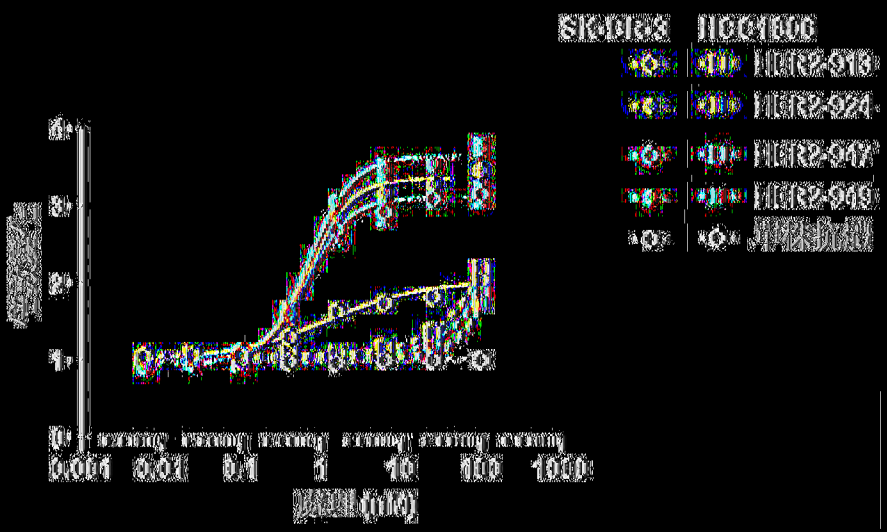
[図 7A]


0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
濃度(nM)
AXC905 (D)
HER2-AXC922
HER2-AXC924
HER2平均抗體
SK-BR-3
AXC905 (D)
HER2-AXC922
HER2-AXC924
HER2平均抗體
HCC1806

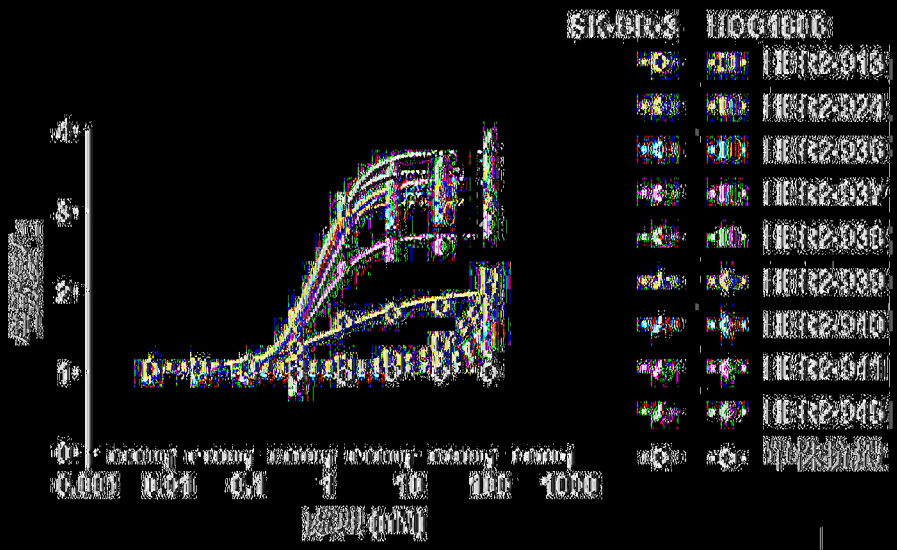
[圖 7B]


0.6
0.4
0.2
0.0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
濃度 (nM)
AXC905 (D)
HER2-AXC926
HER2-AXC926
SK-BR-3
AXC905 (D)
HER2-AXC926
HER2-AXC926
HCC1806

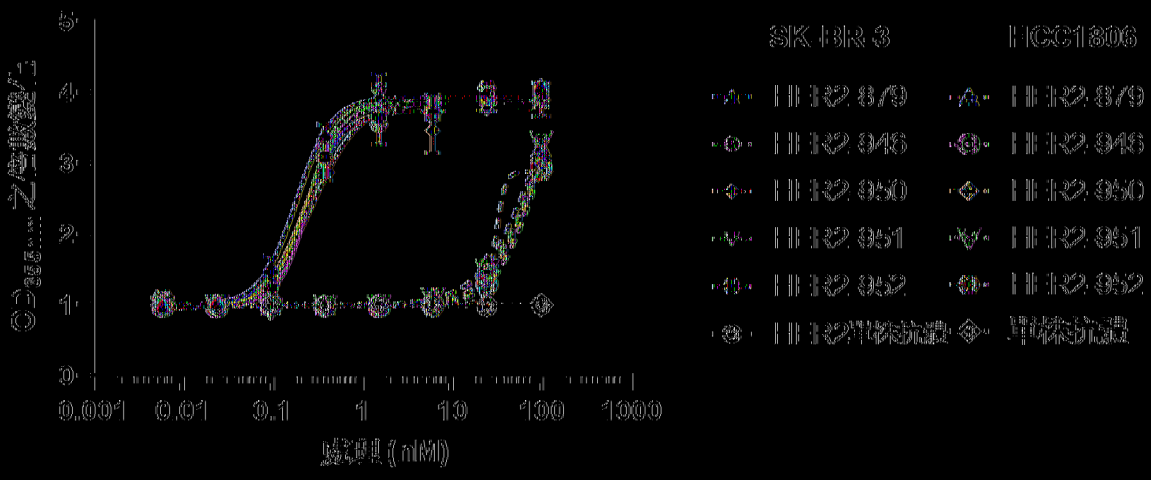
[圖 7C]


SK-BR-3
HCC1806
HER2-918
HER2-924
HER2-947
HER2-949
非特異的結合
0
1
2
3
4
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000

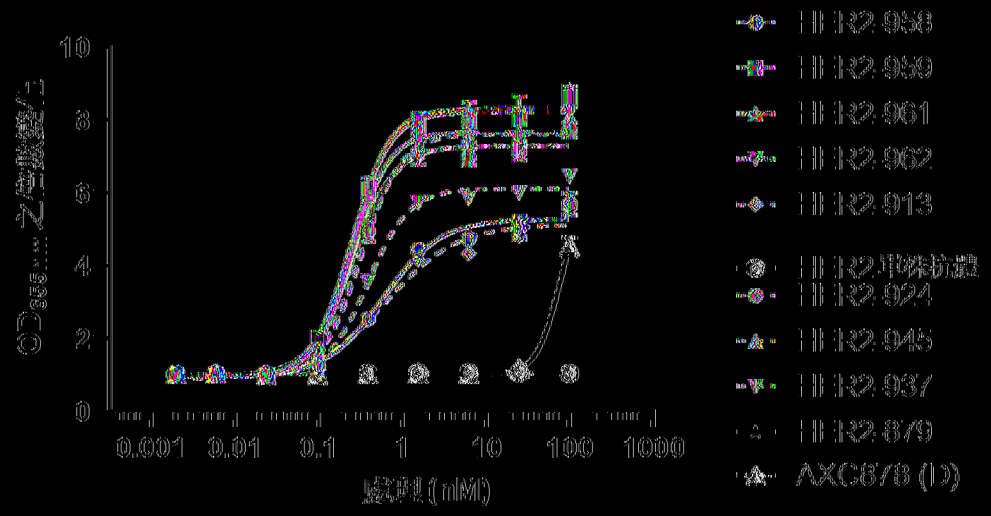
[図 8A]


SK-BR-3
HCC1806
HER2-918
HER2-924
HER2-936
HER2-937
HER2-938
HER2-939
HER2-940
HER2-941
HER2-946
非特異的結合
0
1
2
3
4
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000

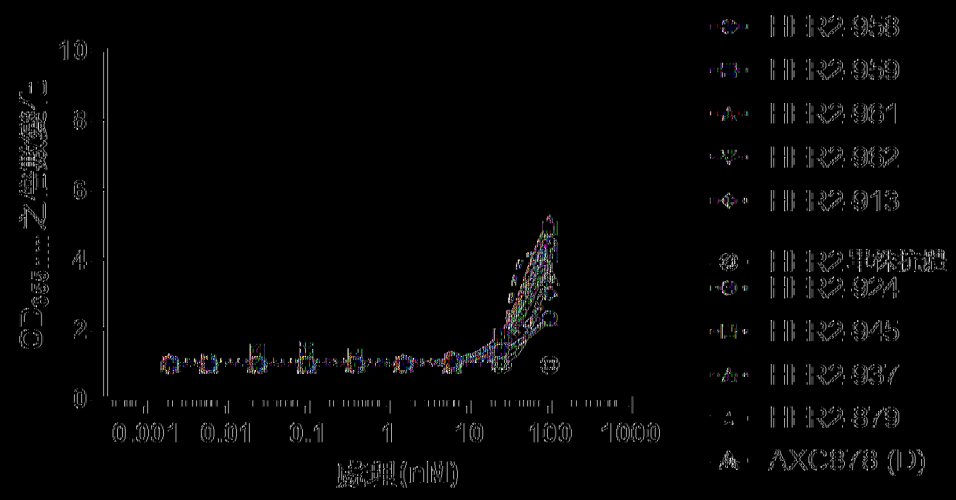
[図 8B]


SK-BR-3
HCC1806
H1R2.879
H1R2.948
H1R2.950
H1R2.951
H1R2.952
H1R2非結合抗體
平均抗體
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
濃度(nM)

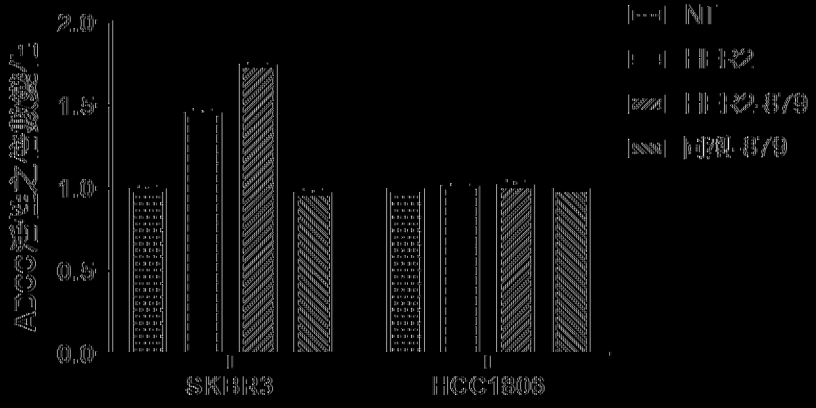
[圖 8C]


H1R2.958
H1R2.959
H1R2.961
H1R2.962
H1R2.913
H1R2非結合抗體
H1R2.924
H1R2.945
H1R2.937
H1R2.879
AXC6/8 (D)
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
濃度(nM)

[圖 9A]


10
8
6
4
2
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
濃度(nM)
HH12.058
HH12.059
HH12.061
HH12.062
HH12.013
HH12.抗体無添加
HH12.024
HH12.045
HH12.057
HH12.079
AXCB78 (D)

[図 9B]


2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
SKBR3
HCC1806
NT
HH12
HH12.079
抗体-079

[図 10]

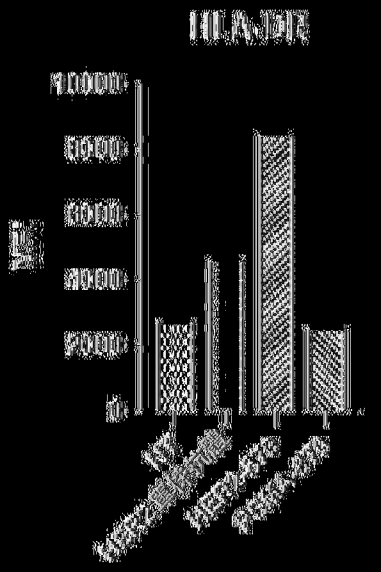
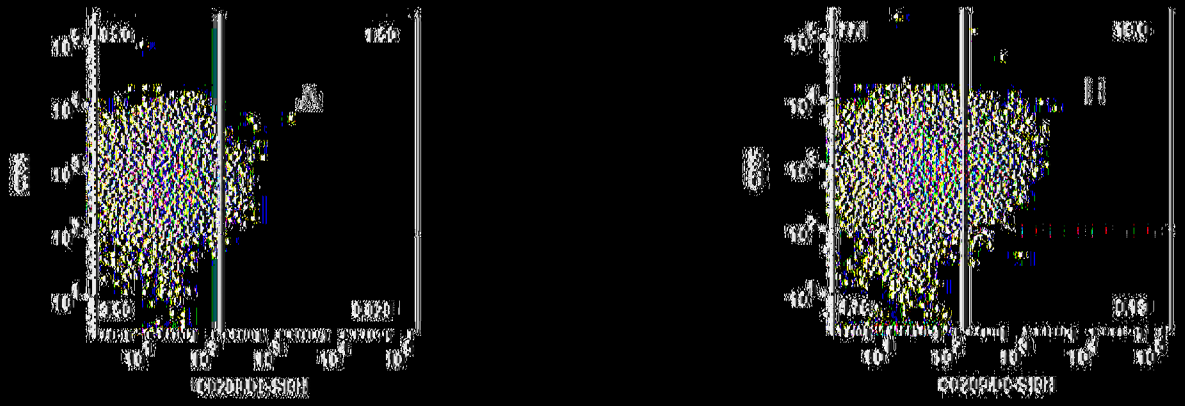


圖 11



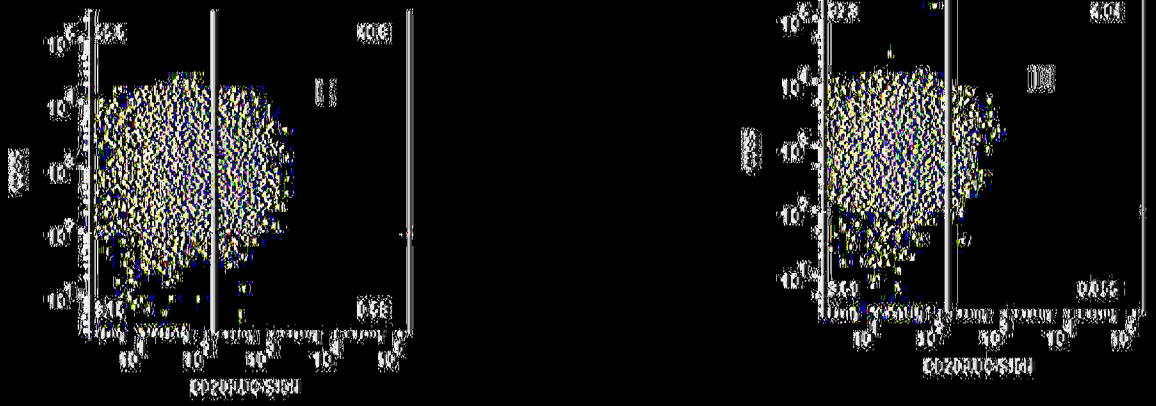
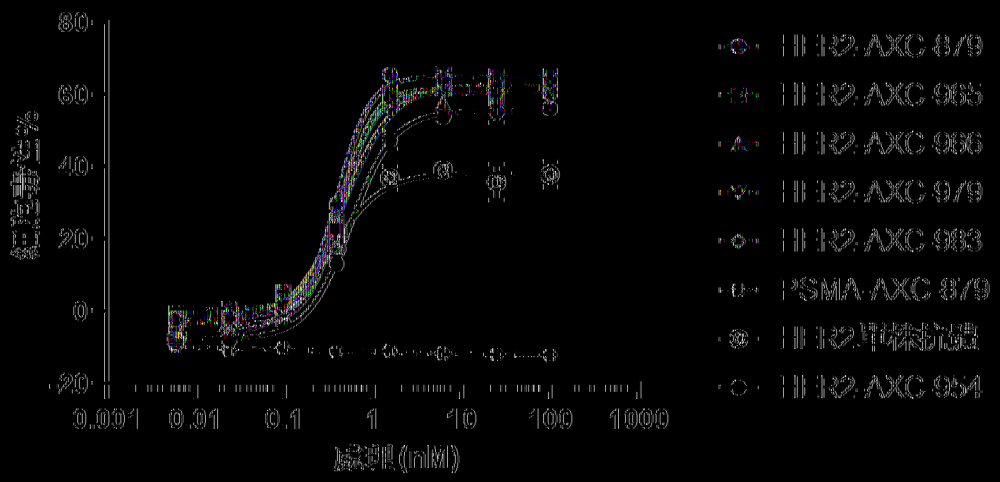
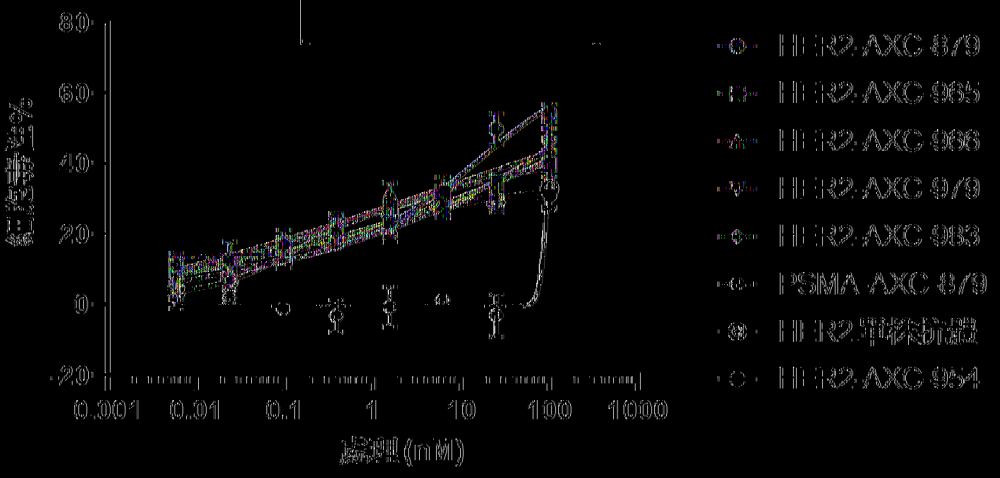


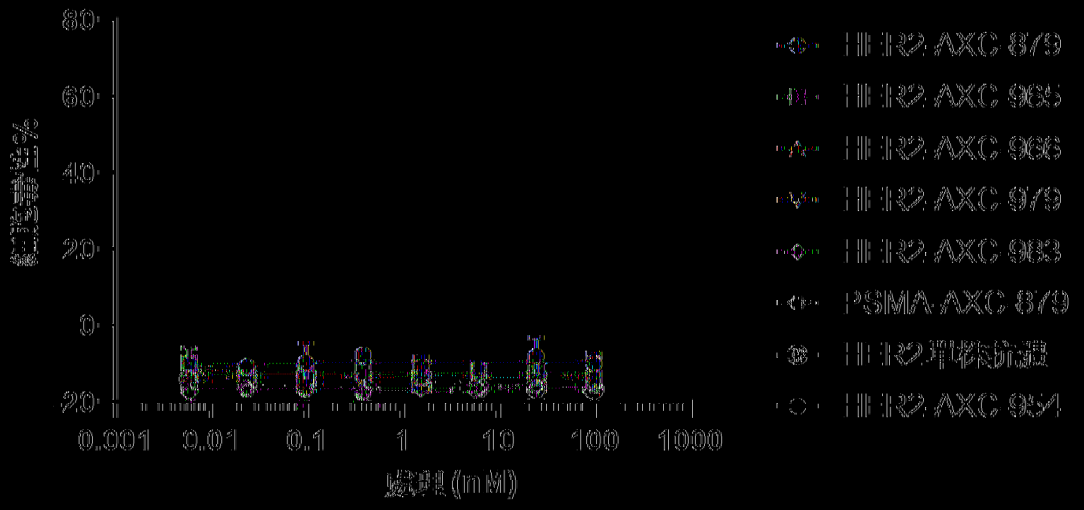
圖 12


80
60
40
20
0
-20
0.0001
0.01
0.1
1
10
100
1000
濃度(nM)
HER2-AXC 8/9
HER2-AXC 965
HER2-AXC 966
HER2-AXC 9/9
HER2-AXC 983
PSMA-AXC 8/9
HER2単独抗体
HER2-AXC 954

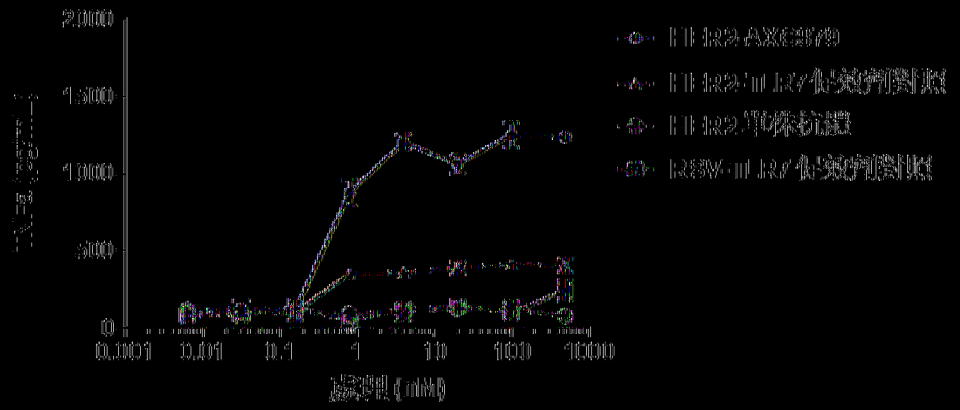
[図 13A]


80
60
40
20
0
-20
0.0001
0.01
0.1
1
10
100
1000
濃度(nM)
HER2-AXC 8/9
HER2-AXC 965
HER2-AXC 966
HER2-AXC 9/9
HER2-AXC 983
PSMA-AXC 8/9
HER2単独抗体
HER2-AXC 954

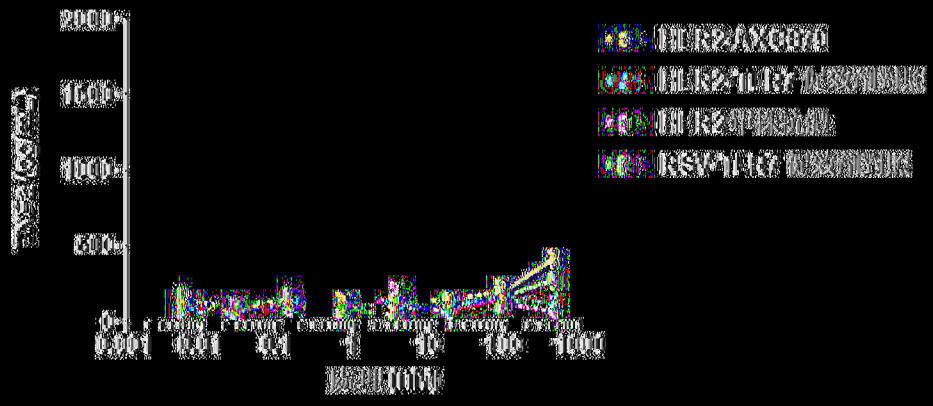
[図 13B]


80
60
40
20
0
-20
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
濃度(nM)
HER2 AXC 879
HER2 AXC 985
HER2 AXC 986
HER2 AXC 979
HER2 AXC 983
PSMA AXC 879
HER2 ADC対照
HER2 AXC 954

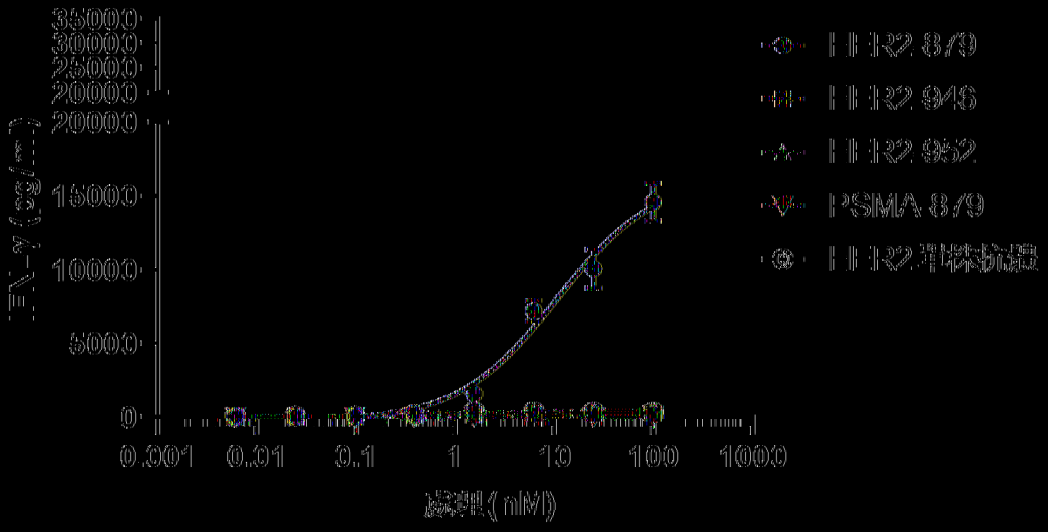
[図 13C]


2000
1500
1000
500
0
0.0001
0.001
0.1
1
10
100
1000
濃度(nM)
HER2-AXC879
HER2 ADC対照
RSV-ADC対照

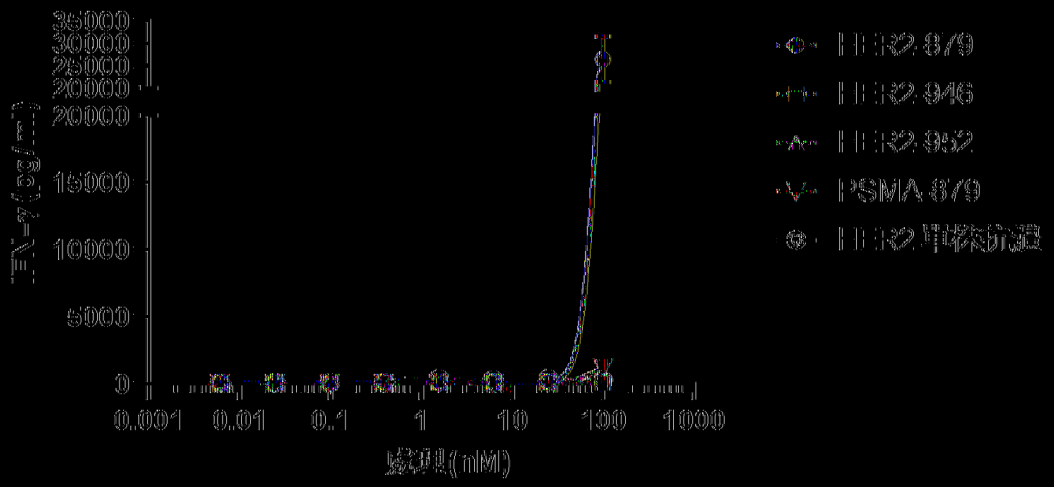
[図 14A]


2000
1600
1200
800
400
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000

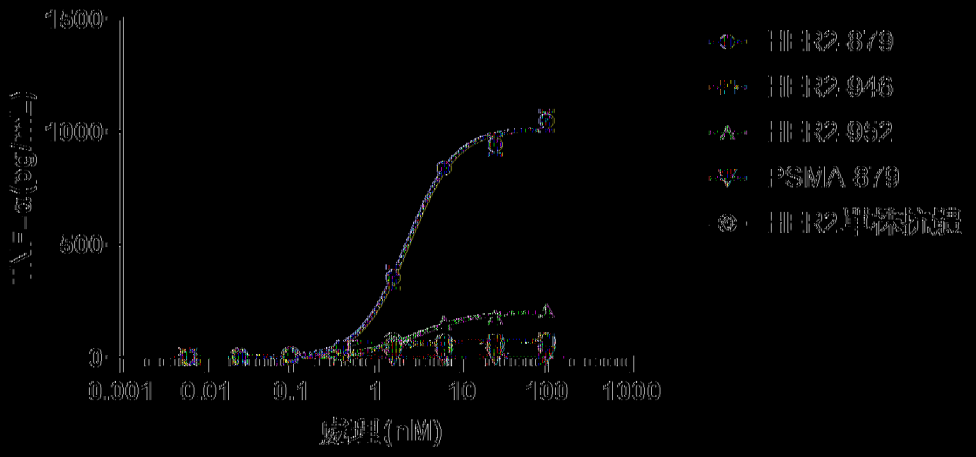
[圖 14B]


35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
濃度(nM)
H1R2.8/9
H1R2.046
H1R2.052
PSMA 8/9
H1R2非特異的結合

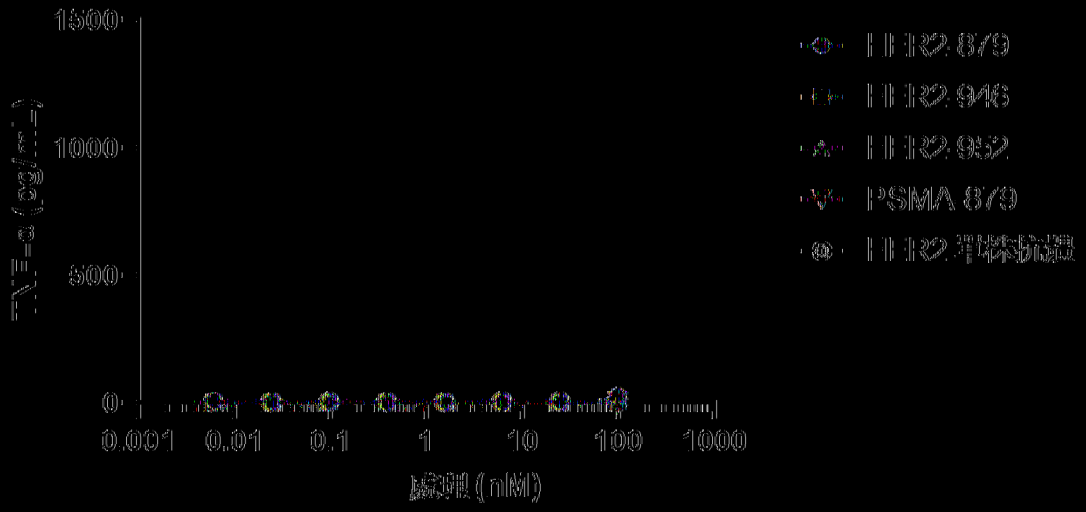
[圖 15A]


35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
濃度(nM)
HER2.879
HER2.946
HER2.952
PSMA.879
HER2單株抗體

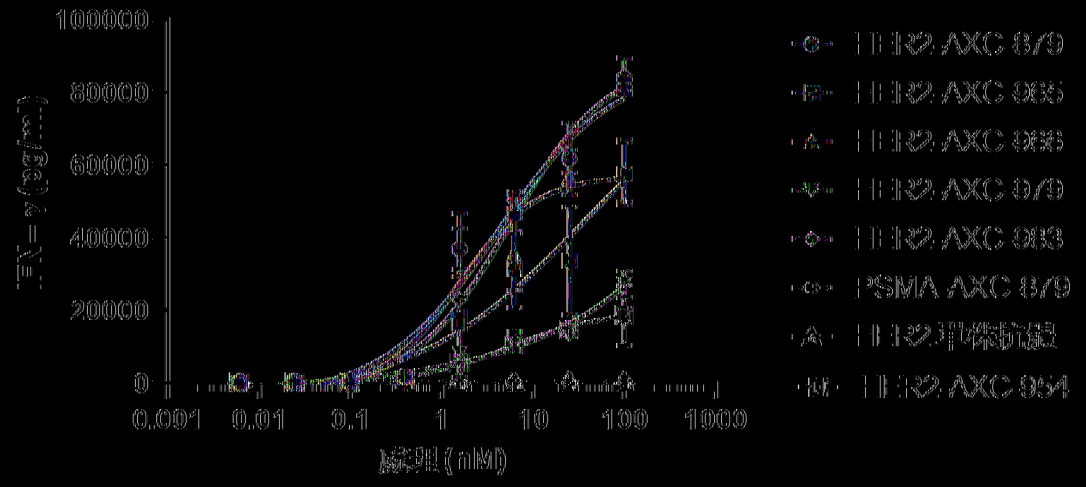
[圖 15B]


1500
1000
500
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
濃度(nM)
HER2.879
HER2.946
HER2.952
PSMA.879
HER2單株抗體

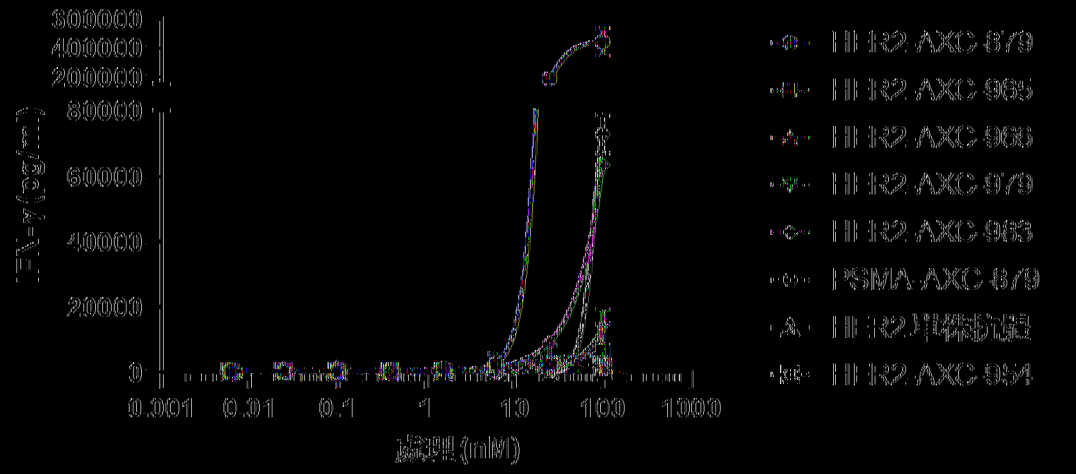
[圖 15C]


1500
1000
500
0
MFI-1 (ヒト)
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
濃度 (nM)
HER2.8/9
HER2.946
HER2.952
PSMA 8/9
HER2単体抗体

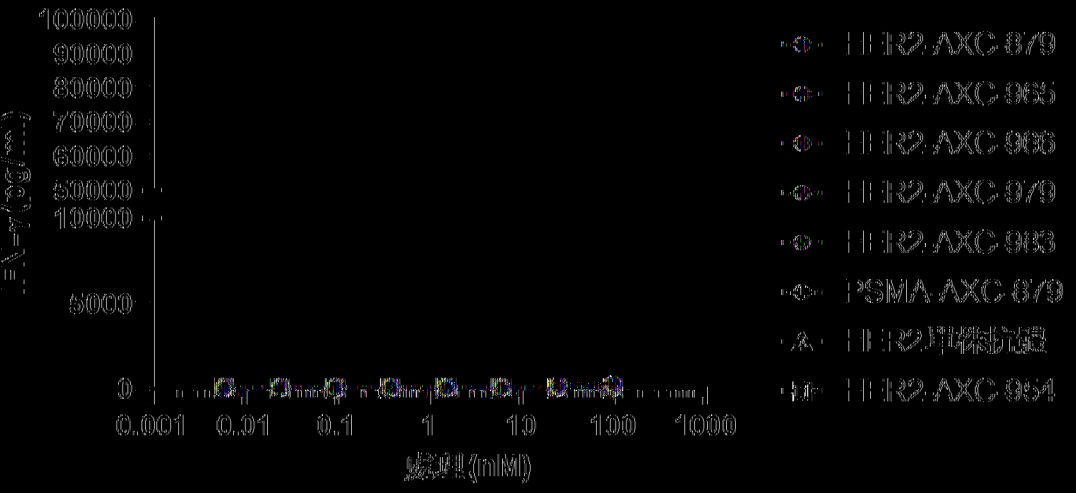
[図 15D]


100000
80000
60000
40000
20000
0
MFI-1 (ヒト)
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
濃度 (nM)
HER2 AXC 8/9
HER2 AXC 965
HER2 AXC 963
HER2 AXC 9/9
HER2 AXC 953
PSMA AXC 8/9
HER2単体抗体
HER2 AXC 954

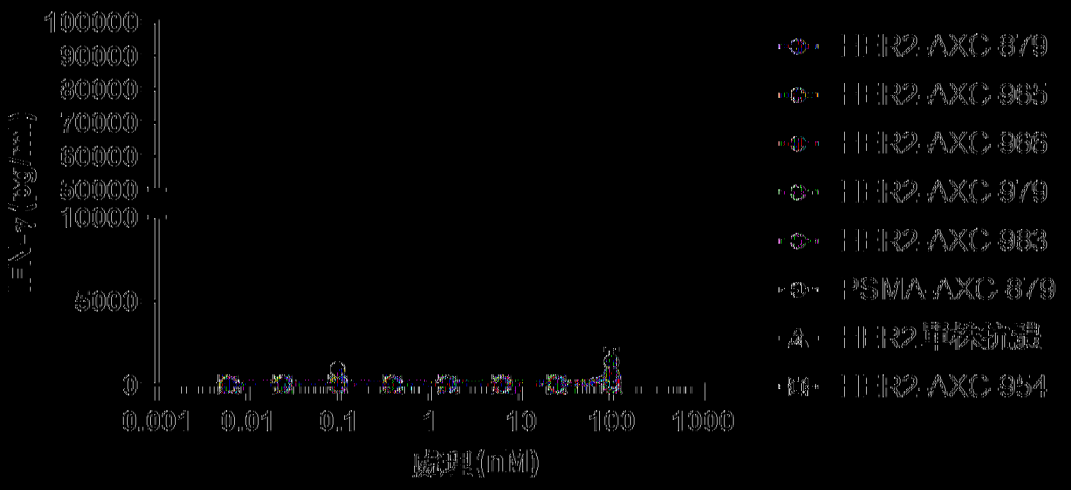
[図 16A]


300000
400000
200000
80000
60000
40000
20000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
濃度(nM)
HER2.AXC 879
HER2.AXC 965
HER2.AXC 966
HER2.AXC 979
HER2.AXC 963
PSMA.AXC 879
HER2抗體對照
HER2.AXC 954

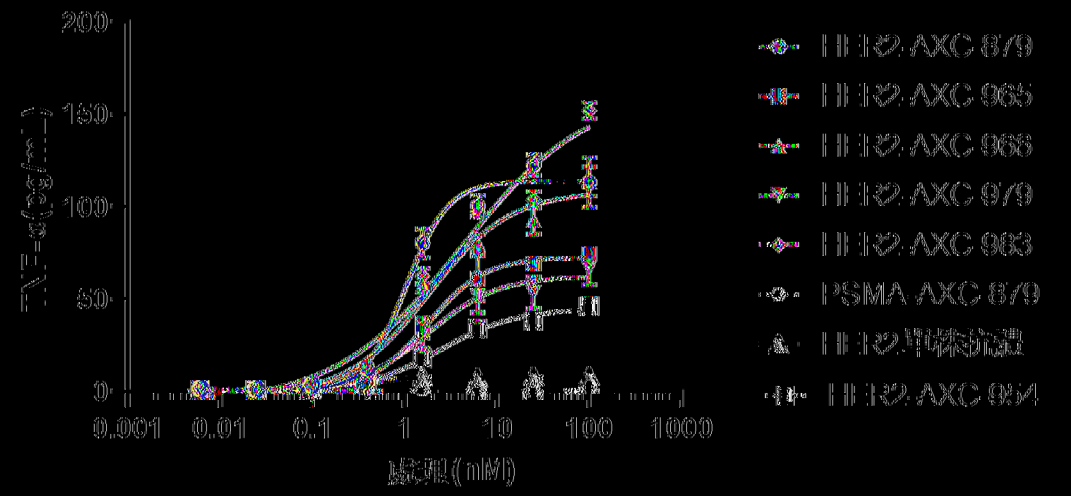
[圖 16B]


100000
90000
80000
70000
60000
50000
10000
5000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
濃度(nM)
HER2.AXC 879
HER2.AXC 965
HER2.AXC 966
HER2.AXC 979
HER2.AXC 963
PSMA.AXC 879
HER2抗體對照
HER2.AXC 954

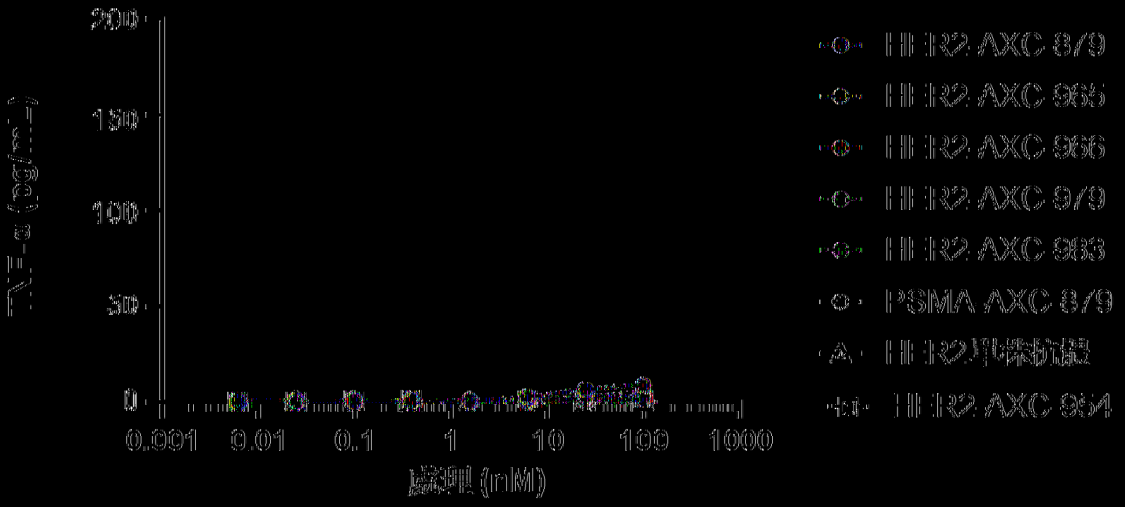
[圖 16C]


100000
90000
80000
70000
60000
50000
10000
5000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
濃度(nM)
HER2 AXC 879
HER2 AXC 985
HER2 AXC 986
HER2 AXC 970
HER2 AXC 983
PSMA AXC 879
HER2單純抗體
HER2 AXC 954

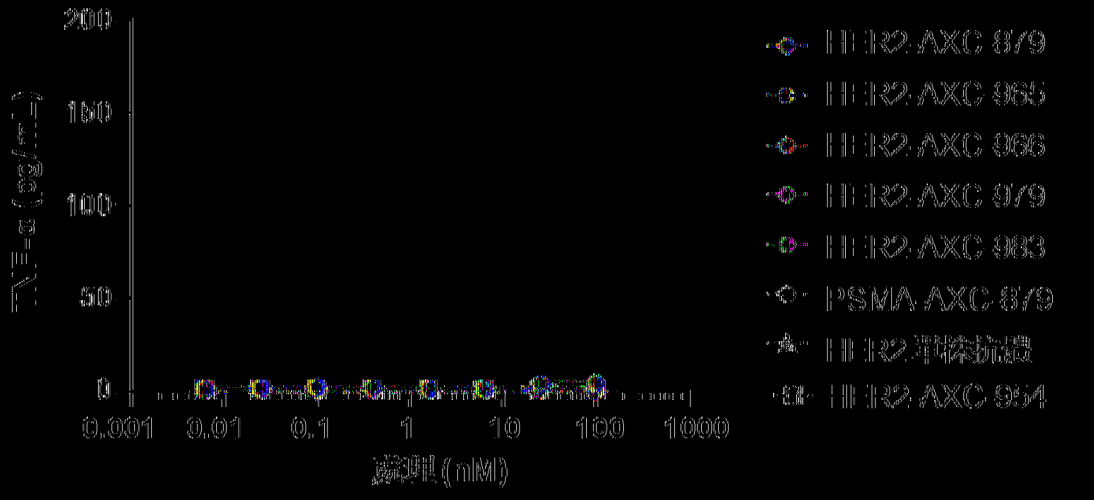
[圖 16D]


200
150
100
50
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
濃度(nM)
HER2 AXC 879
HER2 AXC 985
HER2 AXC 986
HER2 AXC 970
HER2 AXC 983
PSMA AXC 879
HER2單純抗體
HER2 AXC 954

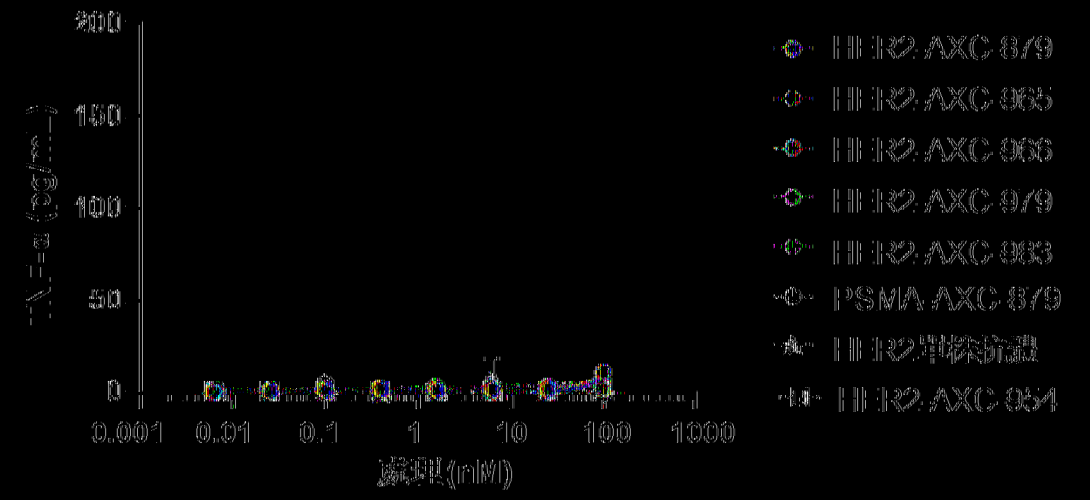
[圖 17A]


200
150
100
50
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
濃度 (nM)
HER2 AXC 8/9
HER2 AXC 965
HER2 AXC 966
HER2 AXC 9/9
HER2 AXC 983
PSMA AXC 8/9
HER2抗体抗體
HER2 AXC 954

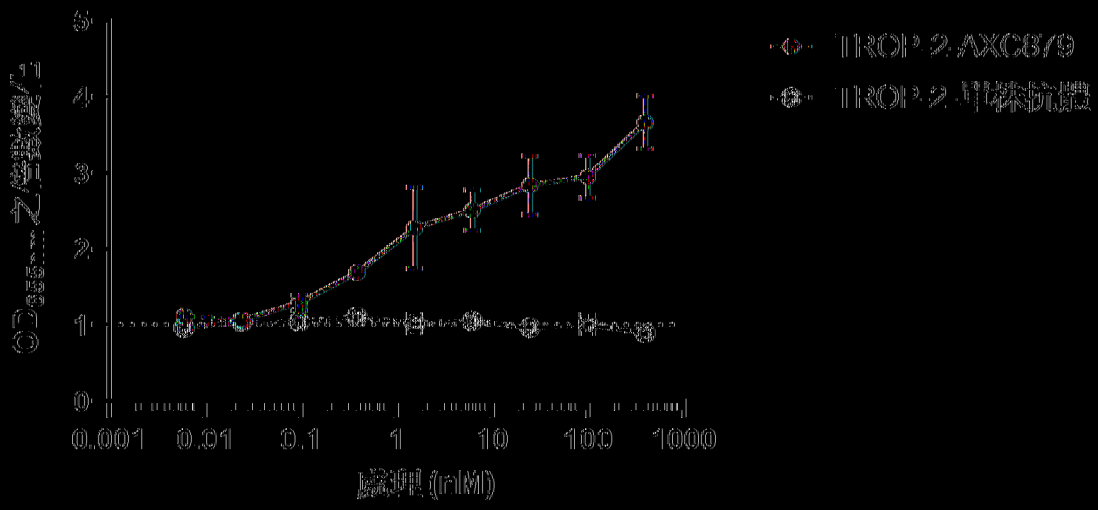
[圖 1/B]


200
150
100
50
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
濃度 (nM)
HER2 AXC 8/9
HER2 AXC 965
HER2 AXC 966
HER2 AXC 9/9
HER2 AXC 983
PSMA AXC 8/9
HER2抗體抗體
HER2 AXC 954

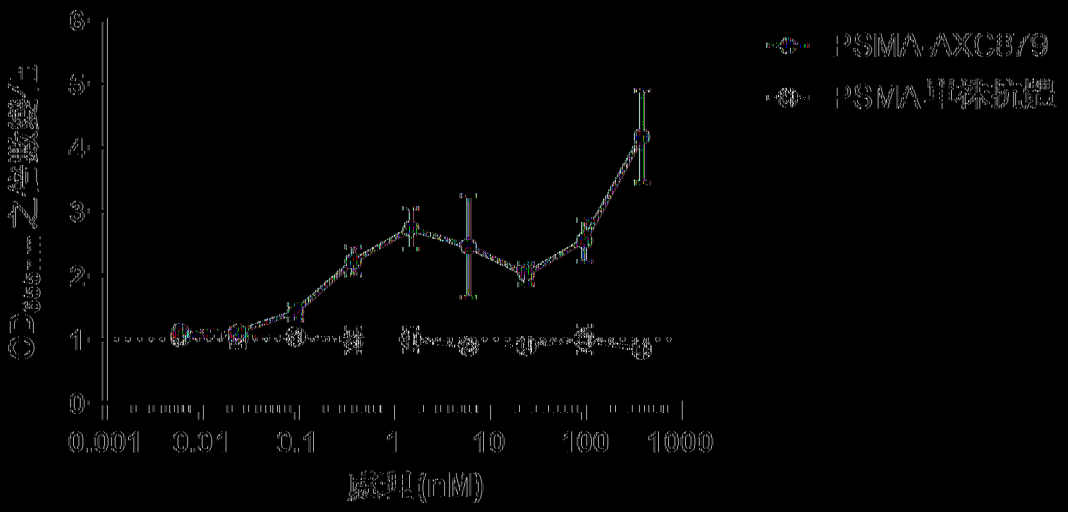
[圖 1/C]


200
150
100
50
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
濃度(nM)
HER2:AXC 8/9
HER2:AXC 063
HER2:AXC 066
HER2:AXC 9/9
HER2:AXC 083
PSMA:AXC 8/9
HER2単独抗体
HER2:AXC 054

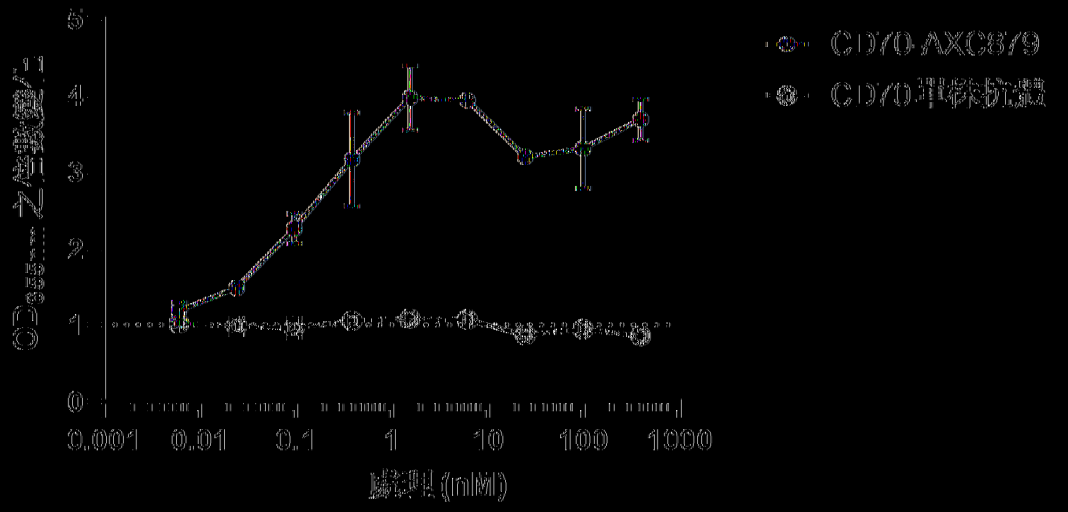
[図 17D]


5
4
3
2
1
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
濃度(nM)
TROP 2:AXC8/9
TROP 2 単独抗体

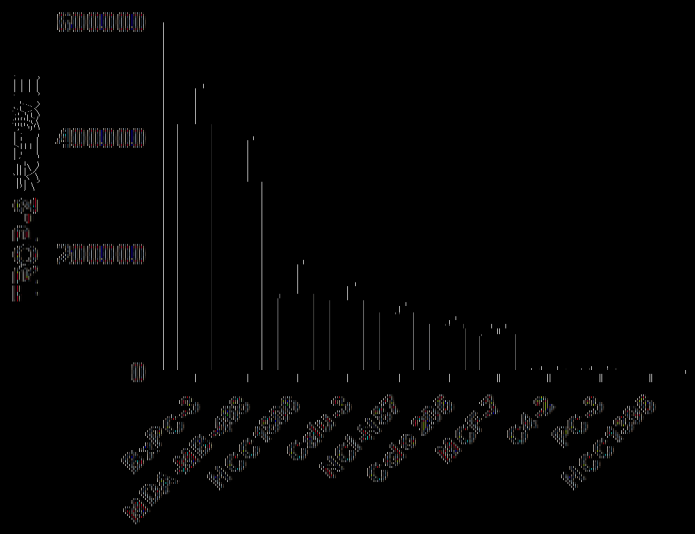
[図 18A]


PSMA AXCB/9
PSMA非特異抗體
CD70結合活性(相對於最大值)
0
1
2
3
4
5
6
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
濃度(nM)

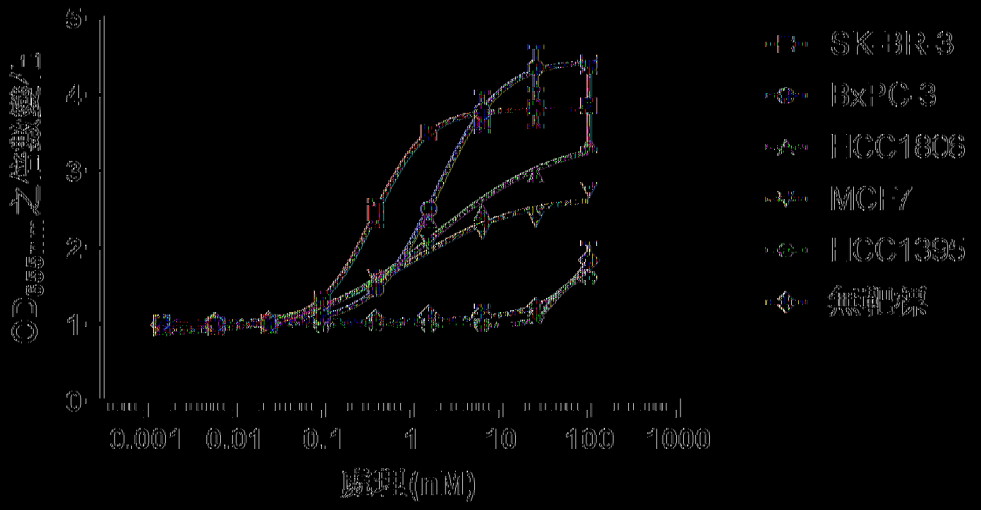
|(圖 18B)|


CD70 AXCB/9
CD70非特異抗體
CD70結合活性(相對於最大值)
0
1
2
3
4
5
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
濃度(nM)

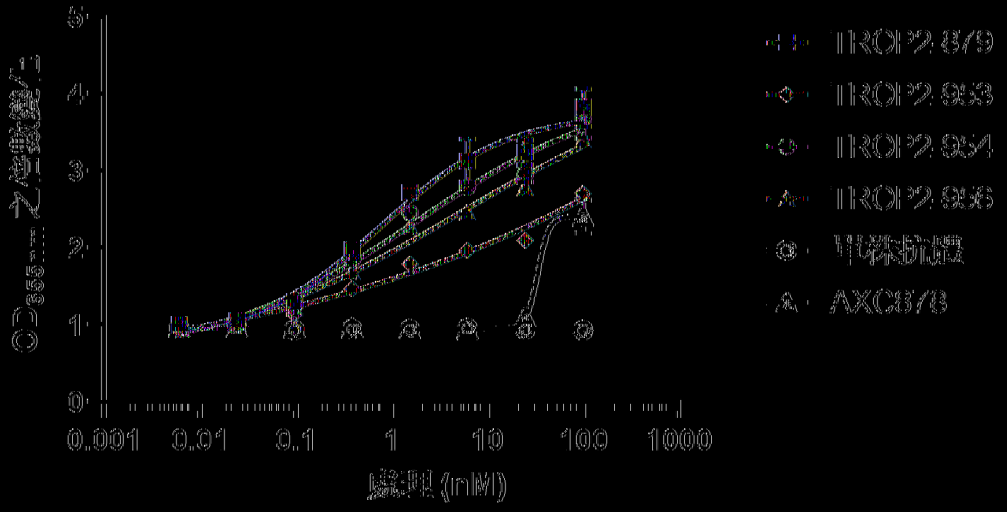
|(圖 18C)|


60000
40000
20000
0
SK-BR-3
BxPC-3
HCC1806
MCF-7
HCC1395
無細胞

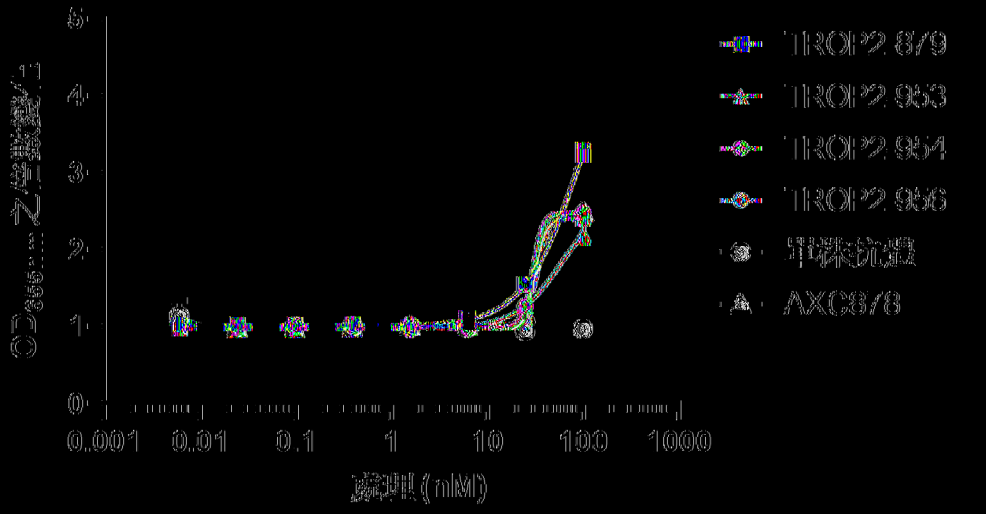
[圖 19A]


5
4
3
2
1
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
劑量(nM)
SK-BR-3
BxPC-3
HCC1806
MCF-7
HCC1395
無細胞

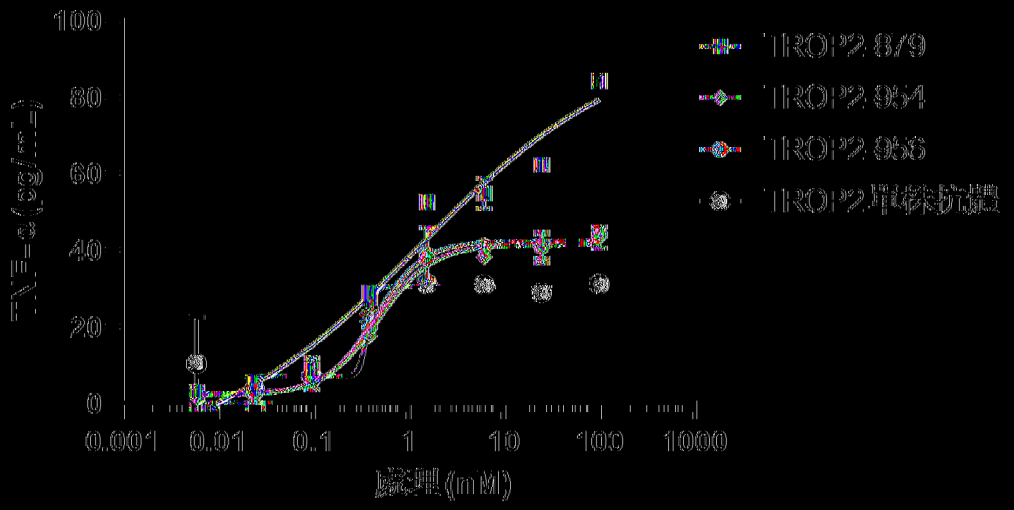
[圖 19B]


TROP2.8/9
TROP2.953
TROP2.954
TROP2.956
甲磺酸盐
AXC8/8
0
1
2
3
4
5
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
浓度(nM)

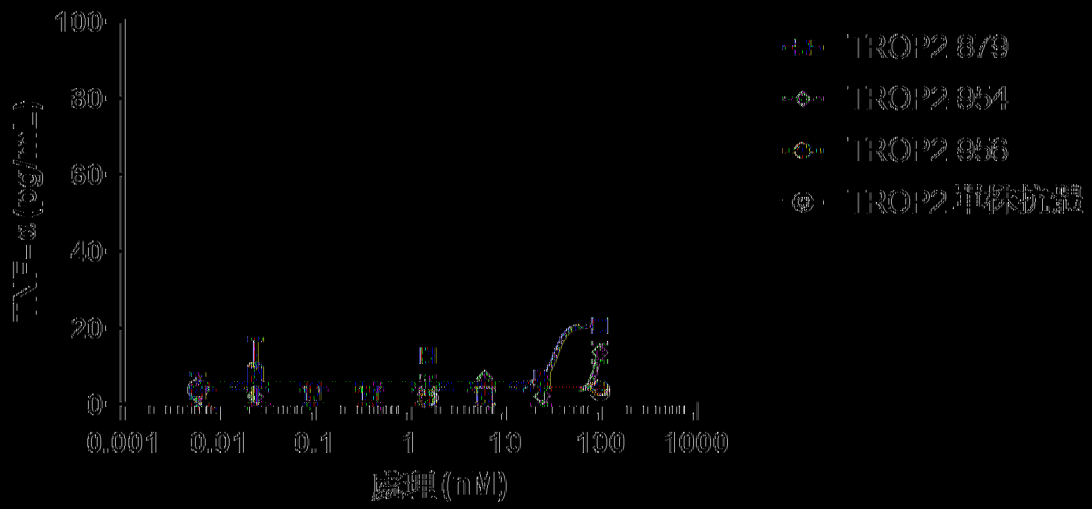
[图 20A]


TROP2.8/9
TROP2.953
TROP2.954
TROP2.956
甲磺酸盐
AXC8/8
0
1
2
3
4
5
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
浓度(nM)

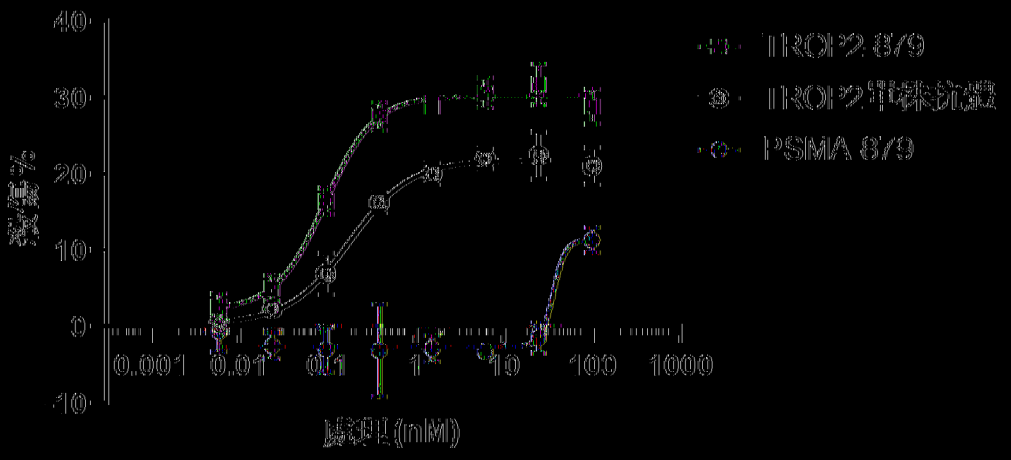
[图 20B]


100
80
60
40
20
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
濃度(nM)
TROP2 8/9
TROP2 9/4
TROP2 9/6
TROP2單株抗體

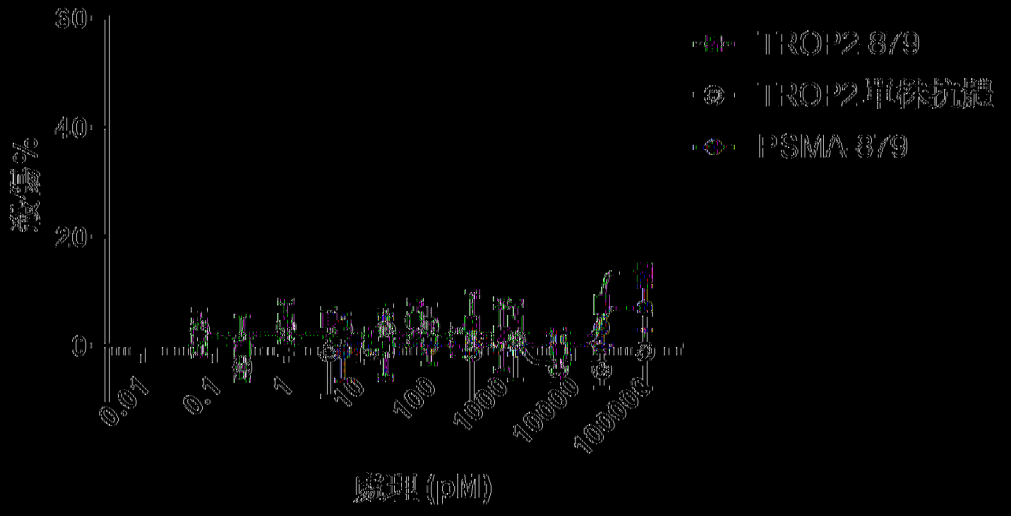
[圖 21A]


100
80
60
40
20
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
濃度(nM)
TROP2 8/9
TROP2 9/4
TROP2 9/6
TROP2單株抗體

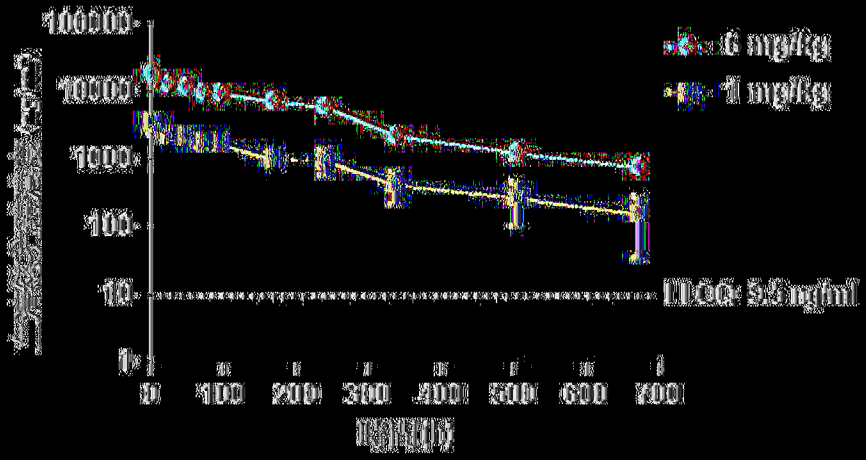
[圖 21B]


TROP2 8/9
TROP2單株抗體
PSMA 8/9
40
30
20
10
0
-10
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
濃度(nM)

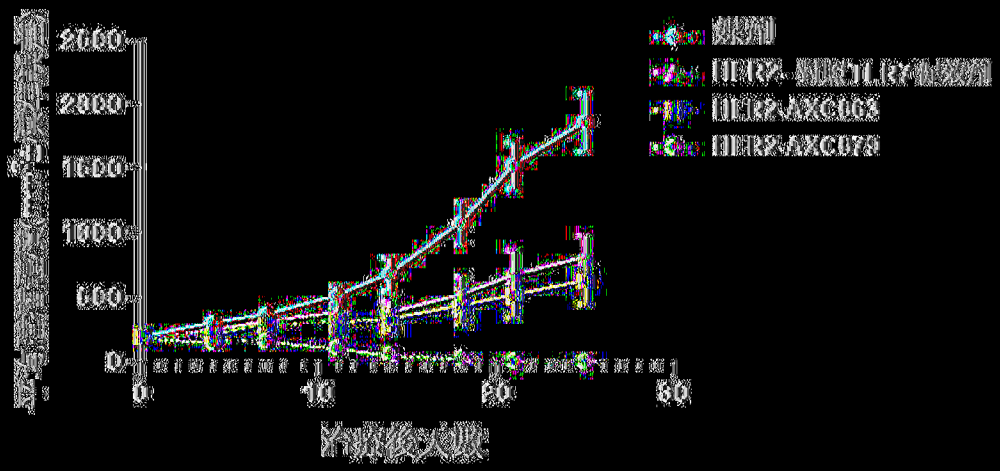
[圖 22A]


TROP2 8/9
TROP2單株抗體
PSMA 8/9
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
濃度 (pM)

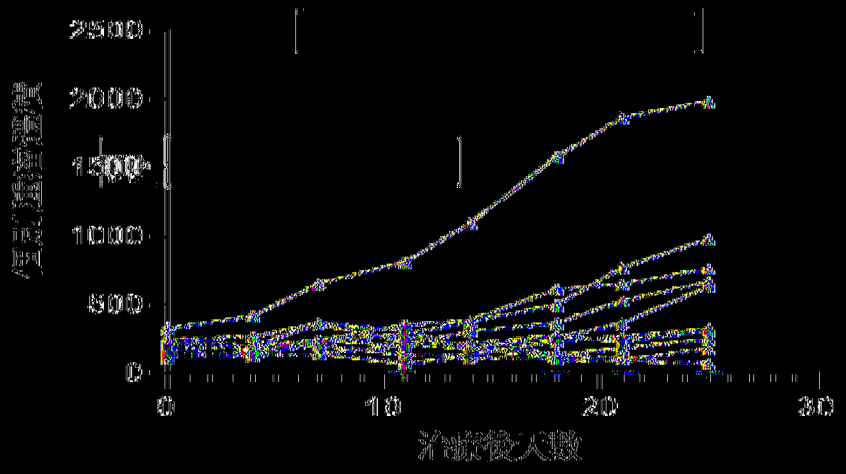
[圖 22B]


100000
10000
1000
100
10
0
0
100
200
300
400
500
600
700
6 mg/kg
1 mg/kg
LLOQ 5.5 ng/ml

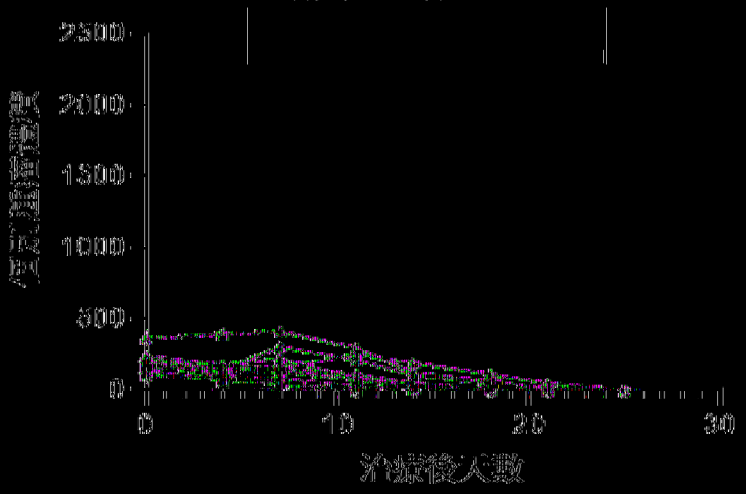
[圖 23]


2000
1600
1200
800
400
0
0
10
20
30
媒劑
IDR2-AXC063
IDR2-AXC079

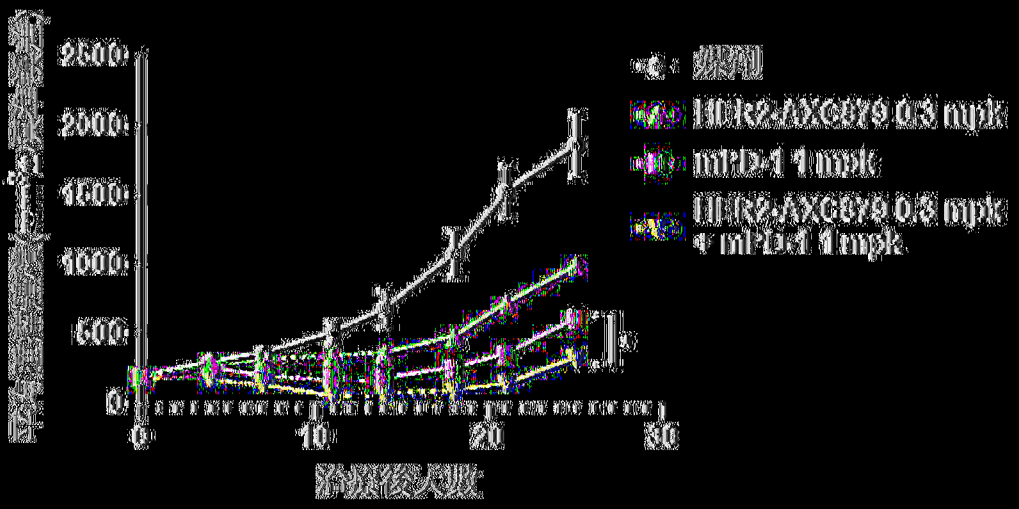
[圖 24A]


2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
冷凍後入數

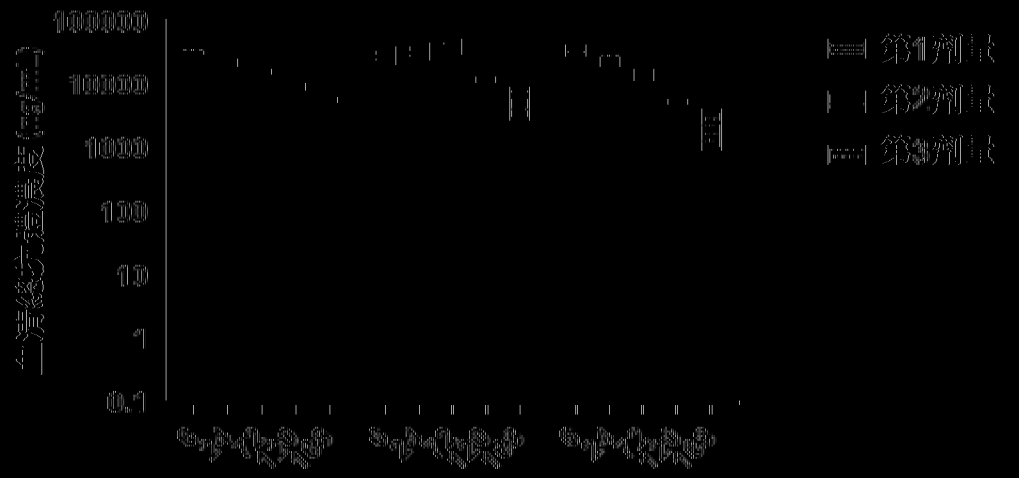
[圖 24B]


2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
冷凍後入數

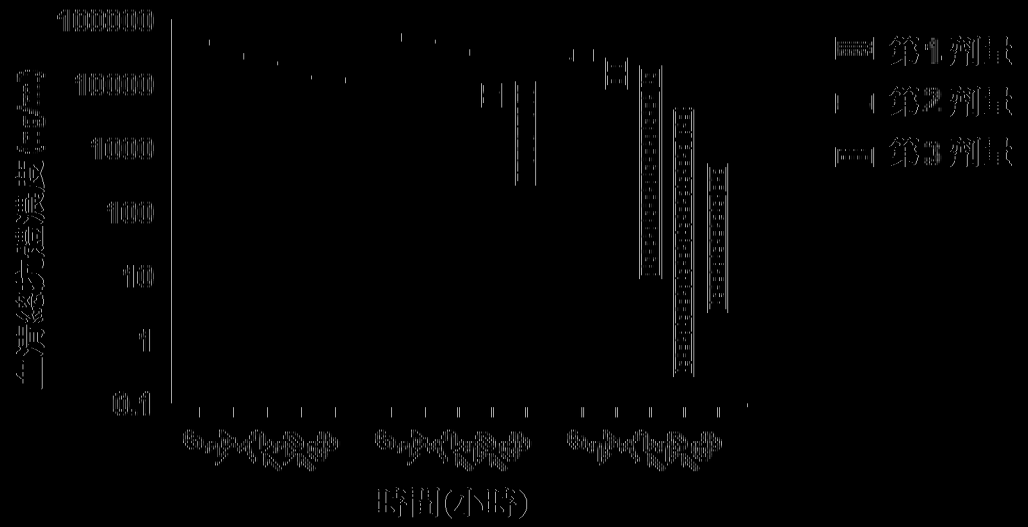
[圖 24C]


腫瘤體積(mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
治療後天數
溶劑
IBI322+AXG879 0.3 mpk
mPD-1 1 mpk
IBI322+AXG879 0.3 mpk + mPD-1 1 mpk

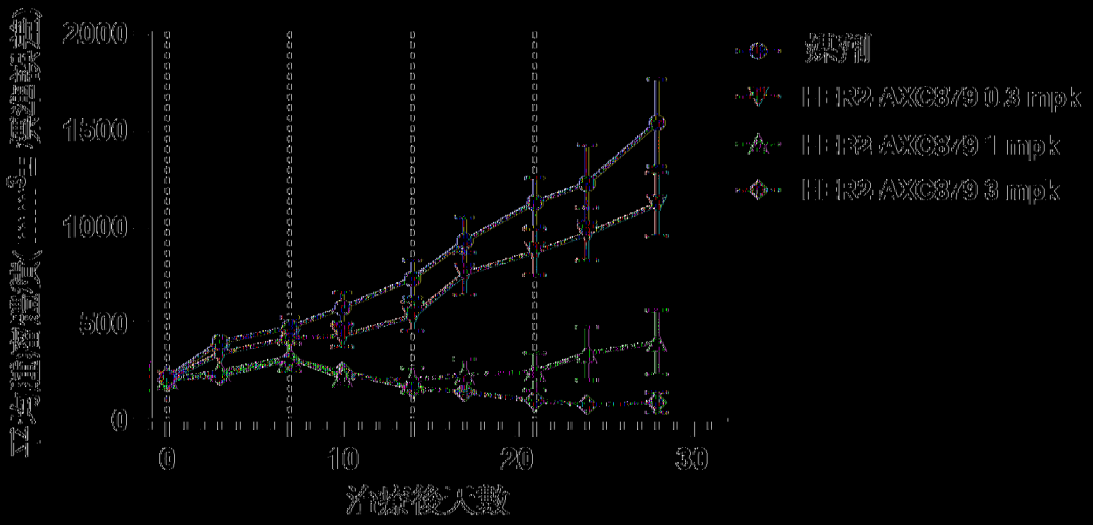
[圖 25]


100000
10000
1000
100
10
1
0.1
第1劑量
第2劑量
第3劑量
時間(小時)

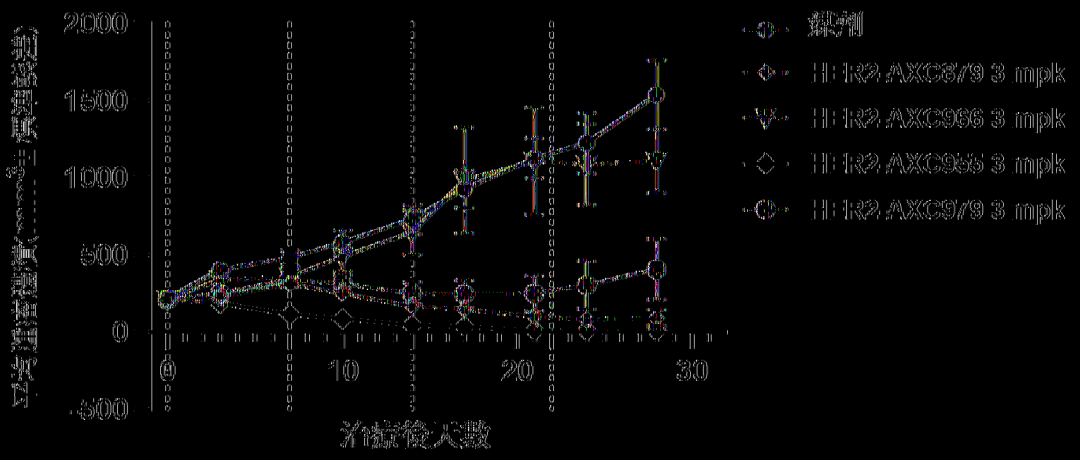
[圖 26A]


1000000
100000
10000
1000
100
10
1
0.1
第1剤
第2剤
第3剤
時間(小時)

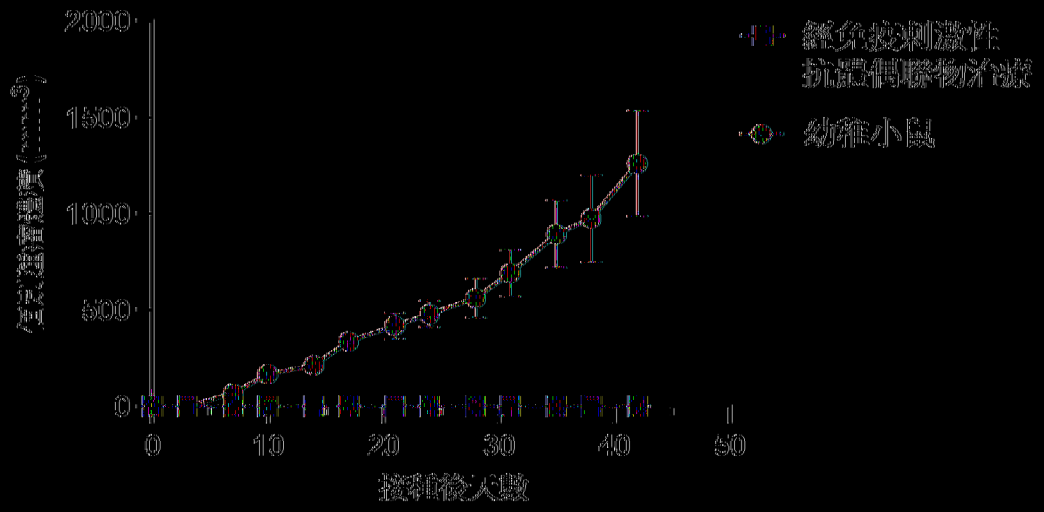
[圖 26B]


2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
對照劑
HBR2.AXC8/9 0.3 mpk
HBR2.AXC8/9 1 mpk
HBR2.AXC8/9 3 mpk
注射後天數

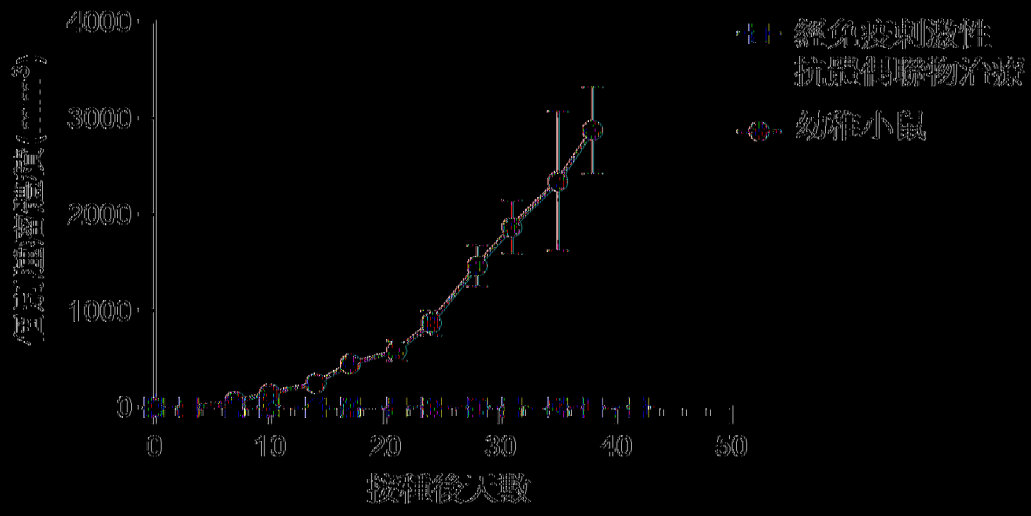
[圖 27]


腫瘤體積 (mm3)
2000
1500
1000
500
0
-500
0
10
20
30
注射後天數
載劑
H1R2.AXC879 3 mpk
H1R2.AXC966 3 mpk
H1R2.AXC955 3 mpk
H1R2.AXC979 3 mpk

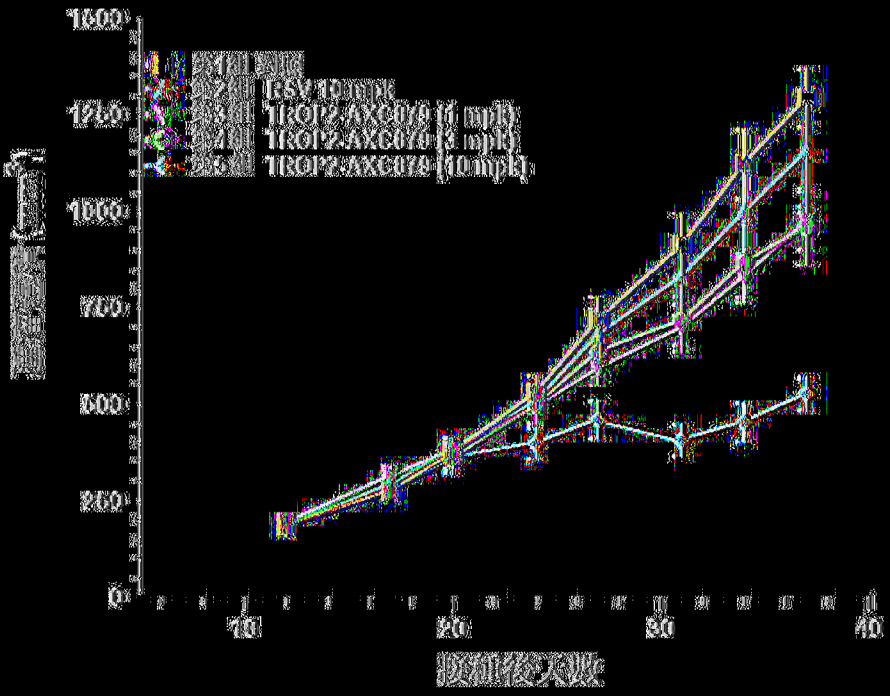
[圖 28]


腫瘤體積 (mm3)
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
接種後天數
經化學刺激性抗體傳遞物質
幼稚小鼠

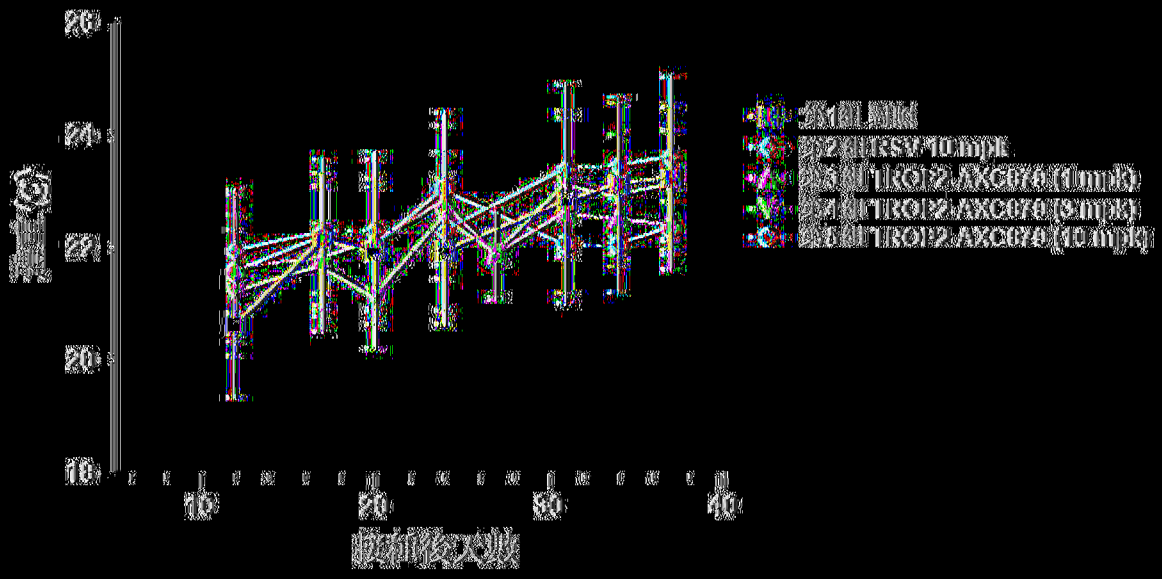
[圖 29A]


4000
3000
2000
1000
0
0
10
20
30
40
50
接種後天數
經免疫刺激性
抗體相關物質組
幼稚小鼠

[圖 29B]


1600
1200
1000
800
600
400
200
0
10
20
30
40
接種後天數
RSV antigen
TROP2-AXC070 (1 mpk)
TROP2-AXC070 (3 mpk)
TROP2-AXC070 (10 mpk)

[圖 30A]


26
24
22
20
18
16
20
30
40
模擬前後次數
第1組測試
第2組RSV-10mpk
第3組TROI2-AXC070-(1mpk)
第4組TROI2-AXC070-(3mpk)
第5組TROI2-AXC070-(10mpk)

[圖 30B]