



(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 201818974 A

(43) 公開日：中華民國 107 (2018) 年 06 月 01 日

(21) 申請案號：106139296

(22) 申請日：中華民國 106 (2017) 年 11 月 14 日

(51) Int. Cl. :

A61K47/68 (2017.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61K31/7056(2006.01)

A61K31/40 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30) 優先權：2016/11/14

美國

62421429

(71) 申請人：醣基生醫股份有限公司 (中華民國) CHO PHARMA INC. (TW)

臺北市南港區園區街 3 號 F 棟 18 樓

(72) 發明人：林 南宏 LIN, NAN-HORNG (US)；蔡長昇 TSAI, CHARNG-SHENG (TW)；洪鼎

鈞 HUNG, TING-CHUN (TW)；莊宏揚 CHUANG, HONG-YANG (TW)

(74) 代理人：何美瑩

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：15 項 圖式數：10 共 141 頁

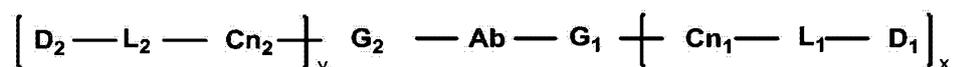
(54) 名稱

抗體藥物複合體

ANTIBODY-DRUG CONJUGATES

(57) 摘要

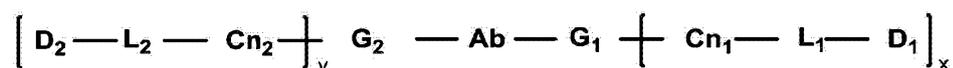
本揭示內容提供一種抗體藥物複合體(antibody-drug conjugate, ADC)，包括如式(I)所示之結構或其藥學上可接受之鹽類：



式(I)

其中，Ab 為不具醣基之抗體(即為抗體的蛋白質部分)；G₁ 及 G₂ 可為相同或不同之醣單元；C_{n₁} 及 C_{n₂} 可為相同或不同之複合單元；L₁ 和 L₂ 可為相同或不同之連結單元；D₁ 和 D₂ 可為相同或不同的藥物單元；以及在 x + y ≠ 0 的前提下，x 和 y 係獨立為 0 至 8 之整數。

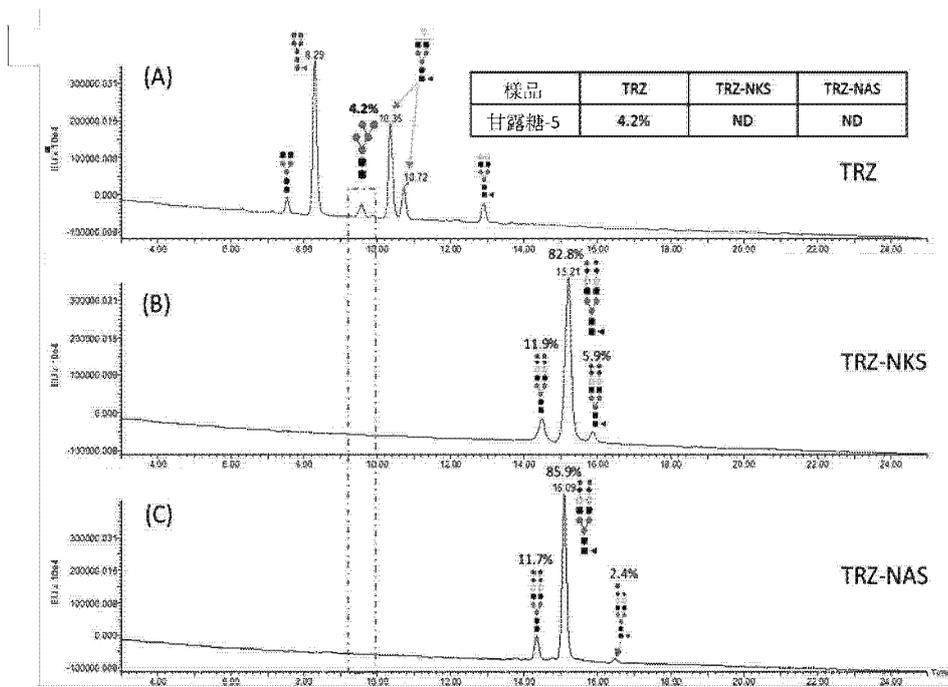
An antibody-drug conjugate (ADC) has a structure represented by Formula (I):



Formula (I)

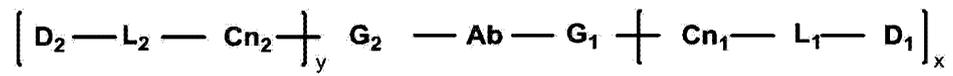
or a pharmaceutically acceptable salt thereof, wherein Ab is an antibody without glycans (i.e., the protein portion of an antibody); G₁ and G₂ are glycan moieties, which may be the same or different; C_{n₁} and C_{n₂} are conjugation moieties, which may be the same or different; L₁ and L₂ are linker moieties, which may be the same or different; D₁ and D₂ are drug units which may be the same or different; and x and y are independently an integer from 0 to 8, provided that x + y ≠ 0.

指定代表圖：



第 3 圖

特徵化學式：



【發明說明書】

【中文發明名稱】 抗體藥物複合體

【英文發明名稱】 ANTIBODY-DRUG CONJUGATES

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種抗體藥物複合體(antibody-drug conjugate, ADC),尤指一種透過醯基使藥物單元專一性連接至抗體接點的抗體藥物複合體。

【先前技術】

【0002】 抗體藥物複合體(antibody-drug conjugat, ADCs)可提供治療多種疾病或症狀的標靶治療,例如提供癌症的標靶治療。抗體藥物複合體是一種複合分子,其包括連結至生物活性藥物(例如細胞毒殺性藥劑或藥物)的抗體。藉由組合特定抗體標的以及藥物療效,抗體藥物複合體可以辨別正常細胞與癌細胞,進而減少副作用。

【0003】 抗體藥物複合體一般包括一可辨識特殊標記(例如腫瘤標記)之抗體以及藉由偶聯結至抗體之抗癌藥物(例如細胞毒素)。在身體內,抗體追蹤這些蛋白質標記,並使自己與癌細胞表面接觸。抗體與標的蛋白(抗原)之間的生化反應會引發腫瘤細胞內的訊號傳遞,而後使抗體藥物複合體內化;待抗體藥物複合體內化以後,細胞毒性藥物被釋放出來並且殺死癌細胞。由於此標靶過程,藥物具有較低的副作用。

【0004】 在抗體藥物複合體中,抗體與細胞毒性藥物(例如抗癌藥物)之間的穩定連結相當重要。連結基(linkers)可為裂解性或非裂解性。在使用非裂解性

連結基的情況下，抗體、連結基及細胞毒性藥物(抗癌藥物)全部皆進入標的癌細胞中，抗體可在癌細胞內被分解，而細胞毒性藥物可在細胞內被釋放出來。另一方面，在使用裂解性連結基的情況下，細胞毒性藥物可能會在標的細胞外就被釋放出來，可能引發針對鄰近癌細胞的「旁觀者殺傷效應」(bystander killing)。

【0005】 在抗體藥物複合體早期的發展中，已經研究出部分的共軛化學性。在非選擇性的模式中，藥物基團通常會接觸抗體的離胺酸或半胱胺酸側鏈，因此，非選擇性的共軛方式使抗體藥物複合體一般包含具有不同藥物抗體比(drug-antibody ratio, DAR)的分子混合物，因此產生不同的藥物動力學性質。

【0006】 近年來，生物科技已發展出接點專一性的共軛方式，能夠固定連結基和承載的細胞毒殺藥物的數量與準確的連結位置。舉例來說，此類方法包括經由硫基修飾的抗體、或其他修飾後具有結合區的相似抗體。

【0007】 提供接點專一性接觸的另一種方法為：使承載物接觸抗體的醣基。即使該方法可提供接點專一性的接觸，但因抗體上醣基的異質性(heterogeneity)，該方法可能無法製造出同質的抗體藥物複合體。

【0008】 典型的IgG包含位於Fc區域Asn297位置的N-醣基。N-醣基一般為具有相當結構異質性的雙分支(biantennary)複合型，其中核心五聚醣可以不同的核心海藻糖(Fuc)、等分N-乙醯基葡萄糖胺(GlcNAc)、末端半乳糖(Gal)、及末端唾液酸(Sia)修飾。N-醣基的組成可影響Fc區域的構形，因而調節抗體性質，例如穩定性、免疫原性、效用功能(effector functions)、抗體介導的發炎反應、以及補體活化作用。

【0009】 具有接點專一性的抗體藥物複合體係以異質性醣基為基礎，造成高度變異性的藥物抗體比(DAR)以及藥物動力學特性。因此，目前亟需發展一種

較佳的接點專一性抗體藥物複合體之製備方法，以使組合物內具有實質相同的抗體藥物複合體。

【發明內容】

【0010】 本發明之實施方式係關於抗體藥物複合體，其利用醣基團與承載物接觸。抗體的醣基可以被修飾為實質相同物，此類醣基修飾可利用醣苷內切酶進行。例如，在天然抗體上的醣基可被醣苷內切酶切割分解成一種或多種醣基殘基。然後，具有特定結構的醣基可以與剩下的醣基殘基結合，以產生具有實質相同醣基結構的抗體。接著，這些抗體可用於製備抗體藥物複合體(antibody-drug conjugate, ADC)。

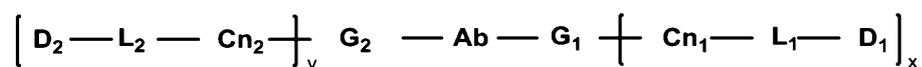
【0011】 本發明之抗體藥物複合體皆為實質均相化，它們在製造、品質控管、及體內藥物動力學特性上可具有較佳的性質，尤其是針對給藥系統的設計與監測的體內藥物動力學特性。

【0012】 由於特殊的製程，本發明之實施方式可具有相對高的平均藥物抗體比。根據本發明之實施方式，具有兩個雙分支醣基的抗體，其平均藥物抗體比為3.0以上。相反地，一般來說，在本技術領域中已知抗體的平均藥物抗體比為2.0以下。具有兩個單分支醣基的抗體，其平均藥物抗體比為1.5至2.0。較高的平均藥物抗體比表示各抗體分子可以攜帶較多的承載體，且由本發明說明書中記載的實驗證明：本發明的抗體藥物複合體作為療效藥物可具有更大的功效。此外，因本發明的抗體藥物複合體僅需少量即可達到相同的承載體輸送量，故成本較低；由於抗體價錢昂貴，此項優點可讓病患省下不少的治療費用。

【0013】 根據本發明的實施方式，具有特定結構的醣單元可以先和連結基-藥物單元(linker-drug moiety)結合，再與被切割的抗體複合。或者，具有特定結構的醣單元可以先與被切割的抗體複合，再和連結基-藥物單元結合。

【0014】 根據本發明部分實施方式，「連結基-藥物」(linker-drug)單元可以不用在與醣單元複合之前形成。換言之，連結基可以先和醣基連結，然後藥物單元再與產物單元接觸。

【0015】 根據本發明的實施方式，一種抗體藥物複合體(ADC)可具有如式(I)所示之結構或其藥學上可接受之鹽類：



式(I)

其中，

Ab為不具醣基之抗體(即為抗體的蛋白質部分)；

G₁及G₂可為相同或不同之醣單元；

Cn₁及Cn₂可為相同或不同之複合單元；

L₁和L₂可為相同或不同之連結單元；

D₁和D₂可為相同或不同的藥物單元；以及

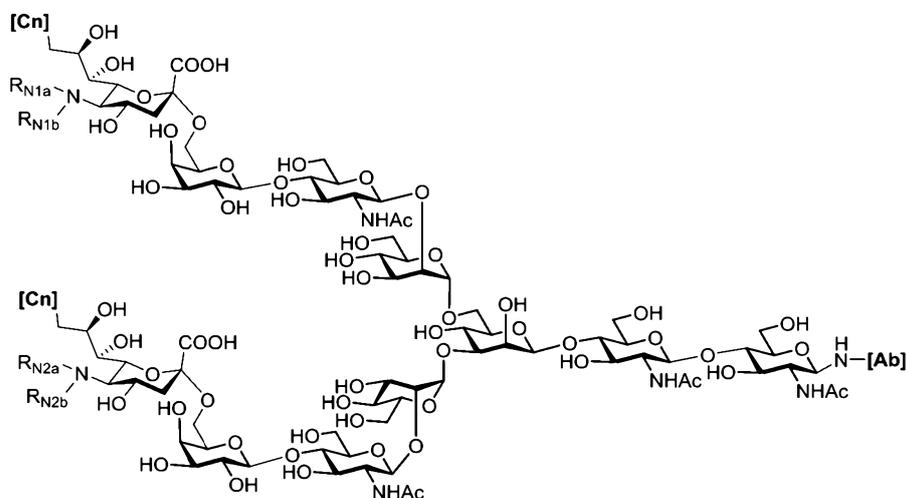
在x + y ≠ 0的前提下，x和y係各自為從0至8之整數。

【0016】 根據本發明部分實施方式，抗體藥物複合體中的抗體結合至一標的，該標的係選自由：分化群19 (Cluster of differentiation 19, CD19)、分化群22 (CD22)、分化群27 (CD27)、分化群30 (CD30)、分化群33 (CD33)、分化群37 (CD37)、分化群56 (CD56)、分化群70 (CD70)、分化群74 (CD74)、分化群79b (CD79b)、分化群138 (CD138)、分化群142 (CD142)、碳酸酐酶6(Carbonic anhydrase

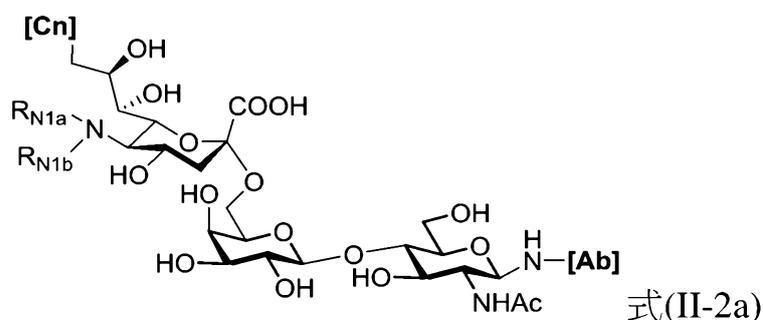
6, CA6)、鈣黏素(p-Cadherin)、癌胚抗原相關細胞黏附分子5 (Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5, CEACAM5)、LY6/PLAUR結構域蛋白3(LY6/PLAUR Domain Containing 3, C4.4a)、Delta樣配體3 (Delta-like 3, DLL3)、上皮生長因子受器 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、上皮生長因子受器VIII (epidermal growth factor receptor variant III, EGFRVIII)、外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶家族成員3 (Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 3, ENPP3)、肝配蛋白A型受體2 (ephrin type-A receptor 2, EphA2)、肝配蛋白A(EphrinA)、葉酸受體蛋白1(Folate Receptor 1, FLOR1)、纖維母細胞生長因子受體2 (Fibroblast growth factor receptor, FGFR2)、鳥苷酸環化酶C (Guanylate cyclase, GCC)、人類表皮生長因子受體2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)、受體酪胺酸激酶(receptor tyrosine kinase, cKIT)、雌激素調節蛋白1(Estrogen-Regulated Protein LIV1)、間皮素(Mesothelin, MSLN)、黏蛋白16 (Mucin 16, MUC16)、鈉依賴性磷酸鹽轉運蛋白2b (Sodium-dependent phosphate transport protein 2B, NaPi2b)、連接蛋白4 (Nectin4)、跨膜醣蛋白神經介素蛋白B (Transmembrane glycoprotein neuromedin B, gpNMB)、前列腺特異性膜抗原 (prostate specific membrane antigen, PSMA)、SLIT及NTRK相似蛋白6 (SLIT and NTRK-like protein 6, SLITRK6)、前列腺六跨膜上皮抗原1 (six transmembrane epithelial antigen of the prostate, STEAP1)、滋養層細胞表面抗原2 (trophoblast cell surface antigen, TROP2)、滋養層醣蛋白(Trophoblast glycoprotein, 5T4)、階段特異性胚胎抗原4 (stage-specific embryonic antigen 4, SSEA4)、Globohexaosylceramide, (GloboH)、五分子前趨醣脂質(Gb5)、(Sialyl-Tn, STn)、及Tn所組成之群組。

【0017】 根據本發明部分實施方式，醣基可選自由：雙醣、三醣、四醣、五醣、六醣、七醣、八醣、九醣、十醣及十一醣所組成之群組。

【0018】 根據本發明之較佳實施方式，該醣單元可具有如式(II-1a)或式(II-2a)所示之結構：



式(II-1a)



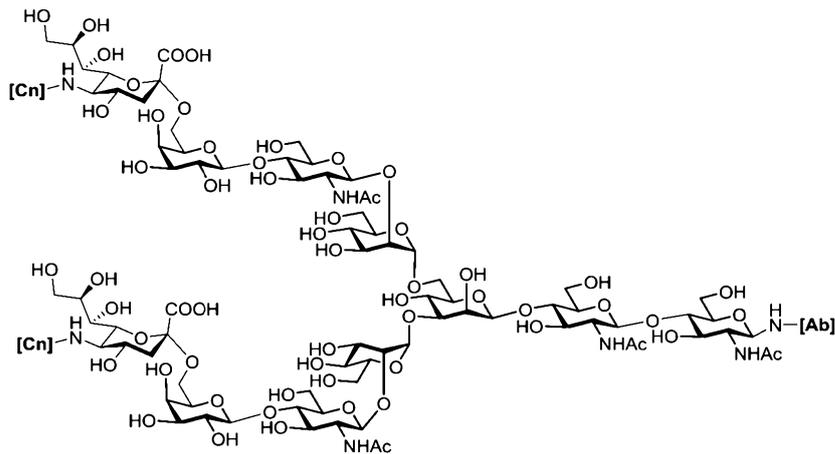
式(II-2a)

其中，

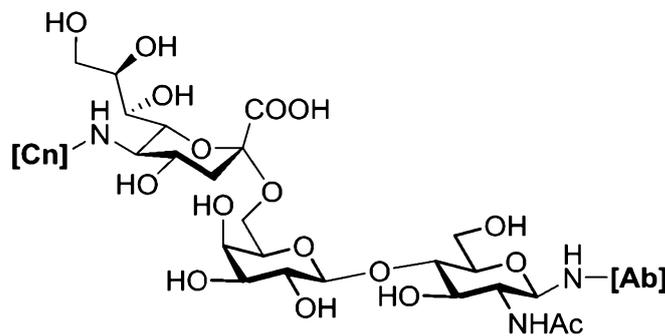
R_{N1a} 、 R_{N1b} 、 R_{N2a} 、及 R_{N2b} 各自獨立選自由氫、選擇性被取代之 C1-C6 烷基、選擇性被取代之 C1-C6 醯基、及氮保護基團所組成之群組；其中氮保護基團可為本技術領域中所熟知的合適氮保護基團，例如異丁基氧基羰基 (isotertbutyloxycarboxy group, t-BOC)、9-芴基甲氧基羰基 (9-fluorenylmethoxycarbonyl group, Fmoc)、苄基 (benzyl group, Bn)、苄氧羰基 (benzyloxycarbonyl group, Cbz)、烯丙氧羰基 (allyloxycarbonyl group, Alloc)、2-(三

甲基甲矽烷基) 乙氧基羰基(2-(trimethylsilyl)ethoxycarbonyl group, Teoc)、2,2,2-三氯乙氧羰基(2,2,2-trichloroethoxycarbonyl,Troc)、二苯甲基(diphenylmethyl group, Dpm)、三苯甲基(trityl group, Tr)、9-苯芴基(9-phenylfluorenyl group, PhFl)、及對甲氧基苄基(p-methoxybenzyl group, PMB)；[Ab] 表示抗體的接點；以及 [Cn] 表示複合單元的接點。

【0019】 根據本發明之較佳實施方式，該醣單元可具有如式(II-1b)或式(II-2b)所示之結構：



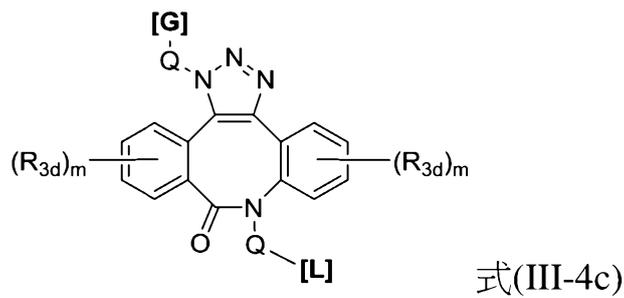
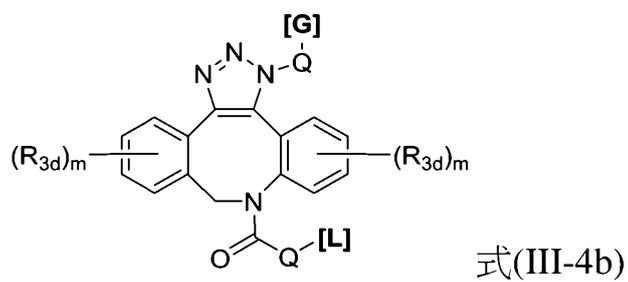
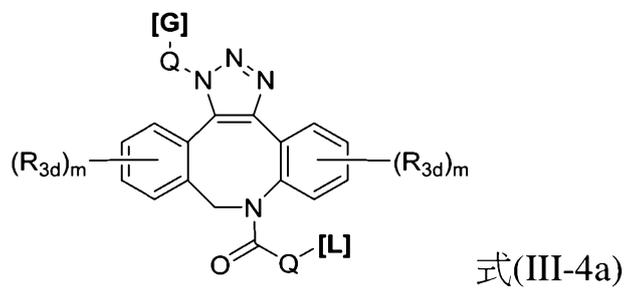
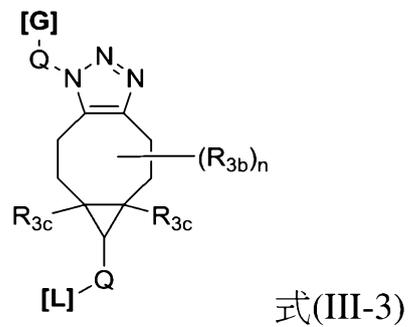
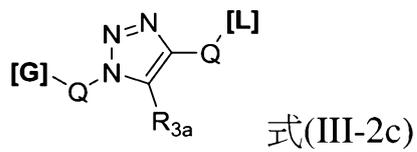
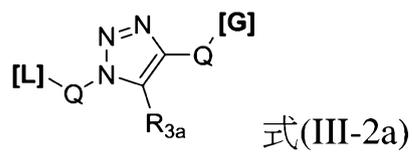
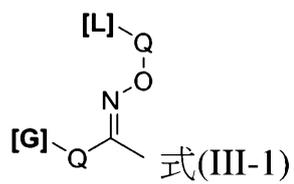
式(II-1b)

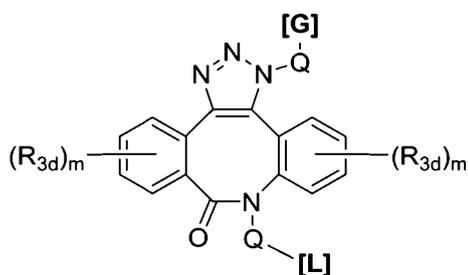


式(II-2b)。

其中[Ab] 表示抗體的接點；[Cn] 表示複合單元的接點。

【0020】 根據本發明之部分實施方式，該複合單元可選自由：式(III-1)、式(III-2a)、式(III-2b)、式(III-2c)、式(III-2d)、式(III-3)、式(III-4a)、式(III-4b)、式(III-4c)、及式(III-4d)之結構所組成的群組；





式(III-4d)

其中，

Q 係 Y1+Y2 連接基團(spacer group)，其中 Y1 和 Y2 係獨立選自由：直接鍵結、 $-(CH_2)_n-$ 、 $-O-$ 、 $-NH-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-(CH_2)_nO-$ 、 $-O(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_n-C(O)-$ 、 $-C(O)(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_n-NH-$ 、 $-NH-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_n-NHC(O)-$ 、 $-C(O)(CH_2)_n-NHC(O)-$ 、 $(CH_2)_nSCH_2C(O)-$ 、及 $-(CH_2CH_2O)_m$ 所組成之群組；

R_{3a} 係選自由：氫、鹵素、C1-C6 烷基所組成之群組；

R_{3b} 係獨立選自由：氫、鹵素、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、選擇性被取代之 C1-C6 烷基、選擇性被取代之 C1-C6 烷氧基、選擇性被取代之 C1-C24 環烷基、選擇性被取代之 C6-C24 芳基、選擇性被取代之 C7-C24 芳烷基、選擇性被取代之 C4-C24 雜芳基、及選擇性被取代之 C5-C24 雜芳烷基所組成之群組；

R_{3c} 係獨立選自由：氫、鹵素、選擇性被取代之 C1-C6 烷基、選擇性被取代之 C6-C24 芳基、選擇性被取代之 C7-C24 芳烷基、選擇性被取代之 C4-C24 雜芳基、及選擇性被取代之 C5-C24 雜芳烷基所組成之群組；

R_{3d} 係獨立選自由：氫、鹵素、OH、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、選擇性被取代之 C1-C6 烷基、選擇性被取代之 C1-C6 烷氧基所組成之群組；

n 為 1 至 8 的整數，亦包括 1 及 8；

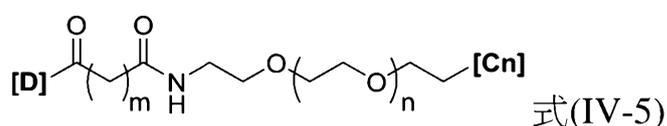
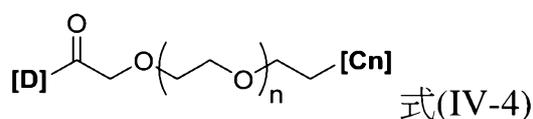
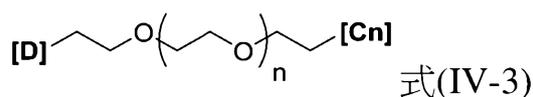
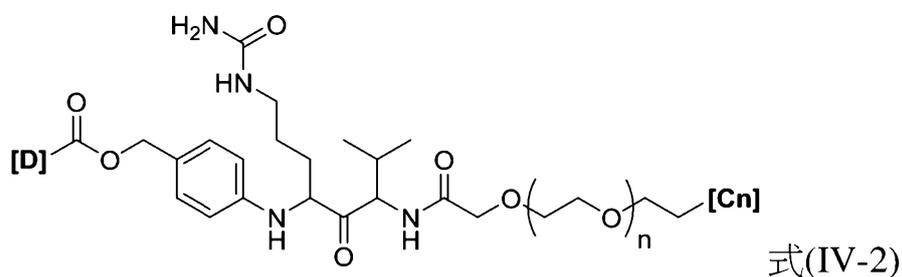
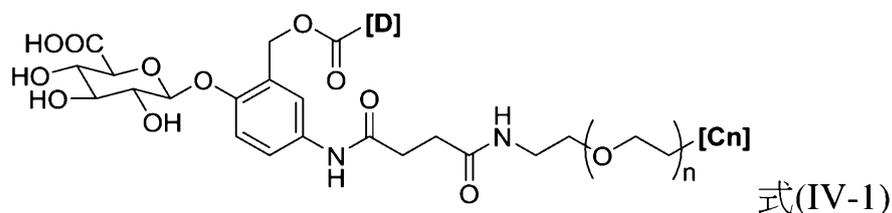
m 為 1 至 4 的整數，亦包括 1 及 4；

[G] 表示醣單元的接點；以及

[L] 表示連結單元的接點。

【0021】 根據本發明之部分實施方式，「連結單元」(linker moiety)可為一直接鍵結。換言之，藥物係直接連結到複合單元而不需中間連結基。根據本發明之部分實施方式，連結單元可為裂解性或非裂解性。裂解性的連結單元，例如：可包含化學鍵(如酯或醯胺)，其可水解/降解或可在體內被酵素切割。根據本發明之部分實施方式，連結單元可為水溶性或非水溶性。

【0022】 根據本發明之較佳實施方式，連結單元可選自由：式(IV-1)、式(IV-2)、式(IV-3)、式(IV-4)、及式(IV-5)結構所組成之群組；



其中，

[Cn] 表示複合單元的接點；

[D] 表示藥物單元的接點；

並且m和n各自為0至6的整數，亦包括0及6。

【0023】 根據本發明之部分實施方式，該藥物單元(承載物)可選自由：單甲基澳瑞他汀 E (Monomethyl auristatin E, MMAE)、單甲基澳瑞他汀 F (Monomethyl auristatin F, MMAF)、單甲基澳瑞他汀 D (Monomethyl auristatin D, MMAD)、美登素 DM1/DM4 (Mertansine, Maytansinoid DM1/DM4)、紫杉醇 (Paclitaxel)、多西他賽 (Docetaxel)、埃博黴素 B (Epothilone B)、埃博黴素 A (Epothilone A)、CYT997、澳瑞他汀酪胺磷酸鹽 (Auristatin tyramine phosphate)、澳瑞他汀氨基喹啉 (Auristatin aminoquinoline)、Halocombstatins、刺孢霉素 θ (Calicheamicin theta)、7-乙基-10-羥基-喜樹鹼 (SN-38) (7-Ethyl-10-hydroxy-camptothecin (SN-38))、吡咯苯並二氮雜卓 (Pyrrolobenzodiazepine, PBD)、水鬼蕉鹼 (Pancratistatin)、環磷酸酯 (Cyclophosphate)、Cribrostatin-6、Kitastatin、渦輪他汀 1-4 (Turbostatin 1-4)、海洛因他汀 (Halocombstatins)、Silstatins、前微管菌素 D (Pretubulysin D)、及微管菌素 (Tubulysins) (微管菌素 A、B、C、D、E、F、G、H、I、U、V、及 Z) 所組成之群組。本發明另一目的係提供一種使用上述抗體藥物複合體做為用以治療癌症之醫藥組合物的方法。根據本發明之部分實施方式，該癌症可為腦癌、肺癌、乳癌、口腔癌、食道癌、胃癌、肝癌、膽管癌、胰臟癌、結腸癌、腎癌、胃癌、子宮頸癌、卵巢癌或前列腺癌。

【0024】 由下列敘述和依附之申請專利範圍，可明顯推知本發明之其他特徵和優點。

【圖式簡單說明】

【0025】 第 1 圖為本發明實施例之 TRZ(天然賀癌平(Herceptin))、TRZ-N(F)(切醣後的賀癌平)、以及 TRZ-NAS/TRZ-NKS(經具有兩個修飾過的雙分支醣基醣基化修飾的賀癌平)的 SDS-PAGE 實驗結果。第 1 道：標準品，第 2 道：TRZ，第 3 道：TRZ-N(F)，第 4 道：TRZ-NAS/TRZ-NKS。

【0026】 第 2 圖為本發明實施例之 TRZ-N、TRZ-NG 及 TRZ-NGKS(經醣基化修飾的賀癌平，具有兩個修飾過的單分支醣基)的質譜圖。頂圖：TRZ-N，中圖：TRZ-NG，底圖：TRZ-NGKS。

【0027】 第 3 圖為本發明實施例之 TRZ (A 圖)、TRZ-NKS (B 圖)及 TRZ-NAS (C 圖)的醣基分析圖(glycan mapping)。各醣基波峰係利用線上 MS 分析連接至具螢光檢測的 HPLC 所判定。A 圖右邊的表格列舉出甘露糖-5(Man-5)醣基的含量，其係按照多寡排列。

【0028】 第 4 圖為本發明實施例之接點專一性抗體藥物複合體(ADCs) 的 SDS-PAGE 實驗結果。第 1 道：標準品，第 2 道：TRZ-NKS，第 3 道：TRZ-A22。

【0029】 第 5 圖為本發明實施例之接點專一性抗體藥物複合體(ADCs)的 SDS-PAGE 實驗結果。第 1 道：標準品，第 2 道：TRZ-NGKS，第 3 道：TRZ-A11-D2。

【0030】 第 6 圖為本發明實施例之接點專一性抗體藥物複合體(ADCs) 與時間相關的 SDS-PAGE 實驗結果。第 1 道：標準品，第 2 道：TRZ-NKS，第 3

道：TRZ-A09 (反應時間：15 分鐘)，第 4 道：TRZ-A09 (反應時間：30 分鐘)，第 5 道：TRZ-A09 (反應時間：60 分鐘)，第 6 道：TRZ-A09 (反應時間：120 分鐘)。

【0031】 第 7 圖為本發明實施例之 TRZ-A22 及 TRZ-NKS 的質譜圖。頂圖：TRZ-A22，底圖：TRZ-NKS。

【0032】 第 8 圖為本發明實施例之 TRZ-A01 對 HER2 的結合親和力評估 (比較組：Roche-TRZ)。

【0033】 第 9 圖為本發明實施例之 TRZ-A01(具有抗體或毒素)於 HER2 正表現細胞株 BT474 的細胞毒殺性實驗結果。

【0034】 第 10 圖為本發明實施例之 ADC A01 於 NCI-N87 異種移植模式中的抗腫瘤活性實驗結果。以 5 mg/kg TRZ-A01 Q7D x 4 處理能夠抑制 NCI-N87 的腫瘤生長。數據係以平均值±標準差表示之。「**」表示與載體控制組比較下 $P < 0.01$ 。

【實施方式】

【0035】 本發明之實施方式係關於利用醣基與承載物接觸的抗體藥物複合體。抗體的醣基可以被修飾為實質相同。在本發明中，「實質相同」表示80%以上、較佳為85%以上、更佳為90%以上、再更佳為95%以上的同質性 (homogeneity)。此類醣基修飾可利用醣苷內切酶進行。例如，在天然抗體上的醣基可被醣苷內切酶切割分解成一種或多種醣基的殘基。然後，具有特定結構的醣基可以與剩下的醣基殘基結合，以產生具有實質相同醣基結構的抗體。接著，這些經醣基化修飾的抗體可用於製備抗體藥物複合體。另一種可能是，具有特定結

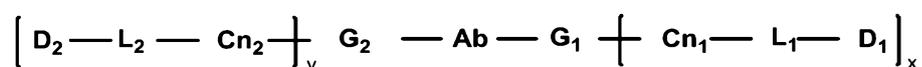
構的醣基可與連結基或帶有藥物基團的連結基結合，接著再與經醣苷內切酶切割後的抗體結合。

【0036】 根據本發明之實施方式，醣基化修飾可包含使用源自釀膿鏈球菌 (*Streptococcus Pyogenes*) 之醣苷內切酶S2 (endoglycosidase S2, EndoS2) 或其突變體，可提高轉醣化活性以及降低水解活性，使合成的抗體攜帶大量具有明確定義的N-醣基。這些帶有明確定義的N-醣基可接續用於製備抗體藥物複合體。

【0037】 由於特殊的製程，本發明之實施方式可具有相對高的平均藥物抗體比。根據本發明之實施例，具有兩個雙分支(biantennary)醣基的抗體的平均藥物抗體比為3.0以上。相反地，一般而言在本技術領域中已知抗體的平均藥物抗體比為2.0以下。具有兩個單分支醣基的抗體，其平均藥物抗體比為1.5至2.0。較高的平均藥物抗體比表示：各抗體分子可以攜帶較多的承載體，且由本發明說明書中記載的實驗證明：本發明的抗體藥物複合體作為療效藥物可具有更大的功效。此外，因本發明的抗體藥物複合體僅需少量即可達到相同的承載體輸送量，故成本較低；由於抗體價錢昂貴，此項優點可讓病患省下不少的治療費用。

【0038】 根據本發明之實施方式，抗體藥物複合體中的藥物單元(承載物)可以使用連結基與醣基接觸、或不使用連結基直接與醣基接觸。

【0039】 根據本發明的實施方式，一種抗體藥物複合體可具有如式(I)所示之結構或其藥學上可接受之鹽類：



式(I)

其中，

Ab為不具醣基之抗體(即為抗體的蛋白質部分)；

G₁及G₂可為相同或不同之醣單元；

Cn₁及Cn₂可為相同或不同之複合單元；

L₁和L₂可為相同或不同之連結單元；

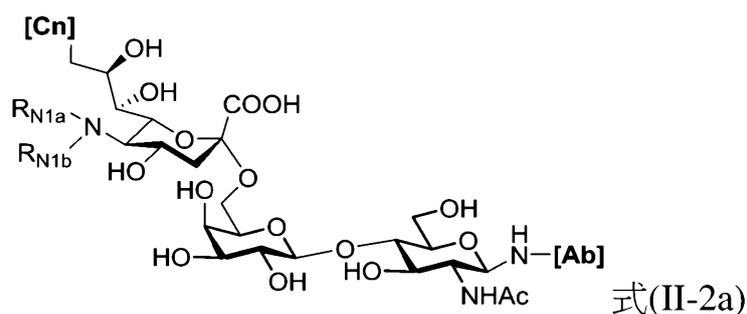
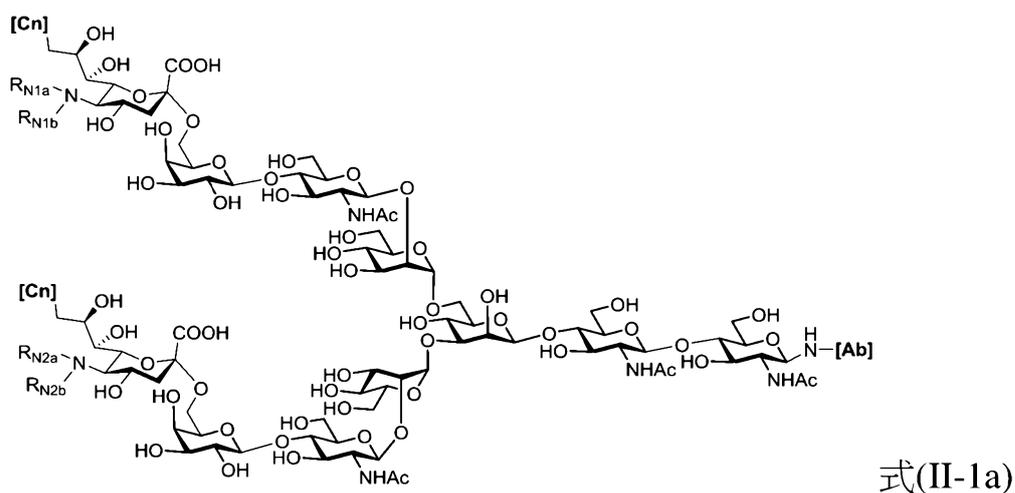
D₁和D₂可為相同或不同的藥物單元；以及

在 $x + y \neq 0$ 的前提下，x 和 y 係獨立為 0 至 8 之整數。

【0040】 根據本發明部分實施方式，抗體藥物複合體中的該抗體可自主結合至一標的，例如：分化群 19 (CD19)、分化群 22 (CD22)、分化群 27 (CD27)、分化群 30 (CD30)、分化群 33 (CD33)、分化群 37 (CD37)、分化群 70 (CD70)、分化群 74 (CD74)、分化群 79b (CD79b)、分化群 138 (CD138)、分化群 142 (CD142)、碳酸酐酶 6(CA6)、鈣黏素(p-Cadherin)、癌胚抗原相關細胞黏附分子 5 (CEACAM5)、LY6/PLAUR 結構域蛋白 3(C4.4a)、Delta 樣配體 3 (DLL3)、上皮生長因子受器 (EGFR)、上皮生長因子受器 VIII (EGFRVIII)、外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶家族成員 3 (ENPP3)、肝配蛋白 A 型受體 2 (EphA2)、肝配蛋白 A(EphrinA)、葉酸受體蛋白 1(FLOR1)、纖維母細胞生長因子受體 2 (FGFR2)、鳥苷酸環化酶 C (GCC)、人類表皮生長因子受體 2(HER2)、受體酪胺酸激酶 (cKIT)、雌激素調節蛋白 1(LIV1)、間皮素(MSLN)、黏蛋白 16 (MUC16)、鈉依賴性磷酸鹽轉運蛋白 2b (NaPi2b)、連接蛋白 4 (Nectin4)、跨膜醣蛋白神經介素蛋白 B (gpNMB)、前列腺特異性膜抗原(PSMA)、SLIT 及 NTRK 相似蛋白 6 (SLITRK6)、前列腺六跨膜上皮抗原 1 (STEAP1)、滋養層細胞表面抗原 2 (TROP2)、滋養層醣蛋白 (5T4)、階段特異性胚胎抗原 4 (SSEA4)、

Globohexaosylceramide (GloboH)、五分子前趨醣脂質(Gb5)、(Sialyl-Tn, STn)及 Tn 所組成之群組。

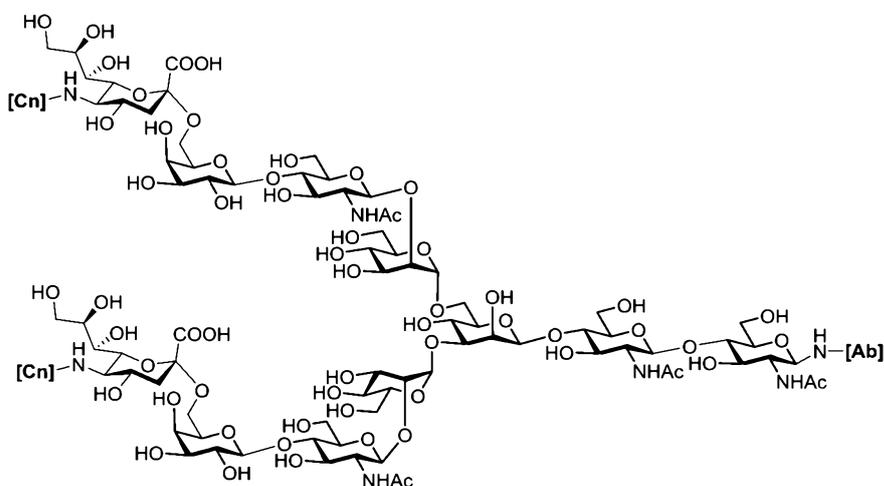
【0041】 根據本發明部分實施方式，醣基可選自由：雙醣、三醣、四醣、五醣、六醣、七醣、八醣、九醣、十醣及十一醣所組成之群組。根據本發明之較佳實施方式，該醣單元可具有如式(II-1a)或式(II-2a)所示之結構：



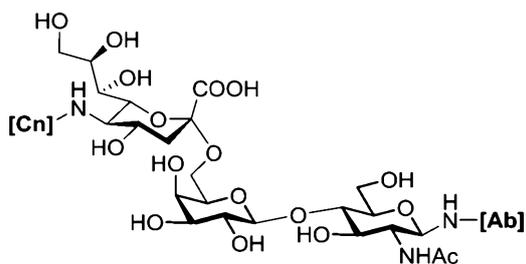
其中， R_{N1a} 、 R_{N1b} 、 R_{N2a} 、及 R_{N2b} 係獨立選自由氫、選擇性被取代之 C1-C6 烷基、選擇性被取代之 C1-C6 醯基、及氮保護基團所組成之群組；其中氮保護基可為本技術領域中所熟知的氮保護基團，例如異丁基氧基羰基(t-BOC)、9-芴基甲氧基羰基(Fmoc)、苄基(Bn)、苄氧羰基(Cbz)、烯丙氧基羰基(Aloc)、2-(三甲基甲矽烷基)乙氧基羰基(Teoc)、2,2,2-三氯乙氧基羰基(Troc)、二苯甲基(Dpm)、三苯甲

基(Tr)、9-苄芴基(PhFl)、及對甲氧基苄基(PMB); [Ab] 表示抗體的接點; 以及[Cn] 表示複合單元的接點。

【0042】 根據本發明之較佳實施方式，該醣單元可具有如式(II-1b)或式(II-2b)所示之結構：



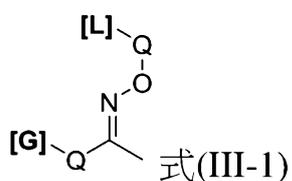
式(II-1b)



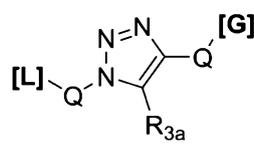
式(II-2b) ,

其中[Ab] 表示抗體的接點; 以及[Cn] 表示複合單元的接點。

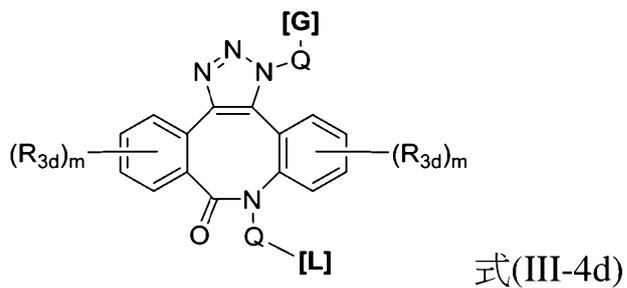
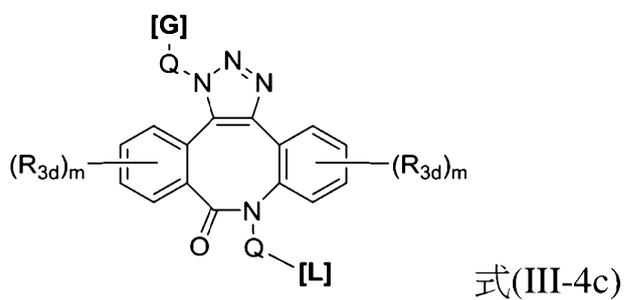
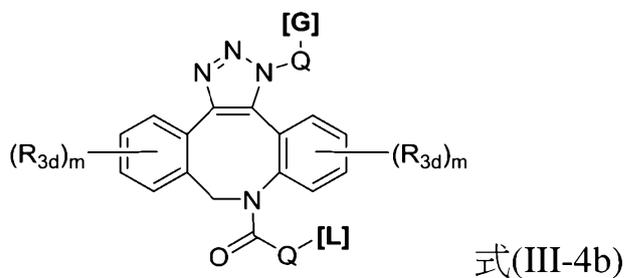
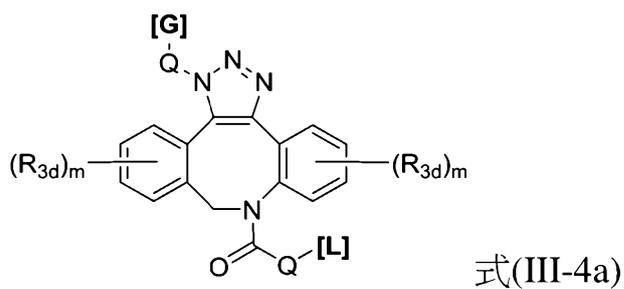
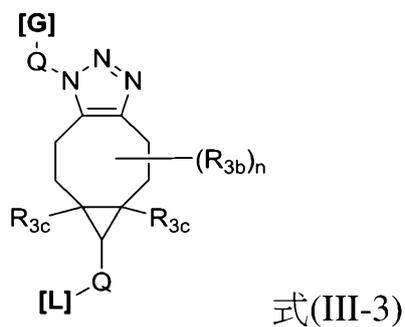
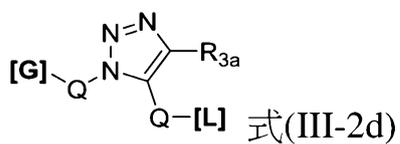
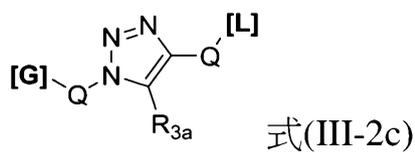
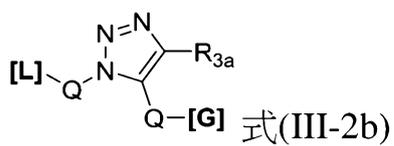
【0043】 根據本發明之部分實施方式，該複合單元可選自由：式(III-1)、式(III-2a)、式(III-2b)、式(III-2c)、式(III-2d)、式(III-3)、式(III-4a)、式(III-4b)、式(III-4c)、及式(III-4d)結構所組成之群組；



式(III-1)



式(III-2a)



其中，

Q 係 Y1+Y2 連接基團(spacer group)，其中 Y1 和 Y2 係獨立選自由：直接鍵結、 $-(\text{CH}_2)_n-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n\text{O}-$ 、 $-\text{O}(\text{CH}_2)_n-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_n-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}-$ 、 $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_n-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n-\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_n-\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $(\text{CH}_2)_n\text{SCH}_2\text{C}(\text{O})-$ 、及 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m$ 所組成之群組；

R_{3a} 係選自由：氫、鹵素、C1-C6 烷基所組成之群組；

R_{3b} 係獨立選自由：氫、鹵素、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、選擇性被取代之 C1-C6 烷基、選擇性被取代之 C1-C6 烷氧基、選擇性被取代之 C1-C24 環烷基、選擇性被取代之 C6-C24 芳基、選擇性被取代之 C7-C24 芳烷基、選擇性被取代之 C4-C24 雜芳基、及選擇性被取代之 C5-C24 雜芳烷基所組成之群組；

R_{3c} 係獨立選自由：氫、鹵素、選擇性被取代之 C1-C6 烷基、選擇性被取代之 C6-C24 芳基、選擇性被取代之 C7-C24 芳烷基、選擇性被取代之 C4-C24 雜芳基、及選擇性被取代之 C5-C24 雜芳烷基所組成之群組；

R_{3d} 係獨立選自由：氫、鹵素、OH、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、選擇性被取代之 C1-C6 烷基、選擇性被取代之 C1-C6 烷氧基所組成之群組；

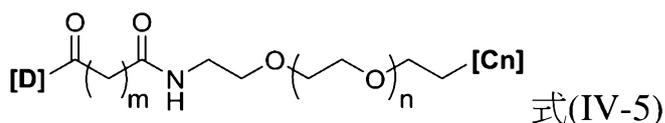
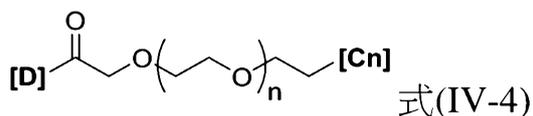
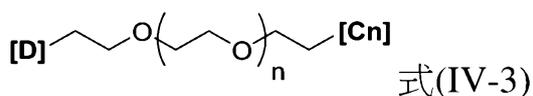
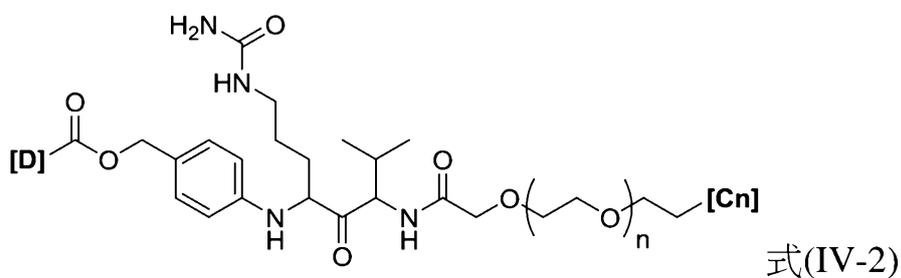
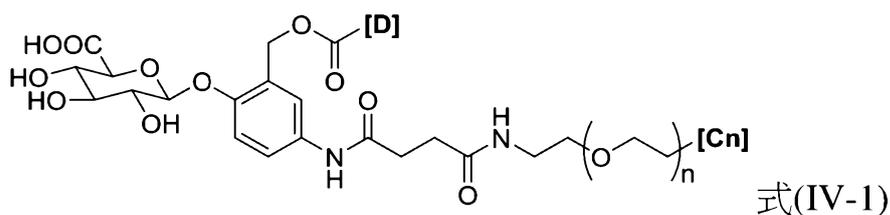
n 為 1 至 8 的整數，包含 1 及 8；

m 為 1 至 4 的整數，包含 1 及 4；

[G] 表示醣單元的接點；以及

[L] 表示連結單元的接點。

【0044】 根據本發明之較佳實施方式，連結單元可選自由：式(IV-1)、式(IV-2)、式(IV-3)、式(IV-4)、及式(IV-5)結構所組成之群組；



其中，

[Cn] 表示複合單元的接點；以及

[D] 表示藥物單元的接點；

並且m和n係獨立為0至6的整數，包含0及6。

【0045】 根據本發明之部分實施方式，該藥物(承載物)可選自由：單甲基澳瑞他汀 E (MMAE)、單甲基澳瑞他汀 F (MMAF)、單甲基澳瑞他汀 D (MMAD)、美登素 DM1/DM4 (Maytansinoid DM1/DM4)、紫杉醇、多西他賽、埃博黴素 B、埃博黴素 A、CYT997、澳瑞他汀酪胺磷酸鹽、澳瑞他汀氨基喹啉、

Halocombstatis、刺孢霉素 θ 、7-乙基-10-羥基-喜樹鹼(SN-38)、吡咯苯並二氮雜卓(PBD)、水鬼蕉鹼、環磷酸酯、Cribrostatin-6、Kitastatin、渦輪他汀1-4、海洛因他汀、Silstatins、前微管菌素 D (Pretubulysin D)、及微管菌素(Tubulysins, A、B、C、D、E、F、G、H、I、U、V、及 Z)所組成之群組。

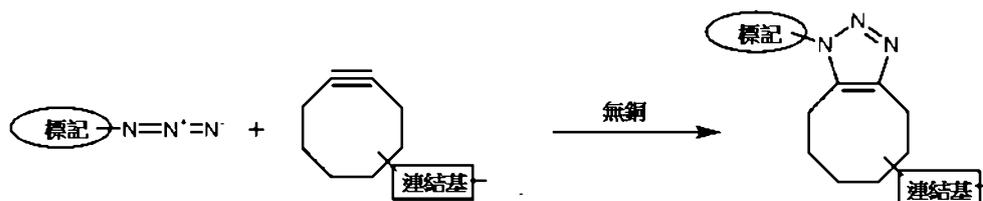
【0046】 根據本發明之實施方式，藥物單元可以先和連結基結合(在有使用連結基之情況下)，然後再與醣基結合(例如：透過上述複合單元與醣基結合)。若沒有使用連結基，藥物單元可直接與醣基結合。

【0047】 連結基和藥物之間的結合可以透過本技術領域中任一合適方法所完成。本技術領域中具有通常知識者將依據連結基和藥物的性質進而選用特定方法，且本技術領域中具有通常知識者不需過度實驗即能夠完成此結合。在稍後的段落中將描述部分實施例。一旦製備出藥物-連結單元，即可與醣單元結合。

【0048】 別種可行方式是，連結基可先和醣單元結合，然後再使藥物單元與連結基接觸。再次說明，這些方法為習知技術，本技術領域中具有通常知識者不需過度實驗即能夠進行這些反應。

【0049】 可透過本技術領域中已知的多種利用溫和反應條件的方法以結合生物分子。例如：鍵擊化學(click chemistry)屬於一種生物相容性反應，其可用於結合標誌和生物分子(可參考 H. C. Kolb; M. G. Finn; K. B. Sharpless (2001), "Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions," *Angewandte Chemie, Int'l Ed.*, 40(11): 2004–2021)。一種特別有效的鍵擊化學法係利用無銅、加壓的疊氮-炔基環加成法，將疊氮基添加至緊繃式炔基(例如環辛炔)，

以形成新穎的五員環(five-membered ring)。此類鍵擊反應的一實例係於下列反應式中說明：



【0050】 根據本發明部分實施方式，可以利用鍵擊化學法合成用於抗體藥物複合體的醣基-連結基單元。例如：醣基單元可包含一疊氮基，且連結基可包含環辛炔基(或相似的炔基)；以此類推。

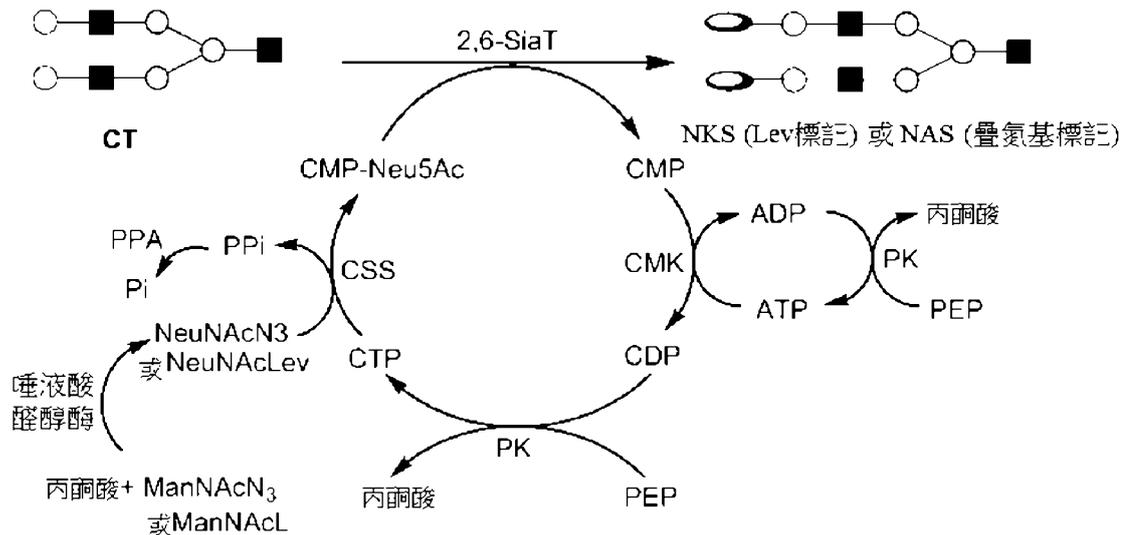
【0051】 除了鍵擊化學法以外，其他常用的耦合化學法也可用於本發明之實施方式。這些其他方法，例如可包括：透過加成或取代反應在酮/醛和胺之間形成希夫鹼(Schiff base，或肟(oxime))、或形成共價鍵等。

【0052】 本發明之實施方式係由以下的實施例加以說明，本技術領域中具有通常知識者可了解這些實施例僅用於舉例說明，在不偏離本發明範圍的其他修改或變化亦可為之。此外，本技術領域中具有通常知識者可知曉以下實施例中的具體條件或數量。然而，這些具體條件或數量僅用於舉例說明而非用於限制本發明之範圍。

【0053】 實施例

【0054】 實施例 1：經醣基化修飾抗體的製備與定性

【0055】 反應式 1：自 CT(複合型)醣基製備 NKS 或 NAS 醣基



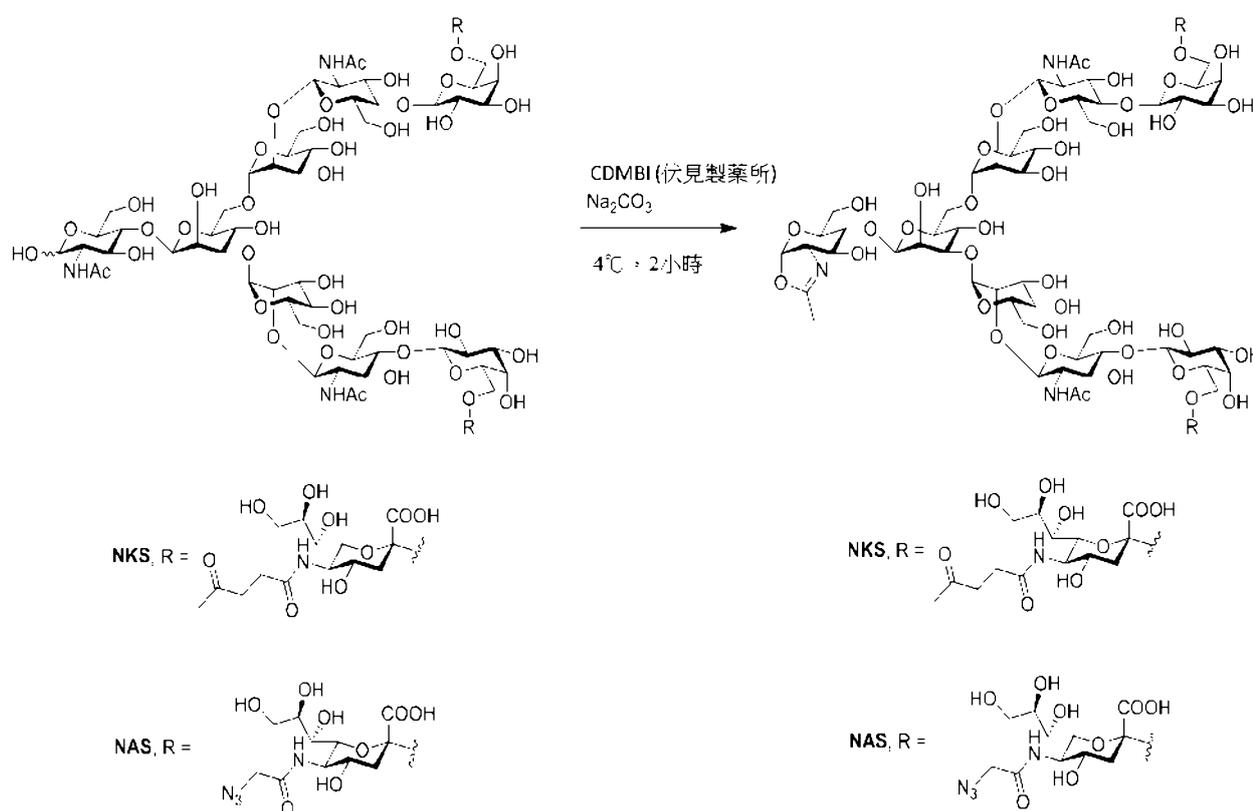
【0056】 1.1 製備 NKS/NAS 醣基

【0057】 將 CT(複合型)醣基進行唾液酸化以製備 NKS/NAS 醣基。將 SCT(唾液酸化複合型)醣基(50.5 mg, 25 μmol 溶於 50 mM Tris-HCl 緩衝液, pH 值 7.4)於 37°C 下以唾液酸酶(sialidase)(75 單位)處理 24 小時以獲得 CT 醣基, 並使用薄層色層分析儀(Thin Layer Chromatography, TLC)監測獲得的 CT 醣基。然後將該溶液於 80°C 下加熱 30 分鐘, 利用過濾移除失活的酵素, 並將該溶液於真空中濃縮, 接著透過 G-20 膠體層析(洗脫液, 90%)純化出 CT 醣基粗萃物。

【0058】 將 CT 醣基進行酵素法以製備 NKS/NAS 醣基。簡言之, 將降鈣素(calcitonin, CT) (32.8 mg, 18 μmol)、三磷酸胞苷酸(cytidine triphosphate, CTP) (5 μmol)、ManNAcN₃/ManNAcLev (40 μmol)、丙酮酸鈉(Sodium Pyruvate) (81 μmol)、磷酸烯醇丙酮酸鹽(Phosphoenolpyruvate, PEP) (55 μmol)、及三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP) (5 μmol)溶於 50 mM 的三羥甲基氨基甲烷鹽酸鹽(Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride, Tris-HCl)緩衝液(pH 8.0)中。將 α -(2,6)- 唾液酸轉移酶(20 單位)、唾液酸醯醇酶(20 單位)、CMK (10 單位)、丙酮

酸激酶 I(pyruvatekinase I, Pykf) (10 單位)、多聚磷酸(polyphosphoric acid, PPA) (10 單位)、及 Pmcss (10 單位)添加至該溶液中，且使該反應液於 37°C 下作用 8 小時，並使用薄層色層分析儀(TLC)監測該反應。待反應終止後，於 100°C 下加熱 5 分鐘使酵素失活。然後，以 G25、二乙基氨基乙基(Diethylaminoethyl, DEAE)、及 G25 管柱純化所需之 NKS/NAS (產率：29.1 mg, 80%)。ESI-TOF m/z: 2130.8349 ([M-H]⁻of NKS), 2100.7804 ([M-H]⁻of NAS)。

【0059】 反應式 2：NKS-噁唑林(oxazoline)或 NAS-噁唑林之合成



【0060】 1.2 形成 NKS/NAS-噁唑林的一般流程

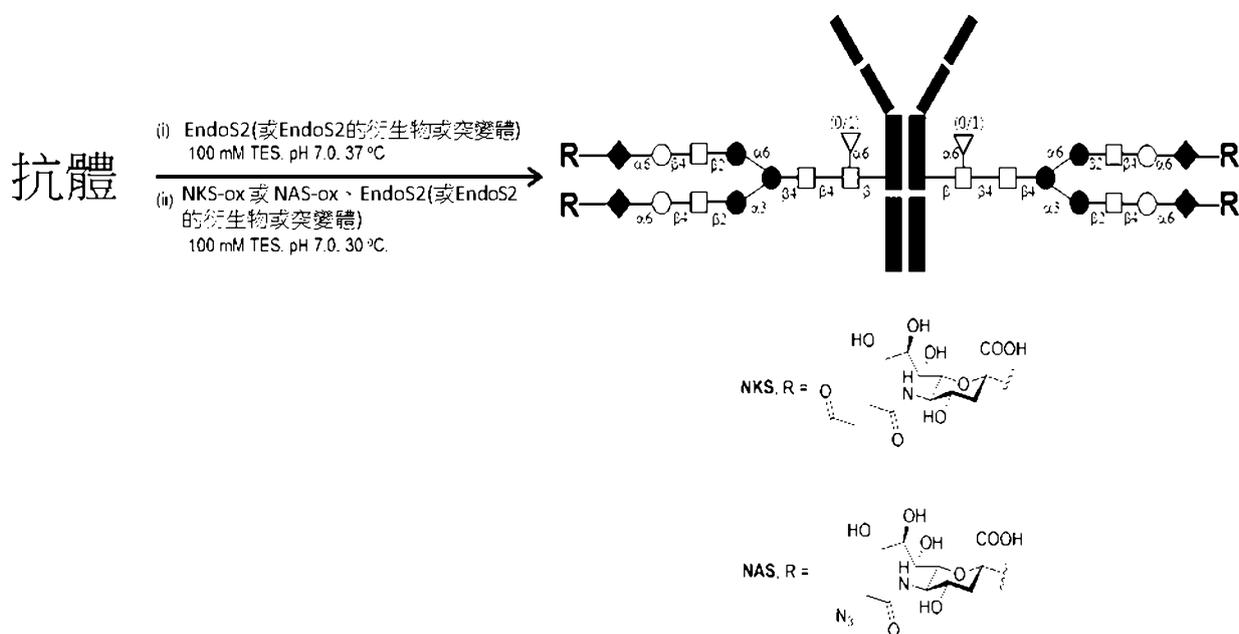
【0061】 將 NKS/NAS 糖基(13.6 mg)及 Na₂CO₃ (78.75 mg)溶於 H₂O (1.16 mL)中，冷卻至 4°C，接著添加 2-氯-1,3-二甲基-1H-苯並咪唑-3-鎊氯化物 (2-chloro-1,3-dimethyl-1H-benzimidazol-3-ium chloride, CDMBI) (48 mg)並將該反

應液於 4°C 下以 1000 rpm 震盪 2 小時。該初萃液於 3000 rpm 下離心 2 分鐘，然後收集上清液待進一步純化。使用尺寸排除管柱(G25)，以 0.01% 的三乙醇胺/水 (TEA (trithanolamine)/H₂O) 接續 100% 的 H₂O 進行洗脫，收集產物然後凍乾，以得到白色粉末的 NKS-噁唑林(NKS-ox)或 NAS-噁唑林(NAS-ox)。

【0062】 **NAS-ox** : ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.09 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 5.12 (s, 1H), 4.96 (s, 1H), 4.8 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 4.74 (s, 1H), 4.65-4.57 (m, 2H), 4.44 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.38 (t, J = 2.8 Hz, 1H), 4.23-4.13 (m, 4H), 4.06 (s, 4H), 4.25-3.46 (61H), 3.45-3.38 (m, 1H), 2.67 (dd, J = 4 Hz, 12.8 Hz, 1H), 2.08-2.04 (m, 9H), 1.72 (t, J = 12.4 Hz, 1H)。

【0063】 **NKS-ox** : ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.05 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 6.05 (s, 1H), 4.92 (s, 1H), 4.65-4.55 (m, 2H), 4.43-4.34 (m, 3H), 4.2-4.1 (m, 5H), 4.0-3.34 (m, 72H), 2.93-2.75 (m, 4H), 2.63 (dd, J = 3.6 Hz, 12.4 Hz, 2H), 2.58-2.4 (m, 5H), 2.19 (s, 7H), 2.07-1.96 (m, 11H), 1.68 (t, J = 12.0 Hz, 1H)。

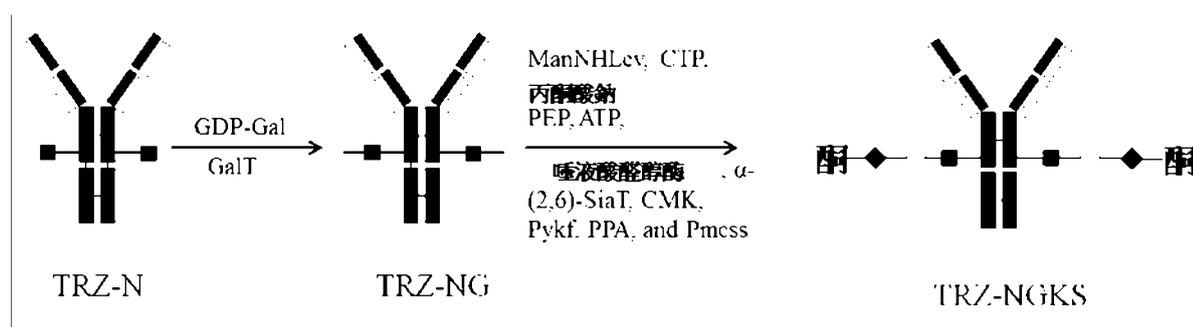
【0064】 反應式 3：抗體(1)的醣基化修飾



【0065】 1.3 以單一容器化學酵素合成法的一般流程合成經醣基化修飾的賀癌平，其具有兩個修飾過的雙分支醣基(TRZ-NKS 及 TRZ-NAS)

【0066】 取 10 mg 的賀癌平(Herceptin)溶於 100 mM 的 TES 緩衝液(pH 值 7.0)中，再添加 1 至 5 μ g 的 EndoS2(或 EndoS2 的衍生物或突變體)，使最終抗體濃度為 10 mg/mL。將該溶液於室溫下(30 $^{\circ}$ C 或 37 $^{\circ}$ C)反應 1 至 4 小時。然後，另取 10-15 μ g 的 EndoS2(或 EndoS2 的衍生物或突變體)添加至得到的賀癌平-N(F) (包含或不包含海藻糖的單 GlcNAc; N 為 GlcNAc 且 F 為海藻糖)，冷卻至 30 $^{\circ}$ C，然後添加 NKS/NAS-ox (6-8 mg)，使最終抗體濃度為 8 mg/mL，再反應 1 至 1.5 小時。待反應完成後，經轉醣化的賀癌平通過吸附管柱(Protein A)及陰離子交換管柱 Canto S (GE Healthcare)純化。利用 SDS-PAGE 分析純化後的醣基化賀癌平 (TRZ-NKS 及 TRZ-NAS)，並將緩衝液置換成磷酸鹽緩衝生理食鹽水(Phosphate buffered saline, PBS) (pH 值 7.4)待後續使用。

【0067】 反應式 4：抗體(2)的醣基化修飾



【0068】 1.4 經醣基化修飾的賀癌平後具有兩個修飾過的單觸角醣基 (TRZ-NGKS)的一般製程

【0069】 取 50mg 的 TRZ-N 溶於 Tris 緩衝液(pH 7.0),使最終濃度為 10mM 的 $MnCl_2$, 混合 1mg 的 β -1,4-半乳糖轉移酶, 然後再添加 5mg 的尿嘧啶二磷酸半乳糖(UDP-Gal), 將該混合物於 37°C 下作用 8 小時, 以生成 TRZ-NG。接著合成 TRZ-NGKS, 在 $MgCl_2$ (10 mM)溶於 Tris-HCl(100 mM)緩衝液(pH 值 8.0)中, 將 TRZ-NG 與 5 mmol 的 N-乙基神經胺酸 (Neu5Ac)、0.05 mmol 的 ATP、0.5 mmol 的 CTP、10 mmol 的 PEP 混合, 再加入 50 U 的胞嘧啶核苷單磷酸激酶 (CMK)、120 U 的 CMP-唾液酸合成酶 (CSS)、100 U 的丙酮酸激酶(pyruvatekinase, PK)、100 U 的 PPA 及 150 U 的 α -2,6-唾液酸轉移酶。將燒瓶置於 25°C 下作用至反應完成。利用質譜儀完善監控反應原料和產物(第 2 圖)。

【0070】 1.5 醣基性質分析

【0071】 利用 GlycoWorks RapiFluor-MS N-醣基套組分析 TRZ-NKS 和 TRZ-NAS 的醣基特性。根據操作手冊, 從抗體水解出醣基並標誌上醣苷胺。標誌步驟後, 利用 HILIC SPE 微洗脫板(μ Elution plate)純化樣品。純化後的醣基利用 Xevo G2-XS QToF 結合 Waters H-class UHPLC 進行分析。利用 ACQUITY UPLC 醣基 BEH 醯胺管柱 (2.1 mm X 150 mm, 1.7 μ m, Waters Corp, Milford, MA) 以 50 分鐘梯度於 0.4 mL/min 流速下分離出醣基樣品。移動相 A 由 50 mM 的甲酸銨(溶於 ddH₂O)所組成, 以及移動相 B 由乙腈所組成。醣基分析是透過操作 Xevo G2 XS QToF 質譜儀在 FastDDA 模式下收集數據。

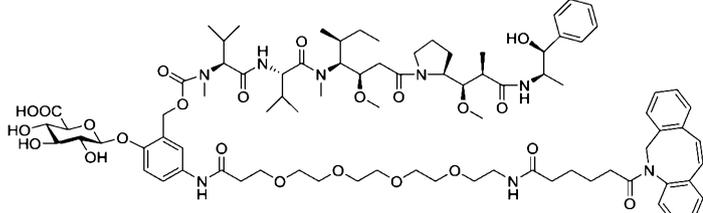
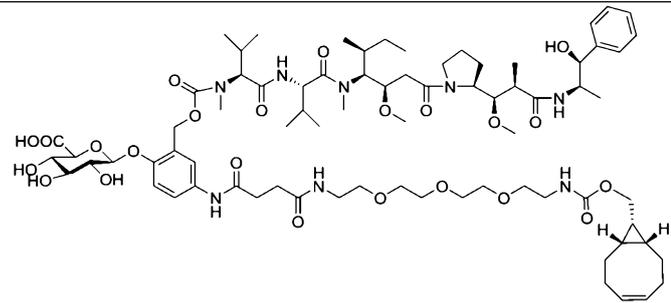
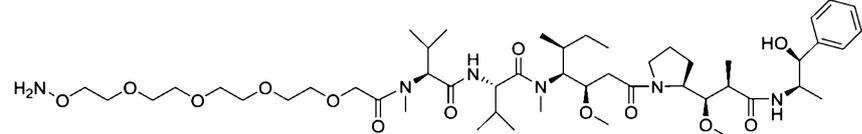
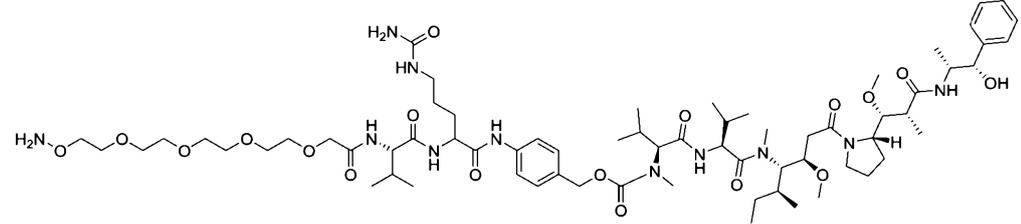
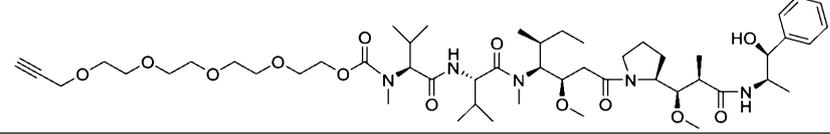
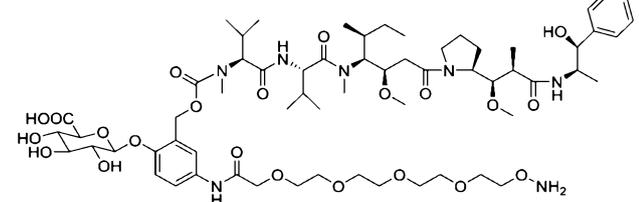
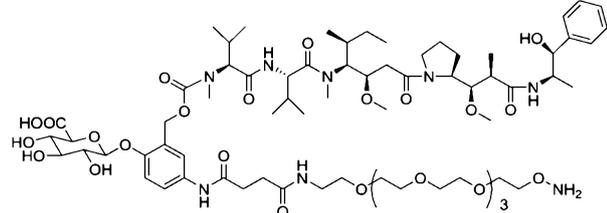
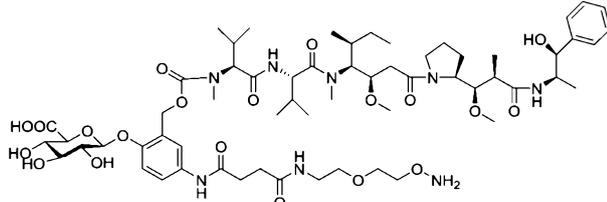
【0072】 第 3 圖顯示 TRZ、TRZ-NKS 及 TRZ-NAS 的醣基特性比較結果。TRZ 呈現出 4.2% 水平以上的高甘露糖型的 N-醣基特性。相反地, TRZ-NKS 及

TRZ-NAS 不具高甘露糖型的 N-醣基。大多數從 TRZ-NKS 及 TRZ-NAS 釋放出來的醣基為經修飾的唾液酸化(Neu5AcN₃ 及 Neu5AcLev)雙分支複合型醣基。

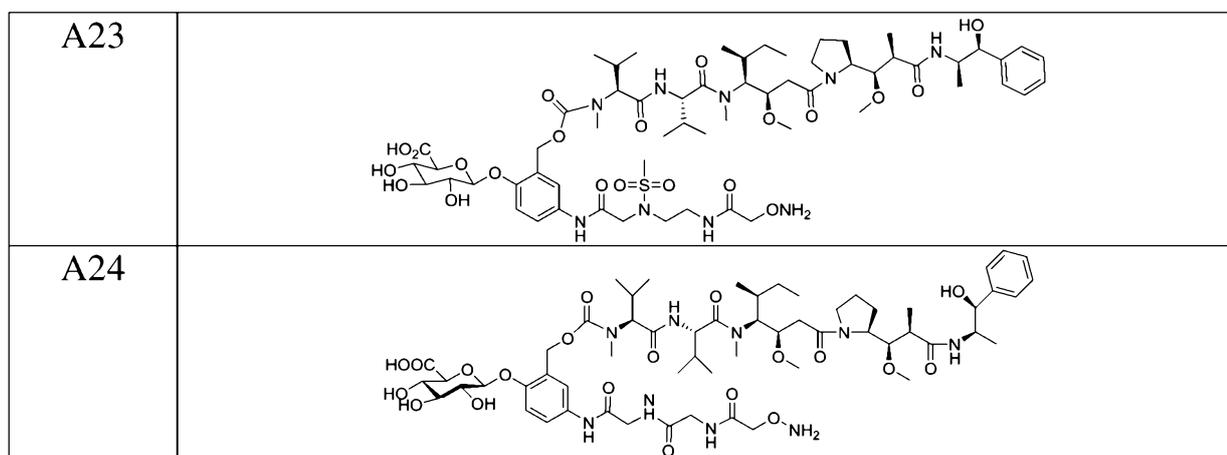
【0073】 實施例 2：承載物(A01-A24)的製備和特性

【0074】 表 1：經設計的承載物

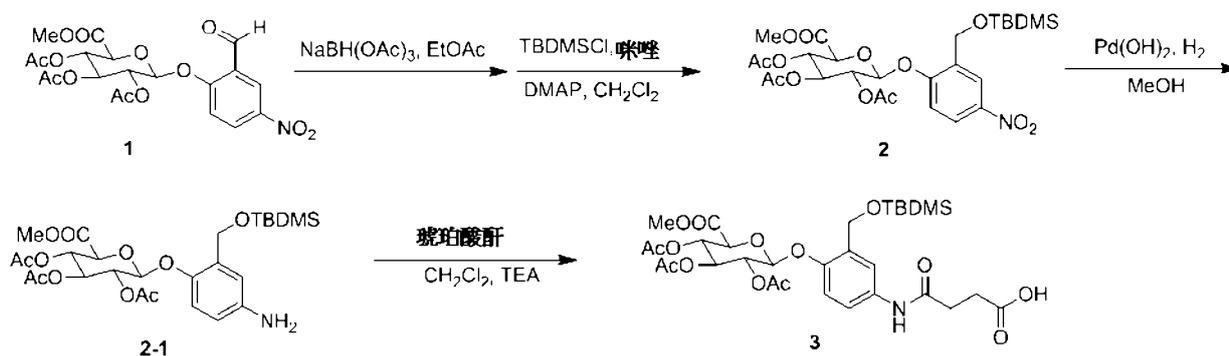
承載物	結構
A01	
A02	
A03	
A04	
A05	
A06	
A07	

<p>A08</p>	
<p>A09</p>	
<p>A10</p>	
<p>A11</p>	
<p>A12</p>	
<p>A13</p>	
<p>A14</p>	
<p>A15</p>	

<p>A16</p>	
<p>A17</p>	
<p>A18</p>	
<p>A19</p>	
<p>A20</p>	
<p>A21</p>	
<p>A22</p>	



【0075】 2.1 化合物 9 (A11)之合成與特性



【0076】 製備化合物 2

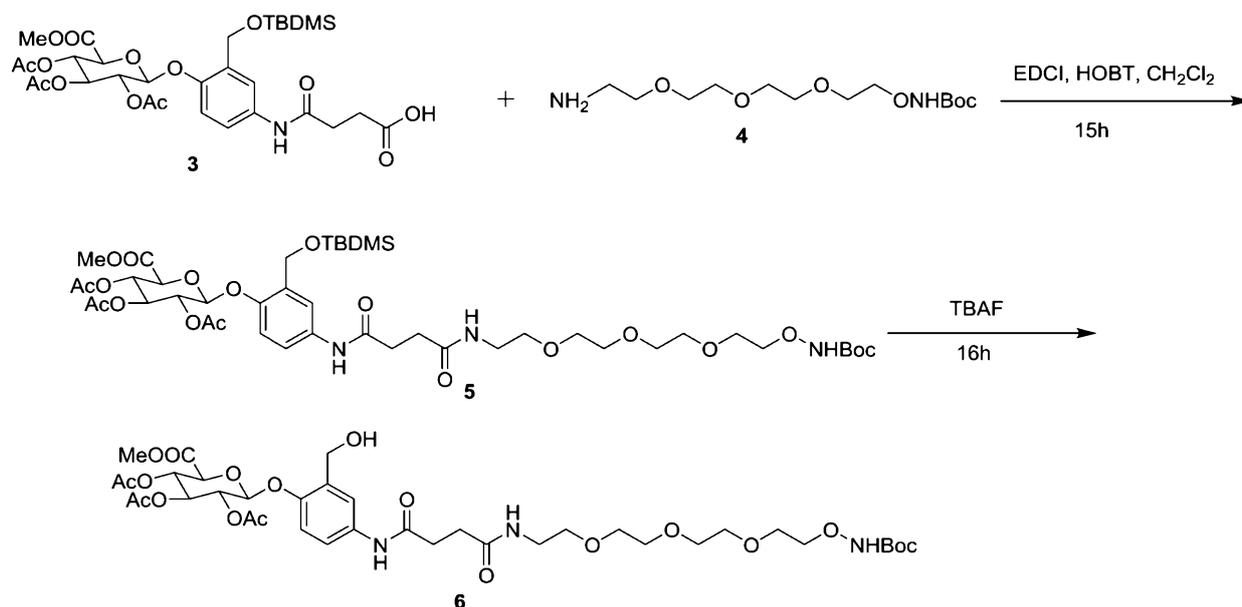
【0077】 在化合物 1(500.0 mg, 1.03 mmol)溶於 20 ml EtOAc 之溶液中添加 $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (500.0 mg, 1.54 mmol)，並於室溫下攪拌反應 20 小時。將該反應混合物用 EtOAc 稀釋並以 1 N 的 HCl、飽和 NaHCO_3 水溶液及滷水清洗。該有機萃取層使用 MgSO_4 進行乾燥後濃縮以得到用於下一步驟的黃色固體化合物(485.0 mg)。將上述所得的化合物(450.0 mg, 0.93 mmol)、咪唑(69.4 mg, 1.02 mmol)及 4-二甲氨基吡啶(4-dimethylaminopyridine, DMAP) (11.4 mg, 0.093 mmol)溶於 30 ml 的 CH_2Cl_2 溶液中，再添加重量為 154.0 mg、濃度為 1.02 mmol 的叔丁基二甲基氯矽烷(*tert*-ButyldiMethylsilyl chloride, TBDMSCl)，將該反應液於室溫下攪拌 15 小時。將該反應混合物以 CH_2Cl_2 稀釋，並以 1 N 之 HCl、飽和 NaHCO_3 水溶液

及滷水清洗。該有機萃取層使用 MgSO_4 進行乾燥後濃縮以得到黃色固體的化合物 2(490.0 mg)。88% ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.37 (t, $J = 1.6$ Hz, 1H), 8.08 (dd, $J = 2.8, 9.2$ Hz, 1H), 7.00 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 5.33 (m, 3 H), 5.23 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 4.70 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H), 4.56 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H), 4.23 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 3.69 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 0.94 (s, 9H), 0.10 (s, 3H), 0.10 (s, 3H)。

【0078】 製備化合物 3

【0079】 將 $\text{Pd}(\text{OH})_2$ 添加至溶有化合物 2(1.0 g, 1.67 mmol)的 20 ml 之 EtOAc/MeOH (9:1)溶液中。此反應系統經抽真空後以 H_2 填充三次，利用球型瓶使該反應系統保持在 H_2 環境下，並於室溫下攪拌 1 小時。待反應完成後，過濾移除 $\text{Pd}(\text{OH})_2$ 。蒸發該濾出物以得到用於下一步驟的化合物 2-1(930.0 mg)。在溶有化合物 2-1(930.0 mg, 1.63 mmol)及琥珀酸酐(180.0 mg, 1.80 mmol)的 20 ml CH_2Cl_2 溶液中添加 TEA (272 μL)。將該反應液於室溫下攪拌 15 小時後，利用管柱抽真空並純化以得到黃色油狀的化合物 3 (2.78g)。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 10.09 (s, 1H), 7.59 (dd, $J = 2.4, 8.8$ Hz, 1H), 7.39 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 6.86 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 5.27 (m, 3H), 5.01 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 4.69 (d, $J = 14.8$ Hz, 1H), 4.58 (d, $J = 14.8$ Hz, 1H), 4.09 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 3.70 (s, 3H), 2.88 (q, $J = 7.2$ Hz, 8H), 2.59 (bs, 4H), 2.03 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.17 (t, $J = 7.2$ Hz, 9H), 0.92 (s, 9 H), 0.08 (s, 6H)。

【0080】



【0081】 製備化合物 5

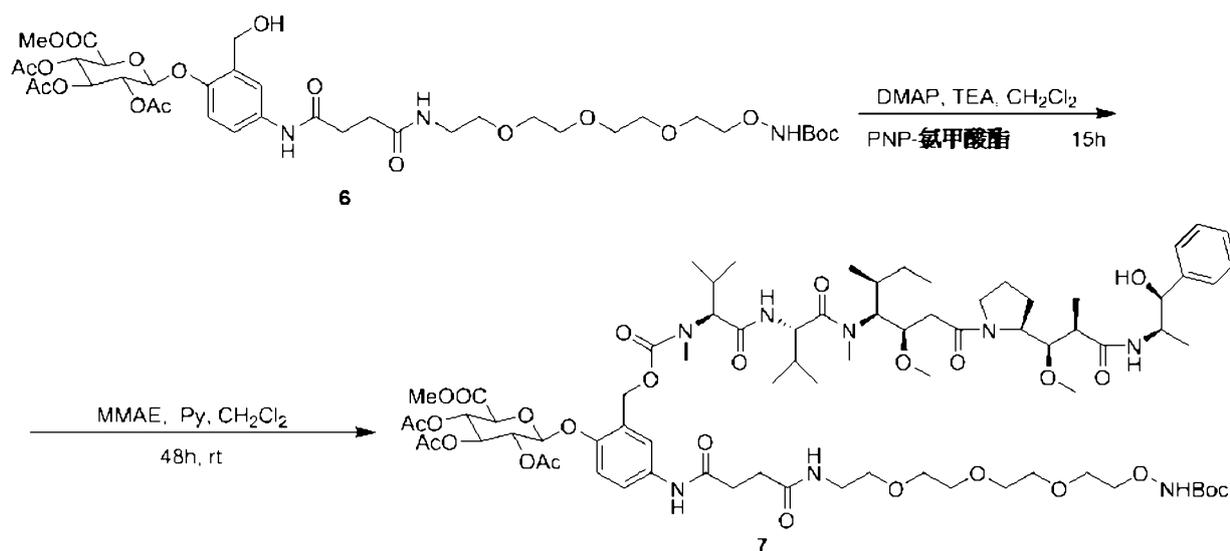
【0082】 在溶有化合物 3(289.0 mg, 0.432 mmol)、化合物 4 (200 mg, 0.648 mmol)、及羥基苯並三唑(Hydroxybenzotriazole, HOBT) (100.0 mg, 0.648 mmol)之 CH_2Cl_2 溶液中添加 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳醯二亞胺(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, EDCI) (100.0 mg, 0.648 mmol)。將該反應液於室溫下攪拌 14 小時後，將該溶液抽真空。利用管柱純化該粗萃物，以得到黃色油狀之化合物 5 (340.0 mg, 0.35 mmol)。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.78 (s, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.53 (dd, $J = 2.4, 8.8$ Hz, 1H), 7.41 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 6.85 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.75 (bs, 1H), 5.30 (m, 3H), 5.01 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.68 (d, $J = 15.2$ Hz, 1H), 4.59 (d, $J = 15.2$ Hz, 1H), 4.10 (m, 1H), 3.95 (m, 2H), 3.70 (s, 3H), 3.70-3.15 (m, 12H), 3.40 (m, 2H), 2.60 (m, 4H), 2.03 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.43 (s, 9H), 0.92 (s, 9H), 0.07 (s, 6H)。

【0083】 製備化合物 6

【0084】 在溶有化合物 5(300.0 mg, 0.312 mmol)的四氫呋喃(THF)溶液(25 mL)中添加 375 μL 的四丁基氟化銨(Tetrabutylammonium fluoride, TBAF)，於室溫

下攪拌 15 小時。將該溶液抽真空後，利用管柱純化該粗產物，以得到黃色油狀之化合物 6 (235.0 mg, 0.28 mmol)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.12 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 7.51 (dd, J = 2.4, 8.8 Hz, 1H), 7.40 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.15 (bs, 1H), 6.9 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 5.30 (m, 3H), 5.02 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.68 (d, J = 15.2 Hz, 1H), 4.40 (d, J = 15.2 Hz, 1H), 4.12 (m, 1 H), 3.98 (m, 2H), 3.67 (s, 3 H), 3.66-3.50 (m, 12H), 3.40 (m, 2H), 2.60 (m, 4 H), 2.04 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.42 (s, 9H)。

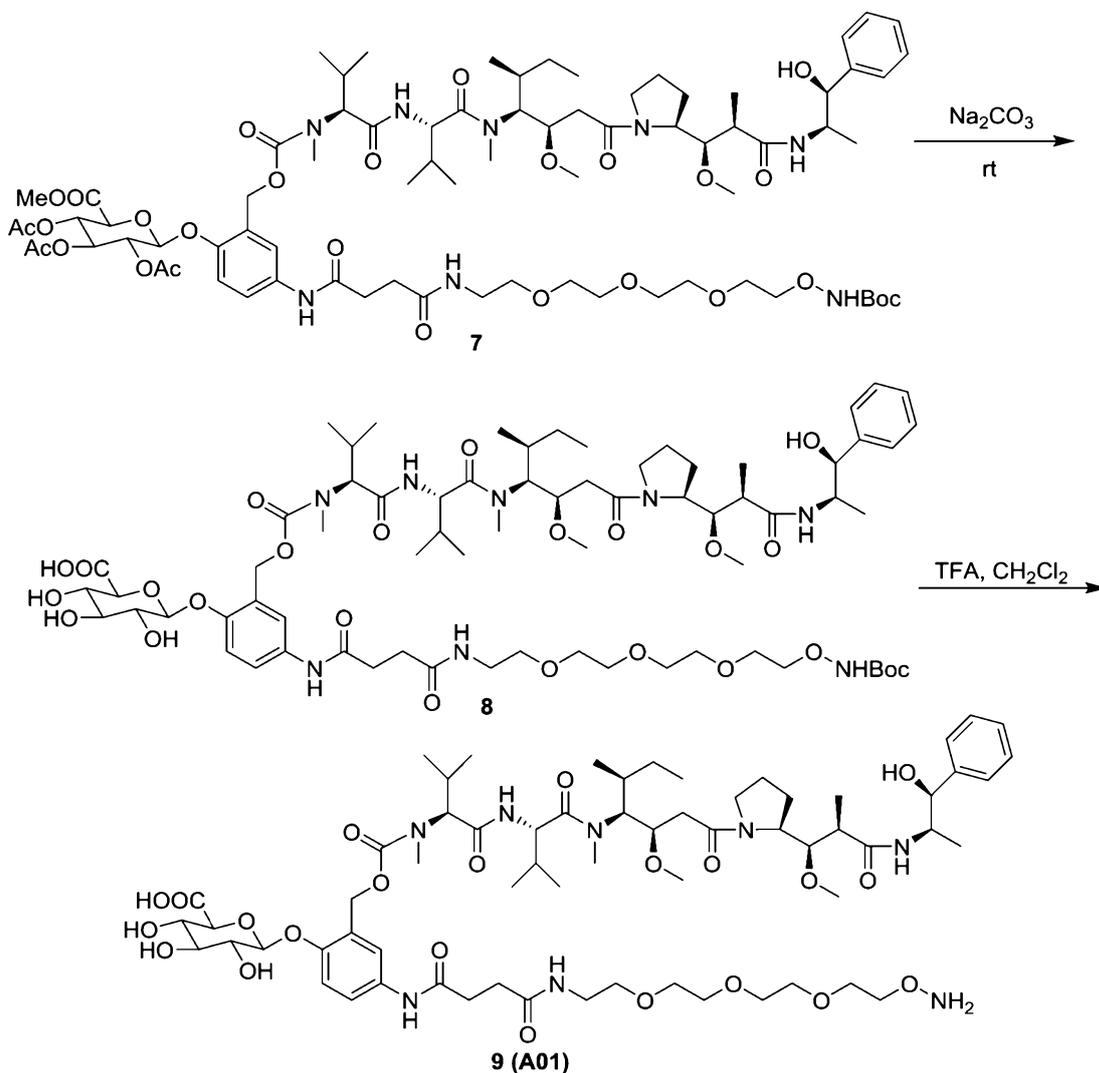
【0085】 製備化合物 7



【0086】 將化合物 6(100.0 mg, 0.12 mmol)溶於 5 mL 之 CH₂Cl₂ 並冷卻至 0 °C。將 TEA (24.0 mg, 0.24 mmol)、DMAP (14.7 mg, 0.12mmol)、對硝基苯氯甲酸酯(PNP Chloroformate) (47.7 mg, 0.24 mmol)添加至該混合物中，於室溫下攪拌 3 小時。將該反應混合物以 CH₂Cl₂ 稀釋，並以 1 N 之 HCl、飽和 NaHCO₃ 水溶液及滷水清洗。該有機萃取層使用 MgSO₄ 進行乾燥後濃縮，利用管柱純化該粗萃物以得到用於下一步驟的化合物 A01-6。在溶有 A01-6 (95.0 mg, 0.094 mmol)及 MMAE (67.5 mg, 0.094 mmol)的 THF 之溶液(4 mL)中，加入 TEA (19.0 mg, 0.188

mmol)進行處理。將該反應混合物於室溫下攪拌 48 小時，待反應完成後，將 35 mL 的乙酸乙酯(EA)及 20 mL 的 HCl (0.5N)添加至該溶液中。該有機萃取層使用 MgSO_4 進行乾燥後濃縮，利用管柱純化該粗萃物以得到黃色油狀的化合物 7 (98.0 mg, 0.06 mmol)。 (ESI-TOF m/z : 1587.8759 [M-H])。

【0087】



【0088】 製備化合物 8

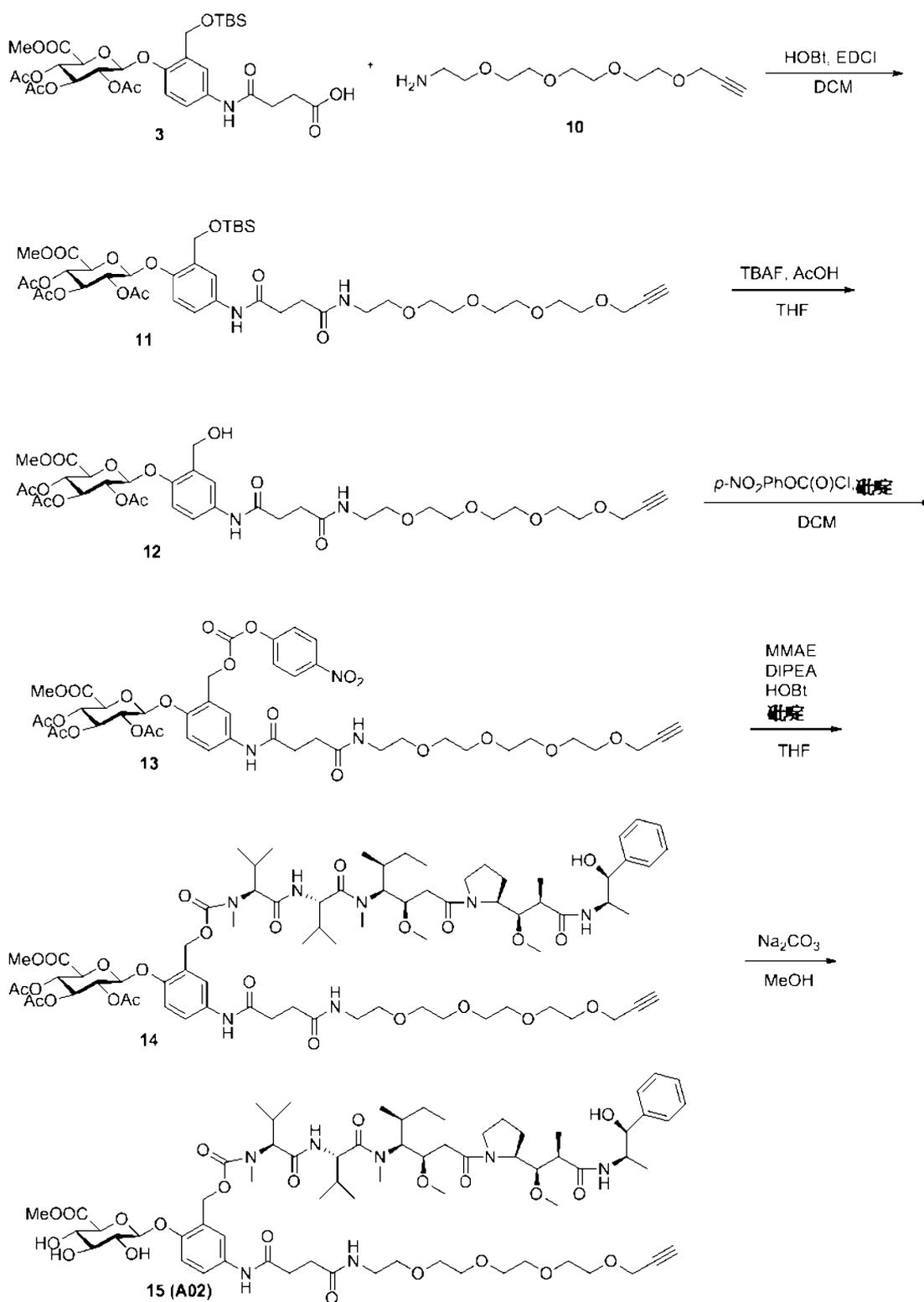
【0089】 將化合物 7 (20.0 mg, 0.013 mmol)溶於 2.5 mL 之甲醇與水混合溶液($\text{MeOH} : \text{H}_2\text{O} = 4 : 1$)中，於 0°C 加入 Na_2CO_3 處理，將該反應混合物於室溫下攪拌 3 小時。待反應完成後，在減壓環境下移除該有機層。該剩餘物利用 C18

管柱純化後得到化合物 8(15.2 mg, 0.010 mmol, 77.0%)。ESI-TOF m/z: 1471.7639 [M+Na⁺]。

【0090】 製備化合物 9

【0091】 將化合物 8 (10 mg, 2.99 mmol)溶於 2 ml 的 CH₂Cl₂,再添加 0.25 ml TFA, 於室溫下攪拌 1 小時。濃縮該溶液並利用 C18 管柱純化該剩餘物, 得到化合物 9(6.5 mg, 77%)。ESI-TOF m/z: 1347.7178 [M-H]⁻。

【0092】 2.2 化合物 15 (A02)之合成與特性



【0093】 製備化合物 11

【0094】 將 2,3,4-三-Ac-6-甲基-葡萄糖醛酸酯-2'-OTBS-PAB-琥珀酸 3 (109 mg, 0.16 mmol)及炔基-PEG4-胺 10 (60 mg, 0.16)溶於 CH_2Cl_2 (5 mL)，再於該

溶液中添加 EDCI (46.4 mg, 0.244 mmol)、HOBt (2.5 mg, 0.015 mmol) 及 DMAP (6.2 mg, 0.05 mmol)。4 小時後，移除溶劑，接著透過矽膠柱層析法(silica gel chromatography)(依序以 20% EA/己烷、50% EA/己烷洗脫)純化該反應混合物，藉以得到 103 mg (73%)的 2,3,4-三-Ac-6-甲基-葡萄糖醛酸酯-2'-OTBS-PAB-琥珀酸酯-炔基-PEG4 (化合物 11)。然後，將化合物 11(95 mg, 0.108 mmol)溶於吡啶(9 mL)及醋酸(3 mL)的溶液中，再添加 TBAF (0.5 mL, 1 M 溶於 THF)。12 小時後，移除溶劑，接著透過依序以 CH₂Cl₂ (100%)及 5% MeOH/CH₂Cl₂ 洗脫的矽膠柱層析法純化該反應混合物，藉此以得到 66.4 mg (80%) 的 2,3,4-三-Ac-6-甲基-葡萄糖醛酸酯-2'-OH-PAB-琥珀酸酯-炔基-PEG4 (2,3,4-tri-Ac-6-methyl-Glucuronate-2'-OH-PAB-succinate-alkynyl-PEG4) (化合物 12)。將得到的化合物 12 懸浮於無水 CH₂Cl₂ (2.6 mL)中，添加吡啶(122 μL, 0.88 mmol)和 4-硝基氯化苯甲醯(74 mg, 0.36 mmol)。2 小時後，移除溶劑並利用矽膠柱層析法純化(依序以 CH₂Cl₂ (100%)、及 5%的 MeOH/CH₂Cl₂ 洗脫)，藉此以得到 46.6 mg (58%) 的 2,3,4-三-Ac-6-甲基-葡萄糖醛酸酯-2'-OpNP-PAB-琥珀酸酯-炔基-PEG4 (2,3,4-tri-Ac-6-methyl-Glucuronate-2'-OpNP-PAB-succinate-alkynyl-PEG4)(化合物 13)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.12 (s, 1H), 8.24 (d, J = 2.04 Hz, 2H), 7.57 (d, J = 2.44 Hz, 1H), 7.5 (d, J = 8.88 Hz, 1H), 7.39 (d, J = 7.12 Hz, 1H), 6.98 (d, J = 8.88 Hz, 1H), 6.76 (t, J = 2.74 Hz, 1H), 5.37-5.28 (m, 3H), 5.24 (dd, J = 11.92 Hz, 24.04 Hz, 2H), 5.1 (d, J = 14.32 Hz, 1H), 4.16 (d, J = 9.08 Hz, 1H), 4.13 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 3.69 (s, 3H), 3.67-3.6 (m, 8H), 3.59-3.56 (m, 4H), 3.5 (t, J = 4.8 Hz, 1H), 3.41 (t, J = 4.8 Hz, 1H), 2.62 (ddd, J = 4.6 Hz, 7.76 Hz, 16.12 Hz, 4H), 2.41 (t, J = 2.36 Hz, 1H), 2.35 (s, 1H), 2.03 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 2.0 (s, 3H)。

【0095】 製備化合物 14

【0096】 將 MMAE (30 mg, 0.043 mmol) 溶於 THF (2.0 mL) 和吡啶 (0.5 mL) 之混合液中，再添加 N,N-二異丙基乙基胺 (N,N-Diisopropylethylamine, DIPEA) (80 μ L)、HOBt (1.5 mg, 0.01 mmol) 及 2,3,4-三-Ac-6-甲基-葡萄糖醛酸酯-2'-OpNP-PAB-琥珀酸酯-炔基-PEG4 (化合物 13) (40 mg, 0.043 mmol)。48 小時後，移除溶劑並利用矽膠柱層析法純化 (依序以 CH_2Cl_2 (100%) 及 7.5% MeOH/ CH_2Cl_2 洗脫)，以得到 38.4 mg (59%) 之 2,3,4-三-Ac-6-甲基-1-葡萄糖醛酸酯-2'-MMAE-PAB-琥珀酸酯-炔基-PEG4 (2,3,4-tri-Ac-6-methyl-Glucuronate-2'-MMAE-PAB-succinate-alkynyl-PEG4) (化合物 14)。¹H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9.0 (m, 1H), 7.67-7.25 (m, 6H), 7.24-6.9 (m, 3H), 6.81 (s, 1H), 6.7-6.45 (m, 2H), 5.42-5.29 (m, 4H), 5.29-4.88 (m, 4H), 4.8-4.55 (m, 2H), 4.22 (bs, 1H), 4.15 (s, 3H), 4.12-4.0 (m, 3H), 3.85-3.23 (m, 33H), 3.1-2.75 (m, 6H), 2.73-2.5 (m, 5H), 2.42 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 2.4-2.3 (m, 4H), 2.3-2.16 (m, 2H), 2.15-2.07 (m, 5H), 2.06 (s, 9H), 1.8-1.0 (m, 33H). ESI-TOF m/z: 1408.7366[M+Na]⁺。

【0097】 製備化合物 15

【0098】 將 2,3,4-三-Ac-6-甲基-葡萄糖醛酸酯-2'-MMAE-PAB-琥珀酸酯-炔基-PEG4 (化合物 14) (30 mg, 0.02 mmol) 溶於 MeOH (1.0 mL)，再於該溶液中添加 Na_2CO_3 (7 mg, 0.063 mmol)。1 小時後，將 H_2O (40 μ L) 加入反應混合物中，並且於室溫下再攪拌 1 小時。利用 IR-120 中和該反應液，經過濾後將該粗萃物抽真空，並以 C18 管柱純化 (依序以 100% H_2O 及 50% 的乙腈/ H_2O 洗脫)，接著得到 12.3 mg (44.5%) 的 6-甲基-葡萄糖醛酸酯-2'-MMAE-PAB-琥珀酸酯-炔基-PEG4 (6-methyl-Glucuronate-2'-MMAE-PAB-succinate-alkynyl-PEG4) (化合物 15)。¹H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.95 (m, 1H), 7.68 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.5-6.8 (m, 8H), 5.38 (d, J = 6.7 Hz, 1H), 5.37-5.15 (m, 1H), 5.0 (d, J = 6.7 Hz, 1H), 4.9 (s, 1H),

115mmole)。然後，將上述得到的化合物(40g, 115mmole)加入含疊氮化鈉(20g, 307mmole)之 N,N-二甲基甲醯胺溶液中，於 80 °C 攪拌 16 小時。觀察到白色固體後，使用矽藻土片過濾，並以 CH₂Cl₂ 清洗。該濾液於真空濃縮後，使用快速管柱層析進行純化(使用矽膠體，含有 50 至 70% 之乙酸乙酯的己烷溶液)，以得到油狀產物(化合物 17)(24g, 109.5mmole)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 3.67 (t, J = 4.0 Hz, 2H), 3.62-3.61 (m, 10H), 3.57-3.55 (m, 2H), 3.34 (t, J = 2.4 Hz, 2H), 2.66 (s, 1H)。

【0102】 製備化合物 18

【0103】 將 p-甲苯磺醯氯(26g, 136.8mmole)溶於 CH₂Cl₂ (40mL) 之溶液，逐滴加入含有化合物 17(24g, 109.5mmole) 及三乙基胺(19mL, 136.8mmole) 之二氯甲烷溶液(40mL)，於室溫下攪拌 16 小時。觀察到白色固體後，使用矽藻土片過濾，並以 CH₂Cl₂ 清洗。該濾液於真空濃縮後，使用快速管柱層析進行純化(使用矽膠體，含有 25-30% 乙酸乙酯的己烷溶液)，以得到油狀的甲苯磺醯化產物(34.7g, 93mmole)。然後，將上述得到的甲苯磺醯化產物(10g, 26.78mmole) 加入 N-Boc-脛胺(5.35g, 40mmole) 之二氯乙烷(30mL) 溶液中，再添加 DBU (8.07mL, 54mmole) 後，於室溫下攪拌 72 小時。當 TLC 顯示起始原料被完全消耗時，該溶液已被濃縮。使用快速管柱層析進行純化該粗萃物(使用矽膠體，含有 35-30% 乙酸乙酯的己烷溶液)，得到油狀產物(化合物 18)(5.37g, 產率 60%)。以 HRMS (ESI-TOF, MNa⁺) 計算 C₁₃H₂₆N₄O₆Na，計算值：357.1745，實測值：357.1736。

【0104】 製備化合物 20

【0105】 將化合物 18(1.4g, 4.2mmole)及三苯基膦(2.89g, 11mmole)加入二氯甲烷(20mL)溶液中，於室溫下攪拌隔夜，該濾液於真空濃縮後，剩餘物使用快速管柱層析(矽膠體，含有 90%乙酸乙酯的己烷溶液)進行純化，以得到油狀產物(1.09g, 3.53mmole)。然後，將化合物 19 (1.46g, 5.52 mmol, 1.0 eq)及上述所得之中間化合物(1.09g, 3.53 mmole)加入 N,N-二甲基甲醯胺(DMF)(90 mL)溶液中，再添加 EDCI-HCl (1.06 g, 6.83 mmol)及 HOBt (0.34 g, 2.52 mmol)。使用快速管柱層析(矽膠體，含有 2%之 MeOH 的乙酸乙酯溶液)對該粗產物進行純化，以得到油狀產物(化合物 20)(1.38g, 2.49mmole)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 7.78 (s, 1H), 7.35-7.26 (m, 5H), 6.26 (s, 1H), 5.07 (s, 2H), 3.99-3.97 (m, 2H), 3.70-3.68 (m, 2H), 3.67-3.58 (m, 8H), 3.53 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 3.42-3.39 (m, 2H), 2.31 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.12 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.64-1.54 (m, 4H), 1.44 (s, 9H), 1.30-1.27 (m, 4H); 以 HRMS (ESI-TOF, MNa⁺)計算 C₂₈H₄₆N₂O₉Na，計算值：577.3096，實測值：577.3080。

【0106】 製備化合物(21)

【0107】 將化合物 20 (1.38g, 2.49mmole)和 Pd/C (0.4g)溶於甲醇(10mL)溶液，於氫氣環境下攪拌之。待攪拌 14 小時隔夜後，使用矽藻土片過濾出 Pd/C，並以甲醇清洗。該溶液於真空中濃縮後，使用快速管柱層析(矽膠體，含有 2%之 MeOH 的 CH₂Cl₂ 溶液)對該剩餘物進行純化，以得到油狀產物(化合物 21)(0.5146g, 1.1mmole)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 7.98 (s, 1H), 6.45 (s, 1H), 4.00-3.98 (m, 2H), 3.70-3.68 (m, 2H), 3.64-3.61 (m, 8H), 3.54 (t, J = 4.4 Hz, 2H), 3.43-3.41 (m, 2H), 2.30 (t, J = 6.8z, 2H), 2.16 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 1.64-1.54 (m, 4H), 1.45 (s, 9H), 1.32-1.31 (m, 4H); 以 HRMS (ESI-TOF, MNa⁺)計算 C₂₁H₄₀N₂O₉Na，以得計算值：487.2626，實測值：487.2625。

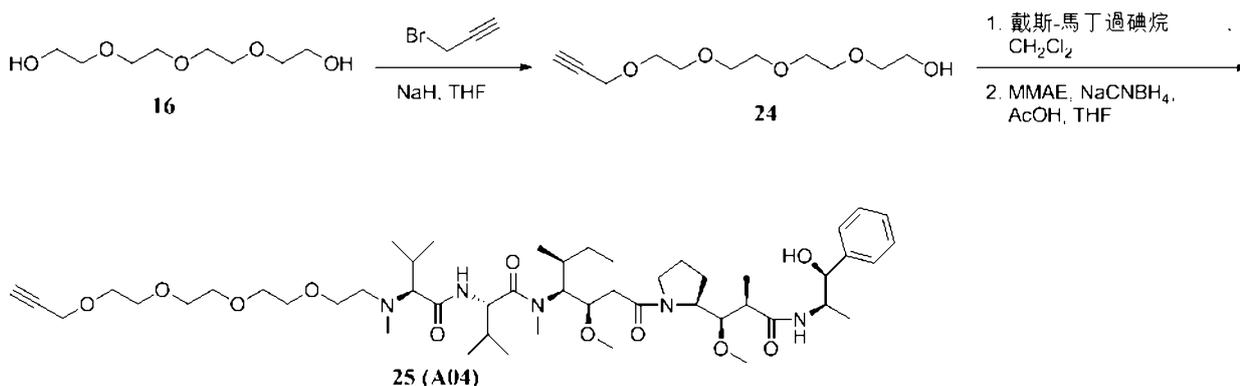
【0108】 製備化合物 22

【0109】 將化合物 21(30 mg, 0.0646 mmol)和 MMAE (35.5 mg, 0.0494 mmol)溶於 DMF (2 mL)中，於 0 °C 下依序添加焦碳酸二乙酯(Diethylpyrocarbonate, DEPC) (0.31g, 0.181mmole)及 DIPEA (0.03mL, 0.181 mmol)，該混合物於 0 °C 至室溫環境下攪拌 16 小時。該反應混合物於真空中濃縮後，使用快速管柱層析(矽膠體，含有 6-10%之 MeOH 的 CH₂Cl₂ 溶液)對該剩餘物進行純化，以得到油狀產物 22(52.6 mg, 0.0452mmole);以 HRMS (ESI-TOF, MNa⁺)計算 C₂₁H₄₀N₂O₉Na，以得計算值：1186.7561，實測值：1186.7567。

【0110】 製備化合物 23

【0111】 將化合物 22 溶於二氯甲烷(DCM) (0.7 mL)之溶液中，於 0°C 下緩慢添加 TFA (0.3 mL)，於室溫下攪拌該反應混合物 2 小時。經濃縮後，使用快速管柱層析(矽膠體，含有 6-10%MeOH 之 CH₂Cl₂ 溶液)對該粗產物進行純化，以得到油狀產物(化合物 23) (33.6 mg, 0.032 mmol)。以 HRMS (ESI-TOF, MNa⁺) 計算 C₁₃H₂₆N₄O₆Na，以得計算值：1086.7037，實測值：1086.7113。

【0112】 2.4 化合物 25(A04)之合成與特性



【0113】 製備化合物 24

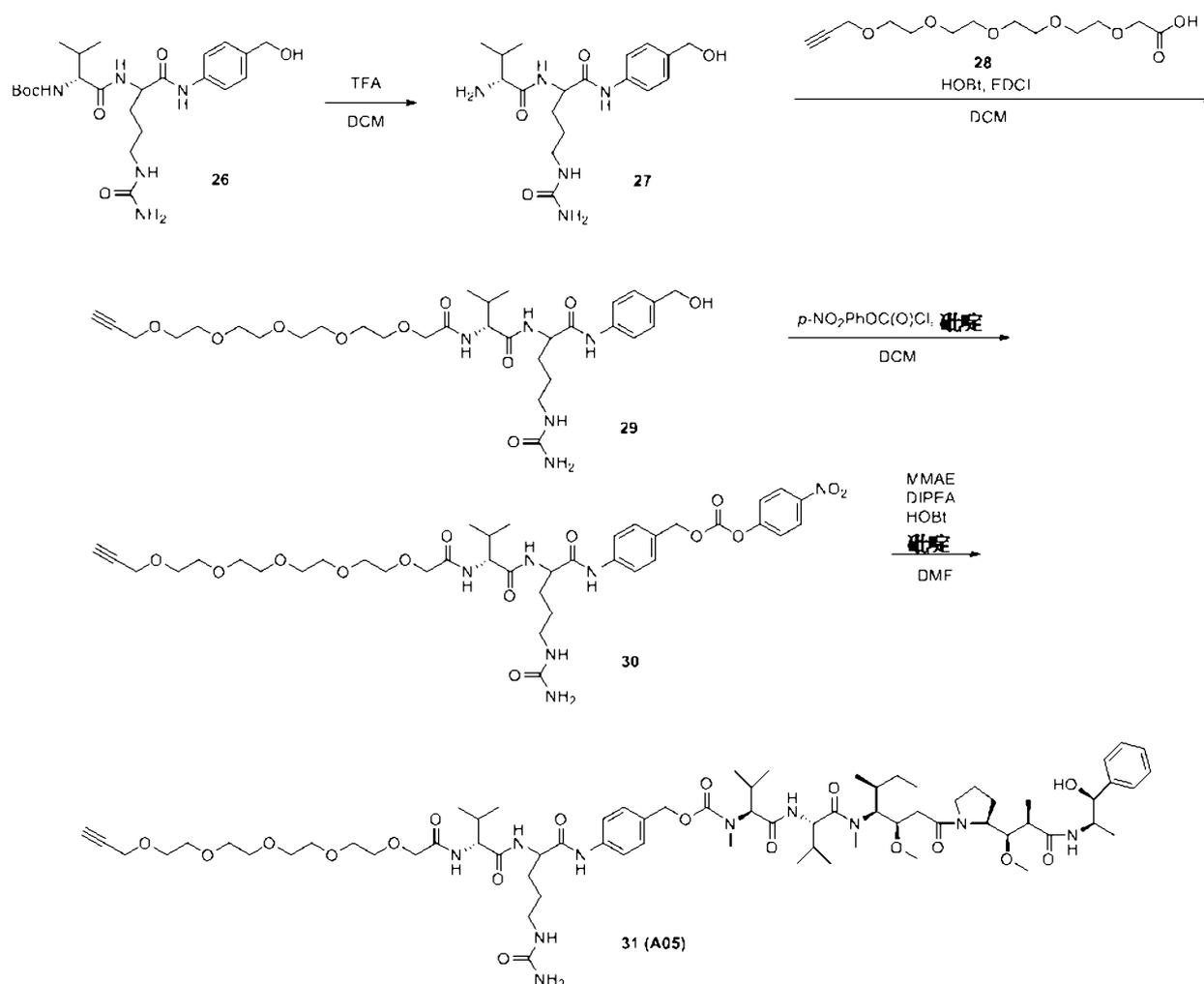
【0114】 將四乙二醇 16(40g, 207mmole)及氫化鈉(4.8g, 120mmole)加入四氫呋喃(250mL)溶液中，於 0℃ 下再添加溴丙炔(7.4mL, 69mmole)，並於室溫下攪拌該反應混合物 16 小時。當薄層色層分析儀(TLC)顯示起始原料被完全消耗時，表示已濃縮該溶液。利用二氯甲烷(CH₂Cl₂)(4 x 30 mL)和水(H₂O)對剩餘物進行萃取，將有機層集中後使用硫酸鎂(MgSO₄)乾燥，乾燥後過濾。於真空中濃縮該濾出物後，使用快速管柱層析(矽膠體，含有 15%乙酸乙酯的己烷溶液)對剩餘物進行純化，得到油狀產物 24(14g, 60.3mmole)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 4.17-4.16 (m, 2H), 3.70-3.62(m, 14H), 3.59-3.56(m, 2H), 2.40 (t, J = 2.4 Hz, 1H);以 HRMS (ESI-TOF, MNa⁺)計算 C₁₁H₂₀O₅Na，計算值：255.1203，實測值：255.1202。

【0115】 製備化合物 25

【0116】 將化合物 24(920 mg, 3.96 mmol)溶於 70 mL 二氯甲烷之溶液，並添加戴斯-馬丁過碘烷(Dess-Martin Periodinane;2.25 g, 5.30 mmol)於該溶液中。在環境溫度下隔夜攪拌該反應混合物。利用溶於 60 mL 的飽和碳酸氫鈉之亞硫酸氫鈉終止反應。將該混合物分離，以飽和碳酸氫鈉、滷水洗滌有機層，並以硫酸鈉進行乾燥，過濾後於真空中濃縮。利用快速管柱層析法純化該剩餘物以得化合物 (0.54g, 2.345mmole)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 9.69 (s, 1H), 4.16-4.13 (m, 2H), 3.71-3.62(m, 14H), 2.40 (t, J = 2.4 Hz, 1H)。將上述得到的化合物(12.8mg, 0.0556 mmol)及 16μL 醋酸添加至溶有 MMAE(10 mg, 0.0139 mmol)的 N,N-二甲基甲醯胺 (DMF)之溶液(0.286 mL)中，接著添加 2 mg 之氰基硼氫化物。將該反應混合物於室溫下攪拌 2 小時，該反應混合物經濃縮並以快速管柱層析法純化，藉此得到化

合物 25(10 mg, 0.0107mmole) 以 HRMS (ESI-TOF, MNa⁺) 計算 C₅₀H₈₅N₅O₁₁Na, 計算值: 954.6138, 實際值: 954.6303。

【0117】 2.5 化合物 31(A05)之合成和特性



【0118】 製備化合物 27

【0119】 將 Boc-Val-Cit-PAB-OH (化合物 26) (100 mg, 0.2 mmol) 懸浮於無水 CH₂Cl₂ (1.8 mL) 溶液中，並添加 TFA (0.45 mL)。於 0 °C 下攪拌該反應液 10 分鐘，然後回溫至室溫後再攪拌 30 分鐘。將該反應混合物蒸餾至乾燥(以甲苯共沸 3 次)後，不需進一步純化便可得到 Val-Cit-PAB-OH (化合物 27)。¹H NMR (400

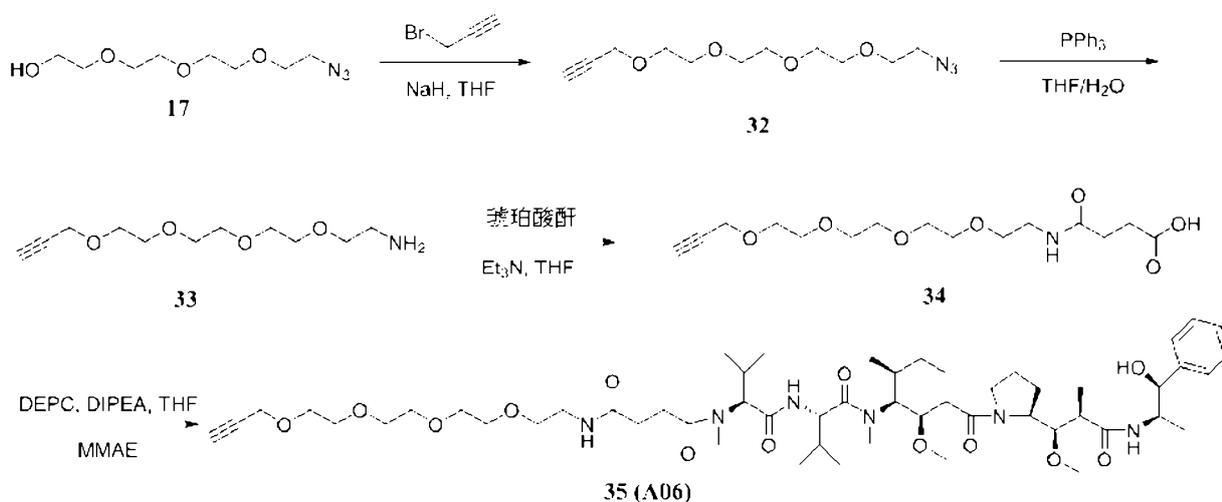
MHz, CDCl₃) δ 7.3-6.99 (m, 5H), 4.47 (m, 1H), 4.44 (s, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.05 (m, 2H), 2.11 (m, 1H), 1.7 (m, 1H), 1.58 (m, 1H), 1.5 (m, 2H), 0.95 (q, 6H)。

【0120】 製備化合物 29

【0121】 將得到的化合物 27 及炔基-PEG4-COOH (化合物 28) (58 mg, 0.2 mmol)懸浮於無水 CH₂Cl₂ (2.0 mL)中，再添加 HOBt (2.7 mg, 0.02 mmol) 及 EDCI (57 mg, 0.3 mmol)。12 小時後，移除溶劑並透過矽膠柱層析純化(以 CH₂Cl₂ (100%) 接著 10% 的 MeOH/CH₂Cl₂ 進行洗脫)，以得到 80.8 mg (62%) 之炔基-PEG4-Val-Cit-PAB-OH (化合物 29)。將化合物 29 (80 mg, 0.12 mmol)懸浮於無水 DMF (2 mL)，然後再添加吡啶(58 μL, 0.72 mmol)及硝基苯甲醯氯(66.8 mg, 0.36 mmol)。2 小時後，移除溶劑並以矽膠柱層析純化(依序以 CH₂Cl₂ (100%)及 5% MeOH/CH₂Cl₂ 進行洗脫)，以得到 63.7 mg (65%) 的炔基-PEG4-Val-Cit-PAB-OpNP(化合物 30)。接著，將 MMAE (33.4 mg, 0.047 mmol) 溶於 DMF (1.5 mL)和吡啶(0.5 mL)之混合溶液中，再添加 DIPEA (72 μL)、HOBt (2 mg, 0.014 mmol) 及 炔基 -PEG4-Val-Cit-PAB-OpNP (alkynyl-PEG4-Val-Cit-PAB-OpNP，化合物 30) (38 mg, 0.047 mmol)。48 小時後，移除溶劑並以矽膠柱層析純化(依序以 CH₂Cl₂ (100%)及 15% MeOH/CH₂Cl₂ 進行洗脫) 該反應混合物，以得到 30 mg (45%) 之炔基-PEG4-Val-Cit-PAB-MMAE(alkynyl-PEG4-Val-Cit-PAB-MMAE，化合物 31)。¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.48 (d, J = 7.88 Hz, 2H), 7.3-7.05 (m, 7H), 5.14-4.9 (m, 2H), 4.6-4.37 (m, 3H), 4.19 (dd, J = 2.76 Hz, 7.12 Hz, 1H), 4.15-4.09 (m, 2H), 4.07 (d, J = 2.36 Hz, 2H), 3.78 (s, 2H), 3.64-3.57 (m, 5H), 3.56-3.53 (m, 8H), 3.51 (s, 4H), 3.3 (t, J = 10.8 Hz, 1H), 2.45 (d, J = 3.32 Hz, 1H), 3.17 (s, 1H), 3.15-2.95 (m, 3H), 2.85-2.8 (m, 3H), 2.75 (t, J = 2.36 Hz, 1H), 2.45-2.35 (m, 2H), 2.15-1.57 (m, 11H), 1.45 (m, 4H),

1.35-1.13 (m, 9H), 1.07 (q, 3H), 1.03 (t, J = 7.08 Hz, 3H), 1.0-0.55 (m, 25H). ESI-TOF m/z: 1417.8368[M+Na]⁺。

【0122】 2.6 化合物 35(A06)之合成與特性



【0123】 製備化合物 32

【0124】 將含有氰化鈉(1.93g, 48.25mmole)及 1-疊氮基-3,6,9,12-四氧雜十五烷(1-azido-3,6,9,12-tetraoxapentadecane, 5g, 22.80mmole)之四氫呋喃(200mL)溶液，於 0 °C 下將溴丙炔(6mL, 69.6mmole) 添加至該溶液中並於室溫下攪拌 16 小時。當 TLC 顯示起始原料被完全消耗時，即表示該溶液已被濃縮，利用 CH_2Cl_2 (4 × 30 mL)和 H_2O 對剩餘物進行萃取，將有機層集中後使用 MgSO_4 乾燥，乾燥後過濾。該濾出物於真空中濃縮後，使用快速管柱層析進行純化(使用矽膠體，含有 35%乙酸乙酯的己烷溶液)以得到油狀產物(化合物 32)(5.4g, 20.9mmole)。¹H NMR (400 MHz, CDCl_3) 4.17 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 3.67-3.64 (m, 14H), 3.36 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 2.40 (t, J = 2.4 Hz, 1H);以 HRMS (ESI-TOF, MNa^+)計算 $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4\text{Na}$ ，計算值：280.1268 實測值：280.1270。

【0125】 製備化合物 33

【0126】 將三苯基膦(3.68g, 14mmole)和化合物 32(2.9g, 11.3mmole)加入四氫呋喃(40mL)溶液中並攪拌之。於室溫下攪拌隔夜後，於真空中濃縮該溶液，且利用快速管柱層析(矽膠體，含有 80% MeOH 的 CH₂Cl₂ 溶液)對剩餘物進行純化以得到油狀產物 33(2.4g, 10.376mmole)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 4.17-4.16 (m, 2H), 3.65-3.57 (m, 14H), 2.83 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 2.40 (t, J = 2.0 Hz, 1H);以 HRMS (ESI-TOF, MNa⁺)計算 C₁₁H₂₁NO₄Na，計算值：232.1543，實測值：232.1615。

【0127】 製備化合物 34

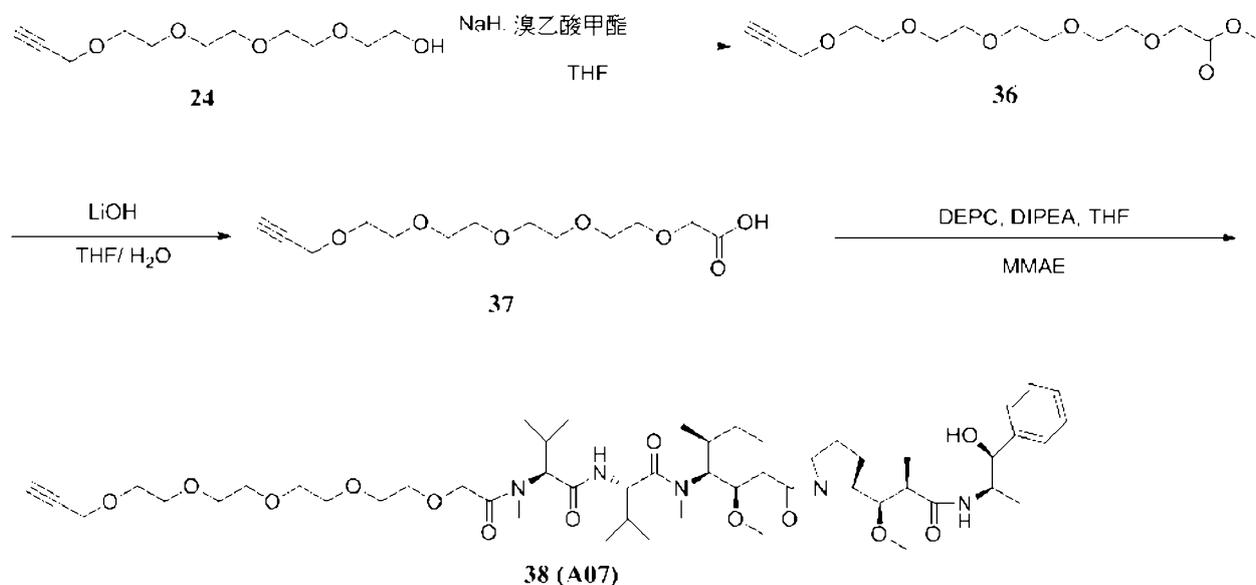
【0128】 將化合物 33(0.34g, 1.47 mmole)和琥珀酸酐(0.18g, 1.79 mmole)溶於四氫呋喃(12mL)中，再添加三乙基胺(0.35 mL, 2.51 mmole)並於室溫下攪拌 2 小時。該溶液經濃縮後，利用快速管柱層析法(矽膠體，含有 5-6% MeOH 的 CH₂Cl₂ 溶液)純化該剩餘物以得到油狀產物 34 (2.4g, 10.376mmole)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 6.79 (s, 1H), 4.16 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 3.68-3.58 (m, 12H), 3.52 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 3.43-3.39 (m, 2H), 2.64 (t, J = 6 Hz, 2H), 2.51 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.42 (t, J = 2.4 Hz, 1H);以 HRMS (ESI-TOF, MNa⁺)計算 C₁₅H₂₅NO₇Na，計算值：354.1523，實測值：354.1548。

【0129】 製備化合物 35

【0130】 於 0 °C 下依序將 DEPC (0.014g, 0.0863mmole) 和 DIPEA (0.021mL, 0.127 mmol)添加至含有化合物 34 (24.5 mg, 0.0739 mmol)及 MMAE (30 mg, 0.0418 mmol)溶於 DMF (2.75 mL)之溶液中，並於 0 °C 下攪拌該混合物 16 小時。該反應混合物接著於真空中濃縮後，利用快速管柱層析法(矽膠體，含有 4-7% MeOH 之

CH₂Cl₂ 溶液)純化該剩餘物,以得到油狀產物 35(25.9 mg, 0.0251mmole)。以 HRMS (ESI-TOF,MNa+)計算 C₅₄H₉₀N₆O₁₃Na,計算值:1053.6458,實測值:1053.6604。

【0131】 2.7 化合物 38(A07)之合成與特性



【0132】 製備化合物 36

【0133】 將化合物 24(1.14g, 4.908mmole)及氫化鈉(0.245g, 6.125mmole)溶於四氫呋喃(24mL)溶液中,再於 0°C 下逐滴加入溴乙酸甲酯(0.67mL, 6.865mmole),並於室溫下攪拌該混合物 16 小時。當 TLC 顯示起始原料被完全消耗時,利用 MeOH 終止反應,使用矽藻土片過濾,並以 MeOH 清洗。集中過濾物和清洗物,於減壓下濃縮,使用快速管柱層析對該剩餘物進行純化(矽膠體,含有 70%乙酸乙酯的己烷溶液)以得到油狀產物(化合物 36)(1.18 g, 3.877 mmole)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 4.10 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 4.07 (s, 2H), 3.65 (s, 3H), 3.64-3.56 (m, 16H), 2.36 (t, J = 2.4 Hz, 1H);以 HRMS (ESI-TOF,MH+)計算 C₁₄H₂₅O₇,以得計算值:305.1595,實測值:305.1599。

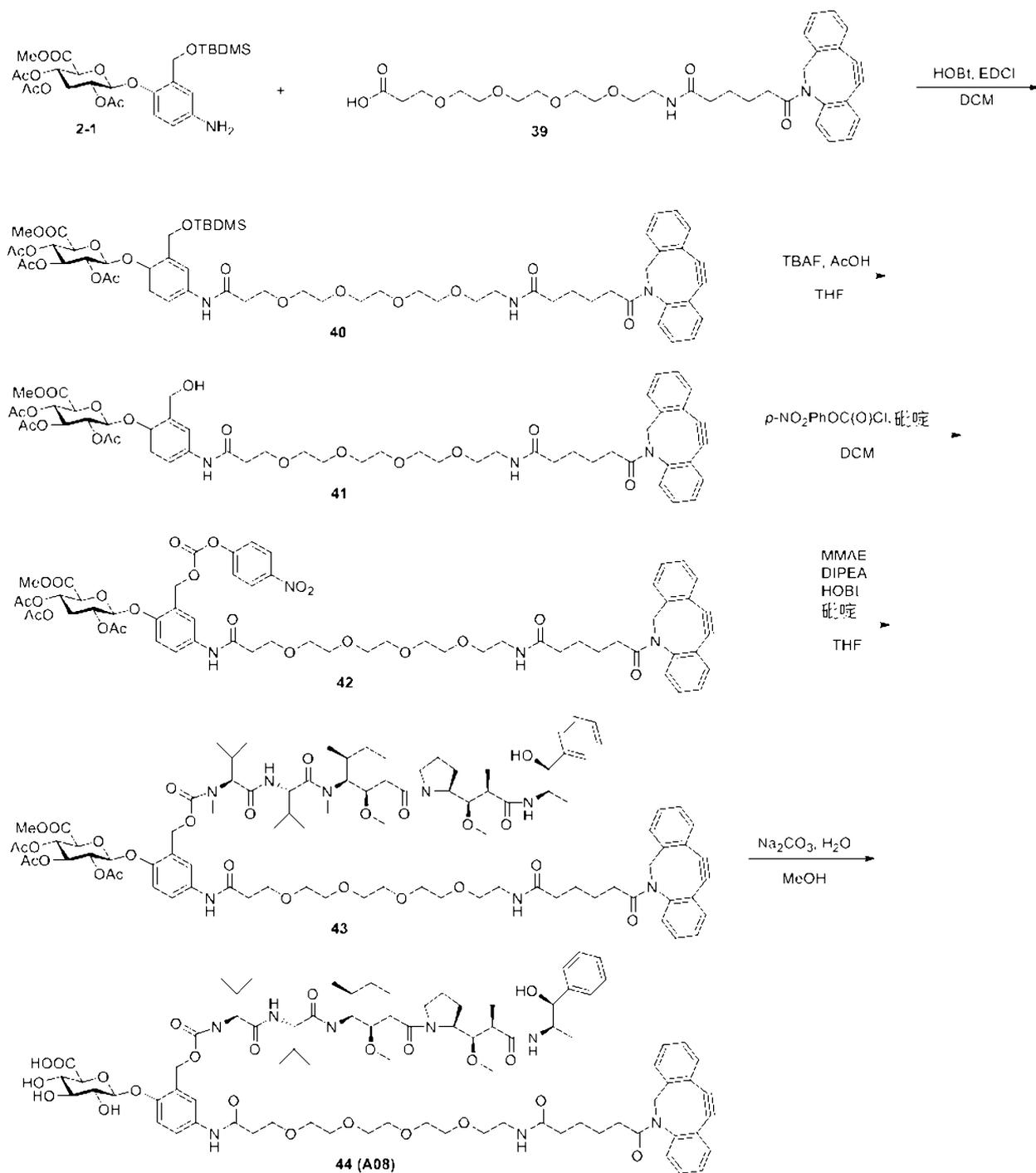
【0134】 製備化合物 37

【0135】 將化合物 36 (1.18g, 3.877mmole)、水(6mL)、及 LiOH (0.188g, 7.85 mmole)溶於四氫呋喃(10mL)之溶液,於室溫下攪拌 2 小時,加入 1N 的 HCl (10mL) 終止反應,再利用乙酸乙酯和滷水進行分離。收集有機層以使用乙酸乙酯(50mL × 4)萃取水相層。集中的有機層經濃縮後利用快速管柱層析法(矽膠體, 10-15% MeOH 溶於 CH₂Cl₂ 溶液)對剩餘物進行純化以得到油狀產物(化合物 37)(0.6 g, 2.07 mmole)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 4.01 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 3.99 (s, 2H), 3.56-3.48 (m, 16H), 2.35 (t, J = 2.0 Hz, 1H); 以 HRMS (ESI-TOF, MNa⁺)計算 C₁₃H₂₂O₇Na, 計算值: 313.1258, 實測值: 313.1261。

【0136】 製備化合物 38

【0137】 將化合物 37(38.8 mg, 0.1337 mmol)及 MMAE (51 mg, 0.071 mmol) 溶於 DMF (4 mL), 於 0 °C 下依序添加 DEPC (0.0334g, 0.206mmole)及 DIPEA (0.034mL, 0.206 mmol)溶液中,且該混合物於 0 °C 至室溫下攪拌 16 小時。該反應混合物於真空中濃縮後,利用快速管柱層析法(矽膠體, 4-6% MeOH 溶於 CH₂Cl₂) 對剩餘物進行純化,以得到油狀產物(化合物 38)(49.2 mg, 0.0497mmole); 以 HRMS (ESI-TOF, MNa⁺)計算 C₅₂H₈₇N₅O₁₃Na, 以得計算值: 1012.6193, 實測值: 1012.6186。

【0138】 2.8 化合物 44(A08)之合成和特性



【0139】 製備化合物 40

【0140】 取 2,3,4-三-Ac-6-甲基-葡萄糖醛酸酯-2'-OTBS-PAB-胺 (2,3,4-tri-Ac-6-methyl-Glucuranate-2'-OTBS-PAB-amine, 化合物 2-1, 44 mg, 0.077 mmol) 及 DBCO-PEG4-酸 (DBCO-PEG4-acid, 化合物 39) (45 mg, 0.077) 溶於 CH₂Cl₂ (4 mL) 中, 再添加 EDCI (22.5 mg, 0.117 mmol)、HOBt (1.2 mg, 0.008 mmol)

及 DMAP (3 mg, 0.025 mmol)。6 小時後，移除溶劑，且利用矽膠體層析法對反應混合物進行純化(依序以 20% EA/己烷及 75% EA/己烷進行洗脫)，得到 56.7 mg (64.8%) 之 2,3,4-三-Ac-6-甲基-葡萄糖醛酸酯-2'-OTBS-PAB-PEG4-DBCO (2,3,4-tri-Ac-6-methyl-Glucuronate-2'-OTBS-PAB-PEG4-DBCO，化合物 40)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.65-7.59 (m, 1H), 7.58-7.55 (m, 1H), 7.46 (t, J = 2.52 Hz, 2H), 7.4-7.26 (m, 5H), 7.23-7.18 (m, 1H), 6.87 (dd, J = 1.04 Hz, 8.8 Hz, 1H), 5.35-5.21 (m, 4H), 5.1 (dd, J = 1.36 Hz, 13.84 Hz, 1H), 5.04 (dd, J = 4.4 Hz, 7.12 Hz, 1H), 4.64 (dd, J = 14.84 Hz, 44.64 Hz, 1H), 4.12 (dd, J = 3.25 Hz, 9.08 Hz, 1H), 3.84-3.68 (m, 5H), 3.68-3.49 (m, 12H), 3.43 (t, J = 5.28 Hz, 2H), 3.31 (t, J = 2.36 Hz, 2H), 2.47 (q, J = 6.36 Hz, 1H), 2.37-2.13 (m, 2H), 2.03 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 2.0 (s, 3H), 1.97-1.91 (m, 2H), 2.91-1.8 (m, 1H), 1.48-1.17 (m, 6H), 0.91 (s, 9H), 0.07 (s, 6H)。

【0141】 製備化合物 41

【0142】 將 2,3,4-三-Ac-6-甲基-葡萄糖醛酸酯-2'-OTBS-PAB-PEG4-DBCO (化合物 40)(56 mg, 0.05 mmol) 溶於含吡啶(0.63 mL)及醋酸(0.42 mL)之混合物中，然後再添加 TBAF (72 μL, 1 M in THF)。12 小時後，移除溶劑，且利用矽膠柱層析法(以 20% EA/己烷及 85% EA/己烷進行洗脫)純化該反應混合物，以得到 50.2 mg (98.6%) 之 2,3,4-三-Ac-6-甲基-葡萄糖醛酸酯-2'-OH-PAB-PEG4-DBCO (2,3,4-tri-Ac-6-methyl-Glucuronate-2'-OH-PAB-PEG4-DBCO，化合物 41)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.01 (s, 1H), 7.64 (dd, J = 5.7 Hz, 9.9 Hz, 2H), 7.45-7.28 (m, 6H), 6.89 (dd, J = 1.07 Hz, 7.9 Hz, 1H), 5.37-5.29 (m, 1H), 5.24 (d, J = 8.16 Hz, 2H), 5.18 (d, J = 12.2 Hz, 2H), 5.06 (t, J = 4.36 Hz, 1H), 4.65 (d, J = 13.2 Hz, 1H), 4.38 (dd, J = 1.07 Hz, 8.9 Hz, 1H), 4.0 (dd, J = 8.07 Hz, 8.9 Hz, 1H), 3.73 (t, J = 5.68 Hz, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.65-3.46 (m, 13H), 3.42 (t, J = 5.12 Hz, 2H), 3.28 (d, J = 4.6 Hz, 2H), 2.53 (t, J = 5.65

Hz, 1H), 2.22-2.12 (m, 1H), 2.05 (s, 3H), 2.02 (s, 2H), 2.01 (s, 3H), 2.0 (s, 3H), 1.93-1.89 (q, J = 4.1 Hz, 2H), 1.87-1.69 (m, 2H), 1.45-1.15 (m, 8H)。

【0143】 製備化合物 42

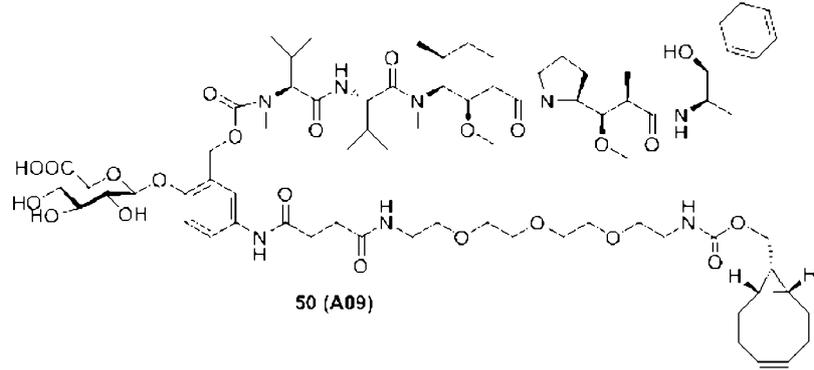
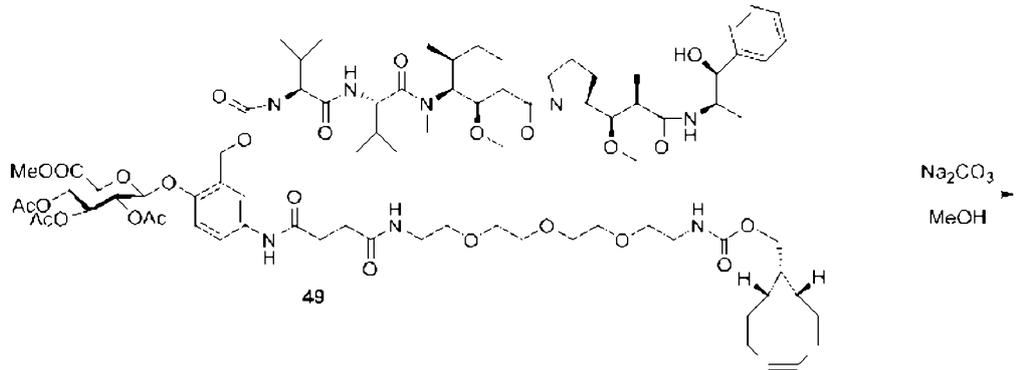
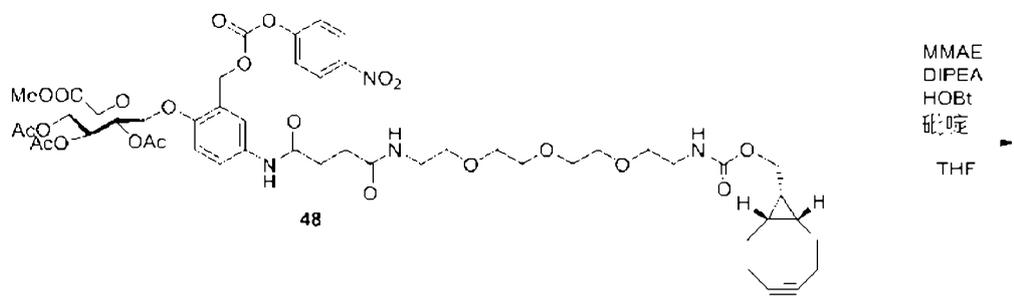
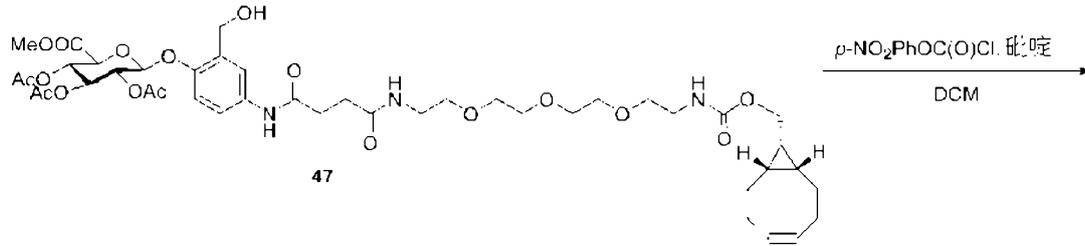
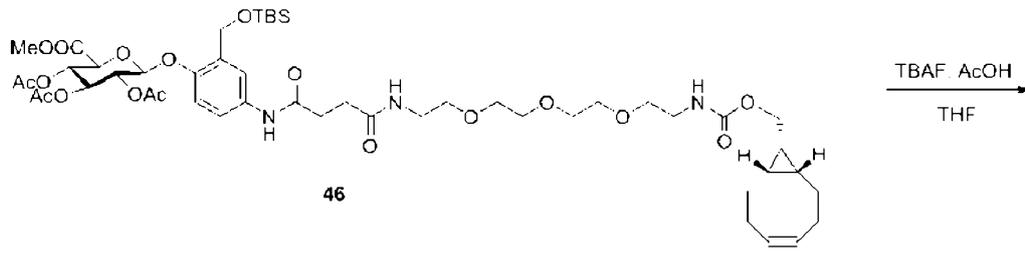
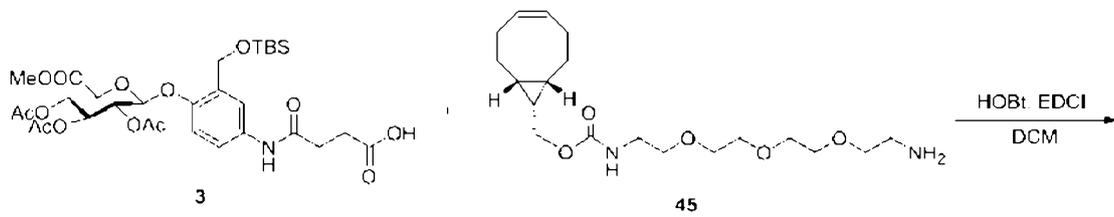
【0144】 將 2,3,4-三-Ac-6-甲基-葡萄糖醛酸酯-2'-OH-PAB-PEG4-DBCO (2,3,4-tri-Ac-6-methyl-Glucuronate-2'-OH-PAB-PEG4-DBCO, 化合物 41)(50 mg, 0.049 mmol)懸浮於無水 CH₂Cl₂ (1 mL)中, 再添加吡啶(40 μL, 0.49 mmol)及 4-硝基苯甲醯氯(41.4 mg, 0.197 mmol)。2 小時後, 移除溶劑, 且利用矽膠柱層析法對該反應混合物進行純化(依序以 20% EA/己烷及 60% EA/己烷進行洗脫)以得到 36.3 mg (62.2%)之 2,3,4-三-Ac-6-甲基-葡萄糖醛酸酯-2'-OpNP-PAB-PEG4-DBCO (化合物 42)。將 MMAE (25.3mg, 0.035 mmol)溶於 THF (1.6 mL) 及吡啶 (0.4 mL)之混合液中, 再添加 DIPEA (48 μL)、HOBt (2 mg, 0.014 mmol)、及 2,3,4-三-Ac-6-甲基-葡萄糖醛酸酯-2'-OpNP-PAB-PEG4-DBCO (2,3,4-tri-Ac-6-methyl-Glucuronate-2'-OpNP-PAB-PEG4-DBCO, 化合物 42)(36 mg, 0.03 mmol)於該溶液中。48 小時後, 移除溶劑, 並利用矽膠柱層析法(以 CH₂Cl₂ (100%)及 5% MeOH/CH₂Cl₂ 進行洗脫)純化該反應混合物, 以得到 29 mg (55%)之 2,3,4-三-Ac-6-甲基-葡萄糖醛酸酯-2'-MMAE-PAB-PEG4-DBCO (2,3,4-tri-Ac-6-methyl-Glucuronate-2'-MMAE-PAB-PEG4-DBCO, 化合物 43)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.8 (m, 1H), 7.7-7.18 (m, 14 H), 7.17-6.87 (m, 1H), 6.66-6.3 (m, 2H), 5.5-5.2 (m, 4H), 5.5-4.88 (m, 2H), 4.87-4.59 (m, 2H), 4.35-3.95 (m, 6H), 3.85 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 3.79-3.68 (m, 7H), 3.68-3.47 (m, 16 H), 3.44 (t, J = 5.16 Hz, 2H), 3.37 (s, 3H), 3.36-3.3 (m, 2H), 3.27 (s, 3H), 2.98 (s, 2H), 2.88 (s, 2H), 2.67-2.02 (m, 18H), 2.01 (s, 9H), 1.92 (bs, 2H), 1.81 (bs, 2H), 1.77-1.59 (m, 3H),

1.5-1.15 (m, 11H), 1.14-0.76 (m, 20H), 0.65 (d, $J = 3.34$ Hz, 1H). ESI-TOF m/z : 1784.8878[M+Na]⁺。

【0145】 製備化合物 44

【0146】 將 2,3,4- 三 -Ac-6- 甲 基 - 葡 萄 糖 醛 酸 酯 -2'-MMAE-PAB-PEG4-DBCO (化合物 43)(10 mg, 0.005 mmol)溶於 MeOH (0.5 mL)中，再將 Na₂CO₃ (1.62 mg, 0.015 mmol)加至該溶液中。1 小時後，對該反應液添加 H₂O (48 μL)並室溫下再攪拌 1 小時。以 IR-120 中和該反應液，經過濾後蒸餾粗萃物，並透過 C18 管柱(依序以 100% 的 H₂O(純水)及 30% 乙腈/H₂O 洗脫)純化該粗萃物，以得到 5 mg (62%)之葡萄糖醛酸酯-2'-MMAE-PAB-PEG4-DBCO (Glucuronate-2'-MMAE-PAB-PEG4-DBCO)5 的 化 合 物 44。ESI-TOF m/z : 1619.8361[M-H]⁻。

【0147】 2.9 化合物 50(A09)之合成及特性



【0148】 製備化合物 46

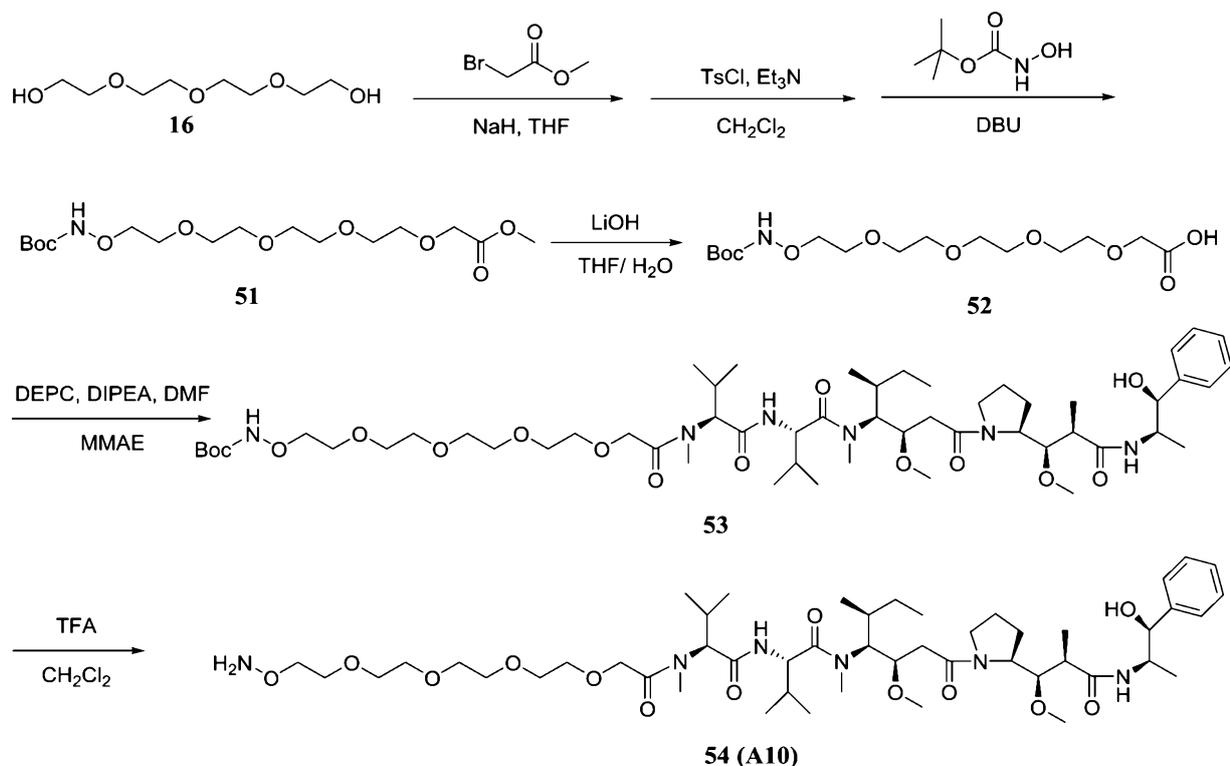
【0149】 將 2,3,4-三-Ac-6-甲基-葡萄糖醛酸酯-2'-OTBS-PAB-琥珀酸(化合物 3) (136 mg, 0.2 mmol)及 BCN-PEG4-胺 (化合物 45) (74.4 mg, 0.2 mmol)溶於 CH_2Cl_2 (7.8 mL)中，再添加 EDCI (58 mg, 0.305 mmol)、HOBt (3.1 mg, 0.019 mmol) 及 DMAP (7.8 mg, 0.063 mmol)於該溶液中。4 小時後，移除溶劑，並利用矽膠柱層析法對反應混合物進行純化(依序以 20% EA/己烷及 60% EA/己烷進行洗脫)，以得到 135 mg (65%)之 2,3,4-三-Ac-6-甲基-葡萄糖醛酸酯-2'-OTBS-PAB-琥珀酸酯 -PEG4-BCN (2,3,4-tri-Ac-6-methyl-Glucuranate-2'-OTBS-PAB-succinate-PEG4-BCN, 化合物 46)。將上述得到的化合物溶於吡啶(9 mL)及醋酸(3 mL)之混合物中，再添加 TBAF (0.5 mL, 1 M 溶於 THF)。12 小時後，將溶劑移除，並利用矽膠柱層析法(依序以 CH_2Cl_2 (100%)及 5% MeOH/ CH_2Cl_2 進行洗脫) 純化該反應混合物，以得到 100 mg (85%) 之 2,3,4-三 -Ac-6- 甲 基 - 葡 萄 糖 醛 酸 酯 -2'-OH-PAB- 琥 珀 酸 酯 -PEG4-BCN (2,3,4-tri-Ac-6-methyl-Glucuranate-2'-OH-PAB-succinate-PEG4-BCN, 化合物 47)。
ESI-TOF m/z: 928.3738[M+Na]⁺。

【0150】 製備化合物 48

【0151】 將 2,3,4-三-Ac-6-甲基-葡萄糖醛酸酯-2'-OH-PAB-琥珀酸酯 -PEG4-BCN (化合物 47)(100 mg, 0.11 mmol)懸浮於無水 CH_2Cl_2 (3.24 mL)中，再添加吡啶(89.6 μL , 1.1 mmol)及 4-硝基苯甲醯氯(92.7 mg, 0.45 mmol)。2 小時後，移除溶劑，利用矽膠柱層析法依序 CH_2Cl_2 (100%)及 5% MeOH/ CH_2Cl_2 洗脫以純化該反應混合物，得到 82.3 mg (69.8%)之 2,3,4-tri-Ac-6-甲基-葡萄糖醛酸酯

-2'-OpNP-PAB-琥珀酸酯-PEG4-BCN (2,3,4-tri-Ac-6-methyl-Glucuronate-2'-OpNP-PAB-succinate-PEG4-BCN, 化合物 48)。然後，取 MMAE (63.3mg, 0.088 mmol) 溶於 THF (4.0 mL) 及吡啶 (1.0 mL) 之混合物中，再添加 DIPEA (120 μ L)、HOBt (3 mg, 0.021 mmol) 及 2,3,4-三-Ac-6-甲基-葡萄糖醛酸酯-2'-OpNP-PAB-琥珀酸酯-PEG4-BCN **48** (82.3 mg, 0.0768 mmol)。48 小時後，將溶劑移除並利用矽膠柱層析法依序以 CH_2Cl_2 (100%) 及 7.5% MeOH/ CH_2Cl_2 進行洗脫以純化該反應混合物，得到 50 mg (34.4%) 之 2,3,4-三-Ac-6-甲基-葡萄糖醛酸酯-2'-MMAE-PAB-琥珀酸酯-PEG4-BCN (2,3,4-tri-Ac-6-methyl-Glucuronate-2'-MMAE-PAB-succinate-PEG4-BCN, 化合物 49)。將 2,3,4-三-Ac-6-甲基-葡萄糖醛酸酯-2'-MMAE-PAB-琥珀酸酯-PEG4-BCN (化合物 49) (50 mg, 0.03 mmol) 溶於 MeOH (1.2 mL) 中，再添加 Na_2CO_3 (10 mg, 0.095 mmol)。1 小時後，添加 H_2O (60 μ L) 至該反應混合物並再攪拌 1 小時。利用 IR-120 中和反應，經過濾後蒸餾粗萃物，並透過以 C18 管柱依序以 100% H_2O 及 35% 乙腈/ H_2O 洗脫以純化該粗萃物，以得到 14.2 mg (31.4%) 之葡萄糖醛酸酯-2'-MMAE-PAB-琥珀酸酯-PEG4-BCN (Glucuronate-2'-MMAE-PAB-succinate-PEG4-BCN, 化合物 50)。 ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 7.62-7.17 (m, 8H), 5.26 (s, 2H), 5.01 (s, 1H), 4.75-4.42 (m, 2H), 4.4-4.17 (m, 2H), 4.01 (bs, 3H), 3.83 (bs, 1H), 3.73-3.51 (m, 18H), 3.5-3.26 (m, 12H), 3.15 (s, 2H), 3.05 (d, $J = 6.44$ Hz, 2H), 3.01-2.9 (m, 3H), 2.84-2.42 (m, 6H), 2.21 (s, 3H), 2.16 (bs, 6H), 1.92-1.77 (m, 2H), 1.72-1.56 (m, 1H), 1.54-1.39 (m, 3H), 1.39-1.23 (m, 4H), 1.22-1.12 (m, 3H), 1.08 (d, $J = 6.48$ Hz, 2H), 0.98 (d, $J = 6.55$ Hz, 2H), 0.95-0.6 (m, 19H)。ESI-TOF m/z : 1507.8027 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。

【0152】 2.10 化合物 54(A10)之合成與特性



【0153】 製備化合物 51

【0154】 經氰化鈉 (0.42g, 10.50mmole) 及四乙二醇 (化合物 16)(6g, 30.89mmole) 加入四氫呋喃(120mL)之溶液，再於 0 °C 下逐滴加入溴乙酸甲酯 (1.25mL, 10.5mmole)，於室溫下攪拌該混合物 16 小時。當 TLC 顯示起始原料被完全消耗時，以 MeOH 終止反應，使用矽藻土片過濾，並以 MeOH 清洗。將過濾物和清洗物集中並於減壓下濃縮，使用快速管柱層析(矽膠體，4-6% MeOH 溶於 CH₂Cl₂)純化該剩餘物，以得到油狀產物(1.843 g, 6.92 mmole)。

【0155】 將上述所得之化合物(0.49g, 1.84mmole)及三乙基胺(0.7mL, 5.02mmole)加入二氯甲烷(10mL)溶液，再添加溶於 CH₂Cl₂ (20mL)之 P-甲苯磺醯氯(0.56g, 2.937mmole)，於室溫下攪拌 16 小時。觀察到白色固體後，使用矽藻土片過濾，再以 CH₂Cl₂ 清洗。過濾物於真空中濃縮後，利用快速管柱層析法(矽膠

體，75-85% 乙酸乙酯溶於己烷) 純化剩餘物，以得到油狀產物(0.367g, 0.872mmole)。

【0156】 取 N-Boc-羥胺(0.1762g, 1.323mmole)及上述所得化合物(0.367g, 0.873mmole)溶於四氫呋喃(4mL)之溶液，添加 DBU (0.26mL, 1.74mmole)並於室溫下攪拌 72 小時。當 TLC 顯示起始原料被完全消耗時，即表示該溶液已被濃縮。使用管柱層析法(使用矽膠體，乙酸乙酯)純化該粗萃物以得到油狀產物 51(0.14g, 0.367mmole)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 4.14 (s, 2H), 4.00-3.98 (m, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.70-3.61 (m, 15H), 1.45 (s, 9H); 以 HRMS (ESI-TOF, MNa⁺)計算 C₁₆H₃₁NO₉ Na，計算值：404.1891，實測值：404.1901。

【0157】 製備化合物 52

【0158】 取化合物 51 (68.4mg, 0.179mmole)、H₂O (0.05mL)、及 LiOH (7.7mg, 0.183 mmole)加入四氫呋喃(1.00mL)溶液並攪拌之。於室溫下攪拌 2 小時後，使用 1N HCl (10mL)終止反應，利用乙酸乙酯和滷水加以分離。集中有機層，以乙酸乙酯(50mL × 4)萃取水相層，集中的有機層經濃縮後，利用快速管柱層析法(矽膠體，12-20% 之 MeOH 溶於 CH₂Cl₂)純化剩餘物，以得到油狀產物(化合物 52)(34.5mg, 0.0939 mmole)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 9.29 (s, 1H), 3.98 (s, 2H), 3.86 (s, 2H), 3.65-3.61 (m, 14H), 1.45 (s, 9H); 以 HRMS (ESI-TOF, MNa⁺)計算 C₁₅H₂₉NO₉Na，計算值：390.1735，實測值：390.1742。

【0159】 製備化合物 53

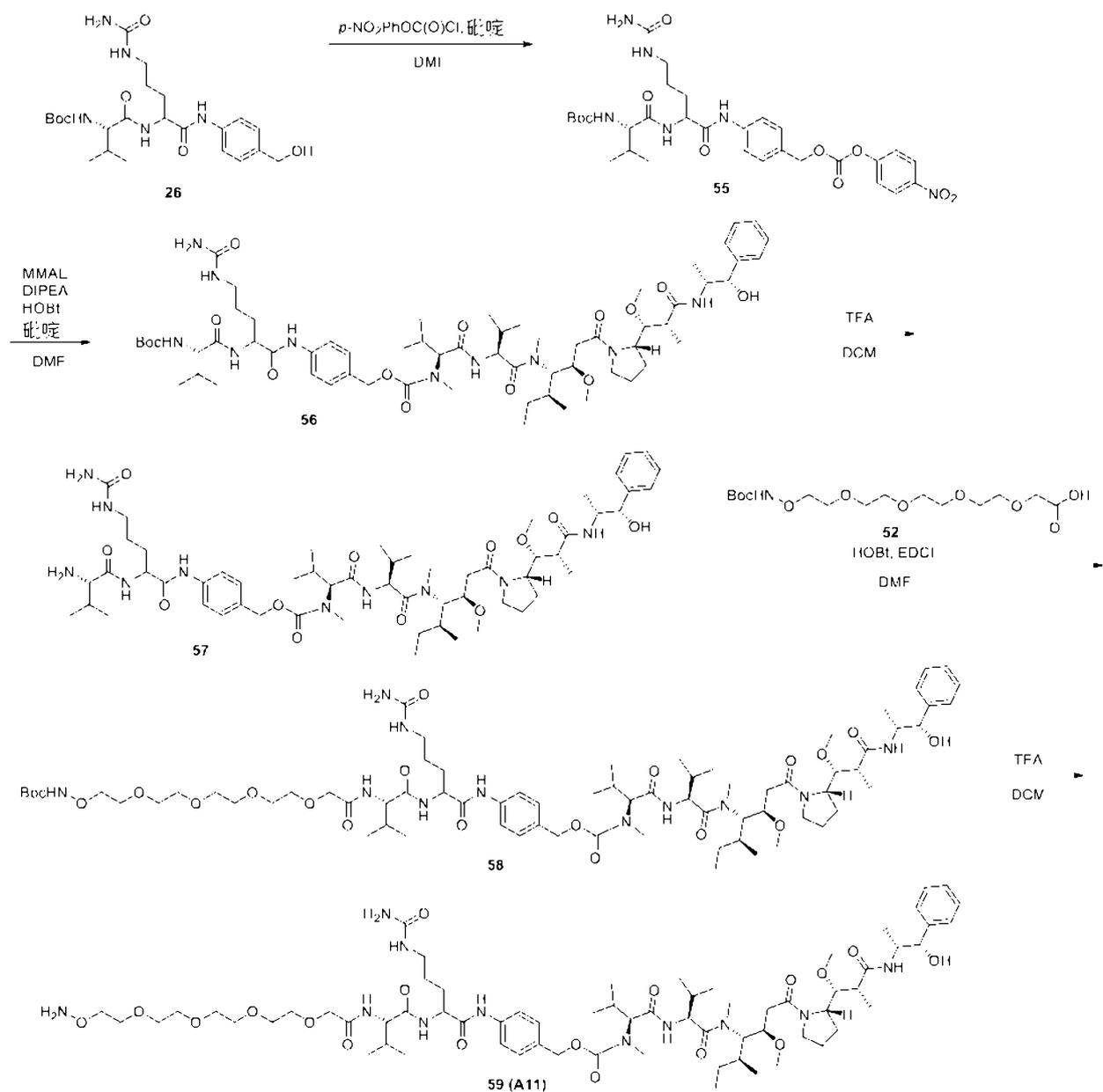
【0160】 取化合物 52(44.8 mg, 0.1219 mmol)及 MMAE (46.5 mg, 0.065 mmol)溶於 DMF (2.7 mL)之溶液，於 0 °C 下依序添加 DEPC (30.6 mg, 0.189mmole)

及 DIPEA (0.030mL, 0.182 mmol)，並於 0 °C 至室溫下攪拌該混合物 16 小時。該反應混合物於真空中濃縮，利用快速管柱層析法(矽膠體，3-6% 之 MeOH 溶於 CH₂Cl₂)純化剩餘物，以得到油狀產物 53(48.6 mg, 0.0455mmole)。以 HRMS (ESI-TOF, MNa+)計算 C₅₄H₉₄N₆O₁₅Na，計算值：1089.6669，實測值：1089.6660。

【0161】 製備化合物 54

【0162】 於 0 °C 下緩慢將 TFA (0.35 mL)加入溶有化合物 53(52.6 mg, 0.0493 mmol)之 DCM (0.65 mL)溶液中，並於室溫下攪拌該反應混合物 2 小時，再濃縮。利用管柱層析法(矽膠體，6-10% MeOH 溶於 CH₂Cl₂)純化該粗產物，以得到油狀產物 54(29 mg, 0.030 mmol)。以 HRMS (ESI-TOF, MNa+) 計算 C₄₉H₈₆N₆O₁₃Na，計算值：967.6326，實測值：967.6353。

【0163】 2.11 化合物 59(A11)之合成與特性



【0164】 製備化合物 55

【0165】 將 Boc-Val-Cit-PAB-OH (化合物 26) (100 mg, 0.2 mmol) 懸浮於無水 DMF (1 mL)、THF (2 mL) 及 CH_2Cl_2 (1 mL) 之混合液中，再添加吡啶 (97 μL , 1.2 mmol) 及 4-硝基苯甲醯氯 (115 mg, 0.62 mmol)。2 小時後移除溶劑，並利用矽膠柱層析法依序以 CH_2Cl_2 (100%) 5% MeOH/ CH_2Cl_2 洗脫以純化，藉此得到 89 mg (69%) 之 Boc-Val-Cit-PAB -OpNP (化合物 55)。然後，將 MMAE (88.6 mg, 0.123 mmol) 溶於 THF (2.8 mL) 及吡啶 (0.7 mL) 之混合液中，再添加 DIPEA (212 μL)、HOBt (5.6

mg, 0.039 mmol)及 Boc-Val-Cit-PAB-OpNP (化合物 55) (89 mg, 0.138 mmol)。48 小時後，移除溶劑，該利用矽膠柱層析法依序以 CH_2Cl_2 (100%)及 15% MeOH/ CH_2Cl_2 洗脫以純化該反應混合物，藉此得到 30 mg (45%) 之 Boc-Val-Cit-PAB-MMAE (化合物 56)。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.49 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.29-7.08 (m, 11H), 5.13-4.94 (m, 2H), 4.69-4.4 (m, 5H), 4.2-4.05 (m, 4H), 4.97 (bs, 1H), 3.81 (dd, $J = 2.5$ Hz, 6.56 Hz, 1H), 3.77 (dt, $J = 9.2$ Hz, 1.8 Hz, 1H), 3.63-3.55 (m, 2H), 3.44 (m, 1H), 3.35-3.15 (m, 20H), 3.14-3.04 (m, 2H), 3.5-2.95 (m, 3H), 2.9-2.75 (m, 4H), 2.41-2.34 (m, 3H), 2.45 (s, 1H), 2.21 (s, 1H), 2.16-1.55 (m, 16H), 1.54-1.39 (m, 4H), 1.34 (s, 9H), 1.3 (bs, 2H), 1.11-0.95 (m, 11H), 0.9-0.6 (m, 42H)。

【0166】 製備 Boc-羥胺-PEG4-Val-Cit-PAB-MMAE (化合物 58)

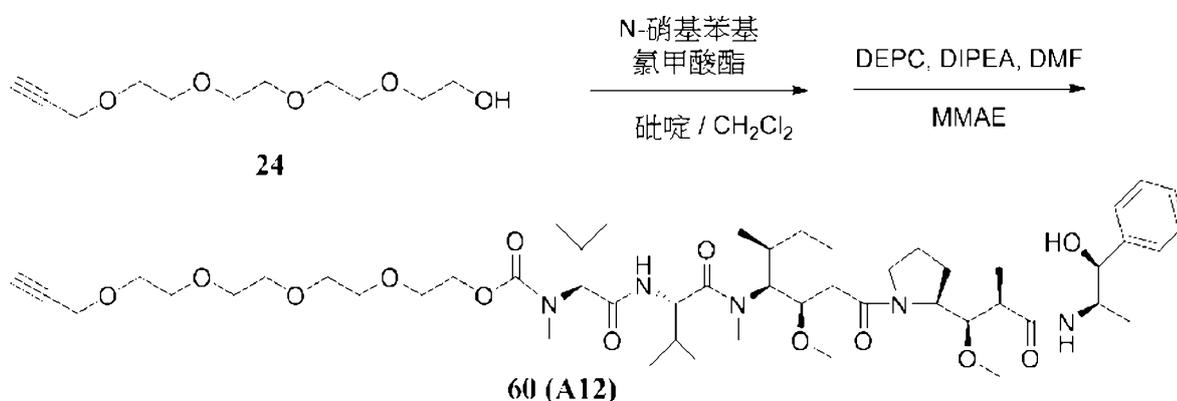
【0167】 將 Boc-Val-Cit-PAB-MMAE (化合物 56) (66 mg, 0.054 mmol)懸浮於無水 CH_2Cl_2 (4.0 mL)中，再添加 TFA (1.0 mL)，將該反應液於 0°C 下攪拌 10 分鐘，然後加熱至室溫後再攪拌 30 分鐘。將該反應混合物蒸餾至乾燥(以甲苯共沸 3 次)後，無需進一步純化即可得到 Val-Cit-PAB-MMAE (化合物 57)。將所得化合物 29 溶於無水 DMF (1.5 mL)中，再添加 EA (75 μL)、DMAP (0.66 mg)、HOBT (0.73 mg)及 Boc-羥胺-PEG4-COOH (化合物 51) (20 mg, 0.054 mmol)。16 小時後，移除溶劑並利用矽膠柱層析法，依序以 1% MeOH/ CH_2Cl_2 及 10% MeOH/ CH_2Cl_2 洗脫，藉此純化以得到 32.6 mg (41%)之 Boc-羥胺-PEG4-Val-Cit-PAB-MMAE (Boc-hydroxylamino-PEG4-Val-Cit-PAB-MMAE，化合物 58)。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.89-7.05 (m, 10H), 5.11-4.95 (m, 2H), 4.6-4.38 (m, 3H), 4.21 (dd, $J = 2.76$ Hz, 7.0 Hz, 1H), 4.18-4.04 (m, 2H), 3.98 (s, 2H), 3.82 (dd, $J = 3.36$ Hz, 5.72 Hz, 2H), 3.63-3.4 (m, 16H), 3.35-3.15 (m, 15H), 3.0 (s, 2H), 2.83 (dd, $J = 2.66$ Hz, 11.1 Hz, 3H),

2.43-1.4 (m, 13H), 1.07 (t, J = 5.92 Hz, 3H), 1.03 (t, J = 7.08 Hz, 3H), 0.95-0.6 (m, 26H). ESI-TOF m/z: 1494.8684[M+Na]⁺。

【0168】 製備羥胺-PEG4-Val-Cit-PAB-MMAE(化合物 59)

【0169】 將 Boc-羥胺-PEG4-Val-Cit-PAB-MMAE (Boc-hydroxylamino-PEG4-Val-Cit-PAB-MMAE，化合物 58) (32 mg, 0.021 mmol) 懸浮於無水 CH₂Cl₂ (2.0 mL) 中，添加 TFA (0.5 mL)。將該反應液於 0°C 下攪拌 10 分鐘，然後加熱至室溫後再攪拌 30 分鐘。該反應混合物蒸餾至乾燥後，通過 C18 管柱依序以 100% H₂O 及 40% 乙腈/H₂O 洗脫，藉此得到 18 mg (65%) 之羥胺-PEG4-Val-Cit-PAB-MMAE (hydroxylamino-PEG4-Val-Cit-PAB-MMAE，化合物 59)。¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.9-6.9(m, 11H), 5.25-4.95 (m, 2H), 4.65-4.37 (m, 2H), 4.21-3.9 (m, 6H), 3.73 (bs, 1H), 3.65-3.48 (m, 12H), 3.42-3.15 (m, 6H), 3.01 (s, 2H), 2.82 (d, J = 10.5 Hz, 2H), 2.45-1.25 (m, 11H), 1.1-0.5 (m, 32H). ESI-TOF m/z: 1394.8241[M+Na]⁺。

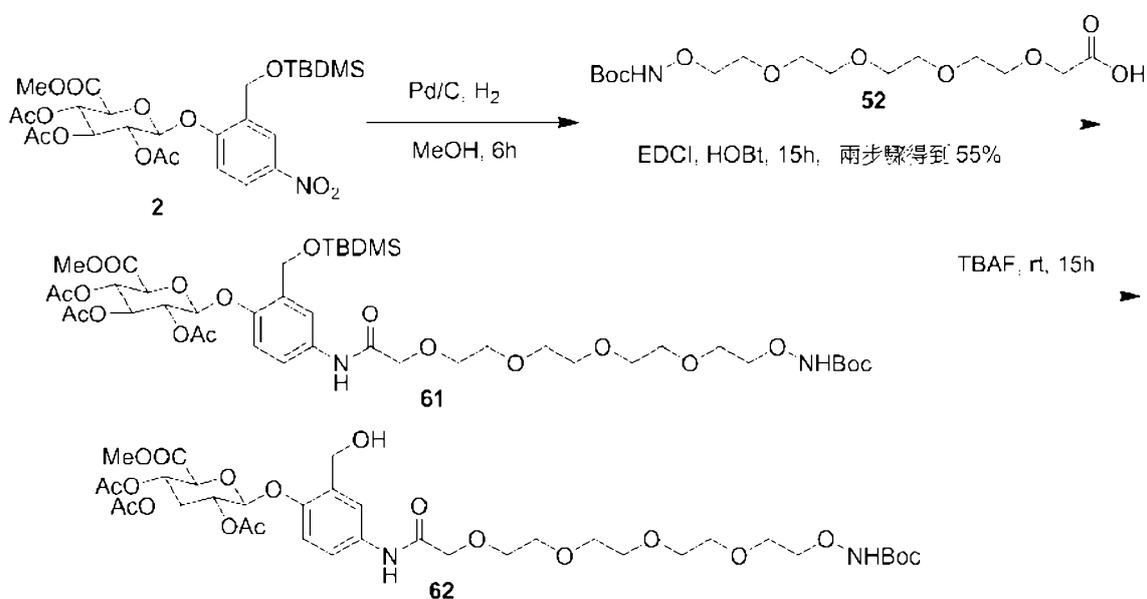
【0170】 2.12 化合物 60(A12)之合成與特性



【0171】 製備化合物 60

【0172】 取化合物 24 (46.4mg, 0.150mmole)、4-硝基苯基氯甲酸酯(150mg, 0.744mmole)、及吡啶(0.12mL, 1.497 mmole)加入二氯甲烷(5.00mL)溶液中，於室溫攪拌 2 小時並濃縮該溶液後，利用快速管柱層析法(矽膠體，35%的乙酸乙酯溶於己烷溶液)純化剩餘物，以得到固體產物(53mg, 0.112 mmole); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) 8.28-8.24 (m, 2H), 7.39-7.35 (m, 2H), 4.43-4.41 (m, 2H), 4.18 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H), 3.80-3.78 (m, 2H), 3.67-3.64 (m, 12H), 2.40 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H)。將上述所得之化合物(28mg, 0.0705mmole)、MMAE (50mg, 0.0696mmole)、DIPEA (0.110mL, 0.631mmole)、HOBT (9.5mg, 0.0703mmole)、及吡啶(2.0mL)加入二甲基甲醯胺(7.5mL)溶液中，於室溫下攪拌 72 小時並濃縮該溶液後，利用快速管柱層析法(矽膠體，4% 之 MeOH 溶於 CH_2Cl_2 溶液)純化剩餘物，以得到固體產物 **60** (47mg, 0.0481 mmole); 以 HRMS (ESI-TOF, MNa^+)計算 $\text{C}_{51}\text{H}_{85}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{Na}$ ，計算值：998.6036，實測值：998.6051。

【0173】 2.13 化合物 64(A13)之合成與特性



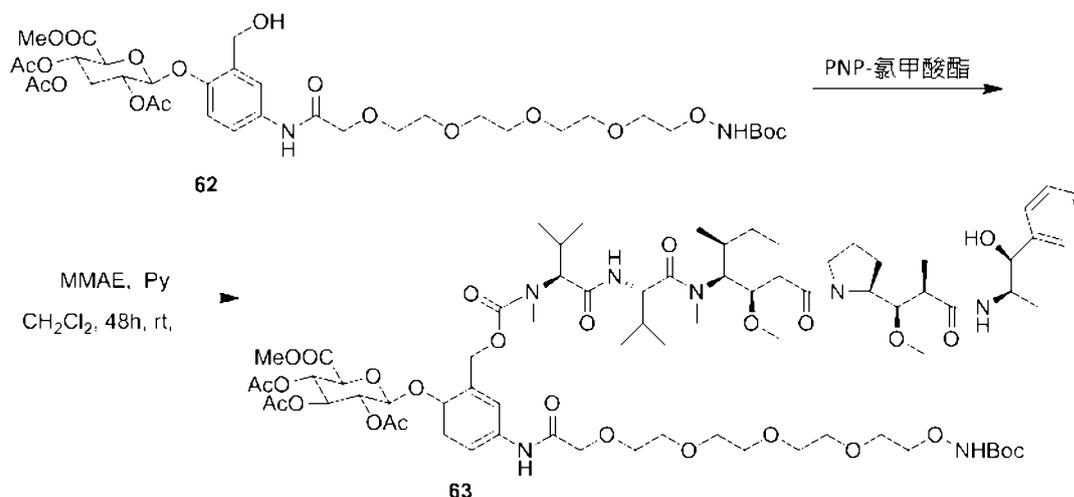
【0174】 製備化合物 61

【0175】 在化合物 2(300.0 mg, 0.50 mmol)溶於 30 ml 之 EtOAc/MeOH (9:1) 之溶液中添加 Pd/C，將該作業空間抽真空後以 H₂ 填充三次，利用球型瓶使該作業空間保持在 H₂ 環境下，然後將該反應液於室溫下攪拌 1 小時。待反應完成後，過濾移除 Pd/C。蒸餾該濾出物以得到用於下一步驟的化合物(265.0 mg, 0.47 mmol)。在溶有上述化合物(265.0 mg, 0.46 mmol)、化合物 2(170 mg, 0.47 mmol)、及 HOBT (105.0 mg, 0.70 mmol)之 CH₂Cl₂ 之溶液中添加 EDCI (108.0 mg, 0.70 mmol)。將該反應液於室溫下攪拌 14 小時後，蒸餾該溶液，並利用管柱純化該粗萃物以得到黃色油狀的化合物 61(300.0 mg, 0.33 mmol)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.71 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.54 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.44 (dd, J = 1.6, 8.8 Hz, 1H), 6.86 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 5.31-5.15 (m, 3H), 5.02 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.65 (d, J = 14.8 Hz, 1H), 4.53 (d, J = 14.8 Hz, 1H), 4.11 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 4.03 (s, 2H), 3.88 (m, 2H), 3.75-3.43 (m, 17H), 1.98 (s, 3H), 1.96 (s, 3H), 1.94 (s, 3H), 1.38 (s, 9H), 0.87 (s, 9H), 0.05 (s, 6H)。

【0176】 製備化合物 62

【0177】 在溶有化合物 61(300.0 mg, 0.33 mmol)的 15 mL 的吡啶與醋酸混合溶液(吡啶:HOAc = 3:2)中添加 2 mL 的 TBAF，並於室溫下攪拌 14 小時。蒸餾該溶液，利用管柱純化該粗萃物以得到黃色油狀的化合物 62(220.0 mg, 0.27 mmol)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.89 (s, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.67 (dd, J = 2.0, 8.8 Hz, 1H), 7.43 (s, 1H), 6.95 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 5.33-5.21 (m, 3H), 5.05 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.67 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 4.42 (d, J = 13.6 Hz, 1H), 4.11 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 4.05 (s, 2H), 3.90 (m, 2H), 3.71-3.53 (m, 17H), 2.05 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.42 (s, 9H)。

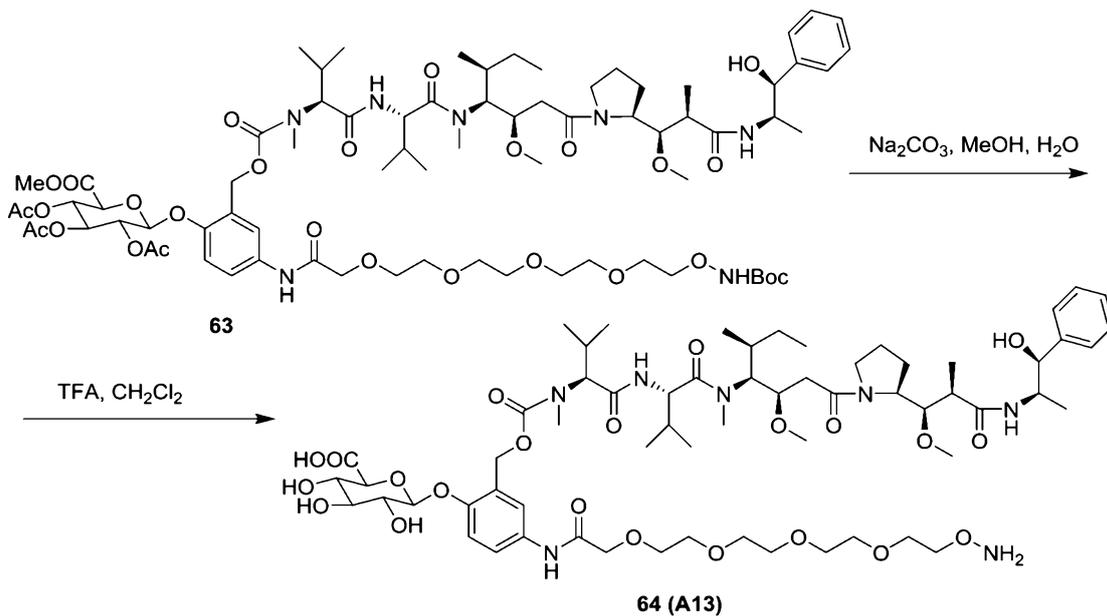
【0178】



【0179】 製備化合物 63

【0180】 取化合物 62 (220.0 mg, 0.27 mmol) 溶於 8 mL 之 CH₂Cl₂ 中，冷卻至 0°C。添加吡啶(0.20 mL)及 PNP lysine，且使該混合物於室溫下攪拌 3 小時。蒸餾該溶液，利用管柱純化該粗萃物以得到用於下一步驟的化合物(80.0 mg, 0.082 mmol)。取上一步驟得到的化合物(80.0 mg, 0.082 mmol)及 MMAE (60.0 mg, 0.082 mmol) 溶於 5 mL 之 THF 中，添加 TEA (0.1 mL) 加以反應，該反應混合物於室溫下攪拌 48 小時。待反應完成後，添加 35 mL 之 EA 以及 20 mL 之 0.5N HCl 溶液。利用 MgSO₄ 將該有機層乾燥後濃縮，利用管柱純化該粗萃物以得到黃色油狀之化合物 63(70.0 mg, 0.05 mmol). ESI-TOF m/z: 1570.7932 [M+Na⁺]

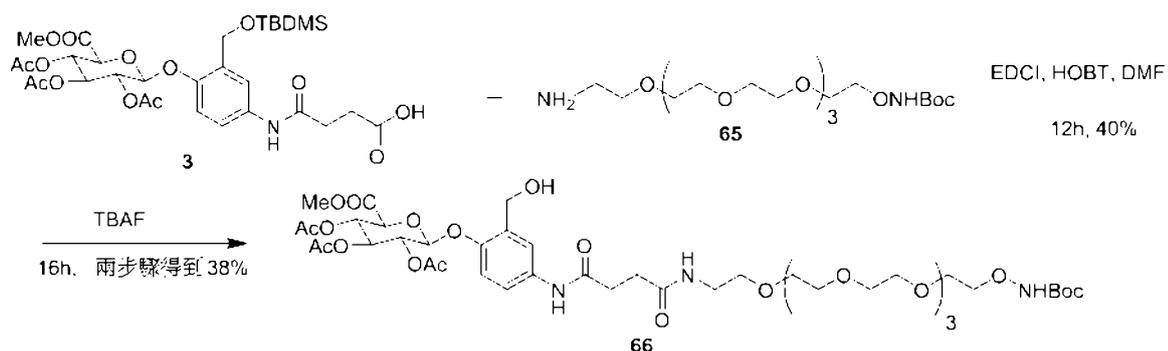
【0181】



【0182】 製備化合物 64

【0183】 取化合物 63(20.0 mg, 0.013 mmol)溶於 2.5 mL 之甲醇與水混合溶液(MeOH : H₂O =4:1)中，於 0°C 下添加 Na₂CO₃ 加以反應，並於室溫下攪拌該反應混合物 3 小時。待反應完成後，在減壓下移除有機溶液，利用 C18 管柱純化剩餘物，以得到用於下一步驟的化合物 A01-8。將上一步驟的化合物溶於 1.6 ml 之 CH₂Cl₂ 溶液中，添加 0.40 ml 之 TFA 並於室溫下攪拌 1 小時。該溶液經濃縮後，利用 C18 管柱純化剩餘物以得到化合物 64 (11.2 mg, 0.0085 mmol)。ESI-TOF m/z: 1306.6916[M-H]⁻。

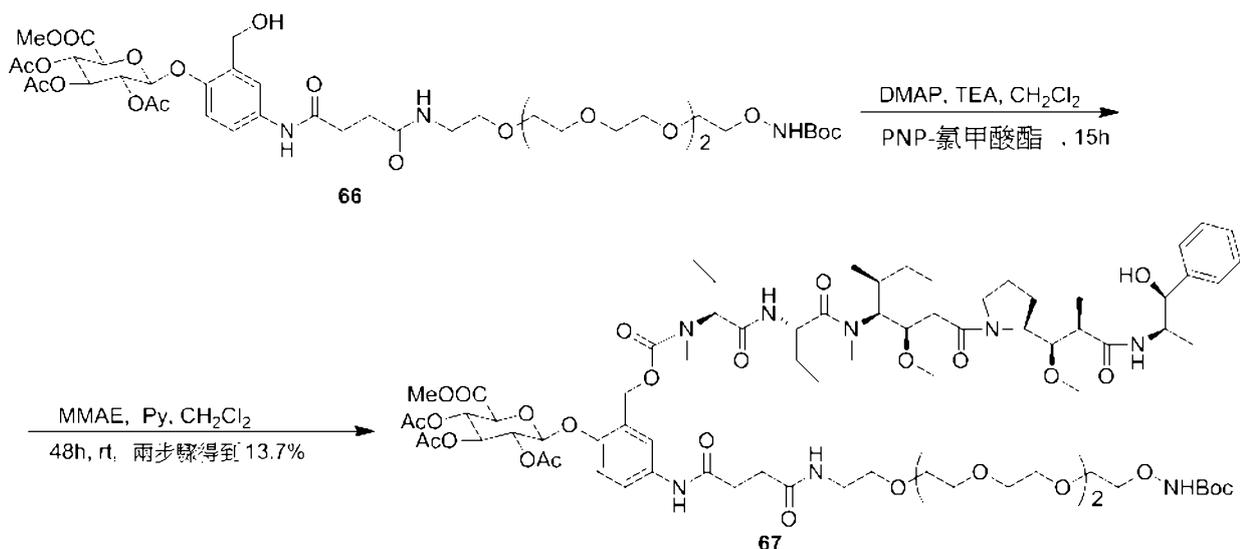
【0184】 2.14 化合物 60(A14)之合成與特性



【0185】 製備化合物 66

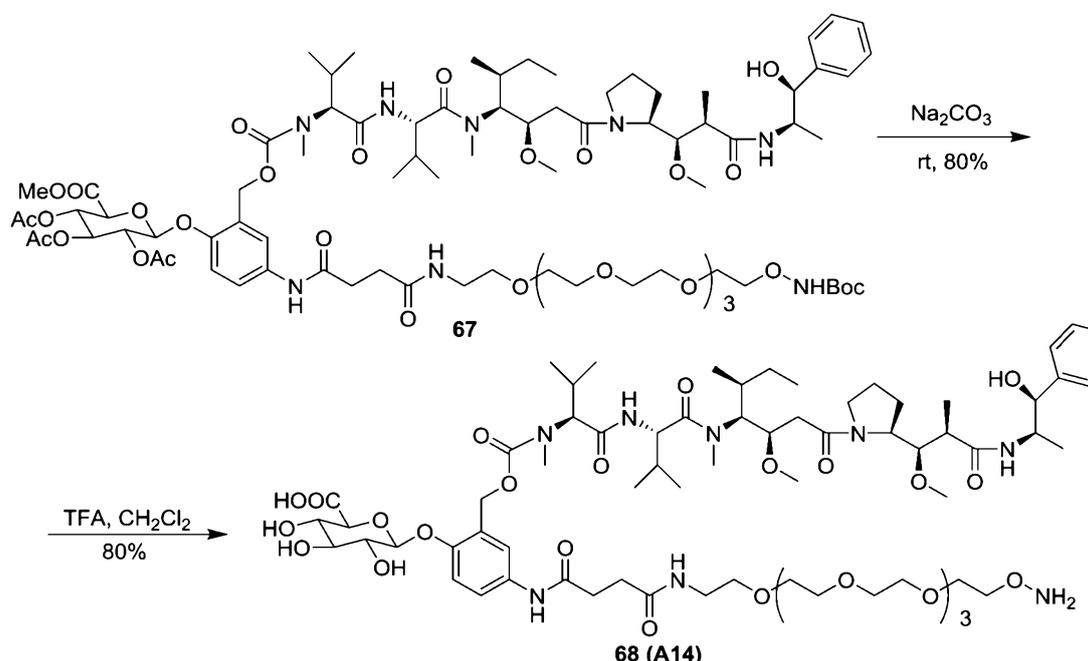
【0186】 取化合物 3(315.0 mg, 0.47 mmol)、化合物 65 (220 mg, 0.43 mmol)、及 HOBT (87.0 mg, 0.65 mmol)溶於 DMF 之溶液，添加 EDCI (87.0 mg, 0.56 mmol)，於室溫下攪拌 12 小時。蒸餾該溶液後，利用管柱純化粗產物後得到用於下一步驟之黃色油狀化合物(200.0 mg, 0.18 mmol)。將上一步驟得到的化合物(200.0 mg, 0.33 mmol)加入 15 mL 的吡啶與醋酸混合溶液(吡啶:HOAc = 3:2)中，添加 2 mL 之 TBAF，於室溫下攪拌 16 小時。蒸餾該溶液，利用管柱純化粗產物以得到黃色油狀之化合物 66(176.0 mg, 0.17 mmol, two steps for 38%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.05 (s, 1H), 7.67 (dd, J = 2.4, 8.8 Hz, 1H), 7.47 (s, 1H), 6.94 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 5.40-5.25 (m, 3H), 5.06 (d, J = 7.6 Hz, 1 H), 4.72 (d, J = 12.8 Hz, 1H), 4.42 (d, J = 12.8 Hz, 1H), 3.99 (m, 2H), 3.75-3.52 (m, 27 H), 2.05 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 1.94 (s, 3H), 1.46 (s, 9H)。

【0187】



【0188】 製備化合物 67

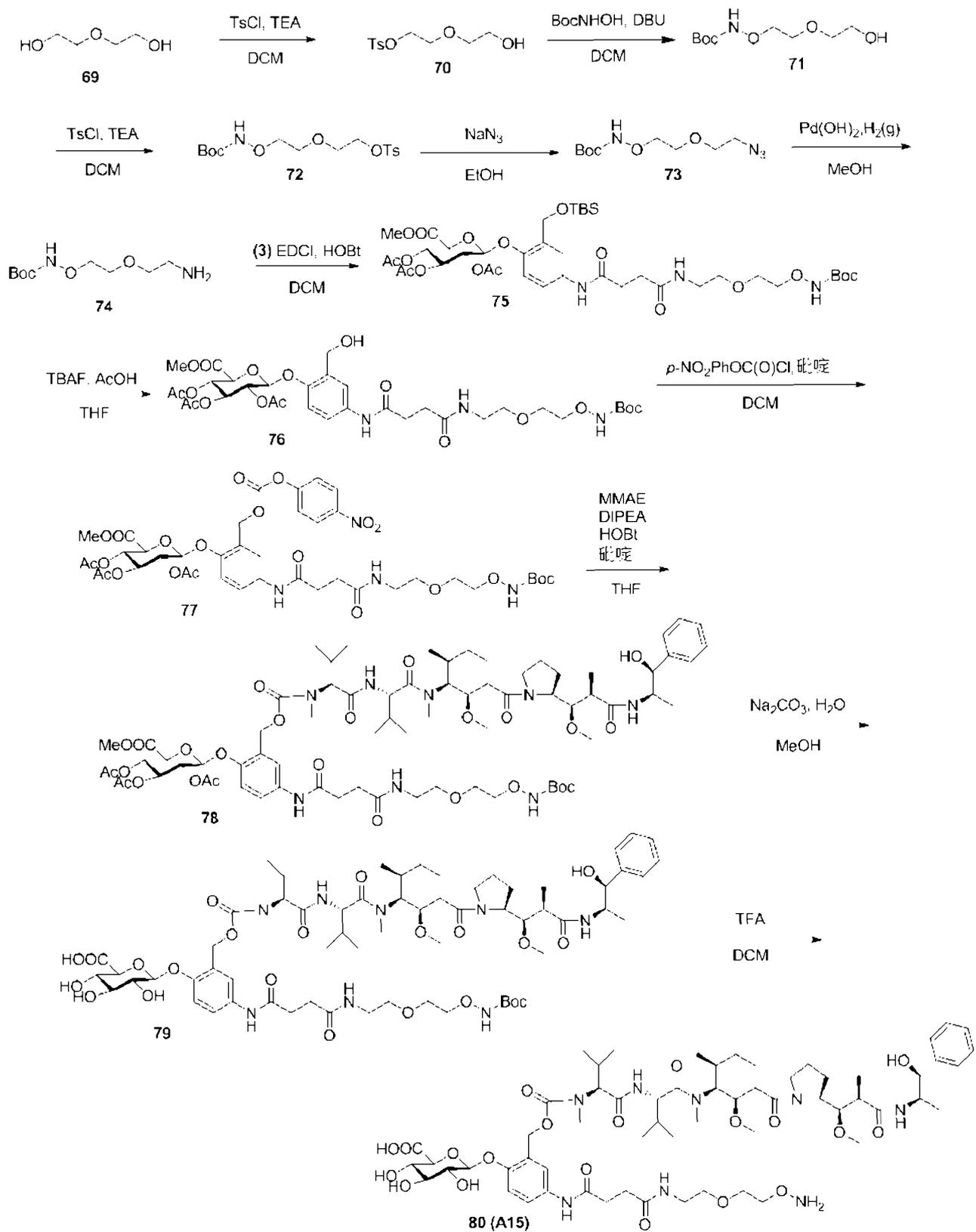
【0189】 將化合物 66(176.0 mg, 0.17 mmol)溶於 5 mL 之 CH_2Cl_2 中，冷卻至 0°C ，再添加吡啶(27uL)和 PNP 氯甲酸酯(52 mg, 0.26 mmol)，於室溫下攪拌 3 小時。以 CH_2Cl_2 稀釋該反應混合物並以 1 N HCl、飽和 NaHCO_3 水溶液、及滷水清洗，利用 MgSO_4 乾燥有機層後濃縮，利用管柱純化粗產物以得到用於下一步驟的化合物。將上一步驟得到的化合物(128.0 mg, 0.108 mmol)及 MMAE (78.0 mg, 0.108 mmol)溶於 4 mL 之 DMF 中，再添加 TEA (100 uL)及吡啶(87 uL)加以反應，並於室溫下攪拌 48 小時。蒸餾該溶液後，以管柱純化粗產物後得到黃色油狀化合物 67(40.0 mg, 0.02 mmol)。ESI-TOF m/z : 1787.9224 [$\text{M} + \text{Na}^+$]。

【0190】**【0191】** 製備化合物 68

【0192】 將化合物 67(10.0 mg, 0.013 mmol)溶於 1.25 mL 之甲醇與水混合溶液($\text{MeOH} : \text{H}_2\text{O} = 4:1$)中，於 0°C 添加 Na_2CO_3 (1.8 mg, 0.017 mmol)處理，該反應混合物於室溫下攪拌 3 小時。待反應完成後，在減壓下移除有機溶液。利用

C18 管柱純化剩餘物以得到用於下一步驟的化合物。將上一步驟得到的化合物溶於 1.6 ml 之 CH_2Cl_2 中，添加 0.40 ml 的 TFA 並於室溫下攪拌 1 小時。該溶液經濃縮後，透過 C18 管柱純化剩餘物以得到化合物 68 (4.0 mg)。ESI-TOF m/z: 1307.5170 $[\text{M-H}]^-$ 。

【0193】 2.15 化合物 80(A)之合成與特性



【0194】 製備化合物 70

【0195】 將二乙二醇(Diethylene glycol, 化合物 69) (20 g, 0.188 mol)溶於 CH_2Cl_2 (500 mL)中, 再添加 TEA (29 mL, 0.207 mol), 然後以冰水浴冷卻之, 在 30 分鐘期間內逐滴加入溶於 CH_2Cl_2 (100 mL)之 TsCl (20 g, 0.094 mol)。緩慢回溫至室溫後, 靜置反應 1 小時。移除溶劑後, 利用矽膠柱層析法依序以 20% EA/己烷及 66% EA/己烷洗脫, 以純化得到 14.4 g (29.5%)之二乙二醇單-Ts (diethylene glycol mono-Ts, 化合物 70)。然後, 將上述得到的二乙二醇單-Ts (化合物 70)(12.61 g, 44.2 mmol)及 N-Boc-羥基胺(8.25 g, 62 mmol)溶於 CH_2Cl_2 (400 mL)中, 再添加 DBU (13.5 mL, 88.4mmol)。反應 48 小時後, 使用 400 mL 之 CH_2Cl_2 稀釋該反應液, 並以 1N HCl (100 mL)清洗兩次、以 H_2O (100 mL)及滷水(200 mL)清洗一次, 有機層利用無水 MgSO_4 乾燥後蒸餾。利用矽膠柱層析法依序以 33% EA/己烷以及 50% EA/己烷(含 5% MeOH)洗脫以純化粗萃物, 藉此得到 1.5 g (16.1%) 之二乙二醇單-Ts (diethylene glycol mono-Ts, 化合物 71)。將該產物溶於 CH_2Cl_2 (70 mL)中, 再添加 TEA (2.96 mL, 21.3 mmol), 然後以冰水浴冷卻之, 在 30 分鐘期間內逐滴加入溶於 CH_2Cl_2 (20 mL)之 TsCl (2 g, 9.4 mmol)。緩慢回溫至室溫後, 靜置反應 1 小時。移除溶劑後, 利用矽膠柱層析法依序以 10% EA/己烷及 40% EA/己烷洗脫以純化, 藉此得到 1.31 g (49%)的 OTs-二乙二醇羥胺-Boc (OTs-diethylene glycol hydroxylamie-Boc, 化合物 72)。最後, 將 OTs-二乙二醇羥胺-Boc(化合物 72)(1.3 g, 3.48 mmol)溶於無水酒精(50 mL), 再添加疊氮化鈉(680 mg, 10.4 mmol), 然後回流至隔夜。移除溶劑後, 以 EA (200 mL)稀釋並以 H_2O (50 mL)及滷水 (50 mL)清洗, 利用無水 MgSO_4 乾燥有機層後進行蒸餾。利用矽膠柱層析法以 10% EA/己烷及 40% EA/己烷洗脫以純化粗萃物, 藉此得到 728 mg (85%)之疊氮-二乙二醇羥胺-Boc (Azido-diethylene glycol hydroxylamie-Boc, 化合物 73)。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 3.85-3.82 (m, 2H), 3.54-3.51 (m, 2H), 3.48 (d, $J = 4.88$ Hz, 2H), 3.21 (d, $J = 5.2$ Hz, 2H), 1.28 (s, 3H)。

【0196】 製備化合物 74

【0197】 將疊氮-二乙二醇脛胺-Boc (化合物 73) (168.5 mg, 0.684 mmol) 溶於甲醇(0.68 mL)和 EA (6.2 mL)之混合液中。該溶液添加 $\text{N}_2(\text{g})$ 。Pd(OH) $_2$ (59 mg) 進行脫氣並充入 $\text{H}_2(\text{g})$ 5 分鐘，然後該反應液在相同條件下反應 2 小時。待反應完成後，使用矽藻土片過濾該粗萃物，並濃縮至乾燥，不需再額外純化即可得到 145 mg (96.2%) 之胺基-二乙二醇脛胺-Boc (amino-diethylene glycol hydroxylamie-Boc，化合物 74)。接著，將 2,3,4-三-Ac-6-甲基-葡萄糖醯醛酸酯-2'-OTBS-PAB-琥珀酸 (化合物 3) (322.6 mg, 0.482 mmol) 和上述化合物 74 (127.3 mg, 0.578 mmol) 溶於 CH_2Cl_2 (5 mL) 中，再添加 EDCI (138.5 mg, 0.723 mmol) 和 HOBT (74 mg, 0.48 mmol)。8 小時後，移除溶劑，接著利用矽膠柱層析法依序以 15% EA/己烷及 60% EA/己烷洗脫，以純化該反應混合物，藉此得到 312.2 mg (74%) 之 2,3,4-三-Ac-6-甲基-葡萄糖酸酯-2'-OTBS-PAB-琥珀酸酯-PEG2-脛胺-Boc (2,3,4-tri-Ac-6-methyl-Glucuranate-2'-OTBS-PAB-succinate-PEG2-hydroxylamie-Boc，化合物 75)。將上述得到的化合物 75 溶解於吡啶(2.7 mL)和醋酸(1.8 mL)之混合物中，然後再添加 TBAF (0.3 mL, 1 M 溶於 THF 溶液)。12 小時後，移除溶劑，接著利用矽膠柱層析法依序以 CH_2Cl_2 (100%) 及 5% MeOH/ CH_2Cl_2 洗脫該反應混合物以純化，藉此得到 218.1 mg (80.4%) 之 2,3,4-三-Ac-6-甲基-葡萄糖酸酯-2'-OH-PAB-琥珀酸酯-PEG2-脛胺-Boc (2,3,4-tri-Ac-6-methyl-Glucuranate-2'-OH-PAB-succinate-PEG2-hydroxylamie-Boc，化合物 76)。將 2,3,4-三-Ac-6-甲基-葡萄糖酸酯-2'-OH-PAB-琥珀酸酯-PEG2-脛胺-Boc (化合物 76) 懸浮於無水

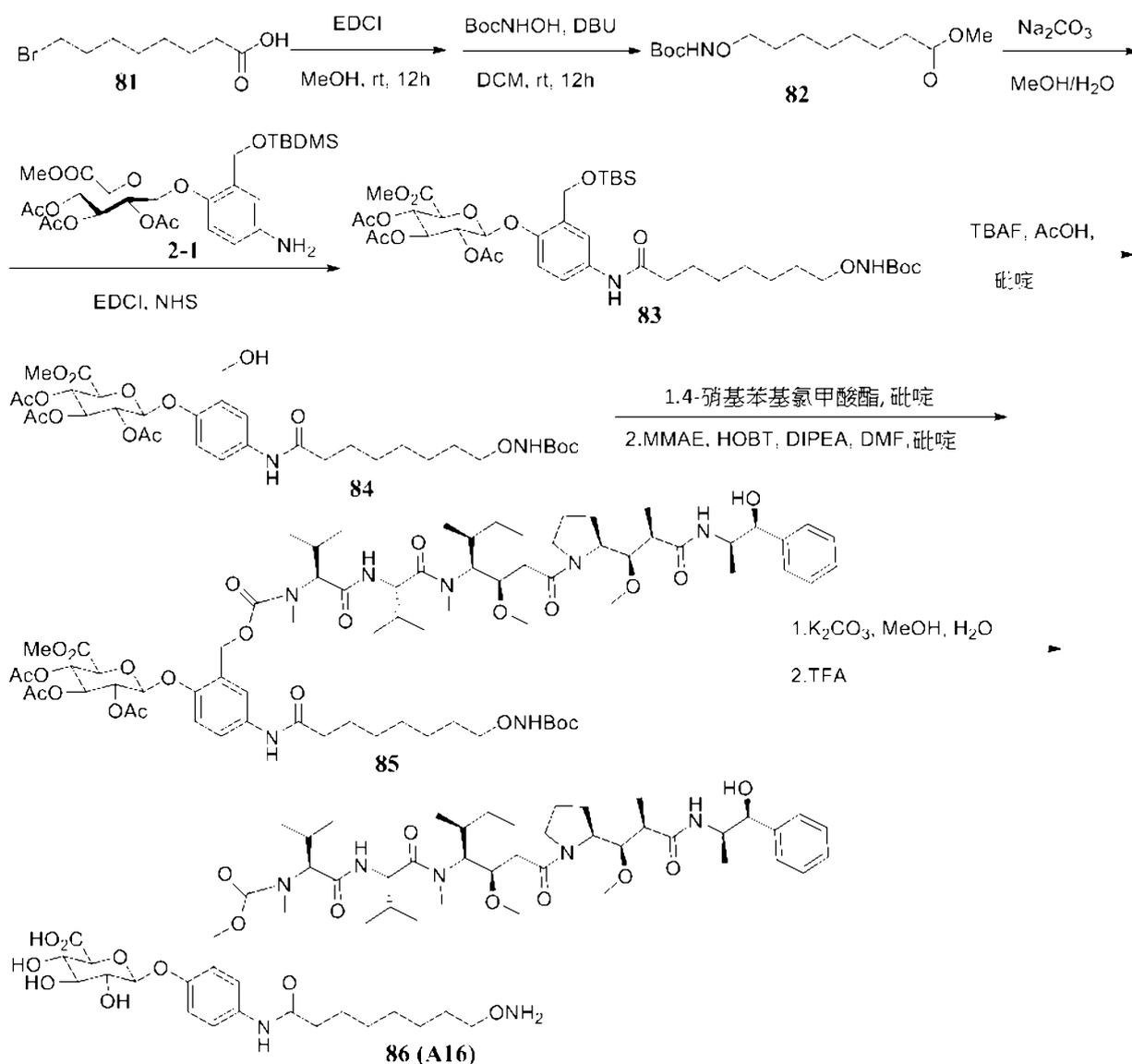
CH₂Cl₂ (5.5 mL)中，再添加吡啶 (240 μL, 2.95 mmol) 和 4-硝基苯甲醯氯(260 mg, 1.26 mmol)。2 小時後，移除溶劑，接著利用矽膠柱層析法依序以 CH₂Cl₂ (100%) 及 5% MeOH/CH₂Cl₂ 洗脫，藉以純化該反應混合物並得到 155.6 mg (58.7%)之 2,3,4-三-Ac-6-甲基-葡萄糖醛酸酯-2'-OpNP-PAB-琥珀酸酯-PEG2-羥胺-Boc (2,3,4-tri-Ac-6-methyl-Glucuronate-2'-OpNP-PAB-succinate-PEG2-hydroxylamie-Boc，化合物 77)。然後，將 MMAE (108.3mg, 0.15 mmol)溶解於 THF (3.45 mL)和吡啶(0.86 mL)之混合物中，然後再添加 DIPEA (260 μL)、HOBt (6.9 mg, 0.048 mmol)、及 2,3,4-三-Ac-6-甲基-葡萄糖醛酸酯-2'-OpNP-PAB-琥珀酸酯-PEG2-羥胺-Boc (化合物 77)(155.6 mg, 0.169 mmol)。48 小時後，移除溶劑，接著利用矽膠柱層析法依序以 CH₂Cl₂ (100%)及 7.5% MeOH/CH₂Cl₂ 洗脫該反應混合物，藉此以純化得到 145.7 mg (57.4%)之 2,3,4-三-Ac-6-甲基-葡萄糖醛酸酯-2'-MMAE-PAB-琥珀酸酯-PEG2-羥胺-Boc (2,3,4-tri-Ac-6-methyl-Glucuronate-2'-MMAE-PAB-succinate-PEG2-hydroxylamie-Boc，化合物 78)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.22 (s, 1H), 8.2-7.95 (m, 2H), 7.6-6.5 (m, 12H), 5.4-5.15 (m, 5H), 5.15-4.92 (m, 3H), 4.85 (d, J = 2.48 Hz, 1H), 4.82-4.5 (m, 3H), 4.49-3.98 (m, 7H), 3.95-3.17 (m, 27H), 3.14-2.46 (m, 13H), 2.45-1.45 (m, 24H), 1.39 (s, 9H), 1.17 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 1.05-0.45 (m, 30H)。

【0198】 製備化合物 79

【0199】 將 2,3,4-三-Ac-6-甲基-葡萄糖醛酸酯-2'-MMAE-PAB-琥珀酸酯-PEG2-羥胺-Boc(化合物 78)(145.7 mg, 0.097 mmol)溶於 MeOH (3.9 mL)中，然後添加 Na₂CO₃ (32.3 mg, 0.31 mmol)。1 小時後，將 H₂O (194 μL) 添加至該反應混合物中並繼續攪拌再使其反應 1 小時。接著，利用 IR-120 中和反應，使用矽藻

土片過濾，蒸餾該粗萃物，並以 C18 管柱，依序利用 100% H₂O 及 40% 乙腈/H₂O 進行洗脫，藉以純化粗萃物以得到 85 mg (65.5%) 之葡萄糖醛酸酯-2'-MMAE-PAB-琥珀酸酯-PEG2-羥胺-Boc (Glucuronate-2'-MMAE-PAB-succinate-PEG2-hydroxylamie-Boc，化合物 79)。將 20 mg 之葡萄糖醛酸酯-2'-MMAE-PAB-琥珀酸酯-PEG2-羥胺-Boc(化合物 79)懸浮於無水 CH₂Cl₂ (1.0 mL)中，添加 TFA (0.25 mL)，該反應液於 0°C 下攪拌 10 分鐘，然後回溫至室溫後攪拌 30 分鐘。該反應混合物被蒸餾至乾燥後，通過 C18 管柱並依序以 100% H₂O 及 20% 乙腈/H₂O 進行洗脫，以得到 13 mg (72%) 之葡萄糖醛酸酯-2'-MMAE-PAB-琥珀酸酯-PEG2-羥胺 (Glucuronate-2'-MMAE-PAB-succinate-PEG2-hydroxylamie，化合物 80)。¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 8.22-7.9 (m, 1H), 7.54-7.1 (m, 8H), 5.4-5.1 (m, 2H), 5.04 (s, 1H), 4.73-4.25 (m, 2H), 4.18 (d, J = 8.28Hz, 1H), 4.05 (bs, 3H), 3.9 (s, 1H), 3.7-3.59 (m, 5H), 3.54 (m, 2H), 3.5-3.24 (m, 9H), 3.18 (s, 1H), 3.07 (d, J = 3.08Hz, 2H), 2.97 (s, 1H), 2.93 (d, J = 2.52Hz, 2H), 2.82-2.24 (m, 6H), 2.2-1.9 (m, 2H), 1.83 (s, 2H), 1.8-1.56 (m, 2H), 1.55-1.47 (m, 1H), 1.27 (d, J = 6.4Hz, 3H), 1.18 (d, J = 7.2Hz, 1H), 1.13 (d, J = 9.58Hz, 1H), 1.06 (d, J = 8.9Hz, 2H), 0.94 (d, J = 7.54Hz, 2H), 0.94-0.5 (m, 14H)。ESI-TOF m/z: 1283.6622[M+Na]⁺。

【0200】 2.16 化合物 86(A16)之合成與特性



【0201】 製備化合物 82

【0202】 取化合物 81(1.5g, 6.756mmole)和 EDCI (1.26g, 8.1mmole)溶於甲醇(20mL)溶液中並攪拌之。於室溫下攪拌 16 小時後，濃縮該溶液且利用快速管柱層析法對剩餘物進行純化，以得到用於下一步驟之油狀產物(1.51g, 6.4 mmole)。取 N-Boc-羥胺(N-Boc-hydroxylamine)(1.28g, 9.6mmole)及上述得到的化合物(1.51g, 6.4 mmole)溶於二氯甲烷(30mL)溶液，添加 DBU (1.95g, 12.8mmole)並於室溫下攪拌 16 小時。該溶液經濃縮後，利用管柱層析法純化該粗萃物，以得到油狀產物(化合物 82)(1.22g, 4.22mmole)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 7.09 (s, 1H),

3.83 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.66 (s, 3H), 2.29 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 1.64-1.49 (m, 4H), 1.45 (s, 9H), 1.39-1.30 (m, 6H)。

【0203】 製備化合物 83

【0204】 取化合物 82(1.22g, 4.22mmole)、 H_2O (1.0mL)、及 Na_2CO_3 (2.24g, 21.1 mmole)溶於甲醇(9mL)溶液並攪拌之。於室溫下攪拌 24 小時後，濃縮該溶液。以 1N HCl (10mL)和乙酸乙酯萃取剩餘物，有機層被濃縮後得到可用於下一步驟之油狀產物(0.22g, 0.8 mmole)。取溶有上述化合物(0.22g, 0.8 mmol)及化合物 2-1(0.5g, 0.88 mmol)之二氯甲烷(16 mL)溶液，於該溶液中依序添加 EDCI (0.16g, 1.04mmole)及 HOBT (0.162g, 1.2 mmol)，將該混合物於室溫下攪拌 12 小時。於真空中濃縮該反應混合物後，利用快速管柱層析法純化剩餘物以得到油狀產物(化合物 83)(0.28g, 0.34mmole)。 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.64 (dd, $J = 2.8, 8.8$ Hz, 1H), 7.31 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 7.23 (s, 1H), 7.15 (s, 1H), 6.91 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 5.34-5.25 (m, 3H), 5.05 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 4.72 (d, $J = 14.8$ Hz, 1H), 4.60 (d, $J = 14.8$ Hz, 1H), 4.13 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H), 3.84 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.73 (s, 3H), 2.34 (m, 1H), 2.08 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 1.72-1.61 (m, 4H), 1.47 (s, 9H), 1.40-1.33 (m, 6H), 0.96 (s, 3H), 0.12 (s, 6H)。

【0205】 製備化合物 84

【0206】 混合含有化合物 83(0.28g, 0.34mmole)、TBAF (0.36mL, 0.36mmole)、AcOH (2.1mL)、及吡啶(3.2mL)之溶液並攪拌之，於室溫下攪拌 12 小時後，濃縮該溶液，利用快速管柱層析法純化剩餘物，以得到固體產物(化合物 84)(0.18g, 0.253 mmole)。 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.61 (dd, $J = 2.4, 8.4$ Hz, 1H), 7.39 (s, 1 H), 7.35 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.18 (s, 1H), 6.97 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 5.40-5.23 (m, 3H), 5.07 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.74 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H), 4.41 (d, $J = 13.2$

Hz, 1H), 4.10 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 3.84 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.71 (s, 3H), 2.34 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 2.10 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.68-1.56 (m, 4H), 1.47 (s, 9H), 1.40-1.35 (m, 6H)。

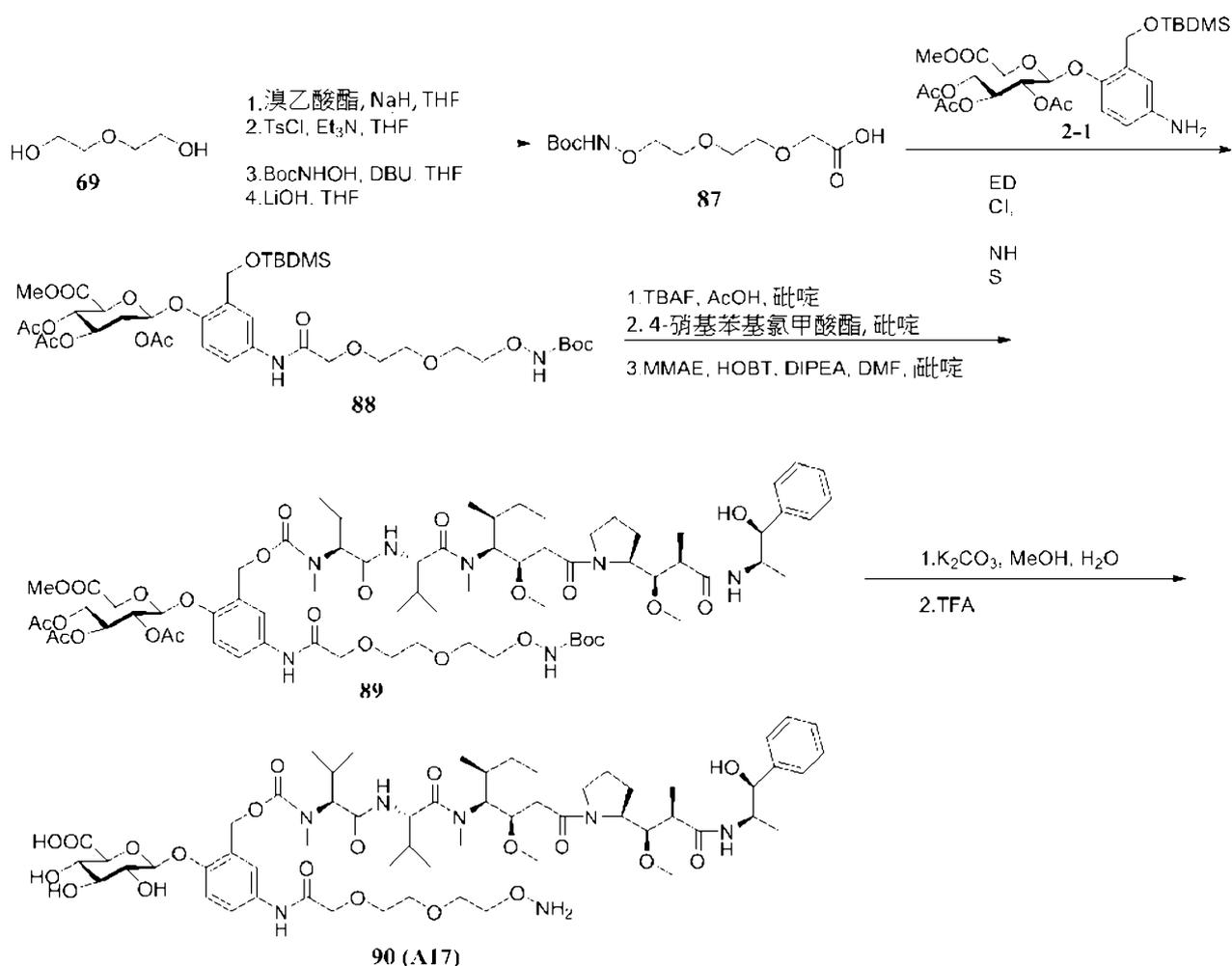
【0207】 製備化合物 85

【0208】 將化合物 84(180mg, 0.253mmole)、4-硝基苯基氯甲酸酯 (76mg, 0.379mmole)及吡啶(0.04mL, 0.506 mmole)溶於二氯甲烷，將該溶液於室溫下攪拌 12 小時。該溶液經濃縮後，利用快速管柱層析法純化剩餘物，以得到用於下一步驟的固體產物(162mg, 0.185 mmole)。取上述化合物(70.8mg, 0.080 mmole)、MMAE (146mg, 0.203mmole)、DIPEA (0.185mL, 0.925mmole)、HOBT (9.65mg, 0.0714mmole)、及吡啶(0.146mL)溶於二氯甲烷之溶液(6 mL)並攪拌之。於室溫下攪拌 48 小時後，濃縮該溶液，利用快速管柱層析法純化剩餘物，得到固體產物(化合物 85)(95mg, 0.065 mmole)。以 HRMS (ESI-TOF, MNa⁺)計算 C₇₃H₁₁₃N₇O₂₃Na，計算值：1478.7780，實際值：1478.7828。

【0209】 製備化合物 86

【0210】 取化合物 85 (20.0 mg, 0.015 mmol)溶於 5 mL 之甲醇與水混合溶液(MeOH : H₂O =4:1)中，於 0°C 添加 Na₂CO₃ (4.0 mg, 0.0371 mmol)以反應。該反應混合物於室溫下攪拌 3 小時。反應完成後，在減壓下移除有機溶液，利用 C18 管柱純化剩餘物以得到用於下一步驟的化合物。將上述溶於 1.6 ml 之 CH₂Cl₂，再添加 0.40 ml 之 TFA，於室溫下攪拌 1 小時。該溶液經濃縮後，利用 C18 管柱純化剩餘物，以得到化合物 86(10.1 mg, 0.0076 mmol)。ESI-TOF m/z: 1214.6890[M-H]⁻。

【0211】 2.17 化合物 90(A17)之合成及特性



【0212】 製備化合物 87

【0213】 取氫化鈉(6.2g, 155mmole)及二乙二醇 **69** (26g, 245mmole)溶於四

氫呋喃(300mL)之溶液，於 0 °C 下逐滴加入甲基溴乙酸酯(25g, 163mmole)，且於室溫下攪拌該溶液 16 小時。當 TLC 顯示起始原料被完全消耗時，利用 MeOH 終止反應，並使用矽藻土片過濾，接著以 MeOH 清洗。集中過濾物和清洗物於減壓下濃縮，使用快速管柱層析(矽膠體，2% MeOH 溶於 CH₂Cl₂)純化該剩餘物，藉此得到油狀產物(8 g, 44.92 mmole)。¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 4.11-4.10 (m, 2H), 3.70-3.65 (m, 9H), 3.56-3.54 (m, 2H)。將上述得到的化合物(8g, 44.92mmole)及三乙基胺(12mL, 86.33mmole)溶於二氯甲烷(100mL)溶液中，添加溶於 CH₂Cl₂

(100mL)之 P-對甲苯磺醯氯(11.53g, 60.48mmole)，該反應混合物於室溫下攪拌 16 小時。觀察到白色固體後，使用矽藻土片過濾，並以 CH_2Cl_2 清洗。該濾液於經真空濃縮後，使用快速管柱層析進行純化(使用矽膠體，溶有 35%乙酸乙酯的己烷溶液)，以得到油狀產物(12g, 36.10mmole)。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) 7.77 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.31 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 4.13 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 4.09 (s, 2H), 3.72 (s, 3H), 3.67-3.58 (m, 6H), 2.42 (s, 3H)。將 DBU (7.0mL, 46.85mmole)加入溶有 N-Boc-脛胺(5.87g, 44.09mmole)及上述得到的化合物(8.9g, 26.78mmole)的四氫呋喃(160mL)混合溶液中，且於室溫下對該混合溶液攪拌 72 小時。當 TLC 顯示起始原料被完全消耗時，該溶液已被濃縮。使用管柱層析法純化(使用矽膠體，乙酸乙酯)該粗萃物，以得到油狀產物(4.05g, 13.80mmole)。將上述得到的化合物(1g, 3.41mmole)、 H_2O (0.5mL)、及 LiOH (0.172g, 4.099 mmole)加入四氫呋喃(12mL)之溶液，並攪拌之。於室溫下攪拌 2 小時後，加入 1N HCl (10mL)終止反應，再利用乙酸乙酯和鹵水進行分離。收集有機層，並使用乙酸乙酯(50mL \times 4)萃取水相層。集中的有機層經濃縮後，利用快速管柱層析法(矽膠體，20%之 MeOH 溶於 CH_2Cl_2)純化剩餘物，以得到油狀產物(化合物 87)(0.87g, 3.11 mmole)。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) 3.95 (m, 4H), 3.66-3.62 (m, 6H), 3.32 (s, 1H), 1.41 (s, 9H); 以 HRMS (ESI-TOF, MNa^+)計算 $\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{NO}_7 \text{Na}$ ，計算值：302.1210，實測值：302.1233。

【0214】 製備化合物 88

【0215】 將化合物 87 (0.4g, 1.432 mmol)及化合物 2-1 (0.532g, 0.934 mmol)溶於二氯甲烷(16 mL)之溶液，並於該溶液中依序添加 EDCI (0.22g, 1.417mmole)及 HOBT (0.126g, 0.932 mmol)，將該混合物於室溫下攪拌 16 小時。該反應混合

物於真空中濃縮後，利用快速管柱層析法(矽膠體，含有 67%乙酸乙酯的己烷)純化該剩餘物，以得到油狀產物 88(0.4676g, 0.562mmole)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 8.69 (s, 1H), 7.61(s, 1H), 7.56 (dd, J = 2.8, 8.8 Hz, 1H), 7.47 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 6.91 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 5.31-5.25 (m, 3H), 5.04 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 4.73 (d, J = 15.2 Hz, 1H), 4.61 (d, J = 14.8 Hz, 1H), 4.12-4.06 (m, 4H), 4.00-3.98 (m, 2H), 3.76-3.68 (m, 8H), 2.03 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.41 (s, 9H), 0.92 (s, 9H), 0.09 (s, 6H); 以 HRMS (ESI-TOF, MNa⁺)計算 C₃₇H₅₈N₂O₁₇SiNa，計算值：853.3397，實測值：853.3385。

【0216】 製備化合物 89

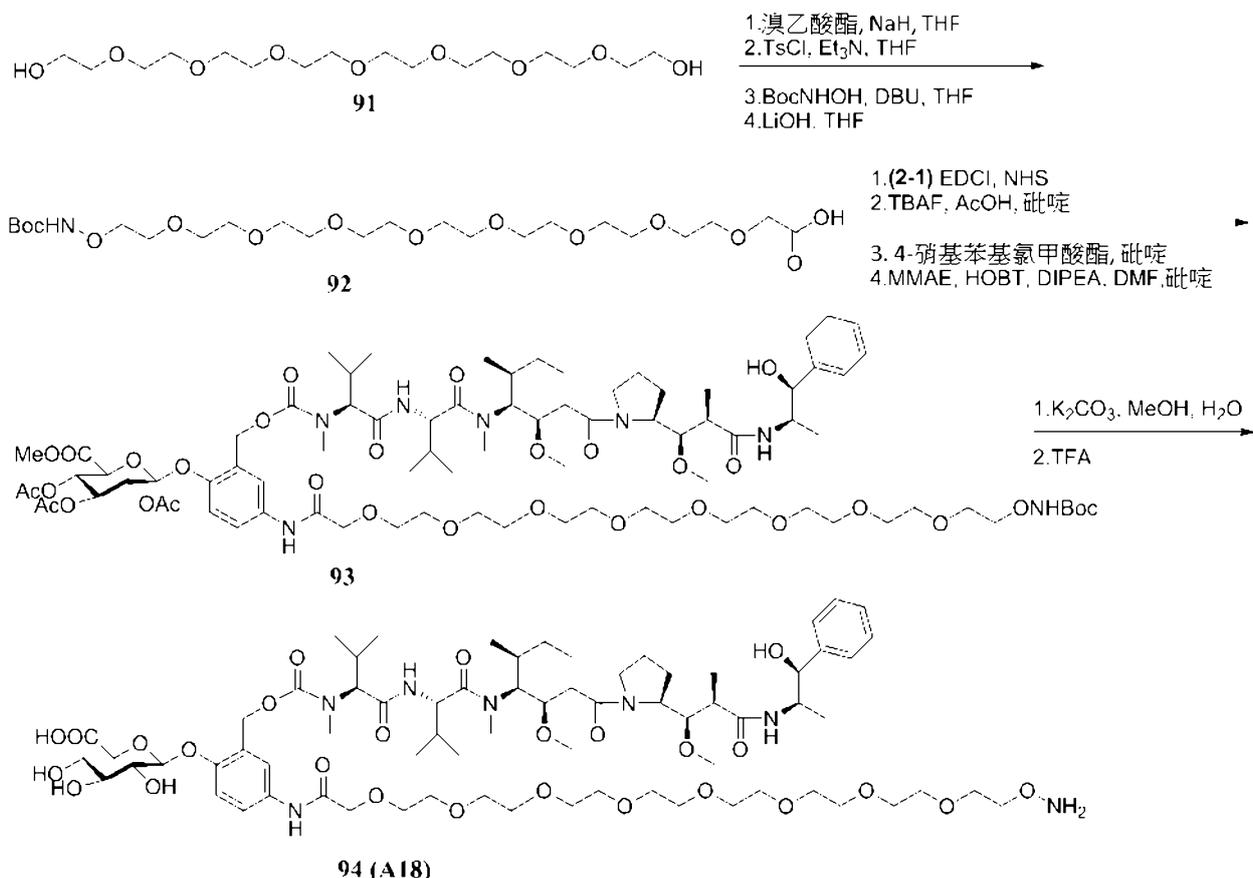
【0217】 取化合物88(0.4676g, 0.562mmole)·TBAF (0.56mL, 0.56mmole)、AcOH (3.4mL)及吡啶(5.5mL)之溶液並攪拌之，於室溫攪拌 12 小時後，濃縮該溶液且利用快速管柱層析法(矽膠體，乙酸乙酯)對該剩餘物進行純化，以得到固體產物(0.36g, 0.5 mmole)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 8.81 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.82-7.79 (m, 1H), 7.33 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 6.95 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 5.35-5.23 (m, 3H), 5.03 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 4.74 (d, J = 13.2 Hz, 1H), 4.41 (d, J = 12.8 Hz, 1H), 4.11-4.02 (m, 7H), 3.77-3.68 (m, 8H), 2.07 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.41 (s, 9H)。將上述得到的化合物(90mg, 0.126mmole)·4-硝基苯基氯甲酸酯 (100mg, 0.495mmole)、及吡啶(0.11mL, 1.423 mmole)加入二氯甲烷(9mL)之溶液中並攪拌之，於室溫下攪拌 2 小時後，濃縮該溶液且利用快速管柱層析法(矽膠體，35%乙酸乙酯溶於己烷)對剩餘物進行純化，以得到固體產物(70.8mg, 0.080 mmole)。將上述化合物 (70.8mg, 0.080 mmole)、MMAE (58mg, 0.08mmole)、DIPEA (0.125mL, 0.7175mmole)·HOBT (9.65mg, 0.0714mmole)、及吡啶(2.0mL)溶於二氯甲烷(6mL)溶液中並攪拌之，於室溫下攪拌 72 小時後，濃縮該溶液且利用快速管柱層析法(矽

膠體，4% MeOH 溶於 CH_2Cl_2)對剩餘物進行純化，得到固體產物(化合物 89)(75mg, 0.051 mmole)。以 HRMS (ESI-TOF, MNa+)計算 $\text{C}_{71}\text{H}_{109}\text{N}_7\text{O}_{25}\text{Na}$ ，計算值：1482.7365，實測值：1482.7334。

【0218】 製備化合物 90

【0219】 取化合物 89(75mg, 0.051 mmole)、 K_2CO_3 (42 mg, 0.304mmole)、及 H_2O (0.4mL)溶於甲醇(2 mL)之溶液並攪拌之，於室溫下攪拌 6 小時後，使用 AcOH 終止反應並濃縮，利用 C18 管柱純化剩餘物後以得到固體產物(44mg, 0.0333 mmole)。以 HRMS (ESI-TOF, MNa+)計算 $\text{C}_{64}\text{H}_{101}\text{N}_7\text{O}_{22}\text{Na}$ ，計算值：1342.6892，實際值：1342.6881。取上述得到的化合物(44mg, 0.0333 mmol)溶於 DCM (0.65 mL)之溶液，於 0°C 下緩慢加入 TFA (0.35 mL)，該反應混合物於室溫下攪拌 2 小時後濃縮。利用 C18 管柱純化該粗產物，得到油狀產物(化合物 90)(36 mg, 0.029 mmol)。以 HRMS (ESI-TOF, M-H)計算 $\text{C}_{59}\text{H}_{92}\text{N}_7\text{O}_{20}$ ，計算值：1218.6392，實際值：1218.6324。

【0220】 2.18 化合物 94(A18)之合成與特性



【0221】 製備化合物 92

【0222】 取氫化鈉(0.7g, 17.5mmole)及八烯醇 **91** (10g, 26.99mmole)之四氫呋喃(200mL)溶液，於 0 °C 下逐滴添加甲基溴乙酸酯(1.7mL, 16.67mmole)，該混合溶液於室溫下攪拌 16 小時。當 TLC 顯示起始原料被完全消耗時，利用 MeOH 終止反應，使用矽藻土片過濾，並以 MeOH 清洗。集中過濾物和清洗物，於減壓下濃縮，使用快速管柱層析(矽膠體，2% MeOH 溶於 CH₂Cl₂)純化該剩餘物，以得到油狀產物(2.7 g, 15.16 mmole); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 4.09 (d, J = 1.2 Hz, 2H), 3.67-3.53 (m, 34H)。取上述得到的化合物(2.7 g, 15.16 mmole)及三乙基胺(3mL, 21.58mmole)溶於二氯甲烷(30mL)之溶液，添加溶於 CH₂Cl₂ (20mL)之 P-甲苯磺醯氯(2.8g, 14.69mmole)，將該反應混合物於室溫下攪拌 16 小時。觀察到白色固體後，使用矽藻土片過濾，並以 CH₂Cl₂ 清洗。該濾液於真空濃縮後，使

用快速管柱層析(使用矽膠體，2% MeOH 溶於 CH₂Cl₂) 進行純化，得到油狀產物(2.16g, 3.62mmole)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 7.73 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.28 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 4.10 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 4.10 (s, 2H), 3.69-3.52 (m, 35H), 2.39 (s, 3H)。取上述化合物(2.16g, 3.62mmole)及 N-Boc-脛胺(1g, 7.51mmole)溶於四氫呋喃(40mL)之溶液，添加 DBU (1.45mL, 9.705mmole)且該反應混合液於室溫下攪拌 72 小時。當 TLC 顯示起始原料被完全消耗時，該溶液已被濃縮。使用快速管柱層析(使用矽膠體，12% MeOH 溶於 CH₂Cl₂) 純化該粗萃物以得到油狀產物(0.6g, 1.076mmole)。取上述化合物(0.6g, 1.076mmole)、H₂O (0.15mL)、及 LiOH (0.056g, 1.335 mmole)溶於四氫呋喃(3mL)之溶液並攪拌之。於室溫下攪拌 2 小時後，加入 1N HCl (10mL)終止反應，再利用乙酸乙酯和鹵水進行分離。收集有機層，使用乙酸乙酯(50mL × 4)萃取水相層。集中的有機層經濃縮後，剩餘物利用快速管柱層析法(矽膠體，20% MeOH 溶於 CH₂Cl₂)進行純化，得到油狀產物(化合物 92)(0.46g, 0.846 mmole)。以 HRMS (ESI-TOF, MNa⁺)計算 C₂₃H₄₅NO₁₃Na，計算值：566.2783，實測值：566.2768。

【0223】 製備化合物 93

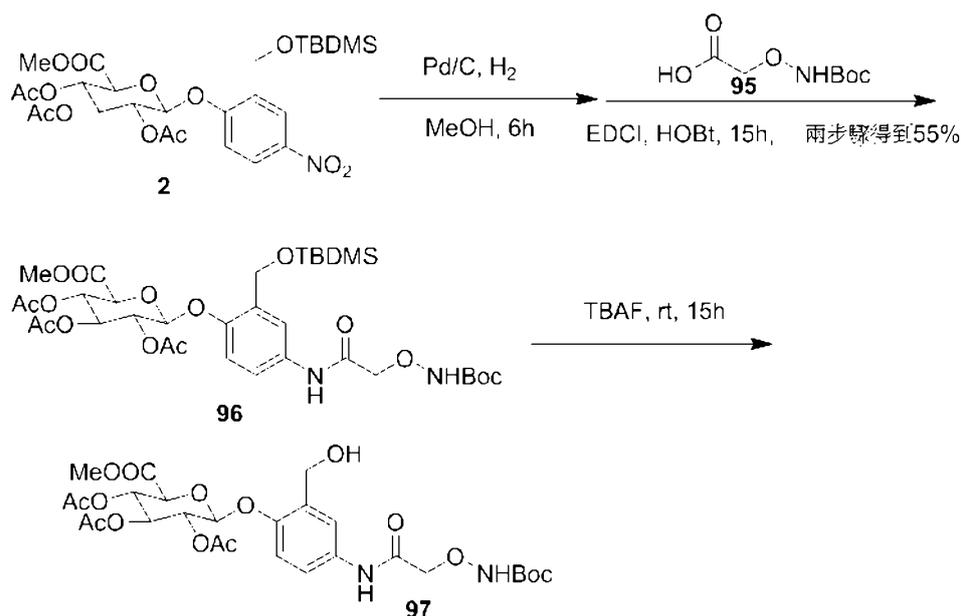
【0224】 取化合物 92(0.46g, 0.846 mmol)及化合物 I (0.683g, 1.2 mmol)溶於二氯甲烷(0.51 mL)之溶液，依序添加 EDCI (0.18g, 1.16mmole)及 HOBT (0.114g, 0.843 mmol)，且該混合液於室溫下攪拌 16 小時。該反應混合物於真空中濃縮後，利用快速管柱層析法(矽膠體，5% MeOH 溶於 CH₂Cl₂)對剩餘物進行純化，以得到油狀產物(0.51g, 0.465mmole)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 8.67 (s, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.55 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.48 (dd, J = 2.0, 8.8 Hz, 1H), 6.90 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 5.30-5.25 (m, 3H), 5.04 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 4.70 (d, J = 15.2 Hz, 1H), 4.59 (d, J = 15.2

Hz, 1H), 4.13-4.08 (m, 3H), 3.99-3.97 (m, 2H), 3.73-3.55 (m, 33H), 2.03 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.44 (s, 9H), 0.92 (s, 9H), 0.08 (s, 6H)。將上述得到的化合物(0.51g, 0.465mmole)、TBAF (0.49mL, 0.49mmole)、AcOH (3mL)、及吡啶 (5mL)之溶液於室溫下攪拌 12 小時後，濃縮該溶液且該剩餘物利用快速管柱層析法(矽膠體，5% MeOH 溶於 CH₂Cl₂)進行純化，得到固體產物(0.49g, 0.499 mmole); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 8.91 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.48 (dd, J = 2.4, 8.8 Hz, 1H), 7.42 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.95 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 5.32-5.23 (m, 3H), 5.05 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.69 (d, J = 13.2 Hz, 1H), 4.43 (d, J = 13.2 Hz, 1H), 4.10-4.07 (m, 3H), 3.98-3.96 (m, 2H), 3.72-3.56 (m, 33H), 3.44 (s, 1H), 2.07 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.43 (s, 9H)。將上述得到的化合物(122.5mg, 0.125mmole)、4-硝基苯基氯甲酸酯(100mg, 0.495mmole)及吡啶(0.11mL, 1.423 mmole)溶於二氯甲烷(24mL)之溶液於室溫下攪拌 2 小時。該溶液經濃縮後，利用快速管柱層析法(矽膠體，35% 乙酸乙酯溶於己烷)對剩餘物進行純化，得到固體產物(59mg, 0.051 mmole)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 8.90 (s, 1H), 8.26-8.23 (m, 2H), 7.74 (s, 1H), 7.66 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.60 (dd, J = 2.4, 9.2 Hz, 1H), 7.41-7.38 (m, 2H), 7.04 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 5.32-5.26 (m, 4H), 5.19-5.10 (m, 2H), 4.16 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 4.08 (s, 2H), 3.99-3.96 (m, 2H), 3.73-3.56 (m, 33H), 2.04 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.43 (s, 9H)。取上述得到的化合物(90mg, 0.0785 mmole)、MMAE (60mg, 0.084mmole)、DIPEA (0.14mL, 0.8037mmole)、HOBT (22mg, 0.163mmole)、及吡啶 (2.0mL)溶於二甲基甲醯胺 (6mL)之溶液並攪拌之。於室溫下攪拌 72 小時後，濃縮該溶液並利用快速管柱層析法(矽膠體，MeOH 溶於 CH₂Cl₂)純化該剩餘物，得到固體產物(化合物 93) (80mg, 0.046 mmole)。HRMS (ESI-TOF, M₂Na⁺) 用於計算 C₈₃H₁₃₃N₇O₃₁ Na，計算值：2884.9415，實測值：884.9360。

【0225】 製備化合物 94

【0226】 取化合物 93(80mg, 0.046 mmole)、 K_2CO_3 (38 mg, 0.276mmole)及 H_2O (0.5mL)溶於甲醇(2.5 mL)之溶液並攪拌之。於室溫下攪拌 6 小時後，利用 AcOH 終止反應並濃縮，利用 C18 管柱純化剩餘物，以得到固體產物(15mg, 0.0095 mmole)；以 HRMS (ESI-TOF, $M2Na^+$)計算 $C76H125N7O28Na$ ，計算值：2814.9178，實測值：814.9132。於上述得到的化合物(15mg, 0.0095 mmole)溶於 DCM (0.65 mL)之溶液中，於 $0^\circ C$ 下緩慢添加 TFA (0.35 mL)，該反應混合物於室溫下攪拌 2 小時後，經濃縮後利用 C18 管柱純化粗萃物，以得到油狀產物 94(12 mg, 0.0081 mmol)。HRMS (ESI-TOF, $M2Na^+$)用於計算 $C71H117N7O26Na$ ，計算值：2764.8916，實測值：764.9085。

【0227】 2.19 化合物 99(A19)之合成及特性



【0228】 製備化合物 96

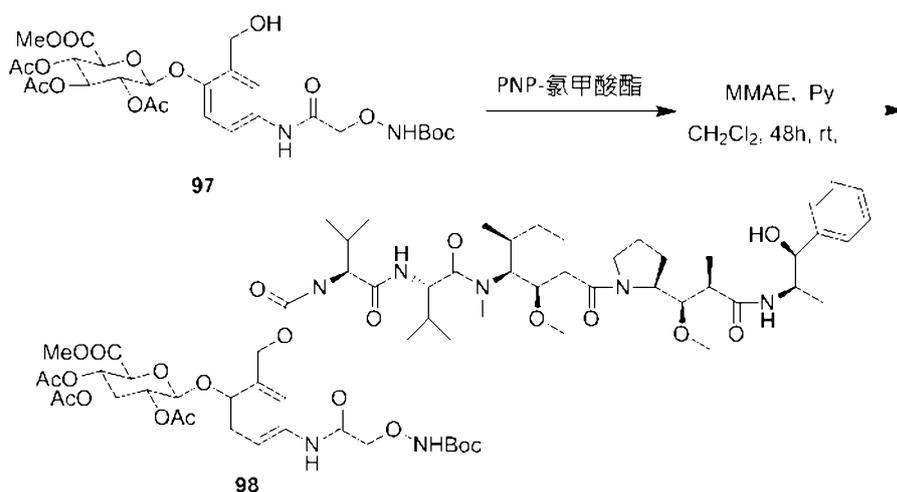
【0229】 取化合物 2 (500.0 mg, 0.83 mmol)溶於 35 ml 之 EtOAc/MeOH (6:1) 之溶液，並於該溶液中添加 Pd/C。對該作業空間抽真空後以 H_2 填充三次，利用

球型瓶使該作業空間保持在 H_2 環境下，然後將該反應液於室溫下攪拌 1 小時。待反應完成後，過濾移除 Pd/C。蒸餾該濾出物以得到用於下一步驟的化合物。取上一步驟得到的化合物及化合物 95 (143 mg, 0.746 mmol) 溶於 CH_2Cl_2 之溶液，添加 EDCI (173.0 mg, 1.12 mmol)，於室溫下攪拌 15 小時。該溶液經蒸餾後，利用管柱純化粗產物，以得到黃色油狀化合物 96 (350.0 mg, 0.47 mmol)。 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 10.19 (s, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.71 (dd, $J = 2.0, 8.4$ Hz, 1H), 7.62 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 6.90 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 5.30-5.20 (m, 3H), 5.04 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.69 (d, $J = 14.8$ Hz, 1H), 4.58 (d, $J = 14.8$ Hz, 1H), 4.37 (s, 2H), 4.12 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 3.68 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.43 (s, 9H), 0.9 (s, 9H), 0.07 (s, 6H)。

【0230】 製備化合物 97

【0231】 取化合物 96 (350.0 mg, 0.471 mmol) 溶於 15 mL 之 THF 之溶液，添加 0.50 mL 之 TBAF，於室溫下攪拌 14 小時。該溶液經蒸餾後，利用管柱純化該粗產物，得到黃色油狀化合物 97 (280.0 mg, 0.45 mmol)。ESI-TOF m/z : 627.2003 (M)。

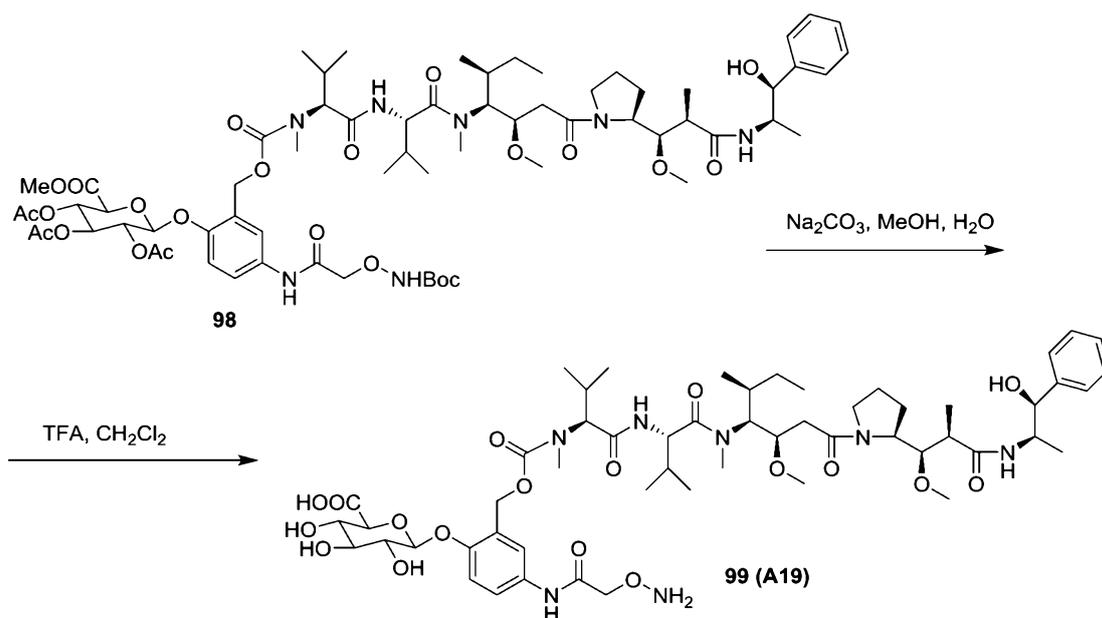
【0232】



【0233】 製備化合物(98)

【0234】 取化合物 97 (275.0 mg, 0.27 mmol) 溶於 8 mL 之 CH_2Cl_2 中，冷卻至 0°C ，添加吡啶(0.50 mL)及 PNP 氯甲酸酯(176.0 mg, 0.87 mmol)，且使該混合液於室溫下攪拌 3 小時。該溶液經蒸餾後，利用管柱純化粗產物，以得到用於下一步驟之化合物(120.0 mg, 0.15 mmol)。將上一步驟得到的化合物(120.0 mg, 0.15 mmol) 及 MMAE (120.0 mg, 0.16 mmol) 溶於 5 mL 之 THF 溶液中，添加 TEA (0.5 mL) 加以處理，將該反應混合物於室溫下攪拌 48 小時後，待反應完成再添加 50 mL 之 EA 及 30 mL 之 0.5 N HCl。利用 MgSO_4 將該有機層乾燥後濃縮，利用管柱純化該粗產物得到黃色油狀之化合物 98(85.0 mg, 0.062 mmol)。ESI-TOF m/z : 1587.8759 $[\text{M}^- \text{H}]^-$ 。

【0235】

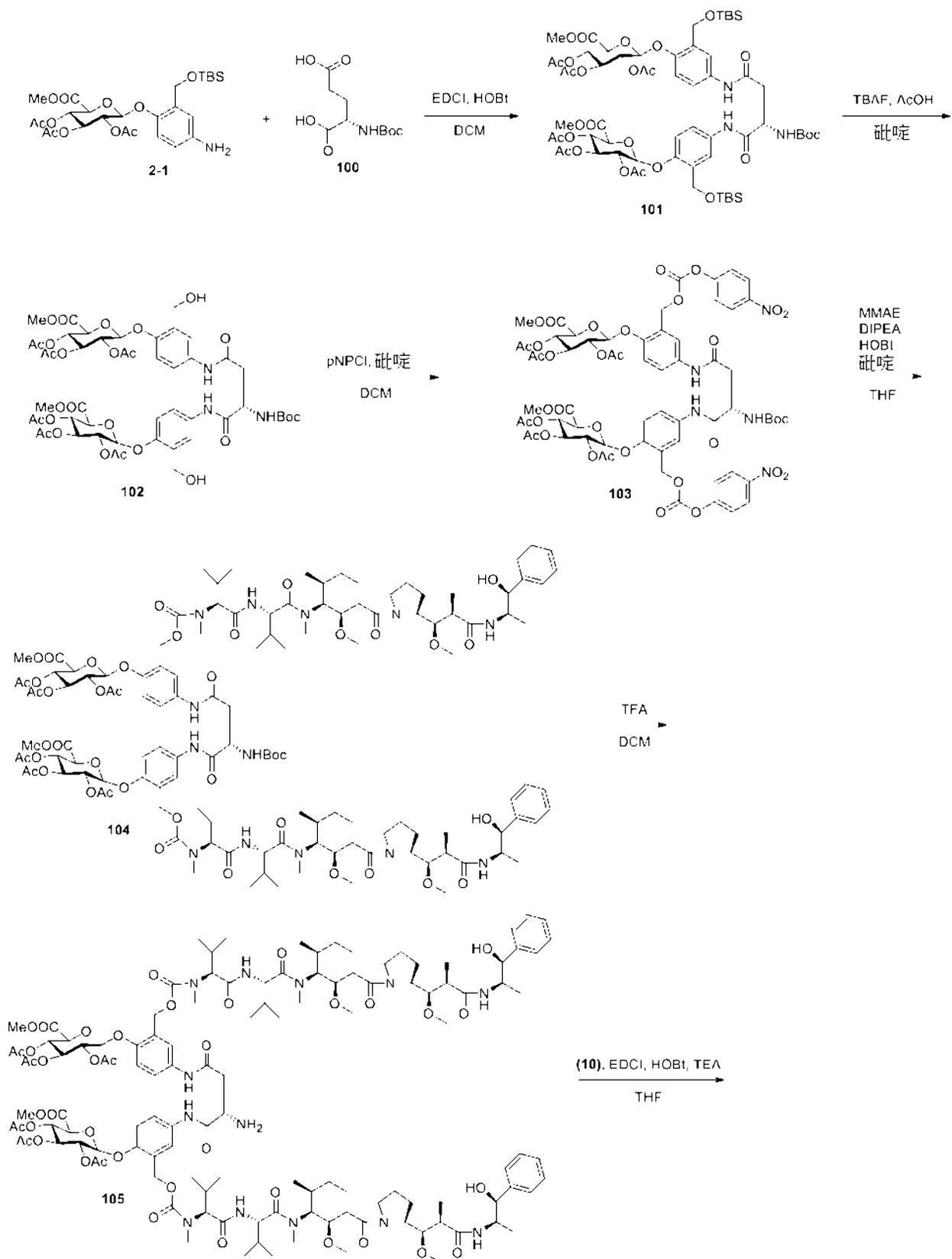


【0236】 製備化合物 99

【0237】 取化合物 98(20.0 mg, 0.015 mmol) 溶於 2.5 mL 之甲醇與水之混合溶液(MeOH : H_2O =4:1)中，於 0°C 下加入 Na_2CO_3 處理，並於於室溫下對該反應

混合物攪拌 3 小時。待反應完成後，在減壓下移除有機層，利用 C18 管柱純化該剩餘物，得到用於下一步驟的化合物。將上一步驟得到的化合物溶於 1.6 ml 之 CH_2Cl_2 溶液，添加 0.40 ml 之 TFA 然後於室溫下攪拌 1 小時。該溶液經濃縮後，利用 C18 管柱純化剩餘物，得到化合物 99 (10.3 mg, 0.0085 mmol)。ESI-TOF m/z: 1130.5896[M-H]⁻。

【0238】 2.20 化合物 108(A20)之合成與特性



【0240】 取 2,3,4-三-Ac-6-甲基-葡萄糖醛酸酯-2'-OTBS-PAB-胺 (2,3,4-tri-Ac-6-methyl-Glucuronate-2'-OTBS-PAB-amine, 化合物 2-1) (1.9 g, 3.34 mmol) 和麩胺酸(化合物 100) (412 mg, 1.67 mmol) 溶於 CH_2Cl_2 (25 mL) 中, 再添加 EDCI (1 g, 5.22 mmol)、HOBt (13 mg, 0.083 mmol)。8 小時後, 移除溶劑然後該反應混合物利用二氧化矽膠層析法依序以 5% EA/己烷及 20% EA/己烷洗脫純化, 以得到 1.07 g (48%) 之雙-(2,3,4-三-Ac-6-甲基-葡萄糖醛酸酯-2'-OTBS-PAB)-麩胺酸-N-Boc (Di-(2,3,4-tri-Ac-6-methyl-Glucuronate-2'-OTBS-PAB)-glutamic-N-Boc, 化合物 101)。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.72 (bs, 1H), 8.19 (bs, 1H), 7.62 (dd, $J = 1.84\text{Hz}, 8.72\text{Hz}, 1\text{H}$), 7.53 (dd, $J = 2.6\text{Hz}, 8.72\text{Hz}, 1\text{H}$), 7.42 (dd, $J = 2.16\text{Hz}, 10.64\text{Hz}, 2\text{H}$), 6.9 (dd, $J = 5.32\text{Hz}, 8.8\text{Hz}, 2\text{H}$), 5.28 (m, 7H), 5.03 (d, $J = 6.84\text{Hz}, 2\text{H}$), 4.69 (dd, $J = 2.4\text{Hz}, 15.16\text{Hz}, 2\text{H}$), 4.58 (d, $J = 14.96\text{Hz}, 2\text{H}$), 4.28 (bs, 1H), 4.12 (q, $J = 4.2\text{Hz}, 2\text{H}$), 3.71 (s, 3H), 3.7 (s, 3H), 2.62-2.45 (m, 2H), 2.32-2.18 (m, 1H), 2.08-2.0 (m, 18H), 1.75 (s, 3H), 1.43 (s, 9H), 0.92 (s, 9H), 0.91 (s, 9H), 0.09 (s, 6H), 0.08 (s, 6H)。

【0241】 製備化合物 102

【0242】 將雙-(2,3,4-三-Ac-6-甲基-葡萄糖醛酸酯-2'-OTBS-PAB)-麩胺酸-N-Boc (化合物 101) (1.07 g, 0.792 mmol) 溶於吡啶 (9.0 mL) 和醋酸 (6.0 mL) 之混合物中, 再添加 TBAF (1.0 mL, 1 M in THF)。12 小時後, 移除溶劑然後該反應混合物利用二氧化矽膠層析法依序以 CH_2Cl_2 (100%) 及 8.3% MeOH/ CH_2Cl_2 洗脫純化, 以得到 658 mg (75%) 之雙-(2,3,4-三-Ac-6-甲基-葡萄糖醛酸酯-2'-OH-PAB)-麩胺酸-N-Boc (Di-(2,3,4-tri-Ac-6-methyl-Glucuronate-2'-OH-PAB)-glutamic-N-Boc, 化合物 102)。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.5-7.33 (m, 4H), 6.87 (dd, $J = 5.68\text{Hz}, 8.8\text{Hz}, 2\text{H}$), 5.91 (d, $J = 7.64\text{Hz}, 1\text{H}$), 5.35 (dd, $J = 1.32\text{Hz}, 9.44\text{Hz}, 2\text{H}$), 5.3-5.18 (m, 4H), 5.04 (d, $J = 7.64\text{Hz}, 2\text{H}$), 4.6 (d, $J = 13.2\text{Hz}, 2\text{H}$), 4.35 (d, $J = 13.32\text{Hz}, 2\text{H}$), 4.16 (dd, J

= 3.64Hz, 9.76z, 2H), 3.66 (, J = 1.72Hz,6H), 3.43 (s, 4H), 2.98-2.92 (m, 1H), 2.38 (bs, 2H), 2.054 (s, 3H), 2.051 (s, 3H), 2.01 (s, 12H), 1.37 (s, 9H), 1.36 (s, 9H)。

【0243】 製備化合物 103

【0244】 將雙-(2,3,4-三-Ac-6-甲基-葡萄糖醛酸酯-2'-OH-PAB)-麩胺酸-N-Boc (化合物 102)(160 mg, 0.143 mmol)懸浮於無水 CH₂Cl₂ (2.5 mL)，再添加吡啶(200 μL, 2.86 mmol)和 4-硝基苯基氯化物(230 mg, 1.14 mmol)。2 小時後移除溶劑，利用矽膠柱層析法依序以 CH₂Cl₂ (100%)、接著 4% MeOH/CH₂Cl₂ 洗脫以純化，藉此得到 131.4 mg (63%) 之雙-(2,3,4-三-Ac-6-甲基-葡萄糖醛酸酯-2'-OpNP-PAB)-麩胺酸-N-Boc (Di-(2,3,4-tri-Ac-6-methyl-Glucuronate-2'-OpNP-PAB)-glutamic-N-Boc，化合物 103)。

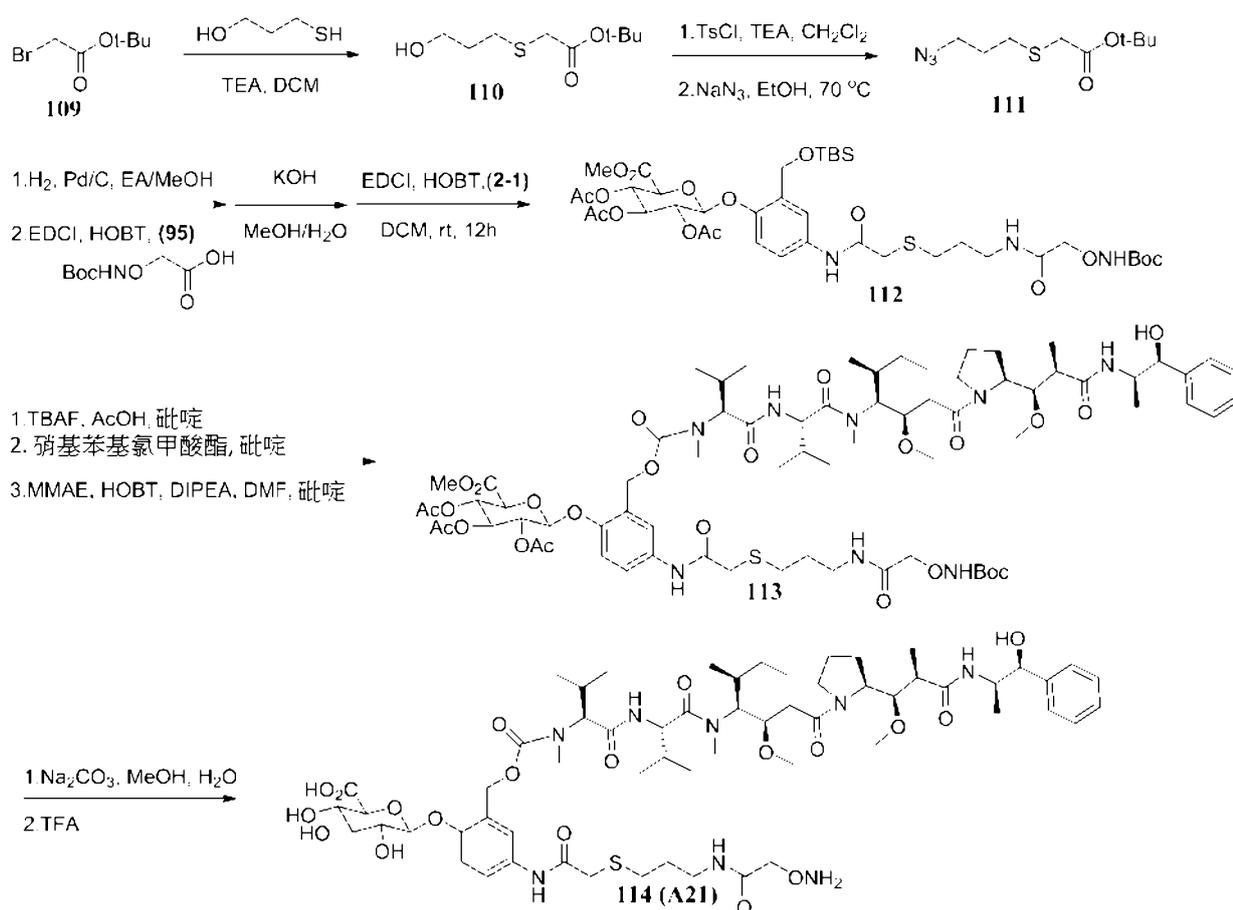
然後，取 MMAE (162 mg, 0.225 mmol)溶於 THF (4.0 mL)及吡啶 (1.0 mL)之混合液中，再添加 DIPEA (280 μL)、HOBt (6.0 mg, 0.042 mmol)、及雙-(2,3,4-三-Ac-6-甲基-葡萄糖醛酸酯-2'-OpNP-PAB)-麩胺酸-N-Boc (化合物 103) (131 mg, 0.09 mmol)。48 小時後移除溶劑，利用矽膠柱層析法依序以 CH₂Cl₂ (100%)及 9% MeOH/CH₂Cl₂ 洗脫並純化該反應混合物，藉此以得到 119.3 mg (51.6%) 之雙-(2,3,4-三-Ac-6-甲基-葡萄糖醛酸酯-2'-MMAE-PAB)-麩胺酸-N-Boc (Di-(2,3,4-tri-Ac-6-methyl-Glucuronate-2'-MMAE-PAB)-glutamic-N-Boc，化合物 104)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ9.5-8.8 (m, 2H), 8.2-6.3 (m, 22H), 5.4-5.28 (m, 8H), 5.16-4.49 (m, 12H), 4.48-3.88 (m, 15H), 3.7 (d, J = 2.87Hz, 2H), 3.74-3.6 (m, 8H), 3.45 (s, 2H), 3.4-3.15 (m, 17H), 3.09 (s, 1H), 3.02-2.88 (m, 6H), 2.88-2.74 (m, 6H), 2.73-2.52 (m, 4H), 2.5-2.24 (m, 8H), 2.24-1.85 (m, 38H), 1.84-1.45 (m, 8H), 1.45-1.23 (m, 12H), 1.2-1.05 (m, 10H), 1.03-0.4 (m, 60H)。

【0245】 製備化合物 106

【0246】 將雙-(2,3,4-三-Ac-6-甲基-葡萄糖醛酸酯-2'-MMAE-PAB)-麩胺酸-N-Boc (化合物 104)(119 mg, 0.046 mmol)懸浮於無水 CH_2Cl_2 (2.8 mL)中，再添加 TFA (0.7 mL)。該反應液於 0 °C 下攪拌 10 分鐘，回溫至室溫後再攪拌 30 分鐘。該反應混合物蒸餾至乾燥(與甲苯共沸 3 次)後，無須額外純化便可得到雙-(2,3,4-三-Ac-6-甲基-葡萄糖醛酸酯-2'-MMAE-PAB)-麩胺酸-胺 (化合物 105)。將得到的化合物 105 和 PEG4-羥胺-N-Boc 酸 (化合物 52) (4.7 mg, 0.02 mmol)懸浮於無水 THF (1.5 mL)中，再添加 TEA (27.8 μL , 0.2 mmol)、HOBt (0.14 mg, 0.001 mmol) 及 EDCI (6 mg, 0.03 mmol)。12 小時後，移除溶劑並用矽膠柱層析法依序以 CH_2Cl_2 (100%)及 15% MeOH/ CH_2Cl_2 洗脫以純化，藉此得到 50 mg (87%) of 雙-(2,3,4-三-Ac-6-甲基-葡萄糖醛酸酯-2'-MMAE-PAB)-麩胺酸-PEG4-羥胺-N-Boc (Di-(2,3,4-tri-Ac-6-methyl-Glucuronate-2'-MMAE-PAB)-glutamic-PEG4-hydroxylamine-N-Boc, 化合物 106)。將上述化合物溶於 MeOH (2.7 mL)中，然後添加 Na_2CO_3 (24.2 mg, 0.23 mmol)。2 小時後，將 H_2O (170 μL)添加至該反應混合物中，該反應液繼續攪拌 2.5 小時。利用 IR-120 中和反應液，使用矽藻土片過濾，蒸餾該粗萃物，並以 C18 管柱依序透過 100% H_2O 及 30% 乙腈/ H_2O 進行洗脫以純化該粗萃物，以得到 27.9 mg (62%)之雙-(葡萄糖醛酸酯-2'-MMAE-PAB)-麩胺酸-PEG4-羥胺-N-Boc (Di-(Glucuronate-2'-MMAE-PAB)-glutamic-PEG4-hydroxylamine-N-Boc, 化合物 107)。然後，取 15 mg 之化合物 107 懸浮於無水 CH_2Cl_2 (0.8 mL)，添加 TFA (0.2 mL)，將該反應液於 0°C 下攪拌 10 分鐘。然後加熱至室溫後再攪拌 30 分鐘。該反應混合物蒸餾至乾燥後，通過 C18 管柱依序以 100% H_2O 及 25%乙腈/ H_2O 洗脫純化該反應混合物，以得到 10 mg (69.5%)

之雙-(葡萄糖醛酸酯-2'-MMAE-PAB)-麩胺酸-PEG4-羥胺
(Di-(Glucuranate-2'-MMAE-PAB)-glutamic-PEG4-hydroxylamie, 化合物 108)。¹H
NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.7-7.0 (m, 26H), 5.35-5.1 (m, 6H), 4.7-4.45 (m, 8H),
4.22-4.17 (m, 8H), 4.05-3.9 (m, 4H), 3.88-3.75 (m, 4H), 3.7-3.4 (m, 26H), 3.38-3.15 (m,
19H), 3.15-2.85 (m, 18H), 2.6-2.3 (m, 10H), 2.28-1.2 (m, 37H), 1.15-1.0 (m, 18H),
1.0-0.5 (m, 60H)。

【0247】 2.21 化合物 114(A21)之合成與特性



【0248】 製備化合物 110

【0249】 取化合物 109 (2.0g, 10.31 mmol)及三乙基胺(1.56g, 15.46 mmol)

溶於二氯甲烷(50 mL)溶液，並添加 3-巯基丙醇(1.04g, 11.34mmole)，於室溫下攪
拌 12 小時。當 TLC 顯示起始原料被完全消耗時，即表示該溶液已被濃縮。剩餘

物分別利用 CH_2Cl_2 、1N HCl、飽和 $\text{NaHCO}_3(\text{aq})$ 及鹵水萃取，將有機層集中後於真空中濃縮，利用快速管柱層析法純化剩餘物以得到油狀產物(化合物 110)(1.0g, 4.8mmole)。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 3.76 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.15 (s, 2H), 2.77 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.87 (m, 2H), 1.47 (s, 9H)。

【0250】 製備化合物 111

【0251】 取化合物 110(1.0g, 4.8mmole)、三乙基胺(1mL, 9.7mmole)、及 P-對甲苯磺醯氯(1.39g, 7.275mmole)溶於二氯甲烷(50mL)之溶液。於室溫下攪拌 16 小時後，濃縮該溶液以得到油狀產物。將疊氮化鈉(0.25g, 3.83mmole)及上述得到的化合物(0.5g, 1.28mmole)溶於乙醇之溶液，於 80°C 下攪拌 16 小時。濃縮該溶液且利用 EA 和鹵水萃取剩餘物，於真空中濃縮該有機層後得到化合物 111(0.27g, 1.17mmole)。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 3.42 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.12 (s, 2H), 2.72 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.89 (m, 2H), 1.47 (s, 9H)。

【0252】 製備化合物 112

【0253】 取化合物 111 (1.38g, 2.49mmole)、乙酸乙酯(5mL)、及 Pd/C (0.5g) 容於甲醇之溶液，於 H_2 環境下攪拌之。待攪拌 12 小時隔夜後，使用矽藻土片過濾出 Pd/C，並以甲醇清洗。該溶液於真空中濃縮後，得到油狀產物。取上述化合物和化合物 95 (0.24g, 1.17 mmol) 溶於二氯甲烷之溶液(15 mL)，依序添加 EDCI (0.236g, 1.521mmole) 和 HOBT (0.206g, 1.521 mmol)，將該混合物於室溫下攪拌 12 小時。該反應混合物於真空中濃縮後，利用快速管柱層析法純化剩餘物，得到油狀產物(0.42g, 1.11mmole)。將上一步驟得到的化合物(0.42g, 1.11mmole)、 H_2O (1mL)、及 KOH (0.28g, 4.98 mmole) 溶於甲醇(9mL)溶液中。於室溫下攪拌 16 小

時後，該溶液加入 1N HCl 終止反應，並依序以 CH_2Cl_2 、1N HCl、及滷水萃取。及中溶液後濃縮得到用於下一步驟的油狀產物(0.357g, 1.11mmole)。將上一步驟得到的化合物(0.357g, 1.11mmole)及化合物 2-1(0.666g, 1.17 mmol)溶於二氯甲烷(20 mL)中，再依序加入 EDCI (0.223g, 1.44 mmole)和 HOBT (0.195g, 1.44 mmol)，於室溫下攪拌 16 小時。該反應混合物於真空中濃縮後，利用快速管柱層析法對剩餘物進行純化，得到油狀產物 **112**(0.39g, 0.447mmole)。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.71 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.53-7.49 (m, 2H), 6.92 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 5.35-5.23 (m, 3H), 5.06 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 4.72 (d, J = 15.2 Hz, 1H), 4.60 (d, J = 15.2 Hz, 1H), 4.23 (s, 2H), 4.15 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 3.71(s, 3H), 3.40 (m, 2H), 3.33 (s, 2H), 2.64 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.07 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.86 (m, 2H), 1.42 (s, 9H), 0.92 (s, 9H), 0.09 (s, 6H)。

【0254】 製備化合物 113

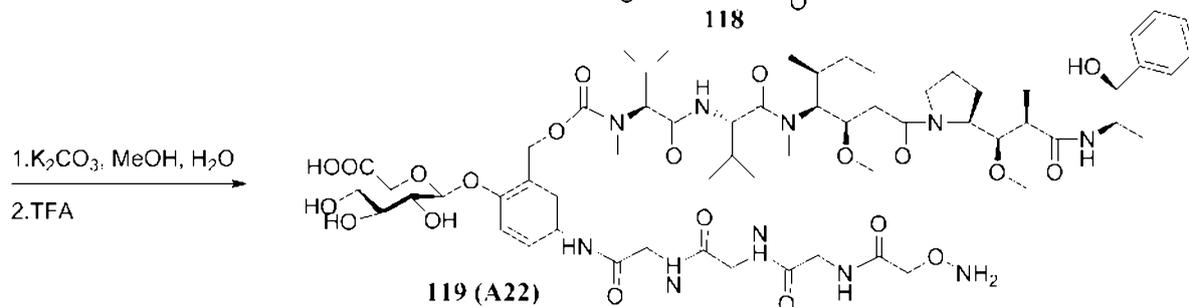
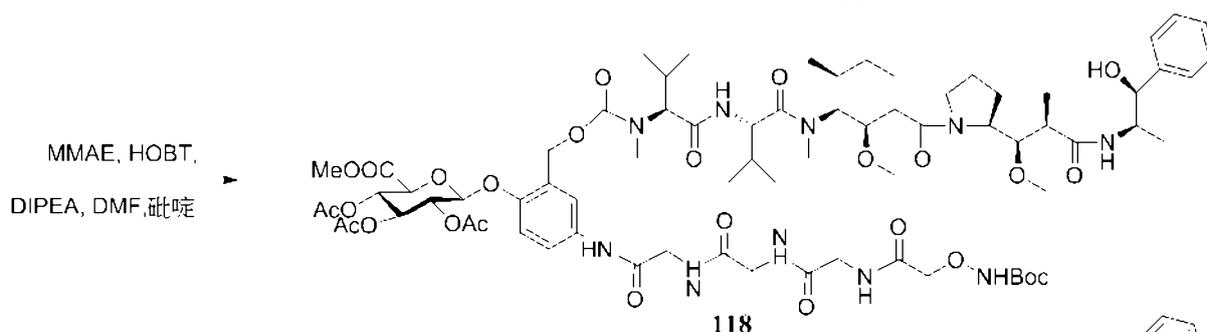
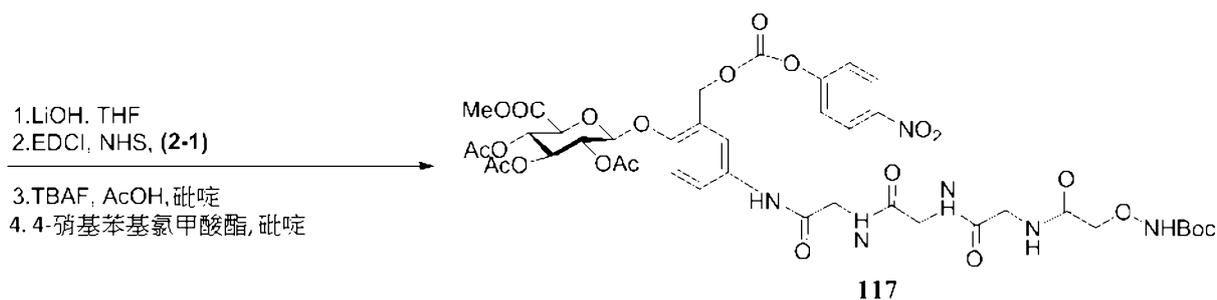
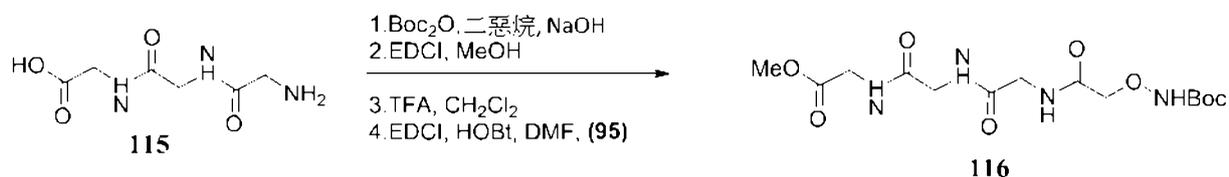
【0255】 取化合物 112(0.39g, 0.447mmole)、TBAF (0.5mL, 0.5mmole)、AcOH (3mL)、及吡啶(4.5mL)之溶液並攪拌之，於室溫下攪拌 12 小時後，濃縮該溶液且利用快速管柱層析法對剩餘物進行純化，以得到固體產物(0.29g, 0.382 mmole)。將上述化合物(0.29g, 0.382 mmole)、4-硝基苯基氯甲酸酯 (231mg, 1.146 mmole)、及吡啶 (0.155 mL, 1.91 mmole)加入二氯甲烷(20mL)溶液中，於室溫下攪拌 12 小時，濃縮該溶液且利用快速管柱層析法純化該剩餘物，以得到固體產物(110 mg, 0.12 mmole)。將上述得到的化合物(110mg, 0.12 mmole)、MMAE (94mg, 0.131mmole)、DIPEA (0.104mL, 0.595mmole)、HOBT (18mg, 0.131mmole)、及吡啶(94mg, 1.19mmole)溶於二甲基甲醯胺(10mL)溶液中。於室溫下攪拌 72 小時後，濃縮該溶液且利用快速管柱層析法對剩餘物進行純化，得到固體產物(化合物 113)

(52mg, 0.035 mmole)。以 HRMS (ESI-TOF, MNa⁺)計算 C₇₂H₁₁₀N₈O₂₄SNa，計算值：1525.7246，實測值：1525.71891。

【0256】 製備化合物(114)

【0257】 取化合物 113 (20.0 mg, 0.0133 mmol)溶於甲醇與水混合溶液 (MeOH : H₂O =4:1)中，於 0°C 加入 Na₂CO₃(4.2 mg, 0.0399 mmol)處理，將該反應混和物於室溫下攪拌 3 小時。待反應完成後，於減壓下移除有機溶液，並利用 C18 管柱對剩餘物進行純化以得到用於下一步驟的化合物。將上一步驟的化合物溶於 4 ml 之 CH₂Cl₂，添加 1.0 ml 之 TFA 並於室溫下攪拌 1 小時。該溶液經濃縮後，利用 C18 管柱純化該剩餘物，以得到化合物 **114** (7.3 mg, 0.0057 mmol)。ESI-TOF m/z: 1301.6356[M-H]⁻。

【0258】 2.22 化合物 119(A22)之合成與特性



【0259】 製備化合物(116)

【0260】 取三-甘胺酸 **115**(10 g, 52.86 mmol)加入含二惡烷(120 mL)、水(60 mL)及 1 M NaOH (60 mL)之混合液中，並於冰水浴中攪拌之，再添加雙-叔丁基焦碳酸酯(17.3 g, 79.29 mmol)，持續於室溫下攪拌 6 小時。該溶液於真空中濃縮至約 10 至 15 mL，以冰水浴冷卻後，覆蓋一層乙酸乙酯(約 50 mL)，並加入稀釋的 HCl 溶液進行酸化調整至 pH 值約 2 至 3。使用乙酸乙酯重複萃取該水相層，倒出乙酸乙酯萃取液，以水清洗後利用無水 Na_2SO_4 乾燥，再於真空中蒸餾之，得到光滑固體之純物質(12.5 g, 43.20 mmol)。將上述得到的化合物(12.5g,

43.20mmole)及 EDCI (8.04g, 51.79mmole)溶於甲醇(24mL)之溶液，於室溫下攪拌 16 小時，濃縮該溶液，利用快速管柱層析法(矽膠體，8% 之 MeOH 溶於 CH₂Cl₂)對該剩餘物進行純化，以得到固體產物(10.45g, 34.44 mmole)。取上述得到的化合物(10.45g, 34.44 mmole)溶於 DCM (65 mL)之溶液，於 0℃ 下緩慢添加 TFA (35 mL)。將該反應混合物於室溫下攪拌 2 小時，濃縮後得到油狀產物(5.88g, 28.92 mmol)。¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 4.04-3.59 (m, 4H), 3.38-3.83 (m, 2H), 3.71 (s, 3H)。將上述化合物(1.5g, 7.381 mmol)及化合物 95 (1.62g, 8.473 mmol)溶於二甲基甲醯胺(25 mL)之溶液，依序添加 EDCI (1.3g, 8.37mmole)及 HOBt (1g, 7.40 mmol)，該混合物於室溫下攪拌 48 小時，且該反應混合物於真空中濃縮後，剩餘物利用快速管柱層析法(矽膠體，6% MeOH 溶於 CH₂Cl₂)進行純化，得到油狀產物 116(1.5g, 3.99mmole)。¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 4.34 (s, 2H), 3.98-3.93 (m, 6H), 3.72 (s, 3H), 1.47 (s, 9H);以 HRMS (ESI-TOF, MNa+)計算 C₁₄H₂₄N₄O₈Na，計算值：399.1486，實測值：399.1488。

【0261】 製備化合物 117

【0262】 取化合物 116 (0.28g, 0.739mmole)、H₂O (0.5mL)、及 LiOH (0.037g, 0.881 mmole)溶於甲醇之溶液，於室溫下攪拌 2 小時。該溶液經濃縮後，利用快速管柱層析法(矽膠體，50% MeOH 溶於 CH₂Cl₂)對剩餘物進行純化，得到油狀產物(0.24g, 0.662 mmole)。將上述得到的化合物(0.46g, 0.846 mmol)及化合物 2-1 (0.51g, 0.895 mmol)溶於二甲基甲醯胺(20 mL)之溶液，再依序添加 EDCI (0.18g, 1.16mmole)及 HOBt (0.114g, 0.843 mmol)，將該混合物於室溫下攪拌 48 小時。該反應混合物於真空中濃縮後，利用快速管柱層析法(矽膠體，5% MeOH 溶於

CH₂Cl₂)對剩餘物進行純化，得到油狀產物(0.42g, 0.460mmole)。¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.72 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.74 (dd, J = 2.4, 9.2 Hz, 1H), 7.02 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 5.45 (t, J = 9.6 Hz, 1H), 5.36 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 5.22-5.17 (m, 2H), 4.68 (q, J = 24.8 Hz, 2H), 4.47 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 4.32 (s, 2H), 4.01 (s, 2H), 4.00 (s, 2H), 3.94 (s, 2H), 3.71 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.46 (s, 9H), 0.96 (s, 9H), 0.12 (s, 6H)。取上述所得化合物(0.42g, 0.460mmole) TBAF (0.48mL, 0.48mmole)、AcOH (3mL)、及吡啶(5mL)之溶液並攪拌之，於室溫下攪拌 12 小時後，濃縮該溶液，並利用快速管柱層析法(矽膠體，9% MeOH 溶於 CH₂Cl₂)對剩餘物進行純化，得到固體產物(0.35g, 0.438 mmole)。取上述化合物(117mg, 0.146mmole)、4-硝基苯基氯甲酸酯 (100mg, 0.495mmole)、及吡啶(0.11mL, 1.423 mmole)溶於二氯甲烷 (24mL)之溶液，於室溫下攪拌 2 小時後，濃縮該溶液，利用快速管柱層析法(矽膠體，6% MeOH 溶於 CH₂Cl₂)對剩餘物進行純化，以得到固體產物 117(100mg, 0.107 mmole)。¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.32-8.29 (m, 2H), 7.76 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.61 (dd, J = 2.4, 8.8 Hz, 1H), 7.52-7.50 (m, 2H), 7.16 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 5.49-5.43 (m, 2H), 5.41-5.19 (m, 4H), 4.51 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 4.31 (s, 2H), 4.01 (s, 2H), 4.00 (s, 2H), 3.93 (s, 2H), 3.72 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.45 (s, 9H)。

【0263】 製備化合物 118

【0264】 取化合物 116(100mg, 0.107 mmole)、MMAE (69mg, 0.096mmole)、DIPEA (0.173mL, 0.995mmole)、HOBT (12mg, 0.092mmole)、及吡啶(2.5mL)溶於二甲基甲醯胺(7mL)之溶液，於室溫下攪拌 72 小時，濃縮該溶液，並利用快速管柱層析法(矽膠體，7% MeOH 溶於 CH₂Cl₂)對該剩餘物進行純化，以得到固體產

物 118 (79mg, 0.051 mmole)。以 HRMS (ESI-TOF, MNa⁺) 計算 C₇₃H₁₁₀N₁₀O₂₆Na, 計算值：1565.7485，實測值：1565.7471。

【0265】 製備化合物 119

【0266】 取化合物 118(79mg, 0.051 mmole)、K₂CO₃ (38 mg, 0.276mmole)、及 H₂O (0.5mL) 溶於甲醇(2.5 mL)之溶液，於室溫下攪拌 6 小時後，以 AcOH 終止反應後濃縮之，利用 C18 管柱純化剩餘物後以得到固體產物(70 mg, 0.0499 mmole)。以 HRMS (ESI-TOF, MNa⁺) 計算 C₆₆H₁₀₂N₁₀O₂₃Na, 計算值：1425.7012, 實測值：1425.7016。將上述得到的化合物(70 mg, 0.0499 mmole) 溶於 DCM (0.65 mL) 溶液中，於 0°C 下緩慢加入 TFA (0.35 mL)，將該反應混合物於室溫下攪拌 2 小時後濃縮。利用 C18 管柱純化該粗產物，以得到油狀產物 119(48 mg, 0.0368 mmol)。以 HRMS (ESI-TOF, MNa⁺) 計算 C₆₁H₉₄N₁₀O₂₁Na, 計算值：1325.6487, 實測值：1325.6540。

【0267】 2.23 化合物 125(A23)之合成與特性

(1.66mL, 20.8mmole)溶於二氯甲烷(30mL)之溶液，添加甲磺醯氯化物(1.03g, 9.0mmole)並於室溫下攪拌 16 小時。當 TLC 顯示起始原料被完全消耗時，該溶液已被濃縮。使用快速管柱層析(使用矽膠體，35%溶於己烷的乙酸乙酯溶液)對該剩餘物進行純化，得到油狀產物(化合物 121) (1.72g, 4.88mmole)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.07 (s, 1H), 4.02 (s, 2H), 3.38 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 3.29 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 3.01 (s, 3 H), 1.47 (s, 9H)。

【0270】 取化合物 121 (1.72g, 4.88mmole)、H₂O (10mL)、及 KOH (2.19g, 39.04 mmole)溶於甲醇(10mL)之溶液，於室溫下攪拌 16 小時。使用 IR-120 終止反應後過濾之，利用甲醇沖洗 IR-120 且合併溶液後濃縮以得到油狀產物。將上述得到的化合物和化合物 I (2.91g, 5.12 mmol)溶於二氯甲烷(30 mL)中，再依序添加 EDCI (1.0g, 6.441mmole)及 HOBT (1.0g, 7.40 mmol)，將該混合物於室溫下攪拌 16 小時後，於真空下濃縮，且利用快速管柱層析法純化剩餘物，以得到油狀產物(化合物 122)(1.2g, 1.416mmole)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.50 (s, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.37 (dd, J = 2.4, 8.8 Hz, 1H), 6.88 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 5.37-5.20 (m, 4H), 5.04 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 4.66 (d, J = 15.2 Hz, 1H), 4.55 (d, J = 15.2 Hz, 1H), 4.14 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 4.08 (s, 2H), 3.67 (s, 3H), 3.37 (m, 2H), 3.23 (m, 2H), 3.00 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.36 (s, 9H), 0.87 (s, 9H), 0.07 (s, 6H)。

【0271】 製備化合物 123

【0272】 取化合物 122(1.2g, 1.416mmole)、TBAF (1.5mL, 1.5mmole)、AcOH (9mL)、及吡啶(13.5mL)之溶液，於室溫下攪拌 12 小時，該溶液經濃縮後，利用快速管柱層析法對剩餘物進行純化，得到固體產物(0.98g, 1.33 mmole)。然後，於 0 °C 下 TFA (0.35 mL)緩慢添加至含上述化合物(0.98g, 1.33 mmole)溶於

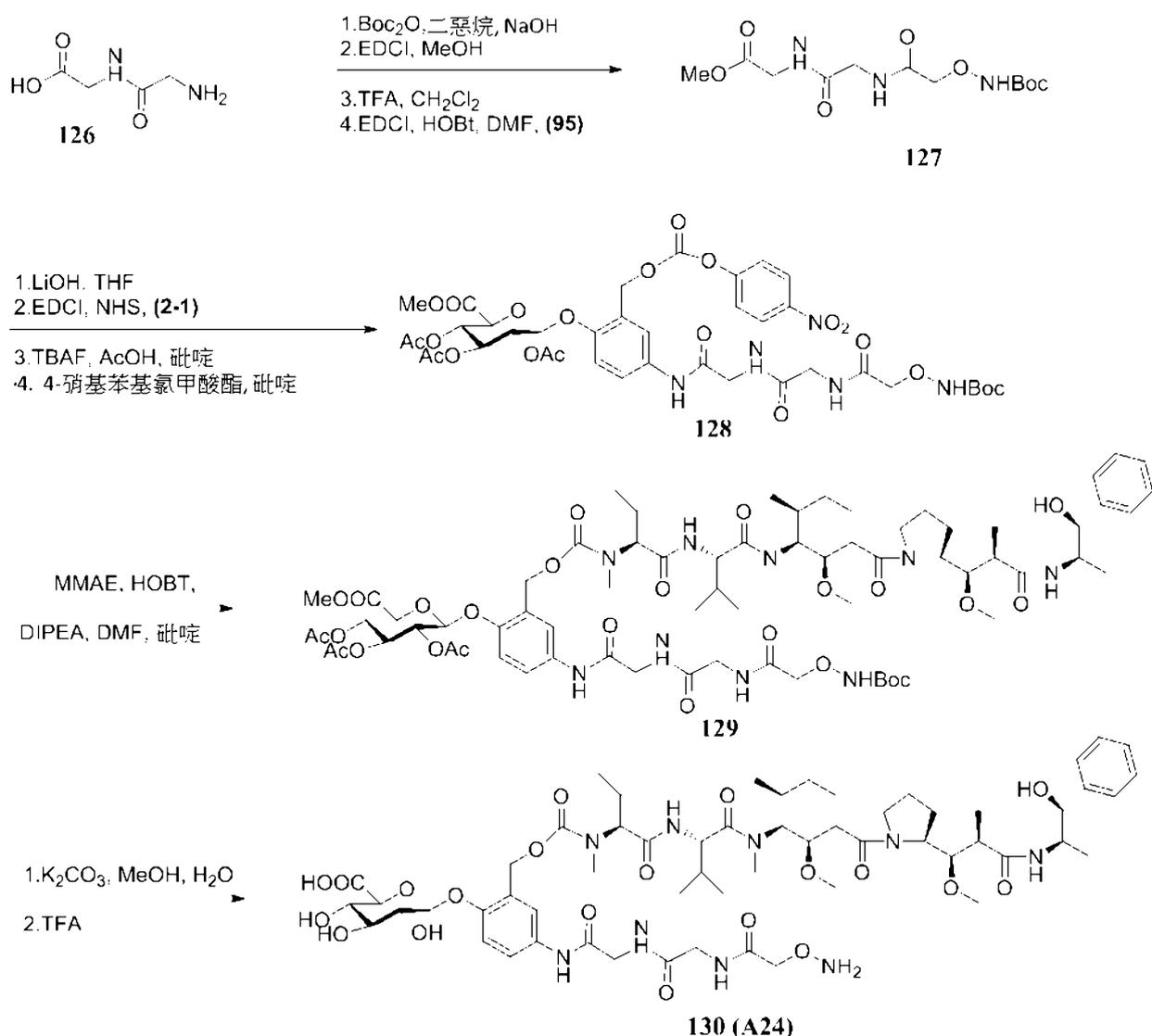
DCM (0.65 mL)之溶液，將該反應混合物於室溫下攪拌 2 小時後，濃縮以得到產物。取上述化合物及化合物 95(0.35g, 1.60 mmol)溶於二氯甲烷(10 mL)之溶液，依序添加三乙基胺(0.175g, 1.729mmole)、EDCI (0.268g, 1.729mmole)、及 HOBT (0.233g, 1.729 mmol)，將該混合物於室溫下攪拌 16 小時後，於真空中濃縮該反應混合物，並利用快速管柱層析法對剩餘物進行純化以得到油狀產物(化合物 123)(0.2g, 0.25 mmole)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.80 (s, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.53 (m, 1H), 7.40 (dd, J = 2.4, 32.4 Hz, 1H), 6.97 (dd, J = 4.0, 8.8 Hz, 1H), 5.40-5.21 (m, 3H), 5.10 (t, J = 76 Hz, 1H), 4.72 (d, J = 12.8 Hz, 1H), 4.42 (m, 1H), 4.30 (s, 1H), 4.11 (s, 2H), 3.69 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 3.51 (m, 2H), 3.42 (m, 2H), 3.03 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 1.46 (s, 9H)。

【0273】 製備化合物 125

【0274】 取化合物 123(0.2g, 0.25 mmole)、4-硝基苯基氯甲酸酯 (151mg, 0.75mmole)、及吡啶 (0.103mL, 1.25 mmole)溶於二氯甲烷(20mL)之溶液，於室溫下攪拌 12 小時，該溶液經濃縮後，利用快速管柱層析法對剩餘物進行純化，以得到固體產物(220 mg, 0.206 mmole)。取上述化合物(100mg, 0.103 mmole)、MMAE (81.3mg, 0.1133mmole)、DIPEA (66.6mg, 0.515mmole)、HOBT (15.3mg, 0.1133mmole)、及吡啶(81.5mg, 1.03mmole)溶於二甲基甲醯胺(6mL)之溶液，於室溫下攪拌 48 小時，使該溶液經濃縮後，利用快速管柱層析法對剩餘物進行純化，以得到固體產物(化合物 124) (50mg, 0.032 mmole)。以 HRMS (ESI-TOF, MNa⁺) 計算 C₇₂H₁₁₁N₉O₂₆SNa 計算值：1572.7253，實測值：1572.7324。取化合物 124(50mg, 0.032 mmole)、K₂CO₃ (25mg, 0.182mmole)、及 H₂O (0.3mL)溶於甲醇 (2mL)之溶液，於室溫下攪拌 6 小時，該溶液以 AcOH 終止反應後濃縮，利用 C18

管柱層析法對剩餘物進行純化，以得到固體產物。然後，於 0°C 下將 TFA (0.35 mL) 緩慢加入含有上述得到的化合物(44mg, 0.0333 mmol)之 DCM (0.65 mL)溶液，於室溫下攪拌 2 小時，該溶液經濃縮後，利用 C18 管柱純化該粗產物，以得到油狀產物(化合物 125)。ESI-TOF m/z: 1308.6360 [M-H]⁻。

【0275】 2.24 化合物 130(A24)之合成與特性



【0276】 製備化合物 127

【0277】 取雙-甘胺酸(化合物 126)(5 g, 37.84 mmol)溶於含二惡烷(60 mL)、水(30 mL) 及 1 M NaOH (30 mL)之混合液中，使用冰水浴冷卻之，添加雙-叔丁

基焦碳酸酯(12.38 g, 56.76 mmol)，於室溫下繼續攪拌 6 小時。該溶液於真空中濃縮至 10–15 mL 之體積，以冰水浴冷卻後，覆蓋一層乙酸乙酯(約 50 mL)，並加入稀釋的 HCl 溶液進行酸化並調整至 pH 值 2–3。使用乙酸乙酯重複萃取該水相層，倒出乙酸乙酯萃取液，以水清洗後利用無水 Na_2SO_4 乾燥，再於真空中蒸餾之，得到光滑固體之純物質(5.2 g, 17.97 mmol)。取上述得到的化合物(5.2 g, 17.97 mmol)及 EDCI (3.38g, 21.60mmole)溶於甲醇(24mL)之溶液，於室溫下攪拌 16 小時，該溶液經濃縮後，利用快速管柱層析法(矽膠體，4% MeOH 溶於 CH_2Cl_2)對該剩餘物進行純化，以得到固體產物(3.5g, 11.54 mmole)。於 0 °C 下將 TFA (18 mL) 緩慢加入含上述得到化合物(3.5g, 11.54 mmole)溶於 DCM (33 mL)之溶液，於室溫下攪拌 2 小時，該溶液經濃縮後，得到油狀產物(1.4g, 9.58 mmol)。取上述化合物(1.106g, 7.568 mmol)及化合物 95 (1.6g, 8.369 mmol)溶於二甲基甲醯胺(24 mL)之溶液，依序添加 EDCI (1.3g, 8.374mmole)及 HOBT (1g, 7.40 mmol)，於室溫下攪拌 48 小時，該溶液於真空中濃縮後，利用快速管柱層析法(矽膠體，4% MeOH 溶於 CH_2Cl_2)對進行剩餘物純化，得到油狀產物(化合物 127)(0.41g, 1.284mmole)。 ^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 4.34 (s, 2H), 3.99 (s, 2H), 3.97 (s, 2H), 3.71 (s, 3H), 1.47 (s, 9H);以 HRMS (ESI-TOF, MNa⁺)計算 $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_7\text{Na}$ ，計算值：342.1278，實測值：342.1281。

【0278】 製備化合物 128

【0279】 將化合物 127(0.41g, 0.739mmole)、水(0.8mL)、及 LiOH (0.065g, 1.548 mmole)溶於甲醇(10mL)溶液中並攪拌混合。於室溫下攪拌 2 小時之後將該溶液濃縮，接著利用快速管柱層析法(矽膠體，50% MeOH 溶於 CH_2Cl_2)對該剩餘物進行純化，以得到油狀產物(0.35g, 1.146 mmole); ^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ

4.34 (s, 2H), 3.98 (s, 2H), 3.80 (s, 2H), 1.47 (s, 9H)。將上述得到的化合物(0.35g, 1.146 mmol)和化合物 **2-1** (0.76g, 1.334 mmol)溶於二甲基甲醯胺(20 mL)之溶液，依序添加 EDCI (0.22g, 1.417 mmole) 及 HOBT (0.155g, 1.147 mmol)，於室溫下攪拌 16 小時，該溶液於真空濃縮後，利用快速管柱層析法(矽膠體，乙酸乙酯)對該剩餘物進行純化，以得到油狀產物(0.67g, 0.780mmole); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD) 7.68 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.48 (dd, $J = 2.4, 8.8$ Hz, 1H), 7.02 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 5.45 (t, $J = 9.6$ Hz, 1H), 5.35 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 5.23-5.18 (m, 2H), 4.68 (q, $J = 24.8$ Hz, 2H), 4.47 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 4.35 (s, 2H), 4.03 (s, 2H), 4.00 (s, 2H), 3.71 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.46 (s, 9H), 0.96 (s, 9H), 0.12 (s, 6H);以 HRMS (ESI-TOF, MNa^+) 計算 $\text{C}_{37}\text{H}_{56}\text{N}_4\text{O}_{17}\text{SiNa}$ ，計算值：879.3302，實測值：879.3272。

取上述得到的化合物(0.668g, 0.78mmole)、TBAF (1.05mL, 1.05mmole)、AcOH (5.6mL)、及吡啶(10mL)之溶液，於室溫下攪拌 12 小時，該溶液經濃縮後，利用快速管柱層析法(矽膠體，7% MeOH 溶於 CH_2Cl_2)對剩餘物進行純化，以得到固體產物(0.55g, 0.74 mmole); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) 9.03 (s, 1H), 8.83 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.40-7.38 (m, 1H), 6.86 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 5.33 (t, $J = 9.2$ Hz, 1H), 5.21 (t, $J = 9.6$ Hz, 1H), 5.05 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 4.57 (d, $J = 13.6$ Hz, 1H), 4.39-4.32 (m, 3H), 4.21 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 3.92 (s, 2H), 3.92 (s, 2H), 3.66 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.40 (s, 9H)。將上述得到的化合物 (183mg, 0.247mmole)、4-硝基苯基氯甲酸酯 (210mg, 1.042mmole)、及吡啶(0.3mL, 3.709 mmole)溶於二氯甲烷(20mL)溶液中，於室溫下攪拌 2 小時，該溶液經濃縮後，利用快速管柱層析法(矽膠體，5% MeOH 溶於 CH_2Cl_2)對剩餘物進行純化，得到固體產物(化合物 128)(116mg, 0.128 mmole)。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) 8.65-8.58 (m, 3H), 8.25-8.23 (m, 2H), 7.28 (s, 1H), 7.67-7.64 (m, 2H), 7.58 (dd, $J = 2.4, 8.8$ Hz, 1H), 7.40-7.38 (m, 2H), 7.28-7.26 (m, 1H), 7.17-7.14 (m, 1H), 7.01 (d, $J = 8.8$

Hz, 1H), 5.32-5.28 (m, 2H), 5.26-5.05 (m, 3H), 4.39 (s, 2H), 4.03 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 3.99 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 3.71 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.44 (s, 9H);以 HRMS (ESI-TOF, MNa⁺) 計算 C₃₈H₄₅N₅O₂₁Na, 計算值: 930.2499, 實測值: 930.2468。

【0280】 製備化合物 129

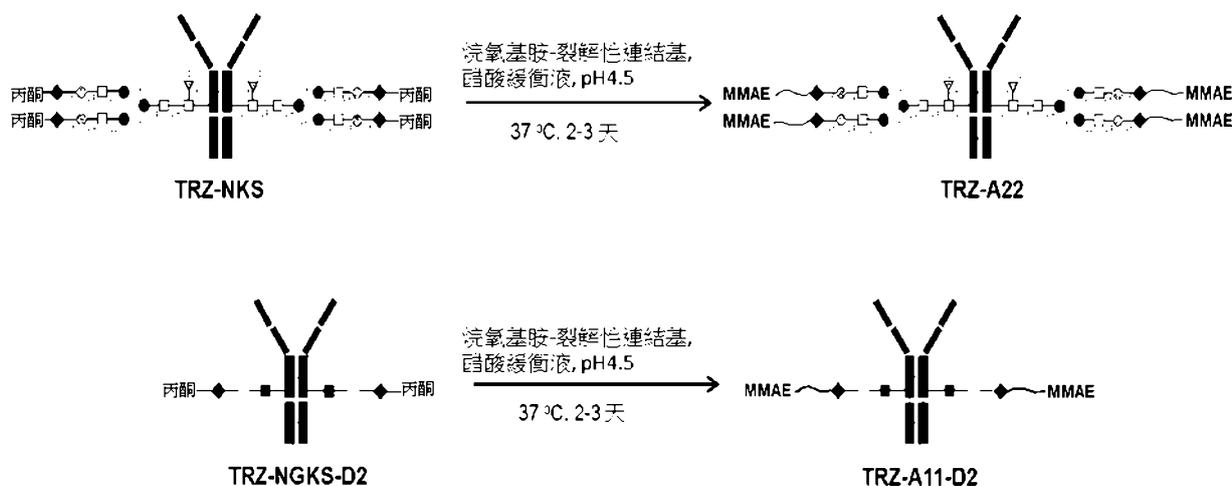
【0281】 將化合物 128 (6mg, 0.128 mmole)、MMAE (83mg, 0.116mmole)、DIPEA (0.203mL, 1.167mmole)、HOBT (18mg, 0.131mmole)、及吡啶(0.8mL)溶於二甲基甲醯胺(8mL)之溶液, 於室溫下攪拌 72 小時, 將該溶液濃縮之後, 利用快速管柱層析法(矽膠體, 8% MeOH 溶於 CH₂Cl₂)對該剩餘物進行純化, 以得到固體產物(化合物 129) (81mg, 0.054 mmole); 以 HRMS (ESI-TOF, MNa⁺)計算 C₇₁H₁₀₇N₉O₂₅Na, 計算值: 1508.7270, 實測值: 1508.7298。

【0282】 製備化合物 130

【0283】 取化合物 129(81mg, 0.054 mmole)、K₂CO₃ (38 mg, 0.276mmole)、及 H₂O (0.5mL)溶於甲醇(3 mL)之溶液, 於室溫下攪拌 6 小時, 該溶液經 AcOH 終止反應後濃縮, 利用 C18 管柱純化剩餘物以得到固體產物(70mg, 0.0499 mmole); 以 HRMS (ESI-TOF, MNa⁺)計算 C₆₄H₉₉N₉O₂₂Na, 計算值: 1368.6797, 實測值: 1368.6902。於 0 °C 下將 TFA (0.35 mL)緩慢加入含有上述得到的化合物(70mg, 0.0499 mmole)之 DCM (0.65 mL)溶液中, 於室溫下將該反應混合物攪拌 2 小時, 該溶液經濃縮之後, 利用 C18 管柱對粗產物進行純化, 得到油狀產物(化合物 130) (48 mg, 0.0368 mmol); 以 HRMS (ESI-TOF, MH⁺)計算 C₅₉H₉₂N₉O₂₀, 計算值: 1246.6453, 實測值: 1246.6609。

【0284】 實施例 3：抗體藥物複合體(ADC)之形成與特性

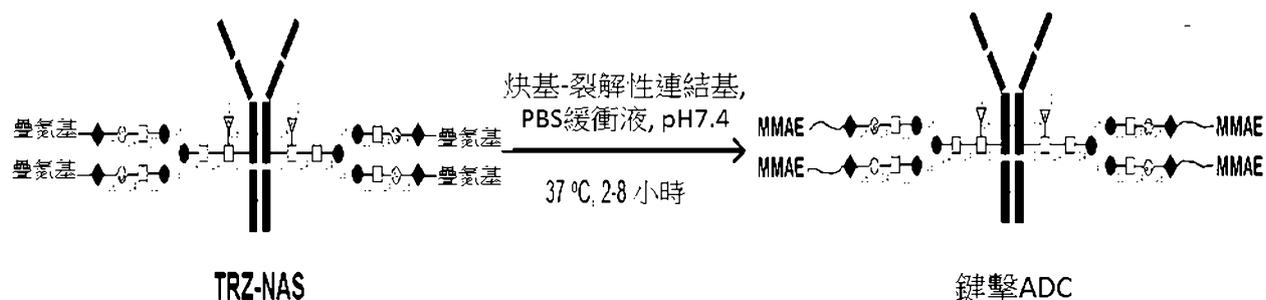
【0285】 反應式 5：TRZ-NKS 或 TRZ-NGKS 透過肟接合(oxime-ligation)之承載物複合方式



【0286】 3.1 透過 TRZ-NKS 或 TRZ-NKS-D2 執行肟接合接點專一性抗體藥物複合體的一般流程

【0287】 於 100 mM 醋酸緩衝液(pH 4.5)中，加入 TRZ-NKS (5 mg/mL)及 3 mM 承載物(A22)，於 37°C 下作用 3 天，以執行抗體的丙酮與烷氧基胺-裂解性承載物(A22)之間的肟接合。在 Amicon 濃縮劑中以 10,000 分子量截斷(Molecular Weight Cut Off, MWCO)與醋酸緩衝液進行緩衝液交換。透過 Amicon 濃縮劑以 10,000 MWCO 使用 PBS(pH 7.4)執行連續清洗，藉以移除多餘的小分子。請參閱第 4 圖及第 5 圖，分別為利用 SDS-PAGE 分析 TRZ-A22 及 TRZ-A11-D2 之結果。

【0288】 反應式 6：TRZ-NAS 透過鍵擊化學之承載物複合方式



【0289】 3.2 經由 TRZ-NAS 之鍵擊化學接點專一性抗體藥物複合體的一般流程

【0290】 於 1X PBS 緩衝液(pH 值 7.4，含 5 至 10% DMSO)中，添加 3-5 mg/mL 之 TRZ-NAS (含 400 μ M 之炔基-裂解性連結基、45 mM 之 CuSO₄、45 mM 之抗壞血酸鈉)，於 37 °C 下作用 2-8 小時，以在抗體上的疊氨基與炔基-裂解性承載物(A09)之間，進行經 Cu (+)催化的鍵擊反應。反應完成後，使用 10 mM EDTA 終止反應。在 Amicon 濃縮劑中，以 10,000 MWCO 與 1X PBS 緩衝液進行緩衝液交換。在 Amicon 濃縮劑中，以 10,000 MWCO 使用 PBS(pH 7.4)執行連續清洗，藉以移除多餘的小分子。SDS-PAGE 分析結果如第 6 圖所示。

【0291】 3.3 ADC 的 DAR 數量定性

【0292】 製造 ADC 時，抗體對承載物之總承載量稱為藥物抗體比或 DAR。利用質譜儀計算每一個 ADC 的 DAR。使用 10 kDa 超高速離心機，使 ADC 樣品在三次濃縮/稀釋循環中利用 ddH₂O 進行脫鹽處理。在正離子模式下進行質譜儀實驗，建立於 Xevo G2-XS QTOF 裝置 (Waters, Manchester, UK)；該裝置設有 ESI 離子源、3.0 kV 之毛細管電壓以及 150 V 之樣品錐。在 700–4000 之 m/z 範圍下收集完整的掃描圖譜。使用 Waters MassLynx 軟體控制裝置以及處理數據。請參

照第 7 圖，TRZ-A22 呈現出：對應至具有 DAR 數= 4 之 ADC 的主要波峰，以及對應至具有 DAR 數= 3 之 ADC 的一較小波峰。下列方程式係用於建立平均 ADR 數：

$$\text{平均DAR數} = \sum_0^n n \times y\%$$

在此，變異性是相對豐富的，n=抗體上的承載物(藥物)數量，y% =每一個 ADC 基於各波峰面積所計算出的波峰面積比。TRZ-A22 的平均藥物抗體比(DAR)係如表 1 所示，且所有 ADC 的平均 DAR 係如表 2 所示。

表 1：各 DAR 數的比值(TRZ-A22)

波峰	DAR0	DAR1	DAR2	DAR3	DAR4
比值	-	-	-	13.7%	86.3%

平均 DAR：3.9

※以波峰面積為基準

表 2：以 MS 圖譜中 ADC 的各質量數的密度百分比為基準，所計算出來的

DAR 數

ADCs	平均DAR	ADCs	平均DAR
TRZ-A01	3.5	TRZ-A12	3.8
TRZ-A01-D2	1.8	TRZ-A13	3.2
TRZ-A02	4.0	TRZ-A14	3.0
TRZ-A03	3.0	TRZ-A15	3.7
TRZ-A04	3.3	TRZ-A17	3.5
TRZ-A05	4.0	TRZ-A18	3.4
TRZ-A06	3.1	TRZ-A20	5.8
TRZ-A09	3.9	TRZ-A21	3.0
TRZ-A10	3.8	TRZ-A22	3.9
TRZ-A11	3.6	TRZ-A23	3.8
TRZ-A11-D2	1.9	TRZ-A24	3.5

【0293】 由於特殊的製程，本發明之實施方式可具有相對高的平均 DAR 數。根據本發明之實施例，具有兩個雙分支醣基的抗體，其平均 DAR 數為 3.0 以上。相反地，在本技術領域中已知抗體的平均 DAR 數一般為 2.0 以下。具有兩個單分支醣基的抗體，其平均 DAR 數為 1.5 至 2.0。較高的平均 DAR 數表示：各抗體分子可以攜帶較多的承載體，且由本發明說明書中記載的實驗證明：本發明的抗體藥物複合體作為療效藥物更加有效且具有更大的經濟效應。

【0294】 實施例 4：利用 ELISA 試驗檢測 CHO-A01 對 HER2 的結合能力

【0295】 進行 Her2 結合 ELISA 試驗係用於評估：在連結基與藥物複合以後，TRZ 的結合是否減少。將人類 HER2 重組蛋白胞外區域(extracellular domain, ECD) (0.025 µg/ml; Sino Biological Inc.)加入碳酸鹽塗覆緩衝液(pH 10.0)中，於 4°C 下塗覆於 96 孔盤(Corning)內靜置隔夜。清洗後，將阻斷(blocking)緩衝液(包含 2%小牛血清蛋白及 0.05% Tween20(溶於 PBS))加入培養盤作用 2 小時。接著，再次清洗後，加入系列稀釋的 TRZ/TRZ-NKS/TRZ-A01，從 0.00001 µg/ml 至 3 µg/ml(溶於 3 倍稀釋的試驗緩衝液)，作用 1 小時後，加入抗人類 IgG HRP (Jackson Immuno Research Inc.)作用 30 分鐘。最後，加入 100 µl 的基質(3,3',5,5'- 四甲基聯苯胺, TMB)用於呈色，然後加入 100 µL 之 2.5 N 硫酸終止反應。利用 Spectra Max M5 微盤分析儀(Molecular Devices)測量 450 nm 的吸光值，並利用四參數非線性迴歸方程式(4PL)作曲線擬合來分析數據。第 8 圖顯示為 TRZ-A01 的代表性結合曲線。在數量上，表 3 同時顯示出：在 Her2 (ECD)的結合親和力方面，TRZ-A01 和其官能化 TRZ-NKS 相較於 TRZ 的 EC50。結果顯示：假設承載物複合不會改變抗原的結合親和力，TRZ-A01、TRZ-NKS 及 TRZ 對抗原的結合親和力是有差

異的。在其他承載物(A02 至 A24)上也可以觀察到相同的結果。這些結果顯示：在 ADC 複合後，不會影響 TRZ-A01 至 A24 對 Her2 的結合性。

表 3：mAbs 對 Her2 (ECD)的 EC 50 值($\mu\text{g/mL}$)

mAb	EC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	R ²
Roche-TRZ	0.021	0.99
TRZ-A01	0.024	0.99
TRZ-NKS	0.026	0.99

【0296】 如第 8 圖所示，抗體藥物複合體(即 CHO-A01)保有市售抗體(即 Roche-TRZ、IgG1 κ anti-HER2 trastuzumab TRZ、Herceptin, Roche)的結合特性，顯示複合不會改變 ADC 中抗體的構型。

【0297】 實施例 5：細胞毒殺性試驗

【0298】 將 BT474 細胞(2.5×10^3 細胞/100 μL /孔)成長並維持在 90% Hybri-Care 培養液(Modified Dulbecco's 培養液)中，其中添加有 30 ng/mL EGF 和 10%胎牛血清蛋白。次日，使用培養液稀釋抗體、ADC (TRZ 或 TRZ-A01)、或承載物，再分別添加使最終濃度範圍介於 20.5-0.0031 nM 或 1000-0.00001 nM。持續培養 5 天，且利用 CellTiter-Glo (Promega Inc.)藉由測量發光性來估算細胞存活數，等同於 ATP 的數量。利用 Spectra Max M5 微盤分析儀(Molecular Devices)收集數據，並利用四參數非線性迴歸方程式(4PL)作曲線擬合來分析數據。在培養液中的 BT474 細胞的數目設定為 100%細胞存活性，而只有培養液的細胞數目設定為 0%細胞存活性。

表 4：在 Her2 正表現之 BT-474 細胞中，TRZ 對 ADCs 的細胞毒殺性增量(EC50 值 of TRZ/ADC)之總表

在 BT-474 細胞的 EC50 增加倍數(TRZ/TRZ-A01)	ADCs
≈ 1	A03, A04, A06, A07, A12
5~ 10 倍	A08, A10, A13, A16, A19, A01-D2, A11-D2
> 10 倍	A01, A02, A05, A09, A11, A14, A15, A17, A18, A20, A21, A22, A23, A24

【0299】 如第 9 圖所示，TRZ-A01 引發的細胞毒殺性呈現劑量依賴性。相反地，在測試單獨 TRZ 濃度的組別中顯示出微弱的細胞毒殺性。此外，在 Her2 抗原負表現的 MDA-MB231 細胞中並沒有觀察到細胞毒殺性。這個結果指出 ADC 同時具有結合專一性及細胞毒殺性的優點。TRZ-A01-TRZ-A25 相較於 TRZ 的相對效能係利用下列方程計算：相對效能=(TRZ 之 EC50 值)/(ADC 之 EC50 值)，且結果整理於表 4 中。

【0300】 其他 Her2-正表現的癌細胞株，例如 SKBR3、NCI-N87、JIMT-1、及 MCF-7，並且同時使用 TRZ-A01 及 TRZ 誘發 Her2-負表現的 MDA-MB-231 細胞進行細胞毒殺性試驗。請參閱表 5，結果顯示所有 Her2-正表現的細胞株對 TRZ-A01 比 TRZ 具有更高的反應。

表 5：比較 TRZ-A01 在 HER2-正表現細胞株或 HER2-負表現細胞株的細胞毒殺性

細胞株	EC50 增加倍數 (TRZ/TRZ-A01)	最大存活性 (TRZ)	最大存活性 (TRZ-A01)
BT-474	17	70%	16%
SKBR3	9.2	50%	4%
NCI-N87	12	81%	15%

JIMT-1	>100	100%	6%
MCF-7	NA	100%	100%
MDA-MB-231	NA	100%	100%

【0301】 實施例 6：活體功效動物模式

【0302】 從臺灣 BioLasco 購得六週大的雌性 C.B-17 SCID 小鼠，所有的小鼠皆在右齒腹以皮下接種注入 5×10^6 個 NCI-N87 細胞。利用游標尺測量腫瘤生長並利用方程式： $1/2 [\text{長度 (mm)}] \times [\text{寬度 (mm)}]^2$ 計算腫瘤體積。當腫瘤尺寸達到約 300 mm^3 體積時(在第 28 天)，將動物隨機分成兩組，每組 3 隻小鼠，以 TRZ-A01 或載體(控制組)處理。TRZ-A01 組係從腹腔給予 5 mg/kg 的 TRZ-A01(溶於無菌生理食鹽水)，每週給藥一次，共處理 4 週；且載體控制組係單獨給予無菌生理食鹽水。在整個實驗期間，每兩週記錄腫瘤尺寸、體重、及死亡率。所有動物實驗方法皆由泉盛生物科技股份有限公司(Fountain Biopharma)的動物實驗管理小組(IACUC)批准並執行。

【0303】 實驗結束(第 71 天)後，兩組腫瘤體積的差異係利用非成對 t 值測驗做統計分析。和載體控制組相比，TRZ-A01 組對活體腫瘤生長表現出顯著的抑制效果。

【0304】 如第 10 圖所示，在 NCI-N87 異種移植模式中，ADC A01 的抗腫瘤活性明顯比載體控制組更加有效。在每 7 天處理一次，共 4 次的 5 mg/kg TRZ-A01 處理以抑制 NCI-N87 的腫瘤生長，數據顯示出腫瘤不但沒有成長，實際上反而縮小。相較之下，控制組的腫瘤持續成長。這個令人印象深刻的結果證明本發明抗體藥物複合體的功效。如此令人印象深刻的結果同樣可證明本發明抗體藥物複合體的每一個抗體分子上具有較多的承載物分子(即：在多數實施例中

DAR 為 3.0 以上)。藥物抗體比(DAR)表示在抗體藥物複合體中的每個抗體分子攜帶的藥物分子數目。在 ADC 複合體中，DAR 數目可由 MS 質譜儀以每一種 ADC 的密度百分比為基準所計算出來。

【0305】 上述結果清楚指出本發明的抗體藥物複合體是有效且專一的療效藥物。本發明部分實施例關於一種利用本發明 ADC 治療疾病或症狀的方法，其中 ADC 中的抗體單元可結合至特定標的，此時 ADC 中的藥物單元發揮其治療效果或細胞毒殺效果。

【0306】 根據本發明實施例的方法可包括：將有效劑量的本發明 ADC 注入有治療需要的一主體。本技術領域中具有通常知識者可了解特定 ADC 的有效劑量須依照疾病種類、病人條件、給藥路徑等而調整。本技術領域中具有通常知識者不需創造性的努力即能夠決定出有效劑量。

【0307】 本發明已經在有限的實施例下加以說明，本技術領域中具有通常知識者可從本發明所揭露內容得到啟發，在不背離於此揭露之本發明申請專利範圍之前提下推知其他可變化的實施方式。據此，本發明的範圍僅受限於所依附的申請專利範圍。

【符號說明】

【0308】 無



201818974

申請日：
IPC 分類：

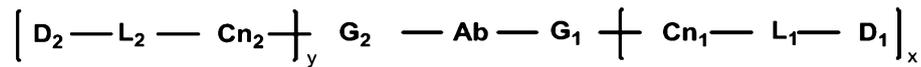
【發明摘要】

【中文發明名稱】 抗體藥物複合體

【英文發明名稱】 ANTIBODY-DRUG CONJUGATES

【中文】

本揭示內容提供一種抗體藥物複合體(antibody-drug conjugate, ADC)，包括如式(I)所示之結構或其藥學上可接受之鹽類：



式(I)

其中，

Ab為不具醣基之抗體(即為抗體的蛋白質部分)；

G₁及G₂可為相同或不同之醣單元；

C_{n₁}及C_{n₂}可為相同或不同之複合單元；

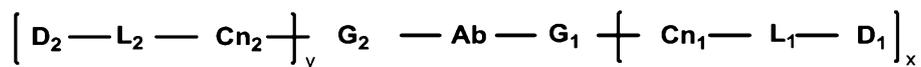
L₁和L₂可為相同或不同之連結單元；

D₁和D₂可為相同或不同的藥物單元；以及

在x + y ≠ 0的前提下，x和y係獨立為0至8之整數。

【英文】

An antibody-drug conjugate (ADC) has a structure represented by Formula (I):



Formula (I)

or a pharmaceutically acceptable salt thereof, wherein

Ab is an antibody without glycans (i.e., the protein portion of an antibody);

G_1 and G_2 are glycanmoieties, which may be the same or different;

Cn_1 and Cn_2 are conjugation moieties, which may be the same or different;

L_1 and L_2 are linker moieties, which may be the same or different;

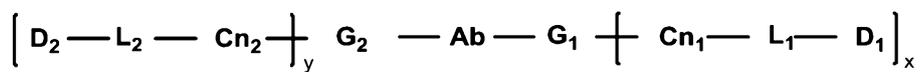
D_1 and D_2 are drug units which may be the same or different; and

x and y are independently an integer from 0 to 8, provided that $x + y \neq 0$.

【指定代表圖】 第3圖

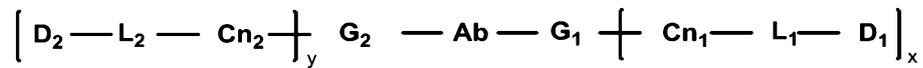
【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】



【發明申請專利範圍】

【第1項】一種抗體藥物複合體(antibody-drug conjugate, ADC)，其包含如式(I)所示之結構或其藥學上可接受之鹽類：



式(I)

其中，

Ab為一不具醣基之抗體；

G₁及G₂各自是相同或不同之一醣單元；

C_{n1}及C_{n2}各自是相同或不同之一複合單元；

L₁和L₂各自是相同或不同之一直接鍵結或一連結單元；

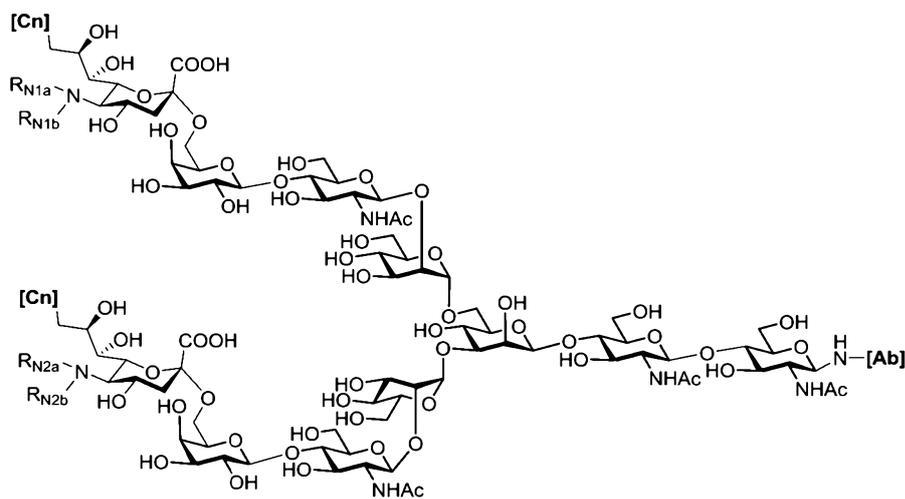
D₁及D₂各自是相同或不同之一藥物單元以及

在x + y ≠ 0的前提下，x和y係獨立為0至8之整數。

【第2項】如申請專利範圍第1項所述之抗體藥物複合體，其中該抗體結合至一標的，該標的係選自由：分化群 19 (Cluster of differentiation 19, CD19)、分化群 22 (CD22)、分化群 27 (CD27)、分化群 30 (CD30)、分化群 33 (CD33)、分化群 37 (CD37)、分化群 70 (CD70)、分化群 74 (CD74)、分化群 79b (CD79b)、分化群 138 (CD138)、分化群 142 (CD142)、碳酸酐酶 6(Carbonic anhydrase 6, CA6)、鈣黏素 (p-Cadherin)、癌胚抗原相關細胞黏附分子 5 (Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5, CEACAM5)、LY6/PLAUR 結構域蛋白 3(LY6/PLAUR Domain Containing 3, C4.4a)、Delta 樣配體 3 (Delta-like 3, DLL3)、上皮生長因子受器 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、上皮生長因子受器 VIII (epidermal growth factor receptor variant III, EGFRVIII)、外核苷酸焦磷酸酶/

磷酸二酯酶家族成員 3 (Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 3, ENPP3)、肝配蛋白 A 型受體 2 (ephrin type-A receptor 2, EphA2)、肝配蛋白 A (EphrinA)、葉酸受體蛋白 1 (Folate Receptor 1, FLOR1)、纖維母細胞生長因子受體 2 (Fibroblast growth factor receptor, FGFR2)、鳥苷酸環化酶 C (Guanylate cyclase, GCC)、人類表皮生長因子受體 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2)、受體酪胺酸激酶 (receptor tyrosine kinase, cKIT)、雌激素調節蛋白 1 (Estrogen-Regulated Protein LIV1)、間皮素 (Mesothelin, MSLN)、黏蛋白 16 (Mucin 16, MUC16)、鈉依賴性磷酸鹽轉運蛋白 2b (Sodium-dependent phosphate transport protein 2B, NaPi2b)、連接蛋白 4 (Nectin4)、跨膜醣蛋白神經介素蛋白 B (Transmembrane glycoprotein neuromedin B, gpNMB)、前列腺特異性膜抗原 (prostate specific membrane antigen, PSMA)、SLIT 及 NTRK 相似蛋白 6 (SLIT and NTRK-like protein 6, SLITRK6)、前列腺六跨膜上皮抗原 1 (six transmembrane epithelial antigen of the prostate, STEAP1)、滋養層細胞表面抗原 2 (trophoblast cell surface antigen, TROP2)、滋養層醣蛋白 (Trophoblast glycoprotein, 5T4)、階段特異性胚胎抗原 4 (stage-specific embryonic antigen 4, SSEA4)、Globohexaosylceramide, GloboH)、五分子前趨醣脂質 (Gb5)、(Sialyl-Tn, STn) 及 Tn 所組成之群組。

【第3項】如申請專利範圍第 1 項或第 2 項所述之抗體藥物複合體，其中該醣單元具有如式(II-1a)所示之結構：



式(II-1a)

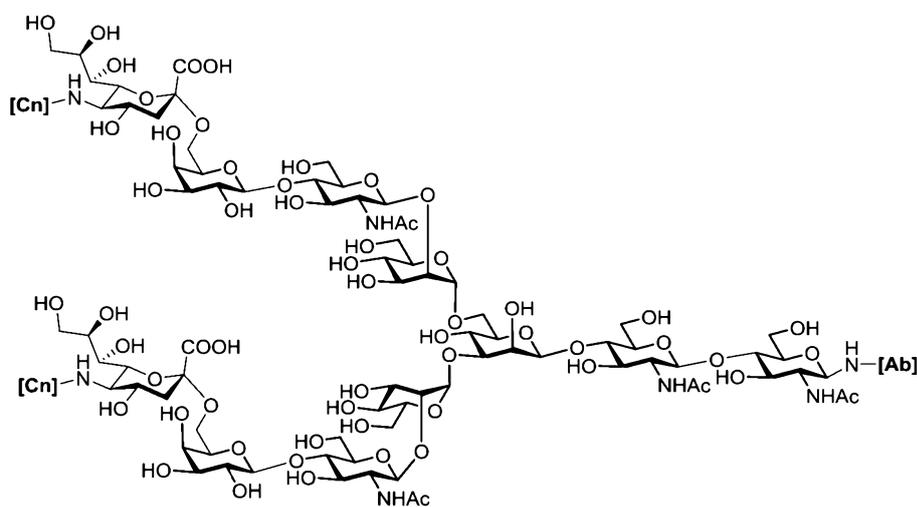
其中，

R_{N1a} 、 R_{N1b} 、 R_{N2a} 、及 R_{N2b} 係獨立選自由氫、選擇性被取代之 C1-C6 烷基、選擇性被取代之 C1-C6 醯基、及氮保護基團所組成之群組；其中氮保護基可為本技術領域中所熟知的氮保護基團，例如異丁基氧基羰基(isotertbutyloxycarboxy group, t-BOC)、9-芴基甲氧基羰基(9-fluorenylmethoxycarbonyl group, Fmoc)、苄基(benzyl group, Bn)、苄氧羰基(benzyloxycarbonyl group, Cbz)、烯丙氧羰基(allyloxycarbonyl group, Alloc)、2-(三甲基甲矽烷基)乙氧基羰基(2-(trimethylsilyl)ethoxycarbonyl group, Teoc)、2,2,2-三氯乙氧羰基(2,2,2-trichloroethoxycarbonyl, Troc)、二苯甲基(diphenylmethyl group, Dpm)、三苯甲基(trityl group, Tr)、9-芴基(9-phenylfluorenyl group, PhFI)、及對甲氧基苄基(p-methoxybenzyl group, PMB)；

[Ab] 表示該抗體的接點；以及

[Cn] 表示該複合單元的接點。

【第4項】 如申請專利範圍第 1 項或第 2 項所述之抗體藥物複合體，其中該醣單元具有如式(II-1b)所示之結構：



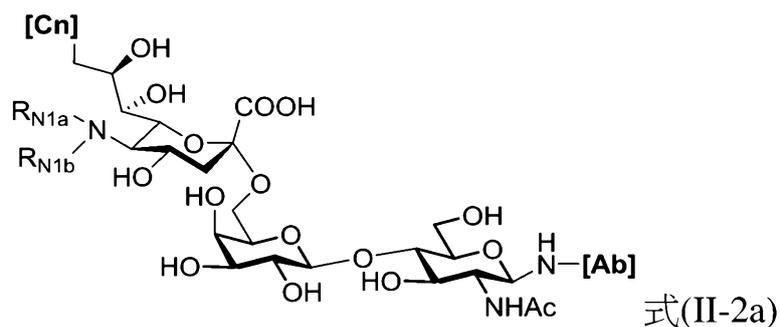
式(II-1b) ,

其中

[Ab] 表示該抗體的接點；以及

[Cn] 表示該複合單元的接點。

【第5項】如申請專利範圍第 1 項或第 2 項所述之抗體藥物複合體，其中該醣單元具有如式(II-2a)所示之結構：



式(II-2a)

其中，

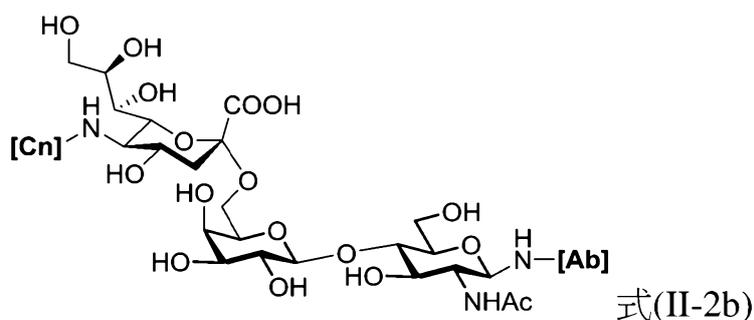
R_{N1a} 、 R_{N1b} 、 R_{N2a} 、及 R_{N2b} 係獨立選自由氫、選擇性被取代之 C1-C6 烷基、選擇性被取代之 C1-C6 醯基、及氮保護基團所組成之群組；其中氮保護基可為本技術領域中所熟知的氮保護基團，例如異丁基氧基羰基(isotertbutyloxycarboxy group, t-BOC)、9-芴基甲氧基羰基(9-fluorenylmethoxycarbonyl group, Fmoc)、苄

基(benzyl group, Bn)、苄氧羰基(benzyloxycarbonyl group, Cbz)、烯丙氧羰基(allyloxycarbonyl group, Aloc)、2-(三甲基甲矽烷基)乙氧基羰基(2-(trimethylsilyl)ethoxycarbonyl group, Teoc)、2,2,2-三氯乙氧羰基(2,2,2-trichloroethoxycarbonyl, Troc)、二苯甲基(diphenylmethyl group, Dpm)、三苯甲基(trityl group, Tr)、9-苯芴基(9-phenylfluorenyl group, PhFl)、及對甲氧基苄基(p-methoxybenzyl group, PMB)；

[Ab] 表示該抗體的接點；以及

[Cn] 表示該複合單元的接點。

【第6項】如申請專利範圍第1項或第2項所述之抗體藥物複合體，其中該醣單元具有如式(II-2b)所示之結構：

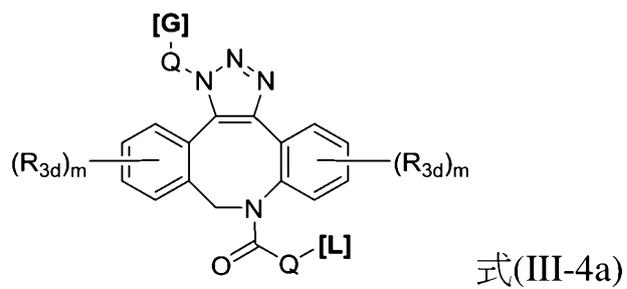
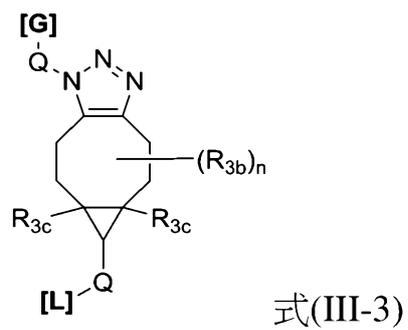
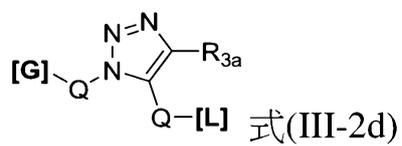
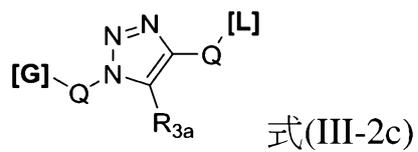
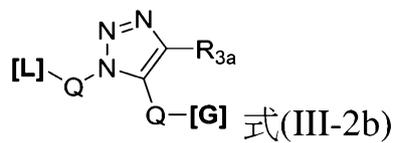
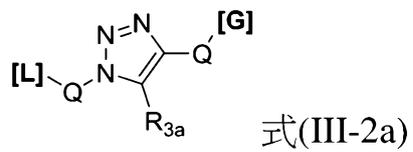
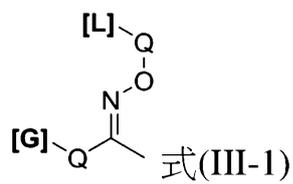


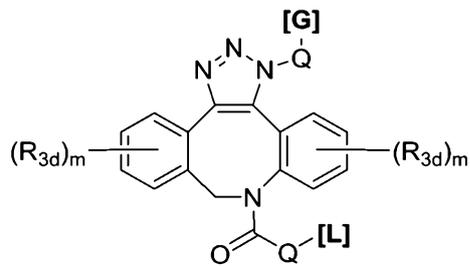
其中，

[Ab] 表示該抗體的接點；以及

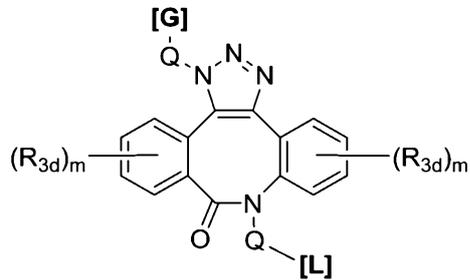
[Cn] 表示該複合單元的接點。

【第7項】如申請專利範圍第1至6項的任一項所述之抗體藥物複合體，其中該複合單元係選自由：式(III-1)、式(III-2a)、式(III-2b)、式(III-2c)、式(III-2d)、式(III-3)、式(III-4a)、式(III-4b)、式(III-4c)、及式(III-4d)之結構所組成之群組；

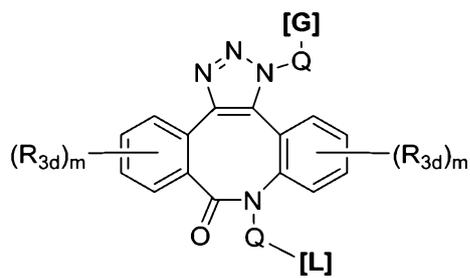




式(III-4b)



式(III-4c)



式(III-4d)

其中，

Q 係 Y1+Y2 連接基團(spacer group)，其中 Y1 和 Y2 係獨立選自由：直接鍵結、 $-(CH_2)_n-$ 、 $-O-$ 、 $-NH-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-(CH_2)_nO-$ 、 $-O(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_n-C(O)-$ 、 $-C(O)(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_n-NH-$ 、 $-NH-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_n-NHC(O)-$ 、 $-C(O)(CH_2)_n-NHC(O)-$ 、 $(CH_2)_nSCH_2C(O)-$ 、及 $-(CH_2CH_2O)_m-$ 所組成之群組；

R_{3a} 係選自由：氫、鹵素、C1-C6 烷基所組成之群組；

R_{3b} 係獨立選自由：氫、鹵素、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、選擇性被取代之 C1-C6 烷基、選擇性被取代之 C1-C6 烷氧基、選擇性被取代之 C1-C24 環烷基、選擇性被取代

之 C6-C24 芳基、選擇性被取代之 C7-C24 芳烷基、選擇性被取代之 C4-C24 雜芳基、及選擇性被取代之 C5-C24 雜芳烷基所組成之群組；

R_{3c} 係獨立選自由：氫、鹵素、選擇性被取代之 C1-C6 烷基、選擇性被取代之 C6-C24 芳基、選擇性被取代之 C7-C24 芳烷基、選擇性被取代之 C4-C24 雜芳基、及選擇性被取代之 C5-C24 雜芳烷基所組成之群組；

R_{3d} 係獨立選自由：氫、鹵素、OH、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、選擇性被取代之 C1-C6 烷基、選擇性被取代之 C1-C6 烷氧基所組成之群組；

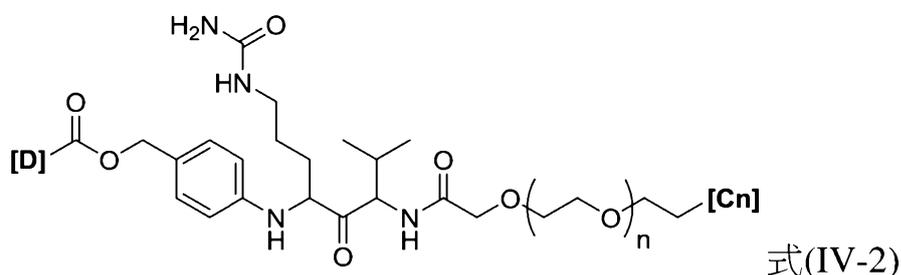
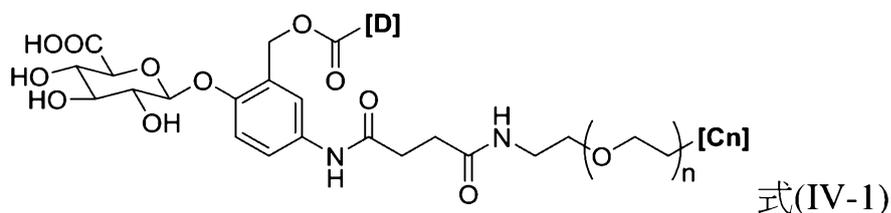
n 為 1 至 8 的整數，亦包括 1 及 8；

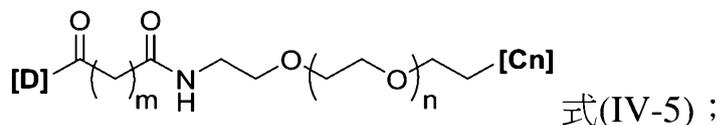
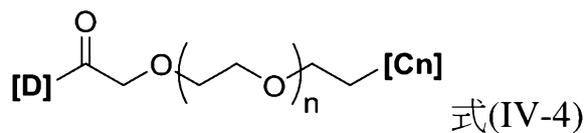
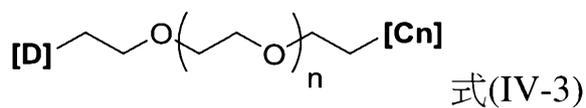
m 為 1 至 4 的整數，亦包括 1 及 4；

[G] 表示該醣單元的接點；以及

[L] 表示該連結單元的接點。

【第8項】如申請專利範圍第 1 至 7 項的任一項所述之抗體藥物複合體，其中該連結單元係選自由：式(IV-1)、式(IV-2)、式(IV-3)、式(IV-4)、及式(IV-5)之結構所組成之群組；





其中，

[Cn] 表示該複合單元的接點；以及

[D] 表示該藥物單元的接點；

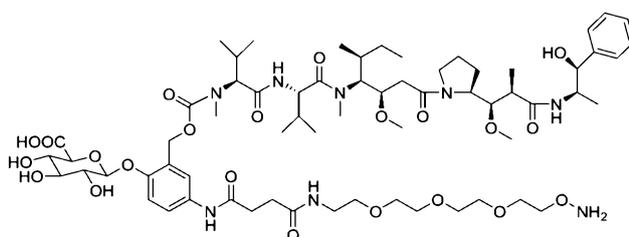
並且 m 和 n 各自為 0 至 6 的整數，亦包括 0 及 6。

【第9項】 如申請專利範圍第 1 至 8 項的任一項所述之抗體藥物複合體，其中該藥物單元係選自由：單甲基澳瑞他汀 E (Monomethyl auristatin E, MMAE)、單甲基澳瑞他汀 F (Monomethyl auristatin F, MMAF)、單甲基澳瑞他汀 D (Monomethyl auristatin D, MMAD)、美登素 DM1/DM4 (Mertansine, Maytansinoid DM1/DM4)、紫杉醇(Paclitaxel)、多西他賽(Docetaxel)、埃博黴素 B (Epothilone B)、埃博黴素 A (Epothilone A)、CYT997、澳瑞他汀酪胺磷酸鹽(Auristatin tyramine phosphate)、澳瑞他汀氨基喹啉(Auristatin aminoquinoline)、Halocombstatins、刺孢霉素 θ (Calicheamicin theta)、7-乙基-10-羥基-喜樹鹼 (SN-38) (7-Ethyl-10-hydroxy-camptothecin (SN-38))、吡咯苯並二氮雜卓 (Pyrrolobenzodiazepine, PBD)、水鬼蕉鹼 (Pancratistatin)、環磷酸酯

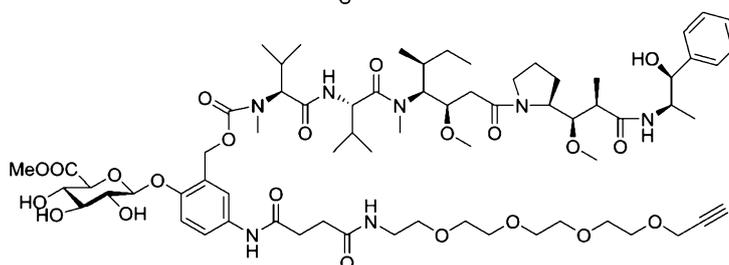
(Cyclophosphate)、Cribrostatin-6、Kitastatin、渦輪他汀 1-4 (Turbostatin 1-4)、海洛因他汀(Halocombstatins)、及 Silstatins 所組成之群組。

【第10項】 如申請專利範圍第 1 至 9 項中任一項所述之抗體藥物複合體，其中該抗體藥物複合體係利用一化合物所合成，該化合物係選自由下列 A01 至 A24 所組成之群組：

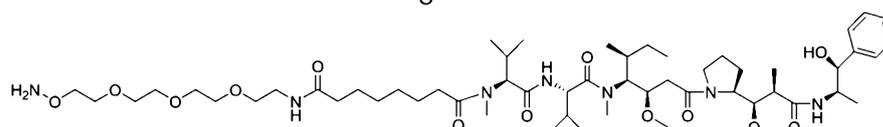
A01



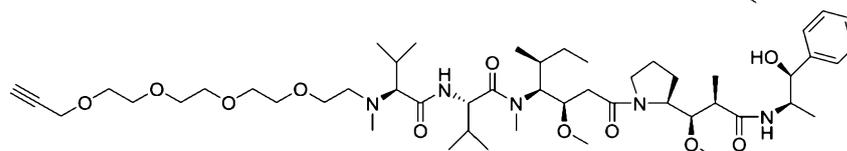
A02



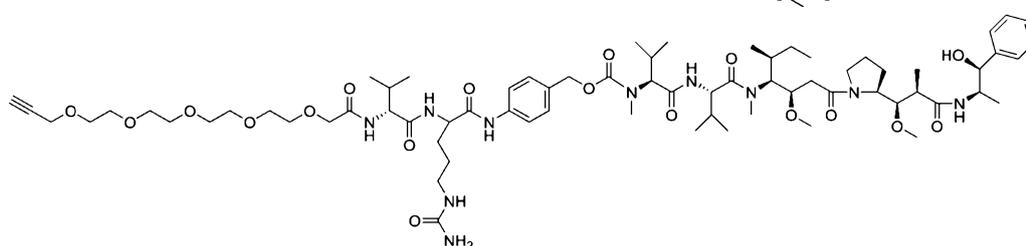
A03



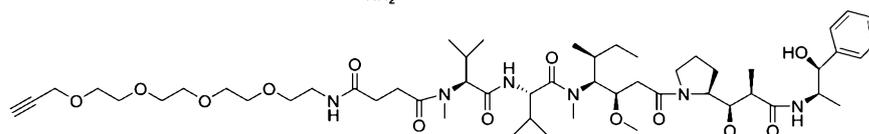
A04



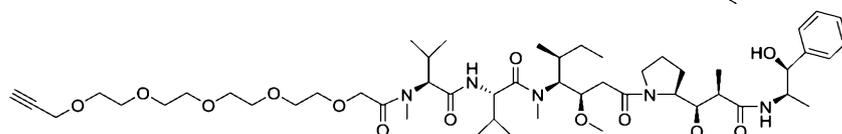
A05



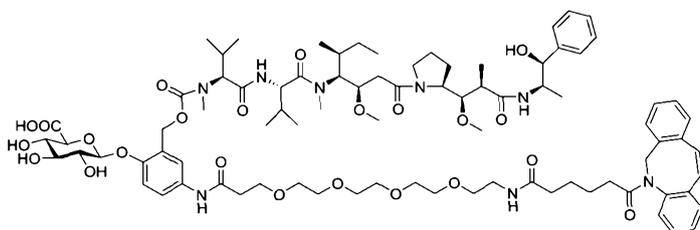
A06



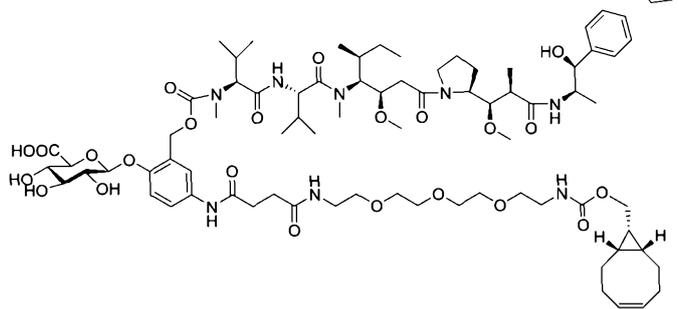
A07



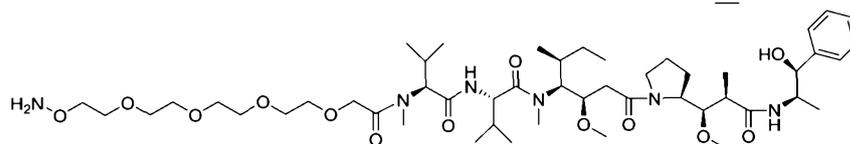
A08



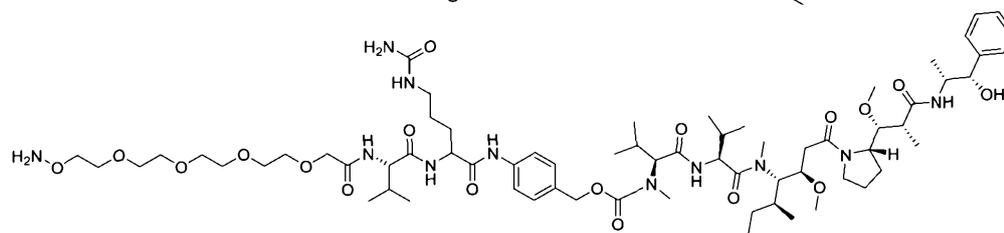
A09



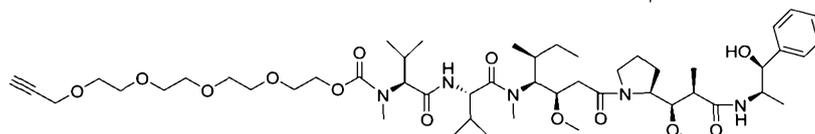
A10



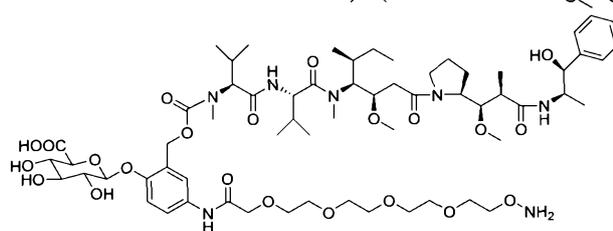
A11



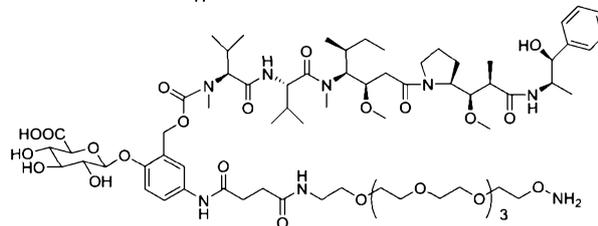
A12



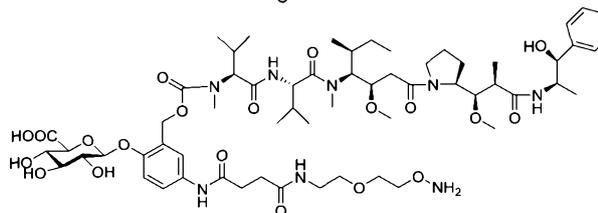
A13



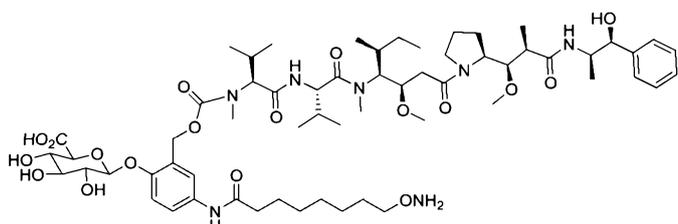
A14



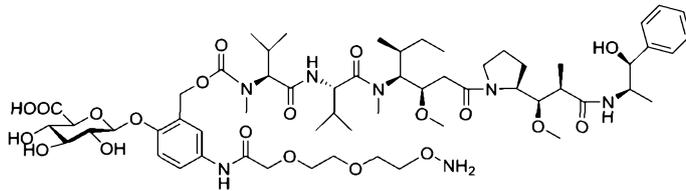
A15



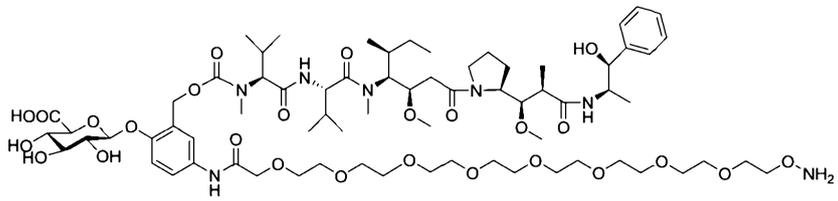
A16



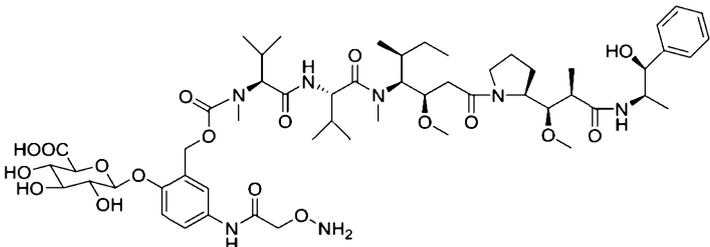
A17



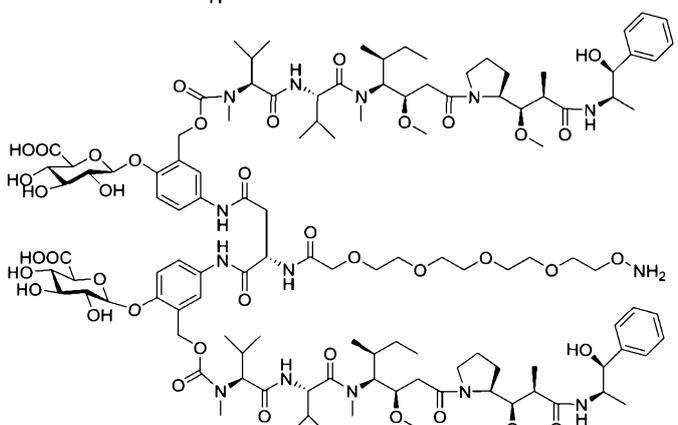
A18



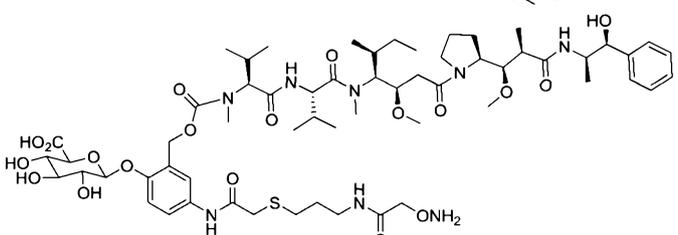
A19



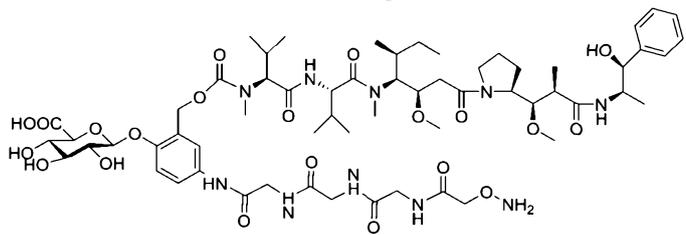
A20



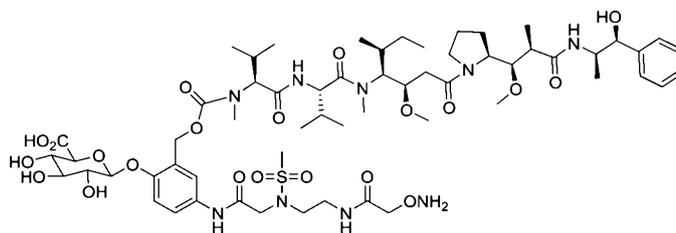
A21



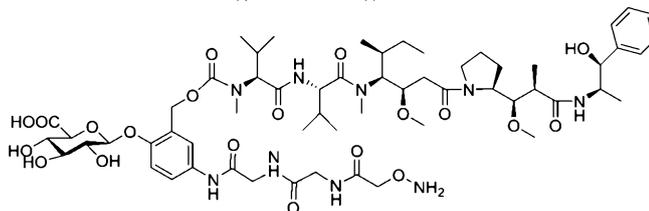
A22



A23



A24



【第11項】 如申請專利範圍第 1 至 4 項及第 7 至 9 項的任一項所述之抗體藥物複合體，其中一藥物抗體比(Drug-to-Antibody Ratio, DAR)為 3 以上。

【第12項】 如申請專利範圍第 1 至 2 項及第 5 至 9 項的任一項所述之抗體藥物複合體，其中一藥物抗體比為介於 1.5 至 2.0 之間。

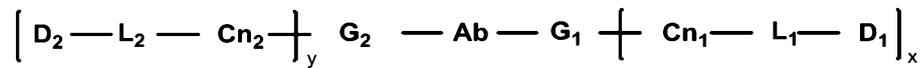
【第13項】 一種用於治療癌症之組合物，其中該組合物包括如申請專利範圍第 1 至 12 項的任一項所述之抗體藥物複合體。

【第14項】 如申請專利範圍第 13 項所述之組合物，其中該癌症為腦癌、肺癌、乳癌、口腔癌、食道癌、胃癌、肝癌、膽管癌、胰臟癌、結腸癌、腎癌、胃癌、子宮頸癌、卵巢癌或前列腺癌。

【第15項】 如申請專利範圍第 14 項所述之組合物，其中該癌症為乳癌或胃癌。

【發明申請專利範圍】

【第1項】一種抗體藥物複合體(antibody-drug conjugate, ADC)，其包含如式(I)所示之結構或其藥學上可接受之鹽類：



式(I)

其中，

Ab為一不具醣基之抗體；

G₁及G₂各自是相同或不同之一醣單元；

C_{n1}及C_{n2}各自是相同或不同之一複合單元；

L₁和L₂各自是相同或不同之一直接鍵結或一連結單元；

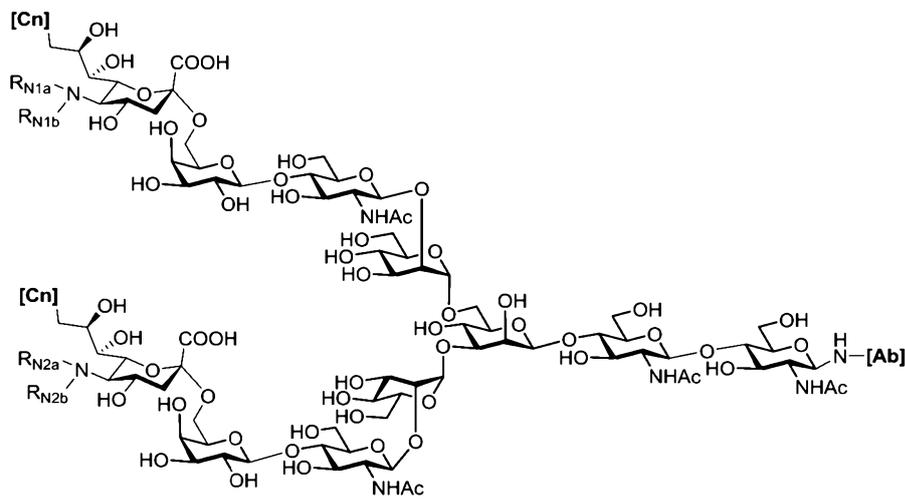
D₁及D₂各自是相同或不同之一藥物單元以及

在x + y ≠ 0的前提下，x和y係獨立為0至8之整數。

【第2項】如申請專利範圍第1項所述之抗體藥物複合體，其中該抗體結合至一標的，該標的係選自由：分化群 19 (Cluster of differentiation 19, CD19)、分化群 22 (CD22)、分化群 27 (CD27)、分化群 30 (CD30)、分化群 33 (CD33)、分化群 37 (CD37)、分化群 70 (CD70)、分化群 74 (CD74)、分化群 79b (CD79b)、分化群 138 (CD138)、分化群 142 (CD142)、碳酸酐酶 6(Carbonic anhydrase 6, CA6)、鈣黏素 (p-Cadherin)、癌胚抗原相關細胞黏附分子 5 (Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5, CEACAM5)、LY6/PLAUR 結構域蛋白 3(LY6/PLAUR Domain Containing 3, C4.4a)、Delta 樣配體 3 (Delta-like 3, DLL3)、上皮生長因子受器 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、上皮生長因子受器 VIII (epidermal growth factor receptor variant III, EGFRVIII)、外核苷酸焦磷酸酶/

磷酸二酯酶家族成員 3 (Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 3, ENPP3)、肝配蛋白 A 型受體 2 (ephrin type-A receptor 2, EphA2)、肝配蛋白 A(EphrinA)、葉酸受體蛋白 1(Folate Receptor 1, FLOR1)、纖維母細胞生長因子受體 2 (Fibroblast growth factor receptor, FGFR2)、鳥苷酸環化酶 C (Guanylate cyclase, GCC)、人類表皮生長因子受體 2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)、受體酪胺酸激酶(receptor tyrosine kinase, cKIT)、雌激素調節蛋白 1(Estrogen-Regulated Protein LIV1)、間皮素(Mesothelin, MSLN)、黏蛋白 16 (Mucin 16, MUC16)、鈉依賴性磷酸鹽轉運蛋白 2b (Sodium-dependent phosphate transport protein 2B, NaPi2b)、連接蛋白 4 (Nectin4)、跨膜醣蛋白神經介素蛋白 B (Transmembrane glycoprotein neuromedin B, gpNMB)、前列腺特異性膜抗原 (prostate specific membrane antigen, PSMA)、SLIT 及 NTRK 相似蛋白 6 (SLIT and NTRK-like protein 6, SLITRK6)、前列腺六跨膜上皮抗原 1 (six transmembrane epithelial antigen of the prostate, STEAP1)、滋養層細胞表面抗原 2 (trophoblast cell surface antigen, TROP2)、滋養層醣蛋白(Trophoblast glycoprotein, 5T4)、階段特異性胚胎抗原 4(stage-specific embryonic antigen 4, SSEA4)、Globohexaosylceramide, GloboH)、五分子前趨醣脂質(Gb5)、(Sialyl-Tn, STn) 及 Tn 所組成之群組。

【第3項】 如申請專利範圍第 2 項所述之抗體藥物複合體，其中該醣單元具有如式(II-1a)所示之結構：



式(II-1a)

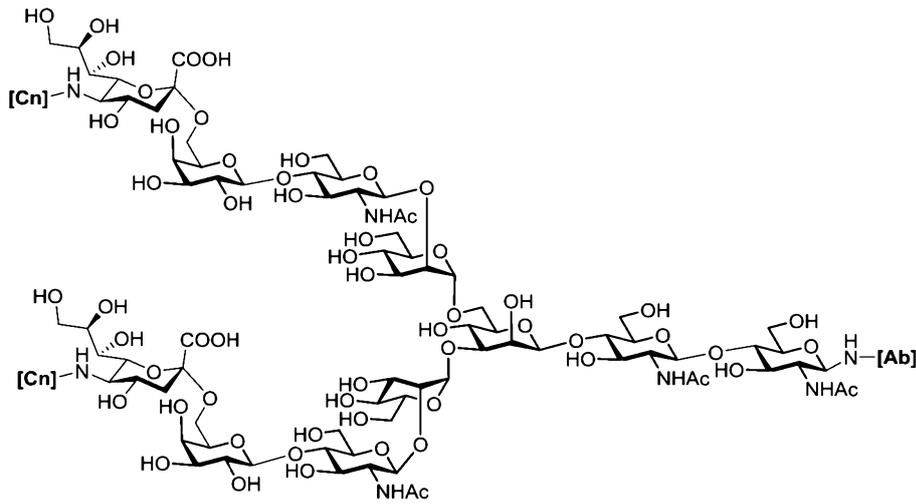
其中，

R_{N1a} 、 R_{N1b} 、 R_{N2a} 、及 R_{N2b} 係獨立選自由氫、選擇性被取代之 C1-C6 烷基、選擇性被取代之 C1-C6 醯基、及氮保護基團所組成之群組；其中氮保護基可包含異丁基氧基羰基 (isotertbutyloxycarboxy group, t-BOC)、9-芴基甲氧基羰基 (9-fluorenylmethoxycarbonyl group, Fmoc)、苄基 (benzyl group, Bn)、苄氧羰基 (benzyloxycarbonyl group, Cbz)、烯丙氧羰基 (allyloxycarbonyl group, Alloc)、2-(三甲基甲矽烷基) 乙氧基羰基 (2-(trimethylsilyl)ethoxycarbonyl group, Teoc)、2,2,2-三氯乙氧羰基 (2,2,2-trichloroethoxycarbonyl, Troc)、二苯甲基 (diphenylmethyl group, Dpm)、三苯甲基 (trityl group, Tr)、9-苯芴基 (9-phenylfluorenyl group, PhFI)、及對甲氧基苄基 (p-methoxybenzyl group, PMB)；

[Ab] 表示該抗體的接點；以及

[Cn] 表示該複合單元的接點。

【第4項】 如申請專利範圍第 2 項所述之抗體藥物複合體，其中該醣單元具有如式(II-1b)所示之結構：



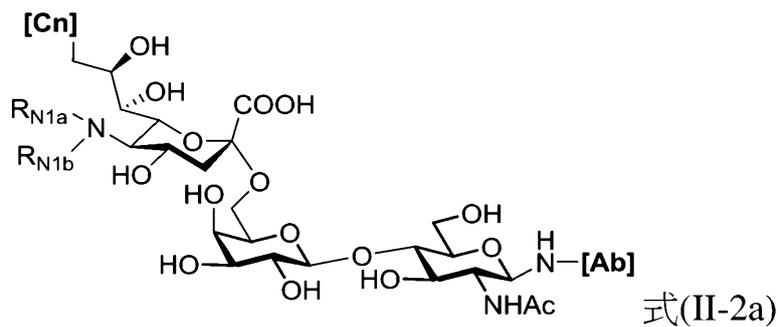
式(II-1b) ,

其中

[Ab] 表示該抗體的接點；以及

[Cn] 表示該複合單元的接點。

【第5項】如申請專利範圍第 2 項所述之抗體藥物複合體，其中該醣單元具有如式(II-2a)所示之結構：



式(II-2a)

其中，

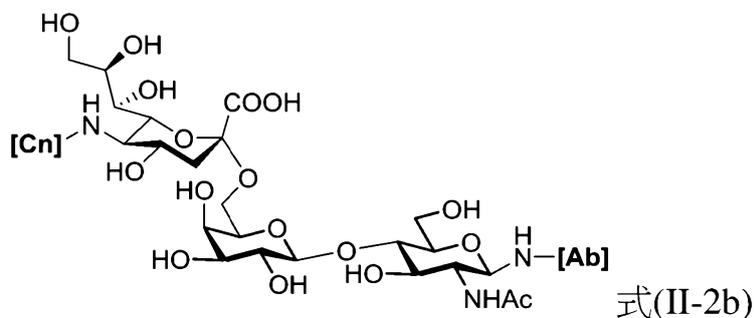
R_{N1a} 、 R_{N1b} 、 R_{N2a} 、及 R_{N2b} 係獨立選自由氫、選擇性被取代之 C1-C6 烷基、選擇性被取代之 C1-C6 醯基、及氮保護基團所組成之群組；其中氮保護基可包含異丁基氧基羰基(isotertbutyloxycarboxy group, t-BOC)、9-芴基甲氧基羰基(9-fluorenylmethoxycarbonyl group, Fmoc)、苄基(benzyl group, Bn)、苄氧羰基

(benzyloxycarbonyl group, Cbz)、烯丙氧羰基(allyloxycarbonyl group, Alloc)、2-(三甲基甲矽烷基)乙氧基羰基(2-(trimethylsilyl)ethoxycarbonyl group, Teoc)、2,2,2-三氯乙氧羰基(2,2,2-trichloroethoxycarbonyl, Troc)、二苯甲基(diphenylmethyl group, Dpm)、三苯甲基(trityl group, Tr)、9-苯芴基(9-phenylfluorenyl group, PhFI)、及對甲氧基苄基(p-methoxybenzyl group, PMB)；

[Ab] 表示該抗體的接點；以及

[Cn] 表示該複合單元的接點。

【第6項】如申請專利範圍第2項所述之抗體藥物複合體，其中該醣單元具有如式(II-2b)所示之結構：

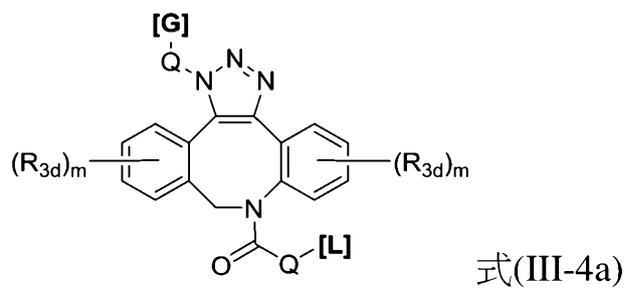
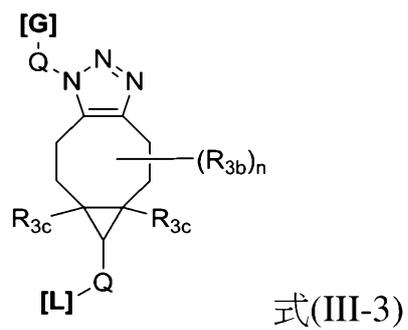
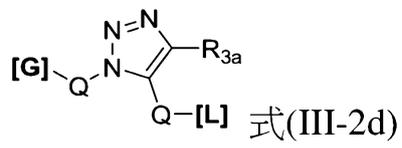
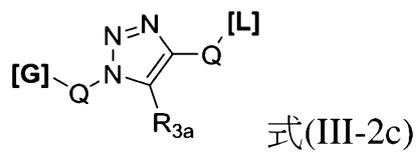
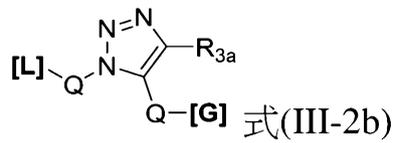
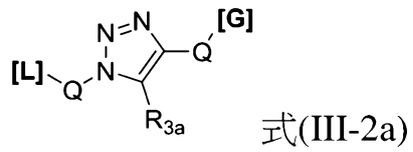
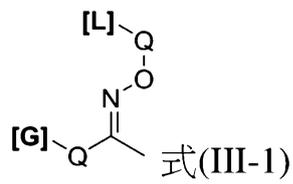


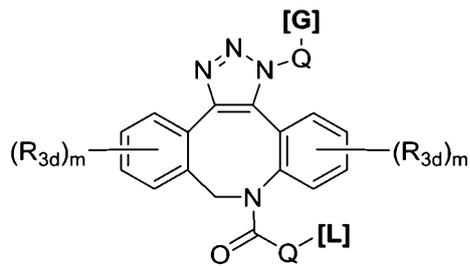
其中，

[Ab] 表示該抗體的接點；以及

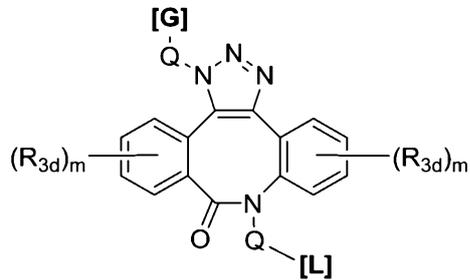
[Cn] 表示該複合單元的接點。

【第7項】如申請專利範圍第1項所述之抗體藥物複合體，其中該複合單元係選自由：式(III-1)、式(III-2a)、式(III-2b)、式(III-2c)、式(III-2d)、式(III-3)、式(III-4a)、式(III-4b)、式(III-4c)、及式(III-4d)之結構所組成之群組；

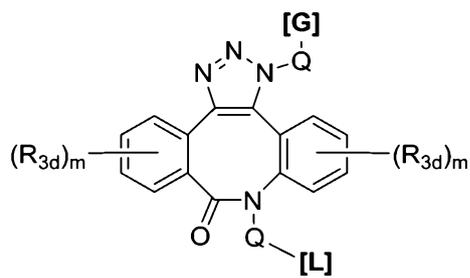




式(III-4b)



式(III-4c)



式(III-4d)

其中，

Q 係 Y1+Y2 連接基團(spacer group)，其中 Y1 和 Y2 係獨立選自由：直接鍵結、 $-(CH_2)_n-$ 、 $-O-$ 、 $-NH-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-(CH_2)_nO-$ 、 $-O(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_n-C(O)-$ 、 $-C(O)(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_n-NH-$ 、 $-NH-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_n-NHC(O)-$ 、 $-C(O)(CH_2)_n-NHC(O)-$ 、 $(CH_2)_nSCH_2C(O)-$ 、及 $-(CH_2CH_2O)_m-$ 所組成之群組；

R_{3a} 係選自由：氫、鹵素、C1-C6 烷基所組成之群組；

R_{3b} 係獨立選自由：氫、鹵素、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、選擇性被取代之 C1-C6 烷基、選擇性被取代之 C1-C6 烷氧基、選擇性被取代之 C1-C24 環烷基、選擇性被取代

之 C6-C24 芳基、選擇性被取代之 C7-C24 芳烷基、選擇性被取代之 C4-C24 雜芳基、及選擇性被取代之 C5-C24 雜芳烷基所組成之群組；

R_{3c} 係獨立選自由：氫、鹵素、選擇性被取代之 C1-C6 烷基、選擇性被取代之 C6-C24 芳基、選擇性被取代之 C7-C24 芳烷基、選擇性被取代之 C4-C24 雜芳基、及選擇性被取代之 C5-C24 雜芳烷基所組成之群組；

R_{3d} 係獨立選自由：氫、鹵素、OH、-NO₂、-CN、選擇性被取代之 C1-C6 烷基、選擇性被取代之 C1-C6 烷氧基所組成之群組；

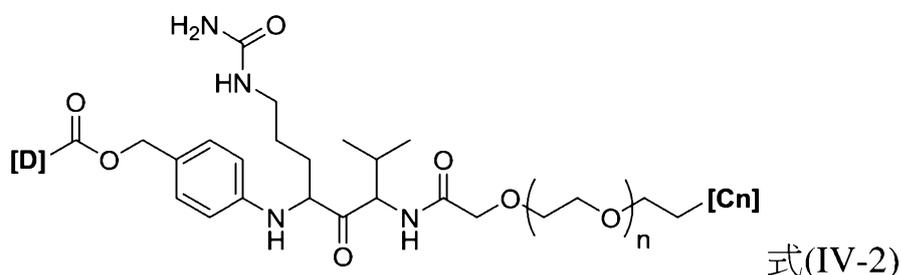
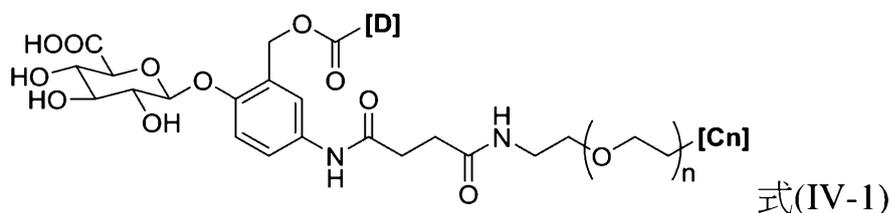
n 為 1 至 8 的整數，亦包括 1 及 8；

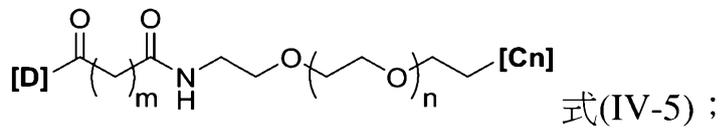
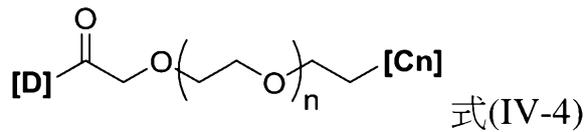
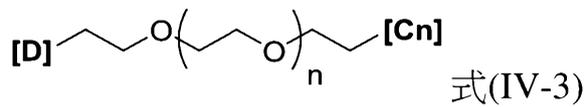
m 為 1 至 4 的整數，亦包括 1 及 4；

[G] 表示該醣單元的接點；以及

[L] 表示該連結單元的接點。

【第8項】如申請專利範圍第 1 項所述之抗體藥物複合體，其中該連結單元係選自由：式(IV-1)、式(IV-2)、式(IV-3)、式(IV-4)、及式(IV-5)之結構所組成之群組；





其中，

[Cn] 表示該複合單元的接點；以及

[D] 表示該藥物單元的接點；

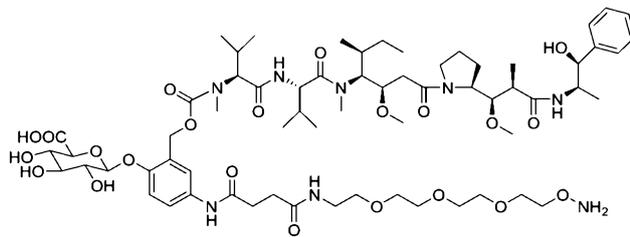
並且 m 和 n 各自為 0 至 6 的整數，亦包括 0 及 6。

【第9項】如申請專利範圍第 1 項所述之抗體藥物複合體，其中該藥物單元係選自由：單甲基澳瑞他汀 E (Monomethyl auristatin E, MMAE)、單甲基澳瑞他汀 F (Monomethyl auristatin F, MMAF)、單甲基澳瑞他汀 D (Monomethyl auristatin D, MMAD)、美登素 DM1/DM4 (Mertansine, Maytansinoid DM1/DM4)、紫杉醇 (Paclitaxel)、多西他賽 (Docetaxel)、埃博黴素 B (Epothilone B)、埃博黴素 A (Epothilone A)、CYT997、澳瑞他汀酪胺磷酸鹽 (Auristatin tyramine phosphate)、澳瑞他汀氨基喹啉 (Auristatin aminoquinoline)、Halocombstatins、刺孢霉素 θ (Calicheamicin theta)、7-乙基-10-羥基-喜樹鹼 (SN-38) (7-Ethyl-10-hydroxy-camptothecin (SN-38))、吡咯苯並二氮雜卓 (Pyrrolobenzodiazepine, PBD)、水鬼蕉鹼 (Pancratistatin)、環磷酸酯

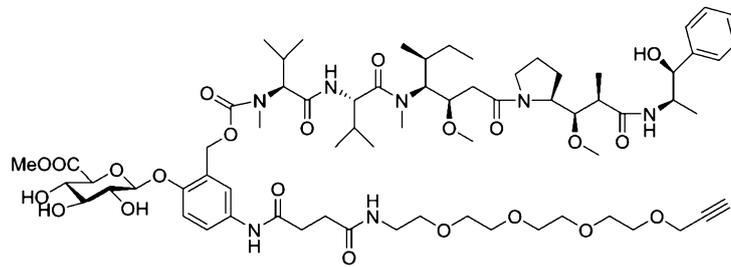
(Cyclophosphate)、Cribrostatin-6、Kitastatin、渦輪他汀 1-4 (Turbostatin 1-4)、海洛因他汀(Halocombstatins)、及 Silstatins 所組成之群組。

【第10項】 如申請專利範圍第 1 項所述之抗體藥物複合體，其中該抗體藥物複合體係利用一化合物所合成，該化合物係選自由下列 A01 至 A24 所組成之群組：

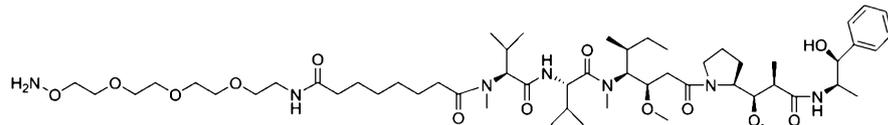
A01



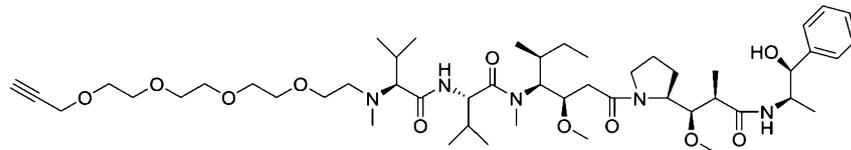
A02



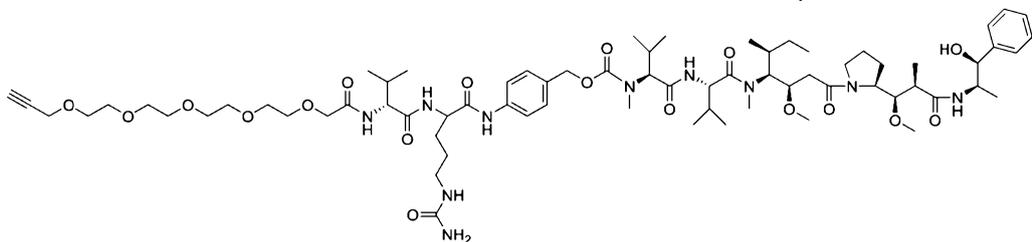
A03



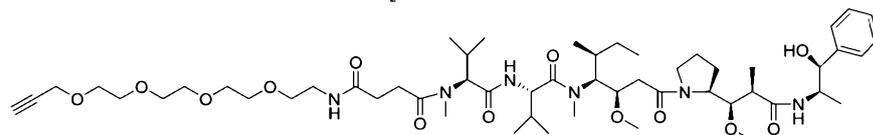
A04



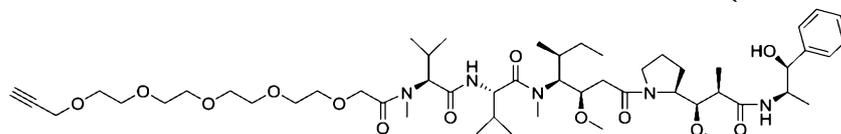
A05



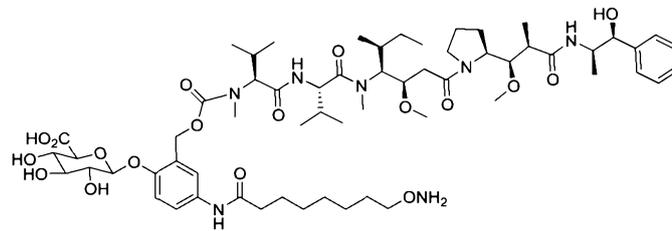
A06



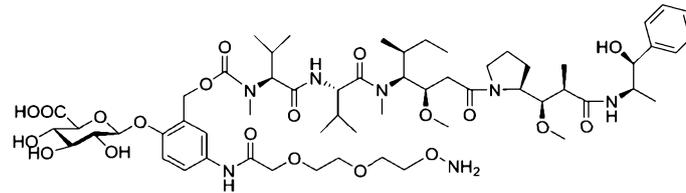
A07



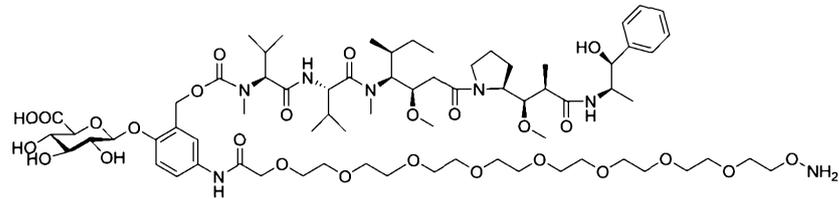
A16



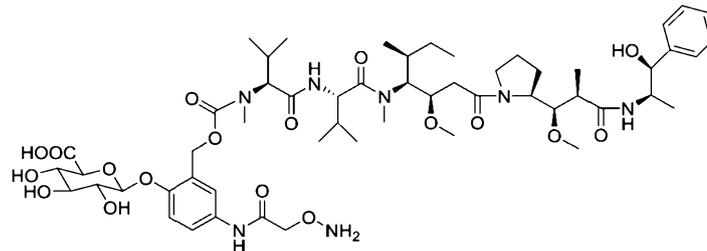
A17



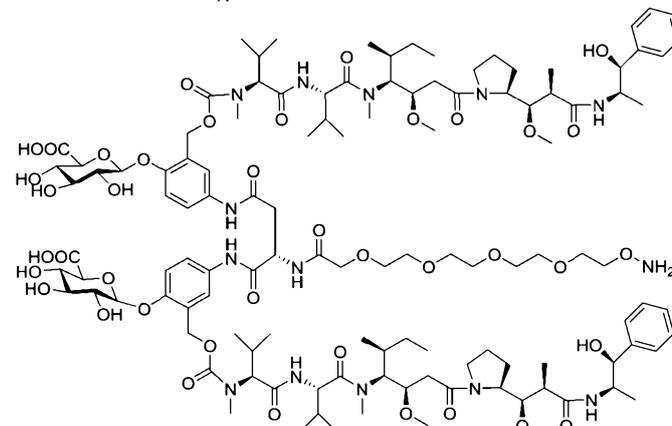
A18



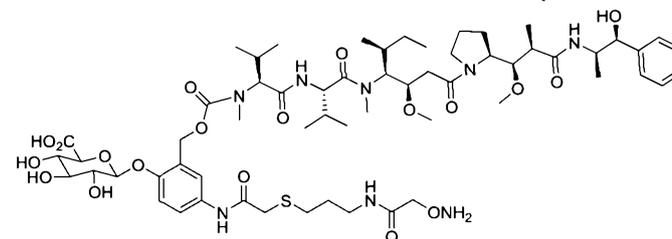
A19



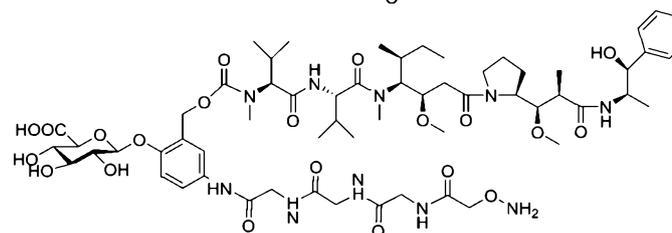
A20



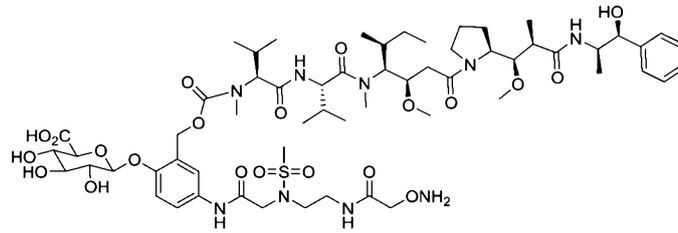
A21



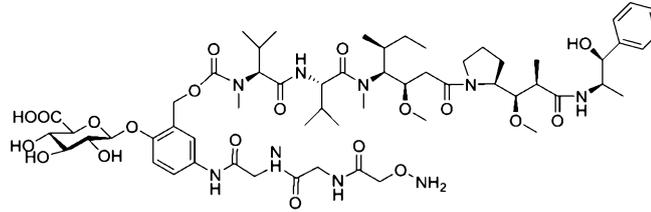
A22



A23



A24



【第11項】 如申請專利範圍第 1 至 4 項及第 7 至 9 項的任一項所述之抗體藥物複合體，其中一藥物抗體比(Drug-to-Antibody Ratio, DAR)為 3 以上。

【第12項】 如申請專利範圍第 1 至 2 項及第 5 至 9 項的任一項所述之抗體藥物複合體，其中一藥物抗體比為介於 1.5 至 2.0 之間。

【第13項】 一種如申請專利範圍第 1 至 12 項的任一項所述之抗體藥物複合體用於製備藥物之用途，其中該藥物用以治療一癌症。

【第14項】 如申請專利範圍第 13 項所述之用途，其中該癌症為腦癌、肺癌、乳癌、口腔癌、食道癌、胃癌、肝癌、膽管癌、胰臟癌、結腸癌、腎癌、胃癌、子宮頸癌、卵巢癌或前列腺癌。

【第15項】 如申請專利範圍第 14 項所述之用途，其中該癌症為乳癌或胃癌。