201713364

(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 201713364 A

(43)公開日： 中華民國 106 (2017) 年 04 月 16 日

(21)申請案號：105119610 (22)申請日： 中華民國 105 (2016) 年 06 月 22 日

(51)Int. Cl.： *A61K47/48 (2006.01)* *A61K39/395 (2006.01)*
A61K31/40 (2006.01)

(30)優先權：2015/06/23 歐洲專利局 15173484.5

(71)申請人：拜耳製藥公司 (德國) BAYER PHARMA AKTIENGESELLSCHAFT (DE)
德國

(72)發明人：勒奇 漢斯 喬治 LERCHEN, HANS-GEORG (DE)；賀伯史塔克 安 索菲 REBSTOCK, ANNE-SOPHIE (FR)；坎丘 葛蘭德 尤蘭達 CANCHO GRANDE, YOLANDA (ES)；維特洛克 史凡 WITTROCK, SVEN (DE)；葛瑞特仁 伍維 GRITZAN, UWE (DE)；帕茲 佩卓 PAZ, PEDRO (US)；費雪 梅蘭妮 FISCHER, MELANIE (DE)；法蘭茲 居爾根 FRANZ, JUERGEN (DE)；葛盧科 朱利安瑪琍爾斯 (DE)；馬爾須 史帝芬 (DE)；史德爾得 露得維格 比特斯 STELTE-LUDWIG, BEATRIX (DE)；瑪樂爾特 克里斯多夫 MAHLERT, CHRISTOPH (DE)；韋伯 恩斯特 WEBER, ERNST (DE)；格瑞文 西門 GREVEN, SIMONE (DE)；本恩特 珊卓 BERNDT, SANDRA (DE)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：34 項 圖式數：2 共 529 頁

(54)名稱

ＫＳＰ抑制劑與抗-Ｂ７Ｈ３抗體之抗體藥物結合物（ＡＤＣｓ）

ANTIBODY DRUG CONJUGATES (ADCS) OF KSP INHIBITORS WITH ANTI-B7H3 ANTIBODIES

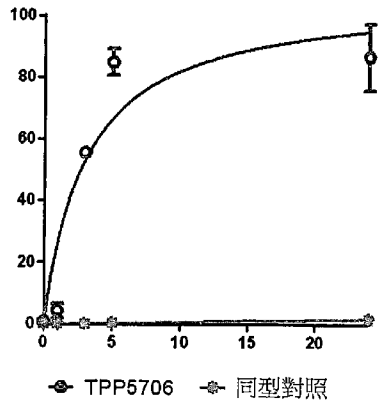
(57)摘要

本發明係關於新穎結合劑藥物結合物(ADC)、此等 ADC 之活性代謝物、用於製備此等 ADC 之方法、此等 ADC 用於治療及/或預防疾病之用途以及此等 ADC 用於製備供治療及/或預防疾病、尤其過度增生性病症及/或血管生成病症(諸如癌症疾病)之藥劑的用途。此類治療可作為單一療法或與其他藥劑或其他治療措施組合實施。

The present application relates to novel binder drug conjugates (ADCs), to active metabolites of these ADCs, to processes for preparing these ADCs, to the use of these ADCs for the treatment and/or prophylaxis of diseases and to the use of these ADCs for preparing medicaments for treatment and/or prophylaxis of diseases, in particular hyperproliferative and/or angiogenic disorders such as, for example, cancer diseases. Such treatments can be effected as monotherapy or else in combination with other medicaments or further therapeutic measures.

指定代表圖：

人類腎癌細胞株A498中特異性B7H3抗體(TPP5706)之內化行為

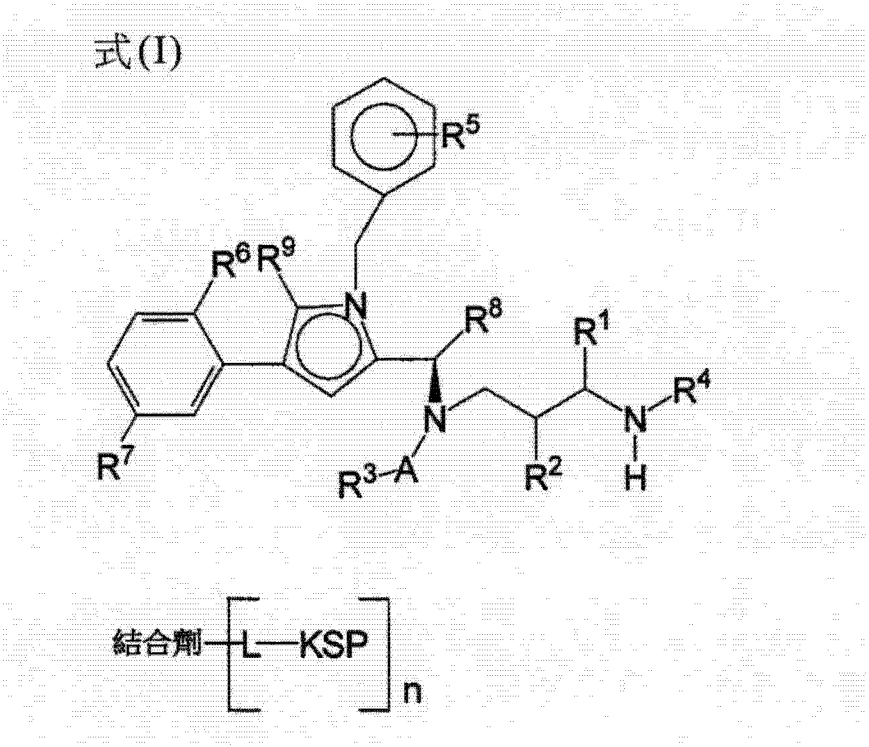


展示24小時內螢光標記之B7H3抗體之內化的動力學進展。為偵測非標靶依賴性內化，平行使用螢光標記之同型對照。詳細實驗條件描述於C-2b下(x軸：時間，以小時為單位；y軸：每個細胞之顆粒數目)。

圖1

特徵化學式：

式(I)



201713364 發明摘要

※ 申請案號：105119610

※ 申請日：105.6.22

※IPC 分類：A61K 47/48 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 31/40 (2006.01)

【發明名稱】

KSP抑制劑與抗-B7H3抗體之抗體藥物結合物(ADCs)

ANTIBODY DRUG CONJUGATES (ADCs) OF KSP INHIBITORS WITH ANTI-B7H3 ANTIBODIES

【中文】

本發明係關於新穎結合劑藥物結合物(ADC)、此等ADC之活性代謝物、用於製備此等ADC之方法、此等ADC用於治療及/或預防疾病之用途以及此等ADC用於製備供治療及/或預防疾病、尤其過度增生性病症及/或血管生成病症(諸如癌症疾病)之藥劑的用途。此類治療可作為單一療法或與其他藥劑或其他治療措施組合實施。

【英文】

The present application relates to novel binder drug conjugates (ADCs), to active metabolites of these ADCs, to processes for preparing these ADCs, to the use of these ADCs for the treatment and/or prophylaxis of diseases and to the use of these ADCs for preparing medicaments for treatment and/or prophylaxis of diseases, in particular hyperproliferative and/or angiogenic disorders such as, for example, cancer diseases. Such treatments can be effected as monotherapy or else in combination with other medicaments or further therapeutic measures.

【代表圖】

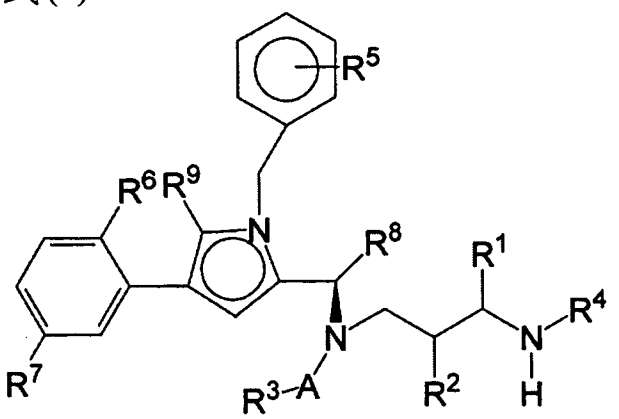
【本案指定代表圖】：第（1）圖。

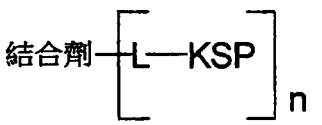
【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

式(I)





發明專利說明書

（本說明書格式、順序，請勿任意更動）

【發明名稱】

KSP抑制劑與抗-B7H3抗體之抗體藥物結合物(ADCs)

ANTIBODY DRUG CONJUGATES (ADCs) OF KSP INHIBITORS WITH ANTI-B7H3 ANTIBODIES

【技術領域】

本發明係關於驅動蛋白紡錘體蛋白抑制劑之結合劑藥物結合物(ADC)、此等ADC之活性代謝物、用於製備此等ADC之方法、此等ADC用於治療及/或預防疾病之用途以及此等ADC用於製備供治療及/或預防疾病、尤其過度增生性病症及/或血管生成病症(諸如癌症疾病)之藥劑的用途。此類治療可作為單一療法或與其他藥劑或其他治療措施組合實施。

【先前技術】

癌症為大部分多樣化組織之細胞生長不可控的結果。在許多情況下，新細胞滲透至現有組織中(侵入性生長)，或其轉移至遠端器官中。癌症出現於多種不同器官中且往往具有組織特異性過程。因此，術語「癌症」作為通用術語係描述不同器官、組織及細胞類型之一大類經定義之疾病。

處於早期階段之一些腫瘤可藉由手術及放射治療措施移除。轉移之腫瘤通常僅可藉由化學治療劑進行姑息治療。本文旨在達成改善生活品質與延長壽命之最佳組合。

結合蛋白與一或多個活性化合物分子之結合物為已知，尤其呈抗體藥物結合物(ADC)形式，其中針對腫瘤相關抗原之內化抗體經由連接子共價連接至細胞毒性劑。ADC引入腫瘤細胞中且結合物隨後解

離之後，細胞毒性劑本身或由其形成之細胞毒性代謝物釋放於腫瘤細胞內且可在其中直接且選擇性地發揮其作用。與習知化學療法相比，以此方式將對正常組織之損傷侷限於明顯縮窄之界限內[參見例如J. M. Lambert, *Curr. Opin. Pharmacol.* **5**, 543-549 (2005)；A. M. Wu及P. D. Senter, *Nat. Biotechnol.* **23**, 1137-1146 (2005)；P. D. Senter, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **13**, 235-244 (2009)；L. Ducry及B. Stump, *Bioconjugate Chem.* **21**, 5-13 (2010)]。因此，WO2012/171020描述其中複數個發毒團分子經由聚合物連接子連接至抗體之ADC。作為可能之發毒團，WO2012/171020尤其提及物質SB 743921、SB 715992 (伊斯平斯(Ispinesib))、MK-0371、AZD8477、AZ3146及ARRY-520。

最近提及之物質為驅動蛋白紡錘體蛋白抑制劑。驅動蛋白紡錘體蛋白(KSP，亦稱為Eg5、HsEg5、KNSL1或KIF11)為驅動蛋白樣馬達蛋白，其對於雙極性有絲分裂紡錘體發揮作用而言為至關重要的。KSP之抑制導致有絲分裂阻滯且經相對較長之時期導致細胞凋亡(Tao等人, Cancer Cell 2005年7月8日(1), 39-59)。在發現第一種細胞滲透性KSP抑制劑蒙納曲醇(monastrol)之後，KSP抑制劑本身已確立為一類新穎化學治療劑(Mayer等人, Science 286: 971-974, 1999)且已成為許多專利申請案(例如WO2006/044825；WO2006/002236；WO2005/051922；WO2006/060737；WO03/060064；WO03/040979；及WO03/049527)之主題。然而，由於KSP僅在有絲分裂階段期間之相對較短時段內發揮其作用，所以KSP抑制劑在此階段期間須以足夠高之濃度存在。WO2014/151030揭示包括某些KSP抑制劑之ADC。

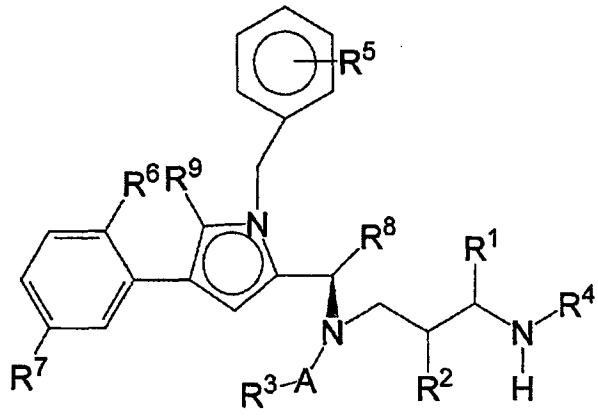
【發明內容】

根據此背景，本發明之一目標為提供在以相對較低濃度投與之後發揮細胞凋亡作用且因此可具有癌症治療益處之物質。

為達成此目標，本發明提供糖基化或去糖基化之抗-B7H3抗體與

以下式(I)化合物之結合物，其中一或多個式(I)化合物經由連接子L連接至抗體。在此情況下，去糖基化之抗體在Fc區之CH2結構域中之保守N-結合位點不具有任何聚糖且因此不結合於NK細胞。因此，去糖基化之抗體不支持NK細胞介導之細胞毒性。抗體較佳為人類、人類化或嵌合單株抗體。尤其較佳為一種抗-B7H3抗體，其特異性結合B7H3之人類Ig4及/或人類及/或鼠類Ig2同功異型物，尤其抗-B7H3抗體TPP-5706及其人類化變異體。

式(I)：



(I)

其中

R^1表示H、-L-#1、-MOD或$-(CH_2)_{0-3}Z$，其中Z表示-H、$-NHY^3$、$-OY^3$、$-SY^3$、鹵素、$-CO-NY^1Y^2$或$-CO-OY^3$，

其中Y^1及Y^2彼此獨立地表示H、NH_2、$-(CH_2CH_2O)_{0-3}-(CH_2)_{0-3}Z'$(例如$-(CH_2)_{0-3}Z'$)或$-CH(CH_2W)Z'$，且$Y^3$表示H或$-(CH_2)_{0-3}Z'$，其中Z'表示H、$NH_2$、$SO_3H$、COOH、$-NH-CO-CH_2-CH_2-CH(NH_2)COOH$或$-(CO-NH-CHY^4)_{1-3}COOH$，其中W表示H或OH，

其中Y^4表示視情況經$-NHCONH_2$取代之直鏈或分支鏈C_{1-6}烷基，或表示視情況經$-NH_2$取代之芳基或苯甲基；

R^2表示H、-MOD、$-CO-CHY^4-NHY^5$或$-(CH_2)_{0-3}Z$，

其中Z表示-H、鹵素、$-OY^3$、$-SY^3$、NHY^3、$-CO-NY^1Y^2$或$-CO-OY^3$，

其中Y^1及Y^2彼此獨立地表示H、NH_2或$-(CH_2)_{0-3}Z'$，且Y^3表示H或$-(CH_2)_{0-3}Z'$，其中Z'表示H、SO_3H、NH_2或COOH；

其中Y^4表示視情況經$-NHCONH_2$取代之直鏈或分支鏈C_{1-6}烷基，或表示視情況經$-NH_2$取代之芳基或苯甲基，且Y^5表示H或$-CO-CHY^6-NH_2$，其中Y^6表示直鏈或分支鏈C_{1-6}烷基；

R^4表示H、-L-#1、$-SG_{lys}-(CO)_{0-1}-R^{4'}$、$-CO-CHY^4-NHY^5$或$-(CH_2)_{0-3}Z$，

其中SG_{lys}為溶酶體酶可裂解之基團，尤其由二肽或三肽組成之群，$R^{4'}$為C_{1-10}烷基、C_{5-10}芳基或C_{6-10}芳烷基、C_{5-10}雜烷基、C_{1-10}烷基-O-C_{6-10}芳基、C_{5-10}雜環烷基、雜芳基、雜芳基烷基、雜芳基烷氧基、C_{1-10}烷氧基、C_{6-10}芳氧基或C_{6-10}芳烷氧基、C_{5-10}雜芳烷氧基、C_{1-10}烷基-O-C_{6-10}芳氧基、C_{5-10}雜環烷氧基，其可經以下基團取代一次或超過一次：$-NH_2$、-NH-烷基、$-N(烷基)_2$、NH-CO-烷基、N(烷基)-CO烷基、$-SO_3H$、$-SO_2NH_2$、$-SO_2-N(烷基)_2$、-COOH、$-CONH_2$、$-CON(烷基)_2$或-OH、-H或基團$-O_x-(CH_2CH_2O)_v-R^{4''}$ (其中x為0或1且v為數值1至10，且$R^{4''}$為-H、-烷基(較佳C_{1-12}烷基)、$-CH_2-COOH$、$-CH_2-CH_2-COOH$或$-CH_2-CH_2-NH_2$)，其中在裂解後存在一級胺基(對應於R^4 = H)；

其中Z表示-H、鹵素、$-OY^3$、$-SY^3$、NHY^3、$-CO-NY^1Y^2$或$-CO-OY^3$，

其中Y^1及Y^2彼此獨立地表示H、NH_2或$-(CH_2)_{0-3}Z'$，且Y^3表示H或$-(CH_2)_{0-3}Z'$，其中Z'表示H、SO_3H、NH_2或COOH；

其中Y^4表示視情況經$-NHCONH_2$取代之直鏈或分支鏈C_{1-6}烷基，或表示視情況經$-NH_2$取代之芳基或苯甲基，且Y^5表示H或$-CO-CHY^6-NH_2$，其中Y^6表示直鏈或分支鏈C_{1-6}烷基；

或R^2及R^4一起(形成吡咯啶環)表示$-CH_2-CHR^{11}-$或$-CHR^{11}-CH_2-$，其中R^{11}表示H、NH_2、SO_3H、COOH、SH、鹵素(尤其F或Cl)、C_{1-4}烷

基、C_{1-4}鹵烷基、C_{1-4}烷氧基、經羥基取代之C_{1-4}烷基、$COO(C_{1-4}$烷基)或OH；

A表示CO、SO、SO_2、SO_2NH或$CNNH_2$；

R^3表示-L-#1、-MOD或視情況經取代之烷基、環烷基、芳基、雜芳基、雜烷基、雜環烷基，較佳-L-#1或可視情況經以下取代之C_{1-10}烷基、C_{6-10}芳基或C_{6-10}芳烷基、C_{5-10}雜烷基、C_{1-10}烷基-O-C_{6-10}芳基或C_{5-10}雜環烷基：1-3個-OH基團、1-3個鹵素原子、1-3個鹵化烷基(各具有1-3個鹵素原子)、1-3個O-烷基、1-3個-SH基團、1-3個-S-烷基、1-3個-O-CO-烷基、1-3個-O-CO-NH-烷基、1-3個-NH-CO-烷基、1-3個-NH-CO-NH-烷基、1-3個-$S(O)_n$-烷基、1-3個-SO_2-NH-烷基、1-3個-NH-烷基、1-3個-N(烷基)$_2$基團、1-3個-NH_2基團或1-3個-$(CH_2)_{0-3}Z$基團，n表示0、1或2，其中Z表示-H、鹵素、-OY^3、-SY^3、-NHY^3、-CO-NY^1Y^2或-CO-OY^3，其中Y^1及Y^2彼此獨立地表示H、NH_2或-$(CH_2)_{0-3}Z'$，且Y^3表示H、-$(CH_2)_{0-3}$-$CH(NHCOCH_3)Z'$、-$(CH_2)_{0-3}$-$CH(NH_2)Z'$或-$(CH_2)_{0-3}Z'$，其中Z'表示H、SO_3H、NH_2或COOH

(其中「烷基」較佳表示C_{1-10}烷基)；

R^5表示H、NH_2、NO_2、鹵素(尤其F、Cl、Br)、-CN、CF_3、-OCF_3、-CH_2F、-CH_2F、SH或-$(CH_2)_{0-3}Z$，其中Z表示-H、-OY^3、-SY^3、鹵素、NHY^3、-CO-NY^1Y^2或-CO-OY^3，

其中Y^1及Y^2彼此獨立地表示H、NH_2或-$(CH_2)_{0-3}Z'$，且Y^3表示H或-$(CH_2)_{0-3}Z'$，其中Z'表示H、SO_3H、NH_2或COOH；

R^6及R^7彼此獨立地表示H、氰基、(視情況氟化) C_{1-10}烷基、(視情況氟化) C_{2-10}烯基、(視情況氟化) C_{2-10}炔基、羥基、NO_2、NH_2、COOH或鹵素(尤其F、Cl、Br)，

R^8表示(視情況氟化) C_{1-10}烷基、(視情況氟化) C_{2-10}烯基、(視情況氟化) C_{2-10}炔基、(視情況氟化) C_{4-10}環烷基或-$(CH_2)_{0-2}$-(HZ^2)，其中

HZ^2表示具有至多兩個選自由N、O及S組成之群的雜原子之4至7員雜環，其中此等基團中之每一者可經-OH、CO_2H或NH_2取代；

R^9表示H、F、CH_3、CF_3、CH_2F或CHF_2；

其中取代基R^1、R^3或R^4之一表示或(在R^8情況下)含有-L-#1，

L表示連接子且#1表示鍵結於結合劑或其衍生物之鍵，

其中-MOD表示-$(NR^{10})_n$-$(G1)_o$-G2-G3，其中

R^{10}表示H或C_1-C_3烷基；

G1表示-NHCO-或-CONH- (其中若G1表示-NHCO-，則R^{10}不表示NH_2)；

n表示0或1；

o表示0或1；且

G2表示具有1至10個碳原子且可間雜以下基團中之一或多者一次或超過一次之直鏈及/或分支鏈烴基：-O-、-S-、-SO-、SO_2、-NRy-、-NRyCO-、CONRy-、-NRyNRy-、-SO_2NRyNRy-、-CONRyNRy- (其中R^y表示H、苯基、C_1-C_{10}烷基、C_2-C_{10}烯基或C_2-C_{10}炔基，各可視情況經以下取代：$NHCONH_2$、-COOH、-OH、-NH_2、NH-$CNNH_2$、磺醯胺、碸、亞碸或磺酸)、-CO-或-CR^x=N-O- (其中Rx表示H、C_1-C_3烷基或苯基)，其中包括任何側鏈(若存在)之烴鏈可經-$NHCONH_2$、-COOH、-OH、-NH_2、NH-$CNNH_2$、磺醯胺、碸、亞碸或磺酸取代，G3表示-H或-COOH，且其中基團-MOD較佳具有至少一個基團-COOH；

及其鹽、溶劑合物、溶劑合物之鹽及差向異構體。

根據本發明之結合物可具有化學不穩定連接子、酶促不穩定連接子或穩定連接子。尤其較佳為穩定連接子及可藉由蛋白酶裂解之連接子。

本發明另外提供製備本發明之結合物的方法，以及製備所用之

前驅物及中間物。

本發明之結合物的製備通常包含以下步驟：

製備連接子前驅物，其視情況帶有保護基且具有能夠與抗體偶合之反應基；

使連接子前驅物與視情況帶有保護基之式(I)(其中在此等式中，尚無鍵結於連接子之鍵)之KSP抑制劑衍生物結合，得到視情況帶有保護基之反應性KSP抑制劑/連接子結合物；

移除存在於KSP抑制劑/連接子結合物中之任何保護基，及

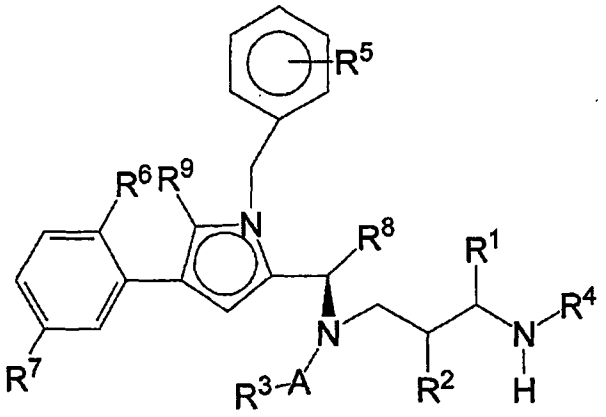
使抗體與KSP抑制劑/連接子結合物結合，得到本發明之抗體/KSP抑制劑結合物。

反應基之連接亦可在視情況經保護之KSP抑制劑/連接子前驅物結合物構築之後進行。

視連接子而定，丁二醯亞胺連接之ADC可在結合之後，根據流程26轉化成開鏈之丁二醯胺，其具有有利的穩定性型態。

如上文所說明，連接子前驅物與低分子量KSP抑制劑之結合可藉由式(I)中之R^1、R^3或R^4之氫原子經連接子取代來達成。在結合之前的合成步驟中，所存在之任何官能基亦可呈經保護之形式存在。在結合步驟之前，藉由已知之肽化學方法移除此等保護基。結合在化學上可藉由不同途徑發生，如實例中之流程20至31以例示性方式所示。詳言之，例如藉由引入保護基或離去基以促進取代，視情況可修飾供與連接子結合之低分子量KSP抑制劑。

詳言之，本發明提供結合於抗-B7H3抗體之新穎低分子量KSP抑制劑。此等KSP抑制劑或其抗體結合物具有以下通式(II)：



(II)

其中

R^1表示H、-L-結合劑、-MOD或$-(CH_2)_{0-3}Z$，其中Z表示-H、$-NHY^3$、$-OY^3$、$-SY^3$、鹵素、$-CO-NY^1Y^2$或$-CO-OY^3$，

其中

Y^1及Y^2彼此獨立地表示H、NH_2、$-(CH_2CH_2O)_{0-3}-(CH_2)_{0-3}Z'$ (例如$-(CH_2)_{0-3}Z'$)或$-CH(CH_2W)Z'$，

Y^3表示H或$-(CH_2)_{0-3}Z'$，

Z'表示H、NH_2、SO_3H、COOH、$-NH-CO-CH_2-CH_2-CH(NH_2)COOH$或$-(CO-NH-CHY^4)_{1-3}COOH$；

W表示H或OH，

Y^4表示視情況經$-NH-C(O)-NH_2$取代之直鏈或分支鏈C_{1-6}烷基，或表示視情況經$-NH_2$取代之芳基或苯甲基；

R^2表示H、-MOD、$-C(=O)-CHY^4-NHY^5$或$-(CH_2)_{0-3}Z$，

或

R^2及R^4一起(形成吡咯啶環)表示$-CH_2-CHR^{11}-$或$-CHR^{11}-CH_2-$，

其中

R^{11}表示-H、$-NH_2$、$-SO_3H$、-COOH、-SH、鹵素(尤其F或Cl)、C_{1-4}烷基、C_{1-4}鹵烷基、C_{1-4}烷氧基、經羥基取代之C_{1-4}烷基、$COO(C_{1-4}$烷基)或-OH；

Z表示-H、鹵素、$-OY^3$、$-SY^3$、NHY^3、$-CO-NY^1Y^2$或$-CO-OY^3$，

Y^1及Y^2彼此獨立地表示H、NH_2或$-(CH_2)_{0-3}Z'$，且Y^3表示H或$-(CH_2)_{0-3}Z'$，其中Z'表示H、SO_3H、NH_2或COOH；

其中Y^4表示視情況經$-NHCONH_2$取代之直鏈或分支鏈C_{1-6}烷基，或表示視情況經$-NH_2$取代之芳基或苯甲基，且Y^5表示H或$-CO-CHY^6-NH_2$，其中Y^6表示直鏈或分支鏈C_{1-6}烷基；

R^4表示H、-L-結合劑、$-SG_{lys}-(CO)_{0-1}-R^{4'}$、$-CO-CHY^4-NHY^5$或$-(CH_2)_{0-3}Z$，

其中SG_{lys}為溶酶體酶可裂解之基團，尤其由二肽或三肽組成之群，$R^{4'}$為C_{1-10}烷基、C_{5-10}芳基或C_{6-10}芳烷基、C_{5-10}雜烷基、C_{1-10}烷基-O-C_{6-10}芳基、C_{5-10}雜環烷基、雜芳基、雜芳基烷基、雜芳基烷氧基、C_{1-10}烷氧基、C_{6-10}芳氧基或C_{6-10}芳烷氧基、C_{5-10}雜芳烷氧基、C_{1-10}烷基-O-C_{6-10}芳氧基、C_{5-10}雜環烷氧基，其可經以下基團取代一次或超過一次：$-NH_2$、-NH-烷基、$-N(烷基)_2$、NH-CO-烷基、N(烷基)-CO-烷基、$-SO_3H$、$-SO_2NH_2$、$-SO_2-N(烷基)_2$、-COOH、$-CONH_2$、$-CON(烷基)_2$或-OH、-H或基團$-O_x-(CH_2CH_2O)_v-R^{4''}$ (其中x為0或1且v為數值1至10，且$R^{4''}$為-H、-烷基(較佳C_{1-12}烷基)、$-CH_2-COOH$、$-CH_2-CH_2-COOH$或$-CH_2-CH_2-NH_2$)，其中在裂解後存在一級胺基(對應於R^4 = H)；

其中Z表示-H、鹵素、$-OY^3$、$-SY^3$、NHY^3、$-CO-NY^1Y^2$或$-CO-OY^3$，

其中Y^1及Y^2彼此獨立地表示H、NH_2或$-(CH_2)_{0-3}Z'$，且Y^3表示H或$-(CH_2)_{0-3}Z'$，其中Z'表示H、SO_3H、NH_2或COOH；

其中Y^4表示視情況經$-NHCONH_2$取代之直鏈或分支鏈C_{1-6}烷基，或表示視情況經$-NH_2$取代之芳基或苯甲基，且Y^5表示H或$-CO-CHY^6-NH_2$，其中Y^6表示直鏈或分支鏈C_{1-6}烷基；

或R^2及R^4一起(形成吡咯啶環)表示-CH_2-CHR^{11}-或-CHR^{11}-CH_2-，其中R^{11}表示H、NH_2、SO_3H、COOH、SH、鹵素(尤其F或Cl)、C_{1-4}烷基、C_{1-4}鹵烷基、C_{1-4}烷氧基、經羥基取代之C_{1-4}烷基、COO(C_{1-4}烷基)或OH；

A表示-C(=O)-、-S(=O)-、-$S(=O)_2$-、-$S(=O)_2$-NH或-$CNNH_2$-；

R^3表示-L-結合劑、-MOD或視情況經取代之烷基、環烷基、芳基、雜芳基、雜烷基、雜環烷基，較佳-L-結合劑或可視情況經以下取代之C_{1-10}烷基、C_{6-10}芳基或C_{6-10}芳烷基、C_{5-10}雜烷基、C_{1-10}烷基-O-C_{6-10}芳基或C_{5-10}雜環烷基：1-3個-OH基團、1-3個鹵素原子、1-3個鹵化烷基(各具有1-3個鹵素原子)、1-3個O-烷基、1-3個-SH基團、1-3個-S-烷基、1-3個-O-CO-烷基、1-3個-O-CO-NH-烷基、1-3個-NH-CO-烷基、1-3個-NH-CO-NH-烷基、1-3個-$S(O)_n$-烷基、1-3個-SO_2-NH-烷基、1-3個-NH-烷基、1-3個-N(烷基)$_2$基團、1-3個-NH_2基團或1-3個-$(CH_2)_{0-3}$Z基團，其中Z表示-H、鹵素、-OY^3、-SY^3、-NHY^3、-CO-NY^1Y^2或-CO-OY^3，其中Y^1及Y^2彼此獨立地表示H、NH_2或-$(CH_2)_{0-3}$Z'，且Y^3表示H、-$(CH_2)_{0-3}$-$CH(NHCOCH_3)$Z'、-$(CH_2)_{0-3}$-$CH(NH_2)$Z'或-$(CH_2)_{0-3}$Z'，其中Z'表示H、SO_3H、NH_2或COOH

(其中「烷基」較佳表示C_{1-10}烷基)；

n表示0、1或2，

R^5表示H、NH_2、NO_2、鹵素(尤其F、Cl、Br)、-CN、CF_3、-OCF_3、-CH_2F、-CH_2F、SH或-$(CH_2)_{0-3}$Z，其中Z表示-H、-OY^3、-SY^3、鹵素、NHY^3、-CO-NY^1Y^2或-CO-OY^3，

其中Y^1及Y^2彼此獨立地表示H、NH_2或-$(CH_2)_{0-3}$Z'，且Y^3表示H或-$(CH_2)_{0-3}$Z'，其中Z'表示H、SO_3H、NH_2或COOH；

R^8表示(視情況氟化) C_{1-10}烷基、(視情況氟化) C_{2-10}烯基、(視情況氟化)C_{2-10}炔基、(視情況氟化) C_{4-10}環烷基或-$(CH_2)_{0-2}$-(HZ^2)，其中

HZ^2表示具有至多兩個選自由N、O及S組成之群的雜原子之4至7員雜環(較佳氧雜環丁烷)，其中此等基團中之每一者可經-OH、CO_2H或NH_2取代；

R^9表示H、F、CH_3、CF_3、CH_2F或CHF_2；

其中L表示連接子且結合劑表示去糖基化之抗-B7H3抗體，其中該結合劑可視情況連接至複數個活性化合物分子，

其中R^1、R^3及R^4之一個代表表示-L-結合劑；

R^6及R^7彼此獨立地表示H、氰基、(視情況氟化) C_{1-10}烷基、(視情況氟化)C_{2-10}烯基、(視情況氟化) C_{2-10}炔基、羥基、NO_2、NH_2、COOH或鹵素(尤其F、Cl、Br)，

其中-MOD表示-$(NR^{10})_n$-$(G1)_o$-G2-G3，其中

R^{10}表示H或C_1-C_3烷基；

G1表示-NHCO-或-CONH- (其中若G1表示-NHCO-，則R^{10}不表示NH_2)；

n表示0或1；

o表示0或1；且

G2表示具有1至10個碳原子且可間雜以下基團中之一或多者一次或超過一次之直鏈及/或分支鏈烴基：-O-、-S-、-SO-、SO_2、-NRy-、-NRyCO-、CONRy-、-NRyNRy-、-SO_2NRyNRy-、-CONRyNRy- (其中R^y表示H、苯基、C1-C10烷基、C2-C10烯基或C2-C10炔基，各可視情況經以下取代：$NHCONH_2$、-COOH、-OH、-NH_2、NH-$CNNH_2$、磺醯胺、碸、亞碸或磺酸)、-CO-或-CR^x=N-O- (其中Rx表示H、C_1-C_3烷基或苯基)，其中包括任何側鏈之烴鏈可經-$NHCONH_2$、-COOH、-OH、-NH_2、NH-$CNNH_2$、磺醯胺、碸、亞碸或磺酸取代，G3表示-H或-COOH，其中較佳該基團-MOD具有至少一個基團-COOH；

及其鹽、溶劑合物、溶劑合物之鹽及差向異構體。

【圖式簡單說明】

圖1：人類腎癌細胞株A498中特異性B7H3抗體TPP5706之內化行為。

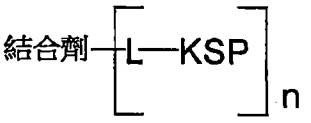
展示24小時內螢光標記之B7H3抗體之內化的動力學進展。為偵測非標靶依賴性內化，平行使用螢光標記之同型對照。詳細實驗條件描述於C-2b下(x軸：時間，以小時為單位；y軸：每個細胞之顆粒數目)

圖2：序列表

【實施方式】

本發明提供抗-B7H3抗體(諸如TPP-5706及TPP-5706之去糖基化及/或人類化變異體)與一或多個活性化合物分子之結合物，該活性化合物分子為經由連接子L連接至抗體之驅動蛋白紡錘體蛋白抑制劑(KSP抑制劑)。

本發明之結合物可由以下通式表示：



其中結合劑表示抗-B7H3抗體，諸如TPP-5706及TPP-5706之去糖基化及/或人類化變異體，L表示連接子，KSP表示KSP抑制劑且n表示數值1至50，較佳1.2至20且尤其較佳2至8。本文中，n為每個結合劑之KSP抑制劑/連接子結合物之平均數目。較佳地，KSP-L具有上文所示之式(I)。另外，連接子較佳連接至抗體之不同胺基酸。尤其較佳為結合於結合劑之不同半胱胺酸殘基。抗體較佳為去糖基化之人類、人類化或嵌合單株抗-B7H3抗體或其抗原結合片段。尤其較佳為一種特異性結合人類Ig4同功異型物之抗-B7H3抗體，尤其抗-B7H3抗體TPP-5706及其人類化變異體，諸如TPP-6642及TPP-6850。

下文描述可根據本發明使用之抗體、可根據本發明使用之KSP抑

制劑及可根據本發明使用之連接子，其可組合使用而無任何限制。詳言之，在各種情況下表示為較佳或尤其較佳之結合劑可與在各種情況下表示為較佳或尤其較佳之KSP抑制劑組合使用，視情況與在各種情況下表示為較佳或尤其較佳之連接子組合。

KSP抑制劑及其結合劑結合物

定義

術語「經取代」表示在指定原子或指定基團上之一或多個氫經自所規定之基團之選擇置換，其限制條件為在所討論之情況下並未超過指定原子之正常原子價。允許取代基及/或變數之組合。

術語「視情況經取代」表示取代基之數目可等於或不同於零。除非另有說明，否則視情況經取代之基團可經如在任何所欲碳或氮或硫原子上氫原子經非氫取代基置換可容納之多的視情況選用之取代基取代。通常，視情況選用之取代基(若存在)的數目可為1、2、3、4或5，尤其1、2或3。

舉例而言，如此處所使用，例如在本發明之通式之化合物的取代基之定義中，表述「單或多」表示「1、2、3、4或5，較佳1、2、3或4，尤其較佳1、2或3，尤其較佳1或2」。

除非另外說明，否則當本發明化合物中之基團經取代時，基團可經單或多取代。在本發明之保護範疇內，多取代之所有基團之定義彼此獨立。經一個、兩個或三個相同或不同取代基取代為較佳。經一個取代基取代尤其較佳。

烷基

烷基為具有1至10個碳原子(C_1-C_{10}烷基)、通常1至6個碳原子(C_1-C_6烷基)、較佳1至4個碳原子(C_1-C_4烷基)且尤其較佳1至3個碳原子(C_1-C_3烷基)之直鏈或分支鏈飽和單價烴基。

較佳實例包括：

甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、異丙基、異丁基、第二丁基、第三丁基、異戊基、2-甲基丁基、1-甲基丁基、1-乙基丙基、1,2-二甲基丙基、新戊基、1,1-二甲基丙基、4-甲基戊基、3-甲基戊基、2-甲基戊基、1-甲基戊基、2-乙基丁基、1-乙基丁基、3,3-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、1,1-二甲基丁基、2,3-二甲基丁基、1,3-二甲基丁基及1,2-二甲基丁基。

尤其較佳為甲基、乙基、丙基、異丙基及第三丁基。

雜烷基

雜烷基為具有1至10個碳原子之直鏈及/或分支鏈烴鏈，其可間雜以下基團中之一或多者一次或超過一次：-O-、-S-、-C(=O)-、-S(=O)-、$-S(=O)_2-$、$-NR^y-$、$-NR^yC(=O)-$、$-C(=O)-NR^y-$、$-NR^yNR^y-$、$-S(=O)_2-NR^yNR^y-$、$-C(=O)-NR^yNR^y-$、$-CR^x=N-O-$，且其中包括側鏈之烴鏈若存在可經$-NH-C(=O)-NH_2$、-C(=O)-OH、-OH、$-NH_2$、$-NH-C(=NNH_2)-$、磺醯胺、碸、亞碸或磺酸取代，

此處，在各種情況下R^y為-H、苯基、C_1-C_{10}烷基、C_2-C_{10}烯基或C_2-C_{10}炔基，其各又可經$-NH-C(=O)-NH_2$、-C(=O)-OH、-OH、$-NH_2$、$-NH-C(=NNH_2)$、磺醯胺、碸、亞碸或磺酸取代。

此處，R^x為-H、C_1-C_3烷基或苯基。

烯基

烯基為具有一或兩個雙鍵及2、3、4、5、6、7、8、9或10個碳原子(C_2-C_{10}烯基)、尤其2或3個碳原子(C_2-C_3烯基)之直鏈或分支鏈單價烴鏈，其中應瞭解若烯基包含超過一個雙鍵，則雙鍵可彼此間分隔或彼此間共軛。烯基為例如乙烯基(或乙烯基)、丙-2-烯-1-基(或「烯丙基」)、丙-1-烯-1-基、丁-3-烯基、丁-2-烯基、丁-1-烯基、戊-4-烯基、戊-3-烯基、戊-2-烯基、戊-1-烯基、己-5-烯基、己-4-烯基、己-3-烯基、己-2-烯基、己-1-烯基、丙-1-烯-2-基(或「異丙烯基」)、2-

甲基丙-2-烯基、1-甲基丙-2-烯基、2-甲基丙-1-烯基、1-甲基丙-1-烯基、3-甲基丁-3-烯基、2-甲基丁-3-烯基、1-甲基丁-3-烯基、3-甲基丁-2-烯基、2-甲基丁-2-烯基、1-甲基丁-2-烯基、3-甲基丁-1-烯基、2-甲基丁-1-烯基、1-甲基丁-1-烯基、1-,1-二甲基丙-2-烯基、1-乙基丙-1-烯基、1-丙基乙烯基、1-異丙基乙烯基、4-甲基戊-4-烯基、3-甲基戊-4-烯基、2-甲基戊-4-烯基、1-甲基戊-4-烯基、4-甲基戊-3-烯基、3-甲基戊-3-烯基、2-甲基戊-3-烯基、1-甲基戊-3-烯基、4-甲基戊-2-烯基、3-甲基戊-2-烯基、2-甲基戊-2-烯基、1-甲基戊-2-烯基、4-甲基戊-1-烯基、3-甲基戊-1-烯基、2-甲基戊-1-烯基、1-甲基戊-1-烯基、3-乙基丁-3-烯基、2-乙基丁-3-烯基、1-乙基丁-3-烯基、3-乙基丁-2-烯基、2-乙基丁-2-烯基、1-乙基丁-2-烯基、3-乙基丁-1-烯基、2-乙基丁-1-烯基、1-乙基丁-1-烯基、2-丙基丙-2-烯基、1-丙基丙-2-烯基、2-異丙基丙-2-烯基、1-異丙基丙-2-烯基、2-丙基丙-1-烯基、1-丙基丙-1-烯基、2-異丙基丙-1-烯基、1-異丙基丙-1-烯基、3,3-二甲基丙-1-烯基、1-(1,1-二甲基乙基)乙烯基、丁-1,3-二烯基、戊-1,4-二烯基或己-1-5-二烯基。尤其該基團為乙烯基或烯丙基。

炔基

炔基表示具有參鍵且具有2、3、4、5、6、7、8、9或10個碳原子(C_2-C_{10}炔基)、尤其2或3個碳原子(C_2-C_3炔基)之直鏈或分支鏈單價烴鏈。C_2-C_6炔基為例如乙炔基、丙-1-炔基、丙-2-炔基(或炔丙基)、丁-1-炔基、丁-2-炔基、丁-3-炔基、戊-1-炔基、戊-2-炔基、戊-3-炔基、戊-4-炔基、己-1-炔基、己-2-炔基、己-3-炔基、己-4-炔基、己-5-炔基、1-甲基丙-2-炔基、2-甲基丁-3-炔基、1-甲基丁-3-炔基、1-甲基丁-2-炔基、3-甲基丁-1-炔基、1-乙基丙-2-炔基、3-甲基戊-4-炔基、2-甲基戊-4-炔基、1-甲基戊-4-炔基、2-甲基戊-3-炔基、1-甲基戊-3-炔基、4-甲基戊-2-炔基、1-甲基戊-2-炔基、4-甲基戊-1-炔基、3-

甲基戊-1-炔基、2-乙基丁-3-炔基、1-乙基丁-3-炔基、1-乙基丁-2-炔基、1-丙基丙-2-炔基、1-異丙基丙-2-炔基、2,2-二甲基丁-3-炔基、1,1-二甲基丁-3-炔基、1,1-二甲基丁-2-炔基或3,3-二甲基丁-1-炔基。尤其炔基為乙炔基、丙-1-炔基或丙-2-炔基。

環烷基

環烷基為具有3-12個碳原子之飽和單價單環或雙環烴基(C_3-C_{12}環烷基)。

此處，**單環**烴基為一般具有3至10 (C_3-C_{10}環烷基)、較佳3至8 (C_3-C_8環烷基)且尤其較佳3至7 (C_3-C_7環烷基)個碳原子之單價烴基。

單環烴基之較佳實例包括：環丙基、環丁基、環戊基、環己基、環庚基及環辛基。

尤其較佳為環丙基、環丁基、環戊基、環己基及環庚基。

此處，**雙環**烴基為一般具有3至12個碳原子之烴基(C_3-C_{12}環烷基)，其中此處應瞭解兩個飽和環系統之稠合，該兩個環系統一起共享兩個直接相鄰之原子。雙環烴基之較佳實例包括：雙環[2.2.0]己基、雙環[3.3.0]辛基、雙環[4.4.0]癸基、雙環[5.4.0]十一烷基、雙環[3.2.0]庚基、雙環[4.2.0]辛基、雙環[5.2.0]壬基、雙環[6.2.0]癸基、雙環[4.3.0]壬基、雙環[5.3.0]癸基、雙環[6.3.0]十一烷基及雙環[5.4.0]十一烷基。

雜環烷基

雜環烷基為具有一、二、三或四個可相同或不同之雜原子的非芳族單環或雙環系統。雜原子可為氮原子、氧原子或硫原子。

根據本發明之**單環**環系統可具有3至8個、較佳4至7個、尤其較佳5或6個環原子。

具有3個環原子之雜環烷基之較佳實例包括：

氮雜環丙烷基。

具有4個環原子之雜環烷基之較佳實例包括：

氮雜環丁烷基、氧雜環丁烷基。

具有5個環原子之雜環烷基之較佳實例包括：

吡咯啶基、咪唑啶基、吡唑啶基、吡咯啉基、二氧戊環基及四氫呋喃基。

具有6個環原子之雜環烷基之較佳實例包括：

哌啶基、哌嗪基、嗎啉基、二噁烷基、四氫哌喃基及硫代嗎啉基。

具有7個環原子之雜環烷基之較佳實例包括：

氮雜環庚烷基、氧雜環庚烷基、1,3-二氮雜環庚烷基、1,4-二氮雜環庚烷基。

具有8個環原子之雜環烷基之較佳實例包括：

氧雜環辛烷基、氮雜環辛烷基。

單環雜環烷基較佳為具有至少兩個來自O、N及S系列之雜原子的4至7員飽和雜環基。

尤其較佳為嗎啉基、哌啶基、吡咯啶基及四氫呋喃基。

具有一、二、三或四個可相同或不同之雜原子的**雙環**環系統根據本發明可具有6至12個、較佳6至10個環原子，其中一、二、三或四個碳原子可交換成來自O、N及S之系列之相同或不同雜原子。

實例包括：氮雜雙環[3.3.0]辛基、氮雜雙環[4.3.0]壬基、二氮雜雙環[4.3.0]壬基、氧氮雜雙環[4.3.0]壬基、硫氮雜雙環[4.3.0]壬基或氮雜雙環[4.4.0]癸基以及衍生自根據定義之其他可能組合的基團。

尤其較佳為全氫環戊并[c]吡咯基、全氫呋喃并[3,2-c]吡啶基、全氫吡咯并[1,2-a]吡嗪基、全氫吡咯并[3,4-c]吡咯基及3,4-亞甲基二氧基苯基。

芳基

芳基表示由碳原子組成之單價單環或雙環芳環系統。實例為萘基及苯基；較佳為苯基或苯基殘基。

C_6-C_{10}芳烷基

本發明範疇內之C_{6-10}芳烷基為C_1-C_4烷基連接之單環芳族芳基，例如苯基。

C_{6-10}芳烷基之一個實例為苯甲基。

雜芳基

雜芳基表示具有5、6、8、9、10、11、12、13或14個環原子(「5至14員雜芳基」)之單價單環、雙環或三環芳環系統，尤其應瞭解意謂包含來自N、O及S之群的至少一個環雜原子及視情況選用之一個、兩個或三個其他環雜原子的5、6、9或10個環原子且經由環碳原子或視情況(在價數允許下)經由環氮原子附接。

雜芳基可為5員雜芳基，諸如噻吩基、呋喃基、吡咯基、噁唑基、噻唑基、咪唑基、吡唑基、異噁唑基、異噻唑基、噁二唑基、三唑基、噻二唑基或四唑基；或6員雜芳基，諸如吡啶基、噠嗪基、嘧啶基、吡嗪基或三嗪基；或三環雜芳基，諸如咔唑基、吖啶基或啡嗪基；或9員雜芳基，諸如苯并呋喃基、苯并噻吩基、苯并噁唑基、苯并異噁唑基、苯并咪唑基、苯并噻唑基、苯并三唑基、吲唑基、吲哚基、異吲哚基、吲哚嗪基或嘌呤基；或10員雜芳基，諸如喹啉基、喹唑啉基、異喹啉基、啐啉基、酞嗪基、喹喏啉基或喋啶基。

一般而言，且若未另外陳述，則雜芳基包括其所有可能異構體形式，例如關於與分子其餘部分之連接點的互變異構體及位置異構體。因此，作為例示性非互斥性實例，術語吡啶基涵蓋吡啶-2-基、吡啶-3-基及吡啶-4-基；或術語噻吩基涵蓋噻吩-2-基及噻吩-3-基。

C_5-C_{10}雜芳基

本發明範疇內之C_{5-10}雜芳基為具有一、二、三或四個可相同或不

同之雜原子的單環或雙環芳環系統。雜原子可為N、O、S、S(=O)及/或$S(=O)_2$。鍵價數可位於任何芳族碳原子或氮原子。

根據本發明之單環雜芳基具有5或6個環原子。較佳為具有一或兩個雜原子之彼等雜芳基。本文中尤其較佳為一或兩個氮原子。

具有5個環原子之雜芳基包括例如以下環：

噻吩基、噻唑基、呋喃基、吡咯基、噁唑基、咪唑基、吡唑基、異噁唑基、異噻唑基、噁二唑基、三唑基、四唑基及噻二唑基。

具有6個環原子之雜芳基包括例如以下環：

吡啶基、噠嗪基、嘧啶基、吡嗪基及三嗪基。

根據本發明之單環雜芳基具有9或10個環原子。

具有9個環原子之雜芳基包括例如以下環：

酞基、硫代酞基、吲哚基、異吲哚基、吲唑基、苯并噻唑基、苯并呋喃基、苯并噻吩基、苯并咪唑基、苯并噁唑基、吖辛因基、吲哚嗪基、嘌呤基、二氫吲哚基。

具有10個環原子之雜芳基包括例如以下環：

異喹啉基、喹啉基、喹嗪基、喹唑啉基、喹喏啉基、啐啉基、酞嗪基、1,7-啉啶基或1,8-啉啶基、喋啶基、吮烷基。

雜烷氧基

雜烷氧基為具有1至10個碳原子之直鏈及/或分支鏈烴鏈，其經由-O-連接至分子其餘部分且可進一步間雜以下基團中之一或多者一次或超過一次：-O-、-S-、-C(=O)-、-S(=O)-、$-S(=O)_2-$、$-NR^y-$、$-NR^yC(=O)-$、$-C(=O)-NR^y-$、$-NR^yNR^y-$、$-S(=O)_2-NR^yNR^y-$、$-C(=O)-NR^yNR^y-$、$-CR^x=N-O-$，且其中包括側鏈(若存在)之烴鏈可經-NH-C(=O)-NH_2、-C(=O)-OH、-OH、$-NH_2$、-NH-C(=NNH_2)-、磺醯胺、碸、亞碸或磺酸取代。

此處，在各種情況下R^y為-H、苯基、C_1-C_{10}烷基、C_2-C_{10}烯基或

C_2-C_{10}炔基，其又可經-NH-C(=O)-NH_2、-C(=O)-OH、-OH、-NH_2、-NH-C(=NNH_2)-、磺醯胺、碸、亞碸或磺酸取代。

此處，R^x為-H、C_1-C_3烷基或苯基。

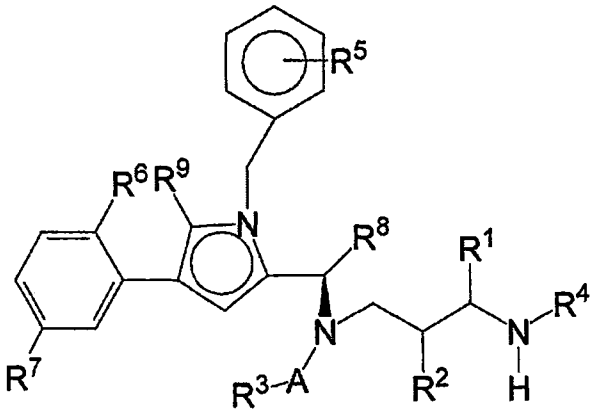
本發明範疇內之鹵素或鹵素原子為氟(-F)、氯(-Cl)、溴(-Br)或碘(-I)。

氟烷基、氟烯基及氟炔基表示烷基、烯基及炔基可經氟單取代或多取代。

KSP抑制劑與抗體之結合在化學上可藉由不同途徑發生，如實例之流程20至31中以例示性方式所示。特定而言，例如藉由引入保護基或離去基以促進取代，視情況可修飾供與連接子結合之低分子量KSP抑制劑(使得在反應中，該離去基而非氫原子經連接子取代)。以此方式獲得之KSP抑制劑-連接子分子(其中連接子具有與結合劑偶合之反應基)接著可與結合劑反應，得到本發明之結合劑結合物。在實驗章節中，以例示性方式，藉由許多實例說明此程序。

其他尤其較佳之化合物具有下文式(I)或(Ia)：

式(I)：



(I)

其中

R^1表示H、-L-#1、-MOD或-$(CH_2)_{0-3}$Z，其中Z表示-H、-NHY^3、-OY^3、-SY^3、鹵素、-CO-NY^1Y^2或-CO-OY^3，

其中Y^1及Y^2彼此獨立地表示H、NH_2、-$(CH_2CH_2O)_{0-3}$-$(CH_2)_{0-3}$Z'

(例如-$(CH_2)_{0-3}Z'$)或-$CH(CH_2W)Z'$，且Y^3表示H或-$(CH_2)_{0-3}Z'$，其中Z'表示H、NH_2、SO_3H、COOH、-NH-CO-CH_2-CH_2-$CH(NH_2)COOH$或-$(CO-NH-CHY^4)_{1-3}COOH$，其中W表示H或OH，

其中Y^4表示視情況經-$NHCONH_2$取代之直鏈或分支鏈C_{1-6}烷基，或表示視情況經-NH_2取代之芳基或苯甲基；

R^2表示H、-MOD、-CO-CHY^4-NHY^5或-$(CH_2)_{0-3}Z$，

其中Z表示-H、鹵素、-OY^3、-SY^3、NHY^3、-CO-NY^1Y^2或-CO-OY^3，

其中Y^1及Y^2彼此獨立地表示H、NH_2或-$(CH_2)_{0-3}Z'$，且Y^3表示H或-$(CH_2)_{0-3}Z'$，其中Z'表示H、SO_3H、NH_2或COOH；

其中Y^4表示視情況經-$NHCONH_2$取代之直鏈或分支鏈C_{1-6}烷基，或表示視情況經-NH_2取代之芳基或苯甲基，且Y^5表示H或-CO-CHY^6-NH_2，其中Y^6表示直鏈或分支鏈C_{1-6}烷基；

R^4表示H、-L-#1、-SG_{lys}-$(CO)_{0-1}$-$R^{4'}$、-CO-CHY^4-NHY^5或-$(CH_2)_{0-3}Z$，

其中SG_{lys}為溶酶體酶可裂解之基團，尤其由二肽或三肽組成之群，$R^{4'}$為C_{1-10}烷基、C_{5-10}芳基或C_{6-10}芳烷基、C_{5-10}雜烷基、C_{1-10}烷基-O-C_{6-10}芳基、C_{5-10}雜環烷基、雜芳基、雜芳基烷基、雜芳基烷氧基、C_{1-10}烷氧基、C_{6-10}芳氧基或C_{6-10}芳烷氧基、C_{5-10}雜芳烷氧基、C_{1-10}烷基-O-C_{6-10}芳氧基、C_{5-10}雜環烷氧基，其可經以下基團取代一次或超過一次：-NH_2、-NH-烷基、-$N(烷基)_2$、NH-CO-烷基、N(烷基)-CO烷基、-SO_3H、-SO_2NH_2、-SO_2-N(烷基)$_2$、-COOH、-$CONH_2$、-CON(烷基)$_2$或-OH、-H或基團-O_x-$(CH_2CH_2O)_v$-$R^{4''}$ (其中x為0或1且v為數值1至20，且$R^{4''}$為-H、-烷基(較佳C_{1-12}烷基)、-CH_2-COOH、-CH_2-CH_2-COOH或-CH_2-CH_2-NH_2)；

其中Z表示-H、鹵素、-OY^3、-SY^3、NHY^3、-CO-NY^1Y^2或-CO-OY^3，

其中Y^1及Y^2彼此獨立地表示H、NH_2或-$(CH_2)_{0-3}Z'$，且Y^3表示H或-$(CH_2)_{0-3}Z'$，其中Z'表示H、SO_3H、NH_2或COOH；

其中Y^4表示視情況經-$NHCONH_2$取代之直鏈或分支鏈C_{1-6}烷基，或表示視情況經-NH_2取代之芳基或苯甲基，且Y^5表示H或-CO-CHY^6-NH_2，其中Y^6表示直鏈或分支鏈C_{1-6}烷基；

或R^2及R^4一起(形成吡咯啶環)表示-CH_2-CHR^{11}-或-CHR^{11}-CH_2-，其中R^{11}表示H、NH_2、SO_3H、COOH、SH、鹵素(尤其F或Cl)、C_{1-4}烷基、C_{1-4}鹵烷基、C_{1-4}烷氧基、經羥基取代之C_{1-4}烷基、COO(C_{1-4}烷基)或OH；

A表示CO、SO、SO_2、SO_2NH或$CNNH_2$；

R^3表示-L-#1、-MOD或視情況經取代之烷基、環烷基、芳基、雜芳基、雜烷基、雜環烷基，較佳為可經以下取代之C_{1-10}烷基、C_{6-10}芳基或C_{6-10}芳烷基、C_{5-10}雜烷基、C_{1-10}烷基-O-C_{6-10}芳基或C_{5-10}雜環烷基：1-3個-OH基團、1-3個鹵素原子、1-3個鹵化烷基(各具有1-3個鹵素原子)、1-3個O-烷基、1-3個-SH基團、1-3個-S-烷基、1-3個-O-CO-烷基、1-3個-O-CO-NH-烷基、1-3個-NH-CO-烷基、1-3個-NH-CO-NH-烷基、1-3個-$S(O)_n$-烷基、1-3個-SO_2-NH-烷基、1-3個-NH-烷基、1-3個-N(烷基)$_2$基團、1-3個-NH((CH_2CH_2O)1-20H)基團、1-3個-NH_2基團或1-3個-$(CH_2)_{0-3}Z$基團，其中n表示0、1或2，Z表示-H、鹵素、-OY^3、-SY^3、-NHY^3、-CO-NY^1Y^2或-CO-OY^3，其中Y^1及Y^2彼此獨立地表示H、NH_2或-$(CH_2)_{0-3}Z'$，且Y^3表示H、-$(CH_2)_{0-3}$-$CH(NHCOCH_3)Z'$、-$(CH_2)_{0-3}$-$CH(NH_2)Z'$或-$(CH_2)_{0-3}Z'$，其中Z'表示H、SO_3H、NH_2或COOH (其中「烷基」較佳為C_{1-10}烷基)；

R^5表示H、-MOD、NH_2、NO_2、鹵素(尤其F、Cl、Br)、-CN、CF_3、-OCF_3、-CH_2F、-CH_2F、SH或-$(CH_2)_{0-3}Z$，其中Z表示-H、-OY^3、-SY^3、鹵素、NHY^3、-CO-NY^1Y^2或-CO-OY^3，

其中Y^1及Y^2彼此獨立地表示H、NH_2或$-(CH_2)_{0-3}Z'$，且Y^3表示H或$-(CH_2)_{0-3}Z'$，其中Z'表示H、SO_3H、NH_2或COOH；

R^6及R^7彼此獨立地表示H、氰基、(視情況氟化) C_{1-10}烷基、(視情況氟化) C_{2-10}烯基、(視情況氟化) C_{2-10}炔基、羥基、NO_2、NH_2、COOH或鹵素(尤其F、Cl、Br)，

R^8表示(視情況氟化) C_{1-10}烷基、(視情況氟化) C_{2-10}烯基、(視情況氟化)C_{2-10}炔基、(視情況氟化) C_{4-10}環烷基或$-(CH_2)_{0-2}-(HZ^2)$，其中HZ^2表示具有至多兩個選自由N、O及S組成之群的雜原子之4至7員雜環(較佳氧雜環丁烷)，其中此等基團中之每一者可經-OH、CO_2H或NH_2取代；

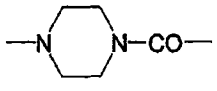
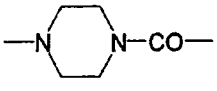
其中取代基R^1、R^3及R^4之一表示-L-#1，

L表示連接子且#1表示鍵結於抗體之鍵，

R^9表示H、F、CH_3、CF_3、CH_2F或CHF_2；

其中-MOD表示$-(NR^{10})_n-(G1)_o-G2-G3$，其中

R^{10}表示H或C_1-C_3烷基；

G1表示-NHCO-、-CONH-或  (其中若G1表示-NHCO-或  ，則R^{10}不表示NH_2)；

n表示0或1；

o表示0或1；且

G2表示具有1至10個碳原子且可間雜以下基團中之一或多者一次或超過一次之直鏈及/或分支鏈烴基：-O-、-S-、-SO-、SO_2、$-NR^y-$、$-NR^yCO-$、$CONR^y-$、$-NR^yNR^y-$、$-SO_2NR^yNR^y-$、$-CONR^yNR^y-$ (其中R^y表示H、苯基、C_1-C_{10}烷基、C_2-C_{10}烯基或C_2-C_{10}炔基，各可視情況經以下取代：$NHCONH_2$、-COOH、-OH、$-NH_2$、NH-$CNNH_2$、磺醯胺、碸、亞碸或磺酸)、-CO-或$-CR^x=N-O-$ (其中Rx表示H、C_1-C_3烷基

或苯基)，其中包括任何側鏈之烴鏈可經-$NHCONH_2$、-COOH、-OH、-NH_2、$NH\text{-}CNNH_2$、磺醯胺、碸、亞碸或磺酸取代，其中G3表示-H或-COOH，且其中該基團-MOD較佳具有至少一個基團-COOH；

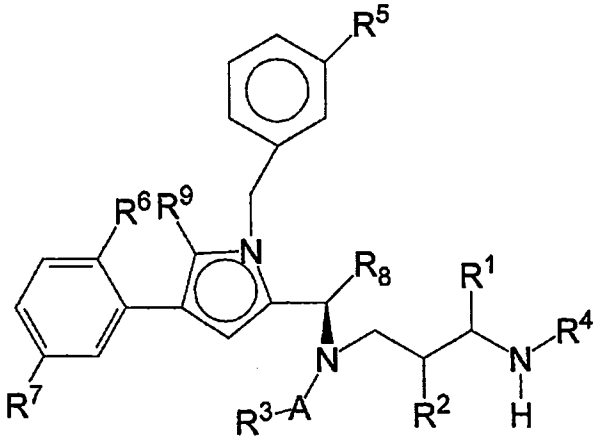
及其鹽、溶劑合物、溶劑合物之鹽及差向異構體。

在式(I)之一較佳實施例中，取代基R^1或R^3之一表示-L-#1。在此實施例中，若R^4表示H或-SG_{lys}-$(CO)_{0-1}$-$R^{4'}$則尤其較佳，其中SG_{lys}及$R^{4'}$具有與上述相同之含義。在式(I)之另一較佳實施例中，取代基R^4表示-L-#1，其中連接子為可在結合於R^4之氮原子處裂解的連接子，使得裂解之後存在一級胺基(對應於R^4=H)。此類可裂解基團詳細描述如下。

若R^1不表示H，則R^1所結合之碳原子為可以L及/或D組態、較佳L組態存在之立構中心。

若R^2不表示H，則R^2所結合之碳原子為可以L及/或D組態存在之立構中心。

式(Ia)：



(Ia)

其中

R^1表示H、-L-#1或-$(CH_2)_{0-3}$Z，其中Z表示-H、-NHY^3、-OY^3、-SY^3、鹵素、-CO-NY^1Y^2或-CO-OY^3，

其中Y^1及Y^2彼此獨立地表示H、NH_2、-$(CH_2CH_2O)_{0-3}$-$(CH_2)_{0-3}$Z'

(例如-$(CH_2)_{0-3}Z'$)或-$CH(CH_2W)Z'$，且Y^3表示H或-$(CH_2)_{0-3}Z'$，其中Z'表示H、NH_2、SO_3H、COOH、-NH-CO-CH_2-CH_2-$CH(NH_2)$COOH或-$(CO\text{-}NH\text{-}CHY^4)_{1-3}$COOH，其中W表示H或OH；

其中Y^4表示視情況經-$NHCONH_2$取代之直鏈或分支鏈C_{1-6}烷基，或表示視情況經-NH_2取代之芳基或苯甲基，

R^2及R^4彼此獨立地表示H、-SG_{lys}-$(CO)_{0-1}$-$R^{4'}$、-CO-CHY^4-NHY^5或-$(CH_2)_{0-3}Z$，

其中-SG_{lys}為溶酶體酶可裂解之基團，尤其由二肽或三肽組成之群，$R^{4'}$為C_{1-10}烷基、C_{5-10}芳基或C_{6-10}芳烷基、C_{5-10}雜烷基、C_{1-10}烷基-O-C_{6-10}芳基、C_{5-10}雜環烷基、雜芳基、雜芳基烷基、雜芳基烷氧基、C_{1-10}烷氧基、C_{6-10}芳氧基或C_{6-10}芳烷氧基、C_{5-10}雜芳烷氧基、C_{1-10}烷基-O-C_{6-10}芳氧基、C_{5-10}雜環烷氧基，其可經以下基團取代一次或超過一次：-NH_2、-NH-烷基、-N(烷基)$_2$、NH-CO-烷基、N(烷基)-CO烷基、-SO_3H、-SO_2NH_2、-SO_2-N(烷基)$_2$、-COOH、-$CONH_2$、-CON(烷基)$_2$或-OH、-H或基團-O_x-$(CH_2CH_2O)_v$-$R^{4''}$ (其中x為0或1且v數值1至20，且$R^{4''}$為-H、烷基(較佳C_{1-12}烷基)、-CH_2-COOH、-CH_2-CH_2-COOH或-CH_2-CH_2-NH_2)；

或R^2及R^4一起表示(形成吡咯啶環) -CH_2-CHR^{11}-或-CHR^{11}-CH_2-，其中R^{11}表示H、NH_2、SO_3H、COOH、SH、鹵素(尤其F或Cl)、C_{1-4}烷基、C_{1-4}鹵烷基、C_{1-4}烷氧基、經羥基取代之C_{1-4}烷基、COO(C_{1-4}烷基)或OH；或R^2表示H、-CO-CHY^4-NHY^5或-$(CH_2)_{0-3}Z$，且R^4表示所述-L-#1，且其中Z表示-H、鹵素、-OY^3、-SY^3、-NHY^3、-CO-NY_1Y_2或-CO-OY^3，

其中Y^1及Y^2彼此獨立地表示H、NH_2或-$(CH_2)_{0-3}Z'$，且Y^3表示H或-$(CH_2)_{0-3}Z'$，其中Z'表示H、SO_3H、NH_2或COOH；

其中Y^4彼此獨立地表示視情況經-$NHCONH_2$取代之直鏈或分支鏈

C_{1-6}烷基或表示視情況經-NH_2取代之芳基或苯甲基，其中Y^4表示視情況經-$NHCONH_2$取代之直鏈或分支鏈C_{1-6}烷基或表示視情況經-NH_2取代之芳基或苯甲基且Y^5表示H或-CO-CHY^6-NH_2，其中Y^6表示直鏈或分支鏈C_{1-6}烷基；

A表示CO、SO、SO_2、SO_2NH或CNNH；

R^3表示視情況經取代之烷基、芳基、雜芳基、雜烷基、雜環烷基，較佳-L-#1或可視情況經以下取代之C_{1-10}烷基、C_{6-10}芳基或C_{6-10}芳烷基、C_{5-10}雜烷基、C_{1-10}烷基-O-C_{6-10}芳基或C_{5-10}雜環烷基：1-3個-OH基團、1-3個鹵素原子、1-3個鹵化烷基(各具有1-3個鹵素原子)、1-3個O-烷基、1-3個-SH基團、1-3個-S-烷基、1-3個-O-CO-烷基、1-3個-O-CO-NH-烷基、1-3個-NH-CO-烷基、1-3個-NH-CO-NH-烷基、1-3個-$S(O)_n$-烷基、1-3個-SO_2-NH-烷基、1-3個-NH-烷基、1-3個-N(烷基)$_2$基團、1-3個-NH_2基團或1-3個-$(CH_2)_{0-3}$Z基團，其中n表示0、1或2，Z表示-H、鹵素、-OY^3、-SY^3、-NHY^3、-CO-NY^1Y^2或-CO-OY^3，其中Y^1及Y^2彼此獨立地表示H、NH_2或-$(CH_2)_{0-3}$Z'，且Y^3表示H、-$(CH_2)_{0-3}$-$CH(NHCOCH_3)$Z'、-$(CH_2)_{0-3}$-$CH(NH_2)$Z'或-$(CH_2)_{0-3}$Z'，其中Z'表示H、SO_3H、NH_2或COOH

(其中「烷基」較佳表示C_{1-10}烷基)；

R^5表示H、F、NH_2、NO_2、鹵素、SH或-$(CH_2)_{0-3}$Z，其中Z表示-H、鹵素、-OY^3、-SY^3、NHY^3、-CO-NY^1Y^2或-CO-OY^3，

其中Y^1及Y^2彼此獨立地表示H、NH_2或-$(CH_2)_{0-3}$Z'，且Y^3表示H或-$(CH_2)_{0-3}$Z'，其中Z'表示H、SO_3H、NH_2或COOH；

R^6及R^7彼此獨立地表示H、氰基、(視情況氟化) C_{1-10}烷基、(視情況氟化)C_{2-10}烯基、(視情況氟化) C_{2-10}炔基、羥基或鹵素，

R^8表示(視情況氟化)C_{1-10}烷基、(視情況氟化) C_{4-10}環烷基或視情況經取代之氧雜環丁烷；且

R^9表示H、F、CH_3、CF_3、CH_2F或CHF_2；

及其鹽、溶劑合物、溶劑合物之鹽及差向異構體。

藉由取代R^1、R^3或R^4之氫原子，可使式(I)或(Ia)化合物(其中取代基R^1、R^3及R^4均不表示-L-#1)以熟習此項技術者已知之方式連接至連接子。由此得到式(I)或(Ia)之結合物，其中取代基R^1、R^3或R^4之一表示-L-#1，L表示連接子且#1表示鍵結於抗體之鍵。若根據式(I)或(Ia)之KSP抑制劑與結合劑結合，則取代基R^1、R^3或R^4之一因此表示-L-#1，其中L表示連接子且#1表示鍵結於抗體之鍵。亦即，在結合物之情況下，取代基R^1、R^3或R^4之一表示-L-#1，其中-L-#1表示鍵結於抗體之鍵。在式(I)或(Ia)之一個較佳實施例中，取代基R^1或R^3之一表示-L-#1。在此實施例中，若R^4表示H或-SG_{lys}-$(CO)_{0-1}$-$R^{4'}$則尤其較佳，其中SG_{lys}及$R^{4'}$具有與上述相同之含義。在式(I)之另一較佳實施例中，取代基R^4表示-L-#1，其中連接子為可在結合於R^4之氮原子處裂解的連接子，使得裂解之後存在一級胺基(對應於R^4=H)。此類可裂解基團詳細描述如下。結合劑較佳為人類、人類化或嵌合單株抗體或其抗原結合片段。抗體較佳為去糖基化之人類、人類化或嵌合單株抗-B7H3抗體。尤其較佳為一種特異性結合人類Ig4同功異型物之抗-B7H3抗體，尤其抗-B7H3抗體TPP-5706及其人類化變異體，諸如TPP-6642及TPP-6850。

化合物中亦可存在基團-L-#3，而非-L-#1，其中L表示連接子且#3表示結合於抗體之反應基。包含-L-#3之化合物為與抗體反應之反應性化合物。#3較佳為經由較佳與蛋白質中之半胱胺酸殘基形成共價鍵，與胺基或硫醇基發生反應之基團。蛋白質中之半胱胺酸殘基可天然存在於蛋白質中，可藉由生物化學方法引入，或較佳可藉由預先還原結合劑之二硫鍵來產生。

A較佳為CO (羰基)。

R^1較佳為-L-#1、H、-COOH、$-CONHNH_2$、$-(CH_2)_{1-3}NH_2$、-CONZ" $(CH_2)_{1-3}NH_2$及$-CONZ"CH_2COOH$，其中Z"表示H或NH_2。

R^2及R^4較佳為H，或R^2及R^4一起(形成吡咯啶環)表示$-CH_2-CHR^{11}-$或$-CHR^{11}-CH_2-$，其中R^{11}表示H。R^4亦較佳為-L-#1，其中-L-#1為可裂解之連接子，較佳為可藉由酶在細胞內裂解之連接子。

R^3較佳為-L-#1或C_{1-10}烷基-，其可視情況經-OH、O-烷基、SH、S-烷基、O-CO-烷基、O-CO-NH-烷基、NH-CO-烷基、NH-CO-NH-烷基、$S(O)_n$烷基、SO_2-NH-烷基、NH烷基、$N(烷基)_2$或NH_2 (其中烷基較佳為C_{1-3}烷基)取代。

較佳R^5為H或F。

R^6及R^7較佳彼此獨立地為H、(視情況氟化) C_{1-3}烷基、(視情況氟化) C_{2-4}烯基、(視情況氟化) C_{2-4}炔基、羥基或鹵素。

R^8較佳為分支鏈C_{1-5}烷基，尤其式$-C(CH_3)_2-(CH_2)_{0-2}-R^y$之基團，其中$R^y$表示-H、-OH、$CO_2H$或$NH_2$，或(視情況氟化) C_{5-7}環烷基。尤其較佳為式$-C(CH_3)_3$之基團或環己基。

R^9較佳為H或F。

尤其較佳為如下式(I)或(Ia)之化合物，其中

A表示CO (羰基)；

R^1表示H、-L-#1、-COOH、$-CONHNH_2$、$-(CH_2)_{1-3}NH_2$、-CONZ" $(CH_2)_{1-3}NH_2$或$-CONZ"CH_2COOH$，其中Z"表示H或NH_2；

R^2及R^4表示H，或R^2及R^4一起(形成吡咯啶環)表示$-CH_2-CHR^{11}-$或$-CHR^{11}-CH_2-$，其中R^{11}表示H；或R^4表示-L-#1且R^2表示H；

R^3表示-L-#1或可經鹵素(尤其F)或視情況氟化 C_{1-3}烷基單取代或多取代之苯基，或表示可視情況經$-OY^4$、$-SY^4$、$-O-CO-Y^4$、$-O-CO-NH-Y^4$、$NH-CO-Y^4$、$-NH-CO-NH-Y^4$、$S(O)_n-Y^4$ (其中n表示0、1或2)、$-SO_2-NH-Y^4$、$NH-Y^4$或$N(Y^4)_2$取代之視情況氟化之C_{1-10}烷基，其

中Y^4表示H、苯基(視情況經鹵素(尤其F)或視情況氟化之C_{1-3}烷基單取代或多取代)或烷基(其中烷基可經-OH、-COOH及/或-NHCO-C_{1-3}烷基取代且其中烷基較佳表示C_{1-3}烷基)；

其中尤其較佳R^3可經-OH、O-烷基、SH、S-烷基、O-CO-烷基、O-CO-NH-烷基、NH-CO-烷基、NH-CO-NH-烷基、$S(O)_n$烷基、SO_2-NH-烷基、NH烷基、N(烷基)$_2$或NH_2取代(其中烷基較佳意謂C_{1-3}烷基)；其中n表示0、1或2，

R^5表示H或F；

R^6及R^7彼此獨立地表示H、(視情況氟化) C_{1-3}烷基、(視情況氟化)C_{2-4}烯基、(視情況氟化)C_{2-4}炔基、羥基或鹵素；

R^8表示分支鏈C_{1-5}烷基或環己基；且

R^9表示H或F。

此外，較佳(單獨或組合)

R^1表示-L-#1、COOH或H，

R^2及R^4表示H，或R^2及R^4一起(形成吡咯啶環)表示-CH_2-CHR^{11}-或-CHR^{11}-CH_2-，其中R^{11}表示H，或R^4表示-L-#1且R^2表示H；

A表示CO，

R^3表示-(CH_2)OH、-$CH(CH_3)$OH、-CH_2SCH_2CH(COOH)$NHCOCH_3$、-$CH(CH_3)OCH_3$、可視情況經1-3個鹵素原子、1-3個胺基或1-3烷基(其可視情況鹵化)取代之苯基，或表示-L-#1，

R^5表示H，

R^6及R^7彼此獨立地表示H、C_{1-3}烷基或鹵素；尤其R^6及R^7表示F；

R^8表示C_{1-4}烷基(較佳第三丁基)或環己基；及/或

R^9表示H。

此外，根據本發明，較佳

R^1表示-L-#1、COOH或H，

R^2及R^4表示H，或R^2及R^4一起(形成吡咯啶環)表示-CH_2-CHR^{11}-或-CHR^{11}-CH_2-，其中R^{11}表示H，

A表示CO，

R^3表示-(CH_2)OH、-$CH(CH_3)OH$、-$CH_2SCH_2CH(COOH)NHCOCH_3$、-$CH(CH_3)OCH_3$、可視情況經1-3個鹵素原子、1-3個胺基或1-3烷基(其可視情況鹵化)取代之苯基，或表示-L-#1，

R^5表示H，

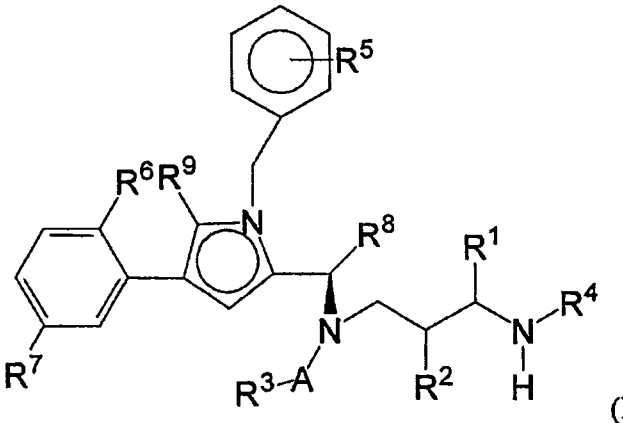
R^6及R^7彼此獨立地表示H、C_{1-3}烷基或鹵素；尤其R^6及R^7表示F；

R^8表示C_{1-4}烷基(較佳第三丁基)；且

R^9表示H。

其他尤其較佳之化合物具有以下式(II)或(IIa)：

式(II)：



(II)

其中

R^1表示H、-L-結合劑、-MOD或-(CH_2)$_{0-3}$Z，其中Z表示-H、-NHY^3、-OY^3、-SY^3、鹵素、-CO-NY^1Y^2或-CO-OY^3，

其中Y^1及Y^2彼此獨立地表示H、NH_2、-(CH_2CH_2O)$_{0-3}$-(CH_2)$_{0-3}$Z'(例如-(CH_2)$_{0-3}$Z')或-$CH(CH_2W)Z'$，且Y^3表示H或-(CH_2)$_{0-3}$Z'，其中Z'表示H、NH_2、SO_3H、-COOH、-NH-CO-CH_2-CH_2-$CH(NH_2)COOH$或-(CO-NH-CHY^4)$_{1-3}$COOH，其中W表示H或OH，

其中Y^4表示視情況經-$NHCONH_2$取代之直鏈或分支鏈C_{1-6}烷基，

或表示視情況經-NH_2取代之芳基或苯甲基；

R^2表示H、-MOD、-CO-CHY^4-NHY^5或-$(CH_2)_{0-3}Z$，其中Y^4表示視情況經-$NHCONH_2$取代之直鏈或分支鏈C_{1-6}烷基，或表示視情況經-NH_2取代之芳基或苯甲基，且Y^5表示H或-CO-CHY^6-NH_2，其中Y^6表示直鏈或分支鏈C_{1-6}烷基，

其中Z表示-H、鹵素、-OY^3、-SY^3、NHY^3、-CO-NY^1Y^2或-CO-OY^3，

其中Y^1及Y^2彼此獨立地表示H、NH_2或-$(CH_2)_{0-3}Z'$，且Y^3表示H或-$(CH_2)_{0-3}Z'$，其中Z'表示H、SO_3H、NH_2或COOH；

R^4表示H、-L-結合劑、-SG_{lys}-$(CO)_{0-1}$-$R^{4'}$、-CO-CHY^4-NHY^5或-$(CH_2)_{0-3}Z$，

其中SG_{lys}為溶酶體酶可裂解之基團，尤其由二肽或三肽組成之群，$R^{4'}$為C_{1-10}烷基、C_{5-10}芳基或C_{6-10}芳烷基、C_{5-10}雜烷基、C_{1-10}烷基-O-C_{6-10}芳基、C_{5-10}雜環烷基、雜芳基、雜芳基烷基、雜芳基烷氧基、C_{1-10}烷氧基、C_{6-10}芳氧基或C_{6-10}芳烷氧基、C_{5-10}雜芳烷氧基、C_{1-10}烷基-O-C_{6-10}芳氧基、C_{5-10}雜環烷氧基，其可經以下基團取代一次或超過一次：-NH_2、-NH-烷基、-N(烷基)$_2$、NH-CO-烷基、N(烷基)-CO-烷基、-SO_3H、-SO_2NH_2、-SO_2-N(烷基)$_2$、-COOH、-$CONH_2$、-CON(烷基)$_2$或-OH、-H或基團-O_x-$(CH_2CH_2O)_v$-$R^{4''}$ (其中x為0或1且v為數值1至10，且$R^{4''}$為-H、-烷基(較佳C_{1-12}烷基)、-CH_2-COOH、-CH_2-CH_2-COOH或-CH_2-CH_2-NH_2)；

其中Z表示-H、鹵素、-OY^3、-SY^3、NHY^3、-CO-NY^1Y^2或-CO-OY^3，

其中Y^1及Y^2彼此獨立地表示H、NH_2或-$(CH_2)_{0-3}Z'$，且Y^3表示H或-$(CH_2)_{0-3}Z'$，其中Z'表示H、SO_3H、NH_2或COOH；

其中Y^4表示視情況經-$NHCONH_2$取代之直鏈或分支鏈C_{1-6}烷基，

或表示視情況經-NH_2取代之芳基或苯甲基，且Y^5表示H或-CO-CHY^6-NH_2，其中Y^6表示直鏈或分支鏈C_{1-6}烷基；

或R^2及R^4一起(形成吡咯啶環)表示-CH_2-CHR^{10}-或-CHR^{10}-CH_2-，其中R^{10}表示H、NH_2、SO_3H、COOH、SH或OH；

A表示CO、SO、SO_2、SO_2NH或$CNNH_2$；

R^3表示-L-結合劑、-MOD或視情況經取代之烷基、環烷基、芳基、雜芳基、雜烷基、雜環烷基，較佳-L-結合劑或可視情況經以下取代之C_{1-10}烷基、C_{6-10}芳基或C_{6-10}芳烷基、C_{5-10}雜烷基、C_{1-10}烷基-O-C_{6-10}芳基或C_{5-10}雜環烷基：1-3個-OH基團、1-3個鹵素原子、1-3個鹵化烷基(各具有1-3個鹵素原子)、1-3個O-烷基、1-3個-SH基團、1-3個-S-烷基、1-3個-O-CO-烷基、1-3個-O-CO-NH-烷基、1-3個-NH-CO-烷基、1-3個-NH-CO-NH-烷基、1-3個-$S(O)_n$-烷基、1-3個-SO_2-NH-烷基、1-3個-NH-烷基、1-3個-N(烷基)$_2$基團、1-3個-NH_2基團或1-3個-$(CH_2)_{0-3}$Z基團，其中Z表示-H、鹵素、-OY^3、-SY^3、-NHY^3、-CO-NY^1Y^2或-CO-OY^3，其中Y^1及Y^2彼此獨立地表示H、NH_2或-$(CH_2)_{0-3}$Z'且Y^3表示H、-$(CH_2)_{0-3}$-$CH(NHCOCH_3)$Z'、-$(CH_2)_{0-3}$-$CH(NH_2)$Z'或-$(CH_2)_{0-3}$Z'，其中Z'表示H、SO_3H、NH_2或COOH

(其中「烷基」較佳表示C_{1-10}烷基)；

R^5表示H、NH_2、NO_2、鹵素(尤其F、Cl、Br)、-CN、CF_3、-OCF_3、-CH_2F、-CH_2F、SH或-$(CH_2)_{0-3}$Z，其中Z表示-H、-OY^3、-SY^3、鹵素、NHY^3、-CO-NY^1Y^2或-CO-OY^3，

其中Y^1及Y^2彼此獨立地表示H、NH_2或-$(CH_2)_{0-3}$Z'，且Y^3表示H或-$(CH_2)_{0-3}$Z'，其中Z'表示H、SO_3H、NH_2或COOH；

R^6及R^7彼此獨立地表示H、氰基、(視情況氟化)C_{1-10}烷基、(視情況氟化)C_{2-10}烯基、(視情況氟化)C_{2-10}炔基、羥基、NO_2、NH_2、COOH或鹵素(尤其F、Cl、Br)，

R^8表示(視情況氟化)C_{1-10}烷基、(視情況氟化)C_{2-10}烯基、(視情況氟化)C_{2-10}炔基、(視情況氟化)C_{4-10}環烷基或$-(CH_2)_{0-2}-(HZ^2)$，其中HZ^2表示具有至多兩個選自由N、O及S組成之群的雜原子之4至7員雜環，其中此等基團中之每一者可經-OH、CO_2H或NH_2取代；

R^9表示H、F、CH_3、CF_3、CH_2F或CHF_2；

其中-MOD表示$-(NR^{10})_n-(G1)_o-G2-G3$，其中

R^{10}表示H或C_1-C_3烷基；

G1表示-NHCO-或-CONH-(其中若G1表示-NHCO-，則R^{10}不表示NH_2)；

n表示0或1；

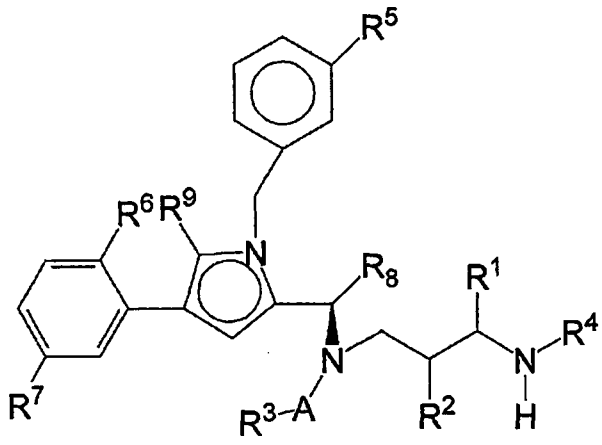
o表示0或1；且

G2表示具有1至10個碳原子且可間雜以下基團中之一或多者一次或超過一次之直鏈及/或分支鏈烴基：-O-、-S-、-SO-、SO_2、$-NR^y-$、$-NR^yCO-$、$CONR^y-$、$-NR^yNR^y-$、$-SO_2NR^yNR^y-$、$-CONR^yNR^y-$ (其中R^y表示H、苯基、C_1-C_{10}烷基、C_2-C_{10}烯基或C_2-C_{10}炔基，各可視情況經以下取代：$NHCONH_2$、-COOH、-OH、$-NH_2$、NH-$CNNH_2$、磺醯胺、碸、亞碸或磺酸)、-CO-或$-CR^x=N-O-$(其中Rx表示H、C_1-C_3烷基或苯基)，其中包括任何側鏈之烴鏈可經$-NHCONH_2$、-COOH、-OH、$-NH_2$、NH-$CNNH_2$、磺醯胺、碸、亞碸或磺酸取代，其中該基團-MOD較佳具有至少一個基團-COOH；

及其鹽、溶劑合物、溶劑合物之鹽及差向異構體。

在式(II)之KSP抑制劑之結合劑結合物的情況下，R^1、R^3及R^4之至多一個代表(或者上文指定之條件之一)可表示-L-結合劑，其中L表示連接子且結合劑表示抗體，其中抗體視情況可連接至複數個活性化合物分子。

式(IIa)：



(IIa)

其中

R^1表示-L-結合劑、H或$-(CH_2)_{0-3}Z$，其中Z表示-H、$-NHY^3$、$-OY^3$、$-SY^3$、鹵素、$-CO-NY^1Y^2$或$-CO-OY^3$，

其中Y^1及Y^2彼此獨立地表示H、NH_2、$-(CH_2CH_2O)_{0-3}-(CH_2)_{0-3}Z'$或$-CH(CH_2W)Z'$，且$Y^3$表示H或$-(CH_2)_{0-3}Z'$，其中Z'表示H、$NH_2$、$SO_3H$、COOH、$-NH-CO-CH_2-CH_2-CH(NH_2)COOH$或$-(CO-NH-CHY^4)_{1-3}COOH$；其中W表示H或OH；

其中Y^4表示視情況經$-NHCONH_2$取代之直鏈或分支鏈C_{1-6}烷基，或表示視情況經$-NH_2$取代之芳基或苯甲基；

R^2及R^4彼此獨立地表示H、$-SG_{lys}-(CO)_{0-1}-R^{4'}$、$-CO-CHY^4-NHY^5$或$-(CH_2)_{0-3}Z$，或$R^2$及$R^4$一起(形成吡咯啶環)表示$-CH_2-CHR^{11}-$或$-CHR^{11}-CH_2-$，或$R^2$表示H、$-CO-CHY^4-NHY^5$或$-(CH_2)_{0-3}Z$，且$R^4$表示-L-#1，其中$R^{11}$表示H、$NH_2$、$SO_3H$、COOH、SH、鹵素(尤其F或Cl)、$C_{1-4}$烷基、$C_{1-4}$鹵烷基、$C_{1-4}$烷氧基、經羥基取代之$C_{1-4}$烷基、$COO(C_{1-4}烷基)$或OH；

其中SG_{lys}為溶酶體酶可裂解之基團，尤其由二肽或三肽組成之群，$R^{4'}$為C_{1-10}烷基、C_{5-10}芳基或C_{6-10}芳烷基、C_{5-10}雜烷基、C_{1-10}烷基$-O-C_{6-10}$芳基、C_{5-10}雜環烷基、雜芳基、雜芳基烷基、雜芳基烷氧基、C_{1-10}烷氧基、C_{6-10}芳氧基或C_{6-10}芳烷氧基、C_{5-10}雜芳烷氧基、C_{1-10}

烷基-O-C_{6-10}芳氧基、C_{5-10}雜環烷氧基，其可經以下基團取代一次或超過一次：-NH_2、-NH-烷基、-N(烷基)$_2$、NH-CO-烷基、N(烷基)-CO-烷基、-SO_3H、-SO_2NH_2、-SO_2-N(烷基)$_2$、-COOH、-$CONH_2$、-CON(烷基)$_2$或-OH、-H或基團-O_x-$(CH_2CH_2O)_v$-$R^{4''}$ (其中x為0或1且v為數值1至10，且$R^{4''}$為-H、-烷基(較佳C_{1-12}烷基)、-CH_2-COOH、-CH_2-CH_2-COOH或-CH_2-CH_2-NH_2)；

其中Z表示-H、鹵素、-OY^3、-SY^3、NHY^3、-CO-NY^1Y^2或-CO-OY^3，

其中Y^1及Y^2彼此獨立地表示H、NH_2或-$(CH_2)_{0-3}$Z'，且Y^3表示H或-$(CH_2)_{0-3}$Z'，其中Z'表示H、SO_3H、NH_2或COOH；

其中Y^4表示視情況經-$NHCONH_2$取代之直鏈或分支鏈C_{1-6}烷基，或表示視情況經-NH_2取代之芳基或苯甲基，且Y^5表示H或-CO-CHY^6-NH_2，其中Y^6表示直鏈或分支鏈C_{1-6}烷基；

A表示CO、SO、SO_2、SO_2NH或$CNNH_2$；

R^3表示-L-結合劑或視情況經取代之烷基、芳基、雜芳基、雜烷基、雜環烷基，較佳-L-結合劑或可視情況經以下取代之C_{1-10}烷基、C_{6-10}芳基或C_{6-10}芳烷基、C_{5-10}雜烷基、C_{1-10}烷基-O-C_{6-10}芳基或C_{5-10}雜環烷基：1-3個-OH基團、1-3個鹵素原子、1-3個鹵化烷基(各具有1-3個鹵素原子)、1-3個O-烷基、1-3個-SH基團、1-3個-S-烷基、1-3個-O-CO-烷基、1-3個-O-CO-NH-烷基、1-3個-NH-CO-烷基、1-3個-NH-CO-NH-烷基、1-3個-$S(O)_n$-烷基、1-3個-SO_2-NH-烷基、1-3個-NH-烷基、1-3個-N(烷基)$_2$基團、1-3個-NH_2基團或1-3個-$(CH_2)_{0-3}$Z基團，其中Z表示-H、鹵素、-OY^3、-SY^3、-NHY^3、-CO-NY^1Y^2或-CO-OY^3，其中Y^1及Y^2彼此獨立地表示H、NH_2或-$(CH_2)_{0-3}$Z'，且Y^3表示H、-$(CH_2)_{0-3}$-$CH(NHCOCH_3)$Z'、-$(CH_2)_{0-3}$-$CH(NH_2)$Z'或-$(CH_2)_{0-3}$Z'，其中Z'表示H、SO_3H、NH_2或COOH

(其中「烷基」較佳表示C_{1-10}烷基)；

R^5表示H、F、NH_2、NO_2、鹵素、SH或$-(CH_2)_{0-3}Z$，其中Z表示-H、鹵素、$-OY^3$、$-SY^3$、$-NHY^3$、$-CO-NY^1Y^2$或$-CO-OY^3$，

其中Y^1及Y^2彼此獨立地表示H、NH_2或$-(CH_2)_{0-3}Z'$，且Y^3表示H或$-(CH_2)_{0-3}Z'$，其中Z'表示H、SO_3H、NH_2或COOH；

其中L表示連接子且結合劑表示結合劑或其衍生物，其中該結合劑可視情況連接至複數個活性化合物分子，

R^6及R^7彼此獨立地表示H、氰基、(視情況氟化)C_{1-10}烷基、(視情況氟化)C_{2-10}烯基、(視情況氟化)C_{2-10}炔基、羥基或鹵素，

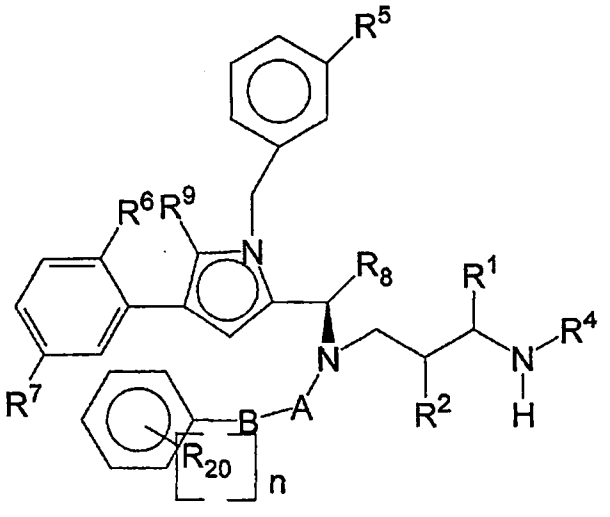
R^8表示(視情況氟化)C_{1-10}烷基、(視情況氟化)C_{4-10}環烷基或視情況經取代之氧雜環丁烷；且

R^9表示H、F、CH_3、CF_3、CH_2F或CHF_2；

及其鹽、溶劑合物、溶劑合物之鹽及差向異構體。

此外，根據本發明，較佳為下述KSP抑制劑/抗體結合物：

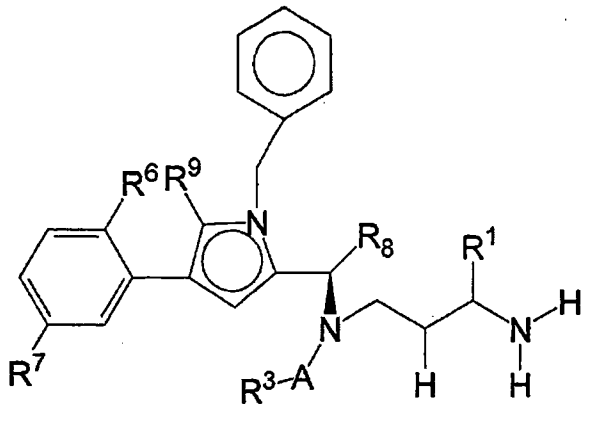
式(IIb)：



(IIb)

其中R^1、R^2、R^4、R^5、R^6、R^7、R^8及R^9具有與式(II)或(IIa)中相同之含義，A表示CO，B表示單一鍵、$-O-CH_2-$或$-CH_2-O-$，且R^{20}表示NH_2、F、CF_3或CH_3，且n表示0、1或2。

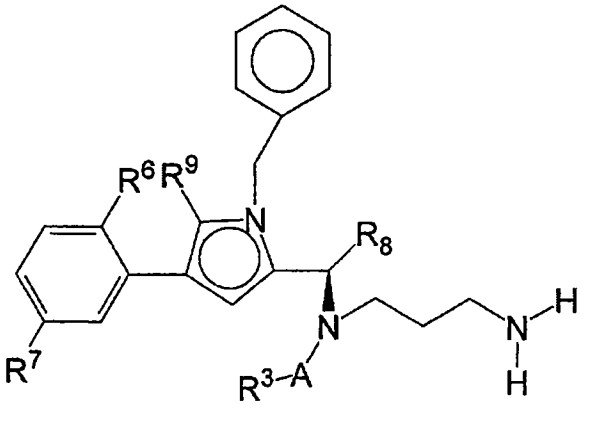
式(IIc)：



(IIc)

其中A、R^1、R^3、R^6、R^7、R^8及R^9具有與式(II)或(IIa)中相同之含義，其中A較佳表示CO且R^3表示-CH_2OH、-CH_2OCH_3、$CH(CH_3)OH$或$CH(CH_3)OCH_3$。

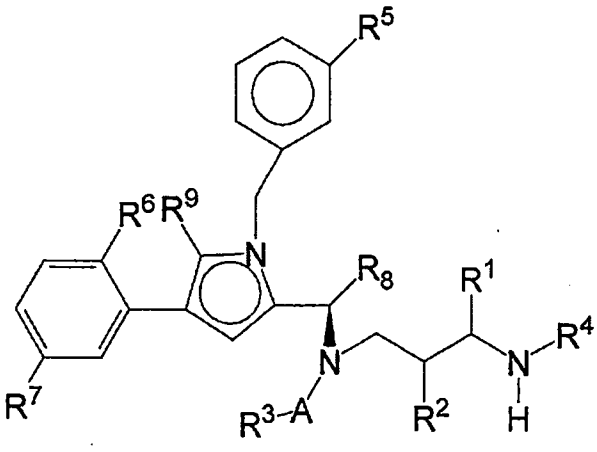
式(IId)：



(IId)

其中A、R^3、R^6、R^7、R^8及R^9具有與式(II)或(IIa)中相同之含義，其中A較佳表示CO且R^3表示-CH_2-S_x-$(CH_2)_{0-4}$-CHY^5-COOH，其中x表示0或1且Y^5表示H或NHY^6，其中Y^6表示H或-$COCH_3$。

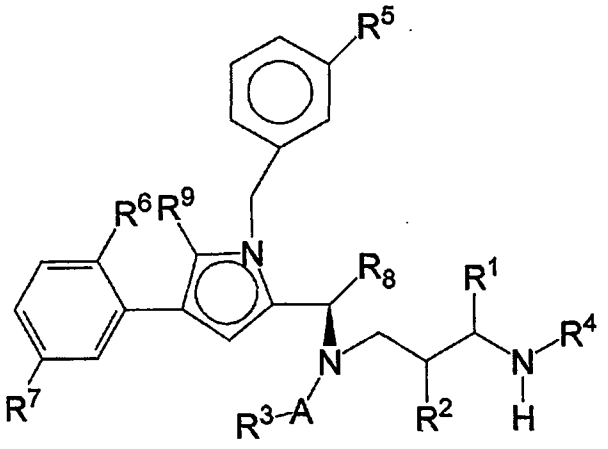
式(IIe)：



(IIe)

其中A、R^2、R^3、R^4、R^6、R^7、R^8及R^9具有與式(II)或(IIa)中相同之含義，且R^1表示-L-結合劑。

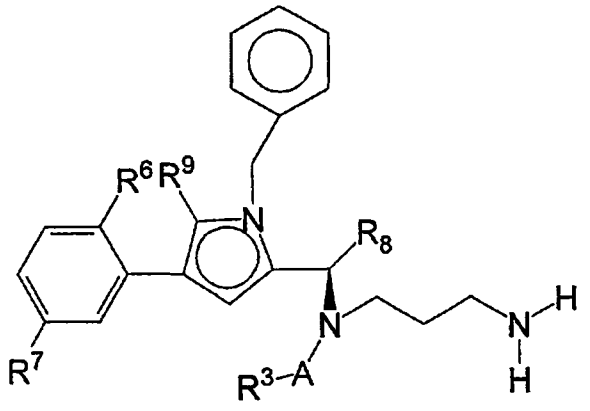
式(IIi)：



(IIi)

其中A、R^1、R^2、R^3、R^6、R^7、R^8及R^9具有與式(II)或(IIa)中相同之含義，且R^4表示-L-結合劑，較佳可酶裂解之結合劑，使得裂解後R^4 =H。

式(IIj)：



(IIj)

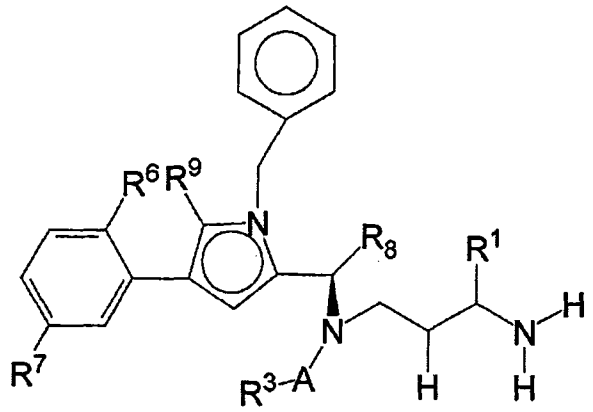
其中

R^3表示-L-#1；

A表示CO；且

R^6、R^7、R^8及R^9具有與式(I)中相同之含義，

式(IIk)：



(IIk)

其中

R^1表示-L-#1；

A表示CO且R^3表示-CH_2OH；

R^3、R^6、R^7、R^8及R^9具有與式(I)中相同之含義。

此外，較佳在(II)、(IIa)、(IIb)、(IIc)、(IId)、(IIe)、(IIi)、(IIj)及(IIk)之化合物中(單獨或組合)：

Z表示Cl或Br；

R^1表示-$(CH_2)_{0-3}Z$，其中Z表示COOH或-CO-NY^1Y^2，其中Y^2表示-$(CH_2CH_2O)_{0-3}$-$(CH_2)_{0-3}Z'$且Y^1表示H、NH_2或-$(CH_2CH_2O)_{0-3}$-$(CH_2)_{0-3}Z'$；

Y^1表示H，Y^2表示-$(CH_2CH_2O)_3$-CH_2CH_2Z'且Z'表示-COOH；

Y^1表示H，Y^2表示-CH_2CH_2Z'且Z'表示-$(CONHCHY^4)_2COOH$；

Y^1表示H，Y^2表示-CH_2CH_2Z'，Z'表示-$(CONHCHY^4)_2COOH$且Y^4基團之一表示異丙基且另一者表示-$(CH_2)_3$-$NHCONH_2$；

Y^1表示H，Y^2表示-CH_2CH_2Z'，Z'表示-$(CONHCHY^4)_2COOH$且Y^4基團之一表示-CH_3且另一者表示-$(CH_2)_3$-$NHCONH_2$；

Y^4表示視情況經-$NHCONH_2$取代之直鏈或分支鏈C_{1-6}烷基；

至少一個Y^4代表係選自由異丙基及-CH_3組成之群；

Y^1表示H，Y^2表示-CH_2CH_2Z'，Z'表示-$CONHCHY^4COOH$且Y^4表示視情況經-NH_2取代之芳基或苯甲基；

Y^4表示胺基苯甲基；

R^2表示-$(CH_2)_{0-3}Z$且Z表示-SY^3；

R^4表示-CO-CHY^4-NHY^5且Y^5表示H；

R^4表示-CO-CHY^4-NHY^5且Y^5表示-CO-CHY^6-NH_2；

Y^4表示視情況經-$NHCONH_2$取代之直鏈或分支鏈C_{1-6}烷基。

此外，較佳在式(I)或(II)中，R^1、R^2或R^3表示-MOD。

尤其較佳，R^3表示-MOD且R^1表示-L-#1或-L-結合劑，

其中-MOD表示-$(NR^{10})_n$-$(G1)_o$-G2-G3，其中

R^{10}表示H或C_1-C_3烷基；

G1表示-NHCO-或-CONH-(其中若G1表示-NHCO-，則R^{10}不表示NH_2)；

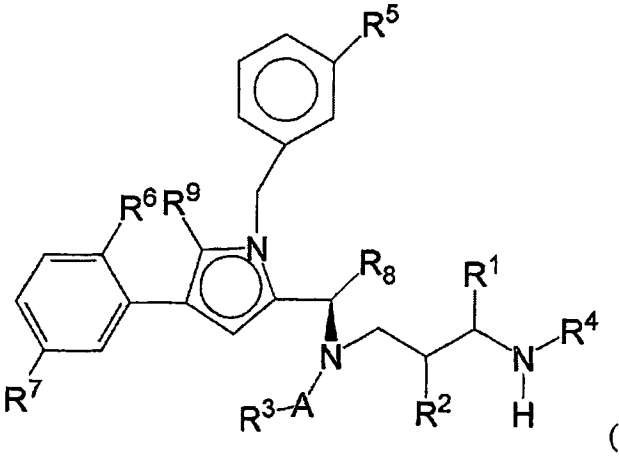
n表示0或1；

o表示0或1；且

G2表示具有1至10個碳原子且可間雜以下基團中之一或多者一次或超過一次之直鏈及/或分支鏈烴基：-O-、-S-、-SO-、SO_2、-NR^y-、-NR^yCO-、$CONR^y$-、-NR^yNR^y-、-$SO_2NR^yNR^y$-、-$CONR^yNR^y$- (其中R^y表示H、苯基、C_1-C_{10}烷基、C_2-C_{10}烯基或C_2-C_{10}炔基，各可視情況經以下取代：$NHCONH_2$、-COOH、-OH、-NH_2、-NH-$CNNH_2$、磺醯胺、碸、亞碸或磺酸)、-CO-或-CR^x=N-O- (其中Rx表示H、C_1-C_3烷基或苯基)，其中包括任何側鏈之烴鏈可經$NHCONH_2$、-COOH、-OH、-NH_2、NH-$CNNH_2$、磺醯胺、碸、亞碸或磺酸取代，其中G3表示-H或-COOH，且其中該基團-MOD較佳具有至少一個基團-COOH。

尤其較佳地，基團-MOD具有(較佳在末端) -COOH基團，例如在甜菜鹼基團中。較佳，該基團-MOD具有式-CH_2-S_x-$(CH_2)_{0-4}$-CHY^5-COOH，其中x為0或1，且Y^5表示H或NHY^6，其中Y^6表示H或-$COCH_3$。

其他尤其較佳之化合物具有以下式(III)：



(III)

其中

R^1表示-L-結合劑、H或$-(CH_2)_{0-3}Z$，其中Z表示-H、$-NHY^3$、$-OY^3$、$-SY^3$、鹵素、$-CO-NY^1Y^2$或$-CO-OY^3$，

其中Y^1及Y^2彼此獨立地表示H、NH_2、$-(CH_2CH_2O)_{0-3}-(CH_2)_{0-3}Z'$或$-CH(CH_2W)Z'$，且$Y^3$表示H或$-(CH_2)_{0-3}Z'$，其中Z'表示H、$NH_2$、$SO_3H$、COOH、$-NH-CO-CH_2-CH_2-CH(NH_2)COOH$或$-(CO-NH-CHY^4)_{1-3}COOH$；

其中Y^4表示視情況經$-NHCONH_2$取代之直鏈或分支鏈C_{1-6}烷基，或表示視情況經$-NH_2$取代之芳基或苯甲基；

R^2及R^4彼此獨立地表示H、$-SG_{lys}-(CO)_{0-1}-R^{4'}$、$-CO-CHY^4-NHY^5$或$-(CH_2)_{0-3}Z$，

或R^2及R^4一起(形成吡咯啶環)表示$-CH_2-CHR^{11}-$或$-CHR^{11}-CH_2-$，其中R^{11}表示H、NH_2、SO_3H、COOH、SH、鹵素(尤其F或Cl)、C_{1-4}烷基、C_{1-4}鹵烷基、C_{1-4}烷氧基、經羥基取代之C_{1-4}烷基、$COO(C_{1-4}$烷基)或OH；

其中SG_{lys}為溶酶體酶可裂解之基團，尤其由二肽或三肽組成之群，$R^{4'}$為C_{1-10}烷基、C_{5-10}芳基或C_{6-10}芳烷基、C_{5-10}雜烷基、C_{1-10}烷基-O-C_{6-10}芳基、C_{5-10}雜環烷基、雜芳基、雜芳基烷基、雜芳基烷氧基、C_{1-10}烷氧基、C_{6-10}芳氧基或C_{6-10}芳烷氧基、C_{5-10}雜芳烷氧基、C_{1-10}

烷基-O-C_{6-10}芳氧基、C_{5-10}雜環烷氧基，其可經以下基團取代一次或超過一次：-NH_2、-NH-烷基、-N(烷基)$_2$、NH-CO-烷基、N(烷基)-CO烷基、-SO_3H、-SO_2NH_2、-SO_2-N(烷基)$_2$、-COOH、-$CONH_2$、-CON(烷基)$_2$或-OH、-H或基團-O_x-$(CH_2CH_2O)_v$-$R^{4''}$ (其中x為0或1且v為數值1至10，且$R^{4''}$為-H、-烷基(較佳C_{1-12}烷基)、-CH_2-COOH、-CH_2-CH_2-COOH或-CH_2-CH_2-NH_2)；

其中Z表示-H、鹵素、-OY^3、-SY^3、NHY^3、-CO-NY^1Y^2或-CO-OY^3，

其中Y^1及Y^2彼此獨立地表示H、NH_2或-$(CH_2)_{0-3}$Z'，且Y^3表示H或-$(CH_2)_{0-3}$Z'，其中Z'表示H、SO_3H、NH_2或COOH；

其中Y^4表示視情況經-$NHCONH_2$取代之直鏈或分支鏈C_{1-6}烷基，或表示視情況經-NH_2取代之芳基或苯甲基，且Y^5表示H或-CO-CHY^6-NH_2，其中Y^6表示直鏈或分支鏈C_{1-6}烷基；

A表示CO、SO、SO_2、SO_2NH或$CNNH_2$；

R^3表示-L-結合劑或視情況經取代之烷基、芳基、雜芳基、雜烷基、雜環烷基或-CH_2-S_x-$(CH_2)_{0-4}$-CHY^5-COOH，其中x表示0或1且Y^5表示H或NHY^6，其中Y^6表示H或-$COCH_3$，較佳-L-結合劑或可視情況經以下取代之C_{1-10}烷基、C_{6-10}芳基或C_{6-10}芳烷基、C_{5-10}雜烷基、C_{1-10}烷基-O-C_{6-10}芳基或C_{5-10}雜環烷基：1-3個-OH基團、1-3個鹵素原子、1-3個鹵化烷基(各具有1-3個鹵素原子)、1-3個O-烷基、1-3個-SH基團、1-3個-S-烷基、1-3個-O-CO-烷基、1-3個-O-CO-NH-烷基、1-3個-NH-CO-烷基、1-3個-NH-CO-NH-烷基、1-3個-S(O)$_n$-烷基、1-3個-SO_2-NH-烷基、1-3個-NH-烷基、1-3個-N(烷基)$_2$基團、1-3個-NH_2基團或1-3個-$(CH_2)_{0-3}$Z基團，其中Z表示-H、鹵素、-OY^3、-SY^3、-NHY^3、-CO-NY^1Y^2或-CO-OY^3，其中Y^1及Y^2彼此獨立地表示H、NH_2或-$(CH_2)_{0-3}$Z'且Y^3表示H、-$(CH_2)_{0-3}$-$CH(NHCOCH_3)$Z'、-$(CH_2)_{0-3}$-

$CH(NH_2)Z'$或$-(CH_2)_{0-3}Z'$，其中Z'表示H、SO_3H、NH_2或COOH，

(其中「烷基」較佳表示C_{1-10}烷基)；

R^5表示H、F、NH_2、NO_2、鹵素、SH或$-(CH_2)_{0-3}Z$，其中Z表示-H、鹵素、$-OY^3$、$-SY^3$、$-NHY^3$、$-CO-NY^1Y^2$或$-CO-OY^3$，

其中Y^1及Y^2彼此獨立地表示H、NH_2或$-(CH_2)_{0-3}Z'$，且Y^3表示H或$-(CH_2)_{0-3}Z'$，其中Z'表示H、SO_3H、NH_2或COOH；

其中L表示連接子且結合劑表示抗體，其中該結合劑可視情況連接至複數個活性化合物分子，

R^6及R^7彼此獨立地表示H、氰基、(視情況氟化)C_{1-10}烷基、(視情況氟化)C_{2-10}烯基、(視情況氟化)C_{2-10}炔基、羥基或鹵素，

R^8表示(視情況氟化)C_{1-10}烷基、(視情況氟化)C_{4-10}環烷基或視情況經取代之氧雜環丁烷；且

R^9表示H、F、CH_3、CF_3、CH_2F或CHF_2；

及其鹽、溶劑合物、溶劑合物之鹽及差向異構體。

此外，較佳(單獨或組合)在式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIc)、(IId)、(IIe)、(IIi)、(IIj)、(IIk)或(III)中：

Z表示Cl或Br；

R^1表示$-(CH_2)_{0-3}Z$，其中Z表示$-CO-NY^1Y^2$，其中Y^2表示$-(CH_2CH_2O)_{0-3}-(CH_2)_{0-3}Z'$且$Y^1$表示H、$NH_2$或$-(CH_2CH_2O)_{0-3}-(CH_2)_{0-3}Z'$；

Y^1表示H，Y^2表示$-(CH_2CH_2O)_3-CH_2CH_2Z'$且Z'表示-COOH；

Y^1表示H，Y^2表示$-CH_2CH_2Z'$且Z'表示$-(CONHCHY^4)_2COOH$；

Y^1表示H，Y^2表示$-CH_2CH_2Z'$，Z'表示$-(CONHCHY^4)_2COOH$且一個Y^4代表表示*i*-丙基且另一者表示$-(CH_2)_3-NHCONH_2$；

Y^1表示H，Y^2表示$-CH_2CH_2Z'$，Z'表示$-(CONHCHY^4)_2COOH$且一個Y^4代表表示$-CH_3$且另一者表示$-(CH_2)_3-NHCONH_2$；

Y^4表示視情況經$-NHCONH_2$取代之直鏈或分支鏈C_{1-6}烷基；

至少一個Y^4代表係選自由異丙基及-CH_3組成之群；

Y^1表示H，Y^2表示-CH_2CH_2Z'，Z'表示-$CONHCHY^4COOH$且Y^4表示視情況經-NH_2取代之芳基或苯甲基；

Y^4表示胺基苯甲基；

R^2表示-$(CH_2)_{0-3}Z$且Z表示-SY^3；

R^4表示-CO-CHY^4-NHY^5且Y^5表示H；

R^4表示-CO-CHY^4-NHY^5且Y^5表示-CO-CHY^6-NH_2；

Y^4表示視情況經-$NHCONH_2$取代之直鏈或分支鏈C_{1-6}烷基。

此外較佳為式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)或(III)之化合物

其中

R^1表示H、-L-#1或-L-結合劑、-MOD或-$(CH_2)_{0-3}Z$，其中Z表示-H、-NHY^3、-OY^3、-SY^3、鹵素、-CO-NY^1Y^2或-CO-OY^3，

其中Y^1及Y^2彼此獨立地表示H、NH_2、-$(CH_2CH_2O)_{0-3}$-$(CH_2)_{0-3}Z'$(例如-$(CH_2)_{0-3}Z'$)或-$CH(CH_2W)Z'$，且Y^3表示H或-$(CH_2)_{0-3}Z'$，其中Z'表示H、NH_2、SO_3H、COOH、-NH-CO-CH_2-CH_2-$CH(NH_2)COOH$或-$(CO-NH-CHY^4)_{1-3}COOH$，其中W表示H或OH，

其中Y^4表示視情況經-$NHCONH_2$取代之直鏈或分支鏈C_{1-6}烷基，或表示視情況經-NH_2取代之芳基或苯甲基；

R^2表示H、-CO-CHY^4-NHY^5或-$(CH_2)_{0-3}Z$，

其中Z表示-H、鹵素、-OY^3、-SY^3、NHY^3、-CO-NY^1Y^2或-CO-OY^3，

其中Y^1及Y^2彼此獨立地表示H、NH_2或-$(CH_2)_{0-3}Z'$，且Y^3表示H或-$(CH_2)_{0-3}Z'$，其中Z'表示H、SO_3H、NH_2或COOH；

其中Y^4彼此獨立地表示視情況經-$NHCONH_2$取代之直鏈或分支鏈C_{1-6}烷基，或表示視情況經-NH_2取代之芳基或苯甲基，且Y^5表示H或-CO-CHY^6-NH_2，其中Y^6表示直鏈或分支鏈C_{1-6}烷基；

R^4表示H或-L-#1或-L-結合劑(其中-L-#1或-L-結合劑為酶可裂解之連接子，使得R^4轉變成H)；

A表示CO、SO、SO_2、SO_2NH或$CNNH_2$；

R^3表示-L-#1或-L-結合劑、-MOD或視情況經取代之烷基、環烷基、芳基、雜芳基、雜烷基、雜環烷基，較佳為可視情況經以下取代之C_{1-10}烷基、C_{6-10}芳基或C_{6-10}芳烷基、C_{5-10}雜烷基、C_{1-10}烷基-O-C_{6-10}芳基或C_{5-10}雜環烷基：1-3個-OH基團、1-3個鹵素原子、1-3個鹵化烷基(各具有1-3個鹵素原子)、1-3個O-烷基、1-3個-SH基團、1-3個-S-烷基、1-3個-O-CO-烷基、1-3個-O-CO-NH-烷基、1-3個-NH-CO-烷基、1-3個-NH-CO-NH-烷基、1-3個-$S(O)_n$-烷基、1-3個-SO_2-NH-烷基、1-3個-NH-烷基、1-3個-N(烷基)$_2$基團、1-3個-NH((CH_2CH_2O)1-20H)基團、1-3個-NH_2基團或1-3個-$(CH_2)_{0-3}$Z基團，其中Z表示-H、鹵素、-OY^3、-SY^3、-NHY^3、-CO-NY^1Y^2或-CO-OY^3，其中Y^1及Y^2彼此獨立地表示H、NH_2或-$(CH_2)_{0-3}$Z'且Y^3表示H、-$(CH_2)_{0-3}$-$CH(NHCOCH_3)$Z'、-$(CH_2)_{0-3}$-$CH(NH_2)$Z'或-$(CH_2)_{0-3}$Z'，其中Z'表示H、SO_3H、NH_2或COOH (其中「烷基」較佳為C_{1-10}烷基)；

R^5表示H、-MOD、NH_2、NO_2、鹵素(尤其F、Cl、Br)、-CN、CF_3、-OCF_3、-CH_2F、-CH_2F、SH或-$(CH_2)_{0-3}$Z，其中Z表示-H、-OY^3、-SY^3、鹵素、NHY^3、-CO-NY^1Y^2或-CO-OY^3，

其中Y^1及Y^2彼此獨立地表示H、NH_2或-$(CH_2)_{0-3}$Z'，且Y^3表示H或-$(CH_2)_{0-3}$Z'，其中Z'表示H、SO_3H、NH_2或COOH；

R^6及R^7彼此獨立地表示H、氰基、(視情況氟化)C_{1-10}烷基、(視情況氟化)C_{2-10}烯基、(視情況氟化)C_{2-10}炔基、羥基、NO_2、NH_2、COOH或鹵素(尤其F、Cl、Br)，

R^8表示(視情況氟化)C_{1-10}烷基、(視情況氟化)C_{2-10}烯基、(視情況氟化)C_{2-10}炔基或(視情況氟化) C_{4-10}環烷基；

其中取代基R^1及R^3之一表示-L-#1或-L-結合劑，

L表示連接子且#1表示鍵結於抗體之鍵且結合劑表示抗體，

R^9表示H、F、CH_3、CF_3、CH_2F或CHF_2；

其中-MOD表示-$(NR^{10})_n$-$(G1)_o$-G2-G3，其中

R^{10}表示H或C_1-C_3烷基；

G1表示-NHCO-或-CONH- (其中若G1表示-NHCO-，則R^{10}不表示NH_2)；

n表示0或1；

o表示0或1；且

G2表示具有1至10個碳原子且可間雜以下基團中之一或多者一次或超過一次之直鏈及/或分支鏈烴基：-O-、-S-、-SO-、SO_2、-NR^y-、-NR^yCO-、CONR^y-、-$NR^y NR^y$-、-$SO_2NR^yNR^y$-、-CONR^yNR^y-(其中R^y表示H、苯基、C_1-C_{10}烷基、C_2-C_{10}烯基或C_2-C_{10}炔基，各可視情況經以下取代：$NHCONH_2$、-COOH、-OH、-NH_2、NH-$CNNH_2$、磺醯胺、碸、亞碸或磺酸)、-CO-或-CR^x=N-O-(其中Rx表示H、C_1-C_3烷基或苯基)，其中包括任何側鏈之烴鏈可經-$NHCONH_2$、-COOH、-OH、-NH_2、NH-$CNNH_2$、磺醯胺、碸、亞碸或磺酸取代，其中G3表示-H或-COOH，且其中該基團-MOD較佳具有至少一個基團-COOH；

及其鹽、溶劑合物、溶劑合物之鹽及差向異構體。

此外較佳為式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)或(III)之化合物，其中

R^1表示H、-L-#1或-L-結合劑、-MOD或-$(CH_2)_{0-3}$Z，其中Z表示-H、-NHY^3、-OY^3、-SY^3、鹵素、-CO-NY^1Y^2或-CO-OY^3，

其中Y^1及Y^2彼此獨立地表示H、NH_2、-$(CH_2CH_2O)_{0-3}$-$(CH_2)_{0-3}$Z'(例如-$(CH_2)_{0-3}$Z')或-CH(CH_2W)Z'，且Y^3表示H或-$(CH_2)_{0-3}$Z'，其中Z'表示H、NH_2、SO_3H、COOH、-NH-CO-CH_2-CH_2-CH(NH_2)COOH或-$(CO-NH-CHY^4)_{1-3}$COOH，其中W表示H或OH，

其中Y^4表示視情況經$-NHCONH_2$取代之直鏈或分支鏈C_{1-6}烷基，或表示視情況經$-NH_2$取代之芳基或苯甲基；

R^2表示H、$-CO-CHY^4-NHY^5$或$-(CH_2)_{0-3}Z$，

其中Z表示-H、鹵素、$-OY^3$、$-SY^3$、NHY^3、$-CO-NY^1Y^2$或$-CO-OY^3$，

其中Y^1及Y^2彼此獨立地表示H、NH_2或$-(CH_2)_{0-3}Z'$，且Y^3表示H或$-(CH_2)_{0-3}Z'$，其中Z'表示H、SO_3H、NH_2或COOH；

其中Y^4表示視情況經$-NHCONH_2$取代之直鏈或分支鏈C_{1-6}烷基，或表示視情況經$-NH_2$取代之芳基或苯甲基，且Y^5表示H或$-CO-CHY^6-NH_2$，其中Y^6表示直鏈或分支鏈C_{1-6}烷基；

R^4表示H，

A表示CO、SO、SO_2、SO_2NH或$CNNH_2$；

R^3表示-L-#1或-L-結合劑、-MOD或視情況經取代之烷基、環烷基、芳基、雜芳基、雜烷基、雜環烷基，較佳為可視情況經以下取代之C_{1-10}烷基、C_{6-10}芳基或C_{6-10}芳烷基、C_{5-10}雜烷基、C_{1-10}烷基-O-C_{6-10}芳基或C_{5-10}雜環烷基：1-3個-OH基團、1-3個鹵素原子、1-3個鹵化烷基(各具有1-3個鹵素原子)、1-3個O-烷基、1-3個-SH基團、1-3個-S-烷基、1-3個-O-CO-烷基、1-3個-O-CO-NH-烷基、1-3個-NH-CO-烷基、1-3個-NH-CO-NH-烷基、1-3個$-S(O)_n$-烷基、1-3個$-SO_2$-NH-烷基、1-3個-NH-烷基、1-3個$-N(烷基)_2$基團、1-3個$-NH((CH_2CH_2O)1-20H)$基團、1-3個$-NH_2$基團或1-3個$-(CH_2)_{0-3}Z$基團，其中Z表示-H、鹵素、$-OY^3$、$-SY^3$、$-NHY^3$、$-CO-NY^1Y^2$或$-CO-OY^3$，其中Y^1及Y^2彼此獨立地表示H、NH_2或$-(CH_2)_{0-3}Z'$且Y^3表示H、$-(CH_2)_{0-3}-CH(NHCOCH_3)Z'$、$-(CH_2)_{0-3}-CH(NH_2)Z'$或$-(CH_2)_{0-3}Z'$，其中Z'表示H、$SO_3H$、$NH_2$或COOH (其中「烷基」較佳為$C_{1-10}$烷基)；

R^5表示H、-MOD、NH_2、NO_2、鹵素(尤其F、Cl、Br)、-CN、

CF_3、$-OCF_3$、$-CH_2F$、$-CH_2F$、SH或$-(CH_2)_{0-3}Z$，其中Z表示-H、$-OY^3$、$-SY^3$、鹵素、NHY^3、$-CO-NY^1Y^2$或$-CO-OY^3$，

其中Y^1及Y^2彼此獨立地表示H、NH_2或$-(CH_2)_{0-3}Z'$，且Y^3表示H或$-(CH_2)_{0-3}Z'$，其中Z'表示H、SO_3H、NH_2或COOH；

R^6及R^7彼此獨立地表示H或鹵素(尤其F、Cl、Br)；

R^8表示(視情況氟化)C_{1-10}烷基；

其中取代基R^1及R^3之一表示-L-#1或-L-結合劑，

L表示連接子且#1表示鍵結於抗體之鍵且結合劑表示抗體，

R^9表示H、F、CH_3、CF_3、CH_2F或CHF_2；

其中-MOD表示$-CH_2-S_x-(CH_2)_{0-4}-CHY^5-COOH$，其中x為0或1，且$Y^5$表示H或$NHY^6$，其中$Y^6$表示H或$-COCH_3$，

及其鹽、溶劑合物、溶劑合物之鹽及差向異構體。

此外較佳為以下化合物，其視情況可連同酸(諸如三氟乙酸)一起存在。此等化合物可經由對應於位置R^1、R^3及R^4之位置，經由連接子連接至抗體(其中氫原子經連接子取代)：

N-(3-胺基丙基)-N-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2-羥基乙醯胺；

(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]-N-甲基丁醯胺(1:1)；

N-(3-胺基丙基)-N-{(1S)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}乙醯胺；

N-(3-胺基丙基)-N-{(1S)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2-羥基乙醯胺；

S-(1-{2-[(N-{(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}-β-丙胺醯基)胺基]乙基}-2,5-二側氧基吡咯啶-3-基)-L-半胱胺酸；

S-(1-{2-[(N-{(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}-β-丙胺醯基)胺基]乙基}-2,5-二側氧基吡咯啶-3-基)-L-半胱胺酸；

S-[1-(2-{[2-({(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}胺基)乙基]胺基}-2-側氧基乙基)-2,5-二側氧基吡咯啶-3-基]-L-半胱胺酸；

N-[19-(3(R/S)-{[(2R)-2-胺基-2-羧基乙基]硫基}-2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)-17-側氧基-4,7,10,13-四氧雜-16-氮雜十九烷-1-醯基]-R/S-{2-[(3-胺基丙基){(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基]-2-側氧基乙基}高半胱胺酸；

S-{(3R/S)-1-[2-({(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}胺基)乙基]-2,5-二側氧基吡咯啶-3-基}-L-半胱胺酸；

S-[(3R/S)-1-(2-{[6-({2-[(3-胺基丙基){(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基]-2-側氧基乙基}硫基)己醯基]胺基}乙基)-2,5-二側氧基吡咯啶-3-基]-L-半胱胺酸；

S-{1-[2-({[(1R,3S)-3-({(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}胺基)環戊基]羰基}胺基)乙基]-2,5-二側氧基吡咯啶-3-基}-L-半胱胺酸；

S-(2-{[2-({(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}胺基)乙基]胺基}-2-側氧基乙基)-L-半胱胺酸；

N^6-(N-{(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}-β-丙胺醯基)-N^2-{N-[6-(3-{[(2R)-2-胺基-2-羧基乙基]硫基}-2,5-二側氧基吡咯啶-1-

基)己醯基]-L-纈胺醯基-L-丙胺醯基}-L-離胺酸；

N-[2-({(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}胺基)乙基]-L-麩醯胺酸；

N^6-(N-{(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}-β-丙胺醯基)-L-離胺酸；

N-(3-胺基丙基)-N-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-3,3,3-三氟丙醯胺；

N-(3-胺基丙基)-N-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-4-氟苯甲醯胺；

N-(3-胺基丙基)-N-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}乙醯胺；

N-(3-胺基丙基)-N-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-4-(三氟甲基)苯甲醯胺；

(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基} (乙二醇醯基)胺基]丁酸；

(2S)-2-胺基-N-(2-胺基乙基)-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯胺；

4-[(2-{[2-({(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}胺基)乙基]胺基}-2-側氧基乙基)胺基]-3-{[(2R)-2-胺基-2-羧基乙基]硫基}-4-側氧基丁酸；

4-[(2-{[2-({(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}胺基)乙基]胺基}-2-側氧基乙基)胺基]-2-{[(2R)-2-胺基-2-羧基乙基]硫基}-4-側氧

基丁酸；

N-{(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}-β-丙胺酸；

N-{(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}-L-絲胺酸；

N-{(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}-L-丙胺酸；

N-{(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}甘胺酸；

N-(3-胺基丙基)-N-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-4-甲基苯甲醯胺；

N-(3-胺基丙基)-N-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-4-(甲基硫基)苯甲醯胺；

(2S)-N-(3-胺基丙基)-N-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2-羥基丙醯胺；

N-(3-胺基丙基)-N-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2-(甲基硫基)乙醯胺；

(2S)-N-(3-胺基丙基)-N-{(1R)-1-[4-苯甲基-1-(2,5-二氟苯基)-1H-吡唑-3-基]-2,2-二甲基丙基}-2-羥基丙醯胺；

4-[(3-胺基丙基){(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基]-4-側氧基丁酸甲酯；

4-[(3-胺基丙基){(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基]-4-側氧基丁酸；

(2R)-22-[(3R/S)-3-{[(2R)-2-胺基-2-羧基乙基]硫基}-2,5-二側氧基吡咯啶-1-基]-2-[({2-[(3-胺基丙基){(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基]-2-側氧基乙基}硫基)甲基]-

4,20-二側氧基-7,10,13,16-四氧雜-3,19-二氮雜二十二烷-1-酸；

N-乙醯基-S-{2-[(3-胺基丙基){(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基]-2-側氧基乙基}-L-半胱胺酸；

N-乙醯基-S-[2-([3-(L-丙胺醯基胺基)丙基]{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基)-2-側氧基乙基]-L-半胱胺酸；

(2S)-N-(3-胺基丙基)-N-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}四氫呋喃-2-甲醯胺；

3-({2-[(3-胺基丙基){(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基]-2-側氧基乙基}硫基)丙酸；

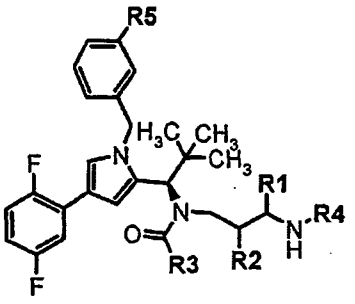
S-{2-[(3-胺基丙基){(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基]-2-側氧基乙基}高半胱胺酸；

4-胺基-N-(3-胺基丙基)-N-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}苯甲醯胺；

4-[(2-{[(2R)-2-({(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}胺基)-2-羧基乙基]胺基}-2-側氧基乙基)胺基]-3-{[(2R)-2-胺基-2-羧基乙基]硫基}-4-側氧基丁酸；

4-[(2-{[(2R)-2-({(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}胺基)-2-羧基乙基]胺基}-2-側氧基乙基)胺基]-2-{[(2R)-2-胺基-2-羧基乙基]硫基}-4-側氧基丁酸。

根據本發明，尤其較佳為以下式IV化合物，其中R^1、R^2、R^3、R^4及R^5具有上述含義(如針對例如式(I)或(II)所述)：



式IV

尤其較佳為如下式IV化合物，其中R^1及R^5表示H或-L-#1；R^2及R^4表示H或R^2及R^4一起(形成吡咯啶環)表示-CH_2-CHR^{10}-或-CHR^{10}-CH_2-，其中R^{10}表示H；且R^3表示CH_2OH、$CH(CH_3)OH$或-L-#1，其中取代基R^1及R^3之一表示-L-#1。此外，尤其較佳為如下式IV化合物，其中R^1表示H或COOH；R^2及R^5表示H；R^4表示-L-#1；且R^3表示CH_2OH或$CH(CH_3)OH$，其中-L-#1為使R^4轉變成H的酶可裂解之連接子。

連接子

文獻揭示用於有機分子與結合劑(諸如抗體)共價偶合(結合)之不同選擇方案(參見例如K. Lang及J. W. Chin. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4764-4806；M. Rashidian等人 *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 1277-1294)。根據本發明，較佳為KSP抑制劑經由抗體之半胱胺酸殘基之一或多個硫原子(已以游離硫醇形式存在或藉由二硫橋還原而產生)及/或經由抗體之離胺酸殘基之一或多個NH基團與抗體結合。然而，亦可使KSP抑制劑經由抗體之酪胺酸殘基、經由抗體之麩醯胺酸殘基、經由抗體之非天然胺基酸殘基、經由抗體之游離羧基或經由抗體之糖殘基連接至抗體。利用連接子進行偶合。連接子可分類成可在活體內裂解之連接子組及在活體內穩定之連接子組(參見L. Ducry及B. Stump, *Bioconjugate Chem.* **21**, 5-13 (2010))。可在活體內裂解之連接子具有可在活體內裂解之基團，其中又可在活體內化學可裂解基團與酶可裂解基團之間作出區分。「活體內化學可裂解」及「活體內酶可裂解」

意謂連接子或基團在循環中穩定且僅在靶細胞處或在靶細胞內藉由化學上或酶學上不同的環境(較低pH；升高之麩胱甘肽濃度；存在溶酶體酶，諸如組織蛋白酶或纖維蛋白溶酶，或糖苷酶，諸如β-葡糖醛酸酶)裂解，從而釋放低分子量KSP抑制劑或其衍生物。在活體內化學可裂解之基團尤其為二硫化物、腙、縮醛及胺縮醛；可在活體內酶可裂解之基團為尤其2-8-寡肽基團，尤其二肽基團或糖苷。肽裂解位點揭示於*Bioconjugate Chem.* **2002,** *13,* 855-869及*Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 8 **(1998)** 3341-3346以及*Bioconjugate Chem.* **1998,** *9,* 618-626中。此等位點包括例如纈胺酸-丙胺酸、纈胺酸-離胺酸、纈胺酸-瓜胺酸、丙胺酸-離胺酸及苯丙胺酸-離胺酸(視情況具有其他醯胺基團)。

活體內穩定之連接子依據高穩定性(24小時之後，血漿中之代謝物少於5%)區分且不具有上述活體內化學或酶可裂解基團。

連接子-L-較佳具有下述基本結構(i)至(iv)之一：

(i)-$(C=O)_m$-SG1-L1-L2-

(ii)-$(C=O)_m$-L1-SG-L1-L2-

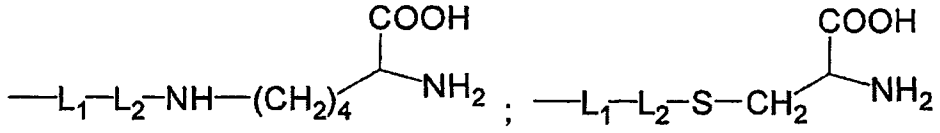
(iii)-$(C=O)_m$-L1-L2-

(iv)-$(C=O)_m$-L1-SG-L2

其中m為0或1；SG為活體內(化學或酶)可裂解基團(尤其二硫化物、腙、縮醛及胺縮醛；或可藉由蛋白酶裂解之2-8-寡肽基團)，SG1為寡肽基團或較佳為二肽基團，L1彼此獨立地表示活體內穩定之有機基團，且L2表示與結合劑或單鍵之偶合基團。本文中，較佳與抗體之半胱胺酸殘基或離胺酸殘基偶合。或者，可與抗體之酪胺酸殘基、麩醯胺酸殘基或非天然胺基酸偶合。非天然胺基酸可含有例如醛基或酮基(諸如甲醯基甘胺酸)或疊氮基或炔基(參見Lan及Chin, Cellular Incorporation of Unnatural Amino Acids and Bioorthogonal Labeling of

Proteins, Chem.Rev. 2014, 114, 4764-4806)。

根據本發明，尤其較佳為基本連接子結構(iii)。投與具有基本連接子結構(iii)且連接子與抗體之半胱胺酸或離胺酸殘基偶合之本發明結合物，經由代謝，產生下式之半胱胺酸或離胺酸衍生物：



其中L1在各種情況下連接至低分子量KSP抑制劑，例如式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIca)、(IId)、(IIe)、(IIf)、(III)或(IV)之化合物。

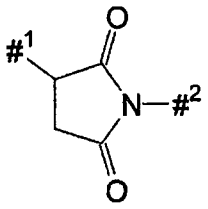
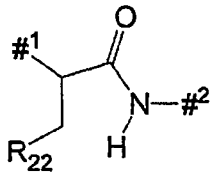
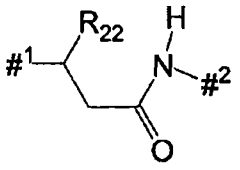
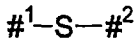
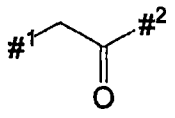
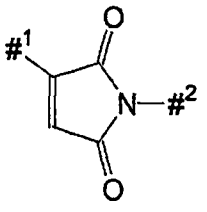
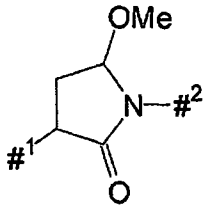
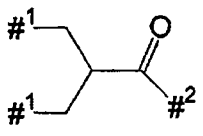
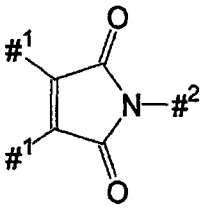
根據本發明，較佳亦為基本連接子結構(ii)及(iv)，尤其在位置R^1連接時，尤其當基團L1具有以下結構之一時：

(a) $-NH-(CH_2)_{0-4}-(CHCH_3)_{0-4}-CHY^5-CO-Y^7$，其中$Y^5$表示H或$NHY^6$，其中$Y^6$表示H或$-COCH_3$，且$Y^7$表示單一鍵或$-NH-(CH_2)_{0-4}-CHNH_2-CO-$，使得裂解後獲得對應結構$-NH-(CH_2)_{0-4}-(CHCH_3)_{0-4}-CHY^5-COOH$或$-NH-(CH_2)_{0-4}-(CHCH_3)_{0-4}-CHY^5-CO-NH-(CH_2)_{0-4}-CHNH_2-COOH$。

(b) $-CH_2-S_x-(CH_2)_{0-4}-CHY^5-CO-$，其中x為0或1，且$Y^5$表示H或$NHY^6$，其中$Y^6$表示H或$-COCH_3$，使得裂解後獲得對應結構$-CH_2-S_x-(CH_2)_{0-4}-CHY^5-COOH$。

根據本發明，在連接至位置R^4時較佳亦為基本連接子結構(i)，尤其m=0時。

若連接子連接至半胱胺酸側鏈或半胱胺酸殘基，則L2較佳衍生自與半胱胺酸之硫氫基反應的基團。此等基團包括鹵乙醯基、順丁烯二醯亞胺、氮雜環丙烷、丙烯醯基、芳族化化合物、乙烯碸、吡啶基二硫化物、TNB硫醇及二硫化物還原劑。此等基團通常以親電方式與硫氫鍵發生反應，形成硫橋(例如硫醚)或二硫橋。較佳為穩定硫醚橋。L2較佳為

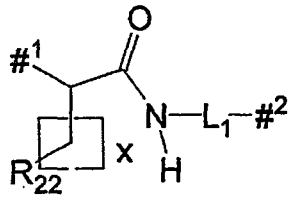
其中

#[1]表示與該抗體之硫原子的連接點，

#[2]表示與基團L^1之連接點，且

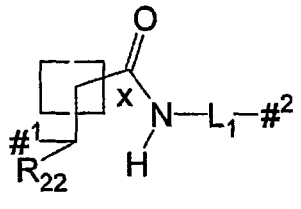
R^{22}表示COOH、COOR、COR、CONHR、$CONR_2$ (其中在各種情況下R表示C1-3烷基)、$CONH_2$，較佳COOH。

尤其較佳L2為：



式A3

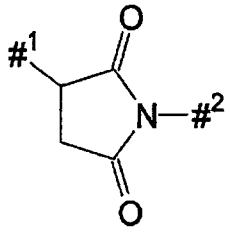
或



式A4

其中#[1]表示與抗體之硫原子的連接點，#[2]表示與活性化合物之連接點，x表示1或2，且R^{22}表示COOH、COOR、COR、$CONR_2$、CONHR(其中R在各種情況下表示C_{1-3}烷基)、$CONH_2$，較佳為COOH。當x=1且R^{22}表示COOH時為較佳。

在本發明之結合物中或在本發明之結合物之混合物中，存在鍵結於抗體之半胱胺酸殘基的鍵，其存在的範圍較佳超過80%，尤佳超過90% (在各種情況下，以連接子鍵結於抗體之鍵的總數計)，尤其較佳為式A3或A4兩種結構之一。本文中，式A3或A4之結構通常一起較佳以60:40至40:60之比率(以鍵結於抗體之鍵的數目計)存在。剩餘鍵則以如下結構存在：

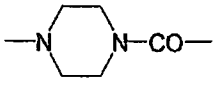
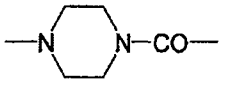


根據本發明，L1較佳由下式表示：

$$\#^1\text{-}(NR^{10})_n\text{-}(G1)_o\text{-}G2\text{-}\#^2$$

其中

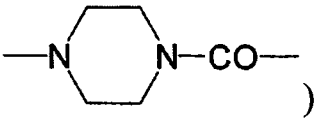
R^{10}表示H、NH_2或C_1-C_3烷基；

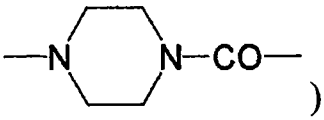
G1表示-NHCO-、-CONH-或  ；(若G1表示NHCO或  ，則R^{10}較佳不為NH_2)

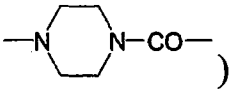
n表示0或1；

o表示0或1；且

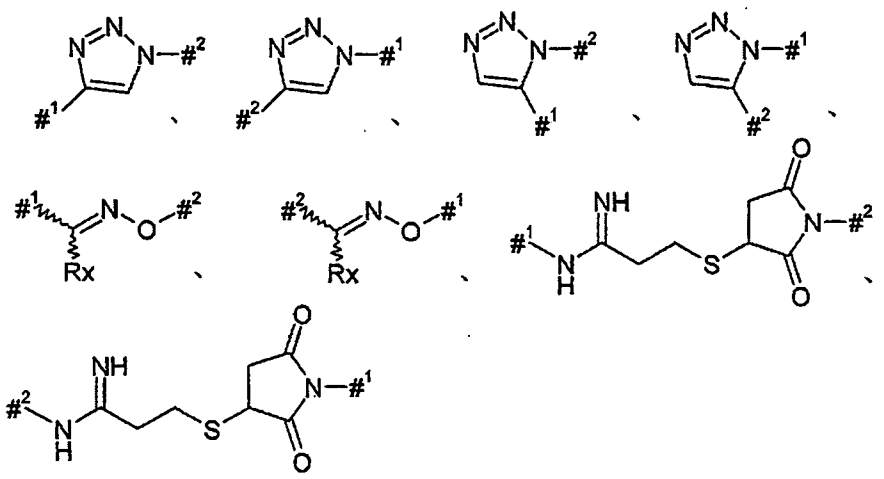
G2表示具有1至100個來自伸芳基及/或直鏈及/或分支鏈及/或環狀伸烷基之碳原子且可間雜以下基團中之一或多者一次或超過一次的直鏈或分支鏈烴鏈：-O-、-S-、-SO-、SO_2、$-NR^y-$、$-NR^yCO-$、$-C(NH)NR^y-$、$CONR^y-$、$-NR^yNR^y-$、$-SO_2NR^yNR^y-$、$-CONR^yNR^y-$ (其中

R^y表示H、苯基、C_1-C_{10}烷基、C_2-C_{10}烯基或C_2-C_{10}炔基，各可視情況經以下取代：$NHCONH_2$、-COOH、-OH、$-NH_2$、$NH-CNNH_2$、磺醯胺、碸、亞碸或磺酸)、-CO-、$-CR^x=N-O-$ (其中R^x表示H、C_1-C_3烷基或苯基)及/或具有至多4個選自由N、O及S組成之群的雜原子、-SO-或$-SO_2-$的3至10員芳族或非芳族雜環(較佳 )，其中包括任何側鏈之烴鏈可經$-NHCONH_2$、-COOH、-OH、$-NH_2$、$NH-CNNH_2$、磺醯胺、碸、亞碸或磺酸取代。

G2表示具有1至100個來自伸芳基及/或直鏈及/或分支鏈及/或環狀伸烷基之碳原子且可間雜以下基團中之一或多者一次或超過一次的直鏈或分支鏈烴鏈：-O-、-S-、-SO-、SO_2、-NH-、-CO-、-NHCO-、-CONH-、-NMe-、-NHNH-、$-SO_2NHNH-$、-CONHNH-及具有至多4個選自由N、O及S組成之群的雜原子或-SO-的5至10員芳族或非芳族雜環(較佳 )，其中側鏈若存在則可經$-NHCONH_2$、-COOH、-OH、$-NH_2$、$NH-CNNH_2$、磺醯胺、碸、亞碸或磺酸取代。

G2較佳表示具有1至100個來自伸芳基及/或直鏈及/或分支鏈及/或環狀伸烷基之碳原子且可間雜以下基團中之一或多者一次或超過一次的直鏈或分支鏈烴鏈：-O-、-S-、-SO-、SO_2、-NH-、-CO-、-NHCO-、-CONH-、-NMe-、-NHNH-、$-SO_2NHNH-$、-CONHNH-、$-CR^x=N-O-$ (其中R^x表示H、C_1-C_3烷基或苯基)及具有至多4個選自由N、O及S組成之群的雜原子、-SO-或$-SO_2-$的3至10員、例如5至10員芳族或非芳族雜環(較佳 )，其中包括側鏈之烴鏈若存在則可經$-NHCONH_2$、-COOH、-OH、$-NH_2$、$NH-CNNH_2$、磺醯胺、碸、亞碸或磺酸取代。

G2中之其他間雜基團較佳為



其中R^x表示H、C_1-C_3烷基或苯基。

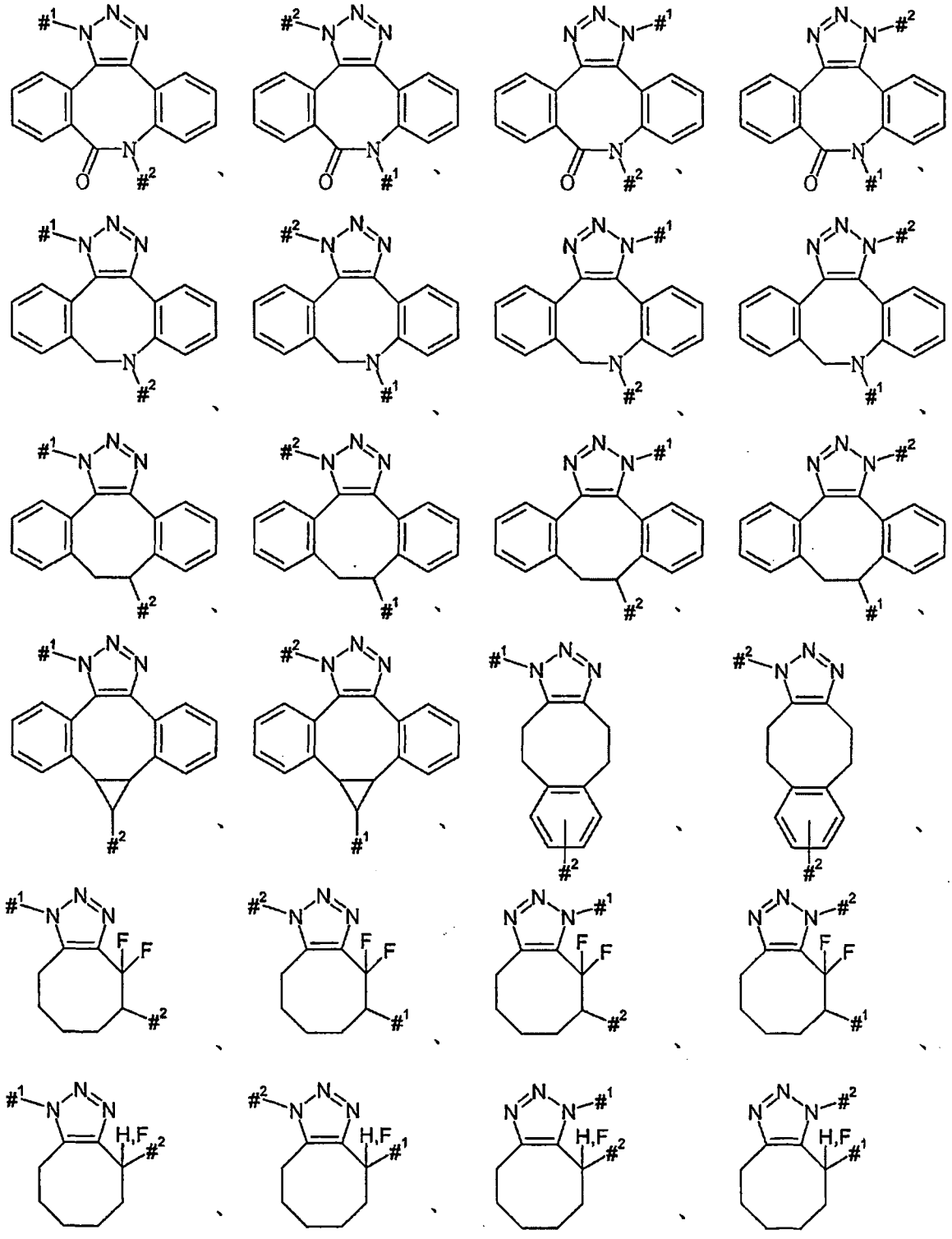
本文中，#1為鍵結於KSP抑制劑之鍵且#2為偶合基團鍵結於抗體(例如L2)之鍵。

伸芳基及/或直鏈及/或分支鏈及/或環狀伸烷基之直鏈或分支鏈烴鏈一般包含具有所述相應碳原子數目之α,ω-二價烷基。可提及以下作為實例且為較佳：亞甲基、乙-1,2-二基(1,2-伸乙基)、丙-1,3-二基(1,3-伸丙基)、丁-1,4-二基(1,4-伸丁基)、戊-1,5-二基(1,5-伸戊基)、己-1,6-二基(1,6-伸己基)、庚-1,7-二基(1,7-伸己基)、辛-1,8-二基(1,8-伸辛基)、壬-1,9-二基(1,9-伸壬基)、癸-1,10-二基(1,10-伸癸基)。然而，烴鏈中之伸烷基亦可為分支鏈，亦即上述直鏈伸烷基中之一或多個氫原子可視情況經C_{1-10}烷基取代，從而形成側鏈。烴鏈另外可含有環狀伸烷基(環烷二基)，例如1,4-環己烷二基或1,3-環戊烷二基。此等環狀基團可為不飽和的。詳言之，烴基中可存在芳族基(伸芳基)，例如伸苯基。繼而，亦在環狀伸烷基及伸芳基中，一或多個氫原子可視情況經C_{1-10}烷基取代。以此方式形成視情況分支之烴鏈。此烴鏈具有總共0至100個碳原子，較佳為1至50個、尤其較佳2至25個碳原子。

側鏈若存在，則可經-$NHCONH_2$、-COOH、-OH、-NH_2、NH-$CNNH_2$、磺醯胺、碸、亞碸或磺酸相同或不同地取代一次或超過一次。

烴鏈可相同或不同地間雜以下基團中之一或多者一次或超過一次：-O-、-S-、-SO-、SO_2、-NH-、-CO-、-NHCO-、-CONH-、-NMe-、-NHNH-、-SO_2NHNH-、-CONHNH-及具有至多4個選自由N、O及S組成之群的雜原子、-SO-或-SO_2-的5至10員芳族或非芳族雜環。

G2中之其他間雜基團較佳為



較佳地，連接子對應於下式：

§-(CO)m-L1-L2-§§

其中

m表示0或1；

§表示鍵結於活性化合物分子之鍵且

§§表示鍵結於結合肽或蛋白之鍵，且

L1及L2具有以上給出之含義。

尤其較佳地，L1具有式-NR11B-，其中

R^{11}表示H或NH_2；

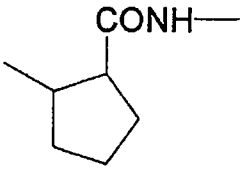
B表示-$[(CH_2)_x$-$(X^4)_y]_w$-$(CH_2)_z$-，

w = 0至20；

x = 0至5；

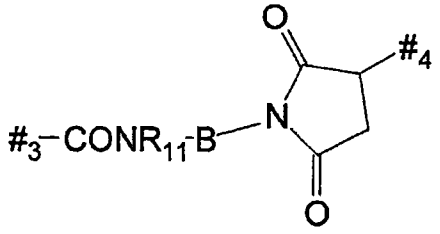
y = 0或1；

z = 0至5；且

X^4表示-O-、-CONH-、-NHCO-或 

。

根據本發明較佳之連接子L具有下式：



其中

#3表示鍵結於活性化合物分子之鍵，

#4表示鍵結於結合肽或蛋白之鍵，

R^{11}表示H或NH_2；

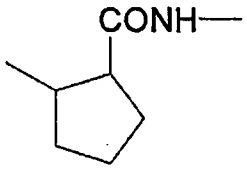
B表示-$[(CH_2)_x$-$(X^4)_y]$w-$(CH_2)_z$-，

w = 0至20；

x = 0至5；

y = 0或1；

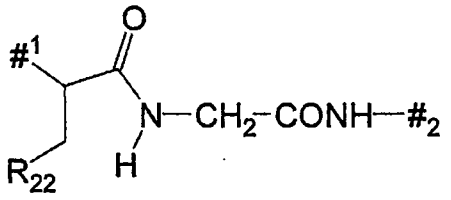
z = 1至5；且

X^4表示-O-、-CONH-、-NHCO-或 

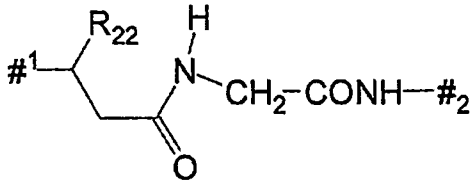
。

上述連接子在式(I)或(II)之結合物中尤其較佳，其中連接子藉由取代R1之氫原子而偶合，或與R4之可裂解連接子SG1組合，亦即R1表示-L-#1或R4表示-SG1-L-#1，其中#1表示鍵結於抗體之鍵。

根據本發明，另外較佳為下述連接子：在本發明之結合物中或在本發明之結合物之混合物中，存在鍵結於抗體之半胱胺酸殘基的鍵，其存在的範圍較佳超過80%、尤其較佳超過90%(在各種情況下，以鍵結於抗體之連接子之鍵的總數計)，尤佳為式A5或A6之兩種結構之一：



式A5



式A6

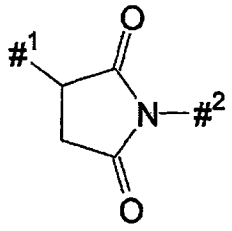
其中

#[1]表示與抗體硫原子之連接點，

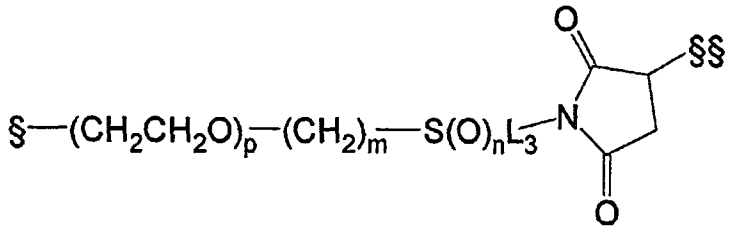
#[2]表示與基團L^1之連接點，且

R^{22}表示COOH、COOR、COR、$CONR_2$、CONHR (其中R在各種情況下表示C1-3烷基)、$CONH_2$，較佳COOH。

本文中，式A5或A6之結構一般一起較佳以60:40至40:60之比率(以鍵結於抗體之鍵的數目計)存在。剩餘鍵則以如下結構存在：



連接至半胱胺酸側鏈或半胱胺酸殘基之其他連接子-L-具有下式：



其中

§表示鍵結於活性化合物分子之鍵且

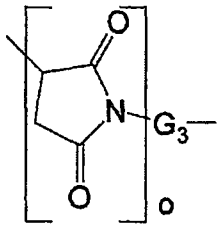
§§表示鍵結於結合肽或蛋白之鍵，

m表示0、1、2或3；

n表示0、1或2；

p表示0至20；且

L3表示



；

其中

o表示0或1；

且

G3表示具有1至100個來自伸芳基及/或直鏈及/或環狀伸烷基之碳原子且可間雜以下基團中之一或多者一次或超過一次的直鏈或分支鏈

烴鏈：-O-、-S-、-SO-、SO_2、-NH-、-CO-、-NHCO-、-CONH-、-NMe-、-NHNH-、-SO_2NHNH-、-CONHNH-及具有至多4個選自由N、O及S組成之群的雜原子、-SO-或SO_2的3至10員(較佳5至10員)芳族或非芳族雜環，其中側鏈若存在則可經-$NHCONH_2$、-COOH、-OH、-NH_2、NH-$CNNH_2$、磺醯胺、碸、亞碸或磺酸取代。

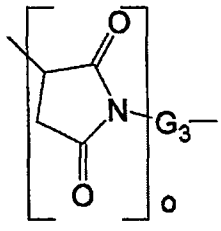
在上式中，較佳

m表示1；

p表示0；

n表示0；

且L3表示



；

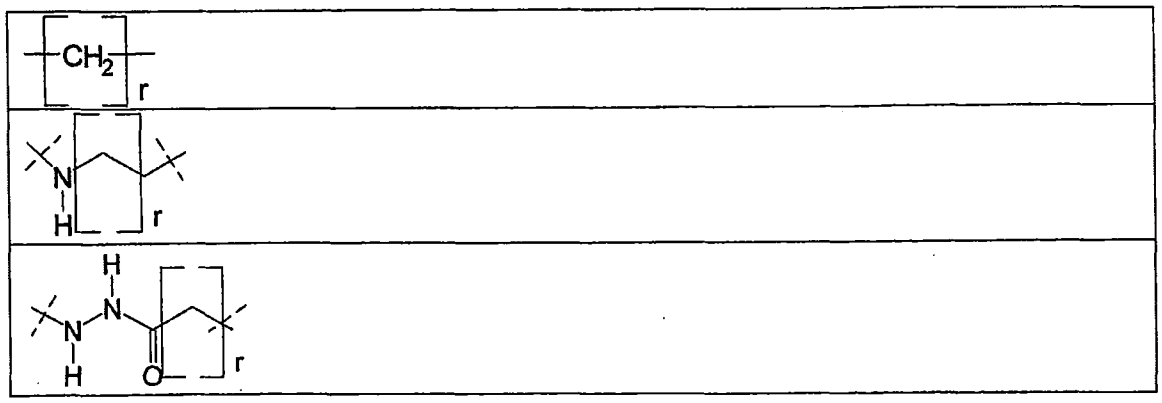
其中

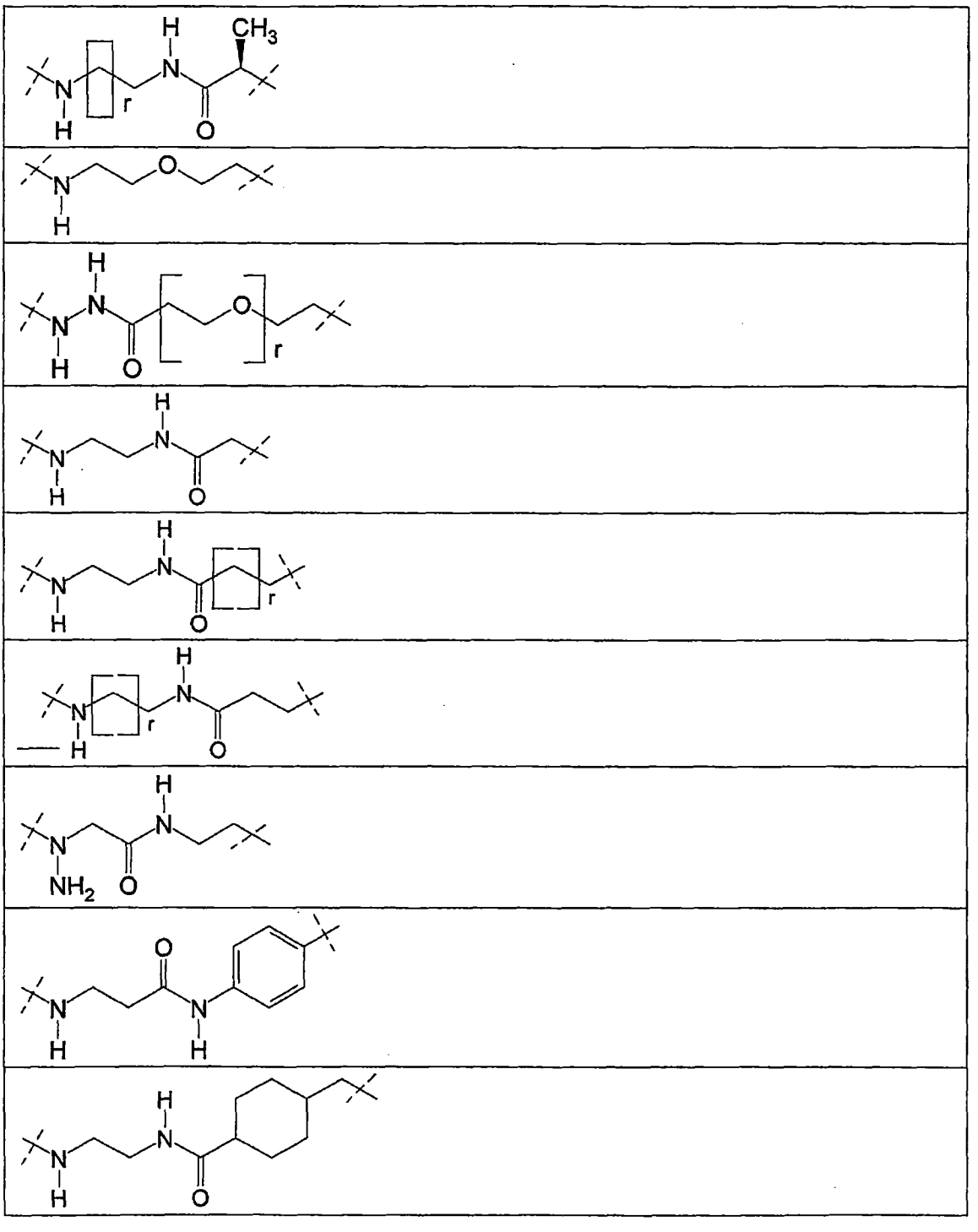
o表示0或1；且

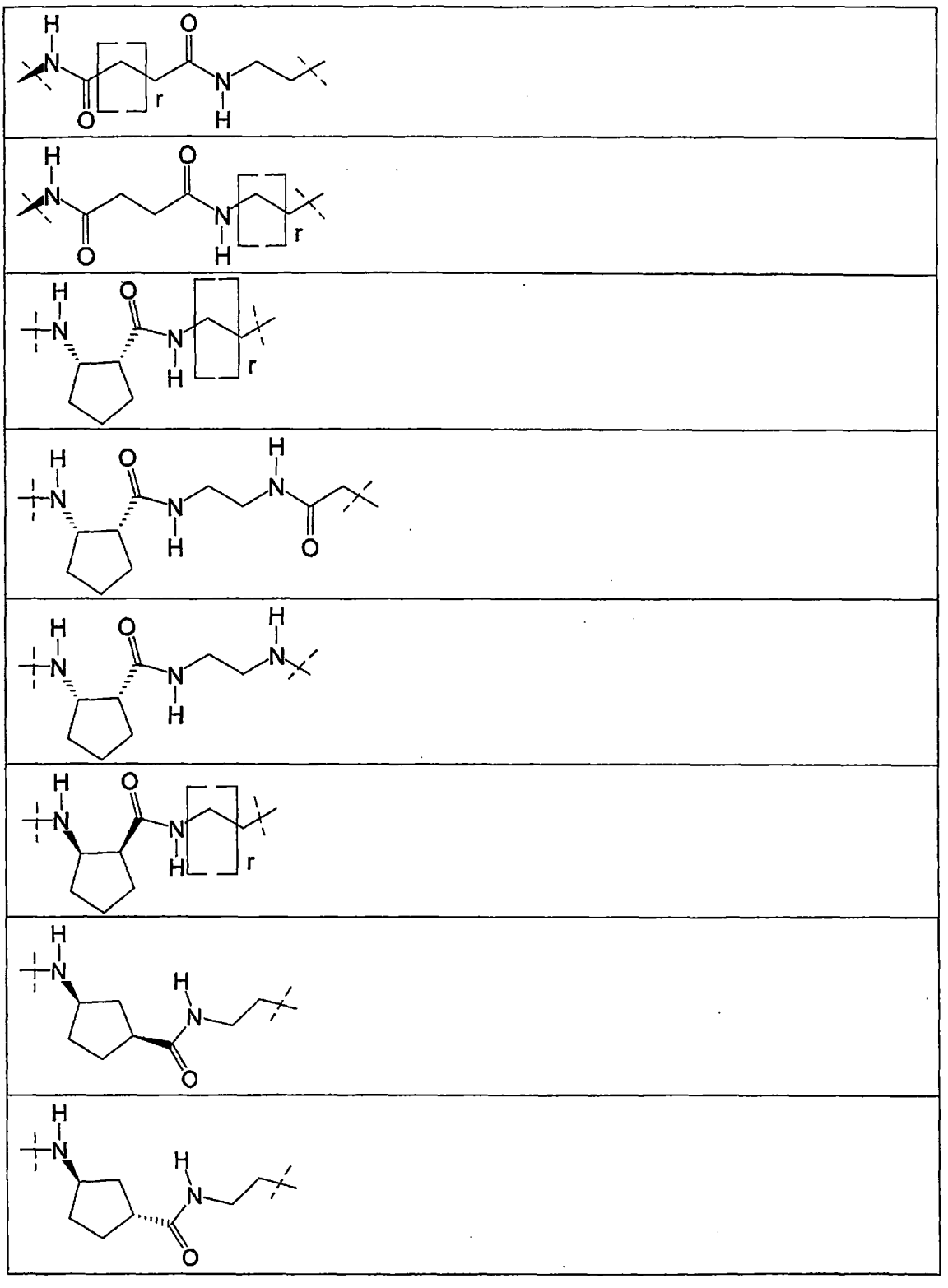
G3表示-$(CH_2CH_2O)_s(CH_2)_t(CONH)_uCH_2CH_2O)_v(CH_2)_w$-，其中

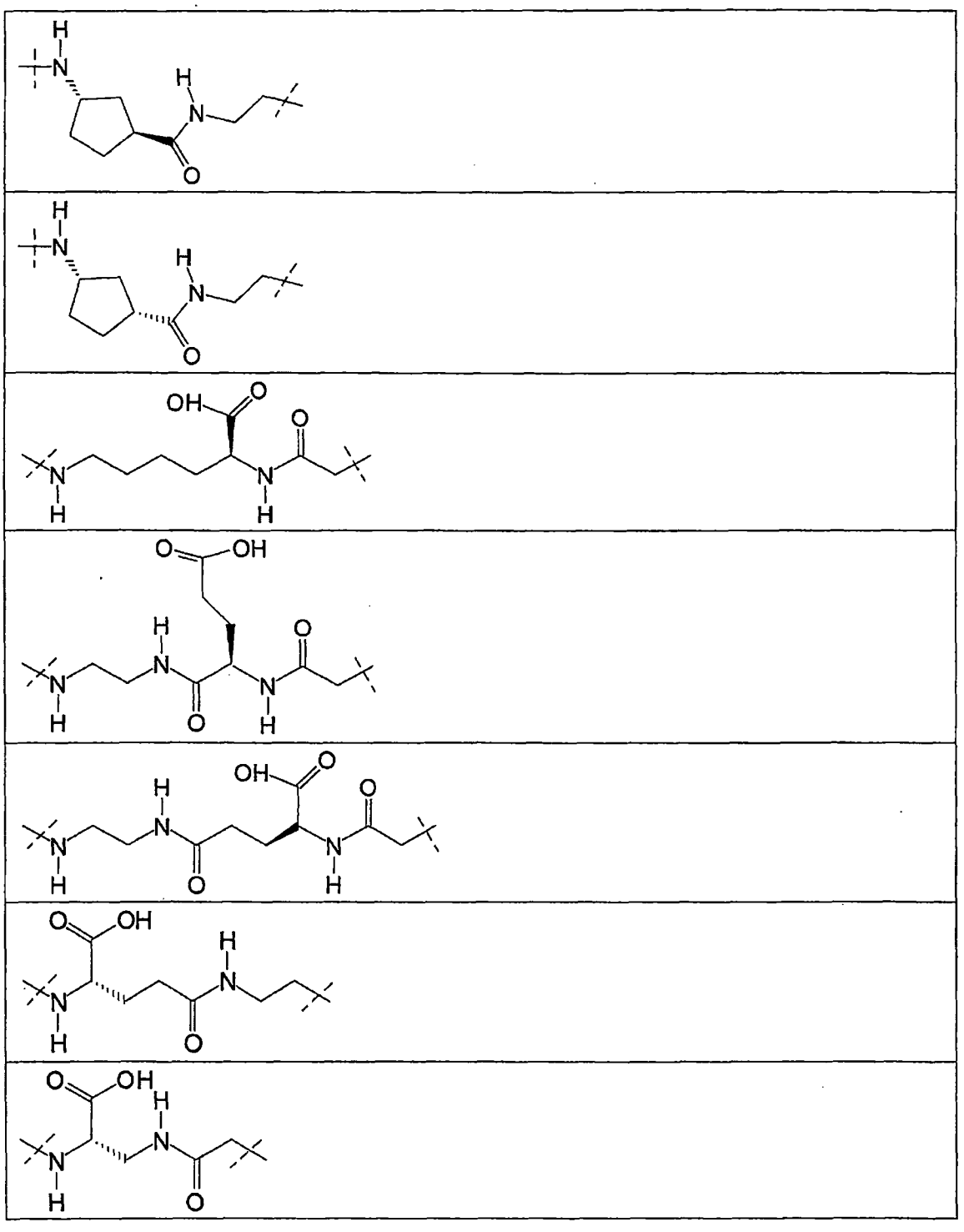
s、t、v及w各彼此獨立地為0至20且u為0或1。

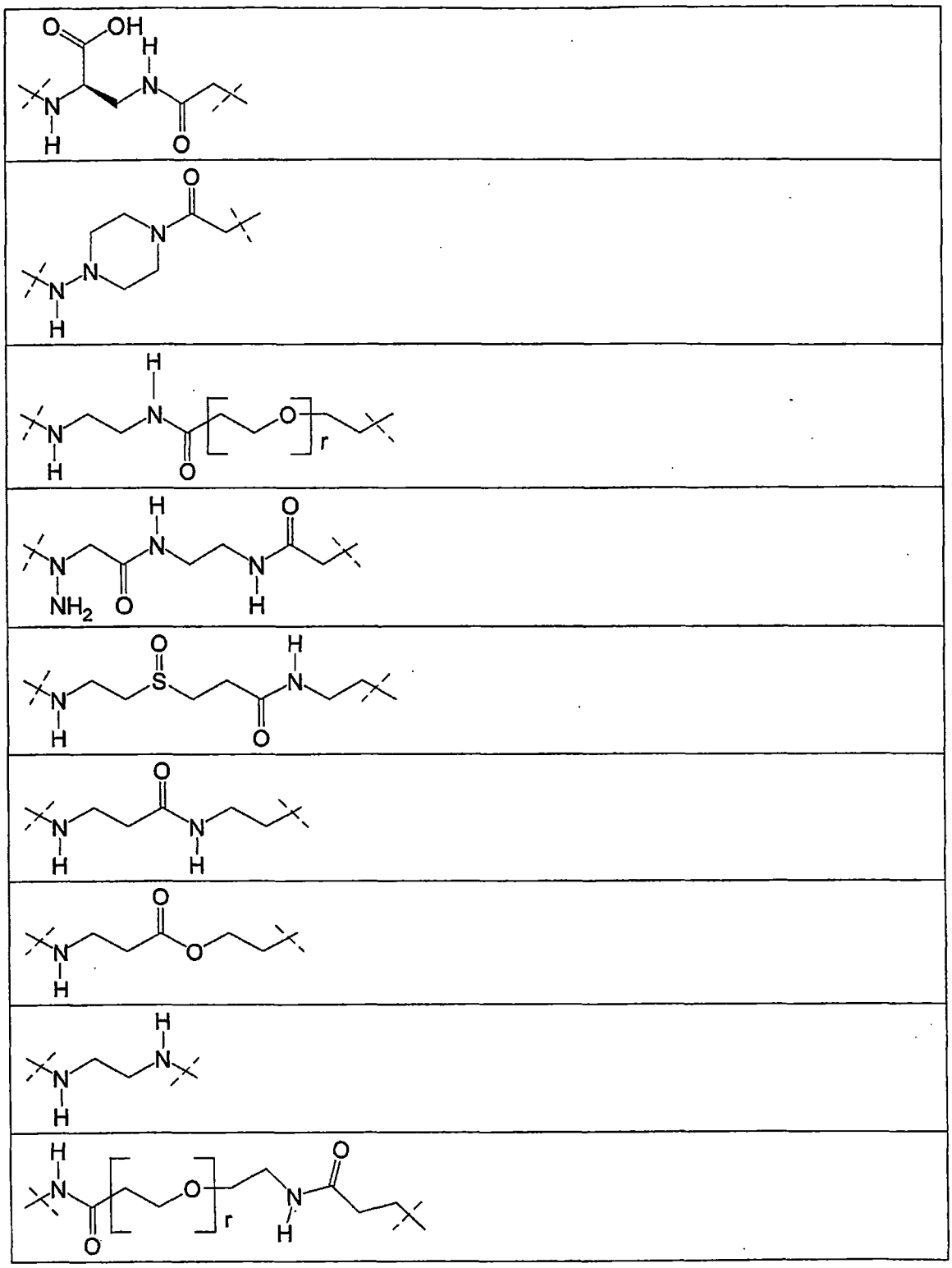
上式§-(CO)m-L1-L2-§§中之較佳基團L1為下述彼等基團，其中r在各種情況下彼此獨立地表示數值0至20，較佳為0至15，尤其較佳為1至20，特別較佳為2至10：

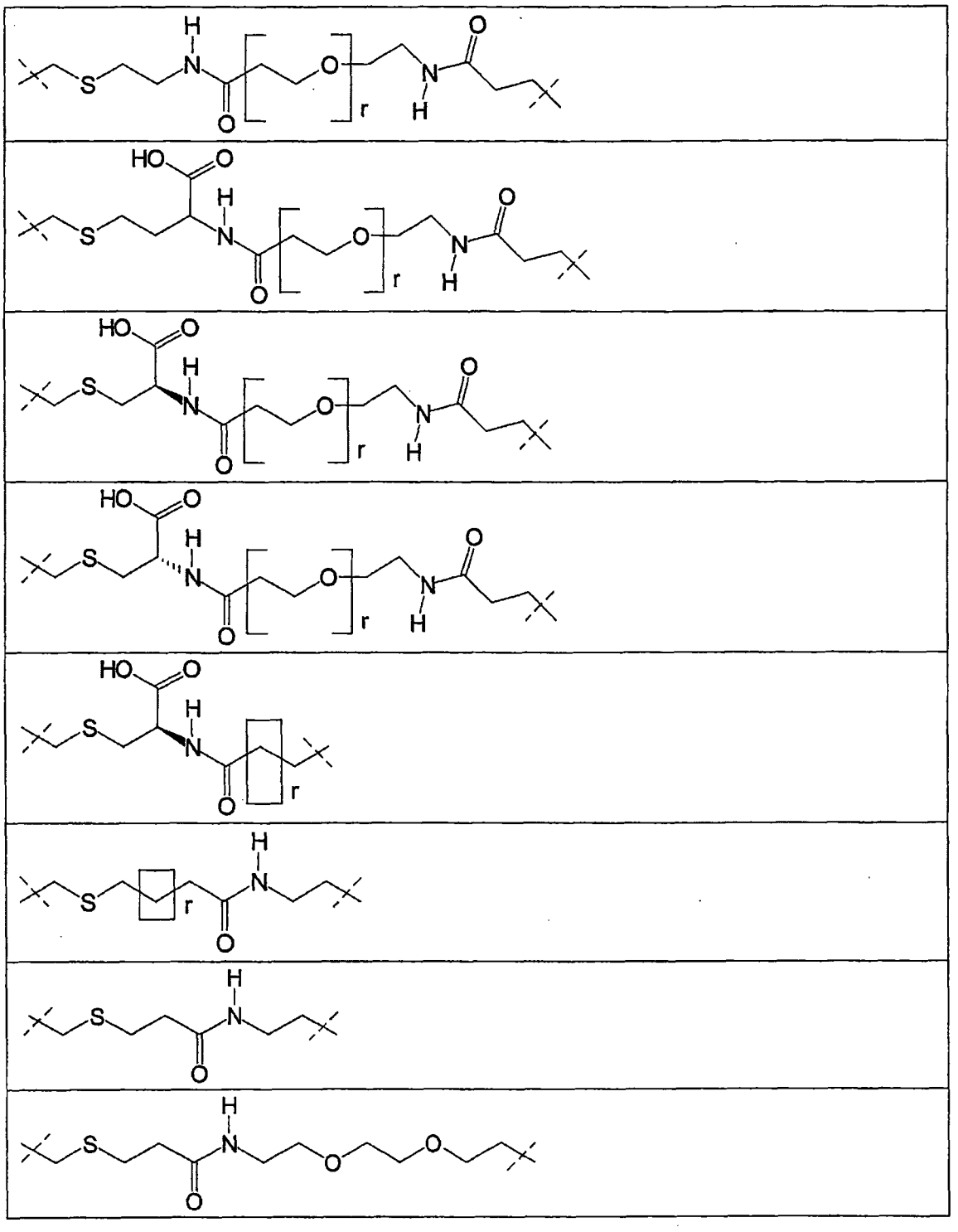


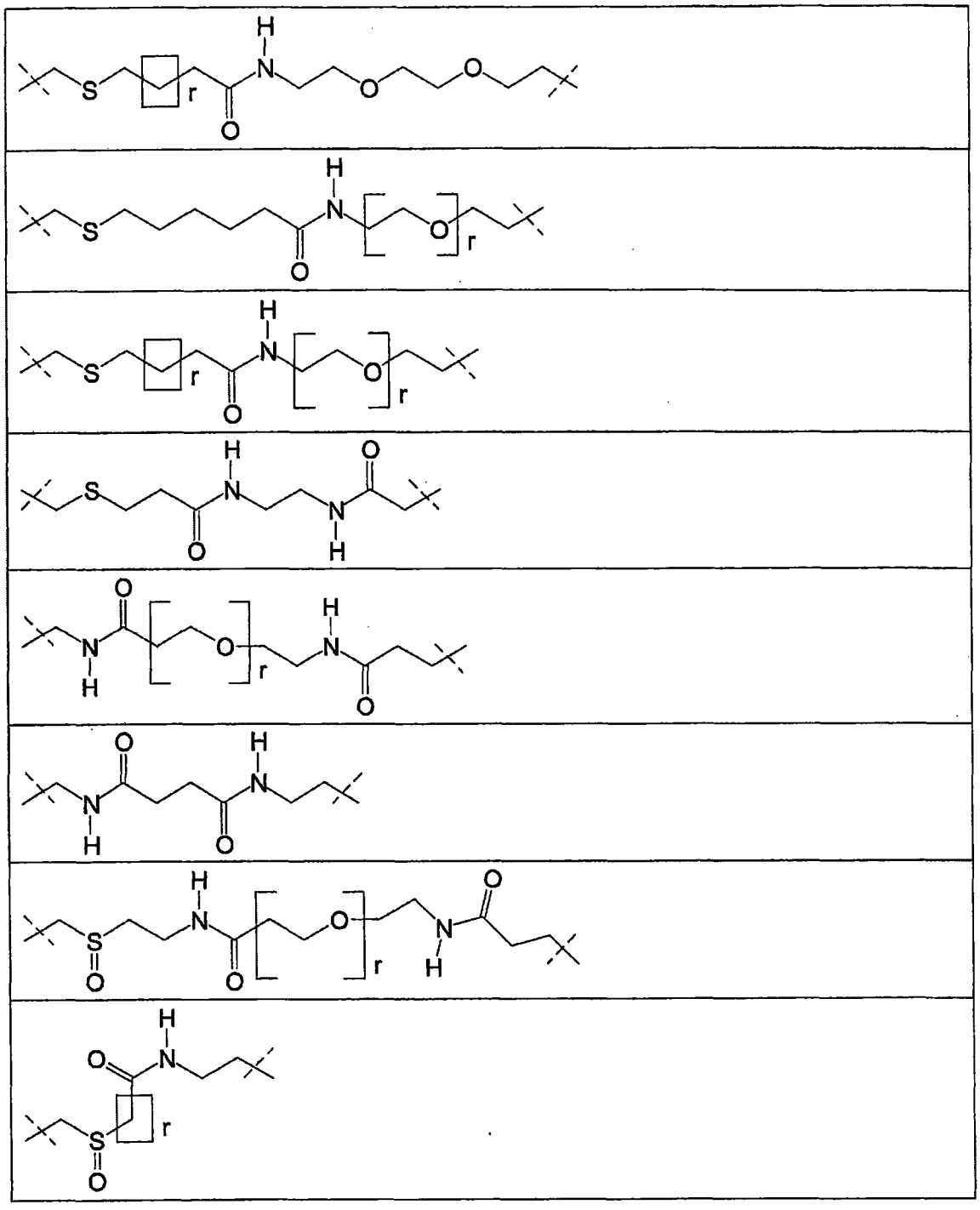


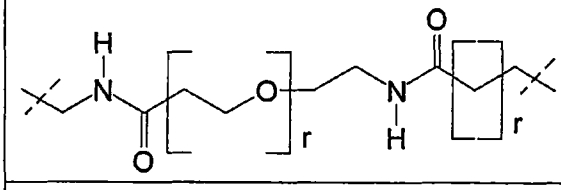


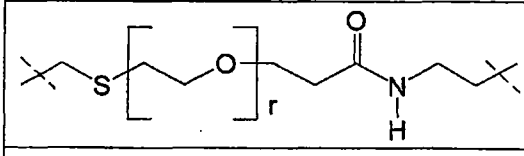


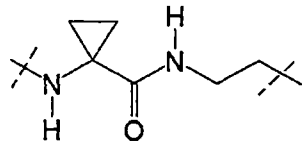


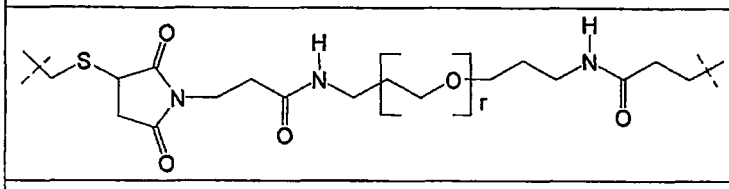


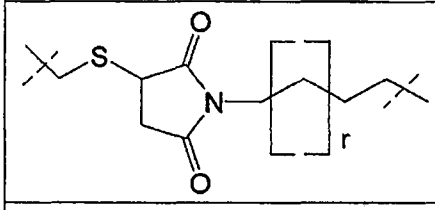


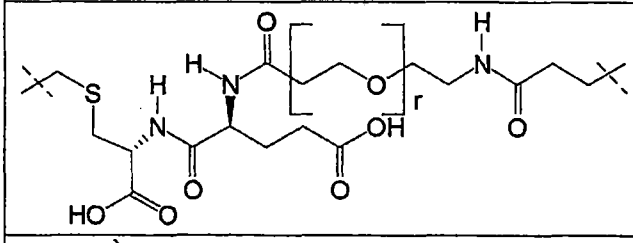


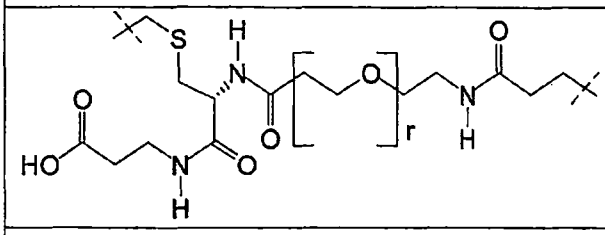


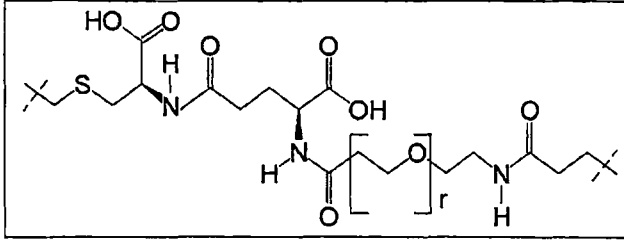


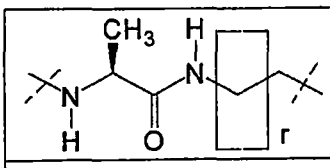


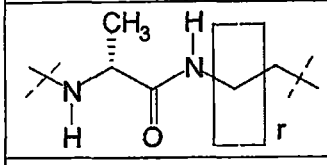


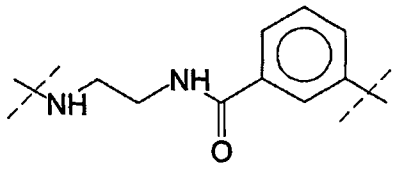


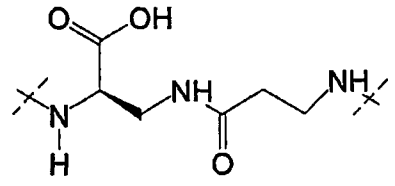


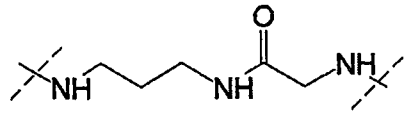


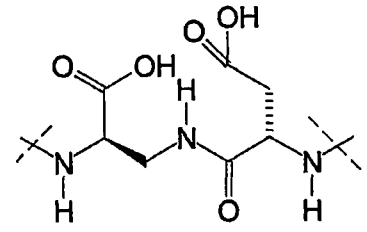


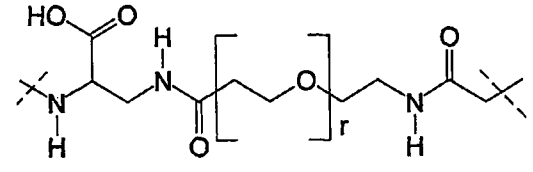


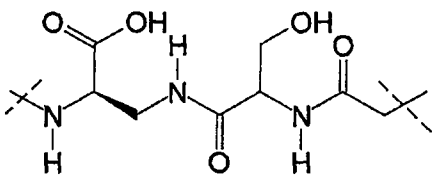


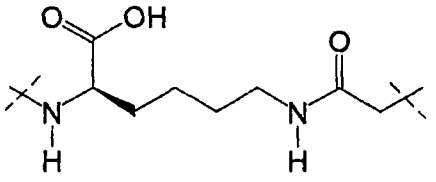


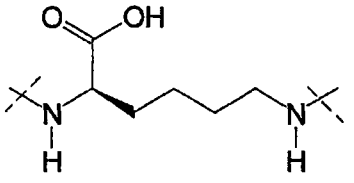


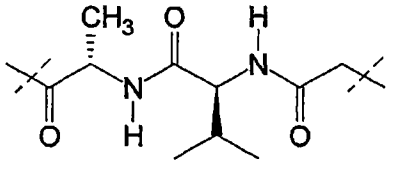


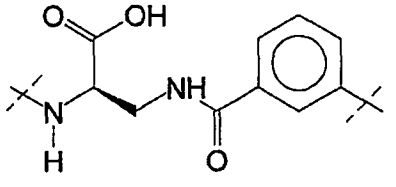


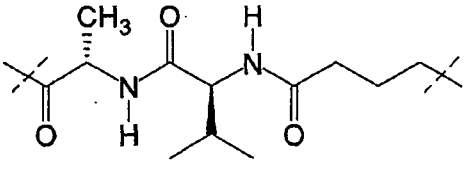


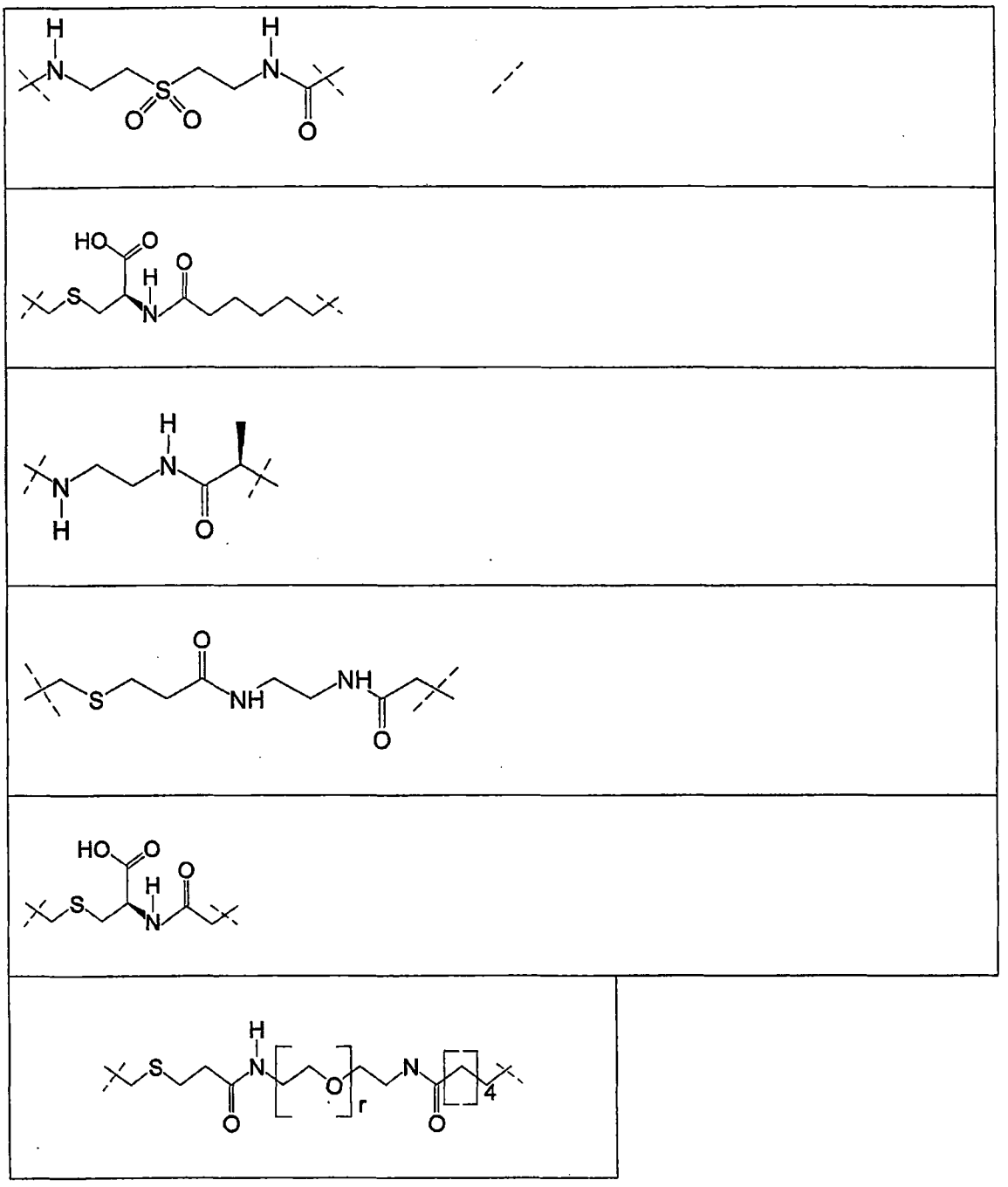


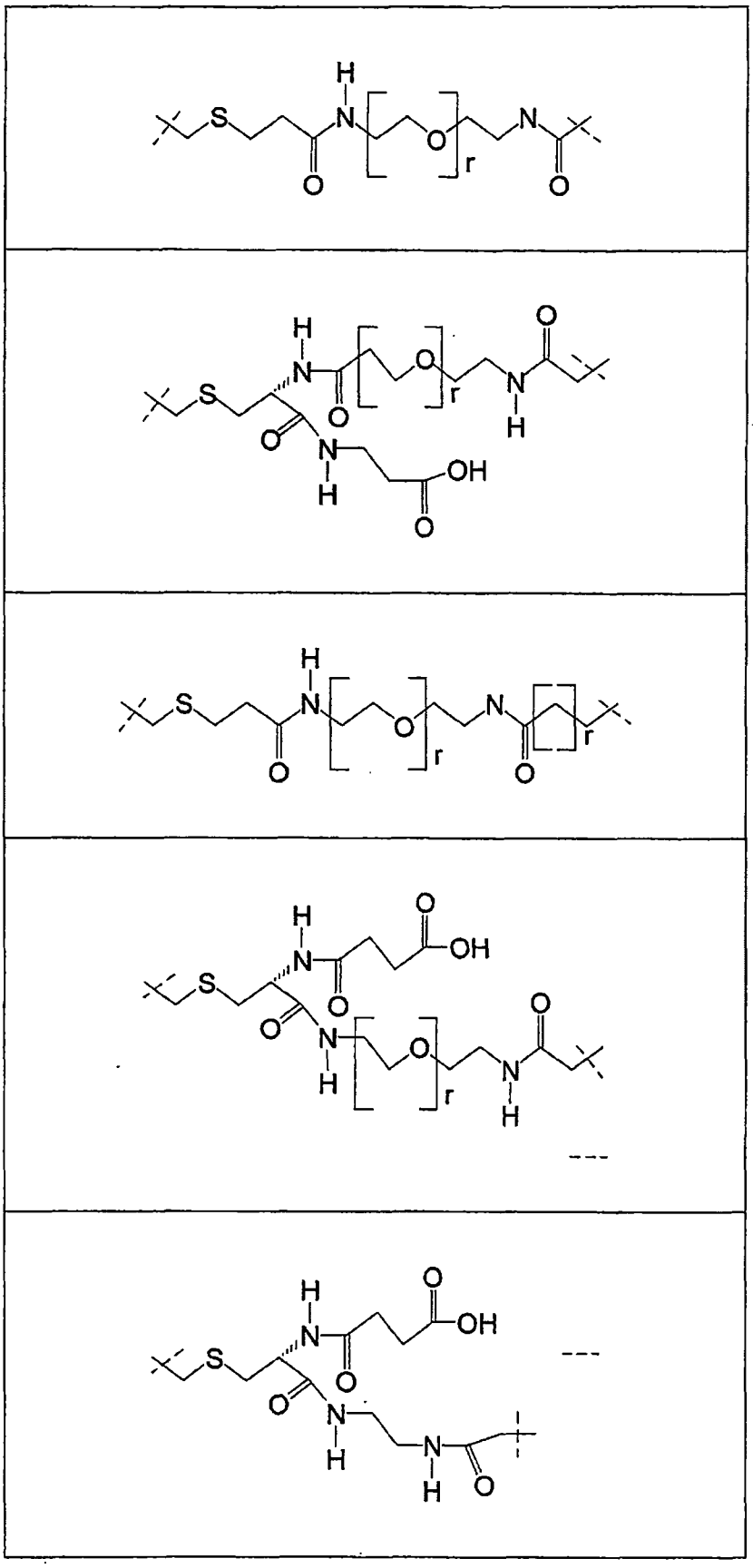


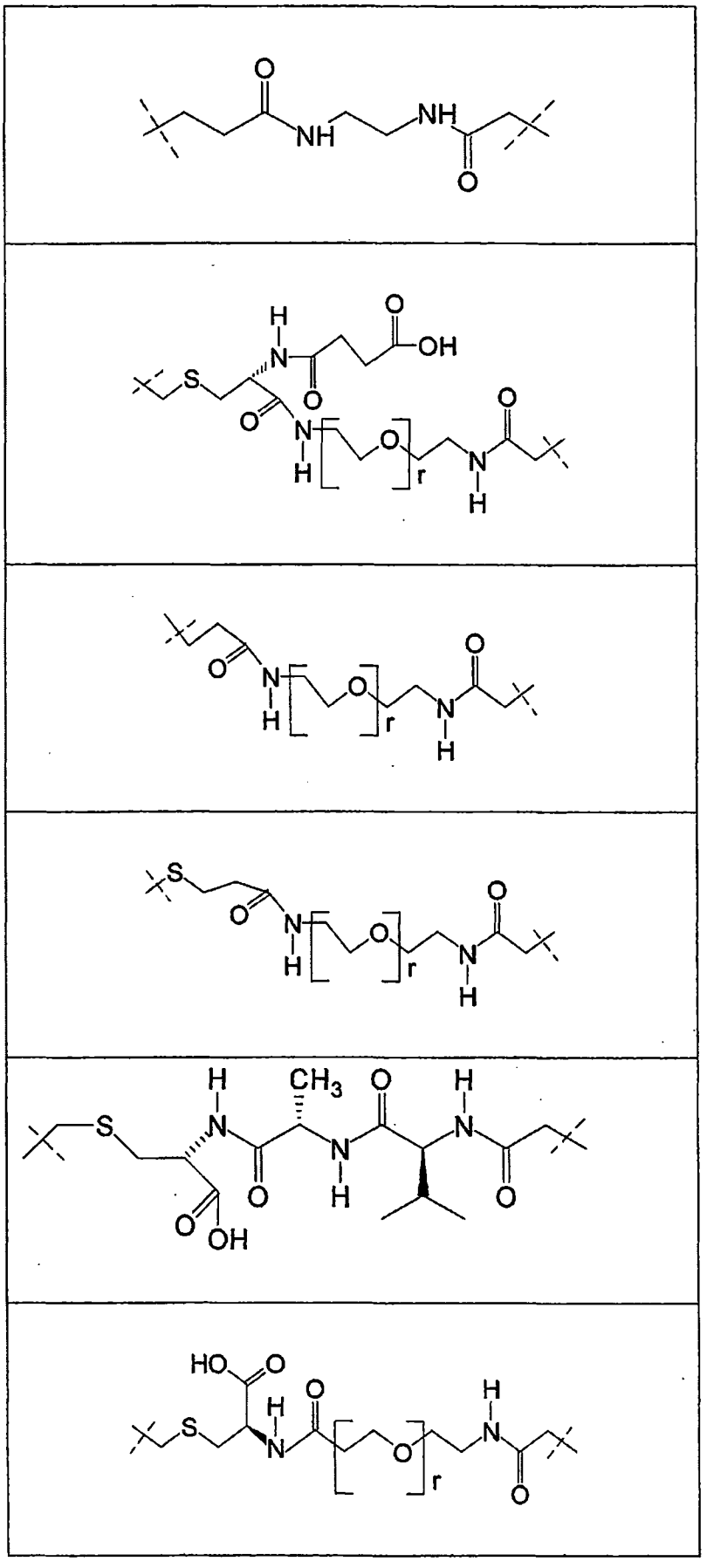


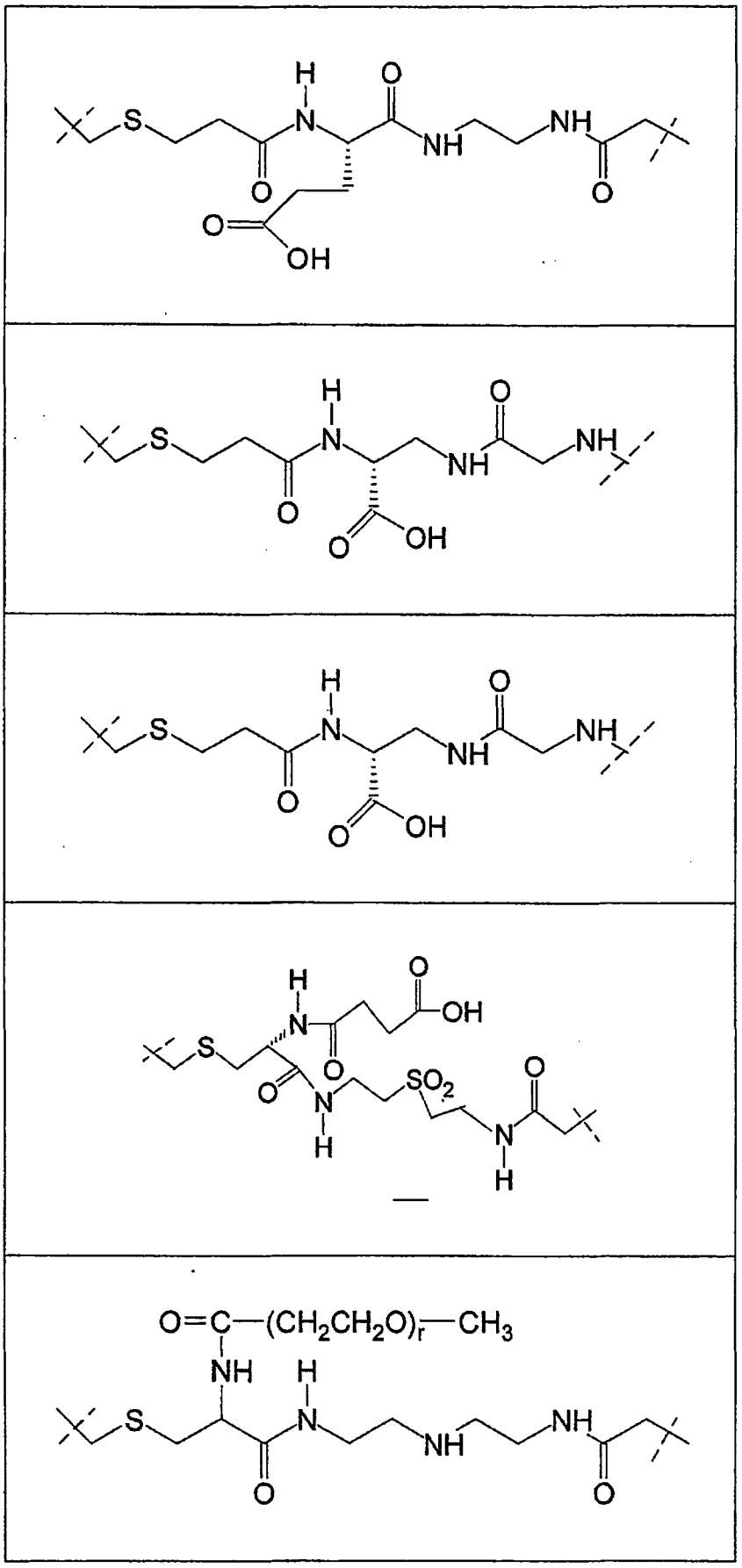


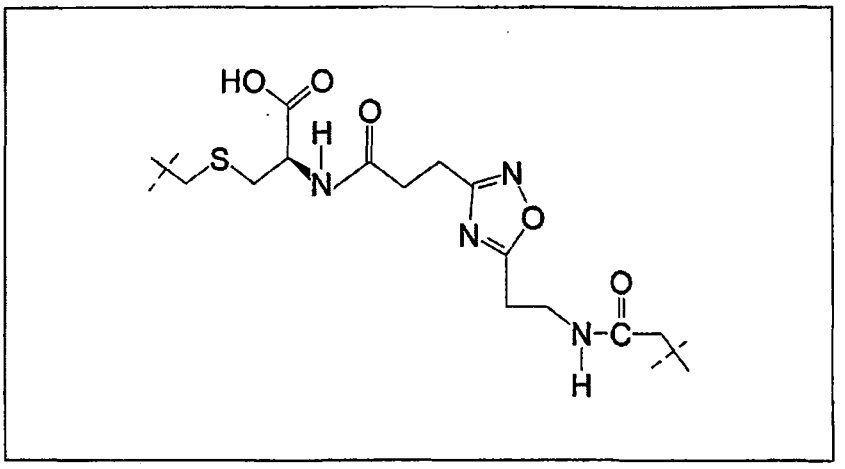








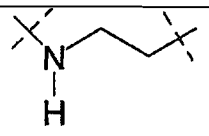
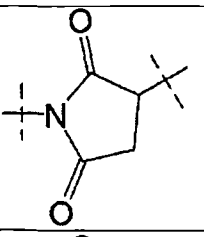
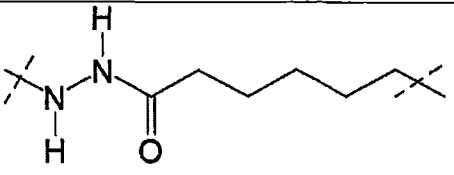
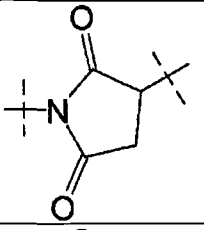
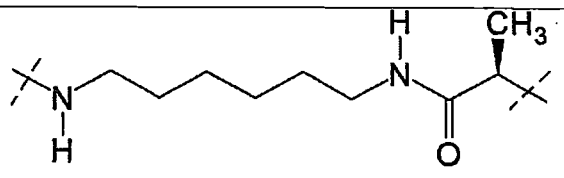
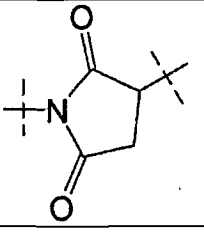


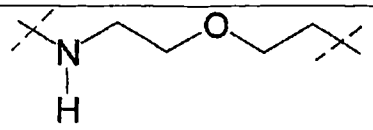
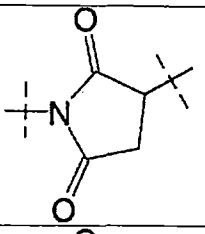
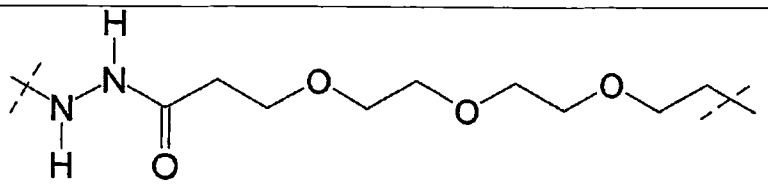
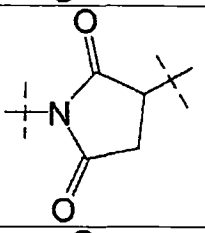
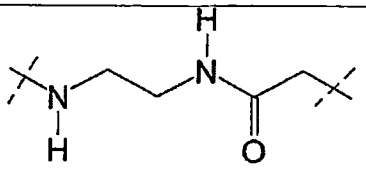
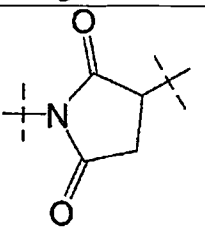
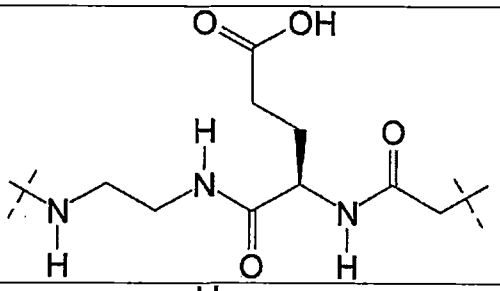
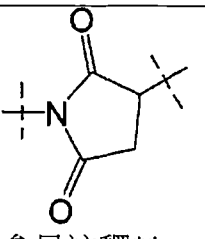
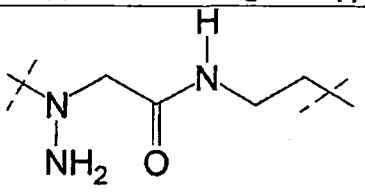
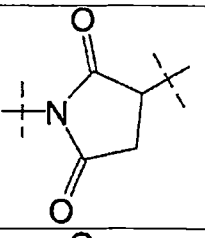
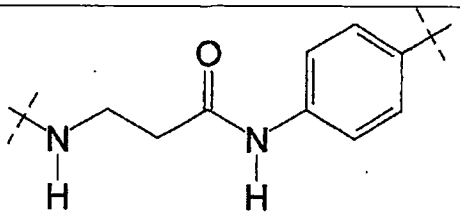
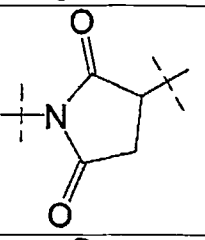
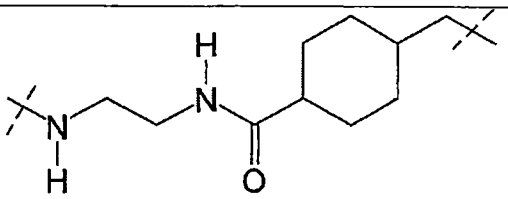
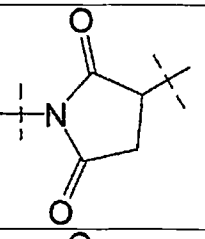
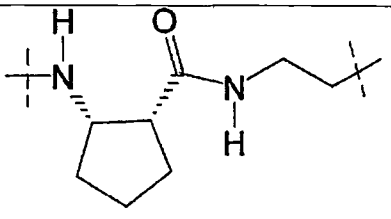
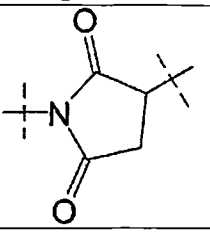


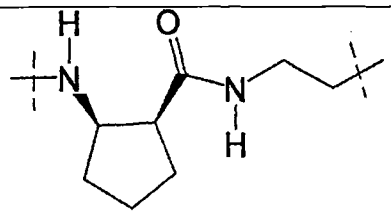
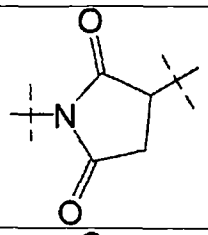
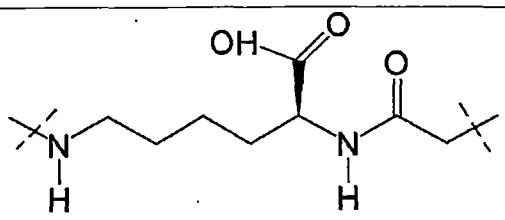
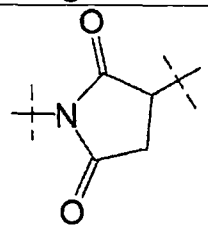
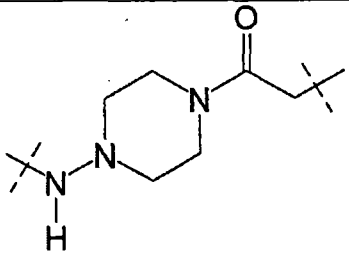
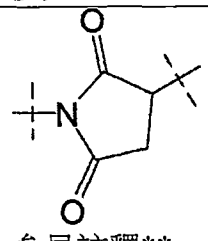
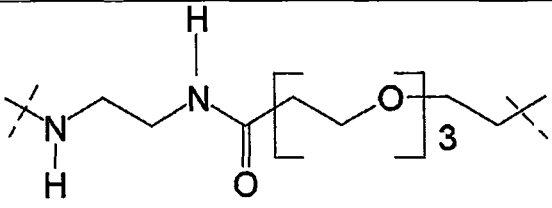
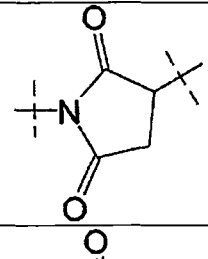
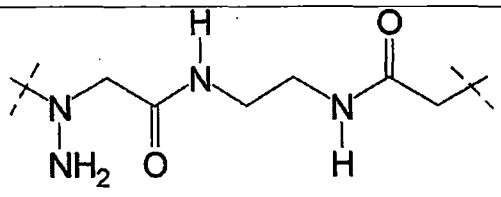
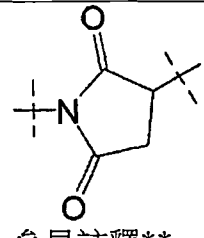
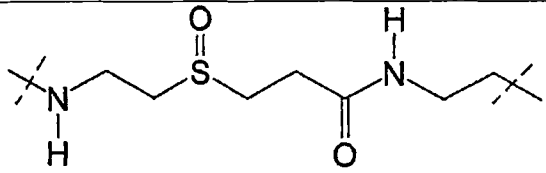
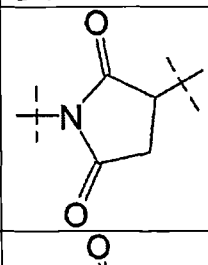
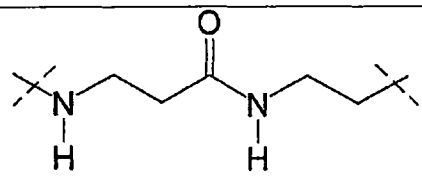
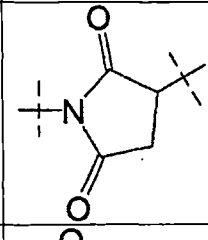
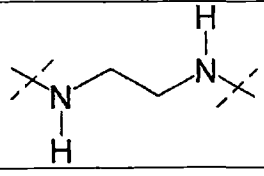
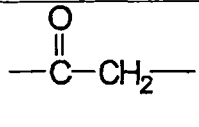
L1之其他實例提供於表C中，其中此基團以方框突出顯示。

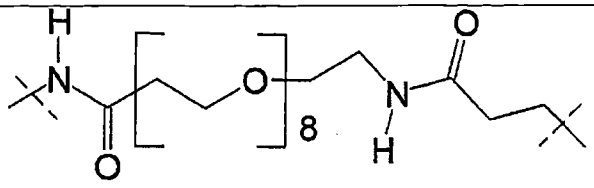
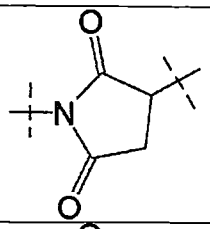
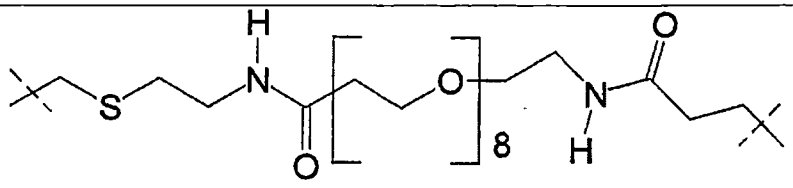
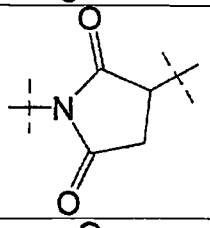
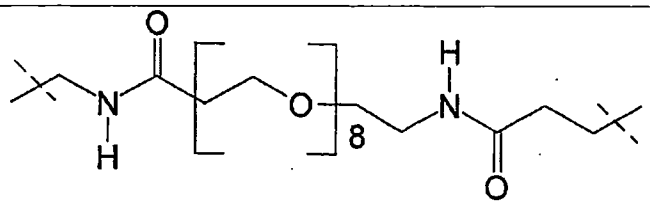
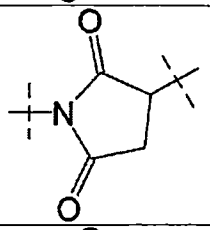
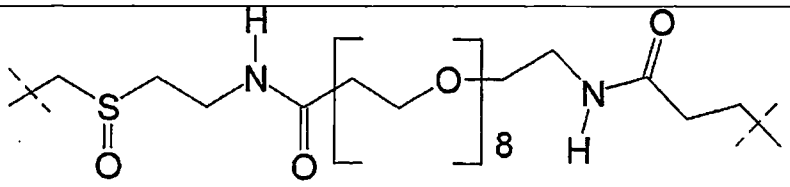
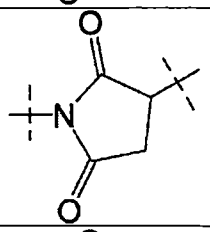
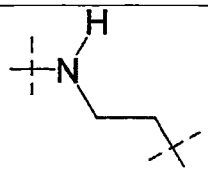
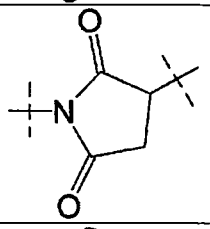
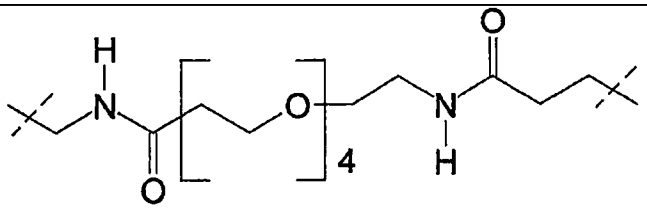
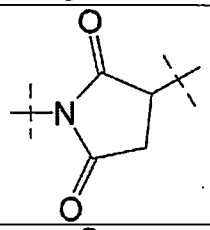
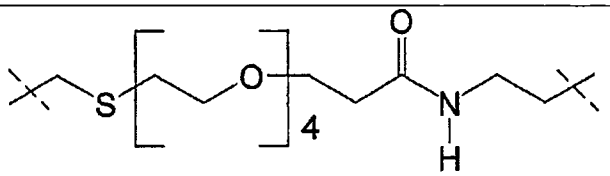
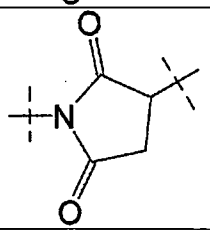
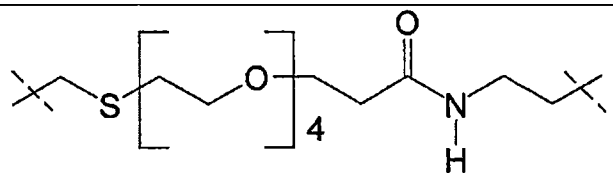
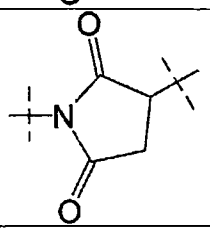
連接子部分L1之實例提供於下文表A及A'中。表另外陳述較佳與L1之此等實例組合的基團L2，以及較佳偶合點(R^1或R^3或R^4)及m之較佳值，即L1之前面是否存在羰基(參見§-(CO)m-L1-L2-§§)。此等連接子較佳與半胱胺酸殘基偶合。若L2為丁二醯亞胺或自其之衍生物，則此醯亞胺亦可完全或部分地呈水解開鏈之丁二醯胺形式，如上文所述。視L1而定，使丁二醯胺開鏈之此水解作用可較明顯或不太明顯或根本不存在。

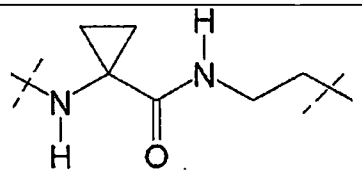
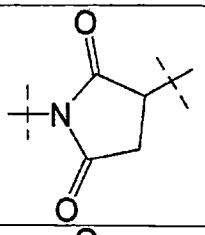
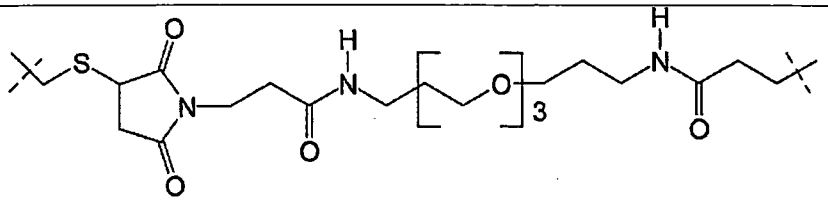
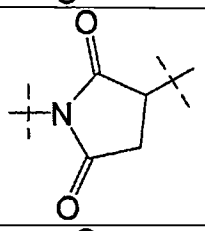
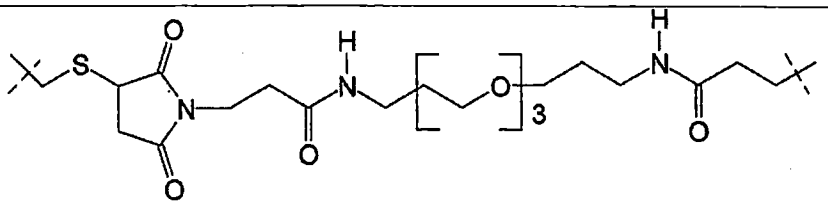
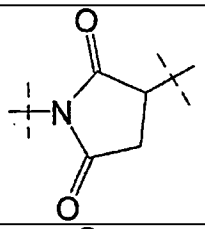
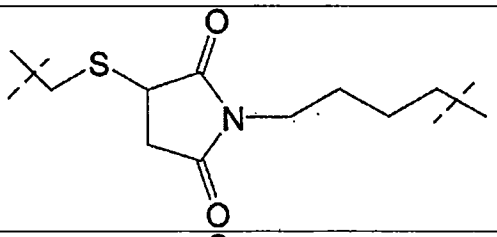
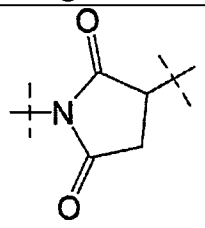
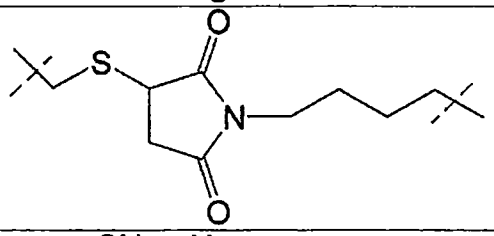
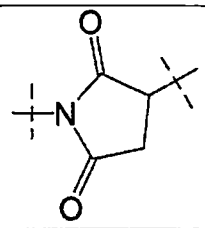
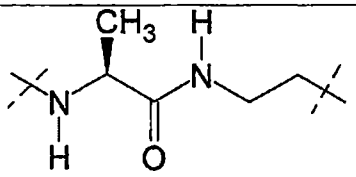
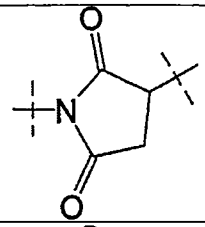
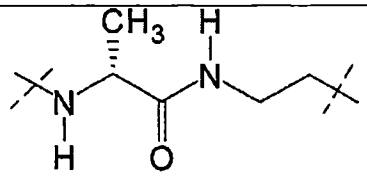
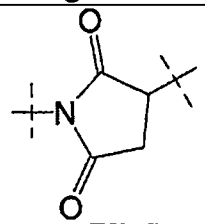
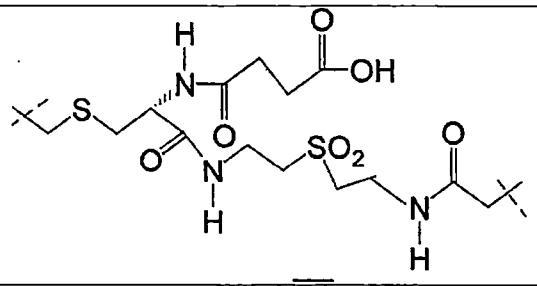
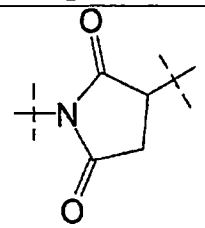
表A

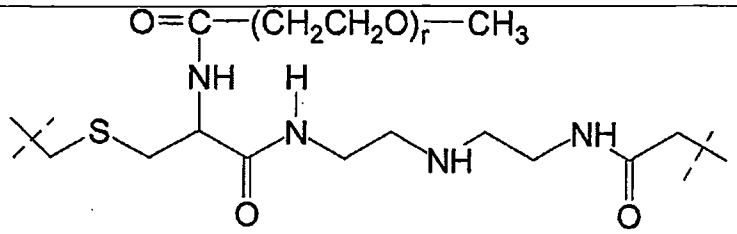
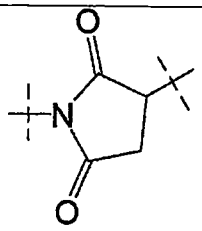
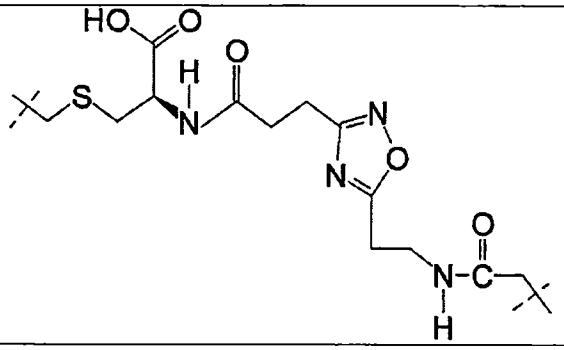
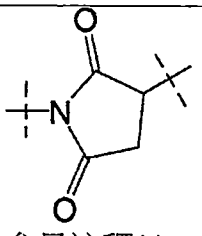
取代基	m	L1	L2
R^1	1		
R^1	1		
R^1	1		

R^1	1		
R^1	1		
R^1	1		 參見註釋**
R^1	1		 參見註釋**
R^1	1		
R^1	1		
R^1	1		
R^1	1		

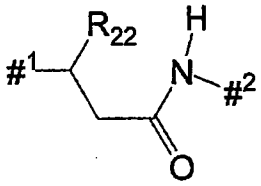
R^1	1		
R^1	1		 參見註釋**
R^1	1		 參見註釋**
R^1	1		
R^1	1		 參見註釋**
R^1	1		
R^1	1		
R^1	1		

R^1	1		
R^3	0		
R^1	1		
R^3	0		
R^1	1		
R^1	0		
R^3	0		
R^3	0		

R^1	1		
R^3	0		
R^3	0		
R^3	0		
R^3	0		
R^1	1		
R^1	1		
R^3	0		 參見註釋**

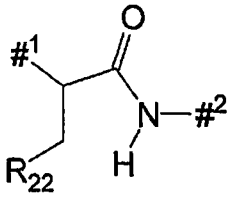
R^3	0		 參見註釋**
R^3	0		 參見註釋**

**在特別較佳的情況下，此等列中所提供之連接子L1連接至選自以下的連接子L2：



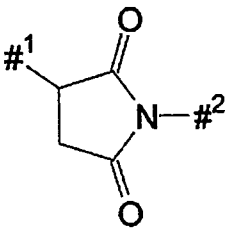
式A7

及/或

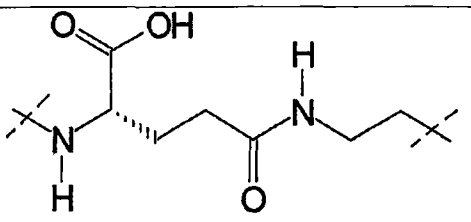
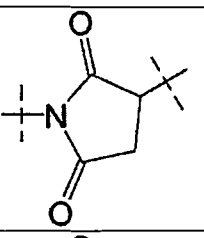
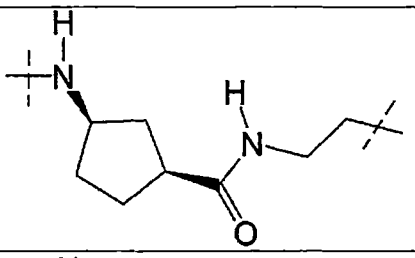
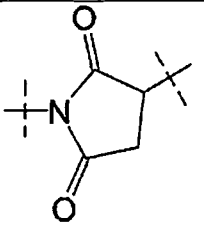
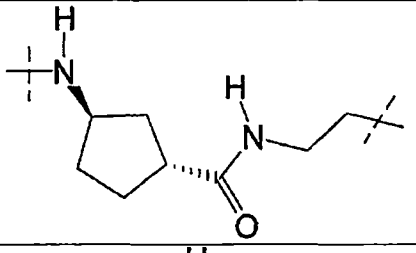
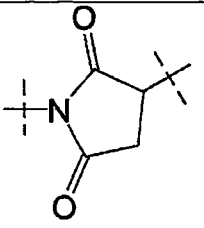
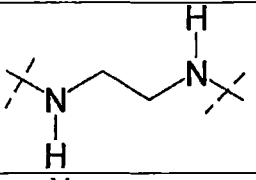
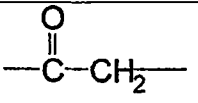
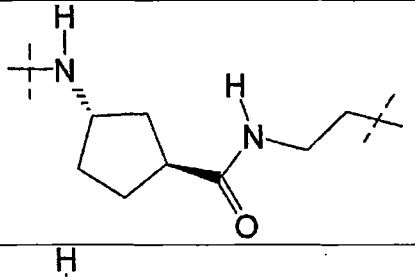
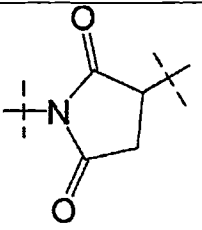
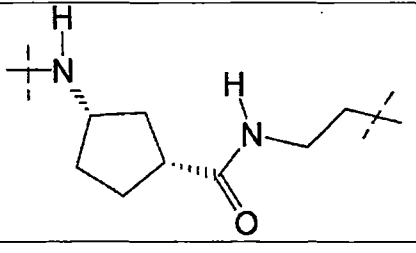
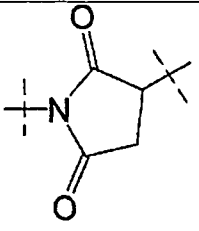


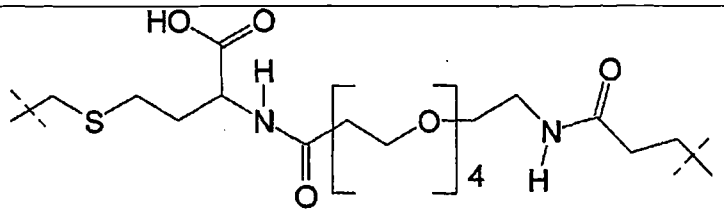
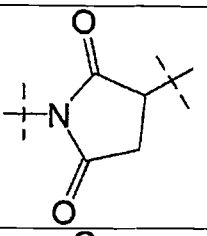
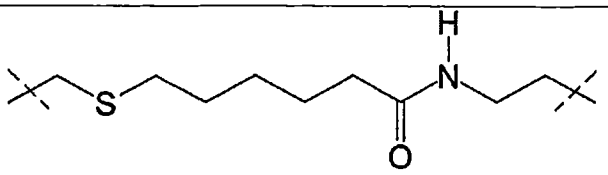
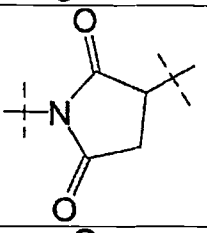
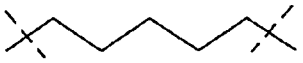
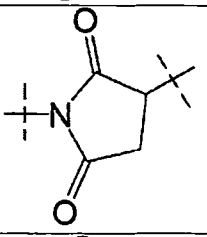
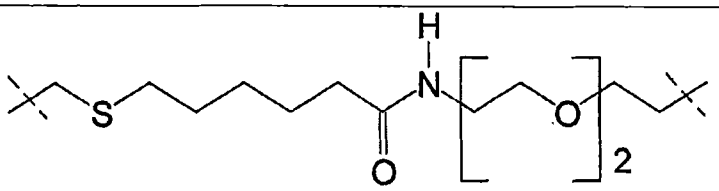
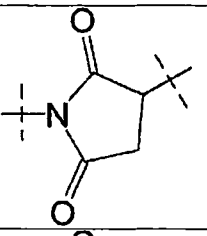
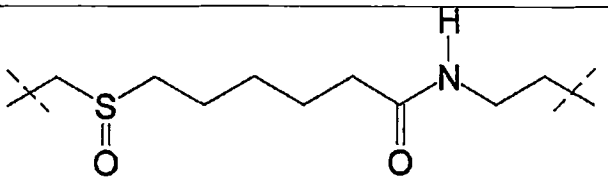
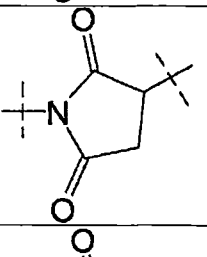
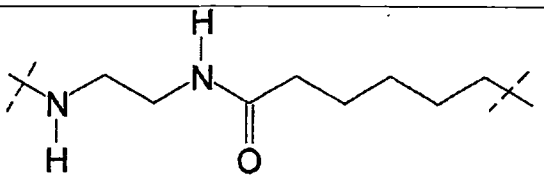
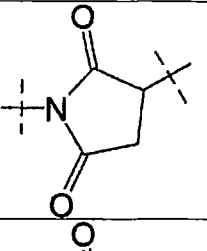
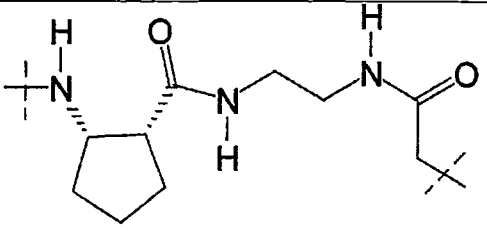
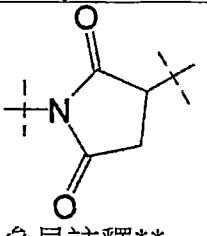
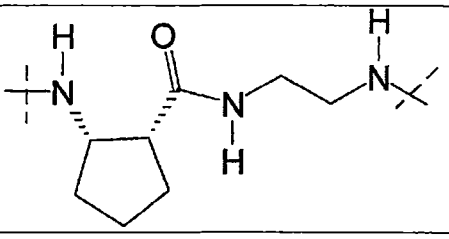
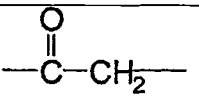
式A8

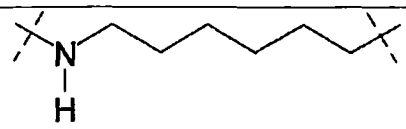
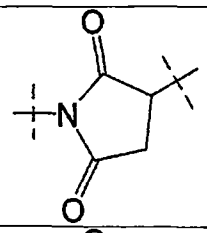
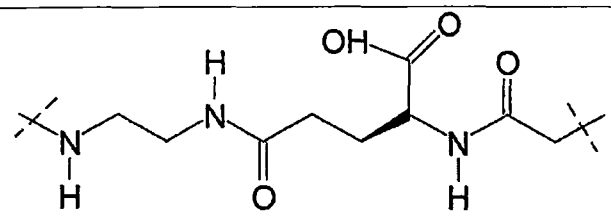
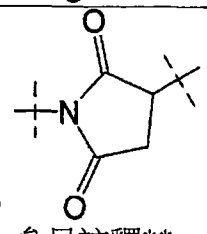
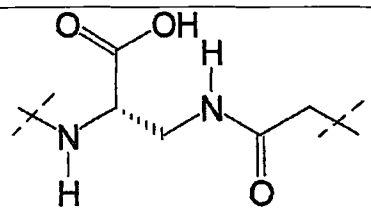
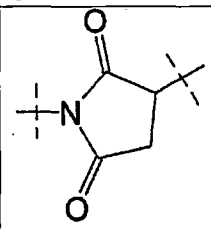
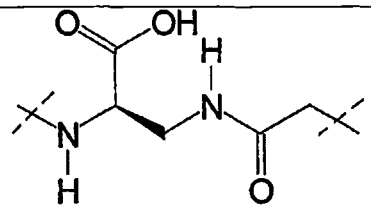
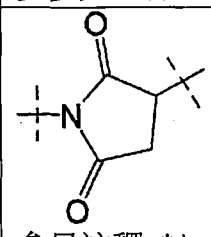
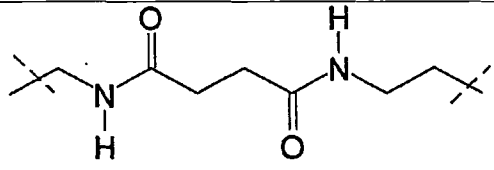
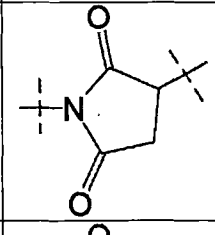
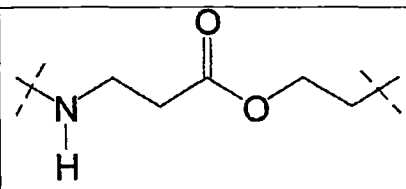
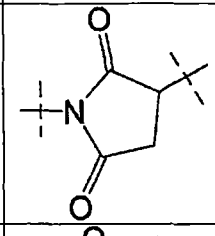
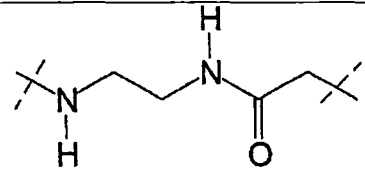
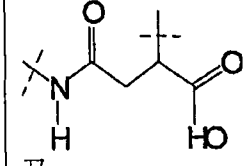
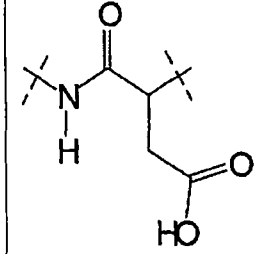
其中#[1]表示與結合劑之硫原子的連接點，#[2]表示與基團L^1之連接點，R^{22}較佳表示COOH。在本發明之結合物中或在本發明之結合物之混合物中，存在鍵結於結合子之半胱胺酸殘基的鍵，其存在的範圍較佳超過80%，尤佳超過90% (在各種情況下，以連接子鍵結於結合子之鍵之總數計)，尤其較佳為兩種結構式A7或A8之一。本文中，式A7或A8之結構一般一起較佳以60:40至40:60之比率(以鍵結於結合子之鍵數目計)存在。剩餘鍵則以如下結構存在：

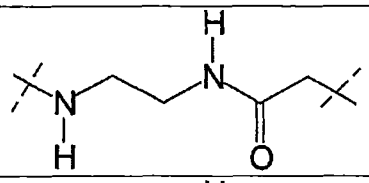
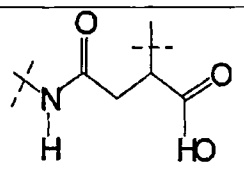
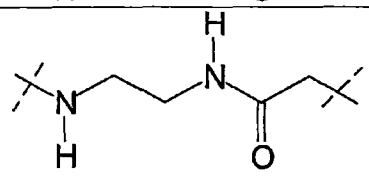
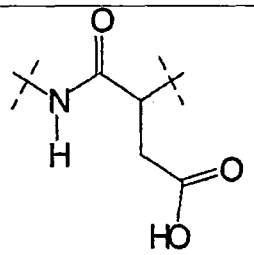
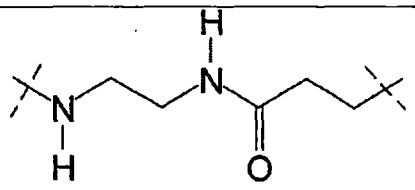
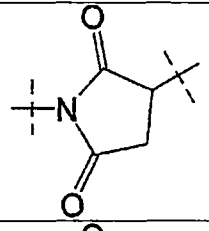
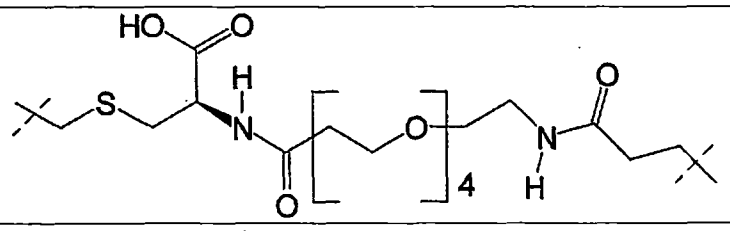
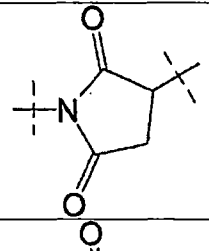
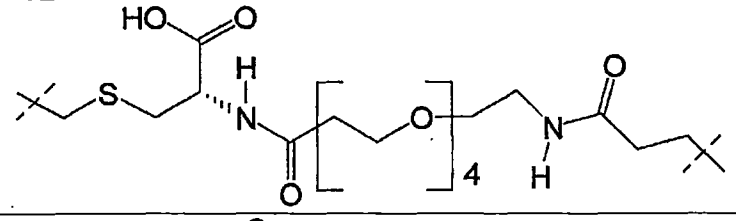
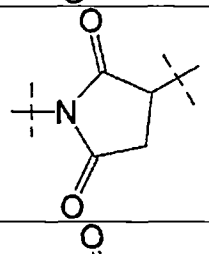
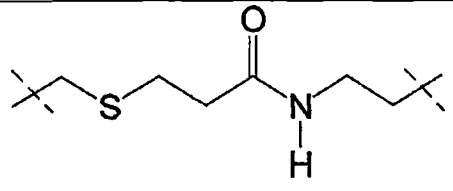
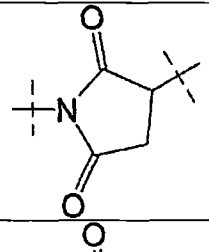
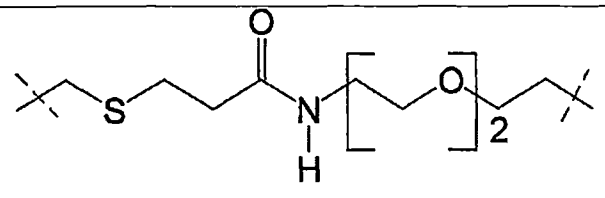
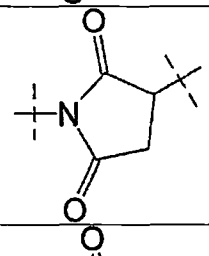
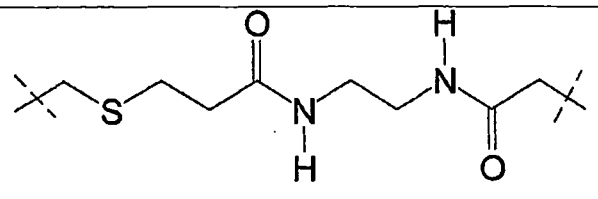
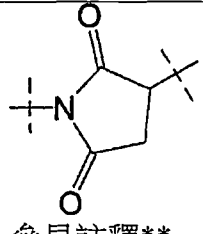


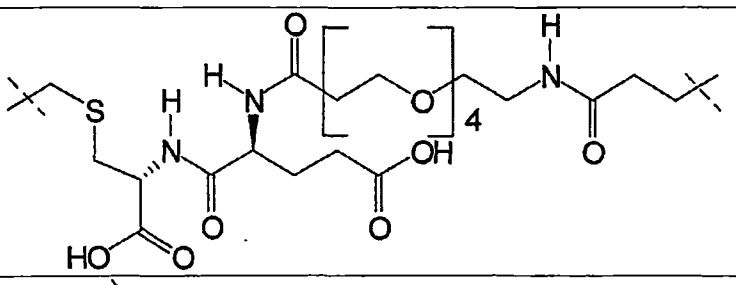
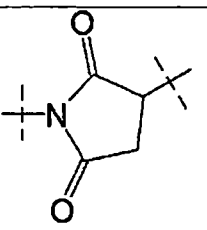
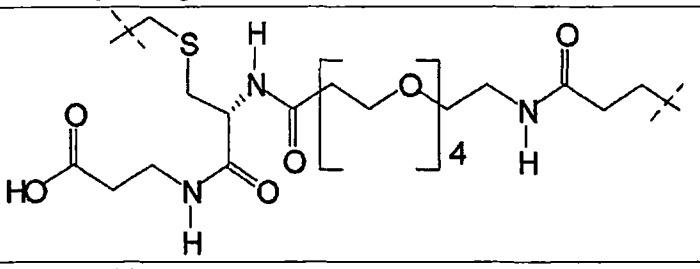
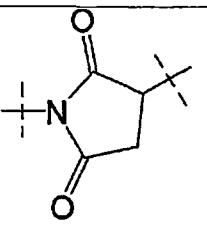
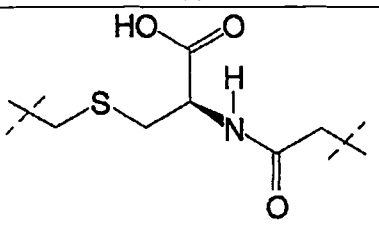
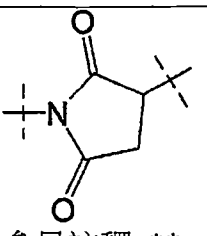
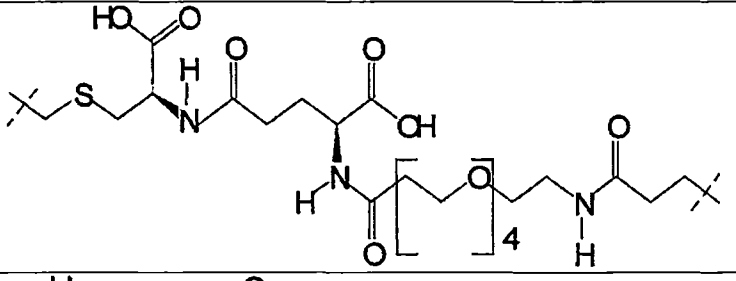
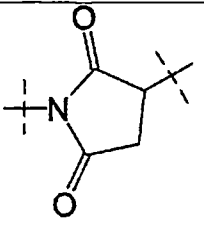
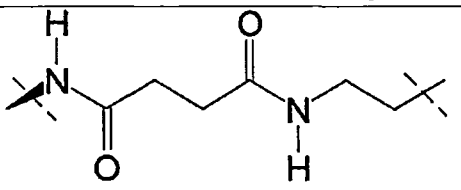
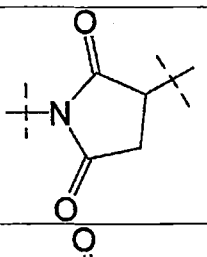
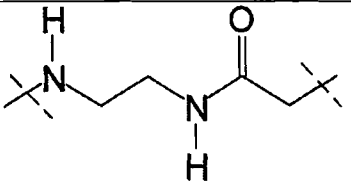
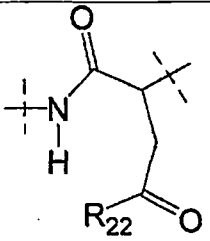
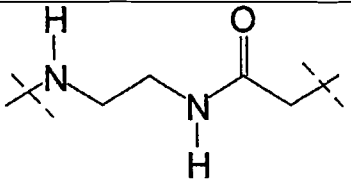
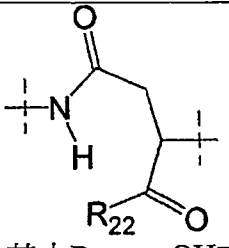
表A

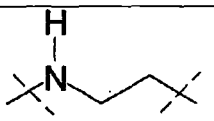
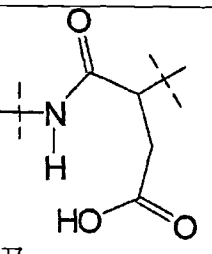
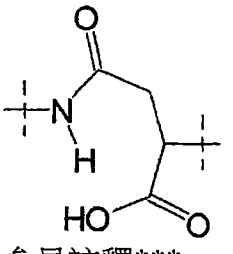
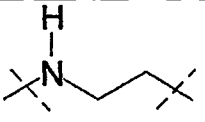
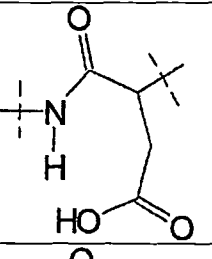
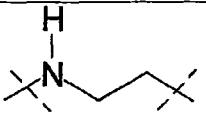
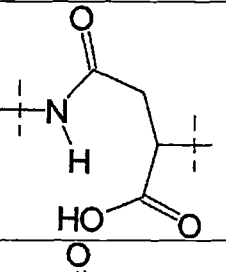
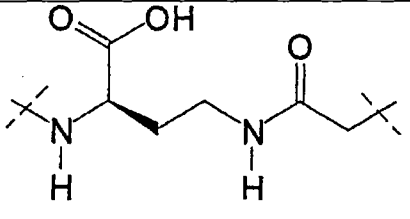
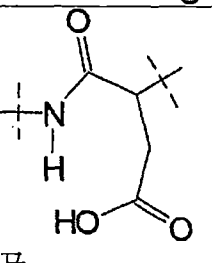
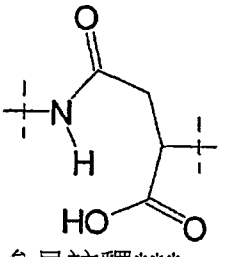
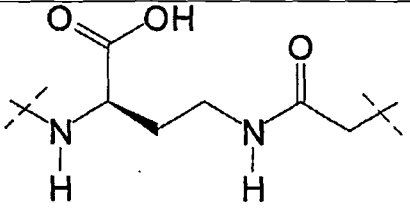
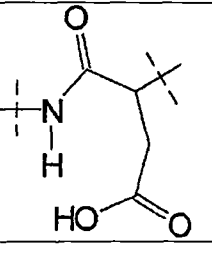
取代基	m	L1	L2
R^1	1		
R^1	1		
R^1	1		
R^1	1		
R^1	1		
R^1	1		

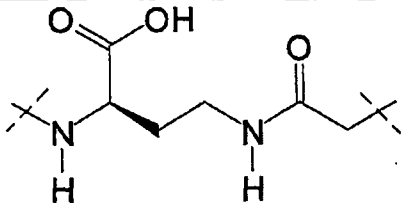
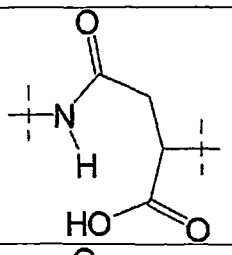
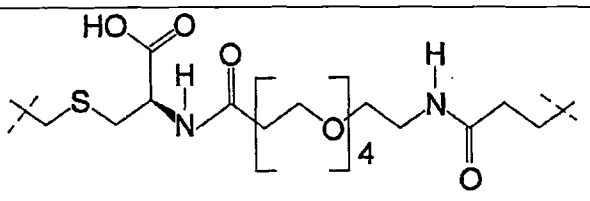
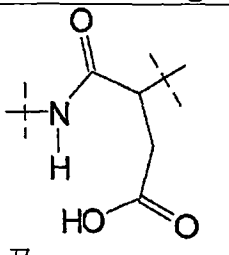
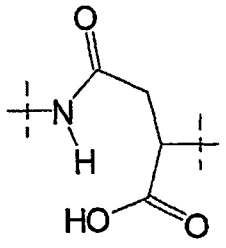
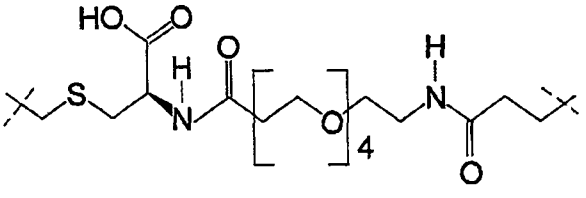
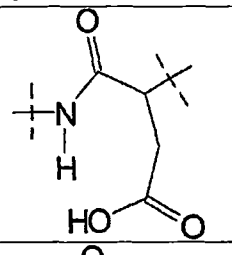
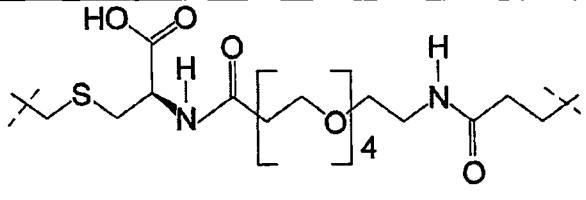
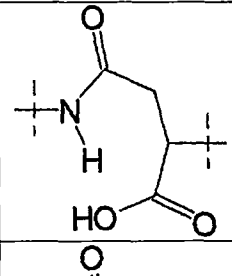
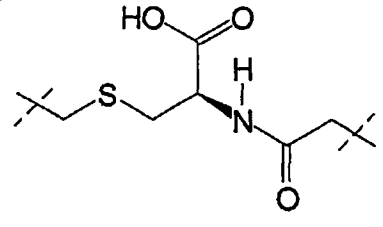
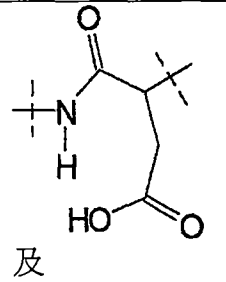
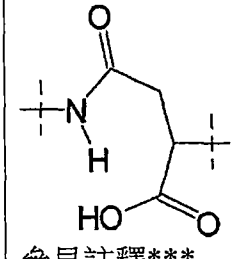
R^3	0		
R^3	0		
R^3	0		
R^3	0		
R^3	0		
R^1	1		
R^1	1		 參見註釋**
R^1	1		

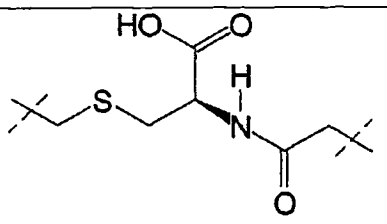
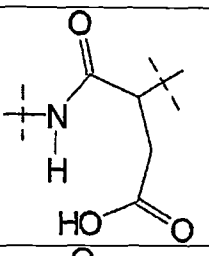
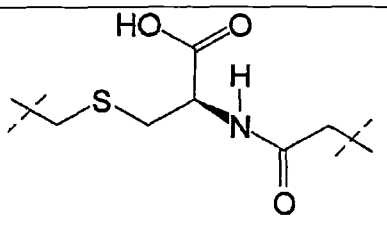
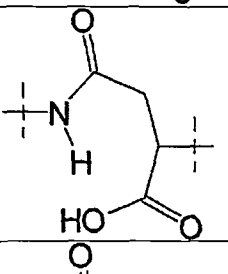
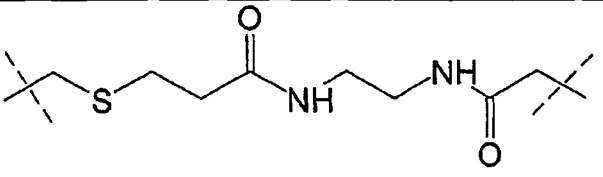
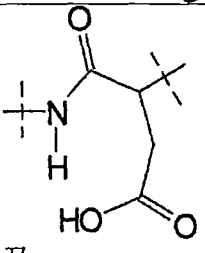
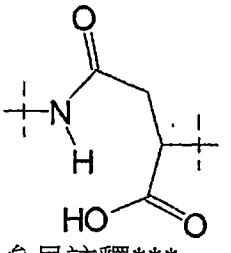
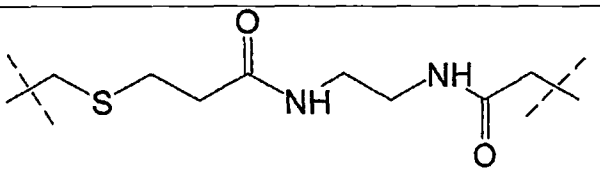
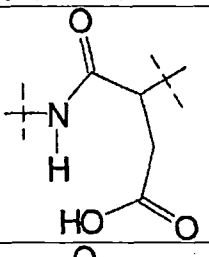
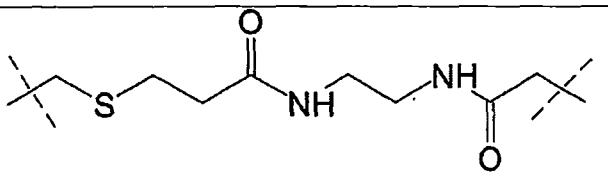
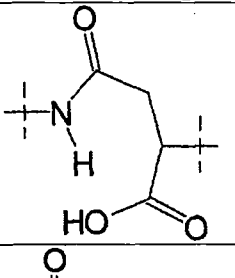
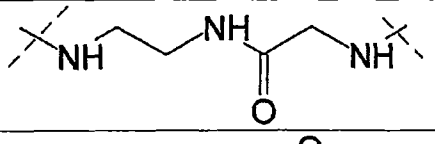
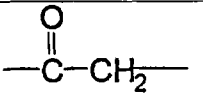
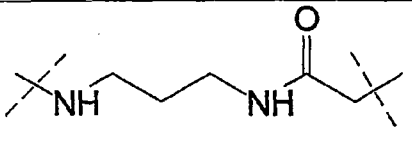
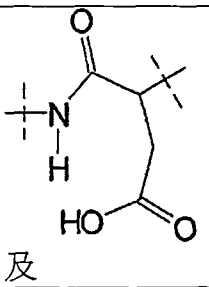
R^1	1		
R^1	1		 參見註釋**
R^1	1		 參參見註釋**
R^1	1		 參見註釋 **
R^1	0		
R^1	1		
R^1	1		 及  參見註釋***

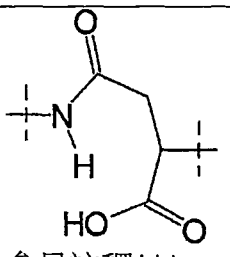
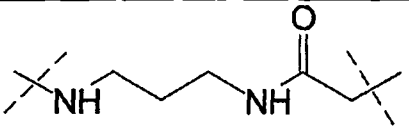
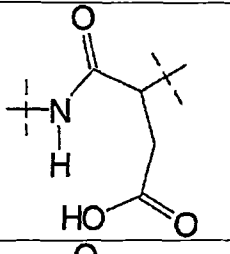
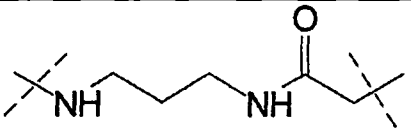
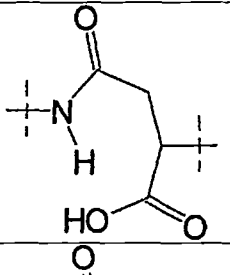
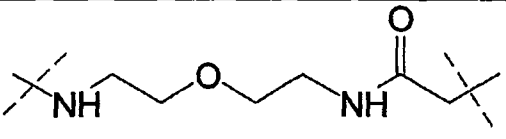
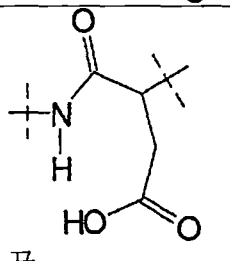
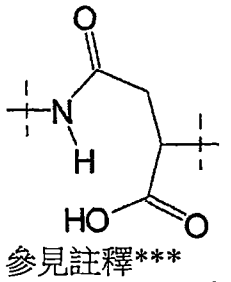
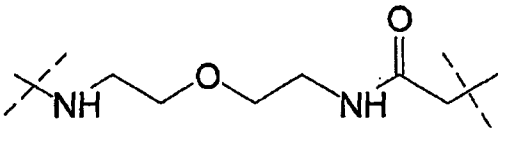
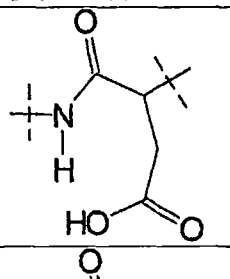
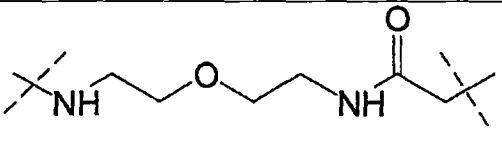
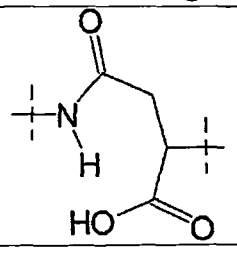
R^1	1		
R^1	1		 與上述兩者一致
R^1	1		
R^3	0		
R^3	0		
R^3	0		
R^3	0		
R^3	0		 參見註釋**

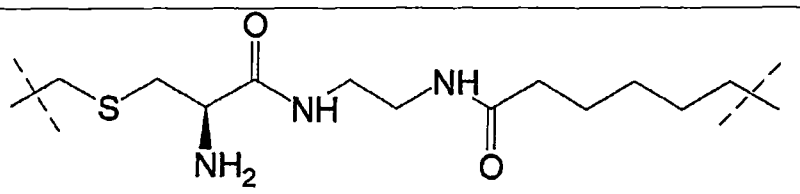
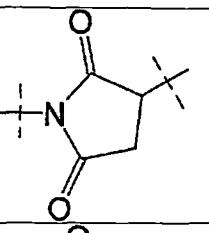
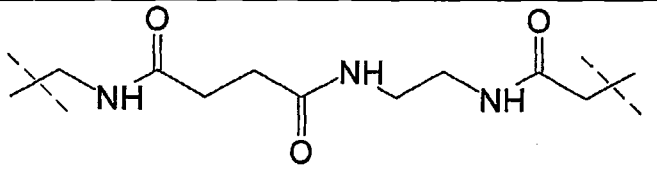
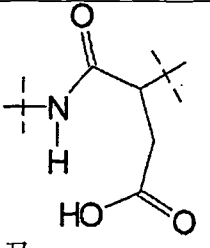
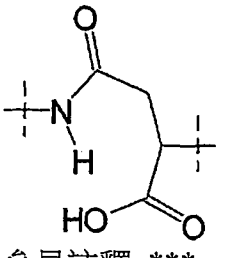
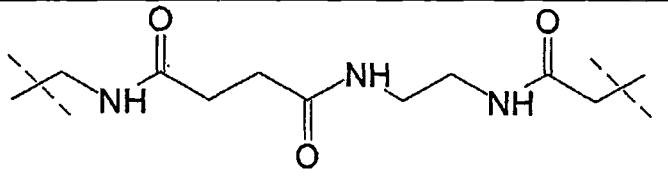
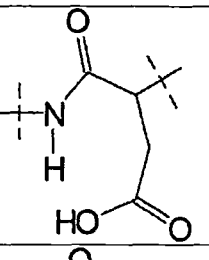
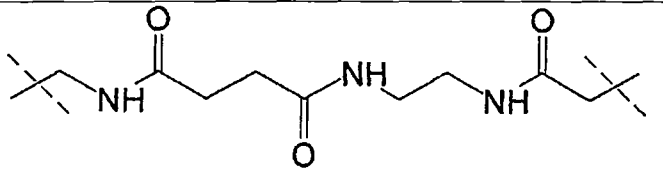
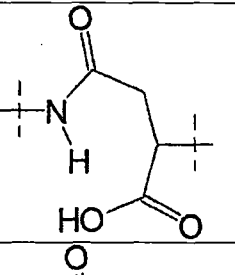
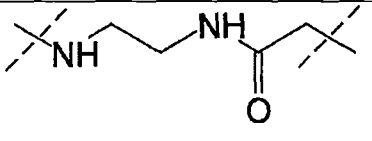
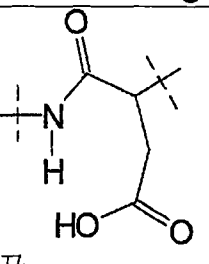
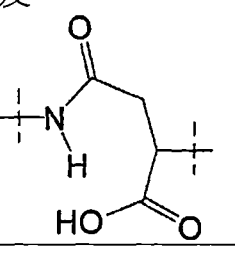
R^3	0		
R^3	0		
R^3	0		 參見註釋 **
R^3	0		
R^2	0		
R^1	1		 其中R_{22} = -OH或-NH_2
R^1	1		 其中R_{22} = -OH或-NH_2

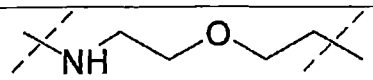
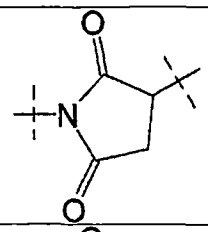
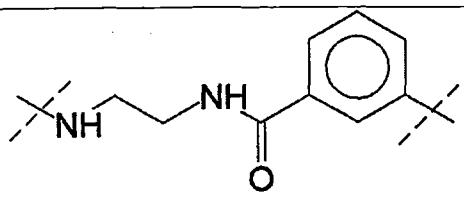
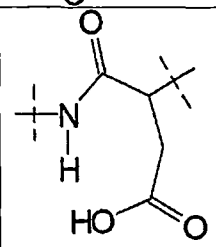
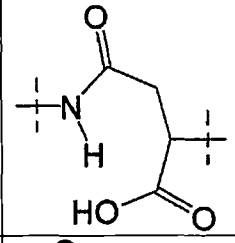
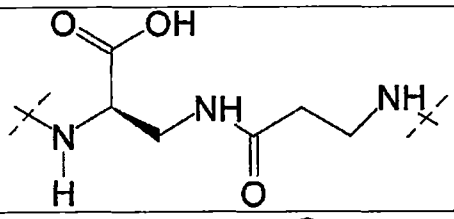
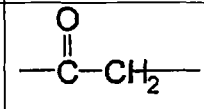
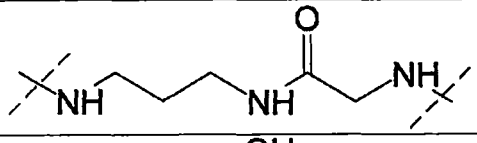
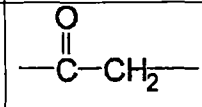
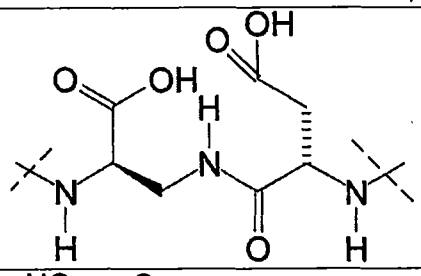
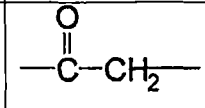
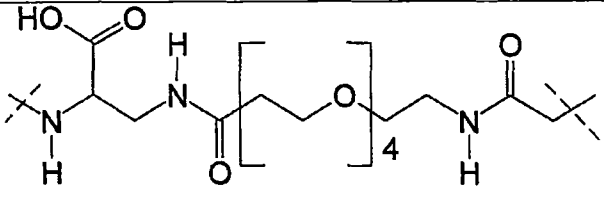
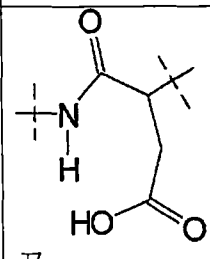
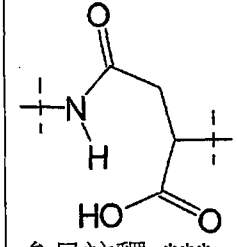
R^1	1		 及  參見註釋***
R^1	1		
R^1	1		
R^1	1		 及  參見註釋***
R^1	1		

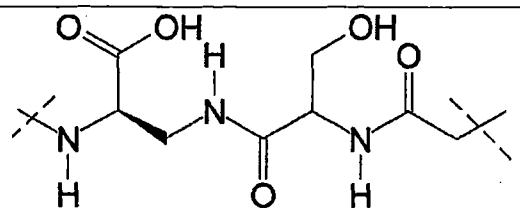
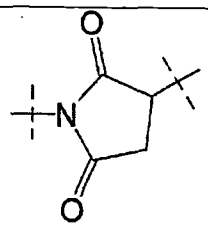
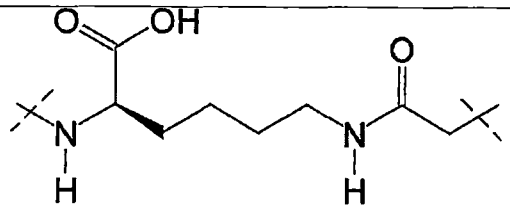
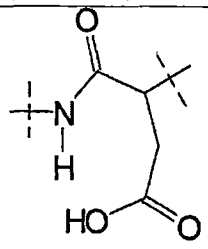
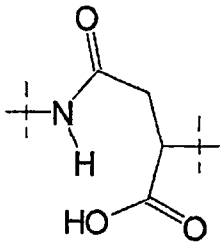
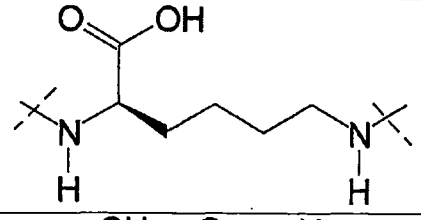
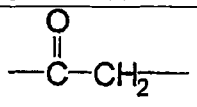
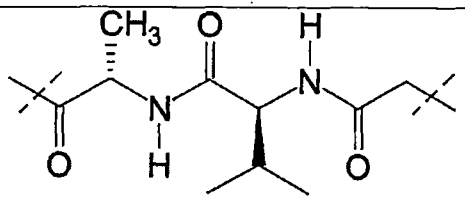
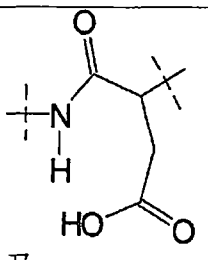
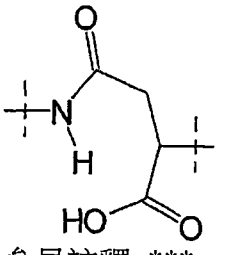
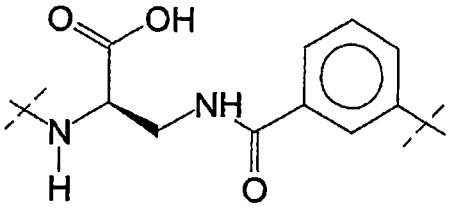
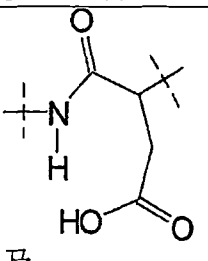
R^1	1		
R^3	0		 及  參見註釋***
R^3	0		
R^3	0		
R^3	0		 及  參見註釋***

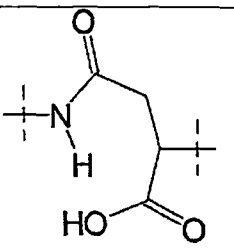
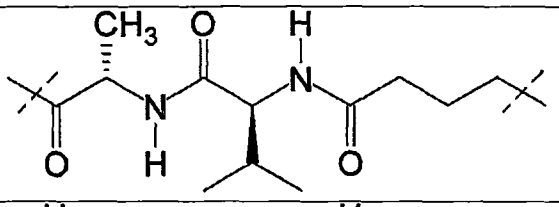
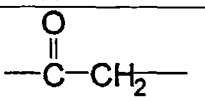
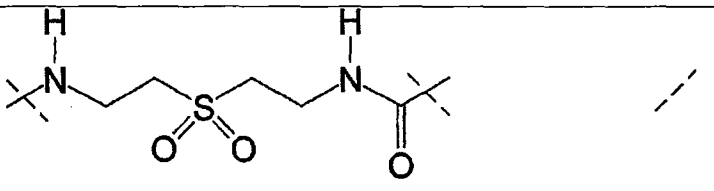
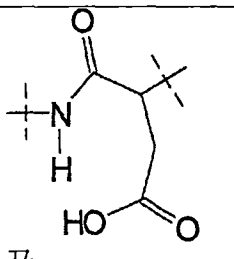
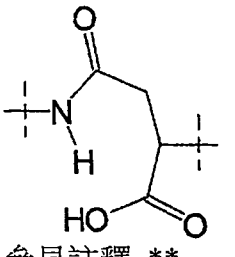
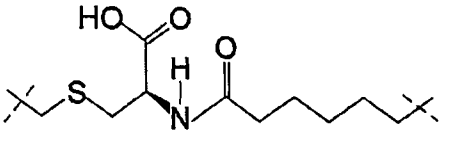
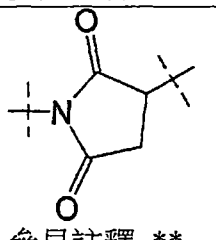
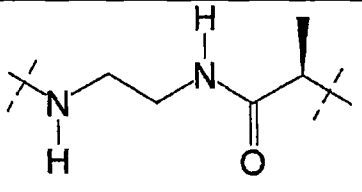
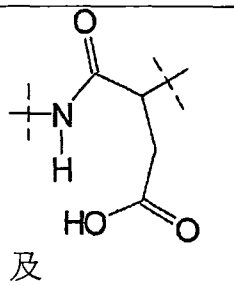
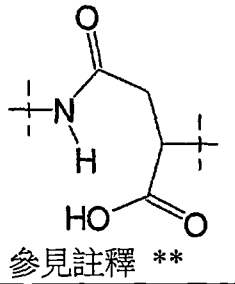
R^3	0		
R^3	0		
R^3	0		 及  參見註釋***
R^3	0		
R^3	0		
R^1	1		
R^1	1		 及

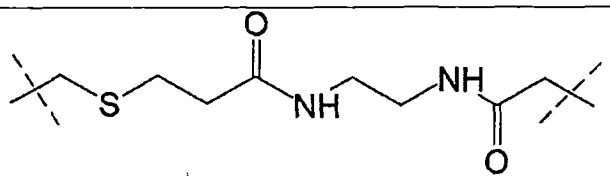
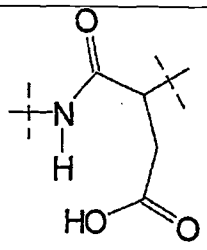
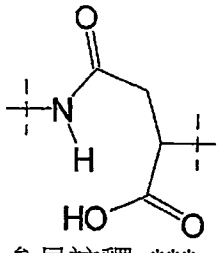
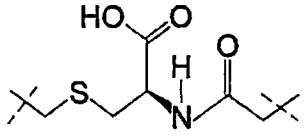
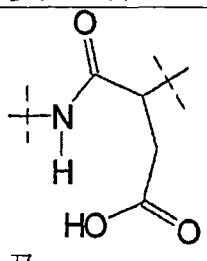
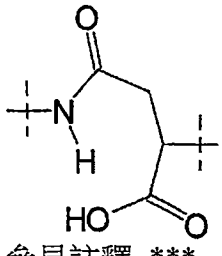
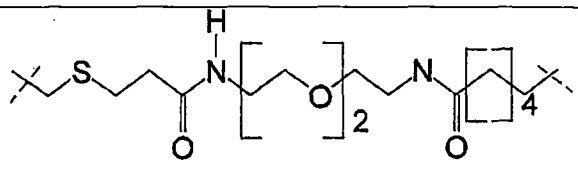
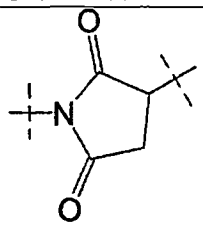
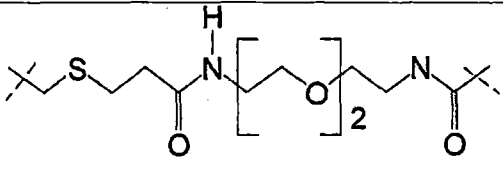
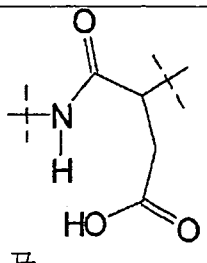
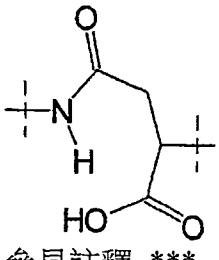
			 參見註釋***
R^1	1		
R^1	1		
R^1	1		 及  參見註釋***
R^1	1		
R^1	1		

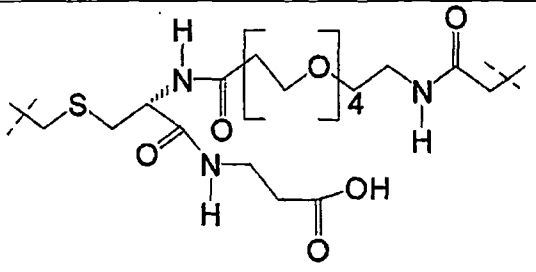
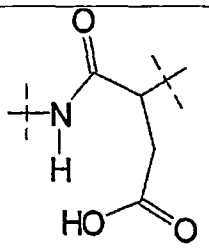
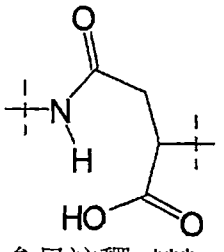
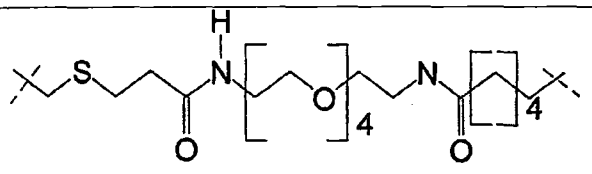
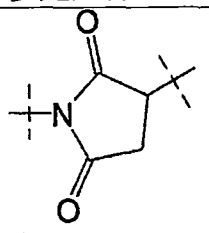
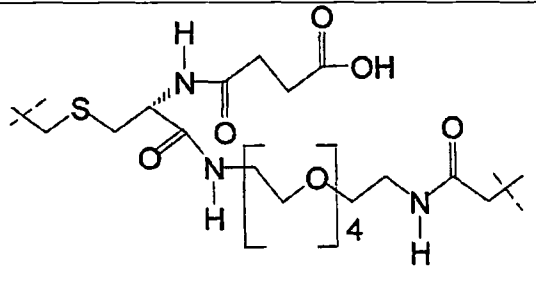
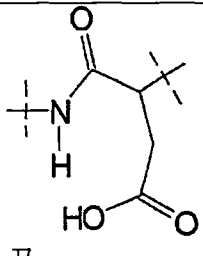
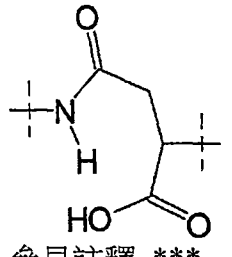
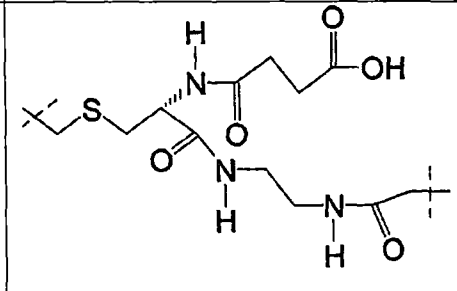
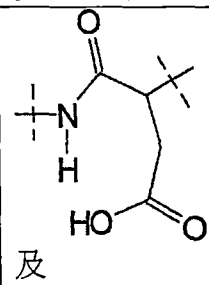
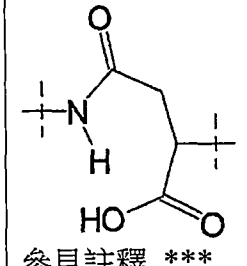
R3	0		
R1	0		 及  參見註釋 ***
R1	0		
R1	0		
R1	1		 及 

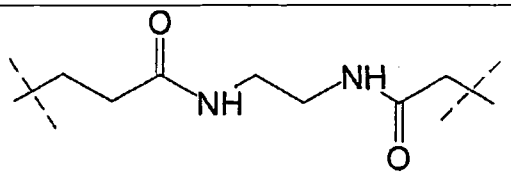
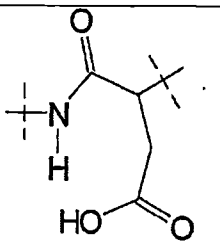
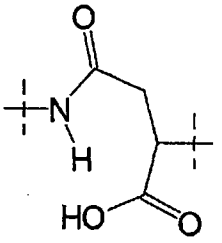
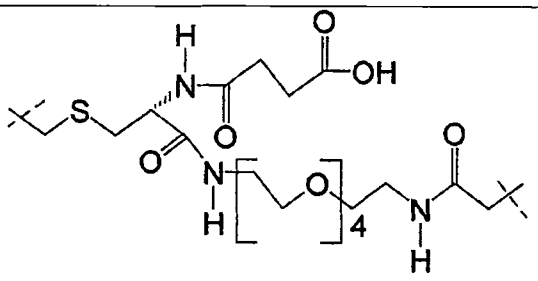
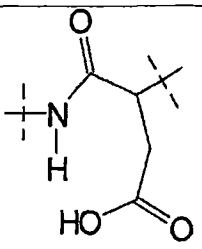
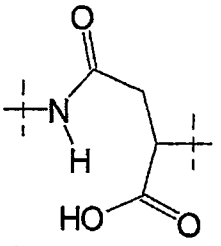
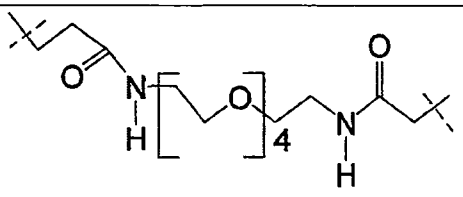
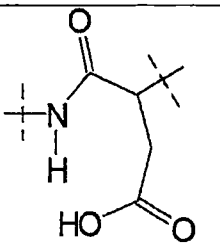
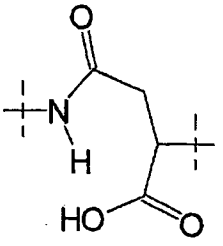
R1	1		
R1	1		 及 
R^1	1		
R^1	1		
R^1	1		
R^1	1		 及  參見註釋 ***

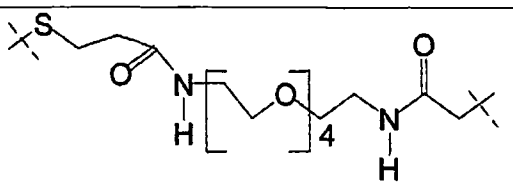
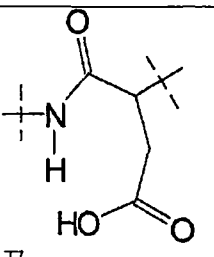
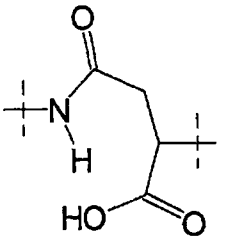
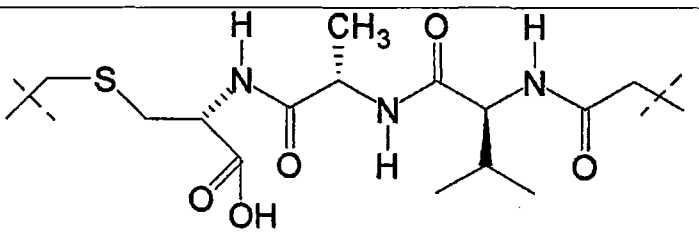
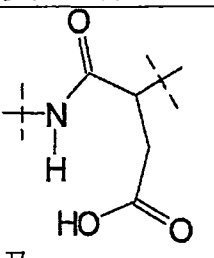
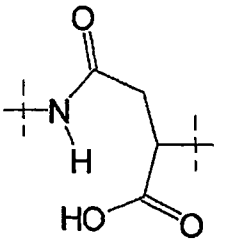
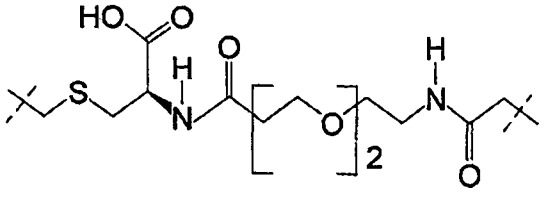
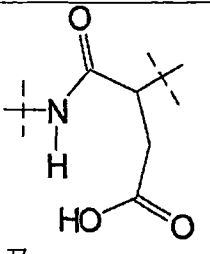
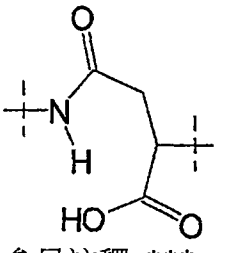
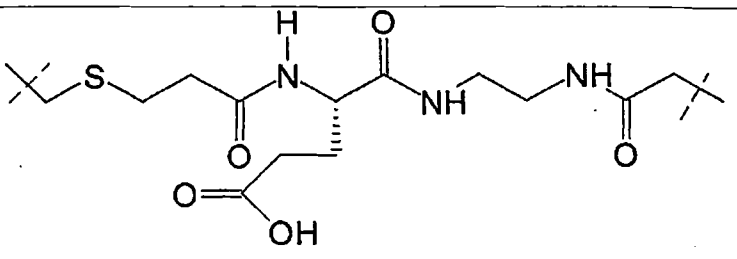
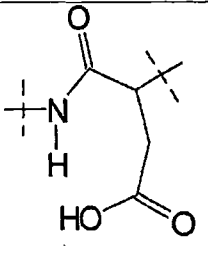
R^1	1		 參見註釋 **
R^1	1		 及  參見註釋 ***
R^1	1		
R^4	0		 及  參見註釋 ***
R^1	1		 及

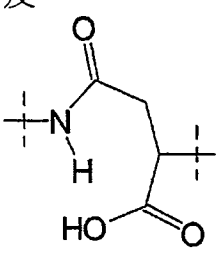
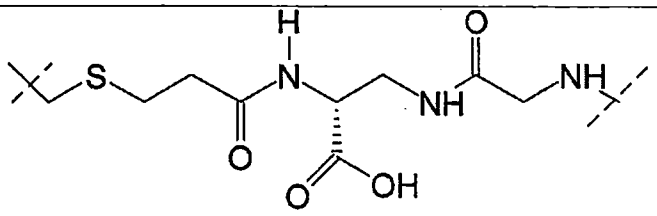
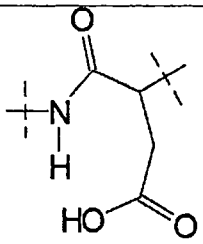
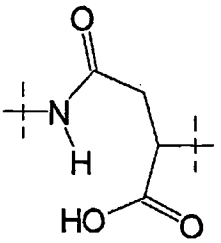
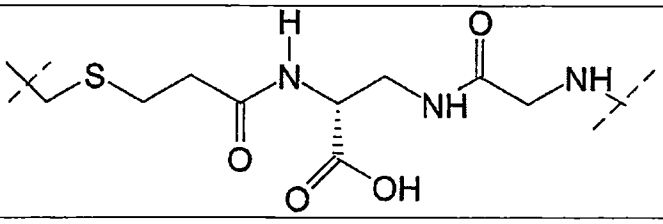
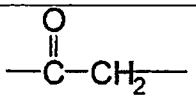
			 參見 註釋 ***
R^4	0		
R^1	1		 及  參見註釋 **
R^3	0		 參見註釋 **
R^1	1		 及  參見註釋 **

R^3	0		 及  參見註釋 ***
R^3	0		 及  參見註釋 ***
R^3	0		 參見註釋 **
R^3	0		 及  參見註釋 ***

R^3	0		 及  參見註釋 ***
R^3	0		 參見註釋 **
R^3	0	 ---	 及  參見註釋 ***
R^3	0	 ---	 及  參見註釋 ***

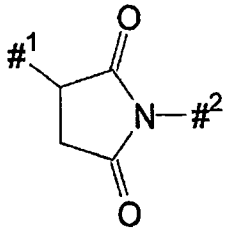
R^3	0		 及  參見註釋 ***
R^3	0		 及  參見註釋 ***
R^3	0		 及  參見註釋 ***

R^3	0		 及  參見註釋 ***
R^3	0		 及  參見註釋 ***
R^3	0		 及  參見註釋 ***
R^3	0		

			及  參見註釋 ***
R^3	0		 及  參見註釋 ***
R^3	0		

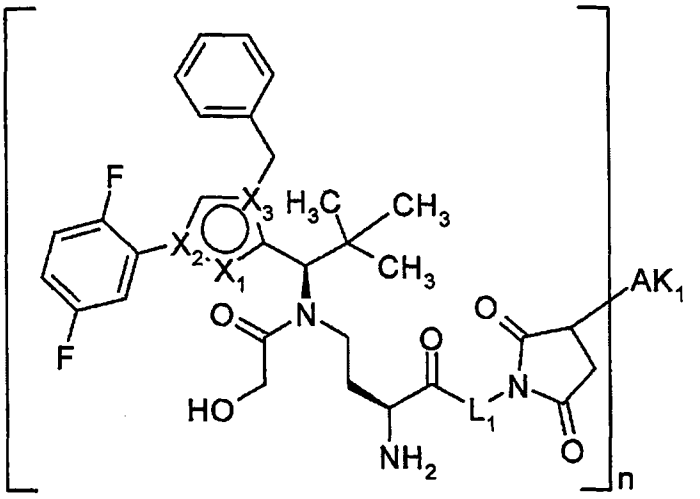
：表A參見註釋。

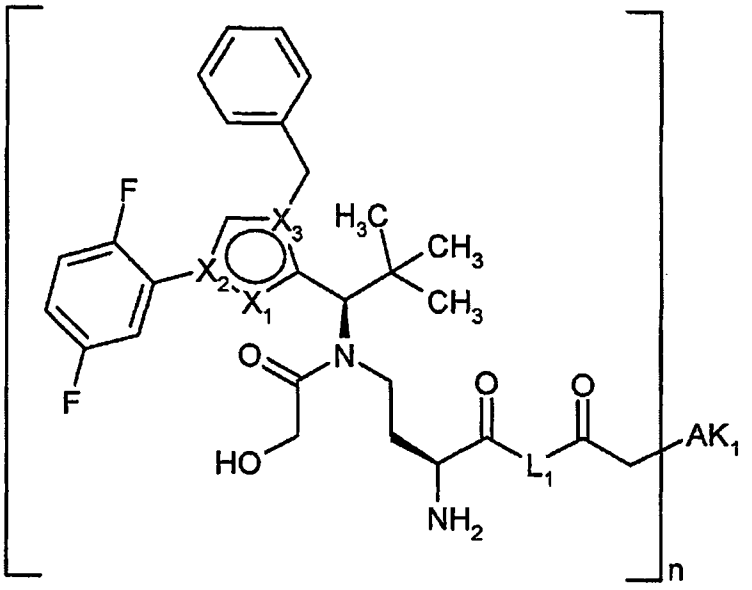
***：存在此結構L2時，可同時存在下式之結構L2：

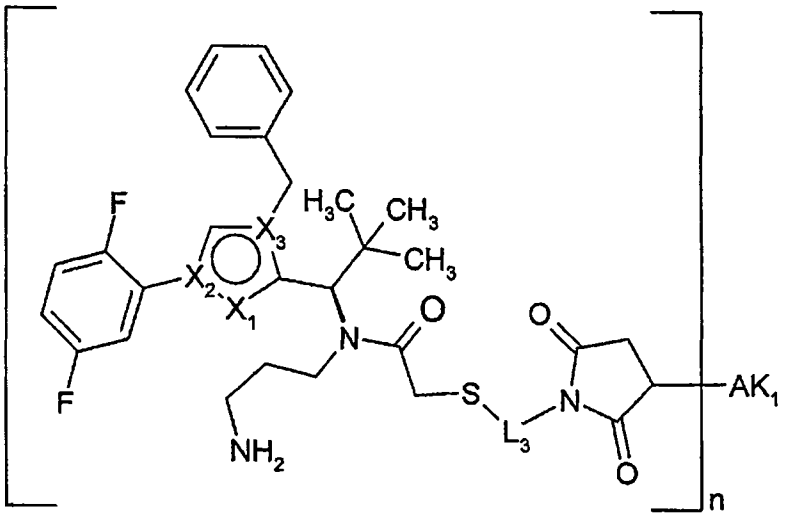


具有對應連接子之結合物之實例具有以下結構，其中X1表示CH，X2表示C且X3表示N且L1具有上文指定之含義，L2及L3具有與L1相同的含義，AK1表示經由半胱胺酸殘基連接之抗-B7H3抗體且n為數值1至10。AK1較佳為人類、人類化或嵌合單株抗體或其抗原結合片段。AK1尤其較佳為特異性結合B7H3之人類Ig4及/或人類及/或鼠類Ig2同功異型物之去糖基化抗-B7H3抗體，尤其抗-B7H3抗體TPP-

5706及其人類化變異體，諸如TPP-6642及TPP-6850。







若連接子連接至離胺酸側鏈或離胺酸殘基，則其較佳具有下式：

-§-$(SG)_x$-L4-C(=O)-§§

其中

§表示鍵結於活性化合物分子之鍵且

§§表示鍵結於結合肽或蛋白之鍵，

x表示0或1，

SG表示可裂解基團，較佳為2-8寡肽，尤其較佳二肽，

且

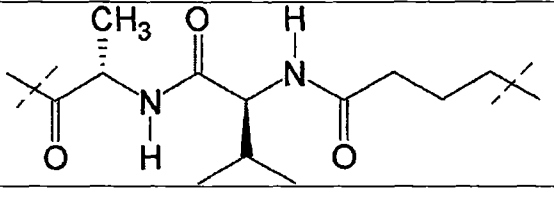
L4表示單一鍵或基團-$(CO)_y$-G4-，其中y表示0或1，且

G4表示具有1至100個來自伸芳基及/或直鏈及/或分支鏈及/或環狀伸烷基之碳原子且可間雜以下基團中之一或多者一次或超過一次的直鏈或分支鏈烴鏈：-O-、-S-、-SO-、SO_2、-NH-、-CO-、-NHCO-、-CONH-、-NMe-、-NHNH-、-SO_2NHNH-、-CONHNH-及具有至多4個選自由N、O及S組成之群的雜原子、-SO-或-SO_2-的5至10員芳族或非芳族雜環，其中側鏈若存在則可經-$NHCONH_2$、-COOH、-OH、-NH_2、NH-$CNNH_2$、磺醯胺、碸、亞碸或磺酸取代。

下表B提供連至離胺酸殘基之連接子實例。該表另外提供較佳偶合點(R^1-R^5)。第一欄另外陳述所用對應連接子之實例編號。

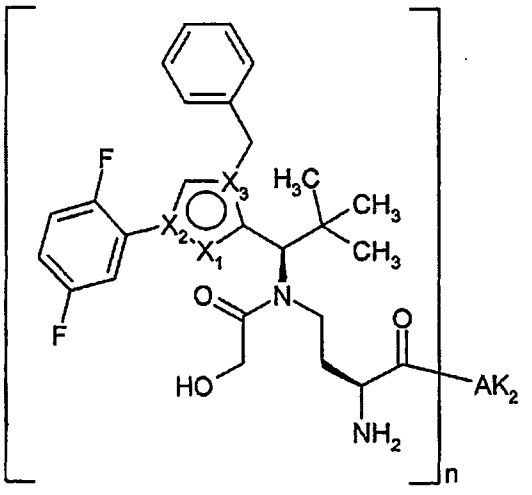
表B：離胺酸連接子

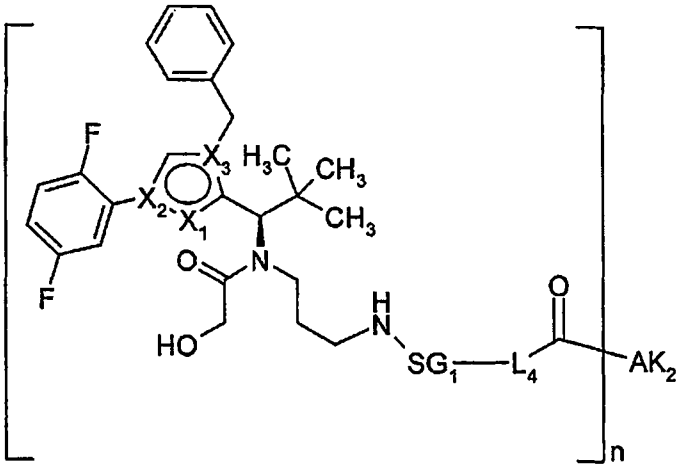
-§-$(SG)_x$-L4-C(=O)-§§

實例	取代基	$(SG)_x$-L4
194、294	R^4	

具有對應連接子之結合物實例具有以下結構，其中X1表示CH，X2表示C且X3表示N且L4具有上文指定之含義，AK2表示經由離胺酸殘基連接之抗體且n為數值1至10。較佳AK2為人類、人類化或嵌合單

株抗-B7H3抗體或其抗原結合片段。尤其較佳為一種特異性結合人類Ig4同功異型物之去糖基化抗-B7H3抗體，尤其抗-B7H3抗體TPP-5706及其人類化變異體，諸如TPP-6642及TPP-6850。





根據本發明，另外較佳為基本結構(i)、(ii)或(iv)，其中SG1或SG表示可藉由蛋白酶裂解之基團且L1及L2具有上文指定之含義。以下基團尤其較佳：

-Val-Ala-CONH- (丙胺酸之C端醯胺的醯胺鍵發生裂解)

-NH-Val-Lys-CONH- (離胺酸之C端醯胺的醯胺鍵發生裂解)

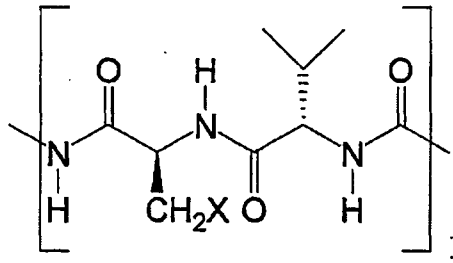
-NH-Val-Cit-CONH- (瓜胺酸之C端醯胺的醯胺鍵發生裂解)

-NH-Phe-Lys-CONH (離胺酸之C端醯胺的醯胺鍵發生裂解)

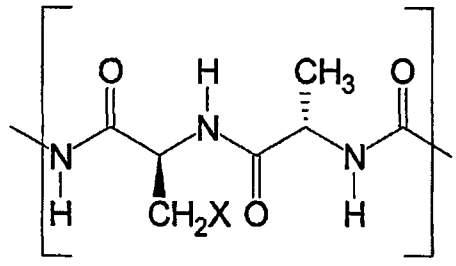
-NH-Ala-Lys-CONH- (離胺酸之C端醯胺的醯胺鍵發生裂解)

-NH-Ala-Cit-CONH- (瓜胺酸之C端醯胺的醯胺鍵發生裂解)

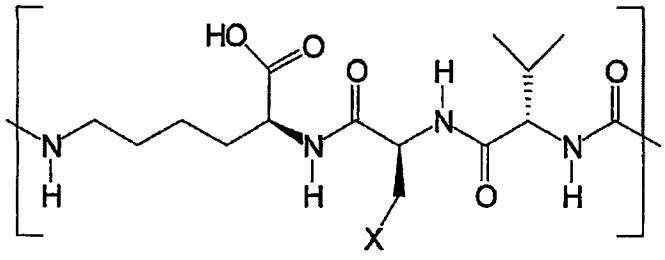
SG1或SG尤其較佳為



或



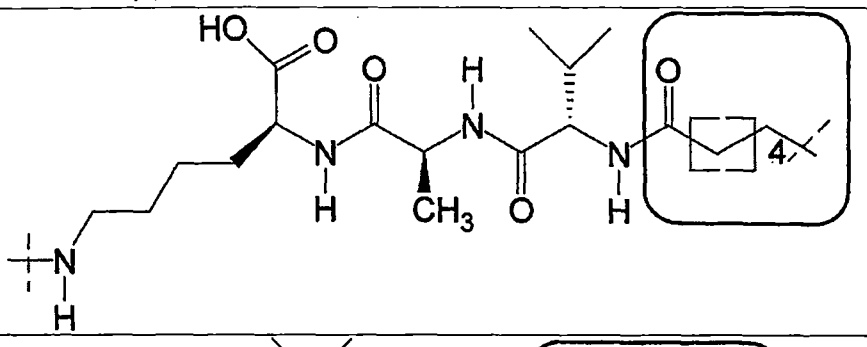
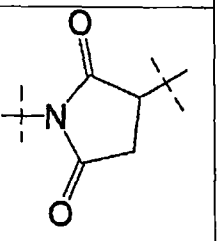
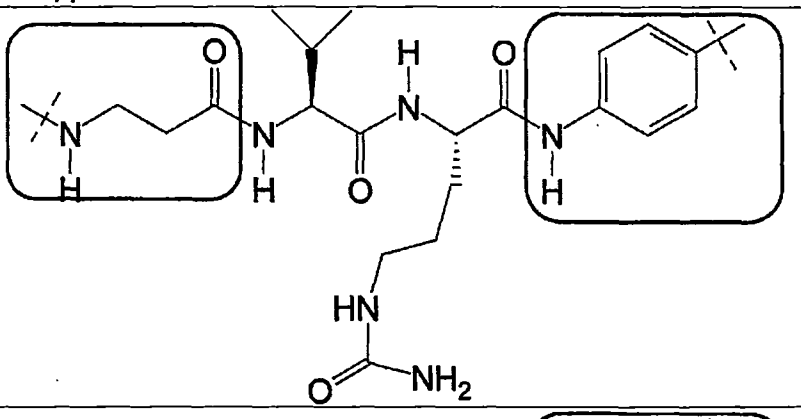
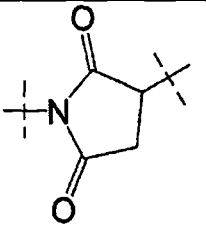
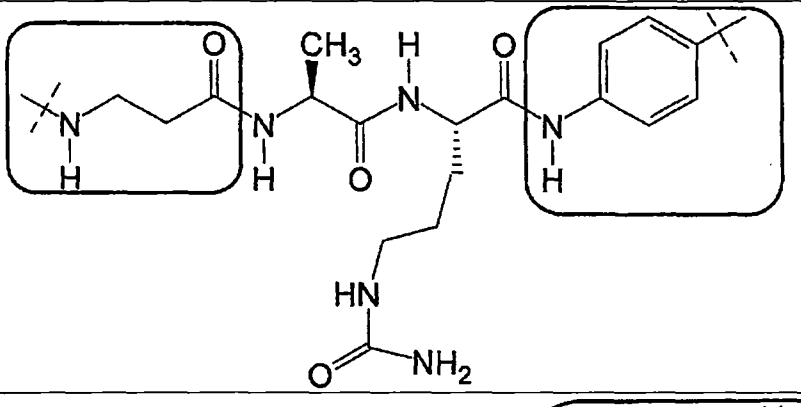
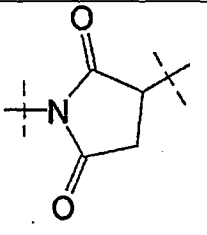
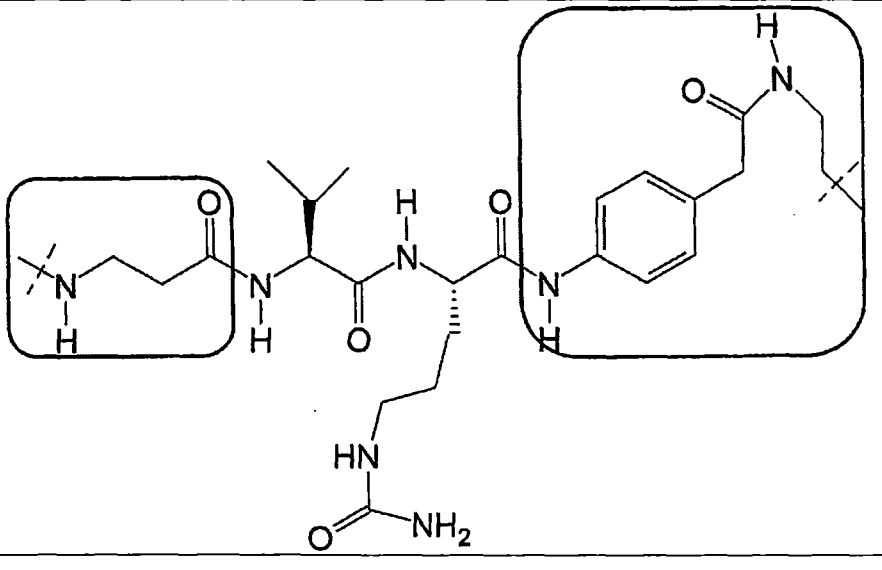
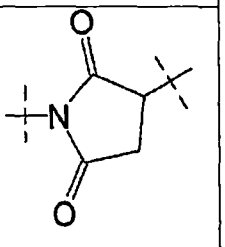
或

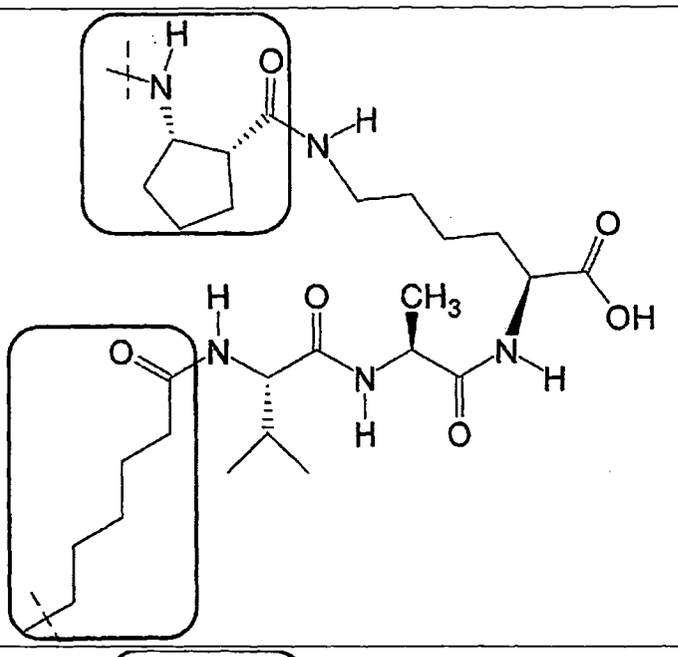
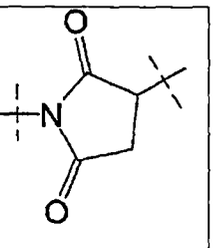
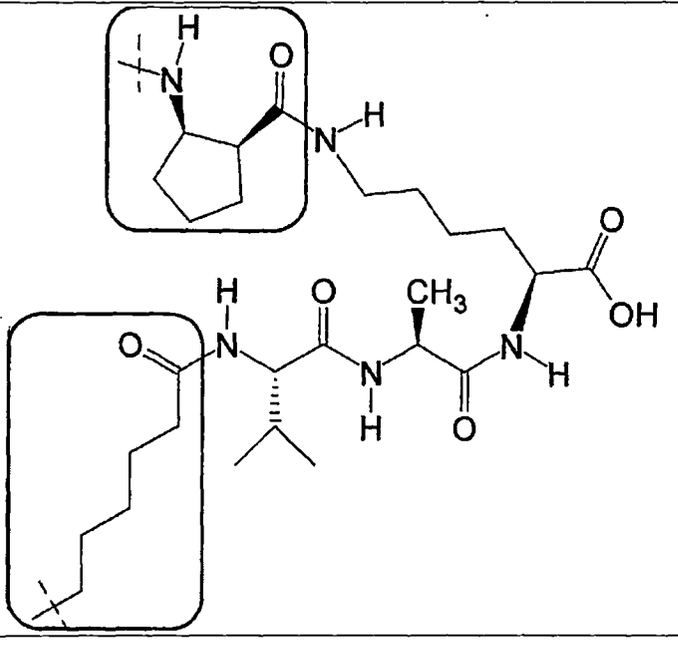
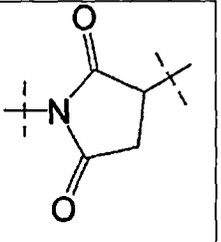
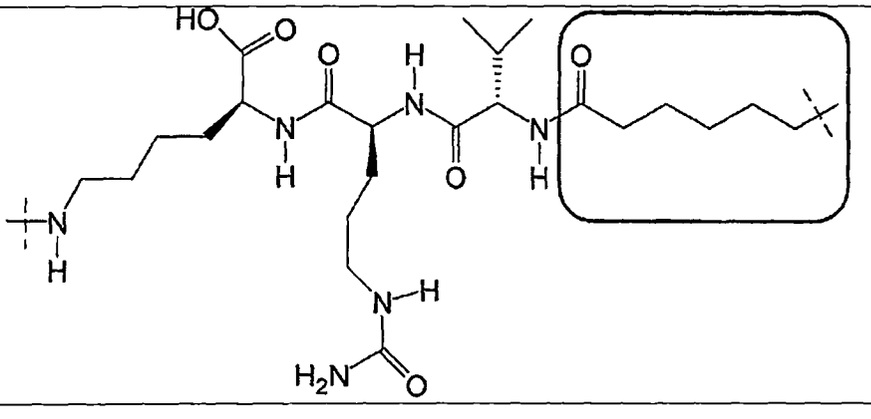
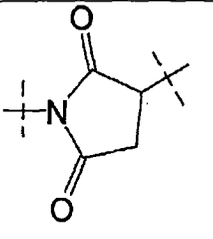


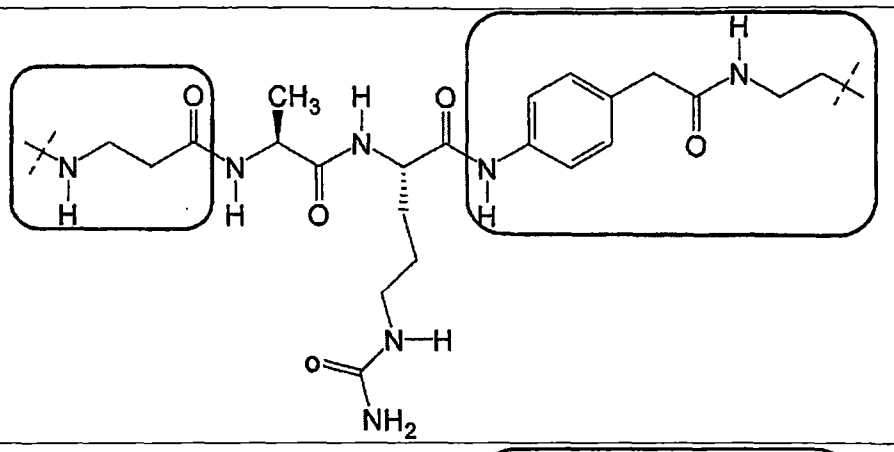
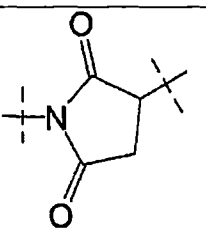
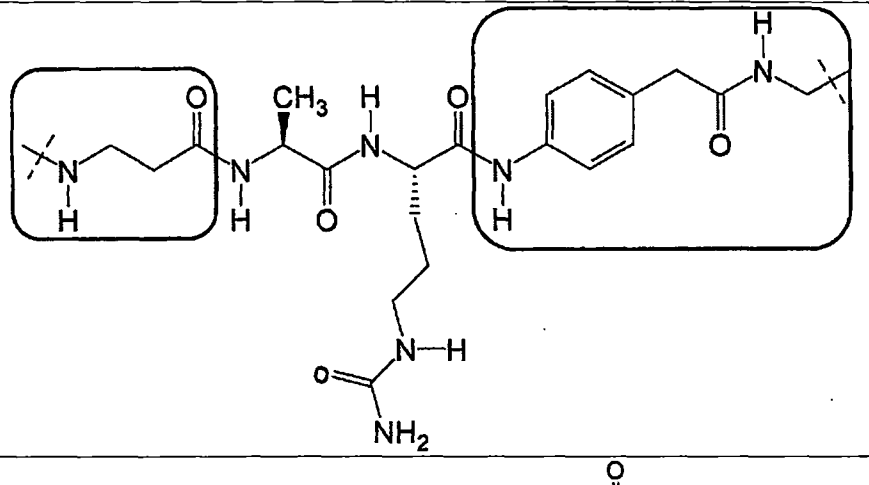
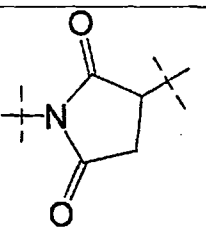
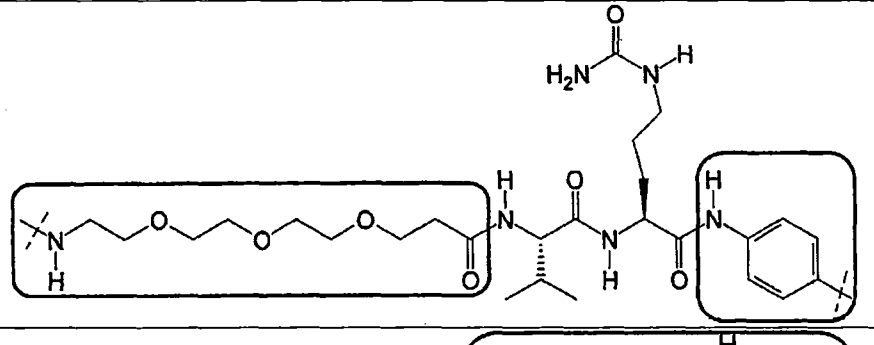
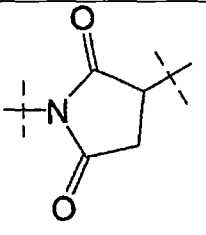
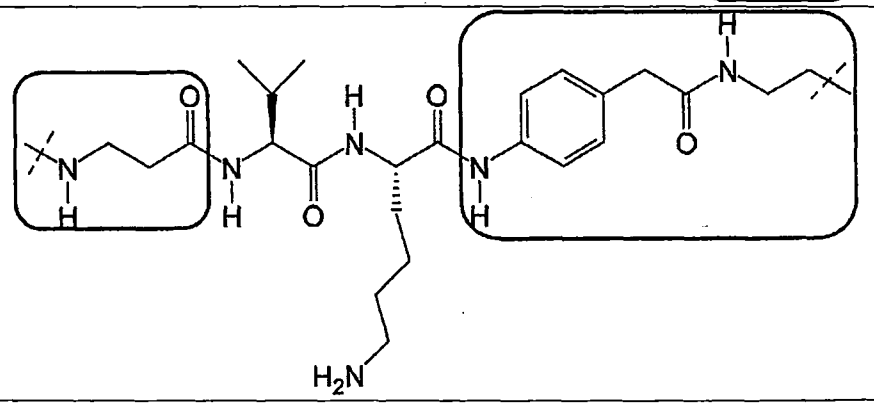
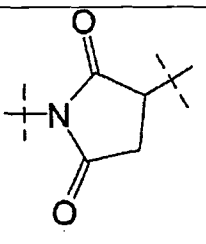
其中X表示H或可視情況經-$NHCONH_2$、-COOH、-OH、NH_2、-NH-$CNNH_2$或磺酸取代之C_{1-10}烷基。

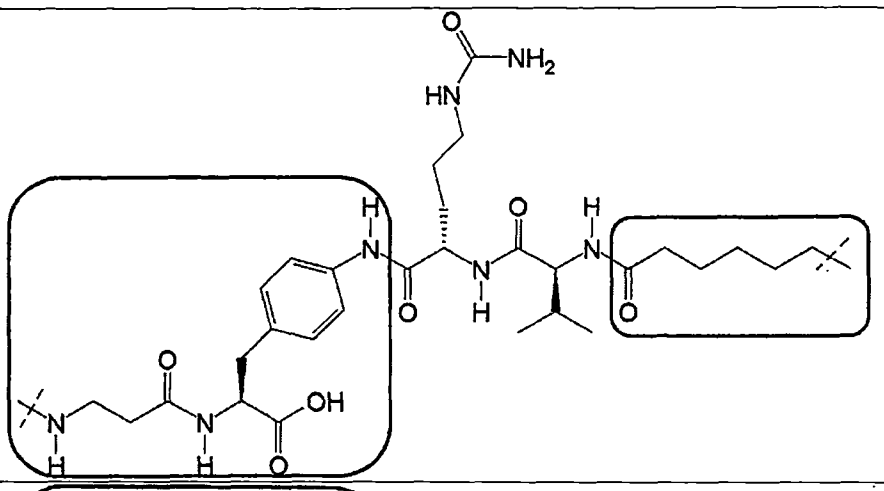
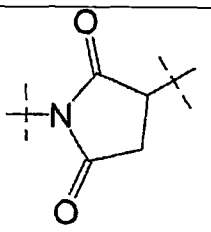
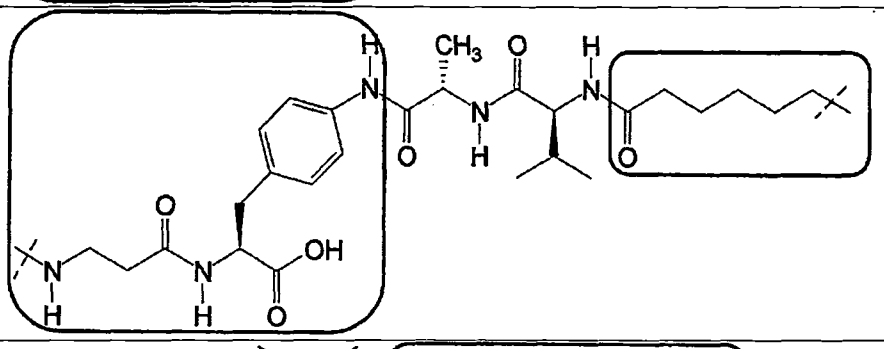
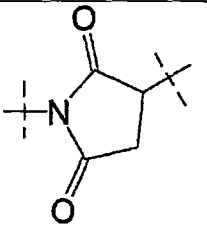
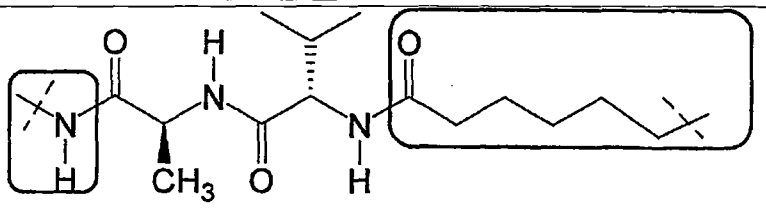
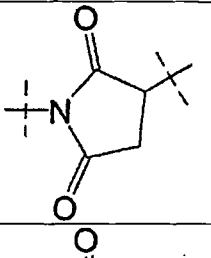
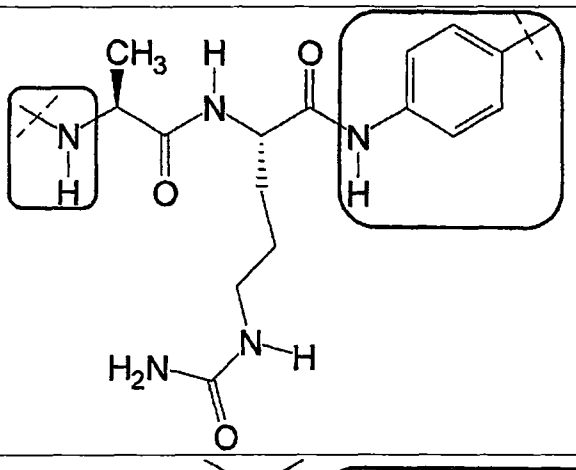
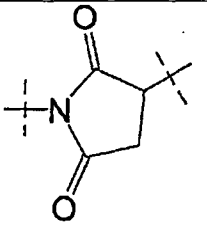
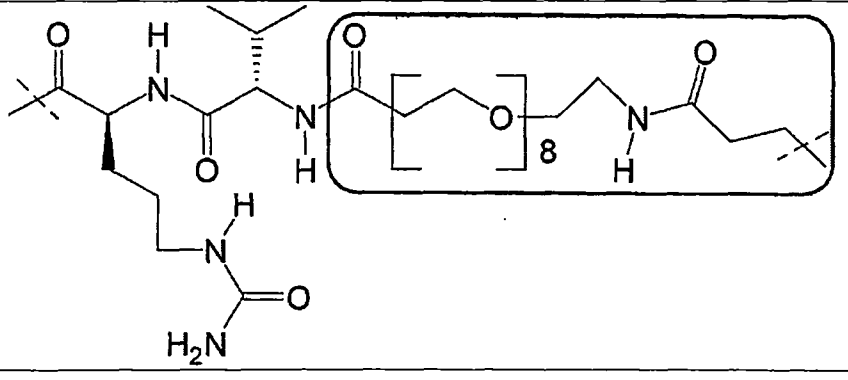
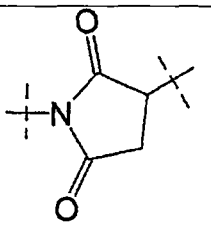
下表C提供連接子部分-SG1-L1-或-L1-SG-L1-之實例，其中SG1及SG為可藉由蛋白酶裂解之基團。表C另外陳述與-SG1-L1-及-L1-SG-L1-之此等實例組合的較佳基團L2，以及較佳偶合點(R^1-R^5)及m之較佳值，即，L1之前面是否存在羰基(參見§-(CO)m-L1-L2-§§)。此等連接子較佳偶合至半胱胺酸殘基。L1基團以方框突出顯示。然而，此等基團L1可經針對上文式§-(CO)m-L1-L2-§§所指定之基團L1之一置換。若L2為丁二醯胺或自其之衍生物，則此醯胺亦可完全或部分地呈水解開鏈之丁二醯胺形式，如上文所述。

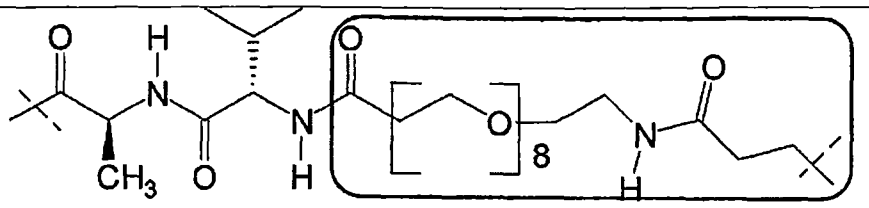
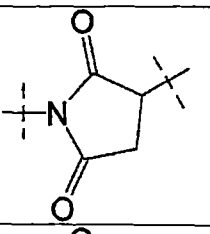
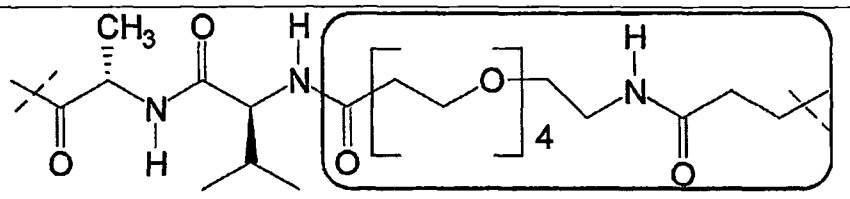
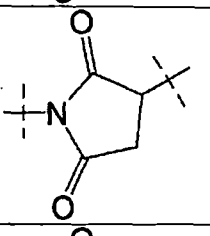
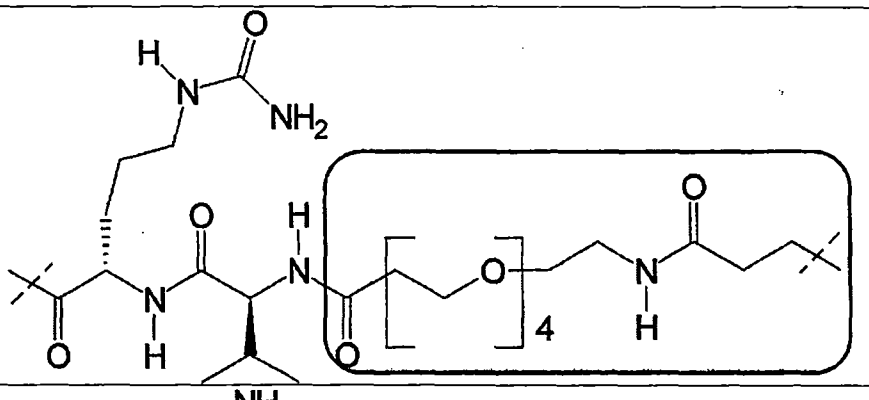
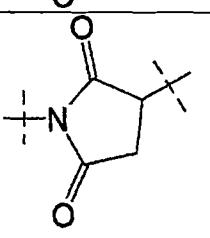
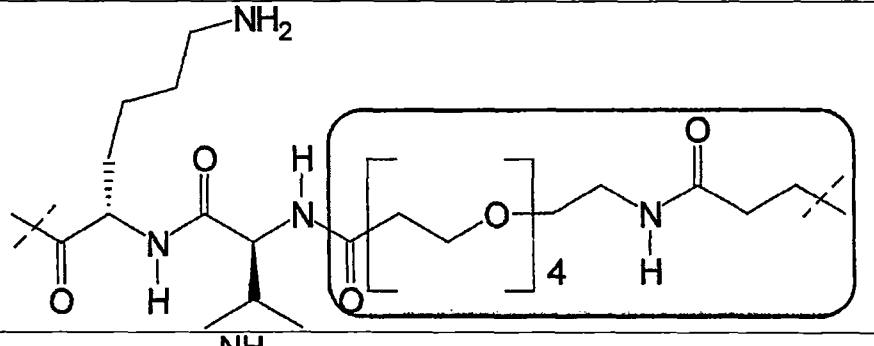
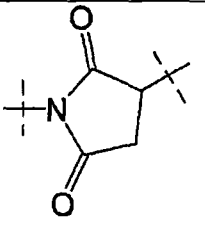
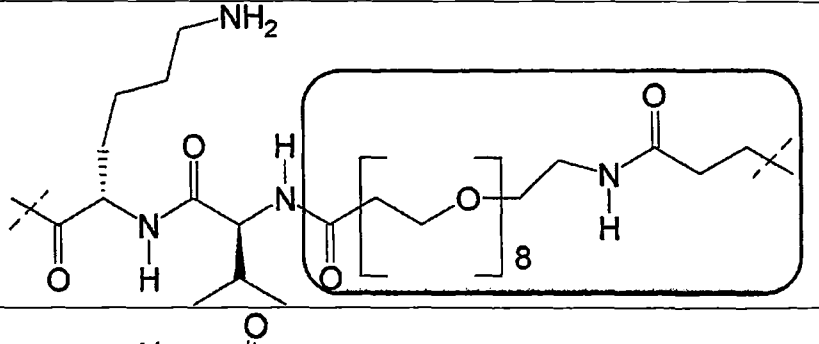
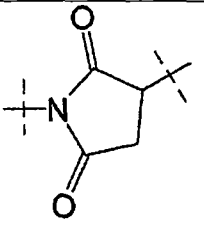
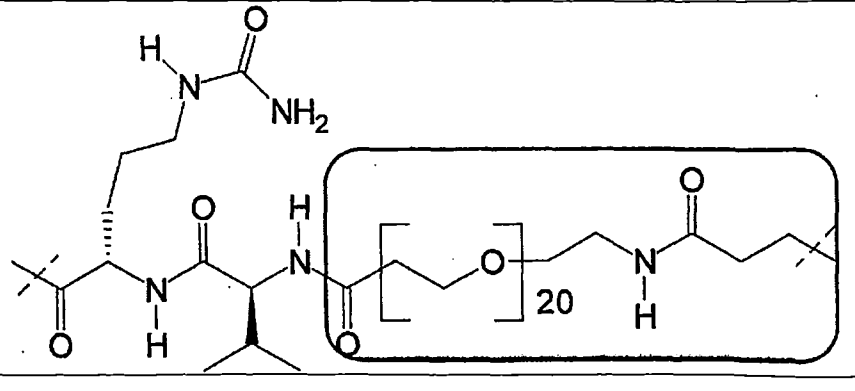
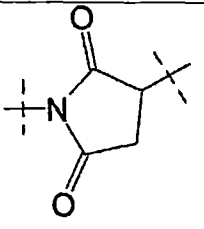
表C

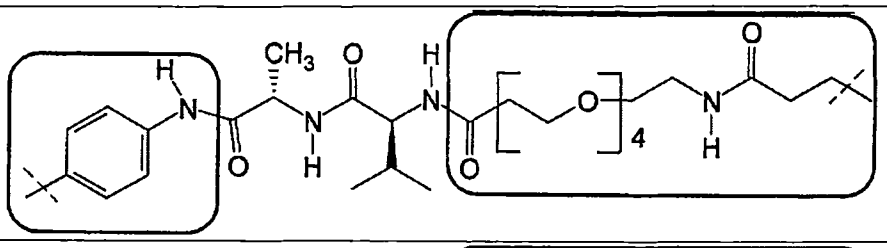
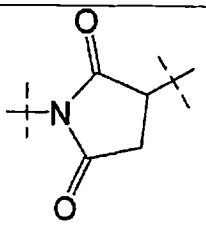
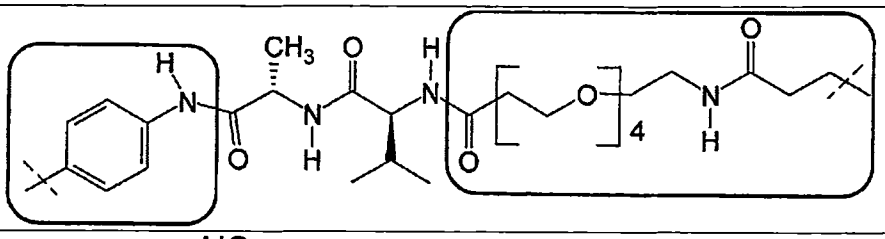
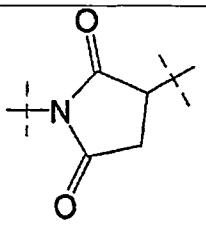
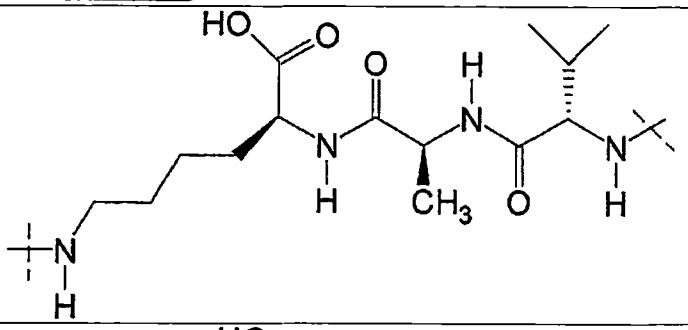
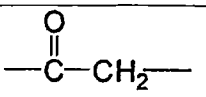
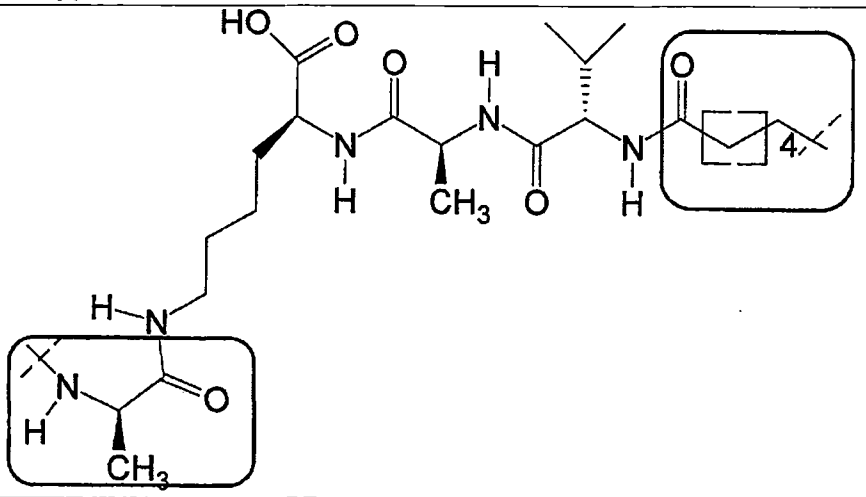
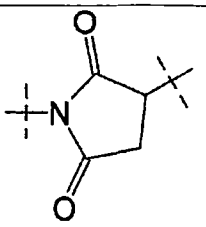
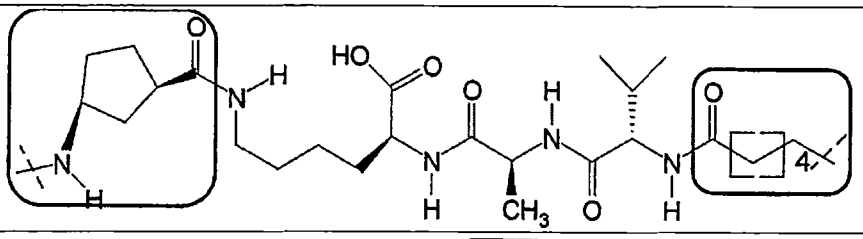
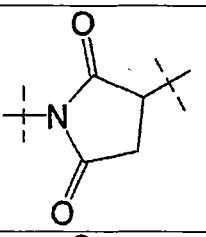
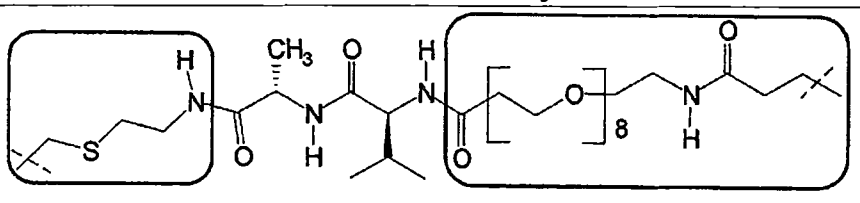
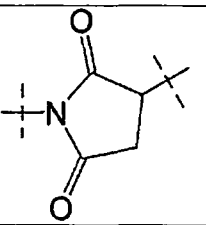
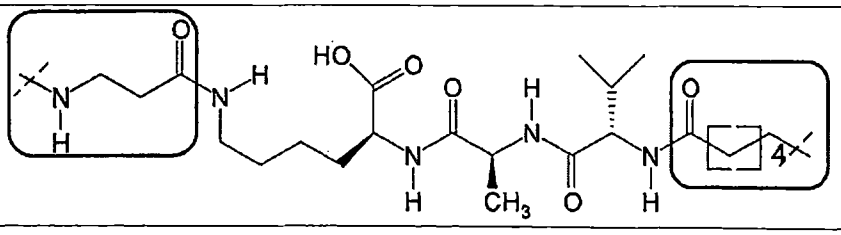
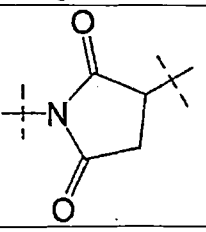
取代基	m	-SG1-L1-或-L1-SG-L1-	L2
R^1	1		
R^1	1		
R^1	1		
R^1	1		

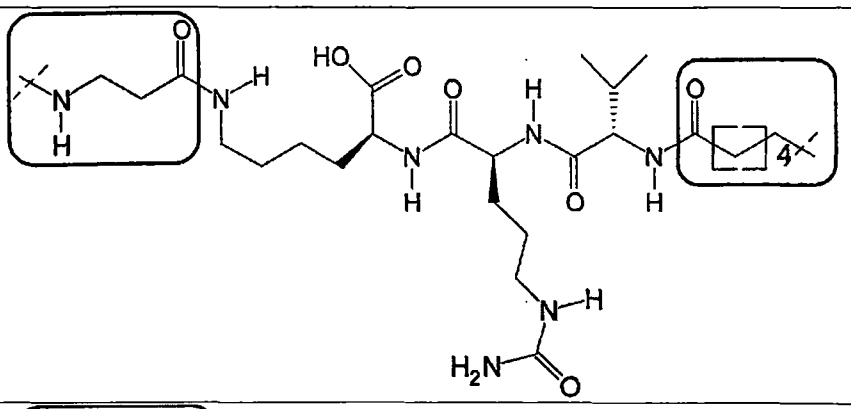
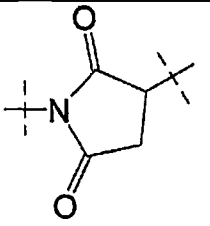
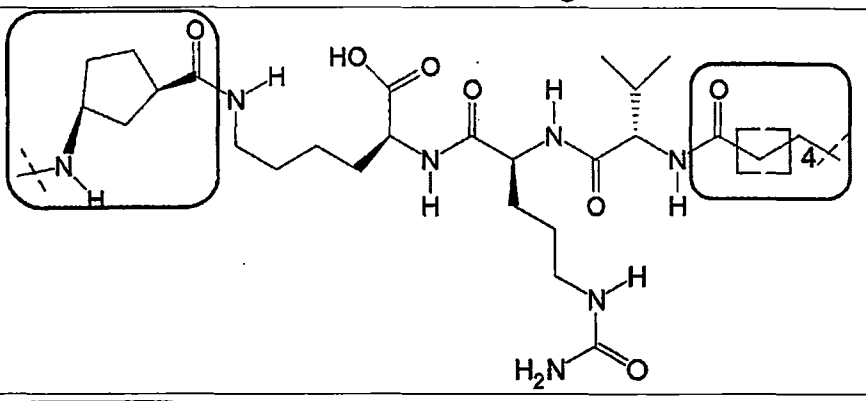
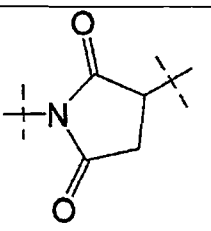
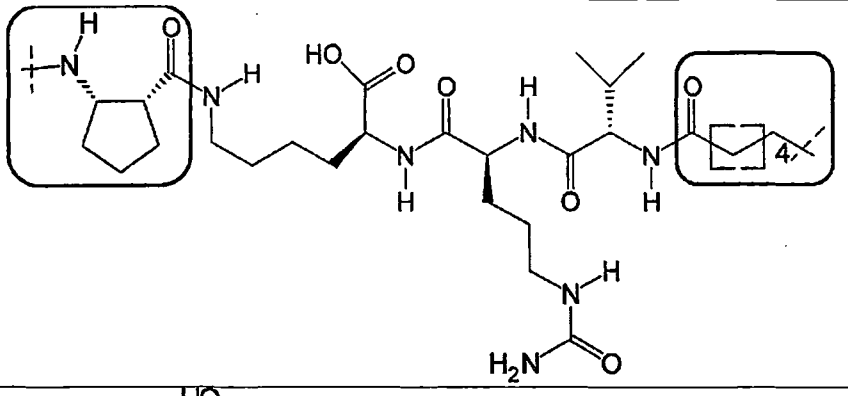
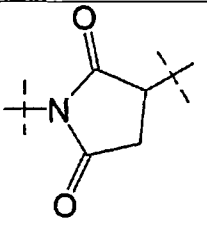
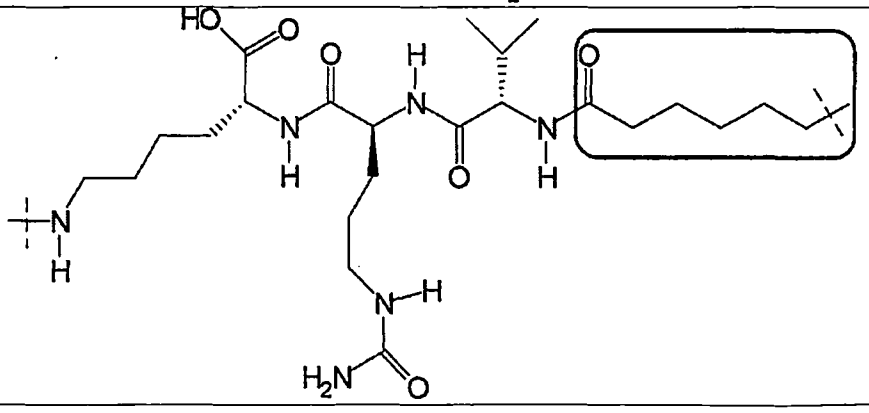
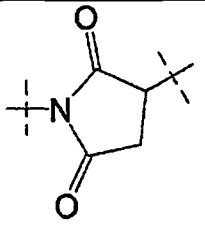
R^1	1		
R^1	1		
R^1	1		

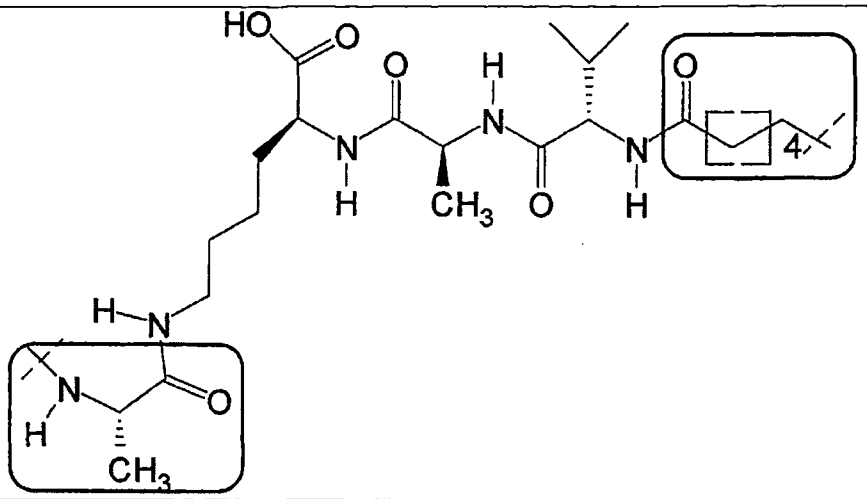
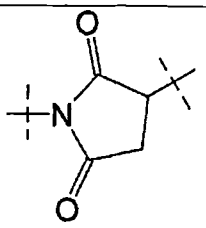
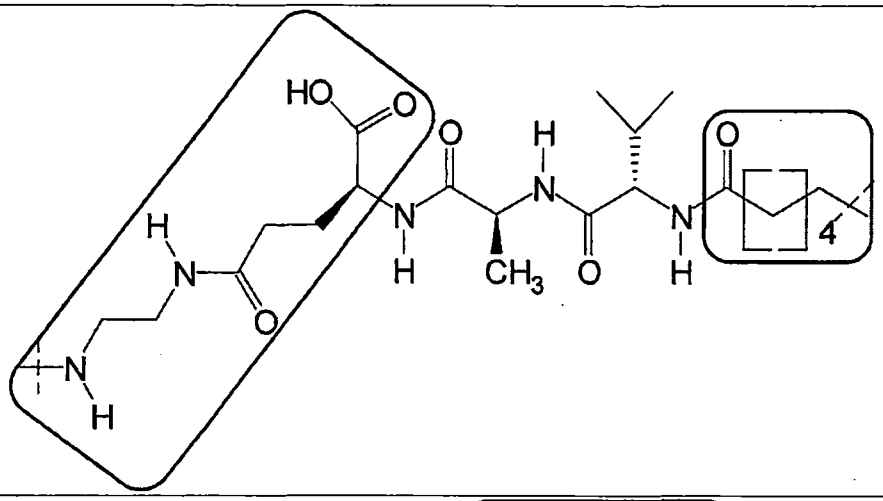
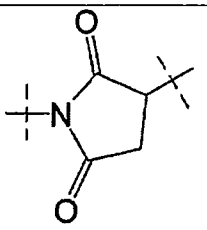
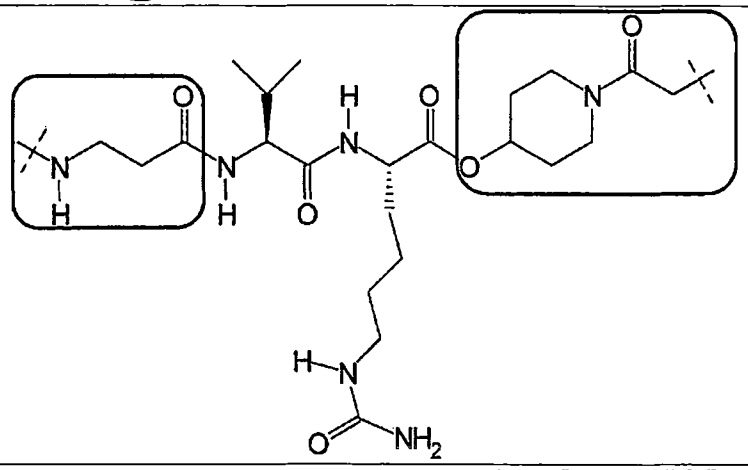
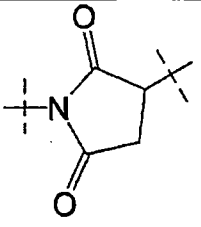
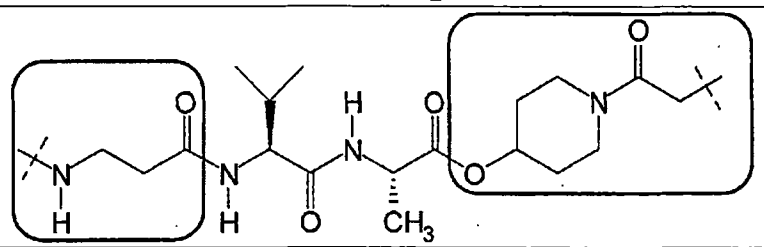
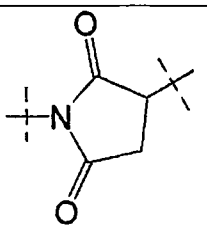
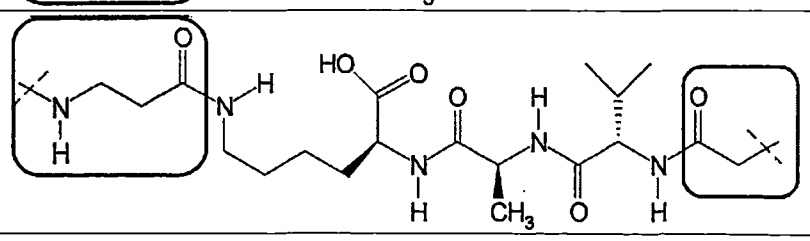
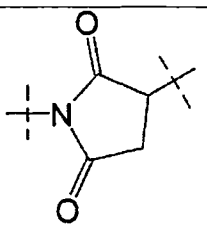
R^1	1		
R^1	1		
R^1	1		
R^1	1		

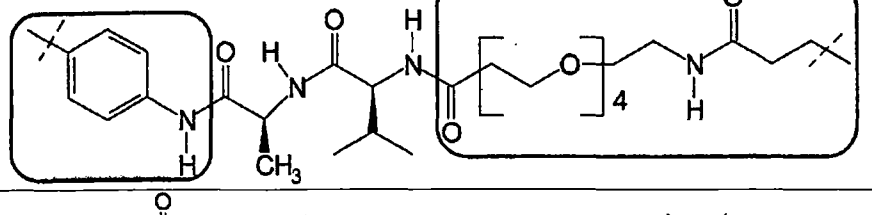
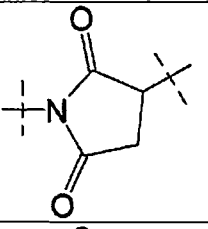
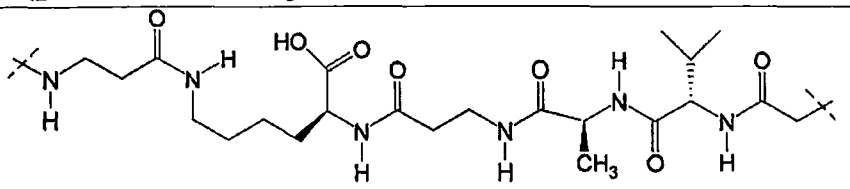
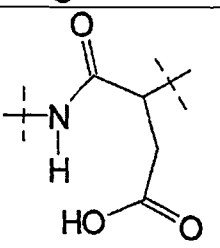
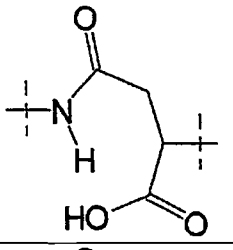
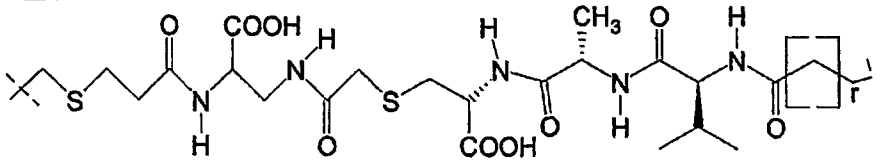
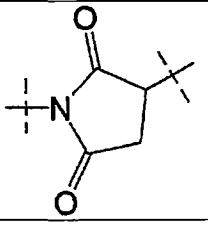
R^1	1		
R^1	1		
R^1	0		
R^1	1		
R^1	0		

R^1	0		
R^1	0		
R^1	0		
R^1	0		
R^1	0		
R^1	0		

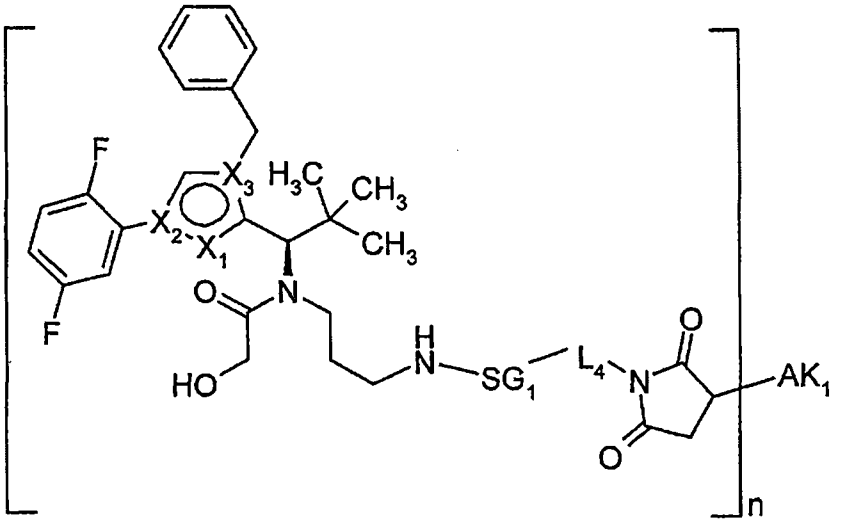
R^3	0		
R^3	0		
R^1	1		
R^1	1		
R^1	1		
R^3	0		
R^1	1		

R^1	1		
R^1	1		
R^1	1		
R^1	1		

R^1	1		
R^1	1		
R^1	1		
R^1	1		
R^1	1		

R^3	0		
R^1	1		 及 
R^3	0		

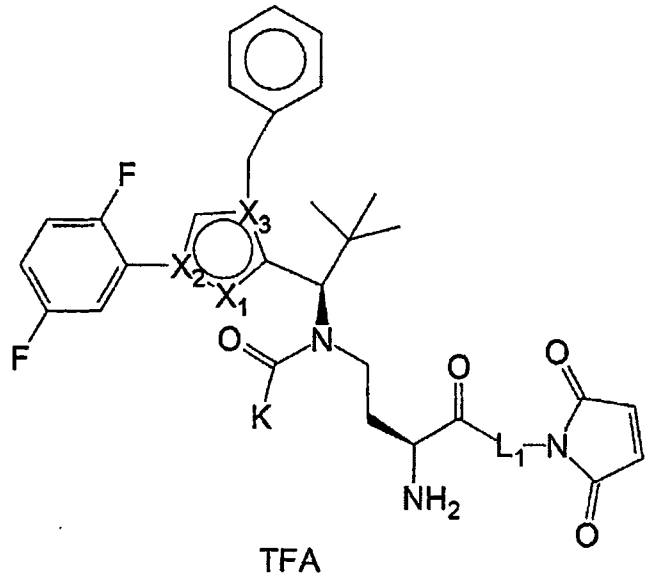
具有基本結構(i)之結合物實例具有以下結構，其中X_1表示CH，X_2表示C且X_3表示N，L_4具有與L_1相同的含義，AK_1表示經由半胱胺酸殘基連接之抗抗-B7H3抗體且n為數值1至10。抗體較佳為去糖基化人類、人類化或嵌合單株抗-B7H3抗體或其抗原結合片段。尤其較佳為一種特異性結合人類Ig4同功異型物之抗-B7H3抗體，尤其抗-B7H3抗體TPP-5706及其人類化變異體，諸如TPP-6642及TPP-6850。

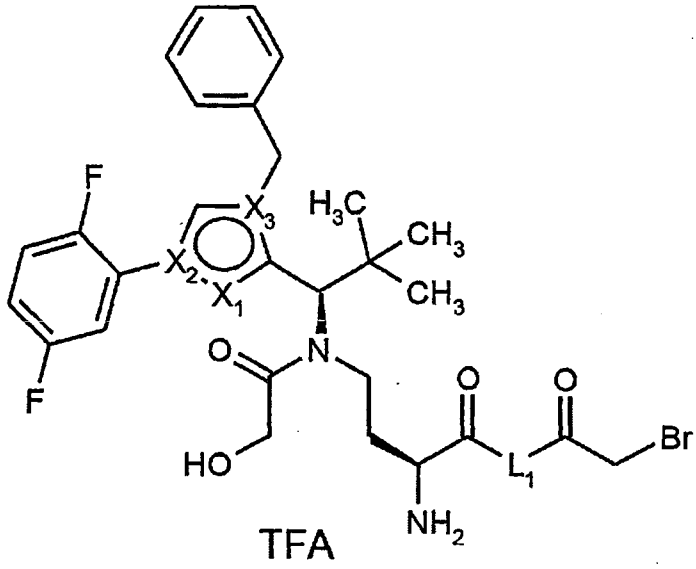


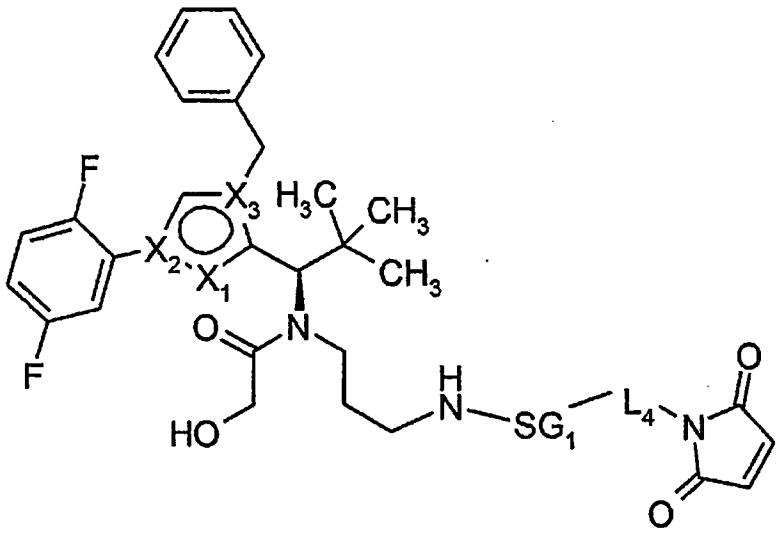
KSP抑制劑-連接子-中間物及結合物製備

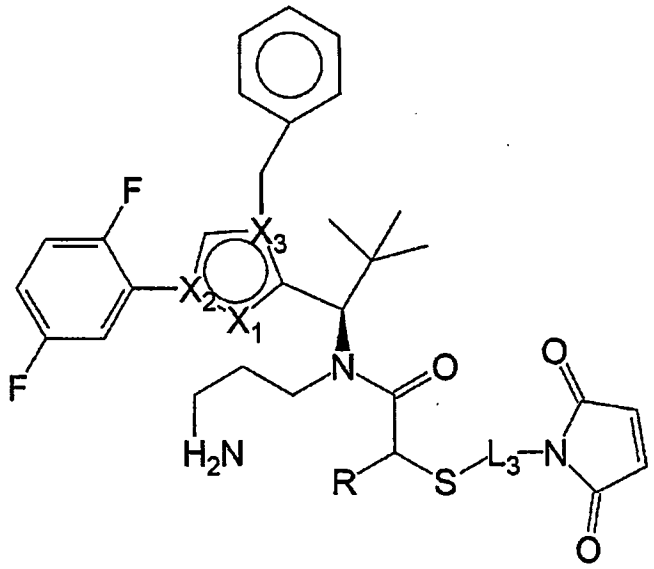
本發明之結合物藉由首先提供低分子量KSP抑制劑及連接子製備。接著使以此方式獲得之中間物與結合劑(較佳為抗體)反應。

較佳地，為與半胱胺酸殘基偶合，使下述化合物之一與含有半胱胺酸之結合劑(諸如抗體)反應，其視情況部分還原用於達成此目的：

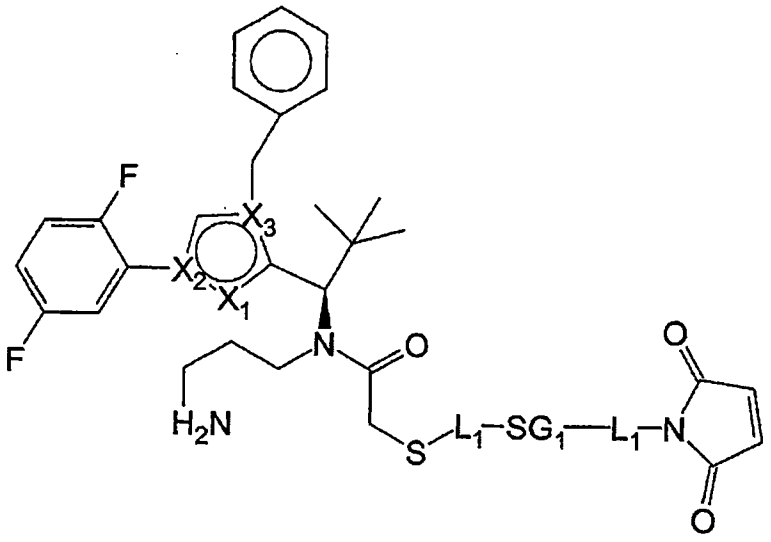




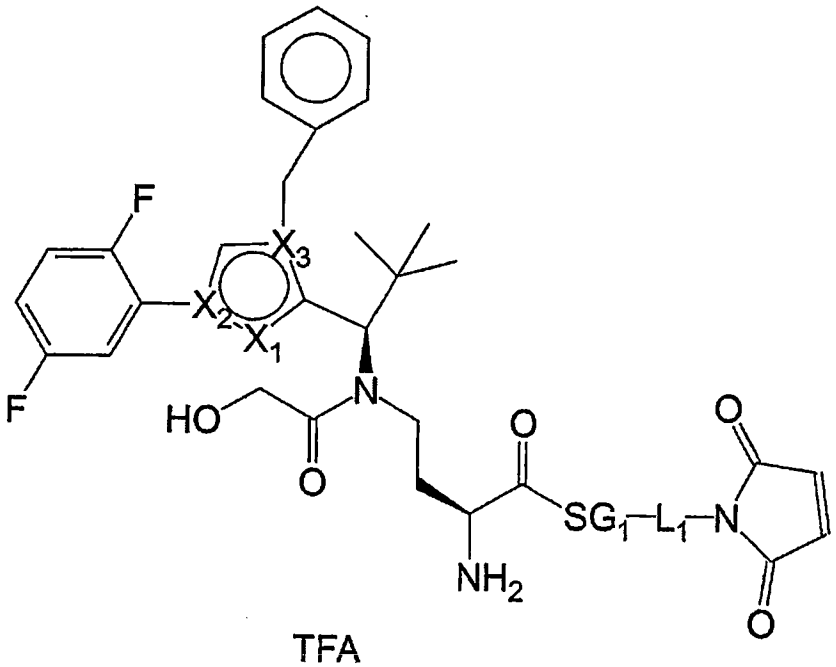




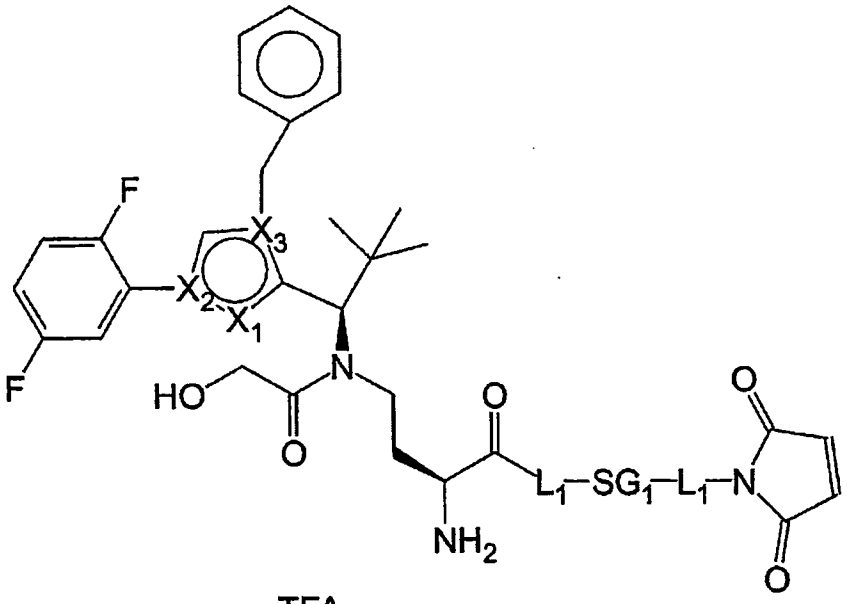
TFA



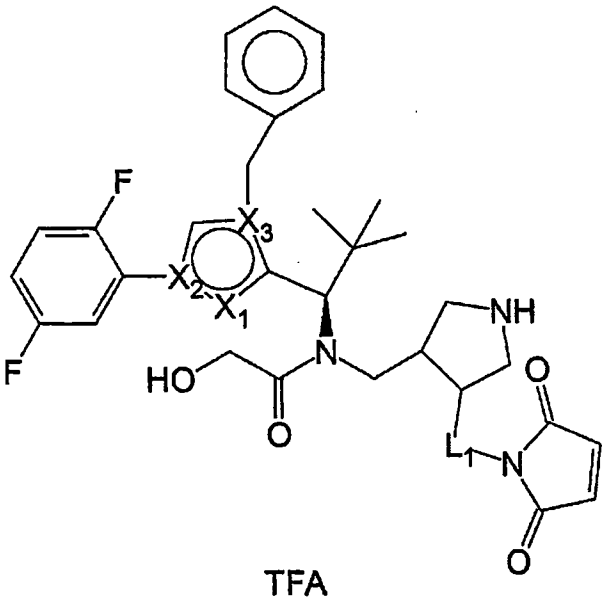
TFA —



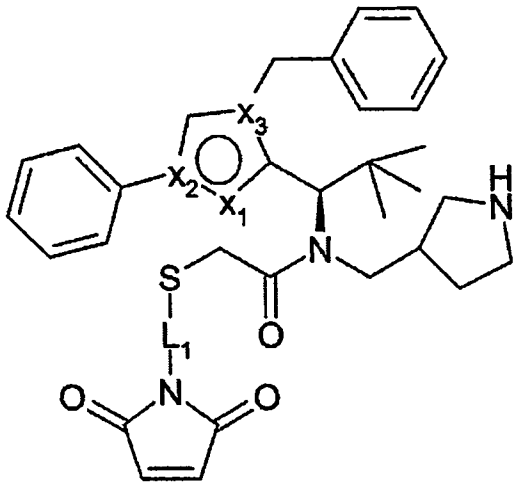
TFA

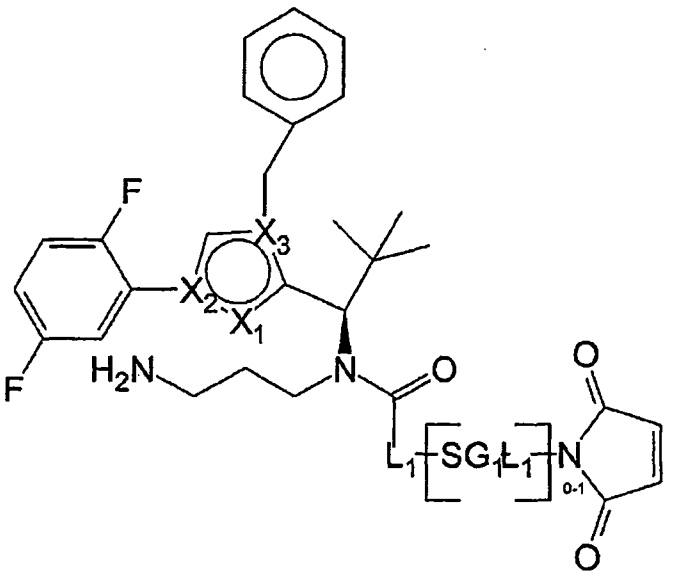

F
F
X3
X2
X1
HO
N
O
O
O
L1
SG1
L1
N
O
O
NH2

TFA


F
F
X3
X2
X1
HO
N
O
O
NH
L1
N
O
O

TFA


X3
X2
X1
H
N
N
S
L1
O
N
O
O



TFA

其中R表示-H或-COOH，

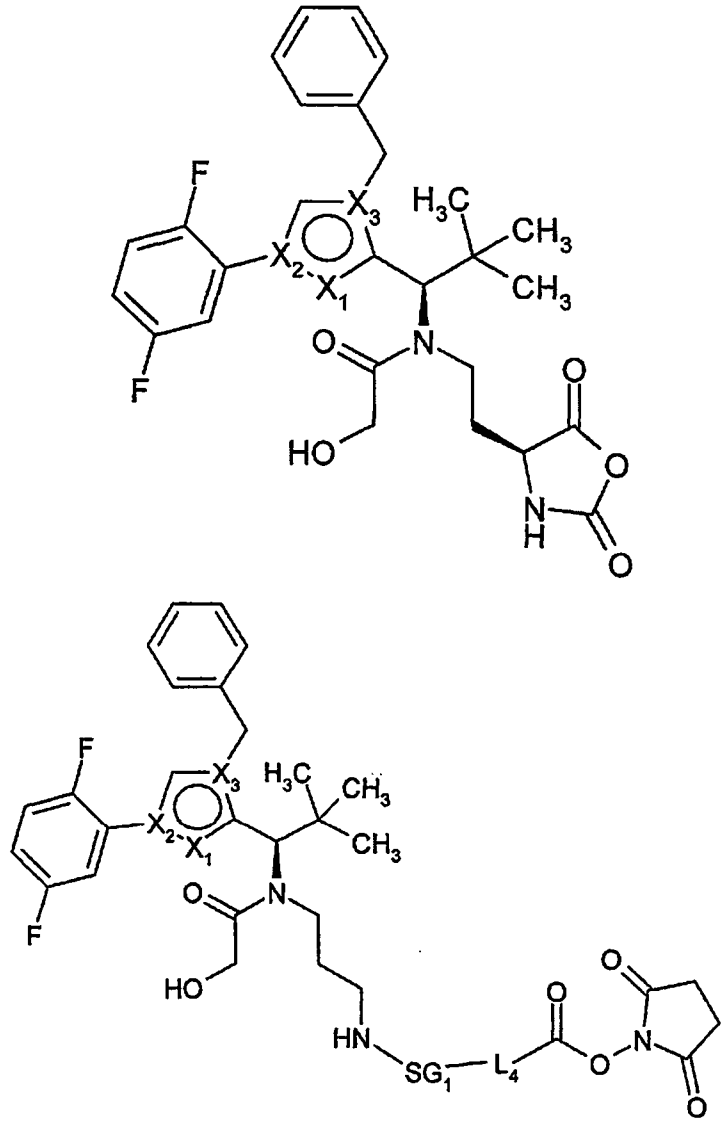
其中K表示視情況經C_1-C_6烷氧基或-OH取代之直鏈或分支鏈C_1-C_6烷基，且

其中X1表示CH，X2表示C且X3表示N，SG1、L1、L2、L3及L4具有與上述相同之含義。

在上述化合物之每一者中及在下述化合物中，第三丁基可經環己基置換。

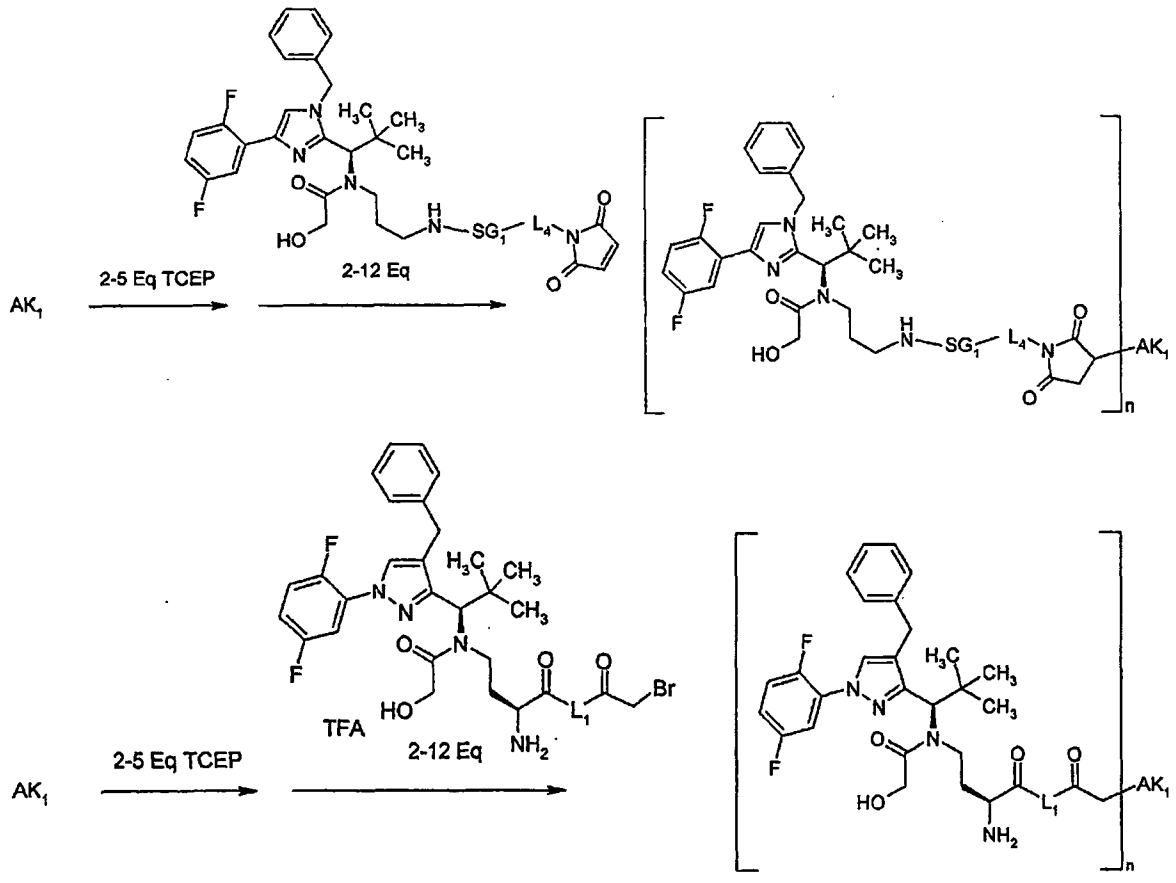
化合物可以例如其三氟乙酸鹽形式使用。為與諸如抗體之結合劑發生反應，化合物較佳以相對於結合劑2倍至12倍莫耳濃度過量使用。

較佳地，為與離胺酸殘基偶合，使下述化合物之一與含有離胺酸之結合劑(諸如抗體)反應：



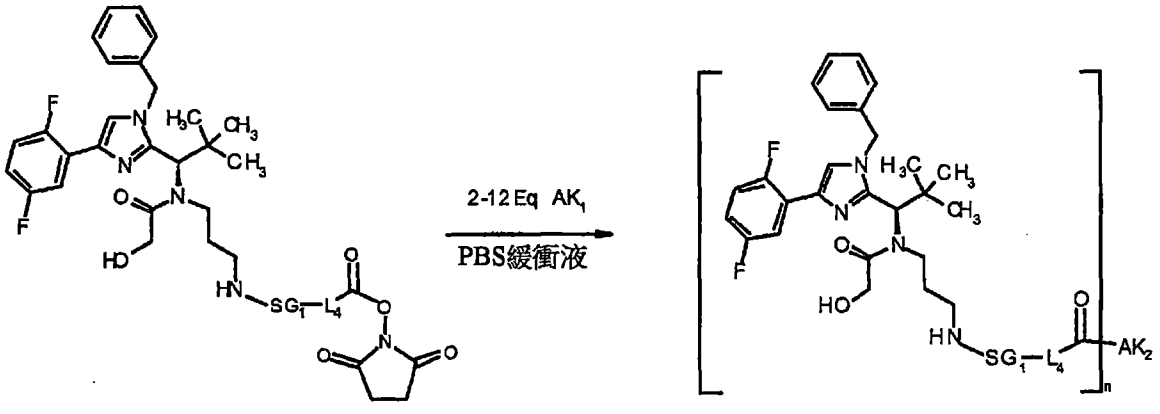
其中X_1表示CH，X_2表示C且X_3表示N且L_4具有與L_1相同之含義且L_1具有與上述相同之含義。

對於與半胱胺酸殘基偶合之中間物而言，反應可說明如下：

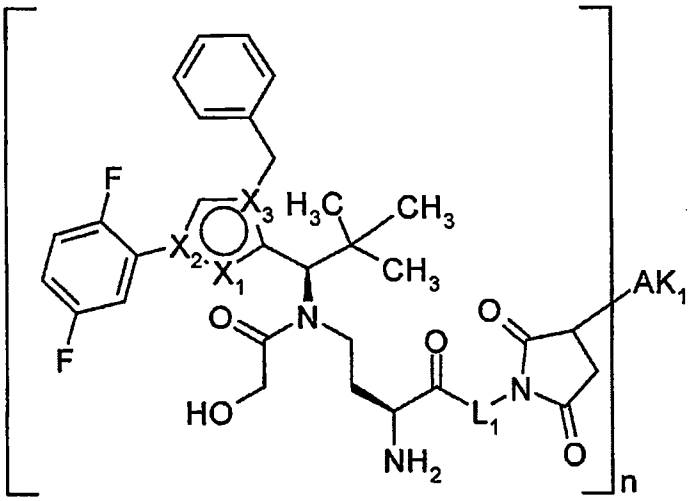


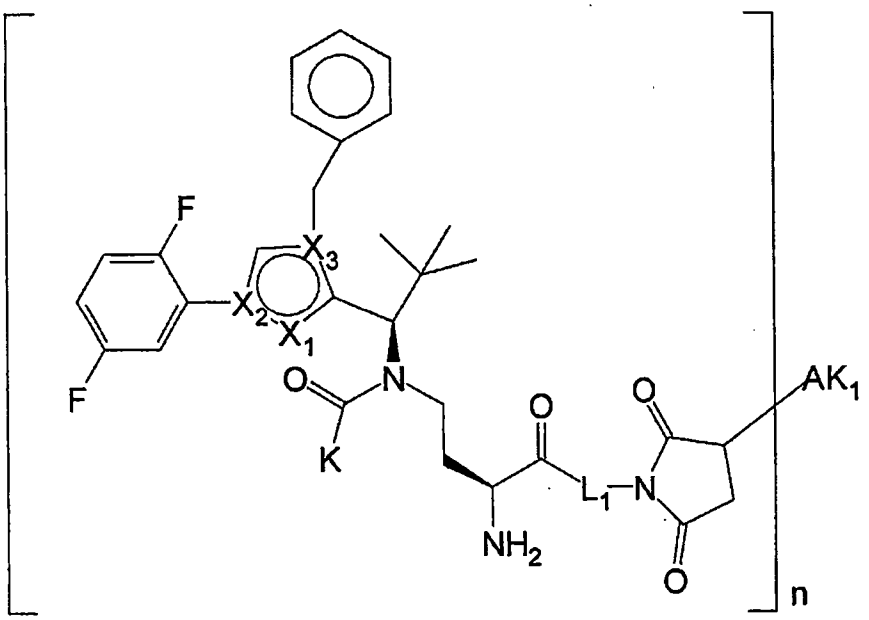
其他中間物及其他抗體可相應地發生反應。

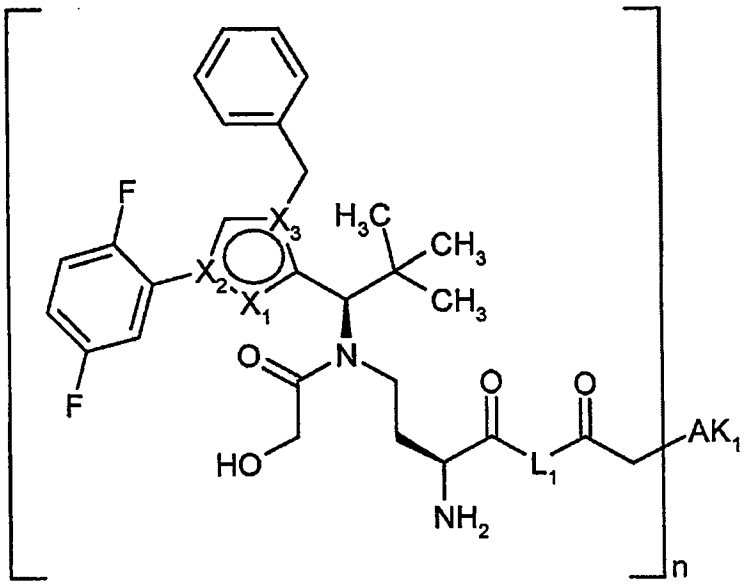
對於與離胺酸殘基偶合之中間物而言，反應可說明如下：

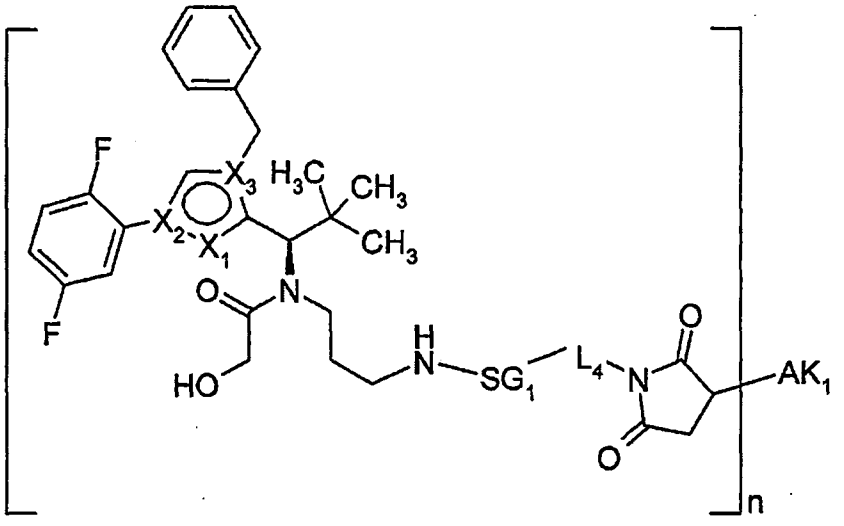


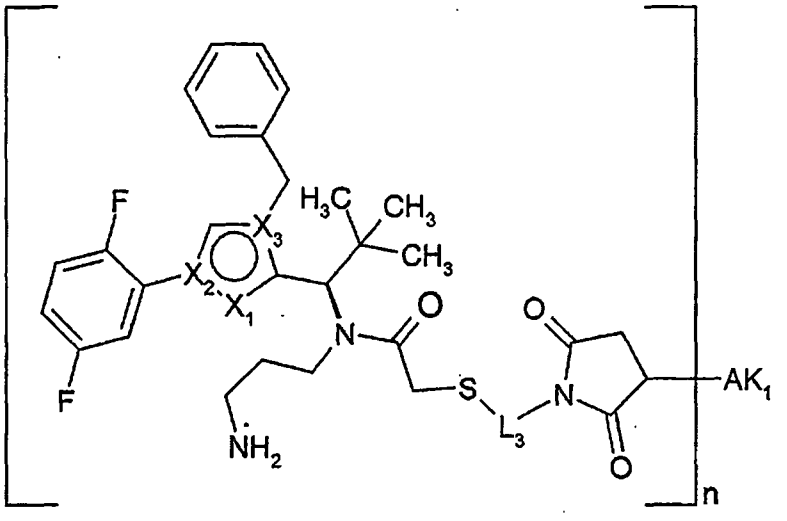
根據本發明，由此產生以下結合物：

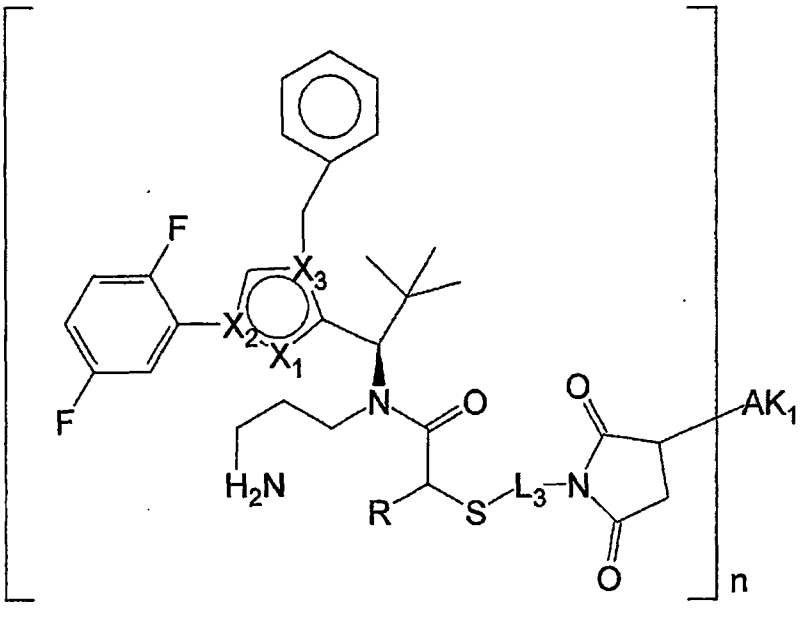


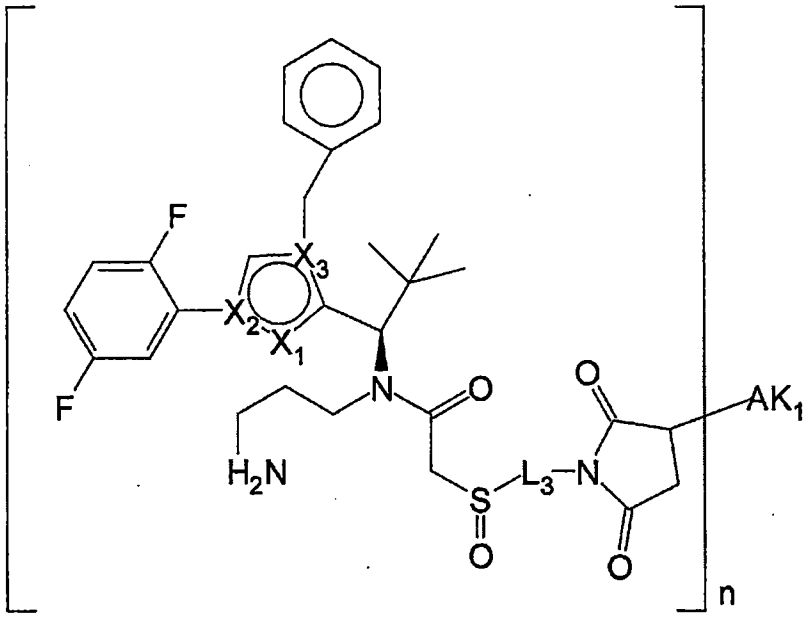


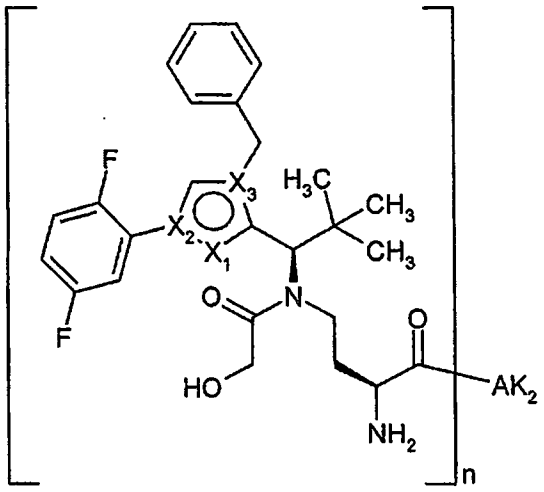


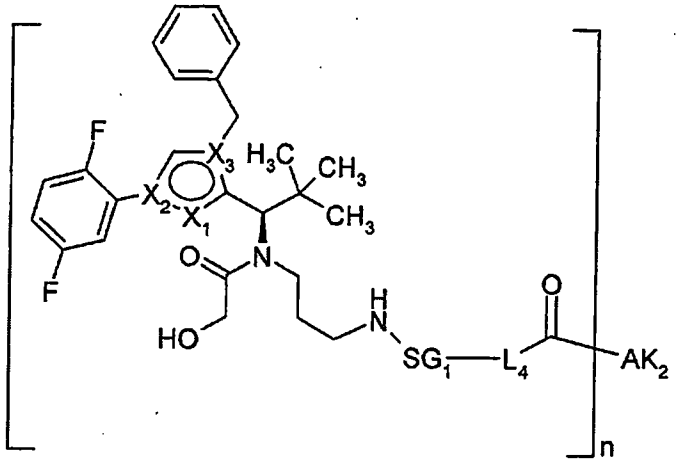


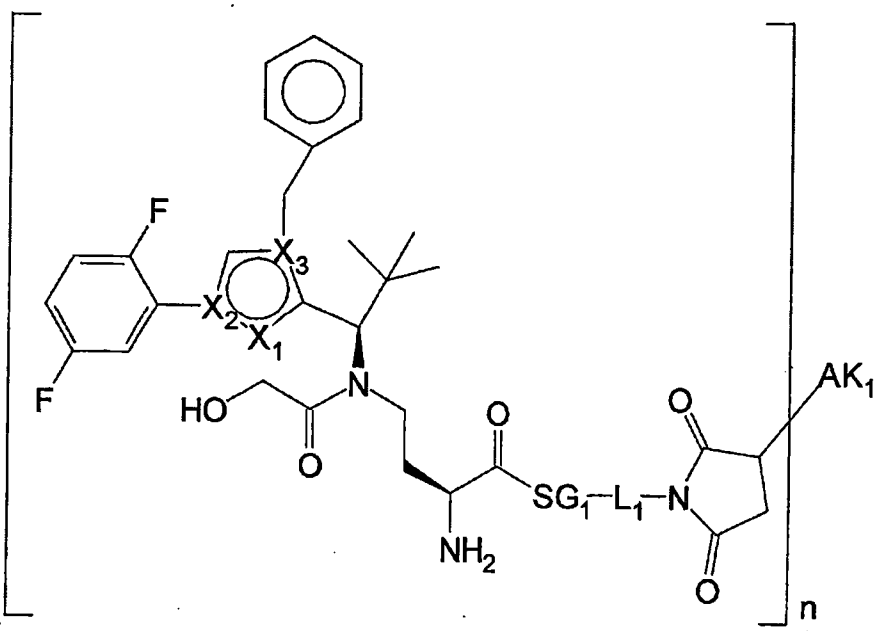


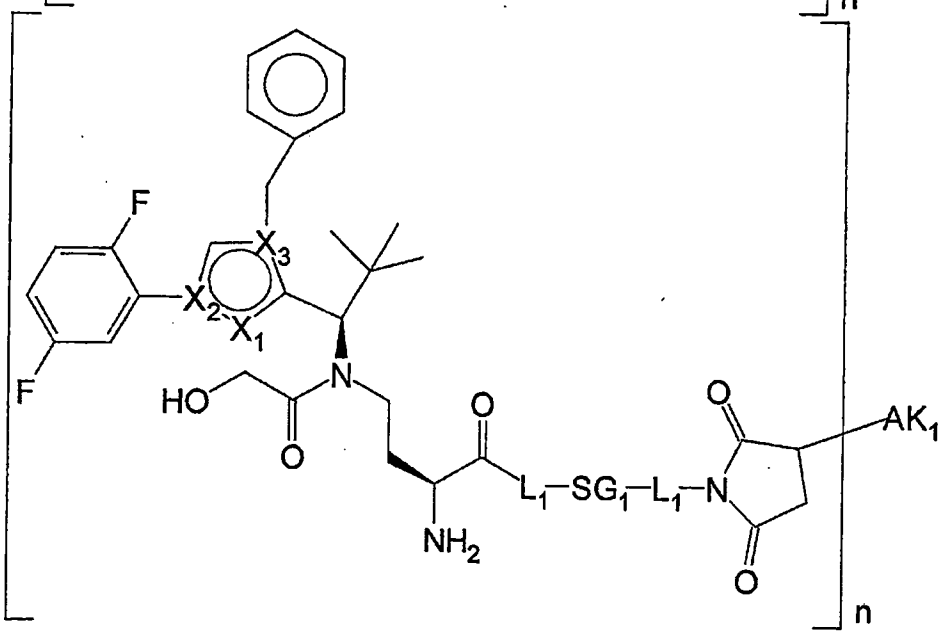


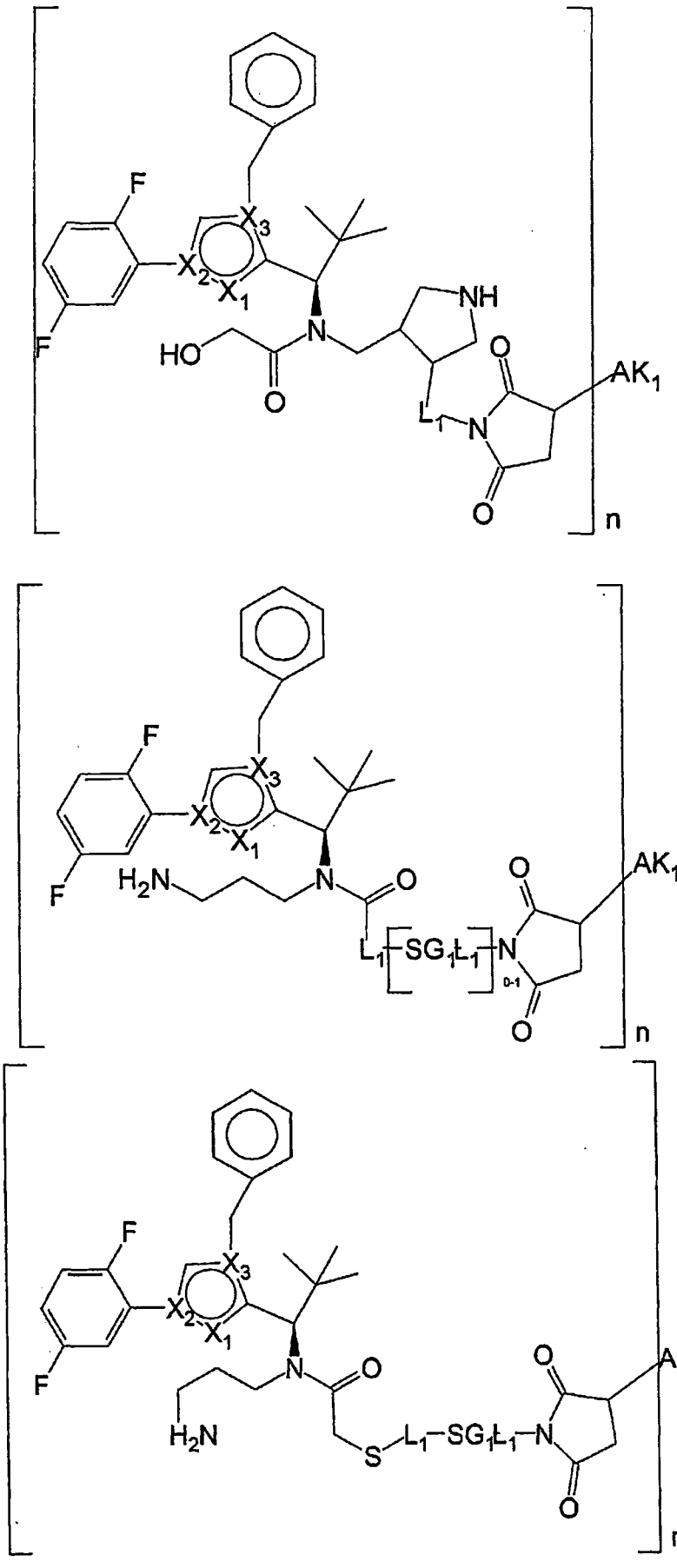




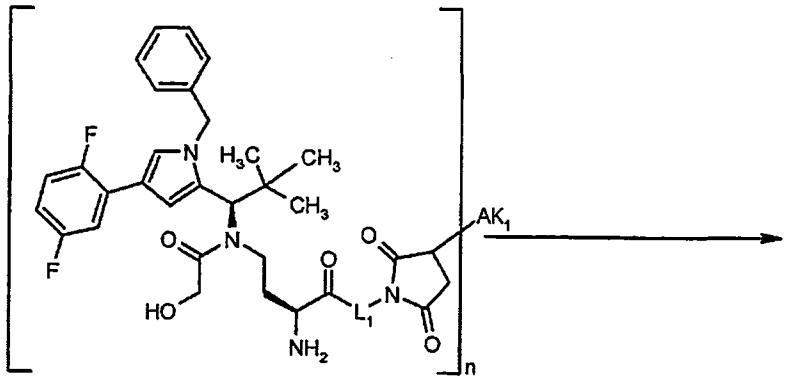


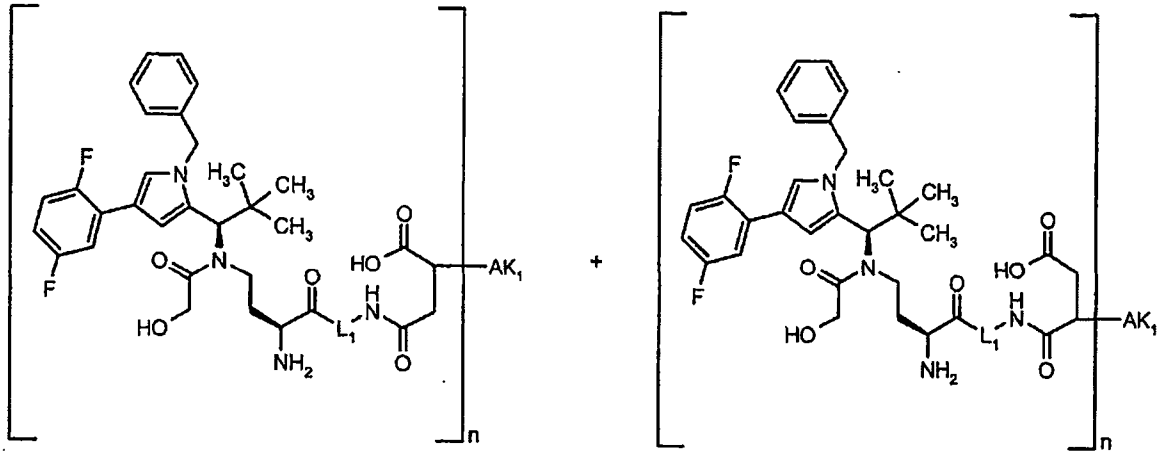






視連接子而定，經丁二醯亞胺連接之ADC可在結合之後轉化成開鏈之丁二醯胺，其具有有利的穩定性型態。





此反應(開環)可在pH 7.5至9、較佳在pH 8、在25℃至37℃之溫度下進行，例如藉由攪拌進行。較佳攪拌時間為8至30小時。

在上述式中，X_1表示CH，X_2表示C且X_3表示N，SG_1及L_1具有與上述相同之義且L_2、L_3及L_4具有與L_1相同的含義；且R及K具有與上述相同之含義。AK1為經由半胱胺酸殘基偶合之抗-B7H3抗體或其抗原結合片段，且AK2為經由離胺酸殘基偶合之抗-B7H3抗體或其抗原結合片段。AK1及AK2較佳為去糖基化之抗-B7H3抗體。尤其較佳AK1及AK2為特異性結合人類Ig4同功異型物之抗-B7H3抗體，尤其抗-B7H3抗體TPP-5706及其人類化變異體，諸如TPP-6642及TPP-6850。

抗-B7H3抗體結合物

抗體較佳為去糖基化人類、人類化或嵌合單株抗-B7H3抗體或其抗原結合片段。尤其較佳為特異性結合人類Ig4同功異型物之抗-B7H3

抗體或其抗原結合片段，尤其抗-B7H3抗體TPP-5706及其人類化變異體，諸如TPP-6642及TPP-6850。在此情況下，糖基化或去糖基化抗體在Fc區之CH2結構域中之保守N-結合位點不具有任何聚糖。文獻亦揭示有機分子與抗體共價偶合(結合)的不同選擇方案。根據本發明，較佳為發毒團與抗體經由抗體之半胱胺酸殘基之一或多個硫原子及/或經由抗體之離胺酸殘基之一或多個NH基團結合。然而，亦可使發毒團經由抗體之游離羧基或經由抗體之糖殘基結合於抗體。

抗體可經由一鍵連接至連接子。抗體可經由結合劑之雜原子連接。可用於連接之本發明抗體之雜原子為硫(在一個實施例中，經由抗體之硫氫基)、氧(根據本發明，藉助於抗體之羧基或羥基)及氮(在一個實施例中，經由抗體之一級或二級胺基或醯胺基)。此等雜原子可存在於天然抗體中或藉由化學方法或分子生物學方法引入。根據本發明，相對於標靶分子，抗體連接至發毒團對抗體之結合活性僅產生微小影響。在一個較佳實施例中，相對於標靶分子，連接對抗體之結合活性無影響。

根據本發明，術語「抗體」以其最廣泛含義理解且包含免疫球蛋白分子，例如完整或經修飾之單株抗體、多株抗體或多特異性抗體(例如雙特異性抗體)。免疫球蛋白分子較佳包含具有四條多肽鏈之分子：兩條重鏈(H鏈)及兩條輕鏈(L鏈)，其典型地經二硫橋連接。各重鏈包含重鏈可變域(簡稱為VH)及重鏈恆定域。重鏈恆定域可包含例如三個結構域CH1、CH2及CH3。各輕鏈包含可變域(簡稱為VL)及恆定域。輕鏈恆定域包含一結構域(簡稱為CL)。VH及VL域可進一步再分成具有高變性之區域，亦稱為互補決定區(簡稱為CDR)，及具有低序列可變性之區域(構架區，簡稱為FR)。典型地，各VH及VL區域係由三個CDR及至多四個FR組成。舉例而言，自胺基端至羧基端依以下次序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。抗體可獲自

任何適合物種，例如兔、大羊駝、駱駝、小鼠或大鼠。在一個實施例中，抗體具有人類或鼠類來源。抗體可為例如人類抗體、人類化抗體或嵌合抗體。

術語「單株」抗體係指自大體上均質抗體群獲得之抗體，亦即該群體之個別抗體除天然存在之可能少數突變之外其他均一致。單株抗體以高特異性識別單一抗原結合位點。術語單株抗體並非係指特定製備過程。

術語「完整」抗體係指包含抗原結合域與輕鏈及重鏈恆定域的抗體。恆定結構域可為天然存在之結構域或其具有多個經修飾之胺基酸位置的變異體。

術語「經修飾之完整」抗體係指胺基末端或羧基末端藉助於共價鍵(例如肽鍵)與不來源於抗體之另一多肽或蛋白質融合的完整抗體。另外，抗體可經修飾，使得反應性半胱胺酸在定義位置引入以促進與發毒團偶合(參見Junutula等人, Nat Biotechnol. 2008年8月, 26(8):925-32)。

術語「人類」抗體係指可自人類獲得之抗體或作為合成人類抗體之抗體。「合成」人類抗體為基於人類抗體序列之分析，可經由電腦模擬而部分或完全自合成序列獲得之抗體。人類抗體可由例如自人類來源之抗體序列文庫分離的核酸編碼。此類抗體之一實例可見於Söderlind等人, Nature Biotech. 2000, 18:853-856。

術語「人類化」或「嵌合」抗體描述由序列之非人類及人類部分組成的抗體。在此等抗體中，人類免疫球蛋白(受體)之一部分序列經非人類免疫球蛋白(供體)之序列部分置換。在許多情況下，供體為鼠類免疫球蛋白。在人類化抗體之情況下，受體CDR胺基酸經供體胺基酸置換。有時，構架胺基酸亦經供體之對應胺基酸置換。在一些情況下，人類化抗體含有既不存在於受體中、亦不存在於供體中之胺基

酸，該等胺基酸係在抗體最佳化期間引入。在嵌合抗體的情況下，供體免疫球蛋白之可變結構域與人類抗體之恆定區融合。

如本文所用之術語互補決定區(CDR)係指結合於抗原所需之抗體可變結構域的彼等胺基酸。典型地，各可變區具有三個CDR區域，稱為CDR1、CDR2及CDR3。各CDR區域可包括根據Kabat定義之胺基酸及/或根據Chotia定義之高變環胺基酸。根據Kabat之定義包含(例如)可變輕鏈之約胺基酸位置24-34 (CDR1)、50-56 (CDR2)及89-97 (CDR3)及可變重鏈之31-35 (CDR1)、50-65 (CDR2)及95-102 (CDR3)的區域(Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。根據Chotia之定義包含(例如)可變輕鏈之約胺基酸位置26-32 (CDR1)、50-52 (CDR2)及91-96 (CDR3)及可變重鏈之26-32 (CDR1)、53-55 (CDR2)及96-101 (CDR3)(Chothia及Lesk; J Mol Biol 196: 901-917 (1987))。在一些情況下，CDR可包含來自根據Kabat及Chotia定義之CDR區域的胺基酸。

視重鏈恆定結構域之胺基酸序列而定，抗體可分成不同類別。存在五種主要類別之完整抗體：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，且其中若干者可分成其他子類。(同型)，例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2。對應於不同類別之重鏈恆定域稱為[alpha/α]、[delta/δ]、[epsilon/ε]、[gamma/γ]及[my/μ]。抗體之三維結構與次單元結構均已知。

術語抗體/免疫球蛋白之「功能片段」或「抗原結合抗體片段」定義為仍包含抗體/免疫球蛋白之抗原結合域的抗體/免疫球蛋白之片段(例如IgG之可變結構域)。抗體之「抗原結合域」典型地包含抗體之一或多個高變區，例如CDR、CDR2及/或CDR3區。然而，抗體之「構架」或「骨架」區在抗體結合於抗原期間亦可起作用。構架區形

成CDR之骨架。較佳地，抗原結合域包含可變輕鏈之至少胺基酸4至103及可變重鏈之胺基酸5至109，更佳包含可變輕鏈之胺基酸3至107及可變重鏈之胺基酸4至111，尤其較佳包含完整可變輕鏈及重鏈，亦即VL之胺基酸1至109及VH之1至113 (根據WO97/08320編號)。

本發明之「功能片段」或「抗原結合抗體片段」非決定性地涵蓋Fab、Fab'、F(ab')2及Fv片段、雙功能抗體、單域抗體(DAb)、線性抗體、抗體之個別鏈(單鏈Fv，簡稱為scFv)；及多特異性抗體，諸如二特異性抗體及三特異性抗體，例如由抗體片段形成C. A. K Borrebaeck 編輯 (1995) Antibody Engineering (Breakthroughs in Molecular Biology), Oxford University Press；R. Kontermann及S. Duebel編輯(2001) Antibody Engineering (Springer Laboratory Manual), Springer Verlag。除「多特異性」或「多官能性」抗體之外的抗體為具有相同結合位點的抗體。多特異性抗體可特異性針對抗原之不同抗原決定基或可特異性針對超過一種抗原之抗原決定基(參見例如WO 93/17715；WO 92/08802；WO 91/00360；WO 92/05793；Tutt等人, 1991, J. Immunol. 147:60 69；美國專利第4,474,893號；第4,714,681號；第4,925,648號；第5,573,920號；第5,601,819號；或Kostelny等人, 1992, J. Immunol. 148: 1547 1553)。$F(ab')_2$或Fab分子可構築成使得Ch1與CL域之間的分子間二硫鍵相互作用之數目可減少或完全阻止。

「抗原決定基」係指能夠特異性結合於免疫球蛋白或T細胞受體之蛋白質決定子。抗原決定基決定子通常由分子之化學活性表面基團(諸如胺基酸或糖側鏈或其組合)組成，且通常具有特定的三維結構特性以及特定電荷特性。

「功能片段」或「抗原結合抗體片段」可藉助於共價鍵(例如肽鍵)，經由其胺基端或羧基端與不來源於抗體之另一多肽或蛋白質融

合。另外，抗體及抗原結合片段可藉由在定義位置引入反應性半胱胺酸來修飾，以便促進與發毒團偶合(參見Junutula等人, Nat Biotechnol. 2008年8月; 26(8):925-32)。

多株抗體可藉由一般技術者已知之方法製備。單株抗體可藉由一般技術者已知之方法製備(Köhler及Milstein, Nature, 256, 495-497, 1975)。人類及人類化單株抗體可藉由一般技術者已知之方法製備(Olsson等人, Meth Enzymol. 92, 3-16或Cabilly等人US 4,816,567或Boss等人US 4,816,397)。

一般技術者瞭解用於製備人類抗體及其片段之多種方法，諸如藉助於轉殖基因小鼠(N Lonberg及D Huszar, Int Rev Immunol. 1995; 13(1):65-93)或噬菌體呈現技術(Clackson等人, Nature. 1991年8月15日; 352(6336):624-8)。本發明之抗體可自重組抗體文庫獲得，重組抗體文庫係由例如自大量健康志願者彙集之多種抗體之胺基酸序列組成。抗體亦可藉助於已知之重組DNA技術產生。抗體之核酸序列可藉由常規定序獲得或獲自公開可獲得之資料庫。

「經分離」抗體或結合劑已經純化以移除細胞之其他成分。可干擾診斷或治療用途之細胞之污染成分為例如酶、激素或細胞之其他肽或非肽成分。較佳抗體或結合劑為相對於抗體或結合劑，其已純化達超過95重量%之程度的抗體或結合劑(例如藉由洛瑞方法(Lowry method)、UV-Vis光譜法或藉由SDS毛細管凝膠電泳所測定)。此外，抗體已純化至可確定胺基末端或內部胺基酸序列之至少15個胺基酸之程度或已純化至均質的程度，均質性藉由SDS-PAGE在還原或非還原條件下測定(可藉助於庫馬斯藍染色(Coomassie Blau staining)或較佳藉由銀著色確定偵測)。然而，抗體通常藉由一或多個純化步驟製備。

術語「特異性結合」或「特異性地結合」係指結合於預定抗原/

標靶分子之抗體或結合劑。抗體或結合劑的特異性結合典型地描述具有至少10^{-7} M之親和力(**為Kd值；亦即較佳為Kd值小於10^{-7} M的抗體或結合劑**)的抗體或結合劑，該抗體或結合劑對預定抗原/標靶分子之親和力為非特異性抗原/標靶分子(例如牛血清白蛋白或酪蛋白)的至少兩倍，該非特異性抗原/標靶分子不為預定抗原/標靶分子或緊密相關之抗原/標靶分子。抗體較佳具有至少10^{-7} M之親和力(為Kd值；換而言之，較佳為Kd值小於10^{-7} M的抗體)，較佳為至少10^{-8} M、更佳在10^{-9} M至10^{-11} M範圍內之親和力。Kd值可藉助於例如表面電漿子共振光譜法測定。

本發明之抗體-藥物結合物同樣展現此等範圍內之親和力。親和力較佳不受藥物結合實質性影響(一般而言，親和力降低小於一個數量級，換而言之，例如至多自10^{-8} M降至10^{-7} M)。

根據本發明使用之抗體較佳亦因高選擇性而值得關注。當本發明抗體對靶蛋白展現之親和力為針對其他獨立抗原(例如人類血清白蛋白)之親和力的至少2倍、較佳5倍或更佳10倍時，存在高選擇性(親和力可藉助於例如表面電漿子共振光譜法測定)。

另外，所用之本發明抗體較佳具有交叉反應性。為能夠促進及更好地解釋臨床前研究，例如毒理學或活性研究(例如異種移植小鼠)，根據本發明使用之抗體宜不僅結合人類靶蛋白，且亦結合研究所用之物種中之物種靶蛋白。在一個實施例中，除人類靶蛋白之外，根據本發明使用之抗體對至少一種其他物種中之靶蛋白具有交叉反應性。在毒理學及活性研究中，較佳使用嚙齒動物、犬及非人類靈長類動物家族之物種。較佳嚙齒動物物種為小鼠及大鼠。較佳非人類靈長類動物為恆河猴、黑猩猩及長尾獼猴。

在一個實施例中，除人類靶蛋白之外，根據本發明使用之抗體對選自由小鼠、大鼠及長尾獼猴(食蟹獼猴)組成之物種之群的至少一

種其他物種的靶蛋白具有交叉反應性。尤其較佳為除人類靶蛋白之外，至少對小鼠靶蛋白具有交叉反應性之根據本發明使用的抗體。較佳為對其他非人類物種之靶蛋白之親和力與對人類靶蛋白之親和力相差不超過50倍、更特定言之不超過十倍的交叉反應性抗體。

針對癌症標靶分子之抗體

結合劑(例如抗體或其抗原結合片段)所針對之標靶分子較佳為癌症標靶分子。術語「癌症標靶分子」描述存在於一或多個癌細胞物種上的豐度大於存在於相同組織類型之非癌細胞上的豐度的標靶分子。相較於相同組織類型之非癌細胞，癌症標靶分子較佳選擇性地存在於一或多個癌細胞物種上，其中選擇性地描述癌細胞上之富集為相同組織類型之非癌細胞的至少兩倍(「選擇性癌症標靶分子」)。使用癌症標靶分子允許使用本發明之結合物選擇性治療癌細胞。

在此，尤其較佳為細胞外癌症標靶分子B7H3 (SEQ ID NO: Q5ZPR3 (蛋白質)；SEQ ID NO: 80381 (DNA))。

結合癌症標靶分子之抗體可由一般技術者使用已知方法(諸如化學合成或重組表現)製備。癌症標靶分子之結合劑可在商業上獲得或可由一般技術者使用已知方法(諸如化學合成或重組表現)製備。用於製備抗體或抗原結合抗體片段之其他方法描述於WO 2007/070538中(參見第22頁「抗體」)。熟習此項技術者已知可如何彙編諸如噬菌體呈現文庫(例如Morphosys HuCAL Gold)之方法及用於發現抗體或抗原結合抗體片段(參見WO 2007/070538，第24頁及以下及第70頁上之AK實例1、第72頁上之AK實例2)。使用得自B細胞之DNA文庫製備抗體的其他方法描述於例如第26頁(WO 2007/070538)。抗體人類化方法描述於WO2007070538之第30-32頁上且詳細描述於Queen等人，Pros. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033, 1989或描述於WO 90/0786中。另外，重組表現蛋白質(一般而言)及抗體(特定而言)之方法為熟習此

項技術者所知(參見例如Berger及Kimrnel (Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, 第152卷, Academic Press, Inc.)；Sambrook等人(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press；Cold Spring Harbor, N.Y.；1989)第1-3卷)；Current Protocols in Molecular Biology, (F. M. Ausabel等人[編輯], Current Protocols, Green Publishing Associates, Inc. / John Wiley & Sons, Inc.)；Harlow等人, (Monoclonal Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (19881, Paul [編輯])；Fundamental Immunology, (Lippincott Williams & Wilkins (1998))；及Harlow等人, (Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998))。熟習此項技術者已知表現蛋白質/抗體所需之對應載體、啟動子及信號肽。常見方法亦描述於WO 2007/070538中之第41-45頁。IgG1抗體製備方法描述於例如WO 2007/070538第74頁及以下之實例6中。測定抗體結合於其抗原後之內化的方法為熟習此項技術者所知且描述於例如WO 2007/070538第80頁上。熟習此項技術者能夠使用WO 2007/070538中所述之方法，類似於製備具有不同標靶分子特異性之抗體，該等方法已用於製備碳酸酐酶IX (Mn)抗體。

本發明之抗體經糖基化或去糖基化，亦即在後一情況下，其在Fc區之CH2結構域中之保守N-結合位點不具有任何聚糖。

抗-B7H3抗體

根據本發明，利用抗-B7H3抗體或其抗原結合片段，較佳TPP5706或衍生自其之抗體。另外，熟習此項技術者熟悉結合於B7H3之抗體，參見例如US6965018。EP2121008描述抗-B7H3抗體8H9及其CDR序列。在人類IgG1之情況下TPP3803含有此等CDR序列。

本發明尤其關於與具有以下特性之抗體或其抗原結合抗體片段

或其變異體的結合物：特異性結合於人類B7H3，亦即不結合於人類B7H2或人類B7H4；活體外及活體內有效及特異性殺死表現B7H3之腫瘤細胞。根據本發明之抗體結合於在結合後尤其適於內化之抗原決定基。同時，根據本發明之抗體之特徵為在用於人類中時低免疫原性，該低免疫原性藉由根據本發明之抗體之胺基酸序列與對應人類生殖系序列的實質同源性來實現。

TPP5706及其衍生物之產生

抗-B7H3抗體已描述於相關文獻中；因此，舉例而言，US 6965018揭示藉由融合瘤PTA-4058分泌之鼠類抗-B7H3抗體。使用標準方法，確定此抗體之胺基酸序列。TPP5706為衍生自此抗體之鼠類Fv與人類IgG1之Ch1-Ch3區的嵌合體。將對應DNA序列插入哺乳動物IgG表現載體中且表現為完整IgG。此等構築體例如在哺乳動物細胞中短暫表現，如Tom等人，第12章，Methods Express: Expression Systems, Michael R. Dyson及Yves Durocher編輯, Scion Publishing Ltd, 2007所描述。藉由蛋白A層析純化抗體且藉由Elisa表徵其與人類B7H3以及人類B7H2及B7H4之結合，如AK-實例1中所述。此外，在活體外及活體內測試活性化合物與TPP5706之結合物的功效，如實例C-1、C-2及C-6中所述。在隨後結合劑之人類化期間，鑑別複數種TPP5706之人類化衍生物，尤其TPP6642及TPP6850，如AK-實例1中所述。在此等抗體中，鼠類序列已實質上經人類序列置換，B7H3結合特性無顯著改變。此等抗體之胺基酸序列與時常出現之人類生殖系序列的比較進一步鑑別使此等抗體與人類生殖系序列之間的同源性程度增加的許多胺基酸取代。

抗-B7H3抗體之特定實施例

在本申請案中，提及以下較佳抗體，如下表中所示：TPP-5706、TPP-6642、TPP-6850及TPP-3803。

抗體	SEQ ID NO:									
	VH	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3	VL	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3	重鏈 (IgG)	輕鏈 (IgG)
TPP-5706	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
TPP-6642	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
TPP-6850	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
TPP-3803	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40

TPP-5706為包含對應於SEQ ID NO: 9之重鏈區及對應於SEQ ID NO: 10之輕鏈區的抗體。

TPP-6642為包含對應於SEQ ID NO: 19之重鏈區及對應於SEQ ID NO: 20之輕鏈區的抗體。

TPP-6850為包含對應於SEQ ID NO: 29之重鏈區及對應於SEQ ID NO: 30之輕鏈區的抗體。

TPP-3803為包含對應於SEQ ID NO: 39之重鏈區及對應於SEQ ID NO: 40之輕鏈區的抗體。

TPP-5706為：包含對應於SEQ ID NO: 1之重鏈可變區及對應於SEQ ID NO: 5之輕鏈可變區的抗體。

TPP-6642為：包含對應於SEQ ID NO: 11之重鏈可變區及對應於SEQ ID NO: 15之輕鏈可變區的抗體。

TPP-6850為：包含對應於SEQ ID NO: 21之重鏈可變區及對應於SEQ ID NO: 25之輕鏈可變區的抗體。

TPP-3803為：包含對應於SEQ ID NO: 31之重鏈可變區及對應於SEQ ID NO: 35之輕鏈可變區的抗體。

根據本發明用於與連接子及/或發毒團偶合之抗-B7H3抗體之較佳實施例為下述抗體：

1. 一種抗-B7H3抗體或其抗原結合片段，其藉由融合瘤PTA-4058產生。

2. 一種抗-B7H3抗體之嵌合或人類化變異體或其抗原結合片段，其藉由融合瘤PTA-4058產生。

3. 根據實施例1或2任一者之抗-B7H3抗體或其抗原結合片段，其結合於如SEQ ID NO: 41中所示之多肽。SEQ ID NO: 41表示人類B7H3多肽之細胞外域之胺基酸序列。

4. 一種結合於B7H3之抗體或抗原結合片段，其包含：

可變重鏈，其包含如SEQ ID NO: 2中所示之該重鏈之可變CDR1序列，如SEQ ID NO: 3中所示之該重鏈之可變CDR2序列及如SEQ ID NO: 4中所示之該重鏈之可變CDR3序列，及

可變輕鏈，其包含如SEQ ID NO: 6中所示之該輕鏈之可變CDR1序列，如SEQ ID NO: 7中所示之該輕鏈之可變CDR2序列及如SEQ ID NO: 8中所示之該輕鏈之可變CDR3序列，或

可變重鏈，其包含如SEQ ID NO: 12中所示之該重鏈之可變CDR1序列，如SEQ ID NO: 13中所示之該重鏈之可變CDR2序列及如SEQ ID NO: 14中所示之該重鏈之可變CDR3序列及

可變輕鏈，其包含如SEQ ID NO: 16中所示之該輕鏈之可變CDR1序列，如SEQ ID NO: 17中所示之該輕鏈之可變CDR2序列及如SEQ ID NO: 18中所示之該輕鏈之可變CDR3序列，或

可變重鏈，其包含如SEQ ID NO: 22中所示之該重鏈之可變CDR1序列，如SEQ ID NO: 23中所示之該重鏈之可變CDR2序列及如SEQ ID NO: 24中所示之該重鏈之可變CDR3序列及

可變輕鏈，其包含如SEQ ID NO: 26中所示之該輕鏈之可變CDR1序列，如SEQ ID NO: 27中所示之該輕鏈之可變CDR2序列及如SEQ ID NO: 28中所示之該輕鏈之可變CDR3序列，或

可變重鏈區，其包含如SEQ ID NO: 32中所示之該重鏈之可變CDR1序列，如SEQ ID NO: 33中所示之該重鏈之可變CDR2序列及如SEQ ID NO: 34中所示之該重鏈之可變CDR3序列及

可變輕鏈，其包含如SEQ ID NO: 36中所示之該輕鏈之可變CDR1

序列，如SEQ ID NO: 37中所示之該輕鏈之可變CDR2序列及如SEQ ID NO: 38中所示之該輕鏈之可變CDR3序列。

5. 根據實施例4之抗體或其抗原結合片段，其包含：

如SEQ ID NO:1中所示之重鏈之可變序列以及如SEQ ID NO:5中所示之輕鏈之可變序列，或

如SEQ ID NO:11中所示之重鏈之可變序列以及如SEQ ID NO:15中所示之輕鏈之可變序列，或

如SEQ ID NO:21中所示之重鏈之可變序列以及如SEQ ID NO:25中所示之輕鏈之可變序列，或

如SEQ ID NO:31中所示之重鏈之可變序列以及如SEQ ID NO:35中所示之輕鏈之可變序列。根據前述技術方案中任一項之結合物，其中該抗-B7H3抗體為IgG抗體。

6. 根據前述實施例中任一項之抗體，其包含：

如SEQ ID NO:9中所示之重鏈序列以及如SEQ ID NO:10中所示之輕鏈序列，或

如SEQ ID NO:19中所示之重鏈序列以及如SEQ ID NO:20中所示之輕鏈序列，或

如SEQ ID NO:29中所示之重鏈序列以及如SEQ ID NO:30中所示之輕鏈序列，或

如SEQ ID NO:39中所示之重鏈序列以及如SEQ ID NO:40中所示之輕鏈序列。

7. 根據前述實施例中任一項之抗體，其中該抗-B7H3抗體為抗體TPP6642及TPP6850之一之人類化變異體。

8. 根據前述實施例中任一項之抗體，其包含：

如SEQ ID NO:19中所示之重鏈序列，其包含至少一個選自包含以下取代之群的胺基酸取代：I31S、N33Y、V34M、T50I、F52N、

G54S、N55G、D57S、N61A、K65Q、D66G、K67R、T72R、A79V及

如SEQ ID NO:20中所示之輕鏈序列，其包含至少一個選自包含以下取代之群的胺基酸取代：E27Q、N28S、N30S、N31S、T34N、F36Y、Q40P、S43A、Q45K、H50A、K52S、T53S、A55Q、E56S、H90Q、H91S、G93S、P96L，或

如SEQ ID NO:29中所示之重鏈序列，其包含至少一個選自包含以下取代之群的胺基酸取代：I31S、N33G、V34I、H35S、I37V、T50W、F52S、P53A、G54Y、D57N、S59N、N61A、F64L、K65Q、D66G、A68V、L70M、K74T、K77S、A107Q及

如SEQ ID NO:30中所示之輕鏈序列，其包含至少一個選自包含以下取代之群的胺基酸取代：E27Q、N28S、N30S、N31S、T34N、F36Y、V48I、H50A、K52S、T53S、A55Q、E56S、Q70D、H90Q、H91S、G93S。

9. 根據前述實施例中任一項之抗體，其為IgG抗體。

10. 根據前述實施例中任一項之抗體，其包含：根據前述實施例中任一項之抗原結合片段或根據前述實施例中任一項之抗體之抗原結合片段，其為scFv、Fab、Fab片段或F(ab)2片段。

11. 根據前述實施例中任一項之抗體或抗原結合片段，其為單株抗體或其抗原結合片段。

12. 根據前述實施例中任一項之抗體或抗原結合片段，其為人類、人類化或嵌合抗體或抗原結合片段。

尤其較佳為抗-B7H3抗體TPP-5706、TPP-6642、TPP-6850及TPP-3803。因此，本發明亦提供具有以下胺基酸取代之人類化衍生物TPP6642及TPP6850，其中E27Q意謂在所討論之人類化衍生物之相應鏈之胺基酸位置27中E經Q取代，N28S意謂在所討論之人類化衍生物之相應鏈之位置28中N經S取代等。

TPP5706之人類化變異體	位置	胺基酸取代
TPP6642	輕鏈	E27Q、N28S、N30S、N31S、T34N、F36Y、Q40P、S43A、Q45K、H50A、K52S、T53S、A55Q、E56S、H90Q、H91S、G93S、P96L
	重鏈	I31S、N33Y、V34M、T50I、F52N、G54S、N55G、D57S、N61A、K65Q、D66G、K67R、T72R、A79V
TPP6850	輕鏈	E27Q、N28S、N30S、N31S、T34N、F36Y、V48I、H50A、K52S、T53S、A55Q、E56S、Q70D、H90Q、H91S、G93S
	重鏈	I31S、N33G、V34I、H35S、I37V、T50W、F52S、P53A、G54Y、D57N、S59N、N61A、F64L、K65Q、D66G、A68V、L70M、K74T、K77S、A107Q

同位素、鹽、溶劑合物、同位素變異體

本發明亦涵蓋本發明化合物之所有適合同位素變異體。本發明化合物之同位素變異體在此理解為意謂本發明化合物內之至少一個原子已與原子數相同、但原子質量與自然界中通常或主要存在之原子質量不同之另一原子交換的化合物。可併入本發明化合物中之同位素之實例為氫、碳、氮、氧、磷、硫、氟、氯、溴及碘之彼等同位素，諸如^{2}H (氘)、^{3}H (氚)、^{13}C、^{14}C、^{15}N、^{17}O、^{18}O、^{32}P、^{33}P、^{33}S、^{34}S、^{35}S、^{36}S、^{18}F、^{36}Cl、^{82}Br、^{123}I、^{124}I、^{129}I及^{131}I。由於相對容易可製備及可偵測，本發明化合物之特定同位素變異體(尤其為已併入一或多種放射性同位素之彼等變異體)可例如有益於檢驗作用機制或活性成分之體內分佈，標記有^{3}H或^{14}C同位素之化合物尤其適合於此目的。另外，由於化合物之代謝穩定性增大，所以同位素(例如氘)之併入可產生特定治療益處，例如延長體內半衰期或減少所需之活性劑劑量；本發明化合物之此類改質因此在一些情況下亦可構成本發明之一個較佳實施例。本發明化合物之同位素變異體可藉由熟習此項技術者已知之方法，例如藉由下文進一步描述之方法及實施例中所述之程序、藉由使用相應試劑及/或起始化合物之對應同位素改質來製備。

在本發明之上下文中之較佳鹽為本發明化合物之生理學上可接

受之鹽。亦涵蓋本身不適於醫藥應用，但可用於例如本發明化合物之分離或純化的鹽。

本發明化合物之生理學上可接受之鹽包括無機酸、羧酸及磺酸之酸加成鹽，例如鹽酸鹽、氫溴酸鹽、硫酸鹽、磷酸鹽、甲烷磺酸鹽、乙烷磺酸鹽、苯磺酸鹽、甲苯磺酸鹽、萘二磺酸鹽、乙酸鹽、三氟乙酸鹽、丙酸鹽、乳酸鹽、酒石酸鹽、蘋果酸鹽、檸檬酸鹽、反丁烯二酸鹽、順丁烯二酸鹽及苯甲酸鹽。

本發明化合物之生理學上可接受之鹽亦包括習知鹼之鹽，例如且較佳為鹼金屬鹽(例如鈉鹽及鉀鹽)、鹼土金屬鹽(例如鈣鹽及鎂鹽)及衍生自氨或具有1至16個碳原子之有機胺的銨鹽，例如且較佳為乙胺、二乙胺、三乙胺、乙基二異丙胺、單乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、二環己胺、二甲胺基乙醇、普魯卡因(procaine)、二苯甲基胺、*N*-甲基哌啶、*N*-甲基嗎啉、精胺酸、離胺酸及1,2-乙二胺。

在本發明之上下文中稱為**溶劑合物**者為藉由與溶劑分子配位而形成固態或液態之複合物的本發明化合物之彼等形式。水合物為與水配位之溶劑合物之特定形式。在本發明之情形下，溶劑合物較佳為水合物。

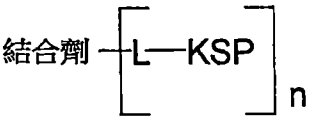
本發明另外亦涵蓋本發明化合物之前藥。在本上下文中，術語「前藥」係指本身可具生物活性或非活性，但在其體內滯留時間期間轉化(例如代謝或水解)成本發明化合物之化合物。

特定實施例

以下為尤其較佳實施例：

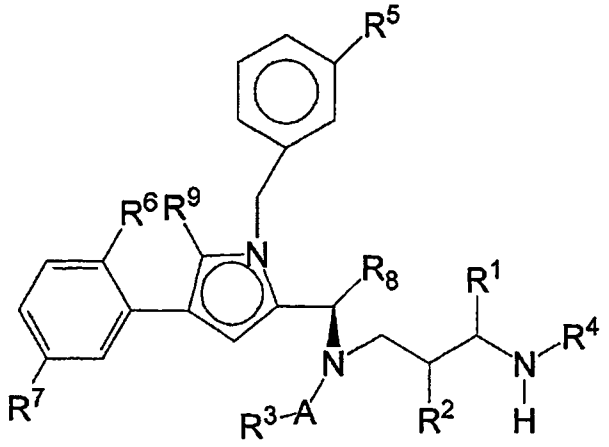
實施例A：

下式之ADC



其中KSP-L-表示以下式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIc)、(IId)、(IIe)、(IIi)、(IIj)、(IIk)或以下式(IIf)之化合物，結合劑為較佳去糖基化之抗-B7H3抗體。尤其較佳為特異性結合B7H3之人類Ig4及/或人類及/或鼠類Ig2同功異構物的抗-B7H3抗體，尤其抗-B7H3抗體TPP-5706及其人類化變異體，諸如TPP-6642及TPP-6850，其中n表示數值1至10：

式(IIf)：



(IIf)

其中

A表示-C(=O)-；

R^1表示-L-#1、H、-COOH、$-CONHNH_2$、$-(CH_2)_{1-3}NH_2$、$-CONZ''(CH_2)_{1-3}NH_2$及$-CONZ''CH_2COOH$，其中Z"表示H或NH_2；

R^2及R^4表示H，或R^2及R^4一起(形成吡咯啶環)表示$-CH_2-CHR^{11}-$或$-CHR^{11}-CH_2-$，其中R^{11}表示H；

R^3表示-L-#1或C_1-10烷基-，其可視情況經-OH、O-烷基、SH、S-烷基、O-CO-烷基、O-CO-NH-烷基、NH-CO-烷基、NH-CO-NH-烷基、$S(O)_n$烷基、SO_2-NH-烷基、NH烷基、N(烷基)$_2$或NH_2 (其中烷基較佳為C_{1-3}烷基)取代；

R^5表示H或F；

R^6及R^7彼此獨立地表示H、(視情況氟化) C_{1-3}烷基、(視情況氟化)

C_{2-4}烯基、(視情況氟化) C_{2-4}炔基、羥基或鹵素；

R^8表示分支鏈C_{1-5}烷基；且

R^9表示H或F，

其中取代基R^1及R^3之一表示-L-#1，且

-L-表示連接子且#1表示鍵結於抗體之鍵，

及ADC之鹽、溶劑合物及溶劑合物之鹽。

連接子較佳為連接子

§-(C=O)m-L1-L2-§§

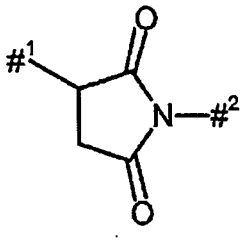
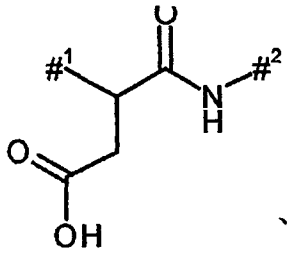
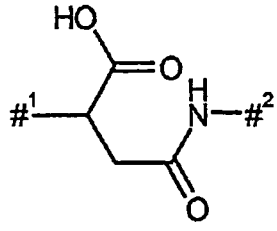
其中

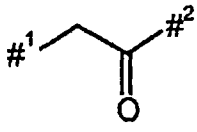
m表示0或1；

§表示鍵結於KSP之鍵且

§§表示鍵結於抗體之鍵，且

L2表示


、

、


或


其中

#1表示與抗體硫原子之連接點，

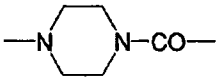
#2表示與基團L^1之連接點，

且L1由下式表示

$$\#^1\text{-}(NR^{10})_n\text{-}(G1)_o\text{-}G2\text{-}\#^2,$$

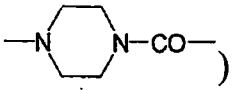
其中

R^{10}表示H、NH_2或C_1-C_3烷基；

G1表示-NHCO-或  ；

n表示0或1；

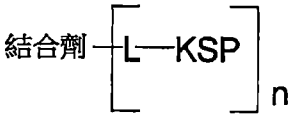
o表示0或1；且

G2表示具有1至100個來自伸芳基及/或直鏈及/或分支鏈及/或環狀伸烷基之碳原子且可間雜以下基團中之一或多者一次或超過一次的直鏈或分支鏈烴鏈：-O-、-S-、-SO-、SO_2、-NH-、-CO-、-NHCO-、-CONH-、-NMe-、-NHNH-、-SO_2NHNH-、-CONHNH-及具有至多4個選自由N、O及S組成之群的雜原子或-SO-的3至10員芳族或非芳族雜環(較佳 )，其中側鏈若存在則可經-$NHCONH_2$、-COOH、-OH、-NH_2、NH-$CNNH_2$、磺醯胺、碸、亞碸或磺酸取代。

此處，#1為鍵結於KSP抑制劑之鍵且#2為偶合基團鍵結於抗體(例如L2)之鍵。

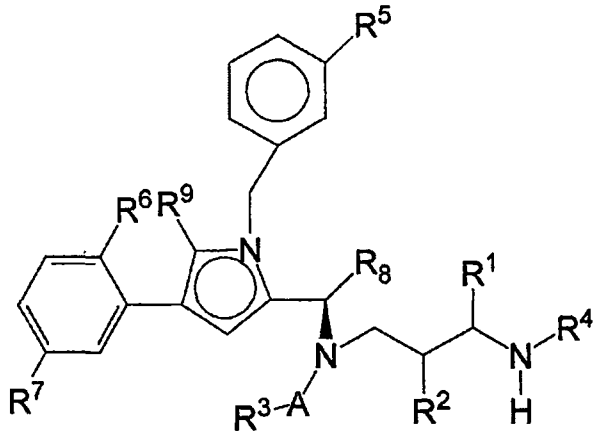
實施例B：

下式之ADC



其中KSP-L-表示以下式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIc)、(IId)、(IIe)、(IIi)、(IIj)、(IIk)、(IIf)或以下式(IIg)之化合物，結合劑為較佳去糖基化之抗-B7H3抗體。此處尤其較佳為特異性結合B7H3之人類Ig4及/或人類及/或鼠類Ig2同功異構物的抗-B7H3抗體，尤其抗-B7H3抗體TPP-5706及其人類化變異體，諸如TPP-6642及TPP-6850，其中n表示數值1至10：

式(IIg)：



(IIg)

其中

A表示CO (羰基)；

R^1表示-L-#1、H、-COOH、$-CONHNH_2$、$-(CH_2)_{1-3}NH_2$、$-CONZ''(CH_2)_{1-3}NH_2$及$-CONZ''CH_2COOH$，其中Z''表示H或NH_2；

R^2及R^4表示H，或R^2及R^4一起(形成吡咯啶環)表示$-CH_2-CHR^{11}-$或$-CHR^{11}-CH_2-$，其中R^{11}表示H；

R^3表示-L-#1或C_{1-10}烷基-，其可視情況經-OH、O-烷基、SH、S-烷基、O-CO-烷基、O-CO-NH-烷基、NH-CO-烷基、NH-CO-NH-烷基、$S(O)_n$烷基、SO_2-NH-烷基、NH烷基、$N(烷基)_2$或NH_2 (其中烷基較佳為C_{1-3}烷基)取代；

R^5表示H或F；

R^6及R^7彼此獨立地表示H、(視情況氟化) C_{1-3}烷基、(視情況氟化) C_{2-4}烯基、(視情況氟化)C_{2-4}炔基、羥基或鹵素；

R^8表示分支鏈C_{1-5}烷基；且

R^9表示H或F，

其中取代基R^1及R^3之一表示-L-#1，且

-L-表示連接子且#1表示鍵結於抗體之鍵，

其中-L-由以下表示

§-(CO)m-L1-L2-§§

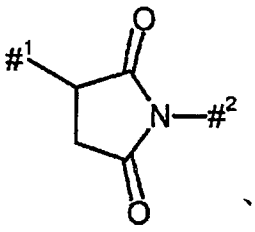
其中

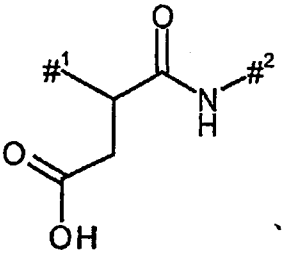
m表示0或1；

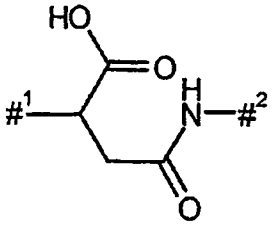
§表示鍵結於KSP之鍵且

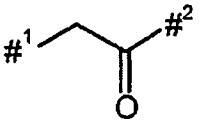
§§表示鍵結於抗體之鍵，且

L2表示



、


、


或


其中

#[1]表示與抗體硫原子之連接點，

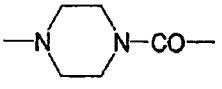
#[2]表示與基團L^1之連接點，

且L1由下式表示

$$\#^1\text{-}(NR^{10})_n\text{-}(G1)_o\text{-}G2\text{-}\#^2,$$

其中

R^{10}表示H、NH_2或C_1-C_3烷基；

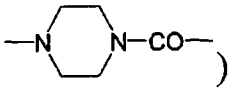
G1表示-NHCO-或 

；

n表示0或1；

o表示0或1；且

G2表示具有1至100個來自伸芳基及/或直鏈及/或分支鏈及/或環狀伸烷基之碳原子且可間雜以下基團中之一或多者一次或超過一次的直鏈或分支鏈烴鏈：-O-、-S-、-SO-、SO_2、-NH-、-CO-、-NHCO-、-CONH-、-NMe-、-NHNH-、-SO_2NHNH-、-CONHNH-及具有至多4個

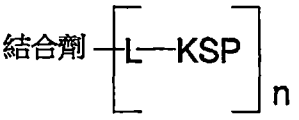
選自由N、O及S組成之群的雜原子或-SO-的3至10員芳族或非芳族雜環(較佳 )，其中側鏈若存在則可經-$NHCONH_2$、-COOH、-OH、-NH_2、NH-$CNNH_2$、磺醯胺、碸、亞碸或磺酸取代，

#1為鍵結於KSP抑制劑之鍵且#2為偶合基團與抗體(例如L2)之鍵，

及ADC之鹽、溶劑合物及溶劑合物之鹽。

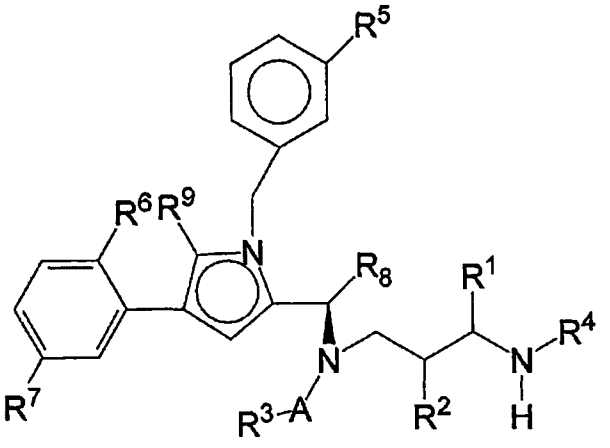
實施例C：

下式之ADC



其中KSP-L-表示以下式(II)、(IIa)、(IIb)、(IIc)、(IId)、(IIe)、(IIf)、(IIg)、(IIi)、(IIj)、(IIk)或以下式(IIh)之化合物，結合劑為去糖基化之抗-B7H3抗體，且n表示數值1至10：

式(IIh)：



(IIh)

其中

A表示-C(=O)-；

R^1表示-L-#1；

R^2及R^4表示H，或

R^2及R^4一起(形成吡咯啶環)表示-CH_2-CHR^{11}-或-CHR^{11}-CH_2-，其

中R^{11}表示H；

R^3表示C_{1-10}烷基-，其可視情況經-OH、O-烷基、SH、S-烷基、O-CO-烷基、O-CO-NH-烷基、NH-CO-烷基、NH-CO-NH-烷基、$S(O)_n$烷基、SO_2-NH-烷基、NH烷基、$N(烷基)_2$或NH_2 (其中烷基較佳為C_{1-3}烷基)或-MOD取代；

其中-MOD表示-$(NR^{10})_n$-$(G1)_o$-G2-G3，其中

R^{10}表示H或C_1-C_3烷基；

G1表示-NHCO-或-CONH- (其中若G1表示-NHCO-，則R^{10}不表示NH_2)；

n表示0或1；

o表示0或1；且

G2表示具有1至10個碳原子且可間雜以下基團中之一或多者一次或超過一次的直鏈或分支鏈烴基：-O-、-S-、-SO-、SO_2、-NR^y-、-NR^yCO-、$CONR^y$-、-NR^yNR^y-、-$SO_2NR^yNR^y$-、-$CONR^yNR^y$- (其中R^y表示H、苯基、C_1-C_{10}烷基、C_2-C_{10}烯基或C_2-C_{10}炔基，各可視情況經以下取代：$NHCONH_2$、-COOH、-OH、-NH_2、NH-$CNNH_2$、磺醯胺、碸、亞碸或磺酸)、-CO-或-CR^x=N-O- (其中Rx表示H、C_1-C_3烷基或苯基)，其中包括任何側鏈之烴鏈可經-$NHCONH_2$、-COOH、-OH、-NH_2、NH-$CNNH_2$、磺醯胺、碸、亞碸或磺酸取代，G3表示-H或-COOH，其中該基團-MOD較佳具有至少一個基團-COOH；

R^5表示H或F；

R^6及R^7彼此獨立地表示H、(視情況氟化) C_{1-3}烷基、(視情況氟化) C_{2-4}烯基、(視情況氟化) C_{2-4}炔基、羥基或鹵素；

R^8表示分支鏈C_{1-5}烷基；且

R^9表示H或F，

其中-L-表示連接子且#1表示鍵結於抗體之鍵，

其中-L-由以下表示

§-(CO)m-L1-L2-§§

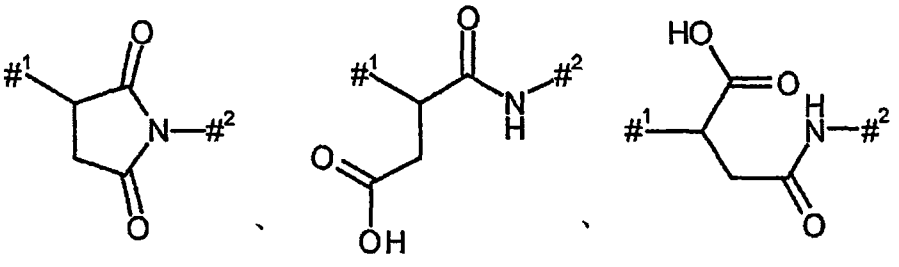
其中

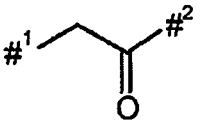
m表示0或1；

§表示鍵結於KSP之鍵且

§§表示鍵結於抗體之鍵，且

L2表示



或 

其中

#[1]表示與抗體硫原子之連接點，

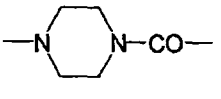
#[2]表示與基團L^1之連接點，

且L1由下式表示

$$\#^1\text{-}(NR^{10})_n\text{-}(G1)_o\text{-}G2\text{-}\#^2,$$

其中

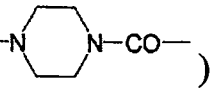
R^{10}表示H、NH_2或C_1-C_3烷基；

G1表示-NHCO-或  ；

n表示0或1；

o表示0或1；且

G2表示具有1至100個來自伸芳基及/或直鏈及/或分支鏈及/或環狀伸烷基之碳原子且可間雜以下基團中之一或多者一次或超過一次的

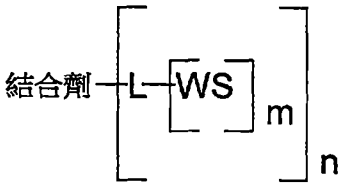
直鏈或分支鏈烴鏈：-O-、-S-、-SO-、SO_2、-NH-、-CO-、-NHCO-、-CONH-、-NMe-、-NHNH-、-SO_2NHNH-、-CONHNH-、-CR^x=N-O-(其中Rx表示H、C_1-C_3烷基或苯基)及具有至多4個選自由N、O及S組成之群的雜原子、-SO-或-SO_2-的3至10員芳族或非芳族雜環(較佳 )，其中包括側鏈之烴鏈若存在則可經-$NHCONH_2$、-COOH、-OH、-NH_2、NH-$CNNH_2$、磺醯胺、碸、亞碸或磺酸取代，

#1為鍵結於KSP抑制劑之鍵且#2為偶合基團鍵結於抗體之鍵(例如L2)，

及ADC之鹽、溶劑合物、溶劑合物之鹽及差向異構體。

實施例D：

本發明亦提供下文通式之結合劑/活性化合物結合物：

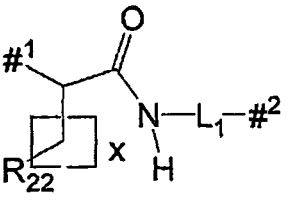


其中結合劑表示(在一較佳實施例中去糖基化)抗-B7H3抗體，L表示連接子，WS表示活性化合物，較佳KSP抑制劑，諸如式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIc)、(IId)、(IIe)、(IIf)、(IIg)、(IIh)或(IIi)之一的根據本發明之KSP抑制劑，m表示數值1至2，較佳1，且n表示數值1至50，較佳1.2至20且尤其較佳2至8，其中L具有以下結構之一。本文中，m表示每個連接子之活性化合物分子數目且n表示每個結合劑之活性化合物/連接子結合物之平均數目。結合物分子中存在之所有WS之總和因此為m與n之乘積。

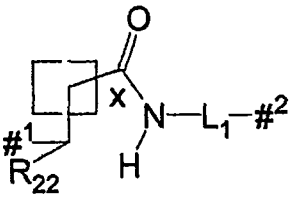
WS為對動物、較佳人類具有局部或全身性治療作用的活性化合物。此等活性化合物通常具有低於5 kDa、較佳低於1.5 kDa之分子量。較佳活性化合物為長春花生物鹼、奧瑞他汀(auristatins)、妥布賴森(tubulysins)、倍癌黴素(duocarmycins)、激酶抑制劑、MEK抑制劑

及KSP抑制劑。

本文中，L表示以下式A3及A4之一



式A3



式A4

其中#[1]表示與結合劑之硫原子的連接點，#[2]表示與活性化合物之連接點，x表示1或2，且R22表示COOH、COOR、COR (其中R在各種情況下表示C1-3烷基)、$CONH_2$、Br，較佳COOH。

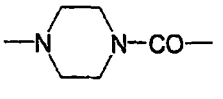
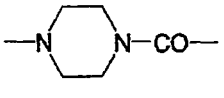
L1具有與上述相同之含義。較佳，-L1-#2由下式表示：

$$\#^3\text{-}(NR^{10})_n\text{-}(G1)_o\text{-}G2\text{-}\#^2$$

其中

#3表示與氮原子之連接點，

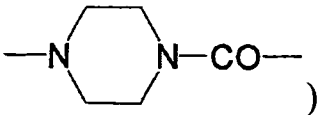
R^{10}表示H、NH_2或C_1-C_3烷基；

G1表示-NHCO-、-CONH-或  (其中若G1表示NHCO或  ，則R10不表示NH_2)，

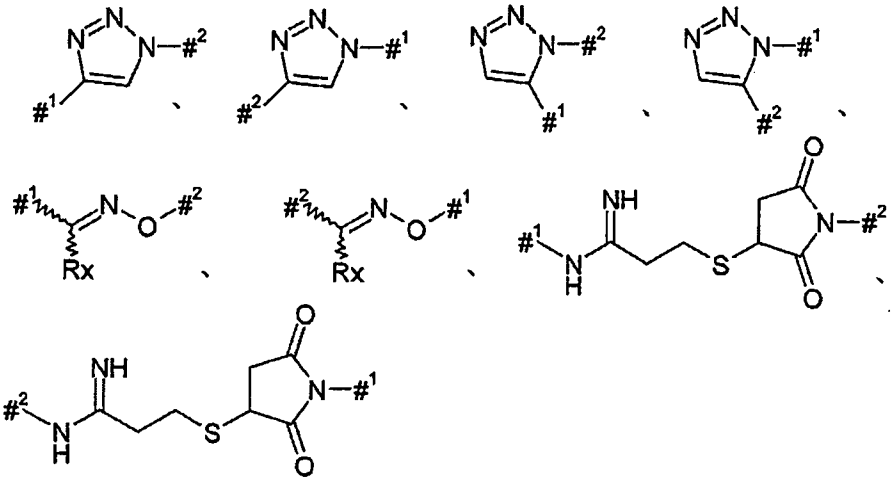
n表示0或1；

o表示0或1；且

G2表示具有1至100個來自伸芳基及/或直鏈及/或分支鏈及/或環狀伸烷基之碳原子且可間雜以下基團中之一或多者一次或超過一次的直鏈或分支鏈烴鏈：-O-、-S-、-SO-、SO_2、$-NR^y-$、$-NR^yCO-$、$-C(NH)NR^y-$、$CONR^y-$、$-NR^yNR^y-$、$-SO_2NR^yNR^y-$、$-CONR^yNR^y-$ (其中

R^y表示H、苯基、C_1-C_{10}烷基、C_2-C_{10}烯基或C_2-C_{10}炔基，各可視情況經以下取代：$NHCONH_2$、-COOH、-OH、$-NH_2$、$NH-CNNH_2$、磺醯胺、碸、亞碸或磺酸)、-CO-、$-CR^x=N-O-$ (其中R^x表示H、C_1-C_3烷基或苯基)及/或具有至多4個選自由N、O及S組成之群的雜原子、-SO-或$-SO_2-$的3至10員芳族或非芳族雜環(較佳 )，其中包括任何側鏈之烴鏈可經$-NHCONH_2$、-COOH、-OH、$-NH_2$、$NH-CNNH_2$、磺醯胺、碸、亞碸或磺酸取代。

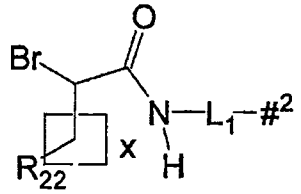
G2中之其他間雜基團較佳為



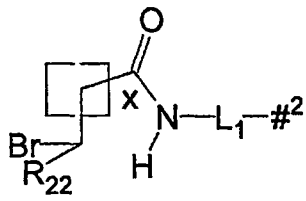
其中R^x表示H、C_1-C_3烷基或苯基。

在本發明之結合物中或在本發明之結合物之混合物中，存在鍵結於抗體之半胱胺酸殘基的鍵，其存在的範圍較佳超過80%，尤其較佳超過90% (在各種情況下，以連接子鍵結於抗體之鍵的總數計)，尤其較佳為式A3或A4兩種結構之一。

具有式A3或A4之連接子的結合物可藉由使抗體分別與下文式A3'及A4'之適當溴衍生物偶合而獲得：



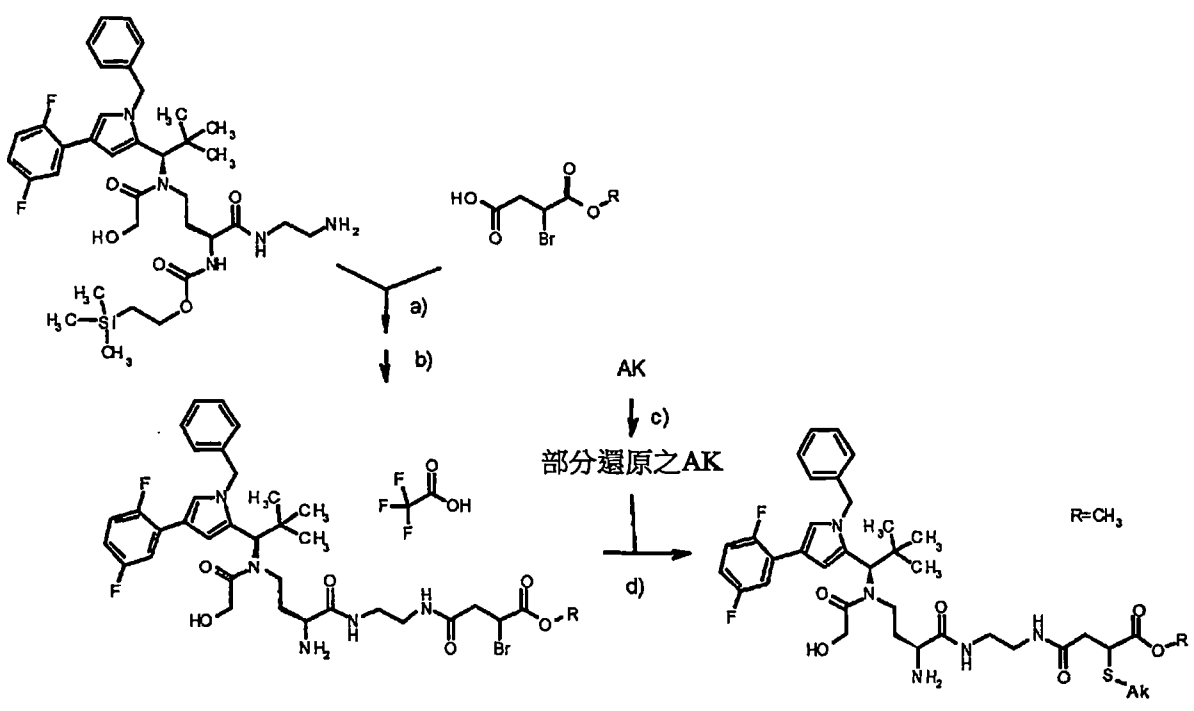
式A3'



式A4'

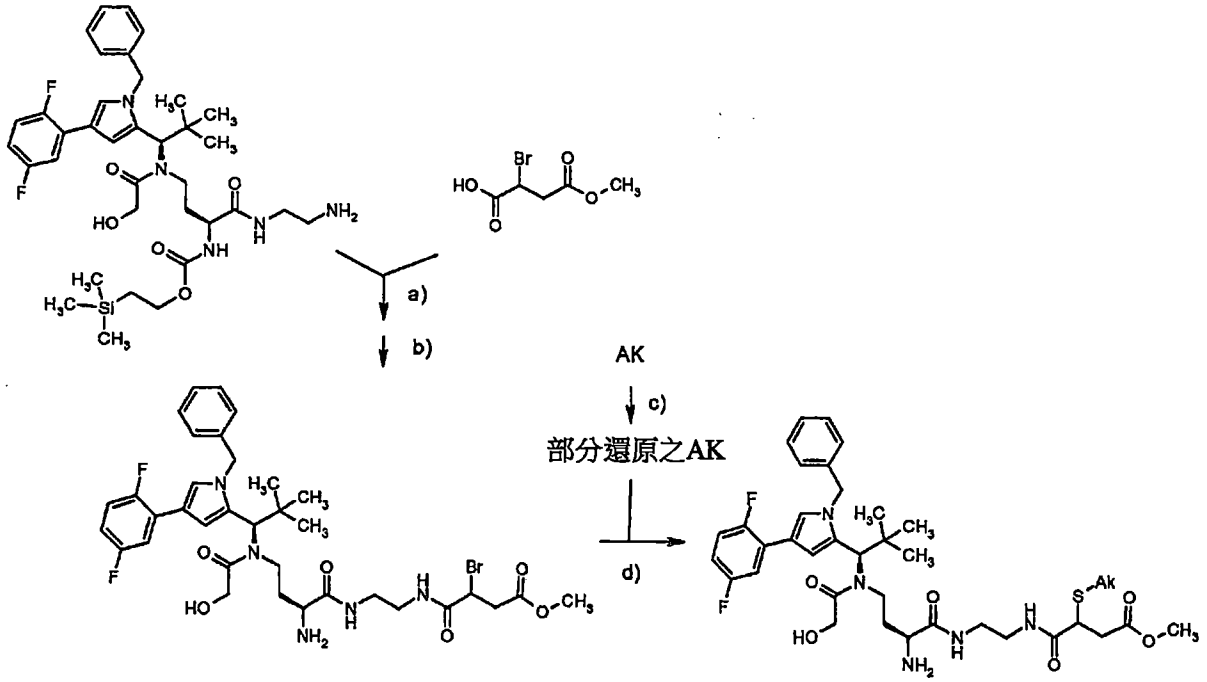
式A3'或A4'之此等溴衍生物可藉由使$HOOCCH_2CHBrCOOR_{22}$或$HOOCCHBrCH_2COOR_{22}$與結合劑之胺基反應而獲得，如下文流程30至32中以例示性方式所說明。

流程30：



[a)：四氟硼酸2-溴-1-乙基吡錠(BEP)，DCM，吡啶，室溫；b)氯化鋅，三氟乙醇，50℃，EDTA；c) 3-4當量TCEP，PBS緩衝液；d) PBS緩衝液，20小時，室溫]

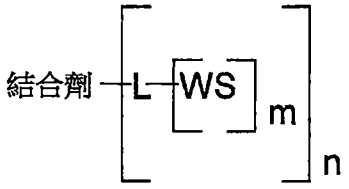
流程31：



[a)：四氟硼酸2-溴-1-乙基吡錠(BEP)，DCM，吡啶，室溫；b)氯化鋅，三氟乙醇，50℃，EDTA；c) 3-4當量TCEP，PBS緩衝液；d) PBS緩衝液，20小時，室溫]

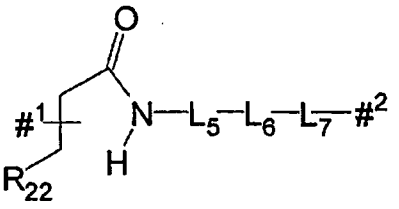
實施例E：

本發明亦提供下文通式之結合劑/活性化合物結合物：



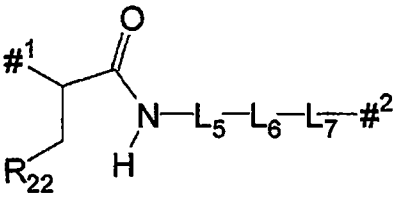
其中結合劑表示較佳去糖基化之抗-B7H3抗體，L表示連接子，WS表示活性化合物，較佳KSP抑制劑，諸如式(I)、(Ia)、(II)或(IIa)之一的根據本發明之KSP抑制劑，m表示數值1至2，較佳1，且n表示數值1至50，較佳1.2至20且尤其較佳2至8，其中L具有以下結構之一。本文中，m表示每個連接子之活性化合物分子數目且n表示每個結合劑之活性化合物/連接子結合物之平均數目。結合物分子中存在之所有WS之總和因此為m與n之乘積。

此處，L表示：

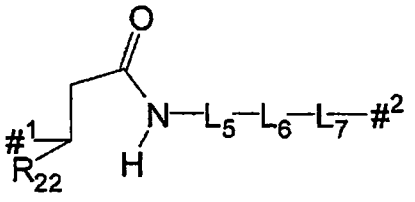


式A

其中#[1]表示與抗體硫原子之連接點，#[2]表示與活性化合物之連接點且R^{22}表示COOH、COOR、COR (其中R在各種情況下表示C1-3烷基)、$CONH_2$、Br，較佳COOH。因此連至結合劑之硫原子的連接子可具有以下結構之一：



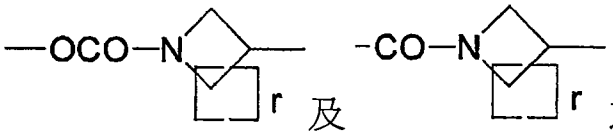
式A1



式A2

在每個抗體藥物結合物含有超過一個活性化合物分子WS之抗體藥物結合物的情況下，式A1及/或A2之結構均可存在於抗體藥物結合物中。由於本發明之抗體藥物結合物可為不同抗體藥物結合物之混合物，因此此混合物亦可包含式A1或式A2之抗體藥物結合物及式A1與A2之抗體藥物結合物。

L_5為選自$-(CH_2)_m-(CHRS)_n-(OCH_2CH_2)_o-(X)_p-(CH_2)_q-$之基團，其中m、n、o、p及q彼此獨立地具有以下值：m=0-10；n=0或1；o=0-10；p=0或1；且q=0-10，其中m+n+o=1-15，較佳1-6。X表示5或6員芳族或非芳族雜環或同素環，較佳$-C_6H_4-$或$-C_6H_{10}-$。RS表示酸基，較佳-COOH或SO_3H。

L_6為選自-CONH-、-OCONH-、-NHCO-、-NHCOO-、  及之基團，其中r為1、2或3。

L_7為單一鍵或選自具有1至100 (較佳1至10)個來自伸芳基及/或直鏈及/或分支鏈及/或環狀伸烷基的碳原子且可間雜以下基團中之一或多者一次或超過一次之直鏈或分支鏈烴鏈的基團：-O-、-S-、-SO-、SO_2、$-NR^y-$、$-NR^yCO-$、$-C(NH)NR^y-$、$CONR^y-$、$-NR^yNR^y-$、$-SO_2NR^yNR^y-$、$-CONR^yNR^y-$ (其中R^y表示H、苯基、C_1-C_{10}烷基、C_2-C_{10}烯基或C_2-C_{10}炔基，各可視情況經以下取代：$NHCONH_2$、-COOH、-OH、$-NH_2$、NH-$CNNH_2$、磺醯胺、碸、亞碸或磺酸)、-CO-、$-CR^x=N-O-$ (其中Rx表示H、C_1-C_3烷基或苯基)及/或具有至多4個選自由N、O及S組成之群的雜原子、-SO-或$-SO_2-$的3至10員、較佳5至10員芳族或非芳族雜環，其中包括任何側鏈之烴鏈可經$-NHCONH_2$、-COOH、-OH、$-NH_2$、NH-$CNNH_2$、磺醯胺、碸、亞碸或磺酸取代。

L_5較佳為基團$-(CH_2)_m-(CHRS)_n-(OCH_2CH_2)_o-(X)_p-(CH_2)_q-$，其中m=1-3，n=0，o=0-7，p=0且q=0或1。尤其較佳為基團$-(CH_2)_m-(CHRS)_n-(OCH_2CH_2)_o-(X)_p-(CH_2)_q-$，其中m=1或2，n=0，o=0或1，p=0且q=0或1。

L_6較佳為選自-CONH-及-NHCO-之基團。

L_7較佳為單一鍵或$-[(CH_2)_x-(X^4)_y]w-(CH_2)_z-$，

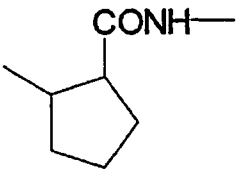
其中

w = 0至20；

x = 0至5；

y = 0或1；

z = 1至5；且



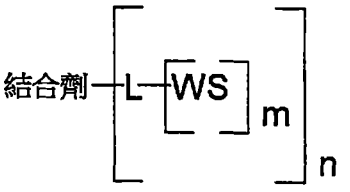
X^4表示-O-、-CONH-、-NHCO-或 。

尤其較佳地，L_7為單一鍵或基團-[$(CH_2)_x$-NHCO-)]，其中x = 1至5。

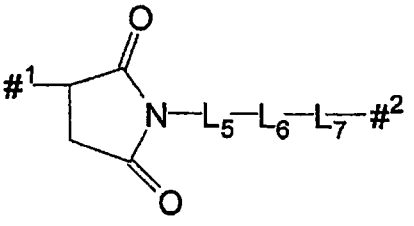
尤其較佳地，-L_5-L_6-L_7-表示-$(CH_2)_m$-$(CHRS)_n$-$(OCH_2CH_2)_o$-$(X)_p$-$(CH_2)_q$-NHCO-[$(CH_2)_x$-NHCO-)]，其中m=1或2，n=0，o=0或1，p=0，且q=0或1，且x=1-5。

然而，此兩種結構亦可共同存在於本發明之結合物中。

根據本發明，此等抗體藥物結合物可由下式化合物製備



其中L具有以下式A'：

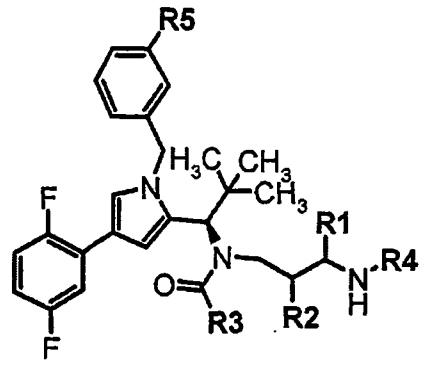


式A'

較佳地，A'轉化成A如下進行：在低於37℃之溫度(較佳為10至25℃)下，在pH 7.5至8.5、較佳為8的pH緩衝液中，攪拌至多40個小時、較佳1至15個小時之時間段。

實施例I：

下式之抗體結合物



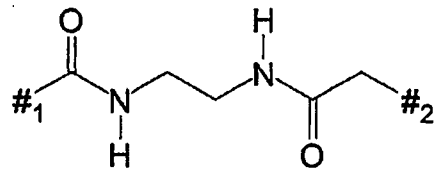
其中

R2、R4及R5表示H；

R3表示-CH_2OH；

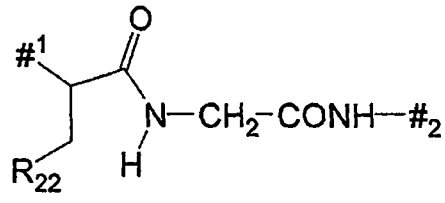
R1表示-L1-L2-結合劑，其中

L1表示

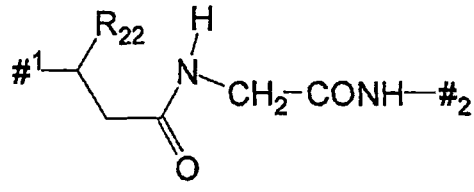


其中#2表示與L2之連接且#1表示與其他連接之連接。

且L2表示以下式A5及A6之結構中之一或兩者：



式A5



式A6

其中

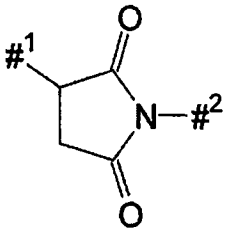
$\#^1$表示與抗體硫原子之連接點，

$\#^2$表示與基團L^1之連接點，且

R^{22}表示COOH、COOR、COR、CONHR (其中R在各種情況下表示C1-3烷基)、$CONH_2$，較佳COOH。

在本發明之結合物中或在本發明之結合物之混合物中，存在連至抗體之半胱胺酸殘基的鍵，其存在的範圍較佳超過80%，尤佳超過90% (在各種情況下，以連接子鍵結於抗體之鍵的總數計)，尤其較佳為式A5或A6兩種結構之一：

本文中，式A5或A6之結構一般一起較佳以60:40至40:60之比率(以鍵結於抗體之鍵的數目計)存在。剩餘鍵則以如下結構存在：

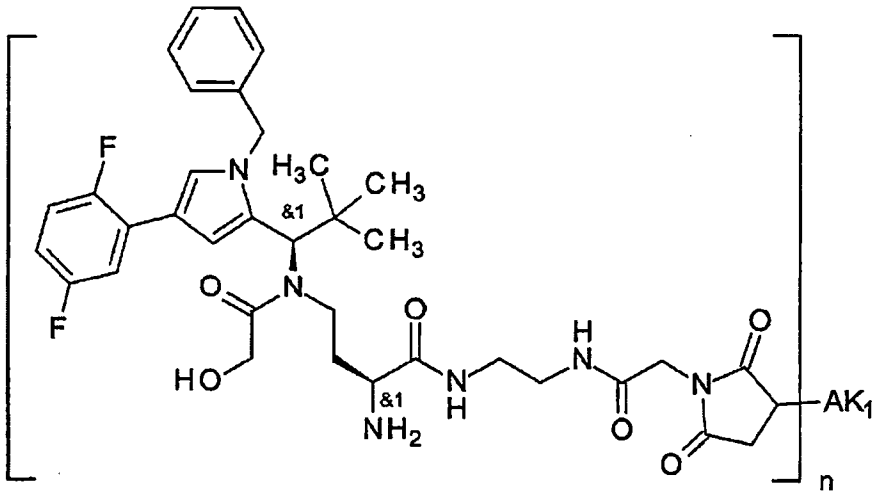


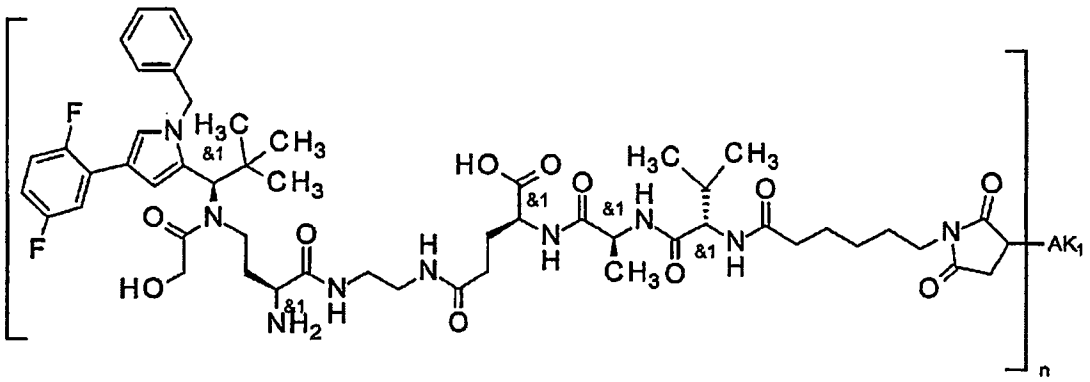
抗體較佳為特異性結合B7H3之人類Ig4及/或人類及/或鼠類Ig2同功異型物之抗-B7H3抗體或其抗原結合片段，尤其抗-B7H3抗體TPP-5706及其人類化變異體，諸如TPP-6642及TPP-6850。在一較佳實施例中，抗-B7H3抗體以去糖基化形式存在。

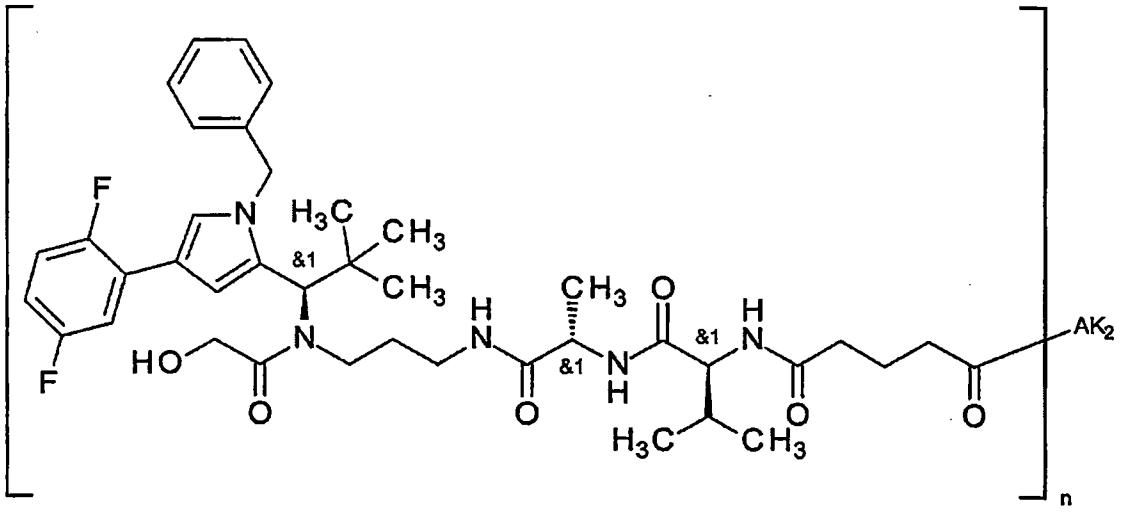
特定實施例

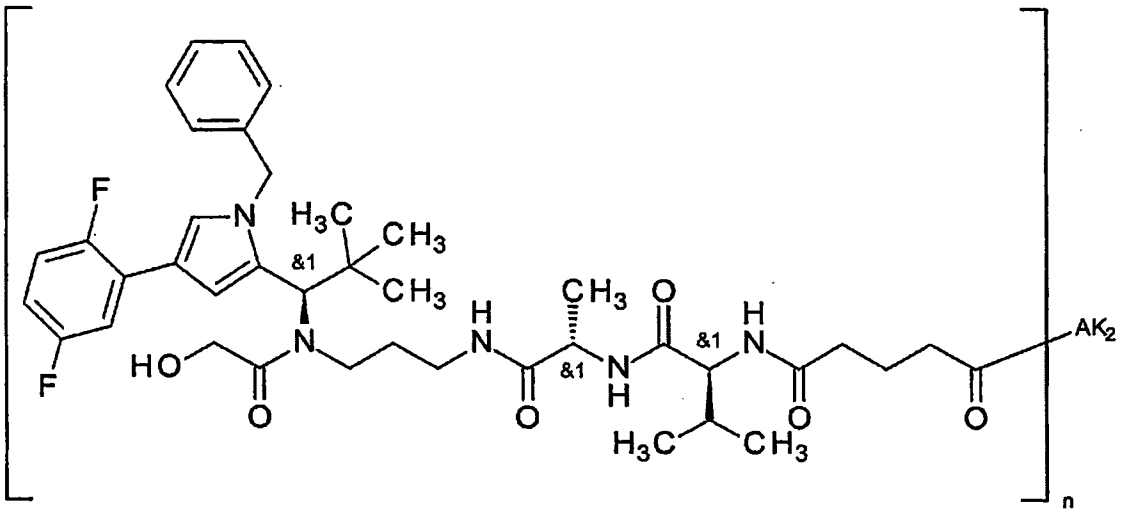
提供根據下式之一的以下較佳抗體結合物，其中n為數值1至20且AK1 (以及AK1a、AK1b等)及AK2 (以及AK2a、AK2b等)為抗體。AK1表示經由半胱胺酸連接之抗體，AK2為經由離胺酸連接之抗體。

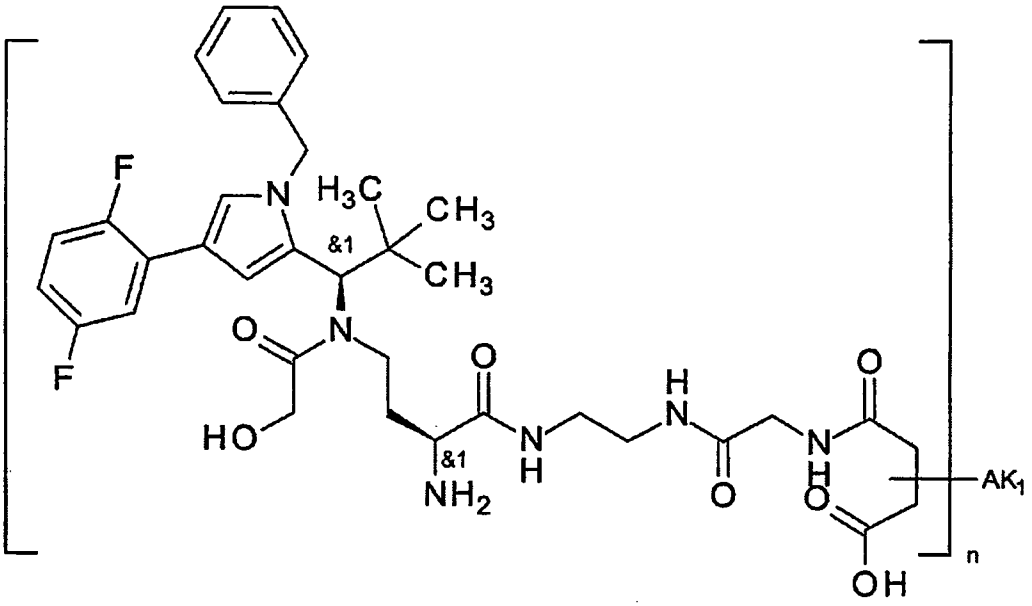
以下任一式中之抗體(AK1或AK2)較佳為特異性結合B7H3之人類Ig4及/或人類及/或鼠類Ig2同功異型物的嵌合或人類化抗-B7H3抗體或其抗原結合片段，尤其抗-B7H3抗體TPP-5706及其人類化變異體，諸如TPP-6642及TPP-6850及抗-B7H3抗體TPP-3803。在一較佳實施例中，抗-B7H3抗體去糖基化。

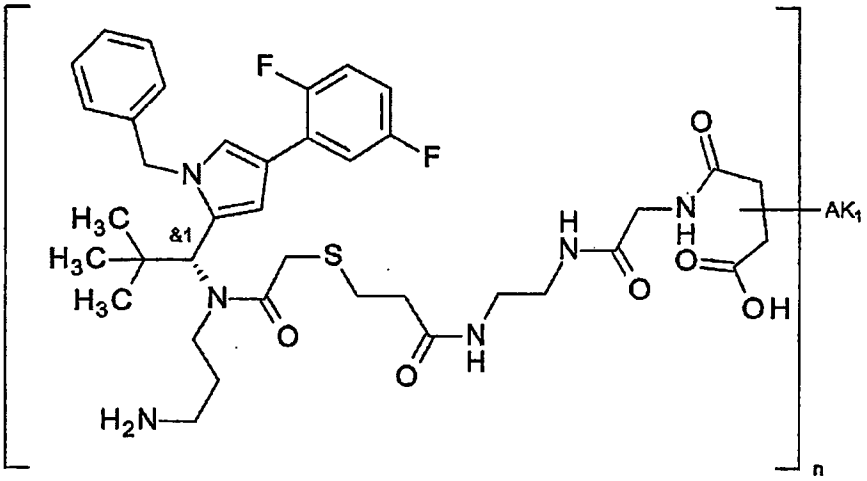


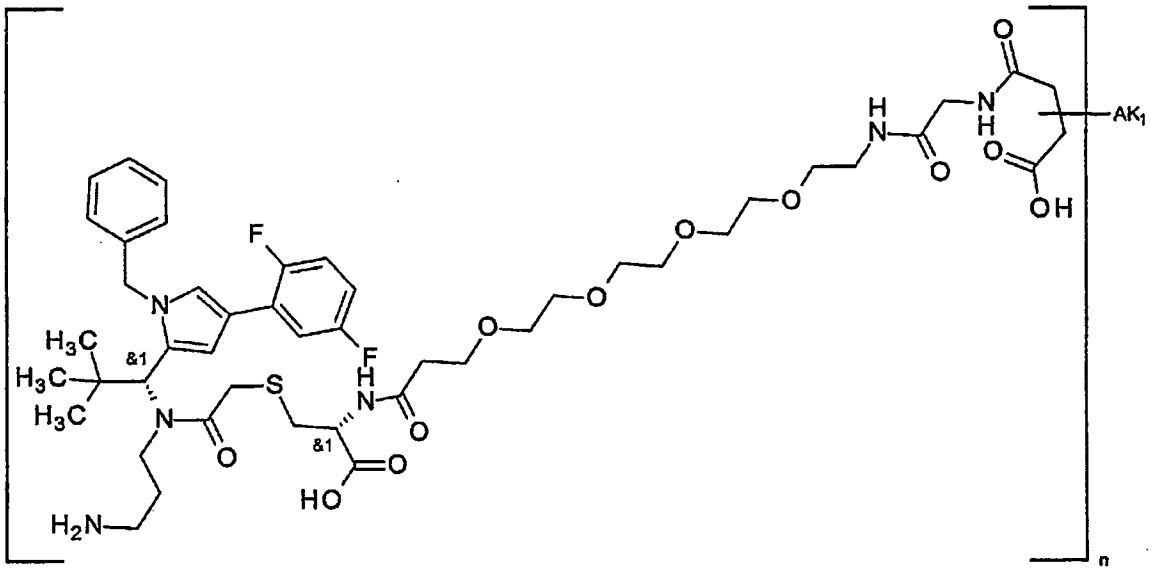


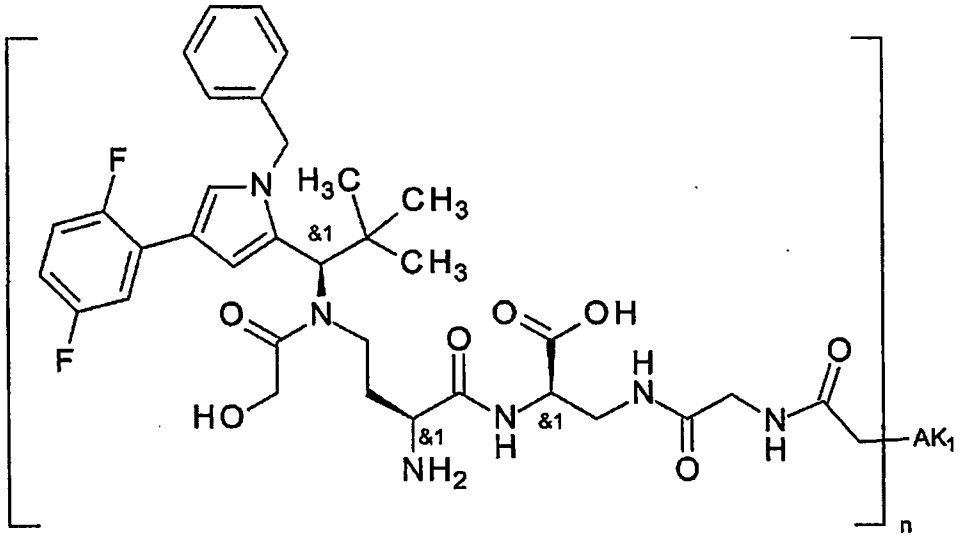


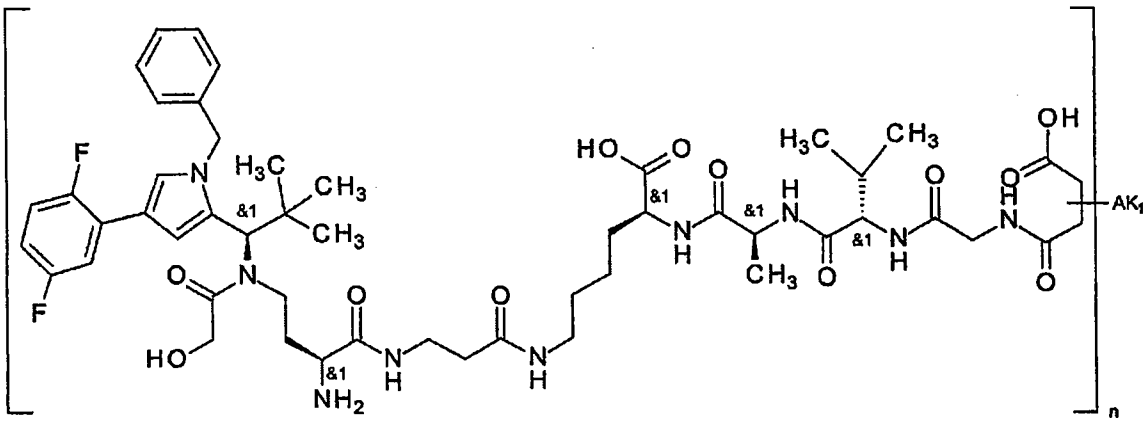


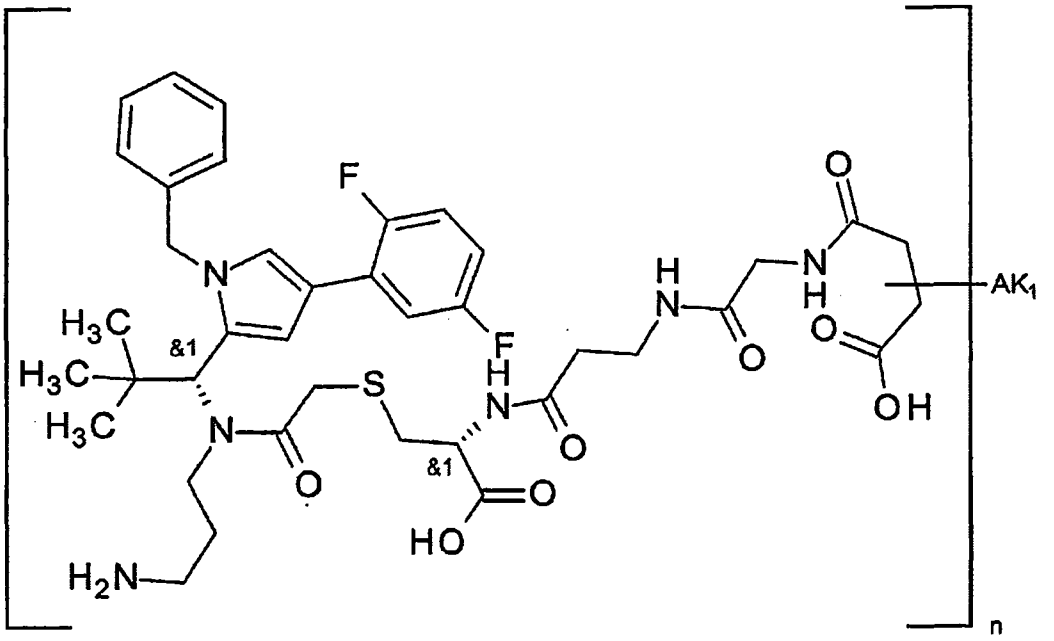


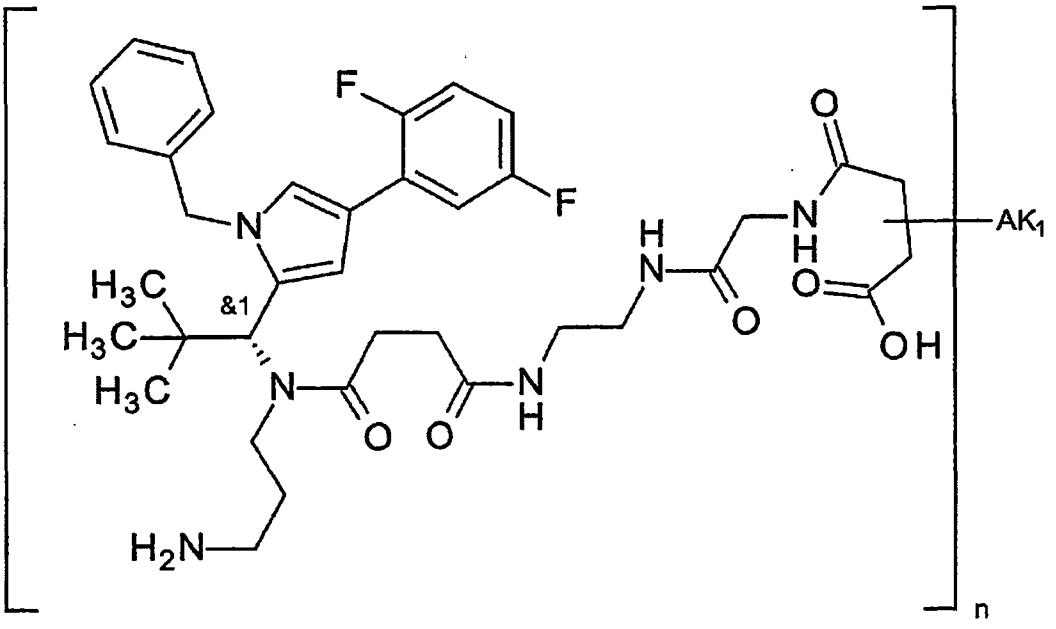


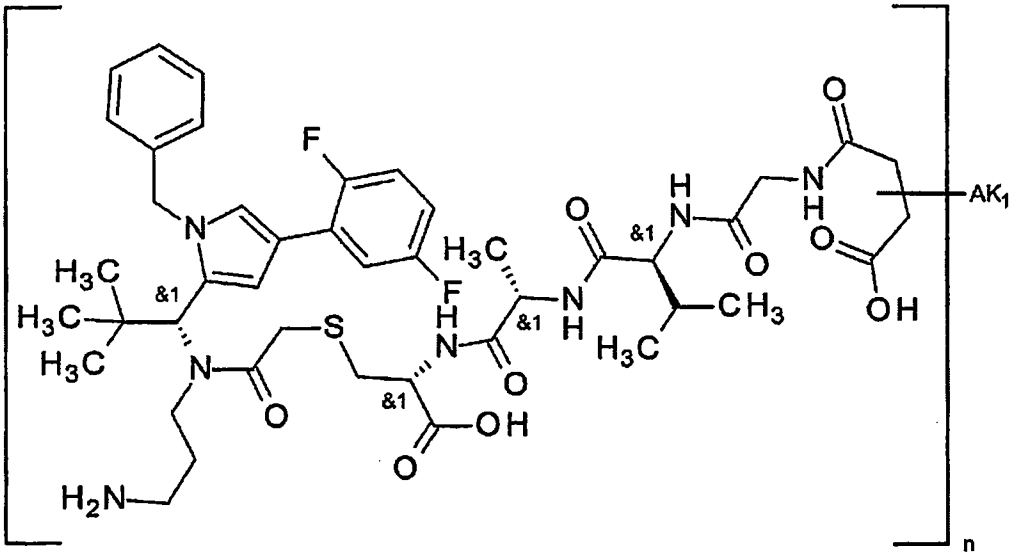


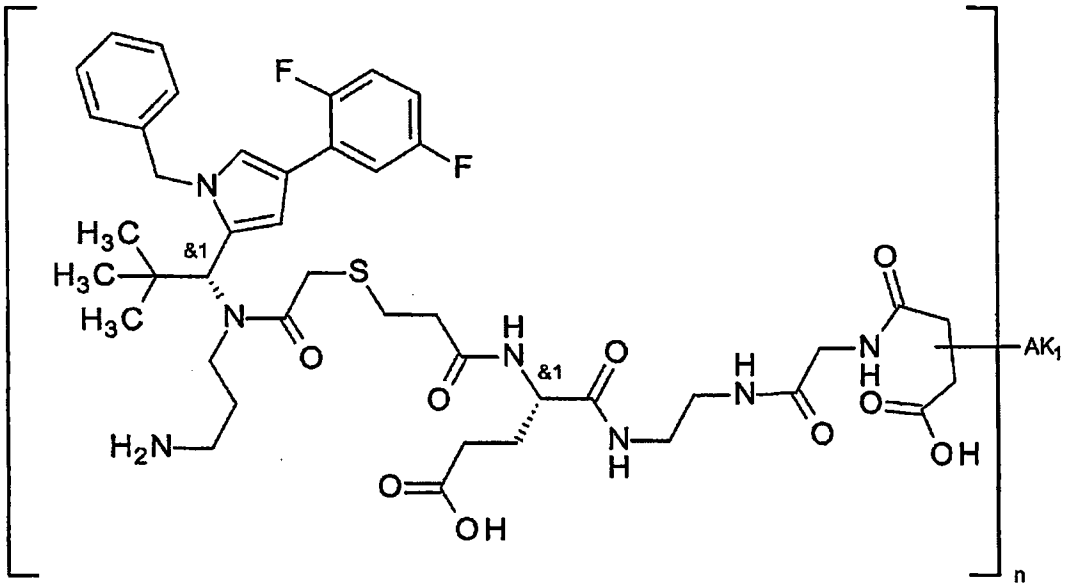


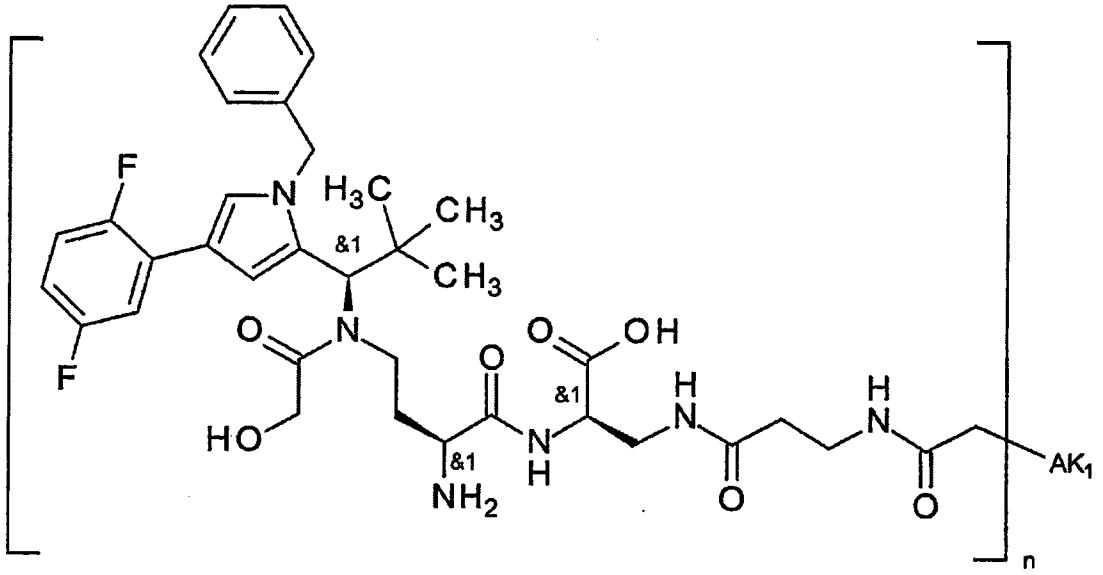


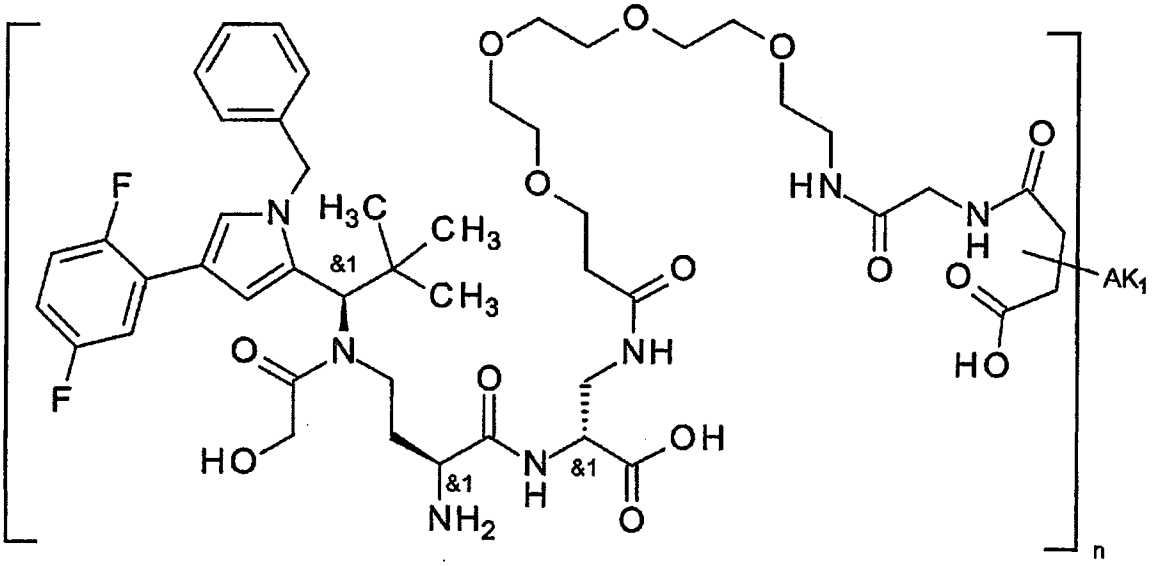


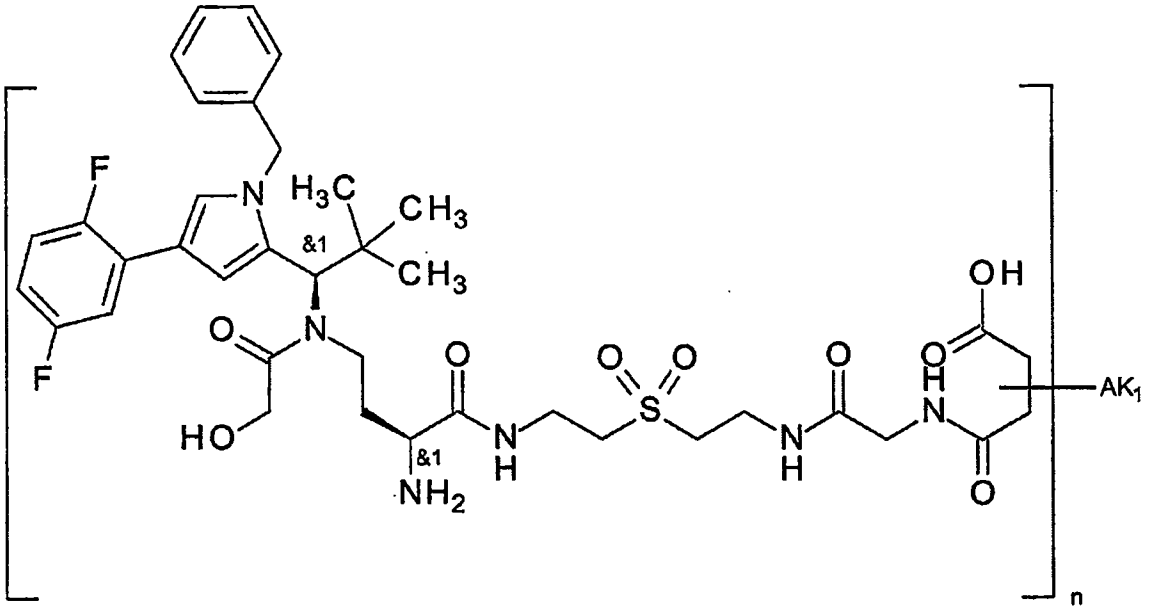


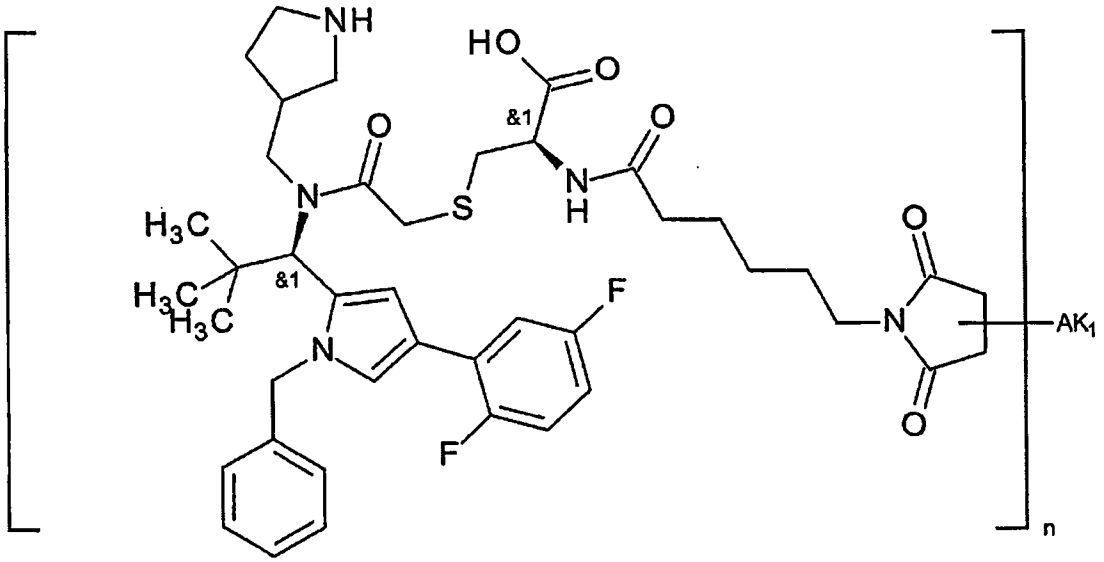


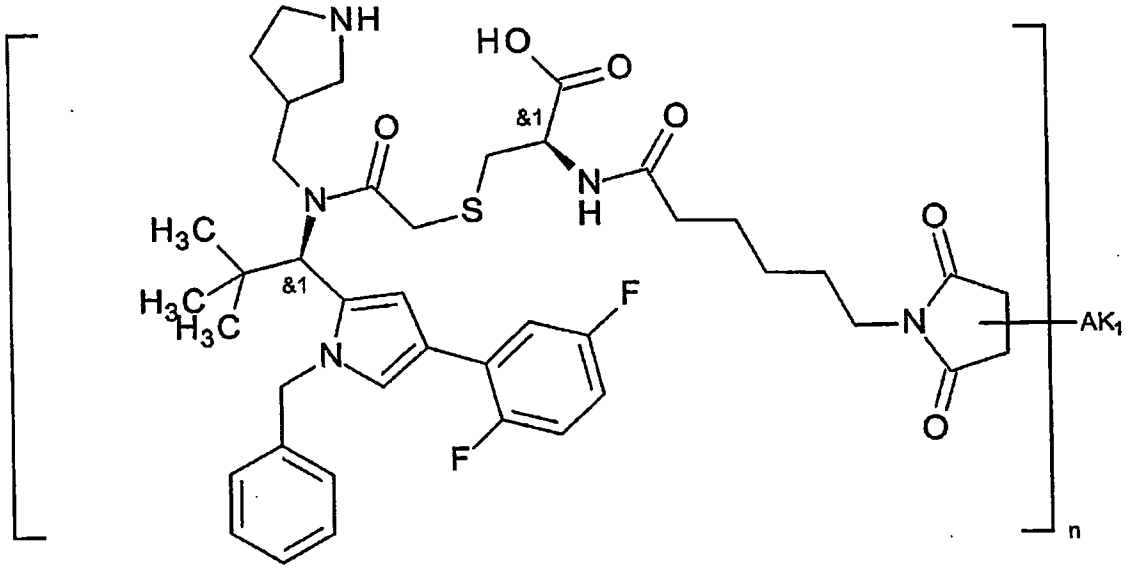




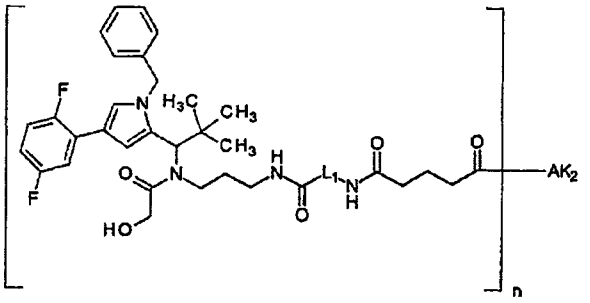


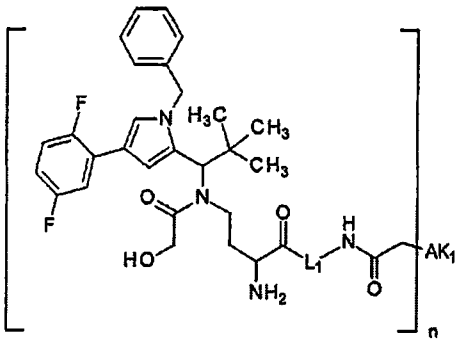


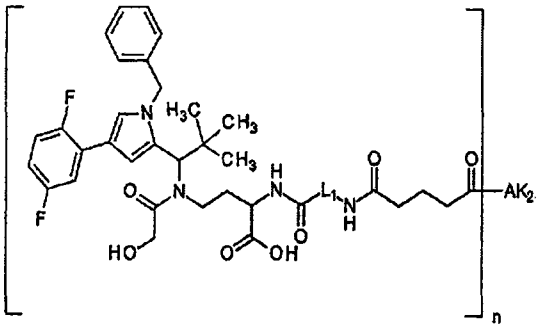


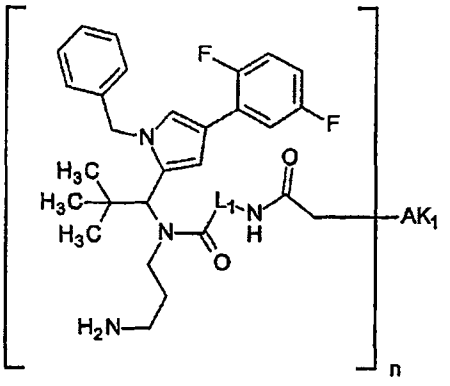


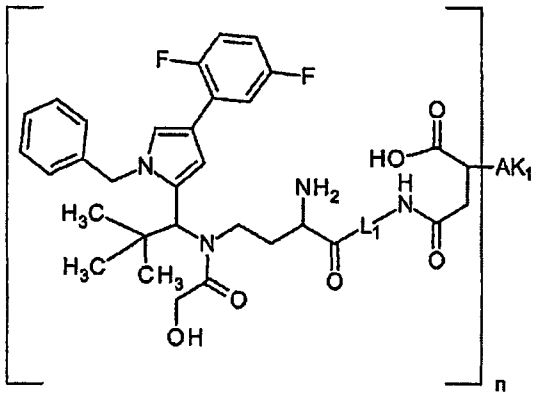
其他結合物可具有以下式之一：

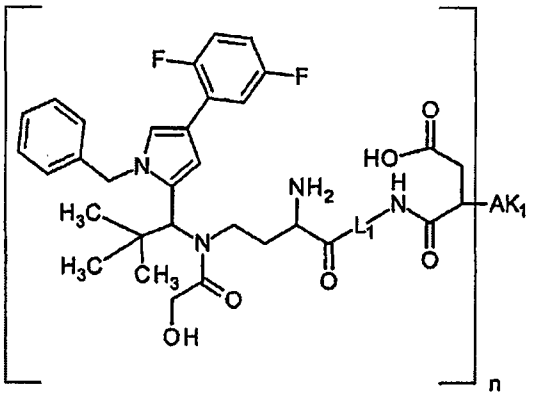


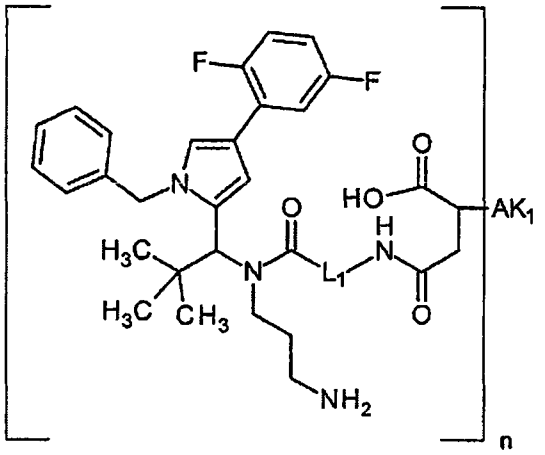


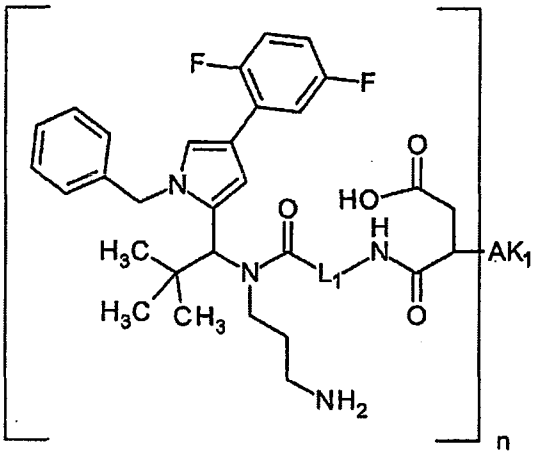


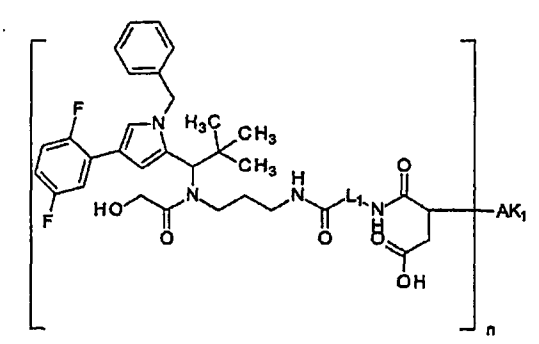


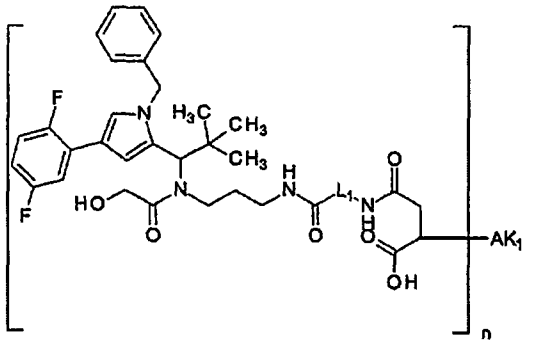


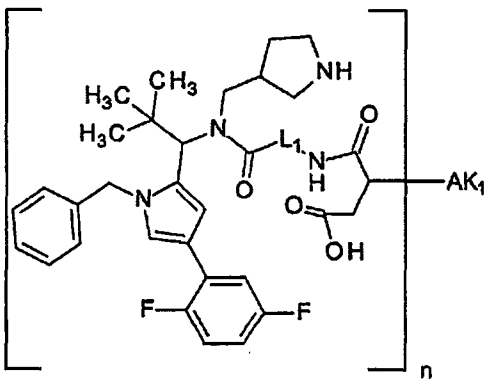


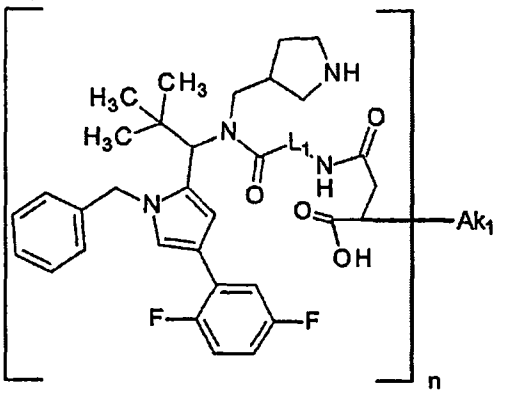


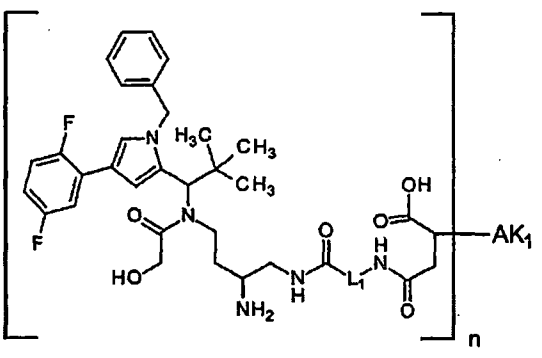


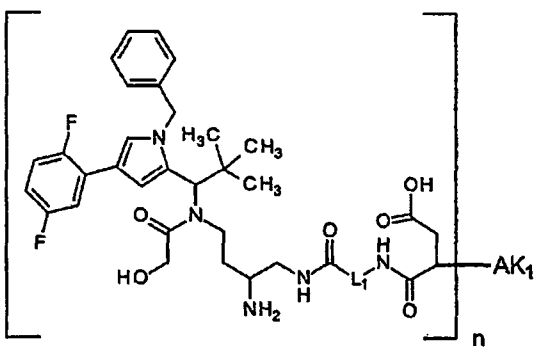


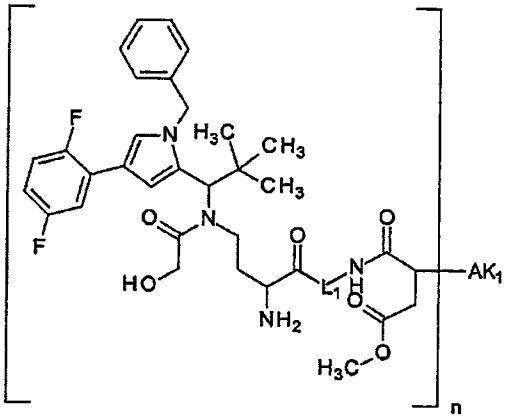


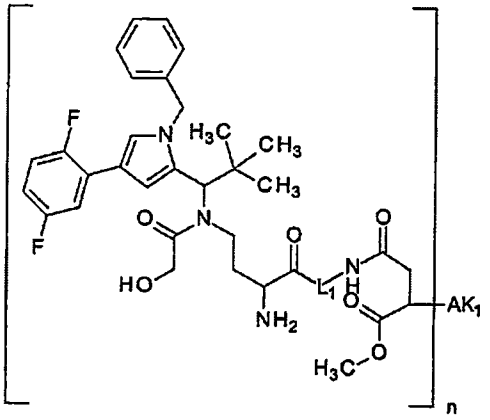


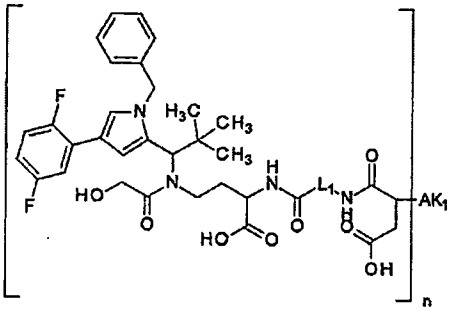


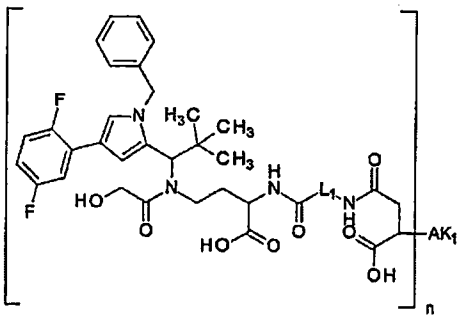


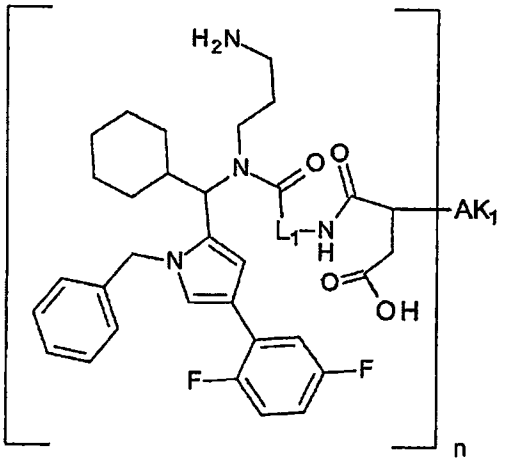


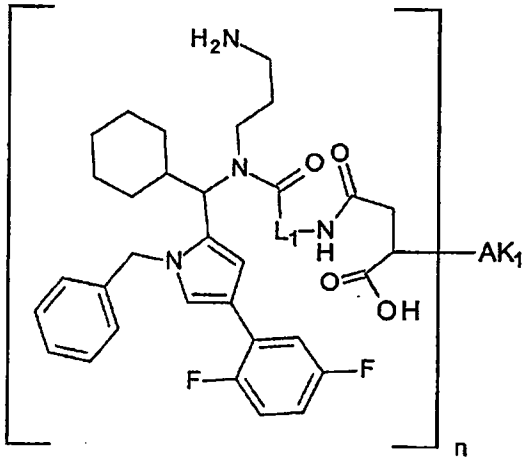


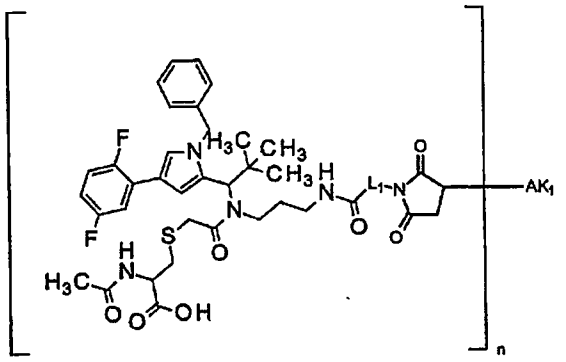


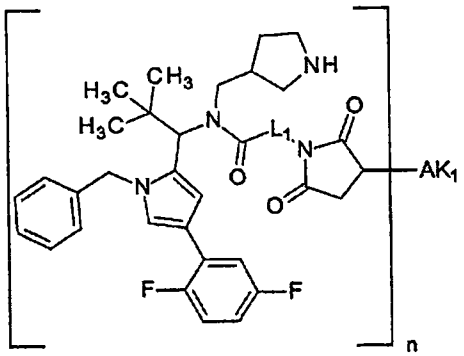


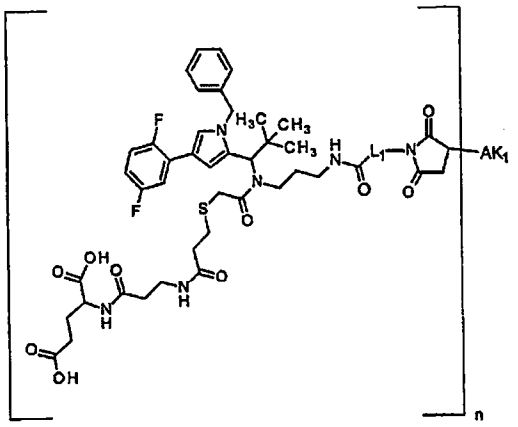


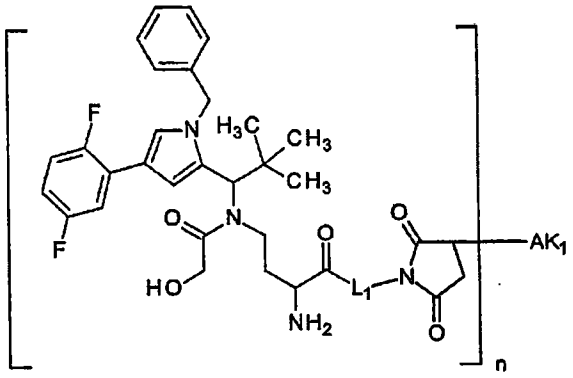


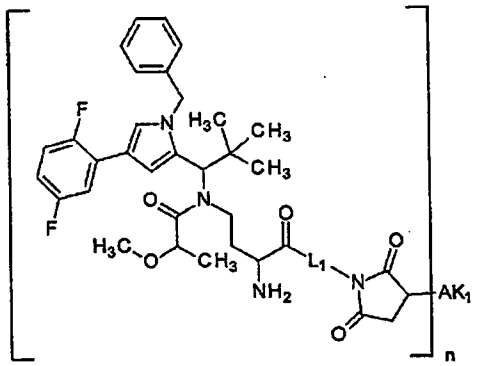


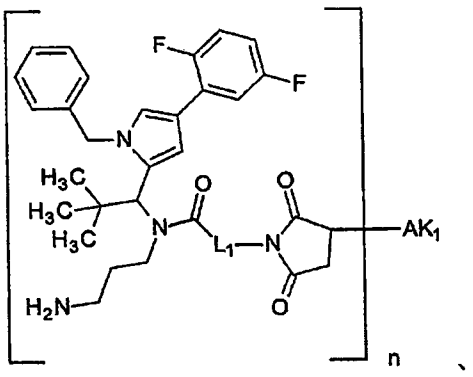


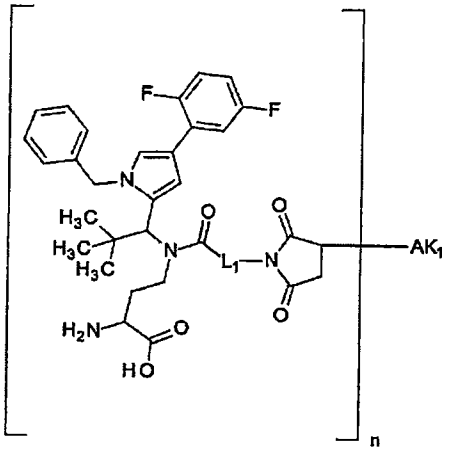


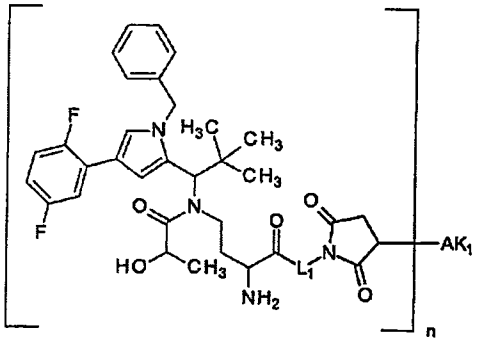


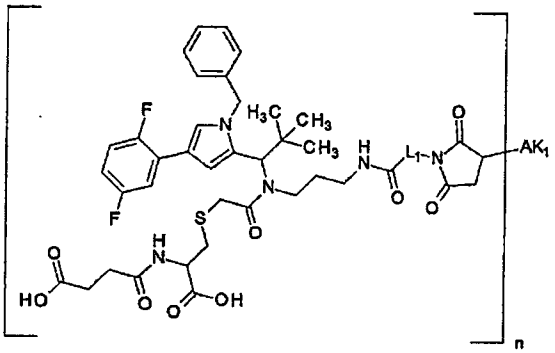


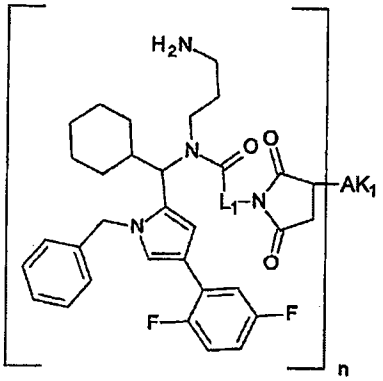


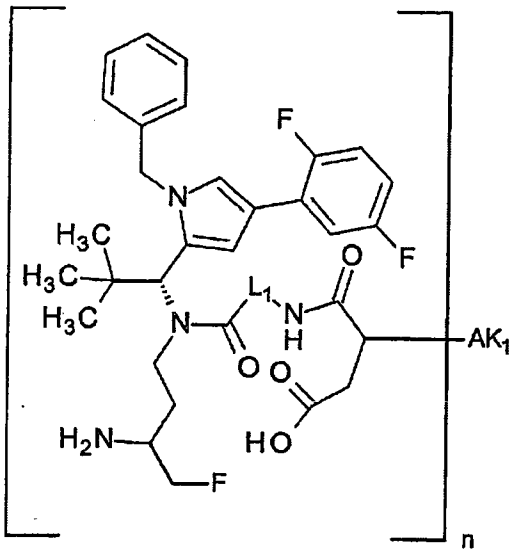


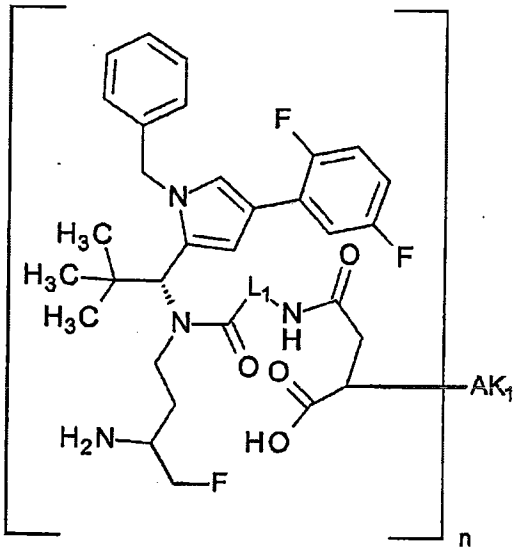


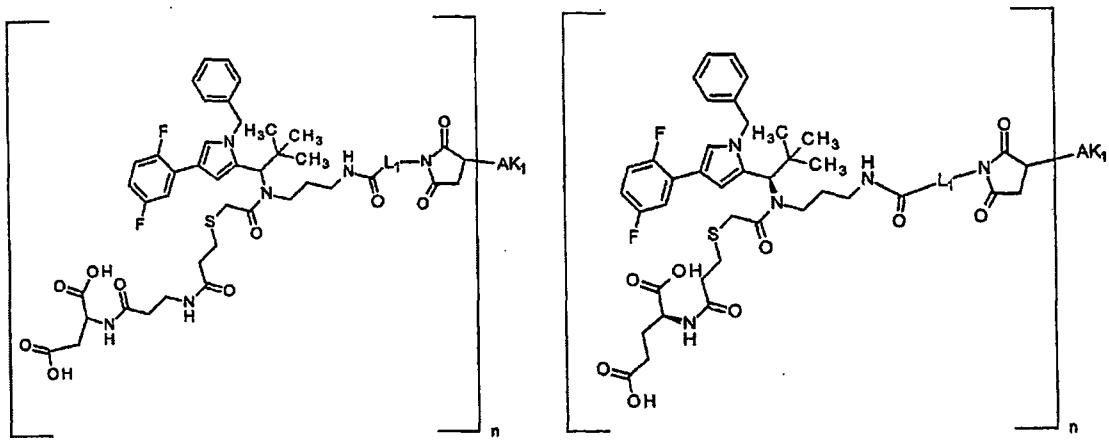




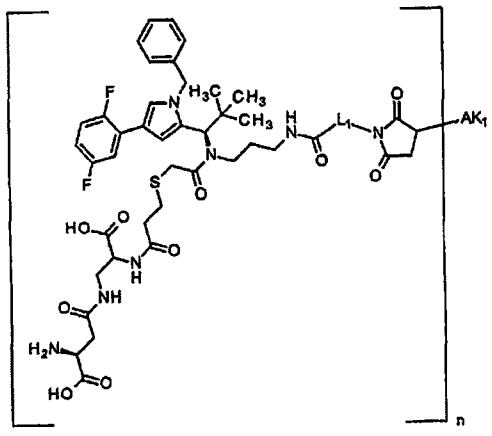








及



其中

AK1為經由半胱胺酸連接之抗-B7H3抗體且

AK2為經由離胺酸連接之抗-B7H3抗體，其為抗體TPP-5706或TPP-3803之嵌合或人類化變異體，

n為數值1至20；且

L_1為具有1至30個碳原子之可相同或不同地間雜以下基團一次或超過一次的直鏈或分支鏈烴鏈：-O-、-S-、-C(=O)-、 $-S(=O)_2-$、-NH-、環戊基、哌啶基、苯基，

其中直鏈或分支鏈烴鏈可經-COOH或$-NH_2$取代，

及其鹽、溶劑合物、溶劑合物之鹽及差向異構體。

此處，連接子L_1較佳表示基團

§-NH-$(CH_2)_2$-§§；

§-NH-$(CH_2)_6$-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-§§ ;

§-NH-CH(COOH)-$(CH_2)_4$-§§

§-NH-NH-C(=O)-$(CH_2)_5$-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_2$-C(=O)-O-$(CH_2)_2$-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_2$-C(=O)-NH-$(CH_2)_2$-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_3$-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-$(CH_2)_2$-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-$(CH_2)_5$-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH(CH_3)-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-NH-CH(COOH)-CH_2-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-NH-CH(COOH)-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-NH-CH(COOH)-$(CH_2)_4$-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-NH-CH(COOH)-CH_2-NH-C(=O)-$(CH_2)_2$-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH(C_2H_4COOH)-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-$((CH_2)_2$-O$)_3$-$(CH_2)_2$-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_2$-S(=O)$_2$-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_3$-NH-C(=O)-CH_2-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-NH-CH(COOH)-CH_2-NH-C(=O)-CH(CH_2COOH)-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH(C_2H_4COOH)-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-NH-CH(COOH)-CH_2-NH-C(=O)-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-$(CH_2)_2$-CH(COOH)-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-NH-CH(COOH)-CH_2-NH-C(=O)-CH(CH_2OH)-NH-C(=O)-CH_2-

§§ ;

§-NH-CH[C(=O)-NH-$(CH_2)_2$-O)$_4$-$(CH_2)_2$COOH]-CH_2-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-NH-CH(COOH)-CH_2-NH-C(=O)-(($(CH_2)_2$-O)$_4$-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_4$-CH(COOH)-NH-C(=O)-CH(CH_3)-NH-C(=O)-CH(isoC_3H_7)-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_4$-CH(COOH)-NH-C(=O)-CH(CH_3)-NH-C(=O)-CH(isoC_3H_7)-NH-C(=O)-$(CH_2)_5$-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_2$-C(=O)-NH-$(CH_2)_4$-CH(COOH)-NH-C(=O)-CH(CH_3)-NH-C(=O)-CH(isoC_3H_7)-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

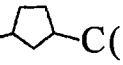
§-NH-$(CH_2)_2$-C(=O)-NH-$(CH_2)_4$-CH(COOH)-NH-C(=O)-CH(CH_3)-NH-C(=O)-CH(isoC_3H_7)-NH-C(=O)-$(CH_2)_5$-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_4$-CH(COOH)-NH-C(=O)- CH[$(CH_2)_3$-NH-C(=O)-NH_2]-NH-C(=O)-CH(isoC_3H_7)-NH-C(=O)-$(CH_2)_5$-§§ ;

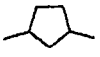
§-NH-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-$(CH_2)_2$-CH(COOH)-NH-C(=O)- CH(CH_3)-NH-C(=O)-CH(isoC_3H_7)-NH-C(=O)-$(CH_2)_5$-§§ ;

§-NH-CH(CH_3)-C(=O)-NH-$(CH_2)_4$-CH(COOH)-NH-C(=O)-CH(CH_3)-NH-C(=O)-CH(isoC_3H_7)-NH-C(=O)-$(CH_2)_5$-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_2$-C(=O)-NH-$(CH_2)_4$-CH(COOH)-NH-C(=O)-CH[$(CH_2)_3$-NH-C(=O)-NH_2]-NH-C(=O)-CH(isoC_3H_7)-NH-C(=O)-$(CH_2)_5$-§§ ;

§-NH  C(=O)-NH-$(CH_2)_2$-§§ ;

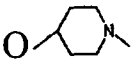
§-NH  C(=O)-NH-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

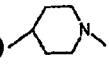
§-NH  C(=O)-NH-$(CH_2)_4$-CH(COOH)-NH-C(=O)-CH[$(CH_2)_3$-

NH-C(=O)-NH_2]-NH-C(=O)-CH($isoC_3H_7$)-NH-C(=O)-$(CH_2)_5$-§§ ;

§-NH  C(=O)-NH-$(CH_2)_4$-CH(COOH)-NH-C(=O)-CH[$(CH_2)_3$-NH-C(=O)-NH_2]-NH-C(=O)-CH($isoC_3H_7$)-NH-C(=O)-$(CH_2)_5$-§§ ;

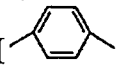
§-NH  C(=O)-NH-$(CH_2)_4$-CH(COOH)-NH-C(=O)-CH(CH_3)-NH-C(=O)-CH($isoC_3H_7$)-NH-C(=O)-$(CH_2)_5$-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_2$-C(=O)-NH-CH($isoC_3H_7$)-C(=O)-NH-CH[$(CH_2)_3$-NH-C(=O)-NH_2]-C(=O)-O  C(=O)-CH_2-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_2$-C(=O)-NH-CH($isoC_3H_7$)-C(=O)-NH-CH(CH_3)-C(=O)-O  C(=O)-CH_2-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)  §§ ;

§-NH-CH(COOH)-CH_2-NH-C(=O)  §§ ;

§-NH-$(CH_2)_2$-C(=O)-NH-CH(CH_3)-C(=O)-NH-CH[$(CH_2)_3$-NH-C(=O)-NH_2]-C(=O)-NH  §§ ;

§-$(CH_2)_2$-C(=O)-NH-$(CH_2)_2$-§§ ;

§-$(CH_2)_2$-C(=O)-NH-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

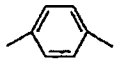
§-CH(CH_3)-NH-C(=O)-CH($isoC_3H_7$)-§§ ;

§-CH(CH_3)-NH-C(=O)-CH($isoC_3H_7$)-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-CH(CH_3)-NH-C(=O)-CH($isoC_3H_7$)-NH-C(=O)-$(CH_2)_5$-§§ ;

§-$(CH_2)_2$-C(=O)-NH-$((CH_2)_2$-O$)_4$-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-CH(CH_3)-NH-C(=O)-CH($isoC_3H_7$)-NH-C(=O)-$((CH_2)_2$-O$)_4$-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-$(CH_2)_2$-§§ ;

§  NH-C(=O)-CH(CH_3)-NH-C(=O)-CH($isoC_3H_7$)-NH-C(=O)-$((CH_2)_2$-O$)_4$-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-$(CH_2)_2$-§§ ;

§-CH_2-S-$(CH_2)_2$-C(=O)-NH-$(CH_2)_2$-§§ ;

§-CH_2-S-$(CH_2)_5$-C(=O)-NH-$(CH_2)_2$-§§ ;

§-CH_2-S-CH_2CH(COOH)-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-CH_2-S-CH_2CH(COOH)-NH-C(=O)-$(CH_2)_5$-§§ ;

§-CH_2-S-$(CH_2)_2$-C(=O)-NH-$((CH_2)_2$-O$)_2$-$(CH_2)_2$-§§ ;

§-CH_2-S-$(CH_2)_2$-C(=O)-NH-$((CH_2)_2$-O$)_2$-$(CH_2)_5$-§§ ;

§-CH_2-S-$(CH_2)_2$-C(=O)-NH-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-CH_2-S-$(CH_2)_2$-C(=O)-NH-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_5-§§ ;

§-CH_2-S-CH_2CH(COOH)-NH-C(=O)-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-CH_2-S-$CH_2CH(NH_2)$-C(=O)-NH-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-$(CH_2)_5$-§§ ;

§-CH_2-S-$(CH_2)_2$-C(=O)-NH-CH(COOH)-CH_2-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-CH_2-S-$(CH_2)_2$-C(=O)-NH-$((CH_2)_2$-O$)_2$-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-CH_2-S-$(CH_2)_2$-C(=O)-NH-$((CH_2)_2$-O$)_4$ -$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-CH_2-S-$(CH_2)_2$-C(=O)-NH-$((CH_2)_2$-O$)_2$-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-$(CH_2)_5$-§§ ;

§-CH_2-S-$(CH_2)_2$-C(=O)-NH-$((CH_2)_2$-O$)_4$-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-$(CH_2)_5$-§§ ;

§-CH_2-S-CH_2CH(COOH)-NH-C(=O)-$((CH_2)_2$-O$)_2$-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-CH_2-S-CH_2CH(COOH)-NH-C(=O)-$((CH_2)_2$-O$)_4$-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-CH_2-S-CH_2CH(COOH)-NH-C(=O)-$((CH_2)_2$-O$)_8$-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-CH_2-S-CH_2CH(COOH)-NH-C(=O)-$((CH_2)_2$-O$)_4$-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-$(CH_2)_2$-§§ ;

§-CH_2-S-$(CH_2)_2$-CH(COOH)-NH-C(=O)-$((CH_2)_2$-O$)_4$-$(CH_2)_2$-NH-

C(=O)-$(CH_2)_2$-§§；

§-CH_2-S-$(CH_2)_2$-C(=O)-NH-CH(C_2H_4COOH)-C(=O)-NH-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§；

§-CH_2-S-CH_2CH[NH-C(=O)-$(CH_2)_2$-COOH]-C(=O)-NH-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§；

§-CH_2-S-CH_2CH[NH-C(=O)-$((CH_2)_2$-O$)_4$-CH_3]-C(=O)-NH-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§；

§-CH_2-S-CH_2CH(COOH)-NH-C(=O)-CH(CH_3)-NH-C(=O)-CH(isoC_3H_7)-NH-C(=O)-CH_2-§§；

§-CH_2-S-CH_2CH[NH-C(=O)-$(CH_2)_2$-COOH]-C(=O)-NH-$(CH_2)_2$-S(=O)$_2$-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§；

§-CH_2-S-CH_2CH[NH-C(=O)-$(CH_2)_2$-COOH]-C(=O)-NH-$((CH_2)_2$-O$)_4$-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§；

§-CH_2-S-CH_2CH[C(=O)-NH-$(CH_2)_2$-COOH]-NH-C(=O)-$((CH_2)_2$-O$)_4$-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§；

§-CH_2-S-CH_2CH[C(=O)-NH-$(CH_2)_2$-COOH]-NH-C(=O)-$((CH_2)_2$-O$)_4$-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-$(CH_2)_2$-§§；

§-CH_2-S-CH_2CH(COOH)-NH-C(=O)-$(CH_2)_2$CH(COOH)-NH-C(=O)-$((CH_2)_2$-O$)_4$-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§

§-CH_2-S-CH_2CH[C(=O)-NH-$((CH_2)_2$-O$)_4$-$(CH_2)_2$-COOH]-NH-C(=O)-$((CH_2)_2$-O$)_4$-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§；

§-CH_2-S-CH_2CH(COOH)-NH-C(=O)-CH[$(CH_2)_2$-COOH]-NH-C(=O)-$((CH_2)_2$-O$)_4$-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-$(CH_2)_2$-§§，

或

§-CH_2-S-$(CH_2)_2$-C(=O)-NH-CH(COOH)-CH_2-NH-C(=O)-CH_2-S-CH_2CH(COOH)-NH-C(=O)-CH(CH_3)-NH-C(=O)-CH(isoC_3H_7)-NH-

$C(=O)-(CH_2)_5-$§§，

其中

§表示鍵結於藥物分子之鍵且

§§表示鍵結於抗體之鍵且

$isoC_3H_7$表示異丙基殘基，

及其鹽、溶劑合物、溶劑合物之鹽及差向異構體。

治療用途

可採用本發明化合物治療之過度增生性疾病，尤其包括癌症及腫瘤疾病之群。在本發明之上下文中，應瞭解此等尤其意謂以下疾病，但對其不作任何限制：乳房癌瘤及乳房腫瘤(乳房癌瘤包括乳腺管及乳腺小葉形式，亦稱原位)、呼吸道腫瘤(小細胞及非小細胞肺部癌瘤、支氣管癌瘤)、大腦腫瘤(例如腦幹及丘腦下部腫瘤、星形細胞瘤、室管膜瘤、神經膠母細胞瘤、神經膠質瘤、神經管母細胞瘤、腦膜瘤及神經外胚層及松果體腫瘤)、消化器官腫瘤(食管、胃、膽囊、小腸、大腸、直腸及肛門癌瘤)、肝臟腫瘤(尤其肝細胞癌、膽管癌及混合型肝細胞膽管癌)、頭頸部區域腫瘤(喉、喉咽、鼻咽、口咽、嘴唇及口腔癌瘤、口腔黑色素瘤)、皮膚腫瘤(基底細胞癌、脊椎瘤、鱗狀細胞癌、卡堡氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、惡性黑色素瘤、非黑色素瘤性皮膚癌、梅克爾細胞皮膚癌(Merkel cell skin cancer)、肥大細胞腫瘤)、基質及結締組織腫瘤(尤其軟組織肉瘤、骨肉瘤、惡性纖維組織細胞瘤、軟骨肉瘤、纖維肉瘤、血管肉瘤、平滑肌肉瘤、脂肪肉瘤、淋巴肉瘤及橫紋肌肉瘤)、眼睛腫瘤(尤其眼內黑色素瘤及視網膜母細胞瘤)、內分泌及外分泌腺體腫瘤(例如甲狀腺及副甲狀腺腫瘤、胰臟及唾液腺癌瘤、腺癌)、泌尿道腫瘤(膀胱、陰莖、腎、腎盂及尿管之腫瘤)及生殖器官腫瘤(女性中子宮內膜、子宮頸、卵巢、陰道、外陰及子宮之癌瘤及男性中前列腺及睪丸之癌瘤)。此等疾病亦包括

呈實體形式及循環細胞形式之血液、淋巴系統及脊髓增生性疾病，諸如白血病、淋巴瘤及骨髓增生性疾病，例如急性骨髓白血病、急性淋巴母細胞性白血病、慢性淋巴細胞性白血病、慢性骨髓性白血病及毛細胞白血病，及AIDS相關淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)、非霍奇金氏淋巴瘤、皮膚T細胞淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)及中樞神經系統中之淋巴瘤。

此等經充分表徵之人類疾病亦可以類似病因出現於其他哺乳動物中，且同樣可用本發明之化合物在此治療。

本發明化合物治療上述癌症疾病包含治療實體腫瘤與治療其轉移或循環形式兩者。

在本發明之上下文中，術語「治療(treatment)」或「治療(treat)」係以習知意義使用且意謂護理、照護及照料患者，其目的在於對抗、減少、減弱或緩解疾病或健康異常，及改善因此疾病受損之生活狀況，例如在癌症情況下。

本發明因此進一步提供本發明化合物用於治療及/或預防病症、尤其前述病症之用途。

本發明進一步提供本發明化合物用於製造供治療及/或預防病症、尤其前述病症之藥劑的用途。

本發明進一步提供本發明化合物用於治療及/或預防病症、尤其前述病症之方法中的用途。

本發明進一步提供一種使用有效量之至少一種本發明化合物治療及/或預防病症、尤其前述病症的方法。

本發明之化合物可單獨使用或必要時與一或多種其他藥理學活性物質組合使用，其限制條件為此組合不會產生不良及不可接受之副作用。因此，本發明進一步提供包含至少一種本發明化合物及一或多種尤其用於治療及/或預防前述病症之其他活性成分的藥劑。

舉例而言，本發明之化合物可與已知之抗過度增生物質、細胞抑制物質或細胞毒性物質組合用於治療癌症疾病。適合組合活性化合物之實例包括：

131I-chTNT、阿巴瑞克(abarelix)、阿比特龍(abiraterone)、阿克拉黴素(aclarubicin)、阿多-曲妥珠單抗恩塔新(ado-trastuzumab emtansin)、阿法替尼(afatinib)、阿柏西普(aflibercept)、阿地白介素(aldesleukin)、阿侖單抗(alemtuzumab)、阿侖膦酸(alendronic acid)、阿利維甲酸(alitretinoin)、六甲蜜胺(altretamine)、阿米福汀(amifostine)、胺魯米特(aminoglutethimide)、己基-5-胺基乙醯丙酸酯(hexyl-5-aminolevulinate)、胺柔比星(amrubicin)、安吖啶(amsacrine)、阿那曲唑(anastrozole)、安西司亭(ancestim)、茴香腦二硫醇硫酮(anethole dithiolethione)、血管緊張素II (angiotensin II)、抗凝血酶III (antithrombin III)、阿匹坦(aprepitant)、阿西莫單抗(arcitumomab)、阿格拉賓(arglabin)、三氧化二砷、天冬醯胺酶、阿西替尼(axitinib)、阿紮胞苷(azacitidine)、貝洛替康(belotecan)、苯達莫司汀(bendamustine)、貝林諾他(belinostat)、貝伐單抗(bevacizumab)、貝瑟羅汀(bexarotene)、比卡魯胺(bicalutamide)、比生群(bisantrene)、博萊黴素(bleomycin)、硼替佐米(bortezomib)、布舍瑞林(buserelin)、伯舒替尼(bosutinib)、貝倫妥單抗維多汀(brentuximab vedotin)、白消安(busulfan)、卡巴他賽(cabazitaxel)、卡博替尼(cabozantinib)、亞葉酸鈣(calcium folinate)、左醛葉酸鈣(calcium levofolinate)、卡培他濱(capecitabine)、卡羅單抗(capromab)、卡鉑(carboplatin)、卡非佐米(carfilzomib)、卡莫氟(carmofur)、卡莫司汀(carmustine)、卡托莫西單抗(catumaxomab)、塞內昔布(celecoxib)、西莫白介素(celmoleukin)、色瑞替尼(ceritinib)、西妥昔單抗(cetuximab)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、氯地孕酮(chlormadinone)、雙氯乙基甲胺

(chlormethine)、西多福韋(cidofovir)、西那卡塞(cinacalcet)、順鉑(cisplatin)、克拉屈濱(cladribine)、氯膦酸(clodronic acid)、氯法拉濱(clofarabine)、考班昔布(copanlisib)、克立他酶(crisantaspase)、克卓替尼(crizotinib)、環磷醯胺(cyclophosphamide)、環丙孕酮(cyproterone)、阿糖胞苷(cytarabine)、達卡巴嗪(dacarbazine)、放線菌素d (dactinomycin)、達拉菲尼(dabrafenib)、達沙替尼(dasatinib)、道諾比星(daunorubicin)、地西他濱(decitabine)、地加瑞克(degarelix)、地尼白介素迪夫托斯(denileukin diftitox)、德諾單抗(denosumab)、地普奧肽(depreotide)、德舍瑞林(deslorelin)、右雷佐生(dexrazoxane)、二溴螺氯銨(dibrospidium chloride)、衛康醇(dianhydrogalactitol)、雙氯芬酸(diclofenac)、多烯紫杉醇(docetaxel)、多拉司瓊(dolasetron)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、小紅莓(doxorubicin)、小紅莓 + 雌酮、屈大麻酚(dronabinol)、依決洛單抗(edrecolomab)、依利醋銨(elliptinium acetate)、內皮生長抑素(endostatin)、依諾他濱(enocitabine)、恩雜魯胺(enzalutamide)、表柔比星(epirubicin)、環硫雄醇(epitiostanol)、阿法依泊汀(epoetin alfa)、倍他依泊汀(epoetin beta)、澤塔依伯汀(epoetin zeta)、依鉑(eptaplatin)、艾日布林(eribulin)、埃羅替尼(erlotinib)、埃索美拉唑(esomeprazole)、雌氮芥(estramustine)、依託泊苷(etoposide)、依維莫司(everolimus)、依西美坦(exemestane)、法屈唑(fadrozole)、芬太尼(fentanyl)、氟甲睾酮(fluoxymesterone)、氟尿苷(floxuridine)、氟達拉賓(fludarabine)、氟尿嘧啶(fluorouracil)、氟他胺(flutamide)、亞葉酸(folinic acid)、福美司坦(formestane)、福沙匹坦(fosaprepitant)、福莫司汀(fotemustine)、氟維司群(fulvestrant)、釓布醇(gadobutrol)、釓特醇(gadoteridol)、釓特酸葡甲胺鹽(gadoteric acid meglumine salt)、釓弗塞胺(gadoversetamide)、釓塞酸二鈉鹽(gadoxetic acid disodium salt)

(Gd-EOB-DTPA二鈉鹽)、硝酸鎵、加尼瑞克(ganirelix)、吉非替尼(gefitinib)、吉西他濱(gemcitabine)、吉妥珠單抗(gemtuzumab)、麩卡匹酶(glucarpidase)、氧化型谷胱甘肽(glutoxim)、戈舍瑞林(goserelin)、格拉司瓊(granisetron)、粒細胞群落刺激因子(G-CSF)、粒細胞巨噬細胞群落刺激因子(GM-CSF)、組織胺二鹽酸鹽(histamine dihydrochloride)、組胺瑞林(histrelin)、羥基脲(hydroxycarbamide)、I-125種、伊班膦酸(ibandronic acid)、布突默單抗泰澤坦(ibritumomab tiuxetan)、依魯替尼(ibrutinib)、艾達黴素(idarubicin)、異環磷醯胺(ifosfamide)、伊馬替尼(imatinib)、咪喹莫特(imiquimod)、英丙舒凡(improsulfan)、吲地司瓊(indisetron)、英卡膦酸(incadronic acid)、巨大戟二萜醇甲基丁烯酸酯(ingenolmebutate)、干擾素α、干擾素β、干擾素γ、碘比醇(iobitridol)、碘苄胍(iobenguane) (123I)、碘美普爾(iomeprole)、伊派利單抗(ipilimumab)、伊立替康(irinotecan)、伊曲康唑(itraconazole)、伊沙匹隆(ixabepilone)、蘭瑞肽(lanreotide)、蘭索拉唑(lansoprazole)、拉帕替尼(lapatinib)、拉索膽鹼(lasocholine)、來那度胺(lenalidomide)、蘑菇多醣(lentinan)、來曲唑(letrozole)、亮丙瑞林(leuprorelin)、左旋咪唑(levamisole)、左炔諾孕酮(levonorgestrel)、左旋甲狀腺素鈉(levothyroxine-sodium)、立普非格司亭(lipegfilgrastim)、麥角乙脲(lisuride)、洛鉑(lobaplatin)、洛莫司汀(lomustine)、氯尼達明(lonidamine)、馬索羅酚(masoprocol)、甲羥孕酮(medroxyprogesterone)、甲地孕酮(megestrol)、美拉胂醇(melarsoprol)、美法侖(melphalan)、美雄烷(mepitiostane)、巰基嘌呤(mercaptopurine)、美司鈉(mesna)、美沙酮(methadone)、甲胺喋呤(methotrexate)、甲氧沙林(methoxsalen)、胺基乙醯丙酸甲酯(methyl aminolevulinate)、甲基潑尼龍(methylprednisolone)、甲睾酮(methyltestosterone)、美替羅新(metirosin)、米伐木肽(mifamurtide)、

米替福新(miltefosine)、米鉑(miriplatin)、二溴甘露醇(mitobronitol)、丙脒腙(mitoguazone)、二溴衛矛醇(mitolactol)、絲裂黴素(mitomycin)、米托坦(mitotane)、米托蒽醌(mitoxantrone)、莫格利珠單抗(mogamulizumab)、莫拉司亭(molgramostim)、莫匹達莫(mopidamole)、鹽酸嗎啡(morphine hydrochloride)、硫酸嗎啡(morphine sulphate)、納比隆(nabilon)、納比西莫(nabiximols)、那法瑞林(nafarelin)、納洛酮(naloxone) + 戊唑星(pentazocine)、納曲酮(naltrexone)、那托司亭(nartograstim)、奈達鉑(nedaplatin)、奈拉濱(nelarabine)、奈立膦酸(neridronic acid)、納武單抗噴曲肽(nivolumabpentetreotide)、尼羅替尼(nilotinib)、尼魯胺(nilutamide)、尼莫唑(nimorazole)、尼妥珠單抗(nimotuzumab)、尼莫司汀(nimustine)、二胺硝吖啶(nitracrine)、納武單抗(nivolumab)、歐比托珠單抗(obinutuzumab)、奧曲肽(octreotide)、奧伐木單抗(ofatumumab)、奧馬塔昔-美匹辛雷(omacetaxin-mepesuccinate)、奧美拉唑(omeprazole)、昂丹司瓊(ondansetron)、奧古蛋白(orgotein)、奧瑞莫德(orilotimode)、奧沙利鉑(oxaliplatin)、羥考酮(oxycodone)、羥次甲氫龍(oxymetholone)、奧唑米星(ozogamicin)、p53基因療法、太平洋紫杉醇(paclitaxel)、鈀-103種、帕洛諾司瓊(palonosetron)、帕米膦酸(pamidronic acid)、帕尼單抗(panitumumab)、泮托拉唑(pantoprazole)、帕佐泮尼(pazopanib)、培門冬酶(pegaspargase)、派立珠單抗(pembrolizumab)、聚乙二醇化干擾素α2b (peginterferon alfa 2b)、培美曲塞(pemetrexed)、噴司他丁(pentostatin)、培洛黴素(peplomycin)、全氟丁烷、培磷醯胺(perfosfamide)、帕妥珠單抗(pertuzumab)、畢西巴尼(picibanil)、匹魯卡品(pilocarpine)、吡柔比星(pirarubicin)、匹蒽醌(pixantrone)、普樂沙福(plerixafor)、普卡黴素(plicamycin)、聚胺葡糖(poliglusam)、聚磷酸雌二醇(polyestradiol

phosphate)、聚乙烯吡咯啶酮 + 玻尿酸鈉、多醣-K、泊利度胺(pomalidomide)、普納替尼(ponatinib)、卟吩姆鈉(porfimer sodium)、普拉曲沙(pralatrexate)、潑尼氮芥(prednimustine)、潑尼松(prednisone)、丙卡巴肼(procarbazine)、丙考達唑(procodazole)、普萘洛爾(propranolol)、喹高利特(quinagolide)、雷貝拉唑(rabeprazole)、拉克莫單抗(racotumomab)、氯化鐳-223、拉多替尼(radotinib)、雷諾昔酚(raloxifene)、雷替曲塞(raltitrexed)、拉莫司瓊(ramosetron)、雷莫蘆單抗(ramucirumab)、雷莫司汀(ranimustine)、拉布立酶(rasburicase)、雷佐生(razoxane)、瑞法美替尼(refametinib)、瑞戈非尼(regorafenib)、利塞膦酸(risedronic acid)、依替膦酸銲-186、利妥昔單抗(rituximab)、羅米地辛(romidepsin)、羅莫肽(romurtide)、羅尼西立(roniciclib)、來昔決南釤(153Sm)、沙妥莫單抗(satumomab)、分泌素(secretin)、西普亮塞-T (sipuleucel-T)、西索菲蘭(sizofiran)、索布佐生(sobuzoxane)、甘胺雙唑鈉(sodium glycididazole)、索拉非尼(sorafenib)、康力龍(stanozolol)、鏈脲菌素(streptozocin)、舒尼替尼(sunitinib)、他拉泊芬(talaporfin)、他米巴羅汀(tamibarotene)、他莫昔芬(tamoxifen)、他噴他多(tapentadol)、他索那明(tasonermin)、替西白介素(teceleukin)、諾非單抗美噴坦鎝(99mTc)(technetium (99mTc) nofetumomab merpentane)、99mTc-HYNIC-[Tyr3]-奧曲肽、喃氟啶(tegafur)、喃氟啶(tegafur) + 吉美拉西(gimeracil) + 奧特拉西(oteracil)、替莫泊芬(temoporfin)、替莫唑胺(temozolomide)、坦羅莫司(temsirolimus)、替尼泊苷(teniposide)、睪固酮(testosterone)、替曲膦(tetrofosmin)、撒利多胺(thalidomide)、噻替派(thiotepa)、胸腺法新(thymalfasin)、α甲狀腺促素(thyrotropine alfa)、硫鳥嘌呤(tioguanine)、托西利單抗(tocilizumab)、拓朴替康(topotecan)、托瑞米芬(toremifene)、托西莫單抗(tositumomab)、曲貝替定

(trabectedin)、曲馬多(tramadol)、曲妥珠單抗(trastuzumab)、曲奧舒凡(treosulfan)、維甲酸(tretinoin)、曲氟尿苷(trifluridine) + 替皮拉西(tipiracil)、曲美替尼(trametinib)、曲洛司坦(trilostane)、曲普瑞林(triptorelin)、曲磷胺(trofosfamide)、血小板生成素(thrombopoietin)、烏苯美司(ubenimex)、伐柔比星(valrubicin)、凡德他尼(vandetanib)、伐普肽(vapreotide)、伐拉替尼(valatinib)、維羅非尼(vemurafenib)、長春鹼(vinblastine)、長春新鹼(vincristine)、長春地辛(vindesine)、長春氟寧(vinflunine)、長春瑞賓(vinorelbine)、維莫德吉(vismodegib)、伏立諾他(vorinostat)、釔-90玻璃微球體、淨司他丁(zinostatin)、淨司他丁司他美(zinostatin stimalamer)、唑來膦酸(zoledronic acid)、左柔比星(zorubicin)。

另外，本發明之化合物可與例如可結合於例如以下標靶之結合劑組合：OX-40、CD137/4-1BB、DR3、IDO1/IDO2、LAG-3、CD40。

此外，本發明之化合物亦可與放射療法及/或手術介入組合使用。

通常，可藉由本發明之化合物與其他細胞抑制或細胞毒性活性劑之組合實現以下目標：

相較於個別活性化合物之治療，達成延緩腫瘤生長、減小其尺寸或甚至使其完全消除之功效提高；

與在單藥療法之情況下相比，可使用較低劑量之化學治療劑；

與個別投藥相比，可實現具有較少副作用之耐受度更高的療法；

可治療更廣範範圍之贅生性病症；

實現對療法之較高反應率；

與現有標準療法相比，患者之存活時間更長。

此外，本發明之化合物亦可與放射療法及/或手術介入組合使用。

本發明進一步提供包含至少一種本發明化合物，典型地連同一或多種惰性、無毒、醫藥學上適合之賦形劑一起的藥劑，及其用於前述目的之用途。

本發明之化合物可全身性及/或局部起作用。為此目的，其可以適合方式投與，例如非經腸、可能之吸入方式或呈植入物或血管內支架。

本發明之化合物可以適於此等投藥途徑之投藥形式投與。

非經腸投藥可繞過吸收步驟(例如靜脈內、動脈內、心內、脊椎內或腰內)或包括吸收(例如肌肉內、皮下、皮內、經皮或腹膜內)。適於非經腸投藥之投藥形式包括呈溶液、懸浮液、乳液或凍乾物形式之注射及輸注用製劑。較佳為非經腸投藥，尤其靜脈內投藥。

通常，已發現在非經腸投藥之情況下，每公斤體重約0.001至1 mg，較佳每公斤體重約0.01至0.5 mg之投藥量可有利地實現有效結果。

然而，在一些情況下，可能需要偏離所述量，尤其根據體重、投藥途徑、對活性成分之個別反應、製劑性質及投藥進行時間或間隔時間而變化。因此，在一些情況下，小於上述最小量可為足夠的，而在其他情況下必須超過所提及之上限。在較大量之投藥之情況下，將其分成在一天中之若干個別劑量可為可取的。

實例

以下實例說明本發明。本發明不限於該等實例。

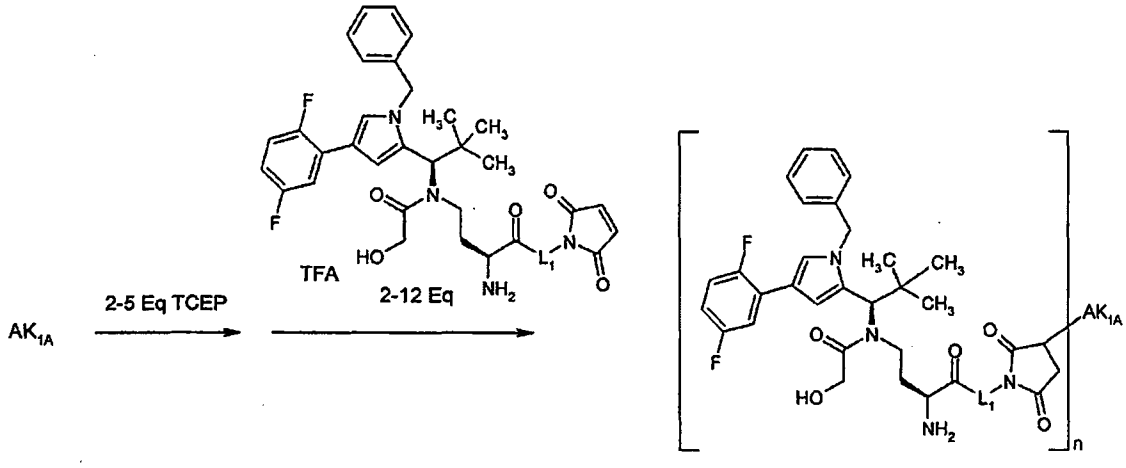
除非另外說明，否則在以下測試及實例中，百分比為重量百分比；份為重量份。液體/液體溶液之溶劑比、稀釋比及濃度資料在各種情況下以體積計。

若在實驗之描述中，未陳述反應進行之溫度，則可假定為室溫。

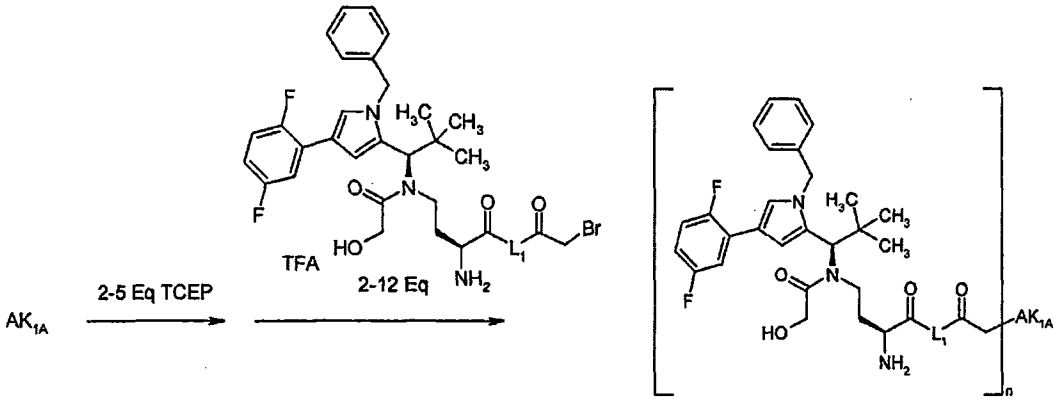
合成途徑：

為舉例說明實施例，下文流程展示產生實施例之例示性合成途徑：

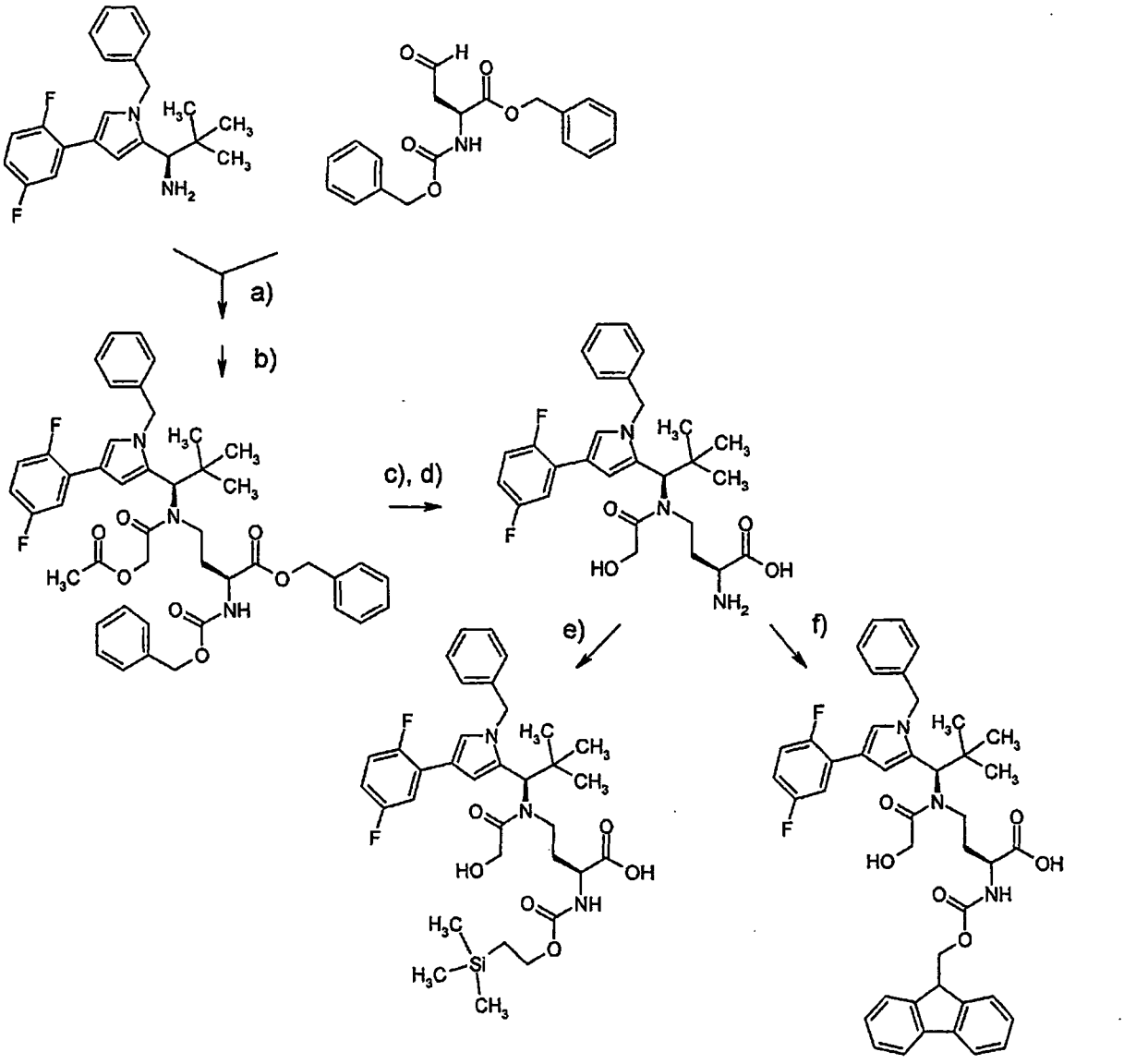
流程20：合成經半胱胺酸連接之ADC



流程21：合成經半胱胺酸連接之ADC

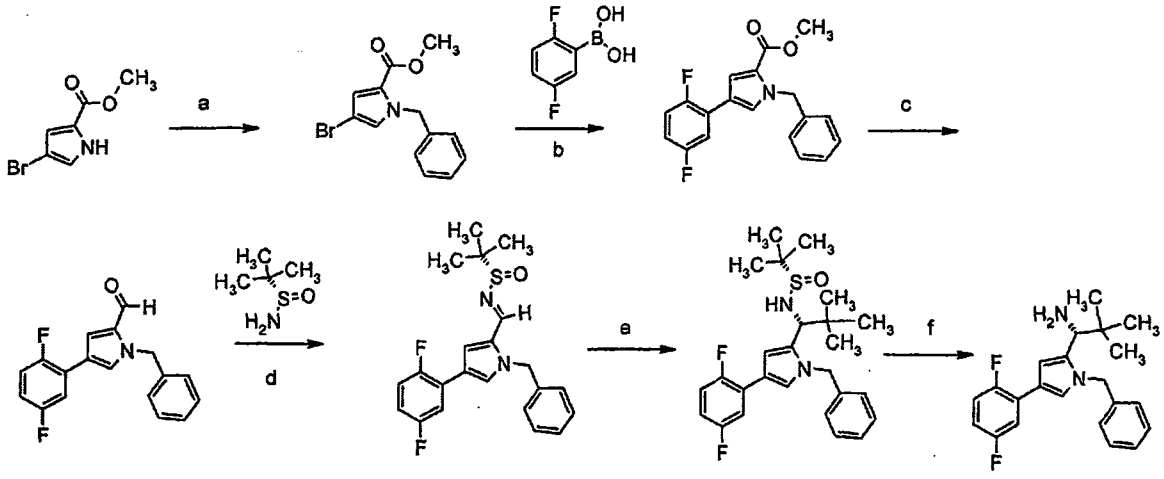


流程22



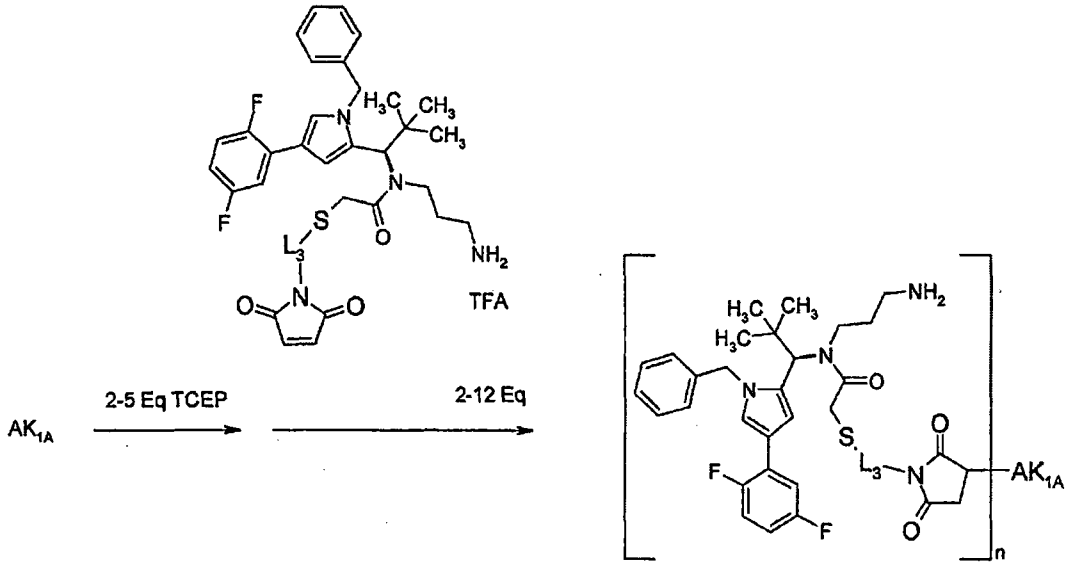
[a)：例如三乙醯氧基硼氫化鈉，乙酸，DCM，室溫；b)例如乙醯氧基乙醯氯，NEt3，DCM，室溫；c)例如LiOH，THF/水，室溫；d)例如H_2，Pd-C，EtOH，室溫；e)例如Teoc-OSu，NEt3，二噁烷，室溫；f)例如Fmoc-Cl，二異丙基乙胺，二噁烷/水2:1，室溫]

流程24



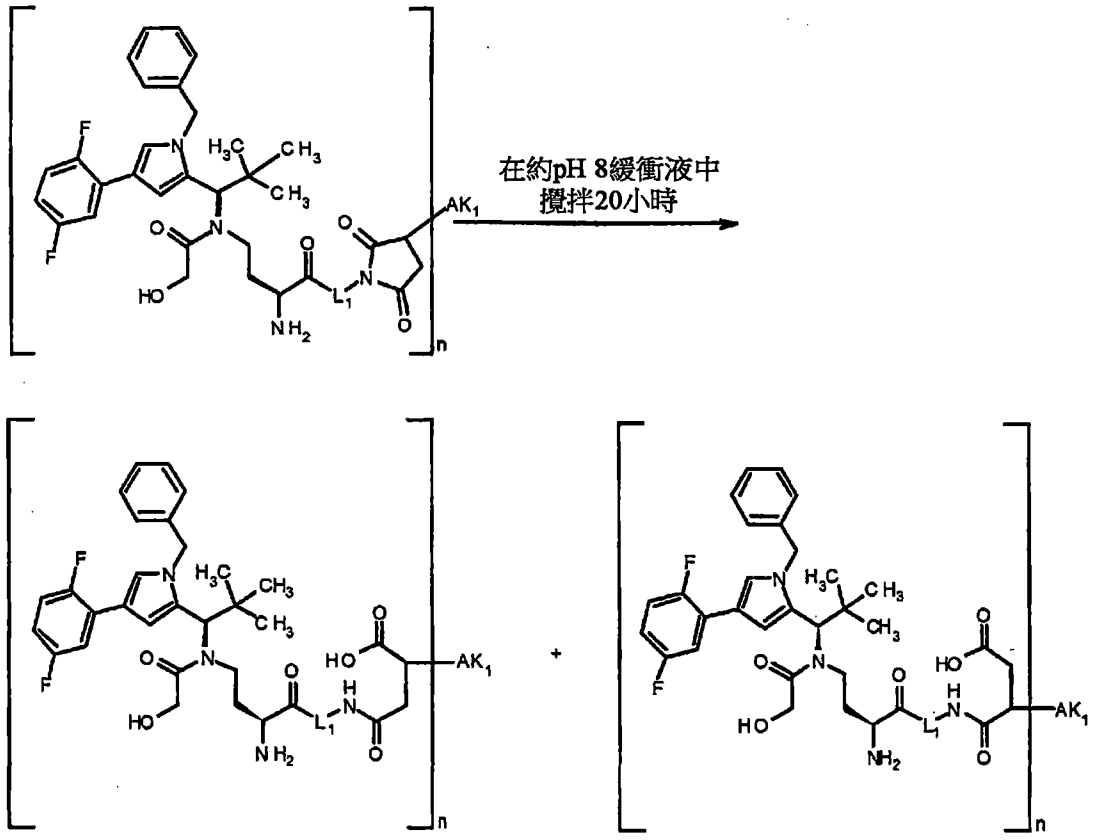
[a)：例如苯甲基溴，Cs_2CO_3，DMF，室溫；b)例如$Pd(dppf)_2Cl_2$，DMF，Na_2CO_3，85℃；c)例如$LiAlH_4$，THF，0℃；MnO_2，DCM，室溫；d)例如$Ti(iOPr)_4$，THF，室溫；e)例如tBuLi，THF，-78℃；MeOH，NH_4Cl；f)例如HCl/1,4-二噁烷]

流程25：合成經半胱胺酸連接之ADC

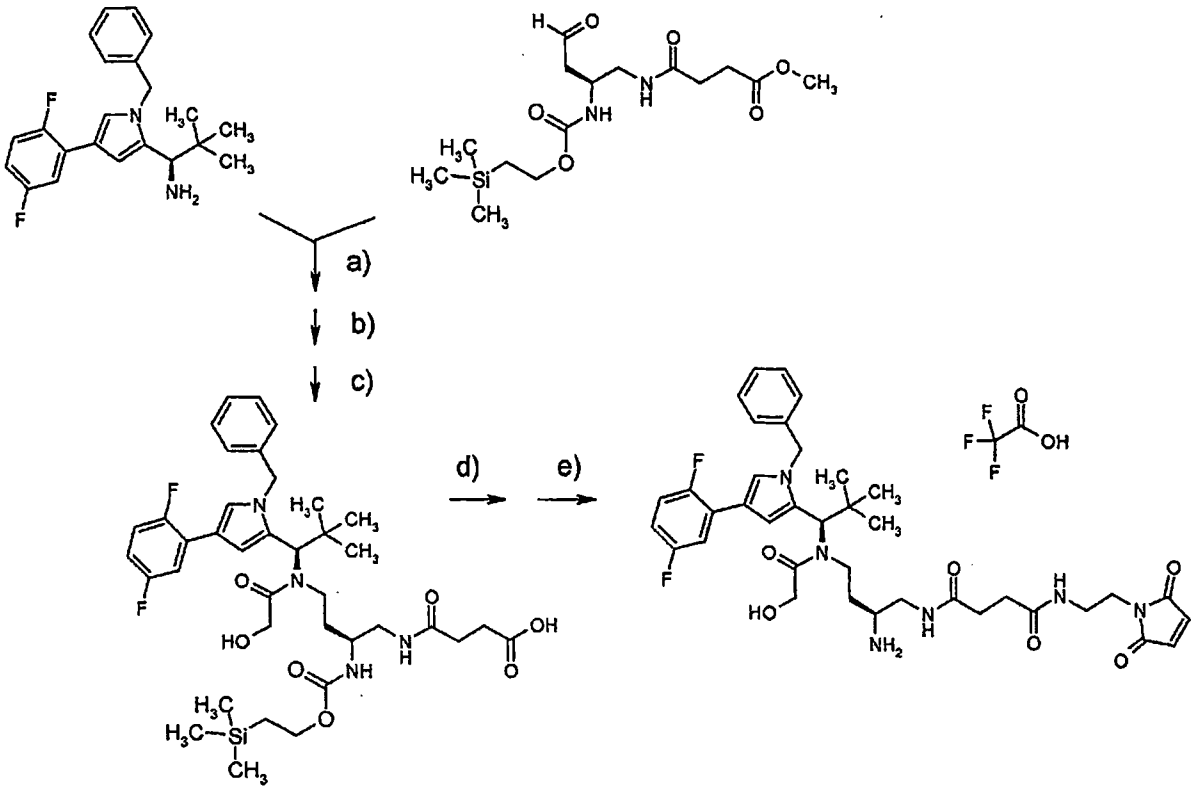


流程26：經由丁二醯胺水解來合成經半胱胺酸連接之ADC

此製程尤其用於其中L1=CH_2之ADC，以將此等ADC轉化成開鏈連接形式。

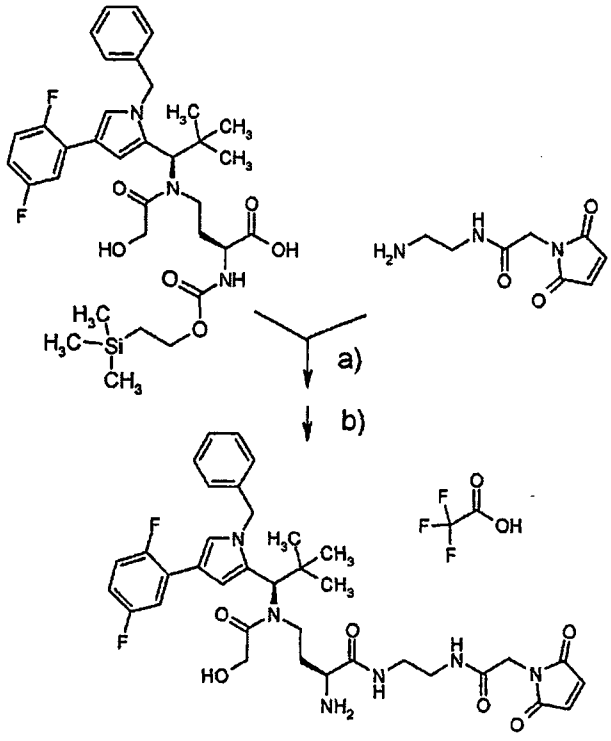


流程27：



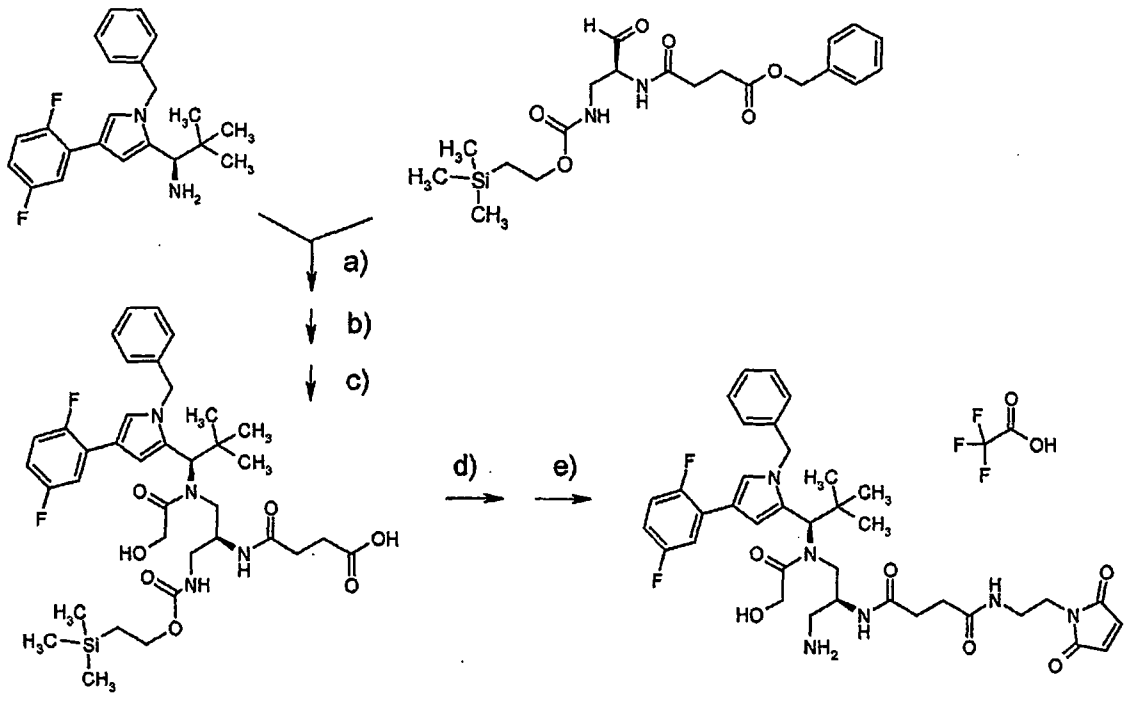
[a)：三乙醯氧基硼氫化鈉，乙酸，DCM，室溫；b)乙醯氧基乙醯氯，二異丙基乙胺，DCM，室溫；c) LiOH，MeOH，室溫；d)三氟乙酸/1-(2-胺基乙基)-1H-吡咯-2,5-二酮(1:1)，HATU，DMF，二異丙基乙胺，室溫；e)氯化鋅，三氟乙醇，50℃，EDTA]

流程28：



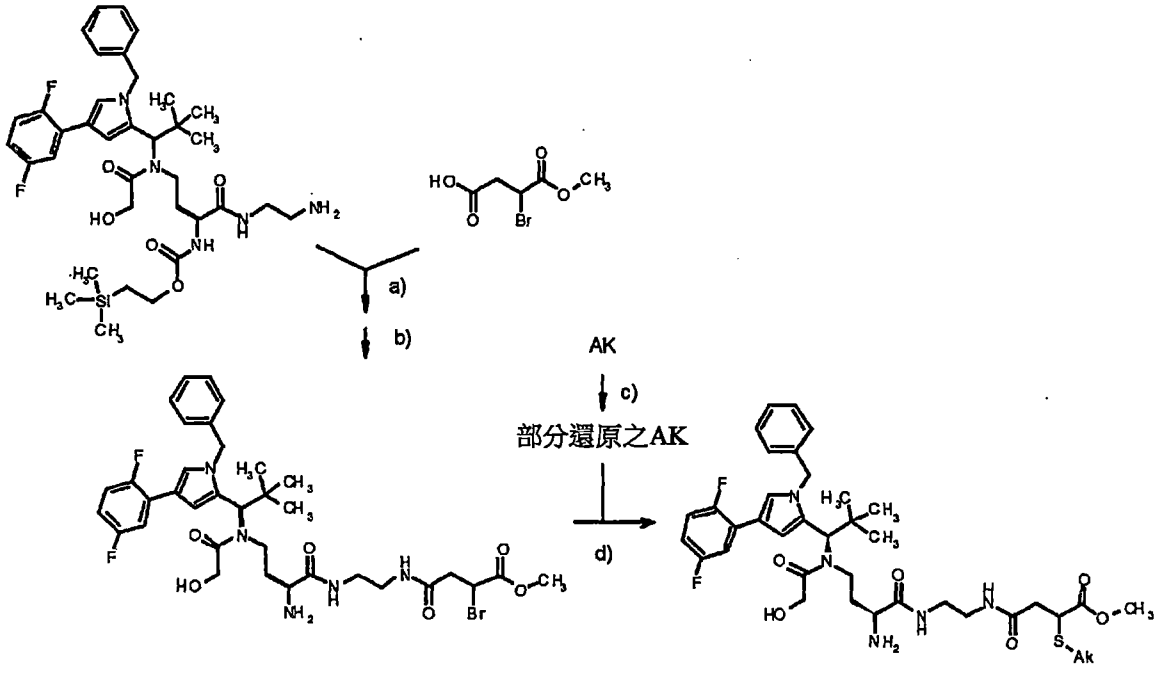
[a)：HATU，DMF，二異丙基乙胺，室溫；b)氯化鋅，三氟乙醇，50℃，EDTA]

流程29：



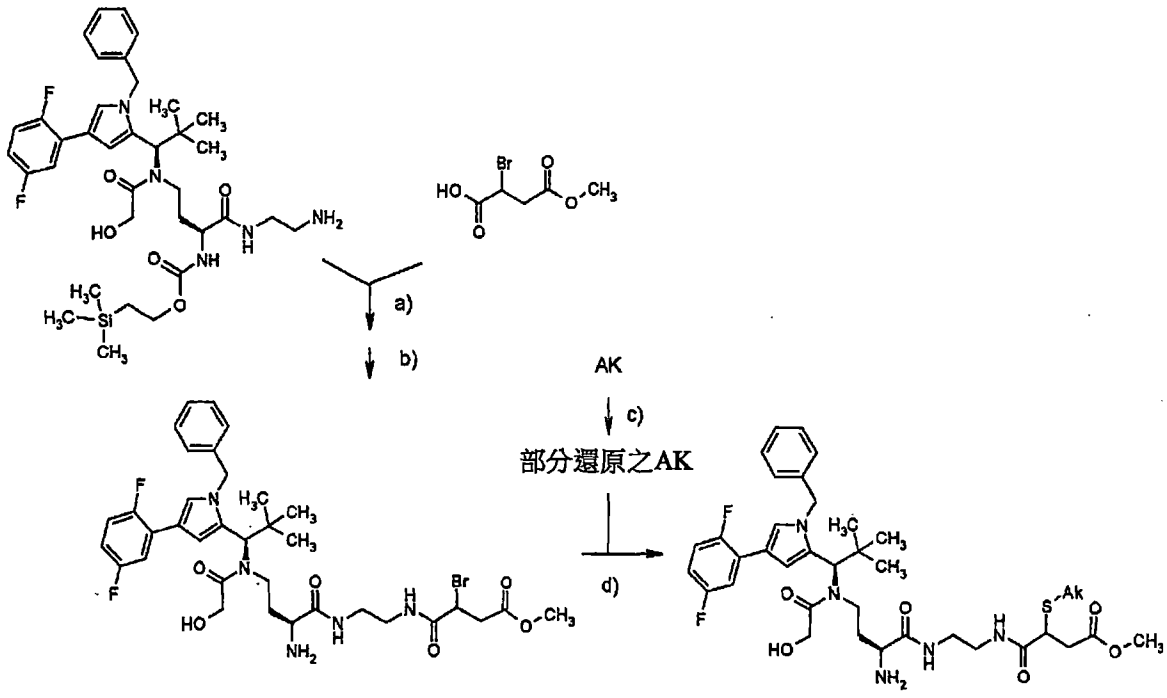
[a)：三乙醯氧基硼氫化鈉，乙酸，DCM，室溫；b)乙醯氧基乙醯氯，三乙胺，DCM，室溫；c) LiOH，MeOH，室溫；d)三氟乙酸/1-(2-胺基乙基)-1H-吡咯-2,5-二酮(1:1)，HATU，DMF，二異丙基乙胺，室溫；e)氯化鋅，三氟乙醇，50℃，EDTA]

流程30：



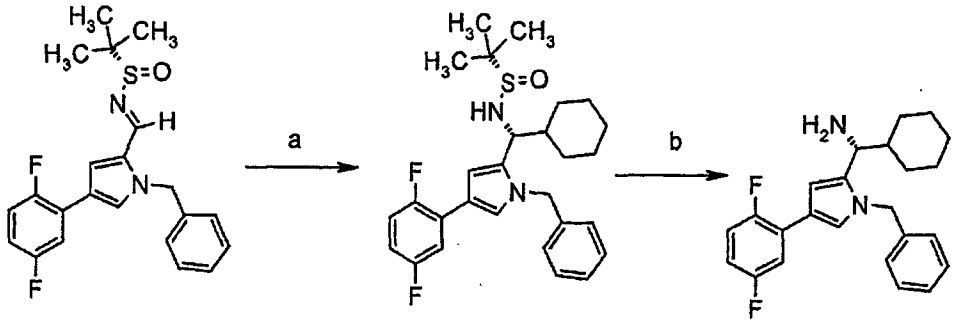
[a)：四氟硼酸2-溴-1-乙基吡錠(BEP)，DCM，吡啶，室溫；b)氯化鋅，三氟乙醇，50℃，EDTA；c) 3-4當量之TCEP，PBS緩衝液；d) PBS緩衝液，20小時，室溫]

流程31：



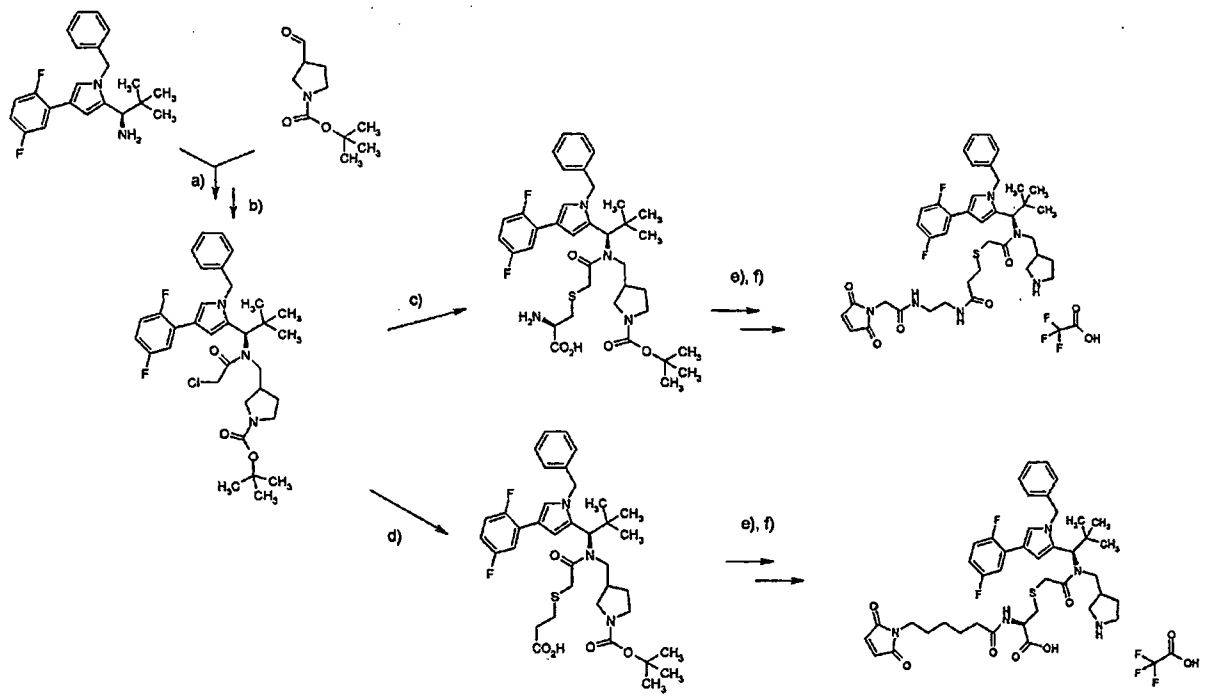
[a)：四氟硼酸2-溴-1-乙基吡錠(BEP)，DCM，吡啶，室溫；b)氯化鋅，三氟乙醇，50℃，EDTA；c) 3-4當量之TCEP，PBS緩衝液；d) PBS緩衝液，20小時，室溫]

流程32：



[a)例如二甲基鋅，環己基MgCl，THF，-78℃；NH_4Cl；b)例如HCl/1,4-二噁烷]

流程33：



[a)：三乙醯氧基硼氫化鈉，乙酸，DCM，室溫；b)乙醯氧基乙醯氯，三乙胺，DCM，室溫；c) L-半胱胺酸，$NaHCO_3$，DBU，異丙醇/水，室溫；d) 3-硫基丙酸，K_2CO_3，室溫；e)連接子，HATU，DMF，二異丙基乙胺，室溫；e)氯化鋅，三氟乙醇，50℃，EDTA]

A. 實例

縮寫及首字母縮寫：

A431NS	人類腫瘤細胞株
A549	人類腫瘤細胞株
A498	人類腫瘤細胞株
ABCB1	ATP結合卡匣子家族B成員1 (同義詞為P-gp及MDR1)
abs.	無水
Ac	乙醯基
ACN	乙腈
aq.	水性，水溶液
ATP	三磷酸腺苷
BCRP	乳癌抗性蛋白質，一種流出轉運蛋白
BEP	四氟硼酸2-溴-1-乙基吡錠
Boc	第三丁氧基羰基
br.	寬峰(NMR中)
Ex.	實例
CI	化學電離(MS中)
d	二重峰(NMR中)

d	天
TLC	薄層層析法
DCI	直接化學電離(MS中)
dd	雙二重峰(NMR中)
DMAP	4-*N*,*N*-二甲基胺基吡啶
DME	1,2-二甲氧基乙烷
DMEM	杜爾貝科氏修飾之伊格爾氏培養基(細胞培養用之標準化培養基)
DMF	*N*,*N*-二甲基甲醯胺
DMSO	二甲亞碸
DPBS, D-PBS, PBS	杜爾貝科氏磷酸鹽緩衝鹽溶液 PBS = DPBS = D-PBS，pH 7.4，來自Sigma，編號D8537 組成： 0.2 g KCl 0.2 g KH_2PO_4 (無水) 8.0 g NaCl 1.15 g Na_2HPO_4 (無水) 用H_2O補足1 l
dt	雙三重峰(NMR中)
DTT	DL-二硫蘇糖醇
EDC	*N'*-(3-二甲基胺基丙基)-*N*-乙基碳化二亞胺鹽酸鹽
EGFR	表皮生長因子受體
EI	電子撞擊電離(MS中)
ELISA	酶聯免疫吸附分析
eq.	當量
ESI	電噴霧電離(MS中)
ESI-MicroTofq	**ESI**-MicroTofq (質譜儀名稱，其中Tof=飛行時間且q=四偶極)
FCS	胎牛血清
Fmoc	(9*H*-芴-9-基甲氧基)羰基
sat.	飽和
GTP	鳥苷-5'-三磷酸
h	小時
HATU	六氟磷酸*O*-(7-氮雜苯并三唑-1-基)-*N*,*N*,*N'*,*N'*-四甲脲
HCT-116	人類腫瘤細胞株
HEPES	4-(2-羥乙基)哌嗪-1-乙烷磺酸
HOAc	乙酸
HOAt	1-羥基-7-氮雜苯并三唑
HOBt	水合1-羥基-1*H*-苯并三唑
HOSu	*N*-羥基丁二醯亞胺
HPLC	高壓高效液相層析
HT29	人類腫瘤細胞株
IC_{50}	半最大抑制濃度
i.m.	肌肉內，投與肌肉中
i.v.	靜脈內，投與靜脈中
濃	濃縮

LC-MS	液相層析耦聯之質譜分析
LLC-PK1細胞	路易斯肺癌豬腎細胞株
L-MDR	經人類MDR1轉染之LLC-PK1細胞
m	多重峰(NMR中)
Me	甲基
MDR1	多藥抗性蛋白1
MeCN	乙腈
min	分鐘
MS	質譜分析
MTT	溴化3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基-2*H*-四唑鎓3
NCI-H292	人類腫瘤細胞株
NCI-H520	人類腫瘤細胞株
NMM	*N*-甲基嗎啉
NMP	*N*-甲基-2-吡咯啶酮
NMR	核磁共振光譜法
NMRI	來源於海軍醫學研究所(Naval Medical Research Institute；NMRI)之小鼠品系
裸小鼠	裸小鼠(實驗動物)
NSCLC	非小細胞肺癌
PBS	磷酸鹽緩衝鹽溶液
Pd/C	鈀/活性碳
P-gp	P-糖蛋白，一種轉運蛋白
PNGaseF	用於裂解糖之酶
定量	定量(產率)
四重峰	四重峰(NMR中)
五重峰	五重峰(NMR中)
R_f	滯留指數(TLC中)
RT	室溫
R_t	滯留時間(HPLC中)
s	單峰(NMR中)
s.c.	皮下，在皮膚下投與
SCC-4	人類腫瘤細胞株
SCC-9	人類腫瘤細胞株
SCID小鼠	患有重度組合型免疫缺乏之測試小鼠
t	三重峰(NMR中)
TBAF	氟化四正丁基銨
TEMPO	(2,2,6,6-四甲基哌啶-1-基)氧基
tert	第三
TFA	三氟乙酸
THF	四氫呋喃
T3P®	2,4,6-三丙基-1,3,5,2,4,6-三氧雜三磷雜環己烷2,4,6-三氧化物
UV	紫外光光譜法
v/v	(溶液)體積比
Z	苯甲氧基羰基
786-O	人類腫瘤細胞株

HPLC及LC-MS方法：

方法1 (LC-MS)：

儀器：Waters ACQUITY SQD UPLC系統；管柱：Waters Acquity UPLC HSS T3 1.8 μ 50×1 mm；移動相A：1 l水 + 0.25 ml 99%濃度甲酸，移動相B：1 l乙腈 + 0.25 ml 99%濃度甲酸；梯度：0.0 min 90% A → 1.2 min 5% A → 2.0 min 5% A烘箱：50℃；流動速率：0.40 ml/min；UV偵測：208-400 nm。

方法2 (LC-MS)：

MS儀器類型：Waters Synapt G2S；UPLC儀器類型：Waters Acquity I-CLASS；管柱：Waters，BEH300，2.1×150 mm，C18 1.7 μm；移動相A：1 l水 + 0.01%甲酸；移動相B：1 l乙腈 + 0.01%甲酸；梯度：0.0 min 2% B → 1.5 min 2% B → 8.5 min 95% B → 10.0 min 95% B；烘箱：50℃；流動速率：0.50 ml/min；UV偵測：220 nm

方法3 (LC-MS)：

MS儀器：Waters (Micromass) QM；HPLC儀器：Agilent 1100系列；管柱：Agilent ZORBAX Extend-C18 3.0×50 mm 3.5微米；移動相A：1 l水 + 0.01 mol碳酸銨，移動相B：1 l乙腈；梯度：0.0 min 98% A → 0.2 min 98% A → 3.0 min 5% A→ 4.5 min 5% A；烘箱：40℃；流動速率：1.75 ml/min；UV偵測：210 nm

方法4 (LC-MS)：

MS儀器類型：Waters Synapt G2S；UPLC儀器類型：Waters Acquity I-CLASS；管柱：Waters，HSST3，2.1×50 mm，C18 1.8 μm；移動相A：1 l水 + 0.01%甲酸；移動相B：1 l乙腈 + 0.01%甲酸；梯度：0.0 min 10% B → 0.3 min 10% B → 1.7 min 95% B → 2.5 min 95% B；烘箱：50℃；流動速率：1.20 ml/min；UV偵測：210 nm

方法5 (LC-MS)：

儀器：Waters ACQUITY SQD UPLC系統；管柱：Waters Acquity UPLC HSS T3 1.8 μ 50×1 mm；移動相A：1 l水 + 0.25 ml 99%濃度甲酸 ，移動相B：1 l乙腈 + 0.25 ml 99%濃度甲酸；梯度：0.0 min 95% A → 6.0 min 5% A → 7.5 min 5% A烘箱：50℃；流動速率：0.35 ml/min；UV偵測：210 - 400 nm。

方法6 (LC-MS)：

儀器：Micromass Quattro Premier與Waters UPLC Acquity；管柱：Thermo Hypersil GOLD 1.9 μ 50×1 mm；移動相A：1 l水 + 0.5 ml 50%濃度甲酸，移動相B：1 l乙腈 + 0.5 ml 50%濃度甲酸；梯度：0.0 min 97% A → 0.5 min 97% A → 3.2 min 5% A → 4.0 min 5% A烘箱：50℃；流動速率：0.3 ml/min；UV偵測：210 nm。

方法7 (LC-MS)：

儀器：Agilent MS Quad 6150；HPLC：Agilent 1290；管柱：Waters Acquity UPLC HSS T3 1.8 μ 50×2.1 mm；移動相A：1 l水 + 0.25 ml 99%濃度甲酸 ，移動相B：1 l乙腈 + 0.25 ml 99%濃度甲酸；梯度：0.0 min 90% A → 0.3 min 90% A → 1.7 min 5% A → 3.0 min 5% A烘箱：50℃；流動速率：1.20 ml/min；UV偵測：205-305 nm。

方法8 (LC-MS)：

MS儀器類型：Waters Synapt G2S；UPLC儀器類型：Waters Acquity I-CLASS；管柱：Waters，HSST3，2.1×50 mm，C18 1.8 μm；移動相A：1 l水 + 0.01%甲酸；移動相B：1 l乙腈 + 0.01%甲酸；梯度：0.0 min 2% B → 2.0 min 2% B → 13.0 min 90% B → 15.0 min 90% B；烘箱：50℃；流動速率：1.20 ml/min；UV偵測：210 nm

方法9：實例181-191之LC-MS-Prep純化方法(方法LIND-LC-MS-Prep)

MS儀器：Waters，HPLC儀器：Waters (管柱Waters X-Bridge C18，19 mm×50 mm，5 μm，移動相A：水 + 0.05%氨，移動相B：具

有梯度之乙腈(ULC)；流動速率：40 ml/min；UV偵測：DAD；210 - 400 nm)。

或：

MS儀器：Waters，HPLC儀器：Waters (管柱Phenomenex Luna 5μ C18(2) 100A，AXIA Tech. 50×21.2 mm，移動相A：水 + 0.05%甲酸，移動相B：具有梯度之乙腈(ULC)；流動速率：40 ml/min；UV偵測：DAD；210-400 nm)。

方法10：實例181-191之LC-MS分析方法(LIND_SQD_SB_AQ)

MS儀器：Waters SQD；儀器HPLC：Waters UPLC；管柱：Zorbax SB-Aq (Agilent)，50 mm×2.1 mm，1.8 μm；移動相A：水 + 0.025%甲酸，移動相B：乙腈(ULC) + 0.025%甲酸；梯度：0.0 min 98%A - 0.9 min 25%A - 1.0 min 5%A - 1.4 min 5%A - 1.41 min 98%A - 1.5 min 98%A；烘箱：40℃；流動速率：0.600 ml/min；UV偵測：DAD；210 nm。

方法11 (HPLC)：

儀器：HP1100系列

管柱：Merck Chromolith SpeedROD RP-18e, 50-4.6 mm，目錄號1.51450.0001，預管柱Chromolith Guard Cartridge Kit, RP-18e，

5-4.6 mm，目錄號1.51470.0001

梯度：流動速率5 ml/min

注射體積5 μl

溶劑A：含HClO4 (70%濃度)之水 (4 ml/l)

溶劑B：乙腈

起始20% B

0.50 min 20% B

3.00 min 90% B

3.50 min 90% B

3.51 min 20% B

4.00 min 20% B

管柱溫度：40℃

波長：210 nm

方法12 (LC-MS MCW-FT-MS-M1)

MS儀器類型：Thermo Scientific FT-MS；UHPLC+儀器類型：Thermo Scientific UltiMate 3000；管柱：Waters，HSST3，2.1×75 mm，C18 1.8 μm；移動相A：1 l水 + 0.01%甲酸；移動相B：1 l乙腈 + 0.01%甲酸；梯度：0.0 min 10% B → 2.5 min 95% B → 3.5 min 95% B；烘箱：50℃；流動速率：0.90 ml/min；UV偵測：210 nm/最佳整合路徑210-300 nm

方法13: (MCW-QM-BAS1)

MS儀器：Waters (Micromass) Quattro Micro；儀器Waters UPLC Acquity；管柱：Waters BEH C18 1.7 μ 50×2.1 mm；移動相A：1 l水 + 0.01 mol甲酸銨，移動相B：1 l乙腈；梯度：0.0 min 95% A → 0.1 min 95% A → 2.0 min 15% A → 2.5 min 15% A→ 2.51 min 10% A → 3.0 min 10% A；烘箱：40℃；流動速率：0.5 ml/min；UV偵測：210 nm

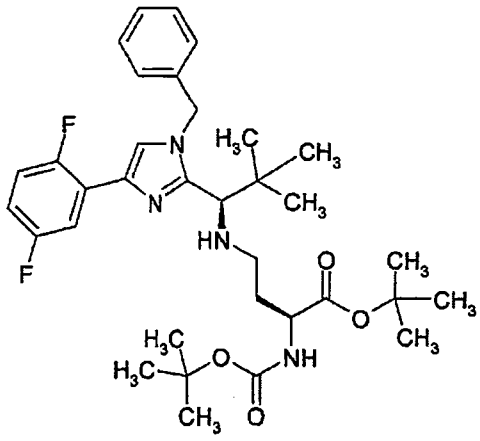
製備在下文中未明確描述之所有反應物或試劑均自通常可獲得之來源購得。對於製備同樣在下文中未描述且在商業上不可獲得或其來源通常不可獲得之所有其他反應物或試劑而言，參考描述有其製備之公開文獻。

起始物質及中間物：

中間物C2

第三丁基-(2S)-4-({(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-咪唑-

2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基)-2-[(第三丁氧羰基)胺基]丁酸酯



使4.22 g (14.5 mmol) N-(第三丁氧羰基)-L-高絲胺酸第三丁酯溶於180 ml二氯甲烷中，且接著添加3.5 ml吡啶及9.2 g (21.7 mmol) 1,1,1-三乙醯氧基-1λ^5,2-苯并氧雜環戊-3(1H)-酮。將混合物在室溫下攪拌1小時且接著用500 ml二氯甲烷稀釋，且用10%濃度硫代硫酸鈉溶液萃取兩次且接著連續用5%濃度檸檬酸萃取兩次及用10%濃度碳酸氫鈉溶液萃取兩次。分離出有機相，經硫酸鎂乾燥且接著在減壓下濃縮。使殘餘物溶解於DCM中，且添加乙醚與正戊烷之混合物。濾出沈澱且接著濃縮濾液且自乙腈/水凍乾。此得到3.7 g (93%) (2S)-2-[(第三丁氧羰基)胺基]-4-側氧基丁酸第三丁酯，其未經進一步純化即用於下一步。(R_f值：0.5 (DCM/甲醇95/5)。

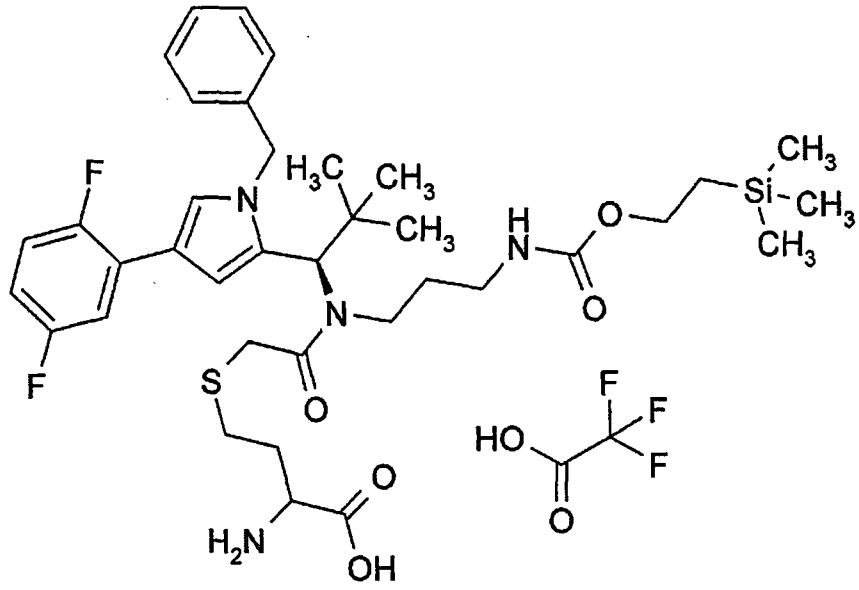
使3.5 g (9.85 mmol)中間物C1溶於160 ml DCM中，且添加3.13 g (14.77 mmol)三乙醯氧基硼氫化鈉及0.7 ml乙酸。在室溫下攪拌5分鐘後，添加3.23 g (11.85 mmol) (2S)-2-[(第三丁氧羰基)胺基]-4-側氧基丁酸第三丁酯且將混合物在室溫下再攪拌30分鐘。接著在減壓下蒸發溶劑且使殘餘物溶解於乙腈/水中。濾出沈澱固體且乾燥，得到5.46 g (84%)標題化合物。

HPLC (方法11): R_t = 2.5 min；

LC-MS (方法1): R_t = 1.13 min；MS (ESIpos): m/z = 613 $(M+H)^+$。

中間物C11

R/S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-高半胱胺酸/三氟乙酸鹽(1:1)



990.0 mg (2.79 mmol) (1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙-1-胺最初饋入15.0 ml二氯甲烷中，且添加828.8 mg (3.91 mmol)三乙醯氧基硼氫化鈉及129.9 mg (3.21 mmol)乙酸，且將混合物在室溫下攪拌5分鐘。添加溶於15.0 ml二氯甲烷中之698.1 mg (3.21 mmol) (3-側氧基丙基)胺基甲酸2-(三甲基矽烷基)乙酯(中間物L58)，且將反應混合物在室溫下攪拌隔夜。反應混合物用乙酸乙酯稀釋且在各種情況下有機相用飽和碳酸鈉溶液及飽和NaCl溶液洗滌兩次。有機相經硫酸鎂乾燥且在減壓下蒸發溶劑。殘餘物在矽膠上(移動相：二氯甲烷/甲醇= 100:2)純化。在減壓下蒸發溶劑且殘餘物在高真空下乾燥。此得到1.25 g (理論之73%)化合物[3-({(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基)丙基]胺基甲酸2-(三甲基矽烷基)乙酯。

LC-MS (方法1): R_t = 1.09 min；MS (ESIpos): m/z = 556 $(M+H)^+$。

將151.4 mg (1.5 mmol)三乙胺及161.6 mg (1.43 mmol)氯乙醯基氯添加至400.0 mg (0.65 mmol) [3-({(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基)丙基]胺基甲酸2-(三甲基矽烷基)乙酯。將反應混合物在室溫下攪拌隔夜。將乙酸乙酯添加至反應混合物且有機相用水洗滌三次且用飽和NaCl溶液洗滌一次。有機相經硫酸鎂乾燥且在減壓下蒸發溶劑。殘餘物藉由矽膠層析法(移動相：環己烷/乙酸乙酯= 3:1)純化。在減壓下蒸發溶劑且殘餘物在高真空下乾燥。此得到254.4 mg (理論之57%)化合物{3-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(氯乙醯基)胺基]丙基}胺基甲酸2-(三甲基矽烷基)乙酯。

LC-MS (方法1): R_t = 1.49 min；MS (ESIneg): m/z = 676 $(M+HCOO^-)^-$。

使117.4 mg (0.19 mmol) {3-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(氯乙醯基)胺基]丙基}胺基甲酸2-(三甲基矽烷基)乙酯溶於10.0 ml異丙醇中，且添加928.4 µl 1M NaOH及50.2 mg (0.37 mmol) DL-高半胱胺酸。將反應混合物在50℃下攪拌4.5小時。將乙酸乙酯添加至反應混合物且有機相用飽和碳酸氫鈉溶液及飽和NaCl溶液洗滌。有機相經硫酸鎂乾燥且在減壓下蒸發溶劑。殘餘物藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×40；10 µ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且殘餘物在高真空下乾燥。此得到75.3 mg (理論之48%)標題化合物。

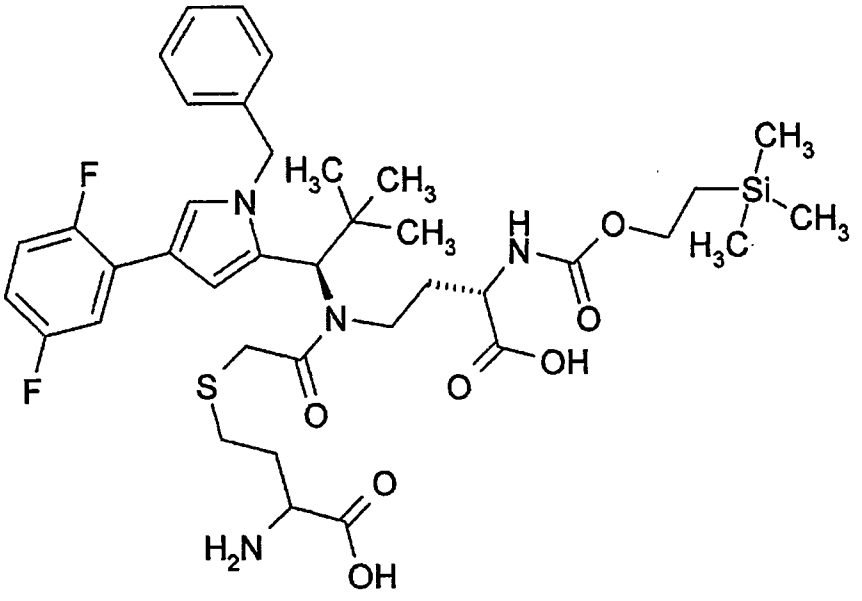
LC-MS (方法1): R_t = 1.24 min；MS (ESIpos): m/z = 731 $(M+H)^+$。

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 0.03 (s, 9H), 0.40 (m, 1H), 0.75-0.91 (m, 11H), 1.30 (m, 1H), 1.99-2.23 (m, 2H), 2.63-2.88 (m, 4H), 3.18-3.61 (m, 5H), 3.79-4.10 (m, 3H), 4.89 (d, 1H), 4.89 (d, 1H),

5.16 (d, 1H), 5.56 (s, 1H), 6.82 (m, 1H), 6.91 (s, 1H), 6.97 (m, 1H), 7.13-7.38 (m, 6H), 7.49 (s, 1H), 7.63 (m, 1H), 8.26 (s, 3H)。

中間物C12

R/S-[(8S)-11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-8-羧基-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基]高半胱胺酸

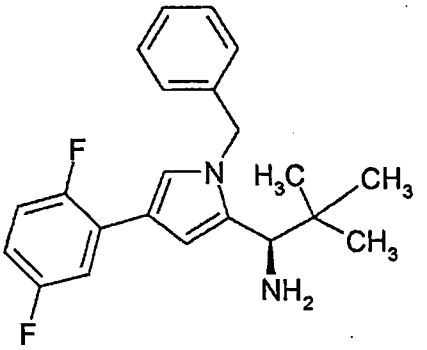


該合成類似於中間物C11之合成，使用(2S)-4-側氧基-2-({[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}胺基)丁酸甲酯(中間物L57)及中間物C52作為起始物質進行。

LC-MS (方法1): R_t = 1.18 min；MS (ESIpos): m/z = 775 $(M+H)^+$。

中間物C52

(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙-1-胺



10.00 g (49.01 mmol) 4-溴-1H-吡咯-2-甲酸甲酯最初饋入100.0 ml DMF，且添加20.76 g (63.72 mmol)碳酸銫及9.22 g (53.91 mmol)苯甲基溴。將反應混合物在室溫下攪拌隔夜。反應混合物分配於水與乙酸乙酯之間且水相用乙酸乙酯萃取。合併之有機相經硫酸鎂乾燥且在減壓下蒸發溶劑。用90.0 g 4-溴-1H-吡咯-2-甲酸甲酯重複反應。

兩個合併之反應物藉由製備型RP-HPLC (管柱：Daiso 300×100；10 μ，流動速率：250 ml/min，MeCN/水)純化。在減壓下蒸發溶劑且殘餘物在高真空下乾燥。此得到125.15 g (理論之87%)化合物1-苯甲基-4-溴-1H-吡咯-2-甲酸甲酯。

LC-MS (方法1): R_t = 1.18 min；MS (ESIpos): m/z = 295 $[M+H]^+$。

在氬氣下，4.80 g (16.32 mmol) 1-苯甲基-4-溴-1H-吡咯-2-甲酸甲酯最初饋入DMF，且添加3.61 g (22.85 mmol) (2,5-二氟苯基)硼酸、19.20 ml飽和碳酸鈉溶液及1.33 g (1.63 mmol) [1,1'-雙(二苯基膦基)二茂鐵]-二氯鈀(II):二氯甲烷。將反應混合物在85℃下攪拌隔夜。反應混合物經矽藻土過濾且濾餅用乙酸乙酯洗滌。有機相用水萃取且接著用飽和NaCl溶液洗滌。有機相經硫酸鎂乾燥且在減壓下蒸發溶劑。殘餘物藉由矽膠層析法(移動相：環己烷/乙酸乙酯100:3)純化。在減壓下蒸發溶劑且殘餘物在高真空下乾燥。此得到3.60 g (理論之67%)化合物1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-甲酸甲酯。

LC-MS (方法7): R_t = 1.59 min；MS (ESIpos): m/z = 328 $[M+H]^+$。

3.60 g (11.00 mmol) 1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-甲酸甲酯最初饋入90.0 ml THF，且在0℃下添加1.04 g (27.50 mmol)氫化鋰鋁(2.4 M THF溶液)。將反應混合物在0℃下攪拌30分鐘。在0℃下，添加飽和酒石酸鉀鈉溶液，且乙酸乙酯添加至反應混合物。有機

相用飽和酒石酸鉀鈉溶液萃取三次。有機相用飽和NaCl溶液洗滌一次且經硫酸鎂乾燥。在減壓下蒸發溶劑且殘餘物溶於30.0 ml二氯甲烷中。添加3.38 g (32.99 mmol)氧化錳(IV)，且將混合物在室溫下攪拌48小時。添加另外2.20 g (21.47 mmol)氧化錳(IV)，且將混合物在室溫下攪拌隔夜。反應混合物經矽藻土過濾且濾餅用二氯甲烷洗滌。在減壓下蒸發溶劑且殘餘物2.80 g (1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-甲醛)未經進一步純化即用於合成下一步。

LC-MS (方法7): R_t = 1.48 min ; MS (ESIpos): m/z = 298 $[M+H]^+$。

28.21 g (94.88 mmol) 1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-甲醛與23.00 g (189.77 mmol) (R)-2-甲基丙烷-2-亞磺醯胺一起最初饋入403.0 ml無水THF中，且添加67.42 g (237.21 mmol)異丙醇鈦(IV)且將混合物在室溫下攪拌隔夜。添加500.0 ml飽和NaCl溶液及1000.0 ml乙酸乙酯，且將混合物在室溫下攪拌1小時。混合物經矽藻土過濾且濾液用飽和NaCl溶液洗滌兩次。有機相經硫酸鎂乾燥，在減壓下蒸發溶劑且殘餘物使用Biotage Isolera (矽膠，管柱1500+340 g SNAP，流動速率200 ml/min，乙酸乙酯/環己烷1:10)純化。

LC-MS (方法7): R_t = 1.63 min ; MS (ESIpos): m/z = 401 $[M+H]^+$。

在氬氣下25.00 g (62.42 mmol) (R)-N-{(E/Z)-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]亞甲基}-2-甲基丙烷-2-亞磺醯胺最初饋入無水THF中且冷卻至-78℃。接著在-78℃下添加12.00 g (187.27 mmol)第三丁基鋰(1.7 M戊烷溶液)且將混合物在此溫度下攪拌3小時。在-78℃下，接著連續添加71.4 ml甲醇及214.3 ml飽和氯化銨溶液，且使反應混合物升溫至室溫且在室溫下攪拌1小時。將混合物用乙酸乙酯稀釋且用水洗滌。有機相經硫酸鎂乾燥且在減壓下蒸發溶劑。殘餘物(R)-

N-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2-甲基丙烷-2-亞磺醯胺未經進一步純化即用於合成下一步。

LC-MS (方法6): R_t = 2.97 min ; MS (ESIpos): m/z = 459 $[M+H]^+$。

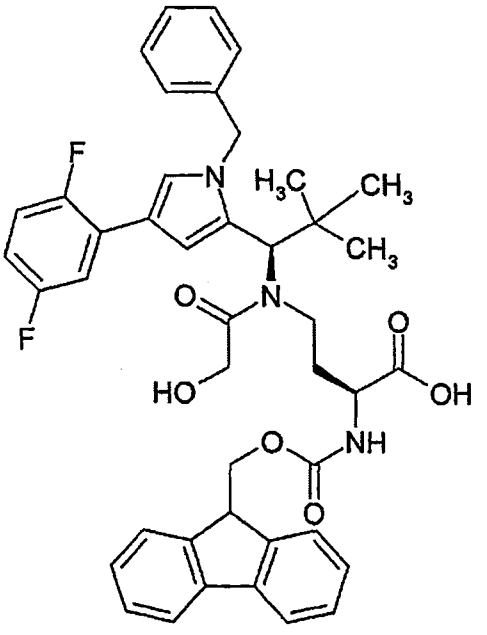
28.00 g (61.05 mmol) (R)-N-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2-甲基丙烷-2-亞磺醯胺最初饋入186.7 ml 1,4-二噁烷中，且接著添加45.8 ml HCl之1,4-二噁烷溶液(4.0 M)。將反應混合物在室溫下攪拌2小時且在減壓下蒸發溶劑。殘餘物藉由製備型RP-HPLC (管柱：Kinetix 100×30；流動速率：60 ml/min，MeCN/水)純化。在減壓下蒸發乙腈且將二氯甲烷添加至水性殘餘物。有機相用碳酸氫鈉溶液洗滌且經硫酸鎂乾燥。在減壓下蒸發溶劑且殘餘物在高真空下乾燥。此得到16.2 g (理論之75%)標題化合物。

LC-MS (方法6): R_t = 2.10 min ; MS (ESIpos): m/z = 338 $[M-NH_2]^+$, 709 $[2M+H]^+$。

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 0.87 (s, 9H), 1.53 (s, 2H), 3.59 (s, 1H), 5.24 (d, 2H), 6.56 (s, 1H), 6.94 (m, 1H), 7.10 (d, 2H), 7.20 (m, 1H), 7.26 (m, 2H), 7.34 (m, 2H), 7.46 (m, 1H)。

中間物C53

(2S)-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]-2-{[(9H-茀-9-基甲氧基)羰基]胺基}丁酸

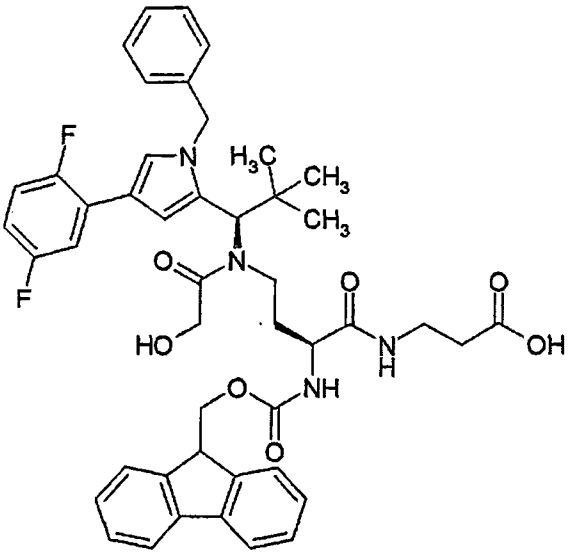


首先，類似於中間物C2，中間物C52用(2S)-2-{[(苯甲氧基)羰基]胺基}-4-側氧基丁酸苯甲酯還原烷基化。如針對中間物C27所述，接著二級胺基用乙酸2-氯-2-側氧基乙酯醯化，且兩個酯基接著用2M氫氧化鋰之甲醇溶液水解。以此方式獲得之中間物溶於乙醇中，添加鈀/碳(10%)且混合物在室溫下在標準壓力下用氫氣氫化1小時。使脫除保護基之化合物溶解於二噁烷/水2:1中且在最後一步中在N,N-二異丙基乙胺存在下使用氯碳酸9H-芴-9-基甲酯引入Fmoc保護基。

LC-MS (方法1): R_t = 1.37 min；MS (ESIpos): m/z = 734 $(M-H)^-$。

中間物C54

N-[(2S)-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]-2-{[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]胺基}丁醯基]-β-丙胺酸

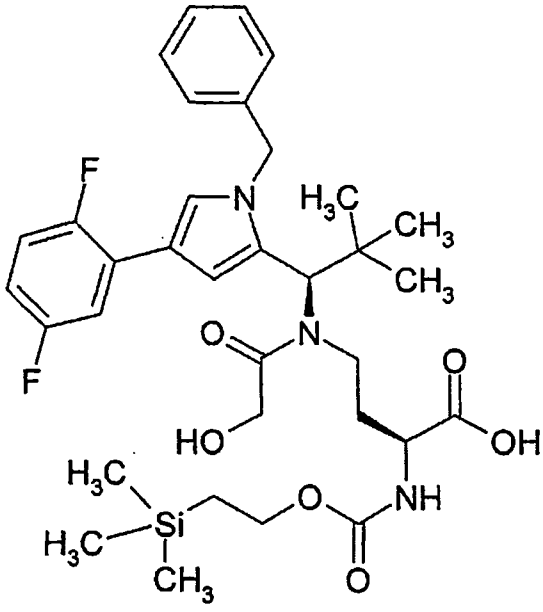


首先，類似於中間物C2，中間物C52用N-[(2S)-2-{[(苯甲氧基)羰基]胺基}-4-側氧基丁醯基]-β-丙胺酸苯甲酯還原烷基化。如針對中間物C27所述，接著二級胺基用乙酸2-氯-2-側氧基乙酯醯化。以此方式獲得之中間物溶於甲醇中，添加鈀/碳(10%)且混合物在室溫下在標準壓力下用氫氣氫化1小時。接著酯基用2M氫氧化鋰之甲醇溶液水解。使脫除保護基之化合物溶解於二噁烷/水2:1中且在最後一步中在N,N-二異丙基乙胺存在下使用氯碳酸9H-芴-9-基甲酯引入Fmoc保護基。獲得48 mg標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 1.38 min；MS (ESIpos): m/z = 807 $(M+H)^+$。

中間物C58

(2S)-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]-2-({[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}胺基)丁酸



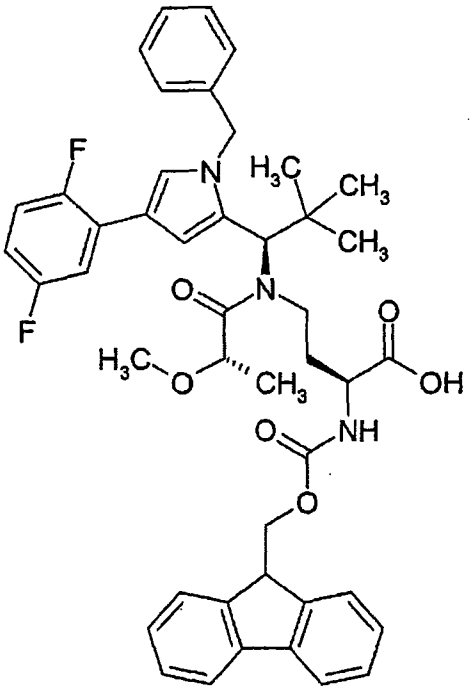
首先，類似於中間物C2，中間物C52用(2S)-2-{[(苯甲氧基)羰基]胺基}-4-側氧基丁酸苯甲酯還原烷基化。如針對中間物C27所述，接著二級胺基用乙酸2-氯-2-側氧基乙酯醯化，且兩個酯基接著用2M氫氧化鋰之甲醇溶液水解。以此方式獲得之中間物溶於乙醇中，添加鈀/碳(10%)且混合物在室溫下在標準壓力下用氫氣氫化1小時。

使500 mg (0.886 mmol)此完全脫除保護基之中間物溶解於60 ml二噁烷中，且添加253 mg (0.975 mmol) 1-({[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}氧基)吡咯啶-2,5-二酮及198 µl三乙胺。在室溫下攪拌24小時後，濃縮反應物且殘餘物藉由製備型HPLC純化。合併適當溶離份，在減壓下濃縮且在高真空下乾燥，得到312 mg (理論之50%)標題化合物。

LC-MS (方法5): R_t = 4.61 min；MS (ESIpos): m/z = 658 $(M+H)^+$。

中間物C59

(2S)-4-({(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}[(2S)-2-甲氧基丙醯基]胺基)-2-{[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]胺基}丁酸

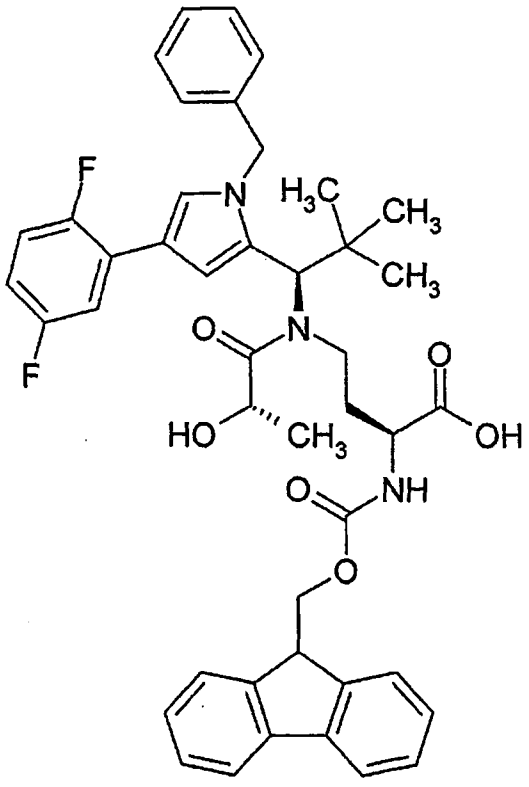


最初，如針對中間物C53所述，(2S)-4-({(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基)-2-{[(苯甲氧基)羰基]胺基}丁酸苯甲酯之二級胺基在三乙胺存在下用(2S)-2-甲氧基丙醯氯(中間物C53之中間物)醯化。使所得中間物溶解於乙醇中，添加鈀/碳(10%)且混合物在室溫下在標準壓力下用氫氣氫化1小時。使脫除保護基之化合物溶解於二噁烷/水2:1中且在最後一步中在N,N-二異丙基乙胺存在下使用氯碳酸9H-芴-9-基甲酯引入Fmoc保護基。

LC-MS (方法1): R_t = 1.39 min；MS (ESIpos): m/z = 764 $(M-H)^-$。

中間物C60

(2S)-4-({(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}[(2S)-2-甲氧基丙醯基]胺基)-2-{[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]胺基}丁酸

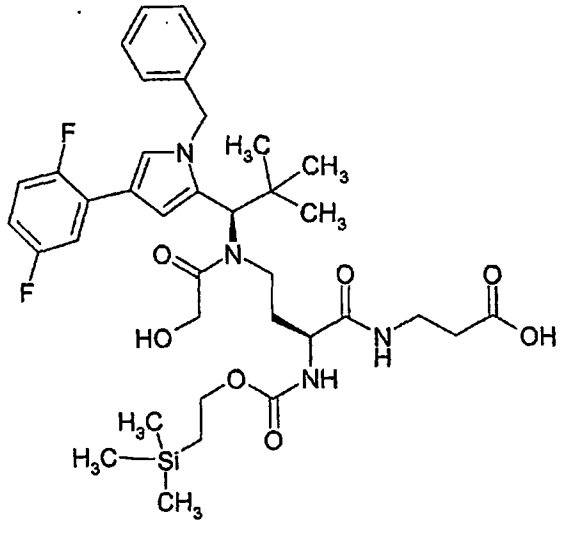


該合成類似於中間物C53進行。

LC-MS (方法1): R_t = 1.41 min ; MS (ESIpos): m/z = 750 $(M+H)^+$。

中間物C61

N-[(2S)-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]-2-({[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}胺基)丁醯基]-β-丙胺酸



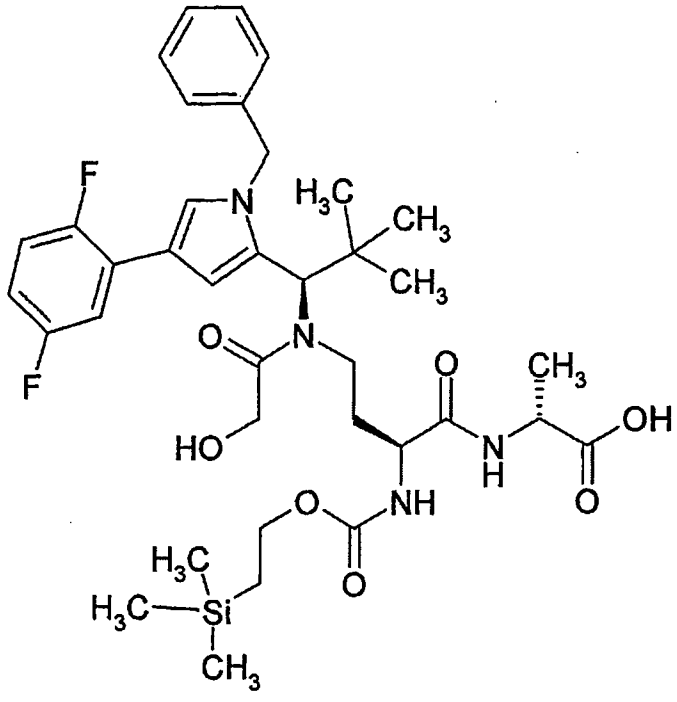
標題化合物藉由使60 mg (0.091 mmol)中間物C58與ß-丙胺酸甲酯

偶合，接著用2M氫氧化鋰溶液使酯裂解來製備。此經兩步得到67 mg (理論之61%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 1.29 min ; MS (ESIpos): m/z = 729 $(M+H)^+$。

中間物C62

N-[(2S)-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]-2-({[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}胺基)丁醯基]-D-丙胺酸

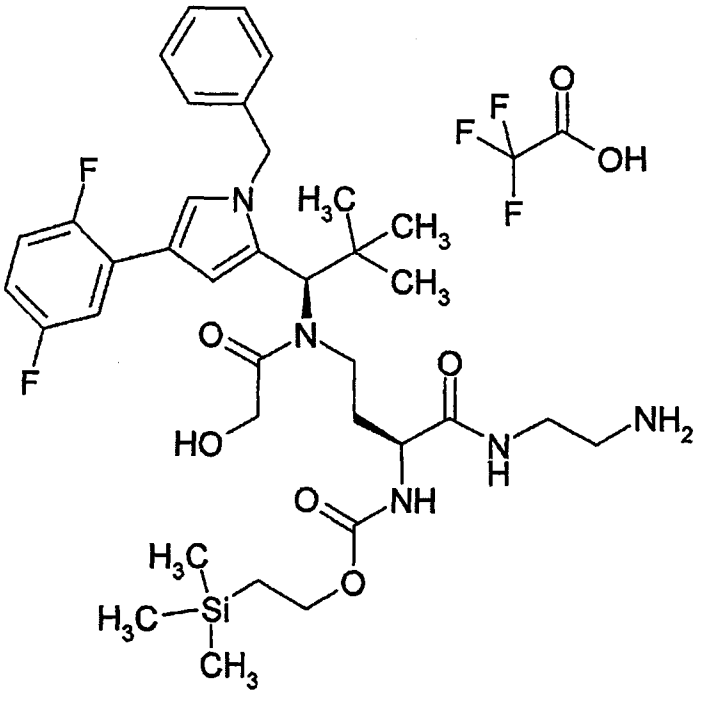


該標題化合物類似於中間物C61，自中間物C58及D-丙胺酸甲酯製備。

LC-MS (方法1): R_t = 1.32 min ; MS (ESIpos): m/z = 729 $(M+H)^+$。

中間物C64

三氟乙酸/{(2S)-1-[(2-胺基乙基)胺基]-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]-1-側氧基丁-2-基}胺基甲酸2-(三甲基矽烷基)乙酯(1:1)



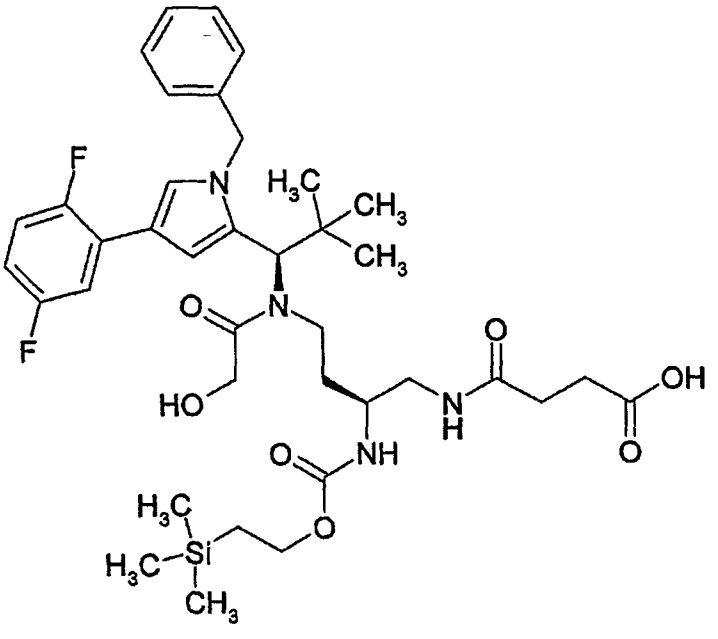
該標題化合物類似於中間物C63，自中間物C58製備。

HPLC (方法11): R_t = 2.4 min；

LC-MS (方法1): R_t = 1.01 min；MS (ESIpos): m/z = 700 $(M+H)^+$。

中間物C65

(8S)-8-{2-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-(乙二醇醯基)胺基]乙基}-2,2-二甲基-6,11-二側氧基-5-氧雜-7,10-二氮雜-2-矽雜十四烷-14-酸



215 mg (0.59 mmol)中間物L66最初饋入25 ml二氯甲烷中，且添加377 mg (0.89 mmol)戴斯-馬丁高碘烷(Dess-Martin periodinane)及144 µl (1.78 mmol)吡啶。將混合物在室溫下攪拌30分鐘。接著反應物用300 ml二氯甲烷稀釋且在各種情況下有機相用10%濃度$Na_2S_2O_3$溶液、10%濃度檸檬酸溶液及飽和碳酸氫鈉溶液洗滌兩次。有機相經硫酸鎂乾燥且在減壓下蒸發溶劑。此得到305 mg醛，其未經進一步純化即反應。

使175 mg (0.49 mmol)中間物C52溶於50 ml二氯甲烷中，且添加147 mg (0.69 mmol)三乙醯氧基硼氫化鈉及32.5 µl乙酸。在室溫下攪拌5分鐘後，添加214 mg (0.593 mmol)上述醛，且將反應物在室溫下攪拌隔夜。此處，代替預期產物，形成[(2S)-4-({(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基)-1-(2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)丁-2-基]胺基甲酸2-(三甲基矽烷基)乙酯。因為此醯胺亦可轉變成標題化合物，所以濃縮反應物且殘餘物藉由製備型HPLC純化。合併適當含醯胺之溶離份後，在減壓下蒸發溶劑且殘餘物在高真空下乾燥。此得到195 mg (58%)的以上提出之醯亞胺。

LC-MS (方法5): R_t = 3.32 min；MS (ESIpos): m/z = 667 $(M+H)^+$。

使65 mg (97.5 µmol)此醯亞胺溶解於15 ml二氯甲烷中，且添加367 µl (3.4 mmol)乙醯氧基乙醯氯及595 µl N,N-二異丙基乙胺。在室溫下攪拌30分鐘後，在減壓下在無加熱下濃縮反應物且殘餘物藉由製備型HPLC純化。合併適當溶離份，在蒸發溶劑及在高真空下乾燥後得到28 mg (理論之37%)乙酸(8S)-11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-8-[(2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)甲基]-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基酯。

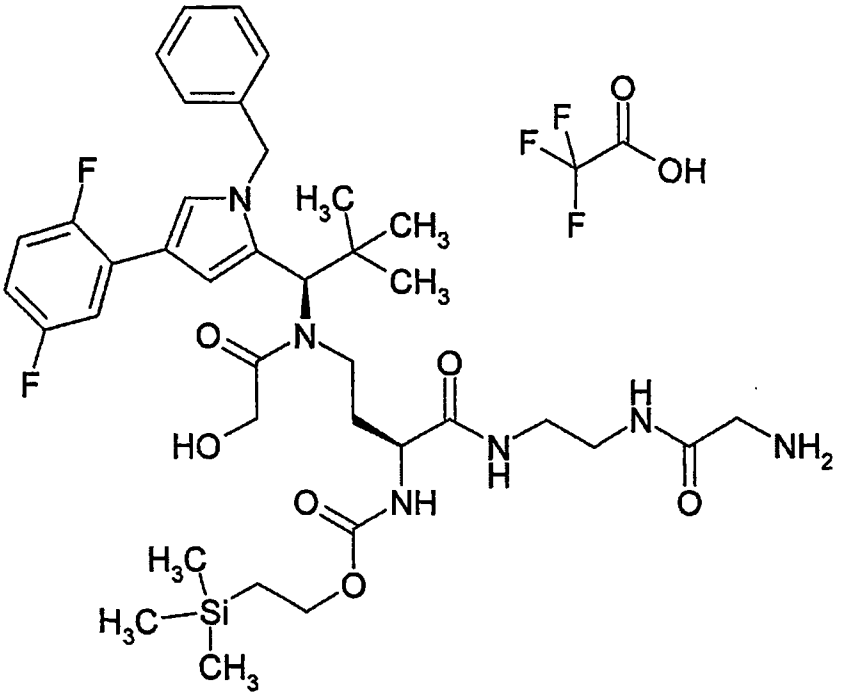
LC-MS (方法1): R_t = 1.44 min；MS (ESIpos): m/z = 767 $(M+H)^+$。

使28 mg (37 μmol)此中間物溶於3 ml甲醇中，且添加548 μl 2M氫氧化鋰溶液。在室溫下攪拌10分鐘後，反應用三氟乙酸調至pH 4且接著濃縮。殘餘物藉由製備型HPLC純化。合併適當溶離份，蒸發溶劑且殘餘物在高真空下乾燥，得到26 mg (理論之96%)呈白色固體狀之標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 1.33 min；MS (ESIpos): m/z = 743 $(M+H)^+$。

中間物C66

[(2S)-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]-1-{[2-(甘胺醯基胺基)乙基]胺基}-1-側氧基丁-2-基]胺基甲酸2-(三甲基矽烷基)乙酯



首先，根據肽化學之經典方法(HATU偶合及Boc移除)，自N-[(苯甲氧基)羰基]甘胺酸及(2-胺基乙基)胺基甲酸第三丁酯製備三氟乙酸/{2-[(2-胺基乙基)胺基]-2-側氧基乙基}胺基甲酸苯甲酯(1:1)。

使13 mg (0.036 mmol)此中間物及25 mg (0.033 mmol)中間物C58

溶解於3 ml DMF中，且添加19 mg (0.05 mmol) HATU及17 µl N,N-二異丙基乙胺。在室溫下攪拌10分鐘後，濃縮混合物且殘餘物藉由製備型HPLC純化。此得到17.8 mg (理論之60%)中間物。

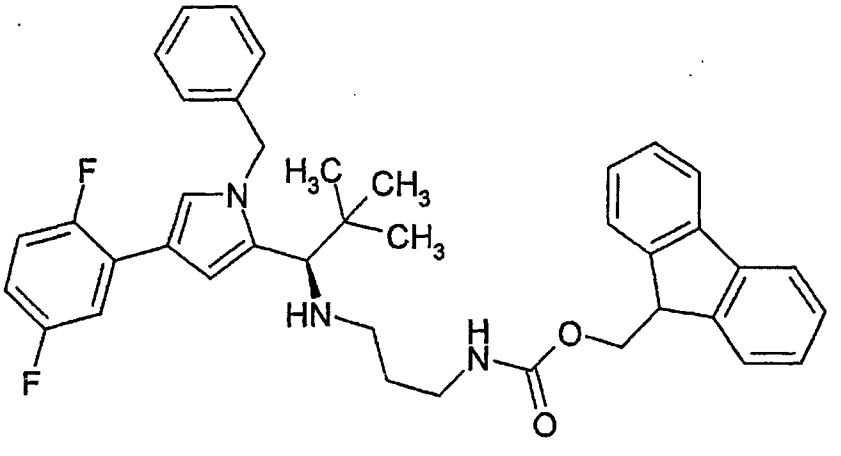
LC-MS (方法1): R_t = 1.36 min；MS (ESIpos): m/z = 891 $(M+H)^+$。

使17 mg (0.019 mmol)此中間物溶於10 ml乙醇中，添加鈀/碳(10%)且混合物在室溫下在標準壓力下用氫氣氫化2小時。濾出催化劑，在減壓下蒸發溶劑且殘餘物在高真空下乾燥。此得到9 mg (理論之62%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 1.03 min；MS (ESIpos): m/z = 757 $(M+H)^+$。

中間物C67

[3-({(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基)丙基]胺基甲酸9H-茀-9-基甲酯



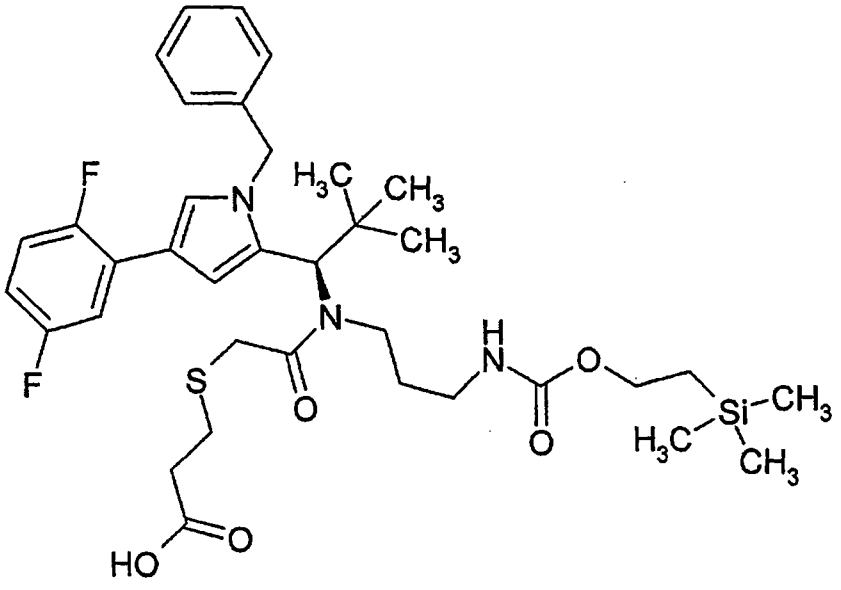
605.3 mg (1.71 mmol) (1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙-1-胺(中間物C52)最初饋入10.0 ml二氯甲烷中，且添加506.7 mg (2.39 mmol)三乙醯氧基硼氫化鈉及117.9 mg (1.96 mmol)乙酸且將混合物在室溫下攪拌5分鐘。添加溶於10.0 ml二氯甲烷中之580.0 mg (1.96 mmol) (3-側氧基丙基)胺基甲酸9H-茀-9-基甲酯(中間物L70)且將反應混合物在室溫下攪拌隔夜。反應混合物用

乙酸乙酯稀釋且有機相在各種情況下用飽和碳酸鈉溶液及飽和NaCl溶液洗滌兩次。有機相經硫酸鎂乾燥且在減壓下蒸發溶劑。殘餘物藉由矽膠層析法(移動相：環己烷/乙酸乙酯3:1)純化。在減壓下蒸發溶劑且殘餘物在高真空下乾燥。此得到514.7 mg (理論之46%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 1.10 min ; MS (ESIpos): m/z = 634 $(M+H)^+$。

中間物C69

11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-14-硫雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十七烷-17-酸



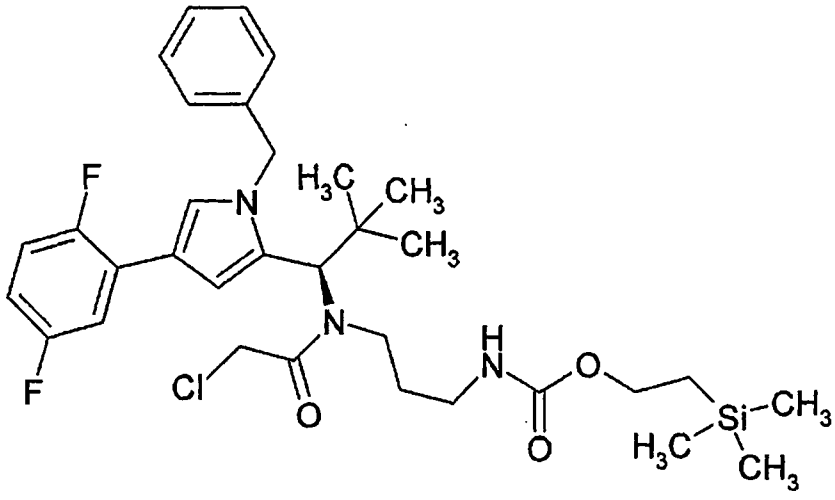
117.0 mg (0.19 mmol) {3-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(氯乙醯基)胺基]丙基}胺基甲酸(2-(三甲基矽烷基)乙酯(中間物C70)及21.6 mg (0.20 mmol) 3-硫基丙酸最初饋入3.0 ml甲醇中，添加89.5 mg (0.65 mmol)碳酸鉀且將混合物在50℃下攪拌4小時。反應混合物用乙酸乙酯稀釋且有機相用水及飽和NaCl溶液洗滌。有機相經硫酸鎂乾燥，在減壓下蒸發溶劑且殘餘物在高真空下乾燥。殘餘物未經進一步純化即用於合成下一步。此得到106.1 mg

(理論之73%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 1.42 min；MS (ESIneg): m/z = 700 $(M-H)^-$。

中間物C70

{3-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(氯乙醯基)胺基]丙基}胺基甲酸(2-(三甲基矽烷基)乙酯



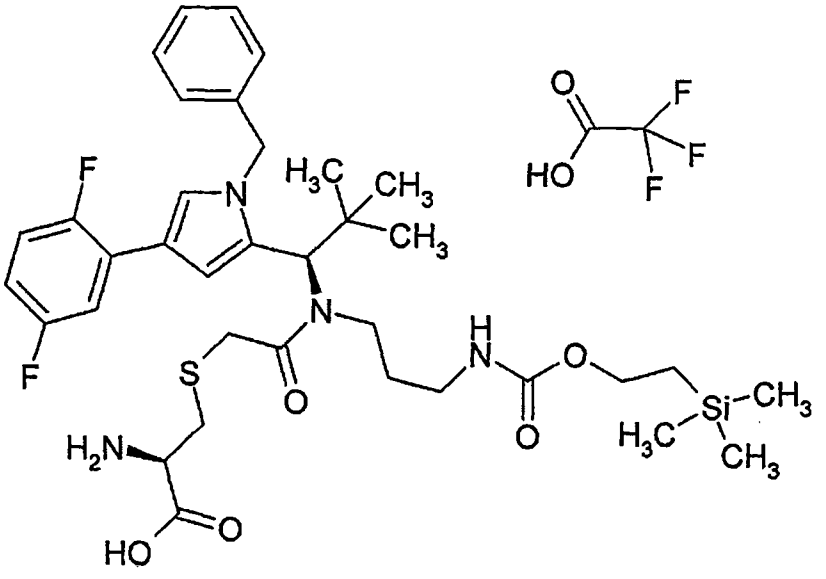
908.1 mg (1.63 mmol) [3-({(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基)丙基]胺基甲酸2-(三甲基矽烷基)乙酯(參見中間物C11之合成)及545.6 mg (5.39 mmol)三乙胺最初饋入10.0 ml二氯甲烷中，且混合物冷卻至0℃。在此溫度下，添加590.5 mg (5.23 mmol)氯乙醯氯且將混合物在室溫下攪拌隔夜。反應混合物用乙酸乙酯稀釋且有機相在各種情況下用飽和碳酸氫鈉溶液及飽和氯化銨溶液洗滌三次。有機相用飽和NaCl溶液洗滌且經硫酸鎂乾燥。殘餘物藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且殘餘物在高真空下乾燥。此得到673.8 mg (理論之65%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 1.53 min；MS (ESIneg): m/z = 676 $(M+HCOO^-)^-$。

中間物C71

S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基

丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-L-半胱胺酸/三氟乙酸(1:1)



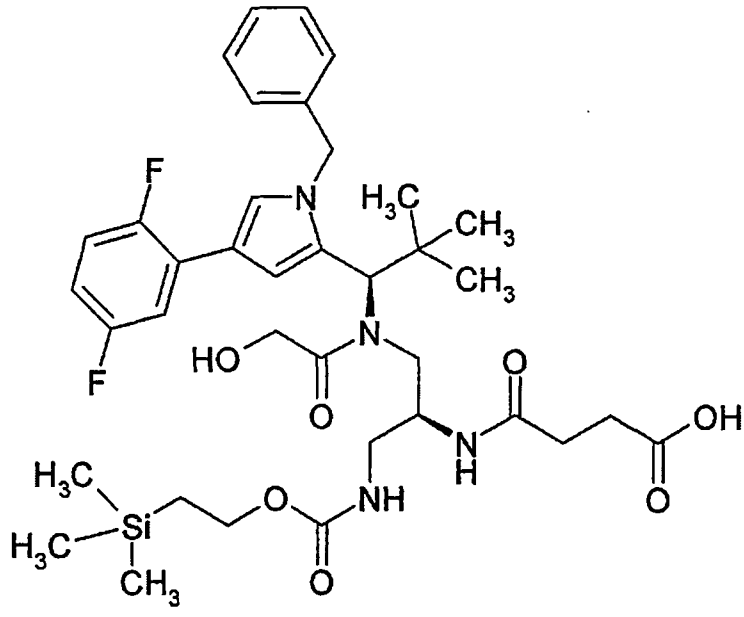
使536.6 mg (4.43 mmol) L-半胱胺酸與531.5 mg (6.33 mmol)碳酸氫鈉一起懸浮於2.5 ml水中。添加溶於25.0 ml異丙醇中之400.0 mg (0.63 mmol) {3-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(氯乙醯基)胺基]丙基}胺基甲酸2-(三甲基矽烷基)乙酯(中間物C70)及1.16 g (7.59 mmol) 1,8-二氮雜雙環[5.4.0]十一-7-烯。將反應混合物在50℃下攪拌1.5小時。乙酸乙酯添加至反應混合物且有機相用飽和碳酸氫鈉溶液重複洗滌且用飽和NaCl溶液洗滌一次。有機相經硫酸鎂乾燥，在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。殘餘物藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 μ，流動速率：50 ml/min, MeCN/水，0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到449.5 mg (理論之86%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 1.20 min；MS (ESIpos): m/z = 717 $(M+H)^+$。

中間物C72

(9S)-9-{[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]甲基}-2,2-二甲基-6,11-二側氧基-5-氧雜-

7,10-二氮雜-2-矽雜十四烷-14-酸



90 mg (0.212 mmol)中間物L72最初饋入6 ml二氯甲烷中，且添加86 µl (1.06 mmol)吡啶及135 mg (0.318 mmol)戴斯-馬丁高碘烷。將混合物在室溫下攪拌30分鐘。接著反應物用30 ml二氯甲烷稀釋且有機相用10%濃度$Na_2S_2O_3$溶液洗滌兩次且用5%濃度檸檬酸溶液洗滌一次。有機相經硫酸鎂乾燥且在減壓下蒸發溶劑。以此方式獲得之醛未經進一步純化即反應。

使63 mg (0.177 mmol)中間物C52溶於15 ml二氯甲烷中，且添加52.4 mg (0.247 mmol)三乙醯氧基硼氫化鈉及20.2 µl乙酸。在室溫下攪拌5分鐘後，添加89.6 mg (0.212 mmol)上述醛，且將反應在室溫下攪拌20分鐘。在減壓下濃縮反應物且殘餘物藉由製備型HPLC純化。合併適當溶離份後，在減壓下蒸發溶劑且殘餘物自乙腈/水凍乾。此得到71 mg (2步理論之53%) (9R)-9-[({(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基)甲基]-2,2-二甲基-6,11-二側氧基-5-氧雜-7,10-二氮雜-2-矽雜十四烷-14-酸苯甲酯。

LC-MS (方法1): R_t = 1.21 min；MS (ESIpos): m/z = 761 $(M+H)^+$。

使70 mg (92 µmol)此中間物溶解於15 ml二氯甲烷中，混合物冷

卻至10℃且添加54 µl三乙胺及25.5 µl (0.23 mmol)乙醯氧基乙醯氯。在室溫下攪拌1小時後，添加相同量之酸氯化物及三乙胺，且在室溫下再攪拌一小時後再添加一次。接著在室溫下再攪拌反應30分鐘且接著在減壓下濃縮，且殘餘物藉由製備型HPLC純化。合併適當溶離份，在蒸發溶劑及自乙腈/水凍乾殘餘物後得到46.5 mg (理論之59%)醯化中間物。

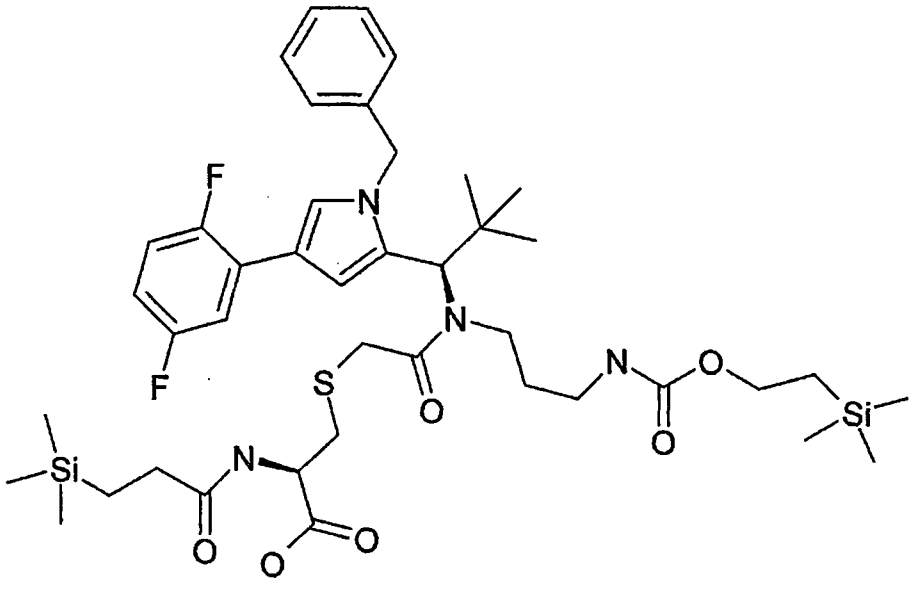
LC-MS (方法1): R_t = 1.53 min；MS (ESIpos): m/z = 861 $(M+H)^+$。

使46 mg (53 µmol)此中間物溶於5 ml甲醇中，且添加2.7 ml 2M氫氧化鋰溶液。在室溫下攪拌10分鐘後，反應用乙酸調至pH 3-4且接著用15 ml水稀釋。水相用乙酸乙酯萃取且有機相經硫酸鎂乾燥且濃縮。殘餘物自乙腈/水凍乾，在高真空下乾燥殘餘物後得到37 mg (理論之90%)呈白色固體狀之標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 1.32 min；MS (ESIpos): m/z = 729 $(M+H)^+$。

中間物C73

S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-N-[3-(三甲基矽烷基)丙醯基]-L-半胱胺酸

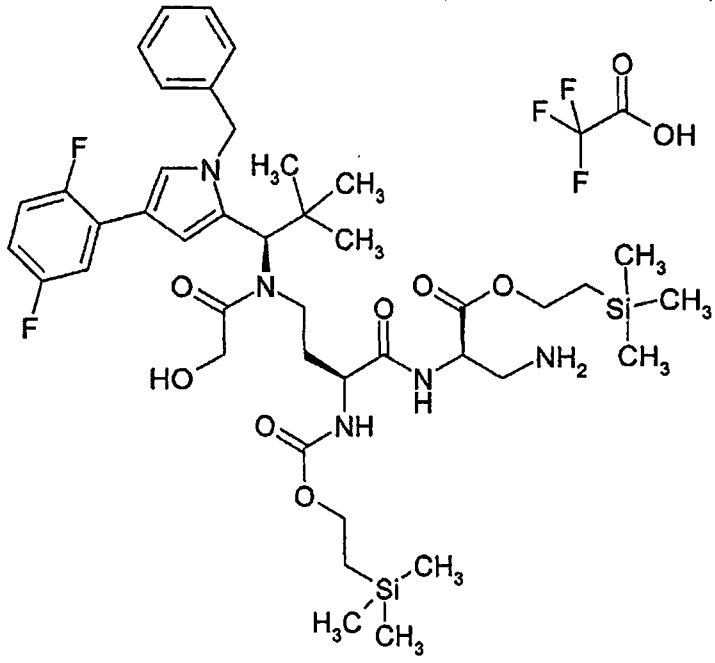


619 mg (0.86 mmol) S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-L-半胱胺酸/三氟乙酸(1:1) (中間物C71)最初饋入8.8 ml二氯甲烷中，且添加87 mg (0.86 mmol)三乙胺及224 mg (0.86 mmol) N-[2-(三甲基矽烷基)乙氧基羰基氧基]吡咯啶-2,5-二酮。1小時後，添加45 mg (0.17 mmol) N-[2-(三甲基矽烷基)乙氧基羰基氧基]吡咯啶-2,5-二酮。將反應混合物在室溫下攪拌1小時。在減壓下濃縮混合物，使殘餘物溶解於二氯甲烷中且接著有機相用水及飽和碳酸氫鈉溶液洗滌兩次。有機相經硫酸鎂乾燥，在旋轉蒸發儀上濃縮，且在高真空下乾燥。殘餘物未經進一步純化即進一步使用。此得到602 mg (71%，純度87%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 1.58 min；MS (ESIpos): m/z = 861 $(M+H)^+$。

中間物C74

三氟乙酸3-胺基-N-[(2S)-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]-2-({[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}胺基)丁醯基]-D-丙胺酸2-(三甲基矽烷基)乙酯(1:1)



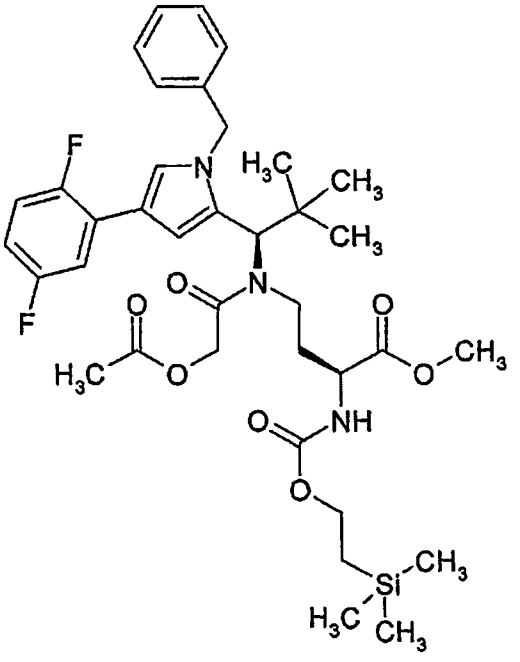
使75 mg (0.114 mmol)中間物C58溶解於12.5 ml DMF中且在65 mg

(0.11 mmol) HATU及79 µl N,N-二異丙基乙胺存在下與78 mg (0.171 mmol)中間物L75偶合。藉由製備型HPLC純化後，使中間物溶解於20 ml乙醇中且在室溫下在氫標準壓力下在10%鈀/活性碳上氫化1小時。接著濾出催化劑，在減壓下移除溶劑且產物藉由製備型HPLC純化。自乙腈/水1:1凍乾，得到63 mg (2步理論之64%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 1.16 min；MS (EIpos): m/z = 844 $[M+H]^+$。

中間物C75

(2S)-4-[(乙醯氧基乙醯基){(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基]-2-({[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}胺基)丁酸甲酯



使4.3 g (12.2 mmol)中間物C52溶於525 ml DCM中，且添加3.63 g (17.12 mmol)三乙醯氧基硼氫化鈉及8.4 ml乙酸。在室溫下攪拌5分鐘後，添加溶於175 ml DCM中之3.23 g (11.85 mmol) (2S)-4-側氧基-2-({[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}胺基)丁酸甲酯(藉由經典方法自(3S)-3-胺基-4-甲氧基-4-側氧基丁酸製備)，且將混合物在室溫下再攪拌45分鐘。接著混合物用DCM稀釋，且用100 ml飽和碳酸氫鈉溶液萃取且接著用飽和氯化鈉溶液萃取兩次。有機相經硫酸鎂乾燥，過濾且

濃縮。殘餘物藉由製備型HPLC純化。合併適當溶離份，濃縮且在高真空下乾燥殘餘物，得到4.6 g (理論之6184%)中間物。

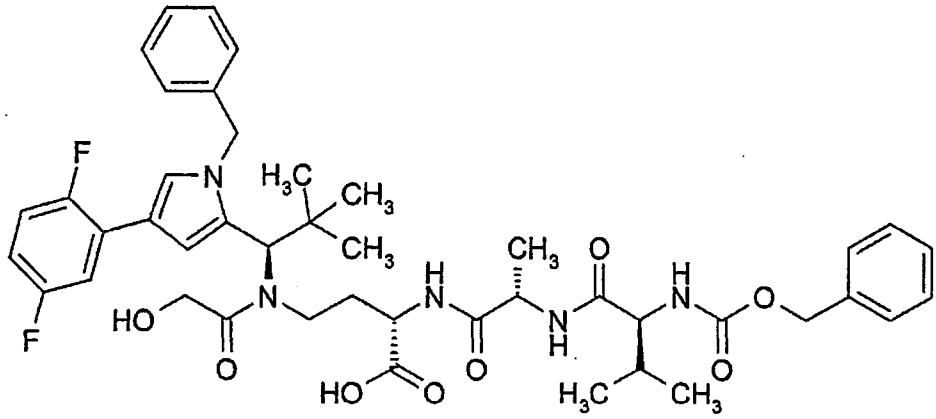
LC-MS (方法12): R_t = 1.97 min ; MS (ESIpos): m/z = 614.32 $(M+H)^+$。

使200 mg (0.33 mmol)此中間物溶於10 ml DCM中，且接著添加105 µl三乙胺及77 µl (0.717 mmol)乙醯氧基乙醯氯。將混合物在室溫下攪拌隔夜且接著在減壓下濃縮。使殘餘物溶解於乙酸乙酯中，且用飽和碳酸氫鈉溶液萃取且接著用飽和氯化鈉溶液萃取兩次。有機相經硫酸鎂乾燥且接著濃縮。此得到213 mg (75%)呈米色泡沫狀之標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 1.46 min ; MS (ESIpos): m/z = 714 $(M+H)^+$。

中間物C76

N-[(苯甲氧基)羰基]-L-纈胺醯基-N-{(1S)-3-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]-1-羧基丙基}-L-丙胺醯胺



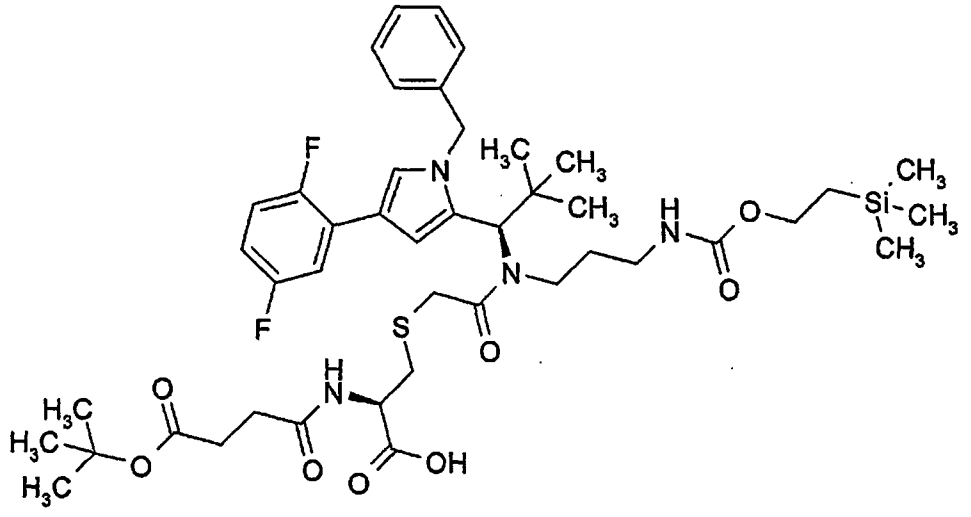
標題化合物根據肽化學之經典方法(用氯化鋅移除Teoc保護基，在HATU存在下用N-[(苯甲氧基)羰基]-L-纈胺醯基-L-丙胺酸醯化及用含氫氧化鋰之THF/水使酯裂解)，自中間物C75製備。

LC-MS (方法1): R_t = 1.23 min ; MS (ESIpos): m/z = 818

$(M+H)^+$。

中間物C77

S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-N-(4-第三丁氧基-4-側氧基丁醯基)-L-半胱胺酸

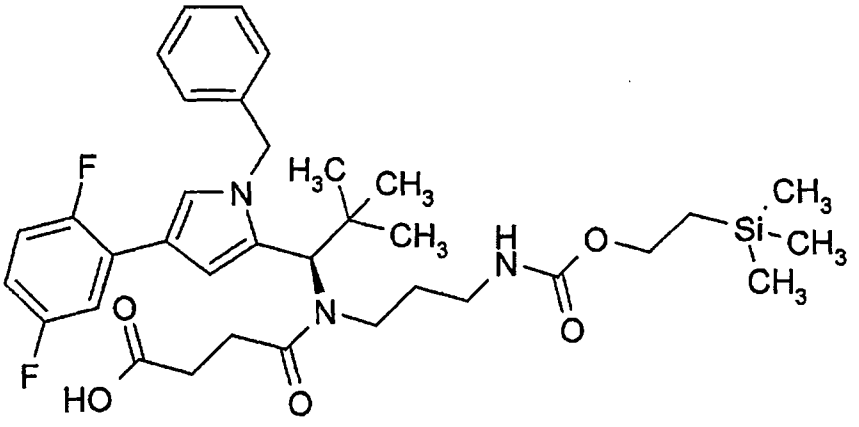


4-第三丁氧基-4-側氧基丁酸(8.39 mg，48.1 μmol)最初饋入1.0 ml DMF中，添加7.37 mg (48.1 μmol) 1-羥基-1H-苯并三唑水合物、15.5 mg ((48.1 μmol)氟硼酸(苯并三唑-1-基氧基)雙二甲基胺基甲基鎓及8.60 μl (48.1 μmol) N,N-二異丙基乙胺且將混合物在室溫下攪拌10分鐘。40.0 mg (0.048 mmol) S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-L-半胱胺酸三氟乙酸(1:1) (中間物C71)最初饋入1.0 ml DMF中，添加25.4 μl (141.9 μmol) N,N-二異丙基乙胺，混合物添加至反應且將反應混合物在室溫下攪拌4小時。反應混合物直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 125×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到35.0 mg (理論之83%)標題化合物。

LC-MS (方法12): R_t = 2.76 min；MS (ESIpos): m/z = 873 $[M+H]^+$

中間物C78

11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十五烷-15-酸



197 mg (0.354 mmol) [3-({(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基)丙基]胺基甲酸2-(三甲基矽烷基)乙酯(參見C11之合成中間物)最初饋入5.0 ml二氯甲烷中，且混合物加熱至40℃。在此溫度下，添加240 µl (3.0 mmol)吡啶及220 µl (1.8 mmol) 4-氯-4-側氧基丁酸甲酯，且將混合物在室溫下攪拌1小時。接著添加240 µl (3.0 mmol)吡啶及220 µl (1.8 mmol) 4-氯-4-側氧基丁酸甲酯，且將混合物在室溫下攪拌1小時。接著添加240 µl (3.0 mmol)吡啶及220 µl (1.8 mmol) 4-氯-4-側氧基丁酸甲酯，且將混合物在室溫下攪拌1小時。反應混合物用乙酸乙酯稀釋且在各種情況下有機相用5%濃度$KHSO_4$溶液萃取三次。有機相用飽和NaCl溶液洗滌且經硫酸鎂乾燥。在減壓下蒸發溶劑。殘餘物藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 µ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到74.1 mg (理論之31%) 11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十五烷-15-酸甲酯。

LC-MS (方法1): R_t = 1.49 min；MS (ESIpos): m/z = 670 $[M+H]^+$

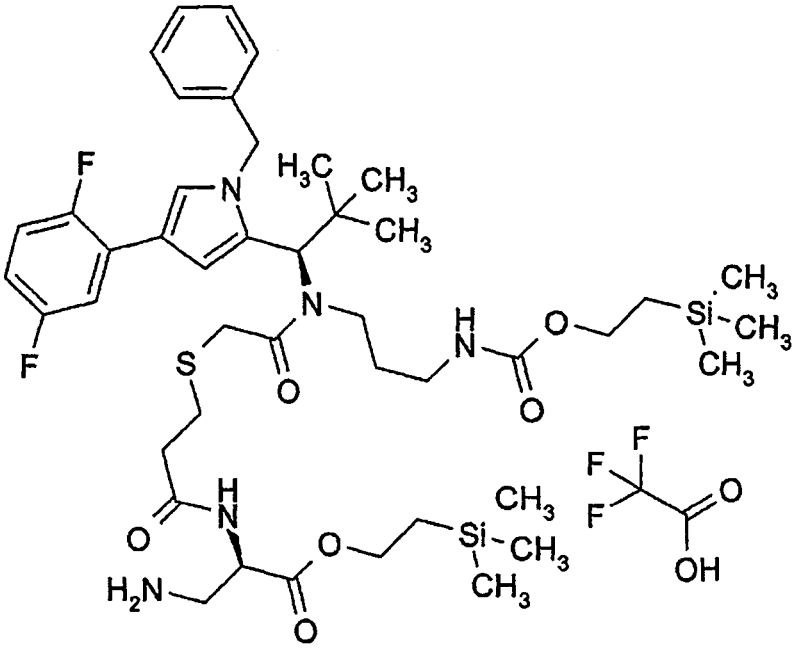
78.3 mg (117 µmol) 11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡

咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十五烷-15-酸甲酯最初饋入4.0 ml THF中，且添加800 µl甲醇、160 µl水及230 µl (230 µmol) LiOH水溶液(1M)。將反應混合物在室溫下攪拌3小時，用乙酸淬滅且直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 µ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到64.8 mg (理論之85%)標題化合物。

LC-MS (方法12): R_t = 2.61 min；MS (ESIneg): m/z = 654 $[M-H]^-$

中間物C79

三氟乙酸3-胺基-N-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12,17-三側氧基-5-氧雜-14-硫雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十七烷-17-基)-D-丙胺酸2-(三甲基矽烷基)乙酯(1:1)



57.4 mg (81.8 µmol) 11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-14-硫雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十七烷-17-酸(中間物C69)最初饋入5.7 ml DMF中，添加74.0 mg (164 µmol)三氟乙酸3-{[(苯甲氧基)羰基]胺基}-D-丙

胺酸2-(三甲基矽烷基)乙酯(1:1) (中間物L75)、43 µl (250 µmol) N,N-二異丙基乙胺及62.2 mg (164 µmol) HATU且將混合物在室溫下攪拌1小時。將反應混合物在室溫下攪拌1小時，用乙酸淬滅且直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 125×30；10 µ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到52.4 mg (理論之63%)化合物N-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12,17-三側氧基-5-氧雜-14-硫雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十七烷-17-基)-3-{[(苯甲氧基)羰基]胺基}-D-丙胺酸2-(三甲基矽烷基)乙酯。

LC-MS (方法1): R_t = 1.64 min；MS (ESIpos): m/z = 1022 $[M]^+$

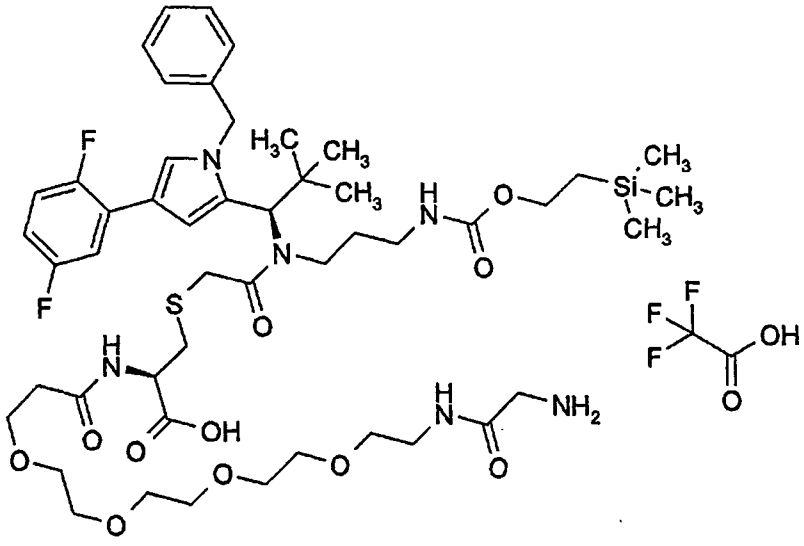
在氬氣下，6.23 mg (27.7 µmol)乙酸鈀(II)最初饋入3.0 ml二氯甲烷中，添加12 µl (83 µmol)三乙胺及89 µl (550 µmol)三乙基矽烷且將混合物攪拌5分鐘。接著添加含56.7 mg (55.5 µmol) N-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12,17-三側氧基-5-氧雜-14-硫雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十七烷-17-基)-3-{[(苯甲氧基)羰基]胺基}-D-丙胺酸2-(三甲基矽烷基)乙酯之3.0 ml二氯甲烷，且將混合物在室溫下攪拌隔夜。混合物幾乎濃縮至乾，添加乙腈/水，且混合物過濾且藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 125×30；10 µ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到37.4 mg (理論之67%)標題化合物。

LC-MS (方法12): R_t = 2.15 min；MS (ESIpos): m/z = 888 $[M+H]^+$

中間物C80

S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-N-[15-(甘胺醯基胺基)-4,7,10,13-四氧雜十五烷-1-醯基]-L-半胱

胺酸三氟乙酸(1:1)



在氬氣下，43.4 mg (95.1 μmol) 1-({N-[(苯甲氧基)羰基]甘胺醯基}胺基)-3,6,9,12-四氧雜十五烷-15-酸(中間物L90)最初饋入2.5 ml DMF中，添加14.6 mg (95.1 μmol) 1-羥基-1H-苯并三唑水合物、30.5 mg (95.1 μmol)氟硼酸(苯并三唑-1-基氧基)雙二甲基胺基甲基鎓及16.5 μl (95.1 μmol) N,N-二異丙基乙胺且將混合物攪拌10分鐘。使79.0 mg (95.1 μmol) S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-L-半胱胺酸三氟乙酸(1:1) (中間物C71)溶於2.5 ml DMF中，添加49.5 μl (285.3 μmol) N,N-二異丙基乙胺且混合物添加至反應。將反應混合物在室溫下攪拌2小時且直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 125×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到44.2 mg (理論之40%)化合物S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-N-[15-({N-[(苯甲氧基)羰基]甘胺醯基}胺基)-4,7,10,13-四氧雜十五烷-1-醯基]-L-半胱胺酸。

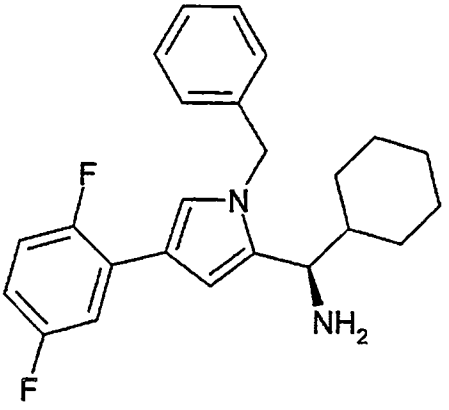
LC-MS (方法12): R_t = 2.57 min；MS (ESIpos): m/z = 1156 $[M+H]^+$

使60.2 mg (52.1 μmol) S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-N-[15-({N-[(苯甲氧基)羰基]甘胺醯基}胺基)-4,7,10,13-四氧雜十五烷-1-醯基]-L-半胱胺酸懸浮於3.0 ml乙醇中，添加6.0 mg鈀/活性碳(10%)且混合物在室溫及標準壓力下用氫氣氫化1小時。兩次添加6.0 mg鈀/活性碳(10%)且混合物在室溫及標準壓力下用氫氣氫化1小時。濾出催化劑且在減壓下自反應混合物移除溶劑，且在高真空下乾燥。殘餘物藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 125×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到29.4 mg (理論之50%)標題化合物。

LC-MS (方法5): R_t = 3.77 min；MS (ESIpos): m/z = 1021 $[M+H]^+$

中間物C81

(R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-1-環己基甲胺



在氬氣下及在-78℃下，將18.7 ml (37.45 mmol)氯化環己基鎂之乙醚溶液(2M)添加至3.12 ml (6.24 mmol)二甲基鋅於甲苯中之溶液(2.0 M)，且將混合物在-78℃下攪拌30分鐘。接著在-78℃添加下5.0 g (12.48 mmol) (R)-N-{(E/Z)-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]亞甲基}-2-甲基丙烷-2-亞磺醯胺於THF中之溶液，且將反應混合物在此溫度下攪拌1小時且接著在室溫下攪拌4小時。在-78℃下，接著添

加飽和氯化銨溶液且使反應混合物升溫至室溫。混合物用乙酸乙酯稀釋且用水洗滌。有機相經硫酸鎂乾燥且在減壓下蒸發溶劑。殘餘物使用Biotage Isolera (矽膠，乙酸乙酯/環己烷25:75)純化。此得到1.59 g (理論之26%)中間物。

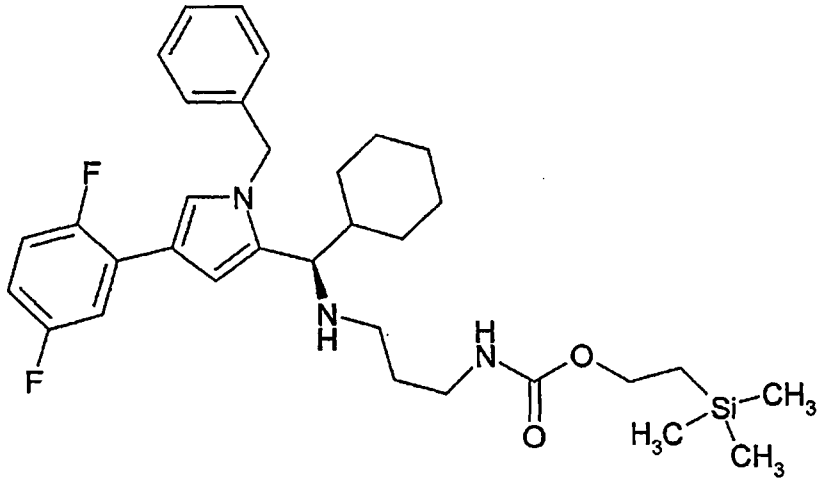
LC-MS (方法12): R_t = 2.76 min；MS (ESIneg): m/z = 483 $[M-H]^-$

在氬氣下，264.0 mg (0.54 mmol)此中間物最初饋入0.5 ml 1,4-二噁烷中，且接著添加1.36 ml HCl之1,4-二噁烷溶液(4.0 M)。將反應混合物在室溫下攪拌1小時。添加二氯甲烷，且反應混合物用1M氫氧化鈉水溶液洗滌。有機相經硫酸鎂乾燥且在減壓下蒸發溶劑。殘餘物使用Biotage Isolera (矽膠，甲醇/二氯甲烷98:2)純化。在減壓下蒸發溶劑且使殘餘物溶於二氯甲烷中，用碳酸氫鈉溶液洗滌且經硫酸鈉乾燥。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到148 mg (理論之72%)標題化合物。

LC-MS (方法13): R_t = 2.07 min；MS (ESIpos): m/z = 364 $[M-NH_2]^+$

中間物C82

(3-{[(R)-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基](環己基)甲基]胺基}丙基)胺基甲酸2-(三甲基矽烷基)乙酯



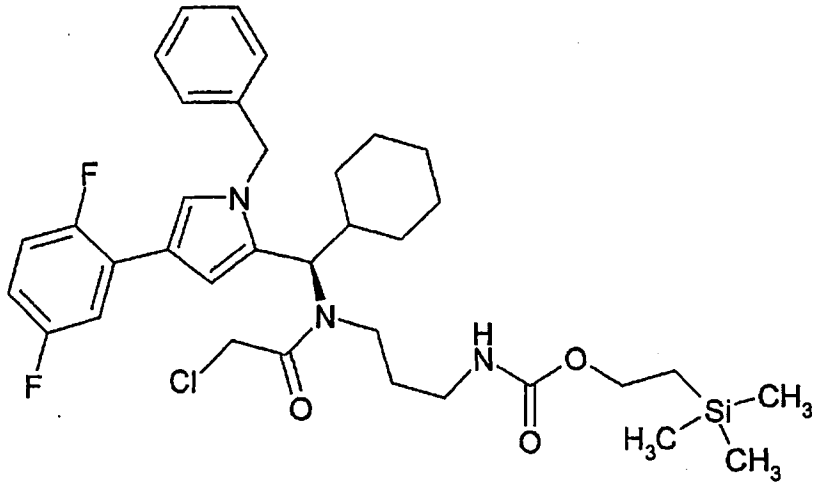
在氬氣下，將392.2 mg (1.85 mmol)三乙醯氧基硼氫化鈉及91.29

mg (1.52 mmol)乙酸添加至503.0 mg (1.32 mmol) 1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-1-環己基甲胺(中間物C81)於1.4 ml二氯甲烷中之溶液，且將反應混合物在室溫下攪拌10分鐘。接著添加574.6 (2.38 mmol) (3-側氧基丙基)胺基甲酸2-(三甲基矽烷基)乙酯於二氯甲烷中之溶液，且將混合物在室溫下攪拌隔夜。添加143 mg (0.66 mmol) (3-側氧基丙基)胺基甲酸2-(三甲基矽烷基)乙酯後，將混合物再攪拌2小時。反應混合物用二氯甲烷稀釋且在各種情況下有機相用飽和碳酸鈉溶液及飽和NaCl溶液洗滌兩次，經硫酸鈉乾燥且濃縮。殘餘物藉由製備型HPLC純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到488 g (理論之63%)標題化合物。

LC-MS (方法12): R_t = 1.89 min ; MS (ESIpos): m/z = 582 $(M+H)^+$。

中間物C83

(3-{[(R)-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基](環己基)甲基](氯乙醯基)胺基}丙基)胺基甲酸2-(三甲基矽烷基)乙酯



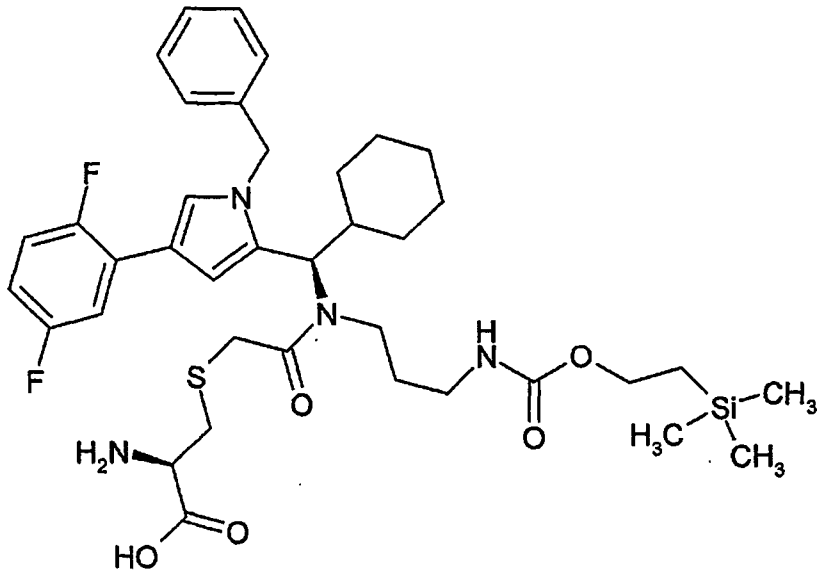
在4 Å分子篩下將280.0 mg (2.77 mmol)三乙胺及397.8 mg (3.52 mmol)氯乙醯氯添加至487.9 mg (0.84 mmol) (3-{[(R)-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基](環己基)甲基]胺基}丙基)胺基甲酸2-(三甲基矽烷基)乙酯(中間物C82)於8.40 ml二氯甲烷中之溶液，且將反應

混合物在室溫下攪拌6小時。反應混合物用二氯甲烷稀釋且有機相用飽和碳酸氫鈉溶液及飽和氯化銨溶液洗滌。有機相經硫酸鈉乾燥且濃縮。殘餘物未經進一步純化即使用。此得到470 mg (理論之85%)標題化合物。

LC-MS (方法12): R_t = 2.88 min ; MS (ESIpos): m/z = 680 $(M+Na)^+$。

中間物C84

S-{11-[(R)-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基](環己基)甲基]-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基}-L-半胱胺酸



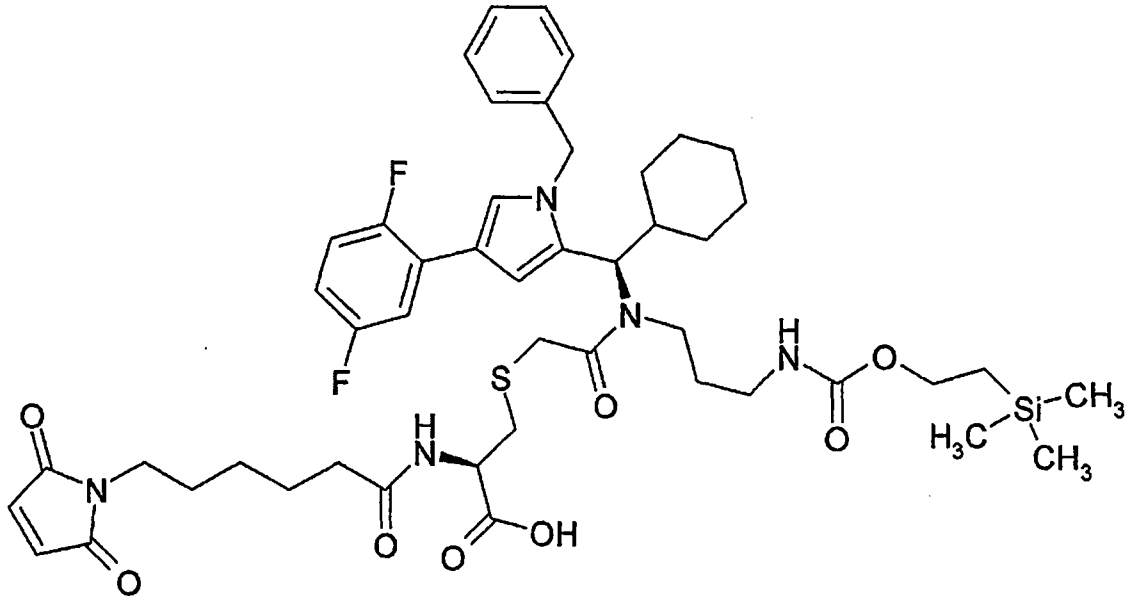
使322.1 mg (2.66 mmol) L-半胱胺酸與319.0 mg (3.80 mmol)碳酸氫鈉一起懸浮於0.19 ml水中。添加溶於1.90 ml異丙醇中之250.0 mg (0.38 mmol) (3-{[(R)-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基](環己基)甲基](氯乙醯基)胺基}丙基)胺基甲酸2-(三甲基矽烷基)乙酯(中間物C83)及693.8 g (4.56 mmol) 1,8-二氮雜雙環[5.4.0]十一-7-烯。將反應混合物在50℃下攪拌3.5小時。將乙酸乙酯添加至反應混合物且有機相用飽和碳酸氫鈉溶液重複洗滌且用飽和NaCl溶液洗滌一次。有機相經硫酸鈉乾燥且在減壓下蒸發溶劑。殘餘物未經進一步純化即進一

步使用。此得到276 mg (理論之97%)標題化合物。

LC-MS (方法12): R_t = 2.34 min ; MS (ESIpos): m/z = 744 $(M+H)^+$。

中間物C85

S-{11-[(R)-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基](環己基)甲基]-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基}-N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]-L-半胱胺酸

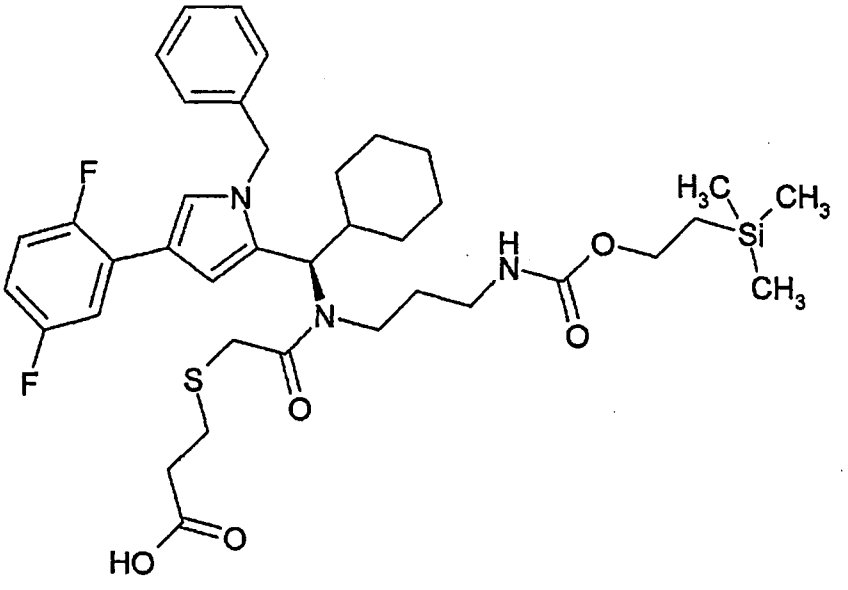


將34.8 mg (0.27 mmol) N,N-二異丙基乙胺添加至100 mg (0.13 mmol) S-{11-[(R)-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基](環己基)甲基]-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基}-L-半胱胺酸(1:1) (中間物C84)及41.5 mg (0.13 mmol) 1-{6-[(2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)氧基]-6-側氧基己基}-1H-吡咯-2,5-二酮於4.0 ml DMF中之混合物，且將反應混合物在室溫下攪拌3小時。不進行處理，混合物藉由製備型HPLC純化。此得到88 mg (理論之70%)標題化合物。

LC-MS (方法12): R_t = 2.71 min ; MS (ESIpos): m/z = 936 $(M+H)^+$。

中間物C86

11-[(R)-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基](環己基)甲基]-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-14-硫雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十七烷-17-酸

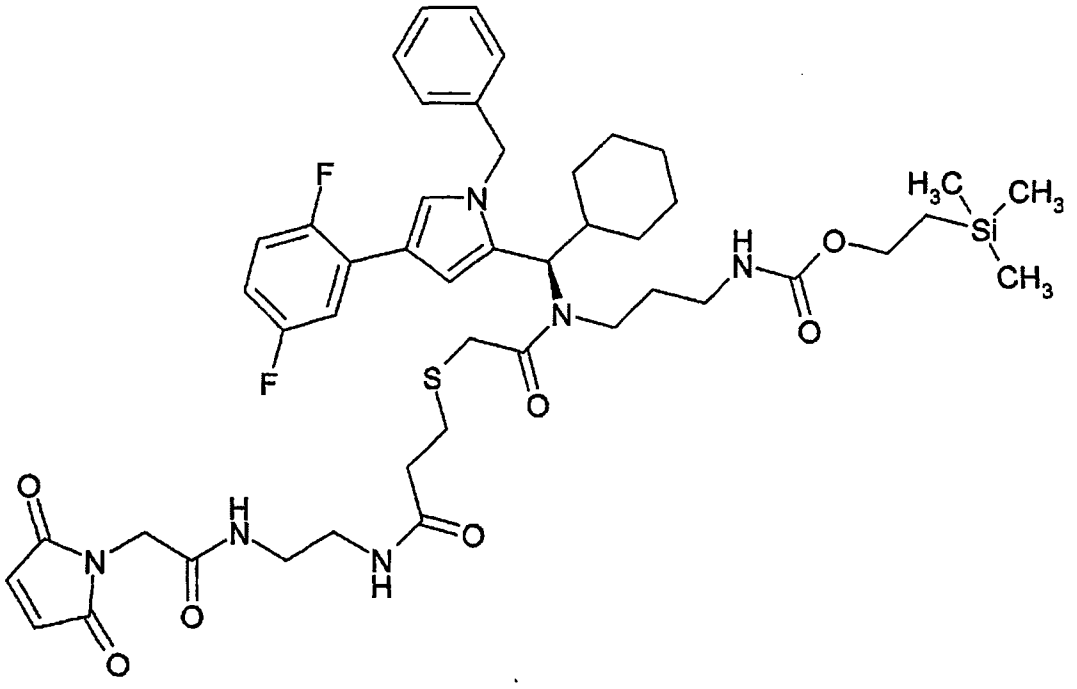


將161.65 mg (1.17 mmol)碳酸鉀添加至220.0 mg (0.33 mmol) (3-{[(R)-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基](環己基)甲基](氯乙醯基)胺基}丙基)胺基甲酸2-(三甲基矽烷基)乙酯(中間物C83)及39.02 mg (0.37 mmol) 3-硫基丙酸於7.45 ml甲醇及幾滴水中之混合物。將反應混合物在50℃下攪拌4小時。乙酸乙酯添加至反應混合物且有機相用水及飽和NaCl溶液重複洗滌。有機相經硫酸鈉乾燥且在減壓下蒸發溶劑。殘餘物未經處理而進一步使用。此得到201 mg (理論之83%)標題化合物。

LC-MS (方法12): R_t = 2.72 min ; MS (ESIneg): m/z = 726 $(M-H)^-$。

中間物C87

{13-[(R)-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基](環己基)甲基]-1-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-2,7,12-三側氧基-10-硫雜-3,6,13-三氮雜十六烷-16-基}胺基甲酸2-(三甲基矽烷基)乙酯



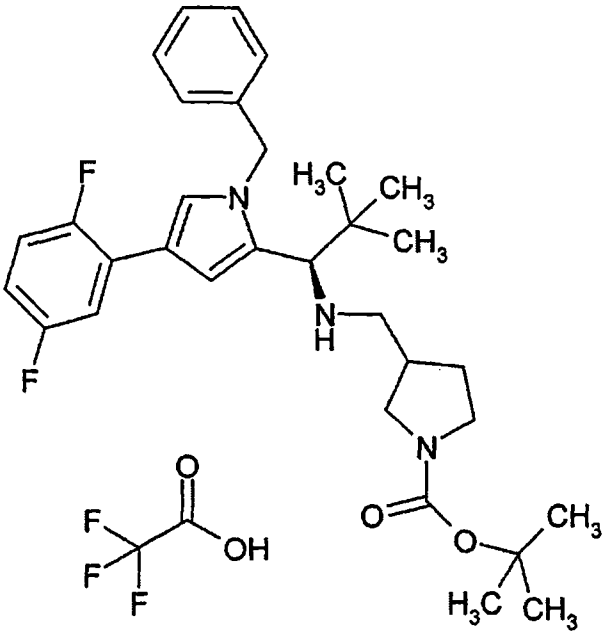
將54.18 mg (0.28 mmol) N-(2-胺基乙基)-2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯胺(中間物L1)、71.01 mg (0.50 mmol) N,N-二異丙基乙胺、104.46 mg (0.27 mmol) HATU及0.23 ml (0.14 mmol) 1-羥基-7-氮雜苯并三唑(0.5 M DMF溶液)添加至100 mg (0.14 mmol) 11-[(R)-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基](環己基)甲基]-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-14-硫雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十七烷-17-酸(中間物C86)於1.37 ml DMF中之溶液。將反應混合物在室溫下攪拌5小時。無進一步處理，混合物藉由製備型HPLC純化。此得到41 mg (理論之33%)標題化合物。

LC-MS (方法12): R_t = 2.61 min ; MS (ESIpos): m/z = 907 $(M+H)^+$。

中間物C88

3-[({(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基)甲基]吡咯啶-1-甲酸第三丁酯三氟乙酸(1:1)

立體異構體混合物

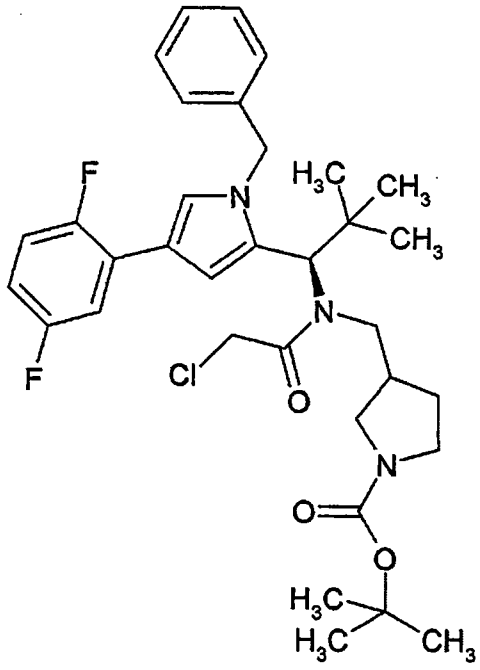


將1.71 g (8.05 mmol)三乙醯氧基硼氫化鈉及0.40 g (6.61 mmol)乙酸添加至2.04 mg (5.75 mmol) (1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙-1-胺於51 ml二氯甲烷中之溶液，且將反應混合物在室溫下攪拌5分鐘。接著添加1.32 g (6.61 mmol) 3-甲醯基吡咯啶-1-甲酸第三丁酯於20 ml二氯甲烷中之溶液，且將混合物在室溫下攪拌隔夜。反應混合物用乙酸乙酯稀釋且在各種情況下有機相用飽和碳酸鈉溶液及飽和NaCl溶液洗滌兩次，經硫酸鎂乾燥且濃縮。殘餘物藉由製備型HPLC純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到1.86 g (理論之50%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.99 min；MS (ESIpos): m/z = 538 $(M+H-CF_3CO_2H)^+$。

中間物C89

3-{[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(氯乙醯基)胺基]甲基}吡咯啶-1-甲酸第三丁酯



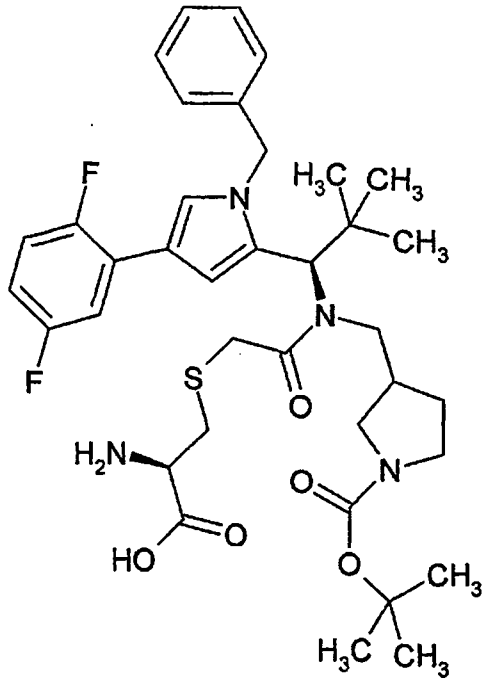
在4 Å分子篩下將1.36 g (13.42 mmol)三乙胺及2.13 g (18.87 mmol)氯乙醯氯添加至2.89 g (4.19 mmol，80%純) 3-[({(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基)甲基]吡咯啶-1-甲酸第三丁酯(中間物C88)於42 ml二氯甲烷中之溶液。將反應混合物在室溫下攪拌5小時。混合物在旋轉蒸發儀上濃縮且殘餘物藉由製備型HPLC純化。此得到449 mg (理論之17%)異構體1及442 mg (理論之17%)異構體2標題化合物。

異構體1 LC-MS (方法12): R_t = 2.74 min；MS (ESIpos): m/z = 636 $(M+NH_4^+)^+$。

異構體2 LC-MS (方法12): R_t = 2.78 min；MS (ESIpos): m/z = 636 $(M+NH_4^+)^+$。

中間物C90

S-[2-({(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}{[1-(第三丁氧羰基)吡咯啶-3-基]甲基}胺基)-2-側氧基乙基]-L-半胱胺酸(異構體1)

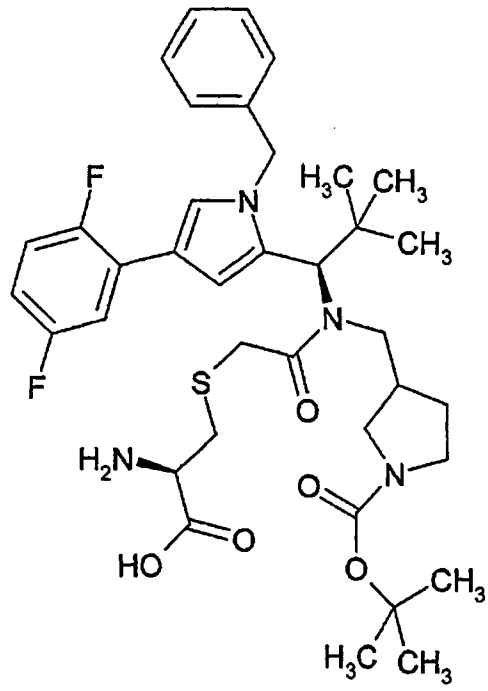


使357.3 mg (0.58 mmol) L-半胱胺酸與488.7 mg (4.07 mmol)碳酸氫鈉一起懸浮於2.3 ml水中。添加溶於23.0 ml異丙醇中之357.0 mg (0.58 mmol) 3-{[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(氯乙醯基)胺基]甲基}吡咯啶-1-甲酸第三丁酯(異構體1) (中間物C89異構體1)及1.06 g (6.98 mmol) 1,8-二氮雜雙環[5.4.0]十一-7-烯。將反應混合物在50℃下攪拌3小時。乙酸乙酯添加至反應混合物且有機相用飽和碳酸氫鈉溶液重複洗滌且用飽和NaCl溶液洗滌一次。有機相經硫酸鎂乾燥且在減壓下蒸發溶劑。殘餘物未經進一步純化即使用。此得到255.0 mg (理論之62%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 1.09 min；MS (ESIpos): m/z = 699 $(M+H)^+$。

中間物C91

S-[2-({(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}{[1-(第三丁氧羰基)吡咯啶-3-基]甲基}胺基)-2-側氧基乙基]-L-半胱胺酸(異構體2)

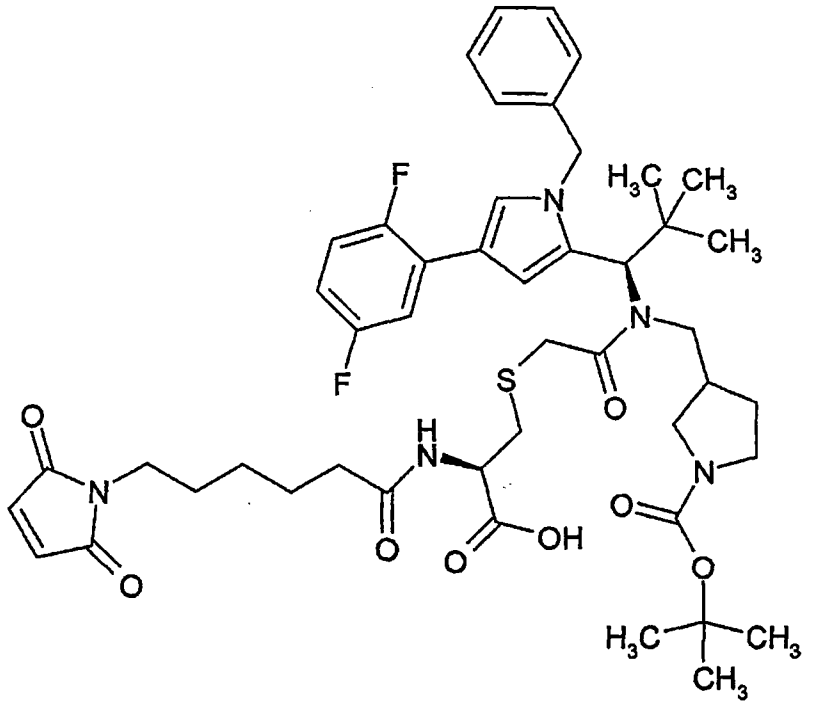


使453.5 mg (3.74 mmol) L-半胱胺酸與449.2 mg (5.35 mmol)碳酸氫鈉一起懸浮於2.1 ml水中。添加溶於21.1 ml異丙醇中之3287.4 mg (0.54 mmol) 3-{[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(氯乙醯基)胺基]甲基}吡咯啶-1-甲酸第三丁酯(中間物C89異構體2)及0.98 g (6.42 mmol) 1,8-二氮雜雙環[5.4.0]十一-7-烯。將反應混合物在50℃下攪拌3小時。乙酸乙酯添加至反應混合物且有機相用飽和碳酸氫鈉溶液重複洗滌且用飽和NaCl溶液洗滌一次。有機相經硫酸鎂乾燥且在減壓下蒸發溶劑。殘餘物未經進一步純化即使用。此得到221.0 mg (理論之59%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 1.12 min；MS (ESIpos): m/z = 699 $(M+H)^+$。

中間物C92

S-[2-({(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}{[1-(第三丁氧羰基)吡咯啶-3-基]甲基}胺基)-2-側氧基乙基]-N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]-L-半胱胺酸(異構體1)

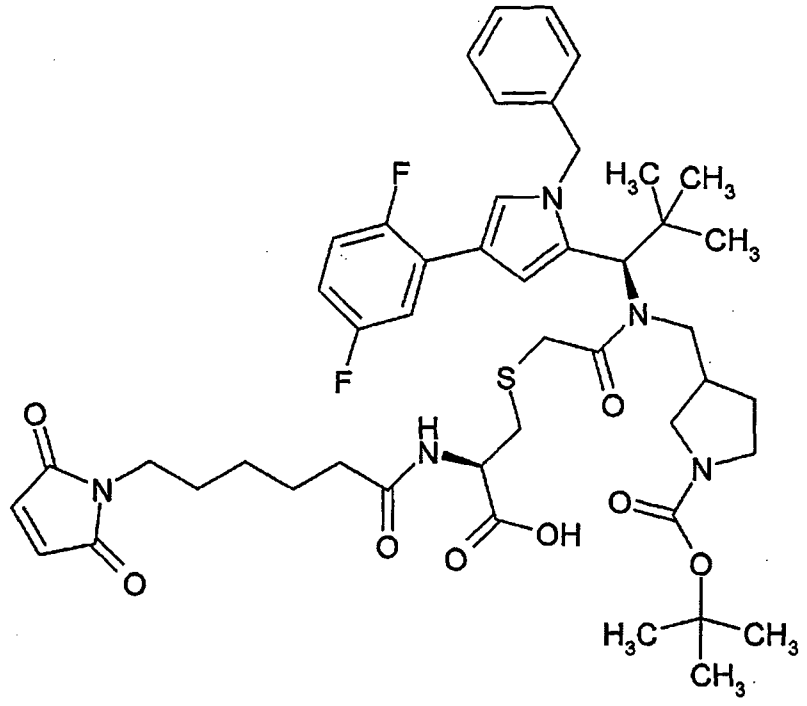


將18.49 mg (0.14 mmol) N,N-二異丙基乙胺添加至50 mg (0.07 mmol) S-[2-({(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}{[1-(第三丁氧羰基)吡咯啶-3-基]甲基}胺基)-2-側氧基乙基]-L-半胱胺酸(中間物C90)及22.06 mg (0.07 mmol) 1-{6-[(2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)氧基]-6-側氧基己基}-1H-吡咯-2,5-二酮於3.3 ml DMF中之混合物，且將反應混合物在室溫下攪拌45分鐘。不進行處理，混合物藉由製備型HPLC純化。此得到65 mg (理論之100%，71%純)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 1.31 min ; MS (ESIpos): m/z = 892 $(M+H)^+$。

中間物C93

S-[2-({(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}{[1-(第三丁氧羰基)吡咯啶-3-基]甲基}胺基)-2-側氧基乙基]-N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]-L-半胱胺酸(異構體2)

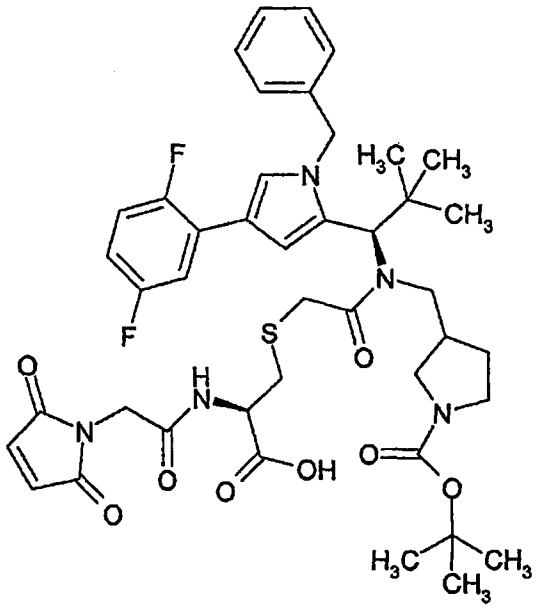


將18.49 mg (0.14 mmol) N,N-二異丙基乙胺添加至50.0 mg (0.07 mmol) S-[2-({(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}{[1-(第三丁氧羰基)吡咯啶-3-基]甲基}胺基)-2-側氧基乙基]-L-半胱胺酸(中間物C91)及22.06 mg (0.07 mmol) 1-{6-[(2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)氧基]-6-側氧基己基}-1H-吡咯-2,5-二酮於3.0 ml DMF中之混合物，且將反應混合物在室溫下攪拌90分鐘。不進行處理，混合物藉由製備型HPLC純化。此得到63 mg (理論之98%，73%純)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 1.34 min ; MS (ESIpos): m/z = 892 $(M+H)^+$。

中間物C94

S-[2-({(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}{[1-(第三丁氧羰基)吡咯啶-3-基]甲基}胺基)-2-側氧基乙基]-N-[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]-L-半胱胺酸(異構體1)

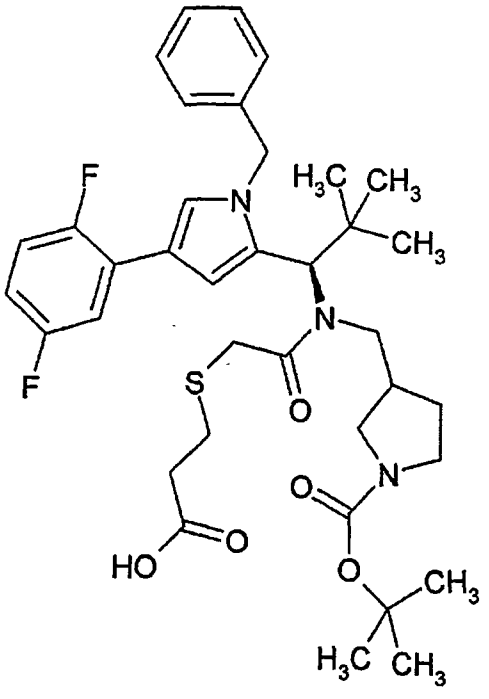


將18.5 mg (0.14 mmol) N,N-二異丙基乙胺添加至50.0 mg (0.07 mmol) S-[2-({(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}{[-1-(第三丁氧羰基)吡咯啶-3-基]甲基}胺基)-2-側氧基乙基]-L-半胱胺酸(中間物C90)及18.0 mg (0.07 mmol) -{2-[(2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)氧基]-2-側氧基乙基}-1H-吡咯-2,5-二酮於3.3 ml DMF中之混合物，且將反應混合物在室溫下攪拌30分鐘。乙酸乙酯添加至反應混合物且有機相用飽和NH_4Cl溶液重複洗滌且用飽和NaCl溶液洗滌一次。有機相經硫酸鎂乾燥且在減壓下蒸發溶劑。殘餘物未經進一步純化即採用。此得到57 mg (理論之81%，85%純)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.96 min ; MS (ESIpos): m/z = 836 $(M+H)^+$。

中間物C95

3-{[2-({(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}{[1-(第三丁氧羰基)吡咯啶-3-基]甲基}胺基)-2-側氧基乙基]硫基}丙酸(異構體1)

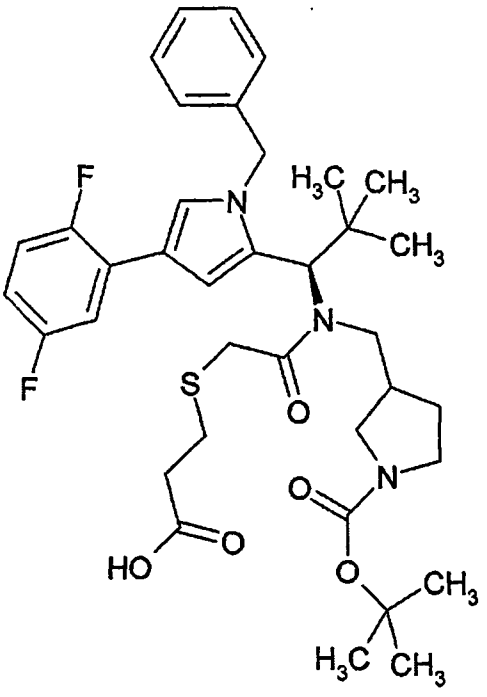


將302.5 mg (2.19 mmol)碳酸鉀添加至384.0 mg (0.62 mmol) 3-{[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(氯乙醯基)胺基]甲基}吡咯啶-1-甲酸第三丁酯(中間物C89異構體1)及73.0 mg (0.69 mmol) 3-硫基丙酸於14 ml甲醇及幾滴水中之混合物。將反應混合物在50℃下攪拌2.5小時。乙酸乙酯添加至反應混合物且有機相用水及飽和NaCl溶液重複洗滌。有機相經硫酸鎂乾燥，在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。殘餘物未經處理而進一步使用。此得到358.0 mg (理論之84%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 1.33 min ; MS (ESIpos): m/z = 684 $(M+H)^+$。

中間物C96

3-{[2-({(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}{[1-(第三丁氧羰基)吡咯啶-3-基]甲基}胺基)-2-側氧基乙基]硫基}丙酸(異構體2)

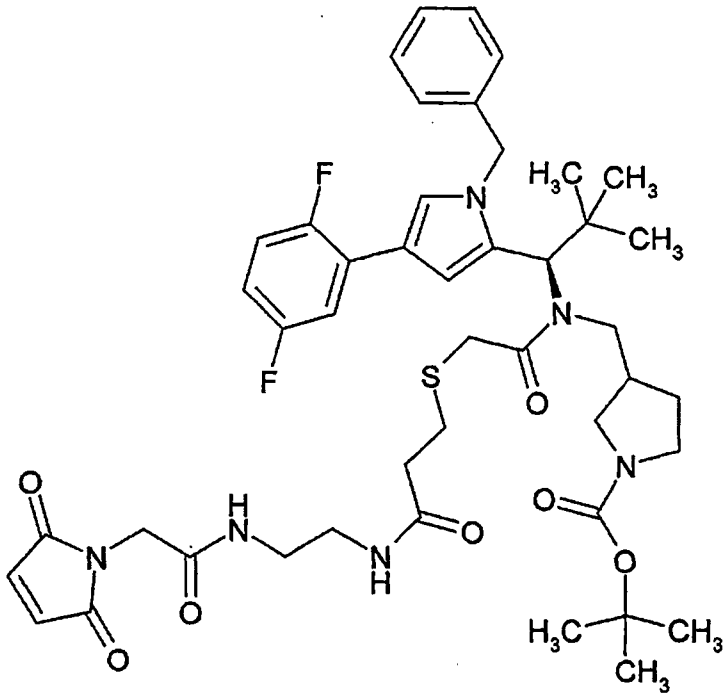


將226.0 mg (1.64 mmol)碳酸鉀添加至287.0 mg (0.45 mmol) 3-{[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(氯乙醯基)胺基]甲基}吡咯啶-1-甲酸第三丁酯(中間物C89異構體2)及54.6 mg (0.51 mmol) 3-硫基丙酸於14 ml甲醇及幾滴水中之混合物。將反應混合物在50℃下攪拌2.5小時。乙酸乙酯添加至反應混合物且有機相用水及飽和NaCl溶液重複洗滌。有機相經硫酸鎂乾燥，在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。殘餘物未經處理而進一步使用。此得到318.7 mg (理論之88%，88%純)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 1.36 min；MS (ESIpos): m/z = 684 $(M+H)^+$。

中間物C97

3-[2-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-14-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-3,8,13-三側氧基-5-硫雜-2,9,12-三氮雜十四烷-1-基]吡咯啶-1-甲酸第三丁酯(異構體2)



在氬氣下，將14.17 mg (0.11 mmol) N,N-二異丙基乙胺及27.80 mg (0.07 mmol) HATU添加至25.0 mg (0.04 mmol) 3-{[2-({(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}{[1-(第三丁氧羰基)吡咯啶-3-基]甲基}胺基)-2-側氧基乙基]硫基}丙酸(中間物C96)於2.81 ml DMF中之溶液。將反應混合物在室溫下攪拌10分鐘。接著添加22.75 mg (0.07 mmol) N-(2-胺基乙基)-2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯胺-乙烷(1:1)三氟乙酸(中間物L1)於1.4 ml DMF中之溶液及5 mg (0.04 mmol) N,N-二異丙基乙胺，且將混合物在室溫下攪拌隔夜。

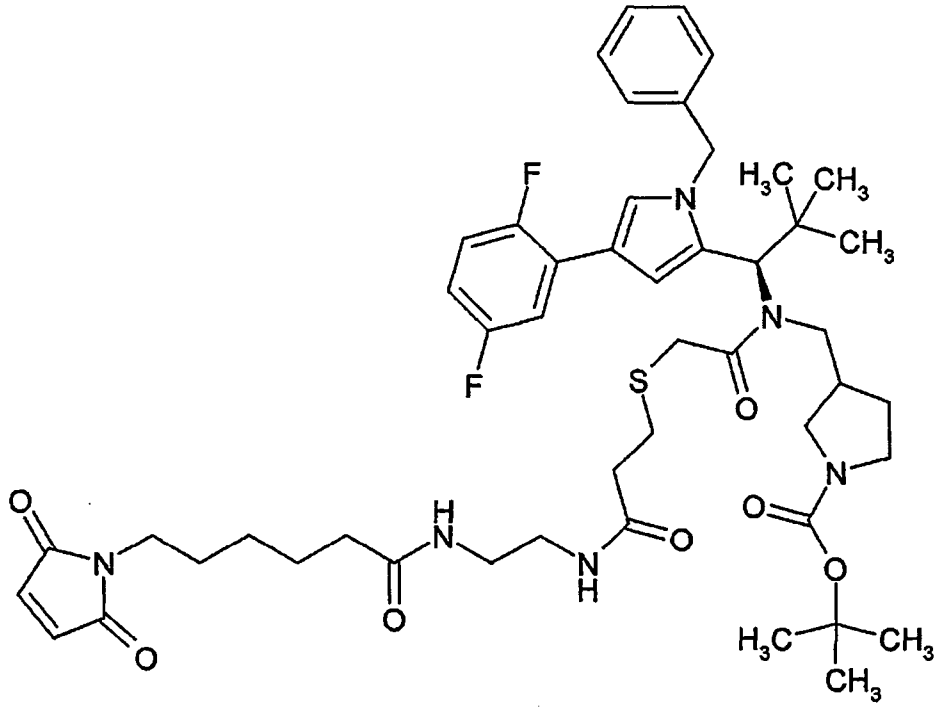
添加水且混合物用二氯甲烷萃取。有機相經硫酸鎂乾燥且在減壓下蒸發溶劑。殘餘物未經處理而進一步使用。此得到318.7 mg (理論之88%)標題化合物。

LC-MS (方法5): R_t = 4.39 min；MS (ESIpos): m/z = 863 $(M+H)^+$。

中間物C98

3-[2-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙

基}-18-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-3,8,13-三側氧基-5-硫雜-2,9,12-三氮雜十八烷-1-基]吡咯啶-1-甲酸第三丁酯(異構體2)

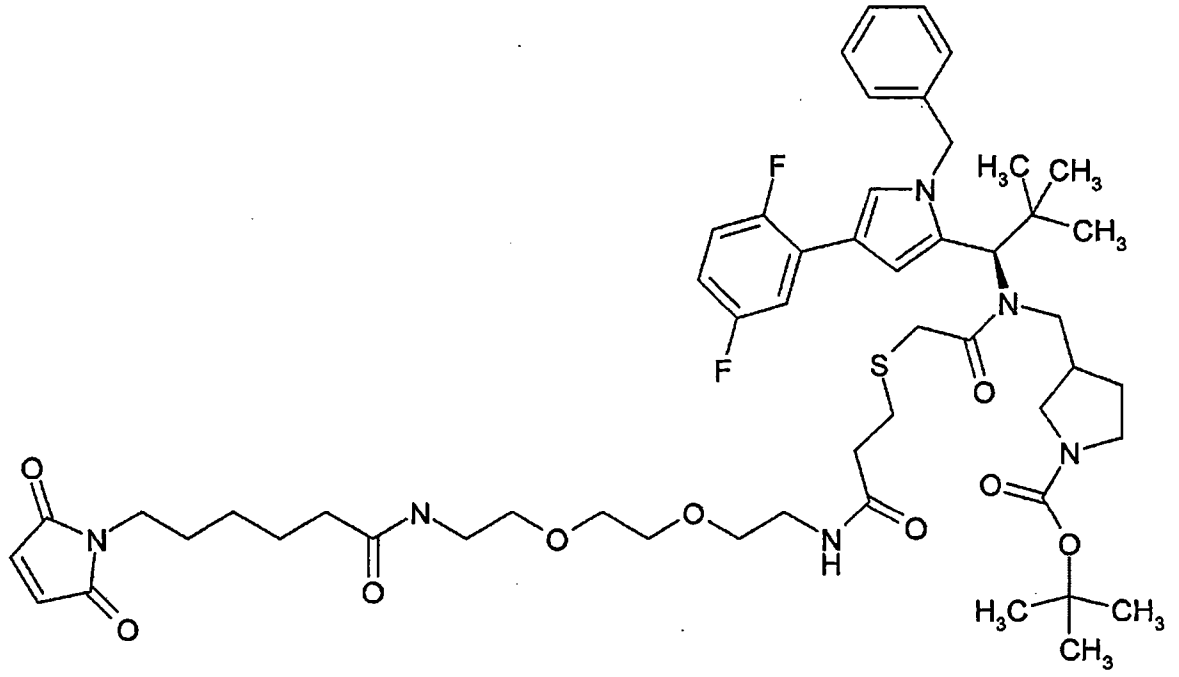


在氬氣下，將14.17 mg (0.11 mmol) N,N-二異丙基乙胺及27.80 mg (0.07 mmol) HATU添加至25.0 mg (0.04 mmol) 3-{[2-({(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}{[1-(第三丁氧羰基)吡咯啶-3-基]甲基}胺基)-2-側氧基乙基]硫基}丙酸(中間物C96)於2.81 ml DMF中之溶液。將反應混合物在室溫下攪拌10分鐘。接著添加37.30 mg (0.07 mmol) N-(2-胺基乙基)-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺-乙烷(1:1)三氟乙酸於1.4 ml DMF中之溶液及5 mg (0.04 mmol) N,N-二異丙基乙胺，且將混合物在室溫下攪拌隔夜。添加水且混合物用二氯甲烷萃取。有機相經硫酸鎂乾燥且在減壓下蒸發溶劑。殘餘物未經進一步純化即採用。此得到318.7 mg (理論之88%)標題化合物。

LC-MS (方法5): R_t = 4.54 min；MS (ESIpos): m/z = 919 $(M+H)^+$。

中間物C99

3-[2-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-24-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-3,8,19-三側氧基-12,15-二氧雜-5-硫雜-2,9,18-三氮雜二十四烷-1-基]吡咯啶-1-甲酸第三丁酯(異構體2)

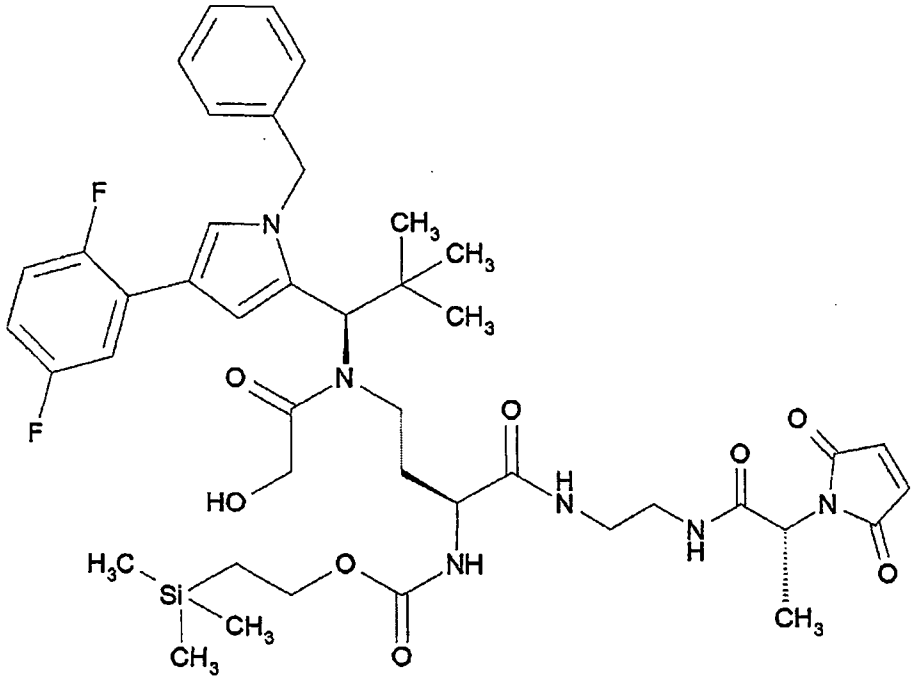


在氬氣下，將14.17 mg (0.11 mmol) N,N-二異丙基乙胺及27.80 mg (0.07 mmol) HATU添加至25.0 mg (0.04 mmol) 3-{[2-({(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}{[1-(第三丁氧羰基)吡咯啶-3-基]甲基}胺基)-2-側氧基乙基]硫基}丙酸(中間物C96)於2.81 ml DMF中之溶液。將反應混合物在室溫下攪拌10分鐘。接著添加35.05 mg (0.07 mmol) N-{2-[2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]乙基}-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺-乙烷(1:1)三氟乙酸(中間物L82)於1.4 ml DMF中之溶液及5 mg (0.04 mmol) N,N-二異丙基乙胺，且將混合物在室溫下攪拌隔夜。添加水且混合物用二氯甲烷萃取。有機相經硫酸鎂乾燥，在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。殘餘物未經處理即進一步使用。此得到25 mg (理論之36%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 4.52 min；MS (ESIpos): m/z = 1007 $(M+H)^+$。

中間物C100

{(2S)-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]-1-[(2-{[(2R)-2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)丙醯基]胺基}乙基)胺基]-1-側氧基丁-2-基}胺基甲酸2-(三甲基矽烷基)乙酯



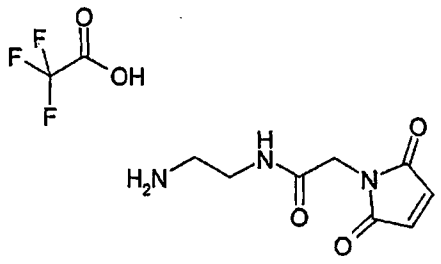
將22.2 mg (0.068 mmol) (2R)-N-(2-胺基乙基)-2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)丙醯胺(1:1)三氟乙酸添加至45 mg (0.068 mmol) (2S)-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]-2-({[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}胺基)丁酸於5.8 ml DMF中之溶液。在室溫下攪拌30分鐘後，將39 mg (0.10 mmol) HATU及36 mg (0.27 mmol) N,N-二異丙基乙胺添加至混合物。將反應混合物在室溫下攪拌1小時。不進行處理，混合物藉由製備型HPLC純化。此得到7 mg (理論之12%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 1.41 min；MS (ESIpos): m/z 851 $(M+H)^+$。

中間物L1

三氟乙酸/N-(2-胺基乙基)-2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙

醯胺(1:1)



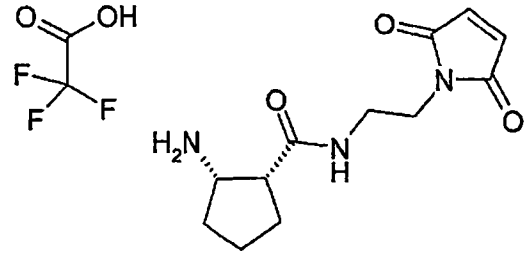
標題化合物藉由肽化學之經典方法，自市售(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙酸及(2-胺基乙基)胺基甲酸第三丁酯製備。

HPLC (方法11): R_t = 0.19 min；

LC-MS (方法1): R_t = 0.17 min；MS (ESIpos): m/z = 198 $(M+H)^+$。

中間物L2

三氟乙酸/rel-(1R,2S)-2-胺基-N-[2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙基]環戊烷甲醯胺(1:1)



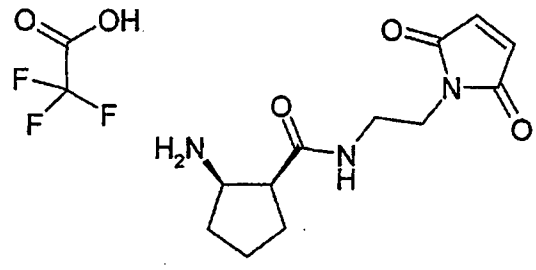
標題化合物自50 mg (0.214 mmol)市售順式-2-[(第三丁氧羰基)胺基]-1-環戊烷甲酸及60 mg (0.235 mmol)同樣市售三氟乙酸/1-(2-胺基乙基)-1H-吡咯-2,5-二酮(1:1)，藉由與EDC/HOBT偶合且隨後用TFA脫除保護基來製備。此得到36 mg (2步理論之38%)標題化合物。

HPLC (方法11): R_t = 0.2 min；

LC-MS (方法1): R_t = 0.17 min；MS (ESIpos): m/z = 252 $(M+H)^+$。

中間物L3

三氟乙酸/(1S,2R)-2-胺基-N-[2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙基]環戊烷甲醯胺(1:1)



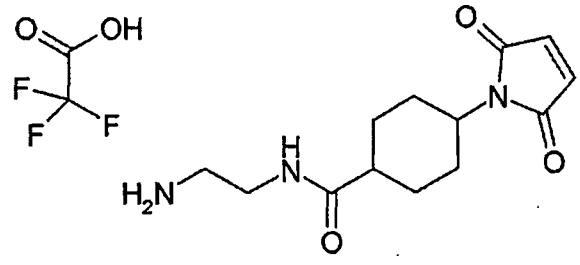
標題化合物自50 mg (0.214 mmol)市售(1S,2R)-2-[(第三丁氧羰基)胺基]環戊烷甲酸與72 mg (0.283 mmol)同樣市售三氟乙酸/1-(2-胺基乙基)-1H-吡咯-2,5-二酮(1:1)，藉由與EDC/HOBT偶合且隨後用TFA脫除保護基來製備。此得到13 mg (2步理論之16%)標題化合物。

HPLC (方法11): R_t = 0.2 min；

LC-MS (方法1): R_t = 0.2 min；MS (ESIpos): m/z = 252 $(M+H)^+$。

中間物L4

三氟乙酸/N-(2-胺基乙基)-4-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)環己烷甲醯胺(1:1)



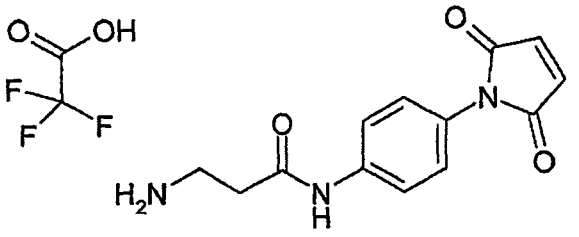
標題化合物藉由肽化學之經典方法，自市售1-[(4-{[(2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)氧基]羰基}環己基)甲基]-1H-吡咯-2,5-二酮及(2-胺基乙基)胺基甲酸第三丁酯製備。

HPLC (方法11): R_t = 0.26 min；

LC-MS (方法1): R_t = 0.25 min；MS (ESIpos): m/z = 280 $(M+H)^+$。

中間物L5

三氟乙酸/N-[4-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)苯基]-β-丙胺醯胺(1:1)



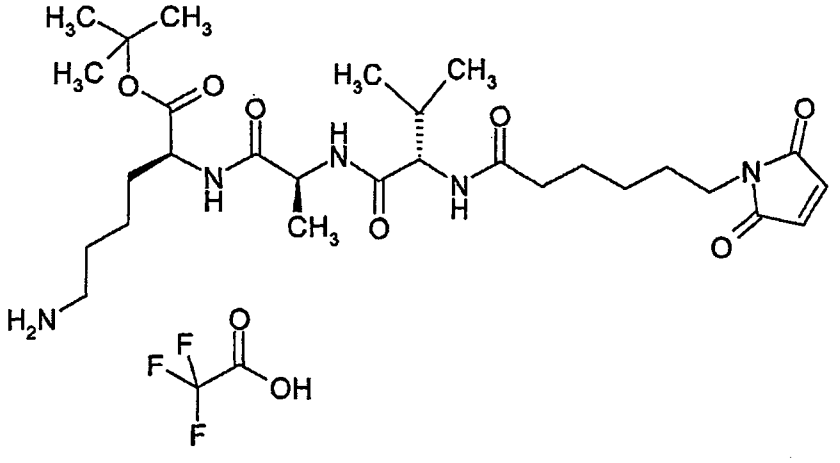
標題化合物藉由肽化學之經典方法，自市售1-(4-胺基苯基)-1H-吡咯-2,5-二酮及N-(第三丁氧羰基)-β-丙胺酸製備。

HPLC (方法11): R_t = 0.22 min；

LC-MS (方法1): R_t = 0.22 min；MS (ESIpos): m/z = 260 $(M+H)^+$。

中間物L6

三氟乙酸/第三丁基-N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]-L-纈胺醯基-L-丙胺醯基-L-離胺酸酯(1:1)



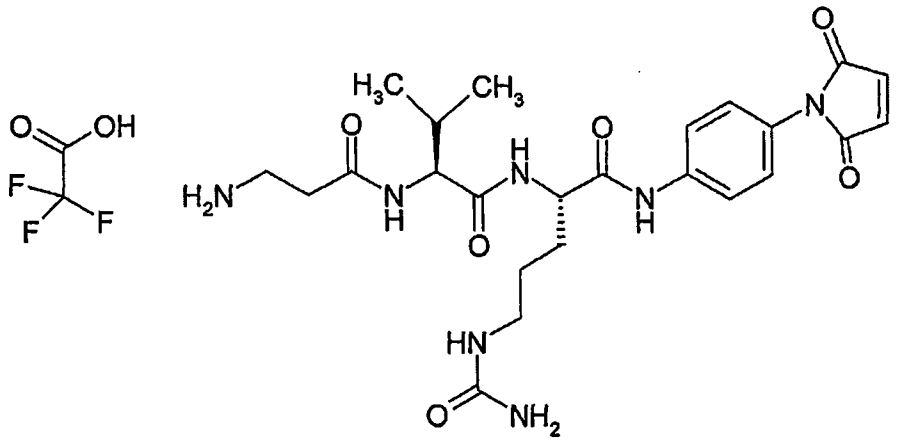
標題化合物藉由最初在EDC/HOBT存在下使市售6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己酸與藉由肽化學之經典方法製備的部分保護之肽L-纈胺醯基-L-丙胺醯基-N^6-(第三丁氧羰基)-L-離胺酸第三丁酯偶合來製備。此後在通常條件下藉由在含5%濃度三氟乙酸之DCM中在室溫下攪拌脫除胺基之保護基，得到標題化合物，產率為37%。

HPLC (方法11): R_t = 1.29 min；

LC-MS (方法1): R_t = 0.62 min；MS (ESIpos): m/z = 566 $(M+H)^+$。

中間物L7

三氟乙酸/β-丙胺醯基-L-纈胺醯基-N^5-胺甲醯基-N-[4-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)苯基]-L-鳥胺醯胺(1:1)



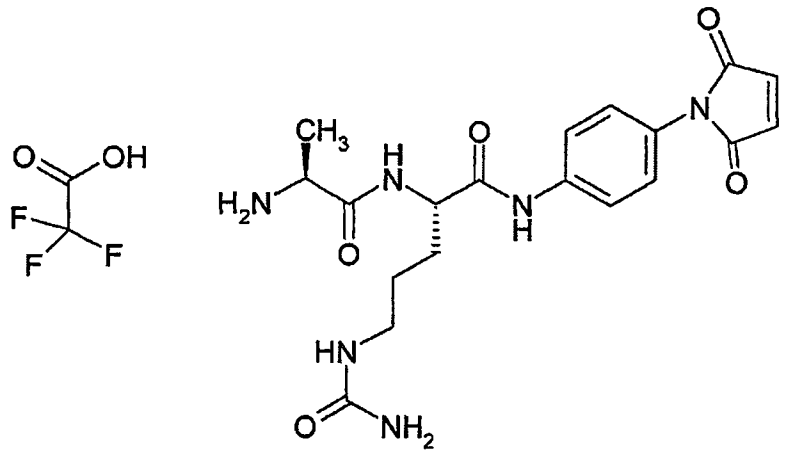
標題化合物根據肽化學之經典方法，自市售1-(4-胺基苯基)-1H-吡咯-2,5-二酮，藉由依序在HATU存在下與N^2-(第三丁氧羰基)-N^5-胺甲醯基-L-鳥胺酸偶合，用TFA脫除保護基，與N-(第三丁氧羰基)-L-纈胺酸2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯偶合，用TFA脫除保護基，與N-(第三丁氧羰基)-β-丙胺酸2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯偶合及再用TFA脫除保護基來製備。獲得32 mg標題化合物。

HPLC (方法11): R_t = 0.31 min；

LC-MS (方法1): R_t = 0.47 min；MS (ESIpos): m/z = 516 $(M+H)^+$。

中間物L8

三氟乙酸/L-丙胺醯基-N5-胺甲醯基-N-[4-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)苯基]-L-鳥胺醯胺(1:1)



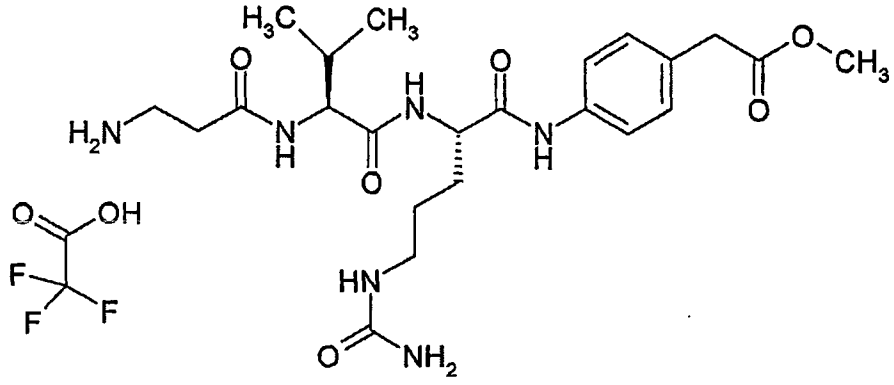
標題化合物根據肽化學之經典方法，自市售1-(4-胺基苯基)-1H-吡咯-2,5-二酮，藉由依序在HATU存在下與N^2-(第三丁氧羰基)-N^5-胺甲醯基-L-鳥胺酸偶合，用TFA脫除保護基，與N-(第三丁氧羰基)-L-丙胺酸2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯偶合及再用TFA脫除保護基來製備。獲得171 mg標題化合物。

HPLC (方法11): R_t = 0.23 min；

LC-MS (方法7): R_t = 0.3 min；MS (ESIpos): m/z = 417 $(M+H)^+$。

中間物L9

三氟乙酸/β-丙胺醯基-L-纈胺醯基-N^5-胺甲醯基-N-[4-(2-甲氧基-2-側氧基乙基)苯基]-L-鳥胺醯胺(1:1)



標題化合物類似於中間物L7，自市售(4-胺基苯基)乙酸甲酯製備。獲得320 mg標題化合物。

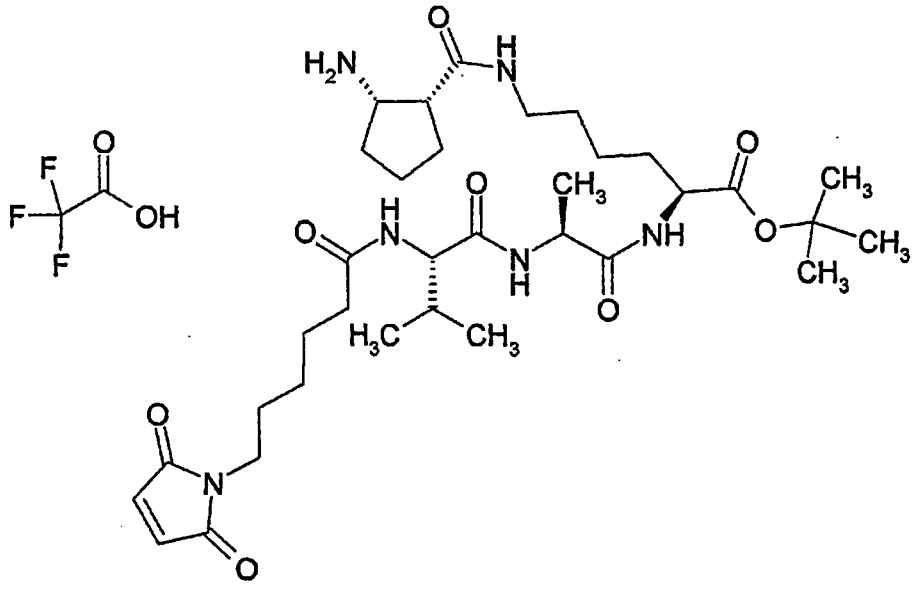
HPLC (方法11): R_t = 0.45 min；

LC-MS (方法1): R_t = 0.48 min；MS (ESIpos): m/z = 493

$(M+H)^+$。

中間物L10

N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]-L-纈胺醯基-L-丙胺醯基-rel-N^6-{[(1R,2S)-2-胺基環戊基]羰基}-L-離胺酸/三氟乙酸(1:2)



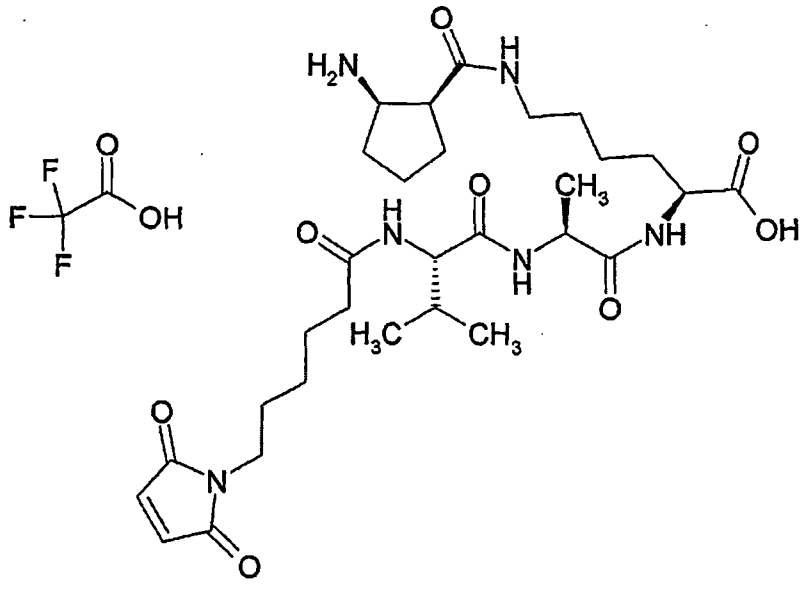
標題化合物自中間物L6，藉由在EDC/HOBT下與順式-2-[(第三丁氧羰基)胺基]-1-環戊烷甲酸偶合且隨後用TFA脫除保護基來製備。此得到12 mg (2步理論之52%)標題化合物。

HPLC (方法11): R_t = 1.45 min；

LC-MS (方法1): R_t = 0.73 min；MS (ESIpos): m/z = 677 $(M+H)^+$。

中間物L11

N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]-L-纈胺醯基-L-丙胺醯基-N^6-{[(1S,2R)-2-胺基環戊基]羰基}-L-離胺酸/三氟乙酸(1:2)



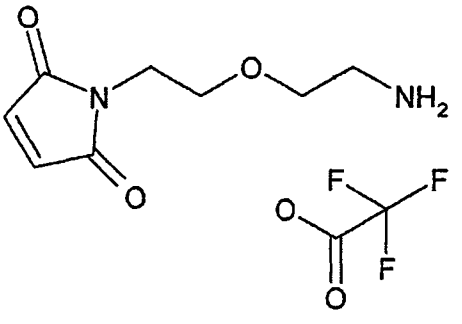
標題化合物自中間物L6，藉由在EDC/HOBT下與(1S,2R)-2-[(第三丁氧羰基)胺基]環戊烷甲酸偶合且隨後用TFA脫除保護基來製備。此得到11 mg (2步理論之39%)標題化合物。

HPLC (方法11): R_t = 1.45 min；

LC-MS (方法1): R_t = 0.74 min；MS (ESIpos): m/z = 677 $(M+H)^+$。

中間物L12

三氟乙酸/1-[2-(2-胺基乙氧基)乙基]-1H-吡咯-2,5-二酮(1:1)



將381 mg (2.46 mmol) 2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-甲酸甲酯添加至溶於7 ml二噁烷/水1:1中之228 mg (1.12 mmol) [2-(2-胺基乙氧基)乙基]胺基甲酸第三丁酯。接著添加1.2 ml飽和碳酸氫鈉溶液且在室溫下攪拌反應。總共攪拌5天及再添加2次相同量之碳酸氫鈉溶液後，反應藉由用三氟乙酸酸化進行處理，在旋轉蒸發儀上濃縮且藉由製備型HPLC純化殘餘物。合併適當溶離份，在減壓下移除溶劑且殘

餘物自乙腈/水1:1凍乾。

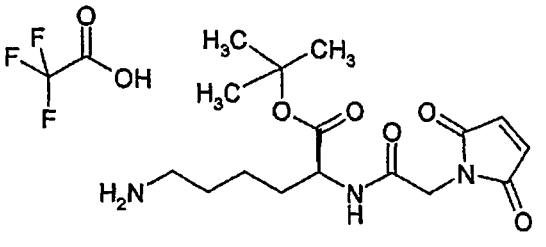
使殘餘物溶解於3 ml二氯甲烷中，且添加1 ml三氟乙酸。在室溫下攪拌15分鐘後，在減壓下移除溶劑且殘餘物自乙腈/水1:1凍乾。此得到70 mg (2步理論之67%)呈樹脂質殘餘物之標題化合物。

HPLC (方法11): R_t = 0.2 min；

LC-MS (方法1): R_t = 0.18 min；MS (ESIpos): m/z = 185 $(M+H)^+$。

中間物L13

三氟乙酸/N^2-[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]-L-離胺酸第三丁酯(1:1)



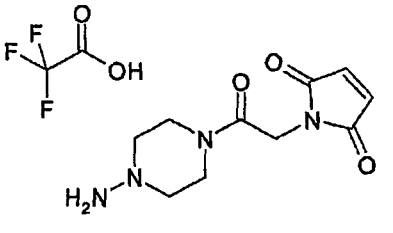
標題化合物藉由類似於中間物L6，在EDC/HOBT存在下使(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙酸與N^6-(第三丁氧羰基)-L-離胺酸第三丁酯鹽酸鹽(1:1)偶合及隨後緩緩移除第三丁氧羰基保護基來製備。

HPLC (方法11): R_t = 0.42 min；

LC-MS (方法1): R_t = 0.43 min；MS (ESIpos): m/z = 340 $(M+H)^+$。

中間物L14

三氟乙酸/1-[2-(4-胺基哌嗪-1-基)-2-側氧基乙基]-1H-吡咯-2,5-二酮(1:1)



標題化合物類似於中間物L2，經2步，自哌嗪-1-基胺基甲酸第三

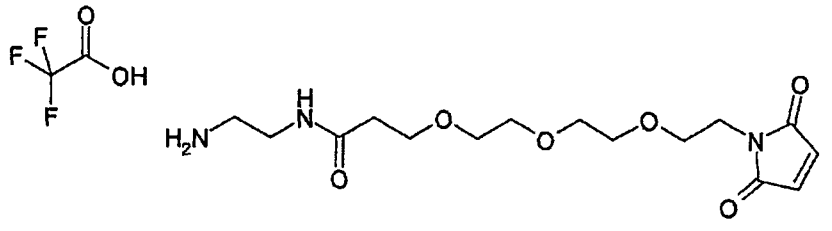
丁酯及(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙酸製備。

HPLC (方法11): R_t = 0.2 min；

LC-MS (方法3): R_t = 0.25 min；MS (ESIpos): m/z = 239 $(M+H)^+$。

中間物L15

三氟乙酸/N-(2-胺基乙基)-3-(2-{2-[2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)丙醯胺(1:1)



使2.93 g (10.58 mmol) 3-{2-[2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]乙氧基}丙酸第三丁酯溶於100 ml二噁烷/水1:1中，且添加3.28 g (21.15 mmol) 2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-甲酸甲酯及飽和碳酸氫鈉溶液，直至達到pH 6-7。將溶液在室溫下攪拌30分鐘且接著在減壓下蒸發1,4-二噁烷。接著添加200 ml水，且混合物在各種情況下用300 ml乙酸乙酯萃取三次。合併有機萃取物，經硫酸鎂乾燥且過濾。濃縮得到呈棕色油狀之3-(2-{2-[2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙氧基]乙氧基}乙氧基)丙酸第三丁酯，接著在高真空下乾燥。

HPLC (方法11): R_t = 1.5 min；

LC-MS (方法3): R_t = 0.88 min；MS (ESIpos): m/z = 375 $(M+NH_4)^+$。

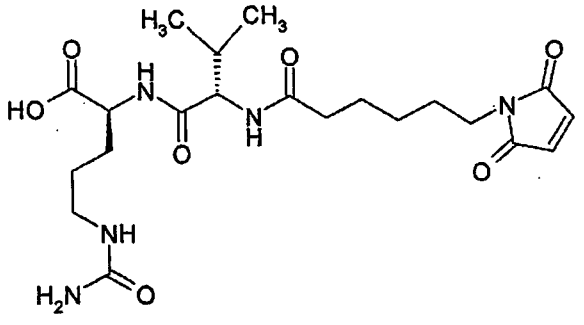
此中間物藉由標準方法(用TFA脫除保護基，與(2-胺基乙基)胺基甲酸第三丁酯偶合及再用TFA脫除保護基)轉變成標題化合物。

HPLC (方法11): R_t = 0.2 min；

LC-MS (方法3): R_t = 0.25 min；MS (ESIpos): m/z = 344 $(M+H)^+$。

中間物L16

N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)已醯基]-L-纈胺醯基-N^5-胺甲醯基-L-鳥胺酸



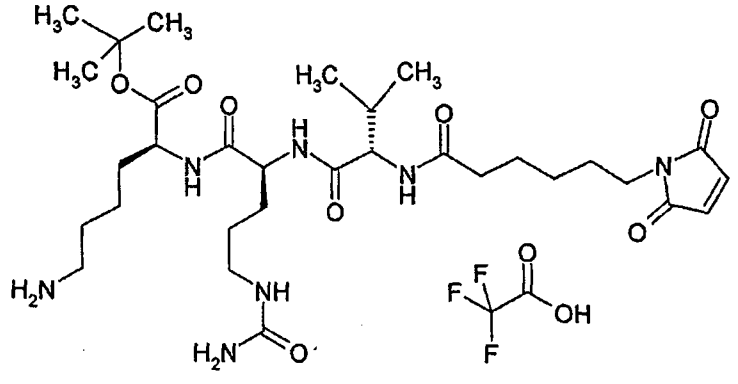
將535 mg (1.73 mmol)市售1-{6-[(2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)氧基]-6-側氧基已基}-1H-吡咯-2,5-二酮及930 ml *N,N*-二異丙基乙胺添加至266 mg (1.33 mmol) L-纈胺醯基-N5-胺甲醯基-L-鳥胺酸於24 ml DMF中之溶液。反應在超音波浴中處理24小時且接著在減壓下濃縮至乾。剩餘殘餘物藉由製備型HPCL純化且在濃縮適當溶離份及在高真空下乾燥殘餘物後得到337 mg (理論之50%)標題化合物。

HPLC (方法11): R_t = 0.4 min；

LC-MS (方法3): R_t = 0.58 min；MS (ESIpos): m/z = 468 $(M+H)^+$。

中間物L17

三氟乙酸/N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)已醯基]-L-纈胺醯基-N^5-胺甲醯基-L-鳥胺醯基-L-離胺酸第三丁酯(1:1)



標題化合物藉由最初在EDC/HOBT及*N,N*-二異丙基乙胺存在下使

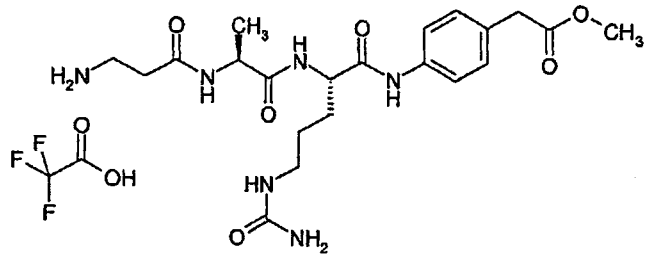
172 mg (0.37 mmol)中間物L16及125 mg (0.37 mmol) N6-(第三丁氧羰基)-L-離胺酸第三丁酯鹽酸鹽(1:1)偶合且接著在通常條件下藉由在含10%濃度三氟乙酸之DCM中在室溫下攪拌2小時而脫除胺基保護基來製備。自乙腈/水冷凍乾燥得到經2步194 mg (理論之49%)標題化合物。

HPLC (方法11): R_t = 1.1 min；

LC-MS (方法1): R_t = 0.58 min；MS (ESIpos): m/z = 652 $(M+H)^+$。

中間物L18

三氟乙酸/β-丙胺醯基-L-丙胺醯基-N^5-胺甲醯基-N-[4-(2-甲氧基-2-側氧基乙基)苯基]-L-鳥胺醯胺(1:1)



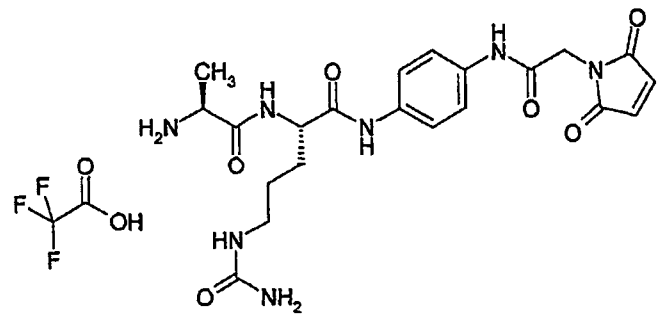
標題化合物類似於中間物L7，自(4-胺基苯基)乙酸甲酯，依序根據肽化學之經典方法，藉由在HATU存在下連接N^2-(第三丁氧羰基)-N^5-胺甲醯基-L-鳥胺酸，用TFA脫除保護基，與N-(第三丁氧羰基)-L-丙胺酸2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯偶合，用TFA脫除保護基，與N-(第三丁氧羰基)-β-丙胺酸2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯偶合及再用TFA脫除保護基來製備。獲得330 mg標題化合物。

HPLC (方法11): R_t = 0.29 min；

LC-MS (方法1): R_t = 0.41 min；MS (ESIpos): m/z = 465 $(M+H)^+$。

中間物L19

三氟乙酸/L-丙胺醯基-N5-胺甲醯基-N-(4-{[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]胺基}苯基)-L-鳥胺醯胺(1:1)



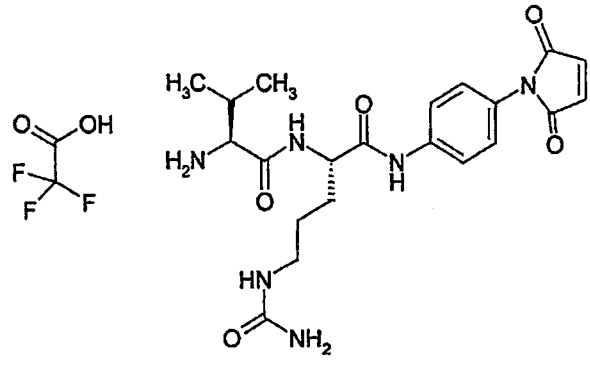
標題化合物自1,4-苯二胺，依序根據肽化學之經典方法製備。在第一步中，在HATU及*N,N*-二異丙基乙胺存在下將942 mg (8.72 mmol) 1,4-苯二胺用0.8 g (2.9 mmol) N^2-(第三丁氧羰基)-N^5-胺甲醯基-L-鳥胺酸單醯化。在第二步中，以類似方式，二級苯胺胺基在HATU及*N,N*-二異丙基乙胺存在下用(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙酸醯化。接著用TFA脫除保護基，與N-(第三丁氧羰基)-L-丙胺酸2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯偶合及再用TFA脫除保護基以另外3個合成步驟得到標題化合物，其中藉由此途徑獲得148 mg。

LC-MS (方法1): R_t = 0.21 min；MS (ESIpos): m/z = 474 $(M+H)^+$。

LC-MS (方法4): R_t = 0.2 min；MS (ESIpos): m/z = 474 $(M+H)^+$。

中間物L20

三氟乙酸/L-纈胺醯基-N^5-胺甲醯基-N-[4-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)苯基]-L-鳥胺醯胺(1:1)



標題化合物根據肽化學之經典方法，類似於中間物L8，自市售1-(4-胺基苯基)-1H-吡咯-2,5-二酮，藉由依序在HATU存在下與N^2-(第三丁氧羰基)-N^5-胺甲醯基-L-鳥胺酸偶合，用TFA脫除保護基，與N-(第三丁氧羰基)-L-纈胺酸2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯偶合及再用TFA脫

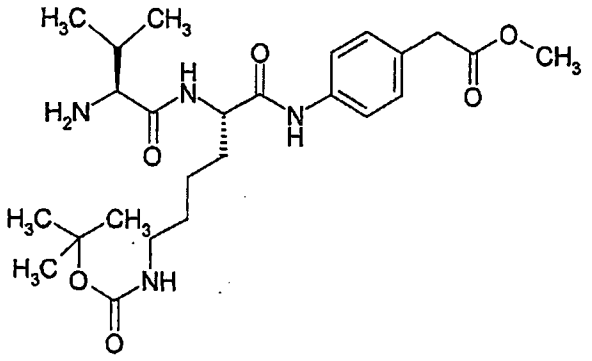
除保護基來製備。獲得171 mg標題化合物。

HPLC (方法11): R_t = 0.28 min；

LC-MS (方法1): R_t = 0.39 min；MS (ESIpos): m/z = 445 $(M+H)^+$。

中間物L21

L-纈胺醯基-N^6-(第三丁氧羰基)-N-[4-(2-甲氧基-2-側氧基乙基)苯基]-L-離胺醯胺



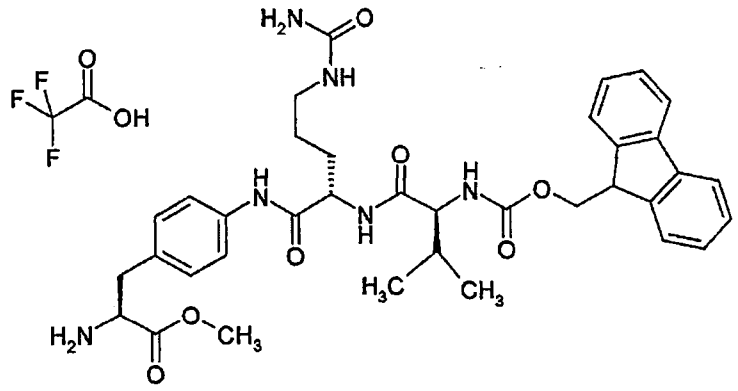
標題化合物根據肽化學之經典方法，自市售0.42 g (2.56 mmol)(4-胺基苯基)乙酸甲酯，藉由依序在HATU及*N,N*-二異丙基乙胺存在下與N6-(第三丁氧羰基)-N2-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]-L-離胺酸偶合，用哌啶脫除保護基，在*N,N*-二異丙基乙胺存在下與N-[(苯甲氧基)羰基]-L-纈胺酸2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯偶合及隨後在10%鈀/活性碳上氫解移除苯甲氧基羰基保護基來製備。此得到360 mg (4步理論之32%)標題化合物。

HPLC (方法11): R_t = 1.5 min；

LC-MS (方法1): R_t = 0.73 min；MS (ESIpos): m/z = 493 $(M+H)^+$。

中間物L22

三氟乙酸/N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]-L-纈胺醯基-N-{4-[(2S)-2-胺基-3-甲氧基-3-側氧基丙基]苯基}-N^5-胺甲醯基-L-鳥胺醯胺(1:1)



標題化合物自N-(第三丁氧羰基)-4-硝基-L-苯基丙胺酸，隨後根據肽化學之經典方法製備。2.5 g (8.06 mmol)此起始物質在第一步中最初轉變成銫鹽且接著用含碘甲烷之DMF轉變成甲酯。

在10%鈀/活性碳上在甲醇中氫解，接著硝基轉變成胺基。

接著以此方式產生之胺基在DMF中在HATU及*N,N*-二異丙基乙胺存在下用N5-胺甲醯基-N2-[(9H-茀-9-基甲氧基)羰基]-L-鳥胺酸醯化。在下一步中，用含哌啶之DMF移除Fmoc基團。

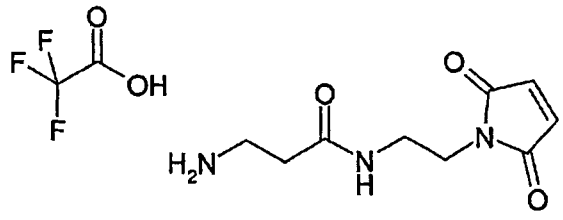
接著在DMF中在1-(3-二甲基胺基丙基)-3-乙基碳化二亞胺鹽酸鹽、1-羥基-1*H*-苯并三唑水合物及*N,N*-二異丙基乙胺存在下與N-[(9H-茀-9-基甲氧基)羰基]-L-纈胺酸偶合且最終用三氟乙酸移除第三丁氧羰基。

HPLC (方法11): R_t = 1.6 min；

LC-MS (方法1): R_t = 0.77 min；MS (ESIpos): m/z = 673 $(M+H)^+$。

中間物L23

三氟乙酸/N-[2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙基]-β-丙胺醯胺(1:1)

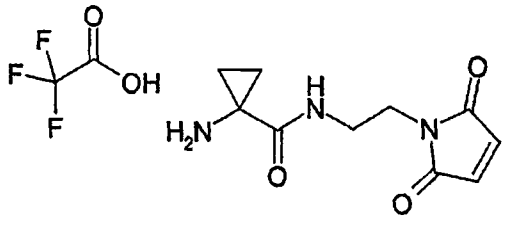


標題化合物自市售三氟乙酸/1-(2-胺基乙基)-1H-吡咯-2,5-二酮(1:1)，藉由在EDCI/HOBT及N,N-二異丙基乙胺存在下與N-(第三丁氧羰基)-β-丙胺酸偶合且隨後用三氟乙酸脫除保護基來製備。

HPLC (方法11): R_t = 0.19 min。

中間物L24

三氟乙酸/1-胺基-N-[2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙基]環丙烷甲醯胺(1:1)



使114 mg (0.67 mmol)市售1-[(第三丁氧羰基)胺基]環丙烷甲酸溶於25 ml DCM中，添加110 mg (0.623 mmol)市售三氟乙酸/1-(2-胺基乙基)-1H-吡咯-2,5-二酮(1:1)及395 µl N,N-二異丙基乙胺且混合物冷卻至-10℃。接著添加217 mg (0.793 mmol)四氟硼酸2-溴-1-乙基吡錠，且將混合物在室溫下攪拌2小時。接著混合物用乙酸乙酯稀釋且連續用10%濃度檸檬酸、飽和碳酸氫鈉溶液及飽和氯化鈉溶液萃取，接著經硫酸鎂乾燥且濃縮。在高真空下乾燥得到152 mg經保護之中間物。

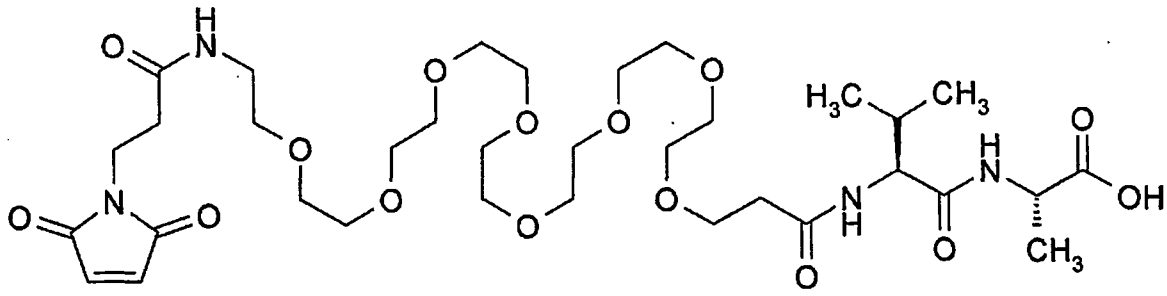
接著此等溶解於10 ml DCM中且用1 ml三氟乙酸脫除保護基。自乙腈/水凍乾得到158 mg (2步理論之71%)標題化合物。

HPLC (方法11): R_t = 0.19 min。

LC-MS (方法3): R_t = 0.98 min；MS (ESIpos): m/z = 224 $(M+H)^+$。

中間物L25

N-[31-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-29-側氧基-4,7,10,13,16,19,22,25-八氧雜-28-氮雜三十一烷-1-醯基]-L-纈胺醯基-L-丙胺酸

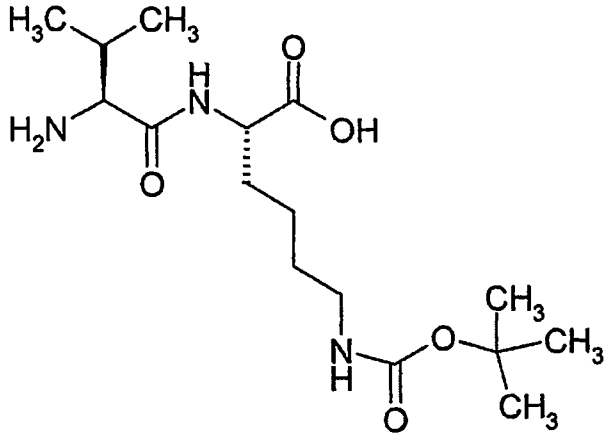


使31.4 mg (0.17 mmol)纈胺醯基-L-丙胺酸溶於3.0 ml DMF中，且添加115.0 mg (0.17 mmol) 3-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-N-{27-[(2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)氧基]-27-側氧基-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧雜二十七烷-1-基}丙醯胺及33.7 mg (0.33 mmol)三乙胺。將混合物在室溫下攪拌隔夜。反應混合物直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到74.1 mg (理論之58%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.61 min；MS (ESIpos): m/z = 763 $[M+H]^+$。

中間物L26

L-纈胺醯基-N6-(第三丁氧羰基)-L-離胺酸



使600.0 mg (1.58 mmol) N2-[(苯甲氧基)羰基]-N6-(第三丁氧羰基)-L-離胺酸懸浮於25.0 ml水/乙醇/THF (1:1:0.5)中，添加鈀/碳(10%)且混合物在室溫下在標準壓力下用氫氣氫化5小時。濾出催化劑且溶劑在減壓下蒸發。所得化合物未經進一步純化即用於下一步。

LC-MS (方法1): R_t = 0.42 min；MS (ESIpos): m/z = 247 $[M+H]^+$。

使180 mg (0.73 mmol) N6-(第三丁氧羰基)-L-離胺酸溶於5.0 ml DMF中，且添加74.0 mg (0.73 mmol)三乙胺。接著添加254.6 mg (0.73 mmol) N-[(苯甲氧基)羰基]-L-纈胺酸2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯及74.0 mg (0.73 mmol)三乙胺。將反應混合物在室溫下攪拌3.5小時。反應溶液直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到294.1 mg (理論之76%) N-[(苯甲氧基)羰基]-L-纈胺醯基-N6-(第三丁氧羰基)-L-離胺酸。

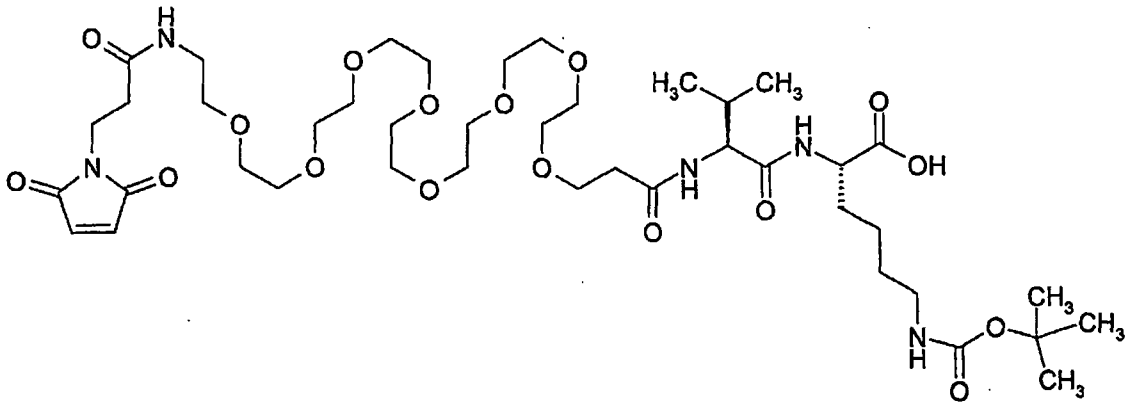
LC-MS (方法1): R_t = 0.97 min；MS (ESIpos): m/z = 480 $[M+H]^+$。

272.2 mg (0.57 mmol) N-[(苯甲氧基)羰基]-L-纈胺醯基-N6-(第三丁氧羰基)-L-離胺酸最初饋入20.0 ml乙酸乙酯/乙醇/THF (1:1:1)中，且添加27.2 mg鈀/活性碳。混合物在室溫下在標準壓力下用氫氣氫化5小時。藉助於Celite(R)濾出混合物且濾餅用乙酸乙酯/乙醇/THF (1:1:1)洗滌。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。標題化合物(182 mg，理論之72%)未經進一步純化即用於下一反應步驟中。

LC-MS (方法1): R_t = 0.53 min；MS (ESIpos): m/z = 346 $[M+H]^+$。

中間物L27

N-[31-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-29-側氧基-4,7,10,13,16,19,22,25-八氧雜-28-氮雜三十一烷-1-醯基]-L-纈胺醯基-N6-(第三丁氧羰基)-L-離胺酸

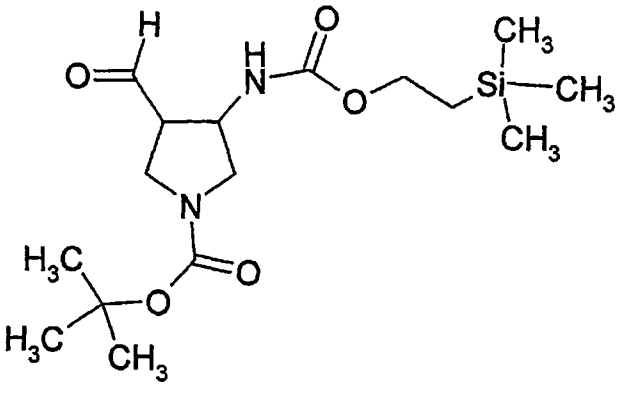


30 mg (0.07 mmol) L-纈胺醯基-N6-(第三丁氧羰基)-L-離胺酸(中間物L26)及46.1 mg (0.07 mmol) 3-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-N-{27-[(2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)氧基]-27-側氧基-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧雜二十七烷-1-基}丙醯胺最初饋入1.5 ml DMF中，且添加6.8 mg (0.07 mmol) 4-甲基嗎啉。將反應溶液在室溫下攪拌隔夜。反應混合物直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到55.6 mg (理論之90%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.77 min；MS (ESIpos): m/z = 920 $[M+H]^+$。

中間物L28

3-甲醯基-4-({[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}胺基)吡咯啶-1-甲酸第三丁酯



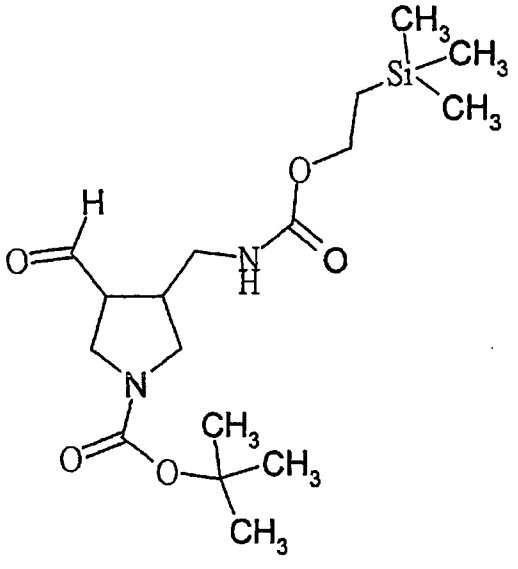
461.7 mg (1.15 mmol) 3-乙基-4-({[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰

基}胺基)吡咯啶-1,3-二甲酸1-第三丁酯(此化合物根據WO 2006/066896之文獻程序製備)最初饋入5.0 ml無水二氯甲烷中且混合物冷卻至-78℃。接著逐滴緩慢添加326.2 mg (2.29 mmol)氫化二異丁基鋁溶液(1 M THF溶液)，且將混合物在-78℃下攪拌2小時(藉由薄層層析法監測(石油醚/乙酸乙酯= 3:1))。逐滴添加溶於60 ml水中之1.3 g (4.59 mmol)酒石酸鉀鈉且使反應混合物升溫至室溫。乙酸乙酯添加至反應混合物且水相用乙酸乙酯萃取三次。合併之有機相用飽和NaCl溶液洗滌一次且經硫酸鎂乾燥。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到629.0 mg標題化合物作為粗產物，其未經進一步純化立即用於下一反應步驟。

中間物L29

3-甲醯基-4-[({[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}胺基)甲基]吡咯啶-1-甲酸第三丁酯

非對映異構體之混合物



807.1 mg (2.34 mmol) 3-({[第三丁基(二甲基)矽烷基]氧基}甲基)-4-(羥基甲基)吡咯啶-1-甲酸第三丁酯(根據WO 2006/100036之文獻程序製備)最初饋入8.0 ml二氯甲烷中，且添加236.4 mg (2.34 mmol)三乙胺。在0℃下，逐滴添加267.6 mg (2.34 mmol)甲烷磺醯氯，且在室溫

下攪拌反應混合物隔夜。再添加133.8 mg (1.17 mmol)甲烷磺醯氯及118.2 mg (1.17 mmol)三乙胺。將反應混合物在室溫下攪拌隔夜。混合物用二氯甲烷稀釋且在各種情況下有機相用飽和碳酸氫鈉溶液、5%濃度硫酸氫鉀溶液及飽和NaCl溶液洗滌一次。經硫酸鎂乾燥後，在減壓下蒸發溶劑且殘餘物在Biotage Isolera (矽膠，管柱50 g SNAP，流動速率66 ml/min，環己烷/乙酸乙酯)上純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到402.0 mg (理論之41%)化合物3-({[第三丁基(二甲基)矽烷基]氧基}甲基)-4-{[(甲基磺醯基)氧基]甲基}吡咯啶-1-甲酸第三丁酯。

LC-MS (方法1): R_t = 1.38 min ; MS (ESIpos): m/z = 424 $[M+H]^+$。

400.0 mg (0.94 mmol) 3-({[第三丁基(二甲基)矽烷基]氧基}甲基)-4-{[(甲基磺醯基)氧基]甲基}吡咯啶-1-甲酸第三丁酯最初饋入5.0 ml DMF中，且添加98.2 mg (1.51 mmol)疊氮化鈉。將反應混合物在40℃下攪拌10小時。接著添加另外30.7 mg (0.47 mmol)疊氮化鈉，且將混合物在40℃下再攪拌10小時。添加乙酸乙酯且有機相用水重複洗滌。經硫酸鎂乾燥有機相後，在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到309.5 mg (理論之89%)化合物3-(疊氮基甲基)-4-({[第三丁基(二甲基)矽烷基]氧基}甲基)吡咯啶-1-甲酸第三丁酯。化合物未經進一步純化即用於合成下一步。

LC-MS (方法1): R_t = 1.50 min ; MS (ESIpos): m/z = 371 $[M+H]^+$。

使250 mg (0.68 mmol) 3-(疊氮基甲基)-4-({[第三丁基(二甲基)矽烷基]氧基}甲基)吡咯啶-1-甲酸第三丁酯溶於10.0 ml乙酸乙酯/乙醇(1:1)中，且添加25.0 mg鈀/活性碳(10%)。混合物在室溫下在標準壓力下用氫氣氫化8小時。反應物經Celite(R)過濾且濾餅用乙酸乙酯澈底

洗滌。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到226.2 mg (理論之82%)化合物3-(胺基甲基)-4-({[第三丁基(二甲基)矽烷基]氧基}甲基)吡咯啶-1-甲酸第三丁酯。化合物未經進一步純化即用於合成下一步。

LC-MS (方法1): R_t = 0.89 min ; MS (ESIpos): m/z = 345 $[M+H]^+$。

使715.0 mg (2.08 mmol) 3-(胺基甲基)-4-({[第三丁基(二甲基)矽烷基]氧基}甲基)吡咯啶-1-甲酸第三丁酯溶於15.0 ml THF中，且添加2.28 ml (2.28 mmol) TBAF溶液(1M THF溶液)。將反應混合物在室溫下攪拌隔夜。在減壓下蒸發溶劑且殘餘物(1.54 g)未經進一步純化即用於合成下一步。

LC-MS (方法1): R_t = 0.41 min ; MS (ESIpos): m/z = 231 $[M+H]^+$。

1.54 g (4.88 mmol) 3-(胺基甲基)-4-(羥基甲基)吡咯啶-1-甲酸第三丁酯最初饋入1,4-二噁烷中，且添加541.8 mg (4.88 mmol)氯化鈣(無水)及488.6 mg (4.88 mmol)碳酸鈣且將混合物用力攪拌。接著添加592.8 mg (5.86 mmol)三乙胺及1.52 g (5.86 mmol) 1-({[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}氧基)吡咯啶-2,5-二酮且反應混合物在室溫下攪拌隔夜。添加644.9 mg (10.7 mmol) HOAc及乙酸乙酯。有機相用水洗滌兩次且用飽和NaCl溶液洗滌一次。經硫酸鎂乾燥後，在減壓下蒸發溶劑且殘餘物在矽膠(移動相：二氯甲烷/甲醇= 100:1)上純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到346.9 mg (理論之19%)化合物3-(羥基甲基)-4-[({[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}胺基)甲基]吡咯啶-1-甲酸第三丁酯。

LC-MS (方法1): R_t = 1.08 min ; MS (ESIpos): m/z = 375 $[M+H]^+$。

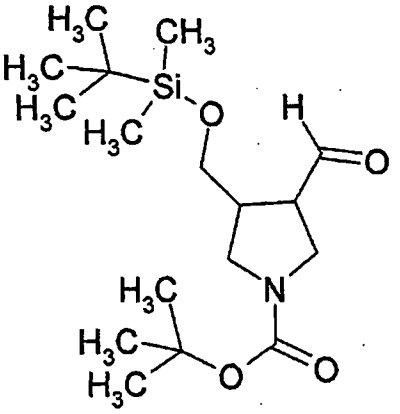
804.0 mg (2.15 mmol) 3-(羥基甲基)-4-[({[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}胺基)甲基]吡咯啶-1-甲酸第三丁酯最初饋入20.0 ml氯仿及20.0 ml 0.05 N碳酸鉀/0.05 N碳酸氫鈉溶液(1:1)中。接著添加59.7 mg (0.22 mmol)氯化四正丁基銨、429.9 mg (3.22 mmol) N-氯代丁二醯亞胺及33.5 mg (0.22 mmol) TEMPO且將反應混合物在室溫下用力攪拌隔夜。分離出有機相且在減壓下脫除溶劑。殘餘物藉由矽膠層析法(移動相：環己烷/乙酸乙酯= 3:1)純化。此得到517.0 mg (理論之46%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 1.13 min ; MS (ESIpos): m/z = 373 $[M+H]^+$。

中間物L30

3-({[第三丁基(二甲基)矽烷基]氧基}甲基)-4-甲醯基吡咯啶-1-甲酸第三丁酯

立體異構體混合物

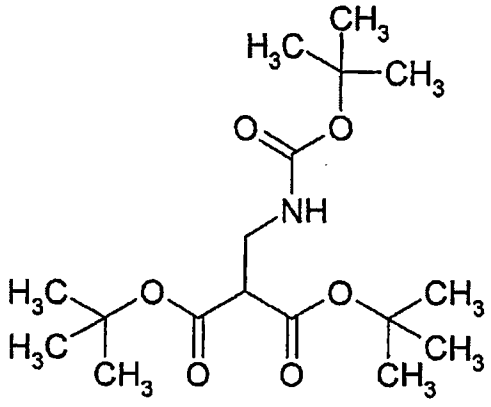


250.0 mg (0.72 mmol) 3-({[第三丁基(二甲基)矽烷基]氧基}甲基)-4-(羥基甲基)吡咯啶-1-甲酸第三丁酯(化合物根據WO2006/100036之文獻程序製備)最初饋入12.5 ml二氯甲烷/DMSO (4:1)中，且添加219.6 mg (2.17 mmol)三乙胺。在2℃下，每次一點添加345.5 mg (2.17 mmol)三氧化硫-吡啶複合物且將混合物在2℃下攪拌3小時。每次一點添加另外345.5 mg (2.17 mmol)三氧化硫-吡啶複合物且將混合物在室

溫下攪拌17小時。反應混合物分配於二氯甲烷與水之間。水相用二氯甲烷萃取三次且合併之有機相用水洗滌一次且經硫酸鎂乾燥。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。殘餘物未經進一步純化即用於合成下一步(薄層層析法：石油醚/乙酸乙酯7:3)。

中間物L31

{[(第三丁氧羰基)胺基]甲基}丙二酸二第三丁酯



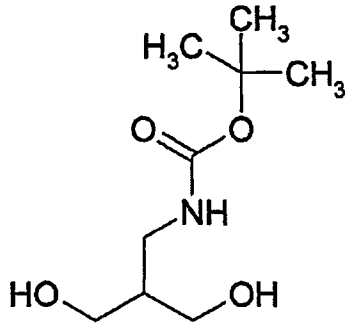
將57.2 g (488.27 mmol)胺基甲酸第三丁酯、51.2 ml (683.57 mmol) 37%濃度甲醛水溶液及25.9 g (244.13 mmol)碳酸鈉添加至600 ml水。使混合物溫熱，直至形成溶液且接著在室溫下攪拌16小時。所形成之懸浮液用500 ml二氯甲烷萃取且分離出有機相，用飽和氯化鈉溶液洗滌且經硫酸鈉乾燥。混合物在旋轉蒸發儀上濃縮且殘餘物在高真空下乾燥，得到結晶固體。使殘餘物溶解於1000 ml無水THF中，且在室溫下逐滴添加322 ml (3.414 mol)乙酸酐與138 ml (1.707 mol)吡啶之混合物。將反應混合物在室溫下攪拌16小時且接著在旋轉蒸發儀上濃縮，其中水浴在室溫下。使殘餘物溶解於乙醚中且用飽和碳酸氫鈉溶液洗滌三次且用飽和氯化鈉溶液洗滌一次。有機相經硫酸鈉乾燥且在旋轉蒸發儀上濃縮且在高真空下乾燥殘餘物2天。使殘餘物溶解於2000 ml無水THF中，且在冰冷卻下添加456 ml (456.52 mmol) 1 M第三丁醇鉀之THF溶液。將混合物在0℃下攪拌20分鐘，且接著逐滴添加溶於200 ml無水THF中之100.8 g (456.52 mmol)丙二酸二第三丁

酯。將混合物在室溫下攪拌48小時，且接著添加水。反應混合物在旋轉蒸發儀上濃縮且溶解於500 ml乙酸乙酯中。混合物用500 ml水及100 ml飽和氯化鈉溶液洗滌且有機相經硫酸鈉乾燥。有機相在旋轉蒸發儀上濃縮且在高真空下乾燥殘餘物。殘餘物藉由矽膠過濾(移動相：環己烷/乙酸乙酯，梯度= 30:1 → 5:1)純化。此得到37.07 g (理論之22%)目標化合物。

LC-MS (方法6): R_t = 2.87 min；MS (ESIpos): m/z = 346 $[M+H]^+$。

中間物L32

[3-羥基-2-(羥基甲基)丙基]胺基甲酸第三丁酯

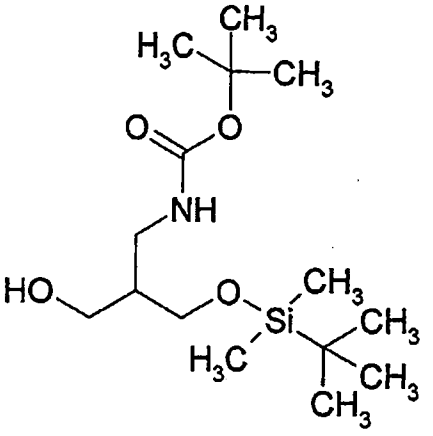


使37.0 g (107.11 mmol) (乙醯氧基甲基)丙二酸二第三丁酯溶於1000 ml無水THF中，且在冰冷卻下逐滴添加535.5 ml (1071.10 mmol) 2 M硼氫化鋰之THF溶液。逐滴添加19.3 ml (1071.10 mmol)水且將混合物在室溫下攪拌4.5小時。反應混合物在旋轉蒸發儀上濃縮，且在高真空下乾燥。使殘餘物溶解於1500 ml乙酸乙酯中，添加100 ml水且在水冷卻下將混合物攪拌(輕微放熱) 30分鐘。分離出有機相且水相用500 ml乙酸乙酯萃取兩次。有機相在旋轉蒸發儀上濃縮且在高真空下乾燥殘餘物。此得到20.7 g (理論之94%)目標化合物。

LC-MS (方法6): R_t = 1.49 min；MS (EIpos): m/z = 106 $[M-C_5H_8O_2]^+$。

中間物L33

[3-{[第三丁基(二甲基)矽烷基]氧基}-2-(羥基甲基)丙基]胺基甲酸第三丁酯

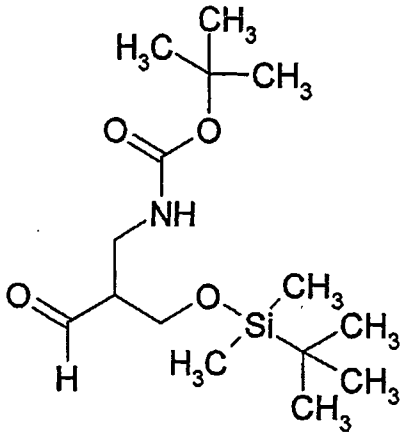


使20.00 g (97.44 mmol) [3-羥基-2-(羥基甲基)丙基]胺基甲酸第三丁酯溶於1000 ml無水二氯甲烷中，且在室溫下添加6.63 g (97.44 mmol)咪唑及16.16 g (107.18 mmol)第三丁基(氯)二甲基矽烷。將反應混合物在室溫下攪拌16小時且用半濃氯化鈉溶液洗滌。水相用乙酸乙酯萃取且合併之有機相經硫酸鈉乾燥，在旋轉蒸發儀上濃縮且在高真空下乾燥。此得到28.50 g (理論之92%)目標化合物。

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 0.02 (s, 6H), 0.86 (s, 9H), 1.37 (s, 9H), 1.58-1.73 (m, 1H), 2.91 (q, 2H), 3.33-3.36 [m, (2H, 隱藏)], 3.53-3.58 (m, 2H), 6.65-6.72 (m, 1H)。

中間物L34

(3-{[第三丁基(二甲基)矽烷基]氧基}-2-甲醯基丙基)胺基甲酸第三丁酯



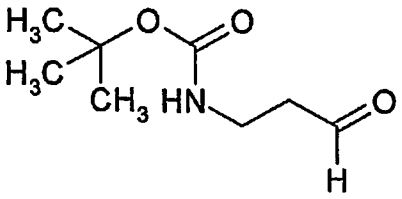
使12.65 g (39.591 mmol) [3-{[第三丁基(二甲基)矽烷基]氧基}-2-

(羥基-甲基)丙基]胺基甲酸第三丁酯溶於200 ml二氯甲烷中，且在室溫下逐滴添加溶於150 ml二氯甲烷中之19.31 g (45.53 mmol)戴斯-馬丁高碘烷。將混合物在室溫下攪拌2小時，接著添加250 ml半濃碳酸氫鈉溶液及250 ml 10%濃度硫代硫酸鈉溶液且將混合物攪拌20分鐘。分離出有機相且水相用乙酸乙酯萃取。合併之有機相用300 ml水洗滌，經硫酸鈉乾燥，在旋轉蒸發儀上濃縮且在高真空下乾燥。此得到11.35 g (理論之90%)目標化合物。

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 0.02 (s, 6H), 0.84(s, 9H), 1.36 (s, 9H), 1.48-1.51 (m, 1H), 3.08-3.32 [m, (1H, 隱藏)], 3.50-3.58 (m, 2H), 3.81-3.91 (m, 1H), 6.71 (t, 1H), 9.60 (d, 1H)。

中間物L35

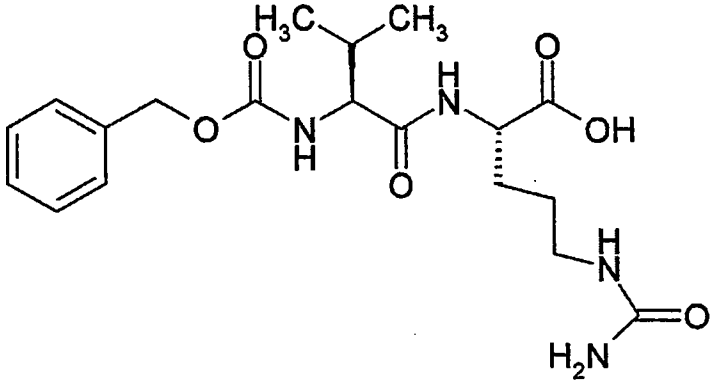
(3-側氧基丙基)胺基甲酸第三丁酯



標題化合物根據自文獻已知之方法(例如Jean Bastide等人*J. Med. Chem.* **2003**, *46*(16), 3536-3545)製備。

中間物L36

N-[(苯甲氧基)羰基]-L-纈胺醯基-N5-胺甲醯基-L-鳥胺酸



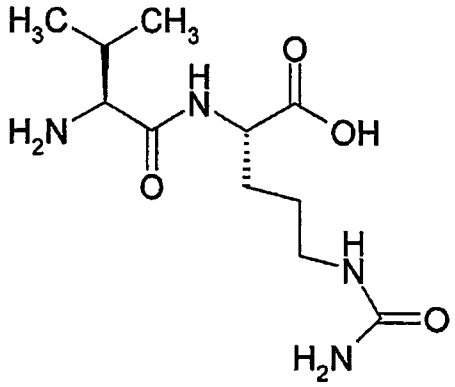
使100 mg (0.57 mmol) N5-胺甲醯基-L-鳥胺酸溶解於4.0 ml DMF中，且添加0.08 ml (0.57 mmol)三乙胺。接著添加199.0 mg (0.57

mmol) 2,5-二側氧基吡咯啶-1-基-N-[(苯甲氧基)羰基]-L-纈胺酸及0.08 ml (0.57 mmol)三乙胺。將混合物在室溫下攪拌48小時。反應混合物直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，含0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到75.7 mg (理論之33%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.69 min；MS (ESIpos): m/z = 409 $[M+H]^+$。

中間物L37

L-纈胺醯基-N5-胺甲醯基-L-鳥胺酸

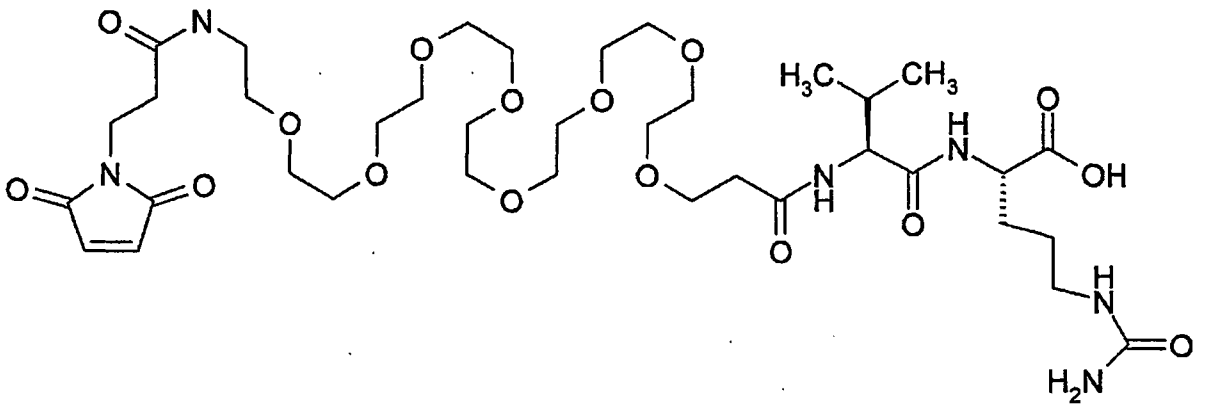


使75.7 mg (0.19 mmol)中間物L36懸浮於25 ml水/乙醇/THF中，且添加7.5 mg鈀/活性碳(10%)且混合物在室溫下在標準壓力下用氫氣氫化4.5小時。濾出催化劑且在減壓下反應混合物脫除溶劑，且在高真空下乾燥。殘餘物未經進一步純化即用於下一步。此得到64.9 mg (理論之93%)標題化合物。

LC-MS (方法6): R_t = 0.25 min；MS (ESIpos): m/z = 275 $[M+H]^+$。

中間物L38

N-[31-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-29-側氧基-4,7,10,13,16,19,22,25-八氧雜-28-氮雜三十一烷-1-醯基]-L-纈胺醯基-N5-胺甲醯基-L-鳥胺酸

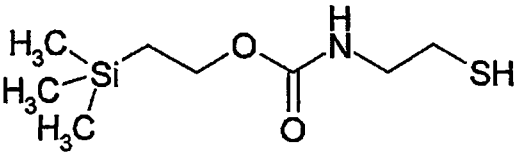


38.3 mg (0.14 mmol)中間物L37最初饋入3.0 ml DMF中，且添加96.4 mg (0.14 mmol) 3-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-N-{27-[(2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)氧基]-27-側氧基-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧雜二十七烷-1-基}丙醯胺及39.0 µl (0.28 mmol)三乙胺。將混合物在室溫下攪拌隔夜。接著添加16.0 µl (0.28 mmol) HOAc，且反應混合物直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 µ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到58.9 mg (理論之45%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.61 min；MS (ESIpos): m/z = 849 $[M+H]^+$。

中間物L39

(2-硫基乙基)胺基甲酸2-(三甲基矽烷基)乙酯

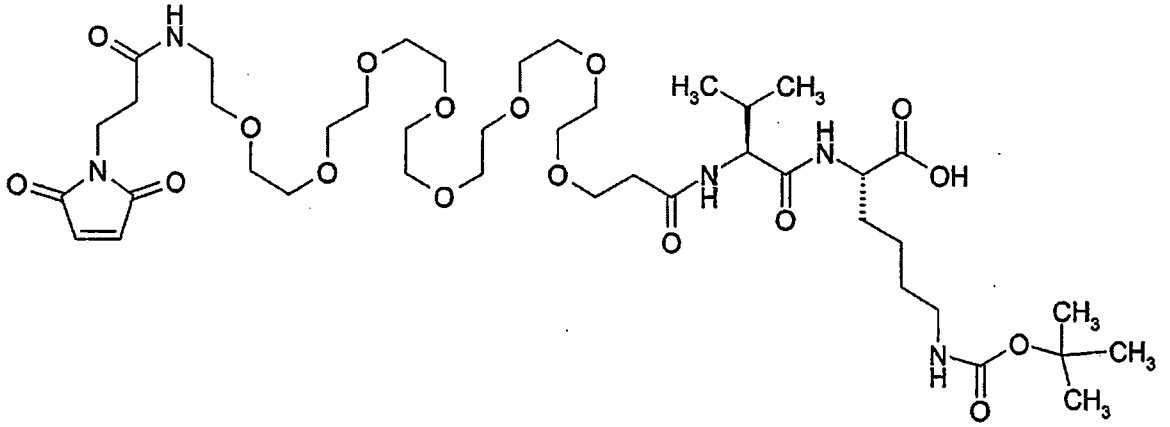


300 mg (2.64 mmol) 2-胺基乙硫醇鹽酸鹽(1:1)最初饋入3.0 ml二氯甲烷中，且添加668.0 mg (6.60 mmol)三乙胺及719.1 mg (2.77 mmol) 1-({[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}氧基)吡咯啶-2,5-二酮。將混合物在室溫下攪拌2天(藉由薄層層析法監測：二氯甲烷/甲醇=100:1.5)。添加乙酸乙酯且反應混合物用水洗滌三次。有機相用飽和NaCl溶液洗滌兩次且經硫酸鎂乾燥。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下

乾燥殘餘物。化合物未經進一步純化即用於合成下一步。

中間物L40

N-[31-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-29-側氧基-4,7,10,13,16,19,22,25-八氧雜-28-氮雜三十一烷-1-醯基]-L-纈胺醯基-N6-(第三丁氧羰基)-L-離胺酸



在25.0 ml水/乙醇/THF (1:1:0.5)中在室溫下在標準壓力下使用鈀/碳(10%)用氫氫化600 mg (1.58 mmol) N2-[(苯甲氧基)羰基]-N6-(第三丁氧羰基)-L-離胺酸。化合物N6-(第三丁氧羰基)-L-離胺酸未經進一步純化即用於合成下一步。

LC-MS (方法1): R_t = 0.99 min；MS (ESIpos): m/z = 247 $[M+H]^+$。

使180.0 (0.73 mmol) N6-(第三丁氧羰基)-L-離胺酸溶於5.0 ml DMF中，且添加74.0 mg (0.73 mmol)三乙胺。添加254.6 mg (0.73 mmol) N-[(苯甲氧基)羰基]-L-纈胺酸2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯及74.0 mg (0.73 mmol)三乙胺。將反應混合物在室溫下攪拌3.5小時。反應混合物直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到294.1 mg (理論之76%)化合物N-[(苯甲氧基)羰基]-L-纈胺醯基-N6-(第三丁氧羰基)-L-離胺酸。

LC-MS (方法1): R_t = 0.97 min；MS (ESIpos): m/z = 480 $[M+H]^+$。

使272.2 mg (0.57 mmol) N-[(苯甲氧基)羰基]-L-纈胺醯基-N6-(第三丁氧羰基)-L-離胺酸溶於20 ml乙酸乙酯/乙醇/THF (1:1:1)中，添加27.2 mg鈀/活性碳且混合物在標準壓力下及在室溫下用氫氣化。混合物經Celite(R)過濾且濾餅用乙酸乙酯/乙醇/THF (1:1:1)澈底洗滌。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到182.0 mg (理論之72%)化合物L-纈胺醯基-N6-(第三丁氧羰基)-L-離胺酸。

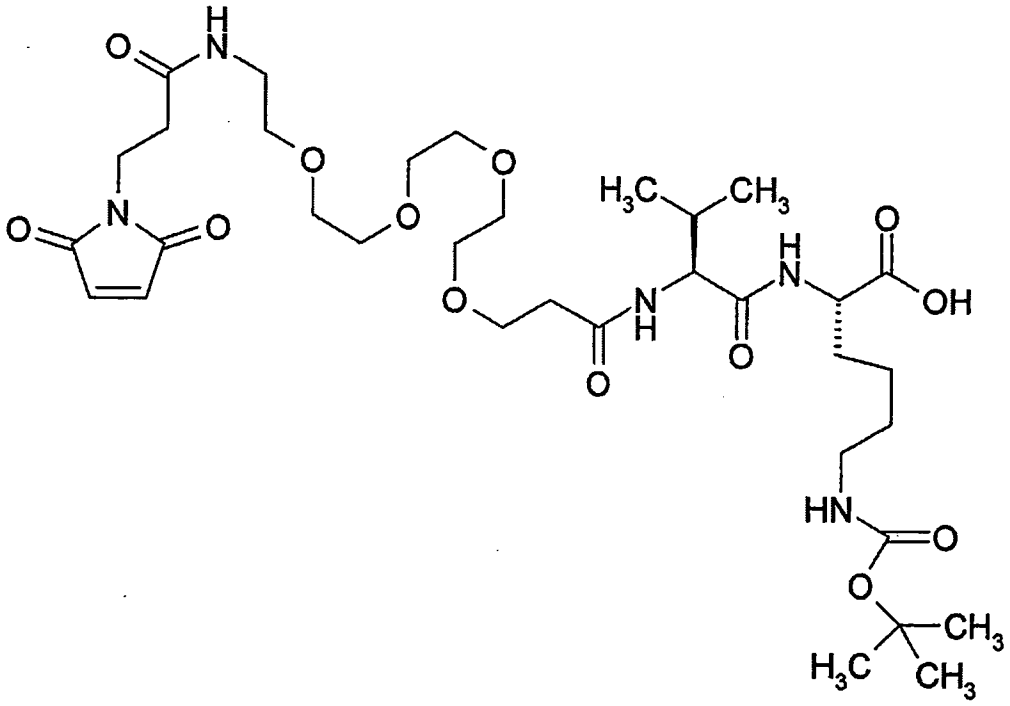
LC-MS (方法1): R_t = 0.53 min；MS (ESIpos): m/z = 346 $[M+H]^+$。

使30.0 mg (0.07 mmol) L-纈胺醯基-N6-(第三丁氧羰基)-L-離胺酸及46.1 mg (0.07 mmol) 3-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-N-{27-[(2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)氧基]-27-側氧基-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧雜二十七烷-1-基}丙醯胺溶於1.5 ml DMF中，且添加6.8 mg (0.07 mmol) 4-甲基嗎啉。將反應混合物在室溫下攪拌隔夜。反應混合物直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到55.6 mg (理論之90%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.77 min；MS (ESIpos): m/z = 920 $[M+H]^+$。

中間物L41

N-[19-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-17-側氧基-4,7,10,13-四氧雜-16-氮雜十九烷-1-醯基]-L-纈胺醯基-N6-(第三丁氧羰基)-L-離胺酸



在25.0 ml水/乙醇/THF (1:1:0.5)中在室溫下在標準壓力下使用鈀/碳(10%)用氫氫化600 mg (1.58 mmol) N2-[(苯甲氧基)羰基]-N6-(第三丁氧羰基)-L-離胺酸。化合物N6-(第三丁氧羰基)-L-離胺酸未經進一步純化即用於合成下一步。

LC-MS (方法1): R_t = 0.99 min；MS (ESIpos): m/z = 247 $[M+H]^+$。

使180.0 (0.73 mmol) N6-(第三丁氧羰基)-L-離胺酸溶於5.0 ml DMF中，且添加74.0 mg (0.73 mmol)三乙胺。添加254.6 mg (0.73 mmol) N-[(苯甲氧基)羰基]-L-纈胺酸2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯及74.0 mg (0.73 mmol)三乙胺。將反應混合物在室溫下攪拌3.5小時。反應混合物直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)純化。接著在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到294.1 mg (理論之76%)化合物N-[(苯甲氧基)羰基]-L-纈胺醯基-N6-(第三丁氧羰基)-L-離胺酸。

LC-MS (方法1): R_t = 0.97 min；MS (ESIpos): m/z = 480 $[M+H]^+$。

使272.2 mg (0.57 mmol) N-[(苯甲氧基)羰基]-L-纈胺醯基-N6-(第三丁氧羰基)-L-離胺酸溶於20.0 ml乙酸乙酯/乙醇/THF (1:1:1)中，添加27.2 mg鈀/活性碳且混合物在標準壓力下及在室溫下用氫氣化。混合物經Celite(R)過濾且濾餅用乙酸乙酯/乙醇/THF (1:1:1)澈底洗滌。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到182.0 mg (理論之72%)化合物L-纈胺醯基-N6-(第三丁氧羰基)-L-離胺酸。

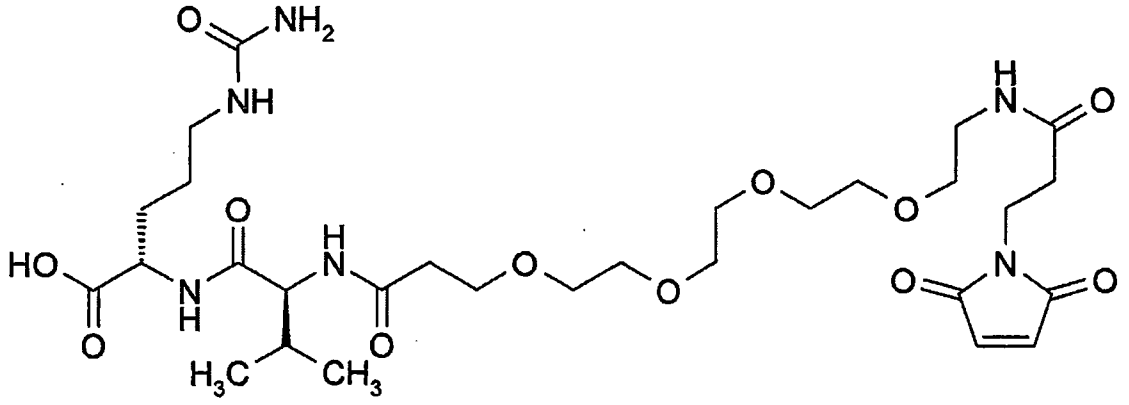
LC-MS (方法1): R_t = 0.53 min；MS (ESIpos): m/z = 346 $[M+H]^+$。

使30.0 mg (0.07 mmol) L-纈胺醯基-N6-(第三丁氧羰基)-L-離胺酸及34.3 mg (0.07 mmol) 3-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-N-{15-[(2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)氧基]-15-側氧基-3,6,9,12-四氧雜十四烷-1-基}丙醯胺溶於1.5 ml DMF中，且添加6.8 mg (0.07 mmol) 4-甲基嗎啉。將反應混合物在室溫下攪拌隔夜。反應混合物直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到40.6 mg (理論之82%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.73 min；MS (ESIpos): m/z = 744 $[M+H]^+$。

中間物L42

N-[19-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-17-側氧基-4,7,10,13-四氧雜-16-氮雜十九烷-1-醯基]-L-纈胺醯基-N5-胺甲醯基-L-鳥胺酸

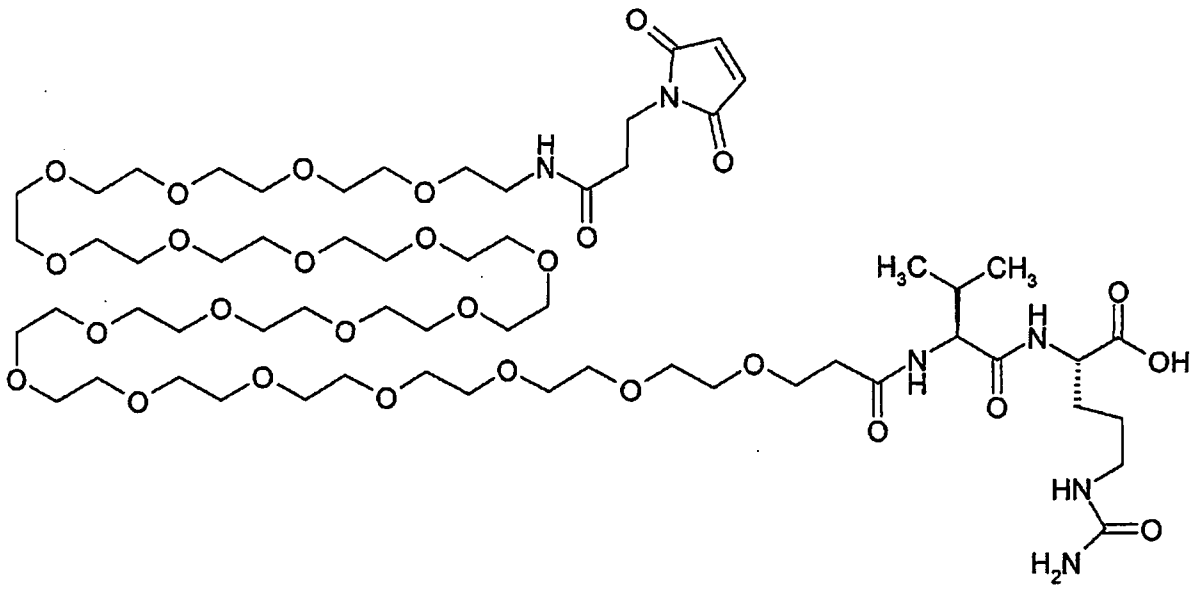


50.0 mg (0.18 mmol) L-纈胺醯基-N5-胺甲醯基-L-鳥胺酸(中間物L37)最初饋入DMF中，且添加93.6 mg (0.18 mmol) 3-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-N-{15-[(2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)氧基]-15-側氧基-3,6,9,12-四氧雜十四烷-1-基}丙醯胺及36.9 mg (0.37 mmol)三乙胺。將反應混合物在室溫下攪拌隔夜。添加21.9 mg (0.37 mmol) HOAc且反應混合物直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到20.6 mg (理論之14%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.55 min；MS (ESIpos): m/z = 673 $[M+H]^+$。

中間物L43

N-[67-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-65-側氧基-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61-二十氧雜-64-氮雜六十七烷-1-醯基]-L-纈胺醯基-N5-胺甲醯基-L-鳥胺酸

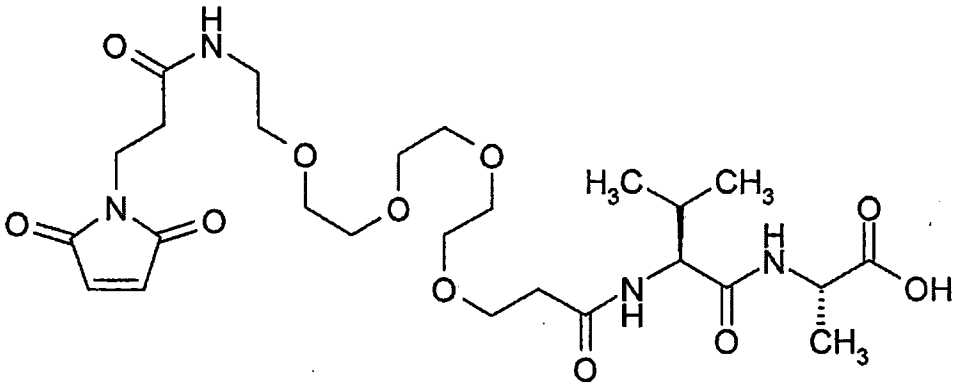


11.3 mg (0.04 mmol) L-纈胺醯基-N5-胺甲醯基-L-鳥胺酸(中間物L37)最初饋入DMF中，且添加50.0 mg (0.04 mmol) 3-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-N-{63-[(2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)氧基]-63-側氧基-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60-二十氧雜六十三烷-1-基}丙醯胺及8.3 mg (0.08 mmol)三乙胺。將反應混合物在室溫下攪拌隔夜。添加4.9 mg (0.08 mmol) HOAc且反應混合物直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到15.8 mg (理論之20%)標題化合物。

LC-MS (方法4): R_t = 0.94 min；MS (ESIpos): m/z = 1377 $[M+H]^+$。

中間物L44

N-[19-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-17-側氧基-4,7,10,13-四氧雜-16-氮雜十九烷-1-醯基]-L-纈胺醯基-L-丙胺酸

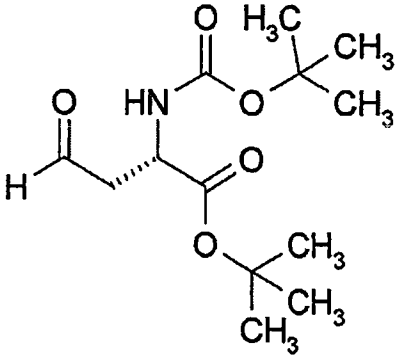


使73.3 mg (0.39 mmol) L-纈胺醯基-L-丙胺酸溶於7.0 ml DMF中，且添加200.0 mg (0.39 mmol) 3-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-N-{15-[(2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)氧基]-15-側氧基-3,6,9,12-四氧雜十四烷-1-基}丙醯胺及78.8 mg (0.78 mmol)三乙胺。將反應混合物在室溫下攪拌隔夜。反應混合物直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到103.3 mg (理論之45%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.58 min；MS (ESIpos): m/z = 587 $[M+H]^+$。

中間物L45

(2S)-2-[(第三丁氧羰基)胺基]-4-側氧基丁酸第三丁酯



使2.00 g (7.26 mmol) N-(第三丁氧羰基)-L-高絲胺酸第三丁酯溶於90 ml二氯甲烷中，且接著添加1.76 ml吡啶及4.62 g (10.90 mmol) 1,1,1-三乙醯氧基-1λ^5,2-苯并氧雜環戊-3(1H)-酮(戴斯-馬丁高碘烷)。

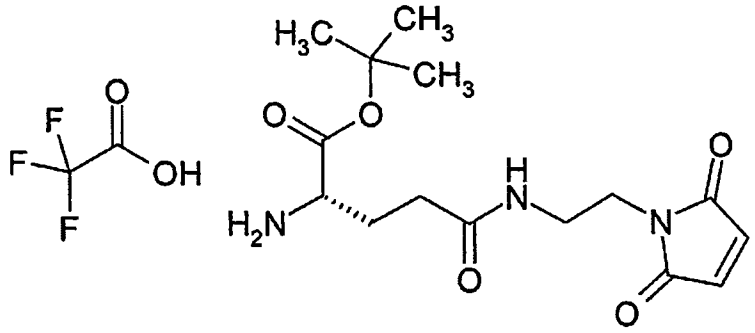
將反應在室溫下攪拌2小時且接著用200 ml二氯甲烷稀釋，且用10%濃度硫代硫酸鈉溶液萃取兩次且接著連續用5%濃度檸檬酸萃取兩次及用飽和碳酸氫鈉溶液萃取兩次。分離出有機相，經硫酸鈉乾燥且接著在減壓下濃縮。將100 ml乙醚及環己烷(v/v=1:1)添加至殘餘物且混合物略微濃縮，形成白色沈澱。此抽濾出。濾液在旋轉蒸發儀上濃縮且在高真空下乾燥，得到1.74 g (理論之88%)呈淡黃色油狀之目標化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.85 min；MS (ESIpos): m/z = 274 $[M+H]^+$。

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 1.38 (s, 18H), 2.64-2.81 (m, 2H), 4.31-4.36 (m, 1H), 7.23 (d, 1H), 9.59 (s, 1H)。

中間物L46

三氟乙酸/N-[2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙基]-L-麩胺酸第三丁酯(1:1)

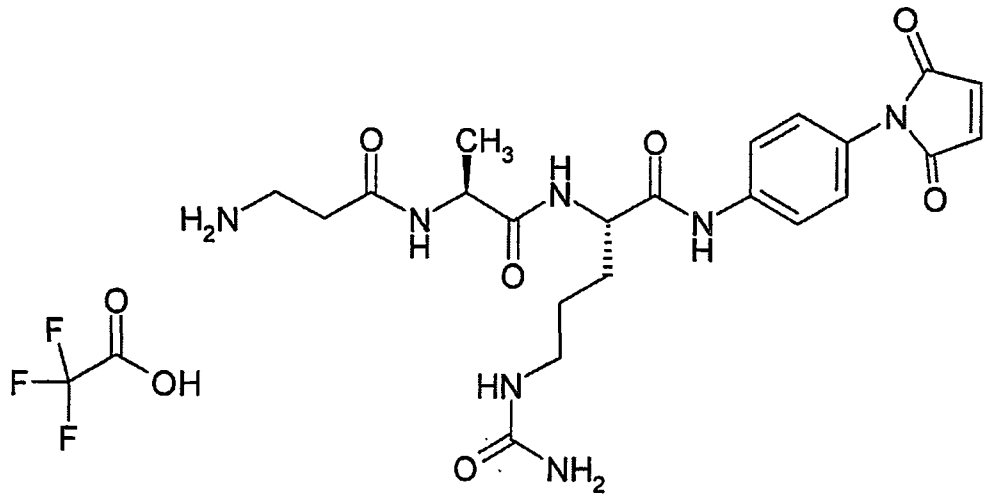


標題化合物藉由首先使200 mg (0.79 mmol)三氟乙酸/1-(2-胺基乙基)-1H-吡咯-2,5-二酮(1:1)與263 mg (0.87 mmol) (4S)-5-第三丁氧基-4-[(第三丁氧羰基)胺基]-5-側氧基戊酸/三氟乙酸(1:1)在EDC/HOBT及N,N-二異丙基乙胺存在下偶合且接著在通常條件下藉由在室溫下在10%濃度含三氟乙酸之DCM中攪拌1小時而脫除胺基保護基來製備。自乙腈/水冷凍乾燥得到經2步85 mg (理論之20%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.37 min；MS (ESIpos): m/z = 326 $[M+H]^+$。

中間物L47

三氟乙酸/β-丙胺醯基-L-丙胺醯基-N5-胺甲醯基-N-[4-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)苯基]-L-鳥胺醯胺(1:1)

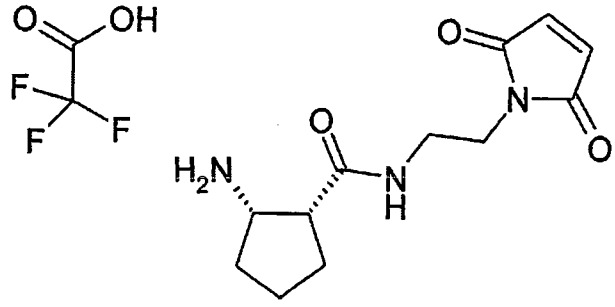


標題化合物藉由使中間物L8與N-(第三丁氧羰基)-β-丙胺酸2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯偶合且隨後用TFA脫除保護基來製備。

LC-MS (方法3): R_t = 1.36 min ; MS (ESIpos): m/z = 488 $(M+H)^+$。

中間物L48

三氟乙酸/(1R,2S)-2-胺基-N-[2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙基]環戊烷甲醯胺(1:1)

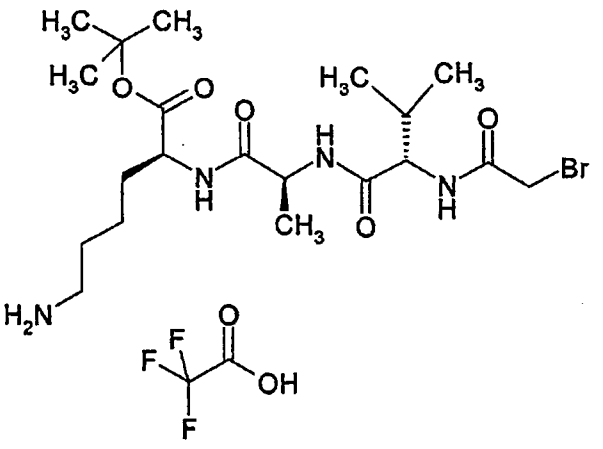


標題化合物類似於中間物L2，自市售(1R,2S)-2-[(第三丁氧羰基)胺基]環戊烷甲酸製備。

LC-MS (方法3): R_t = 1.22 min ; MS (ESIpos): m/z = 252 $(M+H)^+$。

中間物L49

三氟乙酸/N-(溴乙醯基)-L-纈胺醯基-L-丙胺醯基-L-離胺酸第三丁酯(1:1)

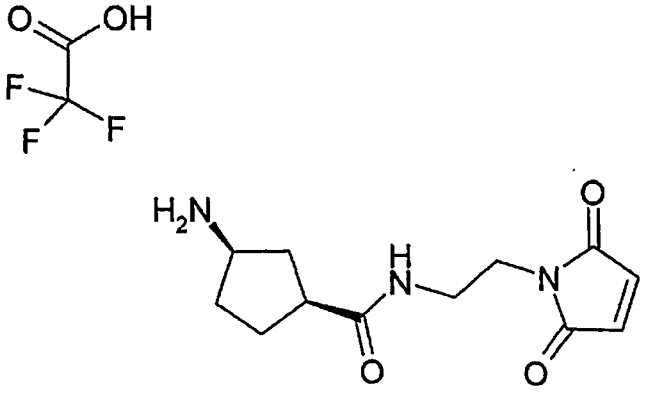


標題化合物藉由首先使市售溴乙酸酐與根據肽化學之經典方法製備的部分保護之肽L-纈胺醯基-L-丙胺醯基-N^6-(第三丁氧羰基)-L-離胺酸第三丁酯在N,N-二異丙基乙胺存在下在二氯甲烷中偶合來製備。此後在通常條件下藉由在室溫下在10%濃度含三氟乙酸之DCM中攪拌而脫除胺基保護基來製備，得到標題化合物，2步產率49%。

LC-MS (方法1): R_t = 1.09 min；MS (ESIpos): m/z = 593及595 $(M+H)^+$。

中間物L50

三氟乙酸/(1S,3R)-3-胺基-N-[2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙基]環戊烷甲醯胺(1:1)



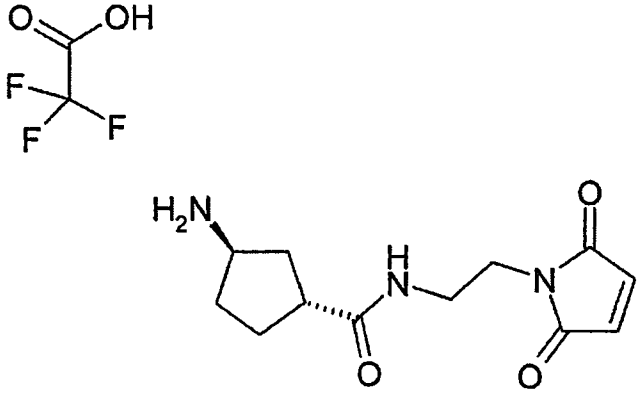
標題化合物自市售(1S,3R)-3-[(第三丁氧羰基)胺基]環戊烷甲酸及同樣市售三氟乙酸/1-(2-胺基乙基)-1H-吡咯-2,5-二酮(1:1)，藉由在N,N-二異丙基乙胺存在下與HATU偶合且隨後用TFA脫除保護基來製備。

HPLC (方法11): R_t = 0.2 min；

LC-MS (方法3): R_t = 0.88 min；MS (ESIpos): m/z = 252 $(M+H)^+$。

中間物L51

三氟乙酸/(1R,3R)-3-胺基-N-[2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙基]環戊烷甲醯胺(1:1)

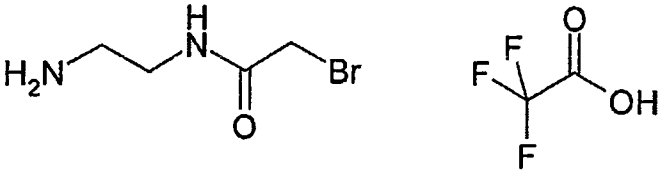


標題化合物自市售(1R,3R)-3-[(第三丁氧羰基)胺基]環戊烷甲酸及同樣市售三氟乙酸/1-(2-胺基乙基)-1H-吡咯-2,5-二酮(1:1)，藉由在N,N-二異丙基乙胺存在下與HATU偶合且隨後用TFA脫除保護基來製備。

LC-MS (方法3): R_t = 0.98 min；MS (ESIpos): m/z = 250 $(M-H)^-$。

中間物L52

三氟乙酸/N-(2-胺基乙基)-2-溴乙醯胺(1:1)



使420 mg (2.62 mmol) (2-胺基乙基)胺基甲酸第三丁酯溶解於50 ml二氯甲烷中，且添加817 mg (3.15 mmol)溴乙酸酐及913 µl (5.24 mmol) N,N-二異丙基乙胺。將反應在室溫下攪拌1小時且接著在減壓下濃縮。殘餘物藉由製備型HPLC純化。

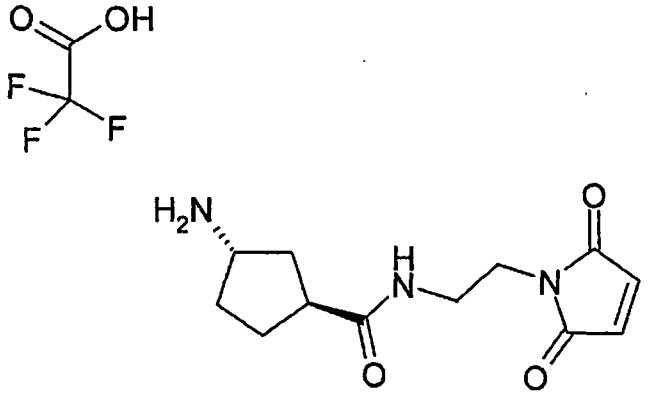
此得到577 mg經保護之中間物，其接著溶解於50 ml二氯甲烷

中，且添加10 ml三氟乙酸。在室溫下攪拌1小時後，在減壓下濃縮反應物且殘餘物自乙腈/水凍乾。此得到705 mg (理論之65%)標題化合物。

LC-MS (方法3): R_t = 0.34 min；MS (ESIpos): m/z = 181及183 $(M+H)^+$。

中間物L53

三氟乙酸/(1S,3S)-3-胺基-N-[2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙基]環戊烷甲醯胺(1:1)



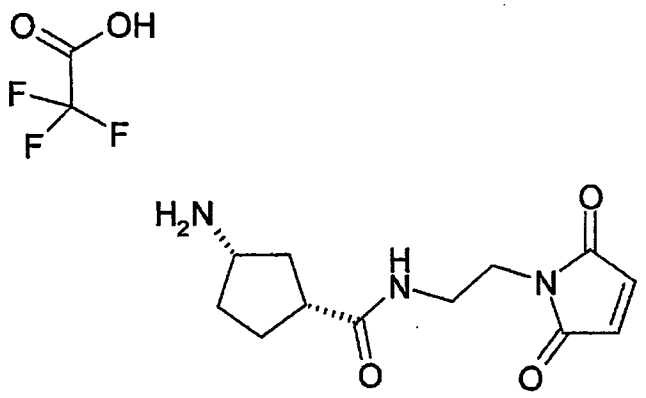
標題化合物自市售(1S,3S)-3-[(第三丁氧羰基)胺基]環戊烷甲酸及同樣市售三氟乙酸/1-(2-胺基乙基)-1H-吡咯-2,5-二酮(1:1)，藉由在N,N-二異丙基乙胺存在下與HATU偶合且隨後用TFA脫除保護基來製備。

HPLC (方法11): R_t = 0.19 min；

LC-MS (方法3): R_t = 0.88 min；MS (ESIpos): m/z = 250 $(M-H)^-$。

中間物L54

三氟乙酸/(1R,3S)-3-胺基-N-[2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙基]環戊烷甲醯胺(1:1)

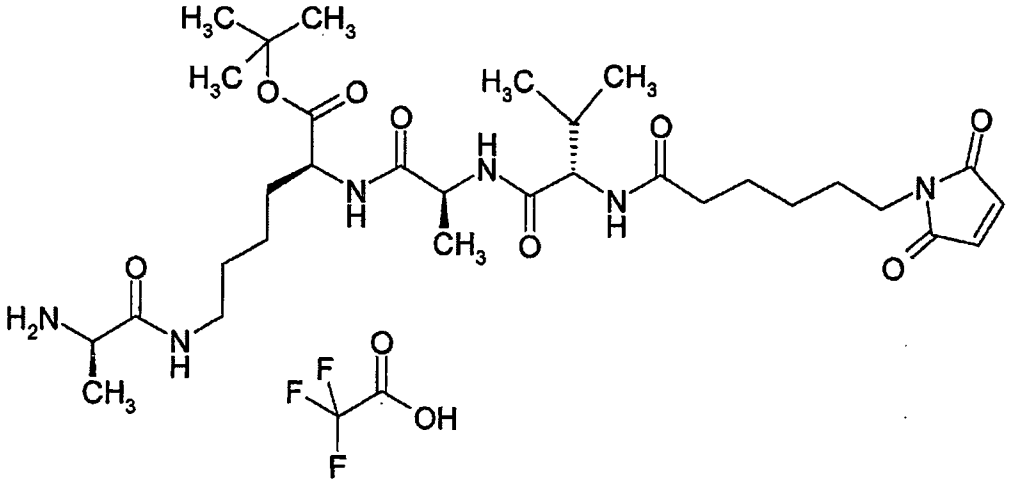


標題化合物自市售(1R,3S)-3-[(第三丁氧羰基)胺基]環戊烷甲酸及同樣市售三氟乙酸/1-(2-胺基乙基)-1H-吡咯-2,5-二酮(1:1)，藉由在N,N-二異丙基乙胺存在下與HATU偶合且隨後用TFA脫除保護基來製備。

LC-MS (方法3): R_t = 0.89 min；MS (ESIpos): m/z = 252 $(M+H)^+$。

中間物L55

三氟乙酸/第三丁基-N6-D-丙胺醯基-N2-{N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-己醯基]-L-纈胺醯基-L-丙胺醯基}-L-離胺酸酯(1:1)



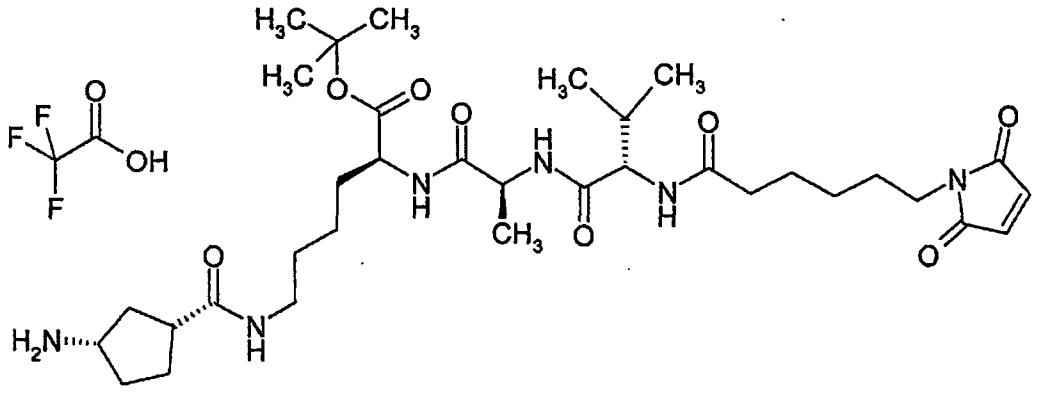
標題化合物藉由首先在HATU存在下使中間物L6與N-(第三丁氧羰基)-D-丙胺酸偶合，接著在通常條件下，藉由在室溫下在含5%濃度三氟乙酸之DCM中攪拌90分鐘而脫除胺基保護基來製備。

HPLC (方法11): R_t = 1.35 min；

LC-MS (方法1): R_t = 0.67 min；MS (ESIpos): m/z = 637 $(M+H)^+$。

中間物L56

三氟乙酸/第三丁基-N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]-L-纈胺醯基-L-丙胺醯基-N6-{[(1R,3S)-3-胺基環戊基]羰基}-L-離胺酸酯(1:1)



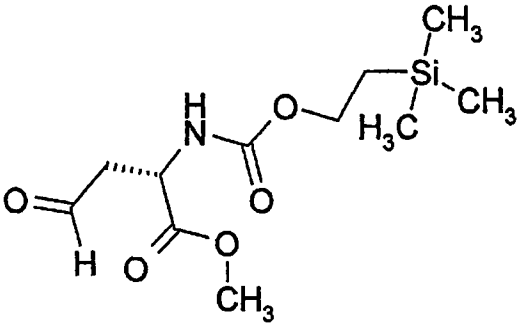
標題化合物藉由首先在HATU存在下使中間物L6與(1R,3S)-3-[(第三丁氧羰基)胺基]環戊烷甲酸偶合，接著在通常條件下，藉由在室溫下在含25%濃度三氟乙酸之DCM中攪拌15分鐘而脫除胺基保護基來製備。

HPLC (方法11): R_t = 1.4 min；

LC-MS (方法1): R_t = 0.7 min；MS (ESIpos): m/z = 677 $(M+H)^+$。

中間物L57

(2S)-4-側氧基-2-({[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}胺基)丁酸甲酯



500.0 mg (2.72 mmol) L-天冬醯胺酸甲酯鹽酸鹽及706.3 mg (2.72 mmol) 2,5-二側氧基吡咯啶-1-甲酸2-(三甲基矽烷基)乙酯最初饋入5.0 ml 1,4-二噁烷中，且添加826.8 mg (8.17 mmol)三乙胺。將反應混合物在室溫下攪拌隔夜。反應混合物直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：

Reprosil 250×40；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)純化。接著在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到583.9 mg (理論之74%)化合物(3S)-4-甲氧基-4-側氧基-3-({[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}胺基)丁酸。

LC-MS (方法1): R_t = 0.89 min；MS (ESIneg): m/z = 290 $(M-H)^-$。

592.9 mg (3S)-4-甲氧基-4-側氧基-3-({[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}胺基)丁酸最初饋入10.0 ml 1,2-二甲氧基乙烷中，混合物冷卻至-15℃且添加205.8 mg (2.04 mmol) 4-甲基嗎啉及277.9 mg (2.04 mmol)氯甲酸異丁酯。15分鐘後，抽濾出沈澱且在各種情況下用10.0 ml 1,2-二甲氧基乙烷處理兩次。濾液冷卻至-10℃，且在用力攪拌下添加溶於10 ml水中之115.5 mg (3.05 mmol)硼氫化鈉。蒸發各相且在各種情況下有機相用飽和碳酸氫鈉溶液及飽和NaCl溶液洗滌一次。有機相經硫酸鎂乾燥，在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到515.9 mg (理論之91%)化合物N-{[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}-L-高絲胺酸甲酯。

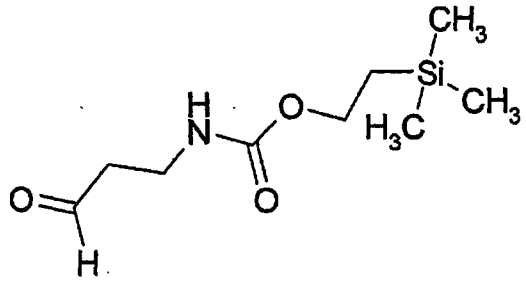
LC-MS (方法1): R_t = 0.87 min；MS (ESIpos): m/z = 278 $(M+H)^+$。

554.9 mg (2.00 mmol) N-{[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}-L-高絲胺酸甲酯最初饋入30.0 ml二氯甲烷中，且添加1.27 g (3.0 mmol)戴斯-馬丁高碘烷及474.7 mg (6.00 mmol)吡啶。將混合物在室溫下攪拌隔夜。4小時後，反應物用二氯甲烷稀釋且在各種情況下有機相用10%濃度$Na_2S_2O_3$溶液、10%濃度檸檬酸溶液及飽和碳酸氫鈉溶液洗滌三次。有機相經硫酸鎂乾燥且在減壓下蒸發溶劑。此得到565.7 mg (理論之97%)標題化合物。

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 0.03 (s, 9H), 0.91 (m, 2H), 2.70-2.79 (m, 1H), 2.88 (dd, 1H), 3.63 (s, 3H), 4.04 (m, 2H), 4.55 (m, 1H), 7.54 (d, 1H), 9.60 (t, 1H)。

中間物L58

(3-側氧基丙基)胺基甲酸2-(三甲基矽烷基)乙酯

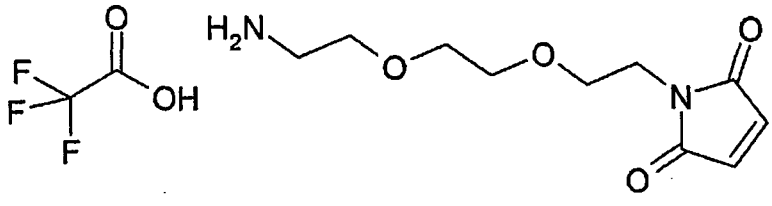


使434.4 mg (5.78 mmol) 3-胺基-1-丙醇及1.50 g (5.78 mmol) 2,5-二側氧基吡咯啶-1-甲酸2-(三甲基矽烷基)乙酯溶於10.0 ml二氯甲烷中，添加585.3 mg (5.78 mmol)三乙胺且將混合物在室溫下攪拌隔夜。反應混合物用二氯甲烷稀釋且有機相用水及飽和碳酸氫鈉溶液洗滌且接著經硫酸鎂乾燥。在減壓下蒸發溶劑。在高真空下乾燥殘餘物(3-羥基丙基)胺基甲酸2-(三甲基矽烷基)乙酯(996.4 mg，理論之79%)且未經進一步純化即用於合成下一步。

807.0 mg (3.68 mmol) (3-羥基丙基)胺基甲酸2-(三甲基矽烷基)乙酯最初饋入15.0 ml氯仿及15.0 ml 0.05 N碳酸鉀/0.05 N碳酸氫鈉溶液(1:1)中。接著添加102.2 mg (0.37 mmol)氯化四正丁基銨、736.9 mg (5.52 mmol) N-氯代丁二醯亞胺及57.5 mg (0.37 mmol) TEMPO且將反應混合物在室溫下用力攪拌隔夜。反應混合物用二氯甲烷稀釋且有機相用水及飽和NaCl溶液洗滌。有機相經硫酸鎂乾燥且在減壓下蒸發溶劑。殘餘物在高真空下乾燥且未經進一步純化即用於合成下一步(890.3 mg)。

中間物L59

三氟乙酸/1-{2-[2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]乙基}-1H-吡咯-2,5-二酮(1:1)

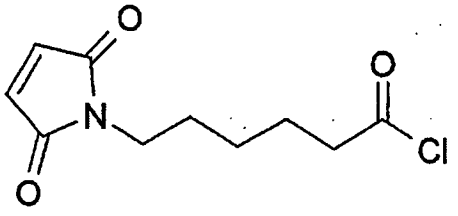


300.0 mg (0.91 mmol) (2-{2-[2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙氧基]乙氧基}乙基)胺基甲酸第三丁酯最初饋入二氯甲烷中，添加4.2 g (36.54 mmol) TFA且將混合物在室溫下攪拌1小時(藉由TLC監測：二氯甲烷/甲醇10:1)。在減壓下蒸發揮發性組分且殘餘物與二氯甲烷共蒸餾四次。殘餘物在高真空下乾燥且未經進一步純化即用於合成下一步。

LC-MS (方法1): R_t = 0.19 min；MS (ESIpos): m/z = 229 $(M+H)^+$。

中間物L60

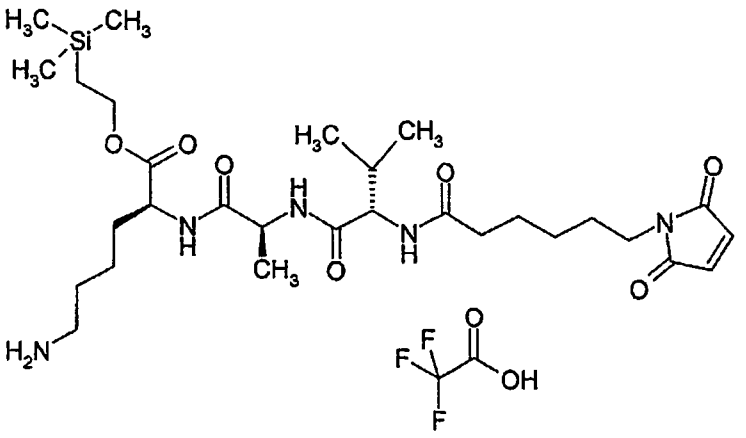
6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯氯



使200.0 mg (0.95 mmol) 6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己酸溶於4.0 ml二氯甲烷中，且添加338.0 mg (2.84 mmol)亞硫醯氯。將反應混合物在室溫下攪拌3小時，且接著添加1滴DMF。將混合物再攪拌1小時。在減壓下蒸發溶劑且殘餘物與二氯甲烷共蒸餾三次。粗產物未經進一步純化即用於合成下一步。

中間物L61

三氟乙酸/N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]-L-纈胺醯基-L-丙胺醯基-L-離胺酸2-(三甲基矽烷基)乙酯(1:1)



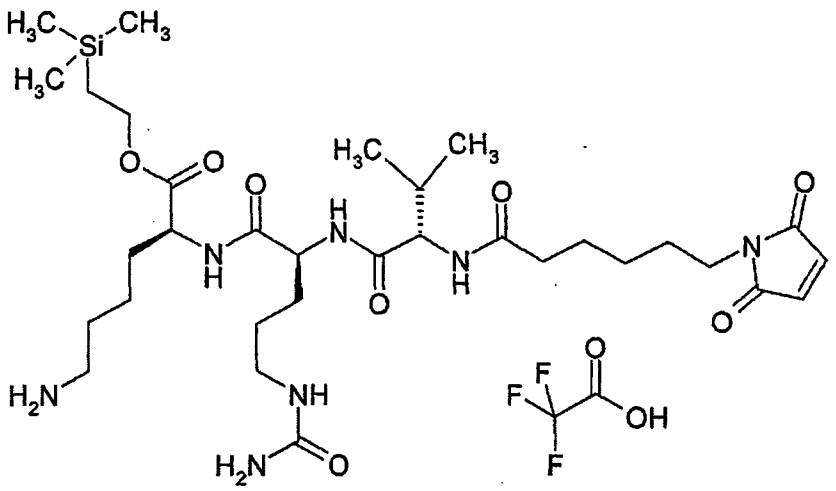
首先，三肽衍生物L-纈胺醯基-L-丙胺醯基-N6-(第三丁氧羰基)-L-離胺酸2-(三甲基矽烷基)乙酯自N2-[(苯甲氧基)羰基]-N6-(第三丁氧羰基)-L-離胺酸，根據肽化學之經典方法(使用EDCI/DMAP，用2-(三甲基矽烷基乙醇)酯化，氫解，在HATU存在下與N-[(苯甲氧基)羰基]-L-纈胺醯基-L-丙胺酸偶合及再次氫解)製備。標題化合物藉由在HATU及*N,N*-二異丙基乙胺存在下使此部分保護之肽衍生物與市售6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己酸偶合來製備。此後在通常條件下，藉由在室溫下在含5%濃度三氟乙酸之DCM中攪拌2.5小時而脫除胺基保護基，使酯保護基保留。處理及藉由製備型HPLC純化得到438 mg標題化合物。

HPLC (方法11): R_t = 1.69 min；

LC-MS (方法1): R_t = 0.78 min；MS (ESIpos): m/z = 610 $(M+H)^+$。

中間物L62

三氟乙酸/N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]-L-纈胺醯基-N5-胺甲醯基-L-鳥胺醯基-L-離胺酸2-(三甲基矽烷基)乙酯(1:1)



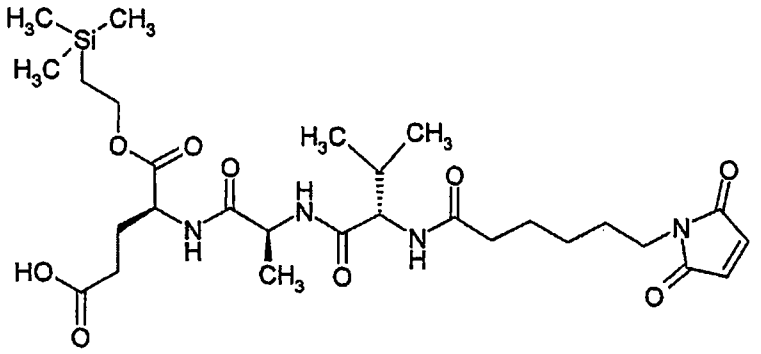
首先，N6-(第三丁氧羰基)-L-離胺酸2-(三甲基矽烷基)乙酯根據肽化學之經典方法，自N2-[(苯甲氧基)羰基]-N6-(第三丁氧羰基)-L-離胺酸製備。接著148 mg (0.43 mmol)此中間物在195 mg (0.51 mmol) HATU及149 µl *N,N*-二異丙基乙胺存在下與200 mg (0.43 mmol) 中間物L16偶合。在濃縮及藉由製備型HPLC純化殘餘物後，使經保護之中間物溶解於20 ml DCM中且第三丁氧羰基保護基藉由添加2 ml三氟乙酸及在室溫下攪拌1小時而移除。濃縮及自殘餘物乙腈/水凍乾得到254 mg (2步理論之63%)。

HPLC (方法11): R_t = 1.51 min；

LC-MS (方法1): R_t = 0.68 min；MS (ESIpos): m/z = 696 $(M+H)^+$。

中間物L63

(4S)-4-{[(2S)-2-{[(2S)-2-{[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]胺基}-3-甲基丁醯基]胺基}丙醯基]胺基}-5-側氧基-5-[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]戊酸

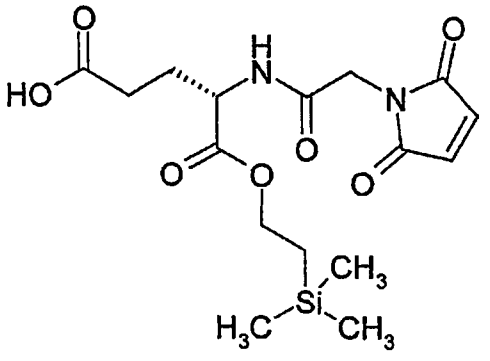


首先，三肽衍生物(4S)-4-{[(2S)-2-{[(2S)-2-胺基-3-甲基丁醯基]胺基}丙醯基]胺基}-5-側氧基-5-[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]戊酸自(2S)-5-(苯甲氧基)-2-[(第三丁氧羰基)胺基]-5-側氧基戊酸，根據肽化學之經典方法(使用EDCI/DMAP，用2-三甲基矽烷基乙醇酯化，用三氟乙酸移除Boc保護基，在HATU存在下與N-[(苯甲氧基)羰基]-L-纈胺醯基-L-丙胺酸偶合及在甲醇中在10%鈀/活性碳上氫解)製備。標題化合物藉由使此部分保護之肽衍生物與市售1-{6-[(2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)氧基]-6-側氧基己基}-1H-吡咯-2,5-二酮偶合來製備。處理及藉由製備型HPLC純化得到601 mg標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.96 min；MS (ESIpos): m/z = 611 $(M+H)^+$。

中間物L64

(4S)-4-{[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]胺基}-5-側氧基-5-[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]戊酸



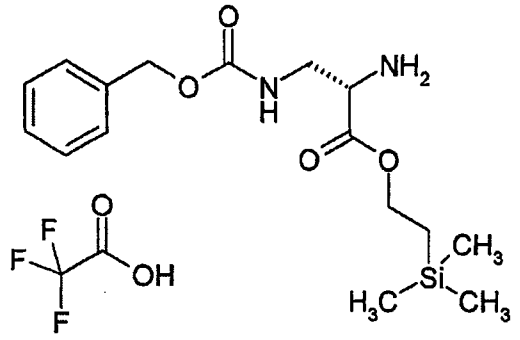
標題化合物自(2S)-5-(苯甲氧基)-2-[(第三丁氧羰基)胺基]-5-側氧基戊酸，根據肽化學之經典方法(使用EDCI/DMAP，用2-(三甲基矽烷

基乙醇酯化，用三氟乙酸移除Boc保護基，在甲醇中在10%鈀/活性碳上使苯甲基酯氫解裂解及在*N*,*N*-二異丙基乙胺存在下與1-{2-[(2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)氧基]-2-側氧基乙基}-1H-吡咯-2,5-二酮偶合)製備。

LC-MS (方法1): R_t = 0.84 min；MS (ESIpos): m/z = 385 $(M+H)^+$。

中間物L65

三氟乙酸/3-{[(苯甲氧基)羰基]胺基}-L-丙胺酸2-(三甲基矽烷基)乙酯(1:1)

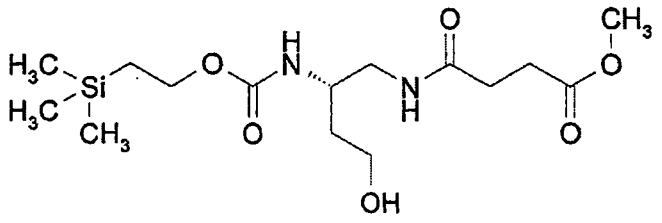


標題化合物自3-{[(苯甲氧基)羰基]胺基}-N-(第三丁氧羰基)-L-丙胺酸，根據肽化學之經典方法(使用EDCI/DMAP，用2-(三甲基矽烷基乙醇酯化及用三氟乙酸移除Boc保護基)製備。此得到373 mg (2步理論之79%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.72 min；MS (ESIpos): m/z = 339 $(M+H)^+$。

中間物L66

(8S)-8-(2-羥基乙基)-2,2-二甲基-6,11-二側氧基-5-氧雜-7,10-二氮雜-2-矽雜十四烷-14-酸甲酯



1000 mg (2.84 mmol) (3S)-3-{[(苯甲氧基)羰基]胺基}-4-[(第三丁氧羰基)胺基]丁酸最初饋入10.0 ml 1,2-二甲氧基乙烷中，且添加344.4 mg (3.4 mmol) 4-甲基嗎啉及504 mg (3.69 mmol)氯甲酸異丁酯。在室溫下攪拌10分鐘後，反應冷卻至5℃且在用力攪拌下每次一點添加溶於3 ml水中之161 mg (4.26 mmol)硼氫化鈉。1小時後，再添加相同量之硼氫化鈉且反應接著緩慢升溫至室溫。添加170 ml水且接著在各種情況下反應物用 200 ml乙酸乙酯萃取四次。分離各相且有機相用檸檬酸洗滌一次且接著用飽和碳酸氫鈉溶液洗滌。有機相經硫酸鎂乾燥，在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到760 mg (理論之78%)化合物[(2S)-4-羥基丁-1,2-二基]雙胺基甲酸苯甲基酯第三丁酯。

LC-MS (方法1): R_t = 0.84 min ; MS (ESIpos): m/z = 339 $(M+H)^+$。

將溶於13 ml氯化氫/二噁烷中之760 mg (2.16 mmol)此中間物在室溫下攪拌20分鐘。接著反應物濃縮至5 ml，且添加乙醚。濾出沈澱且自乙腈/水1:1凍乾。

以此方式獲得之產物溶於132 ml DMF中，且添加345.5 mg (2.35 mmol) 4-甲氧基-4-側氧基丁酸、970 mg (2.55 mmol) HATU及1025 µl *N,N*-二異丙基乙胺。將混合物在室溫下攪拌5分鐘。在減壓下移除溶劑且剩餘殘餘物藉由製備型HPLC純化。合併適當溶離份且在減壓下蒸發乙腈。剩餘水相用乙酸乙酯萃取兩次且接著濃縮有機相且在高真空下乾燥。

使以此方式獲得之中間物溶解於甲醇中且在10%鈀/活性碳上在室溫下在氫標準壓力下氫化1小時。接著濾出催化劑且在減壓下移除溶劑。

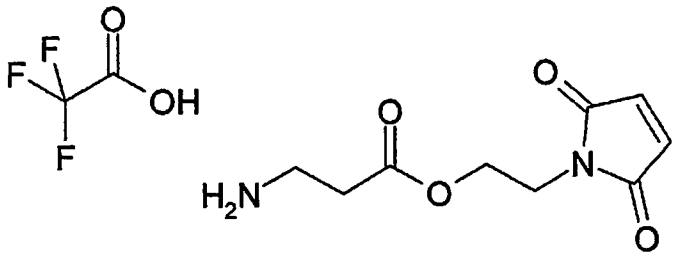
使247 mg此脫除保護基之化合物溶解於20 ml DMF中，且添加

352 mg (1.36 mmol) 1-({[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}氧基)吡咯啶-2,5-二酮及592 µl *N,N*-二異丙基乙胺。將反應混合物在室溫下攪拌1小時且接著濃縮，且殘餘物藉由製備型HPLC純化。接著在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。經此5步反應步驟，此得到218 mg標題化合物，總產率為21%。

LC-MS (方法1): R_t = 0.74 min ; MS (ESIpos): m/z = 363 $(M+H)^+$。

中間物L67

三氟乙酸/2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙基-β-丙胺酸酯(1:1)



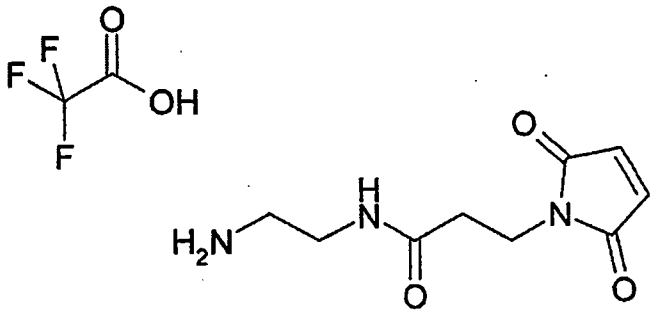
標題化合物自50 mg (0.354 mmol)市售1-(2-羥基乙基)-1H-吡咯-2,5-二酮，藉由在10 ml二氯甲烷中在1.5當量EDCI及0.1當量4-*N,N*-二甲基胺基吡啶存在下與134 mg (0.71 mmol) N-(第三丁氧羰基)-β-丙胺酸偶合且隨後用三氟乙酸脫除保護基來製備。

產率：56 mg (2步理論之48%)

LC-MS (方法3): R_t = 1.15 min ; MS (ESIpos): m/z = 213 $(M+H)^+$。

中間物L68

三氟乙酸/N-(2-胺基乙基)-2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)丙醯胺(1:1)

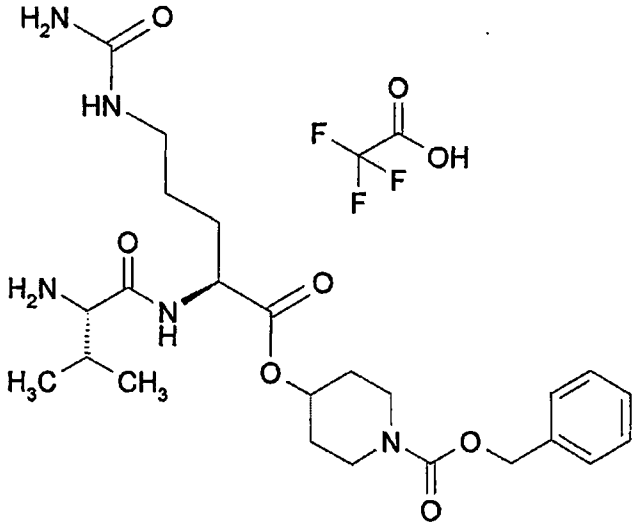


標題化合物類似於中間物L1，根據肽化學之經典方法，自市售(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)丙酸及(2-胺基乙基)胺基甲酸第三丁酯製備。

LC-MS (方法1): R_t = 0.17 min；MS (ESIpos): m/z = 212 $(M+H)^+$。

中間物L69

三氟乙酸/1-[(苯甲氧基)羰基]哌啶-4-基-L-纈胺醯基-N5-胺甲醯基-L-鳥胺酸酯(1:1)

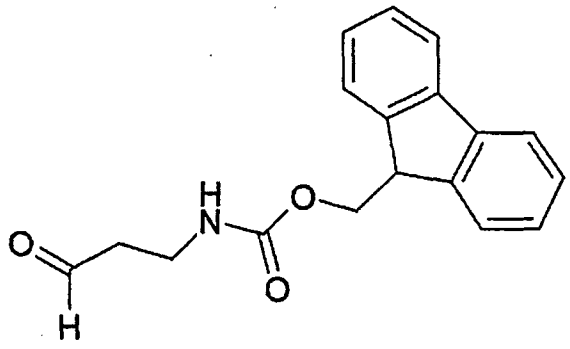


標題化合物藉由肽化學之經典方法，自市售4-羥基哌啶-1-甲酸苯甲酯，藉由使用EDCI/DMAP，用N2-(第三丁氧羰基)-N5-胺甲醯基-L-鳥胺酸酯化，隨後用TFA移除Boc，接著在HATU及*N,N*-二異丙基乙胺存在下與N-[(第三丁氧基)羰基]-L-纈胺酸偶合且最終再用TFA移除Boc來製備。

LC-MS (方法1): R_t = 0.62 min；MS (ESIpos): m/z = 492 $(M+H)^+$。

中間物L70

(3-側氧基丙基)胺基甲酸9H-茀-9-基甲酯

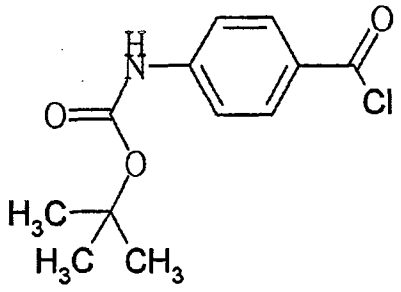


1000.0 mg (3.36 mmol) (3-羥基丙基)胺基甲酸9H-茀-9-基甲酯最初饋入15.0 ml氯仿及15.0 ml 0.05 N碳酸鉀/0.05 N碳酸氫鈉溶液(1:1)中。接著添加93.5 mg (0.34 mmol)氯化四正丁基銨、673.6 mg (5.04 mmol) N-氯代丁二醯亞胺及52.5 mg (0.34 mmol) TEMPO且將反應混合物在室溫下用力攪拌隔夜。反應混合物用二氯甲烷稀釋且有機相用水及飽和NaCl溶液洗滌。有機相經硫酸鎂乾燥且在減壓下蒸發溶劑。殘餘物在高真空下乾燥且藉由矽膠層析法(移動相：環己烷/乙酸乙酯3:1-1:1)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到589.4 mg (理論之58%)標題化合物。

LC-MS (方法6): R_t = 2.15 min；MS (ESIpos): m/z = 296 $(M-H)^+$。

中間物L71

[4-(氯羰基)苯基]胺基甲酸第三丁酯

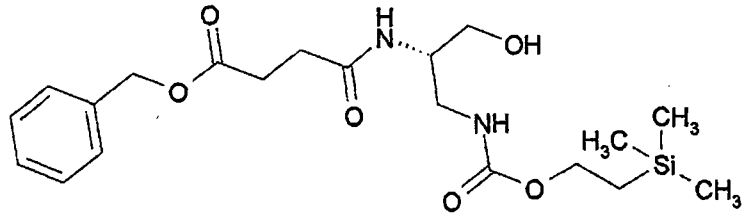


100.0 mg (0.42 mmol) 4-[(第三丁氧羰基)胺基]苯甲酸最初饋入2.0 ml二氯甲烷中，且添加64.2 mg (0.51 mmol)乙二醯二氯。將反應混合物在室溫下攪拌30分鐘(藉由TLC監測：二氯甲烷/甲醇)，接著添加另

外192.6 mg (1.53 mmol)乙二醯二氯及1滴DMF且將混合物在室溫下攪拌1小時。在減壓下蒸發溶劑且殘餘物重複與二氯甲烷共蒸餾。殘餘物未經進一步純化即用於合成下一步。

中間物L72

(9S)-9-(羥基甲基)-2,2-二甲基-6,11-二側氧基-5-氧雜-7,10-二氮雜-2-矽雜十四烷-14-酸苯甲酯

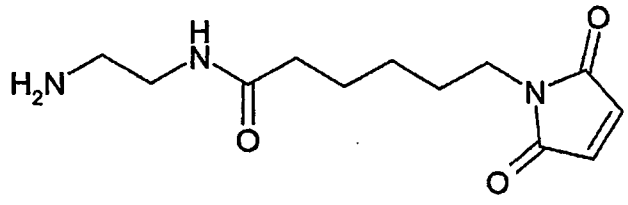


標題化合物自市售[(2S)-3-羥基丙-1,2-二基]雙胺基甲酸苯甲酯第三丁酯，根據肽化學之經典方法，藉由氫解移除Z保護基，隨後在EDCI/HOBT存在下與4-(苯甲氧基)-4-側氧基丁酸偶合，接著用TFA移除Boc保護基且最終在三乙胺存在下與1-({[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}氧基)吡咯啶-2,5-二酮反應來製備。

LC-MS (方法1): R_t = 0.94 min ; MS (ESIpos): m/z = 425 $[M+H]^+$。

中間物L73

N-(2-胺基乙基)-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺



將395.5 mg (1.87 mmol) 6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己酸、1.21 g (9.36 mmol) N,N-二異丙基乙胺及854.3 mg (2.25 mmol) HATU添加至300 mg (1.87 mmol) (2-胺基乙基)胺基甲酸第三丁酯於20 ml二甲基甲醯胺中之溶液。將反應混合物在室溫下攪拌5分鐘。濃縮混合物後，使殘餘物溶解於DCM中且用水洗滌。有機相用鹽水洗

滌，經硫酸鎂乾燥，濾出且濃縮。此得到408 mg (33%，純度53%)標題化合物，其未經進一步純化即使用。

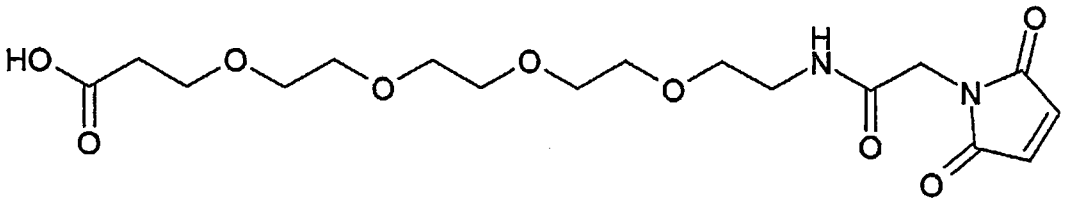
LC-MS (方法1): R_t = 0.75 min ; MS (ESIpos): m/z = 354 $(M+H)^+$。

將1 ml TFA添加至(2-{[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]胺基}乙基)胺基甲酸第三丁酯(408 mg, 0.365 mmol)於7 ml二氯甲烷中之溶液。將反應混合物在室溫下攪拌0.5小時。在減壓下濃縮反應混合物且殘餘物與二氯甲烷共蒸餾兩次。殘餘物未經進一步純化即進一步使用。此得到384 mg (94%，純度57%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.26 min ; MS (ESIpos): m/z = 254 $(M+H)^+$。

中間物L74

3-[2-[2-[2-[2-[[2-(2,5-二側氧基吡咯-1-基)乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酸



使107 mg (0.335 mmol) 3-[2-[2-[2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酸第三丁酯及93 mg (0.369 mmol) 2-(2,5-二側氧基吡咯-1-基)乙酸(2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)酯溶於5 ml二甲基甲醯胺中，且添加0.074 ml (0.671 mmol) N-甲基嗎啉。將反應混合物在室溫下攪拌隔夜。添加0.048 ml (0.838 mmol)乙酸且反應混合物直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 125×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水/0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到133 mg (86%，純度100%) 3-[2-[2-[2-[2-[[2-(2,5-二側氧基吡咯-1-基)乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酸第三丁酯。

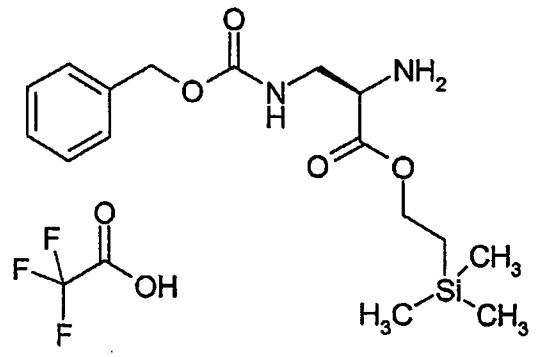
LC-MS (方法1): R_t = 0.82 min ; MS (ESIpos): m/z = 459 $(M+H)^+$。

將0.5 ml TFA添加至3-[2-[2-[2-[2-[[2-(2,5-二側氧基吡咯-1-基)乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酸第三丁酯(130 mg，0.284 mmol)於5 ml二氯甲烷中之溶液。將反應混合物在室溫下攪拌隔夜。在減壓下濃縮反應混合物且使殘餘物溶解於水中且凍乾。殘餘物未經進一步純化即進一步使用。此得到102 mg (90%，純度100%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.52 min ; MS (ESIpos): m/z = 402 $(M+H)^+$。

中間物L75

三氟乙酸/3-{[(苯甲氧基)羰基]胺基}-D-丙胺酸2-(三甲基矽烷基)乙酯(1:1)

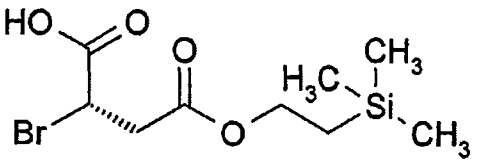


標題化合物自3-{[(苯甲氧基)羰基]胺基}-N-(第三丁氧羰基)-D-丙胺酸，根據肽化學之經典方法(使用EDCI/DMAP，用2-(三甲基矽烷基乙醇酯化，及用三氟乙酸移除Boc保護基製備。此得到405 mg (2步理論之58%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.75 min ; MS (ESIpos): m/z = 339 $(M+H)^+$。

中間物L76

(2S)-2-溴-4-側氧基-4-[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]丁酸



首先，適當保護之天冬胺酸衍生物自(3S)-4-(苯甲氧基)-3-{[(苯甲氧基)羰基]胺基}-4-側氧基丁酸，根據肽化學之經典方法(使用EDCI/DMAP，用2-(三甲基矽烷基)乙醇酯化，及氫解移除Z保護基及苯甲基酯)來製備。

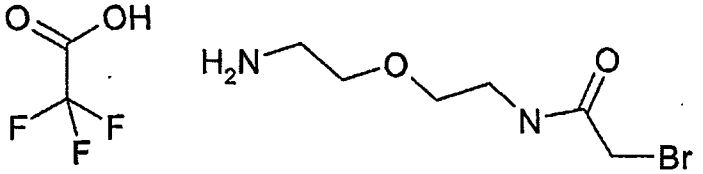
使以此方式獲得之470 mg (1.8 mmol) (2S)-2-胺基-4-側氧基-4-[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]丁酸懸浮於10 ml水中，且添加1.8 ml 1莫耳濃度鹽酸及0.5 ml濃硫酸，接著添加863 mg (7.25 mmol)溴化鉀。接著在10℃下，經30分鐘時間逐滴添加150 mg (2.175 mmol)亞硝酸鈉於1 ml水中之溶液，且將混合物在10-15℃下攪拌2小時。接著混合物用50 ml乙酸乙酯萃取。有機相用飽和氯化鈉溶液洗滌且經硫酸鎂乾燥。蒸發溶劑且藉由製備型HPLC純化產物，得到260 mg (理論之48%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 1.03 min；MS (ESIneg): m/z = 295及297 $(M-H)^-$。

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 0.03 (s, 9H), 0.95 (t, 2H), 2.94及3.2 (2dd, 2H), 4.18 (t, 2H), 4.57 (t, 1H)。

中間物L77

三氟乙酸/N-[2-(2-胺基乙氧基)乙基]-2-溴乙醯胺(1:1)

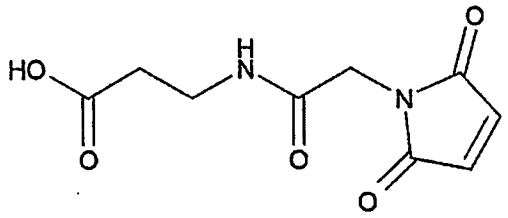


418 mg (2.05 mmol) [2-(2-胺基乙氧基)乙基]胺基甲酸第三丁酯最初與638 mg (2.46 mmol)溴乙酸酐反應，且接著用三氟乙酸移除Boc保護基。此得到551 mg (2步理論之63%)標題化合物。

LC-MS (方法): R_t = 0.32 min；MS (ESIpos): m/z = 227及225 $(M+H)^+$。

中間物L78

N-[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]-β-丙胺酸

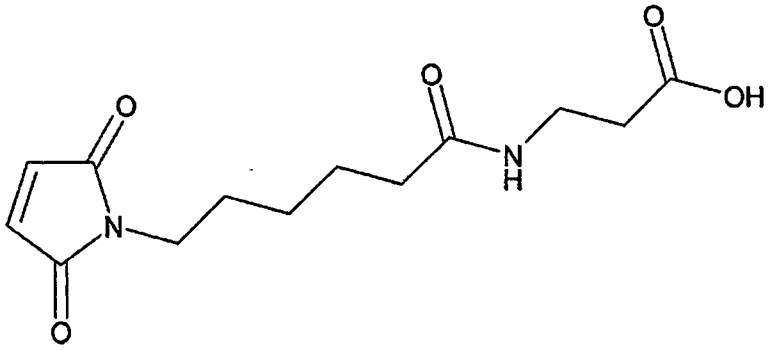


標題化合物自市售(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙酸，藉由在EDCI/HOBt及*N,N*-二異丙基乙胺存在下與β-丙胺酸第三丁酯鹽酸鹽(1:1)偶合且隨後用三氟乙酸脫除保護基來製備。

LC-MS (方法1): R_t = 0.32 min；MS (ESIpos): m/z = 227 $(M+H)^+$。

中間物L79

N-[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]-β-丙胺酸



使64.8 mg (0.357 mmol) β-丙胺酸第三丁酯鹽酸鹽(1:1)及100 mg (0.324 mmol) 1-{6-[(2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)氧基]-6-側氧基己基}-1H-吡咯-2,5-二酮溶於4 ml二甲基甲醯胺中，且添加65.6 mg (0.649 mmol) N-甲基嗎啉。將反應混合物在室溫下攪拌隔夜。添加0.048 ml (0.838 mmol)乙酸且反應混合物直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水/0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到84.5 mg

(77%，純度100%) N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]-β-丙胺酸第三丁酯。

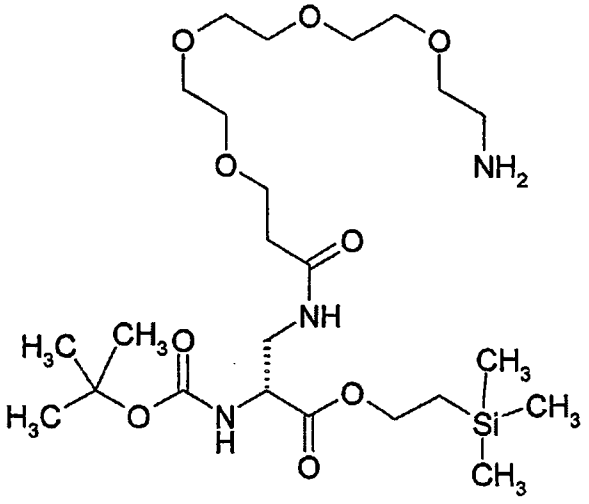
LC-MS (方法1): R_t = 0.78 min；MS (ESIpos): m/z = 339 $(M+H)^+$。

將1.62 ml TFA添加至N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]-β-丙胺酸第三丁酯(82.8 mg，0.244 mmol)於8 ml二氯甲烷中之溶液。將反應混合物在室溫下攪拌2小時。在減壓下濃縮反應混合物且使殘餘物溶解於水中且凍乾。殘餘物未經進一步純化即進一步使用。此得到62.7 mg (87%，純度95%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.75 min；MS (ESIpos): m/z = 283 $(M+H)^+$。

中間物L80

3-[(15-胺基-4,7,10,13-四氧雜十五烷-1-醯基)胺基]-N-(第三丁氧羰基)-D-丙胺酸2-(三甲基矽烷基)乙酯



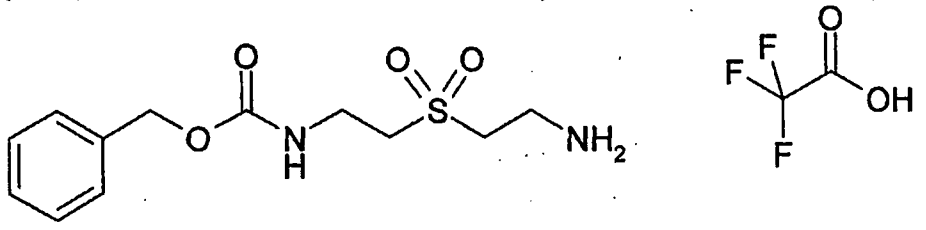
標題化合物自市售3-{[(苯甲氧基)羰基]胺基}-N-(第三丁氧羰基)-D-丙胺酸/N-環己基環己胺(1:1)，根據肽化學之經典方法(自鹽釋放及使用EDCI/DMAP，用2-(三甲基矽烷基)乙醇酯化，氫解移除Z保護基，在HATU及N,N-二異丙基乙胺存在下與市售3-側氧基-1-苯基-2,7,10,13,16-五氧雜-4-氮雜十九烷-19-酸偶合及再次氫解移除Z保護

基)來製備。

LC-MS (方法1): R_t = 0.70 min ; MS (ESIpos): m/z = 552 $(M+H)^+$。

中間物L81

三氟乙酸/{2-[(2-胺基乙基)磺醯基]乙基}胺基甲酸苯甲酯(1:1)

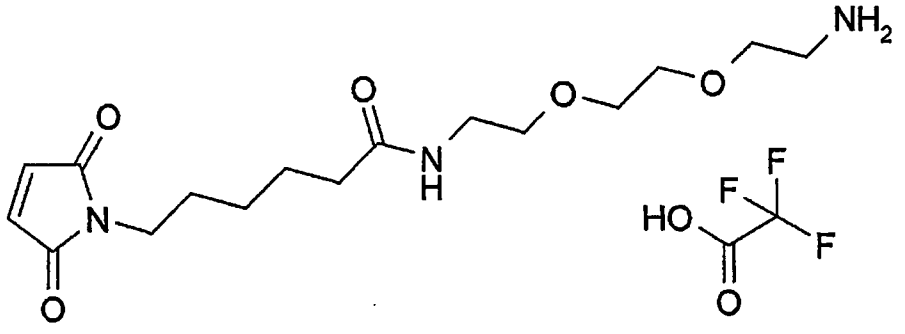


在N,N-二異丙基乙胺存在下在DMF中使250 mg (1.11 mmol) 2,2'-磺醯基二乙胺與92.3 mg (0.37 mmol) 1-{[(苯甲氧基)羰基]氧基}吡咯啶-2,5-二酮偶合。隨後藉由HPLC純化，得到70 mg (理論之47%)標題化合物。

LC-MS (方法12): R_t = 0.64 min ; MS (ESIpos): m/z = 257.11 $(M+H)^+$。

中間物L82

三氟乙酸/N-{2-[2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]乙基}-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺(1:1)



使88.6 mg (0.357 mmol) N-Boc-2,2'-(伸乙基二氧基)二乙胺及100 mg (0.324 mmol) 6-順丁烯二醯亞胺基己酸N-丁二醯亞胺基酯溶於4.0 ml二甲基甲醯胺中，且添加0.071 ml (0.650 mmol) N-甲基嗎啉。將反應混合物在室溫下攪拌隔夜。添加0.048 ml (0.838 mmol)乙酸且反應

混合物直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 125×30；10 μ，流動速率：75 ml/min，MeCN/水/0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到127 mg (理論之81%) {2-[2-(2-{[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]胺基}乙氧基)乙氧基]乙基}胺基甲酸第三丁酯。

LC-MS (方法1): R_t = 0.78 min；MS (ESIpos): m/z = 442 $(M+H)^+$。

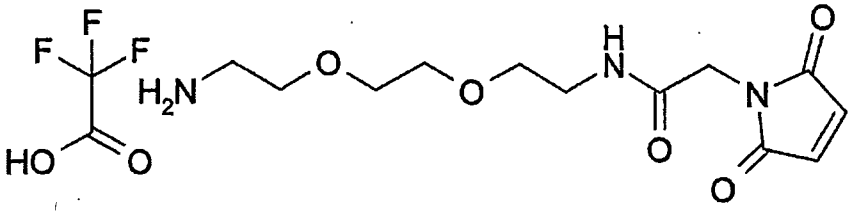
將2.0 ml TFA添加至123 mg (225 μmol) {2-[2-(2-{[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]胺基}乙氧基)乙氧基]乙基}胺基甲酸第三丁酯於7.5 ml二氯甲烷中之溶液。將反應混合物在室溫下攪拌2小時。在減壓下濃縮反應混合物且使殘餘物溶解於水中且凍乾。殘餘物未經進一步純化即進一步使用。此得到111 mg (理論之100%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.31 min；MS (ESIpos): m/z = 342 $(M+H)^+$。

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 1.17 (m, 2H), 1.47 (m, 4H), 2.04 (m, 2H), 2.98 (m, 2H), 3.19 (m, 2H), 3.39 (m, 4H), 3,56 (m, 6H), 7.01 (s, 2H), 7.72 (bs, 3H), 7.80 (m, 1H)。

中間物L83

三氟乙酸/N-{2-[2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]乙基}-2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯胺(1:1)



使200 mg (0.805 mmol) {2-[2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]乙基}胺基甲酸第三丁酯、150 mg (0.966 mmol) (2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯

-1-基)乙酸及560 µl (3.2 mmol) N,N-二異丙基乙胺溶於10 ml二甲基甲醯胺中，且添加459 mg (1.21 mmol) HATU。將反應混合物在室溫下攪拌30分鐘。在減壓下蒸發溶劑且使殘餘物溶於二氯甲烷中。有機相用5%濃度檸檬酸溶液洗滌兩次且經硫酸鎂乾燥，且在減壓下蒸發溶劑。殘餘物使用Biotage Isolera (矽膠，管柱25 g SNAP，二氯甲烷:甲醇98:2)純化。此得到276 mg (理論之89%) {2-[2-(2-{[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]胺基}乙氧基)乙氧基]乙基}胺基甲酸第三丁酯。

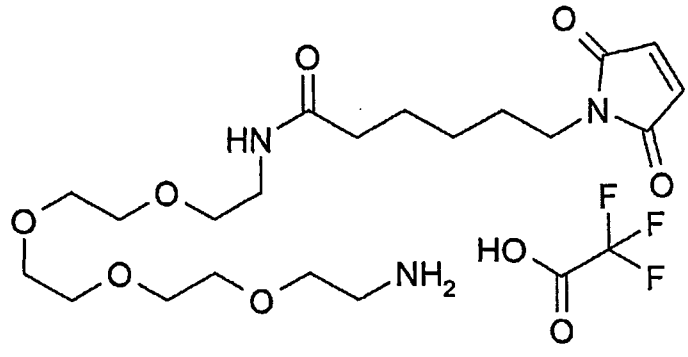
LC-MS (方法1): R_t = 0.67 min ; MS (ESIpos): m/z = 386 $(M+H)^+$。

將4 ml TFA添加至{2-[2-(2-{[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]胺基}乙氧基)乙氧基]乙基}胺基甲酸第三丁酯(275 mg，714 µmol)於15 ml二氯甲烷中之溶液。將反應混合物在室溫下攪拌30分鐘。在減壓下濃縮反應混合物且使殘餘物溶解於水中且凍乾。此得到281 mg (理論之99%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.17 min ; MS (ESIpos): m/z = 286 $(M+H)^+$。

中間物L84

三氟乙酸/N-(14-胺基-3,6,9,12-四氧雜十四烷-1-基)-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺(1:1)



使200 mg (0.594 mmol) (14-胺基-3,6,9,12-四氧雜十四烷-1-基)胺

基甲酸第三丁酯及202 mg (0.654 mmol) 1-{6-[(2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)氧基]-6-側氧基己基}-1H-吡咯-2,5-二酮溶於4.0 ml二甲基甲醯胺中，且添加0.130 ml (1.2 mmol) N-甲基嗎啉。將反應混合物在室溫下攪拌隔夜。添加0.085 ml (1.5 mmol)乙酸且反應混合物直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 125×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水/0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到275 mg (理論之73%) [21-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-16-側氧基-3,6,9,12-四氧雜-15-氮雜二十一烷-1-基]胺基甲酸第三丁酯。

LC-MS (方法1): R_t = 0.81 min；MS (ESIpos): m/z = 530 $(M+H)^+$。

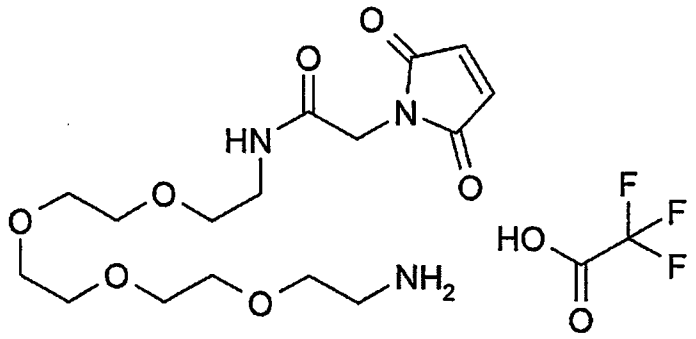
將780 μl (10 mmol) TFA添加至[21-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-16-側氧基-3,6,9,12-四氧雜-15-氮雜二十一烷-1-基]胺基甲酸第三丁酯(268 mg，505 μmol)於5.0 ml二氯甲烷中之溶液。將反應混合物在室溫下攪拌隔夜。在減壓下濃縮反應混合物且使殘餘物溶解於水中且凍乾。殘餘物未經進一步純化即進一步使用。此得到266 mg (理論之97%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.46 min；MS (ESIpos): m/z = 430 $(M+H)^+$。

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 1.17 (m, 2H), 1.47 (m, 4H), 2.03 (m, 2H), 2.99 (m, 2H), 3.18 (m, 2H), 3.38 (m, 4H), 3,52 (m, 8H), 3,58 (m, 6H), 7.01 (s, 2H), 7.73 (bs, 3H), 7.80 (m, 1H)。

中間物L85

三氟乙酸/N-(14-胺基-3,6,9,12-四氧雜十四烷-1-基)-2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯胺(1:1)



使200 mg (0.594 mmol) (14-胺基-3,6,9,12-四氧雜十四烷-1-基)胺基甲酸第三丁酯、111 mg (0.713 mmol) (2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙酸及410 µl (2.4 mmol) N,N-二異丙基乙胺溶於6 ml二甲基甲醯胺中，且添加339 mg (0.892 mmol) HATU。將反應混合物在室溫下攪拌1小時且直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 µ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水/0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到130 mg (理論之43%) [17-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-16-側氧基-3,6,9,12-四氧雜-15-氮雜十七烷-1-基]胺基甲酸第三丁酯。

LC-MS (方法1): R_t = 0.71 min；MS (ESIpos): m/z = 474 $(M+H)^+$。

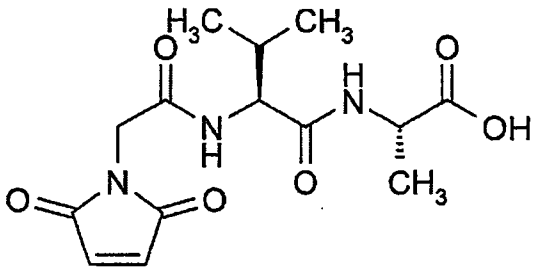
將410 µl (5.3 mmol) TFA添加至[17-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-16-側氧基-3,6,9,12-四氧雜-15-氮雜十七烷-1-基]胺基甲酸第三丁酯(126 mg，267 µmol)於4.0 ml二氯甲烷中之溶液。將反應混合物在室溫下攪拌隔夜。在減壓下濃縮反應混合物且在高真空下乾燥殘餘物。此得到124 mg (理論之95%)標題化合物。

LC-MS (方法13): R_t = 0.74 min；MS (ESIpos): m/z = 374 $(M+H)^+$。

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 2.99 (m, 2H), 3.22 (m, 2H), 3.41 (m, 2H), 3,53 (m, 8H), 3,58 (m, 6H), 4.02 (s, 2H), 7.09 (s, 2H), 7.73 (bs, 3H), 8.21 (m, 1H)。

中間物L86

N-[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]-L-纈胺醯基-L-丙胺酸

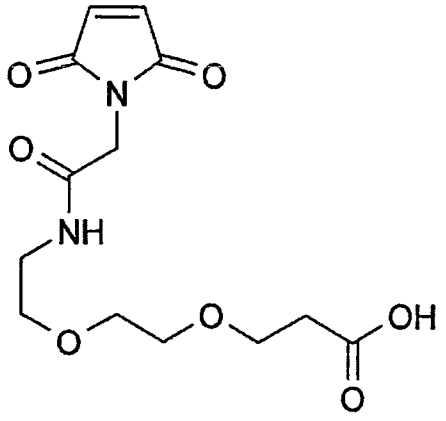


使100 mg (0.531 mmol) L-纈胺醯基-L-丙胺酸及134 mg (0.531 mmol) 1-{2-[(2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)氧基]-2-側氧基乙基}-1H-吡咯-2,5-二酮溶於3 ml二甲基甲醯胺中，且添加0.150 ml (1.1 mmol)三乙胺。將反應混合物在室溫下攪拌8小時。反應混合物直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到71.5 mg (理論之41%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.42 min；MS (ESIpos): m/z = 326 $(M+H)^+$。

中間物L87

3-[2-(2-{[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]胺基}乙氧基)乙氧基]丙酸



使250 mg (1.07 mmol) 3-[2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]丙酸第三丁酯、151 mg (0.974 mmol) 2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙

酸、224 mg (1.46 mmol) 1-羥基-1H-苯并三唑水合物及224 mg (1.17 mmol) 1-(3-二甲基胺基丙基)-3-乙基碳化二亞胺鹽酸鹽溶於5.0 ml二甲基甲醯胺中。將反應混合物在室溫下攪拌1小時。添加乙酸乙酯且混合物用5%濃度檸檬酸溶液及飽和碳酸氫鈉溶液萃取兩次。有機相用飽和氯化鈉溶液洗滌兩次且經硫酸鎂乾燥，且在減壓下蒸發溶劑。殘餘物藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×40；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水/0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到267 mg (理論之64%) 3-[2-(2-{[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]胺基}乙氧基)乙氧基]丙酸第三丁酯。

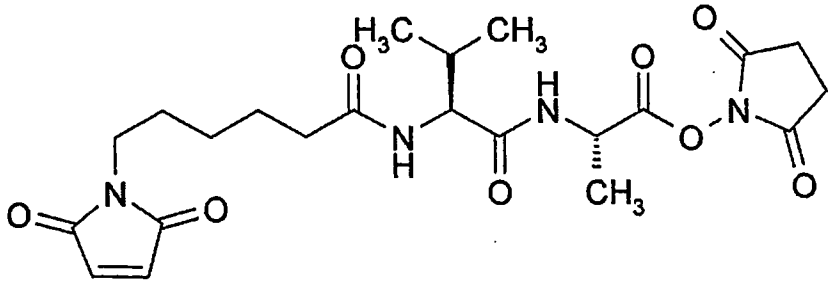
LC-MS (方法1): Rt = 0.73 min；MS (ESIpos): m/z = 371 $(M+H)^+$。

將1.1 ml (14 mmol) TFA添加至3-[2-(2-{[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]胺基}乙氧基)乙氧基]丙酸第三丁酯(263 mg，710 μmol)於10 ml二氯甲烷中之溶液。將反應混合物在室溫下攪拌隔夜。在減壓下濃縮反應混合物且在高真空下乾燥殘餘物。此得到240 mg (理論之94%)標題化合物。

LC-MS (方法12): R_t = 0.57 min；MS (ESIpos): m/z = 315 $(M+H)^+$。

中間物L88

N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]-L-纈胺醯基-L-丙胺酸2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯



使150 mg (0.797 mmol) L-纈胺醯基-L-丙胺酸及246 mg (0.797 mmol) 1-{6-[(2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)氧基]-6-側氧基己基}-1H-吡咯-2,5-二酮溶於4.0 ml二甲基甲醯胺中，且添加0.220 ml (1.6 mmol)三乙胺。將反應混合物在室溫下攪拌隔夜。反應混合物直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到302 mg (理論之97%) N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]-L-纈胺醯基-L-丙胺酸。

LC-MS (方法12): R_t = 1.02 min；MS (ESIpos): m/z = 382 $(M+H)^+$。

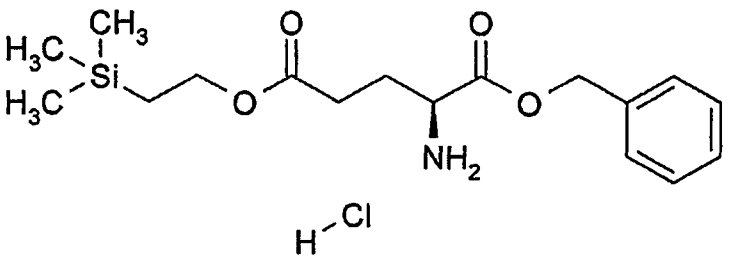
^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 0.82 (dd, 6H), 1.17 (m, 2H), 1.27 (d, 3H), 1.48 (m, 4H), 1.94 (m, 1H), 2.13 (m, 2H), 3.38 (t, 2H), 4.17 (m, 2H), 7.00 (s, 2H), 7.75 (d, 1H), 8.19 (d, 1H)。

使130 mg (0.531 mmol) N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]-L-纈胺醯基-L-丙胺酸溶於6.5 ml二氯甲烷中，且添加58.8 mg (0.511 mmol) 1-羥基吡咯啶-2,5-二酮及78.4 mg (0.409 mmol) 1-(3-二甲基胺基丙基)-3-乙基碳化二亞胺鹽酸鹽。添加另外58.8 mg (0.511 mmol) 1-羥基吡咯啶-2,5-二酮及78.4 mg (0.409 mmol) 1-(3-二甲基胺基丙基)-3-乙基碳化二亞胺鹽酸鹽。添加二氯甲烷且混合物用水洗滌三次。有機相經硫酸鎂乾燥，在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到172 mg (理論之87%)標題化合物。

LC-MS (方法12): R_t = 1.28 min；MS (ESIpos): m/z = 479 $(M+H)^+$。

中間物L89

1-苯甲基-5-[2-(三甲基矽烷基)乙基]-L-麩胺酸酯鹽酸鹽(1:1)



1.00 g (2.96 mmol) (4S)-5-(苯甲氧基)-4-[(第三丁氧羰基)胺基]-5-側氧基戊酸最初饋入13.0 ml THF中，且添加510 µl (3.6 mmol) 2-(三甲基矽烷基)乙醇及109 mg (889 µmol) 4-二甲基胺基吡啶。反應混合物冷卻至0℃，且添加682 mg (3.56 mmol) N-乙基-N'-3-(二甲基胺基丙基)碳化二亞胺鹽酸鹽。將反應混合物在室溫下攪拌隔夜。溶劑在減壓下蒸發且殘餘物溶於乙酸乙酯中。有機相用0.1 N HCl溶液及飽和氯化鈉溶液洗滌兩次且經硫酸鎂乾燥，且在減壓下蒸發溶劑。殘餘物使用Biotage Isolera (矽膠，管柱25 g SNAP，環己烷:乙酸乙酯80:20)純化。此得到649 mg (理論之50%)化合物1-苯甲基-5-[2-(三甲基矽烷基)乙基]-N-(第三丁氧羰基)-L-麩胺酸酯。

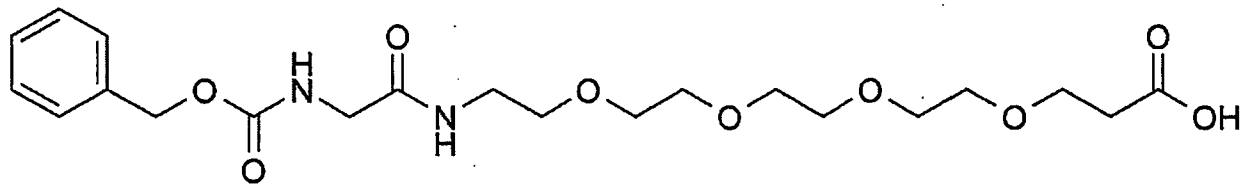
LC-MS (方法1): R_t = 4.6 min；MS (ESIpos): m/z = 438 $(M+H)^+$。

使649 mg (1.48 mmol) 1-苯甲基-5-[2-(三甲基矽烷基)乙基]-N-(第三丁氧羰基)-L-麩胺酸酯溶於7.0 ml二噁烷中，且在冰浴冷卻下，添加14 ml (59 mmol) 4N HCl之二噁烷溶液。將反應混合物在室溫下攪拌隔夜。在減壓下濃縮反應混合物且在高真空下乾燥殘餘物且藉由Biotage Isolera (矽膠，管柱25 g SNAP，二氯甲烷:甲醇90:10)純化。此得到320 mg (理論之57%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.79 min；MS (ESIpos): m/z = 338 $(M+H)^+$。

中間物L90

1-({N-[(苯甲氧基)羰基]甘胺醯基}胺基)-3,6,9,12-四氧雜十四烷-15-酸



118 mg (566 μmol) N-[(苯甲氧基)羰基]甘胺酸最初饋入5.0 ml DMF中，添加200 mg (622 μmol) 1-胺基-3,6,9,12-四氧雜十五烷-15-酸第三丁酯、130 mg (849 μmol) 1-羥基-1H-苯并三唑水合物及130 mg (679 μmol) 1-(3-二甲基胺基丙基)-3-乙基碳化二亞胺鹽酸鹽且將混合物在室溫下攪拌1小時。添加乙酸乙酯且混合物用5%濃度檸檬酸溶液及飽和碳酸氫鈉溶液萃取兩次。有機相用飽和氯化鈉溶液洗滌兩次且經硫酸鎂乾燥。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到274 mg (理論之95%) 1-({N-[(苯甲氧基)羰基]甘胺醯基}胺基)-3,6,9,12-四氧雜十五烷-15-酸第三丁酯。

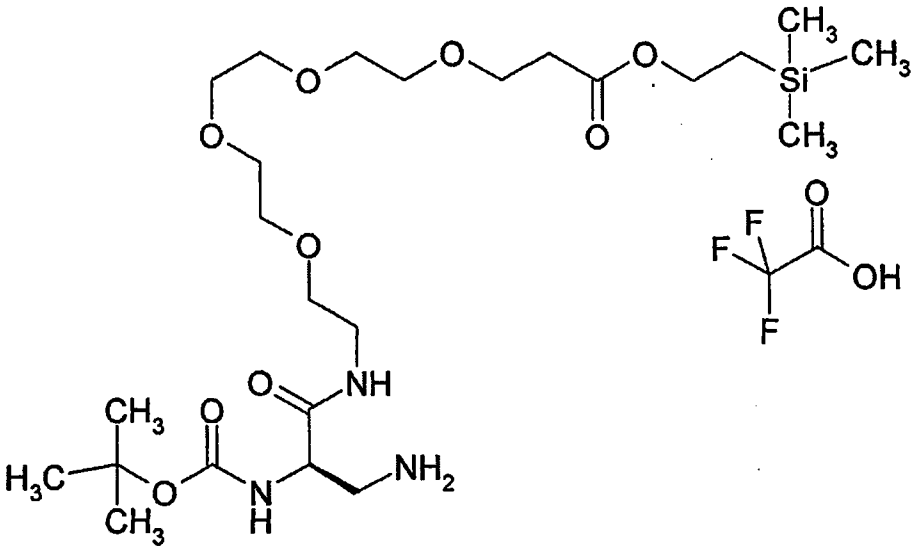
LC-MS (方法12): Rt = 1.69 min ; MS (ESIpos): m/z = 513 $(M+H)^+$。

將820 μl (11 mmol) TFA添加至274 mg (535 μmol) 1-({N-[(苯甲氧基)羰基]甘胺醯基}胺基)-3,6,9,12-四氧雜十五烷-15-酸第三丁酯於5.0 ml二氯甲烷中之溶液。將反應混合物在室溫下攪拌3小時。在減壓下濃縮反應混合物且使殘餘物溶解於水中且凍乾。此得到262 mg (理論之100%)標題化合物。

LC-MS (方法12): R_t = 1.12 min ; MS (ESIpos): m/z = 457 $(M+H)^+$。

中間物L91

三氟乙酸/1-{[3-胺基-N-(第三丁氧羰基)-D-丙胺醯基]胺基}-3,6,9,12-四氧雜十五烷-15-酸2-(三甲基矽烷基)乙酯(1:1)

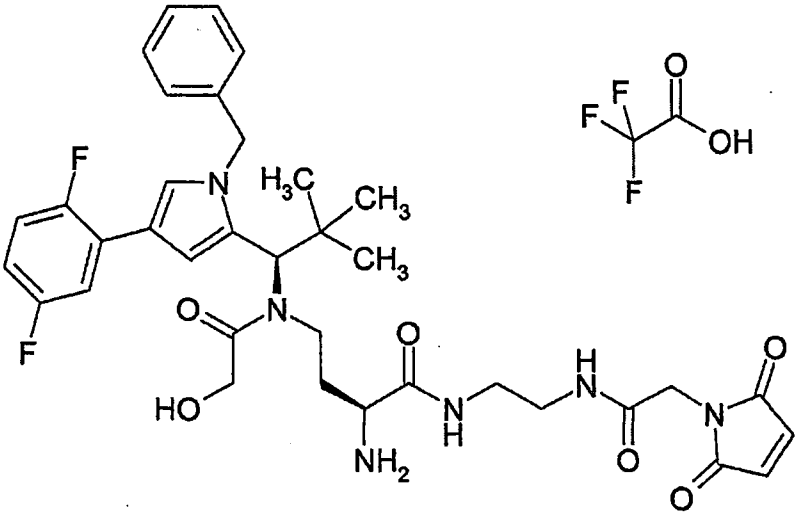


標題化合物自市售3-側氧基-1-苯基-2,7,10,13,16-五氧雜-4-氮雜十九烷-19-酸，藉由肽化學之經典方法(使用EDCI/DMAP，用2-三甲基矽烷基乙醇酯化，氫解移除Z保護基，與市售N-(第三丁氧羰基)-3-{[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]胺基}-D-丙胺酸偶合及移除Fmoc保護基)來製備。

LC-MS (方法1): R_t = 0.74 min；MS (ESIpos): m/z = 552 $(M+H)^+$。

中間物F104

三氟乙酸/(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]-N-(2-{[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]胺基}乙基)丁醯胺(1:1)



使10 mg (0.014 mmol)中間物C53溶於3.3 ml DMF中，且添加8.5 mg (0.027 mmol)中間物L1、7.8 mg (0.02 mmol) HATU及12 µl N,N-二異丙基乙胺。將反應在室溫下攪拌15分鐘且接著濃縮。殘餘物藉由製備型HPLC純化，凍乾後得到5.6 mg (理論之38%)經保護之中間物。

LC-MS (方法1): R_t = 1.32 min；MS (ESIpos): m/z = 915 $(M+H)^+$。

使5.6 mg (0.006 mmol)此中間物溶解於2 ml DMF中，且添加69 mg (0.61 mmol) 1,4-二氮雜雙環[2.2.2]辛烷。反應在超音波浴中處理2小時。接著添加35 µl乙酸且在高真空下濃縮反應物。殘餘物藉由製備型HPLC純化。此得到2.4 mg (理論之48%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.84 min；MS (EIpos): m/z = 693 $[M+H]^+$。

HPLC (方法11): R_t = 1.91 min；

或者，亦自中間物C58製備標題化合物。15 mg (0.023 mmol)中間物C58最初與11 mg (0.036 mmol)中間物L1在13 mg (0.034 mmol) HATU及10 µl N,N-二異丙基乙胺存在下反應。在室溫下攪拌60分鐘後，濃縮混合物且殘餘物藉由製備型HPLC純化。此得到12.3 mg (理論之63%)經保護之中間物。

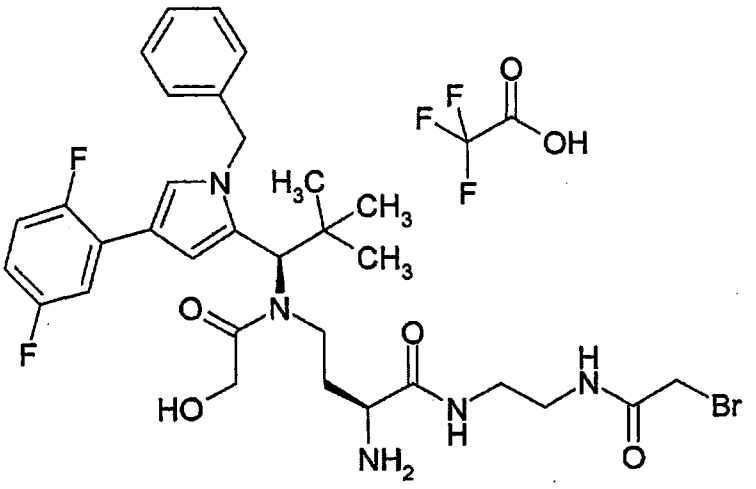
LC-MS (方法1): R_t = 1.3 min；MS (EIpos): m/z = 837 $[M+H]^+$。

在第二步中，此中間物溶於3 ml 2,2,2-三氟乙醇中。添加12 mg (0.088 mmol)氯化鋅，且將反應在50℃下攪拌2小時。接著添加26 mg (0.088 mmol)乙二胺-N,N,N',N'-四乙酸及2 ml 0.1%濃度三氟乙酸水溶液。反應藉由製備型HPLC純化。濃縮適當溶離份且自乙腈/水凍乾殘餘物，得到8.1 mg (理論之68%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.89 min；MS (ESIpos): m/z = 693 $(M+H)^+$。

中間物F119

三氟乙酸/(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]-N-{2-[(溴乙醯基)胺基]乙基}丁醯胺(1:1)



使29 mg (0.044 mmol)中間物C58溶解於3.4 ml DMF中，且添加36 mg (0.087 mmol)中間物L52、25 mg (0.065 mmol) HATU及19 µl N,N-二異丙基乙胺。在室溫下攪拌60分鐘後，濃縮混合物且殘餘物藉由製備型HPLC純化。此得到26.4 mg (理論之73%)中間物。

LC-MS (方法1): R_t = 1.34 min；MS (ESIpos): m/z = 820及822 $(M+H)^+$。

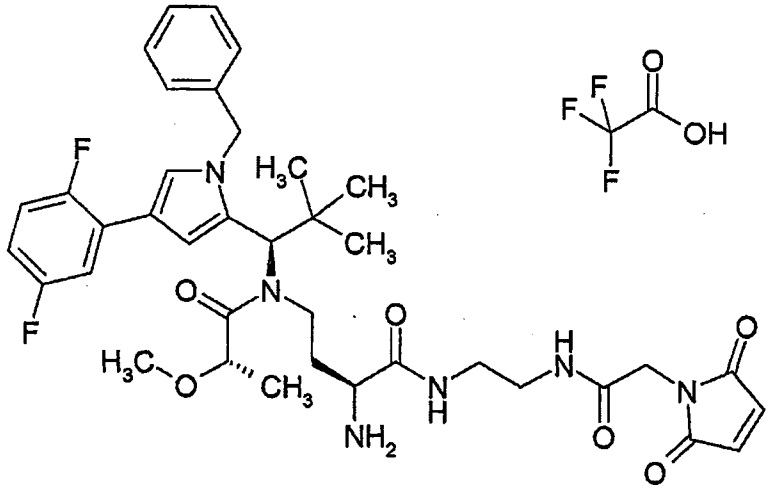
使此中間物溶於3 ml 2,2,2-三氟乙醇中。添加6.5 mg (0.048 mmol)氯化鋅，且將反應在50℃下攪拌4小時。添加13.9 mg (0.048 mmol)乙二胺-N,N,N',N'-四乙酸及2 ml 0.1%濃度三氟乙酸水溶液。反應藉由製備型HPLC純化。濃縮適當溶離份且自乙腈/水凍乾殘餘物，得到14.4 mg (理論之58%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.88 min；MS (ESIpos): m/z = 676及678 $(M+H)^+$。

中間物F127

三氟乙酸/(2S)-2-胺基-4-({(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}[(2S)-2-甲氧基丙醯基]胺基)-N-(2-{[(2,5-二側

氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]胺基}乙基)丁醯胺(1:1)



使12 mg (0.015 mmol)中間物C59溶於2.4 ml DMF中，且添加14.6 mg (0.046 mmol)中間物L1、6 mg (0.031 mmol) 1-(3-二甲基胺基丙基)-3-乙基碳化二亞胺鹽酸鹽、5.9 mg (0.039 mmol) 1-羥基-1*H*-苯并三唑水合物及8 µl *N*,*N*-二異丙基乙胺。在室溫下攪拌1小時後，濃縮混合物且殘餘物藉由製備型HPLC純化。此得到11 mg (理論之70%)此中間物。

LC-MS (方法1): R_t = 1.34 min；MS (ESIpos): m/z = 942 $(M+H)^+$。

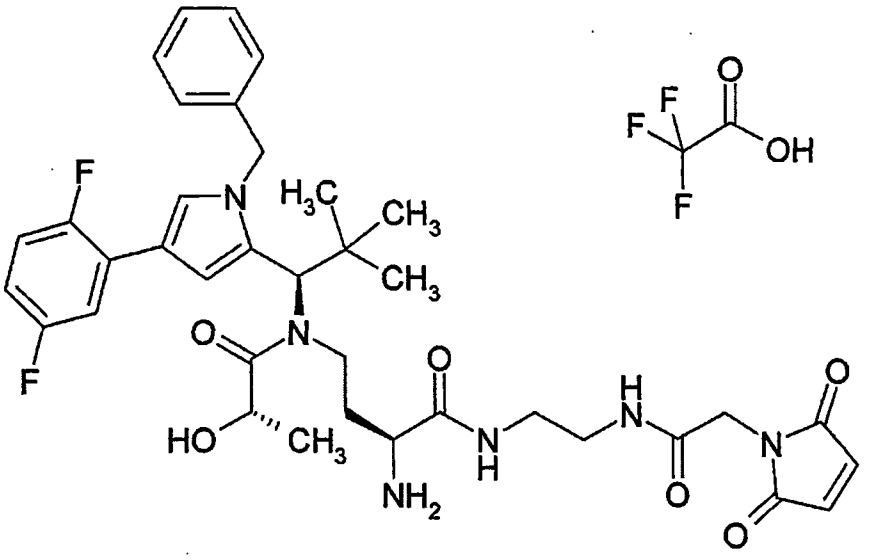
使11 mg (0.011 mmol)此中間物溶解於2 ml DMF中，且添加123 mg (1.1 mmol) 1,4-二氮雜雙環[2.2.2]辛烷。反應在超音波浴中處理2小時。接著添加63 µl乙酸且在高真空下濃縮反應物。殘餘物藉由製備型HPLC純化。此得到2 mg (理論之22%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.89 min；MS (EIpos): m/z = 721 $[M+H]^+$。

HPLC (方法11): R_t = 1.95 min；

中間物F153

三氟乙酸/(2S)-2-胺基-4-({(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}[(2S)-2-羥基丙醯基]胺基)-N-(2-{[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]胺基}乙基)丁醯胺(1:1)

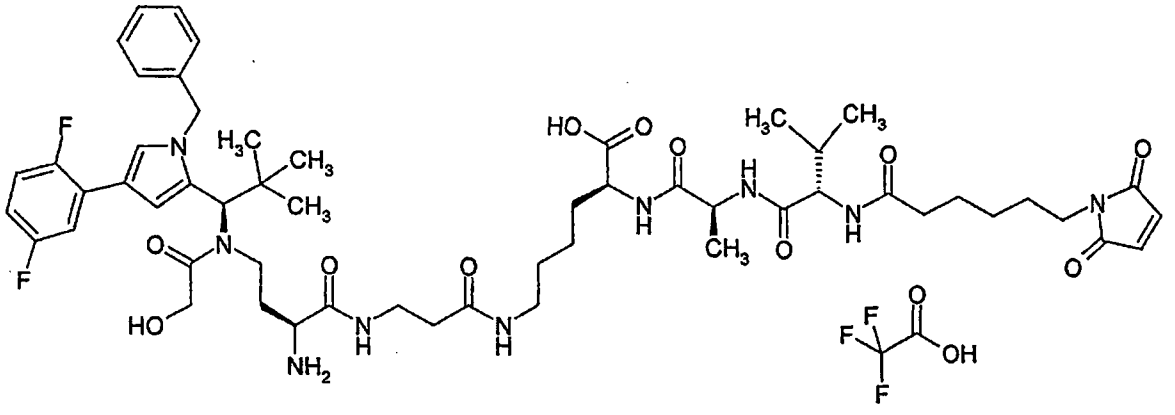


該合成類似於中間物F104，自中間物C60進行。

LC-MS (方法1): R_t = 1.1 min；MS (ESIpos): m/z = 707 $(M+H)^+$。

中間物F155

N^6-(N-{(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}-β-丙胺醯基)-N^2-{N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]-L-纈胺醯基-L-丙胺醯基}-L-離胺酸/三氟乙酸(1:1)

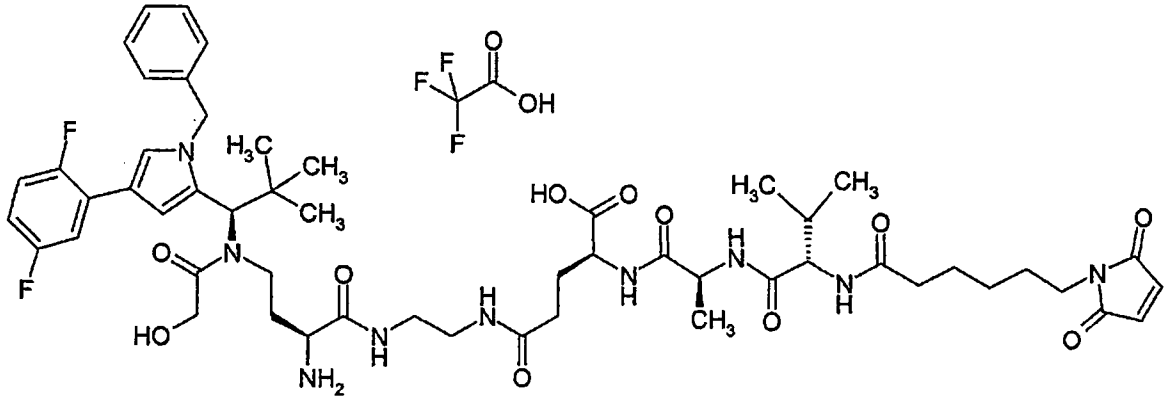


標題化合物藉由在8.7 mg (0.023 mmol) HATU及17 µl N,N-二異丙基乙胺存在下使14 mg (0.019 mmol)中間物C61與15 mg (0.021 mmol)中間物L61偶合且隨後如針中間物F119所述，在三氟乙醇中用氯化鋅脫除保護基來製備。藉由製備型HPLC純化得到13 mg (2步理論之59%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.86 min；MS (ESIpos): m/z = 1076 $(M+H)^+$。

中間物F173

N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]-L-纈胺醯基-L-丙胺醯基-N-[2-({(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}胺基)乙基]-L-麩醯胺酸/三氟乙酸(1:1)

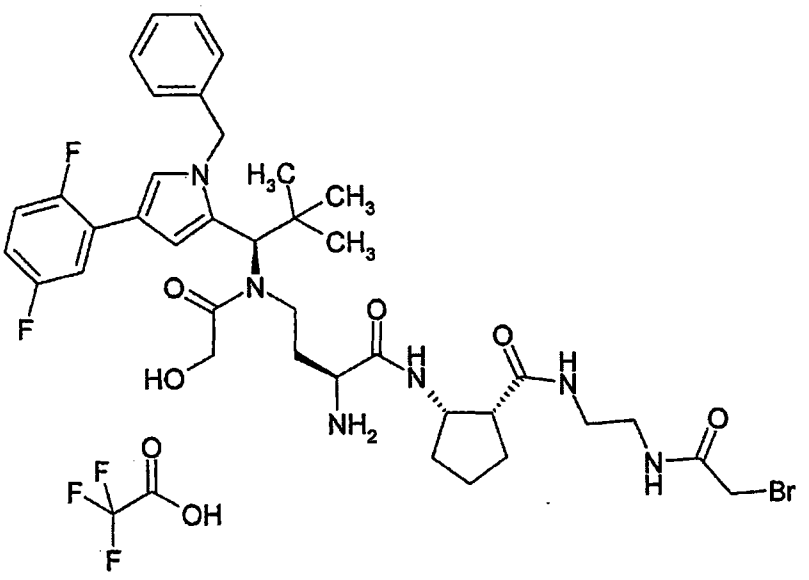


標題化合物自15 mg (0.018 mmol)中間物C64，藉由在7.7 mg (0.02 mmol) HATU及16 µl N,N-二異丙基乙胺存在下與12 mg (0.02 mmol)中間物L63偶合且隨後如針中間物F119所述，在三氟乙醇中用氯化鋅脫除保護基來製備。藉由製備型HPLC純化得到12 mg (2步理論之58%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.91 min；MS (EIpos): m/z = 1048 $[M+H]^+$。

中間物F178

三氟乙酸/(1R,2S)-2-({(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}胺基)-N-{2-[(溴乙醯基)胺基]乙基}環戊烷甲醯胺(1:1)

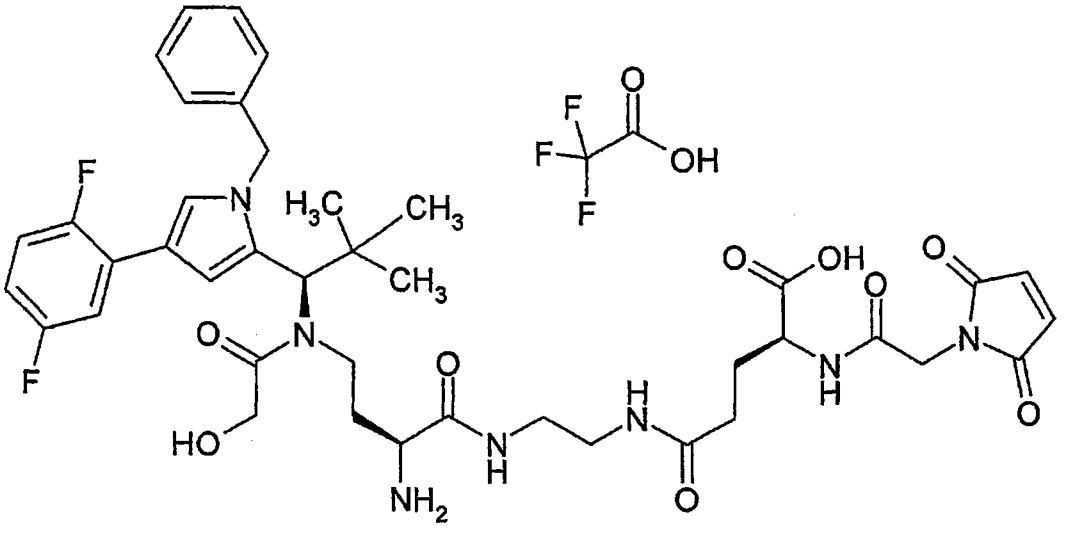


標題化合物類似於中間物F177，代替中間物L1，使用中間物L52製備。

LC-MS (方法1): R_t = 0.89 min；MS (EIpos): m/z = 787及789 $[M+H]^+$。

中間物F180

N-[2-({(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}胺基)乙基]-N2-[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]-L-麩醯胺酸/三氟乙酸(1:1)



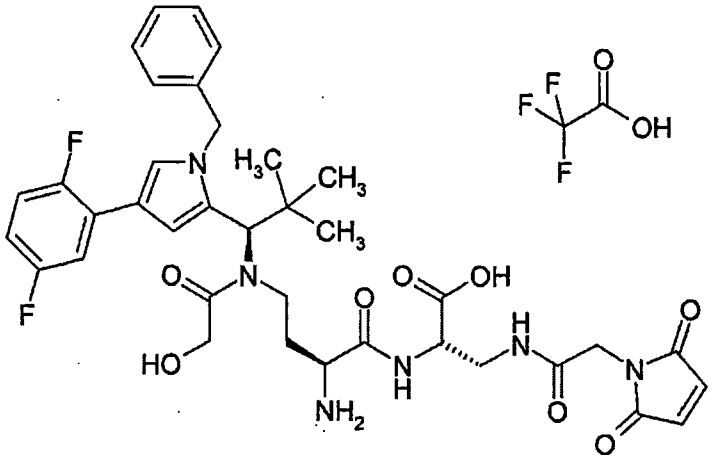
標題化合物藉由在7 mg (0.018 mmol) HATU及6 µl N,N-二異丙基乙胺存在下使9.6 mg (0.012 mmol)中間物C64與5 mg (0.013 mmol)中

間物L64偶合且隨後如針中間物F119所述，在三氟乙醇中用氯化鋅脫除保護基來製備。藉由製備型HPLC純化得到3.1 mg (2步理論之28%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.85 min；MS (EIpos): m/z = 822 $[M+H]^+$。

中間物F192

N-{(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}-3-{[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]胺基}-L-丙胺酸/三氟乙酸(1:1)



使60 mg (0.091 mmol)中間物C58溶解於8 ml DMF中且在42 mg (0.11 mmol) HATU及64 µl N,N-二異丙基乙胺存在下與45 mg (0.100 mmol)中間物L65偶合。藉由製備型HPLC純化後，使中間物溶解於10 ml乙醇中且在10%鈀/活性碳上在室溫下在氫標準壓力下氫化45分鐘。接著濾出催化劑，在減壓下移除溶劑且產物藉由製備型HPLC純化。自乙腈/水1:1凍乾得到24.5 mg (2步理論之31%) 3-胺基-N-[(2S)-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]-2-({[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}胺基)丁醯基]-L-丙胺酸2-(三甲基矽烷基)乙酯。

LC-MS (方法1): R_t = 1.17 min；MS (EIpos): m/z = 844 $[M+H]^+$。

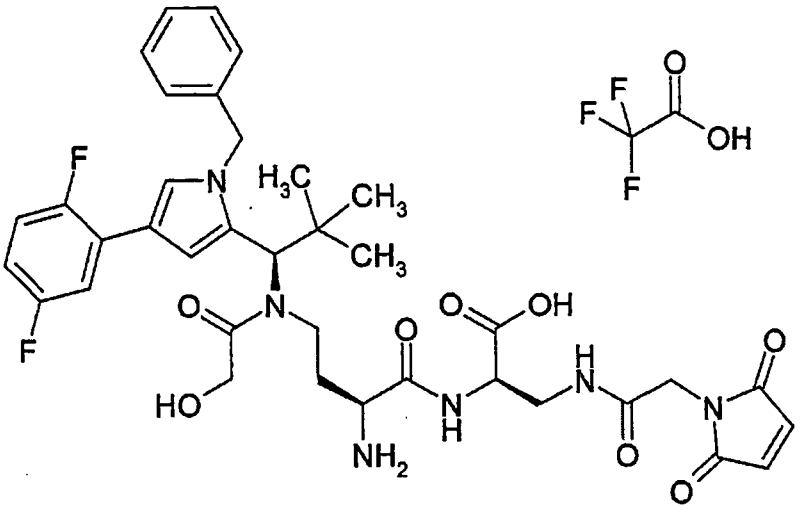
接著標題化合物藉由在5.4 mg (0.014 mmol) HATU及8 µl N,N-二

異丙基乙胺存在下使10 mg (0.012 mmol)此中間物與2 mg (0.013 mmol)市售(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙酸中間物偶合且隨後如針中間物F119所述，在三氟乙醇中用氯化鋅脫除保護基來製備。藉由製備型HPLC純化得到3.5 mg (2步理論之33%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.81 min ; MS (ESIpos): m/z = 737 $(M+H)^+$。

中間物F193

N-{(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}-3-{[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]胺基}-D-丙胺酸/三氟乙酸(1:1)

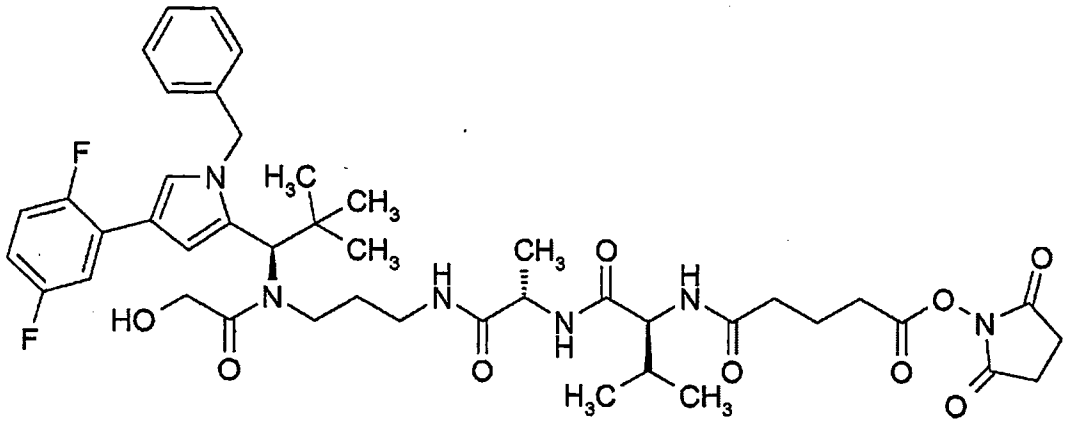


合成標題化合物類似於中間物F192，自3-{[(苯甲氧基)羰基]胺基}-N-(第三丁氧羰基)-D-丙胺酸/N-環己基環己胺(1:1)進行。

LC-MS (方法1): R_t = 0.87 min ; MS (ESIpos): m/z = 737 $(M+H)^+$。

中間物F194

N-{5-[(2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)氧基]-5-側氧基戊醯基}-L-纈胺醯基-N-{3-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丙基}-L-丙胺醯胺

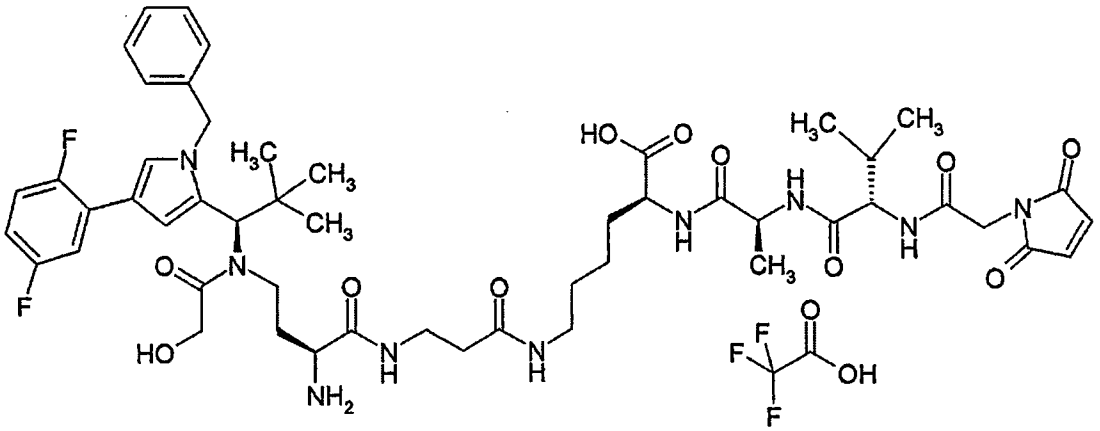


標題化合物自實例M9，首先藉由在HATU及N,N-二異丙基乙胺存在下與N-[(苯甲氧基)羰基]-L-纈胺醯基-L-丙胺酸偶合來製備。在下一步中，Z保護基藉由在10%鈀/活性碳上在室溫下在氫標準壓力下氫化1小時而移除且接著脫除保護基之中間物藉由與1,1'-[(1,5-二側氧基戊烷-1,5-二基)雙(氧基)]二吡咯啶-2,5-二酮反應而轉變成標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 1.19 min；MS (ESIpos): m/z = 851 $[M+H]^+$。

中間物F207

N^6-(N-{(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}-β-丙胺醯基)-N^2-{N-[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]-L-纈胺醯基-L-丙胺醯基}-L-離胺酸/三氟乙酸(1:1)

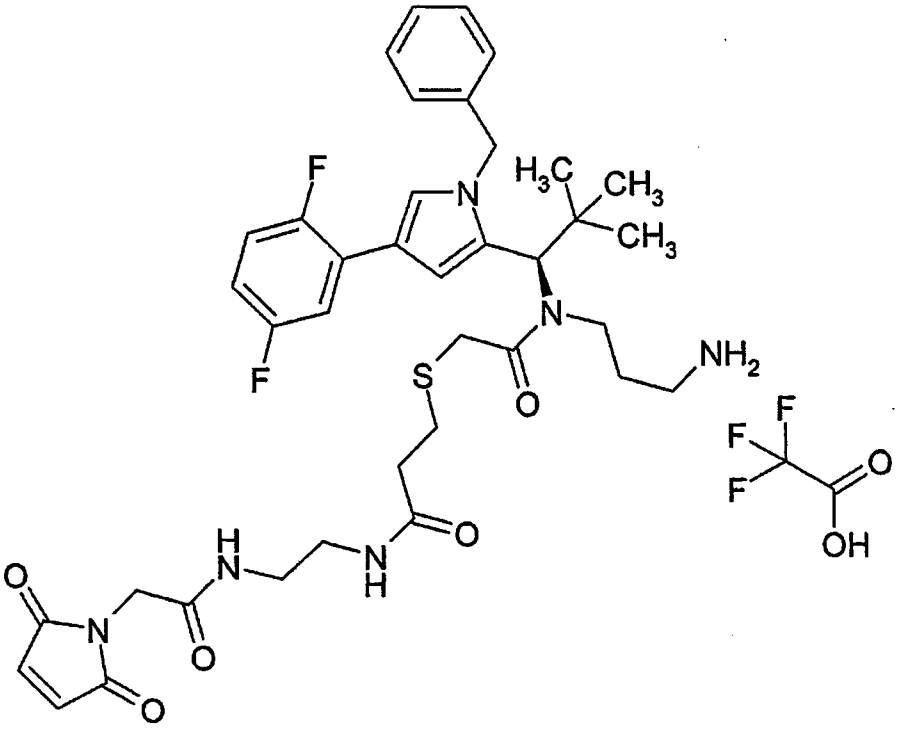


標題化合物類似於中間物F155製備。

LC-MS (方法1): R_t = 0.81 min；MS (ESIpos): m/z = 1020 $(M+H)^+$。

中間物F213

三氟乙酸/3-({2-[(3-胺基丙基){(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基]-2-側氧基乙基}硫基)-N-(2-{[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]胺基}乙基)丙醯胺(1:1)



27.5 mg (0.04 mmol) 11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-14-硫雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十七烷-17-酸(中間物C69)最初與15.9 mg (0.05 mmol)三氟乙酸/N-(2-胺基乙基)-2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯胺(1:1) (中間物L1)一起饋入1.8 ml乙腈。接著添加32.4 mg (0.31 mmol) N,N-二異丙基乙胺，且逐滴添加32.4 mg (0.05 mmol) T3P (50%於乙酸乙酯中)。將反應混合物在室溫下攪拌隔夜。反應混合物直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 125×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到11.9 mg (理論之35%)化合物[13-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-1-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-2,7,12-三側氧基-10-硫雜-3,6,13-三氮雜十六

烷-16-基]胺基甲酸2-(三甲基矽烷基)乙酯。

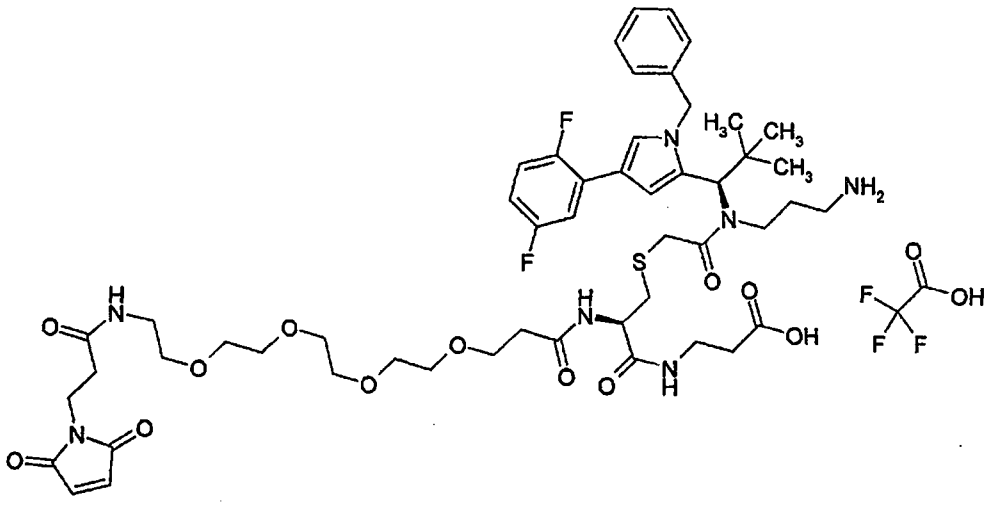
LC-MS (方法1): R_t = 1.39 min；MS (ESIpos): m/z = 881 $(M+H)^+$。

使11.9 mg (0.01 mol) [13-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-1-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-2,7,12-三側氧基-10-硫雜-3,6,13-三氮雜十六烷-16-基]胺基甲酸2-(三甲基矽烷基)乙酯溶於1.0 ml三氟乙醇中，且添加5.5 mg (0.04 mmol)二氯化鋅。將反應混合物在50℃下攪拌隔夜。添加11.8 mg (0.04 mmol)乙二胺-N,N,N',N'-四乙酸，將反應混合物攪拌10分鐘且接著添加水(0.1% TFA)。純化直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 125×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)進行。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到7.4 mg (理論之60%)標題化合物。

LC-MS (方法5): R_t = 2.75 min；MS (ESIpos): m/z = 737 $(M+H)^+$。

中間物F216

S-{2-[(3-胺基丙基){(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基]-2-側氧基乙基}-N-[19-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-17-側氧基-4,7,10,13-四氧雜-16-氮雜十九烷-1-醯基]-L-半胱胺醯基-β-丙胺酸/三氟乙酸(1:1)



在氬氣下，30.2 mg (0.06 mmol) N,N'-雙[(苯甲氧基)羰基]-L-胱胺酸最初饋入2.0 ml水及2.0 ml異丙醇中，且添加56.7 mg (0.20 mmol) TCEP。將反應混合物在室溫下攪拌30分鐘。接著添加溶於2.0 ml異丙醇中之50.0 mg (0.08 mmol) {3-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(氯乙醯基)胺基]丙基}胺基甲酸2-(三甲基矽烷基)乙酯(中間物C70)及122.2 mg (0.48 mmol) 1,8-二氮雜雙環[5.4.0]十一-7-烯，且將反應混合物在50℃下攪拌7小時。接著添加另外122.2 mg (0.48 mmol) 1,8-二氮雜雙環[5.4.0]十一-7-烯，且將反應混合物在50℃下攪拌1小時。混合物用乙酸乙酯稀釋且有機相用水及飽和碳酸氫鈉溶液萃取且用飽和NaCl溶液洗滌。有機相經硫酸鎂乾燥且在減壓下蒸發溶劑。殘餘物藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到43.1 mg (理論之64%)化合物S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-N-[(苯甲氧基)羰基]-L-半胱胺酸。

LC-MS (方法1): R_t = 1.46 min；MS (ESIpos): m/z = 851 $(M+H)^+$。

16.5 mg (0.05 mmol) 4-甲基苯磺酸/β-丙胺酸苯甲酯(1:1)最初與

14.0 mg (0.11 mmol) N,N-二異丙基乙胺一起饋入1.5 ml乙腈中。將反應混合物在室溫下攪拌3分鐘，且接著添加溶於1.5 ml乙腈中之30.8 mg (0.04 mmol) S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-N-[(苯甲氧基)羰基]-L-半胱胺酸、23.4 mg (0.18 mmol) N,N-二異丙基乙胺及29.9 mg (0.05 mmol) T3P (50%於乙酸乙酯中)。將反應混合物在室溫下攪拌隔夜。添加水，且反應混合物直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。所得化合物為S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-N-[(苯甲氧基)羰基]-L-半胱胺醯基-β-丙胺酸苯甲酯。

LC-MS (方法1): R_t = 1.59 min；MS (ESIpos): m/z = 1012 $(M+H)^+$。

使43.8 mg (43.3 μmol) S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-N-[(苯甲氧基)羰基]-L-半胱胺醯基-β-丙胺酸苯甲酯溶於8.0 ml乙醇中，添加4.4 mg鈀/活性碳(10%)且混合物在室溫及標準壓力下氫化隔夜。反應混合物經紙板過濾器過濾且濾餅用乙醇洗滌。在減壓下蒸發溶劑。再如剛剛所述處理殘餘物兩次。殘餘物藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到14.5 mg (理論之37%)化合物S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-

L-半胱胺醯基-β-丙胺酸/三氟乙酸(1:1)。

LC-MS (方法1): R_t = 1.08 min ; MS (ESIpos): m/z = 788 $(M+H)^+$。

14.5 mg (16.1 μmol) S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-L-半胱胺醯基-β-丙胺酸/三氟乙酸(1:1)最初與9.1 mg (17.7 μmol) 3-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-N-{15-[(2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)氧基]-15-側氧基-3,6,9,12-四氧雜十四烷-1-基}丙醯胺一起饋入1.0 ml DMF中，且添加4.9 mg (48.2 μmol) 4-甲基嗎啉。將反應混合物在室溫下攪拌隔夜，且接著添加3.4 mg (0.06 mmol)乙酸。反應混合物直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到4.9 mg (理論之50%)化合物S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-L-半胱胺醯基-β-丙胺酸/三氟乙酸(1:1)。

LC-MS (方法1): R_t = 1.28 min ; MS (ESIpos): m/z = 1186 $(M+H)^+$。

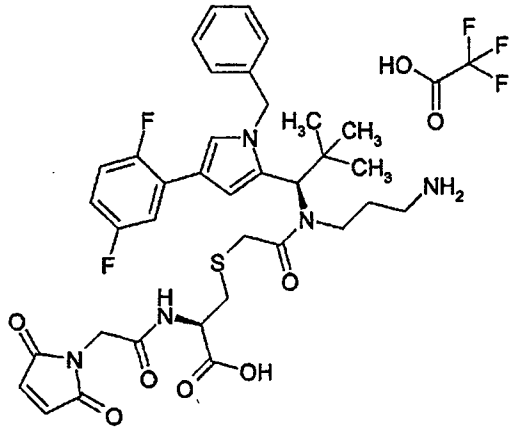
使14.1 mg (11.9 μmol) S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-N-[19-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-17-側氧基-4,7,10,13-四氧雜-16-氮雜十九烷-1-醯基]-L-半胱胺醯基-β-丙胺酸/三氟乙酸(1:1)溶於1.5 ml三氟乙醇中，且添加9.7 mg (71.3 μmol)二氯化鋅。將反應混合物在50℃下攪拌3小時。添加另外9.7 mg (71.3 μmol)二氯化鋅且將反應混合物在50℃下攪拌3小時。添加另外9.7 mg (71.3 μmol)二氯化鋅且將反應混合物在70℃下攪拌4

小時。添加20.8 mg (0.07 mmol)乙二胺-N,N,N',N'-四乙酸且將反應混合物攪拌10分鐘，且接著添加水(0.1% TFA)。純化直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 125×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)進行。在減壓下蒸發溶劑且凍乾殘餘物。此得到6.2 mg (理論之44%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.82 min；MS (ESIpos): m/z = 1042 $(M+H)^+$。

中間物F217

S-{2-[(3-胺基丙基){(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基]-2-側氧基乙基}-N-[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]-L-半胱胺酸/三氟乙酸(1:1)



在氬氣下，7.5 mg (0.05 mmol) (2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙酸最初饋入1.5 ml DMF中，且添加7.5 mg (0.05 mmol) HOBt、15.5 mg (0.05 mmol) TBTU及6.2 mg (0.05 mmol) N,N-二異丙基乙胺。將反應混合物在室溫下攪拌10分鐘。接著添加溶於1.5 ml DMF中之40.0 mg (0.05 mmol) S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-L-半胱胺酸/三氟乙酸(1:1) (中間物C71)及18.7 mg (0.14 mmol) N,N-二異丙基乙胺，且將反應混合物在室溫下攪拌隔夜。反應混合物直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil

250×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到11.2 mg (理論之25%)化合物S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-N-[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]-L-半胱胺酸。

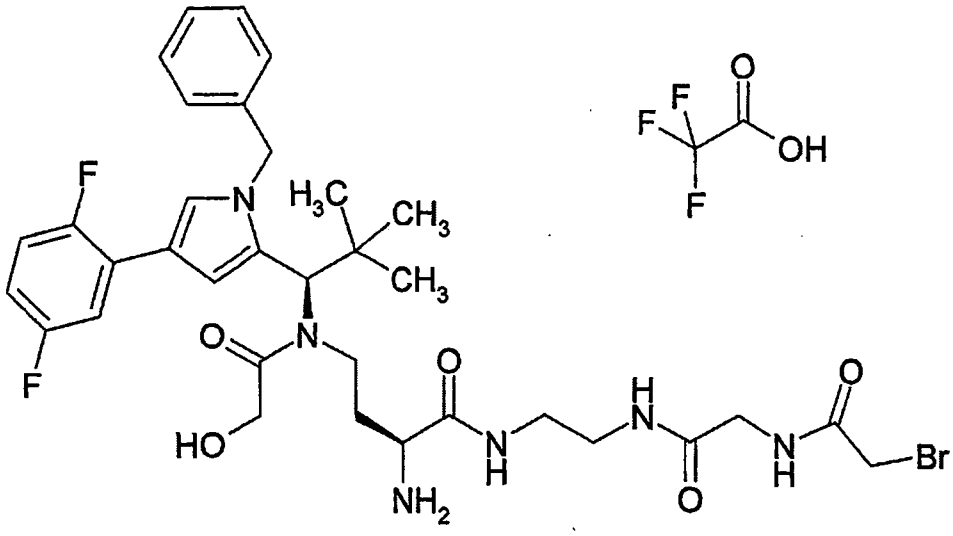
LC-MS (方法1): R_t = 1.37 min；MS (ESIpos): m/z = 854 $(M+H)^+$。

使10.9 mg (12.8 μmol) S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-N-[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]-L-半胱胺酸溶於2.0 ml三氟乙醇中，且添加10.4 mg (76.6 μmol)二氯化鋅。將反應混合物在50℃下攪拌4小時。添加22.4 mg (0.08 mmol)乙二胺-N,N,N',N'-四乙酸，將反應混合物攪拌10分鐘且接著添加水(0.1% TFA)。純化直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)進行。在減壓下蒸發溶劑且殘餘物凍乾。此得到7.5 mg (理論之65%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.92 min；MS (ESIpos): m/z = 710 $(M+H)^+$。

中間物F241

三氟乙酸/(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]-N-(2-{[N-(溴乙醯基)甘胺醯基]胺基}乙基)丁醯胺(1:1)

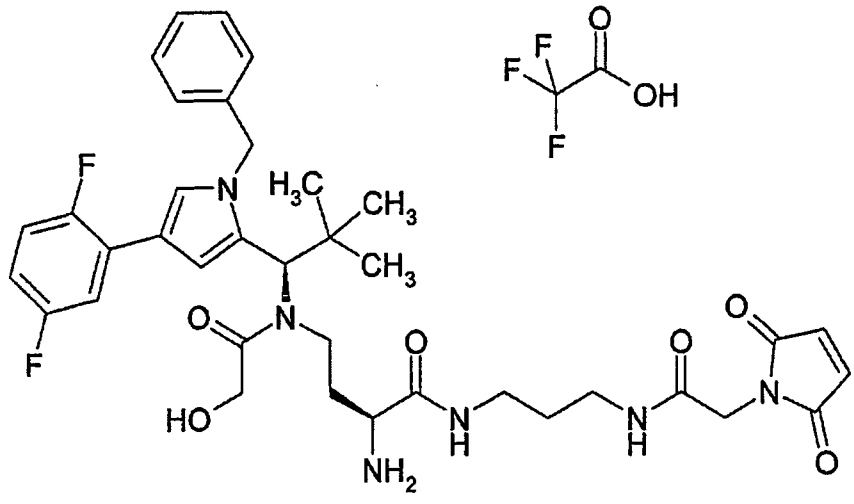


標題化合物自中間物C66，藉由與市售1-(2-溴乙醯氧基)吡咯啶-2,5-二酮偶合及隨後用氯化鋅脫除嵌段製備。

LC-MS (方法1): R_t = 0.84 min；MS (EIpos): m/z = 733及735 $[M+H]^+$。

中間物F242

三氟乙酸/(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]-N-(3-{[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]胺基}丙基)丁醯胺(1:1)

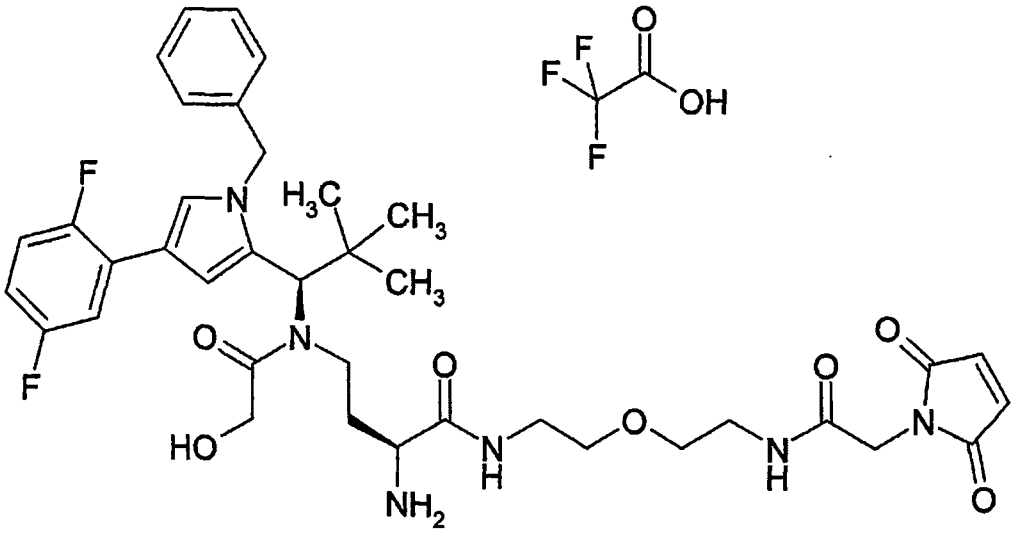


合成標題化合物類似於中間物F104進行。

LC-MS (方法1): R_t = 0.84 min；MS (ESIpos): m/z = 707 $(M+H)^+$。

中間物F243

三氟乙酸/(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]-N-[2-(2-{[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]胺基}乙氧基)乙基]丁醯胺(1:1)

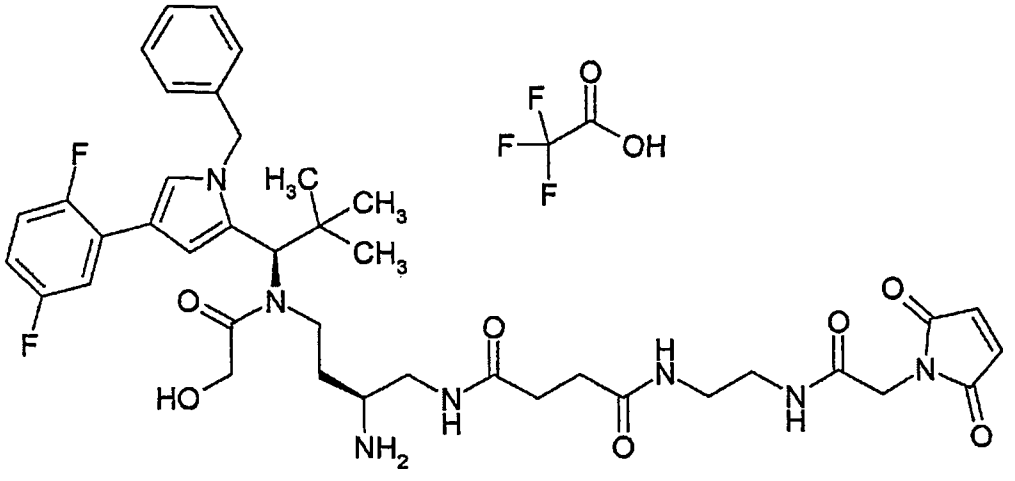


合成標題化合物類似於中間物F242進行。

LC-MS (方法1): R_t = 0.81 min ; MS (ESIpos): m/z = 737 $(M+H)^+$。

中間物F245

三氟乙酸/N-{(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁基}-N'-(2-{[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]胺基}乙基)丁二醯亞胺(1:1)



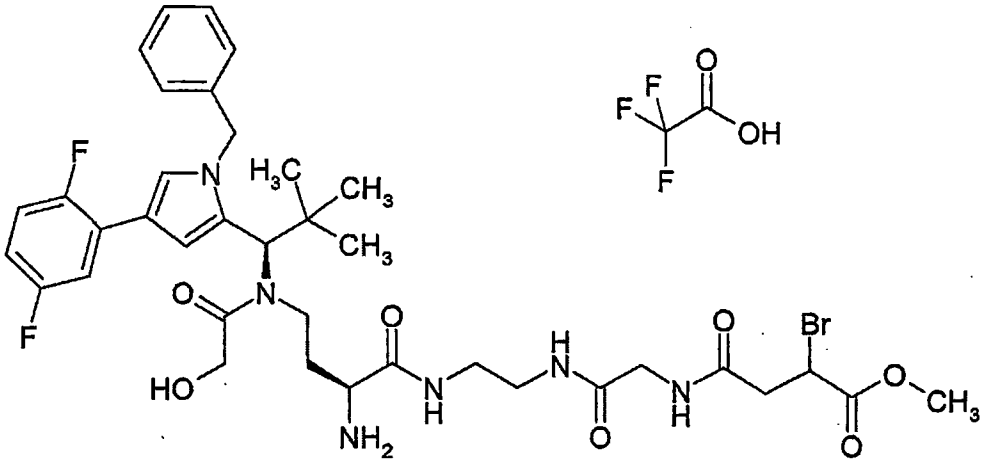
標題化合物藉由在8 ml DMF中在15 mg (0.04 mmol) HATU及9 µl N,N-二異丙基乙胺存在下使10 mg (0.0135 mmol)中間物C65與8 mg

(0.027 mmol)中間物L1偶合且隨後如針中間物F119所述，在三氟乙醇中用氯化鋅脫除保護基來製備。藉由製備型HPLC純化得到8.8 mg (2步理論之58%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.84 min；MS (ESIpos): m/z = 778 $(M+H)^+$。

中間物F247

三氟乙酸/4-[(2-{[2-({(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}胺基)乙基]胺基}-2-側氧基乙基)胺基]-2-溴-4-側氧基丁酸甲酯(1:1)

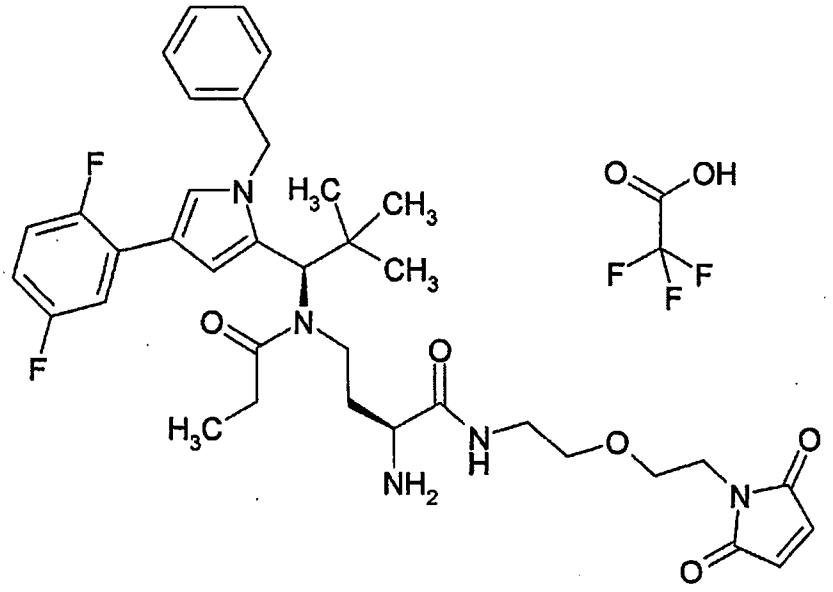


使14 mg (0.018 mmol)中間物C66與10.1 mg (0.037 mmol)四氟硼酸2-溴-1-乙基吡錠(BEP)一起溶於14 ml DCM中，且每次一點添加總共250 µl吡啶，pH維持在5與6之間。接著pH用乙酸調至4，濃縮反應物且殘餘物藉由製備型HPLC純化。合併適當溶離份，凍乾且乾燥得到4 mg (理論之21%)經保護之中間物，接著其用氯化鋅脫除胺基官能基之保護基。HPLC純化及凍乾得到3 mg (理論之72%)呈無色泡沫狀之標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.88 min；MS (ESIpos): m/z = 805及807$(M+H)^+$。

中間物F248

三氟乙酸/(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]-N-{2-[2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙氧基]乙基}丁醯胺(1:1)

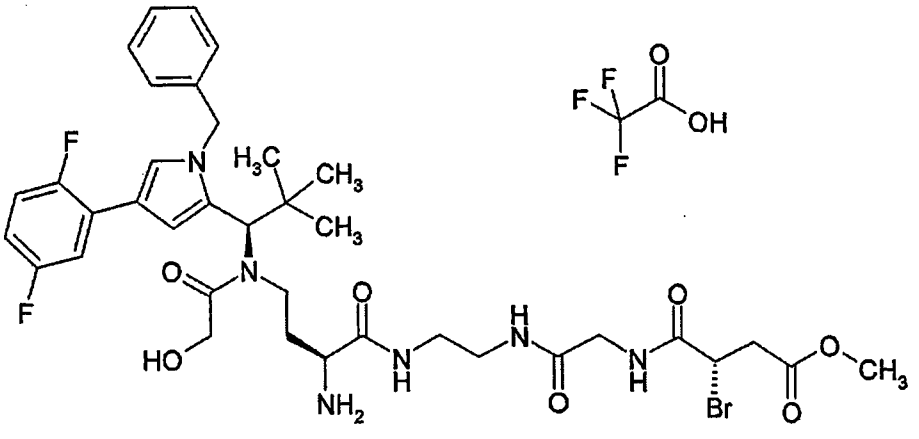


標題化合物藉由在HATU存在下使10 mg (0.015 mmol)中間物C58與5 mg (0.017 mmol)中間物L12偶合及隨後用氯化鋅脫除保護基製備。此得到6.5 mg (2步理論之52%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.91 min ; MS (ESIpos): m/z = 680 $(M+H)^+$。

中間物F254

三氟乙酸/(3S)-4-[(2-{[2-({(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}胺基)乙基]胺基}-2-側氧基乙基)胺基]-3-溴-4-側氧基丁酸甲酯(1:1)

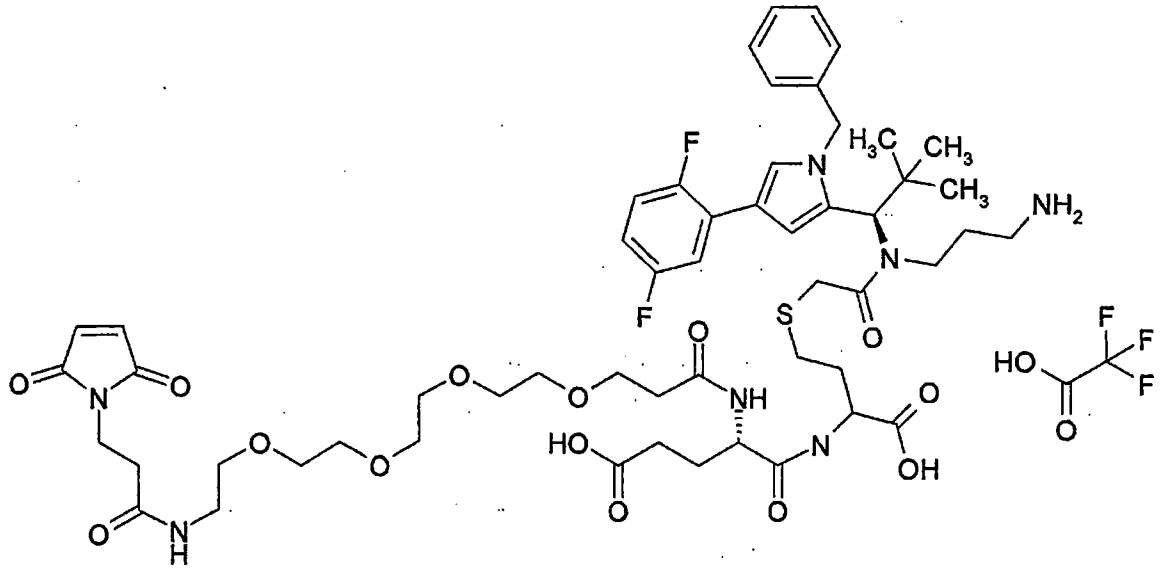


標題化合物類似於中間物247，藉由使15 mg (0.02 mmol)中間物C66與21 mg (0.099 mmol) (2S)-2-溴-4-甲氧基-4-側氧基丁酸(其如(J.Org.Chem. 200, 65, 517-522)中所述，自(2S)-2-胺基-4-甲氧基-4-側氧基丁酸鹽酸鹽(1:1)合成)偶合來製備。

LC-MS (方法1): R_t = 0.89 min；MS (ESIpos): m/z = 805及807$(M+H)^+$。

中間物F255

R/S-(N-[19-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-17-側氧基-4,7,10,13-四氧雜-16-氮雜十九烷-1-醯基]-L-α-麩胺醯基-S-{2-[(3-胺基丙基){(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基]-2-側氧基乙基})高半胱胺酸/三氟乙酸(1:1)



13.1 mg (0.04 mmol) (2S)-5-(苯甲氧基)-2-{[(苯甲氧基)羰基]胺基}-5-側氧基戊酸最初饋入1.0 ml DMF中，且添加5.4 mg (0.04 mmol) HOBt、11.4 mg (0.04 mmol) TBTU及4.6 mg (0.04 mmol) N,N-二異丙基乙胺。將反應混合物在室溫下攪拌10分鐘。接著添加溶於12.9 mg (0.1 mmol) N,N-二異丙基乙胺中之30.0 mg (0.04 mmol) R/S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)高半胱

胺酸/三氟乙酸(1:1) (中間物C11)及1 ml DMF。將反應混合物在室溫下攪拌隔夜。反應混合物直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到32 mg (73%)化合物4-[2-[[(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基]-[3-(2-三甲基矽烷基乙氧基羰基胺基)丙基]胺基]-2-側氧基乙基]硫基-2-[[(2S)-5-苯甲氧基-2-(苯甲氧基羰基胺基)-5-側氧基-戊醯基]胺基]丁酸。

LC-MS (方法1): R_t = 1.53 min；MS (ESIpos): m/z = 1084 $(M+H)^+$。

41.4 mg (0.038 mmol) 4-[2-[[(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基]-[3-(2-三甲基矽烷基乙氧基羰基胺基)丙基]胺基]-2-側氧基乙基]硫基-2-[[(2S)-5-苯甲氧基-2-(苯甲氧基羰基胺基)-5-側氧基-戊醯基]胺基]丁酸溶於10 ml乙醇中，添加4.2 mg Pd/C且混合物在標準壓力下氫化。反應混合物經紙板過濾器過濾且濾餅用乙醇洗滌。在無加熱下在減壓下蒸發溶劑。殘餘物藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×40；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到21.1 mg (56%)化合物R/S-(L-α-麩胺醯基-S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)高半胱胺酸/三氟乙酸(1:1)。

LC-MS (方法1): R_t = 1.11 min；MS (ESIpos): m/z = 860 $(M+H)^+$。

20.4 mg (20.94 μmol) R/S-(L-α-麩胺醯基-S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二

側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基))高半胱胺酸/三氟乙酸(1:1)最初與11.8 mg (23.04 μmol) 3-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-N-{15-[(2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)氧基]-15-側氧基-3,6,9,12-四氧雜十四烷-1-基}丙醯胺一起饋入1.0 ml DMF中，且添加4.2 mg (41.88 μmol) 4-甲基嗎啉。將反應混合物在室溫下攪拌隔夜，且接著添加3.1 mg (0.05 mmol)乙酸。反應混合物直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到9.5 mg (36%)化合物R/S-(N-[19-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-17-側氧基-4,7,10,13-四氧雜-16-氮雜十九烷-1-醯基]-L-α-麩胺醯基-S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基))高半胱胺酸。

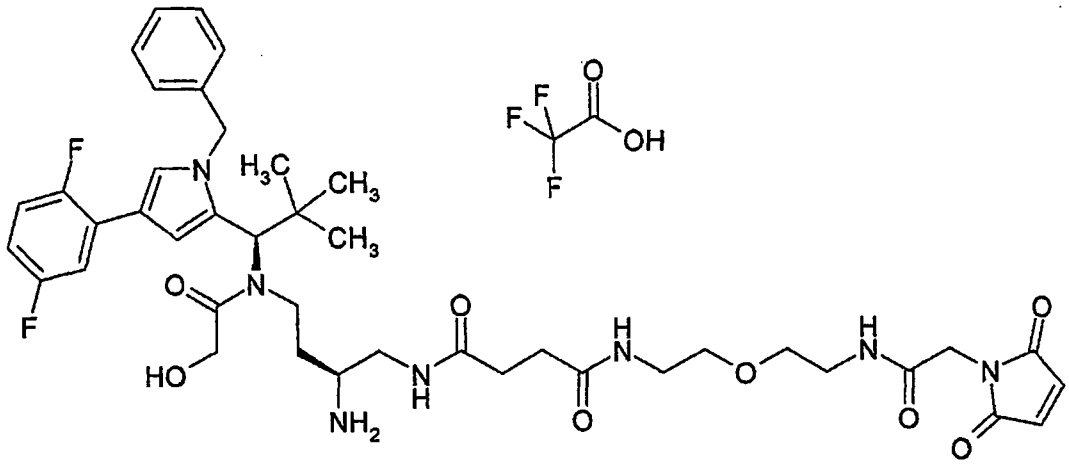
LC-MS (方法1): R_t = 1.66 min；MS (ESIpos): m/z = 1259 $(M+H)^+$。

使9.4 mg (7.47 μmol) R/S-(N-[19-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-17-側氧基-4,7,10,13-四氧雜-16-氮雜十九烷-1-醯基]-L-α-麩胺醯基-S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基))高半胱胺酸溶於1.5 ml三氟乙醇中，且添加6.1 mg (44.81 μmol)二氯化鋅。將反應混合物在50℃下攪拌3小時。添加13.1 mg (0.05 mmol)乙二胺-N,N,N',N'-四乙酸，將反應混合物攪拌10分鐘且接著添加水(0.1% TFA)。純化直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 125×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)進行。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到6.9 mg (75%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.87 min ; MS (ESIpos): m/z = 1114 $(M+H)^+$。

中間物F256

三氟乙酸/N-{(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁基}-N'-[2-(2-{[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]胺基}乙氧基)乙基]丁二醯亞胺(1:1)

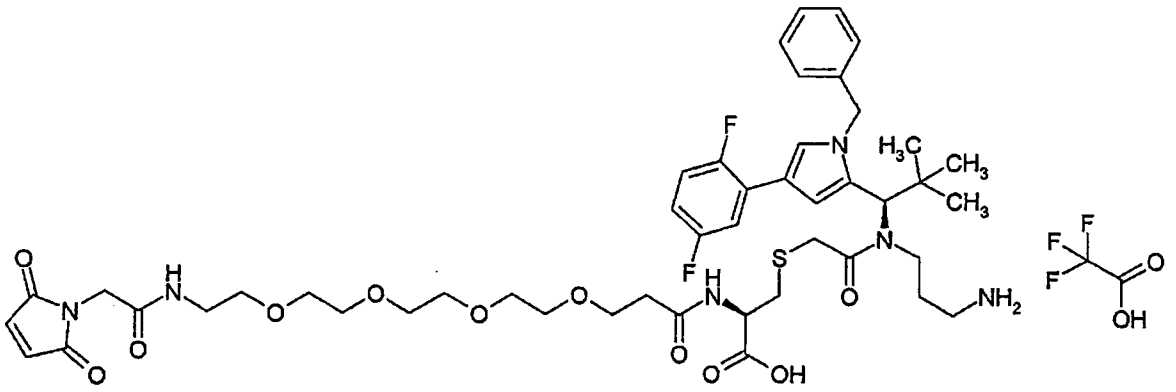


標題化合物藉由在HATU及N,N-二異丙基乙胺存在下使10 mg (0.014 mmol)中間物C65及9.6 mg (0.027 mmol)三氟乙酸/N-[2-(2-胺基乙氧基)乙基]-2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯胺(1:1)偶合且隨後如針中間物F119所述，在三氟乙醇中用氯化鋅脫除保護基來製備。藉由製備型HPLC純化得到8 mg (2步理論之64%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.84 min ; MS (ESIpos): m/z = 822 $(M+H)^+$。

中間物F257

R-{2-[(3-胺基丙基){(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基]-2-側氧基乙基}-N-[18-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-17-側氧基-4,7,10,13-四氧雜-16-氮雜十八烷-1-醯基]-L-半胱胺酸/三氟乙酸(1:1)



使50.0 mg (0.06 mmol) R-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-L-半胱胺酸/三氟乙酸(1:1) (中間物C71)及29 mg (0.07 mmol) 3-[2-[2-[2-[2-[[2-(2,5-二側氧基吡咯-1-基)乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酸(中間物L74)溶於3.0 ml DMF中，且添加27.3 mg (0.07 mmol) HATU及23.3 mg (0.18 mmol) N,N-二異丙基乙胺。將反應混合物在室溫下攪拌2小時。反應混合物直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 125×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水/0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到17.4 mg (26%)化合物R-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-N-[18-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-17-側氧基-4,7,10,13-四氧雜-16-氮雜十八烷-1-醯基]-L-半胱胺酸。

LC-MS (方法6): R_t = 1.34 min；MS (ESIpos): m/z = 1101 $(M+H)^+$。

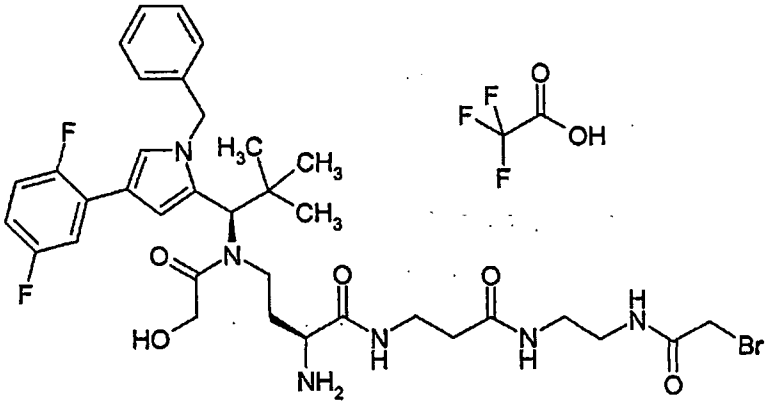
使17 mg (0.02 mmol) R-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-N-[18-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-17-側氧基-4,7,10,13-四氧雜-16-氮雜十八烷-1-醯基]-L-半

胱胺酸溶於1.0 ml三氟乙醇中，且添加6.3 mg (0.05 mmol)二氯化鋅。將反應混合物在50℃下攪拌隔夜。添加13.5 mg (0.05 mmol)乙二胺-N,N,N',N'-四乙酸，將反應混合物攪拌10分鐘且接著添加水(0.1% TFA)。純化直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 125×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)進行。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到7.6 mg (46%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.91 min；MS (ESIpos): m/z = 957 $(M+H)^+$。

中間物F258

三氟乙酸/(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]-N-[3-{2-[(溴乙醯基)胺基]乙基}胺基)-3-側氧基丙基]丁醯胺(1:1)



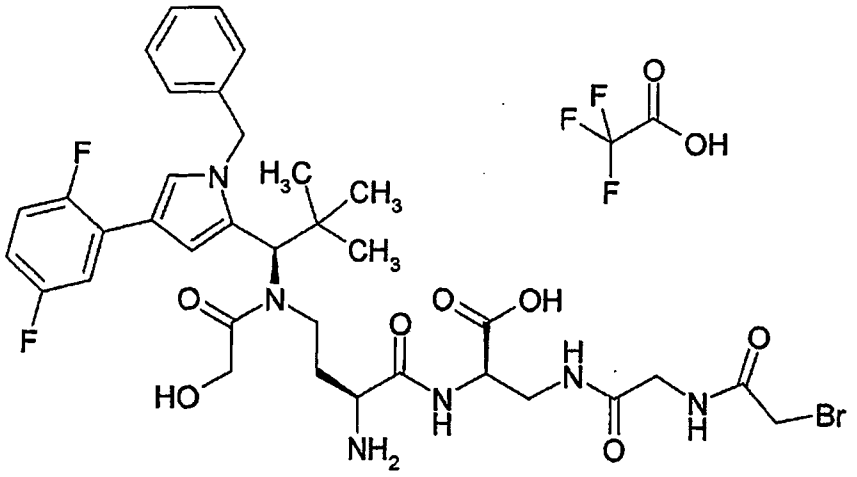
標題化合物藉由使用HATU使中間物C58與三氟乙酸/[2-(β-丙胺醯基胺基)乙基]胺基甲酸苯甲酯(1:1)偶合，隨後氫解，接著與1-(2-溴乙醯氧基)吡咯啶-2,5-二酮偶合且最終藉由用氯化鋅脫除保護基來製備。

LC-MS (方法1): R_t = 0.86 min；MS (ESIpos): m/z = 747及749$(M+H)^+$。

中間物F259

N-{(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-

基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}-3-{[N-(溴乙醯基)甘胺醯基]胺基}-D-丙胺酸/三氟乙酸(1:1)



使75 mg (0.114 mmol)中間物C58溶解於12.5 ml DMF中且在65 mg (0.11 mmol) HATU及79 µl N,N-二異丙基乙胺存在下與78 mg (0.171 mmol)中間物L75偶合。藉由製備型HPLC純化後，使中間物溶解於20 ml乙醇中且在10%鈀/活性碳上在室溫下在氫標準壓力下氫化1小時。接著濾出催化劑，在減壓下移除溶劑且產物藉由製備型HPLC純化。自乙腈/水1:1凍乾，得到63 mg (2步理論之64%) 3-胺基-N-[(2S)-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]-2-({[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}胺基)丁醯基]-D-丙胺酸2-(三甲基矽烷基)乙酯。

LC-MS (方法1): R_t = 1.16 min；MS (EIpos): m/z = 844 $[M+H]^+$。

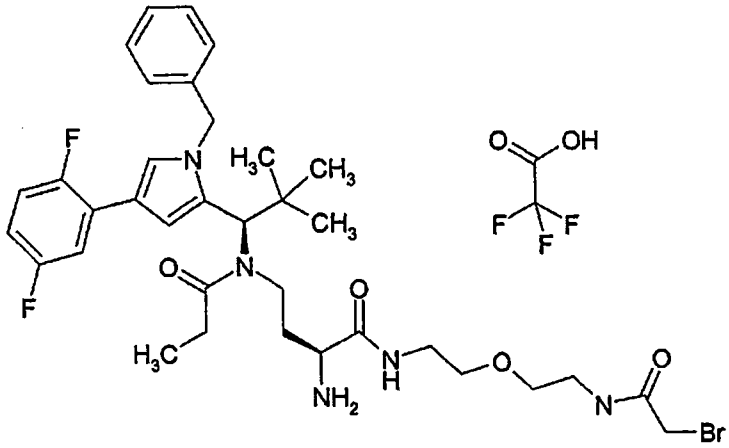
接著在HATU存在下40 mg (0.047 mmol)此中間物如上所述與N-[(苯甲氧基)羰基]甘胺酸偶合且接著再氫解脫除保護基一次。

接著標題化合物藉由在4 µl N,N-二異丙基乙胺存在下使10 mg (0.012 mmol)此中間物與7.7 mg (0.032 mmol)市售1-(2-溴乙醯氧基)吡咯啶-2,5-二酮偶合且隨後如針中間物F119所述，在三氟乙醇中用氯化鋅脫除保護基來製備。藉由製備型HPLC純化得到1.3 mg標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.83 min；MS (ESIpos): m/z = 777及779 $(M+H)^+$。

中間物F261

三氟乙酸/(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]-N-(2-{2-[(溴乙醯基)胺基]乙氧基}乙基)丁醯胺(1:1)

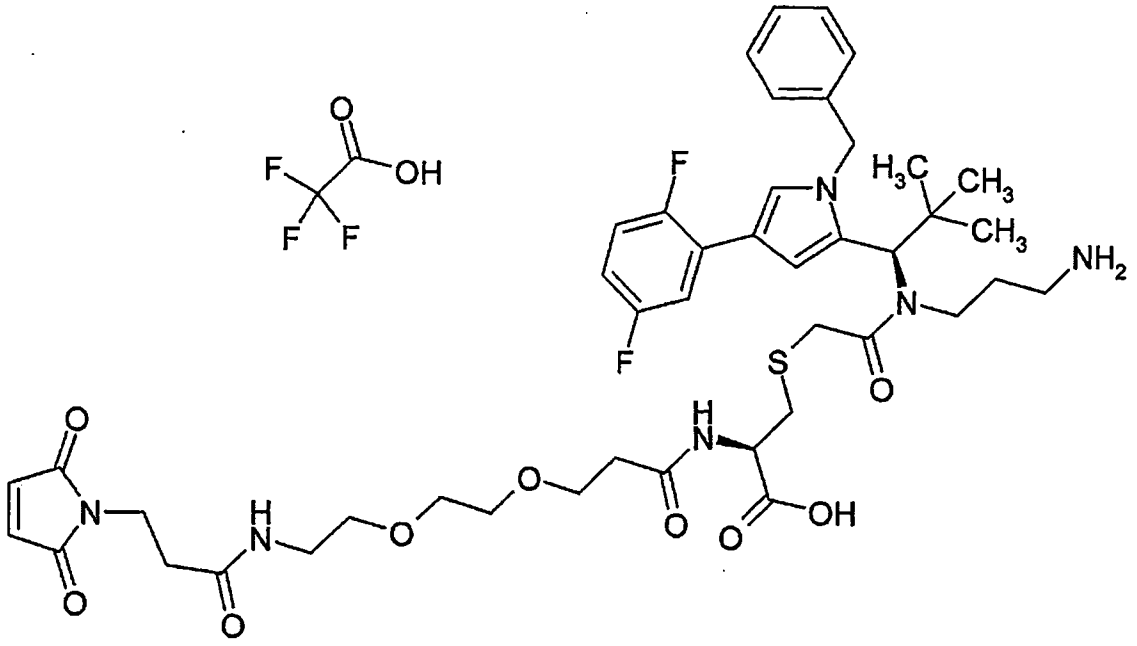


標題化合物藉由在HATU存在下使20 mg (0.03 mmol)中間物C58與25.8 mg (0.061 mmol)中間物L77偶合及隨後用氯化鋅脫除保護基來製備。此得到11.9 mg (2步理論之47%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.84 min；MS (ESIpos): m/z = 722及720 $(M+H)^+$。

中間物F262

S-{2-[(3-胺基丙基){(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基]-2-側氧基乙基}-N-{3-[2-(2-{[3-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)丙醯基]胺基}乙氧基)乙氧基]丙醯基}-L-半胱胺酸/三氟乙酸(1:1)



30 mg (36 μmol) S-{2-[(3-胺基丙基){(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基]-2-側氧基乙基}-L-半胱胺酸/三氟乙酸(1:1) (中間物C71)與16.9 mg (40 μmol) 3-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-N-[2-(2-{3-[(2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)氧基]-3-側氧基丙氧基}乙氧基)乙基]丙醯胺一起最初饋入1.5 ml DMF中，且添加10.9 mg (108 μmol) 4-甲基嗎啉。將反應混合物在室溫下攪拌隔夜，且接著添加7.58 mg (0.13 mmol)乙酸。反應混合物直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到33.4 mg (理論之80%)化合物S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-N-{3-[2-(2-{[3-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)丙醯基]胺基}乙氧基)乙氧基]丙醯基}-L-半胱胺酸。

LC-MS (方法1): R_t = 1.34 min；MS (ESIpos): m/z = 1027 $(M+H)^+$。

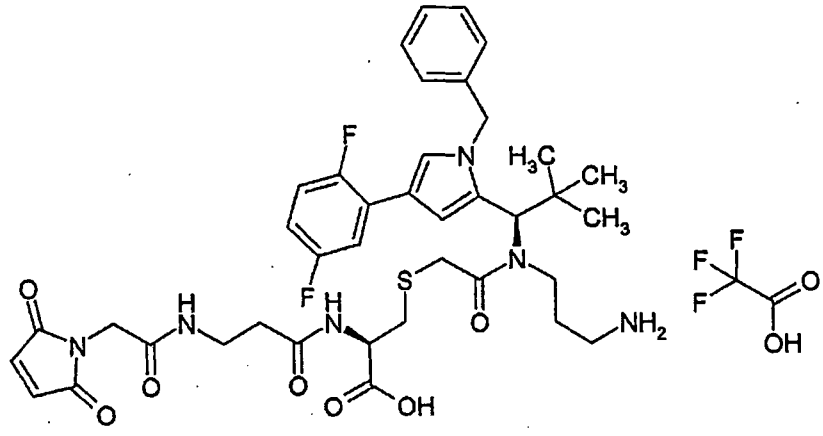
使32.8 mg (32 μmol) S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-

1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-N-{3-[2-(2-{[3-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)丙醯基]胺基}乙氧基)乙氧基]丙醯基}-L-半胱胺酸溶於3.0 ml三氟乙醇中，且添加26.1 mg (192 μmol)二氯化鋅。將反應混合物在50℃下攪拌2小時。添加56.0 mg (0.192 mmol)乙二胺-N,N,N',N'-四乙酸，將反應混合物攪拌10分鐘且接著添加水(0.1% TFA)。純化直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)進行。在減壓下蒸發溶劑且殘餘物凍乾。此得到22.9 mg (理論之71%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.88 min；MS (ESIpos): m/z = 883 $(M+H)^+$。

中間物F263

N-[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]-β-丙胺醯基-S-{2-[(3-胺基丙基){(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基]-2-側氧基乙基}-L-半胱胺酸/三氟乙酸(1:1)



使30.0 mg (0.036 mmol) R-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-L-半胱胺酸/三氟乙酸(1:1) (中間物C71)及9.8 mg (0.04 mmol) N-[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]-β-丙胺酸(中間物L78)溶於1.0 ml DMF中，且添加16.4 mg

(0.04 mmol) HATU及14.0 mg (0.11 mmol) N,N-二異丙基乙胺。將反應混合物在室溫下攪拌2小時。反應混合物直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 125×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水/0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到4.2 mg (13%)化合物N-[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]-β-丙胺醯基-S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-L-半胱胺酸。

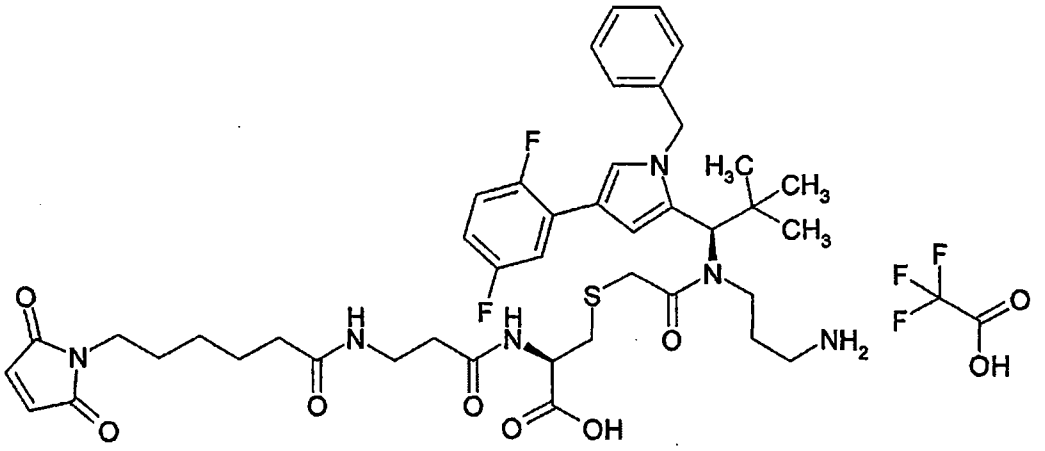
LC-MS (方法6): R_t = 1.31 min；MS (ESIpos): m/z = 925 $(M+H)^+$。

使11.3 mg (0.011 mmol) N-[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]-β-丙胺醯基-S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-L-半胱胺酸溶於2.0 ml三氟乙醇中，且添加5.0 mg (0.04 mmol)二氯化鋅。將反應混合物在50℃下攪拌2小時。添加10.7 mg (0.04 mmol)乙二胺-N,N,N',N'-四乙酸，將反應混合物攪拌10分鐘且接著添加水(0.1% TFA)。純化直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 125×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)進行。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到4.4 mg (40%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.91 min；MS (ESIpos): m/z = 781 $(M+H)^+$。

中間物F264

N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]-β-丙胺醯基-S-{2-[(3-胺基丙基){(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基]-2-側氧基乙基}-L-半胱胺酸/三氟乙酸(1:1)



使30.0 mg (0.036 mmol) R-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-L-半胱胺酸/三氟乙酸(1:1) (中間物C71)及12.2 mg (0.04 mmol) N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]-β-丙胺酸(中間物L79)溶於1.0 ml DMF中，且添加16.4 mg (0.04 mmol) HATU及14.0 mg (0.11 mmol) N,N-二異丙基乙胺。將反應混合物在室溫下攪拌2小時。反應混合物直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 125×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水/0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到8.9 mg (24%)化合物N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]-β-丙胺醯基-S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-L-半胱胺酸。

LC-MS (方法6): R_t = 1.38 min；MS (ESIpos): m/z = 981 $(M+H)^+$。

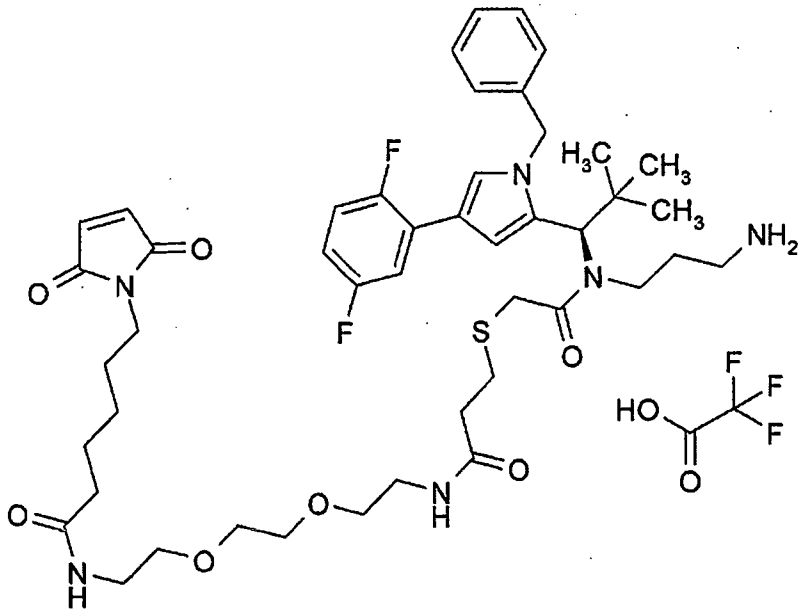
使15.3 mg (0.015 mmol) N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]-β-丙胺醯基-S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-L-半胱胺酸溶於2.0 ml三氟乙醇中，且添加6.3 mg (0.045 mmol)二氯化鋅。將反應混合物在50℃下攪拌2小

時。添加13.5 mg (0.045 mmol)乙二胺-N,N,N',N'-四乙酸，將反應混合物攪拌10分鐘且接著添加水(0.1% TFA)。純化直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 125×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA) 進行。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到9.1 mg (62%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.92 min；MS (ESIpos): m/z = 837 $(M+H)^+$。

中間物F265

三氟乙酸/N-(3-胺基丙基)-N-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-22-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-6,17-二側氧基-10,13-二氧雜-3-硫雜-7,16-二氮雜二十二烷-1-醯胺(1:1)



30.0 mg (42.7 μmol) 11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-14-硫雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十七烷-17-酸(中間物C69)及25.3 mg (55.6 μmol)三氟乙酸/N-{2-[2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]乙基}-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺(1:1) (中間物L82)最初饋入1.9 ml乙腈

中，且添加60 µl (340 µmol) N,N-二異丙基乙胺及50%於乙酸乙酯中之33 µl (56 µmol) 2,4,6-三丙基-1,3,5,2,4,6-三氧雜三磷雜環已烷2,4,6-三氧化物。將反應混合物在室溫下攪拌隔夜。添加水(2.0 ml)，且純化直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 µ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)進行。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到26.7 mg (理論之60%)化合物[4-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-26-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-5,10,21-三側氧基-14,17-二氧雜-7-硫雜-4,11,20-三氮雜二十六烷-1-基]胺基甲酸2-(三甲基矽烷基)乙酯。

LC-MS (方法1): R_t = 1.40 min；MS (ESIpos): m/z = 1025 $(M+H)^+$。

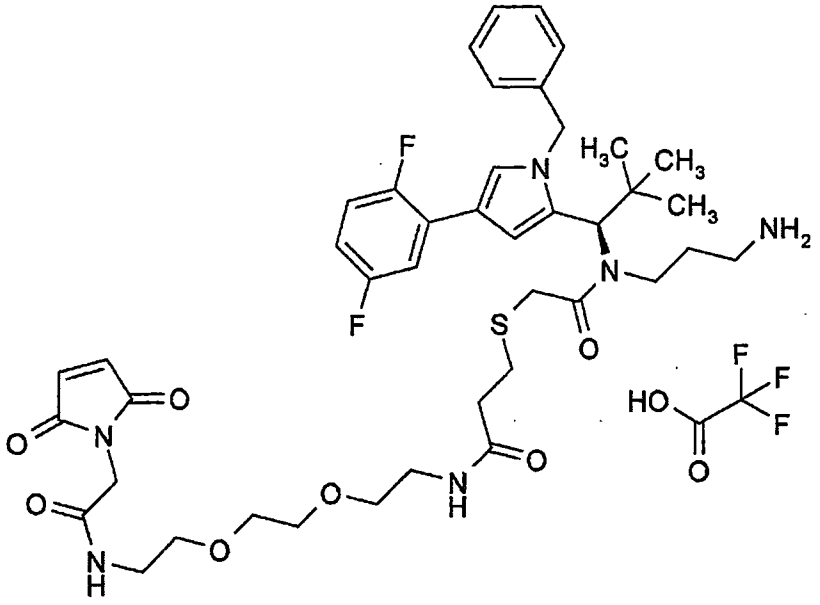
使25.3 mg (24.7 µmol) [4-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-26-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-5,10,21-三側氧基-14,17-二氧雜-7-硫雜-4,11,20-三氮雜二十六烷-1-基]胺基甲酸2-(三甲基矽烷基)乙酯溶於2.0 ml三氟乙醇中，且添加20.2 mg (148 µmol)二氯化鋅。將反應混合物在50℃下攪拌1小時。添加43.3 mg (148 µmol)乙二胺-N,N,N',N'-四乙酸，將反應混合物攪拌10分鐘且接著添加水(0.1% TFA)。純化直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 µ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)進行。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到23.4 mg (理論之95%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.89 min；MS (ESIpos): m/z = 881 $(M+H)^+$。

中間物F266

三氟乙酸/N-(3-胺基丙基)-N-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-1-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-

2,13-二側氧基-6,9-二氧雜-16-硫雜-3,12-二氮雜十八烷-18-醯胺(1:1)



30.0 mg (0.043 mmol) 11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-14-硫雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十七烷-17-酸(中間物C69)最初與22.2 mg (0.056 mmol)三氟乙酸/N-{2-[2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]乙基}-2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯胺(1:1) (中間物L83)一起饋入1.9 ml乙腈中。接著添加60 µl (0.34 mmol) N,N-二異丙基乙胺，且逐滴添加33 µl (0.056 mmol) T3P (50%於乙酸乙酯中)。將反應混合物在室溫下攪拌隔夜。添加水(2.0 ml)。反應混合物直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 125×30；10 µ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到20.5 mg (理論之49%)化合物[19-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-1-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-2,13,18-三側氧基-6,9-二氧雜-16-硫雜-3,12,19-三氮雜二十二烷-22-基]胺基甲酸2-(三甲基矽烷基)乙酯。

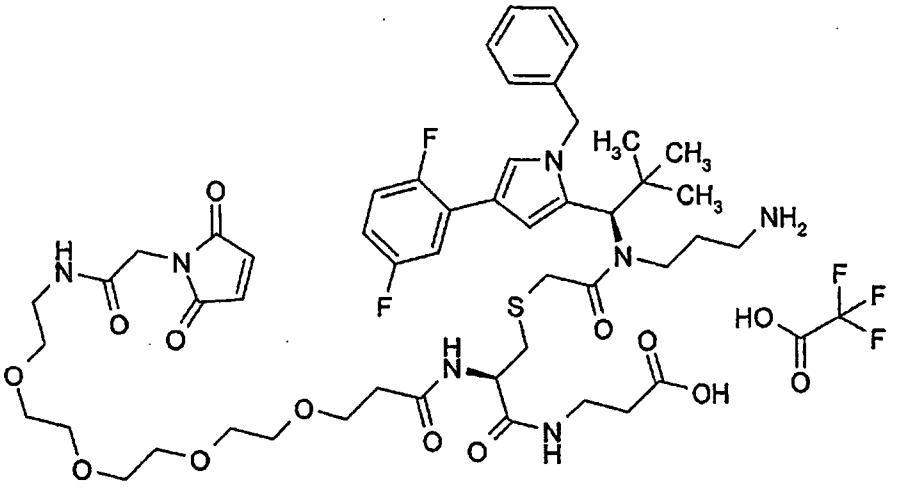
LC-MS (方法1): R_t = 1.38 min；MS (ESIpos): m/z = 969 $(M+H)^+$。

使19.1 mg (19.7 μmol) [19-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-1-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-2,13,18-三側氧基-6,9-二氧雜-16-硫雜-3,12,19-三氮雜二十二烷-22-基]胺基甲酸2-(三甲基矽烷基)乙酯溶於2.0 ml三氟乙醇中，且添加16.1 mg (118 μmol)二氯化鋅。將反應混合物在50℃下攪拌1小時。添加34.6 mg (118 μmol)乙二胺-N,N,N',N'-四乙酸，將反應混合物攪拌10分鐘且接著添加水(0.1% TFA)。純化直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)進行。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到13.9 mg (理論之75%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.86 min；MS (ESIpos): m/z = 825 $(M+H)^+$。

中間物F267

S-{2-[(3-胺基丙基){(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基]-2-側氧基乙基}-N-[1-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-2,18-二側氧基-6,9,12,15-四氧雜-3-氮雜十八烷-18-基]-L-半胱胺醯基-β-丙胺酸/三氟乙酸(1:1)



在氬氣下，13.4 mg (33.3 μmol) 1-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-2-側氧基-6,9,12,15-四氧雜-3-氮雜十八烷-18-酸(中間物L74)

最初饋入1.0 ml DMF中，且添加9.3 µl (54.4 µmol) N,N-二異丙基乙胺及12.6 mg (33.3 µmol) HATU。將反應混合物在室溫下攪拌10分鐘。接著添加溶於4.7 µl (27.7 µmol) N,N-二異丙基乙胺中之25.0 mg (27.7 µmol) S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-L-半胱胺醯基-β-丙胺酸/三氟乙酸(1:1) (參見中間物F216之合成)及1.0 ml DMF。將反應混合物在室溫下攪拌90分鐘。反應混合物直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 µ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到6.90 mg (理論之19%)化合物S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-N-[1-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-2,18-二側氧基-6,9,12,15-四氧雜-3-氮雜十八烷-18-基]-L-半胱胺醯基-β-丙胺酸。

LC-MS (方法5): R_t = 4.44 min；MS (ESIpos): m/z = 1172 $(M+H)^+$。

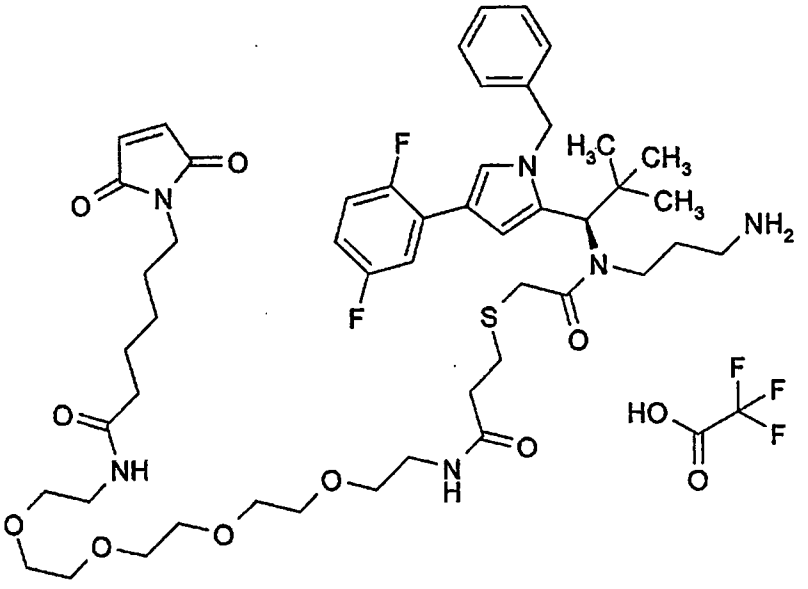
使6.70 mg (5.71 µmol) S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-N-[1-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-2,18-二側氧基-6,9,12,15-四氧雜-3-氮雜十八烷-18-基]-L-半胱胺醯基-β-丙胺酸溶於1.0 ml三氟乙醇中，且添加4.67 mg (34.3 µmol)二氯化鋅。將反應混合物在50℃下攪拌1小時。添加10 mg (34.3 µmol)乙二胺-N,N,N',N'-四乙酸，將反應混合物攪拌10分鐘且接著添加水(0.1% TFA)。純化直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 µ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)進行。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到4.4 mg (理論之

67%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.85 min；MS (ESIpos): m/z = 1028 $(M+H)^+$。

中間物F268

三氟乙酸/N-(3-胺基丙基)-N-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-28-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-6,23-二側氧基-10,13,16,19-四氧雜-3-硫雜-7,22-二氮雜二十八烷-1-醯胺(1:1)



30.0 mg (0.043 mmol) 11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-14-硫雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十七烷-17-酸(中間物C69)最初與30.2 mg (0.056 mmol)三氟乙酸/N-(14-胺基-3,6,9,12-四氧雜十四烷-1-基)-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺(1:1) (中間物L84)一起饋入2.0 ml乙腈中。接著添加60 µl (0.34 mmol) N,N-二異丙基乙胺，且逐滴添加33 µl (0.056 mmol) T3P (50%於乙酸乙酯中)。將反應混合物在室溫下攪拌隔夜。添加水(2.0 ml)。反應混合物直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 µ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到27.9

mg (理論之59%)化合物[4-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-32-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-5,10,27-三側氧基-14,17,20,23-四氧雜-7-硫雜-4,11,26-三氮雜三十二烷-1-基]胺基甲酸2-(三甲基矽烷基)乙酯；

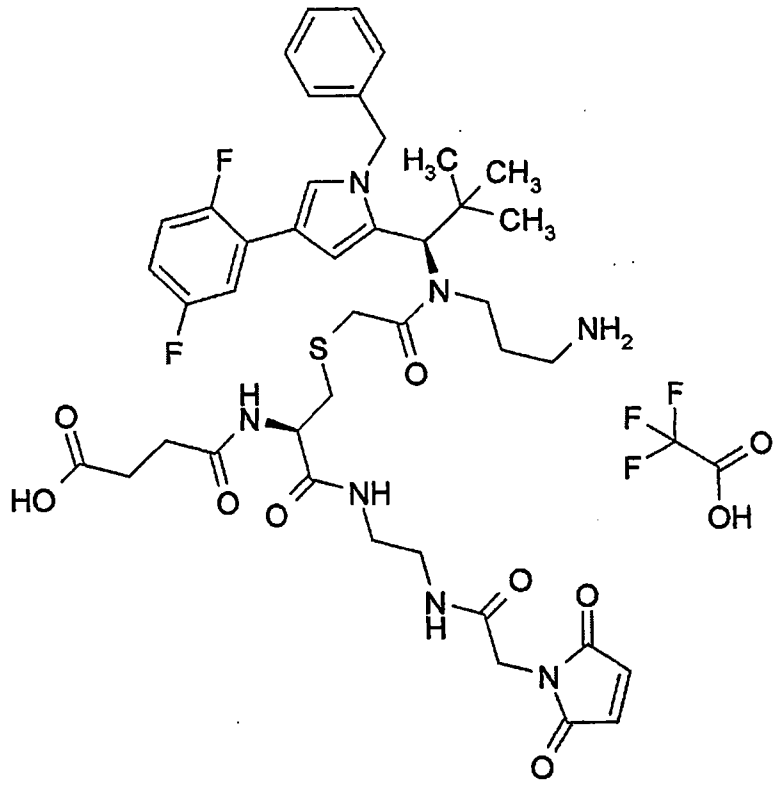
LC-MS (方法1): R_t = 1.41 min；MS (ESIpos): m/z = 1114 $(M+H)^+$。

使25.6 mg (23.0 μmol) [4-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-32-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-5,10,27-三側氧基三側氧基-14,17,20,23-四氧雜-7-硫雜-4,11,26-三氮雜三十二烷-1-基]胺基甲酸2-(三甲基矽烷基)乙酯溶於2.5 ml三氟乙醇中，且添加18.8 mg (138 μmol)二氯化鋅。將反應混合物在50℃下攪拌1小時。添加40.3 mg (138 μmol)乙二胺-N,N,N',N'-四乙酸，將反應混合物攪拌10分鐘且接著添加水(0.1% TFA)。純化直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)進行。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到22.2 mg (理論之88%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.94 min；MS (ESIpos): m/z = 969 $(M+H)^+$。

中間物F269

4-{[(8R,14R)-13-(3-胺基丙基)-14-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-1-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-15,15-二甲基-2,7,12-三側氧基-10-硫雜-3,6,13-三氮雜十六烷-8-基]胺基}-4-側氧基丁酸/三氟乙酸(1:1)



17.0 mg (0.0195 mmol) S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-N-(4-第三丁氧基-4-側氧基丁醯基)-L-半胱胺酸(中間物C77)最初與4.99 mg (0.0253 mmol) N-(2-胺基乙基)-2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯胺(中間物L1)一起饋入1.0 ml乙腈中。接著添加27 µl (0.16 mmol) N,N-二異丙基乙胺，且逐滴添加15 µl (0.025 mmol) T3P (50%於乙酸乙酯中)。將反應混合物在室溫下攪拌隔夜。添加水(2.0 ml)。反應混合物直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 125×30；10 µ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到9.5 mg (理論之46%)化合物4-{[(16R)-11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-23-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-2,2-二甲基-6,12,17,22-四側氧基-5-氧雜-14-硫雜-7,11,18,21-四氮雜-2-矽雜三十三烷-16-基]胺基}-4-側氧基丁酸第三丁酯。

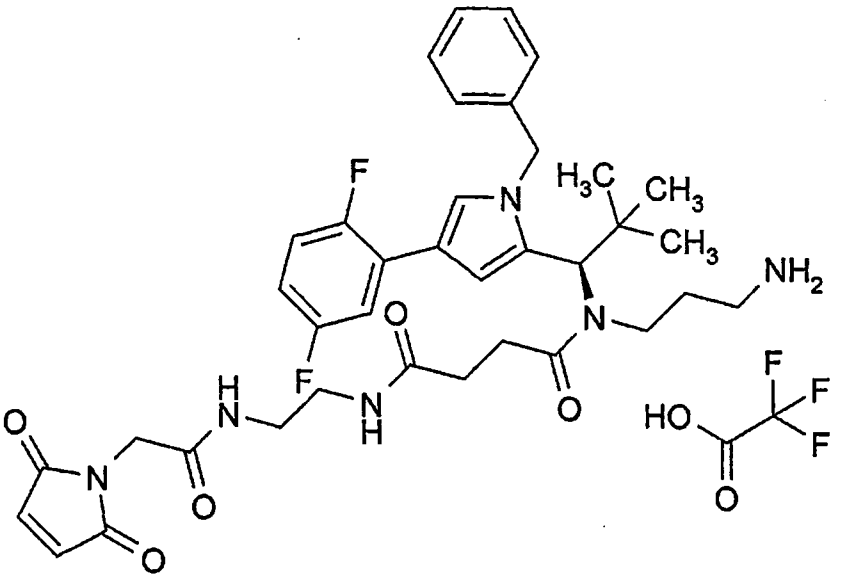
LC-MS (方法1): R_t = 1.47 min；MS (ESIpos): m/z = 1052 $(M+H)^+$。

使8.3 mg (7.89 μmol) 4-{[(16R)-11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-23-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-2,2-二甲基-6,12,17,22-四側氧基-5-氧雜-14-硫雜-7,11,18,21-四氮雜-2-矽雜三十三烷-16-基]胺基}-4-側氧基丁酸第三丁酯溶於1.0 ml三氟乙醇中，且添加6.45 mg (47.3 μmol)二氯化鋅。將反應混合物在50℃下攪拌6小時。添加6.45 mg (47.3 μmol)二氯化鋅且將反應混合物在50℃下攪拌隔夜。添加27.7 mg (94.6 μmol)乙二胺-N,N,N',N'-四乙酸且將反應混合物攪拌10分鐘，且接著添加水(0.1% TFA)。純化直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 125×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)進行。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到1.10 mg (理論之14%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.89 min；MS (ESIpos): m/z = 852 $(M+H)^+$。

中間物F270

三氟乙酸/N-(3-胺基丙基)-N-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-N'-(2-{[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]胺基}乙基)丁二醯亞胺(1:1)



在氬氣下，15.0 mg (22.9 μmol) 11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十五烷-15-酸(中間物C78)最初饋入1.0 ml DMF中，且添加8.0 μl (45.8 μmol) N,N-二異丙基乙胺及10.4 mg (27.4 μmol) HATU。將反應混合物在室溫下攪拌10分鐘。接著添加溶於4.0 μl (22.9 μmol) N,N-二異丙基乙胺及1.0 ml DMF中之8.54 mg (27.4 μmol)三氟乙酸/N-(2-胺基乙基)-2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯胺(1:1) (中間物L1)。將反應混合物在室溫下攪拌1小時。反應混合物直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到14.7 mg (理論之77%)化合物[3-({(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}{4-[(2-{[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]胺基}乙基)胺基]-4-側氧基丁醯基}胺基)丙基]胺基甲酸2-(三甲基矽烷基)乙酯。

LC-MS (方法5): R_t = 1.33 min；MS (ESIpos): m/z = 835 $(M+H)^+$。

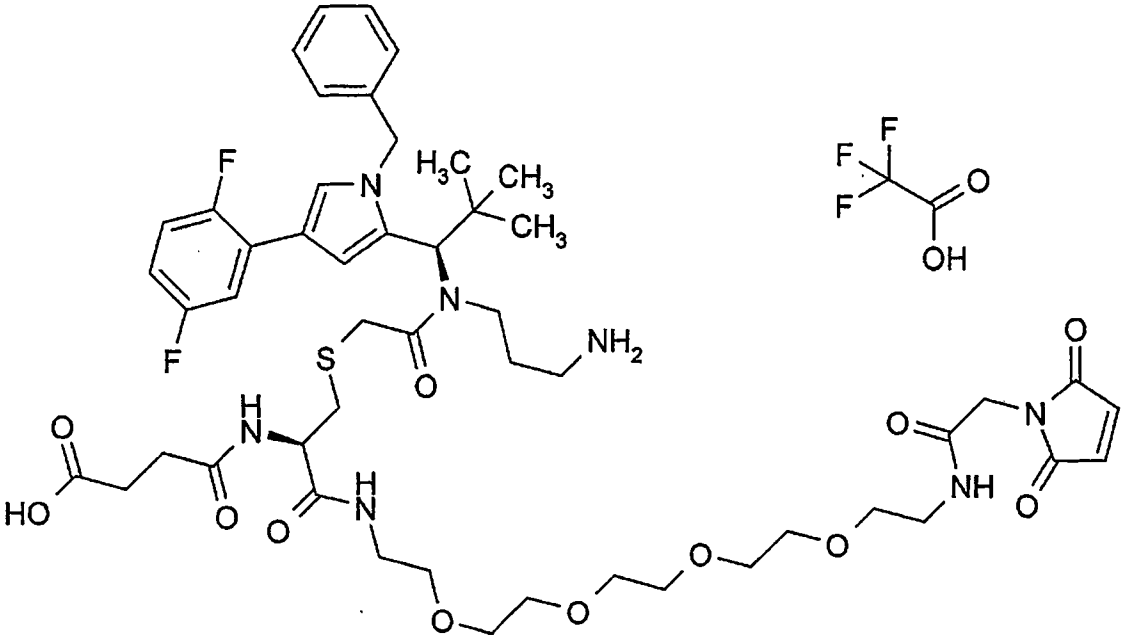
使13.2 mg (15.8 μmol) [3-({(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}{4-[(2-{[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-

吡咯-1-基)乙醯基]胺基}乙基)胺基]-4-側氧基丁醯基}胺基)丙基]胺基甲酸2-(三甲基矽烷基)乙酯溶於2.0 ml三氟乙醇中，且添加12.9 mg (94.8 μmol)二氯化鋅。將反應混合物在50℃下攪拌1小時。添加27.7 mg (94.6 μmol)乙二胺-N,N,N',N'-四乙酸，將反應混合物攪拌10分鐘且接著添加水(0.1% TFA)。純化直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)進行。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到10.9 mg (理論之83%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.83 min；MS (ESIpos): m/z = 691 $(M+H)^+$。

中間物F271

4-{[(20R,26R)-25-(3-胺基丙基)-26-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-1-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-27,27-二甲基-2,19,24-三側氧基-6,9,12,15-四氧雜-22-硫雜-3,18,25-三氮雜二十八烷-20-基]胺基}-4-側氧基丁酸/三氟乙酸(1:1)



在氬氣下，19.4 mg (22.2 μmol) S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基

-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-N-(4-第三丁氧基-4-側氧基丁醯基)-L-半胱胺酸(中間物C77)最初饋入2.0 ml DMF中，且添加21.7 mg (44.4 μmol)三氟乙酸/N-(14-胺基-3,6,9,12-四氧雜十四烷-1-基)-2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯胺(1:1) (中間物L74)、12 μl (67 μmol) N,N-二異丙基乙胺及16.9 mg (44.4 μmol) HATU。將反應混合物在室溫下攪拌1小時。反應混合物直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 125×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到18.1 mg (理論之66%)化合物4-{[(16R)-11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-35-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-2,2-二甲基-6,12,17,34-四側氧基-5,21,24,27,30-五氧雜-14-硫雜-7,11,18,33-四氮雜-2-矽雜三十五烷-16-基]胺基}-4-側氧基丁酸第三丁酯。

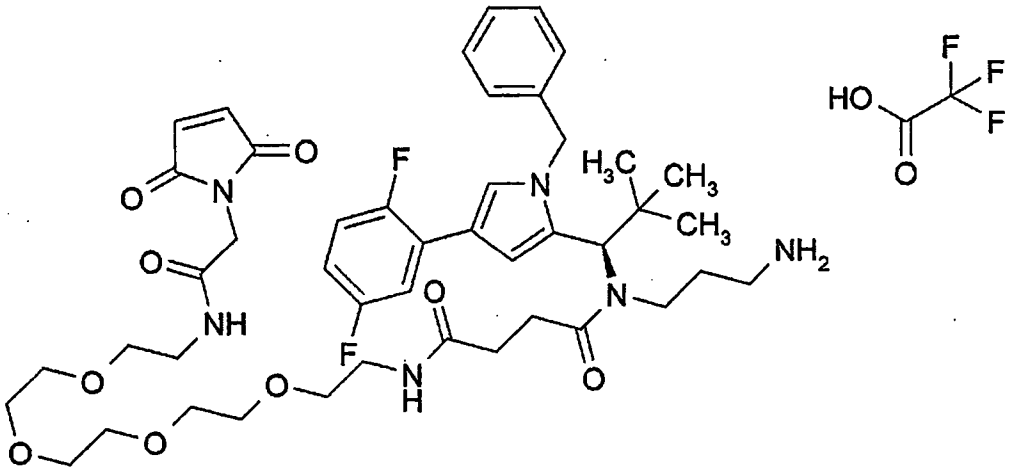
LC-MS (方法4): R_t = 1.79 min；MS (ESIpos): m/z = 1250 $(M+Na)^+$。

使18.1 mg (14.7 μmol) 4-{[(16R)-11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-35-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-2,2-二甲基-6,12,17,34-四側氧基-5,21,24,27,30-五氧雜-14-硫雜-7,11,18,33-四氮雜-2-矽雜三十五烷-16-基]胺基}-4-側氧基丁酸第三丁酯溶於2.0 ml三氟乙醇中，且添加12.0 mg (88.4 μmol)二氯化鋅。將反應混合物在50℃下攪拌4小時。添加25.8 mg (88.4 μmol)乙二胺-N,N,N',N'-四乙酸，將反應混合物攪拌10分鐘且接著添加水(0.1% TFA)。純化直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 125×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)進行。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到12.3 mg (理論之73%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.87 min；MS (ESIpos): m/z = 1028 $(M+H)^+$。

中間物F272

三氟乙酸/N-(3-胺基丙基)-N-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-N'-[17-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-16-側氧基-3,6,9,12-四氧雜-15-氮雜十七烷-1-基]丁二醯亞胺(1:1)



在氬氣下，15.0 mg (22.9 μmol) 11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十五烷-15-酸(中間物C78)最初饋入1.0 ml DMF中，且添加8.0 μl (45.8 μmol) N,N-二異丙基乙胺及10.4 mg (27.4 μmol) HATU。將反應混合物在室溫下攪拌10分鐘。接著添加溶於4.0 μl (22.9 μmol) N,N-二異丙基乙胺及1.0 ml DMF中之13.4 mg (27.4 μmol)三氟乙酸/N-(14-胺基-3,6,9,12-四氧雜十四烷-1-基)-2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯胺(1:1) (中間物L85)。將反應混合物在室溫下攪拌1小時。反應混合物直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到15.8 mg (理論之68%)化合物[23-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡

咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-1-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-2,19,22-三側氧基-6,9,12,15-四氧雜-3,18,23-三氮雜二十六烷-26-基]胺基甲酸2-(三甲基矽烷基)乙酯。

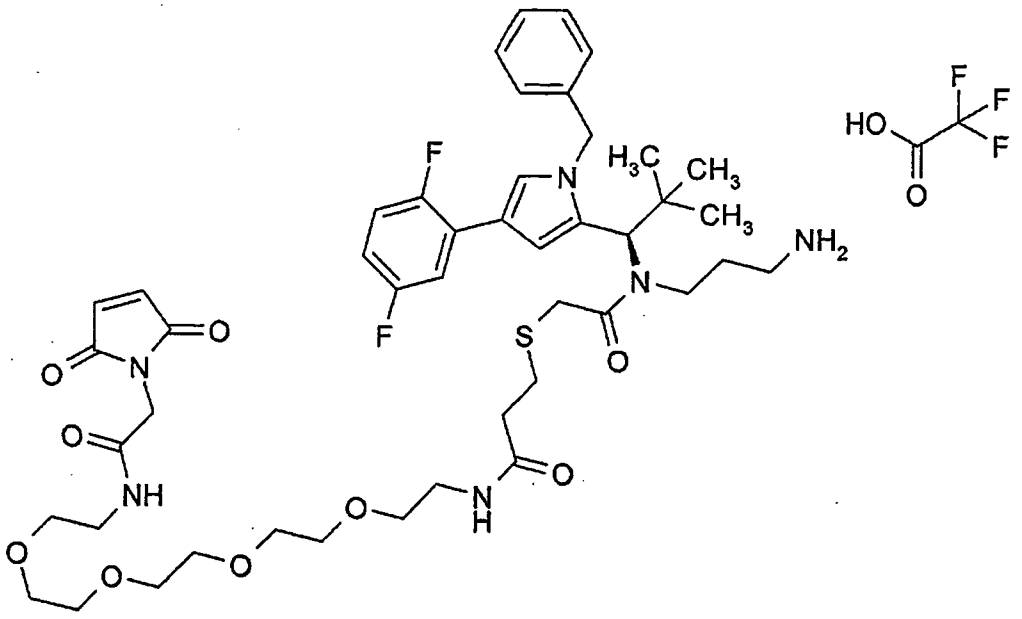
LC-MS (方法1): R_t = 1.35 min ; MS (ESIpos): m/z = 1011 $(M+H)^+$。

使15.1 mg (14.9 μmol) [23-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-1-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-2,19,22-三側氧基三側氧基-6,9,12,15-四氧雜-3,18,23-三氮雜二十六烷-26-基]胺基甲酸2-(三甲基矽烷基)乙酯溶於2.0 ml三氟乙醇中，且添加12.2 mg (89.6 μmol)二氯化鋅。將反應混合物在50℃下攪拌1小時。添加26.2 mg (89.6 μmol)乙二胺-N,N,N',N'-四乙酸，將反應混合物攪拌10分鐘且接著添加水(0.1% TFA)。純化直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)進行。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到10.3 mg (理論之70%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.88 min ; MS (ESIpos): m/z = 867 $(M+H)^+$。

中間物F273

三氟乙酸/N-(3-胺基丙基)-N-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-1-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-2,19-二側氧基-6,9,12,15-四氧雜-22-硫雜-3,18-二氮雜二十四烷-24-醯胺(1:1)



在氬氣下，20.0 mg (28.5 μmol) 11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-14-硫雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十七烷-17-酸(中間物C69)最初饋入1.0 ml DMF中，且添加10.0 μl (57.0 μmol) N,N-二異丙基乙胺及13.0 mg (34.2 μmol) HATU。將反應混合物在室溫下攪拌10分鐘。接著添加溶於5.0 μl (28.5 μmol) N,N-二異丙基乙胺及1.0 ml DMF中之16.7 mg (34.2 μmol)三氟乙酸/N-(14-胺基-3,6,9,12-四氧雜十四烷-1-基)-2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯胺(1:1) (中間物L85)。將反應混合物在室溫下攪拌1小時。反應混合物直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到18.6 mg (理論之62%)化合物[25-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-1-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-2,19,24-三側氧基-6,9,12,15-四氧雜-22-硫雜-3,18,25-三氮雜二十八烷-28-基]胺基甲酸2-(三甲基矽烷基)乙酯。

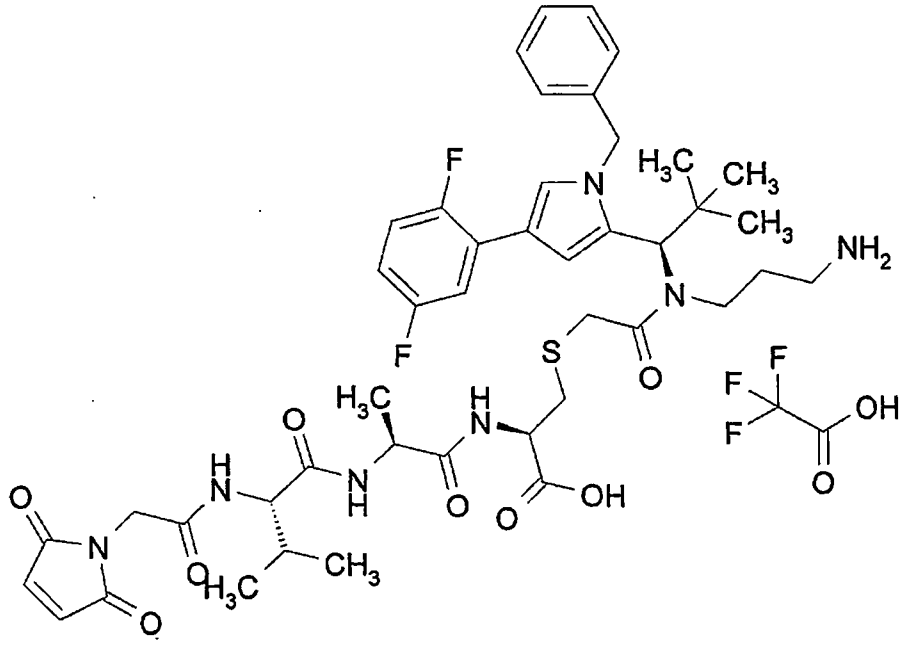
LC-MS (方法1): R_t = 1.37 min；MS (ESIpos): m/z = 1057 $(M+H)^+$。

使17.1 mg (16.2 μmol) [25-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-1-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-2,19,24-三側氧基三側氧基-6,9,12,15-四氧雜-22-硫雜-3,18,25-三氮雜二十八烷-28-基]胺基甲酸2-(三甲基矽烷基)乙酯溶於2.0 ml三氟乙醇中，且添加13.2 mg (97.0 μmol)二氯化鋅。將反應混合物在50℃下攪拌1小時。添加28.4 mg (97.0 μmol)乙二胺-N,N,N',N'-四乙酸，將反應混合物攪拌10分鐘且接著添加水(0.1% TFA)。純化直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)進行。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到9.80 mg (理論之59%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.88 min；MS (ESIpos): m/z = 913 $(M+H)^+$。

中間物F274

N-[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]-L-纈胺醯基-L-丙胺醯基-S-{2-[(3-胺基丙基){(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基]-2-側氧基乙基}-L-半胱胺酸/三氟乙酸(1:1)



13.9 mg (0.0167 mmol) S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-L-半胱胺酸/三氟乙酸(1:1) (中間物C71)最初與7.07 mg (0.0217 mmol) N-[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]-L-纈胺醯基-L-丙胺酸(中間物L86)一起饋入2.0 ml乙腈中。接著添加23 µl (0.13 mmol) N,N-二異丙基乙胺，且逐滴添加13 µl (0.022 mmol) T3P (50%於乙酸乙酯中)。將反應混合物在室溫下攪拌隔夜。反應混合物直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 125×30；10 µ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到3.70 mg (理論之19%)化合物N-[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]-L-纈胺醯基-L-丙胺醯基-S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-L-半胱胺酸。

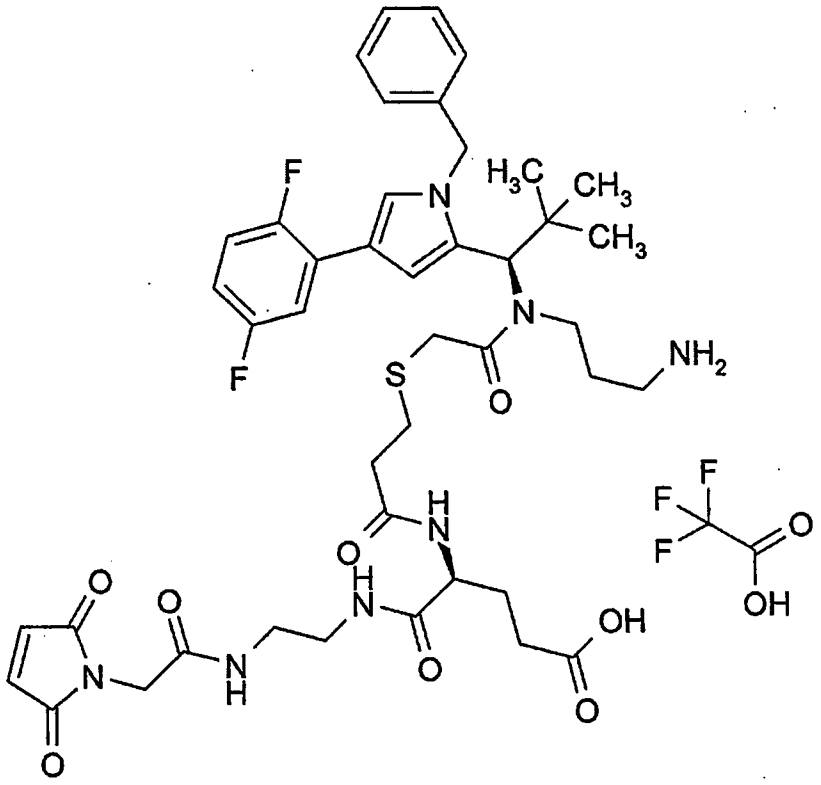
LC-MS (方法1): R_t = 1.34 min；MS (ESIpos): m/z = 1024 $(M+H)^+$。

使10.6 mg (10.3 µmol) N-[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]-L-纈胺醯基-L-丙胺醯基-S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-L-半胱胺酸溶於2.0 ml三氟乙醇中，且添加8.46 mg (62.1 µmol)二氯化鋅。將反應混合物在50℃下攪拌1小時。添加18.1 mg (62.1 µmol)乙二胺-N,N,N',N'-四乙酸，將反應混合物攪拌10分鐘且接著添加水(0.1% TFA)。純化直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 125×30；10 µ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)進行。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到5.60 mg (理論之54%)標題化合物。

LC-MS (方法12): R_t = 1.69 min；MS (ESIpos): m/z = 880 $(M+H)^+$。

中間物F275

N-[3-({2-[(3-胺基丙基){(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基]-2-側氧基乙基}硫基)丙醯基]-N-(2-{[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]胺基}乙基)-L-α-麩醯胺酸/三氟乙酸(1:1)



39.0 mg (55.6 μmol) 11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-14-硫雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十七烷-17-酸(中間物C69)最初饋入4.0 ml DMF中，添加41.6 mg (111 μmol) 1-苯甲基-5-[2-(三甲基矽烷基)乙基]-L-麩胺酸酯鹽酸鹽(1:1) (中間物L89)、29 μl (170 μmol) N,N-二異丙基乙胺及42.3 mg (111 μmol) HATU且將混合物在室溫下攪拌1小時。將反應混合物在室溫下攪拌1小時，用乙酸淬滅且直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，

0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到53.1 mg (理論之93%)化合物1-苯甲基-5-[2-(三甲基矽烷基)乙基]-N-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12,17-三側氧基-5-氧雜-14-硫雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十七烷-17-基)-L-麩胺酸酯。

LC-MS (方法1): R_t = 1.71 min；MS (ESIpos): m/z = 1021 $[M+H]^+$

在氬氣下，7.60 mg (33.9 μmol)乙酸鈀(II)最初饋入3.0 ml二氯甲烷中，且添加14 μl (100 μmol)三乙胺及110 μl (680 μmol)三乙基矽烷。將反應混合物在室溫下攪拌5分鐘，且添加溶於3.0 ml二氯甲烷中之69.2 mg (67.7 μmol) 1-苯甲基-5-[2-(三甲基矽烷基)乙基]-N-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12,17-三側氧基-5-氧雜-14-硫雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十七烷-17-基)-L-麩胺酸酯。將反應混合物在室溫下攪拌隔夜。反應混合物經紙板過濾器過濾且濾餅用二氯甲烷洗滌。在減壓下蒸發溶劑。殘餘物藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到38.4 mg (理論之61%)化合物(19S)-11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12,17-三側氧基-19-{3-側氧基-3-[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]丙基}-5-氧雜-14-硫雜-7,11,18-三氮雜-2-矽雜二十烷-20-酸。

LC-MS (方法1): R_t = 1.53 min；MS (ESIpos): m/z = 931 $(M+H)^+$。

10.0 mg (10.7 μmol) (19S)-11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12,17-三側氧基-19-{3-側氧基-3-[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]丙基}-5-氧雜-14-硫雜-7,11,18-三氮雜-2-矽雜二十烷-20-酸(中間物C69)最初饋入1.0 ml DMF中，添

加6.73 mg (21.5 μmol) N-(2-胺基乙基)-2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯胺/2,2,2-三氟乙烷-1,1-二醇(1:1) (中間物L1)、5.6 μl (32 μmol) N,N-二異丙基乙胺及8.17 mg (21.5 μmol) HATU且將混合物在室溫下攪拌1小時。將反應混合物在室溫下攪拌3小時，用乙酸淬滅且直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 125×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到6.90 mg (理論之58%)化合物N2-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12,17-三側氧基-5-氧雜-14-硫雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十七烷-17-基)-N-(2-{[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]胺基}乙基)-L-α-麩胺酸2-(三甲基矽烷基)乙酯。

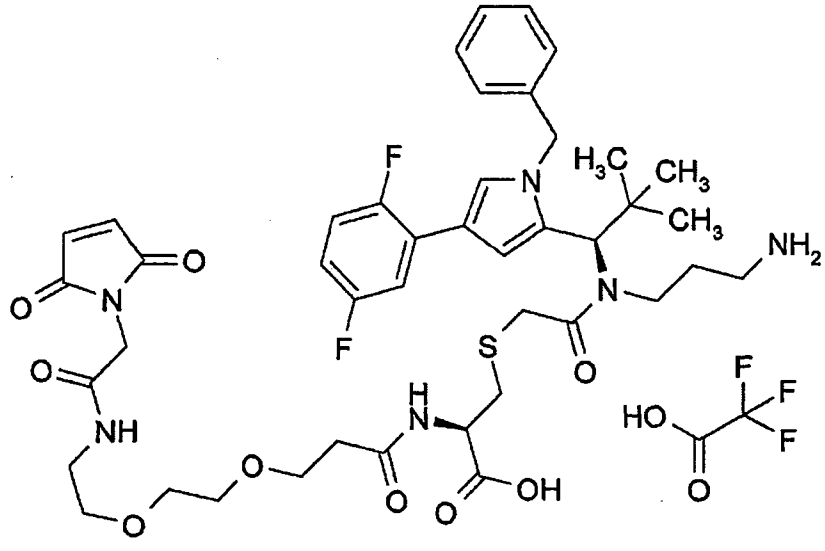
LC-MS (方法1): R_t = 1.57 min；MS (ESIpos): m/z = 1110 $[M+H]^+$

使6.90 mg (6.21 μmol) N^2-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12,17-三側氧基-5-氧雜-14-硫雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十七烷-17-基)-N-(2-{[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]胺基}乙基)-L-α-麩胺酸2-(三甲基矽烷基)乙酯溶於2.0 ml三氟乙醇中，且添加5.1 mg (37.2 μmol)二氯化鋅。將反應混合物在50℃下攪拌3小時。添加5.1 mg (37.2 μmol)二氯化鋅且將反應混合物在50℃下攪拌3小時。添加5.1 mg (37.2 μmol)二氯化鋅且將反應混合物在50℃下攪拌3小時。添加10.1 mg (74.4 μmol)二氯化鋅且將反應混合物在50℃下攪拌隔夜且在室溫下攪拌72小時。添加54.5 mg (186 μmol)乙二胺-N,N,N',N'-四乙酸，將反應混合物攪拌10分鐘且接著添加水(0.1% TFA)。純化直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 125×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)進行。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到2.4 mg (理論之39%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.86 min；MS (ESIpos): m/z = 866 $(M+H)^+$。

中間物F276

S-{2-[(3-胺基丙基){(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基]-2-側氧基乙基}-N-{3-[2-(2-{[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]胺基}乙氧基)乙氧基]丙醯基}-L-半胱胺酸/三氟乙酸(1:1)



在氬氣下，9.08 mg (28.9 μmol) 3-[2-(2-{[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]胺基}乙氧基)乙氧基]丙酸(中間物L87)最初饋入1.0 ml DMF中，且添加8.33 μl (48.2 μmol) N,N-二異丙基乙胺及11.0 mg (28.9 μmol) HATU。將反應混合物在室溫下攪拌10分鐘。接著添加溶於4.67 μl (24.1 μmol) N,N-二異丙基乙胺及1.0 ml DMF中之20.0 mg (27.7 μmol) S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-L-半胱胺酸/三氟乙酸(1:1) (中間物C71)。將反應混合物在室溫下攪拌1小時。反應混合物直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。

此得到4.70 mg (理論之19%)化合物S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-N-{3-[2-(2-{[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]胺基}乙氧基)乙氧基]丙醯基}-L-半胱胺酸。

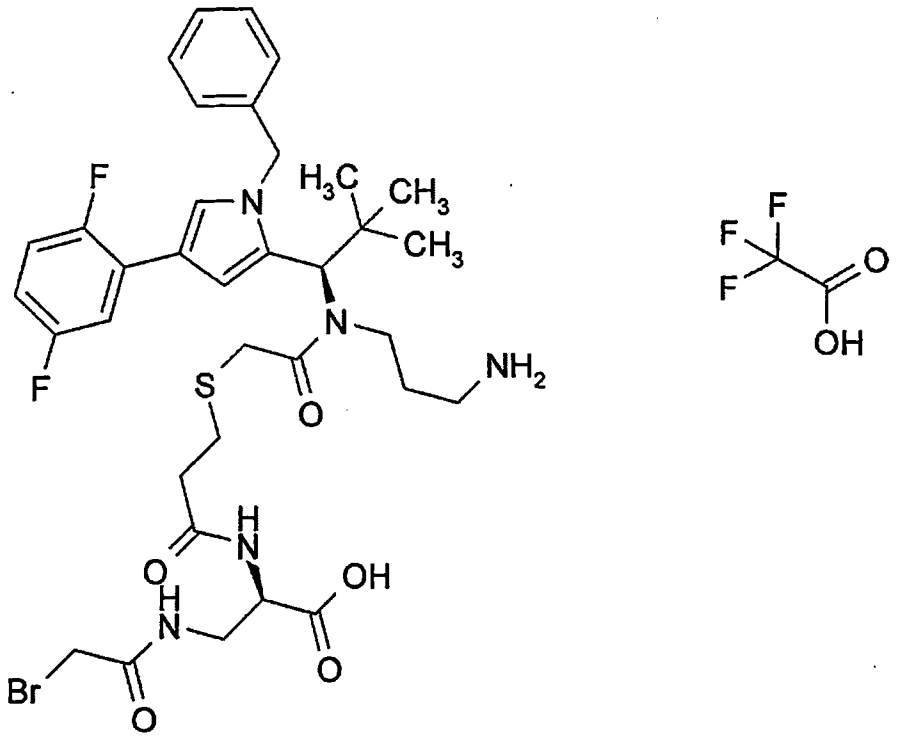
LC-MS (方法12): R_t = 2.47 min ; MS (ESIpos): m/z = 1013 $(M+H)^+$。

使13.9 mg (13.7 μmol) S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-N-{3-[2-(2-{[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]胺基}乙氧基)乙氧基]丙醯基}-L-半胱胺酸溶於2.0 ml三氟乙醇中，且添加5.6 mg (41.2 μmol)二氯化鋅。將反應混合物在50℃下攪拌1小時。添加5.6 mg (41.2 μmol)二氯化鋅且將反應混合物在50℃下攪拌30分鐘。添加24.1 mg (82.4 μmol)乙二胺-N,N,N',N'-四乙酸且將反應混合物攪拌10分鐘，且接著添加水(0.1% TFA)。純化直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)進行。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到10.8 mg (理論之80%)標題化合物。

LC-MS (方法12): R_t = 1.58 min ; MS (ESIpos): m/z = 869 $(M+H)^+$。

中間物F277

N-[3-({2-[(3-胺基丙基){(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基]-2-側氧基乙基}硫基)丙醯基]-3-[(溴乙醯基)胺基]-D-丙胺酸/三氟乙酸(1:1)



使8.90 mg (8.88 μmol)三氟乙酸/3-胺基-N-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12,17-三側氧基-5-氧雜-14-硫雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十七烷-17-基)-D-丙胺酸2-(三甲基矽烷基)乙酯(1:1) (中間物C80)及2.31 mg (9.77 μmol) 1-(2-溴乙醯氧基)吡咯啶-2,5-二酮溶於1 ml二甲基甲醯胺中，且添加2.9 μl (27 μmol) N-甲基嗎啉。將反應混合物在室溫下攪拌1小時。反應混合物直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 125×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水/0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到5.80 mg (理論之65%)化合物N-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12,17-三側氧基-5-氧雜-14-硫雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十七烷-17-基)-3-[(溴乙醯基)胺基]-D-丙胺酸2-(三甲基矽烷基)乙酯。

LC-MS (方法1): R_t = 1.57 min；MS (ESIpos): m/z = 1008 $(M+H)^+$。

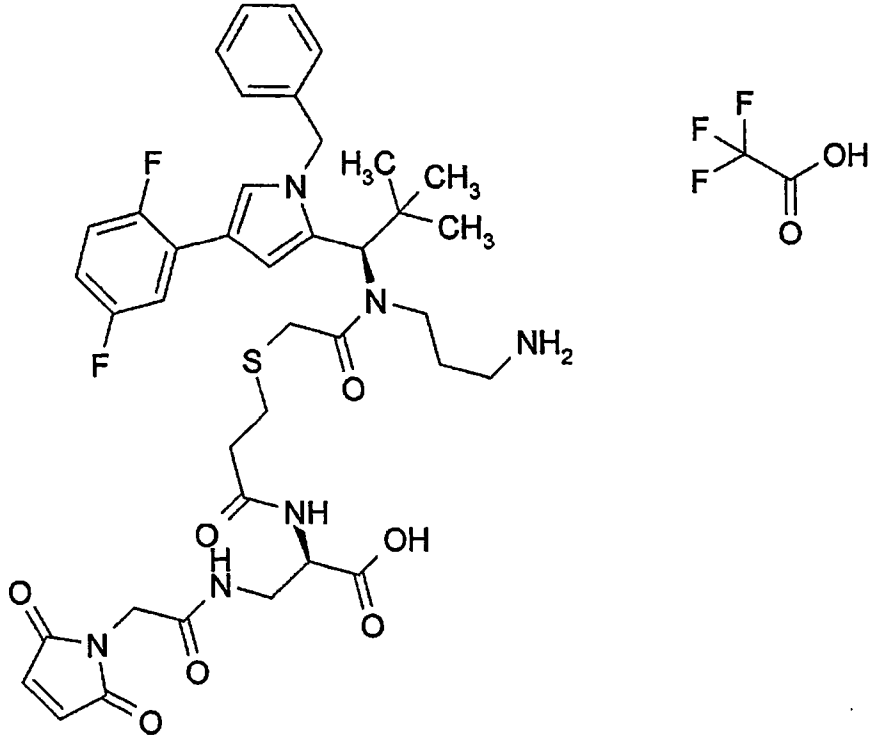
使5.80 mg (5.75 μmol) N-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12,17-三側氧基-5-

氧雜-14-硫雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十七烷-17-基)-3-[(溴乙醯基)胺基]-D-丙胺酸2-(三甲基矽烷基)乙酯溶於2.0 ml三氟乙醇中，且添加4.70 mg (34.5 μmol)二氯化鋅。將反應混合物在50℃下攪拌3小時。添加4.70 mg (34.5 μmol)二氯化鋅且將反應混合物在50℃下攪拌5小時。添加20.2 mg (69.0 μmol)乙二胺-N,N,N',N'-四乙酸且將反應混合物攪拌10分鐘，且接著添加水(0.1% TFA)。純化直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 125×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)進行。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到1.70 mg (理論之34%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.90 min；MS (ESIpos): m/z = 764 $(M+H)^+$。

中間物F278

N-[3-({2-[(3-胺基丙基){(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基]-2-側氧基乙基}硫基)丙醯基]-3-{[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]胺基}-D-丙胺酸/三氟乙酸(1:1)



使10.0 mg (9.98 μmol)三氟乙酸/3-胺基-N-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-

4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12,17-三側氧基-5-氧雜-14-硫雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十七烷-17-基)-D-丙胺酸2-(三甲基矽烷基)乙酯(1:1) (中間物C80)及2.77 mg (11.0 μmol) 1-{2-[(2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)氧基]-2-側氧基乙基}-1H-吡咯-2,5-二酮溶於1 ml二甲基甲醯胺中，且添加3.3 μl (30 μmol) N-甲基嗎啉。將反應混合物在室溫下攪拌隔夜。添加2.0 μl (35 μmol)乙酸，且反應混合物直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 125×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水/0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到5.50 mg (理論之54%)化合物N-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12,17-三側氧基-5-氧雜-14-硫雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十七烷-17-基)-3-{[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]胺基}-D-丙胺酸2-(三甲基矽烷基)乙酯。

LC-MS (方法1): R_t = 1.51 min；MS (ESIpos): m/z = 1024 $(M+H)^+$。

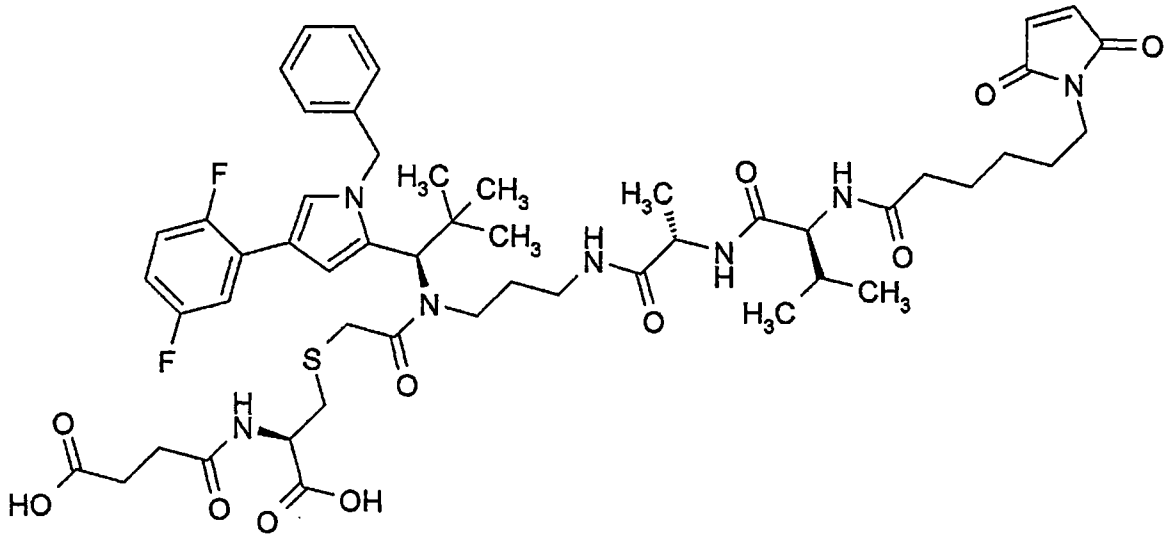
使5.50 mg (5.36 μmol) N-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12,17-三側氧基-5-氧雜-14-硫雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十七烷-17-基)-3-{[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]胺基}-D-丙胺酸2-(三甲基矽烷基)乙酯溶於1.0 ml三氟乙醇中，且添加4.39 mg (32.2 μmol)二氯化鋅。將反應混合物在50℃下攪拌1小時。添加4.39 mg (32.2 μmol)二氯化鋅且將反應混合物在50℃下攪拌1小時。添加4.39 mg (32.2 μmol)二氯化鋅且將反應混合物在50℃下攪拌4小時。添加28.2 mg (96.5 μmol)乙二胺-N,N,N',N'-四乙酸且將反應混合物攪拌10分鐘，且接著添加水(0.1% TFA)。純化直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 125×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)進行。在減壓下蒸

發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到2.70 mg (理論之56%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.89 min ; MS (ESIpos): m/z = 781 $(M+H)^+$。

中間物F279

N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]-L-纈胺醯基-N-[3-({(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}[({(2R)-2-羧基-2-[(3-羧基丙醯基)胺基]乙基}硫基)乙醯基]胺基)丙基]-L-丙胺醯胺



使12.2 mg (14 μmol) S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-N-(4-第三丁氧基-4-側氧基丁醯基)-L-半胱胺酸(中間物C77)溶於2.0 ml三氟乙醇中，且添加11.4 mg (83.8 μmol)二氯化鋅。將反應混合物在50℃下攪拌3小時。添加24.5 mg (83.8 μmol)乙二胺-N,N,N',N'-四乙酸，將反應混合物攪拌10分鐘且接著添加水(0.1% TFA)。純化直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 125×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)進行。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到4.60 mg (理論之

42%)化合物4-{[(1R)-2-({2-[(3-胺基丙基){(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基]-2-側氧基乙基}硫基)-1-羧基乙基]胺基}-4-側氧基丁酸/三氟乙酸(1:1)。

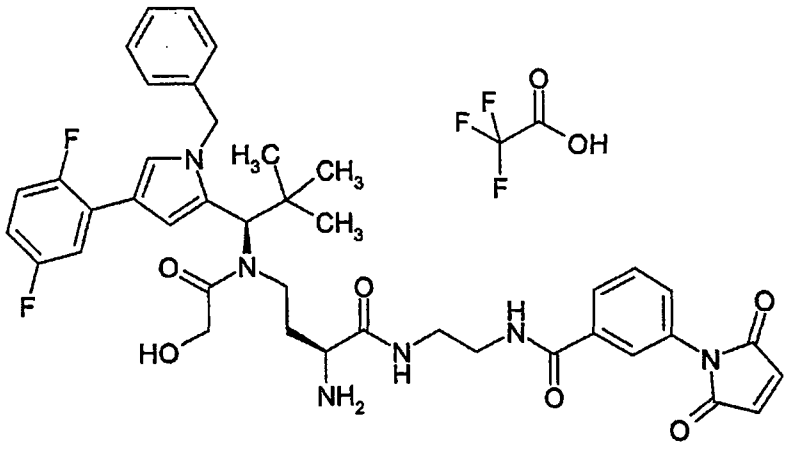
LC-MS (方法1): R_t = 0.88 min ; MS (ESIpos): m/z = 673 $(M+H)^+$。

使10.0 mg (12.7 μmol) 4-{[(1R)-2-({2-[(3-胺基丙基){(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基]-2-側氧基乙基}硫基)-1-羧基乙基]胺基}-4-側氧基丁酸/三氟乙酸(1:1)及7.41 mg (12.7 μmol) N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]-L-纈胺醯基-L-丙胺酸2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯(中間物L88)溶於1.5 ml二甲基甲醯胺中，且添加4.4 μl (25 μmol) N,N-二異丙基乙胺。將反應混合物在室溫下攪拌2小時。添加2.0 μl (35 μmol)乙酸，且反應混合物直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水/0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到5.20 mg (理論之39%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 1.11 min ; MS (ESIpos): m/z = 1036 $(M+H)^+$。

中間物F280

三氟乙酸/N-[2-({(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}胺基)乙基]-3-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)苯甲醯胺(1:1)

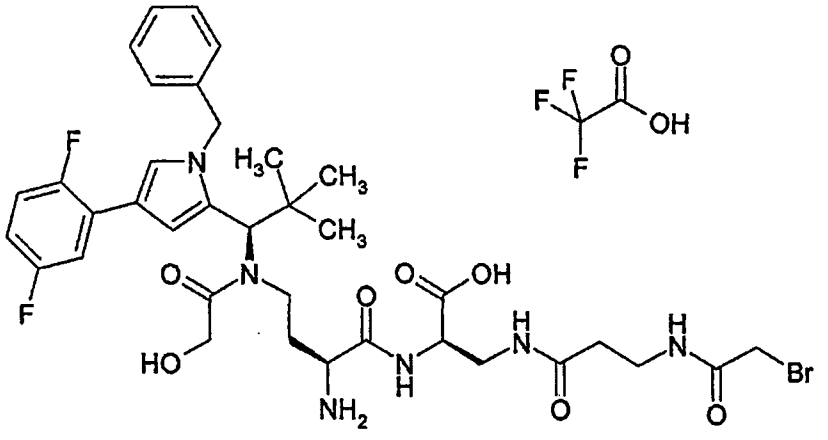


標題化合物自中間物C64，藉由與市售1-(3-{[(2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)氧基]羰基}苯基)-1H-吡咯-2,5-二酮偶合及隨後用氯化鋅脫除保護基來製備。

LC-MS (方法1): R_t = 0.88 min；MS (ESIpos): m/z = 755 $(M+H)^+$。

中間物F281

N-{(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}-3-{[N-(溴乙醯基)-β-丙胺醯基]胺基}-D-丙胺酸/三氟乙酸(1:1)



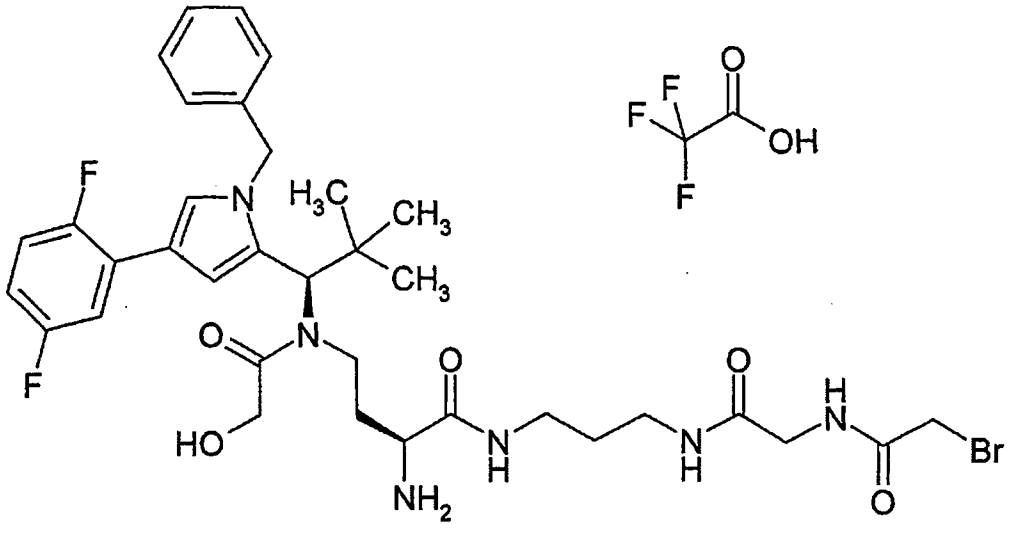
首先，經修飾之胺基酸構築嵌段N-(溴乙醯基)-β-丙胺酸及2-(三甲基矽烷基)乙基-3-胺基-N-(第三丁氧羰基)-D-丙胺酸酯藉由肽化學之經典方法製備。接著此等在HATU及嗎啉存在下偶合。接著使用含10%濃度三氟乙酸之二氯甲烷移除第三丁氧羰基保護基，得到中間物3-{[N-(溴乙醯基)-β-丙胺醯基]胺基}-D-丙胺酸2-(三甲基矽烷基)乙酯。

最終，標題化合物藉由在HATU及4-甲基嗎啉存在下使此中間物與中間物C58偶合，接著用氯化鋅脫除保護基來製備。

LC-MS (方法1): R_t = 0.87 min；MS (ESIpos): m/z = 791及793 $(M+H)^+$。

中間物F282

三氟乙酸/(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]-N-(3-{[N-(溴乙醯基)甘胺醯基]胺基}丙基)丁醯胺(1:1)



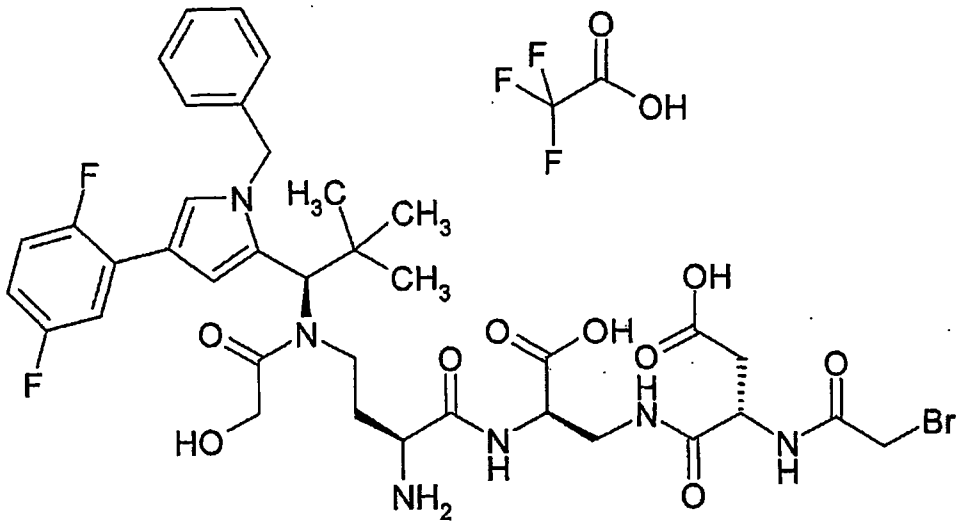
首先，中間物三氟乙酸/N-(3-胺基丙基)-N2-(溴乙醯基)甘胺醯胺(1:1)自甘胺酸第三丁酯及溴乙酸酐，藉由肽化學之經典方法製備。

最終，標題化合物藉由使此中間物與中間物C58在HATU及4-甲基嗎啉存在下偶合，接著用氯化鋅脫除保護基來製備。

LC-MS (方法1): R_t = 0.83 min；MS (ESIpos): m/z = 747及749 $(M+H)^+$。

中間物F283

N-[(2R)-2-({(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}胺基)-2-羧基乙基]-N^2-(溴乙醯基)-L-α-天冬醯胺/三氟乙酸(1:1)



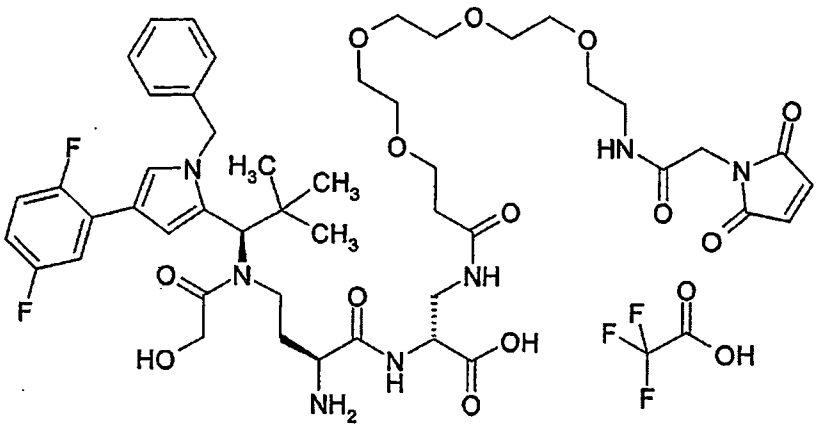
首先，經修飾之胺基酸構築嵌段(2S)-2-[(溴乙醯基)胺基]-4-側氧基-4-[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]丁酸及溴乙酸酐自(2S)-2-胺基-4-側氧基-4-[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]丁酸及溴乙酸酐製備且胺基酸構築嵌段2-(三甲基矽烷基)乙基-3-胺基-N-(第三丁氧羰基)-D-丙胺酸酯自市售3-{[(苯甲氧基)羰基]胺基}-N-(第三丁氧羰基)-D-丙胺酸/N-環己基環己胺(1:1)製備。兩種構築嵌段在HATU及嗎啉存在下偶合且接著使用含5%濃度三氟乙酸之二氯甲烷移除第三丁氧羰基保護基，得到矽烷基乙基酯保護基及因此中間物三氟乙酸/2-(三甲基矽烷基)乙基-N-{(2R)-2-胺基-3-側氧基-3-[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]丙基}-N2-(溴乙醯基)-L-α-天冬醯胺酸酯(1:1)。

最終，標題化合物藉由在HATU及4-甲基嗎啉存在下使此中間物與中間物C58偶合，接著用氯化鋅脫除保護基來製備。

LC-MS (方法1): R_t = 0.84 min；MS (ESIpos): m/z = 835及837 $(M+H)^+$。

中間物F284

N-{(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}-3-{[1-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-2,18-二側氧基-6,9,12,15-四氧雜-3-氮雜十八烷-18-基]胺基}-D-丙胺酸/三氟乙酸(1:1)



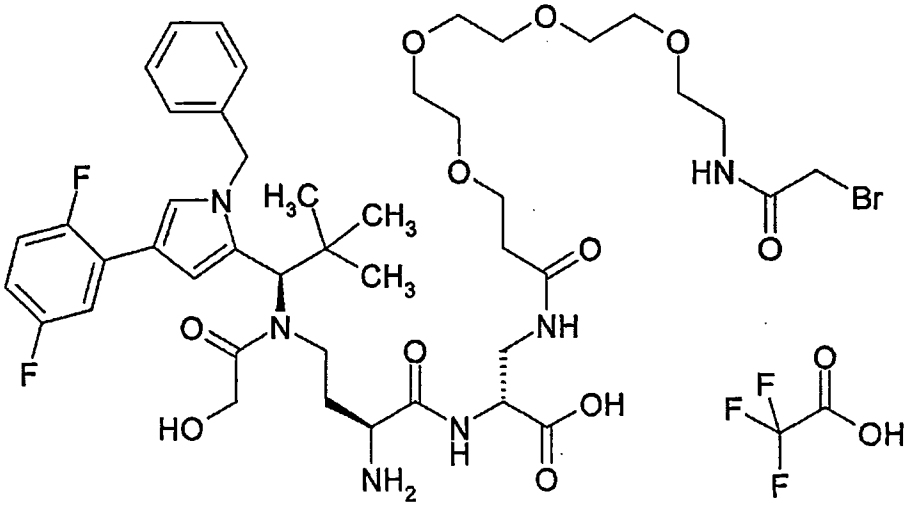
首先，在HATU及N,N-二異丙基乙胺存在下使中間物L80與市售(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙酸偶合，且接著使用含16%濃度三氟乙酸之二氯甲烷移除第三丁氧羰基保護基，得到矽烷基乙基酯保護基。

最終，標題化合物藉由在HATU及N,N-二異丙基乙胺存在下使此中間物與中間物C58偶合，接著用氯化鋅脫除保護基來製備。

LC-MS (方法12): R_t = 1.46 min；MS (ESIpos): m/z = 984.45 $(M+H)^+$。

中間物F285

N-{(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}-3-[(18-溴-17-側氧基-4,7,10,13-四氧雜-16-氮雜十八烷-1-醯基)胺基]-D-丙胺酸/三氟乙酸(1:1)



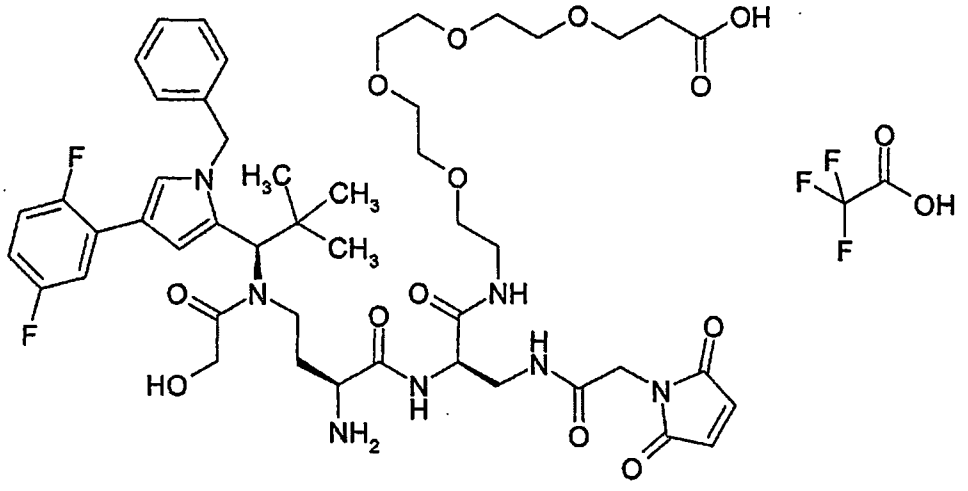
首先，使中間物L80與市售溴乙酸酐偶合，且接著使用含20%濃度三氟乙酸之二氯甲烷移除第三丁氧羰基保護基，得到矽烷基乙基酯保護基。

最終，標題化合物藉由在HATU及N,N-二異丙基乙胺存在下使此中間物與中間物C58偶合，接著用氯化鋅脫除保護基來製備。

LC-MS (方法1): R_t = 0.85 min；MS (ESIpos): m/z = 967及969 $(M+H)^+$。

中間物F286

1-[(N-{(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}-3-{[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]胺基}-D-丙胺醯基)胺基]-3,6,9,12-四氧雜十四烷-15-酸/三氟乙酸(1:1)

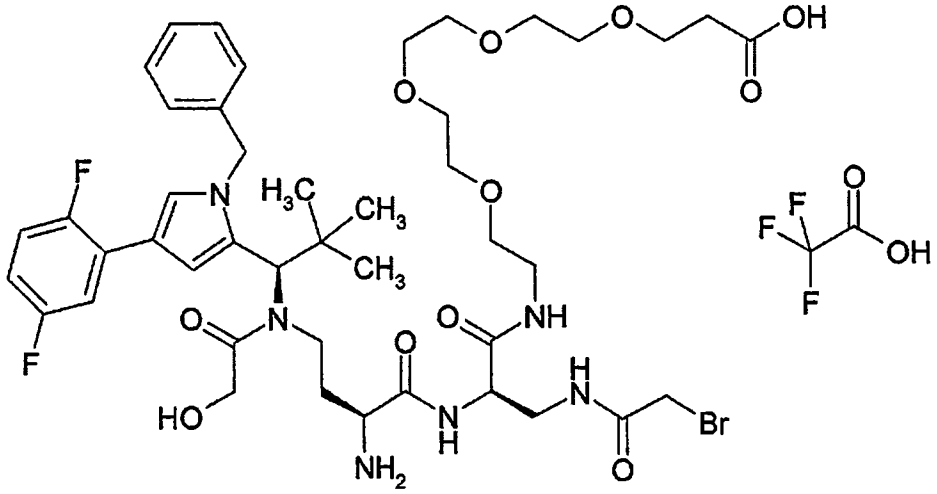


首先，在HATU及N,N-二異丙基乙胺存在下使中間物L91與(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙酸偶合，且接著使用含12.5%濃度TFA之DCM移除Boc保護基。在HATU及N,N-二異丙基乙胺存在下使所得中間物與中間物C58偶合且接著藉由用氯化鋅脫除保護基而轉變成標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.84 min；MS (ESIpos): m/z = 984 $(M+H)^+$。

中間物F287

1-[(N-{(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}-3-[(溴乙醯基)胺基]-D-丙胺醯基)胺基]-3,6,9,12-四氧雜十四烷-15-酸/三氟乙酸(1:1)

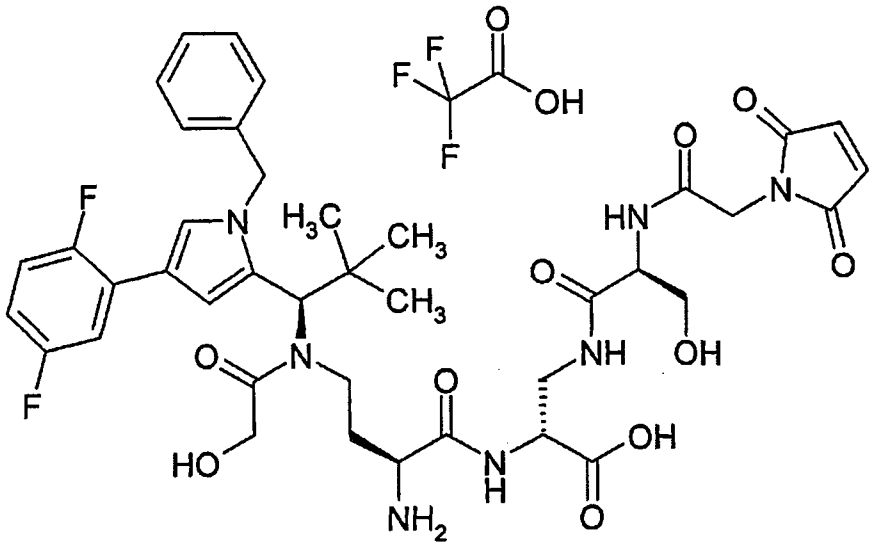


首先，將中間物L91在DCM中用溴乙酸酐醯化，且接著使用含10%濃度TFA之DCM移除Boc保護基。在HATU及嗎啉存在下以此方式獲得之中間物與中間物C58偶合且接著藉由用氯化鋅脫除保護基而轉變成標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.87 min；MS (ESIpos): m/z = 967及969 $(M+H)^+$。

中間物F288

N-{(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}-3-({N-[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]-L-絲胺醯基}胺基)-D-丙胺酸/三氟乙酸(1:1)

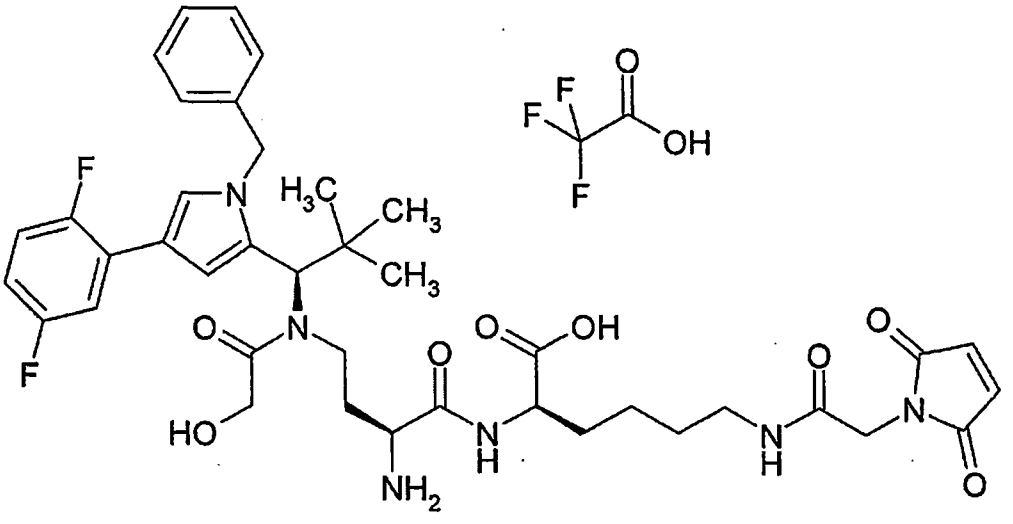


在HATU及N,N-二異丙基乙胺存在下35 mg (39 μmol)中間物C74與N-[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]-L-絲胺酸(其事先自O-第三丁基-L-絲胺酸第三丁酯及(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙酸製備)偶合。用氯化鋅脫除保護基及藉由HPLC純化得到14 mg (理論之38%)標題化合物。

LC-MS (方法12): R_t = 1.43 min ; MS (ESIpos): m/z = 824.34 $(M+H)^+$。

中間物F289

N^2-{(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}-N^6-[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]-D-離胺酸/三氟乙酸鹽(1:1)



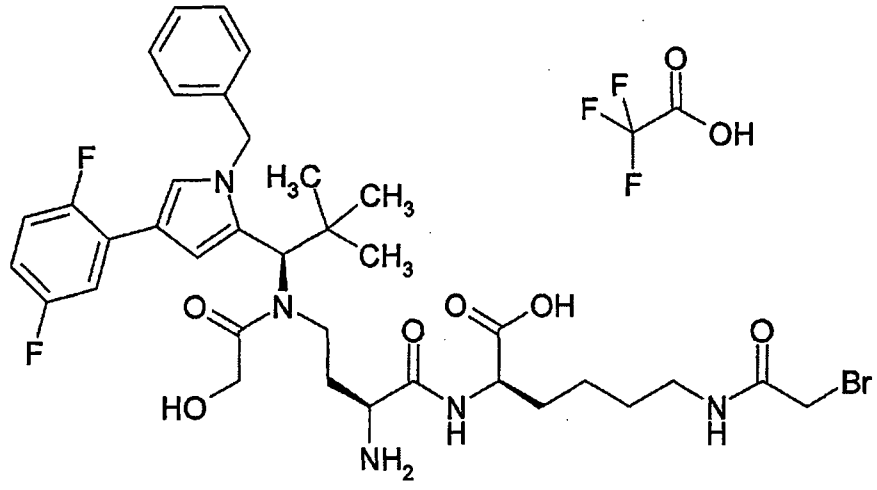
首先，三氟乙酸/2-(三甲基矽烷基)乙基-N^6-[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]-D-離胺酸酯(1:1)藉由肽化學之經典方法，自N^6-[(苯甲氧基)羰基]-N^2-(第三丁氧羰基)-D-離胺酸製備。

接著在HATU及4-甲基嗎啉存在下12.5 mg (25 μmol)此中間物與15 mg (23 μmol)中間物C58偶合。用氯化鋅脫除保護基及藉由HPLC純化得到14 mg (理論之53%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.83 min；MS (ESIpos): m/z = 779 $(M+H)^+$。

中間物F290

N^2-{(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}-N^6-(溴乙醯基)-D-離胺酸/三氟乙酸(1:1)



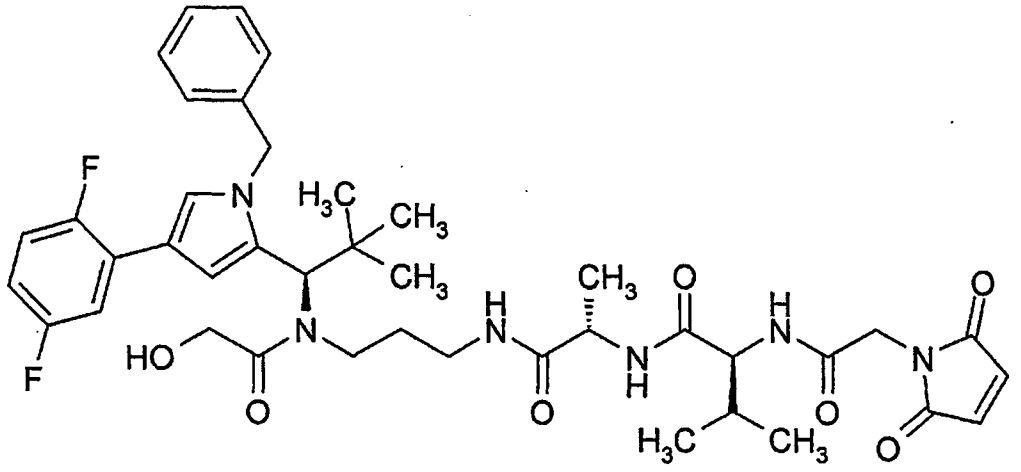
首先，三氟乙酸/2-(三甲基矽烷基)乙基-N6-(溴乙醯基)-D-離胺酸酯(1:1)藉由肽化學之經典方法，自N^6-[(苯甲氧基)羰基]-N^2-(第三丁氧羰基)-D-離胺酸製備。

接著在HATU及4-甲基嗎啉存在下12 mg (25 μmol)此中間物與15 mg (23 μmol)中間物C58偶合。用氯化鋅脫除保護基且藉由HPLC純化得到7 mg (理論之36%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.86 min；MS (ESIpos): m/z = 762及764 $(M+H)^+$。

中間物F291

N-[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]-L-纈胺醯基-N-{3-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丙基}-L-丙胺醯胺

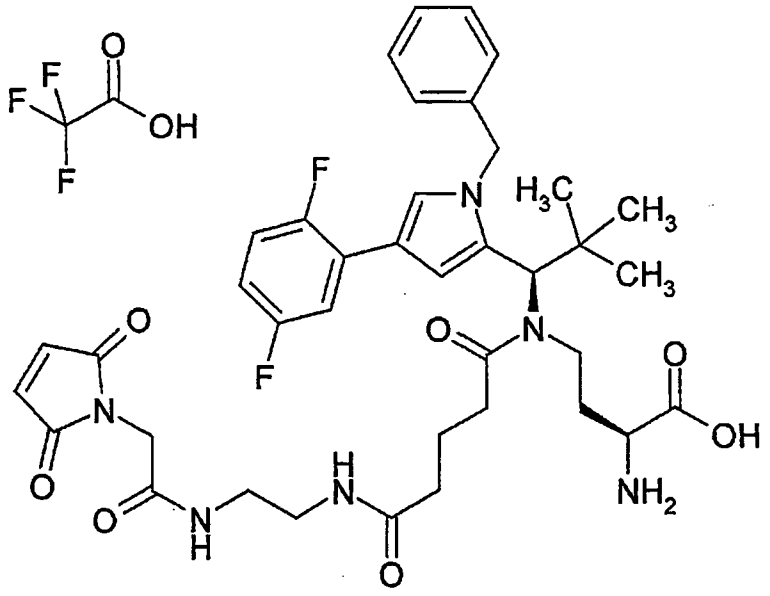


標題化合物自實例M9，首先藉由在HATU及N,N-二異丙基乙胺存在下與N-[(苯甲氧基)羰基]-L-纈胺醯基-L-丙胺酸偶合來製備。在下一步中，Z保護基藉由在10%鈀/活性碳上在室溫下在氫標準壓力下氫化1小時且接著藉由在HATU及N,N-二異丙基乙胺存在下與 (2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙酸偶合使脫除保護基之中間物轉變成標題化合物來移除。

LC-MS (方法1): R_t = 1.21 min ; MS (ESIpos): m/z = 777 $(M+H)^+$。

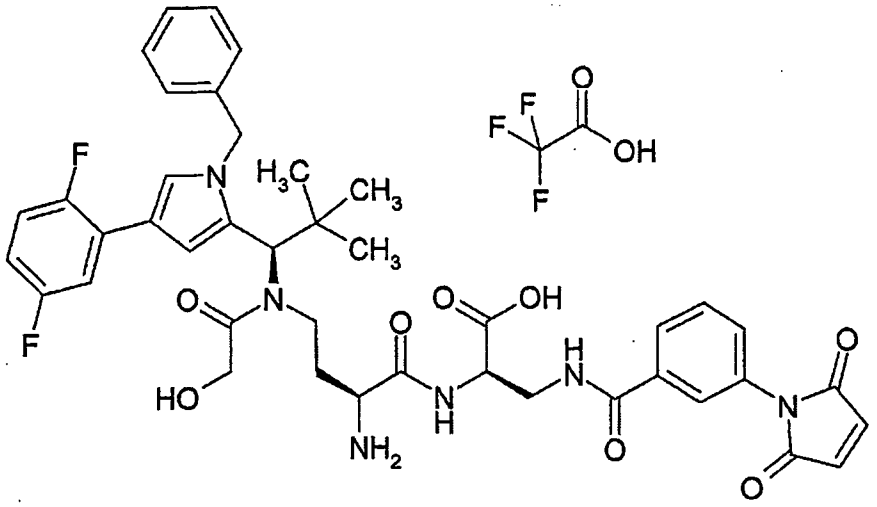
中間物F292

(2S)-2-胺基-4-({(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}{5-[(2-{[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]胺基}乙基)胺基]-5-側氧基戊醯基}胺基)丁酸/三氟乙酸(1:1)



中間物F293

N-{(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}-3-{[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)苯甲醯基]胺基}-D-丙胺酸/三氟乙酸(1:1)

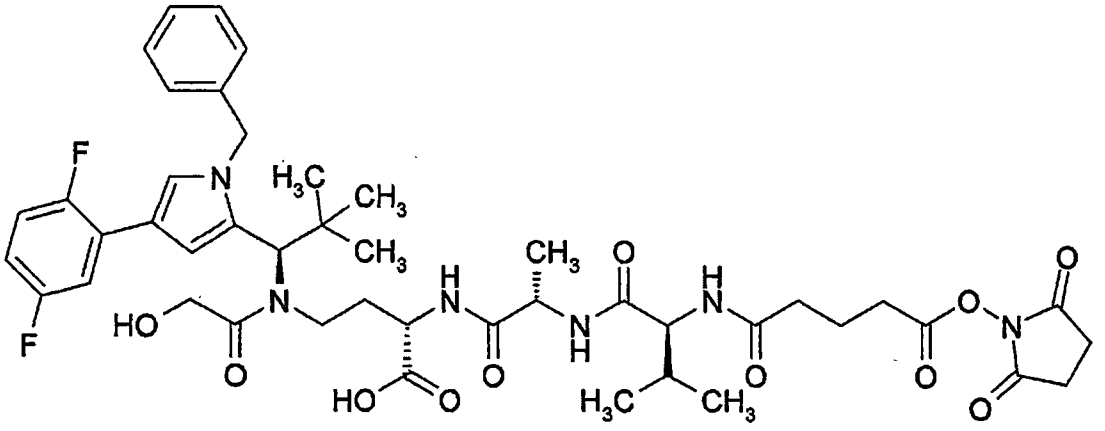


使35 mg (39 μmol)中間物C74溶於4 ml DMF中，且在N,N-二異丙基乙胺存在下，與13.5 mg (43 μmol)市售1-(3-{[(2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)氧基]羰基}苯基)-1H-吡咯-2,5-二酮偶合。用氯化鋅脫除保護基且藉由HPLC純化得到12 mg (理論之34%)標題化合物。

LC-MS (方法12): R_t = 0.93 min；MS (ESIpos): m/z = 799 $(M+H)^+$。

中間物F294

N-{5-[(2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)氧基]-5-側氧基戊醯基}-L-纈胺醯基-N-{(1S)-3-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]-1-羧基丙基}-L-丙胺醯胺



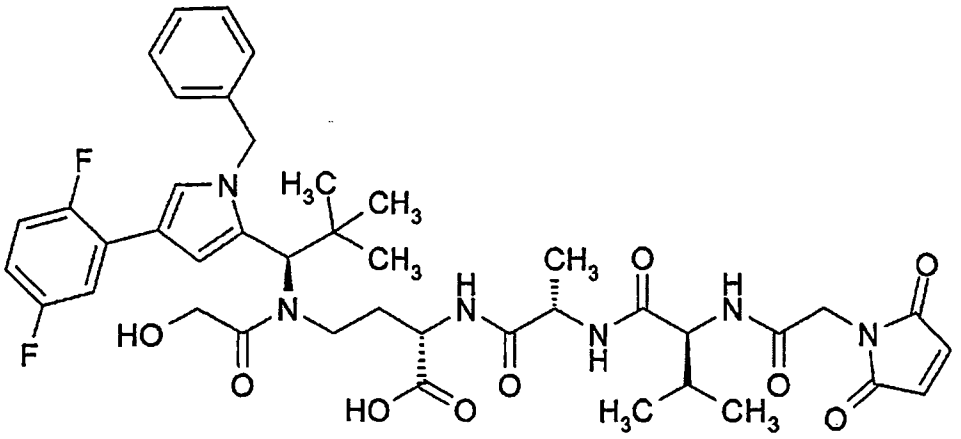
溶於12 ml甲醇中之41 mg (0.05 mmol)中間物C76在10 mg 10%鈀/活性碳上在室溫下在氫標準壓力下氫化1小時。接著濾出催化劑且在減壓下移除溶劑。此得到32 mg (理論之92%)脫除保護基之中間物。

使15 mg (0.022 mmol)此中間物溶於DMF中，且添加13 mg (0.039 mmol) 1,1'-[(1,5-二側氧基戊-1,5-二基)雙(氧基)]二吡咯啶-2,5-二酮及7 µl N,N-二異丙基乙胺。在室溫下攪拌1小時後，濃縮反應物且殘餘物藉由HPLC純化。此得到9 mg (理論之45%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 1.08 min ; MS (ESIpos): m/z = 895 $(M+H)^+$。

中間物F295

N-[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]-L-纈胺醯基-N-{(1S)-3-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]-1-羧基丙基}-L-丙胺醯胺



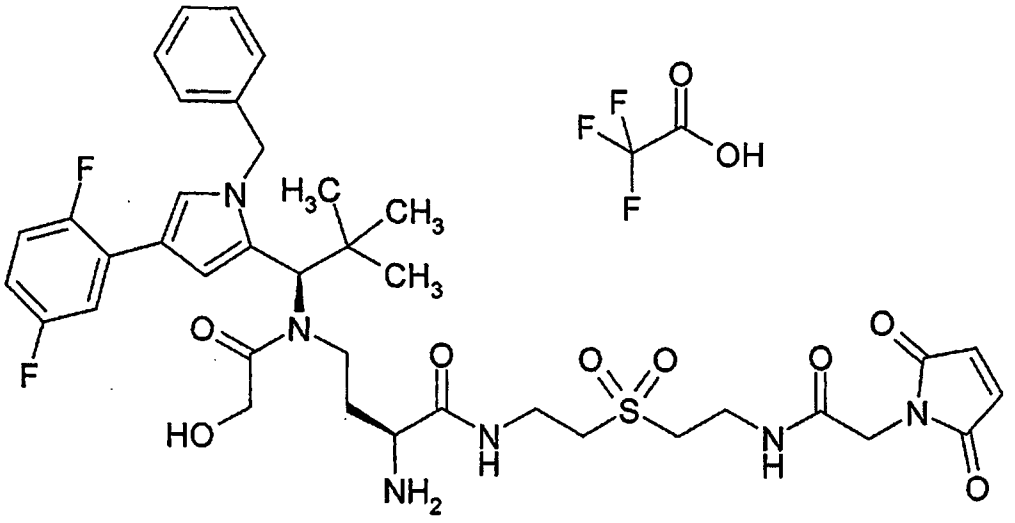
溶於12 ml甲醇中之41 mg (0.05 mmol)中間物C76在10 mg 10%鈀/活性碳上在室溫下在氫標準壓力下氫化1小時。接著濾出催化劑且在減壓下移除溶劑。此得到32 mg (理論之92%)脫除保護基之中間物。

使15 mg (0.022 mmol)此中間物溶於4 ml DMF中，且添加10 mg (0.039 mmol) 1-{2-[(2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)氧基]-2-側氧基乙基}-1H-吡咯-2,5-二酮及7 µl N,N-二異丙基乙胺。在室溫下攪拌2小時後，濃縮反應物且殘餘物藉由HPLC純化。此得到10 mg (理論之56%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 1.08 min；MS (ESIpos): m/z = 821 $(M+H)^+$。

中間物F296

三氟乙酸/(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]-N-{2-[(2-{[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]胺基}乙基)磺醯基]乙基}丁醯胺(1:1)

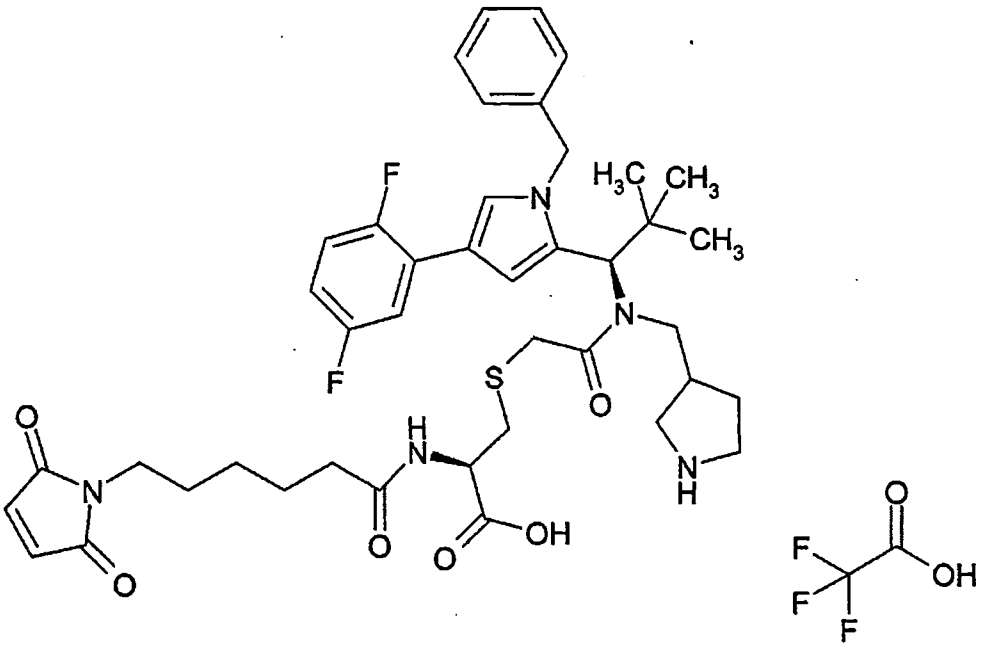


標題化合物自中間物L81，藉由在HATU及N,N-二異丙基乙胺存在下與中間物C58偶合來製備。在下一步中，Z保護基藉由在10%鈀/活性碳上在DCM/甲醇1:1中在室溫下在氫標準壓力下氫化30分鐘來移除。接著脫除保護基之中間物藉由在HATU及N,N-二異丙基乙胺存在下與(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙酸偶合且最終藉由用氯化鋅脫除保護基來轉變成標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.83 min ; MS (ESIpos): m/z = 785 $(M+H)^+$。

中間物F297

S-{2-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(吡咯啶-3-基甲基)胺基]-2-側氧基乙基}-N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]-L-半胱胺酸/三氟乙酸(1:1) (異構體1)

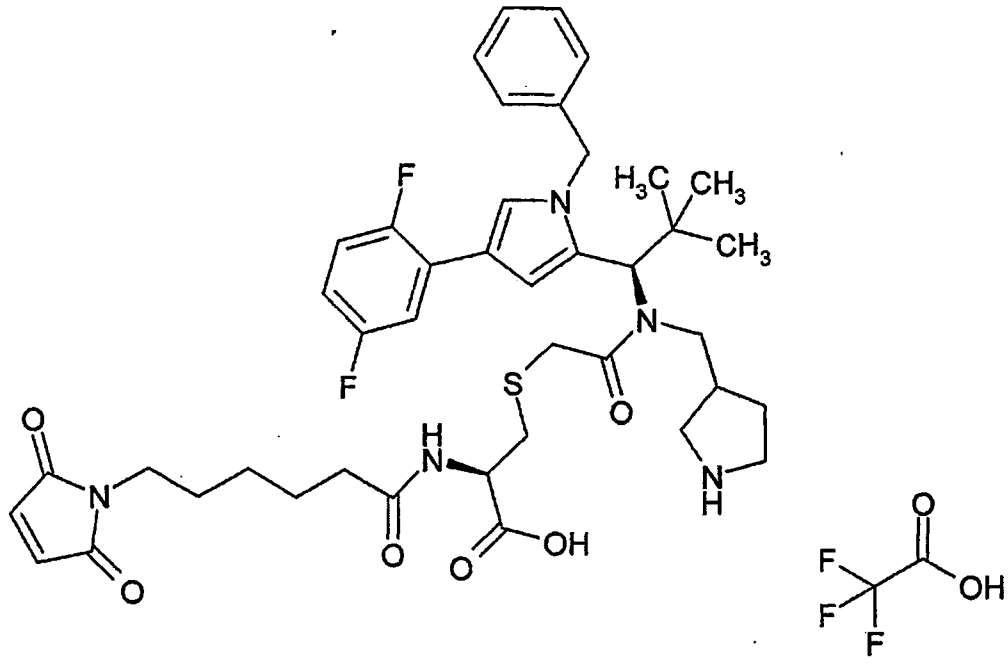


在氬氣下，將15 mg (0.11 mmol)氯化鋅添加至36 mg (0.03 mmol，68%純) S-[2-({(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}{[1-(第三丁氧羰基)吡咯啶-3-基]甲基}胺基)-2-側氧基乙基]-N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]-L-半胱胺酸(中間物C92)於0.74 ml 2,2,2-三氟乙醇中之溶液，且將反應混合物在50℃下攪拌7小時。接著添加32 mg (0.11 mmol) EDTA且將混合物攪拌15分鐘。將乙酸乙酯添加至反應混合物且有機相用水及飽和NaCl溶液重複洗滌。有機相經硫酸鎂乾燥且在減壓下蒸發溶劑。殘餘物藉由製備型HPLC純化。此得到6.4 mg (理論之25%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.95 min；MS (ESIpos): m/z = 792 $(M+H-CF_3CO_2H)^+$。

中間物F298

S-{2-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(吡咯啶-3-基甲基)胺基]-2-側氧基乙基}-N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]-L-半胱胺酸/三氟乙酸(1:1) (異構體2)

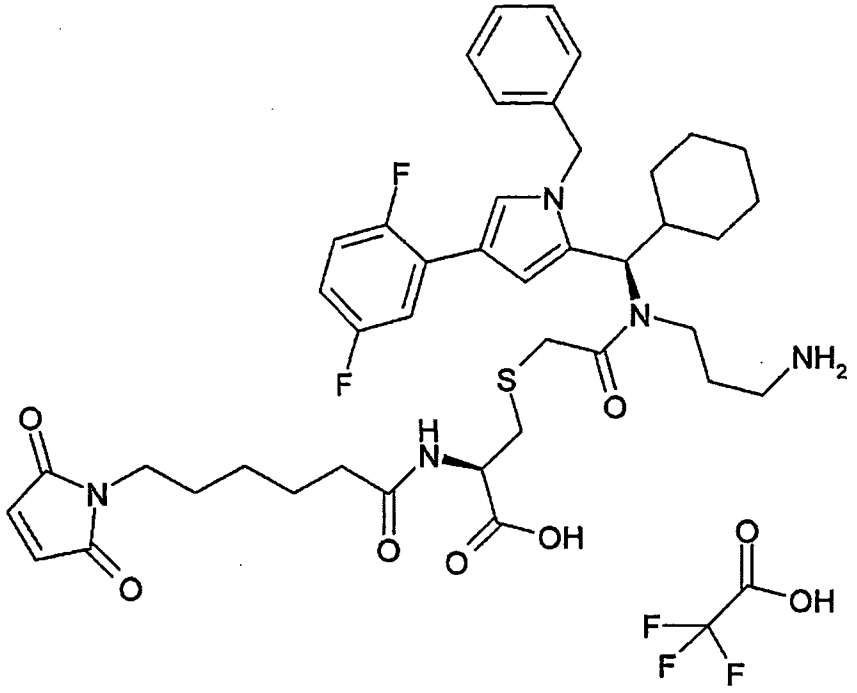


在氬氣下，將19 mg (0.14 mmol)氯化鋅添加至45 mg (0.04 mmol，71%純) S-[2-({(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}{[1-(第三丁氧羰基)吡咯啶-3-基]甲基}胺基)-2-側氧基乙基]-N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]-L-半胱胺酸(中間物C96)於0.94 ml 2,2,2-三氟乙醇中之溶液，且將反應混合物在50℃下攪拌3小時。接著添加42 mg (0.14 mmol) EDTA且將混合物攪拌15分鐘。將乙酸乙酯添加至反應混合物且有機相用水及飽和NaCl溶液重複洗滌。有機相經硫酸鎂乾燥且在減壓下蒸發溶劑。殘餘物藉由製備型HPLC純化。此得到5.7 mg (理論之18%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.96 min；MS (ESIpos): m/z = 791 $(M+H-CF_3CO_2H)^+$。

中間物F299

S-(2-{(3-胺基丙基)[(R)-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基](環己基)甲基]胺基}-2-側氧基乙基)-N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]-L-半胱胺酸/三氟乙酸(1:1)

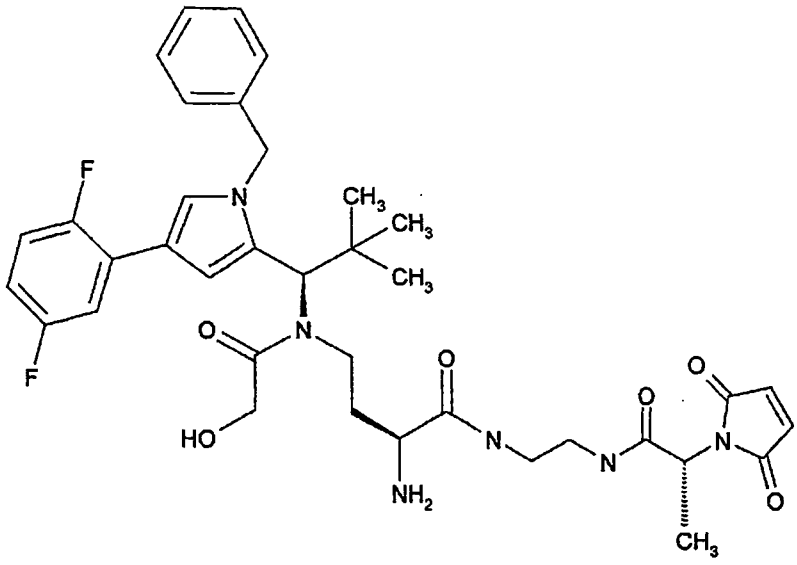


將76.8 mg (0.57 mmol)氯化鋅添加至88.0 mg (0.09 mmol) S-{11-[(R)-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基](環己基)甲基]-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基}-N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]-L-半胱胺酸(中間物C85)於1.88 ml 2,2,2-三氟乙醇中之溶液，且將反應混合物在50℃下攪拌3小時。接著添加164.6 mg (0.57 mmol) EDTA且將混合物攪拌15分鐘。將乙酸乙酯添加至反應混合物且有機相用水及飽和NaCl溶液重複洗滌。有機相經硫酸鈉乾燥且在減壓下蒸發溶劑。殘餘物藉由製備型HPLC純化。此得到31 mg (理論之35%)標題化合物。

LC-MS (方法12): R_t = 1.82 min；MS (ESIpos): m/z = 792 $(M+H)^+$。

中間物F300

(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]-N-(2-{[(2R)-2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)丙醯基]胺基}乙基)丁醯胺

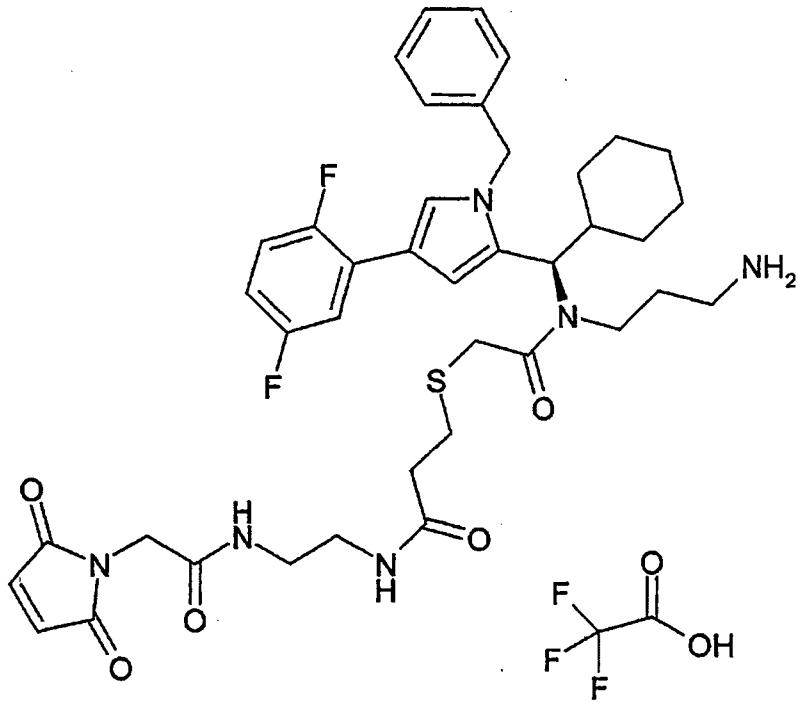


在氬氣下，將11 mg (0.08 mmol)氯化鋅添加至7 mg (0.08 mmol) {(2S)-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]-1-[(2-{[(2R)-2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)丙醯基]胺基}乙基)胺基]-1-側氧基丁-2-基}胺基甲酸2-(三甲基矽烷基)乙酯(中間物100)於0.2 ml 2,2,2-三氟乙醇中之溶液，且將反應混合物在50℃下攪拌8小時。接著添加14 mg (0.05 mmol) EDTA且將混合物攪拌15分鐘。將乙酸乙酯添加至反應混合物且有機相用水及飽和NaCl溶液重複洗滌。有機相經硫酸鎂乾燥且在減壓下蒸發溶劑。殘餘物藉由製備型HPLC純化。此得到1.6 mg (理論之27%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.88 min；MS (ESIpos): m/z = 707 $(M+H-CF_3CO_2H)^+$。

中間物F301

3-[(2-{(3-胺基丙基)[(R)-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基](環己基)甲基]胺基}-2-側氧基乙基)硫基]-N-(2-{[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]胺基}乙基)丙醯胺/三氟乙酸(1:1) (異構體1)

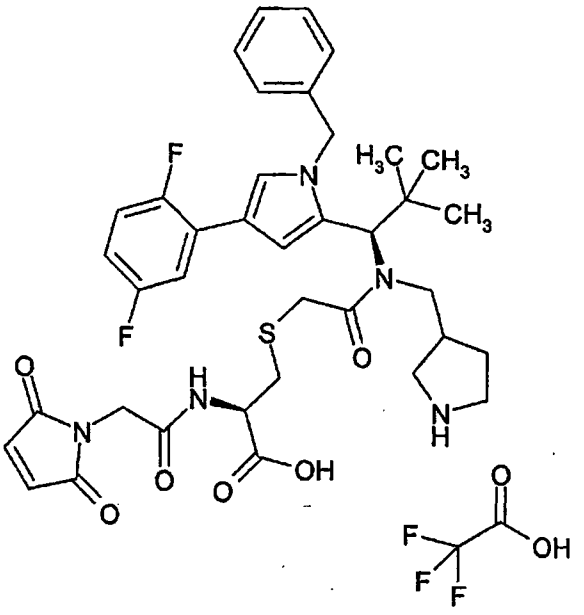


將37.32 mg (0.27 mmol)氯化鋅添加至41.40 mg (0.04 mmol) {13-[(R)-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基](環己基)甲基]-1-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-2,7,12-三側氧基-10-硫雜-3,6,13-三氮雜十六烷-16-基}胺基甲酸2-(三甲基矽烷基)乙酯(中間物C88)於0.92 ml 2,2,2-三氟乙醇中之溶液，且將反應混合物在50℃下攪拌3小時。接著添加80.02 mg (0.27 mmol) EDTA且將混合物攪拌15分鐘。將乙酸乙酯添加至反應混合物且有機相用水及飽和NaCl溶液重複洗滌。有機相經硫酸鈉乾燥且在減壓下蒸發溶劑。殘餘物藉由製備型HPLC純化。此得到9.6 mg (理論之24%)標題化合物。

LC-MS (方法12): R_t = 1.58 min ; MS (ESIpos): m/z = 763 $(M+H)^+$。

中間物F302

S-{2-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(吡咯啶-3-基甲基)胺基]-2-側氧基乙基}-N-[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]-L-半胱胺酸/三氟乙酸鹽(1:1) (異構體1)

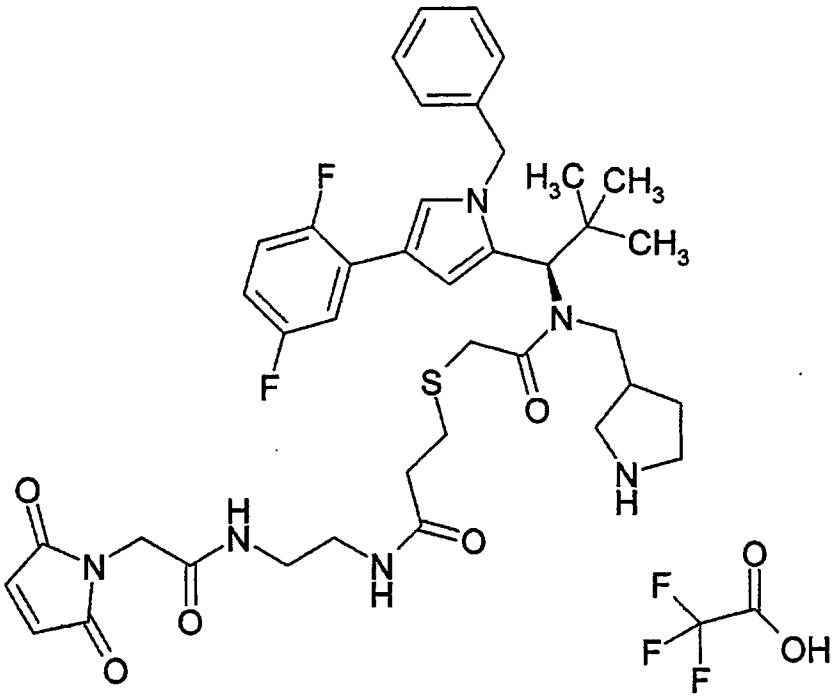


在氬氣下，將31.7 mg (0.23 mmol)氯化鋅添加至56.9 mg (58.2 mmol，85%純) S-[2-({(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}{[(1-(第三丁氧羰基)吡咯啶-3-基]甲基}胺基)-2-側氧基乙基]-N-[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]-L-半胱胺酸(中間物C99)於1.4 ml 2,2,2-三氟乙醇中之混合物，且將反應混合物在50℃下攪拌3小時。接著添加68.0 mg (0.23 mmol) EDTA且將混合物攪拌15分鐘。將乙酸乙酯添加至反應混合物且有機相用水及飽和NaCl溶液重複洗滌。有機相經硫酸鎂乾燥且在減壓下蒸發溶劑。殘餘物藉由製備型HPLC純化。此得到7 mg (理論之13%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.91 min；MS (ESIpos): m/z = 736 $(M+H-CF_3CO_2H)^+$。

中間物F303

3-({2-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(吡咯啶-3-基甲基)胺基]-2-側氧基乙基}硫基)-N-(2-{[(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯基]胺基}乙基)丙醯胺/三氟乙酸(1:1) (異構體2)

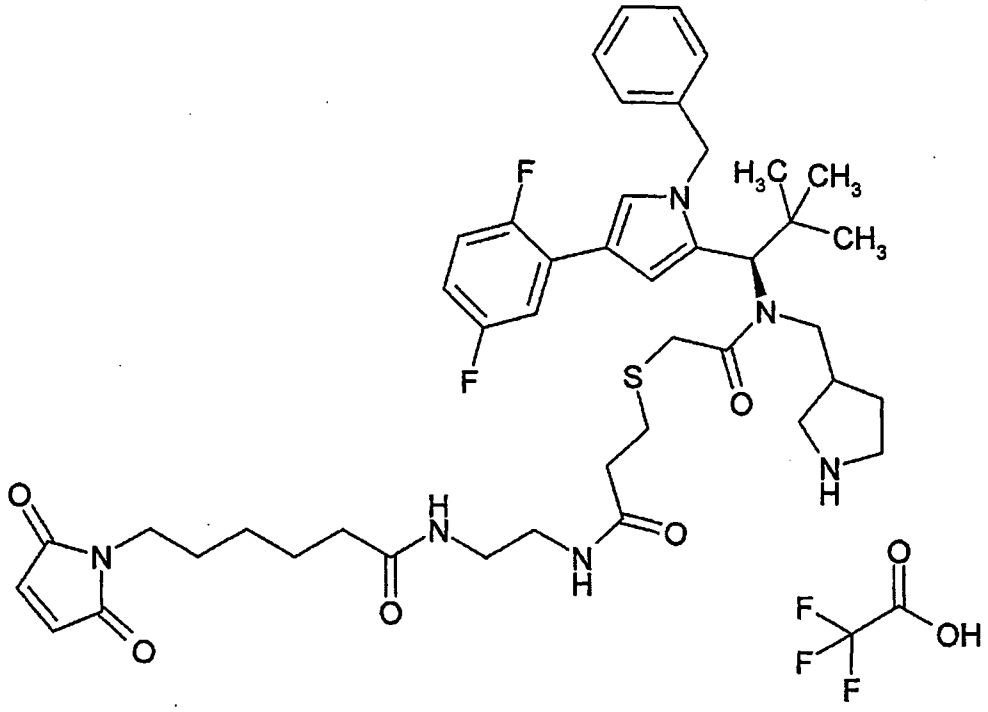


將16.7 mg (0.12 mmol)氯化鋅添加至26.4 mg (0.03 mmol) 3-[2-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-14-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-3,8,13-三側氧基-5-硫雜-2,9,12-三氮雜十四烷-1-基]吡咯啶-1-甲酸第三丁酯(中間物C103)於0.80 ml 2,2,2-三氟乙醇中之溶液，且將反應混合物在50℃下攪拌8小時。接著添加35.76 mg (0.12 mmol) EDTA且將混合物攪拌15分鐘。將乙酸乙酯添加至反應混合物且有機相用水及飽和NaCl溶液重複洗滌。有機相經硫酸鎂乾燥且在減壓下蒸發溶劑。殘餘物藉由製備型HPLC純化。此得到3.8 mg (理論之14%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 2.98 min；MS (ESIpos): m/z = 763 $(M+H-CF_3CO_2H)^+$。

中間物F304

N-(2-{[3-({2-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(吡咯啶-3-基甲基)胺基]-2-側氧基乙基}硫基)丙醯基]胺基}乙基)-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺/三氟乙酸(1:1) (異構體2)



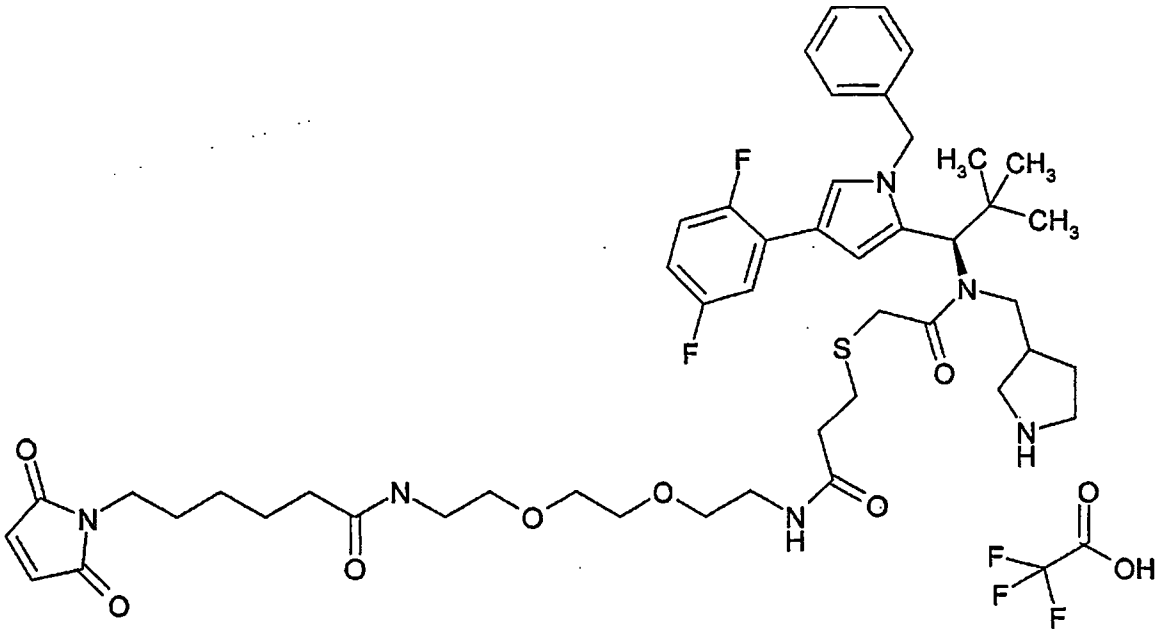
將13.2 mg (0.10 mmol)氯化鋅添加至22.3 mg (0.02 mmol) 3-[2-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-18-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-3,8,13-三側氧基-5-硫雜-2,9,12-三氮雜十八烷-1-基]吡咯啶-1-甲酸第三丁酯(中間物105)於0.64 ml 2,2,2-三氟乙醇中之溶液，且將反應混合物在50℃下攪拌8小時。接著添加28.36 mg (0.10 mmol) EDTA且將混合物攪拌15分鐘。將乙酸乙酯添加至反應混合物且有機相用水及飽和NaCl溶液重複洗滌。有機相經硫酸鎂乾燥且在減壓下蒸發溶劑。殘餘物藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 250×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)純化。此得到5 mg (理論之23%)標題化合物。

LC-MS (方法5): R_t 3.05 min；MS (ESIpos): m/z = 819 $(M+H-CF_3CO_2H)^+$。

中間物F305

N-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-22-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-6,17-二側氧基-N-(吡咯啶-3-基甲基)-10,13-二氧雜-3-硫雜-7,16-二氮雜二十二烷-1-醯胺/三氟

乙酸(1:1) (異構體2)



將13.42 mg (0.10 mmol)氯化鋅添加至24.80 mg (0.02 mmol) 3-[2-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-24-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-3,8,19-三側氧基-12,15-二氧雜-5-硫雜-2,9,18-三氮雜二十四烷-1-基]吡咯啶-1-甲酸第三丁酯(中間物C107)於0.65 ml 2,2,2-三氟乙醇中之溶液，且將反應混合物在50℃下攪拌8小時。接著添加28.78 mg (0.10 mmol) EDTA且將混合物攪拌15分鐘。將乙酸乙酯添加至反應混合物且有機相用水及飽和NaCl溶液重複洗滌。有機相經硫酸鎂乾燥且在減壓下蒸發溶劑。殘餘物藉由製備型HPLC純化。LC-MS (方法5): R_t = 3.11 min；MS (ESIpos): m/z = 907 $(M+H-CF_3CO_2H)^+$。

B：抗體藥物結合物(ADC)之製備

B-1. 用於產生抗-B7H3抗體之通用方法

US 6,965,018描述藉由融合瘤PTA-4058分泌之鼠類抗-B7H3抗體。已藉由標準方法(Precision Antibodies)確定此抗體之胺基酸序列及與人類IgG1之區域Ch1、Ch2及Ch3融合的Fv部分。為此，將編碼個別範圍之DNA序列插入至哺乳動物IgG表現載體中且接著如B-2下所

述表現。結果為鼠類PTA-4058之Fv部分與人類IgG1之Ch1、Ch2及Ch3區域的嵌合體，此處稱為TPP5706。

B-2. 用於哺乳動物細胞中表現抗-B7H3抗體之通用方法

抗體(例如TPP-3803及TPP-5706)係在哺乳動物細胞之短暫培養基中產生，如以下所述：Tom等人, Methods Express: Expression Systems第12章, Micheal R. Dyson及Yves Durocher編, Scion Publishing Ltd, 2007 (參見AK-實例1)。

B-3. 用於自細胞上清液純化抗體之通用方法

抗體(例如TPP-3803及TPP-5706)獲自細胞培養上清液。細胞上清液係藉由細胞離心來澄清。接著藉由在MabSelect Sure (GE Healthcare)層析管柱上進行親和層析來純化細胞上清液。為此目的，管柱在DPBS pH 7.4 (Sigma/Aldrich)中平衡，施加細胞上清液，且管柱用約10個管柱體積之DPBS pH 7.4 + 500 mM氯化鈉洗滌。抗體於50 mM乙酸鈉pH 3.5 + 500 mM氯化鈉中溶離且接著藉由在DPBS pH 7.4中在Superdex 200管柱(GE Healthcare)上進行凝膠過濾層析來進一步純化。

B-4. 用於與半胱胺酸側鏈偶合之通用方法

偶合反應使用以下抗體：

抗-B7H3 AK_{1A} (TPP-3803)

抗-B7H3 AK_{1B} (TPP-5706)

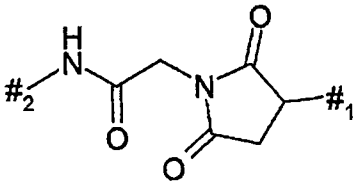
偶合反應通常在氬氣下進行。

將2當量與5當量之間的溶解於PBS緩衝液中之參(2-羧基乙基)膦鹽酸鹽(TCEP)添加至適當抗體於PBS緩衝液中之溶液中，該抗體的濃度範圍在1 mg/ml與20 mg/ml之間，較佳在約10 mg/ml至15 mg/ml之範圍內，且在室溫下攪拌混合物1小時。為此目的，所用相應抗體之溶液可在實施例中所述之濃度下使用，或其亦可視情況用PBS緩衝液稀

釋至約所述起始濃度之一半以便達成較佳濃度範圍。隨後，視預定負載量而定，添加待偶合的2至12當量(較佳約5-10當量)之順丁烯二醯亞胺前驅化合物或鹵化物前驅化合物於DMSO中之溶液。在此，DMSO之量不應超過總體積之10%。反應物在順丁烯二醯亞胺前驅物的情況下，在室溫下攪拌60-240分鐘且在鹵化物前驅物的情況下，在室溫下攪拌8小時至24小時，且接著施加至經PBS平衡之PD-10管柱(Sephadex® G-25，GE Healthcare)上且用PBS緩衝液溶離。一般而言，除非另外指明，否則使用PBS緩衝液中之5 mg相關抗體進行還原且隨後偶合。在PD10管柱上純化，從而在各種情況下得到相應ADC於3.5 ml PBS緩衝液中之溶液。接著藉由超速離心來濃縮樣品且視情況用PBS緩衝液再稀釋。必要時，為更好地移除低分子量組分，在用PBS緩衝液再稀釋之後，重複超濾濃縮。在生物測試中，必要時，視情況藉由再稀釋將最終ADC樣品之濃度調節至0.5-15 mg/ml範圍。測定實施例中所述的ADC溶液中之相應蛋白質濃度。另外，使用B-7下所述之方法測定抗體負載量(藥物/mAb比率)。

除非另外指明，否則實例中所示之免疫結合物藉由此方法製備。視連接子而定，實例中所示之ADC亦可呈連接至抗體之水解開鏈丁二醯胺形式以較低或較高之含量存在。

特定而言，經由連接子子結構連接至抗體硫醇基之KSP-I-ADC



視情況亦可藉由根據流程28，經由開鏈丁二醯胺連接之ADC，在偶合且在pH 8下攪拌約20-24小時之後再緩衝而以靶向方式製備。

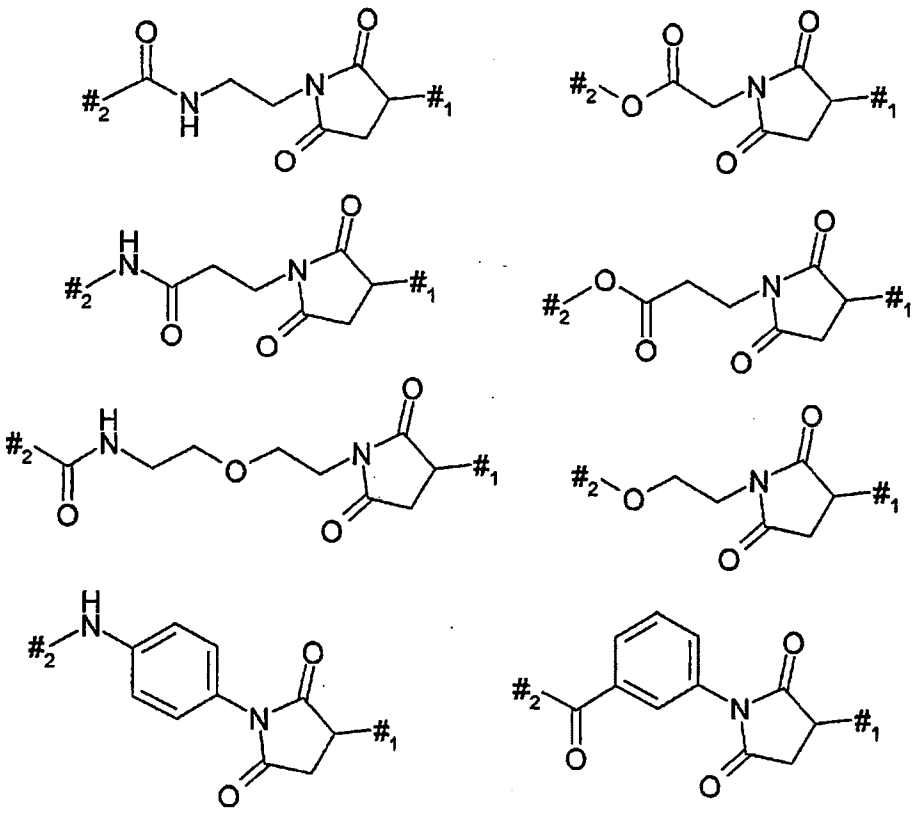
#1表示連至抗體之硫橋，且#2表示連至經修飾之KSP抑制劑的連接點。

其中連接子經由水解開鏈丁二醯胺連接至抗體之此類ADC亦可視情況藉由如下例示性程序以靶向方式製備：

在氬氣下，將0.344 mg TCEP於100 µl PBS緩衝液中之溶液添加至含60 mg相關抗體之5 ml PBS緩衝液(濃度約12 mg/ml)中。在室溫下攪拌反應物30分鐘，且接著添加溶解於600 µl DMSO中之0.003 mmol順丁烯二醯亞胺前驅化合物。在室溫下再攪拌1.5小時至2小時之後，反應物用1075 µl預先已調節至pH 8之PBS緩衝液稀釋。

接著將此溶液施加至已經PBS緩衝液pH 8平衡之PD-10管柱(Sephadex® G-25，GE Healthcare)上，且用PBS緩衝液pH 8溶離。溶離液用PBS緩衝液pH 8稀釋至14 ml總體積。此溶液在室溫下在氬氣下攪拌隔夜。必要時，接著將溶液再緩衝至pH 7.2。ADC溶液藉由超速離心來濃縮，用PBS緩衝液(pH 7.2)再稀釋且接著視情況再次濃縮至約10 mg/ml之濃度。

實施例中連至抗體之其他潛在水解敏感性噻烷基丁二醯亞胺橋含有以下連接子子結構，其中#1表示連至抗體之硫醚鍵且#2表示與經修飾之KSP抑制劑的連接點：



此等連接子子結構表示連至抗體之連接單元且(除連接子組成之外)對腫瘤細胞中所形成之代謝物的結構及型態具有顯著影響。

在所示結構式中，AK_{1A}具有以下含義

AK_{1A} = 抗-B7H3 AK_{1A} (部分還原)- S§[1]

AK_{1B} =抗-B7H3 AK_{1B} (部分還原)- S§

其中

§[1]表示連至丁二醯亞胺基團或連至任何異構體水解開鏈丁二醯胺之鍵或由其所產生之伸烷基，

且

S表示部分還原抗體之半胱胺酸殘基中的硫原子。

B-5. 用於與離胺酸側鏈偶合之通用方法

偶合反應使用以下抗體：

抗-B7H3 AK_{1A} (TPP-3803)

抗-B7H3 AK_{1B} (TPP-5706)

偶合反應通常在氬氣下進行。

將待偶合之2當量至8當量前驅化合物於DMSO中的溶液添加至相關抗體於PBS緩衝液中之溶液中，該抗體濃度範圍為1 mg/ml至20 mg/ml，較佳為約10 mg/ml，此視預定負載量而定。在室溫下攪拌30分鐘至6小時之後，再次添加含有相同量之前驅化合物的DMSO。在此，DMSO之量不應超過總體積之10%。在室溫下再攪拌30分鐘至6小時之後，將反應物施加至經PBS平衡之PD-10管柱(Sephadex® G-25，GE Healthcare)上且用PBS緩衝液溶離。一般而言，除非另外指明，否則使用PBS緩衝液中之5 mg相關抗體進行還原且隨後偶合。在PD10管柱上純化，從而在各種情況下得到相應ADC於3.5 ml PBS緩衝液中之溶液。接著藉由超速離心來濃縮樣品且視情況用PBS緩衝液再稀釋。必要時，為更好地移除低分子量組分，在用PBS緩衝液再稀釋之後，重複超濾濃縮。在生物測試中，必要時，視情況藉由再稀釋將最終ADC樣品之濃度調節至0.5-15 mg/ml範圍。

測定實施例中所述的ADC溶液中之相應蛋白質濃度。另外，使用B-7下所述之方法測定抗體負載量(藥物/mAb比率)。

在所示結構式中，AK_{2A}具有以下含義

AK_{2A} = 抗-B7H3 AK_{1A}- NH§^{2}

AK_{2B} =抗-B7H3 AK_{1B}- NH§^{2}

其中

§^{2}表示連至羰基之鍵

且

NH表示抗體之離胺酸殘基的側鏈胺基。

B-6a. 用於製備閉鏈丁二醯亞胺-半胱胺酸加合物之通用方法：

在一個例示性實施例中，使10 μmol上述順丁烯二醯亞胺前驅化合物溶解於3-5 ml DMF中，且添加2.1 mg (20 μmol) L-半胱胺酸。反應混合物在室溫下攪拌2小時至24小時，接著在減壓下濃縮且接著藉

由製備型HPLC純化。

B-6aa. 用於製備異構型開鏈丁二醯胺-半胱胺酸加合物之通用方法：

在一個例示性實施例中，將68 μmol上述順丁烯二醯亞胺前驅化合物溶解於15 ml DMF中，且添加36 mg (136 μmol) N-{[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}-L-半胱胺酸。將反應混合物在室溫下攪拌約20個小時，接著在減壓下濃縮且接著藉由製備型HPLC純化。合併適當溶離份且在減壓下蒸發溶劑，且接著使殘餘物溶於15 ml THF/水1:1中。添加131 μl 2 M氫氧化鋰水溶液且在室溫下攪拌反應物1小時。接著用1 M鹽酸中和反應物，在減壓下蒸發溶劑且殘餘物藉由製備型HPLC純化。由此得到理論值之約50%的經保護之區位異構型中間物，其呈無色泡沫狀。

在最後一步中，使0.023 mmol此等區位異構型水解產物溶於3 ml 2,2,2-三氟乙醇中。添加12.5 mg (0.092 mmol)氯化鋅，且將反應物在50℃下攪拌4小時。接著添加27 mg (0.092 mmol)乙二胺-N,N,N',N'-四乙酸，且在減壓下蒸發溶劑。藉由製備型HPLC純化殘餘物。濃縮適當溶離份且殘餘物自乙腈/水中凍乾，得到水解開鏈之硫基丁二醯胺，其呈區位異構體混合物形式。

本發明之結合物的進一步純化及表徵

反應之後，在一些情況下，例如藉由超濾，濃縮反應混合物，且接著脫鹽且藉由層析(例如使用Sephadex® G-25管柱)純化。溶離係使用(例如)磷酸鹽緩衝生理鹽水(PBS)進行。接著將溶液無菌過濾且冷凍。或者，可將結合物凍乾。

B-7. 抗體、發毒團負載量及開鏈半胱胺酸加合物之比例的測定

去糖基化及/或變性之後，除分子量測定之外，在蛋白質鑑別中，進行胰蛋白酶消化，其在變性、還原及衍生化之後，經由所發現之胰蛋白酶肽證實蛋白質的身分。

實施例中所述之結合物中所得之PBS緩衝溶液的發毒團負載量如下測定：

藉由個別結合物物質之分子量的質譜測定來測定經離胺酸連接之ADC中之發毒團負載量。在此，首先使用PNGaseF使抗體結合物發生去糖基化，且將樣品酸化且在HPLC分離/脫鹽之後，使用ESI-MicroTof$_Q$ (Bruker Daltonik)藉由質譜分析進行分析。將TIC (總離子層析圖)中信號上之所有光譜相加且基於MaxEnt解迴旋來計算不同結合物物質之分子量。不同物質之信號整合之後，接著計算DAR (=藥物/抗體比率)。

藉由還原及變性ADC之逆相層析來測定經半胱胺酸連接之結合物中的發毒團負載量。將鹽酸胍(GuHCl)(28.6 mg)及DL-二硫蘇糖醇(DTT)溶液(500 mM，3 µl)添加至ADC溶液(1 mg/ml，50 µl)中。將混合物在55℃下培育一小時且藉由HPLC加以分析。

在Agilent 1260 HPLC系統上進行HPLC分析，其中在220 nm下偵測。Polymer Laboratories PLRP-S聚合物逆相管柱(目錄號PL1912-3802)(2.1×150 mm，8 µm粒度，1000 Å)係在1 ml/min流速下在以下梯度下使用：0 min，25% B；3 min，25% B；28 min，50% B。移動相A由含0.05%三氟乙酸(TFA)之水組成，移動相B由含0.05%三氟乙酸之乙腈組成。

所偵測峰藉由非結合抗體之輕鏈(L0)與重鏈(H0)之滯留時間比較來分配。所結合樣品中排他性偵測出之峰分配給具有一個發毒團之輕鏈(L1)及具有一、兩及三個發毒團(H1、H2、H3)之重鏈。

抗體之發毒團平均負載量自藉由整合確定的峰面積計算為所有峰之發毒團數均加權整合結果之總和的雙倍除以所有峰之單個加權整合結果之總和。在個別情況中，由於一些峰出現共溶離，因此不可能準確測定發毒團負載量。

在輕鏈與重鏈無法藉由HPLC充分分離的情況下，藉由輕鏈及重鏈層面之個別結合物物質之分子量之質譜測定來測定經半胱胺酸連接之結合物之發毒團負載量。

將鹽酸胍(GuHCl)(28.6 mg)及DL-二硫蘇糖醇(DTT)溶液(500 mM，3 μl)添加至ADC溶液(1 mg/ml，50 μl)中。將混合物在55℃下培育一小時且在線上脫鹽之後，使用ESI-MicroTof$_Q$ (Bruker Daltonik)藉由質譜加以分析。

為測定DAR，在TIC (總離子層析圖)中，將信號上之所有光譜相加，且基於MaxEnt解迴旋來計算輕鏈及重鏈層面上不同結合物物質之分子量。抗體之發毒團平均負載量自藉由整合確定的分子量面積計算為所有峰之發毒團數均加權整合結果之總和的雙倍除以所有峰之單個加權整合結果之總和。

為測定開鏈半胱胺酸加合物之比例，測定所有單個結合輕鏈及重鏈變異體之閉鏈半胱胺酸加合物相對於開鏈半胱胺酸加合物(分子量Δ18道爾頓)的分子量面積比率。所有變異體之平均值產生開鏈半胱胺酸加合物之比例。

B-8. 檢查ADC之抗原結合

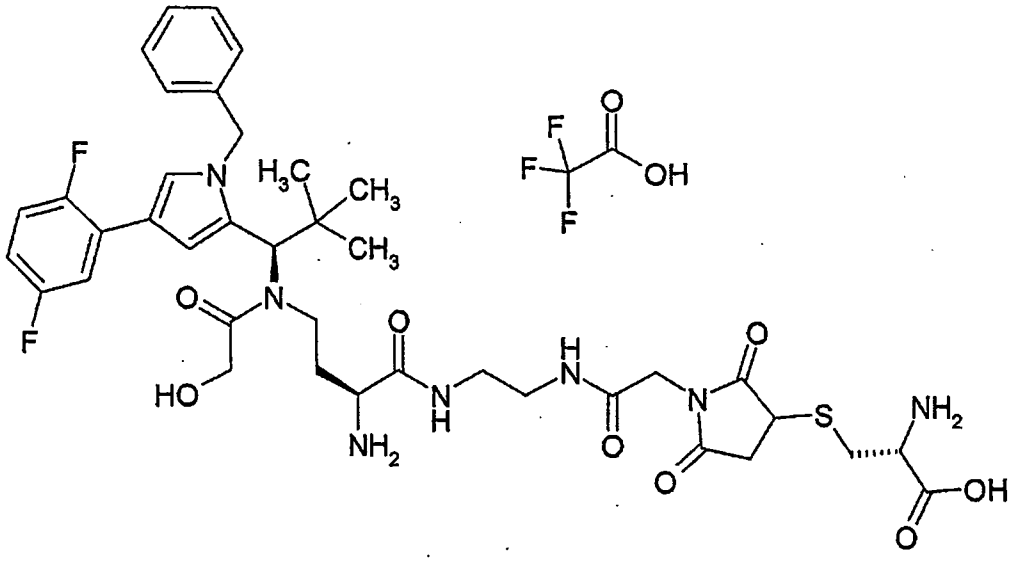
偶合已發生之後，檢查結合劑結合於標靶分子之能力。熟習此項技術者熟悉可用於達成此目的之多種方法，例如結合物之親和力可使用ELISA技術或表面電漿子共振分析(BIAcore™量測)來檢查。熟習此項技術者可使用慣用方法，例如對於抗體結合物，藉由蛋白質測定來量測結合物濃度。(亦參見Doronina等人; Nature Biotechnol. 2003; 21:778-784及Polson等人, Blood 2007; 1102:616-623)。

代謝物實施例

實例M1

S-[1-(2-{[2-({(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-

吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}胺基)乙基]胺基}-2-側氧基乙基)-2,5-二側氧基吡咯啶-3-基]-L-半胱胺酸/三氟乙酸(1:1)



使1.8 mg (2 μmol)中間物F104溶解於1 ml DMF中，且添加2.7 mg (22 μmol) L-半胱胺酸。將反應混合物在室溫下攪拌20小時，接著在減壓下濃縮且接著藉由製備型HPLC純化。剩餘0.6 mg (理論之26%)呈無色泡沫狀之標題化合物。

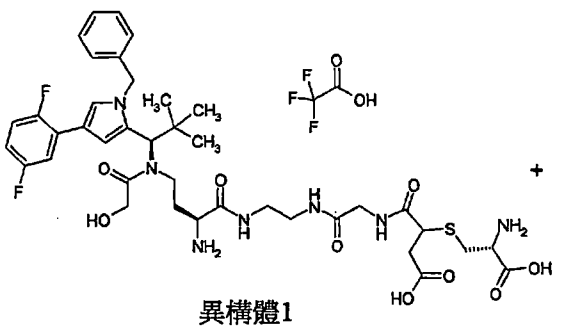
LC-MS (方法1): R_t = 0.80 min；MS (EIpos): m/z = 814 $[M+H]^+$。

實例M2

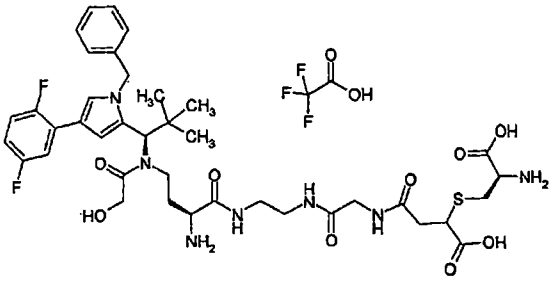
4-[(2-{[2-({(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}胺基)乙基]胺基}-2-側氧基乙基)胺基]-3-{[(2R)-2-胺基-2-羧基乙基]硫基}-4-側氧基丁酸/三氟乙酸(1:1)

及

4-[(2-{[2-({(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}胺基)乙基]胺基}-2-側氧基乙基)胺基]-2-{[(2R)-2-胺基-2-羧基乙基]硫基}-4-側氧基丁酸/三氟乙酸(1:1)



異構體1



異構體2

LC-MS (方法1): R_t = 0.80 min；MS (EIpos): m/z = 814 $[M+H]^+$。

首先，在DMF中在N,N-二異丙基乙胺存在下將L-半胱胺酸用1-({[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}氧基)吡咯啶-2,5-二酮轉變成N-{[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}-L-半胱胺酸。

使406 mg (1.53 mmol) N-{[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}-L-半胱胺酸溶於10 ml DMF中，添加157.5 mg (1.606 mmol)順丁烯二酸酐且將反應在室溫下攪拌1小時。將7.5 mg (0.01 mmol)中間物C66添加至130 µl此溶液，且將反應在室溫下攪拌5分鐘。接著在減壓下濃縮混合物，且殘餘物藉由製備型HPLC純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到10 mg (89%)經保護之中間物；藉由HPLC或藉由LC-MS均可分離區位異構體。

LC-MS (方法1): R_t = 1.38 min；MS (EIpos): m/z = 1120 $[M+H]^+$。

在最後一步中，使10 mg此中間物溶於2 ml 2,2,2-三氟乙醇中。添加12 mg (0.088 mmol)氯化鋅，且將反應在50℃下攪拌30分鐘。接著添加26 mg (0.088 mmol)乙二胺-N,N,N',N'-四乙酸，且在減壓下蒸發溶劑。殘餘物藉由製備型HPLC純化。濃縮適當溶離份且自乙腈/水凍乾殘餘物，得到8.3 mg (理論之99%)呈區位異構體混合物形式之標題化合物，比率為87:13。

LC-MS (方法5): R_t = 2.3 min及2.43 min；MS (ESIpos): m/z = 832 $(M+H)^+$。

^{1}H-NMR主要區位異構體: (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 8.7 (m, 1H), 8.5 (m, 2H), 8.1 (m, 1H), 7.6 (m, 1H), 7.5 (s, 1H) 7.4-7.15 (m, 6H), 6.9-7.0 (m, 1H), 6.85 (s, 1H), 5.61 (s, 1H), 4.9及5.2 (2d, 2H), 4.26及4.06 (2d, 2H), 3.5-3.8 (m, 5H), 3.0-3.4 (m, 5H), 2.75-3.0 (m, 3H), 2.58及2.57 (dd, 1H), 0.77及1,5 (2m, 2H), 0.81 (s, 9H)。

或者，區位異構型標題化合物如下製備：

為此，在DMF中在N,N-二異丙基乙胺存在下首先將L-半胱胺酸用1-({[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}氧基)吡咯啶-2,5-二酮轉變成N-{[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}-L-半胱胺酸。

使55 mg (0.068 mmol)中間物F104及36 mg (0.136 mmol) N-{[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}-L-半胱胺酸溶於15 ml DMF中，且將混合物在室溫下攪拌20小時。接著濃縮混合物且殘餘物藉由製備型HPLC純化。合併適當溶離份且溶劑在減壓下蒸發，且接著殘餘物溶於15 ml THF/水1:1中。添加131 µl 2M氫氧化鋰水溶液且將反應在室溫下攪拌1小時。接著反應物用1M鹽酸中和，在減壓下蒸發溶劑且殘餘物藉由製備型HPLC純化。此得到37 mg (理論之50%)呈無色泡沫狀之區位異構型經保護之中間物。

LC-MS (方法5): R_t = 3.33 min及3.36 min；MS (ESIpos): m/z = 976 $(M+H)^+$。

在最後一步中，使25 mg (0.023 mmol)此中間物溶於3 ml 2,2,2-三氟乙醇中。添加12.5 mg (0.092 mmol)氯化鋅，且將反應在50℃下攪拌4小時。接著添加27 mg (0.092 mmol)乙二胺-N,N,N',N'-四乙酸，且在減壓下蒸發溶劑。殘餘物藉由製備型HPLC純化。濃縮適當溶離份且自乙腈/水凍乾殘餘物，得到18.5 mg (理論之85%)呈區位異構體混合物形式之標題化合物，比率為21:79.

LC-MS (方法5): R_t = 2.37 min及3.44 min；MS (ESIpos): m/z =

832 $(M+H)^+$。

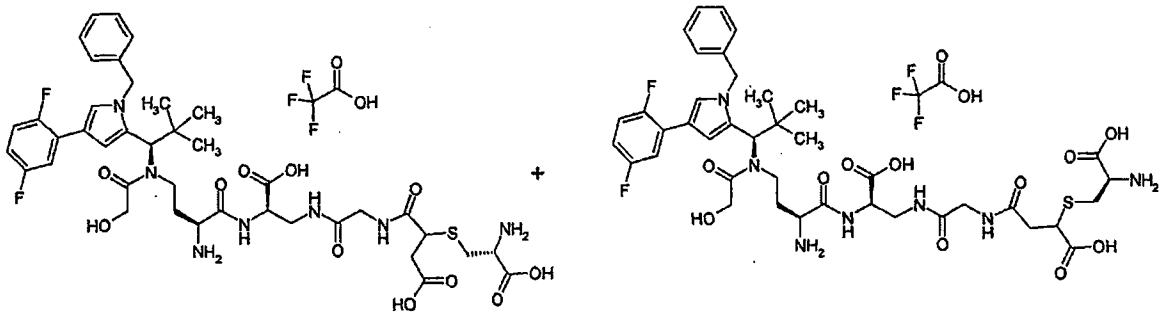
標題化合物之個別區位異構體之目標製備如下進行：

實例M3

4-[(2-{[(2R)-2-({(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}胺基)-2-羧基乙基]胺基}-2-側氧基乙基)胺基]-3-{[(2R)-2-胺基-2-羧基乙基]硫基}-4-側氧基丁酸/三氟乙酸(1:1)

及

4-[(2-{[(2R)-2-({(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}胺基)-2-羧基乙基]胺基}-2-側氧基乙基)胺基]-2-{[(2R)-2-胺基-2-羧基乙基]硫基}-4-側氧基丁酸/三氟乙酸(1:1)



首先，在DMF中在*N*,*N*-二異丙基乙胺存在下將L-半胱胺酸用1-({[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}氧基)吡咯啶-2,5-二酮轉變成N-{[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}-L-半胱胺酸。

使11 mg (0.013 mmol)中間物F193及8 mg (0.016 mmol) N-{[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}-L-半胱胺酸溶於3 ml DMF中，且將混合物在室溫下攪拌20小時。接著濃縮混合物且殘餘物藉由製備型HPLC純化。

合併適當溶離份且溶劑在減壓下蒸發，且接著溶於2 ml THF/水1:1中之殘餘物。添加19 µl 2M氫氧化鋰水溶液且將反應在室溫下攪拌

1小時。接著添加另外19 µl 2M氫氧化鋰水溶液且將反應在室溫下攪拌隔夜。接著用1M 鹽酸中和混合物，在減壓下蒸發溶劑且殘餘物藉由製備型HPLC純化。此得到4.1 mg (理論之38%)呈無色泡沫狀之區位異構型經保護之中間物。

LC-MS (方法1): R_t = 1.03 min (寬)；MS (ESIpos): m/z = 1020 $(M+H)^+$。

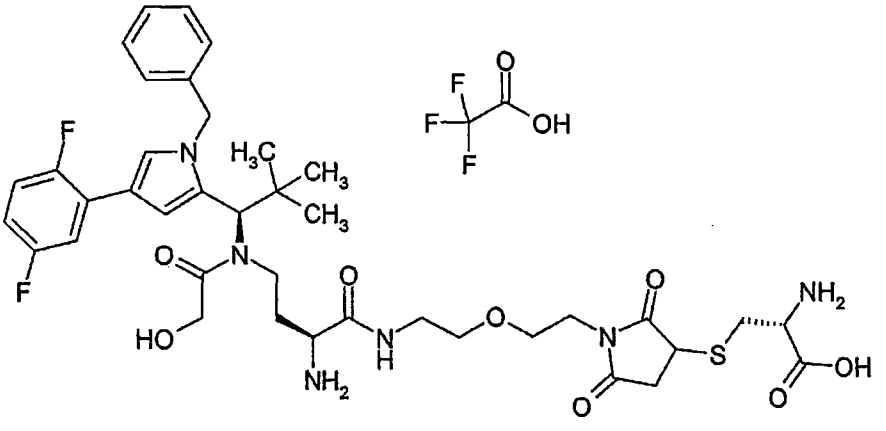
在最後一步中，使4.1 mg (0.004 mmol)此中間物溶於3 ml 2,2,2-三氟乙醇中。添加3 mg (0.022 mmol)氯化鋅，且將反應在50℃下攪拌1小時。接著添加6 mg (0.022 mmol)乙二胺-N,N,N',N'-四乙酸及2 ml 0.1%濃度三氟乙酸水溶液，且在減壓下蒸發溶劑。殘餘物藉由製備型HPLC純化。濃縮適當溶離份且自乙腈/水凍乾殘餘物，得到5 mg (定量)呈區位異構體混合物形式之標題化合物，比率為20:80。

LC-MS (方法1): R_t = 0.78 min (broad)；MS (ESIpos): m/z = 876 $(M+H)^+$。

LC-MS (方法5): R_t = 2.36 min及2.39 min；MS (ESIpos): m/z = 876 $(M+H)^+$。

實例M4

S-(1-{2-[2-({(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}胺基)乙氧基]乙基}-2,5-二側氧基吡咯啶-3-基)-L-半胱胺酸/三氟乙酸(1:1)



使3 mg (4 μmol)中間物F248溶解於2 ml DMF中，且添加0.9 mg (8 μmol) L-半胱胺酸。將反應混合物在室溫下攪拌18小時且接著在減壓下濃縮。殘餘物藉由製備型HPLC純化。濃縮適當溶離份，在自殘餘物乙腈/水濃縮後，得到1.1 mg (理論之32%)呈白色固體狀之標題化合物。

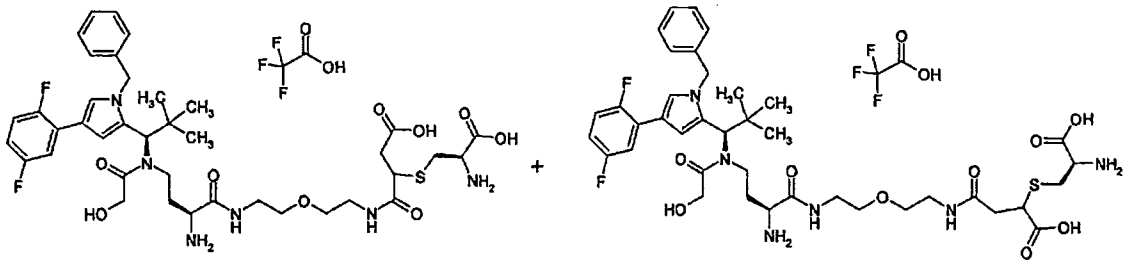
LC-MS (方法1): R_t = 0.78 min；MS (EIpos): m/z = 801 $[M+H]^+$。

實例M5

(3R,7S)-7-胺基-17-{[(2R)-2-胺基-2-羧基乙基]硫基}-3-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-4-乙二醇醯基-2,2-二甲基-8,16-二側氧基-12-氧雜-4,9,15-三氮雜十九烷-19-酸/三氟乙酸(1:1)

及

(3R,7S)-7-胺基-18-{[(2R)-2-胺基-2-羧基乙基]硫基}-3-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-4-乙二醇醯基-2,2-二甲基-8,16-二側氧基-12-氧雜-4,9,15-三氮雜十九烷-19-酸/三氟乙酸(1:1)



使8 mg (0.010 mmol)中間物F248之經保護之中間物及5.1 mg (0.02 mmol) N-{[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}-L-半胱胺酸溶於3 ml DMF中，且將混合物在室溫下攪拌18小時且接著在超音波浴中處理2小時。接著濃縮混合物且殘餘物藉由製備型HPLC純化。合併適當溶離份且溶劑在減壓下蒸發，且接著殘餘物溶於2 ml THF/水1:1中。添加15 μl 2M氫氧化鋰水溶液且將反應在室溫下攪拌15分鐘。接著反應用1M鹽酸調至約pH 3，用20 ml氯化鈉溶液稀釋，且用20 ml乙酸乙酯萃取兩次。有機相經硫酸鎂乾燥且濃縮，且殘餘物自乙腈/水凍乾。

此得到8.4 mg (2步理論之78%)呈無色泡沫狀之區位異構型經保護之中間物。

LC-MS (方法1): R_t = 1.44 min及3.43 min；MS (ESIpos): m/z = 1107 $(M+H)^+$。

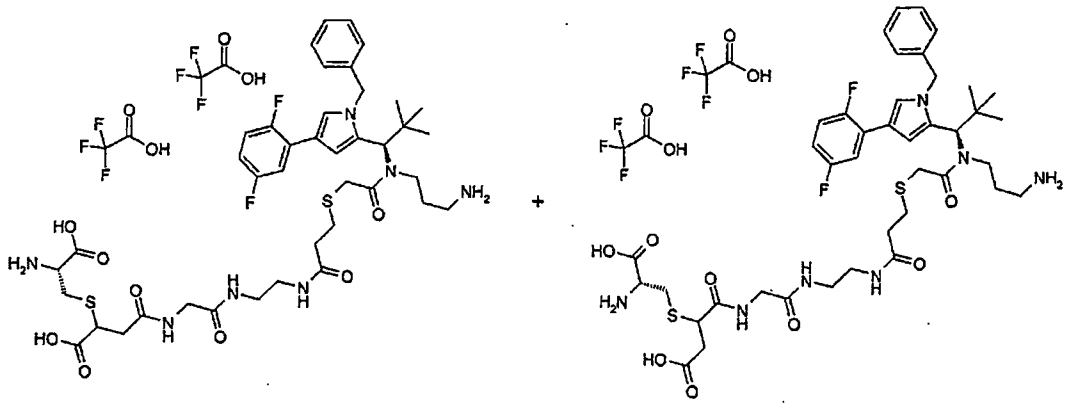
在最後一步中，使8 mg (0.007 mmol)此中間物溶於5 ml 2,2,2-三氟乙醇中。添加9.8 mg (0.072 mmol)氯化鋅，且將反應在50℃下攪拌1.5小時。接著添加乙二胺-N,N,N',N'-四乙酸，且在減壓下蒸發溶劑。殘餘物藉由製備型HPLC純化。濃縮適當溶離份且自乙腈/水凍乾殘餘物，得到4 mg (理論之59%)呈區位異構體混合物形式之標題化合物，比率為31:67。

LC-MS (方法1): R_t = 0.79 min及0.81 min；MS (ESIpos): m/z = 819 $(M+H)^+$。

實例M6

2-{[(2R)-2-胺基-2-羧基乙基]硫基}-4-({(14R)-13-(3-胺基丙基)-14-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-15,15-二甲基-2,7,12-三側氧基-10-硫雜-3,6,13-三氮雜十六烷-1-基}胺基)-4-側氧基丁酸/三氟乙酸(1:2)及

3-{[(2R)-2-胺基-2-羧基乙基]硫基}-4-({(14R)-13-(3-胺基丙基)-14-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-15,15-二甲基-2,7,12-三側氧基-10-硫雜-3,6,13-三氮雜十六烷-1-基}胺基)-4-側氧基丁酸/三氟乙酸(1:2)



使18 mg (0.021 mmol)中間物F213及11.2 mg (0.04 mmol) N-{[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}-L-半胱胺酸溶於2 ml DMF中，且將混合物在室溫下攪拌18小時。在減壓下濃縮反應混合物。殘餘物(21.2 mg)溶於3 ml THF/水1:1中。添加0.04 ml 2M氫氧化鋰水溶液且將反應在室溫下攪拌3小時。添加0.02 ml 2M氫氧化鋰水溶液且將反應在室溫下攪拌1小時。接著使用7.2 mg (0.12 mmol)乙酸將反應調至約pH 7。反應混合物直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 125×30；10 µ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水；0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到13 mg (2步57%)區位異構型經保護之中間物。

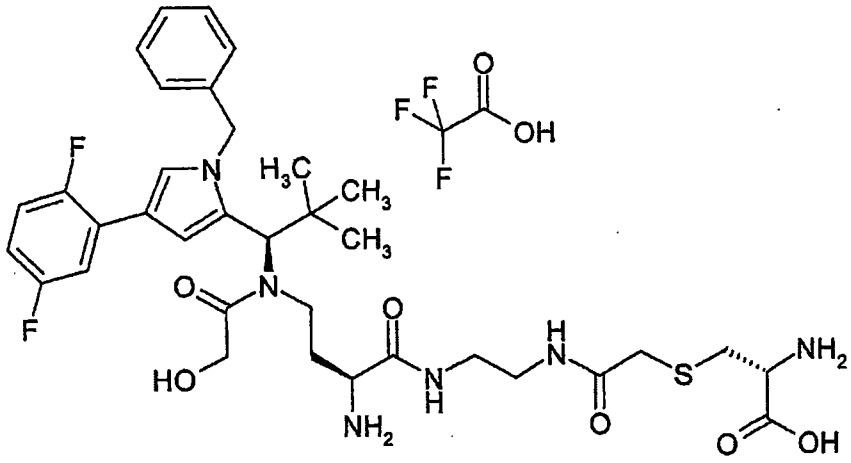
LC-MS (方法1): R_t = 1.03 min；MS (ESIpos): m/z = 1020 $(M+H)^+$。

在最後一步中，使13 mg (0.01 mmol)此中間物溶於2 ml 2,2,2-三氟乙醇中。添加6.2 mg (0.05 mmol)氯化鋅，且將反應在50℃下攪拌7小時。接著添加13.3 mg (0.05 mmol)乙二胺-N,N,N',N'-四乙酸，且產物藉由製備型HPLC純化。濃縮適當溶離份且自乙腈/水凍乾殘餘物，得到10.3 mg (81.4%)呈區位異構體混合物形式之標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 1.03 min；MS (ESIpos): m/z = 875 $(M+H)^+$。

實例M7

S-(2-{[2-({(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}胺基)乙基]胺基}-2-側氧基乙基)-L-半胱胺酸/三氟乙酸(1:1)

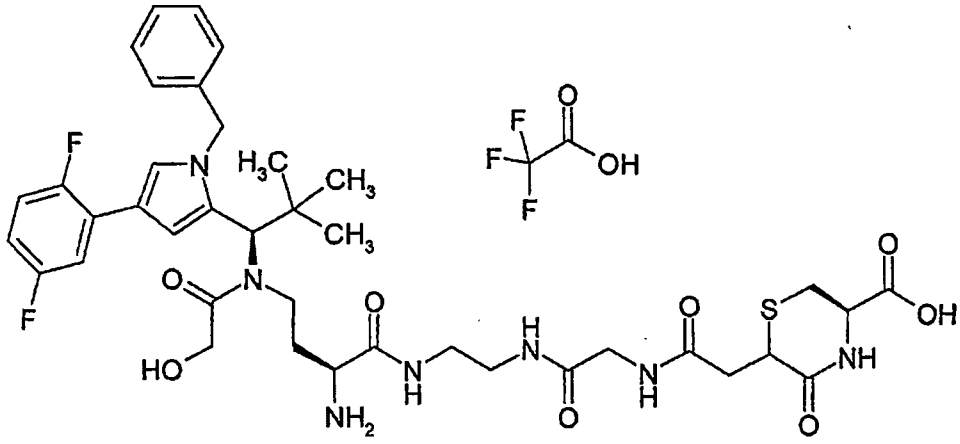


使6 mg (8 μmol)中間物F119溶解於3 ml DMF中，且添加1.8 mg (15 μmol) L-半胱胺酸。將反應混合物在室溫下攪拌6小時且接著靜置於室溫下3天。接著在減壓下濃縮反應物，且產物藉由製備型HPLC純化。

LC-MS (方法1): R_t = 0.81 min ; MS (ESIpos): m/z = 717 $(M+H)^+$。

實例M8

(3R)-6-{(11S,15R)-11-胺基-15-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-14-乙二醇醯基-16,16-二甲基-2,5,10-三側氧基-3,6,9,14-四氮雜十七烷-1-基}-5-側氧基硫嗎啉-3-甲酸/三氟乙酸(1:1)



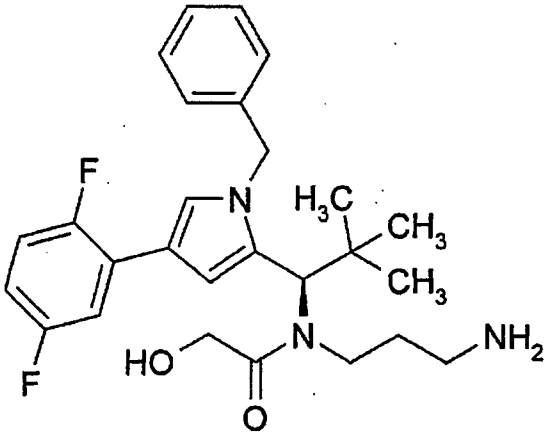
使來自實例135之4 mg (0.004 mmol)化合物溶於4 ml THF/水中，

且添加48 µl 2莫耳濃度氫氧化鋰水溶液。將反應在室溫下攪拌1小時且接著濃縮且藉由製備型HPLC純化。合併，濃縮且自乙腈/水凍乾適當溶離份，得到2.4 mg (理論之60%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.86 min；MS (EIpos): m/z = 814 $[M+H]^+$。

實例M9

N-(3-胺基丙基)-N-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2-羥基乙醯胺



150.0 mg (0.42 mmol) (1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙-1-胺(中間物C52)最初饋入2.0 ml二氯甲烷中，且添加29.2 mg (0.49 mmol) HOAc及125.6 mg (0.59 mmol)三乙醯氧基硼氫化鈉且將混合物在室溫下攪拌5分鐘。添加98.9 mg (0.49 mmol) 3-(1,3-二側氧基-1,3-二氫-2H-異吲哚-2-基)丙醛。將反應混合物在室溫下攪拌隔夜。反應混合物用乙酸乙酯稀釋且有機相用飽和碳酸鈉溶液洗滌兩次且用飽和NaCl溶液洗滌一次。經硫酸鎂乾燥後，在減壓下蒸發溶劑且殘餘物在矽膠(移動相：二氯甲烷/甲醇100:1)上純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到188.6 mg (74%)化合物2-[3-({(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基)丙基]-1H-異吲哚-1,3(2H)-二酮。

LC-MS (方法1): R_t = 1.00 min；MS (ESIpos): m/z = 541 $[M+H]^+$。

171.2 mg (0.32 mmol) 2-[3-({(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基)丙基]-1H-異吲哚-1,3(2H)-二酮最初饋入5.0 ml二氯甲烷中，且添加73.6 mg (0.73 mmol)三乙胺。在0℃下，添加94.9 mg (0.70 mmol)乙醯氧基乙醯氯，且將反應混合物在室溫下攪拌隔夜。反應混合物用乙酸乙酯稀釋且有機相用飽和碳酸氫鈉溶液洗滌兩次且用飽和NaCl溶液洗滌一次。經硫酸鎂乾燥後，在減壓下蒸發溶劑且殘餘物使用Biotage Isolera (矽膠，管柱10 g SNAP，流動速率12 ml/min，乙酸乙酯/環己烷1:3)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到159.0 mg (77%)化合物乙酸2-({(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}[3-(1,3-二側氧基-1,3-二氫-2H-異吲哚-2-基)丙基]胺基)-2-側氧基乙酯。

LC-MS (方法1): R_t = 1.35 min；MS (ESIpos): m/z = 642 $[M+H]^+$。

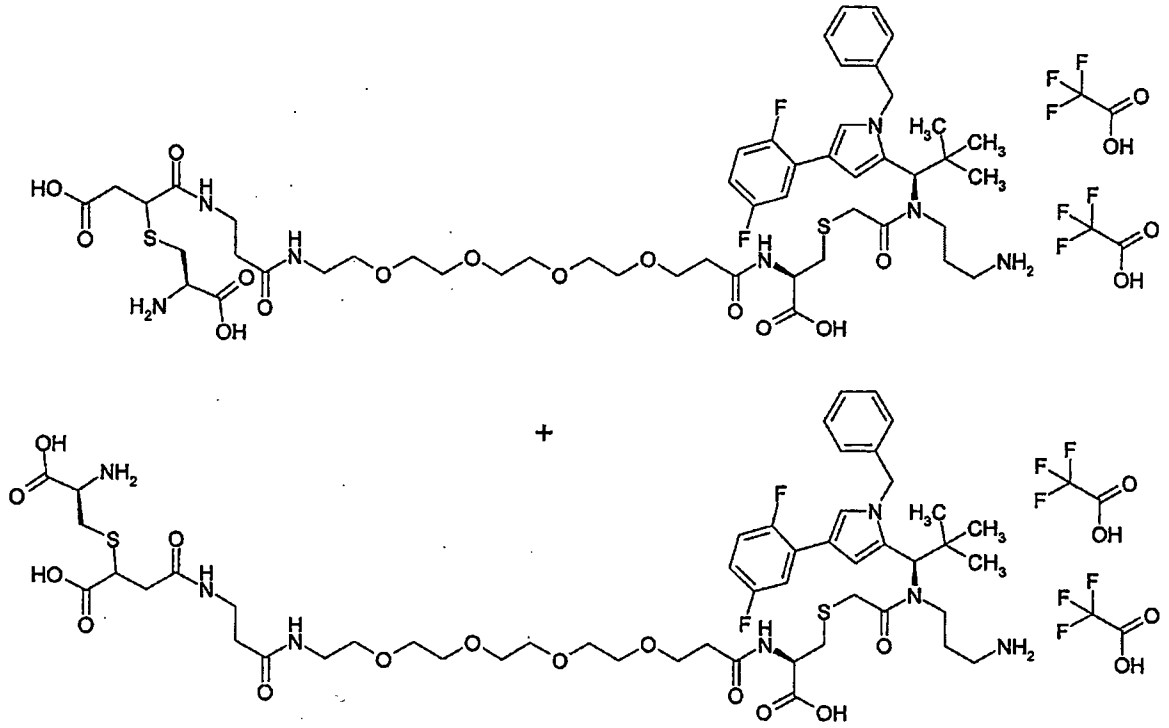
147.2 mg (0.23 mmol)乙酸2-({(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}[3-(1,3-二側氧基-1,3-二氫-2H-異吲哚-2-基)丙基]胺基)-2-側氧基乙酯最初饋入4.0 ml乙醇中，且添加356.2 mg (4.59 mmol)甲胺(40%於水中)。將反應混合物在50℃下攪拌隔夜。在減壓下蒸發溶劑且殘餘物與甲苯共蒸餾三次。殘餘物在矽膠上純化(移動相：二氯甲烷/甲醇= 10:1)。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到67.4 mg (63%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.91 min；MS (ESIpos): m/z = 470 $[M+H]^+$。

實例M10

(2R,28R)-28-胺基-2-[({2-[(3-胺基丙基){(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基]-2-側氧基乙基}硫基)甲基]-25-(羧基甲基)-4,20,24-三側氧基-7,10,13,16-四氧雜-26-硫雜-

3,19,23-三氮雜二十九烷-1,29-二酸/三氟乙酸(1:2)及(1R,28R,34R)-1-胺基-33-(3-胺基丙基)-34-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-35,35-二甲基-6,10,26,32-四側氧基-14,17,20,23-四氧雜-3,30-二硫雜-7,11,27,33-四氮雜三十六烷-1,4,28-三甲酸/三氟乙酸(1:2)



使20 mg (0.018 mmol) R-{2-[(3-胺基丙基){(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基]-2-側氧基乙基}-N-[19-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-17-側氧基-4,7,10,13-四氧雜-16-氮雜十九烷-1-醯基]-L-半胱胺酸/三氟乙酸(1:1) (中間物F209)及9.78 mg (0.036 mmol) N-{[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}-L-半胱胺酸溶於2 ml DMF中，且將混合物在室溫下攪拌18小時。在減壓下濃縮反應混合物。殘餘物(47.7 mg)溶於3 ml THF/水1:1中。添加0.08 ml 2M氫氧化鋰水溶液且將反應在室溫下攪拌1小時。接著使用9.26 mg (0.15 mmol)乙酸將反應調至約pH 7。反應混合物直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 125×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水；0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到15.3 mg (2步29%)區位異構型經保護之中間物。

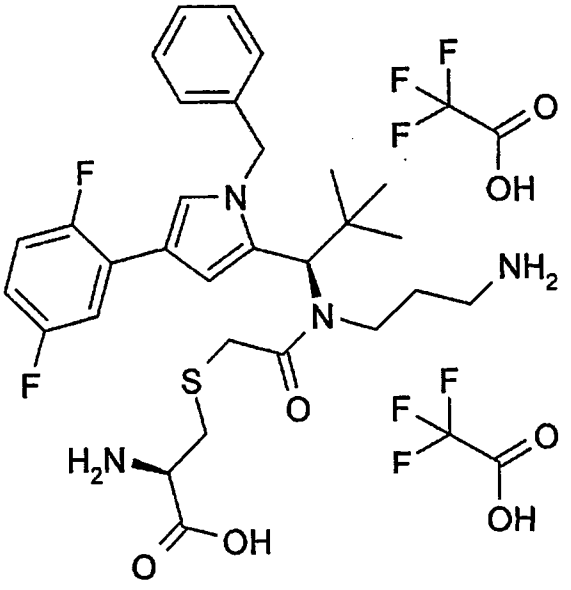
LC-MS (方法6): R_t = 12.26 min及12.30min；MS (ESIpos): m/z = 1254 $(M+H)^+$。

在最後一步中，使15.3 mg (0.01 mmol)此中間物溶於2 ml 2,2,2-三氟乙醇中。添加6.1 mg (0.05 mmol)氯化鋅，且將反應在50℃下攪拌2小時。接著添加13.1 mg (0.05 mmol)乙二胺-N,N,N',N'-四乙酸，且產物藉由製備型HPLC純化。濃縮適當溶離份且自乙腈/水凍乾殘餘物，得到11.9 mg (79.5%)呈區位異構體混合物形式之標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.85 min；MS (ESIpos): m/z = 1110 $(M+H)^+$。

實例M11

S-{2-[(3-胺基丙基){(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基]-2-側氧基乙基}-L-半胱胺酸/三氟乙酸(1:2)



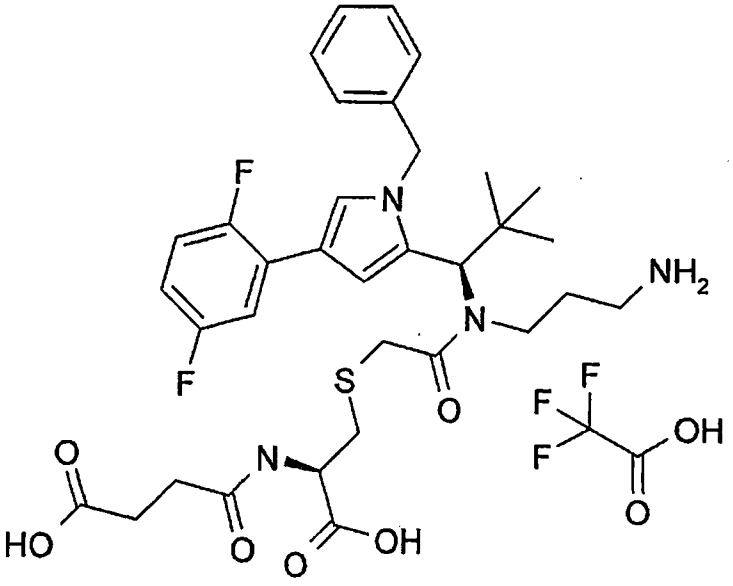
使15.0 mg (0.018 mmol) S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-L-半胱胺酸/三氟乙酸(1:1) (中間物C71)溶於1.0 ml三氟乙醇中，且添加7.4 mg (0.054 mmol)二氯化鋅。將反應混合物在50℃下攪拌隔夜。添加15.8 mg (0.054 mmol)乙二胺-N,N,N',N'-四乙酸，將反應混合物攪拌10分鐘且接著添加水(0.1%

TFA)。直接藉由製備型進行RP-HPLC (管柱：Reprosil 125×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到11.1 mg (77%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.83 min；MS (ESIpos): m/z = 573 $(M+H)^+$。

實例M12

4-{[(1R)-2-({2-[(3-胺基丙基){(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基]-2-側氧基乙基}硫基)-1-羧基乙基]胺基}-4-側氧基丁酸/三氟乙酸(1:1)



使12.2 mg (0.014 mmol) S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-N-(4-第三丁氧基-4-側氧基丁醯基)-L-半胱胺酸(中間物Cx)溶於2.0 ml三氟乙醇中，且添加11.4 mg (0.084 mmol)二氯化鋅。將反應混合物在50℃下攪拌3小時。添加24.5 mg (0.084 mmol)乙二胺-N,N,N',N'-四乙酸，將反應混合物攪拌10分鐘且接著添加水(0.1% TFA)。純化直接藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 125×30；10 μ，流動速率：50 ml/min，MeCN/水，0.1% TFA)進行。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。此得到4.6

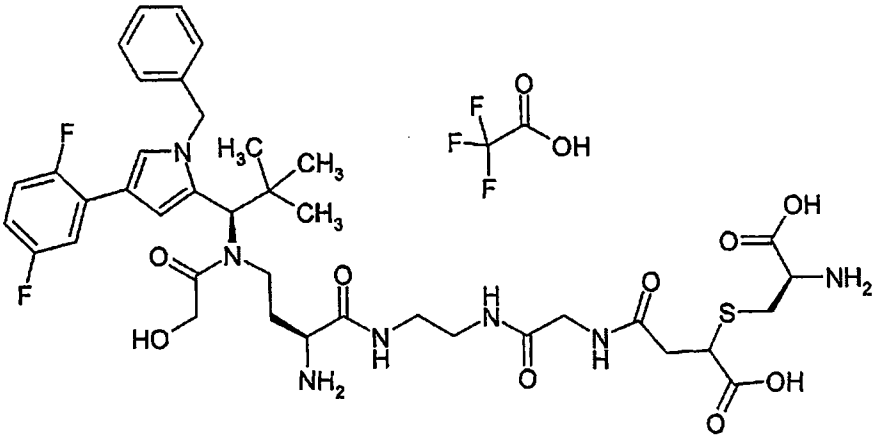
mg (42%)標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.88 min ; MS (ESIpos): m/z = 673 $(M+H)^+$。

實例M13

4-[(2-{[2-({(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}胺基)乙基]胺基}-2-側氧基乙基)胺基]-2-{[(2R)-2-胺基-2-羧基乙基]硫基}-4-側氧基丁酸/三氟乙酸(1:1)

區位異構體1, ，差向異構體1 (2R)或(2S)



LC-MS (方法5): R_t = 2.44 min ; MS (ESIpos): m/z = 832 $[M+H]^+$。

首先，在DMF中在*N*,*N*-二異丙基乙胺存在下將L-半胱胺酸甲酯鹽酸鹽(1:1)用1-({[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}氧基)吡咯啶-2,5-二酮轉變成N-{[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}-L-半胱胺酸甲酯。

使408 mg (1.93 mmol)市售3-溴-4-甲氧基-4-側氧基丁酸及180 mg (0.644 mmol) N-{[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}-L-半胱胺酸甲酯溶於8 ml DMF中，且添加147 mg (0.97 mmol) 1,8-二氮雜雙環[5.4.0]十一-7-烯。在室溫下攪拌18小時後，添加另外136 mg (0.64 mmol) 3-溴-4-甲氧基-4-側氧基丁酸及147 mg (0.97 mmol) 1,8-二氮雜雙環[5.4.0]十一-7-烯，且將混合物在室溫下再攪拌12小時且接著在減壓下濃縮。

殘餘物藉由製備型HPLC純化。合併適當溶離份且在減壓下蒸發溶劑，得到151 mg (理論之57%) 4-甲氧基-3-{[(2R)-3-甲氧基-3-側氧基-2-({[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}胺基)丙基]硫基}-4-側氧基丁酸。

LC-MS (方法12): R_t = 1.74 min；MS (ESIneg): m/z = 408 $(M-H)^-$。

在此中間物中，145 mg藉由超臨界流體層析法經由對掌性管柱(SFC；管柱：DAICEL，AD-H 5u 250×20 mm；流動速率：80 ml/min；方法：AD-25% ETOH-80 ml；壓力：100巴(bar)；波長：210 nM)分離成個別非對映異構體，得到63 mg (43%)差向異構體1及58 mg (40%)差向異構體2。

差向異構體1特徵如下：

LC-MS (方法5): R_t = 2.94 min；MS (ESIneg): m/z = 408 $(M-H)^-$。

^{1}H-NMR: (400 MHz, DMSO-d_6): δ = 7.57 (d, 1H), 4.24 (m, 1H), 4.05 (t, 2H), 3.67 (t, 1H), 3.65 (s, 3H), 3.62 (s, 3H), 3.05 (dd, 1H), 2.70-2.88 (m, 2H), 2.59 (dd, 1H), 0.93 (t, 2H), 0.02 (s, 9H)。

差向異構體2特徵如下：

LC-MS (方法5): R_t = 2.95 min；MS (ESIneg): m/z = 408 $(M-H)^-$。

^{1}H-NMR: (400 MHz, DMSO-d_6): δ = 7.58 (d, 1H), 4.16-4.23 (m, 1H), 4.05 (t, 2H), 3.67 (dd, 1H), 3.65 (s, 3H), 3.64 (s, 3H), 3.04 (dd, 1H), 2.88 (dd, 1H), 2.77 (dd, 1H), 2.61 (dd, 1H), 0.92 (t, 2H), 0.02 (s, 9H)。

在30 mg (0.079 mmol) HATU及13.4 mg (0.132 mmol) 4-甲基嗎啉存在下使32.5 mg (0.079 mmol)差向異構體1與50 mg (0.066 mmol)中間物C66偶合，在HPLC純化後得到43 mg (理論之57%)完全保護之中間物4-{[(8S)-8-{2-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]乙基}-2,2-二甲基-6,9,14-三側氧基-5-氧雜-7,10,13-三氮雜-2-矽雜十四烷-15-基]胺基}-2-{[(2R)-3-甲氧基

-3-側氧基-2-({[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}胺基)丙基]硫基}-4-側氧基丁酸甲酯。

接著將40 mg (0.035 mmol)此中間物在室溫下與0.9 ml 2莫耳濃度氫氧化鋰溶液一起在11 ml甲醇中攪拌20分鐘，使得兩個甲酯基均裂解。藉由HPLC純化，得到12 mg (理論之31%)二甲酸衍生物。

LC-MS (方法5): R_t = 4.74 min ; MS (ESIpos): m/z = 1120 $[M+H]^+$。

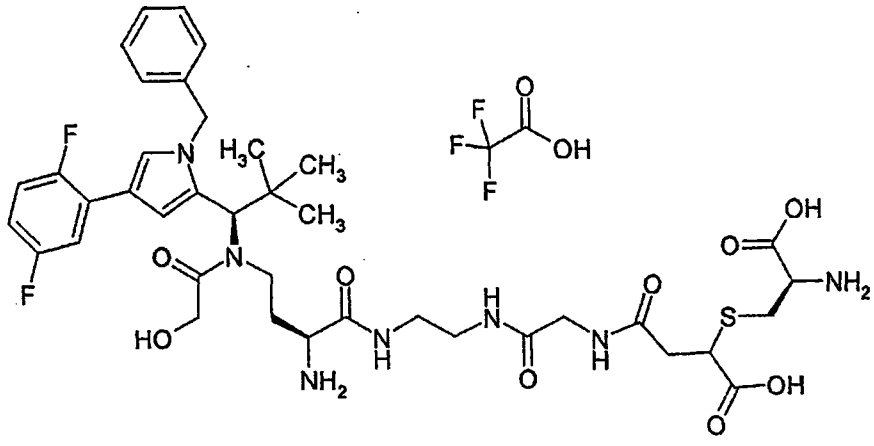
最終，10 mg (0.009 mmol)此中間物如上述在三氟乙醇中用氯化鋅完全脫除保護基。殘餘物藉由製備型HPLC純化。濃縮適當溶離份且自乙腈/水凍乾殘餘物，得到2.6 mg (理論之30%)標題化合物。

LC-MS (方法5): R_t = 2.44 min ; MS (ESIpos): m/z = 832 $[M+H]^+$。

實例M14

4-[(2-{[2-({(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}胺基)乙基]胺基}-2-側氧基乙基)胺基]-2-{[(2R)-2-胺基-2-羧基乙基]硫基}-4-側氧基丁酸/三氟乙酸(1:1)

區位異構體1，差向異構體2 (2R或2S)



LC-MS (方法5): R_t = 2.44 min ; MS (EIpos): m/z = 832 $[M+H]^+$。

實例M13中所述之中間物差向異構體2類似於實例M13中之描述

反應：

在30 mg (0.079 mmol) HATU及13.4 mg (0.132 mmol) 4-甲基嗎啉存在下使32.5 mg (0.079 mmol)差向異構體2與50 mg (0.066 mmol)中間物C66偶合，在HPLC純化後得到43 mg (理論之57%)完全保護之中間物4-{[(8S)-8-{2-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]乙基}-2,2-二甲基-6,9,14-三側氧基-5-氧雜-7,10,13-三氮雜-2-矽雜十四烷-15-基]胺基}-2-{[(2R)-3-甲氧基-3-側氧基-2-({[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}胺基)丙基]硫基}-4-側氧基丁酸甲酯。

接著將40 mg (0.035 mmol)此中間物在室溫下與0.9 ml 2莫耳濃度氫氧化鋰溶液一起在11 ml甲醇中攪拌20分鐘，使得兩個甲酯基均裂解。藉由HPLC純化，得到11 mg (理論之28%)二甲酸衍生物。

LC-MS (方法5): R_t = 4.74 min；MS (ESIpos): m/z = 1120 $[M+H]^+$。

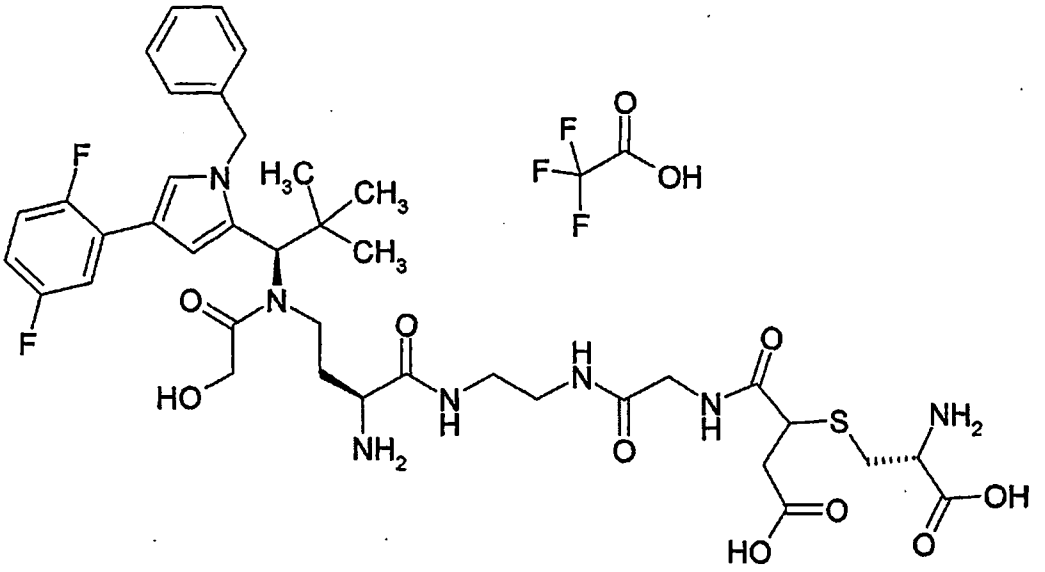
最終，10 mg (0.009 mmol)此中間物如上述在三氟乙醇中用氯化鋅完全脫除保護基。殘餘物藉由製備型HPLC純化。濃縮適當溶離份且自乙腈/水凍乾殘餘物，得到4.4 mg (理論之52%)標題化合物。

LC-MS (方法5): R_t = 2.44 min；MS (ESIpos): m/z = 832 $[M+H]^+$。

實例M15

4-[(2-{[2-({(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}胺基)乙基]胺基}-2-側氧基乙基)胺基]-3-{[(2R)-2-胺基-2-羧基乙基]硫基}-4-側氧基丁酸/三氟乙酸(1:1)

區位異構體2，差向異構體1 (3R或3S)



LC-MS (方法5): R_t = 2.45 min；MS (EIpos): m/z = 832 $[M+H]^+$。

使742.8 mg (3.3 mmol)市售2-溴-4-乙氧基-4-側氧基丁酸及802 mg (2.87 mmol) N-{[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}-L-半胱胺酸甲酯溶於32 ml DMF中，且添加655.4 mg (4.31 mmol) 1,8-二氮雜雙環[5.4.0]十一-7-烯。在室溫下攪拌20小時後，在減壓下濃縮反應物且殘餘物藉由製備型HPLC純化。合併適當溶離份且在減壓下蒸發溶劑，得到521 mg (理論之43%) 4-乙氧基-2-{[(2R)-3-甲氧基-3-側氧基-2-({[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}胺基)丙基]硫基}-4-側氧基丁酸。

LC-MS (方法5): R_t = 3.13 min；MS (ESIpos): m/z = 424 $(M+H)^+$。

在此中間物中，510 mg藉由超臨界流體層析法經由對掌性管柱(SFC；管柱：DAICEL，AD-H 5u 250×20 mm；流動速率：80 ml/min；方法：AD-10% ETOH-80 ml；壓力：100巴；波長：210 nM)分離成個別非對映異構體，得到100 mg (20%)差向異構體1及141 mg (28%)差向異構體2。

差向異構體1特徵如下：

LC-MS (方法1): R_t = 0.99 min；MS (ESIneg): m/z = 422 $(M-H)^-$。

^{1}H-NMR: (400 MHz, DMSO-d_6): δ = 7.60 (d, 1H), 4.18-4.26 (m,

1H), 4.01-4.08 (m, 4H), 3.63 (s, 3H), 3.59 (dd, 1H), 3.04 (dd, 1H), 2.92 (dd, 1H), 2.80 (dd, 1H), 2.63 (dd, 1H), 1.17 (t, 3H), 0.92 (t, 2H), 0.02 (s, 9H)。

差向異構體2特徵如下：

LC-MS (方法5): R_t = 2.95 min；MS (ESIneg): m/z = 408 $(M-H)^-$。

^{1}H-NMR: (400 MHz, DMSO-d_6): δ = 7.56 (d, 1H), 4.21-4.29 (m, 1H), 4.01-4.1 (m, 4H), 3.64 (s, 3H), 3.58 (dd, 1H), 3.08 (dd, 1H), 2.85 (dd, 1H), 2.78 (dd, 1H), 2.60 (dd, 1H), 1.17 (t, 3H), 0.93 (t, 2H), 0.02 (s, 9H)。

使33.6 mg (0.079 mmol)差向異構體1在30 mg (0.079 mmol) HATU及13.4 mg (0.132 mmol) 4-甲基嗎啉存在下與50 mg (0.066 mmol)中間物C66偶合，在HPLC純化後得到51 mg (理論之63%)完全保護之中間物4-{[(8S)-8-{2-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]乙基}-2,2-二甲基-6,9,14-三側氧基-5-氧雜-7,10,13-三氮雜-2-矽雜十四烷-15-基]胺基}-3-{[(2R)-3-甲氧基-3-側氧基-2-({[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}胺基)丙基]硫基}-4-側氧基丁酸乙酯。

接著將49 mg (0.042 mmol)此中間物在室溫下與0.5 ml 2莫耳濃度氫氧化鋰溶液一起在12 ml THF/水1:1中攪拌30分鐘，使得兩個甲酯基均裂解。酸化且藉由HPLC純化，得到11 mg (理論之24%)二甲酸衍生物。

LC-MS (方法5): R_t = 4.68 min；MS (ESIpos): m/z = 1120 $[M+H]^+$。

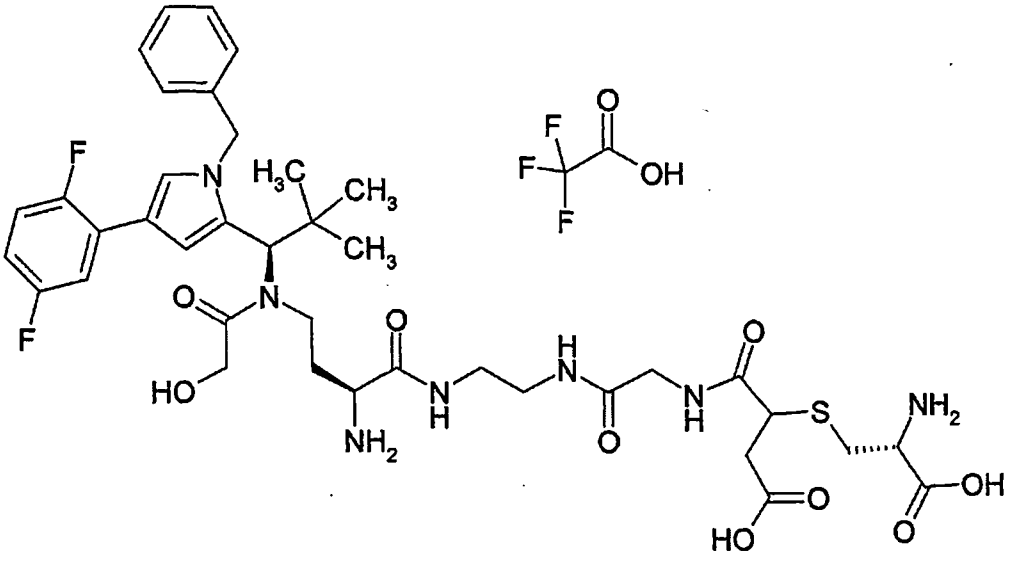
最終，11 mg (0.01 mmol)此中間物如上述在三氟乙醇中用氯化鋅完全脫除保護基。殘餘物藉由製備型HPLC純化。濃縮適當溶離份且自乙腈/水凍乾殘餘物，得到3.7 mg (理論之39%)標題化合物。

LC-MS (方法5): R_t = 2.45 min；MS (ESIpos): m/z = 832 $[M+H]^+$。

實例M16

4-[(2-{[2-({(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}胺基)乙基]胺基}-2-側氧基乙基)胺基]-3-{[(2R)-2-胺基-2-羧基乙基]硫基}-4-側氧基丁酸/三氟乙酸(1:1)

區位異構體2，差向異構體2 (3R或3S)



LC-MS (方法5): R_t = 2.44 min；MS (EIpos): m/z = 832 $[M+H]^+$。

實例M15中所述之中間物差向異構體2類似於實例M15中之描述反應：

使33.6 mg (0.079 mmol)差向異構體2在30 mg (0.079 mmol) HATU及13.4 mg (0.132 mmol) 4-甲基嗎啉存在下與50 mg (0.066 mmol)中間物C66偶合，在HPLC純化後得到51 mg (理論之63%)完全保護之中間物4-{[(8S)-8-{2-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]乙基}-2,2-二甲基-6,9,14-三側氧基-5-氧雜-7,10,13-三氮雜-2-矽雜十四烷-15-基]胺基}-3-{[(2R)-3-甲氧基-3-側氧基-2-({[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}胺基)丙基]硫基}-4-側

氧基丁酸乙酯。

接著將49 mg (0.042 mmol)此中間物在室溫下與0.5 ml 2莫耳濃度氫氧化鋰溶液一起在12 ml THF/水1:1中攪拌30分鐘，使得兩個甲酯基均裂解。酸化且藉由HPLC純化，得到13.4 mg (理論之28%)二甲酸衍生物。

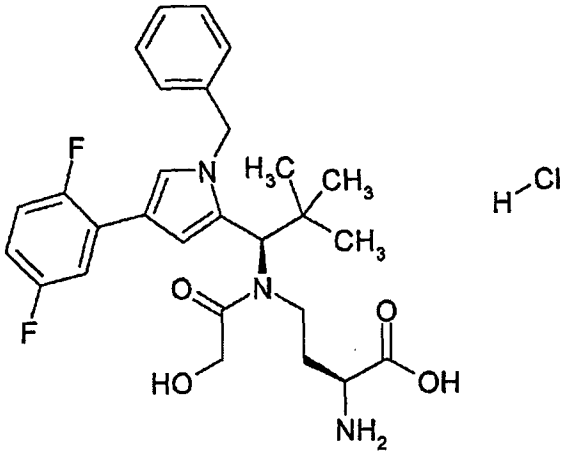
LC-MS (方法5): R_t = 4.66 min ; MS (ESIpos): m/z = 1120 $[M+H]^+$。

最終，13.4 mg (0.012 mmol)此中間物如上述在三氟乙醇中用氯化鋅完全脫除保護基。殘餘物藉由製備型HPLC純化。濃縮適當溶離份且自乙腈/水凍乾殘餘物，得到7.5 mg (理論之66%)標題化合物。

LC-MS (方法5): R_t = 2.44 min ; MS (ESIpos): m/z = 832 $[M+H]^+$。

實例M17

(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁酸鹽酸鹽(1:1)



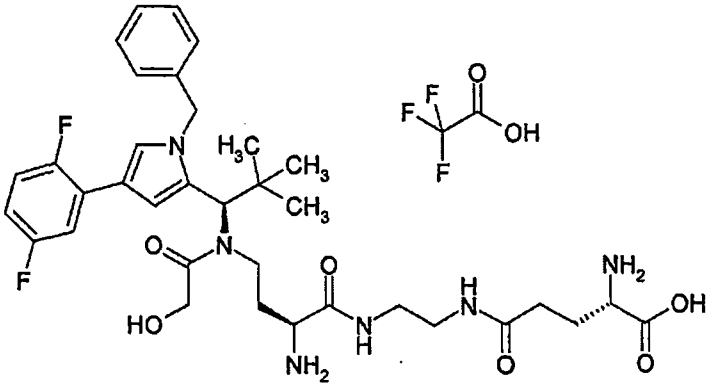
使150 mg (0.2 mmol)中間物C53溶於15 ml DMF中，且添加2.29 g (20.39 mmol) DABCO。反應在超音波浴中處理30分鐘。接著藉由添加1.17 ml乙酸，反應調至pH 3-4，且混合物在減壓下濃縮。殘餘物藉由製備型HPLC純化且適當溶離份在室溫下在減壓下濃縮。使殘餘物溶解於乙腈/水(1:1) 中，添加5 ml 4N鹽酸且接著凍乾混合物。此得

到81 mg (理論之68%)標題化合物。

LC-MS (方法5): R_t = 2.69 min；MS (EIpos): m/z = 514 $[M+H]^+$。

實例M18

N-[2-({(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}胺基)乙基]-L-麩醯胺酸/三氟乙酸(1:1)

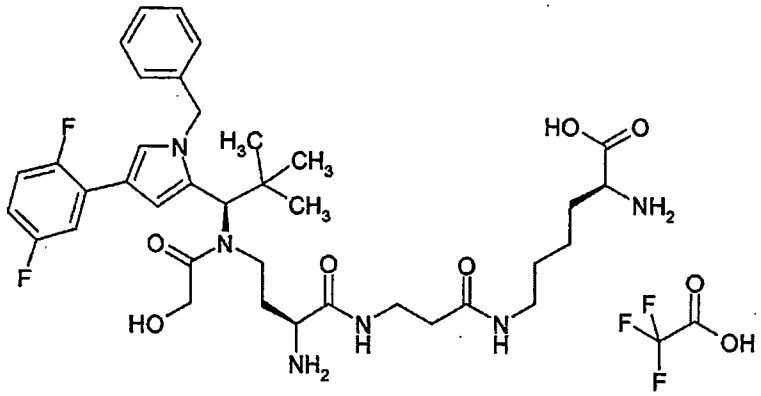


首先，三氟乙酸/N-(2-胺基乙基)-N^2-[(苯甲氧基)羰基]-L-麩胺酸苯甲酯(1:1)使用肽化學之經典方法製備。接著在HATU存在下，此中間物與中間物C58偶合。隨後，首先苯甲氧基羰基保護基及苯甲基酯藉由氫解裂解移除，且接著使用氯化鋅移除2-(三甲基矽烷基)乙氧基羰基保護基。

LC-MS (方法6): R_t = 1.91 min；MS (EIpos): m/z = 685 $[M+H]^+$。

實例M19

N^6-(N-{(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}-β-丙胺醯基)-L-離胺酸/三氟乙酸(1:1)

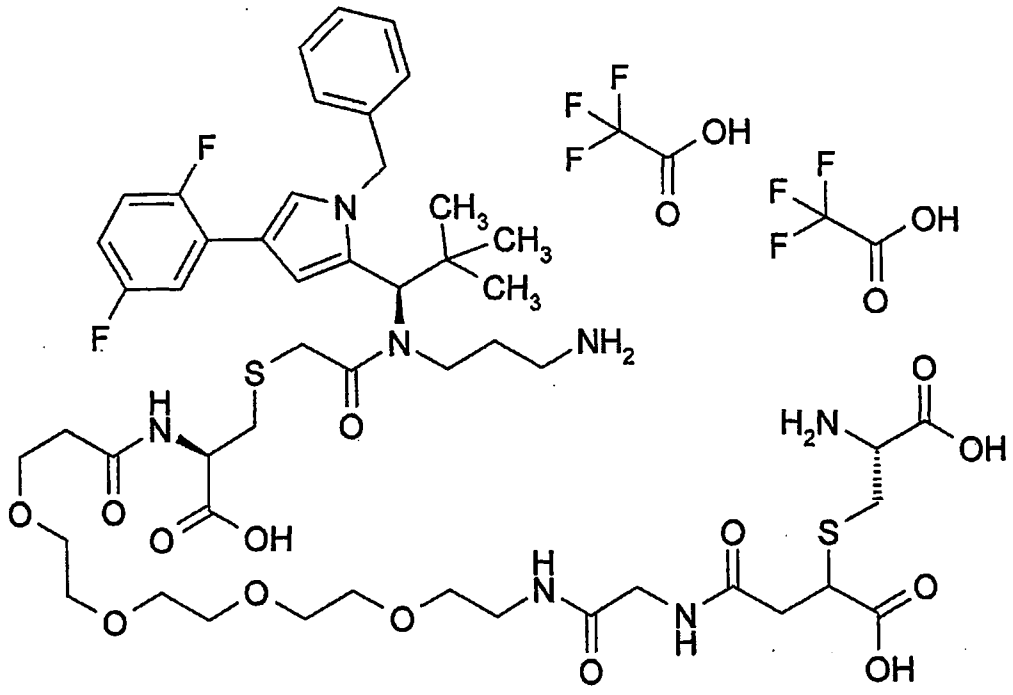


最初，三氟乙酸/2-(三甲基矽烷基)乙基-N2-[(苯甲氧基)羰基]-L-離胺酸酯(1:1)使用肽化學中已知之經典保護基操作製備。接著在HATU存在下，此中間物與中間物C61偶合。隨後，首先2-(三甲基矽烷基)乙氧基羰基保護基及2-(三甲基矽烷基)乙基酯使用氯化鋅裂解。最終，標題化合物藉由苯甲氧基羰基保護基氫解裂解及藉由製備型HPLC純化來獲得。

HPLC (方法11): R_t = 1.65 min；

實例M20

(1R,4R,27R,33R)-1-胺基-32-(3-胺基丙基)-33-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-34,34-二甲基-6,9,25,31-四側氧基-13,16,19,22-四氧雜-3,29-二硫雜-7,10,26,32-四氮雜三十五烷-1,4,27-三甲酸/三氟乙酸(1:2)



首先，在DMF中在*N*,*N*-二異丙基乙胺存在下將L-半胱胺酸甲酯鹽酸鹽(1:1)用1-({[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}氧基)吡咯啶-2,5-二酮轉變成N-{[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}-L-半胱胺酸甲酯。

使408 mg (1.93 mmol)市售3-溴-4-甲氧基-4-側氧基丁酸及180 mg (0.644 mmol) N-{[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}-L-半胱胺酸甲酯溶於8 ml DMF中，且添加147 mg (0.97 mmol) 1,8-二氮雜雙環[5.4.0]十一-7-烯。在室溫下攪拌18小時後，添加另外136 mg (0.64 mmol) 3-溴-4-甲氧基-4-側氧基丁酸及147 mg (0.97 mmol) 1,8-二氮雜雙環[5.4.0]十一-7-烯，且將混合物在室溫下再攪拌12小時且接著在減壓下濃縮。殘餘物藉由製備型HPLC純化。合併適當溶離份且在減壓下蒸發溶劑得到151 mg (理論之57%) 4-甲氧基-3-{[(2R)-3-甲氧基-3-側氧基-2-({[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}胺基)丙基]硫基}-4-側氧基丁酸。

LC-MS (方法12): R_t = 1.74 min；MS (ESIneg): m/z = 408 $(M-H)^-$。

3.66 mg (8.93 μmol) 4-甲氧基-3-{[(2R)-3-甲氧基-3-側氧基-2-({[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}胺基)丙基]硫基}-4-側氧基丁酸在3.66 mg (8.93 μmol) HATU及1.6 μl (15 μmol) 4-甲基嗎啉存在下與13.0

mg (7.44 μmol) S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-N-[15-(甘胺醯基胺基)-4,7,10,13-四氧雜十五烷-1-醯基]-L-半胱胺酸/三氟乙酸(1:1) (中間物C80)偶合，在HPLC純化後得到3.9 mg (理論之37%)完全保護之中間物S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-N-[15-({N-[(8R,11R)-8,11-雙(甲氧基羰基)-2,2-二甲基-6,13-二側氧基-5-氧雜-10-硫雜-7-氮雜-2-矽雜十三烷-13-基]甘胺醯基}胺基)-4,7,10,13-四氧雜十五烷-1-醯基]-L-半胱胺酸。

接著3.90 mg (2.76 μmol)此中間物在室溫下與35 μl 2莫耳濃度氫氧化鋰溶液一起在1.0 ml THF/水3:1中攪拌15分鐘，使得兩個甲酯基均裂解。藉由HPLC純化，得到3.60 mg (理論之94%)二甲酸衍生物。

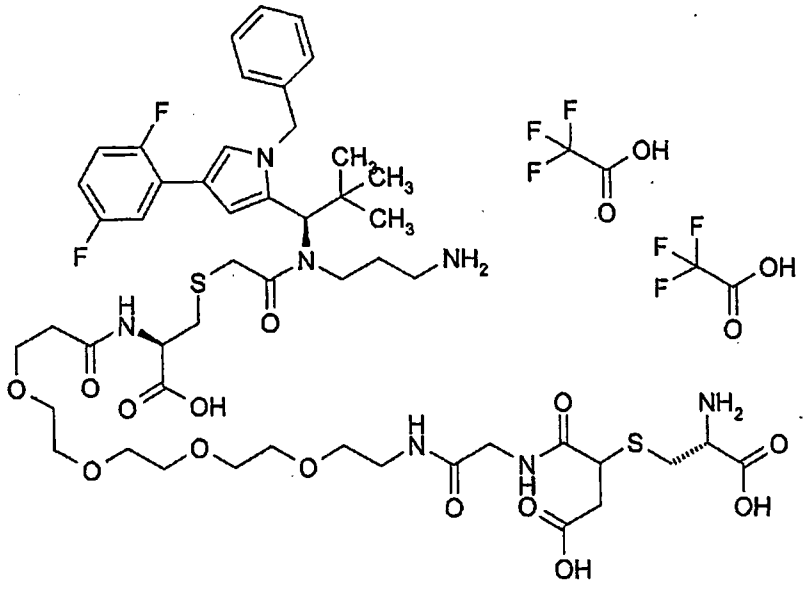
LC-MS (方法5): R_t = 4.83 min；MS (ESIpos): m/z = 1385 $[M+H]^+$。

最終，3.60 mg (2.60 μmol)此中間物如上述在三氟乙醇中用氯化鋅完全脫除保護基。殘餘物藉由製備型HPLC純化。濃縮適當溶離份且自乙腈/水凍乾殘餘物，得到1.92 mg (理論之55%)標題化合物。

LC-MS (方法5): R_t = 2.72 min；MS (ESIneg): m/z = 1094 $[M-H]^-$。

實例M21

(2R,24S,27R)-27-胺基-2-[({2-[(3-胺基丙基){(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基]-2-側氧基乙基}硫基)甲基]-24-(羧基甲基)-4,20,23-三側氧基-7,10,13,16-四氧雜-25-硫雜-3,19,22-三氮雜二十八烷-1,28-二酸/三氟乙酸(1:2)



使742.8 mg (3.3 mmol)市售2-溴-4-乙氧基-4-側氧基丁酸及802 mg (2.87 mmol) N-{[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}-L-半胱胺酸甲酯溶於32 ml DMF中，且添加655.4 mg (4.31 mmol) 1,8-二氮雜雙環[5.4.0]十一-7-烯。在室溫下攪拌20小時後，在減壓下濃縮反應物且殘餘物藉由製備型HPLC純化。合併適當溶離份且在減壓下蒸發溶劑得到521 mg (理論之43%) 4-乙氧基-2-{[(2R)-3-甲氧基-3-側氧基-2-({[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}胺基)丙基]硫基}-4-側氧基丁酸。

LC-MS (方法5): R_t = 3.13 min；MS (ESIpos): m/z = 424 $(M+H)^+$。

4.36 mg (10.3 μmol) 4-乙氧基-2-{[(2R)-3-甲氧基-3-側氧基-2-({[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}胺基)丙基]硫基}-4-側氧基丁酸在3.92 mg (10.3 μmol) HATU及1.9 μl (17 μmol) 4-甲基嗎啉存在下與15.0 mg (8.59 μmol) S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-N-[15-(甘胺醯基胺基)-4,7,10,13-四氧雜十五烷-1-醯基]-L-半胱胺酸/三氟乙酸(1:1) (中間物C80)偶合，在HPLC純化後得到3.6 mg (理論之26%)完全保護之中間物S-(11-{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}-2,2-二甲基-6,12-二

側氧基-5-氧雜-7,11-二氮雜-2-矽雜十三烷-13-基)-N-[15-({N-[(8R,11S)-11-(2-乙氧基-2-側氧基乙基)-8-(甲氧基羰基)-2,2-二甲基-6,12-二側氧基-5-氧雜-10-硫雜-7-氮雜-2-矽雜十二烷-12-基]甘胺醯基}胺基)-4,7,10,13-四氧雜十五烷-1-醯基]-L-半胱胺酸。

接著6.20 mg (2.82 μmol)此中間物在室溫下與35 μl 2莫耳濃度氫氧化鋰溶液一起在1.0 ml THF/水1:1中攪拌15分鐘，使得兩個酯基均裂解。酸化且藉由HPLC純化，得到3.60 mg (理論之92%)二甲酸衍生物。

LC-MS (方法5): R_t = 4.71 min ; MS (ESIpos): m/z = 1385 $[M+H]^+$。

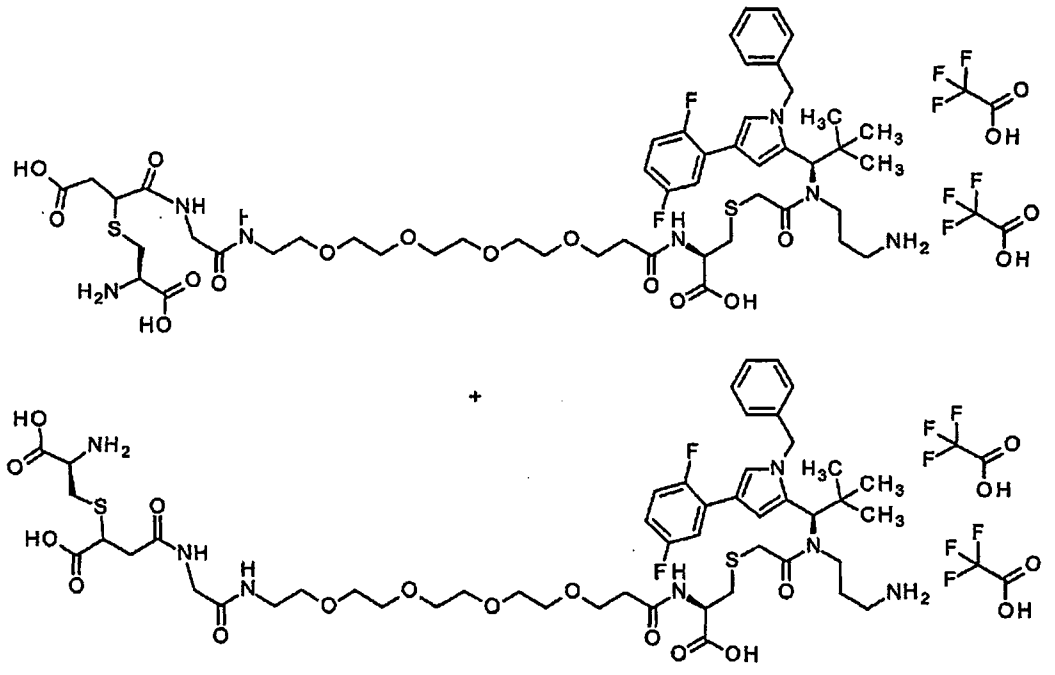
最終，3.60 mg (1.69 μmol)此中間物如上述在三氟乙醇中用氯化鋅完全脫除保護基。殘餘物藉由製備型HPLC純化。濃縮適當溶離份且自乙腈/水凍乾殘餘物，得到0.88 mg (理論之39%)標題化合物。

LC-MS (方法5): R_t = 2.72 min ; MS (ESIneg): m/z = 1094 $[M-H]^-$。

實例M22

(2R,27R)-27-胺基-2-[({2-[(3-胺基丙基){(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基]-2-側氧基乙基}硫基)甲基]-24-(羧基甲基)-4,20,23-三側氧基-7,10,13,16-四氧雜-25-硫雜-3,19,22-三氮雜二十八烷-1,28-二酸-三氟乙酸(1:2)及

(1R,27R,33R)-1-胺基-32-(3-胺基丙基)-33-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-34,34-二甲基-6,9,25,31-四側氧基-13,16,19,22-四氧雜-3,29-二硫雜-7,10,26,32-四氮雜三十五烷-1,4,27-三甲酸-三氟乙酸(1:2)



使16.5 mg (0.015 mmol) S-{2-[(3-胺基丙基){(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}胺基]-2-側氧基乙基}-N-[1-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-2,18-二側氧基-6,9,12,15-四氧雜-3-氮雜十八烷-18-基]-L-半胱胺酸-三氟乙酸(1:1) (中間物F257)及8.18 mg (0.031 mmol) N-{[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]羰基}-L-半胱胺酸溶於2 ml DMF中且混合物在室溫下攪拌18小時。反應混合物在真空下蒸發。殘餘物(28.9 mg)溶於3 mL THF/水1:1中。添加0.046 mL 2M氫氧化鋰水溶液且混合物在室溫下攪拌3小時。隨後，混合物用5.2 µl (0.092 mmol)乙酸調至約pH 7。反應混合物藉由製備型RP-HPLC (管柱：Reprosil 125×30；10 µ，流速：50 mL/min，MeCN/水；0.1% TFA)立即純化。在減壓下蒸發溶劑且在高真空下乾燥殘餘物。獲得12.1 mg (2階段58%)區位異構型經保護之中間物。

LC-MS (方法12): R_t = 1.82 min；MS (ESIpos): m/z = 1240 $(M+H)^+$。

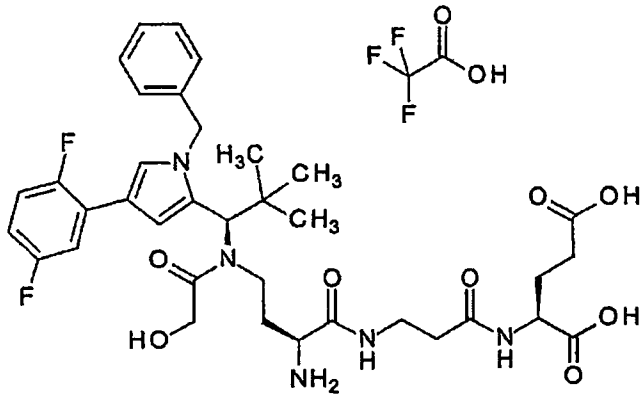
在最終一步中，使12.1 mg (0.009 mmol)此中間物溶於2 ml 2,2,2-三氟乙醇中。添加7.3 mg (0.054 mmol)氯化鋅且將混合物在50℃下攪拌2小時。隨後，添加15.7 mg (0.054 mmol)乙二胺-N,N,N',N'-四乙酸

且溶液藉由製備型HPLC純化。濃縮相關溶離份且自乙腈/水凍乾殘餘物後，獲得6.4 mg (59%)呈區位異構體混合物形式之標題化合物。

LC-MS (方法1): R_t = 0.86 min；MS (ESIpos): m/z = 1096 $(M+H)^+$。

實例M23

N-{(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}-β-丙胺醯基-L-麩胺酸-三氟乙酸(1:1)

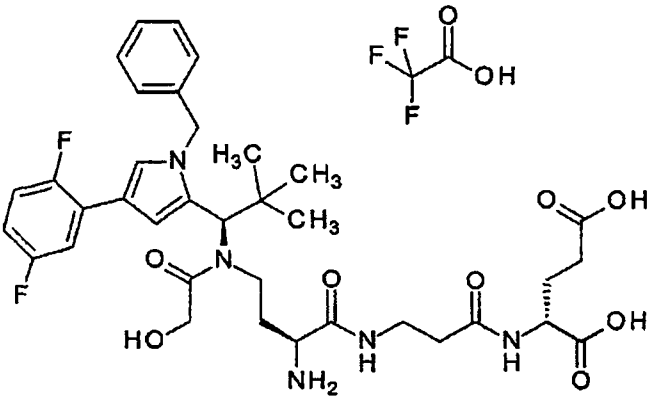


首先，在HATU及*N*,*N*-二異丙基乙胺存在下使L-麩胺酸二第三丁酯鹽酸鹽(1:1)與中間物C61偶合。隨後，使經保護之中間物溶解於三氟乙醇中且藉由在50℃下在氯化鋅存在下攪拌隔夜來完全脫除保護基。EDTA添加後，藉由製備型HPLC純化來進行處理。

LC-MS (方法12): R_t = 1.45 min；MS (ESIpos): m/z = 714 $[M+H]^+$。

實例M24

N-{(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}-β-丙胺醯基-D-麩胺酸-三氟乙酸(1:1)

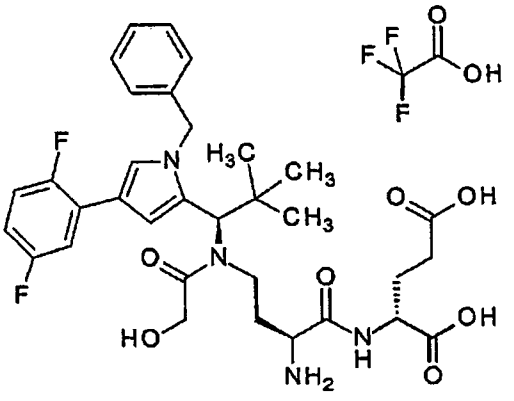


首先，在HATU及*N*,*N*-二異丙基乙胺存在下使D-麩胺酸二第三丁酯鹽酸鹽(1:1)與中間物C61偶合。隨後，使經保護之中間物溶解於三氟乙醇中且藉由在50℃下在氯化鋅存在下攪拌隔夜來完全脫除保護基。EDTA添加後，藉由製備型HPLC純化來進行處理。

LC-MS (方法12): R_t = 1.41 min ; MS (ESIpos): m/z = 714 $[M+H]^+$。

實例M25

N-{(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}-L-麩胺酸-三氟乙酸(1:1)



首先，在HATU及N,N-二異丙基乙胺存在下使L-麩胺酸二第三丁酯鹽酸鹽(1:1)與中間物C61偶合。在下一步中，藉由在10% 鈀/活性碳上在甲醇中在室溫下在標準氫壓力下氫化45分鐘來移除Z保護基。隨後，使部分保護之中間物溶解於三氟乙醇中且藉由在50℃下在氯化鋅存在下攪拌7小時來完全脫除保護基。EDTA添加後，藉由製備型

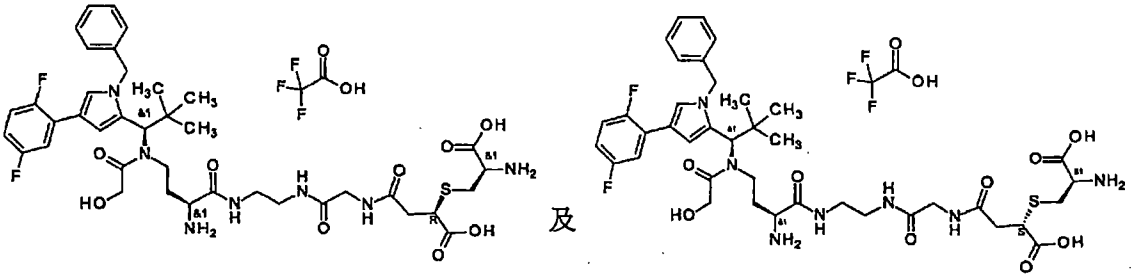
HPLC純化來進行處理。

LC-MS (方法12): R_t = 1.44 min ; MS (ESIpos): m/z = 643 $[M+H]^+$。

實例M26

4-[(2-{[2-({(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}胺基)乙基]胺基}-2-側氧基乙基)胺基]-2-{[(2R)-2-胺基-2-羧基乙基]硫基}-4-側氧基丁酸-三氟乙酸(1:1)

區位異構體1，差向異構體混合物



及

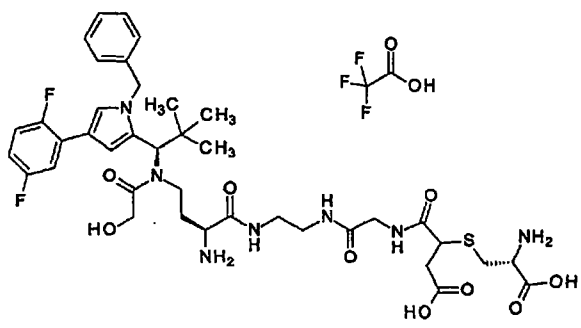
此實例描述實例13及實例14之化合物的差向異構體混合物。該合成類似於實例13進行，其中省略兩種差向異構體藉由超臨界流體層析法之分離且標題化合物製備為差向異構體混合物。

LC-MS (方法5): R_t = 2.43 min ; MS (ESIpos): m/z = 832 $[M+H]^+$。

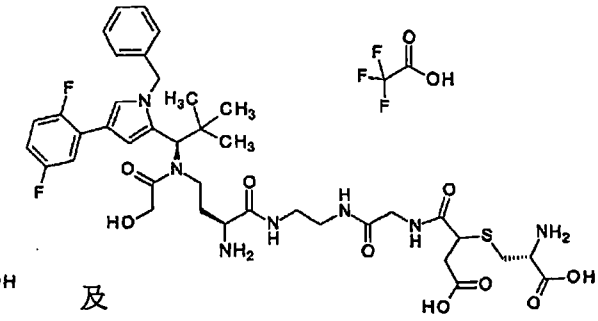
實例M27

4-[(2-{[2-({(2S)-2-胺基-4-[{(1R)-1-[1-苯甲基-4-(2,5-二氟苯基)-1H-吡咯-2-基]-2,2-二甲基丙基}(乙二醇醯基)胺基]丁醯基}胺基)乙基]胺基}-2-側氧基乙基)胺基]-3-{[(2R)-2-胺基-2-羧基乙基]硫基}-4-側氧基丁酸-三氟乙酸(1:1)

區位異構體2，差向異構體混合物



及



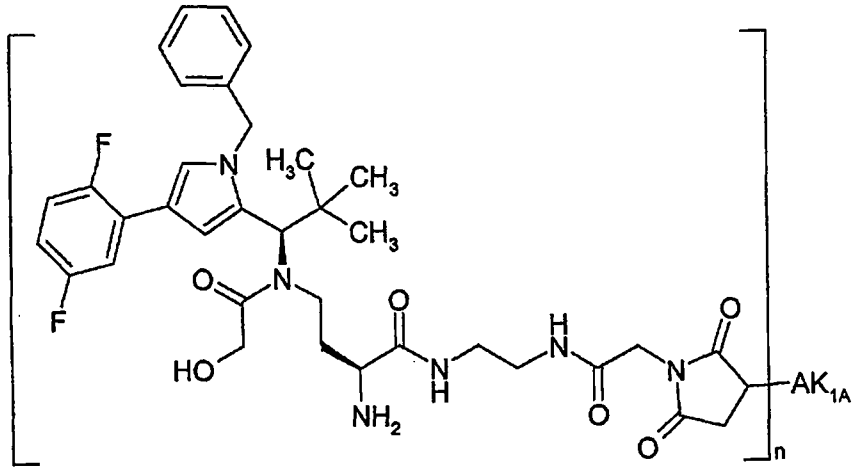
此實例描述實例15及實例16之化合物的差向異構體混合物。該合成類似於實例15進行，其中省略兩種差向異構體藉由超臨界流體層析法之分離且標題化合物製備為差向異構體混合物。

LC-MS (方法5): R_t = 2.45 min；MS (EIpos): m/z = 832 $[M+H]^+$。

實施例ADC

經由順丁烯二醯亞胺基團偶合至抗體之半胱胺酸側鏈的實施例之結構式中所示之ADC視連接子及偶合程序而定，主要呈在各種情況下所示之開環或閉環形式存在。然而，製劑可包含小比例之對應其他形式。

實例104L1



在氬氣下，將0.229 mg TCEP於395 µl PBS中之溶液緩衝液添加至含40 mg抗-B7H3 AK_{1A}之4124 µl PBS (c=9.7 mg/ml)。將反應在室溫下攪拌30分鐘，且接著添加溶於400 µl DMSO中之1.72 mg (0.00027 mmol)中間物F104。在室溫下再攪拌90分鐘後，反應施加至PD 10管柱(Sephadex® G-25，GE Healthcare)，其用PBS緩衝液pH 7.2平衡且用

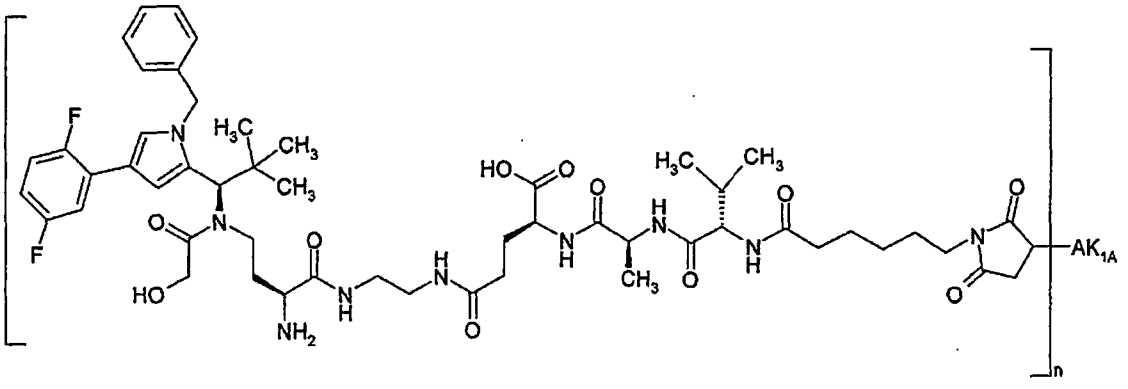
PBS緩衝液pH 7.2溶離。接著溶離液藉由超離心濃縮，再用PBS緩衝液(pH 7.2)稀釋且再次濃縮。所得批次ADC特徵如下：

蛋白質濃縮：11.67 mg/ml

藥物/mAb比率：3.3

ADC亦可部分呈連接至抗體之水解開鏈丁二醯胺形式。

實例173L1

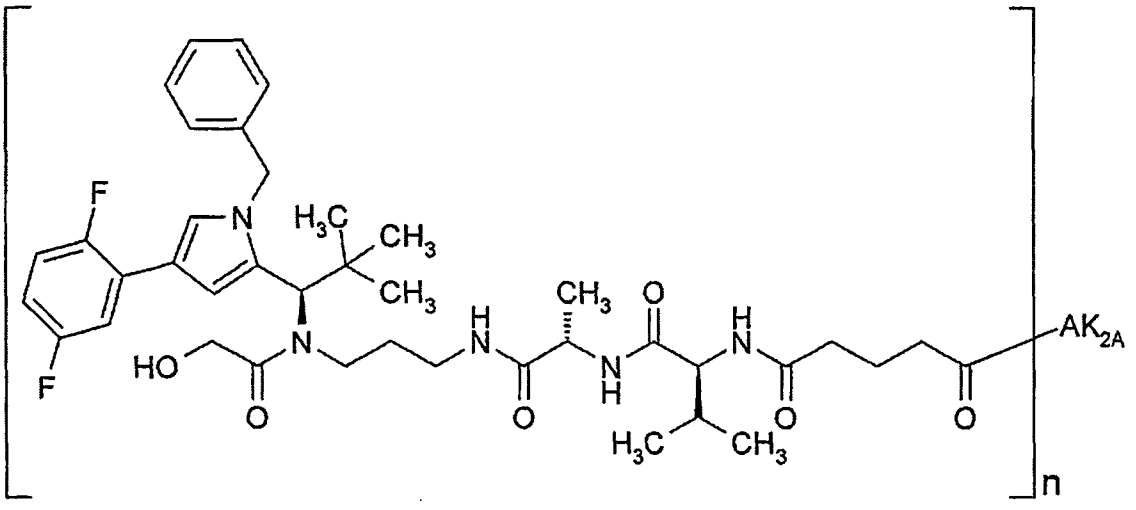


此處，含5 mg抗-B7H3 AK_{1A}之PBS (c=9.7 mg/ml)用於與中間物F173偶合且在Sephadex純化後，藉由超離心濃縮反應物且再用PBS稀釋。

蛋白質濃縮：1.57 mg/ml

藥物/mAb比率：3.4

實例194

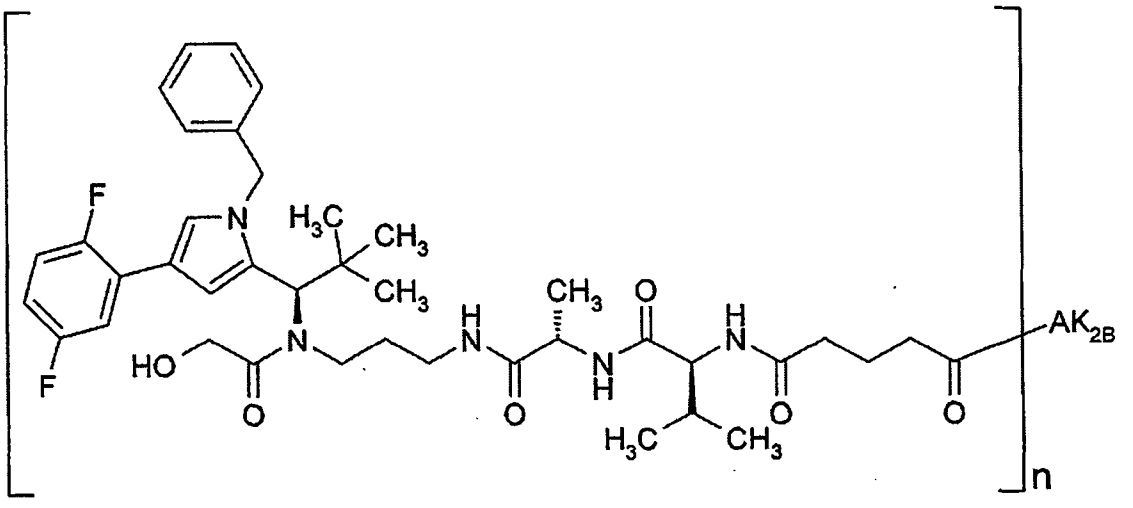


此處，含5 mg抗-B7H3 AK_{1A}之515 µl PBS (c=9.7 mg/ml)用於與中間物F194偶合。首先，添加溶於50 µl DMSO中之5當量中間物F194，且在室溫下攪拌1小時後，再次添加相同量且將反應在室溫下再攪拌小時。反應隨後在Sephadex管柱上純化，接著藉由超離心濃縮且再用PBS稀釋。

蛋白質濃縮：0.51 mg/ml

藥物/mAb比率：2.4

實例194L2

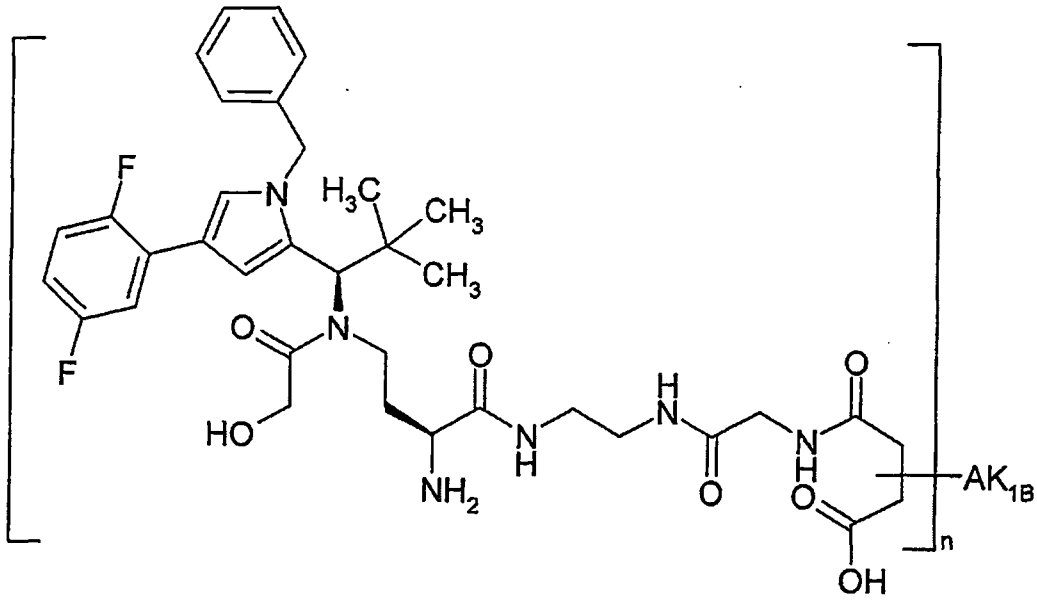


此處，含5 mg抗-B7H3 AK_{1B}之510 µl PBS (c=9.8 mg/ml)用於與中間物F194偶合。首先，添加溶於50 µl DMSO中之5當量中間物F194，且在室溫下攪拌1小時，再次添加相同量且將反應在室溫下攪再拌1小時。反應隨後在Sephadex管柱上純化，接著藉由超離心濃縮且再用PBS稀釋。

蛋白質濃縮：1.02 mg/ml

藥物/mAb比率：2.9

實例208L2



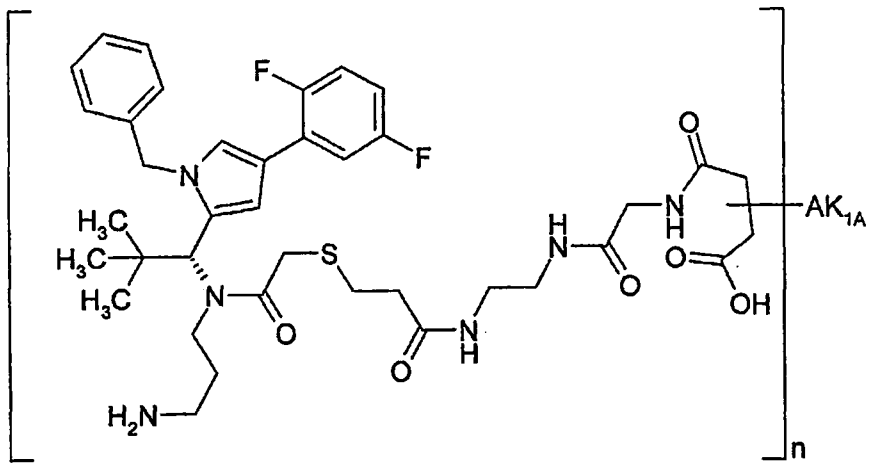
在氬氣下，將0.287 mg TCEP於0.5 ml PBS緩衝液中之溶液添加至含50 mg抗-B7H3 AK_{1B}之4.9 ml PBS (c=10.2 mg/ml)。將反應在室溫下攪拌30分鐘，且接著添加溶於500 µl DMSO中之2.15 mg (0.00267 mmol)中間物F104。在室溫下再攪拌90分鐘後，反應物用4100 µl預先調至pH 8之PBS緩衝液稀釋。

此溶液接著施加至已用PBS緩衝液pH 8平衡之PD 10管柱(Sephadex® G-25，GE Healthcare)且用PBS緩衝液pH 8溶離。溶離液用PBS緩衝液pH 8稀釋至15 ml總體積。將此溶液在氬氣下在室溫下攪拌隔夜且接著使用PD-10管柱再緩衝至pH 7.2。接著溶離液藉由超離心濃縮，再用PBS緩衝液 (pH 7.2)稀釋且再次再濃縮。所得批次ADC特徵如下：

蛋白質濃縮：14.98 mg/ml

藥物/mAb比率：2.9

實例240L1



在氬氣下，將0.029 mg TCEP於50 µl PBS緩衝液中之溶液添加至含5 mg抗-B7H3 AK_{1A}之516 µl PBS (c=9.7 mg/ml)。反應物用1834 µl預先調至pH 8之PBS緩衝液稀釋且在室溫下攪拌1小時。接著添加溶於100 µl DMSO中之0.199 mg (0.00023 mmol)中間物F240。在室溫下再攪拌90分鐘後，反應施加至已用PBS緩衝液pH 8平衡之PD 10管柱(Sephadex® G-25，GE Healthcare)且用PBS緩衝液pH 8溶離。將溶離液在氬氣下在室溫下攪拌隔夜且接著藉由超離心濃縮且再用PBS緩衝液(pH 7.2)稀釋。在此等條件下，一些ADC亦可呈閉環形式存在。所得批次ADC特徵如下：

蛋白質濃縮：0.89 mg/ml

藥物/mAb比率：2.7

實例240L2

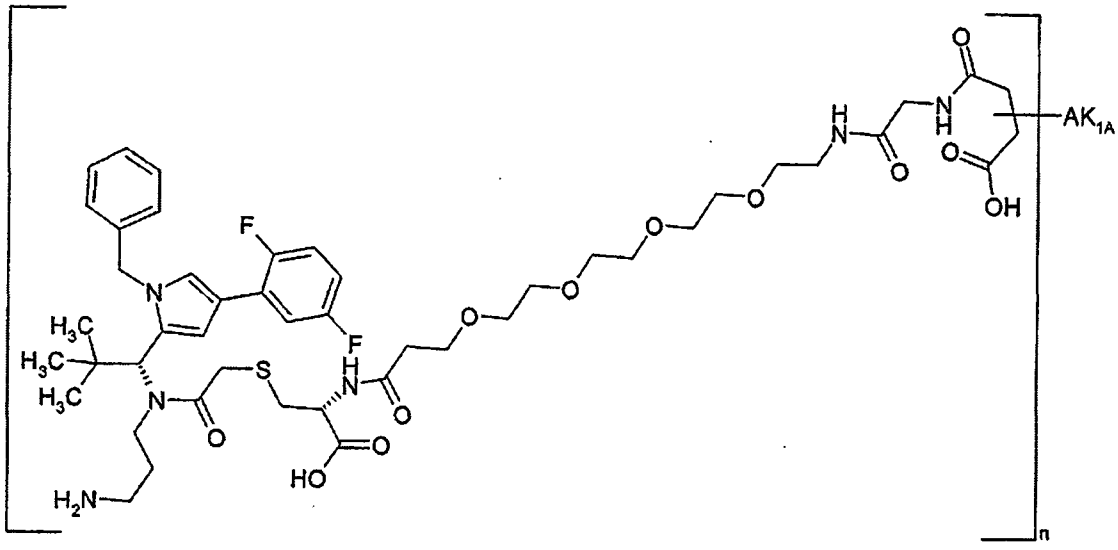
在氬氣下，將0.029 mg TCEP於50 µl PBS緩衝液中之溶液添加至含5 mg抗-B7H3 AK_{1B}之510 µl PBS (c=9.8 mg/ml)。反應物用1840 µl預先調至pH 8之PBS緩衝液稀釋且在室溫下攪拌1小時。接著添加溶於100 µl DMSO中之0.199 mg (0.00023 mmol)中間物F240。在室溫下再攪拌90分鐘後，反應物施加至已用PBS緩衝液pH 8平衡之PD 10管柱(Sephadex® G-25, GE Healthcare)且用PBS緩衝液pH 8溶離。將溶離液在氬氣下在室溫下攪拌隔夜且接著藉由超離心濃縮且再用PBS緩衝液

(pH 7.2)稀釋。在此等條件下，一些ADC亦可呈閉環形式存在。所得批次ADC特徵如下：

蛋白質濃縮：1.35 mg/ml

藥物/mAb比率：3.5

實例257L1



在氬氣下，將0.029 mg TCEP於50 µl PBS緩衝液中之溶液添加至含5 mg抗-B7H3 AK_{1A}之516 µl PBS (c=9.7 mg/ml)。反應物用1834 µl預先調至pH 8之PBS緩衝液稀釋且在室溫下1小時攪拌。接著添加溶於100 µl DMSO中之0.250 mg (0.00023 mmol)中間物F257。在室溫下再攪拌90分鐘後，反應施加至已用PBS緩衝液pH 8平衡之PD 10管柱(Sephadex® G-25，GE Healthcare)且用PBS緩衝液pH 8溶離。將溶離液在氬氣下在室溫下攪拌隔夜且接著藉由超離心濃縮且再用PBS緩衝液(pH 7.2)稀釋。在此等條件下，一些ADC亦可呈閉環形式存在。所得批次ADC特徵如下：

蛋白質濃縮：0.91 mg/ml

藥物/mAb比率：2.4

實例257L2

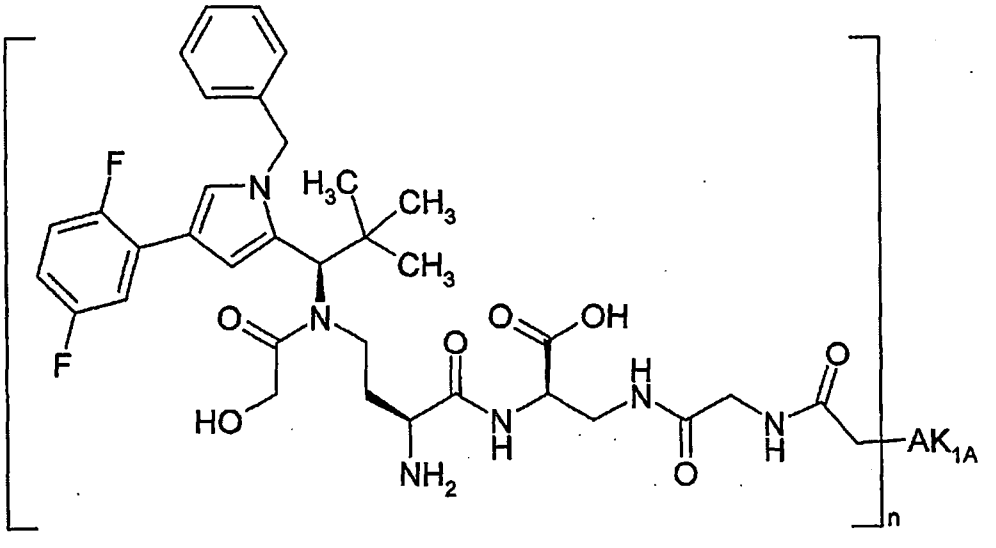
在氬氣下，將0.29 mg TCEP於500 µl PBS緩衝液中之溶液添加至

含50 mg抗-B7H3 AK_{1B}之4810 µl PBS (c=10.4 mg/ml)。反應物用4100 µl預先調至pH 8之PBS緩衝液稀釋且在室溫下1小時攪拌。接著添加溶於500 µl DMSO中之2.856 mg (0.007 mmol)中間物F257。在室溫下再攪拌90分鐘後，反應施加至已用PBS緩衝液pH 8平衡之PD 10管柱(Sephadex® G-25，GE Healthcare)且用PBS緩衝液pH 8溶離。將溶離液在氬氣下在室溫下攪拌隔夜且接著藉由超離心濃縮且再用PBS緩衝液(pH 7.2)稀釋。在此等條件下，一些ADC亦可呈閉環形式存在。所得批次ADC特徵如下：

蛋白質濃縮：10.81 mg/ml

藥物/mAb比率：4.5

實例259L1

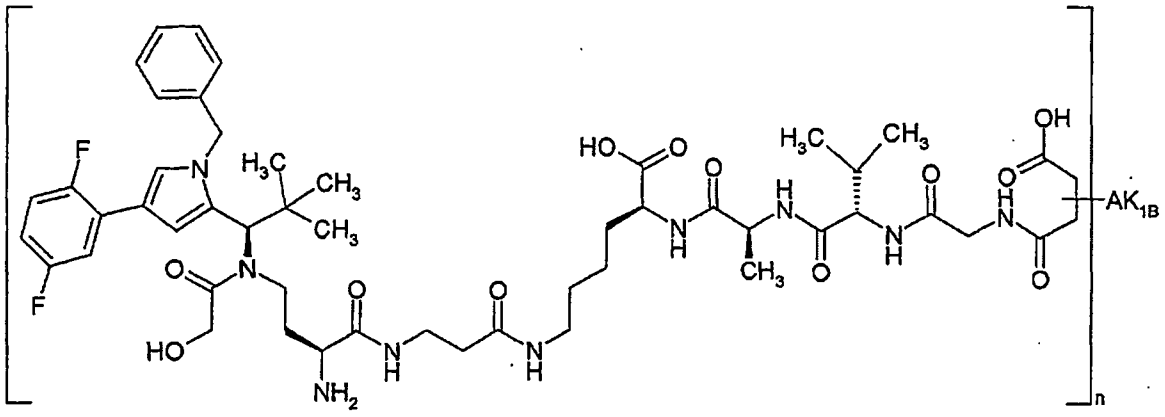


此處，含5 mg抗-B7H3 AK_{1A}之515 µl PBS (c=9.7 mg/ml)用於與中間物F259偶合。抗體還原時間為30分鐘，且添加0.245 mg (0.267 µmol) F259後，將反應在室溫下攪拌20小時且接著在Sephadex上純化。溶離液完全藉由超離心濃縮且再用PBS稀釋。

蛋白質濃縮：1.43 mg/ml

藥物/mAb比率：3.0

實例260L2



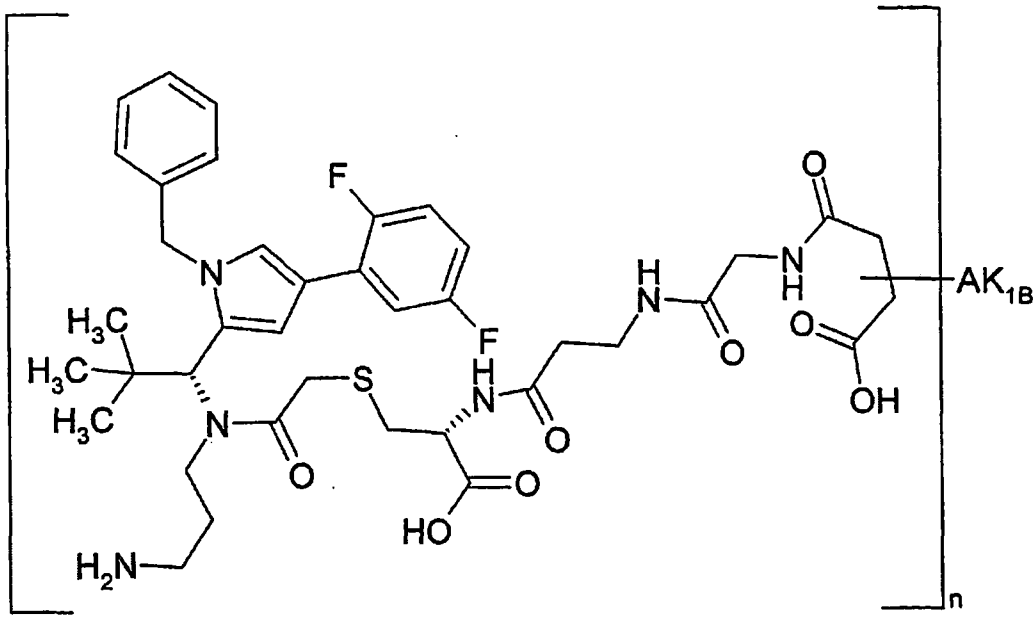
在氬氣下，將0.029 mg TCEP於50 µl PBS緩衝液中之溶液添加至含5 mg抗-B7H3 AK_{1B}之510 µl PBS (c=9.8 mg/ml)。將反應在室溫下攪拌30分鐘，且接著添加溶於50 µl DMSO中之0.302 mg (0.00027 mmol)中間物F260。在室溫下再攪拌90分鐘後，反應物用1890 µl預先調至pH 8之PBS緩衝液稀釋。

此溶液接著已用PBS緩衝液pH 8平衡之施加至PD 10管柱(Sephadex® G-25，GE Healthcare)且用PBS緩衝液pH 8溶離。將溶離液在氬氣下在室溫下攪拌隔夜且接著藉由超離心濃縮且再用PBS緩衝液(pH 7.2)稀釋。在此等條件下，一些ADC亦可呈閉環形式存在。所得批次ADC特徵如下：

蛋白質濃縮：1.05 mg/ml

藥物/mAb比率：3.6

實例263L2

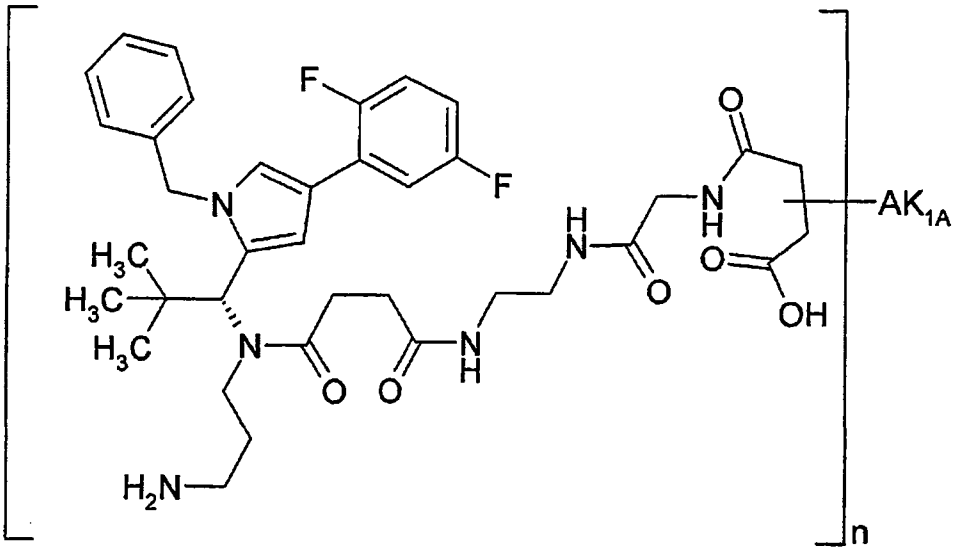


在氬氣下，將0.029 mg TCEP於50 µl PBS緩衝液中之溶液添加至含5 mg抗-B7H3 AK_{1B}之481 µl PBS (c=10.4 mg/ml)且將反應在室溫下攪拌30分鐘。接著添加溶於50 µl DMSO中之0.209 mg (0.00023 mmol)中間物F263。在室溫下再攪拌90分鐘後，反應物用1910 µl 預先調至pH 8之PBS緩衝液稀釋且接著施加至已用PBS緩衝液pH 8平衡之PD 10管柱(Sephadex® G-25，GE Healthcare)且用PBS緩衝液pH 8溶離。將溶離液在氬氣下在室溫下攪拌隔夜且接著藉由超離心濃縮且再用PBS緩衝液(pH 7.2)稀釋。在此等條件下，一些ADC亦可呈閉環形式存在。所得批次ADC特徵如下：

蛋白質濃縮：1.50 mg/ml

藥物/mAb比率：3.6

實例270L1

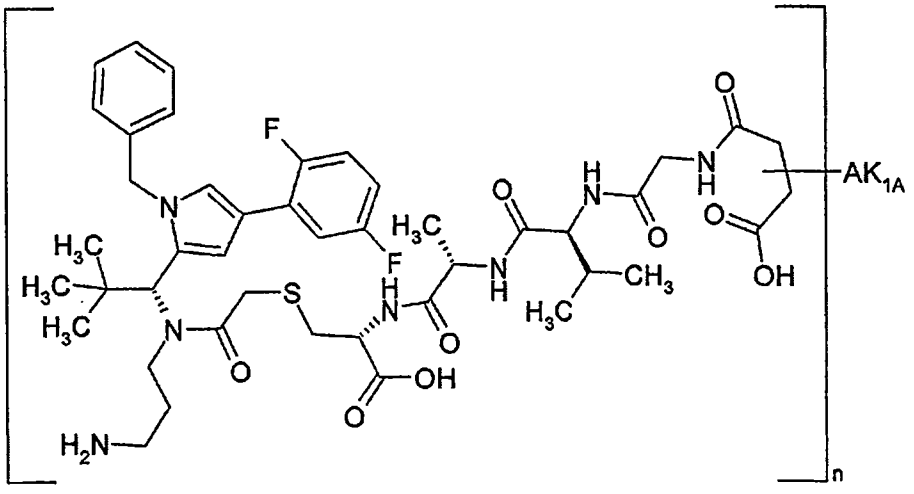


在氬氣下，將0.029 mg TCEP於50 µl PBS緩衝液中之溶液添加至含5 mg抗-B7H3 AK_{1A}之516 µl PBS (c=9.7 mg/ml)。反應物用1834 µl預先調至pH 8之PBS緩衝液稀釋且在室溫下1小時攪拌。接著添加溶於100 µl DMSO中之0.188 mg (0.00023 mmol)中間物F270。在室溫下再攪拌90分鐘後，反應施加至已用PBS緩衝液pH 8平衡之PD 10管柱(Sephadex® G-25，GE Healthcare)且用PBS緩衝液pH 8溶離。將溶離液在氬氣下在室溫下攪拌隔夜且接著藉由超離心濃縮且再用PBS緩衝液(pH 7.2) 稀釋。在此等條件下，一些ADC亦可呈閉環形式存在。所得批次ADC特徵如下：

蛋白質濃縮：1.02 mg/ml

藥物/mAb比率：2.8

實例274L1

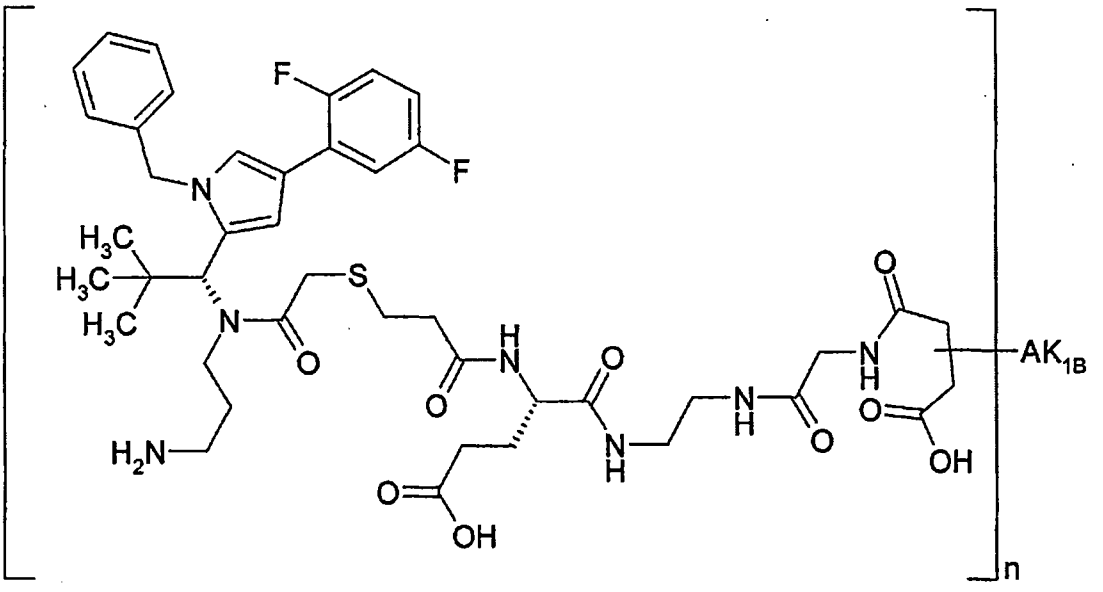


在氬氣下，將0.029 mg TCEP於50 µl PBS緩衝液中之溶液添加至含5 mg抗-B7H3 AK_{1A}之516 µl PBS (c=9.7 mg/ml)。反應物用1834 µl預先調至pH 8之PBS緩衝液稀釋且在室溫下1小時攪拌。接著添加溶於100 µl DMSO中之0.232 mg (0.00023 mmol)中間物F274。在室溫下再攪拌90分鐘後，反應施加至已用PBS緩衝液pH 8平衡之PD 10管柱(Sephadex® G-25，GE Healthcare)且用PBS緩衝液pH 8溶離。將溶離液在氬氣下在室溫下攪拌隔夜且接著藉由超離心濃縮且再用PBS緩衝液(pH 7.2)稀釋。在此等條件下，一些ADC亦可呈閉環形式存在。所得批次ADC特徵如下：

蛋白質濃縮：1.13 mg/ml

藥物/mAb比率：2.9

實例275L2



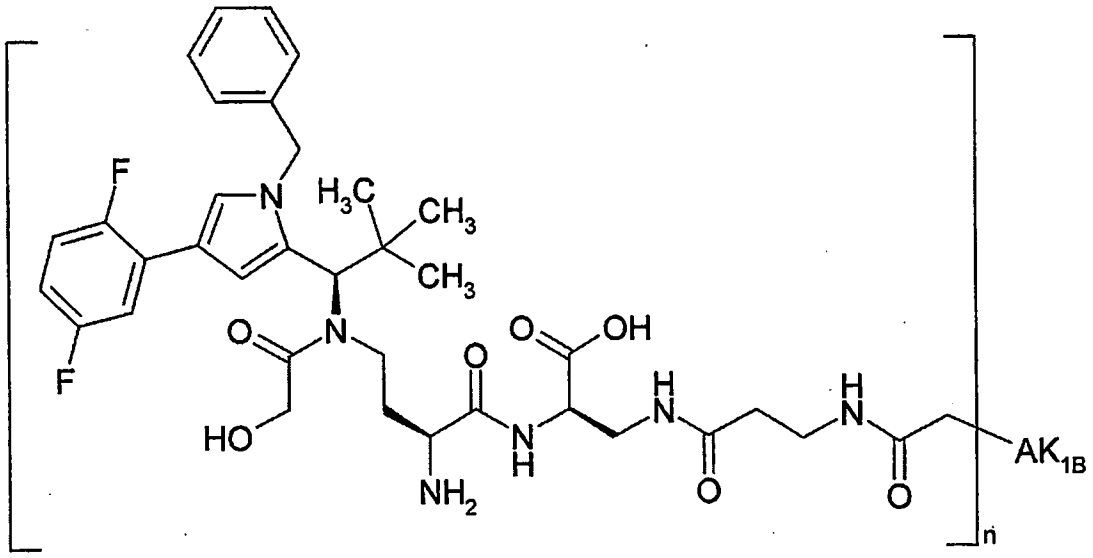
在氬氣下，將0.029 mg TCEP於50 µl PBS緩衝液中之溶液添加至含5 mg抗-B7H3 AK_{1B}之510 µl PBS (c=9.8 mg/ml)。反應物用1840 µl預先調至pH 8之PBS緩衝液稀釋且在室溫下1小時攪拌。接著添加溶於100 µl DMSO中之0.229 mg (0.00023 mmol)中間物F275。在室溫下再攪拌90分鐘後，反應施加至已用PBS緩衝液pH 8平衡之PD 10管柱(Sephadex® G-25，GE Healthcare)且用PBS緩衝液pH 8溶離。將溶離

液在氬氣下在室溫下攪拌隔夜且接著藉由超離心濃縮且再用PBS緩衝液(pH 7.2)稀釋。在此等條件下，一些ADC亦可呈閉環形式存在。所得批次ADC特徵如下：

蛋白質濃縮：1.18 mg/ml

藥物/mAb比率：3.8

實例281L2

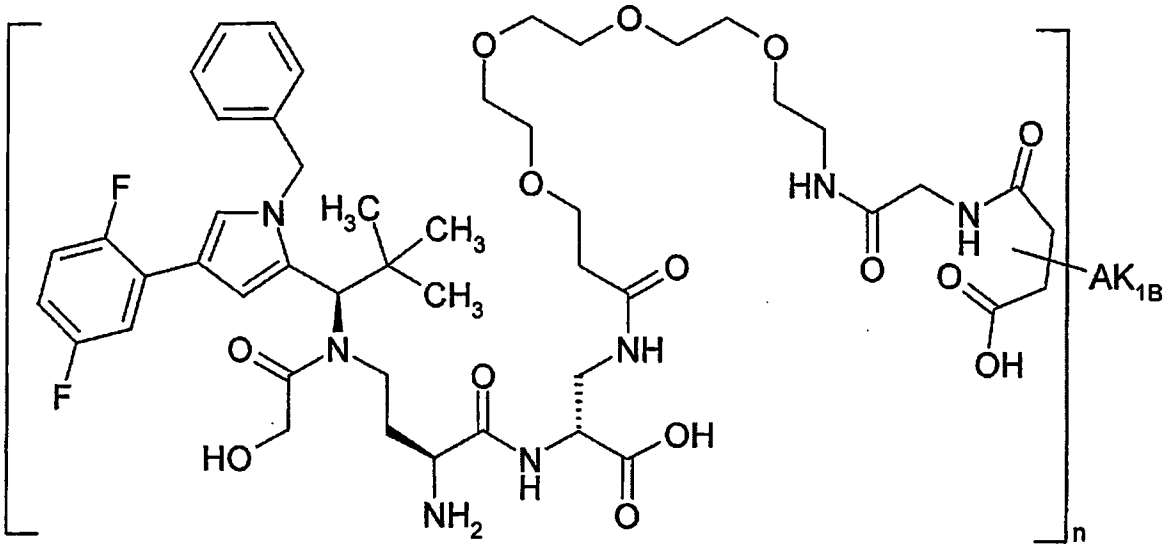


此處，含5 mg抗-B7H3 AK_{1B}之510 µl PBS pH 7.2 (c=9.8 mg/ml)用於與中間物F281偶合。在0.029 mg TCEP存在下抗體還原時間為30分鐘。添加含0.22 mg (0.23 µmol) F281之50 µl DMSO後，接著在室溫下攪拌反應20小時且隨後在Sephadex上純化。溶離液最終藉由超離心濃縮且再用PBS稀釋。

蛋白質濃縮：1.32 mg/ml

藥物/mAb比率：2.4

實例284L2

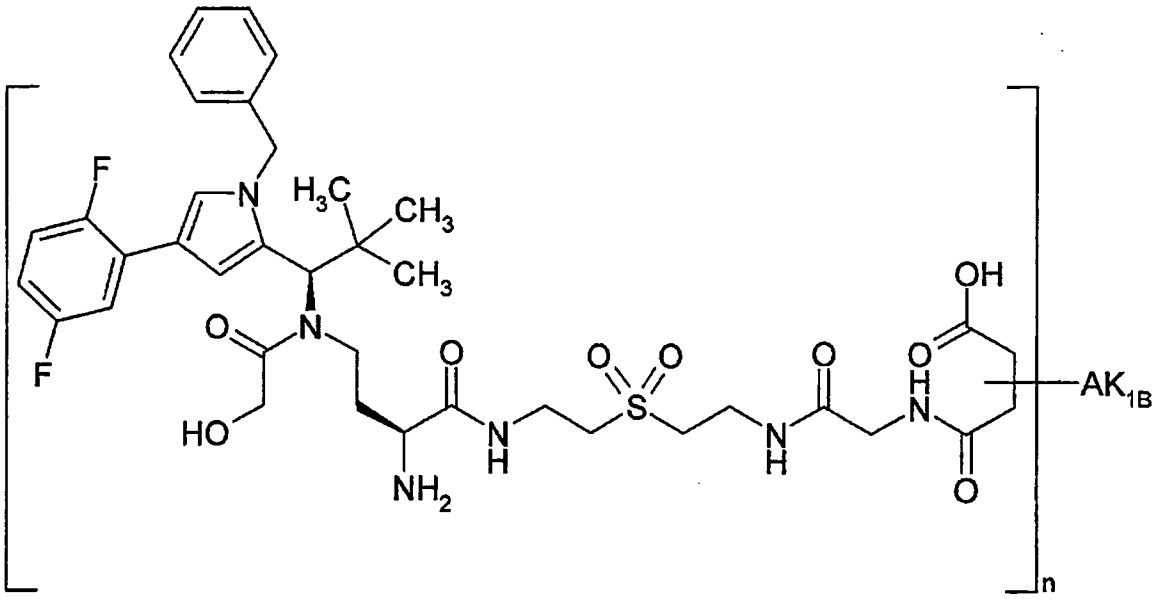


在氬氣下，將0.029 mg TCEP於50 µl PBS緩衝液中之溶液添加至含5 mg抗-B7H3 AK_{1B}之510 µl PBS (c=9.8 mg/ml)，且將混合物在室溫下攪拌30分鐘。接著添加溶於50 µl DMSO中之0.26 mg (0.23 µmol)中間物F284。在室溫下再攪拌90分鐘後，混合物用PBS緩衝液 pH 8補至2.5 ml且通過用PBS緩衝液pH 8平衡之PD 10管柱(Sephadex® G-25，GE Healthcare)，用PBS緩衝液pH 8溶離且接著在室溫下攪拌隔夜。溶離液接著藉由超離心濃縮且再用PBS緩衝液 (pH 7.2)稀釋。所得批次ADC特徵如下：

蛋白質濃縮：1.34 mg/ml

藥物/mAb比率：3.0

實例296L2

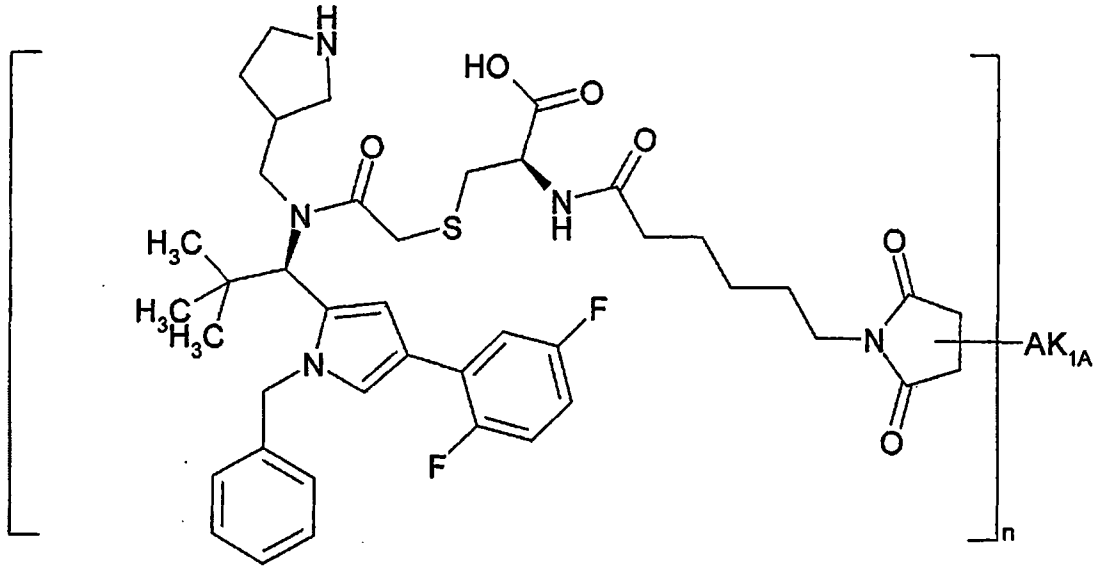


在氬氣下，將0.029 mg TCEP於50 µl PBS緩衝液中之溶液添加至含5 mg抗-B7H3 AK_{1B}之510 µl PBS (c=9.8 mg/ml)，且將混合物在室溫下攪拌30分鐘。接著添加溶於50 µl DMSO中之0.21 mg (0.23 µmol)中間物F296。在室溫下再攪拌90分鐘後，混合物用PBS緩衝液pH 8補至2.5 ml且通過用PBS緩衝液pH 8平衡之PD 10管柱(Sephadex® G-25，GE Healthcare)，用PBS緩衝液pH 8溶離且接著在氬氣下在室溫下攪拌隔夜。接著溶離液藉由超離心濃縮且再用PBS緩衝液(pH 7.2)稀釋。所得批次ADC特徵如下：

蛋白質濃縮：1.31 mg/ml

藥物/mAb比率：3.2

實例297L1 (異構體1)

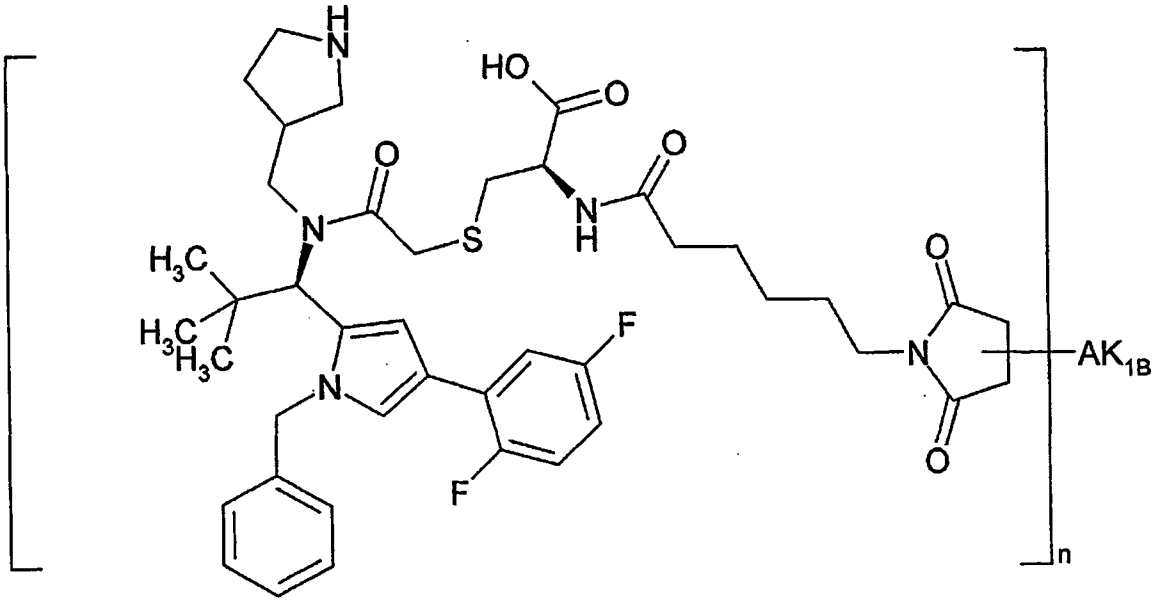


此處，含5 mg抗-B7H3 AK_{1A}之510 µl PBS pH 7.2 (c=9.7 mg/ml)用於與中間物F297偶合。在0.029 mg TCEP存在下抗體還原時間為30分鐘。添加含0.23 mg (0.26 µmol) F297之50 µl DMSO後，接著在室溫下攪拌反應2小時且隨後在Sephadex上純化。溶離液最終藉由超離心濃縮且再用PBS稀釋。

蛋白質濃縮：0.97 mg/ml

藥物/mAb比率：2.4

實例297L2 (異構體1)



此處，含5 mg抗-B7H3 AK_{1B}之515 µl PBS pH 7.2 (c=9.8 mg/ml)用於與中間物F297偶合。在0.029 mg TCEP存在下抗體還原時間為30

分鐘。添加含0.23 mg (0.26 μmol) F297之50 μl DMSO後，接著在室溫下攪拌反應2小時且隨後在Sephadex上純化。溶離液最終藉由超離心濃縮且再用PBS稀釋。

蛋白質濃縮：1.43 mg/ml

藥物/mAb比率：3.1

C: 生物學功效之評估

本發明化合物之生物活性可展示於下述分析中：

a. C-1a 測定針對B7H3之ADC的細胞毒性作用

利用多種細胞株分析抗-B7H3 ADC之細胞毒性作用：

A498：人類腎癌細胞，ATCC-CRL-HTB-44，標準培養基：RPMI 1640；(Biochrom；# FG 1215，具有穩定麩醯胺酸) + 10% FCS (Biochrom；# S0415)，B7H3陽性。

MCF-7：人類乳癌細胞，標準培養基：RPMI 1640；(Biochrom；# F 1275，不具有酚紅) + E2 (最終：1E-10M；ß-雌二醇，Sigma # E2758或ZK 5018，CLL中) + 10% CCS，+ 2 mU/ml胰島素(牛類，Biochrom；# K 3510) + L-丙胺醯基-L-麩醯胺酸；(最終：2 mM，Biochrom；# K 0302)，B7H3陽性。

Caki-2：人類腎癌細胞，ATCC-HTB-27，標準培養基：DMEM/Ham's F12 (#FG4815，Biochrom AG) + 10% FCS (#F2442，Sigma)，B7H3陽性。

Raji：人類伯基特氏淋巴瘤細胞，DMSZ-ACC-319，標準培養基：RPMI 1640；(Biochrom；# FG 1215，具有穩定麩醯胺酸) + 10% FCS (Biochrom；# S0415)，B7H3陰性。

NCI-H292：人類黏液表皮樣肺癌細胞，ATCC-CRL-1848，標準培養基：RPMI 1640 (Biochrom；#FG1215，穩定麩醯胺酸) + 10% FCS (Biochrom；#S0415)。

細胞藉由如美國組織培養收藏中心(American Tissue Culture Collection；ATCC)針對相關細胞株所述之標準方法培育。

CTG分析

使用C-1下所列之生長培養基，根據標準方法培育細胞。如下進行測試：用胰蛋白酶(0.05%)及EDTA (0.02%)於PBS (Biochrom AG #L2143)中之溶液分離細胞，粒化，再懸浮於培養基中，計數且接種於具有白色底之96孔培養盤(Costar #3610)(75 µl/孔，每孔細胞數目如下：NCI-H292：2500個細胞/孔，BxPC3 2500個細胞/孔)中，且在培育箱中在37℃及5%二氧化碳下培育。24小時之後，向細胞中添加含有抗體藥物結合物之25 µl培養基(四倍濃縮)，使得細胞上之抗體藥物結合物最終濃度達到3×10^{-7} M至3×10^{-11} M (一式三份)。細胞接著在培育箱中在37℃及5%二氧化碳下培育。在一並行培養盤中，在藥物處理開始時(第0天)，使用Cell Titer Glow (CTG)發光細胞存活率分析(Promega #G7573及#G7571)測定細胞活力。為此目的，每批細胞中添加100 µl受質，接著用鋁箔覆蓋培養盤，在盤振盪器上以180 rpm振盪2分鐘，在實驗台上擱置8分鐘且接著使用光度計(Victor X2，Perkin Elmer)量測。受質偵測活細胞中之ATP內容物，產生發光信號，其高度與細胞活力成正比。與抗體藥物結合物一起培育72小時之後，亦使用如上文所述之Cell Titer Glow發光細胞存活率分析來測定此等細胞的活力。根據量測資料，使用DRC (劑量反應曲線)分析試算表，經由4參數擬合來計算相較於第0天之生長抑制IC_{50}。DRC分析試算表為Bayer Pharma AG及Bayer Business Services在IDBS E-WorkBook套件平台(IDBS: ID Business Solutions Ltd., Guildford, UK)上所開發的Biobook試算表。

下表1a列舉此分析中之抗-B7H3抗體之代表性實施例的IC_{50}值：

表1a

	A498 IC_{50} [M] CTG	MCF-7 IC_{50} [M] CTG	Caki-2 IC_{50} [M] CTG	Raji IC_{50} [M] CTG
173L1	6.00E-7	4.98E-09	-	6.00E-7
194L2	3.57E-10	2.08E-10	2.75E-10	1.31E-7
208L2	8.91E-10	2.42E-10	5.99E-9	1.14E-7
240L1	2.35E-09	7.25E-10		9.97E-08
257L2	1.16E-10	7.37E-11	1.50E-11	8.75E-08
270L1	6.00E-7	7.00E-08	-	6.00E-7
263L2	<3.0E-11	2.49E-10	>3.0E-7	1.13E-07
194L1	-	6.43E-10	-	>3.00E-7
257L1	-	4.49E-10	-	1.17E-7
259L1	-	4.57E-9	-	>3.00E-7
260L2	-	2.15E-10	-	>3.00E-7
284L2	-	7.02E-10	-	>3.00E-7
274L1	-	1.86E-9	-	1.15E-7
297L1	-	8.93E-9	-	1.41E-7
297L2	>3.00E-7	7.56E-10	>3.00E-7	1.20E-7
240L2	- 7.49E-10	1.58E-10	- >3.00E-7	5.44E-8
275L2	- >3.00E-7	9.15E-11	- >3.00E-7	8.18E-8
257L2	- 1.37E-10	8.63E-11	- <3.00E-11	6.65E-8
296L2	- 6.22E-10	1.63E-10	- >3.00E-7	1.05E-7
281L2	- 1.39E-08	3.42E-8	- 5.26E-9	>3.00E-7
M09	1.65E-11	1.50E-11	9.75E-11	1.50E-11

所報導之活性資料關於本發明實驗章節中所述之實施例，其中指示藥物/mAB比率。該等值可能因藥物/mAB比率不同而偏離。IC_{50}值為若干個獨立實驗或個別值之平均值。B7H3抗體藥物結合物之作用相對於包含相應發毒團之相應同型對照為選擇性的，且相對於非B7H3表現之腫瘤細胞為標靶特異性的。未結合之B7H3抗體同樣對上述細胞株未展示作用。

MTT分析

使用C-1下所列之生長培養基，根據標準方法培育細胞。如下進行測試：用阿庫酶於PBS (Biochrom AG #L2143)中之溶液分離細胞，粒化，再懸浮於培養基中，計數且接種於具有白色底之96孔培養盤(Costar #3610)(NCI H292：2500個細胞/孔，100 µl總體積)中。細胞接著在培育箱中在37℃及5%二氧化碳下培育。48小時之後，置換培養

基。接著將濃度為10^{-5}M至10^{-13}M之10 μl培養基中之代謝物吸至細胞(一式三份)，且接著在培育箱中在37℃及5%二氧化碳下培育分析物。96小時之後，使用MTT分析(ATCC, Manassas, Virginia, USA；目錄號30-1010K)偵測細胞增殖。為此目的，將MTT試劑與細胞一起培育4小時，隨後藉由添加清潔劑來溶解細胞隔夜。在570 nm下(Infinite M1000 pro, Tecan)偵測所形成之染料。使用DRC (劑量反應曲線)，利用所量測之資料計算生長抑制IC_{50}。未經測試物質處理、但以其他方式相同地處理之細胞的增殖定義為100%數字。

C-1b 測定所選實例對驅動蛋白紡錘體蛋白質KSP/Eg5之抑制作用

在室溫下，將人類驅動蛋白紡錘體蛋白質KSP/Eg5 (tebu-bio/Cytoskeleton Inc，編號027EG01-XL)之馬達域在10 nM之濃度下與經50 μg/ml紫杉醇(Sigma，編號T7191-5MG)穩定化之微管(牛類或豬類動物，tebu-bio/Cytoskeleton Inc)一起在15 mM PIPES pH 6.8 (5 mM $MgCl_2$及10 mM DTT，Sigma)中培育5分鐘。將新鮮製備之混合物等分試樣至384 MTP (Greiner bio-one REF 781096)中。接著添加濃度為1.0×10^{-6} M至1.0×10^{-13} M的待檢查之抑制劑及ATP (最終濃度500 μM，Sigma)。在室溫下培育2小時。藉由使用孔雀綠(Biomol)偵測所形成之無機磷酸鹽來偵測ATP酶活性。添加試劑之後，分析物在室溫下培育50分鐘，隨後在620 nm波長下偵測吸收。所用陽性對照物為蒙納曲醇(Sigma，M8515-1 mg)及伊斯平斯(AdooQ Bioscience A10486)。劑量活性曲線之個別資料為八倍測定。IC_{50}值為兩次獨立實驗之平均值。100%對照為尚未經抑制劑處理之樣品。

下表2列舉利用所述分析及相應細胞毒性資料(MTT分析)所得之代表性實施例的IC_{50}值。

表2

實例	KSP分析 IC_{50} [M]	NCI-H292 IC_{50} [M] MTT分析	KPL4 IC_{50} [M] MTT分析
M1	2.01E-09	5.00E-07	5.00E-07
M2	2.45E-09	2.04E-07	1.63E-07
M3	1.52E-09	3.21E-08	9.00E-08
M4	2.71E-10	4.43E-08	1.76E-07
M5	4.57E-10	7.94E-08	2.22E-07
M6	1.78E-09	4.63E-08	1.93E-07
M7	6.21E-10	2.22E-08	9.25E-08
M9	1.07E-09	7.74E-10	2.57E-10
M10	4.70E-10	3.03E-07	2.26E-07
M11	1.11E-09	4.32E-11	
M12	4.46E-10	3.3E-08	
M13	1.50E-09	1.52E-07	1.69E-07
M14	2.16E-09	1.74E-07	1.82E-07
M15	9.64E-10	1.33E-07	1.69E-07
M16	1.48E-09	1.43E-07	1.95E-07
M17	4.17E-09	7.35E-09	
M18	5.17E-09	3.55E-08	
M19	2.58E-09	1.21E-07	
M20	1.14E-07		
M21	2.31E-09		
M22	8.27E-10	2.89E-08	1.82E-07
M23	1.26E-09	5.00E-07	5.00E-07
M24	2.90E-09	1.67E-07	5.00E-07
M25	2.91E-09	5.00E-07	5.00E-07
M26	9.441E-10	6.38E-08	
M27	2.03E-09	2.76E-07	

所報導之活性資料關於本發明實驗章節中所述的實施例。

C-2內化分析

內化為能夠經由抗體藥物結合物(ADC)在表現抗原之癌細胞中特異性且有效提供細胞毒性有效負載的關鍵過程。經由特異性B7H3抗體及同型對照抗體之螢光標記來監測此過程。首先，使螢光染料與抗體之離胺酸結合。使用兩倍莫耳濃度過量之CypHer 5E單NHS酯(批次357392，GE Healthcare)，在pH 8.3下進行結合。偶合之後，反應混合物藉由凝膠層析(Zeba旋轉脫鹽管柱，40K，Thermo Scientific，編號87768；溶離緩衝液：DULBECCO'S PBS，Sigma-Aldrich，編號D8537)純化，以消除過量染料及調節pH。使用VIVASPIN 500管柱

(Sartorius stedim biotec)濃縮蛋白質溶液。抗體之染料負載量藉助於分光光度分析(NanoDrop)及隨後計算(D: P =$A_{染料}\varepsilon_{蛋白質}$: (A_{280}-0.16$A_{染料}$)$\varepsilon_{染料}$)確定。在此所檢查之B7H3抗體及同型對照物的染料負載量具有類似數量級。在細胞結合分析中，證實結合不會引起抗體親和力發生變化。

內化分析中使用經標記之抗體。在起始此處理前，100 μl培養基中細胞(2×10^4/孔)接種於96-MTP (粗，黑色，透明底部，編號4308776，來自Applied Biosystems)中。在37℃/5% CO_2下培育18小時之後，置換培養基且添加多種濃度(10、5、2.5、1、0.1 μg/ml)之經標記抗-B7H3抗體。對經標記之同型對照(陰性對照)使用相同處理方案。所選培育時間為0小時、0.25小時、0.5小時、1小時、1.5小時、2小時、3小時、6小時及24小時。使用InCellAnalyzer 1000 (得自GE Healthcare)進行螢光量測。經由量測參數顆粒數/細胞及總顆粒強度/細胞來進行動力學評價。

結合於B7H3之後，檢查B7H3抗體之內化能力。為此目的，選擇兩種不同的表現B7H3之細胞株(A498、786-O)。觀測到B7H3抗體之標靶介導之特異性內化，而同型對照未展示內化(實例A498-細胞圖2)。

C-3 用於測定細胞滲透性之活體外測試

物質之細胞滲透性可藉助於活體外測試，在使用Caco-2細胞之通量分析[M.D. Troutman及D.R. Thakker, *Pharm. Res.* 20 (*8*), 1210-1224 (2003)]中研究。為此目的，將細胞在24孔過濾盤上培養15-16天。為測定滲透，將相應測試物質於HEPES緩衝液中施加於細胞頂端(A)或基底(B)上且培育2小時。0小時之後及2小時之後，自順式及反式隔室中獲取樣品。藉由使用逆相管柱之HPLC (Agilent 1200, Böblingen, Germany)分離樣品。HPLC系統經由Turbo離子噴霧界面與Triple Quadropol質譜儀API 4000 (AB SCIEX Deutschland GmbH, Darmstadt,

Germany)耦聯。基於P_{app}值來評價滲透性，其係使用Schwab等人公開之式計算[D. Schwab等人, *J. Med. Chem.* 46, 1716-1725 (2003)]。當P_{app} (B-A)相對於P_{app} (A-B)之比率(流出比率)>2或<0.5時，物質歸類為主動輸送。

對於細胞內釋放之發毒團而言，至關重要的為B至A之滲透率[P_{app}(B-A)]及P_{app} (B-A)相對於P_{app} (A-B)的比率(流出比率)：此滲透率愈低，物質穿過Caco-2細胞單層之主動及被動輸送過程則愈慢。若流出比率未另外指示任何主動輸送，則細胞內釋放之後，物質可較長時間保留於細胞中。因此，可供與生物化學標靶(在此情況下：驅動蛋白紡錘體蛋白質，KSP/Eg5)發生相互作用的時間亦愈多。

下表3闡述此分析所得之代表性實施例的滲透率資料：

表3

實施例	P_{app} (B-A) [nm/s]	流出比率
M1	7.8	4
M2	4.8	6.4
M3	1.4	1.3
M4	21.3	18.7
M5	20.3	26.5
M6	1.7	0.7
M7	5.6	2.2
M9	213	16
M11	24.3	27.7
M12	3.3	1.8
M13	7.1	3.6
M14	12.7	6.6
M15	6.4	4.4
M16	9.0	7.0
M17	93.6	81.5
M18	1.6	2.9
M19	1.9	2.9
M21	0.5	1.5
M22	0.9	0.9
M23	2.8	2.0
M24	3.9	1.0
M25	8.1	3.6
M26	13.0	9.6
M27	13.2	11.9

C-4 用於測定P-醣蛋白(P-gp)之受質特性的活體外測試

許多腫瘤細胞表現用於藥物之轉運蛋白，且此時常伴有針對細胞抑制劑之抗性發展。舉例而言，不為此類轉運蛋白(諸如P-醣蛋白(P-gp)或BCRP)之受質的物質因此可展現改良之活性型態。

用於P-gp之物質(ABCB1)的受質特性係藉助於使用過度表現P-gp之LLC-PK1細胞(L-MDR1細胞)的通量分析[A.H. Schinkel等人, *J. Clin. Invest.* 96, 1698-1705 (1995)]來測定。為此目的，將LLC-PK1細胞或L-MDR1細胞在96孔過濾盤上培養3-4天。測定滲透率時，將單獨或在抑制劑(諸如伊維菌素(ivermectin)或維拉帕米(verapamil))存在下的相應測試物質於HEPES緩衝液中施加於細胞頂端(A)或基底(B)且培育2小時。0小時之後及2小時之後，自順式及反式隔室中獲取樣品。藉由使用逆相管柱之HPLC分離樣品。HPLC系統經由Turbo離子噴霧界面與Triple Quadropol質譜儀API 3000 (Applied Biosystems Applera, Darmstadt, Germany)耦聯。基於P_{app}值來評價滲透性，其係使用Schwab等人公開之式計算[D. Schwab等人, *J. Med. Chem.* 46, 1716-1725 (2003)]。當P_{app} (B-A)相對於P_{app} (A-B)的流出比率>2時，物質歸類為P-gp受質。

作為評估P-gp受質特性之其他準則，可比較L-MDR1及LLC-PK1細胞中之流出比率或在抑制劑存在或不存在下之流出比率。若此等值相差大於2倍，則相關物質為P-gp受質。

C-6 活體內活性測試

例如使用異種移植模型，活體內測試根據本發明之結合物之活性。熟習此項技術者熟悉先前技術之方法，其可用於測試根據本發明之化合物之活性(參見例如WO 2005/081711；Polson等人, Cancer Res. 2009年3月15日; 69(6): 2358-64)。為此目的，例如，將表現結合劑之標靶分子的腫瘤細胞株植入嚙齒動物(例如小鼠)中。接著將本發明之

結合物、同型抗體對照結合物或對照抗體或等張生理鹽水投與植入動物。投藥進行一次或超過一次。培育若干天時間後，將腫瘤之尺寸與經結合物處理之動物及對照組相比。經結合物處理之動物顯示較小的腫瘤尺寸。

C-6a. 小鼠中實驗腫瘤之生長抑制/消退

將表現**抗體藥物結合物**之抗原的人類腫瘤細胞皮下接種於免疫抑制小鼠(例如NMRi裸小鼠或SCID小鼠)之旁側中。自細胞培養物中分離一百萬個至一千萬個細胞，離心且再懸浮於培養基或培養基/基質膠中。細胞懸浮液注射於小鼠皮下。

在數天內，腫瘤生長。在腫瘤本身大約確定為40 mm^2之腫瘤尺寸後開始處理。為檢查對較大腫瘤之作用，亦可僅僅在50-100 mm^2之腫瘤尺寸下開始處理。

經由至小鼠尾靜脈之靜脈內(i.v.)途徑，進行ADC處理。ADC以5 ml/kg之體積投與。

處理方案視抗體之藥物動力學而定。標準處理為每四天連續三次。在緩慢生長之腫瘤之情況下，推薦一週處理一次。對於短期評估，亦可適合採用其中僅僅處理一次之方案。然而，亦可繼續處理，或可接著為在隨後時間點第二週期之三天處理。

作為標準，採用每個處理組8隻動物。除接收藥物之組外，一組根據相同方案，僅僅用緩衝液處理，作為對照組。

在實驗過程期間，使用測徑規定期量測腫瘤之二維面積(長度/寬度)。腫瘤面積係以長度×寬度測定。處理組之平均腫瘤面積與對照組之平均腫瘤面積的比較係以T/C面積陳述。

若所有實驗組在處理結束後同時終止，則可移除腫瘤且稱重。處理組之平均腫瘤重量與對照組之平均腫瘤重量的比較係以T/C重量陳述。

C-6b. 不同腫瘤模型中抗-B7H3抗體藥物結合物之活性

腫瘤細胞皮下接種至雌性NMRI-裸小鼠(Janvier)之旁側中。腫瘤尺寸為約40 mm^2時，用**抗體藥物結合物**進行靜脈內處理。處理之後，視情況進一步監測腫瘤生長。

相較於對照組及未結合之抗-B7H3抗體，用抗-B7H3抗體藥物結合物處理對腫瘤產生明顯且持久的生長抑制作用。表8展示經由自處理起始計算之相應天數之腫瘤面積確定的最佳T/C值。

表8：

實例	腫瘤模型	劑量	給藥方案	T/C_{opt}面積
104L1	A498	5 mg/kg	Q4dx3	0.62 (D15)
208L2 257L2	A498	10 mg/kg	Q7dx3	0.49 (D14) 0.60 (D14)
208L2 257L2	MCF-7	10 mg/kg	Q7dx4	0.67 (D24) 0.44 (D24)
208L2 257L2	Caki-2	10 mg/kg	Q7dx4	0.65 (D24) 0.59 (D24)

AK-實例1：TPP5706及其人類化衍生物

如上所述合成TPP5706。使用ELISA表徵TPP5706與人類B7H3及與人類B7H2及B7H4之結合。在37℃下將黑色384孔Maxisorp盤(Nunc)塗上含抗人類IgG Fc (Sigma，I2316；1:440稀釋)之單塗佈緩衝液(Candor)，歷時一小時。用PBS、0.05%Tween洗滌一次後，將培養盤在37℃下用100% Smart Block (Candor)阻斷一小時。接著將待測試之抗體(例如TPP5706或其衍生物之一)連接至培養盤(含2 μg/ml IgG之PBS、0.05% Tween、10% Smart Block；1小時，室溫)。洗滌三次後，將培養盤與相關抗原或僅僅緩衝液(37 ng/ml於PBS、0.05% Tween、10% Smart Block；B7H2：RnDSystems，8206-B7；B7H3：RnDSystems，2318-B3-050/CF；B7H4：RnDSystems，6576-B7；1小時，室溫)一起培育。洗滌三次後，培養盤與抗-His HRP抗體(Novagen，71840-3；1:10 000稀釋；1小時，室溫)一起培育。洗滌三

次後，將培養盤與Amplex Red一起培育30分鐘且接著讀數。表AK-1中之資料展示TPP5706結合B7H3，但不結合B7H2或B7H4。

表AK-1：TPP5706及TPP3803與B7H2、B7H3及B7H4之結合

B7蛋白	B7H2	B7H3	B7H4
TPP5706信號(B7)/信號(緩衝液)之商	< 1.5	294	< 1.5
TPP3803信號(B7)/信號(緩衝液)之商	< 1.5	51	< 1.5

藉助於其特異性結合於B7H3，TPP5706為研發用於治療疾病及涉及表現B7H3之細胞之其他不良作用的治療劑的適合候選人。因為抗體具有鼠類來源，所以使用標準方法人類化(參見例如Almagro及Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008))。尤其TPP6642及TPP6850適合於進一步最佳化，因為其與B7H3之結合實質上不受影響(表AK-2)。根據本發明，可藉由以下列出之胺基酸取代，實現TPP6642及TPP6850與人類生殖系序列之更接近相似性：

對於**TPP6642**，輕鏈中此等為：E27Q、N28S、N30S、N31S、T34N、F36Y、Q40P、S43A、Q45K、H50A、K52S、T53S、A55Q、E56S、H90Q、H91S、G93S、P96L。對於**TPP6642**，重鏈中此等為：I31S、N33Y、V34M、T50I、F52N、G54S、N55G、D57S、N61A、K65Q、D66G、K67R、T72R、A79V。對於**TPP6850**，輕鏈中此等為：E27Q、N28S、N30S、N31S、T34N、F36Y、V48I、H50A、K52S、T53S、A55Q、E56S、Q70D、H90Q、H91S、G93S。對於**TPP6850**，重鏈中此等為：I31S、N33G、V34I、H35S、I37V、T50W、F52S、P53A、G54Y、D57N、S59N、N61A、F64L、K65Q、D66G、A68V、L70M、K74T、K77S、A107Q。

此等取代進一步降低在人類中之免疫源性，此為有利於基於本發明之抗體之治療劑研發的特性。

【符號說明】

無

【補充序列表】

<110> 德商拜耳製藥公司

<120> KSP抑制劑與抗-B7H3抗體之抗體藥物結合物(ADCs)

<130> BHC151036

<160> 41

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TPP-5706 VH

<400> 1

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Asn Val His Trp Ile Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Thr Ile Phe Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Lys Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Asp Gly Asn Val Gly Phe Ala His Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 2
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TPP-5706 H-CDR1

<400> 2

Ile Tyr Asn Val His
1 5

<210> 3
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TPP-5706 H-CDR2

<400> 3

Thr Ile Phe Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TPP-5706 H-CDR3

<400> 4

Trp Asp Asp Gly Asn Val Gly Phe Ala His
1 5 10

<210> 5
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TPP-5706 VL

<400> 5

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
35 40 45

Tyr His Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Pro
85 90 95

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

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TPP-5706 L-CDR1

<400> 6

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Asn Asn Tyr Leu Thr
1 5 10

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TPP-5706 L-CDR2

<400> 7

His Ala Lys Thr Leu Ala Glu
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TPP-5706 L-CDR3

<400> 8

Gln His His Tyr Gly Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 9
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TPP-5706重鏈(IgG)

<400> 9

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Asn Val His Trp Ile Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Thr Ile Phe Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Lys Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Asp Gly Asn Val Gly Phe Ala His Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 10
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TPP-5706輕鏈(IgG)

<400> 10

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
35 40 45

Tyr His Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 11
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TPP-6642 VH

<400> 11

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

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

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

Gly Thr Ile Phe Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Asp Gly Asn Val Gly Phe Ala His Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 12
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TPP-6642 H-CDR1

<400> 12

Ile Tyr Asn Val His
1 5

<210> 13
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TPP-6642 H-CDR2

<400> 13

Thr Ile Phe Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 14
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TPP-6642 H-CDR3

<400> 14

Trp Asp Asp Gly Asn Val Gly Phe Ala His
1 5 10

<210> 15
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TPP-6642 VL

<400> 15

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

Tyr His Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TPP-6642 L-CDR1

<400> 16

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Asn Asn Tyr Leu Thr
1 5 10

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TPP-6642 L-CDR2

<400> 17

His Ala Lys Thr Leu Ala Glu
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TPP-6642 L-CDR3

<400> 18

Gln His His Tyr Gly Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 19
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TPP-6642重鏈(IgG)

<400> 19

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

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

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

Gly Thr Ile Phe Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Asp Gly Asn Val Gly Phe Ala His Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 20
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TPP-6642輕鏈(IgG)

<400> 20

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

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

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

Tyr His Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 21
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TPP-6850 VH

<400> 21

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

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

Asn Val His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Thr Ile Phe Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Thr Lys Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Asp Gly Asn Val Gly Phe Ala His Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 22
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TPP-6850 H-CDR1

<400> 22

Ile Tyr Asn Val His
1 5

<210> 23
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TPP-6850 H-CDR2

<400> 23

Thr Ile Phe Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 24
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TPP-6850 H-CDR3

<400> 24

Trp Asp Asp Gly Asn Val Gly Phe Ala His
1 5 10

<210> 25
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TPP-6850 VL

<400> 25

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val
35 40 45

Tyr His Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 26
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TPP-6850 L-CDR1

<400> 26

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Asn Asn Tyr Leu Thr
1 5 10

<210> 27
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> TPP-6850 L-CDR2

<400> 27

His Ala Lys Thr Leu Ala Glu
1 5

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TPP-6850 L-CDR3

<400> 28

Gln His His Tyr Gly Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 29
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TPP-6850重鏈(IgG)

<400> 29

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

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

Asn Val His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Thr Ile Phe Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Thr Lys Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Asp Gly Asn Val Gly Phe Ala His Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 30
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TPP-6850輕鏈(IgG)

<400> 30

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val
35 40 45

Tyr His Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 31
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TPP-3803 VH

<400> 31

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

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gln Thr Thr Ala Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 32
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TPP-3803 H-CDR1

<400> 32

Asn Tyr Asp Ile Asn
1 5

<210> 33
<211> 17

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TPP-3803 H-CDR2

<400> 33

Trp Ile Phe Pro Gly Asp Gly Ser Thr Gln Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TPP-3803 H-CDR3

<400> 34

Gln Thr Thr Ala Thr Trp Phe Ala Tyr
1 5

<210> 35
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TPP-3803 VL

<400> 35

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Thr Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

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

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

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly His Ser Phe Pro Leu
85 90 95

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

<210> 36
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TPP-3803 L-CDR1

<400> 36

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr Leu His
1 5 10

<210> 37
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TPP-3803 L-CDR2

<400> 37

Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser
1 5

<210> 38
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TPP-3803 L-CDR3

<400> 38

Gln Asn Gly His Ser Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 39
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TPP-3803重鏈(IgG)

<400> 39

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

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gln Thr Thr Ala Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr

325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 40
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TPP-3803輕鏈(IgG)

<400> 40

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Thr Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

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

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

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly His Ser Phe Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 41
<211> 435
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TPP-3760

<400> 41

Gly Ala Leu Glu Val Gln Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val
1 5 10 15

Gly Thr Asp Ala Thr Leu Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe
20 25 30

Ser Leu Ala Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln
35 40 45

Leu Val His Ser Phe Ala Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala
50 55 60

Asn Arg Thr Ala Leu Phe Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser
65 70 75 80

Leu Arg Leu Gln Arg Val Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys
85 90 95

Phe Val Ser Ile Arg Asp Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val
100 105 110

Ala Ala Pro Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp
115 120 125

Leu Arg Pro Gly Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Gln Gly
130 135 140

Tyr Pro Glu Ala Glu Val Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu
145 150 155 160

Thr Gly Asn Val Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe
165 170 175

Asp Val His Ser Ile Leu Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr
180 185 190

Ser Cys Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Ser Ser
195 200 205

Val Thr Ile Thr Pro Gln Arg Ser Pro Thr Gly Ala Val Glu Val Gln
210 215 220

Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu
225 230 235 240

Arg Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn
245 250 255

Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Thr
260 265 270

Glu Gly Arg Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe
275 280 285

Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val
290 295 300

Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp
305 310 315 320

Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys
325 330 335

Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr
340 345 350

Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Arg Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val
355 360 365

Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr
370 375 380

Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu
385 390 395 400

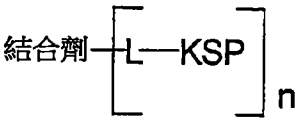
Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn
405 410 415

Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln
420 425 430

Pro Met Thr
435

申請專利範圍

1. 一種抗體與一或多個下式之藥物分子的結合物，



其中

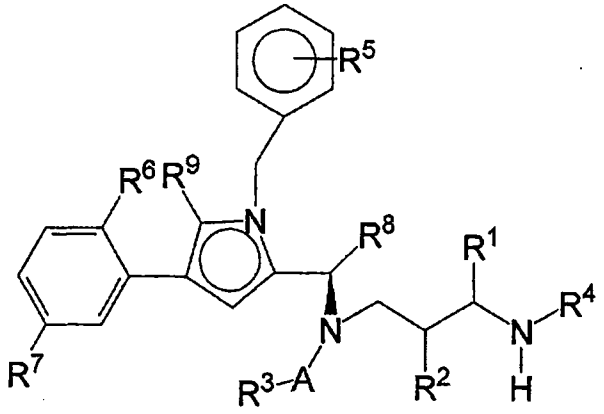
結合劑表示糖基化或去糖基化之抗-B7H3抗體，或表示其抗原結合片段，

L表示連接子，

n表示數值1至50，較佳1.2至20且尤其較佳2至8，且

KSP表示以下式(I)化合物：

式(I)：



其中

R^1表示-H、-L-#1、-MOD或$-(CH_2)_{0-3}Z$，

其中

Z表示-H、$-NHY^3$、$-OY^3$、$-SY^3$、鹵素、$-C(=O)-NY^1Y^2$或$-C(=O)-OY^3$，

Y^1及Y^2彼此獨立地表示-H、$-NH_2$、$-(CH_2CH_2O)_{0-3}-(CH_2)_{0-3}Z'$(例如$-(CH_2)_{0-3}Z'$)或$-CH(CH_2W)Z'$，

Y^3表示-H或$-(CH_2)_{0-3}Z'$，

Z'表示-H、$-NH_2$、$-SO_3H$、-COOH、$-NH-C(=O)-CH_2-CH_2-CH(NH_2)COOH$或$-(CO-NH-CHY^4)_{1-3}COOH$；

W表示H或OH，

Y^4表示視情況經$-NH-C(=O)-NH_2$取代之直鏈或分支鏈C_{1-6}烷基，或表示視情況經$-NH_2$取代之芳基或苯甲基；

R^2表示H、-MOD、$-C(=O)-CHY^4-NHY^5$或$-(CH_2)_{0-3}Z$，

其中

Z表示-H、鹵素、$-OY^3$、$-SY^3$、$-NHY^3$、$-C(=O)-NY^1Y^2$或$-C(=O)-OY^3$，

Y^1及Y^2彼此獨立地表示-H、$-NH_2$或$-(CH_2)_{0-3}Z'$，

Y^3表示-H或$-(CH_2)_{0-3}Z'$，

Z'表示-H、$-SO_3H$、$-NH_2$或-COOH；

Y^4表示視情況經$-NH-C(=O)-NH_2$取代之直鏈或分支鏈C_{1-6}烷基，或表示視情況經$-NH_2$取代之芳基或苯甲基，且

Y^5表示-H或$-C(=O)-CHY^6-NH_2$，

Y^6表示直鏈或分支鏈C_{1-6}烷基；

R^4表示-H、-L-#1、$-SG_{lys}-(CO)_{0-1}-R^{4'}$、$-C(=O)-CHY^4-NHY^5$或$-(CH_2)_{0-3}Z$，

其中

SG_{lys}為溶酶體酶可裂解之基團，尤其由二肽或三肽組成之群，

$R^{4'}$為C_{1-10}烷基、C_{5-10}芳基或C_{6-10}芳烷基、C_{5-10}雜烷基、C_{1-10}烷基-O-C_{6-10}芳基、C_{5-10}雜環烷基、雜芳基、雜芳基烷基、雜芳基烷氧基、C_{1-10}烷氧基、C_{6-10}芳氧基或C_{6-10}芳烷氧基、C_{5-10}雜芳烷氧基、C_{1-10}烷基-O-C_{6-10}芳氧基、C_{5-10}雜環烷氧基，其可經以下基團取代一次或超過一次：$-NH_2$、-

NH-烷基、-N(烷基)$_2$、-NH-C(=O)-烷基、N(烷基)-C(=O)-烷基、-SO_3H、-SO_2NH_2、-SO_2-N(烷基)$_2$、-COOH、-C(=O)-NH_2、-C(=O)-N(烷基)$_2$或-OH、-H或基團-O_x-$(CH_2CH_2O)_v$-$R^{4''}$，

其中x為0或1

其中v為數值1至10，

其中$R^{4''}$為-H、烷基(較佳C_{1-12}烷基)、-CH_2-COOH、-CH_2-CH_2-COOH或-CH_2-CH_2-NH_2；

Z表示-H、鹵素、-OY^3、-SY^3、NHY^3、-C(=O)-NY^1Y^2或-C(=O)-OY^3，

Y^1及Y^2彼此獨立地表示-H、-NH_2或-$(CH_2)_{0-3}Z'$，

Y^3表示-H或-$(CH_2)_{0-3}Z'$，

Z'表示-H、-SO_3H、-NH_2或-COOH；

Y^4表示視情況經-NH-C(=O)-NH_2取代之直鏈或分支鏈C_{1-6}烷基，或表示視情況經-NH_2取代之芳基或苯甲基，

Y^5表示-H或-C(=O)-CHY^6-NH_2，且

Y^6表示直鏈或分支鏈C_{1-6}烷基；

或

R^2及R^4一起(形成吡咯啶環)表示-CH_2-CHR^{11}-或-CHR^{11}-CH_2-，

其中

R^{11}表示-H、-NH_2、-SO_3H、-COOH、-SH、鹵素(尤其F或Cl)、C_{1-4}烷基、C_{1-4}鹵烷基、C_{1-4}烷氧基、經羥基取代之C_{1-4}烷基、COO(C_{1-4}烷基)或-OH；

A表示-C(=O)-、-S(=O)-、-$S(=O)_2$-、-$S(=O)_2NH$-或-C(=N-NH_2)-；

R^3表示-L-#1、-MOD或視情況經取代之烷基、環烷基、芳

基、雜芳基、雜烷基、雜環烷基，較佳-L-#1或各可經以下取代之C_{1-10}烷基、C_{6-10}芳基或C_{6-10}芳烷基、C_{5-10}雜烷基、C_{1-10}烷基-O-C_{6-10}芳基或C_{5-10}雜環烷基：1-3個-OH基團、1-3個鹵素原子、1-3個鹵化烷基(各具有1-3個鹵素原子)、1-3個-O-烷基、1-3個-SH基團、1-3個-S-烷基、1-3個-O-C(=O)-烷基、1-3個-O-C(=O)-NH-烷基、1-3個-NH-C(=O)-烷基、1-3個-NH-C(=O)-NH-烷基、1-3個-$S(=O)_n$-烷基、1-3個-$S(=O)_2$-NH-烷基、1-3個-NH-烷基、1-3個-N(烷基)$_2$基團、1-3個-NH_2基團或1-3個-$(CH_2)_{0-3}Z$基團，

其中

n表示0、1或2，

Z表示-H、鹵素、-OY^3、-SY^3、-NHY^3、-C(=O)-NY^1Y^2或-C(=O)-OY^3，

Y^1及Y^2彼此獨立地表示-H、-NH_2或-$(CH_2)_{0-3}Z'$，

Y^3表示-H、-$(CH_2)_{0-3}$-CH(NH-C(=O)-CH_3)Z'、-$(CH_2)_{0-3}$-CH(NH_2)Z'或-$(CH_2)_{0-3}Z'$，

Z'表示-H、-SO_3H、-NH_2或-COOH，

R^5表示-H、-NH_2、-NO_2、鹵素(尤其F、Cl、Br)、-CN、CF_3、-OCF_3、-CH_2F、-CH_2F、SH或-$(CH_2)_{0-3}Z$，

其中

Z表示-H、-OY^3、-SY^3、鹵素、-NHY^3、-C(=O)-NY^1Y^2或-C(=O)-OY^3，

Y^1及Y^2彼此獨立地表示-H、-NH_2或-$(CH_2)_{0-3}Z'$，

Y^3表示-H或-$(CH_2)_{0-3}Z'$，

Z'表示-H、-SO_3H、-NH_2或-COOH；

R^6及R^7彼此獨立地表示-H、氰基、C_{1-10}烷基、氟-C_{1-10}烷

基、C_{2-10}烯基、氟-C_{2-10}烯基、C_{2-10}炔基、氟-C_{2-10}炔基、羥基、$-NO_2$、$-NH_2$、-COOH或鹵素，

R^8表示C_{1-10}烷基、氟-C_{1-10}烷基、C_{2-10}烯基、氟-C_{2-10}烯基、C_{2-10}炔基、氟-C_{2-10}炔基、C_{4-10}環烷基、氟-C_{4-10}環烷基或-$(CH_2)_{0-2}$-(HZ^2)，其可相同或不同地經-OH、-COOH或$-NH_2$單取代或二取代，且

其中

HZ^2表示具有至多兩個選自N、O及S之雜原子的4至7員雜環，

R^9表示-H、-F、$-CH_3$、$-CF_3$、$-CH_2F$或$-CHF_2$；

其中該等取代基R^1、R^3及R^4之一表示-L-#1，

L表示該連接子且#1表示鍵結於該抗體之鍵，

-MOD表示-$(NR^{10})_n$-$(G1)_o$-G2-G3，

其中

R^{10}表示H或C_1-C_3烷基；

G1表示-NHC(=O)-或-C(=O)NH-（其中若G1表示-NHC(=O)-，則R^{10}不表示NH_2）；

n表示0或1；

o表示0或1；且

G2表示具有1至10個碳原子且可經間雜以下基團中之一或多者一次或超過一次之直鏈或分支鏈烴鏈：-O-、-S-、-S(=O)-、$-S(=O)_2$-、$-NR^y$-、$-NR^yC(=O)$-、$-C(=O)-NR^y$-、$-NR^yNR^y$-、$-S(=O)_2-NR^yNR^y$-、$-C(=O)-NR^yNR^y$-，

其中

R^y表示-H、苯基、C_1-C_{10}烷基、C_2-C_{10}烯基或C_2-C_{10}炔基，各可經以下基團相同或不同地取代一或多次：-NH-

C(=O)-NH_2、-COOH、-OH、-NH_2、-NH-$CNNH_2$、磺醯胺、碸、亞碸或磺酸，及/或可相同或不同地間雜以下基團一或多次：-C(=O)-、-CR^x=N-O-，

其中

R^x表示-H、C_1-C_3烷基或苯基，且

其中

在該烴基上包括視情況經取代之C_1-C_{10}烷基作為側鏈的該烴基可經-NH-C(=O)-NH_2、-COOH、-OH、-NH_2、-NH-CN-NH_2、磺醯胺、碸、亞碸或磺酸取代，

G3表示-H或-COOH，且

其中該基團-MOD較佳具有至少一個基團-COOH；

及其鹽、溶劑合物、該等溶劑合物之鹽及差向異構體。

2. 如請求項1之結合物，其中A表示-C(=O)-。

3. 如請求項1或2之結合物，其中R^1表示-H、-L-#1、-COOH、-C(=O)-$NHNH_2$、-$(CH_2)_{1-3}NH_2$、-C(=O)-NZ''$(CH_2)_{1-3}NH_2$或-C(=O)-NZ''CH_2COOH，其中Z''表示-H或-NH_2。

4. 如前述請求項中一或多項之結合物，

其中R^2及R^4表示-H或

其中R^2及R^4一起(形成吡咯啶環)表示-CHR^{11}-CH_2-或-CH_2-CHR^{11}-；

其中R^{11}表示-H、-COOH、F、甲基、-CH_2F、-O甲基、-CH_2OH、-C(=O)-O-(C_{1-4}烷基)或OH。

5. 如前述請求項中一或多項之結合物，

其中R^3表示-L-#1或表示可經鹵素、C_{1-3}烷基或氟-C_{1-3}烷基單取代或多取代之苯基，或表示可視情況經-OY^4、-SY^4、-O-C(=O)-Y^4、-O-C(=O)-NH-Y^4、-NH-C(=O)-Y^4、-NH-C(=O)-NH-Y^4、-

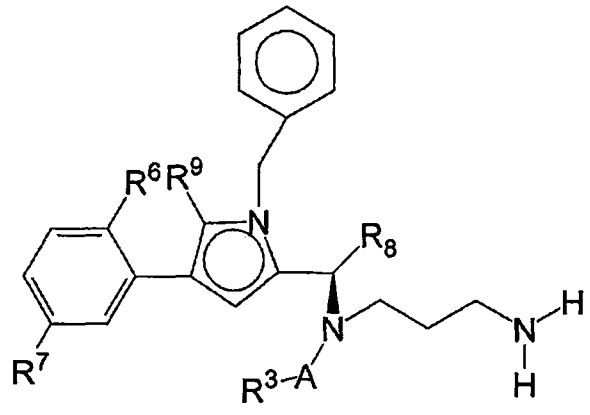
$S(O)_n$-Y^4、-$S(=O)_2$-NH-Y^4、-NH-Y^4或-$N(Y^4)_2$取代之C_{1-10}烷基或氟-C_{1-10}烷基，

其中

n表示0、1或2，

Y^4表示-H、視情況經鹵素、C_{1-3}烷基或氟-C_{1-3}烷基單取代或多取代之苯基，或表示可視情況經-OH、-COOH及/或-NH-C(=O)-C_{1-3}烷基取代之烷基。

6. 如請求項5之結合物，其中該結合物具有以下式(IIj)：



(IIj)

其中

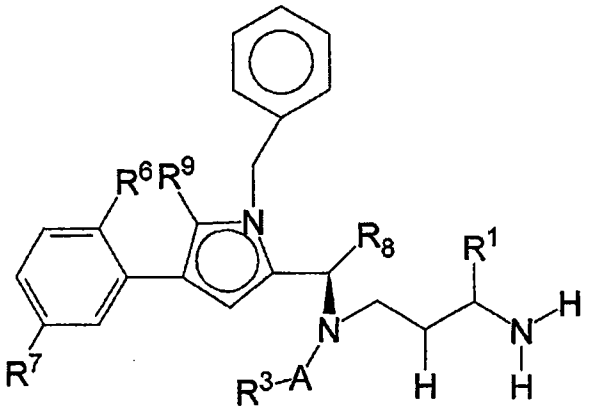
R^3表示-L-#1；

A表示-C(=O)-；且

R^6、R^7、R^8及R^9具有與請求項1中式(I)中相同之含義。

7. 如請求項1至5中一或多項之結合物，其中該取代基R^1表示-L-#1。

8. 如請求項7之結合物，其中該結合物具有式(IIk)：



(IIk)

其中

R^1表示-L-#1；

A表示-C(=O)-，且

R^3表示-CH_2OH；

R^6、R^7、R^8及R^9具有與請求項1中式(I)中相同之含義。

9. 如前述請求項中一或多項之結合物，其中R^5表示-H或-F。

10. 如前述請求項中一或多項之結合物，

其中R^6及R^7彼此獨立地表示-H、C_{1-3}烷基、氟-C_{1-3}烷基、C_{2-4}烯基、氟-C_{2-4}烯基、C_{2-4}炔基、氟-C_{2-4}炔基、羥基或鹵素。

11. 如前述請求項中一或多項之結合物，

其中R^8表示分支鏈C_{1-5}烷基或環己基。

12. 如前述請求項中一或多項之結合物，

其中R^9表示-H或氟。

13. 如前述請求項中一或多項之結合物，其中該連接子-L-具有以下基礎結構(i)至(iv)之一：

(i) -$(C=O)_m$-SG1-L1-L2-

(ii) -$(C=O)_m$ -L1-SG-L1-L2-

(iii) -$(C=O)_m$ -L1-L2-

(iv) -$(C=O)_m$ -L1-SG-L2

其中m表示0或1，

SG及SG1表示活體內可裂解之基團，

L1表示活體內不可裂解之有機基團，且

L2表示與該結合劑偶合之偶合基團。

14. 如請求項13之結合物，其中該活體內可裂解之基團SG為2-8寡肽基團，較佳三肽或二肽基團或二硫化物、腙、縮醛或胺縮醛且SG1為2-8寡肽基團，較佳二肽基團。

15. 如前述請求項中一或多項之結合物，

其中該連接子L連接至半胱胺酸側鏈或半胱胺酸殘基且具有下式：

§-(C(=O)-)m-L1-L2-§§

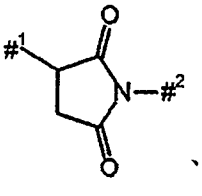
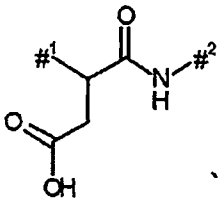
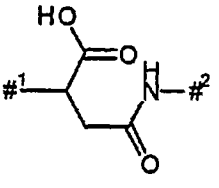
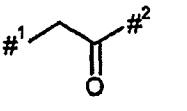
其中

m表示0或1；

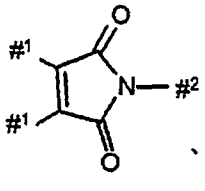
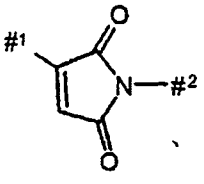
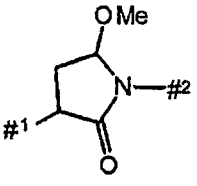
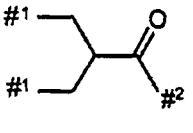
§表示鍵結於該活性化合物分子之鍵且

§§表示鍵結於該抗體之鍵，且

-L2-表示


、

、

、

、

、


、

、

或


其中

#[1]表示與該抗體之硫原子之連接點，

#[2]表示與基團L^1之連接點，

L^1表示-$(NR^{10})_n$-$(G1)_o$-G2-，

其中

R^{10}表示-H、$-NH_2$或C_1-C_3烷基；

G1表示-NH-C(=O)-；

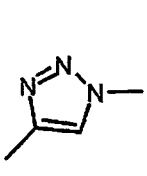
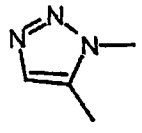
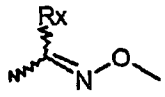
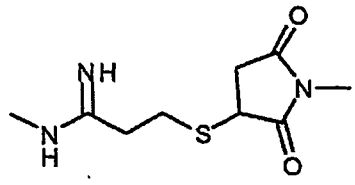
n表示0或1；

o表示0或1；且

G2表示具有1至100 (較佳1至25)個來自芳基及/或直鏈及/或分支鏈烷基及/或環烷基之碳原子且其可相同或不同地間雜以下基團一次或超過一次的直鏈或分支鏈烴鏈：-O-、-S-、-S(=O)-、$-S(=O)_2-$、-NH-、-C(=O)-、$-N-CH_3-$、-NHNH-、$-S(=O)_2-NHNH-$、-NH-C(=O)-、-C(=O)-NH-、-C(=O)-NHNH-及具有1至4個選自N、O及S、-S(=O)-或$-S(=O)_2-$之相同或不同雜原子及/或雜基團的5至10員芳族或非芳族雜環，

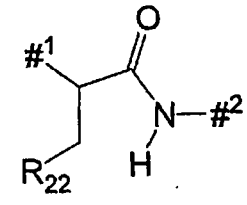
其中直鏈或分支鏈烴鏈可視情況經$-NH-C(=O)-NH_2$、-COOH、-OH、$-NH_2$、$-NH-CN-NH_2$、磺醯胺、碸、亞碸或磺酸取代，

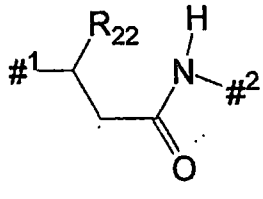
或表示以下基團之一：


、

、

或


其中R^x表示-H、C_1-C_3烷基或苯基。

16. 如請求項15之結合物，其中L2由以下式中之一或兩者表示：





其中

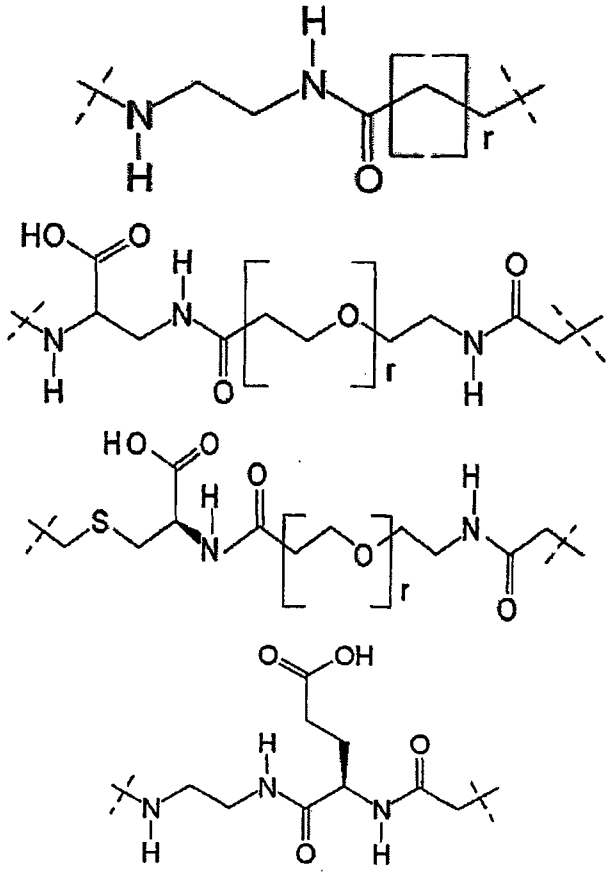
#[1]表示與該結合劑之硫原子的連接點，

#[2]表示與基團L^1之連接點，

R^{22}表示-COOH且

與該結合劑之硫原子鍵結的超過80% (以該連接子鍵結於該結合劑之鍵的總數計)鍵以此兩種結構之一存在。

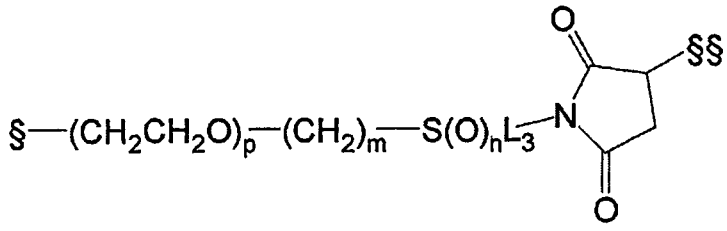
17. 如請求項15及16中一或多項之結合物，其中L^1具有下式：



其中

r表示數值0至8。

18. 如前述請求項中一或多項之結合物，其中該連接子-L-連接至半胱胺酸側鏈或半胱胺酸殘基且具有下式：



其中

§表示鍵結於該活性化合物分子之鍵且

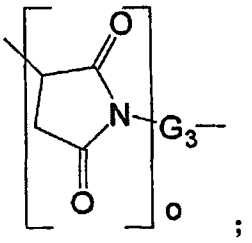
§§表示鍵結於該抗體之鍵，

m表示0、1、2或3；

n表示0、1或2；

p表示0至20；且

L3表示



；

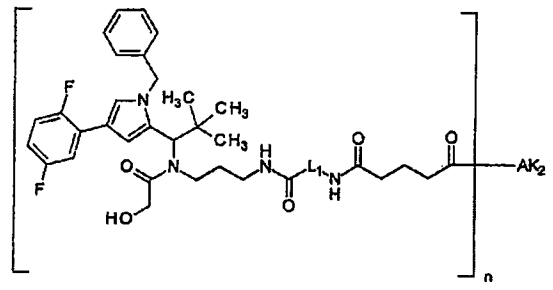
其中

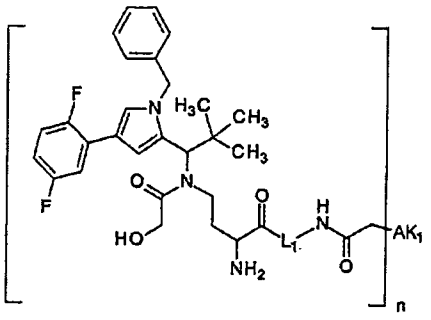
o表示0或1；且

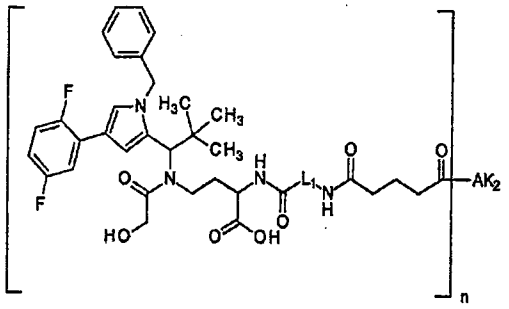
G3表示具有1至100 (較佳1至25)個來自芳基及/或直鏈及/或分支鏈烷基及/或環烷基之碳原子且可相同或不同地間雜以下基團中之一或多者一次或超過一次的直鏈或分支鏈烴鏈：-O-、-S-、-S(=O)-、$-S(=O)_2-$、-NH-、-C(=O)-、$-N-CH_3-$、-NHNH-、$-S(=O)_2-NHNH-$、-NH-C(=O)-、-C(=O)-NH-、-C(=O)-NHNH-及具有1至4個選自N、O及S、-S(=O)-或$-S(=O)_2-$之相同或不同雜原子及/或雜基團的5至10員芳族或非芳族雜環，

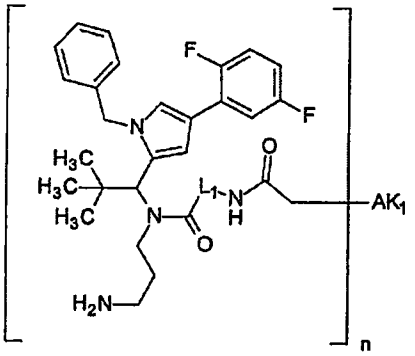
其中該直鏈或分支鏈烴鏈可視情況經$-NH-C(=O)-NH_2$、-COOH、-OH、$-NH_2$、$-NH-CNNH_2$、磺醯胺、碸、亞碸或磺酸取代。

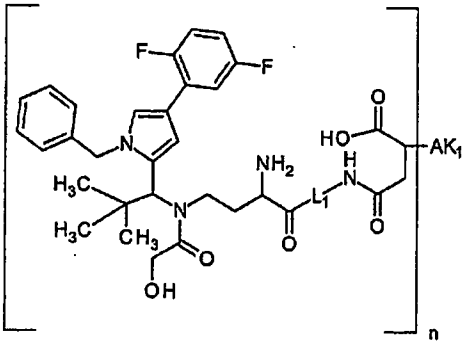
19. 如前述請求項中一或多項之結合物，其中該結合物具有以下式之一：

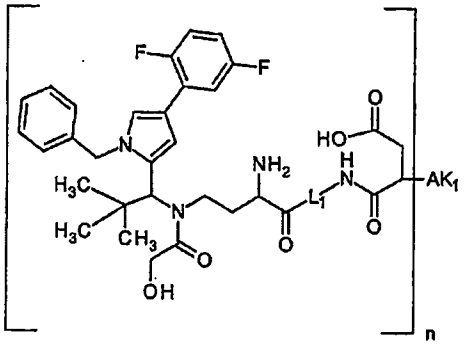


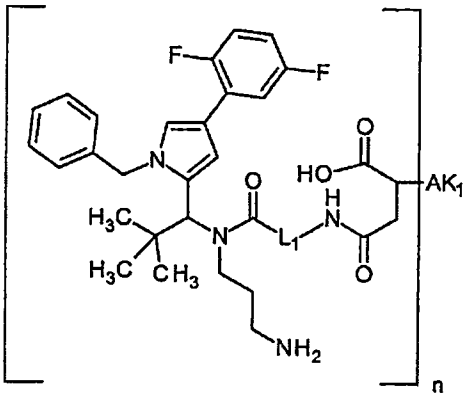


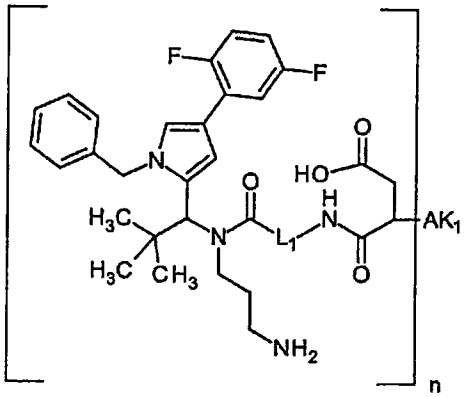


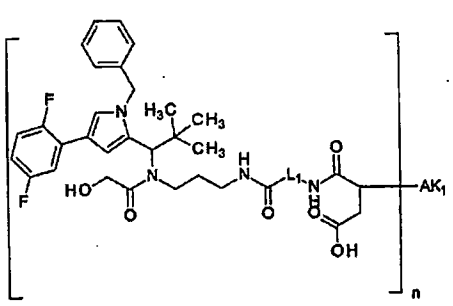


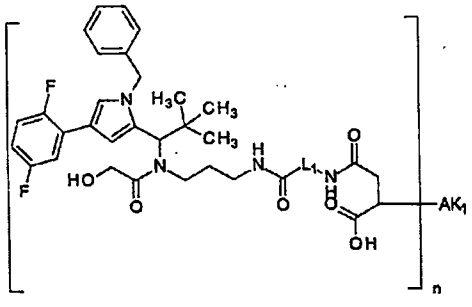


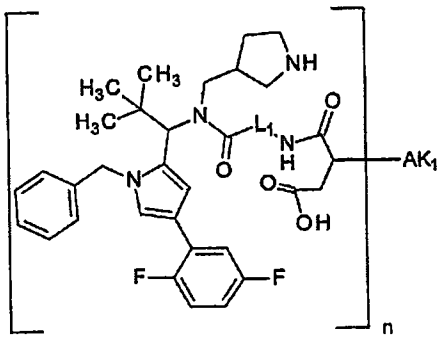


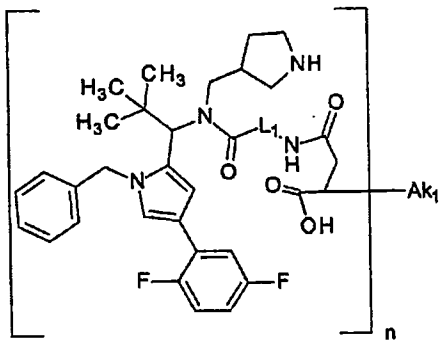


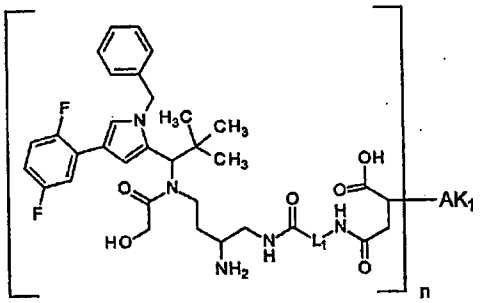


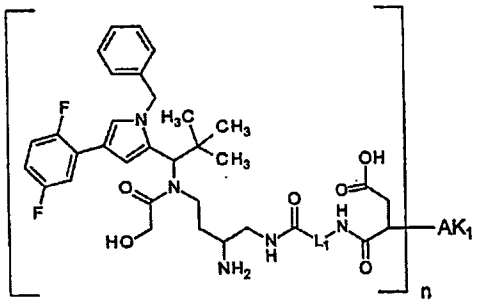


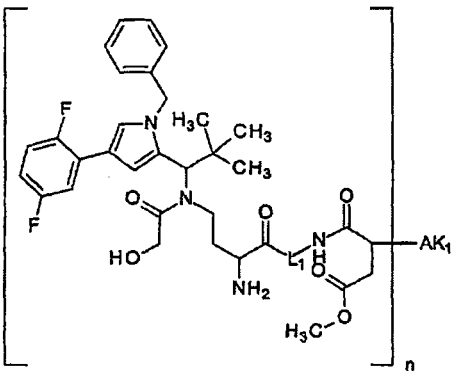


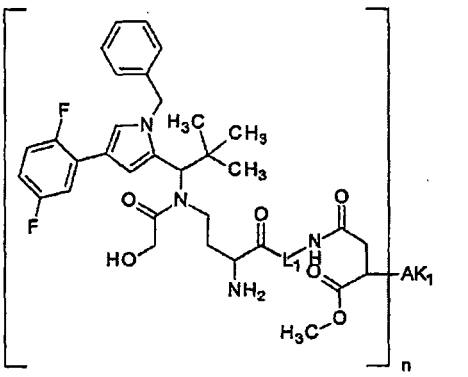


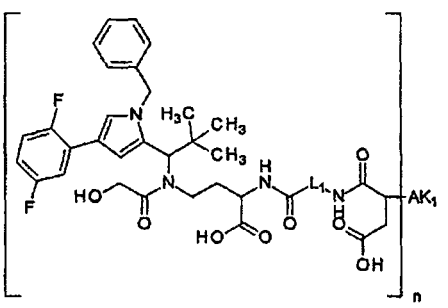


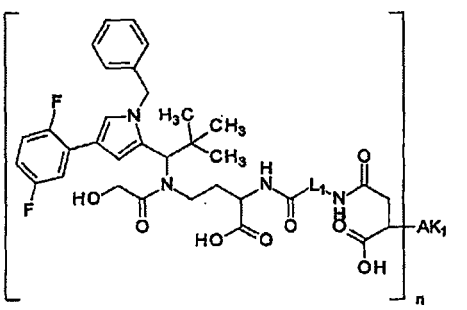


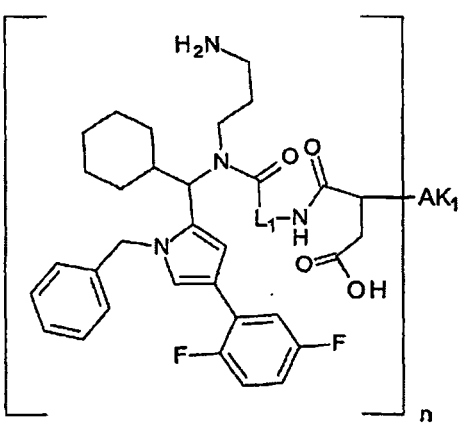


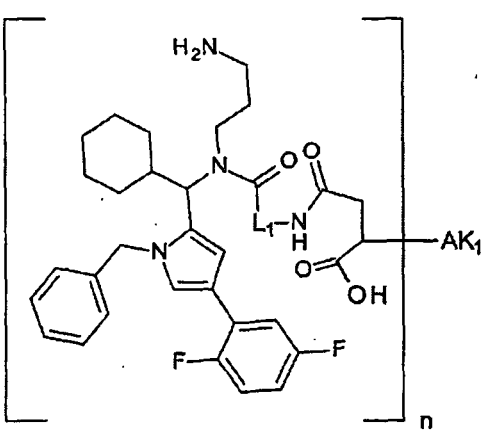


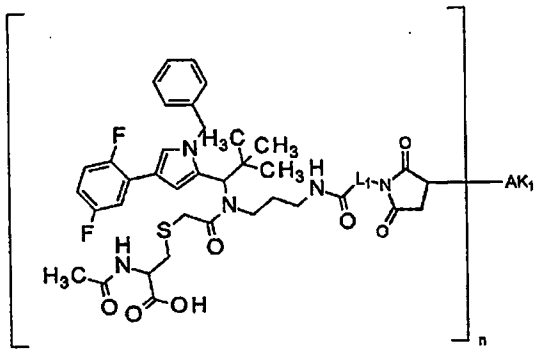


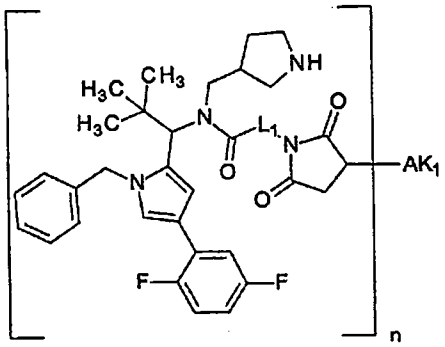


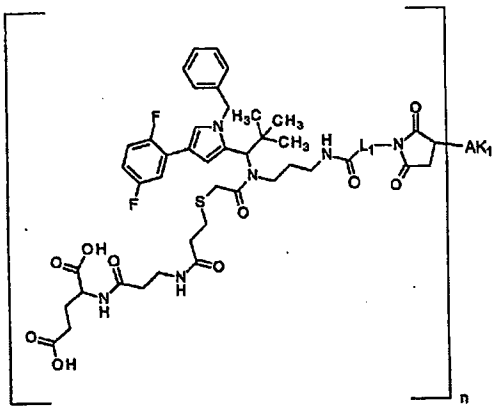


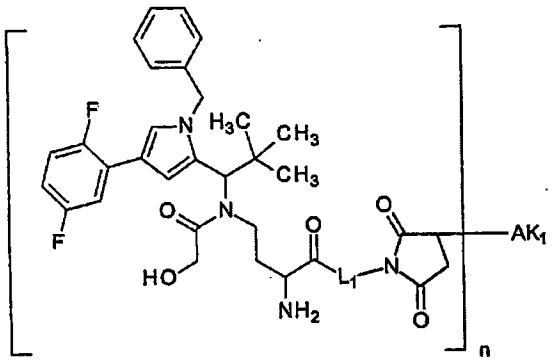


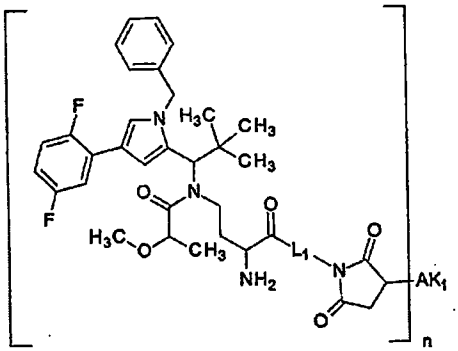


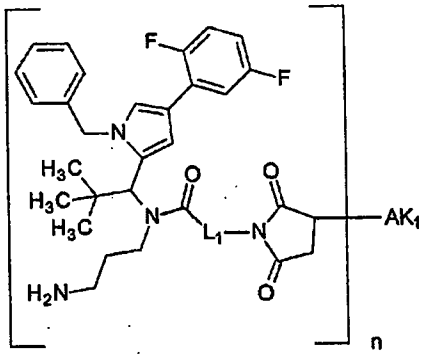


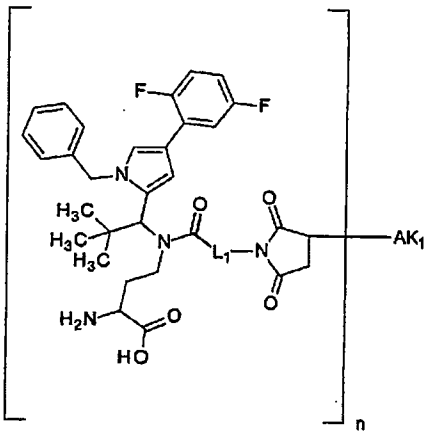


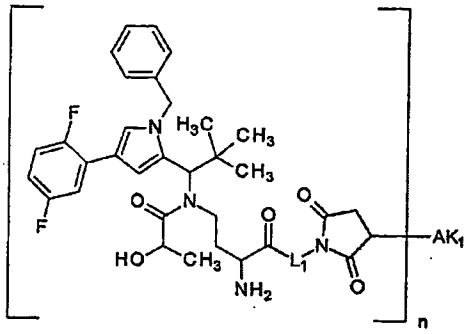


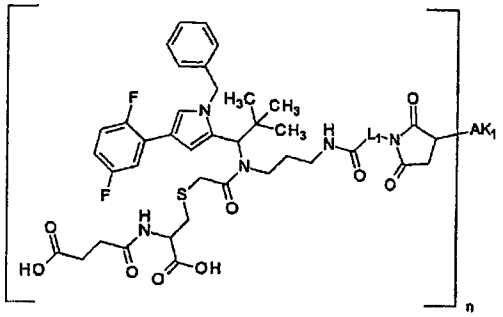


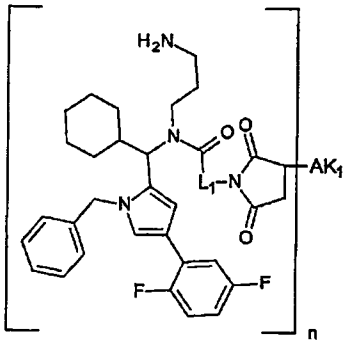


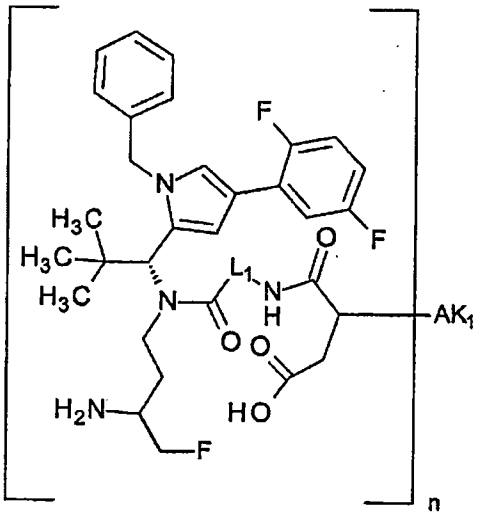


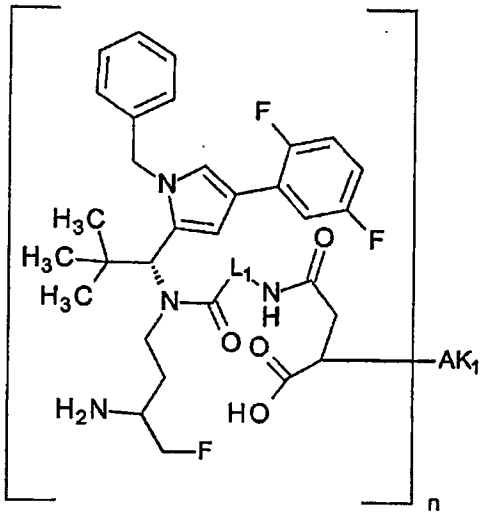


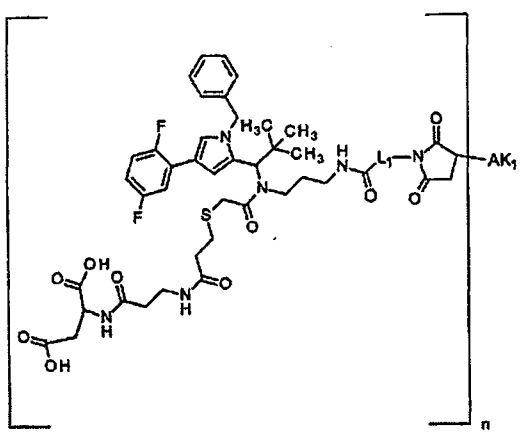
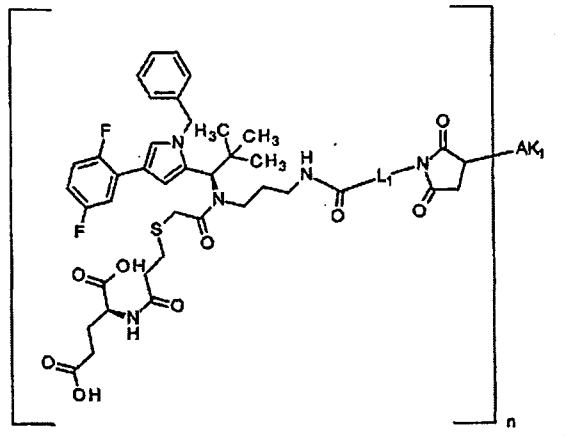




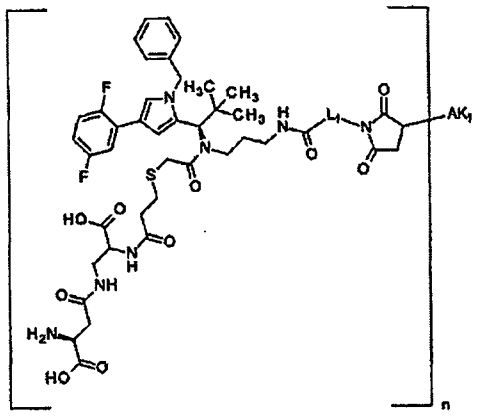






及



其中

AK1表示經由半胱胺酸連接之抗-B7H3抗體且

AK2表示經由離胺酸連接之抗-B7H3抗體，其為抗體TPP-5706或TPP-3803之嵌合或人類化變異體，

n為數值1至20；且

L_1為可相同或不同地間雜以下基團一次或超過一次的具有1至30個碳原子之直鏈或分支鏈烴鏈：-O-、-S-、-C(=O)-、-S(=O)$_2$-、-NH-、環戊基、哌啶基、苯基，

其中該直鏈或分支鏈烴鏈可經-COOH或-NH_2取代，

及其鹽、溶劑合物、該等溶劑合物之鹽及差向異構體。

20. 如請求項19之結合物，其中該連接子L_1表示以下基團：

§-NH-$(CH_2)_2$-§§；

§-NH-$(CH_2)_6$-§§；

§-NH-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-§§ ;

§-NH-CH(COOH)-$(CH_2)_4$-§§

§-NH-NH-C(=O)-$(CH_2)_5$-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_2$-C(=O)-O-$(CH_2)_2$-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_2$-C(=O)-NH-$(CH_2)_2$-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_3$-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-$(CH_2)_2$-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-$(CH_2)_5$-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-$CH(CH_3)$-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-NH-CH(COOH)-CH_2-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-NH-CH(COOH)-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-NH-CH(COOH)-$(CH_2)_4$-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-NH-CH(COOH)-CH_2-NH-C(=O)-$(CH_2)_2$-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-$CH(C_2H_4COOH)$-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-$((CH_2)_2$-O$)_3$-$(CH_2)_2$-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_2$-S(=O)$_2$-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_3$-NH-C(=O)-CH_2-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-NH-CH(COOH)-CH_2-NH-C(=O)-$CH(CH_2COOH)$-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-$CH(C_2H_4COOH)$-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-NH-CH(COOH)-CH_2-NH-C(=O)-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-$(CH_2)_2$-CH(COOH)-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-NH-CH(COOH)-CH_2-NH-C(=O)-$CH(CH_2OH)$-NH-C(=O)-CH_2-

§§ ;

§-NH-CH[C(=O)-NH-$(CH_2)_2$-O)$_4$-$(CH_2)_2$COOH]-CH_2-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-NH-CH(COOH)-CH_2-NH-C(=O)-(($(CH_2)_2$-O)$_4$-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_4$-CH(COOH)-NH-C(=O)-CH(CH_3)-NH-C(=O)-CH(isoC_3H_7)-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_4$-CH(COOH)-NH-C(=O)-CH(CH_3)-NH-C(=O)-CH(isoC_3H_7)-NH-C(=O)-$(CH_2)_5$-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_2$-C(=O)-NH-$(CH_2)_4$-CH(COOH)-NH-C(=O)-CH(CH_3)-NH-C(=O)-CH(isoC_3H_7)-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

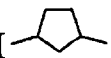
§-NH-$(CH_2)_2$-C(=O)-NH-$(CH_2)_4$-CH(COOH)-NH-C(=O)-CH(CH_3)-NH-C(=O)-CH(isoC_3H_7)-NH-C(=O)-$(CH_2)_5$-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_4$-CH(COOH)-NH-C(=O)-CH[$(CH_2)_3$-NH-C(=O)-NH_2]-NH-C(=O)-CH(isoC_3H_7)-NH-C(=O)-$(CH_2)_5$-§§ ;

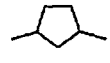
§-NH-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-$(CH_2)_2$-CH(COOH)-NH-C(=O)-CH(CH_3)-NH-C(=O)-CH(isoC_3H_7)-NH-C(=O)-$(CH_2)_5$-§§ ;

§-NH-CH(CH_3)-C(=O)-NH-$(CH_2)_4$-CH(COOH)-NH-C(=O)-CH(CH_3)-NH-C(=O)-CH(isoC_3H_7)-NH-C(=O)-$(CH_2)_5$-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_2$-C(=O)-NH-$(CH_2)_4$-CH(COOH)-NH-C(=O)-CH[$(CH_2)_3$-NH-C(=O)-NH_2]-NH-C(=O)-CH(isoC_3H_7)-NH-C(=O)-$(CH_2)_5$-§§ ;

§-NH  C(=O)-NH-$(CH_2)_2$-§§ ;

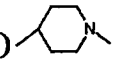
§-NH  C(=O)-NH-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

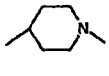
§-NH  C(=O)-NH-$(CH_2)_4$-CH(COOH)-NH-C(=O)-

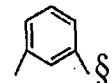
CH[$(CH_2)_3$-NH-C(=O)-NH_2]-NH-C(=O)-CH($isoC_3H_7$)-NH-C(=O)-$(CH_2)_5$-§§ ;

§-NH  C(=O)-NH-$(CH_2)_4$-CH(COOH)-NH-C(=O)-CH[$(CH_2)_3$-NH-C(=O)-NH_2]-NH-C(=O)-CH($isoC_3H_7$)-NH-C(=O)-$(CH_2)_5$-§§ ;

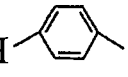
§-NH  C(=O)-NH-$(CH_2)_4$-CH(COOH)-NH-C(=O)-CH(CH_3)-NH-C(=O)-CH($isoC_3H_7$)-NH-C(=O)-$(CH_2)_5$-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_2$-C(=O)-NH-CH($isoC_3H_7$)-C(=O)-NH-CH[$(CH_2)_3$-NH-C(=O)-NH_2]-C(=O)-O  C(=O)-CH_2-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_2$-C(=O)-NH-CH($isoC_3H_7$)-C(=O)-NH-CH(CH_3)-C(=O)-O  C(=O)-CH_2-§§ ;

§-NH-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)  §§ ;

§-NH-CH(COOH)-CH_2-NH-C(=O)  §§ ;

§-NH-$(CH_2)_2$-C(=O)-NH-CH(CH_3)-C(=O)-NH-CH[$(CH_2)_3$-NH-C(=O)-NH_2]-C(=O)-NH  §§ ;

§-$(CH_2)_2$-C(=O)-NH-$(CH_2)_2$-§§ ;

§-$(CH_2)_2$-C(=O)-NH-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

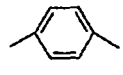
§-CH(CH_3)-NH-C(=O)-CH($isoC_3H_7$)-§§ ;

§-CH(CH_3)-NH-C(=O)-CH($isoC_3H_7$)-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-CH(CH_3)-NH-C(=O)-CH($isoC_3H_7$)-NH-C(=O)-$(CH_2)_5$-§§ ;

§-$(CH_2)_2$-C(=O)-NH-$((CH_2)_2$-O$)_4$-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-CH(CH_3)-NH-C(=O)-CH($isoC_3H_7$)-NH-C(=O)-$((CH_2)_2$-O$)_4$-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-$(CH_2)_2$-§§ ;

§  NH-C(=O)-CH(CH_3)-NH-C(=O)-CH($isoC_3H_7$)-NH-C(=O)-$((CH_2)_2$-O$)_4$-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-$(CH_2)_2$-§§ ;

§-CH_2-S-$(CH_2)_2$-C(=O)-NH-$(CH_2)_2$-§§ ;

§-CH_2-S-$(CH_2)_5$-C(=O)-NH-$(CH_2)_2$-§§ ;

§-CH_2-S-CH_2CH(COOH)-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-CH_2-S-CH_2CH(COOH)-NH-C(=O)-$(CH_2)_5$-§§ ;

§-CH_2-S-$(CH_2)_2$-C(=O)-NH-$((CH_2)_2$-O$)_2$-$(CH_2)_2$-§§ ;

§-CH_2-S-$(CH_2)_2$-C(=O)-NH-$((CH_2)_2$-O$)_2$-$(CH_2)_5$-§§ ;

§-CH_2-S-$(CH_2)_2$-C(=O)-NH-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-CH_2-S-$(CH_2)_2$-C(=O)-NH-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_5-§§ ;

§-CH_2-S-CH_2CH(COOH)-NH-C(=O)-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-CH_2-S-CH_2CH(NH_2)-C(=O)-NH-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-$(CH_2)_5$-§§ ;

§-CH_2-S-$(CH_2)_2$-C(=O)-NH-CH(COOH)-CH_2-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-CH_2-S-$(CH_2)_2$-C(=O)-NH-$((CH_2)_2$-O$)_2$-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-CH_2-S-$(CH_2)_2$-C(=O)-NH-$((CH_2)_2$-O$)_4$ -$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-CH_2-S-$(CH_2)_2$-C(=O)-NH-$((CH_2)_2$-O$)_2$-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-$(CH_2)_5$-§§ ;

§-CH_2-S-$(CH_2)_2$-C(=O)-NH-$((CH_2)_2$-O$)_4$-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-$(CH_2)_5$-§§ ;

§-CH_2-S-CH_2CH(COOH)-NH-C(=O)-$((CH_2)_2$-O$)_2$-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-CH_2-S-CH_2CH(COOH)-NH-C(=O)-$((CH_2)_2$-O$)_4$-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-CH_2-S-CH_2CH(COOH)-NH-C(=O)-$((CH_2)_2$-O$)_8$-$(CH_2)_2$-NH-

C(=O)-CH_2-§§ ;

§-CH_2-S-CH_2CH(COOH)-NH-C(=O)-(($(CH_2)_2$-O)$_4$-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-$(CH_2)_2$-§§ ;

§-CH_2-S-$(CH_2)_2$-CH(COOH)-NH-C(=O)-(($(CH_2)_2$-O)$_4$-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-$(CH_2)_2$-§§ ;

§-CH_2-S-$(CH_2)_2$-C(=O)-NH-CH(C_2H_4COOH)-C(=O)-NH-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-CH_2-S-CH_2CH[NH-C(=O)-$(CH_2)_2$-COOH]-C(=O)-NH-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-CH_2-S-CH_2CH[NH-C(=O)-(($(CH_2)_2$-O)$_4$-CH_3]-C(=O)-NH-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-CH_2-S-CH_2CH(COOH)-NH-C(=O)-CH(CH_3)-NH-C(=O)-CH(isoC_3H_7)-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-CH_2-S-CH_2CH[NH-C(=O)-$(CH_2)_2$-COOH]-C(=O)-NH-$(CH_2)_2$-S(=O)$_2$-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-CH_2-S-CH_2CH[NH-C(=O)-$(CH_2)_2$-COOH]-C(=O)-NH-(($(CH_2)_2$-O)$_4$-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-CH_2-S-CH_2CH[C(=O)-NH-$(CH_2)_2$-COOH]-NH-C(=O)-(($(CH_2)_2$-O)$_4$-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-CH_2-S-CH_2CH[C(=O)-NH-$(CH_2)_2$-COOH]-NH-C(=O)-(($(CH_2)_2$-O)$_4$-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-$(CH_2)_2$-§§ ;

§-CH_2-S-CH_2CH(COOH)-NH-C(=O)-$(CH_2)_2$CH(COOH)-NH-C(=O)-(($(CH_2)_2$-O)$_4$-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§

§-CH_2-S-CH_2CH[C(=O)-NH-(($(CH_2)_2$-O)$_4$-$(CH_2)_2$-COOH]-NH-C(=O)-(($(CH_2)_2$-O)$_4$-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-§§ ;

§-CH_2-S-CH_2CH(COOH)-NH-C(=O)-CH[$(CH_2)_2$-COOH]-NH-

$C(=O)-((CH_2)_2-O)_4-(CH_2)_2-NH-C(=O)-(CH_2)_2-§§$，

或

$§-CH_2-S-(CH_2)_2-C(=O)-NH-CH(COOH)-CH_2-NH-C(=O)-CH_2-S-CH_2CH(COOH)-NH-C(=O)-CH(CH_3)-NH-C(=O)-CH(isoC_3H_7)-NH-C(=O)-(CH_2)_5-§§$，

其中

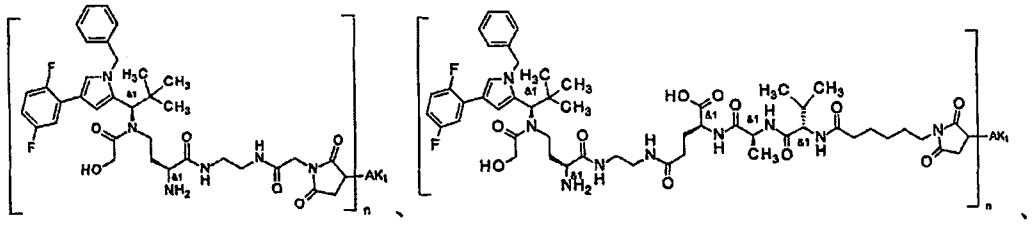
§表示鍵結於該藥物分子之鍵且

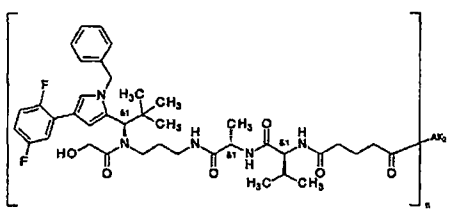
§§表示鍵結於該抗體之鍵，且

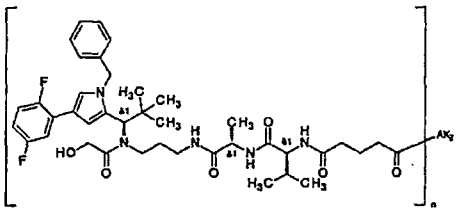
$isoC_3H_7$表示異丙基殘基，

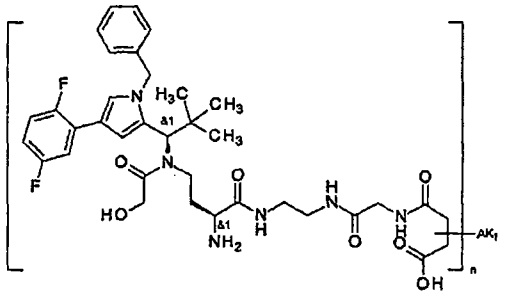
及其鹽、溶劑合物、該等溶劑合物之鹽及R/S對映異構體。

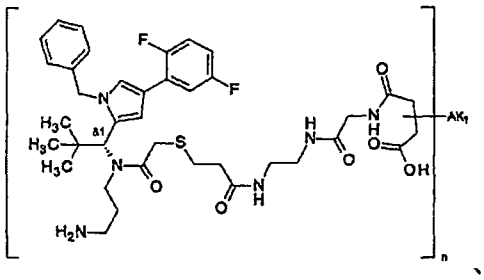
21. 如請求項1至18中一或多項之結合物，其中該結合物具有以下式之一：

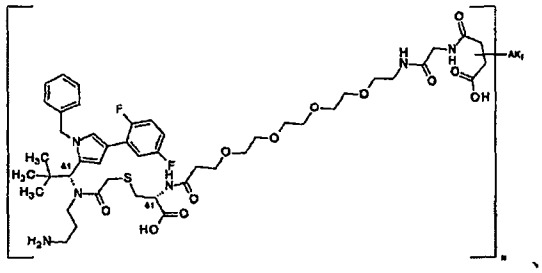


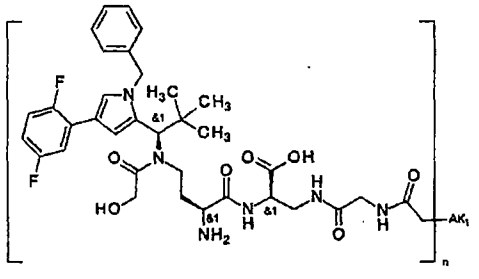


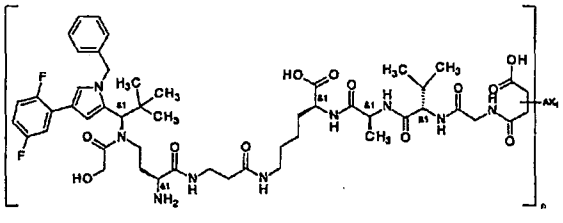


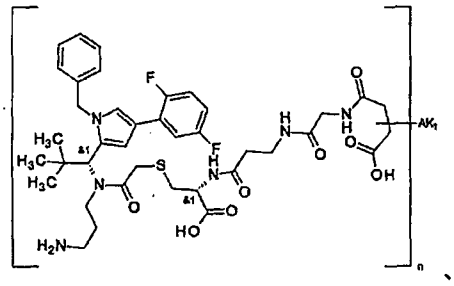


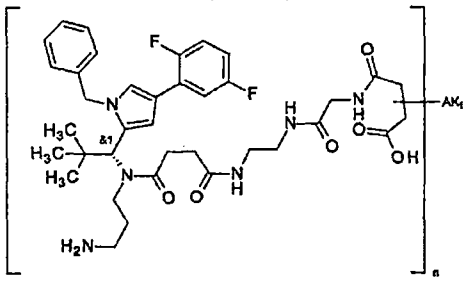


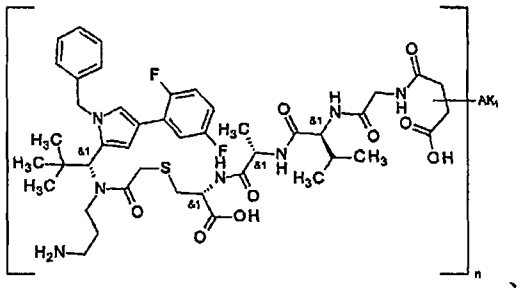


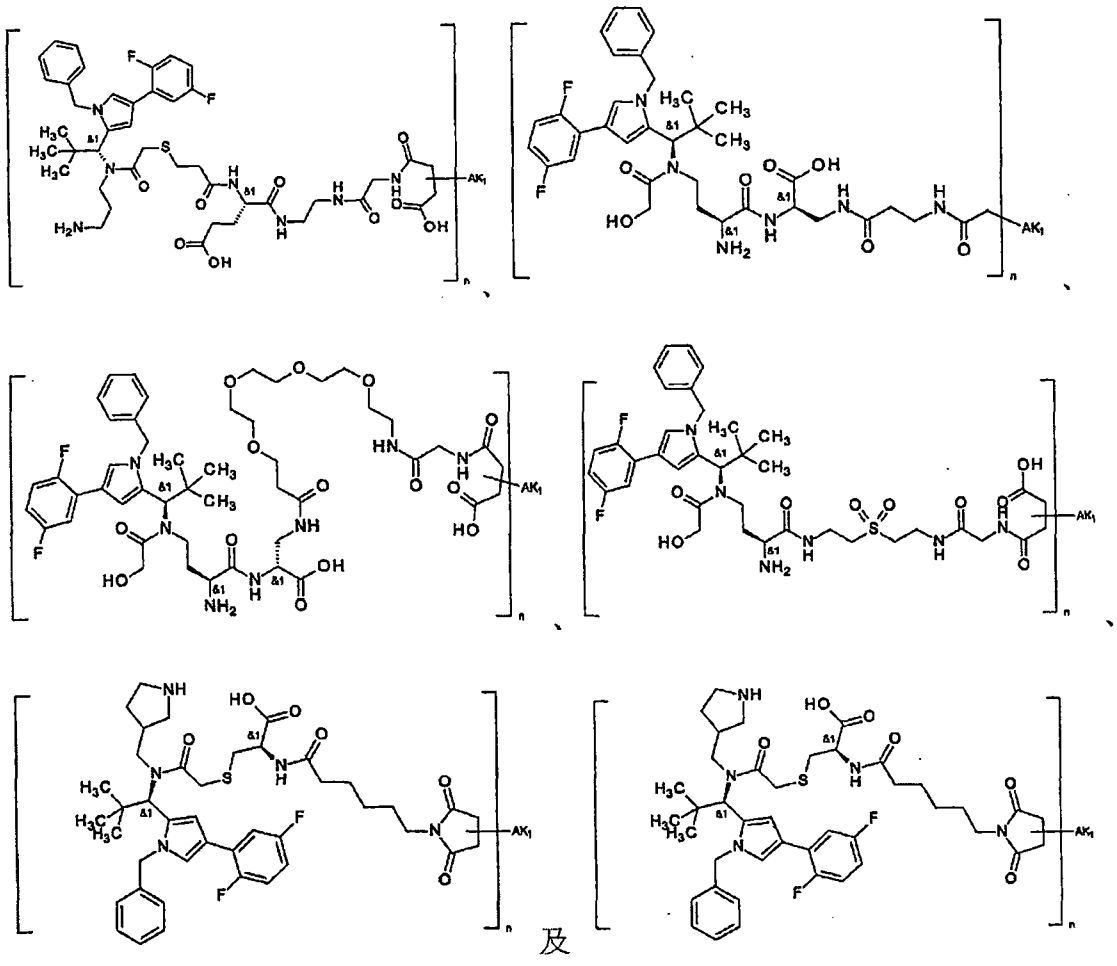












及

其中

AK1表示經由半胱胺酸連接之抗-B7H3抗體且

AK2表示經由離胺酸連接之抗-B7H3抗體，其為抗體TPP-5706或TPP-3803之嵌合或人類化變異體且

n為數值1至20。

22. 如前述請求項中一或多項之結合物，其中該抗-B7H3抗體為去糖基化之抗體。

23. 如前述請求項中一或多項之結合物，其中該抗-B7H3抗體為藉由融合瘤PTA-4058產生之抗體或其抗原結合片段。

24. 如前述請求項中一或多項之結合物，其中該抗-B7H3抗體為藉由融合瘤PTA-4058產生之該抗體或其抗原結合片段的嵌合或人類化變異體。

25. 如前述請求項中一或多項之結合物，其中該抗-B7H3抗體或該其

抗原結合片段結合於如SEQ ID NO: 41中所示之多肽。

26. 如前述請求項中一或多項之結合物，其中該抗-B7H3抗體或該其抗原結合片段包含：

可變重鏈，其包含如SEQ ID NO: 2中所示之該重鏈之可變CDR1序列，如SEQ ID NO: 3中所示之該重鏈之可變CDR2序列及如SEQ ID NO: 4中所示之該重鏈之可變CDR3序列，及

可變輕鏈，其包含如SEQ ID NO: 6中所示之該輕鏈之可變CDR1序列，如SEQ ID NO: 7中所示之該輕鏈之可變CDR2序列及如SEQ ID NO: 8中所示之該輕鏈之可變CDR3序列，或

可變重鏈，其包含如SEQ ID NO: 12中所示之該重鏈之可變CDR1序列，如SEQ ID NO: 13中所示之該重鏈之可變CDR2序列及如SEQ ID NO: 14中所示之該重鏈之可變CDR3序列，及

可變輕鏈，其包含如SEQ ID NO: 16中所示之該輕鏈之可變CDR1序列，如SEQ ID NO: 17中所示之該輕鏈之可變CDR2序列及如SEQ ID NO: 18中所示之該輕鏈之可變CDR3序列，或

可變重鏈，其包含如SEQ ID NO: 22中所示之該重鏈之可變CDR1序列，如SEQ ID NO: 23中所示之該重鏈之可變CDR2序列及如SEQ ID NO: 24中所示之該重鏈之可變CDR3序列及

可變輕鏈，其包含如SEQ ID NO: 26中所示之該輕鏈之可變CDR1序列，如SEQ ID NO: 27中所示之該輕鏈之可變CDR2序列及如SEQ ID NO: 28中所示之該輕鏈之可變CDR3序列，或

可變重鏈，其包含如SEQ ID NO: 32中所示之該重鏈之可變CDR1序列，如SEQ ID NO: 33中所示之該重鏈之可變CDR2序列及如SEQ ID NO: 34中所示之該重鏈之可變CDR3序列及

可變輕鏈，其包含如SEQ ID NO: 36中所示之該輕鏈之可變CDR1序列，如SEQ ID NO: 37中所示之該輕鏈之可變CDR2序列

及如SEQ ID NO: 38中所示之該輕鏈之可變CDR3序列。

27. 如前述請求項中一或多項之結合物，其中該抗-B7H3抗體或該其抗原結合片段包含：

如SEQ ID NO:1中所示之重鏈之可變序列以及如SEQ ID NO:5中所示之輕鏈之可變序列，或

如SEQ ID NO:11中所示之該重鏈之可變序列以及如SEQ ID NO:15中所示之該輕鏈之可變序列，或

如SEQ ID NO:21中所示之該重鏈之可變序列以及如SEQ ID NO:25中所示之該輕鏈之可變序列，或

如SEQ ID NO:31中所示之該重鏈之可變序列以及如SEQ ID NO:35中所示之該輕鏈之可變序列。

28. 如前述請求項中一或多項之結合物，其中該抗-B7H3抗體為IgG抗體。

29. 如前述請求項中一或多項之結合物，其中該抗-B7H3抗體或該其抗原結合片段包含：

如SEQ ID NO:9中所示之該重鏈之序列以及如SEQ ID NO:10中所示之該輕鏈之序列，或

如SEQ ID NO:19中所示之該重鏈之序列以及如SEQ ID NO:20中所示之該輕鏈之序列，或

如SEQ ID NO:29中所示之該重鏈之序列以及如SEQ ID NO:30中所示之該輕鏈之序列，或

如SEQ ID NO:39中所示之該重鏈之序列以及如SEQ ID NO:40中所示之該輕鏈之序列。

30. 如前述請求項中一或多項之結合物，其中該抗-B7H3抗體或該其抗原結合片段為抗體TPP6642或TPP6850之一的人類化變異體。

31. 如前述請求項中一或多項之結合物，其中該抗-B7H3抗體或該其

抗原結合片段包含：

如SEQ ID NO: 19中所示之該重鏈之序列，其含有至少一個選自包含以下取代之組的胺基酸取代：I31S、N33Y、V34M、T50I、F52N、G54S、N55G、D57S、N61A、K65Q、D66G、K67R、T72R、A79V及

如SEQ ID NO: 20中所示之該輕鏈之序列，其含有至少一個選自包含以下取代之組的胺基酸取代：E27Q、N28S、N30S、N31S、T34N、F36Y、Q40P、S43A、Q45K、H50A、K52S、T53S、A55Q、E56S、H90Q、H91S、G93S、P96L，或

如SEQ ID NO: 29中所示之該重鏈之序列，其含有至少一個選自包含以下取代之組的胺基酸取代：I31S、N33G、V34I、H35S、I37V、T50W、F52S、P53A、G54Y、D57N、S59N、N61A、F64L、K65Q、D66G、A68V、L70M、K74T、K77S、A107Q及

如SEQ ID NO: 30中所示之該輕鏈之序列，其含有至少一個選自包含以下取代之組的胺基酸取代：E27Q、N28S、N30S、N31S、T34N、F36Y、V48I、H50A、K52S、T53S、A55Q、E56S、Q70D、H90Q、H91S、G93S。

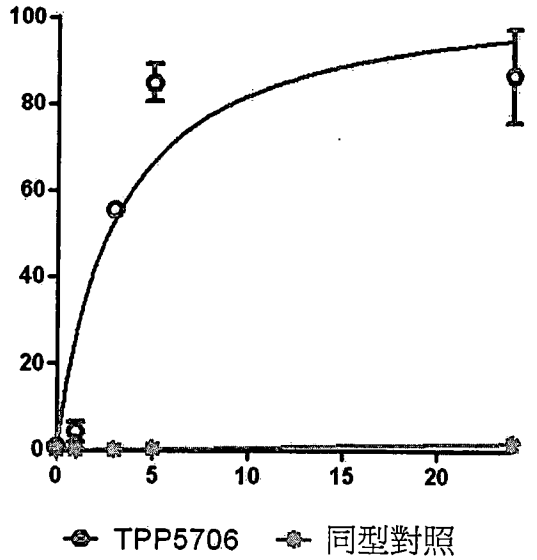
32. 一種醫藥組合物，其包含如前述請求項中一或多項之結合物以及惰性、非毒性之醫藥學上適合之助劑。

33. 如前述請求項中一或多項之結合物，其用於治療及/或預防疾病之方法中。

34. 如前述請求項中一或多項之結合物，其用於治療過度增生性及/或血管生成病症之方法中。

圖式

人類腎癌細胞株A498中特異性B7H3抗體(TPP5706)之內化行為



展示24小時內螢光標記之B7H3抗體之內化的動力學進展。為偵測非標靶依賴性內化，平行使用螢光標記之同型對照。詳細實驗條件描述於C-2b下(x軸：時間，以小時為單位；y軸：每個細胞之顆粒數目)。

圖1

序列方案

<SEQ ID NO:1>
QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTIYNVHWIKQTPGQGLEWMGTIFPGNGDTSYNQKFKD
KATLTTDKSSKTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARWDDGNVGFAHWGQGTLVTVSA

<SEQ ID NO:2>
IYNVH

<SEQ ID NO:3>
TIFPGNGDTSYNQKFKD

<SEQ ID NO:4>
WDDGNVGFAH

<SEQ ID NO:5>
DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENINNYLTWFQQKQGKSPQLLVYHAKTLAEGVPSRFSGSG
SGTQFSLKINSLQPEDFGSYYCQHHYGTPPTFGGGTKLEIK

圖2

<SEQ ID NO:6>
RASENINNYLT

<SEQ ID NO:7>
HAKTLAE

<SEQ ID NO:8>
QHHYGTPPT

<SEQ ID NO:9>
QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTIYNVHWIKQTPGQGLEWMGTIFPGNGDTSYNQKFKD
KATLTTDKSSKTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARWDDGNVGFAHWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

<SEQ ID NO:10>
DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENINNYLTWFQQKQGKSPQLLVYHAKTLAEGVPSRFSGSG
SGTQFSLKINSLQPEDFGSYYCQHHYGTPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC

<SEQ ID NO:11>
EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTIYNVHWVRQAPGQGLEWMGTIFPGNGDTSYNQKFKD
KVTMTTDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWDDGNVGFAHWGQGTLVTVSS

<SEQ ID NO:12>
IYNVH

<SEQ ID NO:13>
TIFPGNGDTSYNQKFKD

<SEQ ID NO:14>
WDDGNVGFAH

<SEQ ID NO:15>
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENINNYLTWFQQKQGKSPQLLIYHAKTLAEGVPSRFSGSG
SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHHYGTPPTFGGGTKVEIK

<SEQ ID NO:16>
RASENINNYLT

<SEQ ID NO:17>
HAKTLAE

<SEQ ID NO:18>
QHHYGTPPT

<SEQ ID NO:19>

圖2(續)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTIYNVHWVRQAPGQGLEWMGTIFPGNGDTSYNQKFKD
KVTMTTDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWDDGNVGFAHWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

<SEQ ID NO:20>
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENINNYLTWFQQKQGKSPQLLIYHAKTLAEGVPSRFSGSG
SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHHYGTPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC

<SEQ ID NO:21>
EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTIYNVHWIRQAPGQGLEWMGTIFPGNGDTSYNQKFKD
RATLTTDKSTKTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDDGNVGFAHWGQGTLVTVSS

<SEQ ID NO:22>
IYNVH

<SEQ ID NO:23>
TIFPGNGDTSYNQKFKD

<SEQ ID NO:24>
WDDGNVGFAH

<SEQ ID NO:25>
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENINNYLTWFQQKPGKAPKLLVYHAKTLAEGVPSRFSGSG
SGTQFTLTISSLQPEDFATYYCQHHYGTPPTFGQGTKLEIK

<SEQ ID NO:26>
RASENINNYLT

<SEQ ID NO:27>
HAKTLAE

<SEQ ID NO:28>
QHHYGTPPT

<SEQ ID NO:29>
EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTIYNVHWIRQAPGQGLEWMGTIFPGNGDTSYNQKFKD
RATLTTDKSTKTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDDGNVGFAHWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

<SEQ ID NO:30>
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENINNYLTWFQQKPGKAPKLLVYHAKTLAEGVPSRFSGSG
SGTQFTLTISSLQPEDFATYYCQHHYGTPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV

圖2(續)

VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC

<SEQ ID NO:31>
QVKLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTNYDINWVRQRPEQGLEWIGWIFPGDGSTQYNEKFKG
KATLTTDTSSSTAYMQLSRLTSEDSAVYFCARQTTATWFAYWGQGTTVTVSS

<SEQ ID NO:32>
NYDIN

<SEQ ID NO:33>
WIFPGDGSTQYNEKFKG

<SEQ ID NO:34>
QTTATWFAY

<SEQ ID NO:35>
DIELTQSPTTLSVTPGDRVSLSCRASQSISDYLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSISGIPSRFSGSG
SGSDFTLSINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGAGTKLELK

<SEQ ID NO:36>
RASQSISDYLH

<SEQ ID NO:37>
YASQSIS

<SEQ ID NO:38>
QNGHSFPLT

<SEQ ID NO:39>
QVKLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTNYDINWVRQRPEQGLEWIGWIFPGDGSTQYNEKFKG
KATLTTDTSSSTAYMQLSRLTSEDSAVYFCARQTTATWFAYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS
SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

<SEQ ID NO:40>
DIELTQSPTTLSVTPGDRVSLSCRASQSISDYLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSISGIPSRFSGSG
SGSDFTLSINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC

<SEQ ID NO:41>
GALEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGQDQGSAYANR
TALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPG
DTVTITCSSYQGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSILRVVLGANGTYSCLVRN
PVLQQDAHSSVTITPQRSPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDT
KQLVHSFTEGRDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQV
AAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYRGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDV
HSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTITGQPMT

圖2(續)