



(21)申請案號：112103149

(22)申請日：中華民國 112 (2023) 年 01 月 30 日

(51)Int. Cl.：

C07D207/452(2006.01)

A61K47/68 (2017.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2022/01/26

美國

63/303,447

(71)申請人：美商建南德克公司(美國) GENENTECH, INC. (US)

美國

(72)發明人：索茲林 丹尼爾 P SUTHERLIN, DANIEL P. (US)；張 東路 ZHANG, DONGLU

(US)；貝克 多克雷 桑默 A BAKER-DOCKREY, SUMMER A (US)；德瑞哥

維克 彼得 S DRAGOVICH, PETER S. (US)

(74)代理人：陳長文；朱淑尹

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：58 項 圖式數：1 共 215 頁

(54)名稱

抗體結合的化學降解誘導物及其方法

(57)摘要

本文所述的主題一般涉及用為連接子以將化學降解誘導物與抗體共價結合之可水解的含順丁烯二醯亞胺分子且涉及自其所產生的結合物及該等結合物治療病症的用途，並且涉及該等結合物在治療疾病及病症中之用途，其中靶向蛋白降解為有益的。

The subject matter described herein relates generally to hydrolysable maleimide-containing molecules that are useful as linkers to covalently bind chemical inducers of degradation to antibodies and to the conjugates produced therefrom and their uses to treat conditions, and to the uses of the conjugates in treating diseases and conditions where targeted protein degradation is beneficial.

指定代表圖：

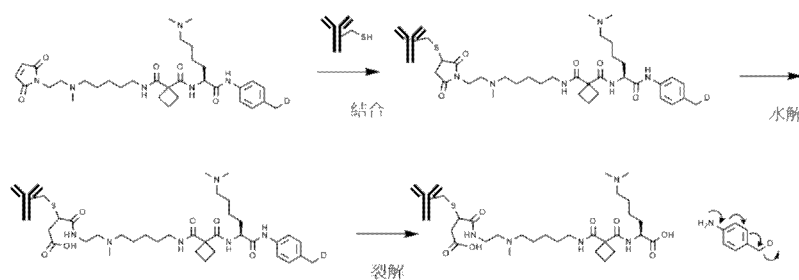
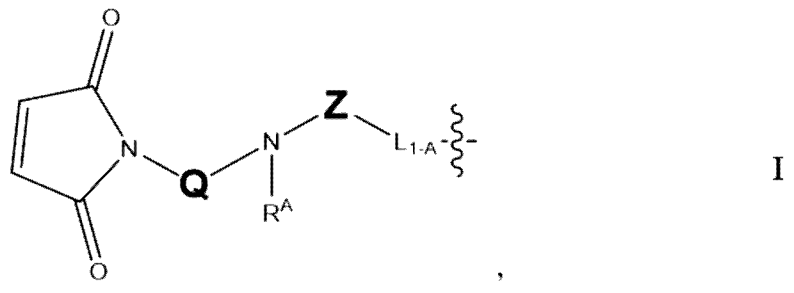


圖 1

特徵化學式：





【發明摘要】

【中文發明名稱】 抗體結合的化學降解誘導物及其方法

【英文發明名稱】 ANTIBODY-CONJUGATED CHEMICAL INDUCERS OF
DEGRADATION AND METHODS THEREOF

【中文】 本文所述的主題一般涉及用為連接子以將化學降解誘導物與抗體共價結合之可水解的含順丁烯二醯亞胺分子且涉及自其所產生的結合物及該等結合物治療病症的用途，並且涉及該等結合物在治療疾病及病症中之用途，其中靶向蛋白降解為有益的。

【英文】 The subject matter described herein relates generally to hydrolysable maleimide-containing molecules that are useful as linkers to covalently bind chemical inducers of degradation to antibodies and to the conjugates produced therefrom and their uses to treat conditions, and to the uses of the conjugates in treating diseases and conditions where targeted protein degradation is beneficial.

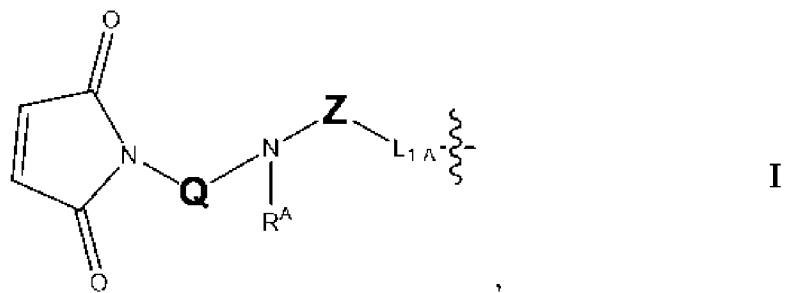
【指定代表圖】

圖 1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】



【發明說明書】

【中文發明名稱】 抗體結合的化學降解誘導物及其方法

【英文發明名稱】 ANTIBODY-CONJUGATED CHEMICAL INDUCERS OF
DEGRADATION AND METHODS THEREOF

【技術領域】

【0001】 本文所述的主題一般地涉及用為連接子以將化學降解誘導物與抗體共價結合之可水解的含有順丁烯二醯亞胺的分子且涉及自其所產生的結合物。

【先前技術】

【0002】 細胞維持及正常功能需要細胞蛋白質的受控降解。例如，調控蛋白之降解觸發細胞週期中的事件，例如 DNA 複製、染色體分離等。因此，該等蛋白質降解影響細胞的增殖、分化及死亡。

【0003】 雖然蛋白質抑制劑可阻斷或降低細胞中的蛋白質活性，但細胞中之蛋白質降解亦可降低活性或完全去除標靶蛋白。因此，利用細胞之蛋白質降解途徑可提供一種降低或去除蛋白質活性的手段。細胞的主要降解途徑之一稱為泛蛋白-蛋白酶體系統。在該系統中，蛋白質藉由泛蛋白化被蛋白酶體標記為降解。蛋白質之泛蛋白化藉由 E3 泛蛋白連接酶與蛋白質結合並在蛋白質上添加泛蛋白分子來完成。E3 泛蛋白連接酶為包括 E1 和 E2 泛蛋白連接酶的途徑的一部分，這使得 E3 泛蛋白連接酶可將泛蛋白添加至蛋白質中。

【0004】 為利用該降解途徑，稱為化學降解誘導物 (CIDE) 的分子構造體將 E3 泛蛋白連接酶與待降解的蛋白質結合在一起。為促進蛋白質被蛋白酶體降解，CIDE 由與 E3 泛蛋白連接酶結合的基團及與待降解之蛋白質標靶結合的

基團組成。這些基團通常通過連接子相連。該 CIDE 可使 E3 泛蛋白連接酶接近蛋白質，使其泛蛋白化並標記降解。但是，CIDE 相對較大的尺寸可能給靶向遞送帶來問題，並且導致不良特性，例如快速代謝/清除、短半衰期及低生物利用度。

【0005】 本領域持續需要改善 CIDE，包括增強 CIDE 向含有蛋白質標靶的細胞的靶向遞送。本文所述之主題解決了本領域中的這一缺陷及其他缺陷。

【發明內容】

【0006】 在某些實施例中，本揭露涉及可水解的含有順丁烯二醯亞胺的連接子，其可用於將 CIDE 與 Ab-結合的 CIDE 中之抗體共價結合以形成 Ab-L1-CIDE。

【0007】 在某些實施例中，本揭露涉及與可水解的含有順丁烯二醯亞胺的連接子共價結合的 CIDE。

【0008】 在某些實施例中，本揭露涉及 Ab-L1-CIDE，其中 L1 為與 Ab 及與 CIDE 共價結合的可水解的含有順丁烯二醯亞胺的連接子。

【0009】 在某些實施例中，可水解的含有順丁烯二醯亞胺的連接子具有式 I、I-A、I-B、I-C 或 I-G 之結構。

【0010】 在某些實施例中，本文所述的主題涉及一種醫藥組成物，其包含如本文所述的 Ab-L1-CIDE 及一種或多種醫藥上可接受之賦形劑。

【0011】 在某些實施例中，本文所述的主題涉及如本文所述的 Ab-L1-CIDE 在治療病症及疾病之方法中的用途，其藉由向個體投予包含 Ab-L1-CIDE 的醫藥組成物來實現。

【0012】 在某些實施例中，本文所述的主題為一種製備 Ab-L1-CIDE 之方法。

【0013】在某些實施例中，本文所述的主題的涉及一種製品，其包含醫藥組成物 (包含 Ab-L1-CIDE)、容器及藥品仿單或標籤，該藥品仿單或標籤指示該醫藥組成物可用於治療疾病或病症。

【0014】其他實施例亦在本文中得到全面描述。

【圖式簡單說明】

【0015】圖 1 為 Ab-L1-CIDE 的可能之結合、水解及裂解途徑的機制表示。

【實施方式】

【0016】本文揭示可水解的含有順丁烯二醯亞胺的连接子 (在實施例中稱為 L_1 、 $L1$ 、 L_x 或 L_z)。连接子可用於將降解劑，亦稱為 PROTAC 或 CIDE (「化學降解誘導物」)，與抗體共價結合。可水解的含有順丁烯二醯亞胺的连接子為 Ab 結合的 CIDE (「抗體結合的 CIDE」、「Ab-L1-CIDE」或「Ab-CIDE」) 中之一個組分，其中可水解的含有順丁烯二醯亞胺的连接子與 CIDE 及與抗體共價結合。此等結合物可用於靶向蛋白質降解。

【0017】本文所述的主題利用能夠以穩定方式共價結合的可水解的含有順丁烯二醯亞胺的连接子以提供增加數量的與抗體結合的连接子。因此，可以穩定地增加每個抗體的 CIDE 數量。抗體上具有相對較多數量的穩定結合的连接子是有利的，此等连接子又可用於結合至 CIDE。與傳統的高細胞毒性有效載荷相比，更高的 DAR 可實現更低效力、靶向的有效載荷。此等效力較低的有效載荷的使用增加了治療窗口。相較於低 DAR 結合物，高 DAR 結合物的劑量亦可以降低。

【0018】 本文所述的主題利用抗體將 CIDE 靶向或引導至標靶細胞或組織。如本文所述，藉由將抗體與 CIDE 連結以形成 Ab-CIDE，改進了 CIDE 向標靶細胞或組織的遞送。如本文所示，例如在實例中，表現抗原的細胞可由 Ab-CIDE 之抗原特異性抗體所靶向，從而將 Ab-CIDE 遞送至表現此類抗原的標靶細胞，且將 Ab-CIDE 之 CIDE 部分在細胞內遞送至該標靶細胞。

【0019】 因此，本文所述之主題涉及導致標靶蛋白泛蛋白化及隨後蛋白質降解的 Ab-CIDE 組成物。該組成物包含與可水解的连接子 1 (L1) 共價連接的抗體，該连接子在任何可用的接附點處與 CIDE 共價連接。CIDE 包含 E3 泛蛋白连接酶結合 (E3LB) 部分 (其中該 E3LB 部分辨識 E3 泛蛋白连接酶蛋白，亦即 VHL)、將 E3LB 部分與蛋白質結合部分 (PB) 共價連結的连接子 2 (L2)，該蛋白質結合部分為辨識標靶蛋白的部分。本文所述之主題用於降解並因此調控蛋白質活性及治療與蛋白質活性相關的疾病和病狀。

【0020】 現在將在下文更全面地描述本發明所揭露之主題。惟，得益於本文所呈遞之教示，本發明所揭示的主題所屬領域之技術人員將想到本文所述之本發明所揭示之主題的許多修改及其他實施例。因此，應理解，本發明所揭露之主題並不限於所揭露之具體實施例，並且修飾及其他實施例意在包含於所附申請專利範圍之範疇內。換言之，本文所述之主題涵蓋所有替代、修改及等同形式。如果納入的文獻、專利及類似材料中的一項或多項與本申請案不同或矛盾 (包括但不限於所定義的術語、術語用法、所述技術等)，則以本申請案為準。除非另有定義，否則本文所用之所有技術及科學術語均具有與熟習本領域者所通常理解之含義相同之含義。本文所提及之所有公開案、專利申請案、專利及其他參考文獻均以全文引用的方式併入。

I. 定義

【0021】術語「可水解的」是指含有在生理條件下可誘導硫基取代之丁二醯亞胺水解的部分的连接子，其在順丁烯二醯亞胺透過硫醚鍵結合至抗體時形成。

【0022】術語「CIDE」是指化學降解誘導物，其為蛋白分解靶向嵌合體分子，通常具有三種組分，即 E3 泛蛋白連接酶結合基團 (E3LB)、連接子 2 (L2) 及蛋白質結合基團 (PB)。

【0023】術語「殘基」、「部分」、「組成部分」或「基團」是指與另一組分共價結合或連接的組分。術語「組分」在本文中亦用於描述此類殘基、部分、組成部分或基團。例如，化合物之殘基將具有化合物的一個或多個原子 (例如氫或羥基) 被共價鍵取代，從而使殘基與 CIDE、L1-CIDE 或 Ab-CIDE 的另一組分結合。例如，「CIDE 之殘基」是指與一個或多個基團 (例如連接子 L2) 共價連接的 CIDE，其本身可視情況進一步連接至抗體。

【0024】術語「共價結合」或「共價連接」是指藉由共享一對或多對電子所形成的化學鍵。

【0025】術語「蛋白質結合基團」或「PB」是指能夠與標靶蛋白或其他目標多肽標靶結合的小分子或其他化合物之殘基。在本文所述的結合物分子中，PB 與標靶結合，其將標靶置於泛蛋白連接酶附近，使得可能發生藉由泛蛋白連接酶進行的蛋白質或多肽之降解。因此，本文所述的結合物可以包括任何 PB，只要它與 L2 共價結合且與目標標靶相互作用或結合。小分子標靶蛋白結合部分的非限制性實例包括與 BRM (BRAHMA) 結合的化合物、Hsp90 抑制劑、Tau 及雄激素受體 (AR)、激酶抑制劑 (諸如 BRG1、AKT、HPK1 及 IRE1)、MDM2 抑制劑、靶向含有人類 BET 溴區結構域的蛋白質的化合物、HDAC 抑制劑、人類離胺酸甲基轉移酶抑制劑 (諸如 KDM5)、血管生成抑制劑、免疫抑制化合物以及靶向芳基烴受體 (AHR) 的化合物等等。在某些實施例

中，本文所述的 CIDE 及結合的 CIDE 不限於 PB 之類型。在某些實施例中，本文所述的 CIDE 及結合的 CIDE 不限於 PB 之類型，其中 PB 與 L2 共價結合；並且，結合的 CIDE 包含可水解的连接子。

【0026】術語「E3 连接酶結合 (E3LB) 配體」是指能夠與 Von Hippel-Lindau (VHL) E3 泛蛋白连接酶結合的分子。術語「VCB E3 泛蛋白连接酶」、「Von Hippel-Lindau (或 VHL) E3 泛蛋白连接酶」、「VHL」及「泛蛋白连接酶」全部一般地描述用於本文所述結合物之 E3LB 部分的標靶酶結合位點。VCB E3 為一種蛋白質，其與 E2 泛素結合酶組合，導致泛素連接至標靶蛋白上之離胺酸；E3 泛素连接酶靶向用於由蛋白酶體降解之特異性蛋白質受質。因此，單獨的或與 E2 泛素結合酶複合之 E3 泛素连接酶負責將泛素轉移到所靶向之蛋白質。在某些實施例中，本文所述的 CIDE 及結合的 CIDE 不限於 E3LB 之類型。在某些實施例中，本文所述的 CIDE 及結合的 CIDE 不限於 E3LB 之類型，其中 E3LB 與 L2 共價結合；並且，結合的 CIDE 進一步共價接附至可水解的连接子。

【0027】如本文所使用的術語「连接子」、「连接子單元」或「连接基」是指包含將 CIDE 部分共價接附至抗體或將 CIDE 之殘基、部分、組成部分、基團或組分接附至 CIDE 之另一殘基、部分、組成部分、基團或組分的一個或多個原子之鏈的化學部分。在多種實施例中，连接子為二價基團，將其指定為连接子 1、连接子 2、L1、L₁、L2 或 L₂ 等。

【0028】如本文所使用的術語「擬肽物」是指非肽化學部分。肽是由肽(醯胺)鍵(當一個胺基酸之羧基與另一個胺基酸的胺基反應時形成的共價化學鍵)连接的胺基酸單體的短鏈。最短的肽是二肽，其由單個肽鍵所连接的 2 個胺基酸組成，其次是三肽、四肽等。擬肽物化學部分包括非胺基酸化學部分。擬肽物化學部分亦可包括由一個或多個非胺基酸化學單元隔開的一個或多個胺

基酸。擬肽物化學部分在其化學結構的任何部分中皆不包含由肽鍵連接的兩個或更多個相鄰胺基酸。「擬肽物連接子」為分子中與 CIDE 及與抗體結合的部分。擬肽物連接子為本領域中已知的並且其他如本文所揭示。擬肽物連接子可為諸如彼等在 WO2015/095227、WO2015/095124 或 WO2015/095223 中描述者的連接子，其各自全文以引用方式併入本文。

【0029】術語「抗體」在本文中以最廣義使用，且具體涵蓋單株抗體、多株抗體、二聚體、多聚體、多特異性抗體 (例如，雙特異性抗體) 及抗體片段，只要其表現出所需的生物活性即可 (Miller 等人 (2003) *Jour. of Immunology* 170:4854-4861)。抗體可為鼠抗體、人抗體、人源化抗體、嵌合抗體或衍生自其他物種的抗體。抗體是免疫系統產生的能夠識別並結合至特異性抗原的蛋白質 (Janeway, C. , Travers, P. , Walport, M. , Shlomchik (2001) *Immuno Biology* , 第 5 版, Garland Publishing , New York)。標靶抗原通常具有許多結合位點 (亦稱為抗原決定基)，其由多種抗體上之 CDR (互補決定區) 識別。與不同抗原決定基特異性結合的各種抗體具有不同的結構。因此，一種抗原可具有一種以上對應的抗體。抗體包括全長免疫球蛋白分子或全長免疫球蛋白分子之免疫活性部分，即含有抗原結合位點的分子，該抗原結合位點免疫特異性結合感興趣的標靶或其組成部分的抗原，該等標靶包括但不限於癌細胞或產生與自身免疫疾病相關的自身免疫抗體的細胞。本文所揭露之免疫球蛋白可為任意類型 (例如，IgG、IgE、IgM、IgD 及 IgA)、類別 (例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 及 IgA2) 或亞型的免疫球蛋白分子。免疫球蛋白可衍生自任何物種。但是，在一個態樣中，免疫球蛋白為人、鼠或兔來源的免疫球蛋白。

【0030】如本文所使用的術語「抗體片段」包含全長抗體的一部分，一般為全長抗體的抗原結合區或可變區。抗體片段的實例包括 Fab、Fab'、F(ab')₂ 及 Fv 片段；雙抗體；直鏈抗體；微抗體 (Olafsen 等人 (2004) *Protein Eng.*

*Design & Sel.*17(4):315-323)、Fab 表現文庫所產生的片段、抗個體遺傳型 (抗 Id) 抗體、CDR (互補決定區) 及上述免疫特異性結合至癌細胞抗原的任一項的抗原決定基結合片段、病毒抗原或微生物抗原、單鏈抗體分子；及由抗體片段所形成之多特異性抗體。

【0031】如本文所用之術語「單株抗體」是指獲自基本上同質之抗體群體之抗體，即構成該群體之個別抗體為相同的，但可能少量存在之自然發生的突變除外。單株抗體具有高度特異性，其針對單個抗原位點。此外，與包括針對不同決定位 (抗原決定基) 之不同抗體之多株抗體製劑相反，每個單株抗體係針對於抗原上的單一決定位。除特異性以外，單株抗體之優勢在於它們可在不受其他抗體污染的情況下合成。修飾詞「單株」表示抗體之特徵係獲自實質上同源之抗體群體，並且不應解釋為需要藉由任何特定方法生產該抗體。例如，根據本文所述之主題使用的單株抗體可藉由 Kohler 等人 (1975) 率先於 *Nature*, 256:495 所描述的雜交瘤方法來製備，或可藉由重組 DNA 方法 (參見例如：US 4816567；US 5807715) 來製備。亦可使用例如以下文獻中所述之技術從噬菌體抗體文庫中分離單株抗體：Clackson 等人 (1991) *Nature*, 352:624-628；Marks 等人 (1991) *J. Mol. Biol.*, 222:581-597。

【0032】本文中之單株抗體特定地包括「嵌合」抗體，其中重鏈及/或輕鏈之一部分與源自特定物種或屬於特定抗體類別或子類之抗體之對應序列一致或同源，而鏈之其餘部分與源自另一物種或屬於另一抗體類別或子類之抗體以及此類抗體之片段之對應序列一致或同源，只要其展現所需之生物活性即可 (US 4816567；及 Morrison 等人 (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855)。本文之目標嵌合抗體包括「靈長類化」抗體，該等抗體包含衍生自非人靈長類動物 (例如，舊大陸猴、猿等) 的可變域抗原結合序列及人恆定區序列。

【0033】術語「嵌合」抗體是指其中重鏈及/或輕鏈的一部分源自特定來源或物種，而重鏈及/或輕鏈的其餘部分源自不同來源或物種的抗體。

【0034】抗體之「類別 (class)」係指為其重鏈所具有的恆定域或恆定區之類型。有五大類抗體：IgA、IgD、IgE、IgG 及 IgM，且彼等中的幾種可進一步分為亞型 (同型 (isotype))，例如 IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁ 及 IgA₂。對應於不同種類之免疫球蛋白的重鏈恆定域分別命名為 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 。

【0035】「親和力」是指分子 (例如，抗體) 之單一結合位點與其結合搭配物 (例如，抗原) 之間的非共價交互作用總和的強度。除非另有說明，否則如本文中所使用的「結合親和力 (binding affinity)」指代反映結合對成員 (例如，抗體與抗原) 之間 1:1 交互作用之內在結合親和力。分子 X 與其配偶體 Y 的親和力通常可以用解離常數 (Kd) 表示。可以藉由本領域已知的習知方法測量親和力，包括彼等本文所述之方法。下面描述了用於測量結合親和力的具體的說明性和示例性實施例。在某些實施例中，如本文所述之抗體具有 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{ nM}$ 、 $\leq 10\text{ nM}$ 、 $\leq 5\text{ nM}$ 、 $\leq 4\text{ nM}$ 、 $\leq 3\text{ nM}$ 、 $\leq 2\text{ nM}$ 、 $\leq 1\text{ nM}$ 、 $\leq 0.1\text{ nM}$ 、 $\leq 0.01\text{ nM}$ 或 $\leq 0.001\text{ nM}$ (例如 10^{-8} M 或更小，例如 10^{-8} M 至 10^{-13} M ，例如 10^{-9} M 至 10^{-13} M) 的解離常數 (Kd)。

【0036】如本文所使用的術語「游離半胱胺酸胺基酸」是指經工程化改造到親本抗體中的半胱胺酸胺基酸殘基，其具有硫醇官能團 (-SH)，且不配對為分子內或分子間二硫鍵。如本文所使用的術語「胺基酸」是指甘胺酸、丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、苯丙胺酸、脯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸、半胱胺酸、蛋氨酸、離胺酸、精胺酸、組胺酸、色胺酸、天冬胺酸、麩胺酸、天冬醯胺酸、麩醯胺酸或瓜胺酸。

【0037】「患者」或「受試者」或「個體」為哺乳動物。哺乳動物包括但不限於馴養的動物 (例如牛、綿羊、貓、狗和馬)、靈長類動物 (例如人及非

人類靈長類動物諸如猴)、兔以及嚙齒動物(例如小鼠及大鼠)。在某些實施例中，患者、受試者或個體為人類。在一些實施例中，患者可為「癌症患者」，即患有或有風險患有一種或多種癌症症狀的人。

【0038】 「患者群體」是指一組癌症患者。該等群體可用於證明藥物的具有統計學意義的療效及/或安全性。

【0039】 術語「癌症」和「癌性」係指或描述哺乳動物中通常以不受調控的細胞生長為特徵的生理狀況。「腫瘤」包含一或多個癌細胞。癌症的實例提供於本文其他地方。

【0040】 如本文中所使用的「治療 (treatment)」(及其語法變異體，諸如「治療 (treat)」或「治療 (treating)」)，係指試圖改變受治療個體之疾病自然病程的臨床干預，並且可進行預防或在臨床病理過程中執行。期望之治療效果包括但不限於預防疾病之發生或複發、減輕症狀、減輕疾病之任何直接或間接病理後果、預防轉移、降低疾病進展之速度、改善或減輕疾病狀態、緩解或改善預後。在一些實施例中，本文所述的主題的抗體用於延遲疾病之發展或減慢疾病之進展。

【0041】 藥劑例如醫藥製劑的「有效量」指代在所需之給藥劑量和時間段內有效實現所需的治療或預防效果的量。例如，用於治療癌症的有效量之藥物可減少癌細胞數；減少腫瘤尺寸；抑制(亦即，在一定程度上減緩或較佳的是停止)癌細胞浸潤入周邊器官中；抑制(亦即，在一定程度上減緩或較佳的是停止)腫瘤轉移；在一定程度上抑制腫瘤生長；及/或在一定程度上減輕與該癌症相關之症狀中的一者或多者。在一定程度上，該藥可防止生長及/或殺除現有的癌細胞，它可為抑制細胞生長的及/或細胞毒性的。有效量可延長無進展生存期(例如，藉由實體腫瘤緩解評估標準、RECIST 或 CA-125 變化量測)、導致客

觀緩解 (包括部分緩解 (PR) 或完全緩解 (CR))、延長總體存活時間及/或改善癌症之一種或多種症狀 (例如，藉由 FOSI 所評估)。

【0042】如本文所使用的術語「治療有效量」是指與未接受該等類量的相應受試者相比，導致疾病、病症得到治療或產生副作用或降低疾病或病症進展速率的任何量。該術語亦包括在其範圍內有效增強正常生理功能的量。為用於治療，可將治療有效量之 Ab-CIDE 及其鹽作為原始化學品投予。此外，活性成分可作為醫藥組成物存在。

【0043】術語「醫藥調配物」係指以下製劑，其形式為允許其中所含之活性成分的生物活性有效，並且不包含對調配物將投予之個體具有不可接受之毒性的其他組分。

【0044】「醫藥上可接受之賦形劑」是指醫藥調配物中除對受試者無毒之活性成分以外的成分。醫藥上可接受之賦形劑包括但不限於緩衝劑、載劑、穩定劑或防腐劑。

【0045】如本文中所使用的短語「醫藥上可接受之鹽」是指分子的醫藥上可接受之有機鹽或無機鹽。例示性鹽包括但不限於硫酸鹽、檸檬酸鹽、乙酸鹽、草酸鹽、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸鹽、硫酸氫鹽、磷酸鹽、酸性磷酸鹽、異菸鹼酸鹽、乳酸鹽、水楊酸鹽、酸式檸檬酸、酒石酸鹽、油酸鹽、單寧酸鹽、泛酸鹽、酒石酸氫鹽、抗壞血酸鹽、琥珀酸鹽、馬來酸鹽、龍膽酸鹽、延胡索酸鹽、葡萄糖酸鹽、葡糖醛酸鹽、蔗糖酸鹽、甲酸鹽、苯甲酸鹽、麩胺酸鹽、甲磺酸鹽、乙磺酸鹽、苯磺酸鹽、對-甲苯磺酸鹽及撲酸鹽 (亦即，1,1'-亞甲基-雙-(2-羥基-3-萘甲酸鹽))。醫藥上可接受之鹽可涉及包含另一種分子，例如乙酸根離子、琥珀酸根離子或其他抗衡離子。抗衡離子可為任何穩定母體化合物上電荷的有機或無機部分。此外，醫藥上可接受之鹽在其結構中可具有多於一個的帶電原子。多個帶電原子是醫藥上可接受之鹽的一部分的實例

可具有多個相對離子。因此，醫藥上可接受之鹽可具有一個或多個帶電原子及/或一個或多個抗衡離子。

【0046】醫藥上不可接受之其他鹽可用於製備本文所述之化合物，且這些鹽應被視為形成本主題的另一態樣。這些鹽，例如草酸鹽或三氟乙酸鹽，雖然本身并非醫藥上可接受之鹽，但是可用於製備用為中間體的鹽，以得到本文所述之化合物及其醫藥上可接受之鹽。

【0047】如本文中所使用的術語「烷基」是指具有一至五個碳原子的任何長度的飽和直鏈或支鏈單價烴基 (C₁-C₅)，其中烷基可視情況獨立地經一個或多個取代基取代。在另一實施例中，烷基含有一個、兩個、三個、四個或五個碳原子。烷基之實例包括但不限於甲基 (Me, -CH₃)、乙基 (Et, -CH₂CH₃)、1-丙基 (n-Pr、正丙基、-CH₂CH₂CH₃)、2-丙基 (i-Pr、異丙基、-CH(CH₃)₂)、1-丁基 (n-Bu、正丁基、-CH₂CH₂CH₂CH₃)、2-甲基-1-丙基 (i-Bu、異丁基、-CH₂CH(CH₃)₂)、2-丁基 (s-Bu、二級丁基、-CH(CH₃)CH₂CH₃)、2-甲基-2-丙基 (t-Bu、三級丁基、-C(CH₃)₃)、1-戊基 (正戊基、-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃)、2-戊基 (-CH(CH₃)CH₂CH₂CH₃)、3-戊基 (-CH(CH₂CH₃)₂)、2-甲基-2-丁基 (-C(CH₃)₂CH₂CH₃)、3-甲基-2-丁基 (-CH(CH₃)CH(CH₃)₂)、3-甲基-1-丁基 (-CH₂CH₂CH(CH₃)₂)、2-甲基-1-丁基 (-CH₂CH(CH₃)CH₂CH₃) 等。應理解，在每一端共價結合的烷基鏈可以形成如下所述的伸烷基鏈。

【0048】「鹵素」或「鹵基」是指佔據元素週期表第 VIIA 族的原子，諸如氟、氯、溴或碘。

【0049】「鹵烷基」是指如上所定義的直鏈或支鏈烷基，其中一個或多個 (例如、1 至 6 個或 1 至 3 個) 氫原子被鹵素替換。例如，當殘基經超過一個鹵素取代時，它可以藉由使用對應於所接附的鹵素部分之數量的前綴來指代。二鹵烷基及三鹵烷基是指經兩個 (「二」) 或三個 (「三」) 鹵基基團取代的烷

基，該等鹵基基團可以是但不一定是相同的鹵素。鹵烷基的實例包括，例如，三氟甲基、二氟甲基、氟甲基、三氯甲基、2,2,2-三氟乙基、1,2-二氟乙基、3-溴-2-氟丙基、1,2-二溴乙基等。此外，「鹵基-C₁-C₃烷基」是指至少一個氫原子被鹵素替換的 1 至 3 個碳的烷基基團。此外，「鹵基-C₁-C₆烷基」是指至少一個氫原子被鹵素替換的 1 至 6 個碳的烷基基團。

【0050】 如本文所使用的術語「伸烷基」是指具有一至十二個碳原子的任何長度的飽和直鏈或支鏈二價烴基 (C₁-C₁₂)，其中伸烷基基團可視情況獨立地經下文所述的一個或多個取代基取代。在另一實施例中，伸烷基基團含有一至八個碳原子 (C₁-C₈) 或一至六個碳原子 (C₁-C₆)。伸烷基的實例包括但不限於，亞甲基 (-CH₂-)、伸乙基 (-CH₂CH₂-)、伸丙基 (-CH₂CH₂CH₂-) 等。

【0051】 術語「碳環」、「碳環基」、「環碳環」和「環烷基」是指具有 3 至 5 個碳原子 (C₃-C₅) 作為單環的單價非芳族、飽和或部分不飽和的環。單環碳環之實例包括但不限於環丙基、環丁基、環戊基、1-環戊-1-烯基、1-環戊-2-烯基、1-環戊-3-烯基等。碳環基可視情況獨立地被一種或多種烷基取代。

【0052】 「芳基」是指具有單個環 (例如，單環) 或多個環 (例如，雙環或三環) 的芳族碳環基團，包括稠合系統。如本文所用，芳基具有 6 至 20 個環碳原子 (亦即，C₆-C₂₀ 芳基)、6 至 12 個環碳原子 (亦即，C₆-C₁₂ 芳基) 或 6 至 10 個環碳原子 (亦即，C₆-C₁₀ 芳基)。芳基的實例包括，例如，苯基、萘基、蒽基及蔥基。

【0053】 「雜芳基」是指具有單個環、多個環或多個稠環的芳族基團，具有一個或多個獨立地選自氮、氧及硫的環雜原子。如本文所用，雜芳基包括 1 至 20 個環碳原子 (亦即，C₁-C₂₀ 雜芳基)、3 至 12 個環碳原子 (亦即，C₃-C₁₂ 雜芳基) 或 3 至 8 個環碳原子 (亦即，C₃-C₈ 雜芳基) 以及獨立地選自氮、氧及硫的 1 至 5 個環雜原子、1 至 4 個環雜原子、1 至 3 個環雜原子、1 至 2 個環雜原

子或 1 個環雜原子。在某些情況下，雜芳基包括 9 員至 10 員環系統、6 員至 10 員環系統、5 員至 10 員環系統、5 員至 7 員環系統或 5 員至 6 員環系統，各系統獨立地具有獨立地選自氮、氧及硫的 1 至 4 個環雜原子、1 至 3 個環雜原子、1 至 2 個環雜原子或 1 個環雜原子。雜芳基的實例包括，例如，吡啶基、苯并咪唑基、苯并噻唑基、苯并呋喃基、苯并噁唑基、苯并噻二唑基、苯并蔡并呋喃基、苯并嘔唑基、苯并噻吩基(苯并噻吩基)、苯并三唑基、苯并[4,6]咪唑并[1,2-a]吡啶基、呖唑基、喹啉基、二苯并呋喃基、二苯并噻吩基、呋喃基、異噻唑基、咪唑基、吡唑基、吡咯基、吡嗪基、異吡咯基、異喹啉基、異嘔唑基、噻啶基、嘔二唑基、嘔唑基、1-氧負離子基吡啶基(oxidopyridinyl)、1-氧負離子基噻啶基、1-氧負離子基吡嗪基、1-氧負離子基噻嗪基、啡嗪基、呋嗪基、喋啶基、嘌呤基、吡咯基、吡唑基、吡啶基、吡嗪基、噻啶基、噻嗪基、喹啉基、喹嘔淋基、喹淋基、奎寧環基、異喹淋基、噻唑基、噻二唑基、三唑基、四唑基及三嗪基。稠合雜芳基環的實例包括但不限於苯并[d]噻唑基、喹淋基、異喹淋基、苯并[b]噻吩基、吡唑基、苯并[d]咪唑基、吡唑并[1,5-a]吡啶基及咪唑并[1,5-a]吡啶基，其中雜芳基可以經由稠合系統的任一環結合。任何具有單個或多個稠合環且含有至少一個雜原子的芳環皆視為雜芳基，而與如何接附(亦即，經由稠合環中之任一者)至分子之其餘部分無關。雜芳基不包括如上所定義的芳基，亦不與其重疊。

【0054】「雜環」、「雜環的」、「雜環烷基」或「雜環基」是指具有單環或多個稠環的飽和或部分不飽和基團，包括稠環、橋環或螺環系統，且具有 3 至 20 個環原子，包括 1 至 10 個雜原子。這些環原子選自由碳、氮、硫或氧所組成之群組，其中，在稠環系統中，一個或多個環可為環烷基、芳基或雜芳基，前提條件是接附點通過非芳環實現。在某些實施例中，雜環基團之氮及/或硫原子視情況被氧化以提供 N-氧化物、-S(O)- 或 -SO₂- 部分。雜環之實例包

括但不限於四氫吡啶、二氫吡啶、吡啶、喹啉(quinolizine)、咪唑啉、咪唑啉、哌啶、哌啶、吡啶、1,2,3,4- 四氫異喹啉、四氫噻唑、嗎啉基、硫代嗎啉基(亦稱為硫雜嗎啉基)、1,1-二側氧基硫代嗎啉基、哌啶基、吡咯啉、四氫呋喃基等。雜環基可經取代，如 WO2014/100762 中所述。

【0055】術語「手性」指代具有鏡像配偶體之不可重疊性的分子，而術語「非手性」指代可疊合在其鏡像配偶體上的分子。

【0056】術語「立體異構物」指代具有相同化學組成，但原子或基團在空間上的排列不同的化合物。

【0057】「非鏡像異構物」指代具有兩個或更多個手性中心並且其分子不是彼此鏡像的立體異構物。非鏡像異構物具有不同的物理性質，例如，熔點、沸點、光譜特性及反應性。非鏡像異構物之混合物可以在高解析度分析規程(諸如電泳及層析術)下分離。

【0058】「鏡像異構物」指代化合物的兩種立體異構物，它們是彼此不可重疊的鏡像。

【0059】本文所用之立體化學定義及慣例通常遵循 S.P.Parker 編輯, *McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (1984) McGraw-Hill Book Company, New York；以及 Eliel, E. 與 Wilen, S., *Stereochemistry of Organic Compounds* (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York。多種有機化合物以光學活性形式存在，亦即，其具有使平面-偏振光之平面旋轉的能力。在描述光學活性化合物時，前綴 D 及 L 或者 R 及 S 用於表示分子圍繞其手性中心的絕對組態。前綴 d 及 l 或者 (+) 及 (-) 用於表示該化合物對平面偏振光的旋轉符號，其中 (-) 或 l 表示該化合物為左旋。帶有 (+) 或 d 前綴的化合物為右旋。對於給定的化學結構，此等立體異構物是相同者，但它們是彼此之鏡像。特定的立體異構物也可以稱為鏡像異構物，並且此等異構物之混合物通常稱為鏡像異構物混合物。鏡

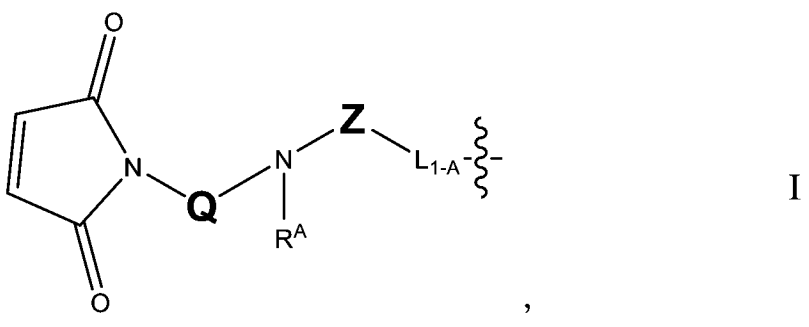
像異構物之 50:50 混合物稱為外消旋混合物或外消旋物，它們可能出現在化學反應或過程中沒有立體選擇或立體特異性的地方。術語「外消旋混合物」及「外消旋物」指代兩種鏡像體種類的等莫耳混合物，其不具旋光性。

【0060】本文中之其他術語、定義及縮寫包括：野生型(「WT」)；經半胱氨酸工程化改造的突變抗體(「硫基」)；輕鏈(「LC」)；重鏈(「HC」)；6-順丁烯二醯亞胺基己醯基(「MC」)；順丁烯二醯亞胺基丙醯基(「MP」)；纈氨酸-瓜氨酸(「val-cit」或「vc」)、丙氨酸-苯丙氨酸(「ala-phe」)、對氨基苄基(「PAB」)及對氨基苄基氧羰基(「PABC」)；重鏈之 A118C (EU 編號) = A121C (順序編號) = A114C (Kabat 編號) 輕鏈之 K149C (Kabat 編號)。

【0061】本文其他地方亦提供了其他定義及縮寫。

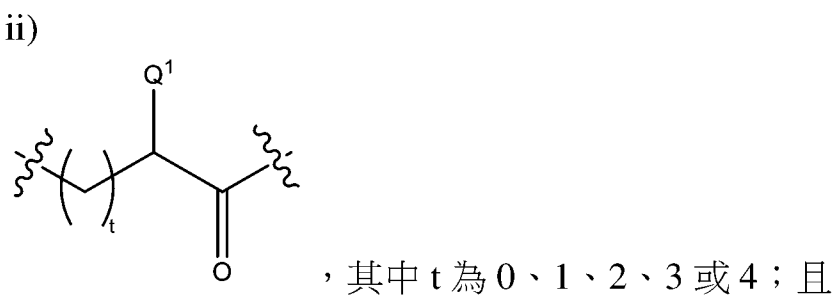
II. 可水解的連接子

【0062】在實施例中，本文所述的主題涉及包含可水解的部分的擬肽物連接子，其中連接子與 CIDE 或抗體及 CIDE 共價結合。在實施例中，擬肽物連接子之順丁烯二醯亞胺部分的可水解的部分包含具有式 I 之結構：



其中，

- Z 為 $-(CH_2)_p-$ 或 $-CH_2-(CH_2-O-CH_2)_p-CH_2-$ ，其中 p 為 1、2、3、4、5 或 6；
- R^A 為氫、 C_{1-6} 烷基、苯基或苄基；
- Q 係選自由以下所組成之群組：



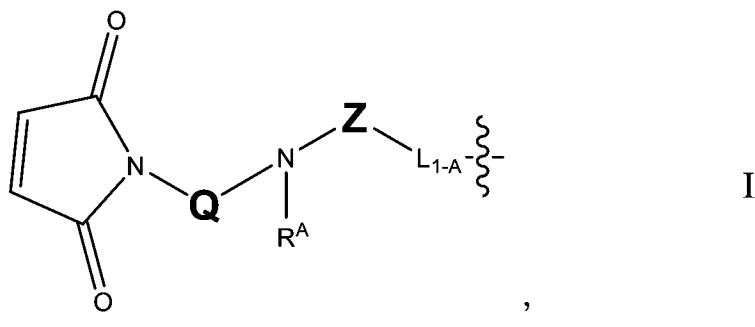
其中 Q¹ 為氫、 或 ，其中 R² 為氫、鹵基(C₁₋₆)烷基或 C₁₋₆ 烷基；且

L_{1-A} 為擬肽物連接子的其餘部分。

【0063】 在某些實施例中，本文所述的主題涉及具有下列結構之化合物：

L₁-D

其中，
D 為 CIDE；
L₁ 為與 D 共價連接且具有式 I 的結構的連接子：

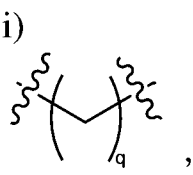


其中，

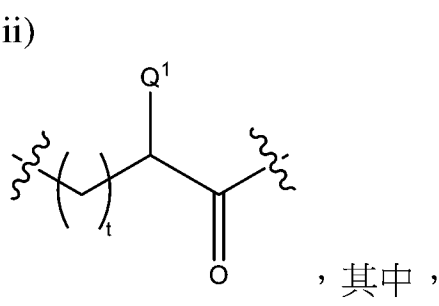
Z 為 $-(CH_2)_p-$ 或 $-CH_2-(CH_2-O-CH_2)_p-CH_2-$ ，其中 p 為 1、2、3、4、5 或 6；

R^A 為氫、 C_{1-6} 烷基、苯基、苄基；

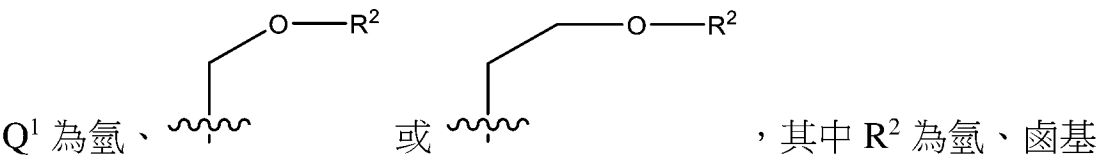
Q 係選自由以下所組成之群組：



其中 q 為 1、2、3 或 4；以及



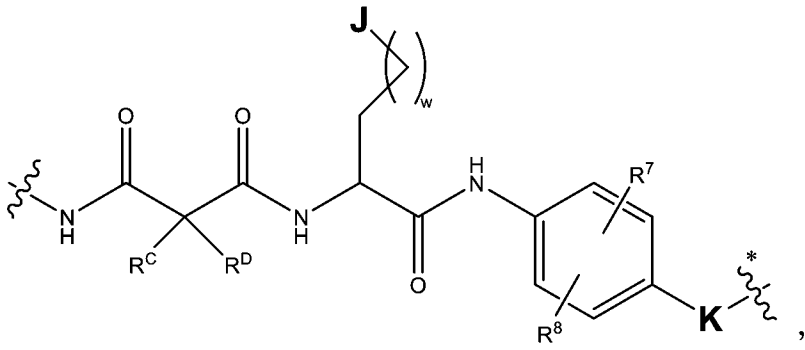
t 為 0、1、2、3 或 4；且



(C_{1-6})烷基或 C_{1-6} 烷基；

及

L_{1-A} 為：



其中  表示與 D 的接附點；

w 為 0、1、2、3、4 或 5；

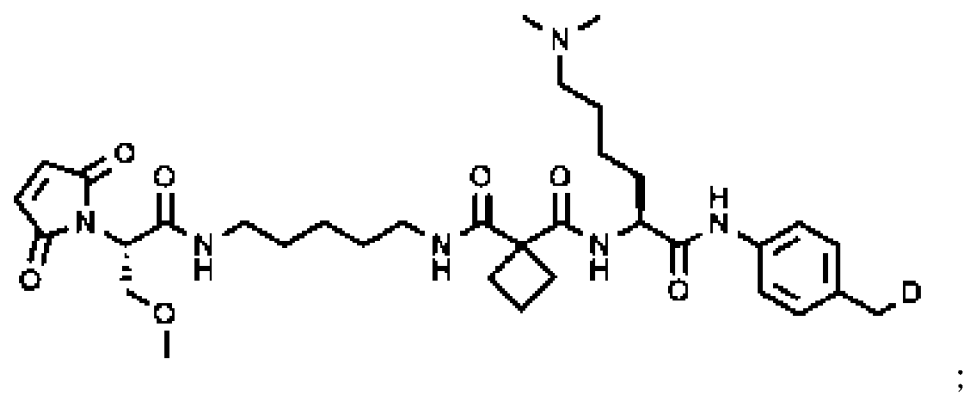
J 係選自由以下所組成之群組： C_{1-5} 烷基、 $-N(R^x)(R^y)$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-NH-C(O)-NH_2$ 及 $-NH-C(NH)-NH_2$ ，其中， R^x 及 R^y 各自獨立地選自氫及 C_{1-3} 烷基；

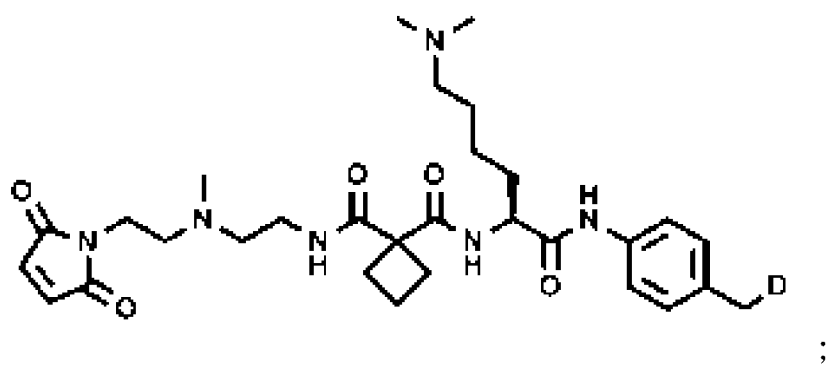
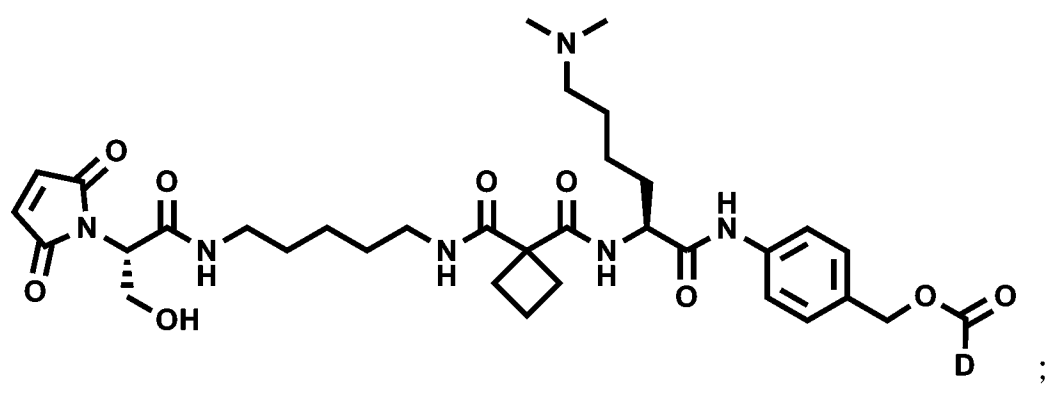
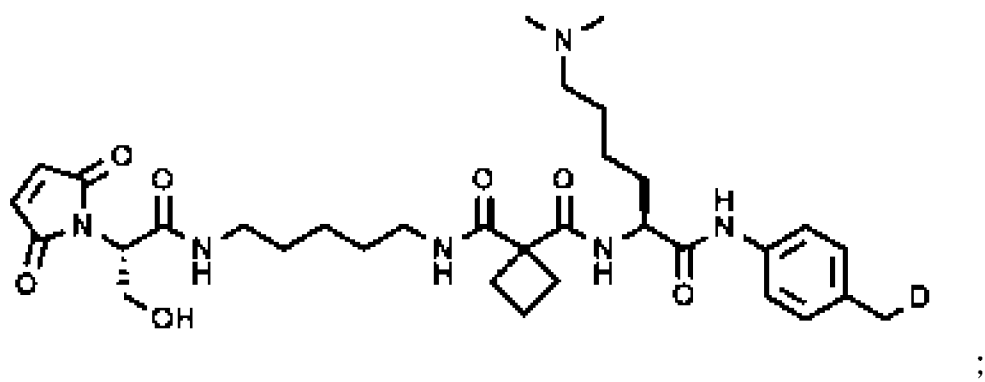
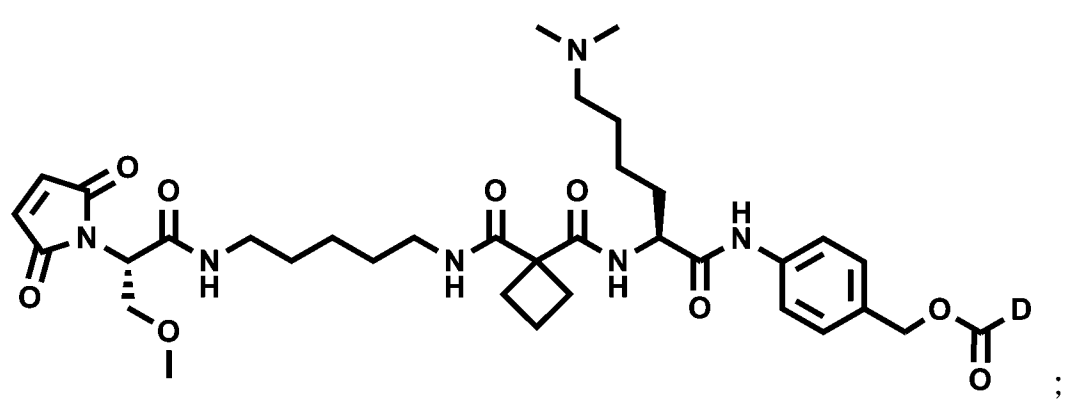
K 係選自由以下所組成之群組： C_{1-3} 伸烷基、 $-CH(R)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)-O-CH(R)-$ 、 $-CH_2-O-C(O)-$ 、 $-CH_2-O-C(O)-NH-CH_2-$ 及 $-CH_2-O-C(O)-R-[CH_2]_u-O-$ ，其中 R 為氫、 C_{1-3} 烷基、 $N(R^x)(R^y)$ 、 $-O-N(R^x)(R^y)$ 或 $C(O)-N(R^x)(R^y)$ ，其中 u 為 0、1、2 或 3，且其中 R_x 及 R_y 各自獨立地選自氫及 C_{1-3} 烷基，或 R_x 及 R_y 與其各自所接附的氮一起形成視情況經取代之 5 員至 7 員雜環基；

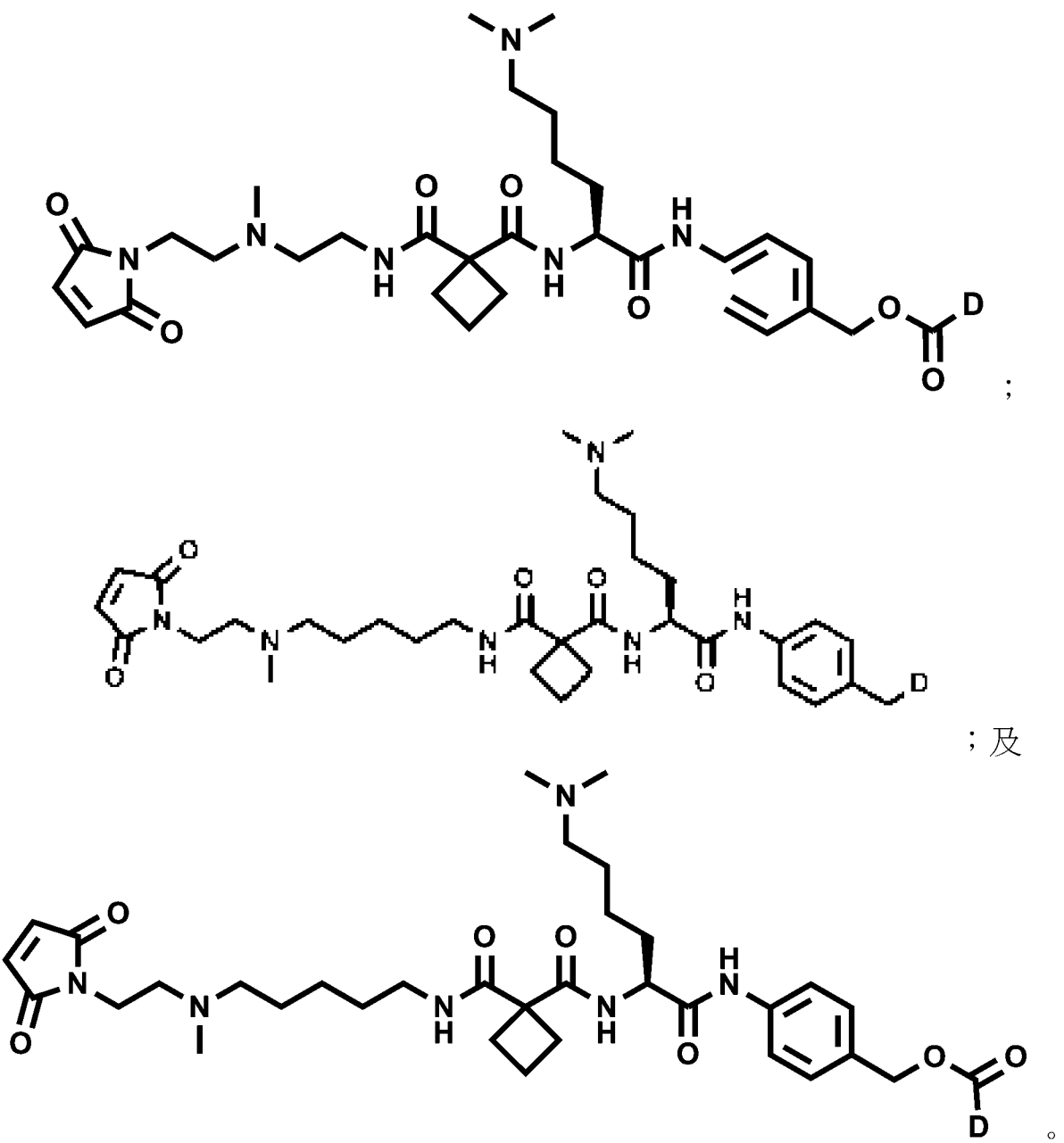
R^C 及 R^D 各自獨立地選自氫及 C_{1-3} 烷基，或 R^C 及 R^D 與其各自所接附的碳一起形成視情況經取代之 C_{3-6} 環烷基；且

R^7 及 R^8 各自獨立地為氫、鹵基、 C_{1-5} 烷基、 C_{1-5} 烷氧基或羥基。

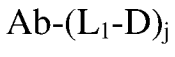
【0064】 在實施例中， L_1-D 係選自由以下所組成之群組：





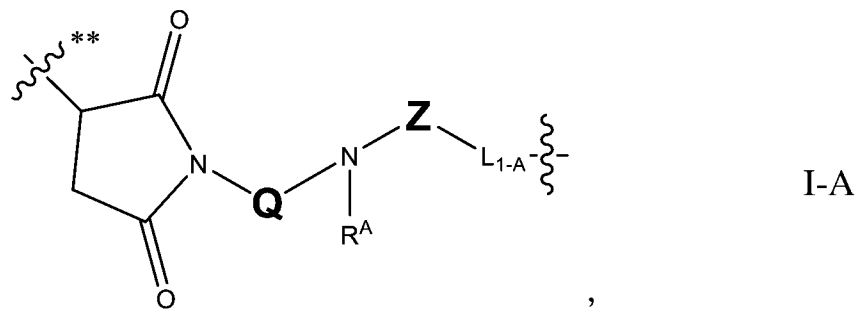


【0065】 在某些實施例中，本文所述的主題涉及具有下列結構的抗體-CIDE 結合物：



- 其中，
- Ab 為抗體；
- j 為 1 至 16；
- D 為 CIDE；

L₁ 為與 Ab 及與 D 共價結合且具有式 I-A 的結構的连接子：

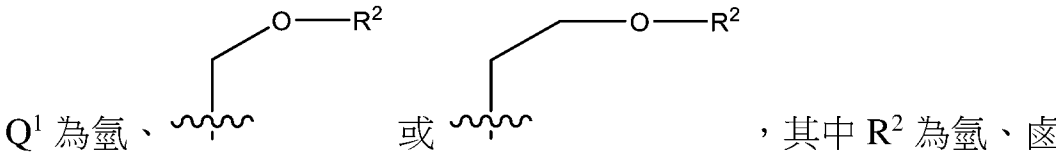
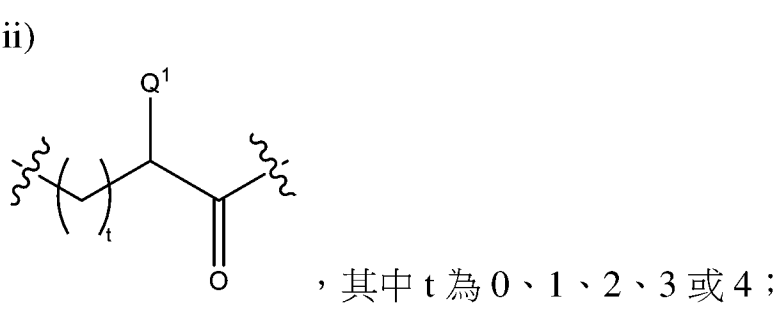
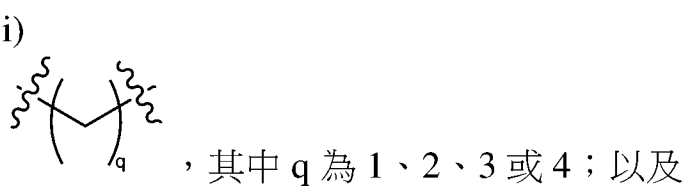


其中，

Z 為 $-(CH_2)_p-$ 或 $-CH_2-(CH_2-O-CH_2)_p-CH_2-$ ，其中 p 為 1、2、3、4、5 或 6；

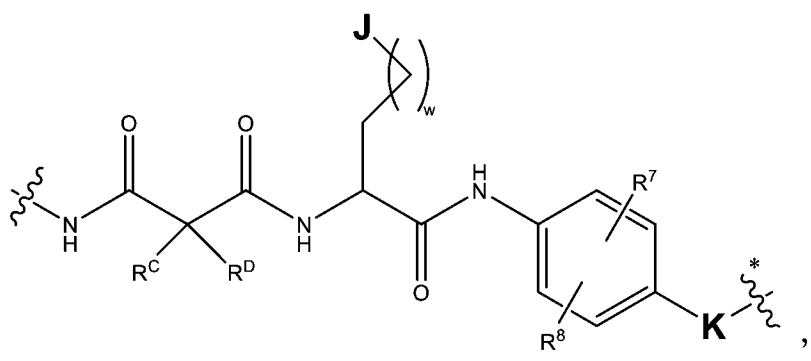
R^A 為氫、C₁₋₆ 烷基、苯基、苄基；

Q 係選自由以下所組成之群組：



基(C₁₋₆)烷基或 C₁₋₆ 烷基；且

L_{1-A} 為：



其中  表示與 D 的接附點；

w 為 0、1、2、3、4 或 5；

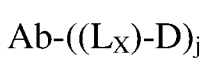
J 係選自由以下所組成之群組：C₁₋₅ 烷基、-N(R^x)(R^y)、-C(O)NH₂、-NH-C(O)-NH₂ 及 -NH-C(=NH)-NH₂，其中，R^x 及 R^y 各自獨立地選自氫及 C₁₋₃ 烷基；

K 係選自由以下所組成之群組：C₁₋₃ 伸烷基、-CH(R)-、-C(O)-、-C(O)-O-CH(R)-、-CH₂-O-C(O)-、-CH₂-O-C(O)-NH-CH₂- 及 -CH₂-O-C(O)-R-[CH₂]_u-O-，其中 R 為氫、C₁₋₃ 烷基、N(R^x)(R^y)、-O-N(R^x)(R^y) 或 C(O)-N(R^x)(R^y)，其中 u 為 0、1、2 或 3，且其中 R_x 及 R_y 各自獨立地選自氫及 C₁₋₃ 烷基，或 R_x 及 R_y 與其各自所接附的氮一起形成視情況經取代之 5 員至 7 員雜環基；

R^C 及 R^D 各自獨立地選自氫及 C₁₋₃ 烷基，或 R^C 及 R^D 與其各自所接附的碳一起形成視情況經取代之 C₃₋₆ 環烷基；且

R⁷ 及 R⁸ 各自獨立地為氫、鹵基、C₁₋₅ 烷基、C₁₋₅ 烷氧基或羥基。

【0066】 在某些實施例中，本文所述的主題涉及具有下列結構的抗體-CIDE 結合物：

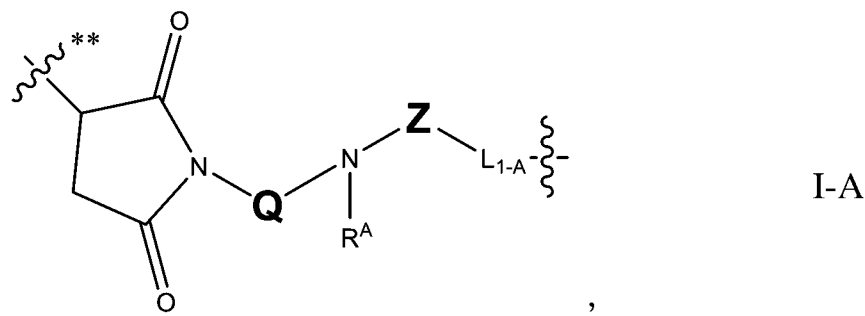


其中

Ab 為抗體；

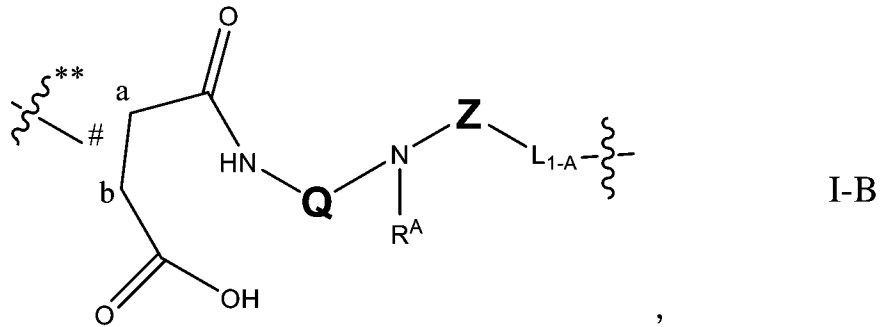
j 為 1 至 16 ；
D 為 CIDE ；
 L_x 係選自由以下所組成之群組： L_1 及 L_{1h} ，其中 L_x 之至少一個實例中
存在 L_{1h} ：

L_1 為與 Ab 及與 D 共價結合且具有式 I-A 之結構的连接子-1：



及

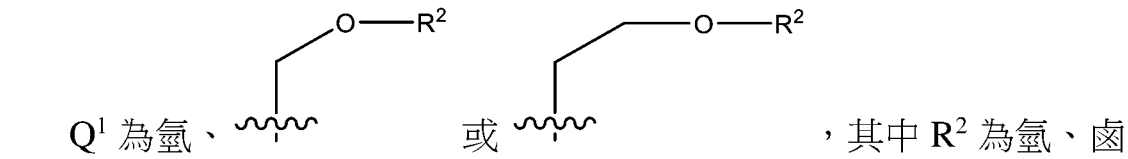
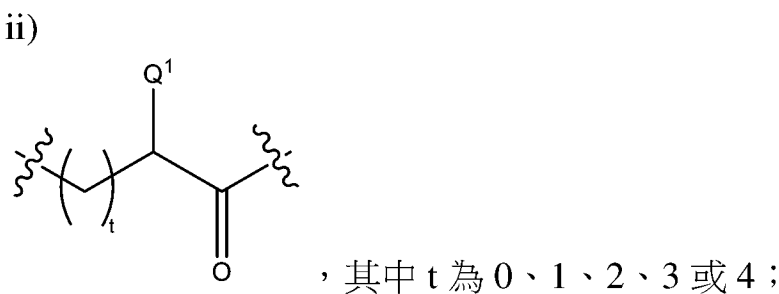
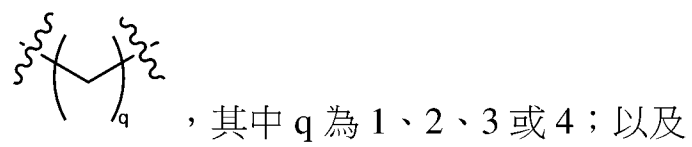
L_{1h} 為與 D 共價結合且具有式 I-B 之結構的连接子：



其中 # 表示位置 a 或 b 處的接附點；

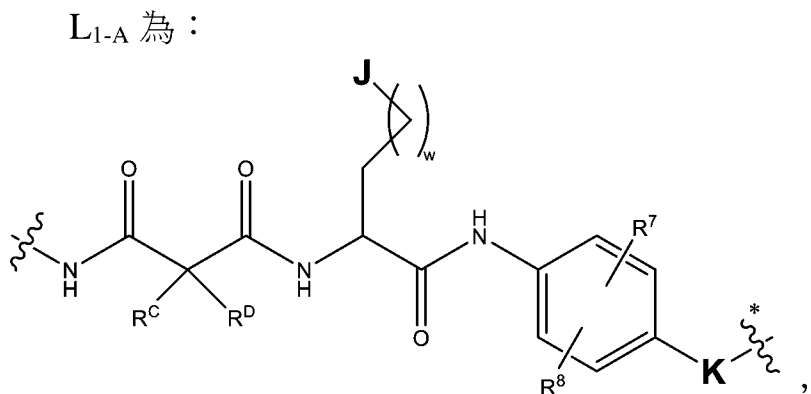
在 L_1 及 L_{1h} 中， 表示與抗體的接附點；

Z 為 $-(CH_2)_p-$ 或 $-CH_2-(CH_2-O-CH_2)_p-CH_2-$ ，其中 p 為 1、2、3、4、5 或
6 ；
 R^A 為氫、 C_{1-6} 烷基、苯基、苄基 ；
Q 係選自由以下所組成之群組：
i)



基(C₁₋₆)烷基或 C₁₋₆ 烷基；

且



其中  表示與 D 的接附點；

w 為 0、1、2、3、4 或 5；

J 係選自由以下所組成之群組：C₁₋₅ 烷基、-N(R^x)(R^y)、-C(O)NH₂、-NH-C(O)-NH₂ 及 -NH-C(=NH)-NH₂，其中，R^x 及 R^y 各自獨立地選自氫及 C₁₋₃ 烷基；

K 係選自由以下所組成之群組：C₁₋₃ 伸烷基、-CH(R)-、-C(O)-、-C(O)-O-CH(R)-、-CH₂-O-C(O)-、-CH₂-O-C(O)-NH-CH₂- 及 -CH₂-O-C(O)-R-[CH₂]_u-O-，其中 R 為氫、C₁₋₃ 烷基、N(R^x)(R^y)、-O-N(R^x)(R^y) 或 C(O)-

$N(R^x)(R^y)$ ，其中 u 為 0、1、2 或 3，且其中 R_x 及 R_y 各自獨立地選自氫及 C_{1-3} 烷基，或 R_x 及 R_y 與其各自所接附的氮一起形成視情況經取代之 5 員至 7 員雜環基；

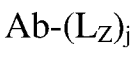
R^C 及 R^D 各自獨立地選自氫及 C_{1-3} 烷基，或 R^C 及 R^D 與其各自所接附的碳一起形成視情況經取代之 C_{3-6} 環烷基；且

R^7 及 R^8 各自獨立地為氫、鹵基、 C_{1-5} 烷基、 C_{1-5} 烷氧基或羥基。

【0067】 在某些實施例中， $Ab-((L_x)-D)_j$ 為如上所述的 $Ab-CIDE$ ，其包含至少一個與抗體共價結合且具有式 I-B 之結構的连接子。

【0068】 在某些實施例中， $Ab-((L_x)-D)_j$ 結合物為 $Ab-(L_1-D)_j$ 之完全或部分水解的產物。

【0069】 在某些實施例中，本文描述的主題涉及具有下列結構的抗體-连接子結合物：



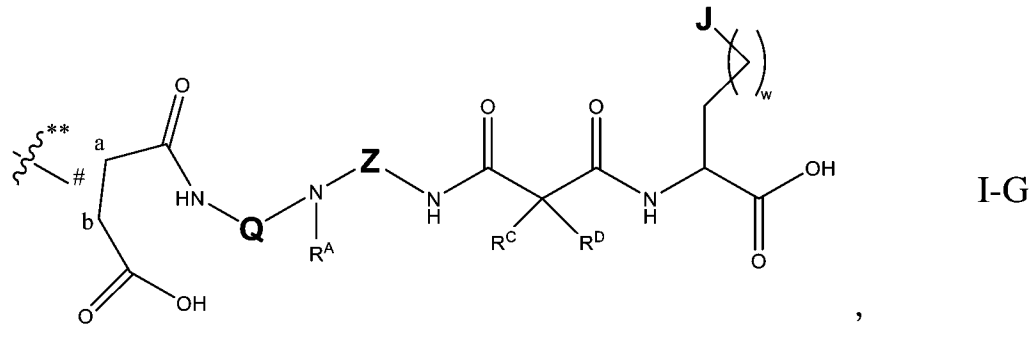
其中，

Ab 為抗體；

j 為 1 至 16；

L_z 係選自由以下所組成之群組： L_{x1} 及 L_x-D ，其中 L_z 之至少一個實施例中存在 L_{x1} ：

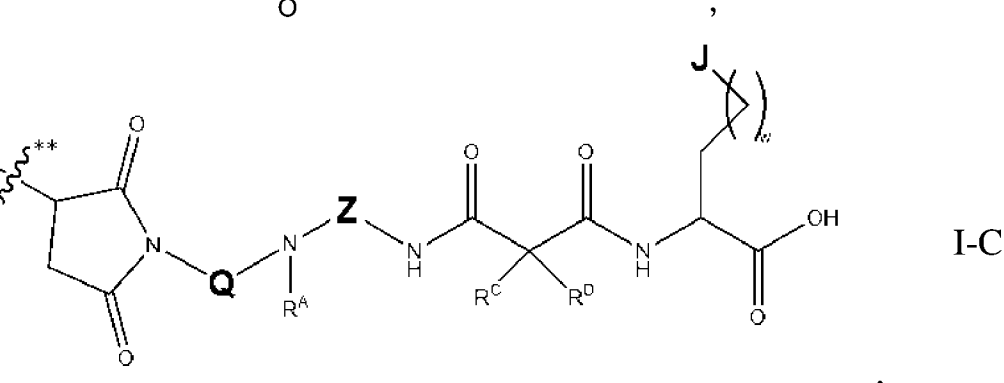
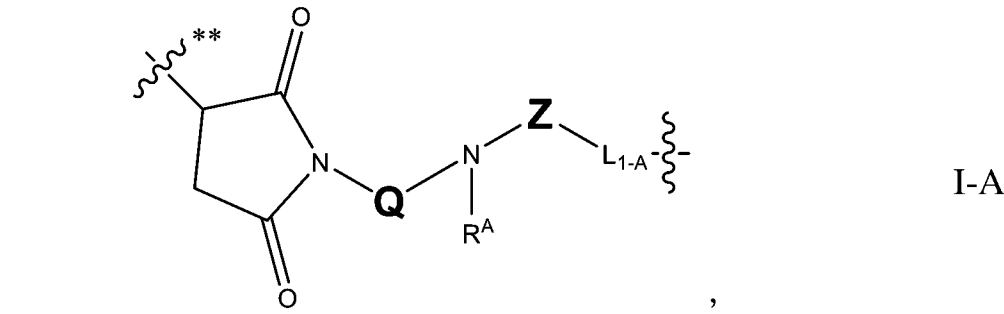
L_{x1} 係與 Ab 共價結合且具有式 I-G 之結構：



及

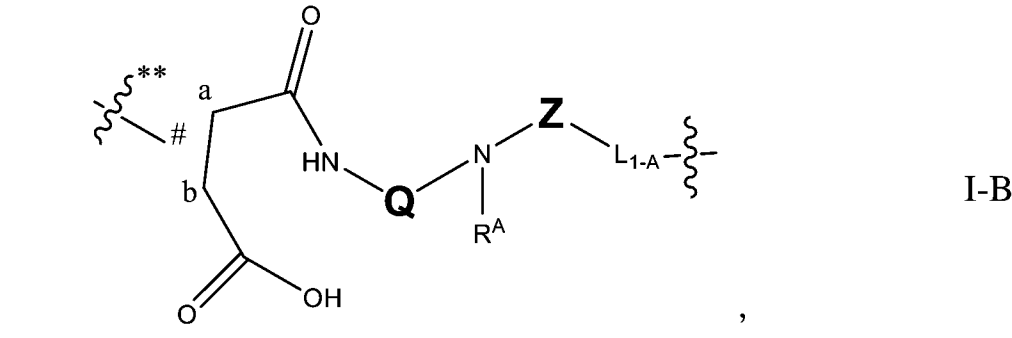
L_x-D，其中 L_x 係選自由以下所組成之群組：L₁ 及 L_{1h}：

L₁ 為與 Ab 及與 D 共價結合且具有式 I-A 或式 I-C 之結構的连接子-1：



且

L_{1h} 為與 Ab 及與 D 共價結合且具有式 I-B 之結構的连接子-1：



其中，# 表示位置 a 或 b 處的接附點；

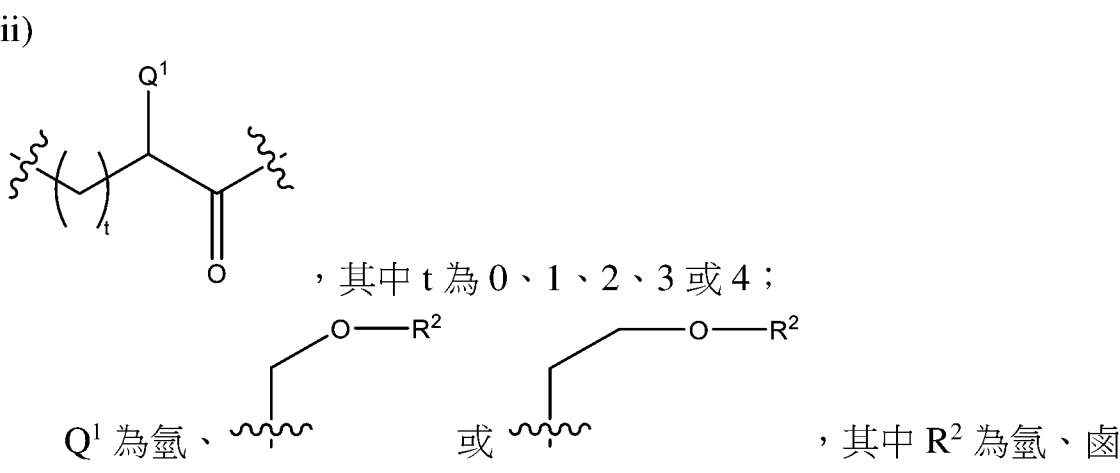
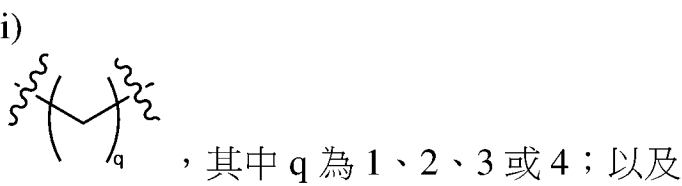
 表示與該抗體的接附點；

Z 為 -(CH₂)_p- 或 -CH₂-(CH₂-O-CH₂)_p-CH₂-，其中 p 為 1、2、3、4、5 或

6；

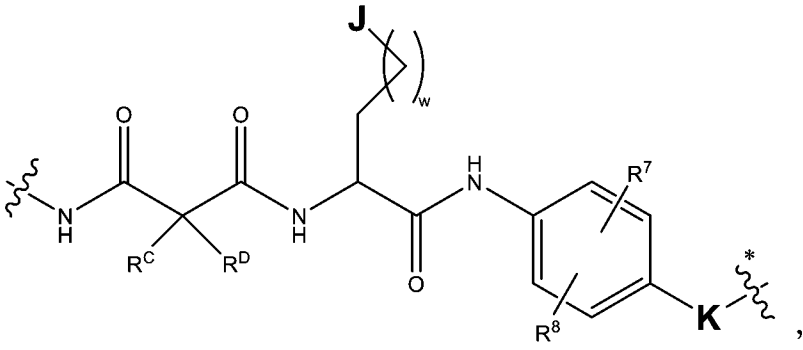
R^A 為氫、C₁₋₆ 烷基、苯基、苄基；

Q 係選自由以下所組成之群組：



基 C₁₋₆ 烷基或 C₁₋₆ 烷基；且

L_{1-A} 為：



其中  表示與 D 的接附點；

w 為 0、1、2、3、4 或 5；

J 係選自由以下所組成之群組：C₁₋₅ 烷基、-N(R^x)(R^y)、-C(O)NH₂、-NH-C(O)-NH₂ 及 -NH-C(=NH)-NH₂，其中，R^x 及 R^y 各自獨立地選自氫及 C₁₋₃ 烷基；

K 係選自由以下所組成之群組：C₁₋₃ 伸烷基、-CH(R)-、-C(O)-、-C(O)-O-CH(R)-、-CH₂-O-C(O)-、-CH₂-O-C(O)-NH-CH₂- 及 -CH₂-O-C(O)-

$R-[CH_2]_u-O-$ ，其中 R 為氫、 C_{1-3} 烷基、 $N(R^x)(R^y)$ 或 $C(O)-N(R^x)(R^y)$ ，其中 u 為 0、1、2 或 3，且其中 R_x 及 R_y 各自獨立地選自氫及 C_{1-3} 烷基，或 R_x 及 R_y 與其各自所接附的氮一起形成視情況經取代之 5 員至 7 員雜環基；

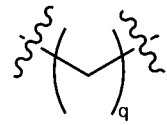
R^C 及 R^D 各自獨立地選自氫及 C_{1-3} 烷基，或 R^C 及 R^D 與其各自所接附的碳一起形成視情況經取代之 C_{3-6} 環烷基；且

R^7 及 R^8 各自獨立地為氫、鹵基、 C_{1-5} 烷基、 C_{1-5} 烷氧基或羥基。

【0070】 在某些實施例中， $Ab-((L_z)_j)$ 為如上所述的 $Ab-CIDE$ ，其包含至少一個與抗體共價結合且具有式 I-G 之結構的连接子。

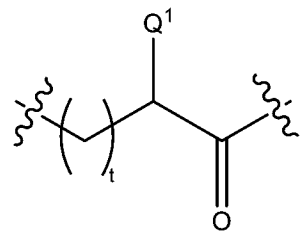
【0071】 在某些實施例中， $Ab-((L_z)_j)$ 結合物為 $Ab-(L_1-D)_j$ 之部分或完全裂解及/或部分或完全水解的產物。

【0072】 在式 I、I-A、I-B、I-C 及 I-G 的某些實施例中， Q 為：

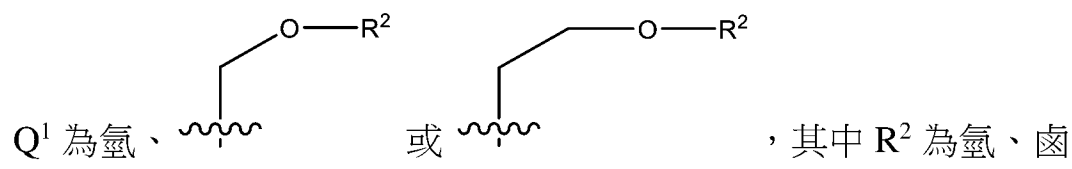


，其中， q 為 1、2、3 或 4。在某些實施例中， q 為 1、2 或 3。在某些實施例中， q 為 2。

【0073】 在式 I、I-A、I-B、I-C 及 I-G 的某些實施例中， Q 為：



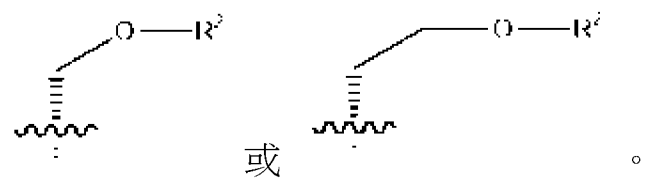
，其中 t 為 0、1、2、3 或 4；



基 C_{1-6} 烷基或 C_{1-6} 烷基。

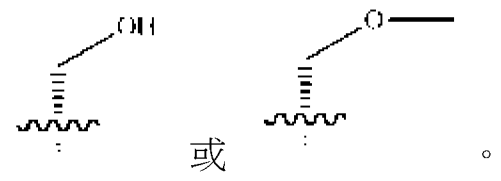
【0074】 在式 I、I-A、I-B、I-C 及 I-G 的某些實施例中， R^2 為氫或 C_{1-6} 烷基。在某些實施例中， R^2 為甲基、乙基、丙基或丁基。在某些實施例中， R^2 為甲基。

【0075】 在式 I、I-A、I-B、I-C 及 I-G 的某些實施例中， Q^1 為：



在此等實施例中的某些態樣中， R^2 為氫或甲基。

【0076】 在式 I、I-A、I-B、I-C 及 I-G 的某些實施例中， Q^1 為：



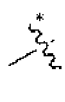
【0077】 在式 I、I-A、I-B、I-C 及 I-G 的某些實施例中， t 為 0。

【0078】 在式 I、I-A、I-B、I-C 及 I-G 的某些實施例中，如請求項 1 之化合物，其中 Z 為 $-(CH_2)_p-$ ，其中 p 為 1、2、3、4、5 或 6。在此等實施例的態樣中， p 為 4、5 或 6。在此等實施例的一態樣中， p 為 5。

【0079】 在式 I、I-A、I-B、I-C 及 I-G 的某些實施例中， Z 為 $-CH_2-(CH_2-O-CH_2)_p-CH_2-$ ，其中 p 為 1、2、3、4、5 或 6。在這些實施例之態樣中， p 為 1、2 或 3。在這些實施例之一個態樣中， p 為 1。

【0080】 在式 I、I-A、I-B、I-C 及 I-G 的某些實施例中， R^A 為氫或 C_{1-6} 烷基。在此等實施例的態樣中， R^A 為氫或甲基。

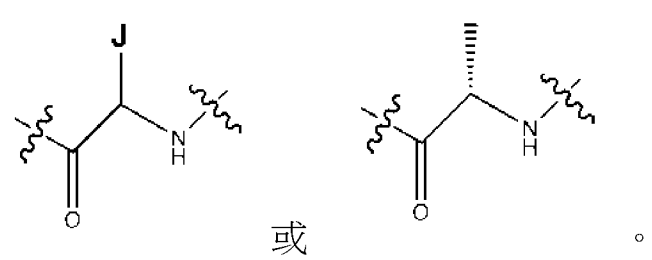
【0081】 在式 I、I-A、I-B、I-C 及 I-G 的某些實施例中， R^A 為 $-(CH_2)_v-Ar$ ，其中 Ar 為視情況經取代之芳基。在某些實施例中， Ar 為 C_{6-10} 芳基。在某些實施例中， Ar 為 C_6 芳基。在某些實施例中， v 為 0 或 1。在某些實施例中，芳基係視情況經經基或 C_{1-3} 烷基取代一次或兩次。在某些實施例中， R^A 為苯基或苄基。

【0082】 在 L_{1-A} 的某些實施例中， 表示與 D 之 PB 的接附點。

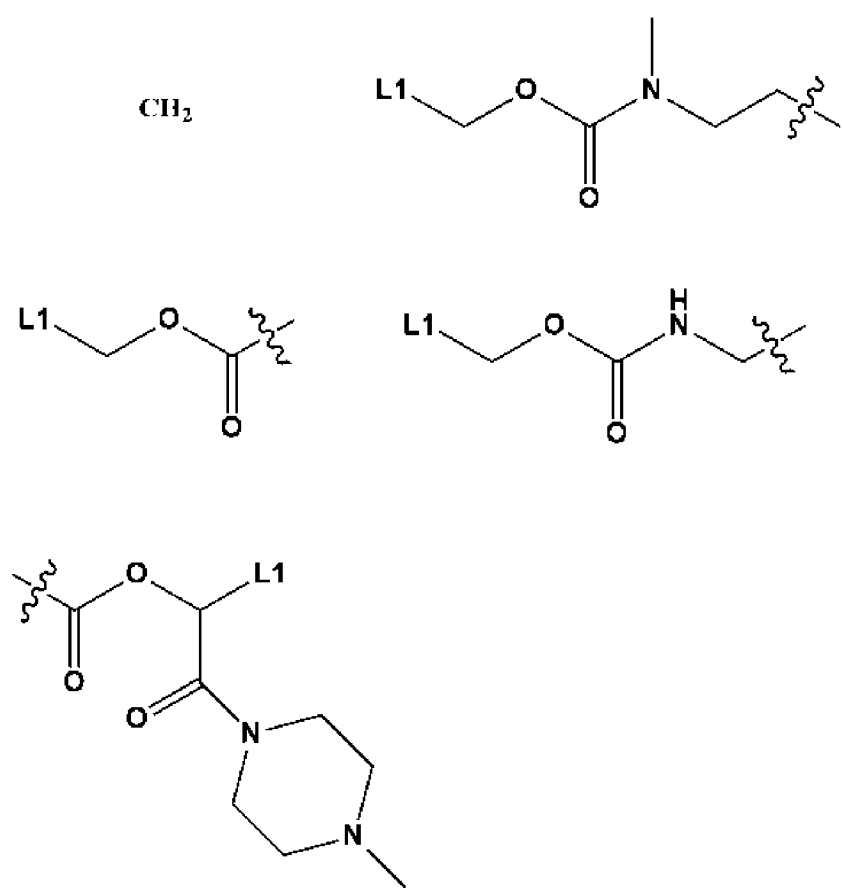
【0083】 在式 I、I-A、I-B、I-C 及 I-G 的某些實施例中， R^7 及 R^8 各自為氫。

【0084】 在式 I、I-A、I-B、I-C 及 I-G 的某些實施例中， R^C 及 R^D 與其各自所接附的碳一起形成視情況經取代之 C_{3-6} 環烷基。在此等實施例的一態樣中， C_{3-6} 環烷基為環丁烷。

【0085】 在某些實施例中，當 w 為 0 時， J 為 C_{1-5} 烷基，諸如甲基，且 L_1 、 L_1 、 L_X 或 L_Z 包含：



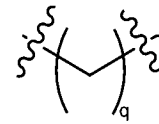
【0086】 在某些實施例中， K 為 $-CH(R)-$ ，其中 R 為氫、 C_{1-3} 伸烷基、 $-CH_2O(CO)-$ 、 $N(R^x)(R^y)$ 、 $-O-N(R^x)(R^y)$ 或 $C(O)-N(R^x)(R^y)$ ，其中 R_x 及 R_y 各自獨立地選自氫及 C_{1-3} 烷基，或 R_x 及 R_y 與其所接附的氮一起形成視情況經取代之 5 員至 7 員雜環基。在此等實施例的態樣中， R 為氫或 C_{1-3} 烷基。在此等實施例的一態樣中， R 為氫。在某些實施例中， K 係選自由以下所組成之群組：



【0087】 在一實施例中，

Z 為 $-(CH_2)_p-$ ，其中 p 為 2 或 5；

R^A 為氫或 C_{1-6} 烷基；

Q 為 ，其中，q 為 2；

w 為 2 或 3；

J 係選自由以下所組成之群組： C_{1-5} 烷基、 $-N(R^x)(R^y)$ ，其中 R^x 及 R^y 各自為 C_{1-3} 烷基及 $-NH-C(O)-NH_2$ ；

K 為 C_{1-3} 伸烷基或 $-CH_2-O-C(O)-$ ；

R^C 及 R^D 與其各自所接附的碳一起形成視情況經取代之 C_{3-6} 環烷基；

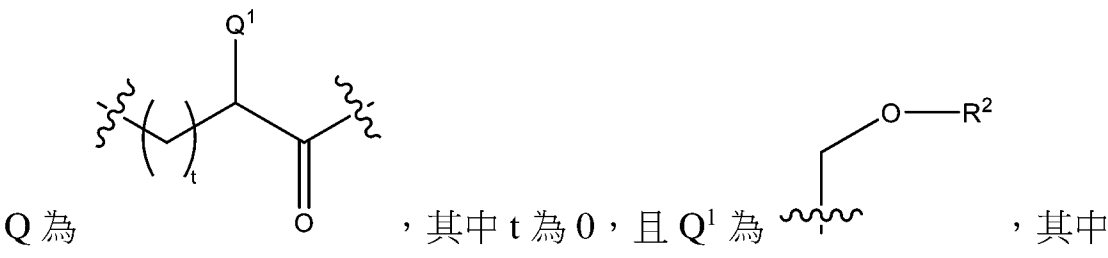
且

R^7 及 R^8 各自為氫。

【0088】 在一實施例中，

Z 為 $-(CH_2)_p-$ ，其中 p 為 2 或 5；

R^A 為氫或 C_{1-6} 烷基；



R^2 為氫或 C_{1-6} 烷基；

w 為 3；

J 係選自由以下所組成之群組： C_{1-5} 烷基、 $-N(R^x)(R^y)$ ，其中 R^x 及 R^y 各自為 C_{1-3} 烷基；

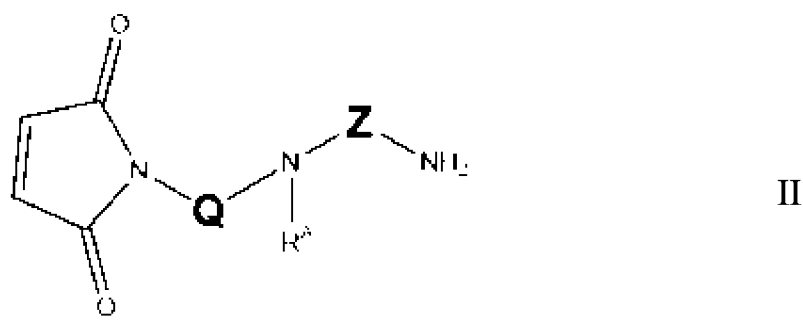
K 為 C_{1-3} 伸烷基或 $-CH_2-O-C(O)-$ ；

R^C 及 R^D 與其各自所接附的碳一起形成視情況經取代之 C_{3-6} 環烷基；

且

R^7 及 R^8 各自為氫。

【0089】 在某些實施例中，本文所述的主題涉及具有下列結構的式 II 化合物：

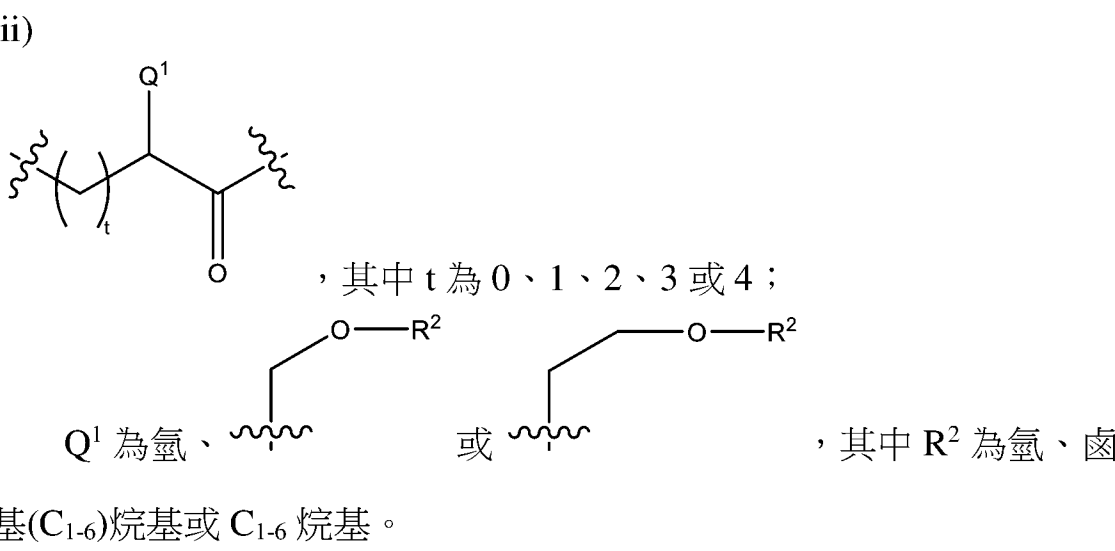
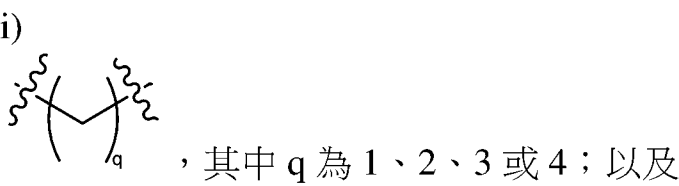


其中

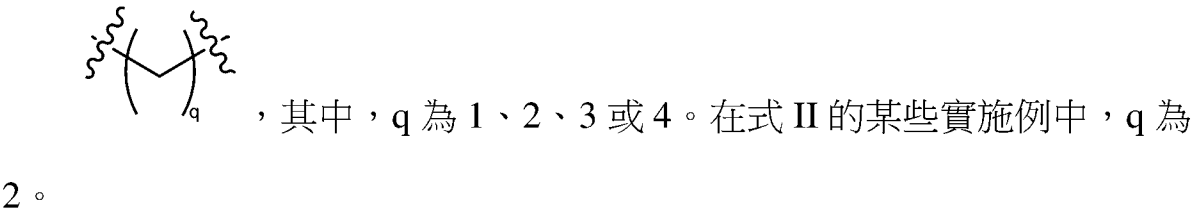
Z 為 $-(CH_2)_p-$ 或 $-CH_2-(CH_2-O-CH_2)_p-CH_2-$ ，其中 p 為 1 至 24 的整數；

R^A 為氫、 C_{1-6} 烷基或 $-(CH_2)_v-$ 芳基，其中 v 為 0 或 1；

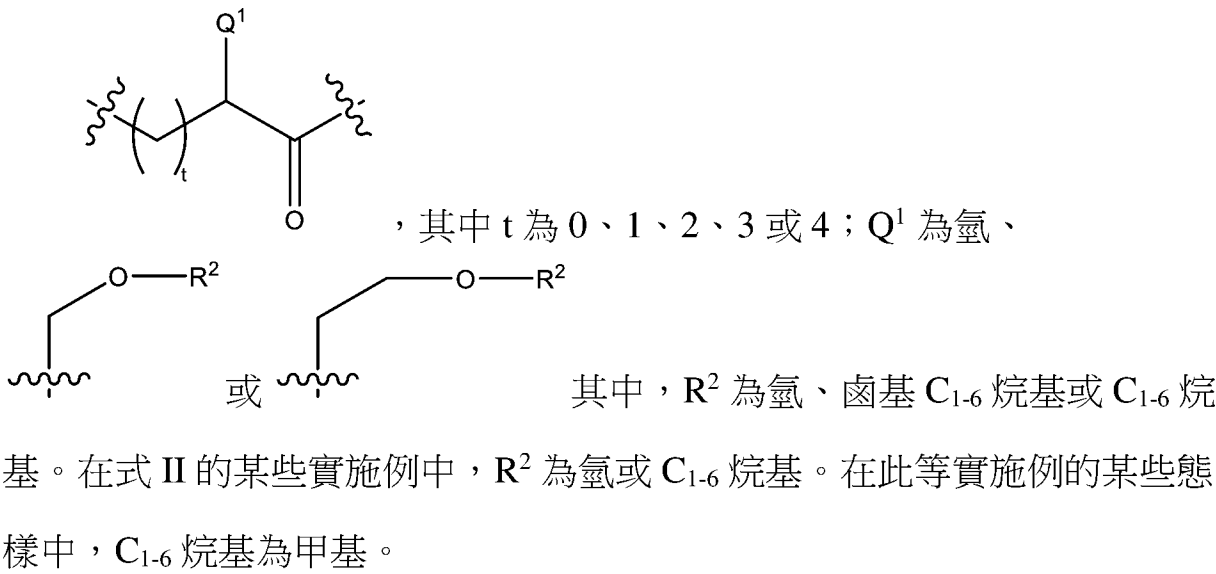
Q 係選自由以下所組成之群組：



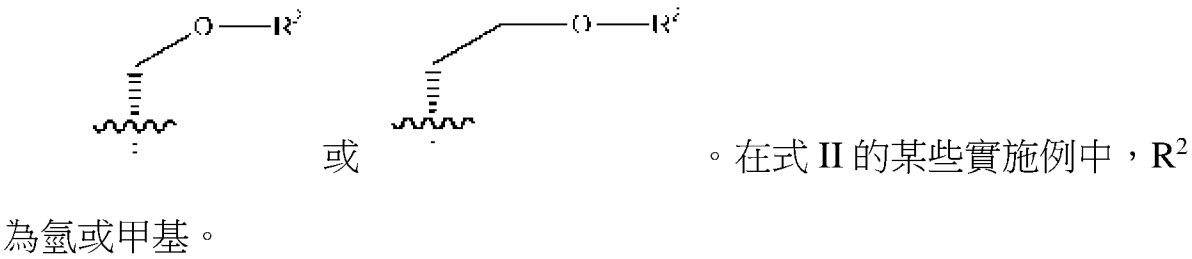
【0090】 在式 II 的某些實施例中，Q 為：



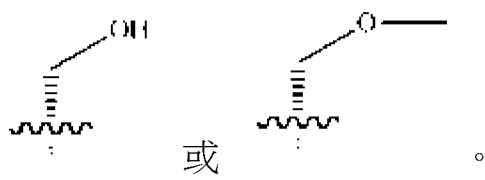
【0091】 在式 II 的某些實施例中，如請求項 26 之化合物，其中 Q 為：



【0092】 在式 II 的某些實施例中，Q¹ 為：



【0093】 在式 II 的某些實施例中， Q^1 為：



【0094】 在式 II 的某些實施例中， t 為 0。

【0095】 在式 II 的某些實施例中， Z 為 $-(CH_2)_p-$ ，其中 p 為 1、2、3、4、5 或 6。在此等實施例的某些態樣中， p 為 4、5 或 6。在此等實施例的某些態樣中， p 為 5。

【0096】 在式 II 的某些實施例中， Z 為 $-CH_2-(CH_2-O-CH_2)_p-CH_2-$ ，其中 p 為 1、2、3、4、5 或 6。在此等實施例的某些態樣中， p 為 1、2 或 3；或 p 為 1。

【0097】 在式 II 的某些實施例中， R^A 為氫或 C_{1-6} 烷基。在此等實施例的某些態樣中， R^A 為氫或甲基。

【0098】 在式 II 的某些實施例中， R^A 為苯基或苄基。

【0099】 在某些實施例中，式 II 不包括其中： Q 為 $-CH_2CH_2-$ ， R^A 為氫且 Z 為 $-CH_2CH_2-$ 的化合物；及其中 Q 為 $-(CH_2)_3-$ ， R^A 為氫且 Z 為 $-(CH_2)_3-$ 的化合物；以及其中 Q 為 $-CH_2CH_2-$ ， R^A 為甲基且 Z 為 $-CH_2CH_2-$ 的化合物。

III. CIDE 與可水解的連接子共價結合

【0100】 化學降解誘導物 (CIDE) 分子與本文所述的可水解的含有順丁烯二醯亞胺的連接子共價結合。在某些實施例中，CIDE 包括降解劑，其為雙功能分子，具有與蛋白質靶向部分連接的泛蛋白結合部分，諸如彼等於

WO2017/201449、WO 2020/086858、US 7,208,157、US 2014/0356322、US 2015/0291562、WO2017/030814、US 2017/0008904、US 9,938,264、US 2019/300521、US 2020/0038378、WO2021/067606 及 WO2021/207291 中描述者。鑑於本文揭示的主題，本領域技術人員將理解，可水解的连接子與 CIDE 的接附點可以變化，且可為 CIDE 上任何可用的接附點。

【0101】在某些實施例中，CIDE 包括彼等具有以下組分者：

a. E3 泛蛋白連接酶結合基團 (E3LB)

【0102】E3 泛蛋白連接酶 (其中 600 多種在人體中已知) 使泛蛋白化具有受質特異性。存在與這些連接酶結合的已知配體。如本文所述，E3 泛蛋白連接酶結合基團為可結合作為 von Hippel-Lindau (VHL) 的 E3 泛蛋白連接酶的肽或小分子。

【0103】一種特定之 E3 泛蛋白連接酶為 von Hippel-Lindau (VHL) 腫瘤抑制因子，其為 E3 連接酶複合體 VCB 的受質識別次單元，亦由延伸蛋白 (elongin) B 和 C、Cul2 及 Rbx1 組成。VHL 之主要受質為缺氧誘導因子 1 α (HIF-1 α)，其係一種轉錄因子，可因應低氧水平而上調基因諸如促血管生成生長因子 VEGF 及紅血球誘導細胞激素紅血球生成素。

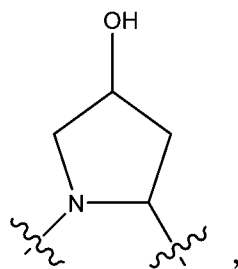
【0104】在某些實施例中，CIDE 的 E3LB 部分可為任何已知的 E3LB 配體。在某些實施例中，本文所述的 CIDE 及結合的 CIDE 不限於 E3LB 之類型，其中 CIDE 與本文所述的可水解的连接子共價連接。

【0105】E3LB 部分的至少一端包含與 L2 部分共價連接或能夠與之共價連接的部分，且至少一端包含與 L1 部分共價連接或能夠與之共價連接的部分。例如，E3LB 部分終止於 -NHCOOH 部分，該部分可藉由醯胺鍵共價連接至 L2 部分。

【0106】 在本文所述之任何態樣或實施例中，如本文所述之 E3LB 可為其醫藥上可接受之鹽、鏡像異構物、非鏡像異構物、溶劑化物或同質異晶物。此外，在本文所述之任何態樣或實施例中，如本文所述之 E3LB 可經由鍵或藉由化學連接子直接偶合至 PB。

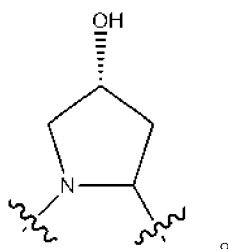
【0107】 在某些實施例中，E3LB 包括包含如 WO 2020/086858、WO2013/106643 及 WO2013/106646 中所述之羥基脯胺酸部分的化合物，它們各自藉由引用方式整體併入本文。

【0108】 在某些實施例中，本文之主題涉及包含羥基脯胺酸之殘基的 E3LB 部分：

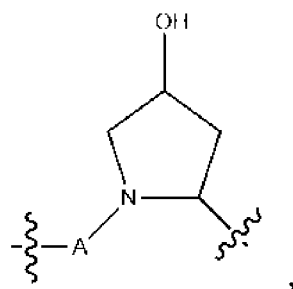


其中，在全部實施例及子結構中，羥基可以視情況被另一基團諸如磷酸酯部分替換。

【0109】 在某些實施例中，E3LB 包含：

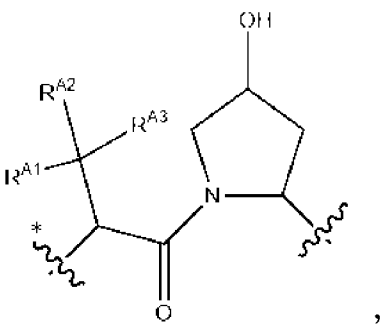


【0110】 在某些實施例中，E3LB 包含：



其中，A 為與 L2 共價結合的基團。

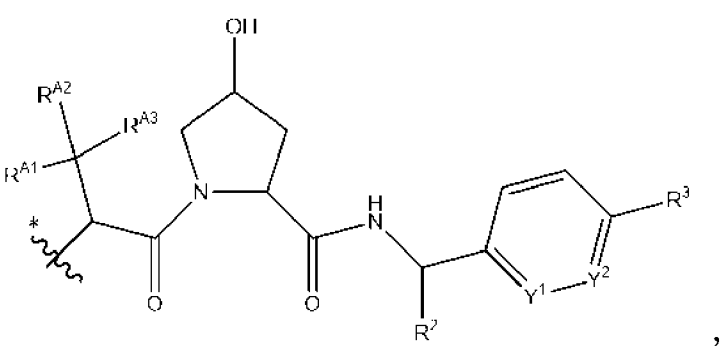
【0111】 在某些實施例中，E3LB 包含：



其中， 為與 L2 的接附點，且

R^{A1} 、 R^{A2} 及 R^{A3} 各自獨立地為氫或 C_{1-5} 烷基；或者 R^{A1} 、 R^{A2} 及 R^{A3} 中之兩者與其各自所接附之碳一起形成 C_{1-5} 環烷基。

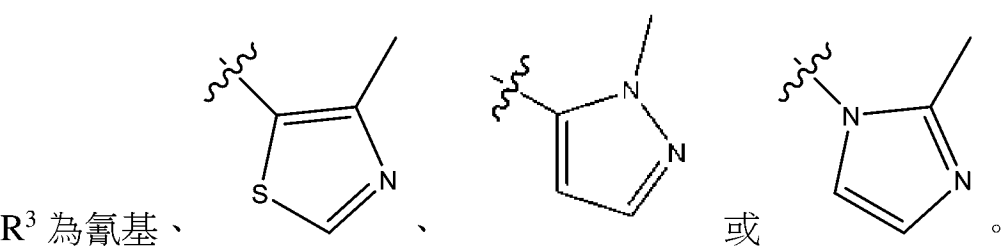
【0112】 在某些實施例中，E3LB 包含：



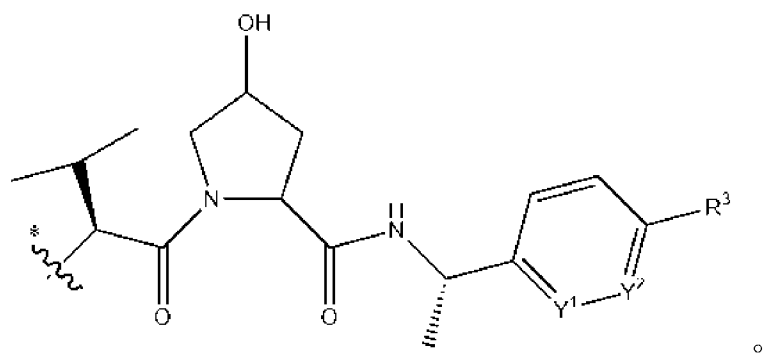
其中，

R^2 為氫或 C_{1-5} 烷基；

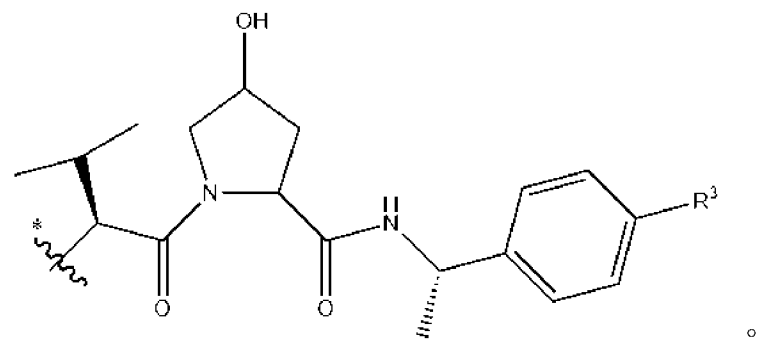
Y^1 及 Y^2 各自為 $-CH$ ，或者 Y^1 及 Y^2 中之一者為 $-CH$ ，且另一者為 N；且



【0113】 在某些實施例中，E3LB 包含：

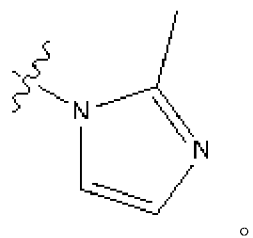


【0114】 在某些實施例中，E3LB 包含：

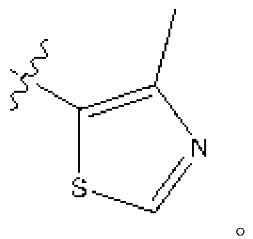


【0115】 在某些實施例中，E3LB 具有這樣的結構，其中 R₃ 為氰基。

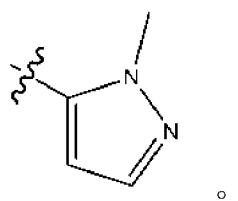
【0116】 在某些實施例中，E3LB 具有這樣的結構，其中 R₃ 為



【0117】 在某些實施例中，E3LB 具有這樣的結構，其中 R₃ 為



【0118】 在某些實施例中，E3LB 具有這樣的結構，其中 R₃ 為



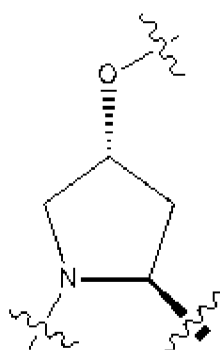
【0119】在某些實施例中，E3LB 具有這樣的結構，其中 R₂ 為氫、甲基、乙基或丙基。

【0120】在某些實施例中，E3LB 具有這樣的結構，其中 R₂ 為甲基。



【0121】在某些實施例中，E3LB 具有這樣的結構，其中 R₂ 為。

【0122】在某些實施例中，E3LB 之羥基脯氨酸部分具有下列結構：



。

【0123】E3LB 部分的至少一個末端具有與 L2 部分共價連接或能夠與之共價連接的部分，且至少一個末端具有與 L1 部分共價連接或能夠與之共價連接的部分。例如，E3LB 部分終止於可藉由醯胺鍵與 L2 部分共價連接的 -NHCOOH 部分。

【0124】在本文所述之任何態樣或實施例中，如本文所述之 E3LB 可為其醫藥上可接受之鹽、鏡像異構物、非鏡像異構物、溶劑化物或同質異晶物。

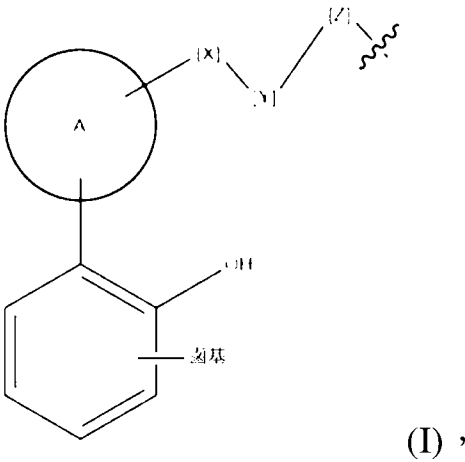
b. 蛋白質結合基團 (PB)

【0125】「蛋白質結合基團」或「PB」是指能夠與標靶蛋白或其他目標多肽標靶結合的小分子或其他化合物之殘基。PB 與標靶結合或以其他方式與標靶相互作用，其將標靶置於泛蛋白連接酶附近，使得可能發生藉由泛蛋白連接酶進行的蛋白質或多肽之降解。PB 可為任何分子，只要它與 L2 共價結合且

與目標標靶相互作用或結合即可。小分子標靶蛋白結合部分的非限制性實例包括與 BRM (BRAHMA) 結合的化合物、Hsp90 抑制劑、Tau 及雄激素受體 (AR)、激酶抑制劑 (諸如 BRG1、AKT、HPK1 及 IRE1)、MDM2 抑制劑、靶向含有人類 BET 溴區結構域的蛋白質的化合物、HDAC 抑制劑、人類離胺酸甲基轉移酶抑制劑 (諸如 KDM5)、血管生成抑制劑、免疫抑制化合物以及靶向芳基烴受體 (AHR) 的化合物等等。在某些實施例中，本文所述的 CIDE 及結合的 CIDE 不限於 PB 之類型。在某些實施例中，本文所述的 CIDE 及結合的 CIDE 不限於 PB 之類型，其中 CIDE 與本文所述的可水解的连接子共價連接。

【0126】 在某些實施例中，CIDE 之 PB 部分為與 BRM (包括 BRM 的全部變異體、突變、剪接變異體、插入/缺失及融合物) 結合的小分子部分。BRM 亦稱為亞家族 A、成員 2、SMARCA2 及 BRAHMA。該等小分子標靶蛋白結合部分亦包括這些組成物的醫藥上可接受之鹽、鏡像異構物、溶劑化物及同質異晶物以及可靶向目標蛋白的其他小分子。本文所述的 CIDE 可包含已知的 BRM 結合化合物之任何殘基，此等結合化合物包括 WO2019/195201 中所揭示之彼等，該專利全文以引用方式併入本文。

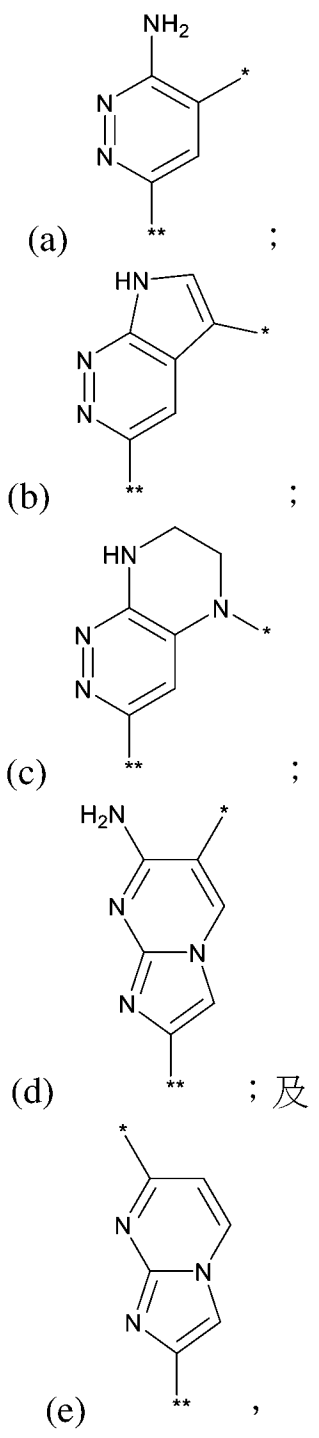
【0127】 在某些實施例中，BRM 結合化合物為式 I 化合物：



或其立體異構物或互變異構物，或前述任一者之醫藥上可接受之鹽，
其中：

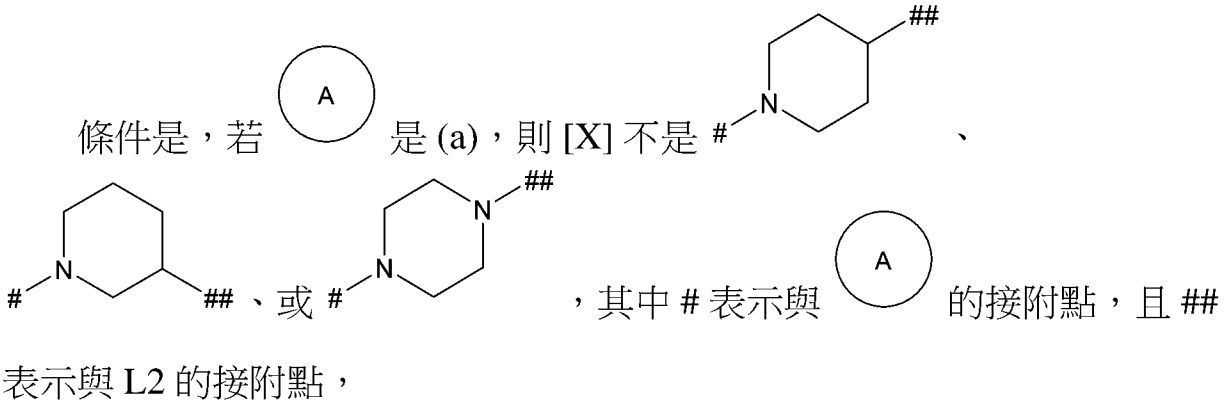
A

選自由以下所組成之群組：



其中，對於 (a) 至 (e)，* 表示與 [X] 的接附點，或者，如果 [X] 不存在，* 表示與 [Y] 的接附點且 ** 表示與苯基環的接附點；且其中：

(i) [X] 為 3 至 15 員雜環基或 5 至 20 員雜芳基，



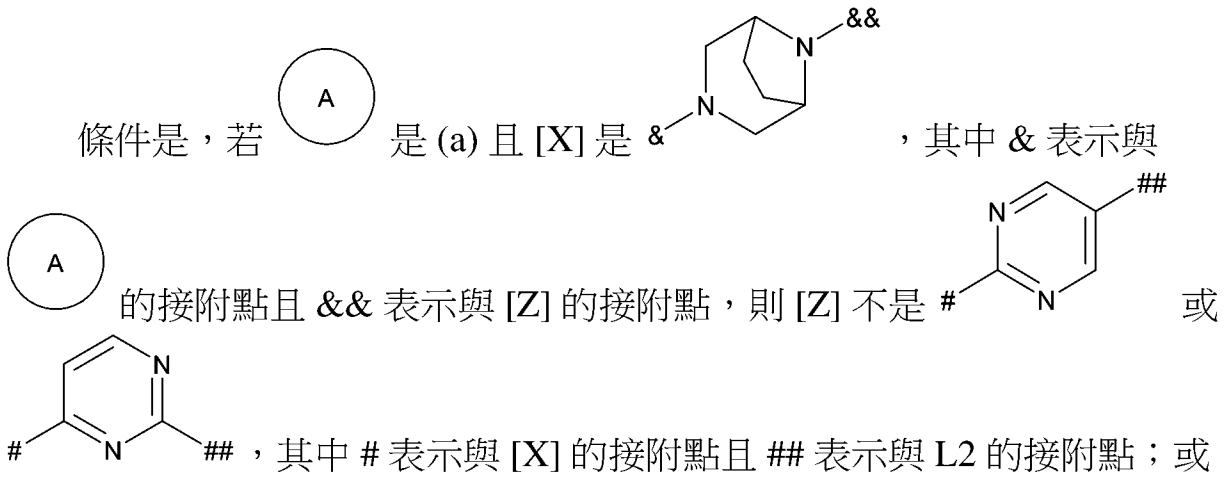
[Y] 不存在，且

[Z] 不存在；或

(ii) [X] 為 3 至 15 員雜環基或 5 至 20 員雜芳基，其中 [X] 的 3 至 15 員雜環基視情況經一個或多個 -OH 或 C₁₋₆ 烷基取代，

[Y] 不存在，且

[Z] 為 3 至 15 員雜環基或 5 至 20 員雜芳基，



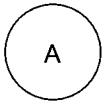
(iii) [X] 為 3 至 15 員雜環基或 5 至 20 員雜芳基，

[Y] 為亞甲基，其中 [Y] 的亞甲基視情況經一個或多個甲基基團取代，
且

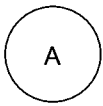
[Z] 為 3 至 15 員雜環基；或

(iv) [X] 不存在，

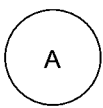
[Y] 為伸乙烯基，其中 [Y] 的伸乙烯基視情況經一個或多個鹵基取代，
且

[Z] 為 5 至 20 員雜芳基，
條件是， 為 (a)、(b)、(d)、或 (e)；或

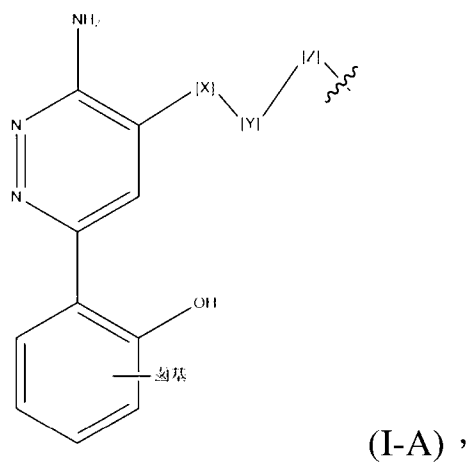
(v) [X] 不存在，
[Y] 為伸乙炔基，且

[Z] 為 5 至 20 員雜芳基，
條件是， 為 (a)、(b)、(d)、或 (e)；或

(vi) [X] 不存在，
[Y] 為環丙基或環丁基，且

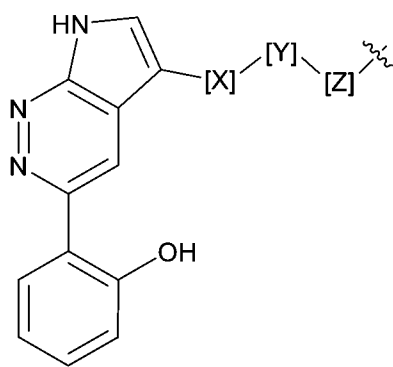
[Z] 為 5 至 20 員雜芳基，
條件是， 為 (a)、(b)、(d)、或 (e)。

【0128】 在某些實施例中，BRM 結合化合物為式 (I-A) 化合物：



或其立體異構物或互變異構物，或前述任一者之醫藥上可接受之鹽，
其中 [X]、[Y] 及 [Z] 如上文針對式 (I) 化合物所定義。

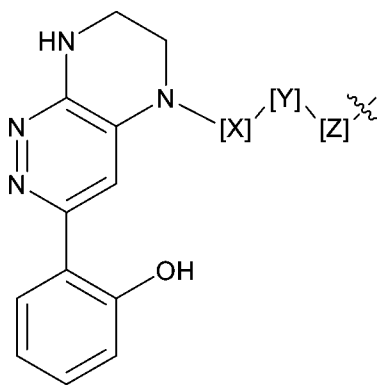
【0129】 在某些實施例中，BRM 結合化合物為式 (I-B) 化合物：



(I-B) ,

或其立體異構物或互變異構物，或前述任一者之醫藥上可接受之鹽，其中 [X]、[Y] 及 [Z] 如上文針對式 (I) 化合物所定義。

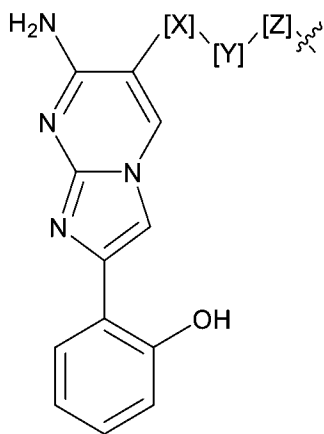
【0130】 在某些實施例中，BRM 結合化合物為式 (I-C) 化合物：



(I-C) ,

或其立體異構物或互變異構物，或前述任一者之醫藥上可接受之鹽，其中 [X]、[Y] 及 [Z] 如上文針對式 (I) 化合物所定義。

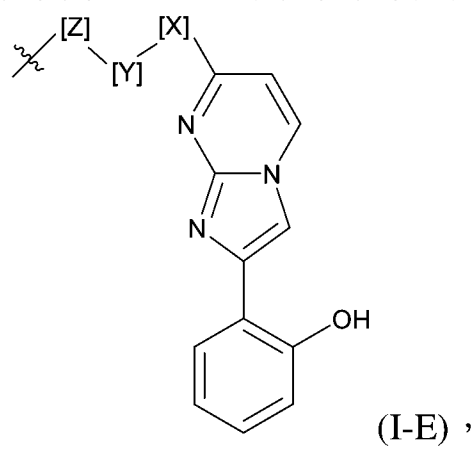
【0131】 在某些實施例中，BRM 結合化合物為式 (I-M) 化合物：



(I-M) ,

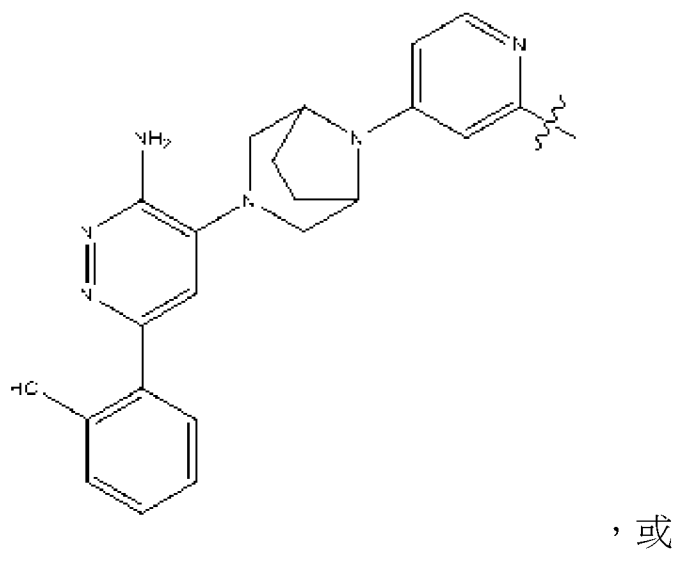
或其立體異構物或互變異構物，或前述任一者之醫藥上可接受之鹽，其中 [X]、[Y] 及 [Z] 如上文針對式 (I) 化合物所定義。

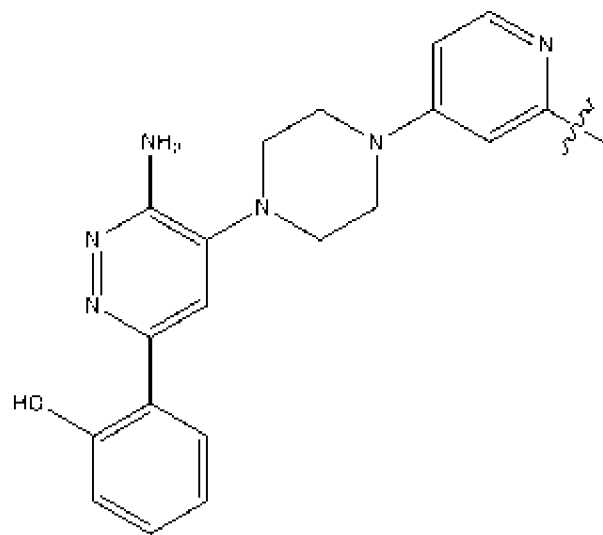
【0132】 在某些實施例中，BRM 結合化合物為式 (I-E) 化合物：



或其立體異構物或互變異構物，或前述任一者之醫藥上可接受之鹽，
其中 [X]、[Y] 及 [Z] 如上文針對式 (I) 化合物所定義。

【0133】 在某些實施例中，CIDE 之 PB (BRM) 部分具有下列結構：





其中， 為與 L2 的接附點。

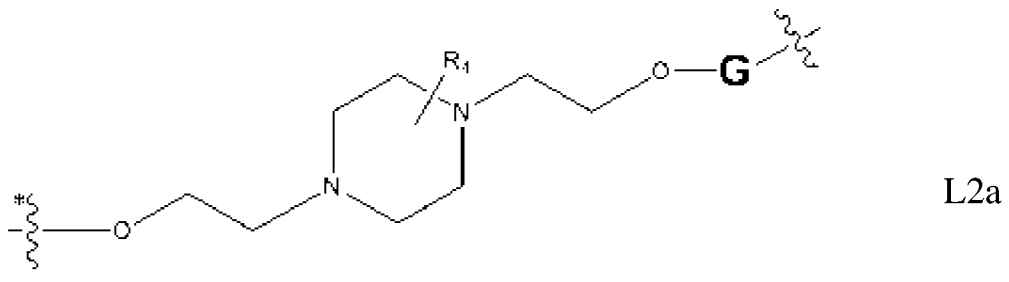
c. 連接子 L2

如本文所述之 CIDE 的 E3LB 及 PB 部分可通過連接子 (L2，連接子 L2，連接子-2) 相連。在某些實施例中，連接子 L2 共價結合至 E3LB 部分並共價結合至 PB 部分，由此組成 CIDE。

在某些實施例中，L2 部分可選自 WO2019/195201 中所揭露之連接子，該專利全文以引用方式併入本文。

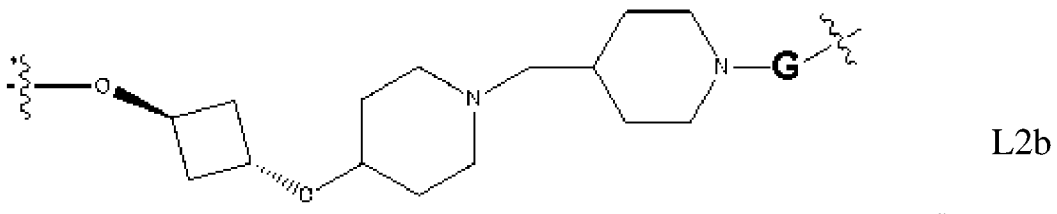
儘管 E3LB 基團及 PB 基團可通過任何對連接子的化學性質合適且穩定的基團與連接子基團共價連接，但在某些態樣中，L2 獨立地通過醯胺、酯、硫酯、酮基、胺甲酸酯 (胺甲酸乙酯) 或醚共價連接至 E3LB 基團和 PB 基團，其中每個基團皆可插入 E3LB 基團及 PB 基團的任何位置，以允許 E3LB 基團與泛蛋白連接酶結合且 PB 基團與待降解之 BRM 標靶蛋白結合。換言之，如本文所示，連接子可設計並連接至 E3LB 和 PB 以調控 E3LB 及 PB 與其相應之結合配偶體的結合。

在某些實施例中，L2 為共價結合至 E3LB 及 PB 的連接子，該 L2 具有下式：

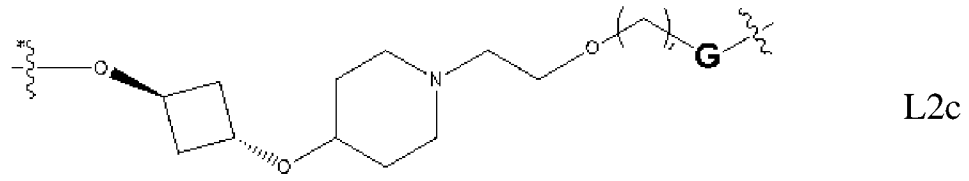


其中，

R₄ 為氫或甲基，

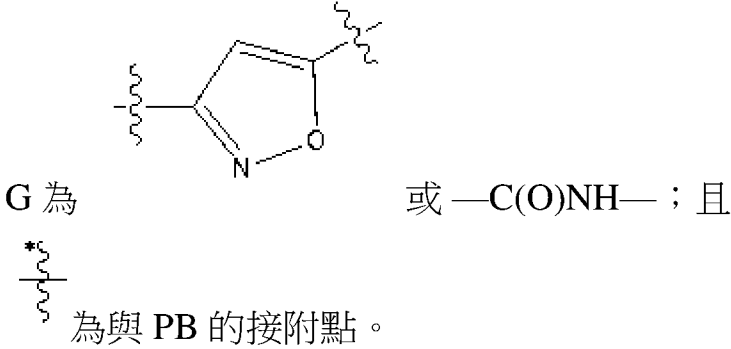


，或



其中，

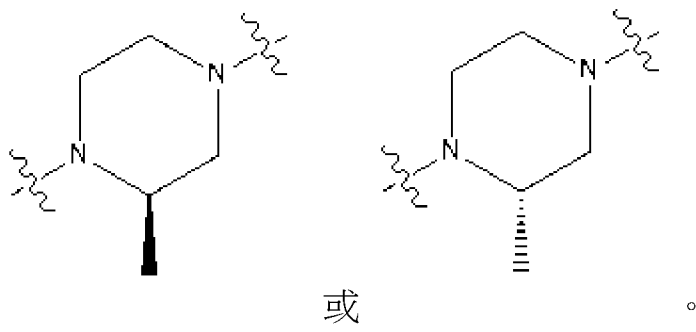
z 為一或零，



在 L2a 的某些實施例中，R₄ 為氫。

在 L2a 的某些實施例中，R₄ 為甲基。

在 L2a 之某些實施例中，R₄ 為甲基，使得甲基相對於其所接附的哌啶取向如下：



在 L2c 的某些實施例中，z 為 0。

在 L2c 的某些實施例中，z 為 1。

IV. 與可水解的连接子共價結合的抗體

【0134】現在提及抗體-可水解的连接子結合物及抗體-可水解的连接子-CIDE 結合物，此類結合物可包含單個抗體，其中該單個抗體可具有超過一個可水解的连接子及/或可水解的连接子-CIDE。抗體與可水解的连接子 (L₁、L_x 或 L_z) 共價結合。結合物係選自如本文別處所述的以下式：

- Ab-(L₁-D)_j；
- Ab-((L_x)-D)_j；以及，
- Ab-(L_z)_j。

【0135】如本文所述，抗體 (例如單株抗體 (mAB)) 用於將 CIDE 遞送至標靶細胞，例如表現由抗體靶向的特異性蛋白質的細胞。Ab-CIDE 之抗體部分可靶向表現抗原的細胞，從而通常通過胞吞作用將抗原特異性 Ab-CIDE 經胞內遞送至標靶細胞。在一些情況下，胞飲作用或類似的非特異性攝取途徑可能導致抗原表現或非表現細胞內對 Ab-CIDE 的一般細胞攝取。本文所述之 Ab-CIDE 及其使用方法有利地利用細胞表面之抗體識別及/或 Ab-CIDE 的內吞作用將 CIDE 部分遞送到細胞內。抗體在 WO2020/086858 中有所描述，其全部內容以引用方式併入本文。

【0136】在特定實施例中，抗體可以經突變以降低效應子功能。調節 Fc 效應子功能之突變的實例包括 LALAPG 突變及 NG2LH 突變。

【0137】在特定實施例中，該抗體為如先前在 WO2016/04856 中描述的 THIOMAB™。此外，考慮到組合，使得任何抗體標靶皆可結合 THIOMAB™ 突變與或不與包括 LALAPG 或 NG2LH 突變的任何 Fc 效應子調控的任何適合的組合。

【0138】該抗體可為人類抗體，例如，如 van Dijk 及 van de Winkel，*Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001)；及 Lonberg，*Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008) 中一般地描述。抗體可為文庫衍生的抗體。本領域中已知用於產生噬菌體展示文庫並篩選此等文庫中具有所需之結合特性的抗體的多種方法。該等方法綜述於例如 Hoogenboom 等人，收錄於 *Methods in Molecular Biology* 178: 1-37 (O'Brien 等人主編，Human Press，Totowa，NJ，2001) 中，並且進一步描述於例如 McCafferty 等人 *Nature* 348: 552-554；Clackson 等人 *Nature* 352: 624-628 (1991)；Marks 等人 *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992)；Marks 和 Bradbury，收錄於 *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo 主編，Human Press，Totowa，NJ，2003)；Sidhu 等人 *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004)；Lee 等人 *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004)；Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472 (2004)；及 Lee 等人 *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132 (2004)。

【0139】抗體可為嵌合抗體及人源化抗體。人源化抗體及其製造方法綜述於例如 Almagro 及 Fransson，*Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008) 中，且進一步描述於例如以下各者中：Riechmann 等人，*Nature* 332:323-329 (1988)；Queen 等人，*Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989)；美國專利第 5,821,337 號、第 7,527,791 號、第 6,982,321 號及第 7,087,409 號；Kashmiri 等

人，*Methods* 36:25-34 (2005) (描述 SDR (a-CDR) 移植)；Padlan，*Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (描述「表面重修」)；Dall'Acqua 等人，*Methods* 36:43-60 (2005) (描述「FR 改組」)；以及 Osbourn 等人，*Methods* 36:61-68 (2005) 及 Klimka 等人，*Br. J. Cancer*，83:252-260 (2000) (描述 FR 改組之「導向選擇」方法)。

【0140】抗體可為多特異性抗體，例如雙特異性抗體。如本文所使用的術語「多特異性抗體」是指包含具有多抗原決定基特異性的抗原結合域的抗體(亦即，能夠結合至一種分子上的兩個或更多個不同抗原決定基或能夠結合至兩種或更多種不同分子上的抗原決定基)。如本文所使用的術語「雙特異性抗體」是指包含能夠結合至一種分子上的兩個不同抗原決定基或能夠結合至兩種不同分子上的抗原結合域的多特異性抗體。雙特異性抗體在本文中亦可稱為具有「雙重特異性」或為「雙特異性的」。例示性雙特異性抗體可同時結合蛋白質及任何其他抗原。製備多特異性抗體的技術包括但不限於，具有不同特異性的兩個免疫球蛋白重鏈-輕鏈對的重組共表現(參見 Milstein 及 Cuello，*Nature* 305: 537 (1983)；WO 93/08829；及 Traunecker 等人，*EMBO J.* 10: 3655 (1991))及「杵臼(knob-in-hole)」工程化改造(參見，例如，美國專利第 5,731,168 號、WO2009/089004、US2009/0182127、US2011/0287009、Marvin 及 Zhu，*Acta Pharmacol. Sin.*(2005) 26(6):649-658；及 Kontermann (2005) *Acta Pharmacol. Sin.*，26:1-9)。多特異性抗體亦可藉由以下方法進行製備：用於製備抗體 Fc-異二聚體分子的工程化改造靜電轉向效應(WO 2009/089004A1)；交聯兩個或更多個抗體或片段(參見，例如，美國專利第 4,676,980 號；及 Brennan 等人 *Science*，229: 81 (1985))；使用白胺酸拉鏈產生雙特異性抗體(參見，例如，Kostelny 等人，*J. Immunol.*，148(5):1547-1553 (1992))；使用「雙抗體」技術以用於製備雙特異性抗體片段(參見，例如，Hollinger 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA, 90:6444-6448 (1993)); 及使用單鏈 Fv (sFv) 二聚體 (參見, 例如 Gruber 等人, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); 及製備三特異性抗體, 如下所述: Tutt 等人, *J. Immunol.* 147: 60 (1991). 本文亦包括具有三個或更多個抗原結合位點之工程化抗體, 包括「章魚抗體」(Octopus antibodies) 或「雙可變域免疫球蛋白」(DVD) (參見例如 US 2006/0025576A1; 及 Wu 等人 *Nature Biotechnology* (2007)). 本文所述之抗體或片段亦包括「雙重作用 FAb」或「DAF」, 其包含與標靶蛋白質及另一種不同抗原結合的抗原結合位點 (例如參見 US 2008/0069820)。

【0141】抗體可為抗體片段。抗體片段包括但不限於 Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv 和 scFv 片段以及下文所述之其他片段。關於某些抗體片段的綜述, 參見 Hudson 等人, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003)。關於 scFv 片段的綜述, 參見例如 Pluckthün, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, 第 113 卷, Rosenberg 及 Moore 編, Springer-Verlag, New York, 第 269-315 頁 (1994); 亦參見 WO 93/16185; 及美國專利第 5,571,894 號及第 5,587,458 號。關於包含補救受體結合抗原決定位殘基且具有增加的活體內半衰期之 Fab 及 F(ab')₂ 片段的論述, 參見美國第 5,869,046 號專利。雙功能抗體為具有兩個抗原結合位點 (其可係二價或雙特異性的) 之抗體片段。參見例如 EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson 等人, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); 及 Hollinger 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993)。Hudson 等人, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003) 中亦描述三功能抗體及四功能抗體。單域抗體為包含抗體之重鏈可變域之全部或部分或抗體之輕鏈可變域之全部或部分之抗體片段。於某些實施例中, 單域抗體為人單域抗體 (Domantis, Inc., Waltham, MA; 參見例如美國專利第 6,248,516 B1 號)。抗體片段可藉由各種技術製得, 包括但不限於完整抗體之蛋白水解消解以及藉由重組宿主細胞產生。

【0142】 抗體可為抗體變異體。在某些實施例中，考慮到本文提供之抗體的胺基酸序列變異體。例如，可能希望改善抗體的結合親和力及/或其他生物學特性。可藉由將適當的修飾引入編碼抗體的核苷酸序列中，或藉由肽合成來製備抗體之胺基酸序列變異體。此等修飾包括例如抗體之胺基酸序列中的殘基的缺失及/或插入及/或取代。可實施缺失、插入和取代之任意組合以得到最終構建體，前提條件是最終構建體具有所需之特徵，例如抗原結合特徵。

【0143】 可使用重組方法及組成物來生產抗體，例如美國專利第 4,816,567 號中所述。現在參照抗體親和力，在實施例中，抗性與一種或多種腫瘤相關抗原或細胞表面受體結合。

【0144】 在某些實施例中，腫瘤相關抗原或細胞表面抗原係選自 CD71、Trop2、MSLN、NaPi2b、Ly6E、EpCAM 及 CD22。因此，在某些實施例中，Ab-CIDE 可包含選自以下的抗體或片段：抗 Ly6E 抗體、抗 NaPi2b 抗體、抗 CD22 抗體、抗 CD71 抗體、抗 Trop2 抗體、抗 MSLN 抗體、抗 EpCAM 抗體、抗 Steap1 抗體、抗 CD33 抗體及抗 HER2 抗體。

【0145】 特定抗體包括但不限於：

i. 抗 Ly6E 抗體

【0146】 在某些實施例中，Ab-CIDE 可包含抗 Ly6E 抗體：Ly6E (淋巴細胞抗原 6 複合體基因座 E；Ly67、RIG-E、SCA-2、TSA-1)；NP_002337.1；NM_002346.2；de Nooij-van Dalen, A.G. 等人 (2003) Int. J. Cancer 103 (6)，768-774；Zammit, D.J. 等人 (2002) Mol. Cell. Biol. 22 (3):946-952；WO 2013/17705。

【0147】 Ly6E 為一種 GPI 連接的、長度為 131 個胺基酸、約 8.4 kDa 的功能未知的蛋白質，無已知的結合配偶體。其最初被鑑定為在小鼠未成熟之胸腺細胞、胸腺髓質上皮細胞中表現的轉錄物 (Mao 等人 (1996) *Proc. Natl. Acad.*

Sci. U.S.A. 93:5910-5914)。在一些實施例中，本文所述的主題提供一種 Ab-CIDE，其包含在 PCT 公開案第 WO 2013/177055 號中所述之抗 Ly6E 抗體。

ii. 抗 NaPi2b 抗體

【0148】在某些實施例中，Ab-CIDE 包含抗 NaPi2b 抗體：Napi2b (Napi3b，NAPI-3B，NPTIib，SLC34A2，溶質載劑家族 34 (磷酸鈉)，成員 2，第 II 型鈉依賴性磷酸鹽轉運子 3b，Genbank 登錄號 NM_006424) *J. Biol. Chem.* 277 (22):19665-19672 (2002)，*Genomics* 62 (2):281-284 (1999)；Feild，J.A. 等人 (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258 (3):578-582)；WO2004022778 (請求項 2)；EP1394274 (實例 11)；WO2002102235 (請求項 13；第 326 頁)；EP875569 (請求項 1；第 17-19 頁)；WO200157188 (請求項 20；第 329 頁)；WO2004032842 (實例 IV)；WO200175177 (請求項 24；第 139-140 頁)；交叉引用：MIM:604217；NP_006415.1；NM_006424_1。

iii. 抗 CD22 抗體

【0149】在某些實施例中，Ab-CIDE 可包含抗 CD22 抗體：CD22 (B 細胞受體 CD22-B 同型、BL-CAM、Lyb-8、Lyb8、SIGLEC-2、FLJ22814、Genbank 登錄號 AK026467)；Wilson 等人 (1991) *J. Exp. Med.* 173:137-146；WO2003072036 (請求項 1；圖 1)；交叉引用：MIM:107266；NP_001762.1；NM_001771_1。

iv. 抗 CD71 抗體

【0150】在某些實施例中，Ab-CIDE 可包含抗 CD71 抗體。CD71 (運鐵蛋白受體) 是一種完整的膜糖蛋白，在細胞對鐵的吸收中發揮重要作用。它是一種熟知的細胞增殖及活化標記。儘管造血系統中的所有增殖細胞皆表現 CD71，但 CD71 已被視為一種有用的紅血球相關抗原。在一給實施例中，抗 CD71 抗體描述於以下文獻中：WO2016081643，其全文以引用方式併入本文。

v. 抗 Trop2 抗體

【0151】在某些實施例中，Ab-CIDE 可包含抗 Trop2 抗體。Trop2 (滋胚層抗原 2) 為一種跨膜醣蛋白，為多種癌症中存在表現差異的細胞內鈣訊息轉導物。它向細胞發出自我更新、增殖、侵入及存活的訊息。Trop 2 亦稱為細胞表面糖蛋白 Trop-2/Trop2、胃腸道腫瘤相關抗原 GA7331、胰腺癌標記蛋白 GA733-1/GA733、膜組分染色體 1 表面標記 1 M1S1、上皮糖蛋白-1、EGP-1、CAA1、膠滴狀角膜營養不良 GDLD 及 TTD2。在以上實施例中任一項中，Ab-CIDE 的抗 Trop2 抗體可為人源化的。在一個實施例中，抗 Trop2 抗體描述於 US-2014/0377287 及 US-2015/0366988 中，其各自全文以引用方式併入本文。

vi. 抗 MSLN 抗體

【0152】在某些實施例中，Ab-CIDE 可包含抗 MSLN 抗體。MSLN (間皮素) 是一種糖基磷脂醯肌醇錨定的細胞表面蛋白，可用作細胞黏附蛋白。MSLN 亦稱為 CAK1 及 MPF。該蛋白質在上皮間皮瘤、卵巢癌及特定之鱗狀細胞癌中過度表現。在以上實施例中任一項中，Ab-CIDE 的抗 MSLN 抗體可為人源化的。在一個實施例中，抗 MSLN 抗體為 Scales, S. J. 等人，*Mol. Cancer Ther.* 2014, 13(11), 2630-2640 中所述的 h7D9.v3，其全文以引用方式併入本文。

vii. 抗 EpCAM 抗體

【0153】在某些實施例中，Ab-CIDE 可包含抗 EpCAM 抗體。在一個態樣中，Ab-CIDE 的抗體可為靶向見於許多細胞或組織類型中之蛋白質的抗體。該等抗體之實例包括 EpCAM。上皮細胞細胞黏附分子 (EpCAM) 是一種跨膜糖蛋白，其介導上皮細胞中獨立於 Ca^{2+} 的同型細胞-細胞黏附 (Litvinov, S. 等人 (1994) *Journal of Cell Biology* 125(2):437-46)。亦稱為 DIAR5、EGP-2、EGP314、EGP40、ESA、HNPCC8、KS1/4、KSA、M4S1、MIC18、MK-1、TACSTD1、TROP1 的 EpCAM 亦參與細胞傳訊 (Maetzel, D. 等人 (2009) *Nature*

Cell Biology 11(2):162–71)、遷移(Osta, WA 等人 (2004) Cancer Res. 64(16):5818–24)、增殖和分化 (Litvinov, S. 等人 (1996) Am J Pathol. 148(3):865–75)。此外，EpCAM 藉由其上調 c-myc、e-fabp 及週期蛋白 A 和週期蛋白 E 的能力而具有致癌潛力 (Munz, M. 等人 (2004) Oncogene 23(34):5748–58)。由於 EpCAM 僅在上皮細胞及上皮來源的腫瘤中表現，因此 EpCAM 可用為各種癌症的診斷標記。換言之，Ab-CIDE 可用於將 CIDE 遞送至許多細胞或組織，而不是像使用靶向抗體那樣將 CIDE 遞送至特定細胞類型或組織類型。

viii. 抗 Steap1 抗體

【0154】在某些實施例中，Ab-CIDE 包含抗 STEAP1 抗體。STEAP1 (前列腺六跨膜上皮抗原，Genbank 登錄號 NM_012449) Cancer Res. 61 (15), 5857-5860 (2001)，Hubert, R.S., 等人 (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96 (25): 14523-14528)；W02004065577 (請求項 6)；W02004027049 (圖 1L)；EP1394274 (實例 11)；W02004016225 (請求項 2)；W02003042661 (請求項 12)；US2003157089 (實例 5)；US2003185830 (實例 5)；US2003064397 (圖 2)；WO200289747 (實例 5；第 618-619 頁)；W02003022995 (實例 9；圖 13A，實例 53；第 173 頁，實例 2；圖 2A)。

viii. 抗 Steap2 抗體

【0155】在某些實施例中，Ab-CIDE 包含抗 STEAP2 抗體。STEAP2 (HGNC 8639、IPCA-1、PCANAP1、STAMP1、STEAP2、STMP、前列腺癌相關基因 1、前列腺癌相關蛋白 1、前列腺之六跨膜上皮抗原 2、六跨膜前列腺蛋白、Genbank 登錄號 AF455138) Lab. Invest. 82 (11): 1573-1582 (2002))；W02003087306；US2003064397 (請求項 1；圖 1)；WO200272596 (請求項 13；第 54-55 頁)；WO200172962 (請求項 1；圖 4B)；W02003104270 (請求項 11)；W02003104270 (請求項 16)；US2004005598 (請求項 22)；W02003042661 (請求

項 12)；US2003060612 (請求項 12；圖 10)；WO200226822 (請求項 23；圖 2)；WO200216429 (請求項 12；圖 10)；交叉引用：GF22655488；AAN04080.1；AF455138_I。

x. 抗 Her2 抗體

【0156】在某些實施例中，Ab-CIDE 包含抗 HER2 抗體。在一個實施例中，Ab-CIDE 之抗 HER2 抗體包含人源化抗 HER2 抗體。在一些實施例中，Ab-CIDE 包含人源化 HER2 抗體，也稱為曲妥珠單抗 (trastuzumab)，可在商品名 HERCEPTIN® 下商業購得。在另一實施例中，Ab-CIDE 之抗 HER2 抗體包含人源化抗 HER2 抗體，例如，人源化 2C4，如 US7862817 中所述。例示性人源化 2C4 抗體為帕妥珠單抗 (pertuzumab)，可在商品名 PERJETA® 下商業購得。

x. 抗 CD33 抗體

【0157】在某些實施例中，Ab-CIDE 包含抗 CD33 抗體。CD33 為唾液酸結合、免疫球蛋白樣凝集素家族之成員，為一種 67 kDa 糖基化跨膜蛋白。除了定向 (committed) 骨髓單核球及類紅血球前驅細胞外，CD33 在大多數骨髓性及單核球性白血病細胞上表現。它未見於最早的多能幹細胞、成熟顆粒性白血球、類淋巴球或非造血細胞中 (Sabbath 等人，(1985)Clin. Invest. 75:756-56；Andrews 等人，(1986) Blood 68:1030-5)。CD33 在其細胞質尾部含有兩個酪胺酸殘基，每個酪胺酸殘基後隨疏水殘基，類似於許多抑制性受體中的免疫受體酪胺酸抑制模體 (ITIM)。

【0158】具體參考抗體-可水解的连接子-CIDE (D) 結合物，「CIDE 負載量」(CIDE/抗體比率、「DAR」或 j，如上所述) 為每個抗體的 CIDE 部分的平均數量。CIDE 載量可在每個抗體 (Ab) 1 至 20 個 CIDE (D) 的範圍內。換言之，在 Ab-CIDE 式 Ab—(L1—D)_j 中，j 表示與抗體連接的 CIDE 的數量且具有

約 1 至約 20、約 1 至約 16、約 1 至約 10、約 2 至約 8 或約 4 至約 7 的值。在實施例中，j 為約 6。在實施例中，m 為約 13 或 14。通過連接子 L1 共價連接至抗體的每個 CIDE 可為相同或不同的 CIDE，且與共價連接至抗體的任何其他 L1 可具有相同類型或不同類型的連接子。在某些實施例中，Ab 為經半胱胺酸工程化改造之抗體。

【0159】在從結合反應製備 Ab-CIDE 中，每個抗體之 CIDE 的平均數量可藉由常規手段 (例如質譜法、ELISA 檢定法、電泳法及 HPLC 法) 來表徵。亦可在 j 之層面確定 Ab-CIDE 之定量分佈。藉由 ELISA，可確定 Ab-CIDE 之特定製劑中 j 的平均值 (Hamblett 等人 (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070；Sanderson 等人 (2005) Clin. Cancer Res. 11:843-852)。然而，由於抗體-抗原結合及 ELISA 之偵測限制，j 值之分佈為無法辨別的。另外，用於偵測 Ab-CIDE 的 ELISA 檢定法無法確定 CIDE 部分接附於抗體的位置，例如重鏈或輕鏈片段或特定的胺基酸殘基。在一些情況下，可藉由諸如反相 HPLC 或電泳法達成將其中 j 為某一值之同質 Ab-CIDE 從具有其他 CIDE 載量之 Ab-CIDE 分離、純化及表徵。

【0160】對於一些 Ab-CIDE，j 可能受到抗體上接附位點數量的限制。例如，抗體可以僅具有一個或幾個半胱胺酸硫醇基團，或者可以僅具有一個或幾個足夠反應性的硫醇基團，而連接子可通過該等硫醇基團接附。Ab 上連接 L1-D 的另一個反應位點是離胺酸殘基的胺官能團。

【0161】一般而言，在結合反應過程中，少於理論最大值的 CIDE 部分與抗體結合。例如，抗體可包含許多與連接子 L1-CIDE 基團 (L1-D) 或連接子試劑不反應的離胺酸殘基。僅反應性最強的離胺酸基團才可與胺反應性連接子試劑反應。另外，僅反應性最強的半胱胺酸硫醇基團才可與硫醇反應性連接子試劑或連接子 L1-CIDE 基團反應。一般而言，抗體不包含許多 (如有的話) 可

與 CIDE 部分連接的游離的反應性半胱胺酸硫醇基團。化合物之抗體中的大多數半胱胺酸硫醇殘基以二硫鍵形式存在，且必須在部分或完全還原條件下用還原劑 (例如二硫蘇糖醇 (DTT) 或 TCEP) 還原。然而，可以藉由數種不同的方式控制 CIDE 加載，包括：(i) 限制連接子 L1-CIDE 基團或連接子試劑相對於抗體的莫耳過量，(ii) 限制結合反應時間或溫度，以及 (iii) 針對半胱胺酸硫醇修飾的部分或限制還原條件。

【0162】現在參照如本文所述之 Ab-CIDE 及 L1-CIDE 化合物，這些化合物可以固體或液體形式存在。在固態下，它可以結晶或非結晶形式存在，或作為它們的混合物存在。技術人員將理解，對於結晶或非結晶化合物，可形成醫藥上可接受之溶劑合物。在結晶溶劑合物中，溶劑分子在結晶過程中摻入晶格中。溶劑合物可涉及非水性溶劑，例如但不限於乙醇、異丙醇、DMSO、乙酸、乙醇胺或乙酸乙酯，或者它們可涉及水作為摻入晶格中的溶劑。其中水為摻入晶格中的溶劑的溶劑化物通常稱為「水合物」。水合物包括化學計量的水合物以及含有不同量的水的組成物。本文所述之主題包括所有該等溶劑化物。

【0163】技術人員將進一步理解，本文所述之以結晶形式存在的某些化合物及 Ab-CIDE (包括其各種溶劑化物) 可呈現出同質多晶形性 (亦即，以不同結晶結構出現的能力)。這些不同的結晶形式通常稱為「同質異晶物」。本文所揭露之主題包括所有該等同質異晶物。同質異晶物具有相同之化學組成，但在堆積、幾何排列及結晶固態的其他描述性特性方面不同。因此，同質異晶物可具有不同的物理特性，例如形狀、密度、硬度、可變形性、穩定性及溶解特性。同質異晶物通常呈現出不同之熔點、紅外光譜及 X 射線粉末繞射圖譜，這些特性可用於鑑定。技術人員將理解，可例如藉由改變或調整用於製備化合物的反應條件或試劑來產生不同的同質異晶物。例如，改變溫度、壓力或溶劑的

變化可得到同質異晶物。此外，一種同質異晶物在某些條件下可自發轉化為另一種同質異晶物。

【0164】 本文所述之化合物及 Ab-CIDE 或其鹽可以立體異構形式存在 (例如，其含有一個或多個不對稱碳原子)。各種立體異構物 (鏡像異構物及非鏡像異構物) 及其混合物涵蓋於本文所公開之主題之範圍內。同樣，應瞭解，式 (I) 化合物或鹽可以式中所示結構之外的互變異構形式存在，並且亦涵蓋於本文所揭露之主題之範圍內。應瞭解，本文所揭露之主題包括本文所述之特定組之所有組合和子集。本文所公開之主題之範圍包括立體異構物之混合物及純化鏡像異構物或對映/非對映富集之混合物。應瞭解，本文所揭露之主題包括上文所定義之特定組之所有組合和子集。

【0165】 本文所揭露之主題亦包括本文所述之化合物之同位素標記形式，但事實上，一個或多個原子由原子質量或質量數不同於自然界中通常所發現的原子質量或質量數的原子置換。可摻入本文所述之化合物及其醫藥上可接受之鹽的同位素的實例包括氫、碳、氮、氧、磷、硫、氟、碘、氯之同位素，例如 ^2H 、 ^3H 、 ^{11}C 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{17}O 、 ^{18}O 、 ^{31}P 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{18}F 、 ^{36}Cl 、 ^{123}I 及 ^{125}I 。

【0166】 含有上述同位素及/或其他原子的其他同位素的如本文所揭露之化合物和 Ab-CIDEs 及醫藥上可接受之鹽在本文所揭露之主題的範圍內。本文中揭露了同位素標記的化合物，例如其中摻入放射性同位素 (例如 ^3H 、 ^{14}C) 的那些，可用於藥物及/或受質組織分佈測定。氚同位素 (亦即 ^3H) 及碳-14 同位素 (亦即 ^{14}C) 因其易於製備和可偵測性而得到普遍使用。 ^{11}C 及 ^{18}F 同位素用於 PET (正子發射斷層攝影術)，且 ^{125}I 同位素用於 SPECT (單光子放射電腦斷層掃描)，它們皆用於腦成像。此外，用諸如氘 (亦即 ^2H) 之較重同位素取代可得到某些由更大代謝穩定性產生之治療優勢，例如延長之活體內半衰期或降低之劑

量需求，因此在某些情況下可能是較佳的。同位素標記之化合物通常可藉由執行下列方案及/或實例中所揭露之程序來製備，其中藉由用容易獲得之同位素標記的試劑替代非同位素標記的試劑來實現。

【0167】 本文所揭示的主題包括以下非限制性實施例：

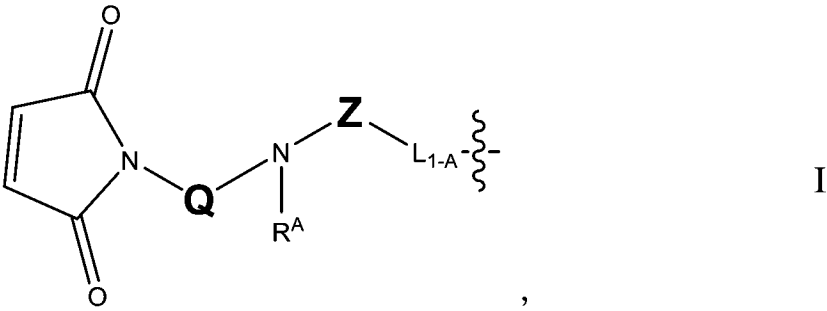
1. 一種化合物，其具有下列結構：

L_1 -D

其中，

D 為 CIDE；

L_1 為與 D 共價結合且具有式 I 之結構的連接子-1：

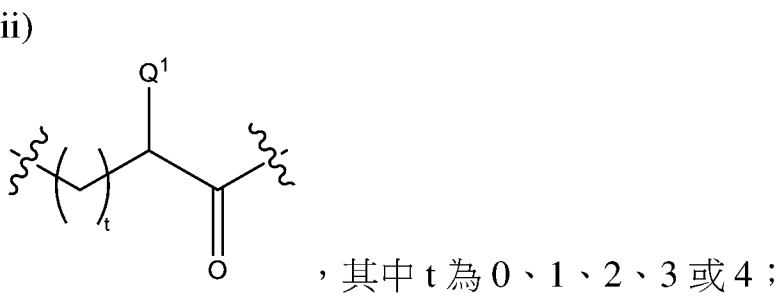
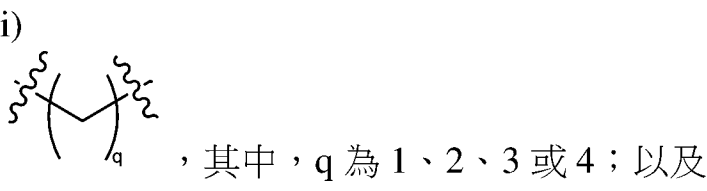


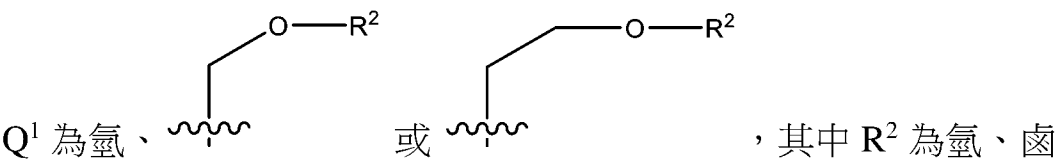
其中，

Z 為 $-(CH_2)_p-$ 或 $-CH_2-(CH_2-O-CH_2)_p-CH_2-$ ，其中 p 為 1 至 24 的整數；

R^A 為氫、 C_{1-6} 烷基或 $-(CH_2)_v$ -芳基，其中，v 為 0 或 1；

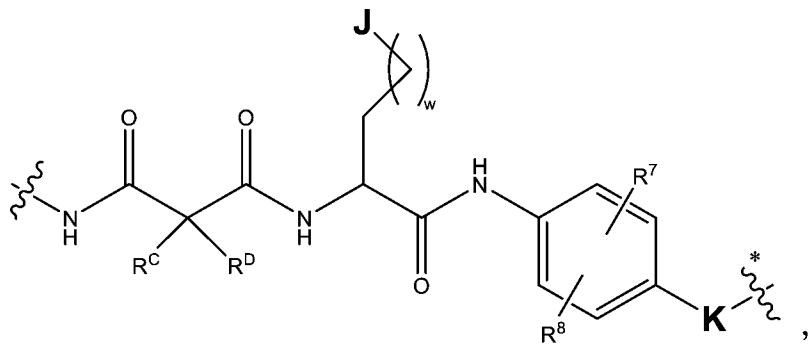
Q 係選自由以下所組成之群組：





基 C_{1-6} 烷基或 C_{1-6} 烷基；且

L_{1-A} 為：



其中  表示與 D 的接附點；

w 為 0、1、2、3、4 或 5；

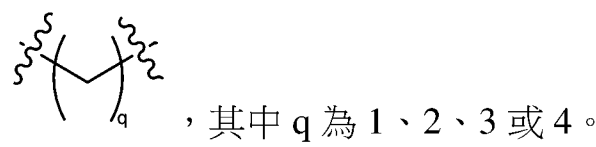
J 係選自由以下所組成之群組： $-C_{1-5}$ 烷基、 $-N(R^x)(R^y)$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-NH-C(O)-NH_2$ 及 $-NH-C(=NH)-NH_2$ ，其中， R^x 及 R^y 各自獨立地選自氫及 C_{1-3} 烷基；

K 係選自由以下所組成之群組： C_{1-3} 伸烷基、 $-CH(R)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)-O-CH(R)-$ 、 $-CH_2-O-C(O)-$ 、 $-CH_2-O-C(O)-NH-CH_2-$ 及 $-CH_2-O-C(O)-R-[CH_2]_u-O-$ ，其中 R 為氫、 C_{1-3} 烷基、 $N(R^x)(R^y)$ 、 $-O-N(R^x)(R^y)$ 或 $C(O)-N(R^x)(R^y)$ ，其中 u 為 0、1、2 或 3，且其中 R^x 及 R^y 各自獨立地選自氫及 C_{1-3} 烷基，或 R^x 及 R^y 與其各自所接附的氮一起形成視情況經取代之 5 員至 7 員雜環基；

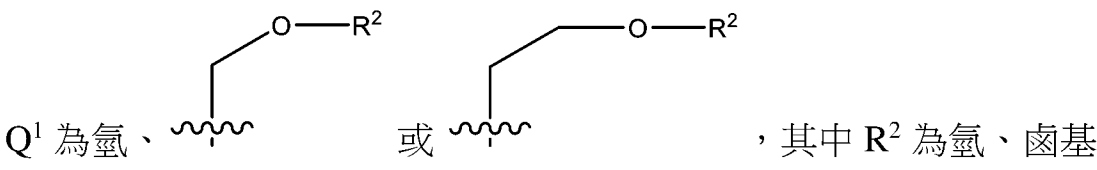
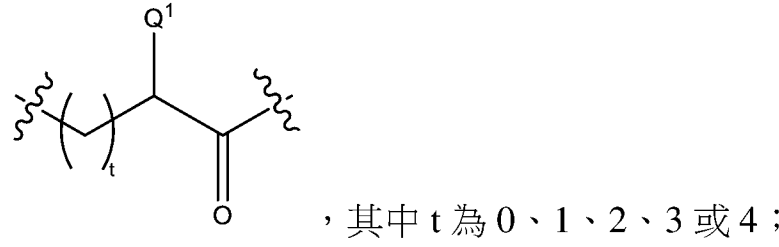
R^C 及 R^D 各自獨立地選自氫及 C_{1-3} 烷基，或 R^C 及 R^D 與其各自所接附的碳一起形成視情況經取代之 C_{3-6} 環烷基；且

R^7 及 R^8 各自獨立地為氫、鹵基、 C_{1-5} 烷基、 C_{1-5} 烷氧基或羥基。

2. 如實施例 1 之化合物，其中 Q 為：

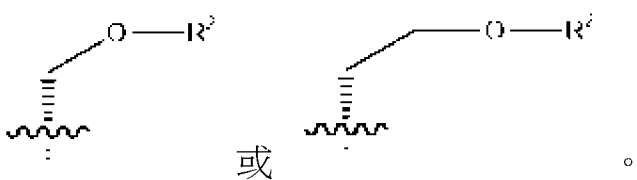


- 3. 如實施例 1 或 2 之化合物，其中 q 為 2。
- 4. 如實施例 1 之化合物，其中 Q 為：

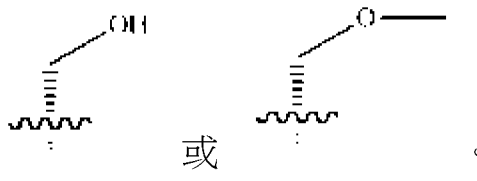


C₁₋₆ 烷基或 C₁₋₆ 烷基。

- 5. 如實施例 4 之化合物，其中 R² 為氫或 C₁₋₆ 烷基。
- 6. 如實施例 5 之化合物，其中 C₁₋₆ 烷基為甲基。
- 7. 如實施例 4 之化合物，其中 Q¹ 為：

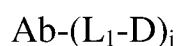


- 8. 如實施例 4 之化合物，其中 R² 為氫或甲基。
- 9. 如實施例請求項 8 之化合物，其中 Q¹ 為：



- 10. 如實施例 4 至 9 中任一項之化合物，其中 t 為 0。
- 11. 如實施例 1 至 10 中任一項之化合物，其中 Z 為 -(CH₂)_p，其中 p 為 1、2、3、4、5 或 6。
- 12. 如實施例 11 之化合物，其中 p 為 4、5 或 6。

13. 如實施例 11 之化合物，其中 p 為 5。
14. 如實施例 1 至 10 中任一項之化合物，其中 Z 為 $-\text{CH}_2-(\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2)_p-\text{CH}_2-$ ，其中 p 為 1、2、3、4、5 或 6。
15. 如實施例 14 之化合物，其中 p 為 1、2 或 3。
16. 如實施例 14 之化合物，其中 p 為 1。
17. 如實施例 1 至 16 中任一項之化合物，其中 R^A 為氫或 C_{1-6} 烷基。
18. 如實施例 17 之化合物，其中 R^A 為氫或甲基。
19. 如實施例 1 至 16 中任一項之化合物，其中 R^A 為苯基或苄基。
20. 如實施例 1 至 19 中任一項之化合物，其中 R^7 及 R^8 各自為氫。
21. 如實施例 1 至 20 中任一項之化合物，其中 R^C 及 R^D 與其各自所接附的碳一起形成視情況經取代之 C_{3-6} 環烷基。
22. 如請求項 21 之化合物，其中 C_{3-6} 環烷基為環丁烷。
23. 如實施例 1 至 22 中任一項之化合物，其中 K 為 $-\text{CH}(\text{R})-$ ，其中 R 為氫、 C_{1-3} 烷基、 $\text{N}(\text{R}^x)(\text{R}^y)$ 或 $\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{R}^x)(\text{R}^y)$ ，其中 R^x 及 R^y 各自獨立地選自氫及 C_{1-3} 烷基，或者 R^x 及 R^y 與其各自所接附的氮一起形成視情況經取代之 5 員至 7 員雜環基。
24. 如實施例 23 之化合物，其中 R 為氫或 C_{1-3} 烷基。
25. 如實施例 24 之化合物，其中 R 為氫。
26. 一種抗體-CIDE 結合物，其具有下列結構：



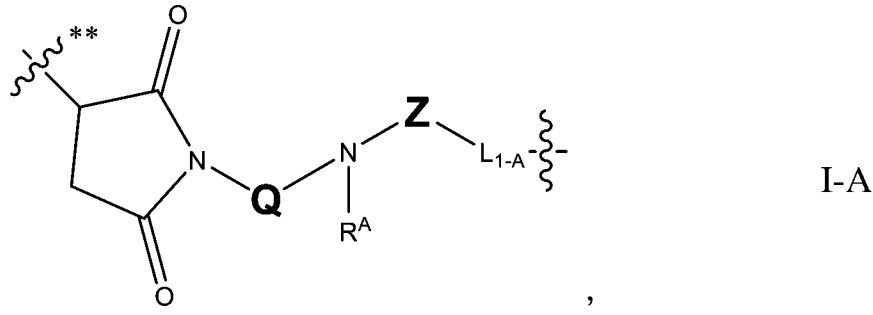
其中，

Ab 為抗體；

j 為 1 至 16；

D 為 CIDE；

L₁ 為與 Ab 及與 D 共價結合且具有式 I-A 之結構的連接子-1：

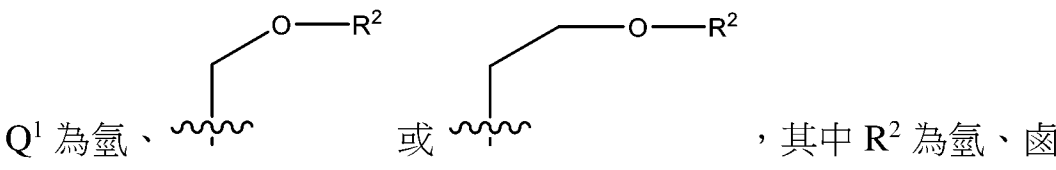
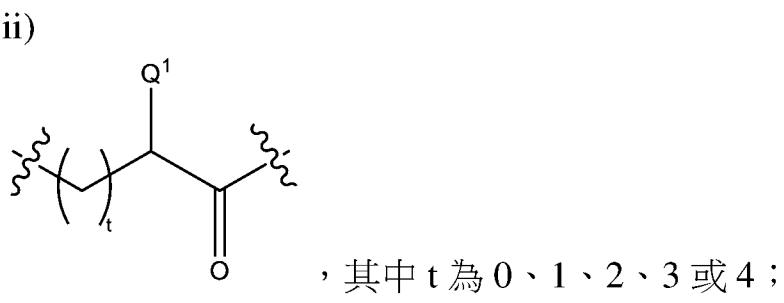
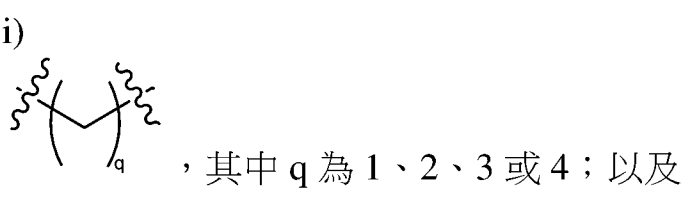


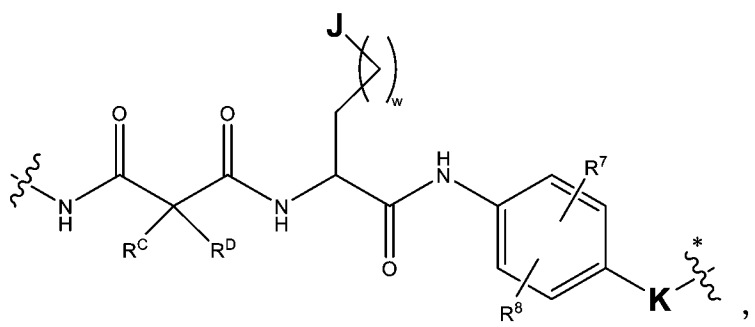
其中，

Z 為 -(CH₂)_p- 或 -CH₂-(CH₂-O-CH₂)_p-CH₂-，其中 p 為 1 至 24 的整數；

R^A 為氫、C₁₋₆ 烷基或 -(CH₂)_v-芳基，其中 v 為 0 或 1；

Q 係選自由以下所組成之群組：





其中  表示與 D 的接附點；

w 為 0、1、2、3、4 或 5；

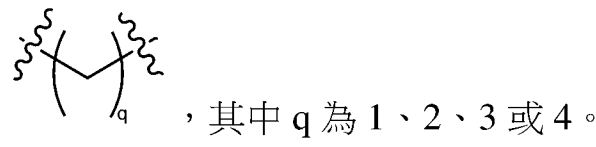
J 係選自由以下所組成之群組： $-N(R^x)(R^y)$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-NH-C(O)-NH_2$ 及 $-NH-C(=NH)(NH_2)$ ，其中， R^x 及 R^y 各自獨立地選自氫及 C_{1-3} 烷基；

K 係選自由以下所組成之群組： C_{1-3} 伸烷基、 $-CH(R)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)-O-CH(R)-$ 、 $-CH_2-O-C(O)-$ 、 $-CH_2-O-C(O)-NH-CH_2-$ 及 $-CH_2-O-C(O)-R-[CH_2]_u-O-$ ，其中 R 為氫、 C_{1-3} 烷基、 $N(R^x)(R^y)$ 、 $-O-N(R^x)(R^y)$ 或 $C(O)-N(R^x)(R^y)$ ，其中 u 為 0、1、2 或 3，且其中 R^x 及 R^y 各自獨立地選自氫及 C_{1-3} 烷基，或 R^x 及 R^y 與其各自所接附的氮一起形成視情況經取代之 5 員至 7 員雜環基；

R^C 及 R^D 各自獨立地選自氫及 C_{1-3} 烷基，或 R^C 及 R^D 與其各自所接附的碳一起形成視情況經取代之 C_{3-6} 環烷基；且

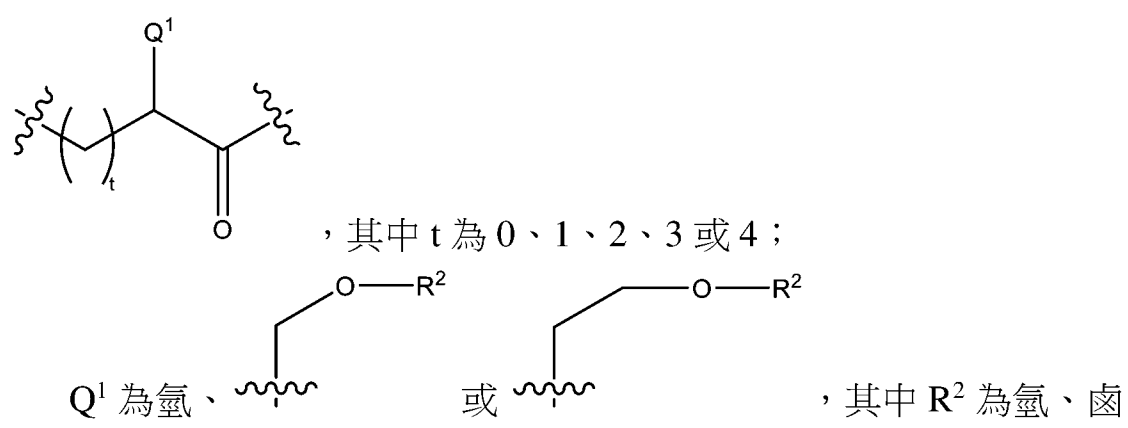
R^7 及 R^8 各自獨立地為氫、鹵基、 C_{1-5} 烷基、 C_{1-5} 烷氧基或羥基。

27. 如實施例 26 之化合物，其中 Q 為：



28. 如實施例 26 或 27 之化合物，其中 q 為 2。

29. 如請求項 26 之化合物，其中 Q 為：

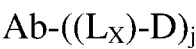


41. 如實施例 39 之化合物，其中 p 為 1。
42. 如實施例 26 至 41 中任一項之化合物，其中 R^A 為氫或 C_{1-6} 烷基。
43. 如實施例 42 之化合物，其中 R^A 為氫或甲基。
44. 如實施例 26 至 41 中任一項之化合物，其中 R^A 為苯基或苄基。
45. 如實施例 26 至 44 中任一項之化合物，其中 R^7 及 R^8 各自為氫。
46. 如實施例 26 至 45 中任一項之化合物，其中 R^C 及 R^D 與其各自所接附的碳一起形成視情況經取代之 C_{3-6} 環烷基。
47. 如實施例 46 之化合物，其中 C_{3-6} 環烷基為環丁烷。
48. 如實施例 26 至 47 中任一項之化合物，其中 K 為 $-\text{CH}(\text{R})-\text{O}-$ ，其中 R 為氫、 C_{1-3} 烷基、 $\text{N}(\text{R}^x)(\text{R}^y)$ 或 $\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{R}^x)(\text{R}^y)$ ，其中 R^x 及 R^y 各自獨立地選自氫及 C_{1-3} 烷基，或者 R^x 及 R^y 與其各自所接附的氮一起形成視情況經取代之 5 員至 7 員雜環基。
49. 如實施例 48 之化合物，其中 R 為氫或 C_{1-3} 烷基。
50. 如實施例 49 之化合物，其中 R 為氫。
51. 一種醫藥組成物，其包含如實施例 26 至 50 中任一項之結合物及一種或多種醫藥上可接受之賦形劑。
52. 一種治療有需要之人的疾病之方法，其包含將有效量的如實施例 26 至 50 或 57 至 108 中任一項之結合物 (或其組成物) 或如實施例 51 之組成物投予該人；或，如實施例 26 至 50 或 57 至 108 中任一項之結合物 (或其組成物) 或如實施例 51 之組成物，其用於治療有需要之人的疾病；或，如實施例 26 至 50 或 57 至 108 中任一項之結合物 (或其組成物) 或如實施例 51 之藥物組成物用於製備的用途，該藥物用於治療有需要之人的疾病。
53. 如實施例 52 之方法，其中該疾病是癌症。

- 54. 如實施例 53 之方法，其中該癌症具有 BRM 依賴性。
- 55. 如實施例 54 之方法，其中該癌症是非小細胞肺癌。
- 56. 一種降低個體的標靶蛋白的量之方法，其包含：

將如實施例 26 至 50 或 58 至 108 中任一項之結合物 (或其組成物) 或如實施例 51 之組成物投予該個體，其中該 D 與該標靶蛋白結合，其中泛蛋白連接酶影響該結合的標靶蛋白之降解，其中該標靶蛋白的量降低。

- 58. 一種抗體-CIDE 結合物，其具有下列結構：



其中，

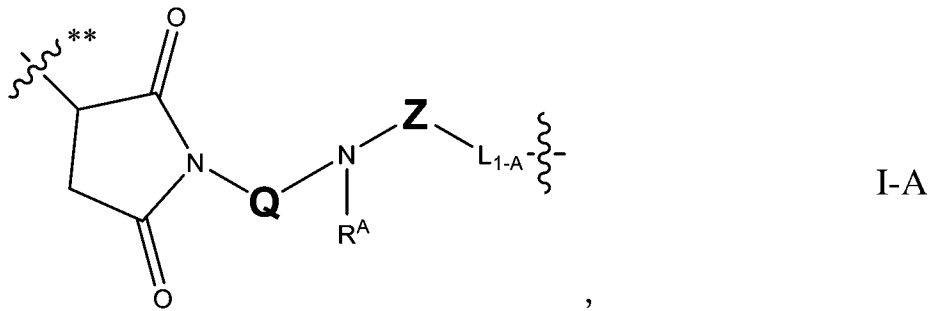
Ab 為抗體；

j 為 1 至 16；

D 為 CIDE；

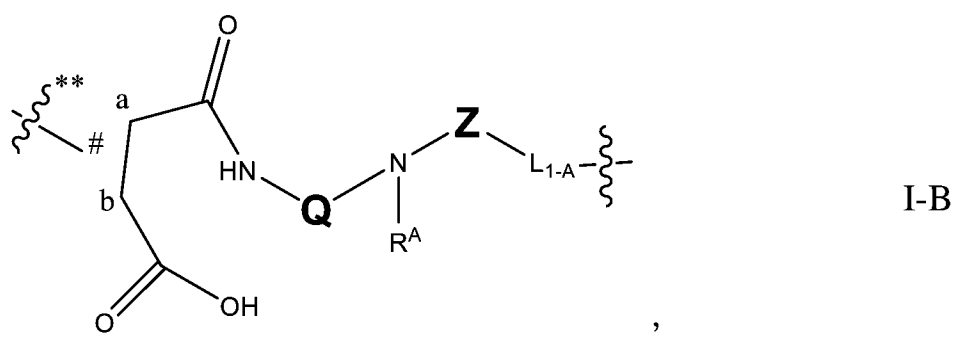
L_x 係選自由以下所組成之群組：L₁ 及 L_{1h}，其中 L_x 之至少一個實例中存在 L_{1h}：

L₁ 為與 Ab 及與 D 共價結合且具有式 I-A 之結構的连接子-1：



且

L_{1h} 為與 D 共價結合且具有式 I-B 之結構的连接子-1：



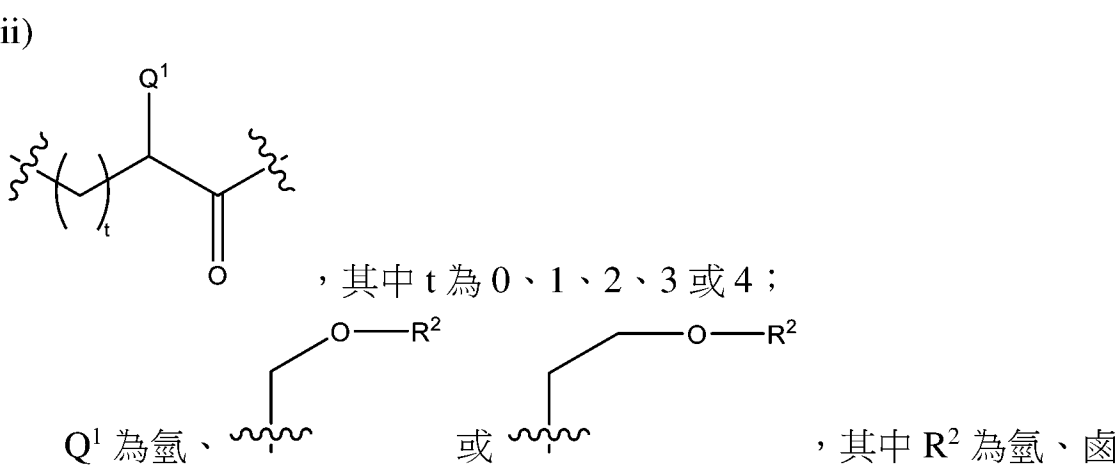
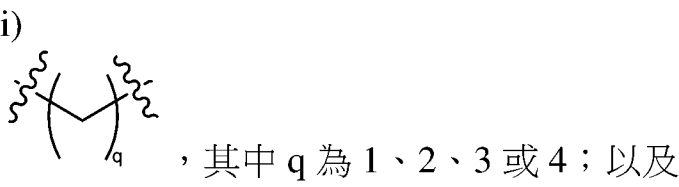
其中，# 表示位置 a 或 b 處的接附點；

在 L_1 及 L_{1h} 中， 表示與該抗體的接附點；

Z 為 $-(CH_2)_p-$ 或 $-CH_2-(CH_2-O-CH_2)_p-CH_2-$ ，其中 p 為 1、2、3、4、5 或 6；

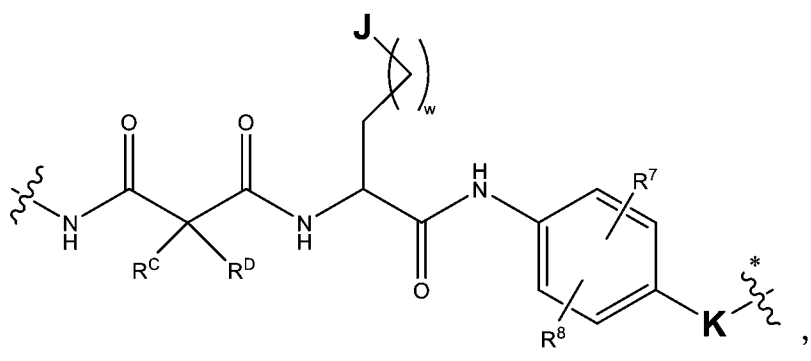
R^A 為氫、 C_{1-6} 烷基或 $-(CH_2)_v-$ 芳基，其中 v 為 0 或 1；

Q 係選自由以下所組成之群組：



基 C_{1-6} 烷基或 C_{1-6} 烷基；且

L_{1-A} 為：



其中  表示與 D 的接附點；

w 為 0、1、2、3、4 或 5；

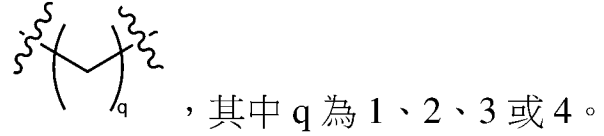
J 係選自由以下所組成之群組：-C₁₋₅ 烷基、-N(R^x)(R^y)、-C(O)NH₂、-NH-C(O)-NH₂、-NH-C(=NH)-NH₂，其中 R^x 及 R^y 各自獨立地選自氫及 C₁₋₃ 烷基；

K 係選自由以下所組成之群組：C₁₋₃ 伸烷基、-CH(R)-、-C(O)-、-C(O)-O-CH(R)-、-CH₂-O-C(O)-、-CH₂-O-C(O)-NH-CH₂- 及 -CH₂-O-C(O)-R-[CH₂]_u-O-，其中 R 為氫、C₁₋₃ 烷基、N(R^x)(R^y)、-O-N(R^x)(R^y) 或 C(O)-N(R^x)(R^y)，其中 u 為 0、1、2 或 3，且其中 R^x 及 R^y 各自獨立地選自氫及 C₁₋₃ 烷基，或 R^x 及 R^y 與其各自所接附的氮一起形成視情況經取代之 5 員至 7 員雜環基；

R^C 及 R^D 各自獨立地選自氫及 C₁₋₃ 烷基，或 R^C 及 R^D 與其各自所接附的碳一起形成視情況經取代之 C₃₋₆ 環烷基；且

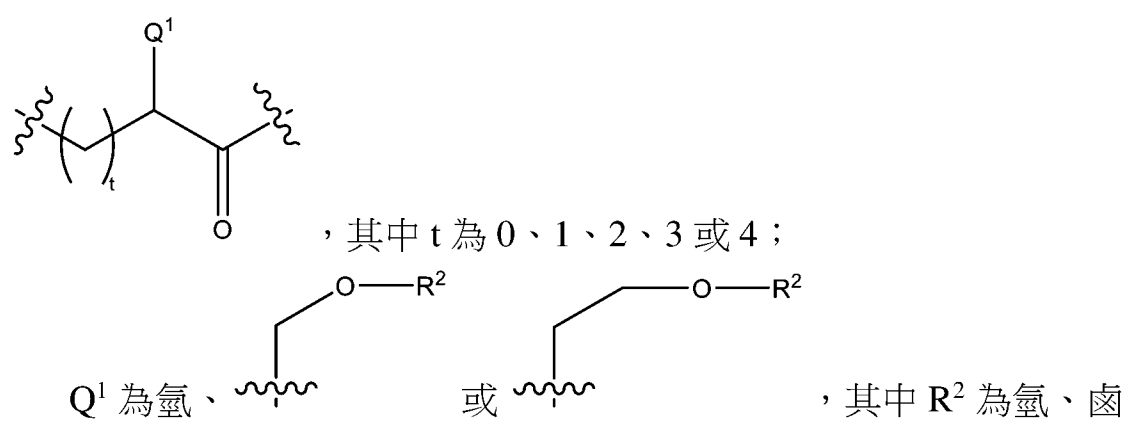
R⁷ 及 R⁸ 各自獨立地為氫、鹵基、C₁₋₅ 烷基、C₁₋₅ 烷氧基或羥基。

59. 如實施例 58 之化合物，其中 Q 為：



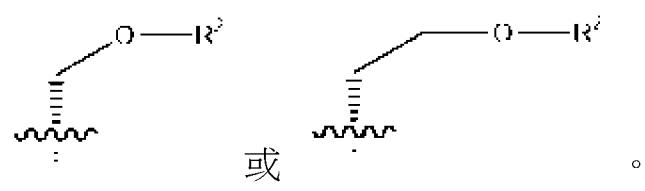
60. 如實施例 58 或 59 之化合物，其中 q 為 2。

61. 如實施例 58 之化合物，其中 Q 為：

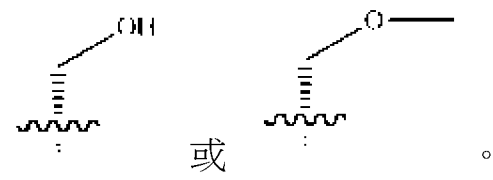


基 C_{1-6} 烷基或 C_{1-6} 烷基。

- 62. 如實施例 61 之化合物，其中 R^2 為氫或 C_{1-6} 烷基。
- 63. 如實施例 62 之化合物，其中該 C_{1-6} 烷基為甲基。
- 64. 如實施例 61 之化合物，其中 Q^1 為：

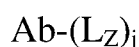


- 65. 如實施例 61 之化合物，其中 R^2 為氫或甲基。
- 66. 如實施例 65 之化合物，其中 Q^1 為：



- 67. 如實施例 61 至 66 中任一項之化合物，其中 t 為 0。
- 68. 如實施例 58 至 67 中任一項之化合物，其中 Z 為 $-(CH_2)_p-$ ，其中 p 為 1、2、3、4、5 或 6。
- 69. 如實施例 68 之化合物，其中 p 為 4、5 或 6。
- 70. 如實施例 68 之化合物，其中 p 為 5。
- 71. 如實施例 58 至 67 中任一項之化合物，其中 Z 為 $-CH_2-(CH_2-O-CH_2)_p-CH_2-$ ，其中 p 為 1、2、3、4、5 或 6。
- 72. 如實施例 71 之化合物，其中 p 為 1、2 或 3。

73. 如實施例 71 之化合物，其中 p 為 1。
74. 如實施例 58 至 73 中任一項之化合物，其中 R^A 為氫或 C_{1-6} 烷基。
75. 如實施例 74 之化合物，其中 R^A 為氫或甲基。
76. 如實施例 58 至 73 中任一項之化合物，其中 R^A 為苯基或苄基。
77. 如實施例 58 至 76 中任一項之化合物，其中 R^7 及 R^8 各自為氫。
78. 如實施例 58 至 77 中任一項之化合物，其中 R^C 及 R^D 與其各自所接附的碳一起形成視情況經取代之 C_{3-6} 環烷基。
79. 如請求項 78 之化合物，其中 C_{3-6} 環烷基為環丁烷。
80. 如實施例 1 至 22 中任一項之化合物，其中 K 為 $-CH(R)-$ ，其中 R 為氫、 C_{1-3} 烷基、 $N(R^x)(R^y)$ 或 $C(O)-N(R^x)(R^y)$ ，其中 R^x 及 R^y 各自獨立地選自氫及 C_{1-3} 烷基，或 R^x 及 R^y 與其各自所接附的氮一起形成視情況經取代之 5 員至 7 員雜環基。
81. 如實施例 80 之化合物，其中 R 為氫或 C_{1-3} 烷基。
82. 如實施例 81 之化合物，其中 R 為氫。
83. 一種抗體-結合物，其具有下列結構：



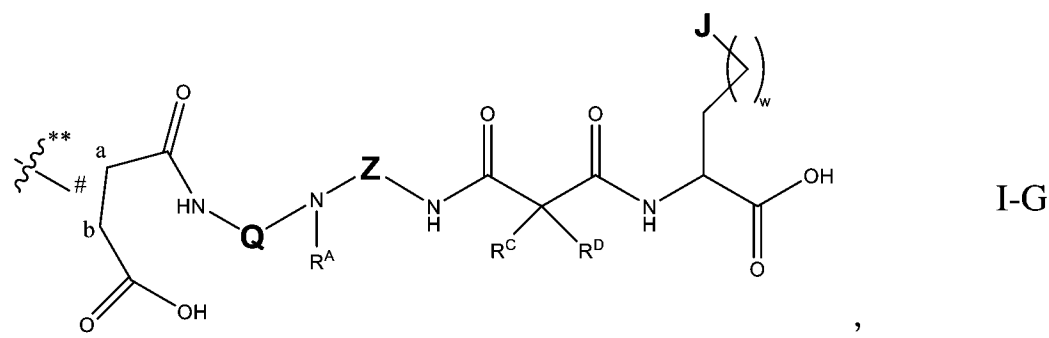
其中，

Ab 為抗體；

j 為 1 至 16；

L_Z 係選自由以下所組成之群組： L_{X1} 及 L_{X-D} ，其中 L_Z 之至少一個實例中存在 L_{X1} ：

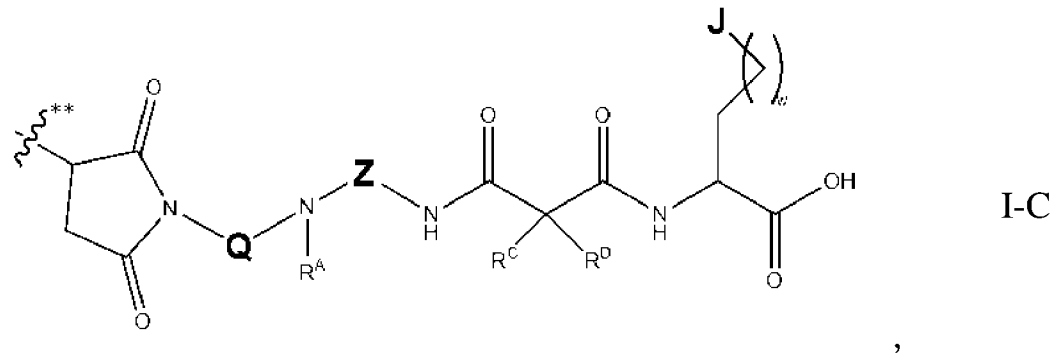
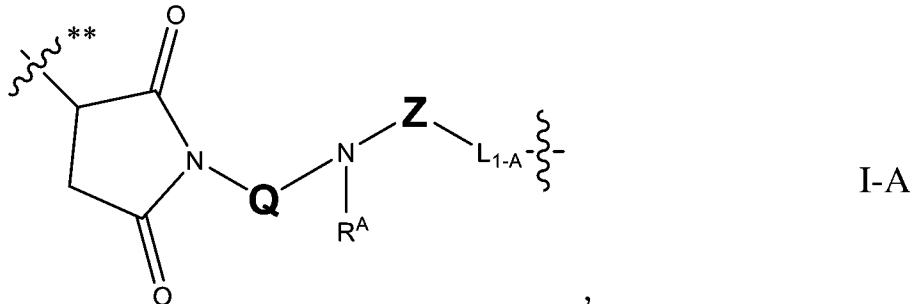
L_{X1} 係與 Ab 共價結合且具有式 I-G 之結構：



及

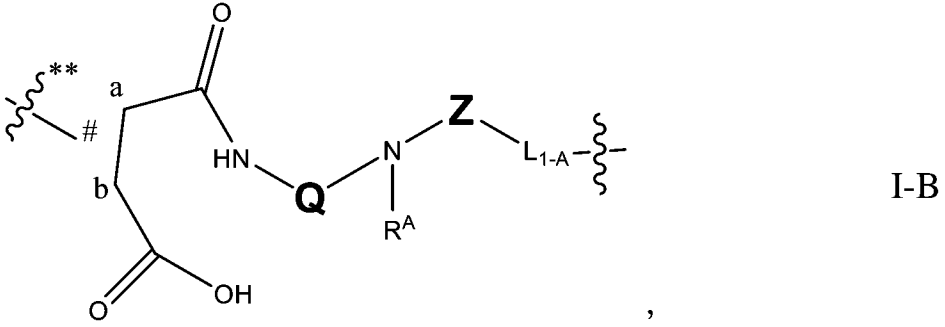
L_x-D，其中 L_x 係選自由以下所組成之群組：L₁ 及 L_{1h}：

L₁ 為與 Ab 及與 D 共價結合且具有式 I-A 或式 I-C 之結構的连接子-1：



及

L_{1h} 為與 D 共價結合且具有式 I-B 之結構的连接子-1：



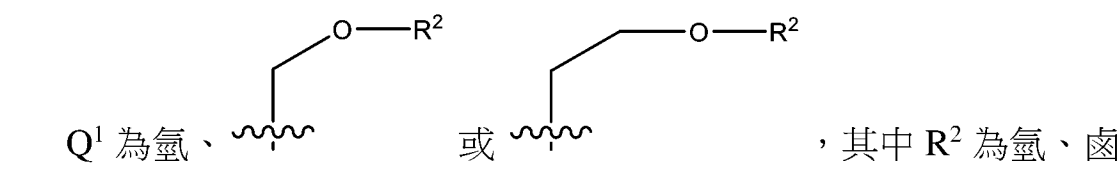
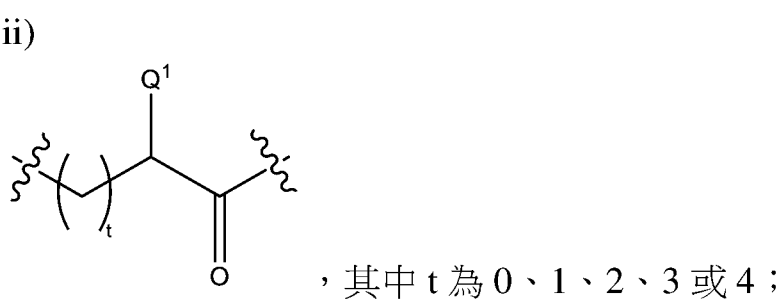
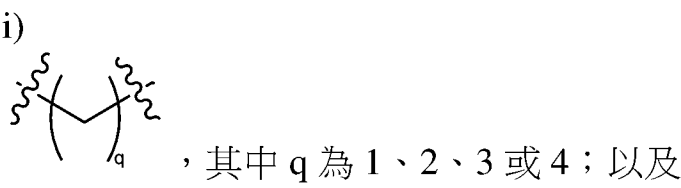
其中，# 表示位置 a 或 b 處的接附點；

 表示與該抗體的接附點；

Z 為 $-(CH_2)_p-$ 或 $-CH_2-(CH_2-O-CH_2)_p-CH_2-$ ，其中 p 為 1、2、3、4、5 或 6；

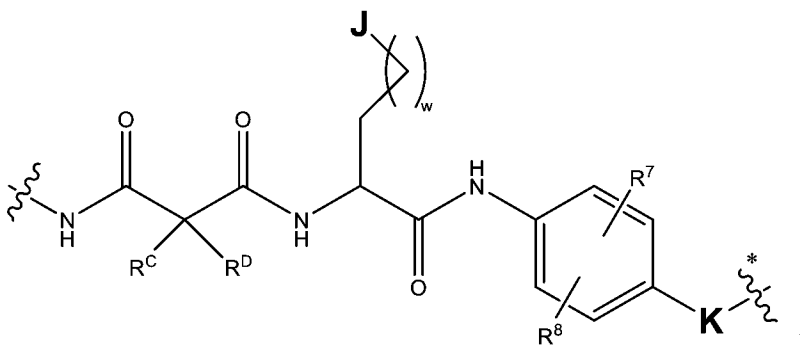
R^A 為氫、 C_{1-6} 烷基或 $-(CH_2)_v$ -芳基，其中，v 為 0 或 1；

Q 係選自由以下所組成之群組：



基 C_{1-6} 烷基或 C_{1-6} 烷基；且

L_{1-A} 為：



其中  表示與 D 的接附點；

w 為 0、1、2、3、4 或 5；

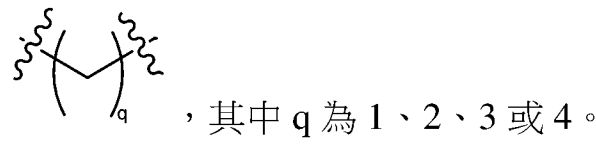
J 係選自由以下所組成之群組： $-C_{1-5}$ 烷基、 $-N(R^x)(R^y)$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-NH-C(O)-NH_2$ 、 $-NH-C(=NH)-NH_2$ ，其中 R^x 及 R^y 各自獨立地選自氫及 C_{1-3} 烷基；

K 係選自由以下所組成之群組： C_{1-3} 伸烷基、 $-CH(R)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)-O-CH(R)-$ 、 $-CH_2-O-C(O)-$ 、 $-CH_2-O-C(O)-NH-CH_2-$ 及 $-CH_2-O-C(O)-R-[CH_2]_u-O-$ ，其中 R 為氫、 C_{1-3} 烷基、 $N(R^x)(R^y)$ 、 $-O-N(R^x)(R^y)$ 或 $C(O)-N(R^x)(R^y)$ ，其中 u 為 0、1、2 或 3，且其中 R^x 及 R^y 各自獨立地選自氫及 C_{1-3} 烷基，或 R^x 及 R^y 與其各自所接附的氮一起形成視情況經取代之 5 員至 7 員雜環基；

R^C 及 R^D 各自獨立地選自氫及 C_{1-3} 烷基，或 R^C 及 R^D 與其各自所接附的碳一起形成視情況經取代之 C_{3-6} 環烷基；且

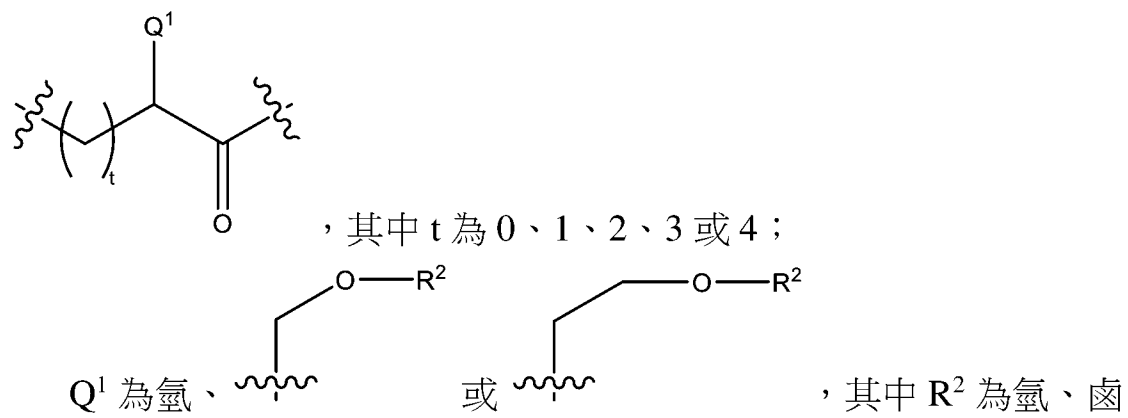
R^7 及 R^8 各自獨立地為氫、鹵基、 C_{1-5} 烷基、 C_{1-5} 烷氧基或羥基。

85. 如實施例 84 之化合物，其中 Q 為：



86. 如實施例 84 或 85 之化合物，其中 q 為 2。

87. 如實施例 84 之化合物，其中 Q 為：

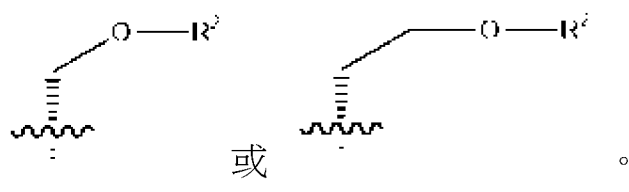


基 C_{1-6} 烷基或 C_{1-6} 烷基。

88. 如實施例 87 之化合物，其中 R^2 為氫或 C_{1-6} 烷基。

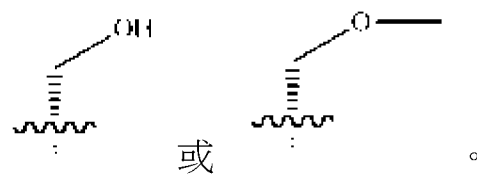
89. 如實施例 88 之化合物，其中該 C₁₋₆ 烷基為甲基。

90. 如實施例 87 之化合物，其中 Q¹ 為：



91. 如實施例 87 之化合物，其中 R² 為氫或甲基。

92. 如實施例 91 之化合物，其中 Q¹ 為：



93. 如實施例 87 至 92 中任一項之化合物，其中 t 為 0。

94. 如實施例 84 至 93 中任一項之化合物，其中 Z 為 -(CH₂)_p-，其中 p 為 1、2、3、4、5 或 6。

95. 如實施例 94 之化合物，其中 p 為 4、5 或 6。

96. 如實施例 94 之化合物，其中 p 為 5。

97. 如實施例 84 至 93 中任一項之化合物，其中 Z 為 -CH₂-(CH₂-O-CH₂)_p-CH₂-，其中 p 為 1、2、3、4、5 或 6。

98. 如實施例 87 之化合物，其中 p 為 1、2 或 3。

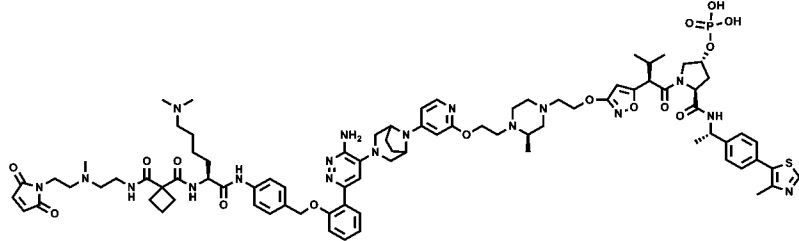
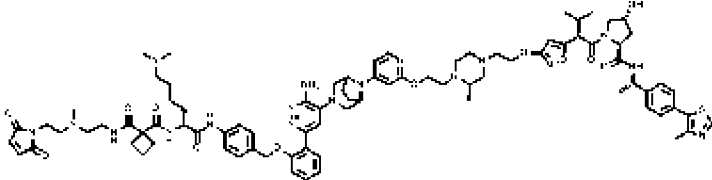
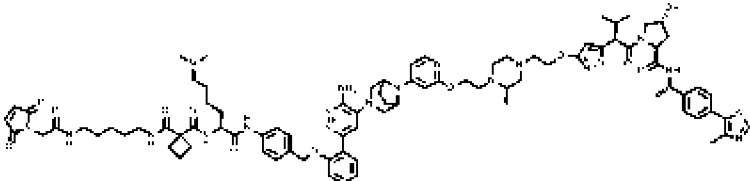
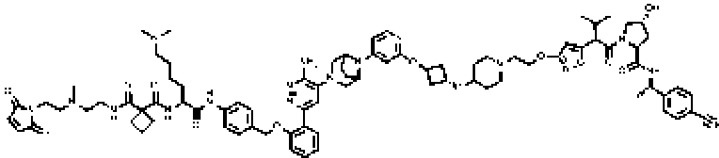
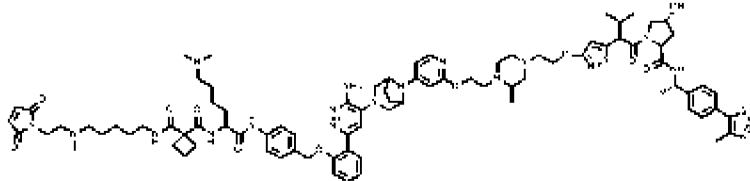
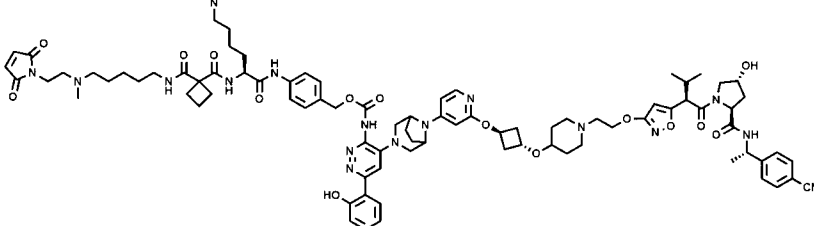
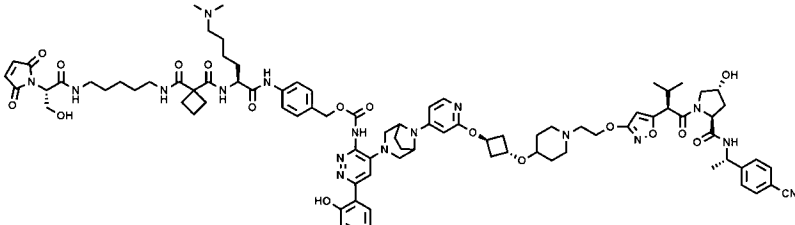
99. 如實施例 87 之化合物，其中 p 為 1。

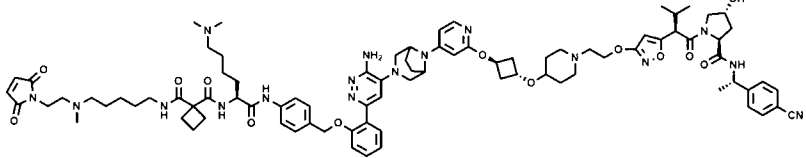
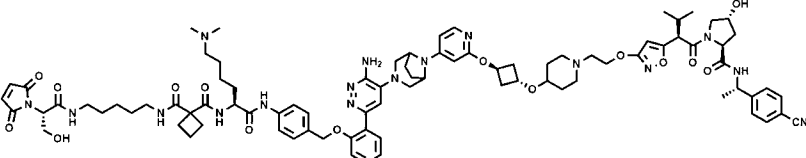
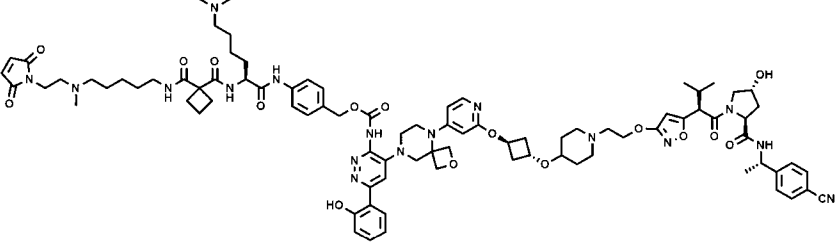
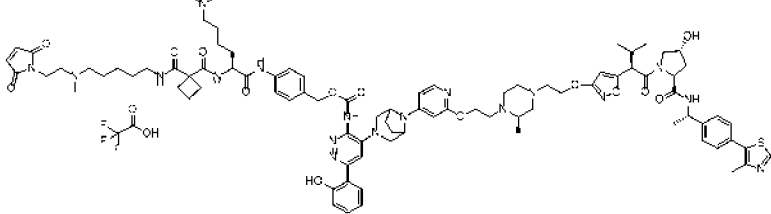
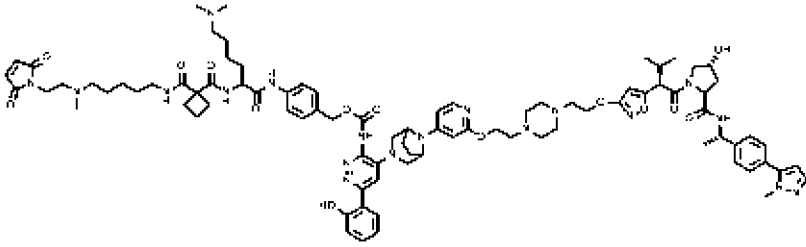
100. 如實施例 84 至 99 中任一項之化合物，其中 R^A 為氫或 C₁₋₆ 烷基。

101. 如實施例 100 之化合物，其中 R^A 為氫或甲基。

102. 如實施例 84 至 99 中任一項之化合物，其中 R^A 為苯基或苄基。

103. 如實施例 84 至 102 中任一項之化合物，其中 R⁷ 及 R⁸ 各自為氫。

	Hy-B-PCIDE-1
	Hy-B-CIDE-5
	Hy-B-CIDE-6
	Hy-B-CIDE-7
	Hy-B-CIDE-8
	Hy-B-CIDE-9
	Hy-B-CIDE-10

	Hy-B-CIDE-11
	Hy-B-CIDE-12
	Hy-B-CIDE-13
	Hy-B-CIDE-14
	Hy-B-CIDE-15

V. 調配物

【0173】可製備如本文所述之治療性 Ab-CIDE 的藥物製劑用於與醫藥上可接受之腸胃外載體以單位劑量可注射形式腸胃外投予，例如推注、靜脈內、腫瘤內注射。具有所需純度之 Ab-CIDE 視情況與一種或多種醫藥上可接受之賦形劑混合 (Remington's Pharmaceutical Sciences (1980)，第 16 版，Osol, A. 主編)，呈用於復溶之凍乾製劑或水溶液的形式。

【0174】 Ab-CIDE 可根據標準醫藥實踐配製為醫藥組成物。根據該態樣，提供一種醫藥組成物，其包含與一種或多種醫藥上可接受之賦形劑關聯的 Ab-CIDE。

【0175】 典型製劑藉由將 Ab-CIDE 與賦形劑 (諸如載劑及/或稀釋劑) 混合來製備。適合的載劑、稀釋劑及其他賦形劑為本領域技術人員所熟知，且包括以下材料，例如：碳水化合物、蠟、水溶性及/或可溶脹聚合物、親水性或疏水性材料、明膠、油、溶劑、水等。所用之特定載劑、稀釋劑或其他賦形劑將取決於應用 Ab-CIDE 的手段及目的。溶劑通常基於本領域技術人員認為投予哺乳動物安全 (GRAS) 的溶劑來選擇。

【0176】 一般而言，安全溶劑是無毒水性溶劑，例如水及其他可溶於或混溶於水中的無毒溶劑。適合的水性溶劑包括水、乙醇、丙二醇、聚乙二醇 (例如，PEG 400、PEG 300) 等及其混合物。可接受之稀釋劑、載劑、賦形劑及穩定劑在所採用之劑量及濃度下對受體無毒，並且包括：緩衝劑，諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸及甲硫胺酸；防腐劑 (諸如十八烷基二甲基苄基氯化銨；六甲基氯化銨；氯化苄銨；氯化本索寧；苯酚、丁醇或苄醇；對羥基苯甲酸烷基酯，諸如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇和間甲酚)；低分子量 (小於約 10 個殘基) 多肽；蛋白質，諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，諸如聚乙烯吡咯啉酮；胺基酸，諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺酸、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單醣、雙醣及其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑 (諸如 EDTA)；糖，諸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇；成鹽相對離子，諸如鈉；金屬錯合物 (例如，Zn-蛋白錯合物)；及/或非離子界面活性劑，諸如 TWEEN™、PLURONICS™ 或聚乙二醇 (PEG)。

【0177】製劑亦可包括一種或多種緩衝劑、穩定劑、界面活性劑、潤濕劑、潤滑劑、乳化劑、懸浮劑、防腐劑、抗氧化劑、遮光劑、滑動劑、加工助劑、著色劑、甜味劑、香味劑、風味劑及其他已知添加劑，以提供 Ab-CIDE 之良好呈現或輔助製造藥品。調配物可使用習用溶解和混合程序來製備。

【0178】可藉由在適當 pH 下於環境溫度下以所需之純度下與生理學上可接受之載劑 (亦即，在採用的劑量和濃度下對受體無毒的載劑) 混合來配製。調配物之 pH 主要取決於化合物之特定用途及濃度，但可以在約 3 至約 8 的範圍內。一個適合的實施例為 pH 5 的乙酸鹽緩衝劑中的調配物。

【0179】Ab-CIDE 製劑可為無菌的。特定而言，用於活體內投予的製劑必須是無菌的。該等滅菌可藉由無菌濾膜過濾輕鬆實現。

【0180】Ab-CIDE 通常可以固體組成物、凍乾製劑或水溶液形式儲存。

【0181】包含 Ab-CIDE 的醫藥組成物可按照與良好醫學實踐一致 (亦即，含量、濃度、時間表、療程、媒劑及投予途徑) 的方式進行調配、給藥及投予。在這種情況下，考慮的因素包括待治療的具體障礙、待治療的具體哺乳動物、個別患者的臨床病症、障礙的原因、遞送藥物的部位、投予方法、投予日程及醫療從業者已知的其他因素。待投予之化合物的「治療有效量」將受該等考慮因素的支配，並且是預防、改善或治療凝血因子所介導的病症所需之最小量。該量較佳的是低於對宿主有毒或使宿主明顯更易於出血的量。

【0182】Ab-CIDE 可配製成醫藥劑型，以提供易於控制的藥物劑量並使患者遵守規定的方案。供應用之醫藥組成物 (或調配物) 可以多種方式包裝，具體取決於用於投予藥物的方法。一般而言，用於分發之製品包括容器，該容器中存放有適當形式的醫藥調配物。適合的容器是本領域技術人員所熟知的，且包括瓶 (塑料瓶及玻璃瓶)、小袋、安瓿、塑料袋、金屬圓筒等材料。容器亦可

包括干預防護組件，以防止不小心接觸到包裝的內容物。此外，容器上亦貼有描述容器內容物的標籤。標籤亦可包括適當的警告。

【0183】醫藥組成物可以是無菌可注射製劑的形式，例如無菌可注射水性或油性懸浮液。該懸浮液可根據已知技術使用上文提及的那些適合的分散劑或潤濕劑及懸浮劑來配製。無菌可注射製劑亦可為無毒腸胃外可接受之稀釋劑或溶劑 (例如 1,3-丁二醇) 中的無菌注射溶液或懸浮液。無菌注射製劑亦可製成凍乾粉劑。可採用的可接受之載體和溶劑包括水、林格氏溶液及等滲氯化鈉溶液。此外，通常可採用無菌的不揮髮油作為溶劑或懸浮介質。為此，可採用任何溫和的固定油，其中包括合成之甘油單酯或甘油二酯。此外，脂肪酸 (例如油酸) 亦可用於注射劑的製備。

【0184】可與載劑材料混合以產生單個劑型的 Ab-CIDE 的量將根據所治療之宿主及特定之投予方式而變化。例如，意欲人類口服的緩釋製劑可含有約 1 mg 至 1000 mg 活性物質，該活性物質與合適且方便的量的載劑物質混合，該載劑物質可佔總組成物的約 5% 至約 95% (重量:重量)。醫藥組成物可製成提供易於量測之投予量。例如，意欲靜脈輸注的水溶液每毫升溶液可含有約 3 µg 至 500 µg 活性成分，以便可以約 30 mL/h 的速率輸注適合之體積。

【0185】適用於腸胃外投予的調配物包括水性和非水性無菌注射液，其可含有抗氧化劑、緩衝劑、抑菌劑以及使調配物與預期受體之血液等滲的溶質；及水性和非水性無菌懸浮液，其可包括懸浮劑和增稠劑。

【0186】調配物可包裝在單位劑量或多劑量容器 (例如密封安瓿和小瓶) 中，且可以儲存於冷凍乾燥 (凍乾) 條件下，在即將使用前添加注射用無菌液體載劑 (例如水) 即可。即時的注射液和懸浮液由前文所述類型之無菌粉末、顆粒劑及片劑製備。較佳之單位劑量調配物為那些包含每日劑量或單位每日亞劑量 (如上文所引述) 或其適當比例的活性成分的調配物。

【0187】 本主題進一步提供了獸醫用組成物，其包含至少一種如上所定義之活性成分以及獸醫用載劑。獸醫用載劑是用於投予組成物的有用材料，且可以是固體、液體或氣態材料，其在獸醫領域是惰性的或可接受的且與活性成分相容。這些獸醫用組合物可以經腸胃外或任何其他所需的途徑投予。

VI. 適應症及治療方法

【0188】 可理解的是本文所揭示之 **Ab-CIDE** 可用於治療涉及或牽涉標靶蛋白諸如 **BRM** 的各種疾病或病症。本文亦提供了用於治療的 **Ab-CIDE** 或包含 **Ab-CIDE** 的組成物。在一些實施例中，本文提供用於治療或預防如本文所揭露之疾病及病症的 **Ab-CIDE** 或包含 **Ab-CIDE** 的組成物。本文亦提供了 **Ab-CIDE** 或包含 **Ab-CIDE** 的組成物在治療中之用途。在一些實施例中，本文提供 **Ab-CIDE** 用於治療或預防如本文所揭露之疾病及病症的用途。本文亦提供了 **Ab-CIDE** 或包含 **Ab-CIDE** 的組成物在製造用於治療或預防如本文所揭露之疾病及病症的藥物中的用途。

【0189】 待治療的疾病或病症一般地為標靶蛋白依賴性疾病或病症，諸如 **BRM** 依賴性疾病或病症。例如，標靶蛋白依賴性疾病或病症可為過度增生性疾病，諸如癌症。本文中待治療之癌症的實例包括 **BRM** 依賴性癌症。在某些實施例中，癌症為非小細胞肺癌。

【0190】 在某些實施例中，本文描述的主題涉及降低個體的標靶蛋白之量的方法，包括將如本文所述的 **Ab-CIDE** 或包含如本文所述的 **Ab-CIDE** 的組成物投予該個體，其中 **PB** 部分與標靶蛋白結合，其中泛蛋白連接酶影響結合的標靶蛋白之降解，其中標靶蛋白之量降低。

【0191】 在某些實施例中，包含抗體 (諸如上文所述的彼等) 的 **Ab-CIDE** 用於治療癌症 (諸如實性瘤) 的方法中。

【0192】 Ab-CIDE 可藉由任何適合待治療之病症的途徑投予。Ab-CIDE 通常經腸胃外投予，即經輸注、皮下、肌內、靜脈內、皮內、鞘內和硬膜外投予。

【0193】 Ab-CIDE 可單獨或與其他藥劑組合使用於治療。例如，Ab-CIDE 可與至少一種額外的治療劑聯合投予。上面提到的該等聯合療法涵蓋聯合投予 (其中兩種或多種治療劑包含在同一或單獨的製劑中) 以及單獨投予，在這種情況下，Ab-CIDE 之投予可在投予額外的治療劑及/或佐劑之前、同時及/或之後發生。Ab-CIDE 亦可與放射療法組合使用。

【0194】 Ab-CIDE (及任何額外的治療劑) 可藉由任何適合的方式投予，包括腸胃外、肺內和鼻內投予，並且如果需要局部治療，則可以採用病灶內投予。腸胃外輸注包括肌內、靜脈內、動脈內、腹膜內或皮下投予。給藥可透過任何合適的途徑進行，例如透過注射，例如靜脈內或皮下注射，部分取決於短暫投予還是長期投予。本文中考慮各種給藥方案，其包括但不限於在多種時間點單次或多次投予、快速注射投予和脈衝輸注。

【0195】 對於疾病之預防或治療，Ab-CIDE 的適當劑量 (單獨使用或與一種或多種其他額外治療劑組合使用) 將取決於待治療疾病之類型、Ab-CIDE 之類型、疾病的嚴重度及病程、是否為了預防或治療目的而將 Ab-CIDE 投予、既往療法、患者的臨床病史及對該 Ab-CIDE 的反應及主治醫師的判斷。Ab-CIDE 適合在一次或一系列治療中投予患者。根據疾病的類型和嚴重程度不同，約 1 µg/kg 至 15 mg/kg (例如 0.1 mg/kg – 10 mg/kg) 的 Ab-CIDE 可為例如透過一次或多次分開的投予或藉由連續輸注投予患者的初始候選劑量。根據上述因素，一種典型的日劑量可在約 1 µg/kg 至 100 mg/kg 或更多的範圍內。對於在幾天或更長時間內重複給藥，視病症而定，治療通常將持續直至出現所需的疾病症狀抑制。Ab-CIDE 的一種例性示劑量將在 0.05 mg/kg 至約 10 mg/kg 的範

圍內。因此，可以對患者施用約 0.5 mg/kg、2.0 mg/kg、4.0 mg/kg 或 10 mg/kg 中的一種或多種劑量 (或其任意組合)。此等劑量可以間歇投予，例如每週或每三週投予 (例如，使得患者接受約 2 次至約 20 次給藥，或例如約 6 次給藥)。可投予初始較高的負載劑量，隨後投予一個或多個較低劑量。然而，可以使用其他劑量方案。藉由習用技術和測定很容易監測此治療的進展。

【0196】 本文所述之方法包括降解標靶蛋白的方法。在某些實施例中，方法包含向個體投予 Ab-CIDE，其中靶蛋白被降解。蛋白質之降解程度可為約 1% 至約 5%；或約 1% 至約 10%；或約 1% 至約 15%；或約 1% 至約 20%；約 1% 至約 30%；或約 1% 至約 40%；約 1% 至約 50%；或約 10% 至約 20%；或約 10% 至約 30%；或約 10% 至約 40%；或約 10% 至約 50%；或至少約 1%；或至少約 10%；或至少約 20%；或至少約 30%；或至少約 40%；或至少約 50%；或至少約 60%；或至少約 70%；或至少約 80%；或至少約 90%；或至少約 95%；或至少約 99%。

【0197】 本文所述之方法包括減少腫瘤組織 (例如非小細胞肺癌) 增殖的方法。在某些實施例中，方法包含向個體投予 Ab-CIDE，其中腫瘤組織之增殖降低。降低幅度可為約 1% 至約 5%；或約 1% 至約 10%；或約 1% 至約 15%；或約 1% 至約 20%；約 1% 至約 30%；或約 1% 至約 40%；約 1% 至約 50%；或約 10% 至約 20%；或約 10% 至約 30%；或約 10% 至約 40%；或約 10% 至約 50%；或至少約 1%；或至少約 10%；或至少約 20%；或至少約 30%；或至少約 40%；或至少約 50%；或至少約 60%；或至少約 70%；或至少約 80%；或至少約 90%；或至少約 95%；或至少約 99%。

VI. 製成品

【0198】 在另一態樣中，本文所述為製品，例如提供了含有可用於治療上述疾病及病症的材料的「套組」。該套組包含容器，該容器包含 Ab-CIDE。

該套組可進一步包含在容器上或與容器相關聯的標籤或藥品說明書。術語「藥品說明書」用於指涉通常包含在治療性產品的商業包裝中的說明，該說明包含有關使用此等治療性產品的適應症、用法、劑量、投予途徑、禁忌症及/或警告等資訊。

【0199】適合的容器包括例如瓶、小瓶、注射器、泡型包等。「小瓶」為適合容納液體或凍乾製劑的容器。在一個實施例中，小瓶為一次性小瓶，例如帶有瓶塞的 20 cc 一次性小瓶。容器可由各種材料諸如玻璃或塑料形成。容器可容納 Ab-CIDE 或其製劑 (其有效治療病狀)，並可具有無菌入口 (例如，容器可為具有可藉由皮下注射針頭穿孔的塞子的靜脈輸液袋或小瓶)。

【0200】組成物中的至少一種活性劑為 Ab-CIDE。標籤或藥品說明書指示該組成物用於治療所選擇的疾病 (例如癌症)。此外，標籤或藥品說明書可指示待治療之患者為患有過度增生性病變、神經退化、心肥大、疼痛、偏頭痛或神經創傷性疾病或事件的患者。在一個實施例中，標籤或藥品仿單指示包含 Ab-CIDE 的組成物可用於治療由異常細胞生長引起的病症。標籤或藥品說明書亦可指示組成物可用於治療其他病症。可替代地或另外地，製品可以進一步包含第二容器，該容器包含醫藥上可接受之緩衝劑，例如抑菌注射用水 (BWFI)、磷酸鹽緩衝鹽水、林格氏溶液及右旋糖溶液。從商業和使用者的角度來看，它可以進一步包含其他材料，其中包括其他緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針頭和注射器。

【0201】套組可進一步包含 Ab-CIDE 及 (如果存在) 第二醫藥製劑之投予說明。例如，如果套組包含第一組成物 (含 Ab-CIDE) 及第二藥物製劑，則該套組可進一步包含將第一醫藥組成物和第二醫藥組成物同時、順序或單獨投予有此需要之患者的說明。

【0202】在另一實施例中，套組適合於遞送固體口服形式的 Ab-CIDE，例如片劑或膠囊。該套組較佳的是包括多個單位劑量。該等套組可包括一張卡，該卡具有按其預期用途的順序取向的劑量。該等套組之一個實例為「泡型包」。泡型包在包裝行業中為人所熟知，且廣泛用於包裝藥品單位劑型。如果需要，可提供記憶輔助，例如以數字、字母或其他標記之形式，或帶有日曆插入物，其表示治療計劃中可投予劑量的天數。

【0203】根據一個實施例，套組可包含 (a) 其中容納有 Ab-CIDE 的第一容器；及視情況存在的 (b) 其中容納有第二醫藥製劑的第二容器，其中第二醫藥製劑包含具有抗過度增生活性的第二化合物。可替代地或另外地，套組可進一步包含第三容器，該第三容器包含醫藥上可接受之緩衝劑，例如抑菌注射用水 (BWFI)、磷酸鹽緩衝鹽水、林格氏溶液及右旋糖溶液。從商業和使用者的角度來看，它可以進一步包含其他材料，其中包括其他緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針頭和注射器。

【0204】在其中套組包含 Ab-CIDE 及第二治療劑的某些其他實施例中，套組可包含用於容納單獨組成物的容器，例如分開的瓶子或分開的箔包；但是單獨組成物亦可容納於單個未分開的容器中。通常，套組包含單獨組分的投予說明。當單獨組分較佳的是以不同劑型投予 (例如，經口和腸胃外)、以不同的劑量間隔投予時或者當處方醫師需要滴定組合中的單獨組分時，套組形式特別有利。

VII. 製備結合物之方法

一般合成途徑

【0205】本文所述的主題亦涉及由 L1-CIDE 製備 CIDE、L1-CIDE 及 Ab-L1-CIDE 之方法。一般而言，該方法包含使抗體或其變異體、突變、剪接變異體、插入/缺失及融合物與 L1-CIDE 在其中抗體共價結合至 L1-CIDE 上任何可

用接附點的條件下接觸，其中製得 Ab-L1-CIDE。本文所述的主題亦涉及由共價接附至 L1 的 Ab-L1 部分 (亦即抗體或其變異體、突變、剪接變異體、插入/缺失及融合物) 製備 Ab-L1-CIDE 之方法，該等方法包含使 CIDE 與 Ab-L1 在其中 CIDE 共價結合至 Ab-L1 上任何可用接附點的條件下接觸，其中製得 Ab-L1-CIDE。該方法可進一步包含 Ab-L1-CIDE 之常規分離及純化。

【0206】 CIDE、L1-CIDE 及 Ab-L1-CIDE 及本文所述之其他化合物可藉由以下合成途徑合成，該等合成途徑包括與彼等化學領域中所熟知者類似的製程，特別是根據本文所含之描述，以及下列文獻中所述的彼等用於其他雜環者：Comprehensive Heterocyclic Chemistry II，Katritzky 及 Rees 主編，Elsevier，1997，例如第 3 卷；Liebigs Annalen der Chemie，(9):1910-16 (1985)；Helvetica Chimica Acta，41:1052-60 (1958)；Arzneimittel-Forschung，40(12):1328-31 (1990)。起始材料通常可獲自商業來源，例如 Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI)，或容易使用本領域技術人員所熟知的方法來製備，例如，藉由下列文獻總體所述的方法來製備：Louis F. Fieser 及 Mary Fieser，*Reagents for Organic Synthesis*，第 1-23 卷，Wiley，N.Y.(1967-2006)；或 *Beilsteins Handbuch der organischen Chemie*，4，Aufl. ed. Springer-Verlag，Berlin (包括補充資料，亦可通過 Beilstein 在線數據庫獲得)。

【0207】 可用於合成 CIDE、L1-CIDE 及 Ab-L1-CIDE 及本文所述之其他化合物以及必要試劑及中間體的合成化學轉化及保護基團方法 (保護及去保護) 為本領域中已知的，且包括例如以下文獻中所述之彼等：R. Larock，Comprehensive Organic Transformations，VCH Publishers (1989)；T. W. Greene 與 P. G. M. Wuts，Protective Groups in Organic Synthesis，第 3 版，John Wiley and Sons (1999)；及 L. Paquette 主編，Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis，John Wiley and Sons (1995) 及其後續版本。在製備 CIDE、L1-CIDE

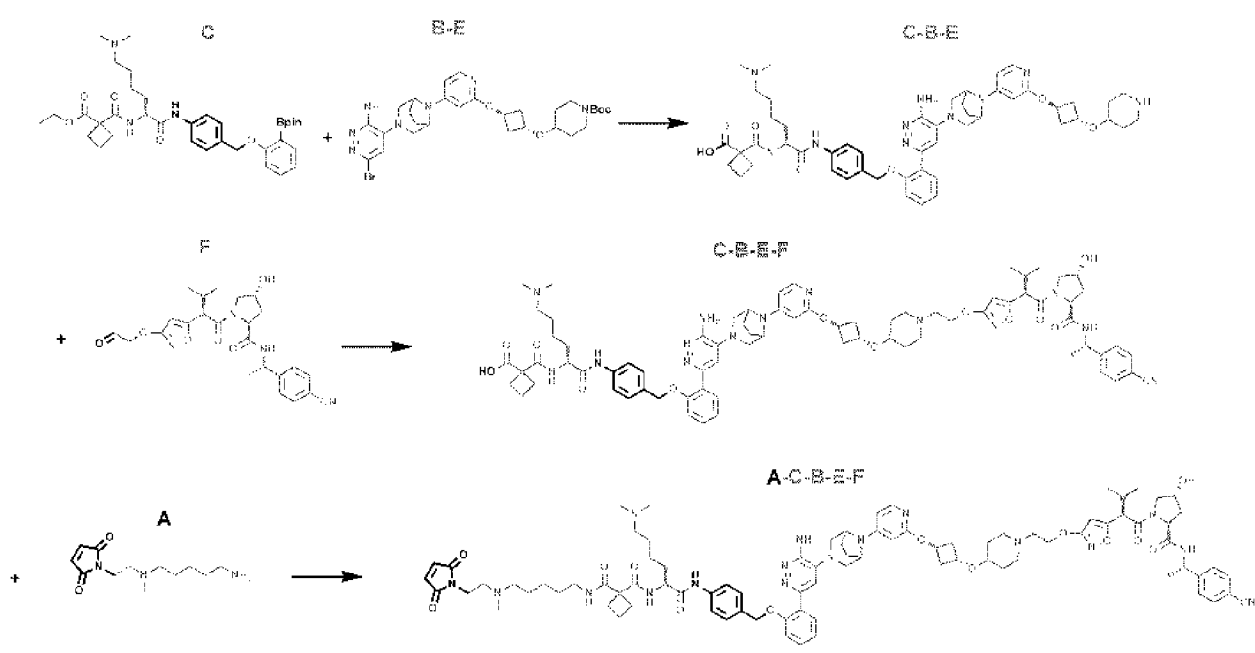
和 Ab-CIDE 及其他化合物時，可能需要保護中間體之的遠端官能團 (例如，一級胺或二級胺)。對該等保護之需求將根據遠端官能團之性質和製備方法的條件而有所不同。合適的胺基保護基團包括乙醯基、三氟乙醯基、三級丁氧羰基 (BOC)、苄氧羰基 (CBz 或 CBZ) 及 9-芴基亞甲基氧羰基 (Fmoc)。本領域技術人員容易確定是否需要該等保護。有關保護基團及其使用的一般說明，參見：T. W. Greene，Protective Groups in Organic Synthesis，John Wiley & Sons，New York，1991。

【0208】 一般程序及實例提供用於製備 CIDE、L1-CIDE 及 Ab-L1-CIDE 及本文所述之其他化合物的例示性方法。本領域技術人員將理解，可使用其他合成途徑來合成 Ab-L1-CIDE 及化合物。儘管在方案、一般程序及實例中描述並討論了具體之起始材料和試劑，但是可容易替換其他起始材料和試劑以提供各種衍生物和/或反應條件。此外，根據本揭露，可使用本領域技術人員所熟知的常規化學方法進一步修飾藉由所述方法所製備的許多例示性化合物。

【0209】 一般而言，Ab-L1-CIDE 可藉由以下方法來製備：按照 WO 2013/055987、WO 2015/023355、WO 2010/009124、WO 2015/095227 之程序將 CIDE 與 L1 連接子試劑連結以製備 L1-CIDE，然後使 L1-CIDE 與本文所述之任何抗體或其變異體、突變、剪接變異體、插入/缺失及融合物 (包括經半胱胺酸工程化改造之抗體) 結合。另選地，Ab-CIDE 可藉由以下方法來製備：首先將本文所述之抗體或其變異體、突變、剪接變異體、插入/缺失和融合物 (包括經半胱胺酸工程化改造之抗體) 與 L1 連接子試劑連接，然後使其與任何 CIDE 結合。

【0210】 以下合成途徑描述製備 CIDE、L1-CIDE 及 Ab-L1-CIDE 及其他化合物及其組分的例示性方法。本文其他地方揭示用於製備 CIDE、L1-CIDE 及 Ab-L1-CIDE 及其他化合物及其組分的其他合成途徑。

【0211】 方案 1 中描述一種用於製備 Ab-CIDE 的非限制性一般合成途徑。



方案 1

1. 經半胱胺酸工程化改造之抗體

【0212】 經半胱胺酸工程化改造之抗體 (THIOMABS™) 可以使用標準方法重組表現及純化，且一般可以如下藉由還原及再氧化製備以用於結合。

【0213】 重組表現的全長經半胱胺酸工程化改造之單株抗體 (THIOMAB™ 抗體) 帶有半胱胺酸加合物 (胱胺酸) 或由於細胞培養條件而在經工程化改造之半胱胺酸上發生麩胱甘肽化。如此，從標準哺乳動物細胞株中純化的 THIOMAB™ 抗體不能結合 Cys 反應性連接子 L1-CIDE 中間體。藉由用還原劑，諸如 DTT (Cleland 試劑，二硫蘇糖醇) 或 TCEP (三(2-羧基乙基)膦鹽酸鹽；Getz 等人 (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80；Soltec Ventures，Beverly，MA) 進行處理，接著用溫和的氧化劑 (諸如去氫抗壞血酸) 重新形成鏈間二硫鍵 (再氧化)，使經半胱胺酸工程化改造之抗體具有反應性，以與本文所述之 L1-CIDE 中間體結合。將 CHO 細胞中表現的經半胱胺酸工程化改造之

單株抗體 (THIOMAB™ 抗體) (Gomez 等人 (2010) *Biotechnology and Bioeng.* 105(4):748-760 ; Gomez 等人 (2010) *Biotechnol. Prog.* 26:1438-1445) 於室溫下在含 2 mM EDTA 的 50 mM Tris (pH 8.0) 中用過量約 50 倍的 DTT 還原，其去除 Cys 及麩胱甘肽加合物並減少抗體中之鏈間二硫鍵。藉由反相 LCMS 使用 PLRP-S 柱監測加合物之去除。

【0214】 去除 Cys 及麩胱甘肽加合物後，可藉由本領域中已知的常用方法純化 THIOMAB™ 抗體，包括本文詳細說明的陽離子交換層析法。可藉由添加至少四倍體積的 10 mM 琥珀酸鹽 (pH 5) 和/或用 10% 乙酸滴定直至 pH 為約五，對經還原之 THIOMABs™ 進行稀釋及酸化。隨後可將 pH 降低且經稀釋的 THIOMAB™ 抗體加載到 HiTrap S 陽離子交換柱上，用幾倍柱體積的 10 mM 醋酸鈉 (pH 5) 洗滌，並用 50 mM Tris (pH 8.0)、150 mM 氯化鈉洗脫。藉由進行再氧化，可在親本 Mab 中存在的半胱胺酸殘基之間重建二硫鍵。將上述溶析的經還原之 THIOMAB™ 抗體用 15X 去氫抗壞血酸 (DHAA) 處理約 3 小時，或替代性地，用 200 nM 至 2 mM 水性硫酸銅 (CuSO₄) 在室溫處理過夜。可使用本領域中已知的其他氧化劑，即氧化試劑及氧化條件。環境空氣氧化亦可能有效。這種溫和的、部分再氧化步驟以高保真度有效形成鏈內二硫化物。藉由反相 LCMS 使用 PLRP-S 管柱監測再氧化。然後，可將經再氧化之 THIOMAB™ 抗體用琥珀酸鹽緩衝劑稀釋 (如上所述) 以使 pH 達到大約 5，接著如上所述在 S 管柱上進行純化，不同之處在於用 10 mM 琥珀酸鹽 (pH 5)、300 mM 氯化鈉 (緩衝劑 B) 及 10 mM 琥珀酸鹽 (pH 5) (緩衝劑 A) 的梯度進行溶析。可向溶析的 Thiomab™ 抗體中添加 EDTA 至 2 mM 的最終濃度。如有必要，可將 THIOMAB™ 濃縮以達到超過 5 mg/mL 的最終濃度。準備好結合的所得 THIOMAB™ 抗體可儲存於 -20°C 或 -80°C。液相層析法/質譜分析可在 6200 系列 TOF 或 QTOF Agilent LC/MS 上進行。樣品在加熱至 80°C 的 PRLP-S®

1000 A 微孔管柱 (50mm × 2.1mm, Polymer Laboratories, Shropshire, UK) 上進行層析分離。使用 30%-40% B (溶劑 A：0.05% TFA 水溶液，溶劑 B：在乙腈中的 0.04% TFA) 的線性梯度，並且使用電灑源將溶析液直接電離。采集資料，並藉由 MassHunter 軟體 (Agilent) 進行去捲積。在 LC/MS 分析之前，將抗體 (50 微克) 用 PNGase F (2 單位/ml；PROzyme, San Leandro, CA) 在 37°C 處理 2 小時以去除 N-連接的碳水化合物。

【0215】替代性地，可將抗體用 LysC (每 50 µg (微克) 抗體或結合物 0.25 µg) 在 37°C 部分消解 15 分鐘，以得到 Fab 及 Fc 片段，用於 LCMS 分析

2. 連接子 L1-CIDE 基團與抗體之結合

【0216】在將連接子 L1-CIDE 化合物與抗體結合的一種方法中，經上述還原及再氧化程序後，將經半胱胺酸工程化改造之抗體 (THIOMAB™ 抗體) 於 10 mM 琥珀酸鹽 (pH 5)、150 mM NaCl、2 mM EDTA 中用 1 M Tris 調節至 pH 7.5-8.5。將過量的約 3 莫耳至 20 當量的含有硫醇反應性基團的連接子-CIDE 中間體 (例如，順丁烯二醯亞胺或 4-硝基吡啶基二硫化物或甲烷硫代磺醯基 (MTS) 二硫化物) 溶於具有或不具有丙二醇的 DMF 或 DMA 中，然後添加至經還原、再氧化及 pH 調節的抗體中。反應在室溫或 37°C 下溫育並監測直至完成 (1 小時至約 24 小時)，如藉由反應混合物之 LC-MS 分析所確定的。反應完成後，藉由一種或幾種方法之任意組合純化結合物，目的是去除剩餘的未反應 L1-CIDE 中間體及聚集蛋白 (如果以顯著的水平存在)。例如，可將結合物用 10 mM 組胺酸-乙酸鹽 (pH 5.5) 稀釋，直到最終 pH 值為約 5.5，然後藉由 S 陽離子交換層析法使用連接至 Akta 純化系統 (GE Healthcare) 的 HiTrap S 柱或 S maxi 離心柱 (Pierce) 進行純化。可替代地，可藉由凝膠過濾層析法使用連接至 Akta 純化系統的 S200 柱或 Zeba 離心柱純化結合物。替代性地，透析可用於去除未反應的或過量的連接子藥物。使用凝膠過濾或透析法，可將 THIOMAB™ 抗體

CIDE 結合物用含 240 mM 蔗糖的 20 mM His/醋酸鹽 (pH 5) 配製。可藉由離心超濾法濃縮純化的結合物，和/或在無菌條件下透過 0.2- μ m 過濾器過濾，然後冷凍儲存。藉由 BCA 檢定法表徵 Ab-L1-CIDE 以確定蛋白質濃度，藉由分析型 SEC (粒徑篩析層析法) 進行聚集分析，並用離胺酸 C 內肽酶 (LysC) 處理或使用標準程序還原後進行 LC-MS 分析以計算 DAR。

【0217】 在包含 0.25 mM 氯化鉀及 15% IPA 的 0.2 M 磷酸鉀 (pH 6.2) 中，使用 Shodex KW802.5 柱對結合物進行粒徑篩析層析分析，其中所用流速為 0.75 ml/min。結合物之聚集狀態藉由對溶析峰面積進行積分 (280 nm 下之吸光度) 來確定。

【0218】 可使用 Agilent QTOF 6520 ESI 儀器對 Ab-L1-CIDE 進行 LC-MS 分析。例如，於 37°C 下，將 Ab-L1-CIDE 用 1:500 w/w 內切蛋白酶 Lys C (Promega) 於 Tris (pH 7.5) 中處理 30 分鐘。將所得切割片段加載到加熱至 80°C 的 1000Å (埃)、8 μ m (微米) PLRP-S (高度交聯聚苯乙烯) 柱上，並用流動相 B 在 5 分鐘內由 30% 增加至 40% 的梯度洗脫。流動相 A 為含 0.05% TFA 的 H₂O，流動相 B 為含 0.04% TFA 的乙腈。流速為 0.5 ml/min。在電噴霧電離和 MS 分析之前，藉由 280nm 處的紫外吸光度偵測來監測蛋白質洗脫。未結合之 Fc 片段、殘留的未結合之 Fab 和已給藥的 Fab 通常可實現色譜分離。使用 Mass Hunter™ 軟體 (Agilent Technologies) 對獲得的 m/z 譜圖去卷積以計算抗體片段的質量。可對去捲積之 LCMS 譜圖中的峰進行分配及定量。藉由計算對應於 CIDE 結合的抗體的一個或多個峰之強度相對於全部所觀察到的峰的比率來計算 CIDE 與抗體比 (DAR)。

3. 將 L2 偶合至 E3LB 以製備 E3LB-L2 中間體的一般合成偶合

【0219】 在某些實施例中，首先使 L2 與適合的第一溶劑、第一鹼及第一偶合試劑接觸以製備第一溶液。在某些實施例中，L2 與適合的第一溶劑、第一

鹼及第一偶合試劑之接觸於室溫 (約 25°C) 下進行 15 分鐘。然後使 E3LB 與該第一溶液接觸。

【0220】 在某些實施例中，E3LB 與第一溶液之接觸於室溫 (約 25°C) 下進行 1 小時。然後濃縮溶液，並視情況進行純化。

【0221】 在某些實施例中，L2 與第一鹼與第一偶合試劑之莫耳比為約 1:4:1.19。在某些實施例中，L2 與第一鹼與第一偶合試劑之莫耳比為約 1:2:0.5、約 1:3:1、約 1:4:2、約 1:5:3 或約 1:6:4。

【0222】 在某些實施例中，L2 與 E3LB 之莫耳比為約 1:1。在某些實施例中，L2 與 E3LB 之莫耳比為約 1:0.5、約 1:0.75、約 1:2 或約 0.5:1。

4. 用於將 E3LB-L2 中間體偶合至 PB 的通用合成方法

【0223】 在某些實施例中，使 E3LB-L2 中間體偶合至 PB 以製備 CIDE。在某些實施例中，首先使 PB 與適合的第二溶劑、第二鹼及第二偶合試劑接觸。在某些實施例中，接觸於室溫 (約 25°C) 下進行約 10 分鐘。然後使溶液與 E3LB-L2 中間體接觸。在某些實施例中，第二溶液與 E3LB-L2 中間體之接觸於室溫 (約 25°C) 下進行約 1 小時。然後濃縮溶液，並視情況進行純化，以製備 CIDE。

【0224】 在某些實施例中，PB 與第二鹼與第二偶合試劑之莫耳比為約 1:4:1.2。在某些實施例中，PB 與第二鹼與第二偶合試劑之莫耳比為約 1:3:0.75、約 1:5:1、約 1:3:2 或約 1:5:3。

【0225】 在某些實施例中，PB 與 E3LB-L2 中間體之莫耳比為約 1:1。在某些實施例中，PB 與 E3LB-L2 中間體之莫耳比為約 1:0.5、約 1:0.75、約 1:2 或約 0.5:1。

5. 用於將 CIDE 偶合至 L1 以製備 L1-CIDE 的一般合成方法

【0226】在某些實施例中，使 CIDE 與 L1 及第三鹼在適合的第三溶劑中接觸以製備溶液。在某些實施例中，接觸於約室溫 (約 25°C) 下進行約 2 小時然後可視情況純化溶液以製備 L1-CIDE。

【0227】在某些實施例中，CIDE 與 L1 之莫耳比為約 1:4。在某些實施例中，CIDE 與 L1 之莫耳比為約 1:1、1:2、1:3、1:5、1:6、1:7 或約 1:8。

6. 用於將 L1-CIDE 偶合至抗體的一般合成方法

【0228】在某些實施例中，使 L1-CIDE 與硫醇及適合的第四溶劑接觸以形成第四溶液。然後使該溶液與抗體接觸以製備結合物。在某些實施例中，

【0229】在某些實施例中，硫醇為順丁烯二醯亞胺或 4-硝基吡啶基二硫化物。在某些實施例中，適合的溶劑選自由二甲基甲醯胺、二甲基乙醯胺及丙二醇所組成之群組。

【0230】在某些實施例中，L1-CIDE 與硫醇反應性基團之莫耳比為約 3:1 至約 20:1。

【0231】在某些實施例中，包含 L1-CIDE 的溶液、硫醇反應性基團及適合的溶劑與抗體之接觸進行約 1 小時至約 24 小時。在某些實施例中，包含 L1-CIDE 的溶液、硫醇反應性基團及適合的溶劑與抗體之接觸於約室溫 (約 25°C) 至約 37°C 下進行。

【0232】在上述方法的某些實施例中，適合的溶劑為極性非質子性溶劑，其選自由以下所組成之群組：二甲基甲醯胺、四氫呋喃、乙酸乙酯、丙酮、乙腈、二甲亞砷及碳酸丙烯酯。

【0233】在上述一般方法的某些實施例中，鹼係選自由以下所組成之群組：*N,N*-二異丙基乙胺 (DIEA)、三乙胺及 2,2,2,6,6-四甲基哌啶。在某些實施例中，偶合試劑係選自由以下所組成之群組：1-[雙(二甲基胺基)亞甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎘 3-氧化物六氟磷酸鹽 (HATU)、(苯并三唑-1-基氧)三(二甲

基胺基)磷六氟磷酸鹽 (BOP)、(7-氮雜苯并三唑-1-基氧)三吡咯啉基磷六氟磷酸鹽 (PyAOP)、O-(苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸鹽 (HBTU)、O-(苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸鹽 (TBTU)、O-(6-氯苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸鹽 (HCTU)、O-(N-Suc-桂醯基 (cinimidyl))-1,1,3,3-四甲基-脲四氟硼酸鹽 (TSTU)、O-(5-降莧烯-2,3-二甲醯亞胺基)-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸鹽 (TNTU)、O-(1,2-二氫-2-側氧-1-吡啶基)-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸鹽 (TPTU) 及羰基二咪唑 (CDI)。

【0234】 在上述方法的某些實施例中，接觸持續約 30 秒、1 分鐘、2 分鐘、3 分鐘、4 分鐘、5 分鐘、6 分鐘、7 分鐘、8 分鐘、9 分鐘、10 分鐘、11 分鐘、12 分鐘、13 分鐘、14 分鐘、15 分鐘、16 分鐘、17 分鐘、18 分鐘、19 分鐘、20 分鐘、30 分鐘、60 分鐘、90 分鐘、120 分鐘、180 分鐘、4 小時、5 小時、6 小時、7 小時、8 小時、9 小時、10 小時、20 小時、40 小時、60 小時或 72 小時。

【0235】 在上述方法的某些實施例中，接觸於約 20°C、21°C、22°C、23°C、24°C、25°C、26°C、27°C、28°C、29°C、30°C、31°C、32°C、33°C、34°C、35°C、36°C、37°C、38°C、39°C、40°C、41°C、42°C、43°C、44°C、45°C、46°C、47°C、48°C、49°C、50°C、60°C、70°C、80°C、90°C 或 100°C 下進行。

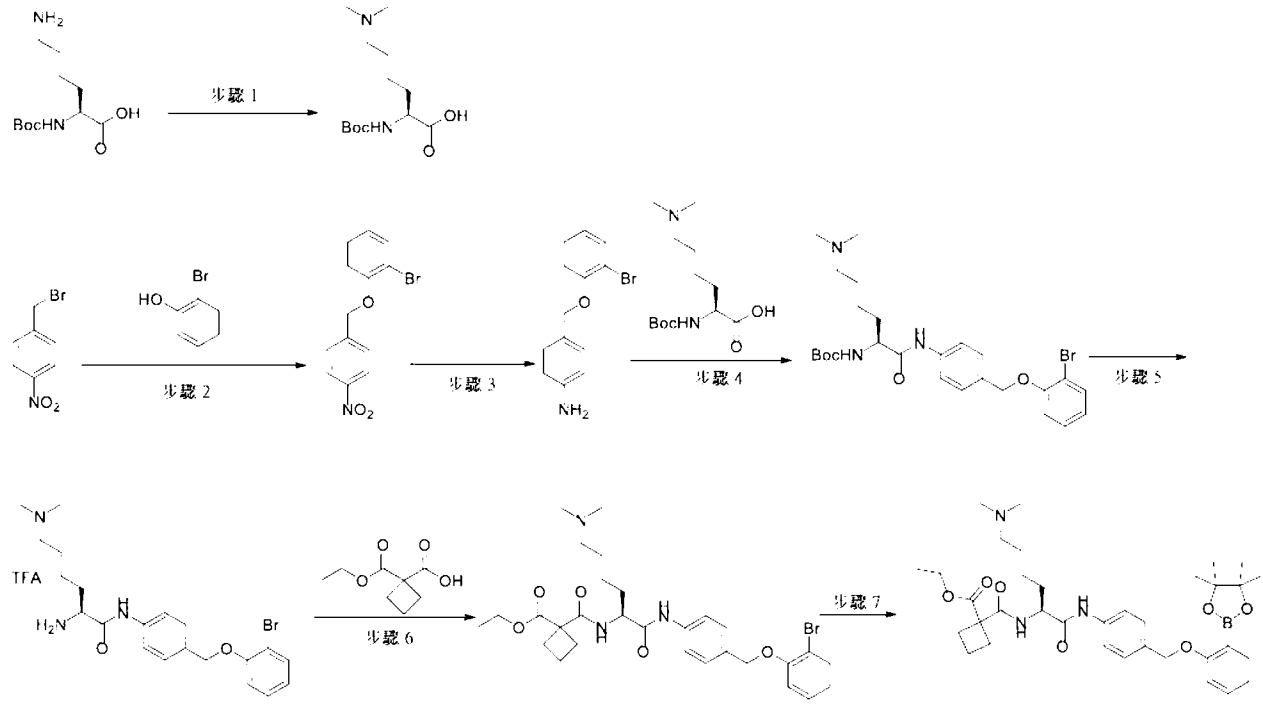
【0236】 以下實例以說明而非限制性方式提供。

實例

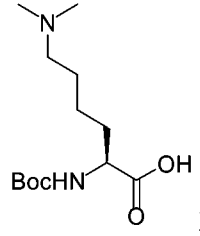
實例 1

可水解的连接子及 PB 之部分的合成

【0237】 中間體 1：(S)-1-((6-(二甲基氨基)-1-側氧-1-((4-((2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧雜環戊硼烷-2-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸乙酯

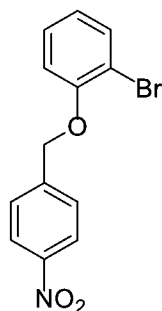


【0238】 步驟 1：N²-(三級丁氧基羰基)-N⁶,N⁶-二甲基-L-離胺酸



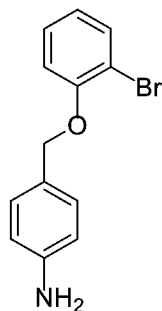
在氫氣 (3 atm) 下，將 (三級丁氧基羰基)-L-離胺酸 (20.0 g, 81.2 mmol)、37% 水性 CH₂O (12.2 g, 150 mmol) 及 10% Pd/C (2.00 g) 在甲醇 (100 mL) 中之溶液在室溫攪拌 4 小時。過濾後，將濾液在減壓下濃縮。將殘餘物用 Et₂O 洗滌。藉由過濾收集固體，以得到 20.6 g (產率 92%) 白色固體狀標題化合物。LCMS (ESI) [M+H]⁺ =275。

【0239】 步驟 2：1-溴-2-((4-硝基苄基)氧基)苯



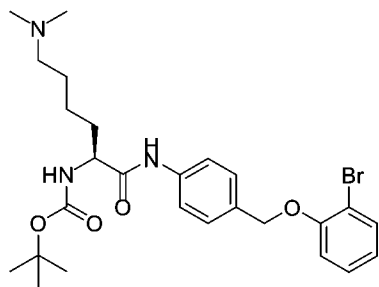
將 2-溴苯酚 (52.6 g, 304 mmol)、1-(溴甲基)-4-硝基苯 (65.7 g, 304 mmol) 及 K_2CO_3 (83.9 g, 608 mmol) 在 DMF (700 mL) 中之溶液在室溫攪拌 1 小時。添加 EtOAc 並使用水洗滌三次。有機層經無水 Na_2SO_4 乾燥，並在真空下濃縮，以得到 73.8 g (產率 78%) 黃色固體狀標題化合物。 1H NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$, ppm) δ 8.34 – 8.24 (m, 2H), 7.81 – 7.70 (m, 2H), 7.62 (dd, $J = 7.9, 1.6$ Hz, 1H), 7.36 (ddd, $J = 8.3, 7.3, 1.6$ Hz, 1H), 7.20 (dd, $J = 8.3, 1.5$ Hz, 1H), 6.94 (td, $J = 7.6, 1.4$ Hz, 1H), 5.39 (s, 2H)。

【0240】 步驟 3：4-((2-溴苯氧基)甲基)苯胺



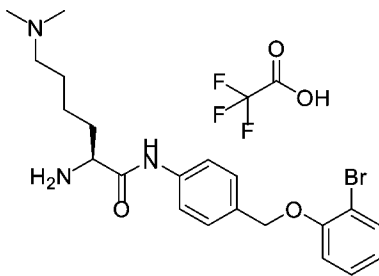
在氮氣下，在 $0^\circ C$ 向 1-溴-2-((4-硝基苄基)氧)苯 (43.0 g, 139.5 mmol) 及 K_2CO_3 (115 g, 837 mmol) 在乙腈 (800 mL) 及水 (400 mL) 中之溶液中分批添加 $Na_2S_2O_4$ (242 g, 1395 mmol)。將混合物在室溫攪拌 6 小時。用 EtOAc 萃取產物一次。有機層經無水 Na_2SO_4 乾燥，並在真空下濃縮，以得到 35 g (粗產物) 黃色固體狀標題化合物。LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 278$ 。

【0241】 步驟 4：(S)-(1-((4-((2-溴苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲胺基)-1-側氧己-2-基)胺羧酸三級丁酯



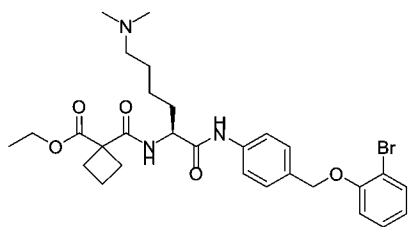
在氮氣下，在 -25°C 向 N^2 -(三級丁氧基羰基)- N^6,N^6 -二甲基- L -離胺酸 (13.3 g, 48.4 mmol) 及 NMM (10.3 g, 96.9 mmol) 在四氫呋喃 (200 mL) 中之溶液中逐滴添加氯甲酸異丁酯 (7.91 g, 58.1 mmol)。將反應在 -25°C 攪拌 0.5 小時。然後在 -25°C 添加 4-((2-溴苯氧基)甲基)苯胺 (16.1 g，粗產物) 在四氫呋喃 (120 mL) 中之溶液。將反應在室溫攪拌 4 小時。將溶劑在真空下濃縮。添加 DCM 並用水洗滌。有機層經無水 Na_2SO_4 乾燥並在真空下濃縮。將殘餘物藉由矽膠急速層析法 (溶劑梯度：0-9% MeOH/DCM) 純化，以得到 6.70 g (產率 25%) 白色固體狀標題化合物。LCMS (ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 534$ 。

【0242】 步驟 5：(S)-2-胺基- N -(4-((2-溴苯氧基)甲基)苯基)-6-(二甲基胺基)己醯胺 (2,2,2-三氟乙酸鹽)



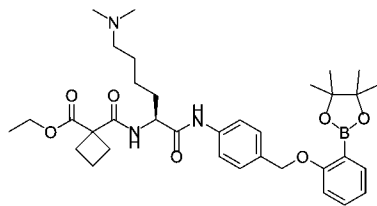
將 (S)-1-((4-((2-溴苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲酸三級丁酯 (4.00 g, 7.48 mmol) 在 5% TFA/HFIP (50 mL) 中之溶液在室溫攪拌 3 小時。將溶劑在真空下濃縮，並將其直接用於下一步驟。LCMS (ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 434$ 。

【0243】 步驟 6：(S)-1-((1-((4-((2-溴苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲胺基)-1-側氧己-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸乙酯



在 0°C 向 (S)-2-胺基-N-(4-((2-溴苯氧基)甲基)苯基)-6-(二甲基胺基)己醯胺 (2,2,2-三氟乙酸鹽) (來自步驟 5 的粗產物)、1-(乙氧基羰基)環丁烷-1-甲酸 (1.55 g, 8.98 mmol) 及 DIPEA (9.65 g, 74.8 mmol) 在 DMF (20 mL) 中之溶液中添加 HATU (3.41 g, 8.98 mmol)。將混合物在室溫攪拌 0.5 小時。粗產物藉由預填充之 C18 管柱 (溶劑梯度：在水 (0.05% NH_4HCO_3) 中的 0-100% MeOH) 純化，以得到 2.70 g (產率 61%) 紅色固體狀標題化合物。LCMS (ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 588$ 。 ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, ppm) δ 9.87 (s, 1H), 7.72 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.54 – 7.42 (m, 3H), 7.30 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.21 (ddd, $J = 8.8, 7.3, 1.6$ Hz, 1H), 7.07 (dd, $J = 8.4, 1.5$ Hz, 1H), 6.77 (td, $J = 7.6, 1.4$ Hz, 1H), 5.02 (s, 2H), 4.30 (q, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.00 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.35 – 2.21 (m, 2H), 2.03 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 1.96 (s, 6H), 1.80-1.41 (m, 4H), 1.30-1.14 (m, 6H), 1.06 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H)。

【0244】 步驟 7：(S)-1-((6-(二甲基胺基)-1-側氧-1-((4-((2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧雜環戊硼烷-2-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸乙酯



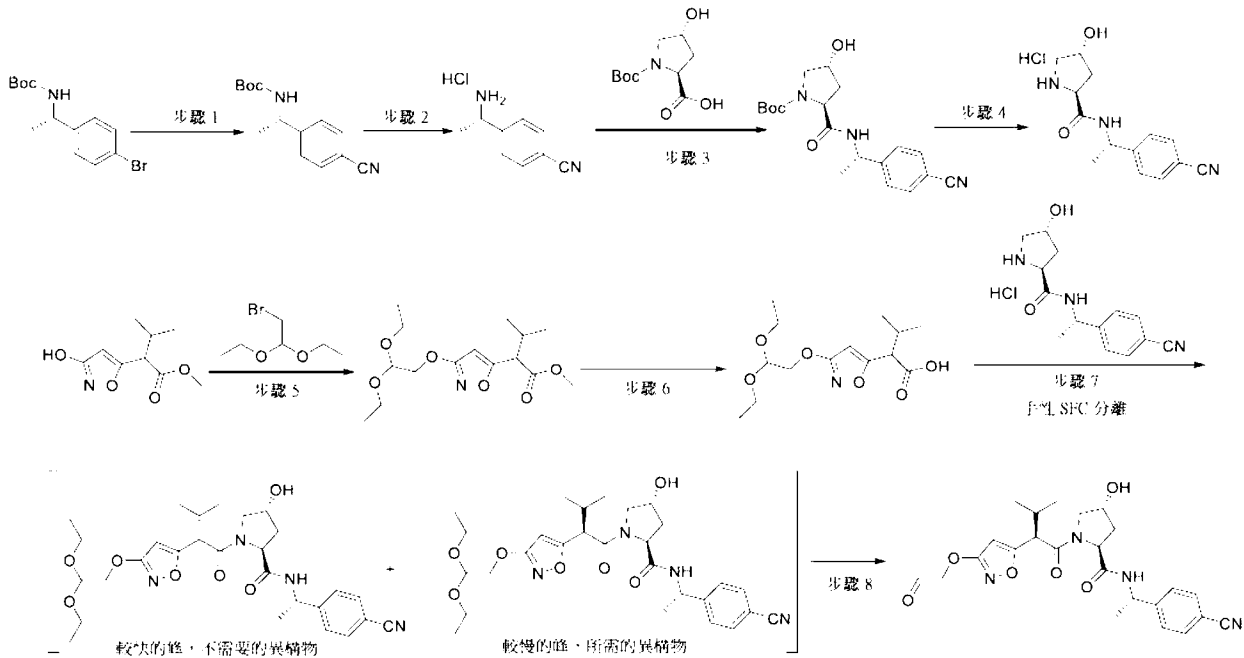
在氮氣下，將 (S)-1-((1-((4-((2-溴苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸乙酯 (500 mg, 0.852 mmol)、 B_2Pin_2 (649 mg, 2.55 mmol)、 $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ (124 mg, 0.170 mmol) 及 KOAc (250 mg, 2.55 mmol) 在 1,4-二噁烷 (5 mL) 中之溶液在 80°C 攪拌 2 小時。反應用 DCM 稀釋並

用水洗滌。有機層經無水硫酸鈉乾燥，並在真空下濃縮。將殘餘物藉由矽膠急速層析法 (梯度：0%-20% MeOH / DCM (含 0.3% 7 M NH₃/MeOH)) 純化，以得到 390 mg (產率 72%) 黃色固體狀標題化合物。LC-MS：(ESI, m/z)：[M+H]⁺ = 636。

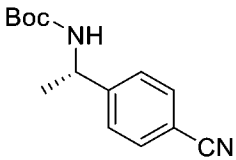
實例 2

E3LB 之部分的合成

【0245】中間體 2：(2*S*,4*R*)-*N*-((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)-4-羥基-1-((*R*)-3-甲基-2-(3-(2-側氧乙氧基)異噁唑-5-基)丁醯基)吡咯啉-2-甲醯胺



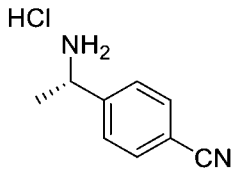
【0246】步驟 1：(*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲酸三級丁酯



在氮氣下，將 (*S*)-1-(4-溴苯基)乙基)胺甲酸三級丁酯 (5.00 g, 16.7 mmol)、氰基鋅 (2.32 g, 20.1 mmol) 及 Pd(PPh₃)₄ (184 mg, 0.159 mmol) 在 DMF (50 mL) 中在 80°C 攪拌 30 分鐘。然後將反應混合物倒入水中，藉由過濾收集固體並用水洗滌。固體藉由急速層析法在矽膠上 (溶劑梯度：0%-30% EtOAc/石

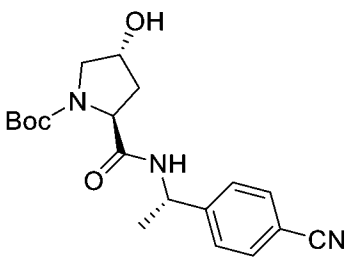
油醚) 純化，以產生 2.80 g (產率 68%) 無色油狀標題化合物。LCMS (ESI) :
[M+H]⁺ = 247 。

【0247】 步驟 2：(S)-4-(1-胺基乙基)苯甲腈 (氯化氫鹽)



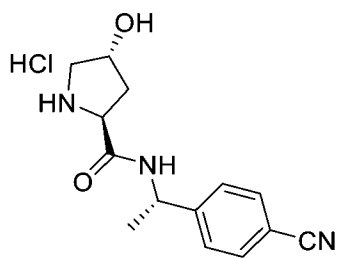
在氮氣下，將 (S)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲酸三級丁酯 (2.80 g, 11.4 mmol) 在 CH₂Cl₂ (10 mL) 及 4 M HCl/二噁烷 (20 mL) 在室溫攪拌 1 小時。將所得混合物在真空下濃縮，以產生 2.8 g (粗產物) 白色固體狀標題化合物。LC-MS :
(ESI, m/z) : [M+H]⁺ = 147 。

【0248】 步驟 3：(2S,4R)-2-(((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-4-羥基吡咯啉-1-甲酸三級丁酯



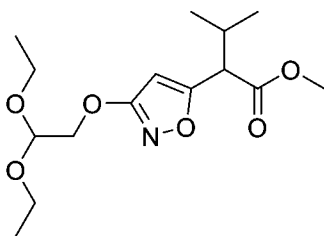
在氮氣下，將 (S)-4-(1-胺基乙基)苯甲腈 (2.35 g, 16.1 mmol)、(2S,4R)-1-(三級丁氧基羰基)-4-羥基吡咯啉-2-甲酸 (3.71 g, 16.1 mmol)、HATU (7.34 g, 19.3 mmol) 及 DIPEA (20.7 g, 161 mmol) 在 DMF (20 mL) 中之溶液在室溫攪拌 30 分鐘。反應藉由預填充之 C18 柱 (溶劑梯度：0-60% ACN 於水 (0.05% NH₄HCO₃))，以得到 4.60 g (50%，產率) 白色固體狀標題化合物。LC-MS :
(ESI, m/z) : [M+H]⁺ = 360 。

【0249】 步驟 4：(2S,4R)-N-(((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)-4-羥基吡咯啉-2-甲醯胺 (氯化氫鹽)



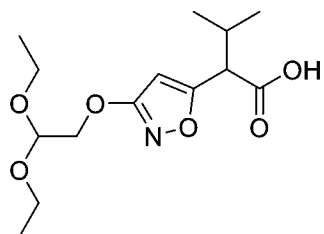
在氮氣下，將 (2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-4-羥基吡咯啉-1-甲酸三級丁酯 (3.50 g, 9.7 mmol) 在 CH₂Cl₂(35 mL) 及 4 M HCl 二噁烷 (70 mL) 中之溶液在室溫攪拌 30 分鐘。將所得混合物在真空下濃縮，以產生 3.1 g (粗產物) 白色固體狀標題化合物。LC-MS：(ESI, *m/z*)：[*M*+*H*]⁺ = 260。

【0250】 步驟 5：2-(3-(2,2-二乙氧基乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁酸甲酯



將 2-(3-羥基異噁唑-5-基)-3-甲基丁酸甲酯 (10.0 g, 50.2 mmol)、2-溴-1,1-二乙氧基乙烷 (11.3 mL, 75.1 mmol) 及 K₂CO₃ (13.9 g, 101 mmol) 在 DMF (150 mL) 中之溶液在 70°C 攪拌過夜。反應混合物用 EtOAc 稀釋，並用水洗滌。合併之有機層用鹽水洗滌，經無水硫酸鈉乾燥並在減壓下濃縮。殘餘物藉由預填充之 C18 柱 (溶劑梯度：在水 (0.05% NH₄HCO₃) 中的 0-100% ACN) 純化，以產生 12.5 g (產率 79%) 黃色油狀標題化合物。LC-MS：(ESI, *m/z*)：[*M*+*H*]⁺ = 316。

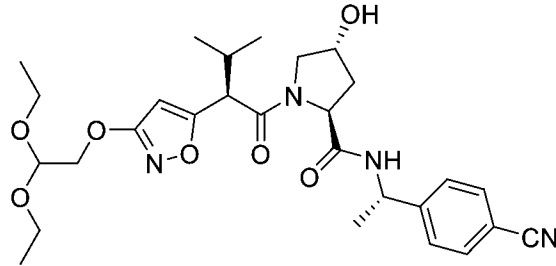
【0251】 步驟 6：2-(3-(2,2-二乙氧基乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁酸



將 2-(3-(2,2-二乙氧基乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁酸甲酯 (12.5 g, 39.6 mmol) 及 LiOH (4.75 g, 198 mmol) 在四氫呋喃 (100 mL) 及水 (100 mL) 中之溶液

在室溫攪拌 4 小時。用 1 M 氯化氫將 pH 調節為 4 至 5 並用乙酸乙酯萃取。合併之有機層經無水硫酸鈉乾燥，並在真空下濃縮，以產生 13 g (粗產物) 標題化合物。LC-MS：(ESI, m/z)：[M+Na]⁺= 324。

【0252】 步驟 7：(2*S*,4*R*)-*N*-((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)-1-((*R*)-2-(3-(2,2-二乙氧基乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁酰基)-4-羥基吡咯啉-2-甲酰胺



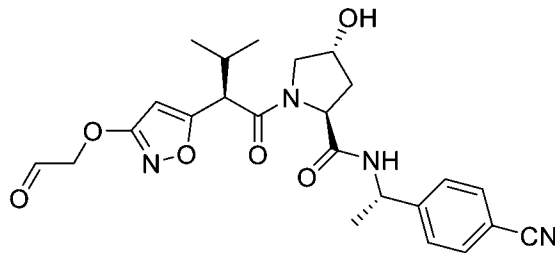
將 (2*S*,4*R*)-*N*-((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)-4-羥基吡咯啉-2-甲酰胺 (氯化氫鹽) (3.00 g，來自步驟 4 的粗產物)、2-(3-(2,2-二乙氧基乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁酸 (3.00 g, 9.96 mmol)、HATU (4.56 g, 12.0 mmol) 及 DIPEA (3.85 g, 29.8 mmol) 在 DMF (30 mL) 中之溶液在室溫攪拌 30 分鐘。粗產物藉由預填充之 C18 管柱 (溶劑梯度：在水 (0.05% NH₄HCO₃) 中的 0-100% ACN) 純化，以得到 4.3 g 兩種異構物的黃色固體狀混合物。混合物藉由手性製備型 SFC 分離，使用以下條件：管柱：CHIRALPAK IG-3，3.0*50mm, 3μm；流動相 B：IPA(0.1%DEA)；流速：2 mL/min；梯度：等度 10% B；波長：220 nm，以產生 2.14 g (較快的峰，不需要的異構物) 及 2.6 g (較慢的峰，所需的異構物) 黃色固體。

【0253】 對於較快之峰 (不期望的異構物)：LC-MS：(ESI, m/z)：[M+Na]⁺ = 565。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 8.35(8.95) (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.85-7.70 (m, 2H), 7.52-7.30 (m, 2H), 6.08(6.16) (s, 1H), 5.10 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 5.06 – 4.83 (m, 1H), 4.79 (td, *J* = 5.2, 1.7 Hz, 1H), 4.55 – 4.29 (m, 1H), 4.27 – 4.19 (m, 1H), 4.12-3.99 (m, 2H), 3.73 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 3.67 – 3.38 (m, 6H), 2.34-

2.15 (m, 1H), 2.09 – 1.81 (m, 1H), 1.78-1.60 (m, 1H), 1.40-1.25 (m, 3H), 1.19-1.05 (m, 6H), 1.05-0.90 (m, 3H), 0.85-0.70 (m, 3H)。

【0254】對於較慢的峰 (所需的異構物)，LC-MS：(ESI, m/z)：[M+Na]⁺ = 565。 ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 8.46 (8.85) (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.83 – 7.72 (m, 2H), 7.45 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.13(5.92) (m, 1H), 5.09 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 4.98-4.82 (m, 1H), 4.79 (td, J = 5.2, 2.0 Hz, 1H), 4.39 – 4.28 (m, 1H), 4.24 (s, 1H), 4.07 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 3.80 – 3.59 (m, 4H), 3.56 – 3.39 (m, 3H), 2.29 – 2.13 (m, 1H), 2.05 – 1.65 (m, 2H), 1.45-1.25 (m, 3H), 1.20-1.00 (m, 6H), 0.93 (t, J = 6.9 Hz, 3H), 0.79 (dd, J = 9.4, 6.7 Hz, 3H)。

【0255】步驟 8：(2*S*,4*R*)-*N*-((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)-4-羥基-1-((*R*)-3-甲基-2-(3-(2-側氧乙氧基)異噁唑-5-基)丁醯基)吡咯啉-2-甲醯胺

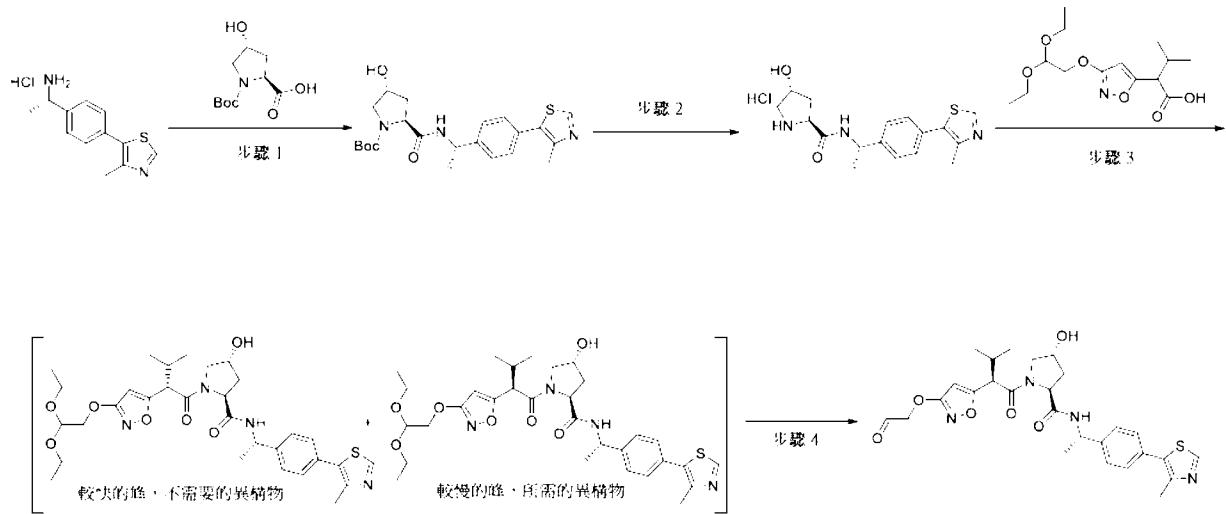


將 (2*S*,4*R*)-*N*-((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)-1-((*R*)-2-(3-(2,2-二乙氧基乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-4-羥基吡咯啉-2-甲醯胺 (300 mg, 0.550 mmol) 在四氫呋喃 (3 mL) 及 1 M H₂SO₄ (3 mL) 中之溶液在 50°C 攪拌 2 小時。將溶液冷卻，並藉由飽和碳酸氫鈉溶液將 pH 調節為 8。將產物用乙酸乙酯萃取。合併之有機層用鹽水洗滌，經硫酸鈉乾燥並在真空中濃縮，以產生 250 mg (粗產物) 白色固體狀標題化合物。LC-MS：(ESI, m/z)：[M+H]⁺ = 469。

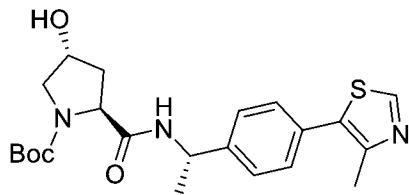
實例 3

E3LB 之部分的合成

【0256】 中間體 3：(2*S*,4*R*)-4-羥基-1-((*R*)-3-甲基-2-(3-(2-側氧乙氧基)異噁唑-5-基)丁醯基)-*N*-((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)吡咯啉-2-甲醯胺

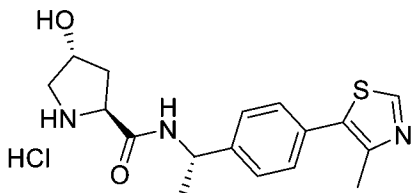


【0257】 步驟 1：(2*S*,4*R*)-4-羥基-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-甲酸三級丁酯



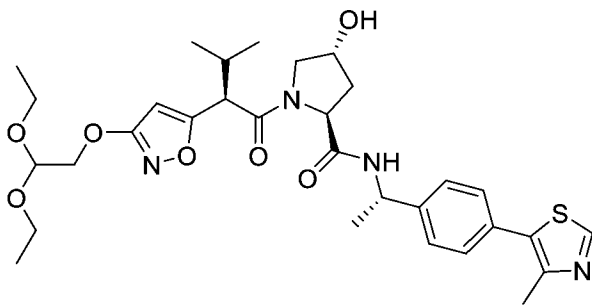
將 (*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙烷-1-胺 (鹽酸鹽) (10.0 g, 39.3 mmol)、(2*S*,4*R*)-1-(三級丁氧基羰基)-4-羥基吡咯啉-2-甲酸 (9.07 g, 39.2 mmol)、HATU (17.9 g, 47.0 mmol) 及 DIPEA (25.3 g, 195 mmol) 在 DMF (100mL) 中之溶液在室溫攪拌 1 小時。反應用 EtOAc 稀釋並用水洗滌。有機層經無水 Na₂SO₄ 乾燥並在減壓下濃縮。殘餘物藉由預填充之 C18 柱 (溶劑梯度：在水 (0.05% NH₄HCO₃) 中的 0-100% ACN) 純化，以產生 14.2 g (產率 83%) 灰白色固體狀標題化合物。LC-MS：(ESI, m/z)：[M+H]⁺= 432。

【0258】 步驟 2：(2*S*,4*R*)-4-羥基-*N*-((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)吡咯啉-2-甲醯胺 (鹽酸鹽)



將 (2*S*,4*R*)-4-羥基-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲酯基)吡咯啉-1-甲酸三級丁酯 (6.89 g, 13.5 mmol) 在 4 M HCl/二噁烷 (50 mL) 及二氯甲烷 (100 mL) 中之溶液在室溫攪拌 1 小時。將溶劑在真空下濃縮，以產生 5.8 g (粗產物) 白色固體狀標題化合物。LC-MS：(ESI, *m/z*)：[*M*+*H*]⁺= 332。

【0259】 步驟 3：(2*S*,4*R*)-1-((*R*)-2-(3-(2,2-二乙氧基乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-4-羥基-*N*-((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)吡咯啉-2-甲醯胺

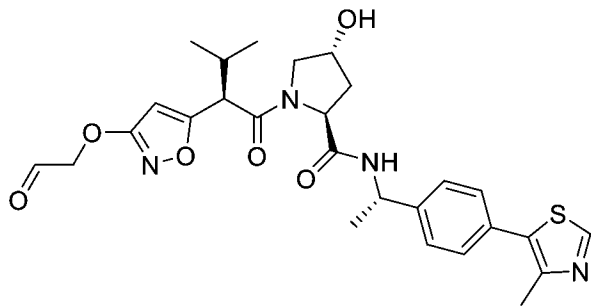


將 2-(3-(2,2-二乙氧基乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁酸 (4.80 g, 15.9 mmol)、(2*S*,4*R*)-4-羥基-*N*-((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)吡咯啉-2-甲醯胺 (5.78 g, 15.7 mmol)、HATU (7.29 g, 19.2 mmol) 及 DIPEA (6.19 g, 48.0 mmol) 在 DMF (60 mL) 中之溶液在室溫攪拌 30 分鐘。粗產物藉由預填充之 C18 管柱 (溶劑梯度：在水 (0.05% NH₄HCO₃) 中的 0-100% ACN) 純化，以得到 7.8 g 兩種異構物的黃色固體狀混合物。混合物藉由手性製備型 SFC 分離，使用以下條件：管柱：CHIRAL ART Amylose-SA，5 × 25 cm，5 μm；流動相 A：CO₂，流動相 B：MeOH；流速：200 mL/min；梯度：等度 40% B；管柱溫度 (°C)：35；背壓 (bar)：100；波長：220 nm；RT1 (分鐘)：2.61；RT2 (分鐘)：3.63；樣品溶劑：MeOH(0.1% 2M NH₃-MeOH)，以產生 2.57 g 較快的峰 (不需要的異構物) 及 3.00 g 較慢的峰 (需要的異構物)，其為黃色固體。

【0260】 對於較快之峰 (不期望的異構物) : LC-MS : (ESI, m/z) : $[M+H]^+$ = 615 ; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ 9.02 (s, 1H), 8.31 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.58 – 7.29 (m, 4H), 6.16(6.23) (s, 1H), 5.09 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 5.05 – 4.71 (m, 2H), 4.52 – 4.38 (m, 1H), 4.25 (s, 1H), 4.19-4.04 (m, 2H), 3.83 – 3.39 (m, 7H), 2.44 (d, J = 3.4 Hz, 3H), 2.32 – 1.74 (m, 3H), 1.54-1.30 (m, 3H), 1.23-1.09 (m, 6H), 1.08-0.73 (m, 6H)。

【0261】 對於較慢的峰 (所需的異構物) : LC-MS : (ESI, m/z) : $[M+H]^+$ = 615 ; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ 8.97 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 8.40 (8.80) (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.50 – 7.26 (m, 4H), 6.12(5.94) (s, 1H), 5.08 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 4.95-4.80 (m, 1H), 4.79 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 4.36 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 4.26 (s, 1H), 4.08 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 3.73 – 3.36 (m, 7H), 2.44 (d, J = 1.5 Hz, 3H), 2.29 – 1.96 (m, 2H), 1.80-1.65 (m, 1H), 1.50-1.30 (m, 3H), 1.20-1.05(m, 6H), 1.05-0.90 (m, 3H), 0.85-0.70 (m, 3H)。

【0262】 步驟 4 : (2*S*,4*R*)-4-羥基-1-((*R*)-3-甲基-2-(3-(2-側氧乙氧基)異噁唑-5-基)丁醯基)-*N*-((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)吡咯啉-2-甲醯胺



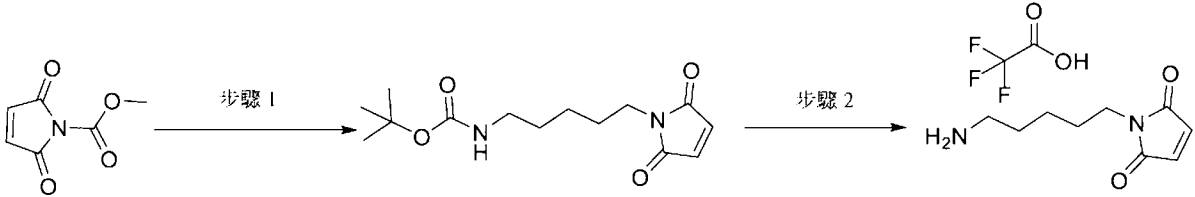
將 (2*S*,4*R*)-1-((*R*)-2-(3-(2,2-二乙氧基乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-4-羥基-*N*-((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)吡咯啉-2-甲醯胺 (300 mg, 0.490 mmol) 在四氫呋喃 (3 mL) 及 1 M H_2SO_4 (3 mL) 中之溶液在 50°C 攪拌 2 小時。將溶液冷卻並藉由飽和碳酸氫鈉溶液將 pH 調節為 8。將產物用乙酸乙酯萃

取。合併之有機層用鹽水洗滌，經無水硫酸鈉乾燥並在真空下濃縮，以產生 260 mg (粗產物) 白色固體狀標題化合物。LC-MS：(ESI, m/z): $[M+H]^+ = 541$ 。

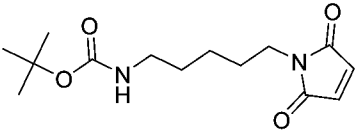
實例 4

可水解的連接子之部分的合成

【0263】 中間體 4：1-(5-胺基戊基)-1*H*-吡咯-2,5-二酮 (2,2,2-三氟乙酸)

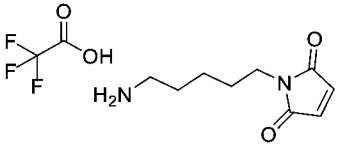


【0264】 步驟 1：(5-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)戊基)胺甲酸三級丁酯



在氮氣下，在 0°C 向 (5-胺基戊基)胺甲酸三級丁酯 (2.60 g, 12.8 mmol) 在二噁烷 (20 mL) 及飽和 NaHCO_3 (64 mL) 中之溶液中添加 2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-甲酸甲酯 (2.00 g, 12.9 mmol)。將溶液在 0°C 攪拌 40 分鐘。然後將反應混合物在室溫攪拌 1 小時。反應用乙酸乙酯萃取。有機層經無水硫酸鈉乾燥，並在真空下濃縮。將殘餘物藉由矽膠急速層析法 (梯度：0%-30% EtOAc/石油醚) 純化，以產生 2.00 g (產率 54%) 棕色油狀標題化合物。LC-MS：(ESI, m/z): $[M+H]^+ = 283$ 。

【0265】 步驟 2：1-(5-胺基戊基)-1*H*-吡咯-2,5-二酮 (2,2,2-三氟乙酸)



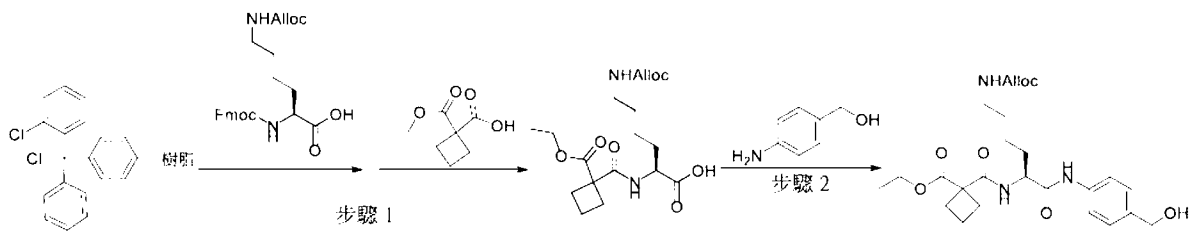
在氮氣下，將 (5-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)戊基)胺甲酸三級丁酯 (200 mg, 0.709 mmol) 在 TFA (0.5 mL) 及二氯甲烷 (2 mL) 中之溶液在室溫攪拌

30 分鐘。將所得混合物在真空下濃縮，以產生 270 mg (粗產物) 黃色油狀標題化合物。LC-MS：(ESI, m/z)：[M+H]⁺ = 183。

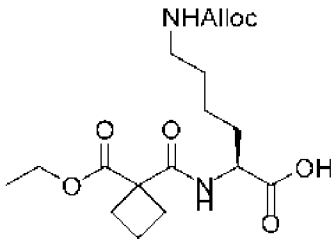
實例 5

可水解連接子部分的合成

【0266】 中間體 5：(S)-1-(((6-(((烯丙氧基)羰基)胺基)-1-((4-(羥基甲基)苯基)胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸乙酯



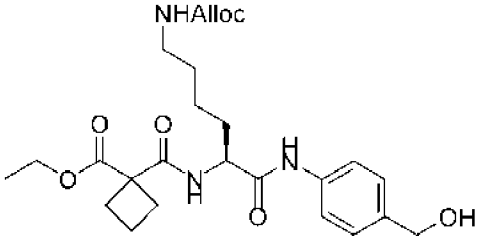
【0267】 步驟 1：N⁶-(((烯丙氧基)羰基)-N²-(1-(乙氧基羰基)環丁烷-1-羰基)-L-離胺酸



將 N²-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)-N⁶-(((烯丙氧基)羰基)-L-離胺酸 (900 mg, 1.98 mmol) 及 DIPEA (1 g, 7.75 mmol) 在 DCM (10 mL) 及 DMF (10 mL) 中之溶液添加至 2-氯三苯甲基氯樹脂 (2 g)。將混合物在室溫攪動 (agitate) 1 小時。添加 5 mL MeOH 並在室溫攪拌 0.5 小時。用 DMF 洗滌樹脂三次。添加哌啶 (4 mL) 及 DMF (16 mL) 之溶液並在室溫攪動 0.5 小時。然後用 DMF 洗滌四次。然後，在 0°C 向 1-乙氧基羰基環丁烷甲酸 (514 mg, 2.98 mmol) 及 DIPEA (771 mg, 5.97 mmol) 在 DMF (15 mL) 中之溶液中添加 HATU (1.1g, 2.89 mmol) 及 HOBt (454 mg, 2.98 mmol) 並在室溫攪拌 0.5 小時。將該溶液添加至上述樹脂中，在室溫攪拌 1 小時。使用 DMF 洗滌樹脂三次，然後使用 DCM 洗滌。將

樹脂在 HFIP (4 mL) 及 DCM (16 mL) 之溶液中攪動 1 小時。將樹脂過濾，並將濾液濃縮，以產生 900 mg (粗產物) 黃色油狀標題化合物。LCMS (ESI, m/z) $[M+H]^+ = 385$ 。

【0268】 步驟 2：(S)-1-((6-(((烯丙氧基)羰基)胺基)-1-((4-(羥基甲基)苯基)胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸乙酯

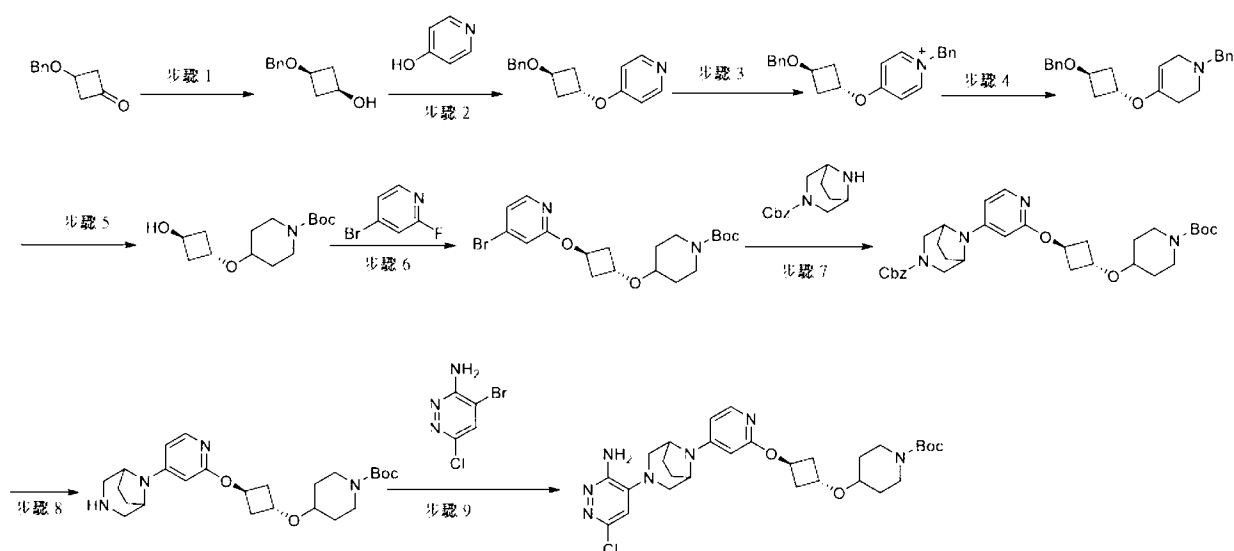


將 N^6 -((烯丙氧基)羰基)- N^2 -(1-(乙氧基羰基)環丁烷-1-羰基)- L -離胺酸 (4.2 g, 10.96 mmol)、(4-胺基苯基)甲醇 (1.48 g, 11.9 mmol)、EEDQ (5.41 g, 21.8 mmol) 在 DCM (40 mL) 及 MeOH (20 mL) 中之溶液在 30°C 攪拌 1 小時。將溶劑蒸發，並且粗產物藉由快速色譜法在矽膠上 (溶劑梯度：在 DCM 中的 0%-10% MeOH) 純化，以產生 2.6 g (產率 49%) 黃色油狀標題化合物。LCMS (ESI, m/z) $[M+H]^+ = 490$ 。

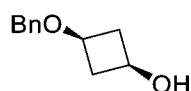
實例 6

連接子 L2 之部分的合成

【0269】 中間體 6：4-((1*r*,3*r*)-3-((4-(3-(3-氨基-6-氯嘓啉-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧)環丁氧基)哌啶-1-甲酸三級丁酯



步驟 1：(1*S*,3*S*)-3-(苄氧基)環丁烷-1-醇



在氮氣下，在 0°C 向 3-(苄氧基)環丁烷-1-酮 (10.0 g, 56.8 mmol) 在甲醇 (100 mL) 中之溶液中添加 NaBH₄ (2.15 g, 56.9 mmol)。將所得溶液在 0°C 攪拌 1 小時。反應用水淬滅並用 EtOAc 萃取。將有機層合併，經無水硫酸鈉乾燥，並在真空下濃縮。將殘餘物藉由矽膠急速層析法 (溶劑梯度：0-50% 乙酸乙酯/石油醚) 純化，以產生 9.85 g (產率 97.4%) 無色油狀標題化合物。LC-MS：(ESI, *m/z*)：[*M*+*H*]⁺ = 179。

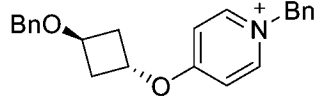
【0270】 步驟 2：4-((1*r*,3*r*)-3-(苄氧基)環丁氧基)吡啶



在氮氣下，在 0°C 向 (1*S*,3*S*)-3-(苄氧基)環丁烷-1-醇 (11.0 g, 61.7 mmol)、吡啶-4-醇 (8.80 g, 92.5 mmol) 及 PPh₃ (19.4 g, 74.2 mmol) 在四氫呋喃 (110 mL) 中之溶液中添加 DIAD (14.9 g, 74.1 mmol)。將反應在 50°C 攪拌 2 小時。將有機層在真空下濃縮。將所得溶液用水稀釋，並用二氯甲烷萃取。將有機層合併，經無水硫酸鈉乾燥，並在真空下濃縮。將殘餘物藉由矽膠急速層析法 (溶劑梯

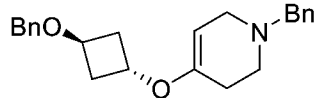
度：0-50% 乙酸乙酯/石油醚) 純化，以產生 15.0 g (粗產物) 黃色油狀標題化合物。LC-MS：(ESI, m/z)：[$M+H$] $^{+}$ = 256。

【0271】 步驟 3：1-苄基-4-((1*r*,3*r*)-3-(苄氧基)環丁氧基)吡啶-1-鎗 (ium)



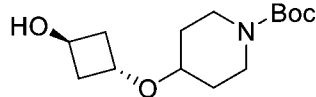
在氮氣下，將 4-((1*r*,3*r*)-3-(苄氧基)環丁氧基)吡啶 (7.00 g, 粗產物) 及 BnBr (4.69 g, 27.4 mmol) 在甲苯 (70 mL) 中之溶液在 80°C 攪拌過夜。將溶液在真空下濃縮。添加石油醚並攪拌溶液直至有白色固體沉澱。過濾後，收集固體，以得到 7.86 g 白色固體狀標題化合物。LC-MS：(ESI, m/z)：[M] $^{+}$ = 346。

【0272】 步驟 4：1-苄基-4-((1*r*,3*r*)-3-(苄氧基)環丁氧基)-1,2,3,6-四氫吡啶



在氮氣下，在 0°C 向 1-苄基-4-((1*r*,3*r*)-3-(苄氧基)環丁氧基)吡啶-1-鎗 (7.50 g, 21.7 mmol) 在乙醇 (75 mL) 中之溶液中添加 NaBH₄ (4.90 g, 129 mmol)。將所得溶液在室溫攪拌 1 小時。所得溶液用乙酸乙酯稀釋並用水洗滌。有機層經無水硫酸鈉乾燥，並在真空下濃縮。將殘餘物藉由矽膠急速層析法 (梯度：0-100% 乙酸乙酯/石油醚) 純化，以產生 4.13 g (產率 55.1%) 黃色油狀標題化合物。LC-MS：(ESI, m/z)：[$M+H$] $^{+}$ = 350。

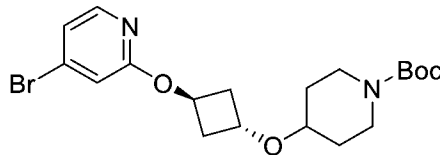
【0273】 步驟 5：4-((1*r*,3*r*)-3-羥基環丁氧基)哌啶-1-甲酸三級丁酯



在氮氣 (3 atm) 下，將 1-苄基-4-((1*r*,3*r*)-3-(苄氧基)環丁氧基)-1,2,3,6-四氫吡啶 (4.00 g, 11.4 mmol)、Boc₂O (7.49 g, 34.3 mmol)、20% Pb(OH)₂/C (800 mg) 及 10 % Pd/C (800 mg) 在甲醇 (400 mL) 中之溶液在室溫攪拌 48 小時。將反應混合物過濾，並在真空下濃縮濾液。將殘餘物藉由矽膠急速層析法 (溶劑梯度：0-

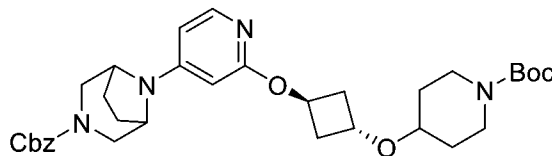
100% 乙酸乙酯/石油醚) 純化，以產生 900 mg (產率 28.9%) 白色固體狀標題化合物。LC-MS：(ESI, m/z)：[M+H]⁺ = 272。

【0274】 步驟 6：4-((1*r*,3*r*)-3-((4-溴吡啶-2-基)氧)環丁氧基)哌啶-1-甲酸三級丁酯



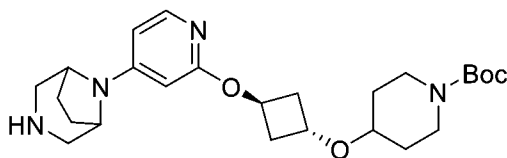
在氮氣下，將 4-((1*r*,3*r*)-3-羥基環丁氧基)哌啶-1-甲酸三級丁酯 (3.27 g, 12.0 mmol)、4-溴-2-氟-吡啶 (3.92 g, 22.4 mmol) 及 Cs₂CO₃ (7.81 g, 24.0 mmol) 在 ACN (150 mL) 中之溶液在 90°C 攪拌 12 小時。過濾固體，並在真空下濃縮濾液。將殘餘物藉由矽膠急速層析法 (溶劑梯度：0-30% 乙酸乙酯/石油醚) 純化，以產生 4.50 g (產率 87%) 白色固體狀標題化合物。LC-MS：(ESI, m/z)：[M+H]⁺ = 427。

【0275】 步驟 7：8-(2-((1*r*,3*r*)-3-((1-(三級丁氧基羰基)哌啶-4-基)氧)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-甲酸苄酯



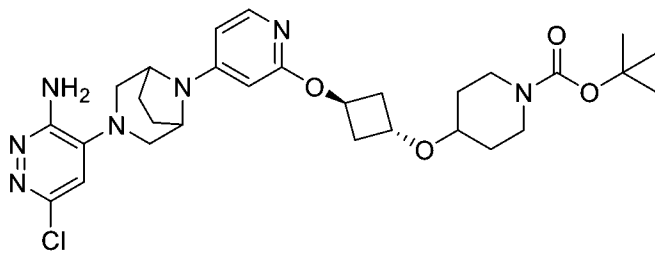
在氮氣下，將 4-((1*r*,3*r*)-3-((4-溴吡啶-2-基)氧)環丁氧基)哌啶-1-甲酸三級丁酯 (4.50 g, 10.5 mmol)、3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-甲酸苄酯 (3.23 g, 13.1 mmol)、Cs₂CO₃ (16.7 g, 51.6 mmol) 及 Ruphos Pd G2 (1.73 g, 2.22 mmol) 在甲苯 (300 mL) 中之溶液在 90°C 攪拌 12 小時。將溶液在真空下濃縮。將殘餘物藉由矽膠急速層析法 (溶劑梯度：0-30% 乙酸乙酯/石油醚) 純化，以得到 4.70 g (產率 75.2 %) 白色固體狀標題化合物。LC-MS：(ESI, m/z)：[M+H]⁺ = 593。

【0276】 步驟 8：4-((1*r*,3*r*)-3-((4-(3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧)環丁氧基)吡啶-1-甲酸三級丁酯



在氬氣 (3 atm) 下，將 8-(2-((1*r*,3*r*)-3-((1-(三級丁氧基羰基)吡啶-4-基)氧)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-甲酸苄酯 (260 mg, 0.438 mmol)、20% Pb(OH)₂/C (61.6 mg) 在乙醇 (40 mL) 及 THF (40 ml) 中之溶液在 60°C 攪拌 3 小時。過濾後，收集濾液並在真空下濃縮，以得到 220 mg (粗產物) 黑色固體狀標題化合物。LC-MS：(ESI, *m/z*)：[*M*+*H*]⁺ = 459。

【0277】 步驟 9：4-((1*r*,3*r*)-3-((4-(3-(3-氨基-6-氯嘧啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧)環丁氧基)吡啶-1-甲酸三級丁酯



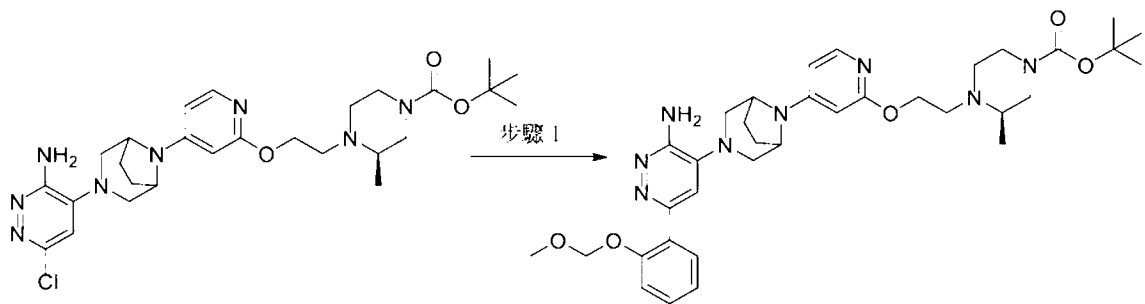
在氬氣下，將 4-溴-6-氯-嘧啶-3-胺 (0.60 g, 2.98 mmol)、4-((1*r*,3*r*)-3-((4-(3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧)環丁氧基)吡啶-1-甲酸三級丁酯 (1.10 g, 2.40 mmol) 及 DIPEA (3.10 g, 24.0 mmol) 在 DMSO (15 mL) 中之溶液在 130°C 攪拌 18 小時。將反應混合物用乙酸乙酯稀釋並用水洗滌。有機層經無水硫酸鈉乾燥並在真空下濃縮。殘餘物藉由預填充之 C18 柱 (溶劑梯度：在水 (0.05% NH₃·H₂O) 中的 0-100% ACN) 純化，以產生 1.10 g (產率 78%) 白色固體狀標題化合物。LC-MS：(ESI, *m/z*)：[*M*+*H*]⁺ = 586。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, *ppm*) δ 7.76 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 6.90 (s, 1H), 6.50 (dd, *J* = 6.1, 2.1 Hz, 1H), 6.12 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 5.85 (s, 2H), 5.26 – 5.12 (m, 1H), 4.45 (s, 2H), 4.31 (p, *J* = 6.0 Hz, 1H), 3.66 (dt, *J* = 13.4, 4.7 Hz, 2H), 3.50-3.37 (m, 1H), 3.18 (d, *J* = 11.5

Hz, 2H), 2.92 (dd, J = 35.6, 11.5 Hz, 4H), 2.40 – 2.21 (m, 4H), 2.13 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 1.97 – 1.88 (m, 2H), 1.80 – 1.70 (m, 2H), 1.39 (s, 9H), 1.33-1.20 (m, 2H)。

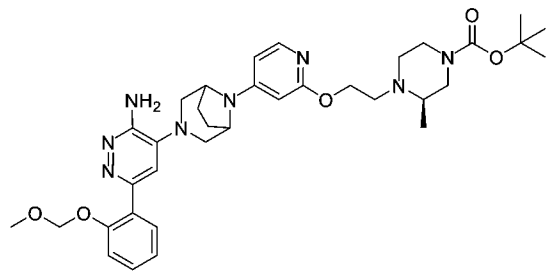
實例 7

連接子 L2 及 PB 之部分的合成

【0278】 中間體 7：(3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-(甲氧基甲氧基)苯基)嗒咩-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧)乙基)-3-甲基哌咩-1-甲酸三級丁酯



【0279】 步驟 1：(3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-(甲氧基甲氧基)苯基)嗒咩-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧)乙基)-3-甲基哌咩-1-甲酸三級丁酯



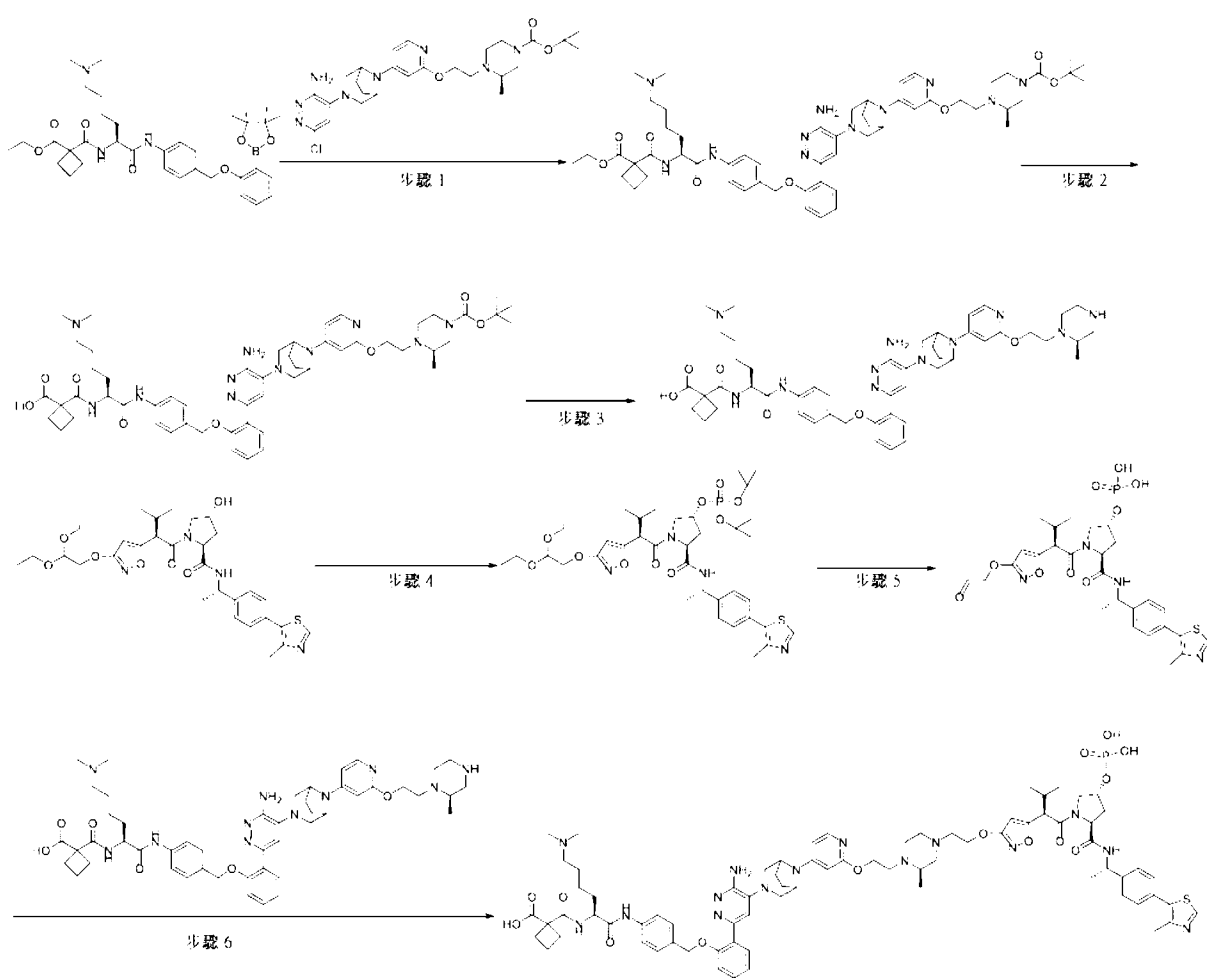
在氮氣下，將 (3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-氯嗒咩-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧)乙基)-3-甲基哌咩-1-甲酸三級丁酯 (1.00 g, 1.79 mmol, 由建南德克公司提供)、(2-(甲氧基甲氧基)苯基)硼酸 (391 mg, 2.15 mmol)、Pd(PPh₃)₄ (413 mg, 0.358 mmol) 及 K₂CO₃ (741 mg, 5.37 mmol) 在二噁烷 (10 mL) 及水 (2 mL) 中之溶液在 100°C 攪拌 1 小時。將反應用水稀釋，並用二氯甲烷萃取。將有機層合併，經無水硫酸鈉乾燥，並在真空下濃縮。將殘餘物

藉由矽膠急速層析法 (溶劑梯度：0%-10% MeOH/DCM) 純化，以得到 670 mg (產率 57%) 黃色固體狀標題化合物。LC-MS：(ESI, m/z)：[M+H]⁺ = 661。 ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 7.76 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H), 7.58 (dd, *J* = 7.6, 1.8 Hz, 1H), 7.34 (ddd, *J* = 9.0, 7.3, 1.8 Hz, 1H), 7.18 – 7.01 (m, 3H), 6.51 (dd, *J* = 6.1, 2.0 Hz, 1H), 6.12 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 5.72 (s, 2H), 5.14 (s, 2H), 4.47 (s, 2H), 4.25 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 3.53 (d, *J* = 12.8 Hz, 2H), 3.22 (s, 3H), 3.14 – 2.67 (m, 8H), 2.64-2.56 (m, 1H), 2.46-2.36 (m, 1H), 2.32-2.22 (m, 1H), 2.22-2.13 (m, 2H), 2.00-1.90 (m, 2H), 1.38 (s, 9H), 0.96 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H)。

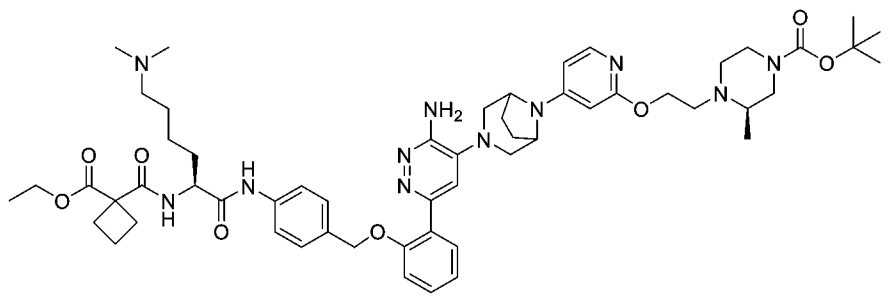
實例 8

可水解的連接子、PB 及連接子 L2 之部分的合成

【0280】 中間體 8：1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-2-甲基-4-(2-((5-((*R*)-3-甲基-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)-4-(磷醯氧基)吡咯啉-1-基)-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)乙基)哌啶-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒啶-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸



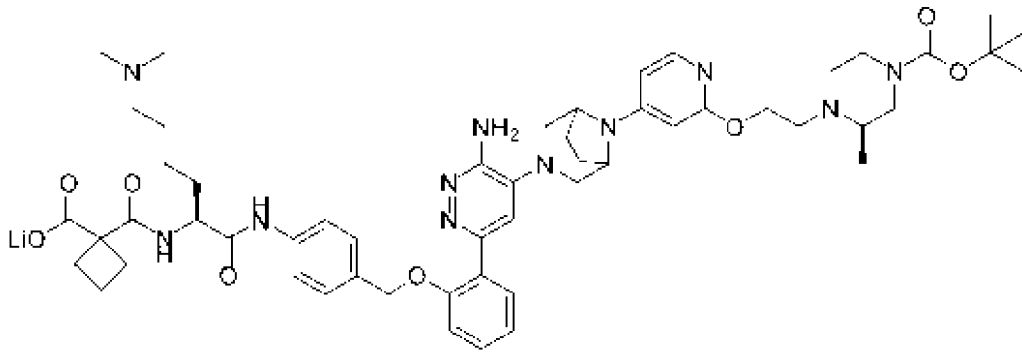
【0281】 步驟 1：(3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-((4-((*S*)-6-(二甲胺基)-2-(1-(乙氧基羰基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基)氧基)苯基)嗒咩-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌咩-1-羧酸三級丁酯



在氮氣下，將 (*S*)-1-((6-(二甲基胺基)-1-側氧-1-((4-((2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧雜環戊硼烷-2-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸乙酯 (316 mg, 0.570 mmol)、(3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-氯嗒咩-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌咩-1-甲酸三級丁酯 (538 mg, 0.850 mmol)、K₃PO₄ (240 mg, 1.13mmol) 及 Ad₂nBuPPdG₂ (37.8 mg, 0.0600

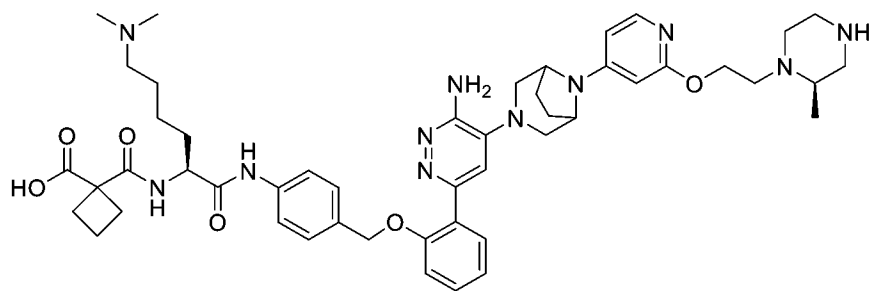
mmol) 在 1,4-二噁烷 (4 mL) 及水 (1 mL) 中之溶液在 95°C 攪拌 3 小時。添加水並使用 EtOAc 萃取三次。合併有機溶劑，並在真空下濃縮。殘餘物藉由預填充之 C18 柱 (溶劑梯度：0-100% ACN 於水 (0.05% NH_4HCO_3) 中) 純化，以得到 230 mg (產率 39%) 紅色固體狀標題化合物。LCMS (ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 1032$ 。

【0282】 步驟 2：1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(三級丁氧基羰基)-2-甲基哌啶-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒啶-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸鋰



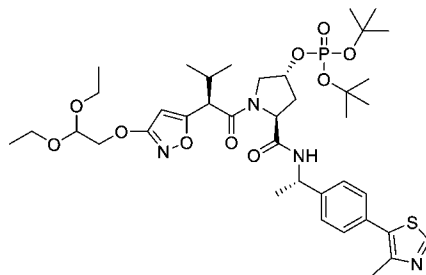
將 (3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-((4-((*S*)-6-(二甲基胺基)-2-(1-(乙氧基羰基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基)氧)苯基)嗒啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧)乙基)-3-甲基哌啶-1-甲酸三級丁酯 (210 mg, 0.200 mmol) 及 $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (25.6 mg, 0.610 mmol) 在四氫呋喃 (3 mL) 及水 (1 mL) 中之溶液在室溫攪拌 1 小時。在真空下濃縮溶劑，以得到 254 mg (粗產物) 黃色固體狀標題化合物。

【0283】 步驟 3：1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-2-甲基哌啶-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒啶-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸



將 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(三級丁氧基羰基)-2-甲基哌啶-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒啉-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸鋰 (254 mg, 0.250 mmol) 在 5% TFA/HFIP (20 mL) 中之溶液在室溫攪拌 3 小時。將溶劑在真空下濃縮。殘餘物藉由預填充之 C18 柱 (溶劑梯度：0-100% MeOH 於水 (0.05% NH₄HCO₃) 中) 純化，以得到 102 mg (產率 44%) 紅色固體狀標題化合物。LCMS (ESI, *m/z*) [M+H]⁺ = 905。

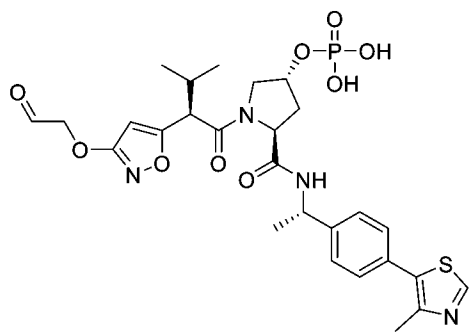
【0284】 步驟 4：((3*R*,5*S*)-1-((*R*)-2-(3-(2,2-二乙氧基乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-5-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-3-基)磷酸二-三級丁酯



在氮氣下，在 0°C 向 (2*S*,4*R*)-1-((*R*)-2-(3-(2,2-二乙氧基乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-4-羥基-*N*-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)吡咯啉-2-甲醯胺 (500 mg, 0.81 mmol) 及 1*H*-四唑 (5.4 mL，在 ACN 中的 0.45 M) 在 THF (5 mL) 中之溶液中逐滴添加二異丙基亞磷醯胺二-三級丁酯 (451 mg, 1.63 mmol)。將反應在室溫攪拌過夜。然後在 -30°C 添加 tBuOOH (0.4 mL，在癸烷中的 5 M) 並在 -30°C 攪拌 30 分鐘。然後將混合物在室溫攪拌 4 小時。反應用水性 NaHSO₃ 淬滅，並用 EtOAc 萃取。合併之有機層用水及鹽水洗滌。有機層經無

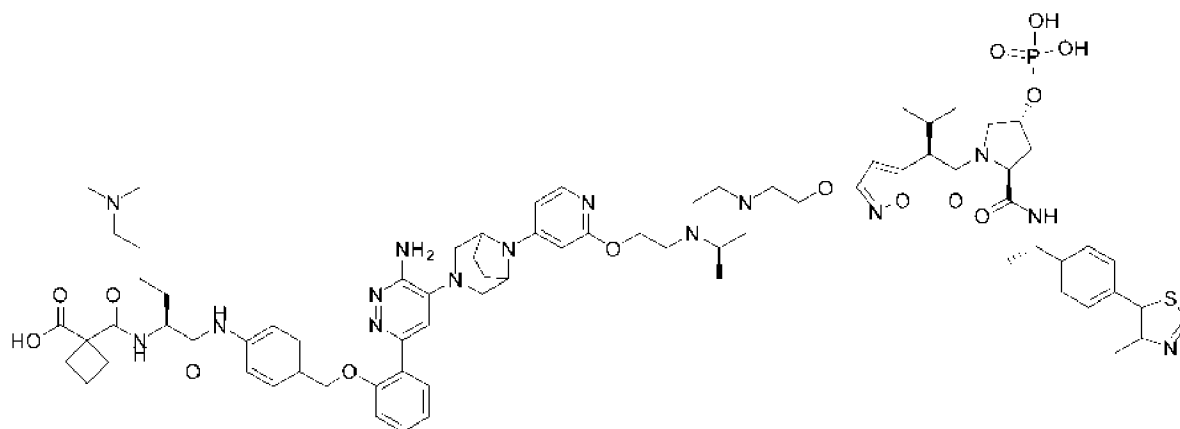
水硫酸鈉乾燥，並在真空下濃縮。殘餘物藉由預填充之 C18 柱 (溶劑梯度：在水 (0.05% NH_4HCO_3) 中的 0-70% ACN) 純化，以產生 340 mg (51%) 黃色油狀標題化合物。LC-MS：(ESI, m/z)：[M+H]⁺ = 807。

【0285】 步驟 5：(3*R*,5*S*)-1-((*R*)-3-甲基-2-(3-(2-側氧乙氧基)異噁唑-5-基)丁醯基)-5-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-3-基二氫磷酸鹽



在氮氣下，將 ((3*R*,5*S*)-1-((*R*)-2-(3-(2,2-二乙氧基乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-5-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-3-基)磷酸二-三級丁酯 (150 mg, 0.185 mmol) 在 HCOOH (0.5 mL) 及水 (0.5 mL) 中之溶液在 60°C 攪拌 1 小時。將溶液在真空下濃縮，以得到 121 mg (粗產物) 固體狀標題化合物。LC-MS：(ESI, m/z)：[M+H]⁺ = 695。

【0286】 步驟 6：1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-2-甲基-4-(2-((5-((*R*)-3-甲基-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)-4-(膦醯氧基)吡咯啉-1-基)-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)乙基)哌啶-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒啶-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸

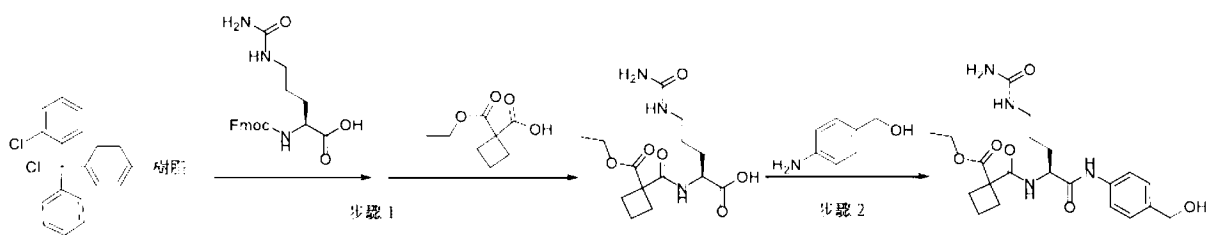


將 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-2-甲基哌啶-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒啉-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (100 mg, 0.110 mmol)、(3*R*,5*S*)-1-((*R*)-3-甲基-2-(3-(2-側氧乙氧基)異噁唑-5-基)丁醯基)-5-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啶-3-基二氫磷酸鹽 (121 mg, 0.190 mmol) 及 NaOAc (13.6 mg, 0.170 mmol) 在甲醇 (1.2 mL) 及二氯甲烷 (0.4 mL) 中之溶液在室溫攪拌 1 小時。然後添加 NaBH₃CN (34.7 mg, 0.550 mmol) 並在室溫攪拌 0.5 小時。添加水以淬滅反應。將溶劑在真空下濃縮。殘餘物藉由製備型 HPLC (管柱：YMC-Actus Triart C18 ExRS, 30 × 150 mm, 5 μm；流動相 A：水 (10 mmol/L NH₄HCO₃), 流動相 B：ACN；流速：60 mL/min；梯度：在 9 分鐘內由 36% B 至 60% B，保持 60% B；波長：254/220 nm；R_T (min)：7.63) 純化，以產生 30.0 mg (產率 18%) 白色固體狀標題化合物。LCMS (ESI, m/z)：[M+H]⁺ = 1509。

實例 9

可水解連接子部分的合成

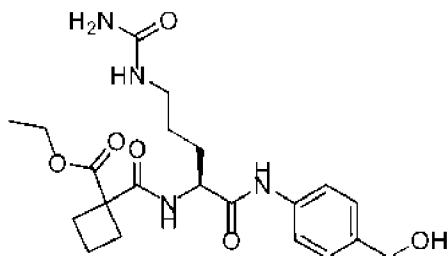
【0287】 中間體 9：(*S*)-1-((6-(((烯丙氧基)羰基)胺基)-1-((4-(羥基甲基)苯基)胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸乙酯



【0288】 步驟 1：(S)-2-(1-(乙氧基羰基)環丁烷-1-甲醯胺基)-5-脲基戊酸

將 Fmoc-CIT-OH(4.00 g, 10.0 mmol) 及 DIPEA (5.20 g, 40.3 mmol) 在 DCM (40 mL) 及 DMF(40 mL) 中之溶液添加至 2-氯三苯甲基氯樹脂 (10.0 g)。將混合物攪動 1 小時。添加 8 mL MeOH 並將所得溶液在室溫攪拌 0.5 小時。使用 DMF 洗滌樹脂三次。添加吡啶 (15 mL) 及 DMF (60 mL) 之溶液，並在室溫攪拌 0.5 小時。然後用 DMF 洗滌四次。然後，在 0°C 向 1-乙氧基羰基環丁烷甲酸 (2.60 g, 15.1 mmol) 及 DIPEA (3.90 g, 30.2 mmol) 在 DMF (60 mL) 中之溶液中添加 HATU (5.70 g, 15.0 mmol) 及 HOBt (2.30 g, 15.1 mmol) 並將反應在室溫攪拌 0.5 小時。將所得溶液添加至上述樹脂中，在室溫攪拌 1 小時。使用 DMF 洗滌樹脂三次，然後使用 DCM 洗滌。將樹脂在 HFIP (15 mL) 及 DCM (60 mL) 之溶液中攪動 1 小時。將樹脂過濾，並將濾液濃縮，以產生 3.7 g (粗產物) 黃色油狀標題化合物。LCMS (ESI, m/z) [M+H]⁺ = 329。

【0289】 步驟 2：(S)-1-(((1-((4-(羥基甲基)苯基)胺基)-1-側氧-5-脲基戊烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸乙酯



將 (S)-2-(1-(乙氧基羰基)環丁烷-1-甲醯胺基)-5-脲基戊酸 (3.20 g, 9.73 mmol)、(4-胺基苯基)甲醇 (1.32 g, 10.6 mmol)、EEDQ (4.81 g, 19.4 mmol) 在 DCM (20 mL) 及 MeOH (10 mL) 中之溶液在 30°C 攪拌 2 小時。將蒸溶劑發，並

且粗產物藉由快速色譜法在矽膠上 (溶劑梯度：0-20% MeOH/DCM) 純化，以產生 1.75 g 棕色油狀標題化合物。LCMS (ESI) [M+H]⁺ = 434。

實例 10

可水解連接子部分的合成

【0290】 中間體 10：1-(((2S)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((R)-4-(2-((5-((R)-1-((2S,4R)-4-羥基-2-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)乙基)-2-甲基哌啶-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒啉-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸



【0291】 步驟 1：1-(((2S)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((R)-4-(2-((5-((R)-1-((2S,4R)-4-羥基-2-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)乙基)-2-甲基哌啶-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒啉-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸



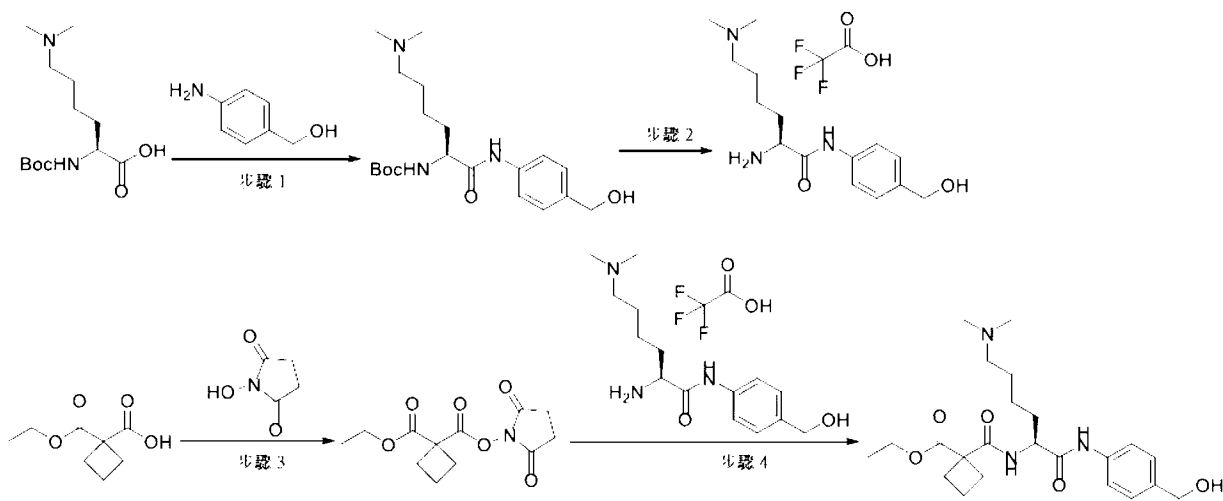
將 1-(((2S)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((R)-2-甲基哌啶-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒啉-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (102 mg, 0.110mmol)、

(2*S*,4*R*)-4-羥基-1-((*R*)-3-甲基-2-(3-(2-側氧乙氧基)異噁唑-5-基)丁醯基)-*N*-((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)吡咯啉-2-甲醯胺 (61.0 mg, 0.110mmol) 及 CH₃COOH (13.6 mg, 0.230 mmol) 在甲醇 (1.2 mL) 及二氯甲烷 (0.4 mL) 中之溶液在室溫攪拌 1 小時。然後添加 NaBH₃CN (21.3 mg, 0.340 mmol) 並在室溫攪拌 0.5 小時。添加水以淬滅反應。在真空下濃縮溶劑。殘餘物藉由預填充之 C18 柱 (溶劑梯度：0-100% MeOH 於水 (0.05% NH₄HCO₃) 中) 純化，以得到 80.0 mg (產率 49%) 黃色固體狀標題化合物。LCMS (ESI, *m/z*) [M+H]⁺ = 1429。

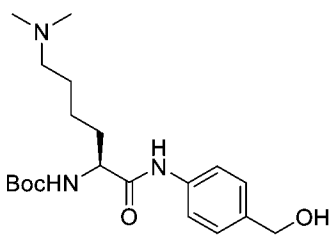
實例 11

可水解連接子部分的合成

【0292】 中間體 11：(*S*)-1-((6-(二甲基胺基)-1-((4-(羥基甲基)苯基)胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸乙酯

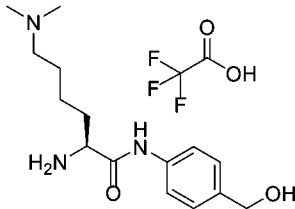


【0293】 步驟 1：(*S*)-(6-(二甲基胺基)-1-((4-(羥基甲基)苯基)胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲酸三級丁酯



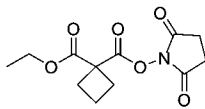
在氮氣下，將 N^2 -(三級丁氧基羰基)- N^6,N^6 -二甲基- L -離胺酸 (5.00 g, 18.2 mmol)、(4-胺基苯基)甲醇 (2.46 g, 20.1 mmol) 及 2-乙氧基喹啉-1(2*H*)-甲酸乙酯 (9.01 g, 36.5 mmol) 在 MeOH (50 mL) 及和 DCM (20 mL) 中之溶液在 30°C 攪拌過夜。在真空下濃縮溶劑。將殘餘物藉由矽膠急速層析法 (溶劑梯度：0-20% EtOAc/石油醚) 純化，以產生 2.32 g (產率 33%) 白色固體狀標題化合物。LCMS (ESI)：[M+H]⁺ = 380。

【0294】 步驟 2：(S)-2-胺基-6-(二甲基胺基)- N -(4-(羥基甲基)苯基)己醯胺 (2,2,2-三氟乙酸鹽)



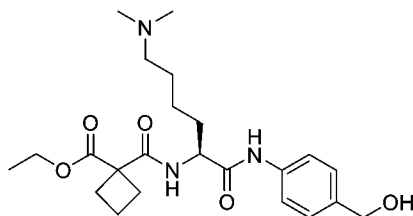
將 (S)-(6-(二甲基胺基)-1-((4-(羥基甲基)苯基)胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲酸三級丁酯 (2.20 g, 5.78 mmol) 在 CH₂Cl₂ (15 mL) and TFA (5 mL) 中之溶液在室溫攪拌 1 小時。將溶劑在真空下濃縮，並且粗產物直接用於下一步驟。LC-MS：(ESI, m/z)：[M+H]⁺ = 280。

【0295】 步驟 3：環丁烷-1,1-二甲酸 1-(2,5-二側氧吡咯啉-1-基) 1-乙酯



將 1-(乙氧基羰基)環丁烷-1-甲酸 (3.00 g, 17.4 mmol)、1-羥基吡咯啉-2,5-二酮 (2.21 g, 19.2 mmol) 及 DCC (3.95 g, 19.2 mmol) 在 THF (50 mL) 中之溶液在室溫攪拌 5 小時。將反應混合物過濾，將濾液在真空下濃縮，以產生 5.19 g (粗產物) 黃色油狀標題化合物。LC-MS：(ESI, m/z)：[M+H]⁺ = 270。

【0296】 步驟 4：(S)-1-((6-(二甲基胺基)-1-((4-(羥基甲基)苯基)胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸乙酯

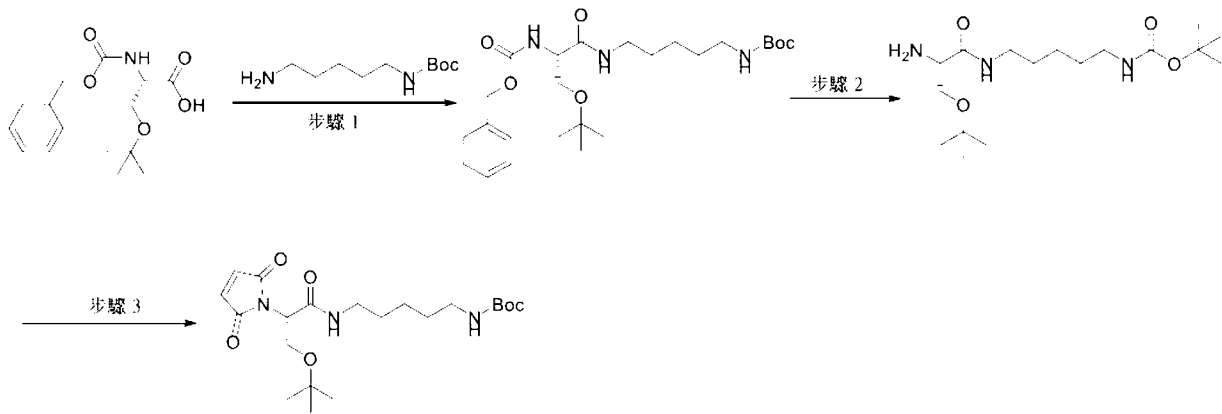


將 (S)-2-胺基-6-(二甲基胺基)-N-(4-(羥基甲基)苯基)己醯胺 (2.9 g, 10.4 mmol) 及 NaHCO_3 (2.27 g, 83.2 mmol) 在 H_2O (30 mL) 中之溶液在室溫攪拌 30 分鐘。然後，添加環丁烷-1,1-二甲酸 1-(2,5-二側氧吡咯啶-1-基) 1-乙酯 (1.51 g, 15.5 mmol) 在 DME (30 mL) 中之溶液並在室溫攪拌過夜。將反應混合物過濾並將濾液在真空下濃縮。殘餘物藉由預填充之 C18 柱 (溶劑梯度：在水 (0.05% NH_4HCO_3) 中的 0-100% MeOH) 純化，以產生 1.26 g (產率 49%) 無色油狀標題化合物。LC-MS：(ESI, m/z)：[$\text{M}+\text{H}$] $^+$ = 434。 ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, ppm) δ 9.77 (s, 1H), 7.73 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.42 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.12 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 4.99 (s, 1H), 4.36 – 4.22 (m, 3H), 4.05 – 3.97 (m, 2H), 2.34 – 2.19 (m, 4H), 2.07 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 1.99 (s, 6H), 1.83 – 1.51 (m, 4H), 1.37 – 1.16 (m, 4H), 1.07 (d, J = 7.0 Hz, 3H)。

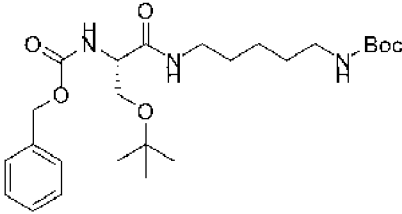
實例 12

可水解連接子部分的合成

【0297】 中間體 12：(S)-(5-(3-(三級丁氧基)-2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)丙醯胺基)戊基)胺甲酸三級丁酯

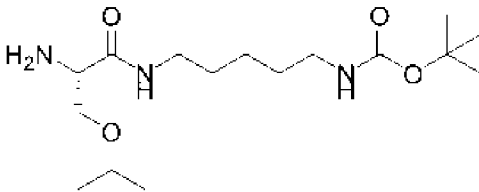


【0298】 步驟 1：(S)-(2,2,16,16-四甲基-4,12-二側氧-3,15-二氧雜-5,11-二氮雜十七烷-13-基)胺甲酸苄酯



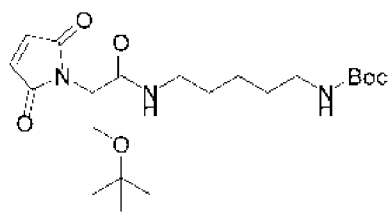
在氮氣下，將 *N*-((苄氧基)羰基)-*O*-(三級丁基)-*L*-絲胺酸 (1.00 g, 3.39 mmol)、(5-胺基戊基)胺甲酸三級丁酯 (684 mg, 3.39 mmol)、HATU (1.67 g, 4.40 mmol) 及 DIPEA (1.31 g, 10.1 mmol) 在 DMF (10 mL) 中之溶液在室溫攪拌 30 分鐘。反應藉由預填充之 C18 柱 (溶劑梯度：0-60% ACN 於水 (0.05% NH₄HCO₃) 中) 純化，以得到 980 mg (60%，產率) 白色固體狀標題化合物。LC-MS：(ESI, *m/z*)：[*M*+*H*]⁺ = 480。

【0299】 步驟 2：(S)-(5-(2-胺基-3-(三級丁氧基)丙醯胺基)戊基)胺甲酸三級丁酯



在氮氣 (3 atm) 下，將 (S)-(2,2,16,16-四甲基-4,12-二側氧-3,15-二氧雜-5,11-二氮雜十七烷-13-基)胺甲酸苄酯 (980 mg, 2.046 mmol) 及 10% Pd/C (196 mg) 在 MeOH (200 mL) 中之溶液在室溫攪拌 1 小時。將固體透過矽藻土墊濾出，並將濾液在減壓下濃縮，以產生 750 mg (粗產物) 黃色油狀標題化合物。LC-MS：(ESI, *m/z*)：[*M*+*H*]⁺ = 346。

【0300】 步驟 3：(S)-(5-(3-(三級-丁氧基)-2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)丙醯胺基)戊基)胺甲酸三級丁酯

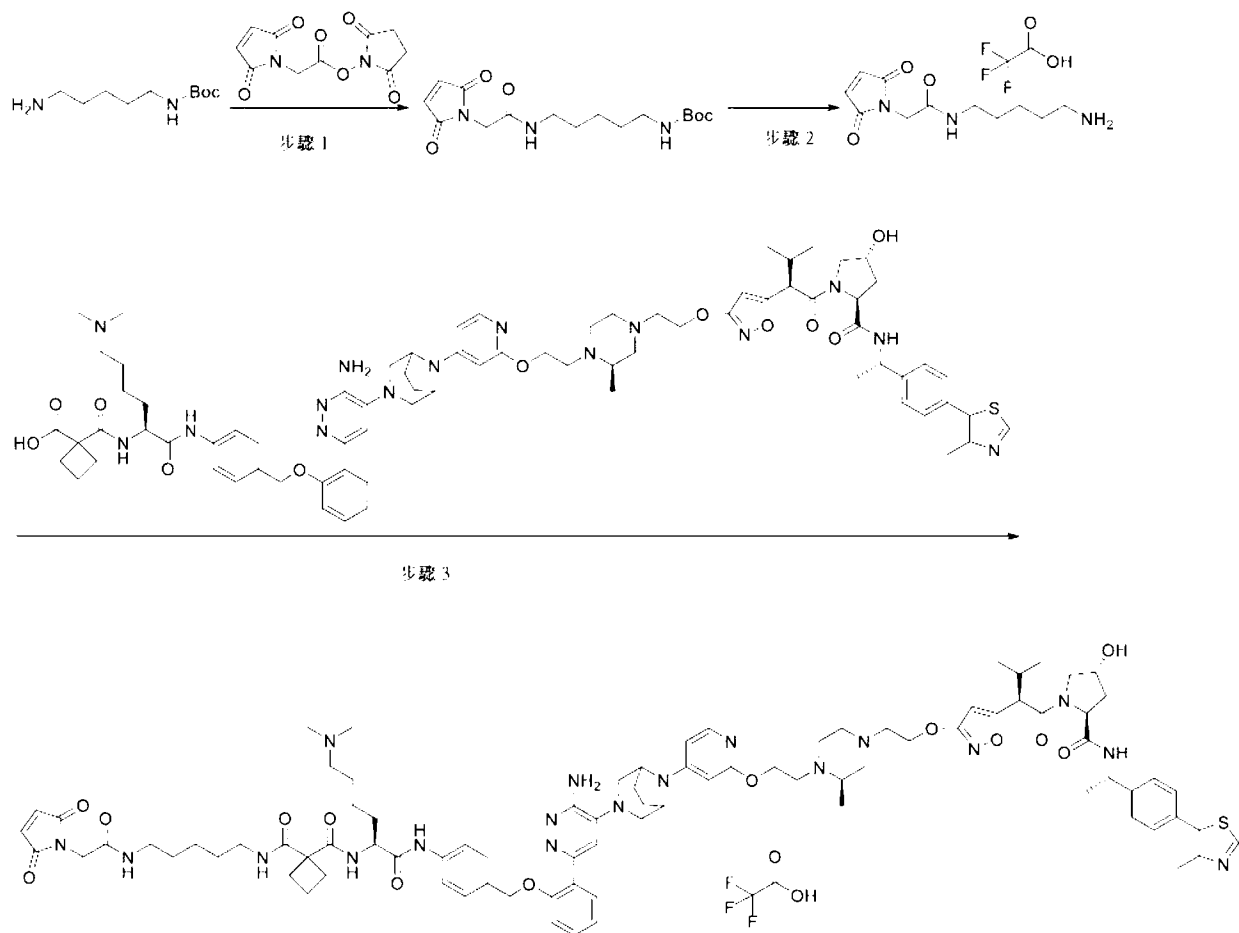


在氮氣下，在 0°C 向 (S)-(5-(2-胺基-3-(三級丁氧基)丙醯胺基)戊基)胺甲酸三級丁酯 (740 mg, 2.14 mmol) 及 NaHCO₃ (540 mg, 6.43 mmol) 在二噁烷 (5 mL) 及 H₂O (16 mL) 之溶液中添加 2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-甲酸甲基 (332 mg, 2.14 mmol)。將溶液在 0°C 攪拌 40 分鐘。然後將反應混合物在室溫攪拌 0.5 小時。使用乙酸乙酯萃取三次。將有機層合併，經無水硫酸鈉乾燥，並在真空下濃縮。將殘餘物藉由矽膠急速層析法 (梯度：0%-60% EtOAc/石油醚) 純化，以產生 540 mg (產率 59%) 無色油狀標題化合物。LC-MS：(ESI, m/z)：[M+H]⁺ = 426。

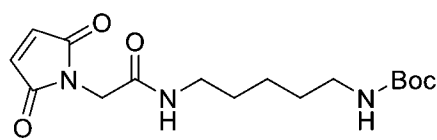
實例 13

Hy-B-CIDE-6 之合成

【0301】 *N*-((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-羥基-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)乙基)-2-甲基哌啶-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氫雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒啶-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)-*N*-(5-(2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)乙醯胺基)戊基)環丁烷-1,1-二甲醯胺 (2,2,2-三氟乙酸鹽)

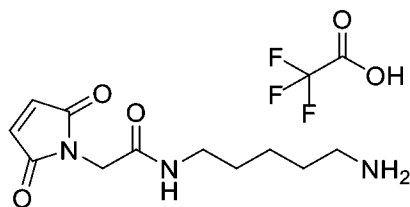


【0302】 步驟 1：(5-(2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)乙醯胺基)戊基)胺甲酸三級丁酯



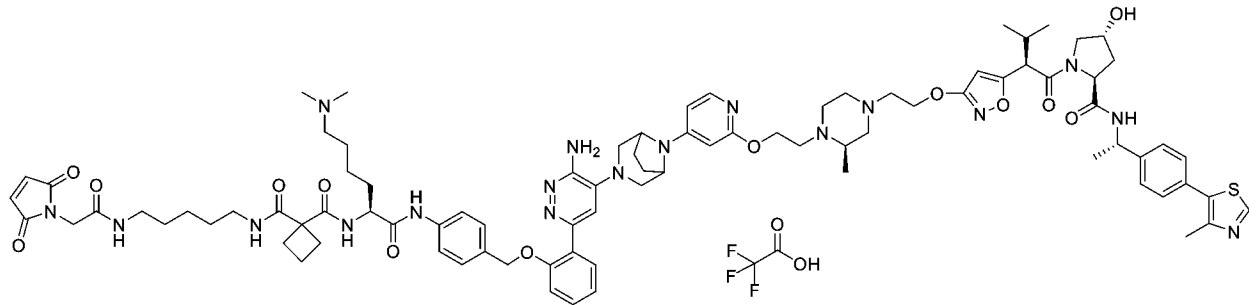
將 (5-胺基戊基)胺甲酸三級丁酯 (500 mg, 2.47 mmol) 及 2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)乙酸 2,5-二側氧吡咯啉-1-酯 (1.25 g, 4.94 mmol) 及 NMM (476 mg, 4.45mmol) 在 DMF (3 mL) 中之溶液在室溫攪拌 1 小時。殘餘物藉由預填充之 C18 柱 (溶劑梯度：在水 (0.05% TFA) 中的 0-100% ACN) 純化，然後藉由快速色譜法在矽膠上 (梯度：0%-10% MeOH/DCM) 再次純化，以產生 343 mg (產率 41%) 紅色油狀標題化合物。LCMS (ESI) [M+H]⁺ = 340。

【0303】 步驟 2：N-(5-胺基戊基)-2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)乙醯胺 (2,2,2-三氟乙酸鹽)



將 (5-(2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)乙醯胺基)戊基)胺甲酸三級丁酯 (30.0 mg, 0.0900mmol) 在二氯甲烷 (2 mL) 及 2,2,2-三氟乙酸 (0.5 mL) 中之溶液在室溫攪拌 1 小時。將溶劑在真空下濃縮，以得到 32.0 mg (粗產物) 黃色油狀標題化合物。LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 240$ 。

【0304】 步驟 3：*N*-((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-羥基-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)乙基)-2-甲基哌啶-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒啶-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)-*N*-(5-(2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)乙醯胺基)戊基)環丁烷-1,1-二甲醯胺 (2,2,2-三氟乙酸鹽)



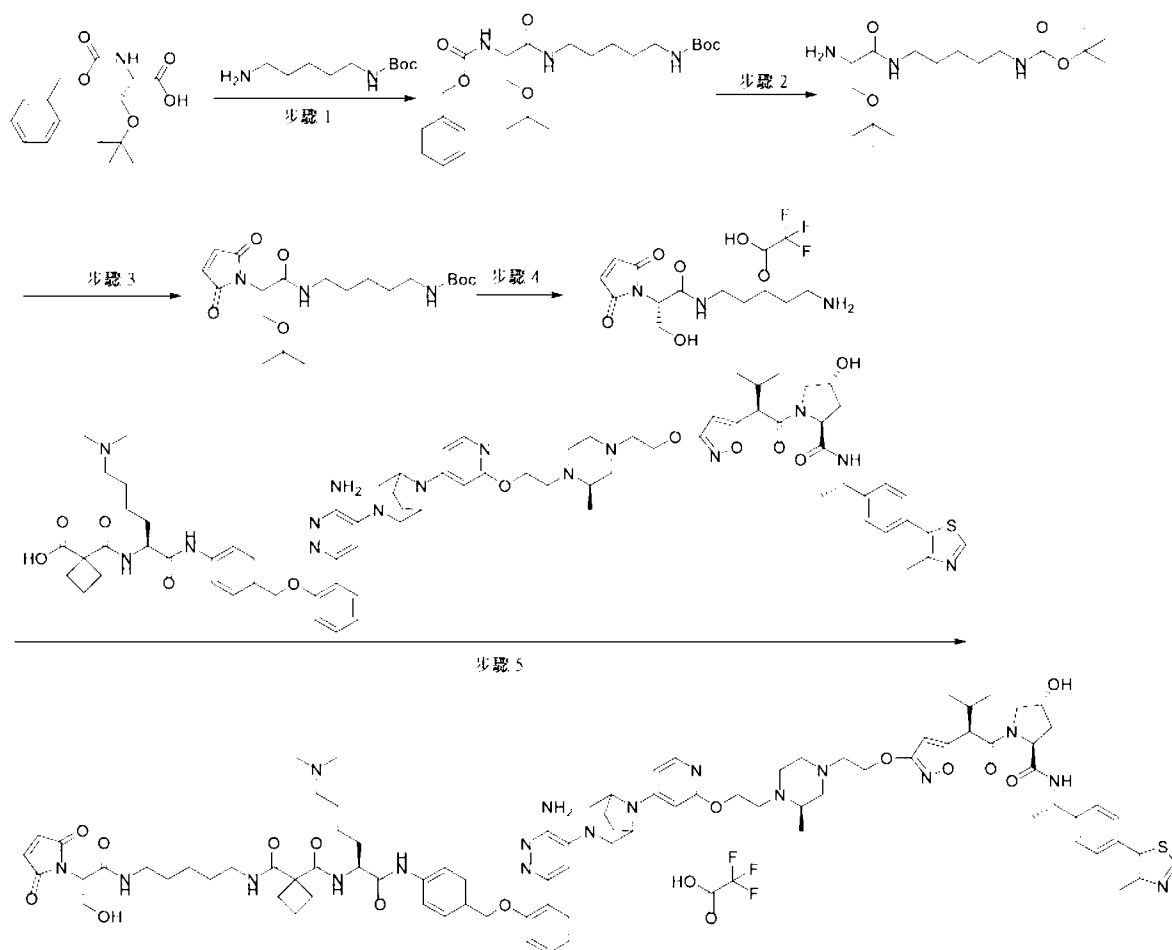
在室溫向 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-羥基-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)乙基)-2-甲基哌啶-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒啶-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (60.0 mg, 0.0400 mmol)、*N*-(5-胺基戊基)-2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)乙醯胺 (2,2,2-三氟乙酸鹽) (30.0 mg，粗產物) 及 DIPEA (54.2 mg, 0.420 mmol) 在 DMF (0.5 mL) 中之溶液中添加

HATU (19.2 mg, 0.0500 mmol)。將反應於室溫攪拌 10 分鐘。粗產物藉由製備型 HPLC (管柱：Xselect CSH F-Phenyl OBD 管柱，19 × 250 mm，5 μm；流動相 A：水 (0.05% TFA)，流動相 B：ACN；流速：25 mL/min；梯度：B 於 11 分鐘內由 20% 增加至 27%，保持 27% B；波長：254 nm；RT1(min)：10.4) 純化，以產生 31.5 mg (產率 45%) 黃色固體狀標題化合物。LCMS (ESI) [M+H]⁺ = 1650。¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 10.20 (s, 1H), 9.51 (s, 1H), 8.99 (s, 1H), 8.38 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 8.11 (t, J = 5.4 Hz, 1H), 7.95-7.80 (m, 3H), 7.67 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.58 (td, J = 5.1, 2.4 Hz, 2H), 7.51 – 7.25 (m, 8H), 7.23 – 7.03 (m, 5H), 6.69 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 6.32 (s, 1H), 6.11 (s, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.91 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 4.55 (s, 2H), 4.47 (s, 2H), 4.43-4.20 (m, 5H), 3.99 (s, 2H), 3.50-3.30(m, 7H), 3.30-3.15 (m, 4H), 3.15-3.05 (m, 6H), 3.05-2.95 (m, 5H), 2.75 (d, J = 4.4 Hz, 6H), 2.50-2.35 (m, 8H), 2.23 – 1.60 (m, 13H), 1.53 – 1.04 (m, 15H), 1.05-0.90 (m, 3H), 0.85-0.70 (m, 3H)。

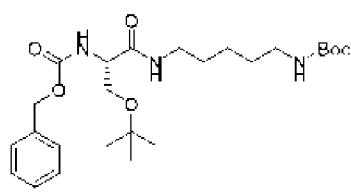
實例 14

Hy-B-CIDE-1 之合成

【0305】 *N*-((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-羥基-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)乙基)-2-甲基哌啶-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒啶-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)-*N*-(5-((*S*)-2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)-3-羥基丙醯胺基)戊基)環丁烷-1,1-二甲醯胺 (2,2,2-三氟乙酸鹽)

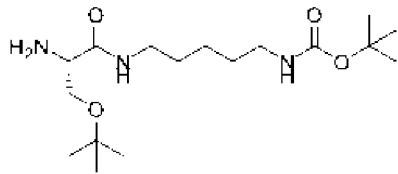


【0306】 步驟 1：(S)-(2,2,16,16-四甲基-4,12-二側氧-3,15-二氧雜-5,11-二氮雜十七烷-13-基)胺甲酸苄酯



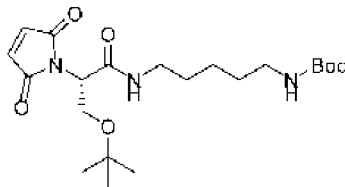
在氮氣下，將 *N*-((苄氧基)羰基)-*O*-(三級-丁基)-*L*-絲胺酸 (1.0 g, 3.390 mmol)、(5-胺基戊基)胺甲酸三級丁酯 (684 mg, 3.39 mmol)、HATU (1.67 g, 4.40 mmol) 及 DIPEA (1.31 g, 10.1 mmol) 在 DMF (10 mL) 中之溶液於室溫下攪拌 30 分鐘。反應藉由預填充之 C18 柱 (溶劑梯度：在水 (0.05% NH₄HCO₃) 中的 0-60% ACN) 純化，以產生 980 mg (產率 60%) 白色固體狀標題化合物。LC-MS：(ESI, *m/z*)：[*M*+*H*]⁺ = 480。

【0307】 步驟 2：(S)-(5-(2-胺基-3-(三級丁氧基)丙醯胺基)戊基)胺甲酸三級丁酯



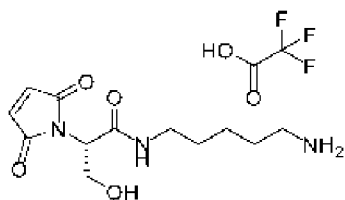
在氮氣 (1 atm) 下，將 (S)-(2,2,16,16-四甲基-4,12-二側氧-3,15-二氧雜-5,11-二氮雜十七烷-13-基)胺甲酸苄酯 (980 mg, 2.046 mmol) 及 Pd/C (196 mg) 在 MeOH (200 mL) 中之溶液在室溫攪拌 1 小時。將固體透過矽藻土墊濾出，並將濾液在減壓下濃縮，以產生 750 mg (粗產物) 黃色油狀標題化合物。LC-MS：(ESI, m/z)：[M+H]⁺ = 346。

【0308】 步驟 3：(S)-(5-(3-(三級-丁氧基)-2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)丙醯胺基)戊基)胺甲酸三級丁酯



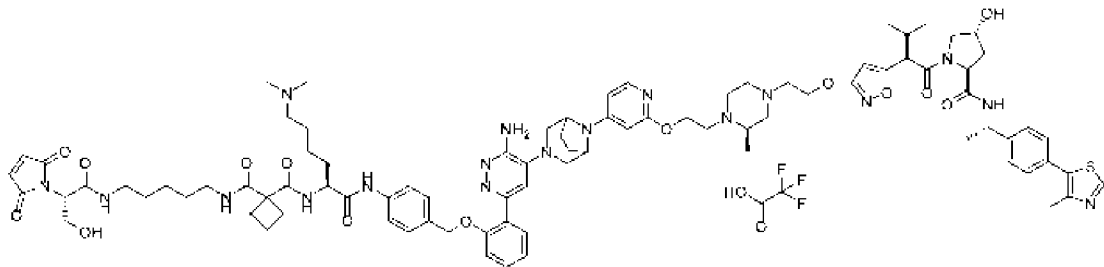
在氮氣下，在 0°C，向 (S)-(5-(2-胺基-3-(三級丁氧基)丙醯胺)戊基)胺甲酸三級丁酯 (740 mg, 2.145 mmol) 及 NaHCO₃ (540 mg, 6.43 mmol) 在二噁烷 (5 mL) 及 H₂O (16 mL) 中之溶液添加 2,5-二側氧-2,5-二氫-1H-吡咯-1-甲酸甲酯 (332 mg, 2.14 mmol)。將溶液在 0°C 攪拌 40 分鐘。然後將反應混合物在室溫攪拌 0.5 小時。反應用乙酸乙酯萃取。將有機層合併，經無水硫酸鈉乾燥，並在真空下濃縮。將殘餘物藉由矽膠急速層析法 (梯度：0%-60% EtOAc/石油醚) 純化，以產生 540 mg (產率 59%) 無色油狀標題化合物。LC-MS：(ESI, m/z)：[M+H]⁺ = 426

【0309】 步驟 4：(S)-N-(5-胺基戊基)-2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-3-羥基丙醯胺 (2,2,2-三氟乙酸鹽)



在氮氣下，將 (S)-(5-(3-(三級丁氧基)-2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)丙醯胺基)戊基)胺甲酸三級丁酯 (15.0 mg, 0.035 mmol) 在 TFA (0.5 mL) 中之溶液在室溫攪拌 1 小時。將所得混合物在真空下濃縮，以產生 20.0 mg (粗產物) 無色油狀標題化合物。LC-MS：(ESI, *m/z*)：[*M*+*H*]⁺ = 270。

【0310】 步驟 5：N-((2S)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(8-(2-(2-((R)-4-(2-((5-((R)-1-((2S,4R)-4-羥基-2-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)乙基)-2-甲基哌咻-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒咻-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)-N-(5-((S)-2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-3-羥基丙醯胺基)戊基)環丁烷-1,1-二甲醯胺 (2,2,2-三氟乙酸鹽)



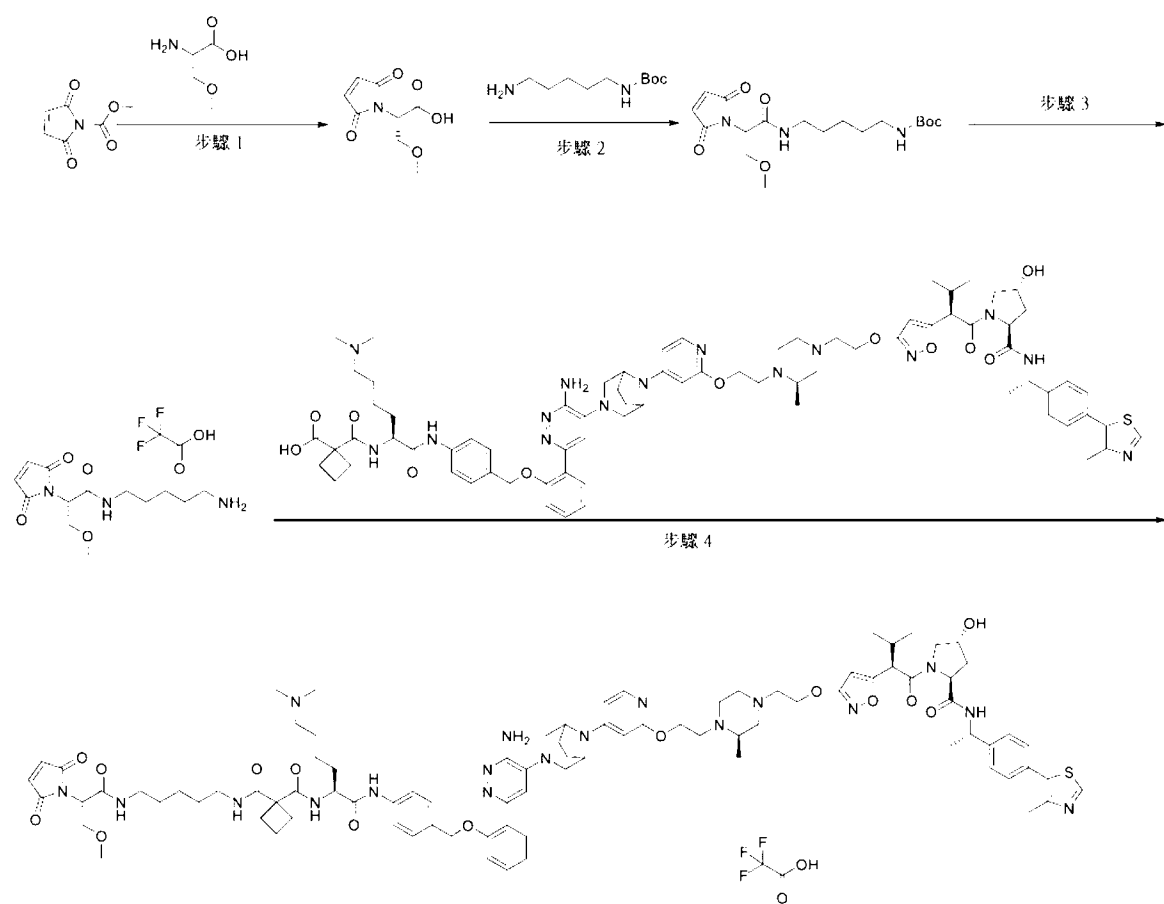
在氮氣下，在室溫向 1-(((2*S*)-1-(((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-羥基-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)乙基)-2-甲基哌咩-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)噻咩-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (30.0 mg, 0.021 mmol)、(*S*)-*N*-(5-胺基戊基)-2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)-3-羥基丙醯胺 (2,2,2-三氟乙酸鹽) (20.0 mg，粗產物)、DIPEA (27.1 mg, 0.210 mmol) 在 DMF (0.9

mL) 中之溶液中添加 HATU (10.4 mg, 0.027 mmol)。將所得溶液於室溫下攪拌 10 分鐘。將所得溶液藉由製備型 HPLC (XBridge Shield RP18 OBD 柱，19 x 250 mm 10µm；流動相 A：水 (0.05% TFA)，流動相 B：ACN；流速：25 mL/min；梯度：在 10 分鐘內由 20% B 至 35% B；254/220 nm；R_{T1}：8.26) 純化，以產生 22.6 mg (產率 64%) 白色固體狀 **HY-B-CIDE-1**。LC-MS：(ESI, m/z)：[M+H]⁺ = 1680。 ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.21 (s, 1H), 9.45 (br, 1H), 9.00 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 8.40 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.98 – 7.84 (m, 4H), 7.67 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.58 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.52 – 7.28 (m, 8H), 7.19 – 6.91 (m, 5H), 6.69 (s, 1H), 6.31 (s, 1H), 6.13 (s, 1H), 5.11 (s, 2H), 4.95-4.80 (m, 1H), 4.62-4.52 (m, 2H), 4.52-4.45 (m, 3H), 4.42-4.32 (m, 4H), 4.32-4.25 (m, 2H), 3.95 – 3.86 (m, 9H), 3.50-3.40 (m, 3H), 3.40-3.28(m, 4H), 3.15-3.05 (m, 5H), 3.05-2.95 (m, 5H), 2.75 (d, *J* = 4.7 Hz, 6H), 2.45-2.35 (m, 8H), 2.25-2.10 (m, 1H), 2.05 – 1.86 (m, 5H), 1.84 – 1.52 (m, 7H), 1.50 – 1.30 (m, 8H), 1.30-1.10 (m, 6H), 0.97 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H), 0.88 – 0.76 (m, 3H)。

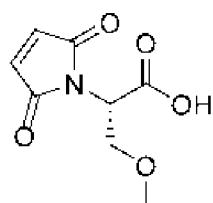
實例 15

Hy-B-CIDE-2 之合成

【0311】 *N*-((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-羥基-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)乙基)-2-甲基哌啶-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒啶-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)-*N*-(5-((*S*)-2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)-3-甲氧基丙醯胺基)戊基)環丁烷-1,1-二甲醯胺 (2,2,2-三氟乙酸鹽)

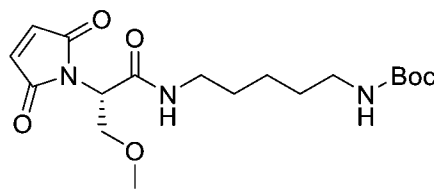


【0312】 步驟 1：(S)-2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)-3-甲氧基丙酸



在室溫向 2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-甲酸甲酯 (500 mg, 3.22mmol) 及 NaHCO₃ (810 mg, 9.64 mmol) 在水 (10 mL) 中之溶液中添加甲基 *O*-甲基-*L*-絲胺酸 (384 mg, 3.22mmol)。將反應在室溫攪拌 2 小時。用 KHSO₄ 將 pH 調節為 5。產物用二氯甲烷萃取四次。合併之有機層用鹽水洗滌，並經無水硫酸鈉乾燥。將溶劑在真空下濃縮，以產生 600 mg (產率 93%) 白色油狀標題化合物。LC-MS：(ESI, *m/z*)：M⁻ = 198。

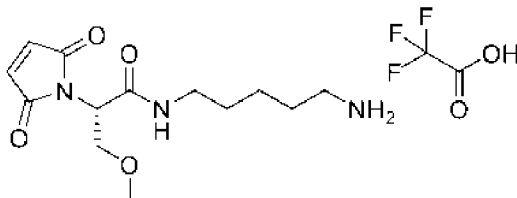
【0313】 步驟 2：(S)-(5-(2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)-3-甲氧基



丙醯胺基)戊基)胺甲酸三級丁酯

將 (5-胺基戊基)胺甲酸三級丁酯 (0.62 mL, 2.97 mmol)、(S)-2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)-3-甲氧基丙酸 (600 mg, 3.01mmol)、HATU (1.50 g, 3.94mmol) 及 DIPEA (1.20g, 9.3mmol) 在 DMF (10mL) 中之溶液在室溫攪拌 1 小時。反應用 EtOAc 稀釋並用水洗滌。將有機層合併，在真空下乾燥，並在真空下濃縮。粗產物藉由急速層析法在矽膠上 (梯度：0%-100% 乙酸乙酯/石油醚) 純化，以產生 150 mg (產率 13%) 黃色油狀標題化合物。LC-MS：(ESI, *m/z*)：[*M*+*H*]⁺ = 384。

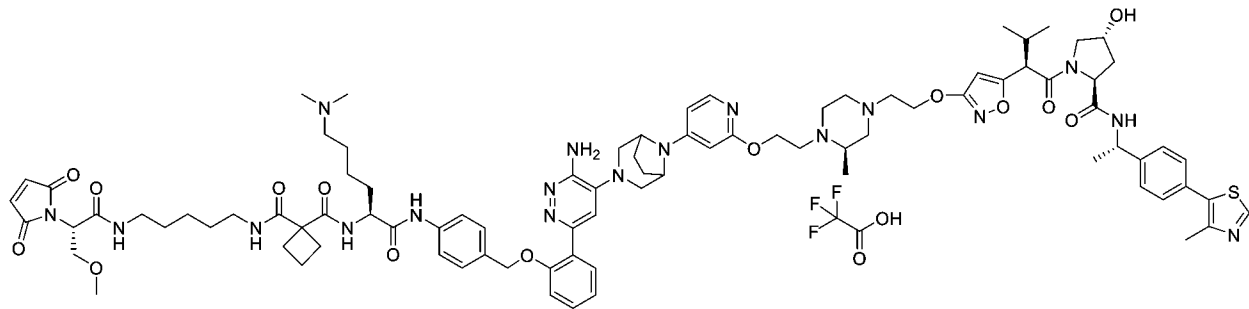
【0314】 步驟 3：(S)-*N*-(5-胺基戊基)-2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)-3-甲氧基丙醯胺 (2,2,2-三氟乙酸鹽)



將 (S)-(5-(2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)-3-甲氧基丙醯胺基)戊基)胺甲酸三級丁酯 (25.0 mg, 0.0700mmol) 在二氯甲烷 (3mL) 及 2,2,2-三氟乙酸 (1mL) 中之溶液在室溫攪拌 1 小時。將溶劑在真空下濃縮，以產生 18 mg (粗產物) 黃色油狀標題化合物。LC-MS：(ESI, *m/z*)：[*M*+*H*]⁺ = 284。

【0315】 步驟 4：N-((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-羥基-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)乙基)-2-甲基哌啶-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒啶-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲

基胺基)-1-側氧己烷-2-基)-*N*-(5-((*S*)-2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)-3-甲氧基丙醯胺基)戊基)環丁烷-1,1-二甲醯胺 (2,2,2-三氟乙酸鹽)



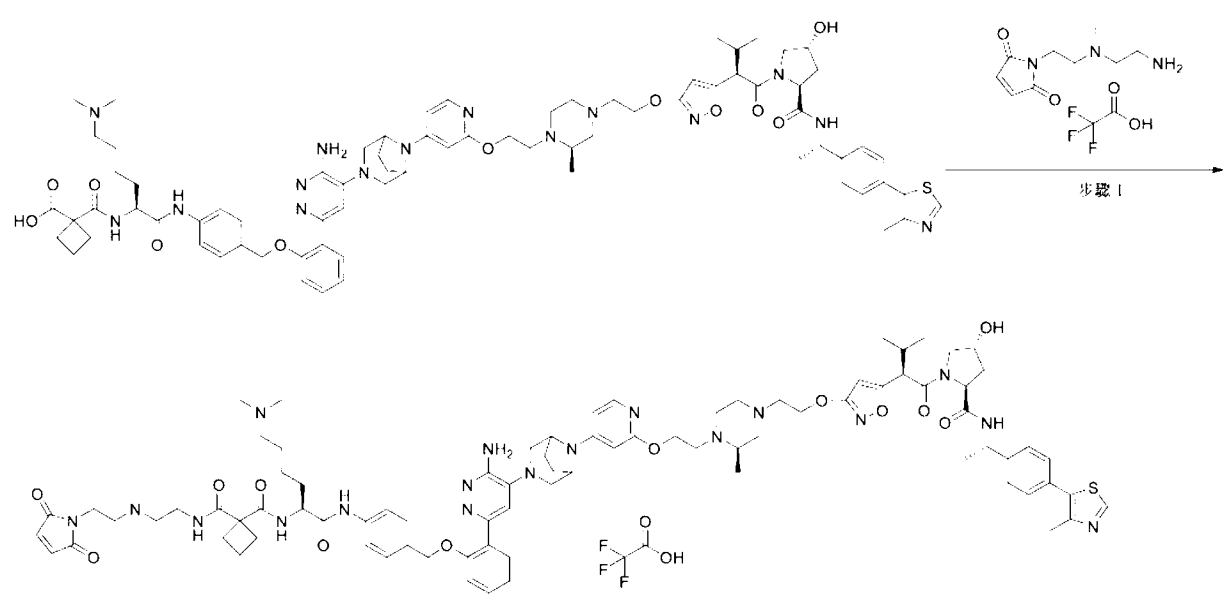
在室溫向 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-羥基-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)乙基)-2-甲基哌啶-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒啉-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (60.0 mg, 0.0400mmol)、(*S*)-*N*-(5-胺基戊基)-2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)-3-甲氧基丙醯胺 (2,2,2-三氟乙酸鹽) (18.0 mg，粗產物) 及 DIPEA (54.2 mg, 0.420 mmol) 在 DMF (2 mL) 中之溶液中添加 HATU (19.2 mg, 0.0500mmol)。將反應在室溫下攪拌 10 分鐘。藉由製備型 HPLC (XBridge Shield RP18 OBD 柱，30 × 150 mm 5um；流動相 A：水 (10 mmol/L NH₄HCO₃)，流動相 B：ACN；流速：60 mL/min；梯度：B 於 12 分鐘內由 6% 增加至 21%；254 nm；R_{T1}：14.45) 純化殘餘物，以得到 34 mg (產率 44%) 白色固體狀 **Hy-B-CIDE-2**。LC-MS：(ESI, m/z)：[M+H]⁺ = 1694。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 10.22 (s, 1H), 9.52 (s, 1H), 8.99 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.40 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 8.03 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.89 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 7.68 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.57 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.50-7.28 (m, 8H), 7.18 – 7.10 (m, 2H), 7.10-6.90 (m, 3H), 6.66 (s, 1H), 6.28 (s, 1H), 6.12 (s, 1H), 5.10 (s, 3H), 4.91 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 4.71 – 4.66 (m, 1H), 4.60-4.45 (m, 4H), 4.40 – 4.27 (m, 5H), 3.89 – 3.79 (m, 5H), 3.70-3.65 (m, 4H), 3.50-3.40(m, 3 H), 3.17 (s, 4H), 3.13-3.08 (m, 4H), 3.06

- 2.96 (m, 6H), 2.75 (d, $J = 4.5$ Hz, 8H), 2.47-2.43 (m, 5H), 2.42-2.35 (m, 4H), 2.25-2.15 (m, 1H), 2.10-1.55 (m, 10H), 1.52 - 1.27 (m, 9H), 1.27-1.10 (m, 6H), 0.97 (dd, $J = 6.5, 3.7$ Hz, 3H), 0.88-0.75 (m, 3H)。

實例 16

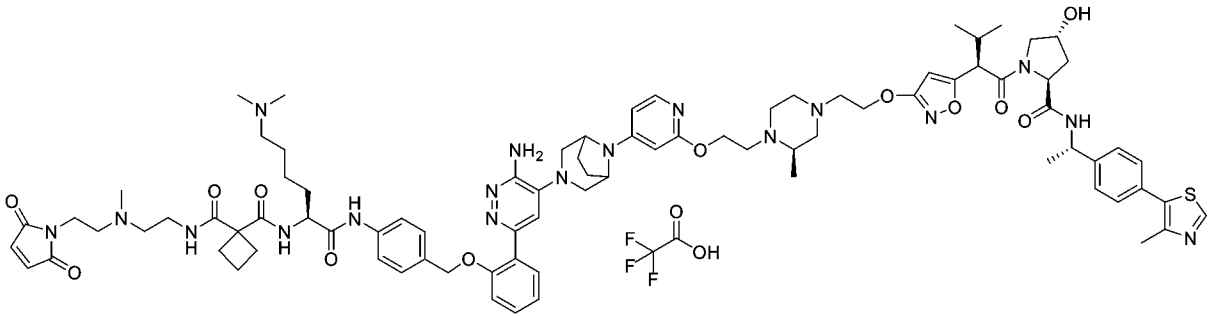
Hy-B-CIDE-5 之合成

【0316】 *N*-((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-羥基-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)乙基)-2-甲基哌啶-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒吡啶-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)-*N*-(2-((2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)乙基)(甲基)胺基)乙基)環丁烷-1,1-二甲醯胺 (2,2,2-三氟乙酸鹽)



【0317】 步驟 1：*N*-((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-羥基-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)乙基)-2-甲基哌啶-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒吡啶-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲

基胺基)-1-側氧己烷-2-基)-*N*-(2-((2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)乙基)(甲基)胺基)乙基)環丁烷-1,1-二甲醯胺 (2,2,2-三氟乙酸鹽)



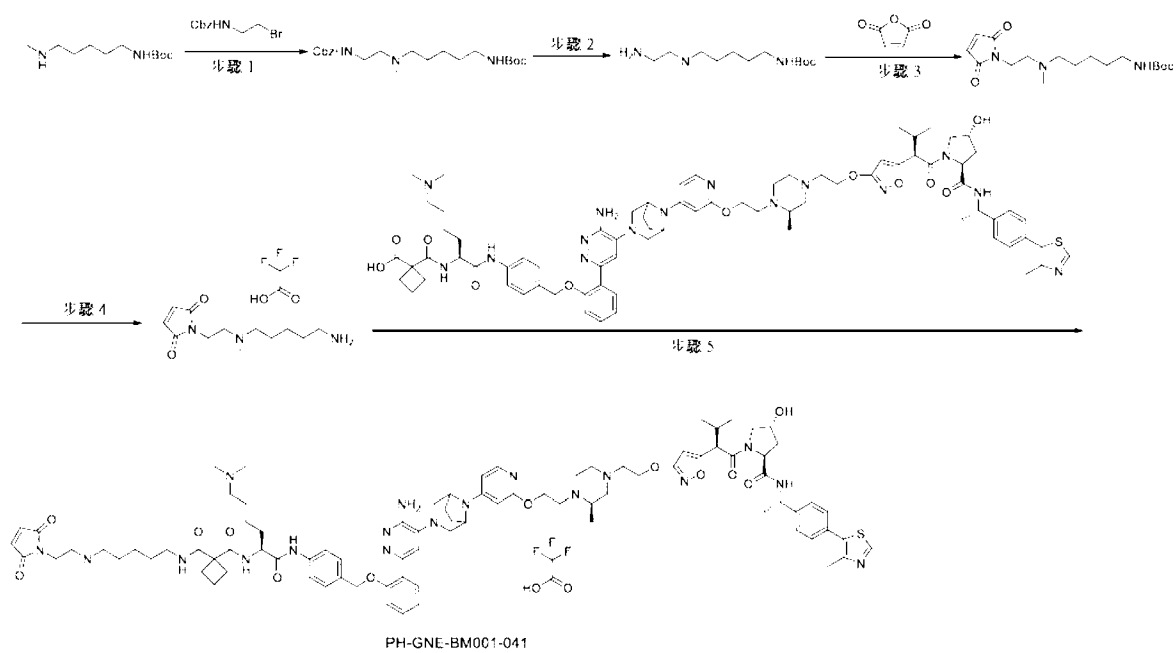
在室溫向 1-(((2*S*)-1-(((4-((2-(6-氨基-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-羥基-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)乙基)-2-甲基哌咻-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒咻-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (60 mg, 0.0420 mmol)、1-(2-((2-氨基乙基)(甲基)胺基)乙基)-1*H*-吡咯-2,5-二酮 (2,2,2-三氟乙酸鹽) (12.4 mg, 粗產物) 及 DIPEA (54.2 mg, 0.420mmol) 在 DMF (1mL) 中之溶液中添加 HATU (19.2 mg, 0.0505mmol)。將反應於室溫攪拌 10 分鐘。反應溶液藉由製備型 HPLC (管柱：Xselect CSH C18 OBD 柱 30 × 150 mm, 5 μm; 流動相 A：水 (0.05% TFA), 流動相 B：ACN; 流速：60 mL/min; 梯度：B 於 12 分鐘內由 5% 增加至 25%, 保持 25% B; 波長：254/220 nm; R_{T1}(min)：12 分鐘) 純化，以產生 34.3 mg (產率 51%) 白色固體狀 **Hy-B-CIDE-5**。LC-MS：(ESI, m/z)：[M+H]⁺ = 1608。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.21 (s, 1H), 9.59 (br, 1H), 8.99 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 8.38 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 8.11 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 7.86 (dd, J = 18.6, 7.0 Hz, 2H), 7.68 – 7.51 (m, 4H), 7.49 – 7.26 (m, 9H), 7.14 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.07 (s, 3H), 6.67 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 6.29 (s, 1H), 6.11 (s, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.91 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 4.60–4.40 (m, 5H), 4.38 – 4.31 (m, 3H), 4.29 (s, 1H), 3.50–3.05 (m, 25H), 2.85 (s, 3H),

2.75 (s, 6H), 2.46 (s, 9H), 2.05 – 1.87 (m, 5H), 1.86 – 1.55 (m, 8H), 1.50-1.30 (m, 5H), 1.25-1.15 (m, 4H), 0.97 (d, J = 6.6, 3H), 0.89-0.70 (m, 3H)。

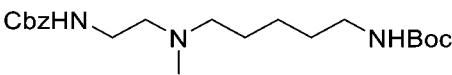
實例 17

Hy-B-CIDE-8 之合成

【0318】 *N*-((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-羥基-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)乙基)-2-甲基哌啶-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒咩-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)-*N*-(5-((2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)乙基)(甲基)胺基)戊基)環丁烷-1,1-二甲醯胺 (2,2,2-三氟乙酸鹽)



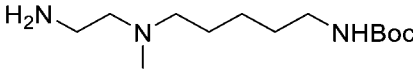
步驟 1：(5-((2-((苄氧基)羰基)胺基)乙基)(甲基)胺基)戊基)胺甲酸三級丁酯



在氮氣下，將 (5-(甲基胺基)戊基)胺甲酸三級丁酯 (1.00 g, 4.62 mmol)、*N*-(2-溴乙基)胺甲酸苄酯 (1.80 g, 6.97 mmol) 及 DIPEA (1.80 g, 13.9 mmol) 在乙腈 (10 mL) 中之溶液在 50°C 攪拌 1 小時。將溶劑在真空下濃縮並添加水。所得溶

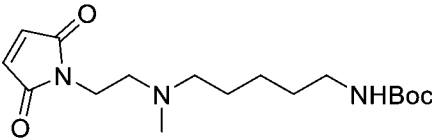
液用 DCM 萃取，並合併有機層。有機層經無水硫酸鈉乾燥，並在真空下濃縮。將殘餘物藉由矽膠急速層析法 (溶劑梯度：0-5% MeOH / DCM) 純化，以得到 1.30 g (產率 71%) 無色油狀標題化合物。LCMS (ESI, m/z) : [M+H]⁺ = 394。

【0319】 步驟 2：(5-((2-胺基乙基)(甲基)胺基)戊基)胺甲酸三級丁酯



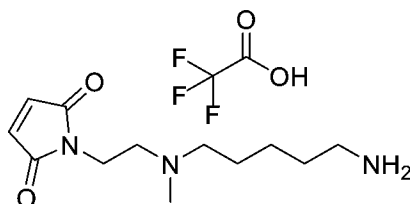
在氫氣 (3 atm) 下，將甲胺 (在 THF 中的 2 M) (7.5 mL, 15.2 mmol) 及 10% Pd/C (240 mg) 在 MeOH (50 mL) 中之溶液在室溫攪拌 30 分鐘 (以去除在 MeOH 中的痕量甲醛)。然後添加 (5-((2-(((苄氧基)羰基)胺基)乙基)(甲基)胺基)戊基)胺甲酸三級丁酯 (1.20 g, 3.05 mmol) 並將反應在室溫攪拌 2 小時。過濾後，將濾液在減壓下濃縮，以得到 810 mg (粗產物) 黃色油狀標題化合物。LCMS (ESI, m/z) : [M+H]⁺ = 260。

【0320】 步驟 3：(5-((2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)乙基)(甲基)胺基)戊基)胺甲酸三級丁酯



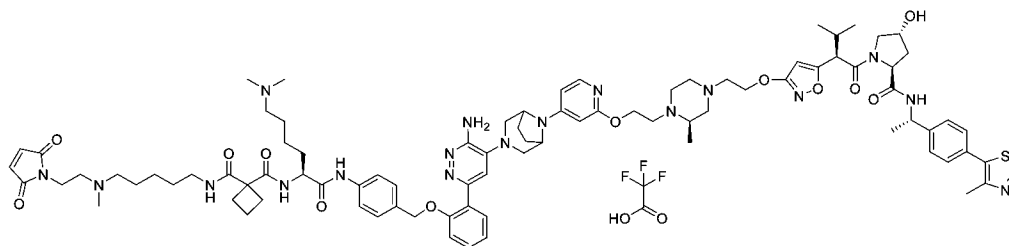
在氫氣下，將 (5-((2-胺基乙基)(甲基)胺基)戊基)胺甲酸三級丁酯 (800 mg, 3.08 mmol) 及順丁烯二酸酐 (300 mg, 3.05 mmol) 在 CH₃COOH (10 mL) 中之溶液在室溫攪拌 1 小時。將溶液在真空下濃縮，並將殘餘物與 DCM/己烷 (1:4) 一起研磨 3 次，添加甲苯 (10 mL)，接著添加三乙胺 (1.56 g, 15.4 mmol) 及 4A 分子篩 (2.86 g)。將反應在 110°C 攪拌 1 小時。過濾後，將濾液在減壓下濃縮。將殘餘物藉由矽膠急速層析法 (溶劑梯度：0-100% EtOAc/石油醚) 純化，以得到 825 mg 黃色油狀標題化合物。LCMS (ESI, m/z) : [M+H]⁺ = 340。

【0321】 步驟 4：1-(2-((5-胺基戊基)(甲基)胺基)乙基)-1*H*-吡咯-2,5-二酮 (2,2,2-三氟乙酸)



在氫氣下，將 (5-((2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)乙基)(甲基)胺基)戊基)胺甲酸三級丁酯 (13.0 mg, 0.0400 mmol) 在 DCM (1 mL) 及 2,2,2-三氟乙酸 (0.3 mL) 中之溶液在室溫攪拌 30 分鐘。蒸發溶劑，以得到 30 mg (粗產物) 黃色油狀標題化合物。LCMS (ESI, m/z): $[M+H]^+ = 240$ 。

【0322】 步驟 5：N-((2S)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(8-(2-(2-((R)-4-(2-((5-((R)-1-((2S,4R)-4-羥基-2-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)乙基)-2-甲基哌咍-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒咍-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)-N-(5-((2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)乙基)(甲基)胺基)戊基)環丁烷-1,1-二甲醯胺 (2,2,2-三氟乙酸鹽)



在氮氣下，在室溫向 1-(2-((5-胺基戊基)(甲基)胺基)乙基)-1*H*-吡咯-2,5-二酮 (2,2,2-三氟乙酸鹽) (8.0 mg，粗產物)、1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-羥基-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)乙基)-2-甲基哌咻-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒咻-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (40.0 mg，0.0300 mmol，**中間體 10**) 及 DIPEA (38.7 mg, 0.300 mmol) 在 *N,N*-二甲基甲醯胺 (1 mL) 中之溶液中添加 HATU (14.0 mg, 0.0400 mmol)。將反應在室溫攪拌 10

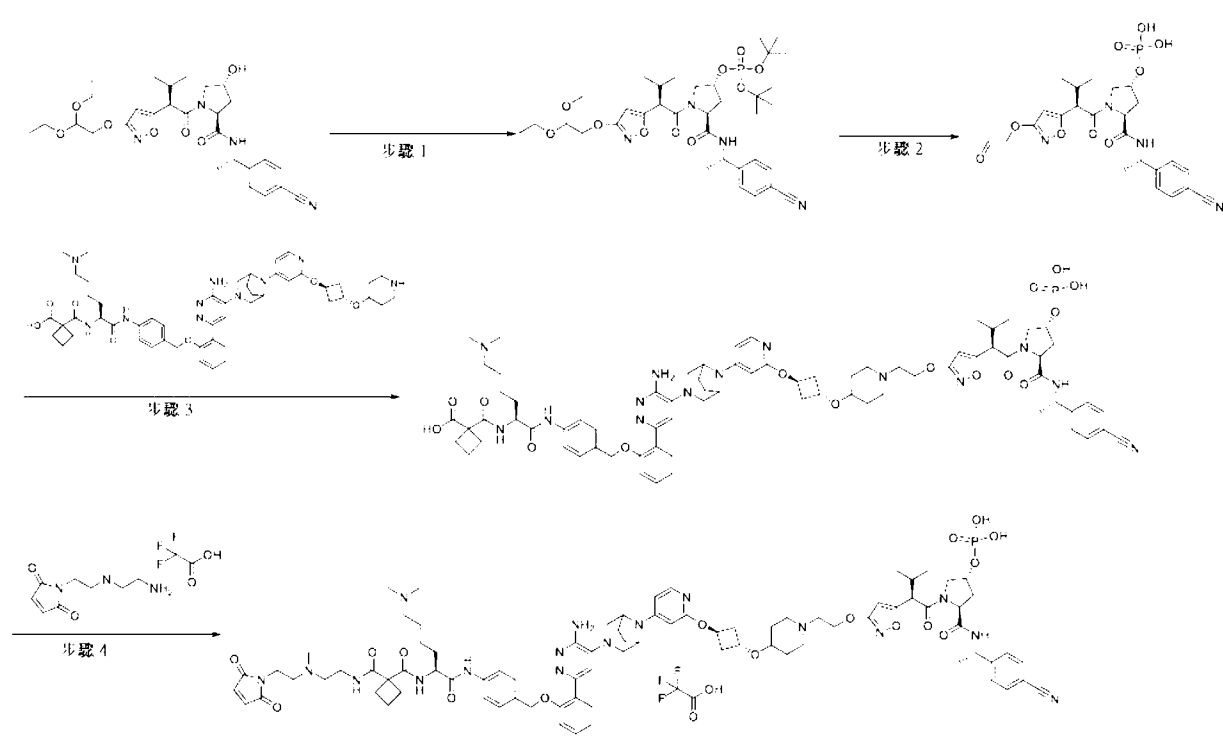
分鐘。粗產物藉由製備型 HPLC 純化，使用以下條件：管柱：Xselect CSH C18 OBD 管柱 30 × 150 mm 5 μm，n；流動相 A：水 (0.05% TFA)，流動相 B：ACN；流速：60 mL/min；梯度：B 於 11 分鐘內由 19% 增加至 34%，保持 34% B；波長：254/220 nm；RT1(min)：10；以得到 7.0 mg 白色固體狀 **Hy-B-CIDE-8**。

LCMS (ESI, m/z) : [M+H]⁺ = 1649。 ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 10.13 (s, 1H), 9.57 (s, 1H), 8.99 (s, 1H), 8.41 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 8.00 – 7.80 (m, 3H), 7.55 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.50 – 7.39 (m, 2H), 7.39 – 7.11 (m, 8H), 7.08 – 6.97 (m, 2H), 6.96 (s, 2H), 6.56 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 6.18 (s, 1H), 6.00 (s, 1H), 4.98 (s, 2H), 4.79 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 4.50 – 4.12 (m, 10H), 3.60 – 3.51 (m, 5H), 3.37 (q, J = 11.1, 10.2 Hz, 10H), 3.06 – 2.83 (m, 11H), 2.72 – 2.57 (m, 9H), 2.45 – 2.35 (m, 7H), 2.31 – 2.10 (m, 2H), 1.99 – 1.85 (m, 3H), 1.79 (s, 2H), 1.72 – 1.39 (m, 9H), 1.34 (d, J = 7.0 Hz, 3H), 1.25 (d, J = 7.0 Hz, 3H), 1.20 – 0.90 (m, 7H), 0.85 (dd, J = 6.6, 3.7 Hz, 3H), 0.69 (dd, J = 10.5, 6.6 Hz, 3H)。

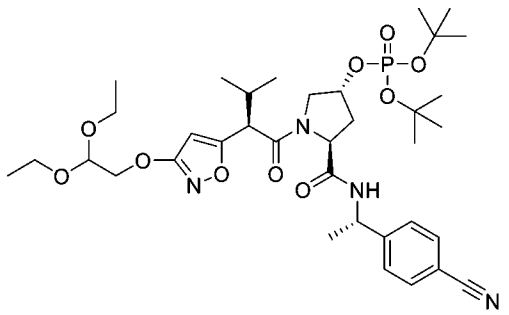
實例 18

Hy-B-PCIDE-2 之合成

【0323】 (3*R*,5*S*)-1-((2*R*)-2-(3-(2-(4-((1*r*,3*R*)-3-((4-(3-(3-胺基-6-(2-((4-((*S*)-6-(二甲基胺基)-2-(1-((2-((2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)乙基)(甲基)胺基)乙基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基)氧)苯基)嗒吡-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧)環丁氧基)哌啶-1-基)乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-5-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啶-3-基二氫磷酸鹽 (2,2,2-三氟乙酸鹽)



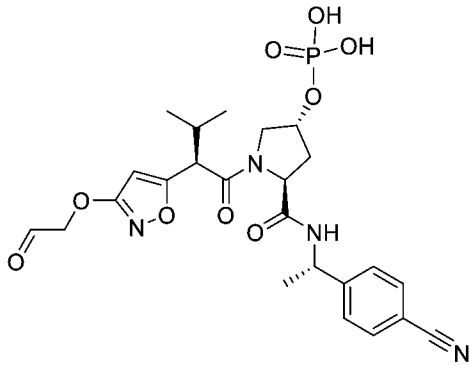
【0324】 步驟 1：((3*R*,5*S*)-5-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-1-((*R*)-2-(3-(2,2-二乙氧基乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)吡咯啉-3-基)磷酸二-三級丁酯



在氮氣下，在 0°C 向 ((3*R*,5*S*)-5-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)-1-((*R*)-2-(3-(2,2-二乙氧基乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-4-羥基吡咯啉-2-甲醯胺 (500 mg, 0.921 mmol) 及 1*H*-四唑 (6.1 mL，在 ACN 中的 0.45 M) 在 THF (15 mL) 中之溶液中添加二異丙基亞磷醯胺二-三級丁酯 (511 mg, 1.84 mmol)。所產生的溶液於室溫攪拌隔夜。然後在 -30°C 添加 *t*-BuOOH (在癸烷中 5M) (0.74 mL, 3.69 mmol) 並在室溫攪拌 5 小時。用 NaHSO₃ 淬滅反應。所得溶液用 EtOAc 萃取，並合併有機層。有機層經無水硫酸鈉乾燥，並在真空下濃縮。將殘餘物藉由矽

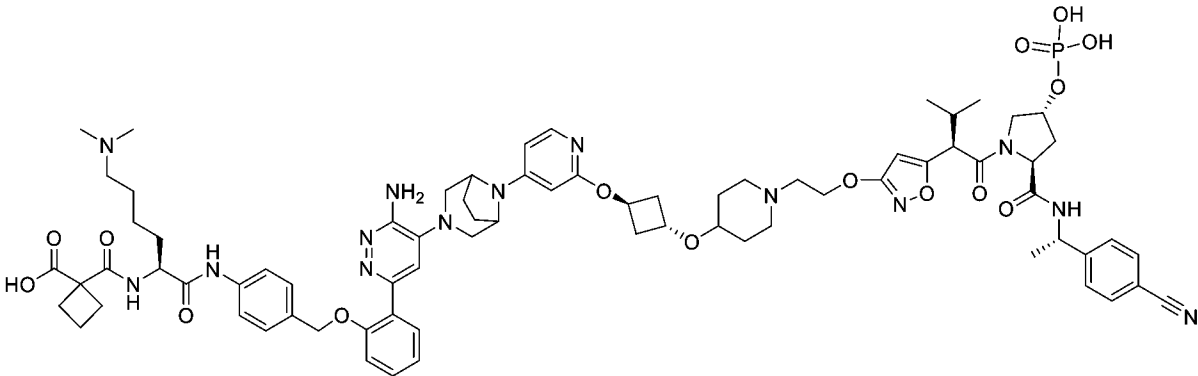
膠急速層析法 (梯度：0%-87% 乙酸乙酯/石油醚) 純化，以產生 420 mg (產率 62%) 無色油狀標題化合物。LC-MS：(ESI, m/z)：[M+H]⁺ = 735。

【0325】 步驟 2：(3*R*,5*S*)-5-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-1-((*R*)-3-甲基-2-(3-(2-側氧乙氧基)異呔唑-5-基)丁醯基)吡咯啉-3-基二氫磷酸鹽



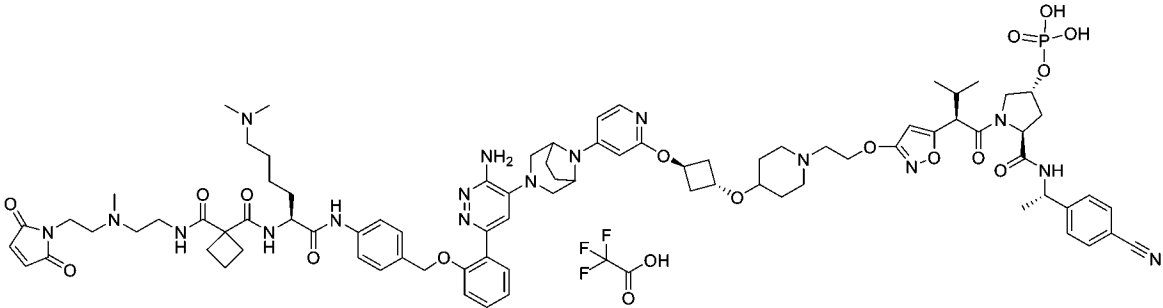
在氮氣下，將 ((3*R*,5*S*)-5-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-1-((*R*)-2-(3-(2,2-二乙氧基乙氧基)異呔唑-5-基)-3-甲基丁醯基)吡咯啉-3-基)磷酸二-三級丁酯 (70.0 mg, 0.100 mmol) 在 HCOOH (0.5 mL) 及水 (0.5 mL) 中之溶液在 60°C 攪拌 1 小時。將溶液在真空下濃縮，以得到 50 mg (粗產物) 固體狀標題化合物。LC-MS：(ESI, m/z)：[M+H]⁺ = 549。

【0326】 步驟 3：1-(((2*S*)-1-(((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(3-(((1-(2-(((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-4-(膦醯氧基)吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異呔唑-3-基)氧)乙基)哌啶-4-基)氧)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒咩-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸



在氮氣下，將 (3*R*,5*S*)-5-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-1-((*R*)-3-甲基-2-(3-(2-側氧乙氧基)異噁唑-5-基)丁醯基)吡咯啉-3-基二氫磷酸鹽 (62.8 mg, 0.115 mmol)、1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-((1*r*,3*r*)-3-(哌啶-4-基氧)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒咭-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (56.0 mg, 0.0602 mmol)、CH₃COONa (14.9 mg, 0.182 mmol) 在甲醇 (1.5 mL) 及二氯甲烷 (0.5 mL) 中之溶液在室溫攪拌 1 小時。然後添加 NaBH₃CN (5.6 mg, 0.0891 mmol)，並於室溫下攪拌 3 小時。反應藉由水淬滅。在真空下濃縮反應混合物。殘餘物藉由預填充之 C18 柱 (溶劑梯度：在水 (0.05% NH₄HCO₃) 中的 0-100% ACN) 純化，以產生 60 mg (產率 65%) 白色固體狀標題化合物。LC-MS：(ESI, *m/z*)：[M+H]⁺=1464。

【0327】 步驟4：(3*R*,5*S*)-1-((2*R*)-2-(3-(2-(4-((1*r*,3*R*)-3-((4-(3-(3-胺基-6-(2-((4-((*S*)-6-(二甲基胺基)-2-(1-((2-((2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)乙基)(甲基)胺基)乙基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基)氧)苯基)嗒咩-4-基)-3,8-二氫雜雙環[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧)環丁氧基)哌啶-1-基)乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-5-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啶-3-基二氫磷酸鹽 (2,2,2-三氟乙酸鹽)



【0328】 在室溫向 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(8-(2-(3-((1-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-4-(膦醯氧基)吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)乙基)哌啶-4-基)氧)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二

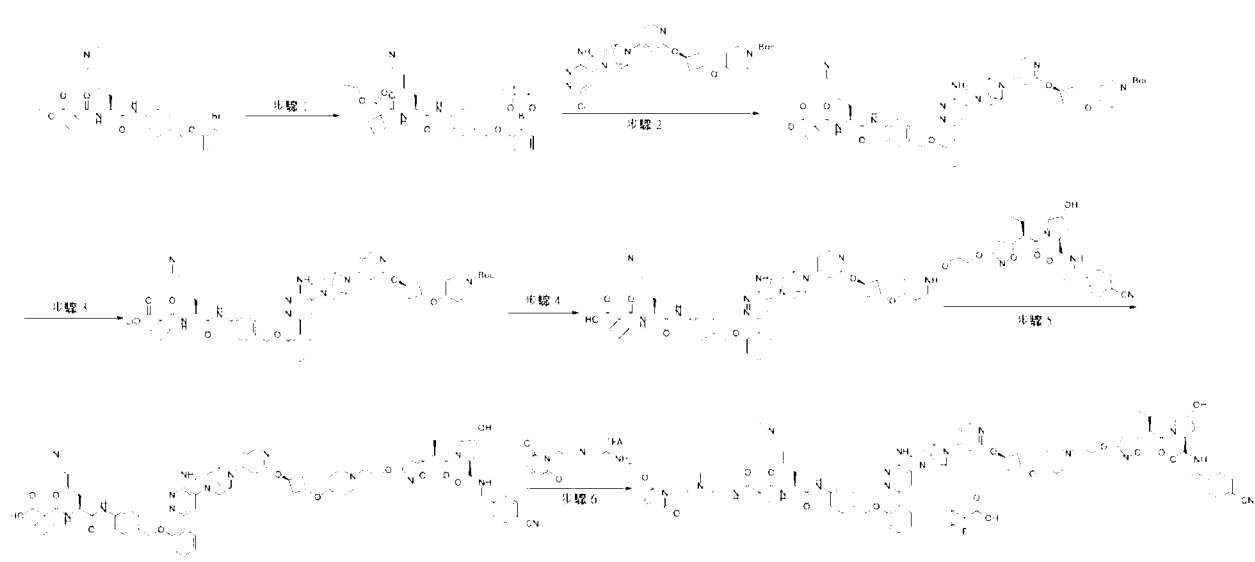
氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒吡-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (60.0 mg, 0.0410mmol)、1-(2-((2-胺基乙基)(甲基)胺基)乙基)-1*H*-吡咯-2,5-二酮 (2,2,2-三氟乙酸鹽) (10.5 mg, 粗產物) 及 DIPEA (54.2 mg, 0.420 mmol) 在 DMF (1mL) 中之溶液中添加 HATU (18.7mg, 0.0492mmol)。將反應於室溫攪拌 10 分鐘。粗產物藉由製備型 HPLC (管柱：Xselect CSH C18 OBD 管柱 30 × 150 mm 5 μm, n；流動相 A：水 (0.05% TFA)，流動相 B：ACN；流速：60 mL/min；梯度：B 於 12 分鐘內由 14% 增加至 23%，保持 23% B；波長：254/220 nm；R_{T1}(min)：11.75 分鐘) 純化，以產生 20.3 mg (產率 30%) 白色固體狀 **Hy-B-PCIDE-2**。

【0329】 LC-MS：(ESI, m/z)：[M+H]⁺ = 1643。 ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.24 (s, 1H), 9.67 (s, 1H), 8.56 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.88 – 7.73 (m, 4H), 7.68 – 7.49 (m, 4H), 7.49 – 7.25 (m, 6H), 7.20-6.80 (m, 4H), 6.61 (s, 1H), 6.21-5.95 (m, 2H), 5.30-5.00 (m, 3H), 4.90 (t, J = 6.9 Hz, 1H), 4.76 (s, 1H), 4.52 – 4.27 (m, 7H), 3.76 – 3.67 (m, 6H), 3.55-3.40 (m, 9H), 3.30-3.20 (m, 5H), 3.15-2.95 (m, 5H), 2.81 (s, 3H), 2.73 (s, 6H), 2.45-2.30 (m, 9H), 2.01 – 1.54 (m, 15H), 1.49-1.20 (m, 5H), 0.94 (d, J = 6.4 Hz, 3H), 0.79 (d, J = 7.0 Hz, 3H)。

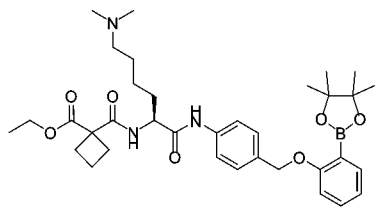
實例 19

Hy-B-CIDE-7 之合成

【0330】 *N*-((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-((1*R*,3*r*)-3-((1-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-4-羥基吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)乙基)哌啶-4-基)氧)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒吡-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)-*N*-(2-((2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)乙基)(甲基)胺基)乙基)環丁烷-1,1-二甲醯胺 (2,2,2-三氟乙酸鹽)

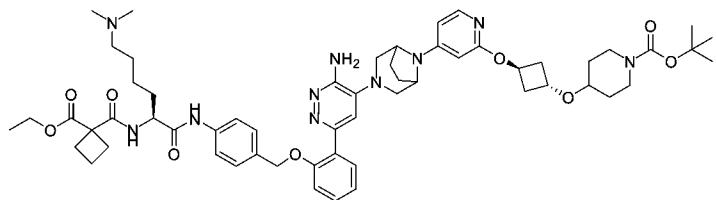


【0331】 步驟 1：(S)-1-((6-(二甲基氨基)-1-側氧-1-((4-((2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧雜環戊硼烷-2-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸乙酯



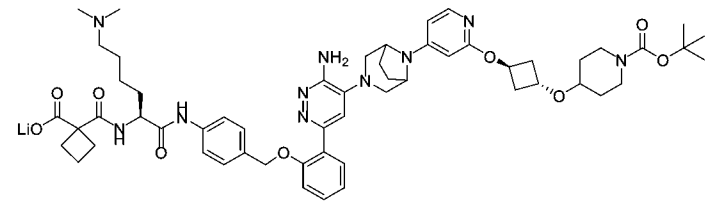
在氮氣下，將 (S)-1-((1-((4-((2-溴苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基氨基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸乙酯 (500 mg, 0.852 mmol)、B₂Pin₂ (649 mg, 2.55 mmol)、Pd(dppf)Cl₂ (124 mg, 0.170 mmol) 及 KOAc (250 mg, 2.55 mmol) 在 1,4-二噁烷 (5 mL) 中之溶液在 80°C 攪拌 2 小時。將反應用 DCM 稀釋，並用水洗滌。有機層經無水硫酸鈉乾燥，並在真空下濃縮。將殘餘物藉由矽膠急速層析法 (梯度：0%-20% MeOH / DCM (含 0.3% 7 M NH₃/MeOH)) 純化，以得到 390 mg (產率 72%) 黃色固體狀標題化合物。LC-MS：(ESI, m/z)：[M+H]⁺ = 636。

【0332】 步驟 2：4-((1*r*,3*r*)-3-((4-(3-(3-胺基-6-(2-((4-((S)-6-(二甲胺基)-2-(1-(乙氧基羰基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基)氧基)苯基)嗒咩-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)環丁氧基)哌啶-1-羧酸三級丁酯



在氮氣下，將 (S)-1-((6-(二甲基胺基)-1-側氧-1-((4-((2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧雜環戊硼烷-2-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸乙酯 (390 mg, 0.614 mmol)、4-((1*r*,3*r*)-3-((4-(3-(3-胺基-6-氯嗒吡-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧)環丁氧基)哌啶-1-甲酸三級丁酯 (395 mg, 0.676 mmol)、Ad₂nBuPPdG2 (41.0 mg, 0.061 mmol) 及 K₂CO₃ (260 mg, 1.22 mmol) 在二噁烷 (5.0 mL) 及 H₂O (1.2 mL) 中之溶液在 95°C 攪拌 2 小時。將所得溶液用水稀釋，並用 EtOAc 萃取。在真空下濃縮有機層。殘餘物藉由預填充之 C18 柱 (溶劑梯度：0-100% MeOH 於水 (0.1% NH₄HCO₃)) 純化，以得到 310 mg (產率 47%) 白色固體狀標題化合物。LC-MS：(ESI, *m/z*)：[M+H]⁺ = 1060。

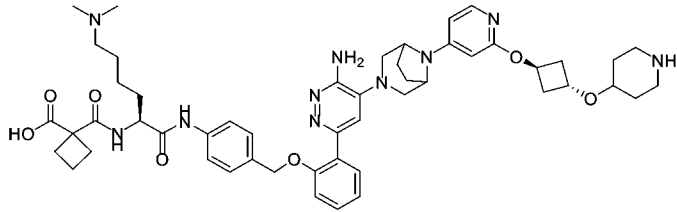
【0333】 步驟 3：1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-((1*r*,3*r*)-3-((1-(三級丁氧羰基)哌啶-4-基)氧基)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒吡-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸鋰



將 4-((1*r*,3*r*)-3-((4-(3-(3-胺基-6-(2-((4-((*S*)-6-(二甲基胺基)-2-(1-(乙氧基羰基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基)氧基)苯基)嗒吡-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)環丁氧基)哌啶-1-羧酸三級丁酯 (270 mg, 0.255 mmol) 及 LiOH·H₂O (32.1 mg, 0.765 mmol) 於 THF (2 mL) 及 H₂O (2 mL) 中之溶液於室溫下攪拌 1 小時。在真空下濃縮將所得混合物。將粗產物直接用於下一步驟。

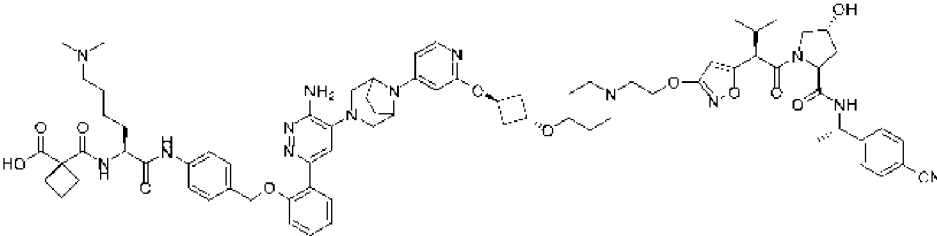
LC-MS：(ESI, *m/z*)：[M+H]⁺ = 1032。

【0334】 步驟 4：1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-((1*r*,3*r*)-3-(哌啶-4-基氧基)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒啉-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲胺基)-1-側氧己-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸



將 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-((1*r*,3*r*)-3-((1-(三級丁氧羰基)哌啶-4-基)氧基)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒啉-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲胺基)-1-側氧己-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸鋰 (由上一步得到的粗產物) 於 TFA (0.75 mL) 及 HFIP (14 mL) 中之溶液於室溫下攪拌 30 分鐘。在真空下濃縮將所得混合物。所獲得的粗產物藉由預填充之 C18 管柱 (溶劑梯度：在水 (0.1% NH_4HCO_3) 中的 0-100% MeOH) 純化，以產生 170 mg (產率 71%) 黃色固體狀標題化合物。LC-MS：(ESI, m/z)：[$M+H$] $^+$ = 932。

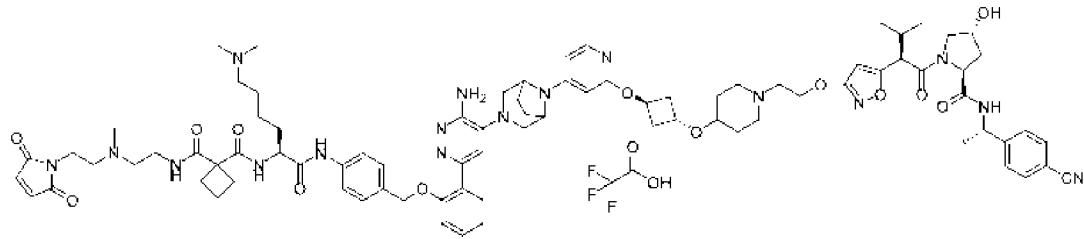
【0335】 步驟 5：1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-((1*R*,3*r*)-3-((1-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-4-羥基吡咯啶-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)乙基)哌啶-4-基)氧)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒啉-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸



在氮氣下，將 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-((1*r*,3*r*)-3-(哌啶-4-基氧基)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒啉-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲胺基)-1-側氧己-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (170.0 mg, 0.183

mmol)、(2*S*,4*R*)-*N*-((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)-4-羥基-1-((*R*)-3-甲基-2-(3-(2-側氧乙氧基)異噁唑-5-基)丁醯基)吡咯啉-2-甲醯胺 (111 mg, 0.237 mmol)、HOAc (21.9 mg, 0.365 mmol) 於 DCM (1.5 mL) 及 MeOH (0.5 mL) 中之溶液於室溫下攪拌 1 小時。然後在 0°C 添加 NaBH₃CN (17.3 mg, 0.274 mmol) 並在室溫攪拌 30 分鐘。用水淬滅反應。在真空下濃縮所得溶液。藉由預填充之 C18 柱 (梯度: 0-100% MeOH 於水 (0.05% NH₄HCO₃) 中) 純化所獲得之粗產物, 以得到 180 mg (產率 71%) 白色固體狀標題化合物。LC-MS: (ESI, *m/z*): [M+H]⁺ = 1384。

【0336】 步驟 5: *N*-((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-((1*R*,3*r*)-3-((1-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-4-羥基吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)乙基)哌啶-4-基)氧)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒吡啶-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)-*N*-(2-((2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)乙基)(甲基)胺基)乙基)環丁烷-1,1-二甲醯胺 (2,2,2-三氟乙酸鹽)



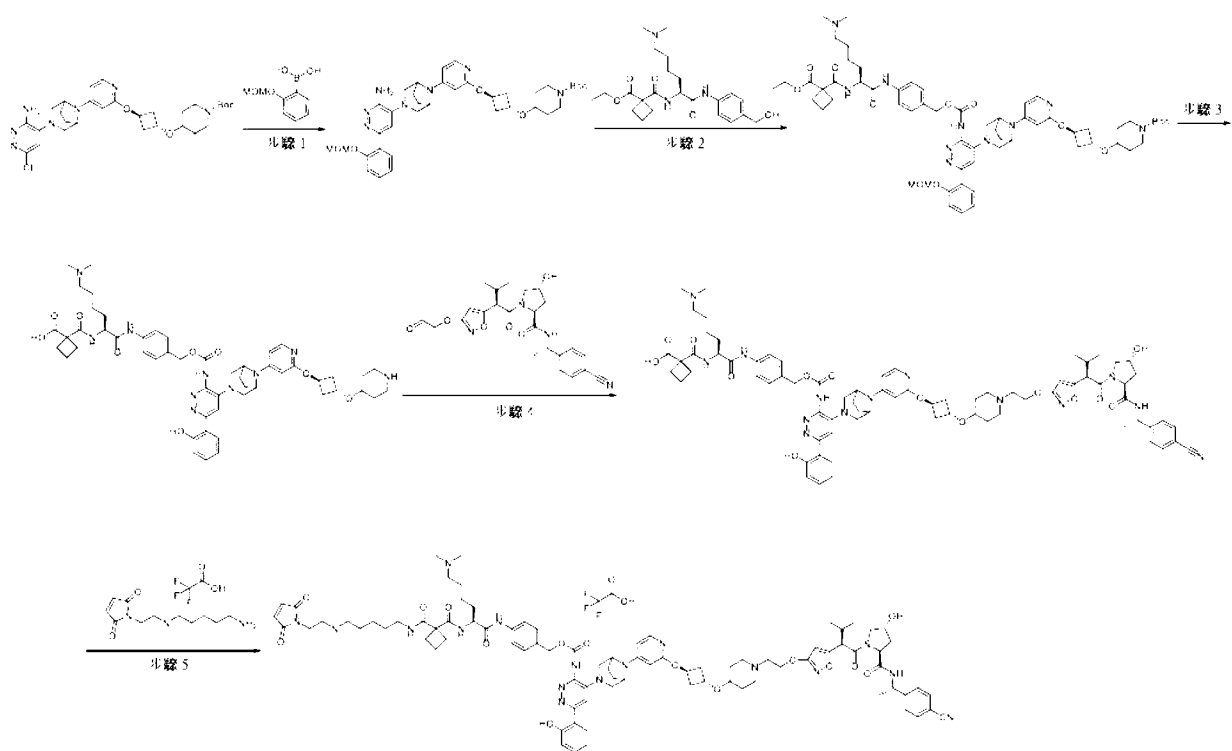
在室溫向 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-((1*R*,3*r*)-3-((1-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-4-羥基吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)乙基)哌啶-4-基)氧)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒吡啶-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (2,2,2-三氟乙酸鹽) (60.0 mg, 粗產物)、1-(2-((2-胺基乙基)(甲基)胺基)乙基)-1*H*-吡咯-2,5-二酮 (12.8 mg, 0.065 mmol)、DIPEA (56.0 mg, 0.434 mmol) 在 DMF (1 mL) 中之溶液中添加 HATU (19.8 mg,

0.052 mmol)。將反應在室溫攪拌 30 分鐘。將所得溶液藉由製備型 HPLC (Xselect CSH C18 OBD 柱，30 x 150mm 5 μ m；流動相 A：水 (0.05% TFA)，流動相 B：ACN；流速：60 mL/min；梯度：在 8 分鐘內由 8% B 至 32% B；254/220 nm；R_{T1}：8 分鐘) 純化，以產生 29.5 mg (產率 43%) 白色固體狀 **Hy-B-CIDE-7**。LC-MS：(ESI, m/z)：[M+H]⁺ = 1563。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.22 (s, 1H), 9.69 (br, 2H), 8.46 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.90-7.70 (m, 4H), 7.70-7.50(m, 4H), 7.51 – 7.27 (m, 6H), 7.19 – 6.96 (m, 5H), 6.65 (s, 1H), 6.17 – 5.98 (m, 2H), 5.22 (s, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.90 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 4.51 (s, 4H), 4.45 – 4.19 (m, 5H), 3.76 – 3.65 (m, 7H), 3.43 (s, 5H), 3.30-3.20 (m, 5H), 3.14 – 2.97 (m, 6H), 2.84 (s, 3H), 2.75 (s, 7H), 2.42-2.30 (m, 7H), 2.27 – 2.24 (m, 1H), 2.07 – 1.52 (m, 17H), 1.50-1.20 (m, 5H), 0.96 (t, *J* = 6.3 Hz, 3H), 0.82 (dd, *J* = 9.1, 6.6 Hz, 3H)。

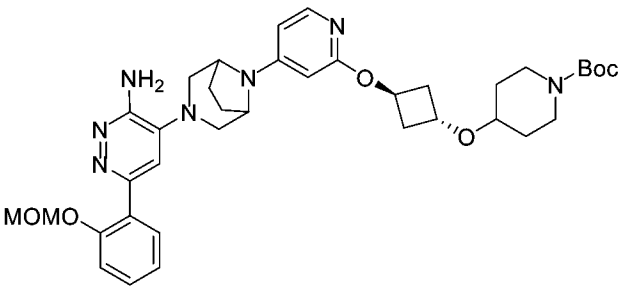
實例 20

Hy-B-CIDE-9 之合成

【0337】 6-(8-氯-4-(2-(二甲基胺基)乙基)-5,6-二氫-4*H*-[1,4]氧氮吡并(oxazepino)[5,6,7-de]喹啉-9-基)-4-甲基-5-(三氟甲基)吡啶-2-胺 (2,2,2-三氟乙酸鹽)



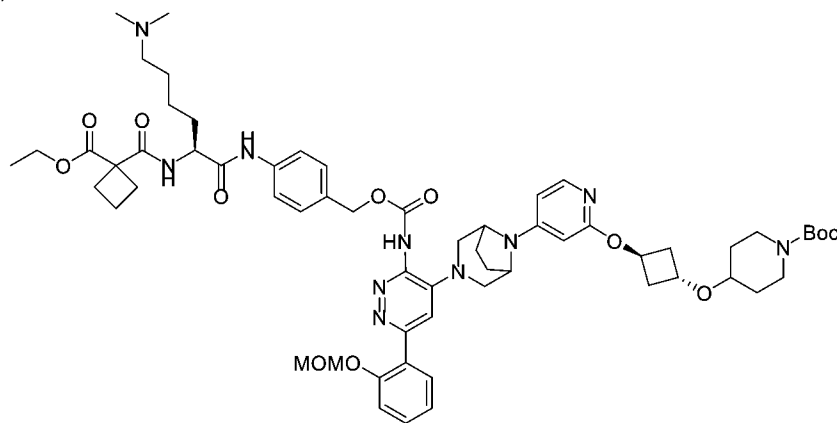
【0338】 步驟 1：4-((1*r*,3*r*)-3-((4-(3-(3-胺基-6-(2-(甲氧基甲氧基)苯基)嗒
吡-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧)環丁氧基)哌啶-1-甲酸三
級丁酯



在氮氣下，將 4-((1*r*,3*r*)-3-((4-(3-(3-胺基-6-氯嗒吡-4-基)-3,8-二氮雜雙環
[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧)環丁氧基)哌啶-1-甲酸三級丁酯 (1.50 g, 2.56
mmol)、2-(甲氧基甲氧基)苯基硼酸 (559 mg, 3.07 mmol)、Pd(PPh₃)₄ (591 mg,
0.512 mmol) 及 K₂CO₃ (1.06 g, 7.68 mmol) 在二噁烷 (12.5 mL) 及 H₂O (2.5 mL)
中之溶液在 100°C 攪拌 1 小時。反應混合物用水稀釋並用 DCM 萃取。合併之
有機層經無水 Na₂SO₄ 乾燥並在減壓下濃縮。所獲得的粗產物藉由急速層析法

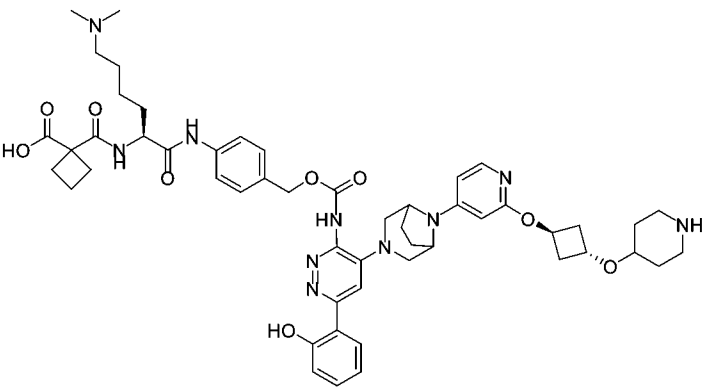
在矽膠管柱上 (溶劑梯度：0-10% MeOH/DCM) 純化，以得到 1.33 g (產率 75%) 黃色固體狀標題化合物。LCMS (ESI, m/z) : $[M+H]^+ = 688$ 。

【0339】 步驟 2：4-((1*r*,3*r*)-3-((4-(3-(3-(((4-((*S*)-6-(二甲基胺基)-2-(1-(乙氧基羰基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基)氧)羰基)胺基)-6-(2-(甲氧基甲氧基)苯基)嗒吡-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧)環丁氧基)哌啶-1-甲酸三級丁酯



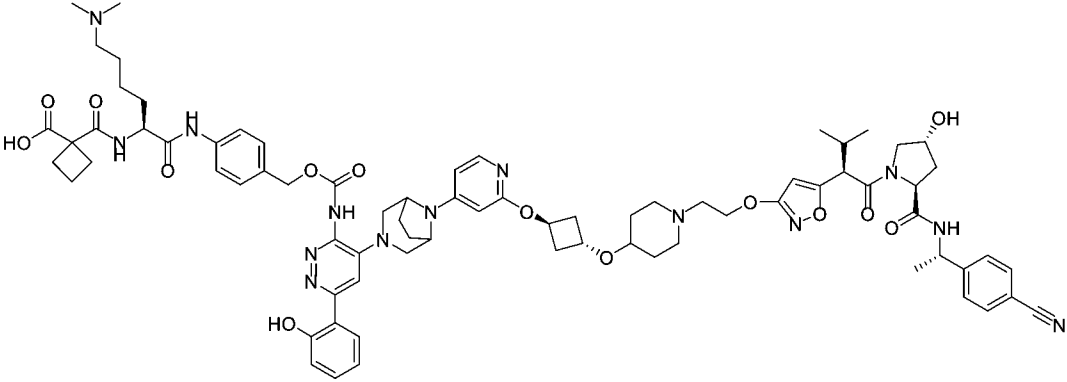
在氮氣下，在 0°C 向 4-((1*r*,3*r*)-3-((4-(3-(3-胺基)-6-(2-(甲氧基甲氧基)苯基)嗒吡-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧)環丁氧基)哌啶-1-甲酸三級丁酯 (400 mg, 0.582 mmol)、(*S*)-1-(((6-(二甲基胺基)-1-((4-(羥基甲基)苯基)胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸乙酯 (882 mg, 2.04 mmol) 及 DIPEA (1.19 g, 9.20 mmol) 在 THF (10 mL) 中之溶液中添加三光氣 (313 mg, 1.05 mmol)。將反應在室溫攪拌 0.5 小時。蒸發溶劑，並且殘餘物藉由預填充之 C18 管柱 (溶劑梯度：在水 (0.05% NH_4HCO_3) 中的 0-100% MeOH) 純化，以產生 160 mg (23%) 黃色固體狀標題化合物。LC-MS : (ESI, m/z) : $[M+H]^+ = 1148$ 。

【0340】 步驟 3：1-(((2*S*)-6-(二甲基胺基)-1-((4-(((6-(2-胺基苯基)-4-(8-(2-((1*r*,3*r*)-3-(哌啶-4-基氧)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒吡-3-基)胺甲醯基)氧)甲基)苯基)胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸



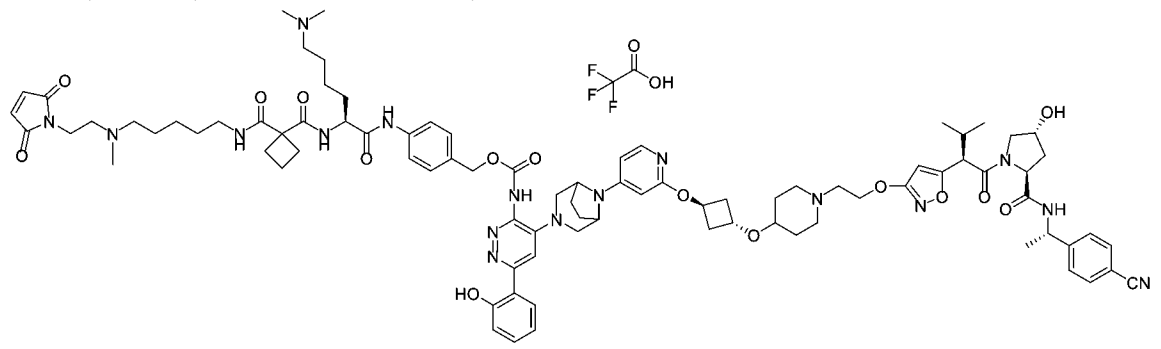
將 4-((1*r*,3*r*)-3-((4-(3-(3-(((4-((*S*)-6-(二甲基氨基)-2-(1-(乙氧基羰基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基)氧)羰基)胺基)-6-(2-(甲氧基甲氧基)苯基)嗒吡-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧)環丁氧基)哌啶-1-甲酸三級丁酯 (60.0 mg, 0.0520 mmol) 及 LiOH·H₂O (6.58 mg, 0.156 mmol) 在 THF (0.5 ml) 及 H₂O (0.5 ml) 中之溶液在室溫攪拌 1 小時。將所得混合物在真空下濃縮。然後將其溶解在濃 HCl (0.33 ml) 及 H₂O (0.67 ml) 的溶液中。將反應在室溫攪拌 20 分鐘。將所得混合物在 0°C 用飽和 NaHCO₃ 溶液鹼化至 pH = 8，並藉由預填充之 C18 管柱 (溶劑梯度：在水 (0.05% NH₄HCO₃) 中的 0-100% MeOH) 純化，以產生 35 mg 黃色固體狀標題化合物。LCMS (ESI, m/z)：[M+H]⁺ = 976。

【0341】 步驟 4：1-(((2*S*)-1-((4-(((4-(8-(2-((1*R*,3*r*)-3-((1-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-4-羥基吡咯啶-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)乙基)哌啶-4-基)氧)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)-6-(2-羥基苯基)嗒吡-3-基)胺甲醯基)氧)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基氨基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸



在氮氣下，將 1-(((2*S*)-6-(二甲基胺基)-1-((4-(((6-(2-羥基苯基)-4-(8-(2-((1*r*,3*r*)-3-(哌啶-4-基氧)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒咩-3-基)胺甲醯基)氧)甲基)苯基)胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (30.0 mg, 0.0310 mmol)、(2*S*,4*R*)-*N*-((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)-4-羥基-1-((*R*)-3-甲基-2-(3-(2-側氧乙氧基)異噁唑-5-基)丁醯基)吡咯啉-2-甲醯胺 (28.8 mg, 0.0620 mmol) 及 HOAc (3.69 mg, 0.0620 mmol) 在 DCM (0.75 mL) 及 MeOH (0.25 mL) 中之溶液在室溫攪拌 1 小時。然後添加 NaBH₃CN (2.90 mg, 0.0460 mmol) 並在室溫攪拌 0.5 小時。在 0°C 用水淬滅反應。將所得混合物在真空下濃縮並藉由預填充之 C18 管柱 (溶劑梯度：在水 (0.05% NH₄HCO₃) 中的 0-100% MeOH) 純化，以產生 27 mg 白色固體狀標題化合物。LCMS (ESI, m/z) : [M+H]⁺ = 1428。

【0342】 步驟 5：(4-(8-(2-((1*R*,3*r*)-3-((1-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-4-羥基吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)乙基)哌啶-4-基)氧)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)-6-(2-羥基苯基)嗒咩-3-基)胺甲酸 4-((*S*)-6-(二甲基胺基)-2-(1-((5-((2-(2,5-二側氧-2,5-二氮-1*H*-吡咯-1-基)乙基)(甲基)胺基)戊基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄酯 (2,2,2-三氟乙酸鹽)



在室溫向 1-(((2*S*)-1-((4-(((4-(8-(2-((1*R*,3*r*)-3-((1-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-4-羥基吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)乙基)哌啶-4-基)氧)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環

[3.2.1]辛烷-3-基)-6-(2-羥基苯基)嗒咩-3-基)胺甲醯基)氧)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (22.0 mg, 0.0150 mmol)、1-(2-((5-胺基戊基)(甲基)胺基)乙基)-1*H*-吡咯-2,5-二酮 (2,2,2-三氟乙酸鹽) (5.5 mg, 粗產物) 及 DIPEA (19.9 mg, 0.154 mmol) 在 DMF (1 mL) 中之溶液中添加 HATU (7.62 mg, 0.0200 mmol)。將反應在室溫攪拌 10 分鐘。所得混合物藉由製備型 HPLC 純化，使用以下條件：管柱：XBridge Shield RP18 OBD 管柱，30 × 150 mm，5 μm；流動相 A：水 (0.05% TFA)，流動相 B：ACN；流速：60 mL/min；梯度：B 於 10 分鐘內由 2% 增加至 32%，保持 32% B；波長：220/254 nm；R_T(min)：11.93；以產生 13.8 mg 白色固體狀 **Hy-B-CIDE-9**。

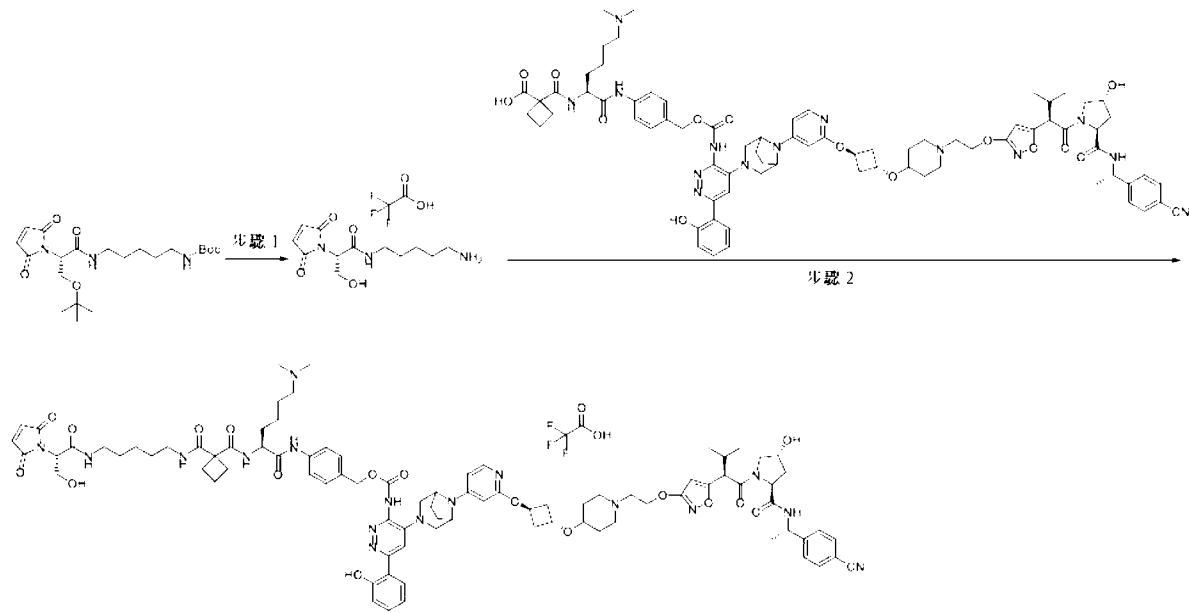
【0343】 LCMS (ESI, m/z)：[M+H]⁺ = 1649。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 10.17 (s, 1H), 10.03 (s, 1H), 9.70 (br, 1 H), 9.47 (br, 2 H), 8.47 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.99 – 7.83 (m, 4H), 7.78 (m, *J* = 9.1, 7.3 Hz, 2H), 7.64 (d, *J* = 8.2 Hz, 3H), 7.45 (m, *J* = 8.5, 2.4 Hz, 2H), 7.37 – 7.25 (m, 3H), 7.08 (d, *J* = 3.9 Hz, 2H), 6.98 – 6.90 (m, 2H), 6.72 (s, 1H), 6.22 (s, 1H), 6.14 (s, 1H), 5.20 (s, 1H), 5.11 (s, 2H), 4.89 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.69 (s, 2H), 4.50 (s, 2H), 4.44 – 4.38 (m, 1H), 4.31 (t, *J* = 11.3 Hz, 3H), 3.75 – 3.69 (m, 7H), 3.42 – 3.39 (m, 2H), 3.38 – 3.33 (m, 2H), 3.33 – 3.27 (m, 3H), 3.27 – 3.12 (m, 7H), 3.12 – 3.00 (m, 4H), 3.00 (s, 3H), 2.74 (s, 6H), 2.46 – 2.38 (m, 7H), 2.37 – 2.09 (m, 1H), 2.05 – 2.00 (m, 2H), 1.95 – 1.85 (m, 5H), 1.85 – 1.75 (m, 5H), 1.75 – 1.59 (m, 5H), 1.43 (t, *J* = 6.6 Hz, 3H), 1.33 (d, *J* = 7.0 Hz, 4H), 1.30 – 1.20 (m, 3H), 0.94 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 0.78 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H)。

實例 21

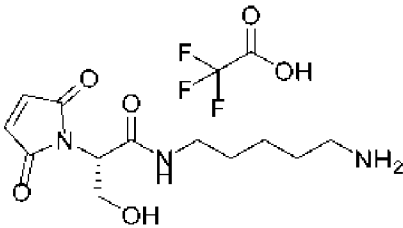
Hy-B-CIDE-10 之合成

【0344】 (4-(8-(2-((1*R*,3*r*)-3-((1-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-4-羥基吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)

乙基)哌啶-4-基)氧)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)-6-(2-羥基苯基)嗒咁-3-基)胺甲酸 4-((*S*)-6-(二甲基胺基)-2-(1-((5-((*S*)-2-(2,5-二側氧-2,5-二氮-1*H*-吡咯-1-基)-3-羥基丙醯胺基)戊基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄酯



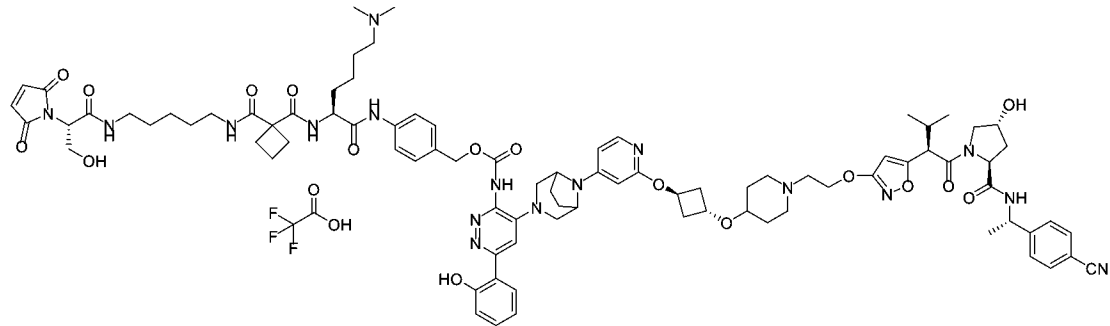
驟 1 : (S)-N-(5-胺基戊基)-2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)-3-羥基丙醯胺
(2,2,2-三氟乙酸)



在氮氣下，將 (*S*)-(5-(3-(三級丁氧基)-2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)丙醯胺基)戊基)胺甲酸三級丁酯 (8.8 mg, 0.0094 mmol) 在 TFA (0.3 mL) 中之溶液在室溫攪拌 1.5 小時。將溶劑在真空下濃縮，以得到 10 mg (粗產物) 無色油狀標題化合物。LCMS (ESI, *m/z*) : $[M+H]^+ = 270$ 。

【0345】 步驟 2：(4-(8-(2-((1*R*,3*r*)-3-((1-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-
 氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-4-羥基吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-
 3-基)氧)乙基)哌啶-4-基)氧)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-

基)-6-(2-羥基苯基)嗒咩-3-基)胺甲酸 4-((*S*)-6-(二甲基胺基)-2-(1-((*S*)-2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)-3-羥基丙醯胺基)戊基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄酯 (2,2,2-三氟乙酸鹽)



在室溫向 1-(((2*S*)-1-((4-(((4-(8-(2-((1*R*,3*r*)-3-((1-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-羥基苯基)乙基)胺甲醯基)-4-羥基吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)乙基)哌啶-4-基)氧)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)-6-(2-羥基苯基)嗒咩-3-基)胺甲醯基)氧)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (27.0 mg, 0.0190 mmol)、(*S*)-*N*-(5-胺基戊基)-2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)-3-羥基丙醯胺 (2,2,2-三氟乙酸) (8.8 mg, 粗產物) 及 DIPEA (24.4 mg, 0.189 mmol) 在 DMF (0.9 mL) 中之溶液中添加 HATU (9.3 mg, 0.025 mmol)。將反應在室溫攪拌 10 分鐘。粗產物藉由製備型 HPLC 純化，使用以下條件：管柱：Xselect CSH C18 OBD 管柱 30 × 150 mm 5 μm，n；流動相 A：水 (0.05% TFA)，流動相 B：ACN；流速：60 mL/min；梯度：B 於 12 分鐘內由 15% 增加至 27%，保持 27% B；波長：254/220 nm；R_T(min)：12；以產生 9.9 mg 白色固體狀 **Hy-B-CIDE-10**。

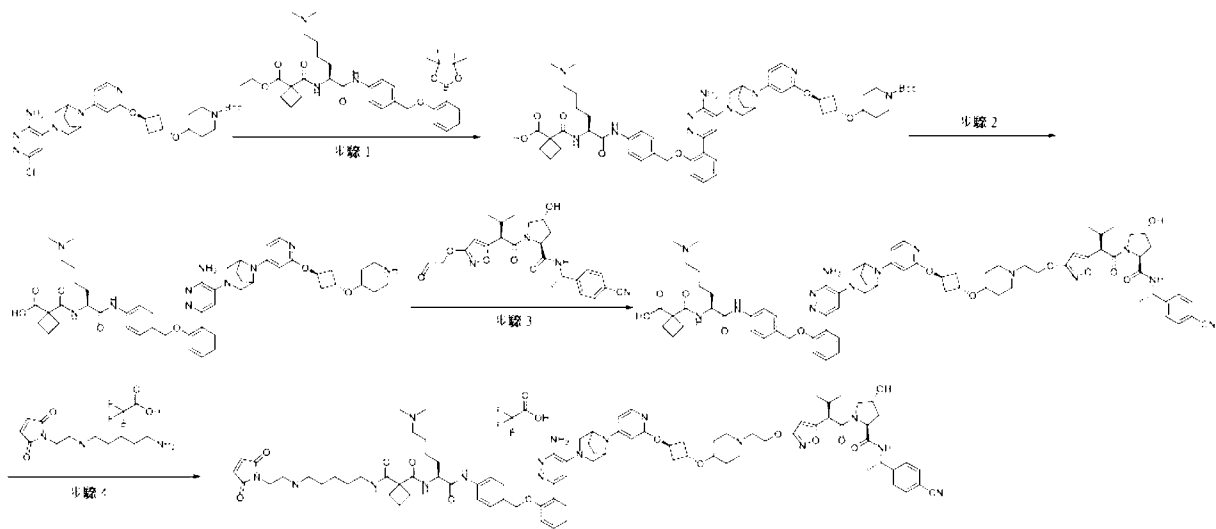
【0346】 LCMS (ESI, *m/z*)：[*M*+*H*]⁺ = 1679。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 10.16 (s, 1H), 10.04 (s, 1H), 9.60 (br, 1H), 9.35 (br, 1H), 8.47 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 8.06 – 7.84 (m, 4H), 7.79 (t, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.69 – 7.58 (m, 3H), 7.45 (d, *J* = 8.4, 2H), 7.40 – 7.34 (m, 3H), 7.04 (s, 2H), 7.00 – 6.88 (m, 2H), 6.72 (s, 1H), 6.21

(s, 1H), 6.14 (s, 1H), 5.19 (s, 1H), 5.11 (s, 2H), 4.89 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 4.68 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.55 – 4.23 (m, 7H), 3.97 – 3.82 (m, 2H), 3.67 (d, *J* = 9.5 Hz, 3H), 3.62 – 3.52 (m, 8H), 3.17 – 2.95 (m, 10H), 2.73 (d, *J* = 4.1 Hz, 6H), 2.45 – 2.30 (m, 8H), 2.19 – 1.97 (m, 4H), 1.95 – 1.85 (m, 5H), 1.82 – 1.53 (m, 8H), 1.45 – 1.30 (m, 8H), 1.25 – 1.15 (m, 4H), 0.95 (t, *J* = 6.4 Hz, 3H), 0.90 – 0.70 (m, 3H)。

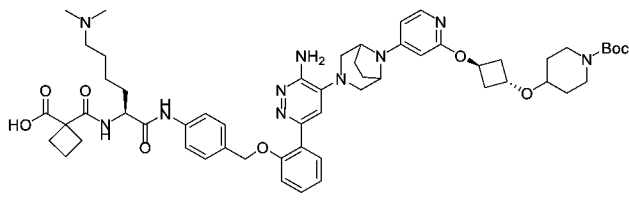
實例 22

Hy-B-CIDE-11 之合成

【0347】 *N*-((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-((1*R*,3*r*)-3-((1-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-4-羥基吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)乙基)哌啶-4-基)氧)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒吡-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)-*N*-(5-((2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)乙基)(甲基)胺基)戊基)環丁烷-1,1-二甲醯胺 (2,2,2-三氟乙酸鹽)

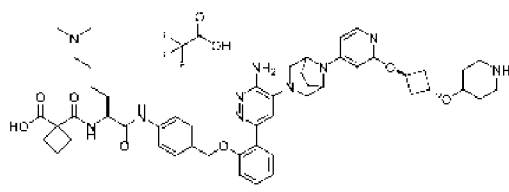


【0348】 步驟 1：1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-((1*r*,3*r*)-3-((1-(三級丁氧基羰基)哌啶-4-基)氧)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒吡-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸



在氮氣下，將 4-((1*r*,3*r*)-3-((4-(3-(3-胺基-6-氯嗒吡-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧)環丁氧基)哌啶-1-甲酸三級丁酯 (550 mg, 0.900 mmol)、(S)-1-((6-(二甲基胺基)-1-側氧-1-((4-((2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧雜環戊硼烷-2-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸乙酯 (600 mg, 0.900 mmol)、Pd(dppf)Cl₂ (138 mg, 0.200 mmol) 及 Na₂CO₃ (300 mg, 2.800 mmol) 在 1,4-二噁烷 (10 mL) 及水 (2 mL) 中之溶液在110°C 攪拌 1 小時。將反應冷卻至室溫並添加 LiOH.H₂O (160 mg, 3.800 mmol)。將反應在室溫攪拌 1 小時。所得混合物藉由預填充之 C18 管柱 (溶劑梯度：在水 (0.5% NH₄HCO₃) 中的 0-70% ACN) 純化，以得到 383 mg (產率 39%) 棕色固體狀標題化合物。LCMS (ESI, m/z)：[M+H]⁺ = 1032。

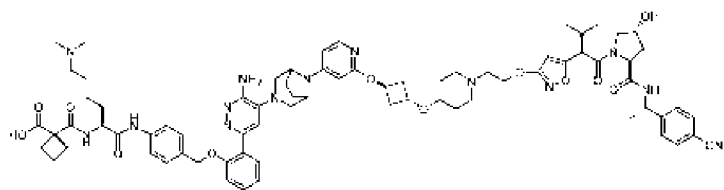
【0349】 步驟 2：1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-((1*r*,3*r*)-3-(哌啶-4-基氧)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒吡-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (2,2,2-三氟乙酸鹽)



將 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-((1*r*,3*r*)-3-((1-(三級丁氧基羰基)哌啶-4-基)氧)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒吡-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (383.0 mg, 0.3700 mmol) 在 DCM (1 mL) 及 2,2,2-三氟乙酸 (1 mL) 中之溶液在室溫攪拌 30 分鐘。將溶劑在真空下蒸發，並且殘餘物藉由預填充之 C18 管柱 (溶劑梯

度：在水 (0.05% TFA) 中的 0-100% ACN) 純化，以得到 290 mg 白色固體狀標題化合物。LCMS (ESI, m/z) : $[M+H]^+ = 931$ 。

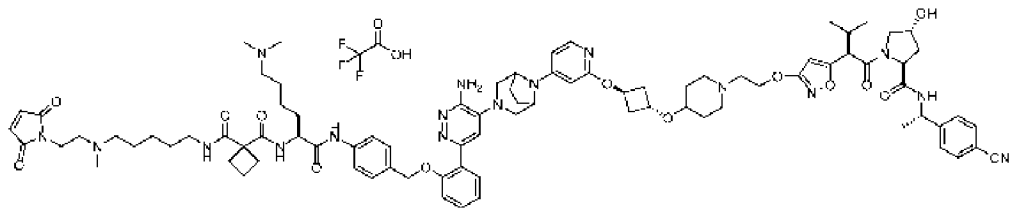
【0350】 步驟 3：1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-((1*R*,3*r*)-3-((1-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-4-羥基吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)乙基)哌啶-4-基)氧)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒吡-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸



將 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-((1*R*,3*r*)-3-(哌啶-4-基氧)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒吡-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (2,2,2-三氟乙酸鹽) (260 mg, 0.248 mmol)、(2*S*,4*R*)-*N*-((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)-4-羥基-1-((*R*)-3-甲基-2-(3-(2-側氧乙氧基)異噁唑-5-基)丁烯基)吡咯啉-2-甲醯胺 (195 mg, 0.420 mmol) 及 NaOAc (228 mg, 2.79 mmol) 在 MeOH (1 mL) 及 DCM (3 mL) 中之溶液在室溫攪拌 1 小時。然後添加 NaBH₃CN (52.0 mg, 0.830 mmol) 並在室溫攪拌 1 小時。粗產物藉由預填充之 C18 管柱 (溶劑梯度：在水 (0.05% NH₄HCO₃) 中的 0-100% MeOH) 純化，以得到 210 mg 黃色固體狀標題化合物。LCMS (ESI, m/z) : $[M+H]^+ = 1383$ 。

【0351】 步驟 4：*N*-((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-((1*R*,3*r*)-3-((1-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-4-羥基吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)乙基)哌啶-4-基)氧)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒吡-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-

側氧己烷-2-基)-*N*-(5-((2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)乙基)(甲基)胺基)戊基)環丁烷-1,1-二甲醯胺 (2,2,2-三氟乙酸鹽)



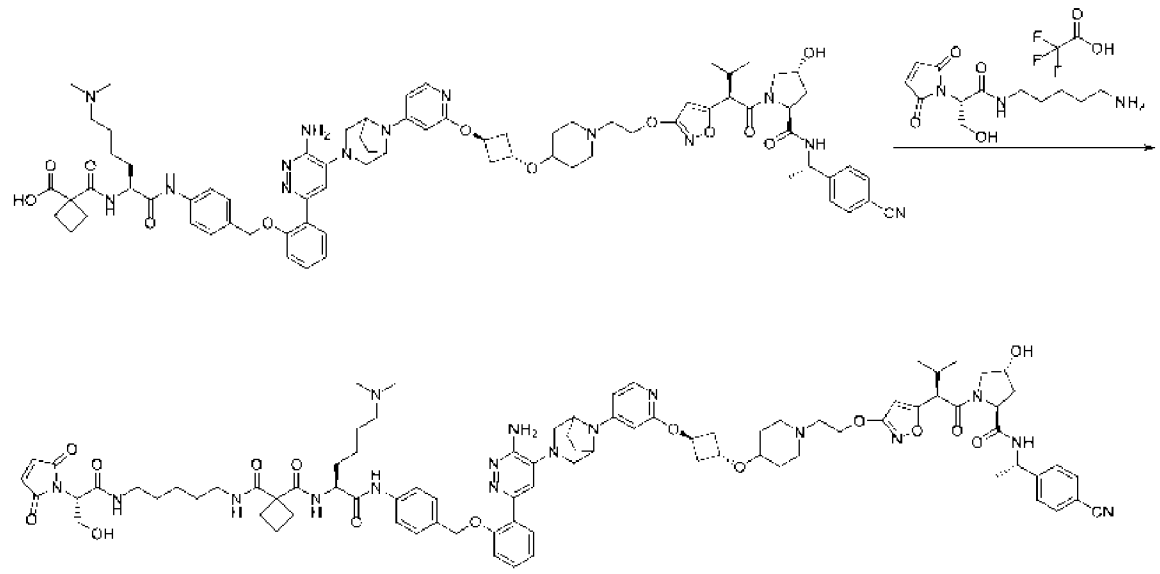
在室溫向 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-((1*R*,3*r*)-3-((1-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-4-羥基吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)乙基)哌啶-4-基)氧)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒咩-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (50.0 mg, 0.0400 mmol)、1-(2-((5-胺基戊基)(甲基)胺基)乙基)-1*H*-吡咯-2,5-二酮 (2,2,2-三氟乙酸鹽) (30.0 mg, 粗產物) 及 DIPEA (46.6 mg, 0.360 mmol) 在 DMF (1 mL) 中之溶液中添加 HATU (18.0 mg, 0.0500 mmol)。將反應在室溫攪拌 10 分鐘。粗產物藉由製備型 HPLC 純化，使用以下條件：管柱：Xselect CSH C18 OBD 管柱 30 × 150 mm 5 μm，n；流動相 A：水 (0.05% TFA)，流動相 B：ACN；流速：60 mL/min；梯度：B 於 12 分鐘內由 8% 增加至 26%，保持 26% B；波長：254/220 nm；R_T(min)：12；以得到 16.7 mg 白色固體狀 **Hy-B-CIDE-11**。LCMS (ESI, *m/z*)：[*M*+*H*]⁺ = 1604。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, *ppm*) δ 10.12 (s, 1H), 9.53 (s, 2H), 8.36 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 8.00 – 7.77 (m, 3H), 7.74 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.55 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.51 – 7.39 (m, 2H), 7.45 – 7.29 (m, 5H), 7.21 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.02 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.96 (s, 2H), 6.87 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 6.04 (d, *J* = 9.9 Hz, 2H), 5.09 (s, 1H), 4.97 (s, 2H), 4.80 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.69 – 4.49 (m, 1H), 4.39 (s, 4H), 4.37 – 4.30 (m, 1H), 4.27 – 4.03 (m, 3H), 3.70 – 3.52 (m, 6H), 3.40 – 3.30 (m, 5H), 3.03 – 2.78 (m, 11H), 2.82 – 2.70 (m, 9H), 2.45 – 2.30 (m, 8H), 2.22 – 2.15 (m, 1H), 1.97 – 1.84 (m, 4H),

1.77 (s, 4H), 1.69 – 1.54 (m, 5H), 1.54 – 1.40 (m, 5H), 1.39 – 1.28 (m, 3H), 1.25 – 1.14 (m, 8H), 0.84 (t, J = 6.3 Hz, 3H), 0.69 (dd, J = 9.2, 6.6 Hz, 3H)。

實例 23

Hy-B-CIDE-12 之合成

【0352】 *N*-((2*S*)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(8-(2-((1*R*,3*r*)-3-((1-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-4-羥基吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)乙基)哌啶-4-基)氧)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒吡-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)-*N*-(5-((*S*)-2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)-3-羥基丙醯胺基)戊基)環丁烷-1,1-二甲醯胺 (2,2,2-三氟乙酸鹽)



【0353】 步驟 1：*N*-((2*S*)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(8-(2-((1*R*,3*r*)-3-((1-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-4-羥基吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)乙基)哌啶-4-基)氧)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒吡-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)-*N*-(5-((*S*)-2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)-3-羥基丙醯胺基)戊基)環丁烷-1,1-二甲醯胺 (2,2,2-三氟乙酸鹽)

在氮氣下，在室溫向 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(8-(2-((1*R*,3*r*)-3-((1-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-4-羥基吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)乙基)哌啶-4-基)氧)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒吡-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (40.0 mg, 0.0300 mmol)、(*S*)-*N*-(5-氨基戊基)-2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)-3-羥基丙醯胺 (2,2,2-三氟乙酸鹽) (30.0 mg，粗產物) 及 DIPEA (37.0 mg, 0.290 mmol) 在 *N,N*-二甲基甲醯胺 (1 mL) 中之溶液中添加 HATU (14.0 mg, 0.0400 mmol)。將反應在室溫攪拌 10 分鐘。產物藉由製備型 HPLC 純化，使用以下條件：管柱：Xselect CSH C18 OBD 管柱 30 × 150 mm 5 μm，n；流動相 A：水 (0.05% TFA)，流動相 B：ACN；流速：60 mL/min；梯度：B 於 12 分鐘內由 12% 增加至 27%，保持 27% B；波長：254/220 nm；R_T(min)：12；以得到 7.2 mg 白色固體狀 **Hy-B-CIDE-12**。

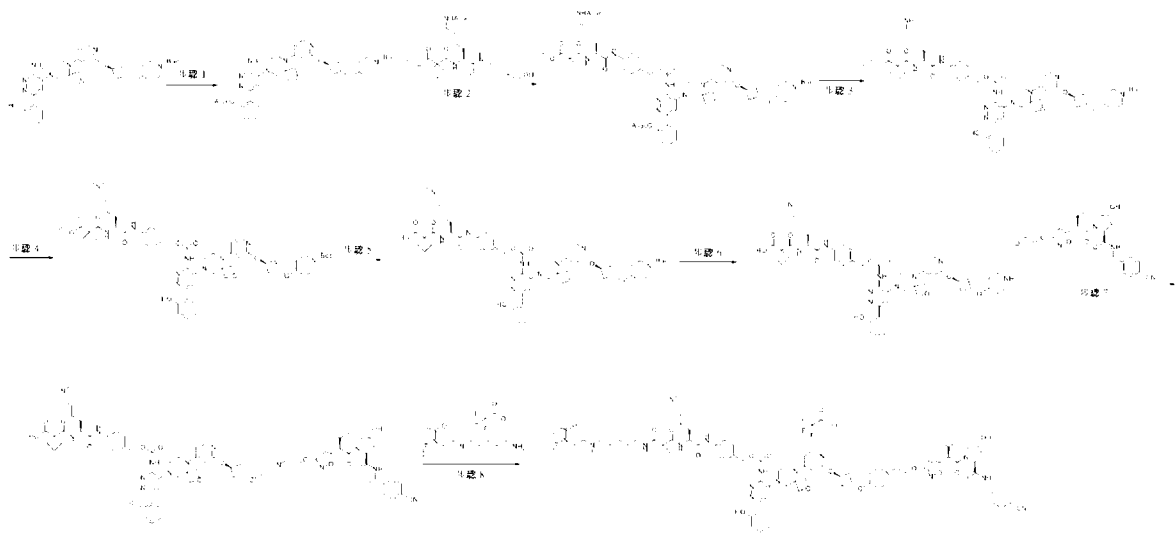
LCMS (ESI, m/z)：[M+H]⁺ = 1634。 ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 10.23 (s, 1H), 9.59 (d, J = 47.0 Hz, 2H), 8.49 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 8.00 – 7.75 (m, 6H), 7.68 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.57 (t, J = 8.6 Hz, 2H), 7.52 – 7.28 (m, 6H), 7.14 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.05 (s, 2H), 6.98 (s, 1H), 6.64 (s, 1H), 6.17 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 5.25 – 5.05 (m, 4H), 4.92 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 4.58 – 4.25 (m, 9H), 4.01 – 3.85 (m, 3H), 3.74 – 3.66 (m, 3H), 3.17 – 2.96 (m, 11H), 2.80 – 2.70 (m, 7H), 2.45 – 2.30 (m, 8H), 2.29 – 2.18 (m, 2H), 2.16 – 1.52 (m, 18H), 1.49 – 1.13 (m, 12H), 0.97 (d, J = 6.4 Hz, 3H), 0.82 (dd, J = 9.3, 6.6 Hz, 3H)。

實例 24

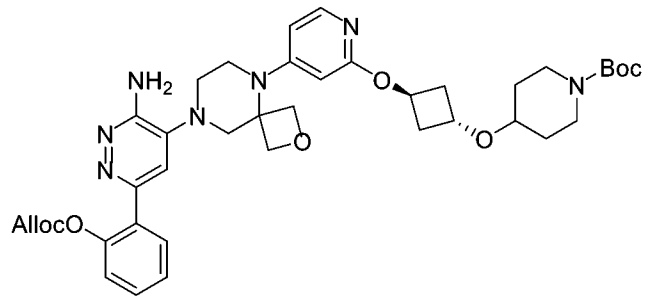
Hy-B-CIDE-13 之合成

【0354】 (4-(5-(2-((1*R*,3*r*)-3-((1-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-4-羥基吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)

乙基)哌啶-4-基)氧)環丁氧基)吡啶-4-基)-2-氧雜-5,8-二氮雜螺[3.5]壬烷-8-基)-6-(2-羥基苯基)嗒咁-3-基)胺甲酸 4-((*S*)-6-(二甲基胺基)-2-(1-((5-((2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)乙基)(甲基)胺基)戊基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄酯 (2,2,2-三氟乙酸鹽)

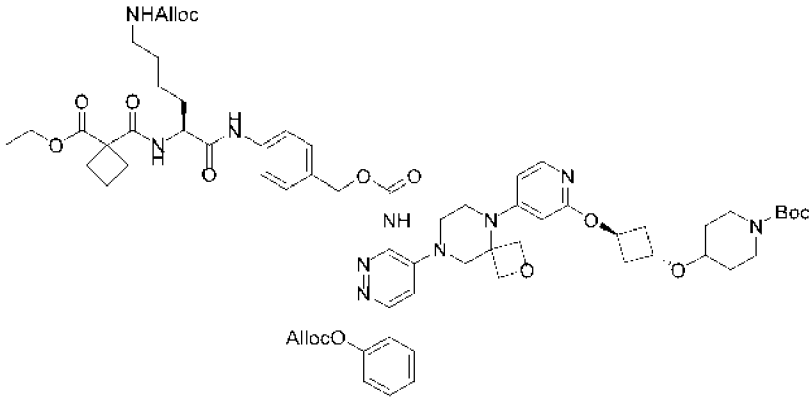


【0355】 步驟 1：4-((1*r*,3*r*)-3-((4-(8-(6-(2-(((烯丙氧基)羰基)氧)苯基)-3-胺基嗒咁-4-基)-2-氧雜-5,8-二氮雜螺[3.5]壬烷-5-基)吡啶-2-基)氧)環丁氧基)哌啶-1-甲酸三級丁酯



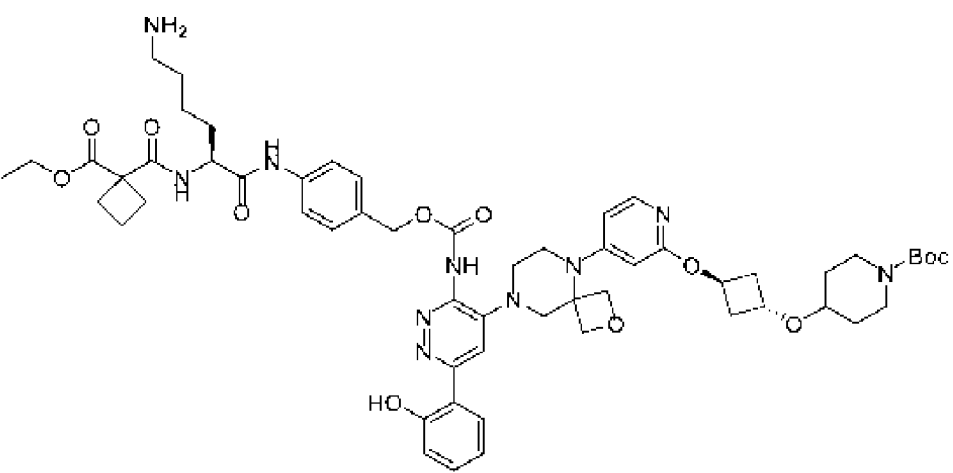
在氮氣下，在 0°C 向 4-((1*r*,3*r*)-3-((4-(8-(3-胺基-6-(2-羥基苯基)嗒咁-4-基)-2-氧雜-5,8-二氮雜螺[3.5]壬烷-5-基)吡啶-2-基)氧)環丁氧基)哌啶-1-甲酸三級丁酯 (480 mg, 7.28 mmol) 及 DIPEA (847 mg, 65.6 mmol) 在 DCM (6 mL) 中之溶液中添加 AllocCl (306 mg, 25.5 mmol)。將所得溶液在室溫攪拌 30 分鐘。粗產物藉由急速層析法在矽膠上 (溶劑梯度：0-5% MeOH/DCM) 純化，以得到 505 mg (產率 86%) 黃色固體狀標題化合物。LC-MS：(ESI, *m/z*)：[*M*+*H*]⁺ = 744。

【0356】 步驟 2：4-((1*r*,3*r*)-3-((4-(8-(3-(((4-((*S*)-6-((烯丙氧基)羰基)胺基)-2-(1-(乙氧基羰基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基)氧)羰基)胺基)-6-(2-(((烯丙氧基)羰基)氧)苯基)嗒吡-4-基)-2-氧雜-5,8-二氮雜螺[3.5]壬烷-5-基)吡啶-2-基)氧)環丁氧基)哌啶-1-甲酸三級丁酯



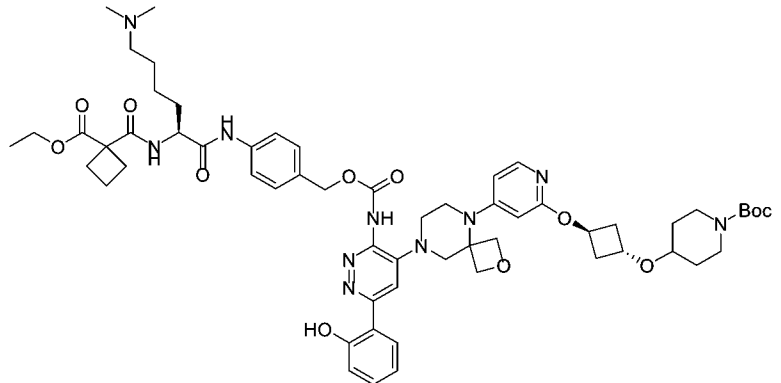
在氮氣下，在 0°C 向 4-((1*r*,3*r*)-3-((4-(8-(6-(2-(((烯丙氧基)羰基)氧)苯基)-3-胺基嗒吡-4-基)-2-氧雜-5,8-二氮雜螺[3.5]壬烷-5-基)吡啶-2-基)氧)環丁氧基)哌啶-1-甲酸三級丁酯 (460 mg, 0.619 mmol)、(*S*)-1-((6-(((烯丙氧基)羰基)胺基)-1-((4-(羥基甲基)苯基)胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸乙酯 (908 mg, 1.86 mmol) 及 DIPEA (480 mg, 3.72 mmol) 在 THF (6 mL) 中之溶液中添加三光氣 (208 mg, 0.433 mmol)。將反應在室溫攪拌 0.5 小時。蒸發溶劑，並且殘餘物藉由預填充之 C18 管柱 (溶劑梯度：在水 (0.05% NH₄HCO₃) 中的 0-100% ACN) 純化，以產生 230 mg (29%) 黃色固體狀標題化合物。LC-MS：(ESI, m/z)：[M+H]⁺ = 1260。

【0357】 步驟 3：4-((1*r*,3*r*)-3-((4-(8-(3-(((4-((*S*)-6-胺基-2-(1-(乙氧基羰基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基)氧)羰基)胺基)-6-(2-羥基苯基)嗒吡-4-基)-2-氧雜-5,8-二氮雜螺[3.5]壬烷-5-基)吡啶-2-基)氧)環丁氧基)哌啶-1-甲酸三級丁酯



在氮氣下，將 4-((1*r*,3*r*)-3-((4-(8-(3-(((4-((*S*)-6-((烯丙氧基)羰基)胺基)-2-(1-(乙氧基羰基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基)氧)羰基)胺基)-6-(2-((烯丙氧基)羰基)氧)苯基)嗒咩-4-基)-2-氧雜-5,8-二氮雜螺[3.5]壬烷-5-基)吡啶-2-基)氧)環丁氧基)哌啶-1-甲酸三級丁酯 (230 mg, 0.183 mmol)、吡咯啉 (131 mg, 1.83 mmol) 及 Pd(PPh₃)₄ (22.0 mg, 0.01830 mmol) 在 DCM (4 mL) 中之溶液在室溫攪拌 1 小時。蒸發溶劑，並且粗產物直接用於下一步驟。

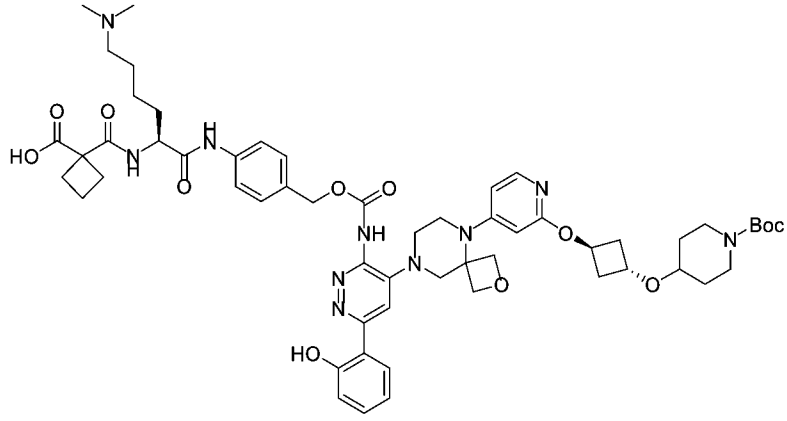
【0358】 步驟 4：4-((1*r*,3*r*)-3-((4-(8-(3-(((4-((*S*)-6-(二甲基胺基)-2-(1-(乙氧基羰基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基)氧)羰基)胺基)-6-(2-羥基苯基)嗒咩-4-基)-2-氧雜-5,8-二氮雜螺[3.5]壬烷-5-基)吡啶-2-基)氧)環丁氧基)哌啶-1-甲酸三級丁酯



在氮氣下，將 4-((1*r*,3*r*)-3-((4-(8-(3-(((4-((*S*)-6-胺基)-2-(1-(乙氧基羰基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基)氧)羰基)胺基)-6-(2-羥基苯基)嗒咩-4-基)-2-氧雜-5,8-二氮雜螺[3.5]壬烷-5-基)吡啶-2-基)氧)環丁氧基)哌啶-1-甲酸三級丁酯 (230

mg，粗產物) 及 37% 水性 CH₂O (230 mg) 在 MeOH (4 mL) 中之溶液在室溫攪拌 1 小時。然後添加 NaBH₃CN (63.5 mg, 1.06 mmol) 並將溶液在室溫攪拌 15 分鐘。用水淬滅反應，並且所得殘餘物藉由預填充之 C18 管柱 (溶劑梯度：0-90% MeOH 於水 (0.05% NH₄HCO₃) 中) 純化，以得到 140 mg (產率 55%) 黃色固體狀標題化合物。LC-MS：(ESI, m/z)：[M+H]⁺ = 1120。

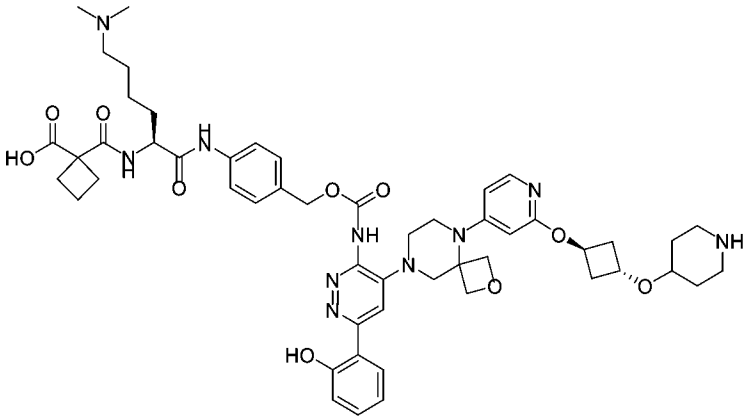
【0359】 步驟 5：1-(((S)-1-((4-(((4-(5-(2-((1*r*,3*r*)-3-((1-(三級丁氧基羰基)哌啶-4-基)氧)環丁氧基)吡啶-4-基)-2-氧雜-5,8-二氮雜螺[3.5]壬烷-8-基)-6-(2-羥基苯基)嗒咩-3-基)胺甲醯基)氧)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸



在氮氣下，將 4-((1*r*,3*r*)-3-((4-(8-(3-(((4-((S)-6-(二甲基胺基)-2-(1-(乙氧基羰基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基)氧)羰基)胺基)-6-(2-羥基苯基)嗒咩-4-基)-2-氧雜-5,8-二氮雜螺[3.5]壬烷-5-基)吡啶-2-基)氧)環丁氧基)哌啶-1-甲酸三級丁酯 (140 mg, 0.125 mmol) 及 LiOH.H₂O (15.9 mg, 0.375 mmol) 在 THF (2 mL) 及 H₂O (2 mL) 中之溶液在室溫攪拌 1 小時。將所得混合物在真空下濃縮，以得到 160 mg (粗產物) 黃色固體狀標題化合物。LC-MS：(ESI, m/z)：[M+H]⁺ = 1092。

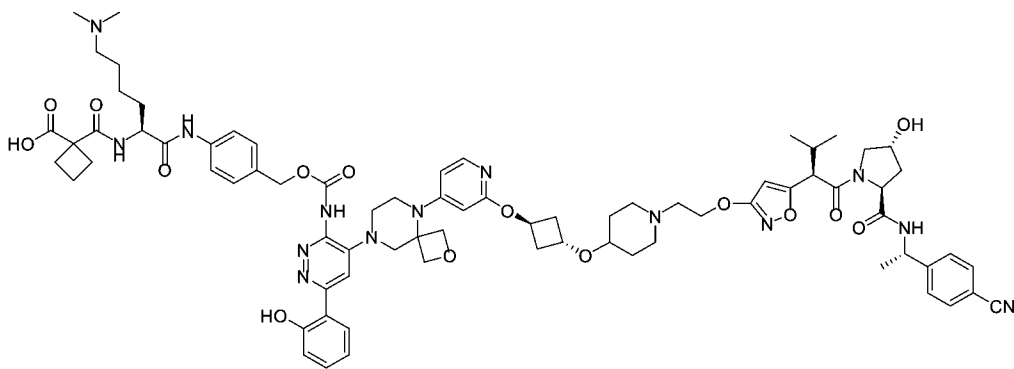
【0360】 步驟 6：1-(((S)-6-(二甲基胺基)-1-((4-(((6-(2-胺基苯基)-4-(5-(2-((1*r*,3*r*)-3-(哌啶-4-基氧)環丁氧基)吡啶-4-基)-2-氧雜-5,8-二氮雜螺[3.5]壬烷-8-基)

嗒咩-3-基)胺甲醯基)氧)甲基)苯基)胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲
酸



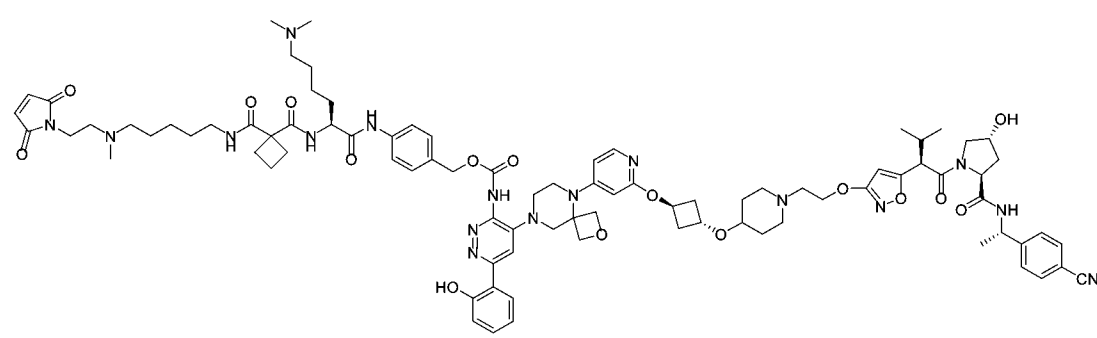
在氮氣下，將 1-(((*S*)-1-((4-(((4-(5-(2-((1*r*,3*r*)-3-((1-(三級丁氧基羰基)哌啶-4-基)氧)環丁氧基)吡啶-4-基)-2-氧雜-5,8-二氮雜螺[3.5]壬烷-8-基)-6-(2-羥基苯基)嗒吡-3-基)胺甲醯基)氧)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (160 mg, 粗產物) 在 HFIP (4.8 mL) 及 2,2,2-三氟乙酸 (0.25 mL) 中之溶液在室溫攪拌 15 分鐘。將溶劑在真空下蒸發並藉由預填充之 C18 管柱 (溶劑梯度：在水 (0.05% NH₄HCO₃) 中的 0-70% ACN) 純化，以得到 74.0 mg (產率 51%) 白色固體狀標題化合物。LC-MS：(ESI, *m/z*)：[*M*+*H*]⁺ = 992。

【0361】 步驟 7：1-(((S)-1-((4-(((4-(5-(2-((1R,3r)-3-((1-(2-((5-((R)-1-((2S,4R)-2-(((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-4-羥基吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)乙基)哌啶-4-基)氧)環丁氧基)吡啶-4-基)-2-氧雜-5,8-二氮雜螺[3.5]壬烷-8-基)-6-(2-羥基苯基)嗒咩-3-基)胺甲醯基)氧)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸



在氮氣下，將 1-(((*S*)-6-(二甲基胺基)-1-((4-(((6-(2-羥基苯基)-4-(5-(2-((1*r*,3*r*)-3-(哌啶-4-基氧)環丁氧基)吡啶-4-基)-2-氧雜-5,8-二氮雜螺[3.5]壬烷-8-基)嗒咩-3-基)胺甲醯基)氧)甲基)苯基)胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (30.0 mg, 0.0300 mmol)、(2*S*,4*R*)-*N*-((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)-4-羥基-1-((*R*)-3-甲基-2-(3-(2-側氧乙氧基)異噁唑-5-基)丁醯基)吡咯啶-2-甲醯胺 (28.5 mg, 0.061 mmol) 及 CH₃COOH (3.60 mg, 0.0610 mmol) 在 MeOH (0.25 mL) 及 DCM (0.75 mL) 中之溶液在室溫攪拌 1 小時。然後添加 NaBH₃CN (3.00 mg, 0.0450 mmol) 並在室溫攪拌 0.5 小時。粗產物藉由預填充之 C18 管柱 (溶劑梯度：在水 (0.05% NH₄HCO₃) 中的 0-80% MeOH) 純化，以得到 18.0 mg (產率 41%) 白色固體狀標題化合物。LC-MS：(ESI, *m/z*)：[*M*+*H*]⁺ = 1444。

【0362】 步驟 8：(4-(5-(2-((1*R*,3*r*)-3-((1-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-4-羥基吡咯啶-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)乙基)哌啶-4-基)氧)環丁氧基)吡啶-4-基)-2-氧雜-5,8-二氮雜螺[3.5]壬烷-8-基)-6-(2-羥基苯基)嗒咩-3-基)胺甲酸 4-(((*S*)-6-(二甲基胺基)-2-(1-((5-((2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)乙基)(甲基)胺基)戊基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄酯 (2,2,2-三氟乙酸鹽)



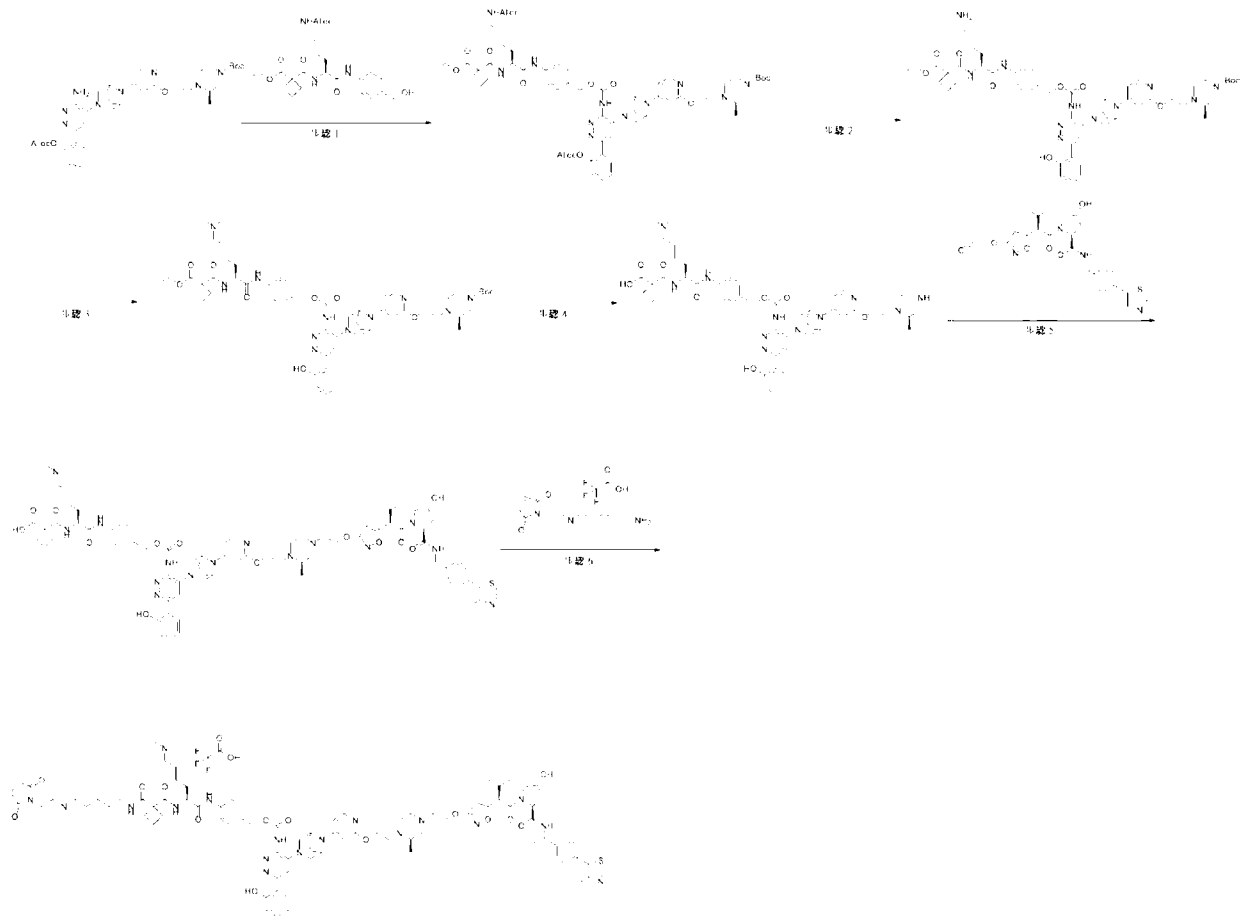
在氮氣下，在室溫向 1-(((*S*)-1-((4-(((4-(5-(2-((1*R*,3*r*)-3-((1-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-4-羥基吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)乙基)哌啶-4-基)氧)環丁氧基)吡啶-4-基)-2-氧雜-5,8-二氮雜螺[3.5]壬烷-8-基)-6-(2-羥基苯基)嗒咩-3-基)胺甲醯基)氧)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (18.0 mg, 0.0125 mmol)、1-(2-((5-胺基戊基)(甲基)胺基)乙基)-1*H*-吡咯-2,5-二酮 (2,2,2-三氟乙酸鹽) (13.0 mg，粗產物) 及 DIPEA (25.8 mg, 0.200 mmol) 在 DMF (1 mL) 中之溶液中添加 HATU (9.50 mg, 0.025 mmol)。將反應在室溫攪拌 10 分鐘。粗產物藉由製備型 HPLC 純化，使用以下條件：管柱：Xselect CSH C18 OBD 管柱 30 × 150 mm 5 μm，n；流動相 A：水 (0.05% TFA)，流動相 B：ACN；流速：60 mL/min；梯度：B 於 10 分鐘內由 14% 增加至 28%，保持 28% B；波長：254/220 nm；R_T(min)：10，以得到 14.9 mg (產率 71.7%) 白色固體狀 **Hy-B-CIDE-13**。LC-MS：(ESI, m/z)：[M+H]⁺ = 1665。 ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 10.17 (d, *J* = 17.2 Hz, 2H), 9.55 (br, 1 H), 9.40 (br, 1 H), 8.49 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 8.03 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.95 – 7.82 (m, 3H), 7.79 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.67 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.47 (m, *J* = 8.4, 2.7 Hz, 2H), 7.38 (t, *J* = 8.5 Hz, 3H), 7.10 (s, 2H), 7.02 – 6.92 (m, 2H), 6.42 – 6.34 (m, 1H), 6.16 (s, 1H), 5.75 (s, 1H), 5.20 (s, 1H), 5.14 (s, 2H), 4.91 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 4.63 (d, *J* = 4.4 Hz, 3H), 4.51 (s, 2H), 4.42 (s, 1H), 4.33 (t, *J* = 8.2 Hz, 2H), 3.81 – 3.66 (m, 10H), 3.21 – 2.94 (m, 13H), 2.82 – 2.74 (m, 9H), 2.45 – 2.20 (m, 12H), 2.18 – 2.00 (m, 3H), 1.92 – 1.70 (m, 7H), 1.70 – 1.50 (m,

5H), 1.47 (q, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.39 – 1.21 (m, 8H), 0.96 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H), 0.80 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H)。

實例 25

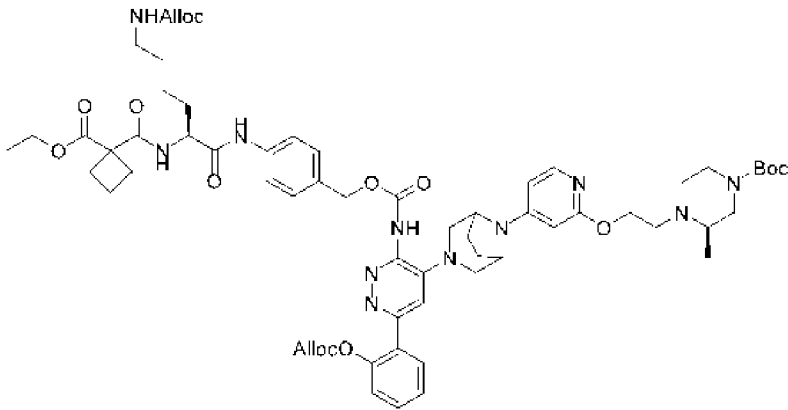
Hy-B-CIDE-14 之合成

【0363】 (4-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-羥基-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)乙基)-2-甲基哌啶-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)-6-(2-羥基苯基)嗒啶-3-基)胺甲酸 4-((*S*)-6-(二甲基氨基)-2-(1-((5-((2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)乙基)(甲基)胺基)戊基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄酯 (2,2,2-三氟乙酸鹽)



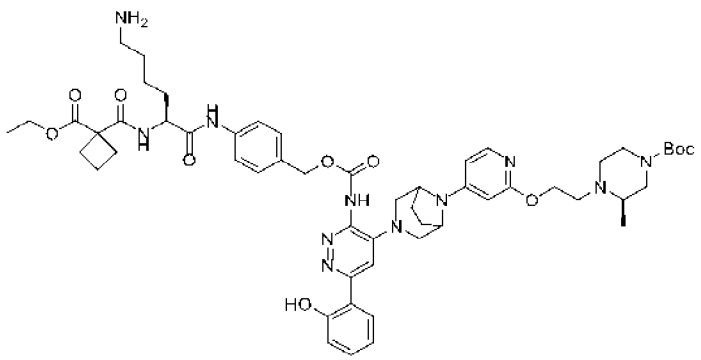
【0364】 步驟 1：(3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-(((4-((*S*)-6-((烯丙氧基)羰基)胺基)-2-(1-(乙氧基羰基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基)氧)羰基)胺基)-6-(2-((烯丙氧

(基)羰基)氧)苯基)嗒吡-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧)乙基)-3-甲基哌吡-1-甲酸三級丁酯



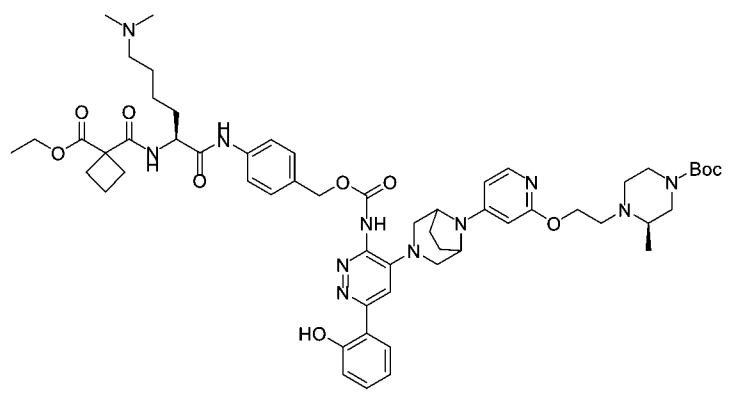
在氮氣下，0°C 向 (3*R*)-4-(2-((4-(3-(6-(2-(((烯丙氧基)羰基)氧)苯基)-3-胺基
嘓啉-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧)乙基)-3-甲基哌啶-1-甲
酸三級丁酯 (500 mg, 0.714 mmol)、(*S*)-1-((6-(((烯丙氧基)羰基)胺基)-1-((4-(羥基
甲基)苯基)胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲酰基)環丁烷-1-甲酸乙酯 (1.05 g, 2.15
mmol) 及 DIPEA (554 mg, 4.29 mmol) 在 DCM (15 mL) 中之溶液中添加三光氣
(109 mg, 0.367 mmol) 在 DCM (1 mL) 中之溶液。將反應在室溫攪拌 2 小時。將
溶劑在真空下濃縮。殘餘物藉由預填充之 C18 柱 (溶劑梯度：在水 (0.05%
NH₄HCO₃) 中的 0-100% CH₃CN) 純化，以產生 480 mg (產率 55%) 白色固體狀
標題化合物。LC-MS：(ESI, *m/z*): [M+H]⁺ = 1216。

【0365】 步驟 2：(3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-(((4-((*S*)-6-胺基-2-(1-(乙氧基羰基)環
丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苺基)氧)羰基)胺基)-6-(2-羥基苯基)嗒咁-4-基)-3,8-二
氮雜雙環[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧)乙基)-3-甲基哌咁-1-甲酸三級丁酯



在氮氣下，在室溫向 (3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-(((4-((*S*)-6-((烯丙氧基)羰基)胺基)-2-(1-(乙氧基羰基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基)氧)羰基)胺基)-6-(2-((烯丙氧基)羰基)氧)苯基)咪唑-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧)乙基)-3-甲基哌啶-1-甲酸三級丁酯 (400 mg, 0.329mmol)、吡咯啉 (234 mg, 3.29 mmol) 在 DCM (5 mL) 中之溶液中添加 Pd(PPh₃)₄ (76.0 mg, 0.0658mmol)。將反應於室溫攪拌 1 小時。反應混合物用 DCM (100 mL) 稀釋並用水洗滌。有機層經無水硫酸鈉乾燥，並在真空下濃縮，以得到 390 mg (粗產物) 黃色固體狀標題化合物。LC-MS：(ESI, m/z)：[M+H]⁺ = 1048。

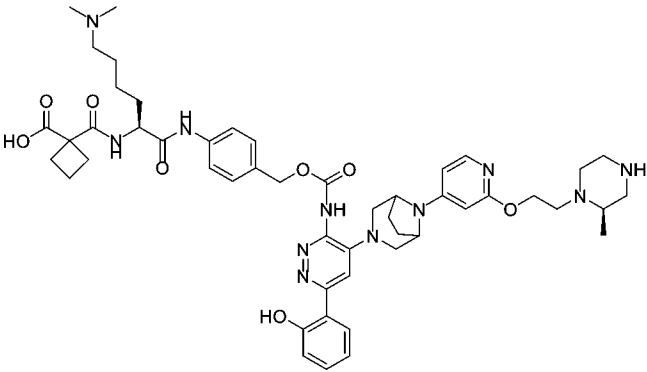
【0366】 步驟 3：(3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-(((4-((*S*)-6-(二甲基胺基)-2-(1-(乙氧基羰基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基)氧)羰基)胺基)-6-(2-羥基苯基)咪唑-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧)乙基)-3-甲基哌啶-1-甲酸三級丁酯



將 (3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-(((4-((*S*)-6-胺基)-2-(1-(乙氧基羰基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基)氧)羰基)胺基)-6-(2-羥基苯基)咪唑-4-基)-3,8-二氮雜雙環

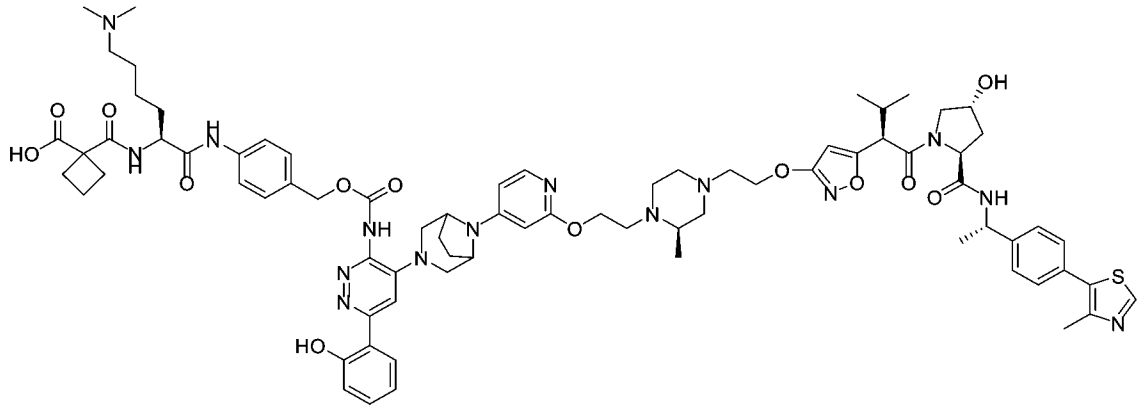
[3.2.1]辛烷-8-(基)吡啶-2-(基)氧)乙基)-3-甲基哌啶-1-甲酸三級丁酯 (465 mg, 0.440 mmol) 及 37% 水性 CH_2O (465 mg, 5.73 mmol) 在 CH_3OH (5 mL) 中之溶液在室溫攪拌 1 小時。然後添加 NaBH_3CN (140 mg, 2.22 mmol) 並在室溫攪拌 1 小時。反應藉由水 (0.2 mL) 淬滅。殘餘物藉由預填充之 C18 柱 (溶劑梯度：在水 (0.05% NH_4HCO_3) 中的 0-100% MeOH) 純化，以產生 260 mg (產率 54%) 白色固體狀標題化合物。LC-MS：(ESI, m/z)：[M]⁺= 1077。

【0367】 步驟4：1-(((2*S*)-6-(二甲基氨基)-1-((4-(((6-(2-羥基苯基)-4-(8-(2-(2-((*R*)-2-甲基哌啶-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒吡啶-3-基)胺甲醯基)氧)甲基)苯基)胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸



將 (3*R*)-4-(2-(((4-(3-(3-(((4-((*S*)-6-(二甲基氨基)-2-(1-(乙氧基羰基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基)氧)羰基)胺基)-6-(2-羥基苯基)嗒咩-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧)乙基)-3-甲基哌咩-1-甲酸三級丁酯 (75.0 mg, 0.0697 mmol) 及 LiOH·H₂O (8.4 mg, 0.210 mmol) 在 THF (5 mL) 及水 (5 mL) 中之溶液在室溫攪拌 1 小時。將溶劑在真空下濃縮。然後添加在 HFIP (3 mL) 中的 5% TFA，並將溶液在室溫攪拌 1 小時。將溶劑在真空下濃縮。殘餘物藉由預填充之 C18 柱 (溶劑梯度：在水 (0.05% NH₄HCO₃) 中的 0-100% MeOH) 純化，以產生 55.0 mg (產率 83%) 白色固體狀標題化合物。LC-MS：(ESI, *m/z*)：[*M*]⁺=949。

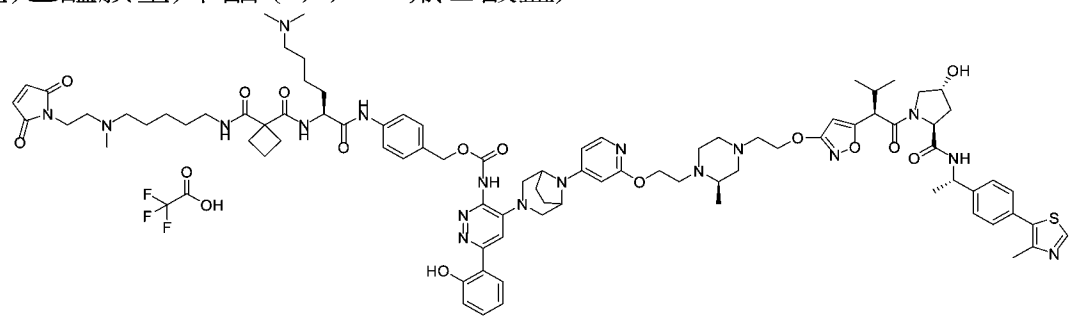
【0368】 步驟 5：1-(((2*S*)-6-(二甲基氨基)-1-((4-(((4-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-羥基-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)乙基)-2-甲基哌啶-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛烷-3-基)-6-(2-羥基苯基)嗒吡-3-基)胺甲醯基)氧)甲基)苯基)胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸



在氮氣下，將 1-(((2*S*)-6-(二甲基氨基)-1-((4-(((6-(2-羥基苯基)-4-(8-(2-(2-((*R*)-2-甲基哌啶-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒吡-3-基)胺甲醯基)氧)甲基)苯基)胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (20.0 g, 0.0211mmol)、(2*S*,4*R*)-4-羥基-1-((*R*)-3-甲基-2-(3-(2-側氧乙氧基)異噁唑-5-基)丁醯基)-*N*-((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)吡咯啉-2-甲醯胺 (19.4 mg, 0.0359mmol) 及 NaOAc (4.0 mg, 0.0488mmol) 在甲醇 (1.5 mL) 中之溶液在室溫攪拌 1 小時。然後添加 NaBH₃CN (5.2 mg, 0.0827 mol) 並在室溫攪拌 3 小時。將反應溶液在真空下濃縮。殘餘物藉由預填充之 C18 柱 (溶劑梯度：在水 (0.05% NH₄HCO₃) 中的 0-100% CH₃OH) 純化，以產生 18 mg (產率 58%) 白色固體狀標題化合物。LC-MS：(ESI, m/z)：[M+H]⁺ = 1473。

【0369】 步驟 6：(4-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-羥基-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)乙基)-2-甲基哌啶-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]

辛烷-3-基)-6-(2-羥基苯基)嗒咩-3-基)胺甲酸 4-((*S*)-6-(二甲基胺基)-2-(1-((5-((2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)乙基)(甲基)胺基)戊基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄酯 (2,2,2-三氟乙酸鹽)

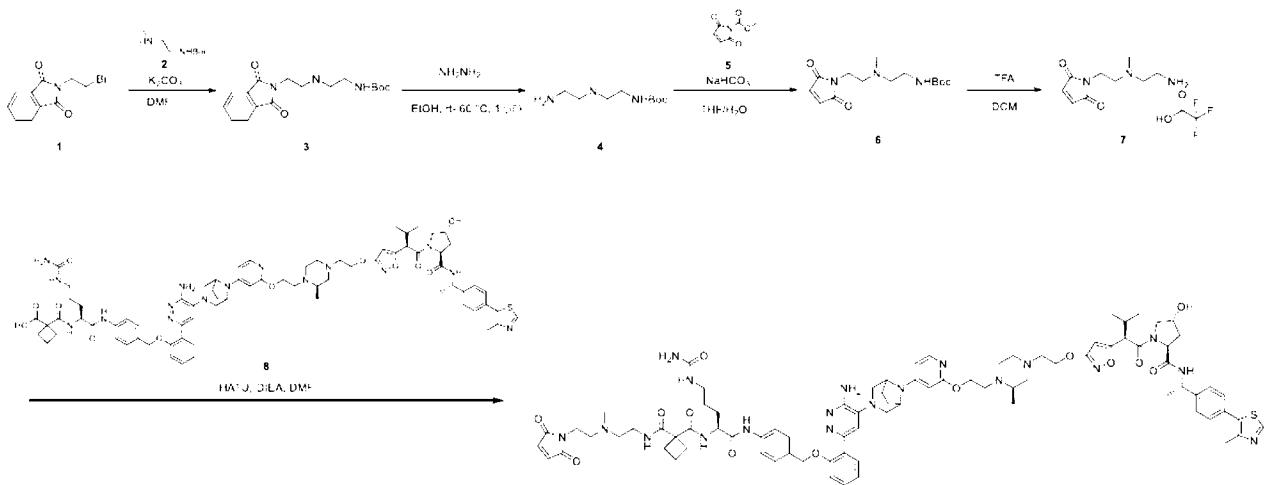


在室溫向 1-(((2*S*)-6-(二甲基胺基)-1-((4-(((4-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-羥基-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)乙基)-2-甲基哌咩-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)-6-(2-羥基苯基)嗒咩-3-基)胺甲醯基)氧)甲基)苯基)胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (40.0 mg, 0.0272 mmol)、1-(2-((5-胺基戊基)(甲基)胺基)乙基)-1*H*-吡咯-2,5-二酮 (2,2,2-三氟乙酸鹽) (9.70 mg，粗產物) 及 DIPEA (35.1 mg, 0.272mmol) 在 DMF (1mL) 中之溶液中添加 HATU (13.5 mg, 0.0355mmol)。將反應在室溫攪拌 10 分鐘。粗產物藉由製備型 HPLC 純化，使用以下條件：管柱：XSelect CSH Fluoro Phenyl，30 × 150 mm，5 μm；流動相 A：水 (0.05% TFA)，流動相 B：ACN；流速：60 mL/min；梯度：10 分鐘內 15% B 至 20% B；波長：254/220 nm；R_T(min)：10.5，以產生 13.0 mg (產率 28.3%) 黃色固體狀 **Hy-B-CIDE-14**。LC-MS：(ESI, m/z)：[M+H]⁺ = 1808。 ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 10.09 (s, 1H), 9.97 (s, 1H), 9.50 (s, 2H), 8.88 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 8.30 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 8.00 – 7.80 (m, 4H), 7.58 – 7.50 (m, 3H), 7.39 – 7.16 (m, 7H), 6.96 (s, 2H), 6.84 (ddd, *J* = 11.0, 7.0, 2.3 Hz, 2H), 6.65 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 6.29 (s, 1H), 6.00 (s, 1H), 5.01 (s, 2H), 4.95 – 4.80 (m, 1H), 4.59 (s, 2H), 4.37 (s, 2H), 4.35 – 4.21 (m, 4H), 4.21 – 4.15 (m,

2H), 3.59 – 3.48 (m, 6H), 3.40 – 3.30 (m, 4H), 3.27 – 2.97 (m, 14H), 2.89 (s, 4H), 2.70 – 2.60 (m, 9H), 2.45 – 2.34 (m, 4H), 2.30 – 2.19 (m, 2H), 2.17 – 2.03 (m, 2H), 2.05 – 1.83 (m, 5H), 1.83 – 1.66 (m, 5H), 1.66 – 1.49 (m, 4H), 1.34 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.25 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 1.20 – 1.10 (m, 6H), 0.85 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 0.69 (dd, $J = 10.7, 6.6$ Hz, 3H)。

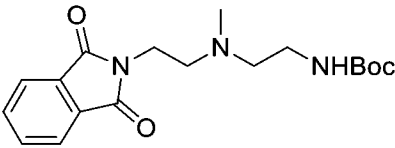
實例 26

Hy-B-CIDE-3 之合成



【0370】 步驟 1：(2-((2-(1,3-二側氧異吡啶-2-基)乙基)(甲基)胺基)乙基)

胺甲酸三級丁酯

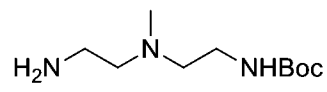


將碳酸鉀 (10.9 g, 78.7 mmol)、2-(2-溴乙基)異二氫吡啶-1,3-二酮 (10.0 g, 39.4 mmol) 及 (2-(甲基胺基)乙基)胺甲酸三級丁酯 (8.23 g, 47.2 mmol) 在 *N,N*-二甲基甲醯胺 (200 mL) 中之混合物在 90°C 在 N_2 環境下攪拌 16 小時。將反應冷卻至 25°C 並用水 (30 mL) 稀釋並用乙酸乙酯 (50 mL x 3) 萃取。有機物用鹽水 (20 mL x 2) 洗滌，經硫酸鈉乾燥，過濾，並濃縮至乾。殘餘物藉由急速層析法

(矽膠，100 至 200 目，在二氯甲烷中的 0-15% 甲醇) 純化，以得到白色固體狀標題化合物 (4.5 g，產率 32.9%)。

【0371】 ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.92 - 7.82 (m, 2H), 7.73 (m, 2H), 4.32 - 4.28 (m, 1H), 4.01 - 3.98 (m, 1H), 3.84 - 3.74 (m, 1H), 3.50 (s, 1H), 3.37 - 3.09 (m, 3H), 2.94 - 2.78 (m, 1H), 2.69 - 2.65 (m, 1H), 2.55 - 2.50 (m, 1H), 2.31 - 2.35 (m, 1H), 1.49 - 1.32 (m, 10H)。

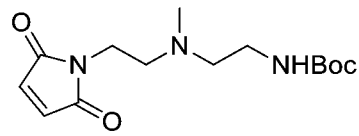
【0372】 步驟 2：(2-((2-胺基乙基)(甲基)胺基)乙基)胺甲酸三級丁酯



向 (2-((2-(1,3-二側氧異吡啶啉-2-基)乙基)(甲基)胺基)乙基)胺甲酸三級丁酯 (4.00 g, 11.5 mmol) 在乙腈 (60 mL) 中之攪拌的溶液中逐滴添加胼一水合物 (22.4 mL, 230 mmol)。將所得混合物在 70°C 在 N₂ 環境下攪拌 16 小時。將反應混合物倒入冰水 (15.0 mL) 中，並用乙酸乙酯 (20.0 mL x 3) 萃取。合併之有機層用鹽水 (20.0 mL x 2) 洗滌，並用無水硫酸鈉乾燥，濃縮，以得到粗產物，該粗產物藉由製備型 TLC (在二氯甲烷中的 5% 甲醇) 純化，以得到無色油狀標題化合物 (1.50 g，產率 60%)。

【0373】 ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 4.13 - 4.10 (m, 2H), 3.43 - 3.33 (m, 2H), 3.30 - 3.25 (m, 2H), 2.96 - 2.92 (m, 5H), 1.41 (s, 9H)。

【0374】 步驟 3：(2-((2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙基)(甲基)胺基)乙基)胺甲酸三級丁酯

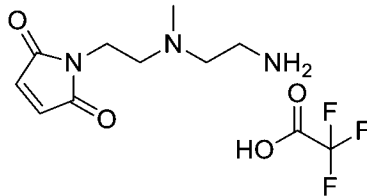


向 (2-((2-胺基乙基)(甲基)胺基)乙基)胺甲酸三級丁酯 (100 mg, 0.46 mmol) 在四氫呋喃 (2.00 mL) 中之溶液中添加 2,5-二側氧-2,5-二氫-1H-吡咯-1-甲酸甲酯 (107 mg, 0.69 mmol) 及碳酸氫鈉 (116 mg, 1.38 mmol) 在水 (1.00 mL) 中之溶液。

將反應混合物在 0°C 攪拌 2 小時。將反應混合物過濾，並將有機層在真空中濃縮至乾。向所得溶液中添加水 (20.0 mL) 並用乙酸乙酯 (3 x 20 mL) 萃取。合併之有機層用無水硫酸鈉乾燥並濃縮至乾。殘餘物藉由急速層析法 (矽膠，100 至 200 目，在二氯甲烷中的 0-10% 甲醇) 純化，以得到無色油狀標題化合物 (73 mg，產率 53.4%)。

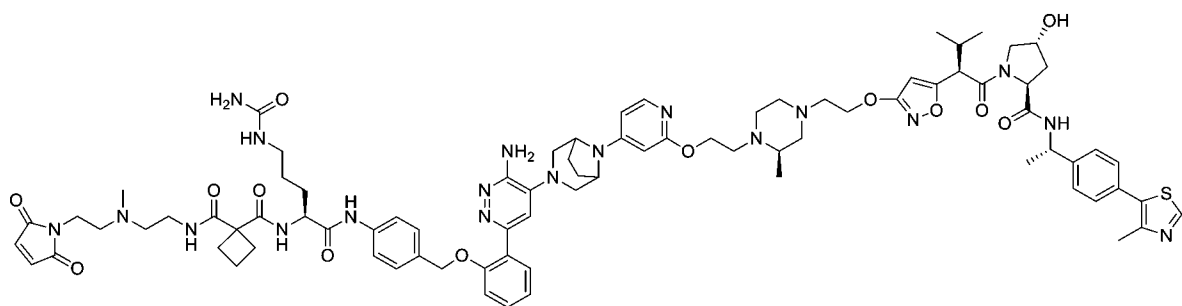
【0375】 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 6.71 (s, 2H), 3.65 - 3.62 (m, 2H), 3.16 - 3.13 (m, 2H), 2.62 - 2.41 (m, 4H), 2.25 (s, 3H), 1.45 (s, 10H)。

【0376】 步驟 4：1-(2-((2-胺基乙基)(甲基)胺基)乙基)-1*H*-吡咯-2,5-二酮 2,2,2-三氟乙酸鹽



向 (2-((2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)乙基)(甲基)胺基)乙基)胺甲酸三級丁酯 (73.0 mg, 0.25 mmol) 在二氯甲烷 (2.0 mL) 中之混合物中添加三氟乙酸 (2.31 mL, 29.95mmol)。將反應混合物於 20°C 攪拌 5 小時。將反應濃縮，以得到黃色油狀標題化合物 (40 mg, 82.6%)。

【0377】 步驟 5：N-((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-羥基-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)乙基)-2-甲基哌啶-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒吡啶-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧-5-脲基戊烷-2-基)-N-(2-((2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)乙基)(甲基)胺基)乙基)環丁烷-1,1-二甲醯胺



向 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-羥基-2-((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)乙基)-2-甲基哌咩-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒咩-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧-5-脲基戊烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷甲酸 (40.0 mg, 0.03 mmol) 及 1-(2-((2-氨基乙基)(甲基)胺基)乙基)-1*H*-吡咯-2,5-二酮 2,2,2-三氟乙酸鹽 (10.5 mg, 0.03 mmol) 在 *N,N*-二甲基甲醯胺 (4.00 mL) 中之混合物中添加 *N,N*-二異丙基乙胺 (0.01 mL, 0.08 mmol)、2-(7-氮雜苯并三唑-1-基)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸鹽 (12.8 mg, 0.03 mmol)。將反應混合物於 25°C 攪拌 3 小時。將混合物藉由油泵濃縮。殘餘物藉由製備型 HPLC (Boston Green ODS 150*30mm*5um, 水 (0.075% 三氟乙酸) - 乙腈 20% - 50%) 純化, 以得到白色固體狀標題化合物 (12.0 mg, 產率 26.7%)。

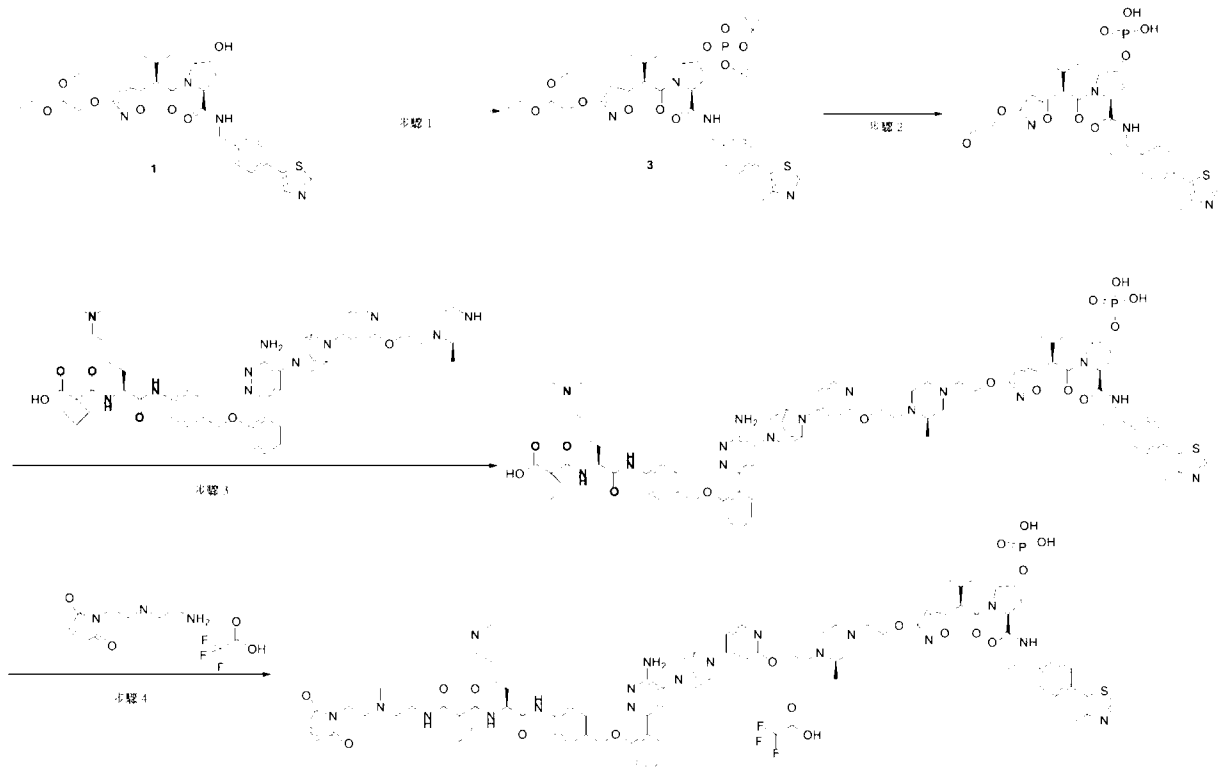
【0378】 ^1H NMR (400 MHz, DMSO - d_6) δ 10.19 (s, 1H), 9.02 - 8.86 (m, 1H), 8.39 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.94 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 7.87 - 7.78 (m, 2H), 7.65 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.51 - 7.41 (m, 5H), 7.36 (d, J = 6.8 Hz, 5H), 7.29 - 7.09 (m, 1H), 6.97 (s, 2H), 6.76 (s, 1H), 6.42 (s, 1H), 6.15 - 5.96 (m, 2H), 5.07 (s, 2H), 4.93 - 4.86 (m, 1H), 4.71 - 4.60 (m, 2H), 4.52 - 4.24 (m, 9H), 3.66 (s, 4H), 3.33 (d, J = 7.2 Hz, 5H), 3.09 - 2.96 (m, 8H), 2.45 (s, 3H), 2.42 - 2.34 (m, 4H), 2.29 - 2.14 (m, 2H), 2.04 (d, J = 11.2 Hz, 3H), 1.91 (s, 2H), 1.83 - 1.55 (m, 5H), 1.51 - 1.30 (m, 9H), 1.19 (d, J = 5.8 Hz, 5H), 0.96 (d, J = 6.4 Hz, 3H), 0.86 - 0.75 (m, 3H) $\circ$

【0379】 LCMS (ESI) m/z : 1609.8 [M+H]⁺ ◦

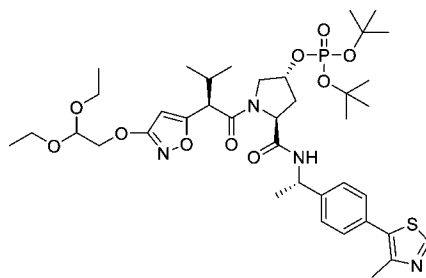
實例 27

Hy-B-PCIDE-1 之合成

【0380】 (3*R*,5*S*)-1-((2*R*)-2-(3-(2-((3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-((4-((*S*)-6-(二甲基胺基)-2-(1-((2-((2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)乙基)(甲基)胺基)乙基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基)氧)苯基)嗒吡-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧)乙基)-3-甲基哌吡-1-基)乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-5-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-3-基二氫磷酸鹽 (2,2,2-三氟乙酸鹽)

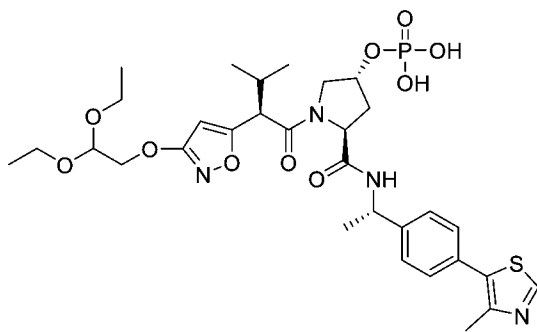


【0381】 步驟 1：((3*R*,5*S*)-1-((*R*)-2-(3-(2,2-二乙氧基乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-5-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-3-基)磷酸二-三級丁酯



在氮氣下，在 0°C 向 (2*S*,4*R*)-1-((*R*)-2-(3-(2,2-二乙氧基乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-4-羥基-*N*-((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)吡咯啉-2-甲醯胺 (500 mg, 0.81 mmol) 及 1*H*-四唑 (5.4 mL，在 ACN 中的 0.45 M) 在 THF (5 mL) 中之溶液中逐滴添加二異丙基亞磷醯胺二-三級丁酯 (451 mg, 1.63 mmol)。將反應在室溫攪拌過夜。然後在 -30°C 添加 *t*BuOOH (0.4 mL，在癸烷中的 5 M) 並在 -30°C 攪拌 30 分鐘。然後將混合物在室溫攪拌 4 小時。反應用水性 NaHSO₃ 淬滅，並用 EtOAc 萃取。合併之有機層用水及鹽水洗滌。有機層經無水硫酸鈉乾燥，並在真空下濃縮。殘餘物藉由預填充之 C18 柱 (溶劑梯度：在水 (0.05% NH₄HCO₃) 中的 0-70% ACN) 純化，以產生 340 mg (51%) 黃色油狀標題化合物。LC-MS：(ESI, *m/z*)：[*M*+*H*]⁺ = 807。

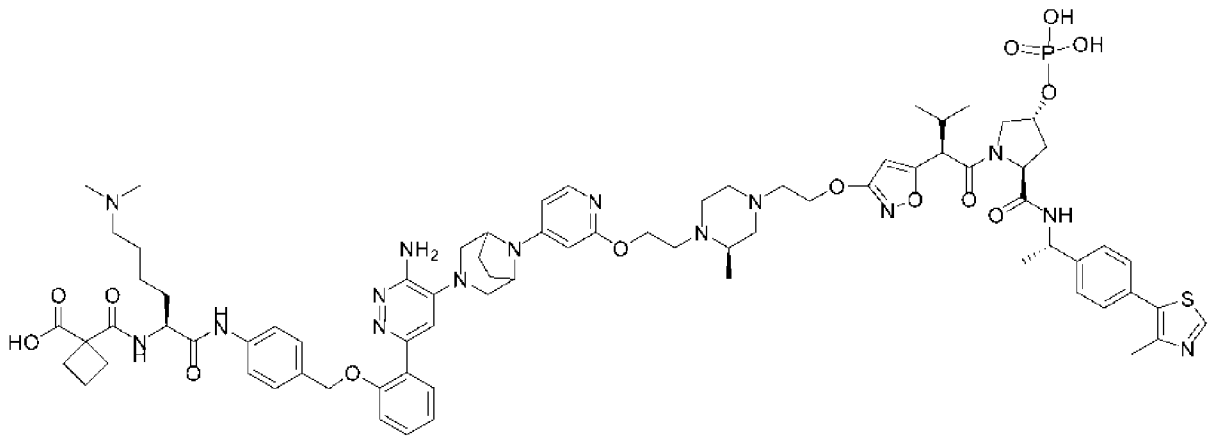
【0382】 步驟 2：(3*R*,5*S*)-1-((*R*)-3-甲基-2-(3-(2-側氧乙氧基)異噁唑-5-基)丁醯基)-5-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-3-基二氫磷酸鹽



在氮氣下，將 ((3*R*,5*S*)-1-((*R*)-2-(3-(2,2-二乙氧基乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-5-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-3-基)磷酸二-三級丁酯 (150 mg, 0.185 mmol) 在 HCOOH (0.5 mL) 及水 (0.5 mL) 中之溶液

在 60°C 攪拌 1 小時。將溶液在真空下濃縮，以得到 121 mg (粗產物) 固體狀標題化合物。LC-MS：(ESI, m/z)：[M+H]⁺ = 695。

【0383】 步驟 3：1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(8-(2-(2-((*R*)-2-甲基-4-(2-((5-((*R*)-3-甲基-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲酰基)-4-(膦酰氧基)吡咯啉-1-基)-1-側氧丁烷-2-基)異噁唑-3-基)氧)乙基)哌啶-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒啶-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲酰基)環丁烷-1-甲酸



將 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-2-甲基哌啶-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜雙環[3.2.1]辛烷-3-基)嗒啶-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己烷-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (100 mg, 0.110 mmol)、(3*R*,5*S*)-1-((*R*)-3-甲基-2-(3-(2-側氧乙氧基)異噁唑-5-基)丁醯基)-5-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-3-基二氫磷酸鹽 (121 mg, 0.190 mmol) 及 NaOAc (13.6 mg, 0.170 mmol) 在甲醇 (1.2 mL) 及二氯甲烷 (0.4 mL) 中之溶液在室溫攪拌 1 小時。然後添加 NaBH₃CN (34.7 mg, 0.550 mmol) 並在室溫攪拌 0.5 小時。添加水以淬滅反應。將溶劑在真空下濃縮。殘餘物藉由製備型 HPLC (管柱：YMC-Actus Triart C18 ExRS, 30 × 150 mm, 5 μm；流動相 A：水 (10 mmol/L NH₄HCO₃), 流動相 B：ACN；流速：60 mL/min；梯度：在 9 分鐘內由 36% B 至 60% B, 保持 60% B；波長：254/220 nm；RT1(min)：7.63) 純化，

8.70 mg (產率 24%) 白色固體狀 **Hy-B-PCIDE-1**。LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1688$ 。
 ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10.26 (s, 1H), 8.99 (s, 1H), 8.50 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 8.15 (t, 1H), 7.87 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H), 7.65 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.61-7.51(m, 2 H), 7.50 – 7.30 (m, 8H), 7.20-6.90 (m, 5H), 6.62 (s, 1H), 6.14 (s, 1H), 5.99 (s, 1H), 5.09 (s, 2H), 4.92 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.79 (s, 1H), 4.55 – 4.25 (m, 8H), 3.80-3.65 (m, 8H), 3.25-2.95 (m, 17H), 2.70 (s, 3H), 2.62 (s, 6H), 2.48-2.38 (m, 9H), 2.20 – 1.55 (m, 13H), 1.52-1.30 (m, 5H), 1.30-1.15(m, 4H), 0.85 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H), 0.85-0.70 (m, 3H)。

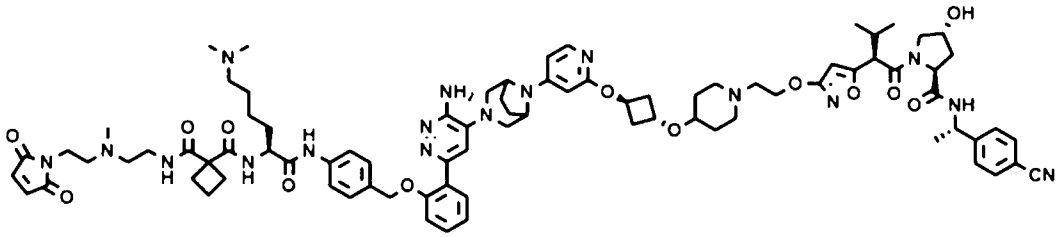
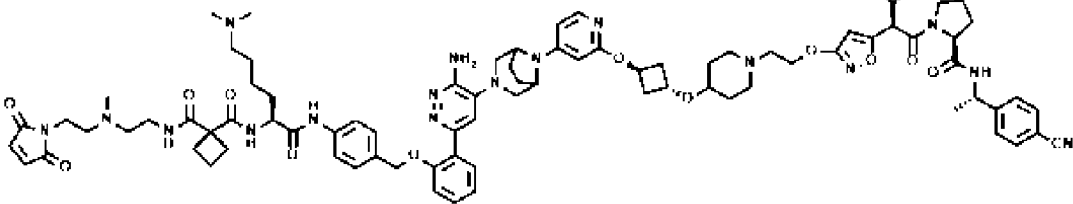
實例 28

用於測定 DC50 和 Dmax 的細胞分析

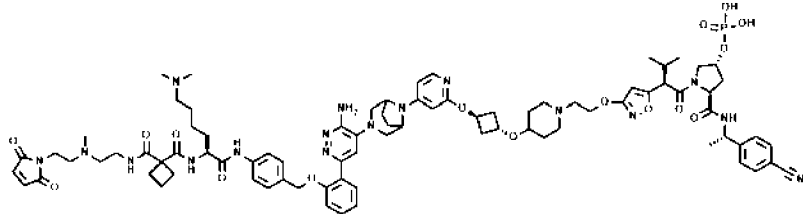
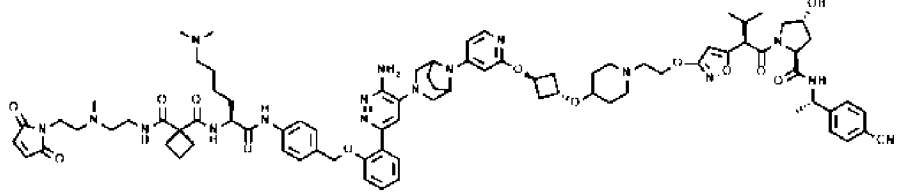
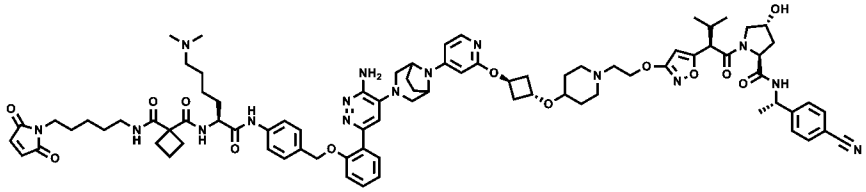
【0385】 將 HCC515 及 H1944 細胞分別以 4000 及 2500 個細胞/孔的密度接種於 384 孔盤中。第二天，添加 Ab-CIDE。經藥物處理 24 小時後，將細胞用 4% 甲醛固定 15 分鐘。將平板用 PBS 洗滌 3 次。將細胞用 IF 封閉液 (10% FCS, 1% BSA, 0.1% Triton, 0.01% 疊氮化物, X-100, 於 PBS 中) 培育。1.5 小時後，添加於 IF 封閉緩衝劑中稀釋 2X 的初級抗體溶液：添加 BRM (Cell signaling 目錄號 11966, 1:2000)。將平板於 4°C 下培育過夜。第二天早上，將細胞用 PBS 洗滌 3 次。然後將細胞用二級抗體 (兔-Alexa 488 A21206 (1:2000)) 於室溫下避光培育 1 小時。將 Hoechst H3570 以 1:5000 添加至細胞中，並將平板繼續培育 30 分鐘。將平板用 PBS 洗滌 3 次，並在 Opera Phenix™ 高容量篩選系統上成像。使用核染色為遮蔽物，量化核 BRM 平均訊息強度。

【0386】 資料顯示於下表中。資料證明本文所揭示的成功的抗體靶向策略，並且含有可水解的連接子的 Ab-CIDE 能夠以與含有不可水解的連接子的 Ab-CIDE 相似的量降解標靶蛋白。

【0388】 資料顯示使用含有可水解的连接子的 CIDE 可獲得的 DAR 量：

L1-CIDE	DAR
	5.61
 Hy-B-CIDE-7	13.75

【0389】 相較於含有不可水解的连接子的 CIDE，結合至抗體的含有可水解的连接子的 CIDE 之 DAR 量具有有利的高 DAR：

L1-CIDE	DAR 14 合成	穩定性
 Hy-B-PCIDE-2	13.13	穩定
 Hy-B-CIDE-7	13.75	穩定
非可水解 	無法達到高 DAR	不穩定

【0390】 已盡力確保所用數字 (例如數量、溫度等) 的準確性，但應考量一些實驗誤差和偏差。

【0391】 本領域技術人員將認識到，與本文所述之方法及材料相似或等效的許多方法和材料可用於實踐本文所述之主題。本揭露不僅限於本文所述之方法及材料。

【0392】 除非另有定義，否則本文所使用之技術及科學術語具有與本主題所屬技術領域之普通技術人員所一般理解之相同意義，並與以下文獻保持一致：Singleton 等人 (1994) Dictionary of Microbiology and Molecular Biology，第 2 版，J. Wiley & Sons，New York，NY；及 Janeway, C.，Travers, P.，Walport, M.，Shlomchik (2001) Immunobiology，第 5 版，Garland Publishing，New York。

【0393】 在整個說明書及請求項中，除非上下文另有要求，否則以非排他性的意義使用詞語「包含」。應當理解的是，本文所述之實施例包括「由...構成」及/或「實質上由...構成」的實施例。

【0394】 如本文中所使用之術語「約」在涉及數值時，意在涵蓋指定的量的各種變化，在一些實施例中，涵蓋指定的量 $\pm 50\%$ ；在一些實施例中，涵蓋指定的量 $\pm 20\%$ ；在一些實施例中，涵蓋指定的量 $\pm 10\%$ ；在一些實施例中，涵蓋指定的量 $\pm 5\%$ ；在一些實施例中，涵蓋指定的量 $\pm 1\%$ ；在一些實施例中，涵蓋指定的量 $\pm 0.5\%$ ；在一些實施例中，涵蓋指定的量 $\pm 0.1\%$ ；因為該等變化適合於執行所揭露之方法或採用所揭露之組合物。

【0395】 基本上，在提供值的範圍的情況下，應理解為，除非上下文另有明確規定，否則在該範圍的上限及下限範圍內每個介入值與任何其他所述或介入的範圍均在涵蓋的範圍內，直至下限單位的十分之一。這些小範圍的上限和下限亦可獨立地包括在較小的範圍界定中，在此還涵蓋了所述範圍內任何明

確排除的限制。在所述範圍包括一個或兩個限值時，排除那些涵蓋的一者或兩者的範圍亦被包括。

【0396】得益於前述說明書及相關圖式所呈遞之教示，本主題所屬領域之技術人員將想到本文所述之眾多修改及其他實施例。因此，應理解，本主題並不限於所揭露之具體實施例，並且修改及其他實施例意在包含於所附申請專利範圍之範疇內。儘管本文中採用特定術語，但它們是僅作一般性及描述性意義之用而非用於限制之目的。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

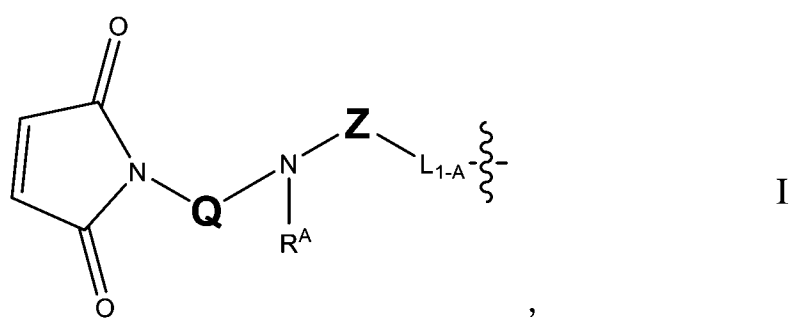
一種化合物，其具有下列結構：

L₁-D

其中，

D 為 CIDE；

L₁ 為與 D 共價結合且具有式 I 之結構的连接子-1 (linker-1)：



其中，

Z 為 $-(CH_2)_p-$ 或 $-CH_2-(CH_2-O-CH_2)_p-CH_2-$ ；

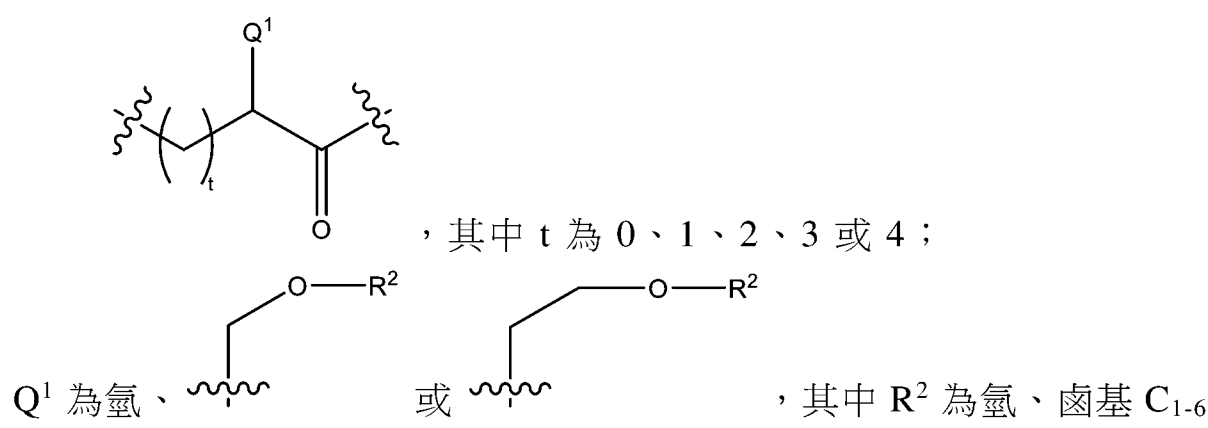
p 為 1 至 24 的整數；

R^A 為氫、C₁₋₆ 烷基或 $-(CH_2)_v-$ 芳基，

其中，v 為 0 或 1；

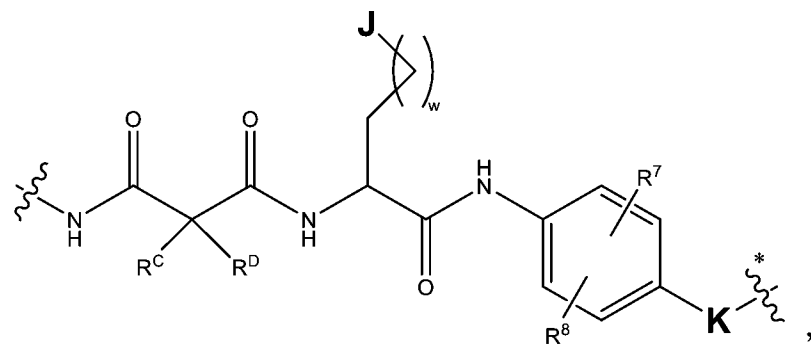
Q 係選自由以下所組成之群組：

- i)
-
- ，其中 q 為 1、2、3 或 4；以及
- ii)



烷基或 C₁₋₆ 烷基；且

L_{1-A} 為：



其中  表示與 D 的接附點；

w 為 0、1、2、3、4 或 5；

J 係選自由以下所組成之群組：-C₁₋₅ 烷基、-N(R^x)(R^y)、-C(O)NH₂、-NH-C(O)-NH₂ 及 -NH-C(NH)-NH₂，其中，R^x 及 R^y 各自獨立地選自氫及 C₁₋₃ 烷基；

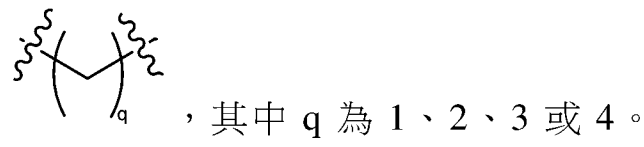
K 係選自由以下所組成之群組：C₁₋₃ 伸烷基、-CH(R)-、-C(O)-、-C(O)-O-CH(R)-、-CH₂-O-C(O)-、-CH₂-O-C(O)-NH-CH₂- 及 -CH₂-O-C(O)-R-[CH₂]_u-O-，其中 R 為氫、C₁₋₃ 烷基、N(R^x)(R^y)、-O-N(R^x)(R^y) 或 C(O)-N(R^x)(R^y)，其中 u 為 0、1、2 或 3，且其中 R^x 及 R^y 各自獨立地選自氫及 C₁₋₃ 烷基，或 R^x 及 R^y 與其各自所接附的氮一起形成視情況經取代之 5 員至 7 員雜環基；

R^C 及 R^D 各自獨立地選自氫及 C_{1-3} 烷基，或 R^C 及 R^D 與其各自所接附的碳一起形成視情況經取代之 C_{3-6} 環烷基；且

R^7 及 R^8 各自獨立地為氫、鹵基、 C_{1-5} 烷基、 C_{1-5} 烷氧基或羥基。

【請求項2】

如請求項 1 之化合物，其中 Q 為：

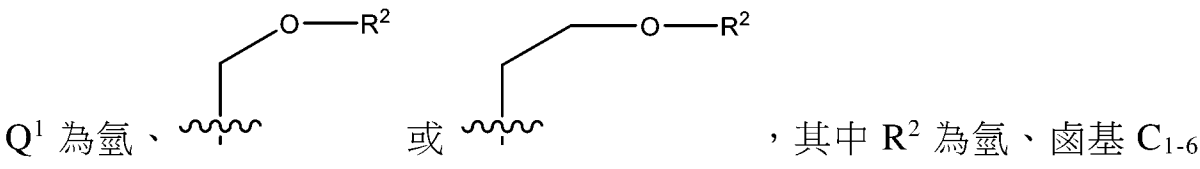
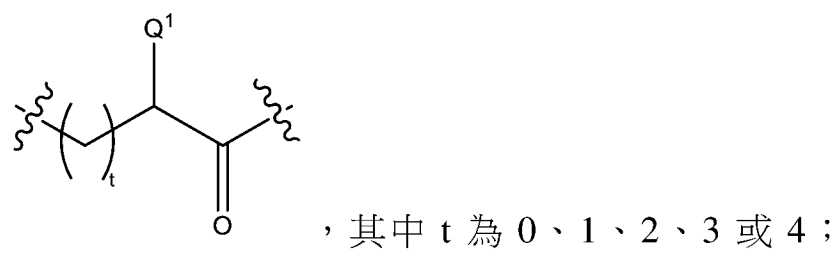


【請求項3】

如請求項 2 之化合物，其中 q 為 2。

【請求項4】

如請求項 1 之化合物，其中 Q 為：



烷基或 C_{1-6} 烷基。

【請求項5】

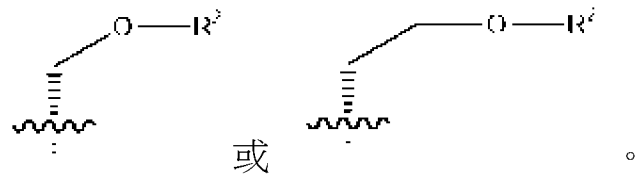
如請求項 4 之化合物，其中 R^2 為氫或 C_{1-6} 烷基。

【請求項6】

如請求項 5 之化合物，其中該 C_{1-6} 烷基為甲基。

【請求項7】

如請求項 4 之化合物，其中 Q^1 為：

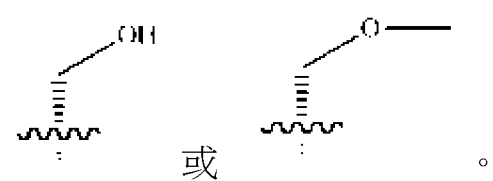


【請求項8】

如請求項 4 之化合物，其中 R^2 為氫或甲基。

【請求項9】

如請求項 8 之化合物，其中 Q^1 為：



【請求項10】

如請求項 4 之化合物，其中 t 為 0。

【請求項11】

如請求項 1 之化合物，其中 Z 為 $-(CH_2)_p-$ ，其中 p 為 1、2、3、4、5 或 6。

【請求項12】

如請求項 11 之化合物，其中 p 為 4、5 或 6。

【請求項13】

如請求項 11 之化合物，其中 p 為 5。

【請求項14】

如請求項 1 之化合物，其中 Z 為 $-CH_2-(CH_2-O-CH_2)_p-CH_2-$ ，其中 p 為 1、2、3、4、5 或 6。

【請求項15】

如請求項 14 之化合物，其中 p 為 1、2 或 3。

【請求項16】

如請求項 14 之化合物，其中 p 為 1。

【請求項17】

如請求項 1 之化合物，其中 R^A 為氫或 C_{1-6} 烷基。

【請求項18】

如請求項 17 之化合物，其中 R^A 為氫或甲基。

【請求項19】

如請求項 1 之化合物，其中 R^A 為苯基或苄基。

【請求項20】

如請求項 1 之化合物，其中 R^7 及 R^8 各自為氫。

【請求項21】

如請求項 1 之化合物，其中 R^C 及 R^D 與其各自所接附的碳一起形成視情況經取代之 C_{3-6} 環烷基。

【請求項22】

如請求項 21 之化合物，其中該 C_{3-6} 環烷基為環丁烷。

【請求項23】

如請求項 1 之化合物，其中 K 為 $-\text{CH}(\text{R})-$ ，其中 R 為氫、 C_{1-3} 烷基、 $\text{N}(\text{R}^x)(\text{R}^y)$ 或 $\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{R}^x)(\text{R}^y)$ ，其中 R^x 及 R^y 各自獨立地選自氫及 C_{1-3} 烷基，或 R^x 及 R^y 與其各自所接附的氮一起形成視情況經取代之 5 員至 7 員雜環基。

【請求項24】

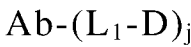
如請求項 23 之化合物，其中 R 為氫或 C_{1-3} 烷基。

【請求項25】

如請求項 24 之化合物，其中 R 為氫。

【請求項26】

一種抗體-CIDE 結合物，其具有下列結構：



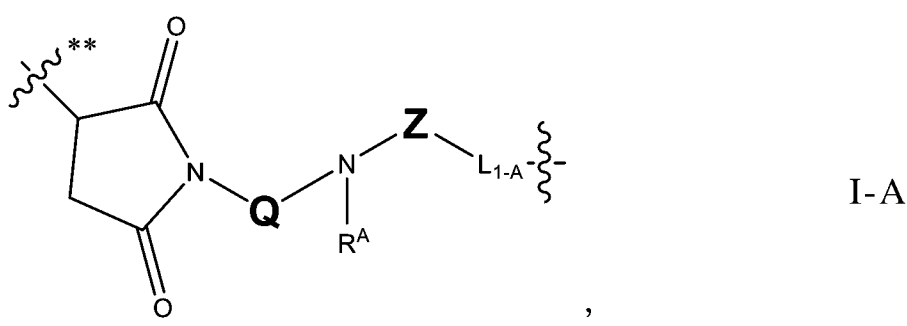
其中，

Ab 為抗體；

j 為 1 至 16；

D 為 CIDE；

L_1 為與 Ab 及與 D 共價結合且具有式 I-A 之結構的連接子-1：



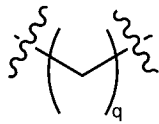
其中，

Z 為 $-(CH_2)_p-$ 或 $-CH_2-(CH_2-O-CH_2)_p-CH_2-$ ，其中 p 為 1 至 24 的整

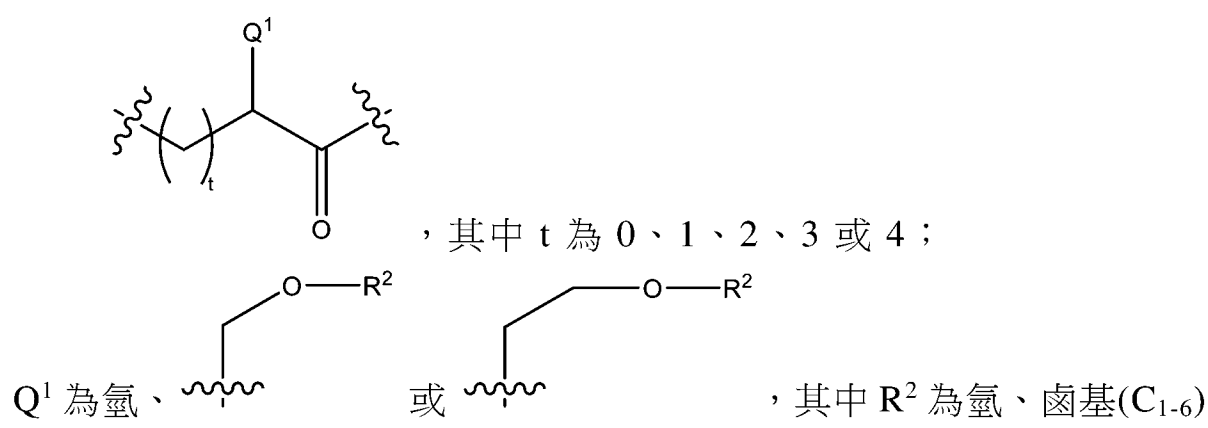
數；

R^A 為氫、 C_{1-6} 烷基或 $-(CH_2)_v-$ 芳基，其中，v 為 0 或 1；

Q 係選自由以下所組成之群組：

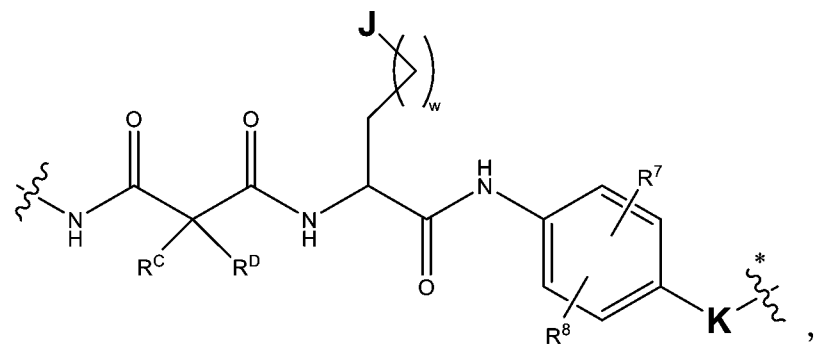
- i)


，其中 q 為 1、2、3 或 4；以及
- ii)



烷基或 C₁₋₆ 烷基；且

L_{1-A} 為：



其中  表示與 D 的接附點；

w 為 0、1、2、3、4 或 5；

J 係選自由以下所組成之群組：-N(R^x)(R^y)、-C(O)NH₂、-NH-C(O)-NH₂ 及 -NH-C(=NH)(NH₂)，其中，R^x 及 R^y 各自獨立地選自氫及 C₁₋₃ 烷基；

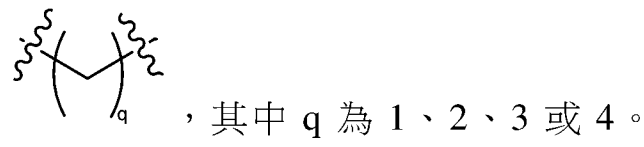
K 係選自由以下所組成之群組：C₁₋₃伸烷基、-CH(R)-、-C(O)-、-C(O)-O-CH(R)-、-CH₂-O-C(O)-、-CH₂-O-C(O)-NH-CH₂- 及 -CH₂-O-C(O)-R-[CH₂]_u-O-，其中 R 為氫、C₁₋₃烷基、N(R^x)(R^y)、-O-N(R^x)(R^y) 或 C(O)-N(R^x)(R^y)，其中 u 為 0、1、2 或 3，且其中 R^x 及 R^y 各自獨立地選自氫及 C₁₋₃烷基，或 R^x 及 R^y 與其各自所接附的氮一起形成視情況經取代之 5 員至 7 員雜環基；

R^C 及 R^D 各自獨立地選自氫及 C_{1-3} 烷基，或 R^C 及 R^D 與其各自所接附的碳一起形成視情況經取代之 C_{3-6} 環烷基；且

R^7 及 R^8 各自獨立地為氫、鹵基、 C_{1-5} 烷基、 C_{1-5} 烷氧基或羥基。

【請求項27】

如請求項 26 之化合物，其中 Q 為：

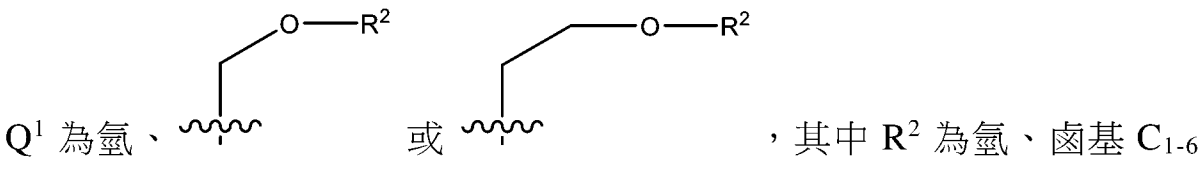
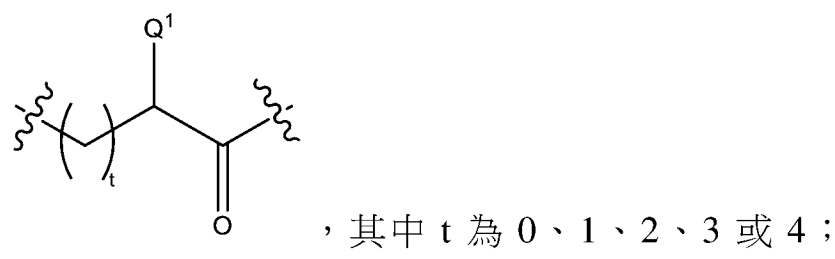


【請求項28】

如請求項 27 之化合物，其中 q 為 2。

【請求項29】

如請求項 26 之化合物，其中 Q 為：



烷基或 C_{1-6} 烷基。

【請求項30】

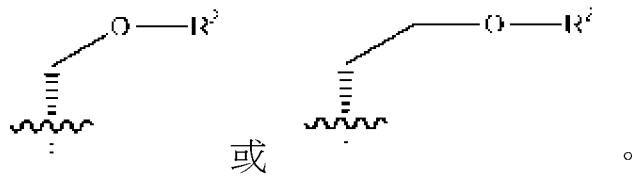
如請求項 29 之化合物，其中 R^2 為氫或 C_{1-6} 烷基。

【請求項31】

如請求項 30 之化合物，其中該 C_{1-6} 烷基為甲基。

【請求項32】

如請求項 29 之化合物，其中 Q^1 為：

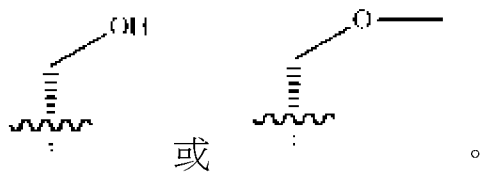


【請求項33】

如請求項 29 之化合物，其中 R^2 為氫或甲基。

【請求項34】

如請求項 33 之化合物，其中 Q^1 為：



【請求項35】

如請求項 29 之化合物，其中 t 為 0。

【請求項36】

如請求項 26 之化合物，其中 Z 為 $-(CH_2)_p-$ ，其中 p 為 1、2、3、4、5 或 6。

【請求項37】

如請求項 36 之化合物，其中 p 為 4、5 或 6。

【請求項38】

如請求項 36 之化合物，其中 p 為 5。

【請求項39】

如請求項 26 之化合物，其中 Z 為 $-CH_2-(CH_2-O-CH_2)_p-CH_2-$ ，其中 p 為 1、2、3、4、5 或 6。

【請求項40】

如請求項 39 之化合物，其中 p 為 1、2 或 3。

【請求項41】

如請求項 39 之化合物，其中 p 為 1。

【請求項42】

如請求項 26 之化合物，其中 R^A 為氫或 C_{1-6} 烷基。

【請求項43】

如請求項 42 之化合物，其中 R^A 為氫或甲基。

【請求項44】

如請求項 26 之化合物，其中 R^A 為苯基或苄基。

【請求項45】

如請求項 26 之化合物，其中 R^7 及 R^8 各自為氫。

【請求項46】

如請求項 26 之化合物，其中 R^C 及 R^D 與其各自所接附的碳一起形成視情況經取代之 C_{3-6} 環烷基。

【請求項47】

如請求項 46 之化合物，其中該 C_{3-6} 環烷基為環丁烷。

【請求項48】

如請求項 26 之化合物，其中 K 為 $-\text{CH}(\text{R})-\text{O}-$ ，其中 R 為氫、 C_{1-3} 烷基、 $\text{N}(\text{R}^x)(\text{R}^y)$ 或 $\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{R}^x)(\text{R}^y)$ ，其中 R^x 及 R^y 各自獨立地選自氫及 C_{1-3} 烷基，或 R^x 及 R^y 與其各自所接附的氮一起形成視情況經取代之 5 員至 7 員雜環基。

【請求項49】

如請求項 48 之化合物，其中 R 為氫或 C_{1-3} 烷基。

【請求項50】

如請求項 49 之化合物，其中 R 為氫。

【請求項51】

一種醫藥組成物，其包含如請求項 26 之結合物及一種或多種醫藥上可接受之賦形劑。

【請求項52】

一種治療有需要之人的疾病之方法，其包含將有效量之如請求項 26 之結合物或如請求項 51 之組成物投予該人。

【請求項53】

如請求項 52 之方法，其中該疾病為癌症。

【請求項54】

如請求項 53 之方法，其中該癌症具有 BRM 依賴性。

【請求項55】

如請求項 54 之方法，其中該癌症為非小細胞肺癌。

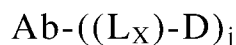
【請求項56】

一種降低個體的標靶蛋白的量之方法，其包含：

將如請求項 26 之結合物或如請求項 51 之組成物投予該個體，其中該 PB 部分結合該標靶蛋白，其中泛蛋白連接酶影響該結合的標靶蛋白之降解，其中該標靶蛋白的量降低。

【請求項57】

一種抗體-CIDE 結合物，其具有下列結構：



其中，

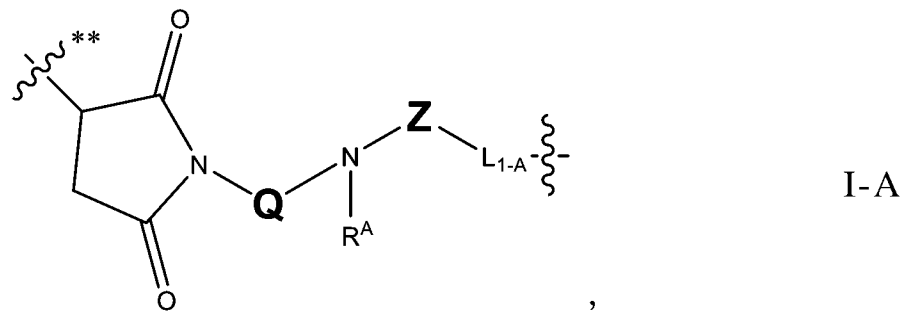
Ab 為抗體；

j 為 1 至 16；

D 為 CIDE；

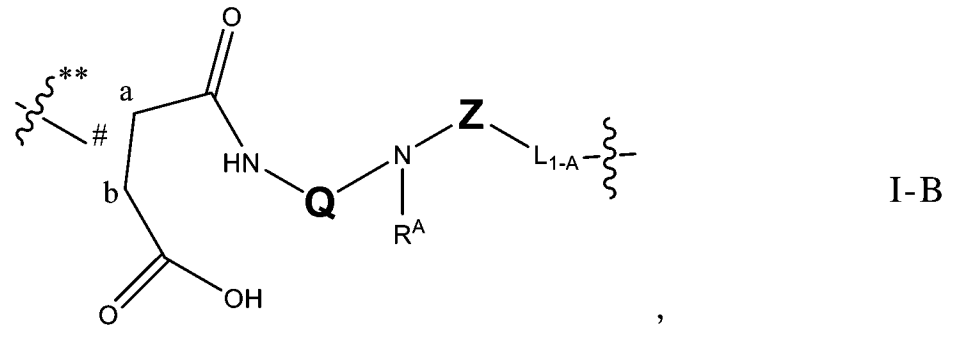
L_X 係選自由以下所組成之群組： L_1 及 L_{1h} ，其中 L_X 之至少一個實例中存在 L_{1h} ：

L_1 為與 Ab 及與 D 共價結合且具有式 I-A 之結構的连接子-1：



且

L_{1h} 為與 D 共價結合且具有式 I-B 之結構的连接子-1：



其中，# 表示位置 a 或 b 處的接附點；

在 L_1 及 L_{1h} 中， 表示與該抗體的接附點；

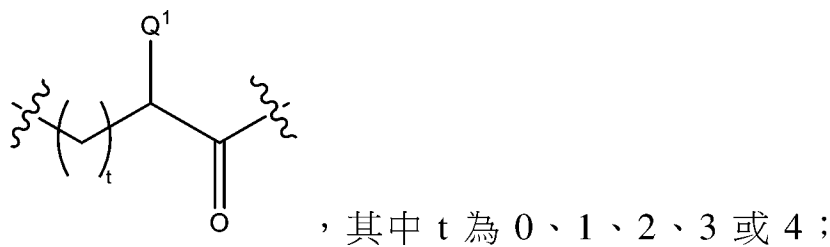
Z 為 $-(CH_2)_p-$ 或 $-CH_2-(CH_2-O-CH_2)_p-CH_2-$ ，其中 p 為 1、2、3、4、5 或 6；

R^A 為氫、 C_{1-6} 烷基或 $-(CH_2)_v-$ 芳基，其中，v 為 0 或 1；

Q 係選自由以下所組成之群組：



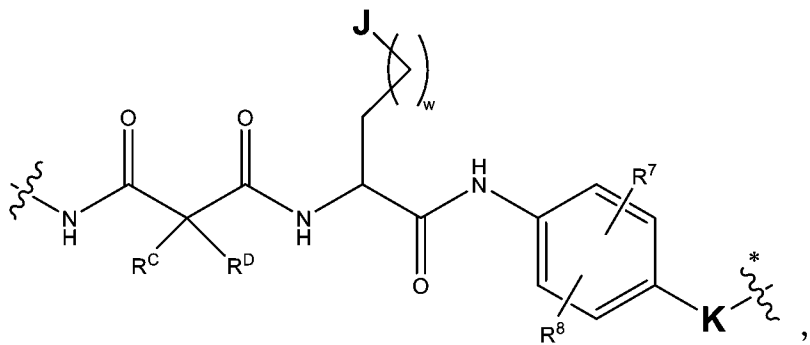
ii)



Q^1 為氫、 或 ，其中 R^2 為氫、鹵基 C_{1-6}

烷基或 C_{1-6} 烷基；且

L_{1-A} 為：



其中 表示與 D 的接附點；

w 為 0、1、2、3、4 或 5；

J 係選自由以下所組成之群組： $-C_{1-5}$ 烷基、 $-N(R^x)(R^y)$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-NH-C(O)-NH_2$ 、 $-NH-C(=NH)-NH_2$ ，其中 R^x 及 R^y 各自獨立地選自氫及 C_{1-3} 烷基；

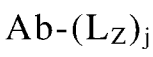
K 係選自由以下所組成之群組： C_{1-3} 伸烷基、 $-CH(R)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)-O-CH(R)-$ 、 $-\text{CH}_2-O-C(O)-$ 、 $-\text{CH}_2-O-C(O)-NH-CH_2-$ 及 $-CH_2-O-C(O)-R-[CH_2]_u-O-$ ，其中 R 為氫、 C_{1-3} 烷基、 $N(R^x)(R^y)$ 、 $-O-N(R^x)(R^y)$ 或 $C(O)-N(R^x)(R^y)$ ，其中 u 為 0、1、2 或 3，且其中 R^x 及 R^y 各自獨立地選自氫及 C_{1-3} 烷基，或 R^x 及 R^y 與其各自所接附的氮一起形成視情況經取代之 5 員至 7 員雜環基；

R^C 及 R^D 各自獨立地選自氫及 C_{1-3} 烷基，或 R^C 及 R^D 與其各自所接附的碳一起形成視情況經取代之 C_{3-6} 環烷基；且

R^7 及 R^8 各自獨立地為氫、鹵基、 C_{1-5} 烷基、 C_{1-5} 烷氧基或羥基。

【請求項58】

一種抗體-結合物，其具有下列結構：



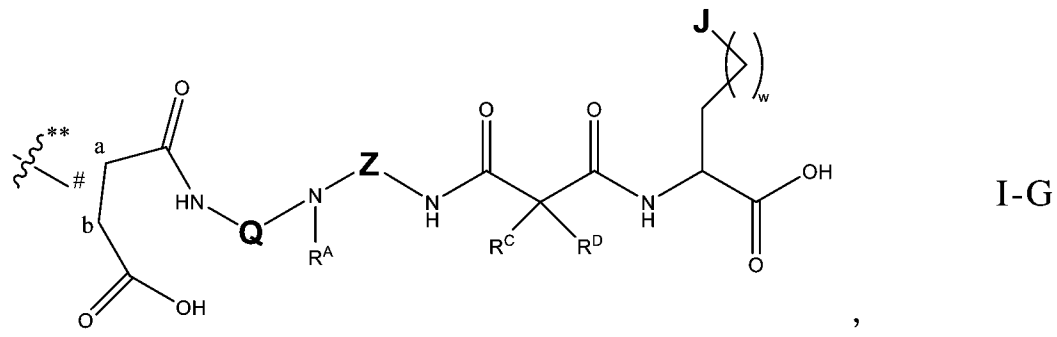
其中，

Ab 為抗體；

j 為 1 至 16；

L_Z 係選自由以下所組成之群組： L_{X1} 及 L_{X-D} ，其中 L_Z 之至少一個實例中存在 L_{X1} ：

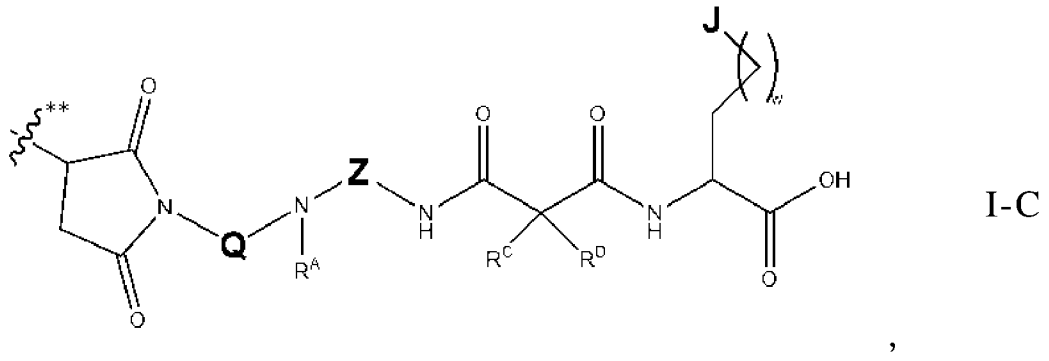
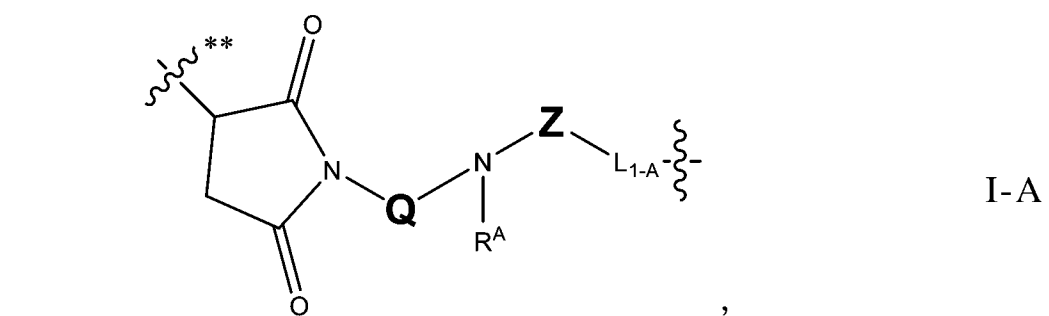
L_{X1} 係與 Ab 共價結合且具有式 I-G 之結構：



及

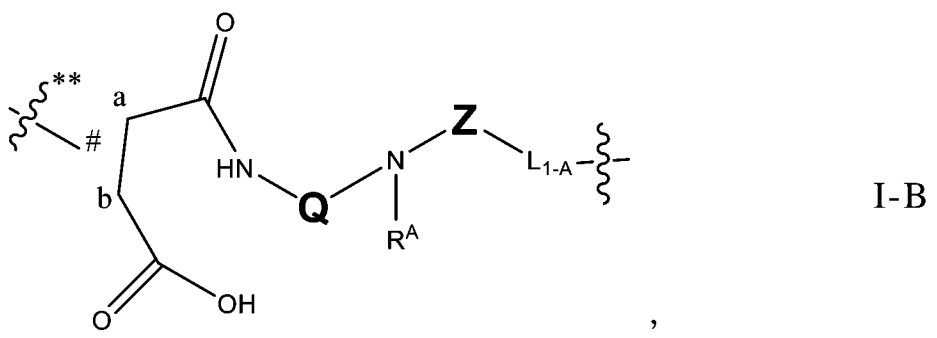
L_{X-D} ，其中 L_X 係選自由以下所組成之群組： L_1 及 L_{1h} ：

L_1 為與 Ab 及與 D 共價結合且具有式 I-A 或式 I-C 之結構的連接子-1：



且

L_{1b} 為與 D 共價結合且具有式 I-B 之結構的連接子-1：



其中，# 表示位置 a 或 b 處的接附點；

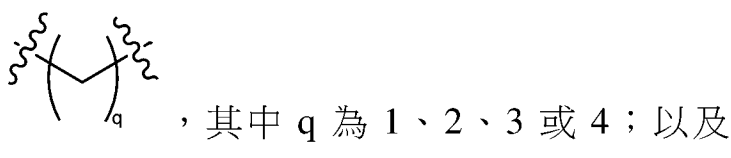
 表示與該抗體的接附點；

Z 為 $-(CH_2)_p-$ 或 $-CH_2-(CH_2-O-CH_2)_p-CH_2-$ ，其中 p 為 1、2、3、4、5 或 6；

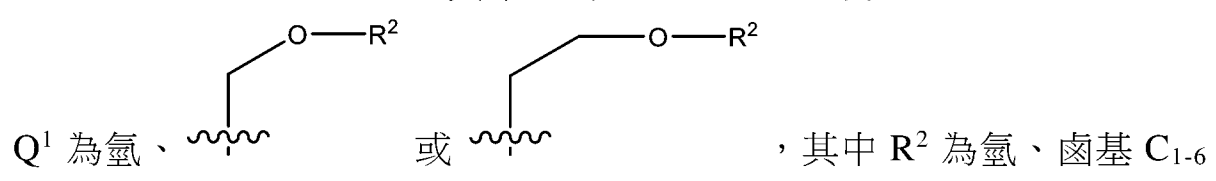
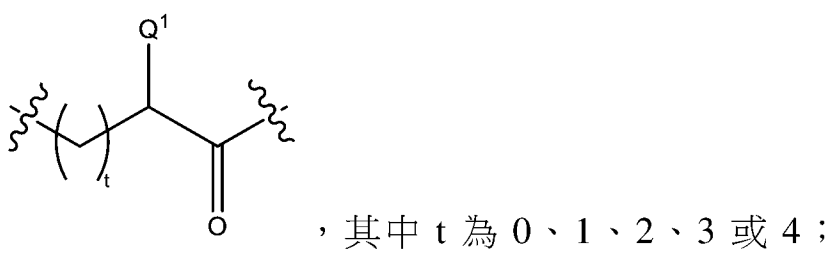
R^A 為氫、C₁₋₆ 烷基或 $-(CH_2)_v-$ 芳基，其中，v 為 0 或 1；

Q 係選自由以下所組成之群組：

i)

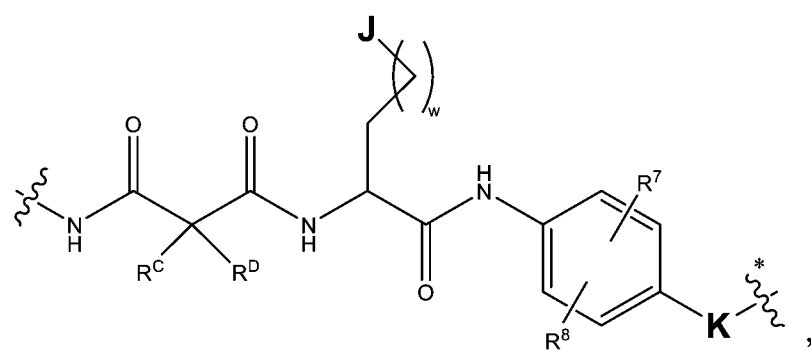


ii)



烷基或 C₁₋₆ 烷基；且

L_{1-A} 為：



其中  表示與 D 的接附點；

w 為 0、1、2、3、4 或 5；

J 係選自由以下所組成之群組：-C₁₋₅ 烷基、-N(R^x)(R^y)、-C(O)NH₂、-NH-C(O)-NH₂、-NH-C(=NH)-NH₂，其中 R^x 及 R^y 各自獨立地選自氫及 C₁₋₃ 烷基；

K 係選自由以下所組成之群組：C₁₋₃ 伸烷基、-CH(R)-、-C(O)-、-C(O)-O-CH(R)-、-CH₂-O-C(O)-、-CH₂-O-C(O)-NH-CH₂- 及 -CH₂-O-C(O)-R-[CH₂]_u-O-，其中 R 為氫、C₁₋₃ 烷基、N(R^x)(R^y)、-O-N(R^x)(R^y) 或 C(O)-N(R^x)(R^y)，其中 u 為 0、1、2 或 3，且其中 R^x 及 R^y 各自獨立地選自氫

及 C_{1-3} 烷基，或 R^x 及 R^y 與其各自所接附的氮一起形成視情況經取代之 5 員至 7 員雜環基；

R^C 及 R^D 各自獨立地選自氫及 C_{1-3} 烷基，或 R^C 及 R^D 與其各自所接附的碳一起形成視情況經取代之 C_{3-6} 環烷基；且

R^7 及 R^8 各自獨立地為氫、鹵基、 C_{1-5} 烷基、 C_{1-5} 烷氧基或羥基。

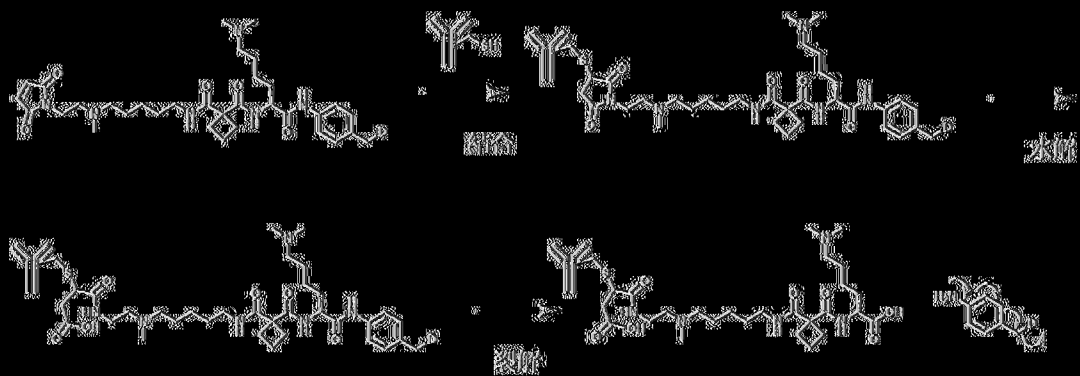


圖 1