



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202216215 A

(43)公開日：中華民國 111 (2022) 年 05 月 01 日

(21)申請案號：110126679

(22)申請日：中華民國 110 (2021) 年 07 月 20 日

(51)Int. Cl. : *A61K47/68 (2017.01)*

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2020/07/21 美國

63/054,757

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

美國

(72)發明人：德瑞哥維克 彼得 史考特 DRAGOVICH, PETER SCOTT (US)；貝克 多克雷
桑默 A BAKER DOCKREY, SUMMER A (US)；皮勒 湯瑪斯 賀登 PILLOW,
THOMAS HARDEN (US)；張 東路 ZHANG, DONGLU (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：72 項 圖式數：12 共 371 頁

(54)名稱

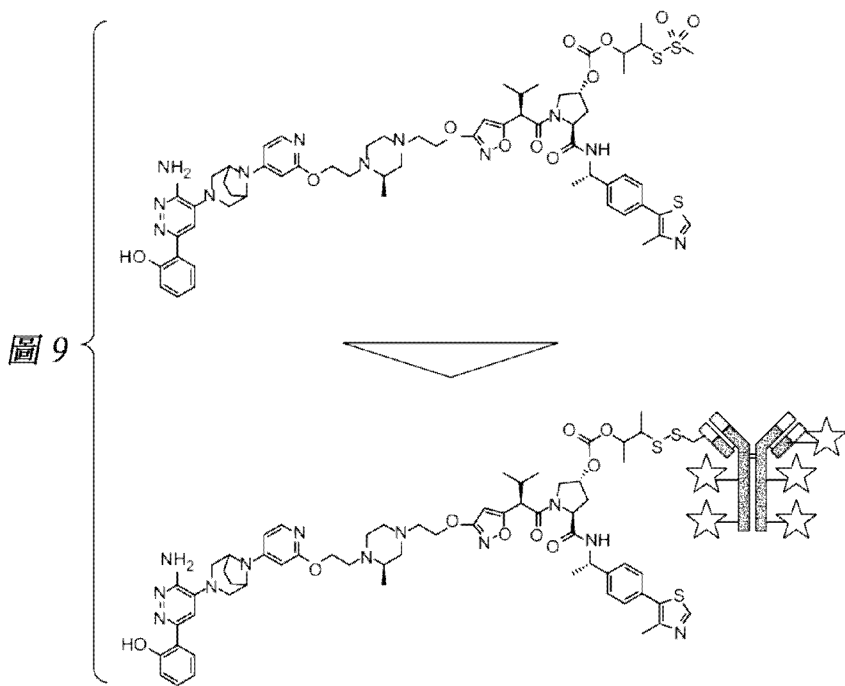
B RM降解之抗體結合化學誘導物及其方法

(57)摘要

本文中所述之主題涉及靶向用於降解的 BRM 的抗體-CIDE 結合物 (Ab-CIDE)、涉及含有它們的醫藥組成物以及涉及它們用於治療其中 BRM 降解為有益的疾病和病症之用途。

The subject matter described herein is directed to antibody-CIDE conjugates (Ab-CIDEs) that target BRM for degradation, to pharmaceutical compositions containing them, and to their use in treating diseases and conditions where BRM degradation is beneficial.

指定代表圖：





【發明摘要】

【中文發明名稱】 BRM 降解之抗體結合化學誘導物及其方法

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

【中文】本文中所述之主題涉及靶向用於降解的 BRM 的抗體-CIDE 結合物 (Ab-CIDE)、涉及含有它們的醫藥組成物以及涉及它們用於治療其中 BRM 降解為有益的疾病和病症之用途。

【英文】 The subject matter described herein is directed to antibody-CIDE conjugates (Ab-CIDEs) that target BRM for degradation, to pharmaceutical compositions containing them, and to their use in treating diseases and conditions where BRM degradation is beneficial.

【指定代表圖】

圖 9

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 BRM 降解之抗體結合化學誘導物及其方法

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

【技術領域】

【0001】 本文所述之主題整體涉及降解劑結合物，該等降解劑結合物包含用於促進標靶 BRM 蛋白質之細胞內降解的抗體-蛋白分解-靶向嵌合體分子。

【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

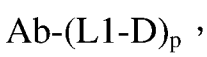
降解，CIDE 由與 E3 泛蛋白連接酶結合的基團及與待降解之蛋白質標靶結合的基團組成。這些基團通常通過連接子相連。該 CIDE 可使 E3 泛蛋白連接酶接近蛋白質，使其泛蛋白化並標記降解。但是，CIDE 相對較大的尺寸可能給靶向遞送帶來問題，並且導致不良特性，例如快速代謝/清除、短半衰期及低生物利用度。

【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】 在一個態樣中，本文所述之主題涉及結合或共價連接的 Ab-CIDE，其中連接 Ab-CIDE 之以下組分的共價鍵的位置：抗體 (Ab)、連接子 1 (L1)、連接子 2 (L2)、蛋白質結合基團 (PB) 及 E3 連接酶結合基團 (E3LB)，可根據需要進行定制以製備具有所需特性（例如效價、活體內藥代動力學、穩定性及溶解性）的 Ab-CIDE。

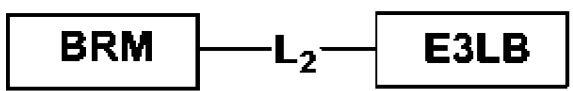
【0007】 在一個態樣中，本文所述之主題涉及具有以下化學結構的 Ab-CIDE：



其中，

Ab 為抗體；

D 為 CIDE 或其前驅藥，其具有下列結構：

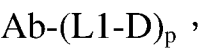


其中，

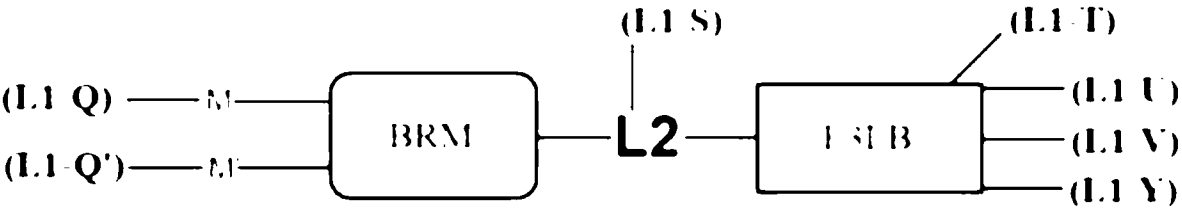
BRM 為 BRM 結合化合物之殘基，
E3LB 為 E3 連接酶結合化合物之殘基，且
L2 為共價連接 BRM 與 E3LB 之部分；

L1 為共價連接 Ab 至 BRM、E3LB 或 L2 中之一者的連接子-1；且
p 為 1 至 16。

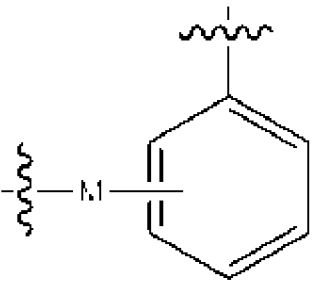
【0008】 在另一態樣中，本文所述之主題涉及具有以下化學結構的 Ab-
CIDE：



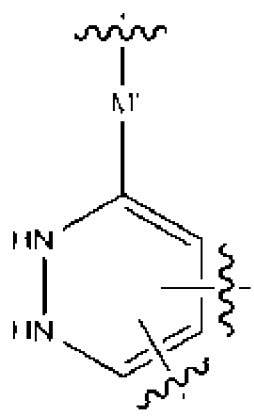
其中，
Ab 為抗體；
D 為 CIDE 或其前驅藥，其具有下列結構：



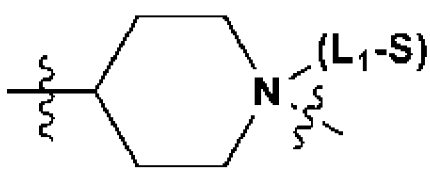
其中 L1 是接附在一個接附點處，該接附點選自 L1-Q、L1-Q’、L1-S、L1-T，且如果存在的話，視情況選自 L1-U、L1-V 和 L1-Y，其中



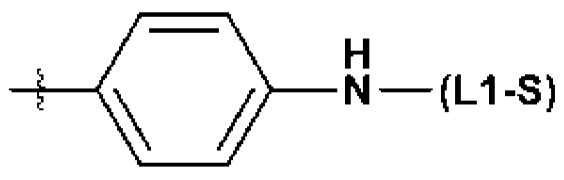
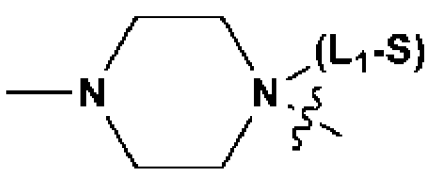
L1Q 在 BRM 上 處，其中 M 為 O；



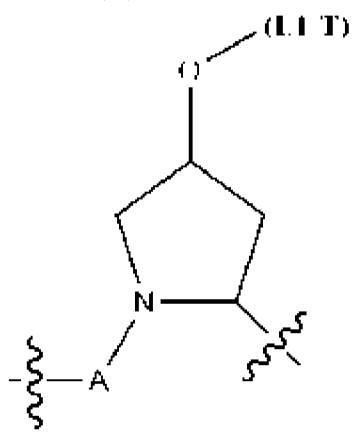
L1-Q' 在 BRM 上 處，其中 M' 為 -NH；



L1-S 在 L2 上

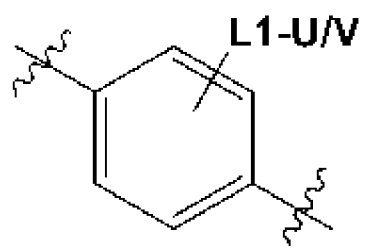


或 處；

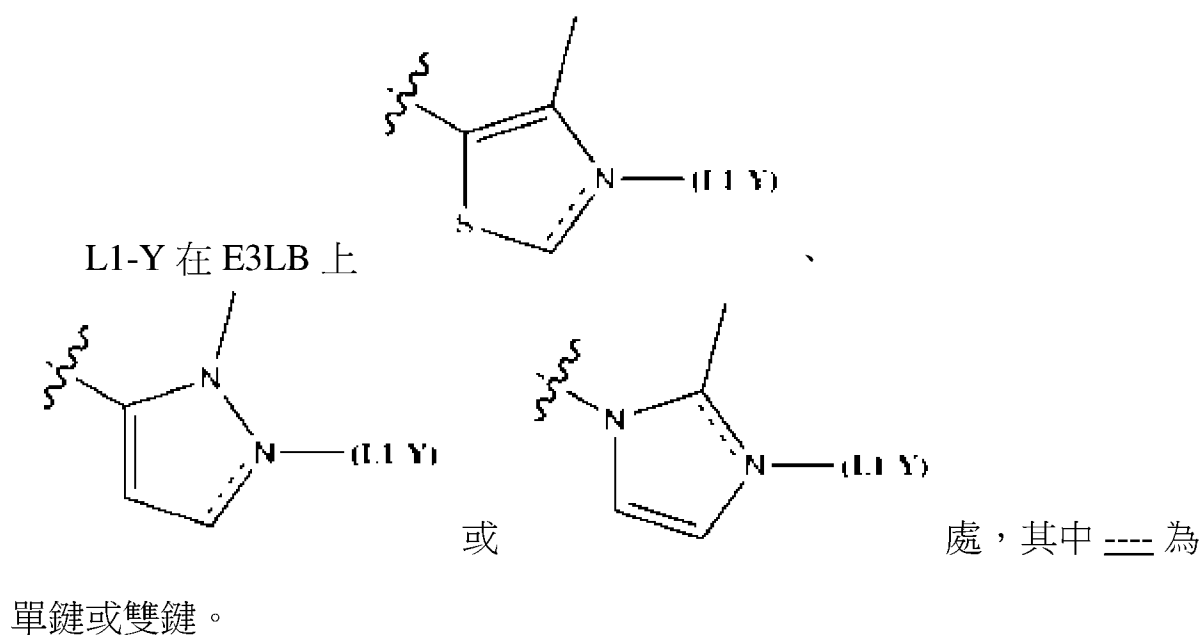


L1-T 在 E3LB 上 處，其中 A 為共價結合至 L2

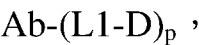
的基團；



L1-U 和 L1-V 在 E3LB 上 處；且



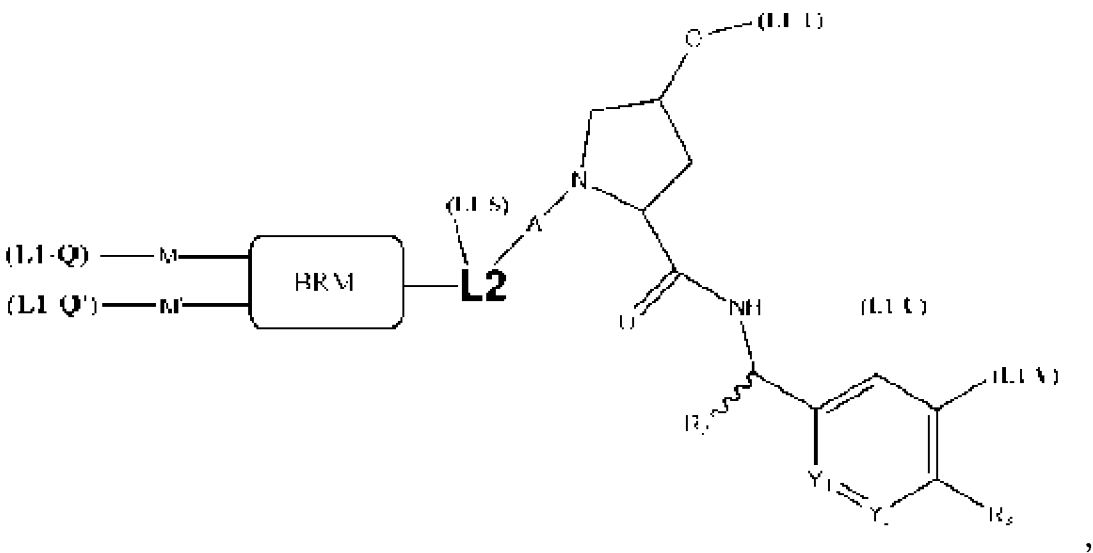
【0009】 在另一態樣中，本文所述之主題涉及具有以下化學結構的 Ab-
CIDE：



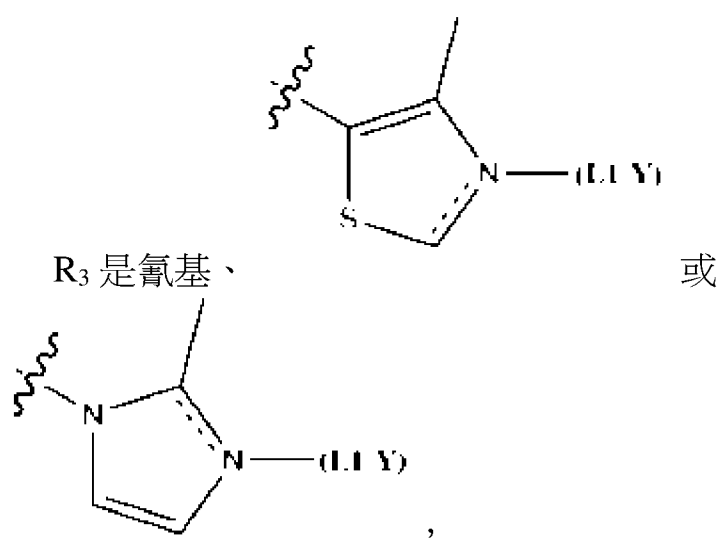
其中，

Ab 為抗體；

D 為 CIDE 或其前驅藥，其具有下列結構：

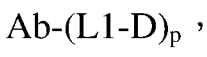


其中：



其中 $---$ 是單鍵或雙鍵。

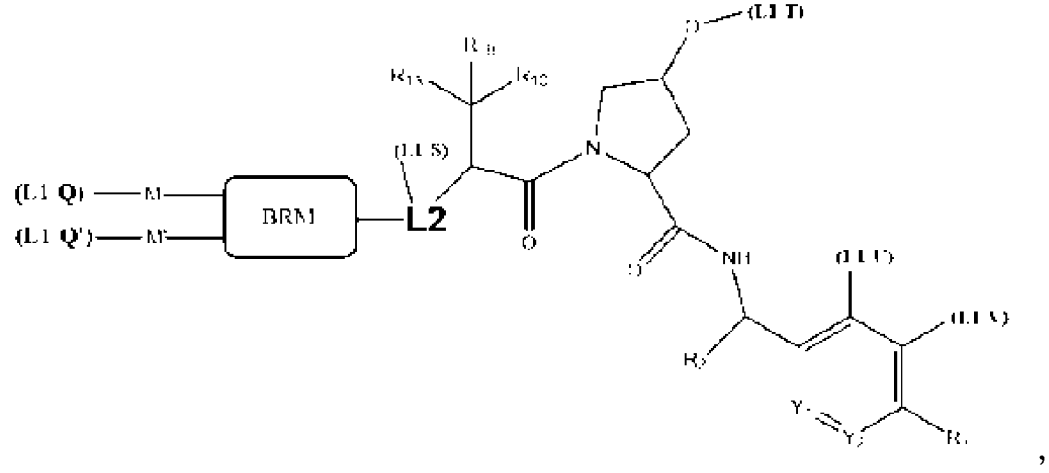
【0010】 在另一態樣中，本文所述之主題涉及具有以下化學結構的 Ab-CIDE：



其中，

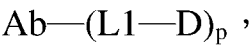
Ab 為抗體；

D 為 CIDE 或其前驅藥，其具有下列結構：



其中 R_{1A} 、 R_{1B} 和 R_{1C} 各自獨立地為氫，或 C_{1-5} 烷基；或 R_{1A} 、 R_{1B} 和 R_{1C} 中的二者與各自所接附的碳一起形成 C_{1-5} 環烷基。

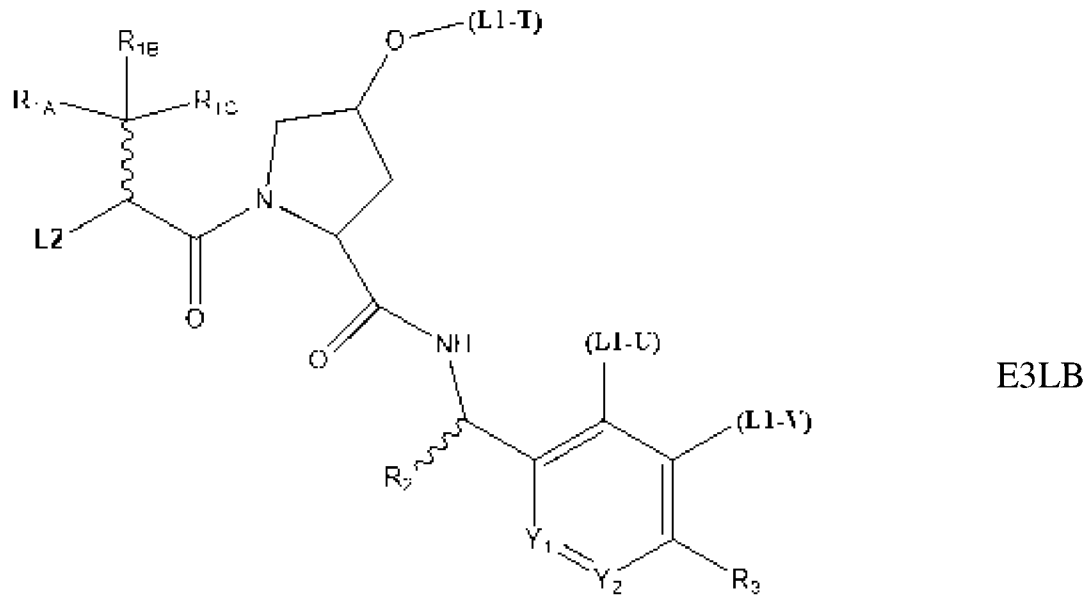
【0011】 在另一態樣中，本文所述之主題涉及具有以下化學結構的 Ab-CIDE：



其中，

D 為具有結構 E3LB—L2—PB 的 CIDE；

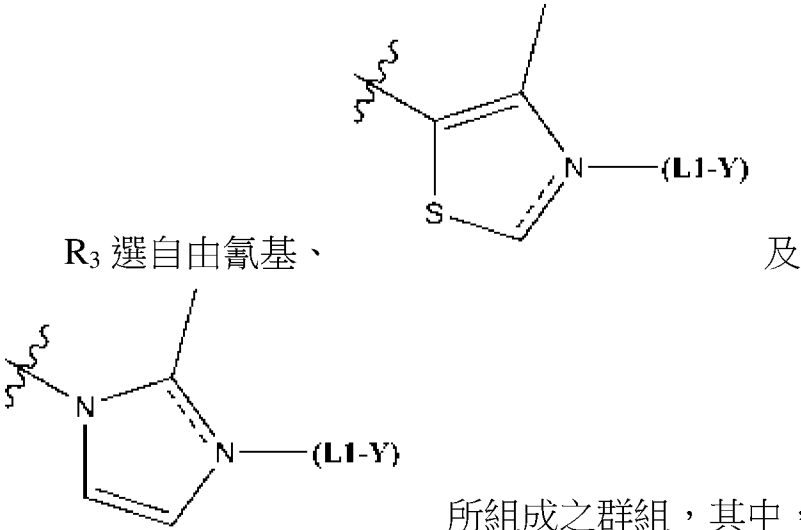
E3LB 共價結合至 L2，該 E3LB 具有下式：



其中，

R_{1A}、R_{1B} 和 R_{1C} 各自獨立地為氫或 C₁₋₅ 烷基；或者 R_{1A}、R_{1B} 和 R_{1C} 中的兩個與其各自所接附之碳一起形成 C₁₋₅ 環烷基；

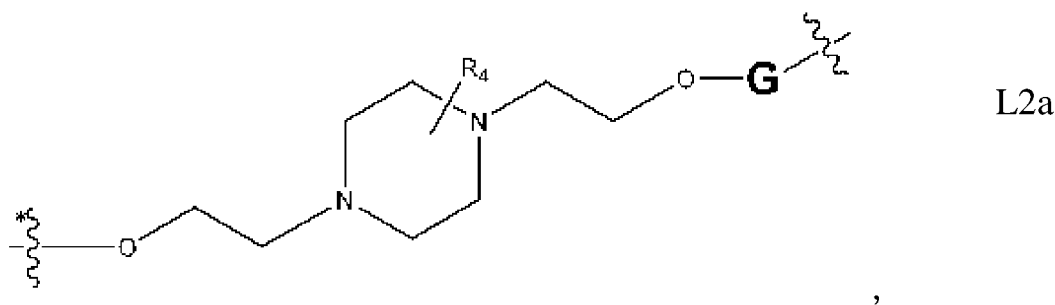
R₂ 為 C₁₋₅ 烷基；



所組成之群組，其中，---- 是單鍵或雙鍵；

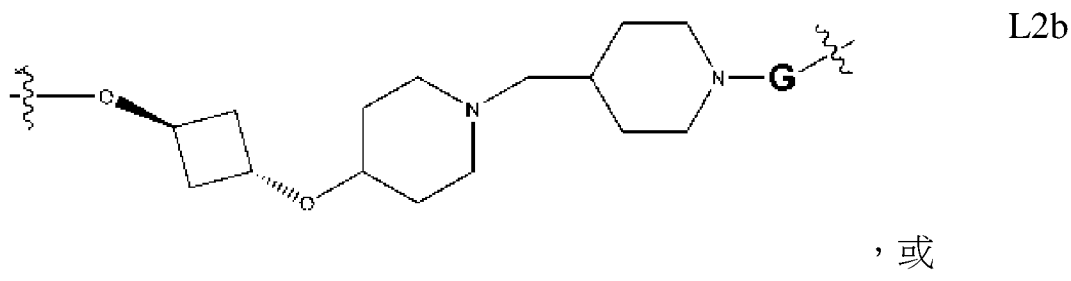
Y₁ 及 Y₂ 中之一者為 -CH，Y₁ 及 Y₂ 中之另一者為 -CH 或 N；

L2 為共價結合至 E3LB 及 PB 的连接子，該 L2 具有下式：

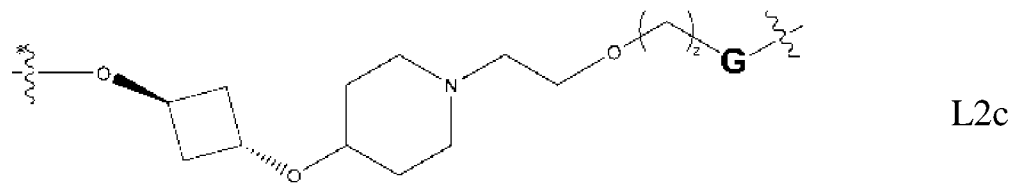


其中，

R₄ 為氫或甲基，

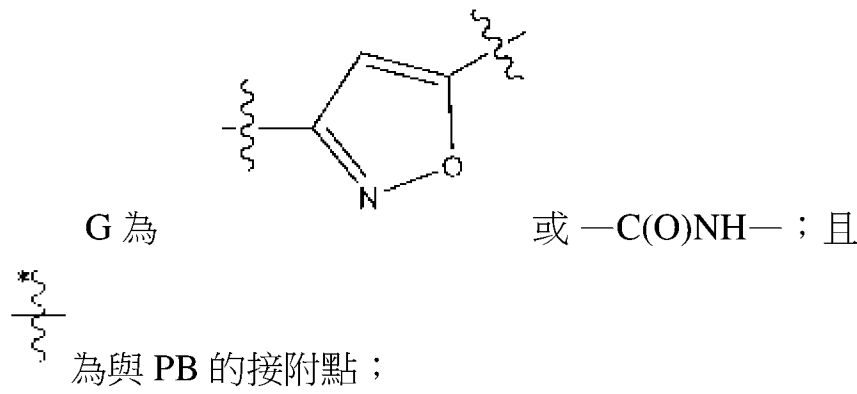


，或

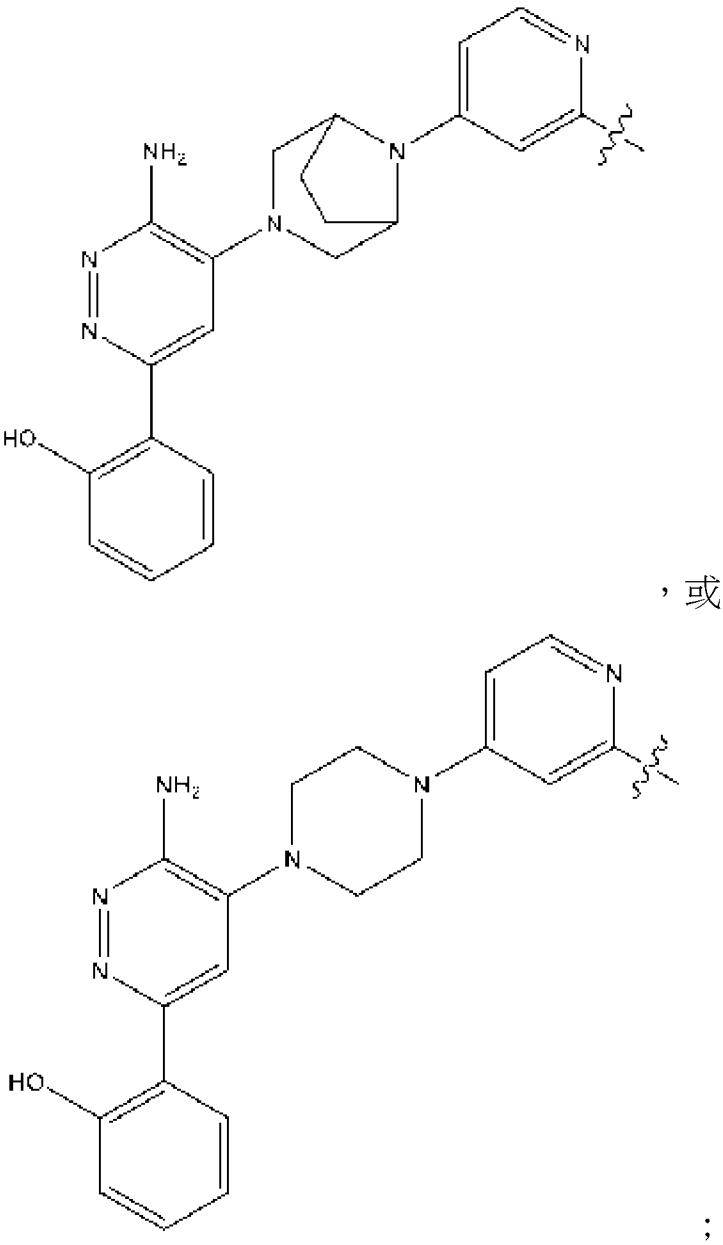


其中，

z 為一或零，



PB 為共價結合至 L2 的蛋白質結合基團，具有下列結構：



Ab 為共價結合至至少一個 L1 的抗體，該至少一個 L1 為連接子；

L1-T、L1-U 及 L1-V 各自獨立地為氫或共價結合至 Ab 及 D 的 L1 連接子；

L1-Y 為氫或共價結合至 Ab 及 D 的 L1 連接子；

q 為 1 或 0；

且

p 具有約 1 至約 8 的值。

【0012】 本文所述之主題的另一態樣為一種醫藥組成物，其包含 Ab-CIDE 及一種或多種醫藥上可接受之賦形劑。

【0013】 本文所述之主題的另一態樣為 Ab-CIDE 在治療病狀及疾病的方法中的用途，其藉由向個體投予包含 Ab-CIDE 的醫藥組成物來實現。

【0014】 本文所述之主題的另一態樣為一種製備 Ab-CIDE 的方法。

【0015】 本文所述之主題的另一態樣為一種製品，其包含醫藥組成物（包含 Ab-CIDE）、容器及藥品說明書或標籤，該藥品說明書或標籤指示醫藥組成物可用於治療疾病或病狀。

【0016】 其他實施例亦在本文中得到全面描述。

【圖式簡單說明】

【0017】

圖 1A 及圖 1B 示出例示性 Ab-CIDE Ab-L1a-CIDE-BRM1-1 在基於細胞的測定中具有活性。

圖 2A 及圖 2B 示出例示性 Ab-CIDE Ab-L1a-CIDE-BRM1-3 在基於細胞的測定中具有活性。

圖 3A 至圖 3L 示出例示性 Ab-CIDE Ab-L1a-CIDE-BRM1-1 的劑量及抗原依賴性抗腫瘤活性。

圖 4A 至圖 4L 示出例示性 Ab-CIDE Ab-L1a-CIDE-BRM1-3 的劑量及抗原依賴性抗腫瘤活性。這些資料與 Ab-CIDE Ab-L1a-CIDE-BRM1-1 的資料形成對比。

圖 5 示出 BRM 及 BRG1 降解與例示性 Ab-CIDE Ab-L1a-CIDE-BRM1-1 的抗腫瘤活性相關。

圖 6 示出 BRM 及 BRG1 降解與例示性 Ab-CIDE Ab-L1a-CIDE-BRM1-3 的抗腫瘤活性的相關性較低。所有泳道均對應於 Ab-CIDE Ab-L1a-CIDE-BRM1-3，但**除外，其表示 Ab-CIDE-L1a-BRM1-1 的泳道。

圖 7 示出抗體連接策略可調控 CIDE 之活性。這些資料顯示，儘管 CIDE-BRM1-3 通常比 CIDE-BRM1-1 更有效，但例示性 Ab-CIDE Ab-L1a-CIDE-BRM1-1 比未結合之 CIDE-BRM1-3 提供了更強的 BRM 降解。所有泳道均對應於 Ab-CIDE Ab-L1a-CIDE-BRM1-1，但**除外，其表示 Ab-CIDE-L1a-BRM1-3 的泳道。

圖 8 至圖 12 示出本文所述的一些抗體連接策略。

【實施方式】

相關申請之交叉引用

【0018】本申請案主張 2020 年 7 月 21 日提交的美國專利申請案第 63/054,757 號之優先權，該美國專利申請案之內容全文以引用方式併入本文。

序列表

【0019】序列表之正式副本經由 EFS-Web 以電子方式提交 ASCII 格式的序列表，其文件命名為 P36010-WO_SL.txt，創建於 2021 年 7 月 20 日，大小為 44,936 位元組字節，並與本說明書一起呈送。該 ASCII 格式文檔中包含的序列表為本說明書的一部分，且全文以引用方式併入本文。

【0020】本文揭露了抗體-化學降解誘導物(「CIDE」)結合物，其在本文中稱為「Ab-CIDE」，可用於 BRM (亦稱為 SMARCA2) 的靶向蛋白質降解及相關疾病和病症的治療。特定而言，本揭露涉及與抗體結合的 CIDES，其在一端含有結合至 Von Hippel-Lindau E3 泛蛋白連接酶的配體，且另一端為結合

BRM（標靶蛋白質）的部分，使得標靶蛋白置於泛蛋白連接酶附近以實現降解，從而調控 BRM。如本文所述，對連接子之連接策略及類型進行調控，且報告的資料顯示，這些調控可對於 CIDE 對 BRM 的活性產生有利影響。

【0021】 本文所述之主題利用抗體靶向將 CIDE 導向標靶細胞或組織。如本文所述，抗體與 CIDE 連接以形成 Ab-CIDE 已顯示將 CIDE 遞送至標靶細胞或組織。如本文所示，例如在實例中，表現抗原的細胞可由抗原特異性 Ab-CIDE 靶向，從而 Ab-CIDE 之 CIDE 部分在細胞內遞送至標靶細胞。包含針對細胞上未發現之抗原的抗體的 CIDE 不會導致顯著的 CIDE 向細胞的細胞內遞送。

【0022】 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。該等組成物包含共價連接至連接子 1 (L1) 的抗體，該連接子在任何可用的接附點共價連接至 CIDE，其中 CIDE 包含 E3 泛蛋白連接酶結合 (E3LB) 部分，其中 E3LB 部分識別 E3 泛蛋白連接酶蛋白 (VHL)，連接子 2 (L2) 將 E3LB 部分共價連接至蛋白質結合部分 (PB)，該蛋白質結合部分為識別標靶蛋白質 BRM 或 SMARCA2 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。

【0023】 現在將在下文更全面地描述本發明所揭露之主題。但是，得益於前述說明書所呈遞之教示，本發明所揭露之主題所屬領域之技術人員將想到本文所述之本發明所揭露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

【0024】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 L2 及蛋白質結合基團 (PB)。

【0025】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該等殘基、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。

【0026】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。

【0027】如本文所使用的術語「擬肽物」或 PM 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）連接的胺基酸單體的短鏈。最短的肽是二肽，其由單個肽鍵所連接的 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皆不包含由肽鍵連接的兩個或更多個相鄰胺基酸。

【0028】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。

【0029】如本文所使用的術語「抗體片段」包含全長抗體的一部分，通常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。

【0030】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。

【0031】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。

【0032】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。

【0033】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。對應於不同類別之免疫球蛋白的重鏈恆定域分別稱為 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 。

【0034】如本文所使用的術語「完整抗體」為包含 VL 及 VH 域以及輕鏈恆定域 (CL) 及重鏈恆定域 CH1、CH2 及 CH3 的抗體。恆定域可為天然序列恆定域（例如，人天然序列恆定域）或其胺基酸序列變異體。完整抗體可具有一種或多種「效應功能」，該等效應功能是指歸因於抗體之 Fc 恆定區（天然序列 Fc 區或胺基酸序列變異體 Fc 區）的那些生物活性。抗體效應功能之實例包括 C1q 結合；補體依賴性細胞毒性；Fc 受體結合；抗體依賴性細胞介導之細胞毒性 (ADCC)；吞噬作用；及細胞表面受體（例如 B 細胞受體及 BCR）之下調。

【0035】如本文所使用的術語「Fc 區」是指包含恆定區的至少一部分的免疫球蛋白重鏈的 C 端區。該術語包括天然序列 Fc 區和變異體 Fc 區。於一個實施例中，人類 IgG 重鏈 Fc 區從 Cys226 或 Pro230 延伸至重鏈的羧基端。然而，Fc 區的 C 端離胺酸 (Lys447) 可以存在或可以不存在。除非本文另有說明，否則 Fc 區或恆定區中胺基酸殘基之編號根據 EU 編號系統 (也稱為 EU 指數) 進行，如 Kabat 等人所述 (*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，

第 5 版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991)
(另見上文)。

【0036】如本文所使用的術語「骨架 (framework)」或「FR」是指除高度可變區 (HVR) 殘基之外的可變域殘基。可變域之 FR 通常由四個 FR 域組成：FR1、FR2、FR3、及 FR4。因此，HVR 及 FR 序列通常以如下順序出現在 VH (或 VL) 中：FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

【0037】術語「全長抗體」、「完整抗體」及「全抗體」在本文中可互換使用，係指具有與天然抗體結構實質上類似的結構之抗體或具有含有本文定義的 Fc 區的重鏈之抗體。

【0038】「人抗體 (human antibody)」為具有胺基酸序列之抗體，該胺基酸序列對應於由人或人體細胞產生或自利用人抗體譜系 (antibody repertoire) 或其他人抗體編碼序列之非人來源衍生之抗體之胺基酸序列。人抗體的該定義具體而言排除包含非人抗原結合殘基之人源化抗體。

【0039】「人源化 (humanized)」抗體係指包含來自非人 HVR 之胺基酸殘基及來自人 FR 之胺基酸殘基之嵌合抗體。在某些實施例中，人源化抗體將包括實質上所有至少一個 (且通常兩個) 可變域，其中所有或實質上所有 HVR (例如，CDR) 對應於非人抗體的那些 HVR，且所有或實質上所有 FR 對應於人抗體的那些 FR。人源化抗體視情況可包含衍生自人抗體之抗體恆定區之至少一部分。抗體 (例如，非人抗體) 之「人源化形式」涉及已接受人源化之抗體。

【0040】「經分離之抗體」是從其自然環境的組分中分離出來之抗體。在一些實施例中，將抗體純化至大於 95% 或 99% 純度，藉由 (例如) 電泳 (例如 SDS-PAGE、等電位聚焦 (IEF)、毛細管電泳) 或層析 (例如，離子交換或反相

HPLC) 來確定。關於評估抗體純度之方法的綜述，參見例如 Flatman 等人，*J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007)。

【0041】 「分離的核酸」是指已經與其天然環境的組分分離的核酸分子。分離的核酸包括通常包含核酸分子之細胞中所含之核酸分子，但是核酸分子存在於染色體外或與自然染色體位置不同之染色體位置。

【0042】 「編碼抗體的分離核酸」涉及編碼抗體重鏈及輕鏈 (或其片段) 之一種或多種核酸分子，包括在單個載體或單獨載體中的該等核酸分子，且該等核酸分子存在於宿主細胞中的一個或複數個位置。

【0043】 「裸抗體」涉及未與異源部分 (例如，細胞毒性部分) 或放射性標記結合之抗體。裸抗體可存在於醫藥製劑中。

【0044】 「天然抗體」係指具有不同結構的天然生成之免疫球蛋白分子。例如，Ig 天然 IgG 抗體為約 150,000 道耳頓、由二條相同的輕鏈及二條相同的重鏈經二硫鍵鍵合所構成之異四聚體糖蛋白。從 N 端至 C 端，每條重鏈具有可變區 (VH)，亦稱為變異重鏈域或重鏈可變域，接著係三個恆定域 (CH1、CH2 及 CH3)。類似地，從 N 端至 C 端，每條輕鏈具有可變區 (VL)，亦稱為變異輕鏈域或輕鏈可變域，接著係輕鏈恆定 (CL) 域。基於其恆定域之胺基酸序列，抗體之輕鏈可被歸類為兩種類型中的一種，稱為卡帕 (κ) 及蘭姆達 (λ)。

【0045】 相對於參考多肽序列所述之「百分比 (%) 胺基酸序列同一性」，是指候選序列中胺基酸殘基與參考多肽序列中之胺基酸殘基相同之百分比，在比對序列並引入差異後 (如有必要)，可實現最大的序列同一性百分比，並且不考慮將任何保守性取代作為序列同一性之一部分。為確定百分比胺基酸

序列同一性之目的而進行的比對可透過本領域中技術範圍內之各種方式實現，例如，使用公眾可取得的電腦軟體諸如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 Megalign (DNASTAR) 軟體。本領域之技術人員可確定用於比對序列之合適參數，包括在所比較之序列全長上實現最大比對所需之任何算法。然而，出於本文的目的，使用序列比較電腦程式 ALIGN-2 產生 % 胺基酸序列同一性值。ALIGN-2 序列比較電腦程式由建南德克公司編寫，原始程式碼已與用戶文檔一起存檔於美國版權局，華盛頓特區，20559，並以美國版權註冊號 TXU510087 進行註冊。ALIGN-2 程式可從加利福尼亞南三藩市的建南德克公司公眾可取得，亦可以從原始程式碼進行編譯。ALIGN-2 程式應編譯為在 UNIX 作業系統（包括數位 UNIX V4.0D）上使用。所有序列比較參數均由 ALIGN-2 程式設置，並且沒有變化。

【0046】 在使用 ALIGN-2 進行胺基酸序列比較的情況下，既定胺基酸序列 A 對、與、或相對於既定胺基酸序列 B 的 % 胺基酸序列同一性（其可選地表述為既定胺基酸序列 A，其對、與、或相對於既定胺基酸序列 B 具有或包含一定 % 的胺基酸序列同一性）計算如下：

$$100 \text{ 乘以分數 } X/Y$$

【0047】 其中 X 為序列排列程式 ALIGN-2 在 A 與 B 程式排列中評分為同一匹配的胺基酸殘基數，Y 為 B 中胺基酸殘基的總數。應當理解的是，在胺基酸序列 A 的長度不等於胺基酸序列 B 的長度的情況下，A 與 B 的 % 胺基酸序列同一性將不等於 B 與 A 的 % 胺基酸序列同一性。除非另有特別說明，否則如前一段所述，使用 ALIGN-2 電腦程式獲得本文使用的所有 % 胺基酸序列同一性值。

【0048】根據其重鏈恆定域之胺基酸序列，完整抗體可歸類為不同的「類別」。有五大類完整免疫球蛋白抗體：IgA、IgD、IgE、IgG 及 IgM，且其中的幾種可進一步分為次類（同型），例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA 及 IgA2。對應於不同類別之抗體的重鏈恆定域分別稱為 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 。不同類別免疫球蛋白的次單元結構及三維構型是本領域所熟知的。Ig 形式包括樞紐修飾或無樞紐形式（Roux 等人 (1998) *J. Immunol.* 161:4083-4090；Lund 等人 (2000) *Eur. J. Biochem.* 267:7246-7256；US 2005/0048572；US 2004/0229310）。

【0049】如本文所使用的術語「人共有骨架」是代表一系列人免疫球蛋白 VL 或 VH 骨架序列中最常見的胺基酸殘基的骨架。通常，系列人免疫球蛋白 VL 或 VH 序列來源於可變域序列的亞組。通常，序列之亞組是如 Kabat 等人在 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第五版，NIH Publication 91-3242，Bethesda MD (1991)，第 1-3 卷中所述之亞組。在一個實施例中，對於 VL，亞組為如 Kabat 等人在上述文獻中所述之亞組 κ I。在一個實施例中，對於 VH，亞組為如 Kabat 等人在上述文獻中所述之亞組 III。

【0050】「受體人骨架 (acceptor human framework)」為本文中之目的是如下述定義的衍生自人免疫球蛋白骨架或人共有骨架、包含輕鏈可變域 (VL) 骨架或重鏈可變域 (VH) 骨架的胺基酸序列之骨架。「衍生自 (derived from)」人免疫球蛋白骨架或人共有骨架的受體人骨架可包含與此等為相同的胺基酸序列，或其可含有胺基酸序列的變更。於一些實施例中，胺基酸變更數目為 10 或更少、9 或更少、8 或更少、7 或更少、6 或更少、5 或更少、4 或更少、3 或

更少、或 2 或更少。於一些實施例中，VL 受體人類骨架與 VL 人類免疫球蛋白骨架序列或人類共有骨架序列的序列相同。

【0051】如本文所使用的術語「可變區 (variable region)」或「可變域 (variable domain)」是指參與抗體與抗原結合的抗體重鏈或輕鏈之域。天然抗體之重鏈及輕鏈 (分別為 VH 及 VL) 之可變域通常具有類似的結構，且每個域均包含四個保守性骨架區 (FR) 及三個高度可變區 (HVR)。(參見，例如，Kindt 等人 *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007)。) 單個 VH 或 VL 域可能足以賦予抗原結合特異性。此外，可以使用 VH 或 VL 域從結合抗原的抗體中分離結合特定抗原的抗體，以分別篩選互補 VL 或 VH 域的文庫。參見，例如，Portolano 等人，*J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson 等人，*Nature* 352:624-628 (1991)。

【0052】如本文所用，術語「高度可變區」或「HVR」是指序列具有高度變異性及/或形成結構上界定之環(「高度變異環」)的抗體可變域中的每個。一般而言，天然四鏈抗體包含六個 HVR；三個在 VH 中 (H1、H2、H3)，並且三個在 VL 中 (L1、L2、L3)。HVR 通常包含來自高度變異環及/或「互補決定區」(CDR) 之胺基酸殘基，後者具有最高的序列變異性及/或參與抗原識別。示例性高度變異環存在於胺基酸殘基 26-32 (L1)、50-52 (L2)、91-96 (L3)、26-32 (H1)、53-55 (H2)、及 96-101 (H3) 處。(Chothia 及 Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)。) 示例性 CDR (CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2 及 CDR-H3) 出現於 L1 之胺基酸殘基 24-34、L2 之 50-56、L3 之 89-97、H1 之 31-35B、H2 之 50-65 以及 H3 之 95-102 處。(Kabat 等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第 5 版，Public Health

Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)。) 除了 VH 中之 CDR1 外, CDR 通常包含形成高度變異環之胺基酸殘基。CDR 亦包含「特異性決定殘基」或「SDR」, 它們是與抗原接觸之殘基。SDR 包含在稱為簡稱 CDR 或者 a-CDR 之 CDR 區內。示例性 a-CDR (a-CDR-L1、a-CDR-L2、a-CDR-L3、a-CDR-H1、a-CDR-H2 及 a-CDR-H3) 位於 L1 之胺基酸殘基 31-34、L2 之 50-55、L3 之 89-96、H1 之 31-35B、H2 之 50-58 以及 H3 之 95-102 處。(參見 Almagro 及 Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)。) 除非另有說明, 否則可變域中之 HVR 殘基及其他殘基(例如, FR 殘基)在本文中係根據前述 Kabat 等人文獻中之編號。

【0053】「效應功能 (effector function)」, 係指歸因於抗體的 Fc 區的那些生物活性, 其隨抗體同型而變化。抗體效應功能的實例包括: C1q 結合和補體依賴性細胞毒性 (CDC); Fc 受體結合; 抗體依賴性細胞介導的細胞毒性 (ADCC); 吞噬作用; 細胞表面受體(例如, B 細胞受體)之下調; 及 B 細胞活化。

【0054】術語「抗原決定基」涉及抗體結合的抗原分子上的特定位點。

【0055】「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常規方法測量親和力, 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 $\leq 1 \mu M$ 、

$\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ nM}$ 、 $\leq 5 \text{ nM}$ 、 $\leq 4 \text{ nM}$ 、 $\leq 3 \text{ nM}$ 、 $\leq 2 \text{ nM}$ 、 $\leq 1 \text{ nM}$ 、
 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.01 \text{ nM}$ 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 (K_d)。

【0056】 術語「親和力成熟」之抗體是指在一或多個高度可變區 (HVR) 中具有一或多種變化之抗體, 與不具有此等變化之親本抗體相比, 此類變化引起該抗體對抗原之親和力的改善。

【0057】 如本文所使用的術語「載體」是指一種核酸分子, 其能夠傳送與其連接之另一種核酸。該術語包括作為自我複製核酸結構之載體以及摻入已引入該宿主細胞的基因組中的載體。某些載體能夠指導與其可操作地連接的核酸的表現。該等載體在本文中稱為「表現載體」。

【0058】 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。

【0059】 如本文所使用的術語「連接子」、「連接子單元」或「連接基」是指包含將 CIDE 部分共價附接至抗體或將 CIDE 的殘基、部分、組成部分、基團或組分附接至 CIDE 的另一殘基、部分、組成部分、基團或組分的原子鏈的化學部分。在各種實施例中, 連接子為二價基團, 將其指定為連接子 1、連接子 2、L1 或 L2。

【0060】「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。

【0061】「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。

【0062】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」包含一種或多種癌細胞。癌症的實例提供於本文其他地方。

【0063】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復發、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，本文所述之主題的抗體用於延遲疾病之發展或減慢疾病之進展。

【0064】與一種或多種其他藥物「並行」投予的藥物與一種或多種其他藥物在同一治療週期、在治療的同一天且視情況與一種或多種其他藥物同時投予。例如，對於每三週給予一次的癌症療法，同時投予的藥物各自在 3 週週期的第 1 天投予。

【0065】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，該藥可防止生長和/或殺除現有的癌細胞，它可為抑制細胞生長的和/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）。

【0066】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個體相比，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。

【0067】術語「醫藥製劑」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，並且不包含對製劑將投予之個體具有不可接受之毒性的其他組分。

【0068】「醫藥上可接受之賦形劑」是指醫藥製劑中除對個體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。

【0069】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和/或一個或多個抗衡離子。

【0070】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。

【0071】如本文中所使用的術語「烷基」是指具有 1 至 5 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被下述一種或多種取代基取代。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、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)、2-甲基-1-丙基 (i-Bu、異丁基、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)、2-丁基 (s-Bu、二級丁基、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$)、2-甲基-2-丙基 (t-Bu、三級丁基、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$)、1-戊基 (正戊基、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)、2-戊基 ($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)、3-戊基 ($-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$)、2-甲基-2-丁基 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)、3-甲基-2-丁基 ($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)、3-甲基-1-丁基 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)、2-甲基-1-丁基 ($-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$) 等。

【0072】如本文中所使用的術語「伸烷基」是指具有 1 至 12 個碳原子的任何長度的飽和直鏈或支鏈二價烴基 (C₁-C₁₂)，其中伸烷基可視情況獨立地經下述一種或多種取代基取代。在另一實施例中，伸烷基含有 1 至 8 個碳原子 (C₁-C₈) 或 1 至 6 個碳原子 (C₁-C₆)。伸烷基的實例包括但不限於亞甲基 (-CH₂-)、亞乙基 (-CH₂CH₂-)、亞丙基 (-CH₂CH₂CH₂-) 等。

【0073】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。

【0074】「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、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。

【0075】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。

【0076】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。

【0077】「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。

【0078】「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。

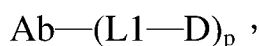
【0079】本文所用之立體化學定義及慣例通常遵循 S.P.Parker 編輯, *McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (1984) McGraw-Hill Book Company, New York；以及 Eliel, E. 與 Wilen, S., *Stereochemistry of Organic Compounds* (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York。許多有機化合物以光學活性形式存在，亦即，它們具有旋轉平面偏振光平面的能力。在描述光學活性化合物時，前綴 D 及 L 或者 R 及 S 用於表示分子圍繞其一個或多個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。

【0080】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-馬來醯亞胺己醯基（「MC」）；馬來醯亞胺丙醯基（「MP」）；纈胺酸-瓜胺酸（「val-cit」或「vc」）、丙胺酸-苯丙胺酸（「ala-phe」）、對胺基苄基（「PAB」）及對胺基苄氧羰基（「PABC」）；重鏈之 A118C（EU 編號）= A121C（順序編號）= A114C（Kabat 編號）輕鏈之 K149C（Kabat 編號）。本文其他地方亦提供了其他定義及縮寫。

II. 化學降解誘導物

【0081】化學降解誘導物 (CIDE) 分子可與抗體結合以形成「Ab-CIDE」結合物。抗體經由連接子 (L1) 與 CIDE（「D」）結合，其中 CIDE 包含泛蛋白 E3 連接酶結合基團（「E3LB」）、連接子（「L2」）及蛋白質結合基團（「PB」）。Ab-CIDE 分子之通式為：



其中，D 為具有結構 E3LB—L2—PB 的 CIDE；其中，E3LB 為共價結合至 L2 的 E3 連接酶結合基團；L2 為共價結合至 E3LB 及 PB 的連接子；PB 為共價結合至 L2 的蛋白質結合基團；Ab 為共價結合至 L1 的抗體；L1 為共價結合至 Ab 及 D 的連接子；且 p 具有約 1 至約 50 的值。變量 p 反映

抗體可連接至一個或多個 L1-D 基團。在一個實施例中， p 為約 1 至 8。在另一實施例中， p 為約 2。

【0082】 以下部分描述了包含 Ab-CIDE 的組分。為獲得具有有效之療效及期望之治療指數的 ab-CIDE，提供以下組分。

1. 抗體 (Ab)

【0083】 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。雖然包含針對細胞表面上未發現的抗原的抗體的 Ab-CIDE 可能導致 CIDE 部分較低特異性胞內遞送至細胞，但 Ab-CIDE 仍可能發生胞飲作用。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。

【0084】 在特定的實施例中，抗體為 Thiomab，如下文所詳述。Thiomab 可具有經調控之 Fc 效應子，例如 LALAPG 或 NG2LH 突變。此外，考慮到組合，使得任何抗體標靶（CD71、Trop2、MSLN、NaPi2b、Ly6E、EpCAM 及 CD22）皆可結合 Thiomab 突變與包括 LALAPG 或 NG2LH 突變的任何 Fc 效應子調控的任何適合的組合。

a. 人抗體

【0085】 在某些具體實例中，本文所提供之抗體為人抗體。可使用此領域中所公知的各種技術生產人抗體。人抗體一般性描述於：van Dijk 和 van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001)；及 Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20: 450-459 (2008)。

【0086】可透過對轉基因動物給予免疫原來製備人抗體，該轉基因動物已被修飾以響應於抗原攻擊而產生完整的人抗體或具有人可變區的完整抗體。此等動物通常包含全部或部分人免疫球蛋白基因座，其取代內源性免疫球蛋白基因座，或存在於染色體外或隨機整合到動物的染色體中。在此等轉基因小鼠中，內源性免疫球蛋白基因座通常已被滅活。有關從轉基因動物中獲得人抗體的方法的綜述，參見 Lonberg，*Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005)。亦參見例如描述 XENOMOUSE™ 技術之美國專利第 6,075,181 號及第 6,150,584 號；描述 HuMab® 技術之美國專利第 5,770,429 號；描述 K-M MOUSE® 技術之美國專利第 7,041,870 號及描述 VelociMouse® 技術之美國專利申請公開案第 US 2007/0061900 號。由此類動物產生之完整抗體的人類可變區可進一步加以修飾，例如藉由與不同人類恆定區組合。

【0087】人抗體也可透過基於雜交瘤的方法進行製備。用於生產人單株抗體的人骨髓瘤和小鼠-人異源骨髓瘤細胞系已有描述。（參見例如：Kozbor *J. Immunol.*，133: 3001 (1984)；Brodeur 等人，*Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*，第 51-63 頁 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)；及 Boerner 等人，*J. Immunol.*，147: 86 (1991)。）透過人 B 細胞雜交瘤技術產生的人抗體也描述於 Li 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*，103:3557-3562 (2006)。其他方法包括描述於例如以下文獻中的那些：美國專利號 7,189,826 (描述了由雜交瘤細胞系生產單株人 IgM 抗體)，及 Ni，*Xiandai Mianyixue*，26(4):265-268 (2006) (描述了人-人雜交瘤)。人雜交瘤技術 (Trioma 技術) 也描述於以下文獻中：Vollmers 和 Brandlein，*Histology and Histopathology*，

20(3):927-937 (2005)；及 Vollmers 和 Brandlein，*Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*，27(3):185-91 (2005)。

【0088】人抗體也可以藉由分離選自人源性噬菌體展示庫的 Fv 選殖株可變域序列來產生。然後可以將此等可變域序列與所需的人恆定域結合。下文描述了從抗體文庫中選擇人抗體的技術。

b. 來源於文庫之抗體

【0089】用於 Ab-CIDE 中的抗體可藉由篩選組合文庫中具有所需之一種或多種活性的抗體來分離。例如，此領域中所公知的多種方法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。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)。

【0090】在某些噬菌體展示方法中，透過聚合酶鏈反應 (PCR) 分別克隆 VH 和 VL 基因庫，並在噬菌體文庫中隨機重組，然後可按照以下文獻所述之方法篩選抗原結合噬菌體：Winter 等人，*Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994)。噬菌體通常以單鏈 Fv (scFv) 片段或 Fab 片段展示抗體片段。來自免疫

源的文庫無需構建雜交瘤即可向免疫原提供高親和性抗體。可替代地，可以在不進行任何免疫的情況下選殖天然譜系（例如，來自人）以向各種非自身以及自身抗原提供抗體的單一來源，如 Griffiths 等人在 *EMBO J*, 12: 725-734 (1993) 中所述。最後，還可以透過選殖幹細胞中未重排的 V 基因片段，並使用包含隨機序列的 PCR 引物來編碼高變異性 CDR3 區並在體外完成重排，由此合成天然庫，如 Hoogenboom 和 Winter 在 *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992) 中所述。描述人抗體噬菌體文庫的專利公開包括例如：美國第 5,750,373 號專利及美國專利公開號 2005/0079574、2005/0119455、2005/0266000、2007/0117126、2007/0160598、2007/0237764、2007/0292936、及 2009/0002360。

【0091】從人抗體庫分離的抗體或抗體片段在本文中被視作人抗體或人抗體片段。

c. 嵌合和人源化抗體

【0092】在某些具體實例中，本文所提供之抗體為嵌合抗體。某些嵌合抗體描述於例如美國專利第 4,816,567 號；及 Morrison 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*，81:6851-6855 (1984) 中。在一個實例中，嵌合抗體包含非人類可變區（例如，衍生自小鼠、大鼠、倉鼠、兔或非人類靈長類動物（諸如猴）之可變區）及人類恆定區。在另一個實例中，嵌合抗體為「類別轉換」抗體，其中類或子類相比於其親代抗體已發生變更。嵌合抗體包括其抗原結合片段。

【0093】於某些實施例中，嵌合抗體為人源化抗體。通常，非人抗體為人源化抗體以降低對人的免疫原性，同時保留親代非人抗體之特異性及親和性。一般而言，人源化抗體包含一個或多個可變域，其中 HVR（例如 CDR）或其部分衍生自非人抗體，且 FR（或其部分）衍生自人抗體序列。人源化抗

體視情況將包含人恆定區之至少一部分。在一些實施例中，人源化抗體中之一些 FR 殘基經來自非人抗體（例如衍生 HVR 殘基之抗體）之對應殘基取代，例如以恢復或提高抗體特異性或親和力。

【0094】 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）。

【0095】 可以用於人源化的人骨架區包括但不限於：使用「最佳匹配」方法選擇的骨架區（參見例如 Sims 等人，*J. Immunol.* 151:2296 (1993)）；來源於輕鏈或重鏈可變區的特定亞組的人抗體的共有序列的骨架區（參見例如：Carter 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*，89:4285 (1992)；及 Presta 等人，*J. Immunol.*，151:2623 (1993)）；人成熟之（體細胞突變）骨架區或人種系骨架區（參見例如 Almagro 和 Fransson，*Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)）；以及來源於篩選 FR 文庫的骨架區（參見例如 Baca 等人，*J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997)；及 Rosok 等人，*J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)）。

d. 多特異性抗體

【0096】 在某些實施例中，本文提供之抗體為多特異性抗體，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）。

【0097】 在一些實施例中，多特異性抗體是對至少兩個不同抗原結合位點具有結合特異性的單株抗體（例如雙特異性抗體）。在一些實施例中，多特異性抗體的第一抗原結合域及第二抗原結合域可結合同一分子內的兩個抗原決定基（分子內結合）。例如，多特異性抗體之第一抗原結合域及第二抗原結合域可與同一蛋白質分子上的兩個不同的抗原決定基結合。在某些實施例中，多特異性抗體所結合的兩個不同的抗原決定基為通常非同時由一種單特異性抗體（例如常規抗體或一個免疫球蛋白單可變域）結合的抗原決定基。在一些實施例中，多特異性抗體之第一抗原結合域及第二抗原結合域可結合位於兩個不同分子內的抗原決定基（分子間結合）。例如，多特異性抗體之第一抗原結合域可與一個蛋白質分子上的一個抗原決定基結合，而多特異性抗體的第二抗原結合域可與不同蛋白質分子上的另一抗原決定基結合，從而交聯這兩個分子。

【0098】 在一些實施例中，多特異性抗體（例如雙特異性抗體）之抗原結合域包含兩個 VH/VL 單元，其中第一 VH/VL 單元與第一抗原決定基結合，且第二 VH/VL 單元與第二抗原決定基結合，其中每個 VH/VL 單元包含重鏈可變域 (VH) 及輕鏈可變域 (VL)。該等多特異性抗體包括但不限於全長抗體、具有兩個或更多個 VL 和 VH 域的抗體及抗體片段（例如 Fab、Fv、dsFv、scFv、雙抗體、雙特異性雙抗體及三抗體、已共價或非共價連接的抗體片段）。進一步包含重鏈可變區之至少一部分及/或輕鏈可變區之至少一部分的 VH/VL 單元

亦可稱為「臂」或「半體 (hemimer)」或「半抗體 (half antibody)」。在一些實施例中，半體包含足夠部分的重鏈可變區以允許與第二半體形成分子內二硫鍵。在一些實施例中，半體包含杵突變或臼突變，例如以允許與包含互補臼突變或杵突變的第二半體或半抗體發生異二聚化。杵突變及臼突變如下文所進一步討論。

【0099】 在某些實施例中，本文所提供的多特異性抗體可為雙特異性抗體。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。在某些實施例中，結合特異性之一針對蛋白質，另一種則針對 CD3。參見例如美國專利第 5,821,337 號。在某些實施例中，雙特異性抗體可與同一蛋白質分子的兩個不同的抗原決定基結合。在某些實施例中，雙特異性抗體可與兩種不同蛋白質分子的兩個不同的抗原決定基結合。雙特異性抗體亦可用於將細胞毒性劑定位於表現蛋白質的細胞。雙特異性抗體可製成全長抗體或抗體片段。

【0100】 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）。如本文中所使用，術語「杵臼 (knob-into-hole)」或「KnH」技

術是指藉由將突起 (杵 (knob)) 導入一個多肽並將腔體 (臼 (hole)) 在其等相互作用的界面處引入其他多肽，在體外或體內指導兩個多肽的配對在一起的技術。例如，在抗體的 Fc:Fc 結合界面、CL:CH1 界面或 VH/VL 界面中引入 KnHs (參見例如：US 2011/0287009；US2007/0178552；WO 96/027011；WO 98/050431；Zhu 等人，1997，*Protein Science* 6:781-788；及 WO2012/106587)。在一些實施例中，在多特異性抗體的製造中，KnHs 驅動兩個不同重鏈配對在一起。例如，在其 Fc 區中具有 KnH 的多特異性抗體可進一步包含與各 Fc 區連接的單個可變域，或進一步包含與相似或不同輕鏈可變域配對的不同重鏈可變域。KnH 技術亦可用於將兩個不同的受體胞外域或包含不同標靶識別序列的任何其他多肽序列 (例如，包括親和體、肽體及其他 Fc 融合體) 配對在一起。

【0101】如本文所使用的術語「杵突變」是指在多肽與另一多肽交互作用的界面處將突起 (杵) 引入該多肽的突變。在一些實施例中，該另一多肽具有臼突變。

【0102】如本文所使用的術語「臼突變」是指在多肽與另一多肽交互作用的界面處將腔體 (臼) 引入該多肽的突變。在一些實施例中，該另一多肽具有杵突變。

【0103】「突起」是指至少一個胺基酸側鏈，其從第一多肽的界面突出並因此可定位於相鄰界面 (亦即第二多肽之界面) 的補償腔體中，以便穩定異源多聚體，從而 (例如) 相比於形成同源多聚體更傾向於形成異源多聚體。突起可存在於原始介面中，也可以合成引入 (例如，透過改變編碼介面的核酸)。在一些實施例中，改變編碼第一多肽之界面的核酸以編碼突起。為此，用編碼

至少一個「導入」胺基酸殘基的核酸 (其側鏈體積大於原始胺基酸殘基) 替換在第一多肽的介面中編碼至少一個「原始」胺基酸殘基的核酸。應當理解，可存在一個以上的原始及相應的導入殘基。各種胺基殘基的側鏈體積顯示於例如 US2011/0287009 的表 1 中。用於引入「突起」的突變可稱為「杵突變。」

【0104】 在一些實施例中，用於形成突起之導入殘基為天然存在的胺基酸殘基，其選自精胺酸 (R)、苯丙胺酸 (F)、酪胺酸 (Y) 和色胺酸 (W)。在一些實施例中，導入的殘基為色胺酸或酪胺酸。在一些實施例中，用於形成突起之原始殘基具有較小的側鏈體積，例如丙胺酸、天冬醯胺酸、天冬胺酸、甘胺酸、絲胺酸、蘇胺酸或纈胺酸。

【0105】 「腔體」是指從第二多肽的介面凹入的至少一個胺基酸側鏈，並由此容納第一多肽的相鄰介面上對應的突起。腔體可存在於原始界面中，亦可合成引入（例如藉由改變編碼界面的核酸來引入）。在一些實施例中，改變編碼第二多肽的介面的核酸以編碼腔體。為此，用編碼至少一個「導入」胺基酸殘基的 DNA (其側鏈體積小於原始胺基酸殘基) 替換在第二多肽的介面中編碼至少一個「原始」胺基酸殘基的核酸。應當理解，可存在一個以上的原始及相應的導入殘基。在一些實施例中，用於形成腔體之導入殘基為天然存在的胺基酸殘基，其選自丙胺酸 (A)、絲胺酸 (S)、蘇胺酸 (T) 及纈胺酸 (V)。在一些實施例中，導入殘基為絲胺酸、丙胺酸或蘇胺酸。在一些實施例中，用於形成腔體之原始殘基具有較大的側鏈體積，例如酪胺酸、精胺酸、苯丙胺酸或色胺酸。用於引入「腔體」的突變可稱為「臼突變」。

【0106】 突起在腔體中是「可定位的」，意味著突起和腔體分別在第一多肽和第二多肽的介面上的空間位置以及突起和腔體的大小使得突起可位於腔

體中而不會顯著干擾第一多肽和第二多肽在介面上的正常締合。由於諸如 Tyr、Phe 和 Trp 等突起通常不從界面的軸線垂直延伸且具有較佳之構型，因此突起與相應腔體的對准在一些情況下中可依賴於基於三維結構對突起/腔體配對進行建模，該三維結構藉由例如 X 射線晶體學或核磁共振 (NMR) 獲得。這可使用本領域中普遍接受的技術來實現。

【0107】 在一些實施例中，IgG1 恆定區中的杵突變為 T366W（EU 編號）。在一些實施例中，IgG1 恆定區中的臼突變包括選自 T366S、L368A 及 Y407V（EU 編號）的一個或多個突變。在一些實施例中，IgG1 恆定區中的臼突變包括 T366S、L368A 及 Y407V（EU 編號）。

【0108】 在一些實施例中，IgG4 恆定區中的杵突變為 T366W（EU 編號）。在一些實施例中，IgG4 恆定區中的臼突變包括選自 T366S、L368A 和 Y407V（EU 編號）的一個或多個突變。在一些實施例中，IgG4 恆定區中的臼突變包括 T366S、L368A 和 Y407V（EU 編號）。

【0109】 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)）；及按照例如 Tutt 等人 *J. Immunol.* 147: 60 (1991) 所述之方法製備三特異性抗體。

【0110】 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)。

e. 抗體片段

【0111】 在某些實施例中，本文提供的抗體是抗體片段。抗體片段包括但不限於 Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv、及 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，Rosenburg 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基殘基且具有增加的體內半衰期之 Fab 及 F(ab')₂ 片段的論述，參見美國第 5,869,046 號專利。

【0112】 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。

【0113】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)。

【0114】抗體片段可藉由各種技術製造，包括但不限於如本文所述之完整抗體之蛋白水解消化以及重組宿主細胞（例如大腸桿菌或噬菌體）之產生。

f. 抗體變異體

【0115】在某些態樣中，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。可通過將適當的修飾引入編碼抗體的核苷酸序列中，或通過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。

g. 重組方法和組成物

【0116】可使用重組方法和組成物來生產抗體，例如美國專利第 4,816,567 號中所述。於一個實施例中，提供編碼本文所述之抗體的經分離之核酸。此等核酸可編碼包含 VL 之胺基酸序列及/或包含抗體之 VH 之胺基酸序列 (例如，抗體之輕鏈及/或重鏈)。在一進一步實施例中，提供一個或多個包含此等核酸之載體 (例如，表現載體)。在又一實施例中，提供包含此核酸之宿主細胞。在此等實施例中，宿主細胞包含 (例如，已轉化)：(1) 包含核酸之載體編碼包含抗體之 VL 之胺基酸序列及包含抗體之 VH 之胺基酸序列，或 (2) 包含核酸之第一載體編碼包含抗體之 VL 之胺基酸序列及包含核酸之第二載體編碼包含抗體之 VL 之胺基酸序列。於一個實施例中，宿主細胞為真核細胞，例如，

中華倉鼠卵巢 (CHO) 細胞或淋巴樣細胞（例如，Y0、NS0、Sp20 細胞）。於一個實施例中，提供一種製備抗體之方法，其中該方法包括在適用於抗體表現的條件下培養包含如上所述之編碼抗體的核酸的宿主細胞，並視情況從宿主細胞（或宿主細胞培養基）中回收該抗體。

【0117】對於抗體之重組生產，將例如上文所述之編碼抗體的核酸分離，並插入一種或多種載體中，以在宿主細胞中進一步選殖及/或表現。此等核酸可使用常規方法（例如，藉由使用能夠與編碼抗體重鏈和輕鏈的基因特異性結合的寡核苷酸探針）輕易地分離並測序。

【0118】適用於克隆或表現編碼抗體之載體的宿主細胞包括本文所述之原核或真核細胞。例如，抗體可能在細菌中產生，特別是在無需糖基化和 Fc 效應功能的情況下。有關抗體片段和多肽在細菌中之表現，參見例如美國專利第 5,648,237、5,789,199 及 5,840,523 號。（也參見 Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254，描述了抗體片段在大腸桿菌中表現。）在表現後，抗體可與細菌細胞糊中的可溶性部分分離，並可經過進一步純化。

【0119】除原核生物以外，真核微生物（如絲狀真菌或酵母菌）也為合適的抗體編碼載體的克隆或表現宿主，包括其糖基化途徑已被「人源化」的真菌和酵母菌株，從而導致具有部分或完全人糖基化模式的多肽的產生。參見：Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004)；及 Li 等人，*Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006)。

【0120】用於表現糖基化抗體的合適的宿主細胞也來源於多細胞生物（無脊椎動物和脊椎動物）。無脊椎動物細胞之實例包括植物和昆蟲細胞。已鑑定出

許多桿狀病毒株，它們可以與昆蟲細胞結合使用，特定而言用於轉染草地貪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 細胞。

【0121】植物細胞培養物也可以用作宿主。參見例如美國專利第 5,959,177、6,040,498、6,420,548、7,125,978 及 6,417,429 號（描述在基因轉殖植物中生產抗體的 PLANTIBODIES™ 技術）。

【0122】脊椎動物細胞也可用作宿主。例如，可使用適於在懸浮液中生長的哺乳動物細胞係。可用的哺乳動物宿主細胞系的其他實例包括：由 SV40 (COS-7) 轉化的猴腎 CV1 系；人胚胎腎系（例如 Graham 等人，*J. Gen Virol.* 36:59 (1977) 中所述之 293 或 293 細胞）；幼地鼠腎細胞 (BHK)；小鼠睪丸支持細胞（例如 Mather，*Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980) 中所述之 TM4 細胞）；猴腎細胞 (CV1)；非洲綠猴腎細胞 (VERO-76)；人子宮頸癌細胞 (HELA)；犬腎細胞 (MDCK)；Buffalo 大鼠肝細胞 (BRL 3A)；人肺細胞 (W138)；人肝細胞 (Hep G2)；小鼠乳腺腫瘤 (MMT 060562)；TRI 細胞（例如 Mather 等人，*Annals N.Y.Acad. Sci.* 383: 44-68 (1982) 所述）；MRC 5 細胞；及 FS4 細胞。其他可用的哺乳動物宿主細胞系包括中國倉鼠卵巢 (CHO) 細胞，包括 DHFR- CHO 細胞 (Urlaub 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216 (1980))；及骨髓瘤細胞系，例如 Y0、NS0 和 Sp2/0。有關某些適用於抗體生產的哺乳動物宿主細胞系的綜述，參見例如：Yazaki 和 Wu，*Methods in Molecular Biology*，第 248 卷（B.K.C. Lo 主編，Humana Press，Totowa, NJ），第 255-268 頁 (2003)。

【0123】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。在實施例中，腫瘤相關抗原或細胞表面抗原選自 CD71、Trop2、MSLN、NaPi2b、Ly6E、EpCAM 及 CD22。

【0124】如本文所述，Ab-CIDE 可包含抗體，例如選自下列各項的抗體：

i. 抗 Ly6E 抗體

【0125】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。

【0126】在某些實施例中，Ab-CIDE 可包含抗 Ly6E 抗體。淋巴細胞抗原 6 複合體基因座 E (Ly6E) 亦稱為視黃酸所誘導之基因 E (RIG-E) 及乾細胞抗原 2 (SCA-2)。它是一種由 GPI 連接、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，本文所述之主題提供一種 Ab-CIDE，其包含在 PCT 公開案第 WO 2013/177055 號中所述之抗 Ly6E 抗體。

【0127】在一些實施例中，本文所述之主題提供一種 Ab-CIDE，其包含抗 Ly6E 抗體，該抗體包含選自以下項的至少一個、兩個、三個、四個、五個或六個 HVR：(a) HVR-H1，其包含 SEQ ID NO: 4 之胺基酸序列；(b) HVR-H2，其包含 SEQ ID NO: 5 之胺基酸序列；(c) HVR-H3，其包含 SEQ ID NO: 6 之胺基酸序列；(d) HVR-L1，其包含 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列；(e) HVR-L2，其包含 SEQ ID NO: 2 之胺基酸序列；及 (f) HVR-L3，其包含 SEQ ID NO: 3 之胺基酸序列。

【0128】 在一個態樣中，本文所述之主題提供一種 Ab-CIDE，其包含抗體，該抗體包含選自以下項的至少一個、至少兩個或全部三個 VH HVR 序列：(a) HVR-H1，其包含 SEQ ID NO: 4 之胺基酸序列；(b) HVR-H2，其包含 SEQ ID NO: 5 之胺基酸序列；及 (c) HVR-H3，其包含 SEQ ID NO: 6 之胺基酸序列。在另一實施例中，抗體包含：(a) HVR-H1，其包含 SEQ ID NO: 4 之胺基酸序列；(b) HVR-H2，其包含 SEQ ID NO: 5 之胺基酸序列；及 (c) HVR-H3，其包含 SEQ ID NO: 6 之胺基酸序列。

【0129】 在另一態樣中，本文所述之主題提供一種 Ab-CIDE，其包含抗體，該抗體包含選自以下項的至少一個、至少兩個或全部三個 VL HVR 序列：(a) HVR-L1，其包含 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列；(b) HVR-L2，其包含 SEQ ID NO: 2 之胺基酸序列；及 (c) HVR-L3，其包含 SEQ ID NO: 3 之胺基酸序列。在一個實施例中，抗體包含：(a) HVR-L1，其包含 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列；(b) HVR-L2，其包含 SEQ ID NO: 2 之胺基酸序列；及 (c) HVR-L3，其包含 SEQ ID NO: 3 之胺基酸序列。

【0130】 在另一態樣中，Ab-CIDE 包含抗體，該抗體包含：(a) VH 域，其包含選自以下項的至少一個、至少兩個或全部三個 VH HVR 序列：(i) HVR-H1，其包含 SEQ ID NO: 4 之胺基酸序列，(ii) HVR-H2，其包含 SEQ ID NO: 5 之胺基酸序列；及 (iii) HVR-H3，其包含 SEQ ID NO: 6 之胺基酸序列；及 (b) VL 域，其包含選自以下項的至少一個、至少兩個或全部三個 VL HVR 序列：(i) HVR-L1，其包含 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列，(ii) HVR-L2，其包含 SEQ ID NO: 2 之胺基酸序列，及 (c) HVR-L3，其包含 SEQ ID NO: 3 之胺基酸序列。

【0131】 在另一態樣中，本文所述之主題提供一種 Ab-CIDE，其包含抗體，該抗體包含：(a) HVR-H1，其包含 SEQ ID NO: 4 之胺基酸序列；(b) HVR-H2，其包含 SEQ ID NO: 5 之胺基酸序列；(c) HVR-H3，其包含 SEQ ID NO: 6 之胺基酸序列；(d) HVR-L1，其包含 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列；(e) HVR-L2，其包含 SEQ ID NO: 2 之胺基酸序列；及 (f) HVR-L3，其包含 SEQ ID NO: 3 之胺基酸序列。

【0132】 在以上實施例中任一項中，Ab-CIDE 的抗 Ly6E 抗體可為人源化的。在一個實施例中，抗 Ly6E 抗體包含如以上實施例中任一項之 HVR，且進一步包含人受體骨架，例如人免疫球蛋白骨架或人共有骨架。

【0133】 在另一態樣中，Ab-CIDE 的抗 Ly6E 抗體包含重鏈可變域 (VH) 序列，該 VH 序列與 SEQ ID NO: 8 之胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 之序列同一性。於某些實施例中，與 SEQ ID NO: 8 之胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的 VH 序列包含相對於參比序列的取代（例如，保守取代）、插入或缺失，但是包含該序列的抗 Ly6E 抗體結合物保留與 Ly6E 結合之能力。於某些實施例中，在 SEQ ID NO: 8 中，共有 1 至 10 個胺基酸被取代、插入及/或缺失。於某些實施例中，在 SEQ ID NO: 8 中，共有 1 至 5 個胺基酸被取代、插入及/或缺失。在某些實施例中，取代、插入或缺失發生在 HVR 以外的區域（亦即，在 FR 中）。視情況，抗 Ly6E 抗體包含 SEQ ID NO: 8 之 VH 序列，其包括該序列之轉譯後修飾。在一個特定實施例中，VH 包含選自以下項之一個、兩個或三個 HVR：(a) HVR-H1，其包含

SEQ ID NO: 4 之胺基酸序列；(b) HVR-H2，其包含 SEQ ID NO: 5 之胺基酸序列；及 (c) HVR-H3，其包含 SEQ ID NO: 6 之胺基酸序列。

【0134】 在另一態樣中，提供 Ab-CIDE 的抗 Ly6E 抗體，其中該抗體包含輕鏈可變域 (VL) 序列，該 VL 序列與 SEQ ID NO: 7 之胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 之序列同一性。於某些實施例中，與 SEQ ID NO: 7 之胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的 VL 序列包含相對於參比序列的取代（例如，保守取代）、插入或缺失，但是包含該序列的抗 Ly6E 抗體結合物保留與 Ly6E 結合之能力。於某些實施例中，在 SEQ ID NO: 7 中，共有 1 至 10 個胺基酸被取代、插入及/或缺失。於某些實施例中，在 SEQ ID NO: 7 中，共有 1 至 5 個胺基酸被取代、插入及/或缺失。於某些實施例中，取代、插入或缺失發生在 HVR 以外的區域（亦即，在 FR 中）。視情況，抗 Ly6E 抗體包含 SEQ ID NO: 7 之 VL 序列，其包括該序列之轉譯後修飾。在一個特定實施例中，VL 包含選自以下項之一個、兩個或三個 HVR：(a) HVR-L1，其包含 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列；(b) HVR-L2，其包含 SEQ ID NO: 2 之胺基酸序列；及 (c) HVR-L3，其包含 SEQ ID NO: 3 之胺基酸序列。

【0135】 在另一態樣中，提供一種包含抗 Ly6E 抗體的 Ab-CIDE，其中抗體包含上文所提供之實施例中任一項之 VH 及上文所提供之實施例中任一項之 VL。

【0136】 在一個實施例中，提供一種 Ab-CIDE，其中抗體包含分別為 SEQ ID NO: 8 和 SEQ ID NO: 7 之 VH 和 VL 序列，其包括那些序列之轉譯後修飾。

【0137】在又一態樣中，本文提供 Ab-CIDE，其包含與本文所提供之抗 Ly6E 抗體結合至同一抗原決定基的抗體。例如，在某些實施例中，提供一種 Ab-CIDE，其包含與抗 Ly6E 抗體結合至同一抗原決定基的抗體，該抗體包含 SEQ ID NO: 8 之 VH 序列及 SEQ ID NO: 7 之 VL 序列。

【0138】在又一態樣中，根據以上實施例中任一項之 Ab-CIDE 的抗 Ly6E 抗體為單株抗體，包括人抗體。在一個實施例中，Ab-CIDE 的抗 Ly6E 抗體為抗體片段，例如 Fv、Fab、Fab'、scFv、雙抗體或 F(ab')₂ 片段。在另一實施例中，抗體為基本上全長抗體，例如本文所定義之 IgG1 抗體、IgG2a 抗體或其他抗體類型或同型。在一些實施例中，Ab-CIDE 包含抗 Ly6E 抗體，該抗 Ly6E 抗體包含重鏈及輕鏈，該重鏈及輕鏈分別包含 SEQ ID NO: 10 和 SEQ ID NO: 9 之胺基酸序列。

ii. 抗 NaPi2b 抗體

【0139】Napi2b (Napi3b, NAPI-3B, NPTIIb, SLC34A2, 溶質載劑家族 34 (磷酸鈉), 成員 2, 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。

【0140】在某些實施例中，Ab-CIDE 包含抗 NaPi2b 抗體。

【0141】 在一些實施例中，本文所述為 Ab-CIDE，其包含抗 NaPi2b 抗體，該抗體包含選自以下項的至少一個、兩個、三個、四個、五個或六個 HVR：(a) HVR-H1，其包含 SEQ ID NO: 11 之胺基酸序列；(b) HVR-H2，其包含 SEQ ID NO: 12 之胺基酸序列；(c) HVR-H3，其包含 SEQ ID NO: 13 之胺基酸序列；(d) HVR-L1，其包含 SEQ ID NO: 14 之胺基酸序列；(e) HVR-L2，其包含 SEQ ID NO: 15 之胺基酸序列；及 (f) HVR-L3，其包含 SEQ ID NO: 16 之胺基酸序列。

【0142】 在一個態樣中，本文所述為 Ab-CIDE，其包含抗體，該抗體包含選自以下項的至少一個、至少兩個或全部三個 VH HVR 序列：(a) HVR-H1，其包含 SEQ ID NO: 11 之胺基酸序列；(b) HVR-H2，其包含 SEQ ID NO: 12 之胺基酸序列；(c) HVR-H3，其包含 SEQ ID NO: 13 之胺基酸序列。在另一實施例中，抗體包含：(a) HVR-H1，其包含 SEQ ID NO: 11 之胺基酸序列；(b) HVR-H2，其包含 SEQ ID NO: 12 之胺基酸序列；(c) HVR-H3，其包含 SEQ ID NO: 13 之胺基酸序列。

【0143】 在另一態樣中，本文所述為 Ab-CIDE，其包含抗體，該抗體包含選自以下項的至少一個、至少兩個或全部三個 VL HVR 序列：(a) HVR-L1，其包含 SEQ ID NO: 14 之胺基酸序列；(b) HVR-L2，其包含 SEQ ID NO: 15 之胺基酸序列；及 (c) HVR-L3，其包含 SEQ ID NO: 16 之胺基酸序列。在一個實施例中，抗體包含：(a) HVR-L1，其包含 SEQ ID NO: 14 之胺基酸序列；(b) HVR-L2，其包含 SEQ ID NO: 15 之胺基酸序列；及 (c) HVR-L3，其包含 SEQ ID NO: 16 之胺基酸序列。

【0144】 在另一態樣中，Ab-CIDE 包含抗體，該抗體包含：(a) VH 域，其包含選自以下項的至少一個、至少兩個或全部三個 VH HVR 序列：(i) HVR-H1，其包含 SEQ ID NO: 11 之胺基酸序列，(ii) HVR-H2，其包含 SEQ ID NO: 12 之胺基酸序列；及 (iii) HVR-H3，其包含 SEQ ID NO: 13 之胺基酸序列；及 (b) VL 域，其包含選自以下項的至少一個、至少兩個或全部三個 VL HVR 序列：(i) HVR-L1，其包含 SEQ ID NO: 14 之胺基酸序列，(ii) HVR-L2，其包含 SEQ ID NO: 15 之胺基酸序列，及 (c) HVR-L3，其包含 SEQ ID NO: 16 之胺基酸序列。

【0145】 在另一態樣中，本文所述為 Ab-CIDE，其包含抗體，該抗體包含：(a) HVR-H1，其包含 SEQ ID NO: 11 之胺基酸序列；(b) HVR-H2，其包含 SEQ ID NO: 12 之胺基酸序列；(c) HVR-H3，其包含 SEQ ID NO: 13 之胺基酸序列；(d) HVR-L1，其包含 SEQ ID NO: 14 之胺基酸序列；(e) HVR-L2，其包含 SEQ ID NO: 15 之胺基酸序列；及 (f) HVR-L3，其包含 SEQ ID NO: 16 之胺基酸序列。

【0146】 在以上實施例中任一項中，Ab-CIDE 的抗 NaPi2b 抗體可為人源化的。在一個實施例中，抗 NaPi2b 抗體包含如以上實施例中任一項之 HVR，且進一步包含人受體骨架，例如人免疫球蛋白骨架或人共有骨架。

【0147】 在另一態樣中，Ab-CIDE 的抗 NaPi2b 抗體包含重鏈可變域 (VH) 序列，該 VH 序列與 SEQ ID NO: 17 之胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 之序列同一性。在某些實施例中，與 SEQ ID NO: 54 之胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的 VH 序列包含相對於參

比序列的取代（例如，保守取代）、插入或缺失，但是包含該序列的抗 NaPi2b 抗體保留與 NaPi2b 結合之能力。於某些實施例中，在 SEQ ID NO: 17 中，共有 1 至 10 個胺基酸被取代、插入及/或缺失。於某些實施例中，在 SEQ ID NO: 17 中，共有 1 至 5 個胺基酸被取代、插入及/或缺失。在某些實施例中，取代、插入或缺失發生在 HVR 以外的區域（亦即，在 FR 中）。視情況，抗 NaPi2b 抗體包含 SEQ ID NO: 17 之 VH 序列，其包括該序列之轉譯後修飾。在一個特定實施例中，VH 包含選自以下項之一個、兩個或三個 HVR：(a) HVR-H1，其包含 SEQ ID NO: 11 之胺基酸序列；(b) HVR-H2，其包含 SEQ ID NO: 12 之胺基酸序列；及 (c) HVR-H3，其包含 SEQ ID NO: 13 之胺基酸序列。

【0148】 在另一態樣中，提供 Ab-CIDE 的抗 NaPi2b 抗體，其中該抗體包含輕鏈可變域 (VL) 序列，該 VL 序列與 SEQ ID NO: 18 之胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 之序列同一性。於某些實施例中，與 SEQ ID NO: 18 之胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的 VL 序列包含相對於參比序列的取代（例如，保守取代）、插入或缺失，但是包含該序列的抗 NaPi2b 抗體結合物保留與抗 NaPi2b 結合之能力。於某些實施例中，在 SEQ ID NO: 18 中，共有 1 至 10 個胺基酸被取代、插入及/或缺失。於某些實施例中，在 SEQ ID NO: 18 中，共有 1 至 5 個胺基酸被取代、插入及/或缺失。於某些實施例中，取代、插入或缺失發生在 HVR 以外的區域（亦即，在 FR 中）。視情況，抗 NaPi2b 抗體包含 SEQ ID NO: 18 之 VL 序列，其包括該序列之轉譯後修飾。在一個特定實施例中，VL 包含選自以下項之一個、兩個或三個 HVR：(a) HVR-L1，其包含 SEQ ID NO: 14 之胺基酸序列；(b) HVR-L2，其

包含 SEQ ID NO: 15 之胺基酸序列；及 (c) HVR-L3，其包含 SEQ ID NO: 16 之胺基酸序列。

【0149】 在另一態樣中，提供一種包含抗 NaPi2b 抗體的 Ab-CIDE，其中抗體包含上文所提供之實施例中任一項之 VH 及上文所提供之實施例中任一項之 VL。

【0150】 在一個實施例中，提供一種 Ab-CIDE，其中抗體包含分別為 SEQ ID NO: 17 和 SEQ ID NO: 18 之 VH 和 VL 序列，其包括那些序列之轉譯後修飾。

【0151】 在又一態樣中，本文提供 Ab-CIDE，其包含與本文所提供之抗 NaPi2b 抗體結合至同一抗原決定基的抗體。例如，在某些實施例中，提供一種 Ab-CIDE，其包含與抗 NaPi2b 抗體結合至同一抗原決定基的抗體，該抗體包含 SEQ ID NO: 17 之 VH 序列及 SEQ ID NO: 18 之 VL 序列。

【0152】 在又一態樣中，根據以上實施例中任一項之 Ab-CIDE 的抗 NaPi2b 抗體為單株抗體，包括人抗體。在一個實施例中，Ab-CIDE 的抗 NaPi2b 抗體為抗體片段，例如 Fv、Fab、Fab'、scFv、雙抗體或 F(ab')₂ 片段。在另一實施例中，抗體為基本上全長抗體，例如本文所定義之 IgG1 抗體、IgG2a 抗體或其他抗體類型或同型。

iii. 抗 CD22 抗體

【0153】 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。

【0154】在某些實施例中，Ab-CIDE 可包含抗 CD22 抗體，該等抗體包含三個輕鏈高度可變區（HVR-L1、HVR-L2 及 HVR-L3）及三個重鏈高度可變區（HVR-H1、HVR-H2 及 HVR-H3）。在一個實施例中，Ab-CIDE 的抗 CD22 抗體包含三個輕鏈高度可變區及三個重鏈高度可變區 (SEQ ID NO: 19-24)，其序列如下所示。在一個實施例中，Ab-CIDE 的抗 CD22 抗體包含 SEQ ID NO: 25 之可變輕鏈序列及 SEQ ID NO: 26 之可變重鏈序列。在一個實施例中，本發明之Ab-CIDE 的抗 CD22 抗體包含 SEQ ID NO: 27 之輕鏈序列及 SEQ ID NO: 28 之重鏈序列。

iv. 抗 CD71 抗體

【0155】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。在以上實施例中任一項中，Ab-CIDE 的抗 CD71 抗體可為人源化的。

【0156】在一個實施例中，抗 CD71 抗體包含 NG2LH 修飾，該修飾為 N297G 突變與降低/消除 IgG1 mAb 效應功能的 IgG2 下樞紐區之組合。在另一實施例中，抗 CD71 抗體包含用於結合至連接子的經工程化改造的 Cys 殘基。在一個實施例中，缺乏所有這些變化的親本 IgG1 mAb 描述於：WO2016081643，其全文以引用方式併入本文。

【0157】在實施例中，抗 CD71 抗體為抗 huTfR1.hIgG1.LC.K149C.HC.L174C.Y373C.NG2LH ABP1AA25970（高親和力

DAR6)。在一個實施例中，Ab-CIDE 的抗 CD71 抗體包含 SEQ ID NO: 30 之輕鏈序列及 SEQ ID NO: 29 之重鏈序列。

【0158】在實施例中，抗 CD71 抗體為抗 huTfR2.hIgG1.LC.K149C.HC.L174C.Y373C.NG2LH ABP1AA25969（低親和力 DAR6）。在一個實施例中，Ab-CIDE 的抗 CD71 抗體包含 SEQ ID NO: 32 之輕鏈序列及 SEQ ID NO: 31 之重鏈序列。

【0159】在實施例中，抗 CD71 抗體為抗 huTfR1.hIgG1.LC.K149C.NG2LH ABP1AA30139（高親和力 DAR2）。在一個實施例中，Ab-CIDE 的抗 CD71 抗體包含 SEQ ID NO: 34 之輕鏈序列及 SEQ ID NO: 33 之重鏈序列。

【0160】在實施例中，抗 CD71 抗體為抗 huTfR2.hIgG1.LC.K149C.NG2LH ABP1AA30140（低親和力 DAR2）。在一個實施例中，Ab-CIDE 的抗 CD71 抗體包含 SEQ ID NO: 36 之輕鏈序列及 SEQ ID NO: 35 之重鏈序列。

v. 抗 Trop2 抗體

【0161】在某些實施例中，Ab-CIDE 可包含抗 Trop2 抗體。Trop2（滋胚層抗原 2）是一種跨膜糖蛋白，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

【0162】 在某些實施例中，Ab-CIDE 可包含抗 MSLN 抗體。MSLN（間皮素）是一種糖基磷脂酰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) 所述的 h7D9.v3，其全文以引用方式併入本文。

vii. 抗 EpCAM 抗體

【0163】 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 遞送之特定細胞類型或組織類型。

1. 抗體親和性

【0164】在某些實施例中，本文所提供之抗體具有 $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 50 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ nM}$ 、 $\leq 5 \text{ nM}$ 、 $\leq 1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.01 \text{ nM}$ 或 $\leq 0.001 \text{ nM}$ 的解離常數 (K_d)，且解離常數視情況 $\geq 10^{-13} \text{ M}$ (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)。

【0165】於一個實施例中， K_d 係藉由放射性標記之抗原結合分析 (RIA) 來量測，該分析利用所關注抗體之 Fab 型式及其抗原來進行，如由以下分析所述。如下量測 Fab 對抗原之溶液結合親和力：藉由在一個滴定系列之未標記抗原存在下用最低濃度之 (^{125}I) 標記抗原來平衡 Fab，隨後用經抗 Fab 抗體塗佈之培養盤來捕獲結合抗原 (參見例如 Chen 等人，*J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999))。為確定測定的條件，用溶於 50 mM 碳酸鈉 (pH 9.6) 中的 $5 \mu\text{g/ml}$ 捕獲抗 Fab 抗體 (Cappel Labs) 將 MICROTITER® 多孔板 (Thermo Scientific) 包被過夜，然後用溶於 PBS 中的 2% (w/v) 牛血清白蛋白在室溫 (約 23°C) 下將其阻斷。在非吸附板 (Nunc #269620) 中，將 100 pM 或 26 pM [^{125}I]-抗原與目標 Fab 的系列稀釋液混合 (例如，與 Presta 等人在 *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997) 中所述之抗 VEGF 抗體 Fab-12 的評估結果一致)。然後將目標 Fab 過夜培育；但是，可繼續培育更長時間 (例如約 65 小時)，以確保達到平衡。此後，將混合物轉移至捕獲板上，在室溫下培育 (例如，培育 1 小時)。然後除去溶液，用溶於 PBS 中的 0.1% 聚山梨糖醇酯 20 (TWEEN-20®) 將板洗滌八

次。當板乾燥後，將閃爍劑 (MICROSCINT-20™; Packard) 以 150 μ l/孔的量加入，並利用 TOPCOUNT™ 伽瑪計數器 (Packard) 進行十分鐘計數。選擇提供小於或等於最大結合濃度的 20% 的各種 Fab 的濃度以用於競爭性結合測定中。

【0166】根據另一實施例，使用表面電漿子共振分析，使用 BIACORE®-2000 或 BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)，在 25°C 下，用固定抗原 CM5 晶片，在約 10 個反應單位 (RU) 下量測 Kd。簡言之，根據供應商之說明書，用 *N*-乙基-*N'*-(3-二甲胺基丙基)-碳化二亞胺鹽酸鹽 (EDC) 及 *N*-羥基琥珀醯亞胺酯 (NHS) 來活化羧基甲基化聚葡萄糖生物感測器晶片 (CM5, BIAcore, Inc.)。用 10 mM 醋酸鈉 (pH 4.8) 將抗原稀釋至 5 μ g/ml (約 0.2 μ M)，然後以 5 μ l/分鐘的流速注入，以獲得大約 10 反應單位 (RU) 的偶合蛋白。注入抗原後，注入 1 M 乙醇胺以封閉未反應的基團。在動力學測量中，將 Fab 之兩倍連續稀釋液 (0.78 nM 至 500 nM) 在 25°C 下以約 25 μ l/min 的流速注入含 0.05% 聚山梨糖醇酯 20 (TWEEN-20™) 界面活性劑 (PBST) 的 PBS 中。使用簡單的一對一朗繆爾結合模型 (one-to-one Langmuir binding model)

(BIACORE® 評估軟體 3.2 版)，藉由同時擬合結合及解離感測器圖譜來計算締合速率 (kon) 及解離速率 (koff)。平衡解離常數 (Kd) 係計算為 koff/kon 之比率。參見例如 Chen 等人，*J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999)。若藉由上述表面電漿子共振分析測定之締合速率超過 10⁶ M⁻¹ s⁻¹，則締合速率可使用螢光淬滅技術量測，該技術在如光譜儀 (諸如具有攪拌式比色管之止流裝備型分光光度計 (Aviv Instruments) 或 8000-系列 SLM-AMINCO™ 分光光度計 (ThermoSpectronic)) 中所量測之濃度增加之抗原存在下，在 25°C 量測 PBS (pH

值 7.2) 中之 20 nM 抗-抗原抗體 (Fab 形式) 之螢光發射強度 (激發 = 295 nm ; 發射 = 340 nm , 16 nm 帶通) 的增加或減少。

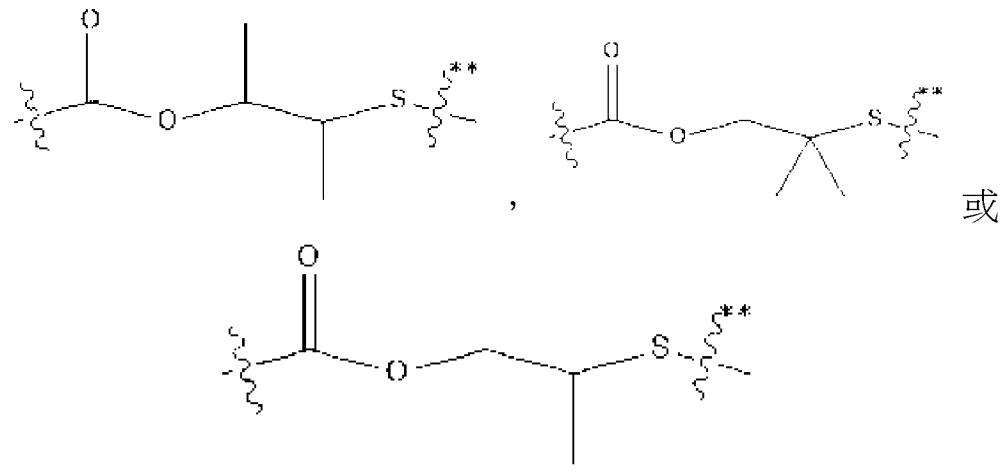
2. 連接子 (L1)

【0167】 如本文所述，「連接子」(L1，連接子-1) 為可用於將一個或多個 CIDE 部分(D) 連接至抗體 (Ab) 以形成 Ab-CIDE 的雙功能或多功能部分。在一些實施例中，可使用具有反應性官能團的 L1 製備 Ab-CIDE，以共價接附於 CIDE 及抗體。例如，在一些實施例中，抗體 (Ab) 之半胱胺酸硫醇可與連接子或連接子 L1-CIDE 組的反應性官能基形成鍵，以製備 Ab-CIDE。具體而言，連接子之化學結構對 Ab-CIDE 之療效及安全性皆有顯著影響 (Ducry 及 Stump , *Bioconjugate Chem* , 2010 , 21 , 5-13) 。選擇合適之連接子影響將藥物正確遞送之標靶細胞之預期細胞隔室。

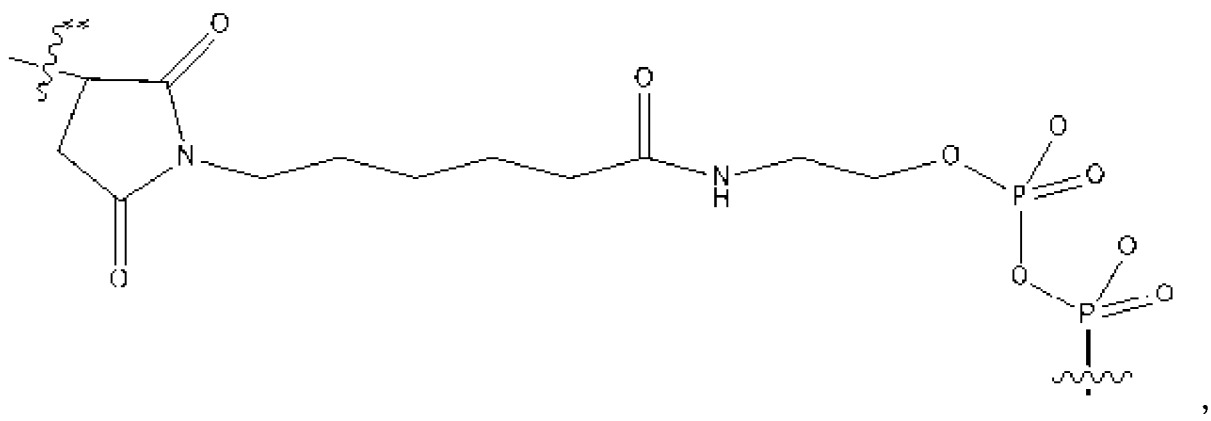
【0168】 在某些實施例中，L1 連接子可為自消耗性連接子。

【0169】 在某些實施例中，L1 連接子選自由 L1a、L1b 及 L1c 所組成之群組：

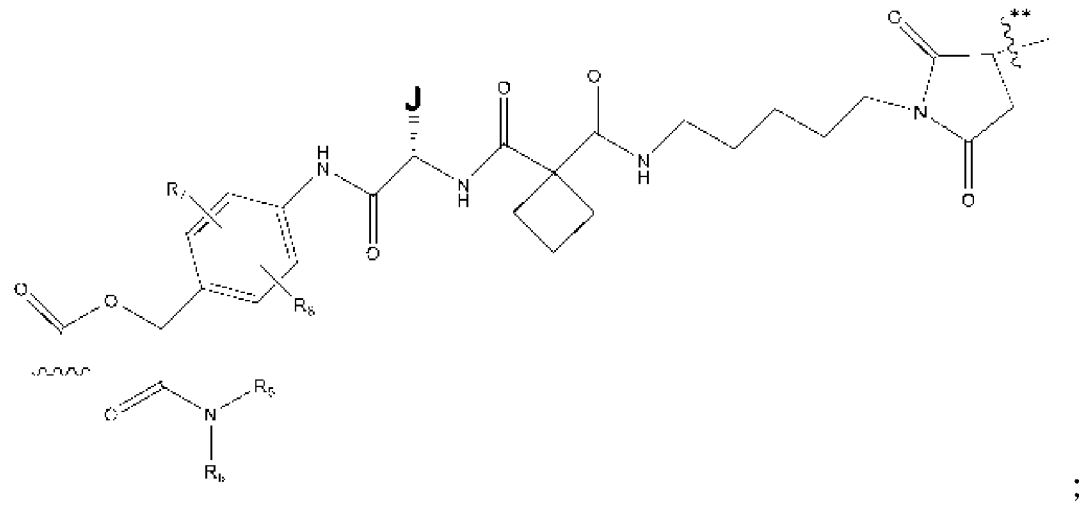
L1a 之實例：



L1b 之實例：



L1c 之實例：



其中，

J 為 —CH₂-CH₂-CH₂-NH-C(O)-NH₂；—CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂；—CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH-CH₃；或 —CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-N(CH₃)₂；

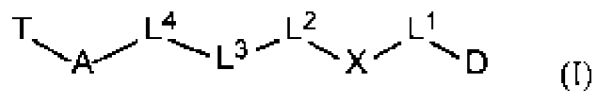
R₅ 和 R₆ 獨立地為氫或 C₁₋₅ 烷基；或者，R₅ 和 R₆ 與各自所接附之氮一起形成視情況經取代之 5 至 7 員雜環基；

R₇ 和 R₈ 各自獨立地為氫、鹵代、C₁₋₅ 烷基、C₁₋₅ 烷氧基或羥基；

且其中  為 Ab 的接附點。

【0170】 在某些實施例中，L1 連接子為親水性自消耗性連接子。這些類型的 L1 連接子之實例為 WO2014/100762 中所述的那些，該專利全文以引用方式併入本文。L1 連接子包括但不限於式 I-XII。

【0171】 本揭露提供式 (I) 之 L1 連接子：



或其鹽或溶劑化物或立體異構物；

其中：

D 為部分或 CIDE；

T 為靶向部分，例如抗體；

X 為親水性自消耗性連接子；

L¹ 不同於 L1，且為鍵、第二自消耗性連接子或環化自消除連接子；

L² 為鍵或第二自消耗性連接子；

其中，如果 L¹ 為第二自消耗性連接子或環化自消除連接子，則 L 為鍵；

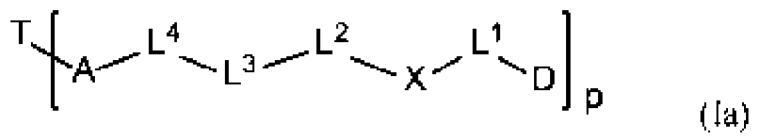
其中，如果 L² 為第二自消耗性連接子，則 L¹ 為鍵；

L³ 為肽連接子；

L⁴ 為鍵或間隔基；且

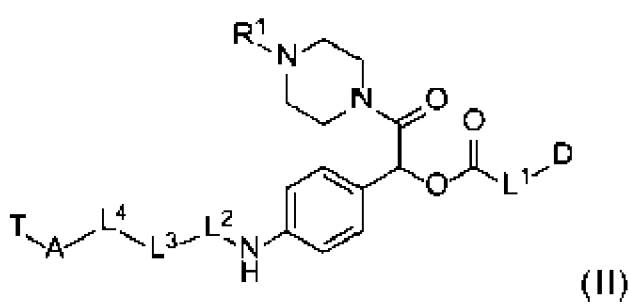
A 為醯基單元。

【0172】 在一些實施例中，提供具有式 (Ia) 之 L1 連接子：



或其鹽或溶劑化物或立體異構物；其中 D、T、X、L¹、L²、L³、L⁴ 及 A 如針對式 (I) 所定義，且 p 為 1 至 20。在一些實施例中，p 為 1 至 8。在一些實施例中，p 為 1 至 6。在一些實施例中，p 為 1 至 4。在一些實施例中，p 為 2 至 4。在一些實施例中，p 為 1、2、3 或 4。

【0173】 本揭露亦提供式 (II) 之 L1 連接子：



或其鹽或溶劑化物或立體異構物；

其中：

D 為部分或 CIDE；

T 為靶向部分或抗體；

R¹ 為氫、未經取代或經取代之 C₁₋₃ 烷基或未經取代或經取代之雜環基；

L¹ 為鍵、第二自消耗性連接子或環化自消除連接子；2

L² 為鍵、第二自消耗性連接子；

其中，如果 L¹ 為第二自消耗性連接子或環化自消除連接子，則 L² 為鍵；

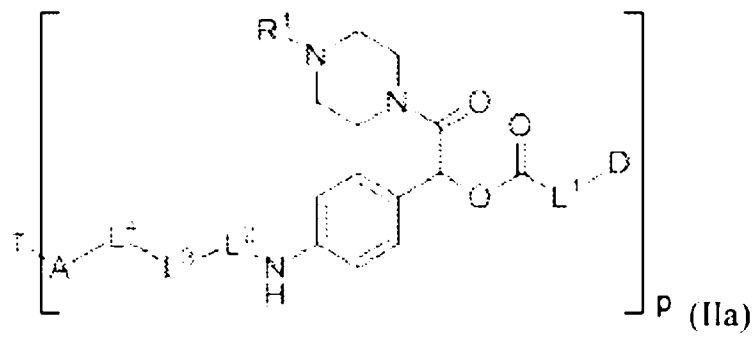
其中，如果 L¹ 為第二自消耗性連接子，則 L² 為鍵；

L³ 為肽連接子；

L⁴ 為鍵或間隔基；且

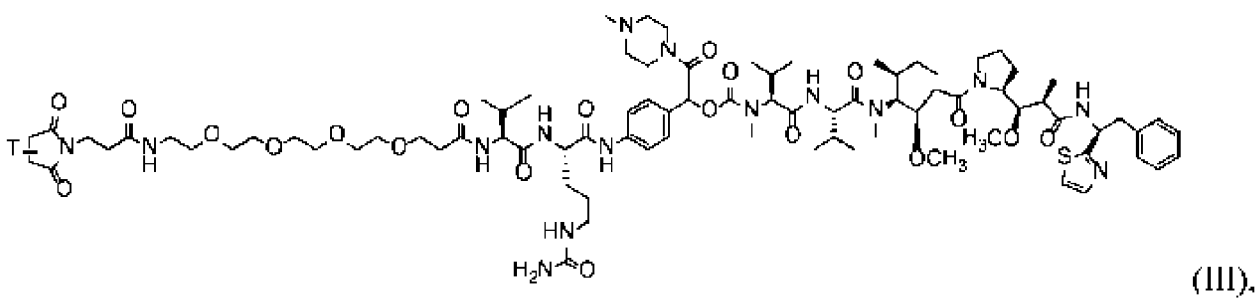
A 為醯基單元。

【0174】 在一些實施例中，提供式 (IIa) 之 L1 連接子：



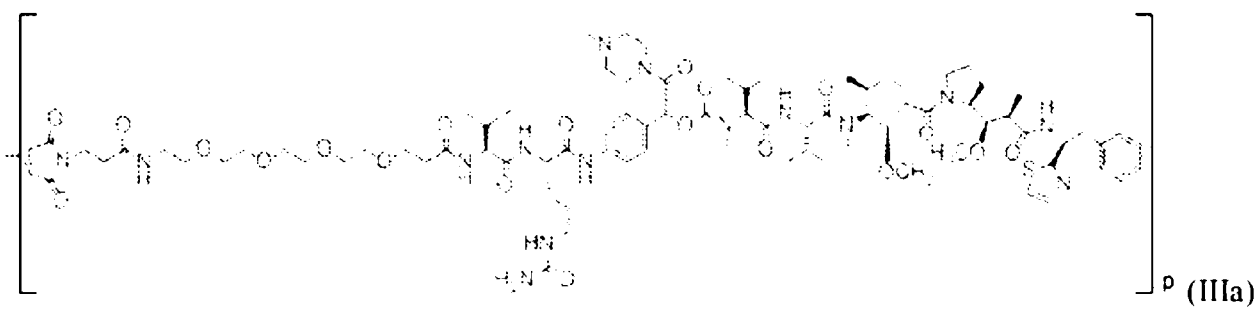
或其鹽或溶劑化物或立體異構物；其中 D、T、L¹、L²、L³、L⁴ 及 A 如針對式 (II) 所定義，且 p 為 1 至 20。在一些實施例中，p 為 1 至 8。在一些實施例中，p 為 1 至 6。在一些實施例中，p 為 1 至 4。在一些實施例中，p 為 2 至 4。在一些實施例中，p 為 1、2、3 或 4。

【0175】 本揭露亦提供式 (III) 之 L1 連接子：



或其鹽或溶劑化物或立體異構物；
其中 T 為靶向部分。

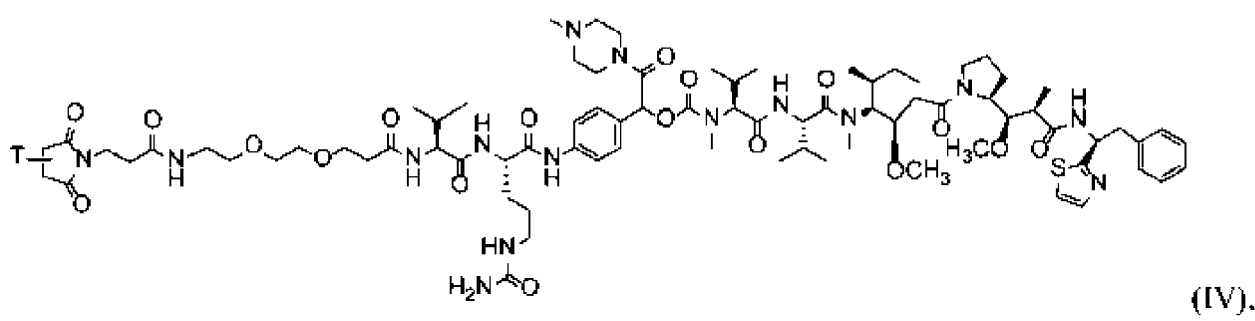
【0176】 在一些實施例中，提供式 (IIIa) 之 L1 連接子：



或其鹽或溶劑化物或立體異構物；其中 T 為靶向部分且 p 為 1 至 20。在一些實施例中，p 為 1 至 8。在一些實施例中，p 為 1 至 6。在一些實施

例中，p 為 1 至 4。在一些實施例中，p 為 2 至 4。在一些實施例中，p 為 1、2、3 或 4。

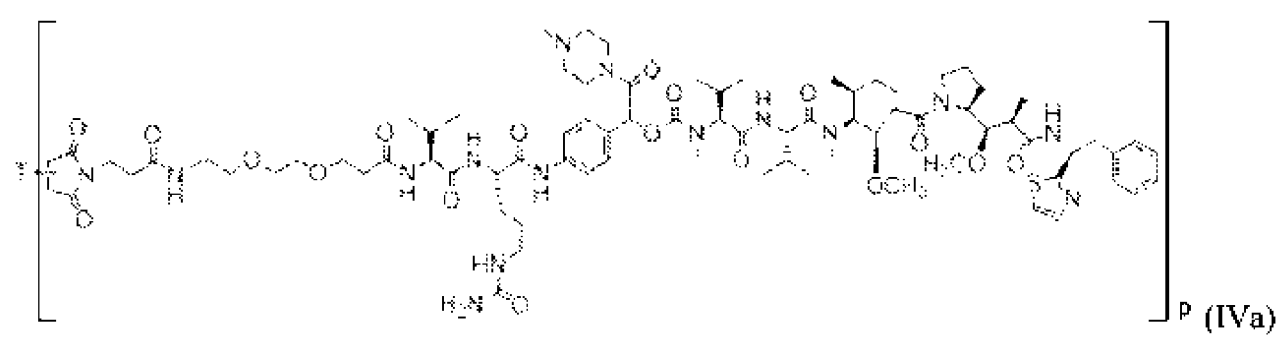
【0177】 本揭露提供式 (IV) 之 L1 連接子：



或其鹽或溶劑化物或立體異構物；

其中 T 為靶向部分。

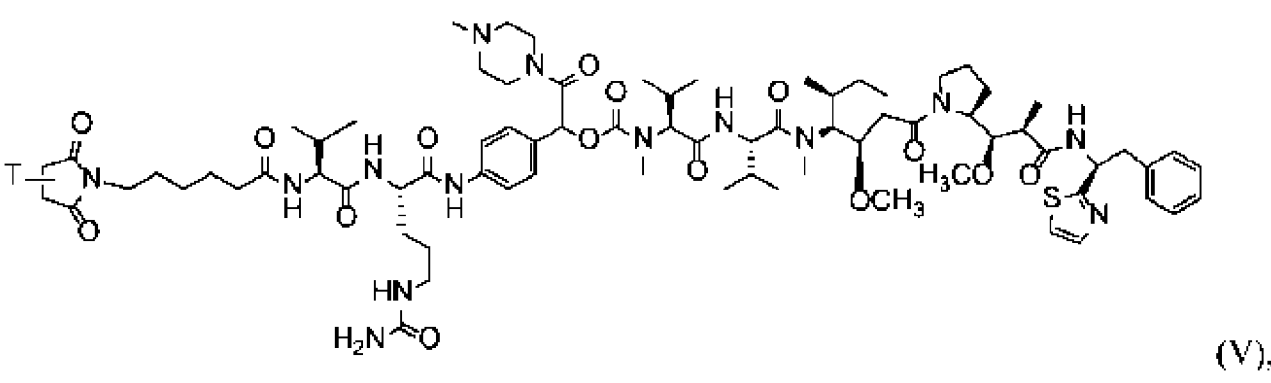
【0178】 在一些實施例中，提供式 (IVa) 之 L1 連接子：



或其鹽或溶劑化物或立體異構物；其中 T 為靶向部分且 p 為 1 至 20。

在一些實施例中，p 為 1 至 8。在一些實施例中，p 為 1 至 6。在一些實施例中，p 為 1 至 4。在一些實施例中，p 為 2 至 4。在一些實施例中，p 為 1、2、3 或 4。

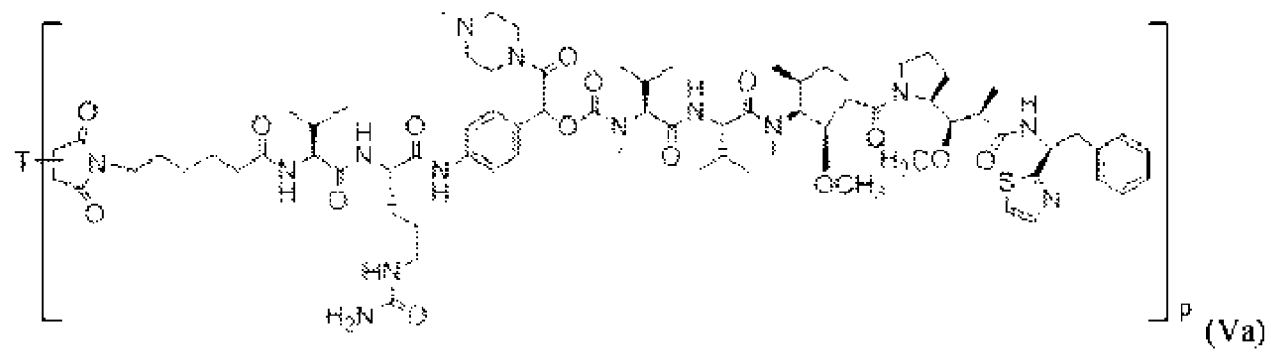
【0179】 本揭露提供式 (V) 之 L1 連接子：



或其鹽或溶劑化物或立體異構物；

其中 T 為靶向部分。

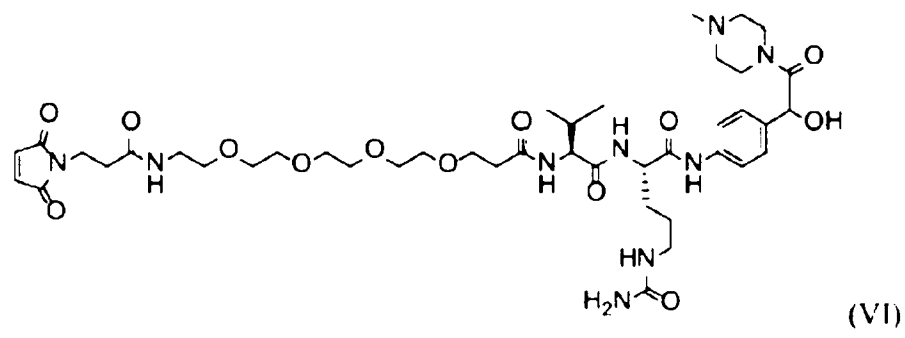
【0180】 在一些實施例中，提供具有式 (Va) 之 L1 連接子：



或其鹽或溶劑化物或立體異構物；其中 T 為靶向部分且 p 為 1 至 20。

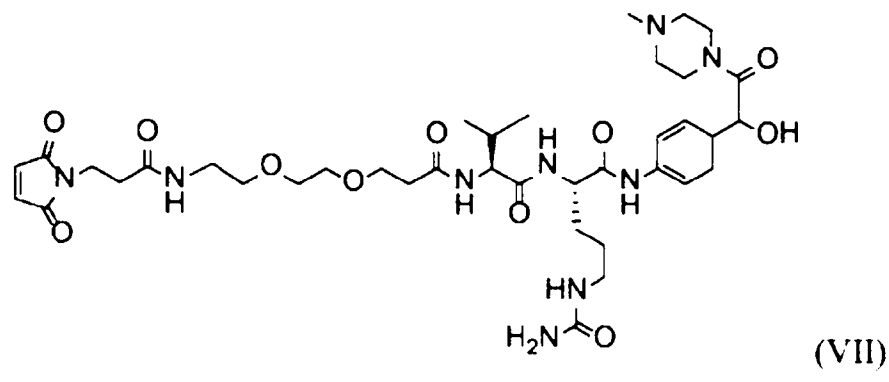
在一些實施例中，p 為 1 至 8。在一些實施例中，p 為 1 至 6。在一些實施例中，p 為 1 至 4。在一些實施例中，p 為 2 至 4。在一些實施例中，p 為 1、2、3 或 4。

【0181】 本揭露提供式 (VI) 之 L1 連接子：



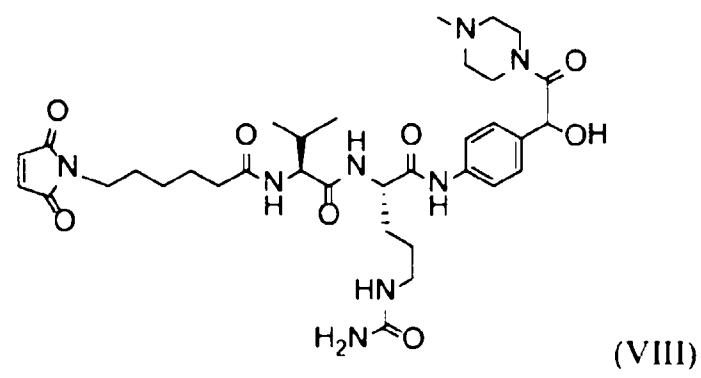
或其鹽或溶劑化物。

【0182】 本揭露提供式 (VII) 之 L1 連接子：

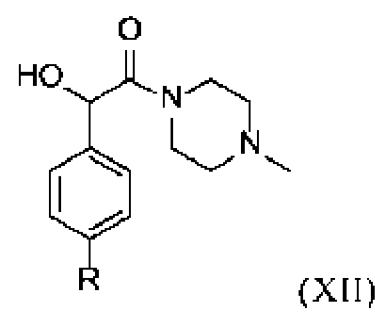


或其鹽或溶劑化物。

【0183】 本揭露提供式 (VIII) 之 L1 連接子：



【0184】 本揭露提供式 (XII) 之 L1 連接子：



或其鹽或溶劑化物或立體異構物；其中 R 為 NO₂ 或 NH₂。

【0185】 在某些實施例中，L1 連接子通常亦可分為兩類：可切割連接子（例如肽、腙 (hydrazone) 或二硫化物）或不可切割連接子（例如硫醚）。如果連接子為不可切割連接子，則其在 E3LB 部分上之位置使其不干擾 VHL 結合。具體而言，不可切割連接子並非共價連接至 VHL 結合域之脯胺酸上的羥基位置。可由溶酶體酶（例如組織蛋白酶 B）水解的肽連接子，例如纈胺酸-瓜

胺酸 (Val-Cit)，已被用於將藥物與抗體相連 (US 6,214,345)。它們特別有用，部分原因在於它們在體循環中的相對穩定性以及在腫瘤中有效釋放藥物的能力。然而，天然肽所代表的化學空間有限；因此，希望具有多種非肽連接子，其作用類似於肽，且能夠被溶酶體蛋白酶有效切割。非肽結構所具有的更大的多樣性可產生肽連接子無法提供的新的、有益特性。本文提供了不同類型的可被溶酶體酶切割的用於連接子 L1 的非肽連接子。

a. 擬肽物連接子

【0186】 本文提供了不同類型的可被溶酶體酶切割的用於 Ab-CIDE 的非肽、擬肽物連接子。例如，將二肽中間的醯胺鍵（例如 Val-Cit）替換為醯胺模擬物；及/或將整個胺基酸（例如，Val-Cit 二肽中之纈胺酸）替換為非胺基酸部分（例如，環烷基二羰基結構（例如，環大小 = 4 或 5））。

【0187】 當 L1 為擬肽物連接子時，由下式表示

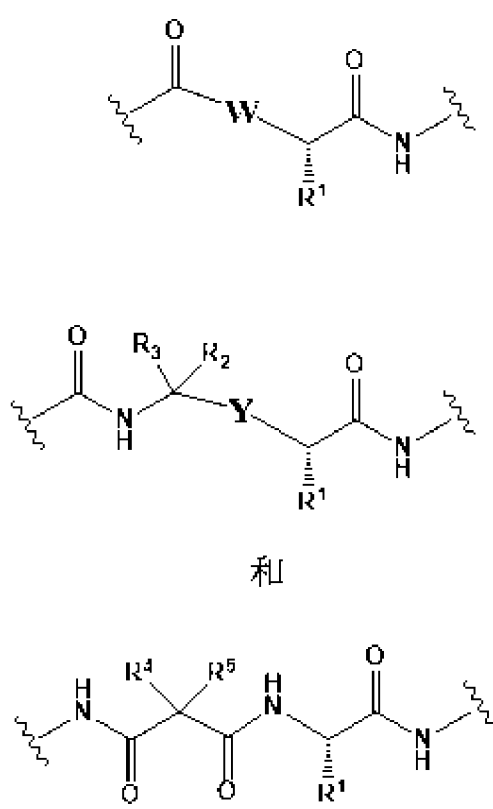


其中：

Str 為共價接附於 Ab 的延伸基單元；

Sp 為鍵或共價接附於 CIDE 部分的間隔基單元；且

PM 為選自由以下所組成之群組的非肽化學部分：



W 為 -NH-雜環烷基- 或雜環烷基；W 為 - NH-雜環烷基- 或雜環烷基；

Y 為雜芳基、芳基、-C(O)C₁-C₆伸烷基、C₁-C₆伸烷基-NH₂、C₁-C₆伸烷基-NH-CH₃、C₁-C₆伸烷基-N-(CH₃)₂、C₁-C₆烯基或 C₁-C₆伸烷基基團；

每個 R¹ 獨立地為 C₁-C₁₀烷基、C₁-C₁₀烯基、(C₁-C₁₀烷基)NHC(NH)NH₂ 或 (C₁-C₁₀烷基)NHC(O)NH₂；

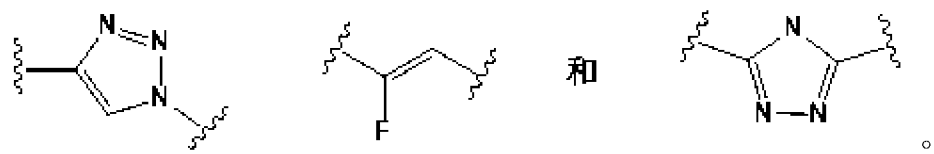
R³ 和 R² 各自獨立為 H、C₁-C₁₀烷基、C₁-C₁₀烯基、芳基烷基或雜芳基烷基，或者 R³ 和 R²可一起形成 C₃-C₇環烷基；且

R⁴ 和 R⁵ 各自獨立為 C₁-C₁₀烷基、C₁-C₁₀烯基、芳基烷基、雜芳基烷基、(C₁-C₁₀烷基)OCH₂-，或者 R⁴ 和 R⁵可形成 C₃-C₇環烷基環。

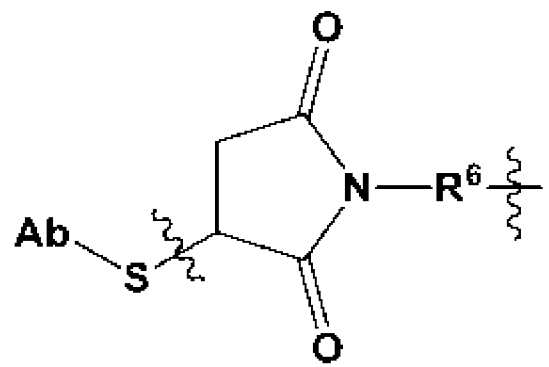
【0188】 注意，L1 可通過 E3LB、L2 或 PB 基團中之任一者連接至 CIDE。

【0189】 在實施例中，Y 為雜芳基；R⁴ 與 R⁵一起形成環丁基環。

【0190】 在實施例中，Y 為選自由以下所組成之群組的部分：

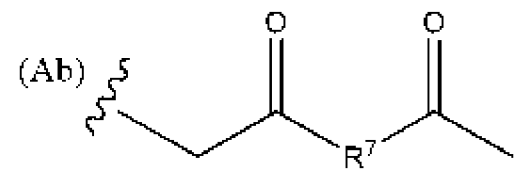


【0191】 在實施例中，Str 是由下式表示的化學部分：



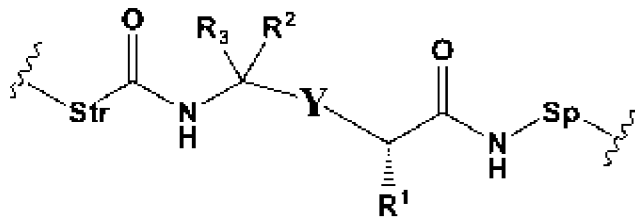
其中 R^6 選自由以下所組成之群組： C_1 - C_{10} 伸烷基、 C_1 - C_{10} 烯基、 C_3 - C_8 環烷基、(C_1 - C_8 伸烷基)O- 及 C_1 - C_{10} 伸烷基- $C(O)N(R^a)$ - C_2 - C_6 伸烷基，其中每個伸烷基可經選自由以下所組成之群組的一至五個取代基取代：鹵代、三氟甲基、二氟甲基、胺基、烷基胺基、氰基、磺醯基、磺醯胺、亞砷、羥基、烷氧基、酯、羧酸、烷硫基、 C_3 - C_8 環烷基、 C_4 - C_7 雜環烷基、芳基、芳基烷基、雜芳基烷基及雜芳基，每個 R^a 獨立地為 H 或 C_1 - C_6 烷基； S_p 為 $-Ar-R^b-$ ，其中 Ar 為芳基或雜芳基， R^b 為 (C_1 - C_{10} 伸烷基)O-。當馬來醯亞胺經由麥可加成與抗體上暴露的 Cys 殘基反應時，可發生與抗體之結合。所暴露之 Cys 殘基可藉由分子工程人工引入及/或藉由鏈間二硫鍵之還原產生。

【0192】 在實施例中，Str 具有下式：



其中 R^7 選自 C_1 - C_{10} 伸烷基、 C_1 - C_{10} 烯基、 $(C_1$ - C_{10} 伸烷基)O-、 $N(R^c)$ -(C_2 - C_6 伸烷基)- $N(R^c)$ 及 $N(R^c)$ -(C_2 - C_6 伸烷基)；其中每個 R^c 獨立地為 H 或 C_1 - C_6 伸烷基； Sp 為 $-Ar-R^b-$ ，其中 Ar 為芳基或雜芳基， R^b 為 $(C_1$ - C_{10} 伸烷基)O- 或 Sp - C_1 - C_6 伸烷基- $C(O)NH-$ 。

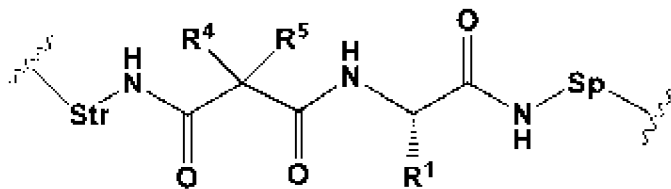
【0193】 在實施例中，L1 是由下式表示的非肽化學部分



R^1 為 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 烯基、 $(C_1$ - C_6 烷基) $NHC(NH)NH_2$ 或 $(C_1$ - C_6 烷基) $NHC(O)NH_2$ ；

R^3 和 R^2 各自獨立為 H 或 C_1 - C_{10} 烷基。

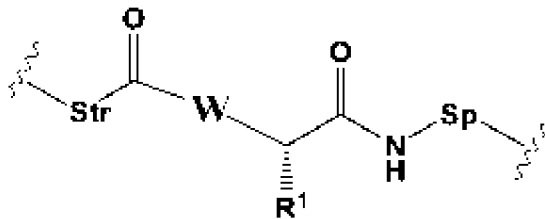
【0194】 在實施例中，L1 是由下式表示的非肽化學部分



R^1 為 C_1 - C_6 烷基、 $(C_1$ - C_6 烷基) $NHC(NH)NH_2$ 或 $(C_1$ - C_6 烷基) $NHC(O)NH_2$ ；

R^4 與 R^5 一起形成 C_3 - C_7 環烷基環。

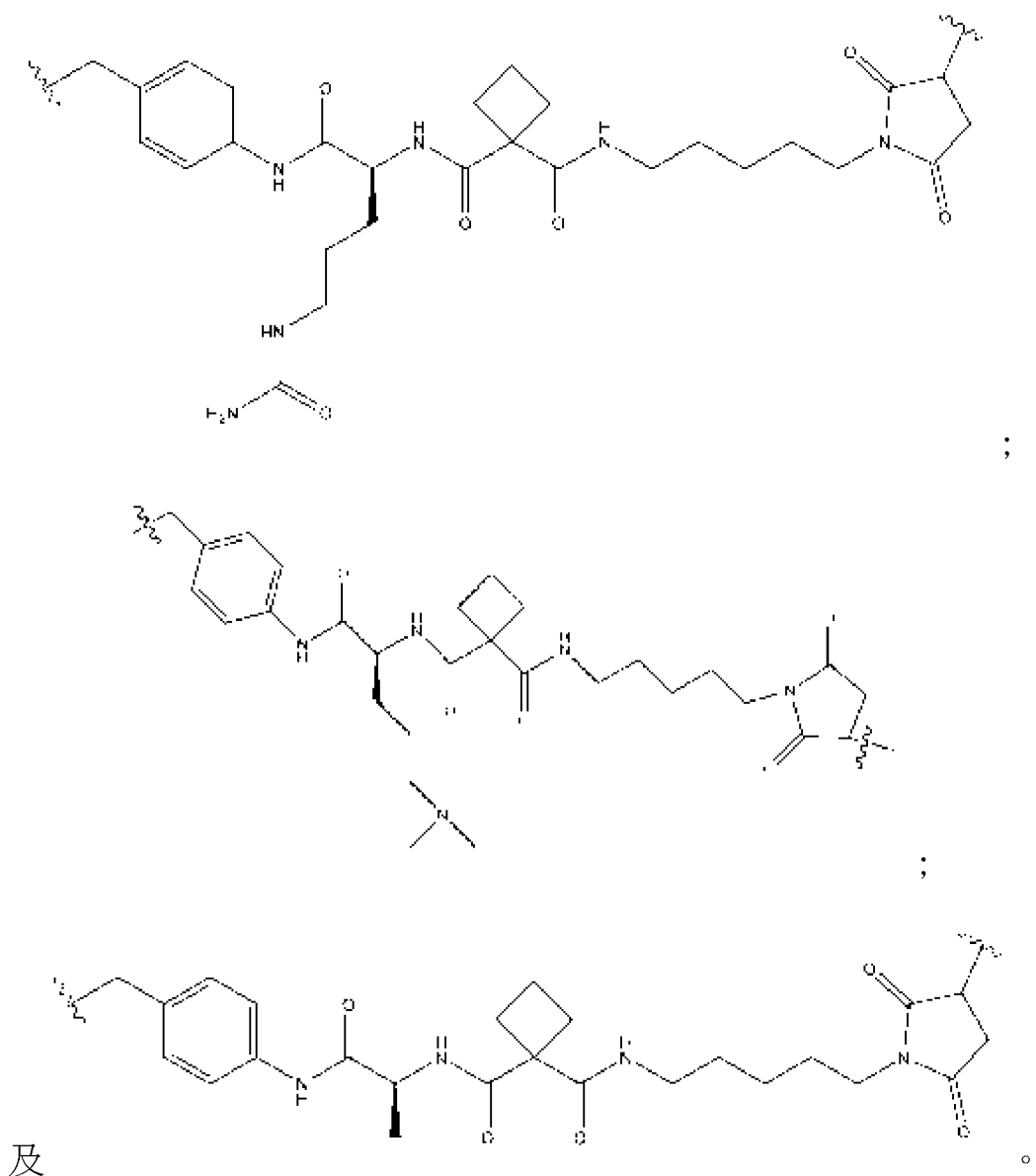
【0195】 在實施例中，L1 是由下式表示的非肽化學部分



R^1 為 C_1 - C_6 烷基、 $(C_1$ - C_6 烷基) $NHC(NH)NH_2$ 或 $(C_1$ - C_6 烷基) $NHC(O)NH_2$ ，且 W 如上所述。

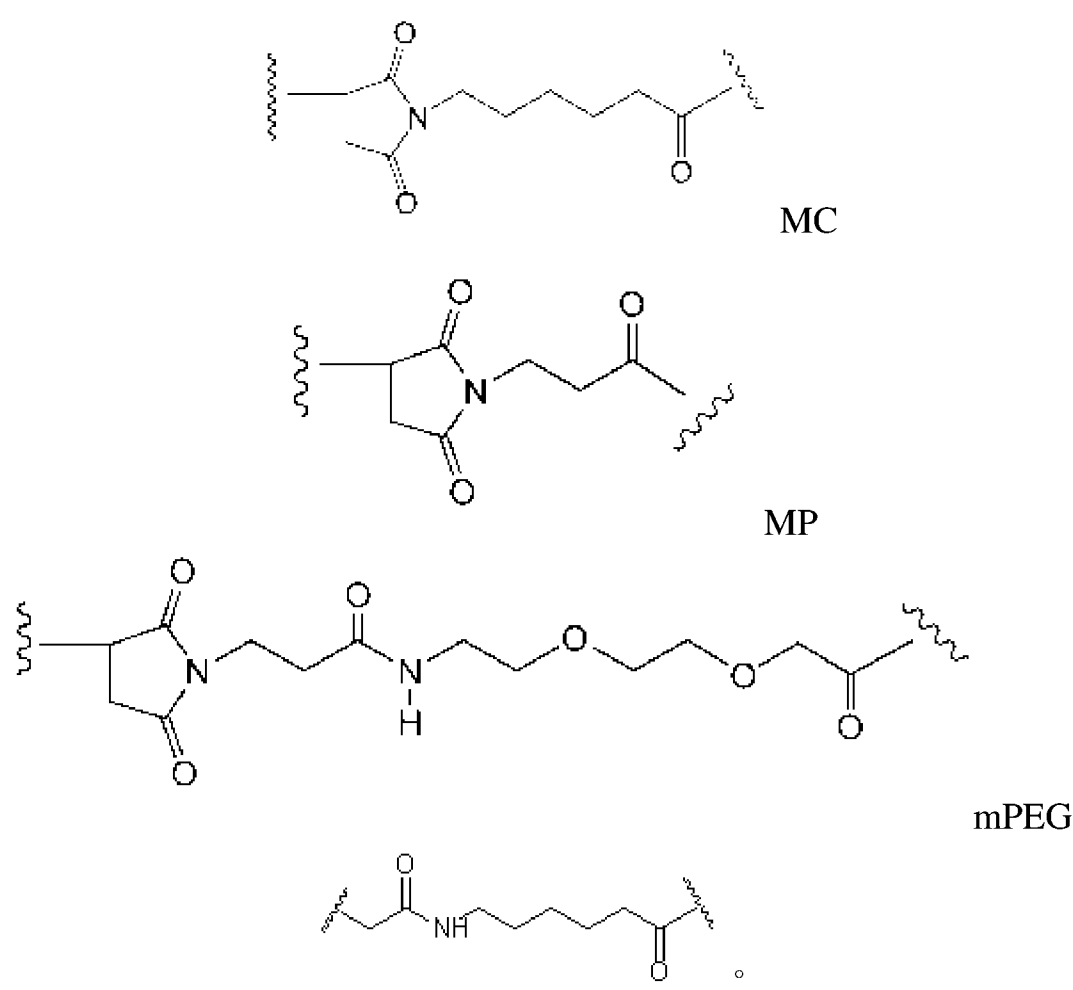
【0196】 在一些實施例中，連接子可為擬肽物連接子，例如 WO2015/095227、WO2015/095124 或 WO2015/095223 中所述的那些，其各自全文以引用方式併入本文。

【0197】 在某些實施例中，連接子選自由以下所組成之群組：

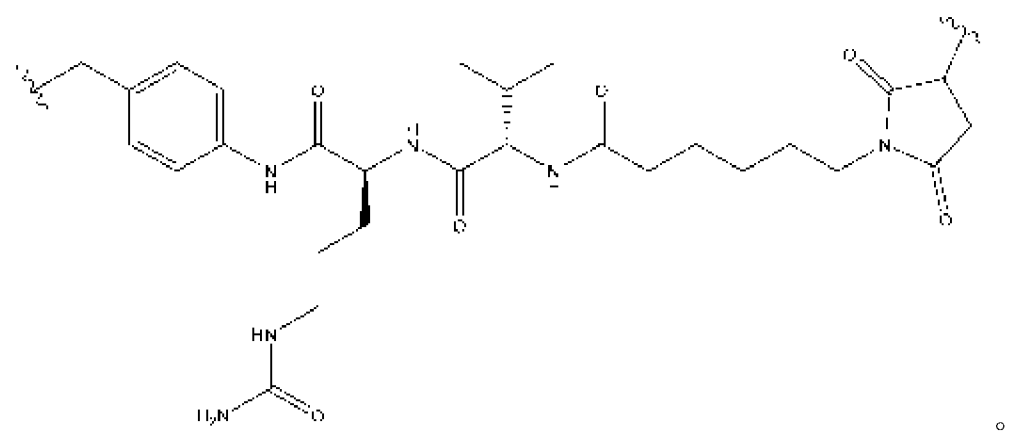


b. 非擬肽物連接子

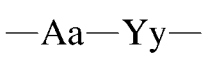
【0198】 在一個態樣中，連接子 L1 可共價結合至抗體及 CIDE，如下所示：



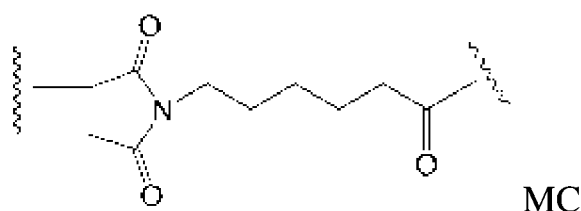
【0206】 在某些實施例中，連接子為：



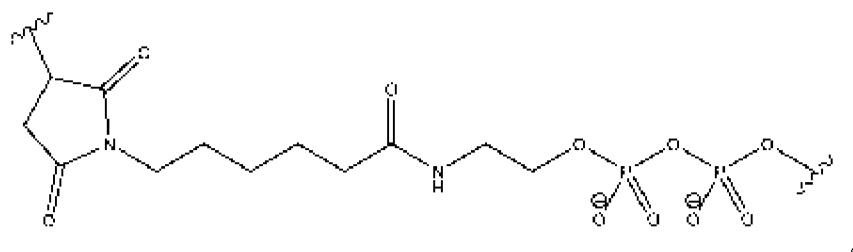
【0207】 在某些實施例中，連接子具有下式：



其中 A 及 Y 如上文所定義。在某些實施例中，間隔基單元 Y 可為磷酸鹽，例如單磷酸鹽或雙磷酸鹽。在某些實施例中，延伸基組分 A 包含：



在某些實施例中，連接子為：



3. CIDE (「D」)

【0208】 可用的 CIDE 具有上述通式。

【0209】 可用的 Ab-L1-CIDE 及未結合之降解劑呈現出所需特性，例如細胞靶向及蛋白質靶向和降解。在某些實施例中，Ab-L1-CIDE 呈現出 0.0001 之小於約 2.0、或小於約 1.0、或小於約 0.8、或小於約 0.7、或小於約 0.6、或小於約 0.5、或小於約 0.4、或小於約 0.3、或小於約 0.2 的 DC50 (μg/mL)。在某些實施例中，Ab-L1-CIDE 呈現出至少 70、75、80、85、90、95、96、97、98 或 99 的 DCmax。

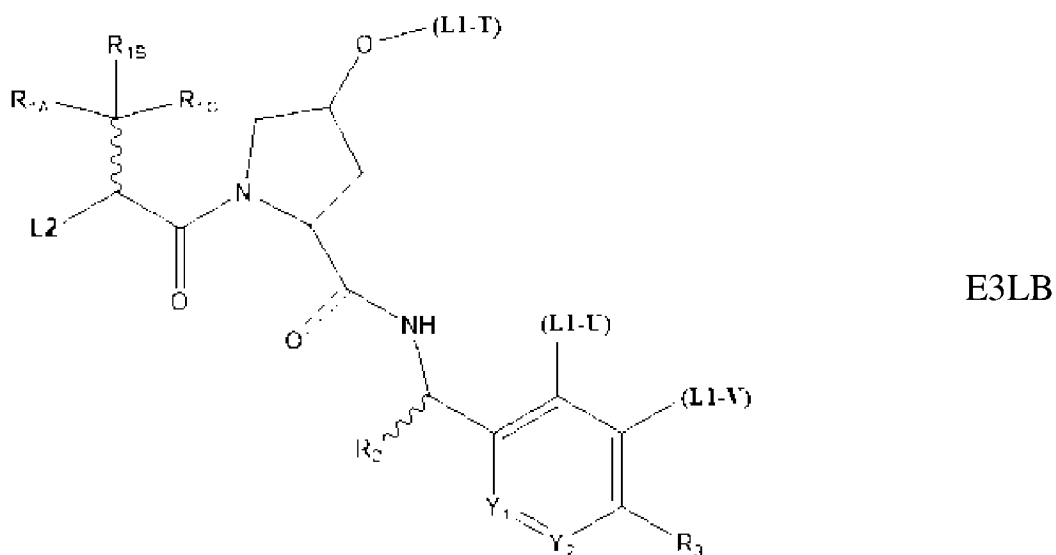
【0210】 CIDE 包括具有下列組分的那些。

a. E3 泛蛋白連接酶結合基團 (E3LB)

【0211】 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。

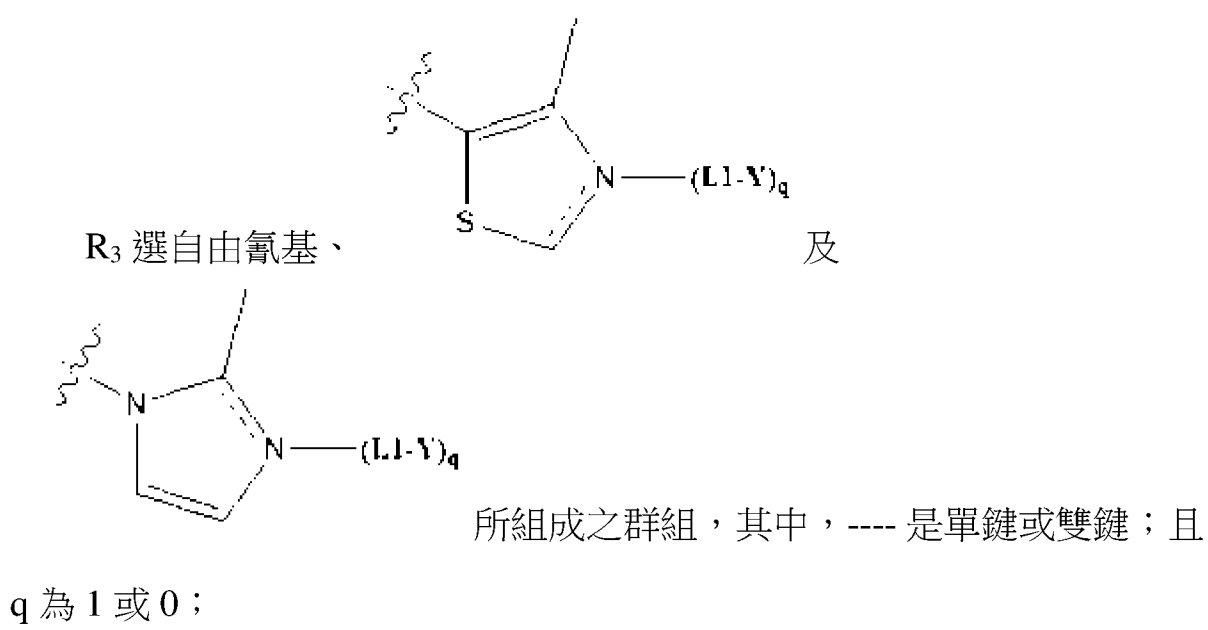
【0212】一種特定之 E3 泛蛋白連接酶為 von Hippel-Lindau (VHL) 腫瘤抑制因子，其為 E3 連接酶複合體 VCB 的受質識別次單元，亦由延伸蛋白 (elongin) B 和 C、Cul2 及 Rbx1 組成。VHL 之主要受質為缺氧誘導因子 1α (HIF- 1α)，這是一種轉錄因子，可響應於低氧水平而上調促血管生成生長因子 VEGF 及紅血球誘導細胞因子紅血球生成素等基因。

【0213】在一個態樣中，本文之主題涉及 CIDE 的 E3LB 部分，其具有下列化學結構：



其中， R_{1A} 、 R_{1B} 和 R_{1C} 各自獨立地為氫或 C_{1-5} 烷基；或者 R_{1A} 、 R_{1B} 和 R_{1C} 中的兩個與其各自所接附之碳一起形成 C_{1-5} 環烷基；

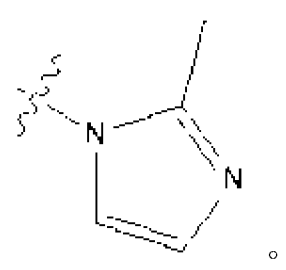
R_2 為 C_{1-5} 烷基；



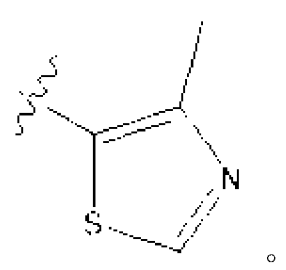
Y_1 及 Y_2 中之一者為 -CH， Y_1 及 Y_2 中之另一者為 -CH 或 N；
其中，L1-T、L1-U、L1-V 及 L1-Y 各自獨立地如本文其他地方所述；
且 L2 如本文其他地方所述。

【0214】 在某些實施例中，E3LB 具有這樣的結構，其中 R_3 為氰基。

【0215】 在某些實施例中，E3LB 具有這樣的結構，其中 R_3 為



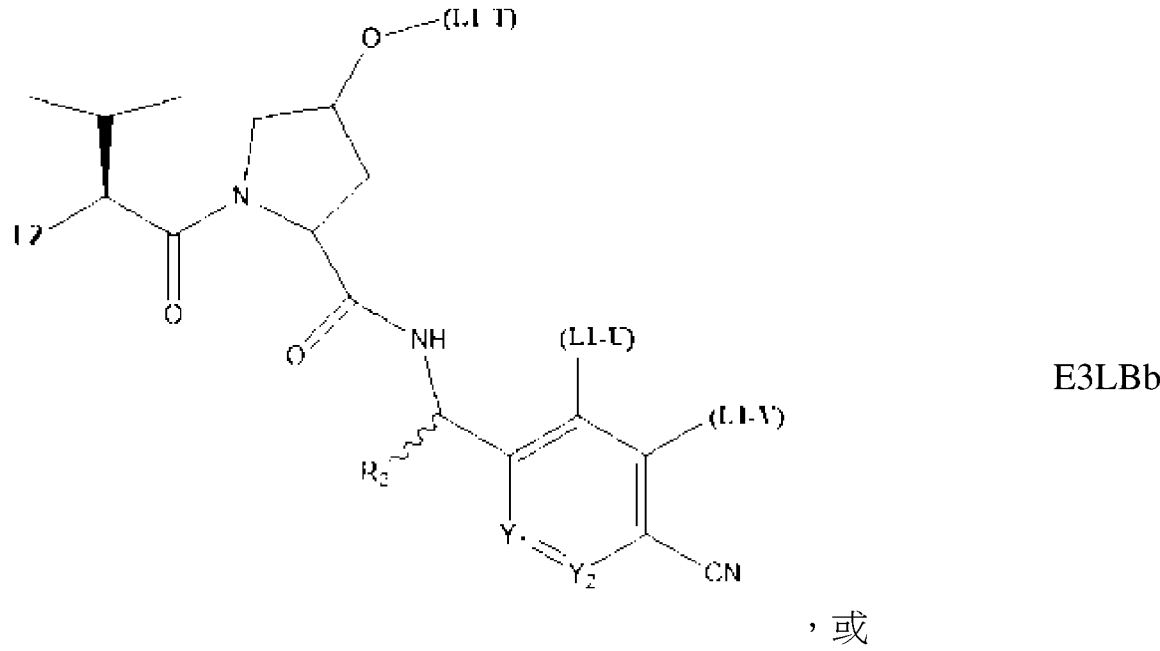
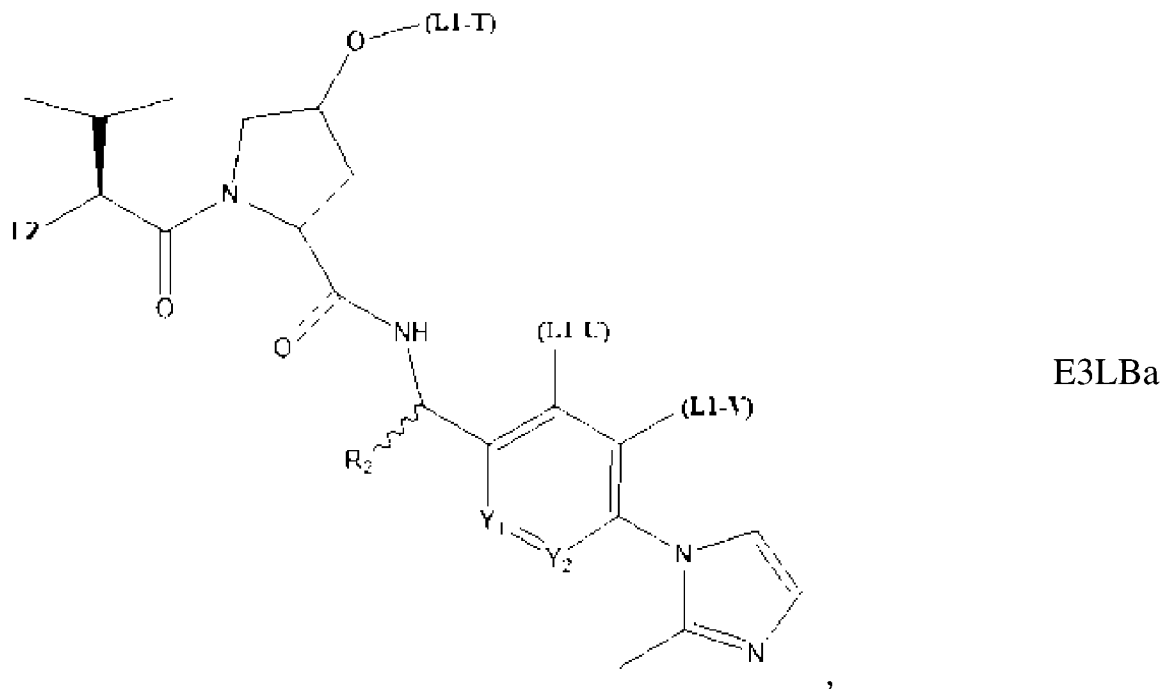
【0216】 在某些實施例中，E3LB 具有這樣的結構，其中 R_3 為



【0217】 在某些實施例中，E3LB 具有這樣的結構，其中 R_{1A} 、 R_{1B} 和 R_{1C} 各自獨立地為氫或甲基。

【0218】 在某些實施例中，E3LB 具有這樣的結構，其中 R_{1A} 和 R_{1B} 各自為甲基。

【0219】 在某些實施例中，E3LB 具有下式之一：





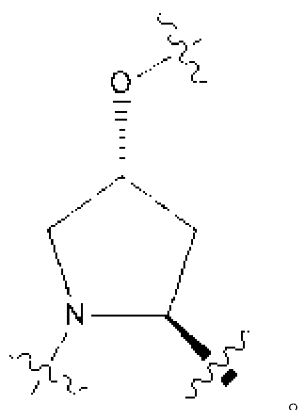
【0221】在某些實施例中，E3LB 具有這樣的結構，其中 R₂ 為甲基。

$$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \equiv \\ \text{---} \end{array}$$

【0224】在某些實施例中，E3LB 具有這樣的結構，其中 Y₁ 為 N 且 Y₂ 為 -CH。

【0225】 在某些實施例中，E3LB 具有這樣的結構，其中 Y₁ 為 -CH 且 Y₂ 為 N。

【0226】 在某些實施例中，E3LB 之脯胺酸部分具有下列結構：



【0227】 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。

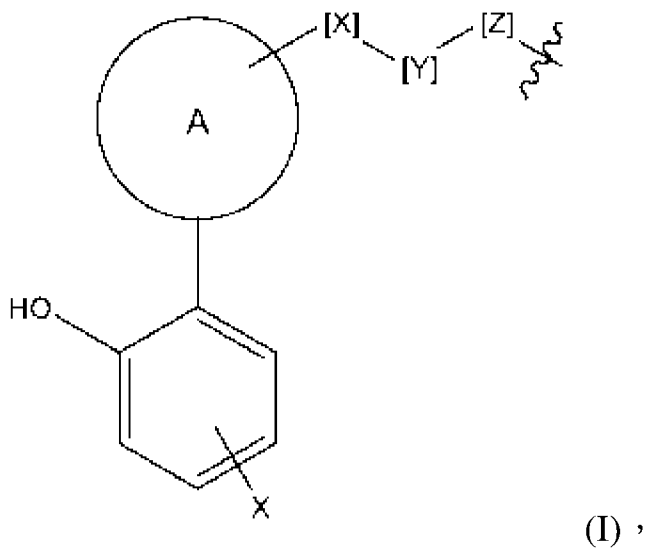
【0228】 在本文所述之任何態樣或實施例中，如本文所述之 E3LB 可為其醫藥上可接受之鹽、鏡像異構物、非鏡像異構物、溶劑化物或同質異晶物。此外，在本文所述之任何態樣或實施例中，如本文所述之 E3LB 可經由鍵或藉由化學連接子直接偶合至 PB。

b. BRM 蛋白質結合基團 (PB)

【0229】 CIDE 之 PB 部分是與 BRM 結合的小分子部分，包括 BRM 的所有變異體、突變、剪接變異體、插入/缺失和融合物。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。

【0230】 本文所述之 CIDE 或 DAC 可包含已知的 BRM 結合化合物之任何殘基，這些結合化合物包括 WO2019/195201 中所揭露之那些，該專利全文以引用方式併入本文。

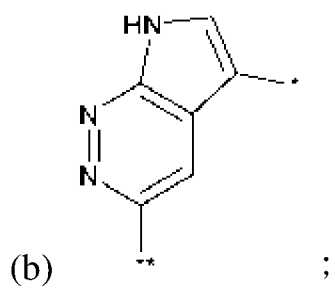
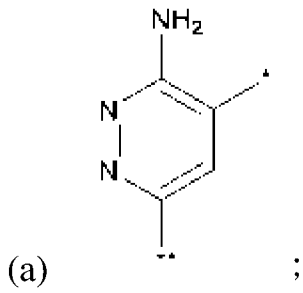
【0231】 在某些實施例中，BRM 結合化合物為式 I 化合物：



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：

其中 X 為氫或鹵素；

 選自由以下所組成之群組：

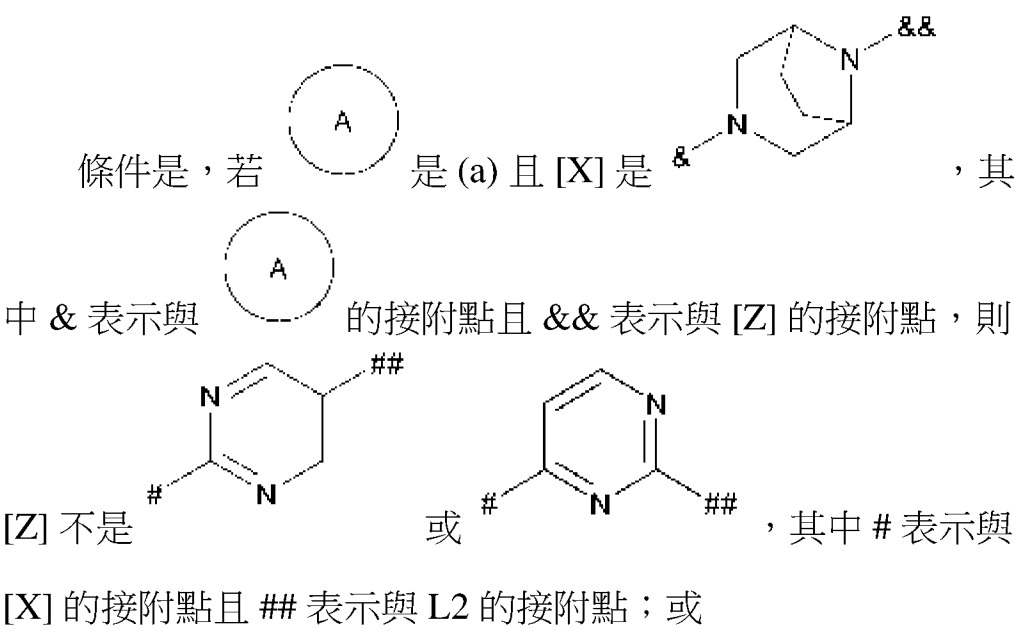


[Z] 不存在；或

(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，

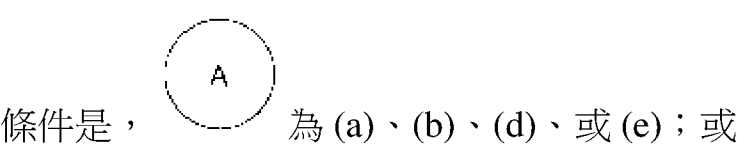
[Y] 為亞甲基，其中 [Y] 的亞甲基視情況經一個或多個甲基基團取代，且

[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代取代，且

[Z] 為 5 至 20 員雜芳基，



(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，

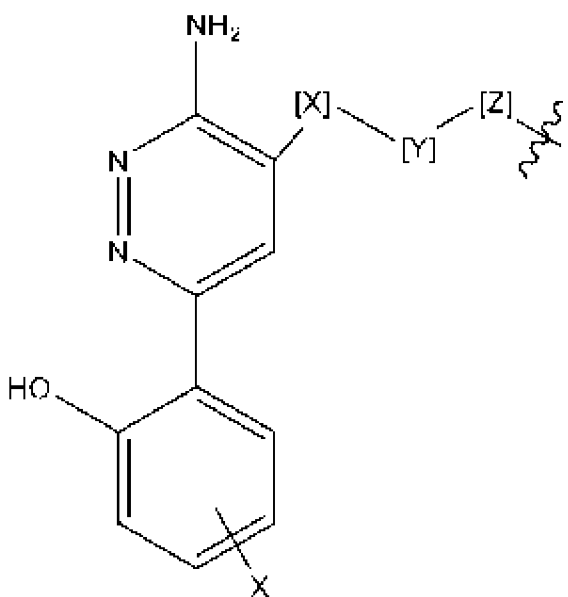
[Y] 為環丙基或環丁基，且

[Z] 為 5 至 20 員雜芳基，



條件是，為 (a)、(b)、(d)、或 (e)。

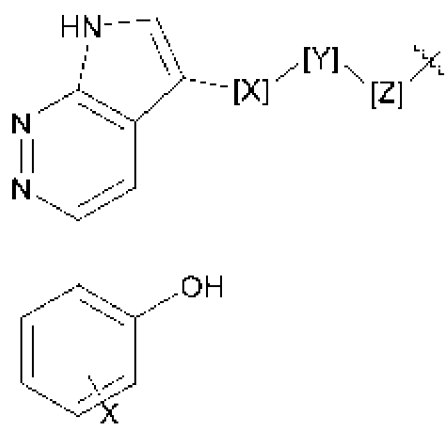
【0232】 在某些實施例中，BRM 結合化合物為式 (I-A) 化合物：



(I-A)，

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 為氫或鹵素，且其中 [X]、[Y] 及 [Z] 如上文針對式 (I) 化合物所定義。

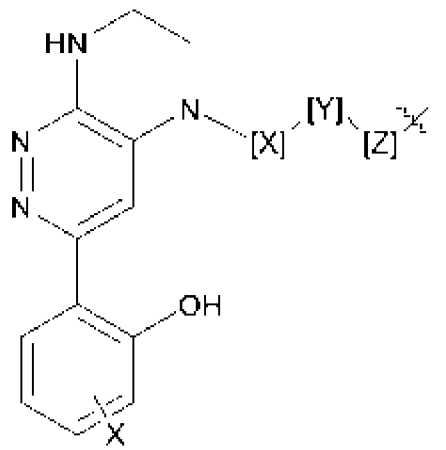
【0233】 在某些實施例中，BRM 結合化合物為式 (I-B) 化合物：



(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 為氫或鹵素，且其中 [X]、[Y] 及 [Z] 如上文針對式 (I) 化合物所定義。

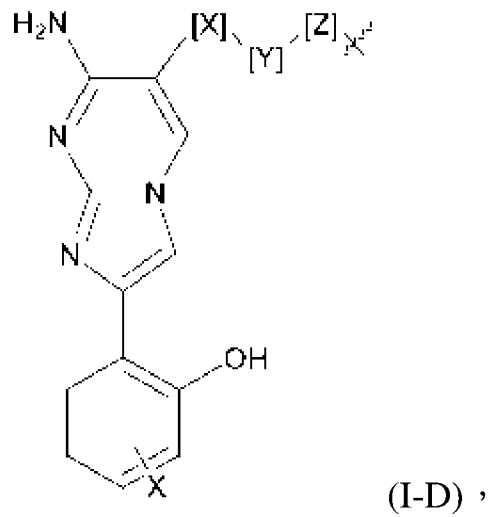
【0234】 在某些實施例中，BRM 結合化合物為式 (I-C) 化合物：



(I-C) ,

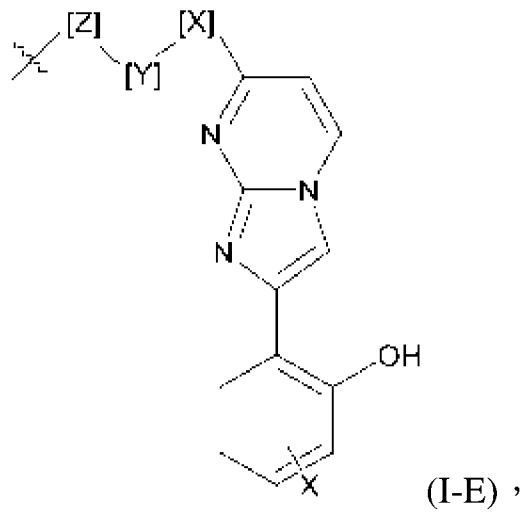
或其立體異構物或互變異構物，或前述任一者之醫藥上可接受之鹽，其中 X 為氫或鹵素，且其中 [X]、[Y] 及 [Z] 如上文針對式 (I) 化合物所定義。

【0235】 在某些實施例中，BRM 結合化合物為式 (I-D) 化合物：



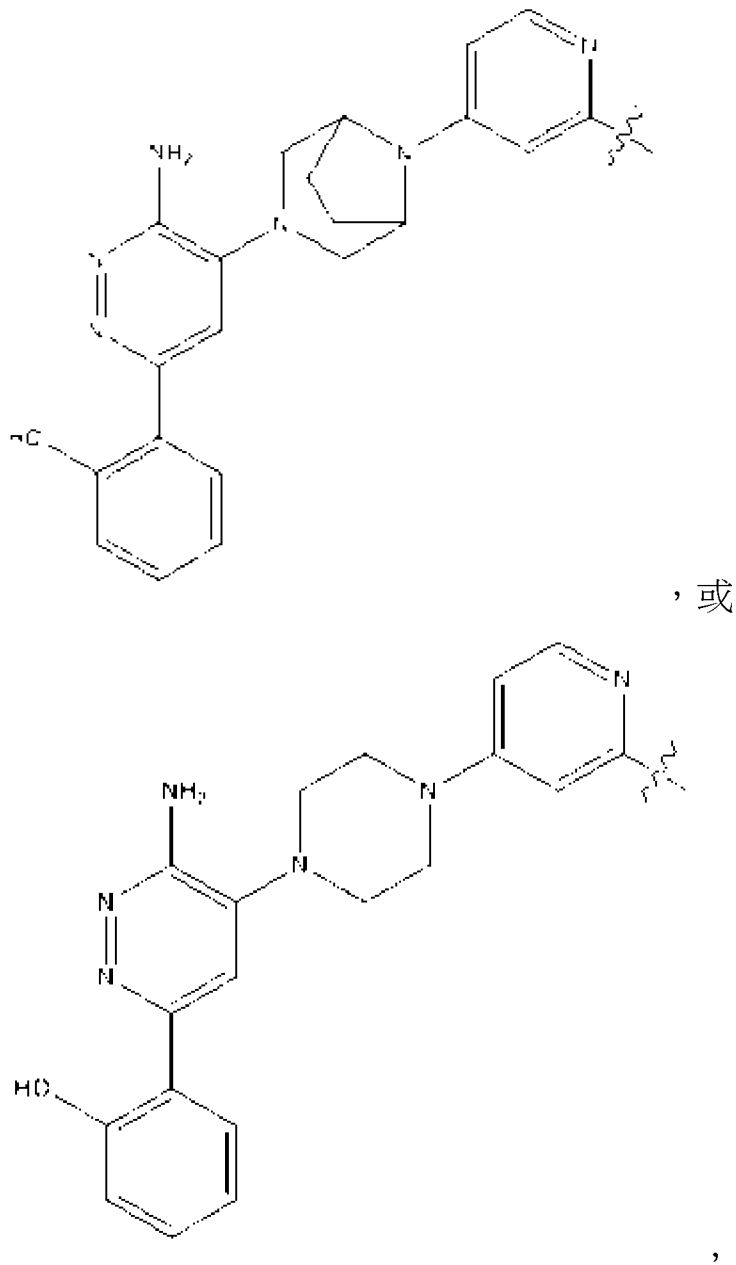
或其立體異構物或互變異構物，或前述任一者之醫藥上可接受之鹽，其中 X 為氫或鹵素，且其中 [X]、[Y] 及 [Z] 如上文針對式 (I) 化合物所定義。

【0236】 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 為氫或鹵素，且其中 [X]、[Y] 及 [Z] 如上文針對式 (I) 化合物所定義。

【0237】 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。

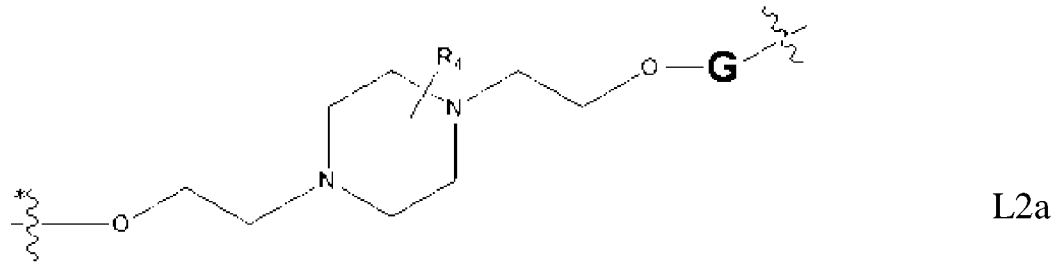
c. 連接子 L2

【0238】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。

【0239】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。

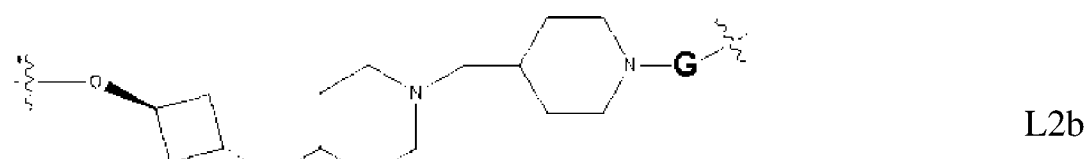
【0240】 儘管 E3LB 基團及 PB 基團可通過任何對連接子的化學性質合適且穩定的基團與連接子基團共價連接，但在某些態樣中，L2 獨立地通過醯胺、酯、硫酯、酮基、胺甲酸酯（胺甲酸乙酯）或醚共價連接至 E3LB 基團和 PB 基團，其中每個基團皆可插入 E3LB 基團及 PB 基團的任何位置，以允許 E3LB 基團與泛蛋白連接酶結合且 PB 基團與待降解之 BRM 標靶蛋白結合。換言之，如本文所示，連接子可設計並連接至 E3LB 和 PB 以調控 E3LB 及 PB 與其相應之結合配偶體的結合。

【0241】 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：

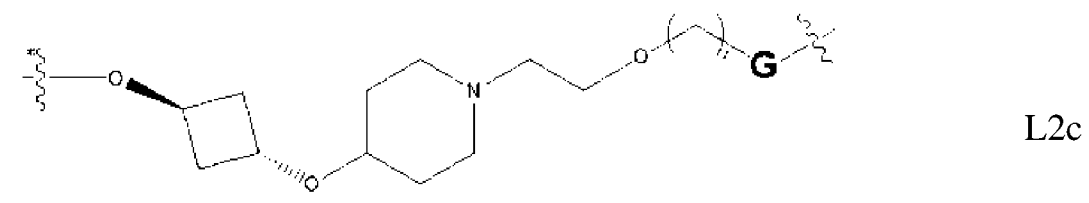


其中，

R₄ 為氫或甲基，

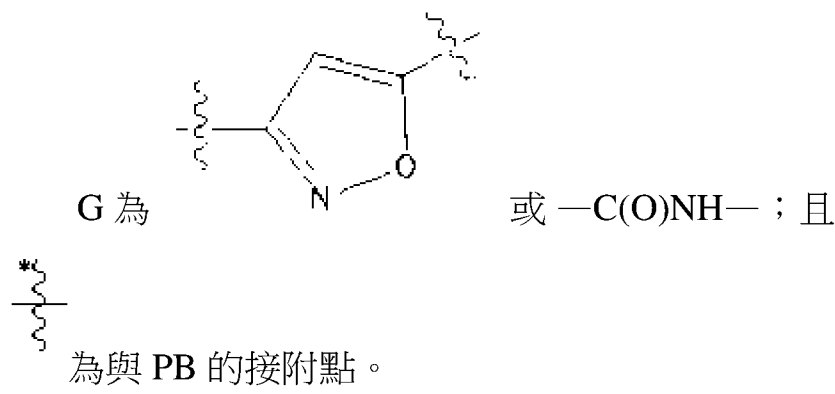


，或



其中，

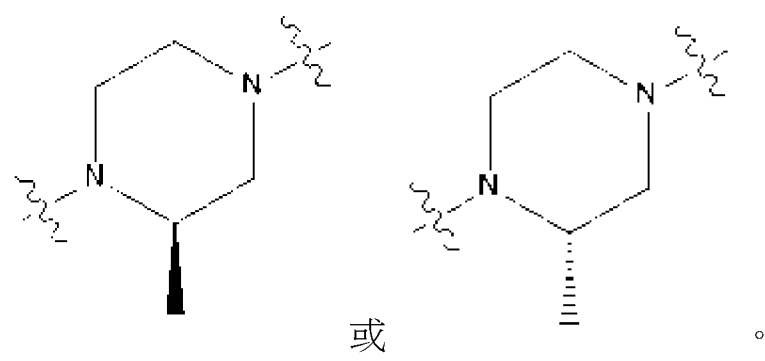
z 為一或零，



【0242】 在 L2a 的某些實施例中， R_4 為氫。

【0243】 在 L2a 的某些實施例中， R_4 為甲基。

【0244】 在 L2a 之某些實施例中， R_4 為甲基，使得甲基相對於其所接附的哌啶取向如下：



【0245】 在 L2c 的某些實施例中， z 為 0。

【0246】 在 L2c 的某些實施例中， z 為 1。

【0247】 現在參照 Ab-CIDE，Ab-CIDE 可包含單個抗體，其中單個抗體可具有多個 CIDE，每個 CIDE 通过連接子 L1 共價連接至抗體。「CIDE 載量」為每個抗體中 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。即，在 Ab-CIDE 式 Ab—(L1—D)_p 中， p 具有約 1 至約 20、約 1 至約 8、約 1 至約 5、約 1 至約 4 或約 1 至約 3 的值。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，且 p 為約 2。

【0248】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。亦可以 p 確定 Ab-CIDE 之定量分佈。藉由 ELISA，可確定 Ab-CIDE 之特定製劑中 p 的平均值（Hamblett 等人 (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070；Sanderson 等人 (2005) Clin. Cancer Res. 11:843-852）。但是， p 值之分佈無法藉由 ELISA 之抗體-抗原結合和檢測限制來辨別。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 p 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。

【0249】對於一些 Ab-CIDE， p 可能受到抗體上連接位點數量的限制。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。 p 值包括約 1 至約 20、約 1 至約 8、約 1 至約 5、約 1 至約 4、約 1 至約 3 的值及其中 p 等於 2 的情況。在一些實施例中，本文所述之主題涉及任何 Ab-CIDE，其中 p 為約 1、2、3、4、5、6、7 或 8。

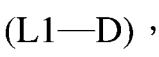
【0250】一般而言，在結合反應過程中，少於理論最大值的 CIDE 部分與抗體結合例如，抗體可包含許多與連接子 L1-CIDE 基團 (L1-D) 或連接子試劑不反應的離胺酸殘基。僅反應性最強的離胺酸基團才可與胺反應性連接子試劑

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。但是，CAR 的 CIDE 載量

（CIDE/抗體比率，「CAR」）可通過幾種不同的方式進行控制，其中包括：
(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。

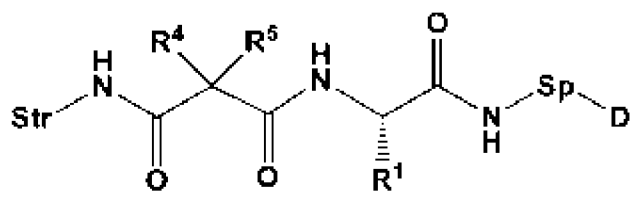
III. L1-CIDE 化合物

【0251】 本文所述之 CIDE 可與連接子 L1 共價連接以製備 L1-CIDE 基團。這些化合物具有下列通式：



其中，D 為 CIDE 具有結構 E3LB—L2—PB；其中，E3LB 為共價結合至 L2 的 E3 連接酶結合基團；L2 為共價結合至 E3LB 及 PB 的連接子；PB 為共價結合至 L2 的 BRM 蛋白質結合基團；且 L1 為共價結合至 D 的連接子。這些組分中每一者的有用的基團如上所述。

【0252】 在特定實施例中，L1 如本文其他地方所述，包括擬肽物連接子。在這些實施例中，L1-CIDE 具有下式：



其中
Str 為延伸基單元；

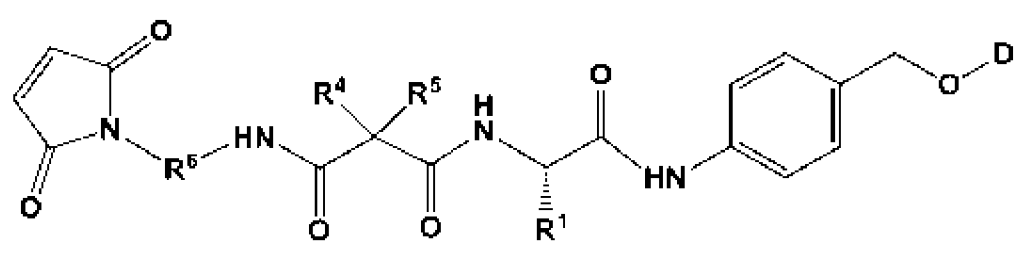
Sp 為鍵或共價接附於 D（即 CIDE 部分）的間隔基單元；

R¹ 為 C₁-C₁₀ 烷基, (C₁-C₁₀ 烷基)NHC(NH)NH₂ 或 (C₁-C₁₀ 烷基)NHC(O)NH₂；

R⁴ 和 R⁵ 各自獨立為 C₁-C₁₀ 烷基、芳基烷基、雜芳基烷基、(C₁-C₁₀ 烷基)OCH₂-，或者 R⁴ 和 R⁵ 可形成 C₃-C₇ 環烷基環；

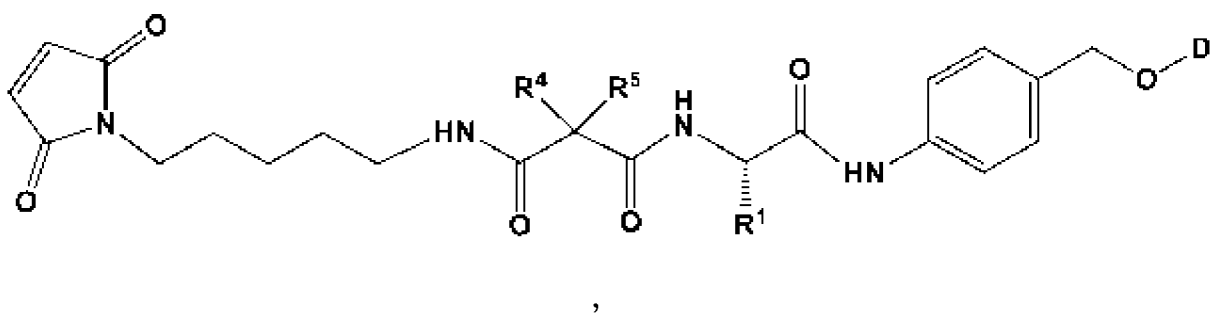
D 為 CIDE 部分。

【0253】 一種 L1-CIDE 化合物可由下式表示：



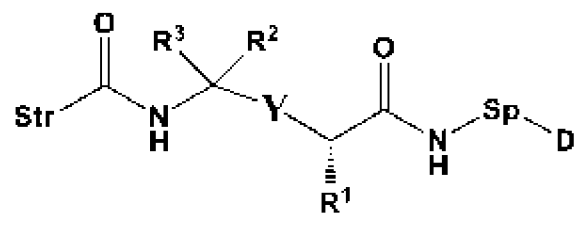
其中 R₆ 為 C₁-C₁₀ 伸烷基；R⁴ 與 R⁵ 一起形成 C₃-C₇ 環烷基環，且 D 為 CIDE 部分。

【0254】 一種 L1-CIDE 化合物可由下式表示：



其中 R¹、R⁴ 和 R⁵ 如本文其他地方所述，且 D 為 CIDE 部分。

【0255】 一種 L1-CIDE 化合物可由下式表示：



其中

Str 為延伸基單元；

Sp 為視情況存在之共價接附於 D（即 CIDE 部分）的間隔基單元；

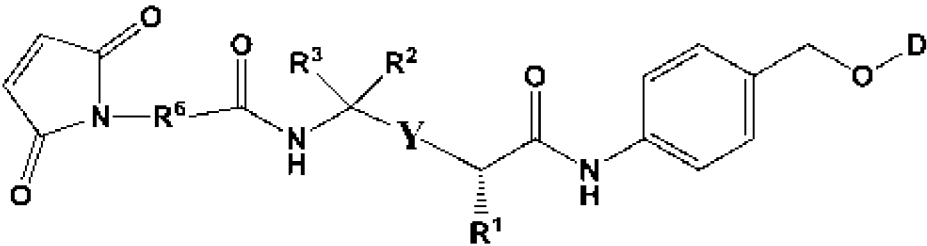
Y 為雜芳基、芳基、-C(O)C₁-C₆伸烷基、C₁-C₆伸烷基-NH₂、C₁-C₆伸烷基-NH-CH₃、C₁-C₆伸烷基-N-(CH₃)₂、C₁-C₆烯基或 C₁-C₆伸烷基基團；

R¹ 為 C₁-C₁₀烷基, (C₁-C₁₀烷基)NHC(NH)NH₂ 或 (C₁-C₁₀烷基)NHC(O)NH₂；

R³ 和 R² 各自獨立為 H、C₁-C₁₀烷基、芳基烷基或雜芳基烷基，或者 R³ 和 R² 可一起形成 C₃-C₇環烷基；且

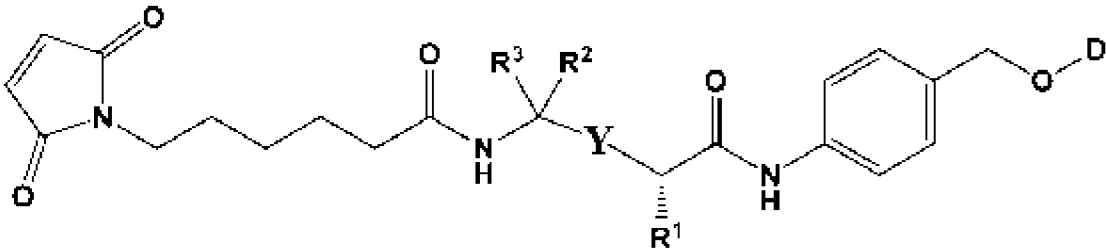
D 為 CIDE 部分。

【0256】一種 L1-CIDE 化合物可由下式表示：



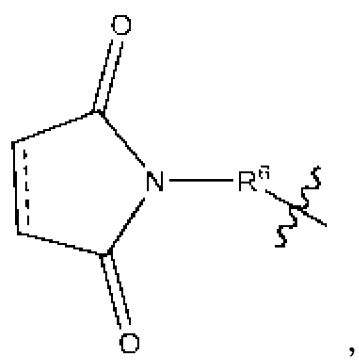
其中，R⁶ 為 C₁-C₁₀伸烷基，且 R¹、R² 和 R³ 如本文其他地方所述，且 D 為 CIDE 部分。

【0257】一種 L1-CIDE 化合物可由下式表示：



其中 R¹、R² 和 R³ 如本文其他地方所述，且 D 為 CIDE 部分。

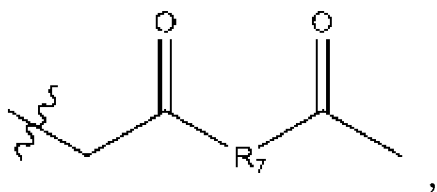
【0258】在上述 L1-CIDE 化合物中任一者中，Str 可具有下式：



其中 R^6 選自由以下所組成之群組： C_1 - C_{10} 伸烷基、 C_3 - C_8 環烷基、 O -(C_1 - C_8 伸烷基) 及 C_1 - C_{10} 伸烷基- $C(O)N(R^a)$ - C_2 - C_6 伸烷基，其中每個伸烷基可經選自由以下所組成之群組的一至五個取代基取代：鹵代、三氟甲基、二氟甲基、胺基、烷基胺基、氰基、磺醯基、磺醯胺、亞磺、羥基、烷氧基、酯、羧酸、烷硫基、 C_3 - C_8 環烷基、 C_4 - C_7 雜環烷基芳基、芳基烷基、雜芳基烷基及雜芳基；每個 R^a 獨立地為 H 或 C_1 - C_6 烷基； Sp 為 $-Ar-$ R^b- ，其中 Ar 為芳基或雜芳基， R^b 為 (C_1 - C_{10} 伸烷基) $O-$ 。

【0259】 在某些 L1-CIDE 化合物中， R^6 為 C_1 - C_{10} 伸烷基， Sp 為 $-Ar-$ R^b- ，其中 Ar 為芳基， R^b 為 (C_1 - C_6 伸烷基) $O-$ ；或 R_6 為 $-(CH_2)_q$ ，其中 q 為 1-10；

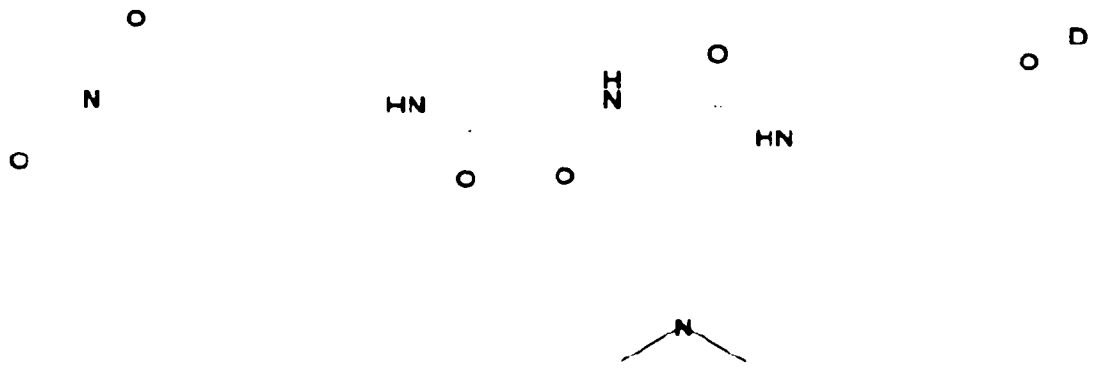
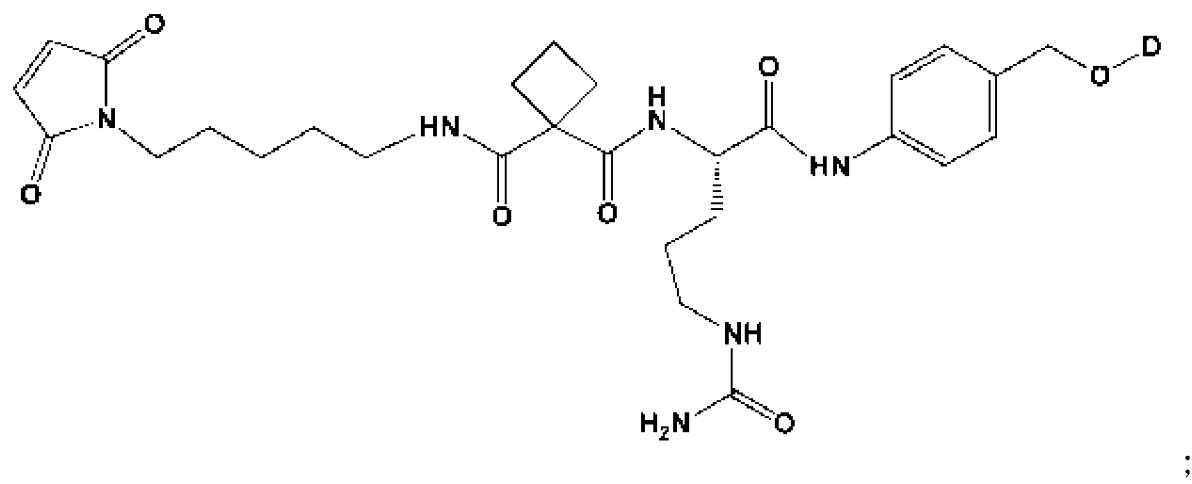
在上述 L1-CIDE 化合物中任一者中， Str 可具有下式：



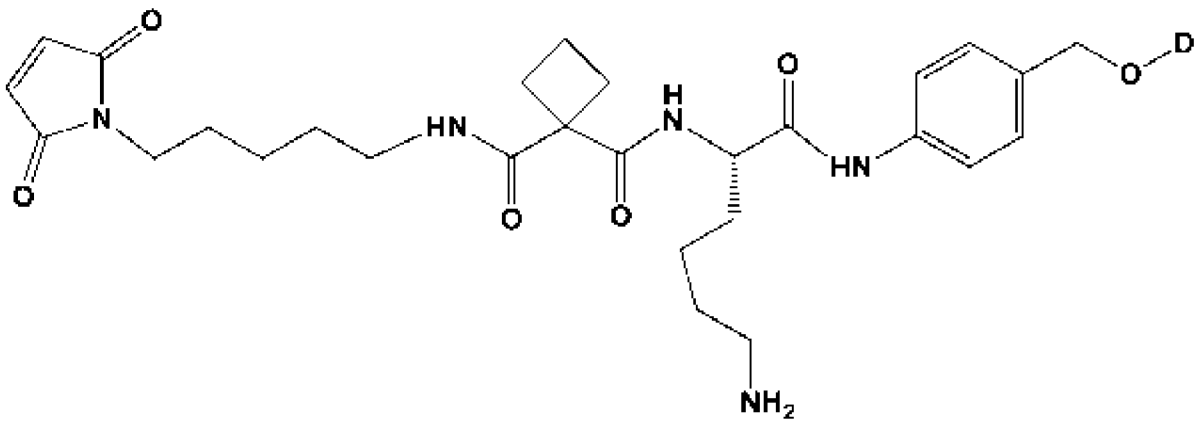
其中， 表示能夠與抗體結合的部分， R^7 選自 C_1 - C_{10} 伸烷基、 C_1 - C_{10} 伸烷基- O 、 $N(R^c)$ -(C_2 - C_6 伸烷基)- $N(R^c)$ 及 $N(R^c)$ -(C_2 - C_6 伸烷基)；其中每個 R^c 獨立地為 H 或 C_1 - C_6 烷基；

Sp 為 —Ar—R^b—，其中 Ar 為芳基或雜芳基，R^b 為 (C₁-C₁₀ 伸烷基)O-；或其中 R⁶ 為 C₁-C₁₀ 伸烷基，Sp 為 —Ar—R^b—，其中 Ar 為芳基，R^b 為 (C₁-C₆ 伸烷基)O-。

【0260】 L1-CIDE 可具有下式，其中在各個實例中，D 為 CIDE 部分：

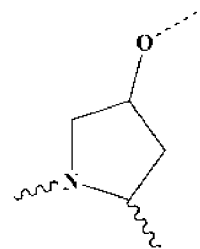
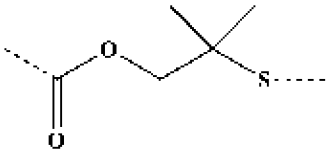
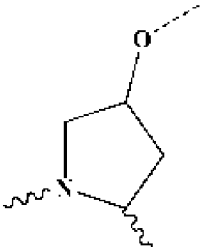
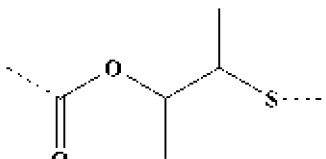


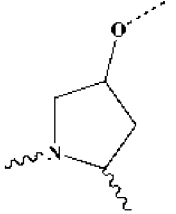
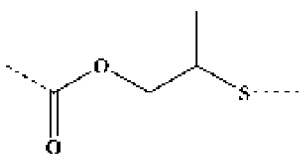
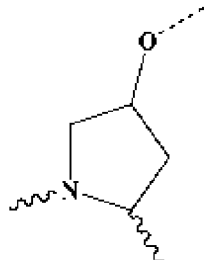
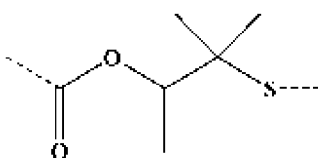
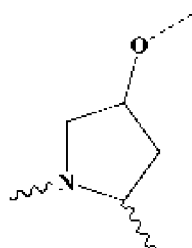
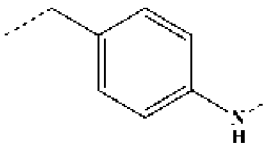
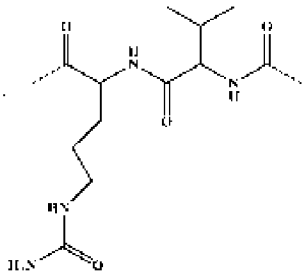
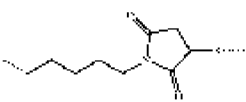
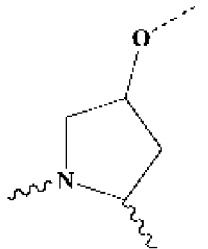
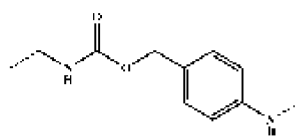
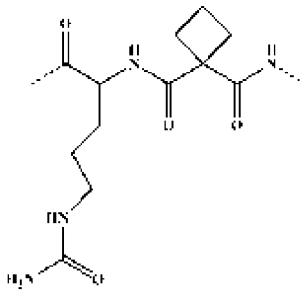
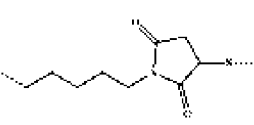
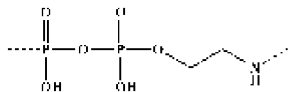
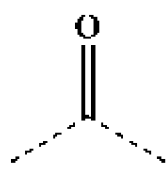
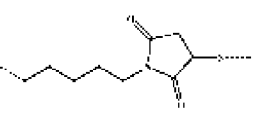
及

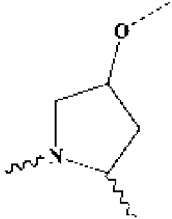
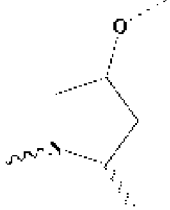
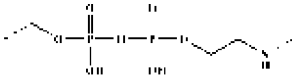
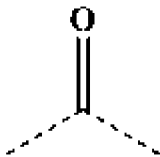
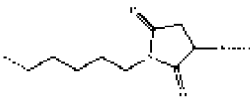
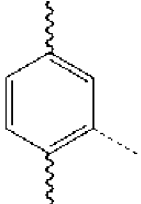
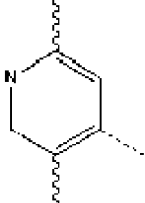
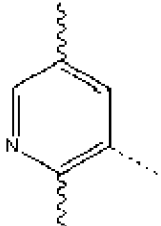
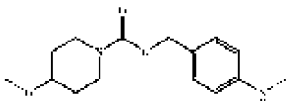
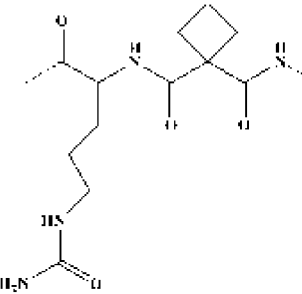
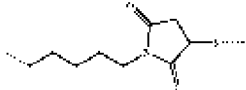


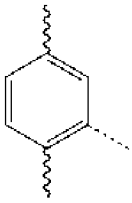
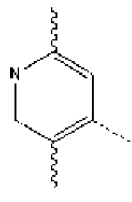
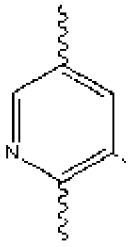
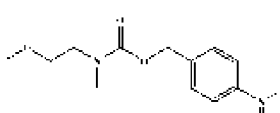
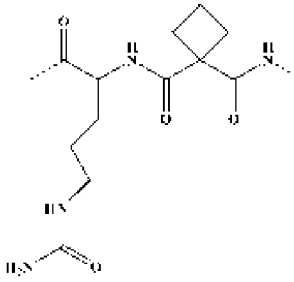
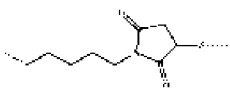
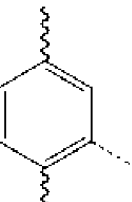
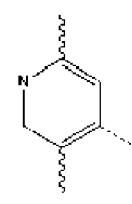
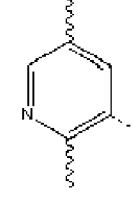
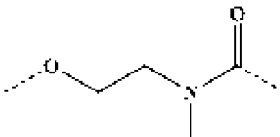
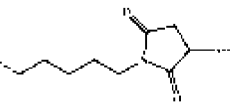
現在參照 CIDE 之 PB 基團，在特定實施例中，PB 如本文其他地方所述。現在參照 CIDE 之 E3LB 基團，E3LB 如本文其他地方所述。Ab-CIDE 可包括 PB、E3LB、Ab、L1 與 L2 之任意組合。

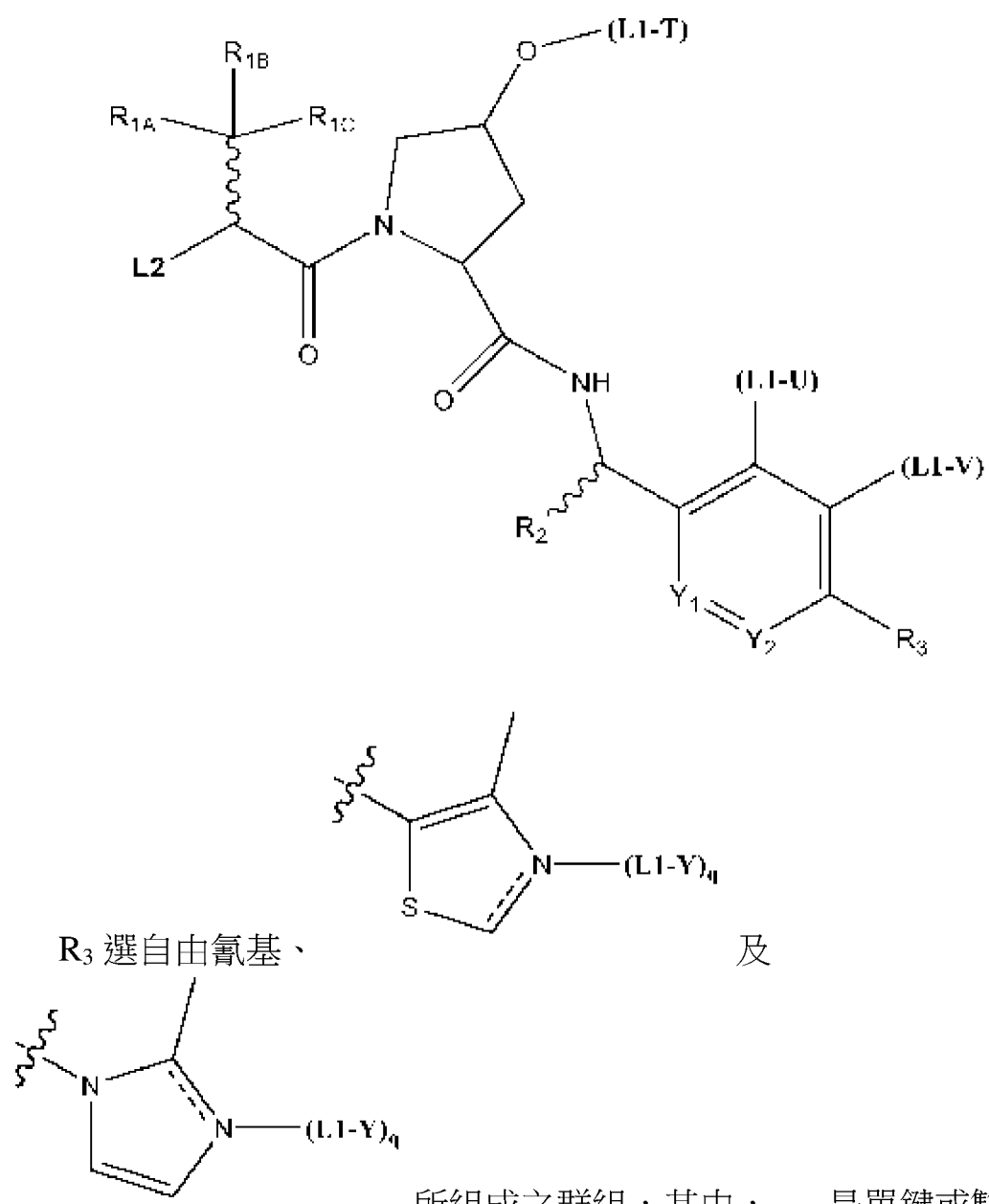
【0261】鑑於本文所揭露之主題，本領域技術人員將理解 L1 和 L2 接附點可以變化。此外，連接子的部分，例如 —Str—(PM)—Sp— 可互換。另外，連接子 L1 的部分可互換。接附於 CIDE、抗體或可互換的其他連接子的 L1 連接子包括但不限於表 1-L1 中所示的那些。

L1 所接附之 CIDE 部分	L1 之 CIDE 接附部分	L1 之連接子部分	L1 之抗體接附部分
E3LB 殘基 	NA		NA
E3LB 殘基 	NA		NA

E3LB 殘基 	NA		NA
E3LB 殘基 	NA		NA
E3LB 殘基 			
E3LB 殘基 			
E3LB 殘基			

			
E3LB 殘基 			
E3LB 殘基  或  或 			

E3LB 殘基  或  或 			
E3LB 殘基  或  或 		NA	



R₃ 選自由氨基、
及
所組成之群組，其中，---- 是單鍵或雙鍵；
Ab 為共價結合至至少一個 L1 的抗體，該至少一個 L1 為連接子；
L1-T、L1-U 及 L1-V 各自獨立地為氫或共價結合至 Ab 及 D 的 L1 連接子；
L1-Y 為氫或共價結合至 Ab 及 D 的 L1 連接子；且
q 為 1 或 0。

【0263】 連接子-L1 可接附於抗體的任意位置，只要連接子 L1 與抗體之間的共價鍵為二硫鍵即可。

【0264】 在實施例中，抗體 Ab 結合至八種化學降解誘導物 (CIDE) D 之一，其各自經由連接子 L1 結合。

$$Ab-(L1-D)_p, \text{ 其中 } p \text{ 為 } 1 \text{ 至 } 8。$$

【0265】 D 包含 E3 連接酶結合 (E3LB) 配體，該配體經由連接子 L2 連接至標靶蛋白結合 (PB) 配體，如下所示：

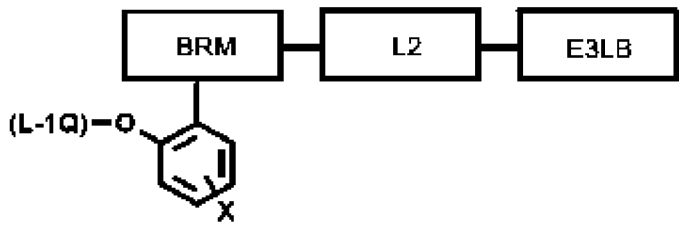


【0266】 在實施例中，L1 與抗體之經工程化改造之 Cys 殘基的硫形成二硫鍵，以將 CIDE 連接至 Ab。

【0267】 在實施例中，抗體經由 L1 連接至 CIDE 之 E3LB 配體。

【0268】 在實施例中，L1 連接至 CIDE 之 E3LB 配體的 E3LB 配體殘基。

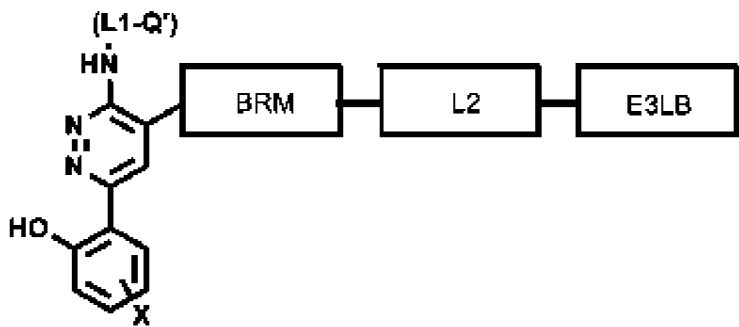
【0269】 例如，在實施例中，L1 於接附點 (L1-Q) 處共價結合至 BRM 的一部分，如下所示：



，其中 X 為氫或鹵素，且

L1 選自 L1b 及 L1c。

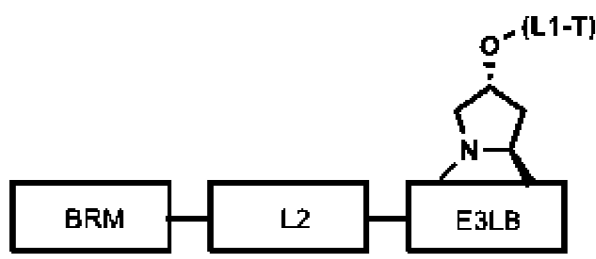
【0270】 在實施例中，L1 在如下所示之接附點 (L1-Q') 處共價結合至 BRM 的一部分：



，其中 X 為氫或鹵

素，且 L1 選自 L1b 及 L1c。

【0271】 在實施例中，L1 在如下所示之接附點 (L1-Q') 處共價結合至 E3LB 的一部分：



，其中 L1 選自 L1a、L1b 及

L1c。

【0272】 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化物。在結晶溶劑化物中，溶劑分子在結晶過程中摻入晶格中。溶劑化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。

【0273】 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 射線粉末衍射圖譜，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。

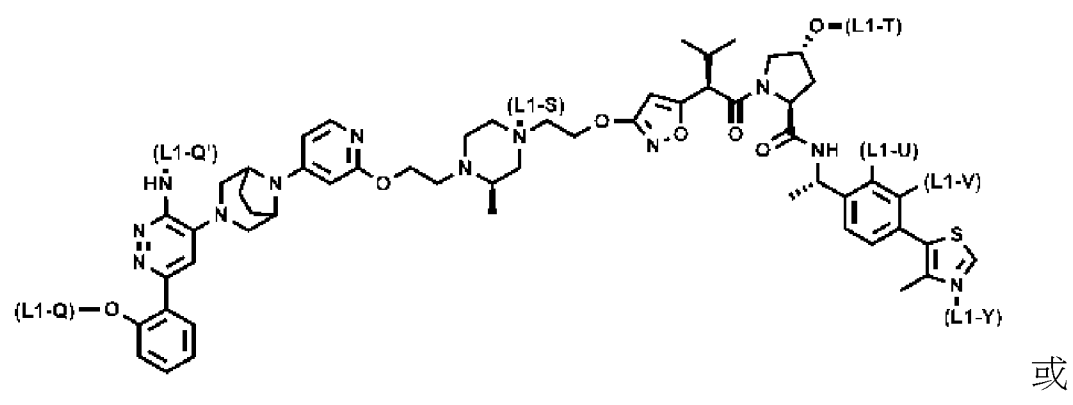
【0274】 本文所述之化合物及 Ab-CIDE 或其鹽可以立體異構形式存在（例如，其含有一個或多個不對稱碳原子）。各種立體異構物（鏡像異構物及非鏡像異構物）及其混合物涵蓋於本文所公開之主題之範圍內。同樣，應瞭解，式 (I) 化合物或鹽可以式中所示結構之外的互變異構形式存在，並且亦涵蓋於本文所揭露之主題之範圍內。應瞭解，本文所揭露之主題包括本文所述之特定組之所有組合和子集。本文所公開之主題之範圍包括立體異構物之混合物及純化鏡像異構物或對映/非對映富集之混合物。應瞭解，本文所揭露之主題包括上文所定義之特定組之所有組合和子集。

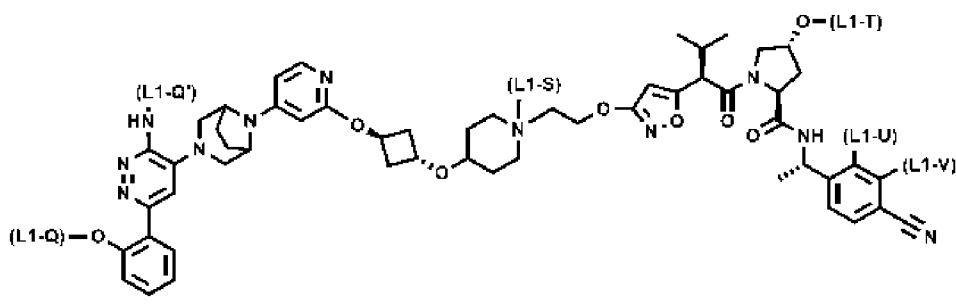
【0275】 本文所揭露之主題亦包括本文所述之化合物之同位素標記形式，但事實上，一個或多個原子由原子質量或質量數不同於自然界中通常所發現的原子質量或質量數的原子置換。可摻入本文所述之化合物及其醫藥上可接受之鹽的同位素的實例包括氫、碳、氮、氧、磷、硫、氟、碘、氯之同位素，

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 。

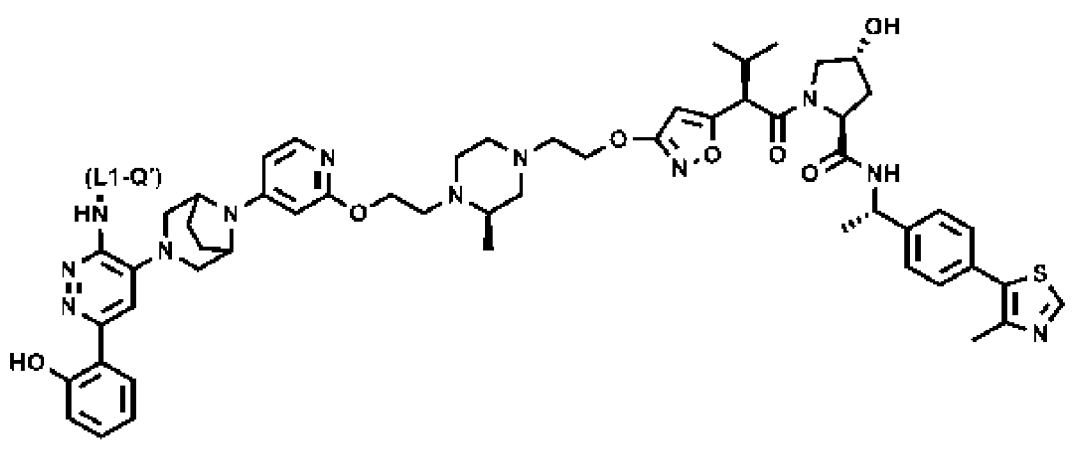
【0276】 含有上述同位素及/或其他原子的其他同位素的如本文所揭露之化合物和 Ab-CIDEs 及醫藥上可接受之鹽在本文所揭露之主題的範圍內。本文中揭露了同位素標記的化合物，例如其中摻入放射性同位素（例如 ^3H 、 ^{14}C ）的那些，可用於藥物及/或受質組織分佈測定。氚同位素（亦即 ^3H ）及碳-14 同位素（亦即 ^{14}C ）因其易於製備和可偵測性而得到普遍使用。 ^{11}C 及 ^{18}F 同位素用於 PET（正子發射斷層攝影術），且 ^{125}I 同位素用於 SPECT（單光子放射電斷層掃描），它們皆用於腦成像。此外，用諸如氘（亦即 ^2H ）之較重同位素取代可得到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。

【0277】 在實施例中，D 為

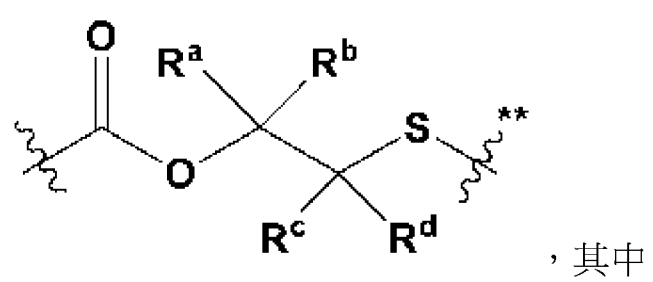




，其中 L1 在選自由以下所組成之群組的一個接附點處共價連接至 D：L1-Q、L1-Q'、L1-S、L1-T、L1-U、L1-V 及 L1-Y。應理解，L1-Q、L1-Q'、L1-S、L1-T、L1-U、L1-V 及 L1-Y 中并非 L1 之接附點中的每一個保留其原始價態。例如，如果 L1 接附於 L1-Q'，其不接附於 L1-Q、L1-S、L1-T、L1-U、L1-V 或 L1-Y，且 D 具有下列結構：



【0278】 在實施例中，L1 為 L1a，其具有下列結構



R^a、R^b、R^c 和 R^d 各自獨立地選自由 H、視情況經取代之支鏈或直鏈 C₁-C₅ 烷基和視情況經取代之 C₃-C₆ 環烷基所組成之群組，或者，R^a 和 R^b

一起或 R^c 和 R^d 與他們結合的碳原子一起形成視情況經取代之 C₃-C₆ 環烷



基環或 3 至 6 員雜環烷基環，且其中 為與 Ab 的接附點。

【0279】 在實施例中，L1a 接附於 L1-T 處，且 R^a、R^b、R^c 和 R^d 中之至少一者為甲基。

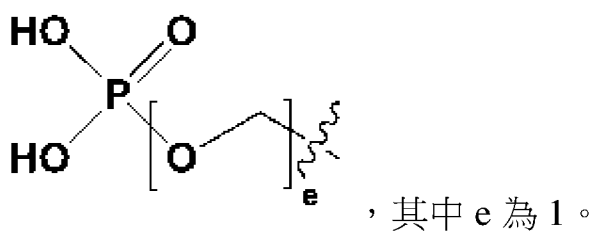
【0280】 在實施例中，L1a 接附於 L1-T 處，且 R^a、R^b、R^c 和 R^d 中之至少兩者為甲基。

【0281】 在實施例中，L1a 接附於 L1-T 處，且 R^a 和 R^c 各自為甲基，且 R^b 和 R^d 各自為氫。

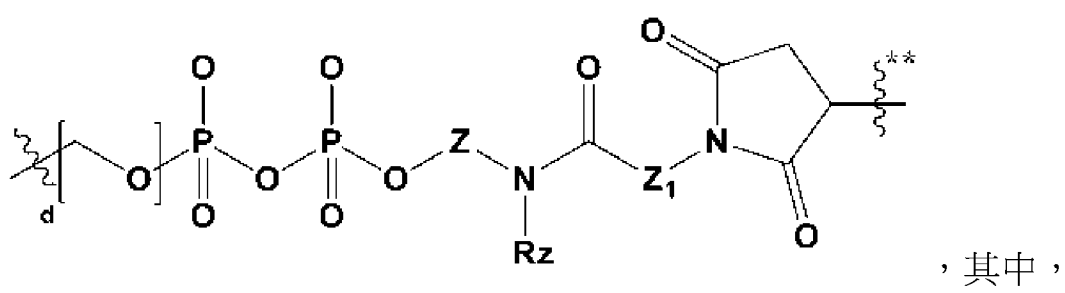
【0282】 在實施例中，L1a 接附於 L1-T 處，且 R^a、R^c 和 R^d 各自為甲基，且 R^b 為氫。

【0283】 在實施例中，L1a 接附於 L1-T 處，且 R^a 和 R^b 各自為氫，R^c 和 R^d 與其所結合之碳原子一起形成視情況經取代之 3 至 6 員雜環烷基環。在實施例中，3 至 6 員雜環烷基環為視情況經取代之哌啶環。在實施例中，哌啶環經甲基取代。

【0284】 在實施例中，L1a 接附於 L1-T 處，其中 R^a、R^b、R^c 和 R^d 中之至少兩者為甲基；且磷酸鹽部分接附於 L1-Q 處，其中磷酸酯部分具有下列結構



【0285】 在實施例中，L1 為 L1b，其具有下列結構



Z 及 Z₁ 各自獨立為 C₁₋₁₂ 伸烷基或 -[CH₂]_g-[-O-CH₂]_h-，其中 g 為 0、1 或 2，且 h 為 1-5；R_z 為 H 或 C₁₋₃ 烷基；d 為 0、1 或 2；且其中 為與 Ab 的接附點。

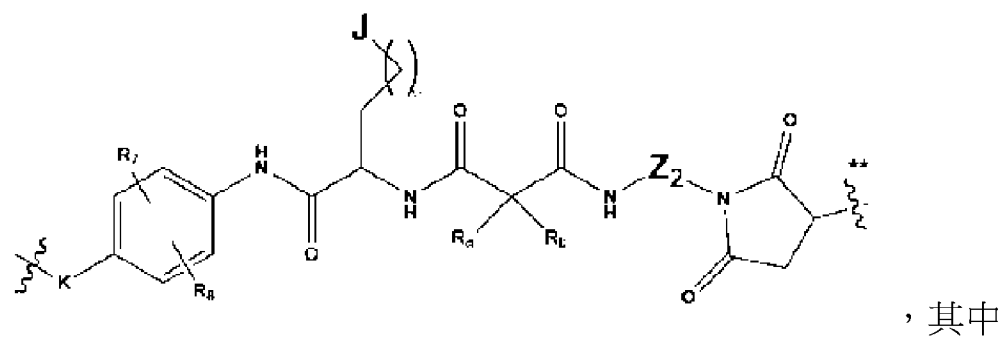
【0286】 在實施例中，Z 及 Z₁ 各自獨立為 C₁₋₁₂ 伸烷基，R_z 為氫，且 d 為 0 或 1。

【0287】 在實施例中，Z 為 C₂ 伸烷基，且 Z₁ 為 C₅ 伸烷基，R_z 為氫，且 d 為 0 或 1。

【0288】 在實施例中，L1b 接附於 L1-Q 處，且 d 為 1。

【0289】 在實施例中，L1b 接附於 L1-T 處，且 d 為 0。

【0290】 在實施例中，L1 為 L1c，其具有下列結構



Z₂ 為 C₁₋₁₂ 伸烷基或 -[CH₂]_g-[-O-CH₂]_h-，其中 g 為 0、1 或 2，且 h 為 1-5；

w 為 0、1、2、3、4 或 5，且其中 為與 Ab 的接附點；

J 為氫、 $-N(R_x)(R_y)$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-NH-C(O)-NH_2$ 、 $-NH-C(=NH)-NH_2$ 、其中， R_x 和 R_y 各自獨立地選自氫及 C_{1-3} 烷基，其中 R_x 和 R_y 各自獨立地選自氫及 C_{1-3} 烷基；

K 選自 $-CH_2-$ 、 $-CH(R)-$ 、 $-CH(R)-O-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)-O-CH(R)-$ 、 $-CH_2-O-C(O)-$ 、 $-CH_2-O-C(O)-NH-$ 、 $-O-C(L1c)-C(O)-NR_xR_y-$ 、 $-C(L1c)-C(O)-NR_xR_y-$ 、 $-CH_2-O-C(O)-NH-CH_2-$ 、 $-CH_2-O-C(O)-R-[CH_2]_q-O-$ 、 $-CH_2-O-C(O)-R-[CH_2]_q-$ 、其中 $\wedge$ 表示接附至 CIDE，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 q 為 0、1、2 或 3，且 R_x 和 R_y 各自獨立地選自氫及 C_{1-3} 烷基，或者， R_x 和 R_y 與各自所接附之氮一起形成視情況經取代之 5 至 7 員雜環基；

Ra 和 Rb 各自獨立地選自氫及 C_{1-3} 烷基，或者 Ra 和 Rb 與其各自所接附之碳一起形成視情況經取代之 C_{3-6} 環烷基；且

R_7 和 R_8 各自獨立地為氫、鹵代、 C_{1-5} 烷基、 C_{1-5} 烷氧基或羥基。

【0291】在實施例中， Z_2 為 C_{1-12} 伸烷基，w 為 2，J 為 $-NH-C(O)-NH_2$ ，Ra 和 Rb 與其各自所接附之碳一起形成視情況經取代之 C_{3-6} 環烷基，且 R_7 和 R_8 各自獨立地為氫。

【0292】在實施例中， Z_2 為 C_5 伸烷基，w 為 2，J 為 $-NH-C(O)-NH_2$ ，Ra 和 Rb 與其各自所接附之碳一起形成視情況經取代之 C_4 環烷基，且 R_7 和 R_8 各自獨立地為氫。

【0293】在實施例中， Z_2 為 C_{1-12} 伸烷基，w 為 2，J 為 $-NH-C(O)-NH_2$ ，K 為 $-CH_2-O-C(O)-$ ，Ra 和 Rb 與其各自所接附之碳一起形成視情況經取代之 C_{3-6} 環烷基，且 R_7 和 R_8 各自獨立地為氫。

【0294】 在實施例中， Z_2 為 C_5 伸烷基， w 為 2， J 為 $-NH-C(O)-NH_2$ ， K 為 $-CH_2-O-C(O)-$ ， R_a 和 R_b 與其各自所接附之碳一起形成視情況經取代之 C_4 環烷基，且 R_7 和 R_8 各自獨立地為氫。

【0295】 在實施例中， Z_2 為 C_{1-12} 伸烷基， w 為 3， J 為 $-N(R_x)(R_y)$ ，其中 R_x 和 R_y 各自獨立地選自氫及 C_{1-3} 烷基， R_a 和 R_b 與其各自所接附之碳一起形成視情況經取代之 C_{3-6} 環烷基，且 R_7 和 R_8 各自獨立地為氫。

【0296】 在實施例中， Z_2 為 C_5 伸烷基， w 為 3， J 為 $-N(R_x)(R_y)$ ，其中 R_x 和 R_y 各自為甲基， R_a 和 R_b 與其各自所接附之碳形成 C_4 環烷基，且 R_7 和 R_8 各自獨立地為氫。

【0297】 在實施例中， Z_2 為 C_{1-12} 伸烷基， w 為 3， J 為 $-N(R_x)(R_y)$ ，其中 R_x 和 R_y 各自獨立地選自氫及 C_{1-3} 烷基， K 為 $-CH_2-$ ， R_a 和 R_b 與其各自所接附之碳一起形成視情況經取代之 C_{3-6} 環烷基，且 R_7 和 R_8 各自獨立地為氫。

【0298】 在實施例中， Z_2 為 C_5 伸烷基， w 為 3， J 為 $-N(R_x)(R_y)$ ，其中 R_x 和 R_y 各自為甲基， K 為 $-CH_2-$ ， R_a 和 R_b 與其各自所接附之碳形成 C_4 環烷基，且 R_7 和 R_8 各自獨立地為氫。

【0299】 在實施例中， Z_2 為 C_{1-12} 伸烷基， w 為 0， J 為氫， R_a 和 R_b 與其各自所接附之碳一起形成視情況經取代之 C_{3-6} 環烷基，且 R_7 和 R_8 各自獨立地為氫。

【0300】 在實施例中， Z_2 為 C_5 伸烷基， w 為 0， J 為氫， R_a 和 R_b 與其各自所接附之碳形成 C_4 環烷基，且 R_7 和 R_8 各自獨立地為氫。

【0301】 在實施例中， Z_2 為 C_{1-12} 伸烷基， w 為 0， J 為氫， K 為 $-CH_2-$ ， R_a 和 R_b 與其各自所接附之碳一起形成視情況經取代之 C_{3-6} 環烷基，且 R_7 和 R_8 各自獨立地為氫。

【0302】 在實施例中， Z_2 為 C_5 伸烷基， w 為 0， J 為氫， K 為 $-CH_2-$ ， R_a 和 R_b 與其各自所接附之碳形成 C_4 環烷基，且 R_7 和 R_8 各自獨立地為氫。

【0303】 在實施例中， Z_2 為 C_{1-12} 伸烷基， w 為 2， J 為 $-NH-C(O)-NH_2$ ， R_a 和 R_b 與其各自所接附之碳一起形成視情況經取代之 C_{3-6} 環烷基，且 R_7 和 R_8 各自獨立地為氫。

【0304】 在實施例中， Z_2 為 C_5 伸烷基， w 為 2， J 為 $-NH-C(O)-NH_2$ ， R_a 和 R_b 與其各自所接附之碳一起形成視情況經取代之 C_4 環烷基，且 R_7 和 R_8 各自獨立地為氫。

【0305】 在實施例中， Z_2 為 C_{1-12} 伸烷基， w 為 2， J 為 $-NH-C(O)-NH_2$ ， K 為 $-CH(R)-O-C(O)-$ ，其中 R 為 $C(O)-N(R_x)(R_y)$ ，其中 R_x 和 R_y 與各自所接附之氮一起形成視情況經取代之 5 至 7 員雜環基， R_a 和 R_b 與其各自所接附之碳一起形成視情況經取代之 C_{3-6} 環烷基，且 R_7 和 R_8 各自獨立地為氫。

【0306】 在實施例中， Z_2 為 C_5 伸烷基， w 為 2， J 為 $-NH-C(O)-NH_2$ ， K 為 $-CH(R)-O-C(O)-$ ，其中 R 為 $C(O)-N(R_x)(R_y)$ ，其中 R_x 和 R_y 與各自所接附之氮一起形成視情況經取代之哌啶， R_a 和 R_b 與其各自所接附之碳一起形成視情況經取代之 C_4 環烷基，且 R_7 和 R_8 各自獨立地為氫。

【0307】在實施例中， Z_2 為 C_{1-12} 伸烷基， w 為 3， J 為 $-N(R_x)(R_y)$ ，其中 R_x 和 R_y 各自獨立地選自氫及 C_{1-3} 烷基， K 為 $-\text{CH}_2\text{-O-C(O)-}$ ， R_a 和 R_b 與其各自所接附之碳一起形成視情況經取代之 C_{3-6} 環烷基，且 R_7 和 R_8 各自獨立地為氫。

【0308】在實施例中， Z_2 為 C_5 伸烷基， w 為 3， J 為 $-N(R_x)(R_y)$ ，其中 R_x 和 R_y 各自為甲基， K 為 $-\text{CH}_2\text{-O-C(O)-}$ ， R_a 和 R_b 與其各自所接附之碳形成 C_4 環烷基，且 R_7 和 R_8 各自獨立地為氫。

【0309】在實施例中， $L1c$ 接附於 $L1-Q$ 處，且 K 為 $-\text{CH}_2-$ 。

【0310】在實施例中， $L1c$ 接附於 $L1-Q'$ ，且 K 為 $-\text{CH}_2\text{-O-C(O)-}$ 。

【0311】在實施例中， $L1c$ 接附於 $L1-S$ 處，且 K 為 $-\text{CH}_2-$ 。

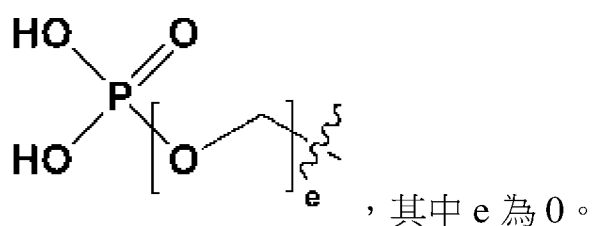
【0312】在實施例中， $L1c$ 接附於 $L1-T$ 處，且 K 為 $-\text{CH(R)-O-C(O)-}$ ，其中 R 為 $\text{C(O)-N(R}_x\text{)(R}_y\text{)}$ ，其中 R_x 和 R_y 與各自所接附之氮一起形成視情況經取代之 5 至 7 員雜環基。

【0313】在實施例中， $L1c$ 接附於 $L1-U$ 處。

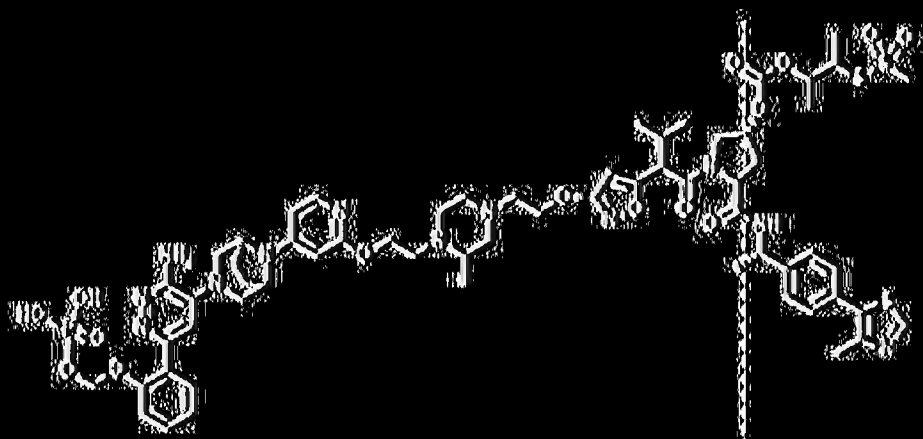
【0314】在實施例中， $L1c$ 接附於 $L1-V$ 處。

【0315】在實施例中， $L1c$ 接附於 $L1-Y$ 處，且 K 為 $-\text{CH}_2-$ 。

【0316】在實施例中， $L1c$ 接附於 $L1-Q$ 處，其中 K 為 $-\text{CH}_2-$ ；且磷酸鹽部分接附於 $L1-T$ 處，其中磷酸鹽部分具有下列結構

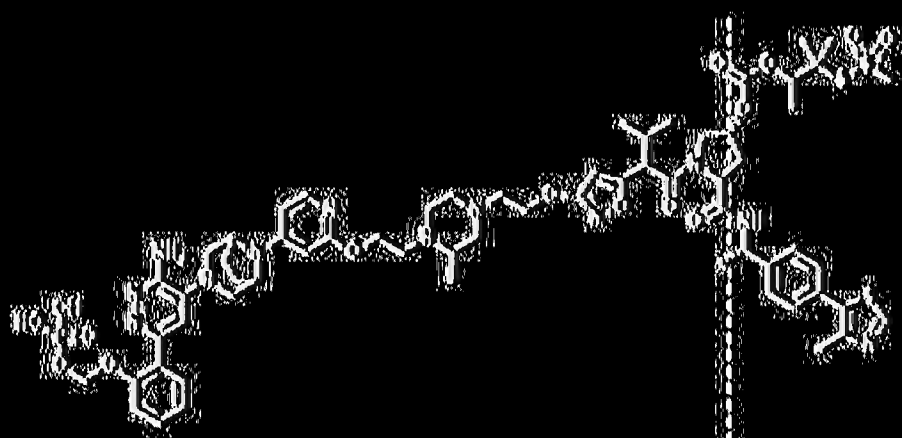


【0317】在某些實施例中，本文所述之主題包括下列 $L1-CIDE$ 。



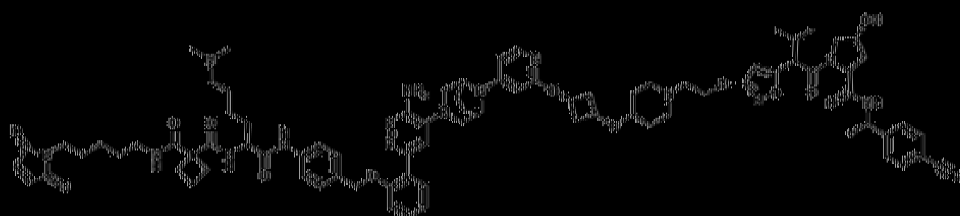
LI-CODE

BRM1-10



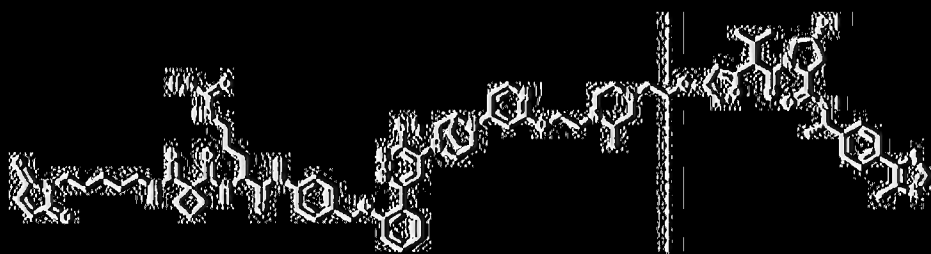
LI-CODE

BRM1-9



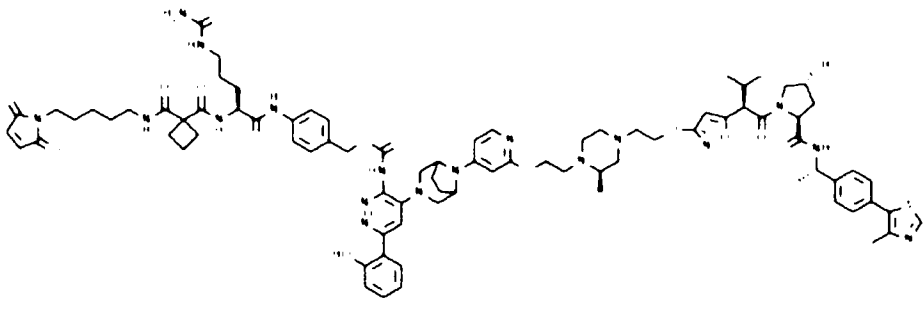
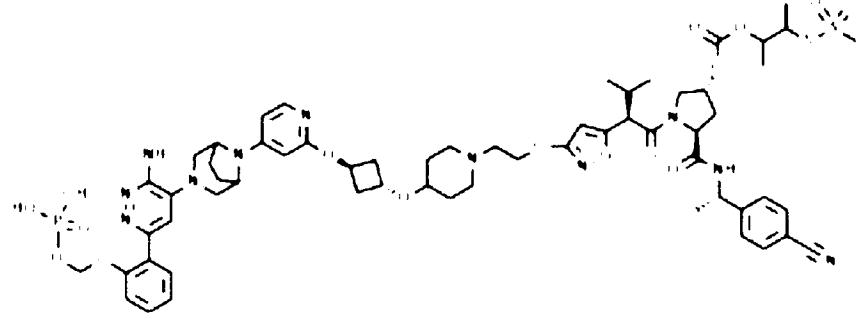
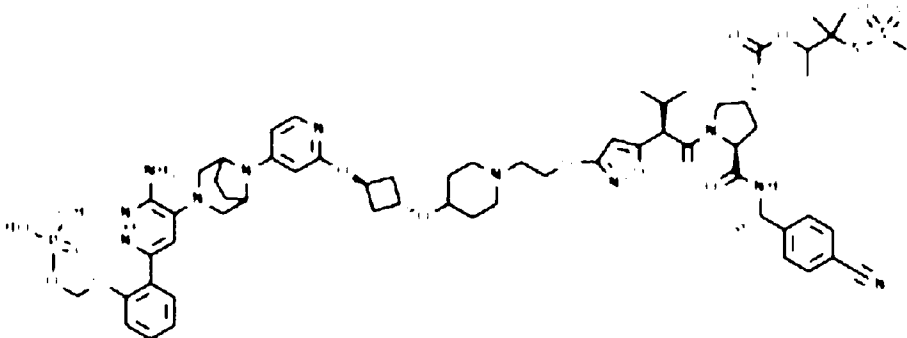
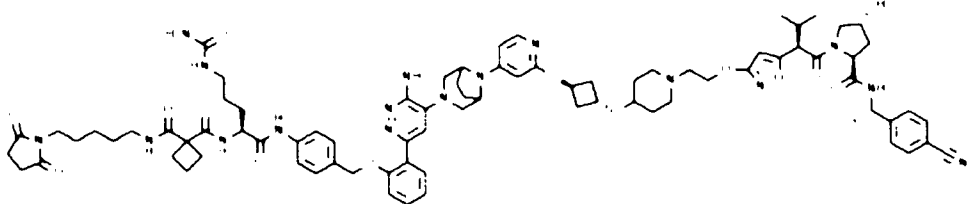
LI-CODE

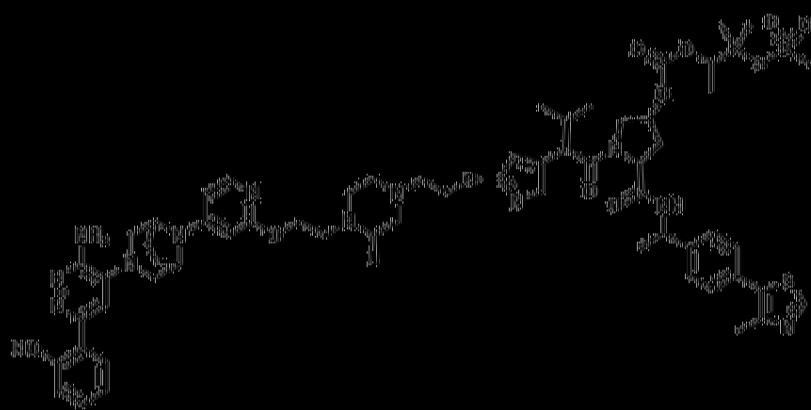
BRM1-19



LI-CODE

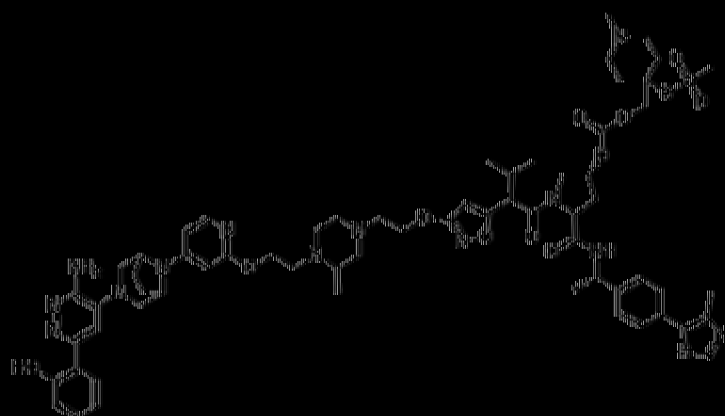
BRM1-13

	L1-CIDE- BRM1-20
	L1-CIDE- BRM1-11
	L1-CIDE- BRM1-12
	L1-CIDE- BRM1-14



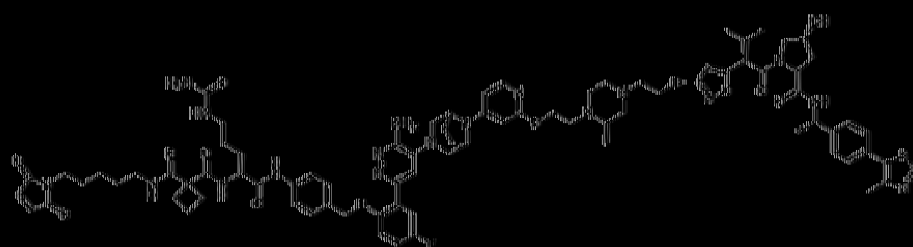
IL1·CIDE·

BRM1.7



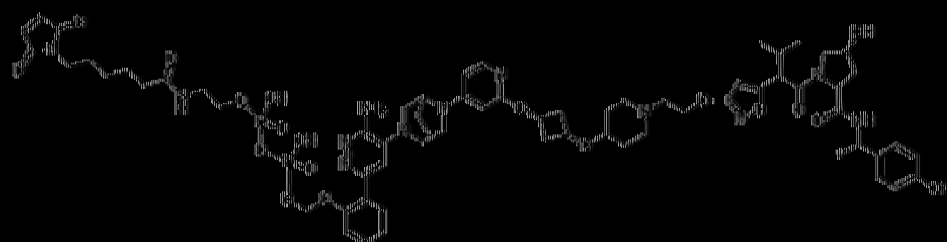
IL1·CIDE·

BRM1.8



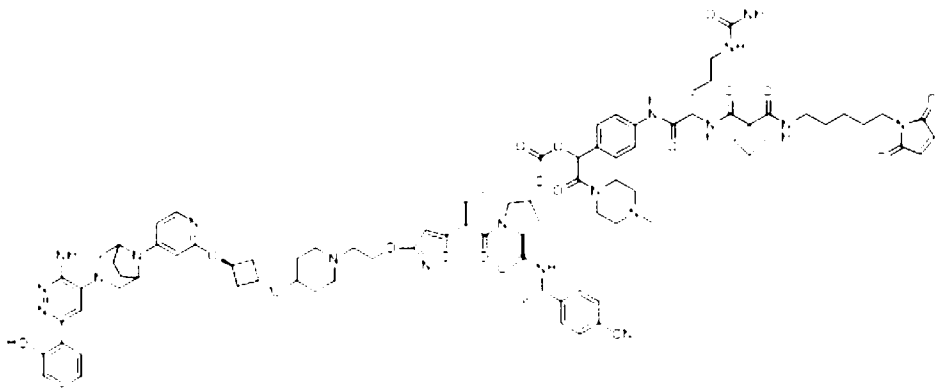
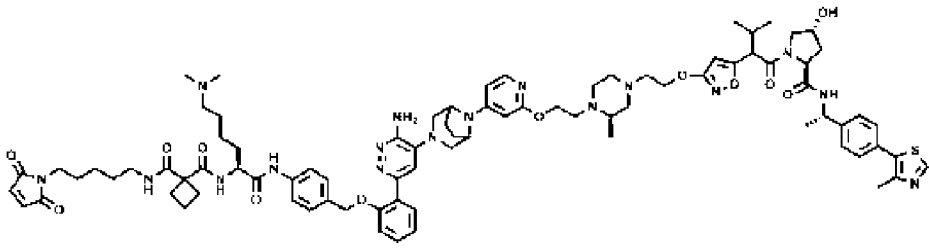
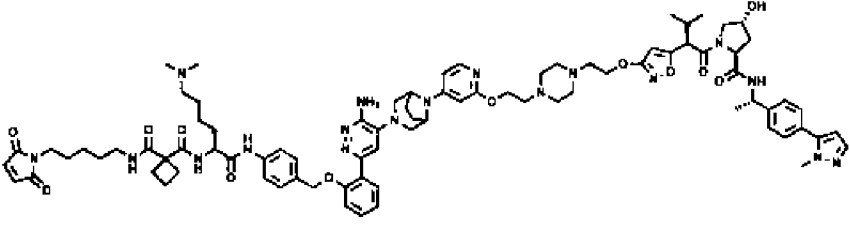
IL1·CIDE·

BRM1.16



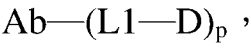
IL1·CIDE·

BRM1.17

	L1-CIDE- BRM1-18
	L1-CIDE- BRM1-21
	L1-CIDE- BRM1-22

【0318】 本文所揭露之主題包括下列非限制性實施例：

1. 一種結合物，其具有下列化學結構



其中，

D 為具有結構 E3LB—L2—PB 的 CIDE；

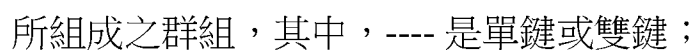
E3LB 共價結合至 L2，該 E3LB 具有下式：



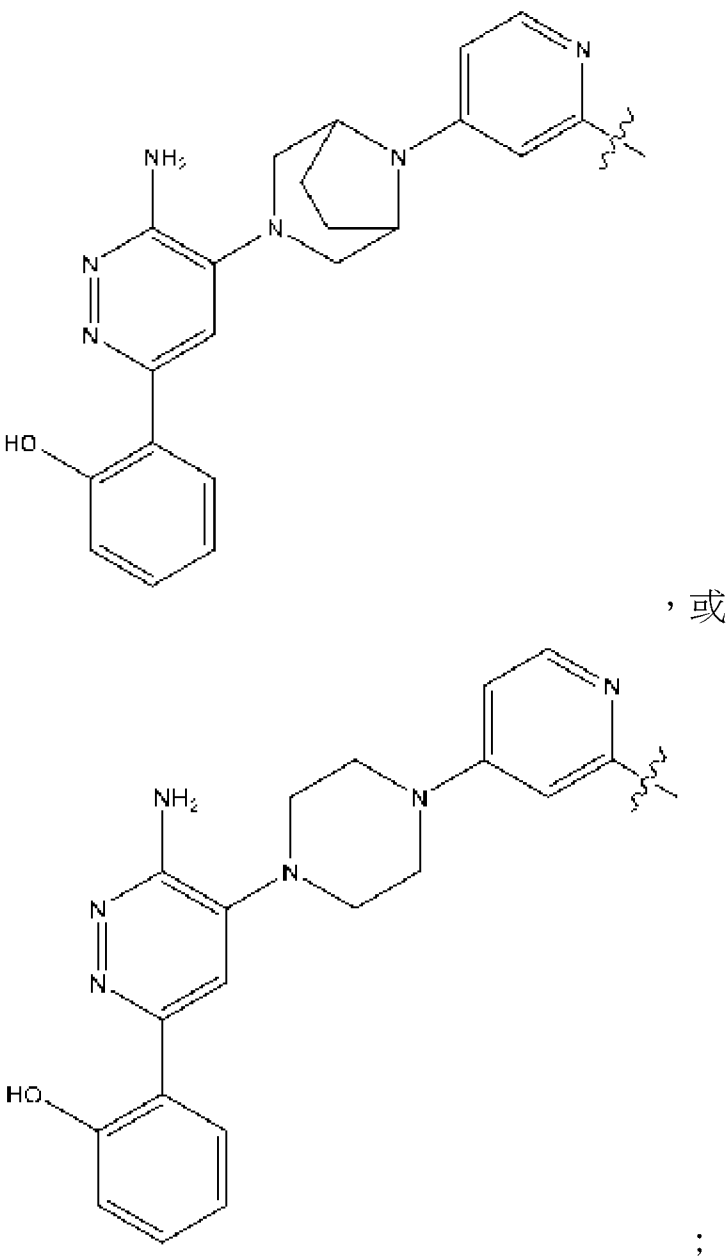
R_{1A} 、 R_{1B} 和 R_{1C} 各自獨立地為氫或 C_{1-5} 烷基；或者 R_{1A} 、 R_{1B} 和 R_{1C} 中的兩個與其各自所接附之碳一起形成 C_{1-5} 環烷基；

The diagram shows a five-membered thiazole ring. A wavy line is attached to the carbon at position 2. The nitrogen atom at position 1 is bonded to a group labeled $(L1-Y)_q$.

及



L2 為共價結合至 E3LB 及 PB 的连接子，該 L2 具有下式：



Ab 為共價結合至至少一個 L1 的抗體，該至少一個 L1 為連接子；

L1-T、L1-U 及 L1-V 各自獨立地為氫或共價結合至 Ab 及 D 的 L1 連接子；

L1-Y 為氫或共價結合至 Ab 及 D 的 L1 連接子；

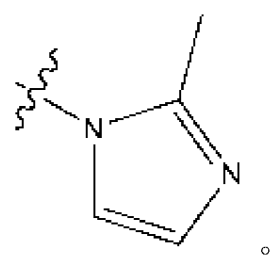
q 為 1 或 0；

且

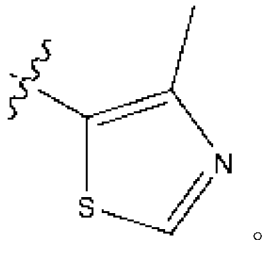
p 具有約 1 至約 8 的值。

2. 如實施例 1 之結合物，其中 R₃ 為氰基。

3. 如實施例 1 之結合物，其中 R_3 為



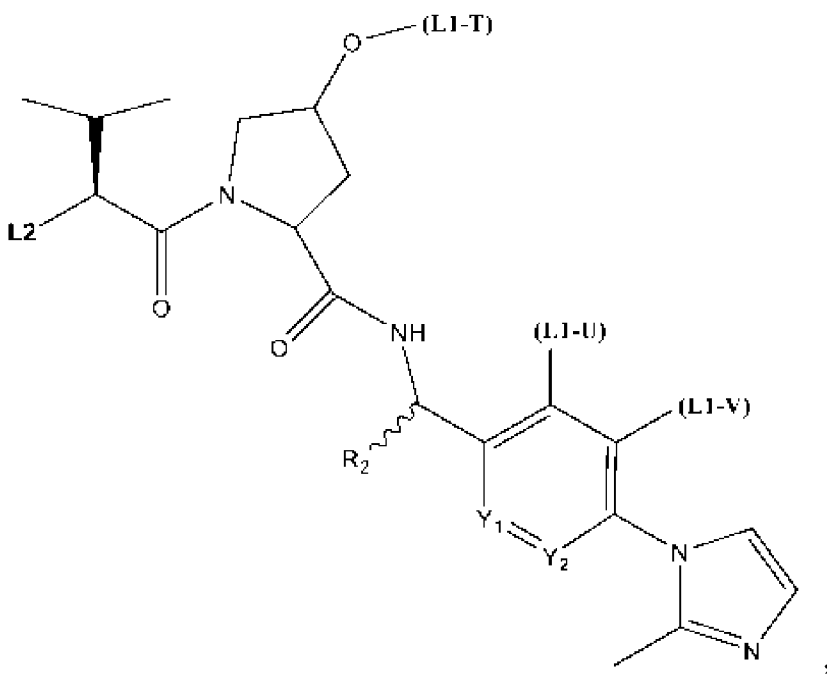
4. 如實施例 1 之結合物，其中 R_3 為



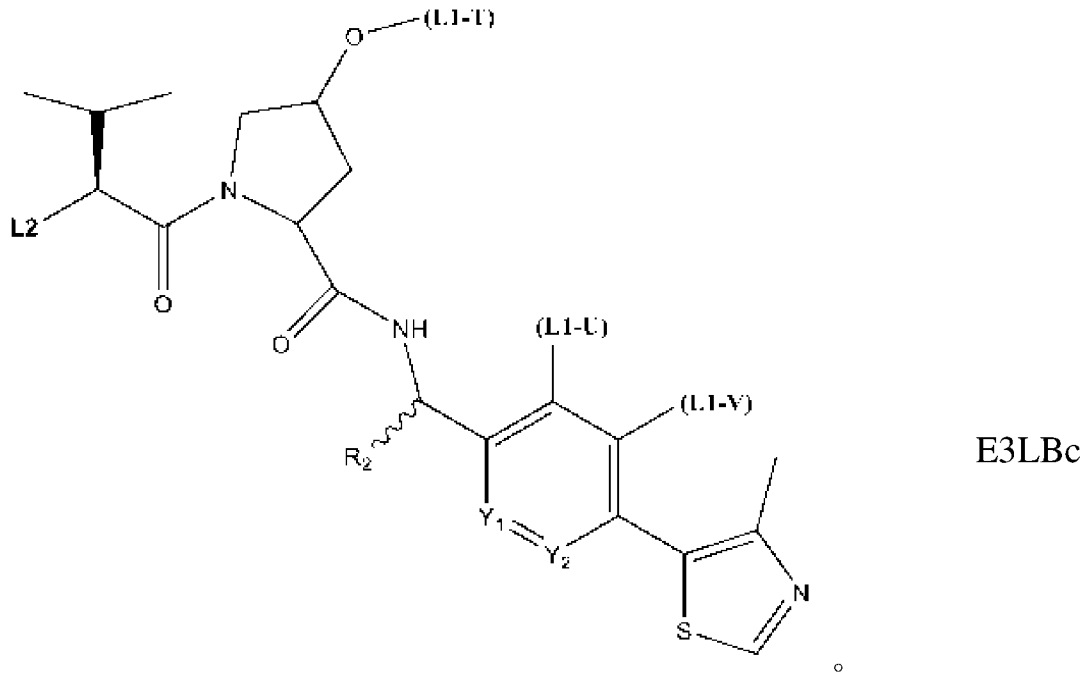
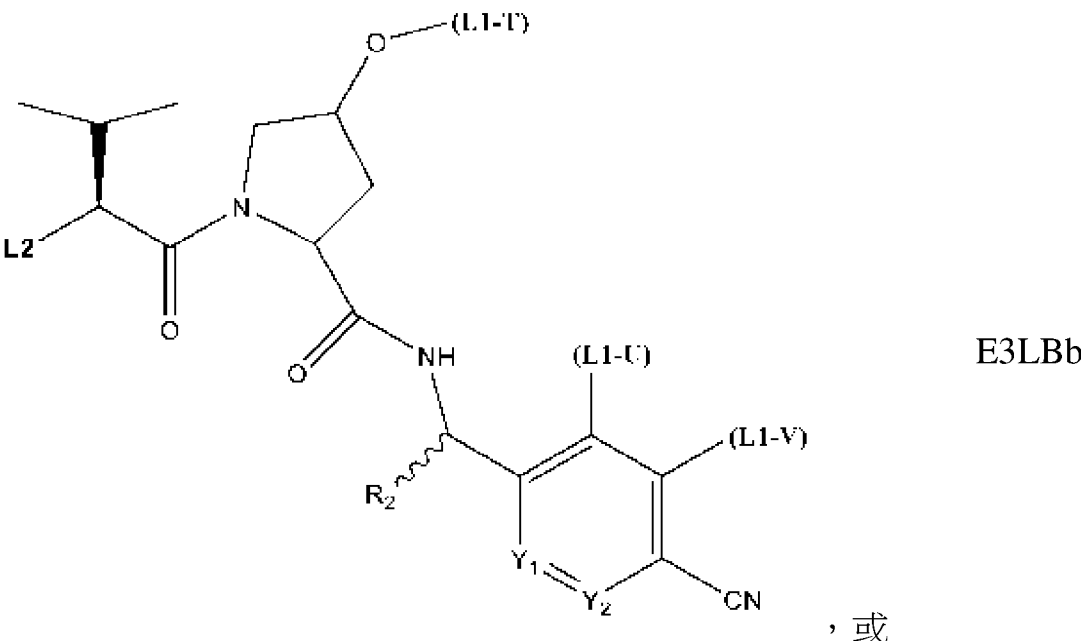
5. 如實施例 1 之結合物，其中 R_{1A} 、 R_{1B} 和 R_{1C} 各自獨立地為氫或甲基。

6. 如實施例 5 之結合物，其中 R_{1A} 和 R_{1B} 各自為甲基。

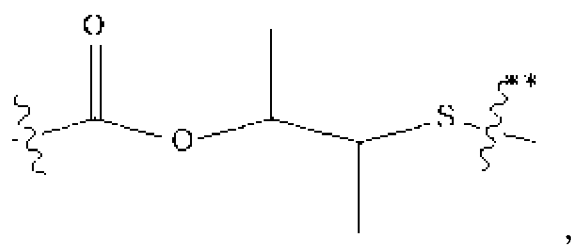
7. 如實施例 6 之結合物，其中 E3LB 具有下式：

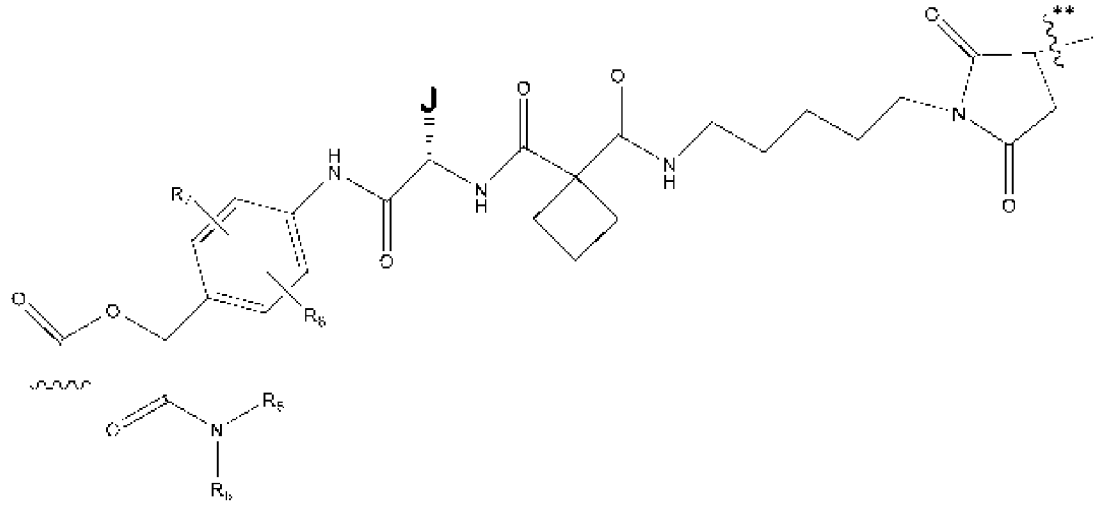
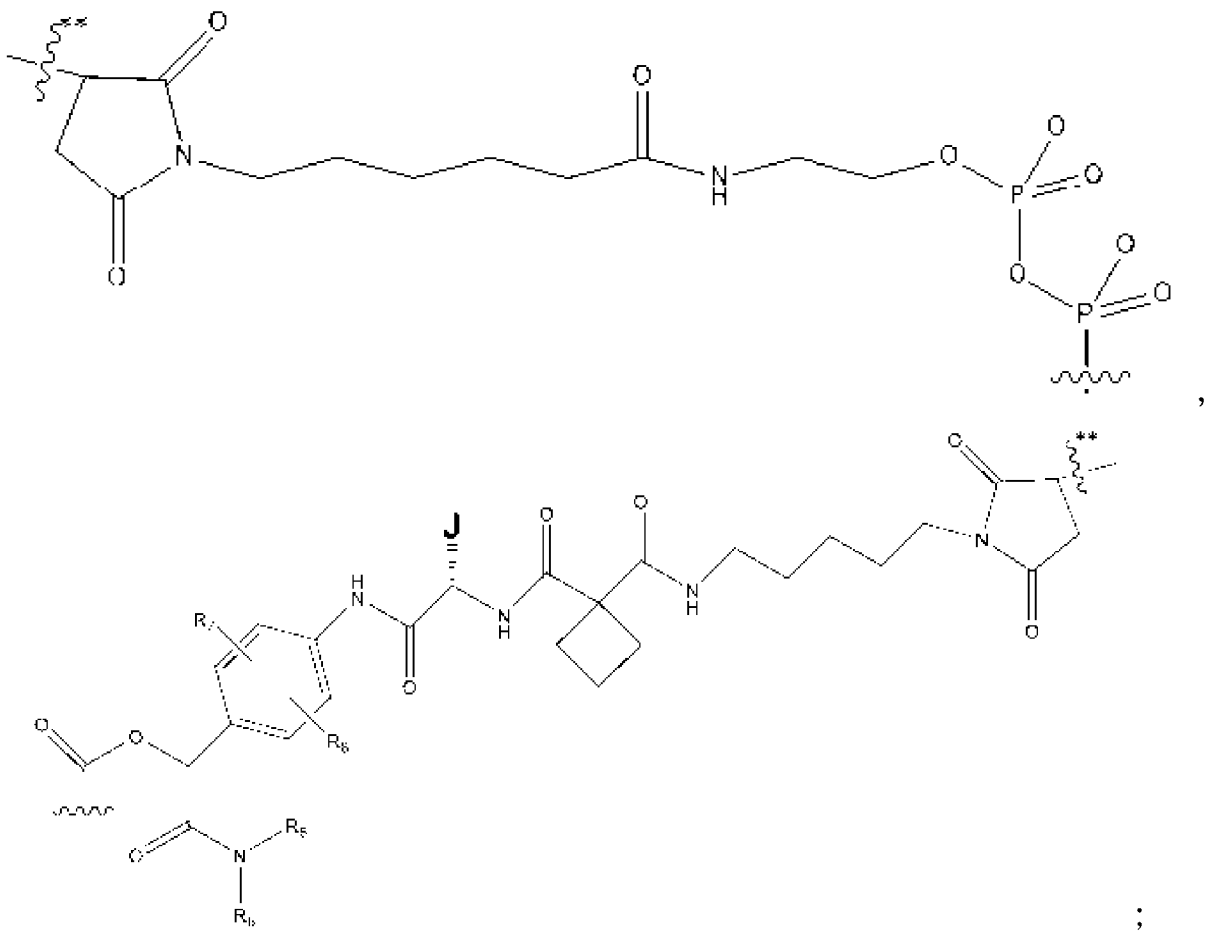


E3LBa



8. 如實施例 1 之結合物，其中在各個實例中，L1 獨立地為選自由以下所組成之群組的连接子：



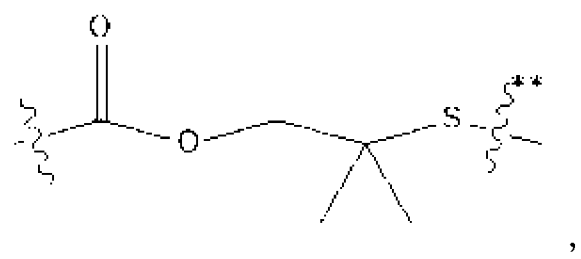


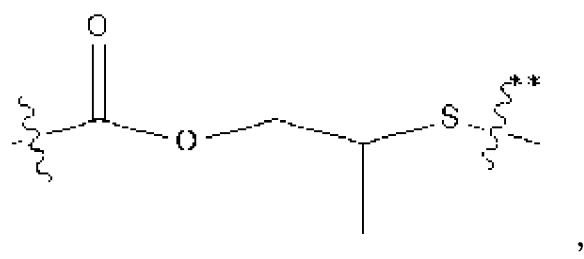
其中，

J 為 —CH₂-CH₂-CH₂-NH-C(O)-NH₂；—CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂；—CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH-CH₃；或 —CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-N(CH₃)₂；

R₅ 和 R₆ 獨立地為氫或 C₁₋₅ 烷基；或者，R₅ 和 R₆ 與各自所接附之氮一起形成視情況經取代之 5 至 7 員雜環基；

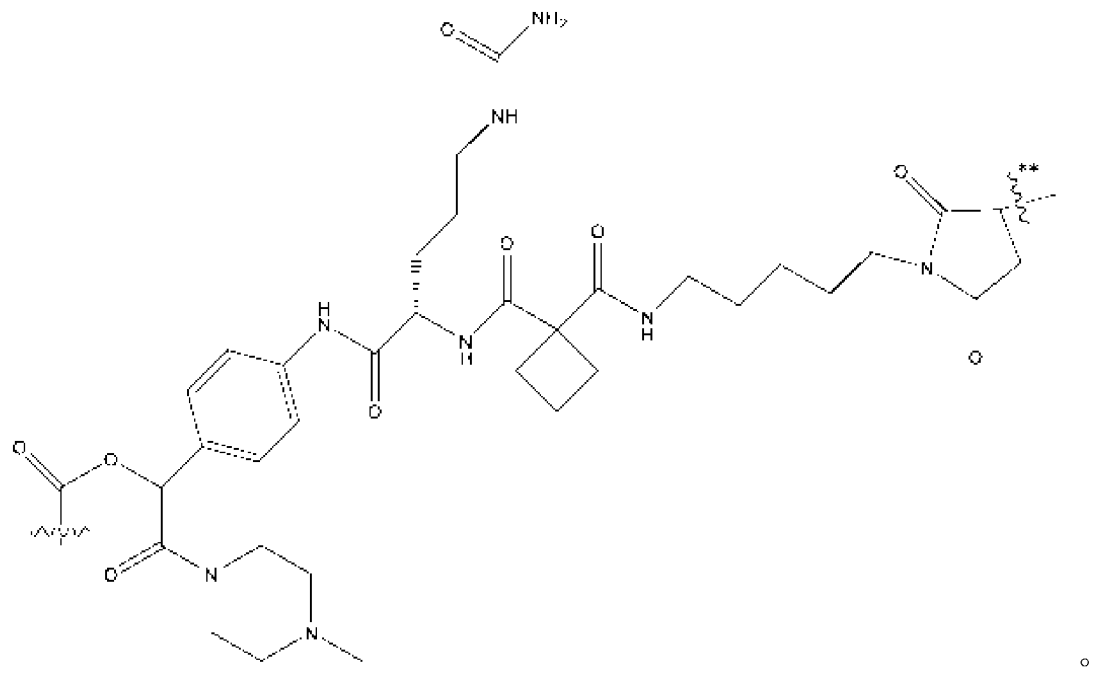
R₇ 和 R₈ 各自獨立地為氫、鹵代、C₁₋₅ 烷基、C₁₋₅ 烷氧基或羥基；



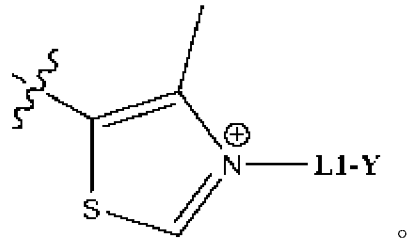


且其中  為 Ab 的接附點。

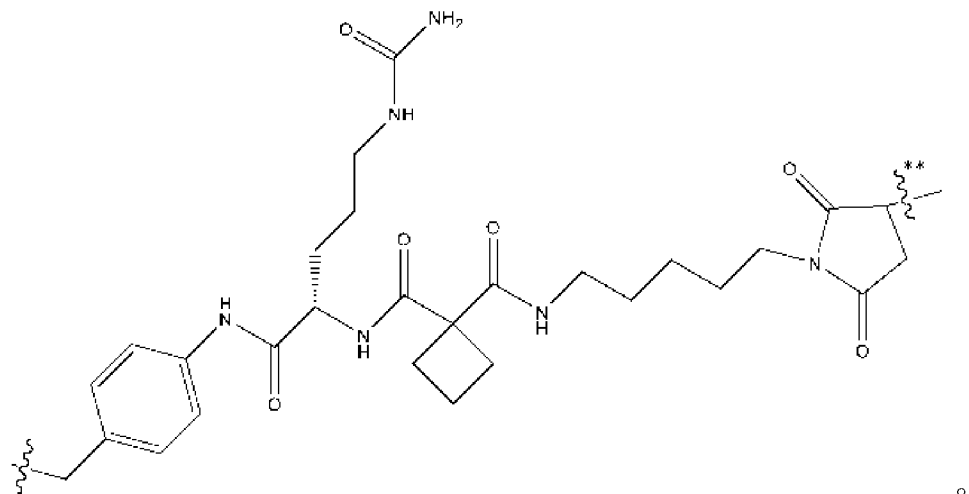
9. 如實施例 8 之結合物，具有下列結構：



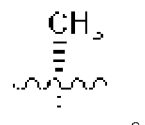
- 10. 如實施例 1 之結合物，其中 L1-T 為連接子。
- 11. 如實施例 1 之結合物，其中 L1-U 或 L1-V 為連接子。
- 12. 如實施例 1 之結合物，其中 L1-Y 為連接子，且 q 為 1，



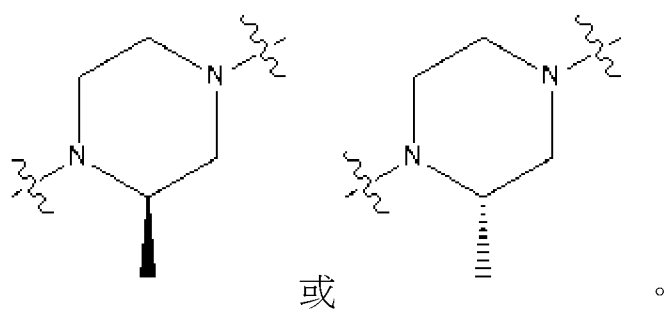
13. 如實施例 12 之結合物，其中 L1-Y 具有下列結構，



- 14. 如實施例 1 之結合物，其中
L1-T 為連接子；
L1-U 及 L1-T 各自為氫；且
q 為 0。
- 15. 如實施例 1 之結合物，其中 z 為 0。
- 16. 如實施例 1 之結合物，其中 z 為 1。
- 17. 如實施例 1 之結合物，其中 R₂ 為氫、甲基、乙基或丙基。
- 18. 如實施例 17 之結合物，其中 R₂ 為甲基。



- 19. 如實施例 18 之結合物，其中 R₂ 結合至 E3LB，為
- 20. 如實施例 1 之結合物，其中 Y₁ 及 Y₂ 各自為 -CH。
- 21. 如實施例 1 之結合物，其中 Y₁ 為 N 且 Y₂ 為 -CH。
- 22. 如實施例 1 之結合物，其中 Y₁ 為 -CH 且 Y₂ 為 N。
- 23. 如實施例 1 之結合物，其中 R₄ 為氫。
- 24. 如實施例 1 之結合物，其中 R₄ 為甲基。
- 25. 如實施例 24 之結合物，其中 R₄ 為如下甲基：

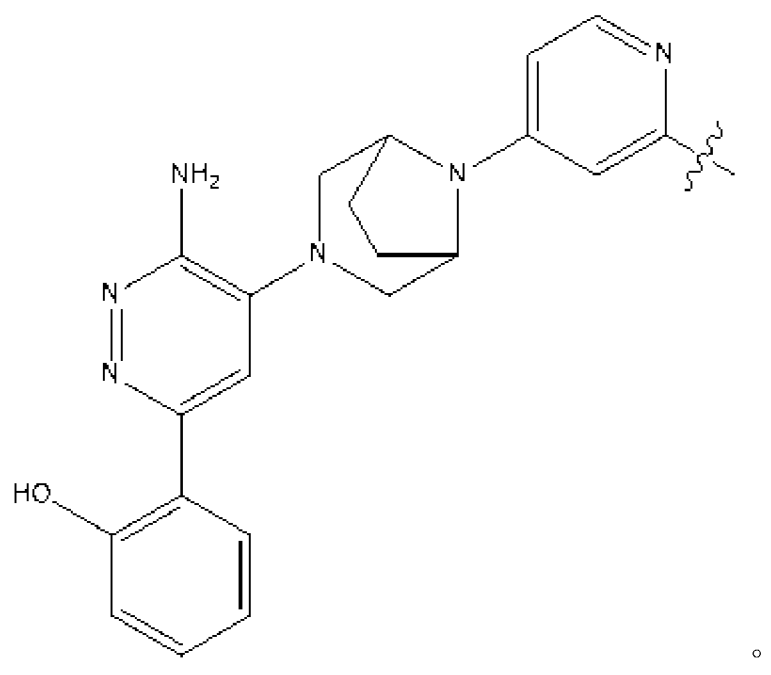


26. 如實施例 1 之結合物，其中 Ab 為抗體，其結合至選自由以下所組成之群組的多肽中的一者或多者：CD71、Trop2、NaPi2b、Ly6E、EpCAM、MSLN 及 CD22。

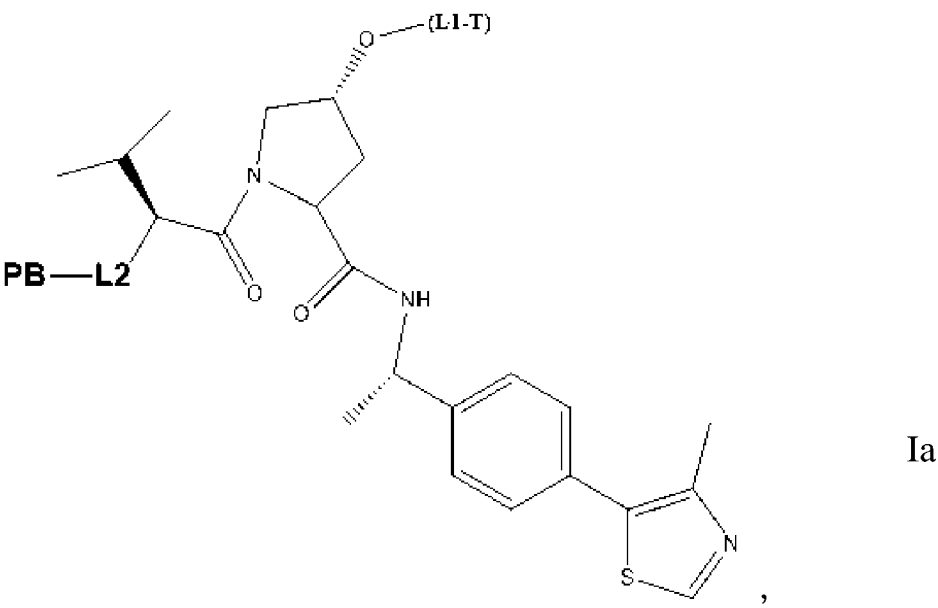
26. 如實施例 1 之結合物，其中 Ab 為抗體，其結合至選自由以下所組成之群組的多肽中的一者或多者：CD71、Trop2、NaPi2b、Ly6E、EpCAM、MSLN 及 CD22。

27. 如實施例 26 之結合物，其中 Ab 為抗體，其結合至選自由 CD71 及 Trop2 所組成之群組的多肽中的一者或多者。

28. 如實施例 1 之結合物，其中 PB 為共價結合至 L2 的蛋白質結合基團，具有下列結構：



29. 如實施例 1 之結合物，具有式 Ia：

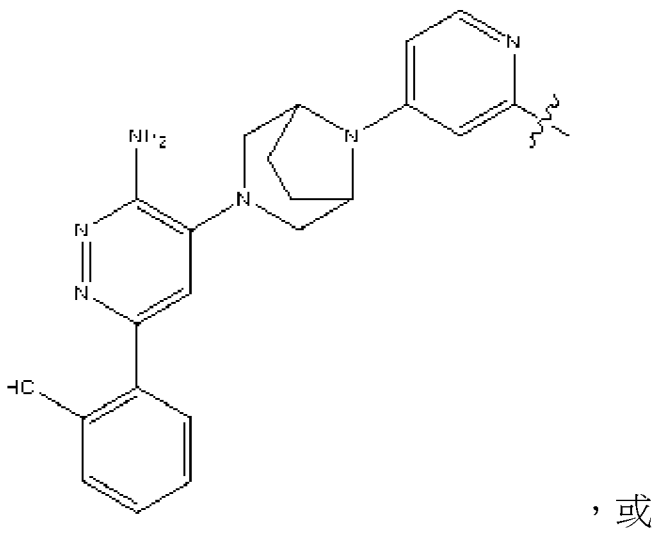


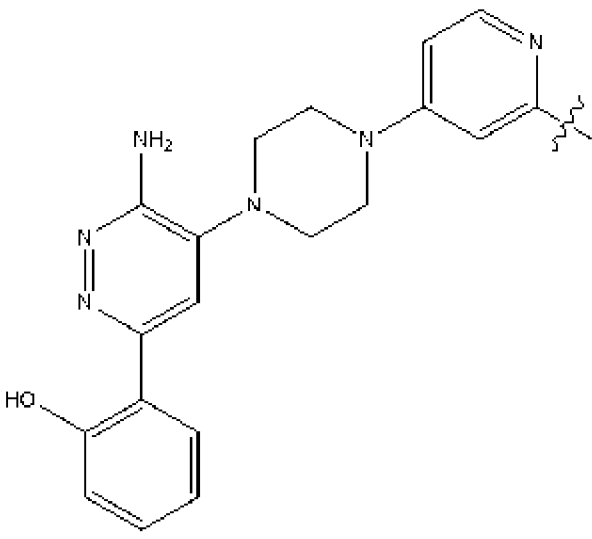
其中，

L1-T 為共價結合至 Ab 的连接子；

Ab 為抗體，其結合至選自由以下所組成之群組肽中的一者或多者：CD71、Trop2、NaPi2b、Ly6E、EpCAM、MSLN 及 CD22；

PB 為共價結合至 L2 的蛋白質結合基團，具有下列結構：





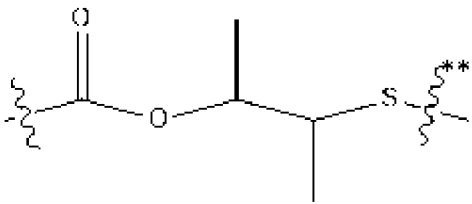
;

L2 選自由 L2a、L2b 及 L2c 所組成之群組；

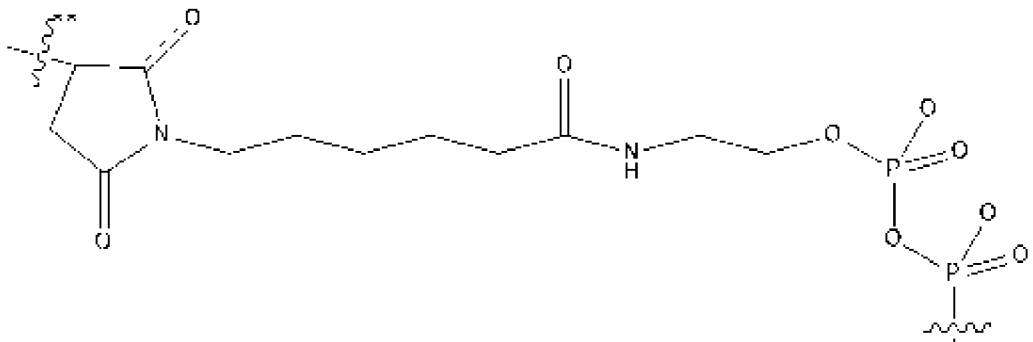
且

p 具有約 4 至約 8 的值。

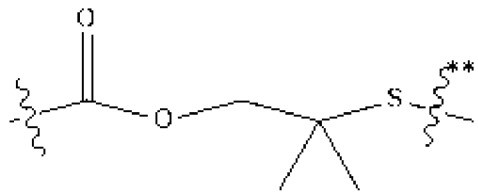
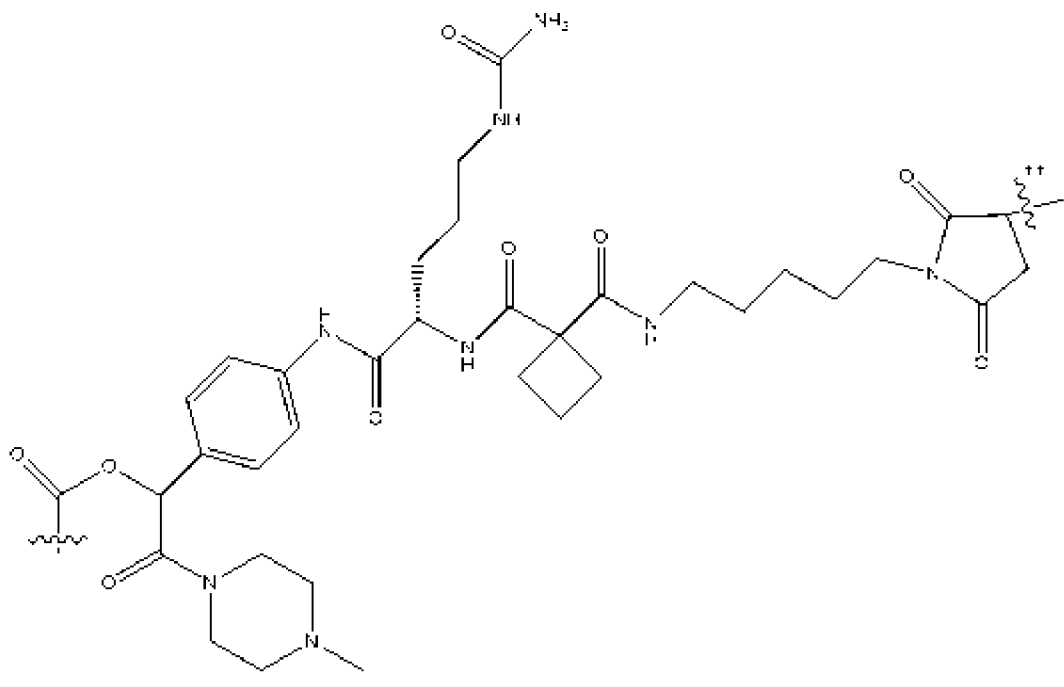
30. 如實施例 29 之結合物，其中 L1-T 為連接子，其選自由以下所組成之群組：



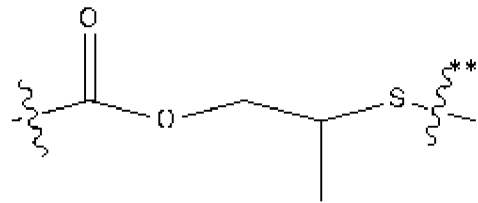
,



,



和

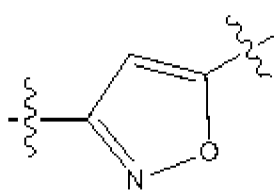


；



其中， 為與 Ab 的接附點。

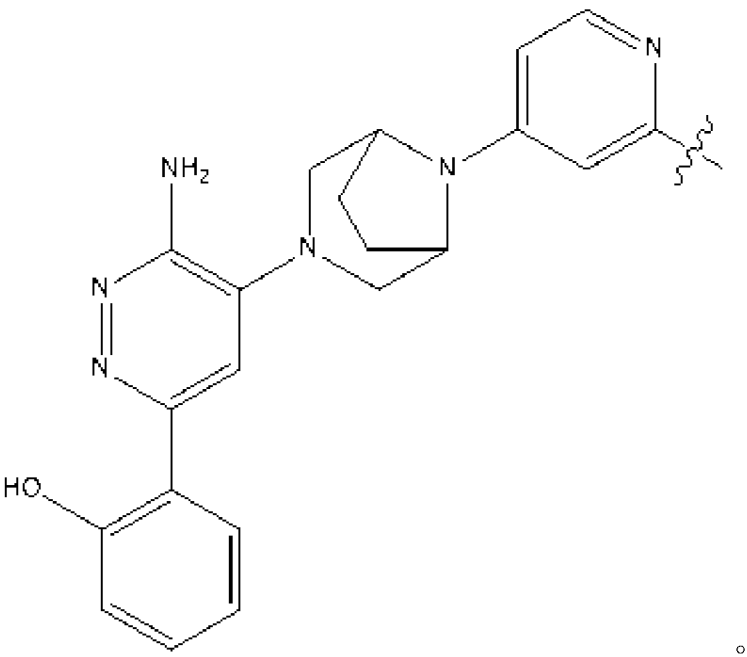
31. 如實施例 29 之結合物，其中 L2 為 L2a。



32. 如實施例 31 之結合物，其中 G 為

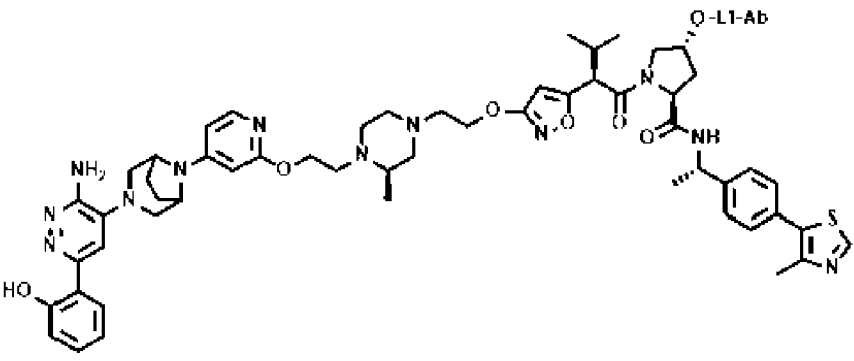
33. 如實施例 31 之結合物，其中 R₄ 為甲基。

34. 如實施例 29 之結合物，其中 PB 為：

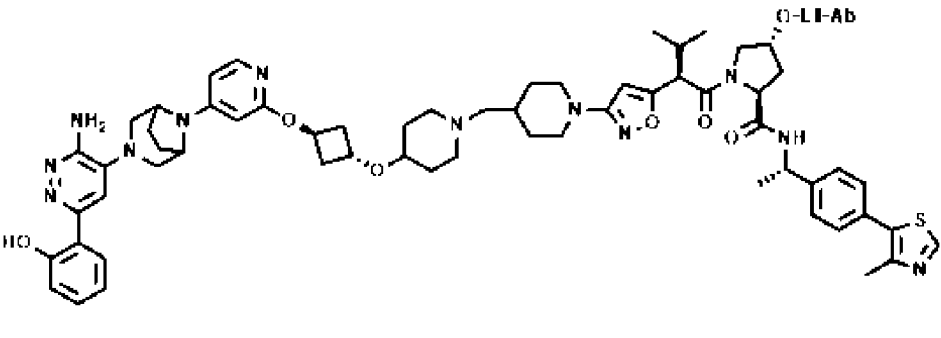


35. 如實施例 29 之結合物，其中 p 具有約 5 至約 7 的值。

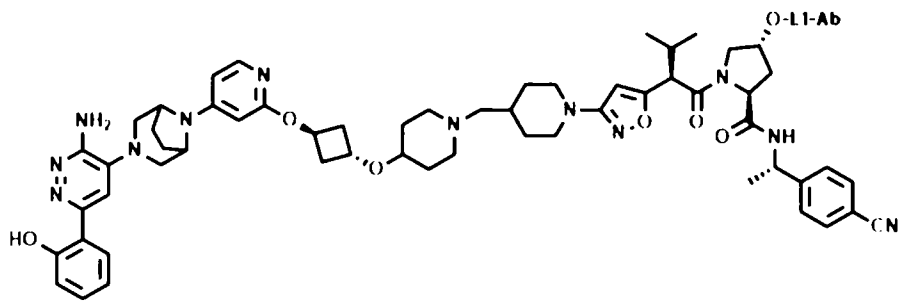
36. 如實施例 1 之結合物，具有下列結構：



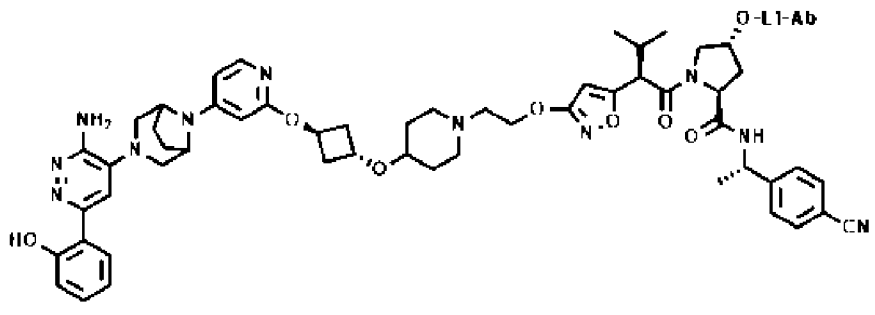
1-L2a



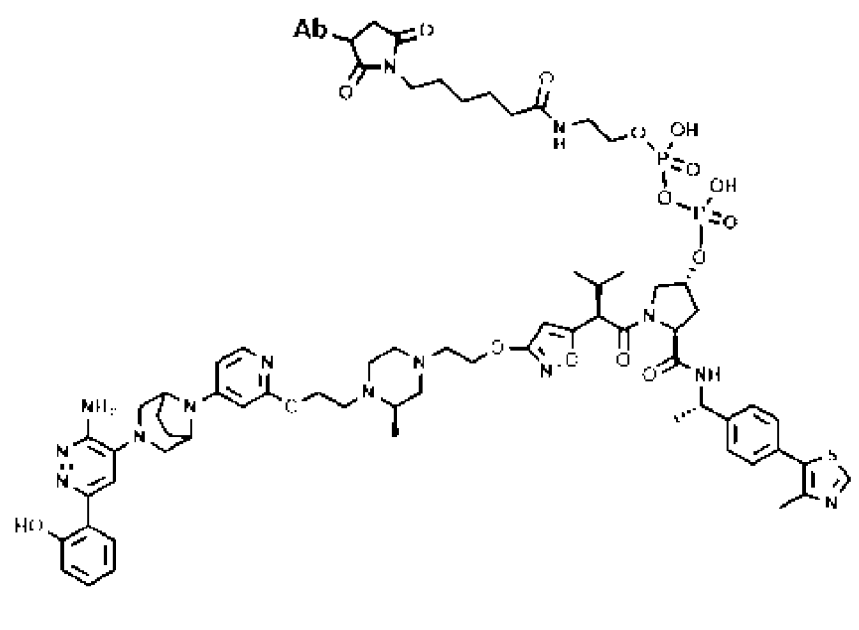
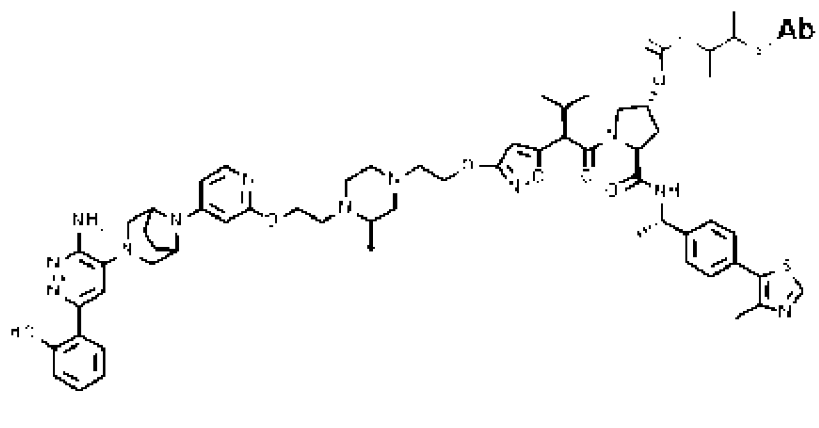
2-L2b

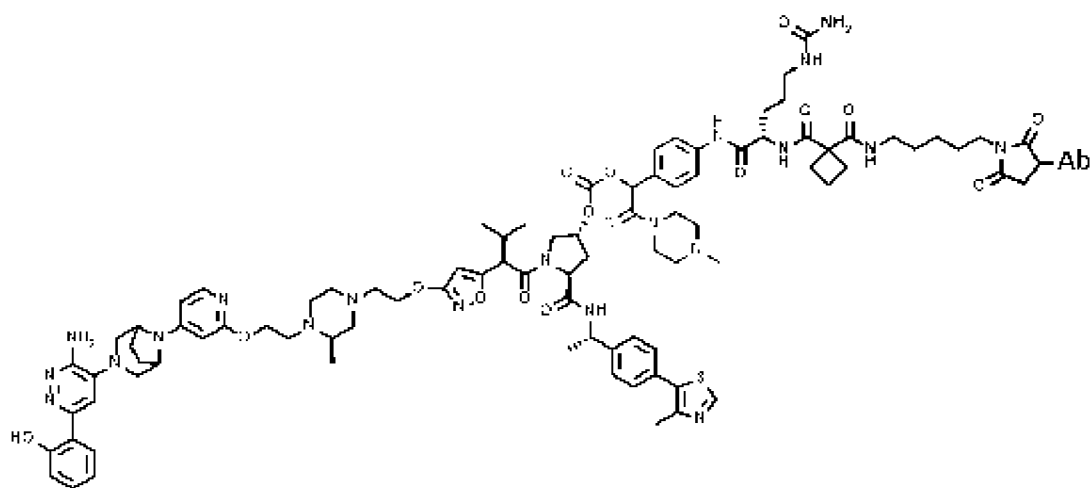


和



37. 如實施例 1 之結合物，具有下列結構：





。

38. 一種醫藥組成物，其包含如實施例 1 之結合物及一種或多種醫藥上可接受之賦形劑。

39. 一種治療有此需要之人的疾病之方法，該方法包含將有效量之如實施例 1 之結合物或如實施例 38 之組成物投予該人。

40. 如實施例 39 之方法，其中該疾病是癌症。

41. 如實施例 40 之方法，其中該癌症具有 BRM 依賴性。

42. 如實施例 40 之方法，其中該癌症是非小細胞肺癌。

43. 一種降低個體的標靶 BRM 蛋白的量之方法，其包含：

將如實施例 1 之結合物或如實施例 38 之組成物投予該個體，其中該 PB 部分結合該標靶 BRM 蛋白，其中泛蛋白連接酶產生該結合的標靶 BRM 蛋白的降解，其中該 BRM 標靶蛋白的量減少。

IV. 製劑

【0319】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。

【0320】 Ab-CIDE 可根據標準藥物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結合的 Ab-CIDE。

【0321】 典型製劑藉由將 Ab-CIDE 與賦形劑（例如載劑及/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 的手段和目的。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。

【0322】 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、賦形劑及穩定劑在採用的劑量和濃度下對受體無毒，並且包括：緩衝劑，例如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸和蛋氨酸；防腐劑（例如十八烷基二甲基苄基氯化銨；六甲基氯化銨；苯扎氯銨；苄索氯銨；苯酚、丁醇或苄醇；對羥基苯甲酸烷基酯，如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯；鄰苯二酚；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，例如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，例如聚乙烯吡咯烷酮；胺基酸，例如甘氨酸、麩醯胺酸、天冬醯胺酸、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單醣、二糖及其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑（例如 EDTA）；糖，例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖。

醇；成鹽抗衡離子，例如鈉；金屬錯合物（例如鋅蛋白錯合物）；及/或非離子表面活性劑，例如 TWEEN™、PLURONICS™ 或聚乙二醇 (PEG)。

【0323】製劑亦可包括一種或多種緩衝劑、穩定劑、表面活性劑、潤濕劑、潤滑劑、乳化劑、懸浮劑、防腐劑、抗氧化劑、滲透劑、滑動劑、加工助劑、著色劑、甜味劑、香化劑、調味劑及其他已知添加劑，提供 Ab-CIDE 之良好呈現或輔助製造藥品。製劑可使用常規溶解和混合程序來製備。

【0324】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。製劑之 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製劑。

【0325】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。

【0326】Ab-CIDE 通常可以固體組成物、凍乾製劑或水溶液形式儲存。

【0327】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、載體及投予途徑）的方式進行調配、給藥及投予。此背景中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、個體患者的臨床病症、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。

【0328】Ab-CIDE 可配製成藥物劑型，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（或製劑）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製劑。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。

【0329】 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。

【0330】 可與載劑材料混合以產生單一劑型的 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 μ g 至 500 μ g 活性成分，以便可以約 30 mL/h 的速率輸注適合之體積。

【0331】 適用於腸胃外投予的製劑包括水性和非水性無菌注射液，其可含有抗氧化劑、緩衝劑、抑菌劑以及使製劑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。

【0332】製劑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。較佳之單位劑量製劑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製劑。

【0333】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。獸醫用載劑是用於用藥組成物的有用材料，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非消化道或任何其他所需的途徑給藥。

V. 適應症及治療方法

【0334】預期本文所揭露之 Ab-CIDE 可用於治療與 BRM 相關的各種疾病或病症。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。

【0335】一般而言，待治療之疾病或病症為 BRM 依賴性疾病或病症，例如過度增殖性疾病（例如癌症）。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。

【0336】在某些實施例中，本文所述之主題涉及一種降低受試者中標靶 BRM 蛋白水平的方法，該方法包含：

向個體投予如本文所述之 Ab-CIDE 或包含如本文所述之 Ab-CIDE 的組成物，其中 PB 部分結合標靶 BRM 蛋白，其中泛蛋白連接酶影響所結合之標靶 BRM 蛋白的降解，其中 BRM 標靶蛋白之水平下降。

【0337】在某些實施例中，包含抗 NaPi2b 抗體（例如上文所述的那些）的 Ab-CIDE 用於治療實體瘤（例如卵巢癌）的方法中。在某些實施例中，包含抗 CD71、Trop2、NaPi2b、Ly6E、EpCAM、MSLN 或 CD22 抗體的 Ab-CIDE 用於治療腫瘤或癌症的方法中。

【0338】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、肌肉內、靜脈內、皮內、鞘內和硬膜外投予。

【0339】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。

【0340】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。腸胃外輸注包括肌肉內、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，部分取決於短暫給藥還是長期給藥。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。

【0341】對於疾病的預防或治療，Ab-CIDE 的適當劑量（單獨使用或與一種或多種其他額外的治療劑組合使用）將取決於待治療疾病的類型、Ab-CIDE 的類型、疾病的嚴重度及病程、為了預防或是治療目的投予 Ab-CIDE、既往治療、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投予，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）。可以施用初始較高的負荷劑量，然後施用一種或多種較低的劑量。但是，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。

【0342】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%。

【0343】 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. 製品

【0344】 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。

【0345】 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）。

【0346】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殖性病變、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，標籤或藥品說明書指示包含 Ab-CIDE 的組成物可用於治療由異常細胞生長引起的病變。標籤或藥品說明書亦可指示組成物可用於治療其他病變。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。

【0347】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。

【0348】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、字母或其他標記的形式，或帶有日曆插入物，其表示治療計劃中可投予劑量的天數。

【0349】根據一個實施例，套組可包含 (a) 其中容納 Ab-CIDE 的第一容器；及視情況存在的 (b) 其中容納有第二藥物製劑的第二容器，其中第二藥物

製劑包含具有抗過度增殖活性的第二化合物。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 (BWF)、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。

【0350】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

合成路線

【0351】本文所述之主題亦涉及由 L1-CIDE 製備 CIDE、L1-CIDE 和 Ab-CIDE 的方法。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/缺失和融合物與 L1-CIDE 在其中抗體共價結合至 L1-CIDE 上任何可用的接附點的條件下接觸，其中製備 Ab-CIDE。本文所述之主題亦涉及共價接附至 L1 的 Ab-L1 部分（亦即抗體或其變異體、突變、剪接變異體、插入/缺失和融合物）製備 Ab-CIDE 的方法，該等方法包含使 CIDE 與 Ab-L1 在其中 CIDE 共價結合至 Ab-L1 上任何可用的接附點的條件下接觸，其中製備 Ab-CIDE。該方法可進一步包含 Ab-CIDE 之常規分離和純化。

【0352】 CIDE、L1-CIDE 和 Ab-CIDE 及本文所述之其他化合物可藉由以下合成路線合成，該等合成路線包括與化學領域中所熟知的那些方法類似的合成路線，特別是根據本文所包含的描述，以及下列文獻中所述的用於其他雜環的那些合成路線：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）。

【0353】 可用於合成 CIDE、L1-CIDE 和 Ab-CIDE 及本文所述之其他化合物以及必要的試劑和中間體的合成化學轉化和保護基團方法（保護和去保護）是本領域中已知的，且包括例如下列文獻中所述的哪些方法：R. Larock，Comprehensive Organic Transformations，VCH Publishers (1989)；T. W. Greene 及 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。

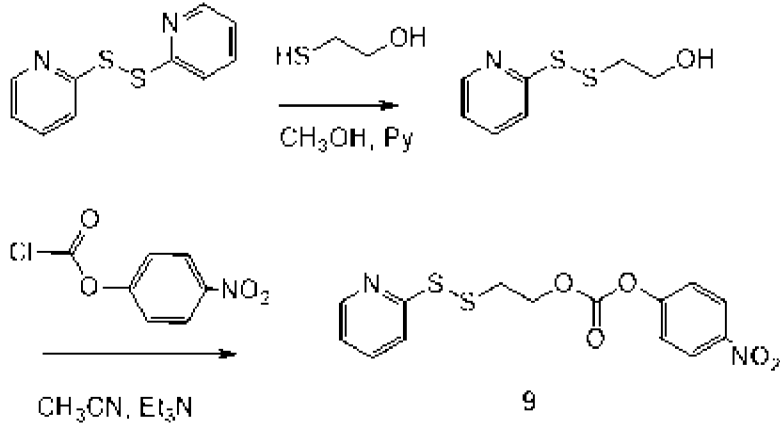
【0354】一般程序及實例提供了用於製備 CIDE、L1-CIDE 和 Ab-CIDE 及本文所述之其他化合物的例示性方法。本領域技術人員將理解，可使用其他合成路線來合成 Ab-CIDE 及化合物。儘管在方案、一般程序及實例中描述並討論了具體之起始材料和試劑，但是可容易替換其他起始材料和試劑以提供各種衍生物和/或反應條件。此外，根據本揭露，可使用本領域技術人員所熟知的常規化學方法進一步修飾藉由所述方法所製備的許多例示性化合物。

【0355】一般而言，Ab-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 連接子試劑連接以製備 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/缺失和融合物（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。

【0356】下列合成路線描述了製備 CIDE、L1-CIDE 和 Ab-CIDE 及其他化合物及其組分的例示性方法。本文其他地方揭露了用於製備 CIDE、L1-CIDE 和 Ab-CIDE 及其他化合物及其組分的其他合成路線。

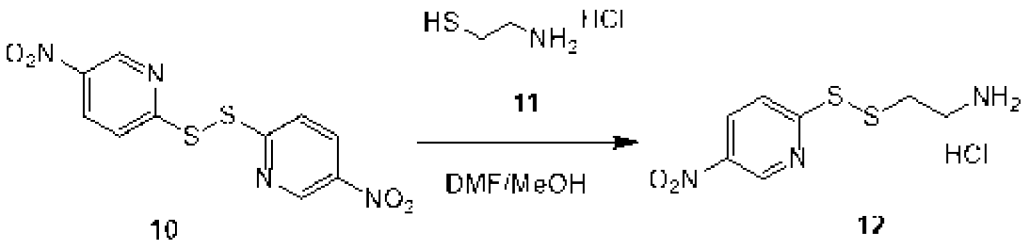
1. 連接子 L1

【0357】關於連接子 L1，方案 1-4 描述了例示性連接子 L1 經二硫鍵接附於抗體 Ab 的合成路線。Ab 通過二硫鍵連接至 L1，且 CIDE 通過 CIDE 上的任何可用的接附點連接至 L1。



方案 1

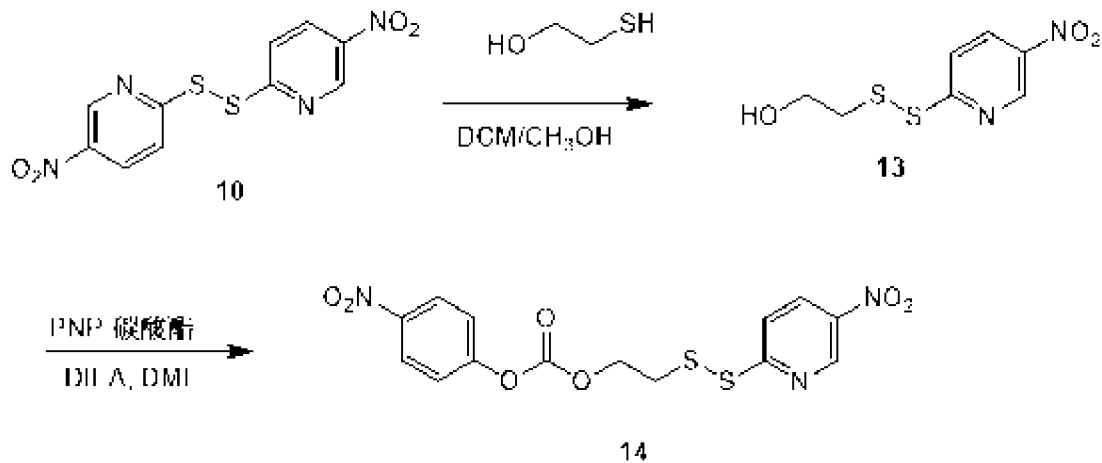
【0358】參照方案 1，使 1,2-二(吡啶-2-基)二硫烷與 2-巰基乙醇於室溫下在吡啶及甲醇中反應以得到 2-(吡啶-2-基二氫硫基)乙醇。三乙胺及乙腈中，用氯甲酸 4-硝基苯酯進行醯基化，以得到 4-硝基苯基 2-(吡啶-2-基二氫硫基)乙基碳酸酯 **9**。



方案 2

【0359】參照方案 2，向 1,2-雙(5-硝基吡啶-2-基)二硫烷 **10** (1.0 g, 3.22 mmol) 於 DMF/MeOH (25 mL/25 mL) 中之混合物中添加 HOAc (0.1 mL)，然後添加 2-胺基乙硫醇鹽酸鹽 **11** (183 mg, 1.61 mmol)。反應混合物於室溫下反應過夜後，將其在真空下濃縮以去除溶劑，並將殘餘物用 DCM (30 mL × 4) 洗滌，以得到淺黃色固體狀 2-((5-硝基吡啶-2-基)二氫硫基)乙胺鹽酸鹽 **12** (300 mg,

69.6%)。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.28 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 8.56 (dd, $J = 8.8, 2.4$ Hz, 1H), 8.24 (s, 4H), 8.03 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 3.15 - 3.13 (m, 2H), 3.08 - 3.06 (m, 2H)。

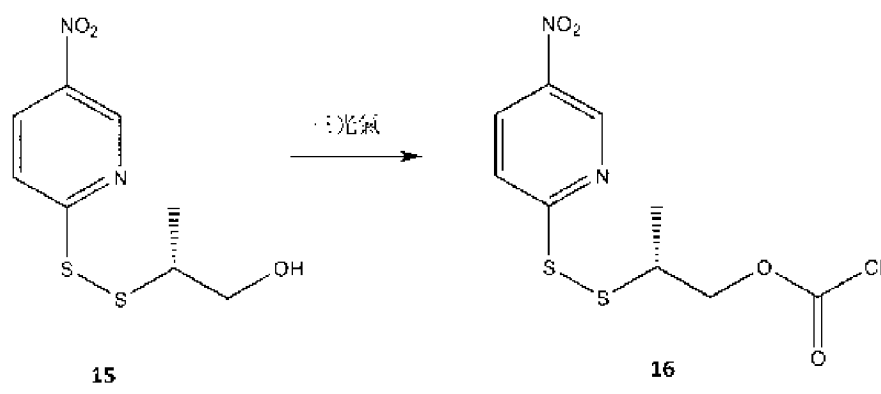


方案 3

【0360】 參照方案 3，將 1,2-雙(5-硝基吡啶-2-基)二硫烷 **10** (9.6 g, 30.97 mmol) 及 2-巰基乙醇 (1.21 g, 15.49 mmol) 於無水 DCM/CH₃OH (250 mL/250 mL) 中之溶液在 N₂ 下於室溫下攪拌 24 小時。將混合物於真空下濃縮後，將殘餘物用 DCM (300 mL) 稀釋。添加 MnO₂ (10 g)，並將混合物於室溫下再攪拌 0.5 小時。藉由矽膠管柱層析 (DCM/MeOH = 100/1 至 100/1) 純化混合物，以得到棕色油狀 2-((5-硝基吡啶-2-基)二氫硫基)乙醇 **13** (2.2 g, 61.1%)。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.33 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 8.38 - 8.35 (dd, $J = 9.2, 2.8$ Hz, 1H), 7.67 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 4.10 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 3.81 - 3.76 (q, 2H), 3.01 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H)。

【0361】 向 **13** (500 mg, 2.15 mmol) 於無水 DMF (10 mL) 中之溶液中添加 DIEA (834 mg, 6.45 mmol)，然後添加 PNP 碳酸酯 (雙(4-硝基苯基)碳酸酯，1.31 g, 4.31 mmol)。將反應溶液於室溫下攪拌 4 小時，並藉由製備型 HPLC (FA) 純化混合物，以得到淺棕色油狀 4-硝基苯基2-((5-硝基吡啶-2-基)二氫硫

基)乙基碳酸酯 **14** (270 mg, 33.1%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.30 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 8.43 - 8.40 (dd, J = 8.8, 2.4 Hz, 1H), 8.30 - 8.28 (m, 2H), 7.87 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.39 - 7.37 (m, 2H), 4.56 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.21 (t, J = 6.4 Hz, 2H)。



方案 4

【0362】 參照方案 4，在氬氣氣氛下，於 0°C（冰/丙酮）下將硫醯氯（2.35 mL，1.0 M 於 DCM 中之溶液，2.35 mmol）逐滴添加至 5-硝基吡啶-2-硫醇 (334 mg, 2.14 mmol) 於乾燥 DCM (7.5 mL) 中之攪拌懸浮液中。反應混合物由黃色懸浮液變為黃色溶液，使其升溫至室溫，然後攪拌 2 小時，之後藉由在真空中蒸發以去除溶劑，得到黃色固體。將固體重新溶於 DCM (15 mL) 中，並在氬氣氣氛下於 0°C 下用 (*R*)-2-巰基丙-1-醇 (213 mg, 2.31 mmol) 於乾燥 DCM (7.5 mL) 中之溶液逐滴處理。將反應混合物升溫至室溫，並攪拌 20 小時，然後藉由 LC/MS 分析，顯示形成保留時間為 1.41 分鐘的大量產物。(ES+) m/z 247 ($[M+H]^+$ ，相對強度約 100%)。藉由過濾去除沉澱，並將濾液在真空中蒸發，以得到橙色固體，將其用 H₂O (20 mL) 處理，並用氫氧化銨溶液鹼化。將混合物用 DCM (3 × 25 mL) 萃取，並將合併之萃取物用 H₂O (20 mL)、鹽水 (20 mL) 洗滌，乾燥 (MgSO₄)，過濾，並在真空中中濃縮，以得到粗產物。藉由急速層析法（以 1% 之增量進行梯度洗脫：100% DCM 至 98:2 v/v DCM/MeOH）

純化，得到油狀 (R)-2-((5-硝基吡啶-2-基)二氫硫基)丙-1-醇 **15** (111 mg，產率 21%)。

【0363】於 20 °C 下，向三光氣 ($\text{Cl}_3\text{COCOCCl}_3$ ，Sigma Aldrich，CAS 登記號 32315-10-9) (241 mg, 0.812 mmol) 於 DCM (10 mL) 中之溶液中逐滴添加 (R)-2-((5-硝基吡啶-2-基)二氫硫基)丙-1-醇 **15** (500 mg, 2.03 mmol) 及吡啶 (153 mg, 1.93 mmol) 於 DCM (10 mL) 中之溶液。在反應混合物於 20 °C 下攪拌 30 分鐘後，將其濃縮，且 (R)-2-((5-硝基吡啶-2-基)二氫硫基)丙基氯甲酸酯 **16** 可直接使用而不經進一步純化，用於通過氯甲酸酯基團共價連接 CIDE 上之任何可用基團。

2. 經半胱胺酸工程化改造之抗體

【0364】關於用於藉由還原和再氧化來結合的經半胱胺酸工程化改造之抗體，它們一般可按照下列方法來製備。輕鏈胺基酸根據 Kabat 進行編號 (Kabat 等人，*Sequences of proteins of immunological interest* (1991)，第 5 版，US Dept of Health and Human Service，National Institutes of Health，Bethesda，MD)。重鏈胺基酸根據 EU 編號系統進行編號 (Edelman 等人 (1969) *Proc. Natl. Acad. of Sci.* 63(1):78-85)，但 Kabat 系統中指明的除外。使用單字母胺基酸縮寫。

【0365】在 CHO 細胞中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) 或經工程化改造之半胱胺酸由於細胞培養條件而發生麩胱甘肽化。照原樣，從 CHO 細胞中純化的 THIOMAB™ 抗體不能與 Cys 反應性連接子 L1-CIDE 中間體結合。藉由用還原劑，例如 DTT (Cleland 試劑，二硫蘇糖醇) 或 TCEP ((三(2-羧乙基)膦鹽酸

鹽；Getz 等人 (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80；Soltec Ventures，Beverly，MA）進行處理，然後用溫和的氧化劑（例如去氫抗壞血酸）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。藉由添加至少四倍體積的 10 mM 琥珀酸鈉 (pH 5) 緩衝劑來稀釋並酸化經還原之 THIOMAB™ 抗體。

【0366】可替代地，藉由添加至少四倍體積的 10 mM 琥珀酸鹽 (pH 5) 並用 10% 乙酸滴定直至 pH 為約 5，對抗體進行稀釋和酸化。隨後將 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。藉由再氧化，在親本 Mab 中存在的半胱胺酸殘基之間重建二硫鍵。將上述洗脫的經還原之 THIOMAB™ 抗體用 15X 去氫抗壞血酸 (DHAA) 處理約 3 小時，或者，用 200 nM 至 2 mM 硫酸銅 (CuSO₄) 水溶液於室溫下處理過夜。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 柱監測再氧化。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 達到約 5，並如上所述在 S 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）於

10 mM 琥珀酸鹽 (pH 5) (緩衝劑 A) 中的梯度進行洗脫。向洗脫的 Thiomab™ 抗體中添加 EDTA，使其最終濃度為 2 mM，並在必要時濃縮，以使最終濃度達到 5 mg/mL 以上。將準備好結合的所得 THIOMAB™ 抗體等分儲存於 -20°C 或 -80 下。在 6200 系列 TOF 或 QTOF Agilent LC/MS 上進行液相層析/質譜分析。樣品在加熱至 80°C 的 PRLP-S® 1000 A 微孔柱 (50 mm × 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：0.04% TFA 的乙腈溶液) 的線性梯度，並使用電噴霧離子源直接電離洗脫液。采集資料，並藉由 MassHunter 軟體 (Agilent) 進行去捲積。在 LC/MS 分析之前，將抗體或結合物 (50 微克) 用 PNGase F (2 單位/ml；PROzyme，San Leandro，CA) 於 37°C 下處理 2 小時以去除 N-連接的碳水化合物。

【0367】可替代地，將抗體或結合物用 LysC (每 50 µg (微克) 抗體或結合物 0.25 µg) 於 37°C 下部分消化 15 分鐘，以得到 Fab 和 Fc 片段，用於 LCMS 分析。對去捲積之 LCMS 譜圖中的峰進行分配和定量。藉由計算對應於 CIDE-結合抗體的一個或多個峰的強度相對於所有觀察到的峰的比率來計算 CIDE 與抗體比 (CAR)。

3. 連接子 L1-CIDE 基團與抗體之結合

【0368】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，馬來醯亞胺或 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 DMF、DMA 或丙二醇中，並添加至經還原、再氧化和 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。可替代地，可使用透析法。使用凝膠過濾或透析法，將 THIOMAB™ 抗體 CIDE 結合物用含 240 mM 蔗糖的 20 mM 組胺酸/醋酸鹽 (pH 5) 配製。藉由離心超濾法濃縮純化的結合物，並在無菌條件下通過 0.2- μ m 過濾器過濾，然後冷凍儲存。藉由 BCA 測定法表徵 Ab-CIDE 以測定蛋白質濃度，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) 處理後進行 LC-MS 分析以計算 CAR。

【0369】 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洗脫峰面積進行積分（280 nm 下之吸光度）來確定。

【0370】 可使用 Agilent QTOF 6520 ESI 儀器對 Ab-CIDE 進行 LC-MS 分析。例如，於 37°C 下，將 CAR 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。

一般合成方法

【0371】製備具有化學結構 Ab—(L1—D)_p 的結合物的一般方法如下所述。

1.1 用於將 L2 偶合至 E3LB 以製備 E3LB-L2 中間體的一般合成方法

【0372】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。

【0373】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。

【0374】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。

【0375】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。

1.2 用於將 E3LB-L2 中間體偶合至 PB 以製備 CIDE 的一般合成方法

【0376】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。

【0377】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。

【0378】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。

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

【0379】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。

【0380】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。

1.4 用於將 L1-CIDE 偶合至抗體的一般合成方法

【0381】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，

【0382】 在某些實施例中，硫醇為馬來醯亞胺或 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。

【0383】 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。

【0384】 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。

【0385】 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。

【0386】 在上述方法的某些實施例中，鹼選自由 *N,N*-二異丙基乙胺 (DIEA)、三乙胺及 2,2,2,6,6-四甲基哌啶所組成之群組。在某些實施例中，偶合試劑選自由以下所組成之群組：1-[雙(二甲胺基)亞甲基]-1*H*-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-基氧基)三(二甲胺基)六氟磷酸鎘 (BOP)、(7-氮雜苯并三唑-1-基氧基)三吡咯啶基六氟磷酸鎘 (PyAOP)、*O*-(苯并三唑-1-基)-*N,N,N'*,*N'*-四甲基六氟磷酸脲 (HBTU)、*O*-(苯并三唑-1-基)-*N,N,N'*,*N'*-四甲基四氟硼酸脲 (TBTU)、*O*-(6-氮雜苯并三唑-1-基)-*N,N,N'*,*N'*-四甲基六氟磷酸脲 (HCTU)、*O*-(*N*-琥珀醯亞胺基)-1,1,3,3-四甲基-四氟硼酸脲 (TSTU)、*O*-(5-降莖烯-2,3-二甲醯亞胺基)-*N,N,N'*,*N'*-四甲基四氟硼酸脲

(TNTU)、O-(1,2-二氫-2-側氧基-1-吡啶基-N,N,N',N'-四甲基四氟硼酸脲 (TPTU) 及羰基二咪唑 (CDI)。

【0387】 在一個較佳之實施例中，溶劑為二甲基甲醯胺，鹼為 *N,N*-二異丙基乙胺，且偶合試劑為 HATU。

【0388】 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。

【0389】 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。

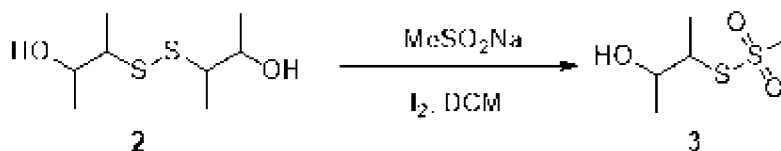
【0390】 以下實例以說明而非限制性方式提供。

實例

【0391】 除非另有說明，否則所有化合物皆為烯烴異構物之混合物（約 1:1）。括號中列出的 ¹³C 共振代表特定化合物之主要異構物的烯烴異構物及/或替代的 *N*-Me 醯胺鍵旋轉異構體。

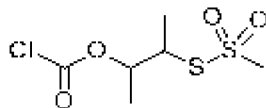
合成實例 1

L1-CIDE-BRM1-1 之合成



【0394】 向 23°C 之 3,3'-二硫烷二基雙(丁-2-醇) (1.97 g、9.36 mmol) 於無水二氯甲烷 (50 mL) 中之溶液中添加甲磺酸亞硫酸鈉 (1.91 g, 18.7 mmol) 及碘 (2.38 g, 9.36 mmol)。將反應混合物於 23°C 下在暗處攪拌 1 天，然後過濾。濃縮濾液，並藉由矽膠層析法純化殘餘物（用含 0 至 5% MeOH 的 DCM 洗脫），以得到淺黃色油狀 S-(3-羥基丁-2-基)甲磺硫代磺醯酯 (1.20 g, 70%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.13-4.11 和 3.96-3.93 (m, 1 H)，3.77-3.73 和 3.51-3.47 (m, 1 H)，3.42 和 3.39 (s, 3 H)，2.04 和 1.96 (brs, 1 H)，1.53 和 1.42 (d, J = 7.2 Hz, 3 H)，1.33 和 1.23 (d, J = 6.0 Hz, 3 H)。

S-(3-((氯羰基)氧基)丁-2-基)甲磺硫代磺醯酯之合成。

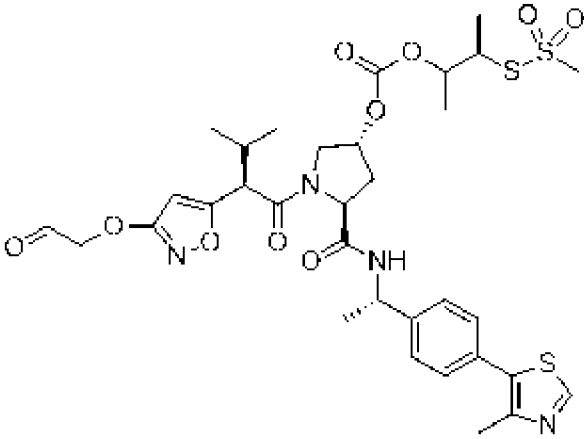


【0395】 於 23°C 下，向 S-(3-羥基丁-2-基)甲磺硫代磺醯酯 (300 mg, 1.63 mmol) 及吡啶 (516 mg, 6.51 mmol) 於二氯甲烷 (2 mL) 中之溶液中添加三光氣 (242 mg, 0.81 mmol) 於二氯甲烷 (2 mL) 中之溶液。將反應於 23°C 下攪拌 30 分鐘。將反應混合物濃縮至乾，以得到黃色油狀標題化合物 (380 mg, 95%)，其直接用於下一步驟。

S-(3-((((3R,5S)-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-甲基噁-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-3-基)氧基)羰基)氧基)丁-2-基)甲磺硫代磺醯酯

【0396】於 23°C 下，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-甲基噁-5-基)苯基)乙基)吡咯啉-2-甲醯胺 [上述實例 1 方案中之化合物 **1**；有關製備方法，參見 US 2020/0038378 第 293-294 頁（頁眉編號）。](300 mg, 0.49 mmol) 及 4 Å MS (100 mg) 於無水二氯甲烷 (5 mL) 中之混合物（於 23°C 下）中緩慢添加三乙胺 (198 mg, 1.95 mmol) 及 *S*-(3-((羧基)氧基)丁-2-基)甲烷硫代磺醯酯 (362 mg, 1.46 mmol) 於無水二氯甲烷 (2 mL) 中之溶液。將混合物於 23°C 下攪拌 16 小時，然後在減壓下濃縮。藉由矽膠急速層析法（於石油醚中之 0 - 70% 乙酸乙酯）純化殘餘物，以得到白色固體狀標題化合物 (120 mg, 30%)。LCMS (ESI) m/z : 825.3 [M+H]⁺。

S-(3-((((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-甲基噁-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-3-基)氧基)羧基)氧基)丁-2-基)甲烷硫代磺醯酯之合成

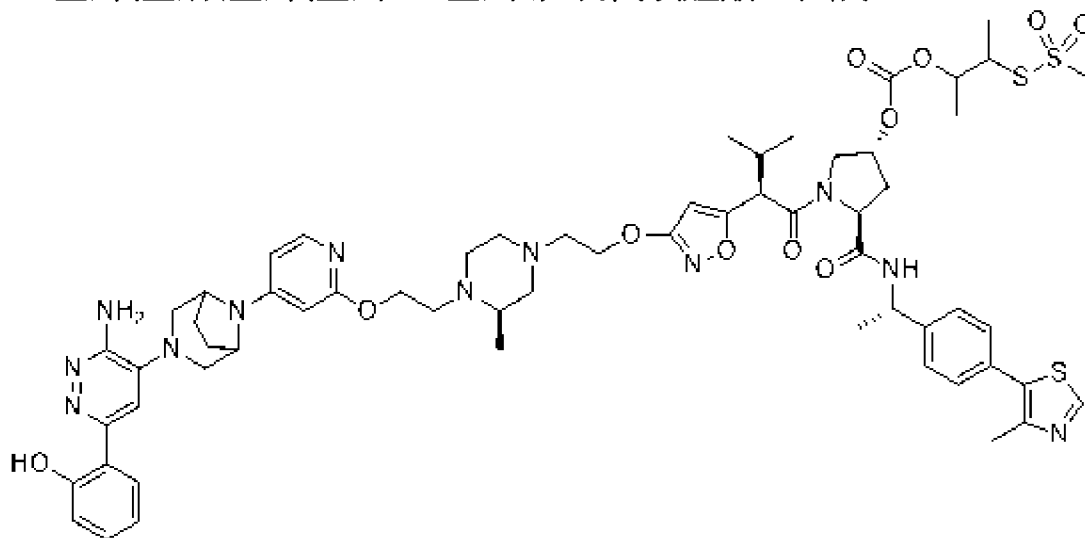


【0397】於 23°C 下，向 *S*-(3-((((3*R*,5*S*)-1-((*R*)-2-(3-(2,2-二乙氧基乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-5-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噁-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-3-基)氧基)羧基)氧基)丁-2-基)甲烷硫代磺醯酯 (120 mg, 0.15 mmol) 之溶液中添加甲酸 (2 mL, 2 mmol) 於水 (1 mL) 中之溶液。將混合物於 50°C 下攪拌 1

小時，然後濃縮，以得到黃色油狀標題化合物 (105 mg, 96%)。LCMS (ESI)

 $m/z : 751.2 \text{ [M+H]}^+$ ○

S-(3-((((3*R*,5*S*)-1-((2*R*)-2-(3-(2-((3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-氨基-6-(2-羟基苯基)嗒吡-4-基)-3,8-二氮杂二环[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌啶-1-基)乙氧基)异噁唑-5-基)-3-甲基丁酰基)-5-(((*S*)-1-(4-(4-甲基唑-5-基)苯基)乙基)胺甲酰基)吡咯啶-3-基)氧基)羧基)氧基)丁-2-基)甲烷硫代磺酰酯之合成



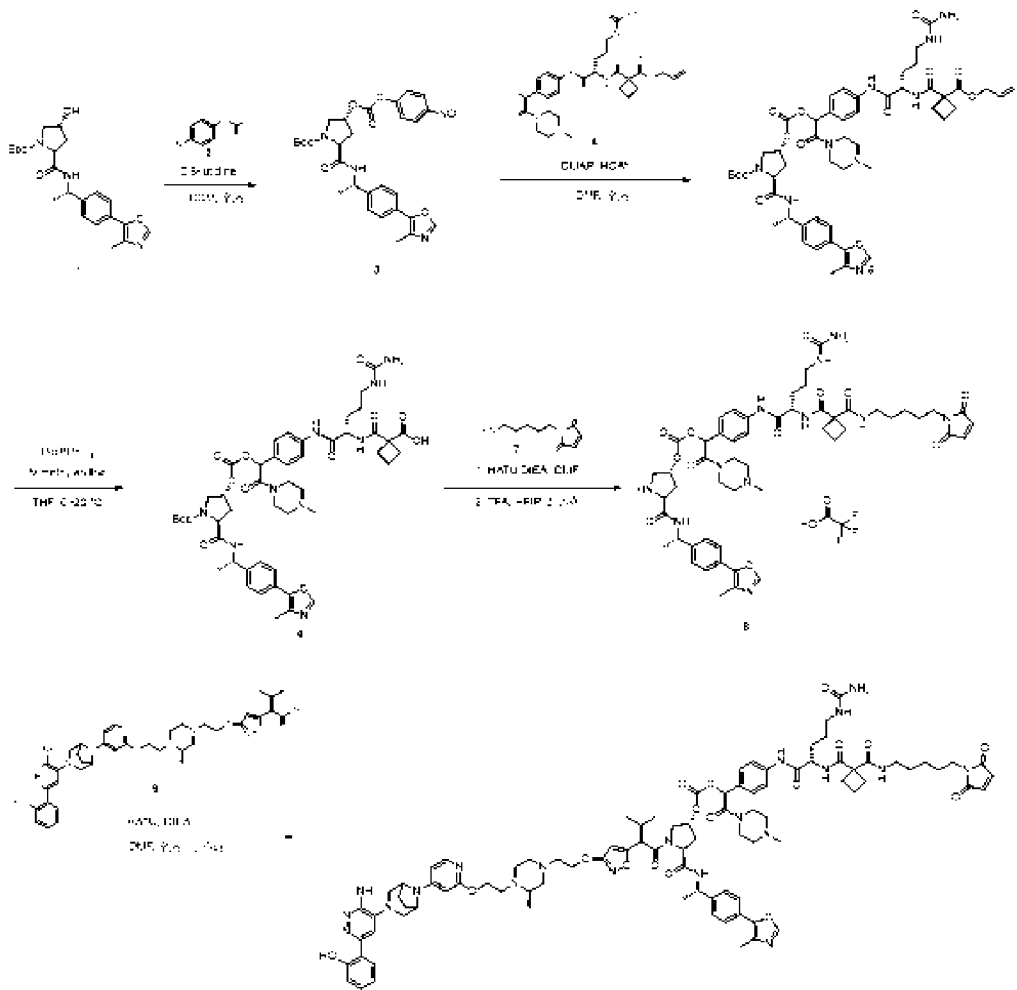
【0398】 向 23°C 之 *S*-(3-((((3*R*,5*S*)-1-((*R*)-3-甲基-2-(3-(2-側氧乙氧基)異噁唑-5-基)丁醯基)-5-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噁-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-3-基)氧基)羰基)氧基)丁-2-基)甲烷硫代磺醯酯 (105 mg, 0.14 mmol) 及 2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-2-甲基哌啶-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒啶-3-基)苯酚 [上述實例 1 方案中之化合物 **3**。它是下面實例 4 方案中之化合物 **4**。](73 mg, 0.14 mmol) 及 HOAc (0.2-0.3 mL) 於二氯甲烷 (2 mL) 及甲醇 (2 mL) 中之溶液中添加 NaBH(OAc)₃ (593 mg, 2.80 mmol)。將反應混合物於 23°C 下攪拌 3 小時，然後濃縮。藉由製備型 TLC (於二氯甲烷中之 8% 甲醇) 純化殘餘物，以得到白色固體狀標題化合物 (48 mg, 27%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 14.21 - 14.08 (m, 1H), 9.01 - 8.97 (m, 1H), 8.59 - 8.46 (m, 1H), 7.92 (d, *J* =

4.8 Hz, 1H), 7.79 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 7.55 - 7.33 (m, 5H), 7.28 - 7.19 (m, 1H), 6.96 - 6.79 (m, 2H), 6.60 - 6.48 (m, 1H), 6.18 - 6.08 (m, 2H), 6.05 - 5.91 (m, 2H), 5.24 - 5.11 (m, 1H), 4.99 - 4.86 (m, 2H), 4.57 - 4.44 (m, 2H), 4.43 - 4.35 (m, 1H), 4.31 - 4.17 (m, 4H), 3.94 - 3.79 (m, 2H), 3.77 - 3.67 (m, 2H), 3.61 - 3.51 (m, 2H), 3.29 - 3.23 (m, 4H), 3.21 - 3.14 (m, 3H), 3.04 - 2.93 (m, 3H), 2.87 - 2.78 (m, 1H), 2.64 - 2.58 (m, 3H), 2.48 - 2.41 (m, 3H), 2.38 - 2.31 (m, 2H), 2.20 - 2.16 (m, 2H), 2.07 - 1.82 (m, 2H), 1.49 - 1.21 (m, 10H), 1.06 - 0.90 (m, 6H), 0.88 - 0.76 (m, 3H) ; LCMS (ESI) m/z : 1251.0 $[M+H]^+$.

合成實例 2

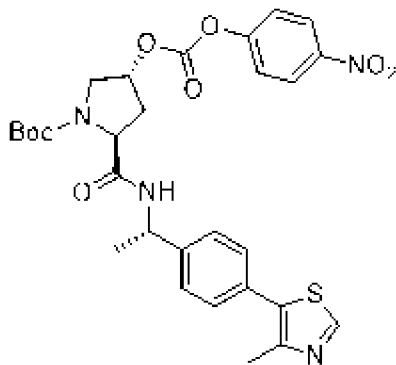
L1-CIDE-BRM1-2 之合成

【0399】 L1-CIDE-BRM1-2 藉由下列方案（方案 2）合成：



方案 2

(2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)-4-(((4-硝基苯氧基)羰基)氧基)吡咯啉-1-羧酸三級丁酯之合成

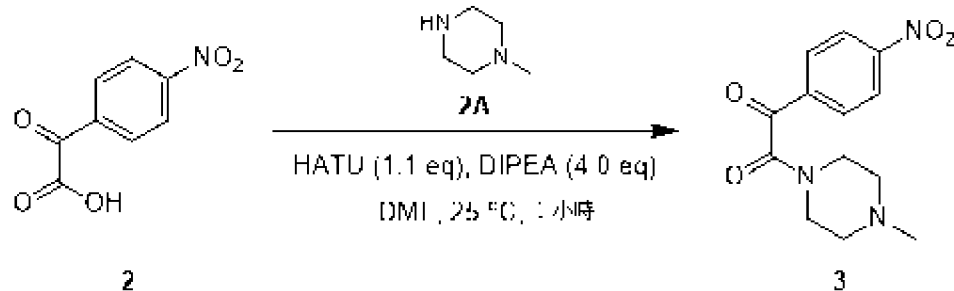


【0400】於 23℃ 下，向氯甲酸4-硝基苯酯 (1.68 g, 8.34 mmol) 及 (2*S*,4*R*)-三級丁基-4-羥基-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-甲酸酯 (參見上述實例方案 2 中之化合物 1；有關製備方法，參見 J. Med. Chem. 2019，62，941 或 J. Med. Chem. 2014，57，8657) (3.0 g, 6.95 mmol) 於無水二氯甲烷 (80 mL) 中之混合物中添加 2,6-二甲吡啶 (1.12 g, 10.4 mmol)。將反應混合物於 23℃ 下攪拌 18 小時，然後濃縮，以得到黃色固體狀標題化合物 (4.0 g, 99%)。將該材料直接用於下一步驟。LCMS (ESI) m/z ：597.2 [M+H]⁺。

化合物 4，方案 2：經由方案 2a 合成 1-(((2*S*)-1-((4-(1-羥基-2-(4-甲基哌啶-1-基)-2-側氧乙基)苯基)胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷甲酸烯丙酯。

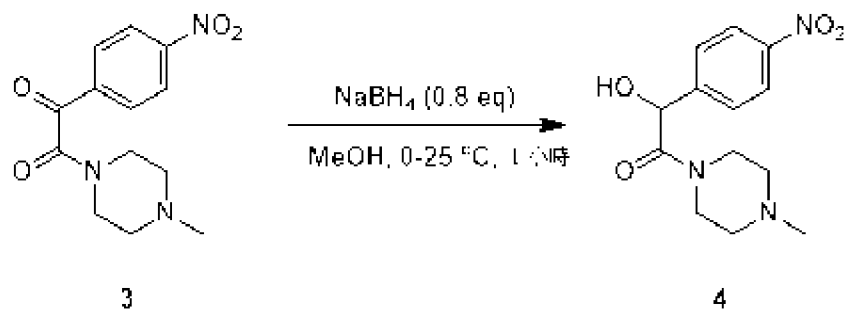
【0401】 平行進行四次單獨的反應。於 23°C 下向化合物 1 (200 g, 1.21 mol) 於吡啶 (3.00 L) 中之溶液中添加 SeO₂ (336 g, 3.03 mol)。然後將混合物在油浴中於 95°C 下加熱 1 小時。合併四個反應以進行檢查。於 45-50°C 下過濾合併之反應，然後將濾液冷卻至 23°C，並於該溫度下保持 1.5 小時。過濾混合物，並將濾餅在真空中乾燥，以得到化合物 2。在減壓下將濾液濃縮至 5.00 L，並於 23°C 下攪拌 12 小時。過濾混合物，並將濾餅在真空中乾燥，以得到額外之黃色固體狀化合物 2 (兩批合併重量 = 830 g，產率 88%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8.63-8.64 (m, 2H), 8.37-8.40 (m, 2H), 8.17-8.19 (m, 2H), 7.90-7.94 (m, 1H), 7.48-7.52 (m, 2H)。

ii. 製備方案 2a 之化合物 3 的一般程序



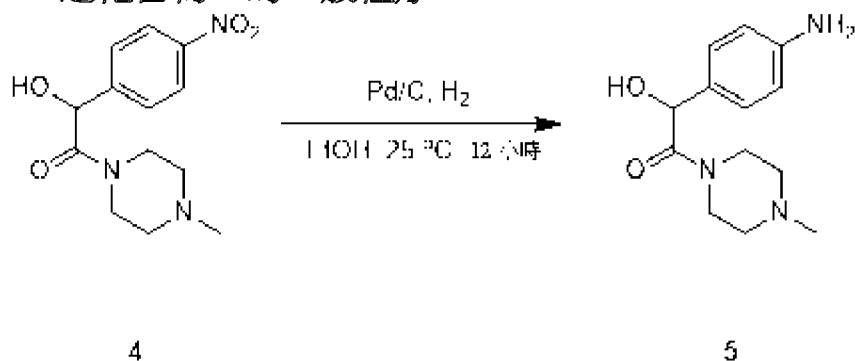
【0402】 平行進行兩次反應。向 23°C 之化合物 2 (140 g, 538 mmol) 於 DMF (700 mL) 中之溶液中添加化合物 2A (54 g, 538 mmol)、HATU (225 g, 592 mmol) 及 DIPEA (278 g, 2.15 mol)。將混合物於 23°C 下攪拌 1 小時。然後合併兩個反應以進行檢查。將合併之反應混合物用 DCM (3.00 L) 稀釋，並用鹽水 (1.00 L $\times$ 3) 洗滌。有機層經 Na₂SO₄ 乾燥，過濾並在減壓下濃縮。藉由管柱層析法 (SiO₂，石油醚/乙酸乙酯 = 50/1 至 0/1) 純化殘餘物，以得到黃色固體狀化合物 3 (200 g，產率 67%)。

iii. 製備方案 2a 之化合物 4 的一般程序



【0403】於 0°C 下向化合物 **3** (184 g, 531 mmol) 於 MeOH (1.30 L) 中之溶液中添加 NaBH₄ (16.1 g, 425 mmol)。將混合物升溫至 23°C，並於該溫度下攪拌 1 小時。在減壓下濃縮反應混合物，並將殘餘物用水稀釋，用 HCl (1 M) 調節至 pH = 7，並用 EtOAc (1.00 L × 3) 萃取。合併之有機層經 Na₂SO₄ 乾燥，過濾並在減壓下濃縮。藉由管柱層析法 (SiO₂，二氯甲烷/甲醇 = 100/1 至 10/1) 純化殘餘物。於 23°C 下，將粗產物用 EtOH (500 mL) 研磨 10 分鐘，以得到黃色固體狀化合物 **4** (161 g，產率 54%)。¹H NMR: (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.24 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.64 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.14 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 5.60 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 3.57-3.47 (m, 2H), 3.43 (s, 2H), 2.23 (s, 2H), 2.12 (s, 5H)。

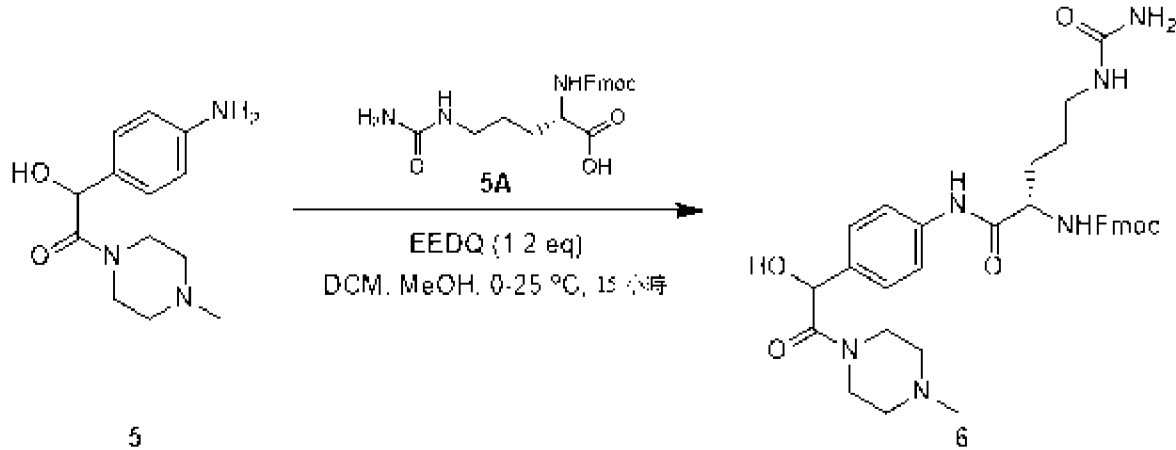
iv. 製備方案 2a 之化合物 5 的一般程序



【0404】平行進行四次反應。在 N₂ 氣氛下，向化合物 **4** (40 g, 143 mmol) 於 EtOH (600 mL) 中之溶液中添加 Pd/C (8.50 g, 10%)。將懸浮液脫氣，並用 H₂ 吹掃 3 次。將混合物於 23°C 下在 H₂ (15 psi) 下攪拌 12 小時。然後合併四個反應以進行檢查。過濾合併之反應混合物，並將濾餅用 MeOH (1.00 L) 洗滌。將

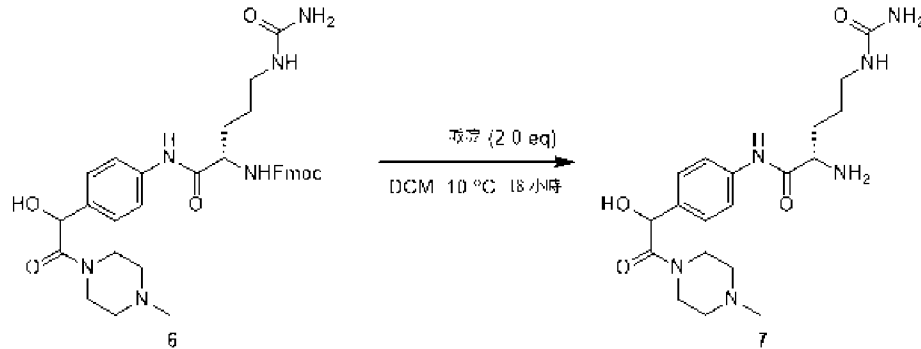
合併之濾液及洗滌液在減壓下濃縮，以得到黃色固體狀化合物 **5** (140 g，產率 98%)。¹H NMR: (400 MHz, CD₃OD): δ 7.11 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.72 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 5.29 (s, 1H), 3.74 (s, 1H), 3.62-3.49 (m, 1H), 3.47-3.35 (m, 2H), 2.48 (s, 1H), 2.35-2.25 (m, 2H), 2.22 (s, 3H), 1.90 (s, 1H)。

v. 製備方案 2a 之化合物 6 的一般程序



【0405】於 0°C 下，向 Fmoc-L-瓜胺酸（化合物 **5A**）(95 g, 239 mmol) 及化合物 **5** (72 g, 287 mmol) 於 MeOH (350 mL) 及 DCM (700 mL) 中之溶液中添加一份 EEDQ (71 g, 287 mmol)。將混合物升溫至 23°C，並在 N₂ 下於該溫度下攪拌 15 小時。將反應混合物在減壓下濃縮。於 15°C 下，將粗產物用 MTBE (1.00 L) 研磨 2 小時，以得到橙色固體狀化合物 **6** (185 g，粗品)。

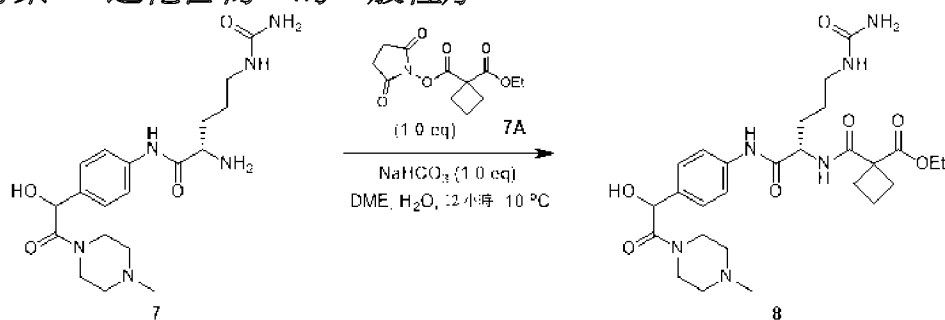
vi. 製備方案 2a 之化合物 7 的一般程序



【0406】於 10°C 下，向化合物 **6** (190 g, 302 mmol) 在 DCM (1.40 L) 綜合那個之攪拌溶液中添加哌啶 (52 g, 604 mmol)。將混合物於 10°C 下攪拌 18 小

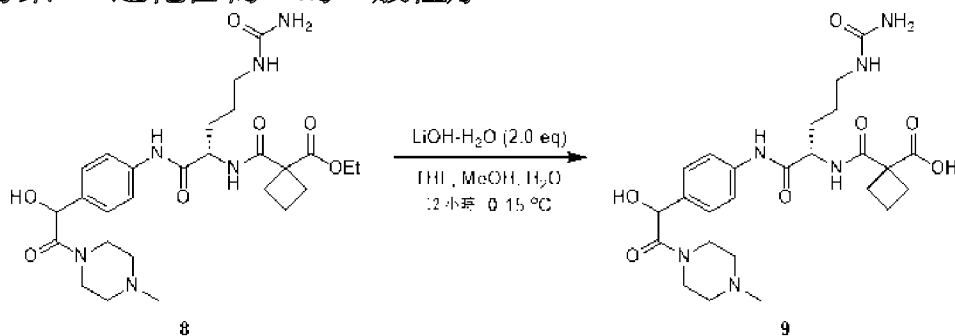
時，然後在減壓下濃縮。藉由管柱層析法（ SiO_2 ，二氯甲烷/甲醇 = 100/1 至 3/1）純化殘餘物，以得到黃色油狀化合物 **7**（85 g，產率 68%）。 ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 7.65 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.37 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 5.43 (s, 1H), 3.68 (s, 1H), 3.62 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 3.53-3.44 (m, 2H), 3.24-3.06 (m, 2H), 2.81 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 2.45 (s, 1H), 2.36-2.25 (m, 2H), 2.22 (s, 3H), 1.97 (s, 1H), 1.86-1.75 (m, 1H), 1.68-1.54 (m, 6H)。

vii. 製備方案 2a 之化合物 **8** 的一般程序



【0407】向 10°C 之化合物 **7** (76 g, 187 mmol) 於 DME (470 mL) 及 H_2O (290 mL) 中之溶液中添加化合物 **7A** (63 g, 234 mmol) 及 NaHCO_3 (20 g, 234 mmol)。將混合物於 10°C 下攪拌 12 小時，然後在減壓下濃縮。藉由管柱層析法（ SiO_2 ，二氯甲烷/甲醇 = 10/1 至 3/1）純化殘餘物，以得到黃色固體狀化合物 **8**（92 g，產率 70%）。

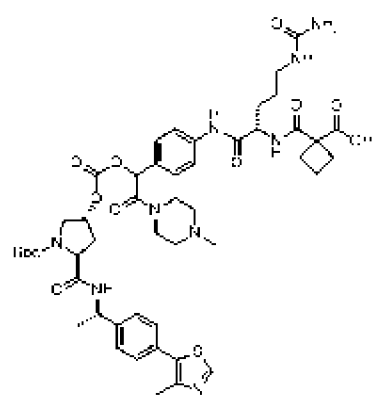
viii. 製備方案 2a 之化合物 **9** 的一般程序



【0408】於 0°C 下向化合物 **8** (63 g, 112 mmol) 於 THF (190 mL) 及 MeOH (95 mL) 中之攪拌溶液中添加 $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (9.43 g, 225 mmol) 在 H_2O (190 mL) 中

(m, 6H), 2.75-2.49 (m, 4H), 2.22-2.08 (m, 1H), 2.06-1.87 (m, 2H), 1.81-1.72 (m, 1H), 1.70-1.52 (m, 2H) 。 LCMS : (M+H⁺ = 573.3)

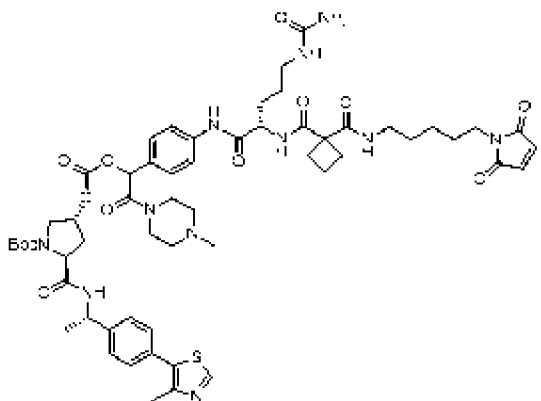
化合物 6，方案 2：1-(((2*S*)-1-((4-(1-(((3*R*,5*S*)-1-(三級丁氧羰基)-5-(((*S*)-1-(4-(4-甲基唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-3-基)氧基)羰基)氧基)-2-(4-甲基哌啶-1-基)-2-側氧乙基)苯基)胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷羧酸之合成



【0410】 於 23℃ 下向 (2*S*,4*R*)-4-(((1-(4-(((*S*)-2-(1-((烯丙基氧基)羰基)環丁烷甲醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苯基)-2-(4-甲基哌啶-1-基)-2-側氧乙氧基)羰基)氧基)-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-羧酸三級丁酯 (76 mg, 0.07 mmol) 及 1,3-二甲基嘧啶-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-三酮 (58 mg, 0.37 mmol) 於二氯甲烷 (5 mL) 及甲醇 (5 mL) 中之溶液中添加 Pd(PPh₃)₄ (17 mg, 0.01 mmol) 。將反應混合物於 23℃ 下在氮氣氣氛下攪拌 10 小時，然後濃縮。藉由製備型 HPLC 純化殘餘物，其中使用下列條件：管柱：Phenomenex Gemini-NX 80 × 30 mm × 3 μm，流動相：(25 - 45%) 水 (10 mM NH₄HCO₃)-ACN，以得到黃色固體狀標題化合物 (50 mg, 69%) 。 LCMS (ESI) *m/z* : 990.6 [M+H]⁺ 。

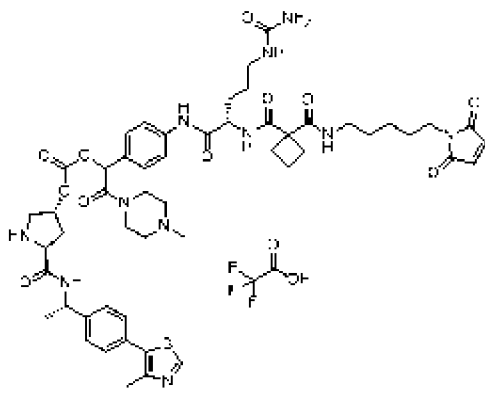
(2*S*,4*R*)-4-(((1-(4-(((*S*)-2-(1-((5-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)戊基)胺甲醯基)環丁烷甲醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苯基)-2-(4-甲基哌啶-1-基)-2-側氧乙氧基)

羰基)氧基)-2-(((S)-1-(4-(4-甲基唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-羧酸三級丁酯之合成



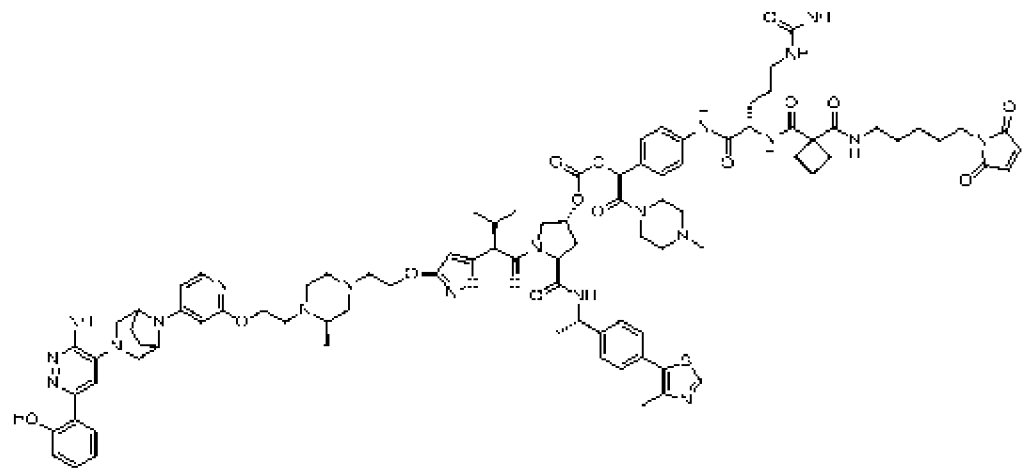
【0411】 於 23℃ 下，向 1-(((2S)-1-((4-(1-((((3R,5S)-1-(三級丁氧羰基)-5-(((S)-1-(4-(4-甲基唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-3-基)氧基)羰基)氧基)-2-(4-甲基哌啶-1-基)-2-側氧乙基)苯基)胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷羧酸 (69 mg, 0.07 mmol) 及 1-(5-胺基戊基)-1*H*-吡咯-2,5-二酮 (16 mg, 0.08 mmol) 於 DMF (8 mL) 中之混合物中添加 *N,N*-二異丙基乙胺 (0.03 mL, 0.21 mmol) 及 HATU (32 mg, 0.08 mmol)。將反應混合物於 23℃ 下攪拌 16 小時，然後濃縮。藉由製備型 HPLC (Boston Green ODS 150 × 30mm × 5 μm (25-45%) 水 (0.075% TFA)-ACN) 純化殘餘物，以得到白色固體狀標題化合物 (67 mg, 84%)。LCMS (ESI) *m/z*: 1155.6 [M+H]⁺。

化合物 7，方案 2：1-(4-((S)-2-(1-((5-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)戊基)胺甲醯基)環丁烷甲醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苯基)-2-(4-甲基哌啶-1-基)-2-側氧乙基((3*R*,5*S*)-5-(((S)-1-(4-(4-甲基唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-3-基)碳酸酯 2,2,2-三氟乙酸酯之合成



【0412】 將 (2*S*,4*R*)-4-(((1-(4-((*S*)-2-(1-((5-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)戊基)胺甲醯基)環丁烷甲醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苯基)-2-(4-甲基哌啶-1-基)-2-側氧乙氧基)羰基)氧基)-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-羧酸三級丁酯 (67.4 mg, 0.06 mmol) 於含 5% TFA 之 HFIP (2 mL, 0.06 mmol) 中之溶液於 23℃ 下攪拌 1.5 小時。然後濃縮反應混合物，以得到黃色油狀標題化合物 (62 mg, 99.9%)。LCMS (ESI) *m/z* : 1054.7 [M+H]⁺。

L1-CIDE-BRM1-2：(3*R*,5*S*)-1-((2*R*)-2-(3-(2-((3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-羥基苯基)嗒吡-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啉-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌啶-1-基)乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-5-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-3-基 (1-(4-((*S*)-2-(1-((5-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)戊基)胺甲醯基)環丁烷甲醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苯基)-2-(4-甲基哌啶-1-基)-2-側氧乙基)碳酸酯之合成

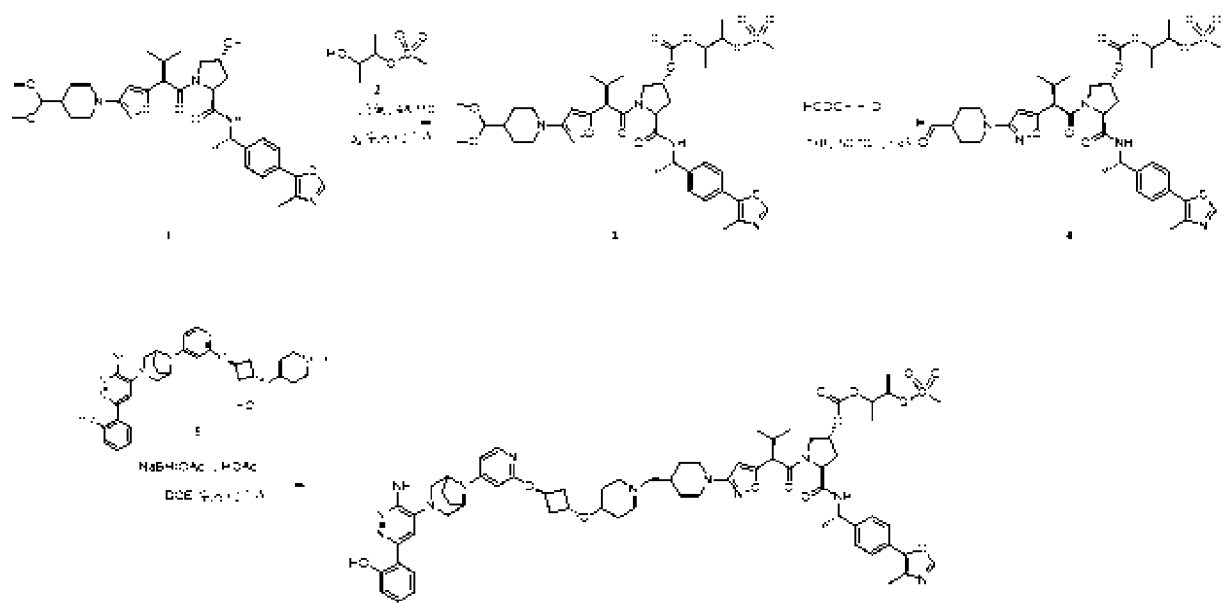


【0413】於 23℃ 下，向 1-(4-((*S*)-2-(1-((5-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)戊基)胺甲醯基)環丁烷甲醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苯基)-2-(4-甲基哌啶-1-基)-2-側氧乙基((3*R*,5*S*)-5-(((*S*)-1-(4-(4-甲基唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-3-基)碳酸酯 2,2,2-三氟乙酸酯 (62 mg, 0.06 mmol) 及 (2*R*)-2-(3-(2-((3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-羥基苯基)嗒咭-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌啶-1-基)乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁酸 (50 mg, 0.07 mmol) 於 DMF (2.5 mL) 中之混合物中添加 *N,N*-二異丙基乙胺 (0.03 mL, 0.18 mmol) 及 HATU (27 mg, 0.07 mmol)。將反應混合物於 23℃ 下攪拌 16 小時，然後濃縮。藉由製備型 HPLC 純化殘餘物，其中使用下列條件：管柱：Phenomenex Gemini-NX 80 × 30 mm × 3 μm；流動相：(26-46%) 水 (10 mM NH₄HCO₃)-ACN，以得到白色固體狀標題化合物 (44 mg, 42%)。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.88 - 8.83 (m, 1H), 7.80 - 7.75 (m, 1H), 7.75 - 7.65 (m, 3H), 7.49 - 7.32 (m, 7H), 7.25 - 7.19 (m, 1H), 6.93 - 6.84 (m, 2H), 6.76 (s, 1H), 6.75 - 6.71 (m, 1H), 6.57 - 6.54 (m, 1H), 6.29 - 6.19 (m, 2H), 5.25 - 5.21 (m, 1H), 4.98 - 4.93 (m, 2H), 4.64 - 4.62 (m, 2H), 4.51 (s, 3H), 4.41 - 4.27 (m, 3H), 4.23 - 4.08 (m, 1H), 4.01 - 3.89 (m, 1H), 3.79 - 3.54 (m, 4H), 3.48 - 3.40 (m, 2H), 3.27 - 3.16 (m, 4H), 3.15 - 3.03 (m, 4H), 2.97 - 2.85 (m, 2H), 2.83 - 2.69 (m, 4H), 2.61 - 2.51 (m, 3H), 2.50 - 2.33 (m, 8H), 2.29 - 2.17 (m, 6H), 2.14 - 2.11 (m, 3H), 1.93 (s, 4H), 1.75 (s, 1H), 1.62 - 1.45 (m, 9H), 1.35 - 1.23 (m, 4H), 1.16 - 1.10 (m, 3H), 1.09 - 0.92 (m, 3H), 0.92 - 0.80 (m, 3H)；LCMS (ESI) *m/z*：1764.8 [M+H]⁺。

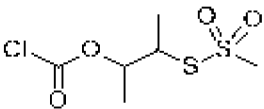
合成實例 3

L1-CIDE-BRM1-3 之合成

L1-CIDE-BRM1-3 藉由下列方案（方案 3）合成：

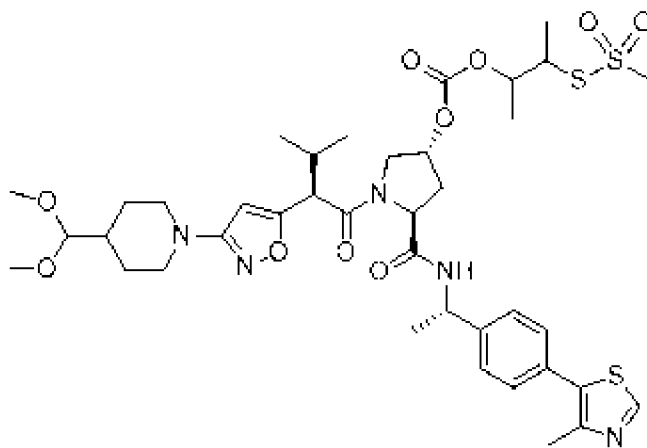


S-(3-((羰基)氧基)丁-2-基)甲烷硫代磺醯酯之合成



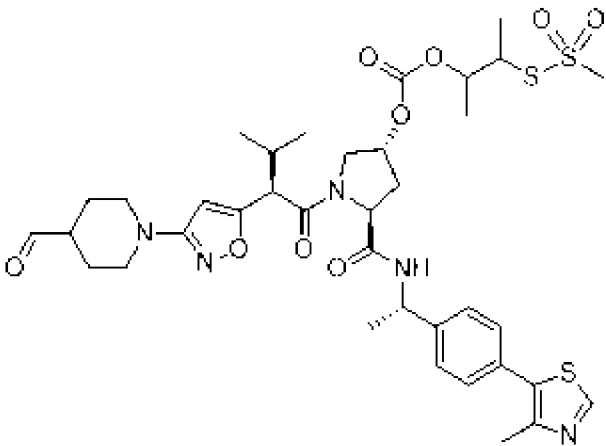
【0414】 於 23℃ 下，向 S-(3-羟基丁-2-基)甲烷硫代磺醯酯 (300 mg, 1.63 mmol) 於二氯甲烷 (2 mL) 及吡啶 (516 mg, 6.51 mmol) 中之溶液中添加三光氣 (242 mg, 0.81 mmol) 於二氯甲烷 (2 mL) 中之溶液。將反應於 23℃ 下攪拌 30 min，然後濃縮至乾，以得到黃色油狀標題化合物 (380 mg, 95%)。將該材料直接用於下一步驟。

S-(3-((((3R,5S)-1-((R)-2-(3-(4-(二甲氧基甲基)哌啶-1-基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-5-(((S)-1-(4-(4-甲基噁-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-3-基)氧基)羰基)氧基)丁-2-基)甲烷硫代磺醯酯之合成



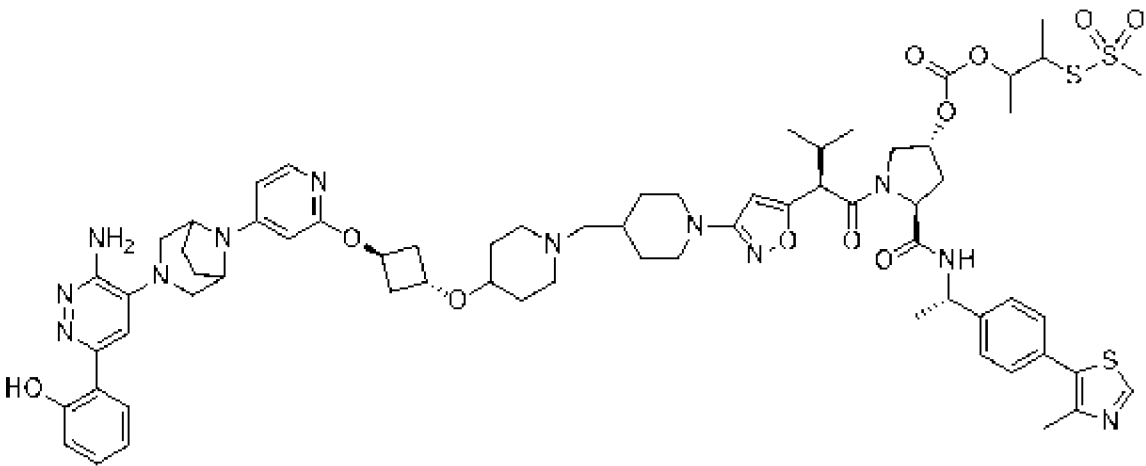
【0415】 向 23℃ 之 (2*S*,4*R*)-1-((*R*)-2-(3-(4-(二甲氧基甲基)哌啶-1-基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-4-羥基-*N*-((*S*)-1-(4-(4-甲基噁-5-基)苯基)乙基)吡咯啉-2-甲醯胺 (250 mg, 0.39 mmol) (參見上述方案 3 中之化合物 **1**；其製備方法描述於 US 2020/0038378 第451-452 頁，其全文以引用方式併入本文) 及 4 Å MS (50 mg) 於二氯甲烷 (2 mL) 中之混合物中添加吡啶 (0.09 mL, 1.17 mmol) 及 *S*-(3-((羧基)氧基)丁-2-基)甲烷硫代磺醯酯 (220 mg, 0.89 mmol) 於二氯甲烷 (1 mL) 中之溶液。將反應於 23℃ 下攪拌 30 分鐘，然後濃縮。藉由矽膠管柱急速層析法 (於乙酸乙酯中之 0-60% 二氯甲烷) 純化殘餘物，以得到白色固體狀標題化合物 **3** (130 mg, 39%)。LCMS (ESI) *m/z* : 850.3 [M+H]⁺。

***S*-(3-((((3*R*,5*S*)-1-((*R*)-2-(3-(4-甲醯基哌啶-1-基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-5-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噁-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-3-基)氧基)羧基)氧基)丁-2-基)甲烷硫代磺醯酯之合成**



【0416】 將 *S*-(3-((((((3*R*,5*S*)-1-((*R*)-2-(3-(4-(二甲氧基甲基)哌啶-1-基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-5-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噁-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-3-基)氧基)羧基)氧基)丁-2-基)甲烷硫代磺醯酯 (130 mg, 0.15 mmol) 於水 (1 mL) 及甲酸 (3 mL) 中之溶液於 50℃ 下攪拌2 小時。然後濃縮反應混合物，以得到黃色油狀標題化合物 (120 mg, 98%)。LCMS (ESI) *m/z*：804.3 [M+H]⁺。

L1-CIDE-BRM1-3：*S*-(3-((((((3*R*,5*S*)-1-((2*R*)-2-(3-(4-((4-(反式-3-((4-(3-(3-胺基-6-(2-羥基苯基)嗒啶-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-基)甲基)哌啶-1-基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-5-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噁-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-3-基)氧基)羧基)氧基)丁-2-基)甲烷硫代磺醯酯之合成



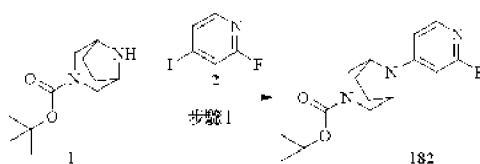
【0417】 向 23°C 之 *S*-(3-((((3*R*,5*S*)-1-((*R*)-2-(3-(4-甲醯基哌啶-1-基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-5-(((*S*)-1-(4-(4-甲基唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-3-基)氧基)羰基)氧基)丁-2-基)甲烷硫代磺醯酯 (120 mg, 0.15 mmol) 於二氯甲烷 (1 mL) 及甲醇 (1 mL) 中之溶液中添加 2-(6-胺基-5-(8-(2-(反式-3-(哌啶-4-基氧基)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒啶-3-基)苯酚鹽酸鹽 (參見上述方案 3 中之化合物 **5** ; 製備方法參見 US 2020/0038378 之第 306-307 頁 (頁眉編號)) (82 mg, 0.15 mmol) 、 HOAc (0.2 mL) 及三乙醯氧基硼氫化鈉 (317 mg, 1.49 mmol) 。將反應混合物於 23°C 下攪拌 3 小時，然後濃縮。藉由製備型 TLC (甲醇 : 二氯甲烷 = 1 : 10) 純化粗殘餘物，以得到白色固體狀標題化合物 (31 mg, 14%) 。 ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 14.13 (s, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.49 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.91 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.76 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 7.52 - 7.41 (m, 3H), 7.40 - 7.33 (m, 2H), 7.24 - 7.21 (m, 1H), 6.90 - 6.80 (m, 2H), 6.54 - 6.51 (m, 1H), 6.14 - 6.12 (m, 2H), 6.00 - 5.91 (m, 2H), 5.18 - 5.15 (m, 2H), 4.95 - 4.90 (m, 2H), 4.50 - 4.46 (m, 2H), 4.39 - 4.35 (m, 1H), 4.32 - 4.22 (m, 1H), 3.94 - 3.66 (m, 3H), 3.64 - 3.55 (m, 4H), 3.54 - 3.52 (m, 2H), 3.28 - 3.21 (m, 4H), 3.02 - 3.01 (m, 2H), 2.77 - 2.69 (m, 2H), 2.45 (s, 3H), 2.30 - 2.22 (m, 4H), 2.19 - 2.15 (m, 2H), 2.10 - 2.05 (m, 2H), 2.04 - 1.89 (m, 5H), 1.81 - 1.57 (m, 5H), 1.47 - 1.34 (m, 8H), 1.33 - 1.28 (m, 2H), 1.27 - 1.20 (m, 2H), 1.16 - 1.02 (m, 2H), 0.95 - 0.91 (m, 3H), 0.85 - 0.75 (m, 3H) ; LCMS (ESI) *m/z* : 1331.9 [M+H]⁺ 。

合成實例 4

L1-CIDE-BRM1-4 之合成

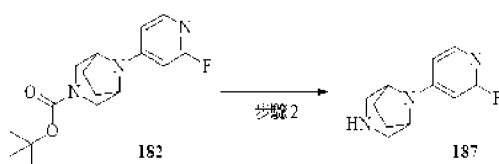
L1-CIDE-BRM1-4 藉由下列方案 (方案 4) 合成 :

步驟 1：182 之製備。



【0418】向包含 3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛烷-3-羧酸三級丁酯 (**1**) (37 g, 175 mmol)、三級丁醇鈉 (26 g, 265 mmol)、氟化鉀 (17 g, 284 mmol) 及 Xantphos (4.8 g, 8.2 mmol) 在 1,4-二噁烷 (750 mL) 中之磁力攪拌混合物的單頸 2 L 圓底燒瓶中，添加 2-氟-4-碘吡啶 (**2**) (52 g, 230 mmol)。將混合物用氮氣吹掃 15 分鐘，然後添加三(二亞苺基丙酮)二鈀(0) (3.7 g, 4.0 mmol)。反應燒瓶配備帶有氮氣入口的冷凝器，並置於預熱至 110°C 的油浴中。於 110°C 下在氮氣氣氛下攪拌 1.25 小時後，將所得棕/紅色懸浮液冷卻至 23°C，並通過矽藻土過濾。將濾餅用 Et₂O 洗滌，並將合併之濾液及洗滌液在減壓下濃縮為紅色油狀物 (127 g)。藉由急速層析法（使用 0-40% EtOAc/DCM）純化粗材料，以得到黃色泡沫固體狀 **182** (56 g，約 100%)。

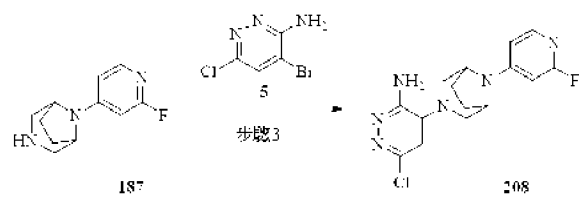
步驟 2：187 之製備。



【0419】於 23°C 下，在 50 分鐘內向單頸 2 L 圓底燒瓶中之 **182** (56 g，約 175 mmol) 於 MeCN (650 mL) 中之磁力攪拌溶液中添加 4 M HCl 於 1,4-二噁烷 (220 mL, 880 mmol) 中之溶液。將混合物於 23°C 下攪拌 1 小時，在此期間，該混合物變為黃色、橙色懸浮液。將反應混合物濃縮為黃色固體，並於 23°C 下將該材料用 Et₂O (1000 mL) 研磨 1 小時。過濾混合物，將收集之材料在減

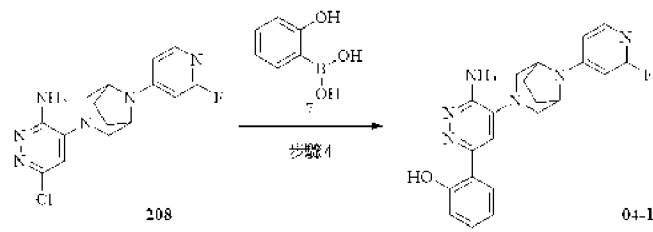
壓下乾燥，以得到黃色粉末狀 Tri-HCl 鹽 **187** (61 g)。將該鹽懸浮於 DCM (1000 mL) 中，並用飽和 NaHCO₃ 水溶液 (500 mL) 緩慢中和。分離各層，並將水相用 DCM (2 × 500 mL) 進一步萃取。將合併之有機相用 NaCl (250 mL) 洗滌，經無水 Na₂SO₄ 乾燥，過濾，並濃縮，以得到黃色固體狀 **187** 之游離鹼 (32 g, 86%)。注：確保 NaHCO₃ 溶液充分飽和，以避免水相中的產物損失。

步驟 3：208 之製備。



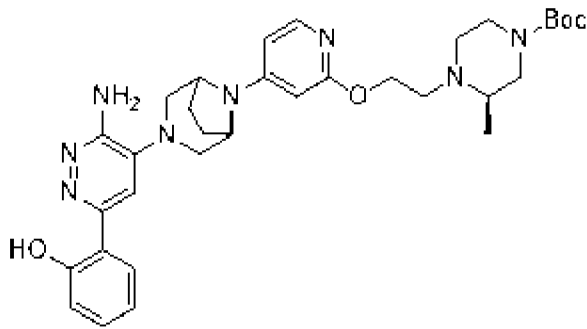
【0420】於 23°C 下，將 1,8-二氮雜二環[5.4.0]十一碳-7-烯 (**5**) (3.0 mL, 20 mmol) 添加至 1 L Erlenmeyer 燒瓶中 **187** (30 g, 145 mmol)、3-胺基-4-溴-6-氯嘧啶 (44 g, 209 mmol) 及 *N,N*-二異丙基乙胺 (80 mL, 460 mmol) 於無水 DMF (300 mL) 中之磁力攪拌溶液中。將該溶液平均分配至兩個 450 mL 可密封圓底燒瓶中，然後在設定為 100°C 的油浴中磁力攪拌 23 小時。將澄清的紅色反應混合物合併，並在高真空下濃縮為棕色殘餘物 (107 g)。藉由急速層析法（使用 0-5% MeOH/DCM）將殘餘物純化兩次，以得到 **208** 與一當量 *N,N*-二異丙基乙胺錯合之黃色固體 (20 g, 30%)。該錯合物包含 72 重量% 的 **208**（約 15 g **208**）。

步驟 4：04-1 之製備。



【0421】於 23°C 下，將 2-羥基苯基硼酸 (9.0 g, 65 mmol) 添加至單頸 2 L 圓底燒瓶中，該圓底燒瓶中包含 **208** 胺錯合物 (17 g, 37 mmol) 及碳酸鉀 (16 g, 113 mmol) 於 1,4-二噁烷 (600 mL) 與去離子水 (120 mL) 之混合物中的磁力攪拌混合物。將該混合物用氮氣吹掃 30 分鐘，然後添加 RuPhos-Pd-G3 (1.8 g, 2.1 mmol)。燒瓶配備帶有氮氣入口的冷凝器，並置於預熱至 100 °C 的油浴中。在氮氣氣氛下於 100 °C 下攪拌 23 小時後，將所得深紅色溶液冷卻至 23°C，並在減壓下濃縮為棕色固體 (40 g)。該粗材料之 ¹H NMR 分析表明，**04-1** 為主要產物。將上述材料與來自早前批次且具有相似純度之 6.8 g 粗製 **04-1** 合併。藉由急速層析法（使用 0-100% EtOAc/DCM）純化合併之批次，然後藉由進一步層析法（用 0-10% MeOH/DCM 洗脫）純化，以得到黃色固體狀純度為 98%（藉由 HPLC 所量測）的 **04-1**。將固體用 Et₂O 研磨，藉由過濾收集，並在減壓下乾燥，以得到黃色粉末狀 **04-1**（8.0 g，合併產率 47%）。

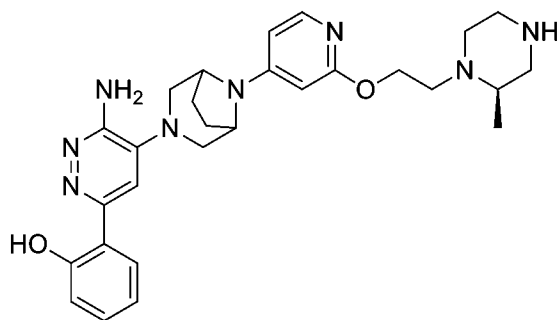
化合物 3，方案 4：(3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-氨基-6-(2-羥基苯基)嗒吡-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌啶-1-羧酸三級丁酯之合成



【0422】於 23°C 下，向 2-(6-氨基-5-(8-(2-氟吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒吡-3-基)苯酚 (1.5 g, 3.82 mmol)（參見上述方案 4 中之化合物 **1**）及氫化鈉（60%，於礦物油中；0.46 g，11.47 mmol）於 THF (20 mL) 中之溶液中逐滴添加 (*R*)-4-(2-羥基乙基)-3-甲基哌啶-1-羧酸三級丁酯（參見上述方

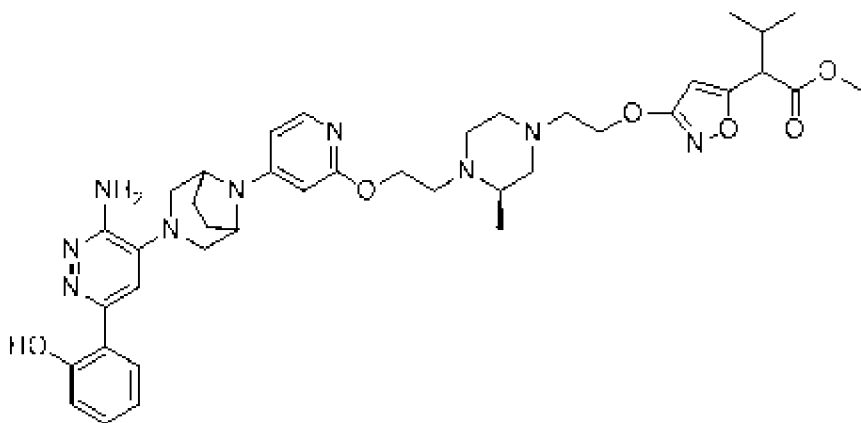
案 4 中之化合物 **2**；亦見 WO2011/28685 第 88 頁第 89 列之合成路線，其全文以引用方式併入本文）(1.87 g, 7.64 mmol)。然後將混合物於 60°C 下攪拌 12 小時。冷卻至 23°C 後，將反應用水 (100 mL) 稀釋，並將所得混合物用乙酸乙酯 (150 mL × 3) 萃取。將合併之有機層用鹽水 (100 mL) 洗滌，經無水硫酸鈉乾燥，並過濾。濃縮濾液，藉由矽膠管柱急速層析法（於 DCM 中之 0-5% 甲醇）純化殘餘物，以得到灰色固體狀標題化合物 (1.2 g, 64%)。LCMS (ESI) m/z : 617.6 [M+H]⁺。

化合物 **4**，方案 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)嗒吡-3-基)苯酚之合成



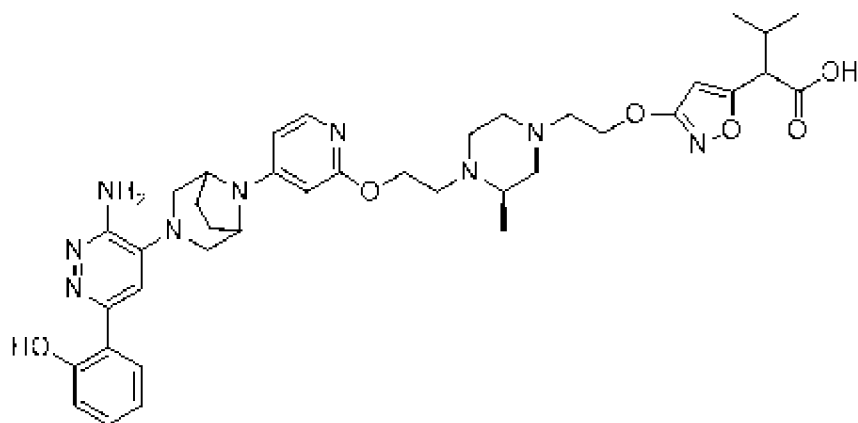
【0423】向 23°C 之 (3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-羥基苯基)嗒吡-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌啶-1-羧酸三級丁酯 (1.2 g, 1.95 mmol) 於乙酸乙酯 (10 mL) 中之溶液中添加 4 M HCl/EtOAc (20 mL, 1.95 mmol)。將混合物於 23°C 下攪拌 16 小時，然後濃縮。藉由矽膠管柱急速層析法（於 DCM 中之 0-10% MeOH (1% NH₃·H₂O)）純化殘餘物，以得到黃色固體狀標題化合物 (900 mg, 90%)。

2-(3-(2-((3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-羥基苯基)嗒吡-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌啶-1-基)乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁酸甲酯之合成



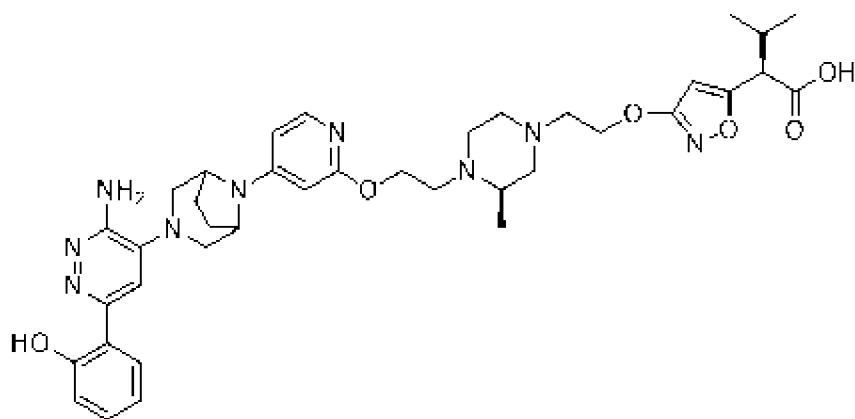
【0424】於 23°C 下，向 NaBH(OAc)₃ (746 mg, 3.48 mmol)、2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-2-甲基哌啶-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒吡-3-基)苯酚 (900 mg, 1.74 mmol) 及 3-甲基-2-(3-(2-側氧乙氧基)異噁唑-5-基)丁酸甲酯 (參見上述方案 4 中之化合物 **5**；參見 US 2020/0038378 第 428 頁之合成路線，其全文以引用方式併入本文) (463 mg, 1.92 mmol) 於甲醇 (10 mL) 及二氯甲烷 (10 mL) 中之溶液中添加醋酸鈉 (712 mg, 8.71 mmol)。將反應混合物於 23°C 下攪拌 16 小時，然後濃縮。藉由矽膠管柱急速層析法 (於 DCM 中之 0-10% MeOH) 純化殘餘物，以得到黃色固體狀標題化合物 (1.0 g, 77%)。LCMS (ESI) *m/z* : 742.6 [M+H]⁺。

化合物 6，方案 4：2-(3-(2-((3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-羥基苯基)嗒吡-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌啶-1-基)乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁酸之合成



【0425】 向 23°C 之 2-(3-(2-((3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-羥基苯基)嗒吡-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌啶-1-基)乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁酸甲酯 (1.0 g, 1.35 mmol) 於水 (6 mL) 及甲醇 (6 mL) 中之溶液中添加氫氧化鋰一水合物 (3 mg, 6.74 mmol)。將混合物於 23°C 下攪拌 16 小時，然後濃縮，以得到黃色固體狀標題化合物 (980 mg)。LCMS (ESI) m/z : 728.3 $[M+H]^+$ 。

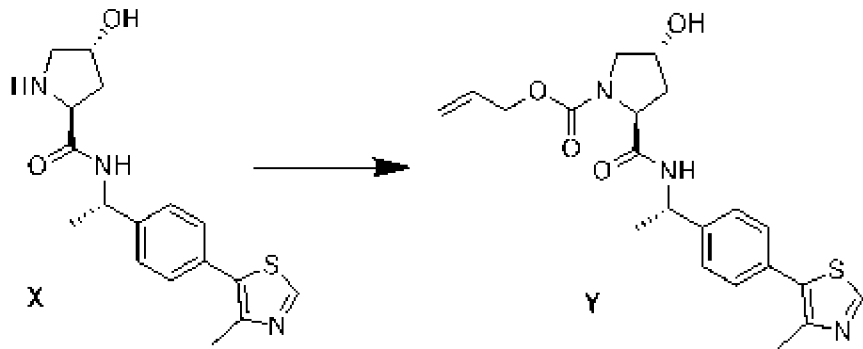
化合物 7，方案 4：(2*R*)-2-(3-(2-((3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-羥基苯基)嗒吡-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌啶-1-基)乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁酸之合成



【0426】 藉由手性 SFC (DAICEL CHIRALPAK AD (250 mm × 50 mm, 10 μ m) 0.1% $\text{NH}_3\text{H}_2\text{O}$, IPA, 18%) 分離 2-(3-(2-((3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-羥基苯基)異噁唑-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)異噁唑-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌

吡啶-1-基)乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁酸 (900 mg, 1.24 mmol)，以得到第一峰 (2*S*)-2-(3-(2-((3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-羥基苯基)噻吩-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基吡啶-1-基)乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁酸 (400 mg, 44%) 及第二峰 (2*R*)-2-(3-(2-((3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-羥基苯基)噻吩-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基吡啶-1-基)乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁酸 (450 mg, 50%)，兩者皆為白色固體。

化合物 15 之合成，方案 4：

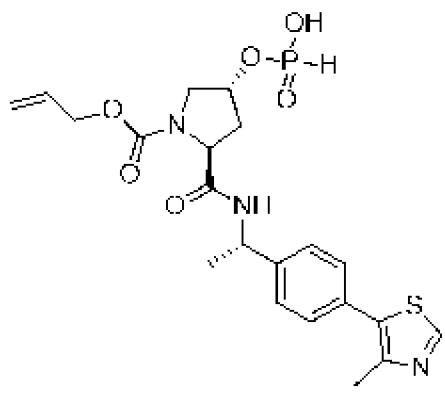


方案 4 之化合物 8 (下文稱為化合物 Y) 之合成。(2*S*)-1-((2*S*,4*R*)-4-羥基-2-((4-(4-甲基噻-5-基)苄基)胺甲酰基)吡咯啶-1-基)-3,3-二甲基-1-側氧丁-2-基)胺甲酸烯丙酯之合成。

【0427】將氯甲酸烯丙酯 (485 mg, 4.02 mmol) 添加至 0°C 之 (2*S*,4*R*)-4-羥基-N-((*S*)-1-(4-(4-甲基噻-5-基)苄基)乙基)吡咯啶-2-甲酰胺 (參見例如上述化合物 1；製備方法參見：*J. Med. Chem.* **2019**, 62, 941) (1.65 g, 3.83 mmol) 及 NaHCO₃ (1.61 g, 19.2 mmol) 於 1:1 THF:H₂O (34 mL) 中之混合物中。將所得混合物升溫至 25°C，並於該溫度下攪拌 12 小時。用水 (50 mL) 稀釋後，將反應混合物用 EtOAc (3 × 50 mL) 萃取，並將合併之有機層用鹽水 (50 mL) 洗滌，經 Na₂SO₄ 乾燥，過濾，並濃縮。藉由快速矽膠管柱層析法 (於 DCM 中之 0-3% MeOH) 純化殘餘物，以得到灰色固體狀 (2*S*,4*R*)-4-羥基-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻-

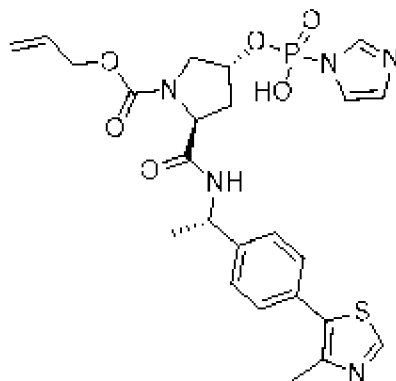
5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-甲酸烯丙酯 (參見上述化合物 Y) (1.60 g, 81%)。LCMS (10-80, AB, 7.0 min) : RT = 2.57 分鐘, $m/z = 537.1 [M+Na]^+$ 。

方案 4 之化合物 9 之合成。(2*S*,4*R*)-4-((*經基氫磷醯基*)氧基)-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-甲酸烯丙酯



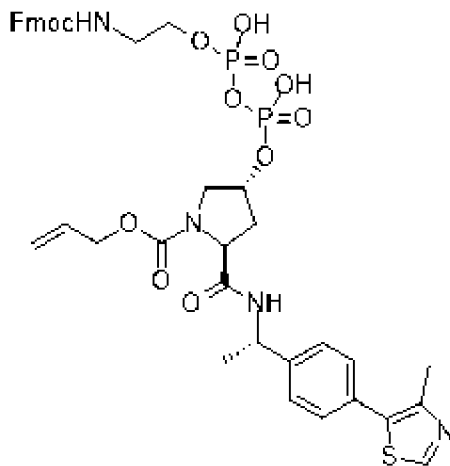
【0428】於 -78℃ 下，向 (2*S*,4*R*)-4-*經基*-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-甲酸烯丙酯 (2.0 g, 4.81 mmol) 於 THF (30 mL) 中之溶液中添加於 THF (5 mL) 中之 PCl_3 (1.67 mL, 19.3 mmol) 及於 THF (3 mL) 中之 Et_3N (4.03 mL, 29 mmol)。將反應混合物於 -78℃ 下攪拌 20 分鐘，然後將其升溫至室溫 23℃。將所得混合物於 23℃ 下攪拌 12 小時，然後用水 (20 mL) 及 $NaHCO_3$ 水溶液 (5 mL) 淬滅。於 23℃ 下攪拌 10 分鐘後，將混合物用 1 N HCl 酸化至 pH = 3，隨後在減壓下濃縮。藉由矽膠管柱急速層析法 (於 DCM 中之 0-10% 甲醇) 純化殘餘物，以得到無色固體狀標題化合物 (1.5 g, 65%)。LCMS (ESI) m/z : 480.2 $[M+H]^+$ 。

方案 4 之化合物 10 之合成。(2*S*,4*R*)-4-((*經基*(1*H*-咪唑-1-基)磷醯基)氧基)-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-甲酸烯丙酯之合成



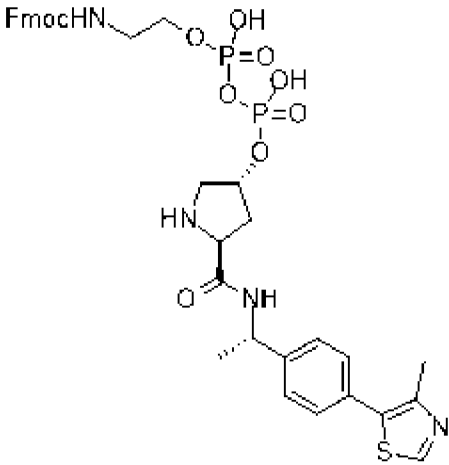
【0429】 於 23°C 下，向 23°C 之 (2*S*,4*R*)-4-(((羥基氫磷醯基)氧基)-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-甲酸烯丙酯 (600 mg, 1.25 mmol) 及 Et₃N (0.52 mL, 3.75 mmol) 於 CCl₄ (8 mL) 及乙腈 (8 mL) 中之溶液中添加 1-(三甲基矽基)-1*H*-咪唑 (0.53 g, 3.75 mmol)。將反應混合物於 23°C 下攪拌 40 分鐘，然後濃縮。將殘餘物用 MTBE/EtOAc=5/1 (3 mL) 研磨，並藉由過濾收集所得沉澱，用 MTBE (3 mL) 洗滌，並風乾，以得到標題化合物 (680 mg, 99%)。LCMS (ESI) *m/z* : 546.3 [M+H]⁺。

方案 4 之化合物 10 之合成。(2*S*,4*R*)-4-((((2-(((9*H*-蒽-9-基)甲氧基)羰基)胺基)乙氧基)(羥基)磷醯基)氧基)(羥基)磷醯基)氧基)-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-甲酸烯丙酯之合成



【0430】向 23°C 之 (2*S*,4*R*)-4-((羥基(1*H*-咪唑-1-基)磷醯基)氧基)-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-甲酸烯丙酯 (600 mg, 1.1 mmol) 及 (9*H*-芴-9-基)甲基 (2-(磷醯氧基)乙基)胺甲酸酯 (上述方案 4 中之化合物 **12**; 製備方法如 *J. Org.Chem.* **2007**, 72, 3116 中所述。) (400 mg, 1.1 mmol) 於 *N,N*-二甲基甲醯胺 (13 mL) 中之溶液中添加於 Et₂O 中之 1 M 氯化鋅 (5.5 mL, 5.5 mmol)。將反應混合物於 23°C 下攪拌 12 小時，然後濃縮。藉由矽膠管柱急速層析法 (於 DCM 中之 0-30% 甲醇 (3% NH₃·H₂O)) 純化殘餘物，以得到黃色油狀標題化合物 (340 mg, 37%)。LCMS (ESI) *m/z*: 814.3 [M+H]⁺。

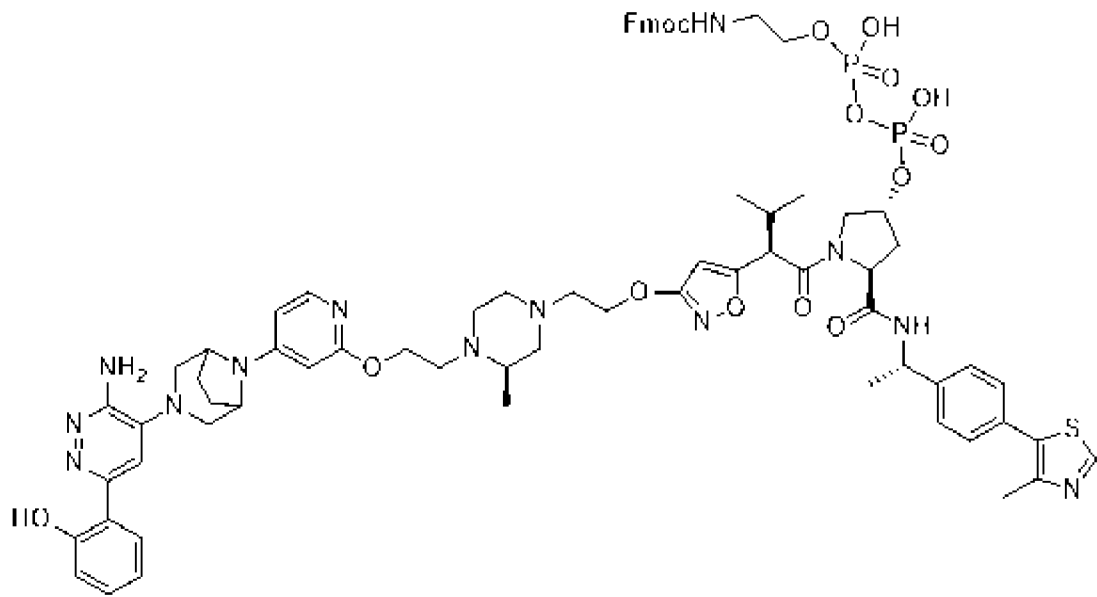
化合物 **15**，方案 4：(2-((羥基((羥基(((3*R*,5*S*)-5-(((*S*)-1-(4-(4-甲基唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-3-基)氧基)磷醯基)氧基)磷醯基)氧基)乙基)胺甲酸(9*H*-芴-9-基)甲酯之合成



【0431】向 23°C 之 (2*S*,4*R*)-4-((((2-(((9*H*-芴-9-基)甲氧基)羰基)胺基)乙氧基)(羥基)磷醯基)氧基)(羥基)磷醯基)氧基)-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-甲酸烯丙酯 (340 mg, 0.40 mmol) 及 1,3-二甲基嘧啶-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-三酮 (316 mg, 2.0 mmol) 於二氯甲烷 (5 mL) 及甲醇 (5 mL) 中之溶液中添加 Pd(PPh₃)₄ (94 mg, 0.08 mmol)。將反應混合物於 23°C 下在氮氣氣氛

下攪拌 2 小時，然後濃縮。藉由製備型 HPLC 純化殘餘物，其中使用下列條件：管柱：YMC Triart C18 150 × 25mm × 5 μm；流動相：20-50% 水 (10 mM NH₄HCO₃)-ACN；偵測器，UV 254 nm，以得到白色固體狀標題化合物 (202 mg, 66%)。LCMS (ESI) *m/z*：757.4 [M+H]⁺。

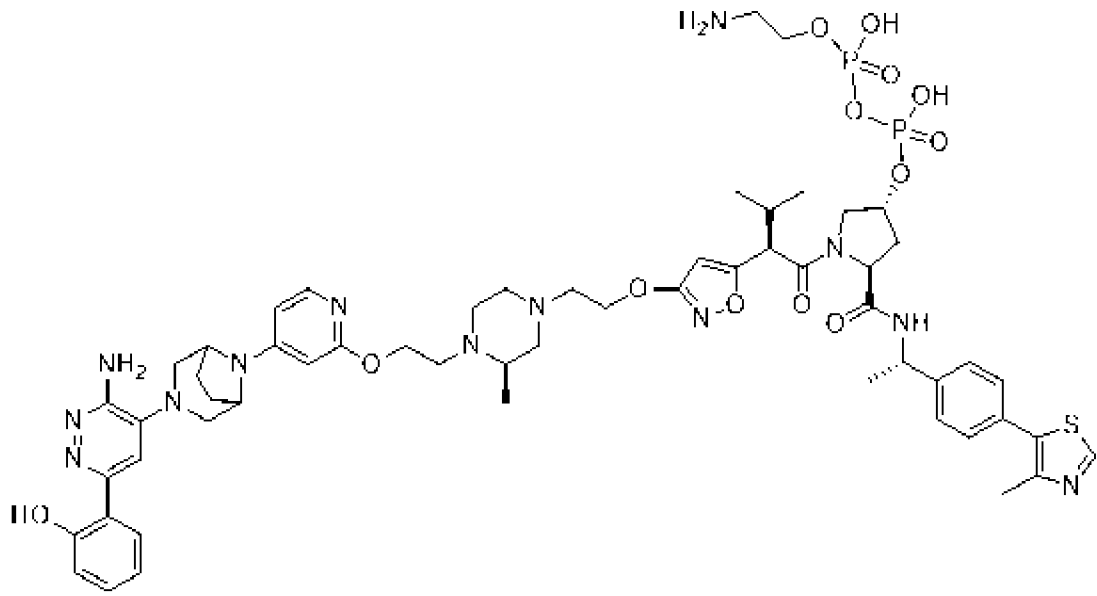
化合物 16，方案 4：(2-(((((((3*R*,5*S*)-1-((2*R*)-2-(3-(2-((3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-羥基苯基)嗒咩-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌咩-1-基)乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-5-(((*S*)-1-(4-(4-甲基唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-3-基)氧基)(羥基)磷醯基)氧基)(羥基)磷醯基)氧基)乙基)胺甲酸(9*H*-芴-9-基)甲酯之合成



【0432】 將 (2*R*)-2-(3-(2-((3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-羥基苯基)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-基)乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁酸 (308 mg, 0.42 mmol)、HATU (201 mg, 0.53 mmol) 及 (2-((羥基((羥基(((3*R*,5*S*)-5-(((*S*)-1-(4-(4-甲基唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-3-基)氧基)磷醯基)氧基)磷醯基)氧基)乙基)胺甲酸(9*H*-芴-9-基)甲酯 (80 mg, 0.11 mmol) 於無水 *N,N*-二甲基甲醯胺 (2 mL) 中之溶液於 23°C 下攪拌 20 分鐘。

然後添加 *N,N*-二異丙基乙胺 (1 mL, 0.63 mmol)，並將所得混合物於 23°C 下攪拌 2 天。藉由製備型 HPLC 直接純化混合物，其中使用下列條件：管柱：Phenomenex Gemini-NX 150 × 30 mm × 5 μm；流動相：24-51% 水 (0.05% NH₃·H₂O)-ACN，以得到白色固體狀標題化合物 (60 mg, 39%)。LCMS (ESI) *m/z*：1467.7 [M+H]⁺。

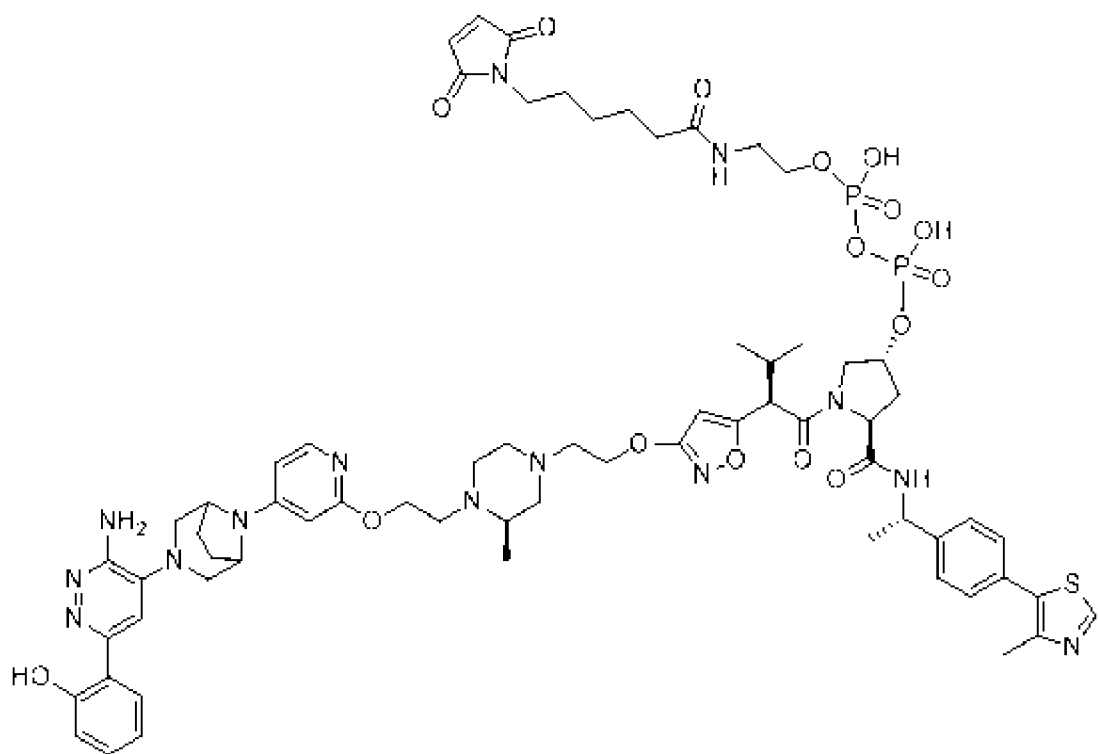
化合物 17，方案 4：[2-胺基乙氧基(羥基)磷醯基][(3*R*,5*S*)-1-[(2*R*)-2-[3-[2-[(3*R*)-4-[2-[[4-[3-[3-胺基-6-(2-羥基苯基)嗒吡-4-基]-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基]-2-吡啶基]氧基]乙基]-3-甲基-哌啶-1-基]乙氧基]異噁唑-5-基]-3-甲基-丁醯基]-5-[[*(1S)*-1-[4-(4-甲基噻-5-基)苯基]乙基]胺甲醯基]吡咯啉-3-基]氫磷酸鹽之合成



【0433】 將 (2-(((((((3*R*,5*S*)-1-((2*R*)-2-(3-(2-((3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-羥基苯基)嗒吡-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌啶-1-基)乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-5-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-3-基)氧基)(羥基)磷醯基)氧基)(羥基)磷醯基)氧基)乙基)胺甲酸(9*H*-第-9-基)甲酯 (20 mg, 0.01 mmol) 及哌啶 (2 mg, 0.01 mmol) 於無水 *N,N*-二甲基甲醯胺 (0.5 mL) 中之溶液於 23°C 下攪拌 2 小時。然後藉由製備型 HPLC

(Phenomenex Gemini-NX 150 × 30 mm × 5 μm, 20-50% 水 (0.05% NH₃·H₂O)-ACN) 直接純化混合物, 以得到白色固體狀標題化合物 (18 mg, 94%)。 ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.01 - 8.91 (m, 1H), 7.93 - 7.89 (m, 1H), 7.79 - 7.75 (m, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.43 - 7.28 (m, 5H), 7.23 - 7.19 (m, 2H), 6.88 - 6.80 (m, 3H), 6.54 - 6.52 (m, 1H), 6.14 - 6.10 (m, 2H), 5.97 (s, 2H), 4.89 - 4.86 (m, 2H), 4.52 - 4.35 (m, 3H), 4.26 - 4.21 (m, 5H), 4.08 - 3.73 (m, 5H), 3.06 - 2.98 (m, 4H), 2.95 - 2.91 (m, 3H), 2.89 - 2.84 (m, 6H), 2.69 - 2.66 (m, 4H), 2.46 - 2.41 (m, 6H), 2.36 - 2.31 (m, 2H), 2.17 - 2.15 (m, 3H), 1.98 - 1.95 (m, 3H), 1.89 - 1.84 (m, 2H), 1.55 - 1.51 (m, 9H), 1.39 - 1.31 (m, 3H), 1.26 - 1.21 (m, 3H), 1.03 - 0.92 (m, 8H), 0.80 - 0.71 (m, 5H); LCMS (ESI) *m/z*: 1245.6 [M+H]⁺。

L1-CIDE-BRM1-4 : [(3*R*,5*S*)-1-[2-[3-[2-[(3*R*)-4-[2-[[4-[3-[3-胺基-6-(2-羥基苯基)嗒吡-4-基]-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基]-2-吡啶基]氧基]乙基]-3-甲基-哌吡-1-基]乙氧基]異噁唑-5-基]-3-甲基-丁醯基]-5-[(1*S*)-1-[4-(4-甲基唑-5-基)苯基]乙基]胺甲醯基]吡咯啉-3-基][2-[6-(2,5-二側氧基吡咯-1-基)己醯基胺基]乙氧基-羥基-磷醯基]氫磷酸鹽之合成



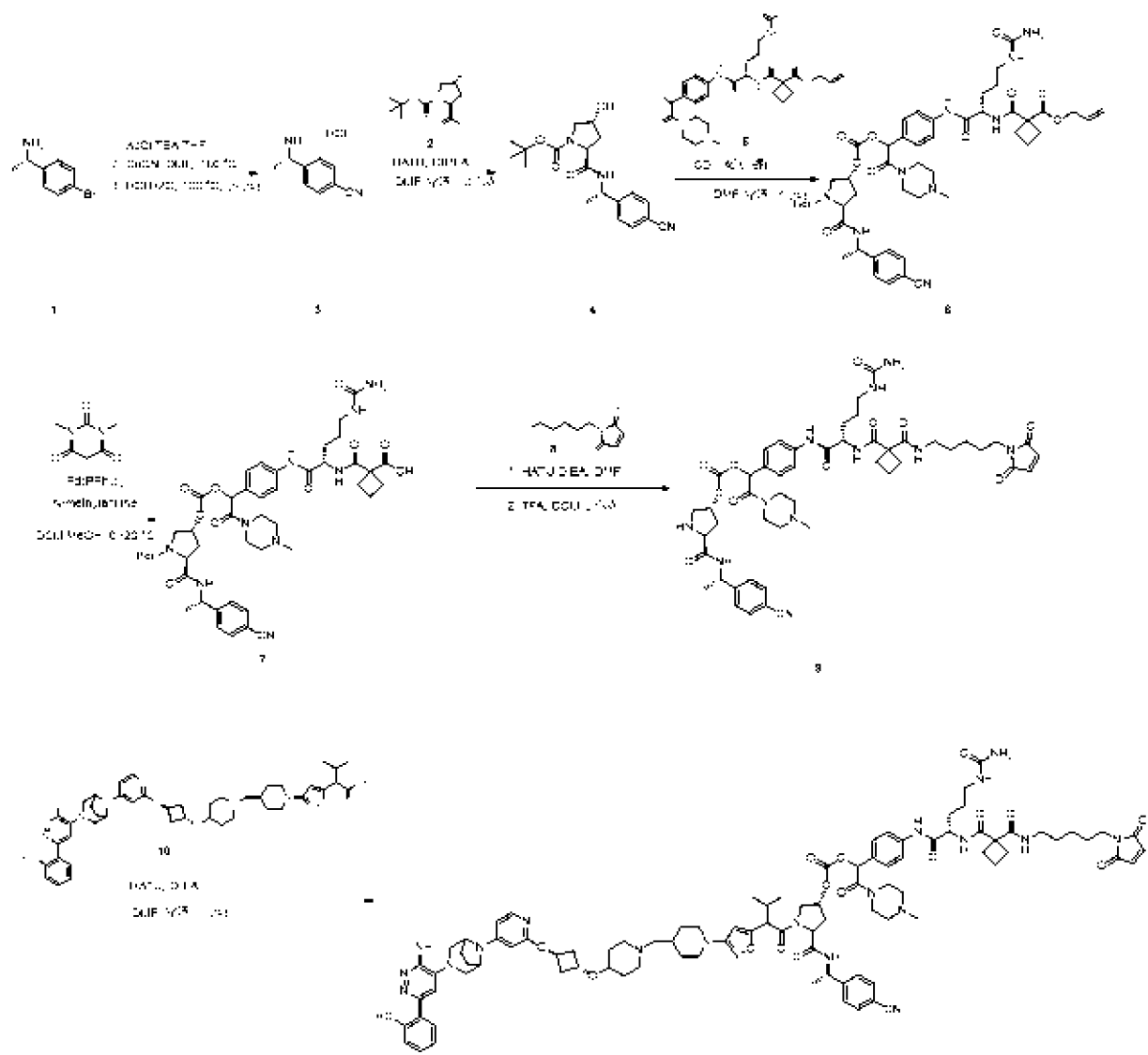
【0434】 向 23℃ 之 [2-胺基乙氧基(羥基)磷醯基][(3*R*,5*S*)-1-[2-[3-[2-[(3*R*)-4-[2-[[4-[3-[3-胺基-6-(2-羥基苯基)嗒咩-4-基]-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基]-2-吡啶基]氧基]乙基]-3-甲基-哌咩-1-基]乙氧基]異噁唑-5-基]-3-甲基-丁醯基]-5-[[*(1S)*-1-[4-(4-甲基唑-5-基)苯基]乙基]胺甲醯基]吡咯啉-3-基]氫磷酸鹽 (50 mg, 0.04 mmol) 於 *N,N*-二甲基甲醯胺 (2 mL) 中之溶液中添加1-(6-(2,5-二側氧基吡咯啉-1-基)-6-側氧己基)-1*H*-吡咯-2,5-二酮 (24 mg, 0.08 mmol) 及 *N,N*-二異丙基乙胺 (0.01 mL, 0.08 mmol)。將混合物於 23℃ 下攪拌 1 小時，然後藉由製備型 HPLC (Phenomenex Gemini-NX 80 × 30 mm × 3 μm, 17-47% 水 (10 mM NH₄HCO₃)-ACN) 直接純化，以得到白色固體狀標題化合物 (7.9 mg, 14%)。 ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.98 - 8.95 (m, 1H), 8.60 - 8.41 (m, 1H), 7.94 - 7.90 (m, 1H), 7.79 - 7.75 (m, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.45 - 7.30 (m, 4H), 7.23 - 7.20 (m, 1H), 6.99 - 6.94 (m, 2H), 6.88 - 6.80 (m, 2H), 6.54 - 6.50 (m, 1H), 6.14 - 6.10 (m, 1H), 5.98 - 5.96 (m, 2H), 4.89 - 4.86 (m, 2H), 4.54 - 4.35 (m, 3H), 4.26 - 4.21 (m, 4H),

3.95 - 3.71 (m, 5H), 3.24 - 3.21 (m, 1H), 3.04 - 2.98 (m, 3H), 2.82 - 2.75 (m, 1H), 2.69 - 2.64 (m, 1H), 2.45 - 2.42 (m, 5H), 2.36 - 2.31 (m, 1H), 2.18 - 2.15 (m, 2H), 2.07 - 1.92 (m, 5H), 1.79 (s, 12H), 1.46 - 1.44 (m, 5H), 1.38 - 1.35 (m, 3H), 1.26 - 1.22 (m, 3H), 1.16 - 1.14 (m, 2H), 0.99 - 0.95 (m, 6H), 0.89 - 0.76 (m, 4H); LCMS (ESI) m/z : 1438.8 $[M+H]^+$.

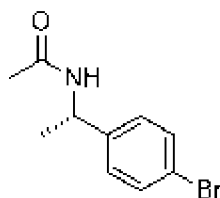
合成實例 5

L1-CIDE-BRM1-5 之合成

L1-CIDE-BRM1-2 藉由下列方案（方案 5）合成：

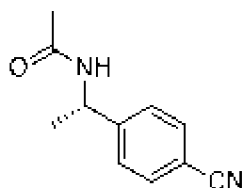


(S)-N-(1-(4-溴苯基)乙基)乙醯胺之合成



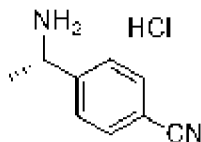
【0435】於 0°C 下，將乙醯氯 (2.35 g, 30 mmol) 逐滴添加至 (S)-1-(4-溴苯基)乙胺 (5.0 g, 25 mmol) 及 Et₃N (3.8 g, 37.49 mmol) 於 THF (50 mL) 中之溶液中。將反應於該溫度下攪拌 2.5 小時，然後分配在 EtOAc (50 mL × 3) 與飽和 NaCl 溶液 (50 mL) 之間。合併的有機層以硫酸鈉乾燥、過濾，並濃縮。藉由矽膠急速層析法（於石油醚中之 0-50% EtOAc）純化殘餘物，以得到白色固體狀標題化合物 (4.0 g, 66%)。LCMS (ESI) m/z : 241.8 [M+H]⁺。

(S)-N-(1-(4-氰基苯基)乙基)乙醯胺之合成



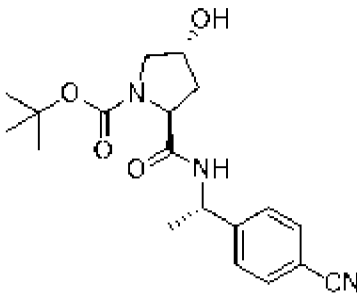
【0436】將氰化銅(I) (1.78 g, 20 mmol) 及 (S)-N-(1-(4-溴苯基)乙基)乙醯胺 (4.0 g, 16.5 mmol) 於 *N,N*-二甲基甲醯胺 (40 mL) 中之混合物回流 24 小時。冷卻至 23°C 後，過濾混合物，並濃縮濾液。於 23°C 下將殘餘物添加至飽和 NaHCO₃ 水溶液 (80 mL) 中，並攪拌 10 分鐘。然後添加飽和次氯酸鈉水溶液，並於 23°C 下繼續攪拌 24 小時。將混合物用 EtOAc (70 mL × 3) 萃取，並將合併之有機層用水 (70 mL × 3) 洗滌，經硫酸鈉乾燥，過濾，並濃縮，以得到黃色固體狀標題化合物 (2.7 g, 87%)。LCMS (ESI) m/z : 189.2 [M+H]⁺。

(S)-4-(1-胺基乙基)苯甲腈鹽酸鹽之合成



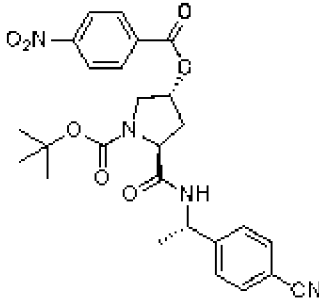
【0437】 將 (S)-N-(1-(4-氰基苯基)乙基)乙醯胺 (2.4 g, 12.8 mmol) 及 2 M HCl 水溶液 (20 mL, 12.8 mmol) 於 100°C 下攪拌 24 小時。將反應溶液冷卻至 23 °C，然後濃縮，以得到黃色固體狀標題化合物 (1.8 g, 97%)。LCMS (ESI) m/z : 147.1 $[M+H]^+$ 。

化合物 4，方案 5：(2S,4R)-2-(((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-4-羥基吡咯啉-1-羧酸三級丁酯之合成



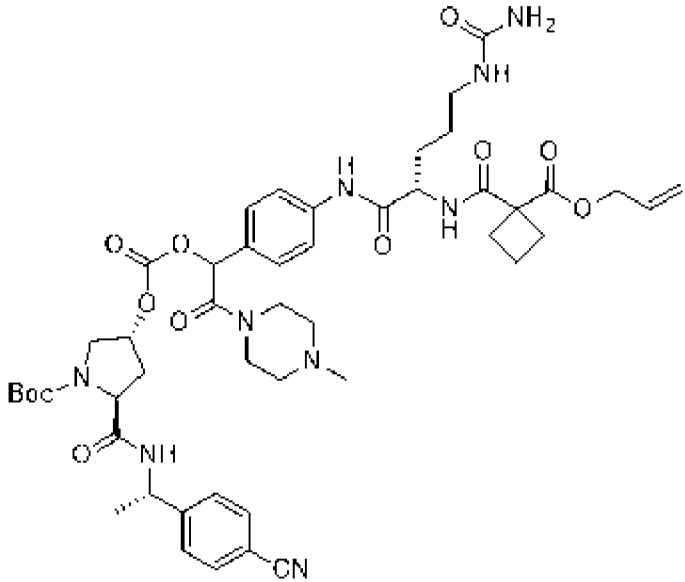
【0438】 向 23°C 之 (S)-4-(1-胺基乙基)苯甲腈鹽酸鹽 (1.6 g, 11 mmol) 及 (2S,4R)-1-(三級丁氧羰基)-4-羥基吡咯啉-2-羧酸 (2.8 g, 12 mmol) 於 N,N-二甲基甲醯胺 (50 mL) 中之混合物中添加 N,N-二異丙基乙胺 (4.3 g, 33 mmol) 及 HATU (1.63 g, 12 mmol)。將反應於 23°C 下攪拌 16 小時，然後濃縮。藉由矽膠急速層析法（於二氯甲烷中之 50-100% 乙酸乙酯）純化殘餘物，以得到黃色固體狀標題化合物 (1.7 g, 43%)。LCMS (ESI) m/z : 360.1 $[M+H]^+$ 。

(2S,4R)-2-(((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-4-((4-硝基苯甲醯基)氧基)吡咯啉-1-羧酸三級丁酯之合成



【0439】 於 23°C 下，向 4-硝基苯基氯甲酸酯 (1.68 g, 8.3 mmol) 及 (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-羧酸三級丁酯 (3.0 g, 7.0 mmol) 於無水二氯甲烷 (80 mL) 中之混合物中添加 2,6-二甲吡啶 (1.1 g, 10.43 mmol)。將反應混合物於 23°C 下攪拌 18 小時，然後濃縮，以得到黃色固體狀標題化合物 (437 mg, 99.8%)。LCMS (ESI) m/z : 597.2 [M+H]⁺。

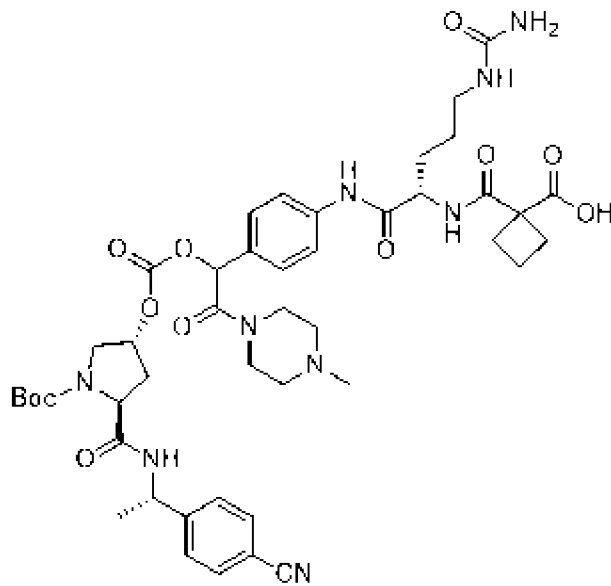
化合物 6，方案 5：(2*S*,4*R*)-4-(((1-(4-((*S*)-2-(1-((烯丙基氧基)羰基)環丁烷甲醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苯基)-2-(4-甲基哌啶-1-基)-2-側氧乙氧基)羰基)氧基)-2-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啶-1-羧酸三級丁酯之合成



【0440】 向 23°C 之 (2*S*,4*R*)-三級丁基 2-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-4-((4-硝基苯甲醯基)氧基)吡咯啶-1-羧酸三級丁酯 (437 mg, 0.83 mmol) 及 1-(((2*S*)-1-((4-(1-羥基-2-(4-甲基哌啶-1-基)-2-側氧乙基)苯基)胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷甲酸烯丙酯 (334 mg, 0.58 mmol) 於無水 *N,N*-二甲基甲醯胺 (10 mL) 中之混合物中添加 DMAP (203 mg, 1.67 mmol)。將反應混合物於 40°C 下攪拌 18 小時，然後冷卻至 23°C 並過濾。藉由製備型 HPLC (Xtimate C18 150 × 40 mm × 5 μm/水 (0.225% FA)-ACN, 18-48%) 直接純化

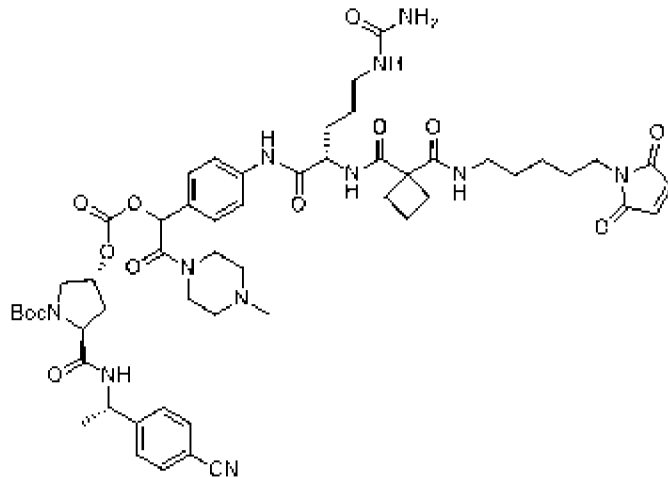
濾液，以得到黃色固體狀標題化合物 (65 mg, 8%)。LCMS (ESI) m/z : 958.6 [M+H]⁺。

化合物 7，方案 5：1-(((2*S*)-1-((4-(1-(((3*R*,5*S*)-1-(三級丁氧羰基)-5-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-3-基)氧基)羰基)氧基)-2-(4-甲基哌啶-1-基)-2-側氧乙基)苯基)胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷甲酸之合成



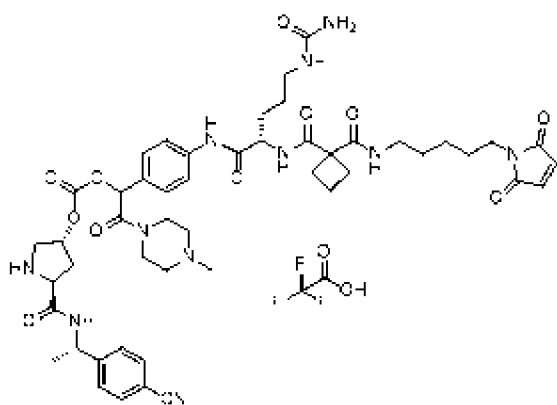
【0441】於 23°C 下，向 (2*S*,4*R*)-4-(((1-(4-((*S*)-2-(1-((烯丙基氧基)羰基)環丁烷甲醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苯基)-2-(4-甲基哌啶-1-基)-2-側氧乙氧基)羰基)氧基)-2-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-羧酸三級丁酯 (65 mg, 0.07 mmol) 及 1,3-二甲基嘧啶-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-三酮 (53 mg, 0.34 mmol) 於二氯甲烷 (3 mL) 及甲醇 (3 mL) 中之溶液中添加 Pd(PPh₃)₄ (16 mg, 0.01 mmol)。將反應混合物在氮氣氣氛下於 23°C 下攪拌 10 小時，然後濃縮。藉由製備型 HPLC 純化殘餘物，其中使用下列條件：管柱：Phenomenex Gemini-NX 80 × 30 mm × 3 μm，流動相：(24-50%) 水 (10 mM NH₄HCO₃)-ACN，以得到紅色固體狀標題化合物 (40 mg, 64%)。LCMS (ESI) m/z : 918.6 [M+H]⁺。

化合物 9，方案 5：(2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-4-(((1-(4-((*S*)-2-(1-((5-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)戊基)胺甲醯基)環丁烷甲醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苯基)-2-(4-甲基哌啶-1-基)-2-側氧乙氧基)羰基)氧基)吡咯啉-1-羧酸三級丁酯之合成



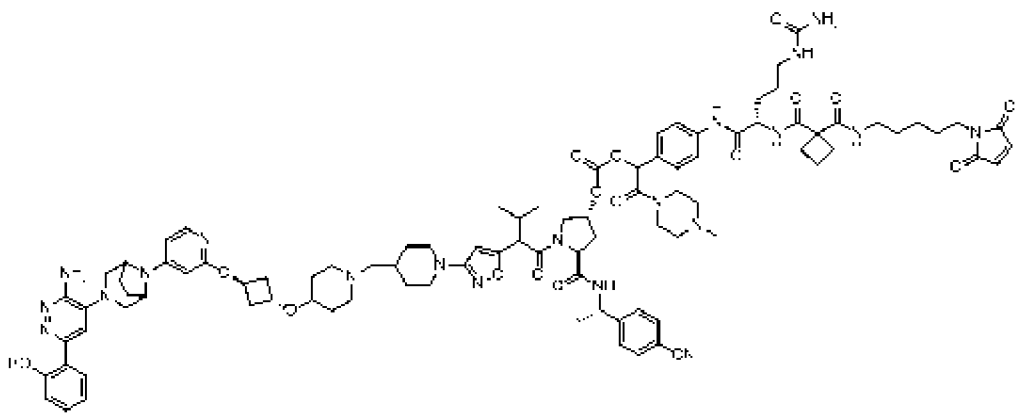
【0442】向 23°C 之 1-(((2*S*)-1-((4-(1-(((3*R*,5*S*)-1-(三級丁氧羰基)-5-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-3-基)氧基)羰基)氧基)-2-(4-甲基哌啶-1-基)-2-側氧乙基)苯基)胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷甲酸 (40 mg, 0.04 mmol) 及 1-(5-胺基戊基)-1*H*-吡咯-2,5-二酮 (10 mg, 0.05 mmol) 於 *N,N*-二甲基甲醯胺 (4 mL) 中之混合物中添加 *N,N*-二異丙基乙胺 (0.02 mL, 0.13 mmol) 及 HATU (20 mg, 0.05 mmol)。將反應混合物於 23°C 下攪拌 16 小時，然後濃縮。藉由製備型 HPLC (Boston Green ODS 150 × 30 mm × 5 μm, 水 (0.075% TFA)-ACN, 20%-50%) 純化殘餘物，以得到藍色固體狀標題化合物 (31 mg, 65%)。LCMS (ESI) *m/z* : 1082.7 [M+H]⁺。

(3*R*,5*S*)-5-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-3-基(1-(4-((*S*)-2-(1-((5-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)戊基)胺甲醯基)環丁烷甲醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苯基)-2-(4-甲基哌啶-1-基)-2-側氧乙基)碳酸酯 2,2,2-三氟乙酸酯之合成



【0443】 將 (2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-氟基苯基)乙基)胺甲醯基)-4-(((1-(4-((*S*)-2-(1-((5-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)戊基)胺甲醯基)環丁烷甲醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苯基)-2-(4-甲基哌啶-1-基)-2-側氧乙氧基)羰基)氧基)吡咯啉-1-羧酸三級丁酯 (30.5 mg, 0.03 mmol) 於含 5% TFA 的 HFIP (3 mL) 中之溶液於 23°C 下攪拌 1.5 小時。然後濃縮反應混合物，得到粉色油狀標題化合物 (28 mg, 99%)。LCMS (ESI) *m/z* : 982.7 [M+H]⁺。

L1-CIDE-BRM-1-5 : (3*R*,5*S*)-1-(2-(3-(4-(反式-3-((4-(3-(3-胺基-6-(2-羥基苯基)嗒啶-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-基)甲基)哌啶-1-基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-5-(((*S*)-1-(4-氟基苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-3-基(1-(4-((*S*)-2-(1-((5-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)戊基)胺甲醯基)環丁烷甲醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苯基)-2-(4-甲基哌啶-1-基)-2-側氧乙基)碳酸酯之合成

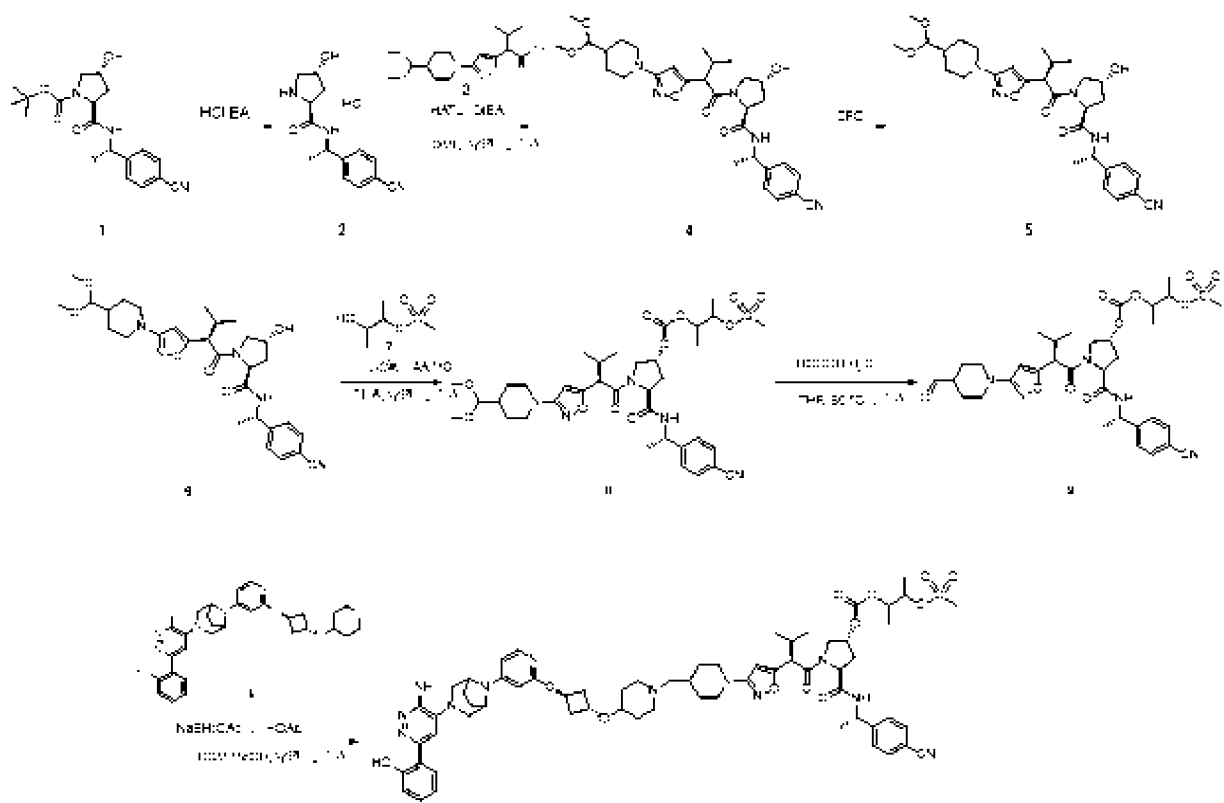


【0444】於 23°C 下，向 (3*R*,5*S*)-5-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-3-基 (1-(4-((*S*)-2-(1-((5-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)戊基)胺甲醯基)環丁烷甲醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苯基)-2-(4-甲基哌啶-1-基)-2-側氧乙基)碳酸酯2,2,2-三氟乙酸酯 (28 mg, 0.03 mmol) 及 2-(3-(4-((4-(反式-3-((4-(3-(3-胺基-6-(2-羥基苯基)嗒啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)環丁氧基)哌啶-1-基)甲基)哌啶-1-基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁酸 (27 mg, 0.03 mmol) 於 DMF (3 mL) 中之混合物中添加 *N,N*-二異丙基乙胺 (0.01 mL, 0.08 mmol) 及 HATU (13 mg, 0.03 mmol)。將混合物於 23°C 下攪拌 4 小時，然後濃縮。藉由製備型 HPLC 純化殘餘物，其中使用下列條件：管柱：Phenomenex Gemini-NX 80 × 30 mm × 3 μm；流動相：(18-36%) 水 (10 mM NH₄HCO₃)-ACN，以得到白色固體狀標題化合物 (23 mg, 31%)。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 7.80 - 7.58 (m, 6H), 7.57 - 7.34 (m, 5H), 7.24 - 7.21 (m, 1H), 6.96 - 6.84 (m, 2H), 6.80 - 6.73 (m, 1H), 6.56 - 6.54 (m, 1H), 6.33 - 6.20 (m, 1H), 6.17 - 6.03 (m, 1H), 5.27 - 5.19 (m, 1H), 5.14 - 5.12 (m, 1H), 4.62 - 4.60 (m, 5H), 4.54 - 4.51 (m, 3H), 4.42 - 4.39 (m, 1H), 4.17 - 3.86 (m, 2H), 3.84 - 3.76 (m, 1H), 3.74 - 3.64 (m, 3H), 3.63 - 3.50 (m, 4H), 3.48 - 3.43 (m, 3H), 3.38 - 3.35 (m, 2H), 3.25 - 3.22 (m, 2H), 3.26 - 3.18 (m, 1H), 3.17 - 3.00 (m, 4H), 2.86 - 2.83 (m, 2H), 2.59-2.55 (m, 6H), 2.48 - 2.35 (m, 7H), 2.29 - 2.12 (m, 8H), 2.09 - 1.86 (m, 8H), 1.85 - 1.68 (m, 1H), 1.79 - 1.75 (m, 5H), 1.67 - 1.52 (m, 7H), 1.51 - 1.43 (m, 2H), 1.41 - 1.23 (m, 9H), 1.10 - 0.94 (m, 3H), 0.93 - 0.81 (m, 3H); LCMS (ESI) *m/z*: 1772.9 [M+H]⁺。

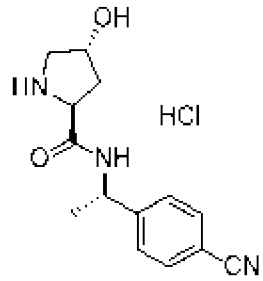
合成實例 6

L1-CIDE-BRM1-6 之合成

L1-CIDE-BRM1-6 藉由下列方案（方案 6）合成：

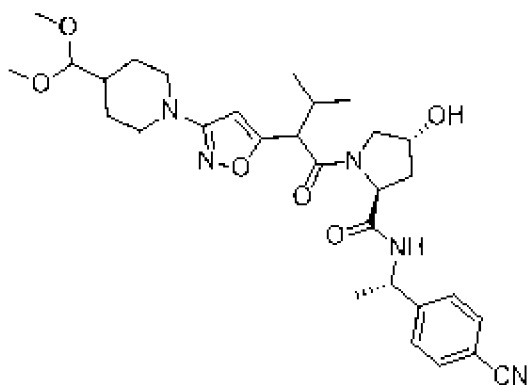


(2*S*,4*R*)-*N*-((*S*)-1-(4-氟苯基)乙基)-4-羥基吡咯啉-2-甲醯胺鹽酸鹽之合成



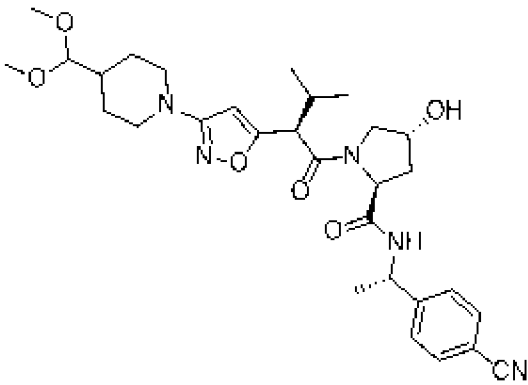
【0445】 向 23℃ 之 (2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-4-羥基吡咯啉-1-羧酸三級丁酯 (參見上述方案 5 中之化合物 **4**) (2.0 g, 5.56 mmol) 於乙酸乙酯 (5 mL) 中之溶液中添加 4 M HCl (10 mL; 藉由將乾燥氯化氫氣體在 EtOAc 中鼓泡來製備)。將反應混合物於 23℃ 下攪拌 16 小時, 然後濃縮, 以得到白色固體狀標題化合物 (1.4 g, 97%)。

化合物 4，方案 6：(2*S*,4*R*)-*N*-((*S*)-1-(4-氟基苯基)乙基)-1-(2-(3-(4-(二甲氧基甲基)哌啶-1-基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-4-羥基吡咯啉-2-甲醯胺之合成



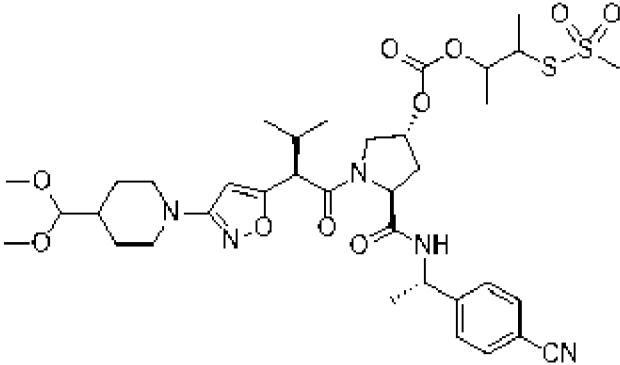
【0446】向23℃之(2*S*,4*R*)-*N*-((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)-4-羥基吡咯啉-2-甲醯胺鹽酸鹽(900 mg, 3.47 mmol)及2-(3-(4-(二甲氧基甲基)哌啶-1-基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁酸(參見上述方案6中之化合物**3**；參見US 2020/0038378第450頁所揭露之合成路線，其全文以引用方式併入本文)(1.4 g, 3.43 mmol)於無水*N,N*-二甲基甲醯胺(20 mL)中之溶液中添加DIEA(1.71 mL, 10.29 mmol)及HATU(2.0 g, 5.15 mmol)。將混合物於23℃下攪拌2小時，然後將其分配在水(100 mL)與乙酸乙酯(100 mL × 3)之間。將合併之有機層用鹽水(50 mL × 2)洗滌，經硫酸鈉乾燥，過濾並濃縮。藉由矽膠急速層析法(於石油醚中之0-100%乙酸乙酯)純化殘餘物，以得到無色油狀標題化合物(2.0 g, 98%)。LCMS (ESI) *m/z* : 568.3 [M+H]⁺。

化合物**5**，方案6：(2*S*,4*R*)-*N*-((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)-1-((*R*)-2-(3-(4-(二甲氧基甲基)哌啶-1-基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-4-羥基吡咯啉-2-甲醯胺之合成



【0447】藉由手性 SFC (DAICEL CHIRALPAK OD (250 mm × 30 mm, 10 μm); (20%) 0.1% NH₃H₂O, EtOH) 分離 (2*S*,4*R*)-*N*-((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)-1-(2-(3-(4-(二甲氧基甲基)哌啶-1-基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-4-羥基吡咯啉-2-甲醯胺 (2 g, 3.52 mmol), 以得到第一峰 (2*S*,4*R*)-*N*-((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)-1-((*S*)-2-(3-(4-(二甲氧基甲基)哌啶-1-基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-4-羥基吡咯啉-2-甲醯胺 (400 mg, 20%) 及第二峰 (2*S*,4*R*)-*N*-((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)-1-((*R*)-2-(3-(4-(二甲氧基甲基)哌啶-1-基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-4-羥基吡咯啉-2-甲醯胺 (700 mg, 35%), 兩者皆為白色固體。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.49 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.82 - 7.76 (m, 2H), 7.50 - 7.44 (m, 2H), 6.11 (s, 1H), 5.13 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 4.93 - 4.89 (m, 1H), 4.36 - 4.31 (m, 1H), 4.27 - 4.25 (s, 1H), 4.07 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 3.72 - 3.53 (m, 4H), 3.45 - 3.40 (m, 1H), 3.26 (s, 6H), 2.76 - 2.67 (m, 2H), 2.25 - 2.16 (m, 1H), 2.08 - 1.96 (m, 1H), 1.79 - 1.61 (m, 4H), 1.44 - 1.33 (m, 3H), 1.30 - 1.19 (m, 2H), 0.98 - 0.89 (m, 3H), 0.84 - 0.74 (m, 3H)。

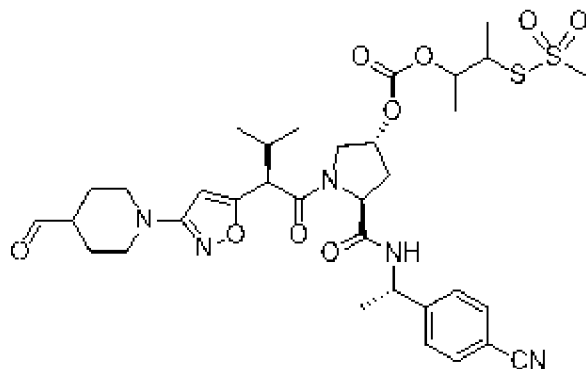
化合物 8，方案 6：S-(3-((((3R,5S)-5-(((S)-1-(4-氟基苯基)乙基)胺甲醯基)-1-((R)-2-(3-(4-(二甲氧基甲基)哌啶-1-基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)吡咯啉-3-基)氧基)羧基)氧基)丁-2-基)甲烷硫代磷醯酯之合成



【0448】 向 23℃ 之 (2*S*,4*R*)-*N*-((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)-1-((*R*)-2-(3-(4-(二甲氧基甲基)哌啶-1-基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁酰基)-4-羥基吡咯啶-2-甲酰胺 (300

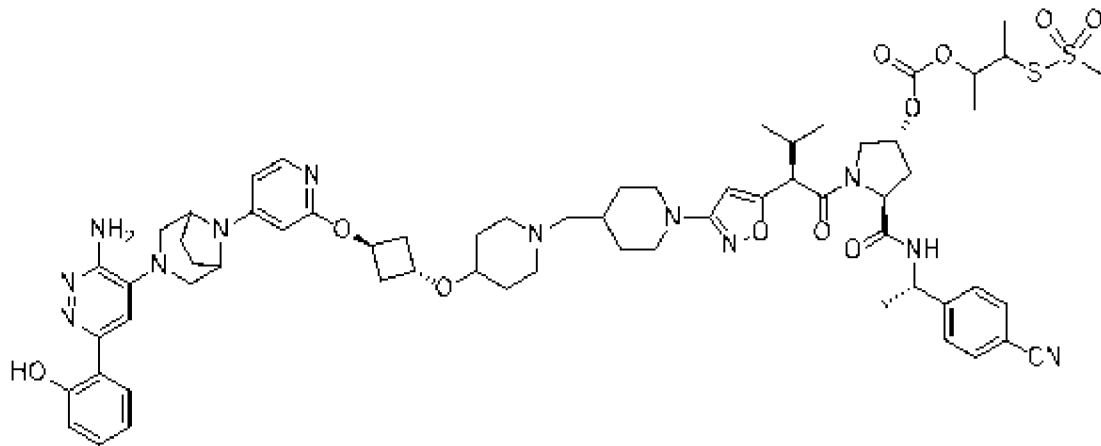
mg, 0.53 mmol) 及 4 Å MS (100 mg) 於無水二氯甲烷 (3 mL) 中之混合物中緩慢添加 *S*-(3-((羧基)氧基)丁-2-基)甲烷硫代磺酸酯 (參見上述方案 6 中之化合物 7 或上述方案 1 中之化合物 2) (391 mg, 1.59 mmol) 於二氯甲烷 (2 mL) 中之溶液及 Et₃N (214 mg, 2.11 mmol) 於無水二氯甲烷 (3 mL) 中之溶液。將反應於 23 °C 下攪拌 16 小時，然後過濾。濃縮濾液，並藉由矽膠急速層析法 (於石油醚中之 0-70% 乙酸乙酯) 純化殘餘物，以得到白色固體狀標題化合物 (200 mg, 49%)。LCMS (ESI) *m/z* : 778.1 [M+H]⁺。

化合物 9，方案 6：*S*-(3-((((3*R*,5*S*)-5-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲羰基)-1-((*R*)-2-(3-(4-甲羰基哌啶-1-基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁羰基)吡咯啉-3-基)氧基)羧基)氧基)丁-2-基)甲烷硫代磺酸酯之合成



【0449】於 23°C 下，向 *S*-(3-((((3*R*,5*S*)-5-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲羰基)-1-((*R*)-2-(3-(4-(二甲氧基甲基)哌啶-1-基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁羰基)吡咯啉-3-基)氧基)羧基)氧基)丁-2-基)甲烷硫代磺酸酯 (100 mg, 0.13 mmol) 於 THF (1 mL) 中之溶液中添加甲酸 (1 mL) 及水 (3 mL)。將混合物於 50°C 下攪拌 16 小時，然後冷卻至 23°C 並濃縮，以得到黃色油狀標題化合物 (80 mg, 85%)。LCMS (ESI) *m/z* : 732.0 [M+H]⁺。

L1-CIDE-BRM1-6 : *S*-(3-((((((3*R*,5*S*)-1-((2*R*)-2-(3-(4-((4-(反式-3-((4-(3-(3-氨基-6-(2-羟基苯基)嗒吡-4-基)-3,8-二氮杂二环[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)环丁氧基)哌啶-1-基)甲基)哌啶-1-基)异噁唑-5-基)-3-甲基丁酰基)-5-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲酰基)吡咯啶-3-基)氧基)羰基)氧基)丁-2-基)甲烷硫代磺酰酯之合成



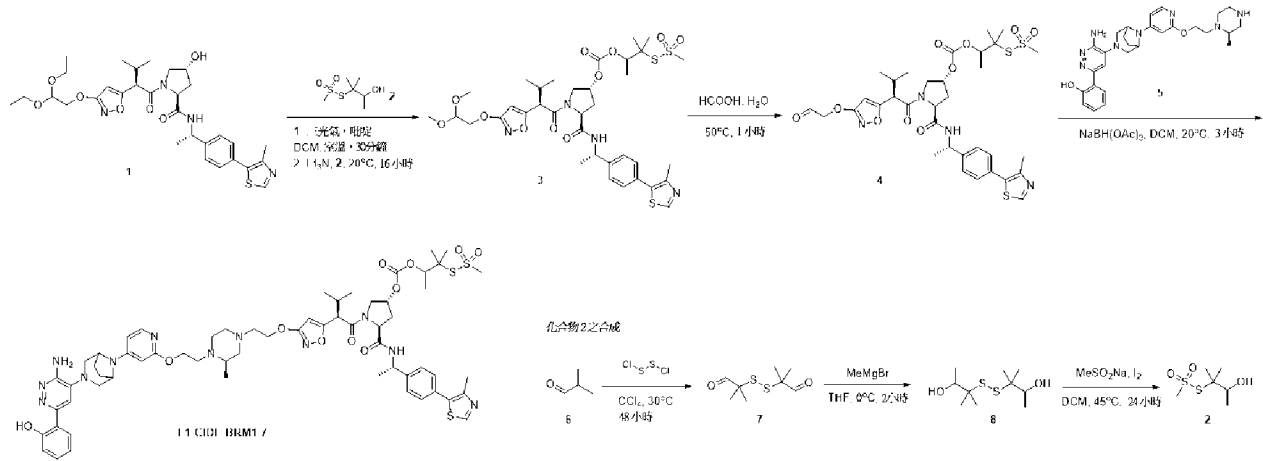
【0450】 向 23°C 之 *S*-(3-((((((3*R*,5*S*)-5-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲酰基)-1-((*R*)-2-(3-(4-甲酰基哌啶-1-基)异噁唑-5-基)-3-甲基丁酰基)吡咯啶-3-基)氧基)羰基)氧基)丁-2-基)甲烷硫代磺酰酯 (80 mg, 0.11 mmol) 及 2-(6-氨基-5-(8-(2-(3-(哌啶-4-基氧基)环丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂二环[3.2.1]辛-3-基)嗒吡-3-基)苯酚盐酸盐 (参见上述方案 6 中之化合物 **5**; 参见 US 2020/0038378 第 306-307 页之合成路线, 其全文以引用方式并入本文) (60 mg, 0.11 mmol) 及 HOAc (0.2 mL) 于二氯甲烷 (1 mL) 及甲醇 (1 mL) 中之溶液中添加 NaBH(OAc)₃ (232 mg, 1.09 mmol)。将反应混合物于 23°C 下搅拌 3 小时, 然后浓缩。藉由制备型 HPLC (Boston Green ODS 150 × 30mm × 5 μm (水 (0.225% FA)-ACN, 15 - 45%)) 纯化残余物, 以得到白色固体状标题化合物 (35 mg, 26%)。经制备型 HPLC (FA) 纯化后, 所需产物为 FA 盐。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.55 - 8.53 (m, 1H), 8.17 - 8.15 (m, 1H), 7.91 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.81 - 7.75 (m, 3H), 7.51 - 7.44 (m, 3H), 7.23 - 7.20 (m, 1H), 6.89 - 6.82 (m, 2H), 6.54 - 6.51 (m, 1H), 6.12 (d, *J*

= 8.8 Hz, 2H), 5.97 (s, 2H), 5.26 - 5.07 (m, 2H), 5.01 - 4.85 (m, 2H), 4.51 - 4.46 (m, 2H), 4.38 - 4.27 (m, 2H), 3.87 - 3.80 (m, 2H), 3.59 - 3.56 (m, 3H), 3.54 - 3.52 (m, 3H), 3.28 - 3.24 (m, 1H), 3.03 - 2.99 (m, 2H), 2.76 - 2.70 (m, 2H), 2.36 - 2.31 (m, 2H), 2.19 - 2.09 (m, 4H), 2.01 - 1.94 (m, 4H), 1.80 - 1.62 (m, 5H), 1.45 - 1.32 (m, 9H), 1.27 - 1.25 (m, 1H), 1.14 - 1.02 (m, 2H), 0.95 - 0.89 (m, 3H), 0.88 - 0.70 (m, 3H) ; LCMS (ESI) m/z : 1259.1 $[M+H]^+$.

合成實例 7

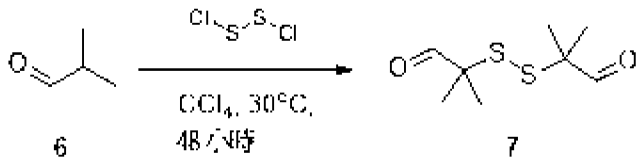
L1-CIDE-BRM1-7 之合成

方案：



實驗：

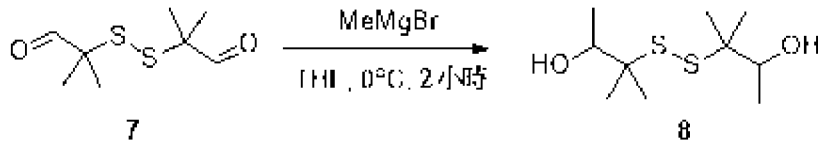
製備化合物7 的一般程序



【0451】 在氮氣氣氛下於 50°C 下，向異丁醛 (2.7 mL, 29.6 mmol) 於四氯化碳 (10 mL) 中之攪拌溶液中逐滴添加二氯化二硫 (1.2 mL, 14.8 mmol)。將反應於 30°C 下在氮氣流中再攪拌 48 小時以去除釋放的氯化氫。TLC (於石油醚中之 25% 乙酸乙酯, $R_f = 0.5$) 指示反應已完成。將溶液在真空下蒸餾，並藉

由急速層析法（用石油醚中之 25% 乙酸乙酯洗脫）進行純化，以得到無色油狀 2-[(1,1-二甲基-2-側氧基-乙基)二氫硫基]-2-甲基丙醛 (3000 mg, 98.2%)。¹H NMR (400 MHz, 氯仿-d) : δ = 9.09 (s, 2H), 1.37 (s, 12H)。

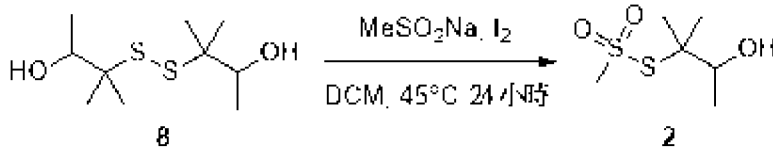
製備化合物 8 的一般程序



【0452】於 0°C 下，在 5 分鐘內向 2,2'-二硫烷二基雙(2-甲基丙醛) (1500.0 mg, 7.3 mmol) 於四氫呋喃 (30 mL) 中之溶液中逐滴添加甲基溴化鎂 (9.7 mL, 29.1 mmol)。將混合物於 0°C 下攪拌 2 小時。

【0453】TLC（於石油醚中之 20% 乙酸乙酯， R_f = 0.5）指示反應已完成。將混合物用飽和 NH_4Cl 水溶液 (10 mL) 淬滅，並用 EtOAc (20 ml $\times$ 3) 萃取。將合併之有機相用水 (20 mL) 及鹽水 (10 mL) 洗滌，經 Na_2SO_4 乾燥，過濾並濃縮，以得到黃色油狀 3-[(2-羥基-1,1-二甲基-丙基)二氫硫基]-3-甲基-丁-2-醇 (1370 mg, 79%)。¹H NMR (400 MHz, 氯仿-d) : δ = 3.77 - 3.74 (m, 1H), 1.31 (s, 6H), 1.26 (d, J = 2.4 Hz, 3H), 1.19 (d, J = 6.4 Hz, 3H)。

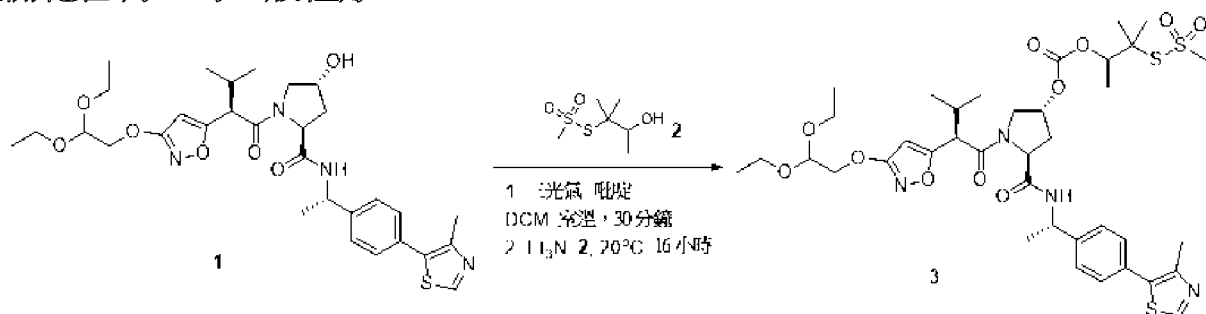
製備化合物 2 的一般程序



【0454】於 25°C 下向 2-甲基-2-[(5-nitro-2-吡啶基)二氫硫基]丙-1-醇 (5983.8 mg, 22.99 mmol) 於二氯甲烷 (50 mL) 中之溶液中添加 3-[(2-羥基-1,1-二甲基-丙基)二氫硫基]-3-甲基-丁-2-醇 (1370.0 mg, 5.75 mmol) 及碘 (2917 mg, 11.49 mmol)。將反應混合物於 45°C 下攪拌 24 小時。TLC（於石油醚中之 33%

EtOAc, $R_f = 0.4$) 表明反應已經完成。過濾混合物，並在真空中濃縮濾液，然後藉由急速層析法（用石油醚中之 0-50% EtOAc 洗脫）進行純化，以得到黃色油狀 3-甲基-3-甲基磺醯基氫硫基-丁-2-醇（460 mg, 產率 40.4%）。 ^1H NMR（400 MHz, 氯仿- d ）： $\delta = 4.14 - 4.09$ (m, 1H), 3.42 (s, 3H), 1.68 (s, 3H), 1.45 (s, 3H), 1.29 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H)。

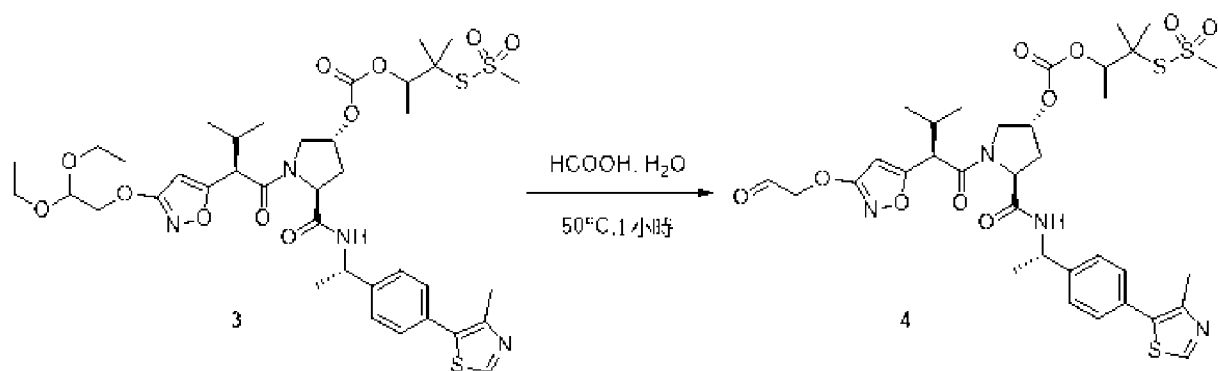
製備化合物 3 的一般程序：



【0455】向三光氣 (112.3 mg, 0.38 mmol) 於二氯甲烷 (2 mL) 中之溶液中添加 3-甲基-3-甲基磺醯基氫硫基-丁-2-醇 (150.0 mg, 0.76 mmol) 及吡啶 (239.3 mg, 3.03 mmol) 於二氯甲烷 (2 mL) 中之溶液，將反應於 25°C 下攪拌 30 分鐘。將反應混合物濃縮至乾，以得到粗產物，其直接用於下一步驟。

【0456】向無水二氯甲烷 (2 mL) 中之上述粗產物中添加 4 Å MS (100 mg)，然後於 20°C 下緩慢添加三乙胺 (32.9 mg, 0.33 mmol) 及化合物 1 (50.0 mg, 0.08 mmol) 於無水二氯甲烷 (2 mL) 中之溶液，並再攪拌 16 小時。濃縮殘餘物，並藉由矽膠急速層析法（用石油醚中之 0-70% 乙酸乙酯洗脫）純化，以得到白色固體狀化合物 3 (64 mg, 93.8%)。LCMS (5-95, AB, 1.5min)：RT = 0.974 分鐘， $m/z = 839.3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

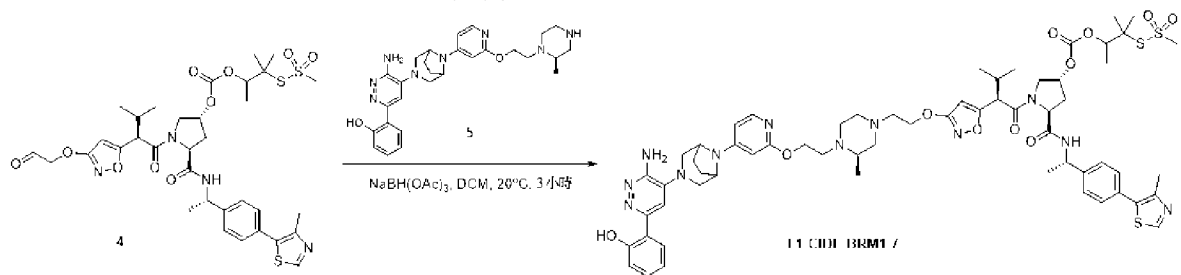
製備化合物 4 的一般程序



【0457】 將化合物 **3** (50.0 mg, 0.06 mmol) 於甲酸 (2 mL) 及水 (2 mL) 中之溶液於 50°C 下攪拌 1 小時。濃縮反應混合物，以得到黃色固體狀化合物 **4** (45 mg, 98.7%)，其直接用於下一步驟。

【0458】 LCMS (5-95, AB, 1.5min) : $R_T = 0.848$ 分鐘， $m/z = 765.2$ [M+H]⁺。

製備 L1-CIDE-BRM1-7 的一般程序：



【0459】 向化合物 **4** (45.0 mg, 0.06 mmol) 於二氯甲烷 (2 mL) 中之溶液中添加化合物 **5** (33.1 mg, 0.06 mmol) 及三乙醯氧基硼氫化鈉 (249.4 mg, 1.18 mmol)。將反應混合物於 20°C 下攪拌 3 小時。濃縮混合物，並藉由 TLC (於 DCM 中之 8% MeOH) 進行純化，以得到白色固體狀 **L1-CIDE-BRM1-7** (15.0 mg, 19.4%)。

【0460】 ¹H NMR (400 MHz, 甲醇-d₄) : $\delta = 8.88$ (s, 1H), 7.81 - 7.75 (m, 2H), 7.49 - 7.41 (m, 5H), 7.24 - 7.20 (m, 1H), 6.92 - 6.87 (m, 2H), 6.57 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H), 6.22 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 6.01 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 5.28 - 5.24 (m, 1H), 5.05 - 5.02 (m, 1H), 4.61 (s, 2H), 4.53 - 4.49 (m, 3H), 4.36 - 4.31 (m, 4H), 4.04 - 3.90

(m, 2H), 3.67 - 3.65 (m, 1H), 3.46 - 3.43 (m, 1H), 3.39 (s, 3H), 3.16 - 3.03 (m, 4H), 2.95 - 2.91 (m, 2H), 2.78 - 2.72 (m, 3H), 2.68 - 2.63 (m, 2H), 2.49 (s, 3H), 2.39 - 2.33 (m, 2H), 2.26 - 2.23 (m, 2H), 2.19 - 2.06 (m, 4H), 1.59 - 1.52 (m, 7H), 1.46 (d, $J = 4.0$ Hz, 2H), 1.40 - 1.29 (m, 6H), 1.14 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H), 1.05 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H), 0.88 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H)。

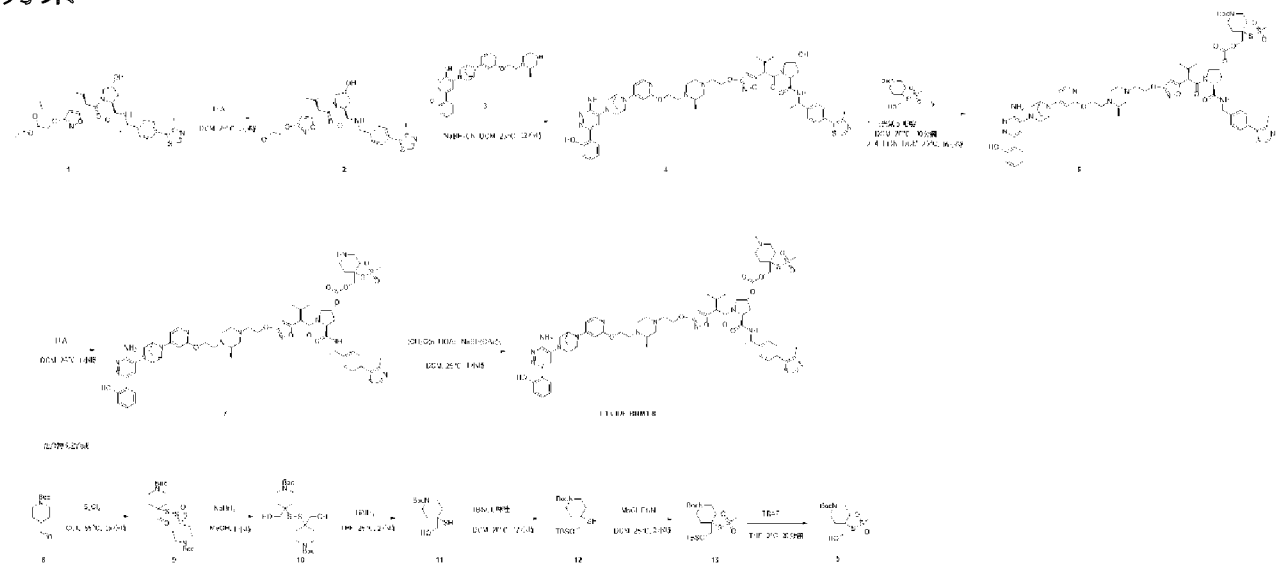
【0461】 LCMS (5-95, AB, 1.5min) : $R_T = 0.829$ 分鐘， $m/z = 633.5$

$[M/2+H]^+$ 。HRMS (5-95AB) : $m/z = 1265.5126$ $[M+H]^+$ 。

合成實例 8

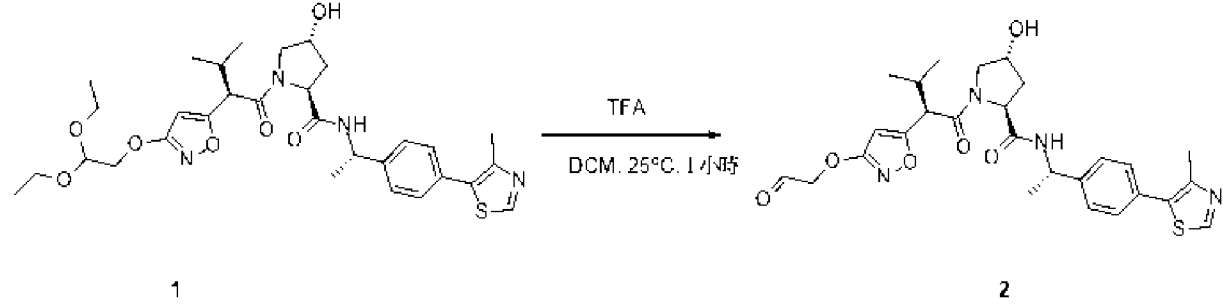
L1-CIDE-BRM1-8 之合成

方案：



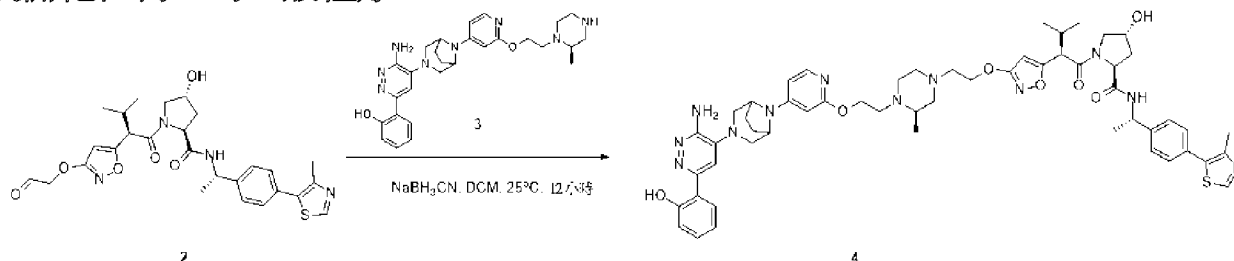
實驗：

製備化合物 2 的一般程序：



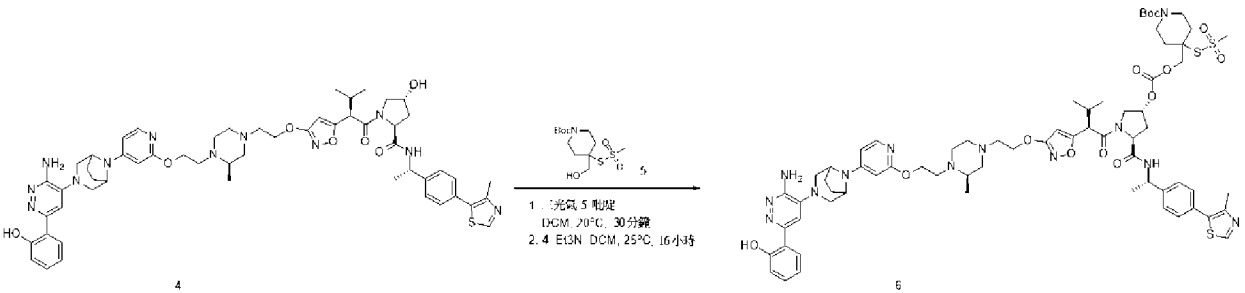
【0462】將**化合物1** (120.00 mg, 0.20 mmol) 於二氯甲烷 (2.00 mL) 及三氟乙酸 (0.40 mL) 中之溶液於 25°C 下攪拌 1 小時。TLC (於 DCM 中之 10% MeOH, $R_f = 0.6$) 表明, 大多數起始材料已消耗, 且形成了新斑點。然後向混合物中添加水 (3.00 mL), 並用飽和 NaHCO_3 (8.00 mL) 調節至 $\text{pH} = 9$ 。然後將混合物用二氯甲烷 (15 mL $\times$ 3) 萃取。濃縮有機層, 以得到白色固體狀粗製**化合物2** (90.00 mg, 85.3%)。LCMS (5-95, AB, 1.5min): $R_T = 0.789$ 分鐘, $m/z = 541.3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

製備**化合物4**的一般程序:



【0463】向**化合物3** (75.50 mg, 0.14 mmol) 及**化合物2** (90.00 mg, 0.14 mmol) 於甲醇 (5.00 mL) 及二氯甲烷 (5.00 mL) 中之溶液中添加氰基硼氫化鈉 (12.9 mg, 0.20 mmol) 及醋酸鈉 (16.80 mg, 0.20 mmol)。將混合物於 25°C 下攪拌 12 小時。TLC (於 DCM 中之 12% MeOH, $R_f = 0.6$) 表明, 大多數起始材料已消耗, 且形成了新斑點。過濾混合物, 並濃縮濾液, 然後藉由 Pre-TLC (於 DCM 中之 12% MeOH) 進行純化, 以得到白色固體狀**化合物4** (40.00 mg, 28.1%)。LCMS (5-95, AB, 1.5min): $R_T = 0.755$ 分鐘, $m/z = 1041.2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

製備**化合物6**的一般程序:

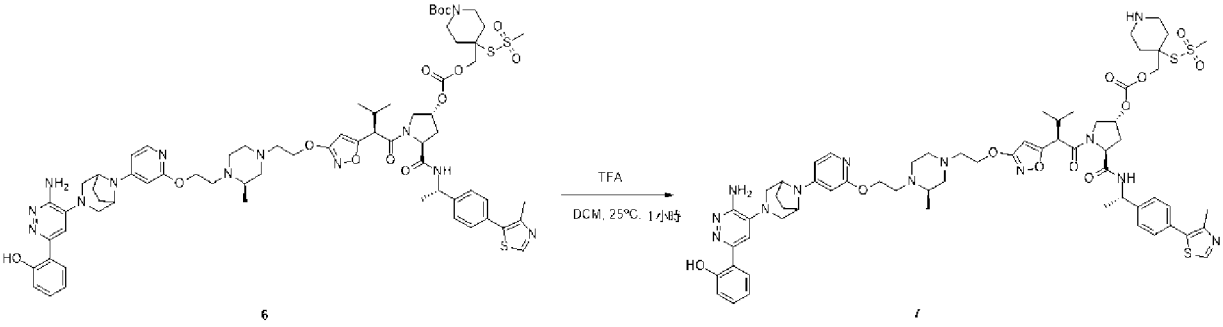


【0464】 向三光氣 (18.3 mg, 0.062 mmol) 及 4A 分子篩於二氯甲烷 (2.0 mL) 中之混合物中添加 4-(羥基甲基)-4-甲基磺醯基氫硫基-哌啶-1-羧酸三級丁酯 (20.0 mg, 0.062 mmol) 及吡啶 (0.02 mL, 0.184 mmol) 於二氯甲烷 (2.0 mL) 中之溶液。將反應混合物於 20°C 下攪拌 30 分鐘。濃縮反應混合物，以得到粗產物，其直接用於下一步驟。

【0465】 向上述粗產物及 4 Å MS (100 mg) 於無水二氯甲烷 (5.00 mL) 中添加 N,N-二異丙基乙胺 (0.02 mL, 0.09 mmol) 及**化合物4** (30.00 mg, 0.03 mmol) 於無水 N,N-二甲基甲醯胺 (2.00 mL) 中之溶液。將混合物於 25°C 下攪拌 16 小時。TLC (於 DCM 中之 11% MeOH, $R_f = 0.6$) 表明，大多數起始材料已消耗，且形成了新斑點。將混合物過濾並濃縮以得到粗產物，其藉由 Pre-TLC (於 DCM 中之 11% MeOH) 進行純化，以得到淺黃色固體狀**化合物6** (25.00 mg, 62.3%)。LCMS (10-80, AB, 7.0min) : $R_T = 3.096$ 分鐘， $m/z = 697.1$

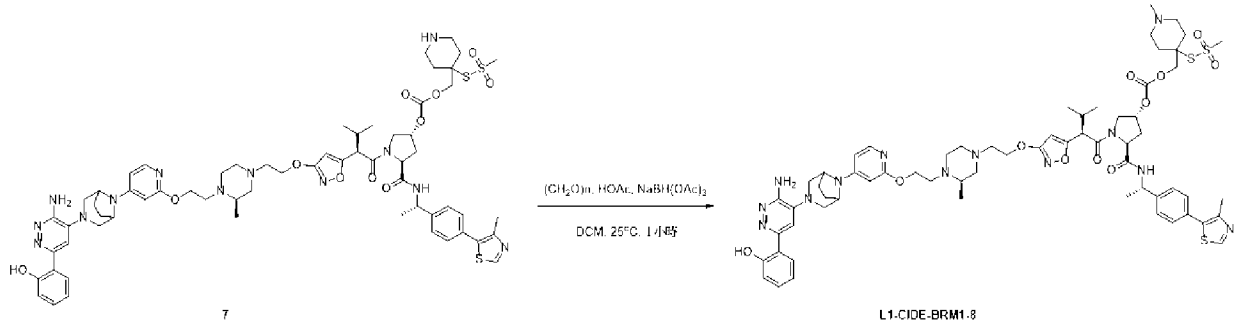
[M/2+H]⁺

製備**化合物7**的一般程序：



【0466】向**化合物6** (20.00 mg, 0.01 mmol) 於二氯甲烷 (1.00 mL) 中之溶液中添加三氟乙酸 (0.80 mL, 10.38 mmol)。將混合物於 25°C 下攪拌 1 小時。濃縮混合物以得到粗產物 **7**，其為 TFA 鹽，直接用於下一步驟。

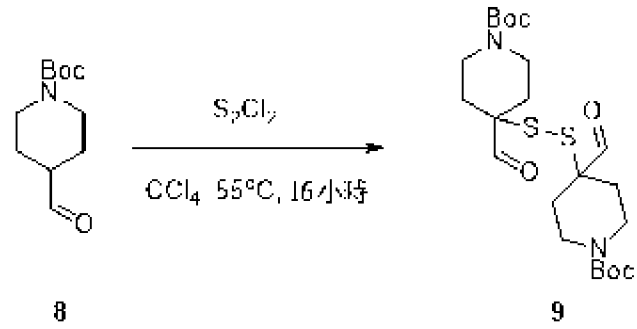
製備 L1-CIDE-BRM1-8 的一般程序：



【0467】向甲醛 (4.3 mg, 0.14 mmol) 及**化合物7** (20.20 mg, 0.01 mmol) 於二氯甲烷 (2 mL) 及甲醇 (1 mL) 中之溶液中添加乙酸 (1.00 mg)。於 25°C 下在 30 分鐘內添加混合物。然後添加三乙醯氧基硼氫化鈉 (9.2 mg, 0.04 mmol)。將混合物於 25°C 下攪拌 1 小時。然後將混合物用 DCM (15 mL) 稀釋，並用飽和 NaHCO₃ (5 mL) 洗滌，並濃縮有機層，然後藉由反相層析 (乙腈 14-44/0.225% FA 水溶液) 純化殘餘物，以得到白色固體狀 **L1-CIDE-BRM1-8** (3.60 mg, 18.2%)。

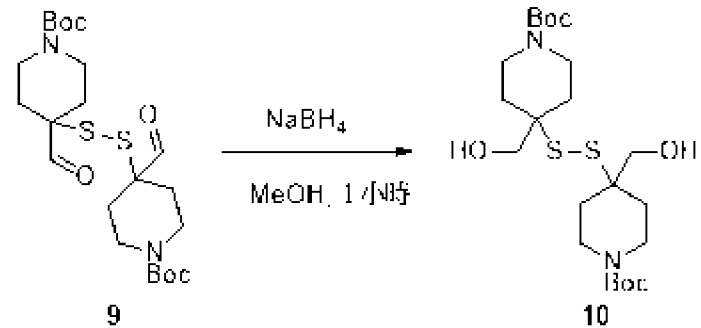
【0468】¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ = 8.99 (s, 1H), 8.49 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.91 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.78 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.49 - 7.36 (m, 6H), 7.22 - 7.20 (m, 1H), 6.88 - 6.85 (m, 2H), 6.54 - 6.52 (m, 1H), 6.13 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 5.97 - 5.94 (m, 2H), 5.25 - 5.21 (m, 1H), 4.93 - 4.89 (m, 1H), 4.52 - 4.43 (m, 6H), 4.26 - 4.21 (m, 6H), 3.87 (br s, 1H), 3.72 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 3.52 (s, 3H), 3.02 - 2.96 (m, 4H), 2.61 (br s, 4H), 2.46 - 2.33 (m, 10H), 2.20 - 2.14 (m, 6H), 1.96 - 1.89 (m, 10H), 1.38 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 0.99 - 0.95 (m, 6H), 0.81 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H)。LCMS (5-95, AB, 1.5min) : R_T = 0.781 分鐘，*m/z* = 1306.5 [M+H]⁺。

製備化合物9 的一般程序



【0469】於 55°C 下向 4-甲醯基-1-哌啶羧酸三級丁酯 (9870.7 mg, 46.28 mmol) 於四氯化碳 (150 mL) 中之混合物中添加二氯化二硫 (1.48 mL, 18.51mmol)，將混合物於 55°C 下攪拌 16 小時，TLC（於二氯甲烷中之 10% 甲醇， $R_f = 0.5$ ）指示反應已完成。過濾混合物，並在真空中濃縮有機層。向殘餘物中添加水 (30 mL)，並用二氯甲烷 (3×50 mL) 萃取，將有機層合併並用 Na_2SO_4 乾燥，過濾並濃縮，以得到粗品，其藉由 Pre-TLC（於二氯甲烷中之 10% 甲醇， $R_f = 0.5$ ）進行純化，以得到白色固體狀 4-[(1-三級丁氧羰基-4-甲醯基-4-哌啶基)二氫硫基]-4-甲醯基-哌啶-1-羧酸三級丁酯 (5.5 g, 60.8%)。 ^1H NMR（400 MHz，氯仿- d ）： $\delta = 9.06$ (s, 2H), 3.73 (br s, 4H), 3.18 - 3.11 (m, 4H), 2.07 - 2.02 (m, 4H), 1.74 - 1.69 (m, 4H), 1.46 (s, 18 H)。

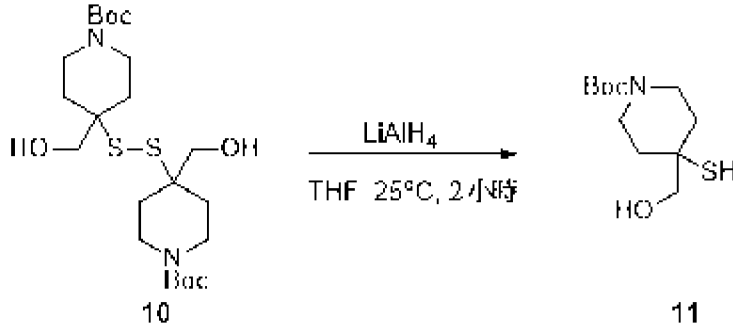
製備化合物10 的一般程序



【0470】向 4-[(1-三級丁氧羰基-4-甲醯基-4-哌啶基)二氫硫基]-4-甲醯基-哌啶-1-羧酸三級丁酯 (3000.0 mg, 6.14 mmol) 於甲醇 (40 mL) 中之混合物中添加

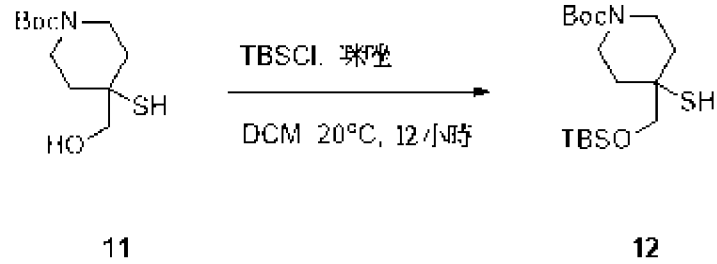
硼氫化鈉 (696.7 mg, 18.42 mmol)，將混合物於 25°C 攪拌 1 小時，TLC（於二氯甲烷中之 10% 甲醇， $R_f=0.5$ ）顯示新斑點，藉由添加水 (30 mL) 以淬滅反應，並將所得混合物用二氯甲烷 (3 × 30 mL) 萃取，將有機層合併，並用 Na_2SO_4 乾燥，過濾並濃縮，以得到粗產物，其藉由矽膠層析法（用二氯甲烷中之 0-3% 甲醇洗脫）進行純化，以得到白色固體狀 4-[[1-三級丁氧羰基-4-(羥基甲基)-4-哌啶基]二氫硫基]-4-(羥基甲基)哌啶-1-羧酸三級丁酯 (3000 mg, 99%)。 ^1H NMR（400 MHz，氯仿- d ）： δ = 3.75 - 3.72 (m, 4H), 3.59 (s, 4H), 3.32 - 3.26 (m, 4H), 1.75 - 1.67 (m, 8H), 1.46 (s, 18H)。

製備化合物 11 的一般程序



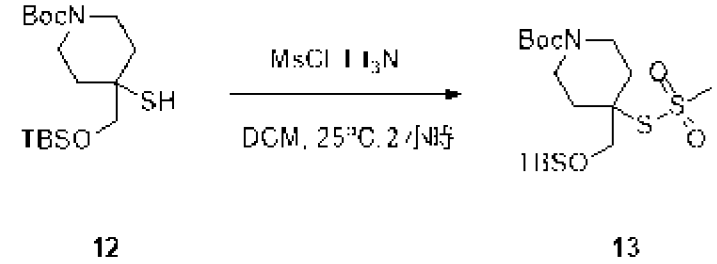
【0471】向氫化鋁鋰 (1232.4 mg, 32.47 mmol) 於四氫呋喃 (40 mL) 中之懸浮液中逐滴添加 4-[[1-三級丁氧羰基-4-(羥基甲基)-4-哌啶基]二氫硫基]-4-(羥基甲基)哌啶-1-羧酸三級丁酯 (3200.0 mg, 6.49 mmol) 於四氫呋喃 (40 mL) 中之溶液。將所形成的混合物在氮氣下於 25°C 下攪拌 2 小時。將反應用 NH_4Cl 水溶液 (10 mL) 淬滅，並用乙酸乙酯 (30 mL × 3) 進行萃取。有機層經無水硫酸鈉乾燥，在真空下濃縮，以得到粗產物 4-(羥基甲基)-4-氫硫基-哌啶-1-羧酸三級丁酯 (2700 mg, 100%)，其直接用於下一步驟。 ^1H NMR（400 MHz，氯仿- d ）： δ = 3.96 - 3.92 (m, 2H), 3.52 (s, 2H) 3.27 - 3.21 (m, 2H), 1.64 - 1.61 (m, 4H), 1.47 (s, 9H)。

製備化合物12 的一般程序



【0472】向咪唑 (1783.5 mg, 26.2 mmol) 及 4-(羥基甲基)-4-氫硫基-哌啶-1-羧酸三級丁酯 (2700.0 mg, 10.92 mmol) 於二氯甲烷 (40 mL) 中之溶液中添加於二氯甲烷 (40 mL) 中之三級丁基二甲基氯矽烷 (2467.8 mg, 16.37 mmol)。將混合物於 20°C 下連續攪拌 12 小時。TLC (於石油醚中之 20% 乙酸乙酯, $R_f = 0.58$) 指示反應已完成。然後將混合物用水 (20 mL) 洗滌, 有機層經無水硫酸鈉乾燥, 並在真空下濃縮, 然後藉由矽膠層析法 (石油醚中之 10% 乙酸乙酯, $R_f = 0.58$) 純化粗產物, 以得到 4-[[三級丁基(二甲基)矽基]氧甲基]-4-氫硫基-哌啶-1-羧酸三級丁酯 (3800 mg, 96.3%)。 ^1H NMR (400 MHz, 氯仿- d) : $\delta = 3.96 - 3.92$ (m, 2H), 3.52 (s, 2H), 3.20 - 3.13 (m, 2H), 1.72 - 1.65 (m, 2H), 1.52 - 1.49 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 0.90 (s, 9H), 0.06 (s, 6H)。

製備化合物13 的一般程序



【0473】在 N_2 保護下, 向甲磺醯氯 (2.51g, 21.91mmol) 於二氯甲烷 (20 mL) 中之溶液中逐滴添加 4-[[三級丁基(二甲基)矽基]氧甲基]-4-氫硫基-哌啶-1-羧酸三級丁酯 (3.8 g, 10.51 mmol) 及三乙胺 (5.45 mL, 42.03 mmol) 於二氯甲烷 (20 mL) 中之溶液。將混合物於 25°C 下攪拌 2 小時。TLC (石油醚中之 20%乙

酸乙酯， $R_f = 0.3$) 顯示新斑點。用水 (30 mL) 淬滅反應，並用二氯甲烷二氯甲烷 (30 mL $\times$ 3) 萃取。濃縮有機層，並藉由矽膠管柱 (用石油醚中之 0-10% 乙酸乙酯洗脫) 進行純化，以得到白色固體狀 4-[[三級丁基(二甲基)矽基]氧甲基]-4-甲基磺醯基氫硫基-哌啶-1-羧酸三級丁酯 (1670 mg, 36.1%)。 ^1H NMR (400 MHz, 氯仿- d) : δ = 3.94 - 3.88 (m, 4H), 3.39 (s, 3H), 3.26 - 3.20 (m, 1H), 1.99 - 1.95 (m, 2H), 1.86 - 1.80 (m, 2H), 1.46 (s, 9H), 0.91 (s, 9H), 0.10 (s, 6H)。LCMS (5-95, AB, 1.5min) : R_T = 1.126 分鐘, m/z = 340.1 $[M-100+H]^+$ 。

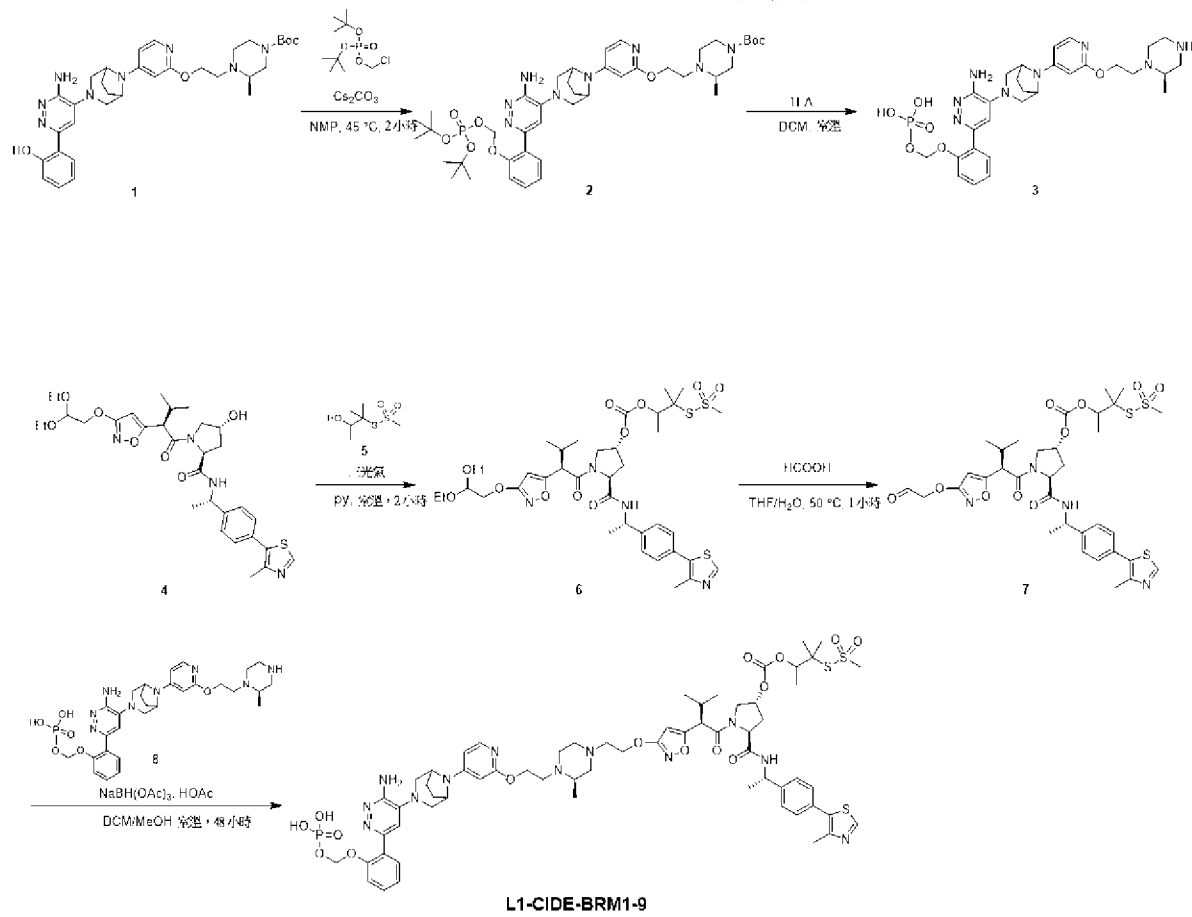
製備化合物5的一般程序：



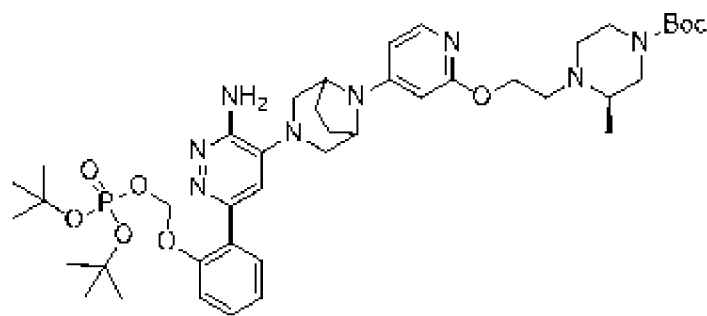
【0474】 向 4-[[三級丁基(二甲基)矽基]氧甲基]-4-甲基磺醯基氫硫基-哌啶-1-羧酸三級丁酯 (1500.00 mg, 3.41 mmol) 於四氫呋喃 (10.0 mL) 中之溶液中添加四丁基氟化銨 (5.12 mL, 5.12 mmol, 1 mol/L, 於 THF 中)。將混合物於 0°C 下攪拌 20 分鐘。TLC (於石油醚中之 60% EtOAc, $R_f=0.4$) 表明大多數起始材料已消耗。向混合物中添加 EtOAc (70 mL), 將有機層用水 (25 mL $\times$ 2)、鹽水 (25 mL) 洗滌, 並濃縮有機層以得到粗產物, 其藉由快速矽膠管柱 (用石油醚中之 0-60% EtOAc) 進行純化, 以得到無色油狀 4-(羥基甲基)-4-甲基磺醯基氫硫基-哌啶-1-羧酸三級丁酯 (670.00 mg, 60.4%)。 ^1H NMR (400 MHz, 氯仿- d) : δ = 3.96 (s, 2H), 3.89 - 3.85 (m, 2H), 3.43 (s, 3H), 3.31 - 3.28 (m, 2H), 2.12 - 2.08 (m, 2H), 1.82 - 1.76 (m, 2H), 1.47 (s, 9H)。

合成實例 9

L1-CIDE-BRM1-9 之合成



步驟 1：(3R)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-(((二-三級丁氧基磷醯基)氧基)甲氧基)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

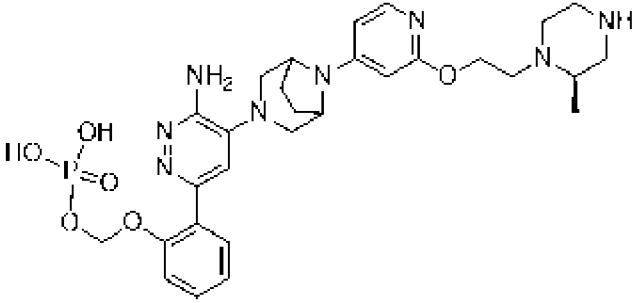


【0475】 向 (3R)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-羟基苯基)嗒咩-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌咩-1-羧酸三級丁酯 (300 mg, 0.49 mmol) 於 1-甲基吡咯啶-2-酮 (8.0 mL) 中之溶液中添加碳酸銨 (0.32 g, 0.97 mmol) 及二-三級丁基(氯甲基)磷酸鹽 (0.19 g, 0.73 mmol)。將反應混合物於 45°C

下攪拌 12 小時。將反應混合物用水 (20 mL) 淬滅，並用乙酸乙酯 (20 mL × 3) 萃取。將合併之有機層用鹽水 (10 mL × 2) 洗滌，經無水硫酸鈉乾燥，過濾並在減壓下濃縮，以得到殘餘物。藉由矽膠層析法（矽膠，100-200 目，於二氯甲烷中之 0-2% 甲醇）純化殘餘物，以得到黃色油狀標題化合物（200 mg，產率 49%）。

【0476】 LCMS (ESI) m/z : 839.3 $[M+H]^+$ 。

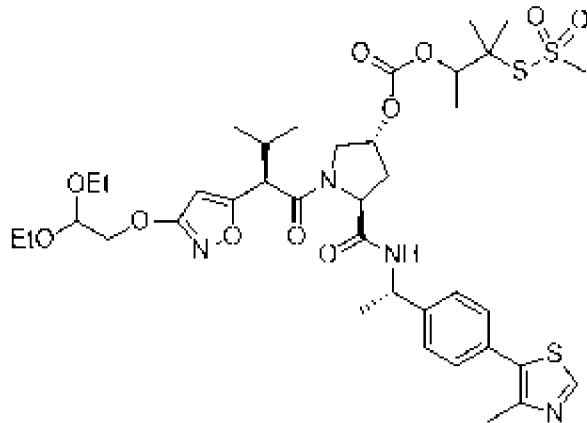
步驟 2：(2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-2-甲基哌啶-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒吡-3-基)苯氧基)甲基二氫磷酸鹽



【0477】 向 (3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-(((二-三級丁氧基磷醯基)氧基)甲氧基)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)乙基)-3-甲基哌啶-1-羧酸三級丁酯 (200 mg, 0.24 mmol) 溶液中添加於六氟異丙醇中之 5% 三氟乙酸 (5.0 mL)。將反應混合物於 20°C 下攪拌 3 小時。濃縮反應，並藉由管柱 Boston Green ODS 150 × 30 mm × 5 μ m（經水（0.225% 甲酸）- 乙腈（5%-35%）活化）進行純化，以得到黃色固體狀標題化合物（100 mg，產率 56.6%）。

【0478】 LCMS (ESI) m/z : 627.3 $[M+H]^+$ 。

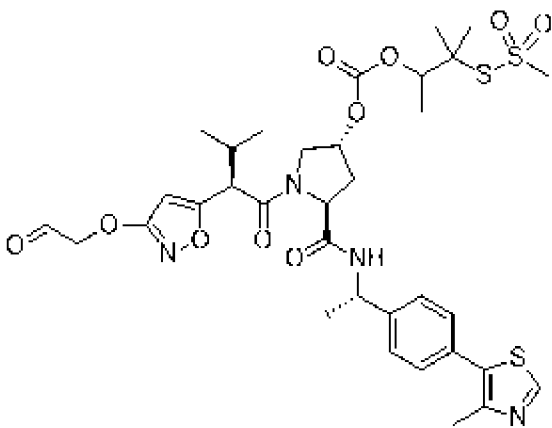
步驟 3：S-(3-((((3*R*,5*S*)-1-((*R*)-2-(3-(2,2-二乙氧基乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁
 醯基)-5-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噁-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-3-基)氧基)羰基)
 氧基)-2-甲基丁-2-基)甲烷硫代磺醯酯



【0479】於 20℃ 下，在 16 小時內向 (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-甲基噁-5-基)苯基)乙基)
 吡咯啉-2-甲醯胺 (380 mg, 0.62 mmol) 和三乙胺 (250 mg, 2.47 mmol) 及 4 Å MS
 (50 mg) 於無水二氯甲烷 (5.0 mL) 中之混合物中緩慢添加S-(3-((羰基)氧基)-2-
 甲基丁-2-基)甲烷硫代磺醯酯 (322 mg, 1.24 mmol)。藉由 Pre-TLC (於二氯甲烷
 中之 7% 甲醇) 純化混合物，以得到白色固體狀標題化合物 (150 mg, 28.9%)。

【0480】 LCMS (ESI) *m/z* : 839.7 [M+H]⁺。

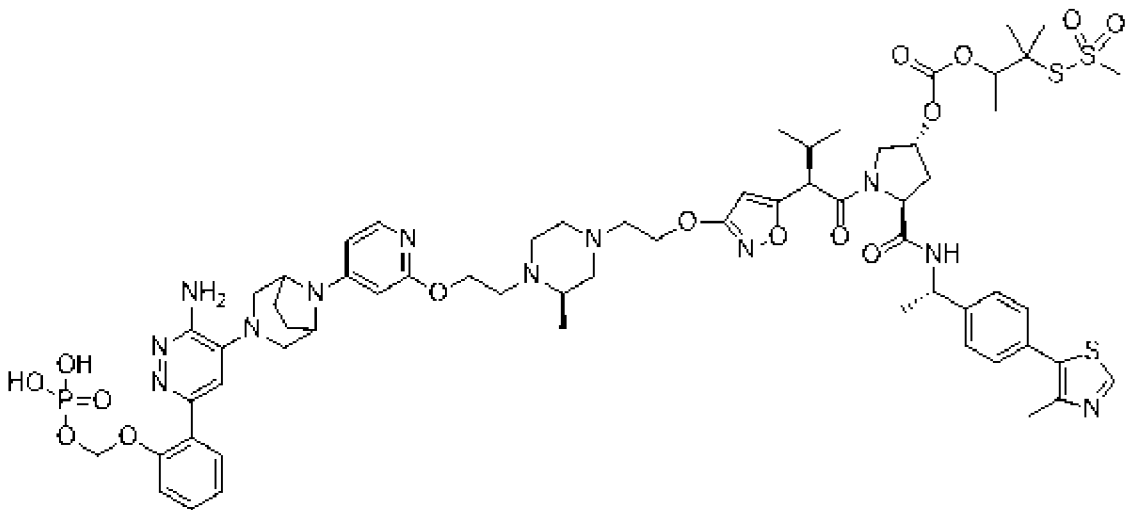
步驟 4：S-(2-甲基-3-((((3*R*,5*S*)-1-((*R*)-3-甲基-2-(3-(2-側氧乙氧基)異噁唑-5-基)
 丁醯基)-5-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噁-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-3-基)氧基)羰
 基)氧基)丁-2-基)甲烷硫代磺醯酯



【0481】 將 *S*-(3-((((((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-甲基噁-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-3-基)氧基)羰基)氧基)-2-甲基丁-2-基)甲烷硫代磺醯酯 (150 mg, 0.18 mmol) 於水 (3.0 mL) 及甲酸 (8.0 mL) 中之溶液於 50℃ 下攪拌 2 小時。將反應混合物濃縮至乾，以得到白色固體狀標題化合物 (135 mg，產率 98.7%)。

【0482】 LCMS (ESI) *m/z* : 765.5 [*M*+*H*]⁺。

步驟 5：*S*-(3-((((((3*R*,5*S*)-1-((2*R*)-2-(3-(2-((3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-((磷醯氧基)甲氧基)苯基)噻吩-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基吡啶-1-基)乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-5-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噁-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-3-基)氧基)羰基)氧基)-2-甲基丁-2-基)甲烷硫代磺醯酯



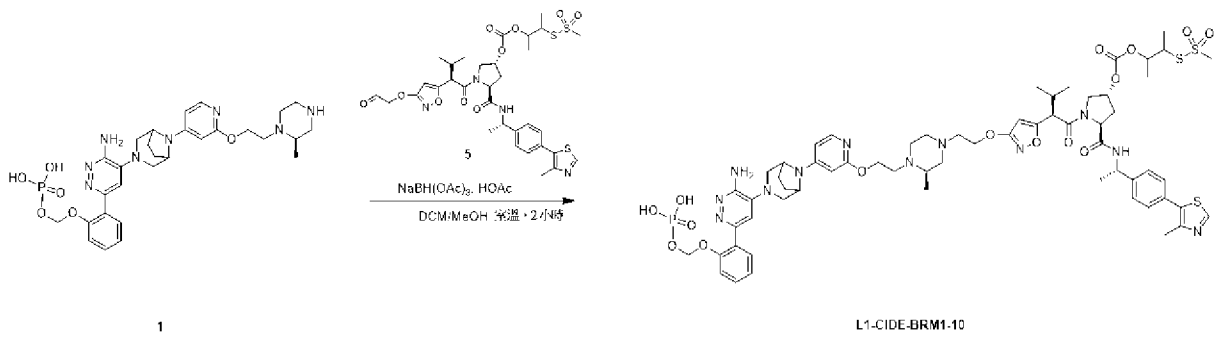
【0483】向 (2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-2-甲基哌啶-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒啉-3-基)苯氧基)甲基 二氫磷酸鹽 (138 mg, 0.19 mmol) 及 *S*-(2-甲基-3-((((3*R*, 5*S*)-1-((*R*)-3-甲基-2-(3-(2-側氧乙氧基)異噁唑-5-基)丁醯基)-5-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-3-基)氧基)羰基)氧基)丁-2-基)甲烷硫代磺醯酯 (130 mg, 0.17 mmol) 於二氯甲烷 (5.0 mL) 及甲醇 (5.0 mL) 中之溶液中添加三乙醯氧基硼氫化鈉 (720 mg, 3.40 mmol)。將反應混合物於 40°C 下攪拌 48 小時。藉由管柱 Welch Xtimate C18 150 × 25mm × 5 μ m (經水 (0.225% 甲酸) - 乙腈 20-50% 活化) 純化反應混合物，以得到白色固體狀標題化合物 (54.2 mg, 21.3%)。

【0484】LCMS (ESI) m/z : 1375.5 $[M+H]^+$ 。

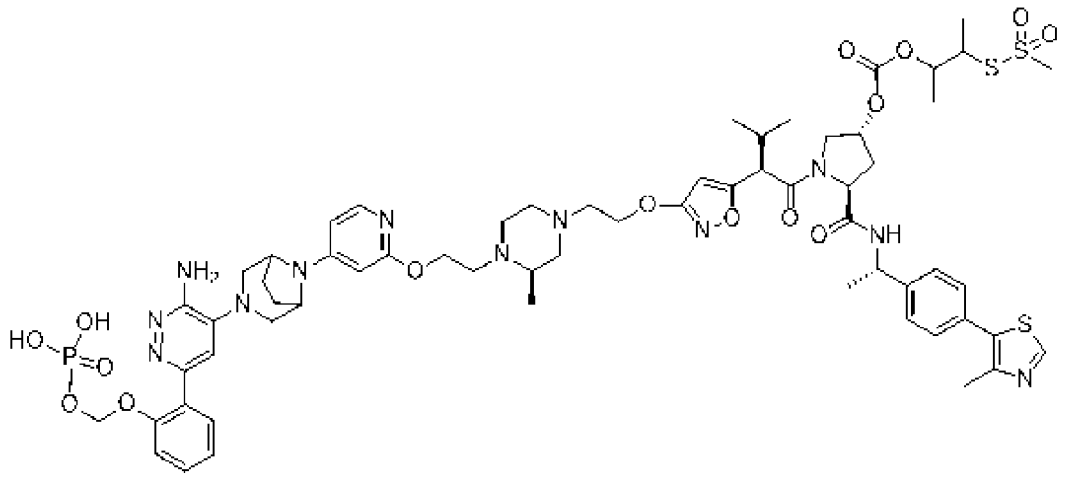
【0485】 ^1H NMR (400 MHz, DMSO - d_6) δ (ppm) 8.98 (s, 1H), 8.52 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.14 (s, 2H), 7.74 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 7.61 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.47 - 7.30 (m, 5H), 7.29 - 7.24 (m, 1H), 7.03 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 6.50 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 6.26 (s, 1H), 6.12 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 5.79 - 5.75 (m, 1H), 5.51 - 5.46 (m, 2H), 5.23 - 5.18 (m, 1H), 5.06 - 4.85 (m, 3H), 4.48 - 4.35 (m, 5H), 4.26 - 4.23 (m, 2H), 3.89 - 3.83 (m, 2H), 3.75 - 3.71 (m, 2H), 3.09 - 2.99 (m, 5H), 2.97 - 2.87 (m, 4H), 2.84 - 2.77 (m, 3H), 2.73 - 2.71 (m, 2H), 2.46 - 2.44 (m, 3H), 2.30 - 2.11 (m, 5H), 2.05 - 1.94 (m, 3H), 1.57 - 1.35 (m, 9H), 1.33 - 1.22 (m, 6H), 1.11 - 1.04 (m, 4H), 0.98 - 0.91 (m, 3H), 0.86 - 0.77 (m, 3H)。

合成實例 10

L1-CIDE-BRM1-10 之合成



步驟 1：*S*-(3-((((((3*R*,5*S*)-1-((2*R*)-2-(3-(2-((3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-((磷鹽氧基)甲氧基)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-基)乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁鹽基)-5-(((*S*)-1-(4-(4-甲基唑-5-基)苯基)乙基)胺甲鹽基)吡咯啉-3-基)氧基)羰基)氧基)丁-2-基)甲烷硫代磷鹽酯



【0486】 向 *S*-(3-((((((3*R*, 5*S*)-1-((*R*)-3-甲基-2-(3-(2-側氧乙氧基)異噁唑-5-基)丁鹽基)-5-(((*S*)-1-(4-(4-甲基唑-5-基)苯基)乙基)胺甲鹽基)吡咯啉-3-基)氧基)羰基)氧基)丁-2-基)甲烷硫代磷鹽酯 (100 mg, 0.13 mmol) 及 (2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-2-甲基哌咩-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒咩-3-基)苯氧基)甲基二氫磷酸鹽 (99.2 mg, 0.16 mmol) 於二氯甲烷 (1.00 mL) 及甲醇 (1.00 mL) 中之溶液中添加三乙鹽氧基硼氫化鈉 (615 mg, 2.9 mmol)。將反應混合物於 20℃ 下攪拌 3 小時。藉由管柱 Phenomenex Gemini-NX C18 75 × 30 mm

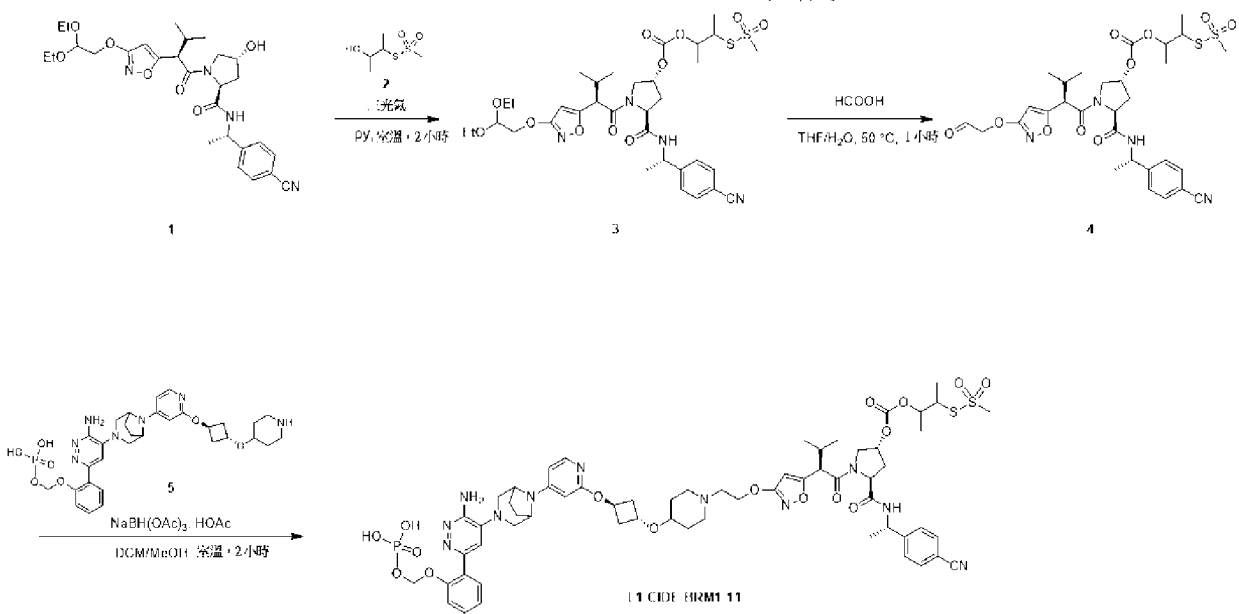
× 3 μm (經水 (0.225% 甲酸) - 乙腈 10%-40% 活化) 純化混合物, 以得到白色固體狀標題化合物 (110 mg, 51.4%)。

【0487】 LCMS (ESI) m/z : 1375.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

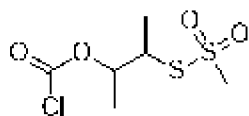
【0488】 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) 8.99 (s, 1H), 8.51 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 8.15 (s, 2H), 7.82 - 7.72 (m, 1H), 7.64 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.52 - 7.32 (m, 6H), 7.30 - 7.24 (m, 1H), 7.08 - 7.03 (m, 1H), 6.56 - 6.46 (m, 1H), 6.33 - 6.30 (m, 1H), 6.14 (s, 1H), 5.91 - 5.86 (m, 1H), 5.55-5.50 (m, 2H), 5.21 - 5.18 (m, 1H), 4.98 - 4.87 (m, 2H), 4.51 - 4.31 (m, 5H), 4.30 - 4.22 (m, 2H), 3.91 - 3.84 (m, 2H), 3.77 - 3.73 (m, 2H), 3.58 - 3.51 (m, 2H), 3.18 - 3.11 (m, 4H), 3.07 - 2.97 (m, 4H), 2.95 - 2.81 (m, 5H), 2.79 - 2.72 (m, 2H), 2.47 - 2.45 (m, 3H), 2.37 - 2.14 (m, 5H), 2.10 - 1.88 (m, 3H), 1.48 - 1.23 (m, 9H), 1.20 - 1.05 (m, 3H), 0.98 - 0.93 (m, 3H), 0.88 - 0.76 (m, 3H)。

合成實例 11

L1-CIDE-BRM1-11 之合成

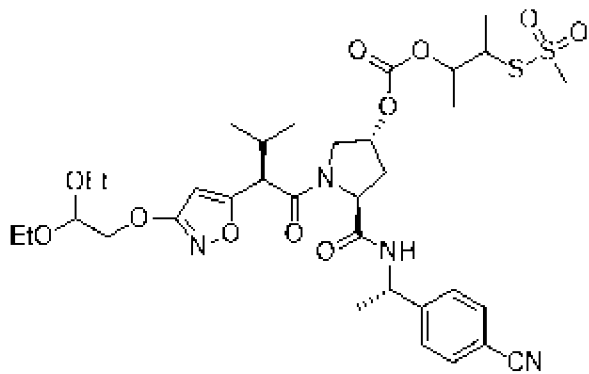


步驟 1 : S-(3-((羧基)氧基)丁-2-基)甲烷硫代磺酸酯



【0489】 向 *S*-(3-羥基丁-2-基)甲烷硫代磺醯酯 (200 mg, 1.09 mmol) 及吡啶 (343 mg, 4.34 mmol) 於二氯甲烷 (4.0 mL) 中之溶液中添加於二氯甲烷 (2.0 mL) 中之三光氣 (129 mg, 0.43 mmol)。將反應混合物於 25°C 下攪拌 30 分鐘。將反應混合物濃縮至乾，以得到黃色油狀標題化合物 (250 mg，產率 93.4%)，其直接用於下一步驟。

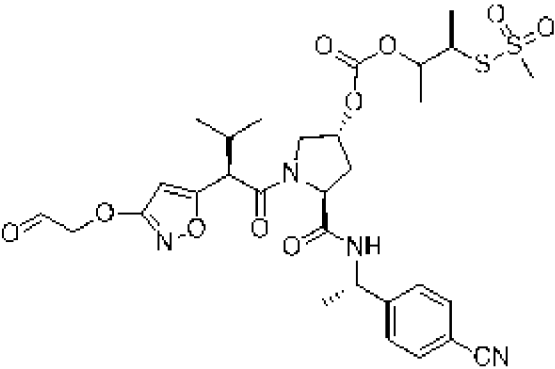
步驟 2：*S*-(3-((((3*R*, 5*S*)-5-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-1-((*R*)-2-(3-(2,2-二乙氧基乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)吡咯啉-3-基)氧基)羰基)氧基)丁-2-基)甲烷硫代磺醯酯



【0490】 於 20°C 下，在 16 小時內向 (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 (260 mg, 0.48 mmol)、三乙胺 (194 mg, 1.92 mmol) 及 4 Å MS (80 mg) 於無水 DCM (4.0 mL) 中之混合物中緩慢添加於無水二氯甲烷 (2.0 mL) 中之 *S*-(3-((羰基)氧基)丁-2-基)甲烷硫代磺醯酯 (250 mg, 1.01 mmol)。過濾反應混合物，並藉由急速層析法 (矽膠，100-200 目，於石油醚中之 0-70% 乙酸乙酯) 純化濾液，以得到黃色油狀標題化合物 (150 mg, 41.6%)。

【0491】 LCMS (ESI) *m/z* : 752.9 [M+H]⁺。

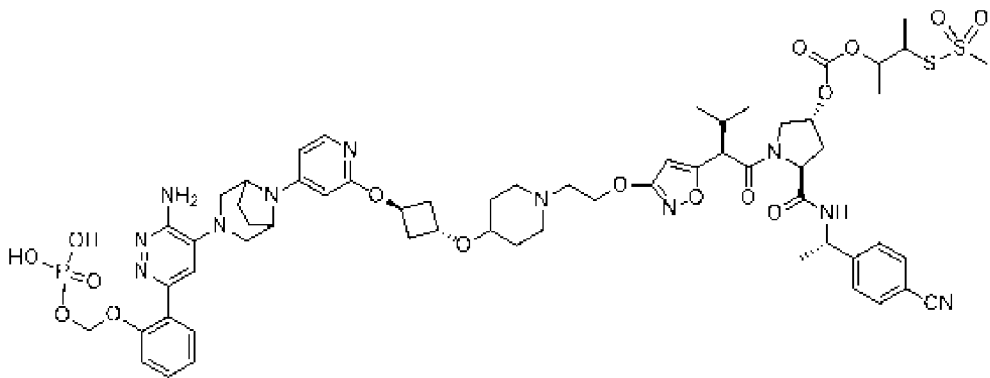
步驟 3：S-(3-((((3*R*, 5*S*)-5-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-1-((*R*)-3-甲基-2-(3-(2-側氧乙氧基)異噁唑-5-基)丁醯基)吡咯啉-3-基)氧基)羰基)氧基)丁-2-基)甲烷硫代磺醯酯



【0492】 將 S-(3-((((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)氧基)羰基)氧基)丁-2-基)甲烷硫代磺醯酯 (150 mg, 0.20 mmol) 於甲酸 (5.0 mL) 及水 (1.0 mL) 中之溶液於 50°C 下攪拌 16 小時。將反應混合物濃縮至乾，以得到黃色油狀標題化合物 (100 mg，產率 73.9%)。

【0493】 LCMS (ESI) *m/z* : 679.5 [*M*+*H*]⁺。

步驟 4：S-(3-((((3*R*,5*S*)-1-((2*R*)-2-(3-(2-(4-((1*r*,3*r*)-3-((4-(3-(3-胺基-6-(2-((磷醯氧基)甲氧基)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)哌吡-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)吡咯啉-3-基)氧基)羰基)氧基)丁-2-基)甲烷硫代磺醯酯



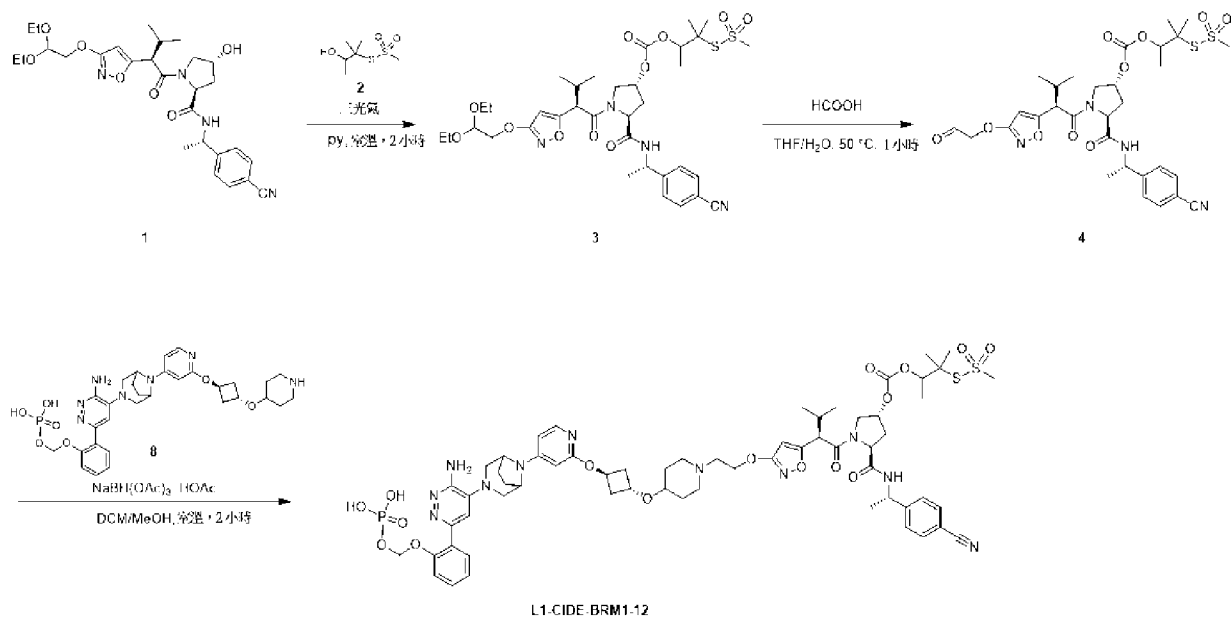
【0494】 向 (2-(6-胺基-5-(8-(2-((1*r*,3*r*)-3-(哌啶-4-基氧基)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒啉-3-基)苯氧基)甲基二氫磷酸鹽 (169 mg, 0.22 mmol) 及 *S*-(3-((((3*R*,5*S*)-5-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-1-((*R*)-2-(3-(2,2-二乙氧基乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)吡咯啉-3-基)氧基)羰基)氧基)丁-2-基)甲烷硫代磷醯酯 (150 mg, 0.22 mmol) 於二氯甲烷 (5.0 mL) 及甲醇 (5.0 mL) 中之溶液中添加三乙醯氧基硼氫化鈉 (1.40 g, 6.63 mmol)。將反應混合物於 20°C 下攪拌 48 小時。藉由管柱 Phenomenex Gemini-NX C18 75 × 30mm × 3 μm (經水 (0.225% 甲酸) - 乙腈 10-40% 活化) 純化反應混合物，以得到白色固體狀標題化合物 (25.6 mg，產率 8.8%)。

【0495】 LCMS (ESI) *m/z* : 659.1 [*M*/2+*H*]⁺。

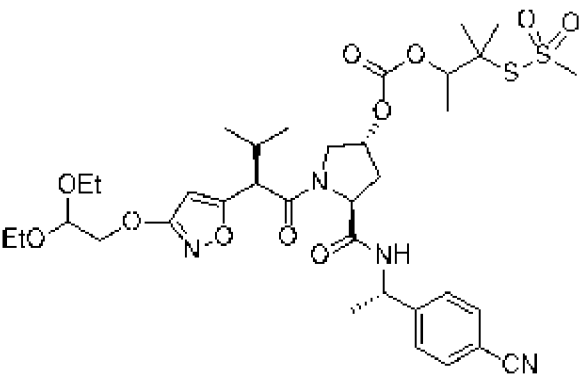
【0496】 ¹H NMR (400 MHz, DMSO - *d*₆) δ (ppm) 8.58 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.82 - 7.74 (m, 3H), 7.55 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.50 - 7.43 (m, 3H), 7.39 - 7.34 (m, 1H), 7.22 (s, 1H), 7.15 - 7.09 (m, 1H), 6.54 - 6.51 (m, 1H), 6.37 - 6.21 (m, 2H), 6.16 - 6.10 (m, 2H), 5.57 - 5.52 (m, 2H), 5.18 - 5.12 (m, 2H), 4.99 - 4.87 (m, 2H), 4.52 - 4.44 (m, 2H), 4.40 - 4.22 (m, 4H), 3.87 - 3.82 (m, 2H), 3.74 - 3.70 (m, 1H), 3.60 - 3.50 (m, 2H), 3.15 - 3.00 (m, 2H), 2.96 - 2.79 (m, 4H), 2.69 - 2.64 (m, 1H), 2.35 - 2.18 (m, 9H), 2.16 - 2.09 (m, 2H), 2.02 - 1.74 (m, 6H), 1.53 - 1.23 (m, 12H), 0.95 - 0.91 (m, 3H), 0.85 - 0.74 (m, 3H)。

合成實例 12

L1-CIDE-BRM1-12 之合成



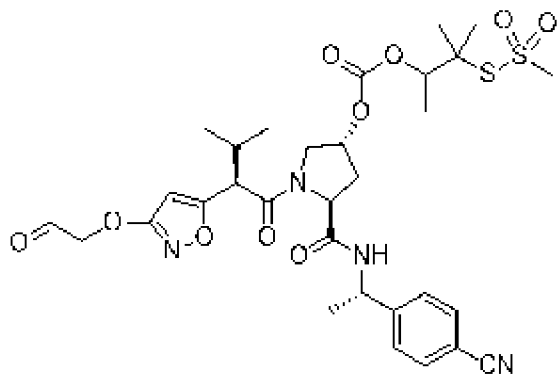
步驟 1：*S*-(3-((((3*R*,5*S*)-5-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-1-((*R*)-2-(3-(2,2-二乙氧基乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)吡咯啉-3-基)氧基)羰基)氧基)-2-甲基丁-2-基)甲烷硫代磺醯酯



【0497】於 20℃ 下，在 16 小時內向 (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, 0.55 mmol)、吡啶 (175 mg, 2.21 mmol) 及 4 Å MS (100 mg) 於無水二氯甲烷 (5.0 mL) 中之混合物中緩慢添加於無水二氯甲烷 (2 mL) 中之 *S*-(3-((羰基)氧基)-2-甲基丁-2-基)甲烷硫代磺醯酯 (259 mg, 1.00 mmol)。藉由 Pre-TLC (於二氯甲烷中之 7% 甲醇) 純化反應混合物，以得到白色固體狀標題化合物 (60.0 mg, 14.2%)。

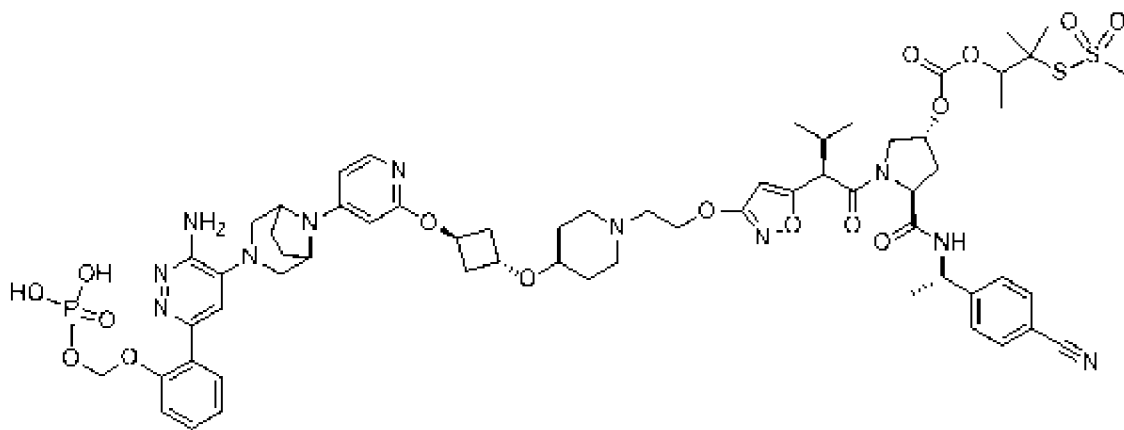
【0498】 LCMS (ESI) m/z : 722.1 [M+H]⁺ 。

步驟 3 : *S*-(3-((((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)氧基)羰基)氧基)-2-甲基丁-2-基)甲烷硫代磺醯酯



【0499】 *S*-(3-((((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)氧基)羰基)氧基)-2-甲基丁-2-基)甲烷硫代磺醯酯 (60.0 mg, 0.08 mmol) 於水 (1.00 mL) 及甲酸 (5.00 mL) 中之溶液。將反應混合物於 50°C 下攪拌 2 小時。濃縮所得殘餘物，以得到白色固體狀標題化合物 (50 mg, 92.2%)。LCMS (ESI) m/z : 693.2 [M+H]⁺ 。

步驟 4 : *S*-(3-((((3*R*,5*S*)-1-((2*R*)-2-(3-(2-(4-((1*r*,3*r*)-3-((4-(3-(3-胺基-6-(2-((磷醯氧基)甲氧基)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)哌吡-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)吡咯啉-3-基)氧基)羰基)氧基)-2-甲基丁-2-基)甲烷硫代磺醯酯



【0500】 向 (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)嗒咭-3-基)苯氧基)甲基二氫磷酸鹽 (138.51 mg, 0.18 mmol) 及 *S*-(3-((((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)氧基)羰基)氧基)-2-甲基丁-2-基)甲烷硫代磷醯酯 (125 mg, 0.18 mmol) 於二氯甲烷 (5.00 mL) 及甲醇 (5.00 mL) 中之溶液中添加三乙醯氧基硼氫化鈉 (38.0 mg, 0.18 mmol)。將反應混合物於 20°C 下攪拌 36 小時。藉由管柱 Welch Xtimate C18 150 × 25mm × 5 μm (經水 (0.225% 甲酸) - 乙腈 17-47% 活化) 純化反應混合物，以得到白色固體狀標題化合物 (15.9 mg，產率 50.4%)。

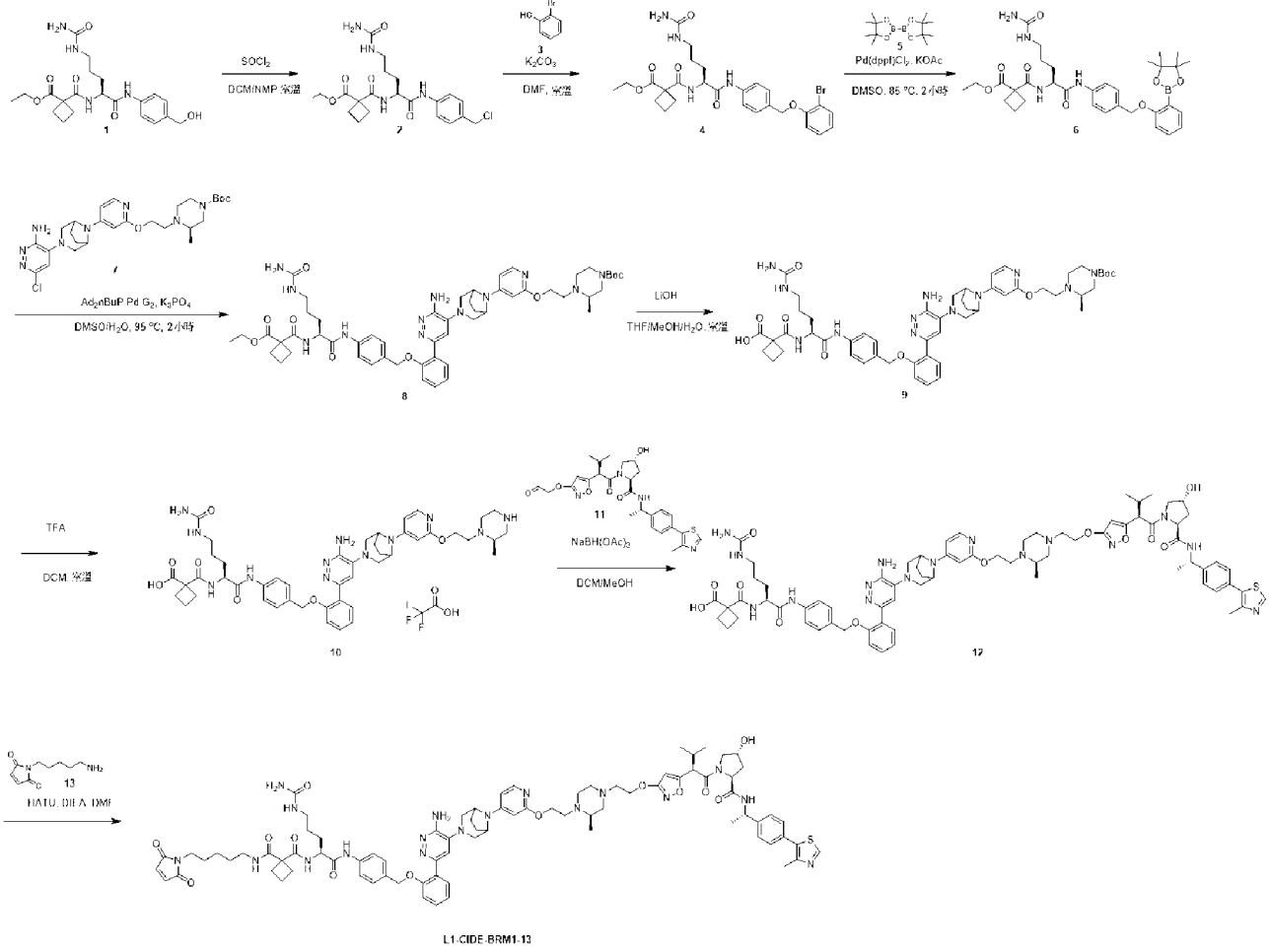
【0501】 LCMS (ESI) *m/z* : 666.1 [*M*/2+*H*]⁺。

【0502】 ¹H NMR (400 MHz, DMSO - *d*₆) δ (ppm) 8.61 - 8.56 (m, 1H), 7.81 - 7.73 (m, 3H), 7.57 - 7.42 (m, 4H), 7.38 - 7.32 (m, 1H), 7.22 (s, 1H), 7.15 - 7.08 (m, 1H), 6.54 - 6.50 (m, 1H), 6.29 - 6.25 (m, 2H), 6.15 - 6.10 (m, 2H), 5.58 - 5.52 (m, 2H), 5.22 - 5.11 (m, 2H), 5.04 - 5.01 (m, 1H), 4.94 - 4.91 (m, 1H), 4.49 - 4.45 (m, 2H), 4.41 - 4.36 (m, 1H), 4.28 - 4.25 (m, 3H), 3.90 - 3.82 (m, 2H), 3.75 - 3.71 (m, 2H), 3.56 - 3.51 (m, 1H), 3.10 - 2.82 (m, 5H), 2.31 - 2.18 (m, 7H), 2.16 - 2.09 (m,

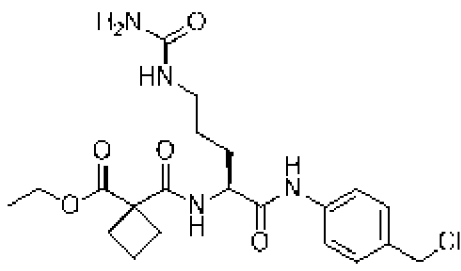
2H), 2.02 - 1.77 (m, 5H), 1.56 - 1.40 (m, 11H), 1.39 - 1.20 (m, 8H), 1.16 - 1.12 (m, 1H), 0.95 - 0.91 (m, 3H), 0.85 - 0.76 (m, 4H)。

合成實例 13

L1-CIDE-BRM1-13 之合成



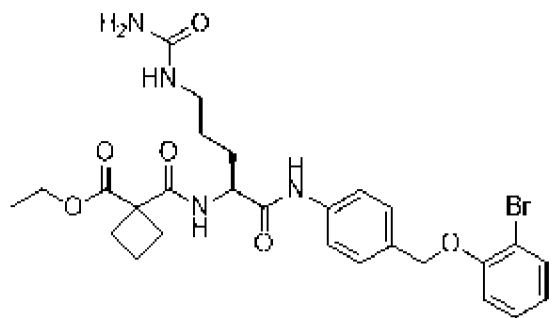
步驟 1：(S)-1-((1-((4-(氯甲基)苯基)胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷甲酸乙酯



【0503】於 25℃ 下向 (S)-1-((1-((4-(羥基甲基)苯基)胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷甲酸乙酯 (1.4 g, 3.22 mmol) 於二氯甲烷 (50.0 mL) 及

NMP (1.0 mL) 中之溶液中添加亞硫醯氯 (0.70 mL, 9.67 mmol)。將反應混合物於 25°C 下攪拌 3 小時。藉由急速層析法 (矽膠, 100-200 目, 於二氯甲烷中之 0-5% 甲醇) 純化反應混合物, 以得到黃色油狀標題化合物 (1.40 g, 產率 96%)。

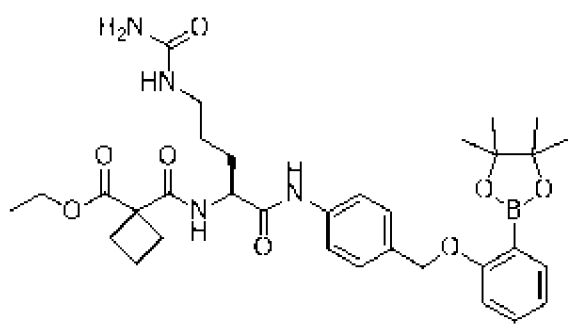
步驟 2：(S)-1-((1-((4-((2-溴苯氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷甲酸乙酯



【0504】 於 25°C 下向 (S)-1-((1-((4-(氯甲基)苯基)胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷甲酸乙酯 (1.40 g, 3.09 mmol) 及碳酸鉀₃ (1.07 g, 7.73 mmol) 於 N,N-二甲基甲醯胺 (60 mL) 中之溶液中添加 2-溴苯酚 (0.54 mL, 4.64 mmol)。將反應於 25°C 下攪拌 3 小時。將反應用水 (30.0 mL) 稀釋, 並用二氯甲烷 (50.0 mL × 3) 萃取。將合併之有機層用鹽水 (20.0 mL × 2) 洗滌, 經硫酸鈉乾燥, 過濾, 並濃縮至乾。藉由急速層析法 (矽膠, 100-200 目, 於二氯甲烷中之 0-5% 甲醇) 純化殘餘物, 以得到白色固體狀標題化合物 (1.1 g, 產率 60%)。

【0505】 LCMS (ESI) m/z : 590.7 [M+H]⁺。

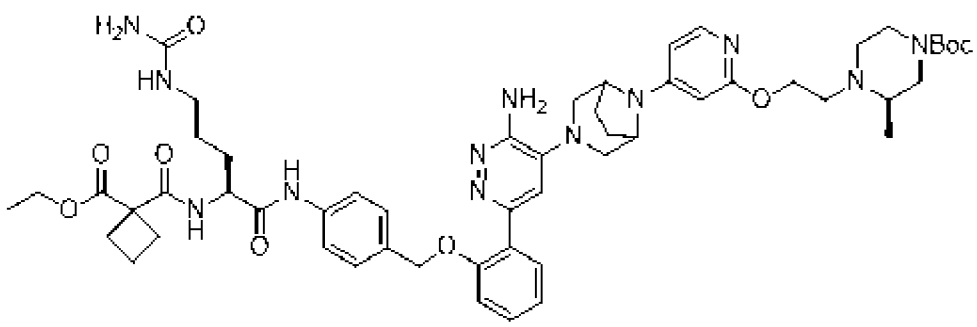
步驟 3：(S)-1-((1-側氧基-1-((4-((2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二側氧基硼戊環-2-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷甲酸乙酯



【0506】 向 (S)-1-((1-((4-((2-溴苯氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷甲酸乙酯 (1.10 g, 1.87 mmol) 及雙(頻哪醇)二硼 (711 mg, 2.80 mmol) 於二甲亞砜 (20.0 mL) 中之溶液中添加 Pd(dppf)Cl₂ (137 mg, 0.19 mmol) 及乙酸鉀 (549 mg, 5.60 mmol)。將混合物在 N₂ 下於 100°C 下攪拌 3 小時。將粗製混合物直接用於下一步驟。

【0507】 LCMS (ESI) *m/z* : 637.1 [M+H]⁺。

步驟 4 : (3R)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-((4-((S)-2-(1-(乙氧基羰基)環丁烷甲醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)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)乙基)-3-甲基哌啶-1-羧酸三級丁酯

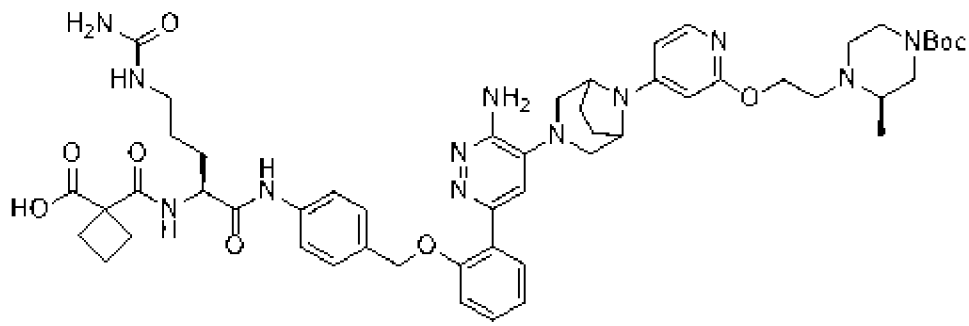


【0508】 向 (3R)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-氯嗒吡-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌啶-1-羧酸三級丁酯 (750 mg, 1.28 mmol) 及正磷酸三鉀 (814 mg, 3.84 mmol) 於二甲亞砜 (15.0 mL) 及 H₂O (1.00 mL) 中之溶液中添加氯[(二(1-金剛烷基)-正丁基膦)-2-(2-胺基聯苯基)]鉀(II) (171 mg, 0.26 mmol) 及 (S)-1-((1-側氧基-1-((4-((2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二側氧基硼戊環-2-基)

苯氧基)甲基)苯基)胺基)-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷甲酸乙酯 (832 mg, 1.31 mmol)。將混合物在 N₂ 下於 100℃ 下攪拌 3 小時。藉由矽膠管柱（矽膠，100-200 目，於二氯甲烷中之 0-15% 甲醇）純化反應，以得到黑色油狀標題化合物（400 mg，產率 28%）。

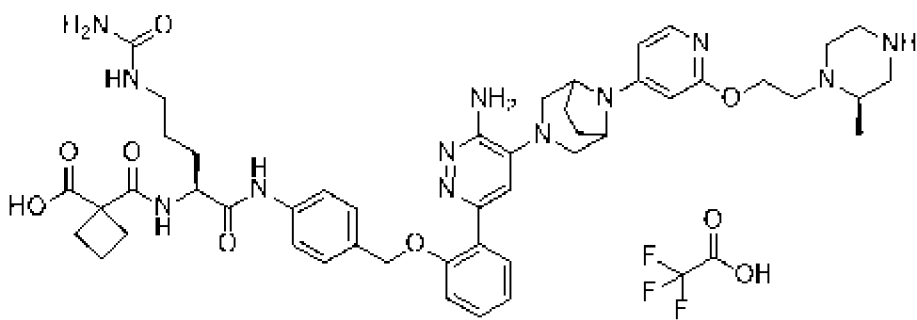
【0509】 LCMS (ESI) *m/z* : 1251.0 [M+H]⁺。

步驟 5：1-(((2*S*)-1-(((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(三級丁氧羰基)-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-3-基)嗒啉-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷甲酸



【0510】 向 (3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-((4-((*S*)-2-(1-(乙氧基羰基)環丁烷甲醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苄基)氧基)苯基)嗒啉-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌啶-1-羧酸三級丁酯 (400 mg, 0.39 mmol) 於甲醇 (5.0 mL) 及水 (2.0 mL) 中之溶液中添加氫氧化鋰一水合物 (92.7 mg, 3.87 mmol)。將混合物在 N₂ 下於 25℃ 下攪拌 3 小時。將反應混合物濃縮至乾，以得到黑色固體狀標題化合物（300 mg，產率 77.1%）。LCMS (ESI) *m/z* : 1005.6 [M+H]⁺。

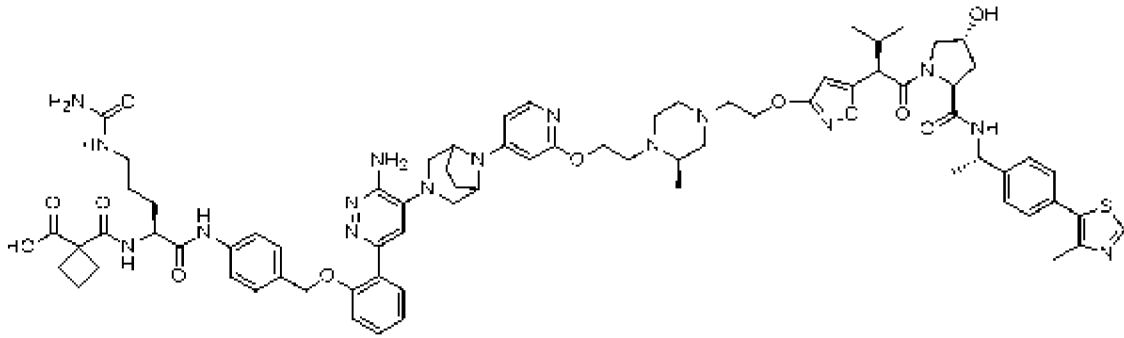
步驟 6：1-(((2*S*)-1-(((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-2-甲基哌啶-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒啉-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷甲酸2,2,2-三氟乙酸酯



【0511】 向 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(三級丁氧羰基)-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-3-基)嗒啉-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷甲酸 (300 mg, 0.3 mmol) 於二氯甲烷 (20.0 mL) 中之溶液中添加三氟乙酸 (0.20 mL, 3.00 mmol)。將溶液於 20°C 下攪拌 5 小時，並濃縮至乾。藉由製備型 HPLC 純化粗產物，其中使用下列條件（柱：Welch Xtimate C18 100 × 40 mm × 3 μm；流動相：12-42% 水（0.075% 三氟乙酸）- 乙腈），以得到白色固體狀標題化合物 (89 mg, 32.9%)。

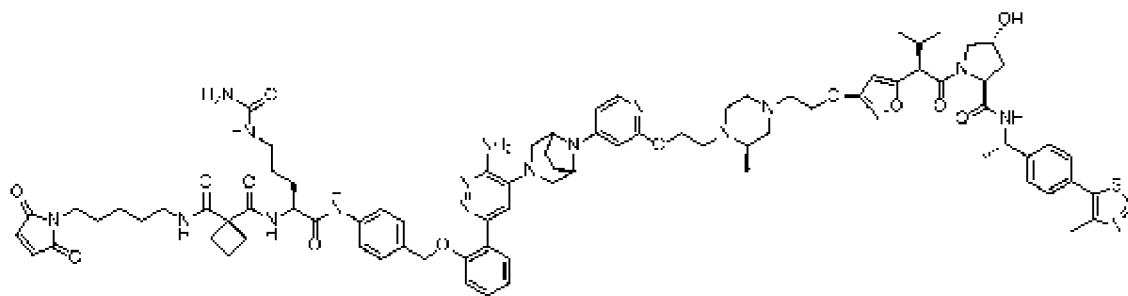
【0512】 LCMS (ESI) m/z : 905.5 [M+H]⁺。

步驟 7：1-(((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-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啶-1-基)-3-甲基-1-側氧丁-2-基)異噁唑-3-基)氧基)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-3-基)嗒啉-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷甲酸



【0513】 向 (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-甲基噁-5-基)苯基)乙基)吡咯啉-2-甲醯胺 (86.02 mg, 0.16 mmol) 及 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)嗒吡啶-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷甲酸 2,2,2-三氟乙酸酯 (96.0 mg, 0.11mmol) 於二氯甲烷 (1.50 mL) 及甲醇 (1.50 mL) 中之溶液中添加氰基硼氫化鈉 (13.6 mg, 0.21 mmol)。將反應混合物於 20°C 下攪拌 3 小時。藉由 Phenomenex Gemini-NX 80 × 40 mm × 3 μm (乙腈 17-47% /0.05% NH₃H₂O 水溶液) 純化所得溶液，以得到白色固體狀標題化合物 (89.0 mg，產率 58.7%)。LCMS (ESI) *m/z* : 1429.9 [M+H]⁺。

步驟 8： *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-甲基噁-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁-2-基)異噁唑-3-基)氧基)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-3-基)嗒吡啶-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)-*N*-(5-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)戊基)環丁烷-1,1-二甲醯胺



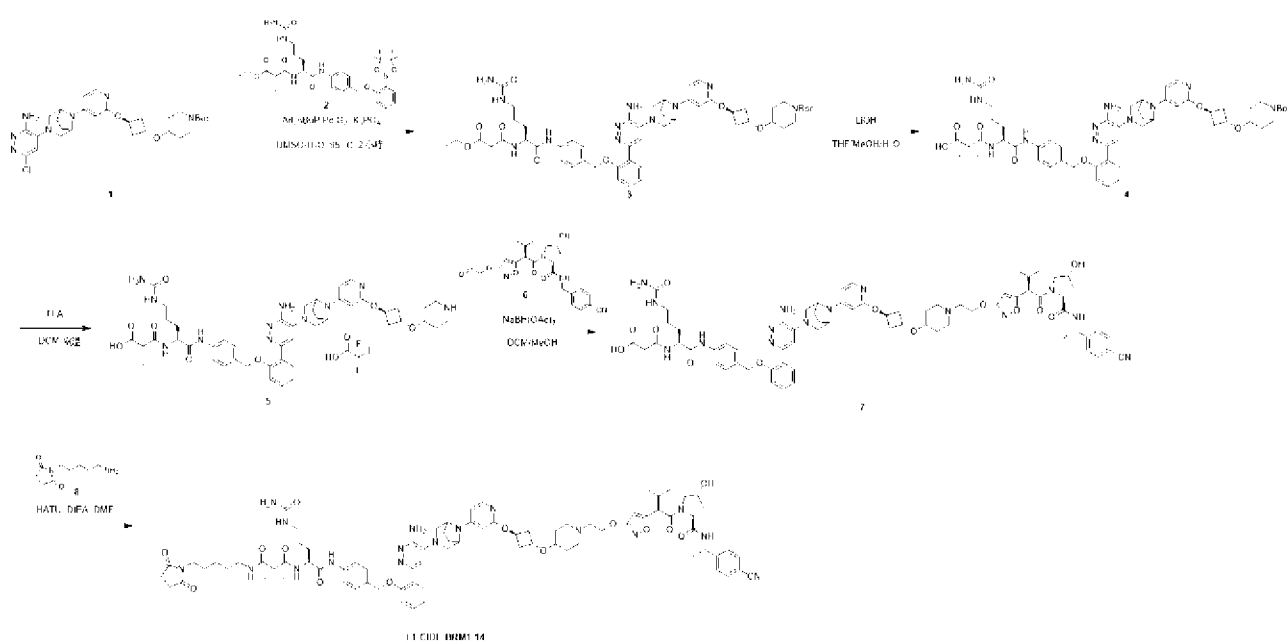
【0514】 向 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-羥基-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噁-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁-2-基)異噁唑-3-基)氧基)乙基)-2-甲基哌啶-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒吡啶-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧基-5-脲基戊

-2-基)胺甲醯基)環丁烷甲酸 (50.0 mg, 0.03 mmol) 及 1-(5-胺基戊基)-1*H*-吡咯-2,5-二酮 2,2,2-三氟乙酸 (12.4 mg, 0.04 mmol) 於 *N,N*-二甲基甲醯胺 (4.0 mL) 中之混合物中添加 *N,N*-二異丙基乙胺 (0.02 mL, 0.10 mmol) 及 2-(7-氮雜苯并三唑-1-基)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸鎂 (16.0 mg, 0.04 mmol)。將混合物於 25°C 下攪拌 3 小時。藉由油泵將反應混合物濃縮至乾。藉由製備型 HPLC (Boston Green ODS 150 × 30mm × 5 μm, 水 (0.075% 三氟乙酸) - 乙腈, 20-50%) 純化殘餘物, 以得到白色固體狀標題化合物 (33.6 mg, 產率 59.7%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO - *d*₆): δ (ppm) 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)。

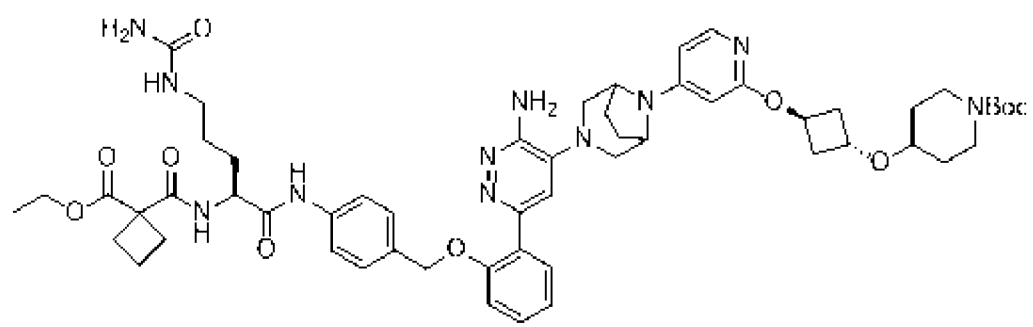
【0515】 LCMS (ESI) *m/z*: 797.5 [*M*/2+*H*]⁺。

合成實例 14

L1-CIDE-BRM1-14 之合成



步驟 1：4-((1*r*,3*r*)-3-((4-(3-(3-胺基-6-(2-((4-((*S*)-2-(1-(乙氧基羰基)環丁烷甲醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)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

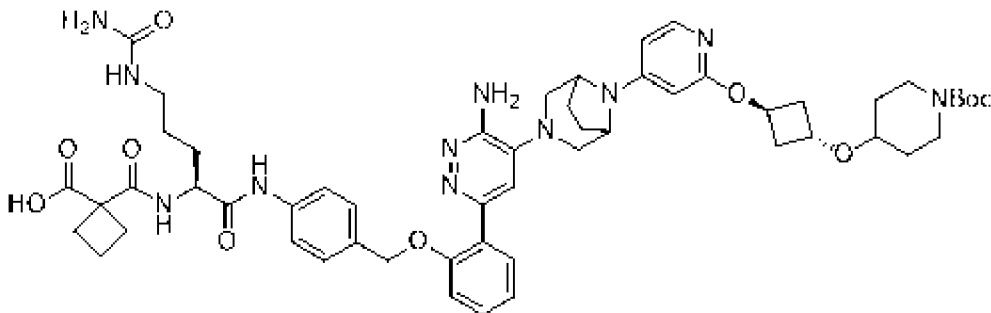


【0516】 向 4-((1*r*, 3*r*)-3-((4-(3-(3-胺基-6-氯嗒吡-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)環丁氧基)哌啶-1-羧酸三級丁酯 (450 mg, 0.77 mmol) 及正磷酸三鉀 (0.19 mL, 2.3 mmol) 於二甲亞碸 (20 mL) 中之溶液中添加氯[(二(1-金剛烷基)-正丁基膦)-2-(2-胺基聯苯基)]鉀(II) (103 mg, 0.15 mmol) 及 (*S*)-1-((1-側氧基-1-((4-((2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二側氧基硼戊環-2-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷甲酸乙酯 (977 mg, 1.54 mmol)。將混合物在 N₂ 下於 100°C 下攪拌 3 小時。將反應混合物用水 (10 mL) 稀釋，並

用二氯甲烷 (20 mL × 3) 萃取。將有機相用鹽水 (30 mL × 2) 洗滌，經硫酸鈉乾燥，過濾，並濃縮，以得到黑色固體狀標題化合物 (400 mg, 49.1%)。

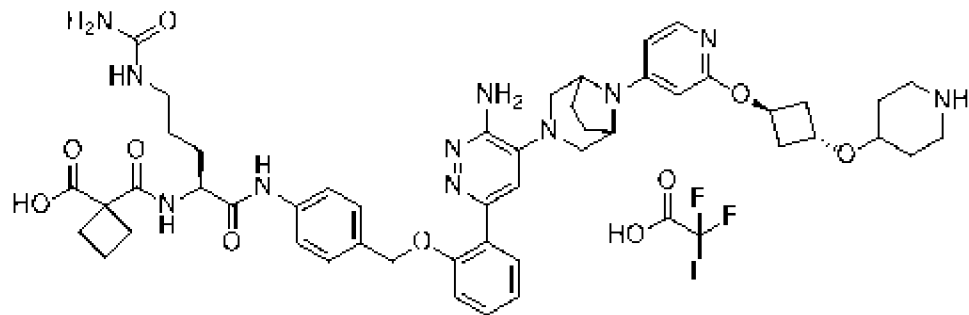
【0517】 LCMS (ESI) m/z : 1060.7 [M+H]⁺。

步驟 2：1-(((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)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷甲酸



【0518】 向 4-((1*r*, 3*r*)-3-((4-(3-(3-胺基-6-(2-((4-((*S*)-2-(1-(乙氧基羰基)環丁烷甲醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苄基)氧基)苯基)嗒啉-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 (450 mg, 0.42 mmol) 於甲醇 (5.0 mL) 及水 (2.0 mL) 中之溶液中添加氫氧化鋰一水合物 (102 mg, 4.24 mmol)。將混合物於 25°C 下濃縮 3 小時。濃縮反應混合物，以得到黑色固體狀標題化合物 (438 mg，產率 97.5%)。LCMS (ESI) m/z : 1032.6 [M+H]⁺。

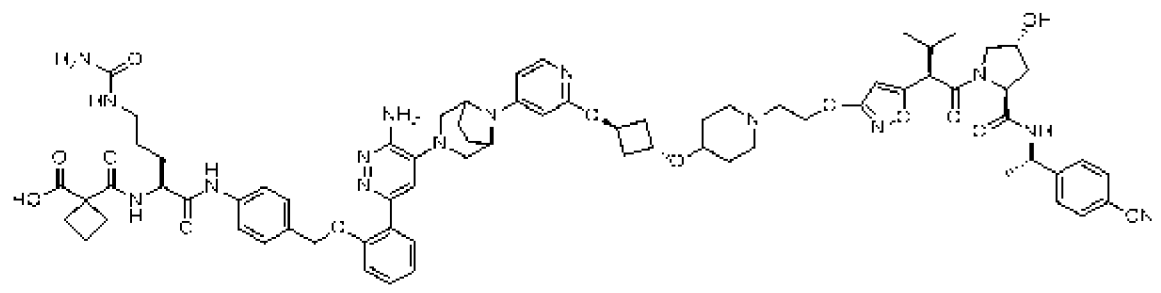
步驟 3：1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-((1*r*,3*r*)-3-(哌啶-4-基氧基)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒啉-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷甲酸2,2,2-三氟乙酸酯



【0519】 向 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)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷甲酸 (400 mg, 0.39 mmol) 於二氯甲烷 (4.0 mL) 中之混合物中添加三氟乙酸 (0.30 mL, 3.90 mmol)。將混合物於 20°C 下攪拌 5 小時。將反應濃縮至乾，並藉由製備型 HPLC (Boston Green ODS 150 × 30mm × 5 μm, 水 (0.075% 三氟乙酸) - 乙腈 12%-42%) 純化殘餘物，以得到標題化合物 (360 mg, 產率 88.9%)。

【0520】 LCMS (ESI) *m/z*: 932.6 [M+H]⁺。

步驟 4: 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-2-基)異噁唑-3-基)氧基)乙基)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)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷甲酸

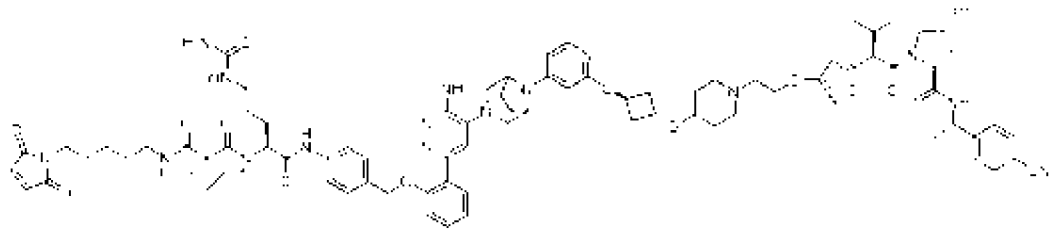


【0521】 向 (2*S*,4*R*)-*N*-((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)-4-羥基-1-((*R*)-3-甲基-2-(3-(2-側氧乙氧基)異噁唑-5-基)丁醯基)吡咯啉-2-甲醯胺 (313.21mg, 0.5800 mmol)

及 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-氨基-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)嗒吡-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷甲酸2,2,2-三氟乙酸酯 (360 mg, 0.39 mmol) 於二氯甲烷 (0.50 mL) 及甲醇 (0.50 mL) 中之溶液中添加氰基硼氫化鈉 (49.3 mg, 0.77 mmol) 和醋酸鈉 (6.00 mg, 0.07 mmol) 及一滴乙酸。將反應混合物於 20°C 下攪拌 3 小時。藉由 Phenomenex Gemini-NX 80 × 40 mm × 3 μm (乙腈 17-47/0.05% NH₃H₂O 水溶液, 20%-50%) 純化所得殘餘物, 以得到白色固體狀標題化合物 (250 mg, 46.7%)。

【0522】 LCMS (ESI) *m/z*: 1384.8 [M+H]⁺。

步驟 5: *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-羥基吡咯啶-1-基)-3-甲基-1-側氧丁-2-基)異噁唑-3-基)氧基)乙基)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)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)-*N*-(5-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)戊基)環丁烷-1,1-二甲醯胺



L1-CIDE-BRM1-14

【0523】 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-羥基吡咯啶-1-基)-3-甲基-1-側氧丁-2-基)異噁唑-3-基)氧基)乙基)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)-1-側氧基-5-脲基戊-2-

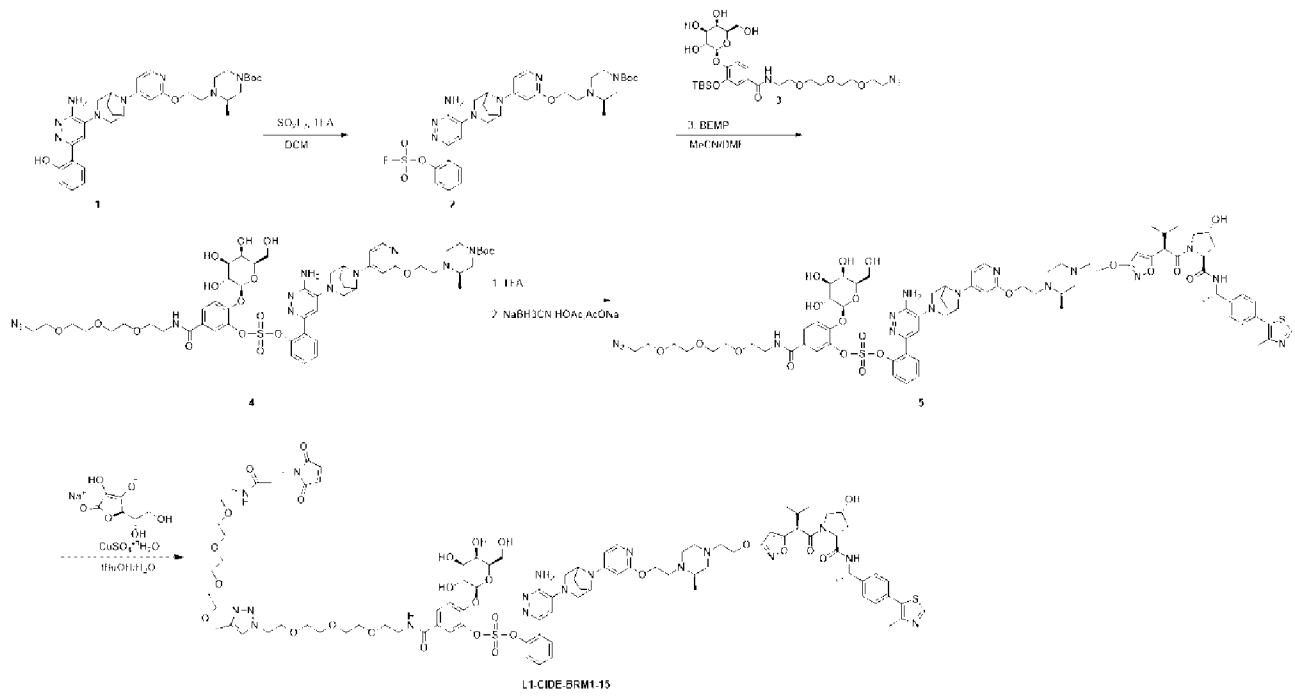
基)胺甲鹽基)環丁烷甲酸 (50.0 mg, 0.04 mmol) 及 1-(5-胺基戊基)-1*H*-吡咯-2,5-二酮 2,2,2-三氟乙酸酯 (12.8 mg, 0.04 mmol) 於 *N,N*-二甲基甲醯胺 (4.00 mL) 中之混合物中添加 *N,N*-二異丙基乙胺 (0.02 mL, 0.1100mmol)、2-(7-氮雜苯并三唑-1-基)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸鎂 (16.5 mg, 0.04 mmol)。將混合物於 25°C 下攪拌 3 小時。藉由油泵濃縮混合物。藉由製備型 HPLC (Boston Green ODS 150 × 30 mm × 5 μm, 水 (0.075% 三氟乙酸) - 乙腈 20%-50%) 純化殘餘物, 以得到白色固體狀標題化合物 (38.5 mg, 65.4%)。

【0524】 LCMS (ESI) m/z : 775.3 $[M/2+H]^+$ 。

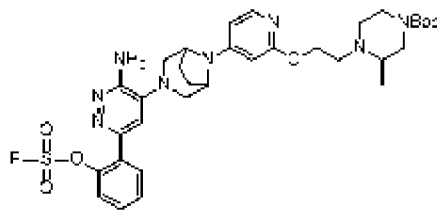
【0525】 ^1H NMR (400 MHz, DMSO - d_6) δ (ppm) 10.19 (s, 1H), 9.02 - 8.86 (m, 1H), 8.39 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.94 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 7.87 - 7.78 (m, 2H), 7.65 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.51 - 7.41 (m, 5H), 7.36 (d, J = 6.8 Hz, 5H), 7.29 - 7.09 (m, 1H), 6.97 (s, 2H), 6.76 (s, 1H), 6.42 (s, 1H), 6.15 - 5.96 (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)。

合成實例 15

L1-CIDE-BRM1-15 之合成

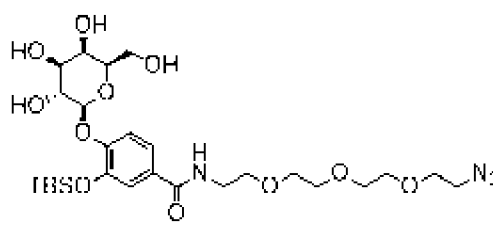


步驟 1：(3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-((氟磺鹽基)氧基)苯基)嗒咩-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌咩-1-羧酸三級丁酯



【0526】 在 SO_2F_2 氣球下，將 (3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-羟基苯基)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 (500 mg, 0.81 mmol) 於二氯甲烷 (3.0 mL) 中之溶液於 0°C 下攪拌 16 小時。濃縮混合物，以得到黃色油狀標題化合物 (566 mg, 99.8%)。將粗品直接用於下一步驟。LCMS (ESI) m/z : 713.5 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 。

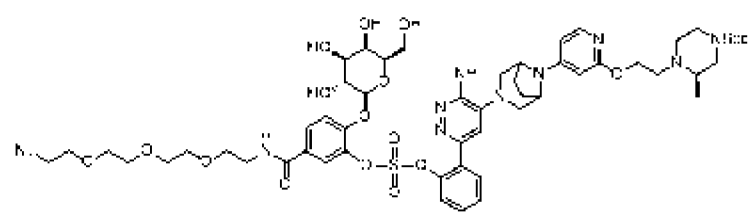
步驟 2：*N*-(2-(2-(2-(2-疊氮乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基)-3-((三級丁基二甲基矽基)氧基)-4-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5-三羟基-6-(羟基甲基)四氫-2*H*-哌喃-2-基)氧基)苯甲醯胺



【0527】 向 *N*-(2-(2-(2-(2-疊氮乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基)-3-羥基-4-(((2*S*, 3*R*, 4*S*, 5*R*, 6*R*)-3,4,5-三羥基-6-(羥基甲基)四氫-2*H*-呋喃-2-基)氧基)苯甲醯胺 (320 mg, 0.70 mmol) 於二氯甲烷 (10.0 mL) 中之溶液中添加 2,6-二甲吡啶 (0.24 mL, 2.09 mmol) 及三級丁基二甲基矽基三氟甲烷磺酸酯 (0.32 mL, 1.40 mmol) , 並於 0℃ 下攪拌 2 小時。濃縮反應，並藉由管柱 Phenomenex Gemini-NX C18 75 × 30 mm × 3 μm (經水 (0.05% NH₃H₂O+10mM NH₄HCO₃) - 乙腈 (35%-65%) 活化) 純化殘餘物，以得到白色固體狀標題化合物 (140 mg, 35%)。

【0528】 LCMS (ESI) *m/z* : 573.4 [M+H]⁺。

步驟 3 : (3*R*)-4-(2-(((4-(3-(3-胺基-6-(2-(((5-((2-(2-(2-(2-疊氮乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基)胺甲醯基)-2-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5-三羥基-6-(羥基甲基)四氫-2*H*-呋喃-2-基)氧基)苯氧基)磺醯基)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)乙基)-3-甲基哌啶-1-羧酸三級丁酯

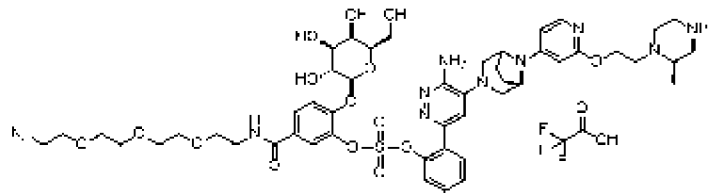


【0529】 將 1 M 2-三級丁基亞胺基-2-二乙基胺基-1,3-二甲基-全氫-1,3,2-二氮雜磷於乙腈 (0.86 mL, 0.86 mmol) 中之溶液、(3*R*)-4-(2-(((4-(3-(3-胺基-6-(2-((氟磺醯基)氧基)苯基)嗒吡-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌啶-1-羧酸三級丁酯 (300 mg, 0.43 mmol) 及 *N*-(2-(2-(2-(2-疊氮乙

氧基)乙氧基)乙氧基)乙基)-3-((三級丁基二甲基矽基)氧基)-4-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5-三羥基-6-(羥基甲基)四氫-2*H*-呷喃-2-基)氧基)苯甲醯胺 (274 mg, 0.43 mmol) 於乙腈 (5.0 mL) 中之溶液及 *N,N*-二甲基甲醯胺 (1.00 mL) 於 24°C 下攪拌 16 小時。將粗製混合物濃縮至乾，並藉由製備型 HPLC (Welch Xtimate C18 150 × 25 mm × 5 μm/水 (10 mM NH₄HCO₃)- 乙腈/40-70%) 純化殘餘物，以得到白色固體狀標題化合物 (200 mg，產率 39%)。

【0530】 LCMS (ESI) *m/z* : 1195.6 [M+H]⁺。

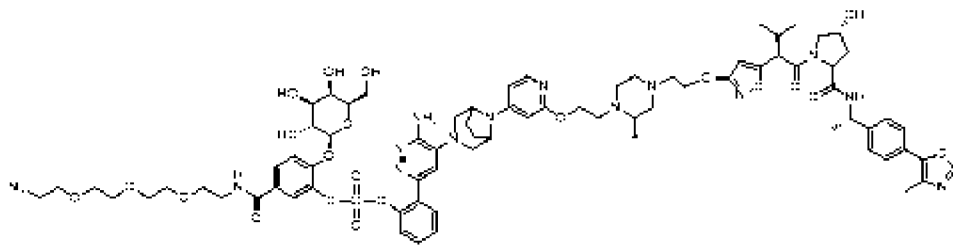
步驟 4：2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-2-甲基呷啉-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒吡-3-基)苯基(5-((2-(2-(2-(2-疊氮乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基)胺甲醯基)-2-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5-三羥基-6-(羥基甲基)四氫-2*H*-呷喃-2-基)氧基)苯基)硫酸酯 2,2,2-三氟乙酸酯



【0531】 將 (3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-(((5-((2-(2-(2-(2-疊氮乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基)胺甲醯基)-2-(((2*S*, 3*R*, 4*S*, 5*R*, 6*R*)-3,4,5-三羥基-6-(羥基甲基)四氫-2*H*-呷喃-2-基)氧基)苯氧基)磺醯基)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)乙基)-3-甲基呷啉-1-羧酸三級丁酯 (205 mg, 0.17 mmol) 於含 5% 三氟乙酸之六氟異丙醇 (6.00 mL) 中之溶液於 15°C 下攪拌 2 小時。濃縮混合物，以得到白色固體狀標題化合物 (207 mg, 99.8%)。將粗品直接用於下一步驟。

【0532】 LCMS (ESI) *m/z* : 1095.4 [M+H-TFA]⁺。

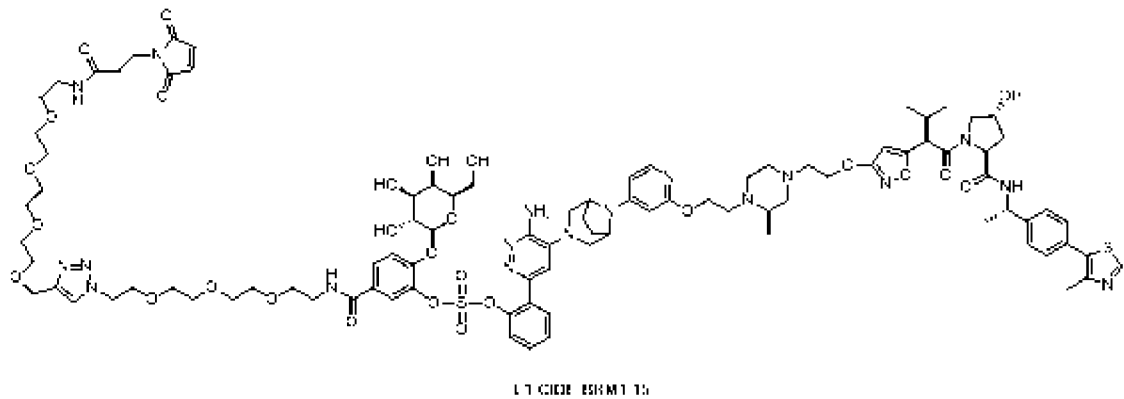
步驟 4：2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-羥基-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁-2-基)異噁唑-3-基)氧基)乙基)-2-甲基哌啶-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒吡-3-基)苯基 (5-((2-(2-(2-(2-疊氮乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基)胺甲醯基)-2-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5-三羥基-6-(羥基甲基)四氫-2*H*-哌喃-2-基)氧基)苯基)硫酸酯



【0533】 向 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)嗒吡-3-基)苯基 (5-((2-(2-(2-(2-疊氮乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基)胺甲醯基)-2-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5-三羥基-6-(羥基甲基)四氫-2*H*-哌喃-2-基)氧基)苯基)硫酸酯 2,2,2-三氟乙酸酯 (207 mg, 0.17 mmol) 及 (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-甲基唑-5-基)苯基)乙基)吡咯啉-2-甲醯胺 (184 mg, 0.34 mmol) 於甲醇 (1.00 mL) 及二氯甲烷 (1.00 mL) 中之溶液中添加氰基硼氫化鈉 (11.8 mg, 0.19 mmol) 及乙醯氧基鈉 (42.1 mg, 0.51 mmol)。將反應於 20°C 下攪拌 3 小時。藉由製備型 HPLC (Welch Xtimate C18 150 × 25 mm × 5 μm/水 (10 mM NH₄HCO₃)- 乙腈/30-60%) 純化粗品，以得到白色固體狀標題化合物 (145 mg, 52.3%)。LCMS (ESI) *m/z* : 810.9 [1/2*M*+*H*]⁺。

步驟 5：2-(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-甲基唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁-2-基)異噁唑-3-

基)氧基)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-3-基)噻吩-3-基)苯基 (5-((2-(2-(2-(2-(4-(17-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)-15-側氧基-2,5,8,11-四側氧基-14-氮雜十七基)-1*H*-1,2,3-三唑-1-基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基)胺甲醯基)-2-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5-三羥基-6-(羥基甲基)四氫-2*H*-嘧喃-2-基)氧基)苯基)硫酸酯

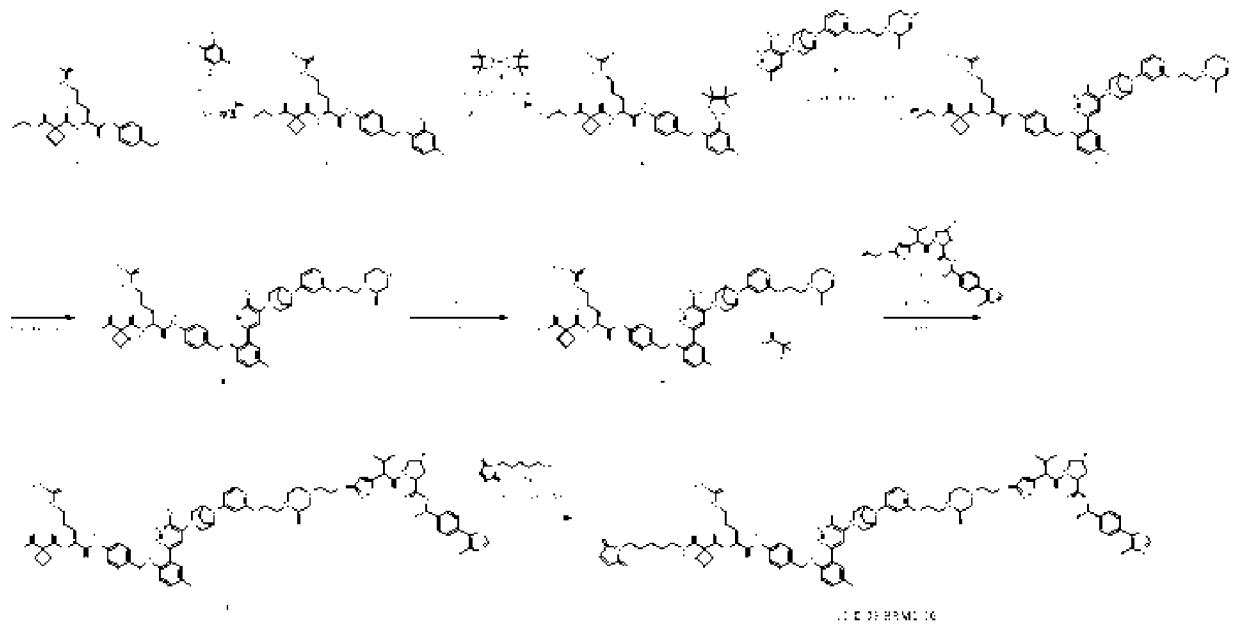


【0534】於 0°C 下，向 2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-羥基-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁-2-基)異噁唑-3-基)氧基)乙基)-2-甲基哌啶-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)噻吩-3-基)苯基 (5-((2-(2-(2-(2-疊氮乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基)胺甲醯基)-2-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5-三羥基-6-(羥基甲基)四氫-2*H*-嘧喃-2-基)氧基)苯基)硫酸酯 (45.0 mg, 0.03 mmol) 及 3-(2,5-二側氧基吡咯-1-基)-*N*-[2-[2-[2-(2-丙-2-炔氧乙氧基)乙氧基]乙氧基]乙基]丙醯胺 (20.0 mg, 0.05 mmol) 於二甲亞碸 (1.00 mL) 及水 (1.00 mL) 中之溶液中添加 硫酸銅 (12.4 mg, 0.06 mmol) 在水 (0.2 mL) 中之溶液及抗壞血酸鈉 (11.01 mg, 0.06 mmol) 在水 (0.2 mL) 中之溶液。將反應在 N₂ 氣氛下於 26°C 下攪拌 1 小時。藉由製備型 HPLC (Welch Xtimate C18 100 × 40 mm × 3 μm/水 (0.075% 三氟乙酸) - 乙腈/15-45%) 純化粗品，以得到白色固體狀標題化合物 (22.6 mg, 40.6%)。

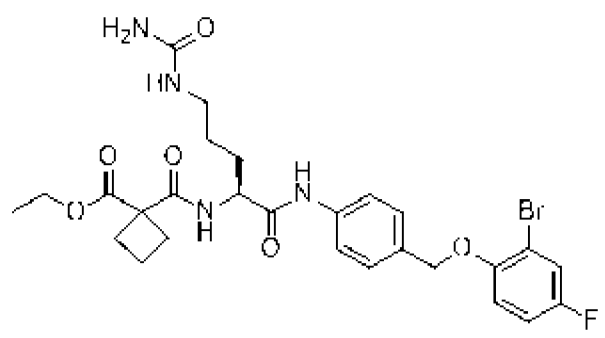
【0535】 LCMS (ESI) m/z : 1001.9 [1/2M+H]⁺ 。

合成實例 16

L1-CIDE-BRM1-16 之合成



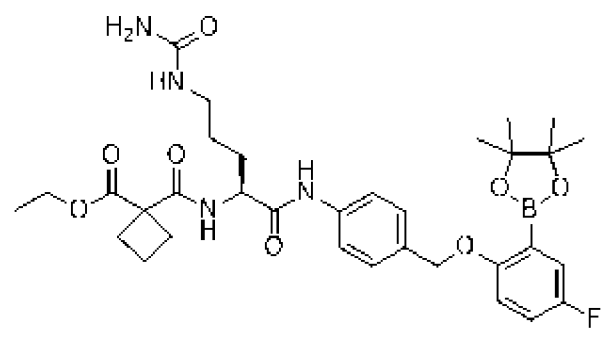
步驟 1：(S)-1-((1-((4-((2-溴-4-氟苯氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷甲酸乙酯



【0536】 於 25℃ 下，向 (S)-1-((1-((4-(氯甲基)苯基)胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷甲酸乙酯 (1.00 g, 2.21 mmol) 及碳酸鉀 (0.76 g, 5.52 mmol) 於 N,N-二甲基甲醯胺 (60.0 mL) 中之溶液中添加 2-溴-4-氟-苯酚 (0.63 g, 3.31 mmol)。將反應於 25℃ 下攪拌 3 小時。將反應混合物用水 (30.0 mL) 稀釋，並用二氯甲烷 (50 mL × 3) 萃取。將合併之有機相用鹽水 (20 mL × 2) 洗滌，經硫酸鈉乾燥，過濾，並濃縮至乾。藉由急速層析法（矽膠，100-200

目，於二氯甲烷中之 0-5% 甲醇）純化殘餘物，以得到白色固體狀標題化合物 (1.2 g, 89.5%)。

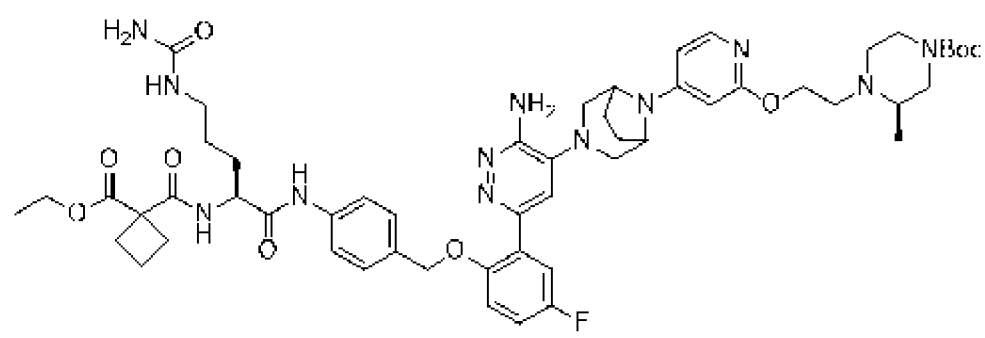
步驟 2：(S)-1-((1-((4-((4-氟-2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二側氧基硼戊環-2-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷甲酸乙酯



【0537】 向 (S)-1-((1-((4-((2-溴-4-氟苯氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷甲酸乙酯 (1.00 g, 1.65 mmol) 及 4,4,4',4',5,5,5',5'-八甲基-2,2'-聯(1,3,2-二側氧基硼戊環) (627 mg, 2.47 mmol) 於 1,4-二噁烷 (5.0 mL) 中之溶液中添加 1,1'-雙(二苯基膦)二茂鐵二氯化鈾 (120 mg, 0.16 mmol) 及醋酸鈉 (485 mg, 4.94 mmol)。將混合物在 N₂ 下於 100℃ 下攪拌 3 小時。將粗製混合物直接用於下一步驟。

【0538】 LCMS (ESI) *m/z* : 655.4 [M+H]⁺。

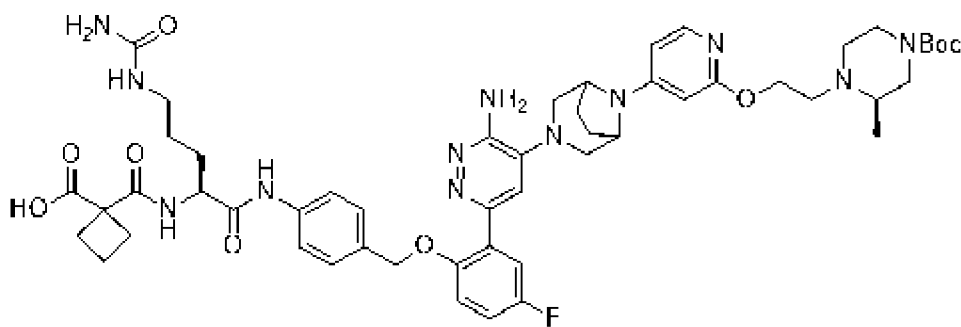
步驟 3：(3R)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-((4-((S)-2-(1-(乙氧基羰基)環丁烷甲醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苄基)氧基)-5-氟苯基)嗒咩-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌啶-1-羧酸三級丁酯



【0539】 向 (3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-氯嗒吡-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌啶-1-羧酸三級丁酯 (1.11 g, 1.99 mmol) 及碳酸鉀 (0.38 mL, 4.58 mmol) 於二甲亞砜 (5 mL) 中之溶液中添加 [2-(2-胺基苯基)-氯化鈹;雙(1-金剛烷基)-丁基-磷氫化合物 (102.15 mg, 0.15 mmol) 及 (*S*)-1-(((1-((4-((4-氟-2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二側氧基硼戊環-2-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷甲酸乙酯 (1.00 g, 1.53 mmol)。將反應混合物在 N₂ 下於 100°C 下攪拌 3 小時。藉由急速層析法 (矽膠, 100-200 目, 於二氯甲烷中之 0-10% 甲醇) 純化反應, 以得到黑色固體狀標題化合物 (360 mg, 22.4%)。

【0540】 LCMS (ESI) m/z : 1095 [M+H]⁺。

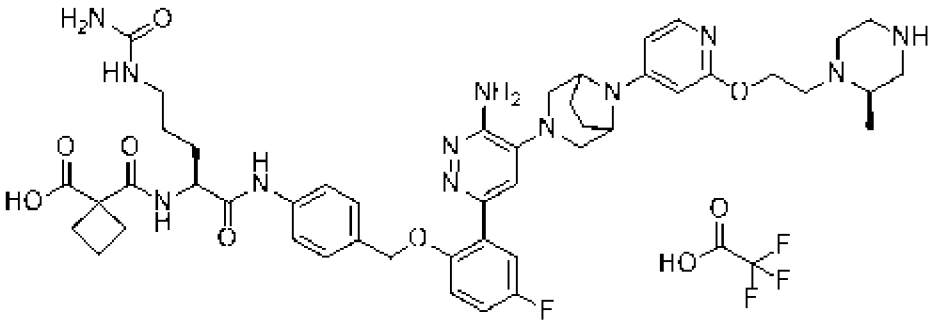
步驟 4: 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(三級丁氧羰基)-2-甲基哌啶-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒吡-3-基)-4-氟苯氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷甲酸



【0541】 向 (3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-((4-((*S*)-2-(1-(乙氧基羰基)環丁烷甲醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苄基)氧基)-5-氟苯基)嗒吡-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌啶-1-羧酸三級丁酯 (360 mg, 0.34 mmol) 於四氫呋喃 (2.00 mL)、甲醇 (5.0 mL) 及水 (2.00 mL) 中之溶液中添加氫氧化鋰一水合物 (41.0 mg, 1.71 mmol)。將反應混合物在 N₂ 氣氛下於 100°C 下

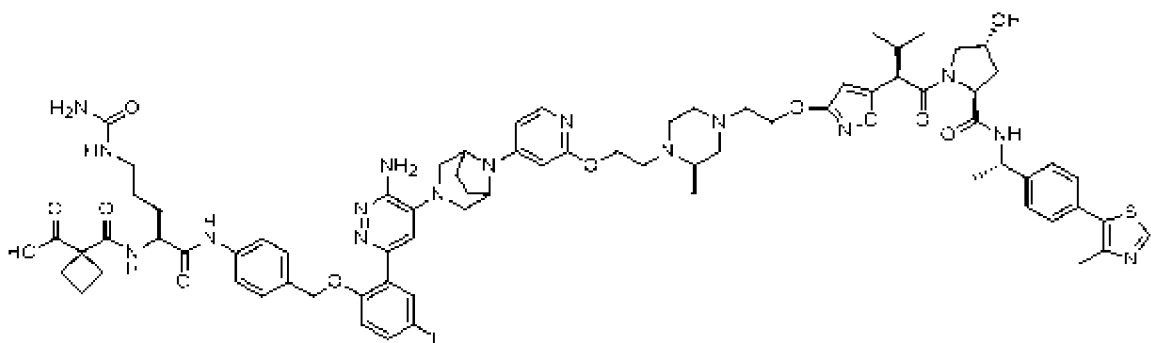
攪拌 3 小時。將反應混合物濃縮至乾，以得到白色固體狀標題化合物 (350 mg, 99.9%)。

步驟 5：1-(((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)嗒吡-3-基)-4-氟苯氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷甲酸2,2,2-三氟乙酸酯



【0542】 向 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(三級丁氧羰基)-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-3-基)嗒吡-3-基)-4-氟苯氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷甲酸 (340 mg, 0.33 mmol) 於二氯甲烷 (5.0 mL) 中之溶液中添加三氟乙酸 (0.05 mL, 0.66 mmol)。將反應混合物於 20°C 下攪拌 3 小時。將反應混合物濃縮至乾，並藉由製備型 HPLC (Boston Green ODS 150 × 30 mm × 5 μm, 水 (0.075% 三氟乙酸) - 乙腈 12%-42%) 純化殘餘物，以得到白色固體狀標題化合物 (80 mg, 26.1%)。

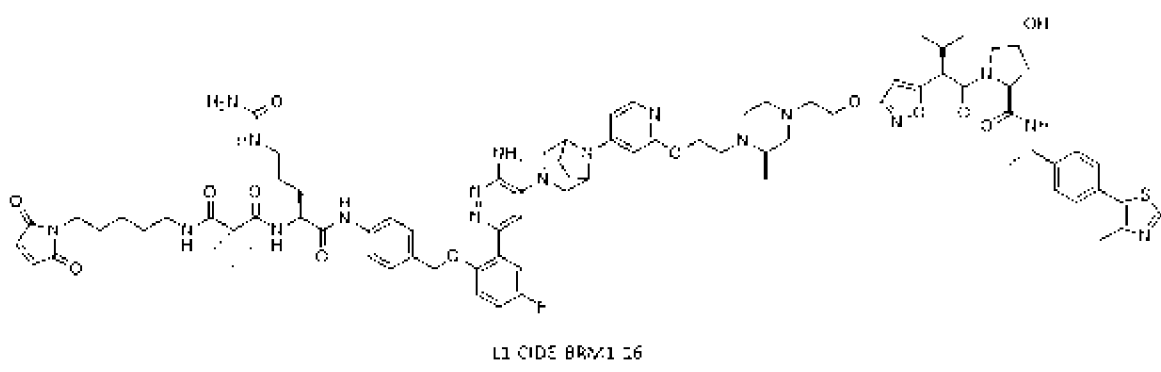
步驟 6：1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-羥基-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啶-1-基)-3-甲基-1-側氧丁-2-基)異噁唑-3-基)氧基)乙基)-2-甲基哌啶-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒吡-3-基)-4-氟苯氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷甲酸



【0543】 向 (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-甲基噁-5-基)苯基)乙基)吡咯啉-2-甲醯胺 (70.3 mg, 0.13 mmol) 及 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)嗒吡-3-基)-4-氟苯氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷甲酸2,2,2-三氟乙酸酯 (80.0 mg, 0.09 mmol) 於二氯甲烷 (0.6 mL) 及甲醇 (0.6 mL) 中之溶液中添加氰基硼氫化鈉 (11.1 mg, 0.17 mmol) 和醋酸鈉 (6.0 mg, 0.07 mmol) 及一滴乙酸。將反應混合物於 20°C 下攪拌 3 小時。藉由 Phenomenex Gemini-NX 80 × 40mm × 3 μm (乙腈 17-47/0.05% NH₃H₂O 水溶液) 純化所得殘餘物，以得到白色固體狀標題化合物 (80 mg，產率 63.8%)。

【0544】 LCMS (ESI) *m/z* : 1448.8 [M+H]⁺。

步驟 7 : *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-甲基噁-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁-2-基)異噁唑-3-基)氧基)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-3-基)嗒吡-3-基)-4-氟苯氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)-*N*-(5-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)戊基)環丁烷-1,1-二甲醯胺



【0545】 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-羟基-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基唑-5-基)苯基)乙基)胺甲酰基)吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-侧氧丁-2-基)异噁唑-3-基)氧基)乙基)-2-甲基哌啶-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂二环[3.2.1]辛-3-基)嗒啶-3-基)-4-氟苯氧基)甲基)苯基)胺基)-1-侧氧基-5-脲基戊-2-基)胺甲酰基)环丁烷甲酸 (80.0 mg, 0.06 mmol) 及 1-(5-氨基戊基)吡咯-2,5-二酮;2,2,2-三氟乙酸 (19.6 mg, 0.07 mmol) 於 N,N-二甲基甲酰胺 (4.00 mL) 中之混合物中添加 2-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐 (25.2 mg, 0.07 mmol)、N,N-二异丙基乙胺 (0.03 mL, 0.1700 mmol)。將反應混合物於 25℃ 下攪拌 3 小時。藉由油泵將反應混合物濃縮至乾。藉由製備型 HPLC (Boston Green ODS 150 × 30mm × 5 μm , 水 (0.075% 三氟乙酸) - 乙腈 20-50%) 純化殘餘物，以得到白色固體狀標題化合物 (68.2 mg , 產率 75%) 。

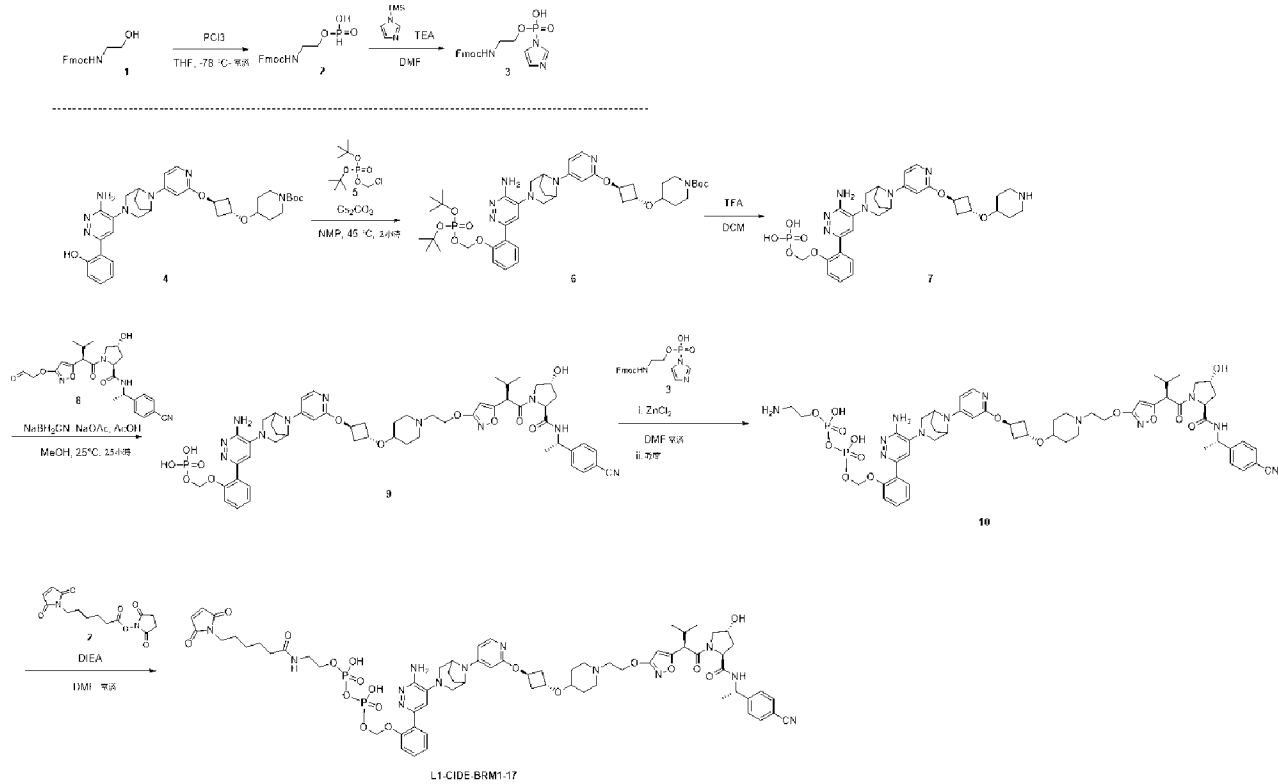
【0546】 LCMS (ESI) m/z : 806.7 [M/2+H]⁺ 。

【0547】 ¹H NMR (400 MHz, DMSO - d₆) δ (ppm) 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

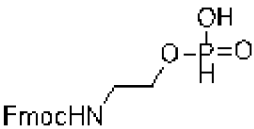
(m, 1H), 4.71 - 4.60 (m, 2H), 4.52 - 4.24 (m, 9H), 3.66 (s, 4H), 3.33 (d, $J = 7.2$ Hz, 5H), 3.09 - 2.96 (m, 8H), 2.45 (s, 3H), 2.42 - 2.34 (m, 4H), 2.29 - 2.14 (m, 2H), 2.04 (d, $J = 11.2$ Hz, 3H), 1.91 (s, 2H), 1.83 - 1.55 (m, 5H), 1.51 - 1.30 (m, 9H), 1.19 (d, $J = 5.8$ Hz, 5H), 0.96 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H), 0.86 - 0.75 (m, 3H) °

合成實例 17

L1-CIDE-BRM1-17 之合成



步驟 1：(2-((羥基氫磷醯基氧基)乙基)胺甲酸(9H-芴-9-基)甲酯

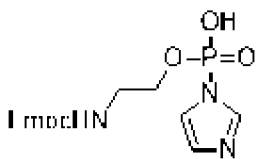


【0548】 於 -78℃ 下向 (2-羥基乙基)胺甲酸(9H-芴-9-基)甲酯 (1.0 g, 3.53 mmol) 於 四氫呋喃 (3.00 mL) 中之溶液中添加四氫呋喃 (5.0 mL) 中之三氯化磷 (0.73 mL, 8.44 mmol) 及四氫呋喃 (3.0 mL) 中之三乙胺 (1.1 mL, 7.89 mmol)。將反應混合物於 -78℃ 下攪拌 20 分鐘，然後使其升溫至 25℃。將所得混合物於

25°C 下攪拌 12 小時。將反應用水 (20 mL) 稀釋，並用乙酸乙酯 (10 mL × 3) 萃取。將有機相用鹽水 (20 mL × 2) 洗滌，經硫酸鈉乾燥，過濾並濃縮，以得到白色固體狀標題化合物 (1.20 g, 97.9%)。

【0549】 LCMS (ESI) m/z : 695.3 [2M+H]⁺。

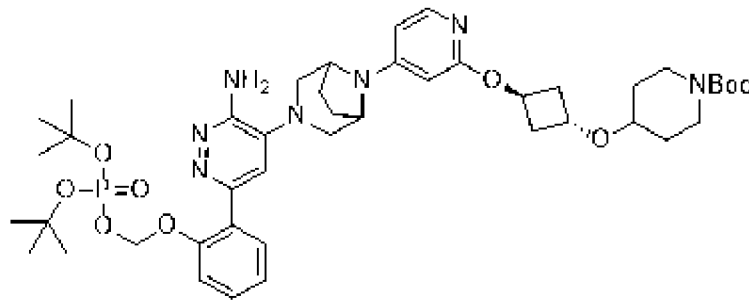
步驟 2：(2-((羥基(1H-咪唑-1-基)磷醯基)氧基)乙基)胺甲酸(9H-芴-9-基)甲酯



【0550】 於 25°C 下向 (2-((羥基氫磷醯基)氧基)乙基)胺甲酸(9H-芴-9-基)甲酯 (0.50 g, 1.44 mmol) 及三乙胺 (0.6 mL, 4.32 mmol) 於四氯化碳 (5.0 mL) 及乙腈 (5.0 mL) 中之溶液中添加 1-(三甲基矽基)-1H-咪唑 (0.61 g, 4.32 mmol)。將反應混合物於 25°C 下攪拌 40 分鐘。將混合物用甲醇 (0.1 mL) 處理，並於 25°C 下攪拌 10 分鐘。去除溶劑，並將殘餘物用甲基三級丁基醚/乙酸乙酯 = 5/1 (3.0 mL) 洗滌，過濾沉澱，並用三級丁基醚 (3.00 mL) 洗滌，獲得黃色油狀標題化合物 (590 mg，產率 99.1%)。

【0551】 LCMS (ESI) m/z : 414.3 [M+H]⁺。

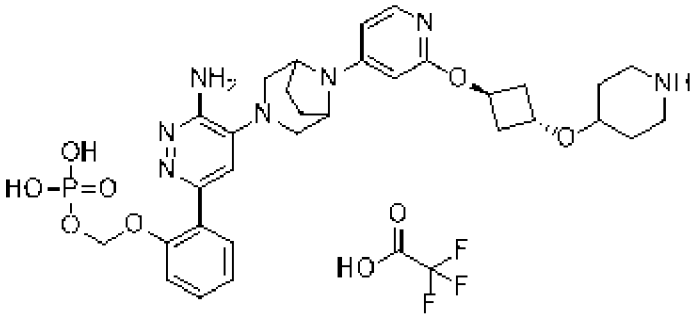
步驟 3：4-(((1r,3r)-3-((4-(3-(3-胺基-6-(2-(((二-三級丁氧基磷醯基)氧基)甲氧基)苯基)嗒咩-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)環丁氧基)哌啶-1-羧酸三級丁酯



【0552】 向 4-((1r, 3r)-3-((4-(3-(3-氨基-6-(2-羥基苯基)嗒咁-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 (1.70 g, 2.64 mmol) 於 N,N-二甲基甲醯胺 (36.0 mL) 中之溶液中添加碳酸銫 (1.72 g, 5.28 mmol) 及 二-三級丁基(氯甲基)磷酸鹽 (1.02 g, 3.96 mmol)。將反應混合物於 70 °C 下攪拌 12 小時。將反應混合物用水 (150 mL) 淬滅，並用乙酸乙酯 (80 mL × 3) 萃取。將合併之有機層用鹽水 (100 mL × 2) 洗滌，經無水硫酸鈉乾燥，過濾，並在減壓下濃縮至乾。藉由矽膠層析法（石油醚:乙酸乙酯 = 100 : 1 至 50 : 1）純化殘餘物，以得到無色油狀標題化合物（1.05 g，產率 45.9%）。

【0553】 LCMS (ESI) m/z : 866.4 [M+H]⁺ ◦

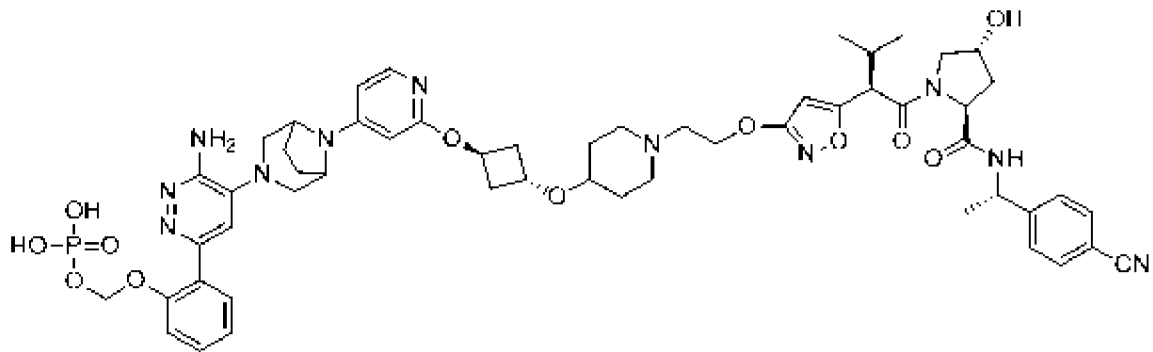
步驟 4：(2-(6-胺基-5-(8-(2-((1r,3r)-3-(哌啶-4-基氧基)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氫雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒啉-3-基)苯氧基)甲基二氫磷酸鹽 2,2,2-三氟乙酸



【0554】 向 4-((1r, 3r)-3-((4-(3-(3-胺基-6-(2-(((二-三級丁氧基磷醯基)氧基)甲氧基)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 (1.05 g, 1.21 mmol) 於二氯甲烷 (36.0 mL) 中之溶液中添加三氟乙酸 (0.09 mL, 1.21 mmol)。將反應混合物於 20℃ 下攪拌 12 小時。濃縮反應，以得到黃色油狀標題化合物 (930 mg, 99%)。

【0555】 LCMS (ESI) m/z : 654.4 [M+H]⁺ ◦

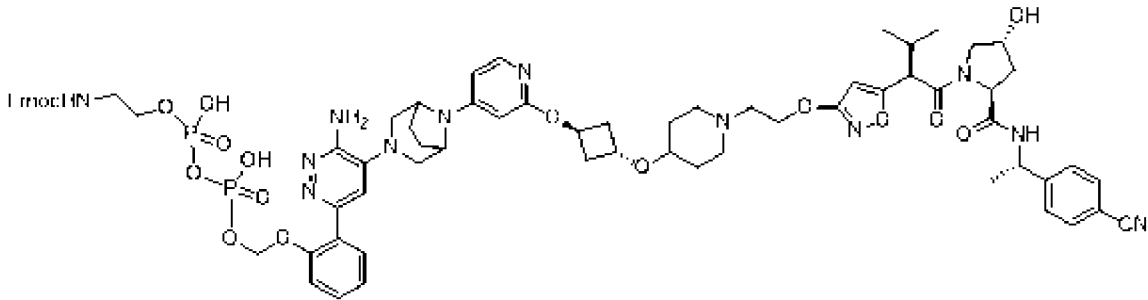
步驟 5：(2-(6-胺基-5-(8-(2-((1*r*,3*r*)-3-((1-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-氰基
 苯基)乙基)胺甲鹽基)-4-羥基吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁-2-基)異噁唑-3-基)氧
 基)乙基)哌啶-4-基)氧基)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒
 吡啶-3-基)苯氧基)甲基二氫磷酸鹽



【0556】 向 (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)丁鹽基)吡咯啉-2-甲鹽胺 (568 mg, 1.21 mmol) 於二
 氯甲烷 (0.6 mL) 及甲醇 (0.6 mL) 中之溶液中添加 (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)嗒吡啶-3-基)苯
 氧基)甲基二氫磷酸鹽 2,2,2-三氟乙酸 (930 mg, 1.21 mmol)、氰基硼氫化鈉 (155
 mg, 2.42 mmol) 和醋酸鈉 (596 mg, 7.26 mmol) 及一滴乙酸。將反應混合物於 20
 °C 下攪拌 3 小時。藉由製備型 HPLC 純化反應，其中使用下列條件：柱，
 Phenomenex Gemini-NX 80 × 40 mm × 3 μm；流動相：11-41%（水
 (0.05% NH₃H₂O）- 乙腈）；偵測器，UV 254 nm，以得到白色固體狀標題化合
 物（700 mg，產率 52.2%）。LCMS (ESI) *m/z*：1106.5 [M+H]⁺。

步驟 6：(2-((((((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)胺甲鹽基)-4-羥基吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁-2-基)異噁唑-
 3-基)氧基)乙基)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-

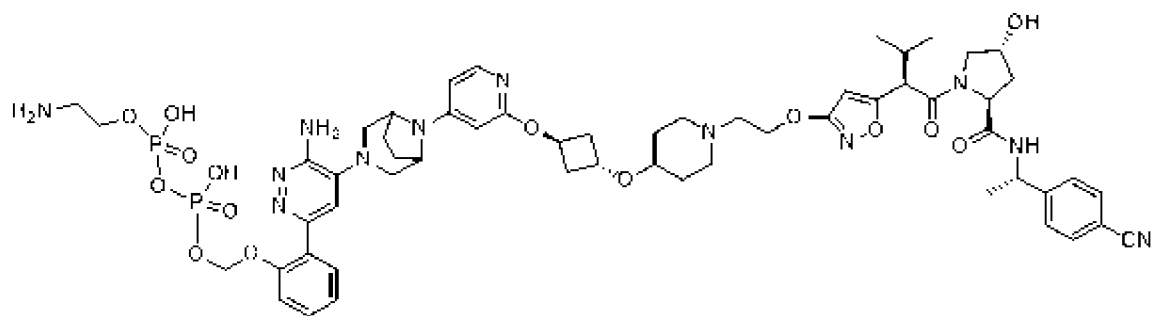
基)啉-3-基)苯氧基)甲氧基)(羥基)磷醯基)氧基)(羥基)磷醯基)氧基)乙基)胺甲
酸(9*H*-芐-9-基)甲酯



【0557】 向 (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-2-基)異噁唑-3-基)氧基)乙基)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)甲基二氫磷酸鹽 (200 mg, 0.18 mmol) 於 N,N-二甲基甲醯胺 (36.0 mL) 中之溶液中添加 1 M 氯化鋅於四氫呋喃中之溶液 (1.45 mL, 1.45 mmol) 及 (2-((羥基(1*H*-咪唑-1-基)磷醯基)氧基)乙基)胺甲酸(9*H*-第-9-基)甲酯 (149 mg, 0.36 mmol)。將反應混合物於 20°C 下攪拌 12 小時。藉由製備型 HPLC 純化粗產物，其中使用下列條件：柱，Phenomenex Gemini-NX 80 × 40 mm × 3 μm；流動相：9-39% 水 (0.05% NH₃H₂O) - 乙腈；偵測器，UV 254 nm，以得到白色固體狀標題化合物 (200 mg，產率 76.2%)。

【0558】 LCMS (ESI) m/z : 726.7 $[M/2+H]^+$ ◦

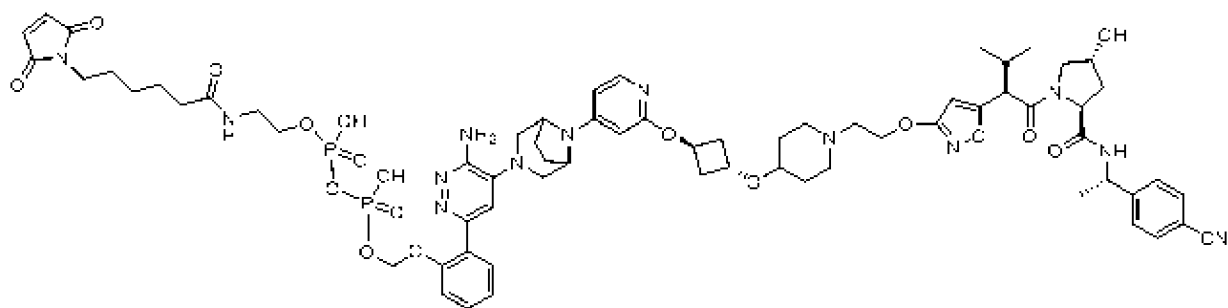
步驟 7：2-氨基乙氧基(羥基)磷醯基][2-[6-氨基-5-[8-[2-[3-[[1-[2-[5-[外消旋-(1R)-2-甲基-1-[外消旋-(2S,4R)-4-羥基-2-[[外消旋-(1S)-1-(4-氟基苯基)乙基]胺甲醯基]吡咯啉-1-羰基]丙基]異噁唑-3-基]氧乙基]-4-哌啶基]氧基]環丁氧基]-4-吡啶基]-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基]嗒吡-3-基]苯氧基]甲基氫磷酸鹽



【0559】 向 (2-((((((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)胺甲酯基)-4-羟基吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-侧氧丁-2-基)异噁唑-3-基)氧基)乙基)哌啶-4-基)氧基)环丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂二环[3.2.1]辛-3-基)嗒吡-3-基)苯氧基)甲氧基)(羟基)磷酯基)氧基)(羟基)磷酯基)氧基)乙基)胺甲酸(9*H*-芴-9-基)甲酯 (200 mg, 0.14 mmol) 於 *N,N*-二甲基甲酰胺 (10.0 mL) 中之溶液中添加哌啶 (0.10 mL, 1.40 mmol)。將反應混合物於 20°C 下攪拌 12 小時。將其用 1 N HCl (1.00 mL) 淬滅，並藉由 Phenomenex Gemini-NX 80 × 40 mm × 3 μm (乙腈 19 - 49/水 (0.05% NH₃H₂O) - 乙腈，20-50%) 純化所得殘餘物，以得到白色固體狀標題化合物 (40.0 mg，產率 22.4%)。

【0560】 LCMS (ESI) *m/z* : 1229.7 [M+H]⁺。

步驟 8 : (2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲酯基)-4-(((1-(4-((*S*)-2-(1-((5-(2,5-二侧氧基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)戊基)胺甲酯基)環丁烷甲酯胺基)-5-脲基戊酯胺基)苯基)-2-(4-甲基哌啶-1-基)-2-侧氧乙氧基)羰基)氧基)吡咯啉-1-羧酸三級丁酯



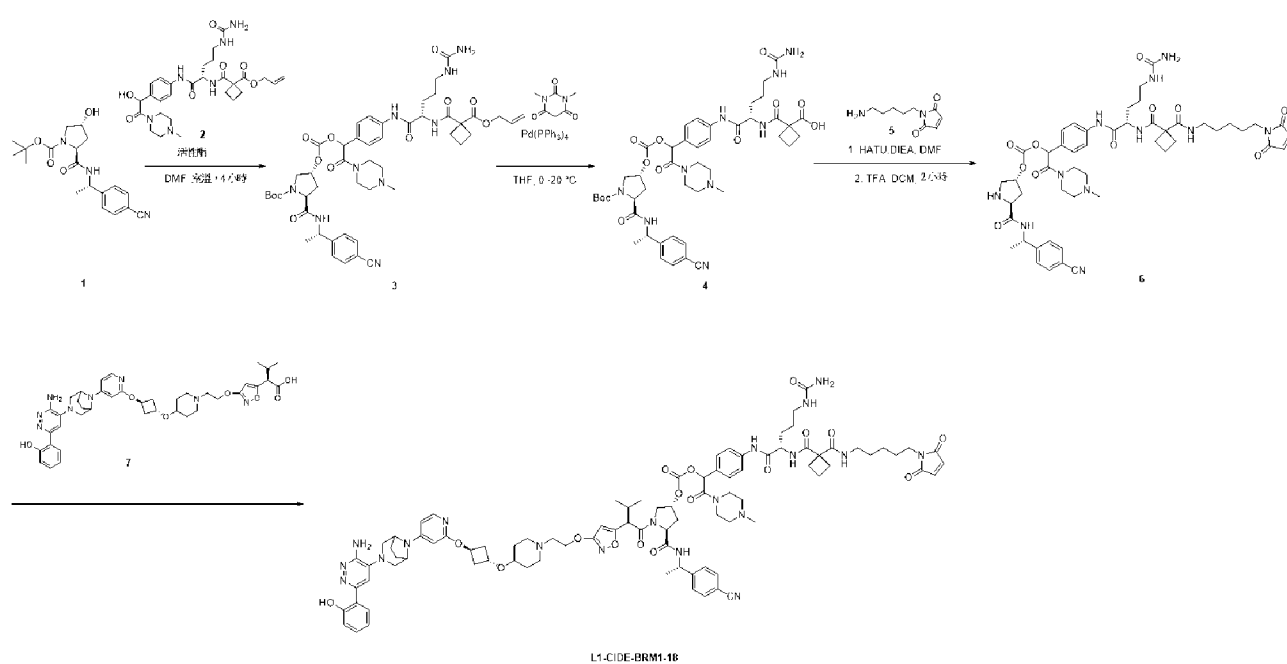
L1-CIDE-BRM1-17

【0561】 向 2-胺基乙氧基(羥基)磷醯基][2-[6-胺基-5-[8-[2-[3-[[1-[2-[5-[外消旋-(1*R*)-2-甲基-1-[外消旋-(2*S*,4*R*)-4-羥基-2-[[外消旋-(1*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基]胺甲醯基]吡咯啉-1-羰基]丙基]異噁唑-3-基]氧乙基]-4-哌啶基]氧基]環丁氧基]-4-吡啶基]-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基]嗒吡-3-基]苯氧基]甲基氫磷酸鹽 (120 mg, 0.10 mmol) 於無水四氫呋喃 (12.0 mL) 中之混合物中添加 *N,N*-二異丙基乙胺 (18.7 μ L, 0.11 mmol)，然後添加 2,5-二側氧基吡咯啉-1-基 6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)己酸酯 (33.1 mg, 0.11 mmol)。將反應溶液於 25°C 下攪拌 16 小時。過濾溶液，並將其濃縮至乾。藉由製備型 HPLC (Boston Green ODS 150 $\times$ 30 mm $\times$ 5 μ m, 水 (0.075% 三氟乙酸) - 乙腈 20%-50%) 純化殘餘物，以得到白色固體狀標題化合物 (60.8 mg, 36.8%)。

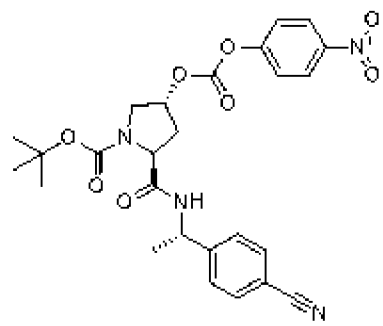
【0562】 LCMS (ESI) m/z : 1423.0 $[M+H]^+$ 。

合成實例 18

L1-CIDE-BRM1-18 之合成



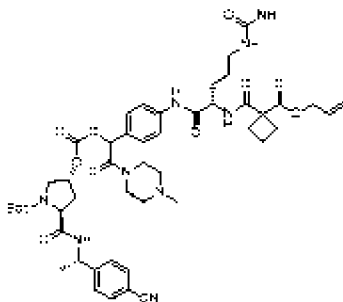
步驟 1：(2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-4-(((4-硝基苯氧基)羰基)氧基)吡咯啉-1-羧酸三級丁酯



【0563】 向 (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-羧酸三級丁酯 (1.00 g, 2.78 mmol) 於二氯甲烷 (10.0 mL) 中之混合物中添加 2,6-二甲吡啶 (0.49 mL, 4.17 mmol) 及 4-硝基苯基氯甲酸酯 (673 mg, 3.34 mmol)。將反應混合物於 25℃ 下攪拌 18 小時。濃縮粗製混合物以得到黃色固體狀標題化合物 (1.46 g, 36.8%)。將粗品立即用於下一步驟。

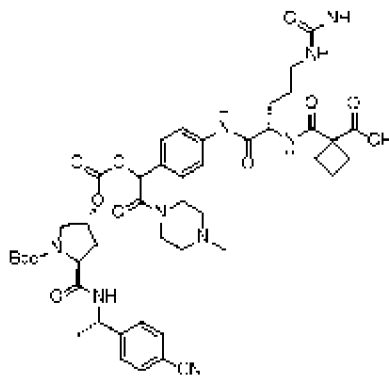
【0564】 LCMS (ESI) *m/z* : 425.1 [M-Boc+H]⁺。

步驟 2：(2*S*,4*R*)-4-(((1-(4-(((*S*)-2-(1-((烯丙基氧基)羰基)環丁烷甲醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苯基)-2-(4-甲基哌啶-1-基)-2-側氧乙氧基)羰基)氧基)-2-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-羧酸三級丁酯



【0565】 向 (2*S*, 4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-氨基苯基)乙基)胺甲鹽基)-4-(((4-硝基苯氧基)羰基)氧基)吡咯啉-1-羧酸三級丁酯 (1.46 g, 2.78 mmol) 及 1-(((2*S*)-1-((4-(1-羥基-2-(4-甲基哌啶-1-基)-2-側氧乙基)苯基)胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)胺甲鹽基)環丁烷甲酸烯丙酯 (1.59 g, 2.78 mmol) 於 *N,N*-二甲基甲醯胺 (15.0 mL) 中之混合物中添加 4-二甲胺基吡啶 (680 mg, 5.56 mmol)。將反應混合物於 25°C 下攪拌 18 小時。過濾粗品，並藉由製備型 HPLC (Phenomenex Gemini-NX 80 × 30 mm × 3 μm/水 (10 mM NH₄HCO₃) - 乙腈/10%-80%) 將其純化，以得到黃色固體狀標題化合物 (400 mg, 15%)。LCMS (ESI) *m/z* : 958.5 [M+H]⁺。

步驟 3 : 1-(((2*S*)-1-((4-(1-(((3*R*,5*S*)-1-(三級丁氧羰基)-5-(((*S*)-1-(4-氨基苯基)乙基)胺甲鹽基)吡咯啉-3-基)氧基)羰基)氧基)-2-(4-甲基哌啶-1-基)-2-側氧乙基)苯基)胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)胺甲鹽基)環丁烷甲酸

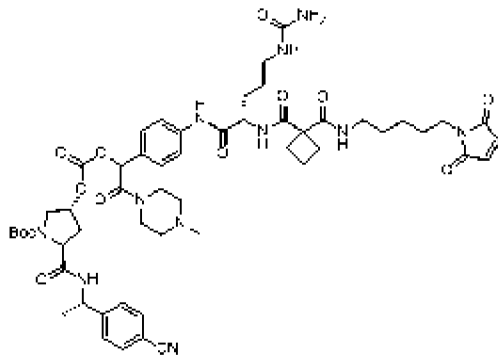


【0566】 於 25°C 下，向 (2*S*, 4*R*)-4-(((1-(4-((*S*)-2-(1-((烯丙基氧基)羰基)環丁烷甲醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苯基)-2-(4-甲基哌啶-1-基)-2-側氧乙氧基)羰基)

氧基)-2-(((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-羧酸三級丁酯 (260 mg, 0.27 mmol) 及 1,3-二甲基嘧啶-2,4,6(1*H*, 3*H*, 5*H*)-三酮 (212 mg, 1.36 mmol) 於二氯甲烷 (2.00 mL) 及甲醇 (2.00 mL) 中之溶液中添加四(三苯基磷)鈰 (62.7 mg, 0.05 mmol)。將反應混合物在氮氣氣氛下於 25°C 下攪拌 16 小時。濃縮粗品，並藉由製備型 HPLC 將其純化，其中使用下列條件：管柱：Phenomenex Gemini-NX 80 × 30 mm × 3 μm，流動相：水 (10mM NH₄HCO₃) - 乙腈 10%-80%，以得到黃色固體狀標題化合物 (110 mg，產率 44.2%)。

【0567】 LCMS (ESI) m/z : 918.6 [M+H]⁺ ◦

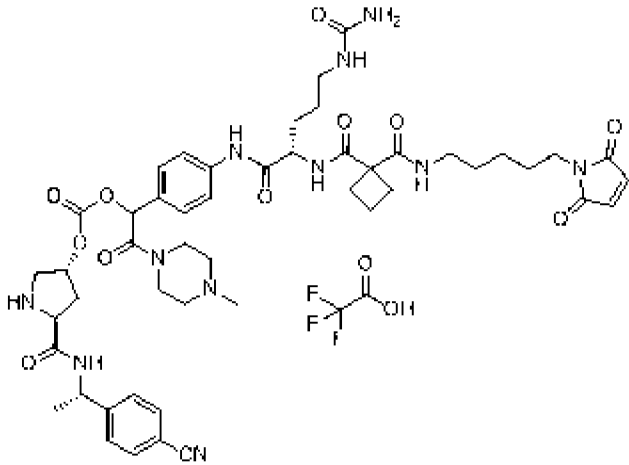
步驟 4：(2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲鹽基)-4-(((1-(4-((*S*)-2-(1-((5-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)戊基)胺甲鹽基)環丁烷甲鹽胺基)-5-脲基戊鹽胺基)苯基)-2-(4-甲基哌啶-1-基)-2-側氧乙氧基)羰基)氧基)吡咯啉-1-羧酸三級丁酯



【0568】向 1-(((2*S*)-1-((4-(1-((((3*R*,5*S*)-1-(三級丁氧羰基)-5-(((*S*)-1-(4-氰基
 苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-3-基)氧基)羰基)氧基)-2-(4-甲基哌啶-1-基)-2-側氧
 乙基)苯基)胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷甲酸 (110 mg, 0.12
 mmol) 及 1-(5-胺基戊基)-1*H*-吡咯-2,5-二酮 2,2,2-三氟乙酸 (43.0 mg, 0.15 mmol)
 於 *N,N*-二甲基甲醯胺 (3 mL) 中之混合物中添加 *N,N*-二異丙基乙胺 (0.06 mL,
 0.36 mmol)、2-(7-氮雜苯并三唑-1-基)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸鎂 (54.7 mg,

0.14 mmol)。將反應混合物於 25°C 下攪拌 3 小時。藉由油泵濃縮混合物。藉由製備型 HPLC (Boston Green ODS 150 × 30 mm × 5 μm, 水 (0.075% TFA)- 乙腈 28%-58%) 純化殘餘物, 以得到白色固體狀標題化合物 (90 mg, 69.4%)。LCMS (ESI) m/z : 1082.6 [M+H]⁺。

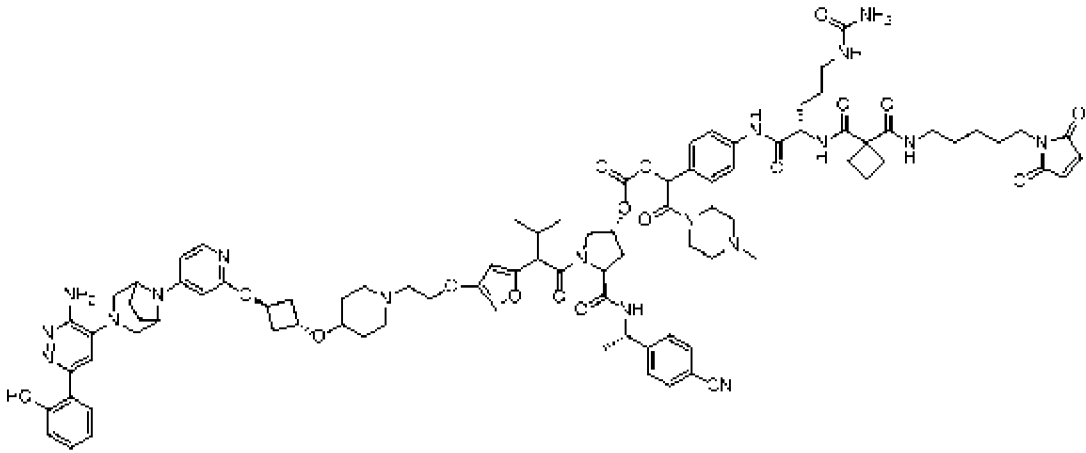
步驟 5: (3*R*,5*S*)-5-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-3-基 (1-(4-((*S*)-2-(1-((5-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)戊基)胺甲醯基)環丁烷甲醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苯基)-2-(4-甲基哌啶-1-基)-2-側氧乙基)碳酸酯 2,2,2-三氟乙酸酯



【0569】 將 (2*S*, 4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-4-(((1-(4-((*S*)-2-(1-((5-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)戊基)胺甲醯基)環丁烷甲醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苯基)-2-(4-甲基哌啶-1-基)-2-側氧乙氧基)羰基)氧基)吡咯啉-1-羧酸三級丁酯 (90 mg, 0.08 mmol) 於含 5% 三氟乙酸的六氟異丙醇 (5 mL) 中之溶液於 25°C 下攪拌 2 小時。濃縮混合物, 以得到黃色油狀標題化合物 (91.0 mg, 產率 99.8%)。LCMS (ESI) m/z : 982.4 [M-TFA+H]⁺。

步驟 6: (3*R*,5*S*)-1-(2-(3-(2-(4-(((1*r*,3*r*)-3-((4-(3-(3-胺基-6-(2-羥基苯基)嗒吡啶-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-基)乙氧基)異噁唑啉-5-基)-3-甲基丁醯基)-5-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-3-基 (1-(4-

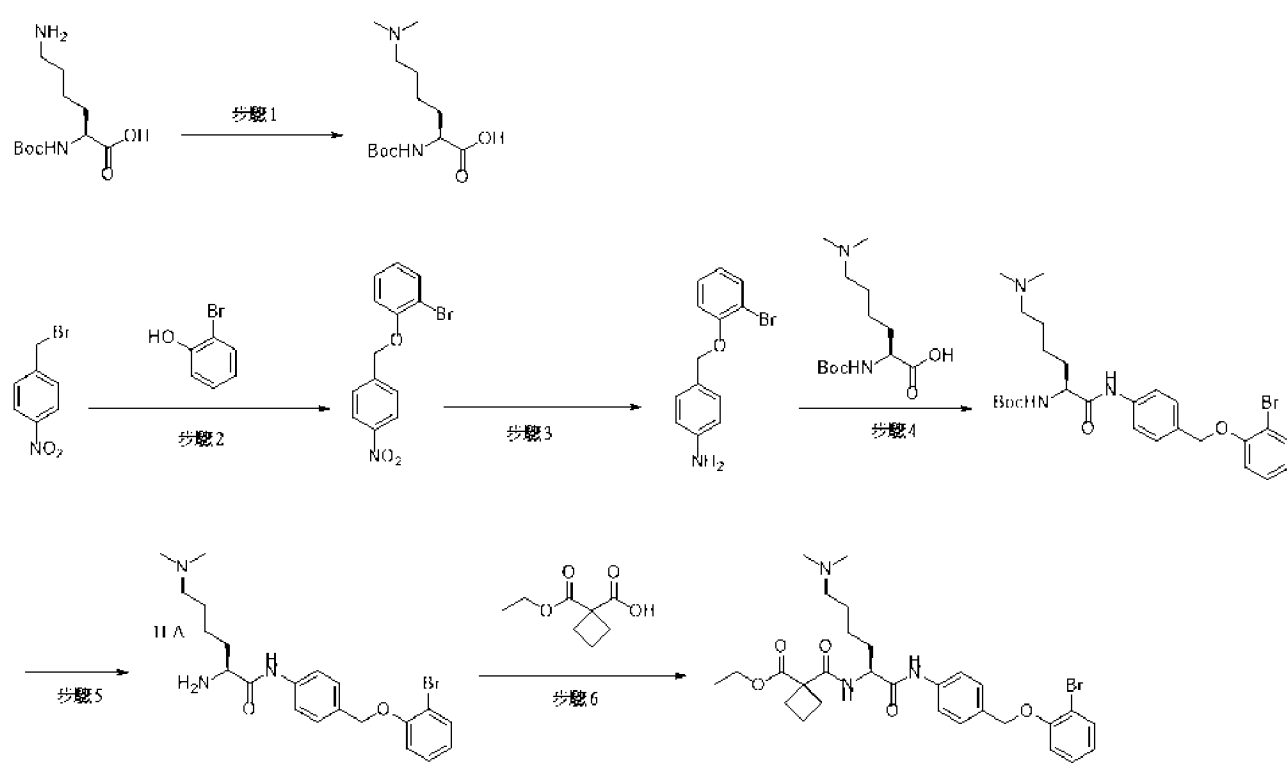
((*S*)-2-(1-((5-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)戊基)胺甲醯基)環丁烷甲醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苯基)-2-(4-甲基哌啶-1-基)-2-側氧乙基)碳酸酯



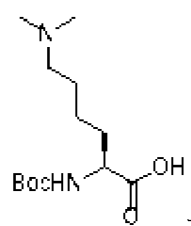
L1-CIDE-BRM1-1B

【0570】向 (3*R*,5*S*)-5-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-3-基 (1-(4-(((*S*)-2-(1-(((5-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)戊基)胺甲醯基)環丁烷甲醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苯基)-2-(4-甲基哌啶-1-基)-2-側氧乙基)碳酸酯 2,2,2-三氟乙酸酯 (91.0 mg, 0.08 mmol) 及 2-(3-(2-(4-(((1*r*,3*r*)-3-(((4-(3-(3-胺基-6-(2-羥基苯基)嗒吡-4-基)-3,8-二氫雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)環丁氧基)哌啶-1-基)乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁酸 (81.5 mg, 0.11 mmol) 於 *N,N*-二甲基甲醯胺 (2.50 mL) 中之混合物中ing添加 *N,N*-二異丙基乙胺 (0.08 mL, 0.50 mmol) 及 2-(7-氮雜苯并三唑-1-基)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸鎂 (41.0 mg, 0.11 mmol) 。將混合物於 25°C 下攪拌 16 小時。濃縮後，藉由製備型 HPLC 純化粗品，其中使用下列條件：管柱：Welch Xtimate C18 100 × 40mm × 3 μm (經水 (0.075% 三氟乙酸)- 乙腈 15-45% 活化)，以得到白色固體狀標題化合物 (80.6 mg，產率 52%) 。LCMS (ESI) *m/z*: 860.4 [1/*M*+*H*]⁺

中間體 1： (*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

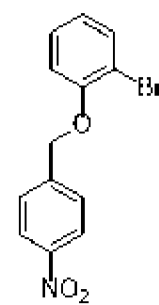


步驟 1： N^2 -(三級丁氧羰基)- N^6,N^6 -二甲基-L-離胺酸



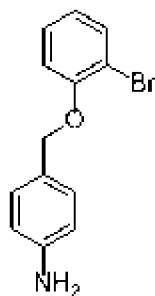
在氫氣 (3 atm) 下，將 (三級丁氧羰基)-L-離胺酸 (20.0 g, 81.2 mmol)、 CH_2O (12.2 g, 162 mmol) 及 Pd/C (2.00 g) 於甲醇 (100 mL) 中之溶液於室溫下攪拌 4 小時。過濾後，在減壓下濃縮濾液。將殘餘物用 Et_2O 洗滌。藉由過濾收集固體，以得到 20.6 g (產率 92%) 白色固體狀標題化合物。LCMS (ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 275$ 。

步驟 2：1-溴-2-((4-硝基苄基)氧基)苯



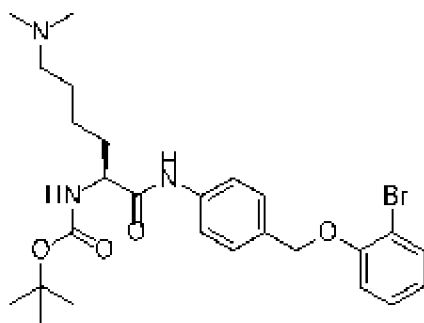
【0572】 將 2-溴苯酚 (52.6 g, 304 mmol)、1-(溴甲基)-4-硝基苯 (65.7 g, 304 mmol) 及 K_2CO_3 (83.9 g, 608 mmol) 於 DMF (700 mL) 中的溶液於室溫下攪拌 1 小時。添加 EtOAc，並使用水洗滌三次。有機層經無水 Na_2SO_4 乾燥，並在真空下濃縮，以得到 73.8 g (產率 78%) 黃色固體狀標題化合物。 1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.34 – 8.24 (m, 2H), 7.81 – 7.70 (m, 2H), 7.62 (dd, *J* = 7.9, 1.6 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)。

步驟 3：4-((2-溴苯氧基)甲基)苯胺



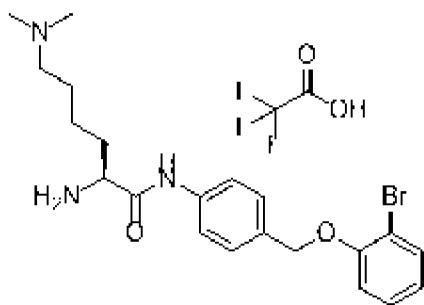
【0573】 在氮氣下，於 0°C 下向 1-溴-2-((4-硝基苄基)氧基)苯 (43.0 g, 139.5 mmol) 及 K_2CO_3 (115 g, 837 mmol) 於乙腈 (800 mL) 及水 (400 mL) 中之溶液中分批添加 $Na_2S_2O_4$ (242 g, 1395 mmol)。混合物於室溫攪拌 6 小時。使用 EtOAc 將產物萃取一次。有機層經無水 Na_2SO_4 乾燥，並在真空下濃縮，以得到 35 g (粗品) 黃色固體狀標題化合物。LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 278$ 。

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



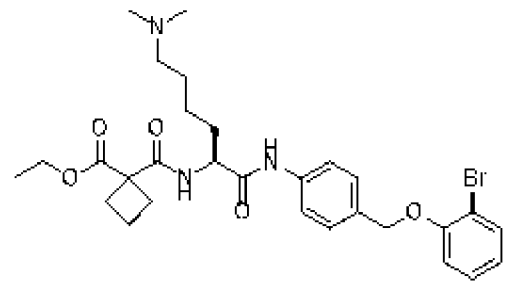
【0574】 在氮氣下，於 -25°C 下向 N^2 -(三級丁氧羰基)- N^6,N^6 -二甲基- L -離胺酸 (13.3 g, 48.4 mmol) 及 NMM (10.3 g, 96.9 mmol) 於四氫呋喃 (200 mL) 中之溶液中逐滴添加氯甲酸異丁酯 (7.91 g, 58.1 mmol)。將反應於 -25°C 下攪拌 0.5 小時。然後於 -25°C 下添加 4-((2-溴苯氧基)甲基)苯胺 (16.1 g，粗品) 於四氫呋喃 (120 mL) 中之溶液。將反應於室溫下攪拌 4 小時。在真空下濃縮溶劑。添加 DCM 並用水洗滌。有機層經無水 Na_2SO_4 乾燥並在減壓下濃縮。藉由矽膠急速層析法 (梯度：0-9% MeOH/DCM) 純化殘餘物，以得到 6.70 g (產率 25%) 白色固體狀標題化合物。LCMS (ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 534$ 。

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



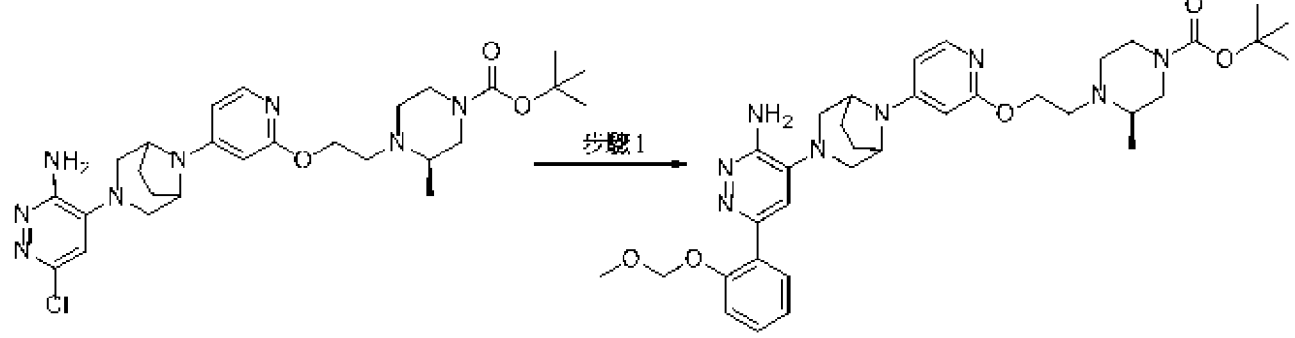
【0575】 將 (S)-(1-((4-((2-溴苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲胺基)-1-側氧己-2-基)胺羧酸三級丁酯 (4.00 g, 7.48 mmol) 於 5% TFA/HFIP (50 mL) 中之溶液於室溫下攪拌 3 小時。在真空下濃縮溶劑，並將其直接用於下一步驟。LCMS (ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 434$ 。

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

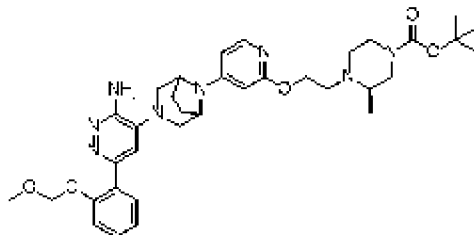


【0576】 於 0°C 下向 (S)-2-胺基-N-(4-((2-溴苯氧基)甲基)苯基)-6-(二甲胺基)己醯胺（2,2,2-三氟乙酸鹽）（由步驟 5 得到的粗品）、1-(乙氧基羰基)環丁烷-1-甲酸 (1.55 g, 8.98 mmol) 及 DIPEA (9.65 g, 74.8 mmol) 於 DMF (20 mL) 中之溶液中添加 HATU (3.41 g, 8.98 mmol)。將混合物於室溫下攪拌 0.5 小時。藉由預填充之 C18 柱（梯度：0-100% MeOH 於水 (0.05% NH₄HCO₃) 中）純化粗品，以得到 2.70 g（產率 61%）紅色固體狀標題化合物。LCMS (ESI) [M+H]⁺ = 588。 ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) 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)。

中間體 5：(3R)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-(甲氧基甲氧基)苯基)嗒咩-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌啶-1-羧酸三級丁酯



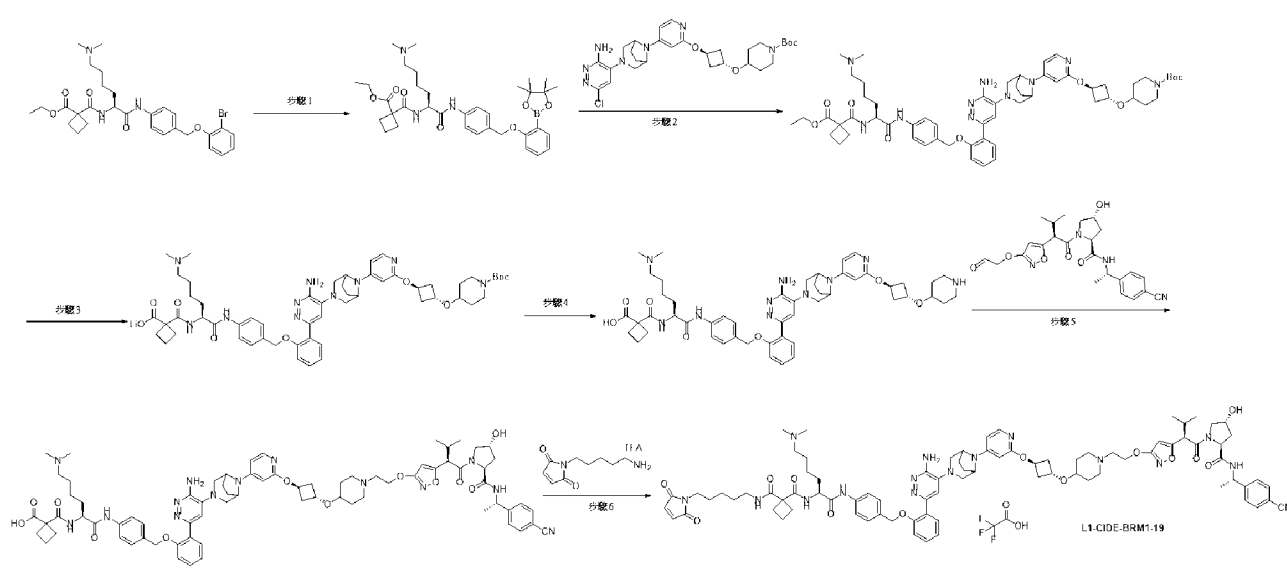
步驟 1：(3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-(甲氧基甲氧基)苯基)嗒吡-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌吡-1-羧酸三級丁酯



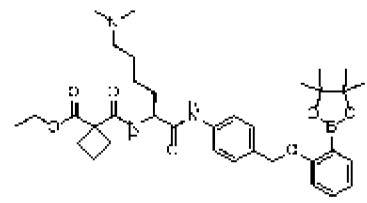
【0577】 在氮氣下，將 (3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-氯嗒吡-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌吡-1-羧酸三級丁酯 (1.00 g, 1.79 mmol)、(2-(甲氧基甲氧基)苯基)硼酸 (391 mg, 2.15 mmol)、Pd(PPh₃)₄ (413 mg, 0.358 mmol) 及 K₂CO₃ (741 mg, 5.37 mmol) 於二噁烷 (10 mL) 及水 (2 mL) 中之溶液於 100°C 下攪拌 1 小時。將反應用水稀釋，並用二氯甲烷萃取。將有機層合併，經無水硫酸鈉乾燥，並在真空下濃縮。藉由矽膠急速層析法（梯度：0%-10% 甲醇/二氯甲烷）純化殘餘物，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) 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)。

合成實例 19

L1-CIDE-BRM1-19 之合成

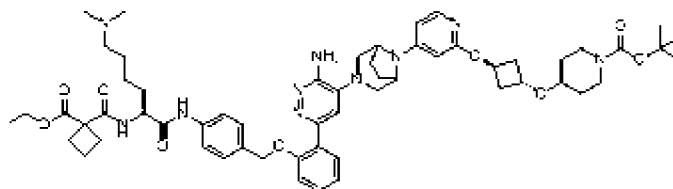


步驟 1：(S)-1-((6-(二甲胺基)-1-側氧基-1-((4-((2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二側氧基硼戊環-2-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)己-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸乙酯



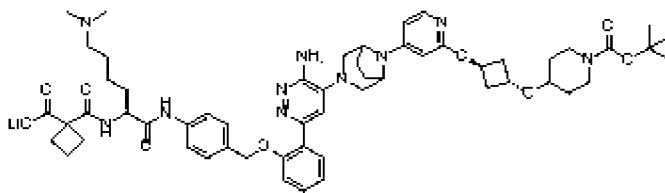
【0578】 在氮氣下，將 (S)-1-((1-((4-((2-溴苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲胺基)-1-側氧己-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸乙酯 (500 mg, 0.852 mmol)、B₂Pin₂ (649 mg, 2.55 mmol)、Pd(dppf)Cl₂ (124 mg, 0.170 mmol) 及 KOAc (250 mg, 2.55 mmol) 於 1,4-二噁烷 (5 mL) 中之溶液於 80℃ 下攪拌 2 小時。將反應用 DCM 稀釋，並用水洗滌。有機層經無水硫酸鈉乾燥，並在真空下濃縮。藉由矽膠急速層析法（梯度：0%-20% MeOH / DCM（含 0.3% 7 M NH₃/MeOH））純化殘餘物，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。

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)吡啶-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



【0579】 在氮氣下，將 (S)-1-((6-(二甲胺基)-1-側氧基-1-((4-((2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二側氧基硼戊環-2-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)己-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-氯嗒啉-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 (395 mg, 0.676 mmol)、Ad₂nBuPPdG2 (41.0 mg, 0.061 mmol) 及 K₂CO₃ (260 mg, 1.22 mmol) 於二噁烷 (5.0 mL) 及 H₂O (1.2 mL) 中之溶液於 95°C 下攪拌 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。藉由預填充之 C18 柱（溶劑梯度：0-100% MeOH 於水 (0.1% NH₄HCO₃)）中）純化殘餘物，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。

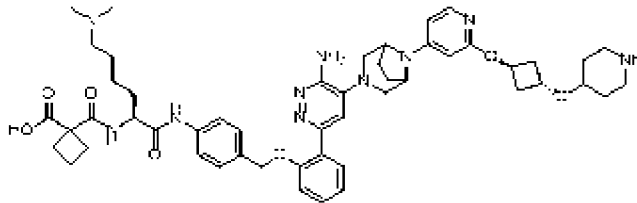
步驟 3：1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-((1*r*,3*r*)-3-((1-(三級丁氧羰基)哌啶-4-基)氧基)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒啉-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲胺基)-1-側氧己-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸鋰



【0580】 將 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)嗒啉-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)

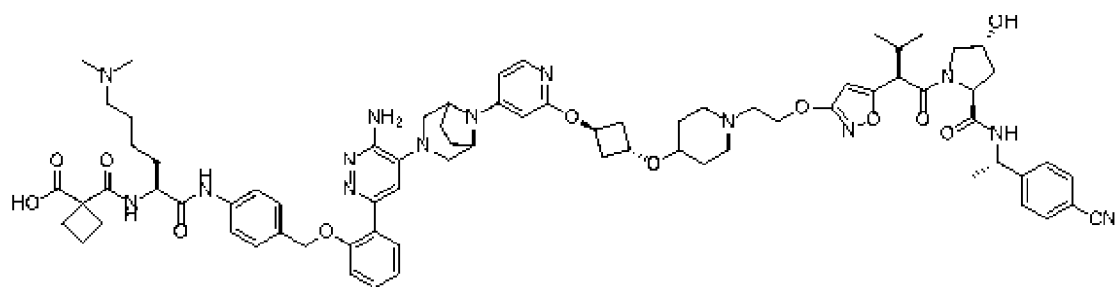
中之溶液於室溫下攪拌 1 小時。在真空下濃縮將所得混合物。將粗品直接用於下一步驟。LC-MS：(ESI, m/z)：[M+H]⁺ = 1032。

步驟 4：1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-氨基-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



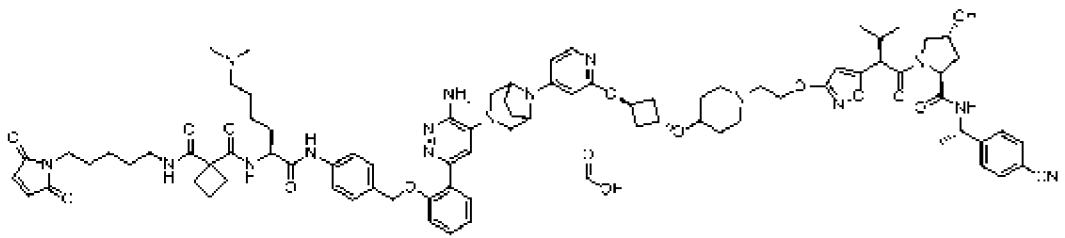
【0581】 將 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(8-(2-((1*r*,3*r*)-3-(哌啶-4-基)氧基)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒啉-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲胺基)-1-側氧己-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸鋰（由上一步得到的粗品）於 TFA (0.75 mL) 及 HFIP (14 mL) 中之溶液於室溫下攪拌 30 分鐘。在真空下濃縮將所得混合物。藉由預填充之 C18 柱（溶劑梯度：0-100% MeOH 於水 (0.1% NH₄HCO₃) 中）純化所獲得之粗產物，以得到 170 mg（產率 71%）黃色固體狀標題化合物。LC-MS：(ESI, m/z)：[M+H]⁺ = 932。

步驟 5：1-(((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-羥基吡咯啶-1-基)-3-甲基-1-側氧丁-2-基)異噁唑-3-基)氧基)乙基)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



【0582】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。然後於 0°C 下添加 NaBH₃CN (17.3 mg, 0.274 mmol) 並於室溫下攪拌 30 分鐘。將反應用水淬滅。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。

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-2-基)異噁唑-3-基)氧基)乙基)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)-N-(5-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)戊基)環丁烷-1,1-二甲醯胺（甲酸鹽）

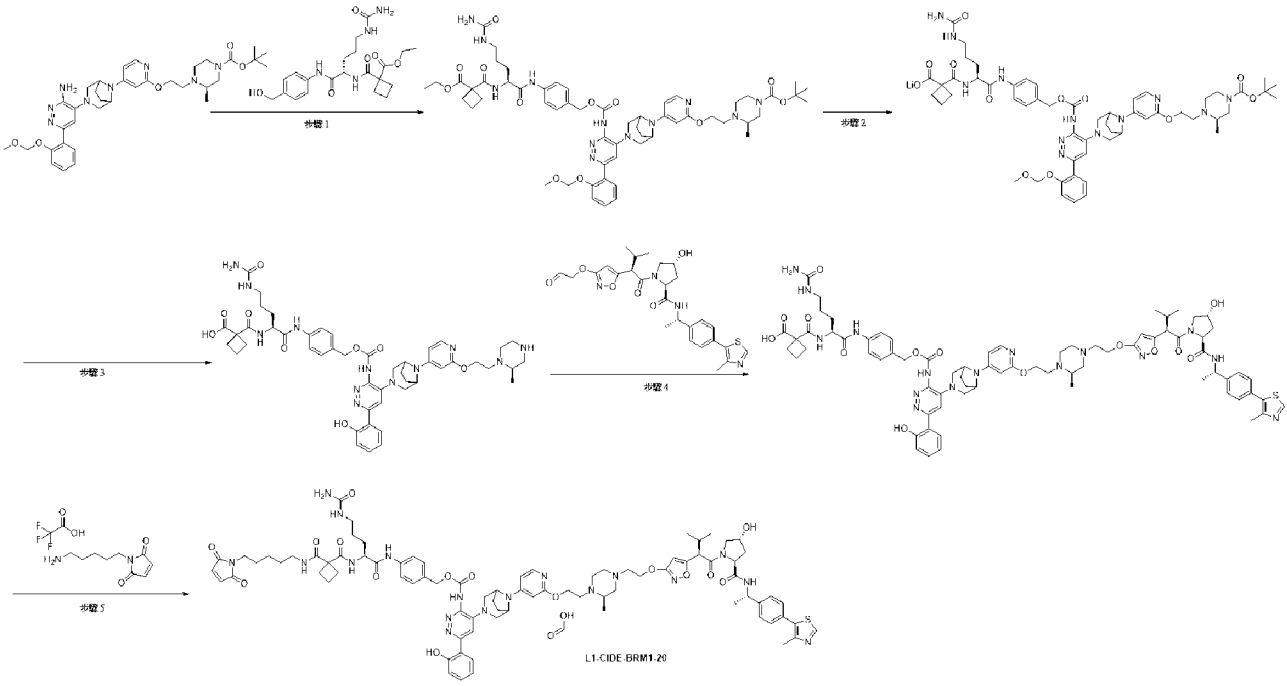


【0583】 於室溫下，向 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-((1*R*,3*r*)-3-((1-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-4-羥基吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁-2-基)異噁唑-3-基)氧基)乙基)哌啶-4-基)氧基)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒咭-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲胺基)-1-側氧己-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (65.0 mg, 0.047 mmol)、1-(5-胺基戊基)-1*H*-吡咯-2,5-二酮(2,2,2-三氟乙酸鹽) (25.6 mg, 粗品)、DIPEA (90.9 mg, 0.705 mmol) 於 DMF (1.5 mL) 中之溶液中添加 HATU (21.4 mg, 0.056 mmol) 。將所得溶液於室溫下攪拌 30 分鐘。藉由製備型 HPLC (Xselect CSH F-Phenyl OBD 柱, 19 × 250 mm, 5 μm; 流動相 A: 水 (0.05% FA), 流動相 B: ACN; 流速: 60 mL/min; 梯度: B 於 7 分鐘內由 2% 增加至 29%; 254 nm; R_{T1}: 6.5 min) 純化所得溶液, 以得到 5.9 mg (產率 8%) 白色固體狀 **L1-CIDE-BRM1-19**。LC-MS: (ESI, m/z): [M+H]⁺ = 1548。 ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.24 (s, 1H), δ 8.47 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.93 – 7.54 (m, 8H), 7.55-7.30 (m, 5H), 7.26 – 7.09 (m, 2H), 7.08 – 6.87 (m, 3H), 6.43 – 5.88 (m, 3H), 5.59 (s, 2H), 5.22 – 4.86 (m, 5H), 4.50 – 4.12 (m, 8H), 3.72 – 3.54 (m, 3H), 3.13 – 2.97 (m, 4H), 2.63 (s, 6H), 2.45-2.35 (m, 5H), 2.25-2.02 (m, 16H), 2.02 – 1.56 (m, 11H), 1.57 – 1.25 (m, 13H), 1.29-1.12 (m, 4H), 0.95 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.79 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H)。

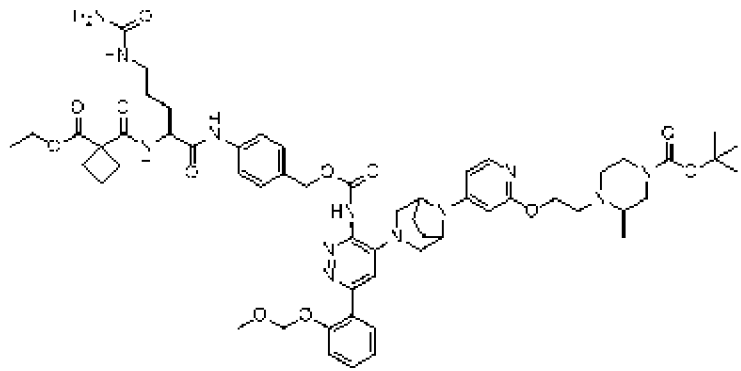
合成實例 20

L1-CIDE-BRM1-20 之合成

4-((*S*)-2-(1-((5-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)戊基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苄基(4-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-羥基-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁-2-基)異噁唑-3-基)氧基)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-3-基)-6-(2-羥基苯基)嗒吡-3-基)胺甲酸酯(甲酸鹽)

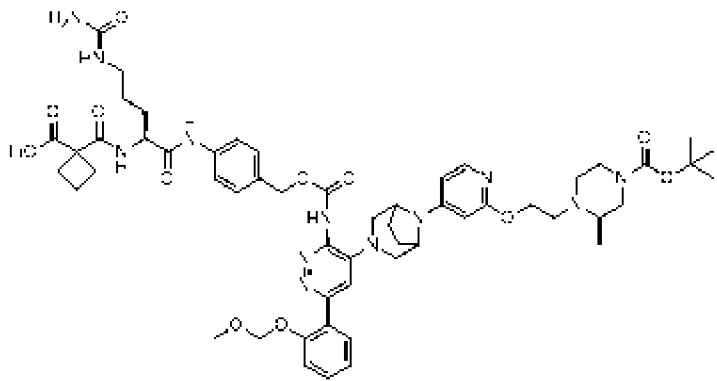


步驟 1：(3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-(((4-((*S*)-2-(1-(乙氧基羰基)環丁烷-1-甲醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苄基)氧基)羰基)胺基)-6-(2-(甲氧基甲氧基)苯基)嗒吡-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌啶-1-羧酸三級丁酯



【0584】 在氮氣下，於 0°C 下向 (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 (500 mg, 0.756 mmol, 由 Genetech 提供)、(S)-1-((1-((4-(羥基甲基)苯基)胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸乙酯 (986 mg, 2.26 mmol, 由 Genetech 提供) 及 DIPEA (488 mg, 3.78 mmol) 於 THF (25 mL) 中之溶液中添加三光氣 (85.5 mg, 0.288 mmol)。將反應於室溫下攪拌 0.5 小時。蒸發溶劑，並藉由矽膠急速層析法 (梯度：0%-13% 甲醇/二氯甲烷) 純化殘餘物，然後藉由預填充之 C18 柱 (溶劑梯度：0-100% ACN 於水 (0.05% NH₄HCO₃)) 中) 進行純化，以得到 191 mg (22%) 白色固體狀標題化合物。LC-MS：(ESI, m/z)：[M+H]⁺ = 1122。

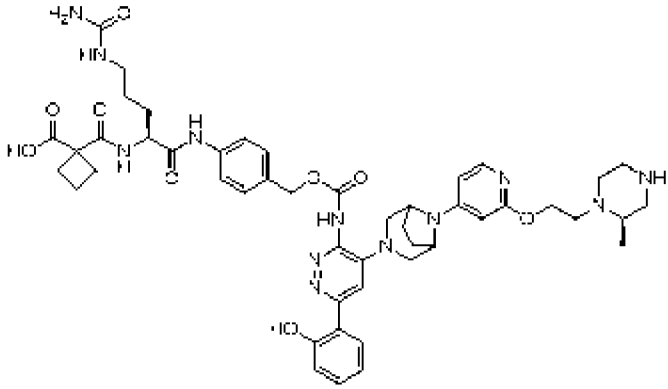
步驟 2：1-(((2*S*)-1-((4-(((4-(8-(2-(2-((*R*)-4-(三級丁氧羰基)-2-甲基哌咩-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)-6-(2-(甲氧基甲氧基)苯基)嗒咩-3-基)胺甲醯基)氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸鎂



【0585】 將 (3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-(((4-((*S*)-2-(1-(乙氧基羰基)環丁烷-1-甲醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苄基)氧基)羰基)胺基)-6-(2-(甲氧基甲氧基)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 (130 mg, 0.115mmol) 及 LiOH (14.0 mg, 0.350 mmol) 於 THF (3 mL) 及水 (3 mL) 中之溶液於室溫下攪拌 1 小時。在真空下去除 THF，然後凍乾，以得到 140 mg (粗品) 白色固體狀標題化合物。LC-MS：(ESI, m/z): $[M+H]^+ = 1094$ 。

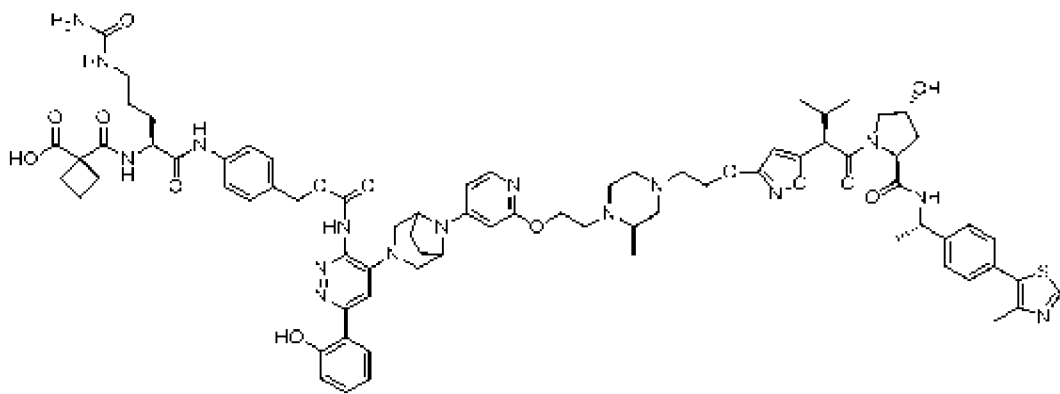
步驟 3：1-(((2*S*)-1-((4-(((6-(2-羥基苯基)-4-(8-(2-(2-((*R*)-2-甲基哌啶-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒啉-3-基)胺甲醯基)氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸



【0586】 在氬氣下，將 1-(((2*S*)-1-((4-(((4-(8-(2-(2-((*R*)-4-(三級丁氧羰基)-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-3-基)-6-(2-(甲氧基甲氧基)苯基)嗒啉-3-基)胺甲醯基)氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸鋰 (240 mg, 0.219 mmol) 於濃 HCl (2 mL)、THF (2 mL) 及 異丙醇 (2 mL) 中之溶液於室溫下攪拌 0.5 小時。在真空下濃縮反應溶液，並藉由預填充之 C18 柱 (溶劑梯度：0-100% ACN 於水 (0.05% NH_4HCO_3)) 中) 純化剩餘水溶液，以得到 150 mg 黃色固體狀標題化合物。LC-MS：(ESI, m/z): $[M+H]^+ = 949$ 。

步驟 4：1-(((2*S*)-1-((4-(((4-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-羥基-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁-2-基)異

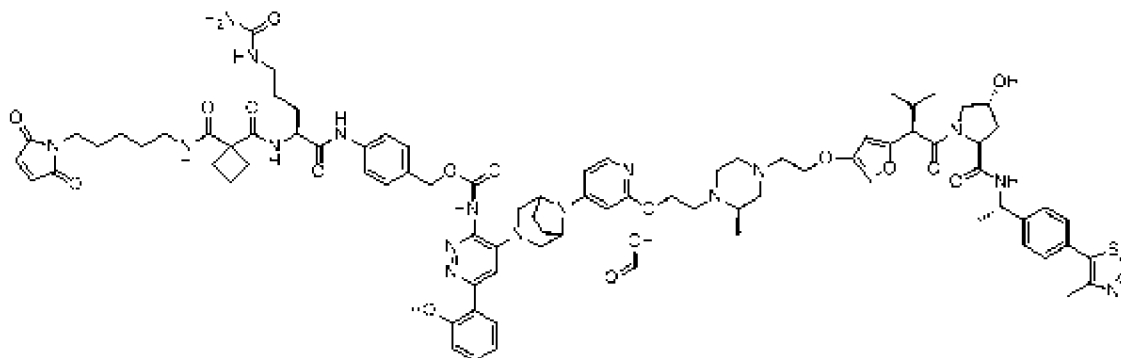
噁唑-3-基)氧基)乙基)-2-甲基哌啶-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]
辛-3-基)-6-(2-羥基苯基)嗒吡-3-基)胺甲醯基)氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧基-5-
脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸



【0587】 在氮氣下，將 1-(((2*S*)-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)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒吡-3-基)胺甲
醯基)氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸
(150 mg, 0.158 mmol)、(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-甲基噁-5-基)苯基)乙基)吡咯啉-2-甲醯胺 (112 mg,
0.207mmol)、CH₃COOH (19.8 mg, 0.329 mmol) 於甲醇 (3 mL) 及 DCM (1 mL) 中
之溶液於 30℃ 下攪拌 1 小時。然後添加 NaBH₃CN (19.5 mg, 0.513 mmol)，並
於 30℃ 下攪拌 0.5 小時。在真空下濃縮反應溶液。藉由預填充之 C18 柱（溶劑
梯度：0-100% 甲醇於水 (0.05% NH₄HCO₃)) 中）純化殘餘物，以得到 180 mg
(77%) 黃色固體狀標題化合物。LC-MS：(ESI, *m/z*)：[*M*+*H*]⁺ = 1474。

步驟 5：4-((*S*)-2-(1-((5-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)戊基)胺甲醯基)環
丁烷-1-甲醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苄基 (4-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-
4-羥基-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噁-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-

側氧丁-2-基)異噁唑-3-基)氧基)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-3-基)-6-(2-羥基苯基)嗒吡-3-基)胺甲酸酯 (甲酸鹽)



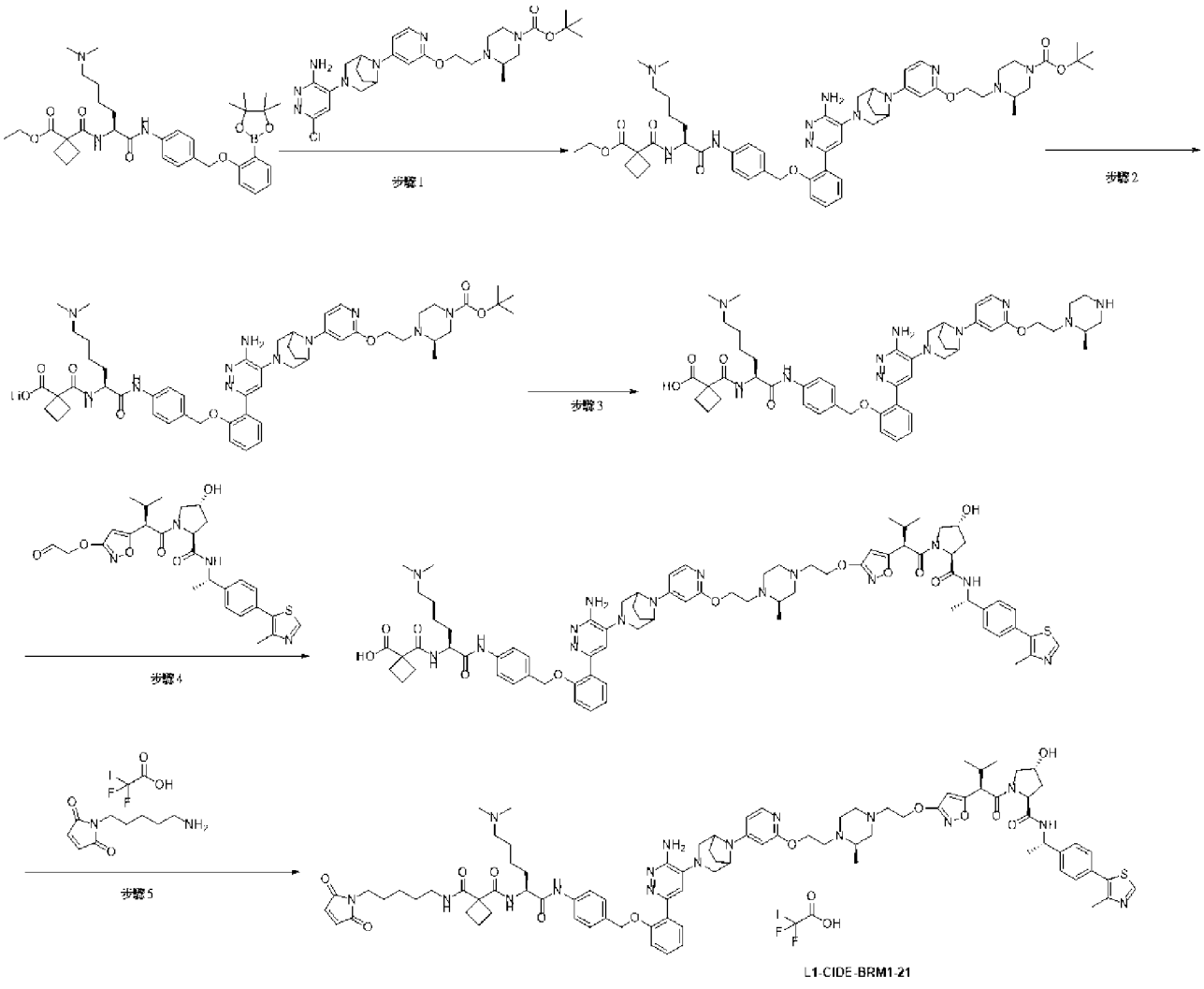
【0588】 於室溫下，向 1-(((2*S*)-1-((4-(((4-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-羥基-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噁-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啶-1-基)-3-甲基-1-側氧丁-2-基)異噁唑-3-基)氧基)乙基)-2-甲基哌啶-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)-6-(2-羥基苯基)嗒吡-3-基)胺甲醯基)氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (180 mg, 0.122mmol)、1-(5-胺基戊基)-1*H*-吡咯-2,5-二酮(2,2,2-三氟乙酸鹽) (67 mg，粗品) 及 DIPEA (158 mg, 1.22 mmol) 於 DMF (3 mL) 中之溶液中添加 HATU (67.0 mg, 0.176 mmol)。將反應於室溫下攪拌 1 小時。藉由製備型 HPLC (柱：XBridge Prep OBD C18 柱，30 × 150 mm，5 μm；流動相 A：水 (0.1% FA)，流動相 B：ACN；流速：60 mL/min；梯度：B 於 7 分鐘內由 8% 增加至 38%；波長：254 nm；R_{T1}(min)：6.5 min) 純化所得溶液，以得到 49.7 mg (產率 24.0%) 白色固體狀 **L1-CIDE-BRM1-20**。LC-MS：(ESI, *m/z*)：[*M*+*H*]⁺ = 1638。 ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.39 (s, 1H), 10.13 (s, 1H), 9.94 (s, 1H), 8.99 (s, 1H), 8.40 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 8.14 (s, 1H), 8.03 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.82 (dd, *J* = 8.0, 5.8 Hz, 3H), 7.70 – 7.61 (m, 3H), 7.51 – 7.41 (m, 2H), 7.41 – 7.28 (m,

5H), 6.96 (d, J = 16.1 Hz, 4H), 6.54 (d, J = 6.1 Hz, 1H), 6.17 (s, 1H), 6.10 (s, 1H), 5.96 (dd, J = 10.3, 4.5 Hz, 1H), 5.41 (s, 2H), 5.09 (d, J = 5.3 Hz, 3H), 4.91 (t, J = 7.1 Hz, 1H), 4.50 – 4.34 (m, 4H), 4.32-4.28 (m, 5H), 3.74 – 3.61 (m, 2H), 3.55-3.40 (m, 4H), 3.39-3.35 (m, 3H), 3.19 – 2.89 (m, 9H), 2.70-2.60 (m, 2H), 2.48-2.38 (m, 9H), 2.23-2.12 (m, 1H), 2.10-1.95 (m, 2H), 1.88 (s, 4H), 1.80-1.70 (m, 4H), 1.68 – 1.57 (m, 1H), 1.52-1.30 (m, 10H), 1.28 – 1.16 (m, 2H), 1.10-0.90 (m, 6H), 0.82 (d, J = 6.6 Hz, 3H)。

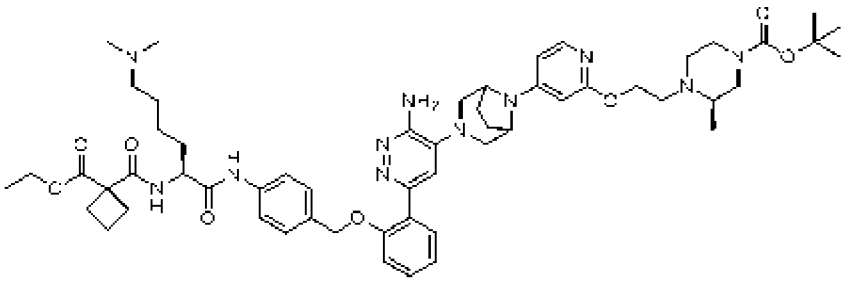
合成實例 21

L1-CIDE-BRM1-21 之合成

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-甲基唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁-2-基)異噁唑-3-基)氧基)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-3-基)嗒啶-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲胺基)-1-側氧己-2-基)-*N*-(5-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)戊基)環丁烷-1,1-二甲醯胺;2,2,2-三氟乙酸



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)苺基)氧基)苯基)嗒吡啉-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌啶-1-羧酸三級丁酯

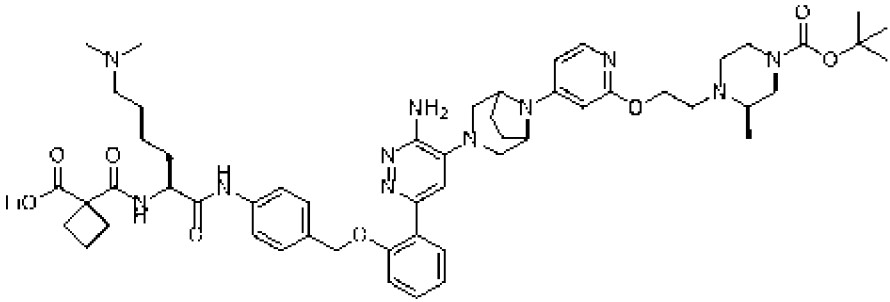


【0589】 在氮氣下，將 (*S*)-1-((6-(二甲胺基)-1-側氧基-1-((4-((2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二側氧基硼戊環-2-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)己-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸乙酯 (316 mg, 0.570 mmol)、(3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-氯嗒吡啉-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌啶-1-羧酸三級丁酯

(538.8 mg, 0.850 mmol)、 K_3PO_4 (240 mg, 1.13 mmol) 及 $\text{Ad}_2\text{nBuPPdG2}$ (37.8 mg, 0.0600 mmol) 於 1,4-二噁烷 (4 mL) 及水 (1 mL) 中之溶液於 95°C 下攪拌 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。藉由預填充之 C18 柱（溶劑梯度：0-100% ACN 於水 (0.05% NH_4HCO_3)) 中）純化殘餘物，以得到 230 mg（產率 39%）紅色固體狀標題化合物。LCMS (ESI)

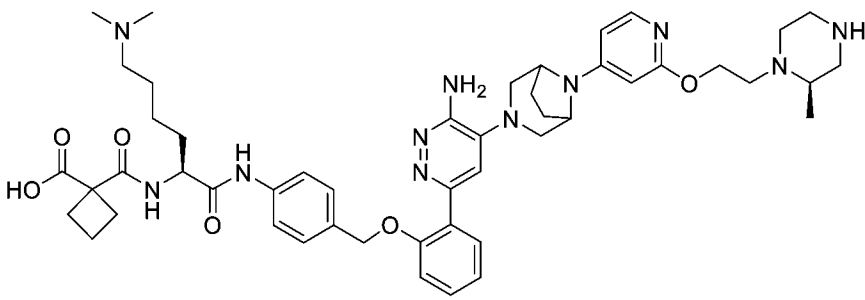
$$[\text{M}+\text{H}]^+ = 1032$$

步驟 2：1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(三級丁氧羰基)-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-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



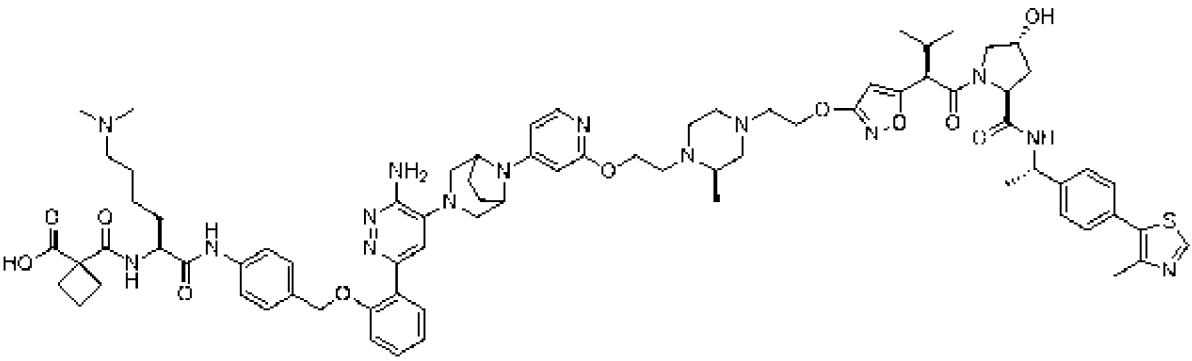
【0590】 將 (3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-((4-((*S*)-6-(二甲胺基)-2-(1-(乙氧基羰基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基)氧基)苯基)嗒吡-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌啶-1-羧酸三級丁酯 (210 mg, 0.200 mmol) 及 LiOH·H₂O (25.6 mg, 0.610 mmol) 於四氫呋喃 (3 mL) 及水 (1 mL) 中之溶液於室溫下攪拌 1 小時。在真空下濃縮溶劑，以得到 254 mg (粗品) 黃色固體狀標題化合物。

步驟 3：1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-氨基-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-(二甲胺基)-1-側氧己-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸



【0591】 將 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(三級丁氧羰基)-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-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 (254 mg, 0.250 mmol) 於 5% TFA/HFIP (20 mL) 中之溶液於室溫下攪拌 3 小時。在真空下濃縮溶劑。藉由預填充之 C18 柱 (溶劑梯度：0-100% MeOH 於水 (0.05% NH₄HCO₃)) 中) 純化殘餘物，以得到 102 mg (產率 44%) 紅色固體狀標題化合物。LCMS (ESI) [M+H]⁺ = 905。

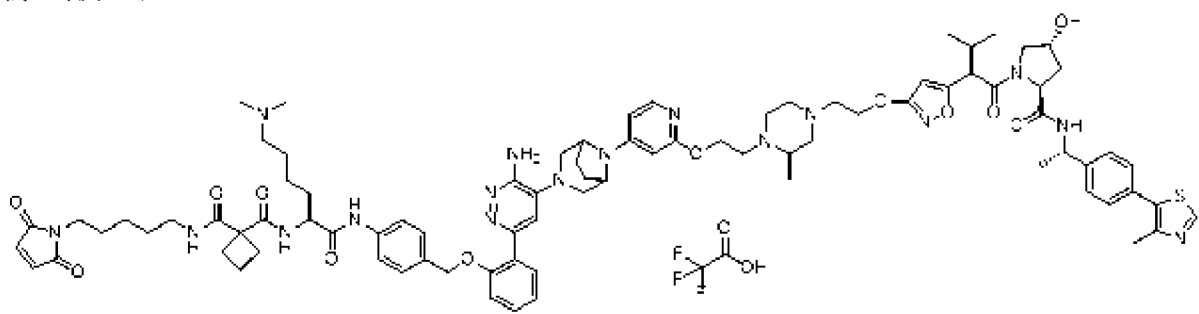
步驟 4：1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-羥基-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啶-1-基)-3-甲基-1-側氧丁-2-基)異噁唑-3-基)氧基)乙基)-2-甲基哌啶-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒啉-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲胺基)-1-側氧己-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸



【0592】 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 (102 mg, 0.110 mmol)、
(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-甲基唑-5-基)苯基)乙基)吡咯啉-2-甲醯胺 (61.0 mg, 0.110 mmol) 及
CH₃COOH (13.6 mg, 0.230 mmol) 於甲醇 (1.2 mL) 及二氯甲烷 (0.4 mL) 中之溶
液於室溫下攪拌 1 小時。然後添加 NaBH₃CN (21.3 mg, 0.340 mmol)，並於室溫
下攪拌 0.5 小時。添加水以淬滅反應。在真空下濃縮溶劑。藉由預填充之 C18
柱（溶劑梯度：0-100% MeOH 於水 (0.05% NH₄HCO₃)) 中）純化殘餘物，以得
到 80.0 mg（產率 49%）黃色固體狀標題化合物。LCMS (ESI) [M+H]⁺ = 1429。

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-甲基唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁-2-基)異噁唑-3-基)氧基)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-3-基)嗒吡啶-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲胺基)-1-側氧己-2-基)-*N*-(5-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)戊基)環丁烷-1,1-二甲醯胺(2,2,2-三氟乙酸鹽)



【0593】 於室溫下向 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-甲基唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啉-1-基)-3-甲基-1-側氧丁-2-基)異噁唑-3-基)氧基)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-3-基)嗒吡啶-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 (60.0 mg, 0.0400 mmol)、1-(5-胺基戊基)-1*H*-吡咯-2,5-二酮(2,2,2-三氟乙酸) (23.0 mg, 粗品) 及 DIPEA (163 mg, 1.26 mmol) 於 DMF (2 mL) 中之溶液中添加 HATU (24.0 mg, 0.0600 mmol)。將反應於室溫下攪拌 0.5 小時。藉由製備型 HPLC (柱: XBridge Prep Phenyl OBD 柱, 19 × 250 mm, 5 μm; 流動相 A: 水 (0.05% FA), 流動相 B: ACN; 流速: 25 mL/min; 梯度: B 於 10 分鐘內由 17% 增加至 25%, 保持 25% B; 波長: 254 nm; $R_{T1}(\text{min})$: 8.77) 純化產物。然後藉由製備型 HPLC (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 8 分鐘內由 13% 增加至 38%, 保持 38% B; 波長: 254/220 nm; $R_{T1}(\text{min})$: 8) 將其再次純化, 以得到 5.0 mg (產率 7%) 黃色固體狀 **L1-CIDE-BRM1-21**。LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1593$ 。 ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10.21 (s, 1H), 9.53 (s, 1H), 8.99 (s, 1H), 8.39 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.95-7.80 (m, 3H), 7.67 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.63-7.50 (m, 2H), 7.50-7.43 (m, 8H), 7.19 - 7.08 (m, 1H), 7.10-6.90 (m, 3H), 6.64 (s, 1H), 6.25 (s, 1H), 6.11 (s, 1H), 5.09 (s, 2H), 4.91 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H), 4.48 (br, 4H), 4.41 - 4.30 (m, 4H), 3.73-3.65 (m, 6H), 3.47 - 3.31 (m, 7H), 3.13 - 2.88 (m, 12H), 2.75 (d, $J = 4.4$ Hz, 7H), 2.48-2.38 (m, 8H), 2.25-2.15(m, 1H), 2.05 - 1.59 (m, 11H), 1.50 - 1.29 (m, 8H), 1.31-1.11 (m, 6H), 0.96 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H), 0.87 - 0.76 (m, 3H)。

合成實例 22

L1-CIDE 與抗體之結合

【0594】 將 10 mM 琥珀酸鹽 (pH 5)、150 mM NaCl、2 mM EDTA 中之經半胱胺酸工程化改造之抗體 (THIOMAB™) 的 pH 用 1 M Tris 調節至 pH 7.5-

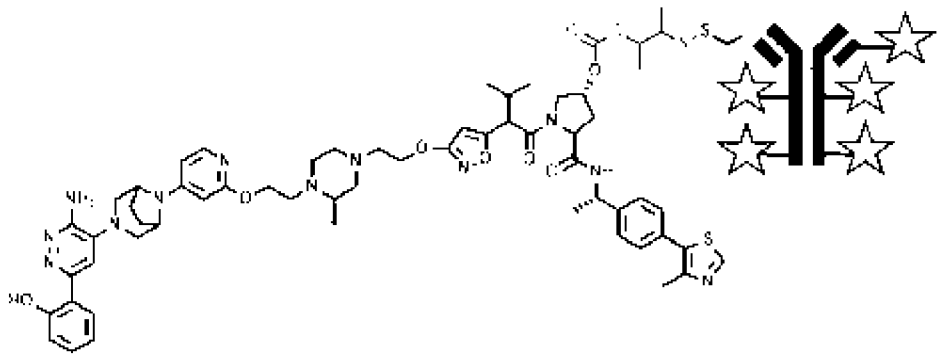
8.5。將 3-16 當量的 L1-CIDE（含有硫醇反應性馬來醯亞胺基團）溶解於 DMF 或 DMA 中（濃度 = 10 mM），並將其添加至經還原、再氧化且 pH 調節的抗體中。將反應在室溫或 37°C 下溫育並監測直至完成（1 小時至約 24 小時），如藉由反應混合物之 LC-MS 分析所確定的。反應完成時，藉由一種或幾種方法之任意組合純化 Ab-CIDE，目的在於去除剩餘的未反應之連接子-藥物中間體及聚集蛋白（如果以顯著的水平存在）。在一個實例中，將 Ab-CIDE 用 10 mM 組胺酸-乙酸鹽 (pH 5.5) 稀釋，直到最終 pH 值為約 5.5，然後藉由 S 陽離子交換層析法使用連接至 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 Ab-CIDE。使用透析法純化結合物。

【0595】 使用凝膠過濾或透析法，將 THIOMAB™ Ab-CIDE 用含 240 mM 蔗糖的 20 mM 組胺酸/乙酸鹽 (pH 5) 配製。藉由離心超濾法濃縮純化的 Ab-CIDE 並在無菌條件下通過 0.2 μ m 過濾器過濾，然後於 -20°C 下冷凍儲存。

生物實例 1

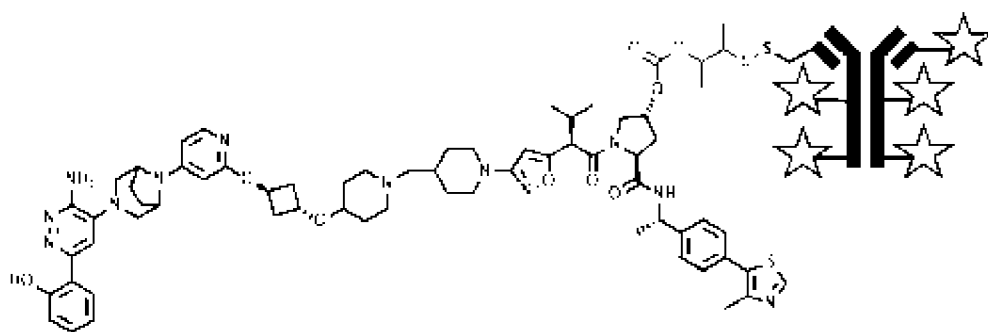
細胞測定

BRM 之免疫熒光偵測



Ab-L1a-CIDE-BRM1-1

【0596】 與 CD22 之結合具有 5.8 的 DAR。與 EpCAM 之結合具有 5.9 的 DAR。



Ab-L1a-CIDE-BRM1-3

【0597】 與 CD22 之結合具有 5.8 的 DAR。與 EpCAM 之結合具有 5.9 的 DAR。CD-22：硫基 Hu 抗 CD22 10F4v3 高 DAR [LC:K149C HC: Y373C HC:L174C] MeMe 二硫化物 BRM CIDE；EpCAM: 硫基 Hu 抗 Her2 7C2 高 DAR [LC:K149C HC:L174C HC:Y373C] MeMe 二硫化物 BRM CIDE

【0598】 圖 1a 及圖 1b 示出 Ab-L1a-CIDE-BRM1-1 之活性。圖 2a 及圖 2b 示出 Ab-L1a-CIDE-BRM1-3 之活性。

生物實例 2

PK/PD BJAB 腫瘤測定

【0599】 在 BJAB-luc 人類非何杰金氏淋巴瘤之小鼠異種移植模型中評估抗 CD22-BRM Ab-CIDE 之 PK/PD 效應。BJAB-luc 獲自 Genentech 細胞系庫。該細胞系藉由使用 Promega PowerPlex 16 系統的短串聯重複序列 (STR) 分析得到驗證，並與細胞系之外部 STR 特徵進行比較以確認細胞系家系。

【0600】 為建立模型，將腫瘤細胞（2000 萬個，於 0.2 mL Hank 平衡鹽溶液中）皮下接種到雌性 C.B-17 SCID 小鼠 (Charles River Laboratories) 之側腹。當腫瘤達到所需之體積 (300-400 mm³) 時，將小鼠隨機分為 n=5 組，每組

具有相似之腫瘤大小分佈，並通過尾靜脈接受單次靜脈注射載體（組胺酸緩衝劑液）或供試品。所有抗 CD22-BRM Ab-CIDE 及未結合之抗體均於組胺酸緩衝劑（20 mM 組胺酸-乙酸鹽 pH 5.5、240 mM 蔗糖、0.02% Tween 20）中配製。未結合之 BRM CIDE 於 10% 羥丙基- β -環糊精、50 mM 醋酸鈉 (pH 4) 中配製。

【0601】給藥後四天，將小鼠實施安樂死並收集腫瘤及全血。將腫瘤切除並分成兩等份，然後在液氮中快速冷凍。一份用於量測釋放之 BRM CIDE 的水平，另一份用於評估下游 PD 標記之調節。在麻醉手術平面下藉由心臟末梢穿刺收集全血，並將其放入含有肝素鈣的管中。將血樣置於濕冰上直至離心（收集後 15 分鐘內）。將樣品於 4°C 下以 10,000 rpm 離心 5 分鐘，並收集血漿，將其置於乾冰上，並儲存於 -70°C 下，直至分析連接子穩定性及總抗體藥代動力學。

異種移植組織之西方印漬術分析

【0602】在乾冰上將冷凍組織切成 15-30 mg 片，然後轉移至 1.5 mL Eppendorf 安全鎖管（其中帶有一個 3.2 mm (NextAdvance (3.2 mm, SSB32)) 不銹鋼珠）中。RIPA 緩衝劑 (350 μ L) 補充有 0.5 M NaCl 及新添加的 1x Halt 蛋白酶及磷酸酶抑制劑，並將樣品管放入 Bullet Blender 組織均質器中。樣品以最高速度均質 3 分鐘。於 4°C 下將樣品管在台式離心機中以最高速度離心 5 分鐘，並將裂解物轉移至新樣品管中。使用 Pierce BCA 蛋白質分析測定蛋白質濃度。蛋白質裂解物用樣品緩衝劑及還原劑製備，並於 95°C 下培育 3 分鐘。在 3-8% Tris 乙酸鹽凝膠上將蛋白質 (12 μ g) 與 Tris-乙酸鹽運行緩衝劑分離，然後使用 iBlot 轉移設備（25 V，10 分鐘）將其轉移至硝酸纖維素膜上。用 TBS-T

中之 5% 乳封閉膜 30 分鐘後，按 1/1000 加入初級抗體。對膜進行 SMARCA2 (BRM)（兔，Cell signaling technologies 目錄號 11966）及 HDAC1（小鼠，Cell signaling technologies 目錄號 5356）進行轉漬，並在搖床上於 4℃ 下培育過夜。第二天，在搖床上將膜於室溫下用 TBS-T 洗滌 30 分鐘，更換洗滌緩衝劑至少 3 次。然後在搖床上將膜與 TBS-T 中 1/5000 之 Licor 二級抗體於室溫下培育 1 小時。將印漬用 TBS-T 洗滌 1 小時，更換洗滌緩衝劑至少 6 次。在 Licor 成像系統上捕捉圖像。

【0603】 進行鼠腫瘤分析。表 1 示出研究組及參數。

表 1. BJAB 腫瘤（CB17-SCID 小鼠），PK/PD 研究

組	化合物	mg/kg	頻率	途徑	PD 時間點	小鼠數量
1	載體對照	NA	一次	IV	96 小時	5
2	未結合之 antiAb 對照	10	一次	IV	96 小時	5
3	CD22-L1a-CIDE-BRM1-1 DAR6	1	一次	IV	96 小時	5
4	EpCAM-L1a-CIDE-BRM1-1 DAR6	1	一次	IV	96 小時	5
5	CD22-L1a-CIDE-BRM1-1 DAR6	10	一次	IV	96 小時	5
6	EpCAM-L1a-CIDE-BRM1-1 DAR6	10	一次	IV	96 小時	5
7	CD22-L1a-CIDE-BRM1-3 DAR6	1	一次	IV	96 小時	5
8	HER2-L1a-CIDE-BRM1-3 DAR6	1	一次	IV	96 小時	5
9	CD22-L1a-CIDE-BRM1-3 DAR6	10	一次	IV	96 小時	5
10	HER2-L1a-CIDE-BRM1-3 DAR6	10	一次	IV	96 小時	5
11	CIDE-BRM1-3 未結合之對照	20	一次	IV	96 小時	5

將腫瘤組織分為兩份，分別用於 (1) BRM、BRG、PBRM1 PD 及 (2) 腫瘤 PK

血漿 PK 時間點與上面列出的 PD 時間點相同

抗體結合物，IV 製劑：組胺酸緩衝劑，劑量體積 = 5 mL/kg

CIDE-BRM1-3，IV 製劑：10% HP-b-CD 及 50 mM 醋酸鈉水溶液 (pH 4.0)，劑量體積 = 5 mL/kg

【0604】 Ab-L1a-CIDE-BRM1-1 之劑量及抗原依賴性抗腫瘤活性如圖 3A-3L 所示，Ab-L1a-CIDE-BRM1-3 之劑量和抗原依賴性抗腫瘤活性如圖 4A-4L 所示。

生物實例 3

標靶蛋白降解分析

【0605】 關於改善之 PD 反應的資料報告。圖 5 示出表明 Ab-L1a-CIDE-BRM1-1、BRM 及 BRG1 降解與抗腫瘤活性相關的資料。圖 6 示出表明 Ab-L1a-CIDE-BRM1-3、BRM 及 BRG1 降解與抗腫瘤活性不太相關的資料。圖 7 示出表明抗體結合策略增加降解活性的資料。獲得這些資料的時間點皆為 96 小時。Ab-L1a-CIDE-BRM1-1 之降解程度高於未結合之 CIDE-BRM1-3，而兩種化合物在未結合形式的細胞分析中具有相似之 BRM 降解特性（WO2019195201 中描述的 CIDE-BRM1-3 vs. CIDE- BRM1-1 分析）。該效應表明本文所述之連接策略可調節降解特性。

生物實例 4

用於測定 DC50 和 Dmax 的細胞分析

【0606】 在兩個細胞系中運行細胞分析，以測定 Ab-L1-CIDE 之 DC50 及 Dmax。將 BJAB、HCC515 及 H1944 細胞分別以 5000、4000 及 2500 個細胞/孔的密度接種於 384 孔板中。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 133370 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。

(0607) 資料顯示於下表 2 中。資料證明本文所揭露之抗體靶向策略取得成功。陰性對照：抗 gD 及抗 TROP2 與 NCI-H1944 細胞無交互作用，而抗 TTR2 則與該等細胞發生交互作用。抗 gD 進一步不與 HCC515 細胞發生交互作用，而抗 TTR2 及抗 TROP2 則與該等細胞發生交互作用。資料顯示，幾種 Ab-L1-CDB 具有所需之低 IC50 及所需之高 IDmax 值。

表 2.

Ab-L1-CDB 名稱	靶點	IC50 (nM)	HCC-1000		HCC515	
			IC50 (nM)	IDmax	IC50 (nM)	IDmax
確證抗 gD 596 的 DAR (DSYJWCYSYSC) (SK16C) MC-mg-BRM 的陽性 Ab-L1-CDB-BRM-13	gD	5.66	106	98	0.69	88
確證抗 gD 1922NC22 的 DAR (DSYJWCYSYSC) (SK16C) MC-mg-BRM 的陽性 Ab-L1-CDB-BRM-13	TTR2	5.67	0.74	99	0.02	96
確證抗 gD 981ALA 的 DAR (DSYJWCYSYSC) (SK16C) MC-mg-BRM 的陽性 Ab-L1-CDB-BRM-13	gD	5.90	9837	98	2005	98
確證抗 gD 1922ALA 的 DAR (DSYJWCYSYSC) (SK16C) MC-mg-BRM 的陽性 Ab-L1-CDB-BRM-13	TTR2	5.94	0.00	96	0.02	96
確證抗 gD 1922ALA 的 DAR (DSYJWCYSYSC) (SK16C) MC-mg-BRM 的陽性 Ab-L1-CDB-BRM-13	TROP2	6.00	6.05	98	<0.01	95
確證抗 gD 981ALA 的 DAR (DSYJWCYSYSC) (SK16C) MC-mg-BRM 的陽性 Ab-L1-CDB-BRM-13	gD	5.89	NA	92	7.60	86
確證抗 gD 1922ALA 的 DAR (DSYJWCYSYSC) (SK16C) MC-mg-BRM 的陽性 Ab-L1-CDB-BRM-13	TTR2	5.79	0.06	80	0.03	84
確證抗 gD 1922ALA 的 DAR (DSYJWCYSYSC) (SK16C) MC-mg-BRM 的陽性 Ab-L1-CDB-BRM-13	TROP2	5.73	NA	73	>50	82
確證抗 gD 596 的 DAR (DSYJWCYSYSC) (SK16C) MC-mg-BRM 的陽性 Ab-L1-CDB-BRM-13	gD	5.96	>10	N/A	>10	NA
確證抗 gD 1922NC22 的 DAR (DSYJWCYSYSC) (SK16C) MC-mg-BRM 的陽性 Ab-L1-CDB-BRM-13	TTR2	5.97	>10	N/A	>10	NA
確證抗 gD 1922 的 DAR (DSYJWCYSYSC) (SK16C) MC-mg-BRM 的陽性 Ab-L1-CDB-BRM-13	TROP2	5.93	>10	N/A	>10	NA
確證抗 gD 1922NC22 的 DAR (DSYJWCYSYSC) (SK16C) MC-mg-BRM 的陽性 Ab-L1-CDB-BRM-13	TTR1	5.96	0.07	77	95.88	

生物實例 5

溶酶體釋放分析

【0608】 在模擬細胞內氛圍的環境中，運行溶酶體釋放分析以量測降解劑從 L1 部分之釋放。為使降解劑在結合 BRM 並將其運送至泛蛋白連接酶方面具有活性，首先必須釋放 L1。

【0609】 該分析使用與 BRM 結合化合物結合之 L1 進行，將其命名為「L1-BRM1-#」，對應於相應的 CIDE。該試驗確定 L1 與 BRM 部分之共價連接是否發生裂解。將連接子-藥物 (10 μ M) 用人肝溶酶體 (0.17 mg/mL) 及半胱胺酸 (5 mM) 在 100 mM 檸檬酸緩衝劑 (pH 5.5) 中培育 24 小時。藉由 Q Exactive Orbitrap 質譜儀分析樣品，其中使用含 (A) 0.1% 甲酸水溶液及 (B) 0.1% 甲酸之乙腈溶液的 LC 流動相進行梯度洗脫。

【0610】 分析結果顯示於下表 3 中。結果表明，L1 與 BRM 部分之直接連接策略在細胞環境中釋放。一種結合物 (L1-CIDE-BRM1-15) 不含本文所述之連接子 1 型抗體連接子。在測試的 DAC 中，L1-CIDE-BRM1-15 未在溶酶體提取物中釋放降解劑。這一發現支持將降解劑選擇性連接至 Ab 的策略，例如本文所述之連接子 1 型 L1 連接子。

表 3.

L1-BRM	溶酶體提取物中之釋放
L1-BRM1-15 (來自 CIDE-BRM1-15 之 BRM)	否
L1-BRM1-9 (來自 CIDE-BRM1-9 之 BRM)	是
L1-BRM1-13 (來自 CIDE-BRM1-13 之 BRM)	是

L1-BRM1-20（來自 CIDE-BRM1-20 之 BRM）	是
-----------------------------------	---

*「否」指示在溶酶體提取物中於 37°C 下培育 24 小時後觀察到 <15% 之游離藥物。「是」指示在溶酶體提取物中於 37°C 下培育 24 小時後觀察到 >50% 之游離藥物。

【0611】關於所用數字（例如量、溫度等）的準確性已被盡力確保，但是應考慮一些實驗誤差和偏差。

【0612】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。

【0613】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。

【0614】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。

【0615】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 ± 50%；在一些實施例中，涵蓋指定的量 ± 20%；在一些實施例中，涵蓋指定的量 ± 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。

【0616】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。

【0617】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。

【序列表】

<110> 美商建南德克公司 (GENENTECH, INC.)

<120> BRM 降解之抗體結合化學誘導物及其方法

<130> P36010-WO

<140>

<141>

<150> 63/054,757

<151> 07-21-2020

<160> 36

<170> PatentIn 3.5 版

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Tyr Thr Ser Asn Leu His Ser
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

Gln Gln Tyr Ser Glu Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 4

Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Ser Val Asn
1 5 10

<210> 5
<211> 16
<212> PRT
<213> 智人

<400> 5

Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 6
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 6

Asp Tyr Tyr Val Asn Tyr Ala Ser Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 7
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 7

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Asn Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Glu Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 8
<211> 120
<212> PRT
<213> 智人

<400> 8

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr
20 25 30

Ser Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu
65 70 75 80

Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Tyr Tyr Phe Asn Tyr Ala Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 9
<211> 214
<212> PRT
<213> 智人

<400> 9

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Asn Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Glu Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Cys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 10
<211> 450
<212> PRT
<213> 智人

<400> 10

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr
20 25 30

Ser Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu
65 70 75 80

Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Asp Tyr Tyr Phe Asn Tyr Ala Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 11

Gly Phe Ser Phe Ser Asp Phe Ala Met Ser
1 5 10

<210> 12

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人

<400> 12

Ala Thr Ile Gly Arg Val Ala Phe His Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Met
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 13

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人

<400> 13

Ala Arg His Arg Gly Phe Asp Val Gly His Phe Asp Phe
1 5 10

<210> 14

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人

<400> 14

Arg Ser Ser Glu Thr Leu Val His Ser Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人

<400> 15

Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 16

Phe Gln Gly Ser Phe Asn Pro Leu Thr
1 5

<210> 17
<211> 120
<212> PRT
<213> 智人

<400> 17

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asp Phe
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Gly Arg Val Ala Phe His Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Met
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Arg Gly Phe Asp Val Gly His Phe Asp Phe Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 18
<211> 113
<212> PRT
<213> 智人

<400> 18

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Glu Thr Leu Val His Ser
20 25 30

Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser Phe Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 19
<211> 16
<212> PRT
<213> 智人

<400> 19

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu

151051

<210> 20
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 20

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
15

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 21

Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr
15

<210> 22
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 22

Gly Tyr Glu Phe Ser Arg Ser Trp Met Asn
1510

<210> 23
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 23

Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys Phe Lys
151015

Gly

<210> 24
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 24

Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 25
<211> 113
<212> PRT
<213> 智人

<400> 25

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 26
<211> 120
<212> PRT
<213> 智人

<400> 26

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ser Arg Ser
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 27
<211> 219
<212> PRT
<213> 智人

<400> 27

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Val	His	Ser	
			20					25					30			
Val	Gly	Asn	Thr	Phe	Leu	Glu	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	
		35					40					45				
Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro	
	50					55					60					
Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	
65					70					75					80	
Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Gly	
				85					90					95		
Ser	Gln	Phe	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	
			100					105					110			
Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	
		115					120					125				
Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	
	130					135					140					
Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Cys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	
145					150					155				160		
Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	
				165					170					175		
Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	
			180					185					190			
Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	
		195					200					205				
Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys						

210										215									
<210>		28																	
<211>		450																	
<212>		PRT																	
<213>		智人																	
<400>		28																	
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly				
1				5						10					15				
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Glu	Phe	Ser	Arg	Ser				
			20						25					30					
Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val				
		35					40						45						
Gly	Arg	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr	Ser	Gly	Lys	Phe				
	50					55					60								
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr				
65					70					75					80				
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys				
				85					90					95					
Ala	Arg	Asp	Gly	Ser	Ser	Trp	Asp	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln				
			100					105						110					
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val				
		115					120					125							
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala				
	130					135					140								
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser				
145					150					155					160				

Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
165					170					175					
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
180					185					190					
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys
195					200					205					
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
210					215					220					
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly
225					230					235					240
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
245					250					255					
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu
260					265					270					
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
275					280					285					
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg
290					295					300					
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
305					310					315					320
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu
325					330					335					
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr
340					345					350					
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
355					360					365					

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 29
<211> 445
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗 huTfR1.hIgG1.LC.K149C.HC.L174C.Y373C.NG2LH 重鏈

<400> 29

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Ile Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Cys Gln Ser Ser
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Cys Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 30
<211> 214

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗 huTfR1.hIgG1.LC.K149C.HC.L174C.Y373C.NG2LH 輕鏈

<400> 30

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Asp Asn Leu Tyr Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Val
35 40 45

Tyr Asp Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Cys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 31
<211> 445
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗 huTfR2.hIgG1.LC.K149C.HC.L174C.Y373C.NG2LH 重鏈

<400> 31

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Ile Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Cys Gln Ser Ser
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Cys Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 32
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗 huTfR2.hIgG1.LC.K149C.HC.L174C.Y373C.NG2LH 輕鏈

<400> 32

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Asp	Asn	Leu	Tyr	Ser	Asn	
		20						25					30			
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Val	
		35					40					45				
Tyr	Asp	Ala	Thr	Asn	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	
	50					55					60					
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	
65					70					75					80	
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Phe	Ala	Gly	Thr	Pro	Leu	
				85					90					95		
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	
			100					105					110			
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	
		115					120					125				
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	
			130				135				140					
Lys	Val	Gln	Trp	Cys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	
145					150					155					160	
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	
				165					170					175		
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	
			180					185					190			
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	
		195					200					205				
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys											
			210													

<210> 33
<211> 445
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗 huTfR1.hIgG1.LC.K149C.NG2LH 重鏈

<400> 33

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Ile Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 34
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗 huTfR1.hIgG1.LC.K149C.NG2LH 輕鏈

<400> 34

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Asp Asn Leu Tyr Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Val
35 40 45

Tyr Asp Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Cys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 35
<211> 445
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗 huTfR2.hIgG1.LC.K149C.NG2LH 重鏈

<400> 35

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	
1			5					10					15			
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr	
		20					25					30				
Trp	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Arg	Leu	Glu	Trp	Ile	
		35				40					45					
Gly	Glu	Ile	Asn	Pro	Thr	Asn	Gly	Arg	Thr	Asn	Tyr	Ile	Glu	Lys	Phe	
	50				55					60						
Lys	Ser	Arg	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr	
65				70					75					80		
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
			85					90					95			
Ala	Arg	Gly	Thr	Arg	Ala	Tyr	His	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	
		100					105					110				
Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	
		115					120					125				
Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	
		130				135					140					
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	
145				150					155					160		
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	
			165					170					175			
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	
		180					185						190			
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	
		195				200					205					

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 36
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗 huTfR2.hIgG1.LC.K149C.NG2LH 輕鏈

<400> 36

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Asp Asn Leu Tyr Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Val
35 40 45

Tyr Asp Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Ala Gly Thr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Cys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

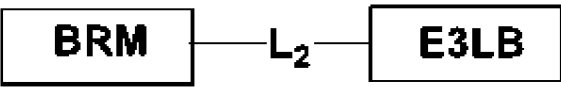
一種結合物，其具有下列結構：

Ab-(L1-D)_p，

其中，

Ab 為抗體；

D 為 CIDE 或其前驅藥，其具有下列結構：



其中，

BRM 為 BRM 結合化合物之殘基，

E3LB 為 E3 連接酶結合化合物之殘基，且

L2 為共價連接 BRM 與 E3LB 之部分；

L1 為共價連接 Ab 至 BRM、E3LB 或 L2 中之一者的連接子-1；

且

p 為 1 至 16。

【請求項2】

如請求項 1 之結合物，其中 L1 共價結合至 E3LB。

【請求項3】

如請求項 2 之結合物，其中該前驅藥為具有共價結合至 BRM 的磷酸鹽部分 (phosphate moiety) 之 CIDE。

【請求項4】

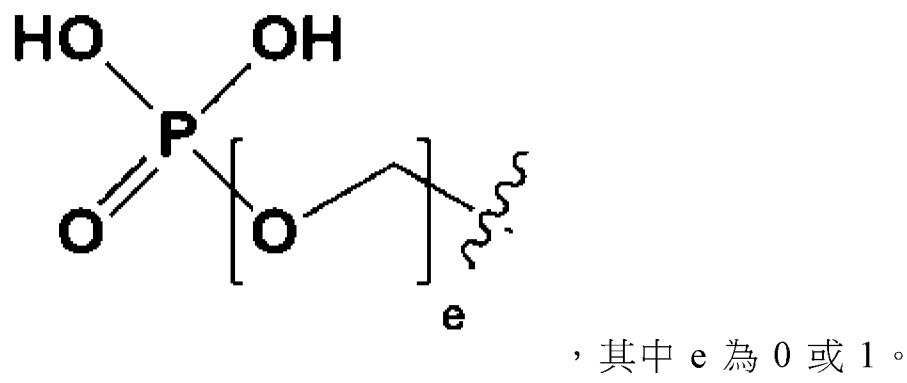
如請求項 1 之結合物，其中 L1 共價結合至 BRM。

【請求項5】

如請求項 4 之結合物，其中該前驅藥為具有共價結合至 E3LB 的磷酸鹽部分之 CIDE。

【請求項6】

如請求項 3 或 5 中任一項之結合物，其中該磷酸鹽部分具有下列結構：

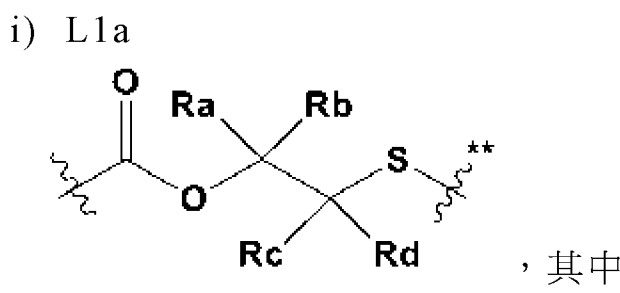


【請求項7】

如請求項 1 之結合物，其中 L1 共價結合至 L2。

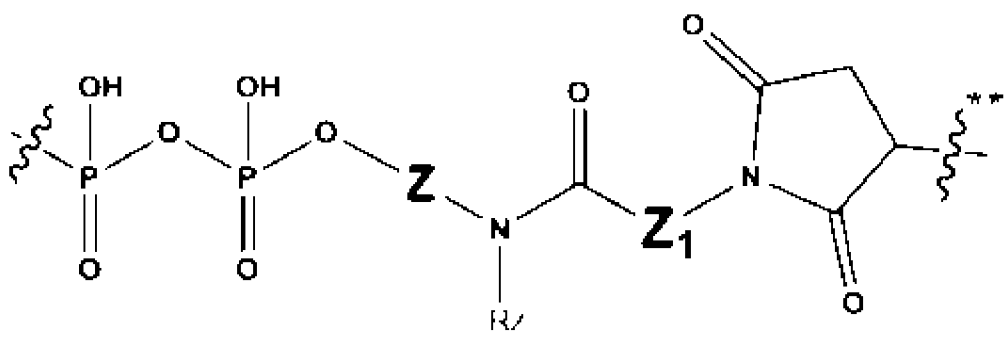
【請求項8】

如請求項 1 之結合物，其中 L1 選自由以下所組成之群組



其中 R^a、R^b、R^c 和 R^d 獨立地選自由 H、視情況經取代之支鏈或直鏈 C₁-C₅ 烷基和視情況經取代之 C₃-C₆ 環烷基所組成之群組，或者，R^a 和 R^b 一起或 R^c 和 R^d 一起與它們所結合的碳原子形成視情況經取代之 C₃-C₆ 環烷基環或 3 至 6 員雜環烷基環；

ii) L1b



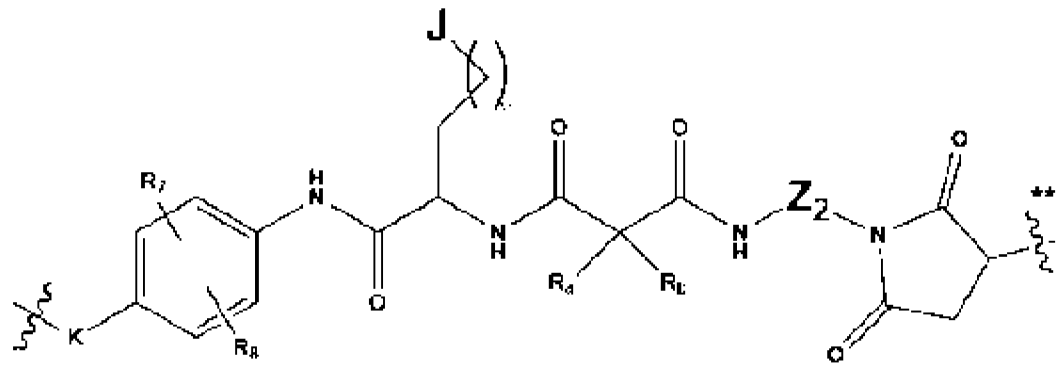
，其

中，

Z 和 Z₁ 各自獨立地為 C₁₋₁₂ 伸烷基或 -[CH₂]_g-[-O-CH₂]_h-，其中 g 為 0、1 或 2，且 h 為 1-5；

R_Z 為 H 或 C₁₋₃ 烷基；以及，

iii)L1c



，

其中

Z₂ 為 C₁₋₁₂ 伸烷基或 -[CH₂]_g-[-O-CH₂]_h-，其中 g 為 0、1 或 2，且 h 為 1-5；

w 為 1、2、3、4 或 5；

J 為 -N(R_x)(R_y)、-C(O)NH₂、-NH-C(O)-NH₂、-NH-NH-NH₂，其中 R_x 及 R_y 各自獨立地選自氫和 C₁₋₃ 烷基；

K 選自 -CH₂-、-CH(R)-、-CH(R)-O-、-C(O)-、-C(O)-O-CH(R)-、-CH₂-O-C(O)-、-CH₂-O-C(O)-NH-、-O-C(L1c)-C(O)-NR_xR_y-、-CH₂-O-C(O)-NH-CH₂-、-

$\text{CH}_2\text{-O-C(O)-R-}[\text{CH}_2]_q\text{-O-}^\wedge$ 、 $\text{-CH}_2\text{-O-C(O)-R-}[\text{CH}_2]_q\text{-}^\wedge$ ，其中 $^\wedge$ 表示接附至 CIDE，其中 R 為氫、 C_{1-3} 烷基、 $\text{N(R}_x\text{)(R}_y\text{)}$ 、 $\text{-O-N(R}_x\text{)(R}_y\text{)}$ 或 $\text{C(O)-N(R}_x\text{)(R}_y\text{)}$ ，其中 q 為 0、1、2、或 3，且 R_x 和 R_y 各自獨立地選自氫和 C_{1-3} 烷基，或者， R_x 和 R_y 與各自所接附之氮一起形成視情況經取代之 5 至 7 員雜環基；

R_a 和 R_b 各自獨立地選自氫和 C_{1-3} 烷基，或者， R_a 和 R_b 與各自所接附之氮一起形成視情況經取代之 C_{3-6} 環烷基；且

R_7 和 R_8 各自獨立地為氫、鹵代、 C_{1-5} 烷基、 C_{1-5} 烷氧基或羥基。

【請求項9】

如請求項 8 之結合物，其中 L1a 共價結合至 E3LB。

【請求項10】

如請求項 8 之結合物，其中 L1b 共價結合至 E3LB 或 BRM。

【請求項11】

如請求項 8 之結合物，其中 L1c 共價結合至 E3LB、BRM 或 L2。

【請求項12】

如請求項 8 之結合物，其中 L1b 共價結合至 E3LB。

【請求項13】

如請求項 8 之結合物，其中 L1b 共價結合至 BRM。

【請求項14】

如請求項 8 之結合物，其中 L1c 共價結合至 E3LB。

【請求項15】

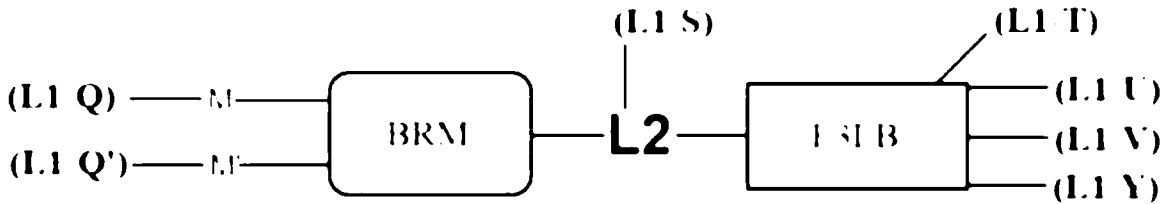
如請求項 8 之結合物，其中 L1c 共價結合至 BRM。

【請求項16】

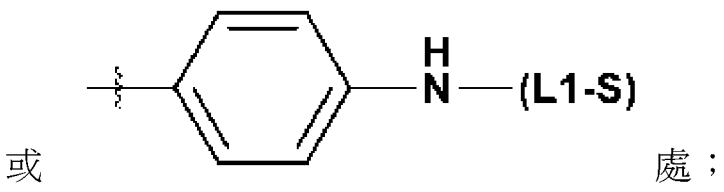
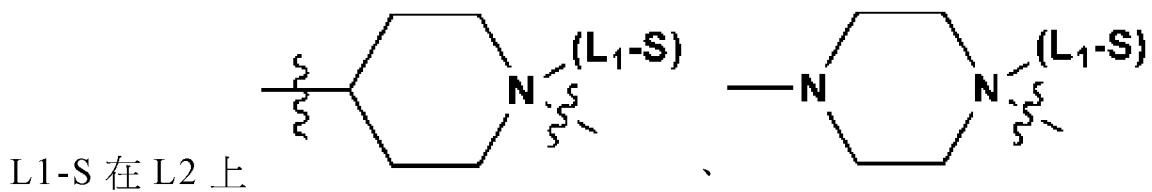
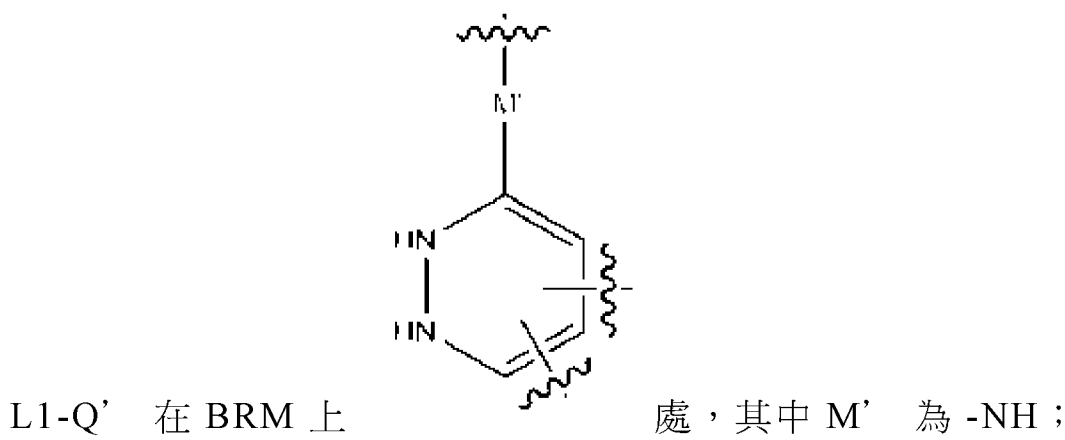
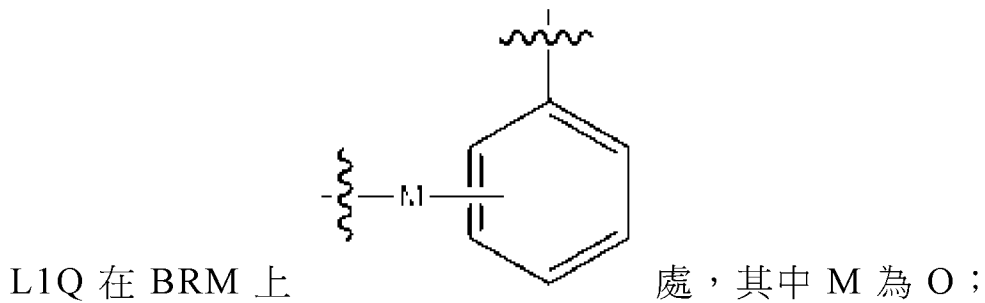
如請求項 8 之結合物，其中 L1c 共價結合至 L2。

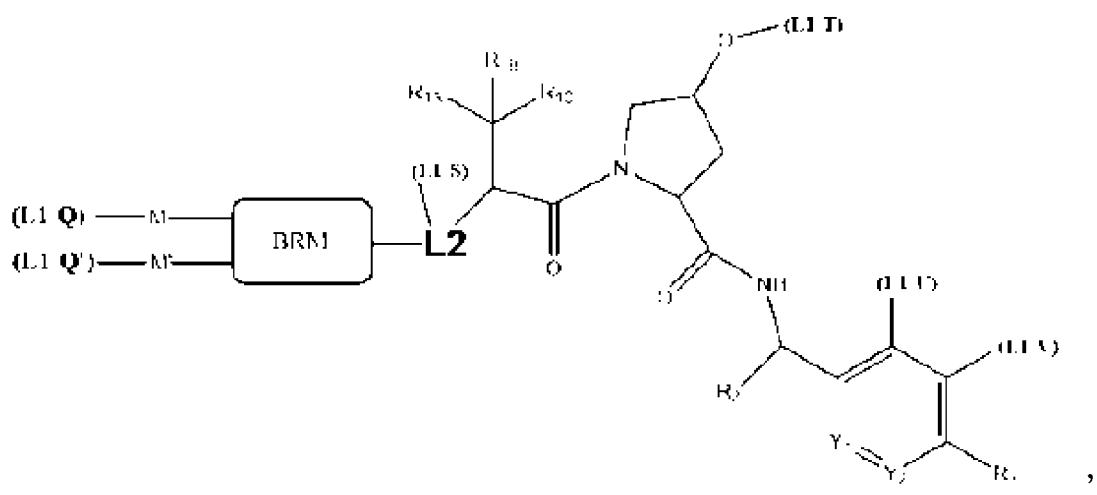
【請求項17】

如請求項 1 之結合物，其中 D 具有下列結構



其中 L1 是接附在一個接附點處，該接附點選自 L1-Q、L1-Q’、L1-S、L1-T，且如果存在的話，視情況選自 L1-U、L1-V 和 L1-Y，其中





其中 R_{1A}、R_{1B} 和 R_{1C} 各自獨立地為氫，或 C₁₋₅ 烷基；或 R_{1A}、R_{1B} 和 R_{1C} 中的二者與各自所接附的碳一起形成 C₁₋₅ 環烷基。

【請求項21】

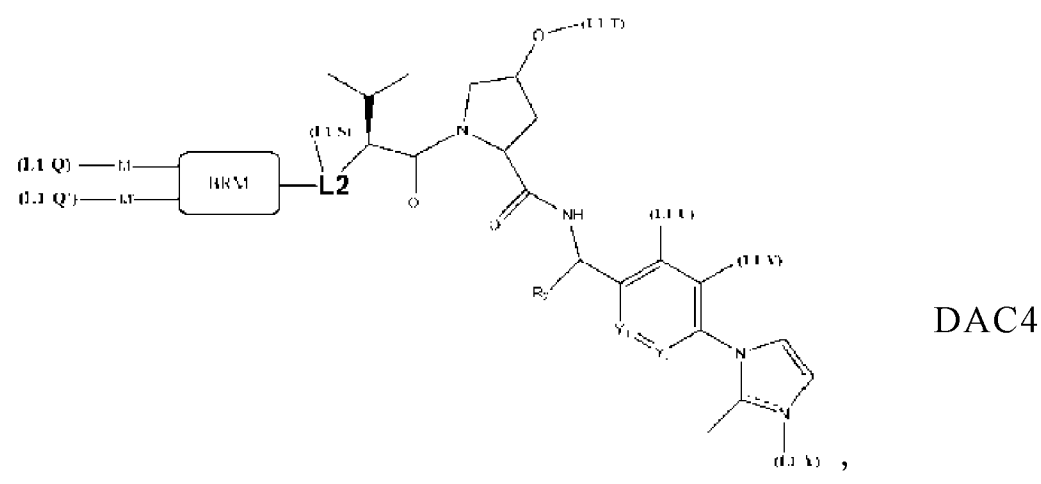
如請求項 20 之結合物，其中 R_{1A}、R_{1B} 和 R_{1C} 各自獨立地為氫或甲基。

【請求項22】

如請求項 21 之結合物，其中 R_{1A} 和 R_{1B} 各自為甲基。

【請求項23】

如請求項 22 之結合物，其具有下列結構：





【請求項24】

如請求項 23 之結合物，其中 R₂ 為氫、甲基、乙基或丙基。

【請求項25】

如請求項 24 之結合物，其中 R_2 為甲基。

【請求項26】

$$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \equiv \\ \text{---} \\ \vdots \end{array}$$

【請求項27】

如請求項 23 之結合物，其中 Y_1 和 Y_2 各自為 $-CH$ 。

【請求項28】

如請求項 23 之結合物，其中 Y₁ 為 N 且 Y₂ 為 -CH。

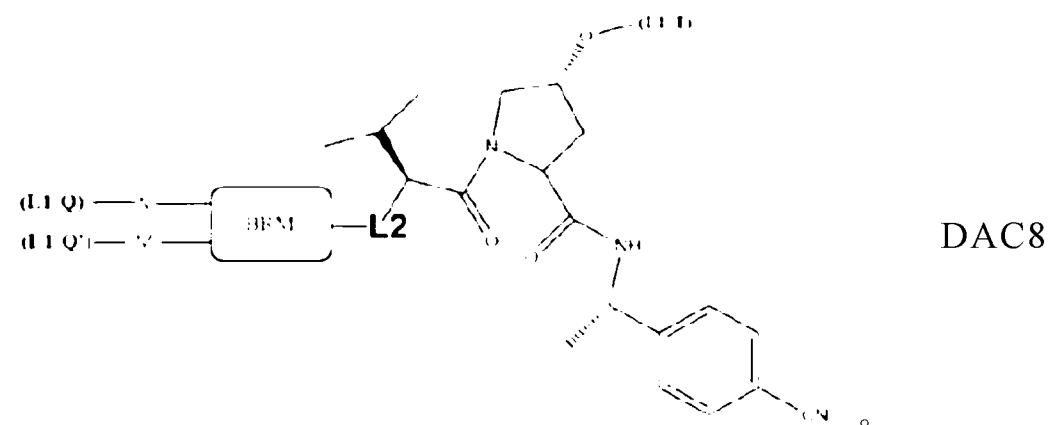
【請求項29】

如請求項 23 之結合物，其中 Y_1 為 $-CH$ 且 Y_2 為 N 。

表單編號 A0202

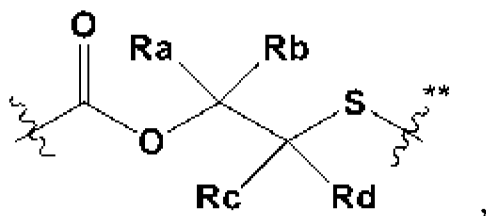
1103294338-0

如請求項 30 之結合物，其具有下列結構：



如請求項 17 之結合物，其中：

L1 接附在 L1-T 處且為

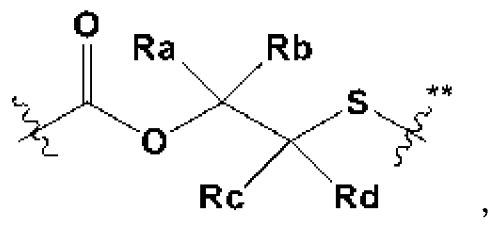


其中 Ra、Rb、Rc 和 Rd 各自獨立地選自氫和 C₁₋₃烷基。

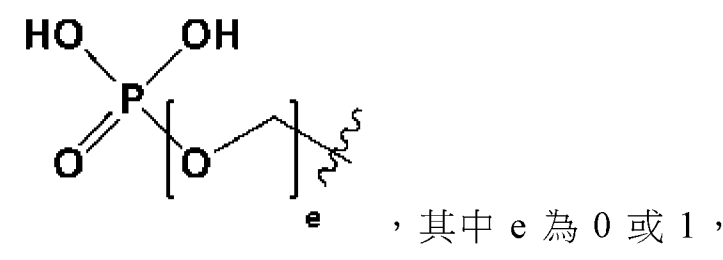
【請求項33】

如請求項 17 之結合物，其中：

L1 接附在 L1-T 處且為



其中 Ra、Rb、Rc 和 Rd 各自獨立地選自氫和 C₁₋₃烷基；且
具有下列結構之磷酸鹽部分：



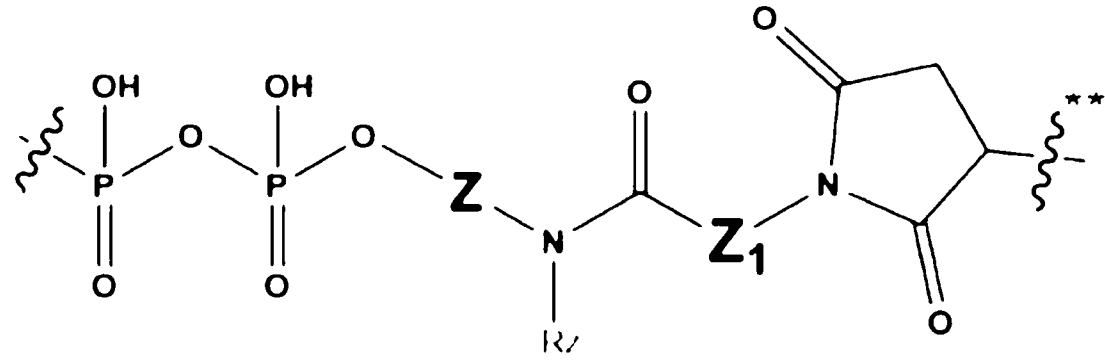
共價結合至 BRM。

【請求項34】

如請求項 17 之結合物，其中：

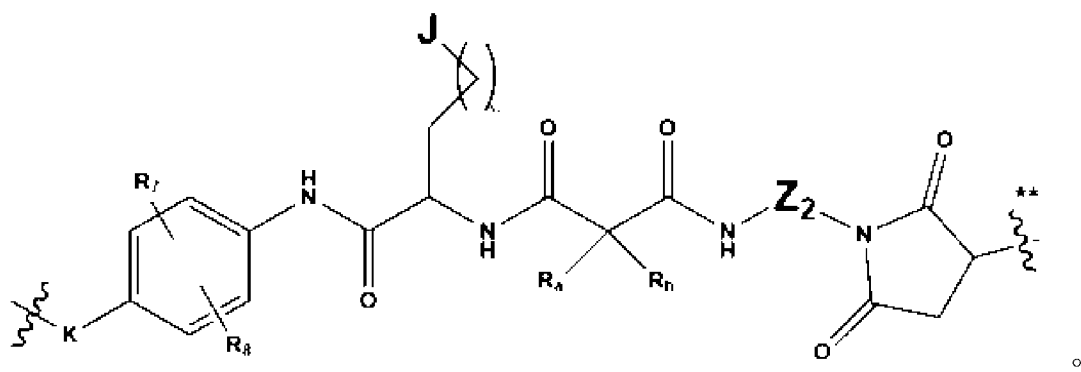
L1 接附在 L1-T 處且選自由以下所組成之群組：

ii) L1b



和

iii)L1c

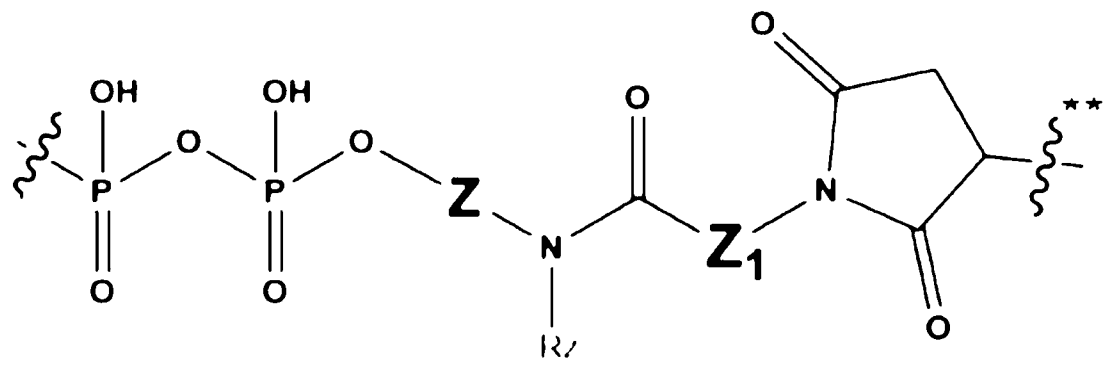


【請求項35】

如請求項 17 之結合物，其中：

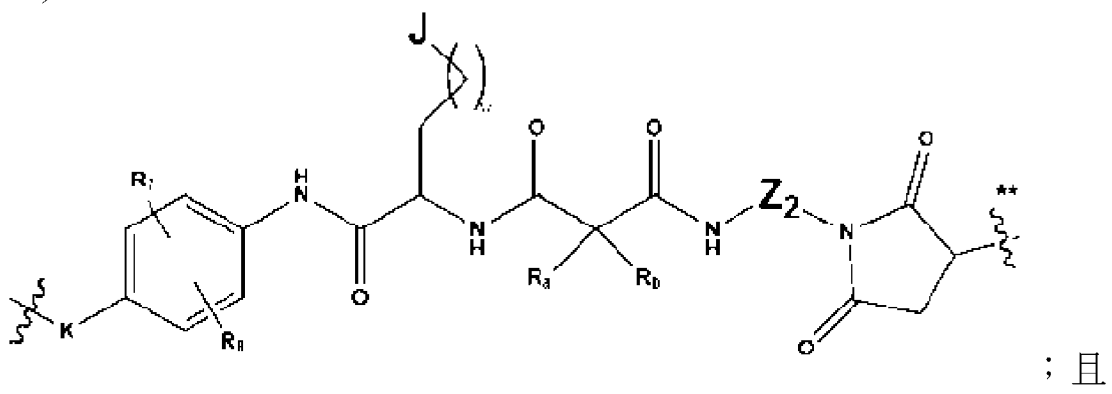
L1 接附在 L1-T 處且選自由以下所組成之群組：

ii) L1b



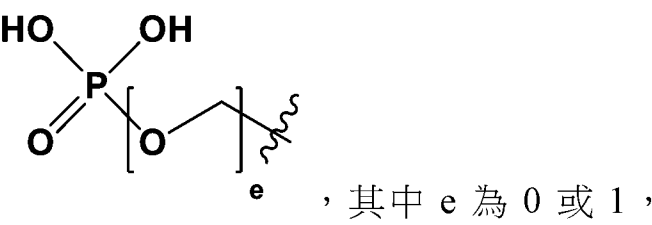
和

iii) L1c



；且

具有下列結構之磷酸鹽部分：



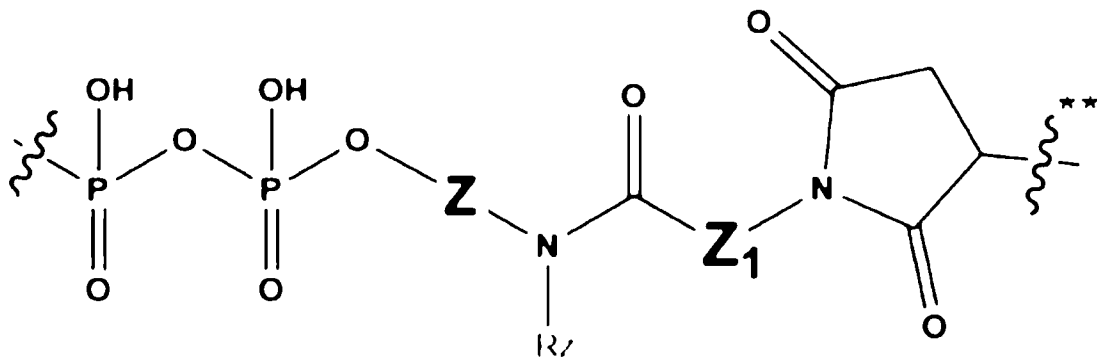
共價結合至 BRM。

【請求項36】

如請求項 17 之結合物，其中：

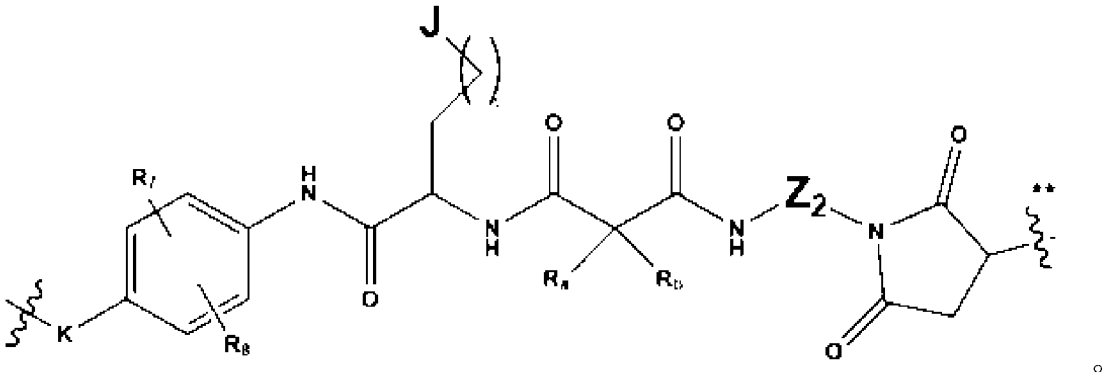
L1 接附在 L1-Q 處且選自由以下所組成之群組：

ii) L1b



和

iii)L1c

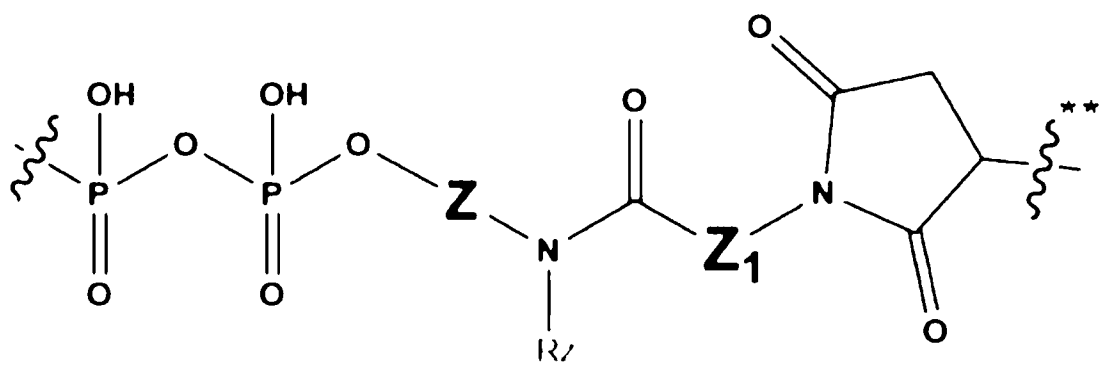


【請求項37】

如請求項 17 之結合物，其中：

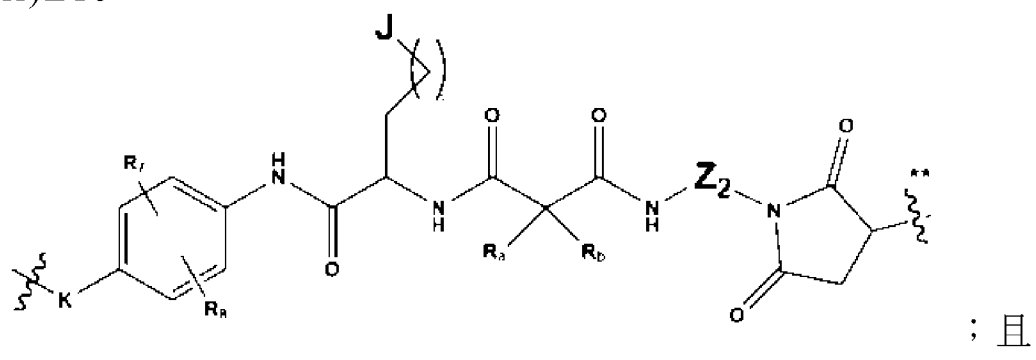
L1 接附在 L1-Q 處且選自由以下所組成之群組：

ii) L1b

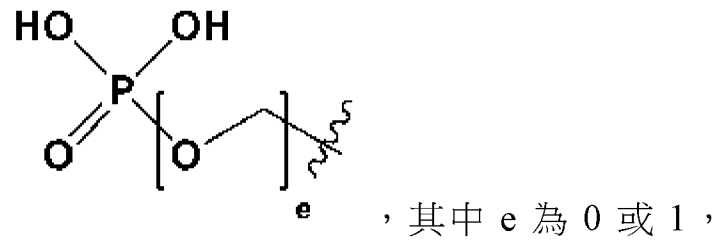


和

iii)L1c



具有下列結構之磷酸鹽部分：



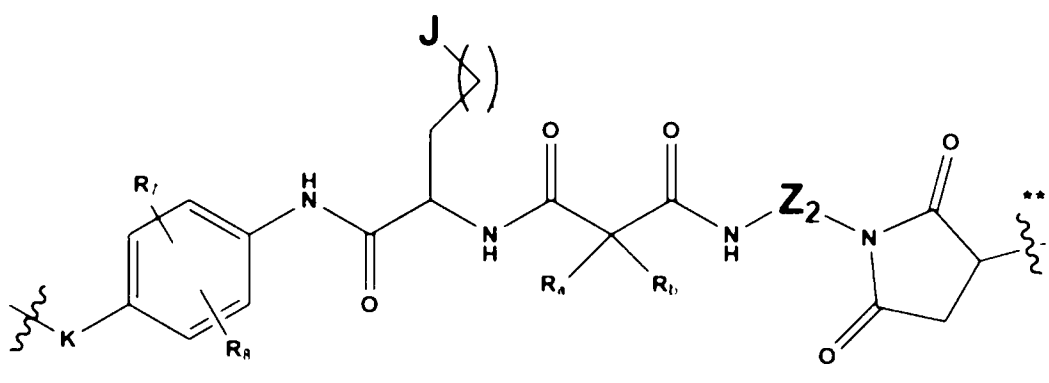
共價結合至 BRM。

【請求項38】

如請求項 17 之結合物，其中：

L1 接附在 L1-Q' 處且具有下列結構：

iii)L1c

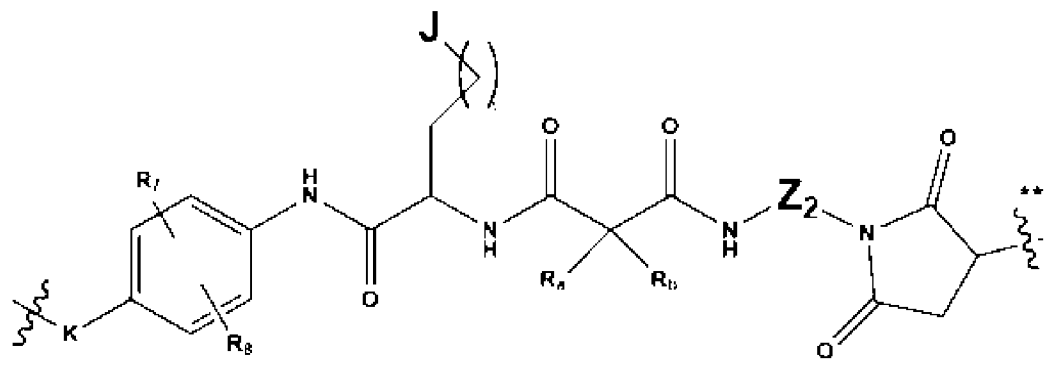


【請求項39】

如請求項 17 之結合物，其中：

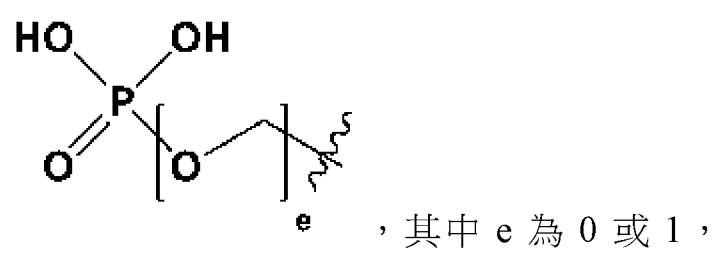
L1 接附在 L1-Q’ 處且具有下列結構：

iii)L1c



；且

具有下列結構之磷酸鹽部分：



共價結合至 E3LB。

【請求項40】

如請求項 8 之結合物，其中：

Z 和 Z1 各自獨立地選自 $-(CH_2)_{1-6}-$ 和 $-[CH_2]_g-[-O-CH_2]_h-$ ，

其中 g 為 0、1 或 2，且 h 為 1-5。

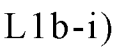
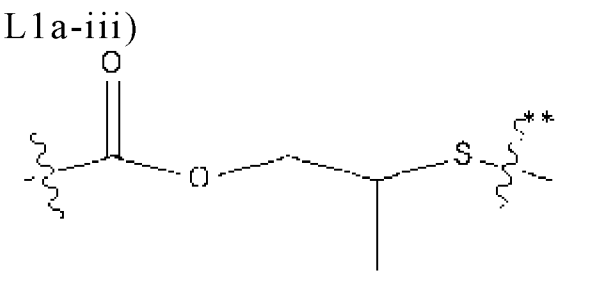
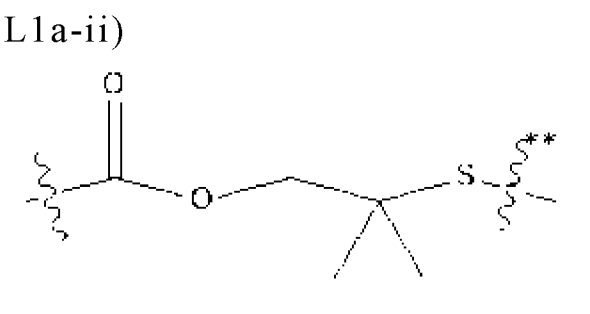
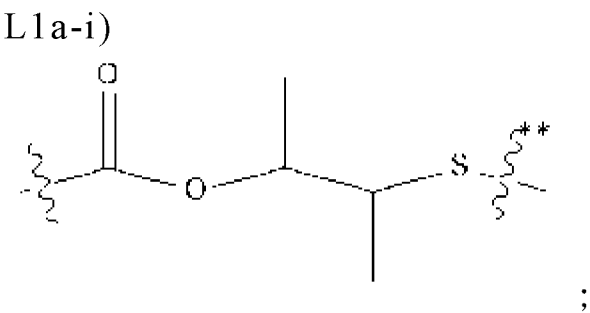
【請求項41】

如請求項 8 之結合物，其中：

Z_2 選自 $-(CH_2)_{1-6}-$ 和 $-[CH_2]_g-[-O-CH_2]_h-$ ，其中 g 為 0、1 或 2，且 h 為 1-5。

【請求項42】

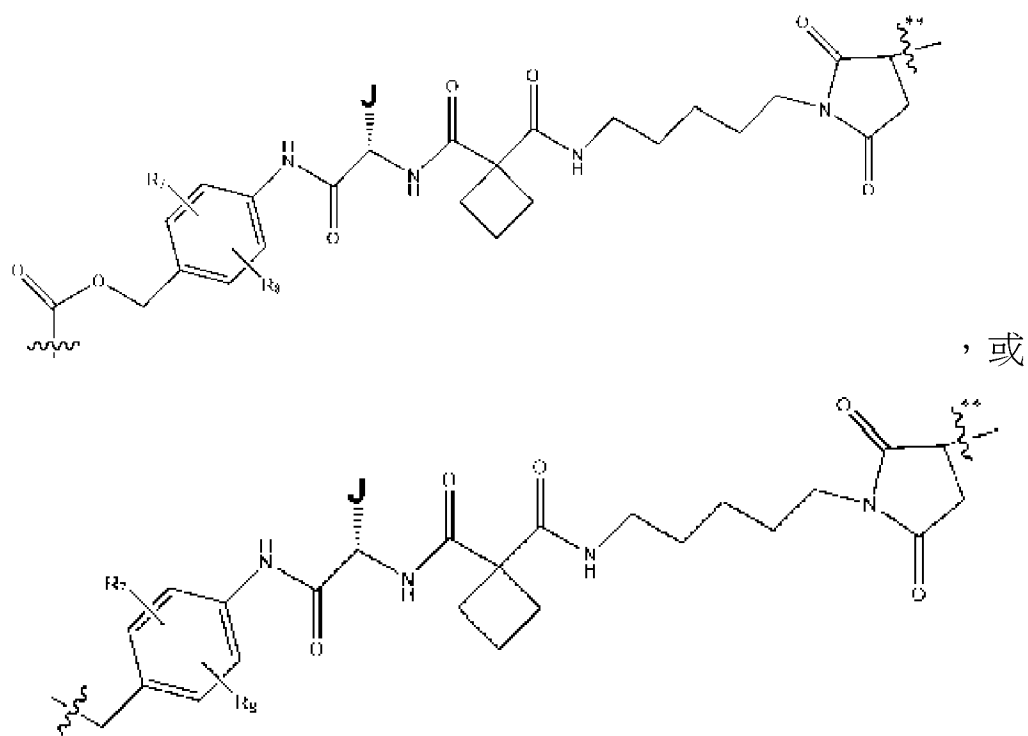
如請求項 8 之結合物，其中 L1 選自由以下所組成之群組：



J 為 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}_2$ ； $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ ；
 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$ ；或 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ；
 R_5 和 R_6 獨立地為氫或 C_{1-5} 烷基；或者， R_5 和 R_6 與各自所接附之氮一起形成視情況經取代之 5 至 7 員雜環基；且
 R_7 和 R_8 各自獨立地為氫、鹵代、 C_{1-5} 烷基、 C_{1-5} 烷氧基或羥基。

【請求項43】

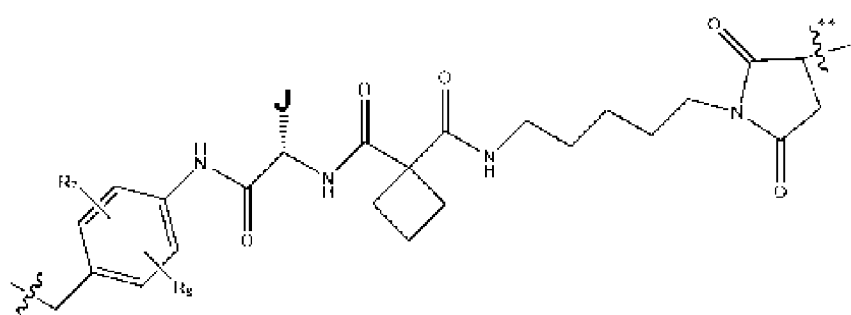
如請求項 42 之結合物，其中 L1 選自由以下所組成之群組：



其中，
J 為 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}_2$ ； $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ ；
 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$ ；或 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ；
且
 R_7 和 R_8 各自獨立地為氫、鹵代、 C_{1-5} 烷基、 C_{1-5} 烷氧基或羥基。

【請求項44】

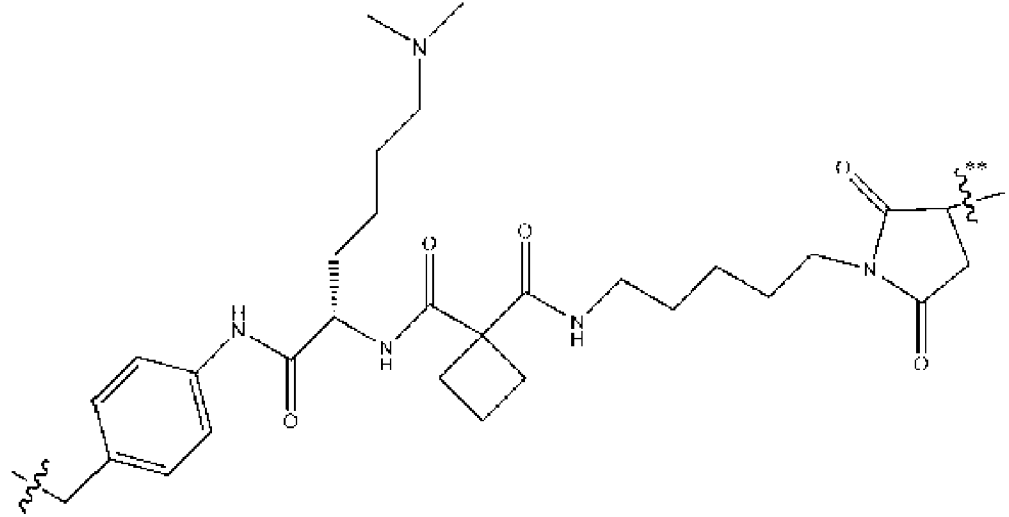
如請求項 43 之結合物，其中連接子-1 具有下列結構：



其中，
J 為 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}_2$ ； $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ ；
 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$ ；或 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ；
且
 R_7 和 R_8 各自獨立地為氫、鹵代、 C_{1-5} 烷基、 C_{1-5} 烷氧基或羥基。

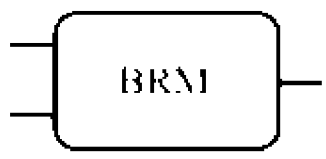
【請求項48】

如請求項 47 之結合物，其中 L1 具有下列結構：

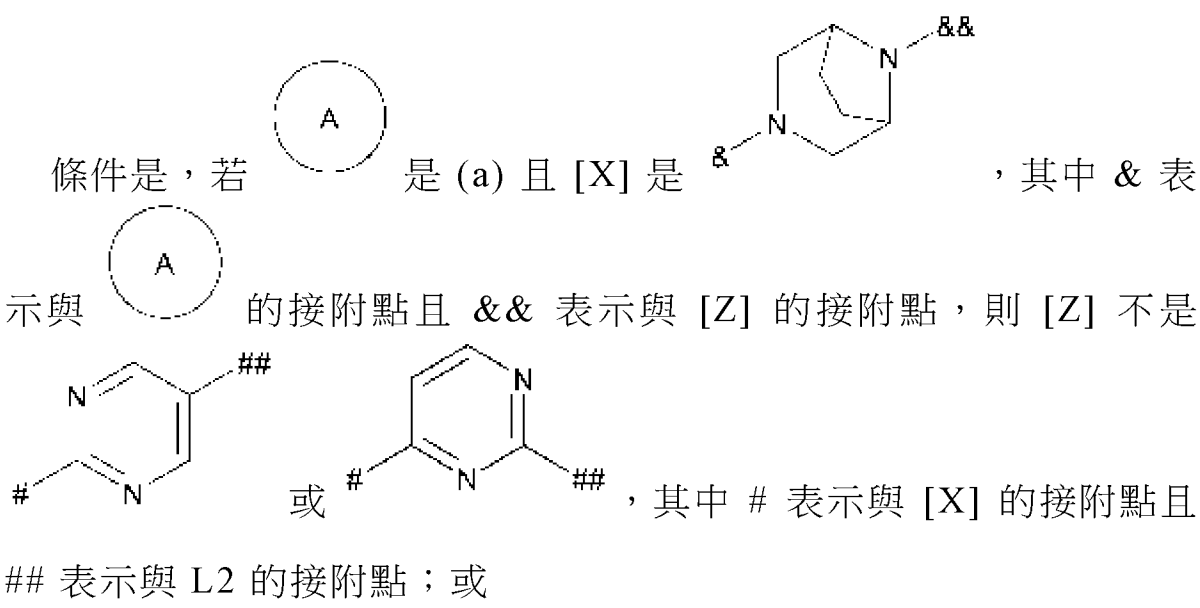


【請求項49】

如請求項 1 之結合物，其中：

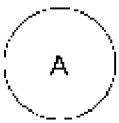


為具有式 I 之結構的 BRM 結合化合物之殘基：

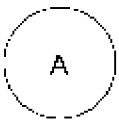


(iii) [X] 為 3 至 15 員雜環基或 5 至 20 員雜芳基，
[Y] 為亞甲基，其中 [Y] 的亞甲基視情況經一個或多個甲基基團取代，且

[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代取代，且

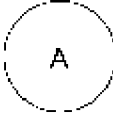
[Z] 為 5 至 20 員雜芳基，
條件是， 為 (a)、(b)、(d)、或 (e)；或

(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，

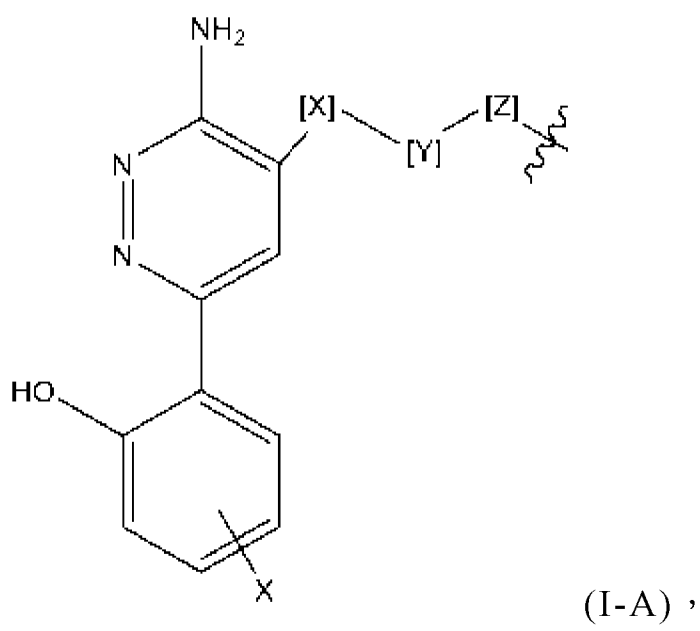
[Y] 為環丙基或環丁基，且

[Z] 為 5 至 20 員雜芳基，

條件是， 為 (a)、(b)、(d)、或 (e)。

【請求項50】

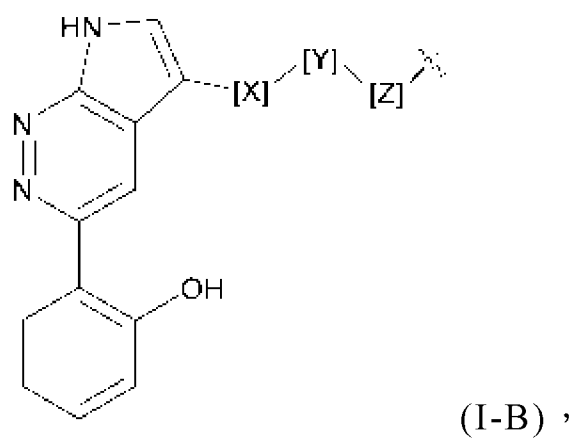
如請求項 49 之結合物，其中該 BRM 結合化合物之殘基為式 (I-A) 化合物：



或其立體異構物或互變異構物、或其醫藥上可接受之鹽。

【請求項51】

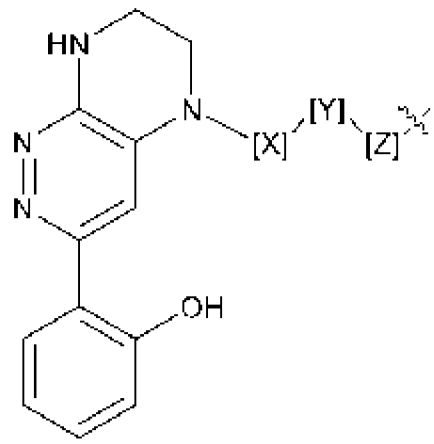
如請求項 49 之結合物，其中該 BRM 結合化合物之殘基是式 (I-B) 化合物：



或其立體異構物或互變異構物、或其醫藥上可接受之鹽。

【請求項52】

如請求項 49 之結合物，其中該 BRM 結合化合物之殘基是式 (I-C) 化合物：

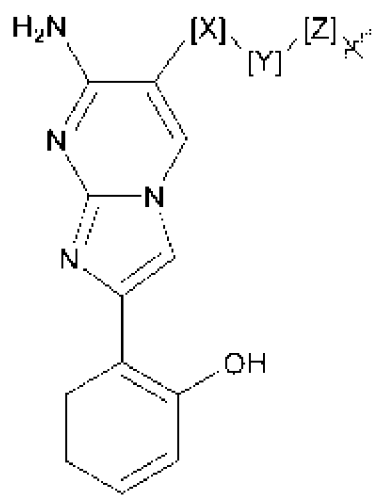


(I-C)，

或其立體異構物或互變異構物、或其醫藥上可接受之鹽。

【請求項53】

如請求項 49 之結合物，其中該 BRM 結合化合物之殘基是式 (I-D) 化合物：

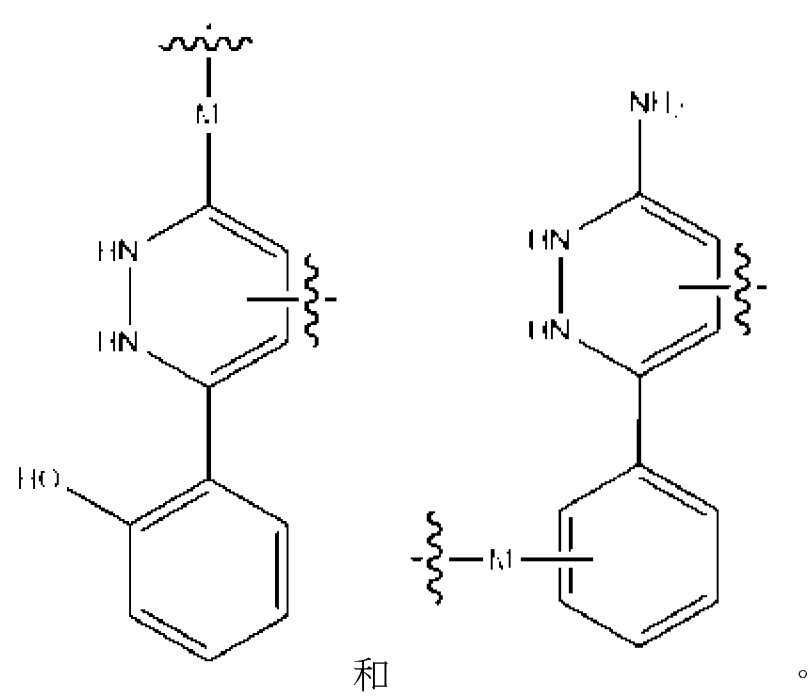


(I-D)，其中 X 為氫或鹵素，

或其立體異構物或互變異構物、或其醫藥上可接受之鹽。

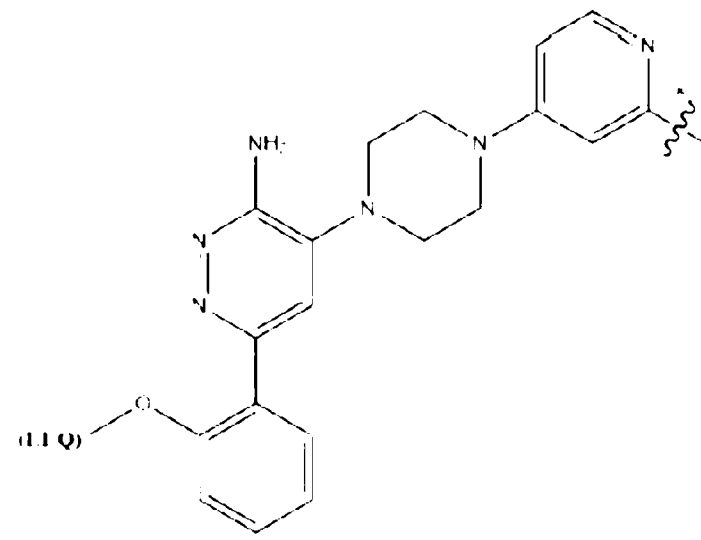
【請求項54】

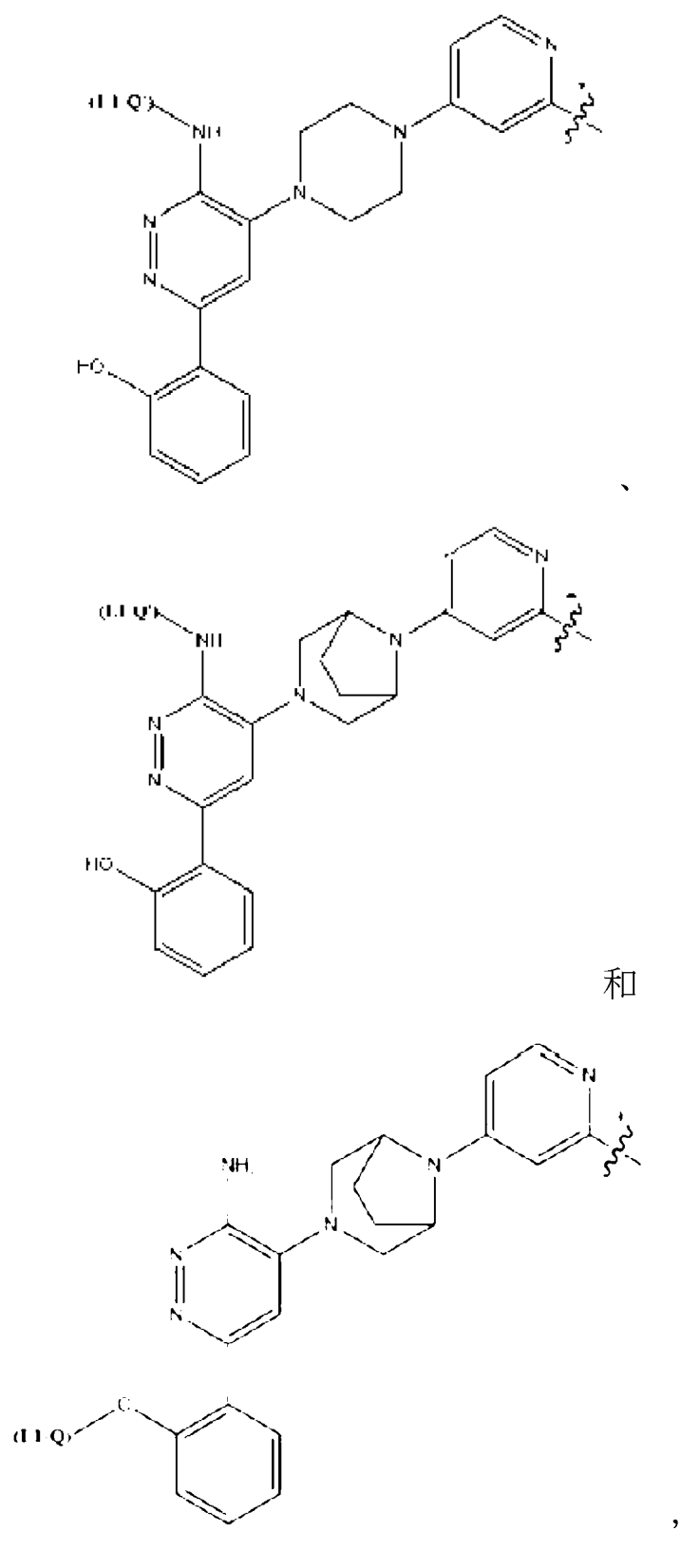
如請求項 49 之結合物，其中該 BRM 結合化合物之殘基是式 (I-E) 化合物：



【請求項57】

如請求項 56 之結合物，其中 BRM 為以下項之殘基：



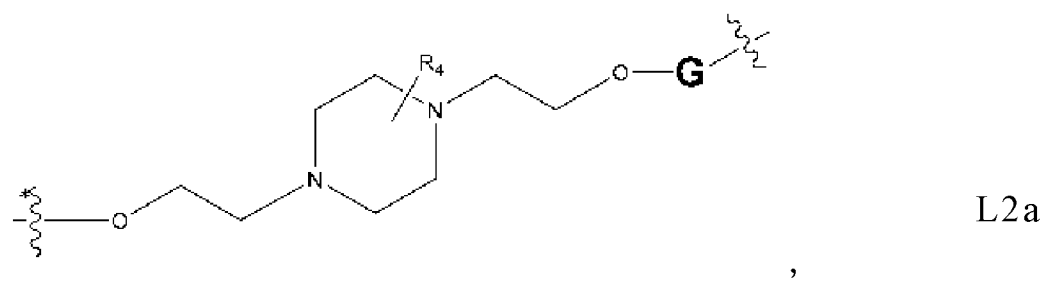


其中， 為與 L2 的接附點。

【請求項58】

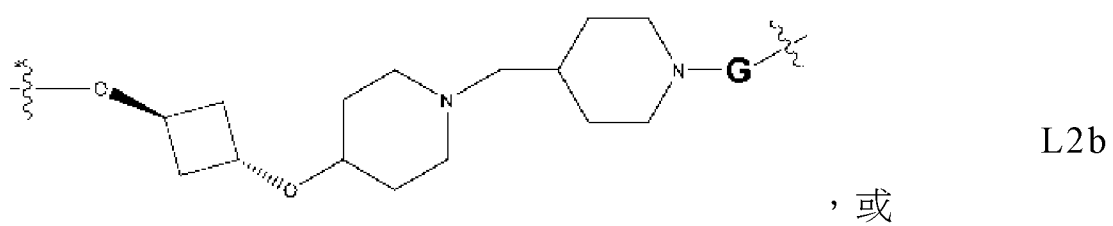
如請求項 1 之結合物，其中：

L2 為與 E3LB 和 BRM 共價結合的连接子-2，該 L2 具有式：

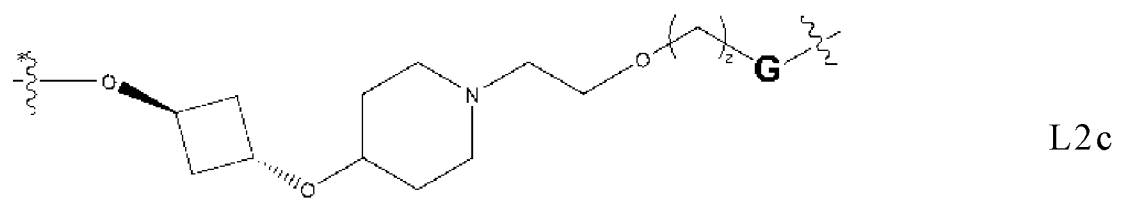


其中，

R₄ 為氫或甲基，

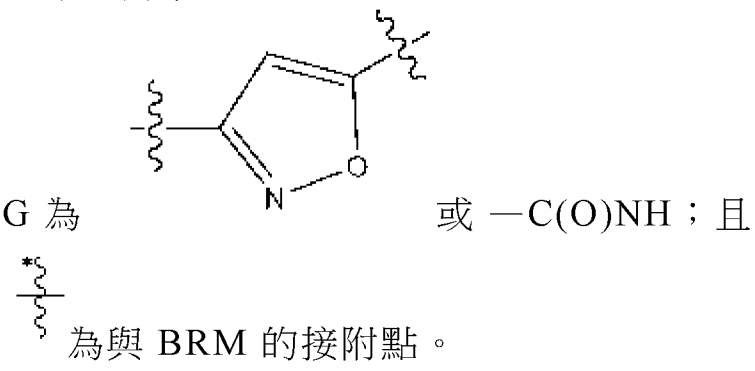


，或



其中，

z 為一或零，



【請求項59】

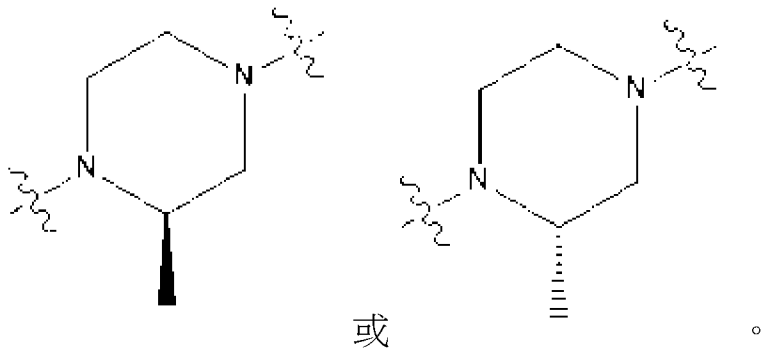
如請求項 58 之結合物，其中 R₄ 為氫。

【請求項60】

如請求項 58 之結合物，其中 R₄ 為甲基。

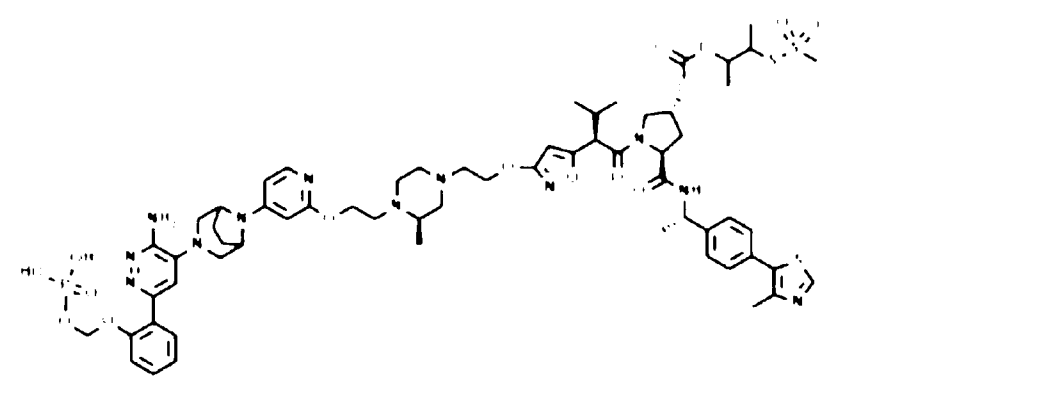
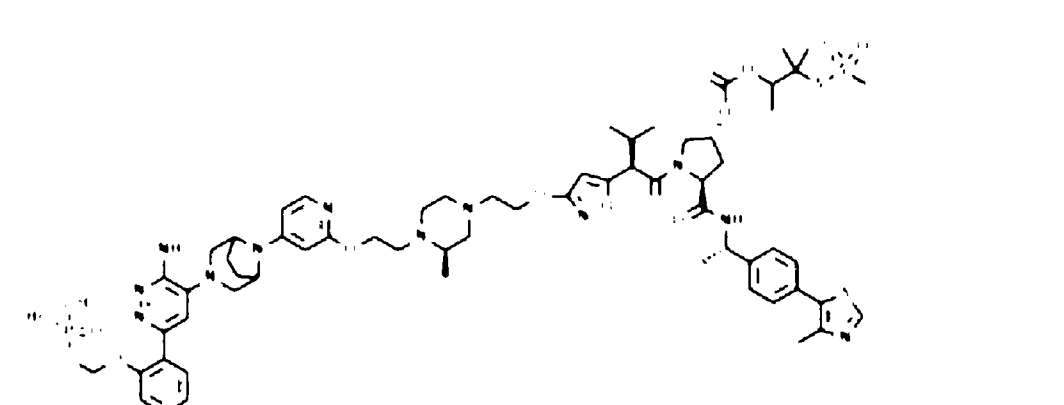
【請求項61】

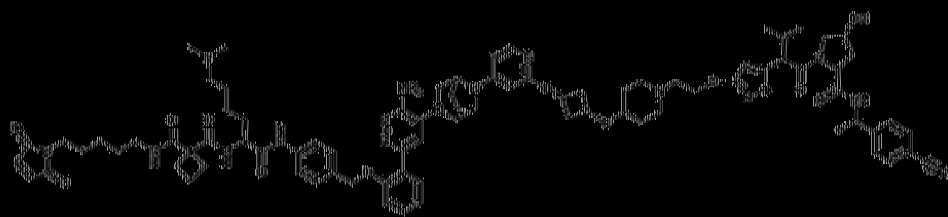
如請求項 60 之結合物，其中 R₄ 為甲基，如下：



【請求項62】

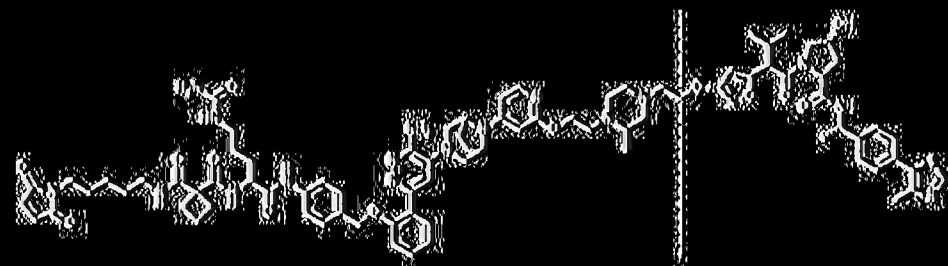
如請求項 1 之結合物，其選自由以下所組成之群組：

	L1-CIDE-BRM1-10
	L1-CIDE-BRM1-9



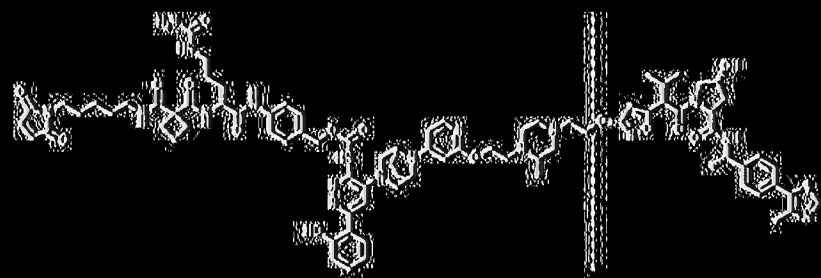
L1-CIDE-

BRM1-19



L1-CIDE-

BRM1-13



L1-CIDE-

BRM1-20



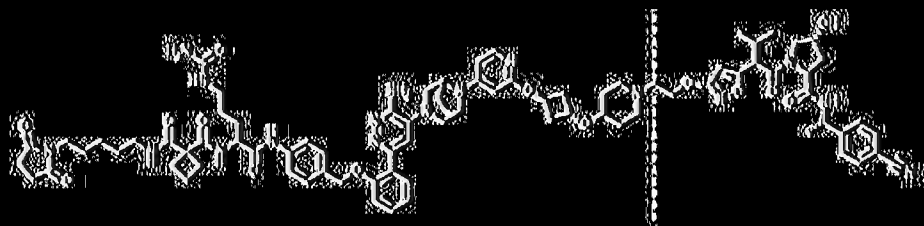
L1-CIDE-

BRM1-11



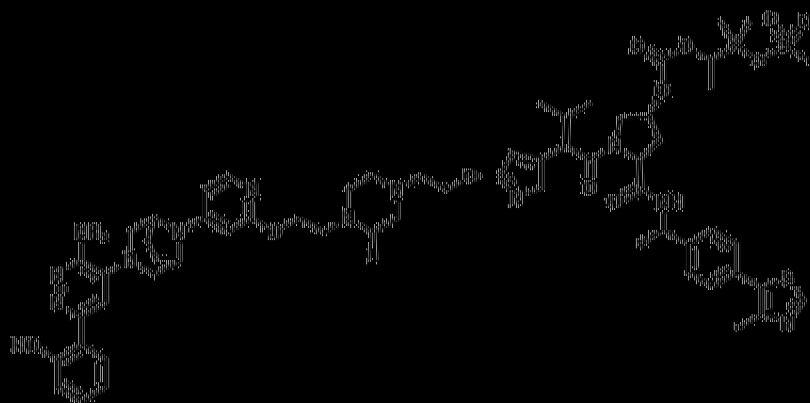
L1-CIDE-

BRM1-12



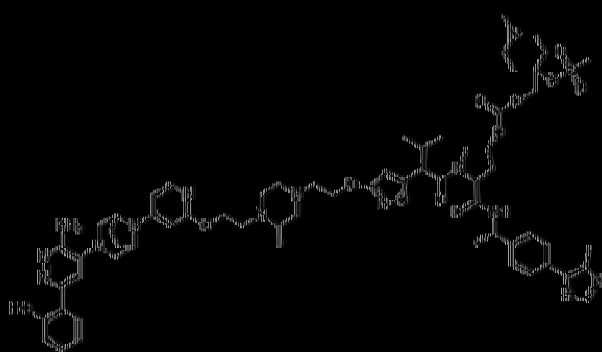
L1-CIDE-

BRM1-14



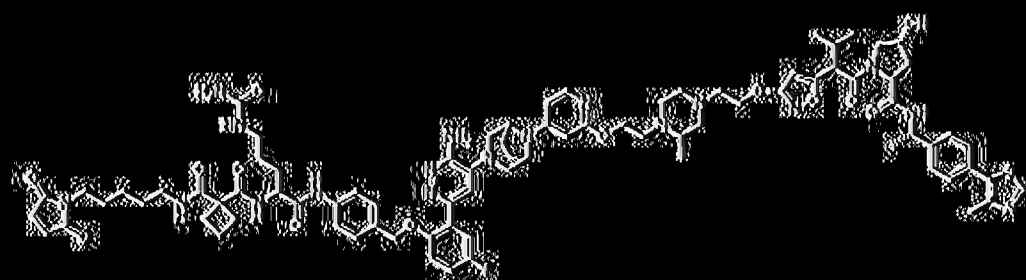
L1-CIDE-

BRM1-7



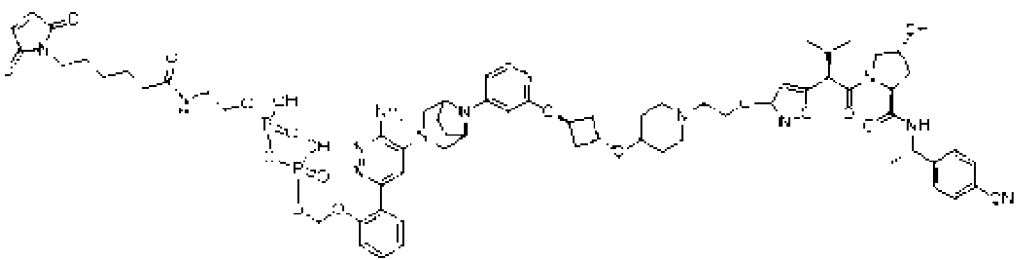
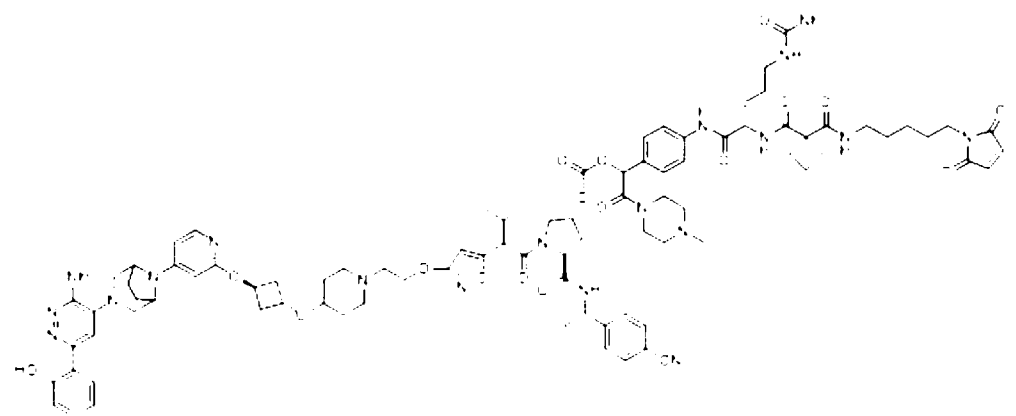
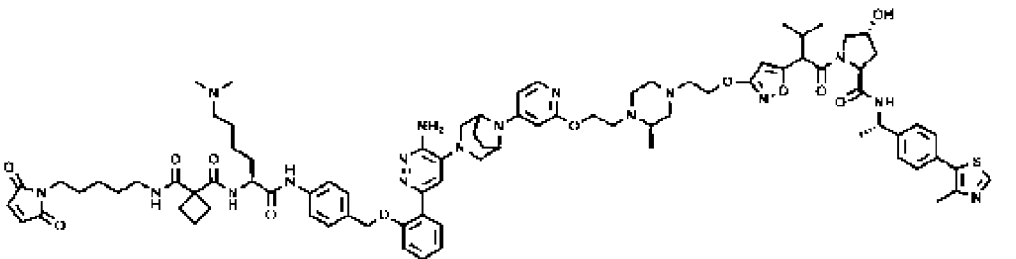
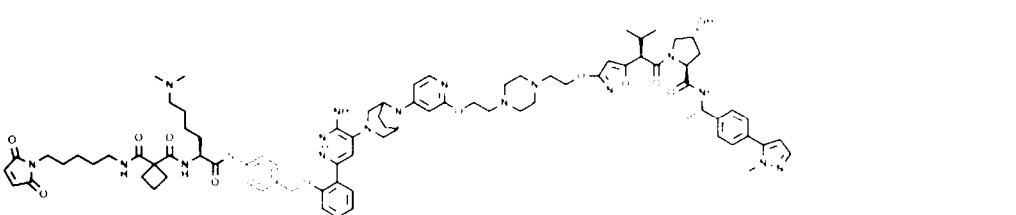
L1-CIDE-

BRM1-8



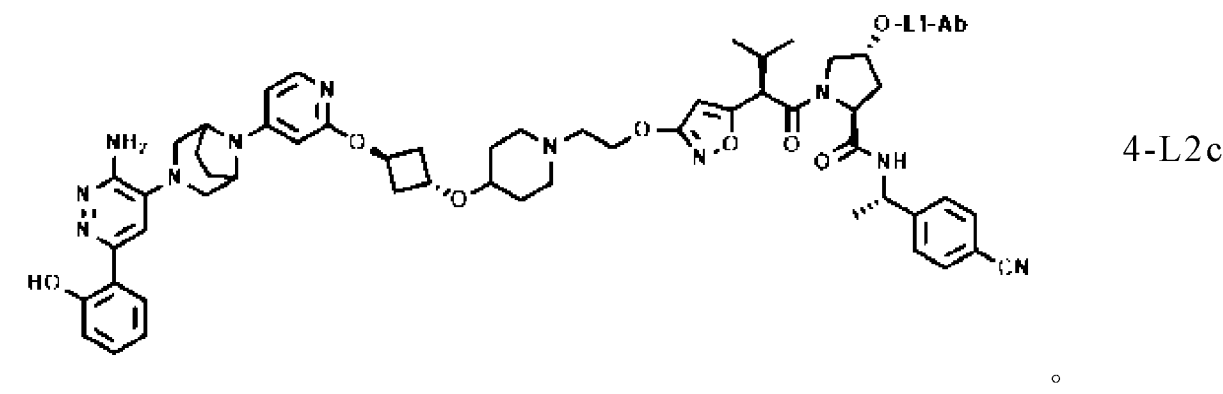
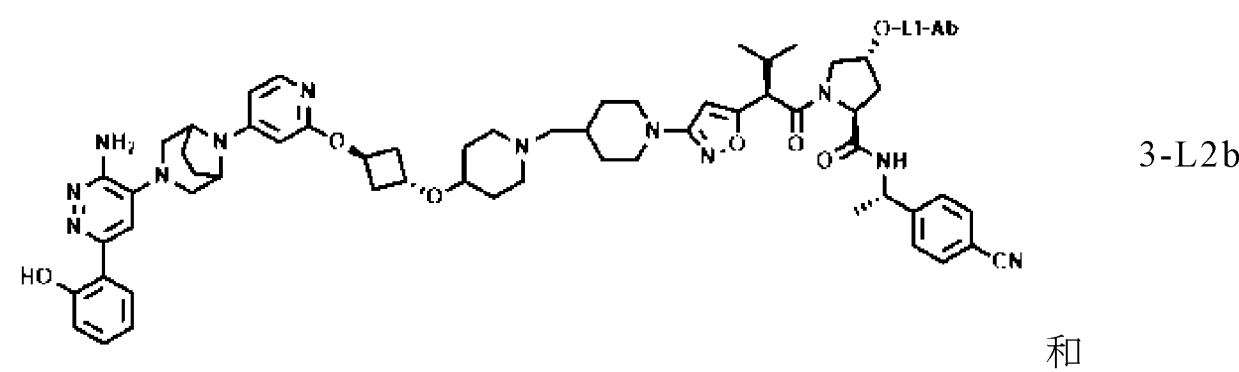
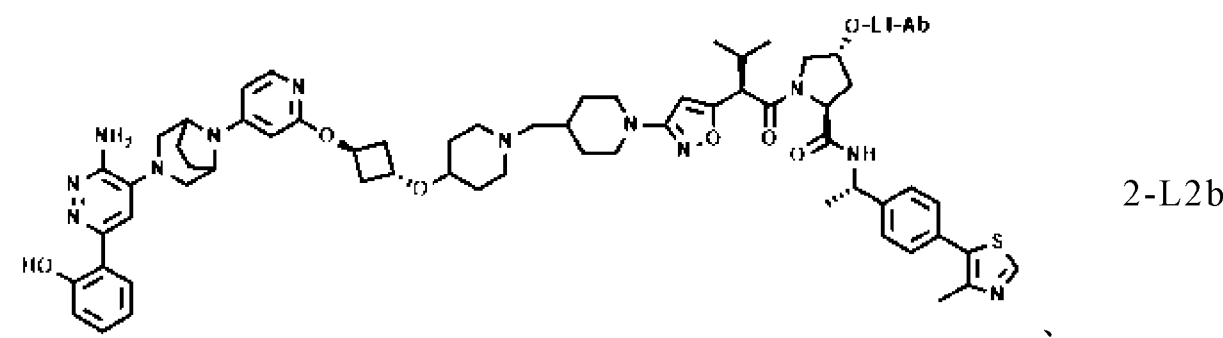
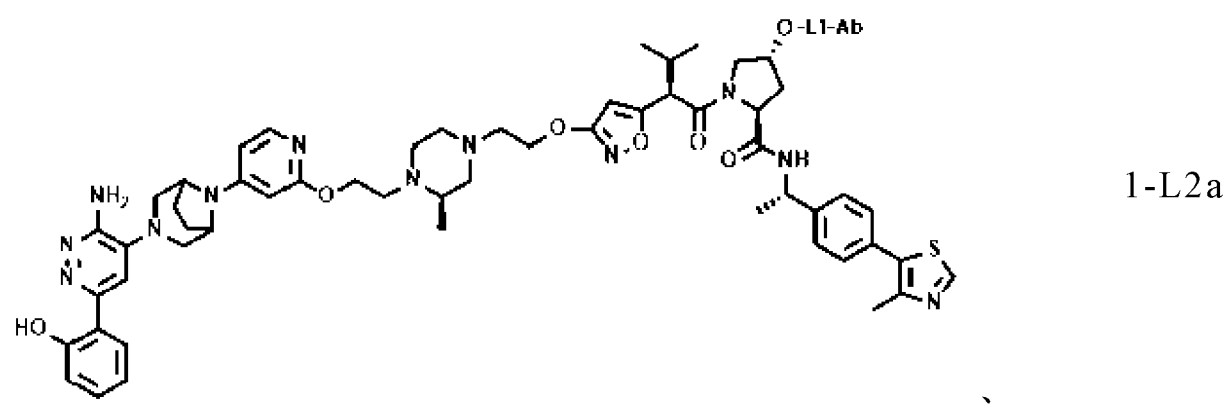
L1-CIDE-

BRM1-16

	L1-CIDE-BRM1-17
	L1-CIDE-BRM1-18
	L1-CIDE-BRM1-21
	L1-CIDE-BRM1-22

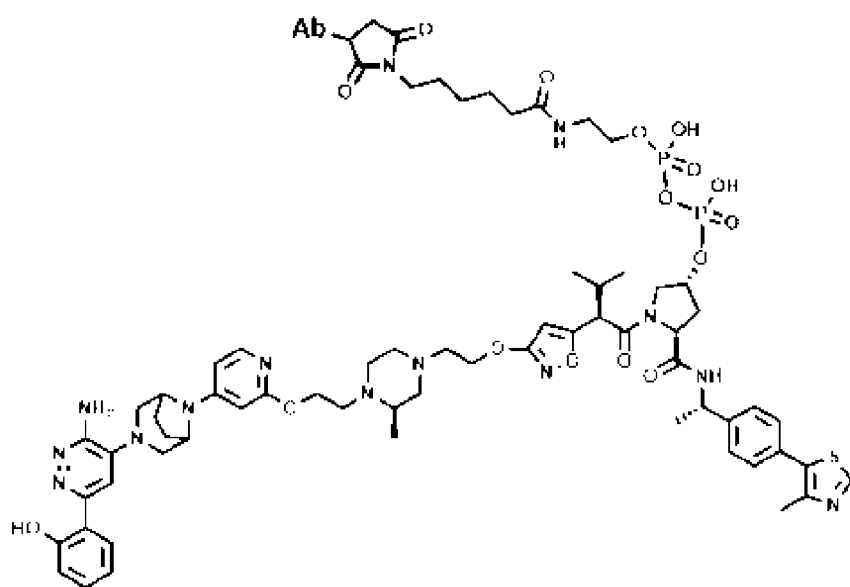
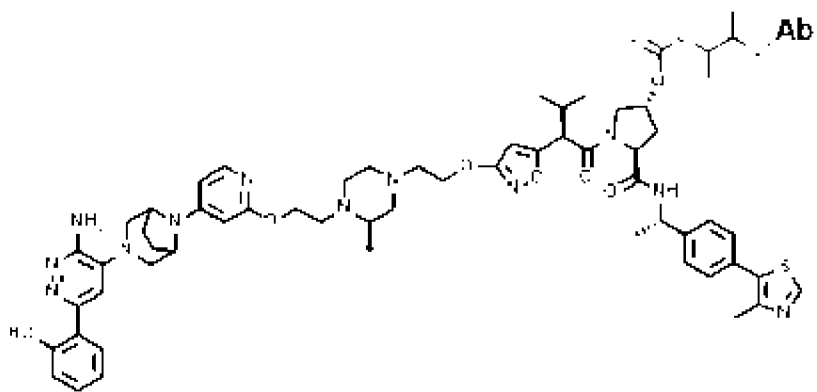
【請求項63】

如請求項 1 之結合物，其選自由以下所組成之群組：

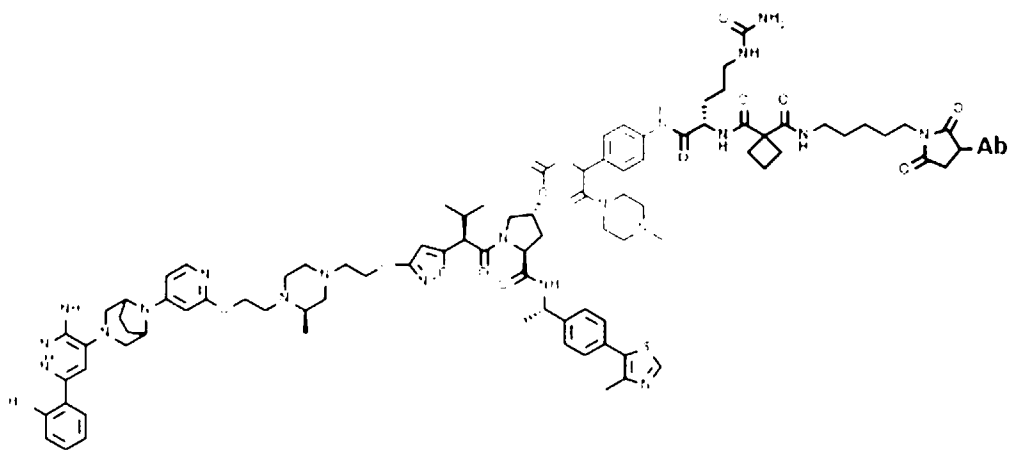


【請求項64】

如請求項 1 之結合物，其選自由以下所組成之群組：



和



【請求項65】

如請求項 1 之結合物，其中 p 具有約 5 至約 14 之值。

【請求項66】

如請求項 1 之結合物，其中 p 具有約 5 至約 10 之值。

【請求項67】

一種醫藥組成物，其包含如請求項 1 之結合物及一種或多種醫藥上可接受之賦形劑。

【請求項68】

一種治療有此需要之人的疾病之方法，該方法包含將有效量之如請求項 1 之結合物或如請求項 47 之組成物投予該人。

【請求項69】

如請求項 68 之方法，其中該疾病是癌症。

【請求項70】

如請求項 68 之方法，其中該癌症具有 BRM 依賴性。

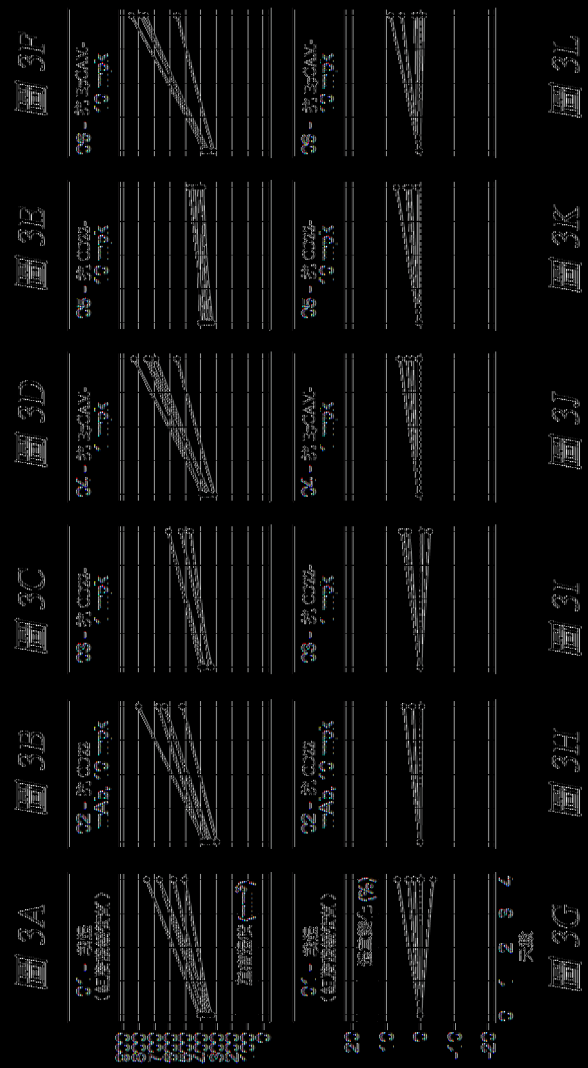
【請求項71】

如請求項 68 之方法，其中該癌症是非小細胞肺癌。

【請求項72】

一種降低個體的標靶 BRM 蛋白的量之方法，其包含：

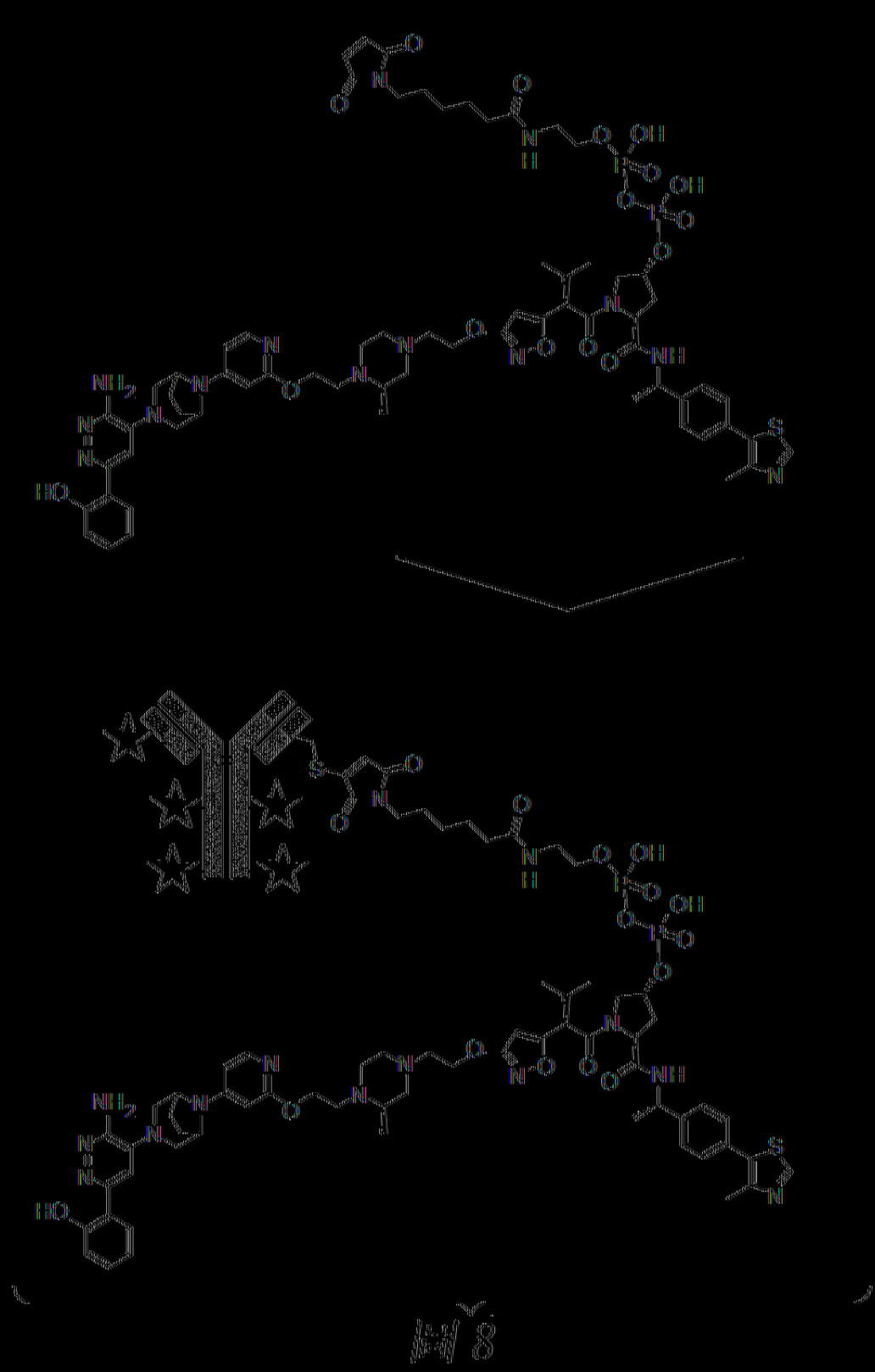
將如請求項 1 之結合物或如請求項 69 之組成物投予該個體，其中該 BRM 部分結合該標靶 BRM 蛋白，其中泛蛋白連接酶產生該結合的標靶 BRM 蛋白的降解，其中該 BRM 標靶蛋白的量減少。

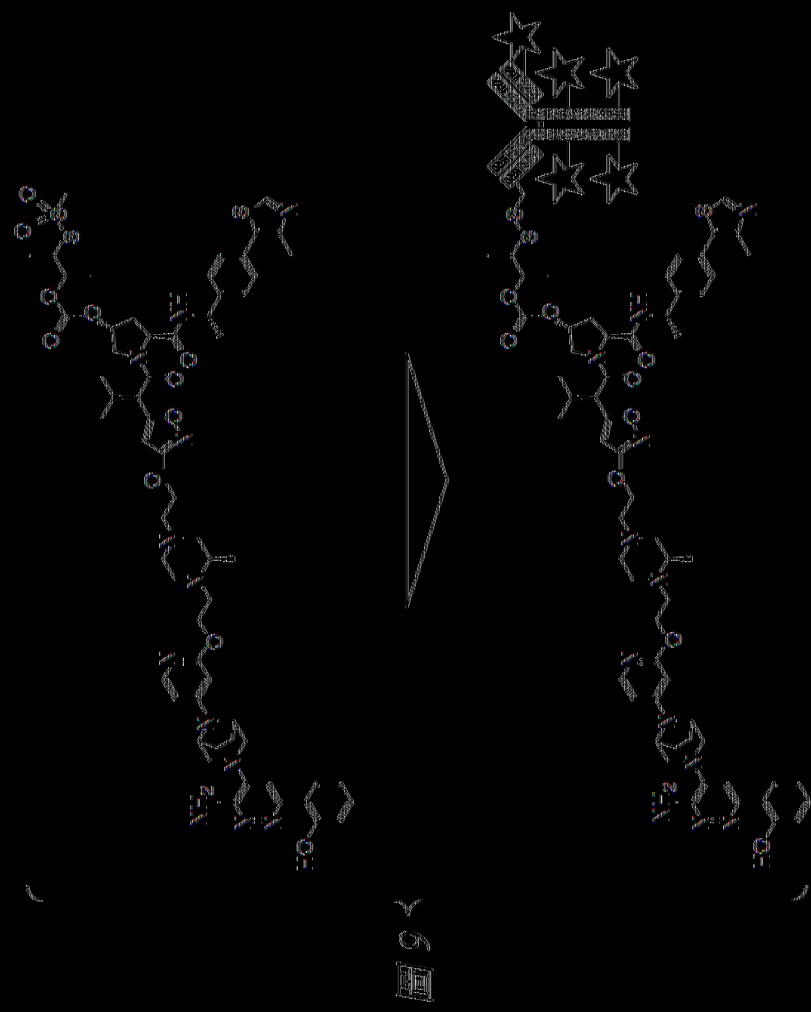


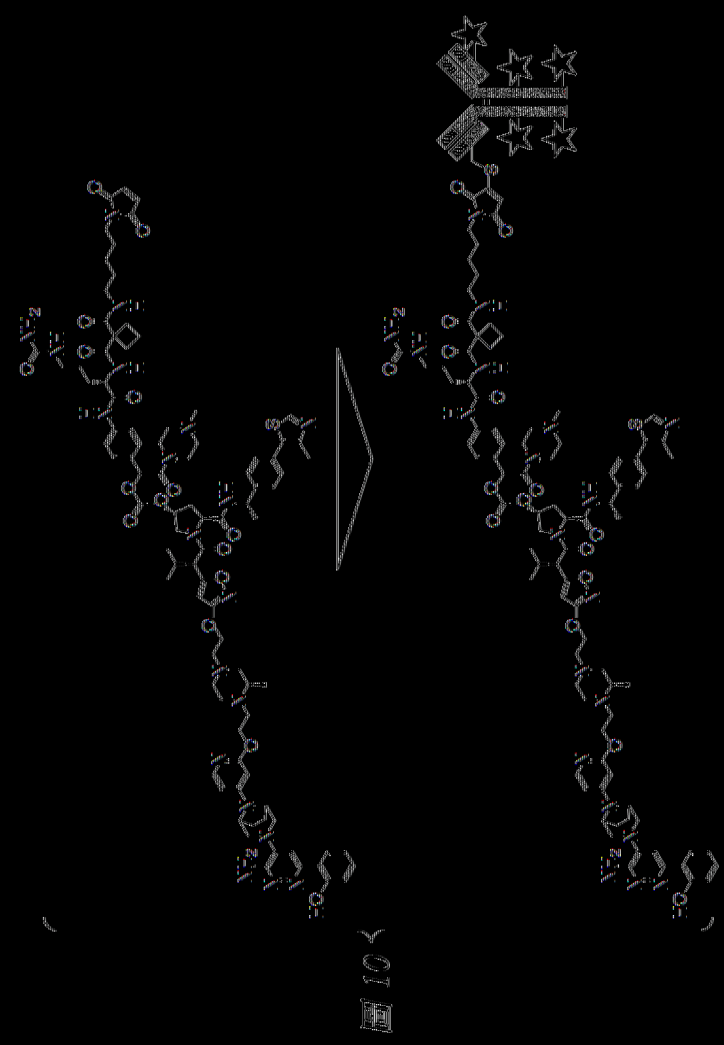


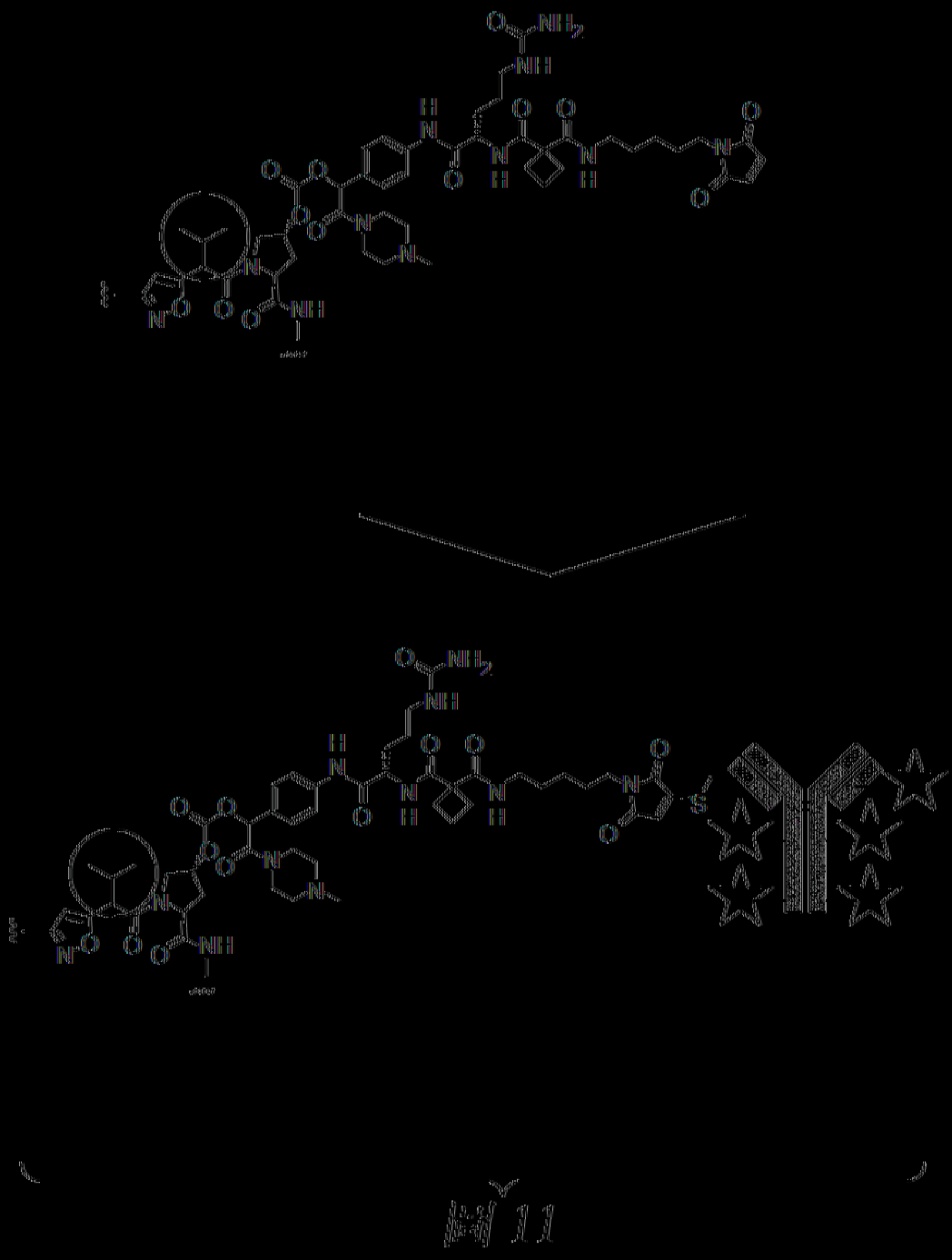




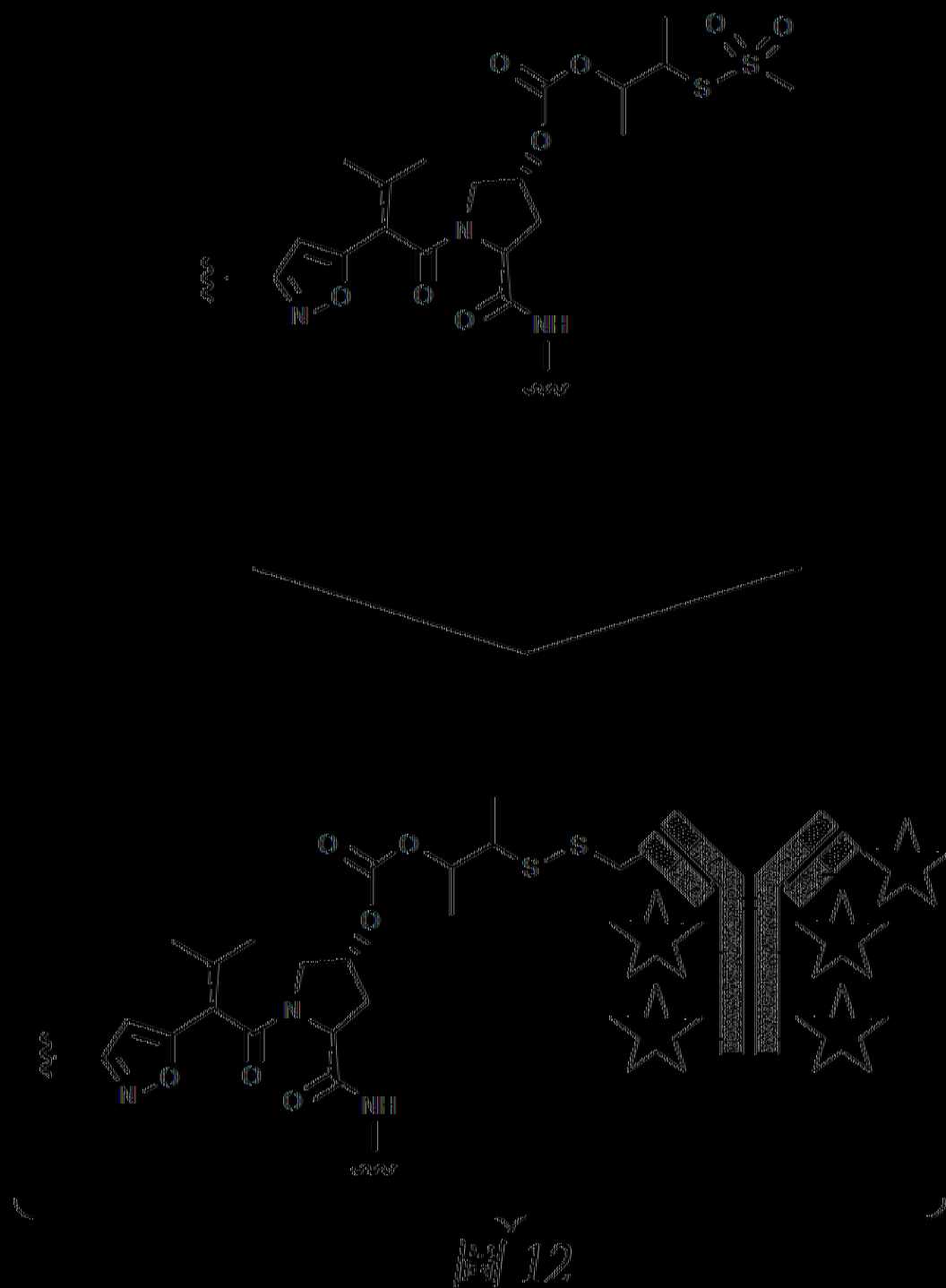








11



12