



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I808931 B

(45)公告日：中華民國 112 (2023) 年 07 月 21 日

(21)申請案號：105138777

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 11 月 25 日

(51)Int. Cl. : A61K47/50 (2017.01)

A61K31/7028(2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61K45/06 (2006.01)

(30)優先權：2015/11/25 美國

62/260,006

(71)申請人：韓商樂高化學生物科學股份有限公司 (南韓) LEGOCHEM BIOSCIENCES, INC.

(KR)

南韓

(72)發明人：金容柱 KIM, YONG ZU (KR)；吳英秀 OH, YEONG SOO (KR)；蔡濟旭 CHAE, JEIWOOK (KR)；宋昊永 SONG, HO YOUNG (KR)；鄭哲雄 CHUNG, CHUL-WOONG (KR)；朴允姬 PARK, YUN HEE (KR)；崔孝汀 CHOI, HYO JUNG (KR)；朴慶恩 PARK, KYUNG EUN (KR)；金炯來 KIM, HYOUNGRAE (KR)；金真影 KIM, JINYEONG (KR)；閔智暎 MIN, JI YOUNG (KR)；金星民 KIM, SUNG MIN (KR)；李秉洙 LEE, BYUNG SOO (KR)；禹東賢 WOO, DONG HYUN (KR)；鄭智恩 JUNG, JI EUN (KR)；李受璘 LEE, SU IN (KR)

(74)代理人：陳長文

審查人員：簡正芳

申請專利範圍項數：44 項 圖式數：22 共 325 頁

(54)名稱

包含分支連接子之抗體-藥物結合物及與其相關之方法

(57)摘要

本發明係關於抗體-藥物結合物(ADC)，其中複數種活性劑經由至少一個分支連接子結合於抗體。分支連接子可包含分支單元，且兩種活性劑經由次要連接子偶合於分支單元，且分支單元藉由主要連接子偶合於抗體。活性劑可相同或不同。在某些此類實施例中，兩個或更多個此類分支連接子結合於抗體，例如 2-4 個分支連接子，其可各偶合於抗體重鏈或輕鏈之不同 C 端半胱胺酸。分支連接子可包含藉由第一分支偶合於分支單元之一種活性劑及包含偶合於分支單元之聚乙二醇部分的第二分支。在某些此類實施例中，兩個或更多個此類分支連接子結合於抗體，例如 2-4 個分支連接子，其可各偶合於抗體重鏈或輕鏈之不同 C 端半胱胺酸。

The present invention relates to antibody-drug conjugates (ADCs) wherein a plurality of active agents are conjugated to an antibody through at least one branched linker. The branched linker may comprise a branching unit, and two active agents are coupled to the branching unit through a secondary linker and the branching unit is coupled to the antibody by a primary linker. The active agents may be the same or different. In certain such embodiments, two or more such branched linkers are conjugated to the antibody, e.g., 2-4 branched linkers, which may each be coupled to a different C-terminal cysteine of a heavy or light chain of the antibody. The branched linker may comprise one active agent coupled to the branching unit by a first branch and a second branch that comprises a polyethylene glycol moiety coupled to the branching unit. In certain such embodiments, two or more such branched linkers are conjugated to the antibody, e.g., 2-4

branched linkers, which may each be coupled to a different C-terminal cysteine of a heavy or light chain of the antibody.



公告本

申請日: 105/11/25

I808931

【發明摘要】

IPC分類: **A61K 47/48** (2006.01)
A61K 31/7028 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)

【中文發明名稱】

包含分支連接子之抗體-藥物結合物及與其相關之方法

【英文發明名稱】

ANTIBODY-DRUG CONJUGATES COMPRISING BRANCHED
LINKERS AND METHODS RELATED THERETO

【中文】

本發明係關於抗體-藥物結合物(ADC)，其中複數種活性劑經由至少一個分支連接子結合於抗體。分支連接子可包含分支單元，且兩種活性劑經由次要連接子偶合於分支單元，且分支單元藉由主要連接子偶合於抗體。活性劑可相同或不同。在某些此類實施例中，兩個或更多個此類分支連接子結合於抗體，例如2-4個分支連接子，其可各偶合於抗體重鏈或輕鏈之不同C端半胱胺酸。分支連接子可包含藉由第一分支偶合於分支單元之一種活性劑及包含偶合於分支單元之聚乙二醇部分的第二分支。在某些此類實施例中，兩個或更多個此類分支連接子結合於抗體，例如2-4個分支連接子，其可各偶合於抗體重鏈或輕鏈之不同C端半胱胺酸。

【英文】

The present invention relates to antibody-drug conjugates (ADCs) wherein a plurality of active agents are conjugated to an antibody through at least one branched linker. The branched linker may comprise a branching unit, and two active agents are coupled to the branching unit through a secondary linker and the branching unit is coupled to the antibody by a primary linker. The active agents may be the same or

different. In certain such embodiments, two or more such branched linkers are conjugated to the antibody, e.g., 2-4 branched linkers, which may each be coupled to a different C-terminal cysteine of a heavy or light chain of the antibody. The branched linker may comprise one active agent coupled to the branching unit by a first branch and a second branch that comprises a polyethylene glycol moiety coupled to the branching unit. In certain such embodiments, two or more such branched linkers are conjugated to the antibody, e.g., 2-4 branched linkers, which may each be coupled to a different C-terminal cysteine of a heavy or light chain of the antibody.

【指定代表圖】

無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

包含分支連接子之抗體-藥物結合物及與其相關之方法

【英文發明名稱】

ANTIBODY-DRUG CONJUGATES COMPRISING BRANCHED
LINKERS AND METHODS RELATED THERETO

【技術領域】

本發明係關於一種抗體-藥物結合物(ADC)。特定言之，本發明係關於一種抗體-藥物結合物，其中複數種活性劑經由至少一個分支連接子結合於抗體。

【先前技術】

抗體-藥物結合物(ADC)技術為一種面向標靶之技術，其允許選擇性殺死癌細胞或抑制癌細胞生長或分裂。通常，ADC藉由使用抗體靶向癌細胞且接著在細胞中釋放毒性物質(亦即藥物)，從而觸發細胞死亡來起作用。因為ADC技術允許藥物準確傳遞至標靶癌細胞且在特定條件下釋放，所以在對健康細胞之附帶損害減至最低的同時，ADC技術增加治療抗體之功效且降低不良反應之風險。

抗體-藥物結合物之基本結構為「抗體-連接子-低分子量藥物(毒素)」。理想地，連接子允許藥物例如在與抗體分離後(例如藉由酶介導之水解)，在藥物達到標靶細胞後對標靶癌細胞展現作用。連接子亦藉由將抗體與藥物連接，起功能性作用。因此，抗體-藥物結合物之功效及毒性部分視連接子之穩定性而定，且因此，連接子在藥物安全性中起重要作用。

抗體-藥物結合物之連接子可大致歸類為不可裂解或可裂解。許多不可裂解之連接子使用包含抗體之半胱胺酸的硫醚附接至抗體。側接藥物一般在活體內無法自抗體解離且當ADC內化不良時可能進一步遭遇功效降低。在廣泛使用之硫醇-順丁烯二醯亞胺方法之情況下，抗體-藥物結合物不穩定，其可能使得藥物在達到標靶細胞之前或之後自結合物解離。

代替在生理細胞外條件下具有有限穩定性之化學上不穩定連接子，諸如基於胺及二硫化物之連接子，需要在生理細胞外條件下穩定之連接子。此外，需要具有高血漿穩定性之連接子來提高治療適用性，因為藥物僅應在藥物所連接之蛋白質所靶向的細胞內釋放，而不應在細胞外釋放。

可裂解之連接子可例如藉由溶酶體酶水解。可裂解之連接子可包含二硫鍵，例如包括抗體之半胱胺酸。允許經由硫醇交換反應解離之二硫化物連接子部分依賴於抗體-藥物結合物攝取至標靶細胞中以及二硫化物暴露於作為還原環境之細胞溶質。因為在血液中存在各種類型硫醇(例如白蛋白及麩胱甘肽)，所以無論如何，藥物在達到其標靶前可自抗體解離。

近來，已描述新的製備抗體-藥物結合物之方法，其使用C端胺基酸序列之蛋白質異戊烯化來安置經改質之類異戊二烯單元，該類異戊二烯單元允許藥物或其他活性劑以輕度及位點特異性方式附接至抗體(例如參見美國專利公開案第2012/0308584號)。可進一步優化。

依據上述，需要改善之用於抗體-藥物結合物之連接子。

【發明內容】

在一些態樣中，本發明係關於抗體-藥物結合物(ADC)，其包含抗體、至少一個共價偶合於抗體之分支連接子及至少一種或兩種共價偶合於分支連接子之活性劑。分支連接子可包含分支單元，其中至少一種藥物經

由次要連接子偶合於分支單元；分支單元藉由主要連接子偶合於抗體。主要及/或次要連接子可包含至少一個聚乙二醇單元。

在一些實施例中，本發明係關於一種配位體-藥物結合物，其包含配位體及一或多個共價偶合於配位體之分支連接子，其中

i)各分支連接子包含分支單元(BR)，該分支單元(BR)藉由主要連接子(PL)共價偶合於配位體。

ii)各分支連接子包含第一分支(B1)，其中第一活性劑藉由次要連接子(SL)及裂解基團(CG)共價偶合於分支單元；且

iii)各分支連接子進一步包含第二分支(B2)，其中a)第二活性劑藉由次要連接子(SL)及裂解基團(CG)共價偶合於分支單元或b)聚乙二醇部分共價偶合於分支單元，

其中各裂解基團可水解以自配位體-藥物結合物釋放活性劑。

在一些實施例中，本發明係關於一種分配位體-活性劑化合物，其中

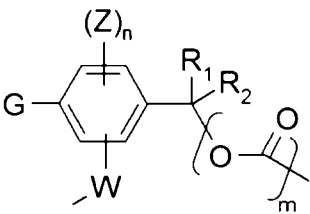
i)各分支連接子包含分支單元(BR)，該分支單元(BR)藉由主要連接子(PL)共價偶合於反應性部分；

ii)分支單元共價偶合於第一分支(B1)，該第一分支(B1)包含共價偶合於次要連接子(SL)及裂解基團(CG)之第一活性劑；以及

iii)分支單元共價偶合於第二分支(B2)，該第二分支(B2)包含共價偶合於次要連接子(SL)及裂解基團(CG)之第二活性劑，或b)聚乙二醇部分，

其中各裂解基團可水解以自配位體-活性劑化合物釋放活性劑。

在一些實施例中，裂解基團具有下式：



其中：

G表示糖、糖酸或經改質之糖，較佳糖或糖酸，最佳葡萄糖醛酸；

W表示-C(O)-、-C(O)NR'-、-C(O)O-、-S(O)₂NR'-、-P(O)R''NR'-、-S(O)NR'-或-PO₂NR'-，在各情況下其中該C(O)、S或P較佳直接結合於該苯環，且R'及R''各獨立地為氫、(C₁-C₈)烷基、單或二羧基(C₁-C₈)烷基、(C₃-C₈)環烷基、(C₁-C₈)烷氧基、(C₁-C₈)烷硫基、單或二(C₁-C₈)烷基胺基、(C₃-C₂₀)雜芳基或(C₆-C₂₀)芳基且W直接或間接偶合於該分支單元；

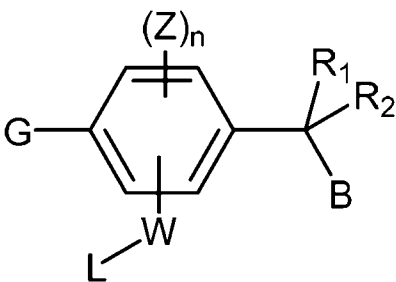
各Z獨立地表示氫、(C₁-C₈)烷基或拉電子基團(諸如醯胺、羧酸、羧酸酯、鹵素、氰基或硝基)，較佳氫、(C₁-C₈)烷基、鹵素、氰基或硝基，最佳氫；

n為整數1至3；

m為0或1，較佳1；且

R₁及R₂各獨立地為氫、(C₁-C₈)烷基,或(C₃-C₈)環烷基，較佳氫，或R₁及R₂連同其附接之碳原子一起形成(C₃-C₈)環烷基環。

在一些實施例中，該活性劑經由具有下式之裂解基團偶合於該第一分支：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中

G表示糖、糖酸或經改質之糖，較佳糖或糖酸，最佳葡萄糖醛酸；

B為共價附接於該活性劑之單元，

W表示-C(O)-、-C(O)NR'-、-C(O)O-、-S(O)₂NR'-、-P(O)R''NR'-、
-S(O)NR'-或-PO₂NR'-，在各情況下其中該C(O)、S或P直接結合於該苯
環，且R'及R''各獨立地為氫、(C₁-C₈)烷基、(C₃-C₈)環烷基、(C₁-C₈)烷氧
基、(C₁-C₈)烷硫基、單或二(C₁-C₈)烷基胺基、(C₃-C₂₀)雜芳基或(C₆-C₂₀)
芳基；

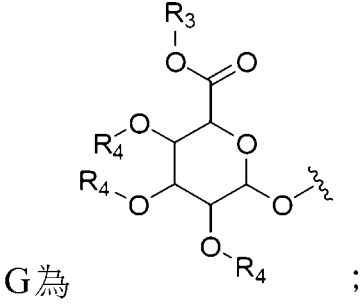
各Z獨立地表示氫、(C₁-C₈)烷基或拉電子基團(諸如醯胺、羧酸、羧
酸酯、鹵素、氰基或硝基)，較佳氫、(C₁-C₈)烷基、鹵素、氰基或硝基，
最佳氫；

n為整數1至3，較佳3；

L表示鍵結於連接子或分支單元之鍵；

R₁及R₂各獨立地為氫、(C₁-C₈)烷基或(C₃-C₈)環烷基，較佳氫，或R₁
及R₂連同其附接之碳原子一起形成(C₃-C₈)環烷基環。

在一些實施例中，糖或糖酸為單醣。在一些實施例中，糖包含：



R₃為氫或羧基保護基；且

各R₄獨立地為氫或羟基保護基。

在一些實施例中，主要或次要連接子具有結構-(CH₂)_r(V(CH₂)_p)_q-、-
((CH₂)_pV)_q-、-(CH₂)_r(V(CH₂)_p)_qY-、-((CH₂)_pV)_q(CH₂)_r-、-
Y(((CH₂)_pV)_q-或-(CH₂)_r(V(CH₂)_p)_qYCH₂-，

其中：

r為整數0至10；

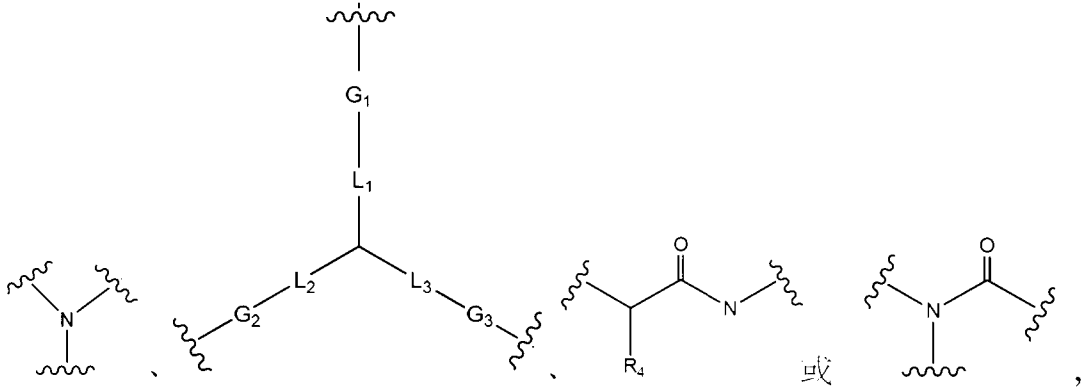
p為整數1至10；

q為整數1至20；

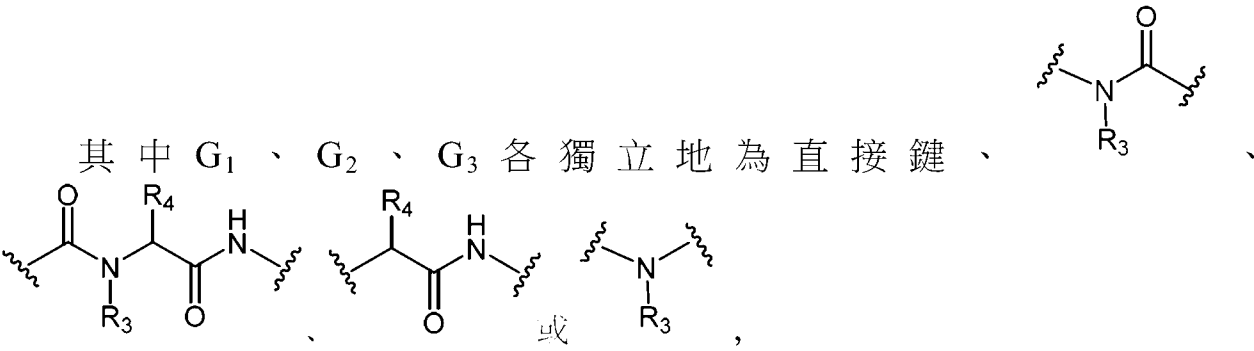
V及Y各獨立地為單一鍵、-O-、-S-、-NR₂₁-、-C(O)NR₂₂-、-NR₂₃C(O)-、-NR₂₄SO₂-或-SO₂NR₂₅-；且

R₂₁至R₂₅各獨立地為氫、(C₁-C₆)烷基、(C₁-C₆)烷基(C₆-C₂₀)芳基或(C₁-C₆)烷基(C₃-C₂₀)雜芳基。

在一些實施例中，至少一個分支單元具有結構



其中L₁、L₂、L₃各獨立地為直接鍵或-C_nH_{2n}-，其中n為整數1至30，

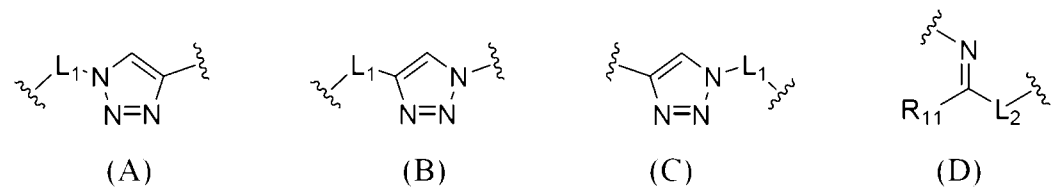


其中R₃為氫或C₁-C₃₀烷基；

其中R₄為氫或-L₄-COOR₅，其中L₄為直接鍵或-C_nH_{2n}-，其中n為整數1至10，且R₅為氫或C₁-C₃₀烷基。

次要連接子(例如將活性劑連接於分支單元)可包含藉由1,3-偶極環加

成反應、雜狄爾斯-阿德反應(hetero-Diels-Alder reaction)、親核取代反應、非醇醛型羰基反應、碳-碳複鍵加成、氧化反應或點擊反應形成之結合單元。結合單元可藉由乙炔與疊氮化物之間的反應，或非醇醛型羰基反應，諸如醛基或酮基與肼或烷氧基胺之間的反應、允許活性劑及/或裂解基團輕度偶合於分支單元之反應來形成。此類結合單元可由式(A)、(B)、(C)或(D)表示。

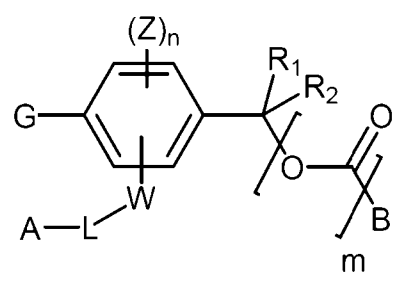


L₁為單一鍵或具有1至30個碳原子，較佳10、11、12、13、14、15或16個碳原子之伸烷基；

R₁₁為氫或具有1至10個碳原子之烷基，較佳甲基；且

L₂為具有1至30個碳原子，較佳10、11、12、13、14、15或16個碳原子之伸烷基。

在一些實施例中，如本文所述之配位體-藥物結合物包含配位體、連接子及活性劑，且具有下式：



其中：

G表示糖、糖酸或經改質之糖；

A表示配位體；

B表示活性劑；

W表示-C(O)-、-C(O)NR'-、-C(O)O-、-S(O)₂NR'-、-P(O)R''NR'-、-S(O)NR'-或-PO₂NR'-，在各情況下其中該C(O)、S或P直接結合於該苯環，且R'及R''各獨立地為氫、(C₁-C₈)烷基、(C₃-C₈)環烷基、(C₁-C₈)烷氧基、(C₁-C₈)烷硫基、單或二(C₁-C₈)烷基胺基、(C₃-C₂₀)雜芳基或(C₆-C₂₀)芳基；

各Z獨立地表示氫、(C₁-C₈)烷基或拉電子基團(諸如醯胺、羧酸、羧酸酯、鹵素、氰基或硝基)，較佳氫、(C₁-C₈)烷基、鹵素、氰基或硝基，最佳氫；

n為整數1至3，較佳3；

m為0或1，較佳1；

L為包含至少一個分支單元(BR)及至少一個主要連接子(PL)之連接子；

R₁及R₂各獨立地為氫、(C₁-C₈)烷基或(C₃-C₈)環烷基，較佳氫，或R₁及R₂連同其附接之碳原子一起形成(C₃-C₈)環烷基環。

在本文揭示之任何實施例中，配位體較佳為抗體。

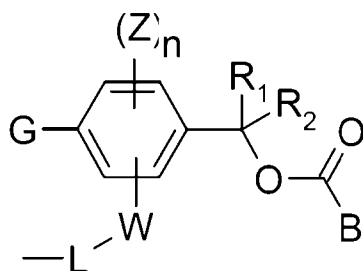
在一些實施例中，本發明係關於一種抗體-藥物結合物，其包含抗體；至少一個共價偶合於抗體之分支連接子；以及至少兩種共價偶合於分支連接子之活性劑。較佳地，至少兩個分支連接子偶合於抗體，且各分支連接子偶合於至少兩種活性劑。三個或甚至四個此類分支連接子可偶合於抗體。在一些實施例中，僅一個分支連接子偶合於抗體。在某些實施例中，各分支連接子偶合於僅兩種活性劑。在一些實施例中，抗體-藥物結合物之所有活性劑均相同。在其他實施例中，抗體-藥物結合物包含至少兩種不同活性劑。在一些此類實施例中，至少一個分支連接子偶合於兩種

不同活性劑。

在一些實施例中，各活性劑藉由可裂解(例如可水解)鍵，諸如經由自消耗基團，例如如以下更詳細描述之裂解基團偶合於分支連接子。

在較佳實施例中，各分支連接子包含分支單元，且各活性劑經由次要連接子偶合於該分支單元且該分支單元藉由主要連接子偶合於抗體。舉例而言，該分支單元可包含例如胺或醯胺之氮原子。在其中分支單元為醯胺之實施例中，主要連接子可包含醯胺之羰基，或次要連接子可包含醯胺之羰基。在某些較佳實施例中，該分支單元為胺。在其他較佳實施例中，該分支單元為離胺酸單元，例如使得次要連接子自 α -氮延伸且另一次要連接子自主鏈氮延伸。

在一些實施例中，一或多個或甚至各活性劑經由具有下式之裂解基團偶合於分支連接子：



其中：

G表示糖或糖酸，較佳葡萄糖醛酸；

B表示活性劑；

W表示拉電子基團，較佳 $-C(O)NR'$ ，其中 $C(O)$ 鍵結於該苯環且 NR' (其可為胺基酸，較佳親水性胺基酸之胺基)鍵結於L；

各Z獨立地表示氫、 (C_1-C_8) 烷基或拉電子基團(諸如醯胺、羧酸、羧酸酯、鹵素、氰基或硝基)，較佳氫、 (C_1-C_8) 烷基、鹵素、氰基或硝基，最佳氫；n為整數1至3；

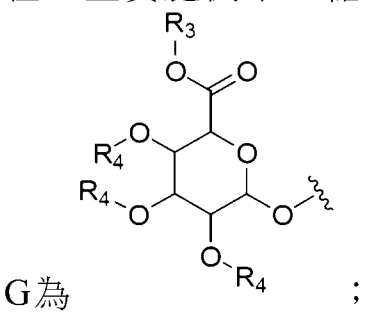
L表示與抗體之連接；

R₁及R₂各獨立地為氫、(C₁-C₈)烷基,或(C₃-C₈)環烷基，較佳氫，或R₁及R₂連同其附接之碳原子一起形成(C₃-C₈)環烷基環。

替代裂解基團包括纈胺酸-瓜胺酸-對胺基苯甲基胺基甲酸酯(VC-PABC)。

在一些實施例中，W為-C(O)-、-C(O)NR'-、-C(O)O-、-S(O)₂NR'-、-P(O)R''NR'-、-S(O)NR'-或-PO₂NR'-，在各情況下其中該C(O)、S或P較佳直接結合於該苯環，且R'及R''各獨立地為氫、(C₁-C₈)烷基、(C₃-C₈)環烷基、(C₁-C₈)烷氧基、(C₁-C₈)烷硫基、單或二(C₁-C₈)烷基胺基、(C₃-C₂₀)雜芳基或(C₆-C₂₀)芳基。在某些較佳實施例中，W表示-C(O)NR'-，且W之氮為胺基酸，較佳親水性胺基酸之氮。在一些實施例中，W為-C(O)NR'-，其中C(O)鍵結於該苯環且NR'鍵結於L。

在一些實施例中，糖或糖酸為單醣。在一些實施例中，糖包含：



R₃為氫或羧基保護基；且

各R₄獨立地為氫或經基保護基。

在一些此類實施例中，R₃為氫且各R₄為氫。

在一些實施例中，各Z表示氫且n為3。

在某些較佳實施例中：

G為葡糖醛酸；

W為-C(O)NR'-，其中C(O)鍵結於該苯環且NR'鍵結於L；

Z表示氫；

n為3；且

R₁及R₂各表示氫。

在本發明之一些實施例中，抗體-藥物結合物之主要連接子包含具有1至100個碳原子，較佳1-50個碳原子之伸烷基，且：

伸烷基包括至少一個不飽和鍵；

伸烷基包括至少一個伸雜芳基；

伸烷基之碳原子經一或多個選自氮(N)、氧(O)及硫(S)之雜原子置換；或

伸烷基進一步經一或多個具有1至20個碳原子之烷基取代。

在一些此類實施例中，伸烷基之至少一個碳原子經氮置換，主要連接子包含親水性胺基酸之至少兩個原子，且氮與親水性胺基酸之主鏈羰基形成肽鍵。親水性胺基酸可為例如精胺酸、天冬胺酸、天冬醯胺、麩胺酸、麩醯胺酸、組胺酸、離胺酸、鳥胺酸、脯胺酸、絲胺酸或蘇胺酸。

在一些實施例中，抗體-藥物結合物之分支連接子包含側鏈具有在水溶液中在中性pH下載有電荷之部分的胺基酸，較佳精胺酸、天冬胺酸、麩胺酸、離胺酸或鳥胺酸。此胺基酸可存在於分支連接子中任何地方。舉例而言，其可將分支連接子之胍共價連接於分支連接子之聚乙二醇單元。或者或另外，此類胺基酸可存在於次要連接子，視情況各次要連接子中。

在某些較佳實施例中，抗體-藥物結合物之分支連接子藉由硫醚鍵共價結合於抗體，且硫醚鍵包含抗體之半胱胺酸，最佳C端半胱胺酸之硫原子，其可為類異戊二烯轉移酶所識別之胺基酸模體的一部分。

舉例而言，胺基酸模體可為選自CXX、CXC、XCXC、XXCC及CYYX之序列；

C表示半胱胺酸；

Y每次出現時均獨立地表示脂族胺基酸；

X每次出現時均獨立地表示麩醯胺酸、麩胺酸、絲胺酸、半胱胺酸、甲硫胺酸、丙胺酸或白胺酸；且

硫醚鍵包含胺基酸模體之半胱胺酸之硫原子。

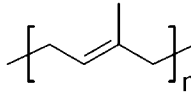
在一些實施例中，胺基酸模體為：

序列CYYX；且

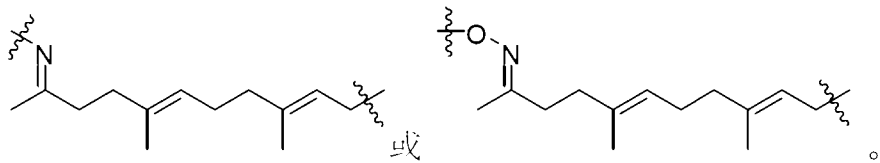
Y每次出現時均獨立地表示丙胺酸、異白胺酸、白胺酸、甲硫胺酸或纈胺酸。

在某些較佳實施例中，胺基酸模體為序列CVIM或CVLL。

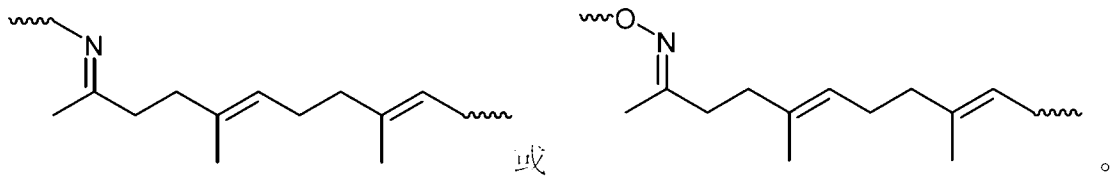
在一些實施例中，在胺基酸模體前之七個胺基酸中之至少一者為甘胺酸。在一些實施例中，在胺基酸模體前之七個胺基酸中之至少三者各獨立地選自甘胺酸及脯胺酸。在一些實施例中，緊靠在胺基酸模體前之一至十個胺基酸為甘胺酸。在某些較佳實施例中，緊靠在胺基酸模體前之至少一個、兩個、三個、四個、五個、六個、七個、八個、九個或十個胺基酸為甘胺酸，最佳至少五個。在某些較佳實施例中，緊靠在胺基酸模體前之至少一個、兩個、三個、四個、五個、六個、七個、八個、九個或十個胺基酸各為甘胺酸。在一些實施例中，抗體C端包含胺基酸序列GGGGGGGCVIM。

在一些實施例中，上述硫醚鍵包含至少一個由  表示之異戊二烯基單元之碳原子。在較佳實施例中，n為1或2，最佳2。

在本發明之一些實施例中，分支連接子包含脗，且至少一個異戊二烯基單元將脗共價連接於抗體。在一些實施例中，分支連接子包含：



在一些實施例中，連接子可包含



在本發明之一些實施例中，主要連接子及/或次要連接子(較佳各次要連接子)包含至少一個由 $\text{[OCH}_2\text{CH}_2\text{]}_n$ 或 $\text{[OCH}_2\text{CH}_2\text{]}_n$ 表示之聚乙二醇單元。聚乙二醇單元可包含1至19個 $\text{-OCH}_2\text{CH}_2\text{-}$ 單元，較佳4至20個 $\text{-OCH}_2\text{CH}_2\text{-}$ 單元。在一些較佳實施例中，連接子可包含1至20個 $\text{-OCH}_2\text{CH}_2\text{-}$ 單元。在某些較佳實施例中，連接子可包含1至12個 $\text{-OCH}_2\text{CH}_2\text{-}$ 單元。在其他較佳實施例中，連接子可包含3至12個 $\text{-OCH}_2\text{CH}_2\text{-}$ 單元。在一些實施例中，連接子包含脗，且至少一個聚乙二醇單元將脗共價連接於肽。

在本發明之一些實施例中，主要連接子、次要連接子(較佳各次要連接子)或兩者包含由 $\text{-(CH}_2\text{)}_r\text{(V(CH}_2\text{)}_p\text{)}_q\text{-}$ 表示之連接單元，其中：

r為整數1至10，較佳2；

p為整數0至12，較佳2；

q為整數1至20；

V為單一鍵、 -O- 、 -S- 、 $\text{-NR}_{21}\text{-}$ 、 $\text{-C(O)NR}_{22}\text{-}$ 、 $\text{-NR}_{23}\text{C(O)-}$ 、 $\text{-NR}_{24}\text{SO}_2\text{-}$ 或 $\text{-SO}_2\text{NR}_{25}\text{-}$ ，較佳 -O- ；且

R_{21} 至 R_{25} 各獨立地為氫、 (C_1-C_6) 烷基、 (C_1-C_6) 烷基 (C_6-C_{20}) 芳基或 (C_1-C_6) 烷基 (C_3-C_{20}) 雜芳基。

在一些實施例中，主要連接子、次要連接子(較佳各次要連接子)或兩者包含由 $-(CH_2)_r(V(CH_2)_p)_q-$ 、 $-((CH_2)_pV)_q-$ 、 $-(CH_2)_r(V(CH_2)_p)_qY-$ 、 $-((CH_2)_pV)_q(CH_2)_r-$ 、 $-Y(((CH_2)_pV)_q-$ 或 $-(CH_2)_r(V(CH_2)_p)_qYCH_2-$ 表示之連接單元，

其中：

r 為整數0至10；

p 為整數1至10；

q 為整數1至20；

V 及 Y 各獨立地為單一鍵、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NR_{21}-$ 、 $-C(O)NR_{22}-$ 、 $-NR_{23}C(O)-$ 、 $-NR_{24}SO_2-$ 或 $-SO_2NR_{25}-$ ；且

R_{21} 至 R_{25} 各獨立地為氫、 (C_1-C_6) 烷基、 (C_1-C_6) 烷基 (C_6-C_{20}) 芳基或 (C_1-C_6) 烷基 (C_3-C_{20}) 雜芳基。

在此等連接子之一些實施例中， q 為整數4至20。在此等連接子之一些實施例中， q 為整數6至20。在某些較佳實施例中， q 為整數1至10。在其他較佳實施例中， q 為2、5或11。

在此等連接子之一些實施例中， r 較佳為2。在此等連接子之一些實施例中， p 較佳為2。在一些實施例中， V 及 Y 各獨立地為 $-O-$ 。

在此等連接子之一些實施例中：

r 為2；

p 為2；

q 為2、5或11，且

V為-O-。

在本發明之一些實施例中，主要連接子、次要連接子(較佳各次要連接子)或兩者包含由-(CH₂CH₂X)_w-表示之連接單元，其中：

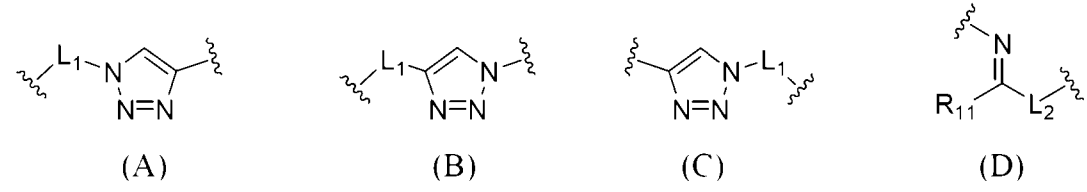
X表示-O-、(C₁-C₈)伸烷基或-NR₂₁-，較佳-O-；

R₂₁表示氫、(C₁-C₆)烷基、(C₁-C₆)烷基(C₆-C₂₀)芳基或(C₁-C₆)烷基(C₃-C₂₀)雜芳基，較佳氫；且

w為整數1至12，較佳1、3、6或12。

在一些實施例中，X為-O-且w為整數6至12。

在本發明之一些實施例中，主要連接子包含藉由1,3-偶極環加成反應、雜狄爾斯-阿德反應、親核取代反應、非醇醛型羰基反應、碳-碳複鍵加成、氧化反應或點擊反應形成之結合單元。在一些實施例中，結合單元藉由乙炔與疊氮化物之間的反應，或醛基或酮基與肼或烷氧基胺之間的反應來形成。在一些實施例中，結合單元由式A、B、C或D中之任一者，較佳D表示：



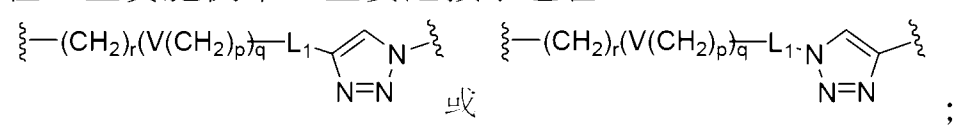
其中：

L₁為單一鍵或具有1至30個碳原子，較佳12個碳原子之伸烷基；

R₁₁為氫或具有1至10個碳原子之烷基，較佳甲基；且

L₂為具有1至30個碳原子，較佳11個碳原子之伸烷基。

在一些實施例中，主要連接子包含



V 為單一鍵、-O-、-S-、-NR₂₁-、-C(O)NR₂₂-、-NR₂₃C(O)-、-NR₂₄SO₂-或-SO₂NR₂₅-，較佳-O-；

R₂₁至R₂₅各獨立地為氫、(C₁-C₆)烷基、(C₁-C₆)烷基(C₆-C₂₀)芳基或(C₁-C₆)烷基(C₃-C₂₀)雜芳基；

r為整數1至10，較佳2或3；

p為整數0至10，較佳1或2；

q為整數1至20，較佳1至6；且

L₁為單一鍵。

在本發明之一些實施例中，分支連接子包含O取代之脞；其中

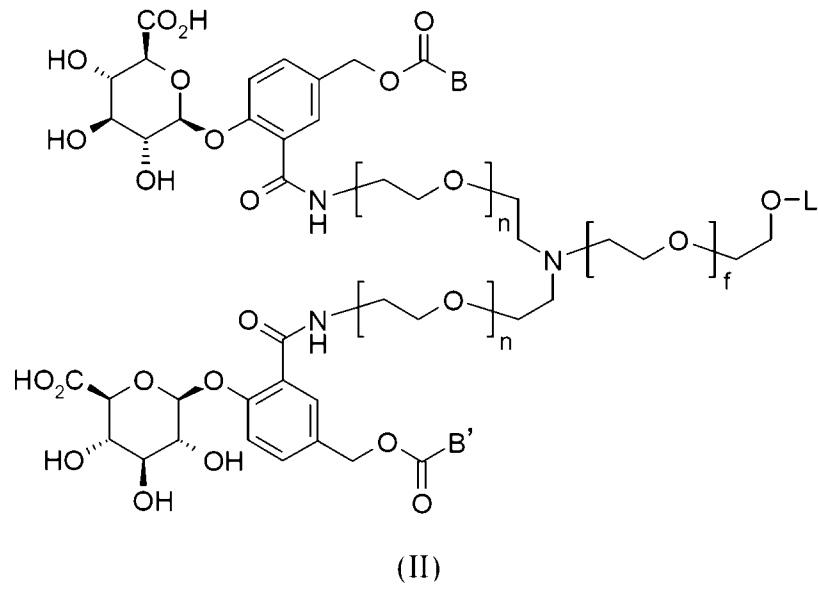
a)脞之氧原子經例如經由分支單元將脞共價連接於活性劑之基團取代；且

脞之碳原子經將脞共價連接於抗體之基團取代；或

b)脞之氧原子經將脞共價連接於抗體之基團取代；以及

脞之碳原子經例如經由分支單元將脞共價連接於活性劑之基團取代。

在一些實施例中，抗體-藥物結合物包含式II之結構：



其中：

B及B'表示活性劑，其可相同或不同；

n每次出現時均獨立地表示整數0至30；

f每次出現時均獨立地表示整數0至30；且

L表示與抗體之連接。

在一些實施例中，n為整數1至10。在一些實施例中，n為整數4至20。在一些實施例中，f為整數1至10。在一些實施例中，f為整數4至20。較佳地，n及f經選擇，使得 $n + f$ 小於20，例如小於15。在一些實施例中，連接子包含脞，且至少一個聚乙二醇單元將脞共價連接於活性劑。

在本發明之一些實施例中，抗體為單株抗體、多株抗體、抗體片段、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv、單鏈Fv (「scFv」)、雙功能抗體、線抗體、雙特異性抗體、多特異性抗體、嵌合抗體、人類化抗體、人類抗體或包含抗體之抗原結合部分的融合蛋白。

在本發明之一些實施例中，抗體選自莫羅單抗-CD3阿昔單抗(muromonab-CD3 abciximab)、利妥昔單抗(rituximab)、達利珠單抗(daclizumab)、帕利珠單抗(palivizumab)、英利昔單抗(infliximab)、曲妥珠單抗(trastuzumab)、依那西普(etanercept)、巴利昔單抗(basiliximab)、吉妥珠單抗(gemtuzumab)、阿倫單抗(alemtuzumab)、替伊莫單抗(ibritumomab)、阿達木單抗(adalimumab)、阿法賽特(alefacept)、奧馬珠單抗(omalizumab)、艾法珠單抗(efalizumab)、托西莫單抗(tositumomab)、西妥昔單抗(cetuximab)、ABT-806、貝伐單抗(bevacizumab)、那他珠單抗(natalizumab)、蘭比珠單抗(ranibizumab)、帕尼單抗(panitumumab)、艾庫組單抗(eculizumab)、利納西普

(rilonacept)、賽妥珠單抗(certolizumab)、羅米司亭(romiplostim)、AMG-531、戈利木單抗(golimumab)、優特克單抗(ustekinumab)、ABT-874、貝拉西普(belatacept)、貝利單抗(belimumab)、阿塞西普(atacicept)、抗CD20抗體、康納單抗(canakinumab)、托西利單抗(tocilizumab)、阿利珠單抗(atlizumab)、美泊利單抗(mepolizumab)、帕妥珠單抗(pertuzumab)、HuMax CD20、曲美單抗(tremelimumab)、替西單抗(ticilimumab)、伊派利單抗(ipilimumab)、IDEC-114、伊諾妥珠單抗(inotuzumab)、HuMax EGFR、阿柏西普(aflibercept)、HuMax-CD4、替利珠單抗(teplizumab)、奧昔珠單抗(otelixizumab)、卡托莫西單抗(catumaxomab)、抗EpCAM抗體IGN101、阿德卡單抗(adecatumomab)、奧戈伏單抗(oregovomab)、迪奴圖單抗(dinutuximab)、吉瑞昔單抗(girentuximab)、德諾單抗(denosumab)、貝頻珠單抗(bapineuzumab)、莫維珠單抗(motavizumab)、依夫單抗(efumgumab)、瑞昔單抗(raxibacumab)、LY2469298及維托珠單抗(veltuzumab)。

在本發明之一些實施例中，活性劑獨立地選自化學治療劑及毒素。

在本發明之一些實施例中，活性劑獨立地選自：

(a) 埃羅替尼(erlotinib)、硼替佐米(bortezomib)、氟維司群(fulvestrant)、舒癌特(sutent)、來曲唑(letrozole)、甲磺酸伊馬替尼(imatinib mesylate)、PTK787/ZK 222584、奧沙利鉑(oxaliplatin)、5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)、甲醯四氫葉酸(leucovorin)、雷帕黴素(rapamycin)、拉帕替尼(lapatinib)、洛那法尼(lonafarnib)、索拉非尼(sorafenib)、吉非替尼(gefitinib)、AG1478、AG1571、噻替派(thiotepa)、環磷醯胺(cyclophosphamide)、白消安(busulfan)、英丙舒凡

(improsulfan)、哌泊舒凡(piposulfan)、苯唑多巴(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、米特多巴(meturedopa)、尤利多巴(uredopa)、伸乙基亞胺、六甲蜜胺(altretamine)、三伸乙基三聚氰胺、三伸乙基磷醯胺、三伸乙基硫代磷醯胺、三羥甲基蜜胺(trimethylolomelamine)、布拉他辛(bullatacin)、布拉他辛酮(bullatacinone)、喜樹鹼(camptothecin)、喜樹鹼衍生物及代謝物(SN-38)、拓朴替康(topotecan)、苔蘚蟲素(bryostatin)、海綿抑素(callystatin)、CC-1065、阿多來新(adozelesin)、卡折來新(carzelesin)、比折來新(bizelesin)、念珠藻素1、念珠藻素8、海兔毒素(dolastatin)、倍癌黴素(duocarmycin)、KW-2189、CB1-TM1、艾榴塞洛素(eleutherobin)、水鬼蕉鹼(pancratistatin)、沙考地汀(sarcodictyin)、海綿抑素(spongistatin)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、氯磷醯胺(cholophosphamide)、雌氮芥(estramustine)、異環磷醯胺(ifosfamide)、甲氮芥(mechlorethamine)、美法侖(melphalan)、新恩比興(novembichin)、芬司特瑞(phenesterine)、潑尼氮芥(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard)、卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)、雷莫司汀(ranimustine)、卡奇黴素(calicheamicin)、卡奇黴素 γ 1(calicheamicin gamma 1)、卡奇黴素 Ω 1(calicheamicin omega 1)、達內黴素(dynemicin)、達內黴素A、氯屈膦酸鹽(clodronate)、埃斯培拉黴素(esperamicin)、新抑癌蛋白發色團(neocarzinostatin chromophore)、阿克拉黴素(aclacinomysins)、放射菌素(actinomycin)、安甦黴素(antrmycin)、偶氮絲胺酸(azaserine)、博來黴素(bleomycin)、放線菌素

C(cactinomycin)、卡拉比辛(carabycin)、洋紅黴素(carninomycin)、嗜癌菌素(carzinophilin)、色黴素(chromomycins)、放線菌素D(dactinomycin)、道諾黴素(daunorubicin)、德托黴素(detorubicin)、6-重氮基-5-側氧基-L-正白胺酸、小紅莓(doxorubicin)、嗎啉基-小紅莓、氰基嗎啉基-小紅莓、2-吡咯嗪基-小紅莓、脂質體小紅莓(liposomal doxorubicin)、去氧小紅莓(deoxydoxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、麻西羅黴素(marcellomycin)、絲裂黴素C(mitomycin C)、黴酚酸(mycophenolic acid)、諾加黴素(nogalamycin)、橄欖黴素(olivomycins)、培洛黴素(peplomycin)、潑非黴素(potfiromycin)、嘌呤黴素(puromycin)、奎那黴素(quelamycin)、羅多比星(rodorubicin)、鏈黴素(streptomigrin)、鏈脲菌素(streptozocin)、殺結核菌素(tubercidin)、烏苯美司(ubenimex)、淨司他丁(zinostatin)、左柔比星(zorubicin)、5-氟尿嘧啶、迪諾特寧(denopterin)、甲胺喋呤(methotrexate)、蝶羅呤(pteropterin)、曲美沙特(trimetrexate)、氟達拉賓(fludarabine)、6-巰基嘌呤(6-mercaptopurine)、硫米嘌呤(thiamiprine)、硫鳥嘌呤(thiguanine)、安西他濱(ancitabine)、阿紫胞苷(azacitidine)、6-氮尿苷(6-azauridine)、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、雙去氧尿苷(dideoxyuridine)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依諾他濱(enocitabine)、氟尿苷(floxuridine)、卡魯甾酮(calusterone)、屈他雄酮丙酸鹽(dromostanolone propionate)、環硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)、甾內酯(testolactone)、胺魯米特(aminogluthimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane)、亞葉酸(folinic acid)、乙醯葡萄糖醛酯(aceglatone)、醛磷醯胺糖苷(aldophosphamide glycoside)、胺基乙

醯丙酸 (aminolevulinic acid)、恩尿嘧啶 (eniluracil)、安吡啶 (amsacrine)、貝塔布辛 (bestrabucil)、比生群 (bisantrene)、艾達曲克 (edatraxate)、得弗伐胺 (defofamine)、秋水仙胺 (demecolcine)、地吡醌 (diaziquone)、艾弗鳥胺酸 (elfornithine)、依利醋鉍 (elliptinium acetate)、依託格魯 (etoglucid)、硝酸鎂 (gallium nitrate)、羥基脲 (hydroxyurea)、蘑菇多醣 (lentinan)、氯尼達明 (lonidainine)、美登素 (maytansine)、安絲菌素 (ansamitocins)、丙脒脞 (mitoguazone)、米托蒽醌 (mitoxantrone)、莫比達摩 (mopidanmol)、二胺硝吡啶 (nitraerine)、噴司他丁 (pentostatin)、蛋胺氮芥 (phenamet)、吡柔比星 (pirarubicin)、洛索蒽醌 (losoxantrone)、2-乙基醯肼 (2-ethylhydrazide)、丙卡巴肼 (procarbazine)、多醣-k (polysaccharide-k)、雷佐生 (razoxane)、根瘤菌素 (rhizoxin)、西索菲蘭 (sizofiran)、螺旋鍺 (spirogermanium)、細交鏈孢菌酮酸 (tenuazonic acid)、三亞胺醌 (triaziquone)、2,2',2''-三氯三乙胺、T-2 毒素、弗納庫林 A (verracurin A)、桿孢菌素 A (roridin A) 及胺癸叮 (anguidine)、胺基甲酸酯 (urethane)、長春地辛 (vindesine)、達卡巴嗪 (dacarbazine)、甘露氮芥 (mannomustine)、二溴甘露醇 (mitobronitol)、二溴衛矛醇 (mitolactol)、哌泊溴烷 (pipobroman)、加西托星 (gacytosine)、阿拉伯糖苷 (arabinoside)、環磷醯胺、噻替派、太平洋紫杉醇 (paclitaxel)、太平洋紫杉醇經白蛋白工程改造之奈米粒子調配物、多西他賽 (doxetaxel)、苯丁酸氮芥、吉西他濱 (gemcitabine)、6-硫代鳥嘌呤、巯基嘌呤、順鉑 (cisplatin)、卡鉑 (carboplatin)、長春鹼 (vinblastine)、鉑、依託泊苷 (etoposide)、異環磷醯胺 (ifosfamide)、米托蒽醌 (mitoxantrone)、長春新鹼 (vincristine)、長春瑞賓 (vinorelbine)、諾

凡特龍(novantrone)、替尼泊苷(teniposide)、依達曲沙(edatrexate)、道諾黴素、胺基喋呤(aminopterin)、希羅達(xeloda)、伊班膦酸鹽(ibandronate)、CPT-11、拓撲異構酶抑制劑RFS 2000、二氟甲基鳥胺酸(difluoromethylornithine)、視黃酸、卡培他濱(capecitabine)或前述任一者之醫藥學上可接受之鹽、溶劑合物或酸；

(b)單核因子(monokine)、淋巴因子(lymphokine)、傳統多肽激素、副甲狀腺激素(parathyroid hormone)、甲狀腺素(thyroxine)、鬆弛素(relaxin)、鬆弛素原(prorelaxin)、醣蛋白激素、促卵泡激素(follicle stimulating hormone)、促甲狀腺激素(thyroid stimulating hormone)、促黃體激素(luteinizing hormone)、肝生長因子纖維母細胞生長因子、促乳素(prolactin)、胎盤催乳激素(placental lactogen)、腫瘤壞死因子- α 、腫瘤壞死因子- β 、苗勒氏管抑制物質(mullerian-inhibiting substance)、小鼠促性腺激素相關肽、抑制素、活化素、血管內皮生長因子、血小板生成素、紅血球生成素、骨誘導因子、干擾素、干擾素- α 、干擾素- β 、干擾素- γ 、群落刺激因子(「CSF」)、巨噬細胞-CSF、顆粒細胞-巨噬細胞-CSF、顆粒細胞-CSF、介白素(「IL」)、IL-1、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、腫瘤壞死因子、TNF- α 、TNF- β 、多肽因子、LIF、kit配位體或前述任一者之組合；

(c)白喉毒素(diphtheria toxin)、肉毒桿菌毒素(botulium toxin)、破傷風毒素(tetanus toxin)、痢疾毒素、霍亂毒素、瓢菌素(amanitin)、瓢菌素衍生物、 α -瓢菌素、吡咯并苯并二氮吡(pyrrolobenzodiazepine)、吡咯并苯并二氮吡衍生物、河豚毒素鹼(tetrodotoxin)、短裸甲藻毒素(brevetoxin)、雪卡毒素(ciguatoxin)、蓖麻毒素、AM毒素、妥布賴森

(tubulysin)、格爾德黴素(geldanamycin)、類美登素(maytansinoid)、卡奇黴素、道諾黴素、小紅莓、甲胺喋呤、長春地辛、SG2285、海兔毒素、海兔毒素類似物、阿瑞他汀、念珠藻素(cryptophycin)、喜樹鹼、喜樹鹼衍生物及代謝物(SN-38)、根瘤菌素、根瘤菌素衍生物、CC-1065、CC-1065類似物或衍生物、倍癌黴素、烯二炔抗生素、埃斯培拉黴素、埃坡黴素(epothilone)、阿那非德(azonafide)、阿匹立定(aplidine)、類毒素或前述任一者之組合；

(d)親和配位體，其中該親和配位體為受質、抑制劑、刺激劑、神經傳導物、放射性同位素或前述任一者之組合；

(e)放射性標記、 ^{32}P 、 ^{35}S 、螢光染料、電子緻密試劑、酶、生物素、抗生蛋白鏈菌素、地高辛、半抗原、免疫原性蛋白質、具有與標靶互補之序列的核酸分子或前述任一者之組合；

(f)免疫調節化合物、抗癌劑、抗病毒劑、抗細菌劑、抗真菌劑及抗寄生蟲劑或前述任一者之組合；

(g)他莫昔芬(tamoxifen)、雷洛昔芬(raloxifene)、曲洛昔芬(droloxifene)、4-羥基他莫昔芬、曲沃昔芬(trioxifene)、克肱昔芬(keoxifene)、LY117018、奧那司酮(onapristone)或托瑞米芬(toremifene)；

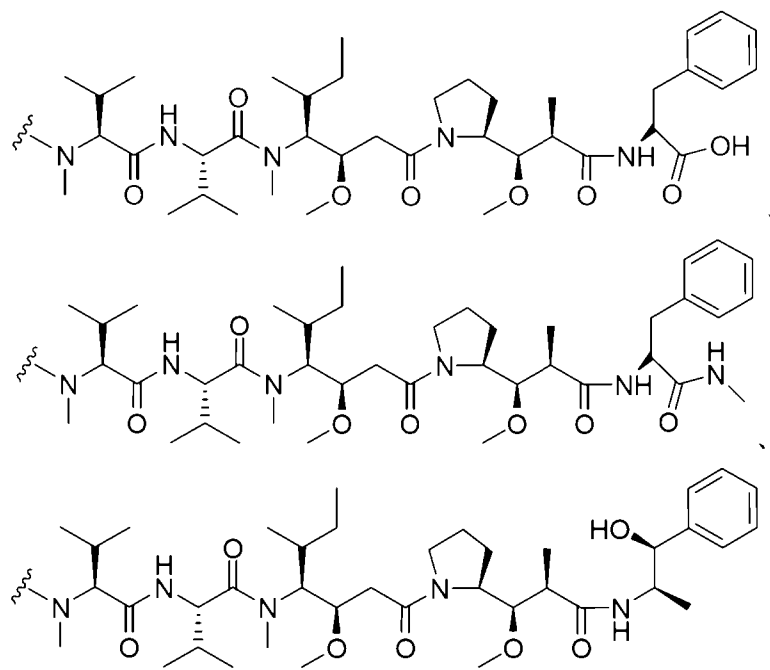
(h)4(5)-咪唑、胺魯米特、乙酸甲地孕酮(megestrol acetate)、依西美坦(exemestane)、來曲唑或阿那曲唑(anastrozole)；

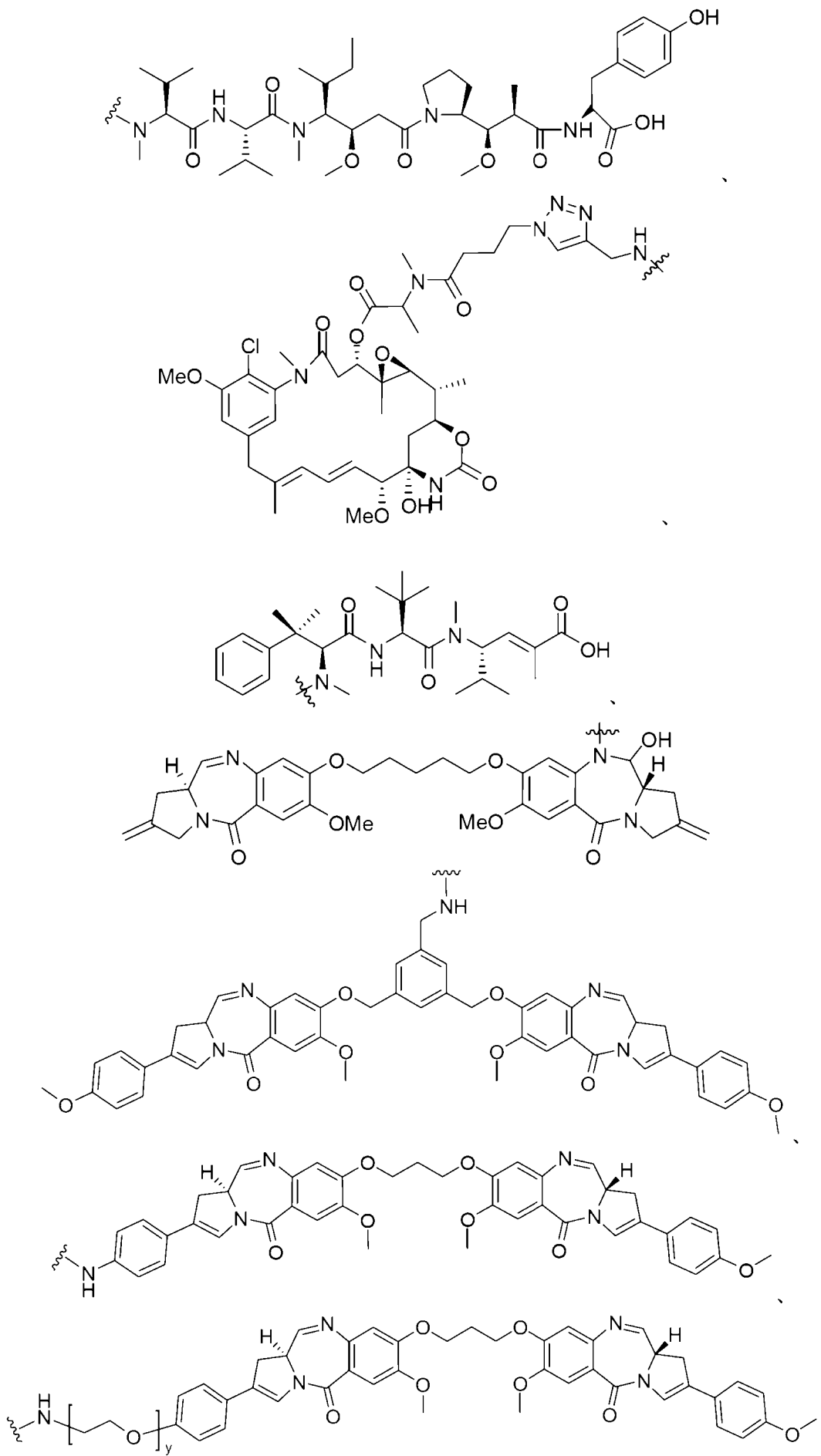
(i)氟他胺(flutamide)、尼魯胺(nilutamide)、比卡魯胺(bicalutamide)、亮丙立德(leuprolide)、戈舍瑞林(goserelin)或曲沙他濱(troxacitabine)；

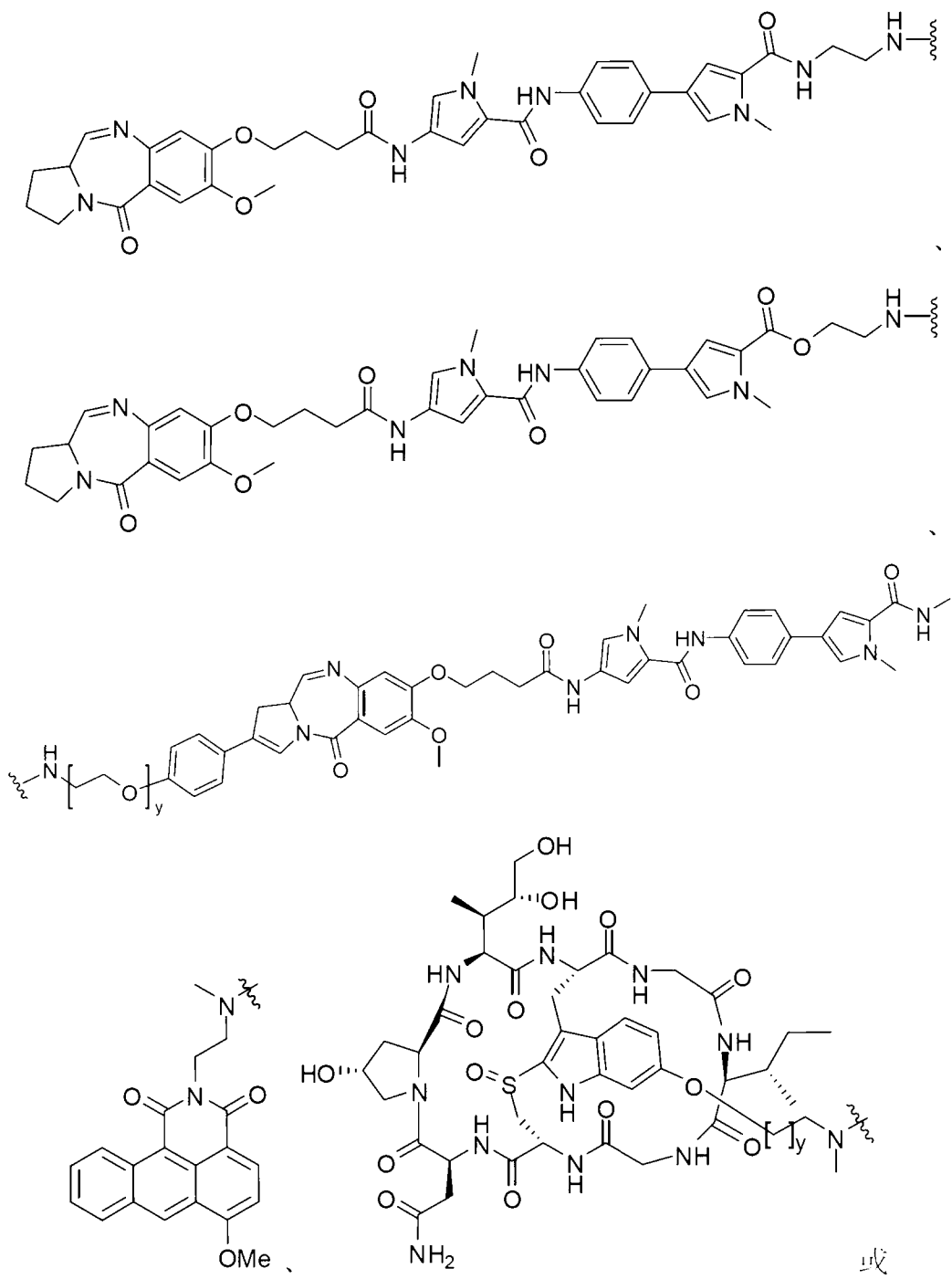
- (j) 芳香酶抑制劑；
- (k) 蛋白激酶抑制劑；
- (l) 脂質激酶抑制劑；
- (m) 反義寡核苷酸；
- (n) 核糖核酸酶；
- (o) 疫苗；以及
- (p) 抗血管生成劑。

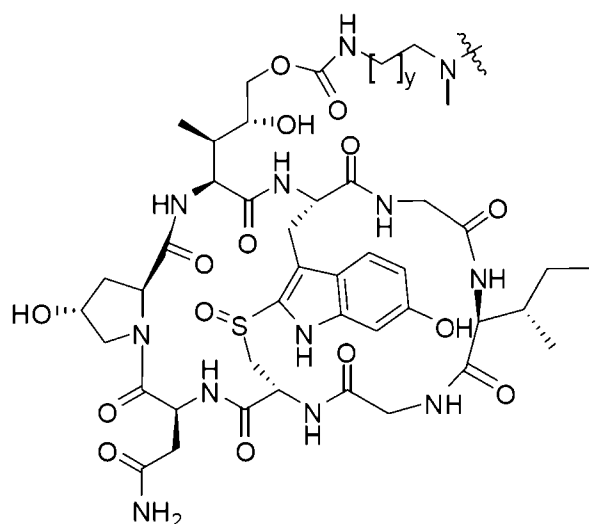
在本發明之一些實施例中，活性劑為瓢菌素、阿瑞他汀、卡奇黴素、喜樹鹼、喜樹鹼衍生物及代謝物(SN-38)、念珠藻素、道諾黴素、海兔毒素、小紅莓、倍癌黴素、埃坡黴素、埃斯培拉黴素、格爾德黴素、類美登素、甲胺喋呤、單甲基阿瑞他汀E (「MMAE」)、單甲基阿瑞他汀F (「MMAF」)、吡咯并苯并二氮呋、根瘤菌素、SG2285、妥布賴森、長春地辛、類毒素或以上任一者之衍生物。在一些實施例中，活性劑為瓢菌素、MMAE或MMAF，或以上任一者之衍生物。

在本發明之一些實施例中，該活性劑為：









其中 y 為整數1至10。

相關抗體-藥物結合物之結構及組分揭示於以全文引用之方式併入本文中之PCT/KR2015/005299中，尤其關於抗體-藥物結合物之化學式及通用結構、其組成部分(例如連接子、裂解基團等)以及如其中所揭示之其製備及用途。在某些較佳實施例中，本發明之各種結合物及其他態樣特別排除PCT/KR2015/005299中揭示之各種結構及方法。

在一些實施例中，本發明提供一種醫藥組合物，其包含如本文所描述之抗體-藥物結合物。醫藥組合物可進一步包含治療有效量之化學治療劑。在一些實施例中，本發明提供一種治療個體之癌症之方法，其包含向該個體投與此類醫藥組合物。在一些實施例中，個體為哺乳動物，例如選自嚙齒動物、兔類動物、貓科動物、犬科動物、豬科動物、綿羊科動物、牛類動物、馬科動物及靈長類動物。在一些實施例中，個體較佳為人類。

在一些實施例中，本發明提供一種用於製備如本文所描述之抗體-藥物結合物的方法，其包含使生物分子與前藥反應，其中：

生物分子包含抗體及酮或醛；

前藥包含烷氧基胺；且

反應產生肟，因此將抗體共價連接於前藥。

在一些實施例中，該方法進一步包含將抗體異戊二烯化，因此產生生物分子，其中：

抗體包含異戊二烯化序列；

將抗體異戊二烯化包含將抗體與類異戊二烯轉移酶及類異戊二烯轉移酶受質一起培育；且

受質包含酮或醛。

在一些實施例中，類異戊二烯轉移酶為法呢基轉移酶或四異戊二烯基轉移酶。

在一些實施例中，本發明提供一種用於製備如本文所描述之配位體-藥物結合物的方法，其包含將配位體異戊二烯化，其中配位體包含由類異戊二烯轉移酶識別之胺基酸模體；將配位體異戊二烯化包含將配位體與類異戊二烯轉移酶及類異戊二烯轉移酶受質一起培育；且受質包含活性劑。

在一些實施例中，本發明提供一種製備如本文所描述之配位體-藥物結合物的方法，其包含將配位體異戊二烯化，其中配位體包含由類異戊二烯轉移酶識別之胺基酸模體；將配位體異戊二烯化包含將配位體與類異戊二烯轉移酶及類異戊二烯轉移酶受質一起培育；且受質包含活性劑。

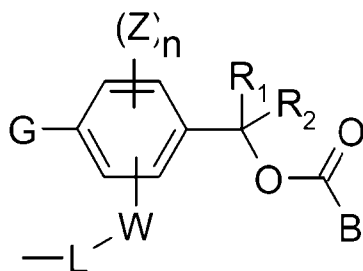
在其他實施例中，本發明係關於一種抗體-藥物結合物，其包含抗體；至少一個共價偶合於抗體之分支連接子，該分支連接子包含藉由主要連接子共價偶合於抗體之分支單元；藉由第一分支共價偶合於分支單元之活性劑；以及包含共價偶合於分支單元之聚乙二醇部分之第二分支。較佳地，至少兩個分支連接子偶合於抗體，各分支連接子偶合於僅一種活性劑。三個或甚至四個此類分支連接子可偶合於抗體。在一些此類實施例中，至少兩種不同活性劑偶合於不同分支連接子。在一些實施例中，僅一

個分支連接子偶合於抗體。在某些較佳實施例中，各分支連接子偶合於僅一種活性劑。

在一些實施例中，活性劑藉由可裂解(例如可水解)鍵，諸如經由自消耗基團，例如如以下更詳細描述之裂解基團，偶合於第一分支。

在一些實施例中，分支單元可包含例如胺或醯胺之氮原子。在某些較佳實施例中，分支單元為胺。在其中分支單元為醯胺之實施例中，主要連接子可包含醯胺之羰基。在一些實施例中，其中分支單元為醯胺且第一分支或第二分支可包含醯胺之羰基。在其他較佳實施例中，分支單元為離胺酸單元。

在一些實施例中，一或多種或甚至每種活性劑經由具有下式之裂解基團偶合於第一分支：



其中：

G表示糖或糖酸，較佳葡萄糖醛酸；

B表示活性劑；

W表示拉電子基團，較佳-C(O)NR'-，其中C(O)鍵結於該苯環且NR' (其可為胺基酸，較佳親水性胺基酸之胺基)鍵結於L；

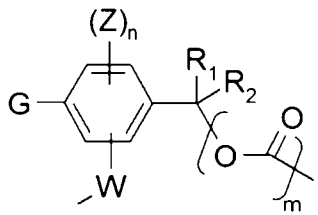
各Z獨立地表示氫、(C₁-C₈)烷基或拉電子基團(諸如醯胺、羧酸、羧酸酯、鹵素、氰基或硝基)，較佳氫、(C₁-C₈)烷基、鹵素、氰基或硝基，最佳氫；

n為整數1至3；

L表示與抗體之連接；

R₁及R₂各獨立地為氫、(C₁-C₈)烷基或(C₃-C₈)環烷基，較佳氫，或R₁及R₂連同其附接之碳原子一起形成(C₃-C₈)環烷基環。

在一些實施例中，活性劑經由具有下式之裂解基團偶合於第一分支：



其中：

G表示糖、糖酸或經改質之糖，較佳糖或糖酸，最佳葡萄糖醛酸；

W表示-C(O)-、-C(O)NR'-、-C(O)O-、-S(O)₂NR'-、-P(O)R''NR'-、-S(O)NR'-或-PO₂NR'-，在各情況下其中該C(O)、S或P較佳直接結合於該苯環，且R'及R''各獨立地為氫、(C₁-C₈)烷基、單或二羧基(C₁-C₈)烷基、(C₃-C₈)環烷基、(C₁-C₈)烷氧基、(C₁-C₈)烷硫基、單或二(C₁-C₈)烷基胺基、(C₃-C₂₀)雜芳基或(C₆-C₂₀)芳基且W直接或間接偶合於該分支單元；

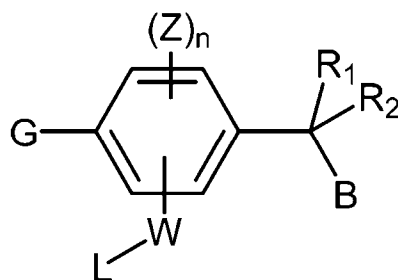
各Z獨立地表示氫、(C₁-C₈)烷基或拉電子基團(諸如醯胺、羧酸、羧酸酯、鹵素、氰基或硝基)，較佳氫、(C₁-C₈)烷基、鹵素、氰基或硝基，最佳氫；

n為整數1至3；

m為0或1，較佳1；且

R₁及R₂各獨立地為氫、(C₁-C₈)烷基或(C₃-C₈)環烷基，較佳氫，或R₁及R₂連同其附接之碳原子一起形成(C₃-C₈)環烷基環。

在一些實施例中，活性劑經由具有下式之裂解基團偶合於第一分支：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中

G表示糖、糖酸或經改質之糖，較佳糖或糖酸，最佳葡萄糖醛酸；

B為共價附接於該活性劑之單元，

W表示-C(O)-、-C(O)NR'-、-C(O)O-、-S(O)₂NR'-、-P(O)R''NR'-、-S(O)NR'-或-PO₂NR'-，在各情況下其中該C(O)、S或P直接結合於該苯環，且R'及R''各獨立地為氫、(C₁-C₈)烷基、(C₃-C₈)環烷基、(C₁-C₈)烷氧基、(C₁-C₈)烷硫基、單或二(C₁-C₈)烷基胺基、(C₃-C₂₀)雜芳基或(C₆-C₂₀)芳基，

各Z獨立地表示氫、(C₁-C₈)烷基或拉電子基團(諸如醯胺、羧酸、羧酸酯、鹵素、氰基或硝基)，較佳氫、(C₁-C₈)烷基、鹵素、氰基或硝基，最佳氫；

n為整數1至3，較佳3；

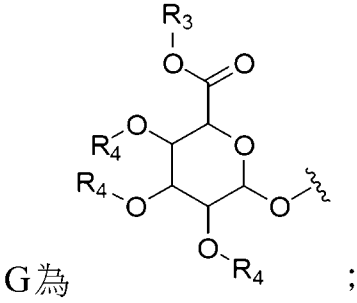
L表示鍵結於連接子或分支單元之鍵；

R₁及R₂各獨立地為氫、(C₁-C₈)烷基或(C₃-C₈)環烷基，較佳氫，或R₁及R₂連同其附接之碳原子一起形成(C₃-C₈)環烷基環。

在一些實施例中，W為-C(O)-、-C(O)NR'-、-C(O)O-、-S(O)₂NR'-、-P(O)R''NR'-、-S(O)NR'-或-PO₂NR'-，在各情況下其中該C(O)、S或P較佳直接結合於該苯環，且R'及R''各獨立地為氫、(C₁-C₈)烷基、(C₃-C₈)環烷基、(C₁-C₈)烷氧基、(C₁-C₈)烷硫基、單或二(C₁-C₈)烷基胺基、(C₃-C₂₀)雜芳基或(C₆-C₂₀)芳基，較佳氫。在某些較佳實施例中，W表示-

C(O)NR'-，且W之氮為胺基酸之氮，較佳親水性胺基酸。在一些實施例中，W為-C(O)NR'-，其中C(O)鍵結於該苯環且NR'鍵結於L。

在一些實施例中，糖或糖酸為單醣。在一些實施例中，糖包含：



R₃為氫或羧基保護基；且

各R₄獨立地為氫或經基保護基。

在一些此類實施例中，R₃為氫且各R₄為氫。

在一些實施例中，各Z表示氫且n為3。

在某些較佳實施例中：

G為葡糖醛酸；

W為-C(O)NR'-，其中C(O)鍵結於該苯環且NR'鍵結於L；

Z表示氫；

n為3；且

R₁及R₂各表示氫。

在本發明之一些實施例中，抗體-藥物結合物之主要連接子包含具有1至100個碳原子，較佳1-50個碳原子之伸烷基，且：

伸烷基包括至少一個不飽和鍵；

伸烷基包括至少一個伸雜芳基；

伸烷基之碳原子經一或多個選自氮(N)、氧(O)及硫(S)之雜原子置換；或

伸烷基進一步經一或多個具有1至20個碳原子之烷基取代。在一些此

類實施例中，伸烷基之至少一個碳原子經氮置換，主要連接子包含親水性胺基酸之至少兩個原子，且氮與親水性胺基酸之主鏈羰基形成肽鍵。親水性胺基酸為精胺酸、天冬胺酸、天冬醯胺、麩胺酸、麩醯胺酸、組胺酸、離胺酸、鳥胺酸、脯胺酸、絲胺酸或蘇胺酸。

在一些實施例中，主要連接子包含胺基酸，且胺基酸包含具有在水溶液中在中性pH下載有電荷之部分的側鏈，較佳精胺酸、天冬胺酸、麩胺酸、離胺酸或鳥胺酸。此胺基酸可存在於分支連接子中任何地方。舉例而言，其可將分支連接子之胍共價連接於分支連接子之聚乙二醇單元。或者或另外，此類胺基酸可存在於該第一分支。

在某些較佳實施例中，抗體-藥物結合物之主要連接子藉由硫醚鍵共價結合於抗體，且硫醚鍵包含抗體之半胱胺酸之硫原子，最佳C端半胱胺酸，其可為類異戊二烯轉移酶所識別之胺基酸模體的一部分。

舉例而言，胺基酸模體可為選自CXX、CXC、XCXC、XXCC及CYYX之序列；

C表示半胱胺酸；

Y每次出現時均獨立地表示脂族胺基酸；

X每次出現時均獨立地表示麩醯胺酸、麩胺酸、絲胺酸、半胱胺酸、甲硫胺酸、丙胺酸或白胺酸；且

硫醚鍵包含胺基酸模體之半胱胺酸之硫原子。

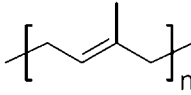
在一些實施例中，胺基酸模體為：

序列CYYX；且

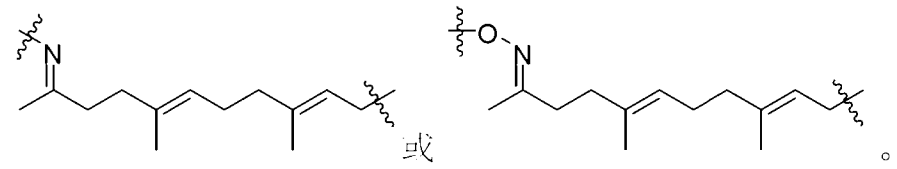
Y每次出現時均獨立地表示丙胺酸、異白胺酸、白胺酸、甲硫胺酸或纈胺酸。

在某些較佳實施例中，胺基酸模體為序列CVIM或CVLL。

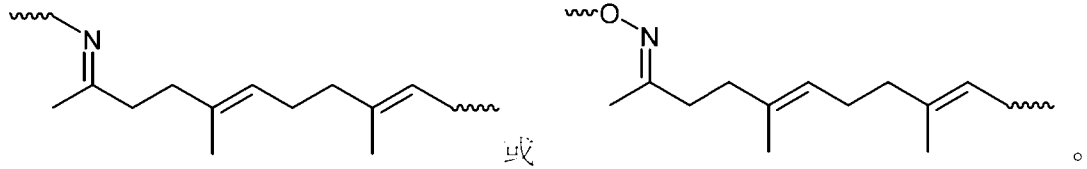
在一些實施例中，在胺基酸模體前之七個胺基酸中之至少一者為甘胺酸。在一些實施例中，在胺基酸模體前之七個胺基酸中之至少三者各獨立地選自甘胺酸及脯胺酸。在一些實施例中，緊靠在胺基酸模體前之一至十個胺基酸為甘胺酸。在某些較佳實施例中，緊靠在胺基酸模體前之至少一個、兩個、三個、四個、五個、六個、七個、八個、九個或十個胺基酸為甘胺酸，最佳至少五個。在某些較佳實施例中，緊靠在胺基酸模體前之至少一個、兩個、三個、四個、五個、六個、七個、八個、九個或十個胺基酸各為甘胺酸。在一些實施例中，抗體C端包含胺基酸序列GGGGGGGCVIM。

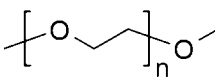
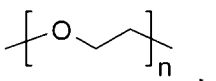
在一些實施例中，上述硫醚鍵包含至少一個由  表示之異戊二烯基單元之碳原子。在較佳實施例中，n為1或2，最佳2。

在一些實施例中，主要連接子包含脞，且至少一個異戊二烯基單元將脞共價連接於抗體。在一些實施例中，連接子包含：



在一些實施例中，連接子可包含



在一些實施例中，主要連接子及/或第一分支包含至少一個由  或  表示之聚乙二醇單元。聚乙二醇單元可包含1至19個-OCH₂CH₂-單元，較佳4至20個-OCH₂CH₂-單元。在一些較佳實施

例中，連接子可包含1至20個-OCH₂CH₂-單元。在某些較佳實施例中，連接子可包含1至12個-OCH₂CH₂-單元。在其他較佳實施例中，連接子可包含3至12個-OCH₂CH₂-單元。在一些實施例中，連接子包含脞，且至少一個聚乙二醇單元將脞共價連接於肽。

在本發明之一些實施例中，主要連接子、第一分支或兩者包含由-(CH₂)_r(V(CH₂)_p)_q-表示之連接單元，其中：

r為整數1至10，較佳2；

p為整數0至12，較佳2；

q為整數1至20；

V為單一鍵、-O-、-S-、-NR₂₁-、-C(O)NR₂₂-、-NR₂₃C(O)-、-NR₂₄SO₂-或-SO₂NR₂₅-，較佳-O-；且

R₂₁至R₂₅各獨立地為氫、(C₁-C₆)烷基、(C₁-C₆)烷基(C₆-C₂₀)芳基或(C₁-C₆)烷基(C₃-C₂₀)雜芳基。

在某些較佳實施例中，q為整數1至10。在其他較佳實施例中，q為2、5或11。

在本發明之一些實施例中，主要連接子、第一分支或兩者包含由-(CH₂)_r(V(CH₂)_p)_q-、-((CH₂)_pV)_q-、-(CH₂)_r(V(CH₂)_p)_qY-、-((CH₂)_pV)_q(CH₂)_r-、-Y(((CH₂)_pV)_q-或-(CH₂)_r(V(CH₂)_p)_qYCH₂-表示之連接單元，

其中：

r為整數0至10；

p為整數1至10；

q為整數1至20；

V 及 Y 各獨立地為單一鍵、-O-、-S-、-NR₂₁-、-C(O)NR₂₂-、-NR₂₃C(O)-、-NR₂₄SO₂-或-SO₂NR₂₅-；且

R₂₁至R₂₅各獨立地為氫、(C₁-C₆)烷基、(C₁-C₆)烷基(C₆-C₂₀)芳基或(C₁-C₆)烷基(C₃-C₂₀)雜芳基。

在此等連接子之某些較佳實施例中，q為整數4至20。在一些實施例中，q為整數6至20。在其他較佳實施例中，q為整數2至12。在一些實施例中，q為2、5或11。

在此等連接子之一些實施例中，r較佳為2。在此等連接子之一些實施例中，p較佳為2。在此等連接子之一些實施例中，q為整數6至20。在一些實施例中，V及Y各獨立地為-O-。

在一些實施例中：

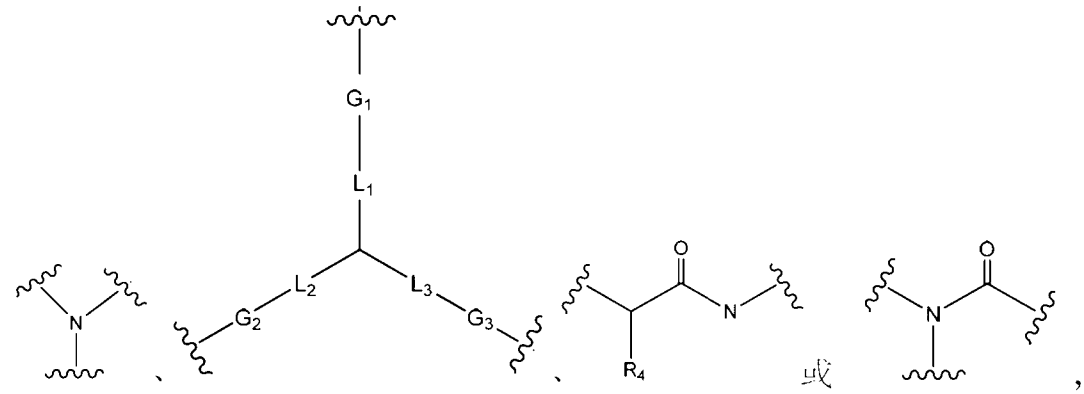
r為2；

p為2；

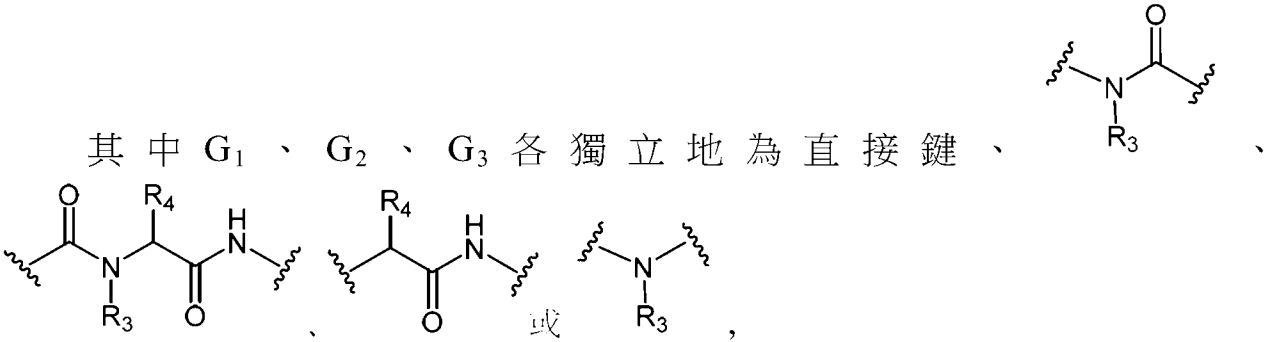
q為2、5或11，且

V為-O-。

在本發明之一些實施例中，至少一個分支單元為



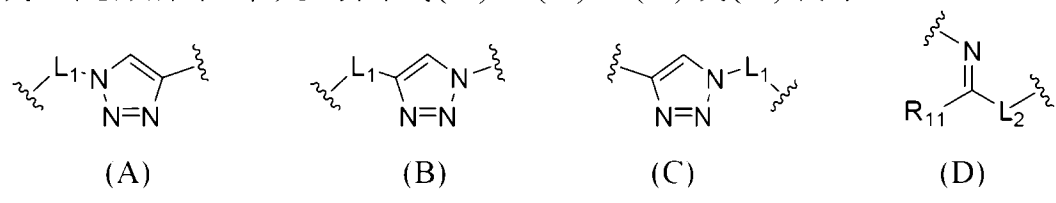
其中L₁、L₂、L₃各獨立地為直接鍵或-C_nH_{2n}-，其中n為整數1至30，



其中 R_3 為氫或 C_1 - C_{30} 烷基；

其中 R_4 為氫或 $-L_4-COOR_5$ ，其中 L_4 為直接鍵或 $-C_nH_{2n}-$ ，其中 n 為整數1至10，且 R_5 為氫或 C_1 - C_{30} 烷基。

次要連接子(例如將活性劑連接於分支單元)可包含藉由1,3-偶極環加成反應、雜狄爾斯-阿德反應、親核取代反應、非醇醛型羰基反應、碳-碳複鍵加成、氧化反應或點擊反應形成之結合單元。結合單元可藉由乙炔與疊氮化物之間的反應，或非醇醛型羰基反應，諸如醛基或酮基與肼或烷氧基胺之間的反應、允許活性劑及/或裂解基團輕度偶合於分支單元之反應來形成。此類結合單元可由式(A)、(B)、(C)或(D)表示。



L_1 為單一鍵或具有1至30個碳原子，較佳10、11、12、13、14、15或16個碳原子之伸烷基；

R_{11} 為氫或具有1至10個碳原子之烷基，較佳甲基；且

L_2 為具有1至30個碳原子，較佳10、11、12、13、14、15或16個碳原子之伸烷基。

在本發明之一些實施例中，主要連接子、第一分支或兩者包含由 $-(CH_2CH_2X)_w-$ 表示之連接單元，其中：

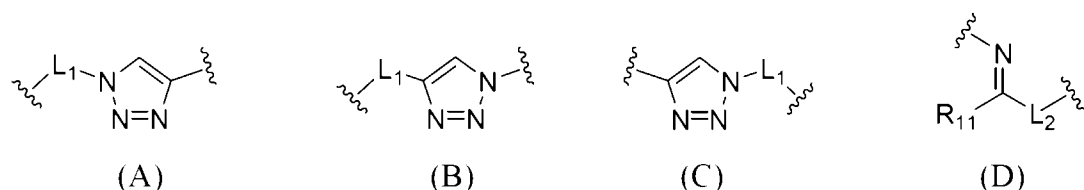
X表示-O-、(C₁-C₈)伸烷基或-NR₂₁-，較佳-O-；

R₂₁表示氫、(C₁-C₆)烷基、(C₁-C₆)烷基(C₆-C₂₀)芳基或(C₁-C₆)烷基(C₃-C₂₀)雜芳基，較佳氫；且

w為整數1至12，較佳1、3、6或12。

在一些實施例中，X為-O-且w為整數6至12。

在本發明之一些實施例中，主要連接子包含藉由1,3-偶極環加成反應、雜狄爾斯-阿德反應、親核取代反應、非醇醛型羰基反應、碳-碳複鍵加成、氧化反應或點擊反應形成之結合單元。在一些實施例中，結合單元藉由乙炔與疊氮化物之間的反應，或醛基或酮基與肼或烷氧基胺之間的反應來形成。在一些實施例中，結合單元由式A、B、C或D中之任一者，較佳D表示：



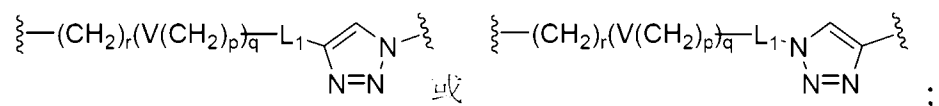
其中：

L₁為單一鍵或具有1至30個碳原子，較佳12個碳原子之伸烷基；

R₁₁為氫或具有1至10個碳原子之烷基，較佳甲基；且

L₂為具有1至30個碳原子，較佳11個碳原子之伸烷基。

在一些實施例中，主要連接子包含



V為單一鍵、-O-、-S-、-NR₂₁-、-C(O)NR₂₂-、-NR₂₃C(O)-、-NR₂₄SO₂-或-SO₂NR₂₅-，較佳-O-；

R₂₁至R₂₅各獨立地為氫、(C₁-C₆)烷基、(C₁-C₆)烷基(C₆-C₂₀)芳基或

(C₁-C₆)烷基(C₃-C₂₀)雜芳基；

r為整數1至10，較佳2或3；

p為整數0至10，較佳1或2；

q為整數1至20，較佳1至6；且

L₁為單一鍵。

在一些實施例中，主要連接子包含O取代之肟；其中

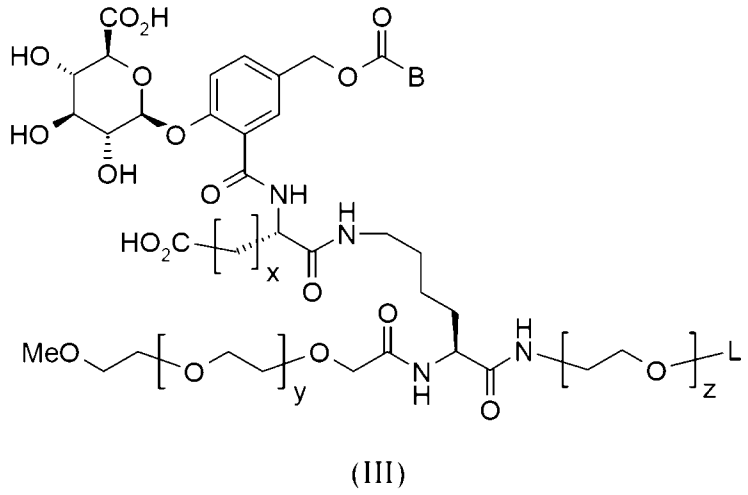
a)肟之氧原子經例如經由分支單元將肟共價連接於活性劑之基團取代；且

肟之碳原子經將肟共價連接於抗體之基團取代；或

b)肟之氧原子經將肟共價連接於抗體之基團取代；且

肟之碳原子經例如經由分支單元將肟共價連接於活性劑之基團取代。

在一些實施例中，抗體-藥物結合物包含式III之結構：



其中：

B表示活性劑，

x表示整數1至3；

y表示整數0至20；

z表示整數1至20；且

L表示與抗體之連接。

在一些實施例中，y及z獨立地表示整數1至20。在其他實施例中，y及z獨立地表示整數2及20。在某些較佳實施例中，y及z獨立地表示整數1至19，最佳4至20。在某些較佳實施例中，y及z獨立地表示小於或等於20之整數。

在一些實施例中，主要連接子及/或第一分支包含至少一個包含1至20個-OCH₂CH₂-單元，較佳4至20個-OCH₂CH₂-單元之聚乙二醇部分。在一些較佳實施例中，主要連接子及/或第一分支包含至少一個包含3至12個-OCH₂CH₂-單元之聚乙二醇部分。在一些實施例中，聚乙二醇部分經經基部分、胺基或烷基醚封端。

在本發明之一些實施例中，抗體為單株抗體、多株抗體、抗體片段、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv、單鏈Fv (「scFv」)、雙功能抗體、線抗體、雙特異性抗體、多特異性抗體、嵌合抗體、人類化抗體、人類抗體或包含抗體之抗原結合部分的融合蛋白。

在本發明之一些實施例中，抗體選自莫羅單抗-CD3阿昔單抗、利妥昔單抗、達利珠單抗、帕利珠單抗、英利昔單抗、曲妥珠單抗、依那西普、巴利昔單抗、吉妥珠單抗、阿倫單抗、替伊莫單抗、阿達木單抗、阿法賽特、奧馬珠單抗、艾法珠單抗、托西莫單抗、西妥昔單抗、ABT-806、貝伐單抗、那他珠單抗、蘭比珠單抗、帕尼單抗、艾庫組單抗、利納西普、賽妥珠單抗、羅米司亭、AMG-531、戈利木單抗、優特克單抗、ABT-874、貝拉西普、貝利單抗、阿塞西普、抗CD20抗體、康納單抗、托西利單抗、阿利珠單抗、美泊利單抗、帕妥珠單抗、HuMax

CD20、曲美單抗、替西單抗、伊派利單抗、IDEC-114、伊諾妥珠單抗、HuMax EGFR、阿柏西普、HuMax-CD4、替利珠單抗、奧昔珠單抗、卡托莫西單抗、抗EpCAM抗體IGN101、阿德卡單抗、奧戈伏單抗、迪奴圖單抗、吉瑞昔單抗、德諾單抗、貝頻珠單抗、莫維珠單抗、依夫單抗、瑞昔單抗、LY2469298及維托珠單抗。

在一些實施例中，一種活性劑選自化學治療劑及毒素。

在一些實施例中，活性劑選自：

(a)埃羅替尼、硼替佐米、氟維司群、舒癌特、來曲唑、甲磺酸伊馬替尼、PTK787/ZK 222584、奧沙利鉑、5-氟尿嘧啶、甲醯四氫葉酸、雷帕黴素、拉帕替尼、洛那法尼、索拉非尼、吉非替尼、AG1478、AG1571、噻替派、環磷醯胺、白消安、英丙舒凡、哌泊舒凡、苯唑多巴、卡波醌、米特多巴、尤利多巴、伸乙基亞胺、六甲蜜胺、三伸乙基三聚氰胺、三伸乙基磷醯胺、三伸乙基硫代磷醯胺、三羥甲基蜜胺、布拉他辛、布拉他辛酮、喜樹鹼、喜樹鹼衍生物及代謝物(SN-38)、拓朴替康、苔蘚蟲素、海綿抑素、CC-1065、阿多來新、卡折來新、比折來新、念珠藻素1、念珠藻素8、海兔毒素、倍癌黴素、KW-2189、CB1-TM1、艾榴塞洛素、水鬼蕉鹼、沙考地汀、海綿抑素、苯丁酸氮芥、氮芥、氯磷醯胺、雌氮芥、異環磷醯胺、甲氮芥、美法侖、新恩比興、芬司特瑞、潑尼氮芥、曲磷胺、尿嘧啶氮芥、卡莫司汀、氯脲菌素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀、雷莫司汀、卡奇黴素、卡奇黴素 γ 1、卡奇黴素 Ω 1、達內黴素、達內黴素A、氯屈磷酸鹽、埃斯培拉黴素、新抑癌蛋白發色團、阿克拉黴素、放射菌素、安麴黴素、偶氮絲胺酸、博來黴素、放線菌素C、卡拉比辛、洋紅黴素、嗜癌菌素、色黴素、放線菌素D、道諾黴素、德托

黴素、6-重氮基-5-側氧基-L-正白胺酸、小紅莓、嗎啉基-小紅莓、氰基嗎
 啉基-小紅莓、2-吡咯啉基-小紅莓、脂質體小紅莓、去氧小紅莓、表柔比
 星、依索比星、麻西羅黴素、絲裂黴素C、黴酚酸、諾加黴素、橄欖黴
 素、培洛黴素、潑非黴素、嘌呤黴素、奎那黴素、羅多比星、鏈黴素、鏈
 脲菌素、殺結核菌素、烏苯美司、淨司他丁、左柔比星、5-氟尿嘧啶、迪
 諾特寧、甲胺喋呤、蝶羅呤、曲美沙特、氟達拉賓、6-巰基嘌呤、硫米嘌
 呤、硫烏嘌呤、安西他濱、阿紮胞苷、6-氮尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、雙
 去氧尿苷、去氧氟尿苷、依諾他濱、氟尿苷、卡魯寧酮、屈他雄酮丙酸
 鹽、環硫雄醇、美雄烷、寧內酯、胺魯米特、米托坦、曲洛司坦、亞葉
 酸、乙醯葡萄糖酯、醛磷醯胺糖苷、胺基乙醯丙酸、恩尿嘧啶、安吡啶、貝
 塔布辛、比生群、艾達曲克、得弗伐胺、秋水仙胺、地吡醌、艾弗烏胺
 酸、依利醋胺、依託格魯、硝酸鎂、羥基脲、蘑菇多醣、氯尼達明、美登
 素、安絲菌素、丙咪脞、米托蒽醌、莫比達摩、二胺硝吡啶、噴司他丁、
 蛋胺氮芥、吡柔比星、洛索蒽醌、2-乙基醯肼、丙卡巴肼、多醣-k、雷佐
 生、根瘤菌素、西索菲蘭、螺旋鍺、細交鏈孢菌酮酸、三亞胺醌、
 2,2',2''-三氯三乙胺、T-2毒素、弗納庫林A、桿孢菌素A及胺癸叮、胺基
 甲酸酯、長春地辛、達卡巴嗪、甘露氮芥、二溴甘露醇、二溴衛矛醇、哌
 泊溴烷、加西托星、阿拉伯糖苷、環磷醯胺、噻替派、太平洋紫杉醇、太
 平洋紫杉醇經白蛋白工程改造之奈米粒子調配物、多西他賽、苯丁酸氮
 芥、吉西他濱、6-硫代烏嘌呤、巰基嘌呤、順鉑、卡鉑、長春鹼、鉑、依
 託泊苷、異環磷醯胺、米托蒽醌、長春新鹼、長春瑞賓、諾凡特龍、替尼
 泊苷、依達曲沙、道諾黴素、胺基喋呤、希羅達、伊班膦酸鹽、CPT-
 11、拓撲異構酶抑制劑RFS 2000、二氟甲基鳥胺酸、視黃酸、卡培他濱

或前述任一者之醫藥學上可接受之鹽、溶劑合物或酸；

(b)單核因子、淋巴因子、傳統多肽激素、副甲狀腺激素、甲狀腺素、鬆弛素、鬆弛素原、醣蛋白激素、促卵泡激素、促甲狀腺激素、促黃體激素、肝生長因子纖維母細胞生長因子、促乳素、胎盤催乳激素、腫瘤壞死因子- α 、腫瘤壞死因子- β 、苗勒氏管抑制物質、小鼠促性腺激素相關肽、抑制素、活化素、血管內皮生長因子、血小板生成素、紅血球生成素、骨誘導因子、干擾素、干擾素- α 、干擾素- β 、干擾素- γ 、群落刺激因子(「CSF」)、巨噬細胞-CSF、顆粒細胞-巨噬細胞-CSF、顆粒細胞-CSF、介白素(「IL」)、IL-1、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、腫瘤壞死因子、TNF- α 、TNF- β 、多肽因子、LIF、kit配位體或前述任一者之組合；

(c)白喉毒素、肉毒桿菌毒素、破傷風毒素、痢疾毒素、霍亂毒素、瓢菌素、瓢菌素衍生物、 α -瓢菌素、吡咯并苯并二氮呋、吡咯并苯并二氮呋衍生物、河豚毒素鹼、短裸甲藻毒素、雪卡毒素、蓖麻毒素、AM毒素、妥布賴森、格爾德黴素、類美登素、卡奇黴素、道諾黴素、小紅莓、甲胺喋呤、長春地辛、SG2285、海兔毒素、海兔毒素類似物、阿瑞他汀、念珠藻素、喜樹鹼、喜樹鹼衍生物及代謝物(SN-38)、根瘤菌素、根瘤菌素衍生物、CC-1065、CC-1065類似物或衍生物、倍癌黴素、烯二炔抗生素、埃斯培拉黴素、埃坡黴素、阿那非德、阿匹立定、類毒素或前述任一者之組合；

(d)親和配位體，其中該親和配位體為受質、抑制劑、刺激劑、神經傳導物、放射性同位素或前述任一者之組合；

(e)放射性標記、 ^{32}P 、 ^{35}S 、螢光染料、電子緻密試劑、酶、生物

素、抗生蛋白鏈菌素、地高辛、半抗原、免疫原性蛋白質、具有與標靶互補之序列的核酸分子或前述任一者之組合；

(f)免疫調節化合物、抗癌劑、抗病毒劑、抗細菌劑、抗真菌劑及抗寄生蟲劑或前述任一者之組合；

(g)他莫昔芬、雷洛昔芬、曲洛昔芬、4-羥基他莫昔芬、曲沃昔芬、克肱昔芬、LY117018、奧那司酮或托瑞米芬；

(h) 4(5)-咪唑、胺魯米特、乙酸甲地孕酮、依西美坦、來曲唑或阿那曲唑；

(i)氟他胺、尼魯胺、比卡魯胺、亮丙立德、戈舍瑞林或曲沙他濱；

(j)芳香酶抑制劑；

(k)蛋白激酶抑制劑；

(l)脂質激酶抑制劑；

(m)反義寡核苷酸；

(n)核糖核酸酶；

(o)疫苗；以及

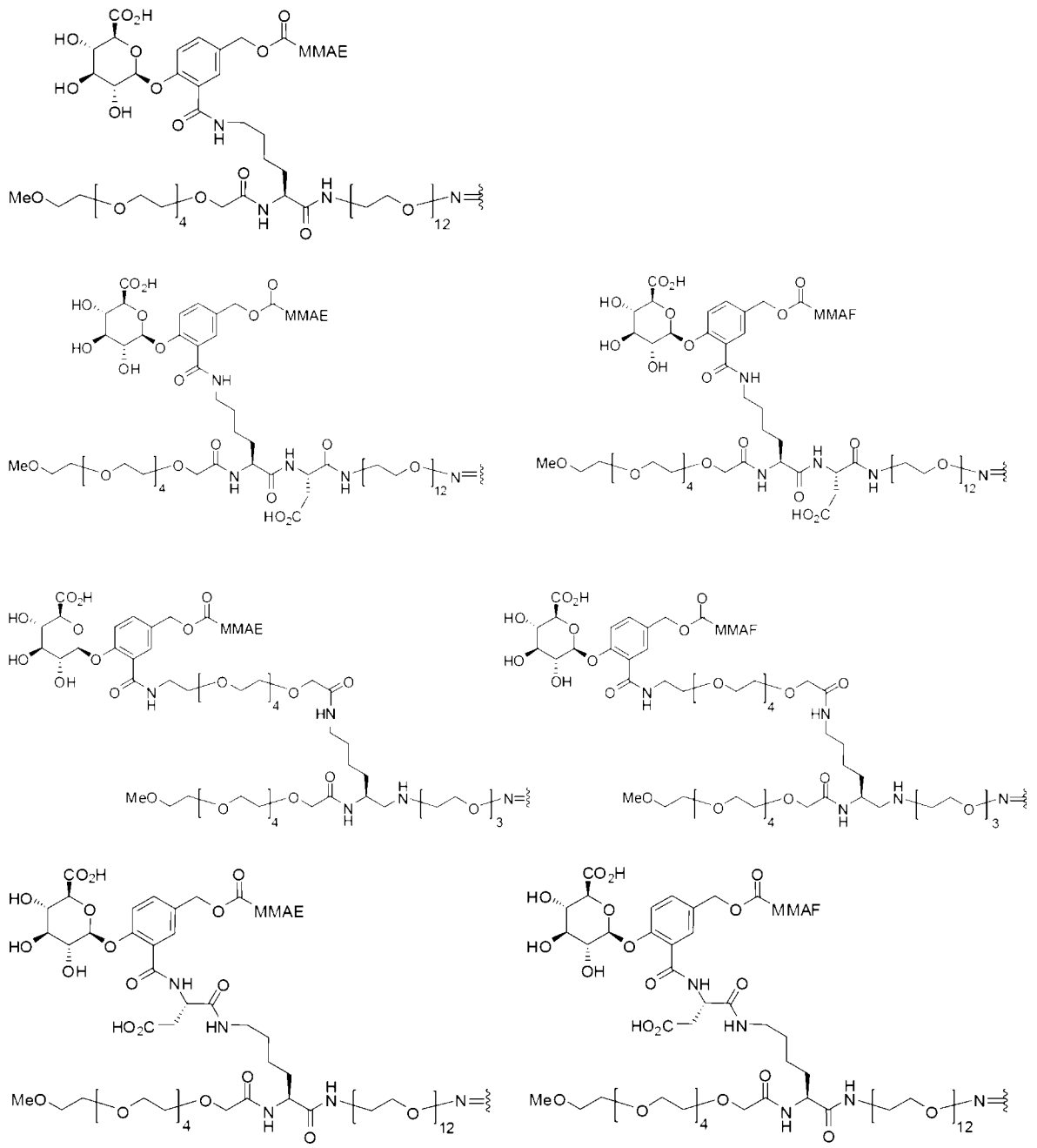
(p)抗血管生成劑。

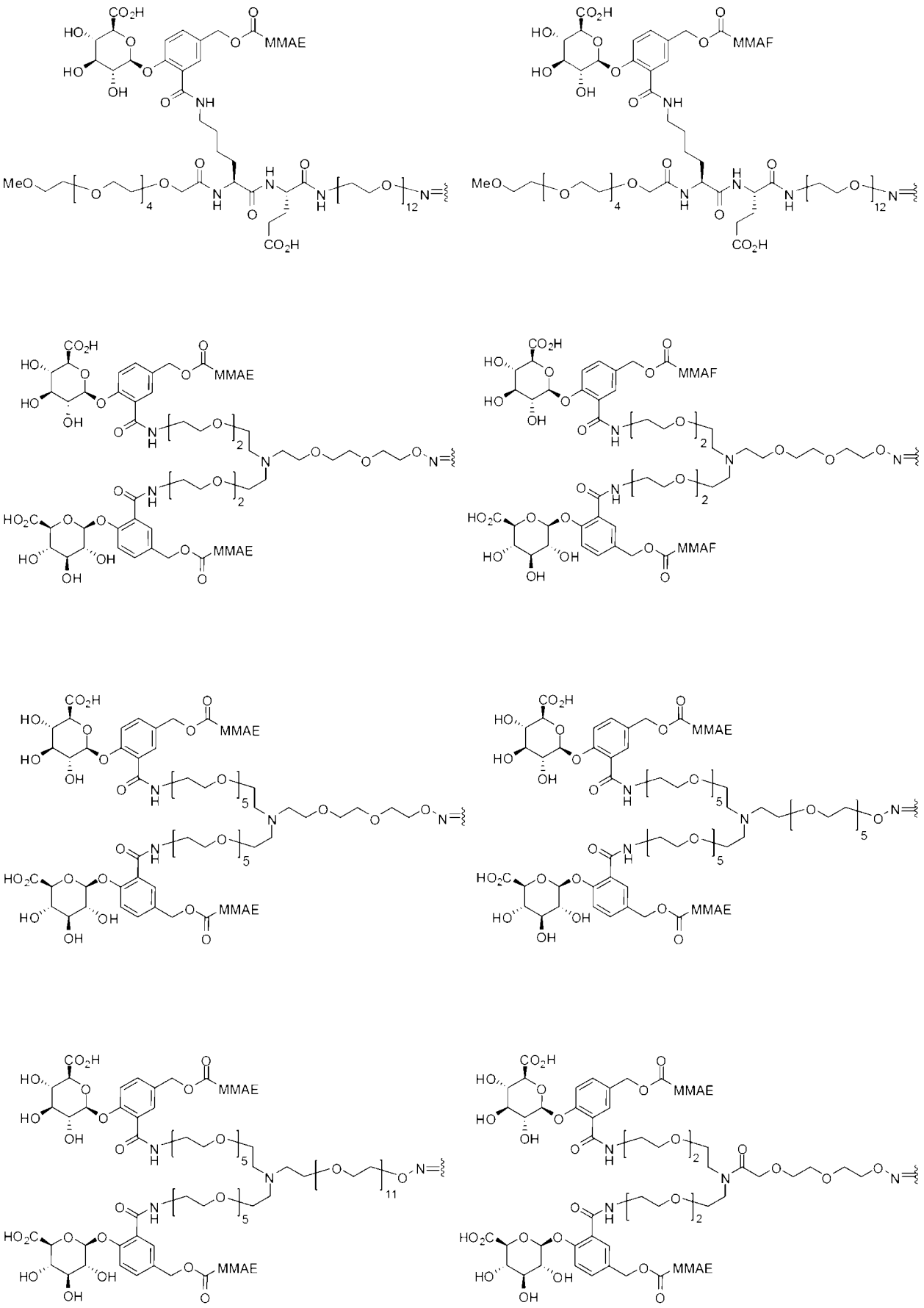
在一些實施例中，至少一種活性劑為塔托布林(taltobulin)或阿那非德(azonafide)。

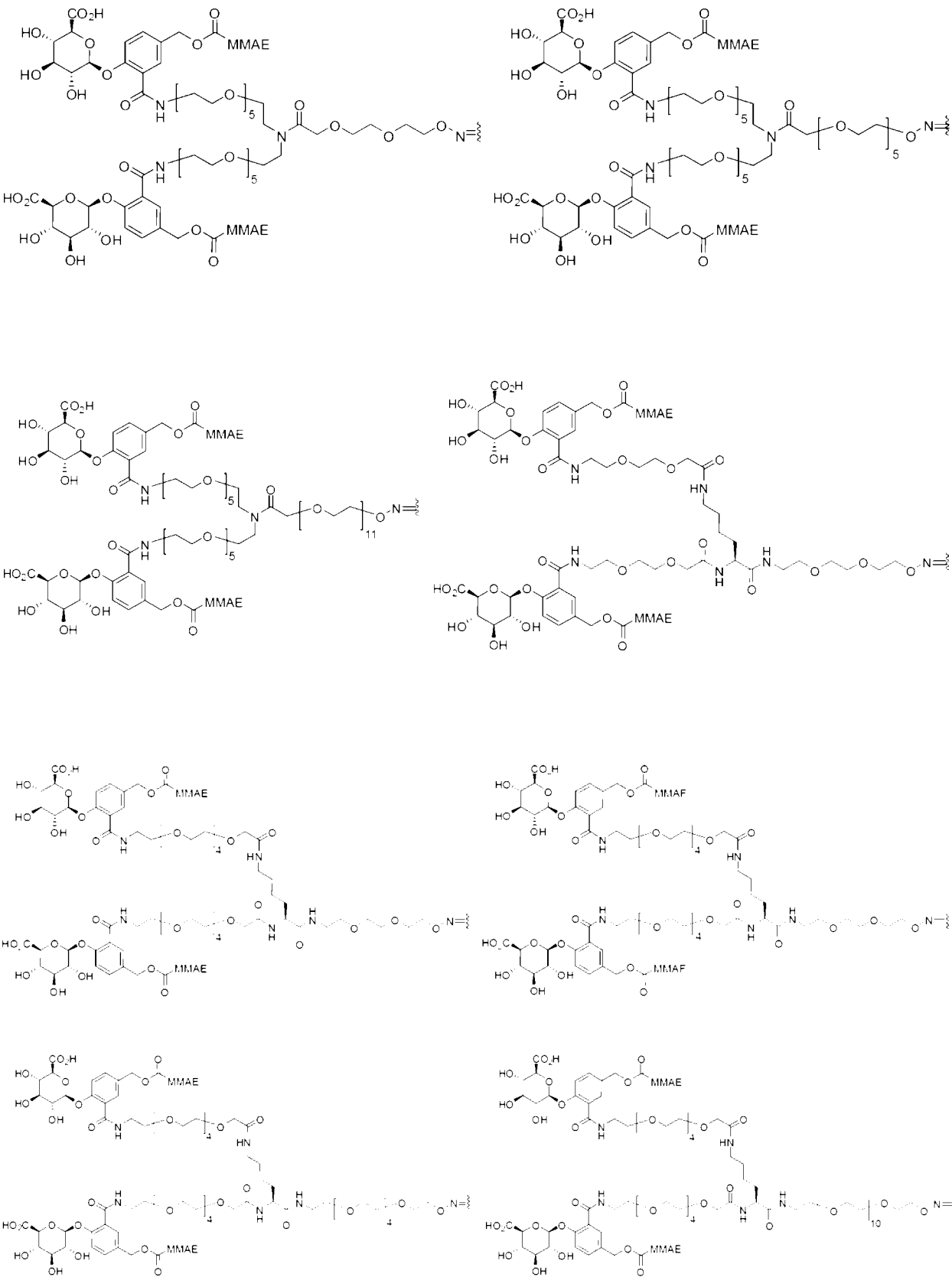
在一些實施例中，活性劑為瓢菌素、阿瑞他汀、卡奇黴素、喜樹鹼、喜樹鹼衍生物及代謝物(SN-38)、念珠藻素、道諾黴素、海兔毒素、小紅莓、倍癌黴素、埃坡黴素、埃斯培拉黴素、格爾德黴素、類美登素、甲胺喋呤、單甲基阿瑞他汀E (「MMAE」)、單甲基阿瑞他汀F (「MMAF」)、吡咯并苯并二氮呋、根瘤菌素、SG2285、妥布賴森、長

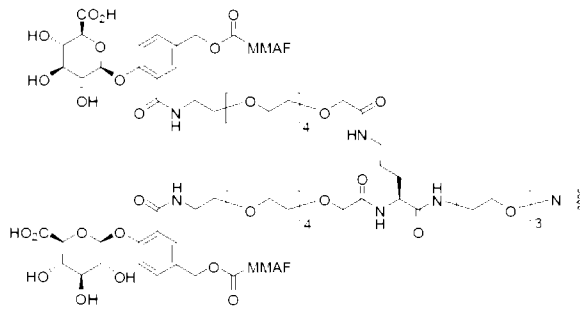
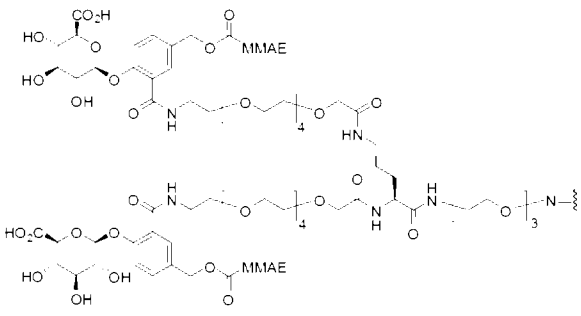
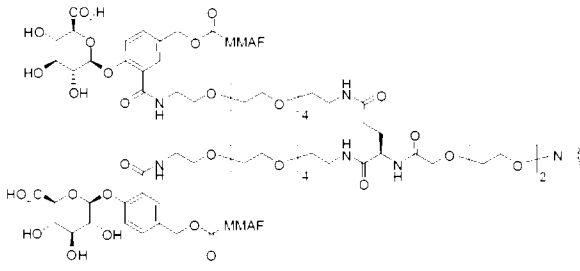
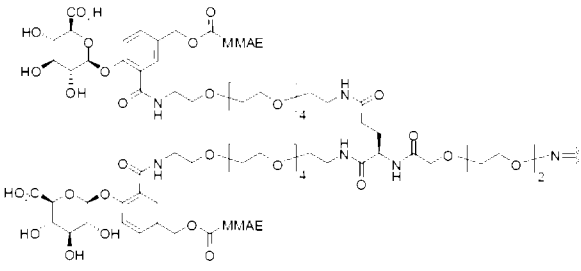
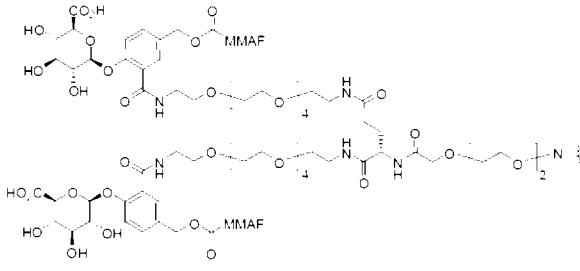
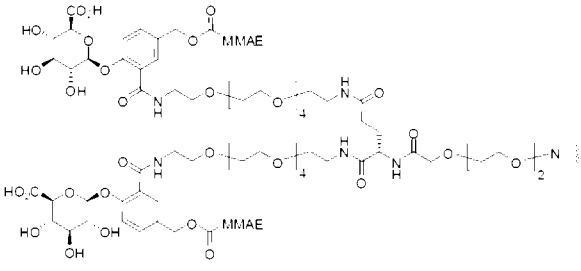
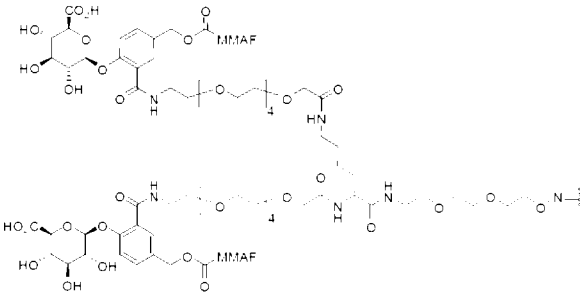
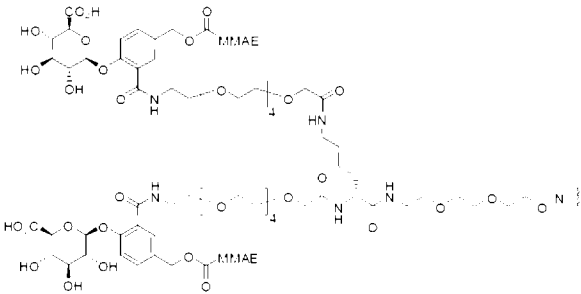
春地辛、類毒素或以上任一者之衍生物。在某些實施例中，活性劑為瓢菌素、MMAE或MMAF，或以上任一者之衍生物。

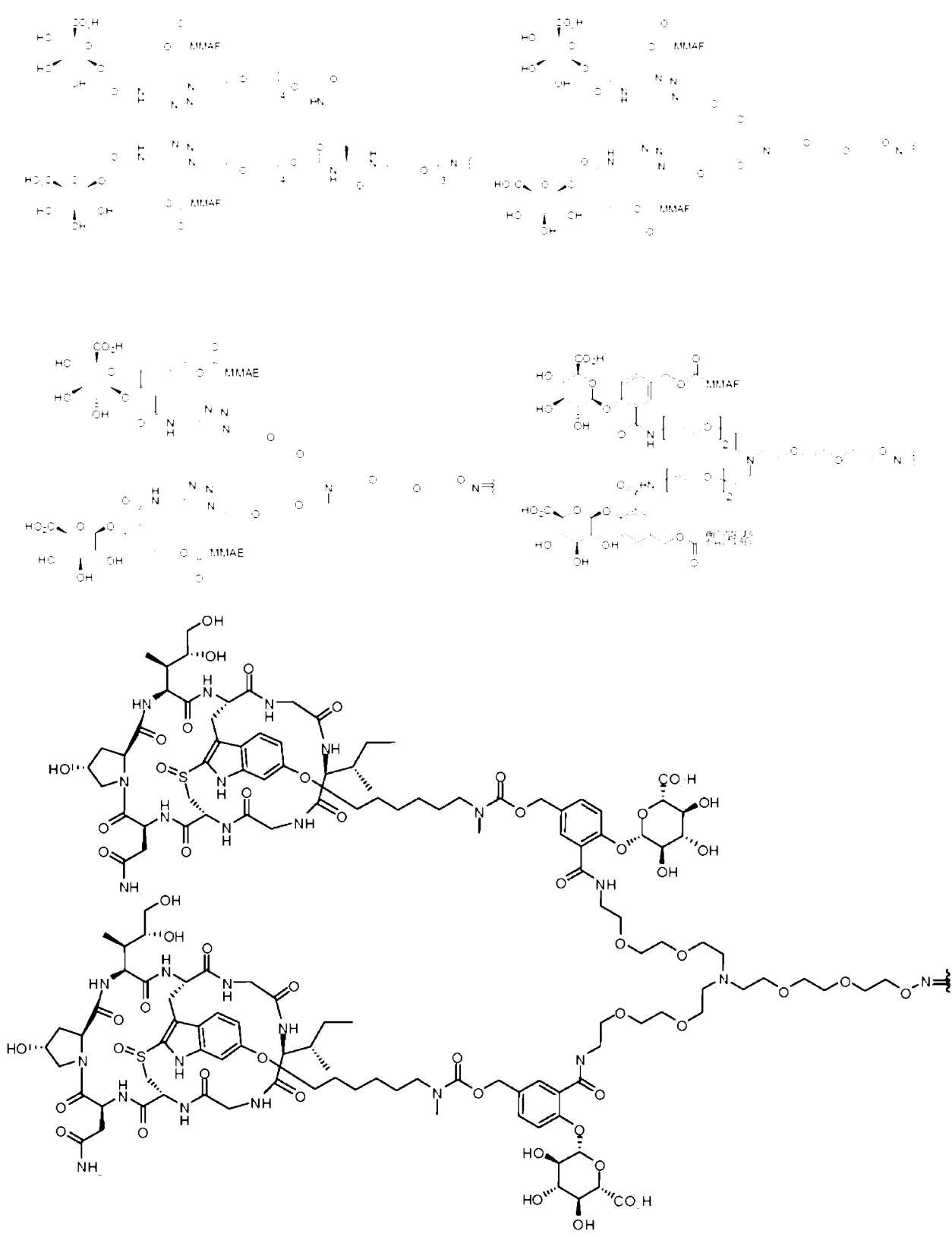
在一些實施例中，結合物包含一或多個包含選自以下之部分的分支連接子：

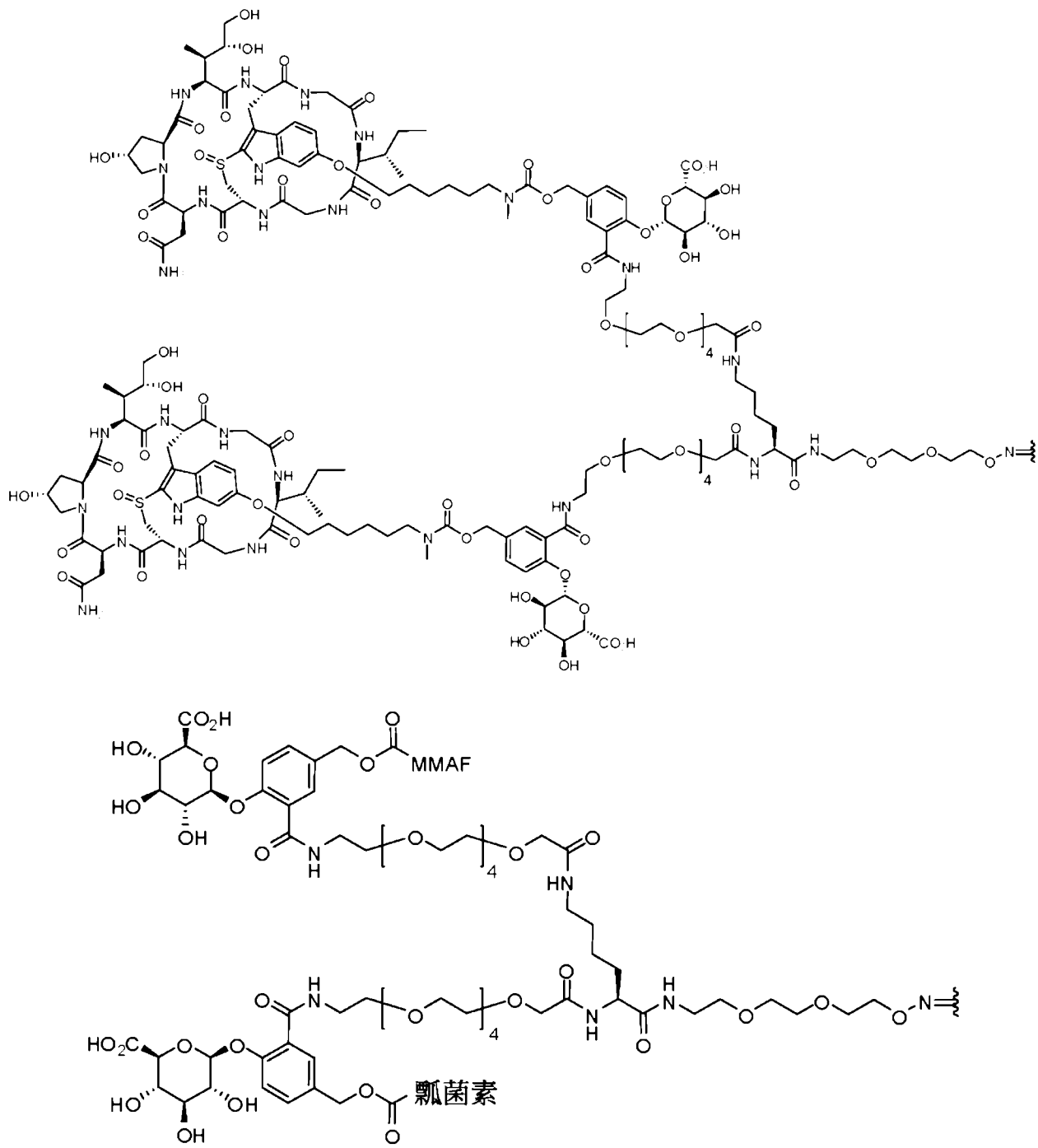


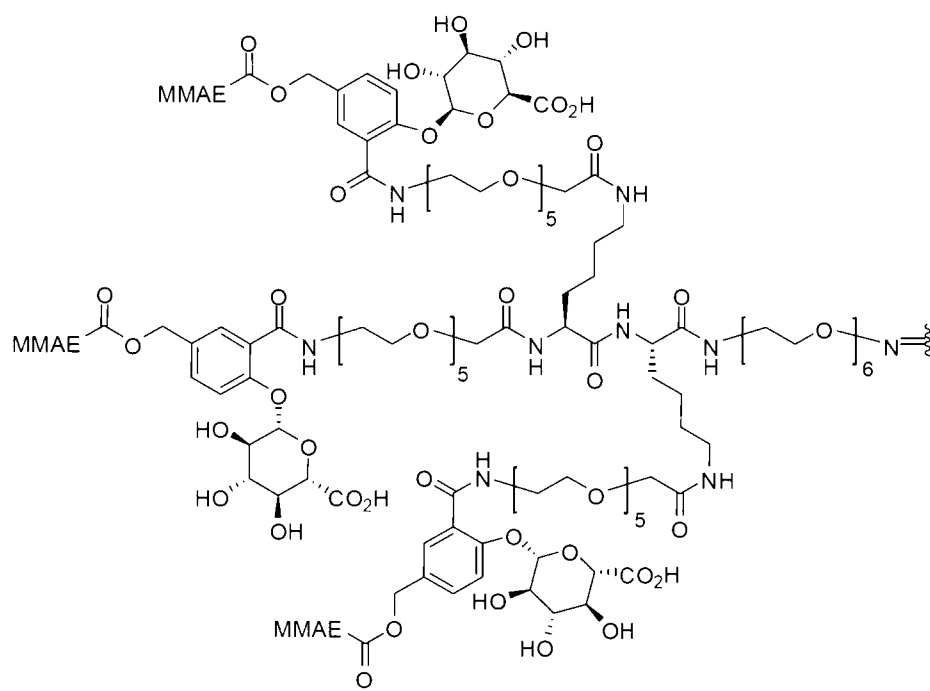


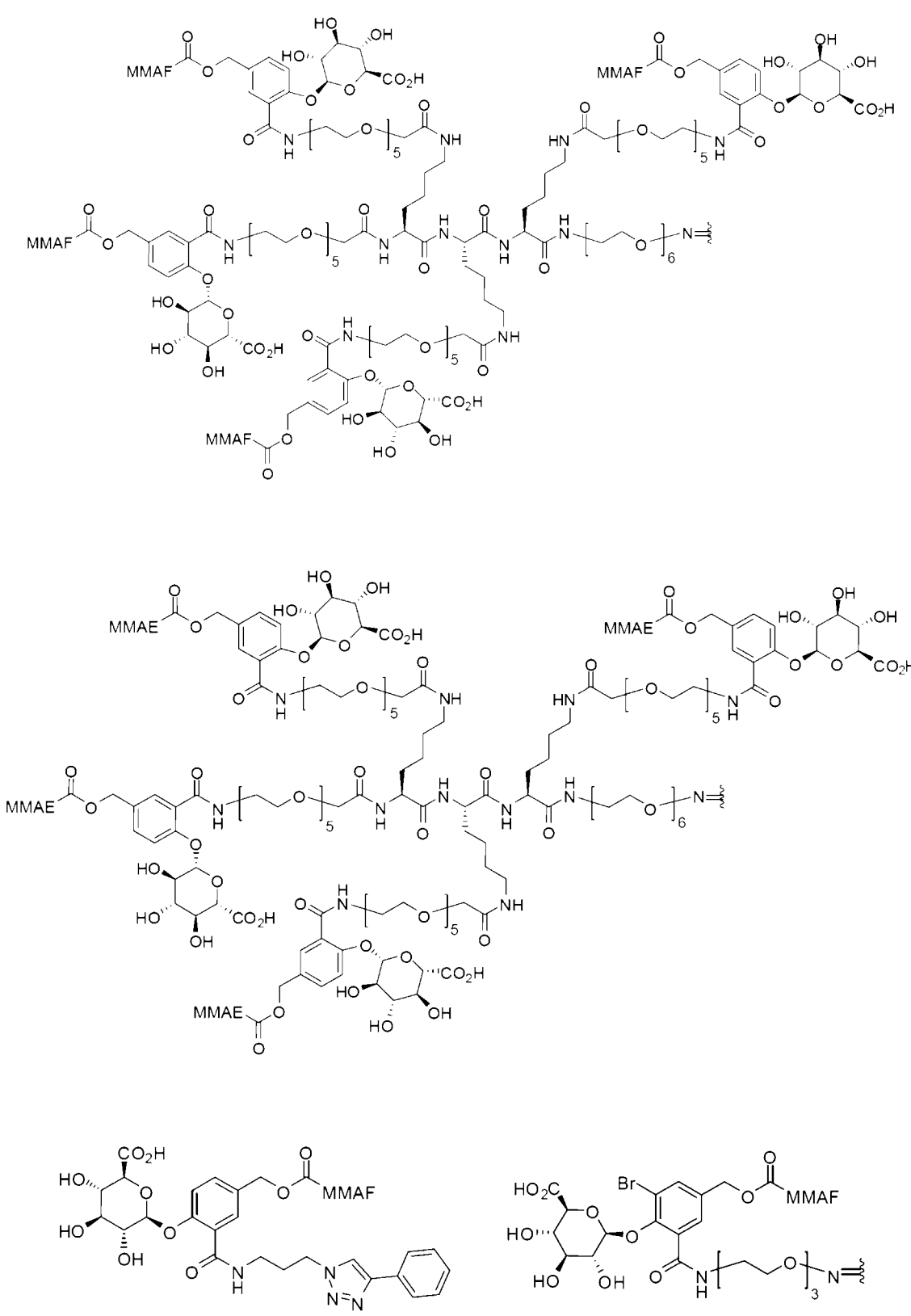


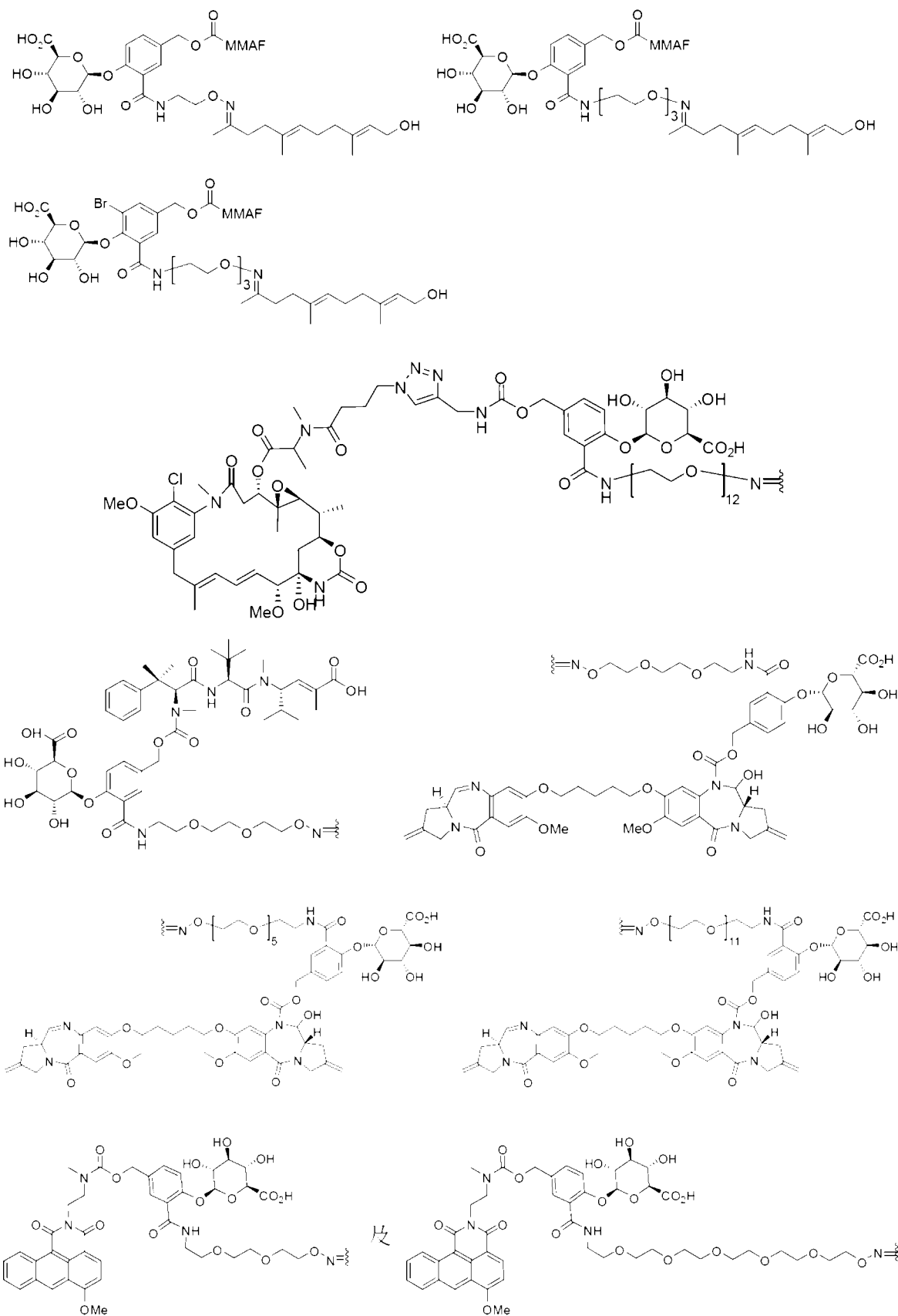




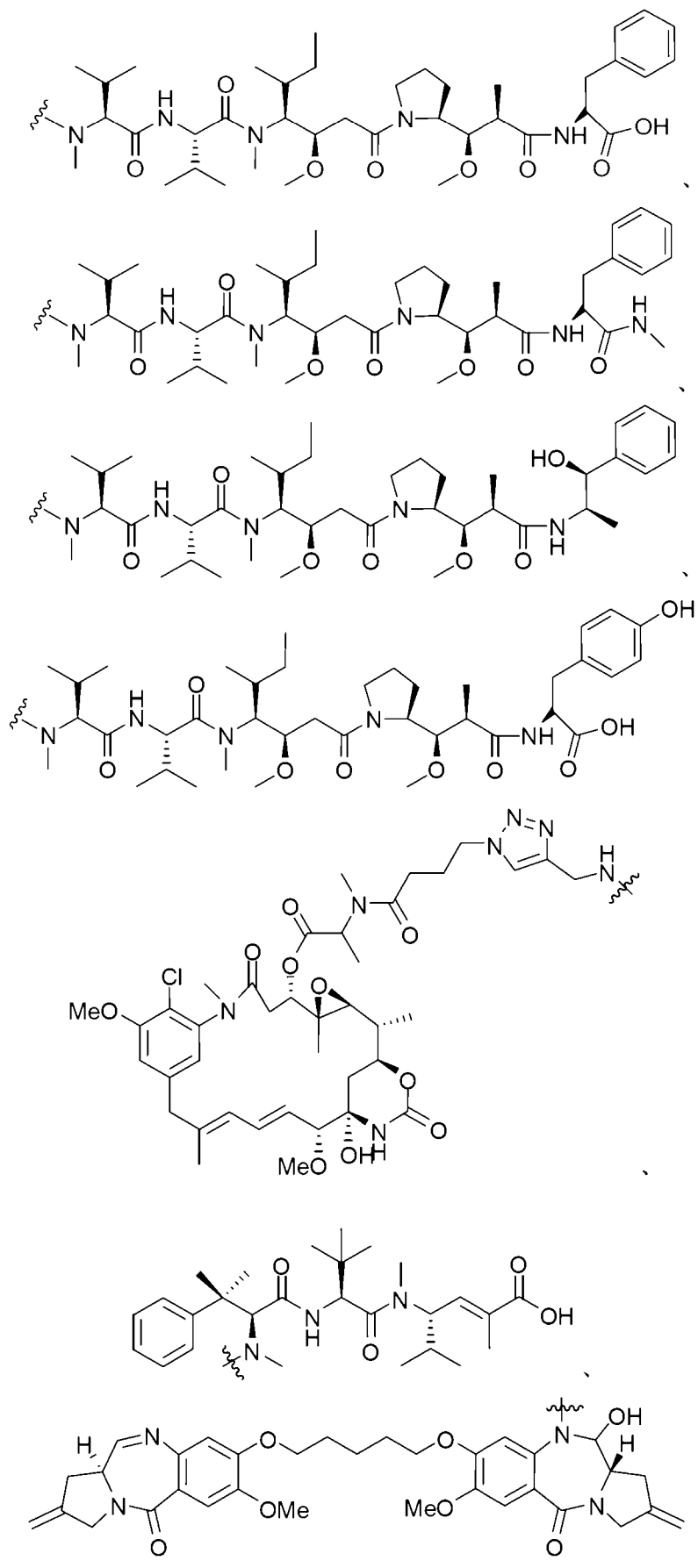


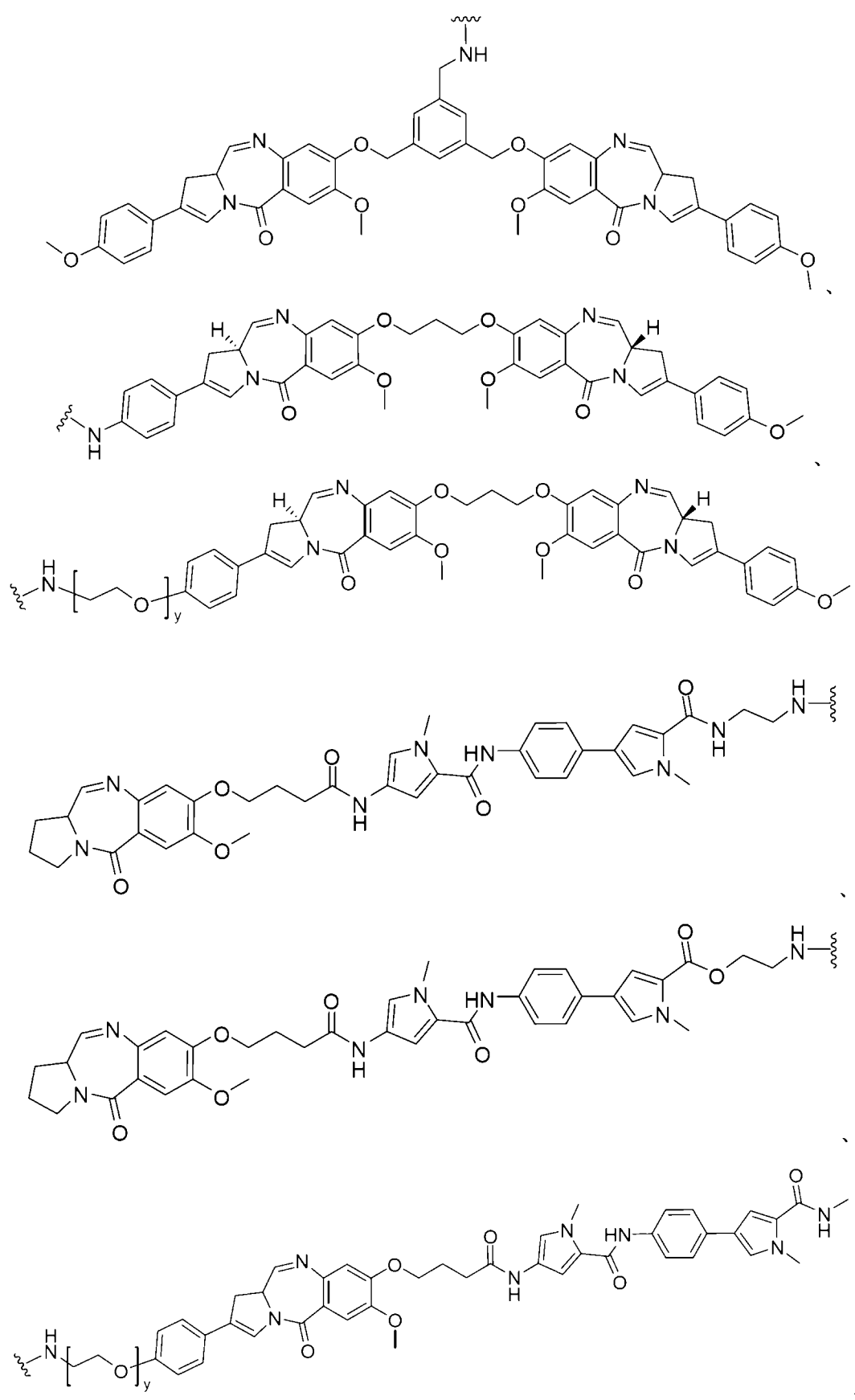


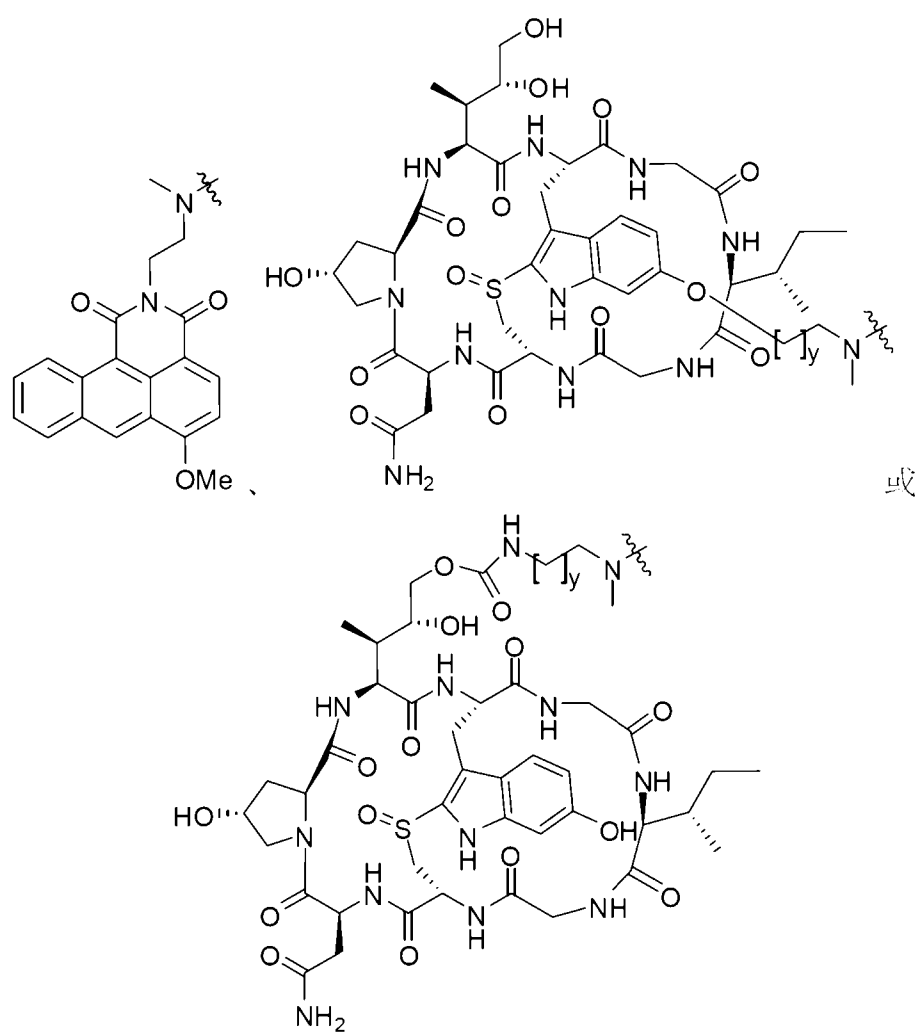




在一些實施例中，活性劑為：







其中y為整數1至10。

在其他實施例中，本發明係關於一種例如適合於偶合於配位體及一或多種活性劑以製備如本文所揭示之配位體-藥物結合物的連接子化合物，其中

- i)分支連接子包含分支單元(BR)，該分支單元(BR)藉由主要連接子(PL)共價偶合於配位體；
- ii)分支單元共價偶合於第一分支(B1)，其中裂解基團(CG)共價偶合於次要連接子(SL)；以及
- iii)分支單元共價偶合於第二分支(B2)，該第二分支(B2)包含a)共價偶合於次要連接子(SL)之第二裂解基團(CG)或b)聚乙二醇部分。

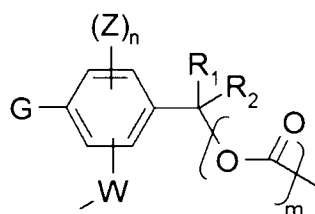
在一些實施例中，本發明係關於一種例如適合於偶合於配位體及一或多種活性劑以製備如本文所揭示之連接子-活性劑結合物的連接子化合物，其中

i)分支連接子包含分支單元(BR)，該分支單元(BR)藉由主要連接子(PL)共價偶合於配位體；

ii)分支單元共價偶合於第一分支(B1)，該第一分支(B1)具有能夠與共價偶合於次要連接子(SL)之裂解基團(CG)反應之末端反應性基團；以及

iii)分支單元共價偶合於第二分支(B2)，該第二分支(B2)包含a)能夠與共價偶合於次要連接子(SL)之裂解基團(CG)反應之第二末端反應性基團，或b)聚乙二醇部分。

在此類連接子化合物之某些實施例中，裂解基團具有下式：



其中：

G表示糖、糖酸或經改質之糖，較佳糖或糖酸，最佳葡萄糖醛酸；

W表示-C(O)-、-C(O)NR'-、-C(O)O-、-S(O)₂NR'-、-P(O)R''NR'-、-S(O)NR'-或-PO₂NR'-，在各情況下其中該C(O)、S或P較佳直接結合於該苯環，且R'及R''各獨立地為氫、(C₁-C₈)烷基、單或二羧基(C₁-C₈)烷基、(C₃-C₈)環烷基、(C₁-C₈)烷氧基、(C₁-C₈)烷硫基、單或二(C₁-C₈)烷基胺基、(C₃-C₂₀)雜芳基或(C₆-C₂₀)芳基且W直接或間接偶合於該分支單元；

各Z獨立地表示氫、(C₁-C₈)烷基或拉電子基團(諸如醯胺、羧酸、羧酸酯、鹵素、氰基或硝基)，較佳氫、(C₁-C₈)烷基、鹵素、氰基或硝基，

第 58 頁(發明說明書)

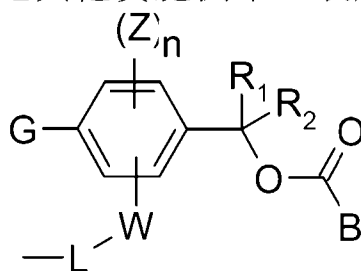
最佳氫；

n 為整數1至3；

m 為0或1，較佳1；且

R_1 及 R_2 各獨立地為氫、 (C_1-C_8) 烷基或 (C_3-C_8) 環烷基，較佳氫，或 R_1 及 R_2 連同其附接之碳原子一起形成 (C_3-C_8) 環烷基環。

在此類連接子化合物之其他實施例中，裂解基團具有下式：



其中：

G表示糖或糖酸，較佳葡萄糖醛酸；

B表示能夠置換活性劑之離去基，諸如鹵素(尤其Cl或Br)或包含能夠偶合於活性劑之反應部分的單元，諸如異氰酸酯、酸氯化物、氯甲酸酯等；

W表示拉電子基團，較佳 $-C(O)NR'$ ，其中 $C(O)$ 鍵結於該苯環且 NR' (其可為胺基酸，較佳親水性胺基酸之胺基)鍵結於L；

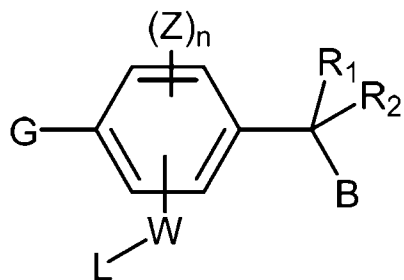
各Z獨立地表示氫、 (C_1-C_8) 烷基或拉電子基團(諸如醯胺、羧酸、羧酸酯、鹵素、氰基或硝基)，較佳氫、 (C_1-C_8) 烷基、鹵素、氰基或硝基，最佳氫；

n 為整數1至3；

L表示與該分支單元之連接；

R_1 及 R_2 各獨立地為氫、 (C_1-C_8) 烷基或 (C_3-C_8) 環烷基，較佳氫，或 R_1 及 R_2 連同其附接之碳原子一起形成 (C_3-C_8) 環烷基環。

在此類連接子化合物之其他實施例中，裂解基團具有下式：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中

G表示糖、糖酸或經改質之糖，較佳糖或糖酸，最佳葡萄糖醛酸；

B為包含能夠偶合於活性劑之反應部分的單元，

W表示 $-C(O)-$ 、 $-C(O)NR'-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-S(O)_2NR'-$ 、 $-P(O)R''NR'-$ 、 $-S(O)NR'-$ 或 $-PO_2NR'-$ ，在各情況下其中該C(O)、S或P直接結合於該苯環，且R'及R''各獨立地為氫、 (C_1-C_8) 烷基、 (C_3-C_8) 環烷基、 (C_1-C_8) 烷氧基、 (C_1-C_8) 烷硫基、單或二 (C_1-C_8) 烷基胺基、 (C_3-C_{20}) 雜芳基或 (C_6-C_{20}) 芳基，

各Z獨立地表示氫、 (C_1-C_8) 烷基或拉電子基團(諸如醯胺、羧酸、羧酸酯、鹵素、氰基或硝基)，較佳氫、 (C_1-C_8) 烷基、鹵素、氰基或硝基，最佳氫；

n為整數1至3，較佳3；

L表示鍵結於該分支單元之鍵；

R₁及R₂各獨立地為氫、 (C_1-C_8) 烷基或 (C_3-C_8) 環烷基，較佳氫，或R₁及R₂連同其附接之碳原子一起形成 (C_3-C_8) 環烷基環。

【圖式簡單說明】

圖1說明活性藥物自基於β-葡萄糖苷酸之連接子釋放的機制。

圖2為描繪來自實驗實例1之連接子藉由β-葡萄糖苷酸酶水解的圖。

圖3為描繪來自實驗實例2之兩種藥物-連接子結合物之血漿穩定性的

圖。

圖4為描繪實例68中描述之化合物47a之血漿穩定性的圖。

圖5為描繪實例70中描述之化合物49a之血漿穩定性的圖。

圖6為描繪實例69中描述之化合物48a之血漿穩定性的圖。

圖7由圖7A及圖7B兩個圖組成。圖7A顯示用於將藥物結合於抗體(DAR2)之策略。圖7B顯示用於將藥物結合於抗體(DAR4)之策略。

圖8展示在改變連接子中PEG長度下DAR2 MMAE-結合物針對JIMT-1 (HER2陽性)及MCF7細胞(HER2陰性)之相對活體外活性。

圖9展示在連接子部分具有不同PEG長度之DAR4 MMAE-結合物針對JIMT-1 (HER2陽性)及MCF7細胞(HER2陰性)之相對活體外活性。

圖10展示具有各種連接子類型之DAR4 ADC中人類 β -葡萄糖苷酸酶反應性。將12 μ M ADC與0.01 μ g人類 β -葡萄糖苷酸酶(R&D Systems)一起在37°C下培育3小時。

圖11展示小鼠或人類血漿中ADC2及Kadcyla之血漿穩定性。

圖12展示ADC33及ADC34之7天人類血漿穩定性。

圖13展示Herceptin及ADC2之大鼠PK型態。

圖14展示ADC23及ADC34之大鼠PK型態。

圖15展示藉由自2g至11j，替換連接子-毒素之基於MMAE之ADC的大鼠PK型態改善。

圖16展示藉由分支連接子單元之大鼠PK型態改善。

圖17展示極性胺基酸對MMAE ADC之大鼠PK型態的影響。

圖18展示在具有DAR2之ADC中有或無極性胺基酸下藉由分支連接子-毒素之大鼠PK型態改善。

圖19展示連接子-毒素單元中之Asp對具有DAR4之ADC之大鼠PK型態的作用。

圖20展示連接子-毒素單元中之Glu對具有DAR4之ADC之大鼠PK型態的作用。

圖21展示使用MMAF (ADC23)或MMAE (ADC24)之代表性胺類型DAR4 ADC之活體內功效。

圖22展示使用MMAF (ADC34)或MMAE (ADC33)之代表性醯胺類型DAR4 ADC之活體內功效。

【實施方式】

相關申請案之交叉參考

本申請案主張2015年11月25日申請之美國臨時申請案第62/260,006號的優先權益，該案以全文引用的方式併入本文中。

本發明係關於抗體-藥物結合物(ADC)，其中複數種活性劑經由至少一個分支連接子結合於抗體。然而，如熟習此項技術者將認識到，此類結合物之抗體部分可經任何適合之配位體置換，且因此本發明同等地關於配位體-藥物結合物。因此，在上下文不矛盾下本文中提及及論述抗體-藥物結合物應理解為同等適用於配位體-藥物結合物及其對應中間物(例如配位體-連接子結合物)。在與本文所揭示之各種配位體-藥物結合物相關之所有態樣中，然而，配位體較佳為抗體。

分支連接子可包含分支單元，其中兩種活性劑經由次要連接子偶合於分支單元，而分支單元藉由主要連接子偶合於抗體。兩個或兩個以上此類分支連接子可結合於抗體，例如2-4個分支連接子，其各可偶合於如本文中更詳細描述之抗體之重鏈或輕鏈的不同C端半胱胺酸。任何分支連接

子上之活性劑可相同或不同，且在同一抗體上活性劑可在一個分支連接子與另一分支連接子之間不同。主要及/或次要連接子中之一或多者，視情況所有主要及次要連接子，可包含至少一個聚乙二醇單元。

分支連接子可包含藉由包含偶合於分支單元之聚乙二醇部分的第一分支及第二分支偶合於分支單元之一種活性劑。兩個或兩個以上此類分支連接子可結合於抗體，例如2-4個分支連接子，其各可偶合於抗體重鏈或輕鏈之不同C端半胱胺酸。

偶合於抗體重鏈或輕鏈之不同C端半胱胺酸的分支連接子可相同或不同。一個可為將活性劑偶合於各分支之第一類型分支連接子，而另一個可為其中分支之一具有聚乙二醇部分但不具有活性劑之第二類型分支連接子。在不同分支連接子之間或甚至在同一分支連接子內活性劑可相同或不同。舉例而言，包含兩種活性劑偶合於分支單元之一個分支連接子可偶合於抗體重鏈，且包含藉由包含聚乙二醇部分之第一分支及第二分支偶合於分支單元之一種活性劑的第二分支連接子可偶合於抗體輕鏈。此類組合允許1至8種經由分支連接子偶合於抗體之活性劑，其可相同或不同。此又允許傳遞每個抗體結合事件更高數目之活性劑至標靶細胞。

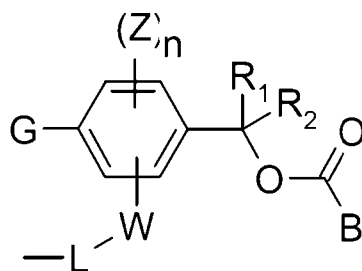
分支連接子之分支單元可包含諸如氮之原子。分支單元可包含允許三鍵之任何原子或基團，諸如胺、三級醯胺或三級或四級碳。在某些較佳實施例中，分支單元為胺或側鏈具有能夠參與醯胺或酯(較佳醯胺)鍵之基團的胺基酸。在一些實施例中，分支單元包含醯胺。當分支單元包含醯胺時，主要連接子可包含醯胺之羰基，或羰基可包括於其他分支之一中。

舉例而言，分支連接子可具有兩種活性劑，使得當分支單元為醯胺時，次要連接子包含醯胺之羰基。分支單元可具有僅僅一種活性劑，使得

當分支單元為醯胺時，第一分支或第二分支包含醯胺之羰基。

在一些實施例中，分支單元為離胺酸單元。離胺酸單元可包含改質，諸如 ϵ -胺基之甲基化，得到甲基離胺酸、二甲基離胺酸及三甲基離胺酸，甚至乙醯化、蘇素化及/或泛素化。在本發明之各種實施例中，分支單元可包含許多其他胺基酸。舉例而言，分支單元之胺基酸可選自離胺酸、5-羥基離胺酸、4-氧雜離胺酸、4-硫雜離胺酸、4-硒雜離胺酸、4-硫雜高離胺酸、5,5-二甲基離胺酸、5,5-二氟離胺酸、反式-4-去氫離胺酸、2,6-二胺基-4-己炔酸、順式-4-去氫離胺酸、6-*N*-甲基離胺酸、二胺基庚二酸、鳥胺酸、3-甲基鳥胺酸、 α -甲基鳥胺酸、瓜胺酸及高瓜胺酸。分支單元可包含L-胺基酸或D-胺基酸。分支單元可包含 α -胺基酸或 β -胺基酸。分支單元可包含天然存在之胺基酸或非天然存在之胺基酸。代替或除離胺酸之外，抗體-藥物結合物之分支單元可包含其他胺基酸。

活性劑可藉由可裂解或不可裂解鍵、可水解或不可水解鍵偶合於連接子。在某些較佳實施例中，活性劑藉由可裂解鍵偶合於分支連接子。舉例而言，抗體-藥物結合物可包含自消耗基團，較佳用於各活性劑，例如以自ADC釋放活性劑之自消耗基團，此類裂解基團具有下式：



其中

G為糖或糖酸，較佳葡萄糖醛酸或其衍生物；

B表示活性劑，諸如藥物；

W表示拉電子基團，較佳-C(O)NR'-，其中C(O)鍵結於該苯環且NR'

鍵結於L；

各Z獨立地表示(C₁-C₈)烷基、鹵素、氰基或硝基，較佳氫；

n為整數1至3，較佳3；

L包含將抗體共價連接於W之20至100個原子之鏈；且

R₁及R₂各獨立地為氫、(C₁-C₈)烷基或(C₃-C₈)環烷基，較佳氫，或R₁及R₂連同其附接之碳原子一起形成(C₃-C₈)環烷基環。

本文所揭示之任何其他式之裂解基團可以此方式類似使用。

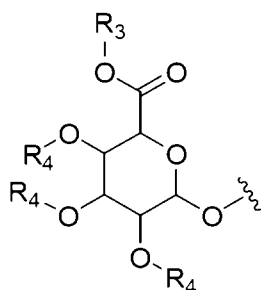
在一些實施例中，L及/或分支連接子包含親水性胺基酸，例如以提高抗體-藥物結合物、連接子及/或抗體-藥物結合物之前驅物的水溶性。親水性胺基酸可位於活性劑近端、抗體近端或插入沿分支連接子之任何地方，例如主要連接子及/或次要連接子、較佳各次要連接子中。舉例而言，親水性胺基酸可將L及/或主要連接子之肱共價連接於L及/或主要連接子之聚乙二醇單元。肽可將L及/或主要連接子之肱共價連接於L及/或主要連接子之聚乙二醇單元。

拉電子基團W可為-C(O)-、-C(O)NR'-、-C(O)O-、-SO₂NR'-、-P(O)R''NR'-、-SONR'-或-PO₂NR'-，較佳-C(O)NR'-，且R'及R''可各自獨立地為氫、(C₁-C₈)烷基、(C₃-C₈)環烷基、(C₁-C₈)烷氧基、(C₁-C₈)烷硫基、單或二(C₁-C₈)烷基胺基、(C₃-C₂₀)雜芳基或(C₆-C₂₀)芳基，較佳氫。在此類實施例中，W較佳取向，使得羰基、磷醯基、磺醯基或亞磺醯基直接結合於苯環。在Z表示拉電子基團之情況下，Z可表示此段落中針對W描述之任一部分。

W可表示-C(O)NR'-，且W之氮可為親水性胺基酸之氮原子。親水性胺基酸可為天然存在之胺基酸或非天然存在之胺基酸。親水性胺基酸可為

α -胺基酸或 β -胺基酸。親水性胺基酸可為精胺酸、天冬胺酸鹽、天冬醯胺、麩胺酸、麩醯胺酸、組胺酸、離胺酸、鳥胺酸、脯胺酸、絲胺酸或蘇胺酸，且可為D-胺基酸或L-胺基酸。在某些較佳實施例中，親水性胺基酸為天冬胺酸或麩胺酸，諸如L-天冬胺酸或L-麩胺酸。在其他較佳實施例中，親水性胺基酸為離胺酸或鳥胺酸，諸如L-離胺酸或L-鳥胺酸。在某些實施例中，親水性胺基酸為精胺酸，諸如L-精胺酸。在某些實施例中，親水性胺基酸包含具有在水溶液中在中性pH值下載有電荷之部分(例如胺、胍或羧基部分)的側鏈。

裂解基團之糖或糖酸(亦即先前圖中之G)例如藉由容易酶裂解之鍵連接於苯環，諸如藉由糖苷鍵連接於苯環上之氧取代基。糖或糖酸較佳為單醣，諸如葡萄糖醛酸或其衍生物，其能夠藉由酶，諸如 β -葡萄糖苷酸酶，例如待由結合物靶向之細胞中存在之酶，自ADC裂解。葡萄糖醛酸及其衍生物可由下式表示：



其中 R_3 為氫或羧基保護基，較佳為氫，且各 R_4 獨立地為氫或羥基保護基，較佳為氫。

羧基保護基可為例如有機合成中用於遮蔽羧酸之任何適合保護基，諸如甲基、甲氧基甲基、甲基硫基甲基、四氫吡喃基、苯甲氧基甲基、苯甲醯甲基、N-鄰苯二甲醯亞胺基甲基、2,2,2-三氯乙基、2-鹵基乙基、2-(對甲苯磺醯基)乙基、第三丁基、桂皮基、苯甲基、三苯基甲基、雙(鄰硝基苯基)甲基、9-蒎基甲基、2-(9,10-二側氧基)蒎基甲基、向日葵基、

2-三甲基矽烷基乙基、三甲基矽烷基或第三丁基二甲基矽烷基。在一些實施例中，整個部分 $R_3-OC(=O)-$ 經羧基遮蔽部分，諸如2-烷基-1,3-噁唑啉基置換。

經基保護基可為例如有機合成中適合於遮蔽經基之任何適合保護基，諸如乙醯基、甲基、乙氧基乙基、苯甲醯基、苯甲基、4-甲氧基苯甲基、3,4-二甲氧基苯甲基、四氫吡喃基(THP)、四氫呋喃基(THF)、第三丁基二甲基矽烷基(TBDMS)、三甲基矽烷基(TMS)、三乙基矽烷基(TES)、三異丙基矽烷基(TIPS)、第三丁基二苯基矽烷基(TBDPS)、三異丙基矽烷氧基甲基(TOM)、 β -甲氧基乙氧基甲基(MEM)、甲氧基甲基(MOM)、烯丙基或三苯甲基。

L及/或分支連接子可包含經取代或未經取代之具有1至100個碳原子，較佳20至80個碳原子之伸烷基，且滿足以下(i)至(iv)中之至少一個，較佳至少兩個：

(i)伸烷基包括至少一個不飽和鍵，較佳3或4個雙鍵且無參鍵，

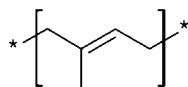
(ii)伸烷基包括至少一個伸雜芳基，

(iii)伸烷基之至少一個碳原子經一或多個選自氮(N)、氧(O)及硫(S)之雜原子，較佳至少一個氮及至少一個氧(例如如肟中)置換，以及

(iv)伸烷基經具有1至20個碳原子之一或多個烷基、較佳2或3個甲基取代。

在較佳實施例中，較佳在抗體重鏈或輕鏈之C端的抗體之半胱胺酸與異戊二烯基單元之碳原子形成硫醚鍵，藉此將抗體共價連接於分支連接子，例如主要連接子。因此，在一些實施例中，L及/或分支連接子(例如主要連接子)可包含至少一個各由下式表示之異戊二烯基單元，較佳兩個

異戊二烯基單元，其較佳可藉由類異戊二烯轉移酶識別，例如作為類異戊二烯轉移酶之產物或受質之部分。



在某些此類較佳實施例中，抗體包含能夠由類異戊二烯轉移酶識別之胺基酸模體。舉例而言，抗體之至少一個C端可包含能夠由類異戊二烯轉移酶識別(例如在形成抗體-藥物結合物前，作為類異戊二烯轉移酶之受質，或例如在形成抗體-藥物結合物後作為類異戊二烯轉移酶之產物)之胺基酸模體。抗體可進一步包含將抗體肽鏈連接於胺基酸模體之間隔子，諸如胺基酸或胺基酸段。間隔子可由1至20個連續胺基酸、較佳7個或更多個胺基酸組成。甘胺酸及脯胺酸為間隔子之較佳胺基酸，且可以任何組合使用，諸如一連串約7個甘胺酸。在一些實施例中，抗體C端包含胺基酸序列GGGGGGGCVIM。例如相對於ADC中不包括之抗體形式，抗體可在羧基端包含添加或缺失。

類異戊二烯轉移酶之實例包括法呢基蛋白質轉移酶(FTase)及四異戊二烯基轉移酶(GGTase)，其可催化法呢基或四異戊二烯基轉移至標靶蛋白之至少一個C端半胱胺酸。GGTase可分類為GGTase I或GGTase II。FTase及GGTase I可識別CAAX模體，且GGTase II可識別XXCC、XCXC或CXX模體，其中C表示半胱胺酸，A表示脂族胺基酸(例如異白胺酸、纈胺酸、甲硫胺酸、白胺酸)，且各X獨立地表示例如麩醯胺酸、麩胺酸、絲胺酸、半胱胺酸、甲硫胺酸、丙胺酸或白胺酸(參見Nature Rev. Cancer, 5(5):405-12 (2005)；Nature Chemical Biology 17:498-506 (2010)；Lane KT, Bees LS, J. Lipid Research, 47:681-699 (2006)；Kasey PJ, Seabra MC, J. Biological Chemistry, 271(10):5289-5292 (1996)，每一者以全文

引用之方式併入本文中)。

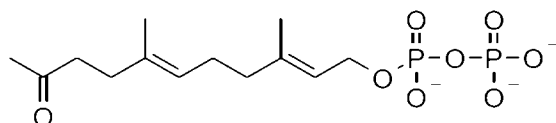
根據本發明之抗體-藥物結合物可包含胺基酸模體，諸如CYYX、XXCC、XCXC或CXX，較佳CYYX (其中C表示半胱胺酸，Y表示脂族胺基酸，諸如白胺酸、異白胺酸、纈胺酸及/或甲硫胺酸，且X表示決定類異戊二烯轉移酶之受質特異性之胺基酸，諸如麩醯胺酸、麩胺酸、絲胺酸、半胱胺酸、甲硫胺酸、丙胺酸及/或白胺酸)。

可使用來自各種來源之類異戊二烯轉移酶。舉例而言，類異戊二烯轉移酶可獲自人類、動物、植物、細菌、病毒或其他來源。在一些實施例中，使用天然存在之類異戊二烯轉移酶。在一些實施例中，可使用天然修飾或人工修飾之類異戊二烯轉移酶。舉例而言，類異戊二烯轉移酶可包含一或多個胺基酸取代、添加及/或缺失，及/或類異戊二烯轉移酶可藉由添加以下至少一者來修飾：組胺酸-標籤、GST、GFP、MBP、CBP、Isopeptag、BCCP、Myc-標籤、調鈣蛋白-標籤、FLAG-標籤、HA-標籤、麥芽糖結合蛋白-標籤、Nus-標籤、麩胱甘肽-S-轉移酶-標籤、綠色螢光蛋白-標籤、硫氧還蛋白-標籤、S-標籤、Softag 1、Softag 3、Strep-標籤、SBP-標籤、Ty-標籤及其類似物。

類異戊二烯轉移酶識別異受質(isosubstrate)及/或受質。術語異受質係指包含化學改質之受質類似物。類異戊二烯轉移酶可將抗體C端之特定胺基酸模體(例如CAAX模體)烷基化(參見例如 Duckworth, BP 等人, ChemBioChem, 8:98 (2007)；Uyen TT 等人, ChemBioChem, 8:408 (2007)；Labadie, GR 等人, J. Org. Chem., 72(24):9291 (2007)；Wollack, JW 等人, ChemBioChem, 10:2934 (2009)，各以引用的方式併入本文中)。官能化抗體可使用可將C端半胱胺酸烷基化之類異戊二烯轉移酶及異

受質產生。

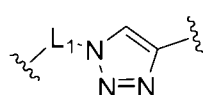
異受質可為例如具有下式之化合物：



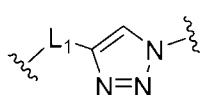
C端CAAX模體之半胱胺酸可使用類異戊二烯轉移酶結合於異受質。

在一些實施例中，例如AAX之模體之一部分隨後可藉由蛋白酶移除，例如僅僅留下類異戊二烯結合之半胱胺酸。半胱胺酸可視情況在羧基端，例如藉由酶而甲基化(參見例如 Bell, IM, J. Med. Chem., 47(8):1869 (2004)，其以引用的方式併入本文中)。

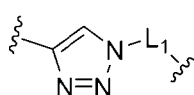
L及/或分支連接子，例如主要連接子，可包含藉由1,3-偶極環加成反應、雜狄爾斯-阿德反應、親核取代反應、非醇醛型羰基反應、碳-碳複鍵加成、氧化反應或點擊反應形成之結合單元。結合單元可藉由乙炔與疊氮化物之間的反應，或非醇醛型羰基反應，諸如醛基或酮基與肼或烷氧基胺之間的反應來形成；此類結合單元可由式(A)、(B)、(C)或(D)表示。



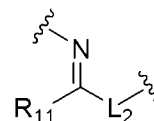
(A)



(B)



(C)



(D)

L₁為單一鍵或具有1至30個碳原子，較佳12個碳原子之伸烷基；

R₁₁為氫或具有1至10個碳原子之烷基，較佳甲基；且

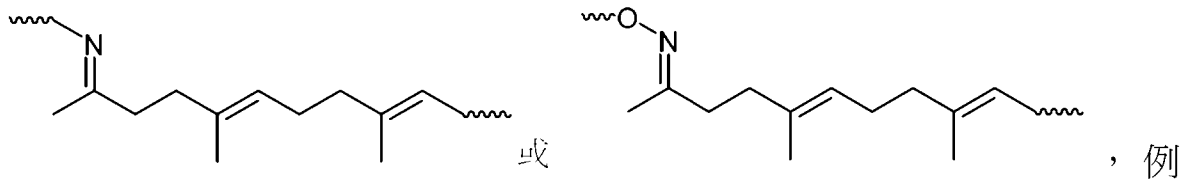
L₂為具有1至30個碳原子，例如10或11個，較佳11個碳原子之伸烷基。

在一些實施例中，L₁及/或L₂可包含至少一個異戊二烯基單元，較佳兩個異戊二烯基單元。L₂可由至少一個異戊二烯基單元、較佳兩個異戊二烯基單元組成。在較佳實施例中，異戊二烯基單元之碳原子與最佳在重鏈

或輕鏈C端之抗體之半胱胺酸的硫原子形成硫醚鍵，藉此共價連接抗體與分支連接子，例如主要連接子。

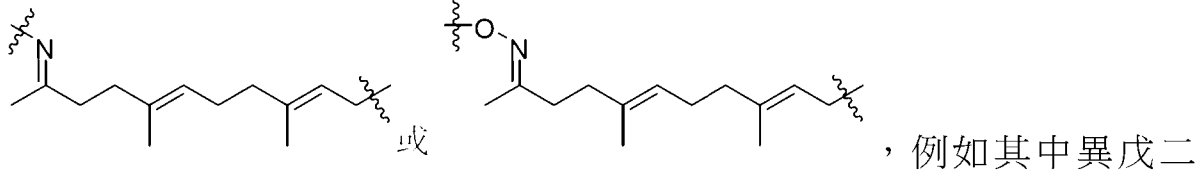
抗體-藥物結合物可包含由上述式(D)表示之結合單元，其中L₂由至少一個異戊二烯基單元、較佳兩個異戊二烯基單元組成。結合單元可為O取代之肟，亦即結合單元之氮可共價鍵結於經取代之氧。異戊二烯基單元之碳原子可與最佳在重鏈或輕鏈C端之抗體之半胱胺酸的硫原子形成硫醚鍵，藉此共價連接結合單元與抗體。

L及/或分支連接子，例如主要連接子，可包含由以下表示之異戊二烯基：



如其中異戊二烯基之碳原子與抗體之半胱胺酸之硫原子形成硫醚鍵，藉此共價連接異戊二烯基與抗體。異戊二烯基之氮可將異戊二烯基共價連接於L及/或分支連接子，例如主要連接子之聚乙二醇單元。

L及/或分支連接子，例如主要連接子，可包含由以下表示之異戊二烯基：



，例如其中異戊二烯基之碳原子與抗體之半胱胺酸之硫原子形成硫醚鍵，藉此共價連接異戊二烯基與抗體。異戊二烯基之氮可將異戊二烯基共價連接於L及/或分支連接子，例如主要連接子之聚乙二醇單元。

點擊化學反應可在溫和條件下進行，其可在抗體存在下在不使抗體變性下進行。點擊化學反應展示高反應特異性。因此，即使抗體具有各種

官能基(例如胺、羧基、甲醯胺及胍鹽)，點擊化學反應亦可例如在不影響抗體之胺基酸側鏈下進行。疊氮基與乙炔基之間的點擊化學反應例如可在抗體存在下發生，不改質抗體之胺基酸側鏈官能基。此外，點擊化學反應可準確靶向特定官能基，諸如在自然界中很少發現之官能基，無論反應物之性質如何。在一些情況下，選擇反應物以提高整體反應效率。舉例而言，疊氮化物-乙炔點擊化學反應可產生高產量三唑(參見例如Hia, RK等人, Chem. Rev., 109:5620 (2009)；Meldal, M及Tornøe, CW, Chem Rev., 108:2952 (2008)；Kolb, HC 等人，Angew. Chemie Int. Ed. Engl., 40:2004 (2001)，各以引用的方式併入本文中)。

疊氮化物及乙炔官能基不存在於天然蛋白質中。因此，胺基酸側鏈、N端胺或C端羧基中無一者受利用此等官能基之點擊化學反應影響。

連接單元可由 $-(CH_2)_r(V(CH_2)_p)_q$ -或 $-(CH_2CH_2X)_w$ -表示，其中

V 為單一鍵、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NR_{21}-$ 、 $-C(O)NR_{22}-$ 、 $-NR_{23}C(O)-$ 、 $-NR_{24}SO_2-$ 或 $-SO_2NR_{25}-$ ，較佳 $-O-$ ；

X為 $-O-$ 、 (C_1-C_8) 伸烷基或 $-NR_{21}-$ ，較佳 $-O-$ ；

R_{21} 至 R_{25} 各獨立地為氫、 (C_1-C_6) 烷基、 (C_1-C_6) 烷基 (C_6-C_{20}) 芳基或 (C_1-C_6) 烷基 (C_3-C_{20}) 雜芳基，較佳氫；

r為整數1至10，較佳2或3；

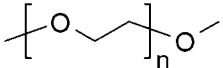
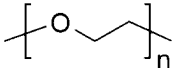
p為整數0至12，較佳1或2；

q為整數1至20；且

w為整數1至20，較佳4至20。

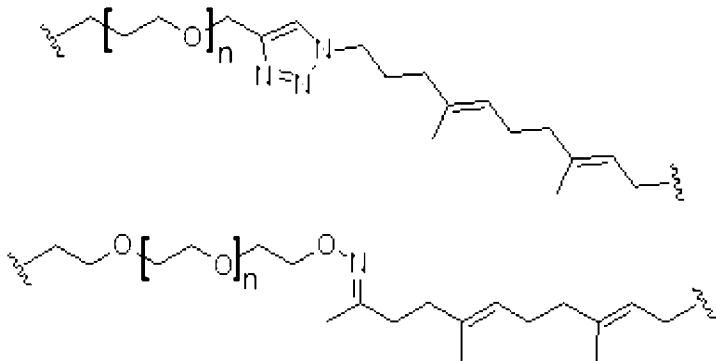
在一些較佳實施例中、q為整數2至12。在其他較佳實施例中，q為整數4至20。

L及/或分支連接子，例如主要連接子，可包含由式(A)、(B)、(C)或(D)表示之結合單元及由 $-(CH_2)_r(V(CH_2)_p)_q-$ 或 $-(CH_2CH_2X)_w-$ 表示之連接單元。

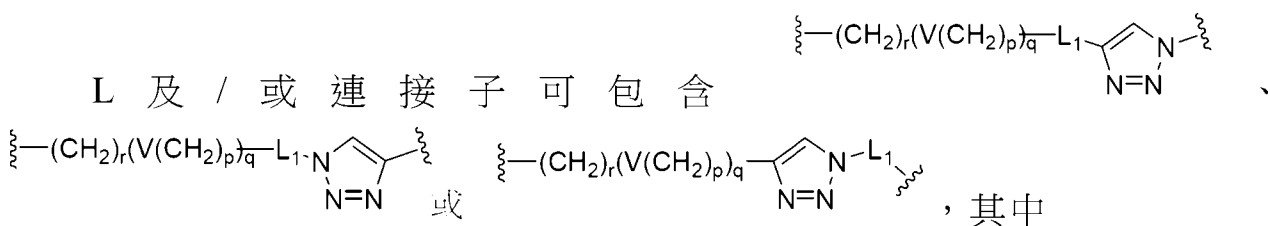
在較佳實施例中，L及/或分支連接子，例如主要連接子或次要連接子或兩者組合，包含至少一個由  或  表示之聚乙二醇單元。在某些實施例中，抗體-藥物結合物可包含1至20個 $-OCH_2CH_2-$ 單元，例如1至19個 $-OCH_2CH_2-$ 單元，諸如1至12個 $-OCH_2CH_2-$ 單元、5至12個 $-OCH_2CH_2-$ 單元、6至12個 $-OCH_2CH_2-$ 單元、5至20個 $-OCH_2CH_2-$ 單元、6至20個 $-OCH_2CH_2-$ 單元或4至20個 $-OCH_2CH_2-$ 單元。在主要及次要連接子中此類單元數目可變化。在其中主要連接子包含肟之實施例中，聚乙二醇單元較佳將肟共價連接於肽，例如肽之N端、肽之C端或肽之側鏈。

L及/或分支連接子，例如主要連接子，較佳包含由 $-(CH_2CH_2O)_n-$ 表示之聚乙二醇基團，其中n為1至20，諸如1至12、5至12、6至12、5至20或6至20。次要連接子較佳包含由 $-(CH_2CH_2O)_n-$ 表示之聚乙二醇基團，其中n為1至20，諸如1至12、5至12、6至12、5至20或6至20。在其中主要連接子包含肟之實施例中，聚乙二醇基團優先將肟共價連接於肽。在其中主要連接子包含肟之實施例中，聚乙二醇基團優先將肟共價連接於W，例如其中W由 $-C(O)NR'-$ 表示。聚乙二醇基團之碳可與W之原子(例如 $-C(O)NR'-$ 之氮)形成共價鍵且/或聚乙二醇基團之氧可為肟之氧。

在一些實施例中，主要連接子較佳由以下兩個結構之一表示，且因此，連接子可包含以下兩個結構之一：



其中n為整數1至20，諸如4至20。

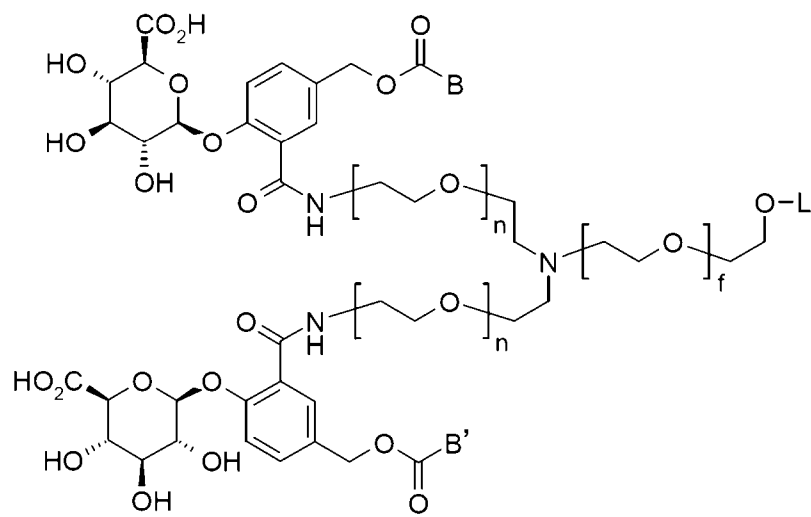


V表示單一鍵、-O-、-S-、-NR₂₁-、-C(O)NR₂₂-、-NR₂₃C(O)-、-NR₂₄SO₂-或-SO₂NR₂₅-，較佳-O-；

R₂₁至R₂₅各獨立地表示氫、(C₁-C₆)烷基、(C₁-C₆)烷基(C₆-C₂₀)芳基或(C₁-C₆)烷基(C₃-C₂₀)雜芳基；

- r為整數1至10，較佳2或3；
- p為整數0至10，較佳1或2；
- q為整數1至20，較佳1至6；且
- L₁為單一鍵。

在一些實施例中，抗體-藥物結合物包含以下結構：



其中：

B及B'表示活性劑，其可相同或不同；

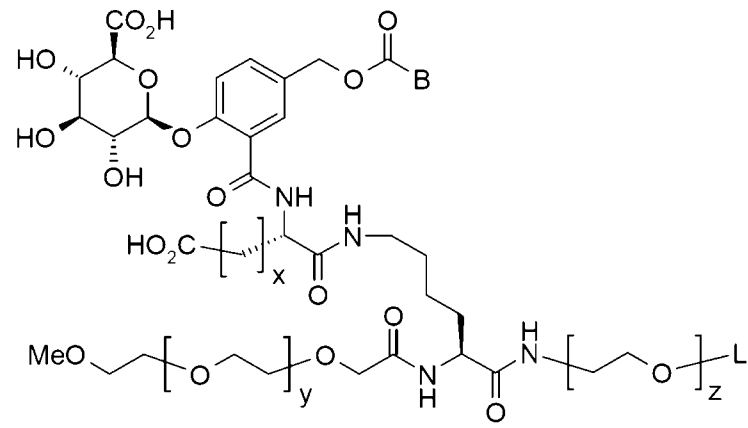
n每次出現時均獨立地表示整數0至30；

f每次出現時均獨立地表示整數0至30；且

L表示與抗體之連接。

在某些較佳實施例中，各n為整數1-20，較佳1-10。在某些較佳實施例中，f為整數1-20，較佳1-10。最佳地，各n及f經選擇，使得f + n小於20，例如小於15。

在一些實施例中，抗體-藥物結合物包含以下結構：



其中：

B表示活性劑；

x表示整數1至3；

y表示整數0至20；

z表示整數1至20；且

L表示與抗體之連接。

在一些實施例中，y及z獨立地表示整數2及20。在較佳實施例中，y及z獨立地表示整數1至19，較佳4至20。在某些較佳實施例中，y及z獨立地表示小於或等於20之整數。

本發明之抗體-藥物結合物可使用此項技術中已知之任何方法，包括分子生物學及細胞生物學方法製備。舉例而言，可使用短暫或穩定轉染方法。編碼能夠由類異戊二烯轉移酶識別之特定胺基酸模體的遺傳序列可使用標準PCR及/或接合技術插入已知之質體載體中，以便表現在C端具有特定胺基酸模體之抗體。因此，具有能夠由類異戊二烯轉移酶識別之至少一個胺基酸模體之抗體可在適合宿主中，例如CHO細胞或大腸桿菌中表現。

術語「醯基」為此項技術中公認的且係指由通式 $\text{C}(\text{O})-$ 、較佳烷基 $\text{C}(\text{O})-$ 表示之基團。

術語「醯胺基」為此項技術中公認的且係指經醯基取代之胺基，且可例如由式 $\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ 表示。

術語「醯氧基」為此項技術中公認的且係指由通式 $\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、較佳烷基 $\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 表示之基團。

術語「烷氧基」係指與氧附接之烷基、較佳低碳烷基。代表性烷氧基包括甲氧基、乙氧基、丙氧基、第三丁氧基及其類似基團。

術語「烷氧基烷基」係指經烷氧基取代之烷基且可由通式 $\text{烷基}-\text{O}-\text{烷基}$ 表示。

如本文所用，術語「烯基」係指含有至少一個雙鍵之脂族基且意欲包括「未經取代之烯基」與「經取代之烯基」，後者係指有取代基置換烯基之一或多個碳上之氫的烯基部分。此類取代基可存在於一或多個包括或不包括於一或多個雙鍵中之碳上。此外，此類取代基包括如下文所論述之對於烷基所涵蓋之所有取代基，除非穩定性不允許。舉例而言，涵蓋烯基經一或多個烷基、碳環基、芳基、雜環基或雜芳基取代。

「烷基」或「烷烴」為完全飽和之直鏈或分支鏈非芳族烴。通常，除非另外定義，否則直鏈或分支鏈烷基具有1至約20個碳原子，較佳1至約10個碳原子。直鏈及分支鏈烷基之實例包括甲基、乙基、正丙基、異丙基、正丁基、第二丁基、第三丁基、戊基、己基、戊基及辛基。C₁-C₆直鏈或分支鏈烷基亦稱為「低碳烷基」。

此外，如整個說明書、實例及申請專利範圍中所用之術語「烷基」(或「低碳烷基」)意欲包括「未經取代之烷基」與「經取代之烷基」，後者係指烴主鏈之一或多個碳上的氫經取代基置換的烷基部分。此類取代基在未另外規定時可包括例如鹵素、羥基、羰基(諸如羧基、烷氧基羰基、甲醯基或醯基)、硫羰基(諸如硫酯、硫代乙酸酯或硫代甲酸酯)、烷氧基、磷醯基、磷酸酯、膦酸酯、亞膦酸酯、胺基、醯胺基、脒、亞胺、氰基、硝基、疊氮基、硫氫基、烷基硫基、硫酸酯、磺酸酯、胺磺醯基、磺醯胺基、磺醯基、雜環基、芳烷基或芳族或雜芳族部分。熟習此項技術者應瞭解烴鏈上經取代之部分本身在適當時可經取代。舉例而言，經取代烷基之取代基可包括胺基、疊氮基、亞胺基、醯胺基、磷醯基(包括膦酸酯及亞膦酸酯)、磺醯基(包括硫酸酯、磺醯胺基、胺磺醯基及磺酸酯)及矽烷基以及醚、烷基硫基、羰基(包括酮、醛、羧酸酯及酯)、-CF₃、-CN及

其類似基團之經取代及未經取代形式。下文描述示例性經取代之烷基。環烷基可進一步經烷基、烯基、烷氧基、烷基硫基、胺基烷基、經羰基取代之烷基、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CN}$ 及類似基團取代。

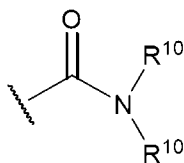
術語「 C_{x-y} 」當與諸如醯基、醯氧基、烷基、烯基、炔基或烷氧基之化學部分結合使用時意欲包括鏈中含有 x 至 y 個碳之基團。舉例而言，術語「 C_{x-y} 烷基」係指鏈中含有 x 至 y 個碳的經取代或未經取代之飽和烴基，包括直鏈烷基及分支鏈烷基，包括鹵烷基，諸如三氟甲基及2,2,2-三氟乙基等。 C_0 烷基指示在基團在末端位置時係指氫，在內部時係指一鍵。術語「 C_{2-y} 烯基」及「 C_{2-y} 炔基」係指經取代或未經取代之不飽和脂族基，其長度及可能之取代與上述烷基類似，但分別含有至少一個雙鍵或參鍵。

如本文所用，術語「烷基胺基」係指經至少一個烷基取代之胺基。

如本文所用，術語「烷基硫基」係指經烷基取代之硫醇基且可由通式烷基S-表示。

如本文所用，術語「炔基」係指含有至少一個參鍵之脂族基且意欲包括「未經取代之炔基」與「經取代之炔基」，後者係指炔基之一或多個碳上之氫經取代基置換的炔基部分。此類取代基可存在於一或多個包括或不包括於一或多個參鍵中之碳上。此外，此類取代基包括如上文所論述之對於烷基所涵蓋之所有取代基，除非穩定性不允許。舉例而言，涵蓋炔基經一或多個烷基、碳環基、芳基、雜環基或雜芳基取代。

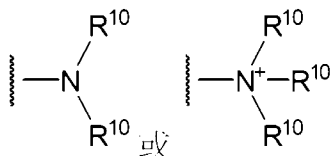
如本文所用，術語「醯胺」係指基團



其中各 R^{10} 獨立地表示氫或烴基，或兩個 R^{10} 與其附接之N原子一起完

成在環結構中具有4至8個原子之雜環。

術語「胺」及「胺基」為此項技術中公認的且係指未經取代與經取代之胺及其鹽，例如可由以下表示之部分：



其中各 R^{10} 獨立地表示氫或烴基，或兩個 R^{10} 與其附接之N原子一起完成在環結構中具有4至8個原子之雜環。

如本文所用，術語「胺基烷基」係指經胺基取代之烷基。

如本文所用，術語「羧基」係指由式 $\text{-CO}_2\text{H}$ 表示之基團。

如本文所用，術語「雜芳烷基(hetaralkyl)」及「雜芳烷基(heteroaralkyl)」係指經雜芳基取代之烷基。

如本文所用，術語「雜烷基」係指具有碳原子及至少一個雜原子之飽和或不飽和鏈，其中不存在相鄰之兩個雜原子。

術語「雜芳基(heteroaryl)」及「雜芳基(hetaryl)」包括經取代或未經取代之芳族單環結構，較佳5至7員環，更佳5至6員環，其環結構包括至少一個雜原子，較佳一至四個雜原子，更佳一個或兩個雜原子。術語「雜芳基」亦包括具有兩個或兩個以上環之多環系統，其中兩個或兩個以上碳為兩個鄰接環所共用，其中該等鄰接環中至少一個環為雜芳族環，例如其他環可為環烷基、環烯基、環炔基、芳基、雜芳基及/或雜環基。雜芳基包括例如吡咯、呋喃、噻吩、咪唑、噁唑、噻唑、吡唑、吡啶、吡嗪、噁嗪及嘧啶及其類似基團。

如本文所用，術語「雜原子」意謂除碳或氫之外的任何元素之原子。較佳雜原子為氮、氧及硫。

術語「雜環基」、「雜環(heterocycle)」及「雜環(heterocyclic)」係指經取代或未經取代之非芳族環結構，較佳3至10員環，更佳3至7員環，其環結構包括至少一個雜原子，較佳一至四個雜原子，更佳一或兩個雜原子。術語「雜環基」及「雜環」亦包括具有兩個或兩個以上環之多環環系統，其中兩個或兩個以上碳為兩個鄰接環所共用，其中至少一個環為雜環，例如其他環可為環烷基、環烯基、環炔基、芳基、雜芳基及/或雜環基。雜環基包括例如哌啶、哌嗪、吡咯啶、嗎啉、內酯、內醯胺及其類似基團。雜環基亦可經側氧基取代。舉例而言，「雜環基」涵蓋吡咯啶與吡咯啶酮。

如本文所用，術語「羥基烷基」係指經羥基取代之烷基。

術語「經取代」係指部分具有置換主鏈之一或多個碳上之氫的取代基。應瞭解，「取代」或「經……取代」包括如下隱含限制條件：此類取代係根據經取代之原子及取代基的容許價數，且取代產生穩定化合物，例如其不會諸如藉由重排、環化、消除等自發發生轉換。如本文所用，術語「經取代」預期包括有機化合物之全部容許取代基。在一廣泛態樣中，可容許取代基包括有機化合物之非環狀及環狀、分支及未分支、碳環及雜環、芳族及非芳族取代基。可容許取代基對於適當有機化合物可為一或多個且相同或不同。出於本發明之目的，諸如氮之雜原子可具有氫取代基及/或本文所描述之滿足雜原子價數之有機化合物的任何可容許取代基。取代基可包括本文所述之任何取代基，例如鹵素、羥基、羰基(諸如羧基、烷氧基羰基、甲醯基或醯基)、硫羰基(諸如硫酯、硫代乙酸酯或硫代甲酸酯)、烷氧基、磷醯基、磷酸酯、膦酸酯、亞膦酸酯、胺基、醯胺基、脒、亞胺、氰基、硝基、疊氮基、硫氫基、烷基硫基、硫酸酯、磺酸酯、

胺磺醯基、磺醯胺基、磺醯基、雜環基、芳烷基或芳族或雜芳族部分。熟習此項技術者應瞭解，適當時，取代基可自身經取代。除非特別陳述為「未經取代」，否則在本文中提及化學部分應理解為包括經取代之變體。舉例而言，提及「芳基」基團或部分隱含地包括經取代與未經取代之變體。

如本文所用，術語「硫烷基」係指經硫醇基取代之烷基。

如本文所用，術語「硫酯」係指基團- $C(O)SR^{10}$ 或- $SC(O)R^{10}$ ，其中 R^{10} 表示烴基。

如本文所用，術語「硫醚」等於醚，其中氧經硫置換。

「保護基」係指當附接至分子中之反應性官能基時遮蔽、降低或預防該官能基之反應性的一組原子。通常，在合成過程期間可根據需要選擇性移除保護基。保護基之實例可見於Greene及Wuts, *Protective Groups in Organic Chemistry*, 第3版, 1999, John Wiley & Sons, NY及Harrison等人, *Compendium of Synthetic Organic Methods*, 第1-8卷, 1971-1996, John Wiley & Sons, NY。代表性氮保護基包括(但不限於)甲醯基、乙醯基、三氟乙醯基、苯甲基、苯甲氧羰基(「CBZ」)、第三丁氧羰基(「Boc」)、三甲基矽烷基(「TMS」)、2-三甲基矽烷基-乙磺醯基(「TES」)、三苯甲基以及經取代之三苯甲基、烯丙氧基羰基、9-芴基甲氧基羰基(「Fmoc」)、硝基-藜蘆基氧基羰基(「NVOC」)及其類似基團。代表性烴基保護基包括(但不限於)烴基經醯基化(酯化)或烷基化之基團，諸如苯甲基及三苯甲基醚，以及烷基醚、四氫吡喃基醚、三烷基矽烷基醚(例如TMS或TIPS基團)、二醇醚，諸如乙二醇及丙二醇衍生物及烯丙基醚。

「共價偶合」包括兩種化學物質之直接鍵結與間接鍵結(例如經由一系列插入原子)。舉例而言，胺基酸可例如藉由在胺基酸之羧基與聚乙二醇之羥基之間形成酯，而直接共價偶合於聚乙二醇，或例如藉由使聚乙二醇與表氯醇反應以形成環氧丙基醚且使所得環氧化物與胺基酸之胺基反應，藉此經由2-羥基丙基連接子共價連接胺基酸與聚乙二醇，而間接共價偶合於聚乙二醇。用於直接或間接偶合不同部分之各種部分及反應為此項技術中所熟知。在某些較佳實施例中，除非上下文另外指示，否則間接鍵結僅僅涉及1-10個插入原子(例如亞甲基、二丁醚、三肽等)，最佳1-6個插入原子。

如本文所用，「預防」病症或病狀之治療劑係指在統計樣本中，相對於未經治療之對照樣本，減少病症或病狀在經治療樣本中之發生率，或相對於未經治療之對照樣本，延緩病症或病狀之一或多種症狀之發作或降低病症或病狀之一或多種症狀之嚴重程度的化合物。

術語「治療」包括預防性及/或治療性治療。術語「預防性或治療性」治療為此項技術中公認的且包括向宿主投與目標組合物中之一或多者。若在臨床表現不希望之病症(例如，宿主動物之疾病或其他不希望之狀態)之前投與目標組合物則治療為預防性的(亦即，其保護宿主避免發展不希望之病症)，而若在表現不希望之病症之後投與，則治療為治療性的(亦即，其意欲減輕、改善或穩定現存不希望之病狀或其副作用)。

術語「前藥」意欲涵蓋在生理條件下轉化為本發明之治療活性劑的化合物。製備前藥之通用方法為包括一或多個在生理學條件下水解產生所要分子的所選部分。在其他實施例中，前藥藉由宿主動物之酶活性轉化。舉例而言，酯或碳酸酯(例如醇或羧酸之酯或碳酸酯)為較佳前藥。

術語「抗體」係指經由免疫球蛋白分子可變區內之至少一個抗原識別位點識別且特異性結合於不同分子的免疫球蛋白分子。如本文所用，術語「抗體」包括完整多株抗體、完整單株抗體、抗體片段(例如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd及Fv片段)、單鏈Fv (scFv)突變體、多特異性抗體(諸如由兩種或兩種以上完整抗體產生之雙特異性抗體)、嵌合抗體、人類化抗體、人類抗體、包括抗體之抗原決定區之融合蛋白及包括抗原識別位點之任何其他經修飾之免疫球蛋白分子。抗體可為免疫球蛋白五個主要類別中之任一者：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM或其亞類(同型)(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2)，基於其重鏈恆定域之身分，分別稱為 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 。免疫球蛋白之不同類別具有不同且熟知之次單元結構及三維組態。術語「抗體」不指與免疫球蛋白序列無同源性之分子。舉例而言，如本文所用，術語「抗體」不包括「重複抗體(repebody)」。

術語「抗原結合片段」係指完整抗體之一部分且係指完整抗體之抗原決定可變區。抗體片段之實例包括Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd及Fv片段、線性抗體、單鏈抗體及由抗體片段形成之多特異性抗體。

術語「單株抗體」係指涉及單一抗原決定子或抗原決定基之高度特異性識別及結合的均質抗體。此與多株抗體形成對比，多株抗體通常包括針對多種不同抗原決定子之不同抗體。術語「單株抗體」包括抗體片段(諸如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv)、單鏈(scFv)突變體、包括抗體部分之融合蛋白及包括抗原識別位點之任何其他經修飾之免疫球蛋白分子以及完整與全長單株抗體，但不限於此。此外，「單株抗體」係指以多種方法產生之此類抗體，該等方法包括(但不限於)融合瘤、噬菌體選擇、重組表現及轉殖基因動物。

術語「人類化抗體」係指非人類(例如鼠類)抗體之形式，其為特定免疫球蛋白鏈、嵌合免疫球蛋白或含有最少非人類(例如鼠類)序列之其片段。一般而言，人類化抗體為人類免疫球蛋白，其中互補決定區(CDR)中之殘基置換為具有所需特異性、親和力及能力之非人類物種(例如小鼠、大鼠、兔或倉鼠)之CDR的殘基(參見例如Jones等人, *Nature*, 321:522-525 (1986)；Riechmann等人, *Nature*, 332:323-327 (1988)；Verhoeyen等人, *Science*, 239:1534-1536 (1988))。在一些情況下，人類免疫球蛋白之Fv構架區(FR)殘基置換為具有所需特異性、親和力及結合能力之來自非人類物種之抗體的對應殘基。人類化抗體可利用Fv構架區及/或所置換之非人類殘基內之其他殘基之取代而進一步修飾，以優化及最佳化抗體特異性、親和力及/或結合能力。一般而言，人類化抗體包括至少一個及通常兩個或三個含有對應於非人類免疫球蛋白之所有或實質上所有CDR區之可變結構域的實質上全部，而所有或實質上所有構架區(FR)具有人類免疫球蛋白共同序列之FR。人類化抗體亦可包括通常人類免疫球蛋白之免疫球蛋白恆定區或結構域(Fc)之至少一部分。用於產生人類化抗體之方法之實例描述於以引用的方式併入本文中之美國專利第5,225,539號。

如本文所用，術語「人類抗體」係指由人類核苷酸序列編碼之抗體或具有對應於使用此項技術中已知之任何技術由人類產生之抗體之胺基酸序列的抗體。人類抗體之此定義包括完整全長抗體及/或其片段。

術語「嵌合抗體」係指其中免疫球蛋白分子之胺基酸序列來源於兩種或兩種以上物種之抗體，物種之一較佳為人類。一般而言，輕鏈與重鏈之可變區對應於來源於哺乳動物(例如小鼠、大鼠、兔等)之一種物種之具有所需特異性、親和力及能力的抗體的可變區，而恆定區與來源於另一物

種(通常人類)之抗體中之序列同源，例如以避免引發該物種中免疫反應。

術語「抗原決定基」與「抗原決定子」在本文中可互換地使用且係指能夠由特定抗體識別且特異性結合之抗原部分。當抗原為或包含多肽或蛋白質時，抗原決定基可由相鄰及/或非相鄰胺基酸形成，例如藉由蛋白質二級、三級及/或四級摺疊而並置。由相鄰胺基酸形成之抗原決定基通常在蛋白質變性後保留，而藉由三級摺疊形成之抗原決定基可在蛋白質變性後喪失。抗原決定基通常包括呈獨特空間組態之3個或更多個、5個或更多個或者8至10個或更多個胺基酸。

抗體「特異性結合」於抗原決定基或抗原分子，此意謂與替代物質，包括不相關蛋白質相比，抗體與抗原決定基或抗原分子更頻繁、更迅速、更長持續時間、更大親和力或上述各者之某一組合相互作用或締合。在特定實施例中，「特異性結合」意謂例如抗體以約0.1 mM或更低、但更通常小於約1 μ M之 K_D 結合於蛋白質。在特定實施例中，「特異性結合」意謂抗體有時以約0.1 μ M或更低之 K_D 且其他時候以約0.01 μ M或更低之 K_D 結合於蛋白質。因為不同物種中同源蛋白質之間的序列一致性，所以特異性結合可包括在超過一個物種中識別特定蛋白質之抗體。應瞭解特異性結合於第一標靶之抗體或結合殘基可或不可特異性結合於第二標靶。如上所述，「特異性結合」不一定需要(雖然其可包括)排他性結合，亦即結合於單個標靶。一般而言，但不一定，本文所用之術語結合意謂特異性結合。

抗體，包括其片段/衍生物及單株抗體，可使用此項技術中已知之方法獲得(參見例如McCafferty等人, Nature 348:552-554 (1990)；Clackson等人, Nature 352:624-628；Marks等人, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)；Marks等人, Bio/Technology 10:779-783 (1992)；Waterhouse等

人，Nucleic Acids Res. 21:2265-2266 (1993)；Morimoto 等人，J Biochemical & Biophysical Methods 24:107-117 (1992)；Brennan等人，Science 229:81(1985)；Carter 等人，Bio/Technology 10:163-167 (1992)；Kohler 等人，Nature 256:495 (1975)；Kilpatrick 等人，Hybridoma 16(4):381-389 (1997)；Wring等人，J. Pharm. Biomed. Anal. 19(5):695-707 (1999)；Bynum等人，Hybridoma 18(5):407-411 (1999)；Jakobovits 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993)；Jakobovits 等人，Nature, 362:255-258 (1993)；Bruggemann 等人，Year Immuno. 7:33 (1993)；Barbas 等人，Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91:3809-3813 (1994)；Schier 等人，Gene 169:147-155 (1995)；Yelton 等人，J. Immunol. 155:1994-2004 (1995)；Jackson 等人，J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995)；Hawkins 等人，J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992)；美國專利第4,816,567號、第5,514,548號、第5,545,806號、第5,569,825號、第5,591,669號、第5,545,807號；PCT專利申請公開案第WO 97/17852號，各以全文引用的方式併入本文中)。

抗體可為莫羅單抗-CD3阿昔單抗、利妥昔單抗、達利珠單抗、帕利珠單抗、英利昔單抗、曲妥珠單抗、依那西普、巴利昔單抗、吉妥珠單抗、阿侖單抗、替伊莫單抗、阿達木單抗、阿法賽特、奧馬珠單抗、艾法珠單抗、托西莫單抗、西妥昔單抗、ABT-806、貝伐單抗、那他珠單抗、蘭比珠單抗、帕尼單抗、艾庫組單抗、利納西普、賽妥珠單抗、羅米司亭、AMG-531、戈利木單抗、優特克單抗、ABT-874、貝拉西普、貝利單抗、阿塞西普、抗CD20抗體、康納單抗、托西利單抗、阿利珠單抗、美泊利單抗、帕妥珠單抗、HuMax CD20、曲美單抗、替西單抗、伊派利

單抗、IDEC-114、伊諾妥珠單抗、HuMax EGFR、阿柏西普、HuMax-CD4、替利珠單抗、奧昔珠單抗、卡托莫西單抗、抗EpCAM抗體IGN101、阿德卡單抗、奧戈伏單抗、迪奴圖單抗、吉瑞昔單抗、德諾單抗、貝頻珠單抗、莫維珠單抗、依夫單抗、瑞昔單抗、LY2469298及維托珠單抗。

當抗體包含至少一個輕鏈及至少一個重鏈時，抗體之至少一個輕鏈或抗體之至少一個重鏈或兩者可包含具有能夠由類異戊二烯轉移酶識別之胺基酸模體的胺基酸區域。因為抗體可包含四個多肽鏈(例如兩個重鏈及兩個輕鏈)，所以抗體可包含四個異戊二烯化序列，其中每一者可用於經由連接子將活性劑結合於抗體。因此，抗體-藥物結合物可包含4個各結合於活性劑之連接子。因此，抗體-藥物結合物可包含至少一個連接子及至少一種活性劑。抗體-藥物結合物可包含至少兩個連接子，且抗體-藥物結合物可包含至少兩種活性劑。抗體-藥物結合物可包含1、2、3或4個連接子。抗體-藥物結合物可包含1、2、3或4種活性劑。

活性劑可為藥物、毒素、親和配位體、偵測探針或前述任一者之組合。

活性劑可選自埃羅替尼；硼替佐米；氟維司群；舒癌特；來曲唑；甲磺酸伊馬替尼；PTK787/ZK 222584；奧沙利鉑；5-氟尿嘧啶；甲醯四氫葉酸；雷帕黴素(西羅莫司)；拉帕替尼；洛那法尼；索拉非尼；吉非替尼；AG1478；AG1571；烷基化劑(例如噻替派或環磷醯胺)；烷基磺酸酯(例如白消安、英丙舒凡或哌泊舒凡)；氮丙啶(例如苯唑多巴、卡波醌、米特多巴或尤利多巴)；伸乙基亞胺、甲基蜜胺、六甲蜜胺、三伸乙基三聚氰胺、三伸乙基磷醯胺、三伸乙基硫代磷醯胺、三羥甲基蜜胺；多聚乙

醯(例如布拉他辛或布拉他辛酮)；喜樹鹼及喜樹鹼衍生物及代謝物(SN-38)；拓朴替康；苔蘚蟲素；海綿抑素；CC-1065 (包括其阿多來新、卡折來新或比折來新合成類似物)；念珠藻環肽(例如念珠藻素1或念珠藻素8)；海兔毒素；倍癌黴素(包括合成類似物，例如KW-2189及CB1-TM1)；艾榴塞洛素；水鬼蕉鹼；沙考地汀；海綿抑素；氮芥(例如苯丁酸氮芥、萘氮芥、氯磷醯胺、雌氮芥、異環磷醯胺、甲氮芥、甲氮芥氧化物鹽酸鹽、美法侖、新恩比興、芬司特瑞、潑尼氮芥、曲磷胺或尿嘧啶氮芥)；亞硝基脲(例如卡莫司汀、氯脲菌素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀或雷莫司汀)；抗生素(例如烯二炔抗生素，諸如選自卡奇黴素 γ 1I及卡奇黴素 Ω 1I之卡奇黴素或包括達內黴素A之達內黴素)；雙膦酸鹽(例如氯屈膦酸鹽；埃斯培拉黴素；新抑癌蛋白發色團或相關色蛋白烯二炔抗生素發色團、阿克拉黴素、放射菌素、安麴黴素、偶氮絲胺酸、博來黴素、放線菌素C、卡拉比辛、洋紅黴素、嗜癌菌素、色黴素、放線菌素D、道諾黴素、德托黴素、6-重氮基-5-側氧基-L-正白胺酸、小紅莓(例如嗎啉基-小紅莓、氰基嗎啉基-小紅莓、2-吡咯啉基-小紅莓、脂質體小紅莓或去氧小紅莓)、表柔比星、依索比星、麻西羅黴素、絲裂黴素(例如絲裂黴素C、黴酚酸、諾加黴素、橄欖黴素、培洛黴素、潑非黴素、嘌呤黴素、奎那黴素、羅多比星、鏈黴素、鏈脲菌素、殺結核菌素、烏苯美司、淨司他丁或左柔比星)；抗代謝物(例如5-氟尿嘧啶)；葉酸類似物(例如迪諾特寧、甲胺喋呤、蝶羅呤或曲美沙特)；嘌呤類似物(例如氟達拉賓、6-巰基嘌呤、硫米嘌呤或硫鳥嘌呤)；嘧啶類似物(例如安西他濱、阿紮胞苷、6-氮尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、雙去氧尿苷、去氧氟尿苷、依諾他濱或氟尿苷)；雄激素(例如卡魯甾酮、屈他雄酮丙酸鹽、環硫雄醇、美雄烷)或甾

內酯)；抗腎上腺素(例如胺魯米特、米托坦或曲洛司坦)；葉酸補充劑(例如亞葉酸)；乙醯葡醛酯；醛磷醯胺糖苷；胺基乙醯丙酸；恩尿嘧啶；安吡啶；貝塔布辛；比生群；艾達曲克；得弗伐胺；秋水仙胺；地吡醯；艾弗鳥胺酸；依利醋銨；埃坡黴素；依託格魯；硝酸鎂；羥基脲；蘑菇多醣；氯尼達明；類美登素(例如美登素或安絲菌素)；單端孢黴烯(尤其T-2毒素、弗納庫林A、桿孢菌素A或胺癸叮)；丙脒脲；米托蒽醯；莫比達摩；二胺硝吡啶；噴司他丁；蛋胺氮芥；吡柔比星；洛索蒽醯；2-乙基醯肼；丙卡巴肼；多醣K複合物；雷佐生；根瘤菌素；西索菲蘭；螺旋鍺；細交鏈孢菌酮酸；三亞胺醯；2,2',2''-三氯三乙胺；單端孢黴烯(尤其T-2毒素、弗納庫林A、桿孢菌素A及胺癸叮)；胺基甲酸酯；長春地辛；達卡巴嗪；甘露氮芥；二溴甘露醇；二溴衛矛醇；哌泊溴烷；加西托星；阿拉伯糖苷；環磷醯胺；噻替派；類紫杉醇(例如太平洋紫杉醇)、ABRAXANETM cremophor-free、太平洋紫杉醇經白蛋白工程改造之奈米粒子調配物、多西他賽；苯丁酸氮芥；吉西他濱；6-硫代鳥嘌呤；巯基嘌呤；鉑類似物(例如順鉑或卡鉑)；長春鹼；鉑；依託泊苷、異環磷醯胺；米托蒽醯；長春新鹼；長春瑞賓；諾凡特龍；替尼泊苷；依達曲沙；道諾黴素；胺基喋呤；希羅達；伊班膦酸鹽；CPT-11；拓撲異構酶抑制劑(RFS 2000)；二氟甲基鳥胺酸；類視黃素(例如視黃酸)；卡培他濱及其醫藥學上可接受之鹽、溶劑合物、酸或衍生物，但不一定限於此。

活性劑可選自(i)用於調控或抑制激素對腫瘤之作用的抗激素劑，諸如抗雌激素及選擇性雌激素受體調節劑，包括例如他莫昔芬、雷洛昔芬、曲洛昔芬、4-羥基他莫昔芬、曲沃昔芬、克肱昔芬、LY117018、奧那司酮及托瑞米芬；(ii)抑制芳香酶之芳香酶抑制劑，其調節腎上腺中雌激素

產生，例如4(5)-咪唑、胺魯米特、乙酸甲地孕酮、依西美坦、來曲唑及阿那曲唑；(iii)抗雄激素，諸如氟他胺、尼魯胺、比卡魯胺、亮丙立德及戈舍瑞林；以及曲沙他濱(1,3-二氧雜環戊烷核苷胞嘧啶類似物)；(iv)芳香酶抑制劑；(v)蛋白激酶抑制劑；(vi)脂質激酶抑制劑；(vii)反義寡核苷酸，尤其抑制涉及黏附細胞之信號傳導路徑的基因之表現的反義寡核苷酸，例如PKC- α 、Raf、H-Ras；(viii)核糖核酸酶，例如VEGF抑制劑，諸如核糖核酸酶及HER2表現抑制劑；(ix)疫苗，諸如基因療法疫苗；ALLOVECTIN® 疫苗、LEUVECTIN 疫苗、VAXID 疫苗；PROLEUKIN® rIL-2；LURTOTECAN® 拓撲異構酶 1 抑制劑；ABARELIX® rmRH；(x)抗血管生成劑，諸如貝伐單抗；以及(xi)其醫藥學上可接受之鹽、溶劑合物、酸或衍生物。

另外，細胞因子可用作活性劑。細胞因子為小的細胞信號傳導蛋白分子，其藉由多個細胞分泌且為在細胞間通信中廣泛使用之信號傳導分子類別。細胞因子包括單核因子、淋巴因子、傳統多肽激素及其類似物。細胞因子之實例包括生長激素(例如人類生長激素、N-甲硫胺鹽基人類生長激素或牛類生長激素)；副甲狀腺激素；甲狀腺素；胰島素；胰島素原；鬆弛素；鬆弛素原；醣蛋白激素(例如促卵泡激素(FSH)、促甲狀腺激素(TSH)或促黃體激素(LH))；肝生長因子；纖維母細胞生長因子；促乳素；胎盤催乳激素；腫瘤壞死因子- α 、腫瘤壞死因子- β ；苗勒氏管抑制物質；小鼠促性腺激素相關肽；抑制素；活化素；血管內皮生長因子；整合素、血小板生成素(TPO)；神經生長因子(例如NGF- β)；血小板生長因子；轉型生長因子(TGF)(例如TGF- α 或TGF- β)；胰島素樣生長因子-I、胰島素樣生長因子-II；紅血球生成素(EPO)；骨誘導因子；干擾素(例如干

擾素- α 、干擾素- β 或干擾素- γ)；群落刺激因子(CSF)(例如巨噬細胞-CSF (M-CSF)、顆粒細胞-巨噬細胞-CSF (GM-CSF)或顆粒細胞-CSF (G-CSF))；介白素(IL)(例如IL-1、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11或IL-12)；腫瘤壞死因子(TNF)(例如TNF- α 或TNF- β)；以及多肽因子(例如LIF或kit配位體)，但不限於此。此外，術語「細胞因子」亦包括來自天然來源或重組細胞培養基之細胞因子及天然序列細胞因子之生物活性相等物。

術語「毒素」係指對活細胞或生物體有毒之物質。毒素可為在與身體組織接觸或由身體組織吸收後，例如經由與一或多種諸如酶或細胞受體之生物大分子相互作用，能夠引起細胞功能異常或細胞死亡之小分子、肽或蛋白質。毒素包括植物毒素及動物毒素。動物毒素之實例包括白喉毒素、肉毒桿菌毒素、破傷風毒素、痢疾毒素、霍亂毒素、河豚毒素鹼、短裸甲藻毒素及雪卡毒素，但不限於此。植物毒素之實例包括蓖麻毒素及AM-毒素，但不限於此。

小分子毒素之實例包括阿瑞他汀、妥布賴森、格爾德黴素(Kerr等人, 1997, Bioconjugate Chem. 8(6):781-784)、類美登素(EP 1391213, ACR 2008, 41, 98-107)、卡奇黴素(美國專利公開案第2009/0105461號, Cancer Res. 1993, 53, 3336-3342)、道諾黴素、小紅莓、甲胺喋呤、長春地辛、SG2285 (Cancer Res. 2010, 70(17), 6849-6858)、海兔毒素、海兔毒素類似物阿瑞他汀(美國專利第5,635,483號)、念珠藻素、喜樹鹼、根瘤菌素衍生物、CC 1065類似物或衍生物、倍癌黴素、烯二炔抗生素、埃斯培拉黴素、埃坡黴素、吡咯并苯并二氮呋(PBD)衍生物、 α -瓢菌素及類毒素，但不限於此。毒素可藉由微管蛋白結合、DNA結合、拓撲異構酶遏制及其

類似作用來展現細胞毒性及細胞生長抑制活性。

術語「配位體」係指能夠與標靶生物分子形成複合物之分子。配位體之一實例為結合於標靶蛋白之預定位置以傳輸信號之分子。配位體可為受質、抑制劑、刺激劑、神經傳導物或放射性同位素。

「可偵測部分」或「標記」係指可藉由光譜法、光化學、生物化學、免疫化學、放射性或化學方式偵測之組合物。舉例而言，適用標籤包括 ^{32}P 、 ^{35}S 、螢光染料、電子緻密試劑、酶(例如ELISA中常用之酶)、生物素-抗生蛋白鏈菌素、地高辛、半抗原及可獲得抗血清或單株抗體之蛋白質或具有與標靶互補之序列的核酸分子。可偵測部分常常產生可用於定量樣品中結合之可偵測部分之量的可量測信號，諸如放射性、發色或螢光信號。信號定量可例如藉由閃爍計數、密度測定法、流動式細胞量測術、ELISA或藉由完整或隨後消化肽(可評估一或多種肽)之質譜分析進行直接分析來實現。

如本文所用，術語「探針」係指如下物質，其可(i)提供可偵測信號；(ii)與第一探針或第二探針相互作用，以改變由第一或第二探針提供之可偵測信號，諸如螢光共振能量轉移(FRET)；(iii)使與抗原或配位體之相互作用穩定化或增加結合親和力；(iv)藉由物理參數，諸如電荷、疏水性等，影響電泳遷移率或細胞侵入活性；或(v)控制配位體親和力、抗原-抗體結合或離子複合物形成。

活性劑可為免疫調節化合物、抗癌劑、抗病毒劑、抗菌劑、抗真菌劑、抗寄生蟲劑或其組合。

免疫調節化合物可選自胺基己酸、硫唑嘌呤、溴麥角環肽、苯丁酸氮芥、氯奎寧、環磷醯胺、環孢靈、環孢靈A、達那唑、脫氫表雄酮、地

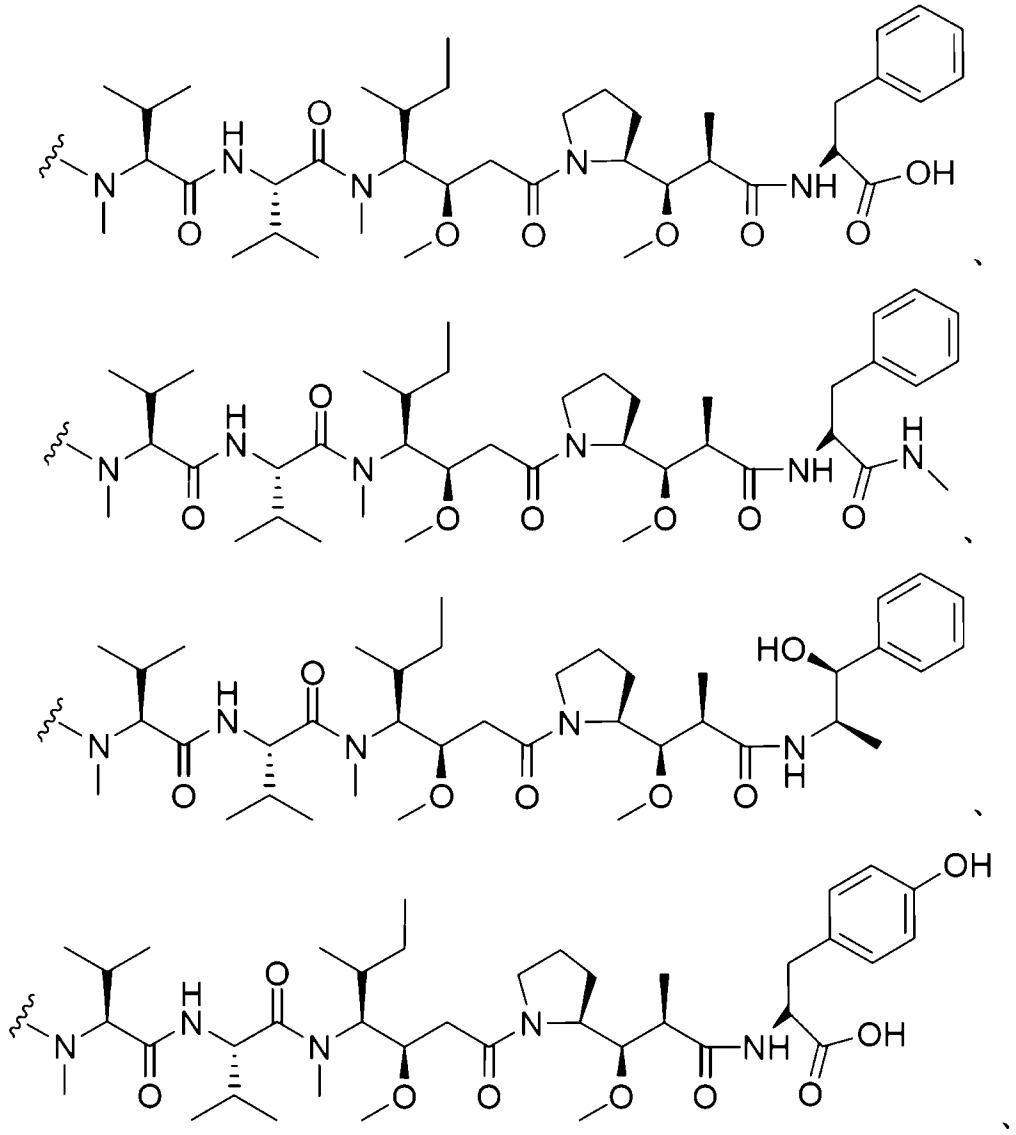
塞米松、依那西普、氫化可的松、羥基氯奎、英利昔單抗、美洛昔康、甲胺喋呤、麥考酚酸莫酯、潑尼松、西羅莫司及他克莫司。抗癌劑可選自1-甲基-4-苯基吡錠離子、5-乙炔基-1-β-D-呋喃核糖基咪唑-4-甲醯胺(EICAR)、5-氟尿嘧啶、9-胺基喜樹鹼、放線菌素D、天冬醯胺酶、比卡魯胺、雙氯乙基亞硝基脲(BCNU)、博萊黴素、博萊黴素A2、博萊黴素B2、白消安、喜樹鹼、卡鉑、卡莫司汀、CB1093、苯丁酸氮芥、順鉑、克立那托、環磷醯胺、阿糖胞苷、胞嘧啶阿拉伯糖苷、賽特杉、達卡巴嗪、放線菌素D、道諾黴素、達卡巴嗪、去鐵胺、去甲氧基-竹紅菌素A、多烯紫杉醇、去氧氟尿苷、小紅莓、EB1089、表柔比星、依託泊苷、氟尿苷、氟達拉賓、氟他胺、吉西他濱、戈舍瑞林、羥基脲、艾達黴素、異環磷醯胺、干擾素-α、干擾素-γ、伊立替康、KH1060、亮丙立德乙酸鹽、洛莫司汀、洛伐他汀、甲地孕酮、美法侖、巯基嘌呤、甲胺喋呤、絲裂黴素、絲裂黴素C、米托蒽醌、黴酚酸、氮芥、亞硝基脲、太平洋紫杉醇、培洛黴素、感光劑Pe4、酞花青、吡柔比星、普卡黴素、丙卡巴肼、雷洛昔芬、雷替曲塞、雷利米得、利巴韋林、星形孢菌素、他莫昔芬、替尼泊苷、撒利多邁、毒胡蘿蔔素、硫鳥嘌呤、噻唑呋林、拓朴替康、曲奧舒凡、曲美沙特、腫瘤壞死因子、萬珂、維拉帕米、維替泊芬、長春鹼、長春新鹼、長春瑞賓及左柔比星。抗病毒劑可選自噴昔洛韋(penciclovir)、發昔洛韋(valacyclovir)、加昔洛韋(ganciclovir)、膦甲酸、利巴韋林、碘苷、阿糖腺苷、曲氟尿苷、阿昔洛韋、發昔洛韋(famciclovir)、金剛胺、金剛乙胺、西多福韋(cidofovir)、反義寡核苷酸、免疫球蛋白及干擾素。抗菌劑可選自氯黴素(chloramphenicol)、萬古黴素(vancomycin)、甲硝噻唑(metronidazole)、甲氧苄啶

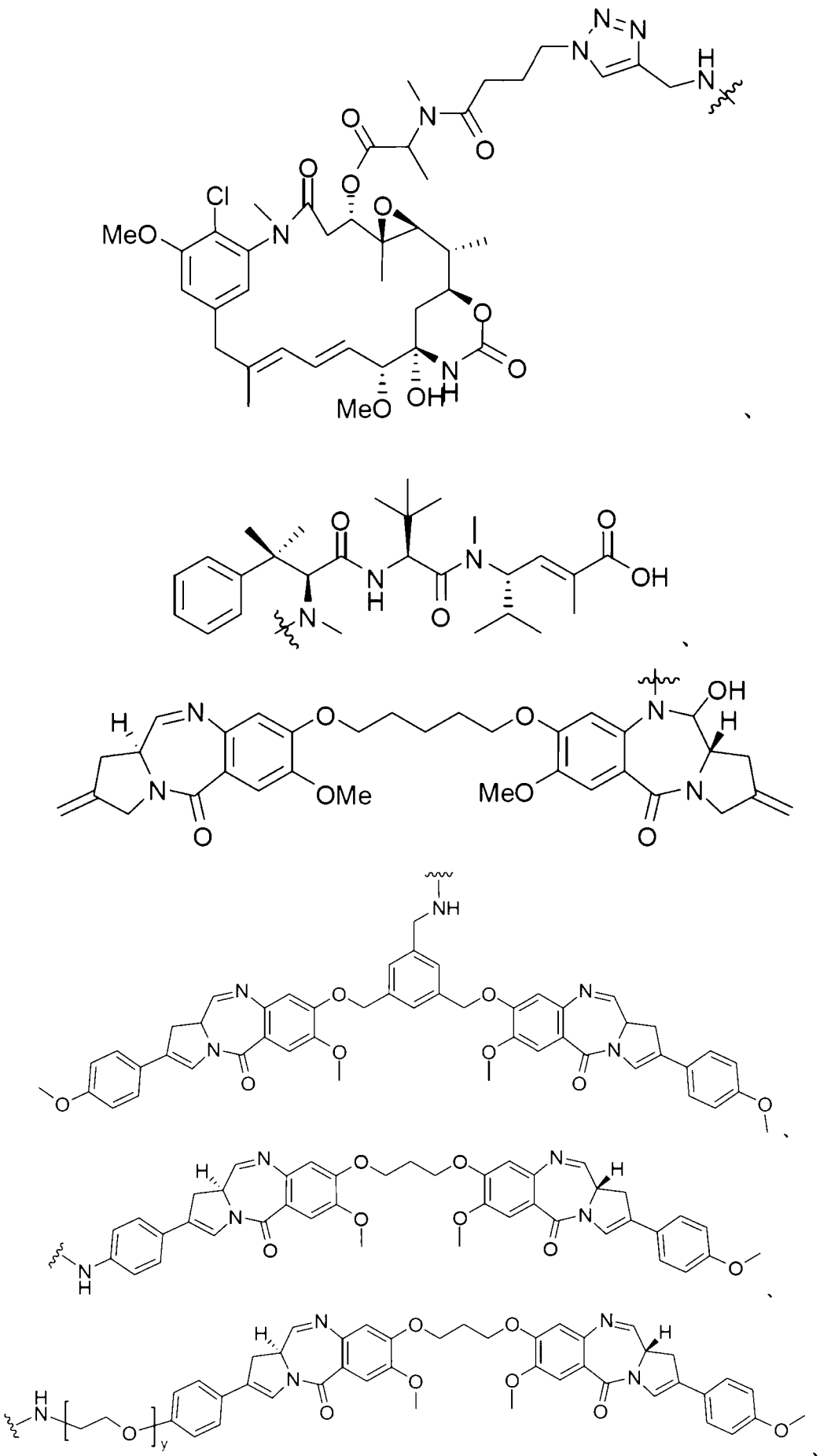
(trimethoprin)、磺胺二甲噁唑(sulfamethazole)、奎奴普丁(quinupristin)、達福普汀(dalfopristin)、利福平(rifampin)、大觀黴素(spectinomycin)及呋喃妥因(nitrofurantoin)。抗真菌劑可選自兩性黴素B(amphotericin B)、康敵西丁(candicidin)、非律平(filipin)、哈黴素(hamycin)、遊黴素(natamycin)、制黴素(nystatin)、龜裂殺菌素(rimocidin)、聯苯苄唑(bifonazole)、布康唑(butoconazole)、克黴唑(clotrimazole)、益康唑(econazole)、芬替康唑(fenticonazole)、異康唑(isoconazole)、酮康唑(ketoconazole)、盧立康唑(luliconazole)、咪康唑(miconazole)、奧莫康唑(omoconazole)、奧昔康唑(oxiconazole)、舍他康唑(sertaconazole)、硫康唑(sulconazole)、噻康唑(tioconazole)、阿巴康唑(albaconazole)、氟康唑(fluconazole)、艾沙康唑(isavuconazole)、伊曲康唑(itraconazole)、泊沙康唑(posaconazole)、拉夫康唑(ravuconazole)、特康唑(terconazole)、伏立康唑(voriconazole)、阿巴芬淨(abafungin)、阿莫羅芬(amorolfine)、布替萘芬(butenafine)、萘替芬(naftifine)、特比萘芬(terbinafine)、阿尼芬淨(anidulafungin)、卡泊芬淨(caspofungin)、米卡芬淨(micafungin)、苯甲酸、環吡酮(ciclopirox)、氟胞嘧啶(flucytosine)、灰黃黴素(griseofulvin)、鹵苯炔醚(haloprogin)、托萘酯(tolnaftate)、十一碳烯酸、結晶紫、秘魯香脂(balsam of peru)、環吡酮乙醇胺(ciclopirox olamine)、吡酮乙醇胺鹽(piroctone olamine)、吡硫鎂(zinc pyrithione)及硫化硒。抗寄生蟲劑可選自甲苯噻唑(mebendazole)、噻嘧啶雙羧萘酸鹽(pyrantel pamoate)、腐絕(thiabendazole)、二乙碳醯嗪(diethylcarbamazine)、伊維菌素(ivermectin)、氯硝柳胺(niclosamide)、吡喹酮(praziquantel)、阿苯達唑

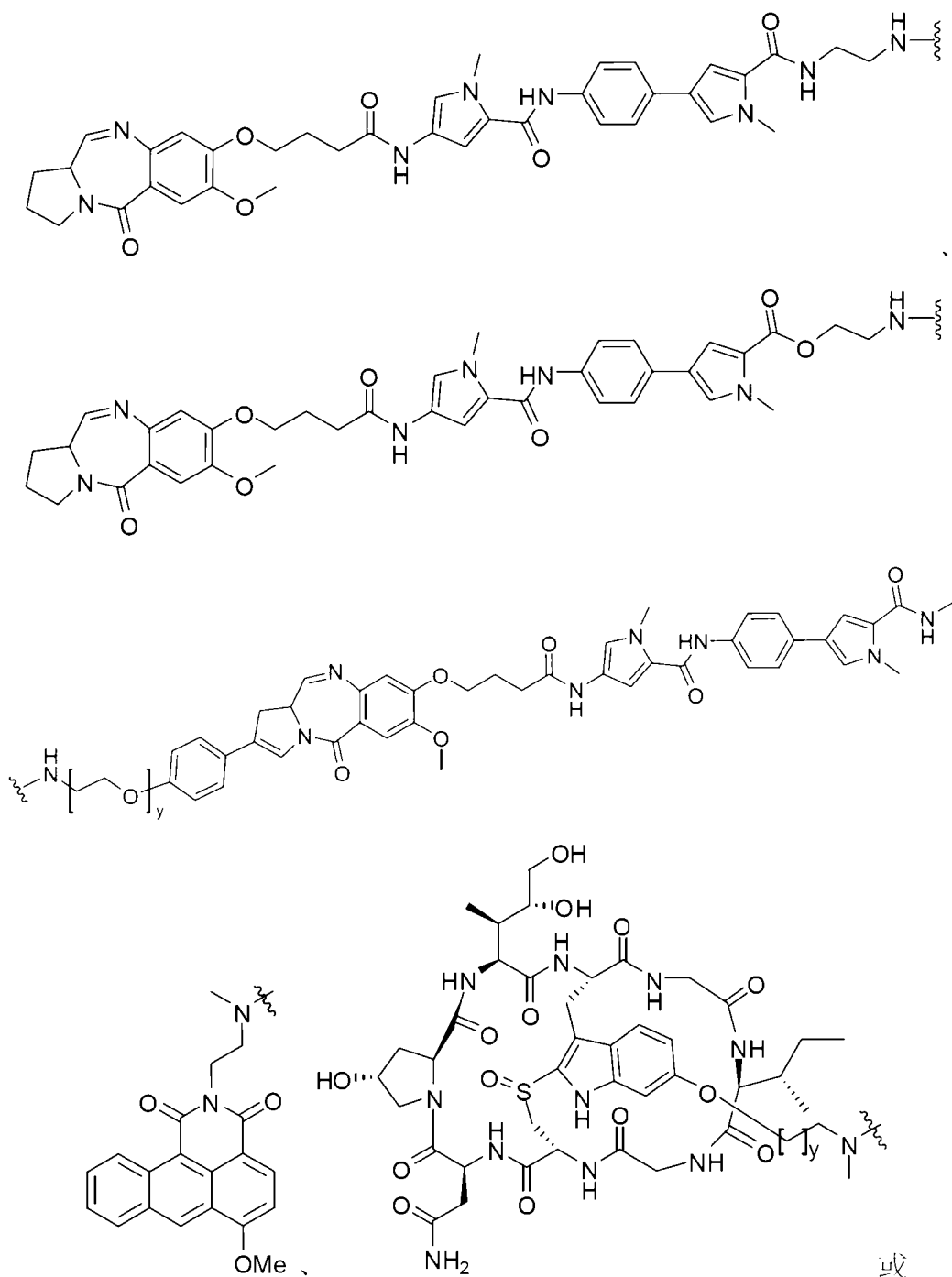
(albendazole)、利福平(rifampin)、兩性黴素B (amphotericin B)、美拉肅醇(melarsoprol)、依氟鳥胺酸(eflornithine)、甲硝噻唑(metronidazole)、噻甲硝咪唑(tinidazole)及米替福新(miltefosine)。

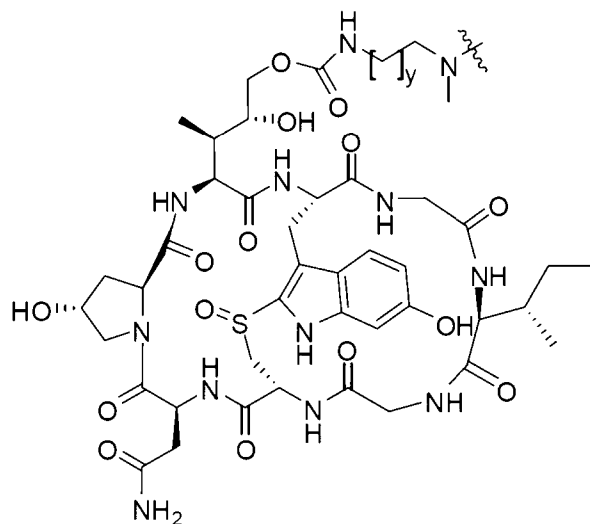
抗體可包含選自 Ab-HC-(G)_zCVIM、Ab-HC-(G)_zCVLL、Ab-LC-(G)_zCVIM及Ab-LC-(G)_zCVLL之胺基酸模體，其中Ab表示抗體，-HC-表示重鏈，-LC-表示輕鏈，G表示甘胺酸，C表示半胱胺酸，V表示纈胺酸，I表示異白胺酸，M表示甲硫胺酸，L表示白胺酸，且z為0至20之整數。

抗體-藥物結合物之活性劑可選自任一以下結構：









其中y為1至10之整數。

抗體-藥物結合物可用於使用熟習此項技術者已知之製備組合物之方法將活性劑轉移至個體之標靶細胞以治療個體。在一些態樣中，本發明係關於一種組合物(例如醫藥組合物)，其包含如本文所描述之抗體-藥物結合物。

組合物可呈可注射形式，呈液體溶液或懸浮液形式製備。適合於注射之固體形式亦可製備為例如乳液，或其中抗體-藥物結合物囊封在脂質體中。抗體-藥物結合物可與醫藥學上可接受之載劑組合，該醫藥學上可接受之載劑包括不誘發對接受載劑之個體有害之抗體產生的任何載劑。適合載劑通常包含代謝緩慢之大分子，例如蛋白質、多醣、聚乳酸、聚乙醇酸、聚合胺基酸、胺基酸共聚物、脂質凝聚體及其類似物。

組合物亦可含有稀釋劑，例如水、生理食鹽水、丙三醇及乙醇。其中亦可存在輔助物質，例如潤濕劑或乳化劑、pH緩衝物質及其類似物。組合物可藉由注射非經腸投與，其中此類注射可為皮下或肌肉內注射。在一些實施例中，組合物可投與腫瘤中。組合物可插入(例如注射)至腫瘤中。其他調配物適合於其他投與形式，諸如栓劑或經口投與。口服組合物可呈溶液、懸浮液、錠劑、丸劑、膠囊或持續釋放調配物投與。

組合物可以與劑量及調配物相容之方式投與。組合物較佳包含治療有效量之抗體-藥物結合物。術語「治療有效量」意謂有效治療或預防疾病或病症之單次劑量或以多劑量時程投與之組合物。劑量可視待治療之個體、個體之健康及身體狀況、希望保護之程度及其他相關因素而變化。活性成分(例如抗體-藥物結合物)之確切量可視醫生判斷而定。舉例而言，治療有效量之抗體-藥物結合物或含有其之組合物可投與罹患癌症或腫瘤之患者以治療癌症或腫瘤。

根據本發明之抗體-藥物結合物或含有其之組合物可呈醫藥學上可接受之鹽或其溶劑合物之形式投與。在一些實施例中，根據本發明之抗體-藥物結合物或含有其之組合物可與醫藥學上可接受之載劑、醫藥學上可接受之賦形劑及/或醫藥學上可接受之添加劑一起投與。醫藥學上可接受之鹽或溶劑合物、賦形劑及添加劑之有效量及類型可使用標準方法量測(參見例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, 第18版, 1990)。

關於癌症或腫瘤之術語「治療有效量」意謂如下之量，其可減少癌細胞數目；減小癌細胞尺寸；抑制癌細胞侵入周圍系統或減少侵入；抑制癌細胞擴展至其他系統或減少擴展；抑制癌細胞生長；及/或改善至少一種與癌症相關之症狀。在治療癌症中，藥物效力可藉由腫瘤進展時間(TTP)及/或反應率(RR)評估。

本文所用之術語「醫藥學上可接受之鹽」包括有機鹽及無機鹽。其實例包括鹽酸鹽、氫溴酸鹽、氫碘酸鹽、硫酸鹽、檸檬酸鹽、乙酸鹽、乙二酸鹽、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、酸性檸檬酸鹽、酒石酸鹽、油酸

鹽、丹寧酸鹽、泛酸鹽、酒石酸氫鹽、抗壞血酸鹽、丁二酸鹽、順丁烯二酸鹽、龍膽酸鹽、反丁烯二酸鹽、葡萄糖酸鹽、葡萄糖醛酸酯、葡萄糖二酸鹽、甲酸鹽、苯甲酸鹽、麩胺酸鹽、甲烷磺酸鹽、乙烷磺酸鹽、苯磺酸鹽、對甲苯磺酸鹽及雙羥萘酸鹽(亦即1,1'-亞甲基雙-(2-羥基-3-萘甲酸鹽))。醫藥學上可接受之鹽可包括另一分子(例如乙酸根離子、丁二酸根離子及/或其他相對離子)。

可用於本文所述之抗體-藥物結合物的醫藥學上可接受之溶劑合物的示例性溶劑合物包括水、異丙醇、乙醇、甲醇、二甲亞砷、乙酸乙酯、乙酸及乙醇胺。

在一些實施例中，本發明係關於一種治療個體之癌症的方法，其包含向該個體投與包含如本文所描述之抗體-藥物結合物的醫藥組合物。醫藥組合物可進一步包含治療有效量之化學治療劑。在較佳實施例中，個體為哺乳動物。舉例而言，個體可選自嚙齒動物、兔類動物、貓科動物、犬科動物、豬科動物、綿羊科動物、牛類動物、馬科動物及靈長類動物。在某些較佳實施例中，個體為人類。

範例

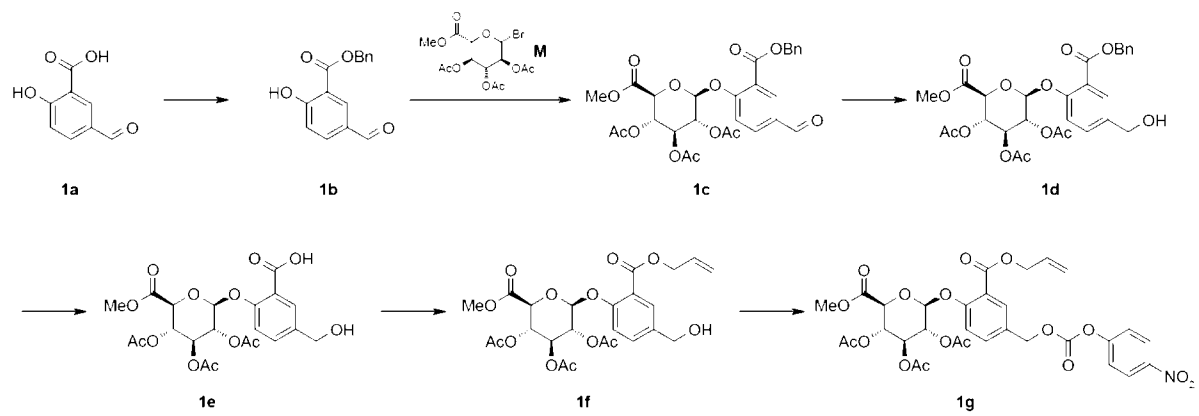
下表列出在整個以下實例中使用之縮寫：

縮寫	參考
Ac	乙醯基
AcOH	乙酸
aq.	水溶液
Bn	苯甲基
鹽水	飽和氯化鈉水溶液
Boc	第三丁氧羰基

Cbz	苄甲氧基羰基
DBU	1,8-二氮雜雙環[5.4.0]十一-7-烯
DCM	二氯甲烷
DIC	<i>N,N</i> -二異丙基碳化二亞胺
DIPEA	<i>N,N</i> -二異丙基乙胺
DMAP	4-(二甲胺基)吡啶
DMF	<i>N,N</i> -二甲基甲醯胺
DMSO	二甲亞砜
EDC	<i>N</i> -(3-二甲基胺基丙基)- <i>N'</i> -乙基碳化二亞胺
Et	乙基
Et2O	乙醚
EtOAc	乙酸乙酯
EtOH	乙醇
HBTU	六氟磷酸O-(苯并三唑-1-基)- <i>N,N,N',N'</i> -四甲錄
Hex	正己烷
HOBt	1-羥基苯并三唑
HPLC	高效液相層析
Me	甲基
MeCN	乙腈
MeOH	甲醇
MMAE	單甲基阿瑞他汀E
MMAF	單甲基阿瑞他汀F
MMAF-OMe	單甲基阿瑞他汀F甲酯
<i>i</i> -PrOH	異丙醇
PyBOP	六氟磷酸(苯并三唑-1-基氧基)三吡咯啶鎂
TBAF	氟化四丁銨

TBS	第三丁基二甲基矽烷基
THF	四氫呋喃
TFA	三氟乙酸
Ts	對甲苯磺醯基
wt	重量

實例1. 製備化合物1i



製備化合物1b

在室溫下向5-甲醯基水楊酸**1a** (10.0 g , 60.1 mmol)於THF (30 mL)中之懸浮液中添加DIPEA (29.8 mL , 180 mmol)及苯甲基溴(7.15 mL , 60.1 mmol)。接著反應混合物在回流下加熱。在回流下18小時後，將反應混合物用2 N HCl水溶液(100 mL)稀釋。將所得混合物用EtOAc (2×100 mL)萃取。合併之有機層經無水MgSO₄乾燥，過濾且濃縮。殘餘物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**1b** (12.9 g , 83%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 11.38 (s, 1H), 9.86 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 8.01 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.44 (m, 5H), 7.12 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.42 (s, 2H)。

製備化合物1c

向化合物**1b** (5.0 g , 19.5 mmol)及化合物**M** (8.5 g , 21.4 mmol , 參見實例66)於MeCN (100 mL)中之溶液中添加4 Å分子篩(10 g)及Ag₂O

(18.0 g, 78.0 mmol)。在N₂下在室溫下攪拌12小時後，濃縮反應混合物。接著將濃縮之反應混合物用H₂O (100 mL)稀釋且用EtOAc (2×200 mL)萃取。合併之有機層經無水MgSO₄乾燥，過濾且濃縮。殘餘物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**1c** (8.63 g, 77%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.94 (s, 1H), 8.28 (s, 1H), 8.02 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.46-7.28 (m, 6H), 5.41-5.32 (m, 6H), 4.27 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 3.71 (s, 3H), 2.05 (m, 9H)。

製備化合物**1d**

在0°C下向化合物**1c** (3.10 g, 5.41 mmol)於*i*-PrOH/CHCl₃ (9 mL/45 mL)中之溶液中添加矽膠(3 g)及NaBH₄ (0.41 g, 10.82 mmol)。在N₂下在0°C下攪拌2小時後，將反應混合物用H₂O (100 mL)淬滅且用EtOAc (200 mL)萃取。有機層經無水MgSO₄乾燥，過濾且濃縮。粗產物藉由管柱層析法來純化，產生呈白色固體狀之化合物**1d** (2.73 g, 87%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.74 (s, 1H), 7.48-7.34 (m, 6H), 7.16 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 5.35-5.26 (m, 5H), 5.15 (m, 1H), 4.17 (m, 1H), 3.73 (s, 3H), 2.04 (s, 9H), 1.73 (t, 1H)。

製備化合物**1e**

向化合物**1d** (2.40 g, 4.17 mmol)於EtOH (150 mL)中之溶液中添加Pd/C (10 wt. %, 240 mg)。在氫氣下在室溫下將反應混合物攪拌10分鐘。接著反應混合物經矽藻土墊過濾且用EtOH (100 mL)洗滌。濃縮濾液，得到呈白色固體狀之粗產物**1e** (2.10 g)，其未經進一步純化即使用。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.06 (s, 1H) 7.61 (dd, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.23 (d, *J* = 8.0 Hz 1H), 5.43-5.29 (m, 5H), 4.17 (s, 2H), 4.32 (d, *J* = 8.4

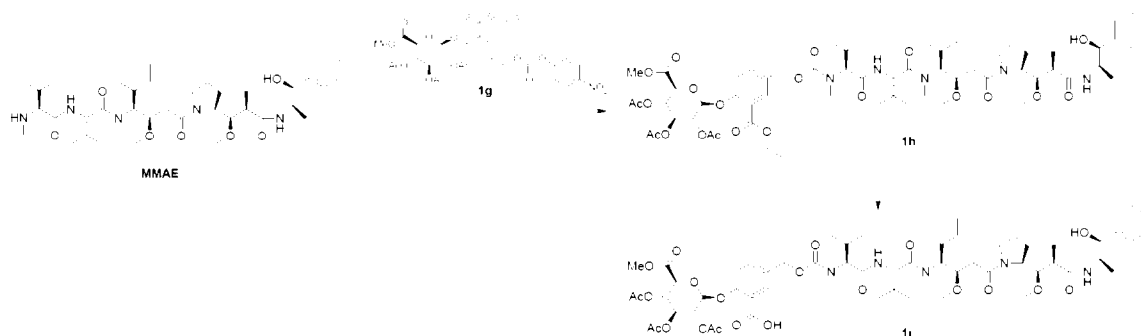
Hz, 1H) 3.69 (s, 3H), 2.11-2.08 (t, 9H), 1.24 (t, 1H)。

製備化合物**1f**

在室溫下向粗化合物**1e** (2.10 g, 4.33 mmol)於DMF (50 mL)中之溶液中添加 K_2CO_3 (1.79 g, 13.01 mmol)及烯丙基溴(0.41 mL, 4.76 mmol)。在室溫下攪拌3小時後，將反應混合物用2 N HCl水溶液(100 mL)稀釋。將所得混合物用EtOAc (200 mL)萃取。有機層經無水 $MgSO_4$ 乾燥，過濾且濃縮。殘餘物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**1f** (1.55 g, 2步70%)。 ^1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.74 (s, 1H), 7.45 (dd, J = 8.0 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.16 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.02 (m, 1H), 5.40-5.26 (m, 5H), 5.16 (m, 1H), 4.76 (m, 2H), 4.66 (s, 2H), 4.19 (m, 1H), 3.73 (s, 3H), 2.07-2.05 (m, 9H), 1.68 (t, 1H)。

製備化合物**1g**

在0°C下在 N_2 下向化合物**1f** (2.50 g, 4.77 mmol)於DMF (20 mL)中之溶液中添加碳酸雙(4-硝基苯基)酯(1.30 g, 4.29 mmol)及DIPEA (0.80 mL, 4.77 mmol)。將反應混合物在0°C下攪拌30分鐘且使之升溫至室溫，歷時1小時。將反應混合物用 H_2O (100 mL)稀釋且用EtOAc (200 mL)萃取。將有機層用鹽水(100 mL)洗滌且經無水 $MgSO_4$ 乾燥。過濾及減壓濃縮後，所得粗產物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**1g** (2.80 g, 85%)。 ^1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.28 (d, J = 15.2 Hz, 2H), 7.85 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.55 (dd, J = 3.2 Hz, 2.4 Hz, 1H), 7.38 (d, J = 15.2 Hz, 2H), 7.20 (d, J = 8.8 Hz, 1H) 6.03 (m, 1H), 5.42-5.19 (m, 8H), 4.78 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 4.12 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 3.74 (s, 3H)。



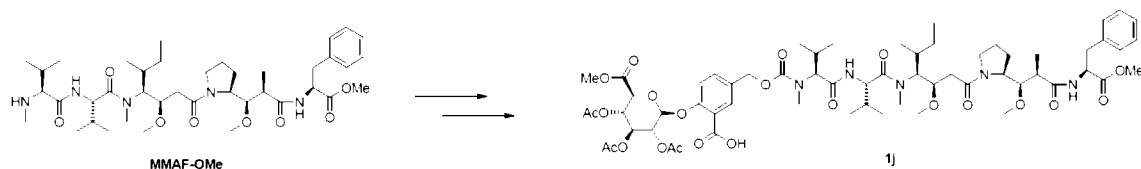
製備化合物**1h**

在0℃下化合物**1g** (528 mg, 0.77 mmol)、MMAE (500 mg, 0.7 mmol)及無水HOBt (19 mg, 0.14 mmol)溶於DMF (3 mL)中。接著添加吡啶(0.7 mL)及DIPEA (0.24 mL, 1.39 mmol)。在N₂下在室溫下攪拌24小時後，將反應混合物用H₂O/飽和NH₄Cl水溶液(100 mL/50 mL)稀釋且用EtOAc (2×100 mL)萃取。合併之有機層經無水MgSO₄乾燥，過濾，且濃縮。殘餘物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**1h** (600 mg, 67%)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 1269.5, [M+Na]⁺ 1291.5。

製備化合物**1i**

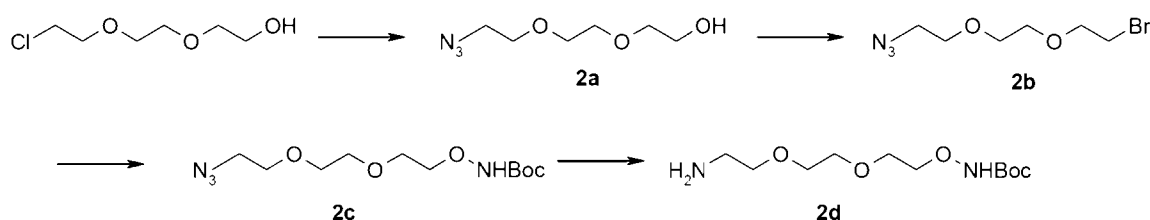
在室溫下向化合物**1h** (600 mg, 0.47 mmol)及三苯基膦(31 mg, 0.12 mmol)於DCM (10 mL)中之溶液中添加吡咯啉(0.047 mL, 0.57 mmol)及Pd(PPh₃)₄ (27 mg, 0.02 mmol)。攪拌2小時後，將反應混合物用H₂O/1 N HCl水溶液(50 mL/50 mL)稀釋且用EtOAc (3×50 mL)萃取。合併之有機層經無水MgSO₄乾燥，過濾，且濃縮。殘餘物藉由管柱層析法(Hex/EtOAc 1/1至EtOAc)來純化，產生呈白色固體狀之化合物**1i** (480 mg, 82%)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 1228.4, [M+Na]⁺ 1250.4。

實例2. 製備化合物**1j**



化合物**1j**係藉由實例1中製備化合物**1i**之類似方法，自MMAF-OMe製備。

實例3. 製備化合物2g



製備化合物2a

在室溫下在氮氣下使2-(2-(2-氯乙氧基)乙氧基)乙醇(10 g, 59.3 mmol)溶於DMF (90 mL)中，且接著向其中添加NaN₃ (5.78 g, 88.9 mmol)。在100℃下攪拌13小時後，向其中添加氯仿(200 mL)及蒸餾水(300 mL)以萃取有機層，且經萃取之有機層經無水Na₂SO₄乾燥且減壓濃縮。殘餘物進行管柱層析法，產生化合物**2a** (10.3 g, 99%)。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 3.75-3.73 (m, 2H), 3.70-3.68 (m, 6H), 3.63-3.61 (m, 2H), 3.40 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H), 2.20 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H)。

製備化合物2b

在0℃下在氮氣下使CBr₄ (21.4 g, 64.6 mmol)溶於DCM (100 mL)中，且接著向其中添加含三苯基膦(16.9 g, 64.6 mmol)之DCM (100 mL)及化合物**2a** (10.3 g, 58.7 mmol)，且混合物在室溫下攪拌13小時。反應結束後，向其中添加DCM (300 mL)及蒸餾水(300 mL)以萃取有機層，且經萃取之有機層經無水Na₂SO₄乾燥且減壓濃縮。殘餘物進行管柱層析

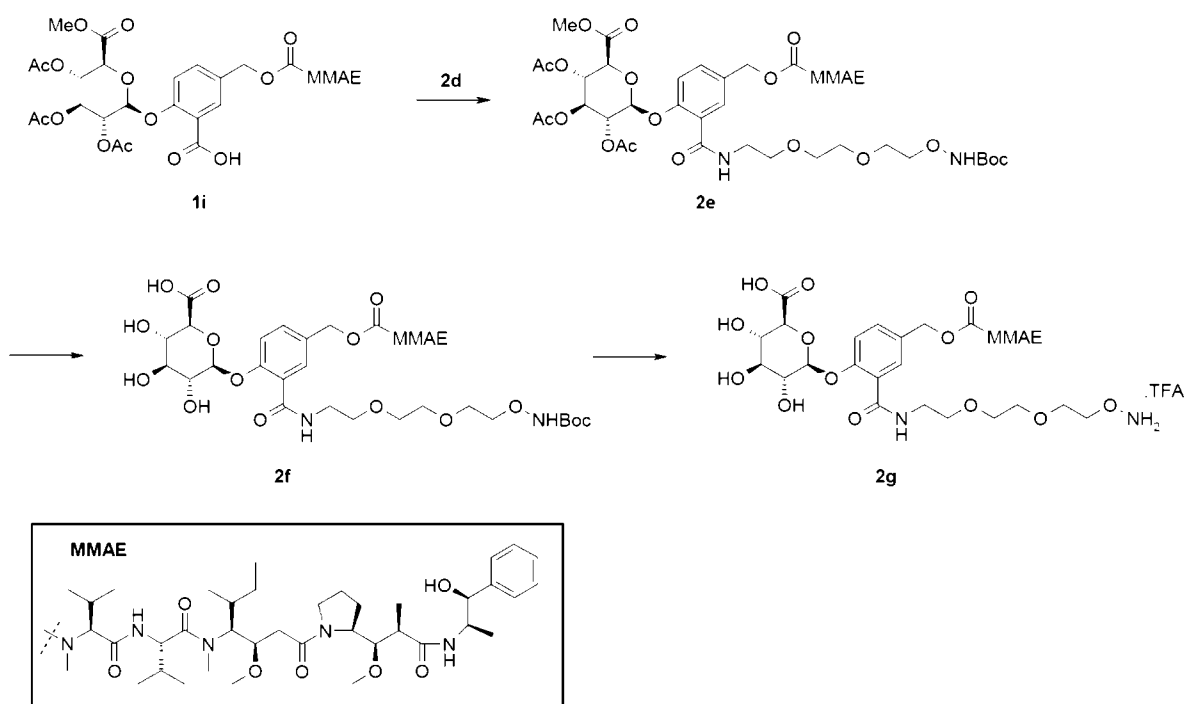
法，產生化合物**2b** (12 g，85%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.83 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.72-3.67 (m, 6H), 3.48 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.40 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H)

製備化合物**2c**

在室溫下在氫氣下使化合物**2b** (1g，4.20 mmol)溶於MeCN中，且接著向其中添加*N*-Boc-羥基胺(643 mg，4.82 mmol)及DBU (0.66 mL，4.41mmol)。在60℃下攪拌13小時後，向其中添加DCM (300 mL)及蒸餾水(300 mL)以萃取有機層，且經萃取之有機層經無水Na₂SO₄乾燥且減壓濃縮。殘餘物進行管柱層析法，產生化合物**2c** (748 mg，70%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.55 (s, 1H), 4.05-4.03 (m, 2H), 3.76-3.74 (m, 2H), 3.74-3.69 (m, 6H), 3.42 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 1.49 (s, 9H)。

製備化合物**2d**

使化合物**2c** (200 mg，0.688 mmol)溶於MeOH (5 mL)中，且接著向其中添加Pd/C (10% wt.，70 mg)且在氫氣下攪拌3小時。反應結束後，反應混合物經矽藻土過濾且減壓濃縮，產生化合物**2d** (180 mg，98%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.04-4.01 (m, 2H), 3.74-3.62 (m, 7H), 3.55 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H), 2.88 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H), 2.81 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H), 1.64 (s, 2H), 1.48 (s, 9H)。



製備化合物2e

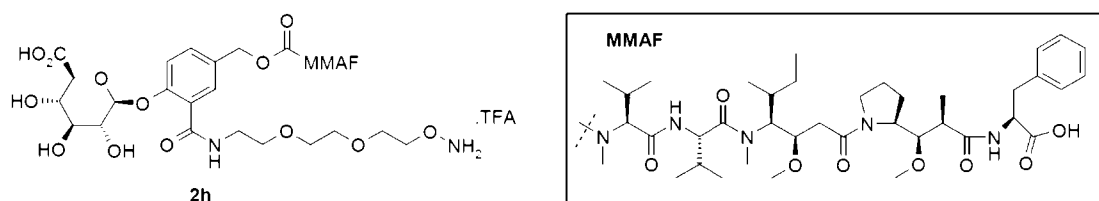
將DIPEA (0.042 mL, 0.32 mmol)及PyBOP (126 mg, 0.24 mmol)添加至攪拌之化合物**1i** (200 mg, 0.16 mmol)及化合物**2d** (51 mg, 0.19 mmol)於DMF (4 mL)中之混合物。在N₂下在室溫下攪拌4小時後，將反應混合物用H₂O (100 mL)稀釋且用EtOAc (2×100 mL)萃取。合併之有機層經無水Na₂SO₄乾燥，過濾且濃縮。所得殘餘物藉由管柱層析法來純化，得到化合物**2e** (142 mg, 60%)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 1474.7。

製備化合物**2f**

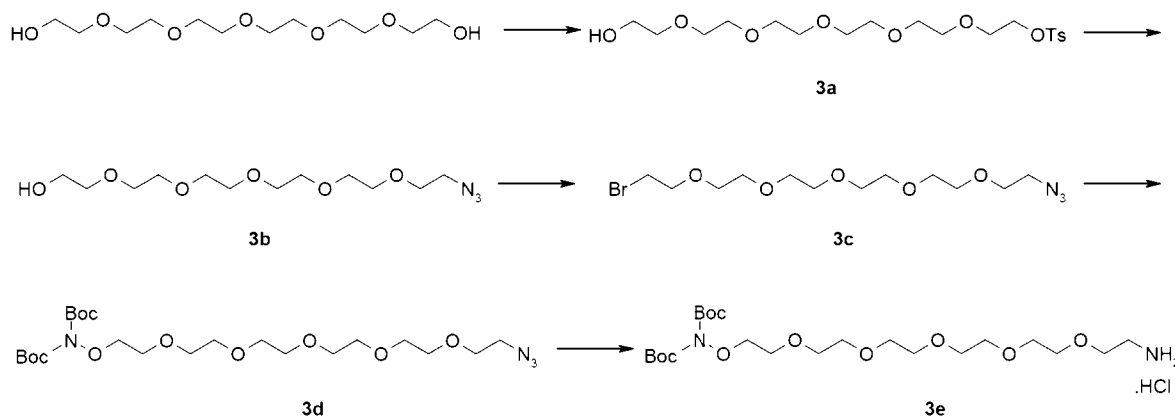
在-20℃下向化合物**2e** (142 mg, 0.096 mmol)於MeOH (2 mL)中之溶液中添加含LiOH單水合物(36 mg, 0.86 mmol)之H₂O (2 mL)。在0℃下攪拌1小時後，將反應混合物用H₂O/2 N HCl水溶液(50 mL/2 mL)稀釋且用CHCl₃ (2×100 mL)萃取。合併之有機層經無水Na₂SO₄乾燥，過濾且濃縮，得到粗化合物**2f** (128 mg)，其未經進一步純化即使用。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 1334.5。

製備化合物**2g**

在0℃下向粗化合物**2f** (105 mg, 0.08 mmol)於DCM (3 mL)中之溶液中添加HCl (4 M之1,4-二噁烷溶液, 1 mL)。1小時後, 溶劑及過量HCl藉由N₂流移除且接著殘餘物藉由HPLC來純化, 產生呈白色固體狀之化合物**2g** (47 mg, 46%)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 1234.4。

實例4. 製備化合物**2h**

化合物**2h**係藉由實例3中製備化合物**2g**之類似方法, 自化合物**1j**及化合物**2d**製備。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 1248.9。

實例5. 製備化合物**3f**製備化合物**3a**

將六乙二醇(1.0 g, 3.54 mmol)、Ag₂O (1.23 g, 5.31 mmol)及KI (117 mg, 0.71 mmol)於DCM (10 mL)中之混合物進行音波處理15分鐘。懸浮液冷卻至-30℃且逐滴添加對甲苯磺醯氯(688 mg, 3.61 mmol)於

DCM (13 mL)中之溶液。混合物接著逐漸升溫至0℃且保持在此溫度下15分鐘。接著反應混合物經無水MgSO₄乾燥，過濾且濃縮，產生糖漿狀殘餘物。接著，糖漿狀殘餘物藉由管柱層析法(EtOAc至EtOAc/MeOH 10/1)來純化。純溶離份真空蒸發，得到化合物**3a** (1.18 g, 77%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.80 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.34 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 4.16 (m, 2H), 3.72-3.58 (m, 22H), 2.97 (br, 1H), 2.45 (s, 3H)。

製備化合物**3b**

化合物**3a** (1.18 g, 2.71 mmol)及NaN₃ (264 mg, 4.07 mmol)溶於DMF (3 mL)中。且接著將反應混合物在100℃下加熱。在100℃下15小時後，將反應混合物過濾且濃縮。殘餘物藉由管柱層析法(EtOAc至EtOAc/MeOH 10/1)來純化，得到化合物**3b** (728 mg, 87%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.75-3.70 (m, 2H), 3.69-3.63 (m, 18H), 3.62-3.60 (m, 2H), 3.39 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.07 (br, 1H)。

製備化合物**3c**

在0℃下向攪拌的化合物**3b** (728 mg, 2.36 mmol)於THF (10 mL)中之溶液中添加三乙胺(0.73 mL, 5.21 mmol)及甲烷磺酸酐(619 mg, 3.55 mmol)。2小時後，將LiBr (1.03 g, 11.8 mmol)添加至攪拌溶液且使所得反應混合物回流5小時。冷卻至室溫後，在減壓下濃縮反應混合物。殘餘物藉由管柱層析法(EtOAc至EtOAc/MeOH 10/1)來純化，得到化合物**3c** (810 mg, 92%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.81 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.69-3.65 (m, 18H), 3.47 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.39 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H)。

製備化合物**3d**

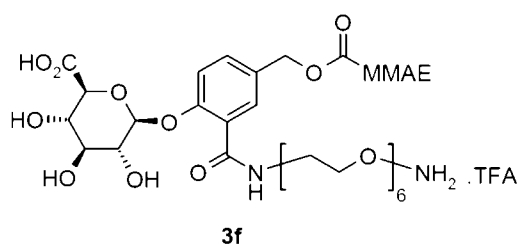
在0℃下將NaH (60%於油中, 564 mg, 12.9 mmol)添加至攪拌之化

合物**3c** (3.42 g, 9.24 mmol)及*N,N*-二Boc-羥基胺(2.80 g, 12.0 mmol, 藉由以引用的方式併入本文中的PCT公開案第WO2004/018466A2號中之程序合成)於DMF (20 mL)之混合物。反應混合物升溫至室溫且保持在此溫度下2小時。在減壓下蒸發溶劑且殘餘物藉由管柱層析法(EtOAc/Hex 1/20至1/5)來純化, 產生化合物**3d** (3.51 g, 73%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.08 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 3.73 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 3.69-3.62 (m, 18H), 3.39 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 1.53 (s, 18H)。

製備化合物**3e**

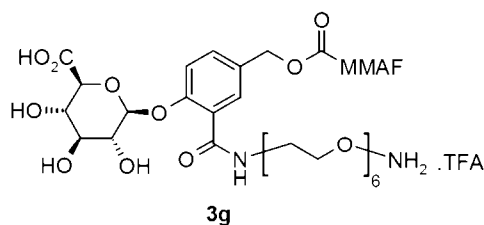
在0°C下向攪拌之化合物**3d** (123 mg, 0.23 mmol)及Pd/C (10 wt. %, 25 mg)於MeOH (5 mL)中之混合物添加HCl (4 N 1,4-二噁烷溶液, 0.05 mL, 0.21 mmol)。在氫氣下在室溫下攪拌5小時後, 反應混合物經矽藻土墊過濾且用MeOH (100 mL)洗滌。濃縮濾液, 產生呈無色油狀之化合物**3e** (118 mg, 95%), 其未經進一步純化即使用。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 3.98 (t, *J* = 4.4 Hz, 2H), 3.61-3.51 (m, 22H), 2.95 (br, 3H), 1.46 (s, 18H)。EI-MS *m/z*: [M+H]⁺ 497.6。

製備化合物**3f**



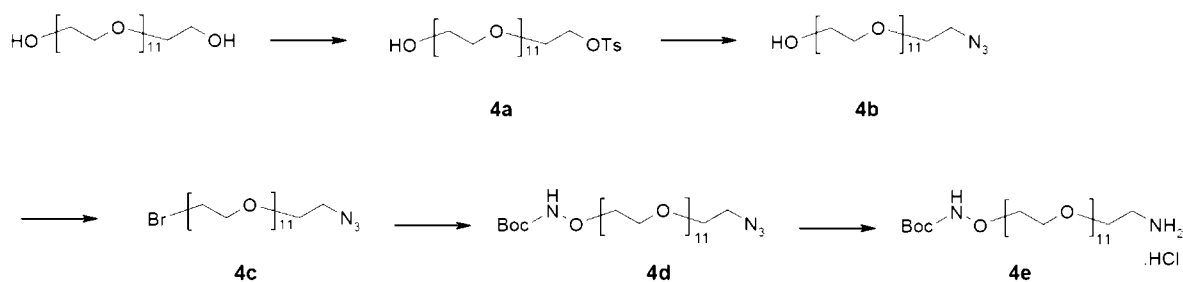
化合物**3f**係藉由實例3中製備化合物**2g**之類似方法, 自化合物**1i**及化合物**3e**製備。EI-MS *m/z*: [M+H]⁺ 1366.6, [M+Na]⁺ 1389.6。

實例 6. 製備化合物**3g**



化合物**3g**係藉由實例3中製備化合物**2g**之類似方法，自化合物**1j**及化合物**3e**製備。EI-MS m/z: $[M+H]^+$ 1380.6, $[M+Na]^+$ 1403.6。

實例7. 製備化合物4f



製備化合物4a

向攪拌的十二乙二醇(1.8 g, 3.2 mmol)於DCM (18 mL)中之溶液中添加對甲苯磺醯氯(656 mg, 3.4 mmol)、Ag₂O (1.13 g, 4.9 mmol)及KI (108 mg, 0.65 mmol)。在室溫下攪拌30分鐘後，反應混合物經矽藻土墊過濾且用DCM (50 mL)洗滌。濃縮濾液。所得殘餘物藉由管柱層析法來純化，產生呈淡黃色油狀之化合物**4a** (490 mg, 21%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.81 (d, 2H), 7.35 (d, 2H), 4.16 (t, 2H), 3.72-3.58 (m, 46H), 2.82 (br s, 1H), 2.45 (s, 3H)。

製備化合物**4b**

使化合物**4a** (490 mg, 0.69 mmol)及NaN₃ (68 mg, 1.04 mmol)溶於DMF (16 mL)中且反應混合物在100℃下加熱3小時。反應混合物過濾且濃縮。粗產物藉由管柱層析法來純化，得到化合物**4b** (267 mg, 67%)。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.72-3.60 (m, 46H), 3.39 (t, 2H), 2.84 (t,

1H), 3.40 (m, 2H)。

製備化合物**4c**

在0℃下向攪拌的化合物**4b** (265 mg, 0.46 mmol)於THF (10 mL)中之溶液中添加4-甲基嗎啉(0.066 mL, 0.60 mmol)及甲烷磺酸酐(121 mg, 0.69 mmol)。2小時後，將LiBr (120 mg, 1.38 mmol)添加至攪拌溶液且使所得反應混合物回流6小時。冷卻至室溫後，在減壓下濃縮反應混合物。殘餘物藉由管柱層析法(EtOAc至EtOAc/MeOH 10/1)來純化，得到化合物**4c** (178 mg, 60%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.81 (t, 2H), 3.65 (m, 42H), 3.47 (t, 2H), 3.39 (t, 2H)。

製備化合物**4d**

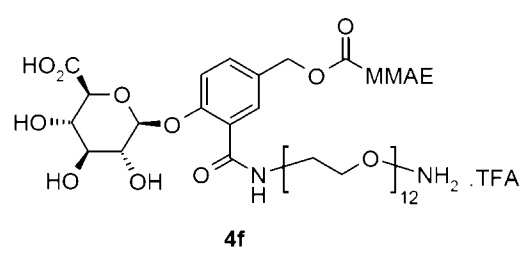
在0℃下NaH (60%於油中, 14 mg, 0.33 mmol)添加至攪拌之化合物**4c** (175 mg, 0.27 mmol)及*N*-Boc-羥基胺(47 mg, 0.35 mmol)於DMF (5 mL)中之混合物。反應混合物升溫至室溫且保持在此溫度下12小時。在減壓下蒸發溶劑且殘餘物藉由管柱層析法(MeOH/CHCl₃ 1/20至1.5/20)來純化，產生化合物**4d** (148 mg, 78%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.00 (t, 2H), 3.66 (m, 44H), 3.39 (t, 2H), 1.47 (d, 9H)。

製備化合物**4e**

在0℃下向攪拌之化合物**4d** (148 mg, 0.21 mmol)及Pd/C (10 wt. %, 28 mg)於MeOH (5 mL)中之混合物添加HCl (4 N 1,4-二噁烷溶液, 0.053 mL, 0.21 mmol)。在氫氣下在室溫下攪拌30分鐘後，反應混合物經矽藻土墊過濾且用MeOH (30 mL)洗滌。濃縮濾液，產生呈無色油狀之化合物**4e** (142 mg, 96%)，其未經進一步純化即使用。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 4.00 (t, 2H), 3.92 (t, 2H), 3.76-3.64 (m, 42H), 3.18

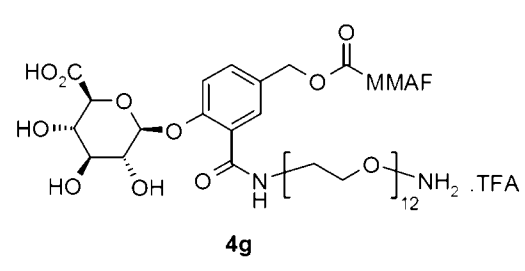
(t, 2H) 1.47 (s, 9H)。

製備化合物**4f**



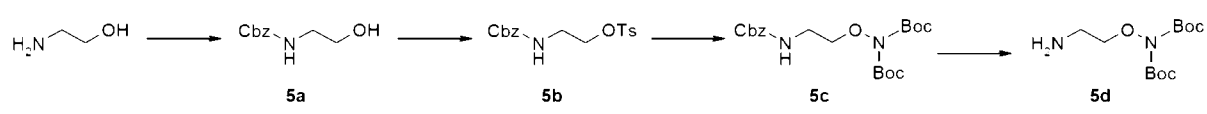
化合物**4f**係藉由實例3中製備化合物**2g**之類似方法，自化合物**1i**及化合物**4e**製備。EI-MS m/z: $[M+H]^+$ 1631.9。

實例8. 製備化合物**4g**



化合物**4g**係藉由實例3中製備化合物**2g**之類似方法，自化合物**1j**及化合物**4e**製備。EI-MS m/z: EI-MS m/z $[M+H]^+$ 1645.3。

實例9. 製備化合物**5e**



製備化合物**5a**

在0°C下在N₂下向2-胺基乙醇(10 g，164 mmol)於DCM (70 mL)中之溶液中添加含三乙胺(3.9 mL，28.1 mmol)及氯甲酸苯甲酯(30 mL，213 mmol)之DCM (30 mL)。24小時後，濃縮反應混合物。將所得殘餘物用H₂O (50 mL)稀釋且用EtOAc (3×100 mL)萃取。合併有機層，經無水

MgSO₄乾燥，過濾且濃縮。粗產物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**5a** (17 g, 53%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.40-7.27 (m, 5H), 5.11 (s, 2H), 3.72 (s, 2H), 3.56 (s, 2H), 2.13 (br s, 1H)。

製備化合物**5b**

在0°C下在N₂下向化合物**5a** (5.0 g, 25.6 mmol)於DCM (70 mL)、三乙胺(3.9 mL, 28.1 mmol)中之溶液中添加含DMAP (100 mg, 5.12 mmol)及對甲苯磺醯氯(5.4 g, 28.1 mmol)之DCM (30 mL)。在0°C下15小時後，將反應混合物用飽和NH₄Cl水溶液(100 mL)稀釋且用DCM (2×100 mL)萃取。合併有機層，經無水MgSO₄乾燥，過濾且濃縮。粗產物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**5b** (8.29 g, 92%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.77 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.40-7.28 (m, 7H), 5.07 (s, 3H), 4.09 (s, 2H), 3.45 (s, 2H), 2.43 (s, 3H)。

製備化合物**5c**

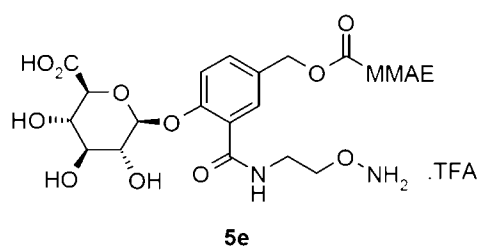
在0°C下在N₂下向化合物**5b** (2.0 g, 7.23 mmol)於THF (20 mL)中之溶液中添加*N,N*-二Boc-羥基胺(1.7 g, 7.44 mmol)及NaH (300 mg, 6.86 mmol)。在室溫下攪拌17小時後，將反應混合物用飽和NH₄Cl水溶液(50 mL)稀釋且用EtOAc (3×50 mL)萃取。合併有機層，經無水MgSO₄乾燥，過濾且濃縮。粗產物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**5c** (375 mg, 16%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.45-7.27 (m, 5H), 5.11 (s, 2H), 4.01 (br s, 2H), 3.44 (d, *J* = 4.8 Hz, 2H), 1.52 (s, 18H)。EI-MS *m/z*: [M+H]⁺ 410.7。

製備化合物**5d**

向化合物**5c** (187 mg, 0.45 mmol)於MeOH (20 mL)中之溶液中添加

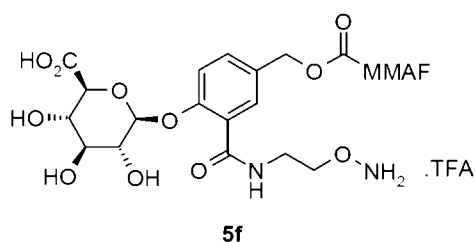
Pd/C (10% wt. %, 20 mg)且接著反應混合物在氫氣下在室溫下攪拌4小時。反應混合物經矽藻土墊過濾且用MeOH (20 mL)洗滌。濃縮濾液，產生呈無色油狀之化合物**5d** (120 mg)，其未經進一步純化即使用。

製備化合物**5e**



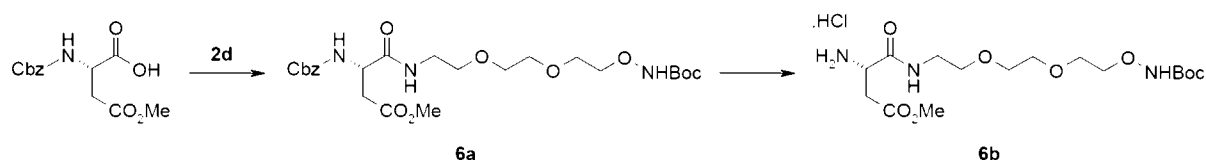
化合物**5e**係藉由實例3中製備化合物**2g**之類似方法，自化合物**1i**及化合物**5d**製備。EI-MS m/z : $[M+H]^+$ 1146.4。

實例10. 製備化合物**5f**



化合物**5f**係藉由實例3中製備化合物**2g**之類似方法，自化合物**1j**及化合物**5d**製備。EI-MS m/z : $[M+H]^+$ 1160.3。

實例11. 製備化合物**6e**



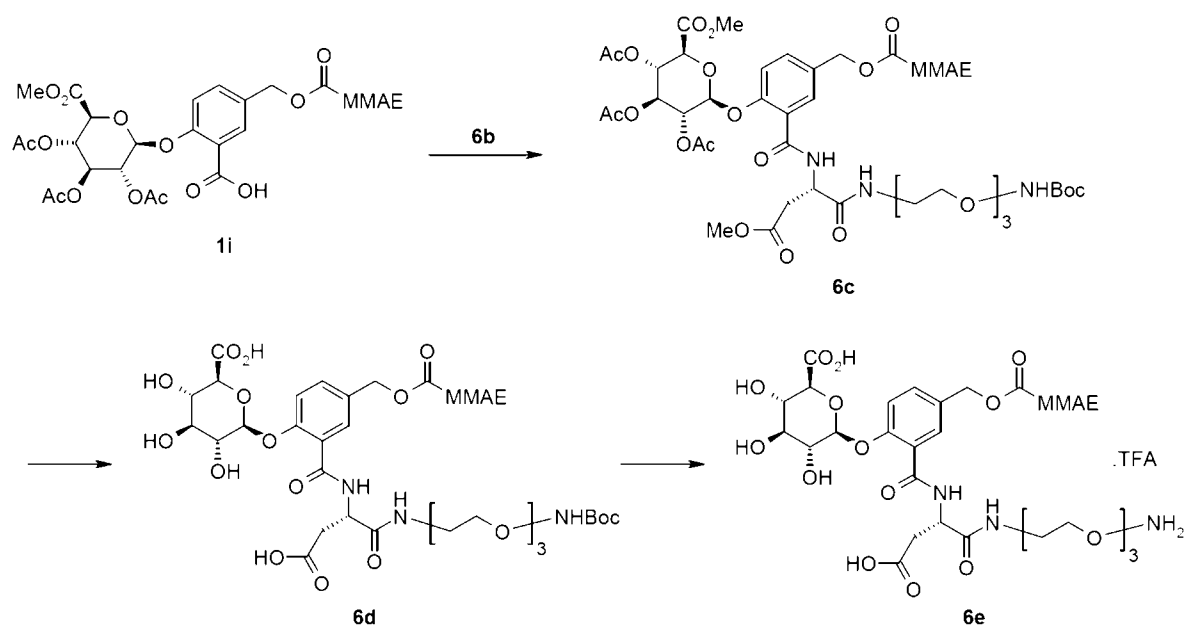
製備化合物**6a**

將DIPEA (1.2 mL, 9.96 mmol)及HBTU (1.69 g, 6.22 mmol)添加

至攪拌之Z-Asp(OMe)-OH (500 mg, 1.78 mmol)及化合物**2d** (642 mg, 2.98 mmol)於DMF (5 mL)中之混合物。反應混合物在N₂下在室溫下攪拌22小時。將反應混合物用H₂O (100 mL)稀釋且用EtOAc (2×100 mL)萃取。合併之有機層經無水Na₂SO₄乾燥，過濾且濃縮。所得殘餘物藉由管柱層析法來純化，得到化合物**6a** (368 mg, 40%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.85-7.70 (m, 1 H), 7.45-7.28 (m, 5H), 7.04 (s, 1H), 6.02 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 5.11 (s, 2H), 4.65-4.50 (m, 1H), 4.00 (d, *J* = 3.6 Hz, 2H), 3.72-3.30 (m, 10H), 2.80 (dd, *J* = 5.6 Hz, 2H), 1.46 (s, 9H)。

製備化合物**6b**

在0℃下向攪拌之化合物**6a** (150 mg, 0.28 mmol)及Pd/C (10 wt. %, 20 mg)於MeOH (5 mL)中之混合物添加HCl (4 N 1,4-二噁烷溶液, 0.07 mL, 0.28 mmol)。在氫氣下在室溫下攪拌2小時後，反應混合物經矽藻土墊過濾且用MeOH (20 mL)洗滌。濃縮濾液，產生呈無色油狀之化合物**6b** (169 mg)，其未經進一步純化即使用。EI-MS *m/z*: [M+1]⁺ 393.7。



製備化合物6c

將DIPEA (0.022 mL, 0.12 mmol)及HBTU (20 mg, 0.05 mmol)添加至攪拌之化合物1i (50 mg, 0.04 mmol)及化合物6b (22 mg, 0.05 mmol)於DMF (1 mL)中之混合物。反應混合物在N₂下在室溫下攪拌14小時。接著，將反應混合物用H₂O (10 mL)稀釋且用EtOAc (2×20 mL)萃取。合併之有機層經無水Na₂SO₄乾燥，過濾且濃縮。所得殘餘物藉由管柱層析法來純化，得到化合物6c (38 mg, 60%)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 1604.5。

製備化合物6d

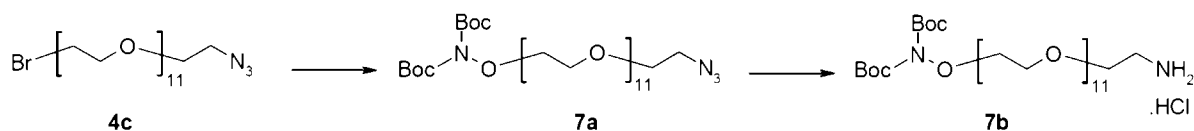
在0°C下向化合物6c (38 mg, 0.023 mmol)於MeOH (1 mL)中之溶液中添加含LiOH單水合物(5 mg, 0.118 mmol)之H₂O (1 mL)。在0°C下2小時後，溶液pH值用AcOH調至4~5且減壓濃縮。殘餘物溶於DMSO (1.5 mL)中且藉由HPLC來純化，產生化合物6d (26 mg, 78%)。

EI-MS m/z: [M+H]⁺ 1450.5。

製備化合物6e

將TFA (0.3 mL)添加至攪拌之化合物6d (26 mg, 0.018 mmol)於DCM (1.5 mL)中之溶液。在0°C下攪拌2小時後，溶劑及過量TFA藉由N₂流移除。接著殘餘物溶於DMSO (1 mL)中且藉由HPLC來純化。將具有相同滯留時間之純溶離份合併且凍乾，產生呈白色固體狀之化合物6e (19.5 mg, 80%)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 1350.6。

實例12. 製備化合物7e

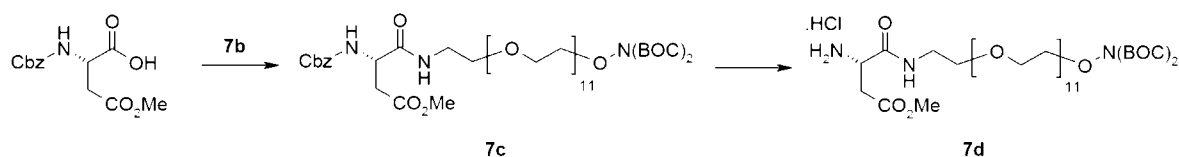


製備化合物**7a**

在0°C下將NaH (60 wt. % , 500 mg , 12.49 mmol)添加至攪拌之化合物**4c** (6.10 g , 9.61 mmol)及*N,N*-二Boc-羥基胺(2.69 g , 11.53 mmol)於DMF (90 mL)中之混合物。反應混合物加熱達室溫且保持在此溫度下12小時。在減壓下蒸發反應混合物且所得殘餘物藉由管柱層析法來純化。純溶離份真空蒸發，得到化合物**7a** (5.70 g , 75%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.05 (t, 2H), 3.71 (t, 2H), 3.64 (m, 42H), 3.37 (t, 2H), 1.51 (d, 18H)。

製備化合物**7b**

在0°C下向攪拌之化合物**7a** (5.70 g , 7.21 mmol)及Pd/C (10 wt. % , 570 mg)於MeOH (100 mL)中之混合物添加HCl (4 N 1,4-二噁烷溶液 , 1.9 mL , 7.2 mmol)。在氫氣下在室溫下攪拌30分鐘後，反應混合物經矽藻土墊過濾且用MeOH (30 mL)洗滌。濃縮濾液，產生呈無色油狀之化合物**7b** (5.10 g , 87%)，其未經進一步純化即使用。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 4.21 (t, 2H), 4.07 (s, 2H), 3.95-3.78 (m, 42H), 3.32 (s, 2H) 1.63 (s, 18H)。

製備化合物**7c**

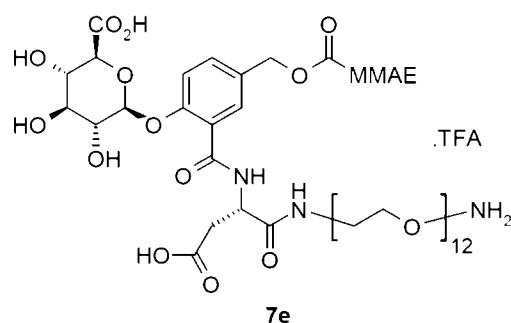
將DIPEA (0.25 mL , 1.42 mmol)及HBTU (337 g , 0.89mmol)添加至攪拌之Z-Asp(OMe)-OH (100 mg , 0.36 mmol)及化合物**7b** (340 mg , 0.43 mmol)於DMF (10 mL)中之混合物。反應混合物在N₂下在室溫下攪

拌20小時。接著，將反應混合物用H₂O (100 mL)稀釋且用EtOAc (2×100 mL)萃取。合併之有機層經無水Na₂SO₄乾燥，過濾且濃縮。所得殘餘物藉由管柱層析法來純化，得到化合物**7c** (123 mg, 58%)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 1024.2。

製備化合物**7d**

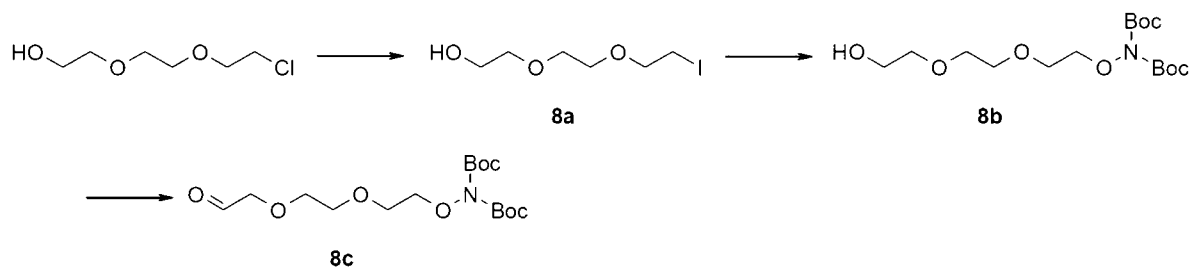
在0℃下向攪拌之化合物**7c** (120 mg, 0.12 mmol)及Pd/C (10 wt. %, 20 mg)於MeOH (5 mL)中之混合物添加HCl (4 N 1,4-二噁烷溶液, 0.03 mL, 0.12 mmol)。在氫氣下在室溫下攪拌2小時後，反應混合物經矽藻土墊過濾且用MeOH (20 mL)洗滌。濃縮濾液，產生呈無色油狀之化合物**7d** (120 mg)，其未經進一步純化即使用。

製備化合物**7e**



化合物**7e**係藉由實例11中製備化合物**6e**之類似方法，自化合物**1i**及化合物**7d**製備。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 1747.1。

實例13. 製備化合物**8f**



製備化合物**8a**

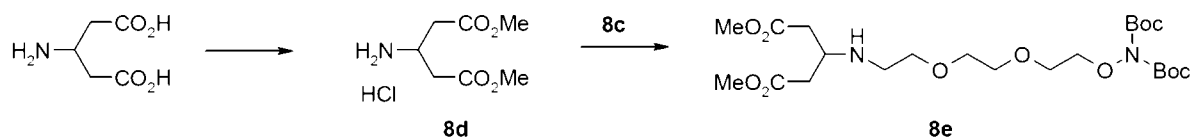
向2-(2-(2-氯乙氧基)乙氧基)乙醇(5.0 g, 29.6 mmol)於丙酮(30 mL)中之溶液中添加NaI (13.3 g, 88.9 mmol)。使反應混合物回流12小時。反應結束後，反應混合物過濾且濃縮。粗產物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**8a** (7.0 g, 91%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.80-3.73 (m, 4H), 3.72-3.65 (m, 4H), 3.63-3.61 (m, 2H), 3.27 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H)。

製備化合物**8b**

在0°C下在N₂下將NaH (500 mg, 12.49 mmol)添加至攪拌之化合物**8a** (2.0 g, 7.69 mmol)及*N,N*-二Boc-羥基胺(2.33 g, 10.00 mmol)於DMF (20 mL)中之混合物。在室溫下攪拌17小時後，將反應混合物用飽和NH₄Cl水溶液(50 mL)稀釋且用EtOAc (3×50 mL)萃取。合併有機層，經無水MgSO₄乾燥，過濾且濃縮。粗產物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**8b** (1.54 g, 54%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.45-7.27 (m, 5H), 5.11 (s, 2H), 4.01 (br s, 2H), 3.44 (d, *J* = 4.8 Hz, 2H), 1.52 (s, 18H)。EI-MS *m/z*: [M+H]⁺ 410.7。

製備化合物**8c**

在0°C下在N₂下向攪拌的化合物**8b** (123 mg, 0.242 mmol)於DMSO (2 mL)及DCM (2 mL)中之溶液中添加SO₃·吡啶複合物(116 mg, 0.726 mmol)及三乙胺(0.17 mL, 1.21 mmol)。1小時後，將反應混合物用飽和NH₄Cl水溶液(10 mL)稀釋且用DCM (2×10 mL)萃取。合併有機層，經無水MgSO₄乾燥，且過濾。在減壓下濃縮得到化合物**8c** (88 mg)，其未經進一步純化即使用。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.74 (s, 1H), 4.19 (s, 2H), 3.77-3.69 (m, 6H), 3.42 (m, 2H)。



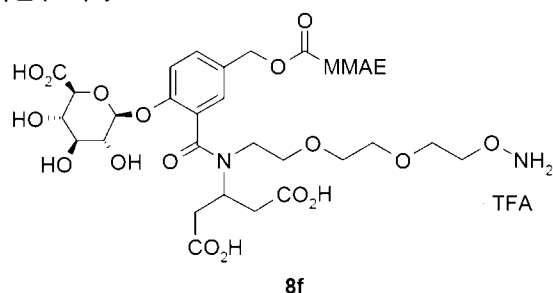
製備化合物**8d**

在0℃下在N₂下向β-麩胺酸(500 mg, 0.339 mmol)於MeOH (10 mL)中之溶液中添加亞硫醯氯(0.148 mL, 2.04 mmol)。24小時後，濃縮反應混合物，產生化合物**8d** (697 mg)，其未經進一步純化即使用。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.40-7.27 (m, 5H), 5.11 (s, 2H), 3.72 (s, 2H), 3.56 (s, 2H), 2.13 (br s, 1H)。

製備化合物**8e**

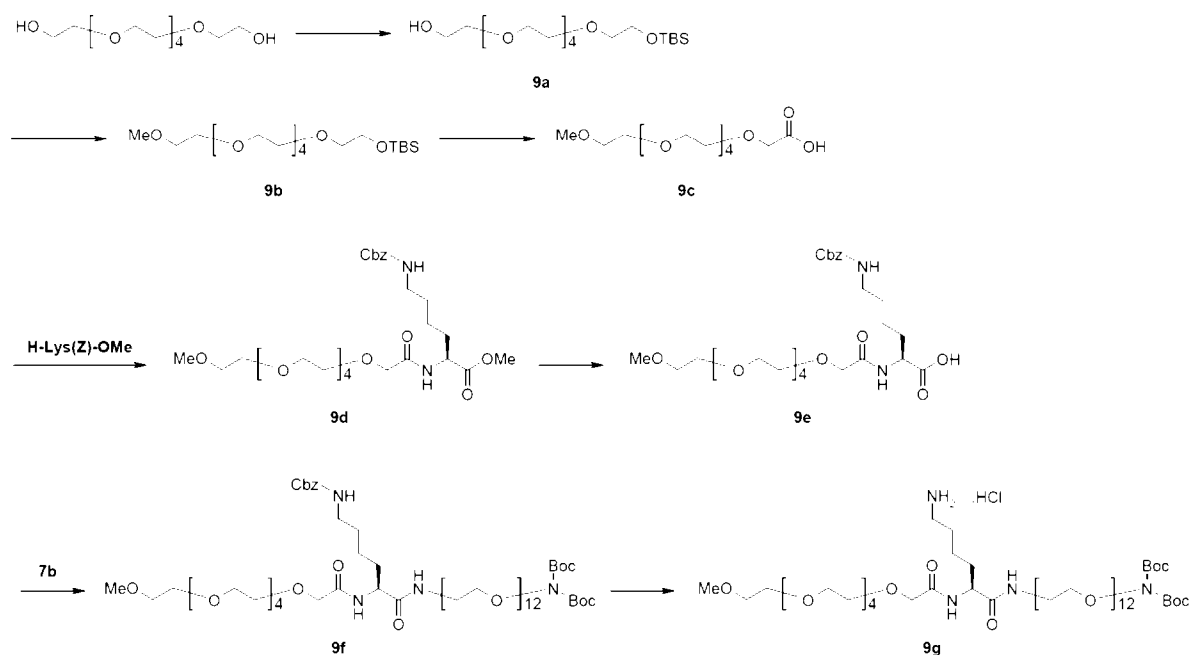
在室溫下在N₂下向化合物**8d** (34 mg, 0.16 mmol)及化合物**8c** (88 mg, 0.24 mmol)於MeOH (5 mL)中之溶液中添加NaCNBH₃ (10 mg, 0.16 mmol)。3小時後，反應混合物過濾且濃縮。粗產物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**8e** (53 mg, 63%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.45-7.25 (m, 10H), 5.60 (br s, 2H), 5.03 (s, 4H), 3.80-3.25 (m, 20H), 2.81 (s, 4H)。

製備化合物**8f**



化合物**8f**係藉由實例11中製備化合物**6e**之類似方法，自化合物**1i**及化合物**8e**製備。EI-MS *m/z*: [M+H]⁺ 1365.0。

實例14. 製備化合物**9j**



製備化合物**9a**

在0℃下在N₂下向六乙二醇(10.48 g, 37.12 mmol)於DCM (400 mL)中之溶液中添加咪唑(3.20 g, 44.54 mmol)。5分鐘後，在相同溫度下在N₂氛圍下反應混合物逐滴添加至TBSCl (5.60 g, 37.12 mmol)於DCM (50 mL)中之溶液。反應混合物在0℃下攪拌且在N₂下升溫至室溫，歷時21小時。反應結束後，將反應混合物用水(200 mL)稀釋且用DCM (2×100 mL)萃取。有機層經無水Na₂SO₄乾燥且減壓濃縮。所得殘餘物藉由管柱層析法來純化。純溶離份真空蒸發，得到化合物**9a** (6.70 g, 46%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.77-3.71 (m, 4H), 3.66-3.60 (m, 18H), 3.56-3.54 (t, 2H), 0.89 (s, 9H), 0.06 (s, 6H)。

製備化合物**9b**

在0℃下在N₂下向化合物**9a** (3.32 g, 8.37 mmol)於無水THF (40 mL)中之溶液中添加NaH (55%於油中, 438 mg, 10.05 mmol)。30分鐘後，在相同溫度下在N₂下MeI (0.78 mL, 12.56 mmol)添加至反應混合物。攪拌反應混合物且在N₂下升溫至室溫，歷時18小時。反應結束後，

用H₂O (10 mL)淬滅且用EA (3×10 mL)萃取。合併有機層，用飽和NH₄Cl水溶液(5 mL)及鹽水(10 mL)洗滌，經無水Na₂SO₄乾燥且在減壓下蒸發。所得殘餘物藉由管柱層析法來純化。純溶離份真空蒸發，得到化合物**9b** (3.16 g, 92%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.78-3.75 (t, 2H), 3.65 (s, 20H), 3.57-3.54 (t, 4H), 3.38 (s, 3H), 0.89 (s, 9H), 0.06 (s, 6H)。

製備化合物**9c**

在0°C下在N₂下向化合物**9b** (3.16 g, 7.69 mmol)於丙酮(100 mL)中之溶液中添加瓊斯試劑(Jones reagent)(10 mL)。攪拌反應混合物且在N₂下升溫至室溫，歷時17小時。反應結束後，反應混合物過濾且在減壓下蒸發。將殘餘物用H₂O (100 mL)稀釋且用CHCl₃ (3×50 mL)萃取。合併有機層，經無水Na₂SO₄乾燥且在減壓下蒸發。所得粗化合物**9c** (2.28 g, 95%)未經進一步純化即使用。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.16 (s, 2H), 3.76-3.75 (t, 2H), 3.69-3.67 (m, 16H), 3.57-3.55 (t, 2H), 3.38 (s, 3H)。

製備化合物**9d**

將DIPEA (3.8 mL, 22.03 mmol)、HOBt (1.29 g, 9.55 mmol)及EDC·HCl (1.83 g, 9.55 mmol)添加至攪拌之化合物**9c** (2.28 g, 7.34 mmol)及H-Lys(Z)-OMe鹽酸鹽(2.91 g, 8.81 mmol)於DMF (30 mL)中之混合物。在N₂下在室溫下攪拌14小時後，濃縮反應混合物。藉由管柱層析法來純化，得到化合物**9d** (1.23 g, 72%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.38-7.31 (m, 5H), 5.10 (s, 2H), 5.00 (s, 1H) 4.68-4.62 (m, 1H), 4.03 (s, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.68-3.64 (m, 16H), 3.56 (t, 2H), 3.39 (s, 3H), 3.20 (m, 2H), 1.89 (m, 1H), 1.74 (m, 1H), 1.55(m, 1H), 1.40 (m, 1H)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 586.8, [M+Na]⁺ 608.9。

製備化合物**9e**

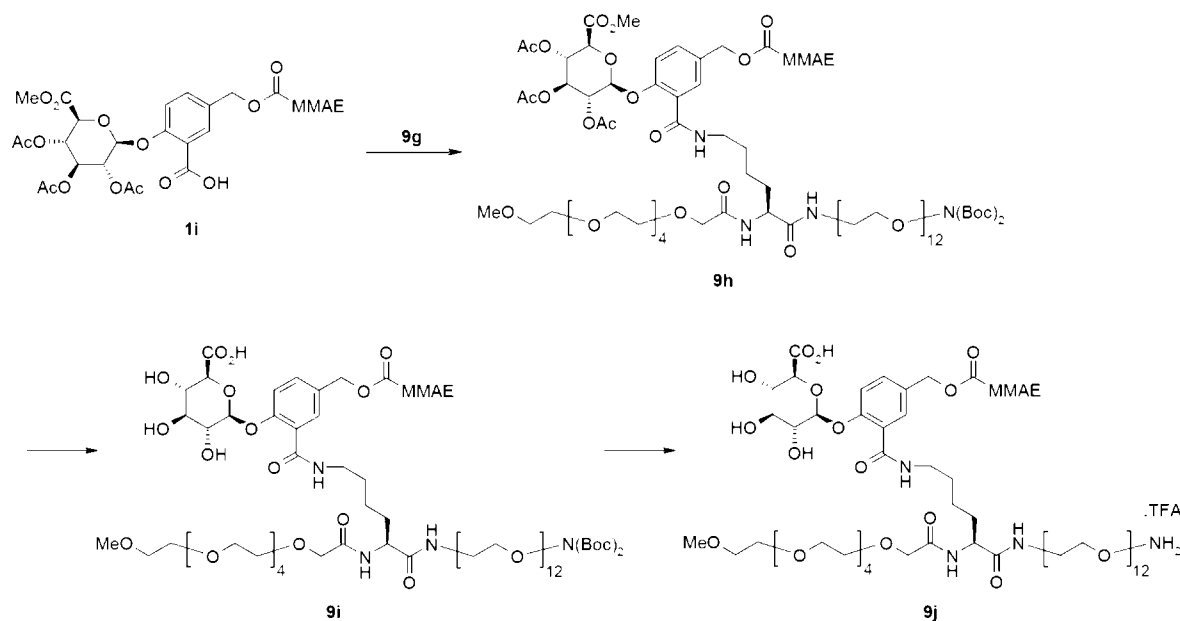
在0℃下在N₂下向化合物**9d** (2.16 g, 3.68 mmol)於THF/MeOH/H₂O (18 mL/6 mL/6 mL)中之溶液中添加LiOH單水合物(307 mg, 7.31 mmol)。將反應混合物在室溫下攪拌1小時。接著溶液pH值用1 N HCl水溶液調至2~3。將反應混合物傾倒至H₂O (20 mL)且用DCM (3×50 mL)萃取。合併有機層，經Na₂SO₄乾燥。過濾且濃縮產生化合物**9e** (2.28 g, 99%)，其未經進一步純化即使用。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.34-7.30 (m, 5H), 5.08 (s, 2H), 4.66-4.60 (q, 1H), 4.01 (s, 2H), 3.67-3.55 (m, 18H), 3.37 (s, 3H), 3.20 (m, 2H), 1.87 (m, 1H), 1.72 (m, 1H), 1.53(m, 1H), 1.38 (m, 1H)。

製備化合物**9f**

將DIPEA (0.45 mL, 2.63 mmol)、HOBt (154 mg, 0.11 mmol)及EDC·HCl (218 mg, 0.11 mmol)添加至攪拌之化合物**9e** (502 mg, 0.88 mmol)及化合物**7b** (700 mg, 0.88 mmol)於DMF (8 mL)中之混合物。在N₂下在室溫下攪拌14小時後，將反應混合物傾倒至H₂O (20 mL)且用EtOAc (3×20 mL)萃取。合併之有機層用NaHCO₃水溶液(20 mL)及鹽水(20 mL)洗滌且經無水Na₂SO₄乾燥。過濾及減壓濃縮後，所得殘餘物藉由管柱層析法來純化，得到化合物**9f** (499 mg, 43%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.35-7.30 (m, 5H), 6.83 (s, 1H), 5.15 (s, 1H), 5.08 (s, 2H), 4.43 (q, 1H) 4.07 (t, 1H), 3.65-3.60 (m, 54H), 3.55-3.53 (m, 4H), 3.37 (s, 3H), 3.16 (m, 2H), 1.85 (m, 1H), 1.53-1.52 (d, 19H), 1.38(m, 2H)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 1337.5。

製備化合物**9g**

在0℃下向攪拌之化合物**9f** (499 mg, 0.37 mmol)及Pd/C (10 wt. %, 50 mg)於MeOH (20 mL)中之混合物添加HCl (4 N 1,4-二噁烷溶液, 0.1 mL, 0.37 mmol)。在氫氣下在室溫下攪拌90分鐘後, 反應混合物經矽藻土墊過濾且用MeOH (10 mL)洗滌。濃縮濾液, 產生呈無色油狀之化合物**9g** (458 mg, 98%), 其未經進一步純化即使用。EI-MS m/z : $[M+H]^+$ 1218.6。



製備化合物**9h**

將DIPEA (0.019 mL, 0.11 mmol)及HBTU (18 mg, 0.05 mmol)添加至攪拌之化合物**1i** (45 mg, 0.04 mmol)及化合物**9g** (57 mg, 0.05 mmol)於DMF (0.5 mL)中之混合物。反應混合物在N₂下在室溫下攪拌14小時。將反應混合物用H₂O/DMSO (1.5 mL/1.5 mL)稀釋且藉由HPLC來純化, 得到化合物**9h** (65 mg, 57%)。EI-MS m/z : $1/2[M+H]^+$ 1181.7。

製備化合物**9i**

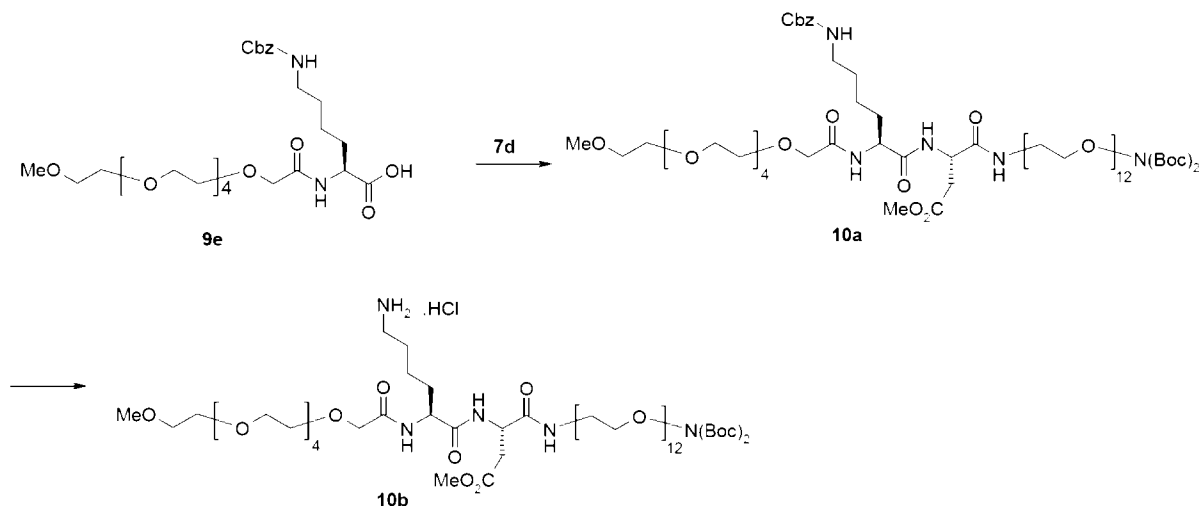
在0℃下向化合物**9h** (65 mg, 0.03 mmol)於MeOH (1.5 mL)中之溶液中添加含LiOH單水合物(10 mg, 0.24 mmol)之H₂O (1.5 mL)。在0℃下1小時後, 溶液pH值用AcOH調至4~5且減壓濃縮。接著反應混合物溶於

H₂O/DMSO (1.5 mL/1.5 mL)中且藉由HPLC來純化，得到化合物**9i** (45 mg, 55%)。EI-MS m/z : $1/2[M+Na]^+$ 1098.7。

製備化合物**9j**

將TFA (0.2 mL)添加至攪拌的化合物**9i** (45 mg, 0.02 mmol)於DCM (1 mL)中之溶液。在0°C下攪拌30分鐘後，溶劑及過量TFA藉由N₂流移除。接著殘餘物溶於H₂O/DMSO (1 mL/1 mL)中且藉由HPLC來純化。將具有相同滯留時間之純溶離份合併且凍乾，產生呈白色固體狀之化合物**9j** (14 mg, 32%)。EI-MS m/z : $1/2[M+H]^+$ 1026.3。

實例15. 製備化合物**10c**



製備化合物**10a**

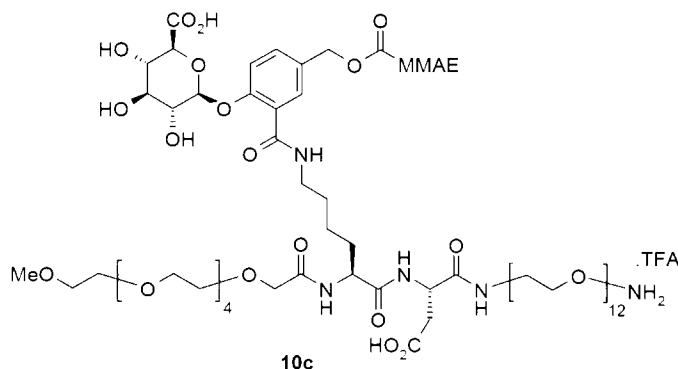
將DIPEA (0.03 mL, 0.17 mmol)、HOBt (10 mg, 0.075 mmol)及EDC·HCl (14 mg, 0.075 mmol)添加至攪拌之化合物**9e** (33 mg, 0.058 mmol)及化合物**7d** (54 mg, 0.058 mmol)於DMF (3 mL)中之混合物。在N₂下在室溫下攪拌14小時後，將反應混合物傾倒至H₂O (10 mL)且用EtOAc (3×10 mL)萃取。合併之有機層用1 N HCl水溶液(8 mL)、飽和NaHCO₃水溶液(8 mL)及鹽水(8 mL)洗滌，且經無水Na₂SO₄乾燥。過濾且濃縮後，殘餘物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**10a** (61 mg,

73%)。EI-MS m/z : $[M+H]^+$ 1445.0, $[M+H-Boc]^+$ 1344.9。

製備化合物10b

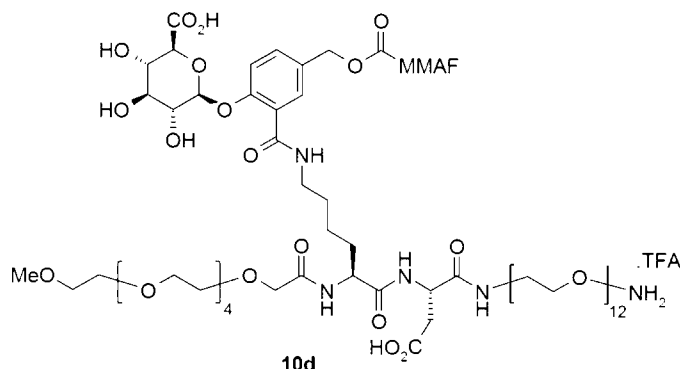
在0℃下向攪拌之化合物10a (60 mg, 0.04 mmol)及Pd/C (10 wt. %, 30 mg)於MeOH (10 mL)中之混合物添加HCl (4 N 1,4-二噁烷溶液, 0.01 mL, 0.01 mmol)。在氫氣下在室溫下攪拌3小時後, 反應混合物經矽藻土墊過濾且用MeOH (40 mL)洗滌。濃縮濾液, 產生呈無色油狀之化合物10b (56 mg, 100%), 其未經進一步純化即使用。EI-MS m/z : $[M+H]^+$ 1311.0, $[M+Na]^+$ 1332.9。

製備化合物10c



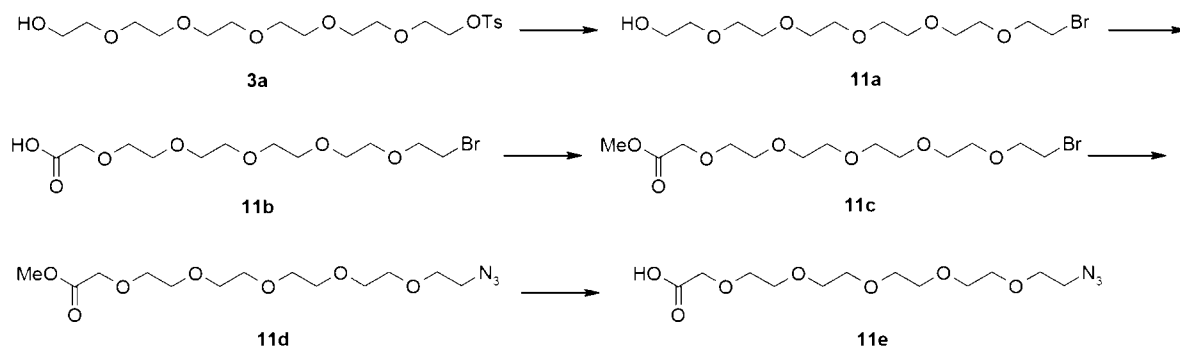
化合物10c係藉由實例14中製備化合物9j之類似方法, 自化合物1i及化合物10b製備。EI-MS m/z : $1/2[M+H]^+$ 1083.8。

實例16. 製備化合物10d



化合物10d係藉由實例14中製備化合物9j之類似方法, 自化合物1j及化合物10b製備。EI-MS m/z : $[M+H]^+$ 2181.3, $1/2[M+H]^+$ 1091.3。

實例17. 製備化合物11j



製備化合物11a

在室溫下向化合物**3a** (8.0 g, 18.3 mmol)於THF (50 mL)中之溶液中添加LiBr (7.9 g, 91.6 mmol)。在回流下攪拌17小時後，反應混合物過濾且濃縮。粗產物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**11a** (3.2 g, 50%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.95-3.50 (m, 24H)。

製備化合物11b

在0°C下向化合物**11a** (3.2 g, 12.3 mmol)於丙酮(20 mL)中之溶液中添加瓊斯試劑(20 mL)。在0°C下15小時後，反應混合物過濾且濃縮。將殘餘物用H₂O (50 mL)稀釋且用EtOAc (2×100 mL)萃取。合併有機層，經無水MgSO₄乾燥，過濾且濃縮。粗產物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**11b** (3.2 g, 72%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.16 (s, 2H), 3.95-3.30 (m, 20H)。

製備化合物11c

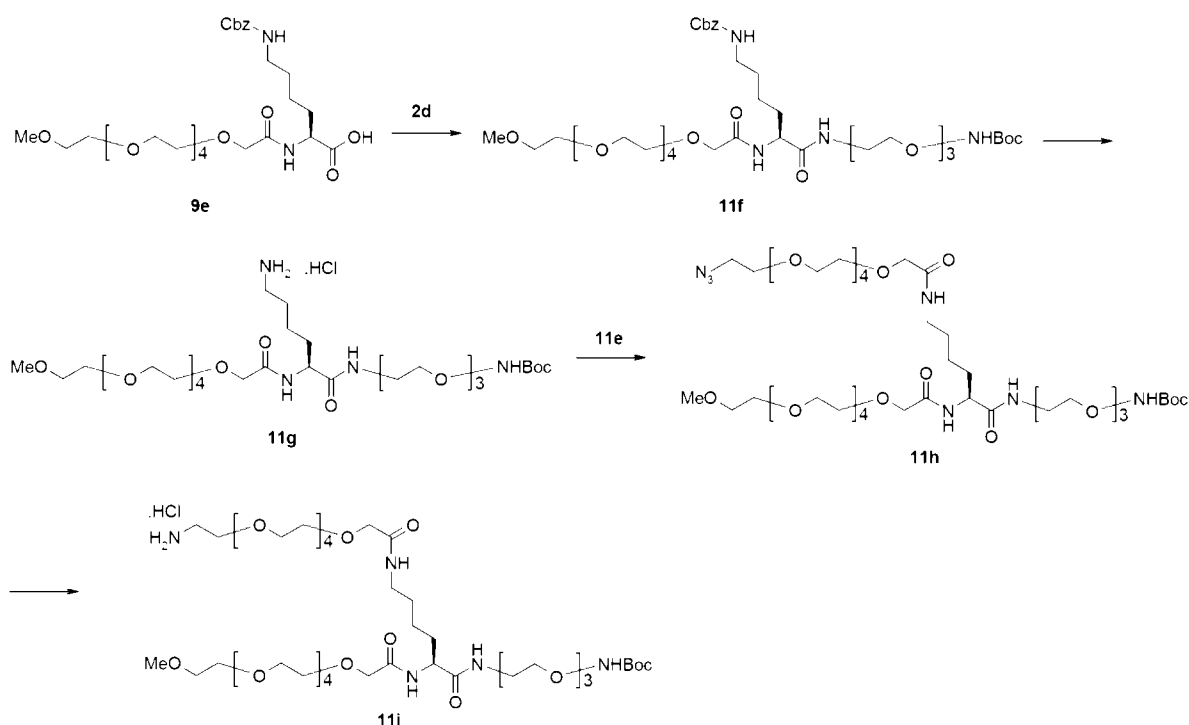
在0°C下在N₂下向化合物**11b** (3.2 g, 8.90 mmol)於MeOH (30 mL)中之溶液中添加乙二醯氯(1.15 mL, 13.3 mmol)。16小時後，濃縮反應混合物且藉由管柱層析法來純化，產生化合物**11c** (2.7 g, 81%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.17 (s, 2H), 3.80-3.60 (m, 21H), 3.47 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H)。

製備化合物11d

使化合物**11c** (1.0 g, 2.67 mmol)及NaN₃ (261 mg, 4.01 mmol)溶於DMF (3 mL)中。將反應混合物在100℃下加熱5小時。反應結束後，反應混合物過濾且濃縮。殘餘物藉由管柱層析法(EtOAc至EtOAc/MeOH 10/1)來純化，產生化合物**11d** (854 mg, 95%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.17 (s, 2H), 3.76-3.64 (m, 21H), 3.39 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H)。

製備化合物11e

在0°C下向攪拌的化合物**11d** (854 mg, 2.54 mmol)於MeOH (25 mL)中之溶液中添加2 M NaOH水溶液(6.3 mL, 12.64 mmol)。反應混合物在室溫下攪拌3小時。溶液接著減壓濃縮。在0°C下冷卻的同時，將所得懸浮液用2 N HCl水溶液酸化。殘餘物藉由CHCl₃ (8×50 mL)萃取。合併有機層，經Na₂SO₄乾燥且濃縮，產生化合物**11e** (783 mg, 96%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.16 (s, 2H), 3.76-3.65 (m, 18H), 3.40 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H)。



製備化合物**11f**

將DIPEA (0.47 mL, 2.72 mmol)、HOBt (160 mg, 1.18 mmol)及EDC·HCl (226 mg, 1.18 mmol)添加至攪拌之化合物**9e** (520 mg, 0.91 mmol)及化合物**2d** (270 mg, 0.91 mmol)於DMF (5 mL)中之混合物。在N₂下在室溫下攪拌14小時後，將反應混合物傾倒至H₂O (20 mL)且用EtOAc (3×30 mL)萃取。合併之有機層用1 N HCl水溶液(15 mL)、飽和NaHCO₃水溶液(15 mL)及鹽水(15 mL)洗滌，且經無水Na₂SO₄乾燥。過濾且濃縮後，殘餘物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**11f** (631 mg, 85%)。

EI-MS m/z: [M+H]⁺ 819.1, [M+H-Boc]⁺ 719.1 [M+Na]⁺ 841.1。

製備化合物**11g**

在0℃下向攪拌之化合物**11f** (300 mg, 0.36 mmol)及Pd/C (10 wt. %, 70 mg)於MeOH (20 mL)中之混合物添加HCl (4 N 1,4-二噁烷溶液, 0.08 mL, 0.08 mmol)。在氫氣下在室溫下攪拌3小時後，反應混合物經矽藻土墊過濾且用MeOH (40 mL)洗滌。濃縮濾液，產生呈無色油狀之化合物**11g** (200 mg, 99%)，其未經進一步純化即使用。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 685.1, [M+Na]⁺ 707.1。

製備化合物**11h**

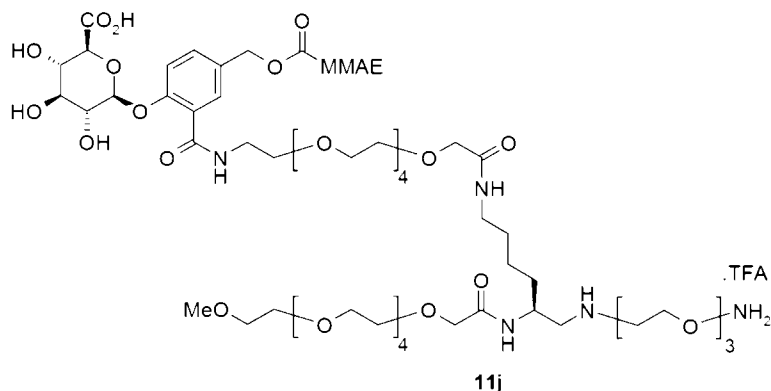
將DIPEA (0.024 mL, 0.41 mmol)、HOBt (24 mg, 0.18 mmol)及EDC·HCl (34 mg, 0.18 mmol)添加至攪拌之化合物**11g** (100 mg, 0.14 mmol)及化合物**11e** (44 mg, 0.14 mmol)於DMF (5 mL)中之混合物。在N₂下在室溫下攪拌14小時後，將反應混合物傾倒至H₂O (10 mL)且用DCM (3×10 mL)萃取。合併之有機層經無水Na₂SO₄乾燥。過濾且濃縮

後，殘餘物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**11h** (73 mg, 53%)。EI-MS m/z : $[M+H]^+$ 988.4, $[M+Na-Boc]^+$ 888.2, $[M+Na]^+$ 1010.4。

製備化合物**11i**

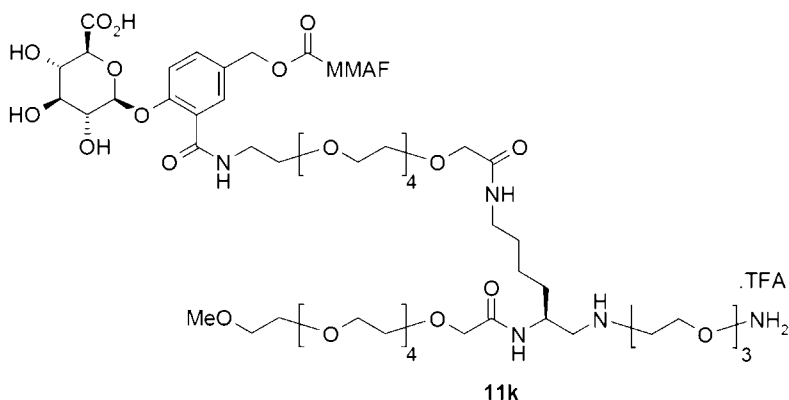
在0℃下向攪拌之化合物**11h** (73 mg, 0.07 mmol)及Pd/C (10 wt. %, 10 mg)於MeOH (7 mL)中之混合物添加HCl (4 N 1,4-二噁烷溶液, 0.018 mL, 0.018 mmol)。在氫氣下在室溫下攪拌2小時後，反應混合物經矽藻土墊過濾且用MeOH (30 mL)洗滌。濃縮濾液，產生呈無色油狀之化合物**11i** (72 mg, 99%)，其未經進一步純化即使用。EI-MS m/z : $[M+H]^+$ 962.4, $[M+Na]^+$ 984.4。

製備化合物**11j**



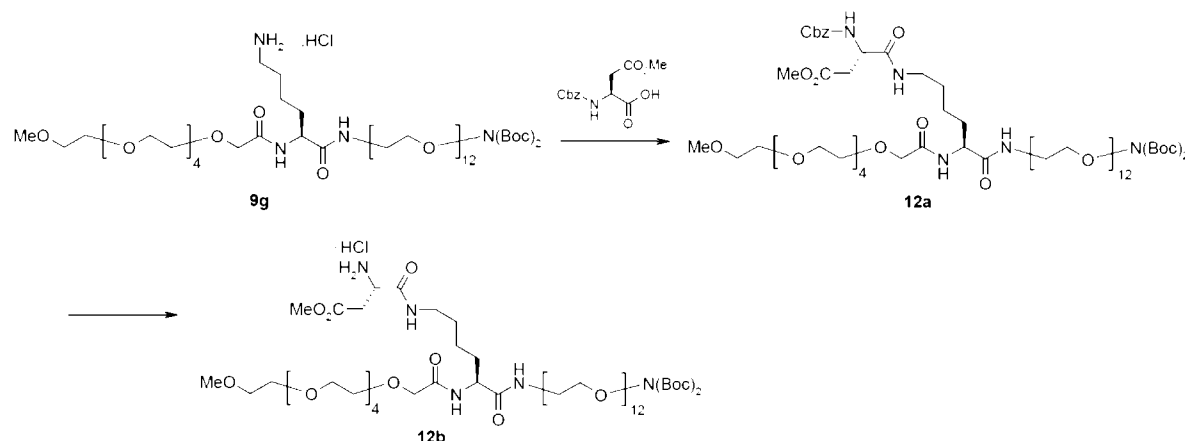
化合物**11j**係藉由實例14中製備化合物**9j**之類似方法，自化合物**1i**及化合物**11i**製備。EI-MS m/z : $[M+H]^+$ 1932.5。

實例18. 製備化合物**11k**



化合物**11k**係藉由實例14中製備化合物**9j**之類似方法，自化合物**1j**及化合物**11i**製備。EI-MS m/z : $[M+H]^+$ 1947.1。

實例19. 製備化合物12c



製備化合物12a

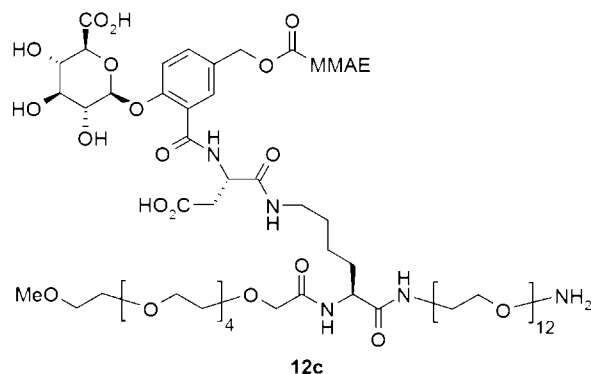
將DIPEA (0.13 mL, 0.77 mmol)及HBTU (110 mg, 0.35 mmol)添加至攪拌之化合物**9g** (235 mg, 0.1929 mmol)及Z-Asp(OMe)-OH (54 mg, 0.212 mmol)於DMF (5 mL)中之混合物。在N₂下在室溫下攪拌14小時後，將反應混合物傾倒至H₂O (20 mL)且用EtOAc (3×20 mL)萃取。合併之有機層用1 N HCl水溶液(7 mL)、飽和NaHCO₃水溶液(7 mL)及鹽水(7 mL)洗滌，且經無水Na₂SO₄乾燥。過濾且濃縮後，殘餘物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**12a** (260 mg, 93%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.07 (t, 1H), 7.62 (t, 1H), 7.54-7.52 (m, 1H), 5.73 (s, 2H), 4.27-4.25 (q, 1H), 3.96 (t, 2H), 3.88 (s, 2H), 3.82 (s, 2H), 3.58-3.48 (m, 52H), 3.19-3.18 (m, 3H), 3.04-3.03 (m, 3H), 1.44 (s, 18H), 1.39-1.37 (m, 3H), 1.21-1.19 (m, 3H)。EI-MS m/z : $[M+H-2Boc]^+$ 1031.6。

製備化合物12b

在0°C下向攪拌之化合物**12a** (260 mg, 0.179 mmol)及Pd/C (10 wt. %, 72 mg)於MeOH (20 mL)中之混合物添加HCl (4 N 1,4-二噁烷溶液，

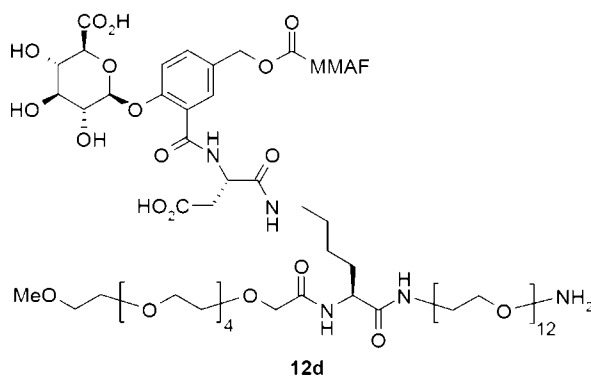
0.040 mL, 0.179 mmol)。在氫氣下在室溫下攪拌3小時後，反應混合物經矽藻土墊過濾且用MeOH (40 mL)洗滌。濃縮濾液，產生呈無色油狀之化合物**12b** (242 mg, 100%)，其未經進一步純化即使用。EI-MS m/z : $[M+H]^+$ 625.0, $[M+H-Boc]^+$ 525.0, $[M+H-2Boc]^+$ 424.9。

製備化合物**12c**



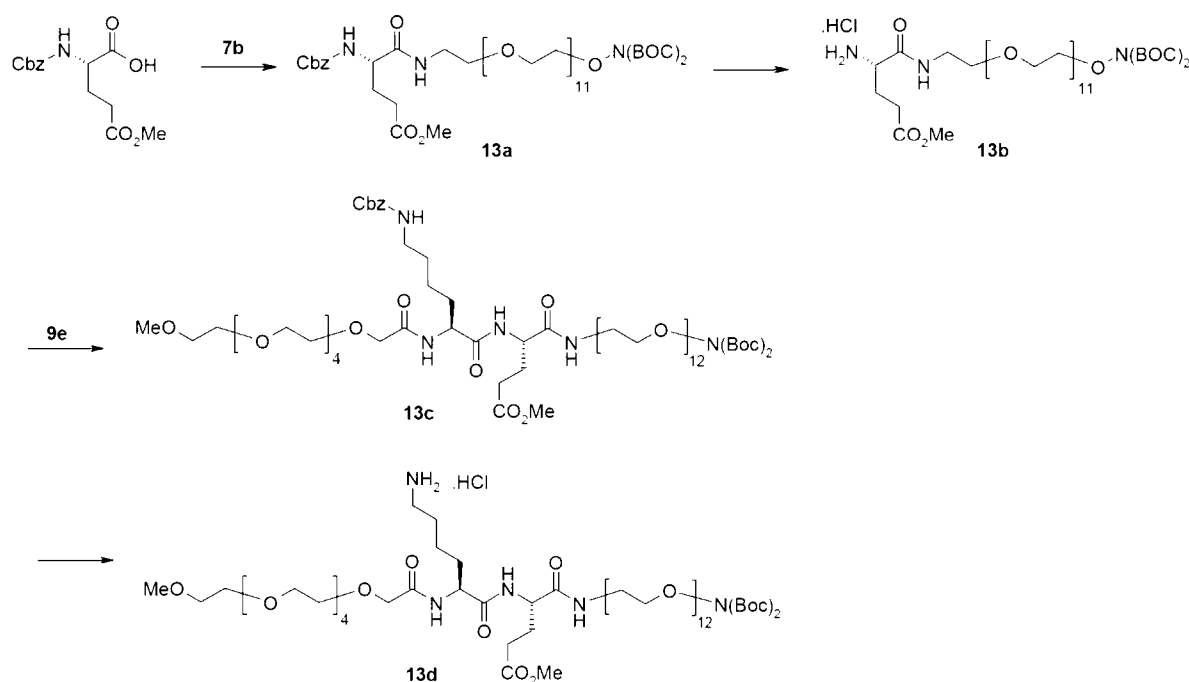
化合物**12c**係藉由實例14中製備化合物**9j**之類似方法，自化合物**1i**及化合物**12b**製備。EI-MS m/z : $1/2[M+H]^+$ 1083.5。

實例20. 製備化合物**12d**



化合物**12d**係藉由實例14中製備化合物**9j**之類似方法，自化合物**1j**及化合物**12b**製備。EI-MS m/z : $1/2[M+H]^+$ 1090.5。

實例21. 製備化合物**13e**



製備化合物**13a**

將DIPEA (0.22 mL, 1.25 mmol)及HBTU (356 mg, 0.94 mmol)添加至攪拌之Z-Glu(OMe)-OH (222 mg, 0.75 mmol)及化合物**7b** (500 mg, 0.62 mmol)於DMF (5.0 mL)中之混合物。反應混合物在N₂下在室溫下攪拌14小時。將反應混合物用水(200 mL)稀釋且用EA (3×100 mL)萃取。有機層經無水MgSO₄乾燥，過濾且減壓濃縮。所得殘餘物藉由管柱層析法來純化，得到化合物**13a** (370 mg, 57%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.34 (br, 5H), 6.73 (br, 1H), 5.72 (d, J=7.6Hz, 1H), 5.06 (br, 2H), 4.28-4.18 (m, 1H), 4.07 (t, J=4.4Hz, 2H), 3.76-3.71 (m, 2H), 3.70-3.50 (m, 45H), 3.48-3.42 (m, 2H), 2.53-2.36 (m, 2H), 2.20-2.08 (m, 1H), 2.00-1.88 (m, 1H), 1.53 (s, 18H)。EI-MS m/z: [M+Na]⁺ 1061.2。

製備化合物**13b**

在0°C下將4N HCl之1,4-二噁烷溶液(0.08 mL, 0.32 mmol)添加至攪拌之化合物**13a** (370 mg, 0.35 mmol)及Pd/C (38 mg)於MeOH (8 mL)中之混合物。在氫氣下在室溫下攪拌20小時後，反應混合物經矽藻土墊過濾

且用MeOH (400 mL)洗滌。濃縮濾液，產生呈黃色液體狀之化合物**13b** (301 mg，90%)，其未經進一步純化即使用。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.41 (br, 1H), 8.09 (br, 3H), 4.13 (br, 1H), 3.85-3.56 (m, 51H), 2.55 (br, 2H), 2.38-2.18 (m, 2H), 1.53 (s, 18H)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 905.0。

製備化合物**13c**

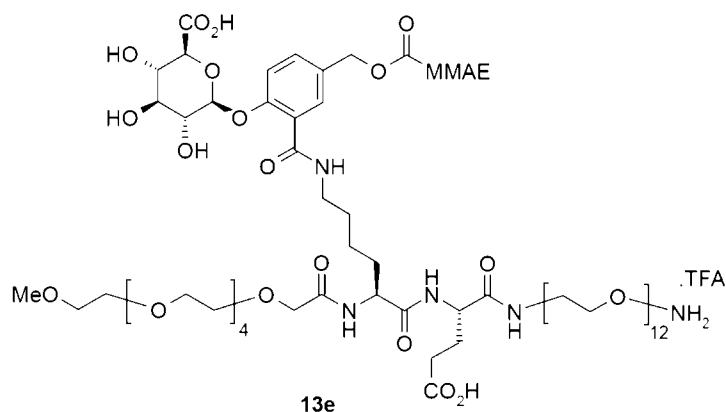
將DIPEA (0.165 mL，0.96 mmol)及HBTU (279 mg，0.74 mmol)添加至攪拌的化合物**13b** (300 mg，0.32 mmol)及化合物**9e** (366 mg，0.64 mmol)於DMF (5.0 mL)中之混合物。反應混合物在N₂下在室溫下攪拌14小時。將反應混合物用水(200 mL)稀釋且用EtOAc (3×100 mL)萃取。有機層經無水MgSO₄乾燥，過濾且減壓濃縮。所得殘餘物藉由管柱層析法來純化，得到化合物**13c** (290 mg，62%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.40-7.32 (m, 7H), 7.00 (br, 1H), 6.73 (br, 1H), 5.07 (br, 2H), 4.44-4.36 (m, 2H), 4.07 (t, J=4.8Hz, 2H), 4.02 (br, 2H), 3.73 (t, J = 5.2Hz, 2H), 3.71-3.52 (m, 68H), 3.24-3.14 (m, 2H), 2.52-2.34 (m, 3H), 2.18-2.06 (m, 2H), 1.98-1.82 (m, 4H), 1.76-1.64 (m, 3H), 1.53 (s, 18H)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 1459.7。

製備化合物**13d**

在0℃下將Pd/C (21 mg)添加至攪拌之化合物**13c** (290 mg，0.19 mmol)於MeOH (5 mL)中之混合物。在氫氣下在室溫下攪拌20小時後，反應混合物經矽藻土墊過濾且用MeOH (400 mL)洗滌。濃縮濾液，產生呈黃色液體狀之化合物**13c** (247 mg，94%)，其未經進一步純化即使用。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.20 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.74 (br, 1H),

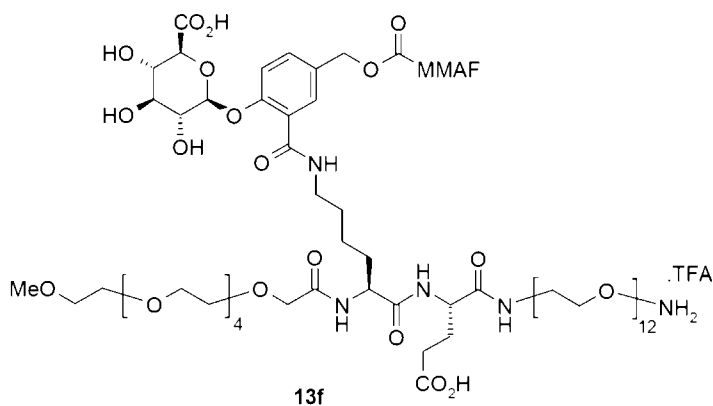
7.30 (br, 1H), 4.66-4.48 (m, 2H), 4.07 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H), 4.01 (br, 2H), 3.74-3.62 (m, 70H), 3.57-3.53 (m, 2H), 3.04-2.98 (m, 2H), 2.24-2.15 (m, 2H), 2.14-2.06 (m, 2H), 1.99-1.86 (m, 4H), 1.84-1.74 (m, 2H), 1.53 (s, 18H) 。 EI-MS m/z : $[M+H]^+$ 1325.5 。

製備化合物13e



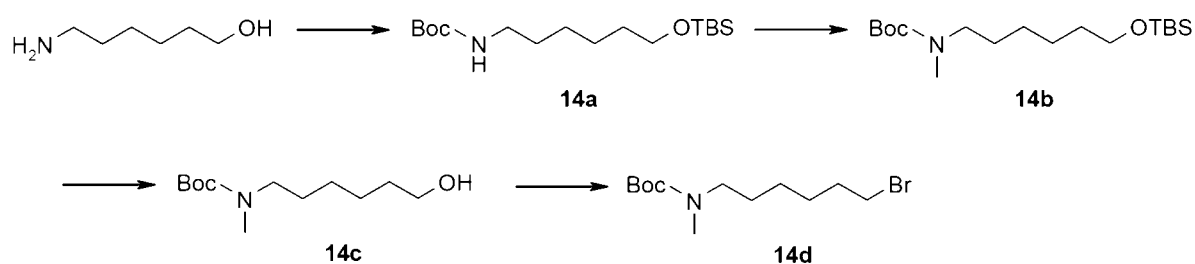
化合物**13e**係藉由實例14中製備化合物**9j**之類似方法，自化合物**1i**及化合物**13d**製備。EI-MS m/z : $[M+H]^+$ 2181.5 。

實例22. 製備化合物13f



化合物**13f**係藉由實例14中製備化合物**9j**之類似方法，自化合物**1j**及化合物**13d**製備。EI-MS m/z : $[M+H]^+$ 2195.5 。

實例23. 製備化合物14m



製備化合物**14a**

在室溫下向6-胺基-1-己醇(5.0 g, 42.6 mmol)於DCM (30 mL)中之溶液中添加二碳酸二第三丁酯(9.3 g, 42.6 mmol)。攪拌18小時後，在0℃下將三乙胺(8.7 mL, 63.9 mmol)及第三丁基二甲基氯矽烷(7.7 g, 51.2 mmol)添加至反應混合物。在室溫下24小時後，將反應混合物用飽和 NH_4Cl 水溶液(200 mL)稀釋。將所得混合物用EtOAc (100 mL)萃取。將有機層用鹽水(100 mL)洗滌且經無水 MgSO_4 乾燥，過濾且濃縮。殘餘物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**14a** (12 g, 84%)。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 4.50 (br s, 1H), 3.58 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.10 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H), 1.72-1.20 (m, 17H), 0.88 (s, 9H), 0.04 (s, 6H)。

製備化合物**14b**

在0℃下在 N_2 下向化合物**14a** (6.0 g, 18.1 mmol)於THF (30 mL)中之溶液中添加NaH (60%於油中, 2.4 g, 54.2 mmol)及甲基碘(3.4 mL, 54.2 mmol)。14小時後，將反應混合物用 H_2O (50 mL)稀釋且用EtOAc (2×100 mL)萃取。合併有機層，經無水 MgSO_4 乾燥，過濾且濃縮。粗產物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**14b** (4.3 g, 69%)。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 3.59 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.17 (br s, 2H), 2.82 (s, 3H), 1.62-1.21 (m, 17H), 0.88 (s, 9H), 0.04 (s, 6H)。

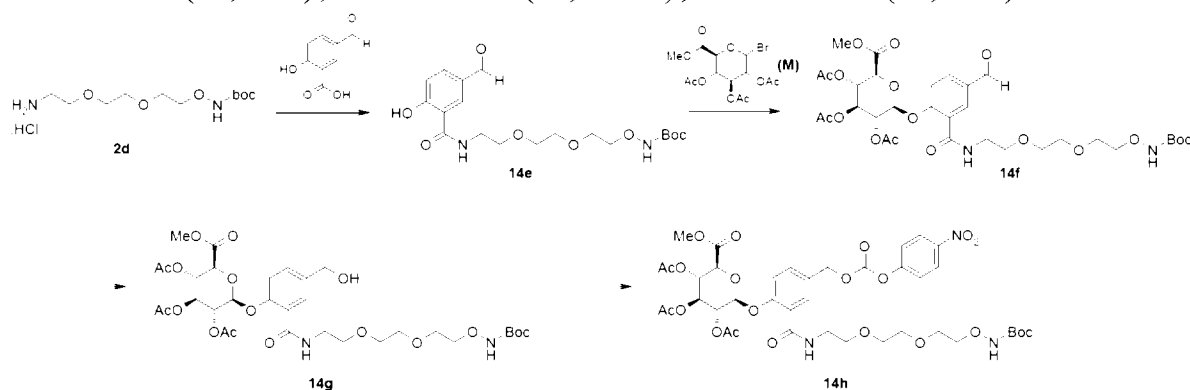
製備化合物**14c**

在0℃下在 N_2 下向化合物**14b** (4.3 g, 12.4 mmol)於THF (15 mL)中

之溶液中添加TBAF (1 M THF溶液, 15 mL, 14.9 mmol)。5小時後, 將反應混合物用H₂O (50 mL)稀釋且用乙醚(2×100 mL)萃取。合併有機層, 經無水MgSO₄乾燥, 過濾且濃縮。粗產物藉由管柱層析法來純化, 產生化合物**14c** (3.0 g, 98%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.63 (br s, 2H), 3.20 (br s, 2H), 2.82 (s, 3H), 1.65-1.23 (m, 17H)。

製備化合物**14d**

在0°C下在N₂下向化合物**14c** (3.0 g, 12.9 mmol)於THF (30 mL)中之溶液中添加四溴化碳(6.4 g, 19.4 mmol)及三苯基膦(5.1 g, 19.4 mmol)。2小時後, 反應混合物經矽膠過濾且用乙醚(100 mL)洗滌。濃縮濾液且藉由管柱層析法來純化, 產生化合物**14d** (3.3 g, 86%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.40 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.19 (br s, 2H), 2.83 (s, 3H), 1.90-1.70 (m, 2H), 1.65-1.40 (m, 13H), 1.38-1.25 (m, 2H)。



製備化合物**14e**

在0°C下將DIPEA (53.0 mL, 302.5 mmol)及EDC•HCl (35.7 g, 186.2 mmol)添加至攪拌之化合物**2d** (35.0 g, 116.4 mmol)及5-甲醯基水楊酸(21.3 g, 128.0 mmol)於DCM (1.6 L)中之混合物。反應混合物在N₂下在室溫下攪拌20小時。將反應混合物用飽和NH₄Cl水溶液(1.5 L)稀釋且用DCM (2×1.5 L)萃取。合併之有機層用鹽水(1.5 L)洗滌且經無水MgSO₄乾燥, 過濾且濃縮。粗產物藉由管柱層析法來純化, 產生化合物**14e** (28.2

g, 59%)。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 13.37 (br s, 1H), 9.86 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 8.07 (br s, 2H), 7.90 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.07 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 4.06-4.01 (m, 2H), 3.79-3.66 (m, 10H), 1.47 (s, 9H)。

製備化合物**14f**

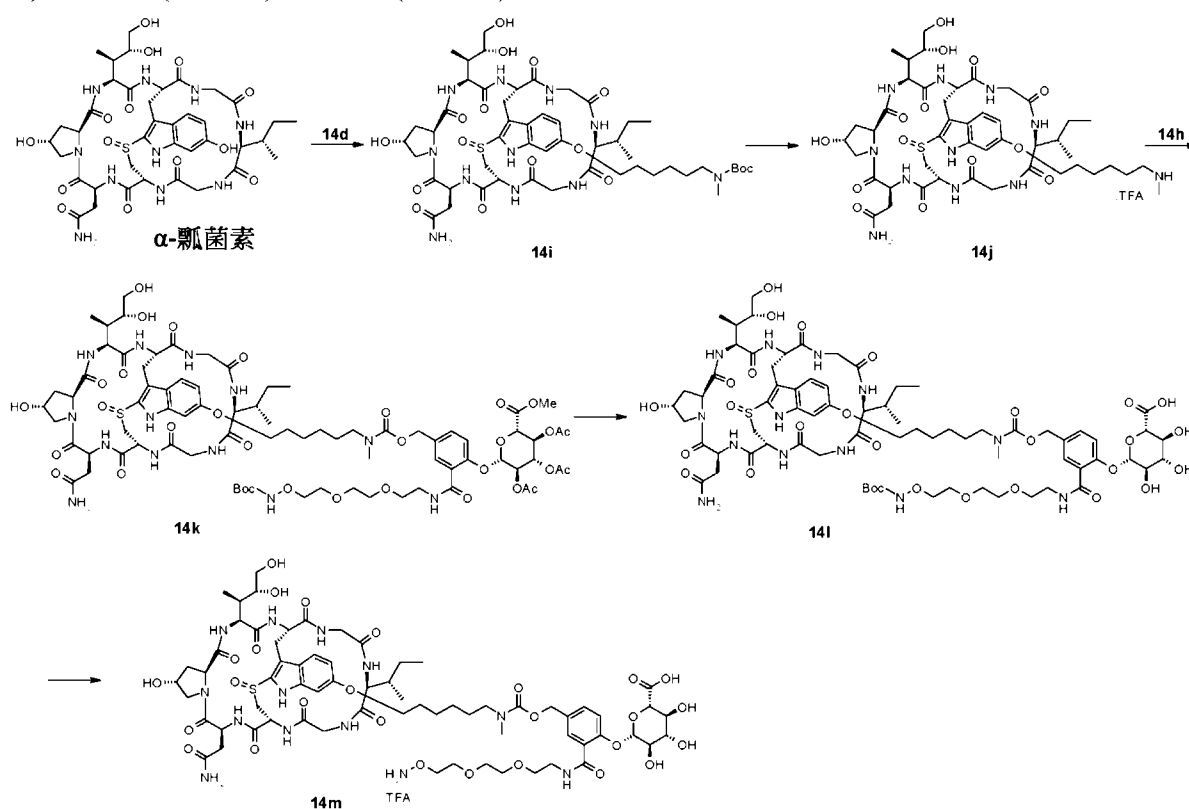
向化合物**14e** (28.0 g, 67.9 mmol)於MeCN (500 mL)中之溶液中添加化合物**M** (29.7 g, 74.7 mmol)、4 Å分子篩(30 g)及 Ag_2O (62.9 g, 272 mmol)。在 N_2 下在室溫下攪拌12小時後，濃縮反應混合物，用 H_2O (800 mL)稀釋且用EtOAc (1 L)萃取。合併之有機層經無水 MgSO_4 乾燥，過濾且濃縮。殘餘物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**14f** (30.1 g, 61%)。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 9.99 (s, 1H), 8.54 (s, 1H), 7.99 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.44 (br s, 1H), 7.18 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 5.45-5.30 (m, 4H), 4.26 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 4.02-3.97 (m, 2H), 3.80-3.55 (m, 13H), 2.06 (s, 9H), 1.46 (s, 9H)。

製備化合物**14g**

在 0°C 下向化合物**14f** (29.0 g, 39.8 mmol)於*i*-PrOH/ CHCl_3 (90 mL/450 mL)中之溶液中添加矽膠(16.7 g)及 NaBH_4 (3.70 g, 99.5 mmol)。在 N_2 下在 0°C 下攪拌2小時後，將反應混合物用 H_2O (500 mL)淬滅且用EtOAc (1 L)萃取。有機層經無水 MgSO_4 乾燥，過濾且濃縮。粗產物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**14g** (24.1 g, 83%)。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.98 (s, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.46 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.41 (br, 1H), 7.04 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 5.41-5.24 (m, 4H), 4.67 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H), 4.19 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 3.99-3.93 (m, 2H), 3.79-3.65 (m, 12H), 3.59-3.50 (m, 1H), 2.08-2.00 (m, 10H), 1.46 (s, 9H)。

製備化合物**14h**

在0℃下在N₂下向化合物**14g** (23.7 g, 31.5 mmol)於DMF (50 mL)中之溶液中添加碳酸雙(4-硝基苯基)酯(8.9 g, 29.3 mmol)及DIPEA (5.65 mL, 31.5 mmol)。將反應混合物在0℃下攪拌30分鐘且使之升溫至室溫，歷時1小時。將反應混合物用H₂O (500 mL)稀釋且用EtOAc (500 mL)萃取。將有機層用鹽水(2×200 mL)洗滌，經無水MgSO₄乾燥，過濾，且濃縮。粗產物藉由管柱層析法來純化，產生呈白色泡沫狀之化合物**14h** (22.4 g, 77%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.28 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 8.13 (s, 1H), 7.68 (br s, 1H), 7.52 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.47 (br, 1H), 7.38 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.08 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 5.44-5.24 (m, 6H), 4.21 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 4.00 (br s, 2H), 3.80-3.64 (m, 12 H), 3.64-3.54 (m, 1H), 2.06 (s, 9H), 1.47 (s, 9H)。

製備化合物**14i**

使 α -瓢菌素(60.0 mg, 0.065 mmol)溶於DMSO (2 mL)中且在0℃下在N₂下添加化合物**14d** (114 mg, 0.39 mmol)及第三丁醇鉀(0.065 mL, 0.065 mmol)。在0℃下4小時後，溶液pH值用乙酸調至4~5。殘餘物溶於DMSO (1 mL)中且藉由HPLC來純化，產生呈白色固體狀之化合物**14i** (29 mg, 39%)。EI-MS m/z: [M-Boc]⁺ 1032.4。

製備化合物**14j**

在0℃下向化合物**14i** (29 mg, 0.026 mmol)於DCM (3 mL)中之溶液中添加TFA (0.5 mL)。在0℃下2小時後，溶劑及過量TFA藉由N₂流移除且所得殘餘物藉由HPLC來純化，產生呈白色固體狀之化合物**14j** (26 mg, 99%)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 1032.3, [M+Na]⁺ 1054.3。

製備化合物**14k**

在0℃下使化合物**14j** (13 mg, 0.011 mmol)、化合物**14h** (10 mg, 0.011 mmol)及無水HOBt (0.3 mg, 0.002 mmol)溶於DMF (0.5 mL)中。接著添加吡啶(0.2 mL)及DIPEA (0.004 mL, 0.023 mmol)。在N₂下在室溫下攪拌24小時後，反應混合物溶於DMSO (1 mL)中且藉由HPLC來純化，產生化合物**14k** (11 mg, 54%)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 1788.1。

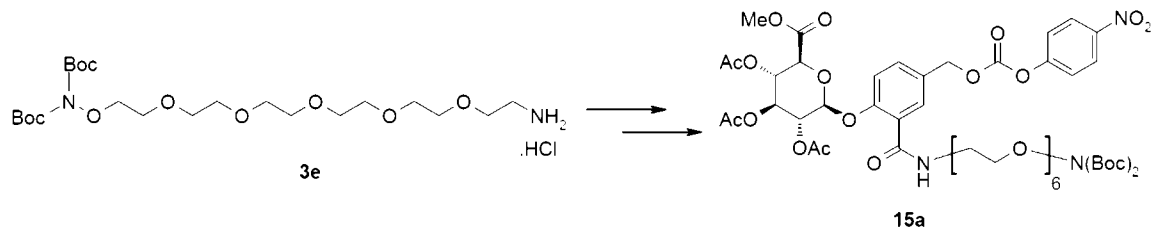
製備化合物**14l**

在-20℃下向化合物**14k** (11 mg, 0.006 mmol)於MeOH (0.2 mL)中之溶液中添加含LiOH單水合物(1.3 mg, 0.03 mmol)之H₂O (0.2 mL)。在0℃下1小時後溶液pH值用乙酸調至4~5。所得溶液溶於DMSO (1 mL)中且藉由HPLC來純化，產生呈白色固體狀之化合物**14l** (7.5 mg, 75%)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 1648.6。

製備化合物**14m**

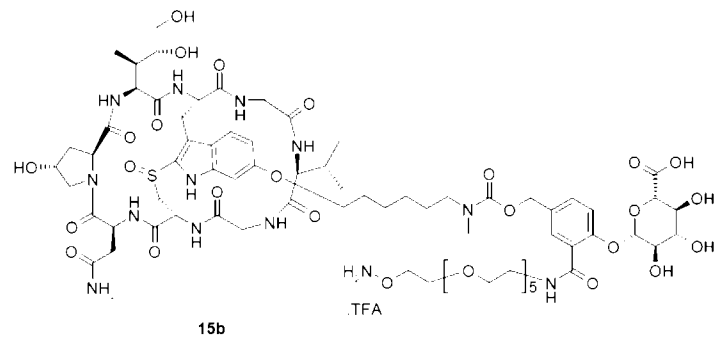
在0℃下向化合物**14l** (7.5 mg, 0.0045 mmol)於DCM (3 mL)中之溶液中添加TFA (0.5 mL)。在0℃下2小時後，溶劑及過量TFA藉由N₂流移除。接著殘餘物藉由HPLC來純化，產生呈白色固體狀之化合物**14m** (6.2 mg, 85%)。EI-MS m/z: [M+H]⁺: 1548.5。

實例24. 製備化合物15b



製備化合物15a

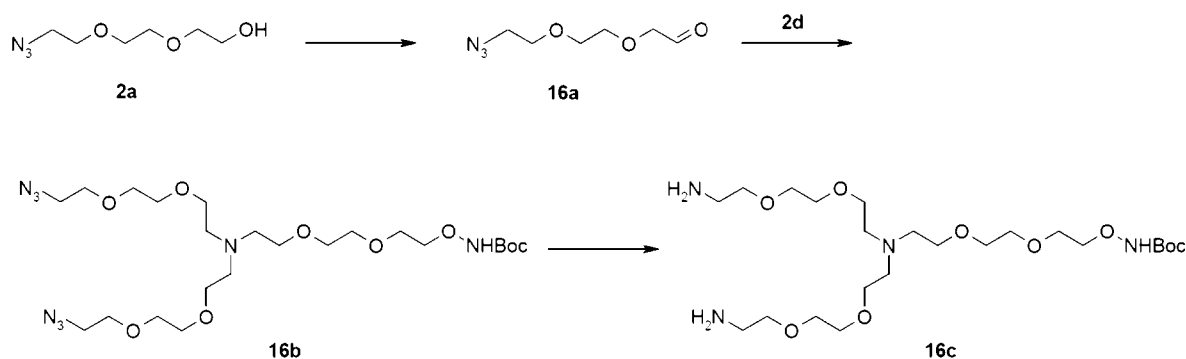
化合物**15a**係藉由與實例23之製備化合物**14h**之方法類似的方法，自化合物**3e**製備。EI-MS m/z: $[M+H]^+$ 1128.3, $[M+H-Boc]^+$ 1028.3, $[M+H-2Boc]^+$ 928.2。



製備化合物15b

化合物**15b**係藉由與製備實例23之化合物**14m**之方法類似的方法，自化合物**14j**及化合物**15a**製備。EI-MS m/z : $[M+H]^+$ 1681.6。

實例25. 製備化合物16f



製備化合物**16a**

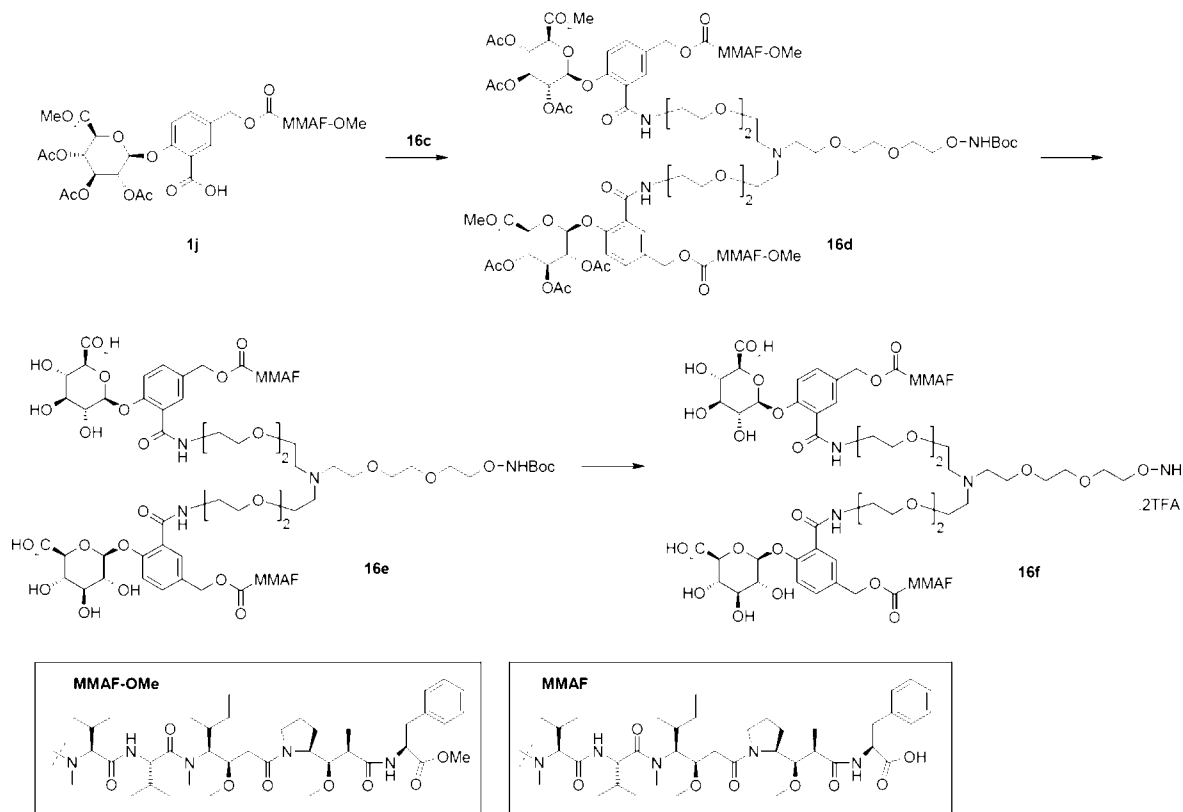
向攪拌的乙二醯氯(2.8 mL, 32.5 mmol)於DCM (5 mL)中之溶液中添加含DMSO (3.08 mL, 43.4 mmol)之DCM (15 mL)且接著反應混合物在-78℃下攪拌30分鐘。在-78℃下向此溶液添加化合物**2a** (3.8 g, 21.7 mmol)且攪拌1小時。添加含三乙胺(15.1 mL, 108 mmol)之DCM (20 mL)且接著使反應混合物升溫至室溫，用H₂O (100 mL)稀釋且用DCM (2×100 mL)萃取。合併有機層，經無水MgSO₄乾燥，過濾且濃縮。殘餘物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**16a** (1.8 g, 48%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.74 (s, 1H), 4.19 (s, 2H), 3.77-3.69 (m, 6H), 3.42 (m, 2H)。

製備化合物**16b**

在0℃下向化合物**16a** (1.0 g, 3.32 mmol)及化合物**2d** (1.72 g, 9.96 mmol)於MeOH (15 mL)中之溶液中添加AcOH (0.19 mL, 3.32 mmol)。在0℃下攪拌30分鐘後，添加NaCNBH₃ (658 mg, 9.96 mmol)且經2小時升溫至室溫。反應結束後，將反應混合物用H₂O (50 mL)稀釋且接著用DCM (3×100 mL)萃取。合併有機層，經無水MgSO₄乾燥，過濾且濃縮。殘餘物藉由管柱層析法來純化，產生呈淡黃色油狀之化合物**16b** (800 mg, 41%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.78 (brs, 1H), 4.01 (m, 2H), 3.69-3.65 (m, 24H), 3.39 (m, 4H), 3.04 (m, 6H), 1.47 (s, 9H)。

製備化合物**16c**

向化合物**16b** (350 mg, 0.60 mmol)於MeOH (10 mL)中之溶液中添加Pd/C (10 wt. %, 300 mg)。在室溫下在氫氣下攪拌8小時後，反應混合物經矽藻土墊過濾且用MeOH (100 mL)洗滌。濃縮得到呈無色油狀之化合物**16c** (300 mg, 94%)，其未經進一步純化即使用。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.02 (m, 2H), 3.71 (m, 2H), 3.65-3.55 (m, 22H), 2.92 (m, 4H), 2.76 (t, *J* = 5.2 Hz, 6H), 1.47 (s, 9H)。EI-MS *m/z*: [M+H]⁺ 527.6。

製備化合物**16d**

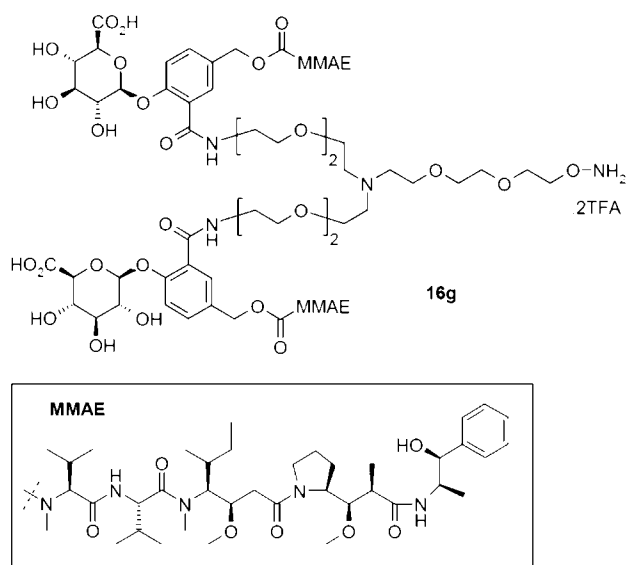
將DIPEA (0.40 mL, 2.24 mmol)及PyBOP (711 mg, 1.34 mmol)添加至攪拌之化合物**1j** (1.57 g, 1.23 mmol)及化合物**16c** (300 mg, 0.56 mmol)於DMF (15 mL)中之混合物。在N₂下在室溫下攪拌4小時後，將反應混合物用H₂O (200 mL)稀釋且用EtOAc (3×100 mL)萃取。合併之有機

層經無水 Na_2SO_4 乾燥，過濾且減壓濃縮。殘餘物溶於 $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ (5 mL/5 mL)中且藉由HPLC來純化，產生化合物**16d** (1.57 g, 91.8%)。EI-MS m/z : $1/2[\text{M}+\text{H}]^+$ 1502.7。

製備化合物**16f**

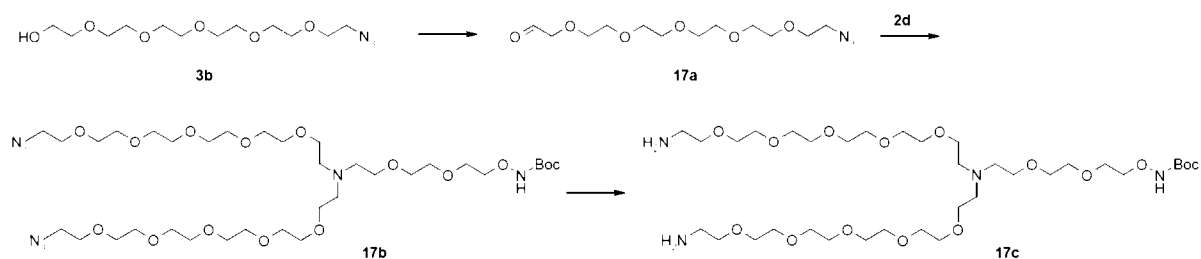
在 0°C 下向化合物**16d** (1.10 g, 0.36 mmol)於 MeOH/THF (5 mL/10 mL)中之溶液中逐滴添加含 NaOH (175 mg, 4.32 mmol)之 H_2O (3 mL)。在 0°C 下3小時後，溶液pH值使用2 N HCl 水溶液調至pH 4且濃縮。在 0°C 下將殘餘物用 DCM (12 mL)及 TFA (3 mL)稀釋。在 0°C 下2小時後，溶劑及過量 TFA 藉由 N_2 流移除。殘餘物溶於 $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ (7.5 mL/7.5 mL)中且藉由HPLC來純化，產生呈白色固體狀之化合物**16f** (432 mg, 46%)。EI-MS m/z : $1/2[\text{M}+\text{H}]^+$ 1298.5。

實例26. 製備化合物**16g**



化合物**16g**係藉由實例25中製備化合物**16f**之類似方法，自化合物**1i**及化合物**16c**製備。EI-MS m/z : $1/2[\text{M}+\text{H}]^+$ 1284.5。

實例27. 製備化合物**17d**



製備化合物**17a**

向攪拌的乙二醯氯(0.62 mL, 7.3 mmol)於DCM (4 mL)中之溶液中添加含DMSO (1.04 mL, 14.6 mmol)之DCM (10 mL)且接著反應混合物在-78℃下攪拌30分鐘。在-78℃下向此溶液添加化合物**3b** (1.5 g, 4.88 mmol)且攪拌1小時。添加含三乙胺(2.72 mL, 19.50 mmol)之DCM (7 mL)且接著使反應混合物升溫至室溫。減壓濃縮後，殘餘物藉由管柱層析法(EtOAc至EtOAc/MeOH 10/1)來純化，產生化合物**17a** (1.23 g, 82%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.73 (s, 1H), 4.16 (s, 2H), 3.75-3.61 (m, 18H), 3.39 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H)。

製備化合物**17b**

在0℃下將NaCNBH₃ (257 mg, 4.09 mmol)添加至攪拌之化合物**17a** (1.30 g, 4.25 mmol)及化合物**2d** (492 mg, 1.63 mmol)於MeOH (5 mL)中之混合物。反應混合物接著經2小時逐漸加熱達室溫。反應結束後，在減壓下濃縮反應混合物。殘餘物藉由管柱層析法(EtOAc至EtOAc/MeOH 10/1)來純化，產生化合物**17b** (620 mg, 45%)。

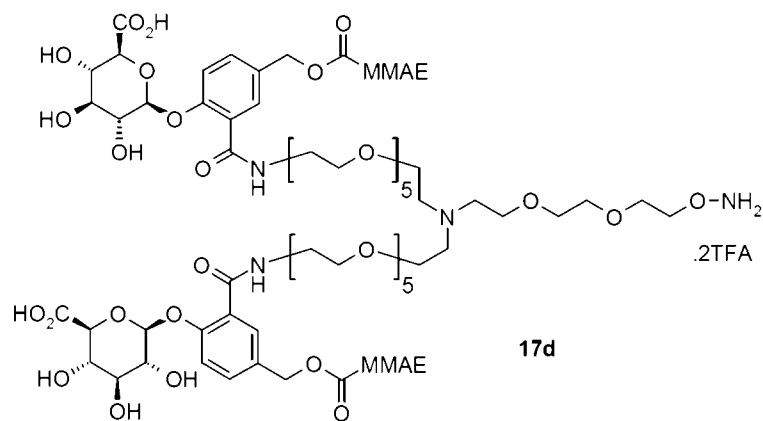
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.96 (br, 1H), 3.79 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H) 3.59 (t, *J* = 4.8 Hz, 4H), 3.56-3.46 (m, 38H), 3.44-3.37 (m, 10H), 2.66-2.56 (m, 6H), 1.39 (s, 9H)。

製備化合物**17c**

向化合物**17b** (300 mg, 0.35 mmol)於MeOH (7 mL)中之溶液中添加

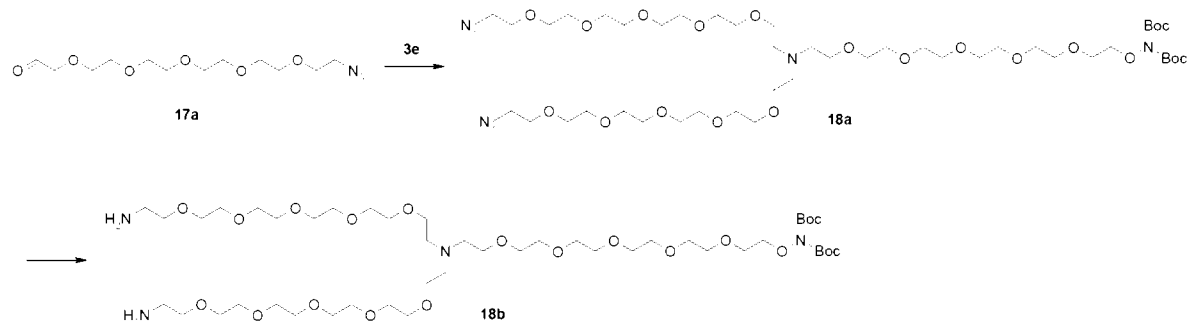
Pd/C (10 wt. %, 38 mg)。在氫氣下在室溫下攪拌4小時後，反應混合物經矽藻土墊過濾且用MeOH (400 mL)洗滌。濃縮得到呈無色油狀之化合物**17c** (253 mg, 90%)，其未經進一步純化即使用。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 3.79 (t, J=4.4Hz, 2H), 3.55-3.45 (m, 38H), 3.42 (t, J = 6.0 Hz, 10H), 2.66-2.56 (m, 10H), 1.39 (s, 9H)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 791.0。

製備化合物**17d**



化合物**17d**係藉由實例25中製備化合物**16f**之類似方法，自化合物**1i**及化合物**17c**製備。EI-MS m/z: 1/2[M+H]⁺ 1415.6。

實例28. 製備化合物**18c**



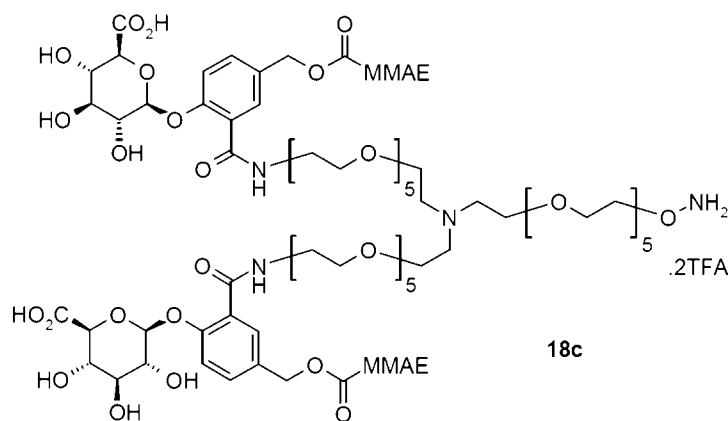
製備化合物**18a**

在0℃下將NaCNBH₃ (197 mg, 3.14 mmol)添加至攪拌之化合物**17a** (998 mg, 3.26 mmol)及化合物**3e** (670 mg, 1.25 mmol)於MeOH (4 mL)中之混合物。反應混合物接著經2小時逐漸加熱達室溫。反應結束後，在

減壓下濃縮反應混合物。殘餘物藉由管柱層析法(EtOAc至EtOAc/MeOH 10/1)來純化，產生化合物**18a** (668 mg, 49%)。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 3.97 (m, 2H) 3.63-3.57 (m, 6H), 3.56-3.44 (m, 46H), 3.44-3.36 (m, 12H), 2.66-2.61 (m, 6H), 1.45 (s, 18H)。

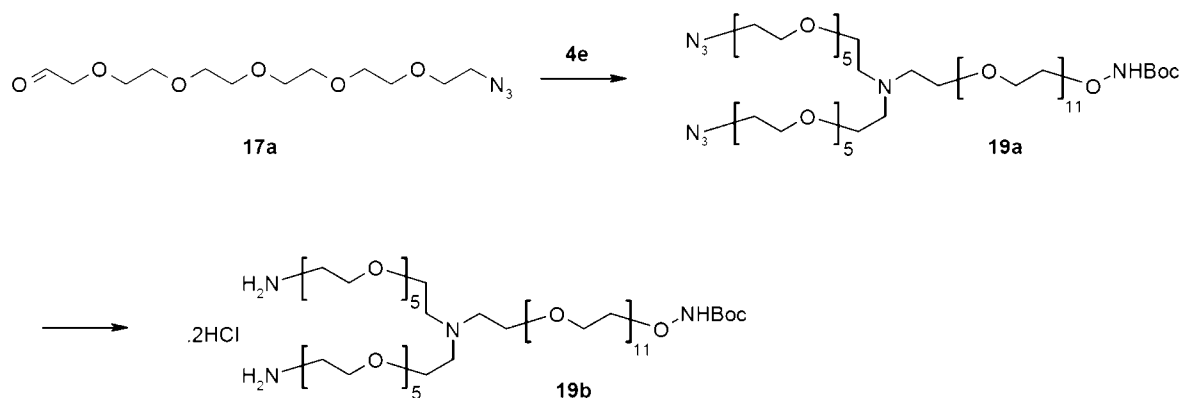
製備化合物**18b**

向化合物**18a** (60 mg, 0.055 mmol)於MeOH (1.2 mL)中之溶液中添加Pd/C (10 wt. %, 6 mg)。在氫氣下在室溫下攪拌4小時後，反應混合物經矽藻土墊過濾且用MeOH (400 mL)洗滌。濃縮得到呈無色油狀之化合物**18b** (55 mg, 96%)，其未經進一步純化即使用。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 3.97 (m, 2H), 3.62-3.57 (m, 4H), 3.54-3.45 (m, 50H), 3.45-3.39 (m, 10H), 2.66-2.61 (m, 10H), 1.46 (s, 18H)。EI-MS m/z: 1/2[M+H]⁺ 1023.3。



化合物**18c**係藉由實例25中製備化合物**16f**之類似方法，自化合物**1i**及化合物**18b**製備。EI-MS m/z: 1/2[M+H]⁺ 1481.7。

實例29. 製備化合物**19c**



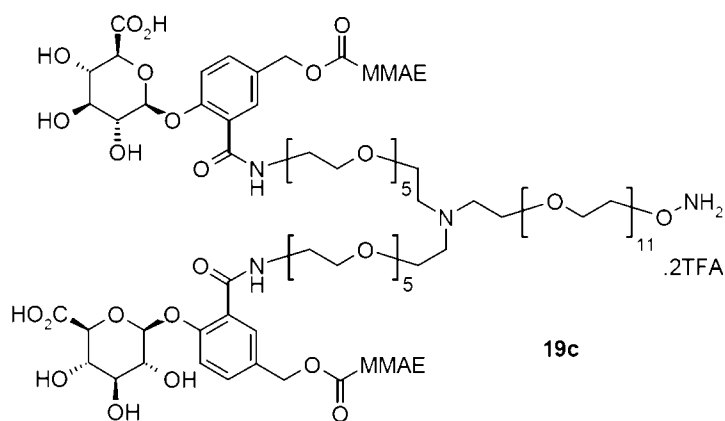
製備化合物19a

在0℃下將NaCNBH₃ (197 mg, 3.14 mmol)添加至攪拌之化合物**17a** (118 mg, 0.16 mmol)及化合物**4e** (232 mg, 0.76 mmol)於MeOH (1 mL)中之混合物。反應混合物接著經2小時逐漸加熱達室溫。反應結束後，反應混合物在減壓下蒸發。殘餘物藉由管柱層析法(EtOAc至EtOAc/MeOH 10/1)來純化，產生化合物**19a** (135 mg, 68%)。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.72 (br s, 1H) 4.02 (t, 2H), 3.72-3.53 (m, 86H), 3.39 (t, 4H), 2.77 (bs, 4H), 1.47 (s, 9H)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 1239.6。

製備化合物19b

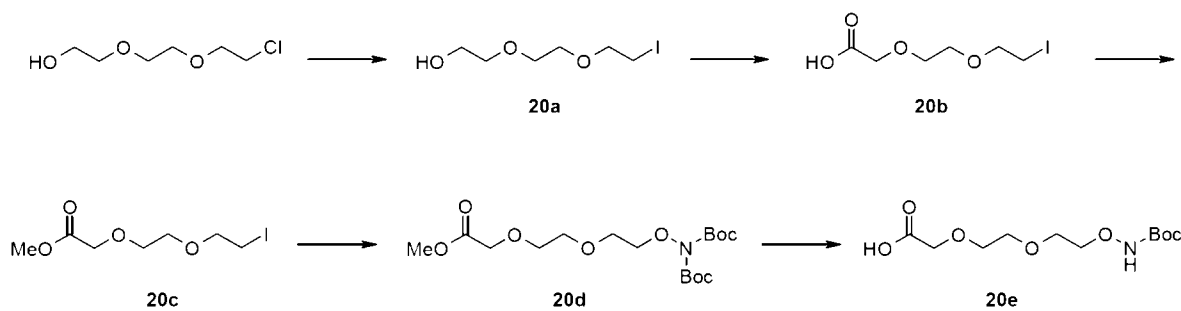
在0°C下向化合物**19a** (133 mg, 0.107 mmol)於MeOH (2 mL)中之溶液中添加Pd/C (10 wt. %, 26 mg)及HCl (4 N 1,4-二噁烷溶液, 0.054 mL, 0.21 mmol)。在氫氣下在室溫下攪拌40分鐘後, 反應混合物經矽藻土墊過濾且用MeOH (40 mL)洗滌。濃縮得到呈無色油狀之化合物**19b** (132 mg, 97%), 其未經進一步純化即使用。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.79 (s, 1H), 4.06-4.02 (m, 8H), 3.88 (m, 2H), 3.73-3.64 (m, 80H), 3.22 (s, 4H), 1.47 (s, 9H)。EI-MS m/z: [M+H]⁺: 1187.5。

製備化合物19c



化合物**19c**係藉由實例25中製備化合物**16f**之類似方法，自化合物**1i**及化合物**19b**製備。EI-MS m/z : $1/2[M+H]^+$ 1614.5。

實例30. 製備化合物20q



製備化合物20a

向2-(2-(2-氯乙氧基)乙氧基)乙醇(5.0 g, 29.6 mmol)於丙酮(30 mL)中之溶液中添加NaI (13.3 g, 88.9 mmol)。使反應混合物回流12小時。反應結束後，反應混合物過濾且濃縮。粗產物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**20a** (7.0 g, 91%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.80-3.73 (m, 4H), 3.72-3.65 (m, 4H), 3.63-3.61 (m, 2H), 3.27 (t, J = 6.4 Hz, 2H)。

製備化合物20b

在0°C下向化合物**20a** (7.0 g, 26.9 mmol)於丙酮(200 mL)中之溶液中添加瓊斯試劑(20 mL)。在0°C下15小時後，反應混合物過濾且濃縮。將殘餘物用H₂O (150 mL)稀釋且用EtOAc (2×100 mL)萃取。合併有機層，經無水MgSO₄乾燥，過濾且濃縮。粗產物藉由管柱層析法來純化，產

生化合物**20b** (7.0 g, 94%)。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 4.22 (s, 2H), 3.85-3.70 (m, 6H), 3.35-3.25 (m, 2H)。

製備化合物**20c**

在 0°C 下在 N_2 下向化合物**20b** (7.0 g, 25.5 mmol) 於 MeOH (70 mL) 中之溶液中添加乙二醯氯 (3.2 mL, 38.3 mmol)。16 小時後，濃縮反應混合物且藉由管柱層析法來純化，產生化合物**20c** (5.7 g, 77%)。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 4.19 (s, 2H), 3.80-3.67 (m, 9H), 3.27 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H)。

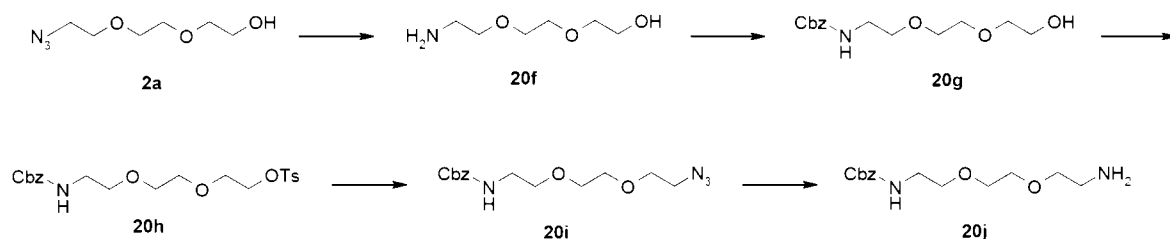
製備化合物**20d**

在 0°C 下在 N_2 下向化合物**20c** (2.5 g, 8.67 mmol) 及 *N,N*-二Boc-經基胺 (2.6 g, 11.2 mmol) 於 DMF (30 mL) 中之溶液中添加 NaH (60% 於油中, 454 mg, 10.4 mmol)。15 小時後，將反應混合物用 H_2O (50 mL) 稀釋且用 EtOAc (3×100 mL) 萃取。合併有機層，經無水 MgSO_4 乾燥，過濾且濃縮。粗產物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**20d** (1.87 g, 73%)。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 4.17 (s, 2H), 4.08 (m, 2H), 3.78-3.65 (m, 9H), 1.53 (s, 18H)。

製備化合物**20e**

在 0°C 下在 N_2 下向化合物**20d** (1.87 g, 6.38 mmol) 於 THF/MeOH/ H_2O (45 mL/15 mL/15 mL) 中之溶液中添加 NaOH (600 mg, 15.9 mmol)。將反應混合物在室溫下攪拌 3 小時。接著溶液 pH 值用 1 N HCl 水溶液調至 4~5。將反應混合物傾倒至 H_2O (100 mL) 且用 EtOAc (2×100 mL) 萃取。合併有機層，經 MgSO_4 乾燥，過濾且濃縮。產生呈無色油狀之化合物**20e** (1.6 g, 90%)，且其未經進一步純化即使用。 $^1\text{H-NMR}$

NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.17 (s, 2H), 4.08-4.02 (m, 2H), 3.80-3.67 (m, 6H), 1.48 (s, 9H)。



製備化合物**20f**

將Pd/C (10 wt. %, 1.0 g)添加至化合物**2a** (6.7 g, 38.2 mmol)於MeOH (38 mL)中之溶液。在室溫下在氫氣下攪拌8小時後，反應混合物經矽藻土墊過濾且用MeOH (100 mL)洗滌。濃縮得到呈無色油狀之化合物**20f** (5.6 g, 99%)，其未經進一步純化即使用。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.95-3.25 (m, 12H), 2.90 (s, 2H)。

製備化合物**20g**

在0℃下在N₂下將氯甲酸苯甲酯(6 mL, 42.2 mmol)緩慢添加至化合物**20f** (5.6 g, 38.2 mmol)及三乙胺(8 mL, 57.6 mmol)於THF (200 mL)中之溶液，歷時30分鐘。在0℃下攪拌1小時後，濃縮反應混合物且粗產物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**20g** (5.7 g, 53%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.45-7.20 (m, 5H), 5.61 (br s, 1H), 5.07 (s, 2H), 3.85-3.20 (m, 12H)。

製備化合物**20h**

在室溫下在N₂下向化合物**20g** (2.7 g, 9.53 mM)於DCM (30 mL)中之溶液中添加三乙胺(1.9 mL, 12.3 mmol)及對甲苯磺醯氯(2.3 g, 10.4 mmol)。8小時後，將反應混合物用H₂O (50 mL)稀釋且用DCM (3×100 mL)萃取。合併有機層，經無水MgSO₄乾燥，過濾且濃縮。粗產物藉由管

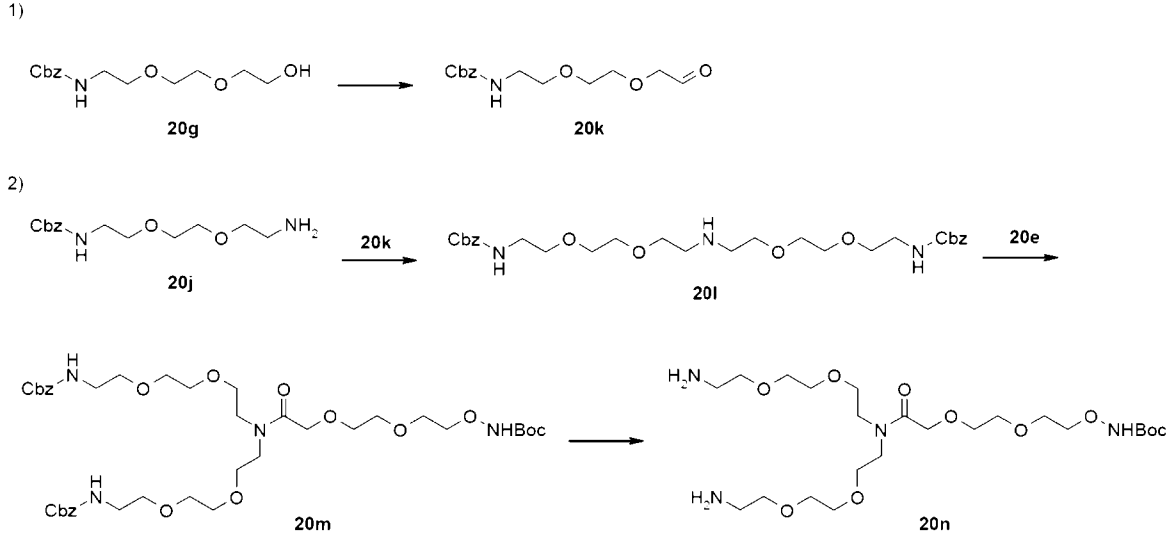
柱層析法來純化，產生化合物**20h** (3.51 g，84%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.78 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.45-7.25 (m, 7H), 5.20 (br s, 1H), 5.09 (s, 2H), 4.20-4.05 (m, 2H), 3.75-3.25 (m, 10H), 2.43 (s, 3H)。

製備化合物**20i**

將化合物**20h** (3.51 g，8.02 mmol)及NaN₃ (3.8 g，57.6 mmol)於DMF (27 mL)中之溶液在100℃下加熱15小時。反應結束後，反應混合物過濾且濃縮。將殘餘物用H₂O (50 mL)稀釋且用EtOAc (2×100 mL)萃取。合併有機層，經無水MgSO₄乾燥，過濾且濃縮。粗產物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**20i** (2.05 g，83%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.45-7.25 (m, 5H), 5.20 (br s, 1H), 5.10 (s, 2H), 3.80-3.25 (m, 12H)。

製備化合物**20j**

在室溫下將三苯基膦(2.09 g，7.97 mmol)添加至化合物**20i** (2.05 g，6.64 mmol)於THF (27 mL)中之溶液。在N₂下攪拌2小時後，添加H₂O (0.6 mL，33.2 mmol)且使反應混合物回流3小時。接著濃縮反應混合物且藉由管柱層析法來純化，產生化合物**20j** (1.78 g，95%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.45-7.25 (m, 5H), 5.63 (br s, 1H), 5.10 (s, 2H), 3.80-3.25 (m, 10H), 2.88 (s, 2H)。



製備化合物**20k**

向攪拌的乙二醯氯(1.4 mL, 15.9 mmol)於DCM (14 mL)中之溶液中添加含DMSO (2.3 mL, 31.9 mmol)之DCM (28 mL)且接著反應混合物在-78℃下攪拌30分鐘。在-78℃下向此溶液添加化合物**20g** (3.01 g, 10.6 mmol)。在-78℃下在0℃下攪拌1小時後，添加三乙胺(7.4 mL, 53.1 mmol)且使反應升溫至室溫。將反應混合物傾倒至H₂O (100 mL)且用EtOAc (2×100 mL)萃取。合併有機層，經MgSO₄乾燥。過濾且濃縮產生化合物**20k** (2.6 g)，其未經進一步純化即使用。¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ 9.70 (s, 1H), 7.45-7.25 (m, 5 H), 5.25 (br s, 1 H), 5.10 (s, 2 H), 3.80-3.25 (m, 10 H)。

製備化合物**20l**

在室溫下在N₂下向化合物**20j** (1.78 g, 6.30 mmol)及化合物**20k** (2.13 g, 7.56 mmol)於MeOH (63 mL)中之溶液中添加NaCNBH₃ (674 mg, 10.7 mmol)。3小時後，反應混合物過濾且濃縮。粗產物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**20l** (2.01 g, 58%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.45-7.25 (m, 10H), 5.60 (br s, 2H), 5.03 (s, 4H), 3.80-3.25 (m, 20H), 2.81 (s, 4H)。

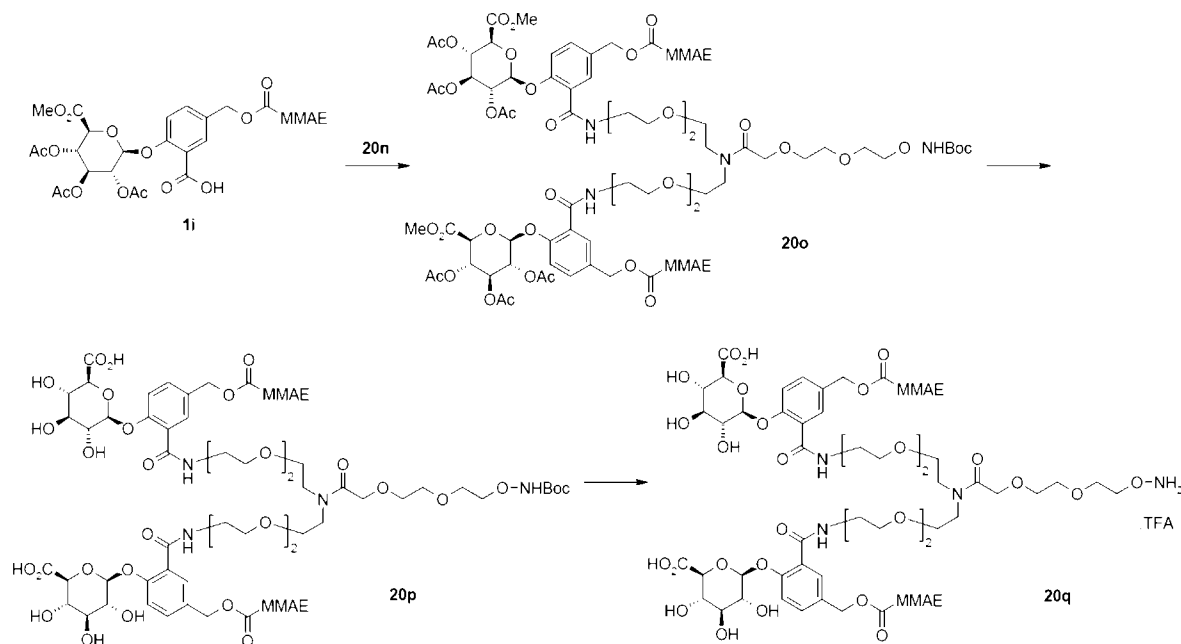
製備化合物**20m**

將DIPEA (0.4 mL, 2.28 mmol)及PyBOP (713 mg, 1.36 mmol)添加至攪拌之化合物**20l** (500 mg, 0.91 mmol)及化合物**20e** (306 mg, 1.09 mmol)於DMF (10 mL)中之溶液。在N₂下在室溫下攪拌6小時後，反應混合物用水(100 mL)稀釋且用EtOAc (3×100 mL)萃取。合併之有機層經無水Na₂SO₄乾燥，過濾且減壓濃縮。粗產物藉由管柱層析法來純化，產生

化合物**20m** (318 mg, 43%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.45-7.25 (m, 10H), 5.47 (br s, 1H), 5.37 (br s, 1H), 5.09 (s, 4H), 3.80-3.25 (m, 34H), 1.46 (s, 9H)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 808.9。

製備化合物**20n**

向化合物**20m** (318 mg, 0.39 mmol)於MeOH (30 mL)中之溶液中添加Pd/C (10 wt. %, 1.0 g)。在氫氣下在室溫下攪拌3小時後，反應混合物經矽藻土墊過濾且用MeOH (100 mL)洗滌。濃縮得到呈無色油狀之化合物**20n** (180 mg)，其未經進一步純化即使用。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 541.2。



製備化合物**20o**

在0℃下將DIPEA (0.034 mL, 0.19 mmol)及PyBOP (63 mg, 0.12 mmol)添加至攪拌之化合物**1i** (130 mg, 0.10 mmol)及化合物**20n** (26 mg, 0.04 mmol)於DMF (3 mL)中之溶液。在0℃下攪拌30分鐘後，在N₂下使反應經20小時升溫至室溫。將反應混合物傾倒至H₂O (50 mL)且用EtOAc (3×50 mL)萃取。將有機層合併，過濾且減壓濃縮。殘餘物溶於

DMSO (1 mL)中且藉由HPLC來純化，產生呈白色固體狀之化合物**20o** (28 mg, 10%)。EI-MS m/z : $1/2[M+H]^+$ 1481.5, $1/2[M+Na]^+$ 1503.8。

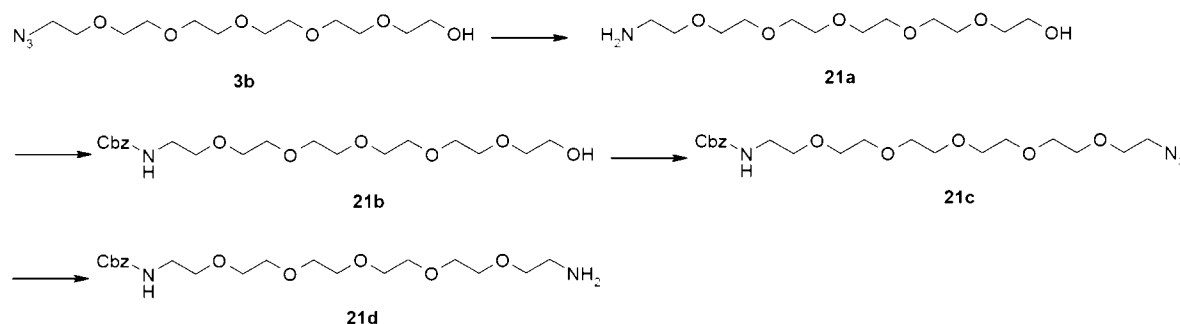
製備化合物**20p**

在 -5°C 下向化合物**20o** (28 mg, 0.009 mmol)於MeOH (1 mL)中之溶液中添加含LiOH單水合物(2 mg, 0.047 mmol)之 H_2O (1 mL)。反應混合物在 -5°C 下攪拌，歷時1小時。反應結束後，溶液pH值用乙酸調至4~5。殘餘物溶於DMSO (1 mL)中且藉由HPLC來純化，產生呈白色固體狀之化合物**20p** (16 mg, 67%)。EI-MS m/z : $1/2[M+H]^+$: 1341.4。

製備化合物**20q**

在 0°C 下向化合物**20p** (16 mg, 0.0059 mmol)於DCM (2 mL)中之溶液中添加TFA (0.2 mL)。在 0°C 下2小時後，溶劑及過量TFA藉由 N_2 流移除。殘餘物溶於DMSO (1 mL)中且藉由HPLC來純化，產生呈白色固體狀之化合物**20q** (8.5 mg, 56%)。EI-MS m/z : $1/2[M+H]^+$: 1291.3。

實例31. 製備化合物21i



製備化合物**21a**

向化合物**3b** (9.0 g, 29.2 mmol)於MeOH (146 mL)中之溶液中添加Pd/C (10 wt. %, 3.0 g)且反應混合物在氫氣下在室溫下攪拌5小時。接著反應混合物經矽藻土墊過濾且用MeOH (100 mL)洗滌。濃縮得到呈無色油狀之化合物**21a** (8.2 g, 100%)，其未經進一步純化即使用。 $^1\text{H-NMR}$

(400MHz, CDCl_3) δ 3.80-3.60 (m, 24H), 3.01 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H)。

製備化合物**21b**

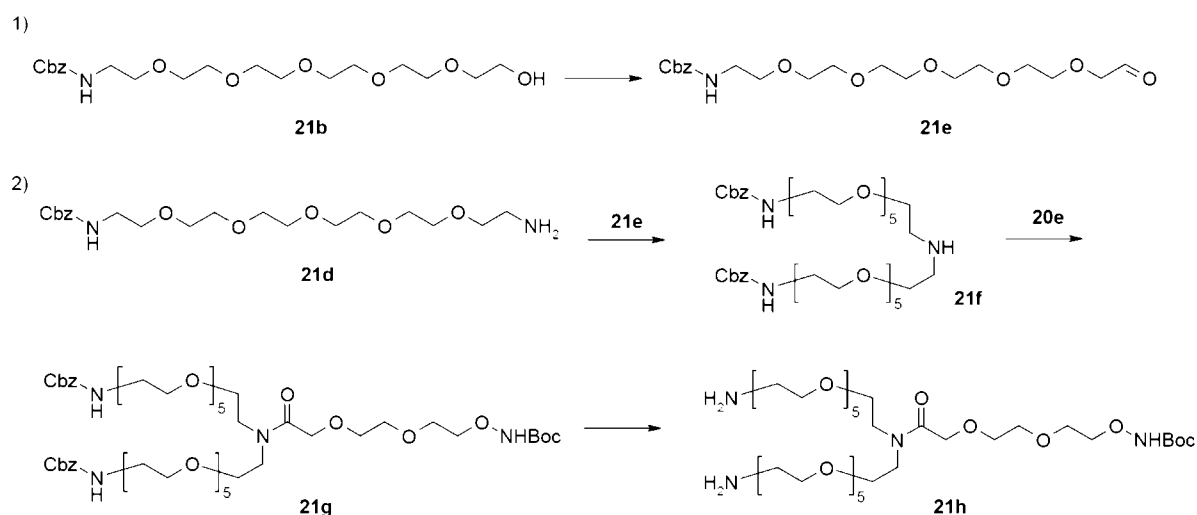
在 0°C 下在 N_2 下向化合物**21a** (8.24 g, 29.2 mmol)於THF (190 mL)中之溶液中添加三乙胺(6.1 mL, 43.9 mmol)及氯甲酸苯甲酯(4.6 mL 32.2 mmol)。濃縮反應混合物且粗產物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**21b** (5.59 g, 46%)。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.45-7.20 (m, 5H), 5.61 (br s, 1H), 5.09 (s, 2H), 3.85-3.50 (m, 22H), 3.39 (m, 2H)。

製備化合物**21c**

在 0°C 下在 N_2 下向化合物**21b** (3.09 g, 7.43 mmol)於THF (75 mL)中之溶液中添加4-甲基嗎啉(1.1 mL, 9.66 mmol)及甲烷磺酸酐(1.43 g, 8.18 mmol)。在 0°C 下5小時後，添加 NaN_3 (969 mg, 14.9 mmol)及DMF (20 mL)。在回流下16小時後，反應混合物過濾且濃縮。將殘餘物用 H_2O (50 mL)稀釋且用EtOAc (2 $\times$ 100 mL)萃取。合併有機層，經無水 MgSO_4 乾燥，過濾且濃縮。粗產物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**21c** (2.62 g, 80%)。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.45-7.20 (m, 5 H), 5.45 (br s, 1 H), 5.09 (s, 2 H), 3.85-3.25 (m, 24 H)。

製備化合物**21d**

在室溫下將三苯基膦(1.87 g, 7.13 mmol)添加至化合物**21c** (2.62 g, 5.94 mmol)於THF (30 mL)中之溶液。在 N_2 下攪拌2小時後，添加 H_2O (0.54 mL, 29.7 mmol)且使反應混合物回流3小時。濃縮反應混合物且藉由管柱層析法來純化，產生化合物**21d** (2.47 g, 95%)。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.45-7.25 (m, 5 H), 5.63 (br s, 1 H), 5.09 (s, 2 H), 3.80-3.25 (m, 22 H), 3.00-2.80 (m, 2 H)。



製備化合物**21e**

向攪拌的乙二醯氯(0.78 mL, 9.02 mmol)於DCM (14 mL)中之溶液中添加含DMSO (1.3 mL, 18.1 mmol)之DCM (6 mL)且接著反應混合物在-78°C下攪拌30分鐘。在-78°C下向此溶液添加化合物**21b** (2.5 g, 6.01 mmol)。在-78°C下攪拌1小時後，添加三乙胺(4.2 mL, 30.1 mmol)且使反應升溫至室溫。將反應混合物傾倒至H₂O (100 mL)且用EtOAc (2×100 mL)萃取。合併有機層，經MgSO₄乾燥。過濾且濃縮產生化合物**21e** (2.29 g)，其未經進一步純化即使用。¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ 9.70 (s, 1H), 7.45-7.25 (m, 5H), 5.25 (br s, 1H), 5.10 (s, 2H), 3.80-3.25 (m, 24H)。

製備化合物**21f**

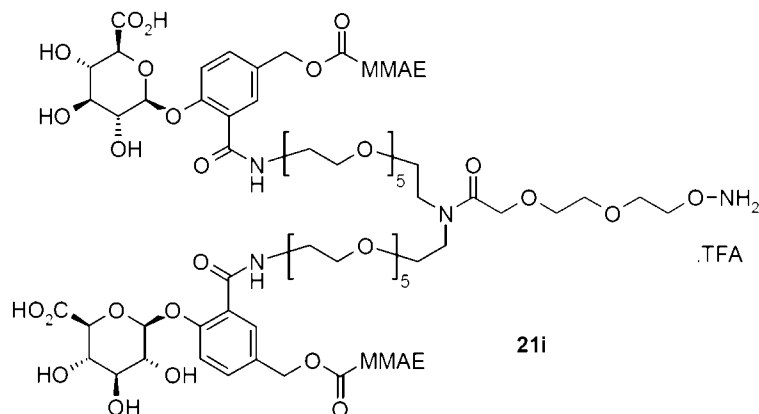
在室溫下在N₂下向化合物**21d** (2.47 g, 5.95 mmol)及化合物**21e** (2.29 g, 5.52 mmol)於MeOH (50 mL)中之溶液中添加NaCNBH₃ (530 mg, 8.44 mmol)。3小時後，反應混合物過濾且濃縮。粗產物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**21f** (2.05 g, 51%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.45-7.25 (m, 10H), 5.47 (br s, 1H), 5.37 (br s, 1H), 5.09 (s, 4H), 3.80-3.25 (m, 48H)。

製備化合物**21g**

將DIPEA (0.27 mL, 1.53 mmol)及HBTU (350 mg, 0.92 mmol)添加至攪拌之化合物**21f** (380 mg, 0.61 mmol)及化合物**20e** (206 mg, 0.73 mmol)於DMF (6 mL)中之溶液。在N₂下在室溫下攪拌6小時後，反應混合物用水(100 mL)稀釋且用EtOAc (3×100 mL)萃取。合併之有機層經無水Na₂SO₄乾燥，過濾且減壓濃縮。粗產物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**21g** (210 mg, 42%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.45-7.25 (m, 10 H), 5.47 (br s, 1 H), 5.37 (br s, 1 H), 5.09 (s, 4 H), 3.80-3.25 (m, 34 H), 1.46 (s, 9 H)。

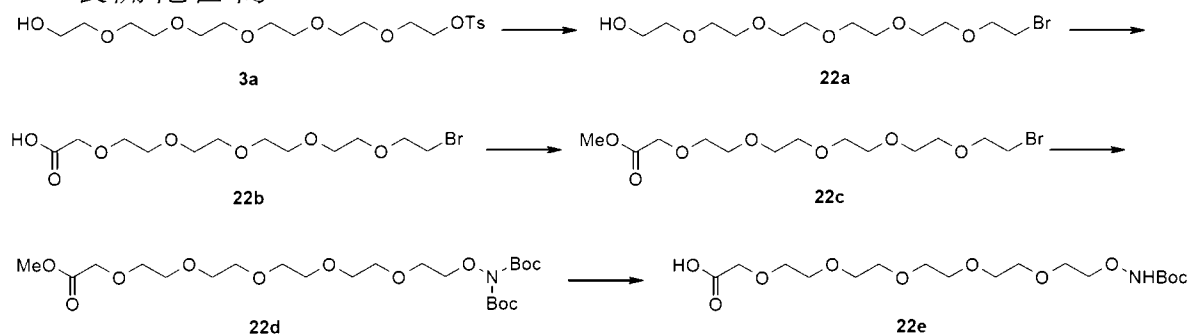
製備化合物**21h**

向化合物**21g** (210 mg, 0.19 mmol)於MeOH (30 mL)中之溶液中添加Pd/C (10 wt. %, 1.0 g)且接著反應混合物在氫氣下在室溫下攪拌4小時。反應混合物經矽藻土墊過濾且用MeOH (50 mL)洗滌。濃縮得到呈無色油狀之化合物**21h** (30 mg)，其未經進一步純化即使用。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 805.2, [M+Na]⁺ 827.2。

製備化合物**21i**

化合物**21i**係藉由實例30中製備化合物**20q**之類似方法，自化合物**1i**及化合物**21h**製備。EI-MS m/z: 1/2[M+H]⁺ 1423.7, 1/2[M+Na]⁺

1445.2。

實例32. 製備化合物22h**製備化合物22a**

在室溫下向化合物**3a** (8.0 g, 18.3 mmol)於THF (50 mL)中之溶液中添加LiBr (7.9 g, 91.6 mmol)。在回流下攪拌17小時後，反應混合物過濾且濃縮。粗產物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**22a** (3.2 g, 50%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.95-3.50 (m, 24H)。

製備化合物22b

在0°C下向化合物**22a** (3.2 g, 12.3 mmol)於丙酮(20 mL)中之溶液中添加瓊斯試劑(20 mL)。在0°C下15小時後，反應混合物過濾且濃縮。將殘餘物用H₂O (50 mL)稀釋且用EtOAc (2×100 mL)萃取。合併有機層，經無水MgSO₄乾燥，過濾且濃縮。粗產物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**22b** (3.2 g, 72%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.16 (s, 2H), 3.95-3.30 (m, 20H)。

製備化合物22c

在0°C下在N₂下向化合物**22b** (3.2 g, 8.90 mmol)於MeOH (30 mL)中之溶液中添加乙二醯氯(1.15 mL, 13.3 mmol)。16小時後，濃縮反應混合物且藉由管柱層析法來純化，產生化合物**22c** (2.7 g, 81%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.17 (s, 2H), 3.80-3.60 (m, 21H), 3.47 (t, *J* = 6.4

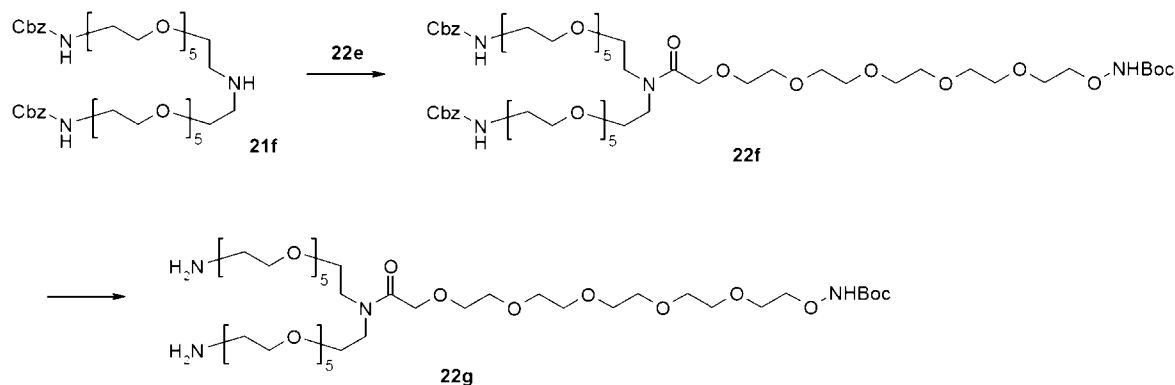
Hz, 2H)。

製備化合物**22d**

在0°C下在N₂下將NaH (60%於油中，378 mg，8.63 mmol)添加至化合物**22c** (2.7 g，7.23 mmol)及*N,N*-二Boc-羥基胺(2.2 g，9.4 mmol)於DMF (30 mL)中之溶液。17小時後，濃縮反應混合物。將殘餘物用H₂O (50 mL)稀釋且用EtOAc (3×100 mL)萃取。合併有機層，經無水MgSO₄乾燥，過濾且濃縮。粗產物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**22d** (2.1 g，55%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.17 (s, 2H), 4.08 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.78-3.60 (m, 21H), 1.53 (s, 18H)。

製備化合物**22e**

在0°C下在N₂下向化合物**22d** (2.1 g，3.99 mmol)於THF/MeOH/H₂O (30 mL/10 mL/10 mL)中之溶液中添加NaOH (400 mg，9.98 mmol)。反應混合物在室溫下攪拌3小時。接著溶液pH值用1 N HCl水溶液調至4~5。將反應混合物傾倒至H₂O (50 mL)且用EtOAc (2×100 mL)萃取。合併有機層，經MgSO₄乾燥。過濾且濃縮產生呈無色油狀之化合物**22e** (1.6 g)，其未經進一步純化即使用。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.90 (s, 1H), 4.15 (s, 2H), 4.03 (br s, 2H), 3.80-3.60 (m, 18H), 1.47 (s, 9H)。



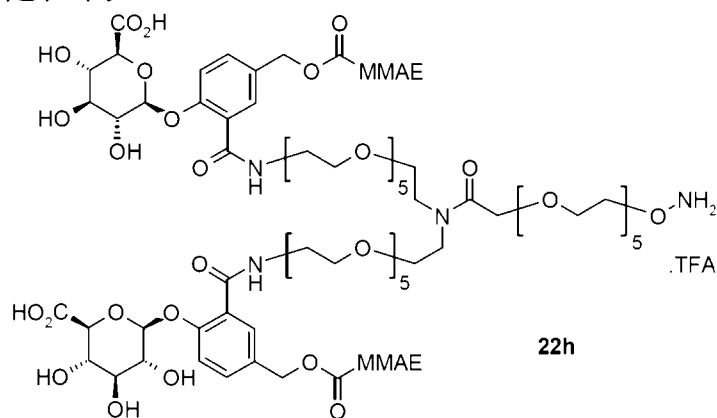
製備化合物**22f**

將DIPEA (0.13 mL, 0.73 mmol)及HBTU (187 mg, 0.49 mmol)添加至攪拌之化合物**21f** (200 mg, 0.24 mmol)及化合物**22e** (152 mg, 0.36 mmol)於DMF (5 mL)中之溶液。反應混合物在N₂下在室溫下攪拌6小時。反應混合物用H₂O (100 mL)稀釋且用EtOAc (3×100 mL)萃取。合併之有機層經無水Na₂SO₄乾燥，過濾且減壓濃縮。粗產物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**22f** (100 mg, 34%)。EI-MS m/z: 1/2[M+H]⁺ 1205.6。

製備化合物**22g**

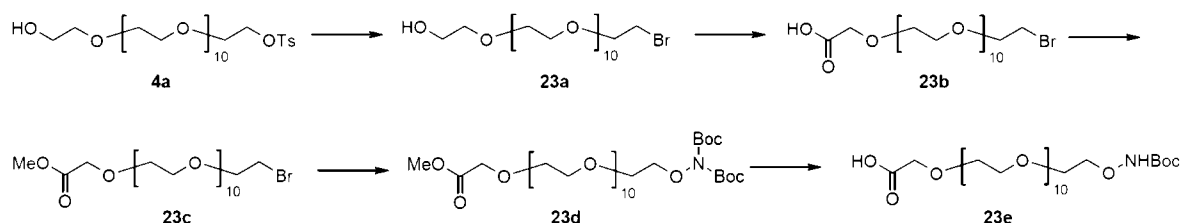
向化合物**22f** (100 mg, 0.08 mmol)於MeOH (20 mL)中之溶液中添加Pd/C (10 wt. %, 20 mg)且接著反應混合物在氫氣下在室溫下攪拌4小時。反應混合物經矽藻土墊過濾且用MeOH (20 mL)洗滌。濃縮得到呈無色油狀之化合物**22g** (70 mg)，其未經進一步純化即使用。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 937.4, [M+Na]⁺ 959.3。

製備化合物**22h**



化合物**22h**係藉由實例30中製備化合物**20q**之類似方法，自化合物**1i**及化合物**22g**製備。EI-MS m/z: 1/2[M+H]⁺ 1489.4。

實例33. 製備化合物**23h**



製備化合物**23a**

向化合物**4a** (483 mg, 0.69 mmol)於THF (10 mL)中之溶液中添加LiBr (180 mg, 2.06 mmol)。使反應混合物在N₂下回流12小時。接著在減壓下濃縮反應混合物。殘餘物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**23a** (330 mg, 78%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.81 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.72-3.59 (m, 44H), 3.47 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H)。

製備化合物**23b**

在0℃下向化合物**23a** (330 mg, 0.54 mmol)於丙酮(2 mL)中之溶液中添加瓊斯試劑(2 mL)。在0℃下15小時後，反應混合物過濾且濃縮。將殘餘物用H₂O (15 mL)稀釋且用EtOAc (2×20 mL)萃取。合併有機層，經無水MgSO₄乾燥，過濾且濃縮。所得粗化合物**23b**未經進一步純化即使用。

製備化合物**23c**

在0℃下在N₂下向粗化合物**23b** (266 mg, 0.43 mmol)於MeOH (5 mL)中之溶液中添加乙二鹽氯(0.054 mL, 0.64 mmol)。16小時後，濃縮反應混合物且藉由管柱層析法來純化，產生化合物**23c** (200 mg, 2步58%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.17 (s, 2H), 3.81 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.79-3.64 (m, 43H), 3.48 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H)。

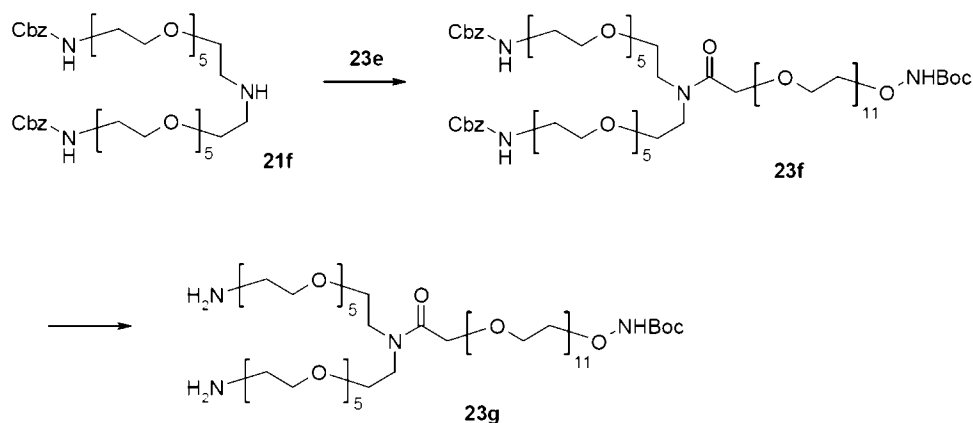
製備化合物**23d**

在0℃下在N₂下向化合物**23c** (200 mg, 0.31 mmol)於DMF (3 mL)中之溶液中添加*N,N*-二Boc-羥基胺(95 mg, 0.40 mmol)及NaH (60%於油

中，16 mg，0.37 mmol)。17小時後，濃縮反應混合物。將殘餘物用H₂O (5 mL)稀釋且用EtOAc (3×10 mL)萃取。合併有機層，經無水MgSO₄乾燥，過濾且濃縮。粗產物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**23d** (120 mg，49%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.17 (s, 2H), 4.13 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 3.75-3.64 (m, 45H), 1.53 (s, 18H)。

製備化合物**23e**

在 0 °C 下在 N₂ 下向化合物 **23d** (120 mg，0.15 mmol) 於 THF/MeOH/H₂O (3 mL/1 mL/1 mL)中之溶液中添加NaOH (15 mg，0.38 mmol)。反應混合物在室溫下攪拌1小時。接著溶液pH值用1 N HCl水溶液調至4~5。將反應混合物傾倒至H₂O (10 mL)且用CHCl₃ (2×20 mL)萃取。合併有機層，經無水Na₂SO₄乾燥。過濾且濃縮產生化合物**23e** (100 mg)，其未經進一步純化即使用。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.23 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.15 (s, 2H), 4.08 (t, *J* = 4.0 Hz, 1H), 4.01 (t, *J* = 4.0 Hz, 1H), 3.74-3.64 (m, 40H), 1.53 (s, 9H)。



製備化合物**23f**

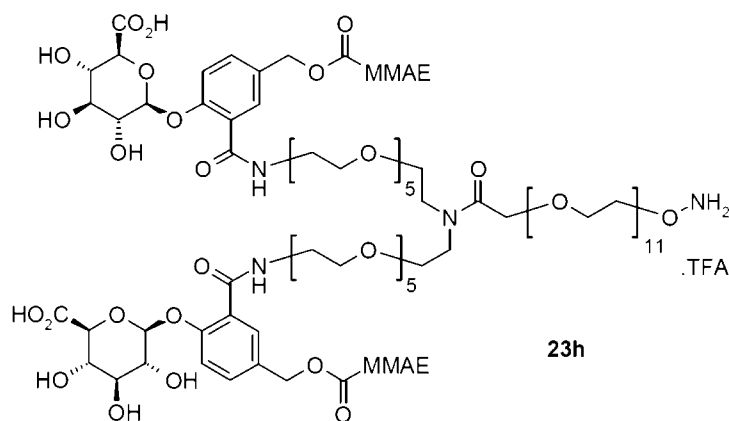
將DIPEA (0.052 mL，0.29 mmol)及HBTU (75 mg，0.20 mmol)添加至攪拌之化合物**21f** (80 mg，0.09 mmol)及化合物**23e** (100 mg，0.15 mmol)於DMF (3 mL)中之溶液。在N₂下在室溫下攪拌6小時後，將反應混

合物用H₂O (50 mL)稀釋且用EtOAc (3×50 mL)萃取。合併之有機層經無水Na₂SO₄乾燥，過濾且減壓濃縮。粗產物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**23f** (140 mg, 97%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.38-7.31 (m, 10 H), 5.44 (br, 2 H), 5.09 (s, 4 H), 4.34 (s, 2 H), 4.26-4.17 (m, 4 H), 4.09-4.08 (m, 1 H), 4.07 (br, 1 H), 3.73-3.47 (m, 76 H), 3.39-3.38 (m, 4 H), 1.53 (s, 9 H)。EI-MS m/z: [M+Na]⁺ 1491.6, [M+H-Boc]⁺ : 1369.6。

製備化合物**23g**

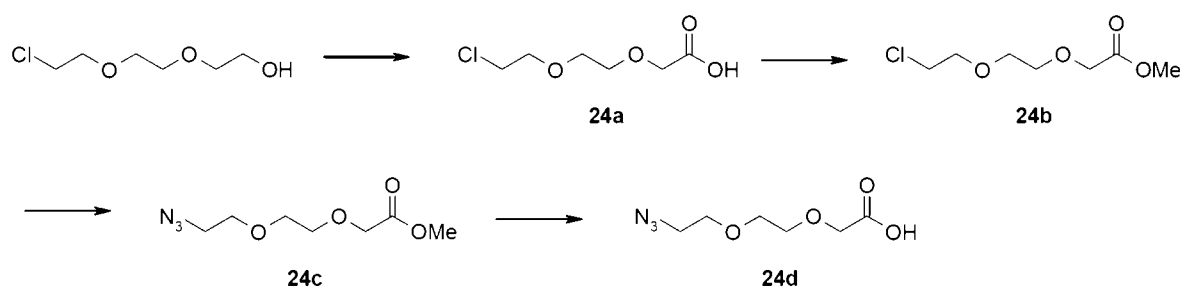
向化合物**23f** (140 mg, 0.09 mmol)於MeOH (20 mL)中之溶液中添加Pd/C (10 wt. %, 20 mg)且接著反應混合物在氫氣下在室溫下攪拌4小時。反應混合物經矽藻土墊過濾且用MeOH (20 mL)洗滌。濃縮得到呈無色油狀之化合物**23g** (120 mg)，其未經進一步純化即使用。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 1201.7, [M+Na]⁺ 1223.7。

製備化合物**23h**



化合物**23h**係藉由實例30中製備化合物**20q**之類似方法，自化合物**1i**及化合物**23g**製備。EI-MS m/z: 1/2[M+H]⁺ 1620.3, 1/2[M+Na]⁺ 1632.1。

實例34. 製備化合物**24l**



製備化合物**24a**

在0℃下將瓊斯試劑(90 mL)緩慢添加至化合物2-[2-(2-氯乙氧基)乙氧基]乙醇(15.0 g, 88.9 mmol)於丙酮(600 mL)中之溶液。在0℃下15小時後，反應混合物過濾且濃縮。將殘餘物用H₂O (200 mL)稀釋且用CHCl₃ (5×300 mL)萃取。合併有機層，經無水MgSO₄乾燥。濃縮得到化合物**24a** (20.0 g)，其未經進一步純化即使用。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.18 (s, 2H), 3.81-3.64 (m, 8H)。

製備化合物**24b**

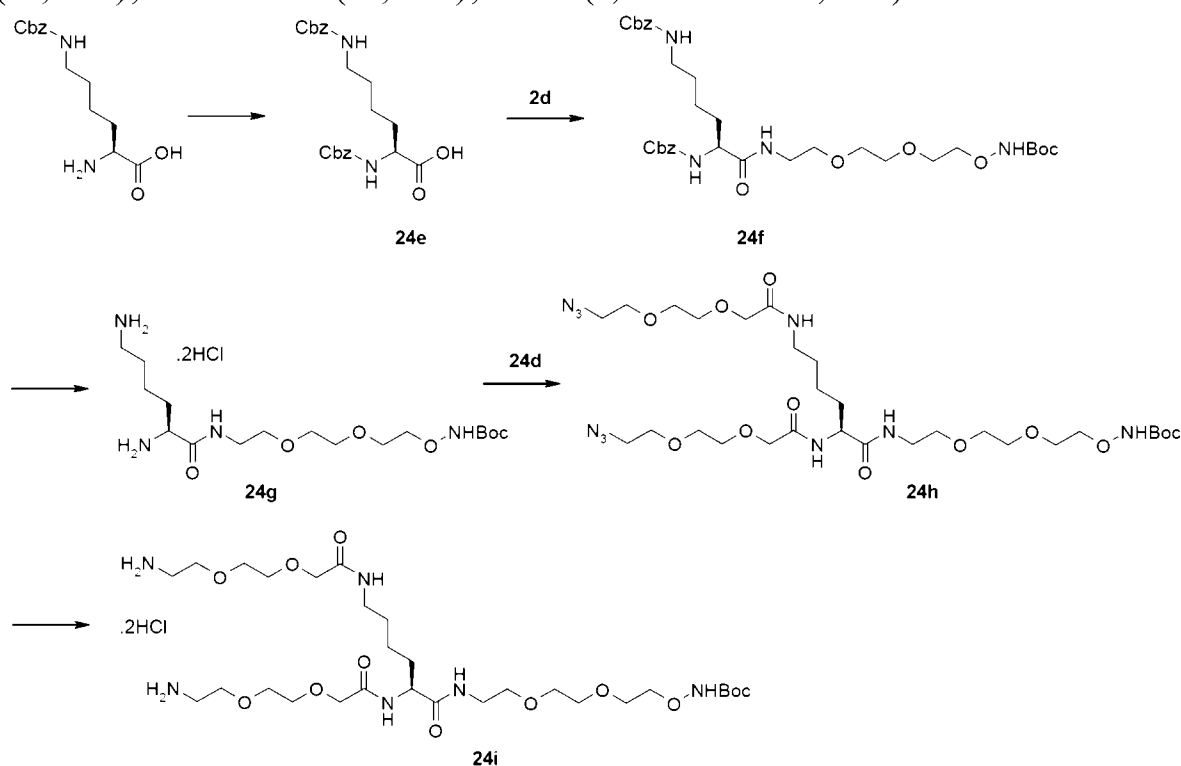
在N₂下在0℃下向化合物**24a** (20.0 g, 88.9 mmol)於MeOH (500 mL)中之溶液中添加乙二醯氯(11.5 mL, 133.4 mmol)，歷時30分鐘。16小時後，濃縮反應混合物且藉由管柱層析法來純化，產生化合物**24b** (13.0 g, 75%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.18 (s, 2H), 3.78-3.67 (m, 9H), 3.65 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H)。

製備化合物**24c**

使化合物**24b** (13.0 g, 66.1 mmol)及NaN₃ (6.4 g, 99.2 mmol)溶於DMF (130 mL)中。在100℃下攪拌2小時後，將反應混合物用鹽水(200 mL)稀釋且用CHCl₃ (2×100 mL)萃取。合併有機層，經無水MgSO₄乾燥。濃縮得到化合物**24c** (11.7 g, 87%)，其未經進一步純化即使用。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.18 (s, 2H), 3.76-3.67 (m, 9H), 3.41 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H)。

製備化合物**24d**

在0℃下向化合物**24c** (11.5 g, 56.6 mmol)於THF/MeOH/H₂O (300 mL/100 mL/100 mL)中之溶液中添加NaOH (4.53 g, 113.2 mmol)。在0℃下在N₂下2小時後，溶液pH值用4 M HCl水溶液調至2。將反應混合物傾倒至H₂O (100 mL)且用CHCl₃ (3×500 mL)萃取。合併有機層，經MgSO₄乾燥。過濾且濃縮產生呈無色油狀之化合物**24d** (10.7 g, 99%)，其未經進一步純化即使用。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.19 (s, 2H), 3.79-3.77 (m, 2H), 3.72-3.70 (m, 4H), 3.44 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H)。

製備化合物**24e**

將三頸燒瓶連續負載H₂O (40 mL)、1,4-二噁烷(70 mL)及H-Lys(Z)-OH (10 g, 35.7 mmol)。攪拌混合物直至完全溶解。pH藉由添加2 M Na₂CO₃水溶液調至約10.5。藉由同時添加2 M Na₂CO₃水溶液維持pH在約10-11下的同時添加氯甲酸苯甲酯(6.69 g, 39.2 mmol)。添加結束後，將反應混合物在20℃下攪拌1小時。接著添加EtOAc (50 mL)且所得混合物

之pH值用c-HCl調至2~3。分離有機層且將水層用EtOAc (50 mL)萃取。合併之有機層用鹽水(50 mL)洗滌，且經Na₂SO₄乾燥。過濾且減壓濃縮，得到呈微黃色油狀之化合物**24e**(14.7 g，99%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.33-7.27 (m, 10H), 5.07-5.04 (d, 4H), 4.08 (m, 1H), 3.09 (t, 2H), 1.51 (br s, 1H), 1.49 (bs, 1H), 1.47-1.40 (m, 4H)。

製備化合物**24f**

將DIPEA (0.40 mL，2.37 mmol)、HOBt (143 mg，1.06 mmol)及EDC·HCl (240 mg，1.25 mmol)添加至攪拌之化合物**24e** (400 mg，0.96 mmol)及化合物**2d** (261 mg，0.86 mmol)於DMF (3 mL)中之混合物。在N₂下在室溫下攪拌14小時後，將反應混合物傾倒至H₂O (50 mL)，用EtOAc (3×50 mL)萃取，用NaHCO₃水溶液(50 mL)及鹽水(50 mL)洗滌且經無水Na₂SO₄乾燥。過濾及減壓濃縮後，所得殘餘物藉由管柱層析法來純化，得到化合物**24f** (380 mg，59%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.16 (s, 1H), 7.34-7.28 (m, 10H), 7.49 (s, 1H) 5.08-5.07 (m, 5H), 4.17 (m, 1H), 3.99 (t, 2H), 3.68-3.16 (m, 10H), 3.17 (d, 2H), 1.66 (m, 1H), 1.51-1.27 (m, 14H)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 661.0。

製備化合物**24g**

在0℃下向攪拌之化合物**24f** (370 mg，0.55 mmol)及Pd/C (10 wt. %，74 mg)於MeOH (10 mL)中之混合物添加HCl (4 N 1,4-二噁烷溶液，0.27 mL，1.1 mmol)。在氫氣下在室溫下攪拌2小時後，反應混合物經矽藻土墊過濾且用MeOH (40 mL)洗滌。濃縮濾液，產生呈無色油狀之化合物**24g** (223 mg，87%)，其未經進一步純化即使用。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10.02 (s, 1H), 8.62 (s, 1H), 8.22 (br, 2H), 7.90 (br, 2H),

3.81 (t, 2H), 3.56 (m, 4H), 3.46 (t, 2H), 3.39-3.27 (m, 26H), 2.75(m, 2H), 1.73 (q, 2H), 1.55 (p, 2H), 1.40-1.33 (m, 14H)。

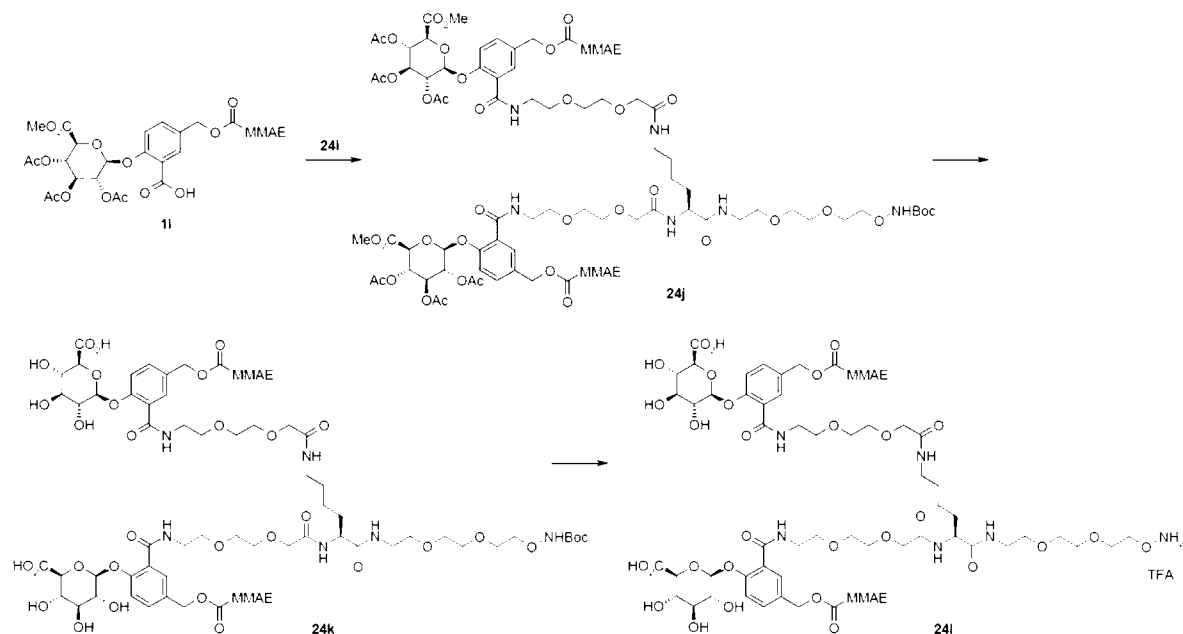
製備化合物**24h**

將DIPEA (1.6 mL, 9.45 mmol)、HOBt (746 mg, 5.52 mmol)及EDC·HCl (1.19 g, 6.42 mmol)添加至攪拌之化合物**24g** (1.0 g, 5.29 mmol)及化合物**24d** (1.1 g, 2.35 mmol)於DMF (15 mL)中之混合物。在N₂下在室溫下攪拌14小時後，將反應混合物傾倒至H₂O (20 mL)中，用DCM (3×50 mL)萃取且經無水Na₂SO₄乾燥。過濾及減壓濃縮後，所得殘餘物藉由管柱層析法來純化，得到化合物**24h** (1.25 g, 70%)。 ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.36 (s, 1H), 7.30 (d, 1H), 7.08 (s, 1H), 7.68 (t, 1H), 4.46 (q, 1H), 4.07-3.98-4.01 (m, 4H), 3.98 (s, 2H), 3.75-3.663 (m, H) 3.57(t, 2H), 3.44 (m, 6H), 3.28 (m, 2H), 1.87(m, 1H), 1.66 (m, 1H), 1.59-1.52 (p,2H), 1.48 (s, 9H), 1.41-1.33 (m, 2H)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 735.0。

製備化合物**24i**

在0℃下向攪拌之化合物**24h** (1.2 g, 0.163 mmol)及Pd/C (10 wt. %, 250 mg)於MeOH (30 mL)中之混合物添加4 N HCl (1,4-二噁烷, 0.81 mL, 3.26 mmol)。在氫氣下在室溫下攪拌1.5小時後，反應混合物經矽藻土墊過濾且用MeOH (100 mL)洗滌。濃縮濾液，產生呈無色油狀之化合物**24i** (1.39 g, 99%)，其未經進一步純化即使用。 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.99 (s, 1H), 8.22 (t 1H) 7.74 (t, 1H), 7.61 (d, 1H), 4.31, (q, 1H), 3.93 (s, 2H), 3.86 (s, 2H), 3.79(t, 2H), 3.60-3.50 (m, 18H), 3.06 (q, 2H), 2.97 (p, 4H), 1.60-1.49 (m, 2H), 1.39 (m, 11H), 1.20 (m, 2H)。

EI-MS m/z : $[M+H]^+$ 683。



製備化合物**24j**

將DIPEA (0.021 mL, 0.125 mmol)及HBTU (29 mg, 0.078 mmol)添加至攪拌之化合物**1i** (85 mg, 0.069 mmol)及化合物**24i** (23 mg, 0.031 mmol)於DMF (0.7 mL)中之混合物。在 N_2 下在室溫下攪拌14小時後，反應混合物溶於 H_2O /DMSO (1.5 mL/1.5 mL)中且藉由HPLC來純化。將具有相同滯留時間之純溶離份合併且濃縮，產生化合物**24j** (67 mg, 68%)。

EI-MS m/z : $1/2[M+H]^+$ 1552.5。

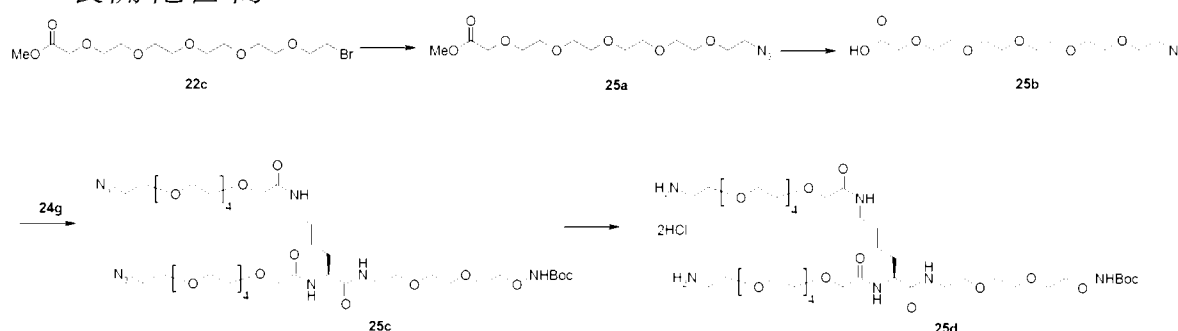
製備化合物**24k**

在 $0^\circ C$ 下向化合物**24j** (67 mg, 0.021 mmol)於MeOH (1.7 mL)中之溶液中添加含LiOH單水合物(16 mg, 0.388 mmol)之 H_2O (1.7 mL)。在 $0^\circ C$ 下攪拌2小時後，反應混合物使用乙酸 (0.018 mL)中和且減壓濃縮。反應混合物溶於 H_2O /DMSO (1.5 mL/1.5 mL)中且藉由HPLC來純化。將具有相同滯留時間之純溶離份合併且濃縮，產生化合物**24k** (37 mg, 62%)。

EI-MS m/z : $1/2[M+H]^+$ 1412.3。

製備化合物**24l**

將TFA (0.4 mL)添加至攪拌之化合物**24k** (37 mg, 0.013 mmol)於DCM (2.0 mL)中之溶液。在0℃下攪拌2小時後，溶劑及過量TFA用N₂吹走。殘餘物溶於H₂O/乙腈(1 mL/1 mL)中且藉由HPLC來純化。將具有相同滯留時間之純溶離份合併且凍乾，產生呈白色固體狀之化合物**24l** (19.8 mg, 53%)。EI-MS *m/z*: 1/2[M+H]⁺ 1362.3。

實例35. 製備化合物**25e**製備化合物**25a**

使化合物**22c** (1.0 g, 2.67 mmol)及NaN₃ (261 mg, 4.01 mmol)溶於DMF (3 mL)中。反應混合物在100℃下加熱5小時。反應結束後，反應混合物過濾且濃縮。殘餘物藉由管柱層析法(EtOAc至EtOAc/MeOH 10/1)來純化，產生化合物**25a** (854 mg, 95%)。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.17 (s, 2H), 3.76-3.64 (m, 21H), 3.39 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H)。

製備化合物**25b**

在0℃下向攪拌的化合物**25a** (854 mg, 2.54 mmol)於MeOH (25 mL)中之溶液中添加2 M NaOH水溶液(6.3 mL, 12.64 mmol)。反應混合物在室溫下攪拌3小時。溶液接著減壓濃縮。在冷卻在0℃下的同時將所得懸浮液用2 N HCl水溶液酸化。殘餘物藉由CHCl₃ (8×500 mL)萃取。合併有機

層，經 Na_2SO_4 乾燥且濃縮，產生化合物**25b** (783 mg, 96%)。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 4.16 (s, 2H), 3.76-3.65 (m, 18H), 3.40 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H)。

製備化合物**25c**

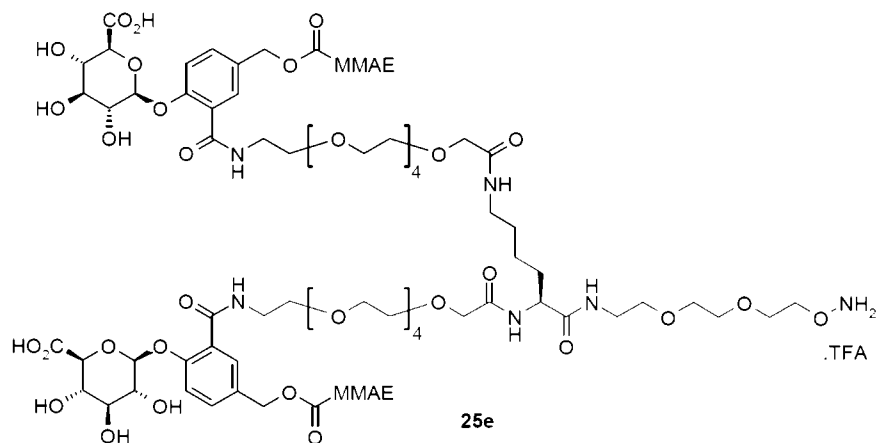
將DIPEA (0.30 mL, 1.70 mmol)及HBTU (483 mg, 1.27 mmol)添加至攪拌之化合物**25b** (337 mg, 1.05 mmol)及化合物**24g** (198 mg, 0.42 mmol)於DMF (3 mL)中之混合物。在 N_2 下在室溫下攪拌14小時後，濃縮反應混合物且藉由管柱層析法(EtOAc至EtOAc/MeOH 10/1)來純化，產生化合物**25c** (358 mg, 84%)。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.98 (s, 1H), 8.09 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H), 7.63 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H), 7.55 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 4.31-4.25 (m, 1H), 3.90 (s, 2H), 3.84 (s, 2H), 3.80 (m, 2H), 3.62-3.46 (m, 34H), 3.42-3.36 (m, 6H), 3.25-3.17 (m, 2H), 3.08-3.03 (m, 2H), 1.61-1.51 (m, 2H), 1.39 (s, 9H), 1.26-1.10 (m, 7H)。EI-MS m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 999.1。

製備化合物**25d**

向化合物**25c** (358 mg, 0.35 mmol)於MeOH (7 mL)中之溶液中添加Pd/C (10 wt. %, 38 mg)及HCl (4 N 1,4-二噁烷溶液, 0.18 mL, 0.72 mmol)。在氫氣下在室溫下攪拌5小時後，反應混合物經矽藻土墊過濾且用MeOH (400 mL)洗滌。濃縮濾液，產生呈無色油狀之化合物**25d** (314 mg, 93%)，其未經進一步純化即使用。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.98 (s, 1H), 8.10 (m, 1H), 7.68 (m, 1H), 7.57 (m, 1H), 4.31-4.25 (m, 1H), 3.90 (s, 2H), 3.84 (s, 2H), 3.80 (m, 2H), 3.62-3.46 (m, 30H), 3.42-3.36 (m, 10H), 3.45-3.16 (m, 4H), 3.08-3.03 (m, 3H), 2.72-2.66 (m, 3H),

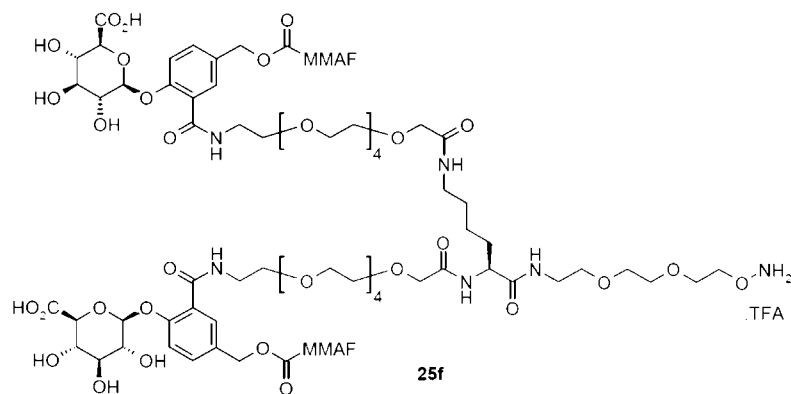
1.61-1.51 (m, 2H), 1.39 (s, 9H), 1.26-1.10 (m, 6H) 。 EI-MS m/z : $[M+H]^+$ 947.1 。

製備化合物**25e**



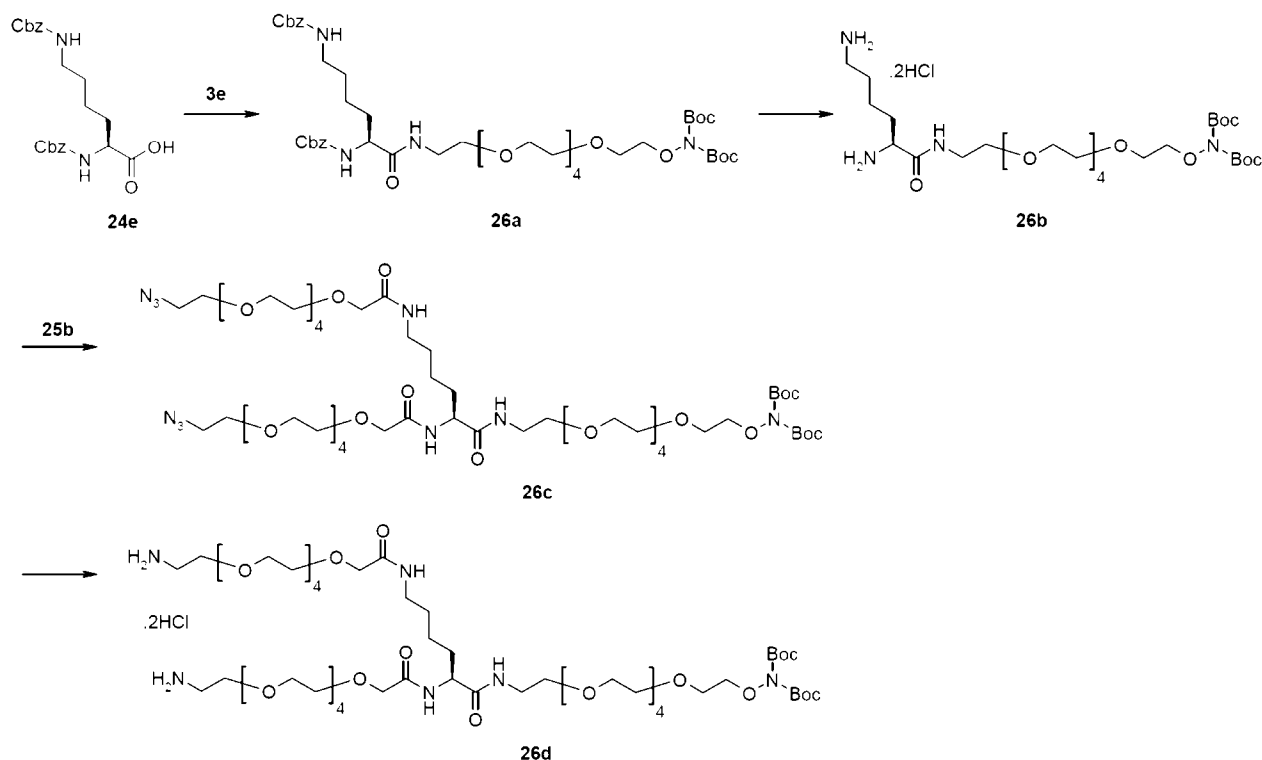
化合物**25e**係藉由實例34中製備化合物**24l**之類似方法，自化合物**1i**及化合物**25d**製備。EI-MS m/z : $1/2[M+H]^+$ 1493.7 。

實例36. 製備化合物**25f**



化合物**25f**係藉由實例34中製備化合物**24l**之類似方法，自化合物**1j**及化合物**25d**製備。EI-MS m/z : $1/2[M+H]^+$ 1508.2 。

實例37. 製備化合物**26e**



製備化合物**26a**

將DIPEA (0.65 mL, 0.004 mmol)、HOBt (218 mg, 1.61 mmol)及EDC·HCl (364 mg, 1.9 mmol)添加至攪拌之化合物**24e** (1.0 g, 2.43 mmol)及化合物**3e** (810 mg, 1.52 mmol)於DMF (10 mL)中之混合物。在N₂下在室溫下攪拌14小時後，將反應混合物傾倒至H₂O (50 mL)中且用EtOAc (3×50 mL)萃取。合併之有機層用1 N HCl水溶液(30 mL)、飽和NaHCO₃水溶液(30 mL)及鹽水(30 mL)洗滌，且經無水Na₂SO₄乾燥。過濾且濃縮後，殘餘物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**26a** (988 mg, 73%)。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.33-7.26 (m, 8 H), 6.85 (s, 1H), 5.63 (s, 1H), 5.08-5.02 (s, 4 H), 4.16-4.11 (m, 1 H), 4.09-4.05 (m, 2 H), 3.72-3.70 (m, 2 H), 3.62-3.59 (m, 14H), 3.53 (s, 2H), 3.44-3.43 (m, 2H), 3.18-3.16 (m, 2H), 1.82 (m, 1H), 1.72 (s, 7H), 1.66 (m, 1H), 1.52 (s, 18H), 1.38-1.36 (m, 2H), 1.24-1.27 (s, 1H)。EI-MS m/z: [M+H-2Boc]⁺

693.1。

製備化合物**26b**

在0℃下向攪拌之化合物**26a** (988 mg, 1.1 mmol)及Pd/C (10 wt. %, 196 mg)於MeOH (6 mL)中之混合物添加HCl (4 N 1,4-二噁烷溶液, 0.55 mL, 2.2 mmol)。在氫氣下在室溫下攪拌1.5小時後，反應混合物經矽藻土墊過濾且用MeOH (40 mL)洗滌。濃縮濾液，產生呈黃色泡沫狀之化合物**26b** (767 mg, 99%)，其未經進一步純化即使用。EI-MS m/z : $[M+H]^+$ 625.0, $[M+H-Boc]^+$ 525.0, $[M+H-2Boc]^+$ 424.9。

製備化合物**26c**

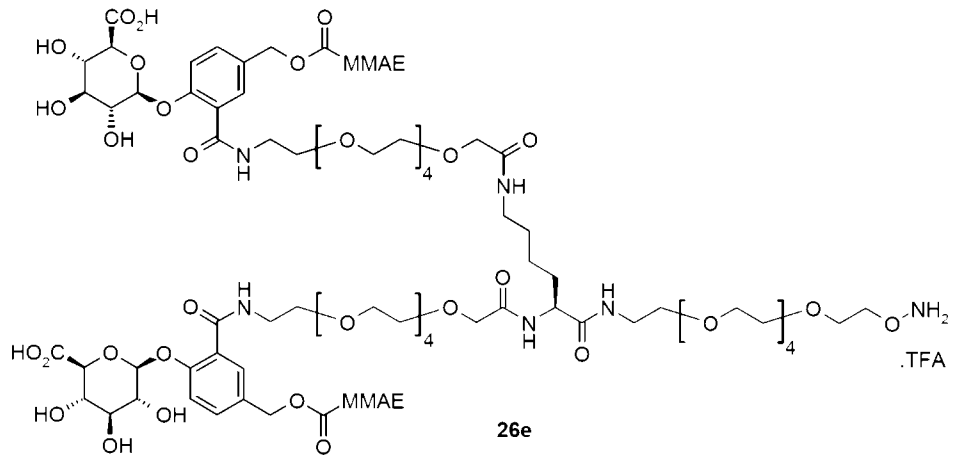
將DIPEA (0.2 mL, 1.14 mmol)、HOBt (89 mg, 0.66 mmol)及EDC·HCl (142 mg, 0.74 mmol)添加至攪拌之化合物**26b** (200 mg, 0.29 mmol)及化合物**25b** (202 mg, 0.63 mmol)於DMF (5 mL)中之混合物。在N₂下在室溫下攪拌14小時後，將反應混合物傾倒至H₂O (10 mL)中且用DCM (3×10 mL)萃取。合併之有機層經無水Na₂SO₄乾燥。過濾且濃縮後，殘餘物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**26c** (270 mg, 77%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.07 (t, 1H), 7.62 (t, 1H), 7.54-7.52 (m, 1H), 5.73 (s, 2H), 4.27-4.25 (q, 1H), 3.96 (t, 2H), 3.88 (s, 2H), 3.82 (s, 2H), 3.58-3.48 (m, 52H), 3.19-3.18 (m, 3H), 3.04-3.03 (m, 3H), 1.44 (s, 18H), 1.39-1.37 (m, 3H), 1.21-1.19 (m, 3H)。EI-MS m/z : $[M+H-2Boc]^+$ 1031.6。

製備化合物**26d**

在0℃下向攪拌之化合物**26c** (160 mg, 0.13 mmol)及Pd/C (10 wt. %, 28 mg)於MeOH (20 mL)中之混合物添加HCl (4 N 1,4-二噁烷溶液，

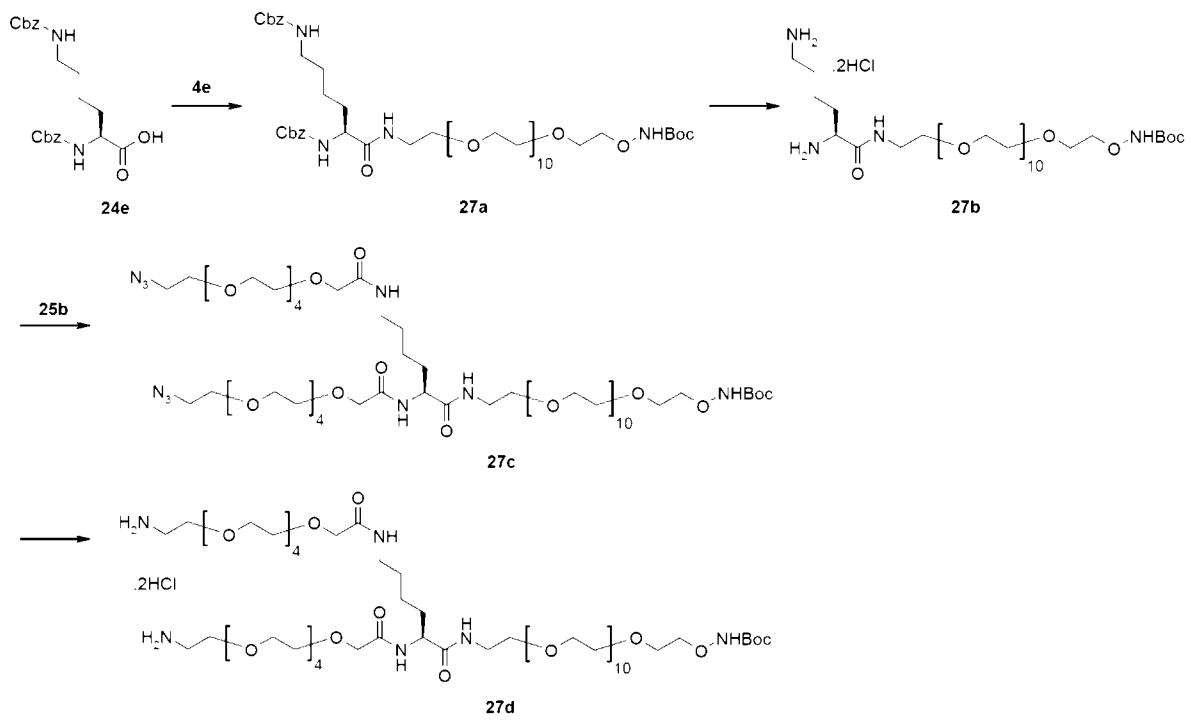
0.07 mL, 0.28 mmol)。在氫氣下在室溫下攪拌30分鐘後，反應混合物經矽藻土墊過濾且用MeOH (30 mL)洗滌。濃縮濾液，產生呈無色油狀之化合物**26d** (140 mg, 91%)，其未經進一步純化即使用。EI-MS m/z : $[M+H]^+$ 1179.7。

製備化合物**26e**



化合物**26e**係藉由實例34中製備化合物**24l**之類似方法，自化合物**1i**及化合物**26d**製備。EI-MS m/z : $1/2[M+H]^+$ 1560.6, $1/3[M+H]^+$ 1040.7。

實例38. 製備化合物**27e**



製備化合物**27a**

將DIPEA (0.19 ml, 1.1 mmol)、HOBt (64 mg, 0.47 mmol)及EDC·HCl (91 mg, 0.47 mmol)添加至攪拌之化合物**24e** (228 mg, 0.55 mmol)及化合物**4e** (256 mg, 0.36 mmol)於DMF (4 mL)中之混合物。在N₂下在室溫下攪拌4小時後，將反應混合物傾倒至H₂O (10 mL)且用EtOAc (3×15 mL)萃取。合併之有機層用1 N HCl水溶液(20 mL)、飽和NaHCO₃水溶液(10 mL)及鹽水(10 mL)洗滌，且經無水Na₂SO₄乾燥。過濾且濃縮後，殘餘物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**27a** (327 mg, 85%)。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.73 (s, 1H), 7.33-7.26 (m, 11 H), 6.91 (s, 1H), 5.67 (br, 1H) 5.08-5.07 (m, 5 H), 4.15 (m, 1 H), 4.02 (t, 2 H), 3.72-3.44 (m, 46H), 3.16 (d, 2H), 1.82 (m, 1H), 1.63 (m, 1H), 1.55-1.36 (m, 13H)。

製備化合物**27b**

在0°C下向攪拌之化合物**27a** (327 mg, 0.309 mmol)及Pd/C (10 wt. %, 65 mg)於MeOH (6 mL)中之混合物添加HCl (4 N 1,4-二噁烷溶液, 0.15 mL, 0.618 mmol)。在氫氣下在室溫下攪拌1.5小時後，反應混合物經矽藻土墊過濾且用MeOH (40 mL)洗滌。濃縮濾液，產生呈無色油狀之化合物**27b** (244 mg, 91%)，其未經進一步純化即使用。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 789.2。

製備化合物**27c**

將DIPEA (0.19 ml, 1.13 mmol)、HOBt (95 mg, 0.707 mmol)及EDC·HCl (135 mg, 0.707 mmol)添加至攪拌之化合物**25b** (227 mg, 0.707 mmol)及化合物**27b** (244 mg, 0.283 mmol)於DMF (6 mL)中之混

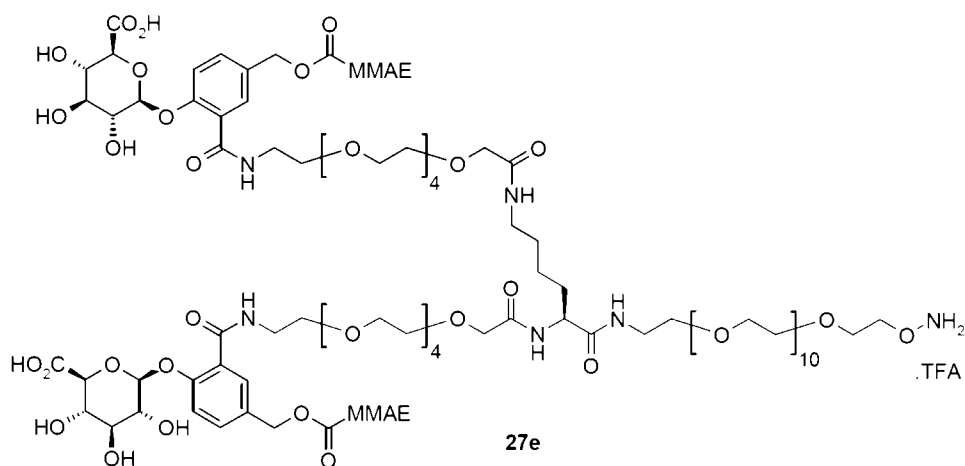
合物。在N₂下在室溫下攪拌3小時後，將反應混合物傾倒至H₂O (5 mL)中且用DCM (3×10 mL)萃取。合併之有機層經無水Na₂SO₄乾燥。過濾且濃縮後，殘餘物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**27c** (339 mg, 85%)。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.69 (s, 1H), 7.29 (d, 1H), 6.99 (s, 1H), 6.82 (s, 1H), 4.39 (q, 1H), 3.99-3.94 (m, 6H), 3.69-3.58 (m, 80H), 3.51 (t, 2H), 3.44-3.34 (m, 8H), 3.25 (m, 2H), 1.68-1.64 (m, 1H), 1.53-1.48 (m, 2H), 1.44 (s, 9H), 1.33 (m, 2H)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 1395.6。

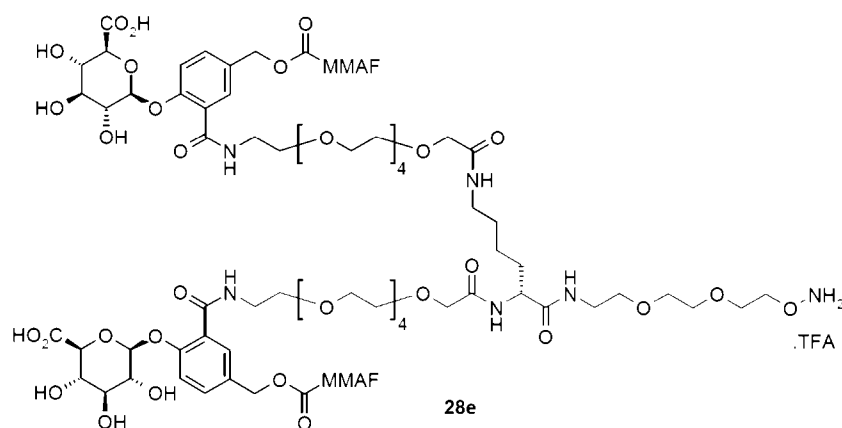
製備化合物**27d**

在0°C下向攪拌之化合物**27c** (339 mg, 0.242 mmol)及Pd/C (10 wt. %, 67 mg)於MeOH (6 mL)中之混合物添加HCl (4 N 1,4-二噁烷溶液, 0.12 mL, 0.484 mmol)。在氫氣下在室溫下攪拌30分鐘後，反應混合物經矽藻土墊過濾且用MeOH (30 mL)洗滌。濃縮濾液，產生呈無色油狀之化合物**27d** (300 mg, 87%)，其未經進一步純化即使用。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 1343.5。

製備化合物**27e**

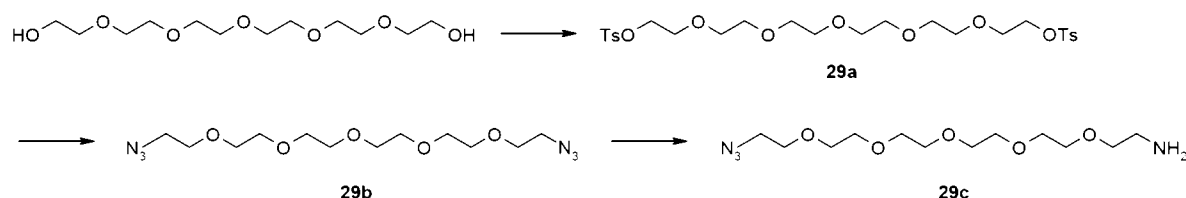


化合物**27e**係藉由實例34中製備化合物**24l**之類似方法，自化合物**1i**及化合物**27d**製備。EI-MS m/z: 1/2[M+H]⁺ 1692.5。



化合物**28e**係藉由實例35中製備化合物**25e**之類似方法，自化合物**1j**及化合物**28c**製備。EI-MS m/z : $1/2[M+H]^+$ 1509.2。

實例41. 製備化合物29j



製備化合物29a

在0℃下在N₂下向六乙二醇(25.0 g, 88.5 mmol)於DCM (100 mL)中之溶液中添加三乙胺(61.7 mL, 443 mmol)及對甲苯磺酰氯(50.6 g, 266 mmol)。在0℃下5小時後，將反應混合物傾倒至1 N HCl水溶液(200 mL)中且用DCM (2×200 mL)萃取。合併之有機層用飽和NaHCO₃水溶液(100 mL)及鹽水(100 mL)洗滌，且經無水Na₂SO₄乾燥。過濾且濃縮後，殘餘物藉由管柱層析法來純化，產生呈棕色油狀之化合物**29a** (45.0 g, 87%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.79 (d, J = 7.6 Hz, 4H), 7.34 (d, J = 7.6 Hz, 4H), 4.16-4.14 (m, 4H), 3.69-3.67 (m, 4H), 3.64-3.56 (m, 16H), 2.44 (s, 6H)。

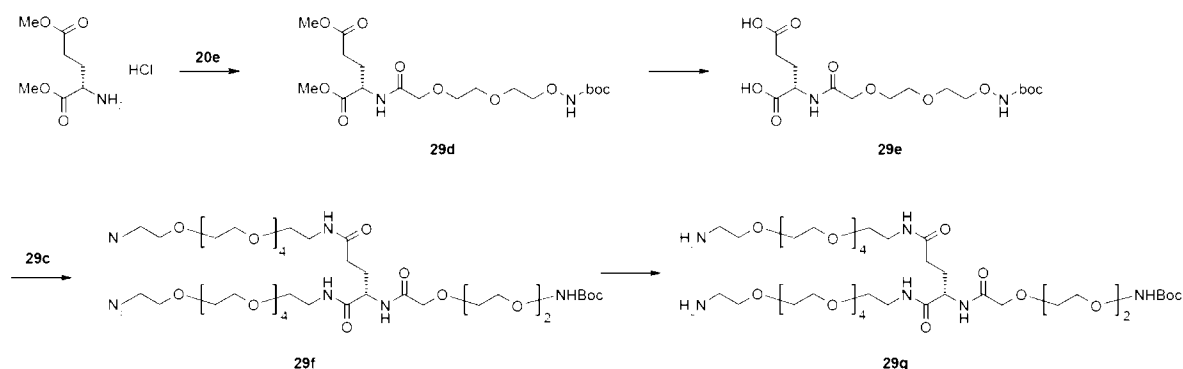
製備化合物29b

向化合物**29a** (17.6 g, 29.7 mmol)於DMF (100 mL)中之溶液中添加

NaN_3 (9.65 g, 148 mmol)及碘化四丁基銨(550 mg, 1.49 mmol)。反應混合物加熱達 80°C 。在 80°C 下攪拌16小時後，使反應混合物冷卻至室溫。反應混合物經矽藻土墊過濾且用DCM (100 mL)洗滌。濃縮後，殘餘物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**29b** (9.4 g, 94%)。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 3.68 (m, 20H), 3.39 (t, 4H)。

製備化合物**29c**

向**29b** (8.4 g, 24.9 mmol)於DCM (24 mL)及甲苯(24 mL)中之溶液中添加1 N HCl水溶液(40.3 mL)及三苯基膦(6.9 g, 23.6 mmol)。反應混合物在室溫下在 N_2 下攪拌16小時。在減壓下移除溶劑後， H_2O (20 mL)添加至反應混合物，且將水層用EtOAc (20 mL)萃取。接著水相pH值調至13。將所得水相用DCM (3×30 mL)萃取。合併之有機層經無水 Na_2SO_4 乾燥，過濾，且減壓濃縮，產生呈無色油狀之化合物**29c** (6.6 g, 84%)。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 3.67 (m, 20H), 3.52 (t, 2H), 3.39(t, 2H), 2.86(t, 2H)。EI-MS m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 306.9。



製備化合物**29d**

在 0°C 下將DIPEA (2.67 mL, 15.4 mmol)及HBTU (3.49 g, 9.21 mmol)添加至攪拌之L-麩胺酸二甲酯鹽酸鹽(1.3 g, 6.14 mmol)及化合物**20e** (1.72 g, 6.14 mmol)於DMF (15 mL)中之混合物。將反應混合物在 0°C 下攪拌30分鐘且在 N_2 下經16小時使之升溫至室溫。將反應混合物傾倒

至水(50 mL)中且用DCM (3×50 mL)萃取。合併之有機層先後用0.5 N HCl (50 mL)、飽和NaHCO₃水溶液(50 mL)及鹽水(50 mL)洗滌，且經無水Na₂SO₄乾燥。過濾及減壓濃縮後，所得粗產物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**29d** (2.18 g, 81%)。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10.00 (s, 1H), 8.04 (d, 1H), 4.34 (m, 1H), 3.93 (s, 1H), 3.77 (s, 1H), 3.63 (s, 3H), 3.58 (s, 9H), 3.38-3.34 (t, 2H), 2.14(m, H), 1.90 (m, 1H), 1.39 (s, 9H)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 437.35。

製備化合物**29e**

在室溫下在N₂下向化合物**29d** (2.18 g, 4.99 mmol)於THF:MeOH:H₂O (12 mL:4 mL:4 mL)中之溶液中添加NaOH (499 mg, 12.5 mmol)。3小時後，反應混合物pH值調至4且濃縮。接著將殘餘物用DCM/MeOH (80 mL/20 mL)萃取。濃縮得到呈黃色油狀之化合物**29e** (1.0 g, 49%)，其未經進一步純化即使用。EI-MS m/z: [M+H-Boc]⁺ 309.20。

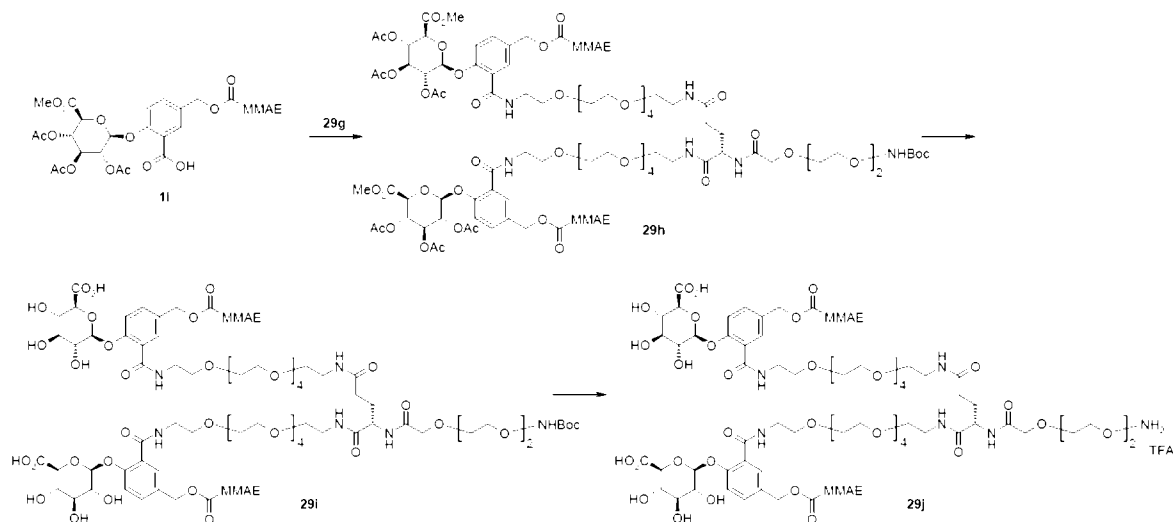
製備化合物**29f**

在0℃下將DIPEA (1.7 mL, 9.79 mmol)及HBTU (2.79 g, 7.35 mmol)添加至攪拌之化合物**29e** (1.0 g, 2.45 mmol)及化合物**29c** (2.25 g, 7.35 mmol)於DMF (10 mL)中之混合物。反應混合物在0℃下攪拌30分鐘且在N₂下經16小時使之升溫至室溫。將反應混合物傾倒至水(50 mL)中且用DCM (3×50 mL)萃取。合併之有機層先後用0.5 N HCl水溶液(50 mL)、飽和NaHCO₃水溶液(50 mL)及鹽水(50 mL)洗滌，且經無水Na₂SO₄乾燥。過濾及減壓濃縮後，所得粗產物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**29f** (611 mg, 25%)。 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.97 (s, 1H), 8.08 (t, 1H), 7.85 (t, 1H), 7.64 (d, 1H), 4.27 (m, 1H), 3.83 (s, 2H), 3.82-

3.61 (m, 2H), 3.61-3.50 (m, 42H), 3.42-3.37 (m, 8H), 3.28-3.15 (m, 4H), 2.90 (s, H), 2.08-2.04(m, 2 H), 1.88 (m, 1H), 1.75 (m, 1H), 1.39 (s, 9H) 。 EI-MS m/z : $[M+H]^+$ 986.73 。

製備化合物**29g**

向攪拌之化合物**29f** (611 mg , 0.62 mmol)於MeOH (50 mL)中之混合物添加Pd/C (10 wt. % , 132 mg , 0.62 mmol) 。在氫氣下在室溫下攪拌2小時後，反應混合物經矽藻土墊過濾且用MeOH (40 mL)洗滌。濃縮濾液，產生呈無色油狀之化合物**29g** (518 mg , 粗)，其未經進一步純化即使用。EI-MS m/z : $[M+H]^+$ 933.85 。



製備化合物**29h**

將DIPEA (0.026 mL , 0.150 mmol)及HBTU (40 mg , 0.105 mmol)添加至攪拌之化合物**29g** (35 mg , 0.037 mmol)及化合物**1i** (106 mg , 0.086 mmol)於DMF (3 mL)中之混合物。在N₂下在室溫下攪拌16小時後，反應混合物用水(20 mL)稀釋且用EtOAc (3×10 mL)萃取。合併之有機層先後用0.5 N HCl (20 mL)、飽和NaHCO₃水溶液(20 mL)及鹽水(20 mL)洗滌，且經無水Na₂SO₄乾燥。過濾及減壓濃縮後，所得粗產物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**29h** (81.4 mg , 65%)。EI-MS m/z :

$1/2[M+H]^+$ 1677.94, $1/3[M+H]^+$ 1119.03。

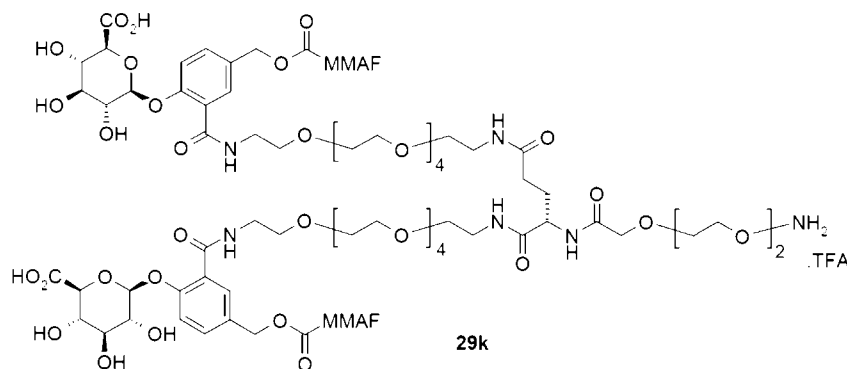
製備化合物**29i**

在-10℃下向化合物**29h** (81 mg, 0.024 mmol)於MeOH (1 mL)中之溶液中添加含LiOH單水合物(8.1 mg, 0.19 mmol)之H₂O (1 mL)。在-10℃下攪拌2小時後，反應混合物使用乙酸中和且減壓濃縮。接著反應混合物溶於H₂O/DMSO (1.5 mL/1.5 mL)中且藉由HPLC來純化，產生呈白色固體狀之化合物 **29i** (53 mg, 72%)。EI-MS m/z : $1/2[M+H]^+$ 1537.86, $1/3[M+H]^+$ 1025.66。

製備化合物**29j**

在0℃下將TFA (0.3 mL)添加至攪拌之化合物**29i** (53 mg, 0.017 mmol)於DCM (1.0 mL)中之溶液。攪拌1小時後，溶劑及過量TFA藉由N₂流移除。接著殘餘物溶於H₂O/MeCN (1 mL/1 mL)中且藉由HPLC來純化。將具有相同滯留時間之純溶離份合併且凍乾，產生呈白色固體狀之化合物**29j** (23.1 mg, 43%)。EI-MS m/z : $1/2[M+H]^+$ 1487.99, $1/3[M+H]^+$ 992.40。

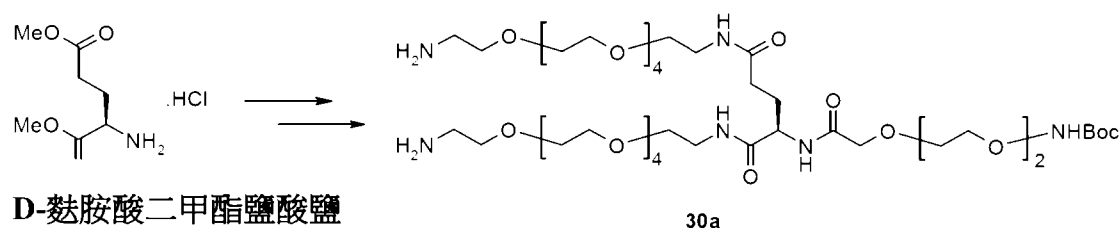
實例42. 製備化合物**29k**



化合物**29k**係藉由實例41中製備化合物**29j**之類似方法，自化合物**1j**及化合物 **29g** 製備。EI-MS m/z : $1/2[M+H]^+$ 1501.93, $1/3[M+H]^+$ 1001.69。

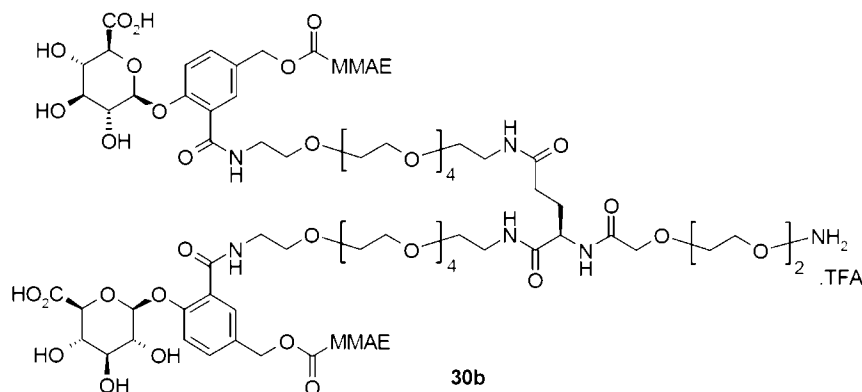
實例43. 製備化合物30b

製備化合物30a



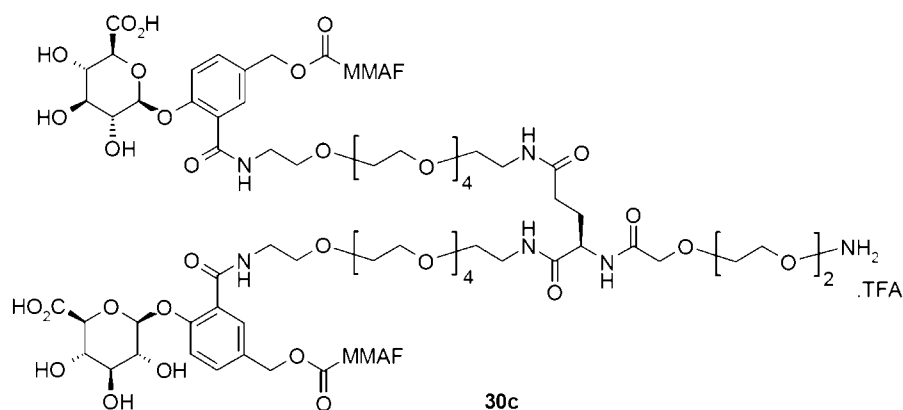
化合物**30a**係藉由實例41中製備化合物**29g**之類似方法，自**D-麩胺酸二甲酯鹽酸鹽**製備。EI-MS m/z : $[M+H]^+$ 933.89。

製備化合物30b



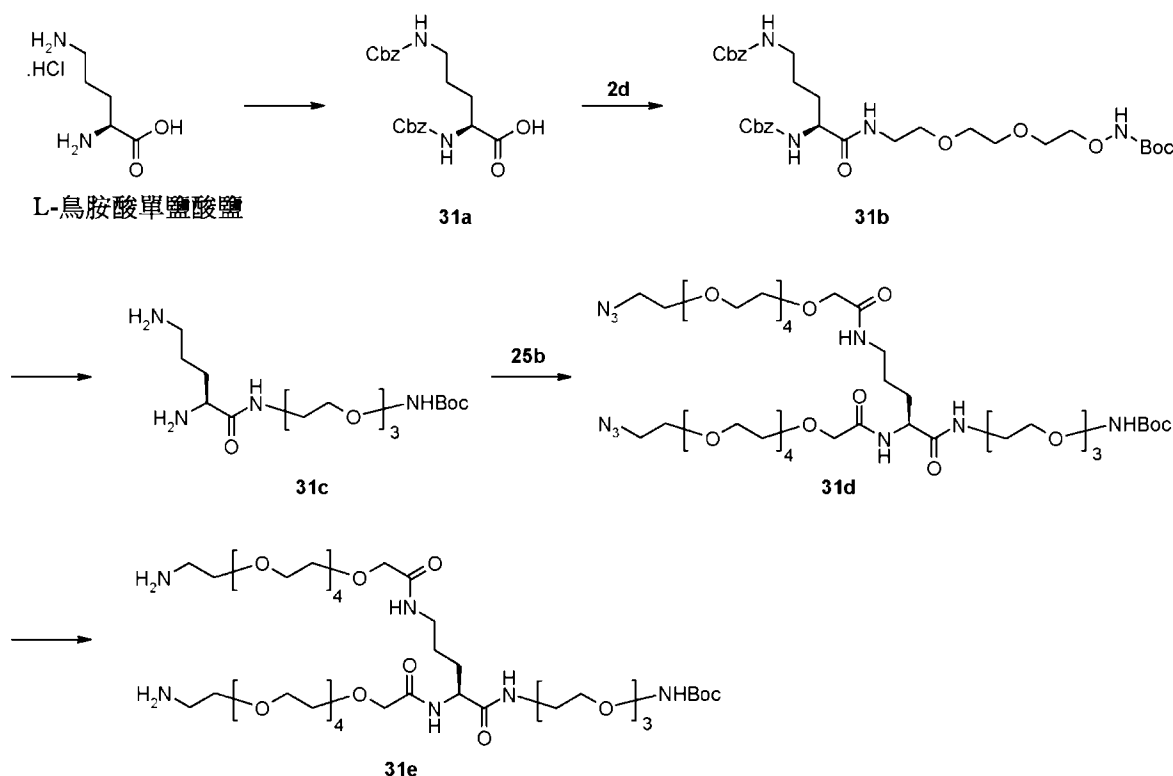
化合物**30b**係藉由實例41中製備化合物**29j**之類似方法，自化合物**1i**及化合物**30a**製備。EI-MS m/z : $1/2[M+H]^+$ 1488.07, $1/3[M+H]^+$ 992.40。

實例44. 製備化合物30c



化合物**30c**係藉由實例41中製備化合物**29j**之類似方法，自化合物**1j**及化合物**30a**製備。EI-MS m/z : $1/2[M+H]^+$ 1501.93, $1/3[M+H]^+$ 1001.69。

實例45. 製備化合物31f



製備化合物31a

將三頸燒瓶連續負載H₂O (18 mL)、1,4-二噁烷(30 mL)及L-鳥胺酸單鹽酸鹽(3.0 g, 17.8 mmol)。攪拌混合物直至完全溶解。pH藉由添加2 M Na₂CO₃水溶液調至約10.5。在藉由同時添加2 M Na₂CO₃水溶液維持pH在約10-11下的同時添加氯甲酸苯甲酯(6.37 g, 37.4 mmol)。添加結束後，將反應混合物在20℃下攪拌1小時。接著添加EtOAc (50 mL)且所得混合物pH值用c-HCl調至2~3。分離有機層且將水層用EtOAc (50 mL)萃取。合併之有機層用鹽水(50 mL)洗滌，且經Na₂SO₄乾燥。過濾且減壓濃縮，得到化合物**31a** (7.1 g)。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 12.54 (s,

1H), 7.54 (s, 1H), 7.44-7.29 (m, 10H), 7.24-7.22 (m, 1H), 5.16-5.00 (d, 4H), 3.95-3.89 (m, 1H), 3.00-2.96 (m, 2H), 1.98-1.57 (m, 1H), 1.56-1.46(m, 3H)。

製備化合物**31b**

在0℃下將DIPEA (1.41 mL, 8.12 mmol)及HBTU (1.85 g, 4.87 mmol)添加至攪拌之化合物**31a** (1.30 g, 3.25 mmol)及化合物**2d** (891 mg, 3.57 mmol)於DMF (10 mL)中之混合物。反應混合物在0℃下攪拌30分鐘且在N₂下經16小時使之升溫至室溫。將反應混合物傾倒至水(50 mL)中且用DCM (3×50 mL)萃取。合併之有機層先後用0.5 N HCl水溶液(50 mL)、飽和NaHCO₃水溶液(50 mL)及鹽水(50 mL)洗滌，且經無水Na₂SO₄乾燥。過濾及減壓濃縮後，所得粗產物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**31b** (1.2 g, 57%)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 647.54, [M+H-Boc]⁺ 547.47

製備化合物**31c**

向攪拌之化合物**31b** (1.2 g, 1.86 mmol)於MeOH (50 mL)中之混合物添加Pd/C (10 wt. %, 59 mg, 5.57 mmol)。在氫氣下在室溫下攪拌2小時後，反應混合物經矽藻土墊過濾且用MeOH (40 mL)洗滌。濃縮濾液，產生化合物**31c** (717 mg)，其未經進一步純化即使用。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.93 (s, 1H), 3.81 (t, 2H), 3.55 (t, 2H), 3.51 (s, 5H), 3.42-3.22 (m, 13H), 1.37 (s, 9H)。

製備化合物**31d**

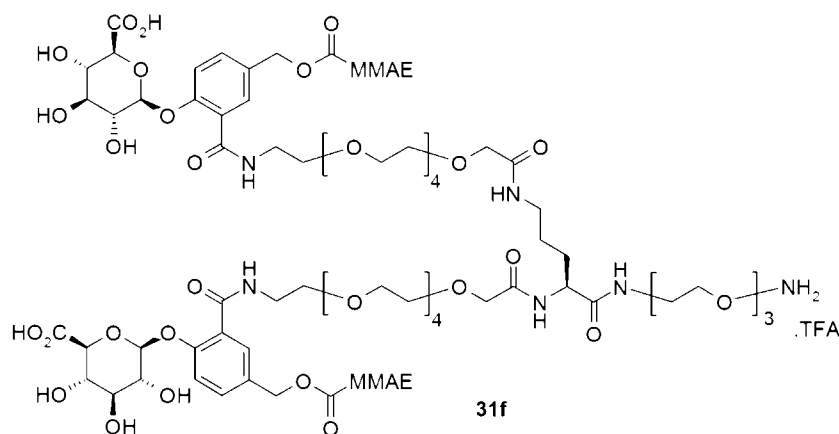
在0℃下將DIPEA (0.55 mL, 3.17 mmol)及HBTU (902 mg, 2.38 mmol)添加至攪拌之化合物**31c** (300 mg, 0.79 mmol)及化合物**25b** (637 mg, 1.98 mmol)於DMF (5 mL)中之混合物。反應混合物在0℃下攪拌30

分鐘且在N₂下經16小時使之升溫至室溫。將反應混合物傾倒至水(30 mL)且用DCM (3×30 mL)萃取。合併之有機層先後用0.5 N HCl水溶液(30 mL)、飽和NaHCO₃水溶液(30 mL)及鹽水(30 mL)洗滌，且經無水Na₂SO₄乾燥。過濾及減壓濃縮後，所得粗產物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**31d** (551 mg, 71%)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 985.87。

製備化合物**31e**

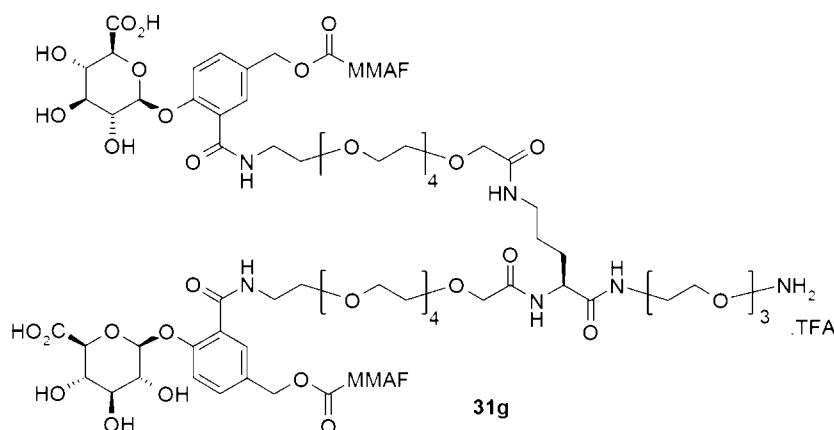
向攪拌之化合物**31d** (491 mg, 0.50 mmol)於MeOH (30 mL)中之混合物添加Pd/C (10 wt. %, 106 mg 1.00 mmol)。在氫氣下在室溫下攪拌2小時後，反應混合物經矽藻土墊過濾且用MeOH (40 mL)洗滌。濃縮濾液，產生化合物**31e** (452 mg)，其未經進一步純化即使用。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 933.94。

製備化合物**31f**



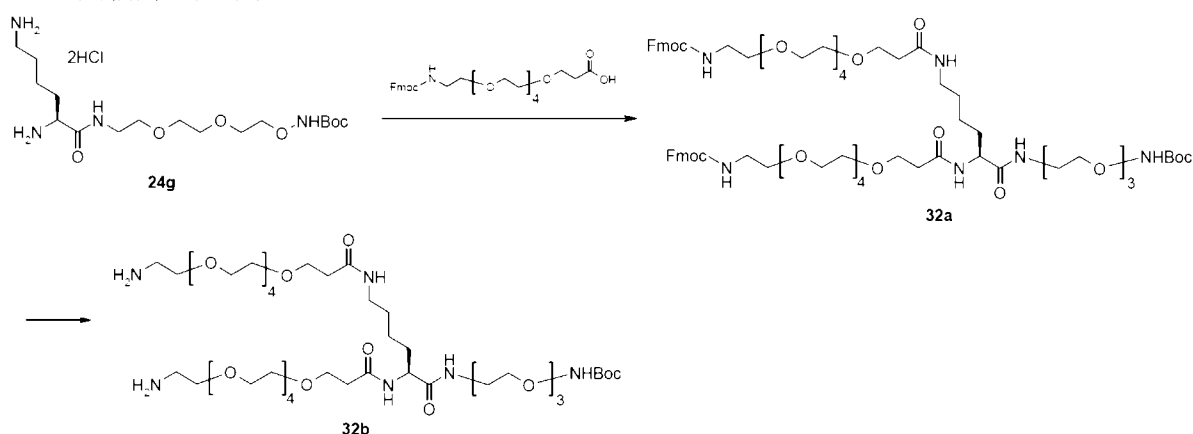
化合物**31f**係藉由實例35中製備化合物**25e**之類似方法，自化合物**1i**及化合物**31e**製備。EI-MS m/z: 1/2[M+H]⁺ 1488.20, 1/3[M+H]⁺ 992.54。

實例46. 製備化合物**31g**



化合物**31g**係藉由實例35中製備化合物**25e**之類似方法，自化合物**1j**及化合物**31e**製備。EI-MS m/z : $1/2[M+H]^+$ 1502.23, $1/3[M+H]^+$ 1001.86。

實例47. 製備化合物32c



製備化合物32a

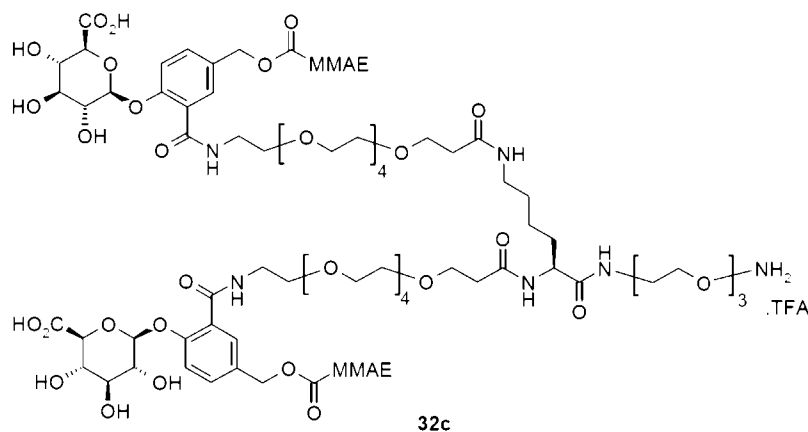
將DIPEA (0.6 mL, 7.07 mmol)及HBTU (972 mg, 5.30 mmol)添加至攪拌之化合物**24g** (483 mg, 0.855 mmol)及Fmoc-NH-PEG5-CH₂CH₂COOH (1.0 g, 3.89 mmol)於DMF (10 mL)中之混合物。在N₂下在室溫下攪拌14小時後，將反應混合物傾倒至H₂O (30 mL)中且用EtOAc (3×30 mL)萃取。合併之有機層先後用1 N HCl水溶液(10 mL)、飽和NaHCO₃水溶液(10 mL)及鹽水(10 mL)洗滌，且經無水Na₂SO₄乾燥。過濾且濃縮後，所得殘餘物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**32a** (1.16

g, 90%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.77 (d, 4H), 7.60(d, 4H), 7.39 (t, 4H), 7.31 (t, 4H), 4.39 (d, 4H), 4.33 (m, 1H), 4.22 (m, 2H), 4.09 (m, 2H), 3.71-3.39 (m, 52H), 3.19 (m, 2H), 2.51 (m, 4H), 1.50 (m, 1H), 1.46 (m, 1H), 1.43 (s, 9H), 1.25 (m, 2H)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 1520.0。

製備化合物**32b**

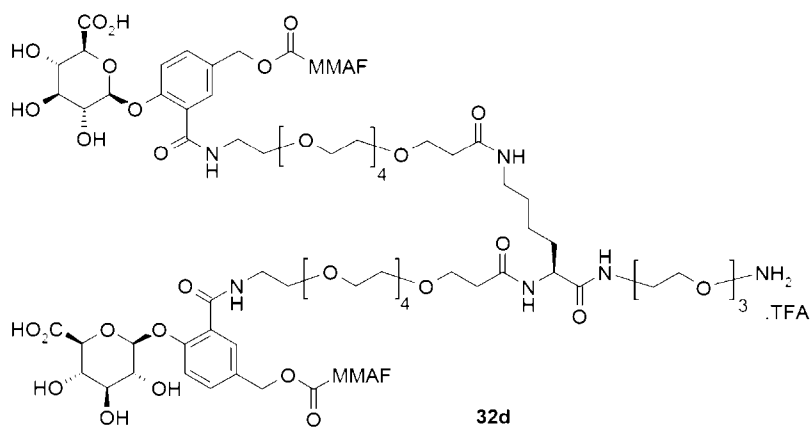
在室溫下向化合物**32a** (500 mg, 0.328 mmol)於THF (8 mL)中之溶液中添加哌啶(2 mL)。攪拌20分鐘後，在減壓下濃縮反應混合物。所得殘餘物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**32b** (175 mg, 50%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.41 (m, 1H), 4.01 (m, 2H), 3.75-3.56 (m, 43H), 3.54 (m, 2H), 3.24 (m, 2H), 2.89 (m, 3H), 2.52 (m, 4H), 1.83 (m, 1H), 1.80 (m, 1H), 1.53 (s, 9H), 1.39 (m, 2H)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 975.5。

製備化合物**32c**



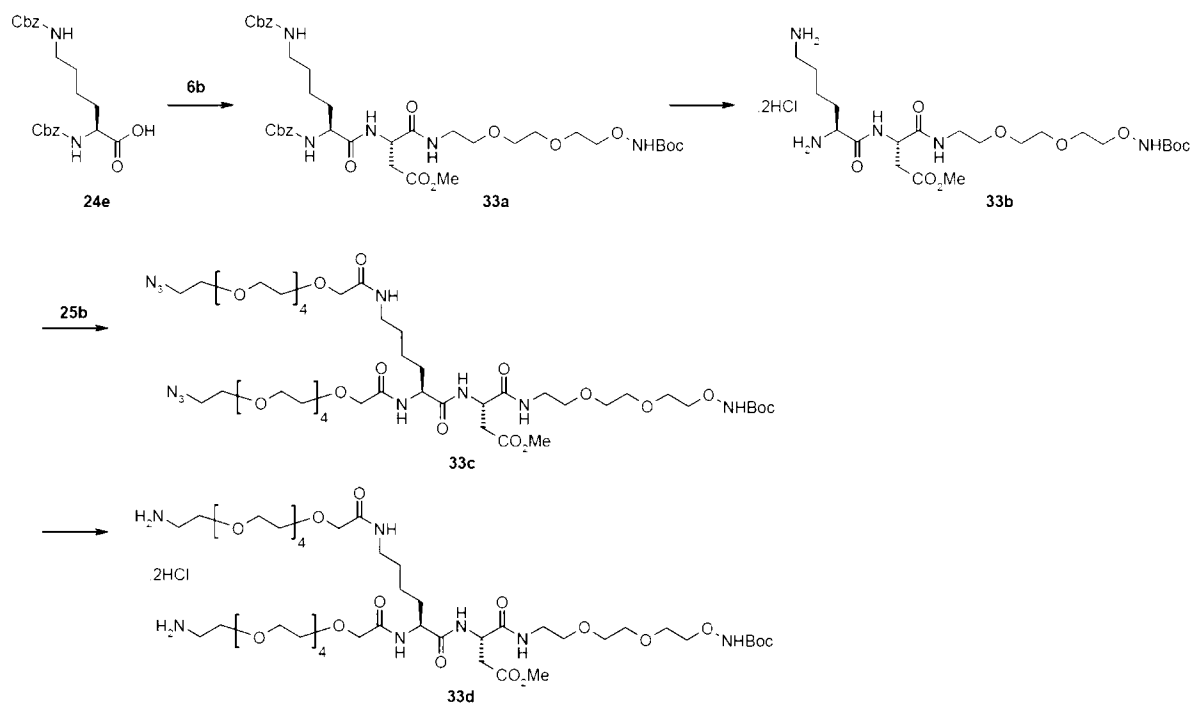
化合物**32c**係藉由實例35中製備化合物**25e**之類似方法，自化合物**1i**及化合物**32b**製備。EI-MS m/z: 1/2[M+H]⁺ 1508.8。

實例48. 製備化合物**32d**



化合物**32d**係藉由實例35中製備化合物**25e**之類似方法，自化合物**1j**及化合物**32b**製備。EI-MS m/z : $1/2[M+H]^+$ 1522.8。

實例49. 製備化合物33e



製備化合物**33a**

將DIPEA (1.98 mL, 11.37 mmol)及HBTU (2.15 g, 5.68 mmol)添加至攪拌之化合物**24e** (1.57 g, 3.79 mmol)及化合物**6b** (1.30 g, 3.15 mmol)於DMF (37 mL)中之混合物。在N₂下在室溫下攪拌14小時後，將反應混合物傾倒至H₂O (40 mL)且用EtOAc (3×40 mL)萃取。合併之有機層

先後用1 N HCl水溶液(40 mL)、飽和NaHCO₃水溶液(40 mL)及鹽水(40 mL)洗滌，且經無水Na₂SO₄乾燥。過濾且濃縮後，殘餘物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**33a** (2.2 g, 88%)。 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.99 (s, 1H), 8.19 (d, 1H), 7.79 (t, 1H), 7.47 (d, 1H), 7.34-7.31 (m, 5H), 7.24 (t, 1H), 5.01 (d, 4H), 4.55 (q, 1H), 3.91 (q, 1H), 3.79 (t, 2H), 3.55-3.48 (m, 9H), 3.24-3.11 (m, 2H), 2.75-2.54 (m, 2H), 1.57-1.49 (m, 2H), 1.38 (s, 9H), 1.25 (m, 2H)。 EI-MS m/z: [M+H]⁺ 790.47, [M+Na]⁺ 812.4。

製備化合物**33b**

在0°C下向攪拌之化合物**33a** (2.2 g, 2.78 mmol)及Pd/C (10 wt. %, 400 mg)於MeOH (60 mL)中之混合物添加HCl (4 N 1,4-二噁烷溶液, 1.39 mL, 5.56 mmol)。在氫氣下在室溫下攪拌3小時後，反應混合物經矽藻土墊過濾且用MeOH (40 mL)洗滌。濃縮濾液，產生化合物**33b** (1.67 g, 99%)，其未經進一步純化即使用。 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.98 (s, 1H), 8.87 (d, 1H), 8.28 (bs, 3H), 8.12 (1H), 7.96 (bs, 3H), 4.51 (q, 1H), 3.77 (t, 2H), 3.72 (bs, 1H), 3.57 (s, 3H), 3.52-3.47 (m, 7H), 3.12 (s, 3H), 2.76-2.61 (m, 4H) 1.71 (q, 2H), 1.55 (q, 2H) 1.36 (s, 9H)。 EI-MS m/z: [M+H]⁺ 522.4, [M+Na]⁺ 544.3。

製備化合物**33c**

將DIPEA (1.95 mL, 11.23 mmol)及HBTU (3.19 g, 8.42 mmol)添加至攪拌之化合物**25b** (1.98 g, 6.17 mmol)及化合物**33b** (1.67 g, 2.80 mmol)於DMF (20 mL)中之混合物。在N₂下在室溫下攪拌14小時後，濃縮反應混合物且藉由管柱層析法來純化，產生化合物**33c** (2 g, 63%)。 ¹H-

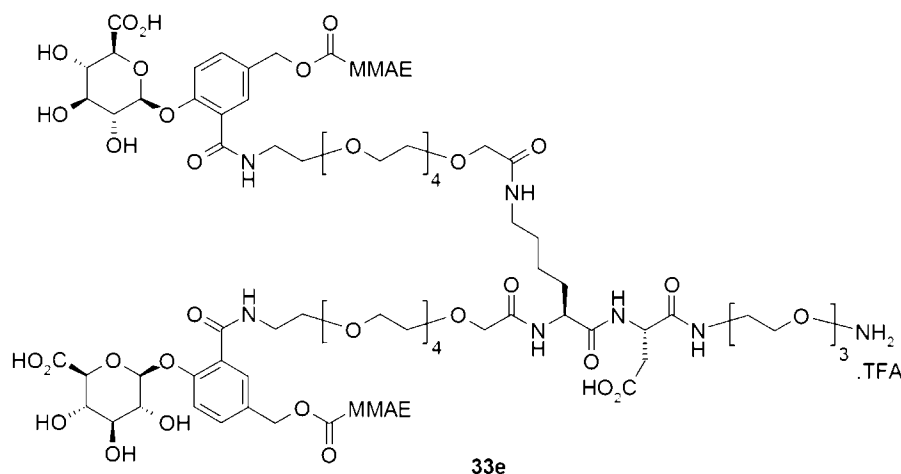
NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.97 (s, 1H), 8.28 (d, 1H), 7.82 (t, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.64 (s, 1H), 4.54 (q, 1H), 4.25 (q, 1H), 3.91 (s, 2H), 3.84 (s, 2H), 3.80 (t, 2H), 3.60-3.49 (m, 48H), 3.26-3.12 (m, 3H), 3.07 (q, 2H), 2.75-2.54 (m, 2H), 1.65-1.55 (m, 2H), 1.39 (s, 10H), 1.21 (m, 3H)。

EI-MS m/z : $[M+H]^+$ 1128.8, $[M+Na]^+$ 1150.7。

製備化合物33d

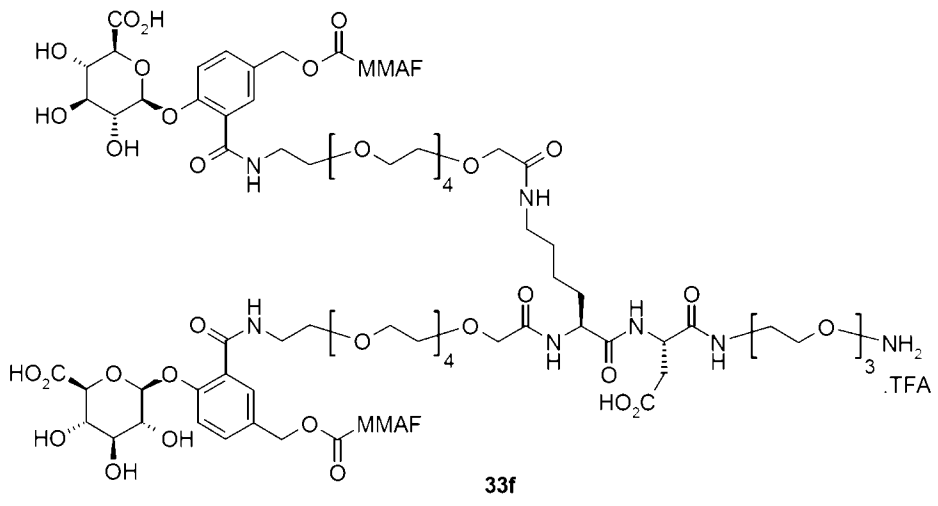
在0°C下向攪拌之化合物33c (1 g, 0.88 mmol)及Pd/C (10 wt. %, 200 mg)於MeOH (20 mL)中之混合物添加HCl (4 N 1,4-二噁烷溶液, 0.44 mL, 0.88 mmol)。在氫氣下在室溫下攪拌3小時後，反應混合物經矽藻土墊過濾且用MeOH (20 mL)洗滌。濃縮濾液，產生化合物33d (936 mg, 92%)，其未經進一步純化即使用。¹H-NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.98 (s 1H), 8.30 (d, 1H), 7.70 (t, 2H), 4.54 (q, 1H), 4.26 (q, 1H), 3.93 (s, 2H), 3.85 (s, 2H), 3.80 (t, 2H), 3.61-3.49 (m, 46H), 3.22-3.12 (m, 4H), 3.06 (q, 2H), 2.97 (q, 4H), 2.76-2.54 (m, 2H), 1.64-1.55 (m, 2H), 1.39 (s, 10H), 1.26 (m, 3H)。EI-MS m/z : $[M+H]^+$ 1076.8。

製備化合物33e



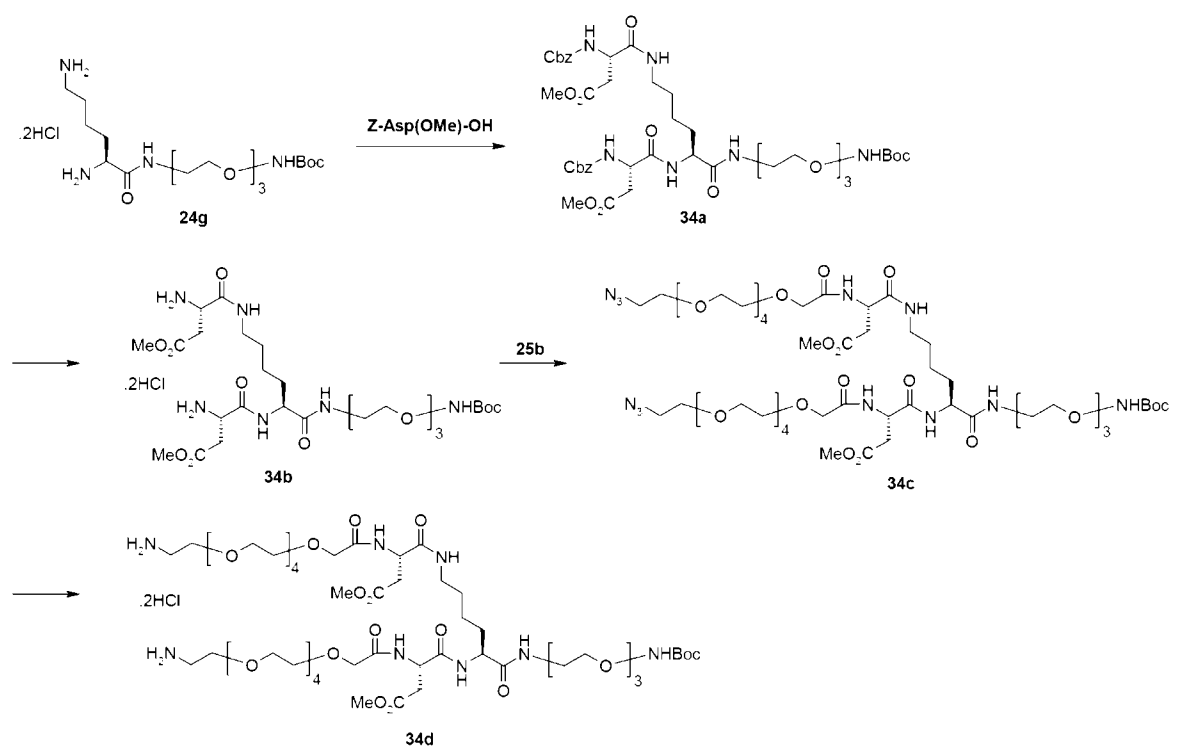
化合物**33e**係藉由實例35中製備化合物**25e**之類似方法，自化合物**1i**及化合物**33d**製備。EI-MS m/z : $1/2[M+H]^+$ 1552.2。

實例50. 製備化合物**33f**



化合物**33f**係藉由實例35中製備化合物**25e**之類似方法，自化合物**1j**及化合物**33d**製備。EI-MS m/z : $1/2[M+H]^+$ 1566.4。

實例51. 製備化合物**34e**



製備化合物34a

將DIPEA (0.8 mL, 4.56 mmol)及HBTU (1.3 g, 3.42 mmol)添加至攪拌之化合物**24g** (530 mg, 1.14 mmol)及Z-Asp(OMe)-OH (704 mg, 2.5 mmol)於DMF (5 mL)中之混合物。在N₂下在室溫下攪拌14小時後，將反應混合物傾倒至H₂O (50 mL)中且用EtOAc (3×30 mL)萃取。合併之有機層先後用1 N HCl水溶液(40 mL)、飽和NaHCO₃水溶液(40 mL)及鹽水(40 mL)洗滌，且經無水Na₂SO₄乾燥。過濾且濃縮後，殘餘物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**34a** (713 mg, 68%)。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) : δ 9.97 (s, 1H), 7.88 (m, 3H), 7.64 (d, 2H), 7.51 (d, 2H), 7.35 (m, 10H), 5.02 (m, 4H), 4.43-4.31 (m, 2H), 4.17 (m, 1H), 3.80 (t, 2H), 3.58-3.50 (m, 12H), 3.41-3.16 (m, 6H), 2.98 (m, 2H), 2.79-2.67 (m, 3H), 2.57 (m, 2H), 1.60-1.34 (m, 13H)。

製備化合物34b

向化合物**34a** (530 mg, 0.58 mmol)於MeOH (5 mL)中之溶液中添加Pd/C (20 wt. %, 106 mg)及HCl (4 N 1,4-二噁烷溶液, 0.29 mL, 1.16 mmol)。在氫氣下在室溫下攪拌3小時後，反應混合物經矽藻土墊過濾且用MeOH (30 mL)洗滌。濃縮濾液，產生化合物**34b** (420 mg, 100%)，其未經進一步純化即使用。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.97 (s, 1H), 8.62 (d, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.27 (m, 4H), 7.02 (s, 1H), 4.17 (m, 2H), 4.02 (m, 1H), 3.76 (t, 2H), 3.61 (m, 4H), 3.51-3.11 (m, 12H), 3.09-2.77 (m, 8H), 1.60-1.24 (m, 13H)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 651.5。

製備化合物34c

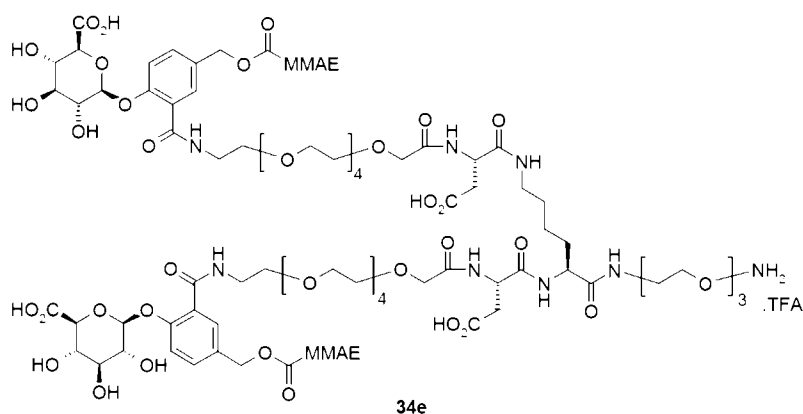
將DIPEA (0.4 mL, 2.32 mmol)及HBTU (660 mg, 1.74 mmol)添加

至攪拌之化合物**34b** (420 mg, 0.58 mmol)及化合物**25b** (299 mg, 0.93 mmol)於DMF (5 mL)中之混合物。在N₂下在室溫下攪拌14小時後，將反應混合物傾倒至H₂O (30 mL)中且用EtOAc (3×30 mL)萃取。合併之有機層先後用1 N HCl水溶液(20 mL)、飽和NaHCO₃水溶液(20 mL)及鹽水(20 mL)洗滌，且經無水Na₂SO₄乾燥。過濾且濃縮後，殘餘物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**34c** (466 mg, 70.8%)。 ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.28 (s, 1H), 7.78 (q, 1H), 7.31 (d, 1H), 7.71 (s, 1H), 6.94 (s, 1H), 4.85 (m, 2H), 4.35 (m, 1H), 4.07-4.03 (m, 6H), 3.75-3.41 (m, 56H), 3.23 (q, 2H), 2.92-2.84 (m, 4H), 1.91-1.32 (m, 15H)。 EI-MS m/z: [M+2H]⁺ 1158.1。

製備化合物**34d**

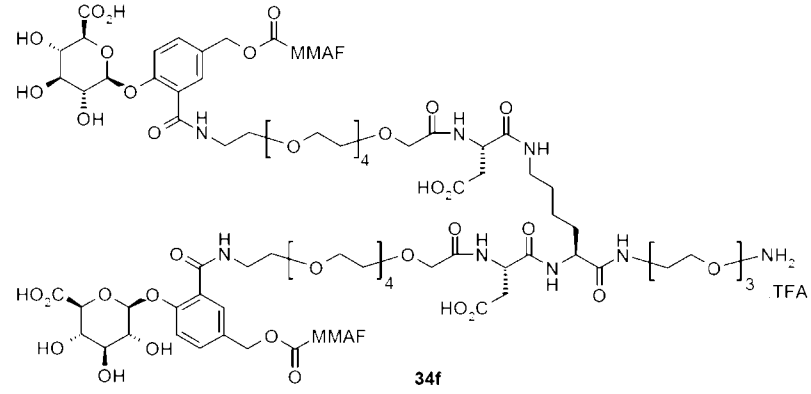
在0℃下向攪拌之化合物**34c** (260 mg, 0.21 mmol)及Pd/C (10 wt. %, 52 mg)於MeOH (20 mL)中之混合物添加HCl (4 N 1,4-二噁烷溶液, 0.10 mL, 0.41 mmol)。在氫氣下在室溫下攪拌2小時後，反應混合物經矽藻土墊過濾且用MeOH (50 mL)洗滌。濃縮濾液，產生化合物**34d** (249 mg, 100%)，其未經進一步純化即使用。EI-MS m/z: [M+2H]⁺ 1206.1。

製備化合物**34e**



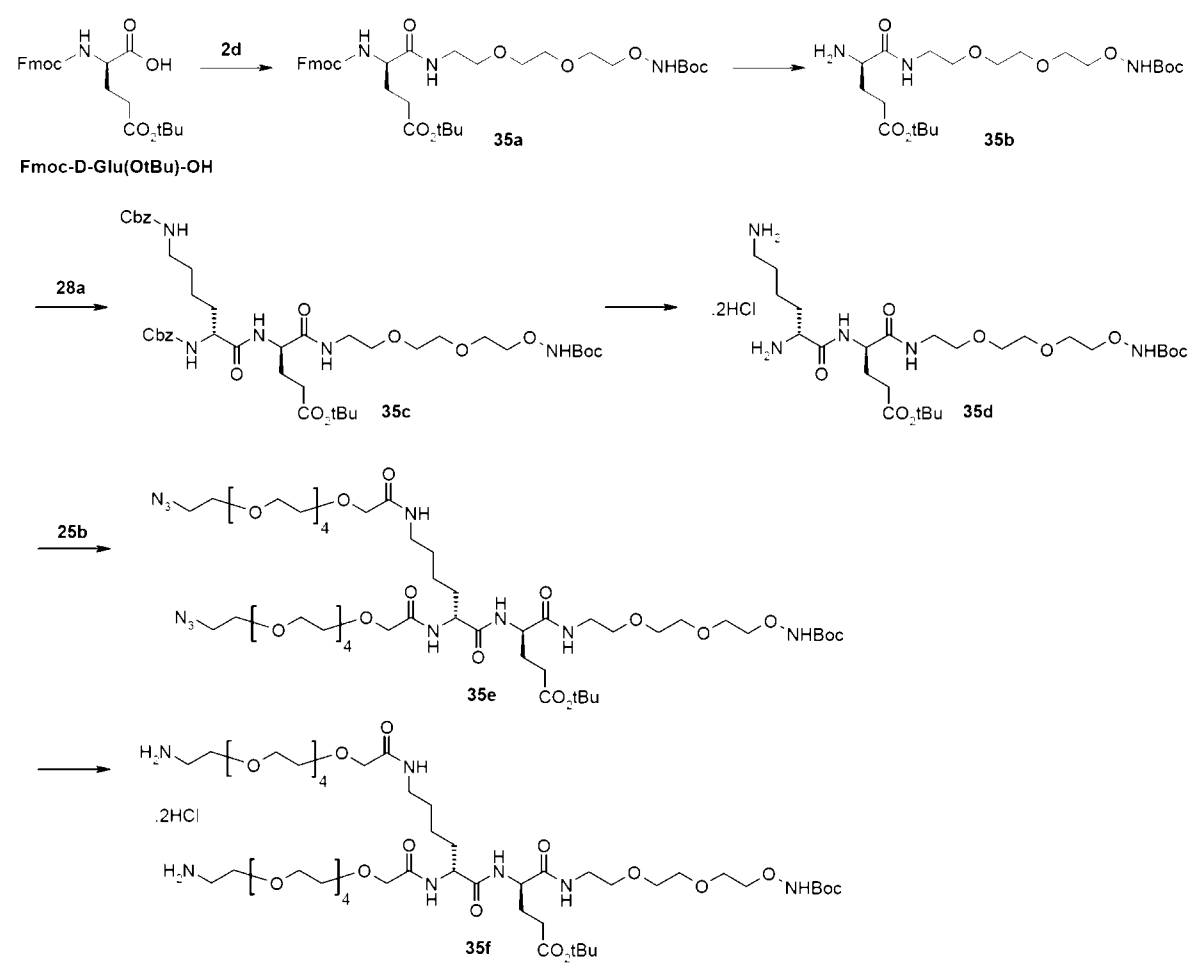
化合物**34e**係藉由實例35中製備化合物**25e**之類似方法，自化合物**1i**及化合物**34d**製備。EI-MS m/z : $1/2[M+H]^+$ 1610.4。

實例52. 製備化合物**34f**



化合物**34f**係藉由實例35中製備化合物**25e**之類似方法，自化合物**1j**及化合物**34d**製備。EI-MS m/z : $1/2[M+H]^+$ 1624.3。

實例53. 製備化合物**35g**



製備化合物**35a**

將DIPEA (0.61 mL, 3.52 mmol)及HBTU (665 mg, 1.175 mmol)添加至攪拌之Fmoc-D-Glu(OtBu)-OH (500 mg, 1.17 mmol)及化合物**2d** (424 mg, 1.404 mmol)於DMF (10 mL)中之混合物。在N₂下在室溫下攪拌14小時後，將反應混合物傾倒至H₂O (30 mL)中且用EtOAc (3×30 mL)萃取。合併之有機層先後用1 N HCl水溶液(20 mL)、飽和NaHCO₃水溶液(20 mL)及鹽水(20 mL)洗滌，且經無水Na₂SO₄乾燥。過濾且濃縮後，所得殘餘物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**35a** (708 mg, 89%)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 672.7。

製備化合物**35b**

在室溫下向化合物**35a** (708 mg, 1.04 mmol)於THF (8 mL)中之溶液中添加哌啶(2 mL)。攪拌20分鐘後，在減壓下濃縮反應混合物。所得殘餘物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**35b** (400 mg, 85%)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 450.1。

製備化合物**35c**

將DIPEA (0.19 mL, 1.1 mmol)及HBTU (253 mg, 0.66 mmol)添加至攪拌之化合物**28a** (203 mg, 0.484 mmol)及化合物**35b** (200 mg, 0.44 mmol)於DMF (10 mL)中之混合物。在N₂下在室溫下攪拌14小時後，將反應混合物傾倒至H₂O (30 mL)中且用EtOAc (3×30 mL)萃取。合併之有機層先後用1 N HCl水溶液(10 mL)、飽和NaHCO₃水溶液(10 mL)及鹽水(10 mL)洗滌，且經無水Na₂SO₄乾燥。過濾且濃縮後，殘餘物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**35c** (235 mg, 63%)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 847.0。

製備化合物**35d**

向化合物**35c** (235 mg, 0.277 mmol)於MeOH (15 mL)中之溶液中添加Pd/C (10 wt. %, 30 mg)。在氫氣下在室溫下攪拌2小時後，反應混合物經矽藻土墊過濾且用MeOH (50 mL)洗滌。濃縮濾液，產生化合物**35d** (160 mg, 100%)，其未經進一步純化即使用。EI-MS m/z : $[M+H]^+$ 578.7。

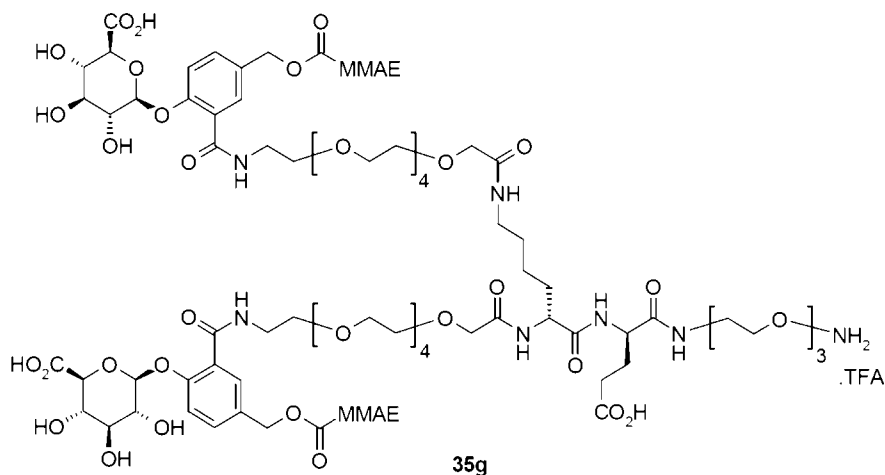
製備化合物**35e**

將DIPEA (0.145 mL, 1.758 mmol)及HBTU (262 mg, 1.465 mmol)添加至攪拌之化合物**35d** (160 mg, 0.276 mmol)及化合物**25b** (187 mg, 0.581 mmol)於DMF (3 mL)中之混合物。在N₂下在室溫下攪拌14小時後，將反應混合物傾倒至H₂O (30 mL)且用EtOAc (3×30 mL)萃取。合併之有機層先後用1 N HCl水溶液(10 mL)、飽和NaHCO₃水溶液(10 mL)及鹽水(10 mL)洗滌，且經無水Na₂SO₄乾燥。過濾且濃縮後，殘餘物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**35e** (260 mg, 79%)。EI-MS m/z : $[M+H]^+$ 1185.4。

製備化合物**35f**

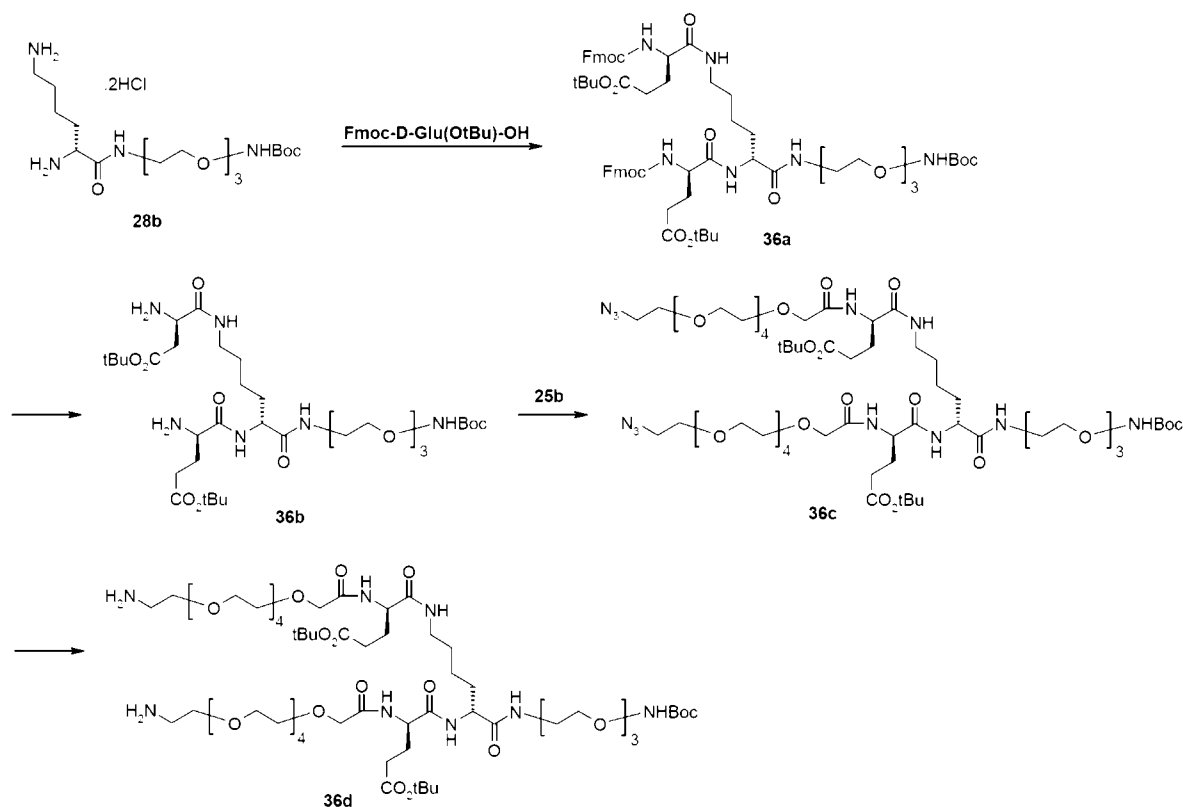
向化合物**35e** (70 mg, 0.059 mmol)於MeOH (5 mL)中之溶液中添加Pd/C (10 wt. %, 15 mg)。在氫氣下在室溫下攪拌90分鐘後，反應混合物經矽藻土墊過濾且用MeOH (30 mL)洗滌。濃縮濾液，產生化合物**35f** (67 mg, 100%)，其未經進一步純化即使用。EI-MS m/z : $[M+H]^+$: 1133.3。

製備化合物**35g**



化合物**35g**係藉由實例35中製備化合物**25e**之類似方法，自化合物**1i**及化合物**35f**製備。EI-MS m/z : $1/2[M+H]^+$ 1559.9。

實例54. 製備化合物36e



製備化合物36a

將DIPEA (0.3 mL, 3.10 mmol)及HBTU (474 mg, 2.275 mmol)添加至攪拌之Fmoc-D-Glu(OtBu)-OH (484 mg, 1.138 mmol)及化合物**28b** (223 mg, 0.569 mmol)於DMF (7 mL)中之混合物。在N₂下在室溫下攪拌

14小時後，將反應混合物傾倒至H₂O (30 mL)中且用EtOAc (3×30 mL)萃取。合併之有機層用1 N HCl水溶液(20 mL)、飽和NaHCO₃水溶液(20 mL)及鹽水(20 mL)洗滌，且經無水Na₂SO₄乾燥。過濾且濃縮後，殘餘物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**36a** (593 mg, 86%)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 1208.3。

製備化合物**36b**

在室溫下向化合物**36a** (593 mg, 0.49 mmol)於THF (8 mL)中之溶液中添加哌啶(1 mL)。攪拌20分鐘後，在減壓下濃縮反應混合物。所得殘餘物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**36b** (166 mg, 44%)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 763.9。

製備化合物**36c**

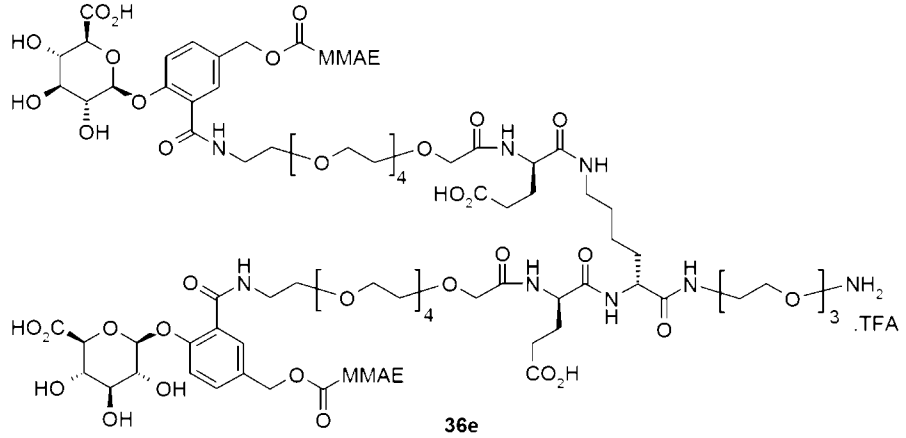
將DIPEA (0.15 mL, 0.84 mmol)及HBTU (247 mg, 0.63 mmol)添加至攪拌之化合物**36b** (166 mg, 0.21 mmol)及化合物**25b** (147 mg, 0.441 mmol)於DMF (3 mL)中之混合物。在N₂下在室溫下攪拌14小時後，將反應混合物傾倒至H₂O (30 mL)中且用EtOAc (3×30 mL)萃取。合併之有機層先後用1 N HCl水溶液(10 mL)、飽和NaHCO₃水溶液(10 mL)及鹽水(10 mL)洗滌，且經無水Na₂SO₄乾燥。過濾且濃縮後，殘餘物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**36c** (195 mg, 68%)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 1370.6。

製備化合物**36d**

向化合物**36c** (195 mg, 0.14 mmol)於MeOH (10 mL)中之溶液中添加Pd/C (10 wt. %, 30 mg)。接著反應混合物在氫氣下在室溫下攪拌90分鐘。反應混合物經矽藻土墊過濾且用MeOH (30 mL)洗滌。濃縮濾液，產

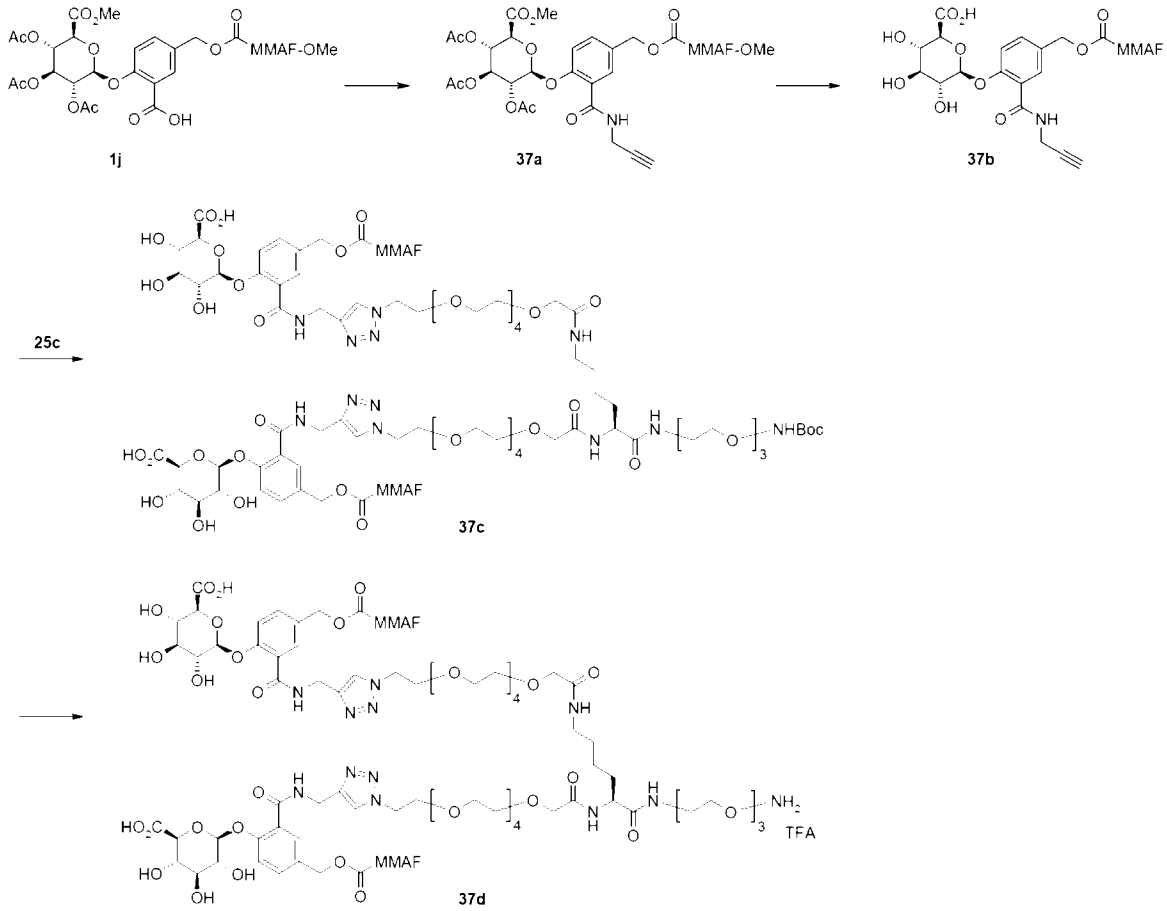
生化合物**36d** (187 mg, 100%), 其未經進一步純化即使用。EI-MS m/z : $[M+H]^+$ 1318.6。

製備化合物**36e**



化合物**36e**係藉由實例35中製備化合物**25e**之類似方法，自化合物**1i**及化合物**36d**製備。EI-MS m/z : $1/2[M+H]^+$ 1624.4。

實例55. 製備化合物**37d**



製備化合物**37a**

將DIPEA (0.083 mL, 0.71 mmol)及HBTU (136 mg, 0.36 mmol)添加至攪拌之炔丙基胺(0.018 mL, 0.285 mmol)及化合物**1j** (300 mg, 0.238 mmol)於DMF (3 mL)中之混合物。在N₂下在室溫下攪拌14小時後，將反應混合物傾倒至H₂O (10 mL)中且用EtOAc (3×10 mL)萃取。合併之有機層先後用1 N HCl水溶液(10 mL)、飽和NaHCO₃水溶液(10 mL)及鹽水(10 mL)洗滌，且經無水Na₂SO₄乾燥。過濾且濃縮後，所得殘餘物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**37a** (300 mg, 97%)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 1294.0。

製備化合物**37b**

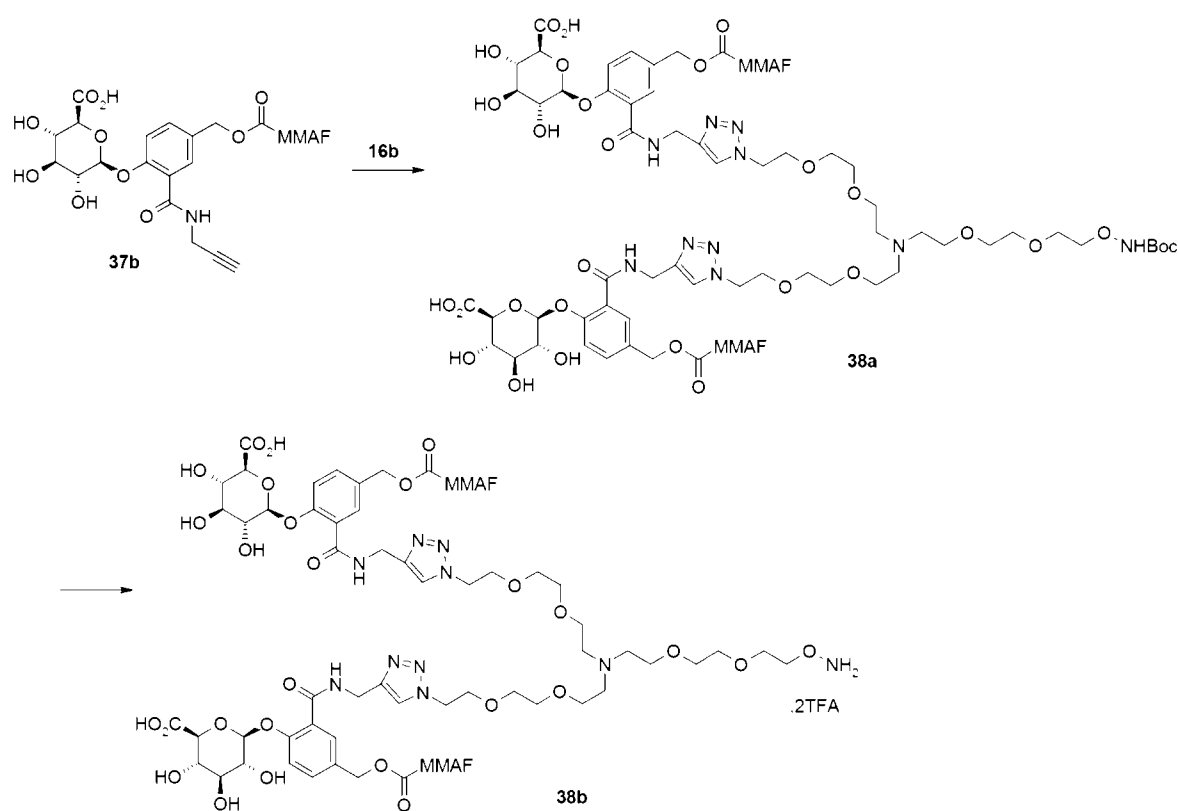
在0℃下向化合物**37a** (300 mg, 0.24 mmol)於THF (2 mL)及MeOH (2 mL)中之溶液中添加含LiOH單水合物(50 mg, 1.20 mmol)之H₂O (2 mL)。在0℃下攪拌2小時後，反應混合物使用乙酸中和且減壓濃縮。接著殘餘物溶於H₂O/DMSO (1.5 mL/1.5 mL)中且藉由HPLC來純化。將具有相同滯留時間之純溶離份合併且濃縮，產生化合物**37b** (165 mg, 60%)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 1140.8。

製備化合物**37c**

CuSO₄·5H₂O (1 mg)及抗壞血酸鈉(2 mg)添加至攪拌之化合物**37b** (50 mg, 0.042 mmol)及化合物**25c** (23 mg, 0.02 mmol)於THF (2 mL)及H₂O (2 mL)中之混合物。pH值藉由添加1 M Na₂CO₃水溶液調至約7。在20℃下攪拌1小時後，反應混合物溶於H₂O/DMSO (1.5 mL/1.5 mL)中且藉由HPLC來純化。將具有相同滯留時間之純溶離份合併且濃縮，產生化合物**37c** (32.4 mg, 48%)。EI-MS m/z: 1/2[M+H]⁺ 1638.2。

製備化合物**37d**

將TFA (0.4 mL)添加至化合物**37c** (32.4 mg, 0.01 mmol)於DCM (2 mL)中之溶液。在0℃下攪拌2小時後，溶劑及過量TFA藉由N₂流移除。接著殘餘物溶於H₂O/MeCN (1 mL/1 mL)中且藉由HPLC來純化。將具有相同滯留時間之純溶離份合併且凍乾，產生呈白色固體狀之化合物**37d** (19.6 mg, 62%)。EI-MS m/z : 1/2[M+H]⁺ 1590.2。

實例56. 製備化合物**38b**製備化合物**38a**

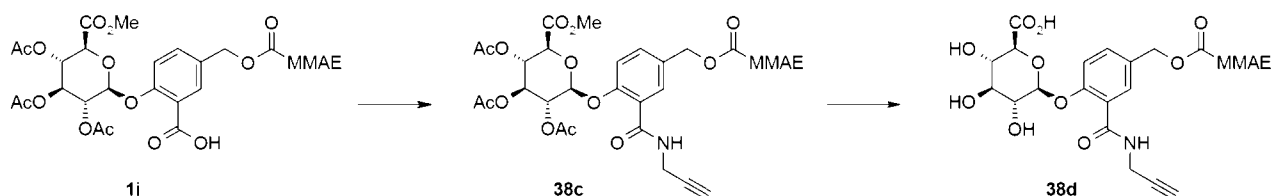
將CuSO₄·5H₂O (1 mg)及抗壞血酸鈉(2 mg)添加至攪拌之化合物**37b** (60 mg, 0.052 mmol)及化合物**16b** (14 mg, 0.025 mmol)於THF (2 mL)及H₂O (2 mL)中之混合物。pH值藉由添加1 M Na₂CO₃水溶液調至約7。在20℃下攪拌1小時後，反應混合物溶於H₂O/DMSO (1.5 mL/1.5 mL)中

且藉由HPLC來純化。將具有相同滯留時間之純溶離份合併且濃縮，產生化合物**38a** (61 mg, 82%)。EI-MS m/z : $1/2[M+H]^+$ 1430.2。

製備化合物**38b**

將TFA (0.4 mL)添加至化合物**38a** (59.8 mg, 0.02 mmol)於DCM (2.0 mL)中之溶液。在0°C下攪拌2小時後，溶劑及過量TFA藉由N₂流移除。接著殘餘物溶於H₂O/AN (1 mL/1 mL)中且藉由HPLC來純化。將具有相同滯留時間之純溶離份合併且凍乾，產生呈白色固體狀之化合物**38b** (14.6 mg, 24%)。EI-MS m/z : $1/2[M+H]^+$ 1380.1。

實例57. 製備化合物**38e**



製備化合物**38c**

將DIPEA (0.075 mL, 0.428 mmol)及HBTU (122 mg, 0.321 mmol)添加至攪拌之炔丙基胺(0.016 mL, 0.256 mmol)及化合物**1i** (264 mg, 0.214 mmol)於DMF (3 mL)中之混合物。在N₂下在室溫下攪拌14小時後，將反應混合物傾倒至H₂O (10 mL)中且用EtOAc (3×10 mL)萃取。合併之有機層先後用1 N HCl水溶液(10 mL)、飽和NaHCO₃水溶液(10 mL)及鹽水(10 mL)洗滌，且經無水Na₂SO₄乾燥。過濾且濃縮後，殘餘物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**38c** (270 mg, 100%)。EI-MS m/z : $[M+H]^+$ 1266.2。

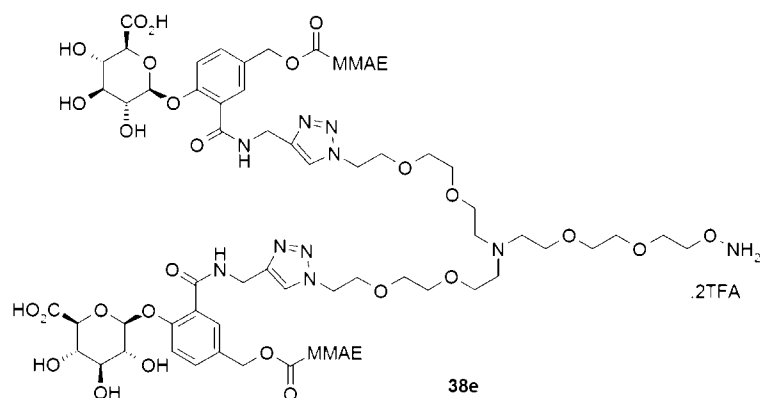
製備化合物**38d**

在0°C下向化合物**38c** (270 mg, 0.213 mmol)於THF (2 mL)及MeOH

(2 mL)中之溶液中添加含LiOH單水合物(36 mg, 0.853 mmol)之H₂O (2 mL)。在0℃下攪拌2小時後，反應混合物使用乙酸中和且減壓濃縮。接著殘餘物溶於H₂O/DMSO (1.5 mL/1.5 mL)中且藉由HPLC來純化。將具有相同滯留時間之純溶離份合併且濃縮，產生化合物**38d** (168 mg, 70%)。

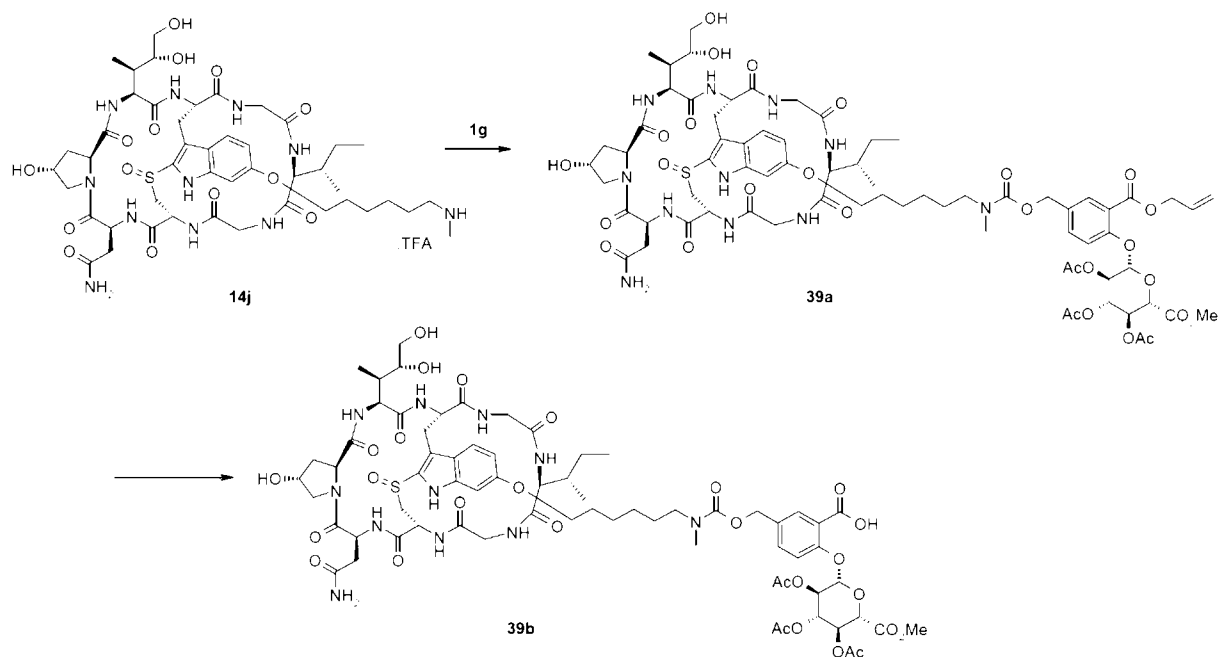
EI-MS m/z : $[M+H]^+$ 1126.1。

製備化合物**38e**



化合物**38e**係藉由實例56中製備化合物**38b**之類似方法，自化合物**38d**及化合物**16b**製備。EI-MS m/z : $1/2[M+H]^+$ 1366.2。

實例58. 製備化合物**39e**

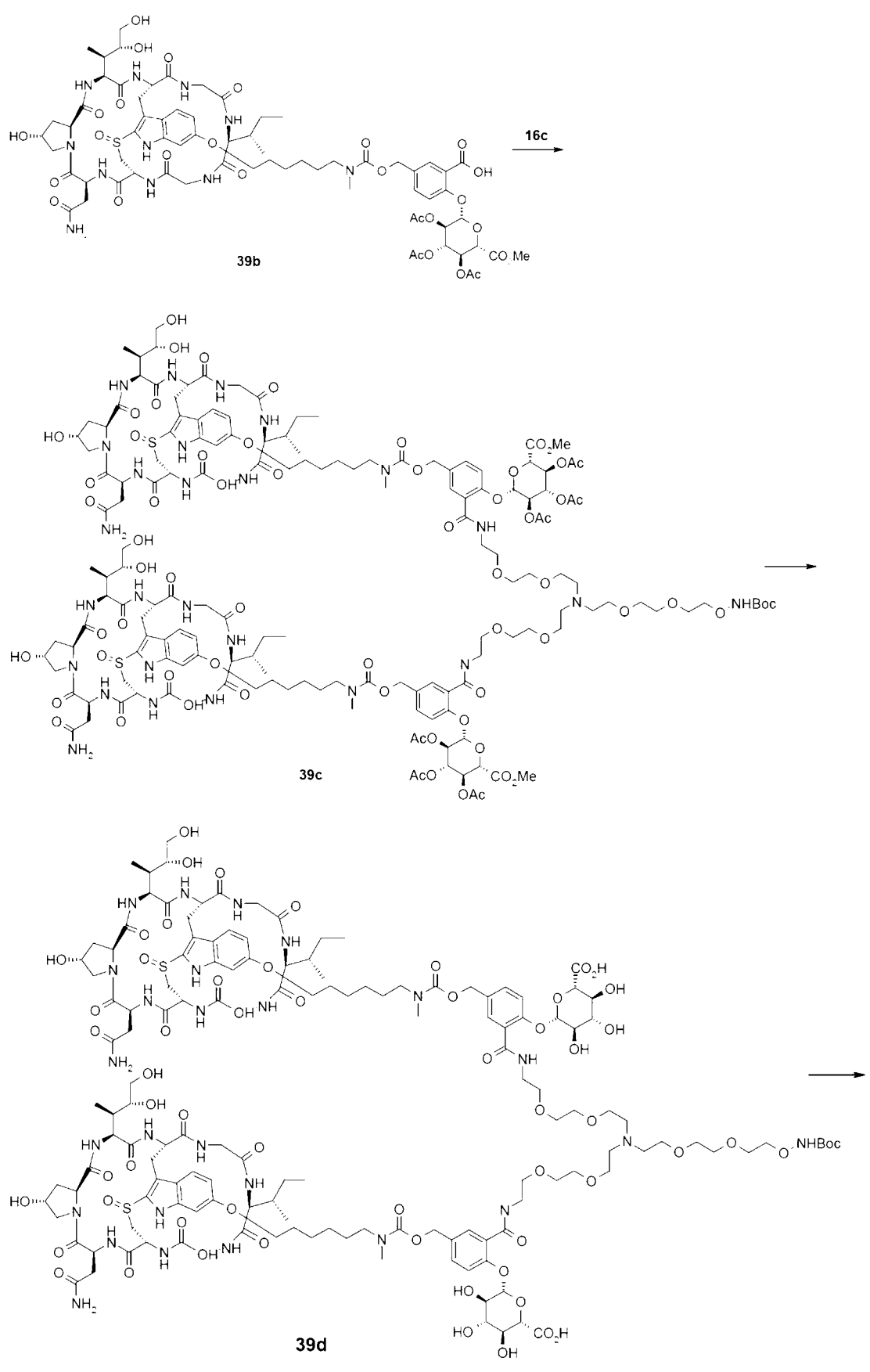


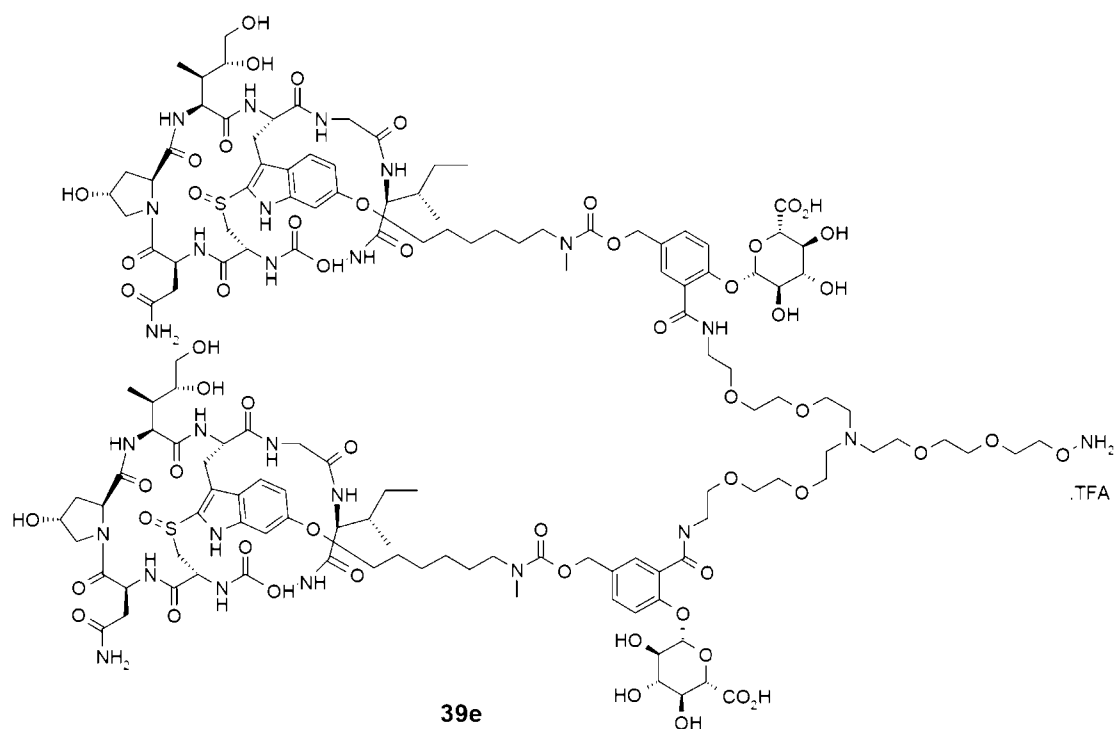
製備化合物**39a**

在0℃下化合物**1g** (27 mg, 0.039 mmol)、化合物**14j** (45 mg, 0.039 mmol)及無水HOBt (1 mg, 0.0078 mmol)溶於DMF (2 mL)中。接著添加吡啶(0.2 mL)及DIPEA (0.014 mL, 0.078 mmol)。在N₂下在0℃下攪拌24小時至室溫後，反應混合物溶於DMSO (1 mL)中且藉由HPLC來純化，產生呈白色固體狀之化合物**39a** (36 mg, 58%)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 1582.9, [M+Na]⁺ 1604.5。

製備化合物**39b**

化合物**39a** (35 mg, 0.022 mmol)及三苯基膦(1.5 mg, 0.005 mmol)溶於DCM (2 mL)中。在室溫下將吡咯啉(0.0025 mL, 0.026 mmol)及Pd(PPh₃)₄ (1.3 mg, 0.001 mmol)添加至反應混合物且接著攪拌2小時。將反應混合物用H₂O (50 mL)稀釋且用正丁醇(2×50 mL)萃取。合併之有機層經無水MgSO₄乾燥，在減壓下蒸發。所得殘餘物溶於DMSO (1 mL)中且藉由HPLC來純化，產生呈白色固體狀之化合物**39b** (34 mg, 粗)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ : 1542.7。





製備化合物**39c**

將 DIPEA (0.0026 mL, 0.039 mmol) 及 PyBOP (4.7 mg, 0.023 mmol) 添加至攪拌之化合物**39b** (15 mg, 0.009 mmol) 及化合物**16c** (2.0 mg, 0.0038 mmol) 於 DMF (0.3 mL) 中之混合物。在 N₂ 下在室溫下攪拌 13 小時後，反應混合物溶於 DMSO (1.5 mL) 中且藉由 HPLC 來純化，產生呈白色固體狀之化合物**39c** (12 mg, 35%)。EI-MS m/z : $1/2[M+H]^+$ 1788.5。

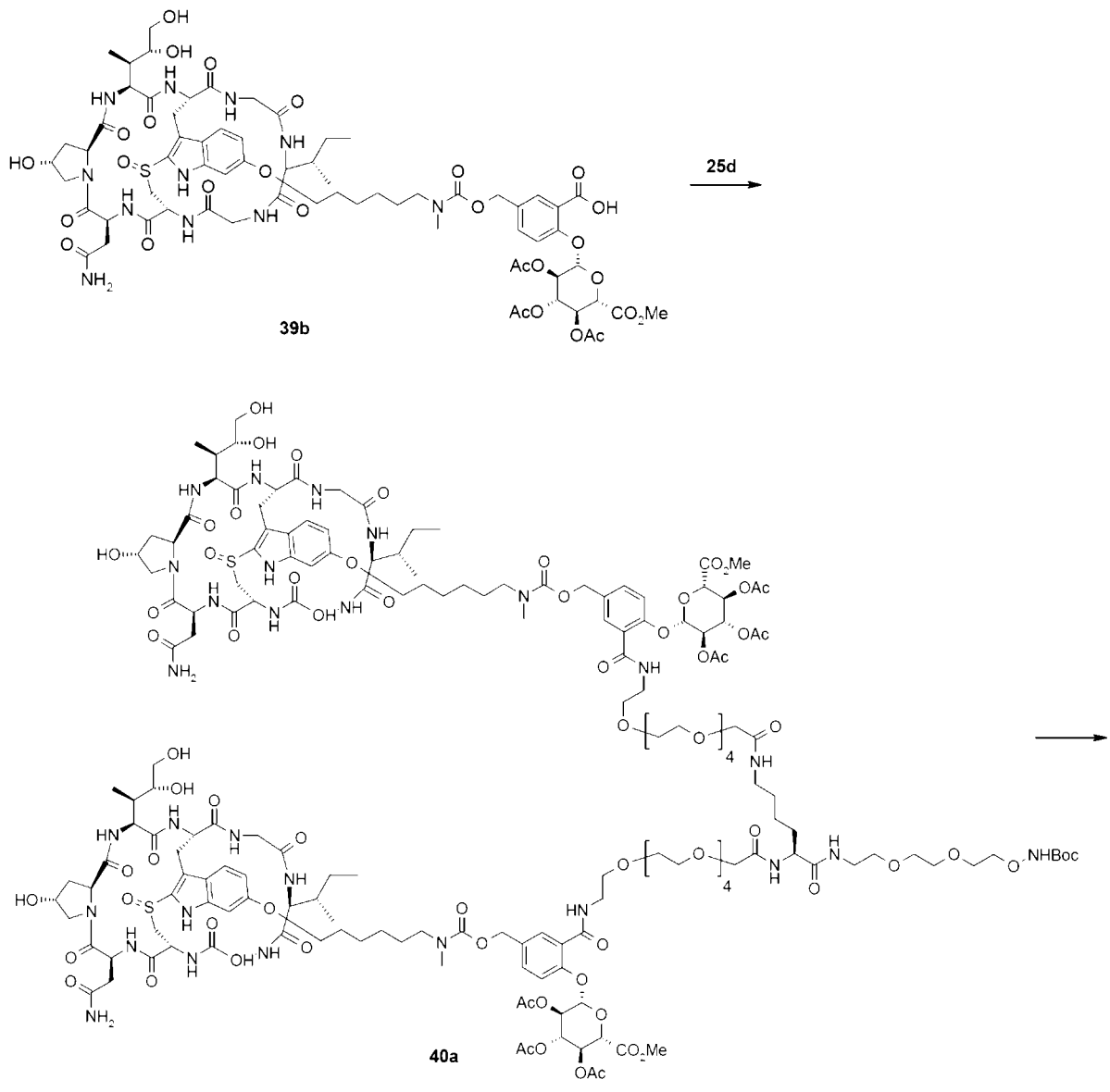
製備化合物**39d**

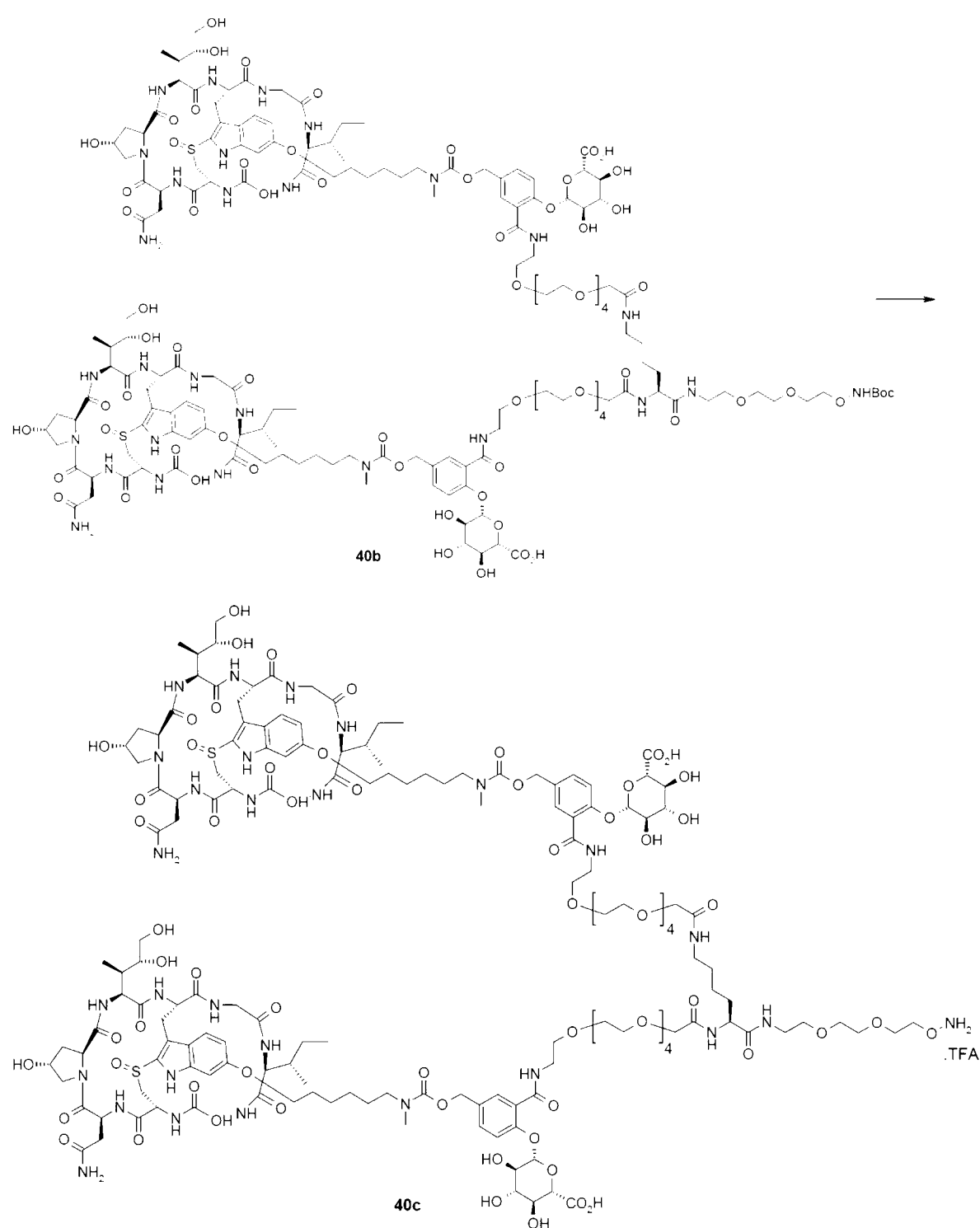
在 0°C 下向化合物**39c** (12 mg, 0.0033 mmol) 於 MeOH (1 mL) 中之溶液中添加含 LiOH 單水合物 (1.4 mg, 0.033 mmol) 之 H₂O (1 mL)。在 0°C 下 2 小時後，溶液 pH 值用乙酸調至 4~5，且在減壓下濃縮反應混合物。所得殘餘物溶於 DMSO (1.5 mL) 中且藉由 HPLC 來純化，產生化合物**39d** (11 mg, 98%)。EI-MS m/z : $1/2[M+H]^+$ 1648.6。

製備化合物**39e**

在0℃下將TFA (0.5 mL)添加至攪拌之化合物**39d** (11 mg，0.003 mmol)於DCM (3.0 mL)中之溶液。在0℃下2小時後，溶劑及過量TFA藉由N₂流移除。接著殘餘物溶於DMSO (1 mL)中且藉由HPLC來純化，產生呈白色固體狀之化合物**39e** (1.2 mg，11%)。EI-MS m/z: 1/2[M+H]⁺ 1598.3。

實例59. 製備化合物40c





製備化合物**40a**

將DIPEA (0.004 mL , 0.021 mmol)及HBTU (5.0 mg , 0.013 mmol)添加至攪拌之化合物**39b** (20 mg , 0.012 mmol)及化合物**25d** (5.0 mg , 0.005 mmol)於DMF (1.5 mL)中之混合物。在N₂下在室溫下攪拌14小時

後，反應混合物溶於DMSO (1.0 mL)中且藉由HPLC來純化，產生化合物**40a** (14.5 mg, 30%)。EI-MS m/z : $1/2[M+H]^+$ 1998.8。

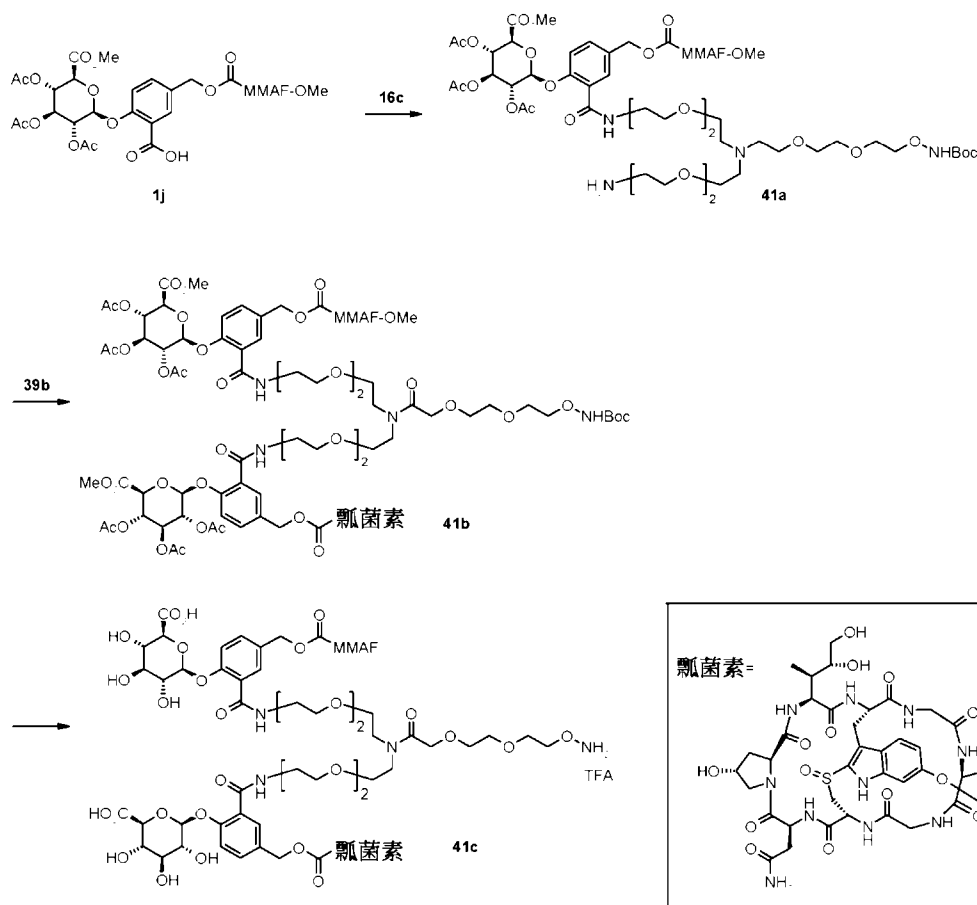
製備化合物**40b**

在0°C下向化合物**40a** (10 mg, 0.0025 mmol)於MeOH (1 mL)中之溶液中添加含LiOH單水合物(1.0 mg, 0.025 mmol)之H₂O (1 mL)。在0°C下2小時後，反應混合物使用乙酸中和且減壓濃縮。接著殘餘物溶於DMSO (1.5 mL)中且藉由HPLC來純化，產生化合物**40b** (6.9 mg, 74%)。EI-MS m/z : $1/2[M+H]^+$ 1858.3。

製備化合物**40c**

將TFA (0.2 mL)添加至攪拌之化合物**40b** (6.9 mg, 0.0018 mmol)於DCM (2.0 mL)中之溶液。在0°C下攪拌2小時後，溶劑及過量TFA藉由N₂流移除。接著殘餘物溶於DMSO (1 mL)中且藉由HPLC來純化。將具有相同滯留時間之純溶離份合併且凍乾，產生呈白色固體狀之化合物**40c** (1.5 mg, 23%)。EI-MS m/z : $1/2[M+H]^+$ 1808.6。

實例60. 製備化合物**41c**



製備化合物**41a**

將DIPEA (0.116 mL, 0.66 mmol)及PyBOP (127 mg, 0.24 mmol)添加至攪拌之化合物**16c** (280 mg, 0.22 mmol)及化合物**1j** (587 mg, 1.10 mmol)於DMF (10 mL)中之混合物。在N₂下在室溫下攪拌2小時後，將反應混合物用H₂O (200 mL)稀釋且用EtOAc (2×100 mL)萃取。合併之有機層經無水MgSO₄乾燥，過濾且濃縮。粗產物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**41a** (250 mg, 64%)。EI-MS *m/z*: 1/2[M+H]⁺ 883.2, [M+H]⁺ 1766。

製備化合物**41b**

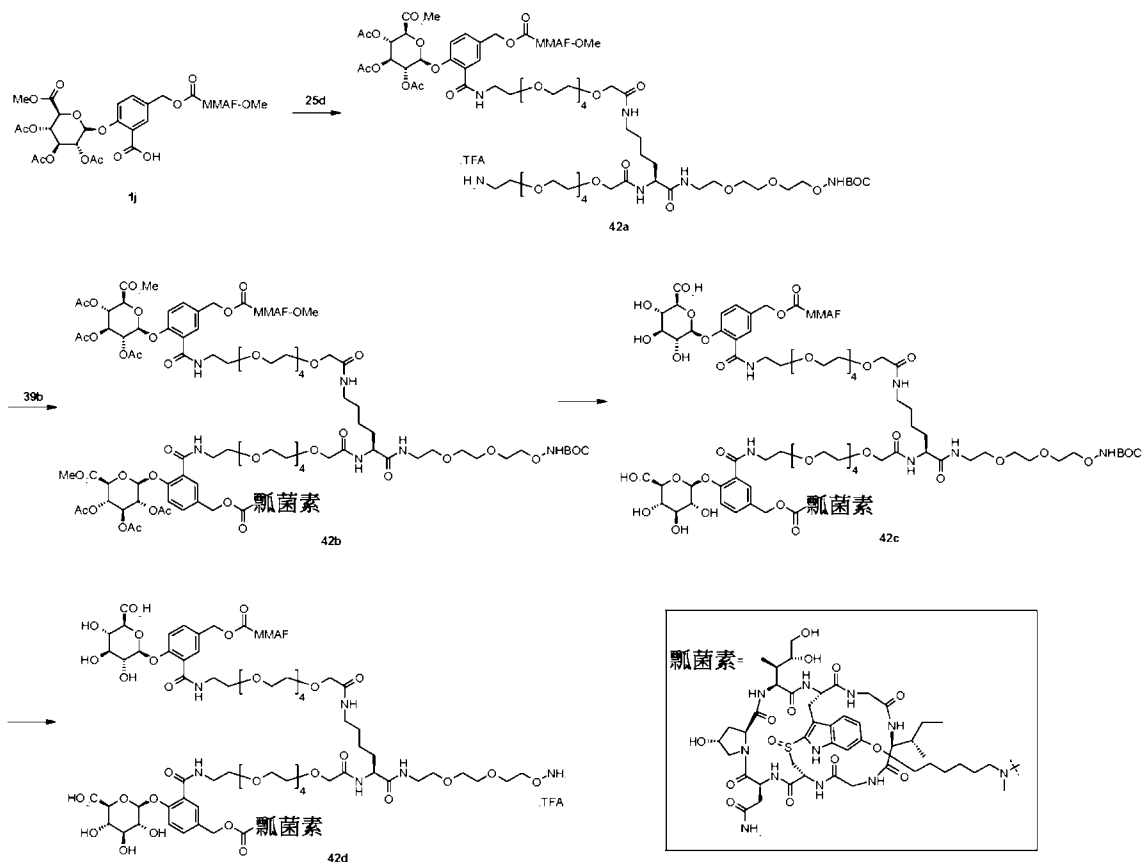
將DIPEA (0.0017 mL, 0.0096 mmol)及PyBOP (2.0 mg, 0.0038 mmol)添加至攪拌之化合物**41a** (5.7 mg, 0.0032 mmol)及化合物**39b** (5.0 mg, 0.0032 mmol)於DMF (0.5 mL)中之混合物。在N₂下在室溫下攪拌3

小時後，反應混合物溶於MeCN (1 mL)中且藉由HPLC來純化，產生化合物**41b** (8.0 mg，75%)。EI-MS m/z : $1/2[M+H]^+$ 1645。

製備化合物**41c**

在0℃下向化合物**41b** (8.0 mg，0.0024 mmol)於MeOH (0.5 mL)中之溶液中添加含LiOH單水合物(1.2 mg，0.028 mmol)之H₂O (0.1 mL)。在0℃下2小時後，反應混合物使用2 N HCl水溶液中中和且減壓濃縮。將所得殘餘物用DCM (2 mL)及H₂O (3滴)稀釋。接著在0℃下添加TFA (0.1 mL)。在0℃下2小時後，溶劑及過量TFA藉由N₂流移除。接著殘餘物溶於DMSO (1 mL)中且藉由HPLC來純化。將具有相同滯留時間之純溶離份合併且凍乾，產生呈白色固體狀之化合物**41c** (3.1 mg，44%)。EI-MS m/z : $1/2[M+H]^+$ 1448, $1/2[M+Na]^+$ 1459。

實例61. 製備化合物**42d**



製備化合物**42a**

將DIPEA (0.026 mL, 0.23 mmol)及HBTU (22 mg, 0.06 mmol)添加至攪拌之化合物**1j** (60 mg, 0.048 mmol)及化合物**25d** (214 mg, 0.19 mmol)於DMF (3 mL)中之混合物。在N₂下在室溫下攪拌14小時後，反應混合物溶於DMSO (1.0 mL)中且藉由HPLC來純化，產生化合物**42a** (64 mg, 58%)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 2286.8。

製備化合物**42b**

將DIPEA (0.011 mL, 0.06 mmol)及HBTU (14 mg, 0.036 mmol)添加至攪拌之化合物**42a** (68 mg, 0.03 mmol)及化合物**39b** (46 mg, 0.03 mmol)於DMF (3 mL)中之混合物。在N₂下在室溫下攪拌14小時後，反應混合物溶於DMSO (1.0 mL)中且藉由HPLC來純化，產生化合物**42b** (60 mg, 52%)。EI-MS m/z: 1/2[M+H]⁺ 1906.3。

製備化合物**42c**

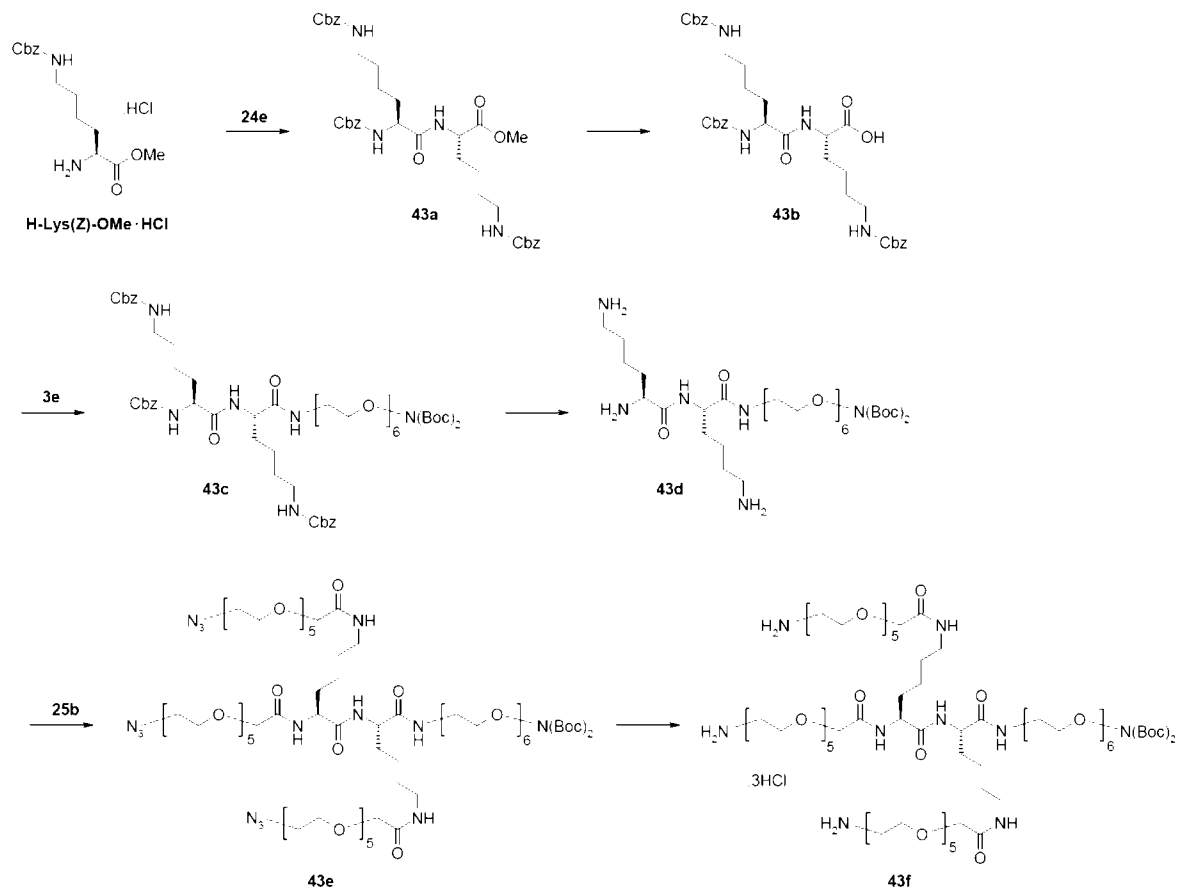
在0°C下向化合物**42b** (60 mg, 0.016 mmol)於MeOH (2 mL)中之溶液中添加含LiOH單水合物(5 mg, 0.126 mmol)之H₂O (2 mL)。在0°C下2小時後，反應混合物使用乙酸中和且減壓濃縮。接著殘餘物溶於DMSO (1 mL)中且藉由製備型HPLC來純化，產生化合物**42c** (37 mg, 65%)。EI-MS m/z: 1/2[M+H]⁺ 1759.3。

製備化合物**42d**

將TFA (0.3 mL)添加至攪拌之化合物**42c** (37 mg, 0.01 mmol)於DCM (3 mL)中之溶液。在0°C下攪拌2小時後，溶劑及過量TFA藉由N₂流移除。接著殘餘物溶於DMSO (1 mL)中且藉由HPLC來純化。將具有相同滯留時間之純溶離份合併且凍乾，產生呈白色固體狀之化合物**42d** (15

mg, 45%)。EI-MS m/z : $1/2[M+H]^+$ 1659.6。

實例62. 製備化合物43i



製備化合物43a

將DIPEA (10.4 mL, 23.8 mmol)及HBTU (13.5 g, 35.7 mmol)添加至攪拌之H-Lys(z)-OMe鹽酸鹽(7.0 g, 23.8 mmol)及化合物24e (9.86 mg, 23.8 mmol)於DMF (50 mL)中之混合物。在N₂下在室溫下攪拌8小時後，反應混合物用水(100 mL)稀釋且用EtOAc (3×50 mL)萃取。合併之有機層先後用0.5 N HCl水溶液(50 mL)、飽和NaHCO₃水溶液(50 mL)及鹽水(50 mL)洗滌，且經無水Na₂SO₄乾燥。過濾及減壓濃縮後，所得粗產物藉由管柱層析法來純化，產生化合物43a (9.3 g, 57%)。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.22 (d, 1H), 7.37-7.29 (m, 15H), 7.22 (m, 2H), 5.00 (s, 6H), 4.18 (m, 1H), 4.00 (m, 1H), 3.59 (s, 3H), 2.96 (m, 4H), 1.67-

1.50 (m, 4H), 1.38-1.29 (m, 4H), 1.19-1.18 (m, 4H) 。 EI-MS m/z : $[M+Na]^+$ 712.96 。

製備化合物**43b**

在0℃下在N₂下向化合物**43a** (9.3 g, 13.5 mmol)於THF:MeOH:H₂O (60 mL:30 mL:30 mL)中之溶液中添加LiOH單水合物(1.13 g, 26.9 mmol)。2小時後，將反應混合物用1 N HCl水溶液酸化直至pH 4，且用EtOAc (3×100 mL)萃取。合併之有機層經無水Na₂SO₄乾燥。過濾且減壓濃縮，得到化合物**43b** (9.1 g, 粗)，其未經進一步純化即使用。EI-MS m/z : $[M+H]^+$ 677.48, $2[M+H]^+$ 1353.82 。

製備化合物**43c**

將DIPEA (1.47 mL, 8.44 mmol)、HOBt (484 mg, 3.58 mmol)及EDC·HCl (809 mg, 4.22 mmol)添加至攪拌之化合物**43b** (2.5 g, 3.71 mmol)及化合物**3e** (1.8 g, 3.38 mmol)於DMF (20 mL)中之混合物。在N₂下在室溫下攪拌14小時後，將反應混合物傾倒至水(50 mL)且用EtOAc (3×50 mL)萃取。合併之有機層先後用0.5 N HCl水溶液(50 mL)、飽和NaHCO₃水溶液(50 mL)及鹽水(50 mL)洗滌，且經無水Na₂SO₄乾燥。過濾及減壓濃縮後，所得殘餘物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**43c** (2.3 g, 59%)。EI-MS m/z : $[M+H]^+$ 1155.92, $[M+H-Boc]^+$ 1055.83 。

製備化合物**43d**

向攪拌之化合物**43c** (2.3 g, 1.99 mmol)及Pd/C (10 wt. % , 424 mg, 3.98 mmol)於MeOH (200 mL)中之混合物添加HCl (4 N 1,4-二噁烷溶液, 0.99 mL, 3.98 mmol)。在氫氣下在室溫下攪拌2小時後，反應混合物經矽藻土墊過濾且用MeOH (100 mL)洗滌。濃縮濾液，產生化合物

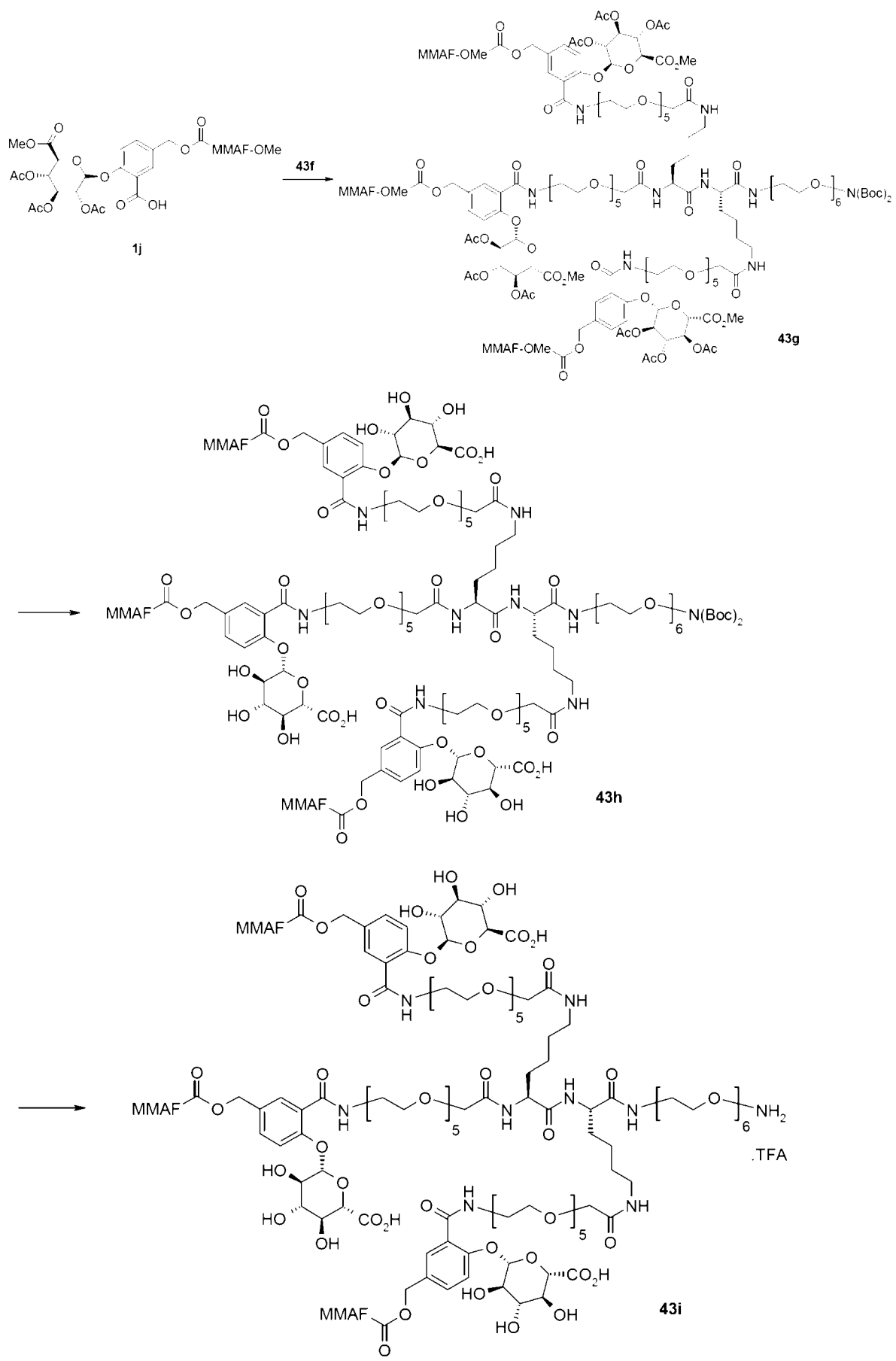
43d (1.5 g, 粗), 其未經進一步純化即使用。EI-MS m/z : $[M+H]^+$ 753.29。

製備化合物**43e**

將DIPEA (0.14 mL, 0.80 mmol)、HOBt (59 mg, 0.43 mmol)及EDC·HCl (102 mg, 0.53 mmol)添加至攪拌之化合物**43d** (2.5 g, 3.71 mmol)及化合物**25b** (150 g, 0.46 mmol)於DMF (5 mL)中之混合物。在 N_2 下在室溫下攪拌14小時後, 將反應混合物傾倒至水(50 mL)且用EtOAc (3×50 mL)萃取。合併之有機層先後用1 N HCl水溶液(30 mL)、飽和 $NaHCO_3$ 水溶液(30 mL)及鹽水(30 mL)洗滌, 且經無水 Na_2SO_4 乾燥。過濾及減壓濃縮後, 所得粗產物藉由管柱層析法來純化, 產生呈無色油狀之化合物**43e** (100 mg, 45%)。EI-MS m/z : $[M+Na]^+$ 1685.11, $1/2[M+H-Boc]^+$ 731.82。

製備化合物**43f**

向攪拌之化合物**43e** (100 mg, 0.06 mmol)及Pd/C (10 wt. %, 20 mg 0.192 mmol)於MeOH (20 mL)中之混合物添加HCl (4 N 1,4-二噁烷溶液, 0.045 mL, 0.18 mmol)。在氫氣下在室溫下攪拌2小時後, 反應混合物經矽藻土墊過濾且用MeOH (30 mL)洗滌。濃縮濾液, 產生呈棕色泡沫狀之化合物**43f** (95 mg), 其未經進一步純化即使用。EI-MS m/z : $[M+H]^+$ 1586.30, $1/2[M+H]^+$ 793.02。



製備化合物**43g**

將DIPEA (0.030 mL, 0.170 mmol)及HBTU (36 mg, 0.094 mmol)添加至攪拌之化合物**43f** (45 mg, 0.028 mmol)及化合物**1j** (114 mg, 0.091 mmol)於DMF (3 mL)中之混合物。在N₂下在室溫下攪拌16小時後，反應混合物溶於H₂O/DMSO (1.5 mL/1.5 mL)中且藉由HPLC來純化。將具有相同滯留時間之純溶離份合併且濃縮，產生化合物**43g** (31 mg, 21%)。EI-MS m/z: 1/3[M+H-Boc]⁺ 1705.74, 1/4[M+H-2Boc]⁺ 1254.79。

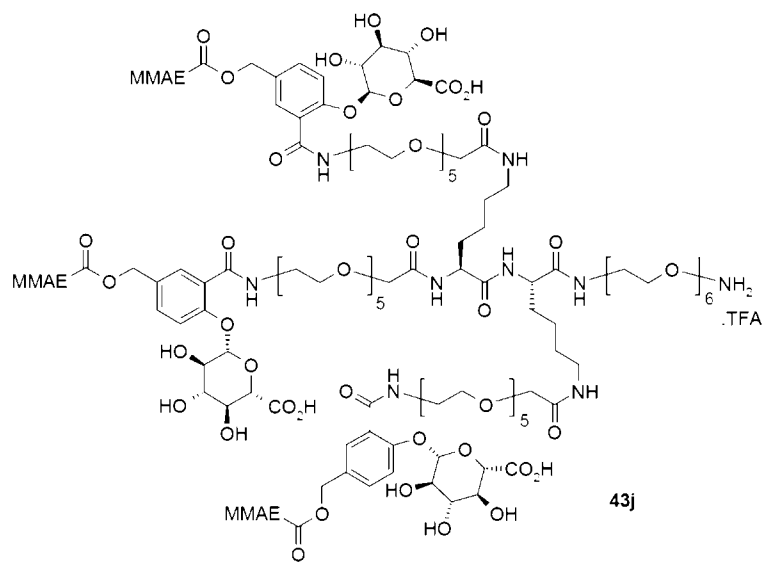
製備化合物**43h**

在-20°C下向化合物**43g** (31 mg, 0.006 mmol)於MeOH (1 mL)中之溶液中添加含LiOH單水合物(3.7 mg, 0.088 mmol)之H₂O (1 mL)。在-20°C下攪拌2小時後，反應混合物使用乙酸中和且減壓濃縮。接著反應混合物溶於H₂O/DMSO (1.5 mL/1.5 mL)中且藉由HPLC來純化，產生呈白色固體狀之化合物**43h** (18 mg, 64%)。EI-MS m/z: 1/3[M+H-Boc]⁺ 1735.19, 1/4[M+H]⁺ 1301.95, 1/5[M+H-Boc]⁺ 1021.71。

製備化合物**43i**

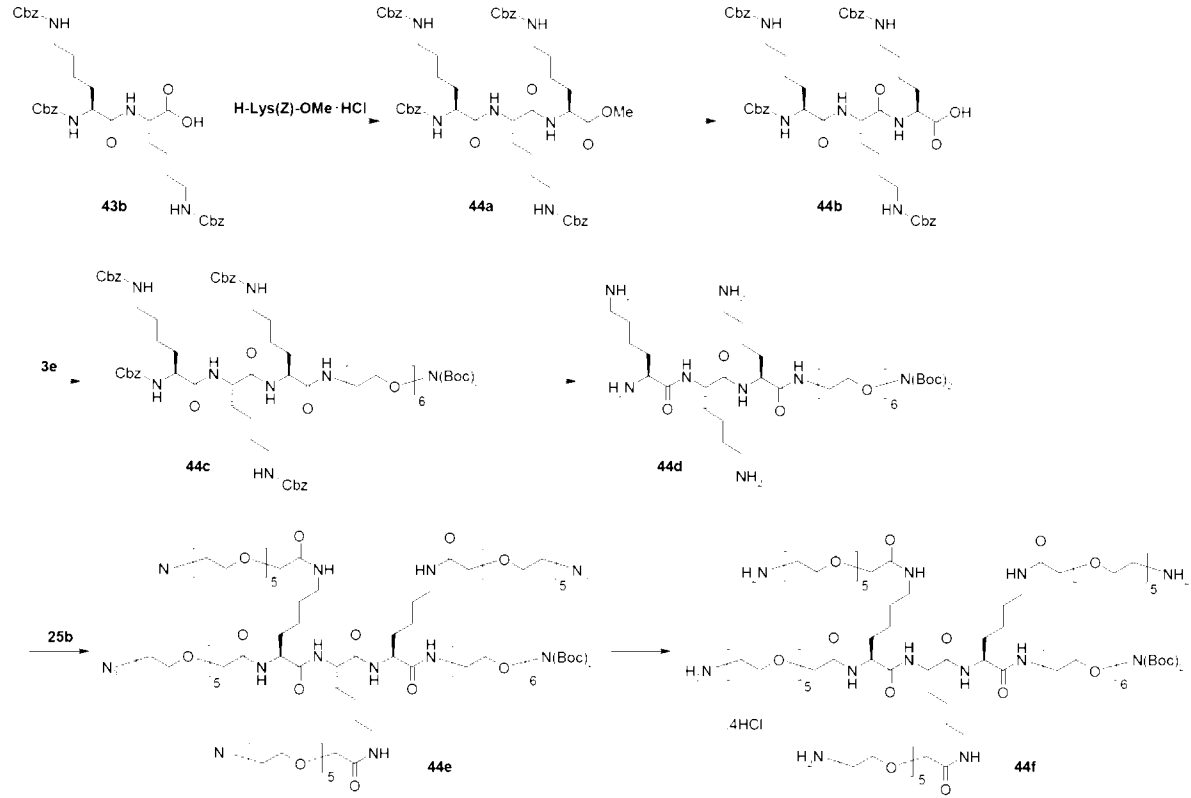
在0°C下將TFA (0.3 mL)添加至攪拌之化合物**43h** (18 mg, 0.004 mmol)於DCM (1.0 mL)中之溶液。攪拌1小時後，溶劑及過量TFA藉由N₂流移除。接著殘餘物溶於H₂O/MeCN (1 mL/1 mL)中且藉由HPLC來純化。將具有相同滯留時間之純溶離份合併且凍乾，產生呈白色固體狀之化合物**43i** (6 mg, 33%)。EI-MS m/z: 1/3[M+H]⁺ 1547.75, 1/4[M+H]⁺ 1161.14。

實例63. 製備化合物**43j**



化合物**43j**係藉由實例62中製備化合物**43i**之類似方法，自化合物**1i**及化合物**43f**製備。EI-MS m/z: 1/3[M+H]⁺ 1532.37, 1/4[M+H]⁺ 1149.69。

實例64. 製備化合物44i



製備化合物**44a**

將DIPEA (1.9 mL，11.0 mmol)及HBTU (2.5 g，6.64 mmol)添加至攪拌之化合物H-Lys(z)-OMe鹽酸鹽(1.3 g，4.43 mmol)及化合物**43b** (3.0

g, 4.43 mmol)於DMF (30 mL)中之混合物。在N₂下在室溫下攪拌14小時後，反應混合物用水(100 mL)稀釋且用EtOAc (3×50 mL)萃取。合併之有機層用0.5 N HCl水溶液(50 mL)、飽和NaHCO₃水溶液(50 mL)及鹽水(50 mL)洗滌，且經無水Na₂SO₄乾燥。過濾及減壓濃縮後，所得殘餘物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**44a** (3.9 g, 93%)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 953.42。

製備化合物**44b**

在室溫下在N₂下向化合物**44a** (2.1 g, 2.20 mmol)於THF:MeOH:H₂O (24 mL:8 mL:8 mL)中之溶液中添加LiOH單水合物(185 mg, 4.40 mmol)。2小時後，將反應混合物用1 N HCl水溶液酸化直至pH 4，且用EtOAc (3×50 mL)萃取。合併之有機層經無水Na₂SO₄乾燥。過濾且減壓濃縮，得到化合物**44b** (2.0 g)，其未經進一步純化即使用。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 939.35, [M+Na]⁺ 961.37。

製備化合物**44c**

將DIPEA (0.93 mL, 5.33 mmol)及HBTU (1.21 g, 3.20 mmol)添加至攪拌之化合物**44b** (2.0 g, 2.13 mmol)及化合物**3e** (1.14 g, 2.13 mmol)於DMF (20 mL)中之混合物。在N₂下在室溫下攪拌14小時後，將反應混合物傾倒至水(50 mL)且用EtOAc (3×50 mL)萃取。合併之有機層先後用0.5 N HCl水溶液(50 mL)、飽和NaHCO₃水溶液(50 mL)及鹽水(50 mL)洗滌，且經無水Na₂SO₄乾燥。過濾及減壓濃縮後，所得殘餘物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**44c** (2.60 g, 86%)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 1418.44, [M+Na]⁺ 1440.39, [M+H-Boc]⁺ 1318.47。

製備化合物**44d**

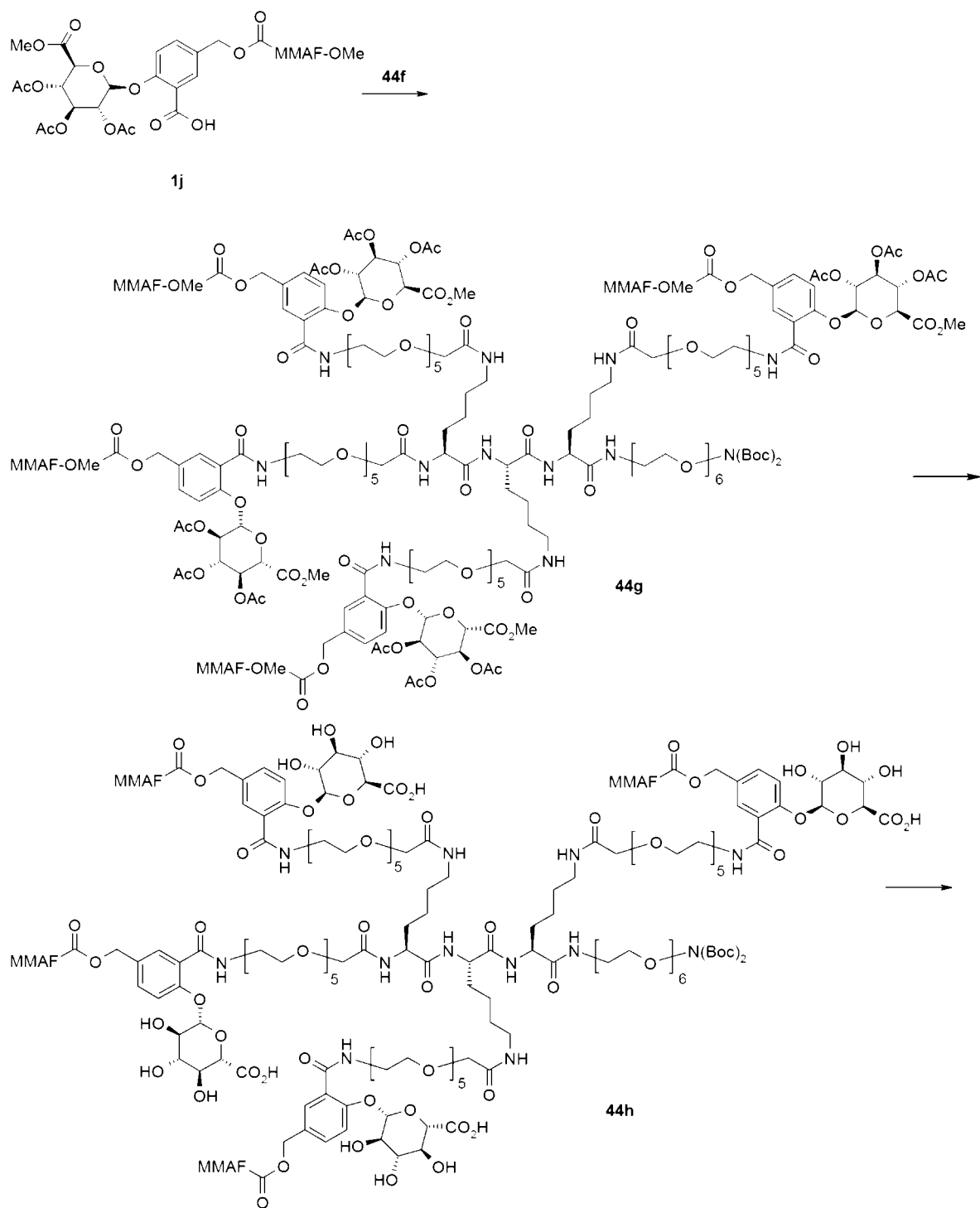
向攪拌之化合物**44c** (2.60 g, 1.83 mmol)及Pd/C (10 wt. %, 781 mg 7.34 mmol)於MeOH (50 mL)中之混合物添加HCl (4 N 1,4-二噁烷溶液, 0.9 mL, 3.67 mmol)。且接著反應在氫氣下在室溫下攪拌2小時。反應混合物經矽藻土墊過濾且用MeOH (50 mL)洗滌。濃縮濾液, 產生呈黃色泡沫狀之化合物**44d** (1.73 g), 其未經進一步純化即使用。EI-MS m/z : $[M+H]^+$ 881.90。

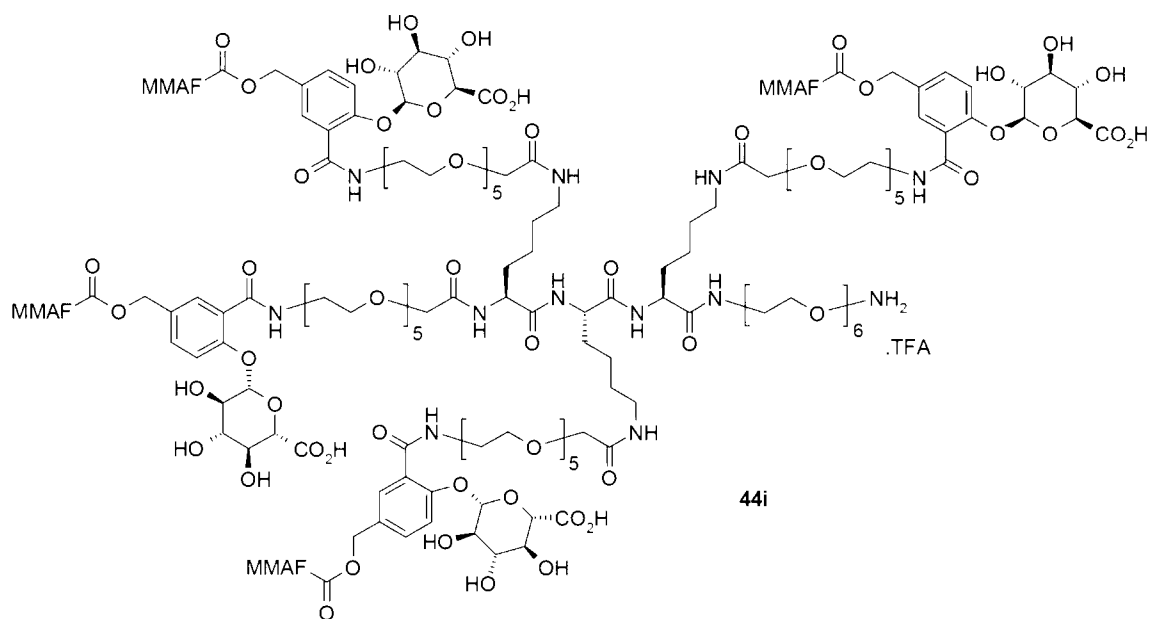
製備化合物**44e**

將DIPEA (1.58 mL, 9.08 mmol)及HBTU (2.58 g, 6.81 mmol)添加至攪拌之化合物**44d** (1.0 g, 1.13 mmol)及化合物**25b** (1.82 g, 5.67 mmol)於DMF (20 mL)中之混合物。在N₂下在室溫下攪拌14小時後, 反應混合物用水(100 mL)稀釋且用EtOAc (3×50 mL)萃取。合併之有機層先後用0.5 N HCl (50 mL)、飽和NaHCO₃水溶液(50 mL)及鹽水(50 mL)洗滌, 且經無水Na₂SO₄乾燥。過濾且減壓濃縮後, 所得殘餘物藉由管柱層析法來純化, 產生化合物**44e** (848 mg, 36%)。EI-MS m/z : $1/2[M+H-2Boc]^+$ 947.63。

製備化合物**44f**

向攪拌之化合物**44e** (848 mg, 0.40mmol)及Pd/C (10 wt. %, 172 mg 1.62 mmol)於MeOH (50 mL)中之混合物添加HCl (4 N 1,4-二噁烷溶液, 0.4 mL, 1.62 mmol)。在氫氣下在室溫下攪拌2小時後, 反應混合物經矽藻土墊過濾且用MeOH (50 mL)洗滌。濃縮濾液, 產生化合物**44f** (625 mg, 粗), 其未經進一步純化即使用。EI-MS m/z : $1/2[M+H]^+$ 996.40, $1/3[M+H]^+$ 664.59





製備化合物44g

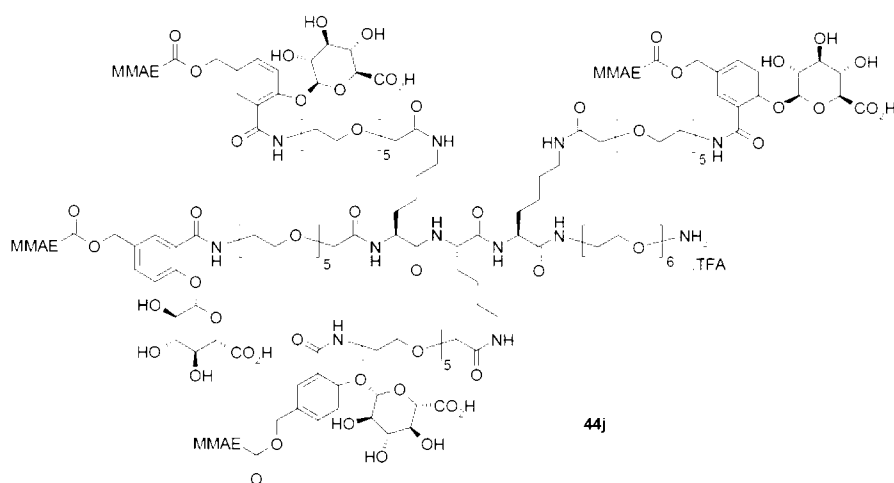
將DIPEA (0.067 mL, 0.386 mmol)及HBTU (110 mg, 0.289 mmol)添加至攪拌之化合物44f (96 mg, 0.048 mmol)及化合物1j (303 mg, 0.24 mmol)於DMF (3 mL)中之混合物。在N₂下在室溫下攪拌16小時後，反應混合物溶於H₂O/DMSO (1.5 mL/1.5 mL)中且藉由HPLC來純化。將具有相同滯留時間之純溶離份合併且濃縮，產生化合物44g (67 mg, 20%)。EI-MS m/z: 1/3[M+H]⁺ 2315.93, 1/4[M+H]⁺ 1737.60, 1/5[M+H]⁺ 1390.37。

製備化合物44h

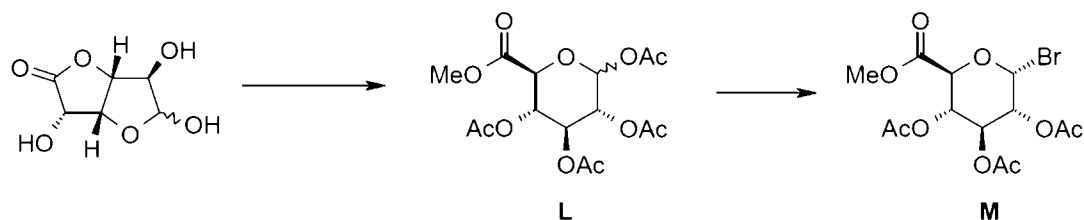
在-20℃下向化合物44g (67 mg, 0.009 mmol)於MeOH (1 mL)中之溶液中添加含LiOH單水合物(8.1 mg, 0.192 mmol)之H₂O (1 mL)。在-20℃下攪拌2小時後，反應混合物使用乙酸中和且減壓濃縮。接著反應混合物溶於H₂O/DMSO (1.5 mL/1.5 mL)中且藉由HPLC來純化，產生呈白色固體狀之化合物44h (27.9 mg, 45%)。EI-MS m/z: 1/3[M+H]⁺ 2110.24, 1/4[M+H]⁺ 1582.97, 1/4[M+H-Boc]⁺ 1557.91。

製備化合物**44i**

在0℃下將TFA (0.3 mL)添加至攪拌之化合物**44h** (27.9 mg, 0.004 mmol)於DCM (1.0 mL)中之溶液。攪拌1小時後，溶劑及過量TFA藉由N₂流移除。接著殘餘物溶於H₂O/MeCN (1 mL/1 mL)中且藉由HPLC來純化。將具有相同滯留時間之純溶離份合併且凍乾，產生呈白色固體狀之化合物**44i** (13.6 mg, 50%)。EI-MS m/z : $1/3[M+H]^+$ 2043.49, $1/4[M+H]^+$ 1532.96, $1/5[M+H]^+$ 1226.62。

實例65. 製備化合物**44j**

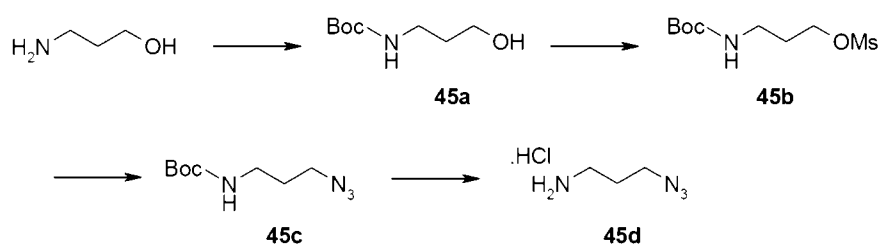
化合物**44j**係藉由實例64中製備化合物**44i**之類似方法，自化合物**1i**及化合物**44f**製備。EI-MS m/z : $1/3[M+H]^+$ 2025.37, $1/4[M+H]^+$ 1519.10, $1/5[M+H]^+$ 1215.60。

實例66. 製備化合物**45k**製備化合物**L**

在室溫下在氮氣下使D-葡萄糖醛酸基-6,3-內酯(25.0 g, 141.9 mmol)溶於MeOH (250 mL)中，且緩慢向其中添加NaOH (141 mg)於MeOH (100 mL)中之溶液。攪拌24小時後，在減壓下濃縮反應混合物，且接著在低於10℃下添加吡啶(66 mL)及乙酸酐(71 mL)。在室溫下攪拌4小時後，在減壓下濃縮反應混合物且進行管柱層析法，產生化合物**L** (41.6 g, 77%)。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 5.77 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.31 (t, *J* = 9.6 Hz, 1H), 5.24 (t, *J* = 9.6 Hz, 1H), 5.14 (m, 1H), 4.17 (d, *J* = 9 Hz, 1H), 3.74 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 2.04 (m, 9H)。

製備化合物**M**

在0℃下在氮氣下使化合物**L** (10.0 g, 26.6 mmol)溶於HBr (33%於AcOH中, 20 mL)中。反應混合物升溫至室溫。攪拌2小時後，向其中添加甲苯(50 mL)，且混合物在減壓下濃縮。所得殘餘物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**M** (10.9 g, 99%)。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 6.64 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 5.61 (t, *J* = 3.6 Hz, 1H), 5.24 (t, *J* = 3.6 Hz, 1H), 4.85 (m, 1H), 4.58 (d, d, *J* = 10.2 Hz, 1H), 3.76 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.05 (s, 3H)。



製備化合物**45a**

在0℃下在氮氣下使3-胺基-1-丙醇(3.0 g, 66.57 mmol)溶於DCM (150 mL)中，且向其中添加二碳酸二第三丁酯(16 g, 73.23 mmol)。所得

混合物在室溫下攪拌12小時。反應結束後，溶劑在減壓下濃縮。殘餘物進行管柱層析法，產生化合物**45a** (6.4 g, 92%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.78 (s, 1H), 3.65 (m, 2H), 3.30 (m, 2H), 2.90 (s, 1H), 1.68 (m, 2H), 1.48 (s, 9H)。

製備化合物**45b**

在0℃下在氮氣下使化合物**45a** (6.04 g, 34.47 mmol)及三乙胺(14.4 mL, 103.4 mmol)溶於THF中且接著緩慢用甲烷磺酸酐(7.21 g, 41.36 mmol)處理。所得混合物在室溫下在氮氣下攪拌12小時。反應結束後，溶劑在減壓下濃縮。殘餘物進行管柱層析法，產生化合物**45b** (9.01 g, 98%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.73 (s, 1H), 4.30 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 3.31-3.24 (m, 2H), 3.04 (s, 3H), 1.94 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 1.44 (s, 9H)。

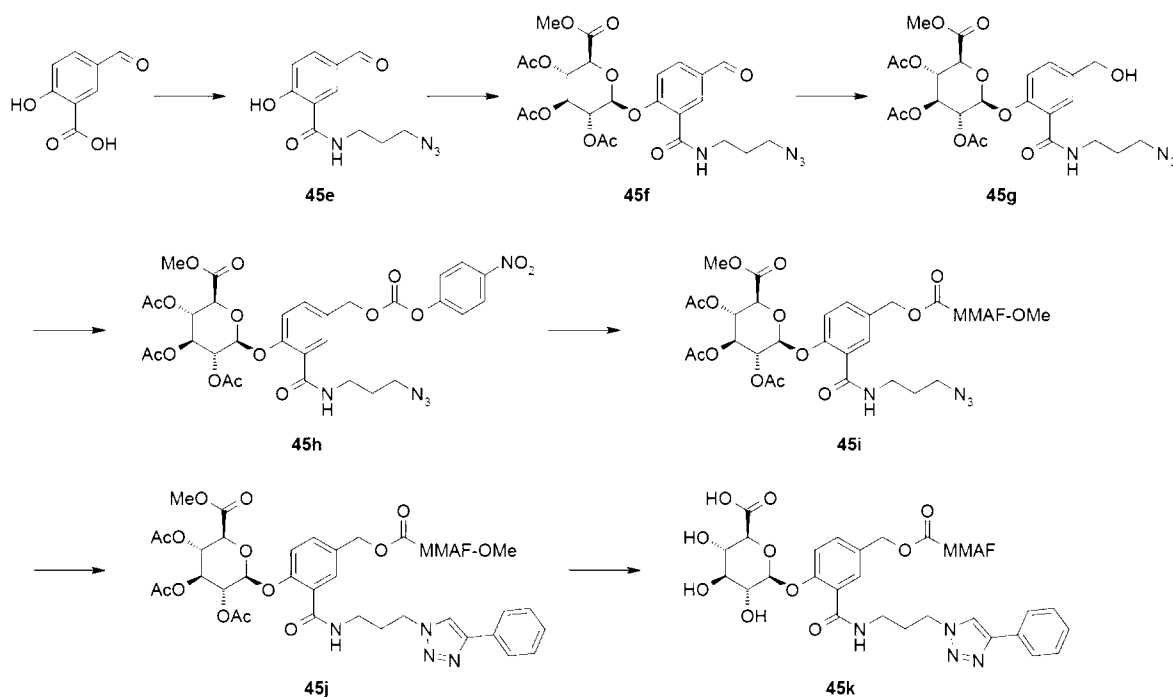
製備化合物**45c**

在室溫下在氮氣下化合物**45b** (3.0 g, 11.84 mmol)溶於DMF (40 mL)中，且接著用NaN₃ (924 mg, 14.21 mmol)處理，且所得混合物在60℃下攪拌12小時。反應結束後，向其中添加EtOAc (50 mL)、蒸餾水(50 mL)及1 N HCl水溶液(5 mL)。有機層經無水Na₂SO₄乾燥，過濾且減壓濃縮。殘餘物進行管柱層析法，產生化合物**45c** (2.3 g, 99%)。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 4.63 (s, 1H), 3.36 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.24-3.18 (m, 2H), 1.80-1.75 (m, 2H), 1.45 (s, 9H)。

製備化合物**45d**

在0℃下在氮氣下使化合物**45c** (3.8 g, 18.98 mmol)溶於DCM (10 mL)中，且接著緩慢向其中添加4 M-HCl之二噁烷溶液(10 mL)。攪拌12

小時後，在減壓下濃縮反應混合物，產生化合物**45d** (2.5 g, 99%)。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ 8.06 (s, 3H), 3.47 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.82 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.84-1.79 (m, 2H)。



製備化合物**45e**

在0°C下在氮氣下使化合物**45d** (58 mg, 0.42 mmol)及5-甲醯基水楊酸(100 mg, 0.60 mmol)溶於DMF (2 mL)中，且接著添加DIPEA (0.2 mL, 1.20 mmol)及PyBop (375 mg, 0.72 mmol)至反應混合物。在室溫下攪拌3小時後，向其中添加EtOAc (30 mL)及蒸餾水(10 mL)。有機層經無水Na₂SO₄乾燥，過濾且減壓濃縮。殘餘物進行管柱層析法，得到化合物**45e** (82 mg, 79%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 13.39 (s, 1H), 9.87 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 7.89 (dd, *J* = 1.6, 7.2 Hz, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.10 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 3.63-3.57 (m, 2H), 3.48 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 1.99-1.92 (m, 2H)。

製備化合物**45f**

在室溫下在氮氣下使化合物**45e** (78 mg, 0.31 mmol)及化合物**M** (125 mg, 0.31 mmol)溶於MeCN (3 mL)中，且接著向其中添加氧化銀 (291 mg, 1.26 mmol)及4 Å分子篩(125 mg)。在室溫下攪拌3小時後，混合物經矽藻土過濾，且濾液在減壓下濃縮。殘餘物進行管柱層析法，產生化合物**45f** (160 mg, 90%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 10.00 (s, 1H), 8.66 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.02 (dd, *J* = 2.0, 6.4 Hz, 1H), 7.46 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 7.14 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 5.48-5.33 (m, 4H), 4.28 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.73-3.64 (m, 1H), 3.50-3.42 (m, 3H), 2.09-2.07 (m, 9H), 2.00-1.92(m, 2H)。

製備化合物**45g**

在0°C下在氮氣下使化合物**45f** (160 mg, 1.51 mmol)溶於2-丙醇(0.4 mL)及氯仿(2 mL)中，且接著向其中添加矽膠(2 g)及硼氫化鈉(27 mg, 0.71 mmol)。在0°C下攪拌2小時後，反應物經矽藻土過濾，且濾液在減壓下濃縮。殘餘物進行管柱層析法，產生化合物**45g** (115 mg, 71%)。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 8.06 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.50-7.44 (m, 2H), 7.01 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 5.45-5.31 (m, 4H), 4.38 (s, 2H), 4.22 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.67-3.61 (m, 1H), 3.46-3.41 (m, 3H), 2.07-2.04 (m, 9H), 1.97-1.91 (m, 2H)。

製備化合物**45h**

在0°C下在氮氣下使化合物**45g** (100 mg, 0.18 mmol)溶於DMF (1 mL)中，且接著向其中添加碳酸雙(4-硝基苯基)酯(110 mg, 0.35 mmol)及DIPEA (0.050 mL, 0.27 mmol)。在室溫下攪拌2小時後，向其中添加EtOAc (30 mL)及蒸餾水(10 mL)。有機層經無水Na₂SO₄乾燥且減壓濃

縮。殘餘物進行管柱層析法，產生化合物**45h** (75 mg, 58%)。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 8.29-8.27 (m, 2H), 8.23 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.54 (dd, *J* = 2.4, 6.6 Hz, 1H), 7.49 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 7.39-7.37 (m, 2H), 7.04 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 5.45-5.29 (m, 4H), 5.28 (s, 2H), 4.23 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.68-3.64 (m, 1H), 3.46-3.42 (m, 3H), 2.08-2.05 (m, 9H), 1.98-1.93 (m, 2H)。

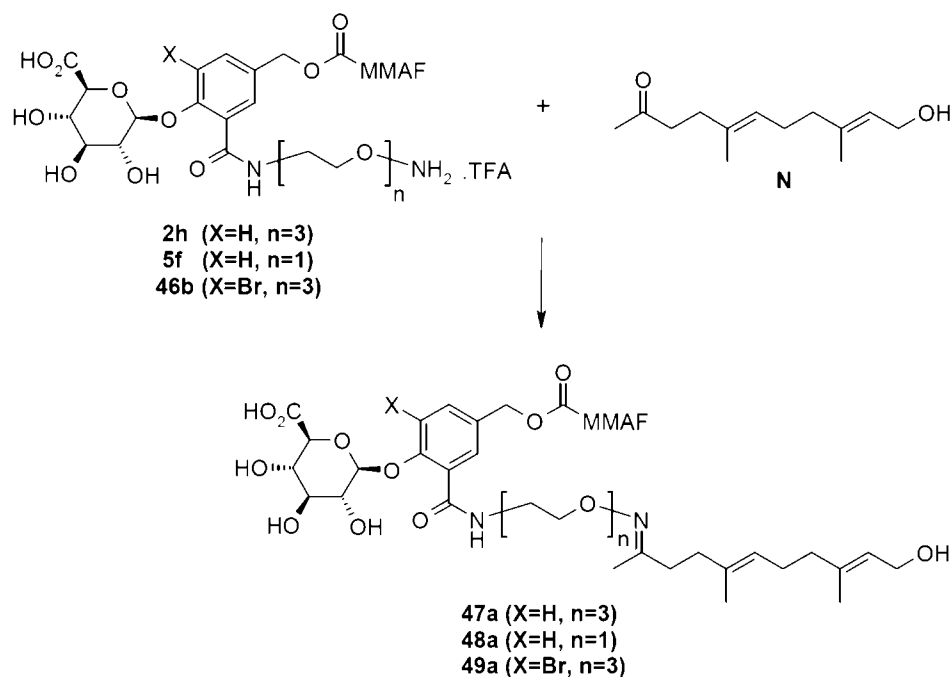
製備化合物**45i**

在室溫下在氮氣下化合物**45h** (50 mg, 0.068 mmol)溶於DMF (0.8 mL)中，且接著向其中添加MMAF-OMe (51 mg, 0.068 mmol)。所得混合物用HOBt (2 mg, 0.013 mmol)、吡啶(0.24 mL)及DIPEA (0.012 mL, 0.068 mmol)處理。在室溫下攪拌18小時後，向其中添加EtOAc (20 mL)及蒸餾水(10 mL)。有機層經無水Na₂SO₄乾燥且減壓濃縮。殘餘物進行管柱層析法，產生化合物**45i** (71 mg, 78%)。EI-MS *m/z*: [M+H]⁺ 1339。

製備化合物**45j**

在室溫下在氮氣下化合物**45i** (30 mg, 0.022 mmol)及苯基乙炔(3.7 μL, 0.033 mmol)溶於EtOH (0.2 mL)及水(30 μL)中，且接著向其中添加0.1 M CuSO₄水溶液(30 μL)及1.0 M抗壞血酸鈉水溶液(30 μL)。所得混合物用HOBt (2 mg, 0.013 mmol)、吡啶(0.24 mL)及DIPEA (12 μL, 0.068 mmol)處理。在室溫下攪拌5小時後，向其中添加EtOAc (20 mL)及蒸餾水(5 mL)。有機層經無水Na₂SO₄乾燥且減壓濃縮。殘餘物進行管柱層析法，產生化合物**45j** (26 mg, 81%)。EI-MS *m/z*: [M+H]⁺ 1441。

製備化合物**45k**



化合物N藉由韓國專利特許公開案第10-2014-0035393號中揭示之方法製備。

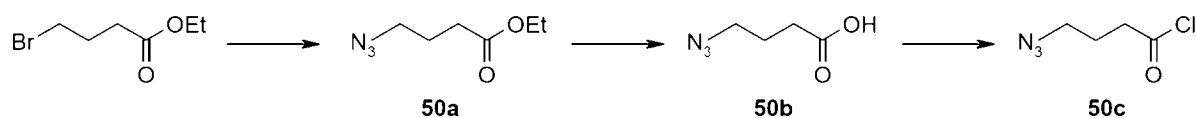
實例68. 製備化合物47a

在室溫下在氮氣下使化合物2h (20 mg, 0.014 mmol)溶於EtOH (0.7 mL)中，且接著向其中添加化合物N (3.7 mg, 0.017 mmol)，且混合物在45°C下攪拌2小時。反應結束後，使用HPLC獲得化合物47a (10.2 mg, 49%)。EI-MS m/z: $[M+H]^+$ 1441。

實例69及70. 製備化合物48a及49a

化合物48a (實例69)及化合物49a (實例70)藉由實例68中製備化合物47a之類似方法製備。化合物48a之EI-MS m/z: $[M+H]^+$ 1353。化合物49a之EI-MS m/z: $[M+H]^+$ 1520。

比較實例66. 製備化合物50k



製備化合物**50a**

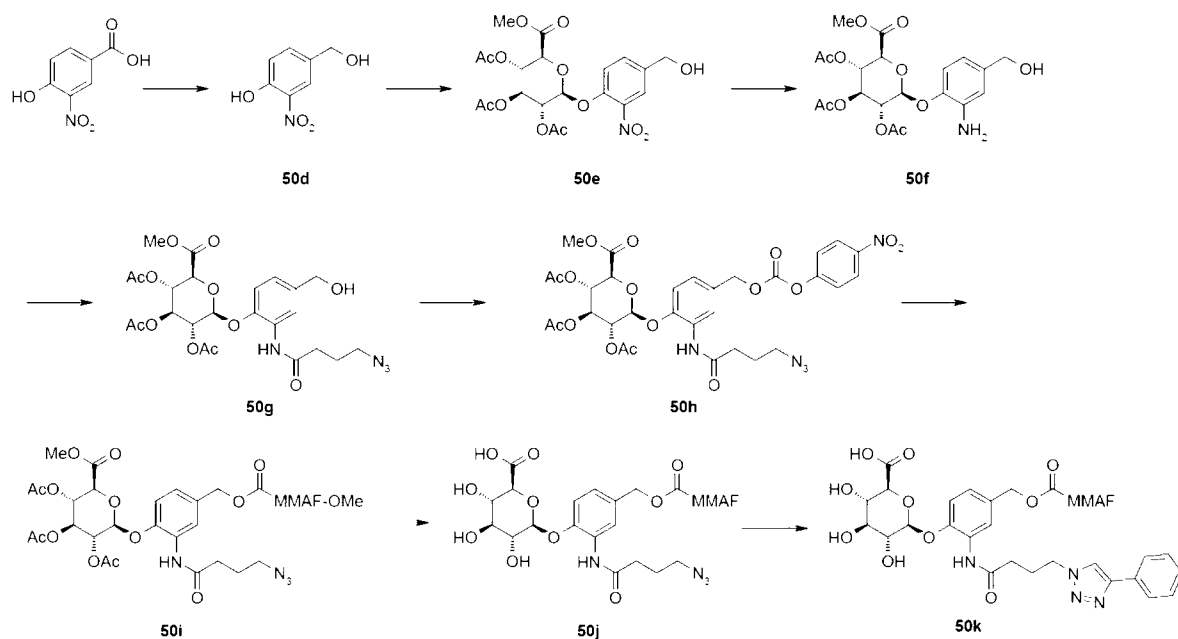
在室溫下在氮氣下使4-溴丁酸乙酯(5.0 mL, 34.6 mmol)溶於MeOH (75 mL)中，且接著向其中添加含NaN₃ (4.5 g, 69.2 mmol)之水(25 mL)且在85°C下攪拌8小時。反應結束後，溶劑在減壓下濃縮，且向其中添加氯仿(300 mL)及蒸餾水(200 mL)。如上所述獲得之有機層經無水Na₂SO₄乾燥且減壓濃縮。殘餘物進行管柱層析法，產生化合物**50a** (5.1 g, 94%)。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 4.15 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.36 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.41 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.94-1.89 (m, 2H), 1.28 (t, *J* = 8.4 Hz, 3H)。

製備化合物**50b**

在0°C下在氮氣下使化合物**50a** (2.0 g, 12.7 mmol)溶於MeOH (32 mL)中，且接著緩慢向其中添加含KOH (3.56 g, 63.6 mmol)之水(26 mL)。在室溫下攪拌6小時後，溶劑在減壓下濃縮，且向其中添加氯仿(300 mL)、1 N HCl水溶液(100 mL)及蒸餾水(100 mL)。如上所述獲得之有機層經無水Na₂SO₄乾燥且減壓濃縮。所得殘餘物進行管柱層析法，產生化合物**50b** (1.28 g, 78%)。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 3.38 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.48 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.95-1.90 (m, 2H)。

製備化合物**50c**

在0°C下在氮氣下使化合物**50b** (850 mg, 6.58 mmol)溶於MeOH (10 mL)中，且接著向其中添加乙二醯氯(1.1 mL, 13.2 mmol)及DMF (1滴)且在室溫下攪拌6小時。反應結束後，溶劑在減壓下濃縮，產生化合物**50c** (965 mg)，其未經進一步純化即使用。



製備化合物**50d**

在0℃下在氮氣下使4-羥基-3-硝基苯甲酸(5.0 g, 27.3 mmol)溶於THF (120 mL)中，且接著向其中添加1 M BH₃-THF複合物(54.6 mL, 54.6 mmol)且在室溫下攪拌20小時。反應結束後，向其中添加EtOAc (200 mL)、0.5 N HCl水溶液(20 mL)及蒸餾水(100 mL)。如上所述獲得之有機層經無水Na₂SO₄乾燥且減壓濃縮。所得殘餘物進行管柱層析法，產生化合物**50d** (4.2 g, 91%)。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ 8.06 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.59 (dd, *J* = 1.2, 7.8 Hz, 1H), 7.12 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.83 (s, 2H)。

製備化合物**50e**

在室溫下在氮氣下使化合物**50d** (937 mg, 5.54 mmol)溶於MeCN (15 mL)中，且向其中添加化合物**M** (2.0 g, 5.04 mmol)、氧化銀(4.66 g, 20.1 mmol)及4 Å分子篩(2.0 g)，且在室溫下攪拌14小時。反應結束後，混合物經矽藻土過濾，且濾液在減壓下濃縮。所得殘餘物進行管柱層析法，產生化合物**50e** (1.0 g, 40%)。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.81

(d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.54 (dd, $J = 1.8, 6.6$ Hz, 1H), 7.37 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 5.37-5.27 (m, 3H), 5.20 (d, $J = 6.6$ Hz, 1H), 4.72 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H), 4.21 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.04-2.02 (m, 1H)。

製備化合物**50f**

使化合物**50e** (900 mg, 6.35 mmol)溶於EtOAc (100 mL)中，且接著向其中添加氧化鉑(IV)(84.2 mg, 0.370 mmol)且在室溫下在氬氣下攪拌3小時。反應結束後，混合物經矽藻土過濾，且濾液在減壓下濃縮，產生化合物**50f** (700 mg, 83%)，其未經進一步純化即使用。

製備化合物**50g**

在0℃下在氬氣下使化合物**50f** (350 mg, 0.77 mmol)溶於DCM (10 mL)中，且接著向其中添加化合物**50c** (136 mg, 0.92 mmol)及DIPEA (0.27 mL, 1.54 mmol)且在室溫下攪拌20分鐘。反應結束後，向其中添加EtOAc (50 mL)及蒸餾水(50 mL)。如上所述獲得之有機層經無水Na₂SO₄乾燥且減壓濃縮。所得殘餘物進行管柱層析法，產生化合物**50g** (280 mg, 65%)。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 8.37 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.07 (dd, $J = 1.8, 6.6$ Hz, 1H), 6.93 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 5.43-5.28 (m, 3H), 5.06 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 4.63 (s, 2H), 4.19 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.44-3.41 (m, 2H), 2.56 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 2.17-2.00 (m, 12H)。

製備化合物**50h**

在0℃下在氬氣下使化合物**50g** (250 mg, 0.44 mmol)溶於DMF (4 mL)中，且接著向其中添加碳酸雙(4-硝基苯基)酯(270 mg, 0.88 mmol)及

DIPEA (0.12 mL, 0.66 mmol), 且在室溫下攪拌1小時。反應結束後, 向其中添加EtOAc (50 mL)及蒸餾水(50 mL)。如上所述獲得之有機層經無水 Na_2SO_4 乾燥且減壓濃縮。所得殘餘物進行管柱層析法, 產生化合物**50h** (290 mg, 90%)。 ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 8.54 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 8.28-8.25 (m, 2H), 8.02 (s, 1H), 7.40-7.36 (m, 2H), 7.11 (dd, $J = 1.8, 6.6$ Hz, 1H), 6.96 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 5.44-5.29 (m, 3H), 5.23 (s, 2H), 5.10 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 4.21 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.45-3.42 (m, 2H), 2.58 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.11-2.00 (m, 12H)。

製備化合物**50i**

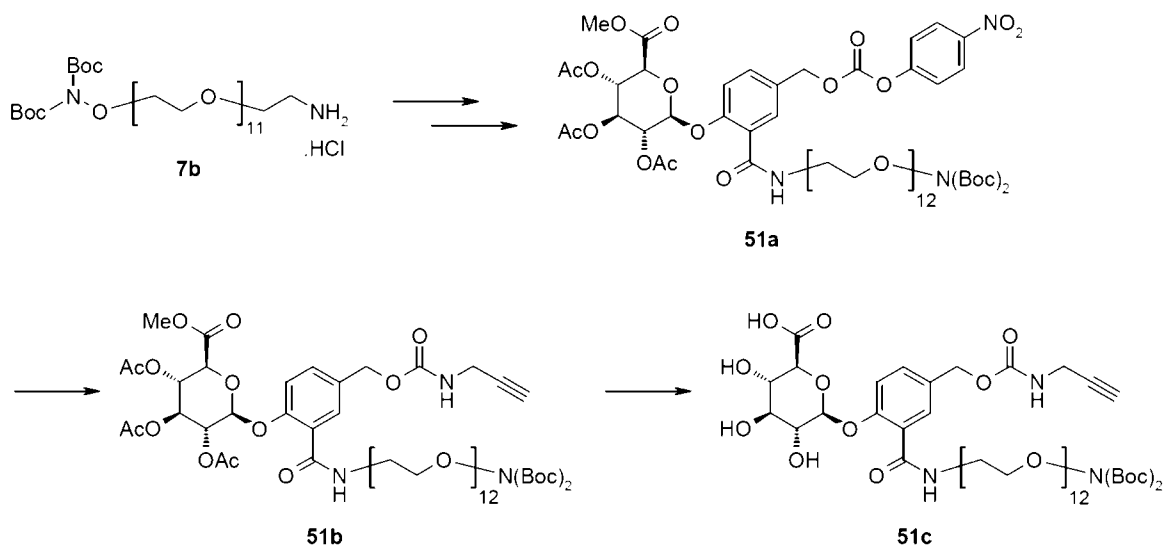
在室溫下在氮氣下使化合物**50h** (250 mg, 0.34 mmol)溶於DMF (4 mL)中, 且接著向其中添加MMAF-OMe (255 mg, 0.34 mmol)。所得混合物用HOBt (9 mg, 0.068 mmol)、吡啶(1.2 mL)及DIPEA (0.060 mL, 0.34 mmol)處理。在室溫下攪拌2天後, 向其中添加EtOAc (50 mL)、2 N HCl水溶液(5 mL)及蒸餾水(50 mL)。如上所述獲得之有機層經無水 Na_2SO_4 乾燥且減壓濃縮。殘餘物進行管柱層析法, 產生化合物**50i** (340 mg, 74%)。EI-MS m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1339。

製備化合物**50j**

在 0°C 下在氮氣下使化合物**50i** (210 mg, 0.156 mmol)溶於MeOH (2 mL)中, 且接著向其中添加含 $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (66 mg, 1.56 mmol)之水(2 mL)。在室溫下攪拌1.5小時後, 向其中添加氯仿(50 mL)、MeOH (5 mL)、蒸餾水(50 mL)及0.5 N HCl水溶液(5 mL)。如上所述獲得之有機層經無水 Na_2SO_4 乾燥且減壓濃縮。所得殘餘物進行管柱層析法, 產生化合物**50j** (107 mg, 57%)。EI-MS m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1184。

製備化合物**50k**

在室溫下在氮氣下使化合物**50j** (10 mg, 0.008 mmol)及苯基乙炔 (0.92 μ L, 0.008 mmol)溶於EtOH (0.15 mL)及水(10 μ L)中，且接著向其中添加0.1 M CuSO_4 水溶液(10 μ L)及1.0 M 抗壞血酸鈉水溶液(10 μ L)。在室溫下攪拌5小時後，向其中添加EtOAc (10 mL)及蒸餾水(5 mL)。如上所述獲得之有機層經無水 Na_2SO_4 乾燥且減壓濃縮。所得殘餘物進行管柱層析法，產生化合物**50k** (5 mg, 46%)。EI-MS m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1286。

實例71. 製備化合物**51h**製備化合物**51a**

化合物**51a**係藉由與實例23之製備化合物**14h**之方法類似的方法，自化合物**7b**製備。EI-MS m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1392.8, $[\text{M}+\text{H}-\text{Boc}]^+$ 1292.7, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1414.8。

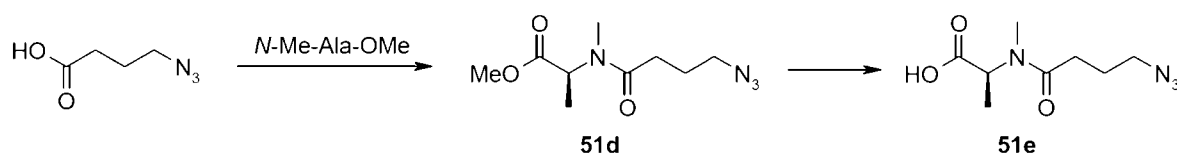
製備化合物**51b**

在 0°C 下使化合物**51a** (1.8 g, 1.29 mmol)、炔丙基胺(0.1 mL, 1.55 mmol)及無水HOBt (35 mg, 0.25 mmol)溶於DMF (5 mL)中。接著添加吡啶(0.2 mL)及DIPEA (0.45 mL, 2.59 mmol)。在 N_2 下在室溫下攪拌24小時後，將反應混合物用 H_2O (100 mL)及飽和 NH_4Cl 水溶液(50 mL)稀

釋。用EtOAc (2×100 mL)萃取後，合併之有機層經無水MgSO₄乾燥，過濾，且濃縮。殘餘物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**51b** (1.15 g，68%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.01 (s, 1H), 7.48-7.31 (m, 2H), 7.02 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 5.45-5.20 (m, 4H), 5.09 (s, 2H), 4.19 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 4.10-4.05 (m, 2H), 3.97 (s, 2H), 3.85-3.45 (m, 4H), 2.24 (s, 1H), 2.05 (s, 9H), 1.53 (s, 18H)。EI-MS *m/z*: [M+Na]⁺ 1330.3。

製備化合物**51c**

在0℃下向化合物**51b** (1.15 g，0.879 mmol)於THF/MeOH (20 mL/20 mL)中之溶液中添加含LiOH單水合物(151 mg，3.603 mmol)之H₂O (20 mL)。在0℃下2小時後，反應混合物使用乙酸中和且減壓濃縮。所得殘餘物溶於DMSO (5 mL)中且藉由製備型HPLC來純化，產生化合物**51c** (600 mg，60%)。EI-MS *m/z*: [M+H]⁺ 1169.2。

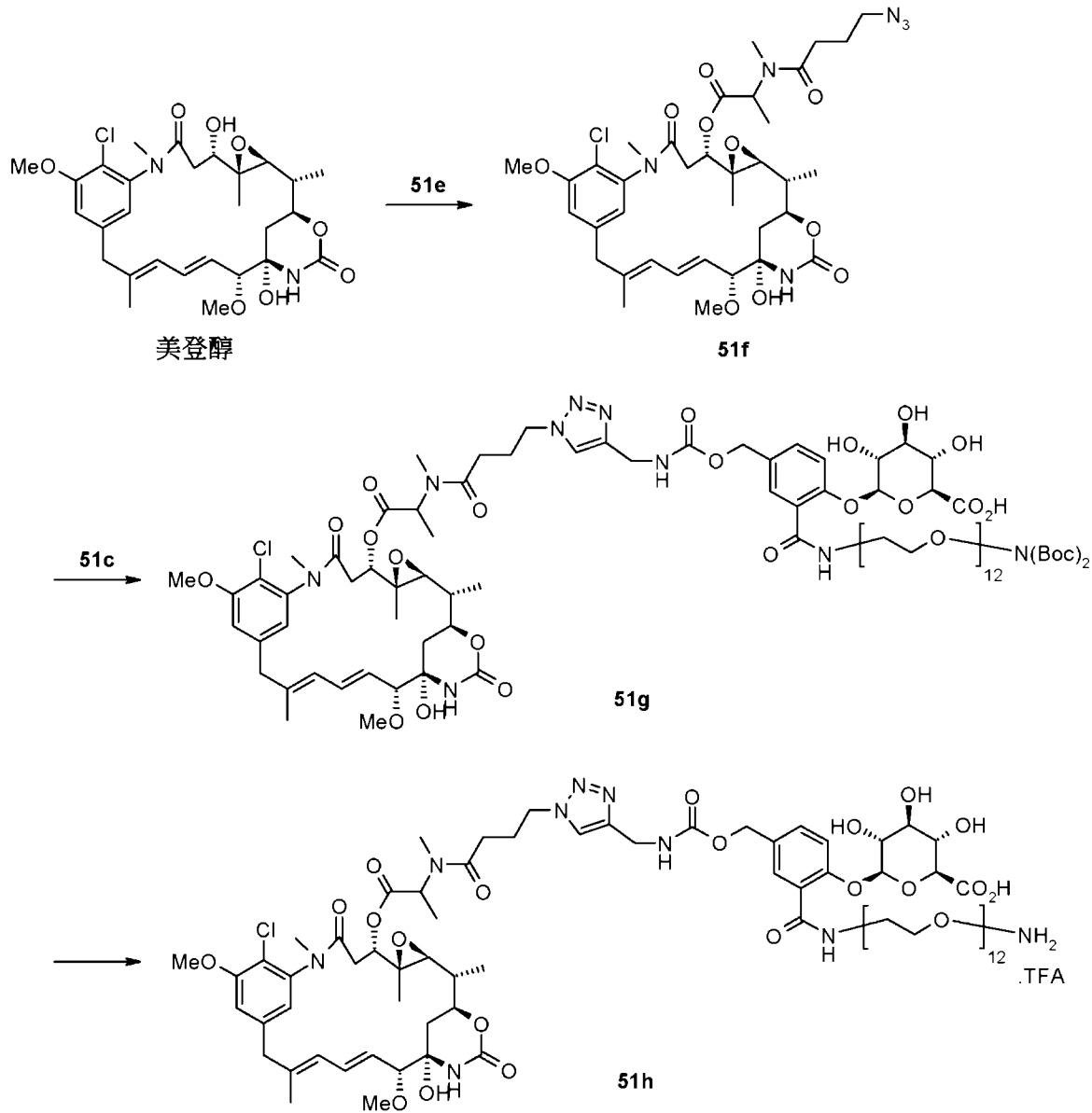


製備化合物**51d**

將DIPEA (0.92 mL，5.30 mmol)及HBTU (1.0 g，2.64 mmol)添加至攪拌之4-疊氮基丁酸(228 mg，1.76 mmol)及*N*-Me-Ala-OMe (298 mg，1.94 mmol)於DMF (10 mL)中之混合物。在N₂下在室溫下攪拌14小時後，將反應混合物用H₂O (50 mL)稀釋且用EtOAc (2×50 mL)萃取。合併之有機層經無水Na₂SO₄乾燥，過濾且濃縮。所得殘餘物藉由管柱層析法來純化，得到化合物**51d** (310 mg，77%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.22 (q, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.39 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.95 (s, 3H), 2.52-2.39 (m, 2H), 1.98-1.92 (m, 2H), 1.41 (d, 3H)。

製備化合物**51e**

在-20℃下向化合物**51d** (310 mg, 1.36 mmol)於MeOH (3 mL)中之溶液中添加含LiOH單水合物(114 mg, 2.72 mmol)之H₂O (3 mL)。在0℃下攪拌1小時後，反應混合物用H₂O/2 N HCl水溶液(50 mL/2 mL)稀釋且用Et₂O (2×30 mL)萃取。合併之有機層經無水Na₂SO₄乾燥。過濾且濃縮產生化合物**51e** (246 mg)，其未經進一步純化即使用。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.15 (q, 1H), 3.39 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.98 (s, 3H), 2.49-2.45 (m, 2H), 1.98-1.92 (m, 2H), 1.41 (d, 3H)。



製備化合物**51f**

在N₂下向美登醇(50 mg, 0.088 mmol)及化合物**51e** (113 mg, 0.528 mmol)於DCM (6 mL)中之溶液中添加DIC (0.087 mL, 0.557 mmol)於DCM (1.4 mL)中之溶液。1分鐘後，添加ZnCl₂溶液(1 M Et₂O溶液, 0.11 mL, 0.11 mmol)。在室溫下攪拌2小時後，將反應混合物用EtOAc (10 mL)稀釋。將有機層用飽和NaHCO₃水溶液(4 mL)及鹽水(2 mL)洗滌，經無水Na₂SO₄乾燥且在減壓下蒸發。所得殘餘物藉由管柱層析法來純化，得到非對映異構體類美登素之混合物化合物**51f** (50 mg, 74%)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 761.7。

製備化合物**51g**

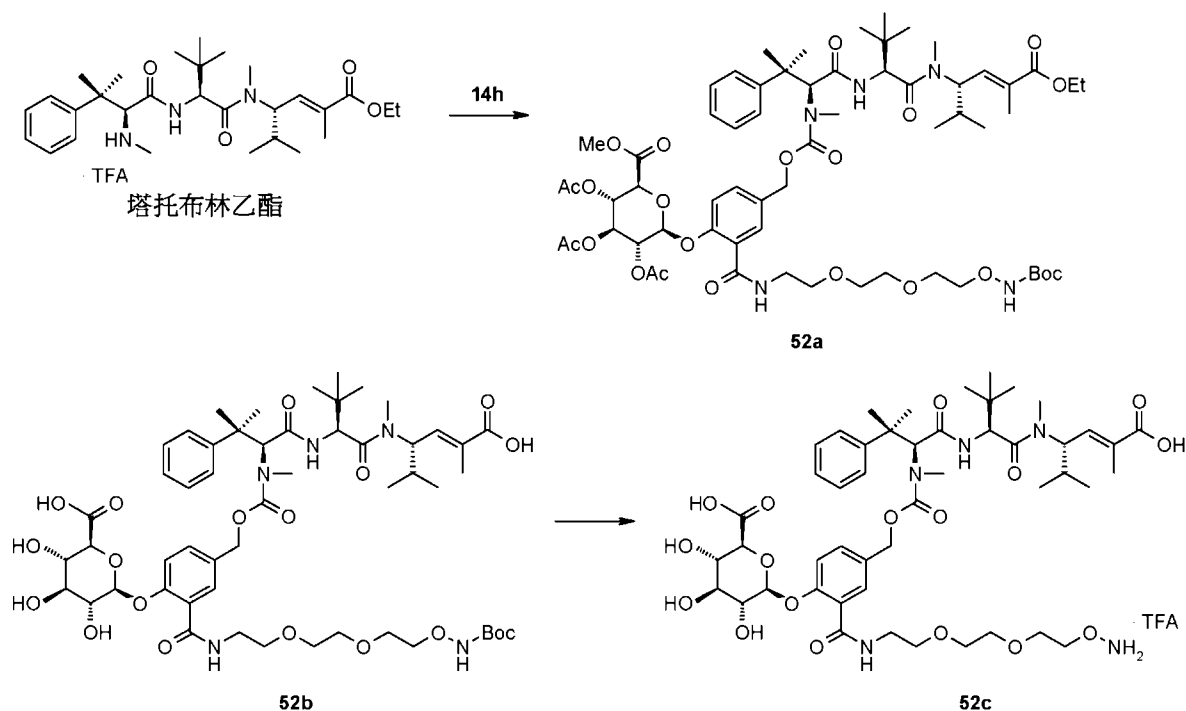
將CuSO₄·5H₂O (2 mg)及抗壞血酸鈉(10 mg)添加至攪拌之化合物**51f** (78 mg, 0.102 mmol)及化合物**51c** (132 mg, 0.112 mmol)於DMSO (4 mL)及H₂O (1 mL)中之混合物。pH值藉由添加1 M Na₂CO₃水溶液調至約7。在20℃下攪拌1小時後，反應混合物溶於H₂O/DMSO (1.5 mL/1.5 mL)中且藉由HPLC來純化。將具有相同滯留時間之純溶離份合併且濃縮，產生化合物**51g** (72.1 mg, 37%)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 1930.9, [M+H-Boc]⁺ 1830.9。

製備化合物**51h**

將TFA (0.2 mL)添加至攪拌之化合物**51g** (72.1 mg, 0.037 mmol)於DCM (1 mL)中之溶液。在0℃下攪拌2小時後，溶劑及過量TFA藉由N₂流移除。接著殘餘物溶於H₂O/MeCN (1 mL/1 mL)中且藉由HPLC來純化。將具有相同滯留時間之純溶離份合併且凍乾，產生呈白色固體狀之化合物**51h** (極性較大異構體17 mg及極性較小異構體6.0 mg, 36%)。EI-MS

m/z : $[M+H]^+$ 1730.8。

實例72. 製備化合物52c



製備化合物52a

在0℃下使塔托布林乙酯(TFA鹽, 80 mg, 0.029 mmol)、化合物14h (128 mg, 0.0142 mmol)及無水HOBt (3.5 mg, 0.026 mmol)溶於DMF (3 mL)中。接著添加吡啶(0.5 mL)及DIPEA (0.045 mL, 0.26 mmol)。在N₂下在室溫下攪拌24小時後, 將反應混合物用H₂O (10 mL)稀釋且用EtOAc (2×10 mL)萃取。合併之有機層經無水Na₂SO₄乾燥, 過濾且濃縮。所得殘餘物藉由管柱層析法來純化, 得到化合物52a (70 mg, 43%)。EI-MS m/z : $[M+H]^+$ 1258.6, $[M+H-Boc]^+$ 1158.6。

製備化合物52b

在-20℃下向化合物52a (70 mg, 0.055 mmol)於MeOH (1.4 mL)中之溶液中添加含LiOH單水合物(11.7 mg, 0.275 mmol)之H₂O (1.4 mL)。在0℃下1小時後溶液pH值用乙酸調至4~5。所得溶液溶於DMSO (1 mL)

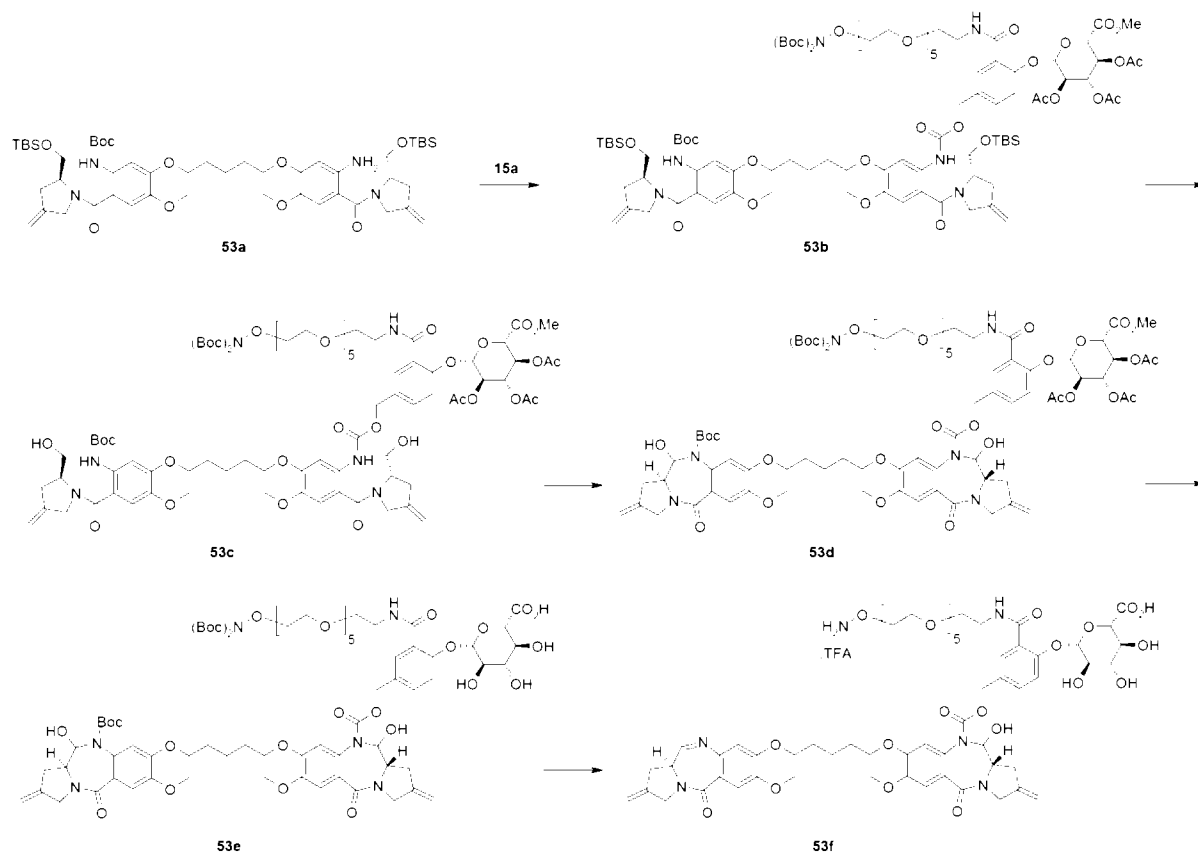
中且藉由HPLC來純化，產生呈白色固體狀之化合物**52b** (4.5 mg, 8%)。

EI-MS m/z : $[M+H]^+$ 1090.4。

製備化合物**52c**

在0℃下向化合物**52b** (4.5 mg, 0.0041 mmol)於DCM (1 mL)中之溶液中添加TFA (0.2 mL)。在0℃下2小時後，溶劑及過量TFA藉由N₂流移除。接著殘餘物藉由HPLC來純化，產生呈白色固體狀之化合物**52c** (2.4 mg, 59%)。EI-MS m/z : $[M+H]^+$ 990.4。

實例73. 製備化合物**53f**



製備化合物**53b**

在0℃下化合物**53a** (300 mg, 0.31 mmol, 化合物**53a**藉由專利WO2013/055987 A1中揭示之方法製備)、化合物**15a** (355 mg, 0.31 mmol)及無水HOBt (10 mg, 0.06 mmol)溶於DMF (0.5 mL)中。接著添加吡啶(0.3 mL)及DIPEA (0.14 mL, 0.78 mmol)。在N₂下在室溫下攪拌23

小時後，將反應混合物用H₂O/飽和NH₄Cl水溶液(100 mL/50 mL)稀釋且用EtOAc (2×100 mL)萃取。合併之有機層經無水MgSO₄乾燥，過濾，且濃縮。殘餘物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**53b** (250 mg, 41%)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 1943.6, [M+Na]⁺ 1965.6。

製備化合物**53c**

在0°C下在N₂下向化合物**53b** (300 mg, 0.31 mmol)於THF/H₂O (2 mL/1 mL)中之溶液中添加乙酸(3 mL)。22小時後，將反應混合物用H₂O (100 mL)稀釋且用EtOAc (2×100 mL)萃取。合併之有機層經無水Na₂SO₄乾燥，過濾且濃縮。所得殘餘物藉由管柱層析法來純化，得到化合物**53c** (140 mg, 68%)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 1713.6。

製備化合物**53d**

在室溫下在N₂下向化合物**53c** (120 mg, 0.07 mmol)於DCM (10 mL)中之溶液中添加氯鉻酸吡錠(158 mg, 0.42 mmol)及4 Å分子篩(50 mg)。攪拌18小時後，反應混合物經矽藻土墊過濾且減壓濃縮。獲得呈無色油狀之所得化合物**53d** (95 mg, 75%)，其未經進一步純化即使用。EI-MS m/z: [M+Na]⁺ 1732.8。

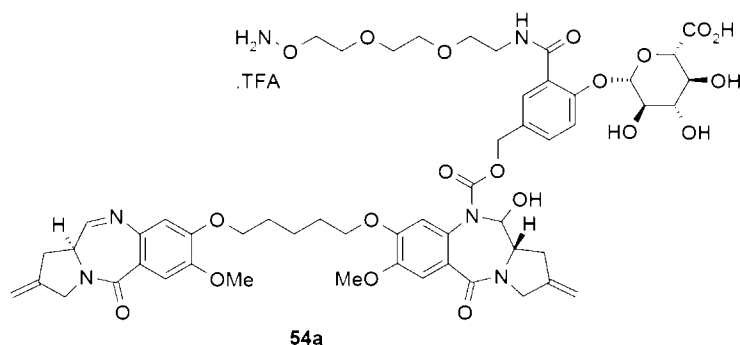
製備化合物**53e**

在0°C下向化合物**53d** (95 mg, 0.056 mmol)於MeOH (1 mL)中之溶液中添加含LiOH單水合物(12 mg, 0.278 mmol)之H₂O (1 mL)。在0°C下2小時後，反應混合物使用乙酸中和且減壓濃縮。所得殘餘物溶於DMSO (1 mL)中且藉由製備型HPLC來純化，產生化合物**53e** (6 mg, 7%)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 1569.7。

製備化合物**53f**

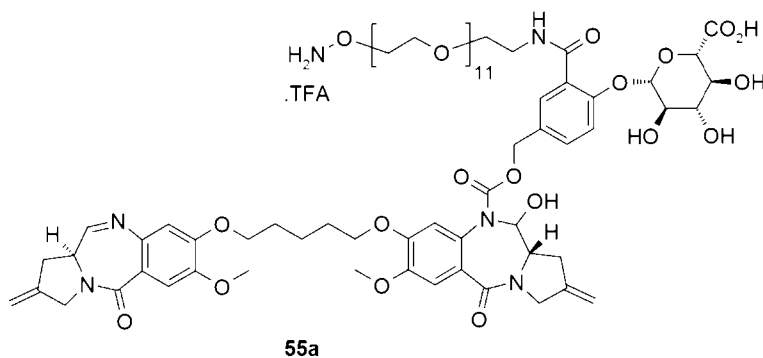
將TFA (0.2 mL)添加至攪拌之化合物**53e** (6 mg, 0.004 mmol)於DCM (2 mL)中之溶液。在0°C下攪拌2小時後，溶劑及過量TFA藉由N₂流移除。接著殘餘物溶於DMSO (1 mL)中且藉由HPLC來純化。將具有相同滯留時間之純溶離份合併且凍乾，產生呈白色固體狀之化合物**53f** (2.7 mg, 53%)。EI-MS m/z : $[M+H]^+$ 1251.3。

實例74. 製備化合物54a



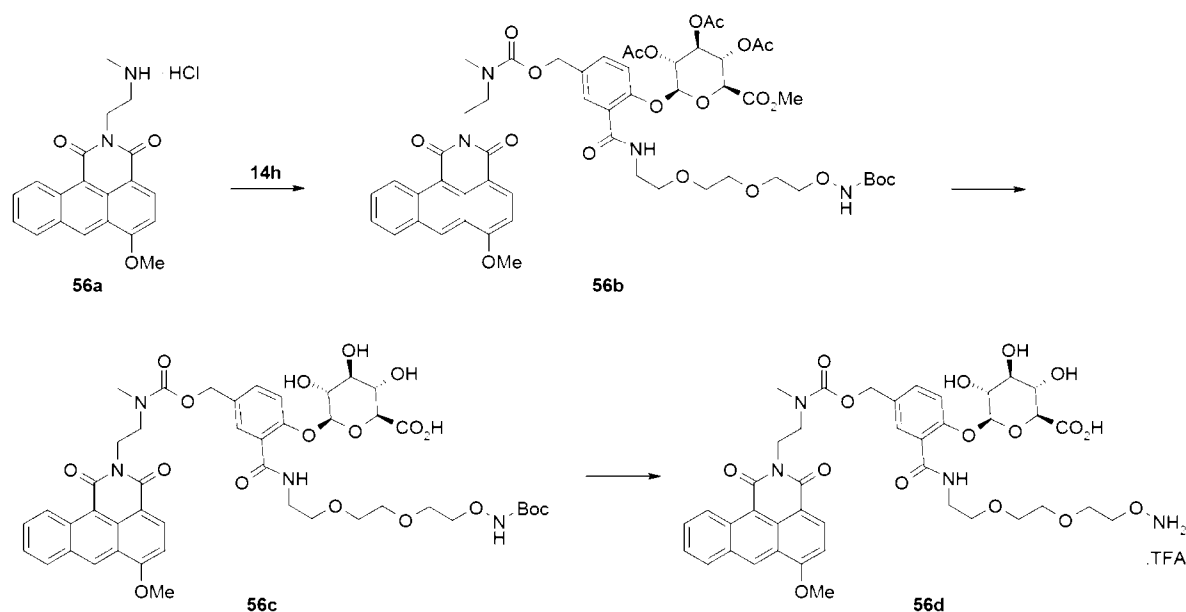
化合物**54a**係藉由實例73中製備化合物**53f**之類似方法，自化合物**53a**及化合物**14h**製備。

實例75. 製備化合物55a



化合物**55a**係藉由實例73中製備化合物**53f**之類似方法，自化合物**53a**及化合物**51a**製備。EI-MS m/z : $[M+H]^+$ 1516.7, $1/2[M+H]^+$ 758.7。

實例76. 製備化合物56d



製備化合物**56b**

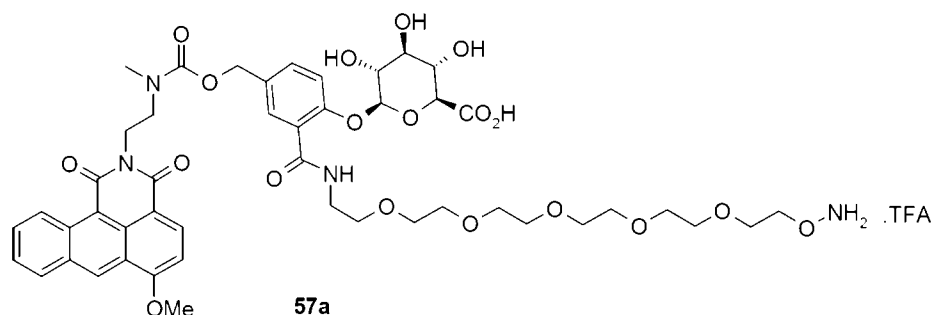
在0℃下化合物**56a** (HCl鹽，100 mg，0.27 mmol，化合物**56a**藉由 *Curr. Med. Chem.* 2009, **16**, 1192-1213中揭示之方法製備)、化合物**14h** (242 mg，0.27 mmol)及無水HOBt (7.3 mg，0.05 mmol)溶於DMF (3 mL)中。接著添加吡啶(0.4 mL)及DIPEA (0.09 mL，0.60 mmol)。在N₂下在室溫下攪拌16小時後，將反應混合物用飽和NH₄Cl水溶液(10 mL)稀釋且用EtOAc (2×20 mL)萃取。合併之有機層經無水MgSO₄乾燥，過濾且濃縮。殘餘物藉由管柱層析法來純化，產生化合物**56b** (184 mg，63%)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 1091.9, [M+H-Boc]⁺ 991.7。

製備化合物**56c**

在-20℃下向化合物**56b** (90 mg，0.08 mmol)於MeOH (2 mL)中之溶液中添加含LiOH單水合物(17 mg，0.41 mmol)之H₂O (2 mL)。在-20℃下攪拌2小時後，反應混合物使用乙酸中和且減壓濃縮。接著反應混合物溶於H₂O/DMSO (1.5 mL/1.5 mL)中且藉由HPLC來純化，產生呈黃色固體狀之化合物**56c** (35 mg，45%)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 951.7, [M+H-Boc]⁺ 851.5。

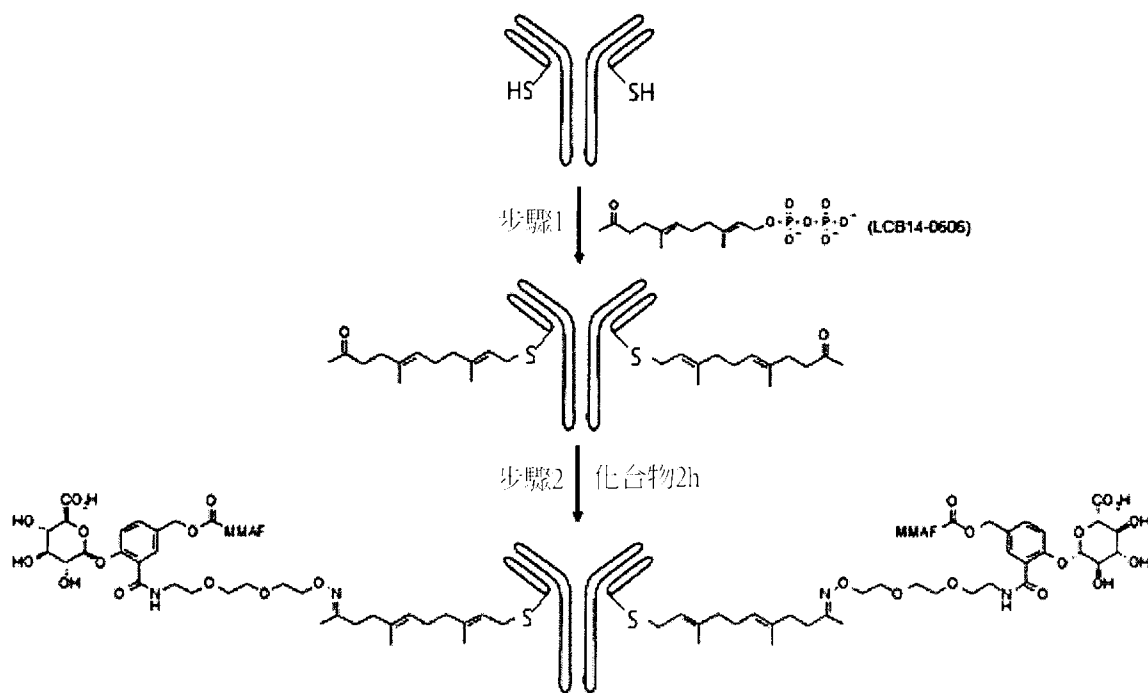
製備化合物**56d**

在 0℃ 下將 TFA (0.3 mL) 添加至攪拌之化合物 **56c** (35 mg, 0.04 mmol) 於 DCM (2.0 mL) 中之溶液。攪拌 1 小時後，溶劑及過量 TFA 藉由 N₂ 流移除。接著殘餘物溶於 H₂O/MeCN (1 mL/1 mL) 中且藉由 HPLC 來純化。將具有相同滯留時間之純溶離份合併且凍乾，產生呈黃色固體狀之化合物 **56d** (24.9 mg, 68%)。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 851.6。

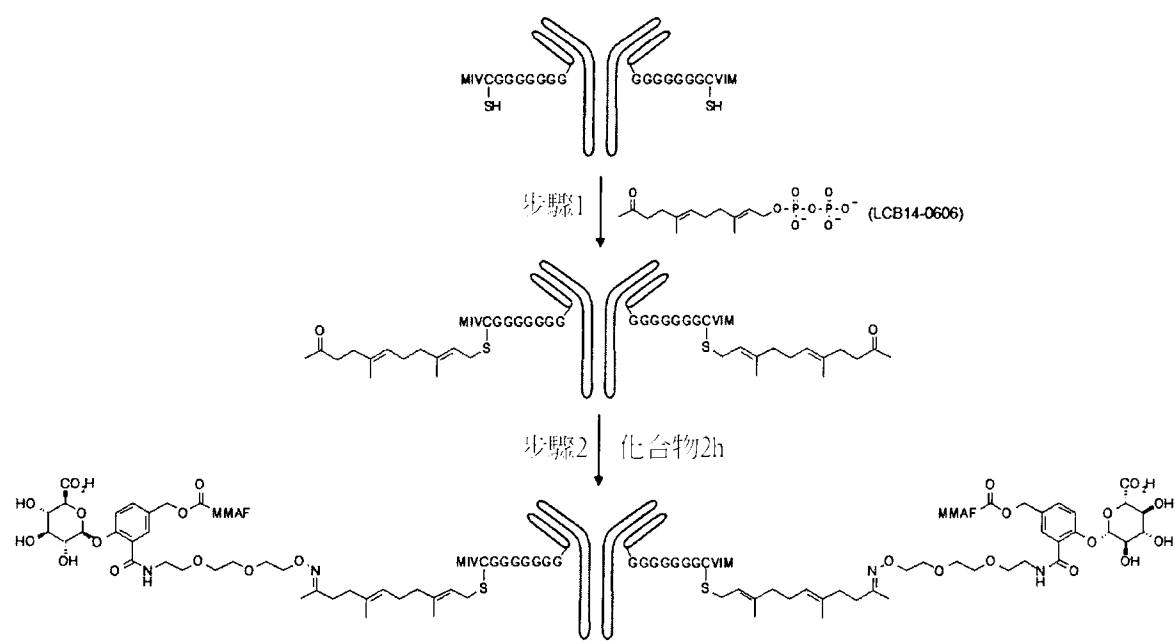
實例 77. 製備化合物 **57a**

化合物 **57a** 係藉由實例 76 中製備化合物 **56d** 之類似方法，自化合物 **56a** 及化合物 **15a** 製備。EI-MS m/z: [M+H]⁺ 983.3。

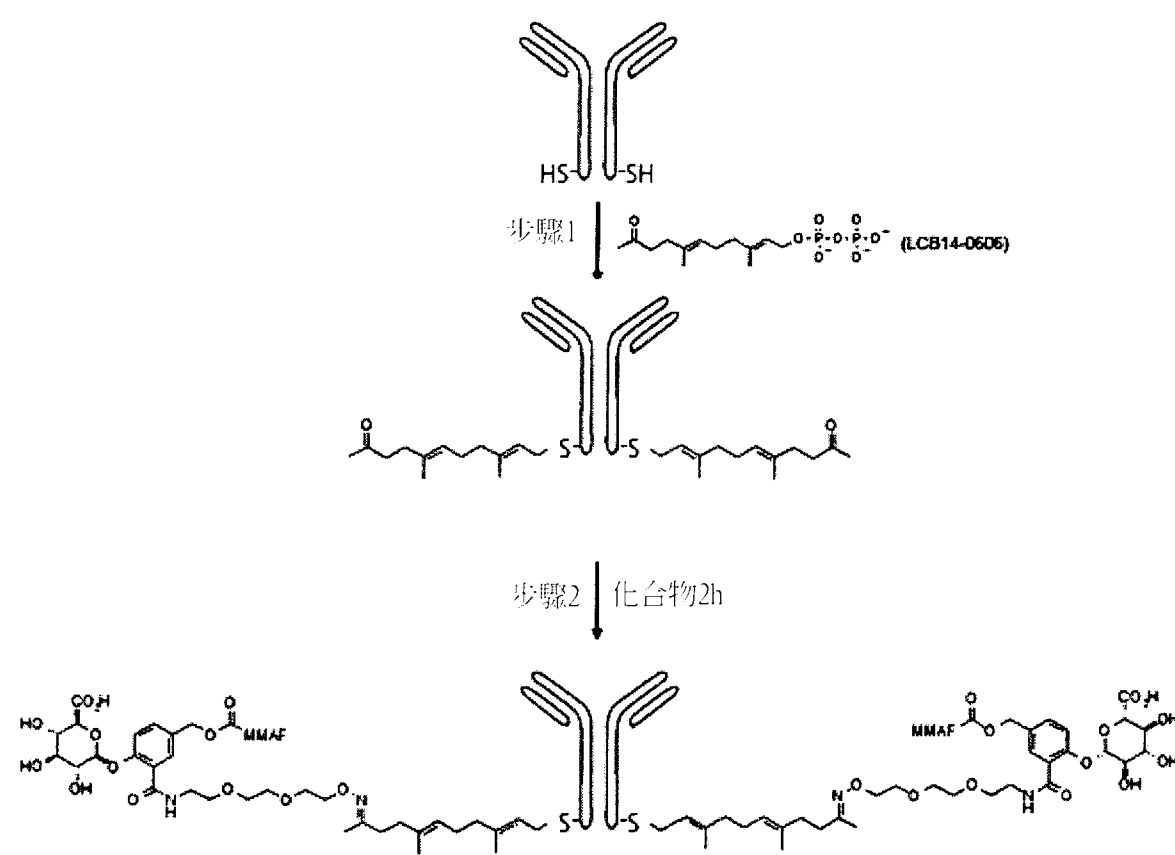
實例 78. ADC2 合成



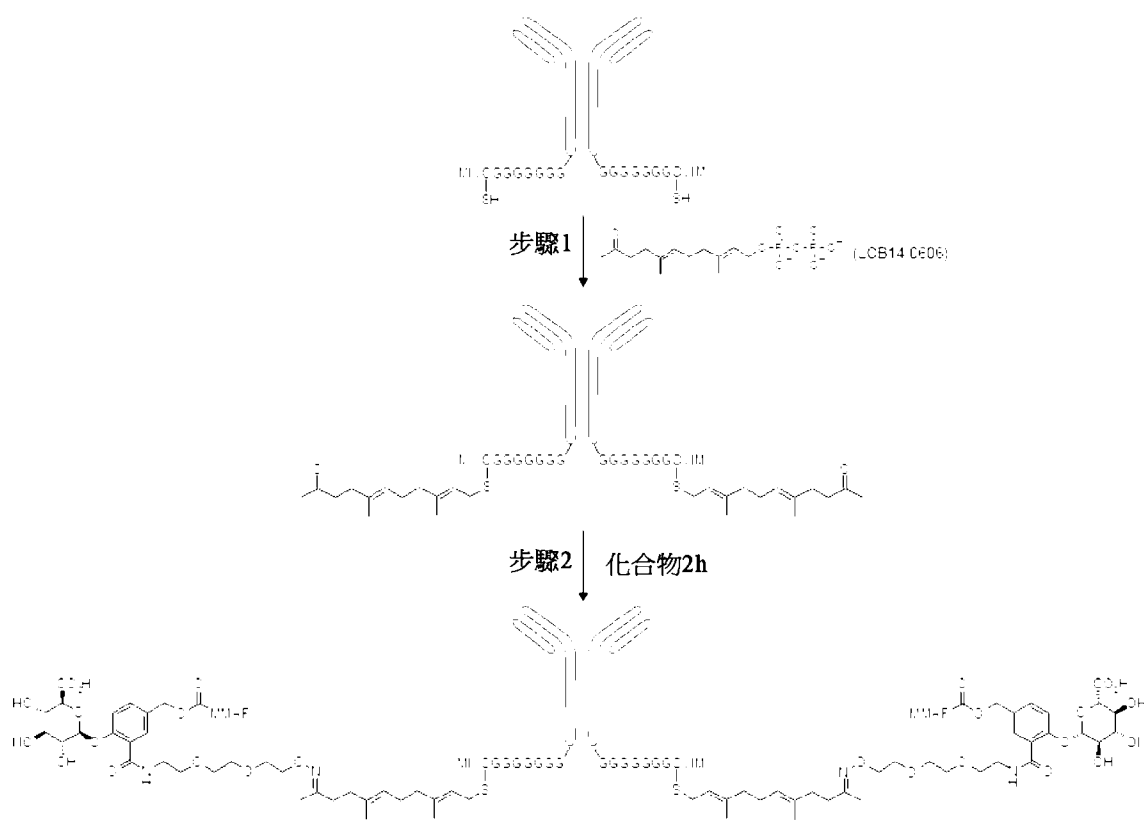
實例79. ADC2 合成



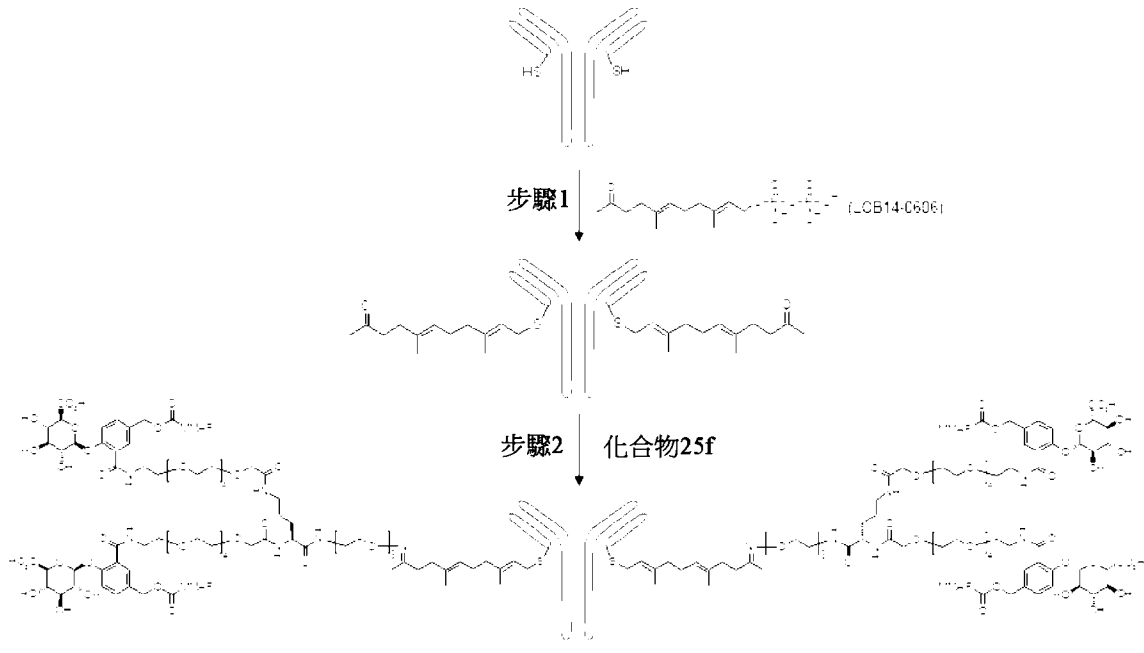
實例80. ADC86 合成



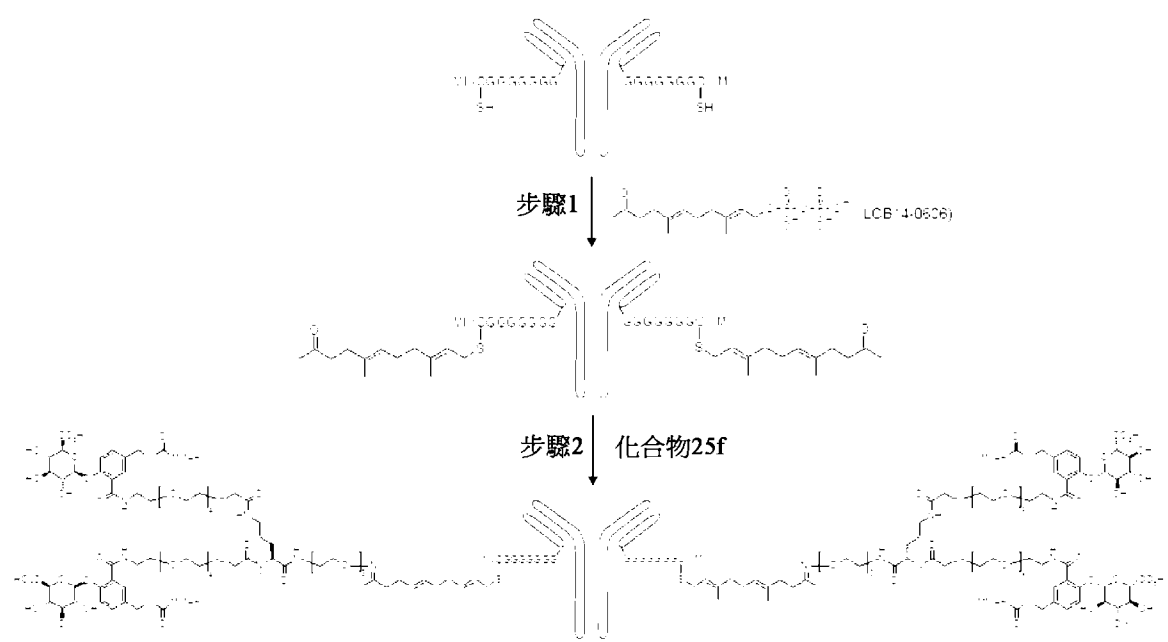
實例81. ADC86 合成



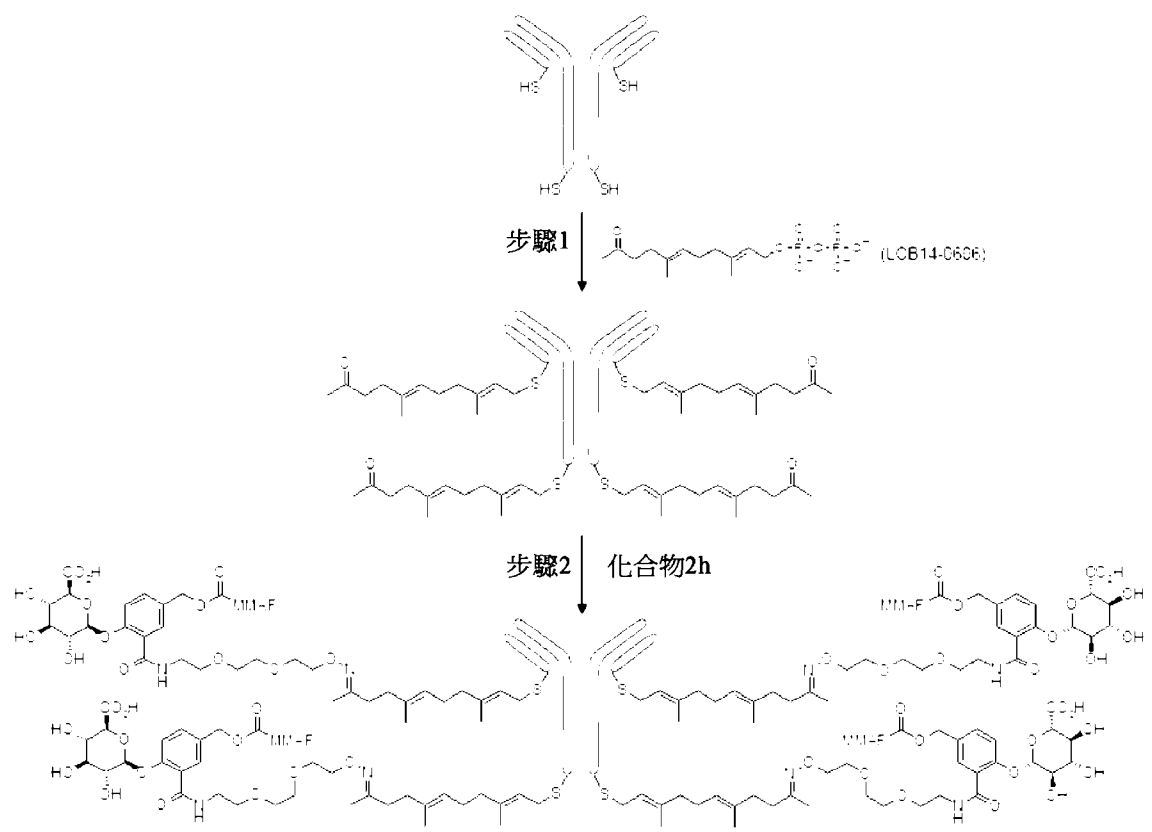
實例82. ADC4 合成



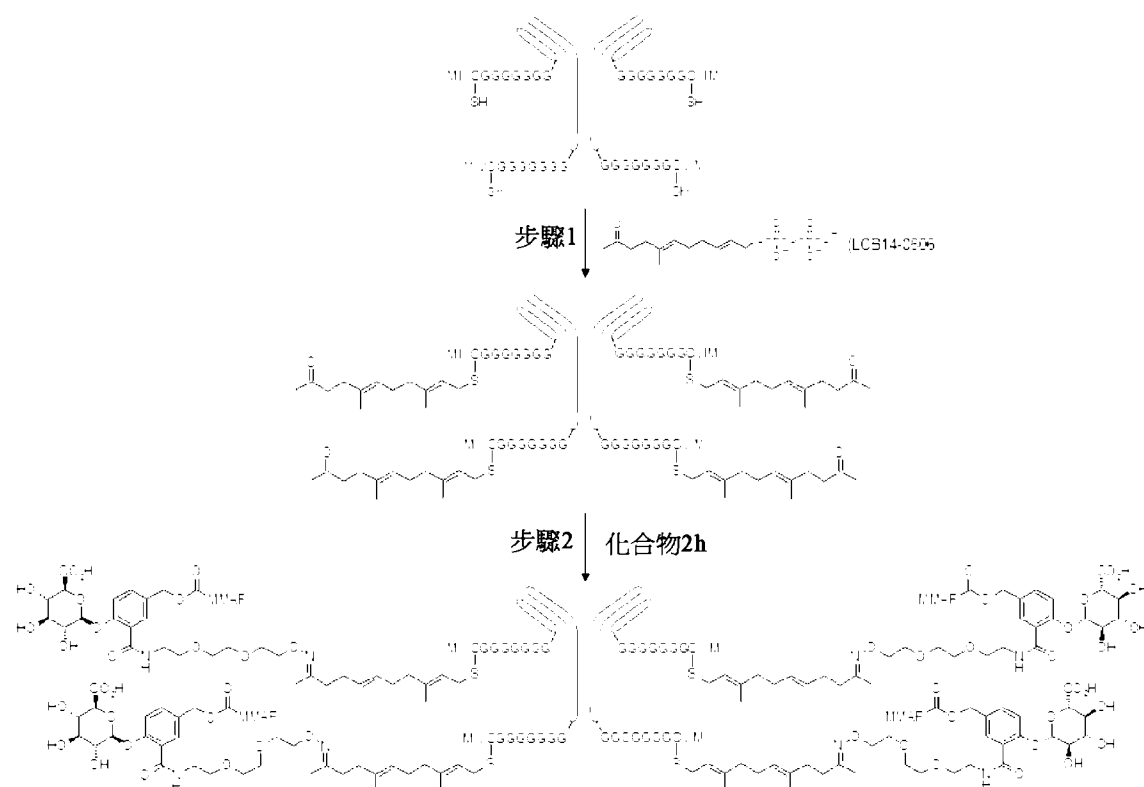
實例83. ADC4 合成



實例84. ADC75 合成



實例85. ADC75 合成



實驗實例1. 相對於β-葡萄糖苷酸酶之反應性比較測試

為比較實例66之化合物45k及比較實例66之化合物50k彼此對β-葡萄糖苷酸酶的反應性，如下進行比較測試。

實例66之化合物45k及比較實例66之化合物50k各製備為500 μM及50 μM DMSO儲備溶液。製備其中880 μL磷酸鹽緩衝生理食鹽水(PBS)溶液分別與100 μL化合物45k及化合物50k儲備溶液彼此混合之反應溶液(其最終濃度分別為50 μM及5 μM)。在添加20 μL大腸桿菌β-葡萄糖苷酸酶(1 mg/ml，Sigma：E.C.3.2.1.31類型IX-A；PBS中1 mg/mL；3.6 μg、13 μmol)至反應溶液後，反應在恆定溫度水浴中在37℃下開始。分別在0 min、25 min、60 min及90 min，分配100 μL混合溶液，且向其中添加200 μL乙腈。使用LC-MS/MS，定量分析自藉由對混合物樣品進行離心(4℃，15 min，14000 rpm)所獲得之各上清液釋放的MMAF (實驗藉由類似於以引用的方式併入本文中之美國專利第8,568,728號中揭示之方法的方法進

行)。

測試結果在圖2中說明，且自圖2證實，MMAF在藉由β-葡萄糖苷酸酶之酶反應後經由1,6-消除反應顯著迅速地自實例66之化合物45k及比較實例66之化合物50k每一者釋放(美國專利第8,568,728號，以引用的方式併入本文中)。

實驗實例2.血漿穩定性比較測試連接子毒素

比較實例66之化合物45k及比較實例66之化合物50k的血漿穩定性。

使10 μL化合物45k或50k以5 mM溶解於DMSO中，且將各組合物與990 μL小鼠血漿混合，藉此製備50 μM樣品，用於評估血漿穩定性。在37 °C下培育血漿/化合物溶液7天。在6天培育期間，在0、1、2及7天取100 μL等分試樣，且與200 μL含有內標之乙腈混合，用於監測血漿蛋白質沈澱。上清液藉由對乙腈/血漿樣品(4°C，15 min，14000 rpm)進行離心來獲得，且藉由對上清液進行LC-MS/MS，對各化合物及產物之量進行定量。(使用類似於J. Chromatography B, 780:451-457 (2002)中揭示之實驗進行實驗)。

使用LS-MS/MS，針對實例66之化合物45k及比較實例66之化合物50k獲得的結果在圖3及表1中說明。在第1天比較實例66之化合物50k之穩定性及實例66之化合物45k之穩定性分別為14%及80%。因此，實例66之化合物45k在小鼠血漿中之穩定性優於比較實例66之化合物50k。

表1. 化合物45k及化合物50k在小鼠血漿中之穩定性

	實例66之化合物45k	比較實例66之化合物50k
連接子	葡萄糖苷酸	葡萄糖苷酸
血漿穩定性 (小鼠血漿)	80%穩定性 (7天)	14%穩定性 (1天)
結果	穩定	不穩定

化合物47a、48a及49a之血漿穩定性藉由使用上述方法進行(圖4-6)。

實驗實例3. 製備抗體-藥物結合物

步驟1. 異戊烯化抗體(根據韓國專利特許公開案第10-2014-0035393號之方法製備)之方法

製備抗體之異戊烯化反應混合物且在30℃下反應16小時。使用包含添加至各輕鏈之c端中之GGGGGGGCVIM序列(「G7CVIM」)的抗體。G7CVIM序列添加在重鏈(ADC86-91)或重鏈與輕鏈(ADC75-77)之C端。所用抗體序列來源如以下表2。

表2. 用於ADC製備之所用抗體列表

標靶(抗體)	參考
HER2 (Herceptin®)	http://www.drugbank.ca/drugs/DB00002
EGFR (Erbix®)	http://www.drugbank.ca/drugs/DB00002
CD19 (DI-B4)	US8691952 B2
CD20 (Rituxan®)	http://www.drugbank.ca/drugs/DB00073
EGFR wt及EGFRvIII (ABT806)	US 2014/02555410 A9

反應混合物由含有24 μM 抗體、200 nM FTase (Calbiochem #344145)及144 μM LCB14-0606 (根據以引用的方式併入本文中之韓國專利特許公開案第10-2014-0035393號之方法自製)之緩衝溶液(50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、5 mM MgCl₂、10 μM ZnCl₂、0.25 mM DTT)構成。反應完成後，異戊烯化抗體藉由FPLC來純化。

步驟2. 製備ADC之方法

藉由混合100 mM乙酸鈉緩衝液(pH 4.5，10% DMSO)、12 μM異戊烯化抗體及120 μM連接子-毒素(自製)來製備在異戊烯化抗體與連接子-毒素之間形成酯鍵的反應混合物，且在30℃下輕緩攪拌。

培育反應24小時後，藉由經由FPLC及疏水相互作用層析-HPLC去鹽

來純化抗體-藥物結合物。

表3. 抗HER2 ADC (DAR2)之列表

ADC#	化合物 #
ADC1	2g
ADC2	2h
ADC3	3f
ADC4	3g
ADC5	4f
ADC6	4g
ADC7	5e
ADC8	5f
ADC9	6e
ADC10	7e
ADC11	8f
ADC12	9j
ADC13	10c
ADC14	10d
ADC15	11j
ADC16	11k
ADC17	12c
ADC18	12d
ADC19	13e
ADC20	13f
ADC86	2h
ADC87	2g

表4. 抗HER2 ADC (DAR4)之列表

ADC#	化合物 #
ADC23	16f
ADC24	16g
ADC25	17d
ADC26	18c

ADC27	19c
ADC28	20q
ADC29	21i
ADC30	22h
ADC31	23h
ADC32	24l
ADC33	25e
ADC34	25f
ADC35	26e
ADC36	27e
ADC37	28d
ADC38	28e
ADC39	29j
ADC40	29k
ADC41	30b
ADC42	30c
ADC43	31f
ADC44	31g
ADC45	32c
ADC46	32d
ADC47	33e
ADC48	33f
ADC49	34e
ADC50	34f
ADC51	35g
ADC52	36e
ADC53	37d
ADC54	38b
ADC55	38e
ADC76	2h
ADC88	16f
ADC89	16g
ADC90	25f
ADC91	25e

表5. 抗HER2 ADC (DAR4<)之列表

	ADC#	化合物#
<DAR6>	ADC60	43i
	ADC61	43j
<DAR8>	ADC62	44i
	ADC63	44j
	ADC77	16f

表6. 使用瓢菌素作為有效負載之抗HER2 ADC之列表

DAR 2		DAR4	
ADC#	化合物#	ADC#	化合物#
ADC21	14m	ADC56	39e
ADC22	15b	ADC57	40c
		ADC58	41c
		ADC59	42d

表7. 使用靶向各種蛋白質之抗體的ADC之列表

標靶(抗體)	ADC#	化合物#
EGFR (Erbix®)	ADC64	2h
	ADC65	25e
	ADC66	25f
CD19 (DI-B4)	ADC67	2h
	ADC68	25e
	ADC69	25f
CD20 (Rituxan®)	ADC70	2h
	ADC71	25e
	ADC72	25f
EGFR wt及EGFRvIII (ABT806)	ADC73	4g
	ADC74	25e
	ADC75	25f

實驗實例4. 抗HER2 ADC之細胞毒性

使用市售人類乳癌細胞株MCF-7 (HER2陰性至正常)、OE-19 (HER2

陽性)、NCI-N87 (HER2陽性)、SK-OV-3 (HER2陽性)、JIMT-1 (HER2陽性)及SK-BR-3 (HER2陽性)。根據隨市售細胞株一起提供之推薦說明書，培養細胞株。

量測抗體、藥物及結合物對癌細胞株之抗增殖活性。將細胞以每孔 1×10^4 個細胞塗鋪在96孔組織培養盤中。培育24小時後，添加各種濃度之抗體、藥物及結合物。72小時後使用SRB分析計數活細胞之數目。在540 nm下，使用SpectraMax 190 (Molecular Devices, USA)量測吸光度。

表8. 不同抗HER2 ADC (DAR2)之IC₅₀值

有效負載	ADC	連接子-毒素	SK-BR-3	JIMT-1	OE-19	NCI-N87	SK-OV-3	MCF-7
MMAF	ADC8	5f	0.10	0.34	-	-	-	>33.33
	ADC2	2h	0.14	0.16	0.42	0.75	1.19	>33.33
	ADC4	3g	0.10	0.32	-	0.97	1.21	>33.33
	ADC6	4g	0.03	0.38	-	-	-	>33.33
	ADC16	11k	0.06	0.26	-	-	-	>33.33
	ADC14	10d	0.09	0.31	-	-	-	>33.33
	ADC18	12d	0.10	0.34	-	-	-	>33.33
	ADC20	13f	0.08	0.29	-	-	-	>33.33
MMAE	ADC7	5e	0.10	13.44	-	-	-	>33.33
	ADC1	2g	0.47	275	-	0.69	241	>33.33
	ADC3	3f	0.29	1.63	-	1.04	1.34	>33.33
	ADC5	4f	0.15	0.97	-	0.40	1.04	>33.33
	ADC9	6e	0.10	>33.3	-	-	-	>33.33
	ADC15	11j	0.17	>33.3	-	-	-	>33.33
	ADC10	7e	0.12	0.64	-	-	-	>33.33
	ADC12	9j	0.20	2.01	-	-	-	>33.33
	ADC13	10c	0.19	1.09	-	-	-	>33.33
	ADC17	12c	0.03	0.11	-	-	-	>33.33
	ADC19	13e	0.13	0.38	-	-	-	>33.33

表9. 不同PEG長度-ADC之IC₅₀值

測試樣品					IC ₅₀ (nM)	
毒性	DAR	ADC	PEG單元數目	連接子-毒素	JIMT-1	MCF-7
MMAE	2	ADC7	1	5e	>10.0	>10.0
		ADC1	3	2g	>10.0	>10.0
		ADC3	6	3f	>10.0	>10.0
		ADC5	12	4f	1.01	>10.0

表10. 具有不同類型連接子之MMAF ADC之IC₅₀值

ADC	連接子-毒素	SK-BR-3	JIMT-1	NCI-N87	SK-OV-3	MCF-7
ADC23	16f	0.05	0.12	0.35	0.44	>33.33
ADC34	25f	0.03	0.10	-	-	>33.33
ADC38	28e	0.03	0.05	-	-	>33.33
ADC40	29k	0.02	0.06	-	-	>33.33
ADC42	30c	0.03	0.04	-	-	>33.33
ADC44	31g	0.03	0.05	-	-	>33.33
ADC46	32d	0.04	0.08	-	-	>33.33
ADC48	33f	0.03	0.08	-	-	>33.33
ADC50	34f	0.03	0.05	-	-	>33.33
ADC53	37d	0.03	0.05	-	-	>33.33
ADC54	38b	0.05	0.12	-	-	>33.33

表11. 具有不同類型連接子之MMAE ADC之IC₅₀值

ADC	連接子-毒素	SK-BR-3	JIMT-1	NCI-N87	SK-OV-3	MCF-7
ADC24	16g	0.14	0.26	0.17	0.37	>33.33
ADC25	17d	0.03	0.10	0.36	0.37	>33.33
ADC26	18c	0.08	0.14	-	-	>33.33
ADC27	19c	0.05	0.43	0.29	0.38	>33.33
ADC28	20q	0.03	0.12	0.36	0.36	>33.33
ADC29	21i	0.03	0.41	0.31	0.49	>33.33

ADC30	22h	0.05	0.41	0.30	0.35	>33.33
ADC31	23h	0.14	0.24	-	-	>33.33
ADC32	24l	0.03	0.40	0.32	0.35	>33.33
ADC33	25e	0.04	0.23	0.27	0.33	>33.33
ADC35	26e	0.13	0.19	-	-	>33.33
ADC36	27e	0.13	0.22	-	-	>33.33
ADC37	28d	0.04	0.07	-	-	>33.33
ADC39	29j	0.03	0.11	-	-	>33.33
ADC41	30b	0.03	0.10	-	-	>33.33
ADC43	31f	0.03	0.04	-	-	>33.33
ADC45	32c	0.03	0.08	-	-	>33.33
ADC47	33e	0.04	0.07	-	-	>33.33
ADC49	34e	0.03	0.05	-	-	>33.33
ADC51	35g	0.04	0.24	0.34	-	>33.33
ADC52	36e	0.07	0.40	0.37	-	>33.33
ADC55	38e	0.04	0.07	-	-	>33.33

表12. 雜交ADC之IC₅₀值

測試樣品				IC ₅₀ (nM)				
毒素	DAR	ADC	連接子-毒素	SK-BR-3	JIMT-1	NCI-N87	SK-OV-3	MCF-7
MMAF	2	ADC2	2h	0.08	0.40	0.84	0.84	>33.33
	4	ADC23	16f	0.05	0.10	0.25	0.36	>33.33
瓢菌素	2	ADC21	14m	0.09	>33.3	0.88	0.25	>33.33
MMAF 及 瓢菌素	4	ADC58	41c	0.06	0.73	0.95	0.64	>33.33
	8	ADC78	41c	0.03	0.03	0.33	0.76	>33.33
MMAF-OMe				0.12	0.07	0.49	0.78	0.60

兩種不同毒素結合之ADC及相同毒素結合之ADC的比較

表13. 各種DAR-ADC之IC₅₀值

測試樣品			IC ₅₀ (nM)	
			JIMT-1	MCF-7
DAR#	ADC編碼	連接子-毒素		
DAR2	ADC2	2h	1.37	>33.33
DAR4	ADC23	16f	0.21	>33.33
	ADC34	25f	0.09	>33.33
	ADC76	2h	0.27	>33.33
DAR8	ADC62	44i	0.08	>33.33
	ADC77	16f	0.02	>33.33

實驗實例5. *Erbix* (LC)-葡萄糖苷酸連接子-MMAF之細胞毒性

將表現高水準EGFR之A431細胞及表現低水準EGFR之MCF-7細胞於100 µL培養基中以每孔約1000個細胞塗鋪在96孔盤中。將表現中等水準EGFR之HCC-827細胞於100 µL培養基中以每孔約5000個細胞塗鋪在96孔盤中。在37℃下在5% CO₂中培育細胞24小時。接著，將單甲基阿瑞他汀F-OMe (MMAF-OMe)、*Erbix* (LC)-G7CVIM及包含*Erbix* (LC)-G7CVIM及MMAF之抗體藥物結合物ADC64以100至0.00128 nM之濃度添加至細胞中。將細胞培育72小時且接著在添加100 µL冰冷10%三氯乙酸至各孔後在4℃下固定1小時。使用SRB染料(磺醯羅丹明B，Sigma S1402)及Molecular Devices SpectraMax 190盤式讀取器操作Softmax Pro v5計數活細胞，在540 nm下監測吸光度(表14)。

Erbix (LC)-G7CVIM針對各細胞株(A431、MCF-7及HCC-827)之IC₅₀超過100 nM。MMAF-OMe針對MCF-7細胞之IC₅₀為1.81 nM，針對HCC-827細胞之IC₅₀為1.99 nM，且針對A431細胞之IC₅₀為1.11 nM。抗體-藥物結合物ADC 64、65及66針對MCF-7細胞之IC₅₀超過100 nM，針對HCC-827細胞之IC₅₀分別為0.47、0.17及0.11 nM。ADC64展示針對

A431 細胞為 1.3 nM，因此展示優於 MMAF-OMe 之特異性，及優於 Erbitux (LC)-G7CVIM 之效能。

表14. 基於抗EGFR mAb、Erbitux之ADC之IC₅₀值

ADC編碼	細胞株		
	A431	HCC-827	MCF-7
ADC64	1.30	0.47	>33.33
ADC65	-	0.17	>33.33
ADC66	-	0.11	>33.33

實驗實例6. *ABT-806 (LC)-葡萄糖苷酸連接子-MMAF*之細胞毒性

基於 ABT-806 之 ADC 的細胞毒性針對 Samsung Medical Center (Seoul, Republic of Korea) 建立之患者來源之細胞株測試。細胞維持在補充 L-麩醯胺酸 (200 nM)、bFGF (20 ng/mL)、EGF (20 ng/mL)、N2 補充劑及 B27 補充劑之 Neurobasal®-A 培養基 (Thermo Fisher Scientific) 中。對於存活力測試，細胞等分至 96 孔盤 (5000 細胞/孔) 且在 37°C 下在 5% CO₂ 中培育 1 天，接著進行處理。在 ADC 處理後，細胞培育 72 小時。將 100 µL CellTiter-Glo® 試劑 (Promega) 添加至各孔中以分析細胞存活率。培育 10 分鐘後，使用光度計分析發光信號。

如所預期，DAR4 ADC (ADC74、ADC75) 之效能比 DAR2 ADC (ADC73) 佳。一些患者細胞對有效負載展示之敏感性少許不同。22 及 780 細胞對 MMAF 比對 MMAE 更敏感，464 細胞反之。

表15. 基於 ABT-806 之 ADC 針對患者來源之細胞株的細胞毒活性

測試樣品		患者來源之細胞株				
		vIII352T1	780	437	464	22
ABT806	ADC73	0.572	0.959	0.357	0.472	0.501
	ADC75	0.104	0.227	0.241	0.151	0.282
	ADC74	0.170	0.425	0.253	0.069	0.489

實驗實例7. 抗CD19 ADC之細胞毒性

將拉莫斯細胞(人類伯基特氏淋巴瘤細胞)於100 µL生長培養基中以20,000個細胞/孔接種於96孔盤中。在37°C下在5% CO₂中培育細胞1天。將抗CD19抗體DI-B4-(LC)-G7CVIM及ADC在100 µL培養基中自33.33 nM至5.1 pM之連續稀釋液添加至孔中，且細胞與抗體及ADC一起培育72小時。使用WST-1 (TaKaRa MK400)及Molecular Devices SpectraMax 190盤式讀取器操作Softmax Pro v5評估細胞存活率，在450 nm下監測吸光度(表16)。

拉莫斯細胞中之實驗與作為評估任何非特異性細胞毒性之陰性對照的K562細胞(不表現CD19之人類骨髓性白血病細胞)上之實驗平行進行。

ADC68及ADC69針對拉莫斯細胞顯示0.09 nM之IC₅₀，優於未結合之DI-B4 (表16)。無抗體顯示針對K562對照細胞低於33.33 nM之細胞毒性。

表16. 基於抗CD19抗體之ADC之細胞毒活性

ADC編碼	細胞株	
	拉莫斯	K562
ADC67	>33.33	>33.33
ADC68	0.09	>33.33
ADC69	0.09	>33.33

實驗實例8. 基於Rituxan之ADC之細胞毒性

將拉莫斯細胞(人類伯基特氏淋巴瘤細胞)於100 µL生長培養基中以20,000個細胞/孔接種於96孔盤中。在37°C下在5% CO₂中培育細胞1天。將Rituxan (LC)-G7CVIM及ADC在100 µL培養基中自33.33 nM至5.1 pM之連續稀釋液添加至孔中，且細胞與抗體及ADC一起培育72小時。使用

WST-1 (TaKaRa MK400)及Molecular Devices SpectraMax 190盤式讀取器操作Softmax Pro v5評估細胞存活率，在450 nm下監測吸光度(表17)。

拉莫斯細胞中之實驗與作為評估任何非特異性細胞毒性之陰性對照的K562細胞(不表現CD20之人類骨髓性白血病細胞)上之實驗平行進行。

ADC70、ADC71及ADC72針對拉莫斯細胞分別顯示4.56 nM、1.47 nM及1.78 nM之IC₅₀，優於未結合之抗CD20抗體(表17)。無抗體顯示針對K562對照細胞低於33.33 nM之細胞毒性。

表17. 基於Rituxan之ADC之細胞毒活性

ADC編碼	細胞株	
	拉莫斯	K562
ADC70	4.56	>33.33
ADC71	1.47	>33.33
ADC72	1.78	>33.33

實驗實例9. β-葡萄糖苷酸酶敏感性之差異

含ADC之0.06 M乙酸鈉緩衝液(pH 5.2)等分至1.5 mL微管中。混合物中ADC之最終濃度調整至12 μM。將0.001 μg人類β-葡萄糖苷酸酶(R&D systems：6144-GH-020)添加至各管中。接著混合物在37°C水浴下培育3小時。反應藉由添加冷PBS緩衝液(pH 7.4)至15倍稀釋來終止。ADC-模式藉由β-葡萄糖苷酸酶之改變藉由HIC-HPLC分析。藉由剩餘%目測酶活性之功效(圖10)。

敏感性似乎歸因於連接子-毒素部分之分支單元(BR)。當Lys位於BR中時，極其有效地發生毒素釋放。醯胺及胺展示比Lys更少之敏感性。

實驗實例10. ADC之血漿穩定性

為在ADC2 (Herceptin-LBG-MMAF，DAR2)與Kadcyla之間比較血

漿穩定性，將彼等ADC在小鼠及人類血漿中培育5秒(0h)或96小時(96h)，接著使用SK-BR3細胞進行SRB活體外細胞毒性測試72小時。

血漿培育之ADC2保留有效細胞毒性(IC₅₀無改變；對於MP，為0.06 (0h)及0.07 nM (96h)，對於HP，為0.08 (0h)及0.08 nM (96h))，而血漿培育之Kadcyla顯示與0h Kadcyla相比，細胞毒性下降 (IC₅₀增加；對於MP，為0.26 (0h)及1.59 nM (96h)，對於HP，為0.29 (0h)及4.21 nM (96h)) (圖11)。

為表徵由各種抗體製成之ADC之血漿穩定性，將ADC在人類血漿中培育5秒(0h)或168小時(168h)，接著使用SK-BR3細胞進行SRB活體外細胞毒性測試72小時。(表18-20及圖12)

表18. 基於Herceptin之ADC之血漿穩定性(nM)

測試樣品			血漿培育時間	
			0h	168h
MMAF-OMe			0.48	N.D.
Herceptin	MMAF	ADC2	0.09	0.15
		ADC6	0.07	0.09
		ADC8	0.11	0.18
		ADC14	0.06	0.08
		ADC16	0.05	0.07
		ADC23	0.04	0.05
		ADC34	0.03	0.04
		ADC40	0.03	0.05
		ADC46	0.03	0.03
		ADC48	0.03	0.04
		ADC62	0.02	0.02
	MMAE	ADC1	0.26	0.41
		ADC3	0.20	0.32

		ADC5	0.19	0.31
		ADC7	0.17	0.26
		ADC12	0.51	0.79
		ADC13	0.63	0.87
		ADC15	0.52	0.70
		ADC24	0.08	0.11
		ADC25	0.07	0.12
		ADC26	0.17	0.22
		ADC27	0.10	0.14
		ADC28	0.07	0.08
		ADC29	0.06	0.08
		ADC30	0.15	0.19
		ADC31	0.08	0.12
		ADC32	0.05	0.09
		ADC33	0.04	0.09
		ADC35	0.11	0.21
		ADC36	0.09	0.12
		ADC39	0.12	0.17
		ADC45	0.04	0.05
		ADC47	0.04	0.05
		ADC61	0.32	0.32

表19. 基於抗CD19抗體之ADC之血漿穩定性(nM)

測試樣品		血漿培育	
		0h	168h
MMAF-OMe		0.160	N.D.
CD19	ADC68	0.036	0.048
	ADC69	0.047	0.135

表20. 基於抗CD20抗體之ADC之血漿穩定性(nM)

測試樣品		血漿培育	
		0h	168h
MMAF-OMe		0.160	N.D.
CD20	ADC71	4.001	4.134
	ADC72	2.026	3.851

實驗實例11. Herceptin®及ADC之藥物動力學

向雄性史泊格多利大鼠(Male Sprague Dawley rat)靜脈內給與3 mg/kg抗體或抗體-藥物結合物。在給藥後多個時間點，取血液樣品，在冰水中冷卻，且分離血漿。血漿冷凍在-80℃下，隨後進行LC/MS/MS分析。

將20 µL各樣品與340 µL PBS及60 µL 蛋白A磁性珠粒混合，且在室溫下在平緩震盪下培育2小時。用PBS洗滌珠粒三次。接著，將25 µL內標(10 µg/mL同位素標記肽)、75 µL RapiGest SF (Waters)及10 µL二硫蘇糖醇添加至珠粒中。將混合物震盪1分鐘且接著在60℃下培育1小時。將25 µL碘乙酸添加至混合物中，混合物震盪1分鐘，且接著在室溫下培育30分鐘。將10 µL定序級經修飾之胰蛋白酶(Promega)添加至混合物中，混合物震盪1分鐘，且在37℃下混合物培育隔夜。將15 µL鹽酸添加至混合物中，混合物震盪1分鐘，且接著在37℃下混合物培育30分鐘。將混合物在4℃下在5000×g下離心10分鐘且上清液轉移至HPLC小瓶中。

液相層析-質譜分析系統由兩個Shimadzu LC-20AD泵、Shimadzu CBM-20A HPLC 泵 控 制 器 (Shimadzu Corporation, Columbia, MD, USA)、CTC HTS PAL自動進樣器(CEAP Technologies, Carrboro, NC, USA)及三重飛行時間5600質譜儀(Triple TOF MS) (AB Sciex, Foster

City, CA, USA)組成。分析型管柱為Phenomenex Kinetex XB-C18管柱 2.1×30 (2.6 μm)。HPLC用水/乙腈梯度進行且用0.1%甲酸酸化。注射體積為10 μL 。裝備有DuosprayTM離子源之Triple TOF MS用於完成高解析度實驗。Triple TOF MS以陽性離子模式操作。高純度氮氣用於噴灑器/DuosprayTM及氣簾。源溫設定在500°C下，氣簾流速為30 L/min。離子噴霧電壓設定在5500 V下，去簇電壓為145 V，且碰撞能量為38V。產物離子模式用作掃描模式。用Windows® (Microsoft)操作之Analyst® TF 1.6版(AB Sciex)用於儀器控制及資料獲取。用MultiQuant® 2.1.1版(AB Sciex)進行峰整合。用MultiQuant® 2.1.1版計算峰面積比率、標準曲線線性回歸、樣品濃度值及描述統計。使用濃度為0.1、0.4、1、2、5、10、20、40、80及100 $\mu\text{g/mL}$ 之標準溶液，校準LC/MS/MS。代表性PK型態展示在圖13中。ADC2 (Herceptin (LC)-MMAF，DAR2)之PK型態極其類似於Herceptin。

實驗實例12. 分支連接子-毒素中PEG(連接單元)組合作用

為鑑別影響ADC之PK型態之關鍵屬性，測試連接單元之不同長度及結構(PEG數目及配置)。用於PK分析之實驗如實驗實例9中所述進行。雖然ADC23 (一種DAR4 ADC)在活體外及活體內比DAR2 ADC更有效，但其在半衰期及AUC上之PK型態降低(圖14)。藉由連接子-毒素自16f替換為25f (附接其他連接單元(3個PEG)於分支單元(BR)後)，PK型態恢復多至Herceptin (圖14)。此等作用在基於MMAE之ADC、ADC24及ADC33中很好地再現(圖15)。因為MMAE比MMAF疏水性更大，所以如藉由ADC1及ADC24所示，基於MMAE之ADC的PK型態變差。添加更長PEG單元為延伸半衰期及AUC之傳統應用。然而，當將ADC1與ADC5比較

時，PEG單元數目自3簡單伸長至12未展示大的差異。換言之，藉由直鏈連接單元(化合物2g或4f)替換為分支連接單元(化合物11j、ADC15)，PK型態顯著改善(圖16)，表明PK之關鍵屬性可能不僅僅為簡單的長度，而是連接單元之結構。

實驗實例13. 親水性連接單元對ADC之PK的作用

用於ADC之許多有效負載具有疏水性特徵，引起不良PK特性。為抵消疏水性，親水性化合物作為連接單元之一部分測試。插入諸如Asp之親水性化合物增強ADC之AUC及半衰期(圖17、18、19)。在DAR2之情況下，具有包括Asp之連接單元之ADC展示比Herceptin更高之AUC (圖17、18)。可在具有DAR4之ADC中觀測到諸如Asp或Glu之極性胺基酸的抵消作用(圖19、20)。ADC49 (2個Asp)及ADC52 (2個D-Glu)分別在AUC及半衰期方面優於ADC47 (1個Asp)及ADC51 (1D-Glu)。

實驗實例14. 活體內功效

使冷凍JIMT-1細胞儲備液解凍且在37°C、5% CO₂條件下培養。存活力超過95%之最佳條件之JIMT-1細胞用於植入。懸浮於50 µL冷生理食鹽水中之 5×10^6 個細胞植入balb/c-裸小鼠之右後腿。每組5隻小鼠用於實驗。定期監測腫瘤形成及生長。藉由下式計算腫瘤體積；體積= $(a^2b)/2$ ，「a」意謂短直徑且「b」意謂長直徑。

當腫瘤體積達至約200 mm³時，選擇具有平均值之小鼠且根據腫瘤體積分組。接著，小鼠用PBS (媒劑對照)或圖21及22中指示之ADC處理。在實驗時間期間腫瘤尺寸一週測定2次，時間間隔為3~4天。自第一天投與至最終日期量測之腫瘤體積繪製成腫瘤生長曲線。

藉由單次注射測試代表性ADC。一般而言，具有含有Lys之分支單元

(BR)之ADC比具有含有醯胺之BR之ADC更好的功效。

以引用的方式併入

本文中所引用之專利、公開之專利申請案及非專利性參考文獻各以全文引用之方式併入本文中。

相等物

熟習此項技術者將認識到，或使用至多常規實驗即能夠確定本文所述之本發明之特定實施例的許多相等物。此類相等物意欲涵蓋於以下申請專利範圍。

【發明申請專利範圍】

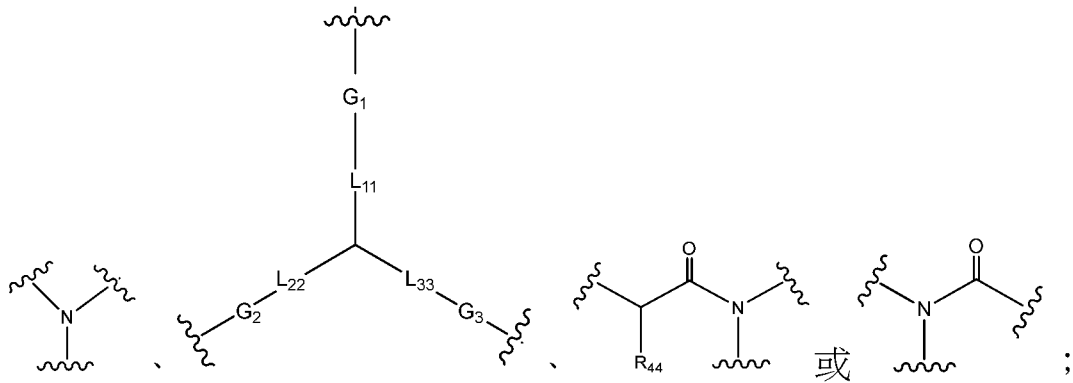
【請求項1】

一種配位體-藥物結合物，其包含配位體及一或多個共價偶合於該配位體之分支連接子，其中各分支連接子包含：

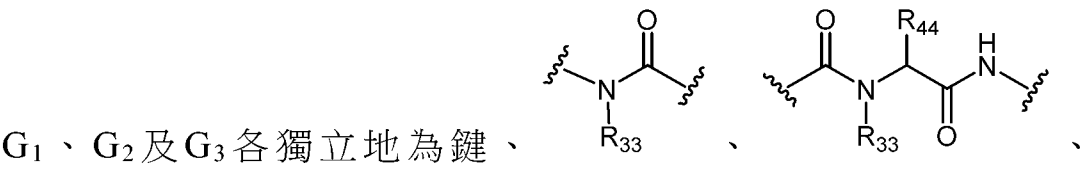
- i)分支單元，其藉由主要連接子共價偶合於該配位體；
- ii)第一分支，其包含藉由次要連接子及裂解基團共價偶合於該分支單元之第一活性劑；及
- iii)第二分支，其包含：
 - a)第二活性劑，其藉由次要連接子及第二裂解基團共價偶合於該分支單元；或
 - b)聚乙二醇部分，其共價偶合於該分支單元，

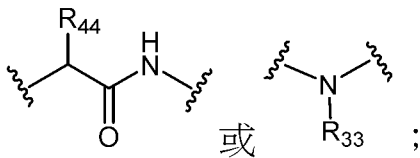
進一步其中該主要連接子及該次要連接子獨立地包含具有1至100個碳原子之伸烷基；

分支單元由以下結構表示：



L₁₁、L₂₂、L₃₃各獨立地為直接鍵或-C_nH_{2n}-，其中n為整數1至30；

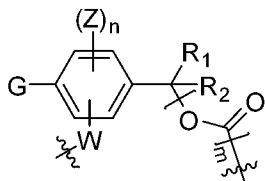




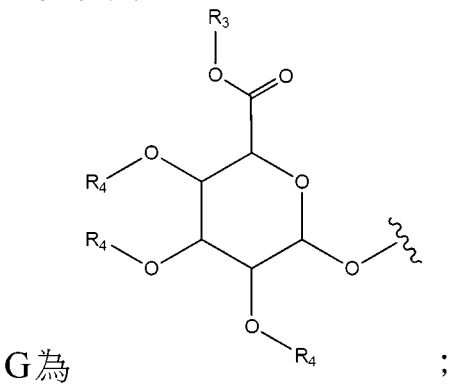
R₃₃為氫或C₁-C₃₀烷基；且

R₄₄為氫或-L₄-COOR₅，其中L₄為直接鍵或-C_nH_{2n}-，其中n為整數1至10，且R₅為氫或C₁-C₃₀烷基；且

各裂解基團具有下式：



進一步其中：



G為

W表示-C(O)NR'-且該C(O)直接結合於該苯環；

R'及R''各獨立地為氫、(C₁-C₈)烷基、單或二羧基(C₁-C₈)烷基、(C₃-C₈)環烷基、(C₁-C₈)烷氧基、(C₁-C₈)烷硫基、單或二(C₁-C₈)烷基胺基、(C₃-C₂₀)雜芳基或(C₆-C₂₀)芳基且W偶合於該分支單元；

各Z獨立地表示氫、(C₁-C₈)烷基、醯胺、羧酸、羧酸酯、鹵素、氰基或硝基；

n為整數1至3；

m為0或1；

R_1 及 R_2 各獨立地為氫、 (C_1-C_8) 烷基或 (C_3-C_8) 環烷基，或 R_1 及 R_2 連同其附接之碳原子一起形成 (C_3-C_8) 環烷基環；

R_3 為氫或羧基保護基；且

各 R_4 獨立地為氫或羥基保護基。

【請求項2】

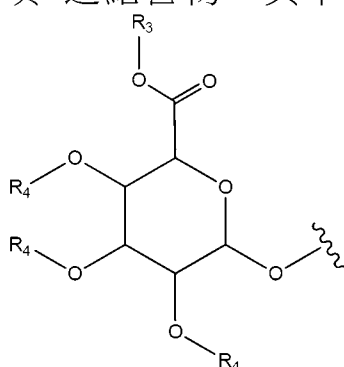
如請求項1之結合物，其中各 Z 獨立地表示氫、 (C_1-C_8) 烷基、醯胺、羧酸、羧酸酯、鹵素、氰基或硝基。

【請求項3】

如請求項1之結合物，其中 W 表示 $-C(O)NR'$ -且 W 之該氮為胺基酸之氮。

【請求項4】

如請求項1之結合物，其中：



G 為

R_3 為氫或羧基保護基；且

各 R_4 獨立地為氫或羥基保護基。

【請求項5】

如請求項4之結合物，其中 R_3 為氫且各 R_4 為氫。

【請求項6】

如請求項1之結合物，其中該主要連接子包含伸烷基，該伸烷基具有1至100個碳原子，且：

- i) 該伸烷基包括至少一個不飽和鍵；
- ii) 該伸烷基包括至少一個伸雜芳基；
- iii) 該伸烷基之碳原子經一或多個選自氮(N)、氧(O)及硫(S)之雜原子置換；或
- iv) 該伸烷基進一步經一或多個具有1至20個碳原子之烷基取代。

【請求項7】

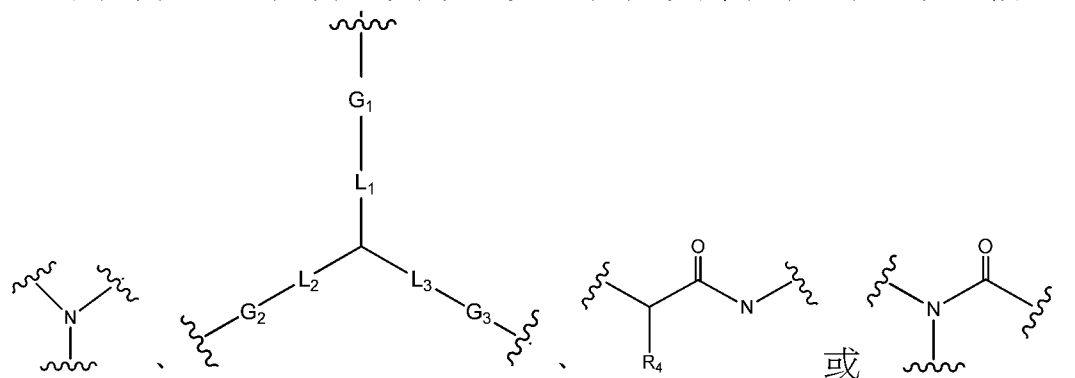
如請求項6之結合物，其中該伸烷基之至少一個碳原子經氮置換，該主要連接子包含親水性胺基酸之至少兩個原子，且該氮與該親水性胺基酸之主鏈羰基形成肽鍵。

【請求項8】

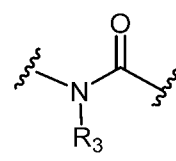
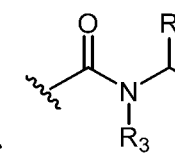
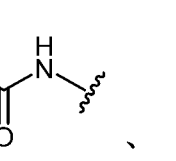
如請求項1之結合物，其中該主要連接子包含胺基酸，且該胺基酸包含側鏈，該側鏈具有在水溶液中在中性pH下載有電荷之部分。

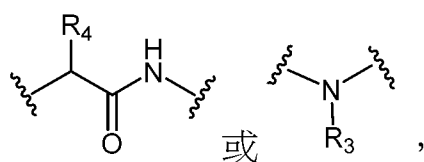
【請求項9】

如請求項1之結合物，其中至少一個分支單元具有以下結構：



其中 L_1 、 L_2 、 L_3 各獨立地為直接鍵或 $-C_nH_{2n}-$ ，其中 n 為整數1至30，

其中 G_1 、 G_2 、 G_3 各獨立地為直接鍵、、、、



其中 R_3 為氫或 C_1 - C_{30} 烷基；

其中 R_4 為氫或 $-L_4-COOR_5$ ，其中 L_4 為直接鍵或 $-C_nH_{2n}-$ ，其中 n 為整數1至10，且 R_5 為氫或 C_1 - C_{30} 烷基。

【請求項10】

如請求項1之結合物，其中該分支單元藉由醯胺部分偶合於該主要連接子，且進一步其中該主要連接子包含該醯胺之羰基。

【請求項11】

如請求項1之結合物，其中該分支單元藉由醯胺部分偶合於該主要連接子且該第一分支或該第二分支包含該醯胺之羰基。

【請求項12】

如請求項1之結合物，其中至少一個分支單元為親水性胺基酸。

【請求項13】

如請求項12之結合物，其中該親水性胺基酸為精胺酸、天冬胺酸、天冬醯胺、麩胺酸、麩醯胺酸、組胺酸、離胺酸、鳥胺酸、脯胺酸、絲胺酸或蘇胺酸。

【請求項14】

如請求項1之結合物，其中兩個、三個或四個分支連接子偶合於該配位體。

【請求項15】

如請求項1之結合物，其中各分支連接子偶合於一種活性劑。

【請求項16】

如請求項1之結合物，其中該活性劑藉由可裂解鍵偶合於該第一分支。

【請求項17】

如請求項1之結合物，其中至少兩種不同活性劑偶合於不同分支連接子。

【請求項18】

如請求項1之結合物，其中該主要連接子藉由硫醚鍵共價結合於該配位體，且該硫醚鍵包含該配位體之半胱胺酸之硫原子。

【請求項19】

如請求項18之結合物，其中該配位體包含由CYYX表示之胺基酸模體；進一步其中：

C表示半胱胺酸；

Y每次出現時均獨立地表示脂族胺基酸；且

X每次出現時均獨立地表示麩醯胺酸、麩胺酸、絲胺酸、半胱胺酸、甲硫胺酸、丙胺酸或白胺酸。

【請求項20】

如請求項19之結合物，其中該胺基酸模體位於該配位體之C端。

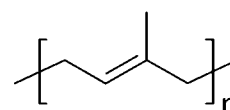
【請求項21】

如請求項19之結合物，其中該胺基酸模體為CVIM或CVLL。

【請求項22】

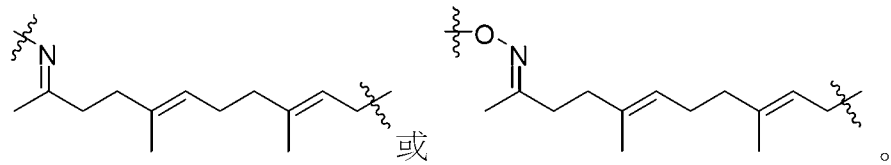
如請求項18之結合物，其中該硫醚鍵包含至少一個由

表示之異戊二烯基單元之碳原子且n為至少2。



【請求項23】

如請求項1之結合物，其中該連接子包含：



【請求項24】

如請求項1之結合物，其中該主要連接子、該第一分支或兩者包含由
- $(\text{CH}_2)_r(\text{V}(\text{CH}_2)_p)_q$ -、 $-\text{((CH}_2)_p\text{V)}_q$ -、 $-(\text{CH}_2)_r(\text{V}(\text{CH}_2)_p)_q\text{Y-}$ 、 $-\text{((CH}_2)_p\text{V)}_q(\text{CH}_2)_r$ 、 $-\text{Y}(\text{((CH}_2)_p\text{V)}_q$ -或 $-(\text{CH}_2)_r(\text{V}(\text{CH}_2)_p)_q\text{YCH}_2$ -表示之連接單元，

其中：

r 為整數0至10；

p 為整數1至10；

q 為整數1至20；

V 及 Y 各獨立地為單一鍵、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{NR}_{21}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}_{22}-$ 、 $-\text{NR}_{23}\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{NR}_{24}\text{SO}_2-$ 或 $-\text{SO}_2\text{NR}_{25}-$ ；且

R_{21} 至 R_{25} 各獨立地為氫、 $(\text{C}_1\text{-C}_6)$ 烷基、 $(\text{C}_1\text{-C}_6)$ 烷基 $(\text{C}_6\text{-C}_{20})$ 芳基或 $(\text{C}_1\text{-C}_6)$ 烷基 $(\text{C}_3\text{-C}_{20})$ 雜芳基。

【請求項25】

如請求項24之結合物，其中該主要連接子、該第一分支或兩者包含由 $-\text{((CH}_2)_p\text{V)}_q$ -表示之連接單元。

【請求項26】

如請求項24之結合物，其中 V 及 Y 各獨立地為 $-\text{O}-$ 。

【請求項27】

如請求項24之結合物，其中：

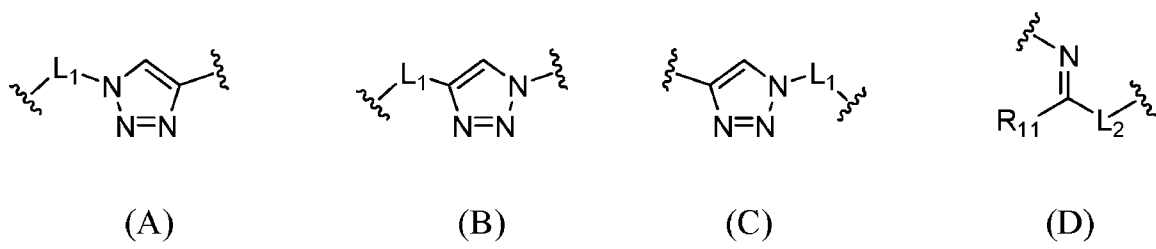
r為2；
p為2；
q為2、5或11，且
V為-O-。

【請求項28】

如請求項1之結合物，其中該主要連接子包含藉由1,3-偶極環加成反應、雜狄爾斯-阿德反應(hetero-Diels-Alder reaction)、親核取代反應、非醇醛型羰基反應、碳-碳複鍵加成、氧化反應或點擊反應形成之結合單元。

【請求項29】

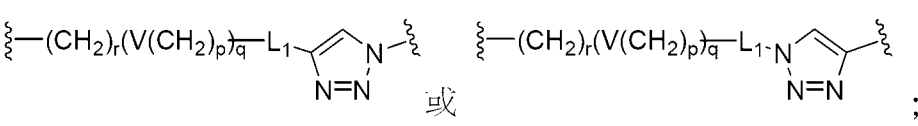
如請求項28之結合物，其中該結合單元由式A、B、C或D表示：



其中：
L₁為單一鍵或具有1至30個碳原子之伸烷基；
R₁₁為氫或具有1至10個碳原子之烷基；且
L₂為具有1至30個碳原子之伸烷基。

【請求項30】

如請求項29之結合物，其中該主要連接子包含



其中，
V為單一鍵、-O-、-S-、-NR₂₁-、-C(O)NR₂₂-、-NR₂₃C(O)-、-

NR₂₄SO₂-或-SO₂NR₂₅-；

R₂₁至R₂₅各獨立地為氫、(C₁-C₆)烷基、(C₁-C₆)烷基(C₆-C₂₀)芳基或(C₁-C₆)烷基(C₃-C₂₀)雜芳基；

r為整數1至10；

p為整數0至10；

q為整數1至20；且

L₁為單一鍵。

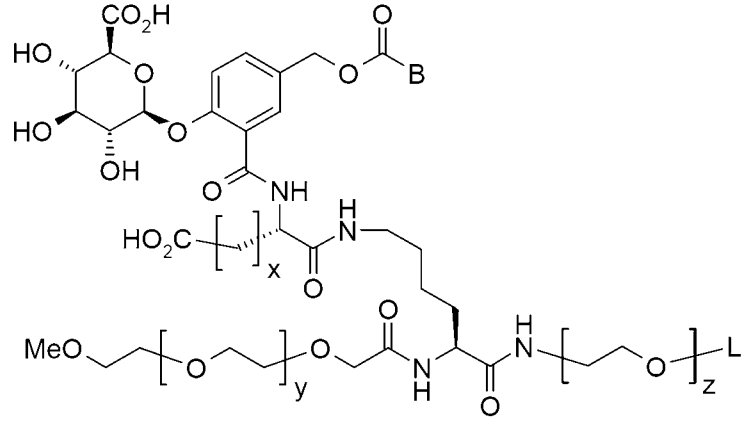
【請求項31】

如請求項1之結合物，其中該主要連接子包含O取代之脞，其中：

- i) 該脞之氧原子經將該脞共價連接於該活性劑之基團取代；且該脞之碳原子經將該脞共價連接於該配位體之基團取代；或
- ii) 該脞之氧原子經將該脞共價連接於該配位體之基團取代；且該脞之碳原子經將該脞共價連接於該活性劑之基團取代。

【請求項32】

如請求項1之結合物，其中該結合物包含：



其中：

B表示活性劑，

x表示整數1至3；

y表示整數0至20；

z表示整數1至20；且

L表示與該配位體之連接。

【請求項33】

如請求項1之結合物，其中該配位體為抗體。

【請求項34】

如請求項1之結合物，其中該配位體為單株抗體、多株抗體、抗體片段、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv、單鏈Fv (「scFv」)、雙功能抗體、線抗體、雙特異性抗體、多特異性抗體、嵌合抗體、人類化抗體、人類抗體或包含抗體之抗原結合部分的融合蛋白。

【請求項35】

如請求項1至33中任一項之結合物，其中該配位體選自莫羅單抗-CD3阿昔單抗(muromonab-CD3 abciximab)、利妥昔單抗(rituximab)、達利珠單抗(daclizumab)、帕利珠單抗(palivizumab)、英利昔單抗(infliximab)、曲妥珠單抗(trastuzumab)、依那西普(etanercept)、巴利昔單抗(basiliximab)、吉妥珠單抗(gemtuzumab)、阿侖單抗(alemtuzumab)、替伊莫單抗(ibritumomab)、阿達木單抗(adalimumab)、阿法賽特(alefacept)、奧馬珠單抗(omalizumab)、艾法珠單抗(efalizumab)、托西莫單抗(tositumomab)、西妥昔單抗(cetuximab)、ABT-806、貝伐單抗(bevacizumab)、那他珠單抗(natalizumab)、蘭比珠單抗(ranibizumab)、帕尼單抗(panitumumab)、艾庫組單抗(eculizumab)、利納西普(rilonacept)、賽妥珠單抗(certolizumab)、羅米司亭(romiplostim)、AMG-531、戈利木單抗(golimumab)、優特克單抗

(ustekinumab)、ABT-874、貝拉西普(belatacept)、貝利單抗(belimumab)、阿塞西普(atacept)、抗CD20抗體、康納單抗(canakinumab)、托西利單抗(tocilizumab)、阿利珠單抗(atlizumab)、美泊利單抗(mepolizumab)、帕妥珠單抗(pertuzumab)、HuMax CD20、曲美單抗(tremelimumab)、替西單抗(ticilimumab)、伊派利單抗(ipilimumab)、IDEC-114、伊諾妥珠單抗(inotuzumab)、HuMax EGFR、阿柏西普(aflibercept)、HuMax-CD4、替利珠單抗(teplizumab)、奧昔珠單抗(otelixizumab)、卡托莫西單抗(catumaxomab)、抗EpCAM抗體IGN101、阿德卡單抗(adecatumomab)、奧戈伏單抗(oregovomab)、迪奴圖單抗(dinutuximab)、吉瑞昔單抗(girentuximab)、德諾單抗(denosumab)、貝頻珠單抗(bapineuzumab)、莫維珠單抗(motavizumab)、依夫單抗(efumgumab)、瑞昔單抗(raxibacumab)、LY2469298及維托珠單抗(veltuzumab)。

【請求項36】

如請求項1之結合物，其中至少一種活性劑選自化學治療劑及毒素。

【請求項37】

如請求項1之結合物，其中至少一種活性劑係選自：

(a) 埃羅替尼(erlotinib)、硼替佐米(bortezomib)、氟維司群(fulvestrant)、舒癌特(sutent)、來曲唑(letrozole)、甲磺酸伊馬替尼(imatinib mesylate)、PTK787/ZK 222584、奧沙利鉑(oxaliplatin)、5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)、甲醯四氫葉酸(leucovorin)、雷帕黴素(rapamycin)、拉帕替尼(lapatinib)、洛那法尼(lonafarnib)、索拉非尼(sorafenib)、吉非替尼(gefitinib)、AG1478、AG1571、嚙替派

(thiotepa)、環磷醯胺(cyclophosphamide)、白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)、哌泊舒凡(piposulfan)、苯唑多巴(benzodopa)、卡波醯(carboquone)、米特多巴(meturedopa)、尤利多巴(uredopa)、伸乙基亞胺、六甲蜜胺(altretamine)、三伸乙基三聚氰胺、三伸乙基磷醯胺、三伸乙基硫代磷醯胺、三羥甲基蜜胺(trimethylolomelamine)、布拉他辛(bullatacin)、布拉他辛酮(bullatacinone)、喜樹鹼(camptothecin)、拓朴替康(topotecan)、苔蘚蟲素(bryostatin)、海綿抑素(callystatin)、CC-1065、阿多來新(adozelesin)、卡折來新(carzelesin)、比折來新(bizelesin)、念珠藻素1、念珠藻素8、海兔毒素(dolastatin)、倍癌黴素(duocarmycin)、KW-2189、CB1-TM1、艾榴塞洛素(eleutherobin)、水鬼蕉鹼(pancratistatin)、沙考地汀(sarcodictyin)、海綿抑素(spongistatin)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、氯磷醯胺(cholophosphamide)、雌氮芥(estramustine)、異環磷醯胺(ifosfamide)、甲氮芥(mechlorethamine)、美法侖(melphalan)、新恩比興(novembichin)、芬司特瑞(phenesterine)、潑尼氮芥(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard)、卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)、雷莫司汀(ranimustine)、卡奇黴素(calicheamicin)、卡奇黴素 γ 1(calicheamicin gamma 1)、卡奇黴素 Ω 1(calicheamicin omega 1)、達內黴素(dynemicin)、達內黴素A、氯屈膦酸鹽(clodronate)、埃斯

培拉黴素(esperamicin)、新抑癌蛋白發色團(neocarzinostatin chromophore)、阿克拉黴素(aclacinomysins)、放射菌素(actinomycin)、安麴黴素(antrmycin)、偶氮絲胺酸(azaserine)、博來黴素(bleomycin)、放線菌素C(cactinomycin)、卡拉比辛(carabycin)、洋紅黴素(carninomycin)、嗜癌菌素(carzinophilin)、色黴素(chromomycin)、放線菌素D(dactinomycin)、道諾黴素(daunorubicin)、德托黴素(detorubucin)、6-重氮基-5-側氧基-L-正白胺酸、小紅莓(doxorubicin)、嗎啉基-小紅莓、氰基嗎啉基-小紅莓、2-吡咯啉基-小紅莓、脂質體小紅莓、去氧小紅莓(deoxydoxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、麻西羅黴素(marcellomycin)、絲裂黴素C(mitomycin C)、黴酚酸(mycophenolic acid)、諾加黴素(nogalamycin)、橄欖黴素(olivomycin)、培洛黴素(peplomycin)、潑非黴素(potfiromycin)、嘌呤黴素(puromycin)、奎那黴素(quelamycin)、羅多比星(rodorubicin)、鏈黴素(streptomigrin)、鏈脲菌素(streptozocin)、殺結核菌素(tubercidin)、烏苯美司(ubenimex)、淨司他丁(zinostatin)、左柔比星(zorubicin)、5-氟尿嘧啶、迪諾特寧(denopterin)、甲胺喋呤(methotrexate)、蝶羅呤(pteropterin)、曲美沙特(trimetrexate)、氟達拉賓(fludarabine)、6-巯基嘌呤(6-mercaptopurine)、硫米嘌呤(thiamiprine)、硫鳥嘌呤(thiguanine)、安西他濱(ancitabine)、阿紫胞苷(azacitidine)、6-氮尿苷(6-azauridine)、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、雙去氧尿苷(dideoxyuridine)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依諾他濱

(enocitabine)、氟尿苷(floxuridine)、卡魯甾酮(calusterone)、屈他雄酮丙酸鹽(dromostanolone propionate)、環硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)、甾內酯(testolactone)、胺魯米特(aminogluthimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane)、亞葉酸(folinic acid)、乙醯葡萄糖酯(aceglatone)、醛磷醯胺糖苷(aldophosphamide glycoside)、胺基乙醯丙酸(aminolevulinic acid)、恩尿嘧啶(eniluracil)、安吡啶(amsacrine)、貝塔布辛(bestrabucil)、比生群(bisantrene)、艾達曲克(edatraxate)、得弗伐胺(defofamine)、秋水仙胺(demecolcine)、地吡醯(diaziquone)、艾弗鳥胺酸(elfornithine)、依利醋鉍(elliptinium acetate)、依託格魯(etoglucid)、硝酸鎂(gallium nitrate)、羥基脲(hydroxyurea)、蘑菇多醣(lentinan)、氯尼達明(lonidainine)、美登素(maytansine)、安絲菌素(ansamitocins)、丙脒脲(mitoguazone)、米托蒽醯(mitoxantrone)、莫比達摩(mopidanmol)、二胺硝吡啶(nitraerine)、噴司他丁(pentostatin)、蛋胺氮芥(phenamet)、吡柔比星(pirarubicin)、洛索蒽醯(losoxantrone)、2-乙基醯肼(2-ethylhydrazide)、丙卡巴肼(procarbazine)、多醣-k(polysaccharide-k)、雷佐生(razoxane)、根瘤菌素(rhizoxin)、西索菲蘭(sizofiran)、螺旋鍺(spirogermanium)、細交鏈孢菌酮酸(tenuazonic acid)、三亞胺醯(triaziquone)、2,2',2''-三氯三乙胺、T-2毒素、弗納庫林A(verracurin A)、桿孢菌素A(roridin A)及胺癸叮(anguidine)、胺基甲酸酯(urethane)、長春地辛(vindesine)、達卡巴嗪(dacarbazine)、甘露氮芥(mannomustine)、二溴甘露醇(mitobronitol)、二溴衛矛醇

(mitolactol)、哌泊溴烷(pipobroman)、加西托星(gacytosine)、阿拉伯糖苷(arabinoside)、環磷醯胺、噻替派、太平洋紫杉醇(paclitaxel)、太平洋紫杉醇經白蛋白工程改造之奈米粒子調配物、多西他賽(doxetaxel)、苯丁酸氮芥、吉西他濱(gemcitabine)、6-硫代鳥嘌呤、巯基嘌呤、順鉑(cisplatin)、卡鉑(carboplatin)、長春鹼(vinblastine)、鉑、依託泊苷(etoposide)、異環磷醯胺(ifosfamide)、米托蒽醌(mitoxantrone)、長春新鹼(vincristine)、長春瑞寶(vinorelbine)、諾凡特龍(novantrone)、替尼泊苷(teniposide)、依達曲沙(edatrexate)、道諾黴素、胺基喋呤(aminopterin)、希羅達(xeloda)、伊班膦酸鹽(ibandronate)、CPT-11、拓撲異構酶抑制劑 RFS 2000、二氟甲基鳥胺酸(difluoromethylornithine)、視黃酸、卡培他濱(capecitabine)或前述任一者之醫藥學上可接受之鹽、溶劑合物或酸；

(b)單核因子、淋巴因子、傳統多肽激素、副甲狀腺激素、甲狀腺素、鬆弛素、鬆弛素原、醣蛋白激素、促卵泡激素、促甲狀腺激素、促黃體激素、肝生長因子纖維母細胞生長因子、促乳素、胎盤催乳激素、腫瘤壞死因子- α 、腫瘤壞死因子- β 、苗勒氏管抑制物質、小鼠促性腺激素相關肽、抑制素、活化素、血管內皮生長因子、血小板生成素、紅血球生成素、骨誘導因子、干擾素、干擾素- α 、干擾素- β 、干擾素- γ 、群落刺激因子(「CSF」)、巨噬細胞-CSF、顆粒細胞-巨噬細胞-CSF、顆粒細胞-CSF、介白素(「IL」)、IL-1、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、腫瘤壞死因子、TNF- α 、TNF- β 、多肽因子、LIF、

kit配位體或前述任一者之組合；

(c)白喉毒素(diphtheria toxin)、肉毒桿菌毒素(botulium toxin)、破傷風毒素(tetanus toxin)、痢疾毒素、霍亂毒素、瓢菌素(amanitin)、瓢菌素衍生物、 α -瓢菌素、吡咯并苯并二氮吡(pyrrolobenzodiazepine)、吡咯并苯并二氮吡衍生物、河豚毒素鹼(tetrodotoxin)、短裸甲藻毒素(brevetoxin)、雪卡毒素(ciguatoxin)、蓖麻毒素、AM毒素、妥布賴森(tobramycin)、格爾德黴素(geldanamycin)、類美登素(maytansinoid)、卡奇黴素、道諾黴素、小紅莓、甲胺喋呤、長春地辛、SG2285、海兔毒素、海兔毒素類似物、阿瑞他汀(auristatin)、念珠藻素(cryptophycin)、喜樹鹼、喜樹鹼衍生物及代謝物、根瘤菌素、根瘤菌素衍生物、CC-1065、CC-1065類似物或衍生物、倍癌黴素、烯二炔抗生素、埃斯培拉黴素、埃坡黴素(epothilone)、阿那非德(azonafide)、阿匹立定(aplidine)、類毒素或前述任一者之組合；

(d)親和配位體，其中該親和配位體為受質、抑制劑、刺激劑、神經傳導物、放射性同位素或前述任一者之組合；

(e)放射性標記、 ^{32}P 、 ^{35}S 、螢光染料、電子緻密試劑、酶、生物素、抗生蛋白鏈菌素、地高辛、半抗原、免疫原性蛋白質、具有與標靶互補之序列的核酸分子或前述任一者之組合；

(f)免疫調節化合物、抗癌劑、抗病毒劑、抗細菌劑、抗真菌劑及抗寄生蟲劑或前述任一者之組合；

(g)他莫昔芬(tamoxifen)、雷洛昔芬(raloxifene)、曲洛昔芬(droloxifene)、4-羥基他莫昔芬、曲沃昔芬(trioxifene)、克呋昔芬

(keoxifene)、LY117018、奧那司酮(onapristone)或托瑞米芬(toremifene)；

(h) 4(5)-咪唑、胺魯米特、乙酸甲地孕酮、依西美坦、來曲唑或阿那曲唑；

(i) 氟他胺(flutamide)、尼魯胺(nilutamide)、比卡魯胺(bicalutamide)、亮丙立德(leuprolide)、戈舍瑞林(goserelin)或曲沙他濱(troxacitabine)；

(j) 芳香酶抑制劑；

(k) 蛋白激酶抑制劑；

(l) 脂質激酶抑制劑；

(m) 反義寡核苷酸；

(n) 核糖核酸酶；

(o) 疫苗；以及

(p) 抗血管生成劑。

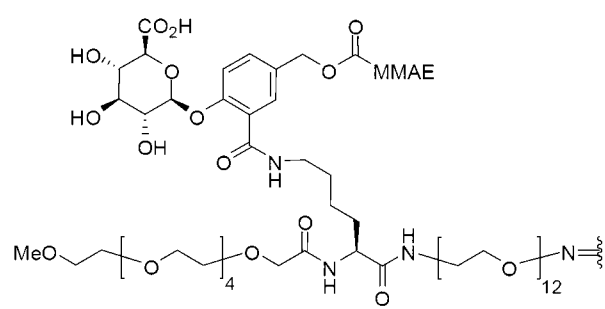
【請求項38】

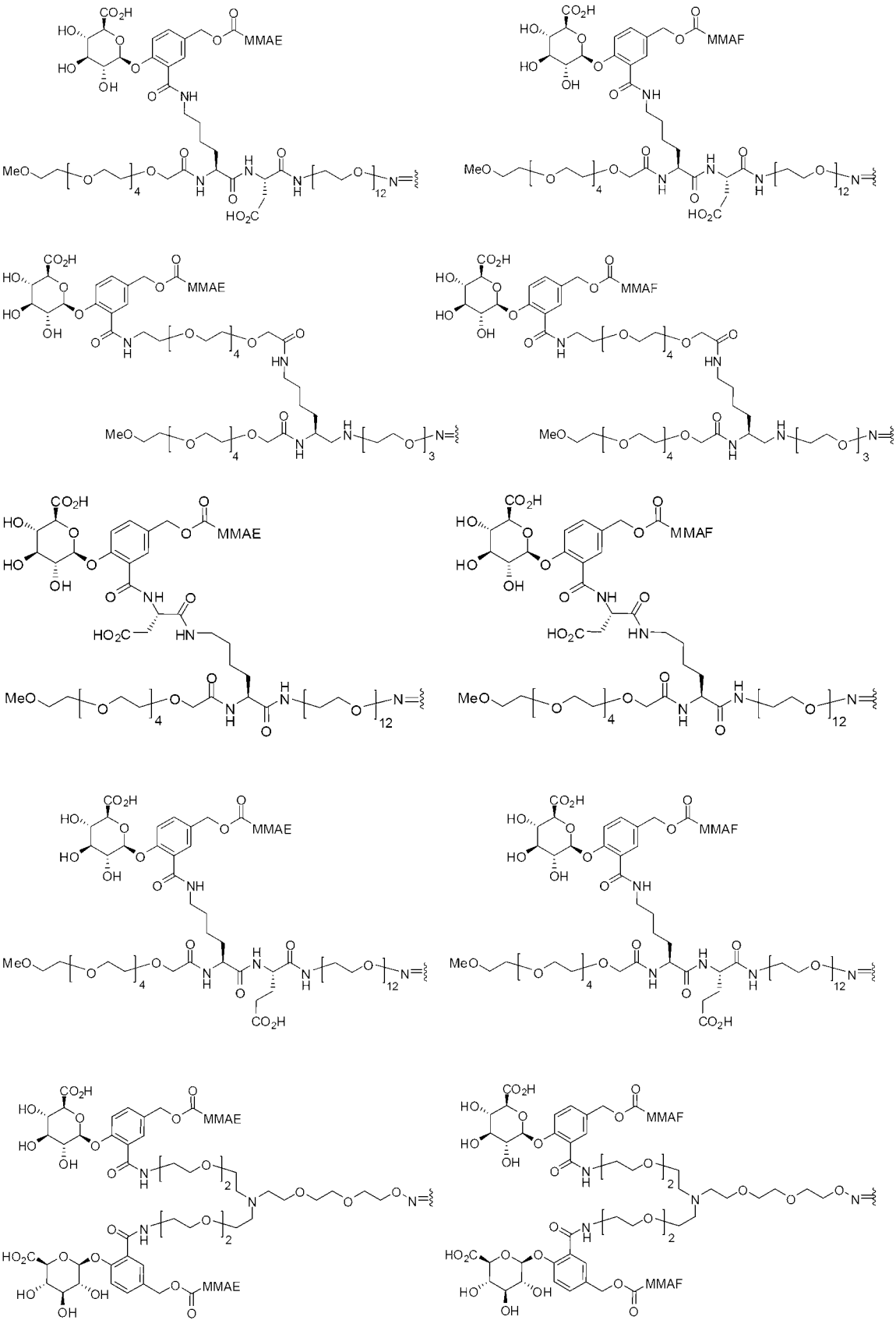
如請求項1之結合物，其中至少一種活性劑為瓢菌素、阿瑞他汀、卡奇黴素、喜樹鹼、念珠藻素、道諾黴素、海兔毒素、小紅莓、倍癌黴素、埃坡黴素、埃斯培拉黴素、格爾德黴素、類美登素、甲胺喋呤、單甲基阿瑞他汀E (「MMAE」)、單甲基阿瑞他汀F (「MMAF」)、吡咯并苯并二氮呋、根瘤菌素、SG2285、妥布賴森、長春地辛、類毒素或前述任一者之衍生物。

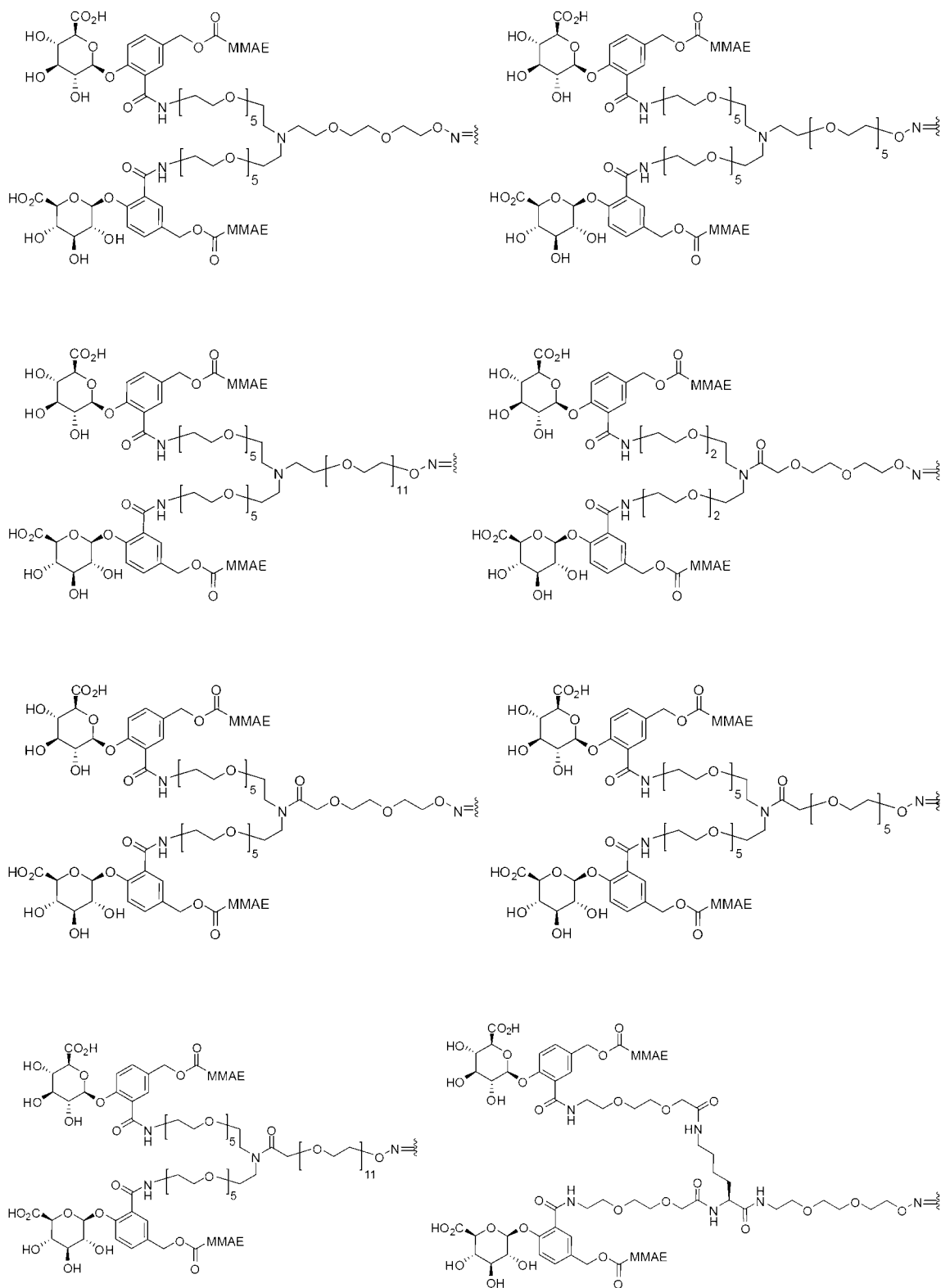
【請求項39】

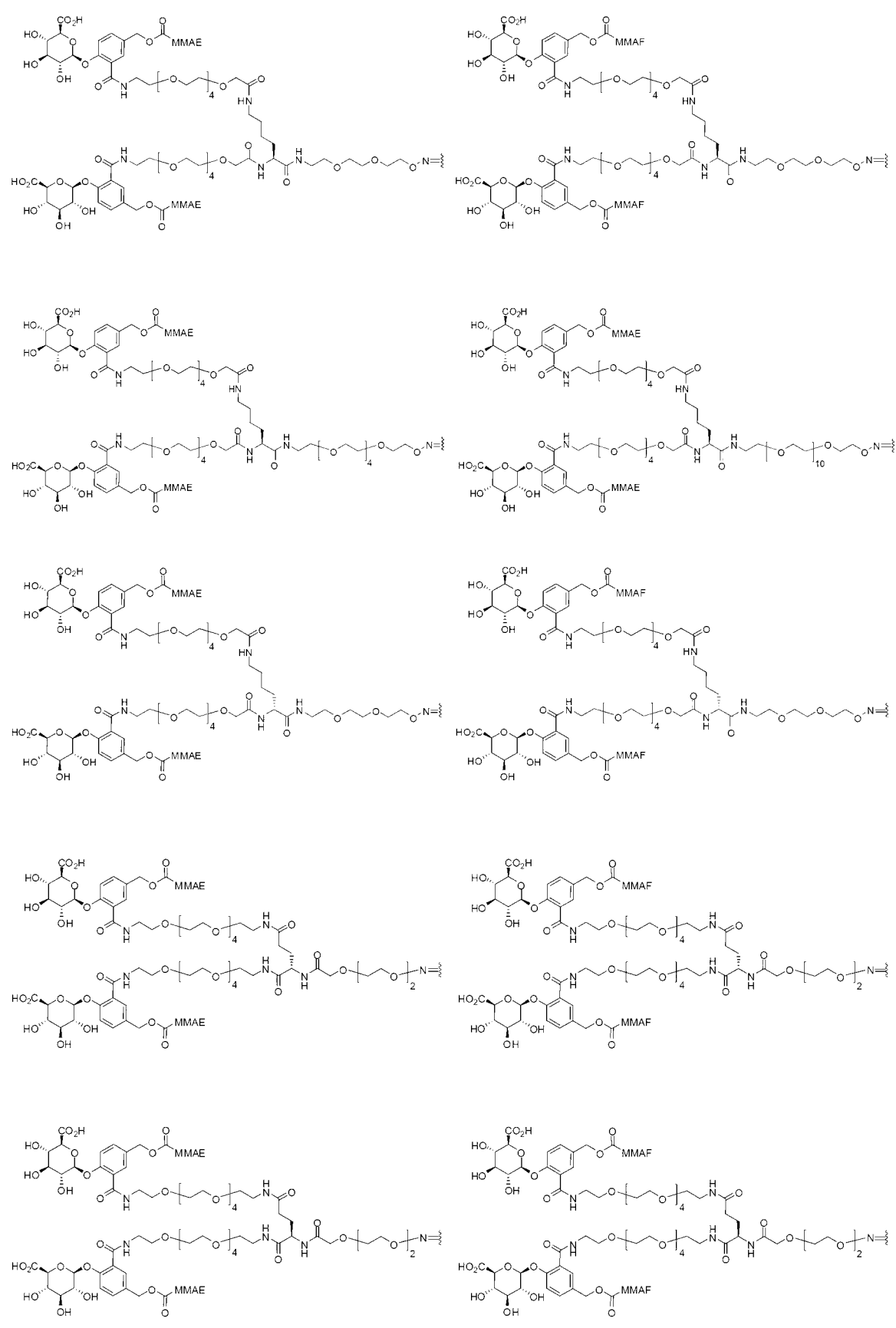
如請求項1之結合物，其中該結合物包含一或多個包含選自以下之部

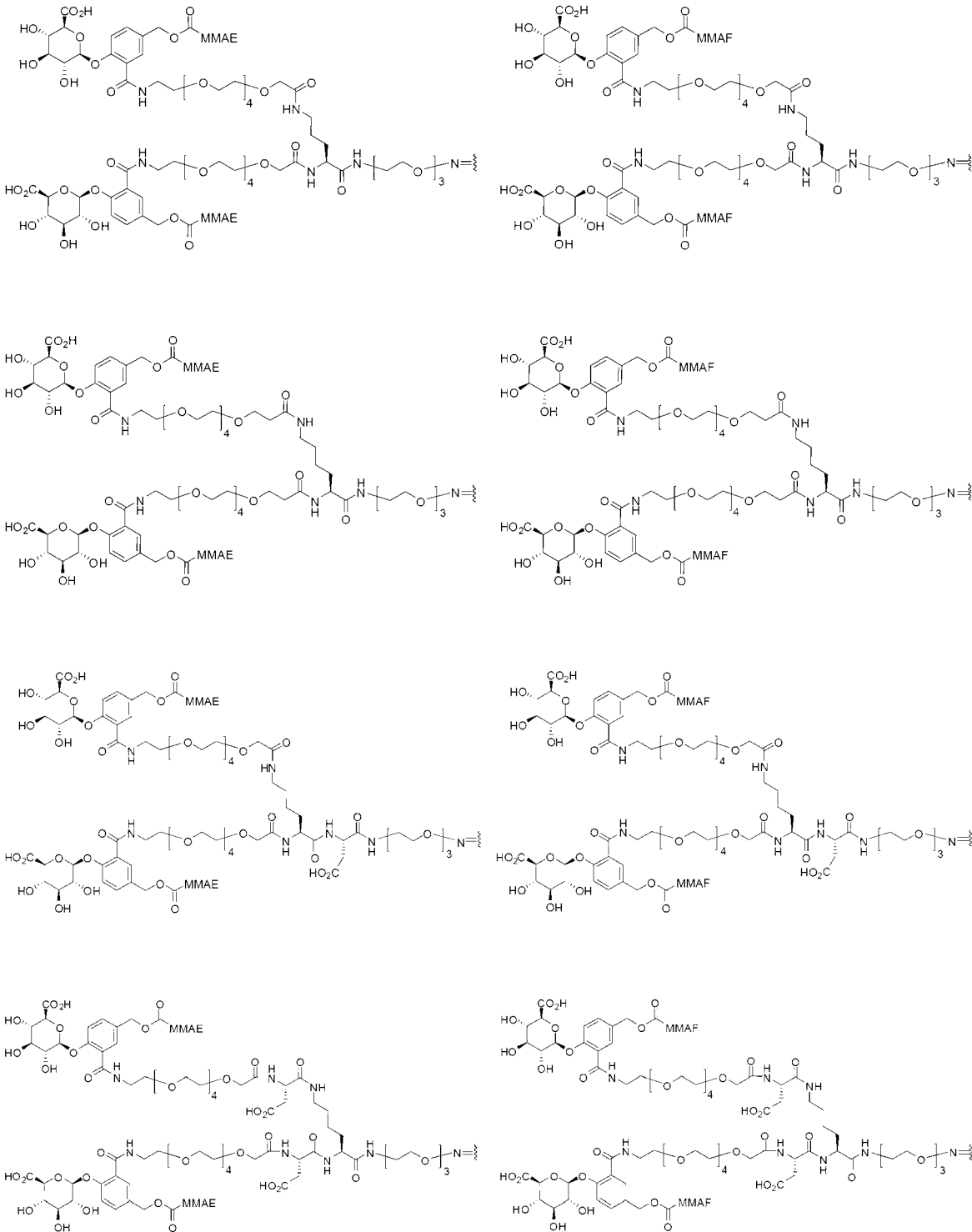
分的分支連接子：

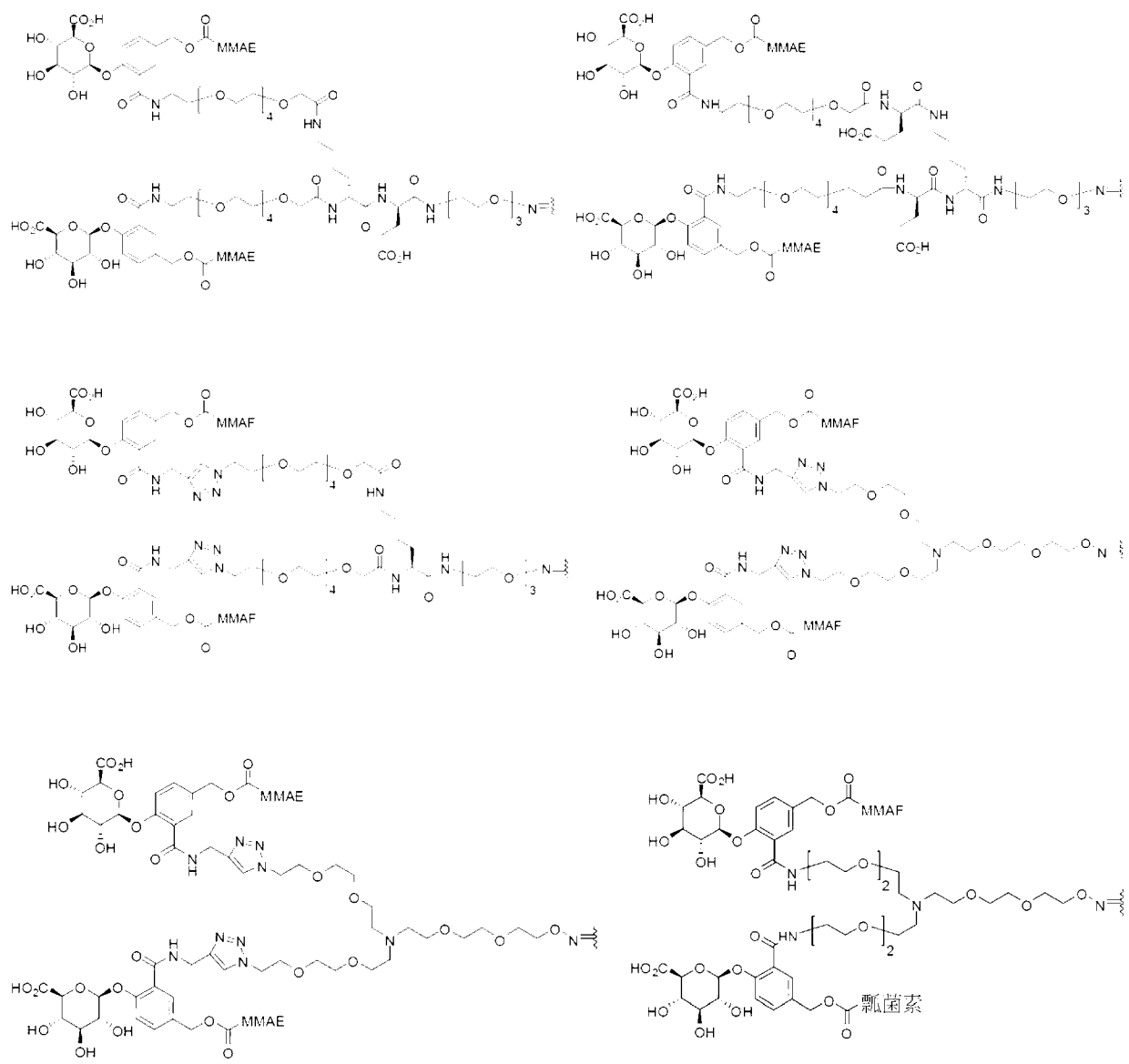


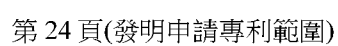


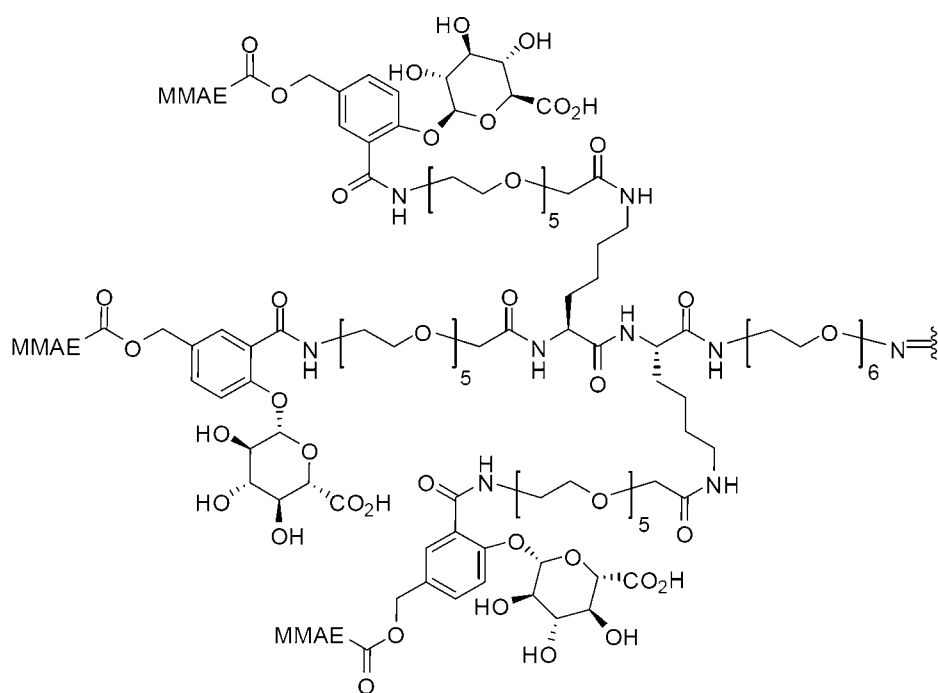






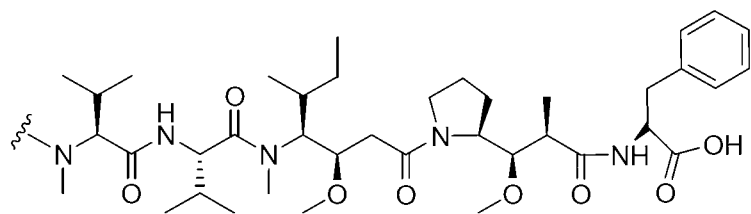


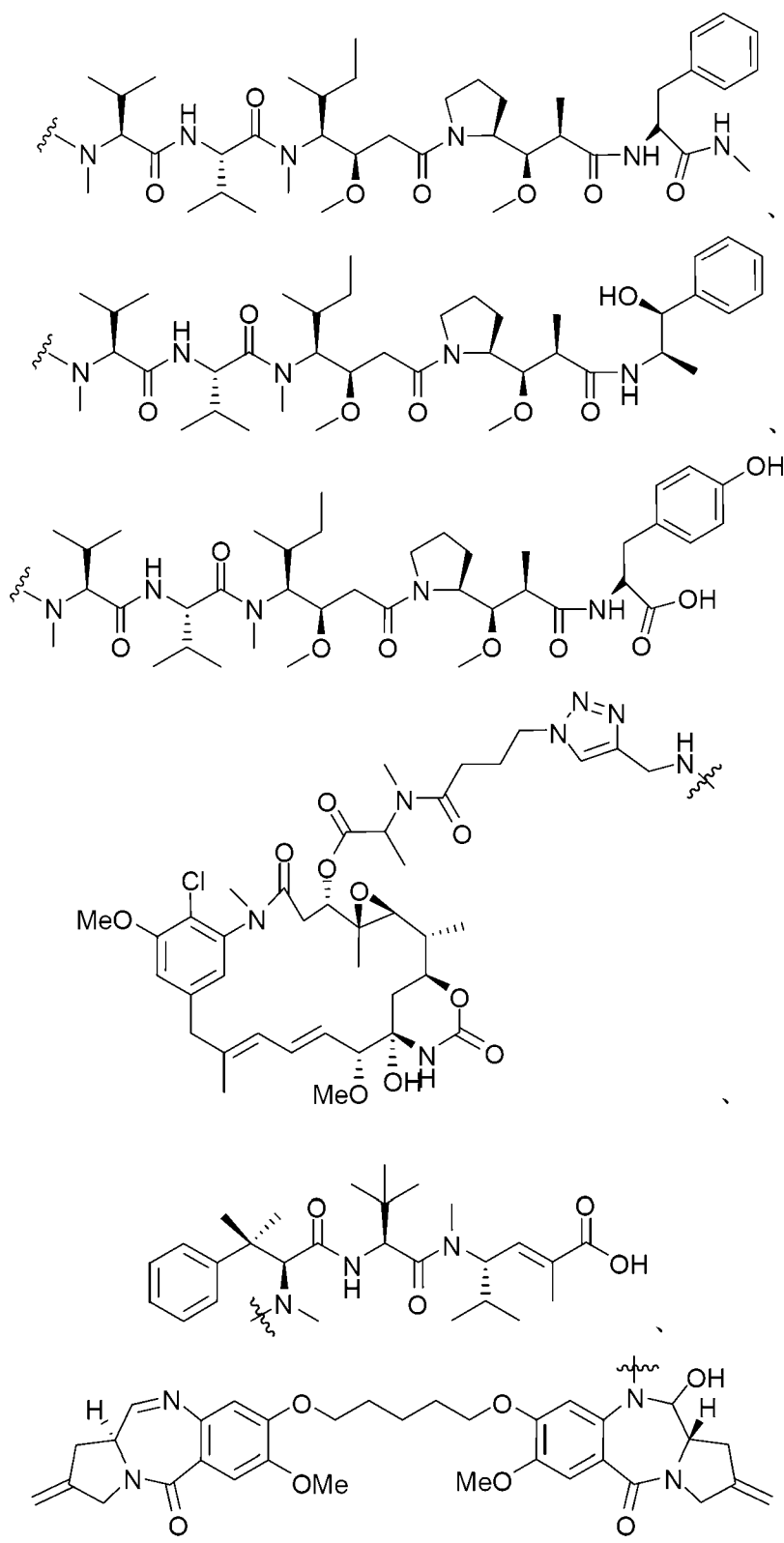


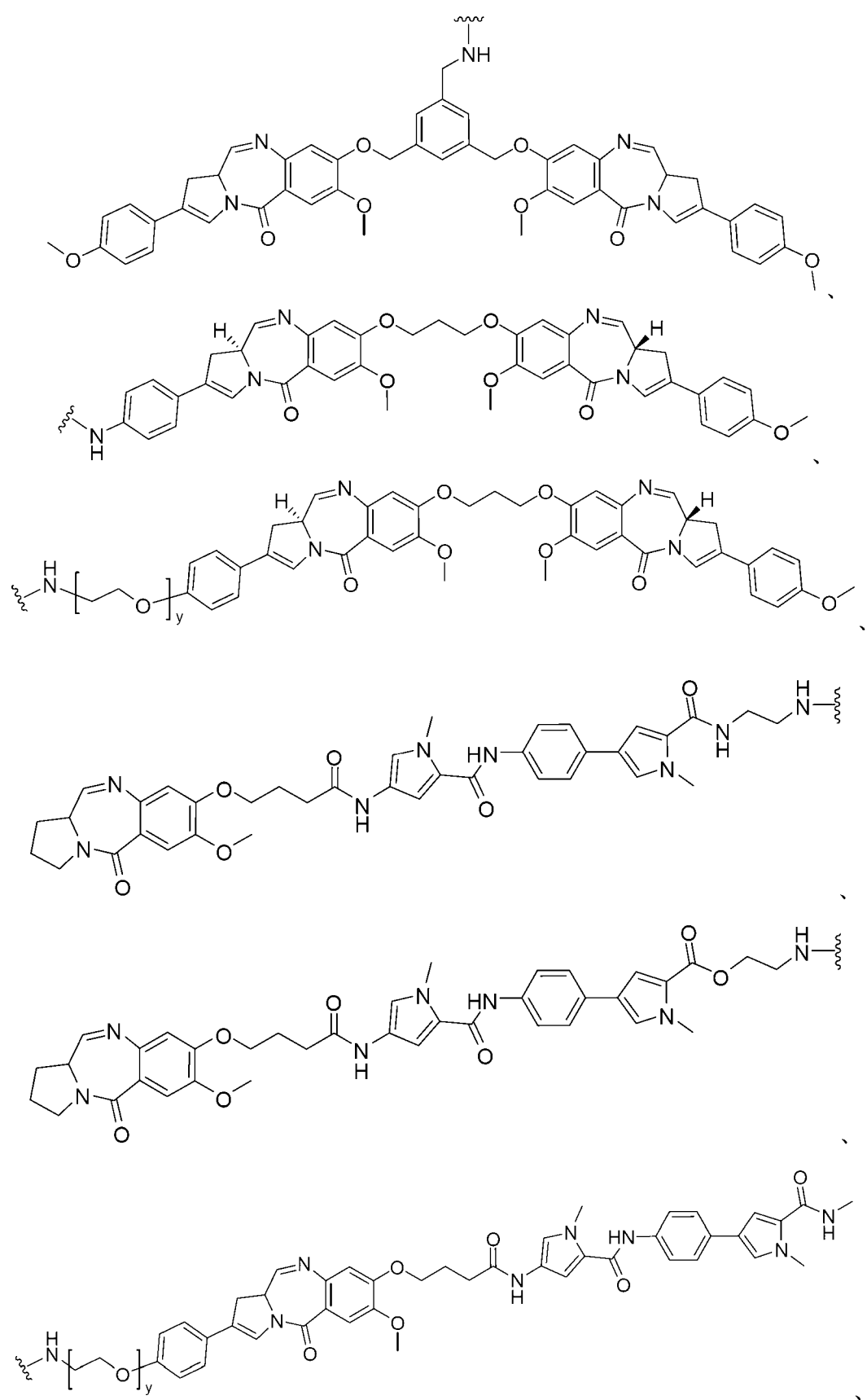


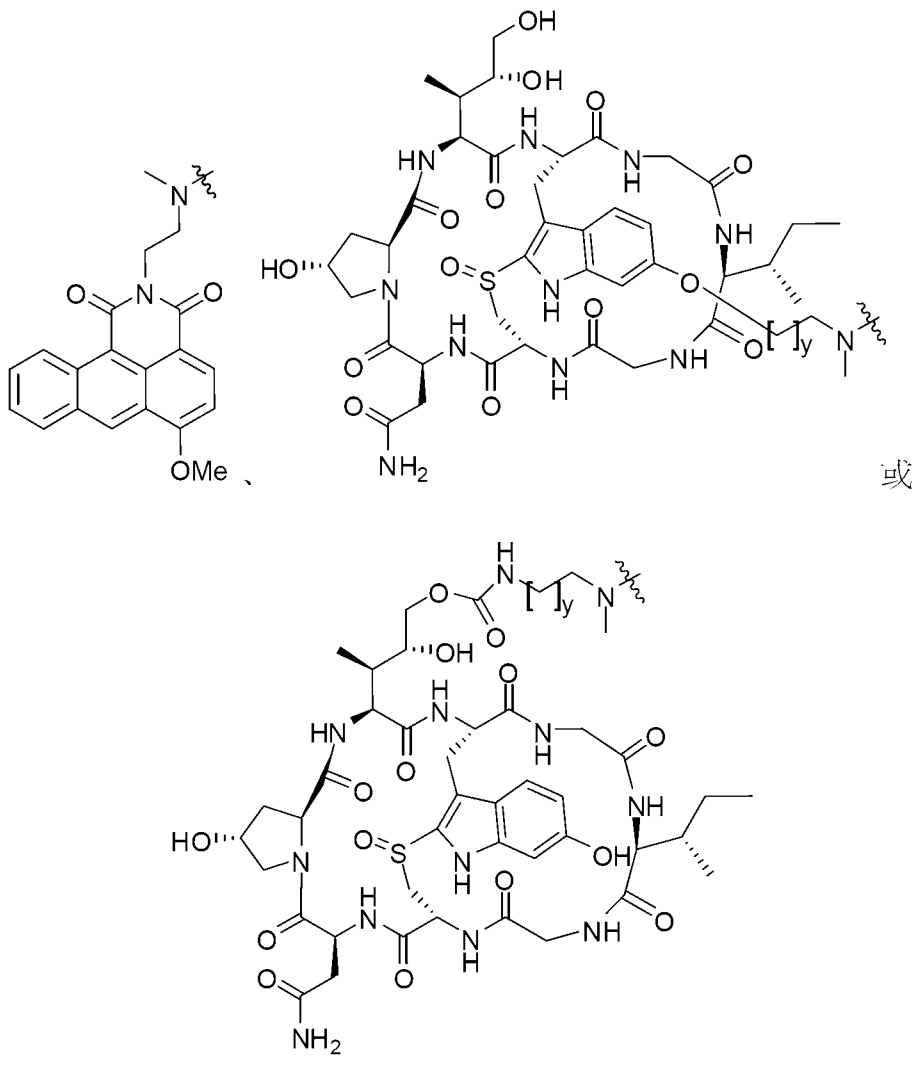


如請求項1之結合物，其中該活性劑為：









其中y為整數1至10。

【請求項41】

一種如請求項1至40中任一項之結合物之用途，其係用於製備用於治療癌症之藥劑。

【請求項42】

一種用於製備如請求項1至40中任一項之配位體-藥物結合物之方法，其包含使生物分子與前藥反應，其中：

- 該生物分子包含配位體及酮或醛；
- 該前藥包含烷氧基胺；且
- 該反應產生肟，因此將該配位體共價連接於該前藥。

【請求項43】

如請求項42之方法，其進一步包含將該配位體異戊二烯化，藉此產生該生物分子，其中：

該配位體包含由類異戊二烯轉移酶識別之胺基酸模體；將該配位體異戊二烯化包含將該配位體與類異戊二烯轉移酶及類異戊二烯轉移酶受質一起培育；且該受質包含該酮或醛。

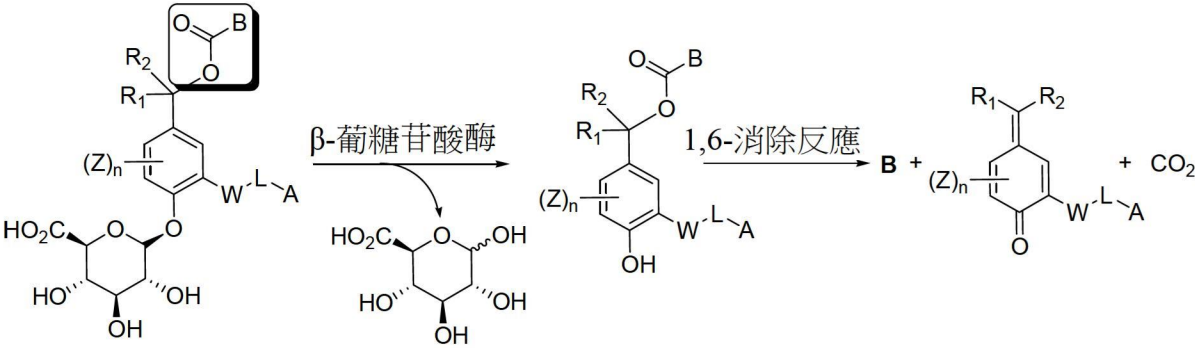
【請求項44】

一種用於製備如請求項1至40中任一項之配位體-藥物結合物的方法，其包含將配位體異戊二烯化，其中：

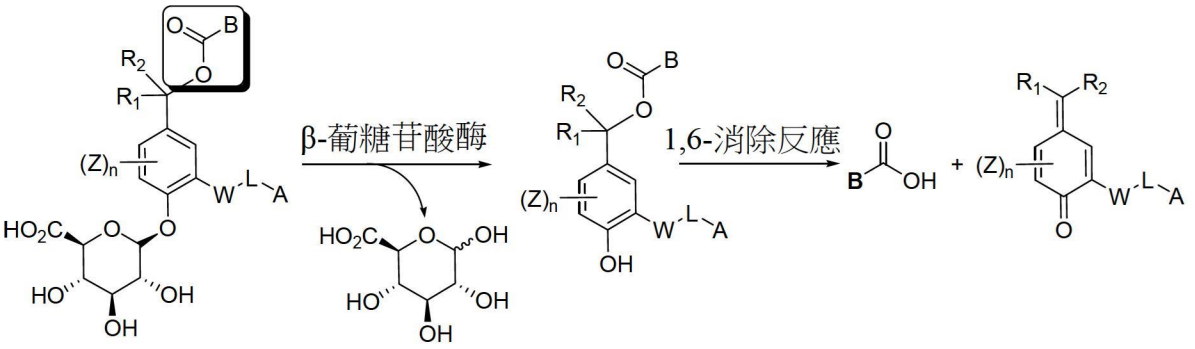
該配位體包含由類異戊二烯轉移酶識別之胺基酸模體；將該配位體異戊二烯化包含將該配位體與類異戊二烯轉移酶及類異戊二烯轉移酶受質一起培育；且該受質包含該活性劑。

【發明圖式】

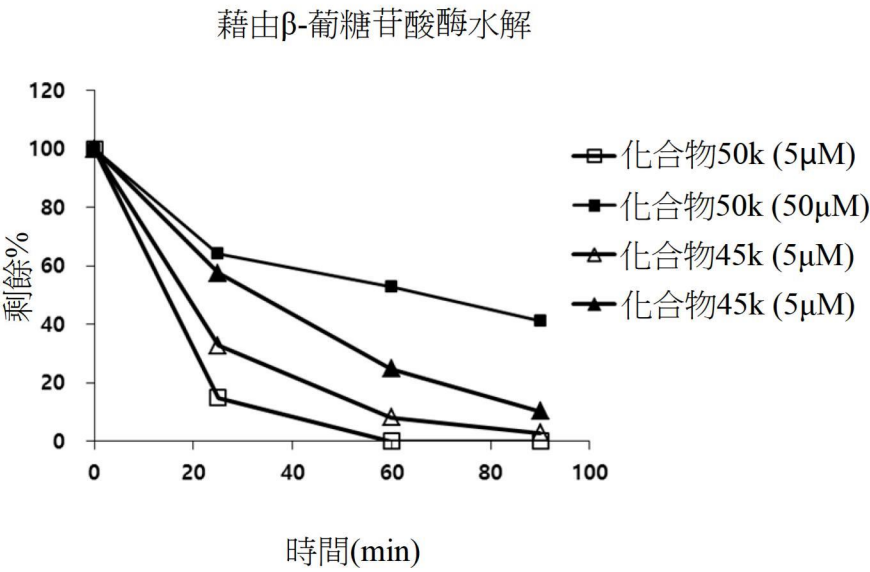
當  部分為胺基甲酸酯時，



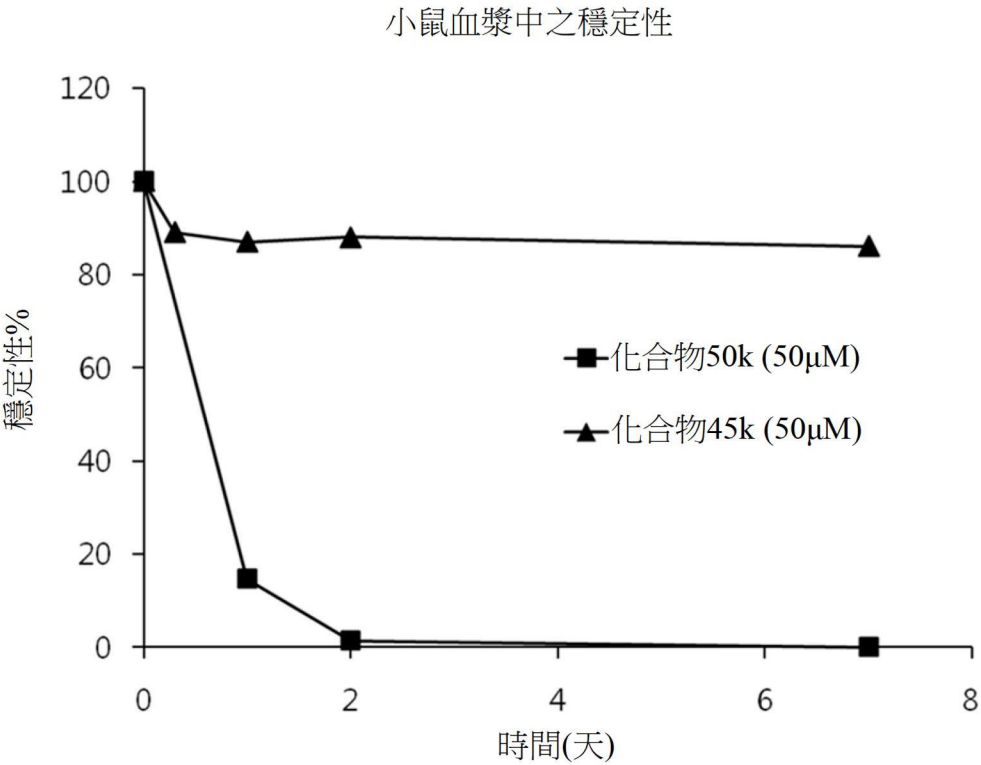
當  部分為酯時，



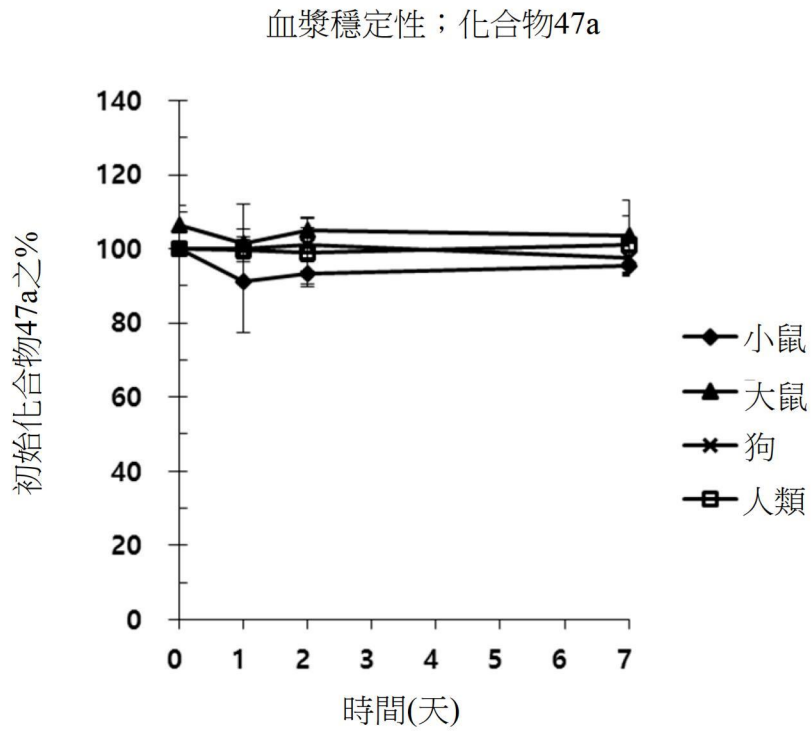
【圖1】



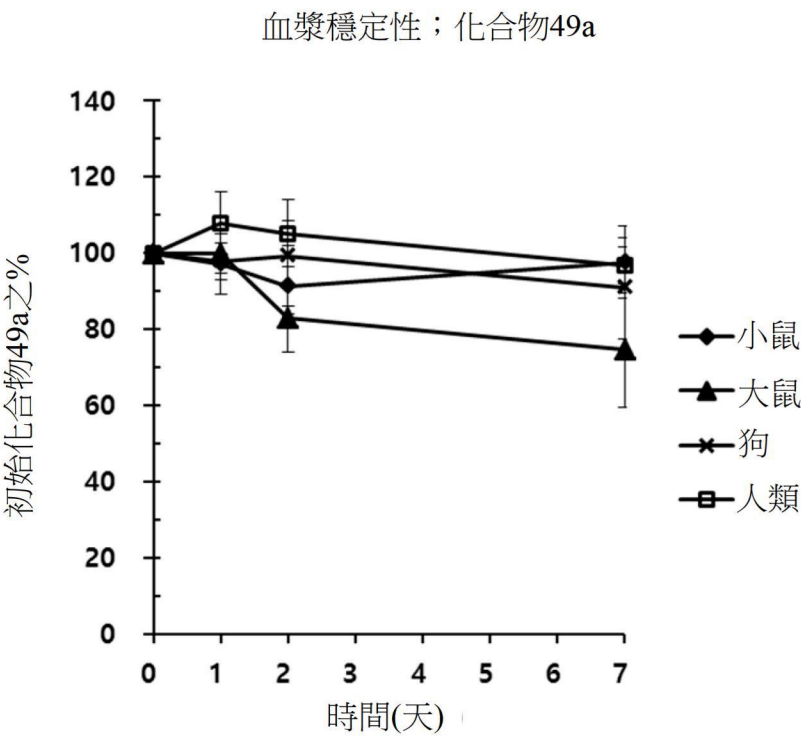
【圖2】



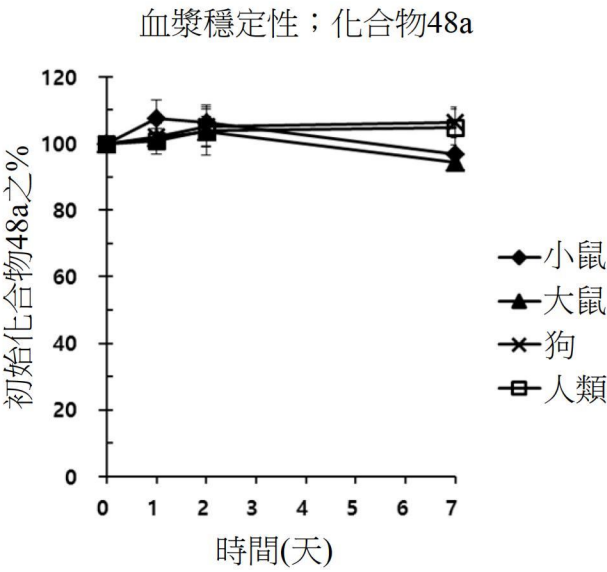
【圖3】



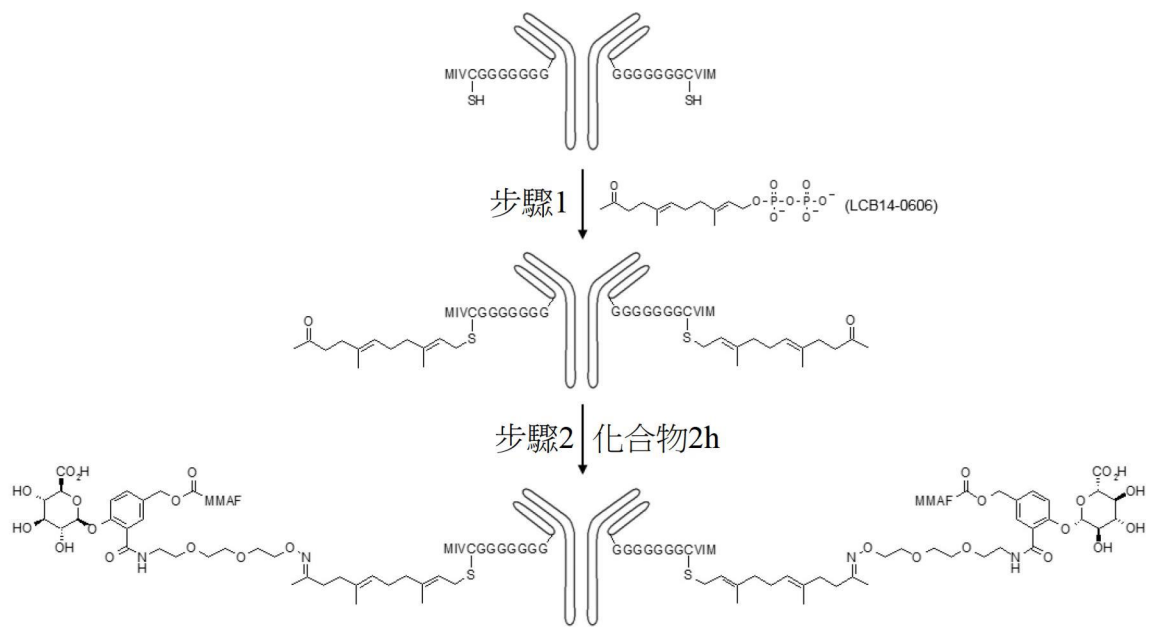
【圖4】



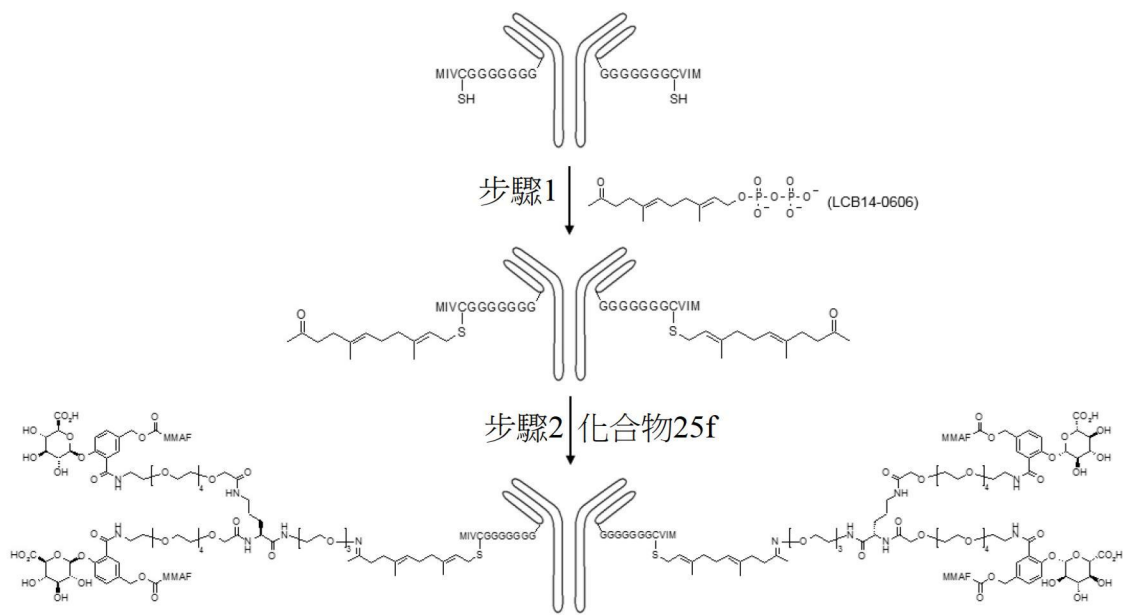
【圖5】



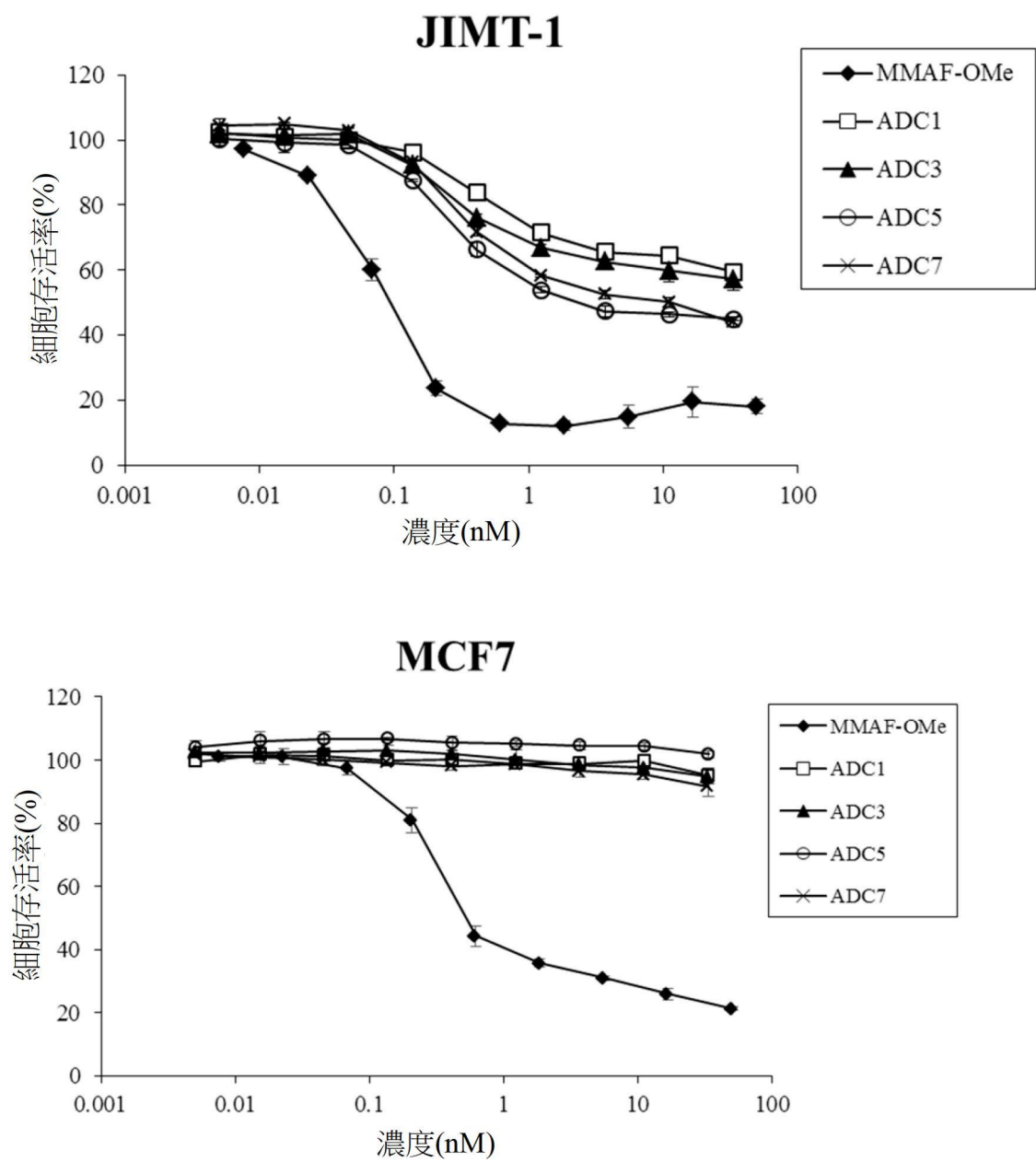
【圖6】



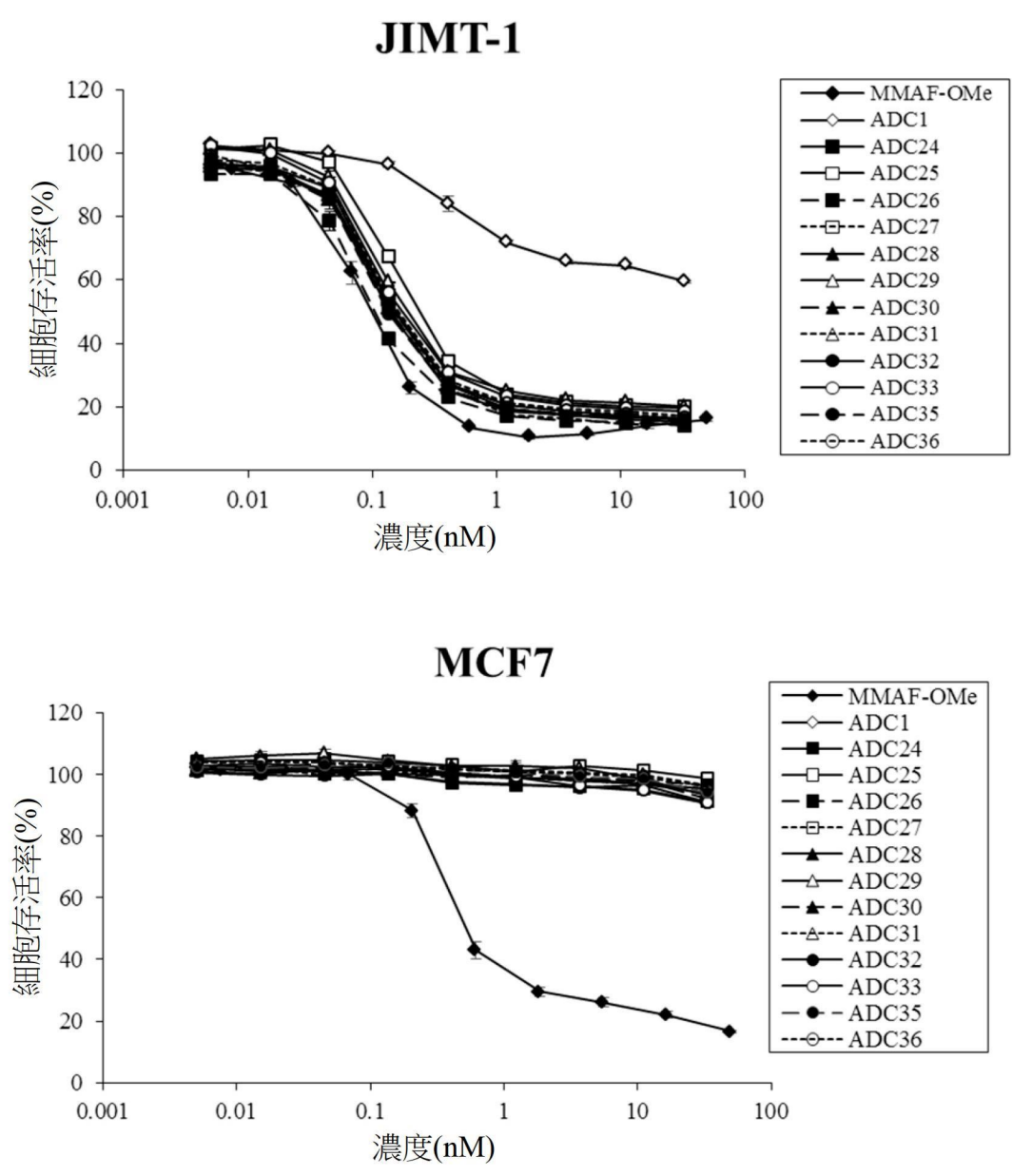
【圖7A】



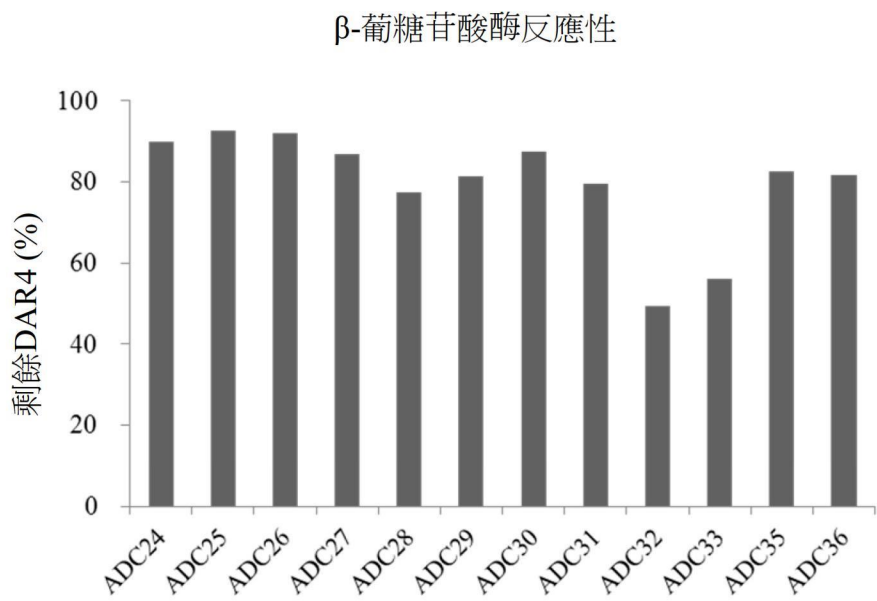
【圖7B】



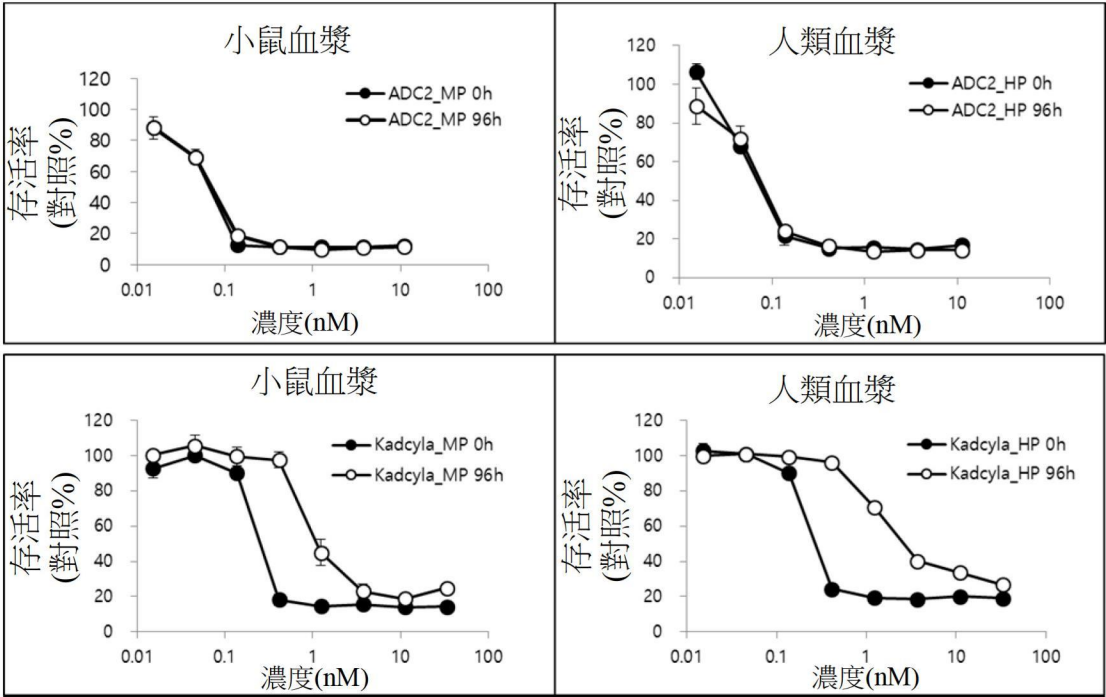
【圖8】



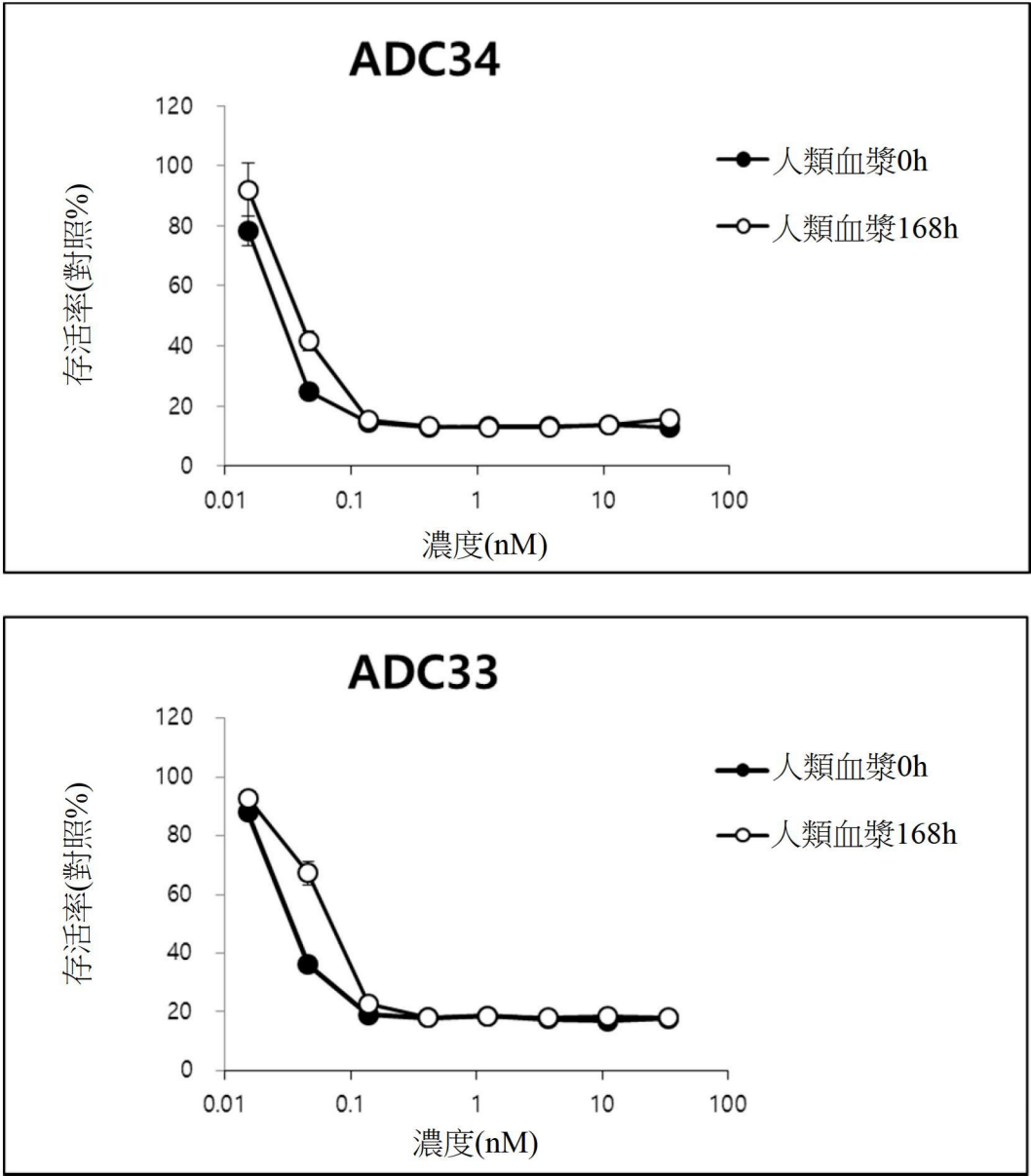
【圖9】



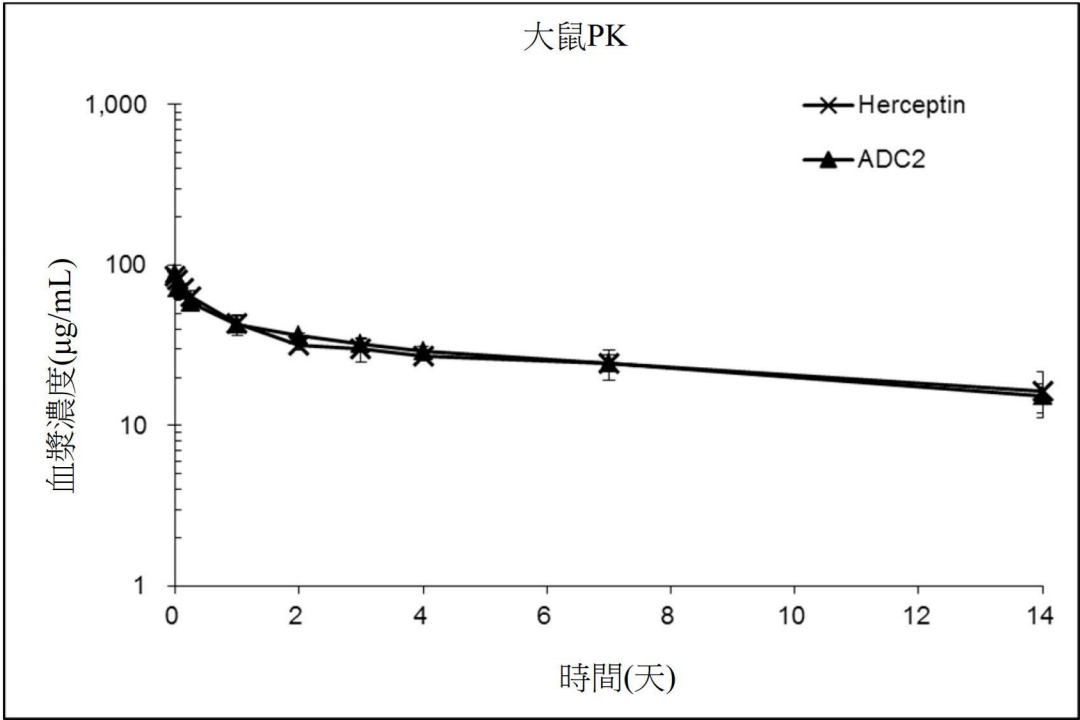
【圖10】



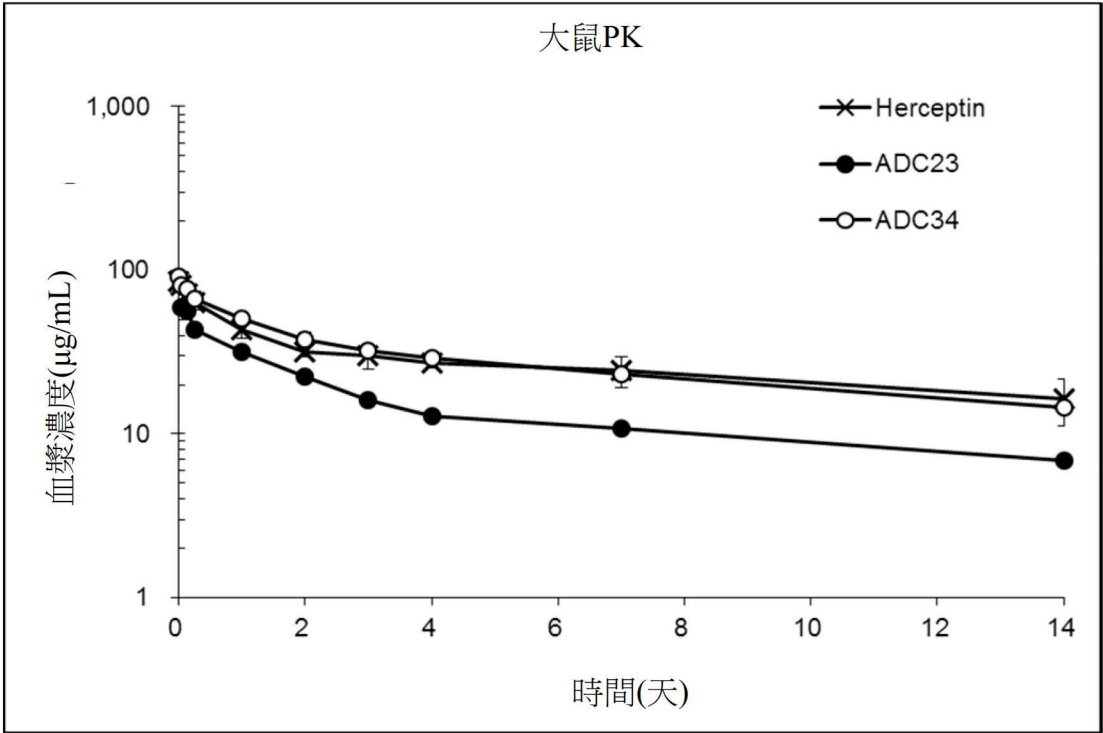
【圖11】



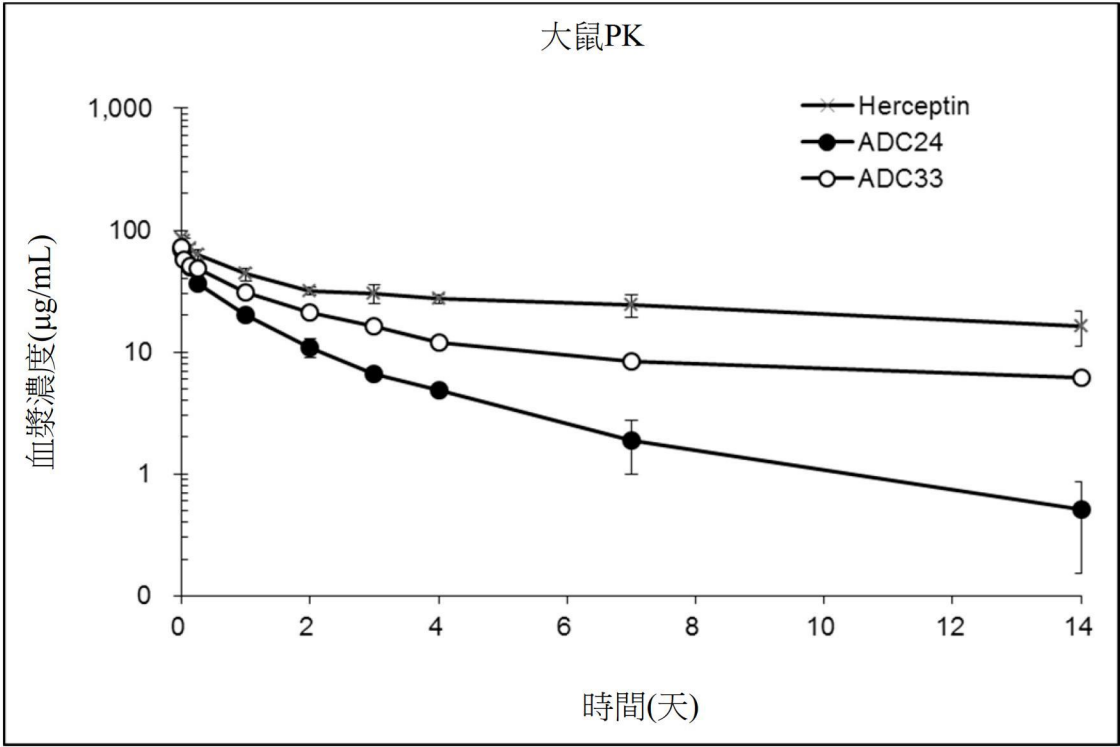
【圖12】



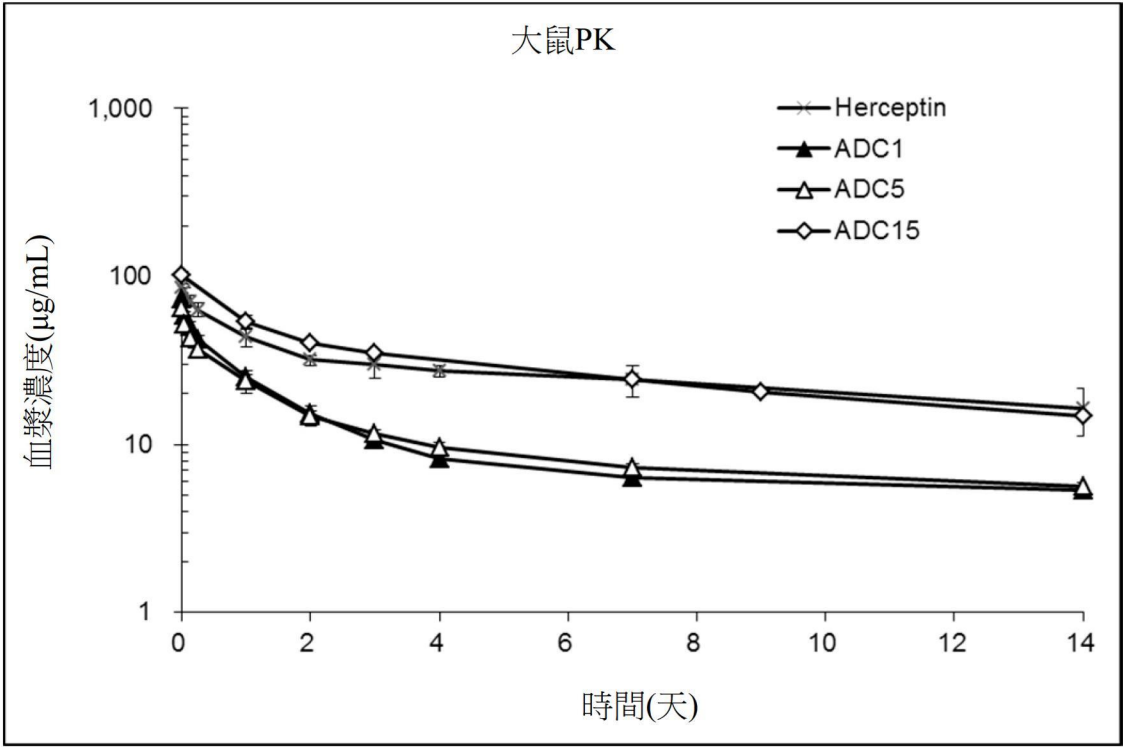
【圖13】



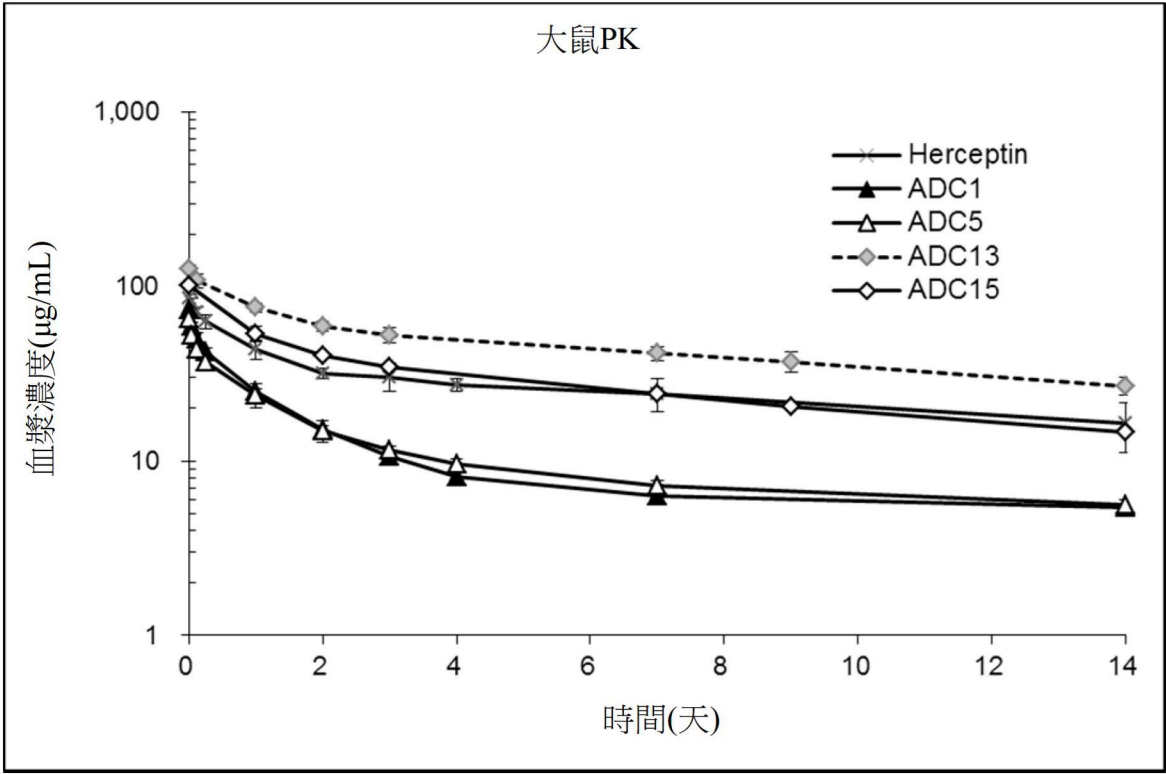
【圖14】



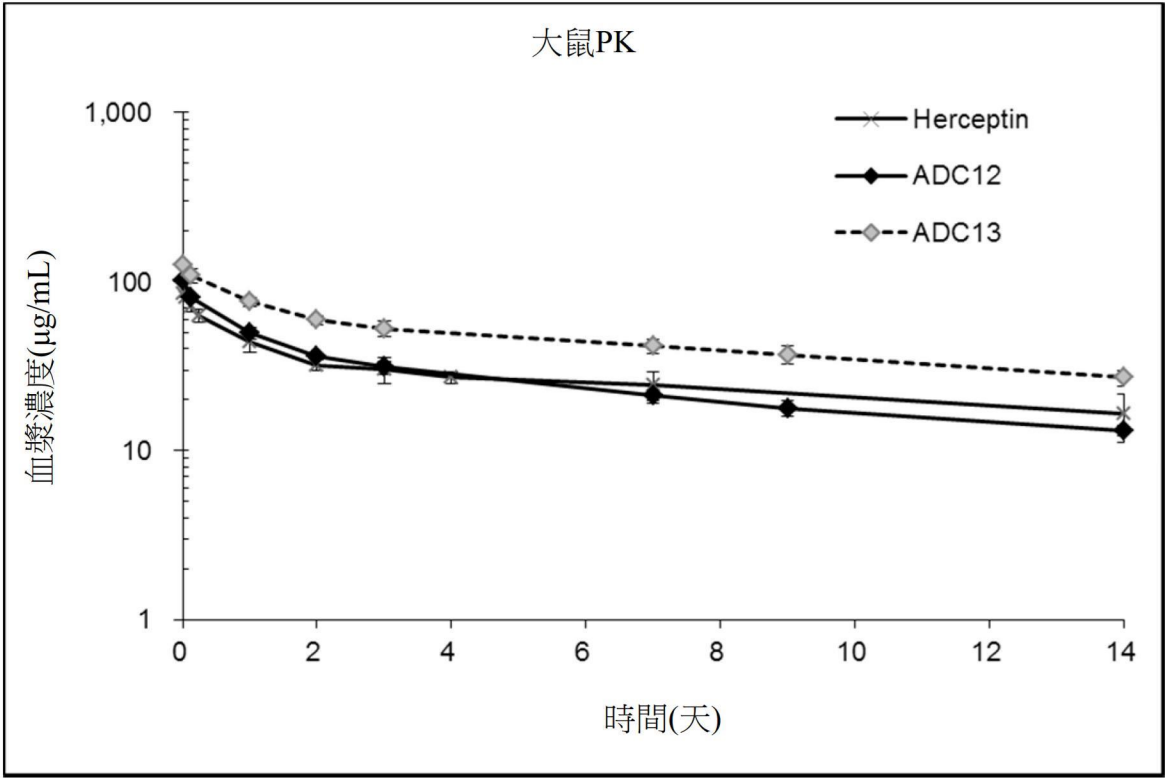
【圖15】



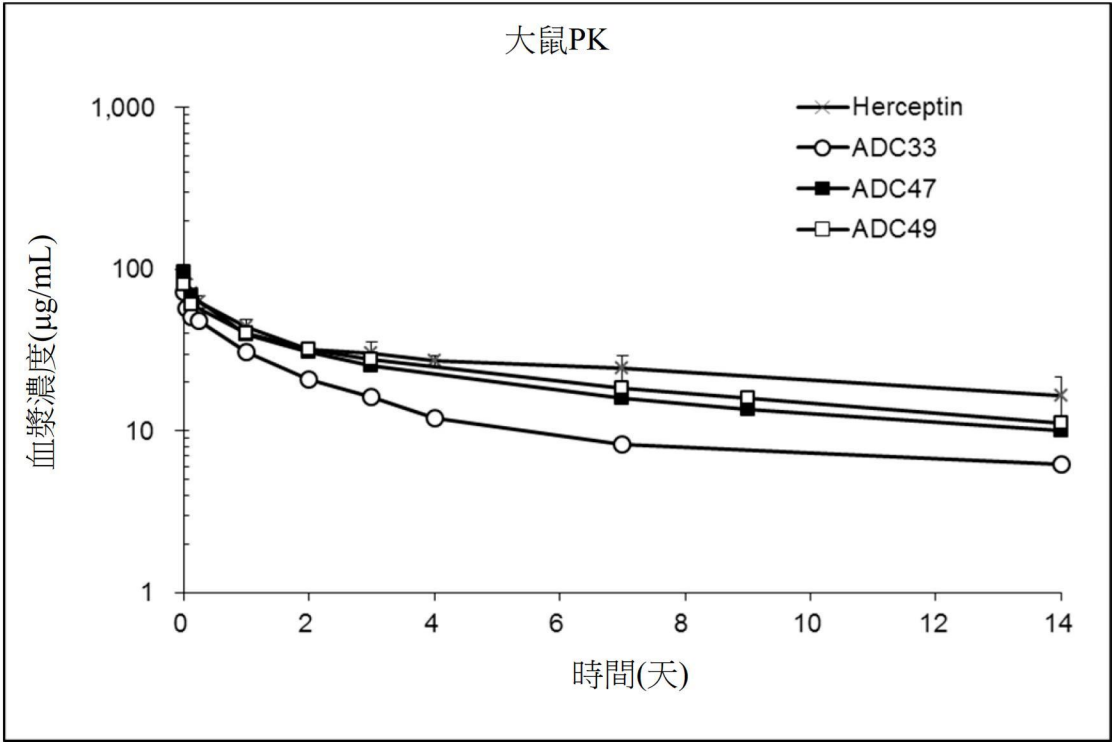
【圖16】



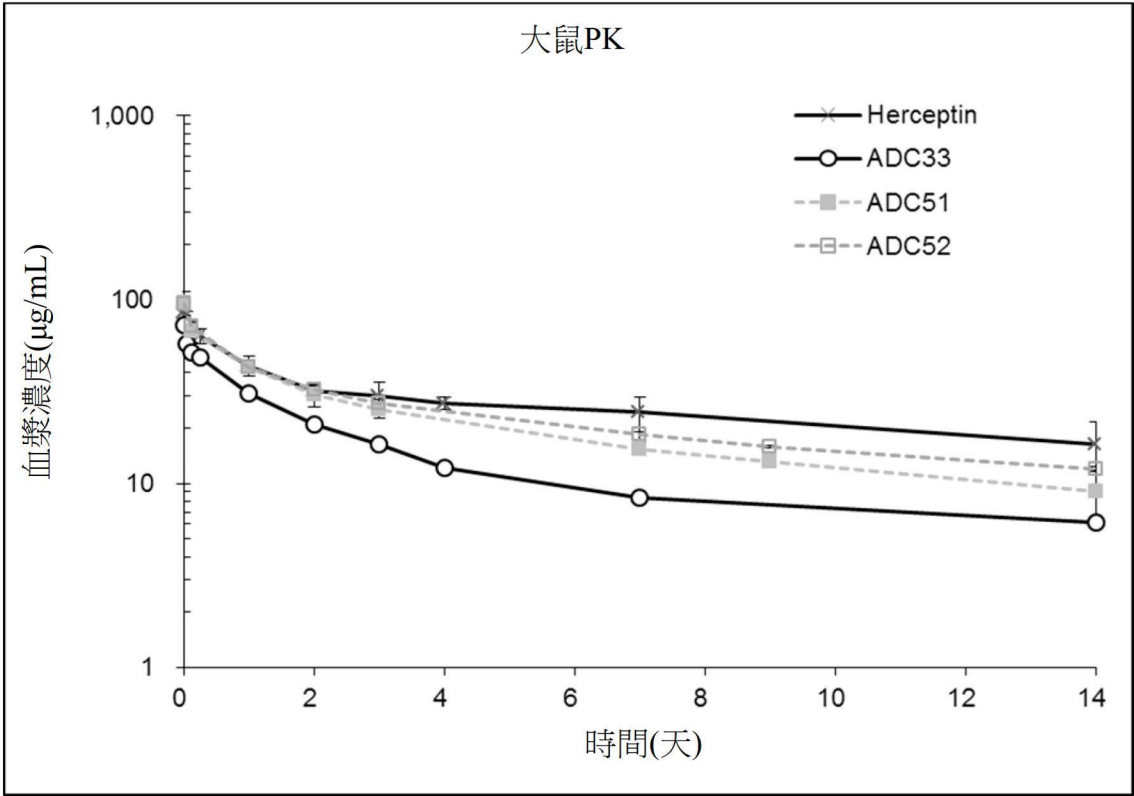
【圖17】



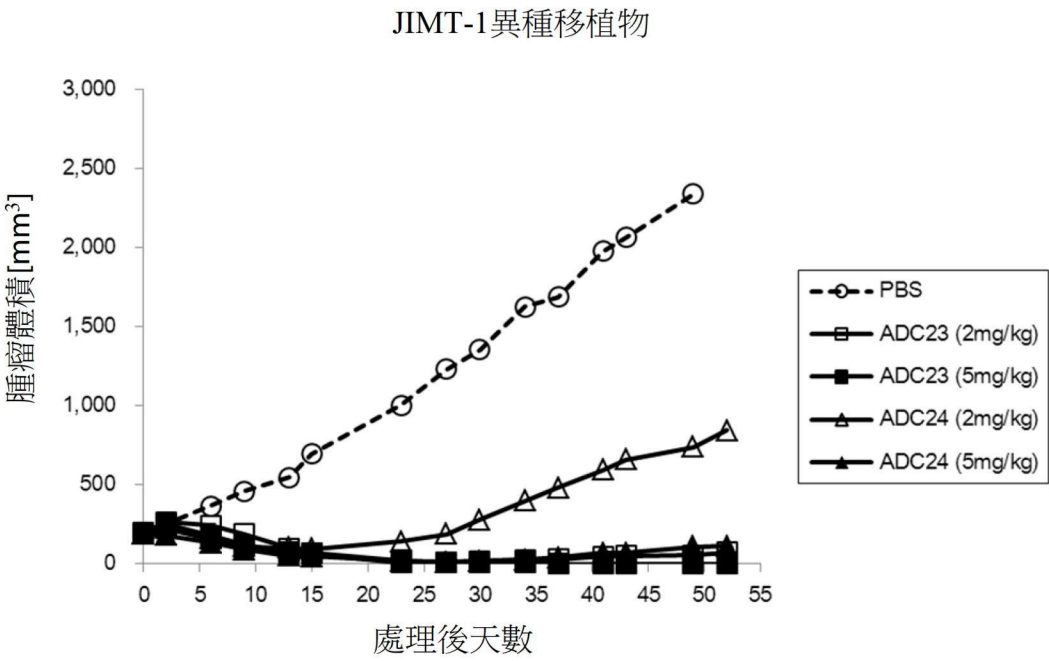
【圖18】



【圖19】

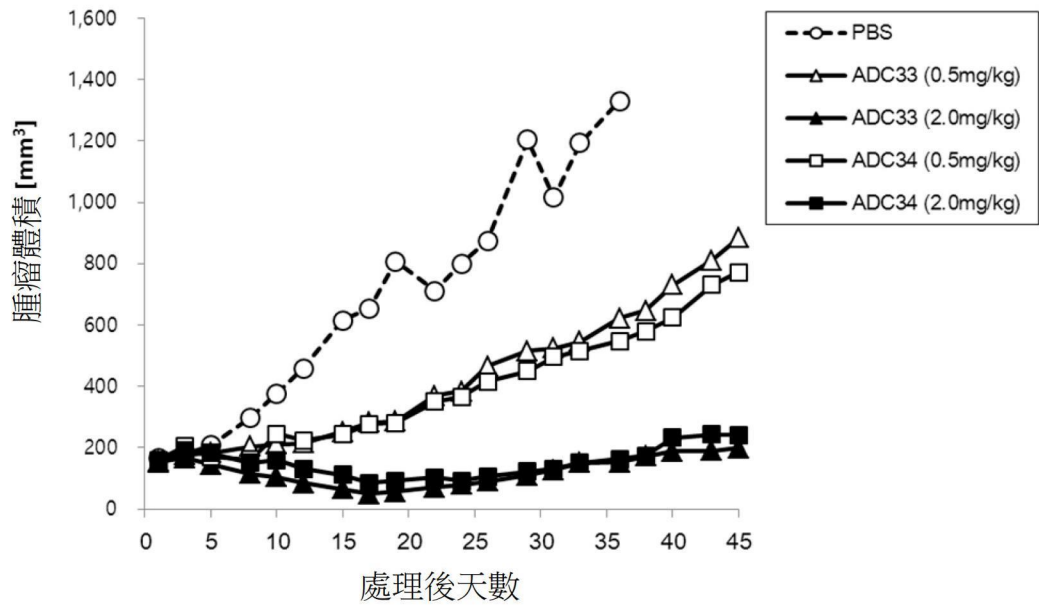


【圖20】



【圖21】

JIMT-1異種移植



【圖22】