202337500

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202337500 A

(43)公開日： 中華民國 112 (2023) 年 10 月 01 日

(21)申請案號：112103178 (22)申請日： 中華民國 112 (2023) 年 01 月 30 日

(51)Int. Cl.： *A61K47/68 (2017.01)* *A61K31/40 (2006.01)*
A61K31/495 (2006.01) *A61K31/41 (2006.01)*
A61K31/435 (2006.01) *A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2022/01/26 美國 63/303,446

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

(72)發明人：索茲林 丹尼爾 P SUTHERLIN, DANIEL P. (US)；張 東路 ZHANG, DONGLU (US)；貝克 多克雷 桑默 A BAKER-DOCKREY, SUMMER A (US)；德瑞哥維克 彼得 S DRAGOVICH, PETER S. (US)

(74)代理人：陳長文；朱淑尹

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：32 項 圖式數：0 共 0 頁

(54)名稱

抗體結合的化學降解誘導物及其方法

(57)摘要

本文所述的主題涉及本文被稱為化學降解誘導物 (CIDE) 及抗體結合的 CIDE (Ab-CIDE) 的分子，其中該 Ab-CIDE 包含透過連接子共價結合至該 CIDE 的抗體，其中該 CIDE 可以進一步經共價結合至磷酸酯部分，並且涉及該等分子在治療疾病及病症中的用途，其中靶向蛋白降解係有益的。

The subject matter described herein is directed to molecules referred to herein as chemical inducers of degradation (CIDEs) and antibody-conjugated CIDEs (Ab-CIDEs), wherein the Ab-CIDEs comprise an antibody covalently bound to the CIDE through a linker, wherein the CIDE can be further covalently bound to a phosphate moiety, and to the uses of the molecules in treating diseases and conditions where targeted protein degradation is beneficial.

20233[illegible]
202357500
專利案號：112103178

【發明摘要】

【中文發明名稱】　抗體結合的化學降解誘導物及其方法

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

【中文】本文所述的主題涉及本文被稱為化學降解誘導物 (CIDE) 及抗體結合的 CIDE (Ab-CIDE) 的分子，其中該 Ab-CIDE 包含透過連接子共價結合至該 CIDE 的抗體，其中該 CIDE 可以進一步經共價結合至磷酸酯部分，並且涉及該等分子在治療疾病及病症中的用途，其中靶向蛋白降解係有益的。

【英文】The subject matter described herein is directed to molecules referred to herein as chemical inducers of degradation (CIDEs) and antibody-conjugated CIDEs (Ab-CIDEs), wherein the Ab-CIDEs comprise an antibody covalently bound to the CIDE through a linker, wherein the CIDE can be further covalently bound to a phosphate moiety, and to the uses of the molecules in treating diseases and conditions where targeted protein degradation is beneficial.

【指定代表圖】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】　抗體結合的化學降解誘導物及其方法

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

【技術領域】

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

【先前技術】

【0002】 細胞維持及正常功能需要細胞蛋白質的受控降解。例如，調節蛋白之降解觸發細胞週期中的事件，諸如 DNA 複製、染色體分離等。據此，蛋白質的這種降解對細胞之增殖、分化及死亡有影響。

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

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

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

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

【發明內容】

【0006】 本揭露涉及一種藉由連接子結合或共價連接至抗體的 CIDE。在某些實施例中，CIDE 經磷酸化。在某些實施例中，將抗體共價連接至 CIDE 的連接子為擬肽物連接子。在另一態樣，磷酸酯部分作為結合物之前驅藥。

【0007】 在某些實施例中，藉由擬肽物連接子結合或共價連接至抗體的 CIDE 具有下列化學結構：

$$Ab—(L1—D)_j，$$

其中 Ab 為抗體；L1 為連接子；D 為 CIDE；j 為 1 與 16 之間的整數。在此類態樣，至少一個磷酸酯部分係共價結合至 D。在某些實施例中，L1 為擬肽物連接子。

【0008】 在某些實施例中，D 為具有下列結構的 CIDE：

E3LB—L2—PB，其中 E3LB 為共價結合至 L2 的 E3 連接酶結合配體；L2 為共價結合至 E3LB 及 PB 的連接子；且 PB 為共價結合至 L2 的蛋白結合基團。在這些實施例之一個態樣，磷酸酯部分係在 D 之 E3LB 及/或 PB 處共價結合至 D。在這些實施例之一個態樣，單個磷酸酯部分係在 D 之 E3LB 或 PB 處共價結合至 D。

【0009】在某些實施例中，E3 連接酶為逢希伯-林道 (von Hippel-Lindau；VHL) 腫瘤抑制蛋白。

【0010】在某些實施例中，磷酸酯部分係共價結合至 D 之 E3LB。

【0011】在某些實施例中，磷酸酯部分係共價結合至 D 之 PB。

【0012】在某些實施例中，L1 係共價結合至 D 之 PB，且磷酸酯部分係共價結合至 D 之 E3LB。

【0013】在某些實施例中，L1 係共價結合至 D 之 PB，且磷酸酯部分係共價結合至 D 之 PB。

【0014】在某些實施例中，E3LB 包含羥基脯胺酸殘基，且磷酸酯部分係共價結合至羥基脯胺酸殘基。

【0015】在某些實施例中，PB 包含羥基苯基部分，且磷酸酯部分係共價結合至羥基苯基部分。

【0016】在某些實施例中，PB 為 BRM 蛋白。

【0017】在某些實施例中，本文所述之主題涉及一種醫藥組成物，其包含如本文所述之 Ab-L1-CIDE 及一種或多種醫藥上可接受之賦形劑。

【0018】在某些實施例中，本文所述之主題涉及如本文所述之 Ab-L1-CIDE 在藉由向個體投予包含 Ab-L1-CIDE 的醫藥組成物來治療病狀及疾病的方法中之用途。

【0019】在某些實施例中，本文所述之主題為一種製備 Ab-L1-CIDE 的方法。

【0020】在某些實施例中，本文所述之主題涉及一種製品，其包含醫藥組成物 (包含 Ab-L1-CIDE)、容器及指示醫藥組成物可用於治療疾病或病狀的藥品說明書或標籤。

【0021】其他實施例亦在本文中得到全面描述。

【實施方式】

【0022】 本文揭示抗體結合的化學降解誘導物 (「抗體結合的 CIDE」、「Ab-L1-CIDE」或「Ab-CIDE」)，其包含共價結合至 CIDE 及抗體的連接子，諸如擬肽物連接子，且可用於靶向蛋白降解。特定而言，本揭露涉及抗體結合的 CIDE，其含有結合至 Von Hippel-Lindau E3 泛蛋白連接酶的配體及結合標靶蛋白 (諸如 BRM) 的部分，使得標靶蛋白置於泛蛋白連接酶附近以實現降解，從而調控標靶蛋白之量。在某些實施例中，磷酸酯部分係共價結合至 CIDE。

【0023】 本文所述之主題利用抗體靶向將 CIDE 導向標靶細胞或組織。如本文所述，抗體與 CIDE 連接以形成 Ab-CIDE 已顯示將 CIDE 遞送至標靶細胞或組織。如本文所示，例如在實例中，表現抗原的細胞可由抗原特異性 Ab-CIDE 靶向，從而 Ab-CIDE 之 CIDE 部分在細胞內遞送至標靶細胞。此外，包含針對細胞上未發現之抗原的抗體的 CIDE 可能不會導致顯著的 CIDE 向細胞的細胞內遞送。

【0024】 所揭示之 Ab-CIDE 包含共價連接至連接子 1 (L1) (諸如擬肽物連接子) 的抗體，該連接子在任何可用的接附點處共價連接至 CIDE，其中 CIDE 包含 E3 泛蛋白連接酶結合 (E3LB) 部分，其中 E3LB 部分識別 E3 泛蛋白連接酶蛋白 (VHL)，連接子 2 (L2) 將 E3LB 部分共價連接至蛋白結合部分 (PB)，該蛋白結合部分為識別標靶蛋白的部分。在某些實施例中，磷酸酯部分係共價結合至 CIDE。因此，本文所述之主題對於降解並因此調控蛋白質活性及治療與蛋白質活性相關的疾病及病狀是有用的。在各實施例中，磷酸化 Ab-CIDE 導致出乎意料地增強的活體內標靶降解。

【0025】 現在將在下文更全面地描述本發明所揭示之主題。惟，得益於前述說明書所呈遞之教示，本發明所揭示之主題所屬領域之技術人員將想到本

文所述之本發明所揭示之主題的許多修改及其他實施例。因此，應理解，本發明所揭示之主題並不限於所揭示之具體實施例，並且修飾及其他實施例意在包含於所附申請專利範圍之範疇內。換言之，本文所述之主題涵蓋所有替代、修改及等同形式。如果併入之文獻、專利及類似材料中之一項或多項與本申請案不同或矛盾（包括但不限於所定義之術語、術語用法、所述之技術等），則以本申請案為準。除非另有定義，否則本文所用之所有技術及科學術語均具有與熟習本領域者所通常理解之含義相同之含義。本文所提及之所有公開案、專利申請案、專利及其他參考文獻均以全文引用的方式併入。

I. 定義

【0026】 術語「CIDE」指化學降解誘導物，其為蛋白分解靶向嵌合體分子，通常具有三種組分，即 E3 泛蛋白連接酶結合基團 (E3LB)、連接子 L2 及蛋白質結合基團 (PB)。在某些實施例中，CIDE 經磷酸化。

【0027】 如本文所用，術語「磷酸化」指共價結合至磷酸酯部分的 CIDE，其形成磷酸化 CIDE。

【0028】 如本文所用，術語「磷酸酯部分」指含有單個磷酸酯及其鹽的化學基團。磷酸酯部分之實例包括–$(P=O)(OH)_2$、-$CH_2O(P=O)(OH)_2$、–$(P=O)(OH)O(P=O)(OH)_2$ 及 –CH_2-$O(P=O)(OH)O(P=O)(OH)_2$、及其鹽。

【0029】 術語「殘基」、「部分」、「組成部分」或「基團」是指與另一組分共價結合或連接的組分。術語「組分」在本文中亦用於描述該等殘基、部分、組成部分或基團。例如，化合物之殘基將具有化合物的一個或多個原子（例如氫或羥基）被共價鍵取代，從而使殘基與 CIDE、L1-CIDE 或 Ab-L1-CIDE 的另一組分結合。例如，「CIDE 之殘基」是指與一個或多個基團（例如連接子 L2）共價連接的 CIDE，其本身可視情況進一步連接至抗體。

【0030】術語「共價結合」或「共價連接」指代藉由共享一對或多對電子所形成的化學鍵。

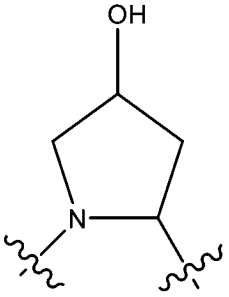
【0031】術語「蛋白結合基團」或「PB」指能夠結合至標靶蛋白或其他目標多肽標靶的小分子或其他化合物之殘基。在本文所述之結合物分子中，PB結合至標靶，這將標靶置於泛蛋白連接酶附近，使得可以發生藉由泛蛋白連接酶的蛋白或多肽之降解。因此，本文所述之結合物可以包括任何 PB，只要其共價結合至 L2，且與目標標靶相互作用或結合至該目標標靶。小分子標靶蛋白結合部分之非限制性實例包括結合 BRM (BRAHMA)、BRG1、AKT、HPK1、IRE1、Tau 及雄激素受體 (AR) 的化合物、Hsp90 抑制劑、激酶抑制劑、MDM2 抑制劑、靶向人 BET 含溴區結構域之蛋白的化合物、HDAC 抑制劑、人離胺酸甲基轉移酶抑制劑 (諸如 KDM5)、血管生成抑制劑、免疫抑制化合物及靶向芳烴受體 (AHR) 的化合物等等。在某些實施例中，本文所述之 CIDE 及經結合 CIDE 不限於 PB 之類型。在某些實施例中，本文所述之 CIDE 及經結合 CIDE 不限於 PB 之類型，其中 PB 共價結合至 L2；且，CIDE 或經結合 CIDE 包含磷酸酯部分及 L1 擬肽物連接子。

【0032】術語「包含羥基苯基部分」等指將共價結合至苯基基團的羥基基團或此類部分之殘基作為其結構之部分而含有的 PB 化合物。在某些實施例中，含有羥基苯基 (苯酚) 基團或其殘基的化合物結合至 BRM。

【0033】術語「E3 連接酶結合 (E3LB) 配體」指能夠結合 Von Hippel-Lindau (VHL) E3 泛蛋白連接酶的分子。術語「VCB E3 泛蛋白連接酶」、「Von Hippel-Lindau (或 VHL) E3 泛蛋白連接酶」、「VHL」及「泛蛋白連接酶」一般而言均描述針對本文所述之結合物之 E3LB 部分的標靶酶結合位點。VCB E3 為一種蛋白質，其與 E2 泛素結合酶組合，導致泛素連接至標靶蛋白上之離胺酸；E3 泛素連接酶靶向用於由蛋白酶體降解之特異性蛋白質受質。因

此，單獨的或與 E2 泛素結合酶複合之 E3 泛素連接酶負責將泛素轉移到所靶向之蛋白質。在某些實施例中，本文所述之 CIDE 及經結合 CIDE 不限於 E3LB 之類型。在某些實施例中，本文所述之 CIDE 及經結合 CIDE 不限於 E3LB 之類型，其中 E3LB 係共價結合至 L2；且 CIDE 或經結合 CIDE 包含磷酸酯部分，且進一步共價接附至 L1 擬肽物連接子。

【0034】 術語「包含羥基脯胺酸殘基」等指 E3LB 化合物，包含具有下列結構的基團或基團之殘基作為其結構的一部分：



。

作為 E3 連接酶結合 (E3LB) 配體的化合物為本領域中所公知。

【0035】 如本文所使用的術語「連接子」、「連接子單元」或「連接基」指包含將 CIDE 部分共價接附至抗體或將 CIDE 之殘基、組成部分、部分、基團或組分接附至 CIDE 之另一殘基、組成部分、部分、基團或組分的一個或多個原子之鏈的化學部分。在各種實施例中，連接子為二價基團，將其指定為連接子 1、連接子 2、L1 或 L2。

【0036】 如本文所使用的術語「擬肽物」或 PM 是指非肽化學部分。肽是由肽（醯胺）鍵（當一個胺基酸之羧基與另一個胺基酸的胺基反應時形成的共價化學鍵）連接的胺基酸單體的短鏈。最短的肽是二肽，其由單個肽鍵所連接的 2 個胺基酸組成，其次是三肽、四肽等。擬肽物化學部分包括非胺基酸化學部分。擬肽物化學部分亦可包括由一個或多個非胺基酸化學單元隔開的一個或多個胺基酸。擬肽物化學部分在其化學結構之任何部分皆可以不含有由肽鍵連接的兩個或更多個相鄰胺基酸。「擬肽物連接子」為分子結合至 CIDE 及抗

體的部分。有用的擬肽物連接子為本領域中所公知的，且本文揭示其他連接子。

【0037】術語「抗體」在本文中以最廣義使用，且具體涵蓋單株抗體、多株抗體、二聚體、多聚體、多特異性抗體（例如，雙特異性抗體）及抗體片段，只要其表現出所需的生物活性即可（Miller 等人 (2003) *Jour. of Immunology* 170:4854-4861）。抗體可為鼠抗體、人抗體、人源化抗體、嵌合抗體或衍生自其他物種的抗體。抗體是免疫系統產生的能夠識別並結合至特異性抗原的蛋白質（Janeway, C.，Travers, P.，Walport, M.，Shlomchik (2001) *Immuno Biology*，第 5 版，Garland Publishing，New York）。標靶抗原通常具有許多結合位點（亦稱為抗原決定基），其由多種抗體上之 CDR（互補決定區）識別。與不同抗原決定基特異性結合的各種抗體具有不同的結構。因此，一種抗原可具有一種以上對應的抗體。抗體包括全長免疫球蛋白分子或全長免疫球蛋白分子之免疫活性部分，即含有抗原結合位點的分子，該抗原結合位點免疫特異性結合感興趣的標靶或其組成部分的抗原，該等標靶包括但不限於癌細胞或產生與自身免疫疾病相關的自身免疫抗體的細胞。本文所揭露之免疫球蛋白可為任意類型（例如，IgG、IgE、IgM、IgD 及 IgA）、類別（例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 及 IgA2）或亞型的免疫球蛋白分子。免疫球蛋白可衍生自任何物種。但是，在一個態樣中，免疫球蛋白為人、鼠或兔來源的免疫球蛋白。

【0038】如本文所使用的術語「抗體片段」包含全長抗體的一部分，通常為全長抗體的抗原結合區或可變區。抗體片段的實例包括 Fab、Fab'、$F(ab')_2$ 及 Fv 片段；雙抗體；直鏈抗體；微抗體（Olafsen 等人 (2004) *Protein Eng. Design & Sel.*17(4):315-323）、Fab 表現文庫所產生的片段、抗個體遺傳型（抗 Id）抗體、CDR（互補決定區）及上述免疫特異性結合至癌細胞抗原的任一項

的抗原決定基結合片段、病毒抗原或微生物抗原、單鏈抗體分子；及由抗體片段所形成之多特異性抗體。

【0039】 如本文所用之術語「單株抗體」是指獲自基本上同質之抗體群體之抗體，*即*構成該群體之個別抗體為相同的，但可能少量存在之自然發生的突變除外。單株抗體具有高度特異性，其針對單個抗原位點。此外，與包括針對不同決定位（抗原決定基）之不同抗體之多株抗體製劑相反，每個單株抗體係針對於抗原上的單一決定位。除特異性以外，單株抗體之優勢在於它們可在不受其他抗體污染的情況下合成。修飾詞「單株」表示抗體之特徵係獲自實質上同源之抗體群體，並且不應解釋為需要藉由任何特定方法生產該抗體。例如，根據本文所述之主題使用的單株抗體可藉由 Kohler 等人 (1975) 率先於 *Nature*, 256:495 所描述的雜交瘤方法來製備，或可藉由重組 DNA 方法（參見例如：US 4816567；US 5807715）來製備。亦可使用 (例如) 以下文獻中所述之技術從噬菌體抗體文庫中分離單株抗體：Clackson 等人 (1991) *Nature*，352:624-628；Marks 等人 (1991) *J. Mol. Biol.*，222:581-597。

【0040】 本文中之單株抗體特定地包括「嵌合」抗體，其中重鏈及/或輕鏈之一部分與源自特定物種或屬於特定抗體類別或子類之抗體之對應序列一致或同源，而鏈之其餘部分與源自另一物種或屬於另一抗體類別或子類之抗體以及此類抗體之片段之對應序列一致或同源，只要其展現所需之生物活性即可（US 4816567；及 Morrison 等人 (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*，81:6851-6855）。本文之目標嵌合抗體包括「靈長類化」抗體，該等抗體包含衍生自非人靈長類動物（*例如*，舊大陸猴、猿等）的可變域抗原結合序列及人恆定區序列。

【0041】 術語「嵌合」抗體是指其中重鏈及/或輕鏈的一部分源自特定來源或物種，而重鏈及/或輕鏈的其餘部分源自不同來源或物種的抗體。

【0042】抗體之「類別 (class)」係指為其重鏈所具有的恆定域或恆定區之類型。有五大類抗體：IgA、IgD、IgE、IgG 及 IgM，且彼等中的幾種可進一步分為亞型 (同型 (isotype))，例如 IgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4、IgA_1 及 IgA_2。對應於不同類別之免疫球蛋白的重鏈恆定域分別稱為 α、δ、ε、γ 及 μ。

【0043】「親和力」指代分子 (例如，抗體) 之單一結合位點與其結合配偶體 (例如，抗原) 之間的非共價交互作用總和的強度。除非另有說明，否則如本文所用的「結合親和力 (binding affinity)」指代反映結合對成員 (例如，抗體與抗原) 之間 1:1 交互作用之內在結合親和力。分子 X 與其配偶體 Y 的親和力通常可以用解離常數 (Kd) 表示。可以藉由本領域已知的習知方法測量親和力，包括彼等本文所述之方法。下面描述測量結合親和力的具體的說明性及例示性實施例。在某些實施例中，如本文所述之抗體具有 ≤ 1μM、≤ 100 nM、≤ 10 nM、≤ 5 nm、≤ 4 nM、≤ 3 nM、≤ 2 nM、≤ 1 nM、≤ 0.1 nM、≤ 0.01 nM 或 ≤ 0.001 nM（*例如* 10^{-8} M 或更小，*例如* 10^{-8} M 至 10^{-13} M，*例如* 10^{-9} M 至 10^{-13} M）的解離常數 (Kd)。

【0044】如本文所使用的術語「游離半胱胺酸胺基酸」是指經工程化改造到親本抗體中的半胱胺酸胺基酸殘基，其具有硫醇官能團 (-SH)，且不配對為分子內或分子間二硫鍵。如本文所使用的術語「胺基酸」是指甘胺酸、丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、苯丙胺酸、脯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸、半胱胺酸、蛋氨酸、離胺酸、精胺酸、組胺酸、色胺酸、天冬胺酸、麩胺酸、天冬醯胺酸、麩醯胺酸或瓜胺酸。

【0045】「患者」或「受試者」或「個體」為哺乳動物。哺乳動物包括但不限於馴養的動物 (例如牛、綿羊、貓、狗和馬)、靈長類動物 (例如人及非人類靈長類動物諸如猴)、兔以及嚙齒動物 (例如小鼠及大鼠)。在某些實施例

中，患者、個體或受試者為人類。在一些實施例中，患者可為「癌症患者」，*即*患有或有風險患有一種或多種癌症症狀的人。

【0046】「患者群體」係指一組癌症患者。該等群體可用於證明藥物的具有統計學意義的療效及/或安全性。

【0047】術語「癌症」及「癌性」指代或描述哺乳動物中通常以不受調控之細胞生長為特徵的生理狀況。「腫瘤」包含一或多個癌細胞。癌症之實例提供於本文其他地方。

【0048】如本文中所使用的「治療 (treatment)」（及其語法變異體，諸如「治療 (treat)」或「治療 (treating)」），係指試圖改變受治療受試者之疾病自然病程的臨床干預，並且可進行預防或在臨床病理過程中執行。期望之治療效果包括但不限於預防疾病之發生或複發、減輕症狀、減輕疾病之任何直接或間接病理後果、預防轉移、降低疾病進展之速度、改善或減輕疾病狀態、緩解或改善預後。在一些實施例中，本文所述之主題之抗體用於延遲疾病之發展或減慢疾病之進展。

【0049】藥劑*例如*醫藥製劑的「有效量」指代在所需之給藥劑量和時間段內有效實現所需的治療或預防效果的量。例如，用於治療癌症的有效量之藥物可減少癌細胞數；減少腫瘤尺寸；抑制（*亦即*，在一定程度上減緩或較佳的是停止）癌細胞浸潤入周邊器官中；抑制（*亦即*，在一定程度上減緩或較佳的是停止）腫瘤轉移；在一定程度上抑制腫瘤生長；及/或在一定程度上減輕與該癌症相關之症狀中的一者或多者。在一定程度上，該藥可防止生長及/或殺除現有的癌細胞，它可為抑制細胞生長的及/或細胞毒性的。有效量可延長無進展存活 (*例如*如藉由實體腫瘤反應評估準則 (Response Evaluation Criteria for Solid Tumors)、RECIST 或 CA-125 變化所測量)，產生目標反應 (包括部分反應 PR

或完全反應 CR)，增加整體存活時間，且/或改良一種或多種癌症症狀 (*例如*如藉由 FOSI 所評價)。

【0050】 如本文所使用之術語「治療有效量」指代與未接受該量之相應受試者相比，導致疾病、病症得到治療或產生副作用或降低疾病或病症進展速率的任何量。該術語亦包括在其範圍內有效增強正常生理功能的量。為用於治療，可將治療有效量之 Ab-CIDE 及其鹽作為原始化學品投予。此外，活性成分可作為醫藥組成物存在。

【0051】 術語「醫藥製劑」係指以下製劑，其形式為允許其中所含之活性成分的生物活性有效，並且不包含對製劑將投予之個體具有不可接受之毒性的其他組分。

【0052】 「醫藥上可接受之賦形劑」指代醫藥調配物中除對受試者無毒之活性成分以外的成分。醫藥上可接受之賦形劑包括但不限於緩衝劑、載劑、穩定劑或防腐劑。

【0053】 如本文中所使用之片語「醫藥上可接受之鹽」指代分子的醫藥上可接受之有機鹽或無機鹽。例示性鹽包括但不限於硫酸鹽、檸檬酸鹽、乙酸鹽、草酸鹽、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸鹽、硫酸氫鹽、磷酸鹽、酸性磷酸鹽、異菸鹼酸鹽、乳酸鹽、水楊酸鹽、酸式檸檬酸、酒石酸鹽、油酸鹽、單寧酸鹽、泛酸鹽、酒石酸氫鹽、抗壞血酸鹽、琥珀酸鹽、馬來酸鹽、龍膽酸鹽、延胡索酸鹽、葡萄糖酸鹽、葡醣醛酸鹽、蔗糖酸鹽、甲酸鹽、苯甲酸鹽、麩胺酸鹽、甲磺酸鹽、乙磺酸鹽、苯磺酸鹽、*對*-甲苯磺酸鹽及撲酸鹽（*亦即*，1,1'-亞甲基-雙-(2-羥基-3-萘甲酸鹽)）。醫藥上可接受之鹽可涉及包含另一種分子，諸如乙酸根離子、琥珀酸根離子或其他相對離子。相對離子可為任何穩定化母體化合物上電荷之有機或無機部分。此外，醫藥上可接受之鹽在其結構中可具有超過一個帶電原子。多個帶電原子為醫藥上可接受之鹽之一部分的實例

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

【0054】醫藥上不可接受之其他鹽可用於製備本文所述之化合物，且這些鹽應被視為形成本主題的另一態樣。該等鹽，諸如草酸鹽或三氟乙酸鹽，雖然本身并非醫藥上可接受之鹽，但可用於製備用為中間產物之鹽，以得到本文所述之化合物及其醫藥上可接受之鹽。

【0055】如本文中所使用的術語「烷基」指具有一個至六個碳原子的任何長度的飽和直鏈或支鏈單價烴基 (C_1-C_6)，其中烷基可視情況獨立地被下述一種或多種取代基取代。在另一實施例中，烷基含有一個、兩個、三個、四個或五個碳原子。烷基之實例包括但不限於甲基 (Me, -CH_3)、乙基 (Et, -CH_2CH_3)、1-丙基 (n-Pr、正丙基、-$CH_2CH_2CH_3$)、2-丙基 (i-Pr、異丙基、-$CH(CH_3)_2$)、1-丁基 (n-Bu、正丁基、-$CH_2CH_2CH_2CH_3$)、2-甲基-1-丙基 (i-Bu、異丁基、-$CH_2CH(CH_3)_2$)、2-丁基 (s-Bu、二級丁基、-$CH(CH_3)CH_2CH_3$)、2-甲基-2-丙基 (t-Bu、三級丁基、-$C(CH_3)_3$)、1-戊基 (正戊基、-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$)、2-戊基 (-$CH(CH_3)CH_2CH_2CH_3$)、3-戊基 (-$CH(CH_2CH_3)_2$)、2-甲基-2-丁基 (-$C(CH_3)_2CH_2CH_3$)、3-甲基-2-丁基 (-$CH(CH_3)CH(CH_3)_2$)、3-甲基-1-丁基 (-$CH_2CH_2CH(CH_3)_2$)、2-甲基-1-丁基 (-$CH_2CH(CH_3)CH_2CH_3$) 等。

【0056】「芳基」指具有單個環 (例如，單環) 或多個環 (例如，雙環或三環) 包括稠合系統的芳族碳環基團。如本文所用，芳基具有 6 個至 20 個環碳原子 (即，C_6-C_{20} 芳基)、6 個至 12 個環碳原子 (即，C_6-C_{12} 芳基) 或 6 個至 10 個環碳原子 (即，C_6-C_{10} 芳基)。芳基基團之實例包括*例如*苯基、萘基、芴基及蒽基。

【0057】「雜芳基」指具有單個環、多個環或多個稠環的芳族基團，帶有獨立地選自氮、氧及硫的一個或多個環雜原子。如本文所用，雜芳基包括 1

個至 20 個環碳原子 (即，C_1-C_{20} 雜芳基)、3 個至 12 個環碳原子 (即，C_3-C_{12} 雜芳基) 或 3 個至 8 個環碳原子 (即，C_3-C_8 雜芳基) 及獨立地選自氮、氧和硫的 1 個至 5 個環雜原子、1 個至 4 個環雜原子、1 個至 3 個環雜原子、1 個至 2 個環雜原子或 1 個環雜原子。在某些情況下，雜芳基包括 9 至 10 員環系統、6 至 10 員環系統、5 至 10 員環系統、5 至 7 員環系統或 5 至 6 員環系統，各系統獨立地具有獨立地選自氮、氧和硫的 1 個至 4 個環雜原子、1 個至 3 個環雜原子、1 個至 2 個環雜原子或 1 個環雜原子。雜芳基基團之實例包括例如吖啶基、苯并咪唑基、苯并噻唑基、苯并吲哚基、苯并呋喃基、苯并噻唑基、苯并噻二唑基、苯并萘并呋喃基、苯并噚唑基、苯并噻吩基 (苯并硫苯基)、苯并三唑基、苯并[4,6]咪唑并[1,2-a]吡啶基、咔唑基、啐啉基、二苯并呋喃基、二苯并硫苯基、呋喃基、異噻唑基、咪唑基、吲唑基、吲哚基、吲唑基、異吲哚基、異喹啉基、異噚唑基、萘啶基、噚二唑基、噚唑基、1-氧負離子基吡啶基、1-氧負離子基嘧啶基、1-氧負離子基吡咑基、1-氧負離子基嗒咑基、啡咑基、呔咑基、喋啶基、嘌呤基、吡咯基、吡唑基、吡啶基、吡咑基、嘧啶基、嗒咑基、喹唑啉基、喹喔啉基、喹啉基、喹嚀環基 (quinuclidinyl)、異喹啉基、噻唑基、噻二唑基、三唑基、四唑基及三咑基。稠合雜芳基環之實例包括但不限於苯并[d]噻唑基、喹啉基、異喹啉基、苯并[b]噻吩基、吲唑基、苯并[d]咪唑基、吡唑并[1,5-a]吡啶基及咪唑基[1,5-a]吡啶基，其中雜芳基可以*經由*稠合系統之任一環結合。具有單個或多個稠合環、含有至少一個雜原子的任何芳族環均被視為雜芳基，而不管與分子之其餘部分的接附 (即，透過稠合環中之任一個)。雜芳基不包括如上所定義之芳基或與其重疊。

【0058】 如本文所用，術語「伸烷基」指具有一個至十二個碳原子之任何長度的飽和直鏈或支鏈二價烴基 (C_1-C_{12})，其中伸烷基可視情況獨立地經下文所述之一個或多個取代基取代。在另一實施例中，伸烷基含有一個至八個碳

原子 (C_1-C_8) 或一個至六個碳原子 (C_1-C_6)。伸烷基基團之實例包括但不限於亞甲基 (-CH_2-)、伸乙基 (-CH_2CH_2-)、伸丙基 (-$CH_2CH_2CH_2$-) 等。

【0059】 術語「碳環」、「碳環基」、「環碳環」及「環烷基」指具有 3 個至 5 個碳原子 (C_3-C_5) 的作為單環的單價非芳族、飽和或部分不飽和環。單環碳環之實例包括但不限於環丙基、環丁基、環戊基、1-環戊-1-烯基、1-環戊-2-烯基、1-環戊-3-烯基等。碳環基可視情況獨立地被一種或多種烷基取代。

【0060】 「雜環」、「雜環的」、「雜環烷基」或「雜環基」指具有單環或多個稠環的飽和或部分不飽和基團，包括稠環、橋環或螺環系統，且具有 3 個至 20 個環原子，包括 1 個至 10 個雜原子。這些環原子選自由碳、氮、硫或氧所組成之群組，其中，在稠環系統中，一個或多個環可為環烷基、芳基或雜芳基，前提條件是接附點通過非芳環實現。在某些實施例中，雜環基團之氮及/或硫原子視情況被氧化以提供 N-氧化物、-S(O)- 或 -SO_2- 部分。雜環之實例包括但不限於四氫吖唉、二氫吲哚、吲唑、喹口巾、咪唑啶、咪唑啉、哌啶、哌啡、吲哚啉、1,2,3,4- 四氫異喹啉、四氫噻唑、嗎啉基、硫代嗎啉基（亦稱為硫雜嗎啉基）、1,1-二側氧基硫代嗎啉基、哌啶基、吡咯啶、四氫呋喃基等。雜環基可經取代，如 WO2014/100762 中所述。

【0061】 術語「手性」指代具有鏡像配偶體之不可重疊性的分子，而術語「非手性」指代可疊合在其鏡像配偶體上的分子。術語「立體異構物」指代具有相同化學組成，但原子或基團在空間上的排列不同的化合物。「非鏡像異構物」指代具有兩個或更多個手性中心並且其分子不是彼此鏡像的立體異構物。非鏡像異構物具有不同的物理性質，例如，熔點、沸點、光譜特性及反應性。非鏡像異構物之混合物可以在高解析度分析程序（諸如電泳及層析術）下分離。「鏡像異構物」指代化合物的兩種立體異構物，它們是彼此不可重疊的鏡像。本文所用之立體化學定義及慣例通常遵循 S.P.Parker 編輯, *McGraw-Hill*

Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York；以及 Eliel, E. 與 Wilen, S., *Stereochemistry of Organic Compounds* (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York。多種有機化合物以光學活性形式存在，亦即，其具有使平面-偏振光之平面旋轉的能力。在描述光學活性化合物時，前綴 D 及 L 或者 *R* 及 *S* 用於表示分子圍繞其手性中心的絕對組態。前綴 d 及 l 或者 (+) 及 (-) 為用於表示該化合物對平面偏振光的旋轉符號，其中 (-) 或 l 表示該化合物為左旋。帶有 (+) 或 d 前綴之化合物為右旋。對於給定化學結構，該等立體異構物係相同者，但它們為彼此之鏡像。特定之立體異構物也可以稱為鏡像異構物，並且該等異構物之混合物通常稱為鏡像異構物混合物。鏡像異構物之 50:50 混合物稱為外消旋混合物或外消旋物，它們可能出現在化學反應或過程中沒有立體選擇或立體特異性之處。術語「外消旋混合物」及「外消旋物」指代兩種鏡像體種類的等莫耳混合物，其不具旋光性。

【0062】 附加定義及縮寫可以在本文的其他地方提供。

II. 化學降解誘導物

【0063】 本揭露涉及一種藉由連接子結合或共價連接至抗體的 CIDE。本揭露涉及一種藉由擬肽物連接子結合至或共價連接至抗體的 CIDE。在某些實施例中，CIDE 經磷酸化。在另一態樣，磷酸酯部分作為結合物之前驅藥。

【0064】 在各實施例中，CIDE 具有下列結構：E3LB—L2—PB，其中 E3LB 為共價結合至 L2 的 E3 連接酶結合配體；L2 為共價結合至 E3LB 及 PB 的連接子；且 PB 為共價結合至 L2 的蛋白結合基團。在各態樣，磷酸酯部分係共價結合至 CIDE (D) 之 E3LB 及/或 PB。

【0065】 在某些實施例中，E3 連接酶為逢希伯-林道 (von Hippel-Lindau；VHL) 腫瘤抑制蛋白。

【0066】 在某些實施例中，磷酸酯部分係共價結合至 D 之 E3LB。

【0067】在某些實施例中，磷酸酯部分係共價結合至 D 之 PB。

【0068】在某些實施例中，L1 係共價結合至 D 之 PB，且磷酸酯部分係共價結合至 D 之 E3LB。

【0069】在某些實施例中，L1 係共價結合至 D 之 PB，且磷酸酯部分係共價結合至 D 之 PB。

【0070】在某些實施例中，E3LB 包含羥基脯胺酸殘基，且磷酸酯部分係共價結合至羥基脯胺酸殘基。

【0071】在某些實施例中，PB 包含羥基苯基部分，且磷酸酯部分係共價結合至羥基苯基部分。

【0072】在某些實施例中，PB 為 BRM 蛋白。

【0073】在某些實施例中，藉由擬肽物連接子 L1 結合或共價連接至抗體的 CIDE 具有下列式：

$$Ab—(L1—D)_j，$$

其中 Ab 為抗體；L1 為連接子；D 為 CIDE；j 為 1 與 16 之間的整數。在此類態樣，至少一個磷酸酯部分係共價結合至 D。

【0074】以下部分進一步詳細描述包含 Ab-CIDE 的以上組分。為了獲得具有一種或多種特性包括有效之療效及期望之治療指數的 Ab-CIDE，提供以下組分：

1. 抗體 (Ab)

【0075】如本文所述，抗體（例如單株抗體 (mAB)）用於將 CIDE 遞送至標靶細胞，例如表現由抗體靶向的特異性蛋白質的細胞。Ab-CIDE 之抗體部分可靶向表現抗原的細胞，從而通常通過胞吞作用將抗原特異性 Ab-CIDE 經胞內遞送至標靶細胞。在一些情況下，胞飲作用或類似的非特異性吸收途徑可能導致抗原表現或非抗原表現細胞內對 Ab-CIDE 之一般細胞吸收。本文所述之

Ab-CIDE 及其使用方法有利地利用細胞表面之抗體識別及/或 Ab-CIDE 的內吞作用將 CIDE 部分遞送到細胞內。抗體在 WO2020/086858 中有所描述，該文獻整體以引用方式併入本文。

【0076】 在特定實施例中，抗體可以經突變以降低效應功能。調控 Fc 效應功能的突變之實例包括 LALAPG 突變及 NG2LH 突變。

【0077】 在特定實施例中，抗體為如先前在 WO2016/04856 中描述的 THIOMAB™。此外，設想了組合，使得任何抗體標靶均可結合 THIOMAB™ 突變與或不與包括 LALAPG 或 NG2LH 突變的任何 Fc 效應子調控的任何適合的組合。

【0078】 抗體可以為人抗體，例如，如一般性描述於：van Dijk 及 van de Winkel，*Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001)；及 Lonberg，*Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008)。抗體可以為來源於文庫之抗體。此領域中所公知之多種方法用於產生噬菌體展示庫並篩選此等庫中具有所需之結合特性的抗體。該等方法綜述於例如 Hoogenboom 等人，收錄於 *Methods in Molecular Biology* 178: 1-37（O'Brien 等人主編，Human Press，Totowa，NJ，2001）中，並且進一步描述於例如 McCafferty 等人 *Nature* 348: 552-554；Clackson 等人 *Nature* 352: 624-628 (1991)；Marks 等人 *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992)；Marks 和 Bradbury，收錄於 *Methods in Molecular Biology* 248:161-175（Lo 主編，Human Press，Totowa，NJ，2003）；Sidhu 等人 *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004)；Lee 等人 *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004)；Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472 (2004)；及 Lee 等人 *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132 (2004)。

【0079】 抗體可以為嵌合及人源化抗體。人源化抗體及其製造方法綜述於例如 Almagro 及 Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008) 中，且進一步描

述於例如以下各者中：Riechmann 等人, *Nature* 332:323-329 (1988)；Queen 等人, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989)；美國專利第 5,821,337 號、第 7,527,791 號、第 6,982,321 號及第 7,087,409 號；Kashmiri 等人, *Methods* 36:25-34 (2005) (描述 SDR (a-CDR) 移植 (grafting))；Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991)（描述「表面重修 (resurfacing)」）；Dall'Acqua 等人, *Methods* 36:43-60 (2005) (描述「FR 改組 (shuffling)」)；以及 Osbourn 等人, *Methods* 36:61-68 (2005) 及 Klimka 等人, *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (描述 FR 改組之「導向選擇 (guided selection)」方法)。

【0080】 抗體可為多特異性抗體，例如雙特異性抗體。如本文所使用的術語「多特異性抗體」是指包含具有多抗原決定基特異性的抗原結合域的抗體（*亦即*，能夠結合至一種分子上的兩個或更多個不同抗原決定基或能夠結合至兩種或更多種不同分子上的抗原決定基）。如本文所使用的術語「雙特異性抗體」是指包含能夠結合至一種分子上的兩個不同抗原決定基或能夠結合至兩種不同分子上的抗原結合域的多特異性抗體。雙特異性抗體在本文中亦可稱為具有「雙重特異性」或為「雙特異性的」。例示性雙特異性抗體可同時結合蛋白質及任何其他抗原。製備多特異性抗體之技術包括但不限於具有不同特異性的兩個免疫球蛋白重鏈-輕鏈對的重組共表現 (參見 Milstein 及 Cuello，*Nature* 305: 537 (1983)；WO 93/08829；及 Traunecker 等人，*EMBO J.* 10: 3655 (1991)) 及「杵臼 (knob-in-hole)」工程改造 (參見例如：美國專利第 5,731,168 號；WO2009/089004；US2009/0182127；US2011/0287009；Marvin 及 Zhu，Acta Pharmacol. Sin.(2005) 26(6):649-658；及 Kontermann (2005) Acta Pharmacol. Sin.，26:1-9）。多特異性抗體也可透過以下方法進行製備：用於製備抗體 Fc-異二聚體分子的工程靜電轉向效應 (WO 2009/089004A1)；交聯兩個或更多個抗體或片段 (參見例如美國第 4,676,980 號專利；及 Brennan 等人，*Science*，229:

81，1985)；使用白胺酸拉鏈產生雙特異性抗體 (參見例如，Kostelny 等人，*J. Immunol.*，148(5):1547-1553 (1992))；使用「雙抗體」技術製備雙鏈抗體片段 (參見例如，Hollinger 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*，90:6444-6448 (1993))；以及使用單鏈 Fv (sFv) 二聚體 (參見例如 Gruber 等人，*J. Immunol.*，152:5368 (1994))；以及按照例如 Tutt 等人 (*J. Immunol.* 147: 60 (1991)) 所述之方法製備三特異性抗體。本文亦包括具有三個或更多個抗原結合位點之工程化抗體，包括「章魚抗體」(Octopus antibodies) 或「雙可變域免疫球蛋白」(DVD)（參見例如 US 2006/0025576A1；及 Wu 等人 *Nature Biotechnology* (2007)）。本文所述之抗體或片段亦包括「雙重作用 FAb」或「DAF」，其包含與標靶蛋白質及另一種不同抗原結合的抗原結合位點（例如參見 US 2008/0069820）。

【0081】 抗體可為抗體片段。抗體片段包括但不限於 Fab、Fab'、Fab'-SH、$F(ab')_2$、Fv 和 scFv 片段以及下文所述之其他片段。關於某些抗體片段的綜述，參見 Hudson 等人，*Nat. Med.* 9:129-134 (2003)。關於 scFv 片段的綜述，參見例如 Pluckthün，*The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*，第 113 卷，Rosenburg 及 Moore 編，Springer-Verlag，New York，第 269-315 頁 (1994)；亦參見 WO 93/16185；及美國專利第 5,571,894 號及第 5,587,458 號。關於包含補救受體結合抗原決定位殘基且具有增加的體內半衰期之 Fab 及 $F(ab')_2$ 片段的論述，參見美國第 5,869,046 號專利。雙功能抗體為具有兩個抗原結合位點 (其可係二價或雙特異性的) 之抗體片段。參見例如 EP 404,097；WO 1993/01161；Hudson 等人，*Nat. Med.* 9:129-134 (2003)；及 Hollinger 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993)。Hudson 等人，*Nat. Med.* 9:129-134 (2003) 中亦描述三功能抗體及四功能抗體。單域抗體為包含抗體之重鏈可變域之全部或部分或抗體之輕鏈可變域之全部或部分之抗體片段。在某些實施例中，單域抗體為人類單域抗體 (Domantis, Inc.，Waltham, MA；*參見例如*美國專利第

6,248,516 B1 號)。抗體片段可藉由各種技術製得，包括但不限於完整抗體之蛋白水解消解以及藉由重組宿主細胞產生。

【0082】 抗體可為抗體變異體。在某些實施例中，考慮到本文提供之抗體的胺基酸序列變異體。例如，可能希望改善抗體的結合親和力及/或其他生物學特性。可藉由將適當的修飾引入編碼抗體的核苷酸序列中，或藉由肽合成來製備抗體之胺基酸序列變異體。此等修飾包括例如抗體之胺基酸序列中的殘基的缺失及/或插入及/或取代。可實施刪除、插入和取代之任意組合以得到最終構建體，前提條件是最終構建體具有所需之特徵，*例如*抗原結合特徵。

【0083】 可使用重組方法及組成物來生產抗體，例如美國專利號 4,816,567 中所述。現在參照抗體親和力，在實施例中，抗性與一種或多種腫瘤相關抗原或細胞表面受體結合。

【0084】 在某些實施例中，腫瘤相關抗原或細胞表面受體選自 CD71、Trop2、MSLN、NaPi2b、Ly6E、EpCAM、STEAP1、HER2、CD33 及 CD22。因此，在某些實施例中，Ab-CIDE 可包含選自以下之抗體：抗 Ly6E 抗體、抗 NaPi2b 抗體、抗 CD22 抗體、抗 CD71 抗體、抗 Trop2 抗體、抗 MSLN 抗體、抗 EpCAM 抗體、抗 Steap1 抗體、抗 CD33 抗體、抗 CLL1 抗體，抗 CD123 抗體及抗 HER2 抗體。

【0085】 特定抗體包括但不限於：

i. 抗 Ly6E 抗體

【0086】 在某些實施例中，Ab-CIDE 可包含抗 Ly6E 抗體：Ly6E（淋巴細胞抗原 6 複合體基因座 E；Ly67、RIG-E、SCA-2、TSA-1）；NP_002337.1；NM_002346.2；de Nooij-van Dalen, A.G. 等人 (2003) Int. J. Cancer 103 (6)，768-774；Zammit, D.J. 等人 (2002) Mol. Cell. Biol. 22 (3):946-952；WO 2013/17705。

【0087】 Ly6E 為一種由 GPI 連接、長度為 131 個胺基酸、約 8.4 kDa 的功能未知的蛋白，無已知的結合配偶體。其最初被鑑定為在小鼠未成熟之胸腺細胞、胸腺髓質上皮細胞中表現的轉錄物（Mao 等人 (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*93:5910-5914）。在一些實施例中，本文所述之主題提供一種 Ab-CIDE，其包含在 PCT 公開案第 WO 2013/177055 號中所述之抗 Ly6E 抗體。

ii. 抗 NaPi2b 抗體

【0088】 在某些實施例中，Ab-CIDE 包含抗 NaPi2b 抗體：Napi2b (Napi3b，NAPI-3B，NPTIIb，SLC34A2，溶質載劑家族 34 (磷酸鈉)，成員 2，第 II 型鈉依賴性磷酸鹽轉運子 3b，Genbank 登錄號 NM_006424) J. Biol. Chem. 277 (22):19665-19672 (2002)，Genomics 62 (2):281-284 (1999)；Feild，J.A. 等人 (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 258 (3):578-582)；WO2004022778 (請求項 2)；EP1394274 (實例 11)；WO2002102235 (請求項 13；第 326 頁)；EP875569 (請求項 1；第 17-19 頁)；WO200157188 (請求項 20；第 329 頁)；WO2004032842 (實例 IV)；WO200175177 (請求項 24；第 139-140 頁)；交叉引用：MIM:604217；NP_006415.1；NM_006424_1。

iii. 抗 CD22 抗體

【0089】 在某些實施例中，Ab-CIDE 可包含抗 CD22 抗體。CD22（B 細胞受體 CD22-B 同型、BL-CAM、Lyb-8、Lyb8、SIGLEC-2、FLJ22814、Genbank 登錄號 AK026467）；Wilson 等人 (1991) J. Exp. Med. 173:137-146；WO2003072036（請求項 1；圖 1）；交叉引用：MIM:107266；NP_001762.1；NM_001771_1。

iv. 抗 CD71 抗體

【0090】 在某些實施例中，Ab-CIDE 可包含抗 CD71 抗體。CD71（運鐵蛋白受體）是一種完整的膜醣蛋白，在細胞對鐵的吸收中發揮重要作用。它是

一種熟知的細胞增殖及活化標記。儘管造血系統中的所有增殖細胞皆表現 CD71，但 CD71 已被視為一種有用的紅血球相關抗原。在一個實施例中，抗 CD71 抗體描述於下者：WO2016081643，其全文以引用方式併入本文。

v. 抗 Trop2 抗體

【0091】在某些實施例中，Ab-CIDE 可包含抗 Trop2 抗體。Trop2 (滋胚層抗原 2) 為一種跨膜醣蛋白，為多種癌症中存在表現差異的細胞內鈣訊息轉導物。它向細胞發出自我更新、增殖、侵入及存活的訊息。Trop 2 亦稱為細胞表面醣蛋白 Trop-2/Trop2、胃腸道腫瘤相關抗原 GA7331、胰腺癌標記蛋白 GA733-1/GA733、膜組分染色體 1 表面標記 1 M1S1、上皮糖蛋白-1、EGP-1、CAA1、膠滴狀角膜營養不良 GDLD 及 TTD2。在以上實施例中任一項中，Ab-CIDE 的抗 Trop2 抗體可為人源化的。在一個實施例中，抗 Trop2 抗體描述於 US-2014/0377287 及 US-2015/0366988 中，其各自全文以引用方式併入本文。

vi. 抗 MSLN 抗體

【0092】在某些實施例中，Ab-CIDE 可包含抗 MSLN 抗體。MSLN（間皮素）是一種糖基磷脂醯肌醇錨定的細胞表面蛋白，可用作細胞黏附蛋白。MSLN 亦稱為 CAK1 及 MPF。該蛋白質在上皮間皮瘤、卵巢癌及特定之鱗狀細胞癌中過度表現。在以上實施例中任一項中，Ab-CIDE 的抗 MSLN 抗體可為人源化的。在一個實施例中，抗 MSLN 抗體為 Scales, S. J. 等人 (*Mol. Cancer Ther*. 2014, 13(11), 2630-2640) 所述的 h7D9.v3，其全文以引用方式併入本文。

vii. 抗 EpCAM 抗體

【0093】在某些實施例中，Ab-CIDE 可包含抗 EpCAM 抗體。在一個態樣中，Ab-CIDE 的抗體可為靶向見於許多細胞或組織類型中之蛋白質的抗體。該等抗體之實例包括 EpCAM。上皮細胞細胞黏附分子 (EpCAM) 是一種跨膜醣蛋白，其介導上皮細胞中獨立於 Ca2+ 的同型細胞-細胞黏附（Litvinov, S. 等人

(1994) Journal of Cell Biology 125(2):437–46）。亦稱為 DIAR5、EGP-2、EGP314、EGP40、ESA、HNPCC8、KS1/4、KSA、M4S1、MIC18、MK-1、TACSTD1、TROP1 的 EpCAM 亦參與細胞傳訊 (Maetzel, D. 等人 (2009) Nature Cell Biology 11(2):162–71)、遷移 (Osta, WA 等人 (2004) Cancer Res. 64(16):5818–24)、增殖和分化 (Litvinov, S. 等人 (1996) Am J Pathol. 148(3):865–75)。此外，EpCAM 藉由其上調 c-myc、e-fabp 及週期蛋白 A 和週期蛋白 E 的能力而具有致癌潛力（Munz, M. 等人 (2004) Oncogene 23(34):5748–58）。由於 EpCAM 僅在上皮細胞及上皮來源的腫瘤中表現，因此 EpCAM 可用為各種癌症的診斷標記。換言之，Ab-CIDE 可用於將 CIDE 遞送至許多細胞或組織，而非像使用靶向抗體那樣將 CIDE 遞送之特定細胞類型或組織類型。

viii. 抗 Steap1 抗體

【0094】 在某些實施例中，Ab-CIDE 包含抗 STEAP1 抗體。STEAP1 (前列腺六次跨膜上皮抗原，Genbank 登錄號 NM_0 12449) Cancer Res. 6 1 (15), 5857-5860 (2001), Hubert, R.S. 等人 (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.96 (25): 14523-14528; W02004065577 (請求項 6)；W02004027049 (圖 1L)；EP1394274 (實例 11)；W02004016225 (請求項 2)；W02003042661 (請求項 12)；US2003 157089 (實例 5)；US2003 185830 (實例 5)；US2003064397 (圖 2)；WO200289747 (實例 5；第 618-619 頁)；WO2003022995 (實例 9；圖 13A，實例 53；第 173 頁，實例 2；圖 2A)；

viii. 抗 Steap2 抗體

【0095】 在某些實施例中，Ab-CIDE 包含抗 STEAP2 抗體。STEAP2 (HGNC 8639、IPCA-1、PCANAP1、STAMP1、STEAP2、STMP、前列腺癌相關基因 1、前列腺癌相關蛋白 1、前列腺六次跨膜上皮抗原 2、六次跨膜前列腺蛋白，Genbank 登錄號 AF455138) Lab. Invest. 82 (11): 1573 1582 (2002))；

W02003087306；US2003064397 (請求項 1；圖 1)；WO200272596 (請求項 13；第 54-55 頁)；WO200172962 (請求項 1；圖 4B)；W02003 104270 (請求項 11)；W02003 104270 (請求項 16)；US2004005598 (請求項 22)；W02003042661 (請求項 12)；US2003060612 (請求項 12；圖 10)；WO200226822 (請求項 23；圖 2)；WO200216429 (請求項 12；圖 10)；交叉引用：GF22655488；AAN04080.1；AF455138_I

ix. 抗 Her2 抗體

【0096】 在 Ab-CIDE 中，包含抗 HER2 抗體。在一個實施例中，Ab-CIDE 之抗 HER2 抗體包含人源化抗 HER2 抗體。在一些實施例中，Ab-CIDE 包含人源化 HER2 抗體，也稱為曲妥珠單抗 (trastuzumab)，可以商品名 HERCEPTIN® 商購獲得。在另一個實施例中，Ab-CIDE 之抗 HER2 抗體包含人源化抗 HER2 抗體，例如，人源化 2C4，如 US7862817 中所述。例示性人源化 2C4 抗體為帕妥珠單抗 (pertuzumab)，可以商品名 PERJETA® 商購獲得。

x. 抗 CD33 抗體

【0097】 在某些實施例中，Ab-CIDE 包含抗 CD33 抗體。CD33 (唾液酸結合、免疫球蛋白樣凝集素家族之成員) 為 67 kDa 醣基化跨膜蛋白。除了在定向 (commited) 骨髓單核球性細胞及紅血球前驅細胞上外，CD33 亦表現在大多數骨髓及單核細胞白血病細胞上。其在最早的多能幹細胞、成熟粒細胞、淋巴樣細胞或非造血細胞中未見 (Sabbath 等人，(1985).Clin. Invest. 75:756-56; Andrews 等人，(1986) Blood 68:1030-5)。CD33 在其細胞質尾部含有兩個酪胺酸殘基，每個酪胺酸殘基後跟疏水殘基，類似於見於許多抑制性受體中之免疫受體酪胺酸抑制基序 (ITIM)。

2. 連接子 (L1)

【0098】 如本文所述，連接子 (L1) 為可用於將一個或多個 CIDE 部分 (D) 連接至抗體 (Ab) 以形成 Ab-CIDE 的雙功能或多功能部分。在一些實施例中，可使用具有反應性官能團的連接子 (L1) 製備 Ab-CIDE，以共價接附至 CIDE 及抗體。例如，在一些實施例中，抗體 (Ab) 之半胱胺酸硫醇可與連接子或連接子 L1-CIDE 組的反應性官能基形成鍵，以製備 Ab-CIDE。

i. 擬肽物連接子

【0099】 在某些實施例中，Ab-CIDE 之連接子 (L1) 為非肽擬肽物連接子，其可藉由溶酶體酶切割。在此類實施例中，非肽連接子像肽一樣起作用且可以藉由溶酶體蛋白酶有效地切割。例如，可將二肽中間的醯胺鍵 (例如 Val-Cit) 替換為醯胺模擬物；及/或可將整個胺基酸 (例如，Val-Cit 二肽中之纈胺酸) 替換為非胺基酸部分 (例如，環烷基二羰基結構 (例如，環大小為 4 或 5 之環烷基))。

【0100】 在某些實施例中，L1 為具有下列式的擬肽物連接子：

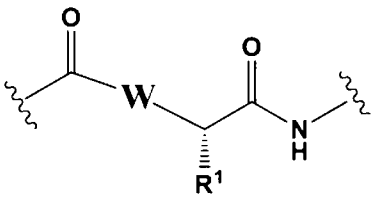
—Str—(PM)—Sp—，

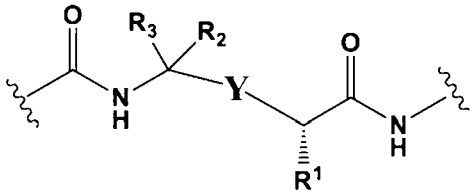
其中：

Str 為共價接附於 Ab 的延伸基單元；

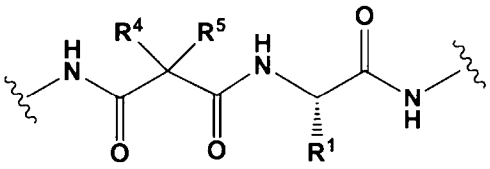
Sp 為鍵或共價接附於 CIDE 部分的間隔基單元；且

PM 為選自由以下所組成之群組的非肽化學部分：





及



，其中

W 為 -NH-雜環烷基- 或雜環烷基；

Y 為雜芳基、芳基、-C(O)C_1-C_6伸烷基、C_1-C_6伸烷基-NH_2、C_1-C_6伸烷基-NH-CH_3、C_1-C_6伸烷基-N-$(CH_3)_2$、C_1-C_6烯基或 C_1-C_6伸烷基基團；

各 R^1 獨立地為 C_1-C_{10} 烷基、C_1-C_{10} 烯基、(C_1-C_{10}烷基)$NHC(NH)NH_2$ 或 (C_1-C_{10}烷基)$NHC(O)NH_2$ $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$； $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH-CH_3$；及 $-CH_2CH_2CH_2CH_2N-(CH_3)_2$；

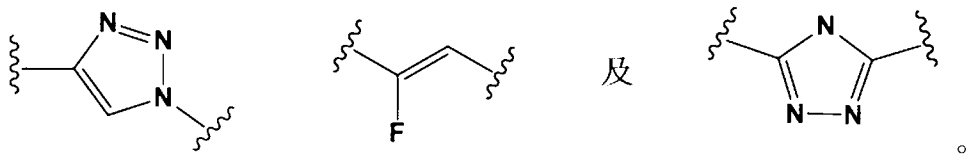
R^3 和 R^2 各自獨立為 H、C_1-C_{10}烷基、C_1-C_{10}烯基、芳基烷基或雜芳基烷基，或者 R^3 和 R^2 可一起形成 C_3-C_7環烷基；且

R^4 和 R^5 各自獨立為 C_1-C_{10}烷基、C_1-C_{10}烯基、芳基烷基、雜芳基烷基、(C_1-C_{10}烷基)OCH_2-，或者 R^4 和 R^5 可形成 C_3-C_7環烷基環。

【0101】 L1 可透過 E3LB、L2 或 PB 基團中之任一者連接至 CIDE。

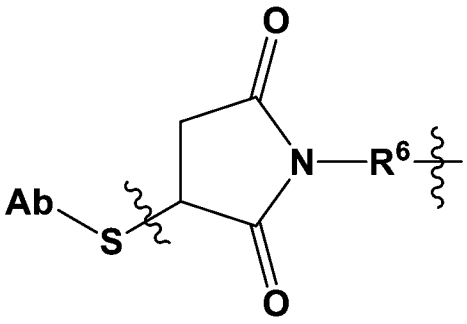
【0102】 在某些實施例中，Y 為雜芳基；且 R^4 與 R^5 一起形成環丁基環。

【0103】在某些實施例中，Y 為選自由以下所組成之群組的部分：



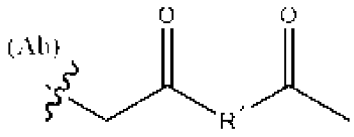
。

【0104】在某些實施例中，Str 為由下式表示的化學部分：



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

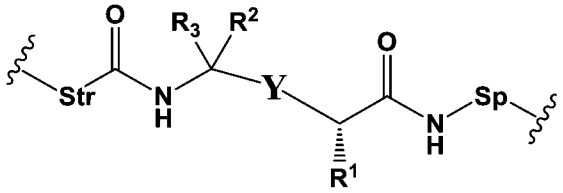
【0105】在某些實施例中，Str 具有下式：



其中 R^7 選自 C_1-C_{10}伸烷基、C_1-C_{10}烯基、(C_1-C_{10}伸烷基)O-、N(R^c)-(C_2-C_6 伸烷基)-N(R^c) 及 N(R^c)-(C_2-C_6伸烷基)；其中每個 R^c 獨立地為 H 或 C_1-C_6 烷基；Sp

為 —Ar—R^b—，其中 Ar 為芳基或雜芳基，R^b 為 (C_1-C_{10}伸烷基)O- 或 Sp -C_1-C_6伸烷基-C(O)NH-。

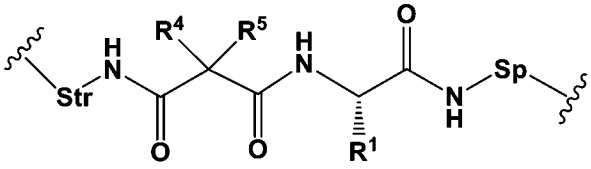
【0106】在實施例中，L1 是由下式表示的非肽化學部分



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

R^3 和 R^2 各自獨立為 H 或 C_1-C_{10}烷基。

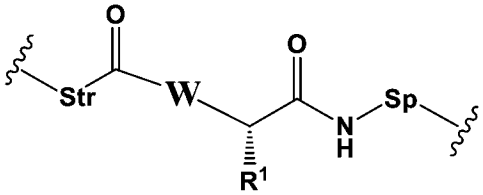
【0107】在實施例中，L1 是由下式表示的非肽化學部分



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

R^4 與 R^5 一起形成 C_3-C_7環烷基環。

【0108】在實施例中，L1 是由下式表示的非肽化學部分

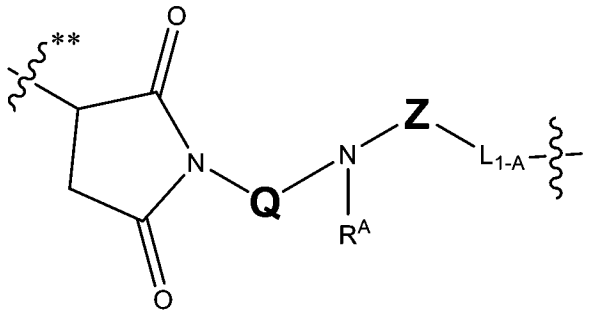


R^1 為 C_1-C_6烷基、(C_1-C_6烷基)NHC(NH)NH_2 或 (C_1-C_6烷基)NHC(O)NH_2，且 W 如上所述。

【0109】在一些實施例中，連接子可為擬肽物連接子，例如 WO2015/095227、WO2015/095124 或 WO2015/095223 中所述的那些，其各自全文以引用方式併入本文。

【0110】在某些實施例中，L1 係選自由以下所組成之群組：

i)



，

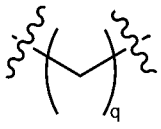
其中， 指示至 Ab 的接附點；

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

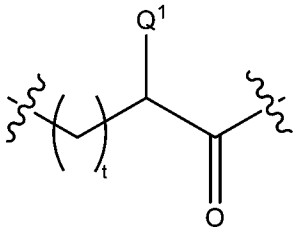
R^A 為氫、C_{1-6} 烷基或 $-(CH_2)_v-$芳基，其中 v 為 0 或 1；諸如苯基或苄基；

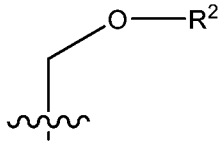
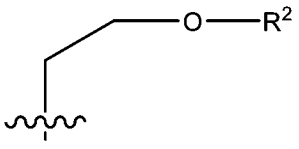
Q 係選自由以下所組成之群組：

a)

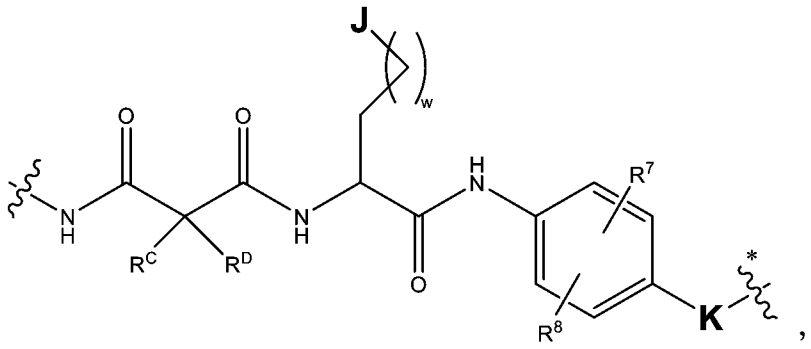
，其中，q 為 1、2、3 或 4；及

b)

，其中，t 為 0、1、2、3 或 4；

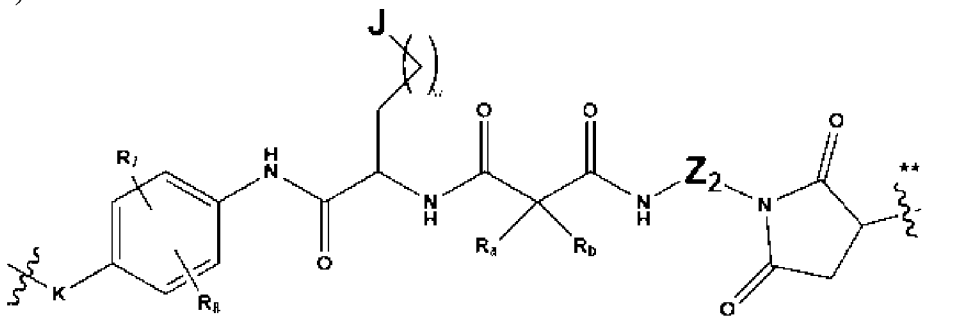
Q^1 為氫、 或 ，其中 R^2 為氫、鹵基 (C_{1-6})烷基或 C_{1-6} 烷基；且

L_{1-A} 為：



其中， 表示與 D 的接附點；且

ii)



其中  表示與 Ab 的接附點；

Z_2 為 C_{1-12} 伸烷基或 $-[CH_2]_g-O-[CH_2]_h-$，其中 g 及 h 各自獨立地為 0、1 或 2；

w 為 0、1、2、3、4 或 5；

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

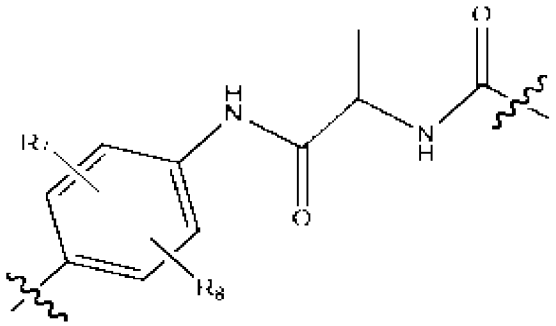
K 係選自由以下所組成之群組：C_{1-3} 伸烷基、-CH(R)-、-C(O)-、$-C(O)-O-CH(R)-$、$-CH_2-O-C(O)-$、$-CH_2-O-C(O)-NH-CH_2-$ 及 $-CH_2-O-C(O)-R-[CH_2]_q-O-$，其中 R 為氫、$C_{1-3}$ 烷基、$N(R_x)(R_y)$、$-O-N(R_x)(R_y)$ 或 $C(O)-N(R_x)(R_y)$，其中 q 為 0、1、2 或 3，且其中 R_x 及 R_y 各自獨立地選自氫及

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

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

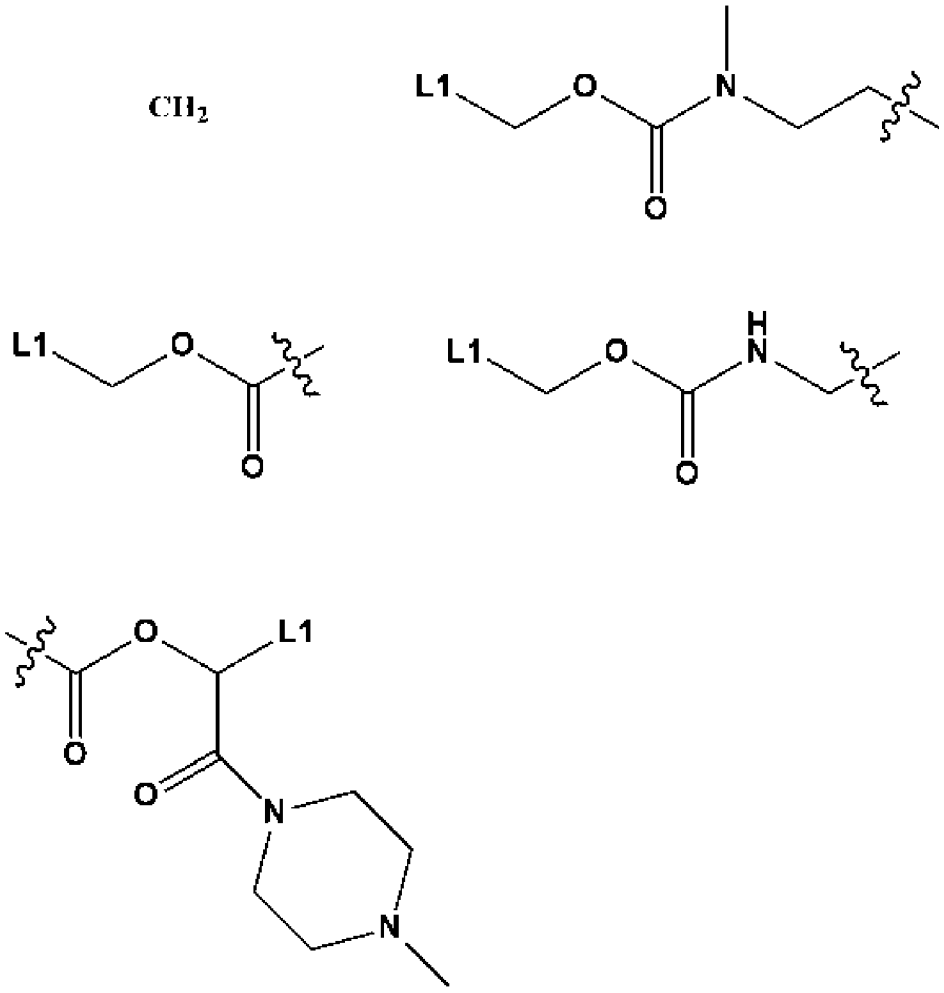
R_7 及 R_8 各自獨立地為氫、鹵基、C_{1-5} 烷基、C_{1-5} 烷氧基或羥基。

【0111】在 L_{1-A} 的某些實施例中，當 w 為 0 且 J 為甲基時，L_{1-A} 包含：

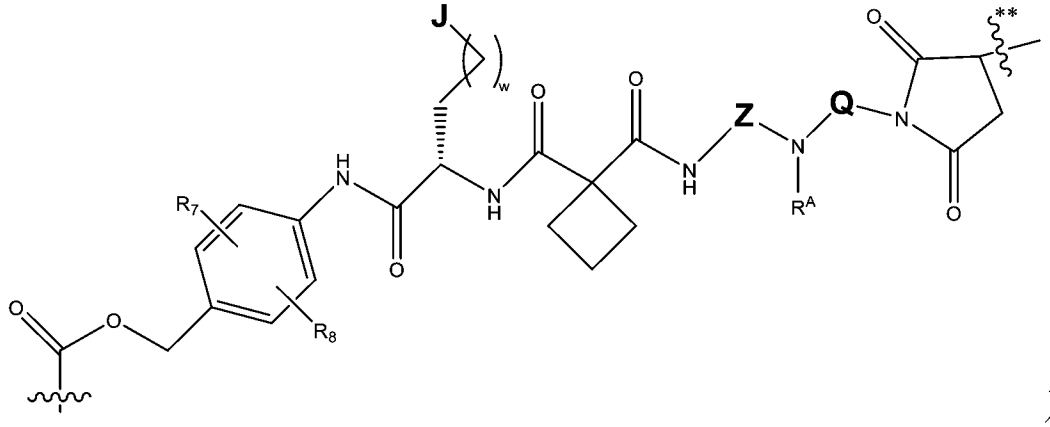


。

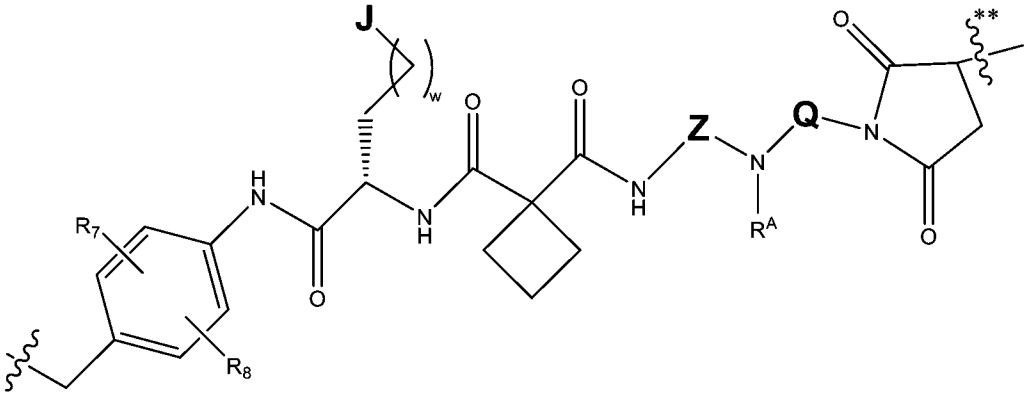
【0112】在某些實施例中，L1 之 K 選自由以下所組成之群組：



【0113】在某些實施例中，L1 係選自由以下所組成之群組：



及



。

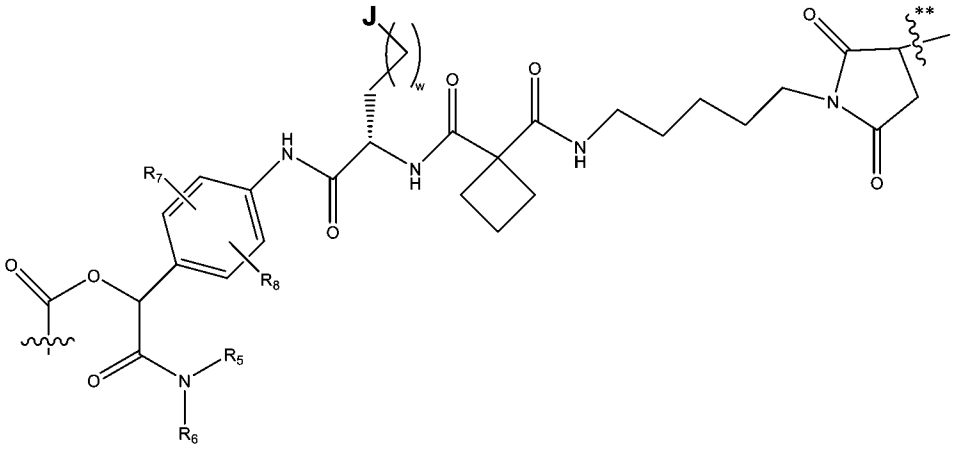
【0114】在某些實施例中，R_7 及 R_8 皆為氫。

【0115】在某些實施例中，Z 為–$(CH_2)_p$-。

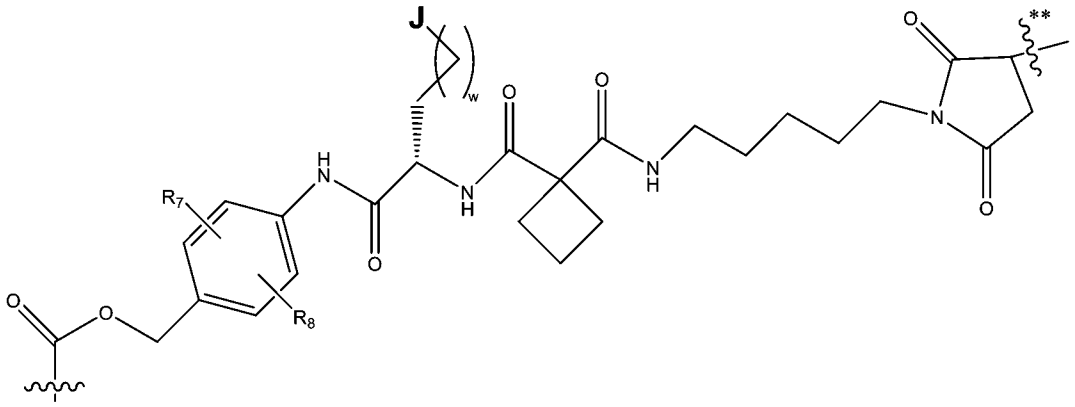
【0116】在某些實施例中，w 為 2 或 3，且 J 為 -$N(CH_3)_2$ 或 -NH(CO)NH。

【0117】在某些實施例中，Q 為 -CH_2-CH_2-。

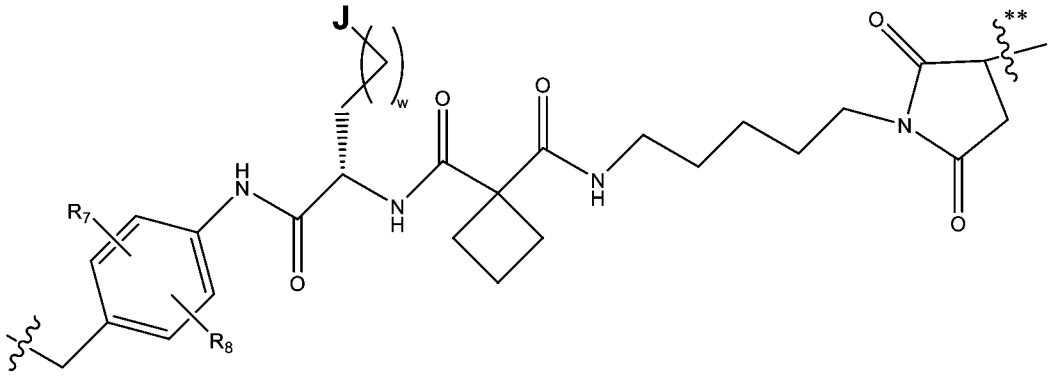
【0118】在某些實施例中，L1 係選自由以下所組成之群組：



；



；且，

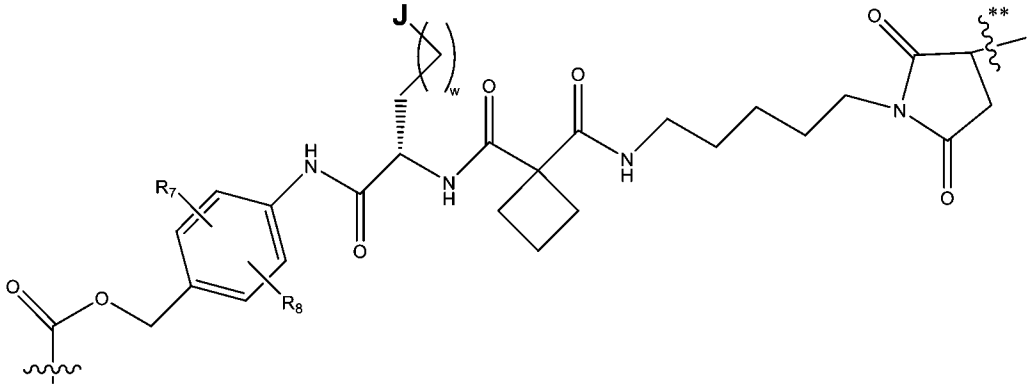


；

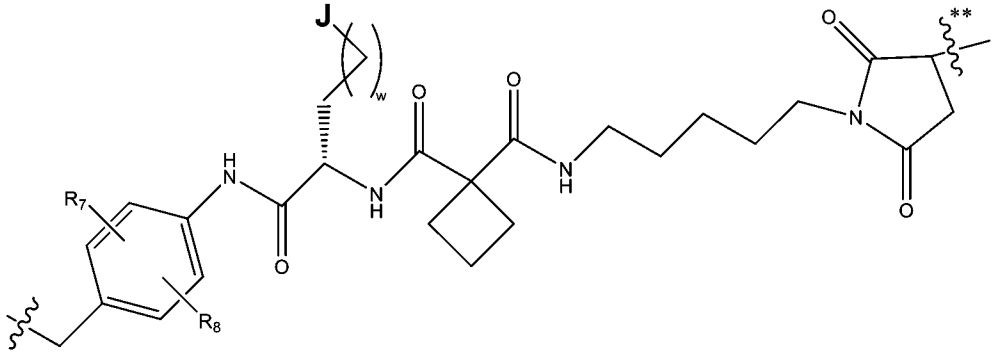
其中，

R_5 和 R_6 獨立地為氫或 $C_{1\text{-}5}$ 烷基；或 R_5 及 R_6 與其各自所接附的氮一起形成視情況經取代之 5 至 7 員雜環基；

【0119】在某些實施例中，L1 為擬肽物連接子，其選自由以下所組成之群組：



；且，



。

【0120】在某些實施例中，J 為 —NH-C(O)-NH_2 或 —$N(CH_3)_2$。

【0121】在某些實施例中，其中 w 為 2 且 J 為 —NH-C(O)-NH_2；或 w 為 3 且 J 為 —$N(CH_3)_2$。

ii. 其他連接子

【0122】在某些實施例中，L1 可以為肽連接子或其他連接子。可由溶酶體酶（例如組織蛋白酶 B）水解的肽連接子，例如纈胺酸-瓜胺酸 (Val-Cit)，已被用於將藥物與抗體相連 (US 6,214,345)。它們很有用，部分原因在於它們在體循環中的相對穩定性及在腫瘤中有效釋放藥物的能力。

【0123】在一個態樣中，連接子之羰基與 CIDE 中之胺基相連。還應注意，與 Ab 連接的硫原子為來自抗體中之半胱胺酸的硫基團。在另一態樣中，連接子 L1 具有能夠與抗體上存在的游離半胱胺酸反應以形成共價鍵的官能度。該等反應性官能度之非限制性實例包括馬來醯亞胺、鹵代乙醯胺、a-鹵代乙醯基、經活化之酯諸如琥珀醯亞胺酯、4-硝基苯酯、五氟苯酯、四氟苯酯、酸酐、醯氯、磺醯氯、異氰酸酯及異硫氰酸酯。參見例如 Klussman，等人

(2004)，Bioconjugate Chemistry l5(4):765-773 第 766 頁之結合方法，以及本文之實例。

【0124】 在一些實施例中，連接子具有能夠與抗體上存在的親電基團反應的官能度。該等親電基團之實例包括但不限於醛和酮羰基。在一些實施例中，連接子之反應性官能度的雜原子可與抗體上的親電基團反應並形成鍵合至抗體單元的共價鍵。該等反應性官能度之非限制性實例包括醯肼、肟、胺基、肼、硫半卡腙 (thiosemicarbazone)、羧酸肼及芳基醯肼。

【0125】 連接子可包含一種或多種連接子組分。例示性連接子組分包括例如 6-馬來醯亞胺基己醯基 (「MC」)、馬來醯亞胺基丙醯基 (「MP」)、纈胺酸-瓜胺酸 (「val-cit」或「vc」)、丙胺酸-苯丙胺酸 (「ala-phe」)、對胺基苄氧羰基 (「PAB」)、N-琥珀醯亞胺基 4-(2-吡啶硫基)戊酸酯 (「SPP」) 及 4-(N-馬來醯亞胺乙基)環己烷 1-甲酸酯 (「MCC」)。各種連接子組分為本領域已知者，其中一些描述於下。

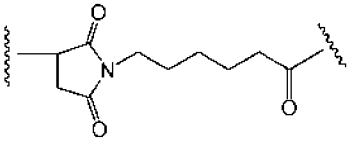
【0126】 連接子可為促進 CIDE 之釋放的「可切割連接子」。非限制性示例性可裂解之連接子包括酸不穩定連接子接頭 (例如，包含腙)、蛋白酶敏感之 (例如，肽酶敏感之) 連接子、光不穩定之連接子或含二硫鍵之連接子 (Chari 等人, Cancer Research 52:127-131 (1992)；US 5208020)。

【0127】 在某些實施例中，連接子具有下式：

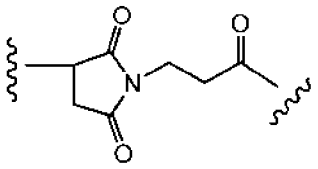
$$—A_a—W_w—Y_y—$$ ，

其中 A 為「延伸基單元」，且 a 為 0 至 1 的整數；W 為「胺基酸單元」，w 為 0 至 12 的整數；Y 為「間隔基單元」，且 y 為 0、1 或 2。該等連接子之例示性實施例描述於美國專利第 7,498,298 號中。

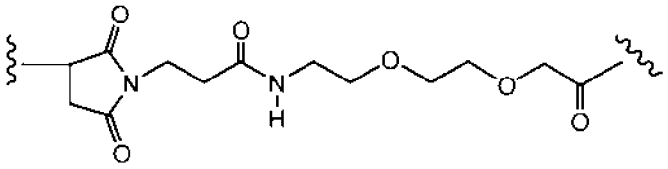
【0128】在一些實施例中，連接子組分包含將抗體與另一連接子組子或CIDE 部分連接的「延伸基單元」。非限制性例示性延伸基單元如下所示（其中，波浪線表示共價連接至抗體、CIDE 或其他連接子組分的位點）：



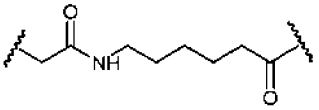
MC



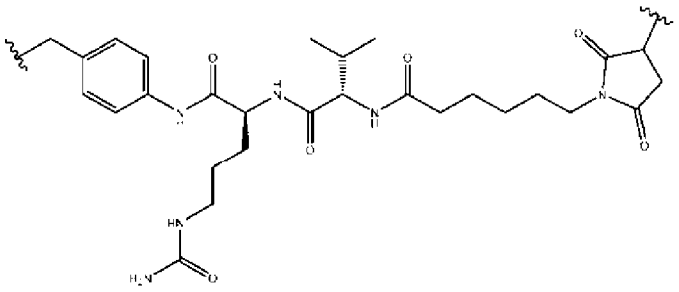
MP



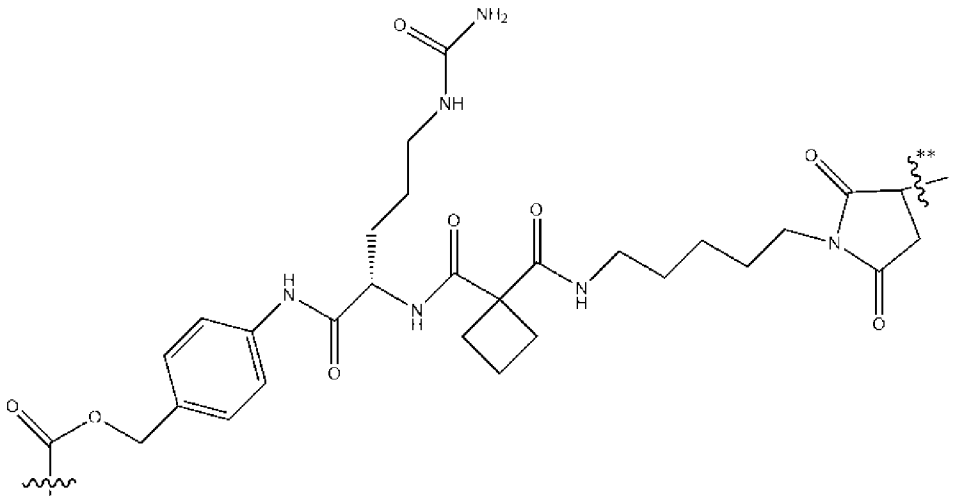
mPEG



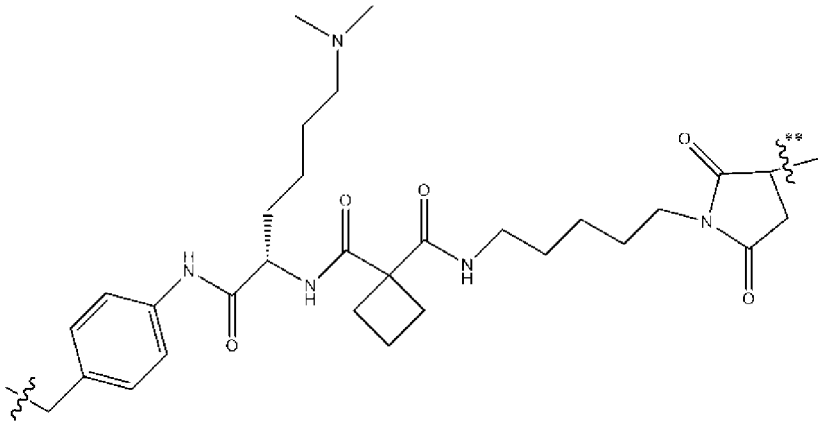
【0129】在某些實施例中，連接子為：



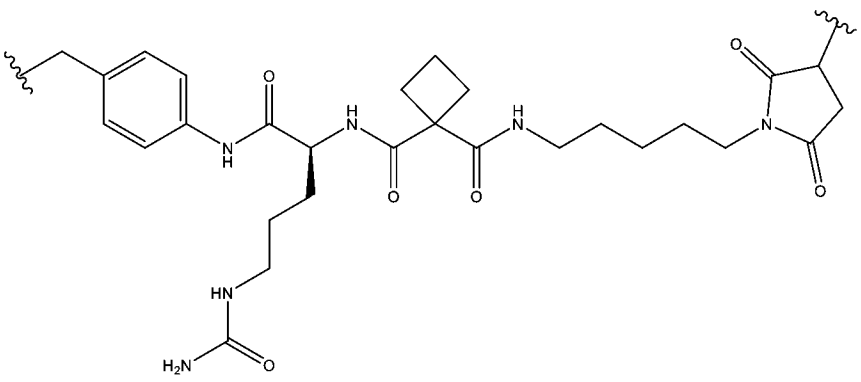
【0130】在某些實施例中，L1 具有下列結構：



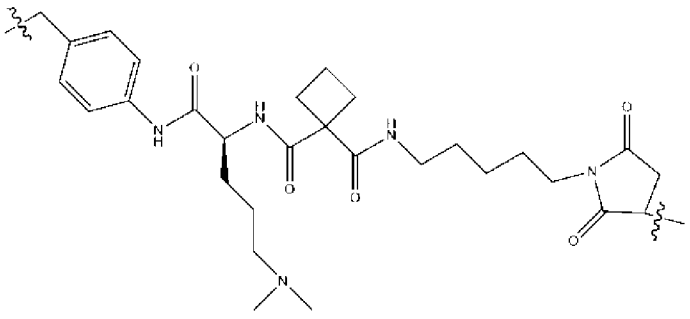
;



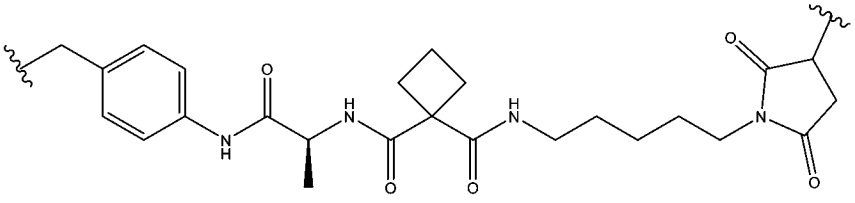
;



;

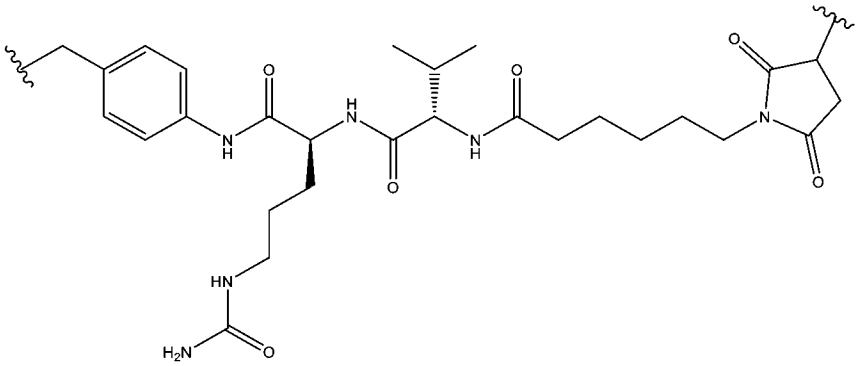


;



;

或，



。

3. CIDE (「D」)

【0131】 可用的 CIDE 具有上述通式。在某些實施例中，CIDE 或 Ab 結合的 CIDE 表現出期望的特性，諸如細胞靶向及蛋白靶向及降解。在某些實施例中，Ab-L1-CIDE 呈現出 0.0001 之小於約 2.0、或小於約 1.0、或小於約 0.8、或小於約 0.7、或小於約 0.6、或小於約 0.5、或小於約 0.4、或小於約 0.3、或小於約 0.2 的 DC50 (μg/mL)。在某些實施例中，Ab-L1-CIDE 呈現出至少 70、75、80、85、90、95、96、97、98 或 99 的 DCmax。在某些實施例中，標靶蛋白降解顯著高於比較物。

【0132】 CIDE 包括具有下列組分的那些。

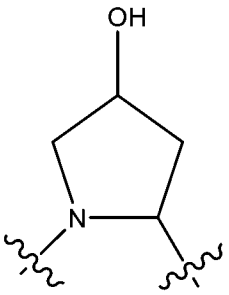
a. E3 泛蛋白連接酶結合基團 (E3LB)

【0133】 E3 泛素連接酶（其中 600 多種在人體中已知）使泛素化具有受質特異性。存在與該等連接酶結合之已知配體。如本文所述，E3 泛蛋白連接酶結合基團為可結合作為 von Hippel-Lindau (VHL) 的 E3 泛蛋白連接酶的肽或小分子。

【0134】 一種特定之 E3 泛蛋白連接酶為 von Hippel-Lindau (VHL) 腫瘤抑制因子，其為 E3 連接酶複合體 VCB 的受質識別次單元，亦由延伸蛋白 (elongin) B 和 C、Cul2 及 Rbxl 組成。VHL 之主要受質為缺氧誘導因子 lα (HIF-

lα)，其係一種轉錄因子，可因應低氧水平而上調基因諸如促血管生成生長因子VEGF 及紅血球誘導細胞激素紅血球生成素。

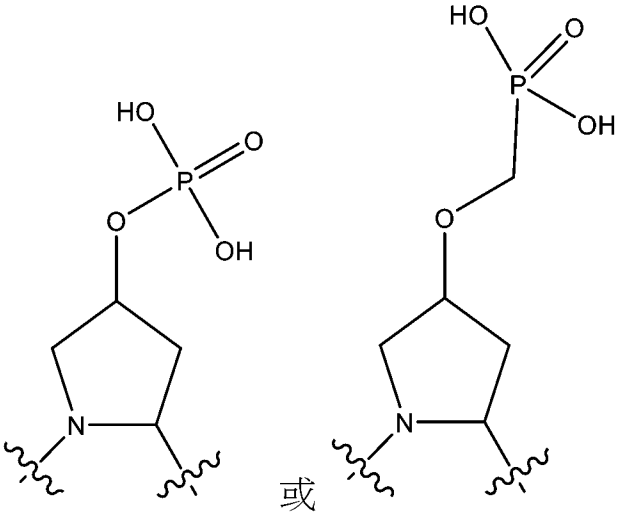
【0135】在某些實施例中，本文之主題涉及一種包含羥基脯胺酸殘基且具有下式的 E3LB 部分：



。

【0136】在某些實施例中，本文之主題涉及包含磷酸酯部分的 E3LB 部分。

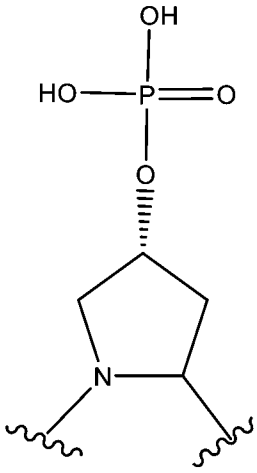
【0137】在某些實施例中，E3LB 包含：



或

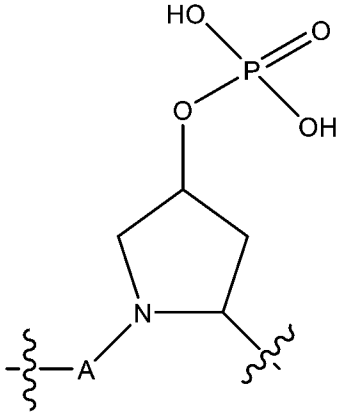
。

【0138】在某些實施例中，E3LB 包含：



。

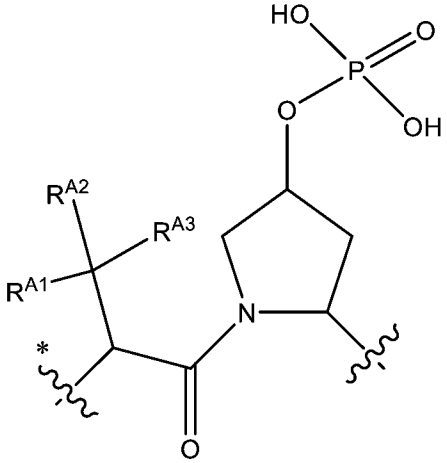
【0139】在某些實施例中，E3LB 包含：



，

其中，A 為共價結合至 L2 的基團。

【0140】在某些實施例中，E3LB 包含：

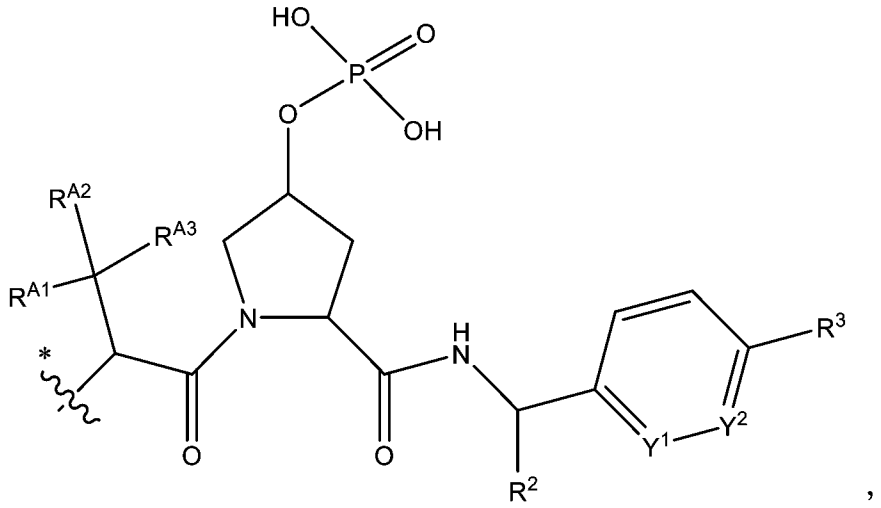


，

其中  為與 L2 的接附點，且

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

【0141】在某些實施例中，E3LB 包含：

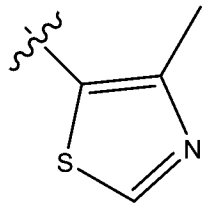
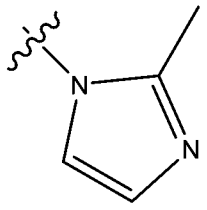


，

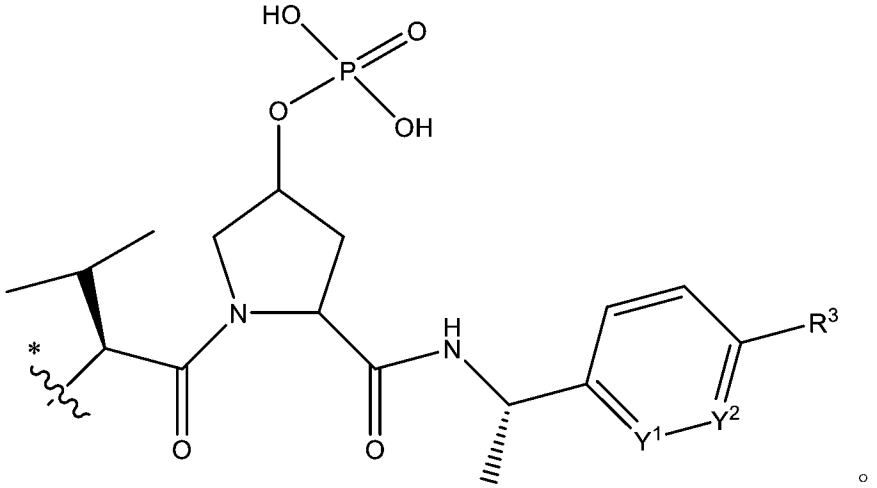
其中，

R^2 為氫或 C_{1-5} 烷基；

Y^1 及 Y^2 各為 -CH，或 Y^1 及 Y^2 中之一者為 -CH，而另一者為 N；且

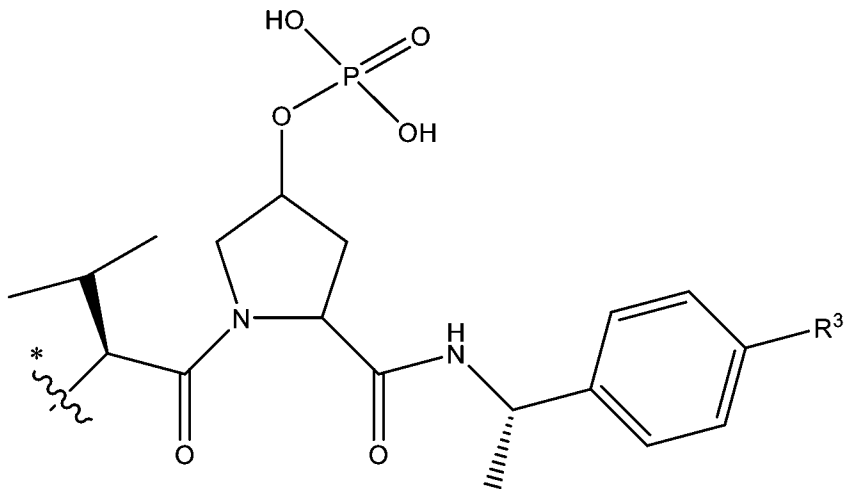
R^3 為氰基、或。

【0142】在某些實施例中，E3LB 包含：



。

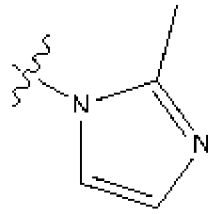
【0143】在某些實施例中，E3LB 包含：



。

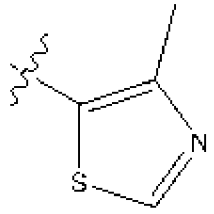
【0144】在某些實施例中，E3LB 具有這樣的結構，其中 R_3 為氰基。

【0145】在某些實施例中，E3LB 具有這樣的結構，其中 R_3 為



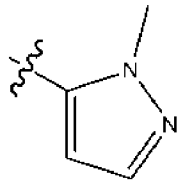
。

【0146】在某些實施例中，E3LB 具有這樣的結構，其中 R_3 為



。

【0147】在某些實施例中，E3LB 具有這樣的結構，其中 R_3 為



。

【0148】在某些實施例中，E3LB 具有這樣的結構，其中 R_2 為氫、甲基、乙基或丙基。

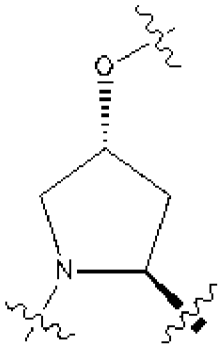
【0149】在某些實施例中，E3LB 具有這樣的結構，其中 R_2 為甲基。

【0150】在某些實施例中，E3LB 具有這樣的結構，其中 R_2 為



。

【0151】在某些實施例中，E3LB 之羥基脯胺酸部分具有下列結構：



。

【0152】E3LB 部分之至少一端包含與 L2 部分共價連接或能夠與之共價連接的部分，且至少一端包含與 L1 部分共價連接或能夠與之共價連接的部分。例如，E3LB 部分終止於 –NHCOOH 部分，該部分可透過醯胺鍵共價連接至 L2 部分。

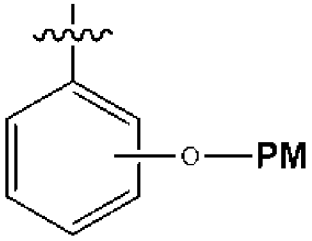
【0153】在本文所述之任何態樣或實施例中，如本文所述之 E3LB 可為其醫藥上可接受之鹽、鏡像異構物、非鏡像異構物、溶劑化物或同質異晶物。

b. 蛋白結合基團 (PB)

【0154】「蛋白結合基團」或「PB」指能夠結合至標靶蛋白或其他目標多肽標靶的小分子或其他化合物之殘基。PB 結合至標靶或以其他方式與標靶相互作用，這將標靶置於泛蛋白連接酶附近，使得可以發生藉由泛蛋白連接酶的蛋白或多肽之降解。PB 可以為任何分子，只要其共價結合至 L2 且與目標標靶相互作用或與之結合。小分子標靶蛋白結合部分之非限制性實例包括結合 BRM (BRAHMA) 的化合物、Hsp90 抑制劑、激酶抑制劑、MDM2 抑制劑、靶向人 BET 含溴區結構域之蛋白的化合物、HDAC 抑制劑、人離胺酸甲基轉移

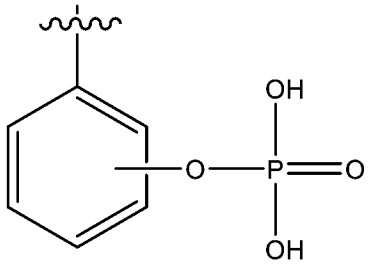
酶抑制劑、血管生成抑制劑、免疫抑制化合物及靶向芳烴受體 (AHR) 的化合物等等。在某些實施例中，本文所述之 CIDE 及經結合 CIDE 不限於 PB 之類型。在某些實施例中，本文所述之 CIDE 及經結合 CIDE 不限於 PB 之類型，其中 PB 係共價結合至 L2；且，CIDE 或經結合 CIDE 包含磷酸酯部分及 L1 擬肽物連接子。

【0155】在某些實施例中，CIDE 之 PB 部分為小分子，其包含透過羥基苯基殘基之氧共價結合至磷酸酯部分的羥基苯基殘基。在此態樣，PB 包含下式：



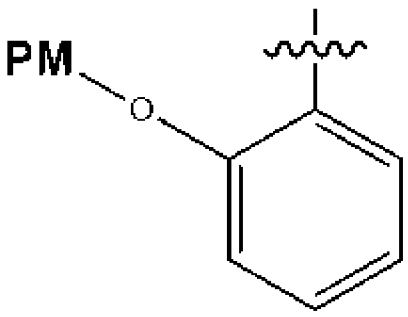
，

其中 PM 為磷酸酯部分。共價結合至磷酸酯部分的羥基苯基殘基之實例為：



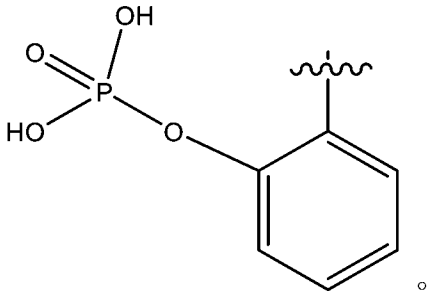
。

【0156】在某些實施例中，PB 結合在下列鄰位：



。

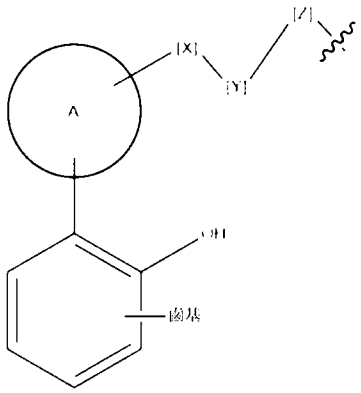
此類結構之實例為包含下列公式的 PB：



。

【0157】在某些實施例中，CIDE 之 PB 部分為與 BRM 結合的小分子部分，包括 BRM 的所有變異體、突變、剪接變異體、插入/缺失和融合物。BRM 亦稱為亞家族 A、成員 2、SMARCA2 及 BRAHMA。該等小分子標靶蛋白結合部分亦包括這些組成物的醫藥上可接受之鹽、鏡像異構物、溶劑化物及同質異晶物以及可靶向目標蛋白的其他小分子。本文所述之 CIDE 可包含已知的 BRM 結合化合物之任何殘基，這些結合化合物包括 WO2019/195201 中所揭示之那些，該專利全文以引用方式併入本文。

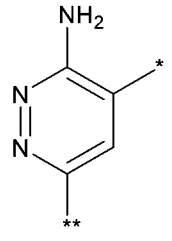
【0158】在某些實施例中，BRM 結合化合物為式 I 化合物：



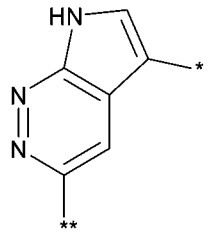
(I)，

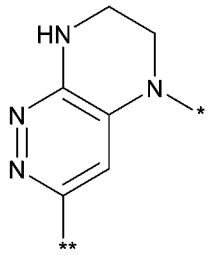
或其立體異構物或互變異構物，或前述任一者之醫藥上可接受之鹽，其中：

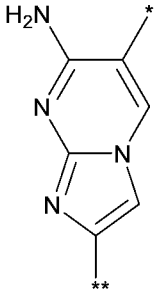
A 選自由以下所組成之群組：

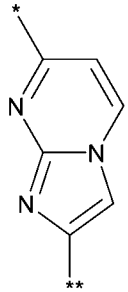


(a)　　；

(b)  ;

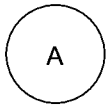
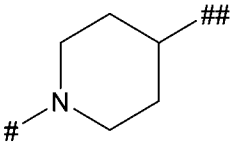
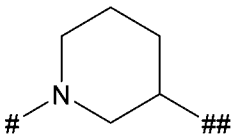
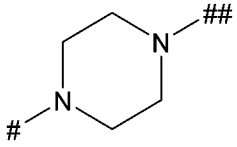
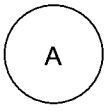
(c)  ;

(d)  ；及

(e)  ，

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

(i) [X] 為 3 至 15 員雜環基或 5 至 20 員雜芳基，

條件是，若  是 (a)，則 [X] 不是  、 、或  ，其中 # 表示與  的接附點，且 ## 表示與 L2 的接附點，

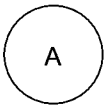
[Y] 不存在，且

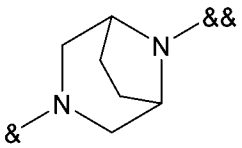
[Z] 不存在；或

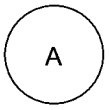
(ii) [X] 為 3 至 15 員雜環基或 5 至 20 員雜芳基，其中 [X] 的 3 至 15 員雜環基視情況經一個或多個 -OH 或 C_{1-6} 烷基取代，

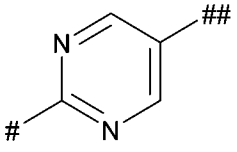
[Y] 不存在，且

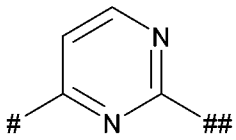
[Z] 為 3 至 15 員雜環基或 5 至 20 員雜芳基，

條件是，若 

是 (a) 且 [X] 是 

，其中 & 表示與 

的接附點且 && 表示與 [Z] 的接附點，則 [Z] 不是 

或 

，其中 # 表示與 [X] 的接附點且 ## 表示與 L2 的接附點；或

(iii) [X] 為 3 至 15 員雜環基或 5 至 20 員雜芳基，

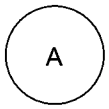
[Y] 為亞甲基，其中 [Y] 的亞甲基視情況經一個或多個甲基基團取代，且

[Z] 為 3 至 15 員雜環基；或

(iv) [X] 不存在，

[Y] 為伸乙烯基，其中 [Y] 的伸乙烯基視情況經一個或多個鹵基取代，且

[Z] 為 5 至 20 員雜芳基，

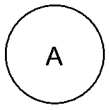
條件是，

為 (a)、(b)、(d)、或 (e)；或

(v) [X] 不存在，

[Y] 為伸乙炔基，且

[Z] 為 5 至 20 員雜芳基，

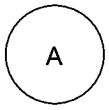
條件是，

為 (a)、(b)、(d)、或 (e)；或

(vi) [X] 不存在，

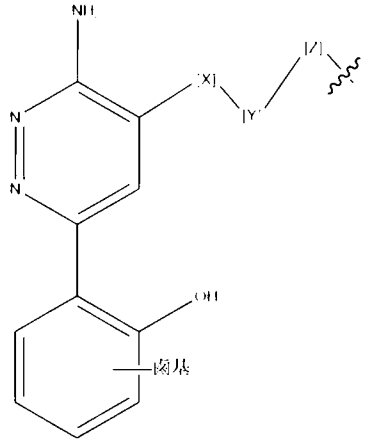
[Y] 為環丙基或環丁基，且

[Z] 為 5 至 20 員雜芳基，

條件是，

為 (a)、(b)、(d)、或 (e)。

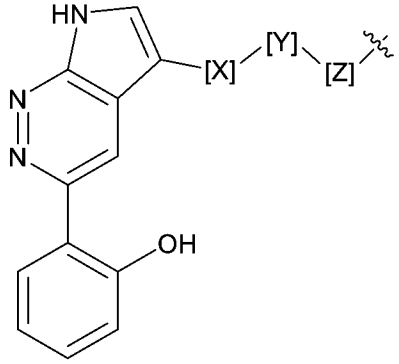
【0159】在某些實施例中，BRM 結合化合物為式 (I-A) 化合物：



(I-A)，

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

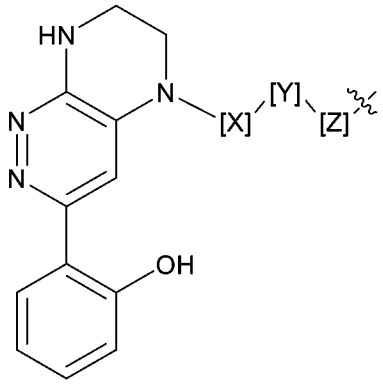
【0160】在某些實施例中，BRM 結合化合物為式 (I-B) 化合物：



(I-B)，

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

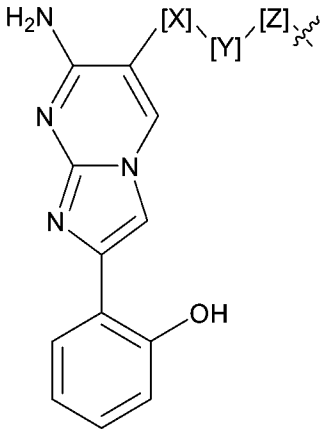
【0161】在某些實施例中，BRM 結合化合物為式 (I-C) 化合物：



(I-C)，

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

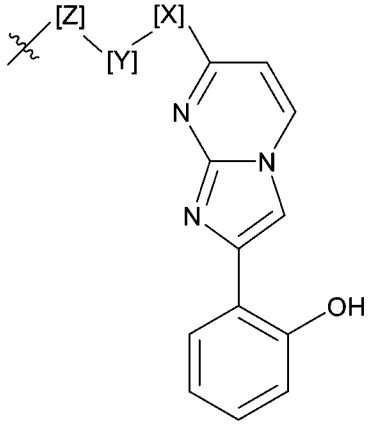
【0162】在某些實施例中，BRM 結合化合物為式 (I-D) 化合物：



(I-D)，

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

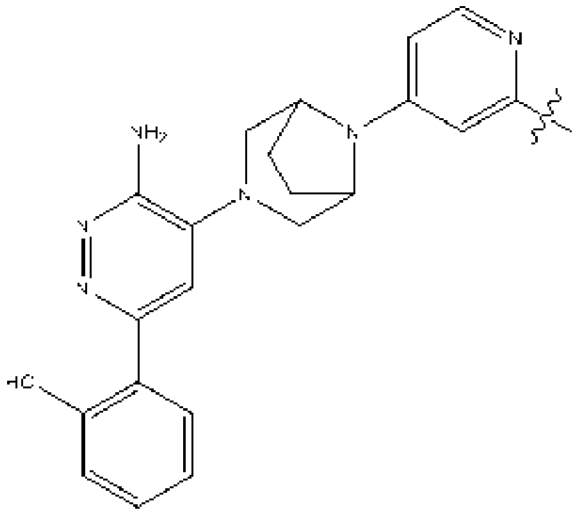
【0163】在某些實施例中，BRM 結合化合物為式 (I-E) 化合物：



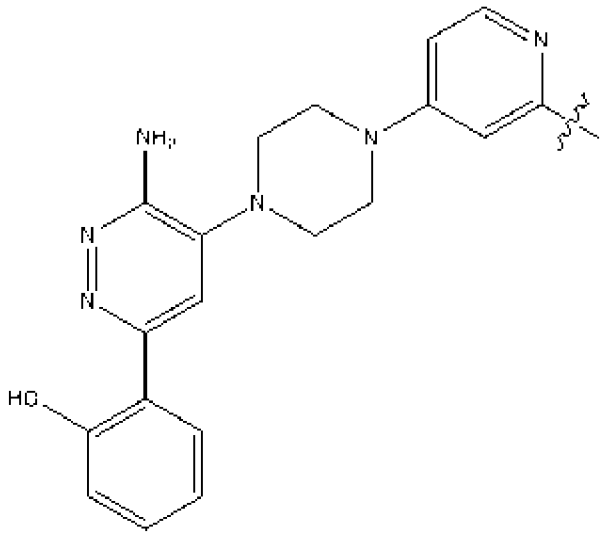
(I-E)，

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

【0164】在某些實施例中，CIDE 之 PB (BRM) 部分具有下列結構：



，或



，

其中， 為與 L2 的接附點。

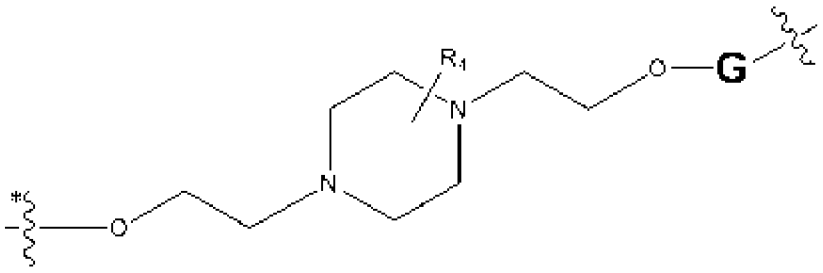
c. 連接子 L2

【0165】如本文所述之 CIDE 的 E3LB 及 PB 部分可通過連接子（L2，連接子 L2，連接子-2）相連。在某些實施例中，連接子 L2 共價結合至 E3LB 部分並共價結合至 PB 部分，由此組成 CIDE。

【0166】在某些實施例中，L2 部分可選自 WO2019/195201 中所揭示之連接子，該專利全文以引用方式併入本文。

【0167】儘管 E3LB 基團及 PB 基團可通過任何對連接子的化學性質合適且穩定的基團與連接子基團共價連接，但在某些態樣中，L2 獨立地通過醯胺、酯、硫酯、酮基、胺甲酸酯 (胺甲酸乙酯) 或醚共價連接至 E3LB 基團和 PB 基團，其中每個基團皆可插入 E3LB 基團及 PB 基團的任何位置，以允許 E3LB 基團與泛蛋白連接酶結合且 PB 基團與標靶蛋白諸如待降解之 BRM 結合。換言之，如本文所示，連接子可設計並連接至 E3LB 和 PB 以調控 E3LB 及 PB 與其相應之結合配偶體的結合。

【0168】在某些實施例中，L2 為共價結合至 E3LB 及 PB 的連接子，該 L2 具有下式：

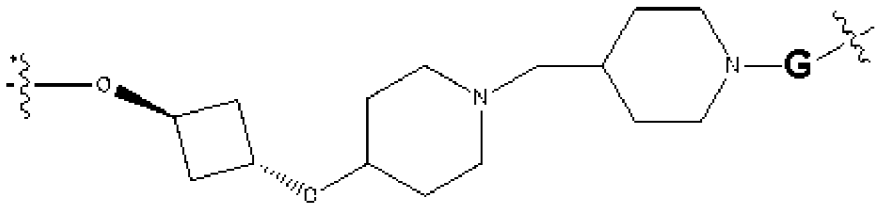


L2a

，

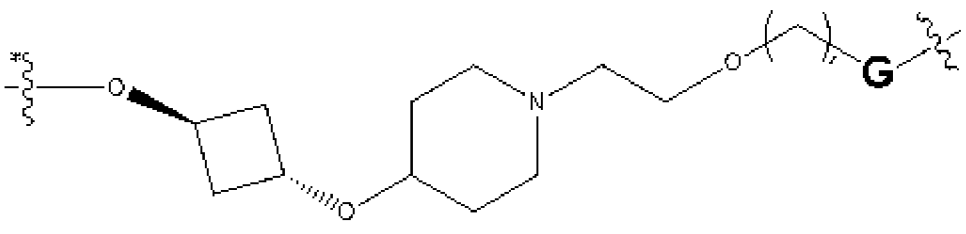
其中，

R_4 為氫或甲基，



L2b

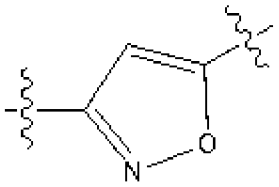
，或



L2c

其中，

z 為一或零，



G 為 或 —C(O)NH—；且

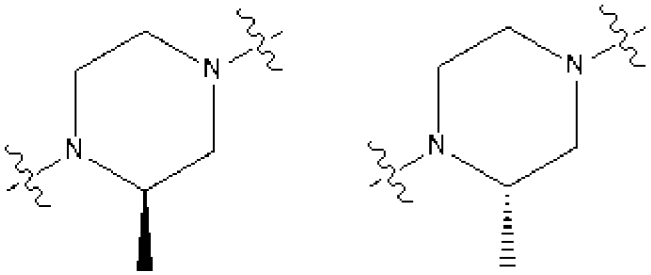


為 CIDE 之接附點，諸如直接結合至 PB。

【0169】在 L2a 的某些實施例中，R_4 為氫。

【0170】在 L2a 的某些實施例中，R_4 為甲基。

【0171】在 L2a 之某些實施例中，R_4 為甲基，使得甲基相對於其所接附的哌啉取向如下：



或 。

【0172】在 L2c 的某些實施例中，z 為 0。

【0173】在 L2c 的某些實施例中，z 為 1。

【0174】現在參照 Ab-CIDE，Ab-CIDE 可包含單個抗體，其中單個抗體可具有多個 CIDE，每個 CIDE 通過連接子 L1 共價連接至抗體。「CIDE 載量」為每個抗體中 CIDE 部分的平均數量。CIDE 載量可在每個抗體 (Ab) 1 至 16 個 CIDE (D) 的範圍內。即，在 Ab-CIDE 式 Ab—(L1—D)$_j$ 中，j 具有約 1 至約 16、約 1 至約 8、約 1 至約 5、約 1 至約 4 或約 1 至約 3 的值。通過連接子 L1 共價連接至抗體的每個 CIDE 可為相同或不同的 CIDE，且與共價連接至抗體的任何其他 L1 可具有相同類型或不同類型的連接子。在某些實施例中，Ab

為經半胱胺酸工程化改造之抗體，且 j 約為 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 或 16。

【0175】在從結合反應製備 Ab-CIDE 中，每個抗體之 CIDE 的平均數量可藉由常規手段（例如質譜法、ELISA 檢定法、電泳法及 HPLC 法）來表徵。亦可以 j 確定 Ab-CIDE 之定量分佈。藉由 ELISA，可確定 Ab-CIDE 之特定製劑中 j 之平均值 (Hamblett 等人 (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070；Sanderson 等人 (2005) Clin. Cancer Res. 11:843-852)。但是，p 值之分佈無法藉由 ELISA 之抗體-抗原結合和檢測限制來辨別。另外，用於偵測 Ab-CIDE 的 ELISA 檢定法無法確定 CIDE 部分接附於抗體的位置，例如重鏈或輕鏈片段或特定的胺基酸殘基。在一些情況下，可藉由諸如反相 HPLC 或電泳法達成將其中 j 為某一值之同質 Ab-CIDE 從具有其他 CIDE 載量之 Ab-CIDE 分離、純化及表徵。

【0176】對於一些 Ab-CIDE，j 可能受到抗體上連接位點數量的限制。例如，抗體可以僅具有一個或幾個半胱胺酸硫醇基團，或者可以僅具有一個或幾個足夠反應性的硫醇基團，而連接子可通過該等硫醇基團接附。Ab 上連接 L1-D 的另一個反應位點是離胺酸殘基的胺官能團。j 之值包括約 1 至約 16、約 1 至約 8、約 1 至約 5、約 1 至約 4、約 1 至約 3 的值及其中 j 等於 2 的情況。在一些實施例中，本文所述之主題涉及任何 Ab-CIDE，其中 j 為約 1、2、3、4、5、6、7 或 8。

【0177】一般而言，在結合反應過程中，少於理論最大值的 CIDE 部分與抗體結合。例如，抗體可包含許多與連接子 L1-CIDE 基團 (L1-D) 或連接子試劑不反應的離胺酸殘基。僅反應性最強的離胺酸基團才可與胺反應性連接子試劑反應。另外，僅反應性最強的半胱胺酸硫醇基團才可與硫醇反應性連接子試劑或連接子 L1-CIDE 基團反應。一般而言，抗體不包含許多（如有的話）可

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

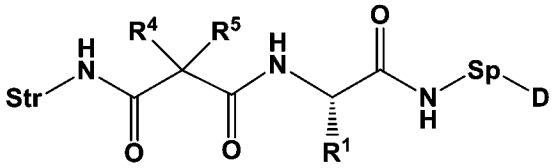
III. L1-CIDE 化合物

【0178】 本文所述之 CIDE 可與連接子 L1 共價連接以製備 L1-CIDE 基團。這些化合物具有下列通式：

L1—D，

其中，D 為 CIDE 具有結構 E3LB—L2—PB；其中，E3LB 為共價結合至 L2 的 E3 連接酶結合基團；L2 為共價結合至 E3LB 及 PB 的連接子；PB 為共價結合至 L2 的標靶蛋白質結合基團；且 L1 為共價結合至 D 的擬肽物連接子。這些組分中每一者的有用的基團如上所述。在某些實施例中，CIDE 經磷酸化。

【0179】 在某些實施例中，L1 如本文其他地方所述，包括擬肽物連接子。在這些實施例中，L1-CIDE 具有下式：



其中

Str 為延伸基單元；

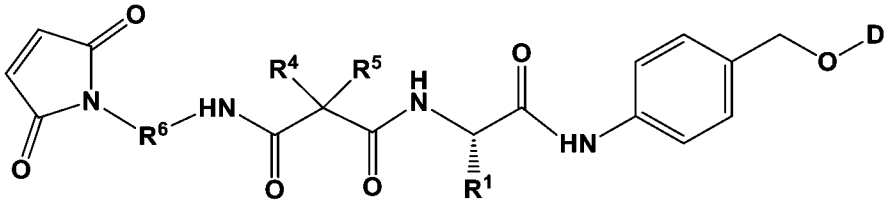
Sp 為鍵或共價接附於 D（即 CIDE 部分）的間隔基單元；

R^1 為 C_1-C_{10}烷基, (C_1-C_{10}烷基)NHC(NH)NH_2 或 (C_1-C_{10}烷基)NHC(O)NH_2；

R^4 和 R^5 各自獨立為 C_1-C_{10}烷基、芳基烷基、雜芳基烷基、(C_1-C_{10}烷基)OCH_2-，或者 R^4 和 R^5 可形成 C_3-C_7環烷基環；

D 為 CIDE 部分。

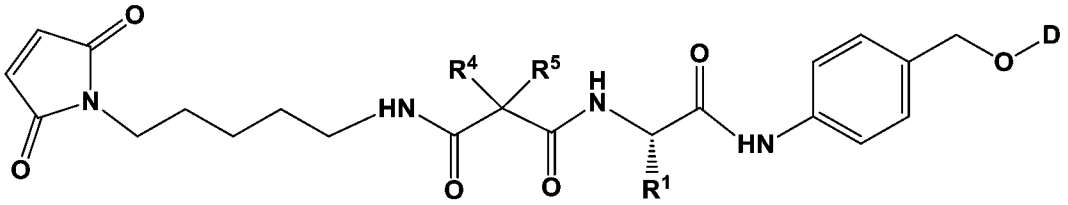
【0180】一種 L1-CIDE 化合物可由下式表示：



，

其中 R_6 為 C_1-C_{10} 伸烷基；R^4 與 R^5 一起形成 C_3-C_7 環烷基環，且 D 為 CIDE 部分。

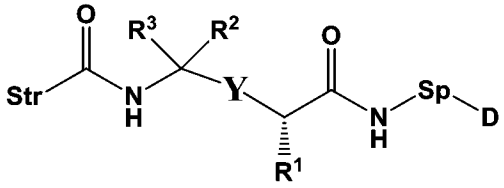
【0181】一種 L1-CIDE 化合物可由下式表示：



，

其中 R^1、R^4 和 R^5 如本文其他地方所述，且 D 為 CIDE 部分。

【0182】一種 L1-CIDE 化合物可由下式表示：



其中

Str 為延伸基單元；

Sp 為視情況存在之共價接附於 D（即 CIDE 部分）的間隔基單元；

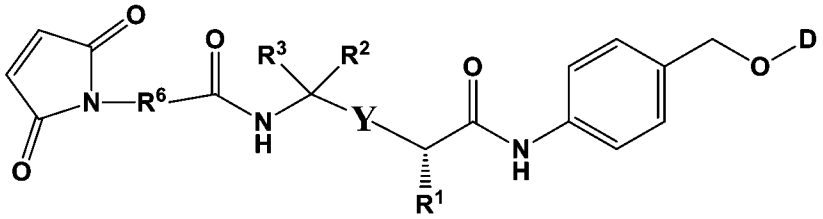
Y 為雜芳基、芳基、-C(O)C_1-C_6伸烷基、C_1-C_6伸烷基-NH_2、C_1-C_6伸烷基-NH-CH_3、C_1-C_6伸烷基-N-$(CH_3)_2$、C_1-C_6烯基或 C_1-C_6伸烷基基團；

R^1 為 C_1-C_{10}烷基, (C_1-C_{10}烷基)NHC(NH)NH_2 或 (C_1-C_{10}烷基)NHC(O)NH_2；

R^3 和 R^2 各自獨立為 H、C_1-C_{10}烷基、芳基烷基或雜芳基烷基，或者 R^3 和 R^2 可一起形成 C_3-C_7環烷基；且

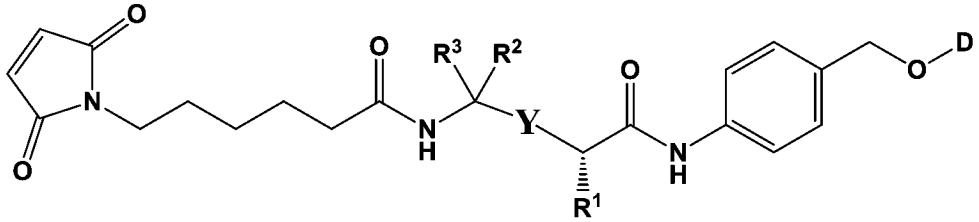
D 為 CIDE 部分。

【0183】一種 L1-CIDE 化合物可由下式表示：



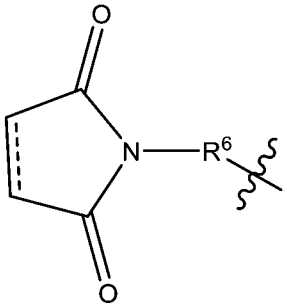
其中，R^6 為 C_1-C_{10}伸烷基，且 R^1、R^2 和 R^3 如本文其他地方所述，且 D 為 CIDE 部分。

【0184】一種 L1-CIDE 化合物可由下式表示：



其中 R^1、R^2 和 R^3 如本文其他地方所述，且 D 為 CIDE 部分。

【0185】在上述 L1-CIDE 化合物中任一者中，Str 可具有下式：



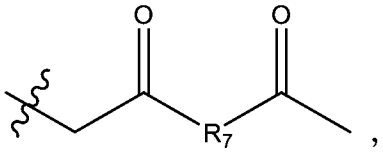
，

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

獨立地為 H 或 C_1-C_6烷基；Sp 為 —Ar—R^b—，其中 Ar 為芳基或雜芳基，R^b 為 (C_1-C_{10}伸烷基)O-。

【0186】在某些 L1-CIDE 化合物中，R^6 為 C_1-C_{10} 伸烷基，Sp 為 —Ar—R^b—，其中 Ar 為芳基，R^b 為 (C_1-C_6 伸烷基)O-；或 R_6 為 $–(CH_2)_q$，其中 q 為 1-10；

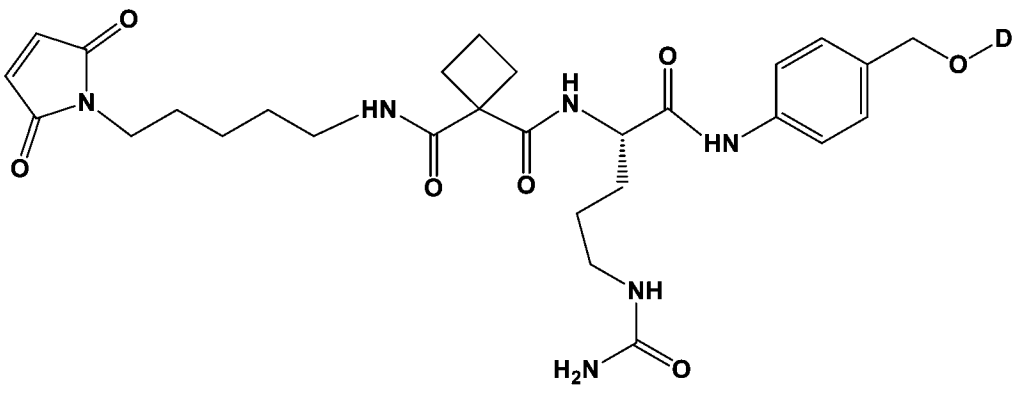
【0187】在上述 L1-CIDE 化合物中任一者中，Str 可具有下式：



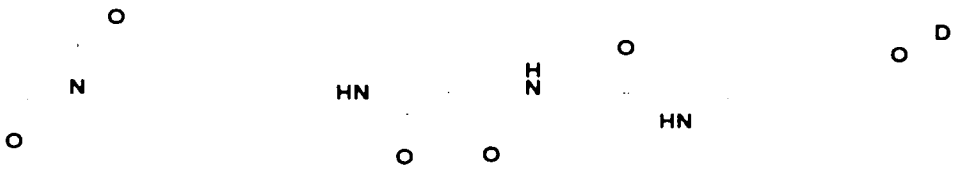
，

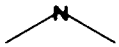
其中， 表示與能夠結合至抗體的部分的接附，R^7 選自 C_1-C_{10} 伸烷基、C_1-C_{10} 伸烷基 -O、N(R^c)-(C_2-C_6 伸烷基)-N(R^c) 及 N(R^c)-(C_2-C_6 伸烷基)；其中各 R^c 獨立地為 H 或 C_1-C_6 烷基；Sp 為 —Ar—R^b—，其中 Ar 為芳基或雜芳基，R^b 為 (C_1-C_{10} 伸烷基)O-；或其中 R^6 為 C_1-C_{10} 伸烷基，Sp 為 —Ar—R^b—，其中 Ar 為芳基，R^b 為 (C_1-C_6 伸烷基)O-。

【0188】一種 L1-CIDE 可具有下式，其中在各實例中，D 為 CIDE 部分：

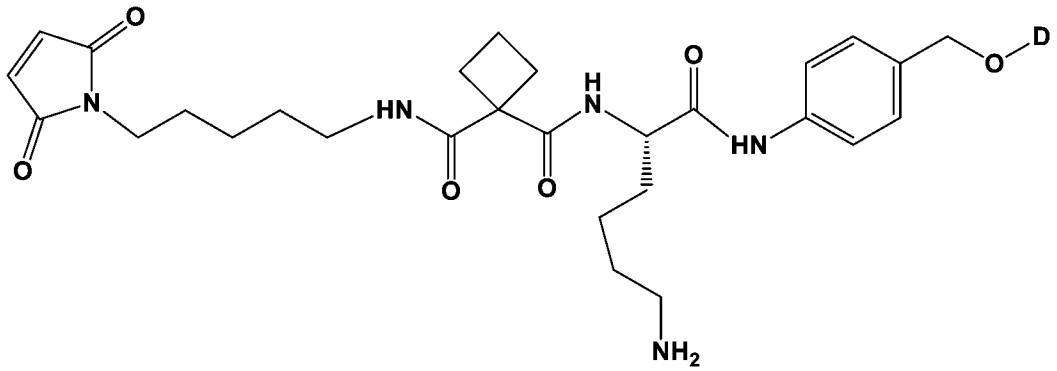


；





及



。

【0189】 Ab-CIDE 可以包括 PB、E3LB、Ab、L1 及 L2 之任意組合；且熟悉此項技術者將理解，L1 及 L2 接附點可以變化，只要當 L1 存在時，CIDE、L1-CIDE 或 Ab-L1-CIDE 包含共價結合至 PB 或 E3LB 的磷酸酯基團及擬肽物連接子。此外，連接子的部分，例如 —Str—(PM)—Sp— 可互換。另外，連接子 L1 的部分可互換。

【0190】 現在參照如本文所述之 Ab-CIDE 及 L1-CIDE 化合物，這些化合物可以固體或液體形式存在。在固態下，它可以結晶或非結晶形式存在，或作為它們的混合物存在。技術人員將理解，對於結晶或非結晶化合物，可形成醫藥上可接受之溶劑化物。在結晶溶劑化物中，溶劑分子在結晶過程中摻入晶格中。溶劑化物可涉及非水性溶劑，例如但不限於乙醇、異丙醇、DMSO、乙酸、乙醇胺或乙酸乙酯，或者它們可涉及水作為摻入晶格中的溶劑。其中水為

摻入晶格中之溶劑的溶劑化物通常稱為「水合物」。水合物包括化學計量的水合物以及含有不同量的水的組成物。本文所述之主題包括所有該等溶劑化物。

【0191】技術人員將進一步理解，本文所述之以結晶形式存在的某些化合物及 Ab-CIDE（包括其各種溶劑化物）可呈現出同質多晶形性（亦即，以不同結晶結構出現的能力）。這些不同的結晶形式通常稱為「同質異晶物」。本文所揭露之主題包括所有該等同質異晶物。同質異晶物具有相同之化學組成，但在堆積、幾何排列及結晶固態之其他描述性特性方面不同。因此，多晶型物可能具有不同的物理特性，諸如形狀、密度、硬度、可變形性、穩定性及溶解特性。同質異晶物通常呈現出不同之熔點、紅外光譜及 X 射線粉末繞射圖譜，該等特性可用於鑑定。技術人員將理解，可例如藉由改變或調整用於製備化合物之反應條件或試劑來產生不同的同質異晶物。例如，改變溫度、壓力或溶劑的變化可得到同質異晶物。此外，一種同質異晶物在某些條件下可自發轉化為另一種同質異晶物。

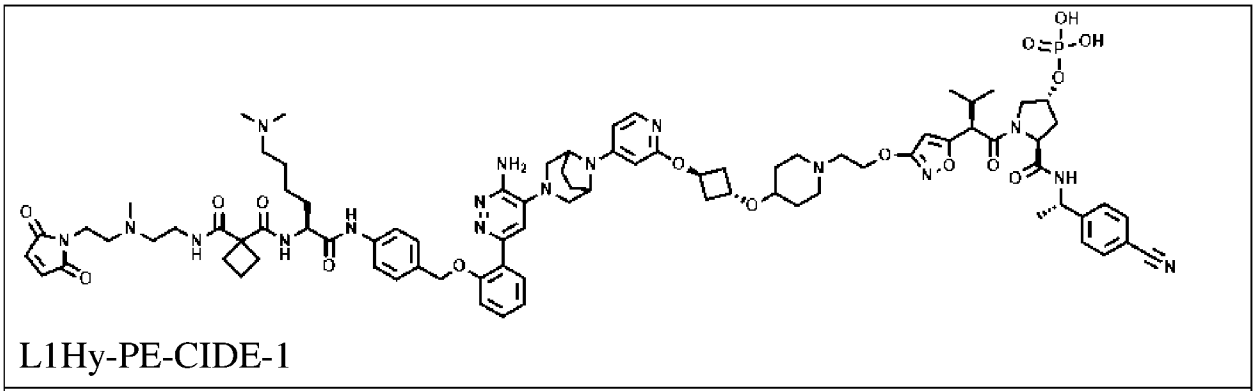
【0192】本文所述之化合物及 Ab-CIDE 或其鹽可以立體異構形式存在（例如，其含有一個或多個不對稱碳原子）。各種立體異構體 (鏡像異構物及非鏡像異構物) 及其混合物涵蓋於本文所揭示之主題之範圍內。同樣，應瞭解，式 (I) 化合物或鹽可以式中所示結構之外的互變異構形式存在，並且亦涵蓋於本文所揭露之主題之範圍內。應瞭解，本文所揭露之主題包括本文所述之特定組之所有組合和子集。本文所揭示之主題之範圍包括立體異構物之混合物及純化鏡像異構物或對映/非對映富集之混合物。應瞭解，本文所揭露之主題包括上文所定義之特定組之所有組合和子集。

【0193】本文所揭示之主題亦包括本文所述之化合物之同位素標記形式，但事實上，一個或多個原子由原子質量或質量數不同於自然界中通常所發現的原子質量或質量數的原子置換。可併入本文所述之化合物及其醫藥上可接

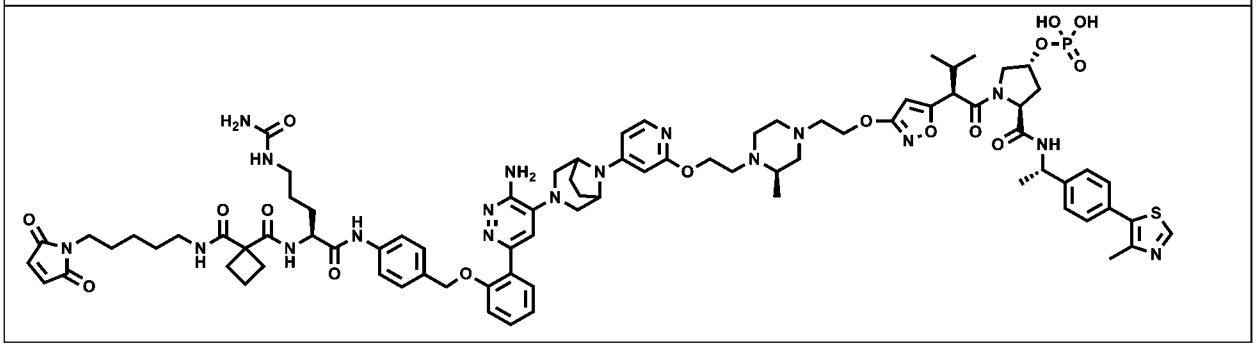
受之鹽的同位素的實例包括氫、碳、氮、氧、磷、硫、氟、碘、氯之同位素，例如 ^{2}H、^{3}H、^{11}C、^{13}C、^{14}C、^{15}N、^{17}O、^{18}O、^{31}P、^{32}P、^{35}S、^{18}F、^{36}Cl、^{123}I 及 ^{125}I。

【0194】含有上述同位素及/或其他原子的其他同位素的如本文所揭露之化合物和 Ab-CIDEs 及醫藥上可接受之鹽在本文所揭露之主題的範圍內。本文中揭示了同位素標記之化合物，例如彼等其中摻入放射性同位素（例如 ^{3}H、^{14}C）者，可用於藥物及/或受質組織分佈檢定。氚同位素（亦即 ^{3}H）及碳-14 同位素（亦即 ^{14}C）因其易於製備和可偵測性而得到普遍使用。^{11}C 及 ^{18}F 同位素用於 PET（正子發射斷層攝影術），且 ^{125}I 同位素用於 SPECT（單光子放射電腦斷層掃描），它們皆用於腦成像。此外，用諸如氘（亦即 ^{2}H）之較重同位素取代可得到某些由更大代謝穩定性產生之治療優勢，例如延長之活體內半衰期或降低之劑量需求，因此在某些情況下可能是較佳的。同位素標記之化合物通常可藉由執行下列方案及/或實例中所揭露之程序來製備，其中藉由用容易獲得之同位素標記的試劑替代非同位素標記的試劑來實現。

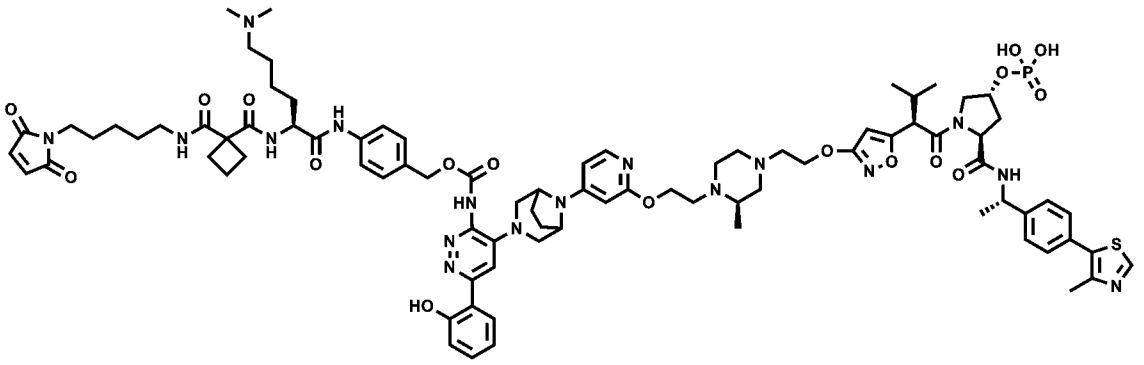
【0195】在某些實施例中，本文所述之主題包括下列 L1-CIDE：



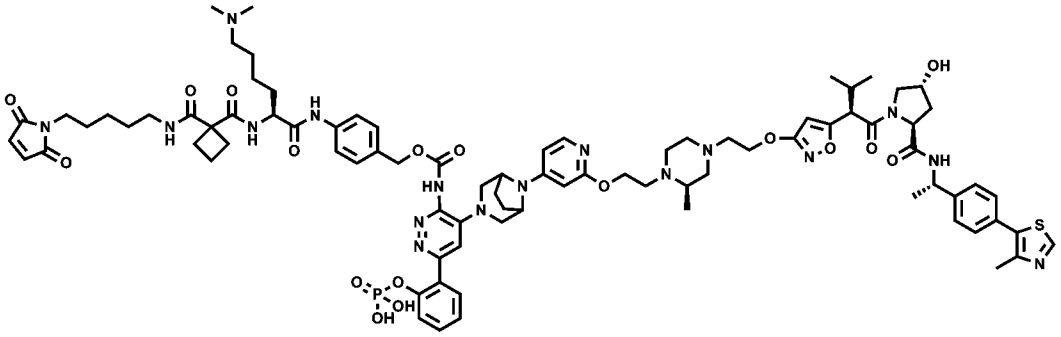
L1Hy-PE-CIDE-1



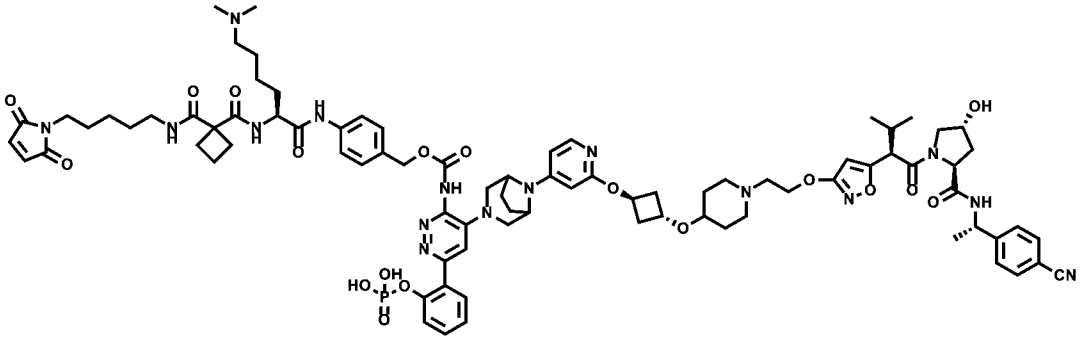
L1-PE-CIDE-2



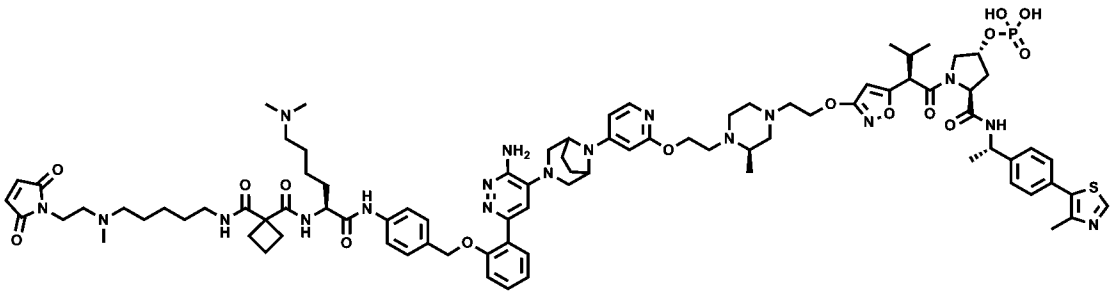
L1-PE-CIDE-3



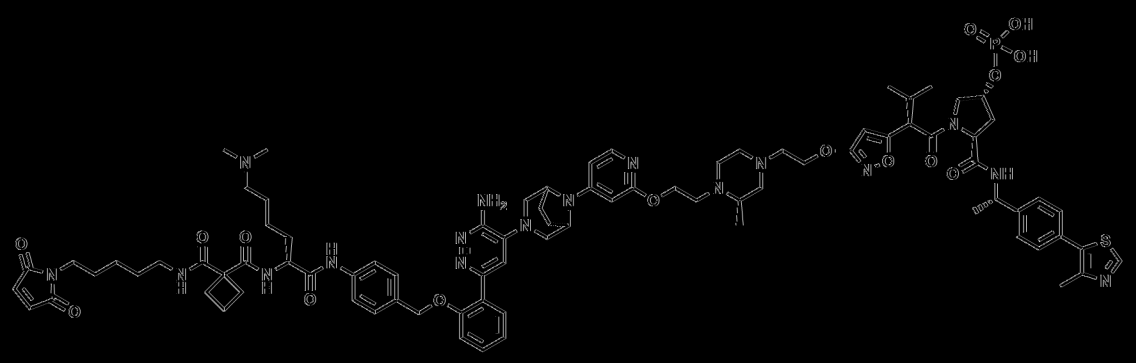
L1-PP-CIDE-1



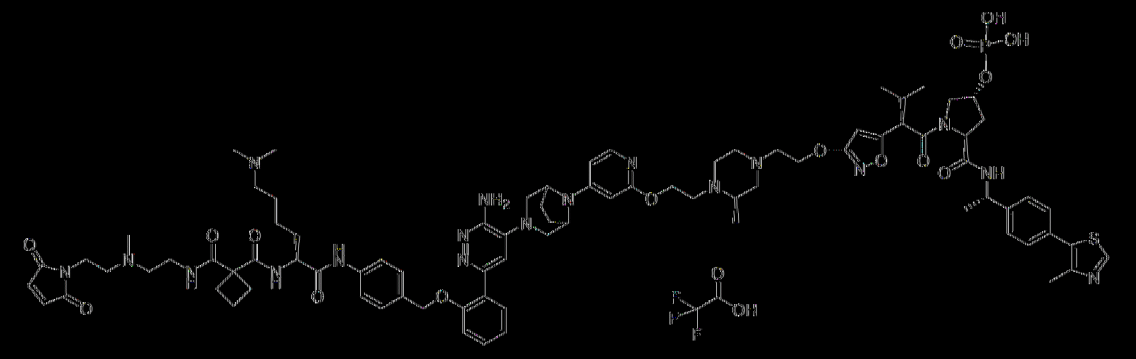
L1-PP-CIDE-2



L1Hy-PE-CIDE-4



L1-PE CIDE 5



L1Ily-PE CIDE 6

[0196] 在各實施例中，L1Ily-PE CIDE 1、L1-PE CIDE 2、L1-PE CIDE 3、L1Ily-PE CIDE 4、L1-PE CIDE 5、L1Ily-PE CIDE 6、L1-PP CIDE 1及L1-PP CIDE 2中之至少一者結合全抗體。在各實施例中，至少一種L1Ily-PE CIDE 1結合全抗體。在各實施例中，至少一種L1-PE CIDE 2結合全抗體。在各實施例中，至少一種L1-PE CIDE 3結合全抗體。在各實施例中，至少一種L1Ily-PE CIDE 4結合全抗體。在各實施例中，至少一種L1-PE CIDE 5結合全抗體。在各實施例中，至少一種L1Ily-PE CIDE 6結合全抗體。在各實施例中，至少一種L1-PP CIDE 1結合全抗體。在各實施例中，至少一種L1-PP CIDE 2結合全抗體。

[0197] 本文所揭露之主題包括下列非限制性實施例：

1. 一種結合物，其具有下列化學結構：

$$Ab\quad(L1\quad D)_j,$$

其中，

D 為具有下列結構的 CIDE：

E3LB—L2—PB，

其中，

E3LB 為共價結合至 L2 的 E3 連接酶結合 (E3LB) 配體，

其中 E3 連接酶為逢希伯-林道 (VHL) 腫瘤抑制蛋白；

L2 為共價結合至 E3LB 及 PB 的連接子；

PB 為共價結合至 L1 及至 L2 的蛋白質結合基團；

其中，至少一個磷酸酯部分係共價結合至 D；

Ab 為共價結合至 L1 的抗體；

L1 為共價結合至 Ab 及 D 的連接子；且

j 具有約 1 至約 16 之值。

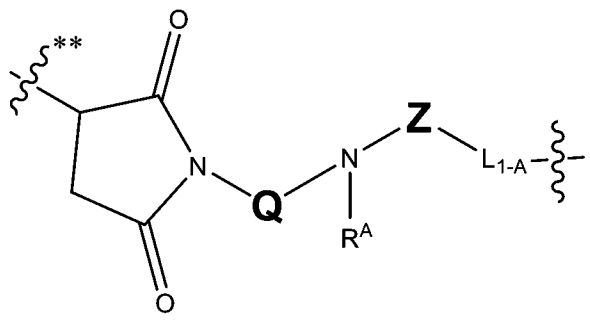
2. 如實施例 1 之結合物，其中一個磷酸酯部分係在 E3LB 或 PB 處共價結合至 D。

3. 如實施例 1 或 2 之結合物，其中 L1 為共價結合至 Ab 及至 D 之 PB 的擬肽物連接子。

4. 如實施例 1 或 2 之結合物，其中 L1 為共價結合至 Ab 及至 D 之該 E3LB 的擬肽物連接子。

5. 如實施例 1、2、3 或 4 之結合物，其中 L1 選自由以下所組成之群組:

i)



，

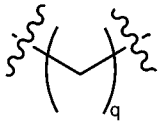
其中， 指示至 Ab 的接附點；

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

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

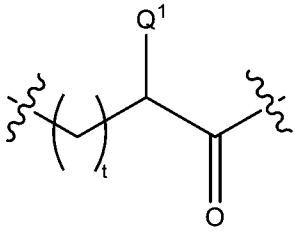
Q 係選自由以下所組成之群組：

a)

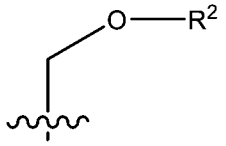


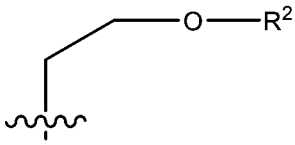
，其中，q 為 1、2、3 或 4；及

b)



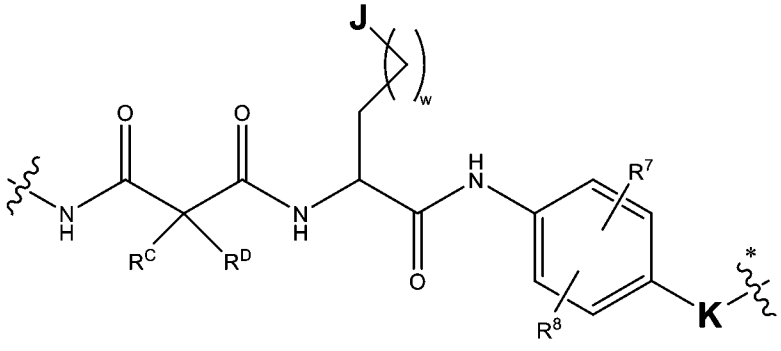
，其中，t 為 0、1、2、3 或 4；

Q^1 為氫、

或 

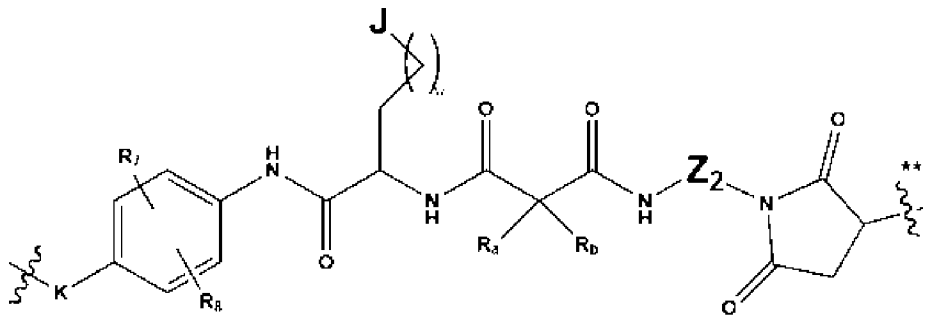
，其中 R^2 為氫、鹵基(C_{1-6})烷基或 C_{1-6} 烷基；且

L_{1-A} 為：



其中， 表示與 D 的接附點；且

ii)



，

其中  表示與 Ab 的接附點；

Z_2 為 C_{1-12} 伸烷基或 $-[CH_2]_g-O-[CH_2]_h-$，其中 g 及 h 各自獨立地為 0、1 或 2；

w 為 0、1、2、3、4 或 5；

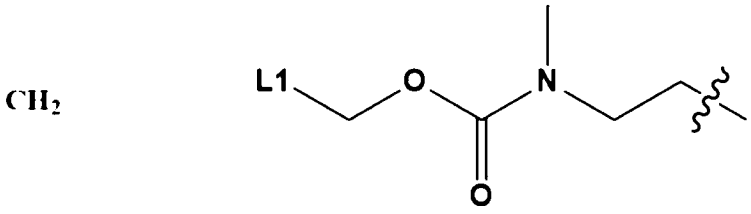
J 係選自由以下所組成之群組：C_{1-5} 烷基、$-N(R_x)(R_y)$、$-C(O)NH_2$、$-NH-C(O)-NH_2$ 及 $-NHC(=NH)NH_2$，其中，R_x 及 R_y 各自獨立地選自氫及 C_{1-3}烷基；

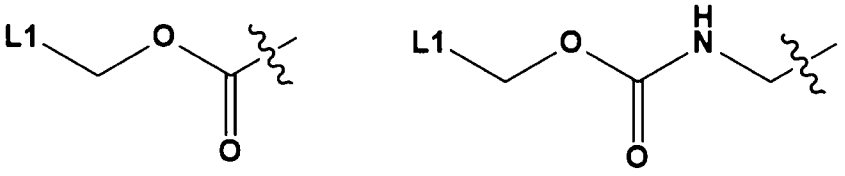
K 係選自由以下所組成之群組：C_{1-3}伸烷基、-CH(R)-、-C(O)-、$-C(O)-O-CH(R)-$、$-CH_2-O-C(O)-$、$-CH_2-O-C(O)-NH-CH_2-$ 及 $-CH_2-O-C(O)-R-[CH_2]_q-O-$，其中 R 為氫、$C_{1-3}$烷基、$N(R_x)(R_y)$、$-O-N(R_x)(R_y)$ 或 $C(O)-N(R_x)(R_y)$，其中 q 為 0、1、2 或 3，且其中 R_x 及 R_y 各自獨立地選自氫及 C_{1-3} 烷基，或 R_x 及 R_y 與其各自所接附的氮一起形成視情況經取代之 5 至 7 員雜環基；

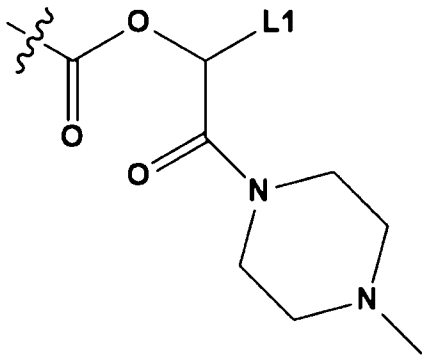
R_a、R_b、 R^C 及 R^D 各自獨立地選自氫及 C_{1-3} 烷基，或者 Ra 及 Rb 與其各自所接附之碳一起形成視情況經取代之 C_{3-6} 環烷基；且

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

6. 如實施例 5 之結合物，其中 L1 之 K 係選自由以下所組成之群組：

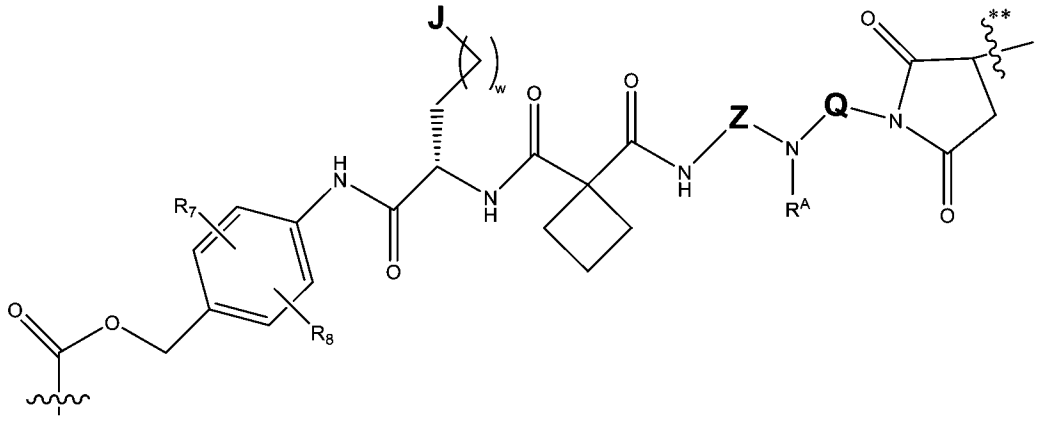




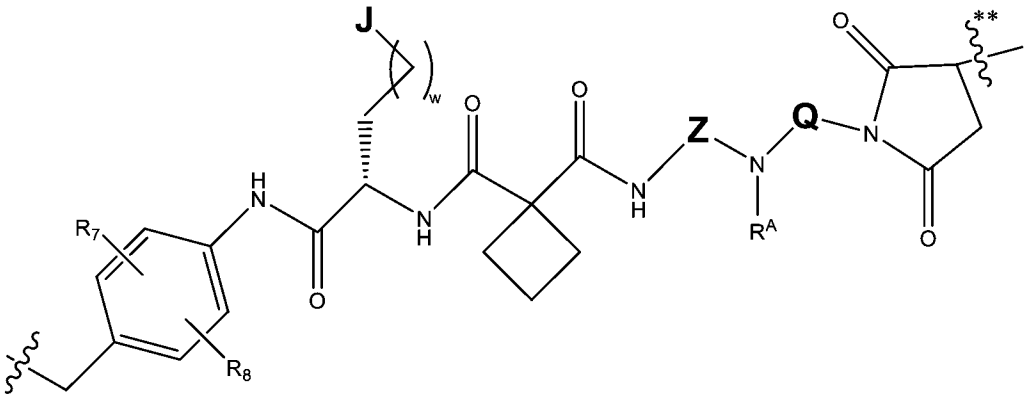


及

7. 如實施例 1、2、3、4 或 5 之結合物，其中 L1 選自由以下所組成之群組:



及



。

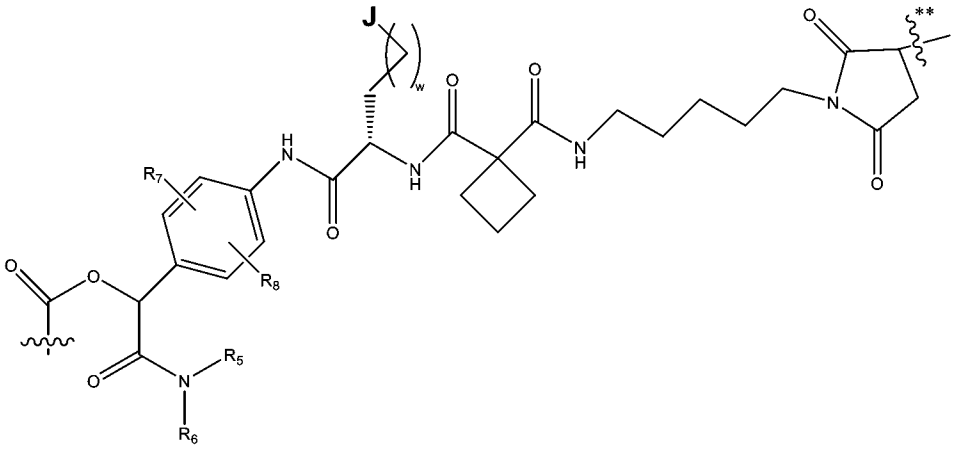
8. 如實施例 7 之結合物，其中 R_7 及 R_8 各自為氫。

9. 如實施例 8 之結合物，其中 Z 為 $-(CH_2)_p-$。

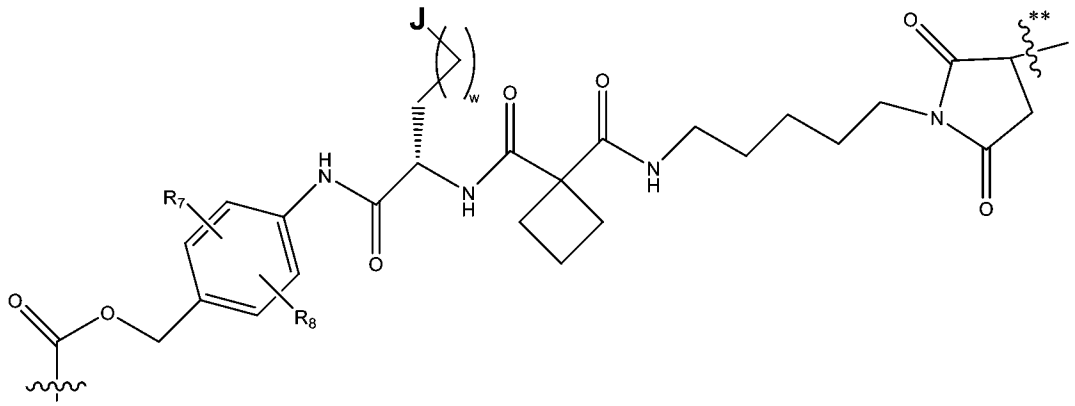
10. 如實施例 9 之結合物，其中 w 為 2 或 3，且 J 為 $-N(CH_3)_2$ 或 -NH(CO)NH。

11. 如實施例 10 之結合物，其中 Q 為 $-CH_2-CH_2-$。

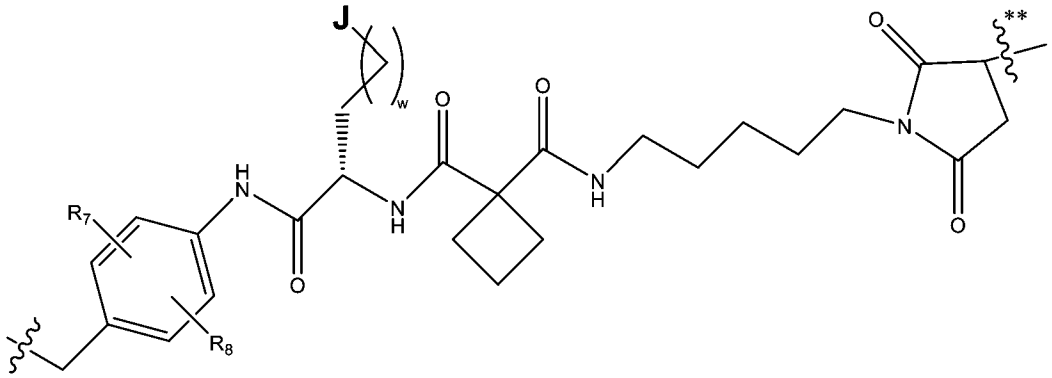
12. 如實施例 1、2、3、4 或 5 之結合物，其中 L1 選自由以下所組成之群組:



；



；且，

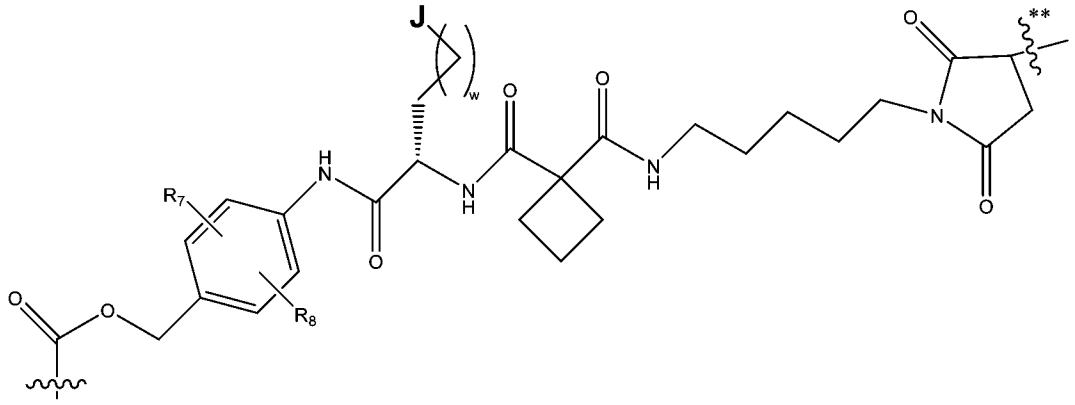


；

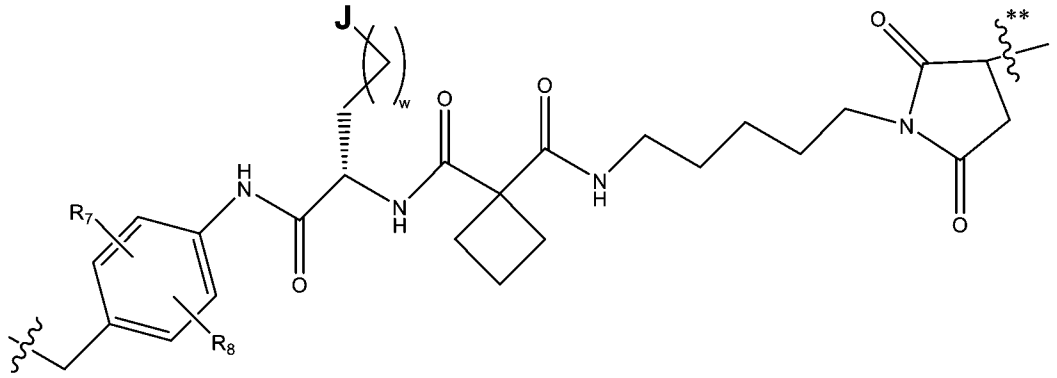
其中，

R_5 和 R_6 獨立地為氫或 C_{1-5} 烷基；或 R_5 及 R_6 與其各自所接附的氮一起形成視情況經取代之 5 至 7 員雜環基；

13. 如實施例 12 之結合物，其中 L1 係選自由以下所組成之群組：



；且，

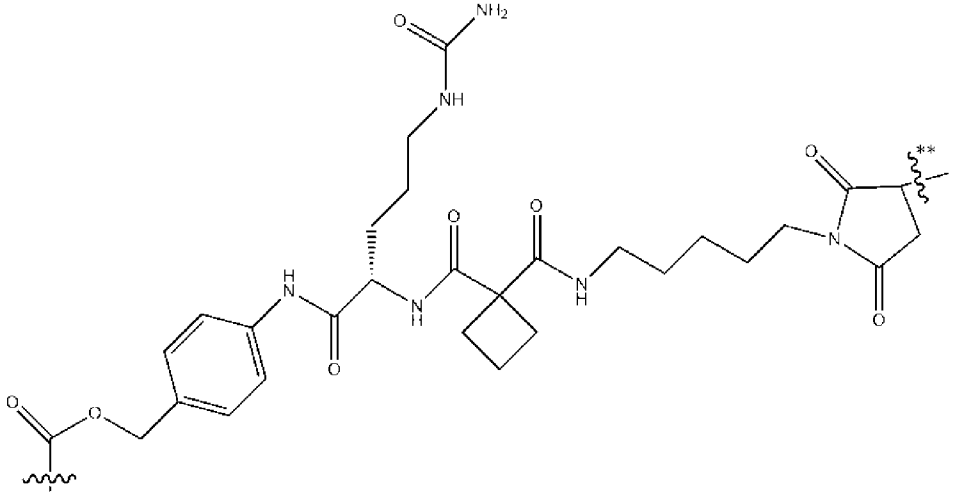


。

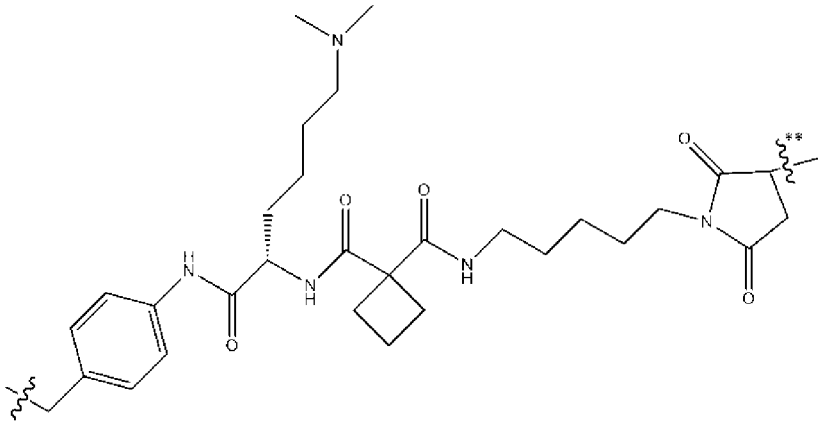
14. 如實施例 13 之結合物，其中 J 為 —NH-C(O)-NH_2 或 —$N(CH_3)_2$。

15. 如實施例 14 之結合物，其中 w 為 2 且 J 為 —NH-C(O)-NH_2；或 w 為 3 且 J 為 —$N(CH_3)_2$。

16. 如實施例 15 之結合物，其中 L1 具有下列結構：



；或



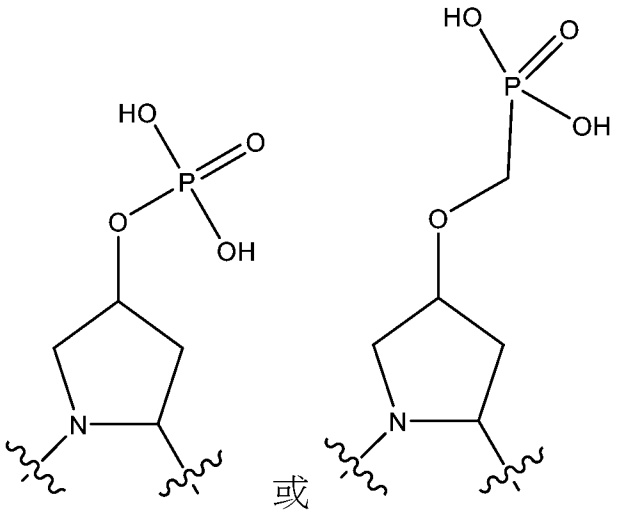
。

17. 如實施例 1 至 16 中任一項之結合物，其中磷酸酯部分係選自由以下所組成之群組：$-(P=O)(OH)_2$、$-CH_2O(P=O)(OH)_2$、$-(P=O)(OH)O(P=O)(OH)_2$及 $-CH_2-O(P=O)(OH)O(P=O)(OH)_2$。

18. 如實施例 1 至 17 中任一項之結合物，其中 E3LB 包含羥基脯胺酸殘基。

19. 如實施例 18 之結合物，其中磷酸酯部分係透過羥基脯胺酸殘基之氧共價結合至 E3LB。

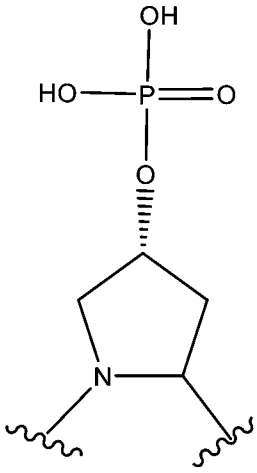
20. 如實施例 19 之結合物，其中 E3LB 包含:



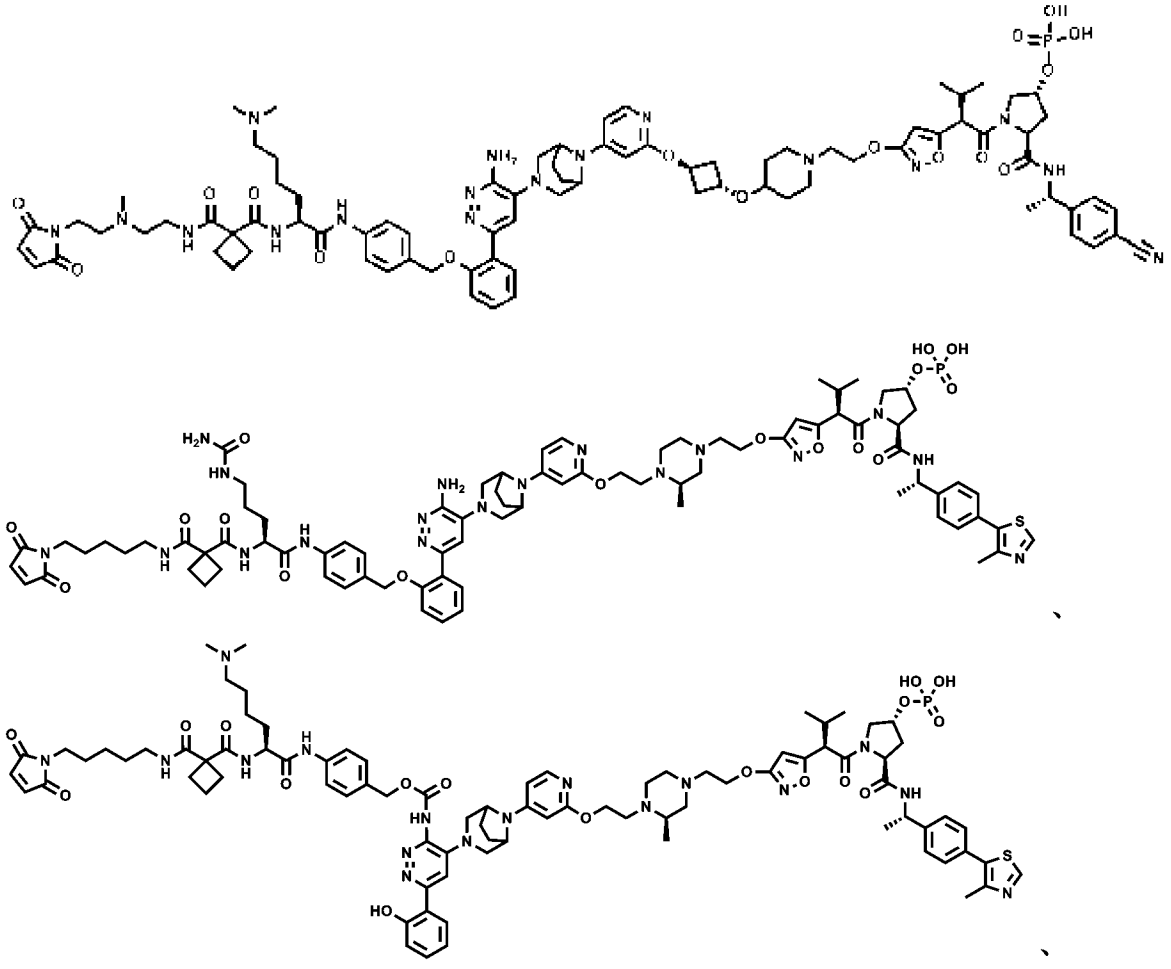
或

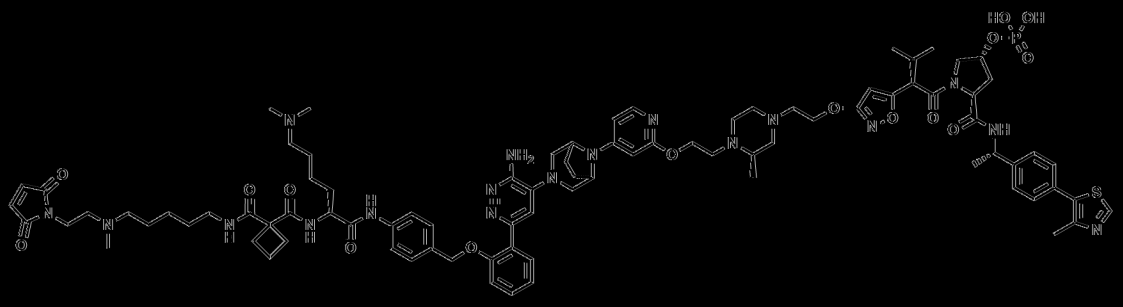
。

21. 如實施例 20 之結合物，其中 E3LB 包含：

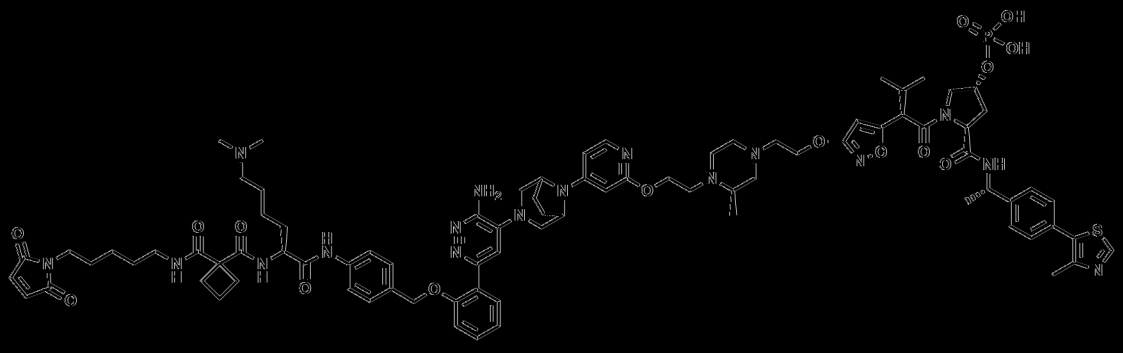


22. 如實施例 21 之結合物，其中抗體所結合至之 L1—D 為選自由以下所組成之群組的組合物：

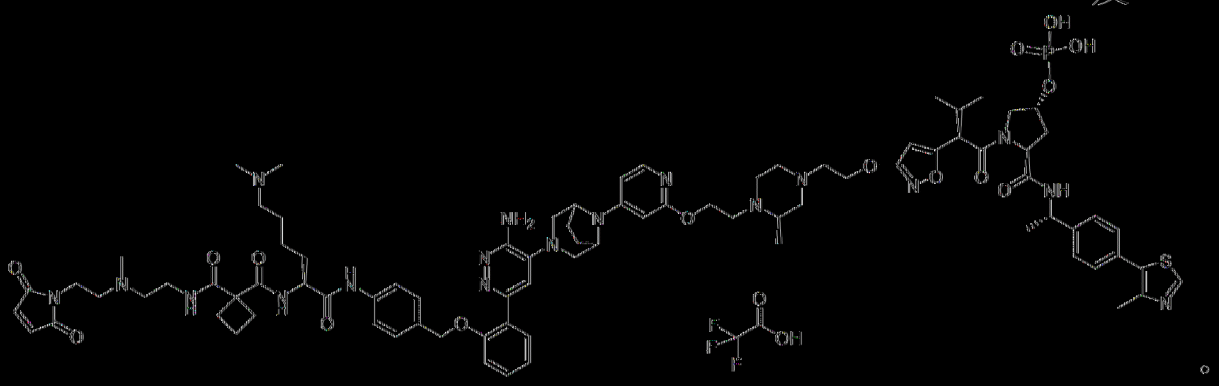




、



及



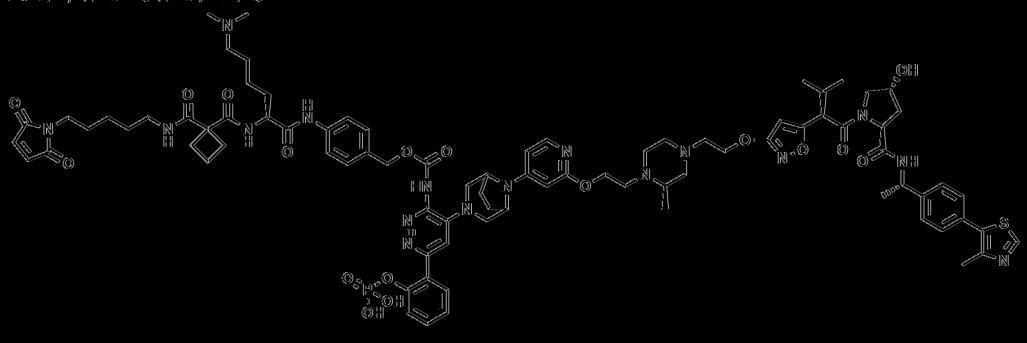
。

23. 如實施例 1 至 22 中任一項之結合物，其中 PB 包含溴結構域部分。

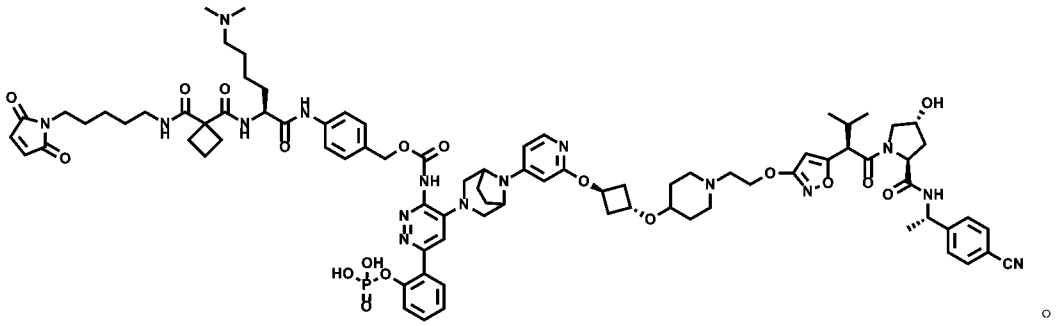
24. 如實施例 23 之結合物，其中磷酸酯部分係透過溴結構域部分之氧共價結合至 PB。

25. 如實施例 24 之結合物，其中 PB 為 BRM 配體。

26. 如實施例 25 之結合物，其中抗體所結合至之 L1 或 D 為選自由以下所組成之群組的結合物：



及



。

27. 一種醫藥組成物，其包含如實施例 1 至 26 中任一項之結合物及一種或多種醫藥上可接受之賦形劑。

28. 一種治療有需要之人的疾病之方法，該方法包含將有效量之如實施例 1 至 26 中任一項之結合物或如實施例 27 之組成物投予該人；或者，一種如實施例 1 至 26 中任一項之結合物 (或其組成物) 或如實施例 27 之組成物，用於治療有此需要之人的疾病；或者，一種如實施例 1 至 26 中任一項之結合物 (或其組成物) 或如實施例 27 之組成物在製備用於治療有此需要之人的疾病的藥物中的用途。

29. 如實施例 28 之方法，其中該疾病是癌症。

30. 如實施例 29 之方法，其中該癌症具有 BRM 依賴性。

31. 如實施例 30 之方法，其中該癌症是非小細胞肺癌。

32. 一種降低個體的標靶蛋白的量之方法，其包含：

將如實施例 1 至 26 中任一項之結合物或如實施例 27 之組成物投予該個體，其中該 PB 部分結合該標靶蛋白，其中泛蛋白連接酶影響該結合的標靶蛋白之降解，其中該標靶蛋白的量降低。

【0198】 在各實施例中，所揭示之化合物具有下列化學結構：

L1—D，

其中，

L1 為共價結合至 D 的擬肽物連接子；且

D 為具有下列結構的 CIDE：

E3LB—L2—PB，

其中，

E3LB 為共價結合至 L2 的 E3 連接酶結合 (E3LB) 配體，其中 E3 連接酶為逢希伯-林道 (VHL) 腫瘤抑制蛋白，且其中 E3LB 包含具有透過羥基脯胺酸殘基之氧共價結合至 E3LB 的磷酸酯部分的羥基脯胺酸殘基，

PB 為共價結合至 L1 及至 L2 的蛋白質結合基團；且

L2 為共價結合至 E3LB 及 PB 的連接子。

【0199】 在各實施例中，所揭示之化合物具有下列化學結構：

L1—D，

其中，

L1 為共價結合至 D 的擬肽物連接子；且

D 為具有下列結構的 CIDE：

E3LB—L2—PB，

其中

E3LB 為共價結合至 L2 的 E3 連接酶結合 (E3LB) 配體，其中 E3 連接酶為逢希伯-林道 (VHL) 腫瘤抑制蛋白，

PB 為共價結合至 L1 及至 L2 的蛋白質結合基團，其中 PB 包含具有透過羥基苯基部分之氧共價結合至 PB 的磷酸酯部分的羥基苯基部分，且

L2 為共價結合至 E3LB 及 PB 的連接子。

【0200】 在各實施例中，所揭示之化合物具有下列化學結構：

L1—D，

其中，

L1 為共價結合至 D 的擬肽物連接子；且

D 為具有下列結構的 CIDE：

E3LB—L2—PB，

其中 E3LB 為共價結合至 L2 的 E3 連接酶結合 (E3LB) 配體，其中 E3 連接酶為逢希伯-林道 (VHL) 腫瘤抑制蛋白，且其中 E3LB 包含羥基脯胺酸殘基；

PB 為共價結合至 L1 及至 L2 的蛋白質結合基團，其中 PB 包含羥基苯基部分；且

L2 為共價結合至 E3LB 及 PB 的連接子，

其中磷酸酯部分透過 PB 之羥基苯基部分之氧共價結合，或者磷酸酯部分透過 E3LB 之羥基脯胺酸殘基之氧共價結合。

【0201】 在各實施例中，所揭示之結合物具有下列化學結構：

$Ab—(L1—D)_j$，

其中，

D 為具有下列結構的 CIDE：

E3LB—L2—PB，

其中，

E3LB 為共價結合至 L2 的 E3 連接酶結合 (E3LB) 配體，其中 E3 連接酶為逢希伯-林道 (VHL) 腫瘤抑制蛋白，且其中 E3LB 包含具有透過羥基脯胺酸殘基之氧共價結合的磷酸酯部分的羥基脯胺酸殘基，

PB 為共價結合至 L1 及至 L2 的蛋白質結合基團；且

L2 為共價結合至 E3LB 及 PB 的連接子；

Ab 為共價結合至 L1 的抗體；

L1 為共價結合至 Ab 及 D 的擬肽物連接子；且

j 具有約 1 至約 16 之值。

【0202】 在各實施例中，所揭示之結合物具有下列化學結構：

$Ab—(L1—D)_j$，

其中，

D 為具有下列結構的 CIDE：

E3LB—L2—PB，

其中

E3LB 為共價結合至 L2 的 E3 連接酶結合 (E3LB) 配體，其中 E3 連接酶為逢希伯-林道 (VHL) 腫瘤抑制蛋白，

PB 為共價結合至 L1 及至 L2 的蛋白質結合基團，其中 PB 包含具有透過羥基苯基部分之氧共價結合的磷酸酯部分的羥基苯基部分，且

L2 為共價結合至 E3LB 及 PB 的連接子；

Ab 為共價結合至 L1 的抗體；

L1 為共價結合至 Ab 及 D 的擬肽物連接子；且

j 具有約 1 至約 16 之值。

【0203】 在各實施例中，所揭示之結合物具有下列化學結構：

$Ab—(L1—D)_j$，

其中，

D 為具有下列結構的 CIDE：

E3LB—L2—PB，

其中 E3LB 為共價結合至 L2 的 E3 連接酶結合 (E3LB) 配體，其中 E3 連接酶為逢希伯-林道 (VHL) 腫瘤抑制蛋白，且其中 E3LB 包含羥基脯胺酸殘基；

L2 為共價結合至 E3LB 及 PB 的連接子；且

PB 為共價結合至 L1 及至 L2 的蛋白質結合基團，其中 PB 包含羥基苯基部分；

Ab 為共價結合至 L1 的抗體；

L1 為共價結合至 Ab 及 D 的擬肽物連接子；且

j 具有約 1 至約 16 之值，

其中磷酸酯部分透過 PB 之羥基苯基部分之氧共價結合，或者磷酸酯部分透過 E3LB 之羥基脯胺酸殘基之氧共價結合。

IV. 調配物

【0204】 可製備如本文所述之治療性 Ab-L1-CIDE 的藥物製劑用於與醫藥上可接受之腸胃外載體以單位劑量可注射形式腸胃外投予，例如推注、靜脈內、腫瘤內注射。具有所需純度之 Ab-CIDE 視情況與一種或多種醫藥上可接受之賦形劑混合 (Remington's Pharmaceutical Sciences (1980)，第 16 版，Osol, A. 主編)，呈用於復溶之凍乾製劑或水溶液的形式。

【0205】 Ab-L1-CIDE 可根據標準藥物實踐配製為醫藥組成物。根據該態樣，提供一種醫藥組成物，其包含與一種或多種醫藥上可接受之賦形劑結合的 Ab-L1-CIDE。

【0206】 典型製劑藉由將 Ab-L1-CIDE 與賦形劑 (例如載劑及/或稀釋劑) 混合來製備。適合的載劑、稀釋劑及其他賦形劑為本領域技術人員所熟知，且包括以下材料，例如：碳水化合物、蠟、水溶性及/或可溶脹聚合物、親水性或疏水性材料、明膠、油、溶劑、水等。所用之特定載劑、稀釋劑或其他賦形劑將取決於施用 Ab-L1-CIDE 的手段和目的。溶劑通常基於本領域技術人員認為投予哺乳動物安全 (GRAS) 的溶劑來選擇。

【0207】 一般而言，安全溶劑是無毒水性溶劑，例如水及其他可溶於或混溶於水中的無毒溶劑。適合的水性溶劑包括水、乙醇、丙二醇、聚乙二醇（例如，PEG 400、PEG 300）等及其混合物。可接受之稀釋劑、載劑、賦形劑及穩定劑在所採用之劑量及濃度下對受體無毒，並且包括：緩衝劑，諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸及甲硫胺酸；防腐劑 (諸如十八烷基二甲基苄基氯化銨；六甲基氯化銨；氯化苯銨；氯化本索寧；苯

酚、丁醇或苄醇；對羥基苯甲酸烷基酯，諸如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇和間甲酚)；低分子量 (小於約 10 個殘基) 多肽；蛋白質，諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，諸如聚乙烯吡咯啶酮；胺基酸，諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺酸、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單醣、雙醣及其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑 (諸如 EDTA)；糖，諸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇；成鹽相對離子，諸如鈉；金屬錯合物 (例如，Zn-蛋白錯合物)；及/或非離子界面活性劑，諸如 TWEEN™、PLURONICS™ 或聚乙二醇 (PEG)。

【0208】 調配物亦可包括一種或多種緩衝劑、穩定劑、界面活性劑、潤濕劑、潤滑劑、乳化劑、懸浮劑、防腐劑、抗氧化劑、滲透劑、助滑劑、加工助劑、著色劑、甜味劑、香化劑、調味劑及其他已知添加劑，提供 Ab-L1-CIDE之良好呈現或輔助製造藥品。調配物可使用習用溶解及混合程序來製備。

【0209】 可藉由在適當 pH 下於環境溫度下以所需之純度與生理學上可接受之載劑（亦即，在採用的劑量和濃度下對受體無毒的載劑）混合來配製。調配物之 pH 主要取決於化合物之特定用途及濃度，但可以在約 3 至約 8 的範圍內。一個適合之實例為 pH 5 的乙酸鹽緩衝劑中的調配物。

【0210】 Ab-L1-CIDE 調配物可為無菌的。特定而言，用於*活體內*投予的製劑必須是無菌的。該等滅菌可藉由無菌濾膜過濾輕易地實現。

【0211】 Ab-L1-CIDE 通常可以固體組成物、凍乾製劑或水溶液形式儲存。

【0212】 包含 Ab-L1-CIDE 的醫藥組成物可按照與良好醫學實踐一致 (亦即，含量、濃度、時間表、療程、載體及投予途徑) 的方式進行調配、給藥及投予。在此情況中考量的因素包括待治療的特定疾病、待治療的特定哺乳動物、個別患者的臨床狀況、疾病原因、遞送藥劑的部位、投予方法、投予日程

及醫療從業人員已知的其他因素。待投予之化合物的「治療有效量」將受該等考慮因素的支配，並且是預防、改善或治療凝血因子所介導的病症所需之最小量。該量較佳的是低於對宿主有毒或使宿主明顯更易於出血的量。

【0213】 Ab-L1-CIDE 可配製成藥物劑型，以提供易於控制的藥物劑量並使患者遵守規定的方案。供應用之醫藥組成物（或調配物）可以多種方式包裝，具體取決於用於投予藥物之方法。一般而言，用於分發之製品包括容器，該容器中存放有適當形式的醫藥調配物。適合之容器為本領域技術人員習知者，且包括瓶（塑膠瓶及玻璃瓶）、小袋、安瓿、塑膠袋、金屬圓筒等材料。容器亦可包括干預防護組件，以防止不小心接觸到包裝之內容物。此外，容器上亦貼有描述容器內容物的標籤。標籤亦可包括適當之警告。

【0214】 醫藥組成物可以為無菌可注射製劑之形式，例如無菌可注射水性或油性懸浮液。該懸浮液可根據已知技術使用上文提及之彼等適合之分散劑或潤濕劑及懸浮劑配製。無菌可注射製劑亦可為無毒腸胃外可接受之稀釋劑或溶劑（例如 1,3-丁二醇）中的無菌注射溶液或懸浮液。無菌注射製劑亦可製成凍乾粉劑。可採用的可接受之媒介物及溶劑包括水、林格氏溶液及等張氯化鈉溶液。此外，通常可採用無菌之不揮發油作為溶劑或懸浮介質。為此，可採用任何溫和之固定油，其中包括合成之甘油單酯或甘油二酯。此外，脂肪酸（例如油酸）亦可用於注射劑的製備。

【0215】 可與載劑材料混合以產生單一劑型的 Ab-L1-CIDE 的量將根據所治療之宿主及特定之投予方式而變化。例如，意欲人類口服的緩釋製劑可含有約 1 mg 至 1000 mg 活性物質，該活性物質與合適且方便的量的載劑物質混合，該載劑物質可佔總組成物的約 5% 至約 95%（重量:重量）。醫藥組成物可製成提供易於量測之投予量。例如，意欲靜脈輸注的水溶液每毫升溶液可含有約 3 μg 至 500 μg 活性成分，以便可以約 30 mL/h 的速率輸注適合之體積。

【0216】 適用於腸胃外投予之調配物包括水性及非水性無菌注射液，其可含有抗氧化劑、緩衝劑、抑菌劑以及使調配物與預期受體之血液等張之溶質；及水性及非水性無菌懸浮液，其可包括懸浮劑和增稠劑。

【0217】 調配物可包裝在單位劑量或多劑量容器（例如密封安瓿及小瓶）中，且可以儲存於冷凍乾燥（凍乾）條件下，在即將使用前添加注射用無菌液體載劑（例如水）即可。即時的注射液和懸浮液由前文所述類型之無菌粉末、顆粒劑及片劑製備。較佳之單位劑量調配物為那些包含每日劑量或單位每日亞劑量（如上文所引述）或其適當比例的活性成分的調配物。

【0218】 本主題進一步提供了獸醫用組成物，其包含至少一種如上所定義之活性成分以及獸醫用載劑。獸醫用載劑為用於投予組成物的有用材料，且可以為固體、液體或氣態材料，其在獸醫領域為惰性或可接受並且與活性成分相容。該等獸醫用組成物可以經非消化道或任何其他適宜之途徑投予。

V. 適應症及治療方法

【0219】 預期本文所揭示之 Ab-L1-CIDE 可用於治療各種疾病或病症。本文亦提供用於治療的 Ab-L1-CIDE 或包含 Ab-L1-CIDE 的組成物。在一些實施例中，本文提供用於治療或預防如本文所揭露之疾病及病症的 Ab-L1-CIDE 或包含 Ab-L1-CIDE 的組成物。本文亦提供 Ab-L1-CIDE 或包含 Ab-L1-CIDE 的組成物在治療中之用途。在一些實施例中，本文提供 Ab-L1-CIDE 用於治療或預防如本文所揭露之疾病及病症的用途。本文亦提供 Ab-L1-CIDE 或包含 Ab-L1-CIDE 的組成物在製造用於治療或預防如本文所揭露之疾病及病症的藥物中的用途。

【0220】 一般而言，待治療之疾病或病症為標靶蛋白依賴性疾病或病症，例如過度增生性疾病 (諸如癌症)。本文中待治療之癌症的實例包括 BRM 依賴性癌症。在某些實施例中，癌症為非小細胞肺癌。

【0221】 在某些實施例中，本文所述之主題涉及一種降低個體的標靶蛋白的量之方法，該方法包含將如本文所述之 Ab-L1-CIDE 或包含如本文所述之 Ab-L1-CIDE 的組合物投予個體，其中 PB 部分結合標靶蛋白，其中泛蛋白連接酶影響結合的標靶蛋白之降解，其中標靶蛋白的量降低。

【0222】 Ab-L1-CIDE 可藉由任何適合待治療之病症的途徑投予。Ab-L1-CIDE 通常經腸胃外投予，即經輸注、皮下、肌內、靜脈內、皮內、鞘內和硬膜外投予。

【0223】 Ab-L1-CIDE 可單獨或與其他藥劑組合用於治療。例如，Ab-L1-CIDE 可與至少一種額外的治療劑聯合投予。上面提到的該等聯合療法涵蓋聯合投予 (其中兩種或多種治療劑包含在同一或單獨的製劑中) 以及單獨投予，在這種情況下，Ab-L1-CIDE 之投予可在投予額外的治療劑及/或佐劑之前、同時及/或之後發生。Ab-L1-CIDE 亦可與放射療法組合使用。

【0224】 Ab-L1-CIDE (及任何額外的治療劑) 可藉由任何適合的方式投予，包括腸胃外、肺內和鼻內投予，且若需要局部治療，則可以採用病灶內投予。腸胃外輸注包括肌內、靜脈內、動脈內、腹膜內或皮下投予。投藥可藉由任何適宜途徑進行，例如藉由注射，諸如靜脈內或皮下注射，此部分地取決於短暫投予抑或長期投予。本文中考慮各種給藥方案，其包括但不限於在多種時間點單次或多次投予、快速注射投予和脈衝輸注。

【0225】 對於疾病的預防或治療，Ab-L1-CIDE 之適當劑量 (單獨使用或與一種或多種其他額外的治療劑組合使用) 將取決於待治療疾病的類型、Ab-L1-CIDE 之類型、疾病的嚴重度及病程、為了預防或治療目的投予 Ab-L1-CIDE、既往治療、患者的臨床病史及對該 Ab-L1-CIDE 的反應及主治醫師之判斷。Ab-L1-CIDE 適合在一次或一系列治療中投予患者。根據疾病的類型和嚴重程度不同，約 1 μg/kg 至 15 mg/kg (例如 0.1 mg/kg 至 10 mg/kg) 的 Ab-L1-

CIDE 可為例如透過一次或多次分開的投予或藉由連續輸注投予患者的初始候選劑量。根據上述因素，一種典型的日劑量可在約 1 μg/kg 至 100 mg/kg 或更多的範圍內。對於在幾天或更長時間內重複投予，視病狀而定，治療通常將持續至出現期望的疾病症狀阻抑。Ab-L1-CIDE 的一種例性示劑量將在 0.05 mg/kg 至約 10 mg/kg 的範圍內。因此，可以對患者施用約 0.5 mg/kg、2.0 mg/kg、4.0 mg/kg 或 10 mg/kg 中的一種或多種劑量 (或其任意組合)。此等劑量可以間歇投予，例如每週或每三週投予（例如，使得患者接受約 2 次至約 20 次給藥，或例如約 6 次給藥）。可投予初始較高的負載劑量，隨後投予一個或多個較低劑量。然而，可以使用其他劑量方案。藉由習用技術和測定很容易監測此治療的進展。

【0226】 本文所述之方法包括降解標靶蛋白的方法。在某些實施例中，方法包含向個體投予 Ab-L1-CIDE，其中標靶蛋白經降解。蛋白質之降解程度可為約 1% 至約 5%；或約 1% 至約 10%；或約 1% 至約 15%；或約 1% 至約 20%；約 1% 至約 30%；或約 1% 至約 40%；約 1% 至約 50%；或約 10% 至約 20%；或約 10% 至約 30%；或約 10% 至約 40%；或約 10% 至約 50%；或至少約 1%；或至少約 10%；或至少約 20%；或至少約 30%；或至少約 40%；或至少約 50%；或至少約 60%；或至少約 70%；或至少約 80%；或至少約 90%；或至少約 95%；或至少約 99%。

【0227】 本文所述之方法包括減少腫瘤組織（例如非小細胞肺癌）增殖的方法。在某些實施例中，方法包含向個體投予 Ab-L1-CIDE，其中腫瘤組織之增殖降低。降低幅度可為約 1% 至約 5%；或約 1% 至約 10%；或約 1% 至約 15%；或約 1% 至約 20%；約 1% 至約 30%；或約 1% 至約 40%；約 1% 至約 50%；或約 10% 至約 20%；或約 10% 至約 30%；或約 10% 至約 40%；或約 10% 至約 50%；或至少約 1%；或至少約 10%；或至少約 20%；或至少約

30%；或至少約 40%；或至少約 50%；或至少約 60%；或至少約 70%；或至少約 80%；或至少約 90%；或至少約 95%；或至少約 99%。

VI. 製成品

【0228】在另一態樣中，本文所述為製品，例如提供了含有可用於治療上述疾病及病症的材料的「套組」。該套組包含容器，該容器包含 Ab-L1-CIDE。該套組可進一步包含在容器上或與容器相關聯的標籤或藥品說明書。術語「藥品說明書」用於指涉通常包含在治療性產品的商業包裝中的說明，該說明包含有關使用此等治療性產品的適應症、用法、劑量、投予途徑、禁忌症及/或警告等資訊。

【0229】適合之容器包括例如瓶、小瓶、注射器、泡型包等。「小瓶」為適合容納液體或凍乾製劑的容器。在一個實施例中，小瓶為一次性小瓶，例如帶有瓶塞的 20 cc 一次性小瓶。容器可由各種材料諸如玻璃或塑膠形成。容器可容納 Ab-L1-CIDE 或其製劑 (其有效治療病狀)，並可具有無菌入口 (例如，容器可為具有可藉由皮下注射針頭穿孔的塞子的靜脈輸液袋或小瓶)。

【0230】組成物中的至少一種活性劑為 Ab-L1-CIDE。標籤或藥品說明書指示該組成物用於治療所選擇的病況（諸如癌症）。此外，標籤或藥品說明書可指示待治療之患者為患有過度增生性病症、神經退化、心肥大、疼痛、偏頭痛或神經創傷性疾病或事件的患者。在一個實施例中，標籤或藥品說明書指示包含 Ab-L1-CIDE 的組成物可用於治療由異常細胞生長引起的病症。標籤或藥品說明書亦可指示組成物可用於治療其他病症。替代性地或另外地，製品可以進一步包含第二容器，該第二容器包含醫藥上可接受之緩衝劑，諸如抑菌注射用水 (BWFI)、磷酸鹽緩衝生理食鹽水、林格氏溶液及右旋糖溶液。從商業和使用者的角度來看，它可以進一步包含其他材料，其中包括其他緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針頭和注射器。

【0231】套組可進一步包含 Ab-L1-CIDE 及 (若存在) 第二醫藥製劑之投予說明。例如，若該套組包含第一組成物 (包含 Ab-L1-CIDE) 及第二藥物製劑，則該套組可進一步包含將第一醫藥組成物和第二醫藥組成物同時、順序或單獨投予有此需要之患者的說明。

【0232】在另一實施例中，套組適合於遞送固體口服形式之 Ab-L1-CIDE，諸如錠劑或膠囊劑。該套組較佳包括多個單位劑量。該等套組可包括一張卡，該卡具有按其預期用途之順序取向的劑量。該等套組之一個實例為「泡型包」。泡型包在包裝行業中為人所熟知，且廣泛用於包裝藥品單位劑型。如果需要，可提供記憶輔助，例如以數字、字母或其他標記之形式，或帶有日曆插入物，其表示治療計劃中可投予劑量的天數。

【0233】根據一個實施例，套組可包含 (a) 其中容納 Ab-L1-CIDE 的第一容器；及視情況存在的 (b) 其中容納有第二藥物製劑的第二容器，其中第二藥物製劑包含具有抗過度增生性活性的第二化合物。替代性地或另外地，套組可進一步包含第三容器，該第三容器包含醫藥上可接受之緩衝劑，諸如抑菌注射用水 (BWFI)、磷酸鹽緩衝生理食鹽水、林格氏溶液及右旋糖溶液。從商業和使用者的角度來看，它可以進一步包含其他材料，其中包括其他緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針頭和注射器。

【0234】在其中套組包含 Ab-L1-CIDE 及第二治療劑的某些其他實施例中，套組可包含用於容納單獨組成物的容器，例如分開的瓶子或分開的箔包；但是單獨組成物亦可容納於單個未分開的容器中。通常，該套組包括單獨成分的投予說明。當單獨組分較佳以不同劑型投予（例如，口服及腸胃外）、以不同的劑量間隔投予時或者當處方醫師需要滴定組合中的單獨組分時，套組形式特別有利。

VII. 製備結合物之方法

合成路線

【0235】本文所述之主題亦涉及由 L1-CIDE 製備 CIDE、L1-CIDE 及 Ab-L1-CIDE 的方法。一般而言，該方法包含使抗體或其變異體、突變、剪接變異體、插入/缺失和融合物與 L1-CIDE 在其中抗體共價結合至 L1-CIDE 上任何可用的接附點的條件下接觸，其中製備 Ab-L1-CIDE。本文所述之主題亦涉及共價接附至 L1 的 Ab-L1 部分 (亦即抗體或其變異體、突變、剪接變異體、插入/缺失和融合物) 製備 Ab-L1-CIDE 的方法，該等方法包含使 CIDE 與 Ab-L1 在其中 CIDE 共價結合至 Ab-L1 上任何可用的接附點的條件下接觸，其中製備 Ab-L1-CIDE。該方法可進一步包含 Ab-L1-CIDE 之常規分離和純化。

【0236】CIDE、L1-CIDE 及 Ab-L1-CIDE 及本文所述之其他化合物可藉由以下合成路線合成，該等合成路線包括與化學領域中所熟知的那些方法類似的合成路線，特別是根據本文所包含的描述，以及下列文獻中所述的用於其他雜環的那些合成路線：Comprehensive Heterocyclic Chemistry II，Katritzky 及 Rees 主編，Elsevier，1997，例如第 3 卷；Liebigs Annalen der Chemie，(9):1910-16 (1985)；Helvetica Chimica Acta，41:1052-60 (1958)；Arzneimittel-Forschung，40(12):1328-31 (1990)。起始材料通常可獲自商業來源，例如 Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI)，或容易使用本領域技術人員所熟知的方法來製備，例如，藉由下列文獻總體所述的方法來製備：Louis F. Fieser 及 Mary Fieser，*Reagents for Organic Synthesis*，第 1-23 卷，Wiley，N.Y.(1967-2006)；或 *Beilsteins Handbuch der organischen Chemie*，4，Aufl. ed. Springer-Verlag，Berlin（包括補充資料，亦可通過 Beilstein 在線數據庫獲得）。

【0237】可用於合成 CIDE、L1-CIDE 及 Ab-L1-CIDE 及本文所述之其他化合物以及必要的試劑和中間體的合成化學轉化和保護基團方法 (保護和去保護) 係此項技術中已知的，且包括例如下列文獻中所述的哪些方法：R.

Larock，Comprehensive Organic Transformations，VCH Publishers (1989)；T. W. Greene 及 P. G .M.Wuts，Protective Groups in Organic Synthesis，第 3 版，John Wiley and Sons (1999)；及 L. Paquette 主編，Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis，John Wiley and Sons (1995) 及其後續版本。在製備 CIDE、L1-CIDE 和 Ab-CIDE 及其他化合物時，可能需要保護中間體之的遠端官能團（例如，一級胺或二級胺）。對該等保護之需求將根據遠端官能團之性質和製備方法的條件而有所不同。合適的胺基保護基團包括乙醯基、三氟乙醯基、三級丁氧羰基 (BOC)、苄氧羰基（CBz 或 CBZ）及 9-芴基亞甲基氧羰基 (Fmoc)。本領域技術人員容易確定是否需要該等保護。有關保護基團及其使用的一般說明，參見：T. W. Greene，Protective Groups in Organic Synthesis，John Wiley & Sons，New York，1991。

【0238】 一般程序及實例提供用於製備 CIDE、L1-CIDE 及 Ab-L1-CIDE 及本文所述之其他化合物的例示性方法。熟悉此項技術者將理解，可使用其他合成路線來合成 Ab-L1-CIDE 及化合物。儘管在方案、一般程序及實例中描述並討論了具體之起始材料和試劑，但是可容易替換其他起始材料和試劑以提供各種衍生物和/或反應條件。此外，根據本揭露，可使用本領域技術人員所熟知的常規化學方法進一步修飾藉由所述方法所製備的許多例示性化合物。

【0239】 一般而言，Ab-L1-CIDE 可藉由以下方法來製備：按照 WO 2013/055987、WO 2015/023355、WO 2010/009124、WO 2015/095227 之程序將 CIDE 與 L1 連接子試劑連接以製備 L1-CIDE，然後使 L1-CIDE 與本文所述之任何抗體或其變異體、突變、剪接變異體、插入/缺失和融合物 (包括經半胱胺酸工程化改造之抗體) 結合。另選地，Ab-CIDE 可藉由以下方法來製備：首先將本文所述之抗體或其變異體、突變、剪接變異體、插入/缺失和融合物（包括

經半胱胺酸工程化改造之抗體）與 L1 連接子試劑連接，然後使其與任何 CIDE 結合。

【0240】 下列合成路線描述製備 CIDE、L1-CIDE 和 Ab-L1-CIDE 及其他化合物及其組分的例示性方法。本文其他地方揭露用於製備 CIDE、L1-CIDE 和 Ab-L1-CIDE 及其他化合物及其組分的其他合成路線。

1. 經半胱胺酸工程化改造之抗體

【0241】 經半胱胺酸工程化改造之抗體 (THIOMABs™) 可使用標準方法在重組上表現及純化，且通常可如下藉由還原及再氧化製備而用於結合。

【0242】 在重組上表現之全長經半胱胺酸工程化改造之單株抗體 (THIOMAB™ 抗體) 帶有半胱胺酸加合物 (胱胺酸) 或經工程化改造之半胱胺酸由於細胞培養條件而發生麩胱甘肽化。照原樣，由標準哺乳動物細胞系純化的 THIOMAB™ 抗體不能與 Cys 反應性連接子 L1-CIDE 中間體結合。藉由用還原劑，例如 DTT (Cleland 試劑，二硫蘇糖醇) 或 TCEP (三(2-羧乙基)膦鹽酸鹽；Getz 等人 (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80；Soltec Ventures，Beverly，MA) 進行處理，然後用溫和的氧化劑 (例如去氫抗壞血酸) 重新形成鏈間二硫鍵 (再氧化)，使經半胱胺酸工程化改造之抗體具有反應性，以與本文所述之 L1-PCIDE 中間體結合。將 CHO 細胞中表現的經半胱胺酸工程化改造之單株抗體（THIOMAB™ 抗體）（Gomez 等人 (2010) Biotechnology and Bioeng. 105(4):748-760；Gomez 等人 (2010) Biotechnol. Prog.26:1438-1445）於室溫下在含 2 mM EDTA 的 50 mM Tris (pH 8.0) 中用過量約 50 倍的 DTT 還原，其去除 Cys 及麩胱甘肽加合物並減少抗體中之鏈間二硫鍵。藉由反相 LCMS 使用 PLRP-S 柱監測加合物之去除。

【0243】 去除 Cys 及麩胱甘肽加合物後，THIOMAB™ 抗體可藉由此項技術中公知之方法純化，該等方法包括本文詳述之陽離子交換層析。藉由添加

至少四倍體積的 10 mM 琥珀酸鹽 (pH 5) 且用 10% 乙酸滴定直至 pH 為大約五，對降低之 THIOMAB™ 進行稀釋及酸化。隨後可將 pH 降低且經稀釋的 THIOMAB™ 抗體加載到 HiTrap S 陽離子交換柱上，用幾倍柱體積的 10 mM 醋酸鈉 (pH 5) 洗滌，並用 50 mM Tris (pH 8.0)、150 mM 氯化鈉洗脫。可藉由再氧化，在親本 Mab 中存在的半胱胺酸殘基之間重建二硫鍵。可將上述洗脫的經還原之 THIOMAB™ 抗體用 15X 去氫抗壞血酸 (DHAA) 處理約 3 小時，或者，用 200 nM 至 2 mM 硫酸銅 ($CuSO_4$) 水溶液於室溫下處理過夜。可使用本領域中已知的其他氧化劑，即氧化試劑及氧化條件。環境空氣氧化亦可能有效。這種溫和的、部分再氧化步驟以高保真度有效形成鏈內二硫化物。可藉由反相 LCMS 使用 PLRP-S 管柱監測再氧化。可將經再氧化之 THIOMAB™ 抗體用琥珀酸鹽緩衝劑 (如上所述) 稀釋以使 pH 達到大約 5，接著如上所述在 S 柱上進行純化，不同之處在於用 10 mM 琥珀酸鹽 (pH 5)、300 mM 氯化鈉 (緩衝劑 B) 及 10 mM 琥珀酸鹽 (pH 5) (緩衝劑 A) 的梯度進行洗脫。向經洗脫的 Thiomab™ 抗體加入 EDTA 至最終濃度為 2 mM。如有必要，可濃縮 THIOMAB™ 以達到超過 5 mg/mL 之最終濃度。所得 THIOMAB™ 抗體儲存於 -20°C 或 -80°C，準備用於結合。可在 6200 系列 TOF 或 QTOF Agilent LC/MS 上進行液相層析/質譜分析。樣品在加熱至 80°C 的 PRLP-S® 1000 A 微孔柱 (50 mm × 2.1 mm, Polymer Laboratories, Shropshire, UK) 上進行層析分離。可使用 30%-40% B (溶劑 A：0.05% TFA 水溶液，溶劑 B：0.04% TFA 的乙腈溶液) 的線性梯度，且使用電噴霧離子源直接電離洗脫液。采集資料，並藉由 MassHunter 軟體 (Agilent) 進行去捲積。在 LC/MS 分析之前，可將抗體 (50 微克) 用 PNGase F (2 單位/ml；PROzyme，San Leandro，CA) 於 37°C 處理 2 小時以去除 N-連接的碳水化合物。

【0244】 可替代地，將抗體用 LysC (每 50 μg (微克) 抗體 0.25 μg) 於 37°C 部分消化 15 分鐘，以得到 Fab 和 Fc 片段，用於 LCMS 分析。

2. 連接子 L1-CIDE 基團與抗體之結合

【0245】 在將連接子 L1-PCIDE 化合物與抗體結合的一種方法中，經上述還原及再氧化程序後，將經半胱胺酸工程化改造之抗體（THIOMAB™ 抗體）於 10 mM 琥珀酸鹽 (pH 5)、150 mM NaCl、2 mM EDTA 中用 1 M Tris 調節至 pH 7.5-8.5。將過量的約 3 莫耳至 20 當量的含有硫醇反應性基團的連接子-PCIDE 中間體 (例如，馬來醯亞胺或 4-硝基吡啶基二硫化物或甲烷硫代磺醯基 (MTS) 二硫化物) 在有丙二醇或沒有丙二醇的情況下溶於 DMF 或 DMA 中，然後添加至經還原、再氧化和 pH 調節的抗體中。反應在室溫或 37°C 下溫育並監測直至完成（1 小時至約 24 小時），如藉由反應混合物之 LC-MS 分析所確定的。反應完成後，藉由一種或幾種方法之任意組合純化結合物，目的是去除剩餘的未反應 L1-PCIDE 中間體及聚集蛋白（如果以顯著的水平存在）。例如，可將結合物用 10 mM 組胺酸-乙酸鹽 (pH 5.5) 稀釋，直到最終 pH 值為約 5.5，然後藉由 S 陽離子交換層析法使用連接至 Akta 純化系統 (GE Healthcare) 的 HiTrap S 柱或 S maxi 離心柱 (Pierce) 進行純化。可替代地，可藉由凝膠過濾層析法使用連接至 Akta 純化系統的 S200 柱或 Zeba 離心柱純化結合物。可替代地，透析可用於去除未反應或過量的連接子藥物。可使用凝膠過濾或透析法，將 THIOMAB™ 抗體 PCIDE 結合物用含 240 mM 蔗糖的 20 mM 組胺酸/醋酸鹽 (pH 5) 配製。可藉由離心超濾法濃縮純化的結合物，及/或在無菌條件下透過 0.2-μm 過濾器過濾，且冷凍儲存。藉由 BCA 測定法表徵 Ab-L1-PCIDE 以確定蛋白濃度，藉由分析型 SEC (粒徑篩析層析法) 進行聚集分析，且用離胺酸 C 內肽酶 (LysC) 處理或使用標準程序進行還原後進行 LC-MS 分析以計算 DAR。

【0246】在包含 0.25 mM 氯化鉀及 15% IPA 的 0.2 M 磷酸鉀 (pH 6.2) 中，使用 Shodex KW802.5 柱對結合物進行粒徑篩析層析分析，其中所用流速為 0.75 ml/min。結合物之聚集狀態藉由對洗脫峰面積進行積分 (280 nm 下之吸光度) 來確定。

【0247】可使用 Agilent QTOF 6520 ESI 儀器對 Ab-L1-PCIDE 進行 LC-MS 分析。例如，於 37°C，將 Ab-L1-PCIDE 用 1:500 w/w 內切蛋白酶 Lys C (Promega) 於 Tris (pH 7.5) 中處理 30 分鐘。將所得切割片段加載到加熱至 80°C 的 1000Å (埃)、8 μm (微米) PLRP-S (高度交聯聚苯乙烯) 柱上，並用 在 5 分鐘內由 30% B 至 40% B 的梯度洗脫。流動相 A 為含 0.05% TFA 的 H_2O，流動相 B 為含 0.04% TFA 的乙腈。流速為 0.5 ml/min。在電噴霧電離和 MS 分析之前，藉由 280nm 處的紫外吸光度偵測來監測蛋白質洗脫。未結合之 Fc 片段、殘留的未結合之 Fab 和已給藥的 Fab 通常可實現色譜分離。使用 Mass Hunter™ 軟體 (Agilent Technologies) 對獲得的 m/z 譜圖去卷積以計算抗體片段的質量。可對去捲積之 LCMS 譜圖中的峰進行分配及定量。藉由計算對應於 PCIDE-結合抗體的一個或多個峰的強度相對於所有觀察到的峰的比率來計算 PCIDE 與抗體比 (DAR)。

3. 製備 E3LB-L2 中間體之 L2 至 E3LB 之一般合成偶合

【0248】在某些實施例中，首先使 L2 與適合的第一溶劑、第一鹼及第一偶合試劑接觸以製備第一溶液。在某些實施例中，L2 與適合的第一溶劑、第一鹼及第一偶合試劑之接觸於室溫 (約 25°C) 進行 15 分鐘。然後使 E3LB 與該第一溶液接觸。

【0249】在某些實施例中，E3LB 與第一溶液之接觸於室溫 (約 25°C) 進行一小時。然後濃縮溶液，並視情況進行純化。

【0250】在某些實施例中，L2 與第一鹼與第一偶合試劑之莫耳比為約 1:4:1.19。在某些實施例中，L2 與第一鹼與第一偶合試劑之莫耳比為約 1:2:0.5、約 1:3:1、約 1:4:2、約 1:5:3 或約 1:6:4。

【0251】在某些實施例中，L2 與 E3LB 之莫耳比為約 1:1。在某些實施例中，L2 與 E3LB 之莫耳比為約 1:0.5、約 1:0.75、約 1:2 或約 0.5:1。

4. 將 E3LB-L2 中間體偶合至 PB 的一般合成方法

【0252】在某些實施例中，使 E3LB-L2 中間體偶合至 PB 以製備 CIDE。在某些實施例中，首先使 PB 與適合的第二溶劑、第二鹼及第二偶合試劑接觸。在某些實施例中，接觸於室溫（約 25°C）下進行約 10 分鐘。然後使溶液與 E3LB-L2 中間體接觸。在某些實施例中，第二溶液與 E3LB-L2 中間體之接觸於室溫（約 25°C）下進行約 1 小時。然後濃縮溶液，並視情況進行純化，以製備 CIDE。

【0253】在某些實施例中，PB 與第二鹼與第二偶合試劑之莫耳比為約 1:4:1.2。在某些實施例中，PB 與第二鹼與第二偶合試劑之莫耳比為約 1:3:0.75、約 1:5:1、約 1:3:2 或約 1:5:3。

【0254】在某些實施例中，PB 與 E3LB-L2 中間體之莫耳比為約 1:1。在某些實施例中，PB 與 E3LB-L2 中間體之莫耳比為約 1:0.5、約 1:0.75、約 1:2 或約 0.5:1。

5. 將 CIDE 偶合至 L1 以製備 L1-CIDE 的一般合成方法

【0255】在某些實施例中，使 CIDE 與 L1 及第三鹼在適合的第三溶劑中接觸以製備溶液。在某些實施例中，接觸於約室溫（約 25°C）下進行約 2 小時然後可視情況純化溶液以製備 L1-CIDE。

【0256】在某些實施例中，CIDE 與 L1 之莫耳比為約 1:4。在某些實施例中，CIDE 與 L1 之莫耳比為約 1:1、1:2、1:3、1:5、1:6、1:7 或約 1:8。

6. 將 L1-CIDE 偶合至抗體的一般合成方法

【0257】 在某些實施例中，使 L1-CIDE 與硫醇及適合的第四溶劑接觸以形成第四溶液。然後使該溶液與抗體接觸以製備結合物。在某些實施例中，

【0258】 在某些實施例中，硫醇為馬來醯亞胺或 4-硝基吡啶基二硫化物。在某些實施例中，適合的溶劑選自由二甲基甲醯胺、二甲基乙醯胺及丙二醇所組成之群組。

【0259】 在某些實施例中，L1-CIDE 與硫醇反應性基團之莫耳比為約 3:1 至約 20:1。

【0260】 在某些實施例中，包含 L1-CIDE 的溶液、硫醇反應性基團及適合的溶劑與抗體之接觸進行約 1 小時至約 24 小時。在某些實施例中，包含 L1-CIDE 的溶液、硫醇反應性基團及適合的溶劑與抗體之接觸於約室溫 (約 25°C) 至約 37°C 下進行。

【0261】 在上述方法的某些實施例中，適合的溶劑為極性非質子性溶劑，其選自由以下所組成之群組：二甲基甲醯胺、四氫呋喃,乙酸乙酯、丙酮、乙腈、二甲亞碸及碳酸丙烯酯。

【0262】 在上述方法的某些實施例中，鹼選自由 N,*N*-二異丙基乙胺 (DIEA)、三乙胺及 2,2,2,6,6-四甲基哌啶所組成之群組。在某些實施例中，偶合試劑選自由以下所組成之群組：1-[雙(二甲基胺基)亞甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓 3-氧化物六氟磷酸鹽 (HATU)、(苯并三唑-1-基氧基)三(二甲基胺基)六氟磷酸鏻 (BOP)、(7-氮雜苯并三唑-1-基氧基)三吡咯啶基六氟磷酸鏻 (PyAOP)、O-(苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基六氟磷酸脲 (HBTU)、O-(苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基四氟硼酸脲 (TBTU)、O-(6-氯苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基六氟磷酸脲 (HCTU)、O-(N-琥珀醯亞胺基)-1,1,3,3-四甲基-四氟硼酸脲 (TSTU)、O-(5-降莰烯-2,3-二甲醯亞胺基)-N,N,N',N'-四甲基四氟硼酸

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

【0263】 在上述方法的某些實施例中，接觸持續約 30 秒、1 分鐘、2 分鐘、3 分鐘、4 分鐘、5 分鐘、6 分鐘、7 分鐘、8 分鐘、9 分鐘、10 分鐘、11 分鐘、12 分鐘、13 分鐘、14 分鐘、15 分鐘、16 分鐘、17 分鐘、18 分鐘、19 分鐘、20 分鐘、30 分鐘、60 分鐘、90 分鐘、120 分鐘、180 分鐘、4 小時、5 小時、6 小時、7 小時、8 小時、9 小時、10 小時、20 小時、40 小時、60 小時或 72 小時。

【0264】 在上述一般方法的某些實施例中，接觸於約 20℃、21℃、22℃、23℃、24℃、25℃、26℃、27℃、28℃、29℃、30℃、31℃、32℃、33℃、34℃、35℃、36℃、37℃、38℃、39℃、40℃、41℃、42℃、43℃、44℃、45℃、46℃、47℃、48℃、49℃、50℃、60℃、70℃、80℃、90℃ 或 100℃ 進行。

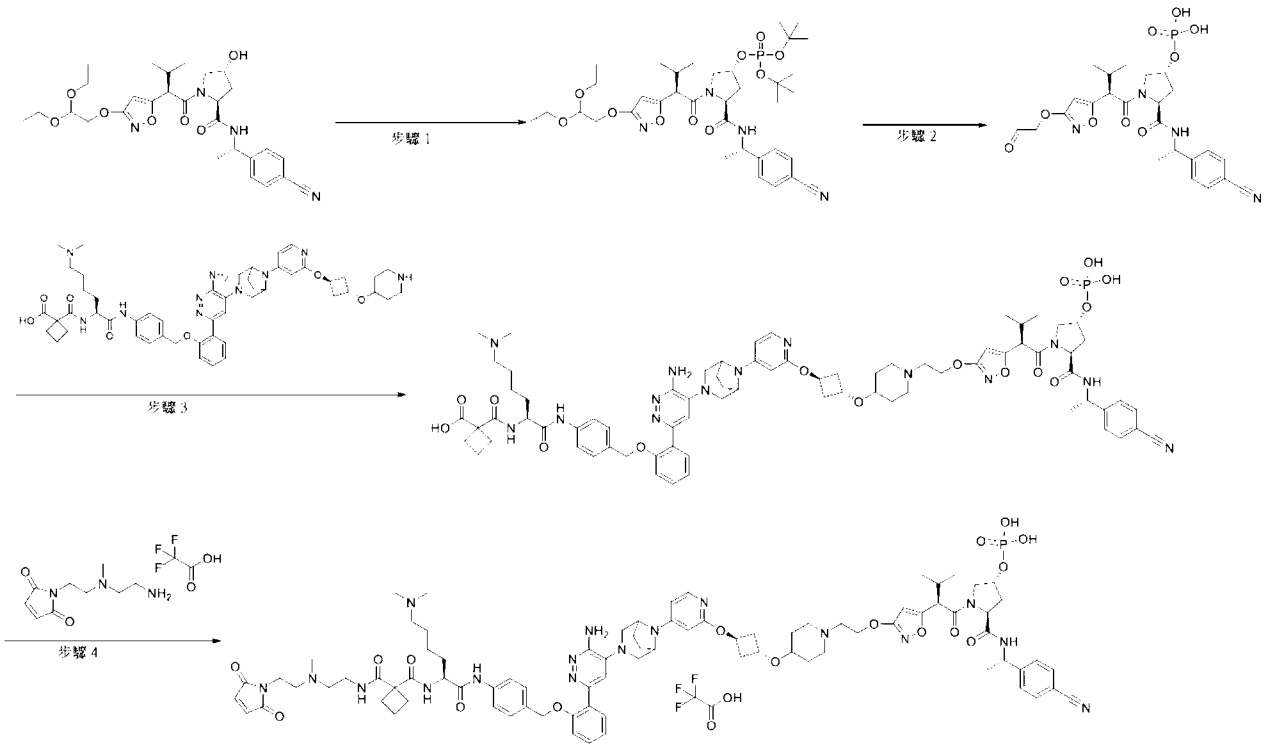
【0265】 以下實例以說明之方式而非以限制之方式提供。

實例

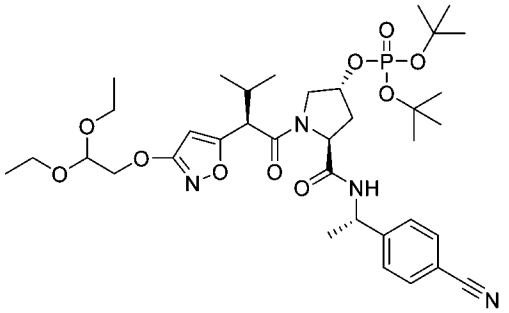
實例 1

L1Hy-PE-CIDE-1 之合成

【0266】 **L1Hy-PE-CIDE-1**：(3*R*,5*S*)-1-((2*R*)-2-(3-(2-(4-((1*r*,3*R*)-3-((4-(3-(3-胺基-6-(2-((4-((*S*)-6-(二甲基胺基)-2-(1-((2-((2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)乙基)(甲基)胺基)乙基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基)氧基)苯基)嗒咔-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)環丁氧基)哌啶-1-基)乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-5-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啶-3-基二氫磷酸鹽 (2,2,2-三氟乙酸鹽)



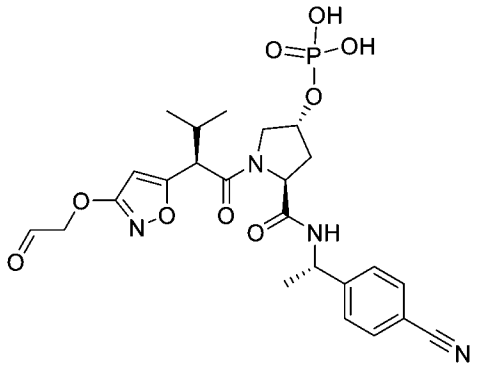
【0267】步驟 1：((3*R*,5*S*)-5-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-1-((*R*)-2-(3-(2,2-二乙氧基乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)吡咯啶-3-基)磷酸二三級丁酯



在氮氣下，於 0°C 向 (2*S*,4*R*)-*N*-((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)-1-((*R*)-2-(3-(2,2-二乙氧基乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-4-羥基吡咯啶-2-甲醯胺 (500 mg，0.921 mmol) 及 1*H*-四唑 (6.1 mL，0.45 M，在 ACN 中) 於 THF (15 mL) 中之溶液加入二異丙基亞磷醯胺二三級丁酯 (511 mg，1.84 mmol)。所產生的溶液於室溫攪拌隔夜。然後於 -30°C 加入 t-BuOOH (5M，在癸烷中) (0.74 mL，3.69 mmol)，且於室溫攪拌 5 小時。用 $NaHSO_3$ 淬滅反應。所得溶液用 EtOAc 萃取，並合併有機層。有機層經無水硫酸鈉乾燥，並在真空下濃縮。藉由矽膠急速層析法（梯

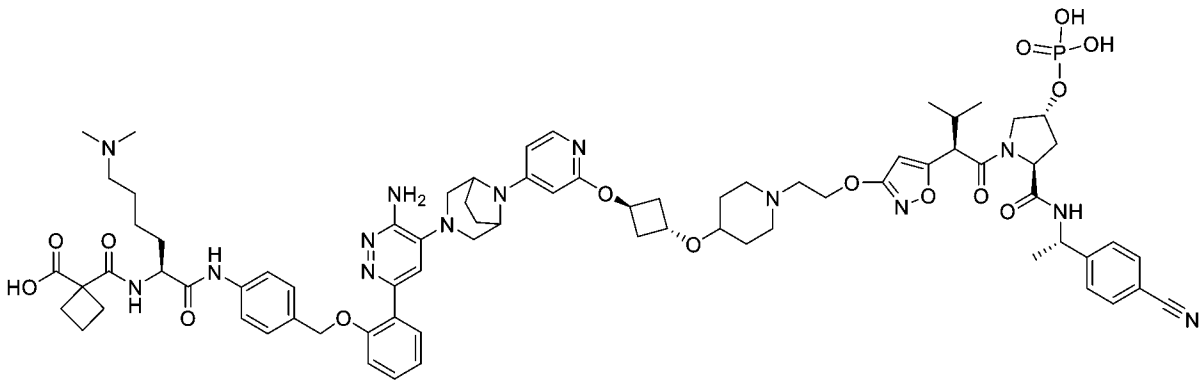
度：0%-87% 乙酸乙酯/石油醚)，以得到 420 mg (產率 62%) 無色油狀標題化合物。LC-MS：(ESI, m/z)：$[M+H]^+ = 735$。

【0268】 步驟 2：(3*R*,5*S*)-5-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-1-((*R*)-3-甲基-2-(3-(2-側氧乙氧基)異噁唑-5-基)丁醯基)吡咯啶-3-基二氫磷酸鹽



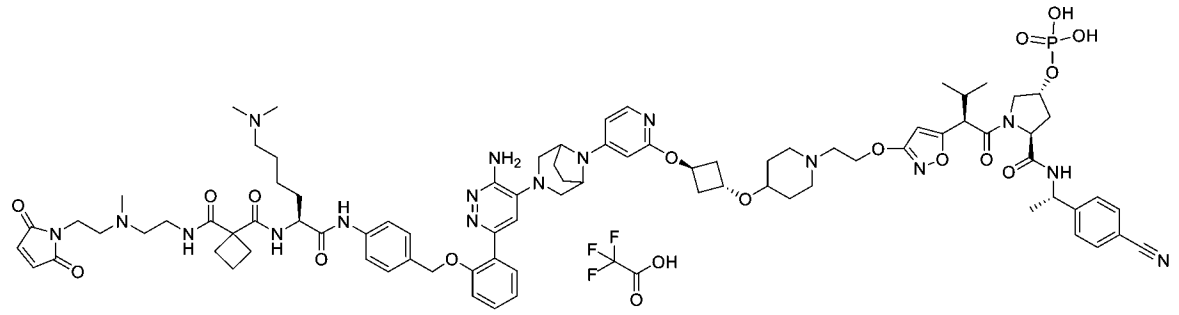
在氮氣下，將 ((3*R*,5*S*)-5-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-1-((*R*)-2-(3-(2,2-二乙氧基乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)吡咯啶-3-基)磷酸二三級丁酯 (70.0 mg，0.100 mmol) 於 HCOOH (0.5 mL) 及水 (0.5 mL) 中之溶液於 60°C 攪拌 1 小時。將溶液於真空濃縮，以得到 50 mg 呈固體狀 (粗製) 標題化合物。LC-MS：(ESI, m/z)：$[M+H]^+ = 549$。

【0269】 步驟 3：1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(3-((1-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-4-(膦醯氧基)吡咯啶-1-基)-3-甲基-1-側氧丁-2-基)異噁唑-3-基)氧基)乙基)哌啶-4-基)氧基)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒吡-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸



在氮氣下，將 (3*R*,5*S*)-5-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-1-((*R*)-3-甲基-2-(3-(2-側氧乙氧基)異噁唑-5-基)丁醯基)吡咯啶-3-基二氫磷酸鹽 (62.8 mg，0.115 mmol)、1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-((1*r*,3*r*)-3-(哌啶-4-基氧基)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒吡-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (56.0 mg，0.0602 mmol)、CH_3COONa (14.9 mg，0.182 mmol) 於甲醇 (1.5 mL) 及二氯甲烷 (0.5 ml) 中之溶液於室溫攪拌 1 小時。然後添加 $NaBH_3CN$ (5.6 mg, 0.0891 mmol)，並於室溫下攪拌 3 小時。將反應藉由水淬滅。在真空下濃縮反應混合物。將殘餘物藉由預填充之 C18 柱（溶劑梯度：0-100% ACN 於水 (0.05% NH_4HCO_3)) 純化，以得到 60 mg (65% 產率) 白色固體狀標題化合物。LC-MS：(ESI, *m/z*)：$[M+H]^+$= 1464。

【0270】 步驟 4：(3*R*,5*S*)-1-((2*R*)-2-(3-(2-(4-((1*r*,3*R*)-3-((4-(3-(3-胺基-6-(2-((4-((*S*)-6-(二甲基胺基)-2-(1-((2-((2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)乙基)(甲基)胺基)乙基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基)氧基)苯基)嗒吡-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)環丁氧基)哌啶-1-基)乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-5-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啶-3-基二氫磷酸鹽 (2,2,2-三氟乙酸鹽)



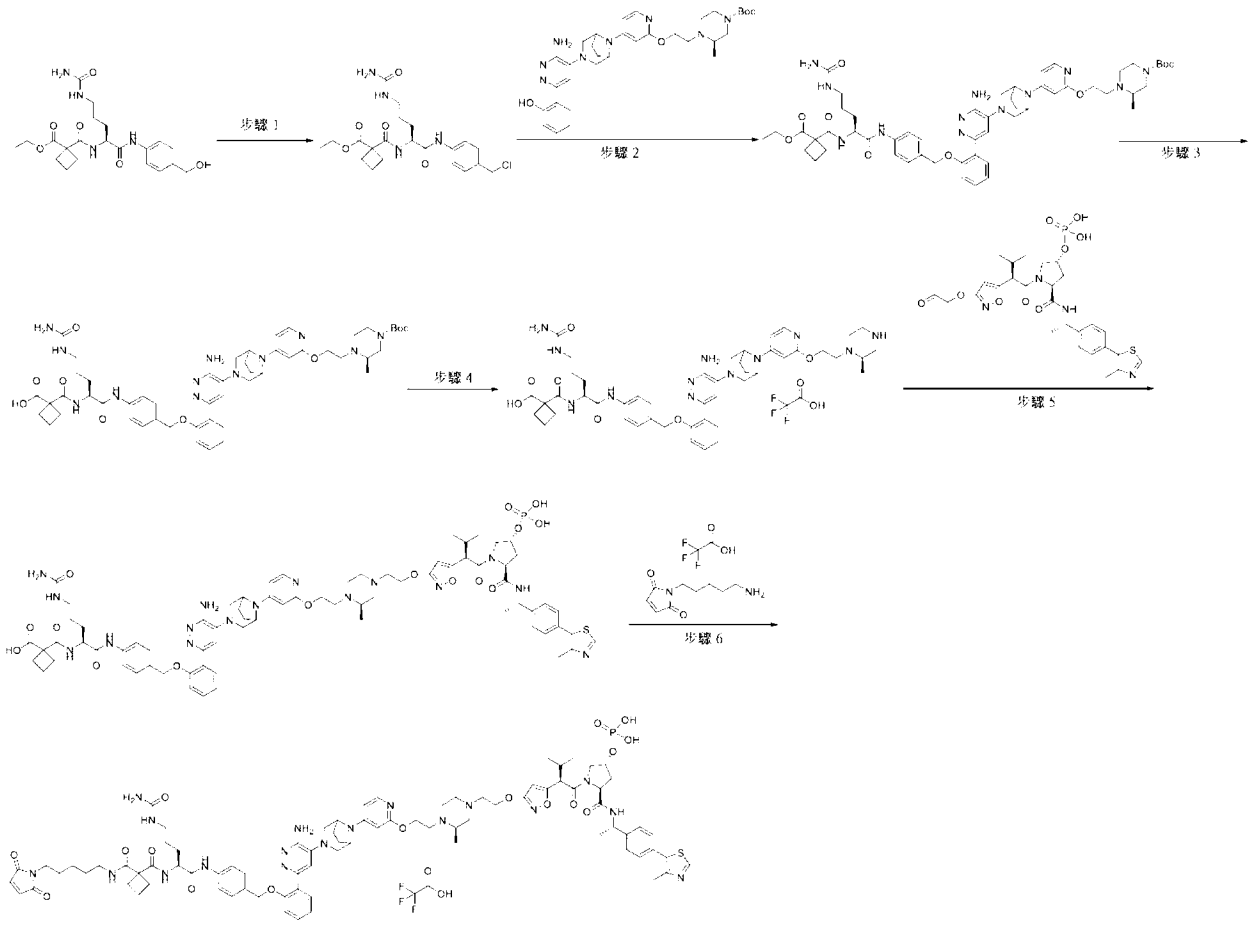
於室溫，向 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(3-((1-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-4-(膦醯氧基)吡咯啶-1-基)-3-甲基-1-側氧丁-2-基)異噁唑-3-基)氧基)乙基)哌啶-4-基)氧基)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環

[3.2.1]辛-3-基)嗒咿-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (60.0 mg，0.0410mmol)、1-(2-((2-胺基乙基)(甲基)胺基)乙基)-1*H*-吡咯-2,5-二酮 (2,2,2-三氟乙酸鹽) (10.5 mg，粗產物) 及 DIPEA (54.2 mg，0.420 mmol) 於 DMF (1 mL) 中之溶液加入 HATU (18.7 mg，0.0492 mmol)。將反應於室溫攪拌 10 分鐘。將粗產物藉由製備型 HPLC (管柱：Xselect CSH C18 OBD 管柱 30 × 150 mm 5 μm，n；流動相 A：水 (0.05% TFA)，流動相 B：ACN；流速：60 mL/min；梯度：B 於 12 分鐘內由 14% 增加至 23%，保持 23% B；波長：254/220 nm；R_{T1}(min)：11.75 min) 純化，以得到 20.3 mg (產率 30%) 白色固體狀 **L1Hy-PE-CIDE-1**。LC-MS：(ESI, m/z)：$[M+H]^+$ = 1643。^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 10.24 (s, 1H), 9.67 (s, 1H), 8.56 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.88 – 7.73 (m, 4H), 7.68 – 7.49 (m, 4H), 7.49 – 7.25 (m, 6H), 7.20-6.80 (m, 4H), 6.61 (s, 1H), 6.21-5.95 (m, 2H), 5.30-5.00 (m, 3H), 4.90 (t, J = 6.9 Hz, 1H), 4.76 (s, 1H), 4.52 – 4.27 (m, 7H), 3.76 – 3.67 (m, 6H), 3.55-3.40 (m, 9H), 3.30-3.20 (m, 5H), 3.15-2.95 (m, 5H), 2.81 (s, 3H), 2.73 (s, 6H), 2.45-2.30 (m, 9H), 2.01 – 1.54 (m, 15H), 1.49-1.20 (m, 5H), 0.94 (d, J = 6.4 Hz, 3H), 0.79 (d, J = 7.0 Hz, 3H)。

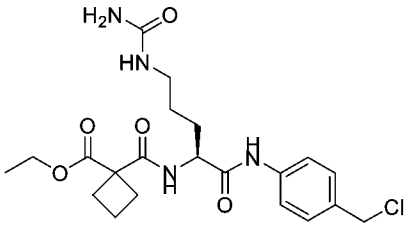
實例 2

L1-PE-CIDE-2 之合成

【0271】 **L1-PE-CIDE-2**：(3*R*,5*S*)-1-((2*R*)-2-(3-(2-((3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-((4-((*S*)-2-(1-((5-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)戊基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苄基)氧基)苯基)嗒咿-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌咿-1-基)乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-5-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啶-3-基二氫磷酸鹽 (2,2,2-三氟乙酸鹽)

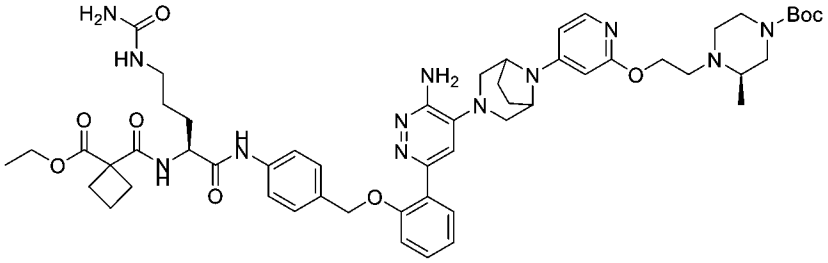


【0272】 步驟 1：(*S*)-1-((1-((4-(氯甲基)苯基)胺基)-1-側氧-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸乙酯



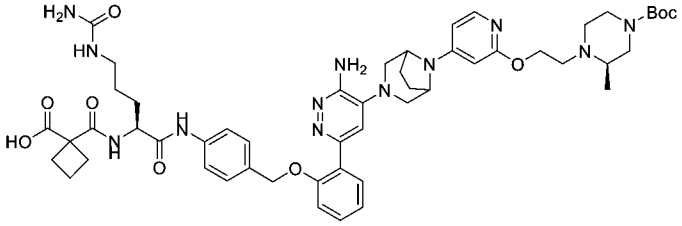
於 0°C 向 (*S*)-1-((1-((4-(羥基甲基)苯基)胺基)-1-側氧-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸乙酯 (1.00 g，2.30 mmol) 於 THF (10 mL) 中之溶液加入 $SOCl_2$ (0.830 g，6.97 mmol)。將反應於室溫攪拌 1 小時。於 0°C 加入 MeOH 以淬滅反應。蒸發溶劑，且粗產物藉由矽膠急速層析法 (溶劑梯度：0%-10% MeOH 於 DCM) 純化，以得到 910 mg 白色固體狀標題化合物。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 453。

【0273】 步驟 2：(3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-((4-((*S*)-2-(1-(乙氧基羰基)環丁烷-1-甲醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苄基)氧基)苯基)嗒吩-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌吩-1-甲酸三級丁酯



在氮氣下，於 0°C 向 (3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-羥基苯基)嗒吩-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌吩-1-甲酸三級丁酯 (1.15 g，1.86 mmol) 及 Cs_2CO_3 (1.22 g，3.74 mmol) 於 DMF (10 mL) 中之溶液加入 (*S*)-1-((1-((4-(氯甲基)苯基)胺基)-1-側氧-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸乙酯 (850 mg，1.87 mmol)。將反應於 0°C 攪拌 15 分鐘。加入 EtOAc 並用水洗滌。有機層經無水 Na_2SO_4 乾燥，並在真空下濃縮。粗產物藉由矽膠急速層析法 (梯度：0%-15% MeOH 於 DCM) 純化，以得到 690 mg 白色固體狀標題化合物。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1034。

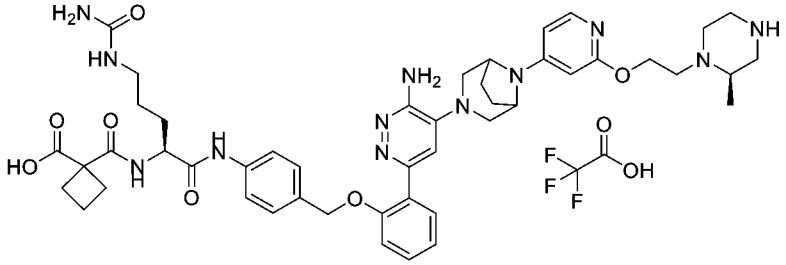
【0274】 步驟 3：1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(三級丁氧基羰基)-2-甲基哌吩-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒吩-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸



將 (3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-((4-((*S*)-2-(1-(乙氧基羰基)環丁烷-1-甲醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苄基)氧基)苯基)嗒吩-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌吩-1-甲酸三級丁酯 (690 mg，0.670 mmol) 及 $LiOH·H_2O$

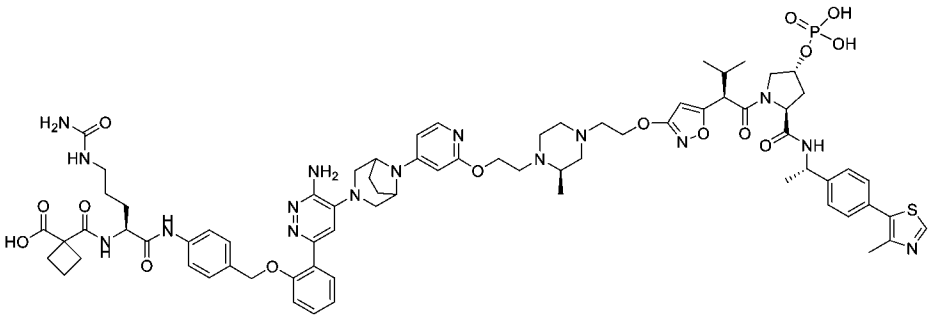
(84.2 mg，2.00 mmol) 於THF (10 mL) 及水 (10 mL) 中之溶液於室溫攪拌 1 小時。粗產物藉由預填充之 C18 管柱 (溶劑梯度：0%-100% MeOH 於水 (0.05% NH_4HCO_3)) 純化，以得到 600 mg 白色固體狀標題化合物。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1006。

【0275】 步驟 4：1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-2-甲基哌啡-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒啡-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (2,2,2-三氟乙酸鹽)



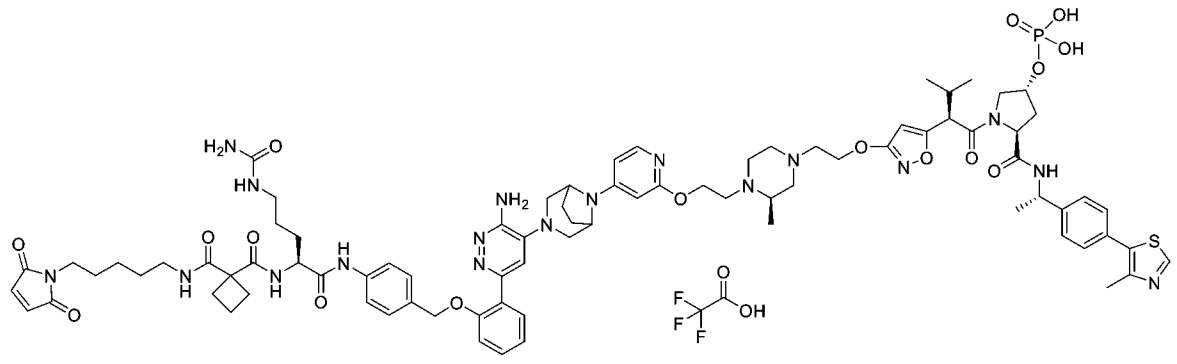
將 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-4-(三級丁氧基羰基)-2-甲基哌啡-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒啡-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (300 mg，0.300 mmol) 於 5% HFIP 中之 TFA (9 mL) 中之溶液於室溫攪拌 1 小時。將溶劑蒸發，且將粗產物直接用於下一步驟。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 906。

【0276】 步驟 5：1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-2-甲基-4-(2-((5-((*R*)-3-甲基-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)-4-(膦醯氧基)吡咯啶-1-基)-1-側氧丁-2-基)異噁唑-3-基)氧基)乙基)哌啡-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒啡-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸



將 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-2-甲基哌啡-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒啡-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (2,2,2-三氟乙酸鹽) (來自最後一步之粗產物)、(3*R*,5*S*)-1-((*R*)-3-甲基-2-(3-(2-側氧乙氧基)異噁唑-5-基)丁醯基)-5-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啶-3-基二氫磷酸鹽 (309 mg，0.498 mmol) 及 NaOAc (60.0 mg，0.731 mmol) 於 MeOH (10 mL) 中之溶液於室溫攪拌 1 小時。隨後加入 $NaBH_3CN$ (32.0 mg，0.510 mmol)，且於室溫攪拌 1 小時。將粗產物藉由預填充之 C18 管柱 (0%-100% MeOH 於水 (0.05% NH_4HCO_3)) 純化，以得到 324 mg 白色固體狀標題化合物。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1510。

【0277】 步驟 6：(3*R*,5*S*)-1-((2*R*)-2-(3-(2-((3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-((4-((*S*)-2-(1-((5-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)戊基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苄基)氧基)苯基)嗒啡-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌啡-1-基)乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-5-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啶-3-基二氫磷酸鹽 (2,2,2-三氟乙酸鹽)



將 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-2-甲基-4-(2-((5-((*R*)-3-甲基-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)-4-(膦醯氧基)吡咯啶-1-基)-1-側氧丁-2-基)異噁唑-3-基)氧基)乙基)-哌啡-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒啡-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧-5-脲基戊-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (324 mg, 0.210 mmol)、1-(5-胺基戊基)-1*H*-吡咯-2,5-二酮 (2,2,2-三氟乙酸鹽) (90.9 mg，粗產物)、HATU (106 mg，0.280 mmol) 及 DIPEA (277 mg，2.15 mmol) 於 DMF 中之溶液於室溫攪拌 15 分鐘。將粗產物藉由製備型 HPLC 以下列條件純化：管柱：Xselect CSH C18 OBD 管柱 30 × 150 mm，5 μm；流動相 A：水 (0.05% TFA)，流動相 B：ACN；流速：60 mL/min；梯度：10 分鐘內從 19% B 至 32% B，32% B；254/220 nm；R_T (分鐘)：10，以得到 173.7 mg 白色固體狀 **L1-PE-CIDE-2**。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1674。^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, *ppm*) δ 10.18 (s, 1H), 9.00 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 8.47 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.91 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 7.82 (q, J = 8.0, 6.7 Hz, 2H), 7.67 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.58 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.53 – 7.25 (m, 8H), 7.16 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 6.98 (s, 3H), 6.71 (s, 1H), 6.35 (s, 1H), 6.12 (s, 1H), 6.01 (s, 1H), 5.44 (s, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.92 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 4.83 – 4.70 (m, 2H), 4.58 (s, 2H), 4.47 (s, 2H), 4.45 – 4.30 (m, 3H), 3.78 – 3.67 (m, 11H), 3.40 – 3.35 (m, 4H), 3.25 – 3.17 (m, 3H), 3.13 – 3.05 (m, 5H), 3.00 – 2.92 (m, 2H), 2.85 – 2.75 (m, 1H), 2.50 – 2.28 (m, 9H), 2.10 – 1.85 (m, 4H), 1.79 – 1.70 (m, 3H), 1.69 (s, 1H), 1.53 – 1.30 (m, 9H), 1.27 – 1.10 (m, 5H), 0.98 (d, J = 6.5 Hz, 3H), 0.85 – 0.75 (m, 3H)。

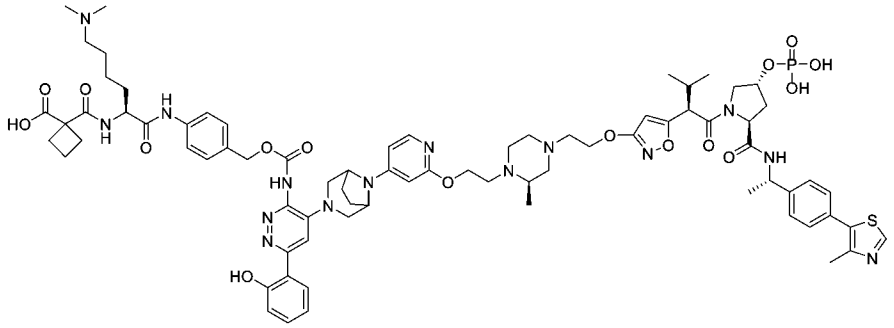
實例 3

L1-PE-CIDE-3 之合成

【0278】 **L1-PE-CIDE-3**：4-((*S*)-6-(二甲基胺基)-2-(1-((5-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)戊基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基(6-(2-羥基

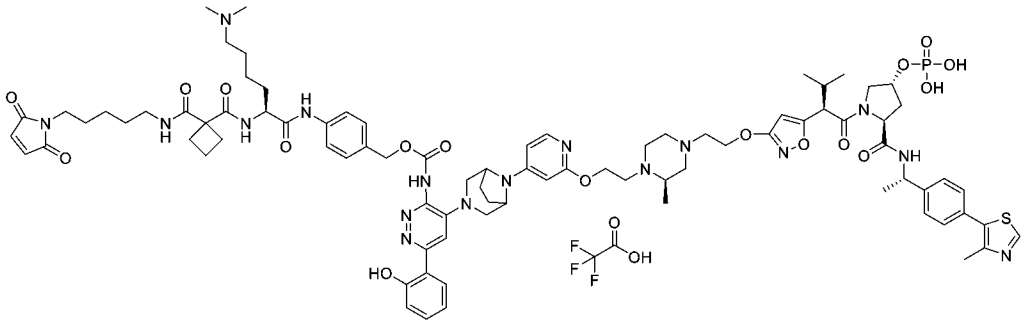
苯基)-4-(8-(2-(2-((*R*)-2-甲基-4-(2-((5-((*R*)-3-甲基-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)-4-(膦醯氧基)吡咯啶-1-基)-1-側氧丁-2-基)異噁唑-3-基)氧基)乙基)哌啡-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒啡-3-基)胺甲酸鹽 (2,2,2-三氟乙酸鹽)

【0279】 步驟 1：1-(((2*S*)-6-(二甲基胺基)-1-((4-((((6-(2-羥基苯基)-4-(8-(2-(2-((*R*)-2-甲基-4-(2-((5-((*R*)-3-甲基-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)-4-(膦醯氧基)吡咯啶-1-基)-1-側氧丁-2-基)異噁唑-3-基)氧基)乙基)哌啡-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒啡-3-基)胺甲醯基)氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧己-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸



在氮氣下，將 1-(((2*S*)-6-(二甲基胺基)-1-((4-((((6-(2-羥基苯基)-4-(8-(2-(2-((*R*)-2-甲基哌啡-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒啡-3-基)胺甲醯基)氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧己-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (50.0 mg，0.0527 mmol)、與實施例 3a 中所述相同之 INT、(3*R*,5*S*)-1-((*R*)-3-甲基-2-(3-(2-側氧乙氧基)異噁唑-5-基)丁醯基)-5-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啶-3-基二氫磷酸鹽 (26.0 mg，0.0419 mmol)、HOAc (9.5 mg，0.157 mmol) 於 MeOH (3 mL) 及 DCM (1 ml) 中之溶液於 30°C 攪拌 1 小時。隨後加入 $NaBH_3CN$ (6.6 mg，0.105 mmol) 並於 30°C 攪拌 0.5 小時。將反應溶液於真空濃縮。將殘餘物藉由預填充之 C18 柱（溶劑梯度：0%-100% CH_3OH 於水 (0.05% NH_4HCO_3)) 純化，以得到 23.0 mg 白色固體狀標題化合物。LCMS (ESI) $[M+H]^+$= 1553。

【0280】 步驟 2：4-((*S*)-6-(二甲基胺基)-2-(1-((5-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)戊基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基(6-(2-羥基苯基)-4-(8-(2-(2-((*R*)-2-甲基-4-(2-((5-((*R*)-3-甲基-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)-4-(膦醯氧基)吡咯啶-1-基)-1-側氧丁-2-基)異噁唑-3-基)氧基)乙基)哌啉-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒啉-3-基)胺甲酸鹽 (2,2,2-三氟乙酸鹽)

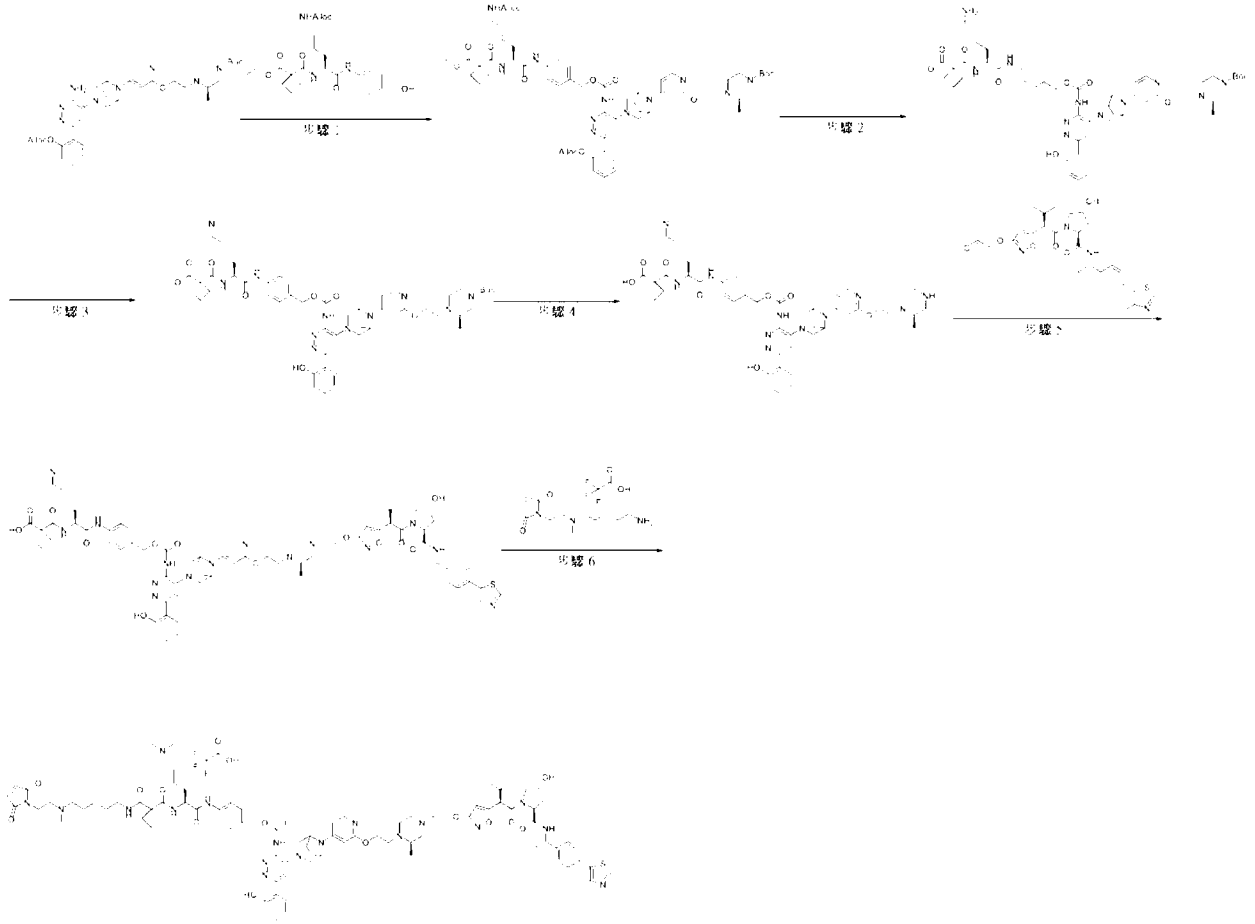


【0281】 將 1-(((2*S*)-6-(二甲基胺基)-1-((4-((((6-(2-羥基苯基)-4-(8-(2-(2-((*R*)-2-甲基-4-(2-((5-((*R*)-3-甲基-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)-4-(膦醯氧基)吡咯啶-1-基)-1-側氧丁-2-基)異噁唑-3-基)氧基)乙基)-哌啉-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒啉-3-基)胺甲醯基)氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧己-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (23.0 mg，0.0148 mmol)、1-(5-胺基戊基)-1*H*-吡咯-2,5-二酮 (2,2,2-三氟乙酸鹽) (5.5 mg，粗產物)、HATU (7.3 mg，0.0192 mmol) 及 DIPEA (19.8 mg，0.153 mmol) 於 DMF (1 mL) 中之溶液於室溫攪拌 10 分鐘。將粗產物藉由製備型 HPLC 以下列條件純化：管柱：Xselect CSH C18 OBD 管柱 30 × 150 mm，5 μm；流動相 A：水 (0.05% TFA)，流動相 B：ACN；流速：60 mL/min；梯度：於 12 分鐘內由 18% B 至 30% B，30% B；波長：254/220 nm；R_T (min)：11，以得到 8.7 mg 白色固體狀 **L1-PE-CIDE-3**。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1717。^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$, *ppm*) δ 10.15 (s, 1H), 10.07(s, 1H), 9.37 (br, 1 H), 8.95 (s, 1H), 8.48 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 8.00-7.80 (m, 4H), 7.66 – 7.57 (m, 3H), 7.49 – 7.28 (m, 6H), 7.02 –

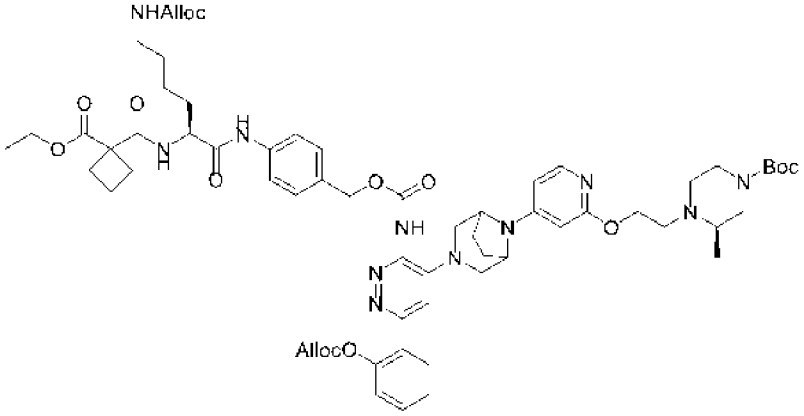
6.89 (m, 4H), 6.78 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 6.44 (s, 1H), 6.10 (s, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.89 (t, J = 6.9 Hz, 1H), 4.80(s, 1H), 4.73 (s, 2H), 4.50-4.30 (m, 6H), 3.85 – 3.63 (m, 9H), 3.52-3.45 (m, 3H), 3.35 (t, J = 7.0 Hz, 3H), 3.20 – 2.98 (m, 8H), 2.90 – 2.70 (m, 8H), 2.48 – 2.34 (m, 9H), 1.93 (s, 4H), 1.83 – 1.55 (m, 6H), 1.49 – 1.32 (m, 8H), 1.28-1.13 (m, 6H), 0.94 (d, J = 6.4 Hz, 3H), 0.85 – 0.74 (m, 3H)。

實例 3a

【0282】 4-((*S*)-6-(二甲基胺基)-2-(1-((5-((2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)乙基)(甲基)胺基)戊基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基(4-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-羥基-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啶-1-基)-3-甲基-1-側氧丁-2-基)異喹唑-3-基)氧基)乙基)-2-甲基哌啉-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)-6-(2-羥基苯基)嗒啉-3-基)胺甲酸鹽 (2,2,2-三氟乙酸鹽)

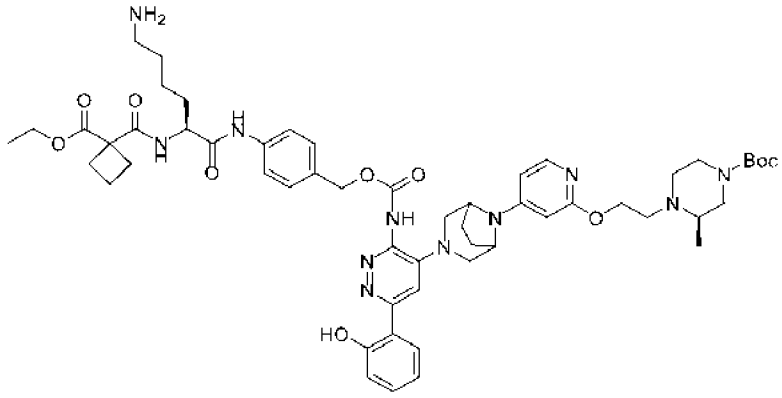


【0283】 步驟 1：(3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-((((4-((*S*)-6-(((烯丙基氧基)羰基)胺基)-2-(1-(乙氧基羰基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基)氧基)羰基)胺基)-6-(2-(((烯丙基氧基)羰基)氧基)苯基)嗒吩-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌啡-1-甲酸三級丁酯



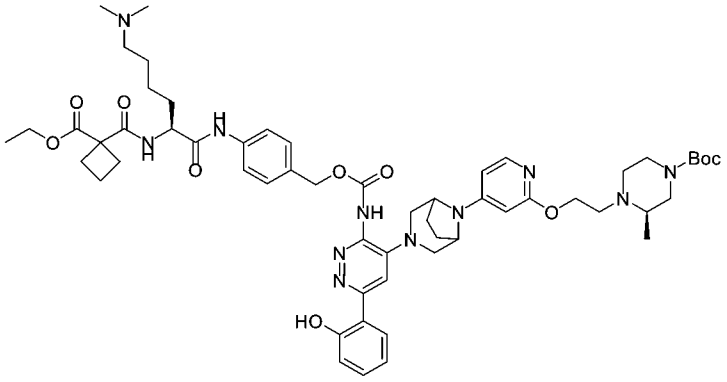
在氮氣下，於 0°C 向 (3*R*)-4-(2-((4-(3-(6-(2-(((烯丙基氧基)羰基)氧基)苯基)-3-胺基嗒吩-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌啡-1-甲酸三級丁酯 (500 mg，0.714 mmol)、(*S*)-1-((6-(((烯丙基氧基)羰基)胺基)-1-((4-(羥基甲基)苯基)胺基)-1-側氧己-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸乙酯 (1.05 g，2.15 mmol) 及 DIPEA (554 mg，4.29 mmol) 於 DCM (15 mL) 中之溶液加入 DCM (1 mL) 中之三光氣 (109 mg，0.367 mmol) 之溶液。將反應於室溫攪拌 2 小時。將溶劑於真空濃縮。將殘餘物藉由預填充之 C18 柱（溶劑梯度：0%-100% CH_3CN 於水 (0.05% NH_4HCO_3)) 純化，以得到 480 mg (產率 55%) 白色固體狀標題化合物。LC-MS：(ESI, m/z)：$[M+H]^+$ = 1216。

【0284】 步驟 2：(3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-((((4-((*S*)-6-胺基-2-(1-(乙氧基羰基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基)氧基)羰基)胺基)-6-(2-羥基苯基)嗒吩-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌啡-1-甲酸三級丁酯



在氮氣下，於室溫向 (3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-((((4-((*S*)-6-(((烯丙基氧基)羰基)胺基)-2-(1-(乙氧基羰基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基)氧基)羰基)胺基)-6-(2-(((烯丙基氧基)羰基)氧基)苯基)嗒吩-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌啡-1-甲酸三級丁酯 (400 mg，0.329 mmol)、吡咯啶 (234 mg，3.29 mmol) 於 DCM (5 mL) 中之溶液加入 $Pd(PPh_3)_4$ (76.0 mg，0.0658 mmol)。將反應於室溫攪拌 1 小時。將反應混合物用 DCM (100 mL) 稀釋並用水洗滌。有機層經無水硫酸鈉乾燥，並於真空濃縮，以得到 390 mg (粗製) 黃色固體狀標題化合物。LC-MS：(ESI, m/z)：$[M+H]^+$ = 1048。

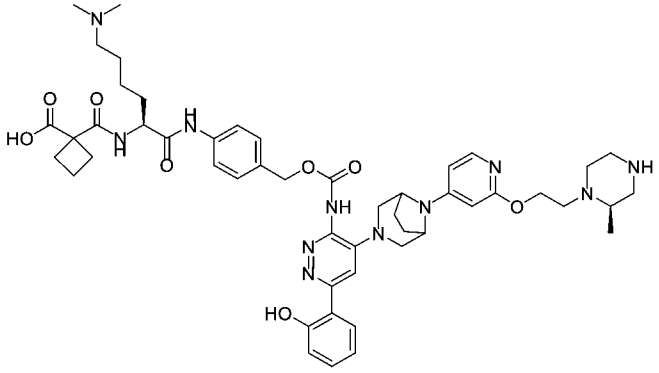
【0285】 步驟 3：(3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-((((4-((*S*)-6-(二甲基胺基)-2-(1-(乙氧基羰基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基)氧基)羰基)胺基)-6-(2-羥基苯基)嗒吩-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌啡-1-甲酸三級丁酯



將 (3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-((((4-((*S*)-6-胺基-2-(1-(乙氧基羰基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基)氧基)羰基)胺基)-6-(2-羥基苯基)嗒吩-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛

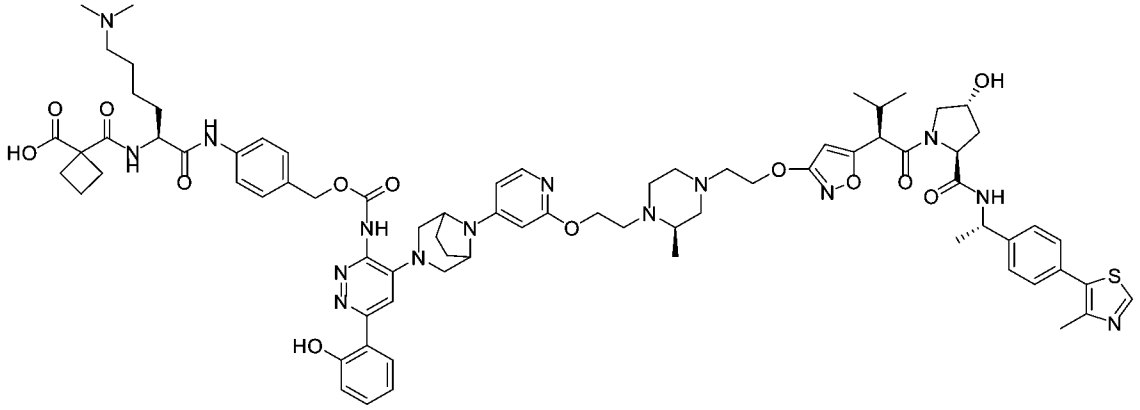
-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌啡-1-甲酸三級丁酯 (465 mg，0.440 mmol) 及 37% 水性 CH_2O (465 mg，5.73 mmol) 於 CH_3OH (5 mL) 中之溶液於室溫攪拌 1 小時。隨後加入 $NaBH_3CN$ (140 mg，2.22 mmol)，且於室溫攪拌 1 小時。反應藉由水 (0.2 mL) 淬滅。將殘餘物藉由預填充之 C18 柱（溶劑梯度：0%-100% MeOH 於水 (0.05% NH_4HCO_3)) 純化，以得到 260 mg (產率 54%) 白色固體狀標題化合物。LC-MS：(ESI, *m/z*)：$[M]^+$= 1077。

【0286】 步驟 4：1-(((2*S*)-6-(二甲基胺基)-1-((4-((((6-(2-羥基苯基)-4-(8-(2-(2-((*R*)-2-甲基哌啡-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒啡-3-基)胺甲醯基)氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧己-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸



將 (3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-((((4-((*S*)-6-(二甲基胺基)-2-(1-(乙氧基羰基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基)氧基)羰基)胺基)-6-(2-羥基苯基)嗒啡-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌啡-1-甲酸三級丁酯 (75.0 mg，0.0697 mmol) 及 $LiOH·H_2O$ (8.4 mg，0.210 mmol) 於 THF (5 mL) 及水 (5 mL) 中之溶液於室溫下攪拌 1 小時。將溶劑於真空濃縮。隨後加入含 5% TFA 之 HFIP (3 mL)，並將溶液於室溫攪拌 1 小時。將溶劑於真空濃縮。將殘餘物藉由預填充之 C18 柱（溶劑梯度：0%-100% MeOH 於水 (0.05% NH_4HCO_3)) 純化，以得到 55.0 mg (產率 83%) 白色固體狀標題化合物。LC-MS：(ESI, *m/z*)：$[M]^+$= 949。

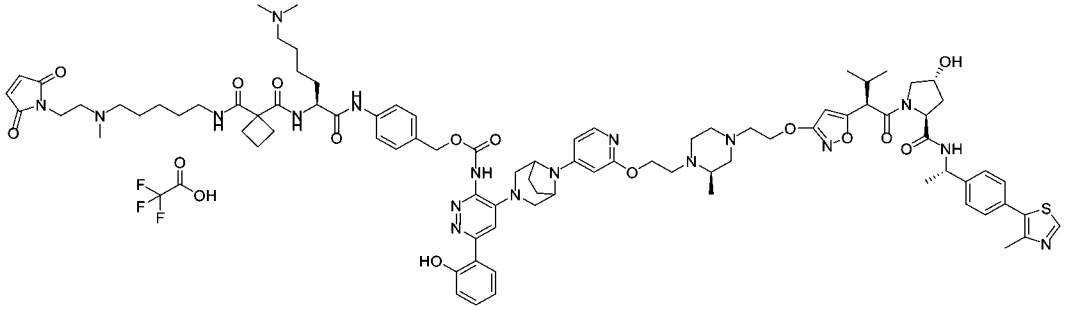
【0287】 步驟 5：1-(((2*S*)-6-(二甲基胺基)-1-((4-((((4-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-羥基-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啶-1-基)-3-甲基-1-側氧丁-2-基)異噁唑-3-基)氧基)乙基)-2-甲基哌啡-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)-6-(2-羥基苯基)嗒啡-3-基)胺甲醯基)氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧己-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸



在氮氣下，將 1-(((2*S*)-6-(二甲基胺基)-1-((4-((((6-(2-羥基苯基)-4-(8-(2-(2-((*R*)-2-甲基哌啡-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒啡-3-基)胺甲醯基)氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧己-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (20.0 g，0.0211 mmol)、(2*S*,4*R*)-4-羥基-1-((*R*)-3-甲基-2-(3-(2-側氧乙氧基)異噁唑-5-基)丁醯基)-*N*-((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)吡咯啶-2-甲醯胺 (19.4 mg，0.0359 mmol) 及 NaOAc (4.0 mg，0.0488 mmol) 於甲醇 (1.5 mL) 中之溶液於室溫攪拌 1 小時。隨後加入 $NaBH_3CN$ (5.2 mg，0.0827 mol) 並於室溫攪拌 3 小時。將反應溶液於真空濃縮。將殘餘物藉由預填充之 C18 柱（溶劑梯度：0%-100% CH_3OH 於水 (0.05% NH_4HCO_3)) 純化，以得到 18 mg (產率 58%) 白色固體狀標題化合物。LC-MS：(ESI, m/z)：$[M+H]^+$ = 1473。

【0288】 步驟 6：4-((*S*)-6-(二甲基胺基)-2-(1-((5-((2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)乙基)(甲基)胺基)戊基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基(4-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-羥基-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯

基)乙基)胺甲醯基)吡咯啶-1-基)-3-甲基-1-側氧丁-2-基)異噁唑-3-基)氧基)乙基)-2-甲基哌啡-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)-6-(2-羥基苯基)嗒啡-3-基)胺甲酸鹽 (2,2,2-三氟乙酸鹽)



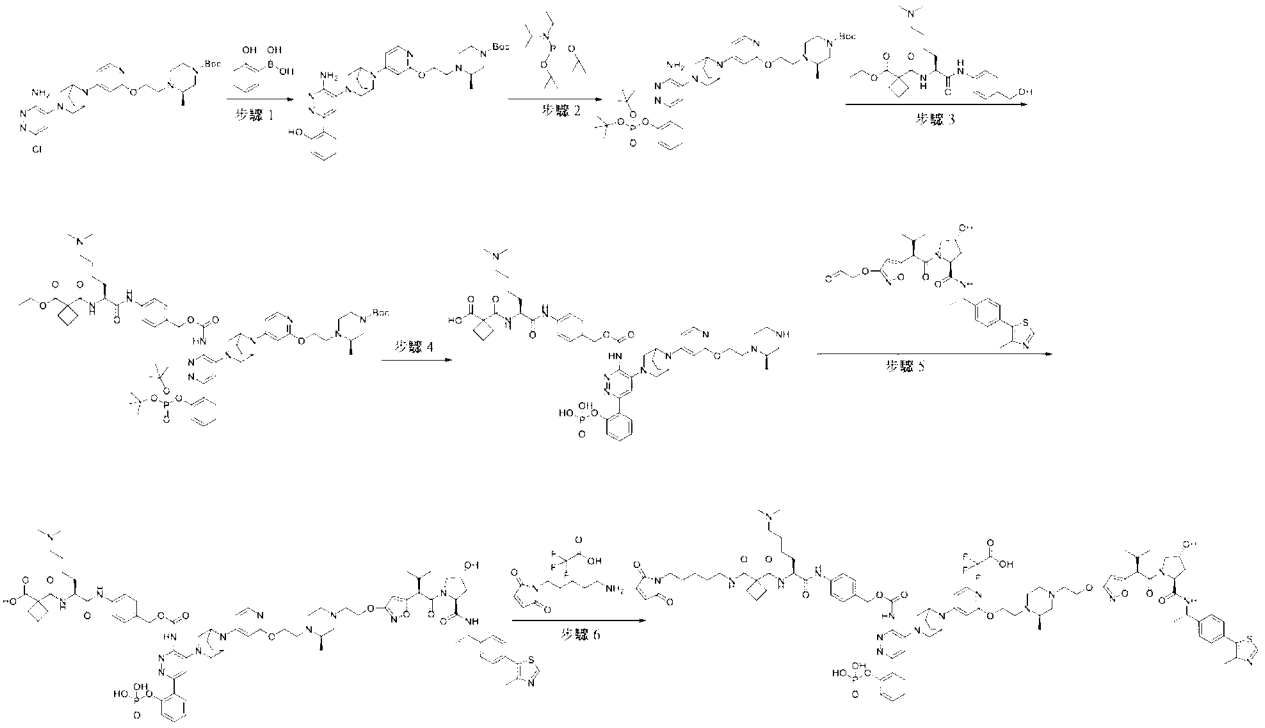
於室溫，向 1-(((2*S*)-6-(二甲基胺基)-1-((4-((((4-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-羥基-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啶-1-基)-3-甲基-1-側氧丁-2-基)異噁唑-3-基)氧基)乙基)-2-甲基哌啡-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)-6-(2-羥基苯基)嗒啡-3-基)胺甲醯基)氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧己-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (40.0 mg，0.0272 mmol)、1-(2-((5-胺基戊基)(甲基)胺基)乙基)-1*H*-吡咯-2,5-二酮 (2,2,2-三氟乙酸鹽) (9.70 mg，粗產物) 及 DIPEA (35.1 mg，0.272 mmol) 於 DMF (1 mL) 中之溶液加入 HATU (13.5 mg，0.0355 mmol)。將反應於室溫下攪拌 10 分鐘。將粗產物藉由製備型 HPLC 以下列條件純化：管柱：XSelect CSH Fluoro Phenyl，30 × 150 mm，5 μm；流動相 A：水 (0.05% TFA)，流動相 B：ACN；流速：60 mL/min；梯度：10 分鐘內 15% B 至 20% B；波長：254/220 nm；R_T (min)：10.5，以得到 13.0 mg (產率 28.3%) 黃色固體狀標靶化合物。LC-MS：(ESI, m/z)：$[M+H]^+$ = 1808。^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, *ppm*) δ 10.09 (s, 1H), 9.97 (s, 1H), 9.50 (s, 2H), 8.88 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 8.30 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 8.00 – 7.80 (m, 4H), 7.58 – 7.50 (m, 3H), 7.39 – 7.16 (m, 7H), 6.96 (s, 2H), 6.84 (ddd, *J* = 11.0, 7.0, 2.3 Hz, 2H), 6.65 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 6.29 (s, 1H), 6.00 (s, 1H), 5.01 (s, 2H), 4.95 – 4.80 (m, 1H), 4.59 (s, 2H), 4.37 (s, 2H), 4.35 – 4.21 (m, 4H), 4.21 – 4.15 (m,

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

實例 4

L1-PP-CIDE-1 之合成

【0289】 **L1-PP-CIDE-1**：6-(8-氯-4-(2-(二甲基胺基)乙基)-2-((四氫-1*H*-吡咯啉-7a(5*H*)-基)甲氧基)-5,6-二氫-4*H*-[1,4]氧氮呼基[5,6,7-de]喹唑啉-9-基)-4-甲基-5-(三氟甲基)吡啶-2-胺 (2,2,2-三氟乙酸鹽)

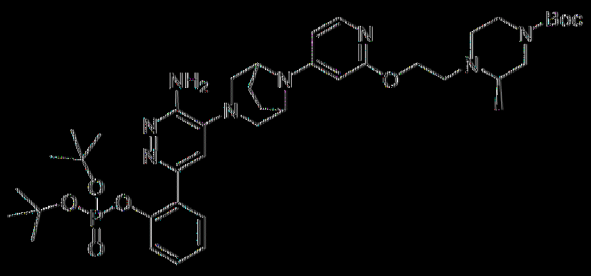


【0290】 步驟 1：(3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-羥基苯基)嗒啉-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌啉-1-甲酸三級丁酯



在氮氣下，將 (3*R*) 4 (2 ((4 (3 (3 胺基 6 氯吡啶 4 基) 3,8 二氮雜 二環[3.2.1]辛 8 基)吡啶 2 基)氧基)乙基) 3 甲基哌啶 1 甲酸 三級」酯 (3.00 g，5.37 mmol，由 Genentech 提供)、2 羥基苯基硼酸 (0.890 g，6.46 mmol)、$Pd(PPh_3)_4$ (1.24 g，1.08 mmol) 及 K_2CO_3 (2.23 g，16.1 mmol) 於 二㗁烷 (37.5 mL) 及 H_2O (7.5 mL) 中之溶液於 100°C 攪拌 1 小時。將反應用水稀釋，並用 DCM 萃取。將合併之有機物經無水 Na_2SO_4 乾燥並於減壓濃縮。將所獲得之粗產物藉由矽膠急速層析法 (梯度：0% 10% MeOH/DCM) 純化，以得到 2.26 g (產率 68%) 黃色固體狀標題化合物。LCMS (ESI, m/z)：$[M+H]^+$ = 617。

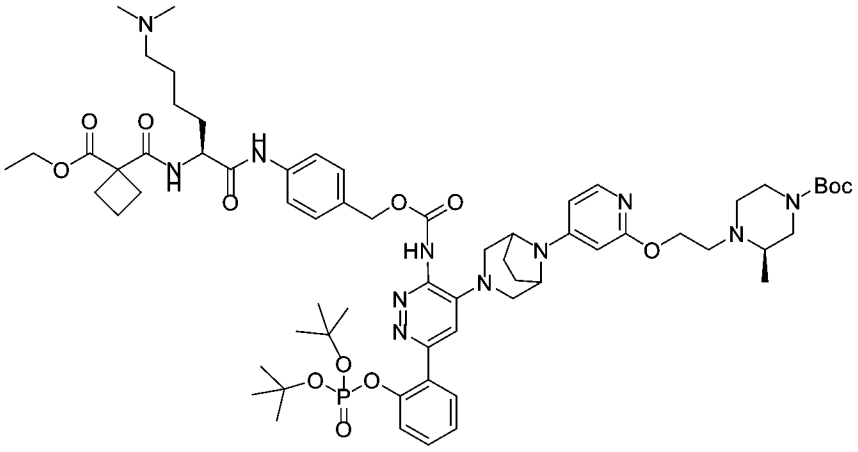
[0291] 步驟 2：(3*R*) 4 (2 ((4 (3 (3 胺基 6 (2 ((二 三級」氧基磷醯基)氧基)苯基)吡啶 4 基) 3,8 二氮雜 二環[3.2.1]辛 8 基)吡啶 2 基)氧基)乙基) 3 甲基哌啶 1 甲酸 三級」酯



在氮氣下，於 0°C 向 (3*R*) 4 (2 ((4 (3 (3 胺基 6 (2 羥基苯基)吡啶 4 基) 3,8 二氮雜 二環[3.2.1]辛 8 基)吡啶 2 基)氧基)乙基) 3 甲基哌啶 1 甲酸 三級」酯 (500 mg，0.811 mmol) 及 1*H*-四唑 (5.4 mL，ACN 中 0.45 M) 於 THF (10 mL) 中之溶液滴加 二異丙基亞磷醯胺 三級」酯 (1.35 g，4.86 mmol)。將反應於 0°C 攪拌 1 小時。隨後於 -30°C 加入 tBuOOH (癸烷中 5M) (0.64 mL，3.20 mmol) 並於 -30°C 攪拌 30 分鐘。隨後將混合物於室溫攪拌過夜。將反應混合物倒入

$NaHSO_3$ 水溶液中，並用 EtOAc 萃取。將合併之有機層用鹽水洗滌，經無水 Na_2SO_4 乾燥，並於減壓濃縮。將所獲得之粗產物藉由預填充之 C18 柱 (溶劑梯度：0%-100% ACN 於水 (0.05% NH_4HCO_3)) 純化，以得到 140 mg (產率 21%) 黃色油狀標題化合物。LCMS (ESI, m/z)：$[M+H]^+$ = 809。

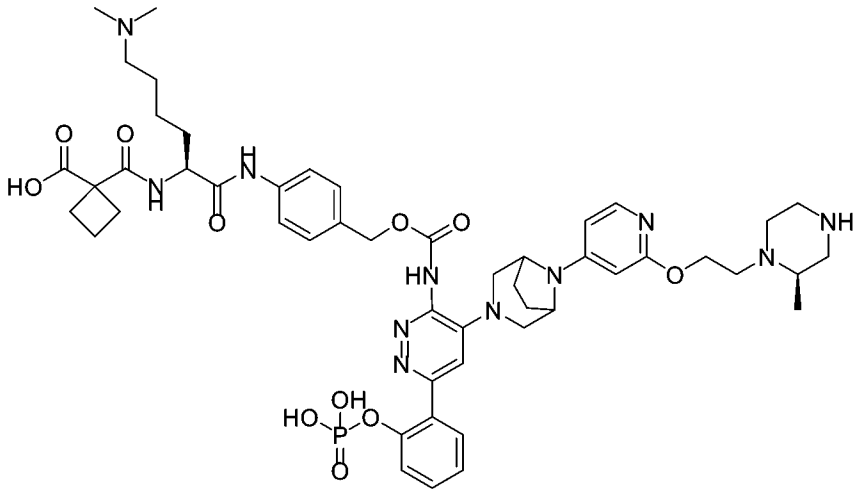
【0292】 步驟 3：(3*R*)-4-(2-((4-(3-(6-(2-((二三級丁氧基膦醯基)氧基)苯基)-3((((4-((*S*)-6-(二甲基胺基)-2-(1-(乙氧基羰基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基)氧基)羰基)胺基)嗒吩-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌吩-1-甲酸三級丁酯



在氮氣下，於 0°C 向 (3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-((二三級丁氧基磷醯基)氧基)苯基)嗒吩- 4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌吩-1-甲酸三級丁酯 (120 mg，0.148 mmol)、(*S*)-1-((6-(二甲基胺基)-1-((4-(羥基甲基)苯基)胺基)-1-側氧己-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸乙酯 (225 mg，0.518 mmol) 及 DIPEA (303 mg，2.34 mmol) 於 THF (5 mL) 中之溶液加入三光氣 (79.8 mg，0.269 mmol)。將反應於室溫攪拌 30 分鐘。隨後將反應混合物藉由預填充之 C18 管柱 (溶劑梯度：0%-100% MeOH 於水 (0.05% NH_4HCO_3)) 純化，以得到 35 mg 黃色固體狀標題化合物。LCMS (ESI, m/z)：$[M+H]^+$ = 1269。

【0293】 步驟 4：1-(((2*S*)-6-(二甲基胺基)-1-((4-((((4-(8-(2-(2-((*R*)-2-甲基哌吩-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)-6-(2-(膦醯氧基)苯

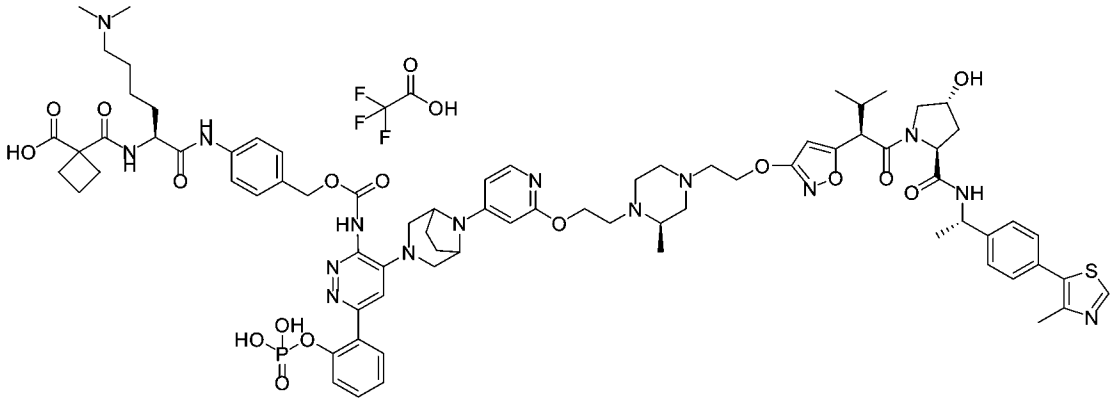
基)嗒咿-3-基)胺甲醯基)氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧己-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸



在氮氣下，於室溫向 (3*R*)-4-(2-((4-(3-(6-(2-((二三級丁氧基磷醯基)氧基)苯基)-3-((((4-((*S*)-6-(二甲基胺基)-2-(1-(乙氧基羰基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基)氧基)羰基)胺基)嗒咿-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌咿-1-甲酸三級丁酯 (35.0 mg，0.0280 mmol) 於 THF (0.3 mL) 中之溶液加入 $LiOH.H_2O$ (3.5 mg，0.0850 mmol) 於 H_2O (0.3 mL) 中之溶液。將反應於室溫攪拌 1 小時。將所得混合物於真空濃縮。隨後加入經濃縮 HCl (0.33 mL) 於 H_2O (0.67 mL) 之溶液，並於室溫攪拌 10 分鐘。將所得混合物於 0°C 用飽和 $NaHCO_3$ 溶液鹼化至 pH = 8，並藉由預填充之 C18 管柱 (溶劑梯度：0%-100% MeOH 於水 (0.05% NH_4HCO_3)) 純化，以得到 13 mg 白色固體狀標題化合物。LCMS (ESI, m/z)：$[M+H]^+$ = 1029。

【0294】 步驟 5：1-(((2*S*)-6-(二甲基胺基)-1-((4-((((4-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-羥基-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啶-1-基)-3-甲基-1-側氧丁-2-基)異噁唑-3-基)氧基)乙基)-2-甲基哌咿-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)-6-(2-(膦醯氧基)苯基)嗒咿-3-基)胺甲醯

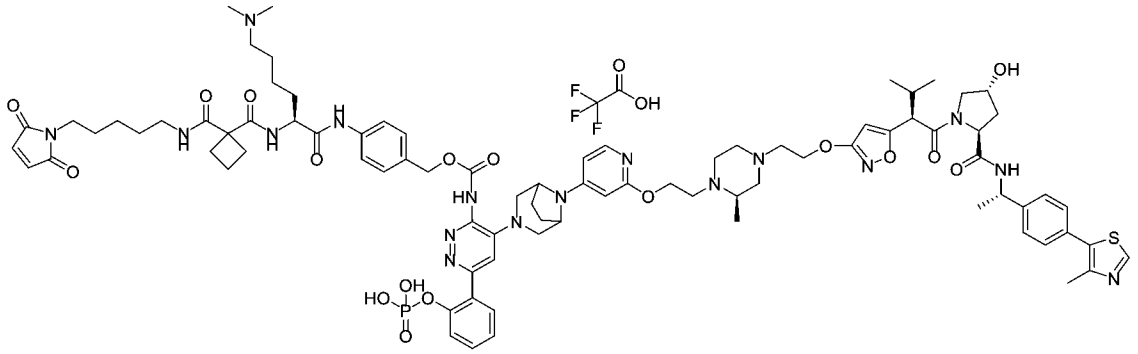
基)氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧己-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (2,2,2-三氟乙酸鹽)



在氮氣下，將 1-(((2*S*)-6-(二甲基胺基)-1-((4-((((4-(8-(2-(2-((*R*)-2-甲基哌啉-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)-6-(2-(膦醯氧基)苯基)嗒啉-3-基)胺甲醯基)氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧己-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (18.0 mg，0.0180 mmol)、(2*S*,4*R*)-4-羥基-1-((*R*)-3-甲基-2-(3-(2-側氧乙氧基)異噁唑-5-基)丁醯基)-*N*-((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)吡咯烷-2-甲醯胺 (9.5 mg，0.0180 mmol) 及 HOAc (2.1 mg，0.0360 mmol) 於 DCM (0.75 mL) 及 MeOH (0.25 mL) 中之溶液於室溫攪拌 1 小時。隨後加入 $NaBH_3CN$ (1.7 mg，0.0260 mmol) 且於室溫攪拌 0.5 小時。將粗產物藉由製備型 HPLC 以下列條件純化：管柱：Xselect CSH C18 OBD 管柱 30 × 150 mm 5 μm，n；流動相 A：水 (0.05% TFA)，流動相 B：ACN；流速：60 mL/min；梯度：B 於 12 分鐘內由 11% 增加至 23%，保持 23% B；波長：254/220 nm；R_T (min)：12，以得到 6 mg 白色固體狀標題化合物。LCMS (ESI, m/z)：$[M+H]^+$ = 1553。

【0295】 步驟 6：4-((*S*)-6-(二甲基胺基)-2-(1-((5-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)戊基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基(4-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-羥基-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啶-1-基)-3-甲基-1-側氧丁-2-基)異噁唑-3-基)氧基)乙基)-2-甲基哌啉-1-基)乙

氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)-6-(2-(膦醯氧基)苯基)嗒咿-3-基)胺甲酸鹽 (2,2,2-三氟乙酸鹽)



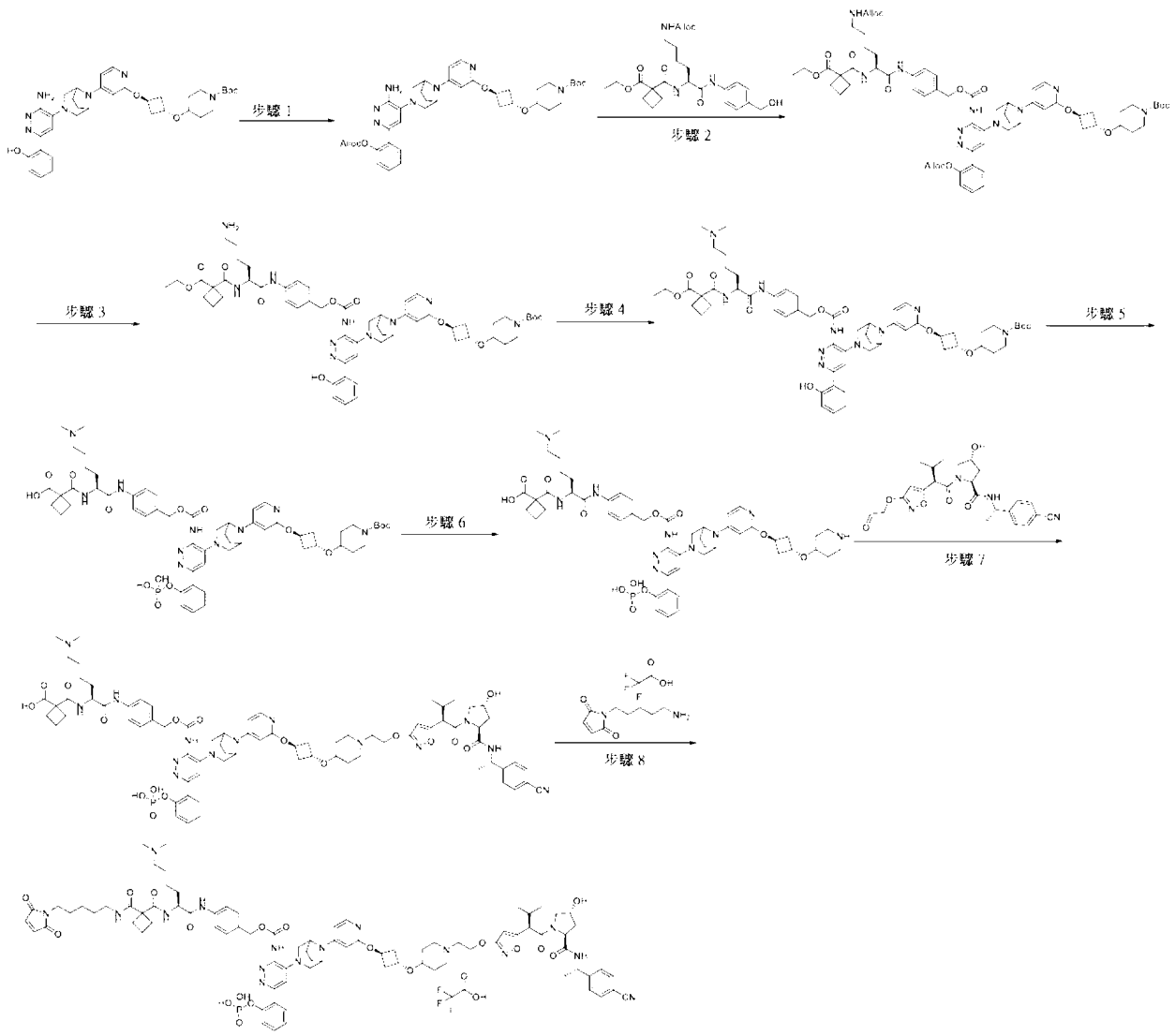
在氮氣下，於室溫向 1-(((2*S*)-6-(二甲基胺基)-1-((4-((((4-(8-(2-(2-((*R*)-4-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-4-羥基-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啶-1-基)-3-甲基-1-側氧丁-2-基)異噁唑-3-基)氧基)乙基)-2-甲基哌咿-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)-6-(2-(膦醯氧基)苯基)嗒咿-3-基)胺甲醯基)氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧己-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (2,2,2-三氟乙酸鹽) (6.0 mg，0.00400 mmol)、1-(5-胺基戊基)吡咯-2,5-二酮 (2,2,2-三氟乙酸鹽) (0.9 mg，粗產物) 及 DIPEA (5.0 mg，0.0400 mmol) 於 DMF (0.8 mL) 中之溶液加入 HATU (1.9 mg，0.00500 mmol)。將反應於室溫攪拌 10 分鐘。將所得混合物藉由製備型 HPLC 以下列條件純化：管柱：XBridge Prep C18 OBD 管柱，30 × 100 mm，5 μm；流動相 A：水 (0.05% TFA)，流動相 B：ACN；流速：60 mL/min；梯度：B 於 11 分鐘內由 15% 增加至 33%，保持 33% B；波長：254/220 nm；R_T (min)：11，以得到 2.7 mg 白色固體狀 **L1-PP-CIDE-1**。LCMS (ESI, m/z)：$[M+H]^+$ = 1717。^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, *ppm*) δ 10.14 (d, *J* = 11.3 Hz, 2H), 8.97 (s, 1H), 8.40 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 8.00 – 7.85 (m, 2H), 7.82 – 7.75 (s, 1H), 7.70 – 7.60 (m, 3H), 7.60 – 7.57 (m, 1 H), 7.57 – 7.42 (m, 6H), 7.35 – 7.30 (m, 1H), 6.93 (s, 2H), 6.66 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 6.31 (s, 1H), 6.10 (s, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.94 – 4.83 (m, 1H), 4.58 (s, 2H), 4.46 (s, 2H), 4.43 – 4.32 (m, 4H), 4.30 –

4.25 (m, 2H), 3.70 – 3.59 (m, 6H), 3.50 – 3.40 (m, 3H), 3.40 – 3.30 (m, 4H), 3.31 – 2.92 (m, 12H), 2.79 – 2.65 (m, 6H), 2.50 – 2.35 (m, 7H), 2.37 – 2.05 (m, 1H), 2.10 – 2.00 (m, 1H), 1.90 (s, 3H), 1.86 – 1.56 (m, 6H), 1.50 – 1.40 (m, 4H), 1.35 (d, *J* = 7.0 Hz, 4H), 1.25 – 1.14 (m, 6H), 1.05 – 0.90 (m, 3H), 0.90 – 0.75 (m, 3H)。

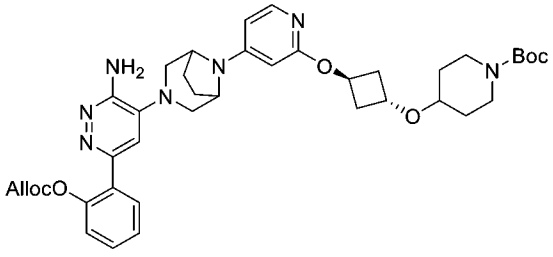
實例 5

L1-PP-CIDE-2 之合成

【0296】 **L1-PP-CIDE-2**：4-((*S*)-6-(二甲基胺基)-2-(1-((5-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)戊基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基(4-(8-(2-((1*R*,3*r*)-3-((1-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-4-羥基吡咯啶-1-基)-3-甲基-1-側氧丁-2-基)異喹唑-3-基)氧基)乙基)哌啶-4-基)氧基)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)-6-(2-(膦醯氧基)苯基)嗒啡-3-基)胺甲酸鹽 (2,2,2-三氟乙酸鹽)



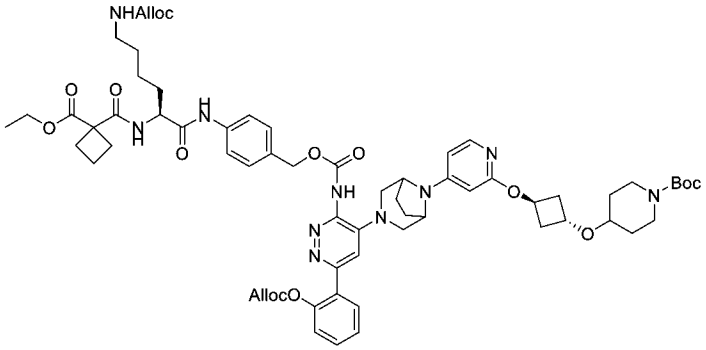
【0297】步驟 1：4-((1*r*,3*r*)-3-((4-(3-(6-(2-(((烯丙基氧基)羰基)氧基)苯基)-3-胺基嗒吡-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)環丁氧基)哌啶-1-甲酸三級丁酯



在氮氣下，於 0°C 向 4-((1*r*,3*r*)-3-((4-(3-(3-胺基-6-(2-羥基苯基)嗒吡-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)環丁氧基)吡啶-1-甲酸三級丁酯 (535 mg，0.832 mmol) 及 DIPEA (967 mg，7.48 mmol) 於 DCM (6 mL) 中之溶液加入

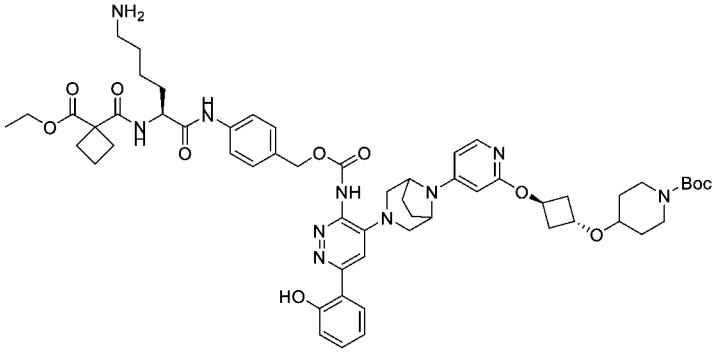
氯甲酸烯丙酯 (350 mg，2.91 mmol)。將反應於室溫攪拌 30 分鐘。將粗產物藉由矽膠急速層析法 (梯度：0%-10% MeOH 於 DCM) 純化，以得到 410 mg 白色固體狀標題化合物。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 728。

【0298】 步驟 2：4-((1*r*,3*r*)-3-((4-(3-(3-((((4-((*S*)-6-(((烯丙基氧基)羰基)胺基)-2-(1-(乙氧基羰基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基)氧基)羰基)胺基)-6-(2-(((烯丙基氧基)羰基)氧基)苯基)嗒吡-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)環丁氧基)哌啶-1-甲酸三級丁酯



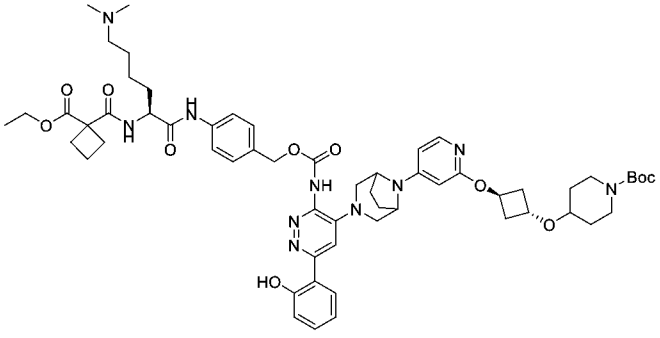
在氮氣下，於 0°C 向 4-((1*r*,3*r*)-3-((4-(3-(6-(2-(((烯丙基氧基)羰基)氧基)苯基)-3-胺基嗒吡-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)環丁氧基)哌啶-1-甲酸三級丁酯 (440 mg，0.605 mmol) 及 (*S*)-1-((6-(((烯丙基氧基)羰基)胺基)-1-((4-(羥基甲基)苯基)胺基)-1-側氧己-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸乙酯 (921 mg，1.81 mmol) 及 DIPEA (468 mg，3.63 mmol) 於 THF (5 mL) 中之溶液加入三光氣 (89.8 mg，0.302 mmol)。將反應於室溫攪拌 0.5 小時。隨後於 0°C 加入另一三光氣 (36.0 mg，0.121 mmol) 並於室溫攪拌 0.5 小時。於 0°C 加入 NH_4Cl 水溶液以淬滅反應。將溶劑在真空下濃縮。將粗產物藉由預填充之 C18 管柱 (溶劑梯度：0%-100% ACN 於水 (0.05% NH_4HCO_3)) 純化，以得到 280 mg 白色固體狀標題化合物。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1244。

【0299】 步驟 3：4-((1*r*,3*r*)-3-((4-(3-(3-((((4-((*S*)-6-胺基-2-(1-(乙氧基羰基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基)氧基)羰基)胺基)-6-(2-羥基苯基)嗒吡-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)環丁氧基)哌啶-1-甲酸三級丁酯



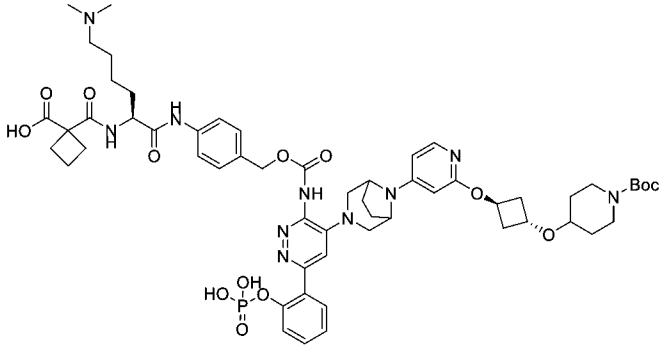
在氮氣下，於室溫向 4-((1*r*,3*r*)-3-((4-(3-(3-((((4-((*S*)-6-胺基-2-(1-(乙氧基羰基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基)氧基)羰基)胺基)-6-(2-羥基苯基)嗒吡-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)環丁氧基)哌啶-1-甲酸三級丁酯 (260 mg，0.209 mmol) 及吡咯啶 (148 mg，2.09 mmol) 於 DCM (5 mL) 中之溶液加入 $Pd(PPh_3)_4$ (24.1 mg，0.0208 mmol)。將反應於室溫攪拌 1 小時。加入水，且用 DCM 萃取三次。將有機層合併，經無水 Na_2SO_4 乾燥並於真空濃縮，以得到 310 mg (粗製) 標題化合物，其直接用於下一步驟。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1076。

【0300】 步驟 4：4-((1*r*,3*r*)-3-((4-(3-(3-((((4-((*S*)-6-(二甲基胺基)-2-(1-(乙氧基羰基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基)氧基)羰基)胺基)-6-(2-羥基苯基)嗒吡-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)環丁氧基)哌啶-1-甲酸三級丁酯



將 4-((1*r*,3*r*)-3-((4-(3-(3-((((4-((*S*)-6-胺基-2-(1-(乙氧基羰基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基)氧基)羰基)胺基)-6-(2-羥基苯基)嗒吡-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)環丁氧基)哌啶-1-甲酸三級丁酯 (310 mg，粗產物) 及水性 CH_2O (37%) (259 mg，3.19 mmol) 於 MeOH (3 mL) 中之溶液於室溫攪拌 1 小時。隨後加入 $NaBH_3CN$ (75.9 mg，1.21 mmol)，且於室溫攪拌 1 小時。將粗產物藉由預填充之 C18 管柱 (溶劑梯度：0%-100% MeOH 於水 (0.05% NH_4HCO_3)) 純化，以得到 120 mg 白色固體狀標題化合物。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1104。

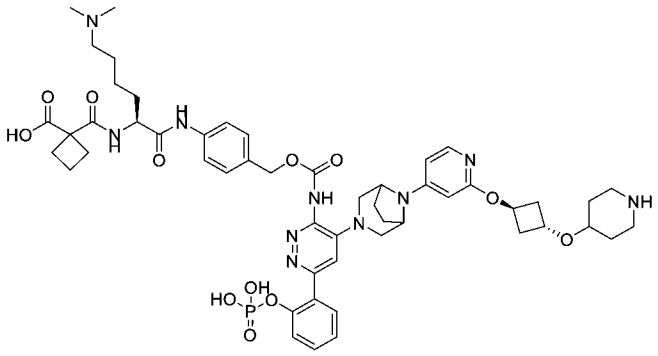
【0301】 步驟 5：1-(((2*S*)-1-((4-((((4-(8-(2-((1*r*,3*r*)-3-((1-(三級丁氧基羰基)哌啶-4-基)氧基)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)-6-(2-(膦醯氧基)苯基)嗒吡-3-基)胺甲醯基)氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸



在氮氣下，於 -60°C 向 4-((1*r*,3*r*)-3-((4-(3-(3-((((4-((*S*)-6-(二甲基胺基)-2-(1-(乙氧基羰基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基)氧基)羰基)胺基)-6-(2-羥基苯基)嗒吡-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)環丁氧基)哌啶-1-甲酸三級丁酯 (120 mg，0.108 mmol) 於 THF (3 mL) 中之溶液加入 TMSOK 於 THF (1 M，2 mL) 中之溶液。隨後於 -60°C 加入 $POCl_3$ (165 mg，1.08 mmol)。將反應於 -60°C 攪拌 20 分鐘。隨後於 -60°C 加入 H_2O (1.6 mL) 中之 NaOH (80.0 mg，2.00 mmol) 且於室溫攪拌 4 小時。將粗產物藉由預填充之 C18 管柱 (溶劑梯度：0%-

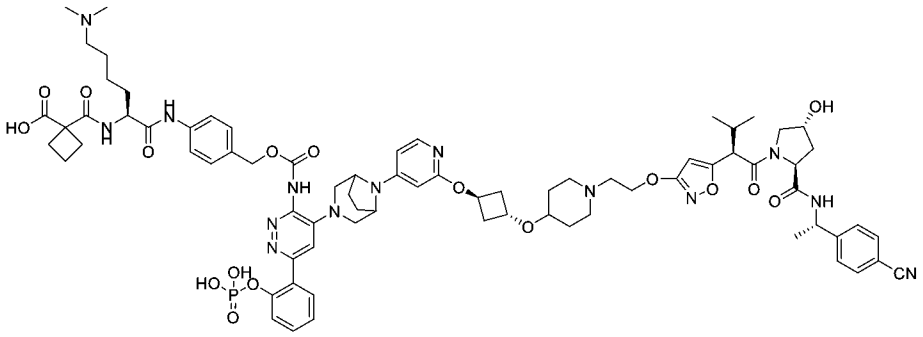
100% MeOH 於水 (0.05% NH_4HCO_3)) 純化，以得到 65.0 mg 白色固體狀標題化合物。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1156。

【0302】 步驟 6：1-(((2*S*)-6-(二甲基胺基)-1-側氧-1-((4-((((6-(2-(膦醯氧基)苯基)-4-(8-(2-((1*r*,3*r*)-3-(哌啶-4-基氧基)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒吡-3-基)胺甲醯基)氧基)甲基)苯基)胺基)己-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸



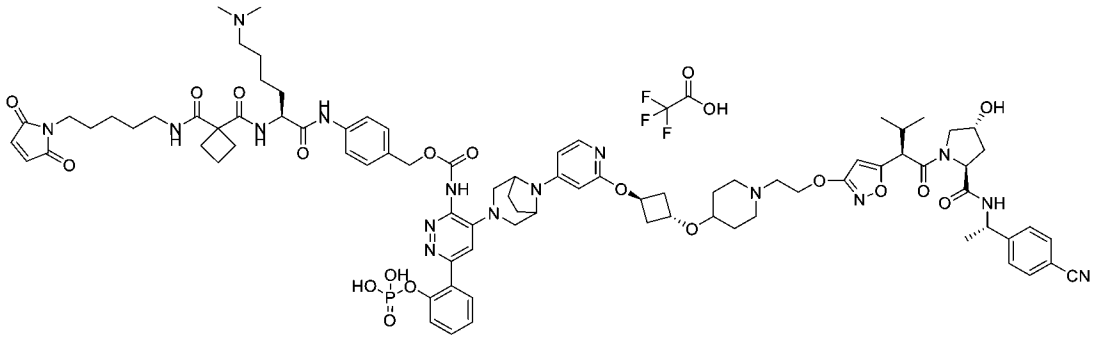
將 1-(((2*S*)-1-((4-((((4-(8-(2-((1*r*,3*r*)-3-((1-(三級丁氧基羰基)哌啶-4-基)氧基)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)-6-(2-(膦醯氧基)苯基)嗒吡-3-基)胺甲醯基)氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (65.0 mg，0.056 mmol) 於 HFIP (6.1 mL) 中之 5% TFA 溶液中之溶液於室溫攪拌 15 分鐘。將溶劑蒸發，且藉由預填充之 C18 管柱 (0%-100% ACN 於水 (0.05% NH_4HCO_3)) 純化，以得到 58.0 mg 黃色油狀標題化合物。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1055。

【0303】 步驟 7：1-(((2*S*)-1-((4-((((4-(8-(2-((1*R*,3*r*)-3-((1-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-4-羥基吡咯啶-1-基)-3-甲基-1-側氧丁-2-基)異噁唑-3-基)氧基)乙基)哌啶-4-基)氧基)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)-6-(2-(膦醯氧基)苯基)嗒吡-3-基)胺甲醯基)氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲胺基)-1-側氧己-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸



將 1-(((2*S*)-6-(二甲基胺基)-1-側氧-1-((4-((((6-(2-(膦醯氧基)苯基)-4-(8-(2-((1*r*,3*r*)-3-(哌啶-4-基氧基)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒吩-3-基)胺甲醯基)氧基)甲基)苯基)胺基)己-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (58.0 mg，0.055 mmol)、(2*S*,4*R*)-*N*-((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)-4-羥基-1-((*R*)-3-甲基-2-(3-(2-側氧乙氧基)異噁唑-5-基)丁醯基)吡咯啶-2-甲醯胺 (73.5 mg，0.157 mmol) 及 HOAc (6.6 mg，0.11 mmol) 於 MeOH (1 mL) 及 DCM (3 mL) 中之溶液於室溫攪拌 1 小時。隨後加入 $NaBH_3CN$ (5.1 mg，0.083 mmol) 且於室溫攪拌 0.5 小時。將粗產物藉由預填充之 C18 管柱 (溶劑梯度：0%-100% MeOH 於水 (0.05% NH_4HCO_3)) 純化，以得到 44.0 mg 白色固體狀標題化合物。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1508。

【0304】 步驟 8：4-((*S*)-6-(二甲基胺基)-2-(1-((5-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)戊基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基(4-(8-(2-((1*R*,3*r*)-3-((1-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-4-羥基吡咯啶-1-基)-3-甲基-1-側氧丁-2-基)異噁唑-3-基)氧基)乙基)哌啶-4-基)氧基)環丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)-6-(2-(膦醯氧基)苯基)嗒吩-3-基)胺甲酸鹽(2,2,2-三氟乙酸鹽)



【0305】將 1-(((2*S*)-1-((4-((((4-(8-(2-((1*R*,3*r*)-3-((1-(2-((5-((*R*)-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-氰基苯基)乙基)胺甲醯基)-4-羥基吡咯啶-1-基)-3-甲基-1-側氧丁-2-基)異噁唑-3-基)氧基)乙基)哌啶-4-基)氧基)環丁烷基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)-6-(2-(膦醯氧基)苯基)嗒吩-3-基)胺甲醯基)氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (44.0 mg，0.0292 mmol) 及 1-(5-胺基戊基)-1*H*-吡咯-2,5-二酮 (2,2,2-三氟乙酸鹽) (19.9 mg，粗產物)、HATU (14.4 mg，0.0378 mmol) 及 DIPEA (37.7 mg，0.290 mmol) 於 DMF (0.8 mL) 中之溶液於室溫攪拌 10 分鐘。將粗產物藉由製備型 HPLC 以下列條件純化：管柱：XBridge Shield RP18 OBD 管柱，30 × 150 mm，5 μm；流動相 A：水 (0.05% TFA)，流動相 B：ACN；流速：60 mL/min；梯度：於 20 分鐘內由 15% B 至 25% B，25% B；波長：254/220 nm；R_T (min)：20，以得到 13.6 mg 白色固體狀 **L1-PP-CIDE-2**。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1672。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6, *ppm*) δ 10.19 (s, 2H), 9.45 (s, 1H), 8.50 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 7.95 – 7.85 (m, 3H), 7.83 – 7.76 (m, 3H), 7.72 – 7.64 (m, 2H), 7.62-7.49 (m, 2H), 7.48 – 7.30 (m, 5H), 7.24 – 6.98 (m, 3H), 6.72 (s, 1H), 6.20 (s, 1H), 6.15 (s, 1H), 5.24 – 5.09 (m, 3H), 4.91 (q, J = 7.2 Hz, 1H), 4.69 (s, 2H), 4.53 (d, J = 5.1 Hz, 2H), 4.47 – 4.24 (m, 5H), 3.70-3.60 (m, 7H), 3.45 -3.40 (m, 2H), 3.38-3.34 (m, 2H), 3.19 – 3.06 (m, 6H), 3.05-2.98 (m, 3H), 2.75 (d, J = 3.8 Hz, 6H), 2.46 – 2.35 (m, 6H), 2.30-2.20 (m, 1H),

2.09 – 1.99 (m, 2H), 1.99-1.85 (m, 5H), 1.84 – 1.56 (m, 8H), 1.54 – 1.41 (m, 5H), 1.40 – 1.27 (m, 5H), 1.26 – 1.13 (m, 3H), 1.01 – 0.93 (m, 3H), 0.87-0.72 (m, 3H)。

實例 6

L1Hy-PE-CIDE-4 之合成

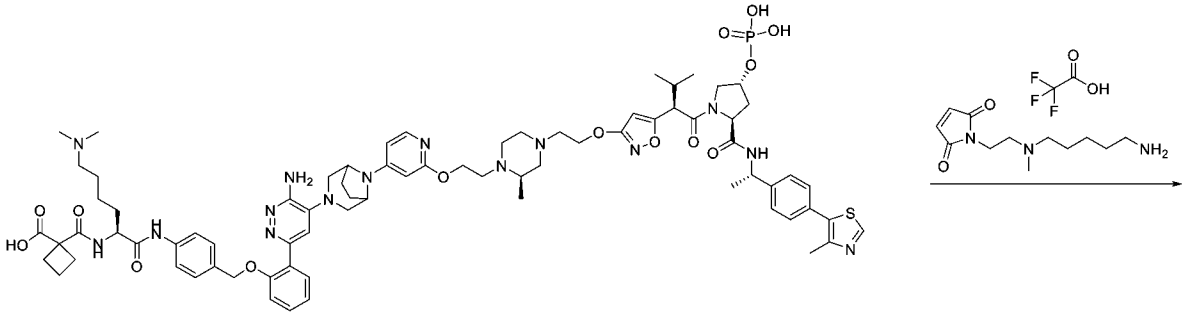
【0306】 **L1Hy-PE-CIDE-4**：(3*R*,5*S*)-1-((2*R*)-2-(3-(2-((3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-((4-((*S*)-6-(二甲基胺基)-2-(1-((5-((2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)乙基)(甲基)胺基)戊基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基)氧基)苯基)嗒咁-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌咁-1-基)乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-5-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啶-3-基二氫磷酸鹽 (2,2,2-三氟乙酸鹽)

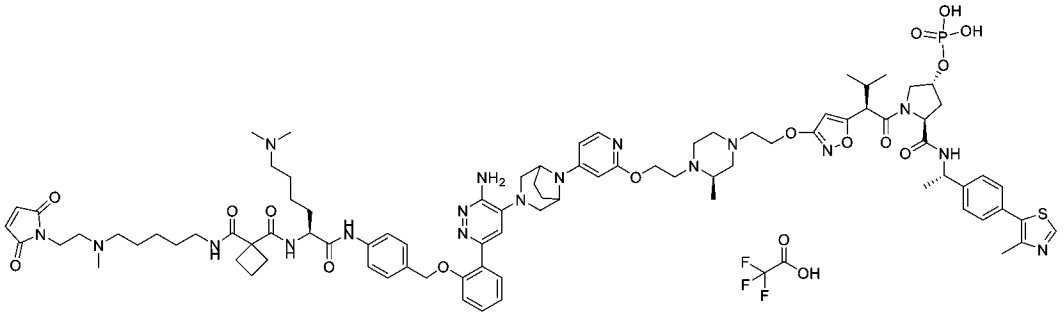
【0307】 步驟 1：((3R,5S)-1-((R)-2-(3-(2,2-二乙氧基乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-5-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啶-3-基)磷酸二三級丁酯。在氮氣下，於 0°C 向 (2S,4R)-1-((R)-2-(3-(2,2-二乙氧基乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-4-羥基-N-((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)吡咯啶-2-甲醯胺 (500 mg，0.81 mmol) 及 1H-四唑 (5.4 mL，0.45 M 於 ACN) 於 THF (5 mL) 中之溶液滴加二異丙基亞磷醯胺二三級丁酯 (451 mg，1.63 mmol)。將反應於室溫攪拌過夜。隨後於 -30°C 加入 tBuOOH (0.4 mL，5 M 於癸烷) 並於 -30°C 攪拌 30 分鐘。隨後將混合物於室溫攪拌 4 小時。將反應用水性 NaHSO3 淬滅，並用 EtOAc 萃取。將合併之有機層用水及鹽水洗滌。有機層經無水硫酸鈉乾燥，並在真空下濃縮。將殘餘物藉由預填充之 C18 柱（溶劑梯度：0%-70% ACN 於水 (0.05% NH4HCO3)) 純化，以得到 340 mg (51%) 黃色油狀標題化合物。LC-MS：(ESI, m/z)：[M+H]+ = 807。

【0308】 步驟 2：(3R,5S)-1-((R)-3-甲基-2-(3-(2-側氧乙氧基)異噁唑-5-基)丁醯基)-5-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啶-3-基二氫磷酸鹽

在氮氣下，將 ((3R,5S)-1-((R)-2-(3-(2,2-二乙氧基乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-5-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啶-3-基)磷酸二三級丁酯 (150 mg，0.185 mmol) 於 HCOOH (0.5 mL) 及水 (0.5 mL) 中之溶液於 60°C 攪拌 1 小時。將溶液於真空濃縮，以得到 121 mg (粗製) 固體狀標題化合物。LC-MS：(ESI, m/z)：[M+H]+ = 695。

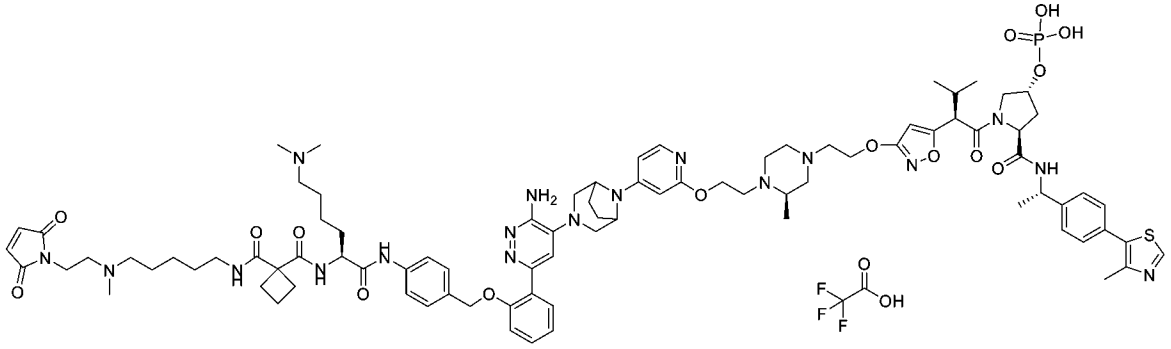
【0309】 步驟 3：1-(((2S)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((R)-2-甲基-4-(2-((5-((R)-3-甲基-1-((2S,4R)-2-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)-4-(膦醯氧基)吡咯啶-1-基)-1-側氧丁-2-基)異噁唑-3-基)氧基)乙基)哌啉-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒啉-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸





【0310】 步驟 1：(3*R*,5*S*)-1-((2*R*)-2-(3-(2-((3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-((4-((*S*)-6-(二甲基胺基)-2-(1-((5-((2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)乙基)(甲基)

胺基)戊基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基)氧基)苯基)嗒啡-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌啡-1-基)乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-5-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啶-3-基二氫磷酸鹽 (2,2,2-三氟乙酸鹽)



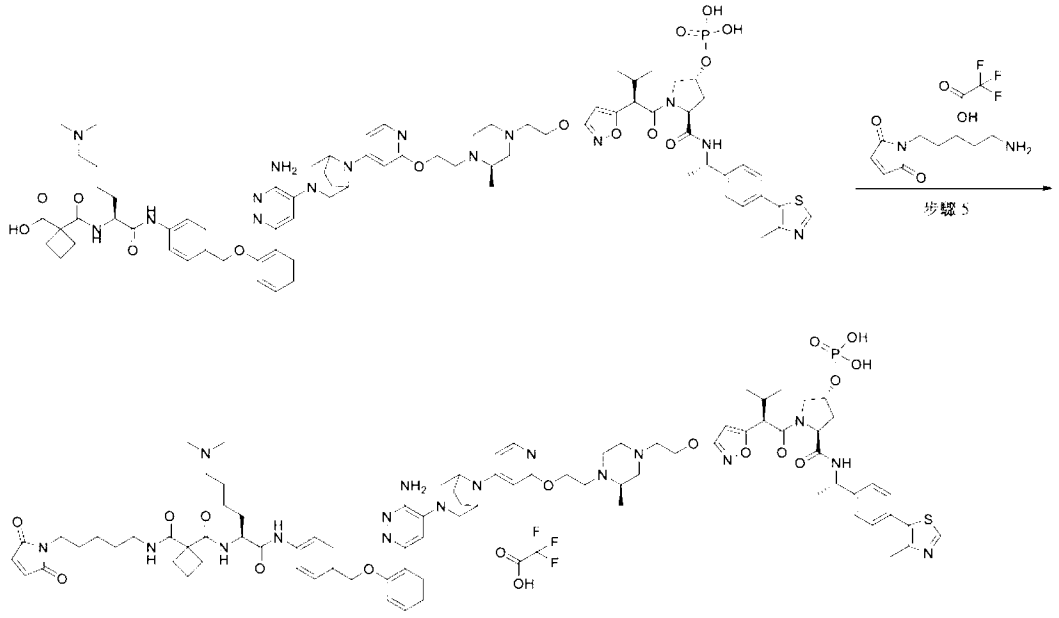
將 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-2-甲基-4-(2-((5-((*R*)-3-甲基-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)-4-(膦醯氧基)吡咯啶-1-基)-1-側氧丁-2-基)異噁唑-3-基)氧基)乙基)-哌啡-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒啡-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (40.0 mg，0.0265 mmol)、1-(2-((5-胺基戊基)(甲基)胺基)乙基)-1*H*-吡咯-2,5-二酮 (2,2,2-三氟乙酸鹽) (10.7 mg，粗產物)、HATU (12.1 mg，0.0318 mmol) 及 DIPEA (34.2 mg，0.265 mmol) 於 DMF (0.8 mL) 中之溶液於室溫攪拌 10 分鐘。將產物藉由製備型 HPLC 以下列條件純化：管柱：XSelect CSH Fluoro Phenyl，30 × 150 mm，5 μm；流動相 A：水 (0.05% TFA)，流動相 B：ACN；流速：60 mL/min；梯度：B 於 7 分鐘內由 6% 增加至 36%；波長：254 nm；R_T (min)：6.5，以得到 7.0 mg 白色固體狀 **L1Hy-PE-CIDE-4**。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1730。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d*$_6$, ppm) δ 10.23 (s, 1H), 9.00 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 8.48 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.93 – 7.83 (m, 3H), 7.67 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.59 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.49 – 7.31 (m, 7H), 7.18 – 7.07 (m, 3H), 6.90 (br, 1H), 6.64 (s, 1H), 6.26 (s, 1H), 6.11 (s, 1H), 5.10

(s, 2H), 4.92 (t, J = 7.1 Hz, 1H), 4.82 – 4.70 (m, 2H), 4.48 (s, 5H), 4.41 – 4.33 (m, 3H), 3.80-3.65 (m, 6H), 3.15-2.96 (m, 18H), 2.79 (s, 4H), 2.73 (s, 6H), 2.50-2.35 (m, 9H), 2.05 – 1.85 (m, 6H), 1.78-1.65 (m, 3H), 1.65-1.40 (m, 8H), 1.39 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 1.35-1.18 (m, 7H), 0.98 (d, J = 6.5 Hz, 3H), 0.90-0.75 (m, 3H)。

實例 7

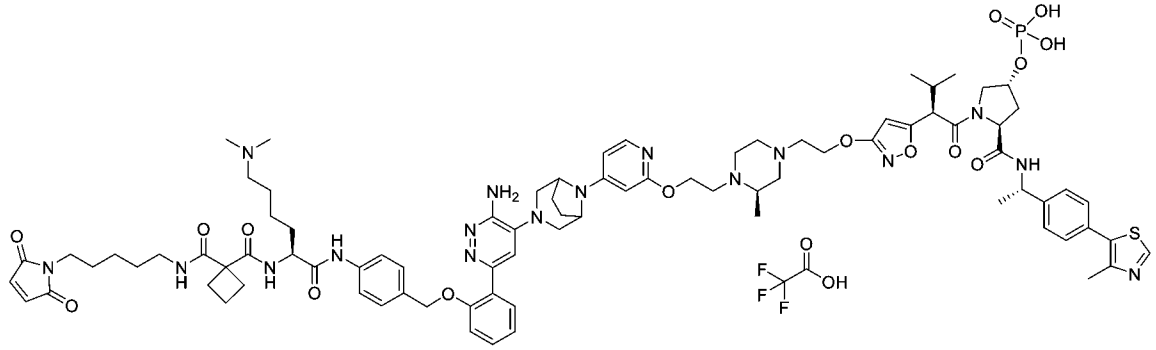
L1-PE-CIDE-5 之合成

【0311】 **L1-PE-CIDE-5**：(3*R*,5*S*)-1-((2*R*)-2-(3-(2-((3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-((4-((*S*)-6-(二甲基胺基)-2-(1-((5-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)戊基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基)氧基)苯基)嗒啡-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌啡-1-基)乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-5-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啶-3-基二氫磷酸鹽 (2,2,2-三氟乙酸鹽)



【0312】 步驟 1：(3*R*,5*S*)-1-((2*R*)-2-(3-(2-((3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-((4-((*S*)-6-(二甲基胺基)-2-(1-((5-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)戊基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基)氧基)苯基)嗒啡-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]

辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌啡-1-基)乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-5-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啶-3-基二氫磷酸鹽(2,2,2-三氟乙酸鹽)



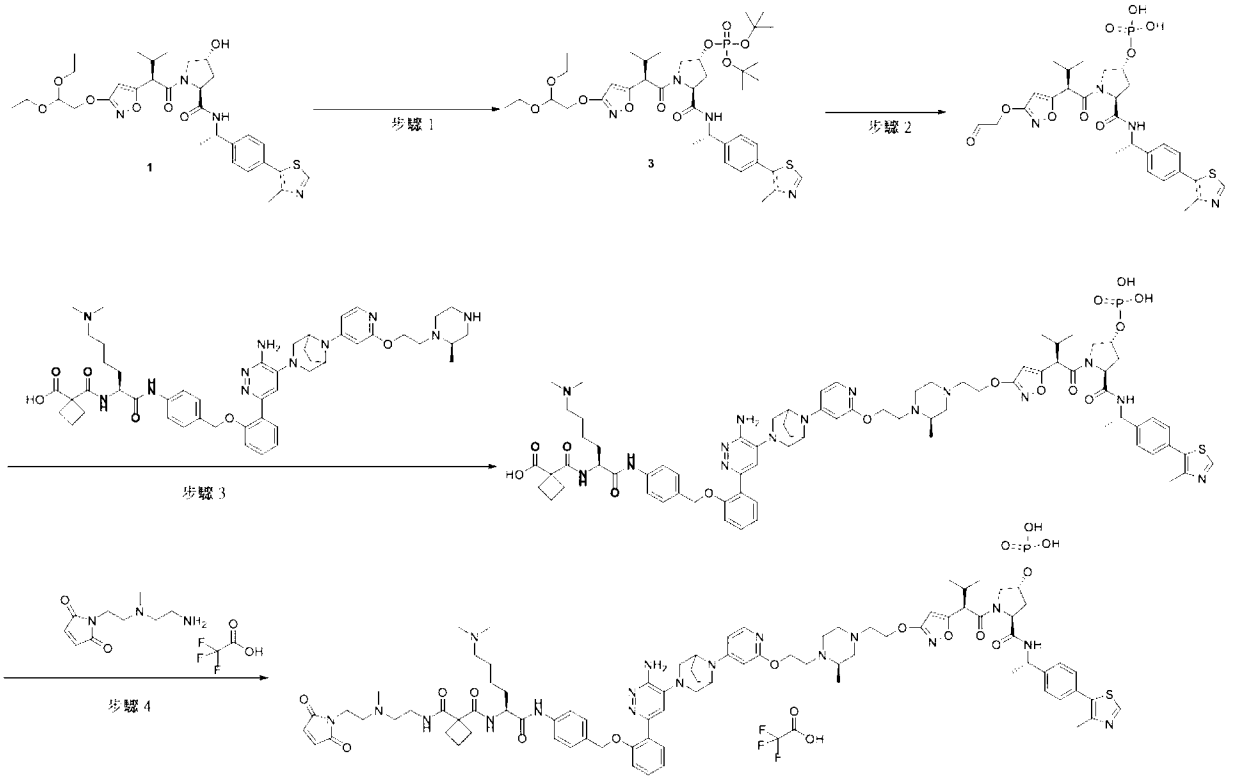
將 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-2-甲基-4-(2-((5-((*R*)-3-甲基-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)-4-(膦醯氧基)吡咯啶-1-基)-1-側氧丁-2-基)異噁唑-3-基)氧基)乙基)-哌啡-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒啡-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (180 mg，0.119 mmol，合成描述於 L1-PE-CIDE-4)、1-(5-胺基戊基)-1*H*-吡咯-2,5-二酮 (2,2,2-三氟乙酸鹽) (45.0 mg，粗產物)、HATU (60.6 mg，0.159 mmol) 及 DIPEA (158 mg，1.22 mmol) 於 DMF (3 mL) 中之溶液於室溫攪拌 5 分鐘。將反應溶液藉由製備型 HPLC 以下列條件純化：管柱：Xselect CSH Prep C18 OBD 管柱，19 × 250 mm，5 μm；流動相 A：水 (0.05% TFA)，流動相 B：MeOH；流速：25 mL/min；梯度：於 11 分鐘內由 46% B 至 57% B，57% B；波長：254/220 nm；R_T (min)：8.75，以得到 66.6 mg 白色固體狀 **L1-PE-CIDE-5**。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1673。^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, *ppm*) δ 10.21 (s, 1H), 9.50 (s, 1H), 9.00 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 8.49 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.01 – 7.84 (m, 3H), 7.67 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.59 (dd, *J* = 8.2, 6.1 Hz, 2H), 7.52 – 7.25 (m, 7H), 7.21 – 7.08 (m, 2H), 6.99 (s, 2H), 6.73 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 6.37 (s, 1H), 6.12 (s, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.92 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 4.85-

4.73 (m, 2H), 4.60 (s, 3H), 4.51 – 4.33 (m, 6H), 3.85-3.70 (m, 7H), 3.55 – 3.45 (m, 2H), 3.40 -3.30 (m, 4H), 3.25 -2.95 (m, 9H), 2.90 -2.70 (m, 7H), 2.47 – 2.30 (m, 9H), 2.10 – 1.85 (m, 5H), 1.85 – 1.54 (m, 6H), 1.53 – 1.29 (m, 8H), 1.27 -1.10 (m, 5H), 0.98 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 0.90 – 0.73 (m, 3H)。

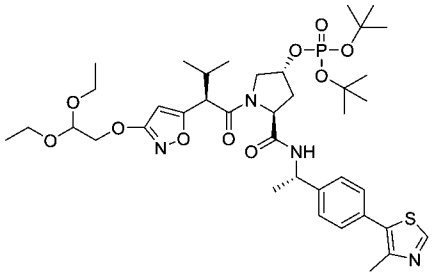
實例 8

L1Hy-PE-PCIDE-6 之合成

【0313】 (3*R*,5*S*)-1-((2*R*)-2-(3-(2-((3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-((4-((*S*)-6-(二甲基胺基)-2-(1-((2-((2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)乙基)(甲基)胺基)乙基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基)氧基)苯基)嗒呯-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌呯-1-基)乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-5-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啶-3-基二氫磷酸鹽 (2,2,2-三氟乙酸鹽)

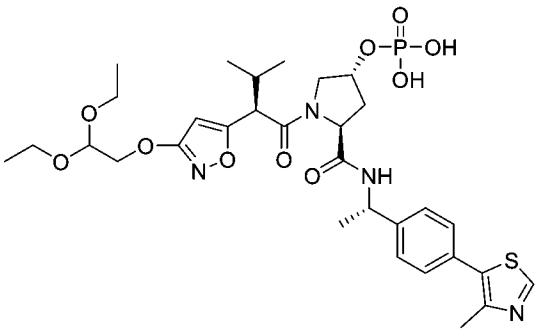


【0314】步驟 1：((3*R*,5*S*)-1-((*R*)-2-(3-(2,2-二乙氧基乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-5-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啶-3-基)磷酸二三級丁酯



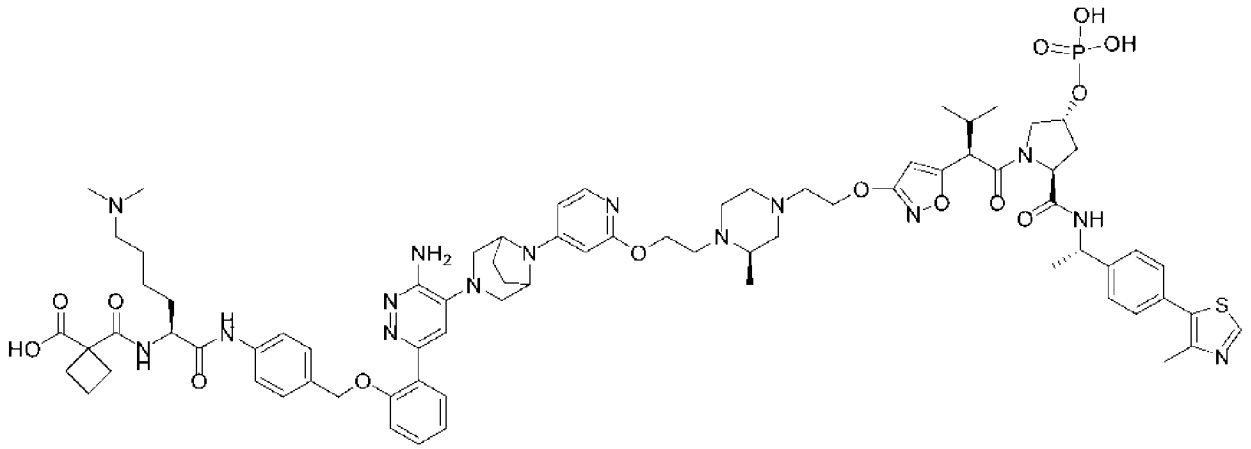
在氮氣下，於 0°C 向 (2*S*,4*R*)-1-((*R*)-2-(3-(2,2-二乙氧基乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-4-羥基-*N*-((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)吡咯啶-2-甲醯胺 (500 mg，0.81 mmol) 及 1*H*-四唑 (5.4 mL，0.45 M 於 ACN) 於 THF (5 mL) 中之溶液滴加二異丙基亞磷醯胺二三級丁酯 (451 mg，1.63 mmol)。將反應於室溫攪拌過夜。隨後於 -30°C 加入 tBuOOH (0.4 mL，5 M 於癸烷) 並於 -30°C 攪拌 30 分鐘。隨後將混合物於室溫攪拌 4 小時。將反應用水性 $NaHSO_3$ 淬滅，並用 EtOAc 萃取。將合併之有機層用水及鹽水洗滌。有機層經無水硫酸鈉乾燥，並在真空下濃縮。將殘餘物藉由預填充之 C18 柱（溶劑梯度：0%-70% ACN 於水 (0.05% NH_4HCO_3)) 純化，以得到 340 mg (51%) 黃色油狀標題化合物。LC-MS：(ESI, m/z)：$[M+H]^+$ = 807。

【0315】步驟 2：(3*R*,5*S*)-1-((*R*)-3-甲基-2-(3-(2-側氧乙氧基)異噁唑-5-基)丁醯基)-5-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啶-3-基二氫磷酸鹽



在氮氣下，將 ((3*R*,5*S*)-1-((*R*)-2-(3-(2,2-二乙氧基乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-5-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啶-3-基)磷酸二三級丁酯 (150 mg，0.185 mmol) 於 HCOOH (0.5 mL) 及水 (0.5 mL) 中之溶液於 60°C 攪拌 1 小時。將溶液於真空濃縮，以得到 121 mg (粗製) 固體狀標題化合物。LC-MS：(ESI, m/z)：$[M+H]^+ = 695$。

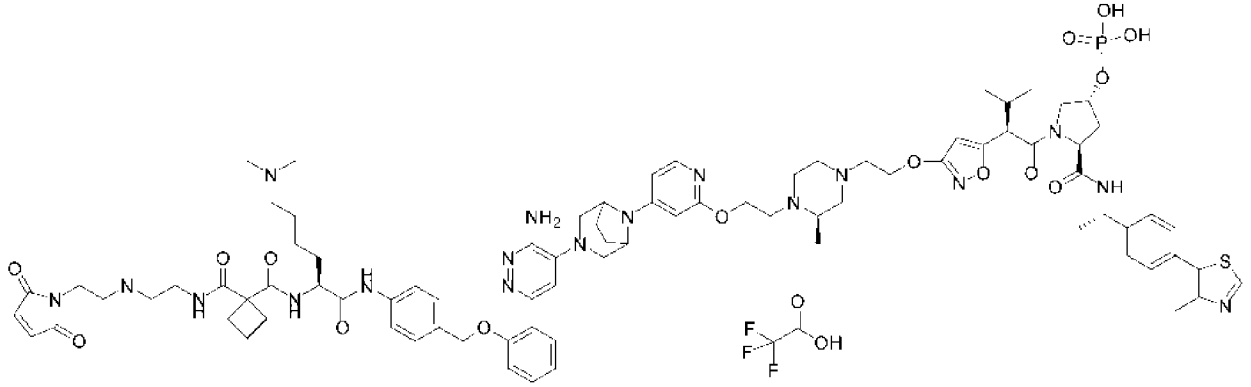
【0316】 步驟 3：1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-2-甲基-4-(2-((5-((*R*)-3-甲基-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)-4-(膦醯氧基)吡咯啶-1-基)-1-側氧丁-2-基)異噁唑-3-基)氧基)乙基)哌啉-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒啉-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸



將 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-2-甲基哌啉-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒啉-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲胺基)-1-側氧己-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (100 mg, 0.110 mmol)、(3*R*,5*S*)-1-((*R*)-3-甲基-2-(3-(2-側氧乙氧基)異噁唑-5-基)丁醯基)-5-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啶-3-基二氫磷酸鹽 (121 mg，0.190 mmol) 及 NaOAc (13.6 mg，0.170 mmol) 於甲醇 (1.2 mL) 及二氯甲烷 (0.4 mL) 中之溶液於室溫攪拌 1 小時。隨後加入 $NaBH_3CN$ (34.7 mg，0.550 mmol) 並於室溫攪拌 0.5 小時。加入水以淬滅反應。將溶劑於真空濃縮。將產物藉由製備型 HPLC (管柱：

YMC-Actus Triart C18 ExRS，30 × 150 mm，5 μm；流動相 A：水 (10 mmol/L NH_4HCO_3)，流動相 B：ACN；流速：60 mL/min；梯度：於 9 分鐘內由 36% B 至 60% B，60% B；波長：254/220 nm；RT1 (min)：7.63，以得到 30.0 mg (產率 18%) 白色固體狀標題化合物。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1509。

【0317】 步驟 4：(3*R*,5*S*)-1-((2*R*)-2-(3-(2-((3*R*)-4-(2-((4-(3-(3-胺基-6-(2-((4-((*S*)-6-(二甲基胺基)-2-(1-((2-((2-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)乙基)(甲基)胺基)乙基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲醯胺基)己醯胺基)苄基)氧基)苯基)嗒啡-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌啡-1-基)乙氧基)異噁唑-5-基)-3-甲基丁醯基)-5-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)吡咯啶-3-基二氫磷酸鹽 (2,2,2-三氟乙酸鹽)



於室溫，向 1-(((2*S*)-1-((4-((2-(6-胺基-5-(8-(2-(2-((*R*)-2-甲基-4-(2-((5-((*R*)-3-甲基-1-((2*S*,4*R*)-2-(((*S*)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)胺甲醯基)-4-(膦醯氧基)吡咯啶-1-基)-1-側氧丁-2-基)異噁唑-3-基)氧基)乙基)哌啡-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮雜二環[3.2.1]辛-3-基)嗒啡-3-基)苯氧基)甲基)苯基)胺基)-6-(二甲基胺基)-1-側氧己-2-基)胺甲醯基)環丁烷-1-甲酸 (30.0 mg，0.0200 mmol)、1-(2-((2-胺基乙基)(甲基)胺基)乙基)-1*H*-吡咯-2,5-二酮 (2,2,2-三氟乙酸鹽) (12.3 mg，粗產物) 及 DIPEA (25.6 mg，0.200 mmol) 於 DMF (1 mL) 中之溶液加入 HATU (9.07 mg，0.0200 mmol)。將反應於室溫攪拌 10 分鐘。將粗產物藉由製備型 HPLC (管柱：Xselect CSH C18 OBD 柱 30 × 150 mm，5 μm；流動相 A：水

(0.05% TFA)，流動相 B：ACN；流速：60 mL/min；梯度：B 於 10 分鐘內由 12% 增加至 24%，保持 24% B；波長：254/220 nm；RT1 (min)：10) 純化，以得到 8.70 mg (產率 24%) 白色固體狀 **L1Hy-PE-CIDE-6**。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1688。^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d6) δ 10.26 (s, 1H), 8.99 (s, 1H), 8.50 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 8.15 (t, 1H), 7.87 (d, J = 6.5 Hz, 2H), 7.65 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.61-7.51(m, 2 H), 7.50 – 7.30 (m, 8H), 7.20-6.90 (m, 5H), 6.62 (s, 1H), 6.14 (s, 1H), 5.99 (s, 1H), 5.09 (s, 2H), 4.92 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 4.79 (s, 1H), 4.55 – 4.25 (m, 8H), 3.80-3.65 (m, 8H), 3.25-2.95 (m, 17H), 2.70 (s, 3H), 2.62 (s, 6H), 2.48-2.38 (m, 9H), 2.20 – 1.55 (m, 13H), 1.52-1.30 (m, 5H), 1.30-1.15(m, 4H), 0.85 (d, J = 6.4 Hz, 3H), 0.85-0.70 (m, 3H)。

實例 9

L1-CIDE 與抗體之結合

【0318】將 10 mM 琥珀酸鹽 (pH 5)、150 mM NaCl、2 mM EDTA 中之經半胱胺酸工程化改造之抗體 (THIOMAB™) 的 pH 用 1 M Tris 調節至 pH 7.5-8.5。將 3-16 當量的 L1-CIDE (含有硫醇反應性馬來醯亞胺基團) 溶解於 DMF 或 DMA中 (濃度 = 10 mM)，並將其添加至經還原、再氧化且 pH 調節的抗體中。將反應於室溫或 37°C 溫育並監測直至完成 (1 小時至約 24 小時)，如藉由反應混合物之 LC-MS 分析所確定。反應完成時，藉由一種或幾種方法之任意組合純化 Ab-CIDE，目的在於去除剩餘的未反應之連接子-藥物中間體及聚集蛋白 (若以顯著的量存在)。

【0319】在一個實例中，將 Ab-CIDE 用 10 mM 組胺酸-乙酸鹽 (pH 5.5) 稀釋，直到最終 pH 值為約 5.5，然後藉由 S 陽離子交換層析法使用連接至 Akta 純化系統 (GE Healthcare) 的 HiTrap S 管柱或 S maxi 離心柱 (Pierce) 進行

純化。可替代地，可藉由凝膠過濾層析法使用連接至 Akta 純化系統的 S200 管柱或 Zeba 離心柱純化 Ab-CIDE。使用透析法純化結合物。

【0320】 使用凝膠過濾或透析法，將 THIOMAB™ Ab-CIDE 用含 240 mM 蔗糖的 20 mM 組胺酸/乙酸鹽 (pH 5) 配製。藉由離心超濾法濃縮純化的 Ab-CIDE 且在無菌條件下透過 0.2 μm 過濾器過濾，然後於 -20°C 冷凍儲存。

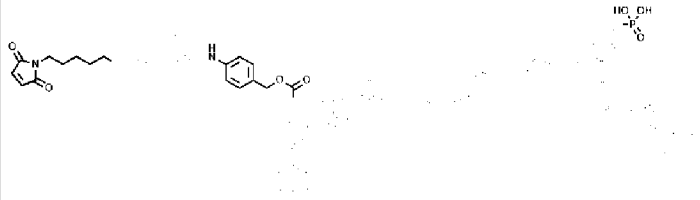
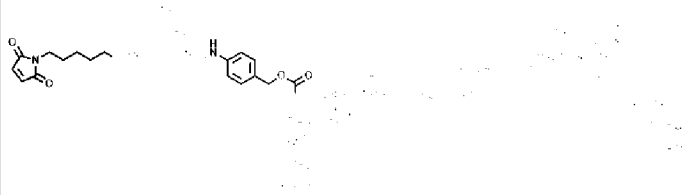
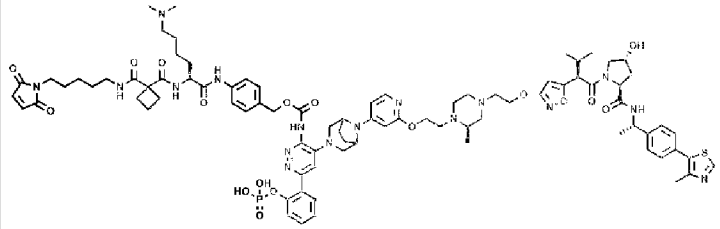
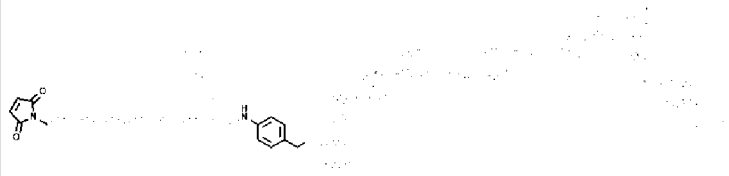
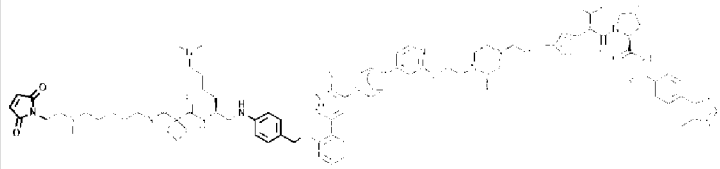
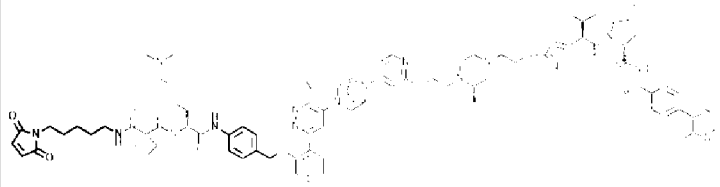
實例 10

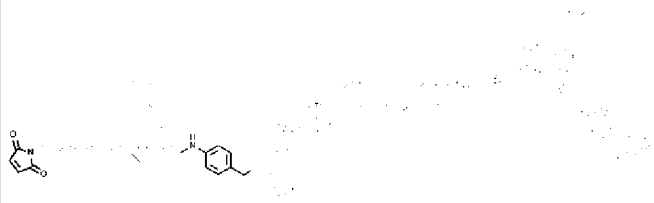
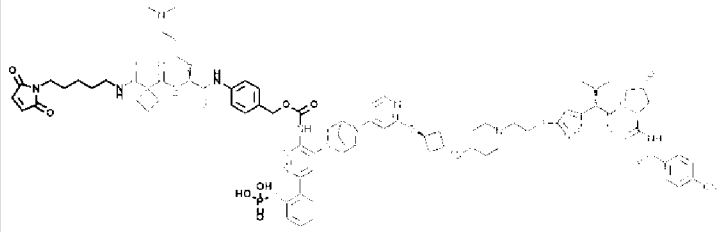
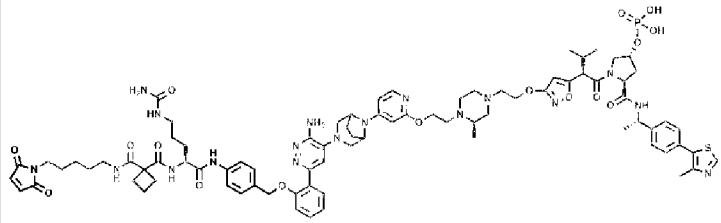
用於測定 DC50 和 Dmax 的細胞分析

【0321】 將 HCC515 及 H1944 細胞分別以 4000 及 2500 個細胞/孔的密度接種於 384 孔盤中。第二天，添加 Ab-CIDE。經藥物處理 24 小時後，將細胞用 4% 甲醛固定 15 分鐘。將平板用 PBS 洗滌 3 次。將細胞用 IF 封閉液（10% FCS，1% BSA，0.1% Triton，0.01% 疊氮化物，X-100，於 PBS 中）培育。1.5 小時後，添加於 IF 封閉緩衝劑中稀釋 2X 的初級抗體溶液：添加 BRM（Cell signaling 目錄號 11966，1:2000）。將平板於 4°C 下培育過夜。第二天早上，將細胞用 PBS 洗滌 3 次。然後將細胞用二級抗體（兔-Alexa 488 A21206 (1:2000)）於室溫下避光培育 1 小時。將 Hoechst H3570 以 1:5000 添加至細胞中，並將平板繼續培育 30 分鐘。將平板用 PBS 洗滌 3 次，並在 Opera Phenix™ 高容量篩選系統上成像。使用核染色為遮蔽物，量化核 BRM 平均訊息強度。

【0322】 資料顯示於下表 1 中。資料證明本文所揭露之抗體靶向策略取得成功。陰性對照：抗 TROP2 與 NCI-H1944 細胞無交互作用，而抗 TfR2 則與該等細胞發生交互作用。資料顯示，幾種 Ab-L1-CIDE 具有理想上低之 DC50 及理想上高 之 DCmax 值。

【0323】 表 1.

L1-CIDE	標靶	DAR	DC50 mg/mL (NCI-H1944)	DCmax (NCI-H1944)	BRM度 (%, 96 h)	BRM度/劑量
L1-PE-CIDE-3 	TfR2	6.18	0.269	87	87	8.7
非磷酸化 	TfR2	5.60	ND	ND	96	9.6
L1-PP-CIDE-1 	TfR2	5.89	0.42	90	ND	ND
L1-PE-CIDE-4 	TfR2	5.77	0.26	88	90	9
非磷酸化 	TfR2	5.41	0.15	74	84	8.4
非磷酸化 	TfR2	5.98	0.11	90	ND	ND
L1-PE-CIDE-5	TfR2	5.80	0.19	89	ND	ND

						
L1-PP-CIDE-2 	TfR2	13.75	0.14	75	ND	ND
非磷酸化 	TfR2	13.75	0.14	75	ND	ND
L1-PE-CIDE-1 	TfR2	13.13	ND	42	ND	ND
L1-PE-CIDE-2 	Trop2	6.00	ND	ND	ND	ND

實例 11

PLAU 及 KRT80 活體內抑制測定

【0324】PLAU 抑制為測量與 PLAU 基因相關的 mRNA 轉錄物響應於 BRM 降解劑處理下的抑制狀況。BRM 活性控制該轉錄物之產生。KRT80 為 BRM 降解之下游標記物。因此，PLAU 測定及 KRT80 測定兩者均為活體內 BRM 降解的測量。

【0325】 PK/PD HCC515 腫瘤測定：在 HCC515 人類非小細胞肺癌之小鼠異種移植模型中評估抗 CD71-BRM Ab-CIDE 之 PK/PD 效應。HCC515 細胞獲自 Genentech 細胞系庫。該細胞系藉由使用 Promega PowerPlex 16 系統的短串聯重複序列 (STR) 分析得到驗證，並與細胞系之外部 STR 特徵進行比較以確認細胞系家系。

【0326】 為建立模型，將腫瘤細胞 (500 萬個，於 0.1 mL Hank 平衡鹽溶液中) 皮下接種到雌性 C.B-17 SCID 小鼠 (Charles River Laboratories) 之側腹。當腫瘤達到所需之體積 (200-300 mm3) 時，將小鼠隨機分為 n=5 組，每組具有相似之腫瘤大小分佈，且透過尾靜脈接受單次靜脈注射載體 (組胺酸緩衝劑液) 或試驗品。所有抗 CD71-BRM Ab-CIDE 及未結合之抗體均於組胺酸緩衝劑（20 mM 組胺酸-乙酸鹽 pH 5.5、240 mM 蔗糖、0.02% Tween 20）中配製。未結合之 BRM CIDE 於 10% 羥丙基-β-環糊精、50 mM 醋酸鈉 (pH 4) 中配製。

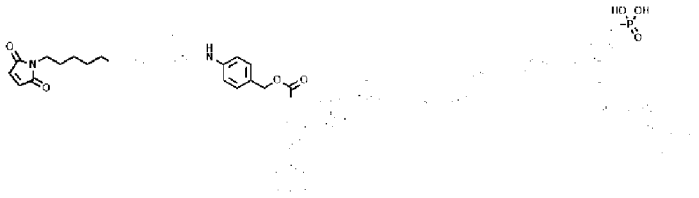
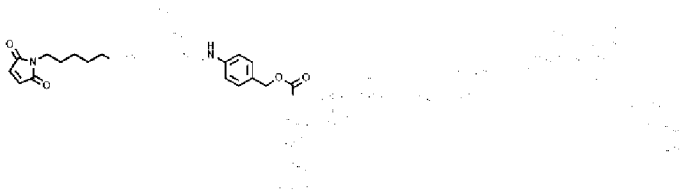
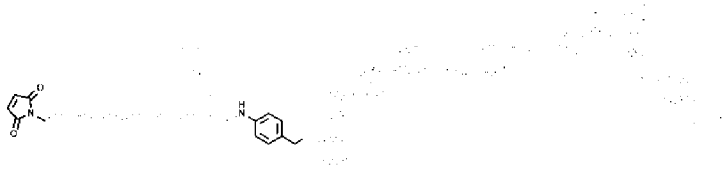
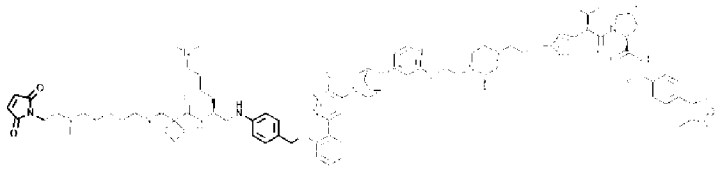
【0327】 給藥後四天，將小鼠實施安樂死並收集腫瘤及全血。將腫瘤切除並分成兩等份，然後在液氮中快速冷凍。一份用於量測釋放之 BRM CIDE 的水平，另一份用於評估下游 PD 標記之調節。在麻醉手術平面下藉由心臟末梢穿刺收集全血，並將其放入含有肝素鋰的管中。將血樣置於濕冰上直至離心（收集後 15 分鐘內）。將樣品於 4°C 下以 10,000 rpm 離心 5 分鐘，並收集血漿，將其置於乾冰上，並儲存於 -70°C 下，直至分析連接子穩定性及總抗體藥代動力學。

【0328】 針對 KRT80 及 PLAU 之 qRT-PCR 測定：對於 qRT-PCR，在 Bullet Blender (Next Advance) 中將 15 至 30 mg 冷凍組織於 300 ul 裂解緩衝液中經攪拌均質化。RNA 藉由 MagMax mirVana Total RNA Isolation Kit (Applied Biosystems) 製備。使用 Taqman 一步 RT-PCR 主混合套組 (ThermoFisher Scientific) 經 FAM 探針 (ThermoFisher Scientific) 偵測基因表現量。使用

7900HT SDS (ThermoFisher Scientific) 進行分析。相對於管家基因 GusB (2-ΔCt) 呈現表現量。

GusB	Hs00939627_m1
Plau	Hs01547051_g1
KRT80	Hs01372363_g1
IL32	Hs00992441_m1

【0329】資料見表 2。

L1-CIDE	**PLAU 抑制 (%)**	**KRT80 抑制 (%)**
L1-PE-CIDE-3 	96	70
非磷酸化 	89	42
L1-PE-CIDE-4 	83	34
非磷酸化 	65	9

【0330】已盡力確保所用數字 (例如數量、溫度等) 的準確性，但應考量一些實驗誤差和偏差。

【0331】本領域技術人員將認識到，與本文所述之方法及材料相似或等效的許多方法和材料可用於實踐本文所述之主題。本揭露不僅限於本文所述之方法及材料。

【0332】除非另有定義，否則本文所使用之技術及科學術語具有與本主題所屬技術領域之普通技術人員所一般理解之相同意義。

【0333】在整個說明書及請求項中，除非上下文另有要求，否則以非排他性的意義使用詞語「包含」、「含」及「含有」。應當理解的是，本文所述之實施例包括「由...構成」及/或「實質上由...構成」的實施例。

【0334】如本文中所使用之術語「約」在涉及數值時，意在涵蓋指定的量的各種變化，在一些實施例中，涵蓋指定的量 ± 50%；在一些實施例中，涵蓋指定的量 ± 20%；在一些實施例中，涵蓋指定的量 ± 10%；在一些實施例中，涵蓋指定的量 ± 5%；在一些實施例中，涵蓋指定的量 ± 1%；在一些實施例中，涵蓋指定的量 ± 0.5%；在一些實施例中，涵蓋指定的量 ± 0.1%；因為該等變化適合於執行所揭露之方法或採用所揭露之組合物。

【0335】基本上，在提供值的範圍的情況下，應理解為，除非上下文另有明確規定，否則在該範圍的上限及下限範圍內每個介入值與任何其他所述或介入的範圍均在涵蓋的範圍內，直至下限單位的十分之一。這些小範圍的上限和下限亦可獨立地包括在較小的範圍界定中，在此還涵蓋了所述範圍內任何明確排除的限制。在所述範圍包括一個或兩個限值時，排除那些涵蓋的一者或兩者的範圍亦被包括。

【0336】得益於前述說明書及相關圖式所呈遞之教示，本主題所屬領域之技術人員將想到本文所述之眾多修改及其他實施例。因此，應理解，本主題並不限於所揭露之具體實施例，並且修改及其他實施例意在包含於所附申請專

利範圍之範疇內。儘管本文中採用特定術語，但它們是僅作一般性及描述性意義之用而非用於限制之目的。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種結合物，其具有下列化學結構：

$$Ab—(L1—D)_j，$$

其中，

D 為具有下列結構的 CIDE：

E3LB—L2—PB，

其中，

E3LB 為共價結合至 L2 的 E3 連接酶結合 (E3LB) 配體，

其中 E3 連接酶為逢希伯-林道 (von Hippel-Lindau；VHL) 腫瘤抑制蛋白；

L2 為共價結合至 E3LB 及 PB 的連接子；

PB 為共價結合至 L1 及至 L2 的蛋白質結合基團；

其中，至少一個磷酸酯部分係共價結合至 D；

Ab 為共價結合至 L1 的抗體；

L1 為共價結合至 Ab 及 D 的連接子；且

j 具有約 1 至約 16 之值。

【請求項2】

如請求項 1 之結合物，其中一個磷酸酯部分係在該 E3LB 或該 PB 處共價結合至 D。

【請求項3】

如請求項 1 之結合物，其中 L1 為共價結合至 Ab 及至 D 之該 PB 的擬肽物連接子。

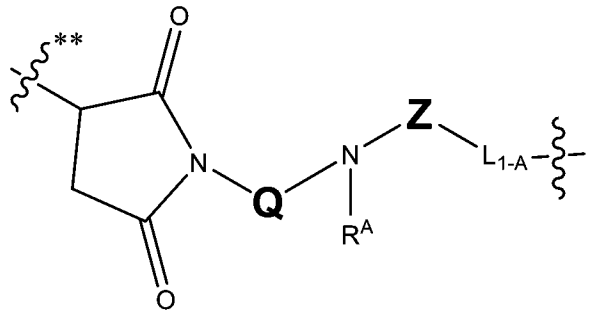
【請求項4】

如請求項 1 之結合物，其中 L1 為共價結合至 Ab 及至 D 之該 E3LB 的擬肽物連接子。

【請求項5】

如請求項 1 之結合物，其中 L1 係選自由以下所組成之群組：

i)



，

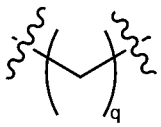
其中， 表示與 Ab 的接附點；

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

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

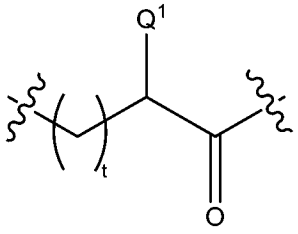
Q 係選自由以下所組成之群組：

a)

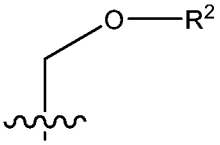


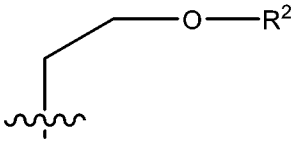
，其中，q 為 1、2、3 或 4；及

b)



，其中，t 為 0、1、2、3 或 4；且

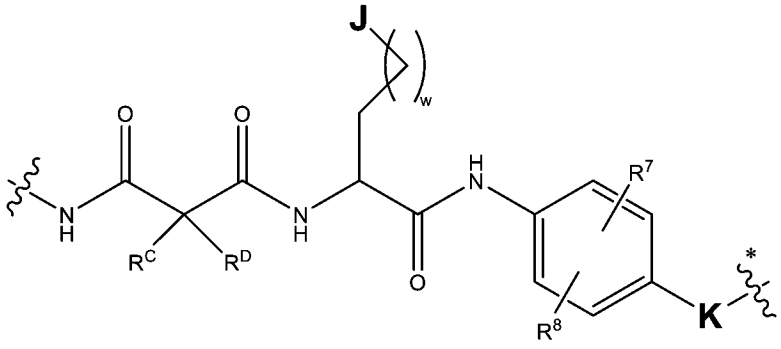
Q^1 為氫、

或

，其中 R^2 為

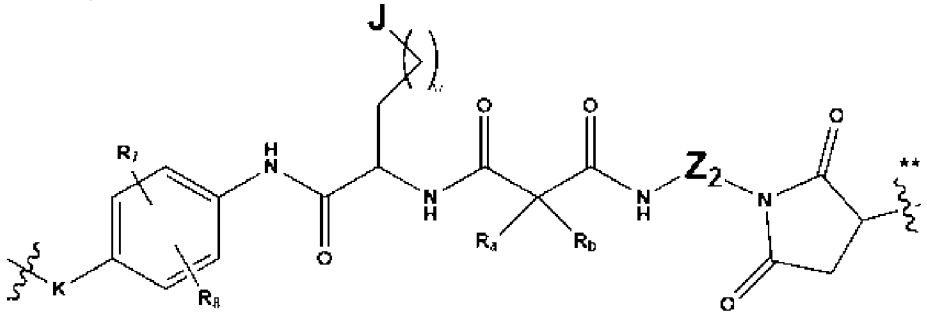
氫、鹵基(C_{1-6})烷基或 C_{1-6} 烷基；且

L_{1-A} 為：



其中， 表示與 D 的接附點；及

ii)



其中  表示與 Ab 的接附點；

Z_2 為 C_{1-12} 伸烷基或 $-[CH_2]_g-O-[CH_2]_h-$，其中 g 及 h 各自獨立地為 0、1 或 2；

w 為 0、1、2、3、4 或 5；

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

K 係選自由以下所組成之群組：C_{1-3}伸烷基、$-CH(R)-$、$-C(O)-$、$-C(O)-O-CH(R)-$、$-CH_2-O-C(O)-$、$-CH_2-O-C(O)-NH-CH_2-$及 $-CH_2-O-C(O)-R-[CH_2]_q-O-$，其中 R 為氫、$C_{1-3}$烷基、

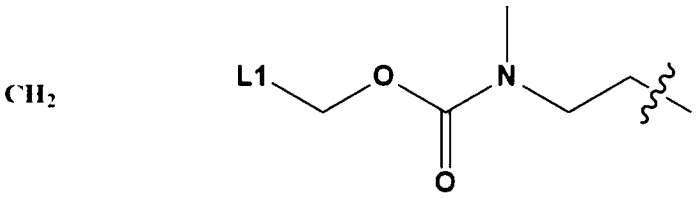
$N(R_x)(R_y)$、-O-$N(R_x)(R_y)$ 或 C(O)-$N(R_x)(R_y)$，其中 q 為 0、1、2 或 3，且其中 R_x 及 R_y 各自獨立地選自氫及 C_{1-3}烷基，或 R_x 及 R_y 與其各自所接附的氮一起形成視情況經取代之 5 員至 7 員雜環基；

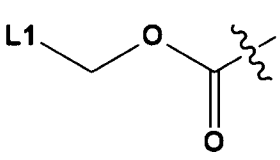
R_a、R_b、R^C 及 R^D 各自獨立地選自氫及 C_{1-3}烷基，或 R_a 及 R_b 與其各自所接附的碳一起形成視情況經取代之 C_{3-6}環烷基；且

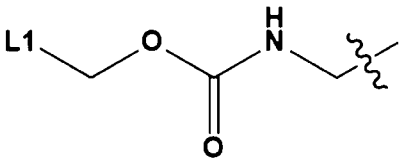
R_7 及 R_8 各自獨立地為氫、鹵基、C_{1-5} 烷基、C_{1-5} 烷氧基或羥基。

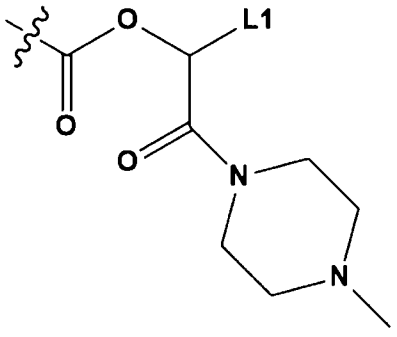
【請求項6】

如請求項 5 之結合物，其中 L1 之 K 係選自由以下所組成之群組：







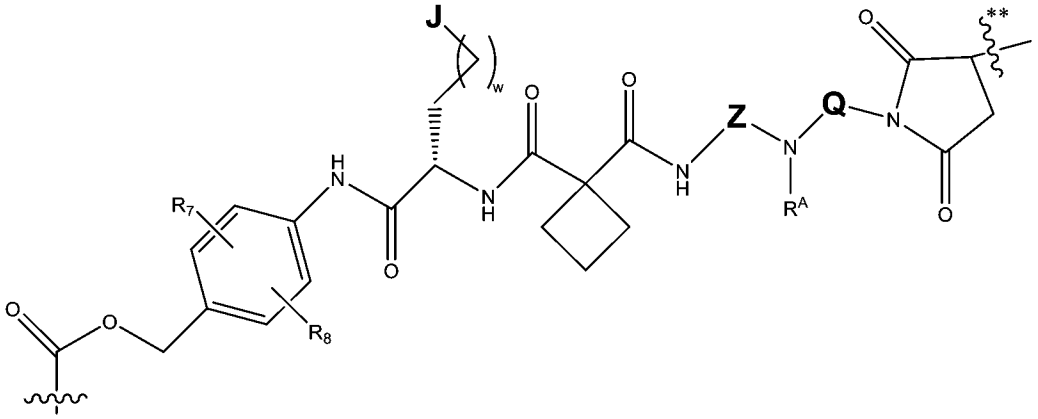


及

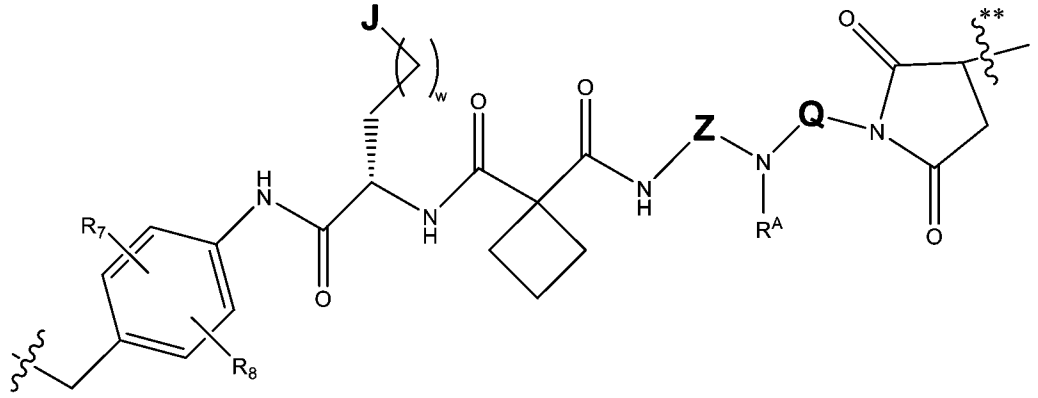
。

【請求項7】

如請求項 5 之結合物，其中 L1 係選自由以下所組成之群組：



及



。

【請求項8】

如請求項 7 之結合物，其中 R_7 及 R_8 各自為氫。

【請求項9】

如請求項 8 之結合物，其中 Z 為 $-(CH_2)_p-$。

【請求項10】

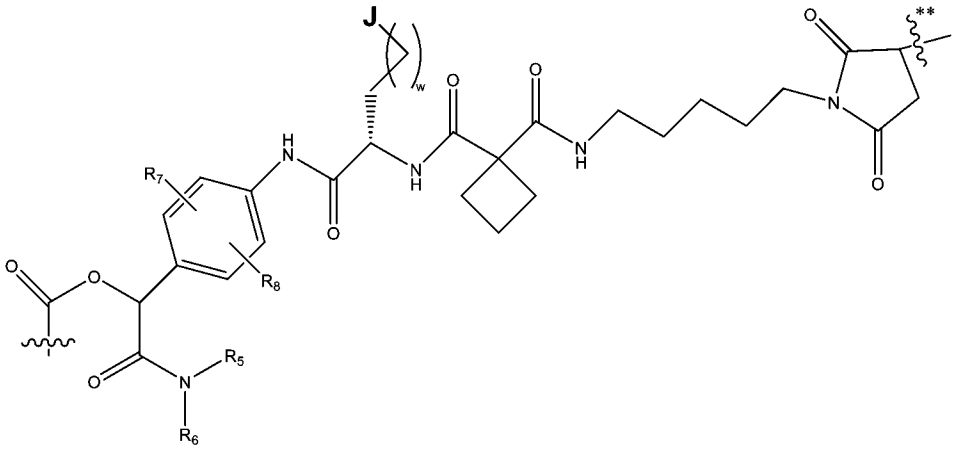
如請求項 9 之結合物，其中 w 為 2 或 3，且 J 為 $-N(CH_3)_2$ 或 -NH(CO)NH。

【請求項11】

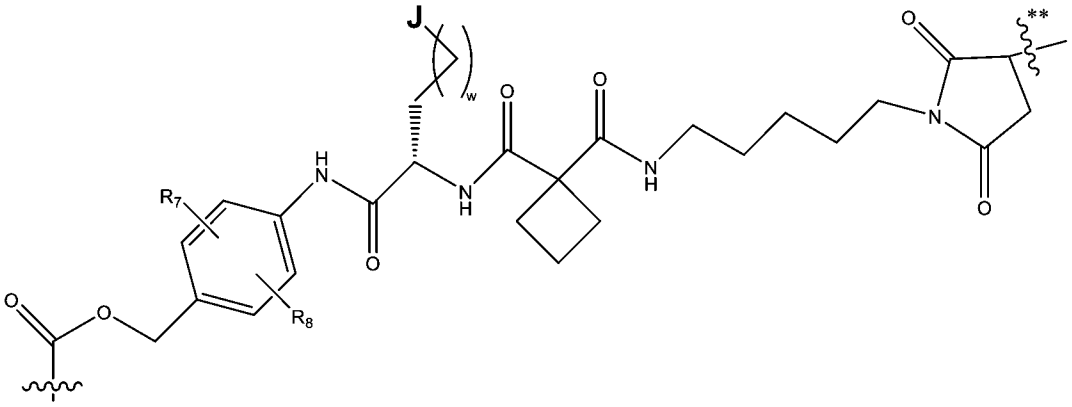
如請求項 10 之結合物，其中 Q 為 $-CH_2-CH_2-$。

【請求項12】

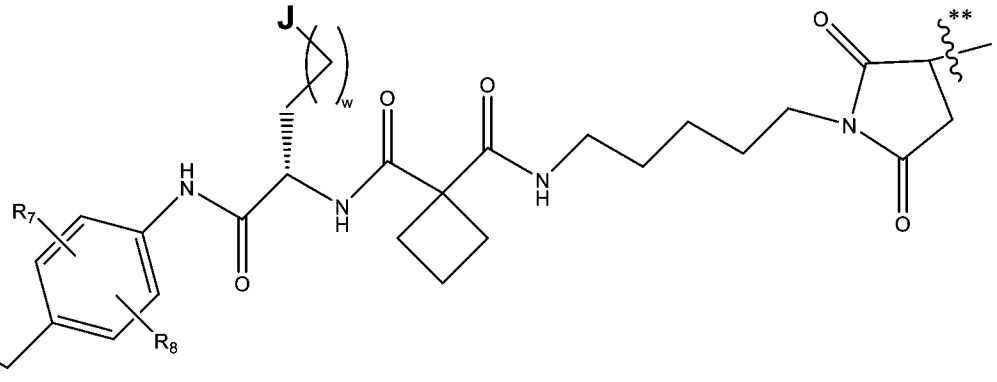
如請求項 5 之結合物，其中 L1 係選自由以下所組成之群組：



;



;

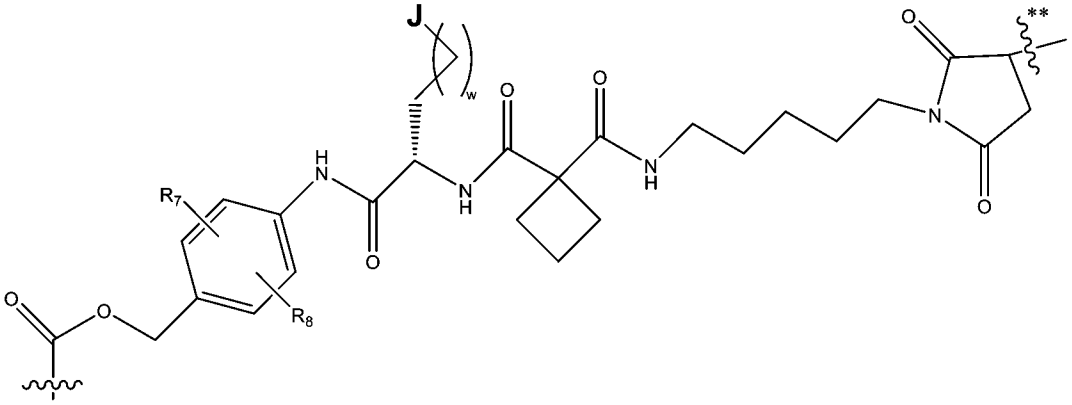


及 ;

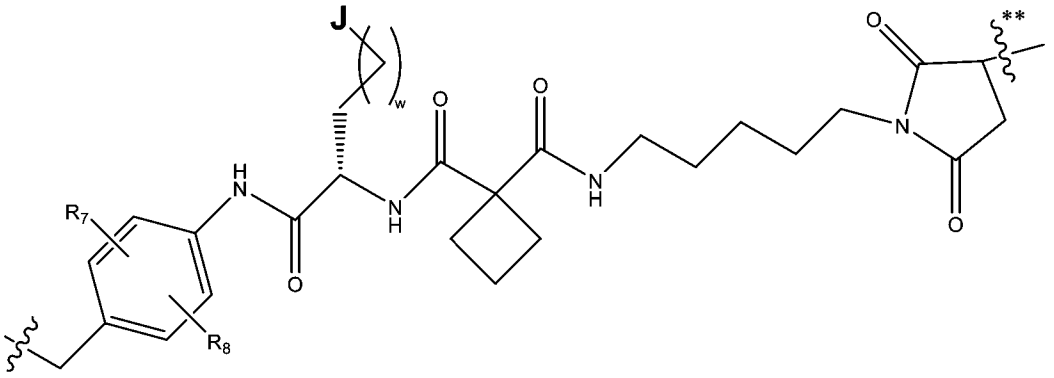
其中，R_5 及 R_6 獨立地為氫或 $C_{1\text{-}5}$ 烷基；或 R_5 及 R_6 與其各自所接附的氮一起形成視情況經取代之 5 員至 7 員雜環基。

【請求項13】

如請求項 12 之結合物，其中 L1 係選自由以下所組成之群組：



；



及

。

【請求項14】

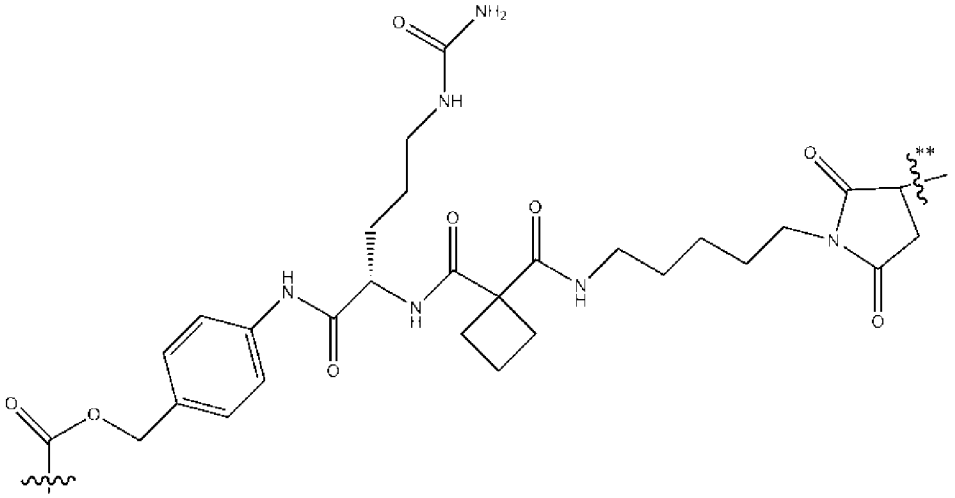
如請求項 13 之結合物，其中 J 為 —NH-C(O)-NH_2 或 —$N(CH_3)_2$。

【請求項15】

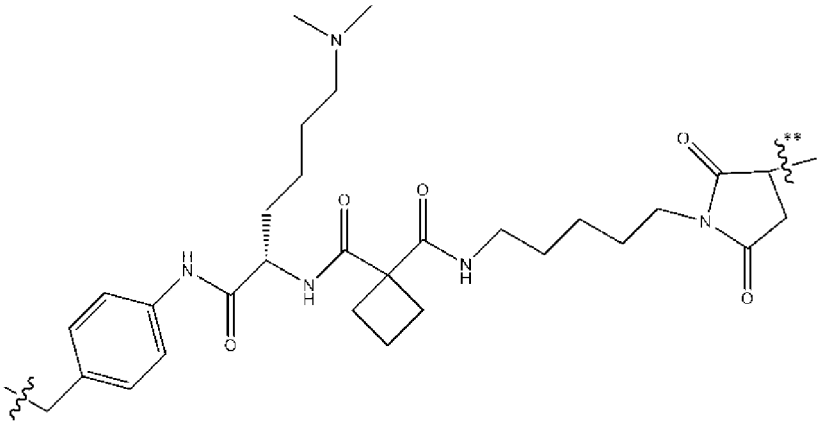
如請求項 14 之結合物，其中 w 為 2 且 J 為 —NH-C(O)-NH_2；或 w 為 3 且 J 為 —$N(CH_3)_2$。

【請求項16】

如請求項 15 之結合物，其中 L1 具有下列結構：



；或



。

【請求項17】

如請求項 1 至 16 中任一項之結合物，其中該磷酸酯部分係選自由以下所組成之群組：

$-(P=O)(OH)_2$、$-CH_2O(P=O)(OH)_2$、$-(P=O)(OH)O(P=O)(OH)_2$ 及 $-CH_2-O(P=O)(OH)O(P=O)(OH)_2$。

【請求項18】

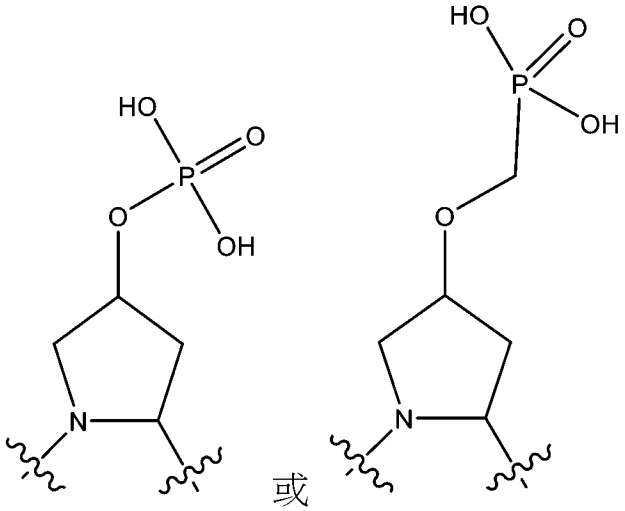
如請求項 1 之結合物，其中該 E3LB 包含羥基脯胺酸殘基。

【請求項19】

如請求項 18 之結合物，其中該磷酸酯部分係透過該羥基脯胺酸殘基之氧共價結合至 E3LB。

【請求項20】

如請求項 19 之結合物，其中該 E3LB 包含：

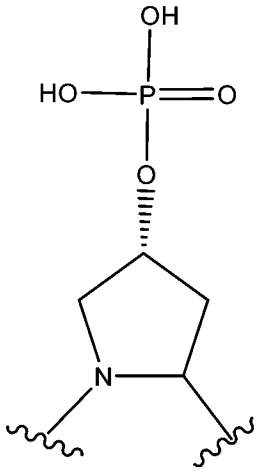


或

。

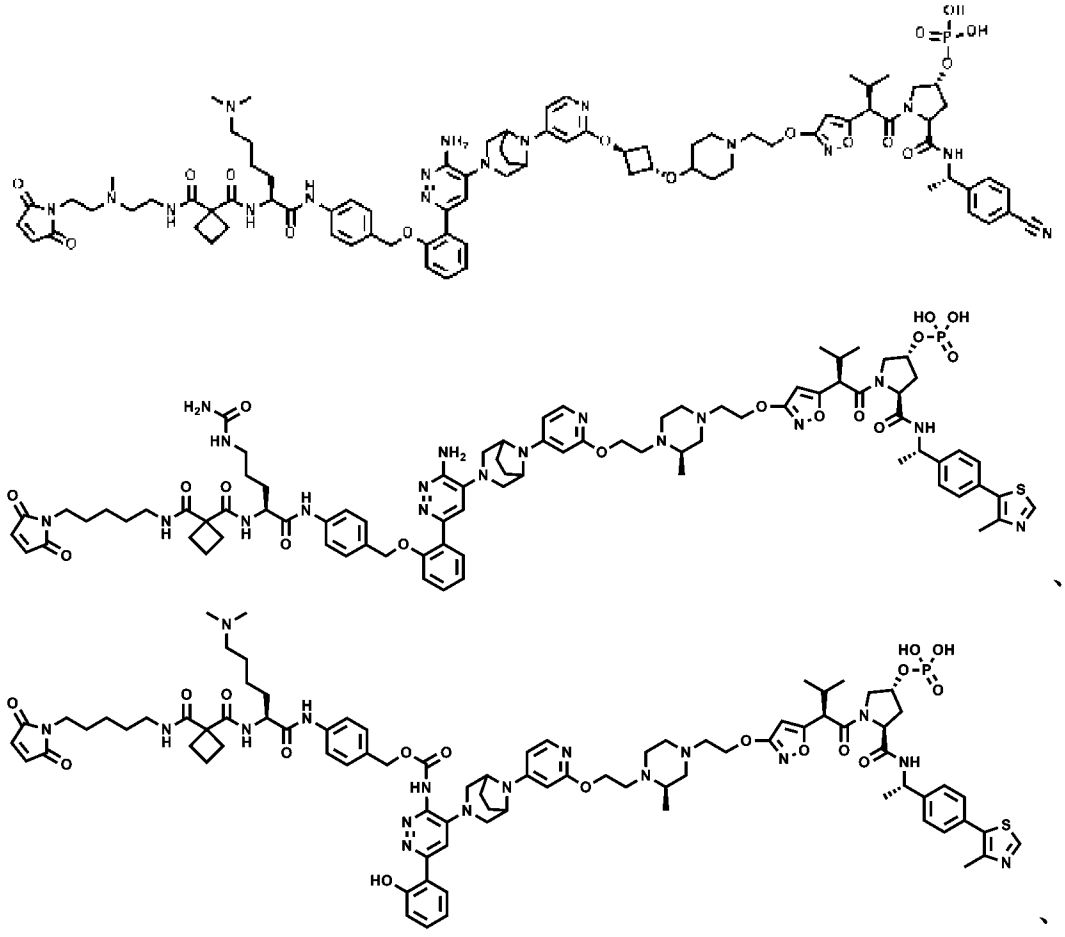
【請求項21】

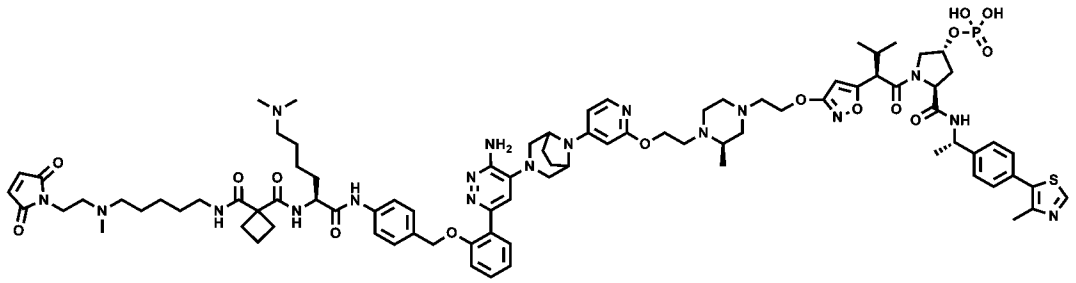
如請求項 20 之結合物，其中該 E3LB 包含：



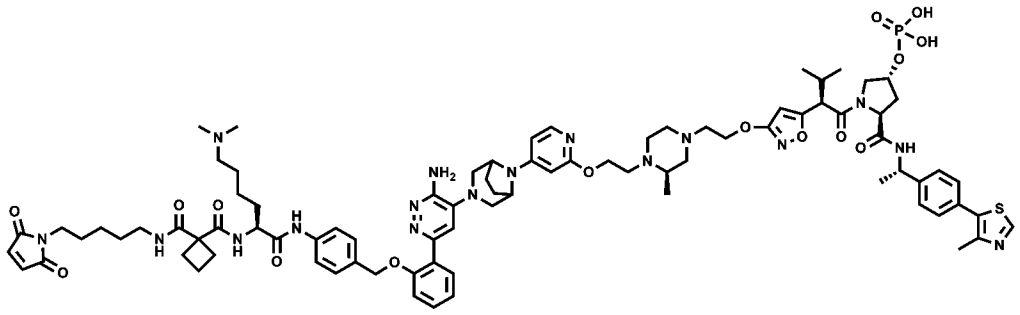
【請求項22】

如請求項 21 之結合物，其中該抗體所結合的 L1—D 為選自由以下所組成之群組的化合物之殘基：

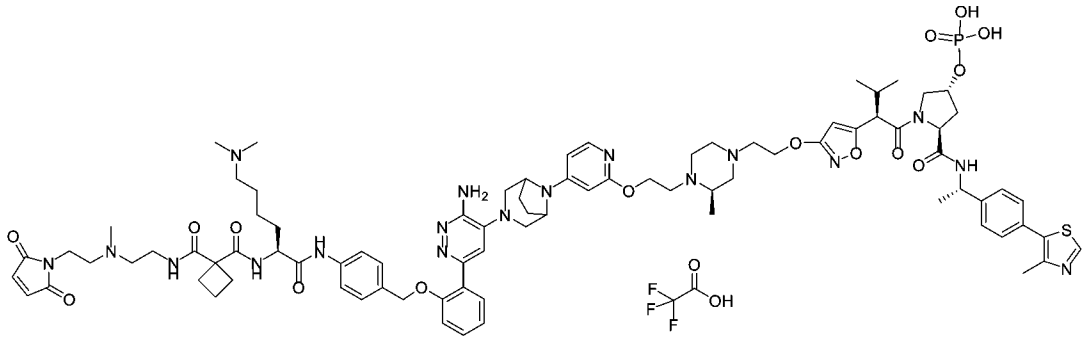




、



及



。

【請求項23】

如請求項 1 之結合物，其中該 PB 包含羥基苯基部分。

【請求項24】

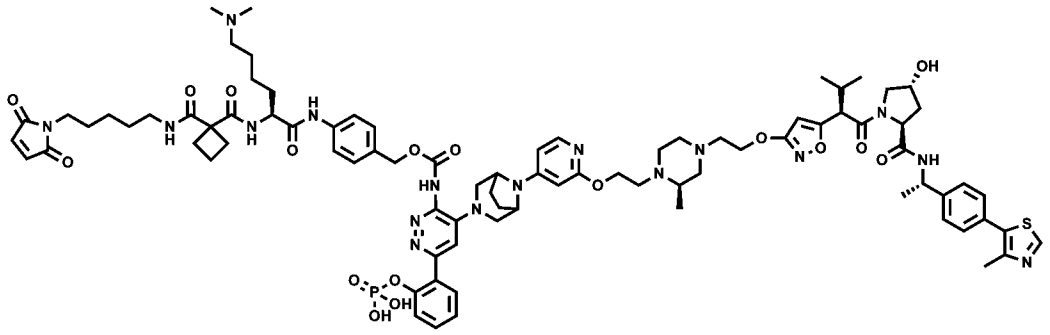
如請求項 23 之結合物，其中該磷酸酯部分係透過該羥基苯基部分之氧共價結合至 PB。

【請求項25】

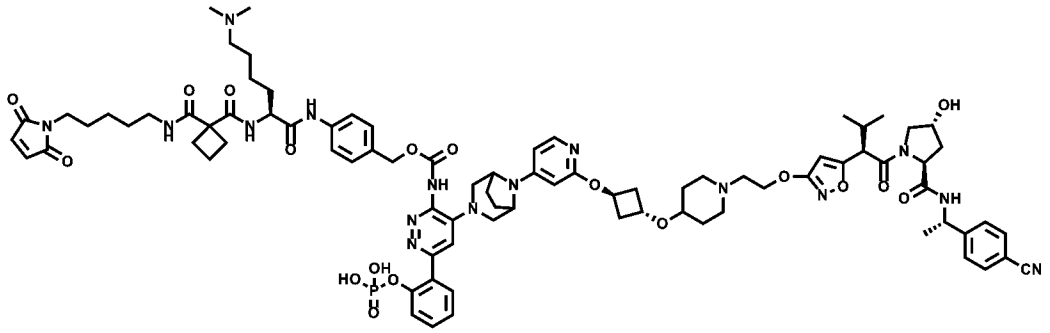
如請求項 24 之結合物，其中該 PB 為 BRM 配體。

【請求項26】

如請求項 25 之結合物，其中該抗體所結合的 L1—D 為選自由以下所組成之群組的化合物之殘基：



及



。

【請求項27】

一種醫藥組成物，其包含如請求項 1 之結合物及一種或多種醫藥上可接受之賦形劑。

【請求項28】

一種治療有需要之人的疾病之方法，其包含將有效量之如請求項 1 之結合物或如請求項 27 之組成物投予該人。

【請求項29】

如請求項 28 之方法，其中該疾病為癌症。

【請求項30】

如請求項 29 之方法，其中該癌症具有 BRM 依賴性。

【請求項31】

如請求項 30 之方法，其中該癌症為非小細胞肺癌。

【請求項32】

一種降低個體的標靶蛋白的量之方法，其包含，

將如請求項 1 之結合物或如請求項 27 之組成物投予該個體，其

中該 PB 部分結合該標靶蛋白，其中泛蛋白連接酶影響該結合的標靶蛋白之降解，且其中該標靶蛋白的量降低。