I636792

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 **(11)證書號數：TW I636792 B**

(45)公告日： 中華民國 107 (2018) 年 10 月 01 日

(21)申請案號：103120758 (22)申請日： 中華民國 103 (2014) 年 06 月 16 日

(51)Int. Cl.： *A61K47/50 (2017.01)* *A61K39/395 (2006.01)*

(30)優先權：2013/08/12 美國 61/864,889

2013/12/16 美國 61/916,388

2014/03/24 美國 61/969,499

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

美國

(72)發明人：費洛加 約翰A FLYGARE, JOHN A. (US)；皮勒 湯瑪斯H PILLOW, THOMAS H. (US)；沙菲那 布萊恩 SAFINA, BRIAN (US)；維瑪 維莎 VERMA, VISHAL (US)；魏斌清 WEI, BINQING (CN)；丹尼 威廉 DENNY, WILLIAM (NZ)；季登斯 安娜 GIDDENS, ANNA (NZ)；李 荷 LEE, HO (NZ)；路國良 LU, GUO-LIANG (CN)；米勒 克莉絲汀 MILLER, CHRISTIAN (GB)；瑞卡索 高登 REWCASTLE, GORDON (NZ)；特索 摩安娜 TERCEL, MOANA (NZ)；波納特 穆瑞爾 BONNET, MURIEL (FR)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

TW 200833683A

審查人員：陳璟如

申請專利範圍項數：73 項 圖式數：49 共 327 頁

(54)名稱

1－（氯甲基）－2，3－二氫－1H－苯并［E］吲哚二聚體抗體－藥物結合物化合物及使用與治療方法

1-(CHLOROMETHYL)-2,3-DIHYDRO-1H-BENZO[E]INDOLE DIMER ANTIBODY-DRUG CONJUGATE COMPOUNDS, AND METHODS OF USE AND TREATMENT

(57)摘要

本發明提供包含經由連接體與 1-(氯甲基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚(CBI)二聚體藥物部分結合之抗體的抗體-藥物結合物及使用該等抗體-藥物結合物之方法。

The invention provides antibody-drug conjugates comprising an antibody conjugated to a 1-(chloromethyl)-2,3-dihydro-1H-benzo[e]indole (CBI) dimer drug moiety via a linker, and methods of using the antibody-drug conjugates.

指定代表圖：

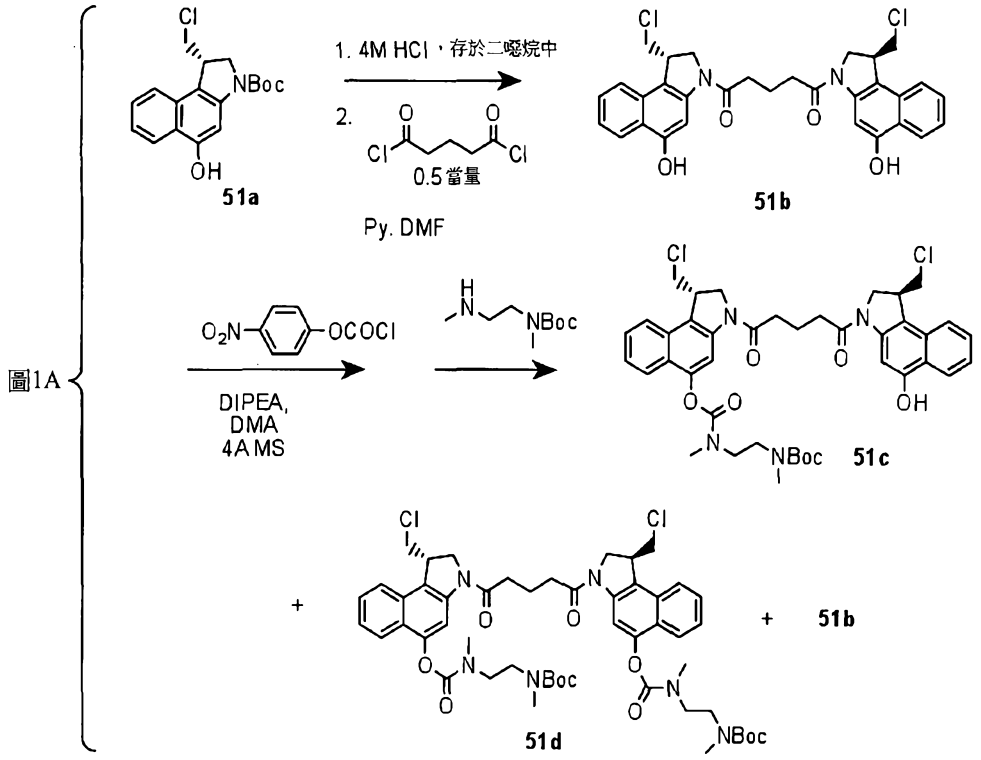

1. 4M HCl，存於二噁烷中
2.
0.5當量
Py. DMF
DIPEA,
DMA
4A MS
51a
51b
51c
51d
51b

圖1A

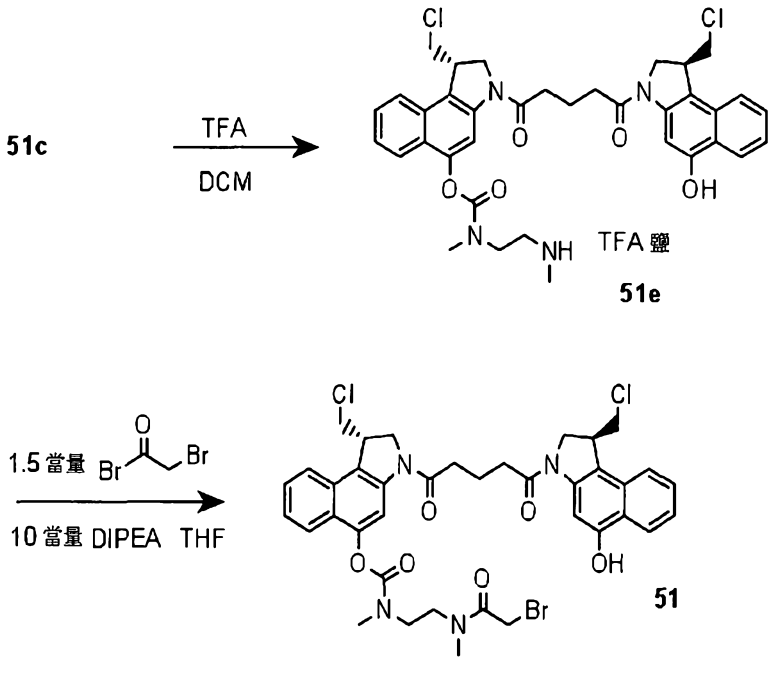

51c
TFA
DCM
TFA鹽
51e
1.5當量
10當量 DIPEA THF
51

圖1B

發明專利說明書

（本說明書格式、順序，請勿任意更動）

【發明名稱】

1-(氯甲基)-2,3-二氫-1H-苯并[E]吲哚二聚體抗體-藥物結合物化合物及使用與治療方法

1-(CHLOROMETHYL)-2,3-DIHYDRO-1H-BENZO[E]INDOLE DIMER ANTIBODY-DRUG CONJUGATE COMPOUNDS, AND METHODS OF USE AND TREATMENT

相關申請案之交叉參考

於37 CFR §1.53(b)下申請之此非臨時申請案於35 USC §119(e)下主張於2013年8月12日提出申請之美國臨時申請案第61/864,889號、於2013年12月16日提出申請之美國臨時申請案第61/916,388號及於2014年3月24日提出申請之美國臨時申請案第61/969,499號的權益，該等案件之全文皆以引用方式併入本文中。

【技術領域】

本發明概言之係關於與1-(氯甲基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚(CBI)二聚體藥物部分結合以形成具有治療或診斷應用之抗體-藥物結合物的抗體。抗體可經對於與CBI二聚體藥物-連接體中間體之結合具有反應性之游離半胱胺酸胺基酸改造。本發明亦係關於使用CBI二聚體抗體-藥物結合物化合物之方法，其用於活體外、原位及活體內診斷或治療哺乳動物細胞或相關病理病況。

【先前技術】

抗體藥物結合物(ADC)係靶向化學治療分子，其藉由將有效細胞毒性藥物靶向表現抗原之腫瘤細胞、內化及釋放藥物來組合抗體及細胞毒性藥物二者之性質，藉此增強其抗腫瘤活性(Carter, P.及Senter, P.

(2008) The Cancer Jour. 14(3):154-169)。對於給定靶抗原之成功ADC研發取決於抗體選擇、連接體設計及穩定性、細胞毒性藥物效能與抗體之藥物及連接體結合模式最佳化(Polakis, P. (2005) Current Opinion in Pharmacology 5:382-387)。

5-胺基-1-(氯甲基)-1,2-二氫-3H-苯并[e]吲哚(胺基CBI)種類之DNA小溝烷基化劑係有效之細胞毒素(Atwell等人，(1999) J. Med. Chem., 42:3400)且已作為效應子單元用於多種前藥設計中用於癌症療法。該等烷基化劑包括抗體結合物(Jeffrey等人，(2005) J. Med. Chem., 48:1344)、基於胺基甲酸硝基苄基酯(Hay等人，(2003) J. Med. Chem. 46:2456)及相應硝基-CBI衍生物作為缺氧活化前藥之基因療法的前藥(Tercel等人，(2011) Angew.Chem., Int.編輯，50:2606-2609)。CBI及吡咯并[2,1-c][1,4]苯二氮呯(PBD)藥效團藉由烷基鏈連接在一起(Tercel等人， (2003) J. Med. Chem 46:2132-2151)。PBD二聚體(其中兩個吡咯并[2,1-c][1,4]苯二氮呯單元由伸烷基或伸烷基-伸芳基鏈繫鏈)係高度有效之鏈間交聯劑，其在DNA小溝中與鳥嘌呤反應(Rahman等人，(2009) Jour. Amer. Chem. Soc. 131(38):13756-13766；Thurston等人，(1994) Chem.Rev., 94:433-465；Bose等人，(1992) J. Am. Chem. Soc. 114:4939-4941；Gregson等人，(2004) Jour. Med. Chem. 47(5):1161-1174；US 7511032；US 7528126；US 7557099；US 7049311；US 7067511；US 7265105)且具有抵抗革蘭氏陽性(gram-positive)細菌(Doyle等人，(2009) Jour. Antimicrob. Chemo. 65(5):949-959；Hadjivassileva等人，(2005) Jour. Antimicrob. Chemo. 56(3):513-518)、人類B細胞慢性淋巴球性白血病(CLL)細胞(Pepper等人，(2004) Cancer Res.64(18):6750-6755)及實體瘤(Hochhauser等人，(2009) Clin.Cancer Res.15(6):2140-2147；Alley等人，(2004) 64(18):6700-6706；Hartley等人，(2004) Cancer Res. 64(18):6693-6699)之活性。二

聚體形式之PBD連接至抗體以形成ADC (US 2009/304710；US 2010/047257；US 2009/036431；WO 2011/130598, WO 2011/130616；US 2013/0028919)。

【發明內容】

本發明包括1-(氯甲基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚(CBI)二聚體藥物部分，其由連接體共價附接以形成具有治療或診斷應用之抗體-藥物結合物(ADC)化合物。

本發明之態樣係具有下式之抗體-藥物結合物化合物：

$$Ab-(L-D)_p$$

其中：

Ab係抗體；

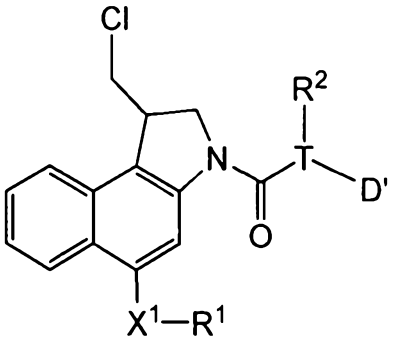
L係具有下式之連接體：

$$-Str-(Pep)_m-(Sp)_n-$$

其中Str係共價附接至抗體之延伸體單元；Pep係2至12個胺基酸殘基之可選肽單元，Sp係共價附接至二聚體藥物部分之可選間隔體單元，且m及n係獨立地選自0及1；

P係1至8之整數；

D係具有下式之二聚體藥物部分：



其中

R^1係選自H、$P(O)_3H_2$、$C(O)NR^aR^b$或與L之鍵；

R^2係選自H、$P(O)_3H_2$、$C(O)NR^aR^b$或與L之鍵；

R^a及R^b係獨立地選自H及視情況經一或多個F取代之C_1-C_6烷基，或R^a與R^b形成5或6員雜環基；

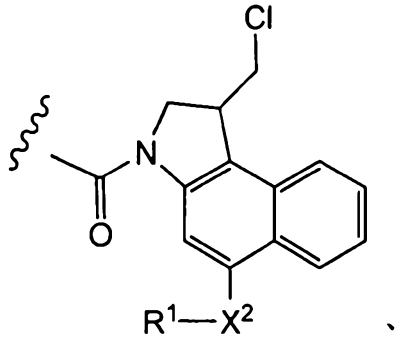
T係選自以下之繫鏈基團：C_3-C_{12}伸烷基、Y、(C_1-C_6伸烷基)-Y-(C_1-C_6伸烷基)、(C_1-C_6伸烷基)-Y-(C_1-C_6伸烷基)-Y-(C_1-C_6伸烷基)、(C_2-C_6伸烯基)-Y-(C_2-C_6伸烯基)及(C_2-C_6伸炔基)-Y-(C_2-C_6伸炔基)；

其中Y係獨立地選自O、S、NR^1、芳基及雜芳基；

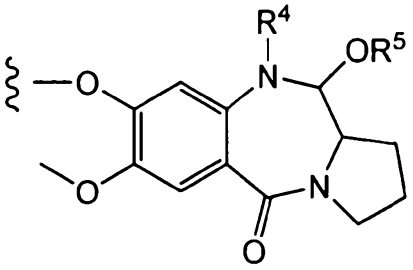
其中伸烷基、伸烯基、芳基及雜芳基獨立地且視情況經F、OH、O(C_1-C_6烷基)、NH_2、$NHCH_3$、$N(CH_3)_2$、$OP(O)_3H_2$及C_1-C_6烷基取代，其中烷基視情況經一或多個F取代；

或伸烷基、伸烯基、芳基及雜芳基獨立地且視情況經與L之鍵取代；

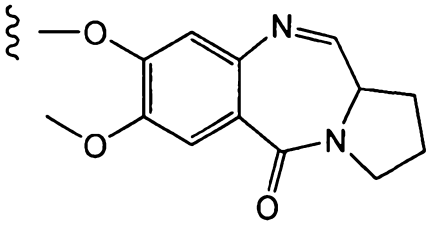
D'係選自以下之藥物部分：



、



及



其中波形線指示與T之附接位點；

X^1及X^2係獨立地選自O及NR^3，其中R^3係選自H及視情況經一或

多個F取代之C_1-C_6烷基；

R^4係H、CO_2R或與L之鍵，其中R係C_1-C_6烷基或苄基；且

R^5係H或C_1-C_6烷基。

本發明之態樣係抗體-藥物結合物化合物及醫藥上可接受之載劑、助流劑、稀釋劑或賦形劑的醫藥組合物。

本發明之態樣係治療癌症之方法，其包含向患者投與治療有效量之抗體-藥物結合物化合物。

本發明之態樣係用於治療癌症之套組，其包含：

a)醫藥組合物；及

b)使用說明書。

本發明之態樣係選自以下之連接體-藥物中間體：

X-L-D

其中：

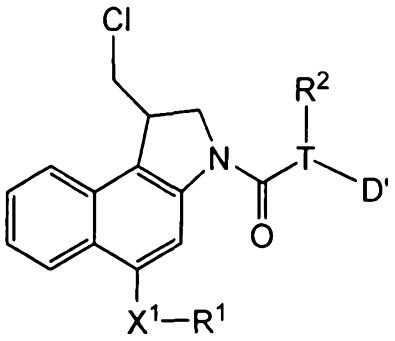
X係選自以下之反應性官能基：馬來醯亞胺、硫醇、胺基、溴化物、溴乙醯胺基、碘乙醯胺基、對甲苯磺酸酯、碘化物、羥基、羧基、吡啶基二硫化物及N-羥基琥珀醯亞胺；

L係具有下式之連接體：

$$-Str-(Pep)_m-(Sp)_n-$$

其中Str係共價附接至X之延伸體單元；Pep係2至12個胺基酸殘基之可選肽單元，Sp係共價附接至二聚體藥物部分之可選間隔體單元，且m及n係獨立地選自0及1；

D係具有下式之二聚體藥物部分：



其中

R^1係選自H、$P(O)_3H_2$、$C(O)NR^aR^b$或與L之鍵；

R^2係選自H、$P(O)_3H_2$、$C(O)NR^aR^b$或與L之鍵；

R^a及R^b係獨立地選自H及視情況經一或多個F取代之C_1-C_6烷基，或R^a與R^b形成5或6員雜環基；

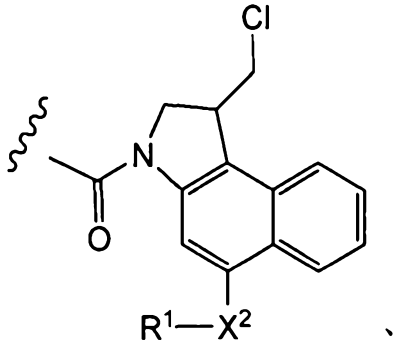
T係選自以下之繫鏈基團：C_3-C_{12}伸烷基、Y、(C_1-C_6伸烷基)-Y-(C_1-C_6伸烷基)、(C_1-C_6伸烷基)-Y-(C_1-C_6伸烷基)-Y-(C_1-C_6伸烷基)、(C_2-C_6伸烯基)-Y-(C_2-C_6伸烯基)及(C_2-C_6伸炔基)-Y-(C_2-C_6伸炔基)；

其中Y係獨立地選自O、S、NR^1、芳基及雜芳基；

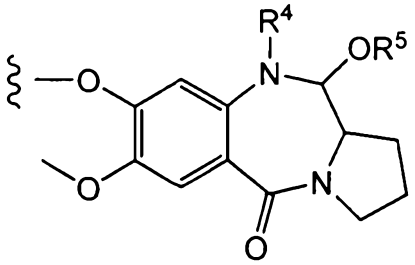
其中伸烷基、伸烯基、芳基及雜芳基獨立地且視情況經F、OH、O(C_1-C_6烷基)、NH_2、$NHCH_3$、$N(CH_3)_2$、$OP(O)_3H_2$及C_1-C_6烷基取代，其中烷基視情況經一或多個F取代；

或伸烷基、伸烯基、芳基及雜芳基獨立地且視情況經與L之鍵取代；

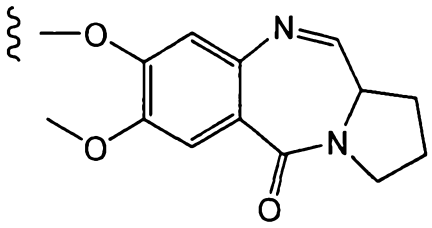
D'係選自以下之藥物部分：



、



及



其中波形線指示與T之附接位點；

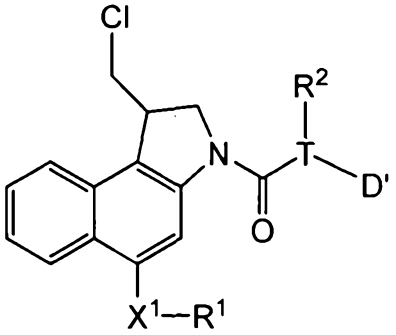
X^1及X^2係獨立地選自O及NR^3，其中R^3係選自H及視情況經一或多個F取代之C_1-C_6烷基；

R^4係H、CO_2R或與L之鍵，其中R係C_1-C_6烷基或苄基；且

R^5係H或C_1-C_6烷基。

本發明之態樣係藉由結合抗體與連接體-藥物中間體製備抗體-藥物結合物的方法。

本發明之態樣係具有下式之CBI二聚體藥物部分化合物：



其中

R^1係選自H、$P(O)_3H_2$、$C(O)NR^aR^b$；

R^2係選自H、$P(O)_3H_2$、$C(O)NR^aR^b$；

R^a及R^b係獨立地選自H及視情況經一或多個F取代之C_1-C_6烷基，或R^a與R^b形成5或6員雜環基；

T係選自以下之繫鏈基團：C_3-C_{12}伸烷基、Y、(C_1-C_6伸烷基)-Y-

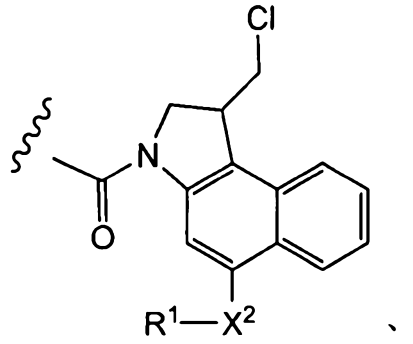
(C_1-C_6伸烷基)、(C_1-C_6伸烷基)-Y-(C_1-C_6伸烷基)-Y-(C_1-C_6伸烷基)、(C_2-C_6伸烯基)-Y-(C_2-C_6伸烯基)及(C_2-C_6伸炔基)-Y-(C_2-C_6伸炔基)；

其中Y係獨立地選自O、S、NR^1、芳基及雜芳基；

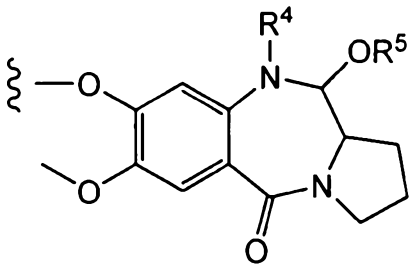
其中伸烷基、伸烯基、芳基及雜芳基獨立地且視情況經F、OH、O(C_1-C_6烷基)、NH_2、$NHCH_3$、$N(CH_3)_2$、$OP(O)_3H_2$及C_1-C_6烷基取代，其中烷基視情況經一或多個F取代；

或伸烷基、伸烯基、芳基及雜芳基獨立地且視情況經與L之鍵取代；

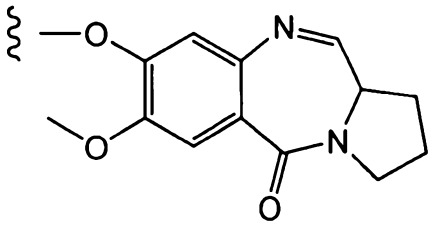
D'係選自以下之藥物部分：



、



及



其中波形線指示與T之附接位點；

X^1及X^2係獨立地選自O及NR^3，其中R^3係選自H及視情況經一或多個F取代之C_1-C_6烷基；

R^4係H、CO_2R，其中R係C_1-C_6烷基或苄基；且

R^5係H或C_1-C_6烷基。

【圖式簡單說明】

圖1顯示(S)-2-(2-溴-N-甲基乙醯胺基)乙基(甲基)胺基甲酸1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**51**自(S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-甲酸第三丁基酯**51a**之合成。

圖2顯示N-((R)-1-(氯甲基)-3-(5-((R)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基)-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺**53**自(R)-1-(氯甲基)-5-(二苯基亞甲基胺基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-甲酸第三丁基酯**53a**之合成。

圖3顯示1-((S)-5-胺基-1-(氯甲基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)戊烷-1,5-二酮**53j**自(S)-5-(5-(苄基氧基)-1-(氯甲基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊酸**57c**之合成。

圖4顯示非自然對映異構物1-((R)-5-胺基-1-(氯甲基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-((R)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)戊烷-1,5-二酮**53p**自(R)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-甲酸第三丁基酯**53k**之合成。

圖5顯示N-(4-(((S)-1-(氯甲基)-3-(6-((S)-7-甲氧基-5-側氧基-2,3,5,11a-四氫-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮呯-8-基氧基)己醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基氧基)甲基)苯基)-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺**54**自(S)-(2-胺基-4-羥基-5-甲氧基苯基)(2-(羥基甲基)吡咯啶-1-基)甲酮**54a**之合成。

圖6顯示N-((S)-1-((S)-1-(4-(((S)-1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基氧基)甲基)苯基胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基胺基)-3-甲

基-1-側氧基丁-2-基)-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺**55**自(S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-甲酸第三丁基酯**51a**之合成。

圖7顯示(S)-8-(6-((S)-5-(4-((S)-2-((S)-2-胺基-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苄基氧基)-1-(氯甲基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-6-側氧基己基氧基)-11-羥基-7-甲氧基-5-側氧基-2,3,11,11a-四氫-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮-呼10(5H)-甲酸第三丁基酯**56d**自(S)-8-(6-((S)-1-(氯甲基)-5-(4-硝基苄基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-6-側氧基己基氧基)-11-羥基-7-甲氧基-5-側氧基-2,3,11,11a-四氫-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮呼-10(5H)-甲酸第三丁基酯**54g**之合成。

圖8顯示N-((S)-1-((S)-1-(4-(((S)-1-(氯甲基)-3-(6-((S)-7-甲氧基-5-側氧基-2,3,5,11a-四氫-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮呼-8-基氧基)己醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基氧基)甲基)苯基胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基胺基)-3-甲基-1-側氧基丁-2-基)-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺**56**自(S)-8-(6-((S)-5-(4-((S)-2-((S)-2-胺基-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苄基氧基)-1-(氯甲基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-6-側氧基己基氧基)-11-羥基-7-甲氧基-5-側氧基-2,3,11,11a-四氫-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮呼-10(5H)-甲酸第三丁基酯**56d**之合成。

圖9顯示(S)-5-(1-(氯甲基)-5-(二-第三丁氧基磷醯基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊酸**57d**自(S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-甲酸第三丁基酯**51a**之合成。

圖10顯示(S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-N-甲基己醯胺基)乙基(甲基)胺基甲酸1-(氯甲基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**57i**自6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己酸之合成。

圖11顯示(S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-N-甲基

己醯胺基)乙基(甲基)胺基甲酸1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-(膦醯基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**57**自(S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-N-甲基己醯胺基)乙基(甲基)胺基甲酸1-(氯甲基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**57i**之合成。

圖12顯示(S)-4-甲基六氫吡嗪-1-甲酸3-(5-((S)-5-(4-胺基苄基氧基)-1-(氯甲基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-1-(氯甲基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**58e**自(*S*)-1-(氯甲基)-5-羥基-1*H*-苯并[*e*]吲哚-3(2*H*)-甲酸第三丁基酯**51a**之合成。

圖13顯示(S)-4-甲基六氫吡嗪-1-甲酸1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苄基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**58**自(S)-4-甲基六氫吡嗪-1-甲酸3-(5-((S)-5-(4-胺基苄基氧基)-1-(氯甲基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-1-(氯甲基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**58e**之合成。

圖14顯示(S)-磷酸二氫1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苄基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**59**自(S)-5-(4-((S)-2-((S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苄基氧基)-1-(氯甲基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-甲酸第三丁基酯**55e**之合成。

圖15顯示(S)-1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-(膦醯基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基胺基甲酸2-(吡啶-2-基二硫烷基)乙基酯**61**自(S)-5-胺基-1-(氯甲基)-

1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-甲酸第三丁基酯**61a**之合成。

圖16顯示(S)-1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-(膦醯基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基胺基甲酸2-(吡啶-2-基二硫烷基)丙基酯**62**自**51a**之合成。

圖17顯示(S)-4-甲基六氫吡嗪-1-甲酸3-(6-(4-((S)-2-(乙醯氧基甲基)吡咯啶-1-羰基)-5-胺基-2-甲氧基苯氧基)己醯基)-1-(氯甲基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**65d**自(S)-6-(5-(第三丁氧基羰基胺基)-4-(2-(羥基甲基)吡咯啶-1-羰基)-2-甲氧基苯氧基)己酸2,2,2-三氯乙基酯**54c**之合成。

圖18顯示苯甲醇離胺酸**65g**自(S)-2-(烯丙基氧基羰基胺基)-6-(第三丁氧基羰基胺基)己酸**65e**之合成。

圖19顯示(S)-8-(6-((S)-1-(氯甲基)-5-(4-甲基六氫吡嗪-1-羰基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-6-側氧基己基氧基)-11-羥基-7-甲氧基-5-側氧基-2,3,11,11a-四氫-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮呯-10(5H)-甲酸4-((S)-2-((S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基胺基)-3-甲基丁醯胺基)-6-(第三丁氧基羰基胺基)己醯胺基)苄基酯**65k**自(S)-4-甲基六氫吡嗪-1-甲酸3-(6-(4-((S)-2-(乙醯氧基甲基)吡咯啶-1-羰基)-5-胺基-2-甲氧基苯氧基)己醯基)-1-(氯甲基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**65d**之合成。

圖20顯示呈雙-三氟乙酸鹽形式之(S)-8-(6-((S)-1-(氯甲基)-5-(4-甲基六氫吡嗪-1-羰基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-6-側氧基己基氧基)-11-羥基-7-甲氧基-5-側氧基-2,3,11,11a-四氫-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮呯-10(5H)-甲酸4-((S)-6-胺基-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)己醯胺基)苄基酯**65**自**65k**之合成。

圖21顯示(S)-磷酸二-第三丁基酯1-(氯甲基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]

吲哚-5-基酯**66d**自(S)-5-(苄基氧基)-1-(氯甲基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-甲酸第三丁基酯**57a**(自**51a**製備)之合成。

圖22顯示N-(3-(2,5-雙((E)-3-((S)-1-(氯甲基)-5-膦醯氧基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-3-側氧基丙-1-烯基)苯基胺基)-3-側氧基丙基)-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺**66**自(2E,2'E)-3,3'-(2-硝基-1,4-伸苯基)二丙烯酸第三丁基酯**66e**之合成。

圖23顯示N-(3-(2,5-雙((E)-3-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-3-側氧基丙-1-烯基)苯基胺基)-3-側氧基丙基)-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺**67**自(2E,2'E)-3,3'-(2-(3-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基胺基)丙醯胺基)-1,4-伸苯基)二丙烯酸第三丁基酯**66g**之合成。

圖24顯示(S)-磷酸二氫1-(氯甲基)-3-((E)-3-(4-((E)-3-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-3-側氧基丙-1-烯基)-2-(3-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)丙醯胺基)苯基)丙烯醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**68**自**66d**、**67c**、**67d**之合成。

圖25顯示第3天時SK-BR-3活體外細胞存活力對硫代hu抗CD22 HC A121C-MC-vc-PAB-(CBI二聚體) **101**及硫代hu抗Her2 HC A121C-MC-vc-PAB-(CBI二聚體) **102**之濃度(μg/ml)之曲線中的抗體-藥物結合物之功效。

圖26顯示第3天時SK-BR-3活體外細胞存活力對硫代Hu抗Her2 4D5 HC A118C-MC-vc-PAB-(CBI-PBD)**103**及硫代Hu抗CD22 10F4v3 HC A118C-MC-vc-PAB-(CBI-PBD) **104**之濃度(μg/ml)之曲線中的抗體-藥物結合物之功效。

圖27顯示第3天時SK-BR-3活體外細胞存活力對硫代Hu抗CD22 10F4v3 HC A118C-MC-vc-PAB-(CBI二聚體) **116**及硫代Hu抗Her2 4D5 HC A118C-MC-vc-PAB-(CBI二聚體) **117**之濃度(μg/ml)之曲線中的抗

體-藥物結合物之功效。

圖28顯示第3天時EOL-1活體外細胞存活力對硫代Hu抗CD33 15G15.33 HC A118C-MC-MMED-(CBI二聚體磷酸酯) **125**之濃度(μg/ml)之曲線中的抗體-藥物結合物之功效。

圖29顯示第3天時EOL-1活體外細胞存活力對硫代Hu抗MUC16 3A5 HC A118C-MC-ED-(CBI二聚體DVB二磷酸酯) **126**及硫代Hu抗CD33 15G15.33 HC A118C-MC-ED-(CBI二聚體DVB二磷酸酯) **127**之濃度(μg/ml)之曲線中的抗體-藥物結合物之功效。

圖30顯示第3天時EOL-1活體外細胞存活力對硫代Hu抗CD33 15G15.33 HC A118C-MC-ED-(CBI二聚體DVB二磷酸酯) **127**、硫代Hu抗CD33 15G15.33 HC A118C-MC-ED-(CBI二聚體DVB磷酸酯) **129**及硫代Hu抗MUC16 3A5 HC A118C-MC-ED-(CBI二聚體DVB磷酸酯) **130**之濃度(μg/ml)之曲線中的抗體-藥物結合物之功效。

圖31顯示在IV給予一次以下物質後接種至CRL nu/nu小鼠之哺乳動物脂肪墊中之MMTV-HER2 Fo5轉基因乳房瘤中活體內擬合腫瘤體積隨時間之變化的曲線中之抗體-藥物結合物的功效：(1) 媒劑：8號組胺酸緩衝液：20 mM組胺酸乙酸鹽，pH 5.5，240 mM蔗糖，0.02% PS 20，(2) 硫代Hu抗CD22 10F4v3 HC A118C-MC-MMED-(CBI二聚體磷酸酯) **110**，(3) 硫代Hu抗CD22 10F4v3 HC A118C-MC-vc-PAB-(CBI二聚體MePip) **108**，(4) 硫代Hu抗CD22 10F4v3 HC A118C-MC-vc-PAB-(CBI二聚體磷酸酯) **111**，(5) 硫代Hu抗Her2 4D5 HC A118C-MC-MMED-(CBI二聚體磷酸酯) **109**，(6) 硫代Hu抗Her2 4D5 HC A118C-MC-vc-PAB-(CBI二聚體MePip) **107**，(7) 硫代Hu抗Her2 4D5 HC A118C-MC-vc-PAB-(CBI二聚體磷酸酯) **112**。ADC係以10 mg/kg給予。

圖32顯示在IV給予一次以下物質後接種至CRL nu/nu小鼠之哺乳

動物脂肪墊中之MMTV-HER2 Fo5轉基因乳房瘤中活體內擬合腫瘤體積隨時間之變化的曲線中之抗體-藥物結合物的功效：(1) 媒劑：8號組胺酸緩衝液：20 mM組胺酸乙酸鹽，pH 5.5，240 mM蔗糖，0.02% PS 20，(2) 硫代Hu抗CD22 10F4v3 HC A118C-DSE-(CBI二聚體磷酸酯) **120**，10 mg/kg，(3) 硫代Hu抗CD22 10F4v3 HC A118C-DSE-(CBI二聚體磷酸酯) **122**，10 mg/kg，(4) 硫代Hu抗CD22 10F4v3 HC A118C-MC-vc-PAB-(N10，PBD-CBI MePip) **124**，10 mg/kg，(5) 硫代Hu抗Her2 4D5 HC A118C-DSE-(CBI二聚體磷酸酯) **119**，3 mg/kg，(6) 硫代Hu抗Her2 4D5 HC A118C-DSE-(CBI二聚體磷酸酯) **119**，10 mg/kg，(7) 硫代Hu抗Her2 4D5 HC A118C-DSP-(CBI二聚體磷酸酯) **121**，3 mg/kg，(8) 硫代Hu抗Her2 4D5 HC A118C-DSP-(CBI二聚體磷酸酯) **121**，10 mg/kg (9) 硫代Hu抗Her2 4D5 HC A118C-MC-vc-PAB-(N10，PBD-CBI MePip) **123**，3 mg/kg，(10) 硫代Hu抗Her2 4D5 HC A118C-MC-vc-PAB-(N10，PBD-CBI MePip) **123**，10 mg/kg。

圖33顯示在IV給予一次以下物質後接種至C.B-17 SCID小鼠中之OVCAR3X2.1人類卵巢腫瘤中活體內擬合腫瘤體積隨時間之變化之曲線中的抗體-藥物結合物的功效：(1) 媒劑：8號組胺酸緩衝液：20 mM組胺酸乙酸鹽，pH 5.5，240 mM蔗糖，0.02% PS 20，(2) 硫代Hu抗CD33 15G15.33 HC A118C-MC-ED-(CBI二聚體DVB二磷酸酯) **127**，3 mg/kg，(3) 硫代Hu抗MUC16 3A5 HC A118C-MC-ED-(CBI二聚體DVB二磷酸酯) **126**，3 mg/kg，(4) 硫代Hu抗MUC16 3A5 HC A118C-MC-ED-(CBI二聚體DVB二磷酸酯) **126**，1 mg/kg。

圖34顯示在以20 μg/m2 IV給予一次以下物質後接種至C.B-17 SCID小鼠中之HL-60人類急性骨髓性白血病中活體內擬合腫瘤體積隨時間之變化的曲線中之抗體-藥物結合物的功效：(1) 媒劑：8號組胺酸緩衝液：20 mM組胺酸乙酸鹽，pH 5.5，240 mM蔗糖，0.02% PS

20，(2) 硫代Hu抗CD33 15G15.33 HC A118C-MC-MMED-(CBI二聚體磷酸酯) **125**，(3) 硫代Hu抗CD33 15G15.33 HC A118C-MC-ED-(CBI二聚體DVB二磷酸酯) **127**，(4) 硫代Hu抗MUC16 3A5 HC A118C-MC-MMED-(CBI二聚體磷酸酯) **128**，(5) 硫代Hu抗MUC16 3A5 HC A118C-MC-ED-(CBI二聚體DVB二磷酸酯) **126**。

圖35a顯示ADC**138**在患有HL-60人類急性骨髓性白血病腫瘤之SCID小鼠中之功效。ADC**138**證實與媒劑組相比腫瘤生長之劑量依賴性抑制。非靶標對照ADC**135**對腫瘤生長無影響。

圖35b顯示ADC**139**在患有HL-60人類急性骨髓性白血病腫瘤之SCID小鼠中之功效。ADC**139**證實與媒劑組相比腫瘤生長之明顯抑制。非靶標對照ADC**136**於1 mg/kg下對腫瘤生長具有中等效應；然而，ADC**139**於匹配劑量下實質上更有效，從而引起完全腫瘤消退。

圖36顯示ADC**134**在患有Igrov-1人類卵巢腫瘤之SCID-灰棕色小鼠中的功效。ADC**134**證實與媒劑組相比腫瘤生長之劑量依賴性抑制。非靶標對照ADC**137**對腫瘤生長無影響。

圖37顯示N-(3-(2,5-雙((E)-3-((S)-1-(氯甲基)-5-(4-甲基六氫吡嗪-1-羰基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-3-側氧基丙-1-烯基)苯基胺基)-3-側氧基丙基)-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺(化合物編號69，表4)之合成。

圖38顯示2,5-雙((E)-3-((S)-1-(氯甲基)-5-(膦醯基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-3-側氧基丙-1-烯基)苯基胺基甲酸2-(吡啶-2-基二硫烷基)丙基酯(表4，化合物編號72，圖38)之合成。

圖39顯示磷酸二氫[(1S)-1-(氯甲基)-3-[(E)-3-[4-[(E)-3-[(1S)-1-(氯甲基)-5-膦醯基氧基-1,2-二氫苯并[e]吲哚-3-基]-3-側氧基-丙-1-烯基]-2-[2-[2-(2,5-二側氧基吡咯-1-基)乙氧基]乙氧基]苯基]丙-2-烯醯基]-1,2-二氫苯并[e]吲哚-5-基]酯(化合物編號78，表4，圖39)之合成。

圖40顯示磷酸二氫[(1S)-1-(氯甲基)-3-[(E)-3-[4-[(E)-3-[(1S)-1-(氯甲基)-5-膦醯基氧基-1,2-二氫苯并[e]吲哚-3-基]-3-側氧基-丙-1-烯基]-2-[2-(2,5-二側氧基吡咯-1-基)乙氧基]苯基]丙-2-烯醯基]-1,2-二氫苯并[e]吲哚-5-基]酯(化合物編號79，表4，圖40)之合成。

圖41顯示N-[1-(氯甲基)-3-[5-[1-(氯甲基)-5-羥基-1,2-二氫苯并[e]吲哚-3-基]-5-側氧基-戊醯基]-1,2-二氫苯并[e]吲哚-5-基]胺基甲酸2-(2-吡啶基二硫烷基)丙基酯(化合物編號80，表4，圖41)之合成。

圖42-43顯示3-[6-[1-(氯甲基)-5-(4-甲基六氫吡嗪-1-羰基)氧基-1,2-二氫苯并[e]吲哚-3-基]-6-側氧基-己氧基]-6-羥基-2-甲氧基-11-側氧基-6a,7,8,9-四氫-6H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯二氮呯-5-甲酸2-(2-吡啶基二硫烷基)丙基酯、3-[6-[1-(氯甲基)-5-膦醯基氧基-1,2-二氫苯并[e]吲哚-3-基]-6-側氧基-己氧基]-6-羥基-2-甲氧基-11-側氧基-6a,7,8,9-四氫-6H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯二氮呯-5-甲酸2-(2-吡啶基二硫烷基)丙基酯及3-[6-[1-(氯甲基)-5-羥基-1,2-二氫苯并[e]吲哚-3-基]-6-側氧基-己氧基]-6-羥基-2-甲氧基-11-側氧基-6a,7,8,9-四氫-6H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯二氮呯-5-甲酸2-(2-吡啶基二硫烷基)丙基酯(化合物編號81-83，表4，圖42-43)之合成。

圖44顯示(1*S*)-β-D-吡喃葡萄糖苷酸1-(氯甲基)-3-((2*E*)-3-{4-((1*E*)-3-{(1*S*)-1-(氯甲基)-5-[(6-甲基-β-D-吡喃葡糖基)氧基]-1,2-二氫-3*H*-苯并[*e*]吲哚-3-基}-3-側氧基-1-丙烯基)-2-[(3-{[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)己醯基]胺基}丙醯基)胺基]苯基}-2-丙烯醯基)-1,2-二氫-3*H*-苯并[*e*]吲哚-5-基酯甲基酯(化合物編號84，表4，圖44)之合成。

圖45顯示(S)-(1-甲基-1H-吡咯-2,5-二基)雙(((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)甲酮) (化合物編號15，表1，圖45)之合成。

圖46顯示N-(2,5-雙((E)-3-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚

-3(2H)-基)-3-側氧基丙-1-烯基)苯基)乙醯胺(化合物編號16，表1，圖46)之合成。

圖47顯示(S,2E,2'E)-3,3'-(2-甲氧基-1,4-伸苯基)雙(1-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)丙-2-烯-1-酮) (化合物編號17，表1，圖47)之合成。

圖48顯示(S,2E,2'E)-3,3'-(1-甲基-1H-吡咯-2,5-二基)雙(1-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)丙-2-烯-1-酮) (化合物編號18，表1，圖48)之合成。

圖49顯示(S)-3,3'-(2-甲氧基-1,4-伸苯基)雙(1-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)丙-2-炔-1-酮) (化合物19，表1，圖49)之合成。

【實施方式】

現將詳細參照本發明之某些實施例，其實例闡釋於隨附結構及式中。儘管將結合所闡釋實施例來闡述本發明，但應理解，該等實施例並不意欲將本發明限於彼等實施例。相反，本發明意欲涵蓋隨附申請專利範圍所界定之本發明範疇內可包括之所有替代、修改及等效形式。

熟習此項技術者可瞭解多種與本文所述之方法及材料類似或等效者，其均可用於實踐本發明。本發明決不受限於所述方法及材料。

除非另有定義，否則本文所用之技術及科學術語皆具有與熟習本發明所屬技術者通常所瞭解的意義相同之意義，且與以下一致：Singleton等人，(1994) Dictionary of Microbiology and Molecular Biology，第2版， J. Wiley & Sons, New York, NY；及Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) Immunobiology，第5版，Garland Publishing, New York。

定義

除非另有說明，否則如本文所用之以下術語及片語皆意欲具有以下含義：

在本文中使用商品名時，申請者意欲獨立地包括商品名產品調配物、通用藥物及商品名產品之活性醫藥成份。

本文中之術語「抗體」係以最寬廣含義使用且特定而言涵蓋單株抗體、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，只要其呈現期望生物活性即可(Miller等人，(2003) Jour. of Immunology 170:4854-4861)。抗體可為鼠類、人類、人類化、嵌合抗體或源自其他物種。抗體係由免疫系統生成之能夠識別並結合至特定抗原之蛋白質。(Janeway, C.、Travers, P.、Walport, M.、Shlomchik (2001) Immuno Biology，第5版，Garland Publishing, New York)。靶抗原通常具有多個由多重抗體上之CDR識別之結合位點，亦稱作表位。特異性結合至不同表位之每一抗體皆具有不同結構。因此，一種抗原可具有一種以上相應抗體。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，含有免疫特異性結合目標靶標之抗原或其一部分之抗原結合位點的分子，該等靶標包括(但不限於)產生與自體免疫性疾病相關之自體免疫性抗體的癌細胞。本文揭示之免疫球蛋白可具有任一類型(例如，IgG、IgE、IgM、IgD及IgA)、種類(例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2)或亞類之免疫球蛋白分子。免疫球蛋白可源自任何物種。在一個態樣中，然而，免疫球蛋白具有人類、鼠類或兔起源。

「抗體片段」包含全長抗體之一部分，通常其抗原結合或可變區。抗體片段之實例包括Fab、Fab'、$F(ab')_2$及Fv片段；雙價抗體；直鏈抗體；微小抗體(Olafsen等人，(2004) Protein Eng. Design& Sel.17(4):315-323)、由Fab表現文庫產生之片段、抗個體基因型(抗Id)抗體、CDR (互補決定區)及上述中任一者之表位-結合片段，其免疫

特異性結合至癌細胞抗原、病毒抗原或微生物抗原、單鏈抗體分子；及自抗體片段形成之多特異性抗體。

本文所用術語「單株抗體」係指自實質上同源之抗體群獲得之抗體，即，除可能存在極少量天然存在之突變外，構成該群體之個別抗體均相同。單株抗體具有高度特異性，其針對單一抗原性位點。此外，與包括針對不同決定子(表位)之不同抗體之多株抗體製劑相反，每一單株抗體皆針對抗原上之單一決定子。除特異性外，單株抗體之優勢亦在於其在合成時可不受其他抗體污染。修飾詞「單株」指示抗體特徵係自實質上同源之抗體群獲得，且不應理解為需要藉由任一特定方法來產生該抗體。舉例而言，欲根據本發明使用之單株抗體可藉由首先由Kohler等人，(1975) Nature, 256:495)闡述之雜交瘤方法製得或可藉由重組DNA方法製得(例如，參見US 4816567；US 5807715)。例如，單株抗體亦可使用Clackson等人，(1991) Nature, 352:624-628；Marks等人，(1991) J. Mol. Biol., 222:581-597中闡述之技術自噬菌體抗體文庫分離出來。

特定而言，本文單株抗體包括「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特定抗體種類或亞類之抗體的相應序列相同或同源，而該(等)鏈之其餘部分與源自另一物種或屬另一抗體種類或亞類之抗體的相應序列相同或同源；以及該等抗體之片段，只要其呈現期望生物學活性即可(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包含源自非人類靈長類動物(例如，舊大陸猴、猿等)之可變結構域抗原-結合序列及人類恆定區序列的「靈長類化」抗體。

本文之「完整抗體」係包含VL及VH結構域、以及輕鏈恆定結構域(CL)及重鏈恆定結構域CH1、CH2及CH3者。恆定結構域可為天然序列恆定結構域(例如，人類天然序列恆定結構域)或其胺基酸序列變

體。完整抗體可具有一或多種「效應功能」，其係指彼等歸因於抗體之Fc恆定區(天然序列Fc區或胺基酸序列變體Fc區)之生物活性。抗體效應功能之實例包括C1q結合；補體依賴性細胞毒性(CDC)；Fc受體結合；抗體依賴性細胞調介之細胞毒性(ADCC)；吞噬作用；及細胞表面受體(例如B細胞受體及BCR)之下調。

術語「Fc區域」在本文中用於定義免疫球蛋白重鏈中含有恆定區域之至少一部分的C-末端區。該術語包括天然序列Fc區及變體Fc區。在一個實施例中，人類IgG重鏈Fc區自Cys226或自Pro230延伸至重鏈之羧基末端。然而，Fc區之C末端離胺酸(Lys447)可存在或可不存在。除非在本文中另外指出，否則Fc區或恆定區中胺基酸殘基之編號係根據亦稱為EU索引之EU編號系統，如Kabat等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991中所述。

「框架」或「FR」係指除超變區(HVR)殘基外之可變結構域殘基。可變結構域之FR通常由4個FR結構域：FR1、FR2、FR3及FR4組成。因此，HVR及FR序列通常出現於VH (或VL)中之下列序列中：FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

端視完整抗體重鏈中恆定結構域之胺基酸序列，可將完整抗體歸類為不同「種類」。存在5個主要種類之完整免疫球蛋白抗體：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，且可將該等種類中若干種類進一步劃分成「亞類」(同型物)，例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA及IgA2。對應於不同抗體種類之重鏈恆定結構域分別稱為α、δ、ε、γ及μ。不同種類免疫球蛋白之亞單元結構及三維組態已為吾人所熟知。Ig形式包括鉸鏈修飾形式或無鉸鏈形式(Roux等人，(1998) J. Immunol. 161:4083-4090；Lund等人，(2000) Eur. J. Biochem. 267:7246-7256；US 2005/0048572；US 2004/0229310)。

「人類抗體」係具有對應於如下抗體之胺基酸序列的胺基酸序列者：其係由人類或人類細胞產生或源自利用人類抗體譜或其他編碼人類抗體之序列之非人類來源。此人類抗體之定義明確排除包含非人類抗原結合殘基之人類化抗體。

「人類共有框架」係代表在選擇人類免疫球蛋白VL或VH框架序列中最普遍存在之胺基酸殘基之框架。通常，人類免疫球蛋白VL或VH序列之選擇係來自可變結構域序列亞組。通常，序列之亞組係如Kabat等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第5版，NIH公開案91-3242, Bethesda MD (1991)，第1-3卷中之亞組。在一個實施例中，對於VL而言，亞組系如Kabat等人，所述之亞組κI (見上文)。在一個實施例中，對於VH而言，該亞組係如Kabat等人，所述之III亞組(見上文)。

「人類化」抗體係指包含來自非人類HVR之胺基酸殘基及來自人類FR之胺基酸殘基的嵌合抗體。在某些實施例中，人類化抗體將包含實質上全部之至少一個、且通常兩個可變結構域，其中全部或實質上全部之HVR (例如，CDR)對應於非人類之彼等HVR，且全部或實質上全部之FR對應於人類抗體之彼等FR。人類化抗體視情況可包含源自人類抗體之抗體恆定區域的至少一部分。抗體之「人類化形式」(例如，非人類抗體)係指已經受人類化之抗體。

本文所用術語「超變區」或「HVR」係指抗體可變結構域區域中序列具有超變性及/或形成結構上經界定之環(「超變環」)中的每一者。通常，天然四鏈抗體包含六個HVR；三個位於VH中(H1、H2、H3)，且三個位於VL中(L1、L2、L3)。HVR通常包含來自超變環及/或來自「互補決定區」(CDR)之胺基酸殘基，後者具有最高序列可變性及/或涉及抗原識別。實例性超變環出現於胺基酸殘基26-32 (L1)、50-52 (L2)、91-96 (L3)、26-32 (H1)、53-55 (H2)及96-101 (H3)處。

(Chothia及Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)。)實例性CDR (CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2及CDR-H3)出現於L1之胺基酸殘基24-34、L2之50-56、L3之89-97、H1之31-35B、H2之50-65及H3之95-102處。(Kabat等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)。)除VH中之CDR1外，CDR通常包含形成超變環之胺基酸殘基。CDR亦包含「特異性決定殘基」或「SDR」，其係接觸抗原之殘基。SDR含於CDR中稱為縮短-CDR (abbreviated-CDR)或a-CDR之區內。實例性a-CDR (a-CDR-L1、a-CDR-L2、a-CDR-L3、a-CDR-H1、a-CDR-H2及a-CDR-H3)出現於L1之胺基酸殘基31-34、L2之50-55、L3之89-96、H1之31-35B、H2之50-58及H3之95-102處。(參見Almagro及Fransson，*Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008))。除非另有指示，否則可變結構域中之HVR殘基及其他殘基(例如，FR殘基)在本文中係根據Kabat等人，(見上文)編號。

術語「可變區」或「可變結構域」係指抗體重鏈或輕鏈中參與使抗體與抗原結合之結構域。天然抗體之重鏈及輕鏈之可變結構域(分別為VH及VL)通常具有相似結構，其中各結構域包含4個保守框架區(FR)及三個超變區(HVR)。(例如，參見，Kindt等人，Kuby Immunology，第6版，W.H. Freeman and Co.，第91頁(2007))。單一VH或VL結構域可足以賦予抗原結合特異性。此外，結合特定抗原之抗體可使用來自結合該抗原之抗體之VH或VL結構域分離以分別篩選互補VL或VH結構域文庫。例如，參見Portolano等人，J. Immunol. 150:880-887 (1993)；Clarkson等人，Nature 352:624-628 (1991)。

本文所用術語「載體」係指能夠轉運與其連接之另一核酸的核酸分子。該術語包括呈自複製核酸結構形式之載體，以及納入引入其之宿主細胞基因組中的載體。某些載體能夠引導與其可操作連接之核

酸的表現。此等載體在本文中稱作「表現載體」。

「游離半胱胺酸胺基酸」係指經改造成親代抗體之半胱胺酸胺基酸殘基具有硫醇官能基(-SH)，且並不配對為分子內或分子間二硫鍵。

「連接體」、「連接體單元」或「連接體」意指包含將抗體共價附接至藥物部分之原子鏈的化學部分。在各種實施例中，連接體係二價基團，指定為L。

在指示取代基之數目時，術語「一或多個」係指自一個取代基至最高可能取代數目之範圍，即經取代基置換一個氫至多達置換所有氫。術語「取代基」表示置換母體分子上之氫原子的一個原子或一組原子。術語「經取代」表示指定基團具有一或多個取代基。在任一基團可帶有多個取代基並提供多個可能取代基時，取代基獨立地加以選擇且無需相同。術語「未經取代」意指指定基團不具有取代基。術語「視情況經取代」意指指定基團未經取代或經一或多個獨立地選自可能取代基之群之取代基取代。在指示取代基之數目時，術語「一或多個」意指自一個取代基至最高可能取代數目，即經取代基置換一個氫至多達置換所有氫。

本文所用術語「烷基」係指1至12個碳原子(C_1-C_{12})之任何長度之飽和直鏈或具支鏈單價烴基團，其中烷基可視情況獨立地經下文所述一或多個取代基取代。在另一實施例中，烷基係1至8個碳原子(C_1-C_8)或1至6個碳原子(C_1-C_6)。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、第二丁基、-$CH(CH_3)CH_2CH_3$)、2-甲基-2-丙基(t-Bu、第三丁基、-$C(CH_3)_3$)、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(-$CH_2CH(CH_3)CH_2CH_3$)、1-己基(-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$)、2-己基(-$CH(CH_3)CH_2CH_2CH_2CH_3$)、3-己基(-$CH(CH_2CH_3)(CH_2CH_2CH_3)$)、2-甲基-2-戊基(-$C(CH_3)_2CH_2CH_2CH_3$)、3-甲基-2-戊基(-$CH(CH_3)CH(CH_3)CH_2CH_3$)、4-甲基-2-戊基(-$CH(CH_3)CH_2CH(CH_3)_2$)、3-甲基-3-戊基(-$C(CH_3)(CH_2CH_3)_2$)、2-甲基-3-戊基(-$CH(CH_2CH_3)CH(CH_3)_2$)、2,3-二甲基-2-丁基(-$C(CH_3)_2CH(CH_3)_2$)、3,3-二甲基-2-丁基(-$CH(CH_3)C(CH_3)_3$、1-庚基、1-辛基及諸如此類。

本文所用術語「伸烷基」係指1至12個碳原子(C_1-C_{12})之任何長度之飽和直鏈或具支鏈二價烴基團，其中伸烷基可視情況獨立地經下文所述一或多個取代基取代。在另一實施例中，伸烷基係1至8個碳原子(C_1-C_8)或1至6個碳原子(C_1-C_6)。伸烷基之實例包括(但不限於)亞甲基(-CH_2-)、伸乙基(-CH_2CH_2-)、伸丙基(-$CH_2CH_2CH_2$-)及諸如此類。

術語「烯基」係指具有至少一個不飽和位點(即，碳-碳，sp^2雙鍵)之2至8個碳原子(C_2-C_8)之任何長度的直鏈或具支鏈單價烴基團，其中烯基可視情況經一或多個本文所述取代基獨立地取代，且包括具有「順式」及「反式」定向或另一選擇為「E」及「Z」定向之基團。實例包括(但不限於)乙烯基(ethylenyl或vinyl) (-$CH=CH_2$)、烯丙基(-$CH_2CH=CH_2$)及諸如此類。

術語「伸烯基」係指具有至少一個不飽和位點(即，碳-碳，sp^2雙鍵)之2至8個碳原子(C_2-C_8)之任何長度的直鏈或具支鏈二價烴基團，其中伸烯基可視情況經一或多個本文所述取代基獨立地取代，且包括具有「順式」及「反式」定向或另一選擇為「E」及「Z」定向之基團。實例包括(但不限於)伸乙烯基(ethylenylene或vinylene) (-CH=CH-

)、烯丙基(-CH_2CH=CH-)及諸如此類。

術語「炔基」係指具有至少一個不飽和位點(即，碳-碳，sp三鍵)之2至8個碳原子(C_2-C_8)之任何長度的直鏈或具支鏈單價烴基團，其中炔基可視情況經一或多個本文所述取代基獨立地取代。實例包括(但不限於)乙炔基(-C≡CH)、丙炔基(炔丙基、-CH_2C≡CH)及諸如此類。

術語「伸炔基」係指具有至少一個不飽和位點(即，碳-碳，sp三鍵)之2至8個碳原子(C_2-C_8)之任何長度的直鏈或具支鏈二價烴基團，其中伸炔基可視情況經一或多個本文所述取代基獨立地取代。實例包括(但不限於)伸乙炔基(-C≡C-)、伸丙炔基(伸炔丙基、-CH_2C≡C-)及諸如此類。

術語「碳環」、「碳環基」、「碳環環」及「環烷基」係指具有3至12個呈單環之碳原子(C_3-C_{12})或7至12個呈二環之碳原子之單價非芳香族飽和或部分不飽和環。具有7至12個原子之二環碳環可佈置呈(例如)二環[4,5]、[5,5]、[5,6]或[6,6]系統，且具有9或10個環原子之二環碳環可佈置呈二環[5,6]或[6,6]系統或橋接系統，例如二環[2.2.1]庚烷、二環[2.2.2]辛烷及二環[3.2.2]壬烷。螺部分亦包括在此定義之範疇內。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、環己基、1-環己-1-烯基、1-環己-2-烯基、1-環己-3-烯基、環己二烯基、環庚基、環辛基、環壬基、環癸基、環十一烷基、環十二烷基及諸如此類。碳環基視情況經一或多個本文所述取代基獨立地取代。

「芳基」意指藉由自母體芳香族環系統之單一碳原子移除一個氫原子獲得之6至20個碳原子(C_6-C_{20})的單價芳香族烴基。一些芳基在實例性結構中表示為「Ar」。芳基包括包含稠合至飽和、部分不飽和環或芳香族碳環之芳香族環的二環基團。典型芳基包括(但不限於)衍

生自苯(苯基)、經取代苯、萘、蒽、聯苯基、茚基、二氫茚基、1,2-二氫萘、1,2,3,4-四氫萘基及諸如此類之基團。芳基視情況經一或多個本文所述取代基獨立地取代。

「伸芳基」意指藉由自母體芳香族環系統之兩個碳原子移除兩個氫原子獲得之6至20個碳原子(C_6-C_{20})的二價芳香族烴基。一些伸芳基在實例性結構中表示為「Ar」。伸芳基包括包含稠合至飽和、部分不飽和環或芳香族碳環之芳香族環的二環基團。典型伸芳基包括(但不限於)衍生自苯(伸苯基)、經取代苯、萘、蒽、伸聯苯基、伸茚基、伸二氫茚基、1,2-二氫萘、1,2,3,4-四氫萘基及諸如此類之基團。伸芳基視情況經一或多個本文所述取代基取代。

術語「雜環(heterocycle)」、「雜環基」及「雜環(heterocyclic ring)」在本文中可互換使用且係指具有3至約20個環原子之飽和或部分不飽和(即在環內具有一或多個雙鍵及/或三鍵)碳環基團，其中至少一個環原子係選自氮、氧、磷及硫之雜原子，其餘環原子為C，其中一或多個環原子視情況獨立地經一或多個下文所述取代基取代。雜環可係具有3至7個環成員(2至6個碳原子及1至4個選自N、O、P及S之雜原子)之單環或具有7至10個環成員(4至9個碳原子及1至6個選自N、O、P及S之雜原子)之二環，例如：二環[4,5]、[5,5]、[5,6]或[6,6]系統。雜環闡述於以下文獻中：Paquette，Leo A.「Principles of Modern Heterocyclic Chemistry」 (W.A. Benjamin, New York, 1968)，尤其第1、3、4、6、7及9章；「The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs」(John Wiley & Sons，New York，1950年至今)，尤其第13、14、16、19及28卷；及J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566。「雜環基」亦包括雜環基團與飽和、部分不飽和環或芳香族碳環或雜環稠合的基團。雜環之實例包括(但不限於)嗎啉-4-基、六氫吡啶-1-基、六氫吡嗪基、六氫吡嗪-4-基-2-酮、六氫吡嗪-4-基-3-酮、

吡咯啶-1-基、硫嗎啉-4-基、S-二側氧基硫嗎啉-4-基、氮雜環辛烷-1-基、氮雜環丁-1-基、八氫吡啶并[1,2-a]吡嗪-2-基、[1,4]二氮雜環庚-1-基、吡咯啶基、四氫呋喃基、二氫呋喃基、四氫噻吩基、四氫吡喃基、二氫吡喃基、四氫硫吡喃基、六氫吡啶基、嗎啉基、硫嗎啉基、氧硫雜環己基、六氫吡嗪基、高六氫吡嗪基、氮雜環丁基、氧雜環丁基、硫雜環丁基、高六氫吡啶基、氧雜環庚烷基、硫雜環庚烷基、氧氮呼基、二氮呼基、硫氮呼基、2-吡咯啉基、3-吡咯啉基、二氫吲哚基、2H-吡喃基、4H-吡喃基、二噁烷基、1,3-二氧雜環戊基、吡唑啉基、二噻烷基、二硫戊環基、二氫吡喃基、二氫噻吩基、二氫呋喃基、吡唑啶基咪唑啉基、咪唑啶基、3-氮雜二環[3.1.0]己烷基、3-氮雜二環[4.1.0]庚烷基、氮雜二環[2.2.2]己烷基、3H-吲哚基喹嗪基及N-吡啶基脲。螺部分亦包括在此定義之範疇內。2個環原子經側氧基(=O)部分取代之雜環基團之實例係嘧啶酮基及1,1-二側氧基-硫嗎啉基。本文中之雜環基團視情況經一或多個本文所述取代基獨立地取代。

術語「雜芳基」係指5-、6-或7員環之單價芳香族基團，且包括5至20個原子之稠合環系統(其中至少一者係芳香族)，其含有一或多個獨立地選自氮、氧及硫之雜原子。雜芳基之實例係吡啶基(包括例如2-羥基吡啶基)、咪唑基、咪唑并吡啶基、1-甲基-1H-苯并[d]咪唑、[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶、嘧啶基(包括例如4-羥基嘧啶基)、吡唑基、三唑基、吡嗪基、四唑基、呋喃基、噻吩基、異噁唑基、噻唑基、噁二唑基、噁唑基、異噻唑基、吡咯基、喹啉基、異喹啉基、四氫異喹啉基、吲哚基、苯并咪唑基、苯并呋喃基、吖啉基、吲哚基、吲嗪基、酞嗪基、噠嗪基、三嗪基、異吲哚基、蝶啶基、嘌呤基、噁二唑基、噻二唑基、噻二唑基、呋呫基、苯并呋呫基、苯并苯硫基、苯并噻唑基、苯并噁唑基、喹唑啉基、喹喔啉基、萘啶基及呋喃并吡

啶基。雜芳基視情況經一或多個本文所述取代基獨立地取代。

倘若可能，則雜環或雜芳基可與碳(碳連接)或氮(氮連接)鍵結。例如且不加以限制，與碳鍵結之雜環或雜芳基係在以下位置處鍵結：吡啶之2、3、4、5或6位；噠嗪之3、4、5或6位；嘧啶之2、4、5或6位；吡嗪之2、3、5或6位；呋喃、四氫呋喃、硫代呋喃、噻吩、吡咯或四氫吡咯之2、3、4或5位；噁唑、咪唑或噻唑之2、4或5位；異噁唑、吡唑或異噻唑之3、4或5位；氮雜環丙烷之2或3位；氮雜環丁烷之2、3或4位；喹啉之2、3、4、5、6、7或8位；或異喹啉之1、3、4、5、6、7或8位。

例如且不加以限制，與氮鍵結之雜環或雜芳基係在以下位置處鍵結：氮雜環丙烷、氮雜環丁烷、吡咯、吡咯啶、2-吡咯啉、3-吡咯啉、咪唑、咪唑啶、2-咪唑啉、3-咪唑啉、吡唑、吡唑啉、2-吡唑啉、3-吡唑啉、六氫吡啶、六氫吡嗪、吲哚、二氫吲哚或1H-吲唑之1位；異吲哚或異二氫吲哚之2位；嗎啉之4位及咔唑或β-咔啉之9位。

術語「對掌性」係指具有鏡像配偶體之不可疊合之性質之分子，而術語「非對掌性」係指可與其鏡像配偶體疊合之分子。

術語「非對映異構物」係指具有相同化學構成、但關於原子或基團之空間佈置不同的化合物。

「非對映異構物」係指具有兩個或更多個對掌性中心且分子並非彼此之鏡像之立體異構物。非對映異構物具有不同物理性質，例如熔點、沸點、光譜性質及反應性。非對映異構物之混合物可在高解析度分析程序(例如電泳及層析)下分開。

「對映異構物」係兩個彼此為不可疊合鏡像之化合物的立體異構物。

本文所用之立體化學定義及規則通常遵循S. P. Parker編輯，*McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (1984) McGraw-Hill Book

公司，New York；及Eliel, E.及Wilen, S., *Stereochemistry of Organic Compounds* (1994) John Wiley & Sons公司，New York。許多有機化合物以光學活性形式存在，即其具有旋轉平面偏振光之平面的能力。在闡述光學活性化合物中，前綴D及L或*R*及*S*用於表示分子在其對掌性中心附近之絕對組態。採用前綴d及l或(+)及(-)表示由化合物之平面偏振光之旋轉符號，其中(-)或l意指化合物係左旋。有(+)或d前綴之化合物係右旋。對於給定化學結構而言，該等立體異構物相同，只是其係彼此之鏡像。特定立體異構物亦可稱作對映異構物，且該等異構物之混合物經常稱作對映異構物混合物。對映異構物之50:50混合物稱作外消旋混合物或外消旋物，若在化學反應或過程中無立體選擇或立體特異性，則此可出現。術語「外消旋混合物」及「外消旋物」係指兩種對映異構物質之等莫耳混合物，不含光學活性。

本文所用片語「醫藥上可接受之鹽」係指抗體-藥物結合物(ADC)之醫藥上可接受之有機或無機鹽。實例性鹽包括(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、酸式磷酸鹽、異煙酸鹽、乳酸鹽、水楊酸鹽、酸式檸檬酸鹽、酒石酸鹽、油酸鹽、鞣酸鹽、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、富馬酸鹽、葡萄糖酸鹽、葡糖醛酸鹽、糖二酸鹽、甲酸鹽、苯甲酸鹽、麩胺酸鹽、甲磺酸鹽、乙磺酸鹽、苯磺酸鹽、對甲苯磺酸鹽及雙羥萘酸鹽(即1.1'-亞甲基-雙-(2-羥基3-萘酸鹽))。醫藥上可接受之鹽可涉及包括另一分子，例如乙酸根離子、琥珀酸根離子或其他抗衡離子。抗衡離子可為可穩定母體化合物上之電荷的任一有機或無機部分。此外，醫藥上可接受之鹽可在其結構中具有一個以上帶電原子。多個帶電原子係醫藥上可接受之鹽之部分之情況可具有多個抗衡離子。因此，醫藥上可接受之鹽可具有一或多個帶電原子及/或一或多個抗衡離子。

本文使用以下縮寫且其具有指定定義：BME係β-巰基乙醇，Boc係*N*-(第三丁氧基羰基)，cit係瓜胺酸(2-胺基-5-脲基戊酸)，DCC係1,3-二環己基碳化二亞胺，DCM係二氯甲烷，DEA係二乙胺，DEAD係偶氮二甲酸二乙基酯，DEPC係氰酸二乙基磷醯基酯，DIAD係偶氮二甲酸二異丙基酯，DIEA係*N,N*-二異丙基乙胺，DMA係二甲基乙醯胺，DMAP係4-二甲基胺基吡啶，DME係乙二醇二甲醚(或1,2-二甲氧基乙烷)，DMF係*N,N*-二甲基甲醯胺，DMSO係二甲亞碸，DTT係二硫蘇糖醇，EDCI係1-(3-二甲基胺基丙基)-3-乙基碳化二亞胺鹽酸鹽，EEDQ係2-乙氧基-1-乙氧基羰基-1,2-二氫喹啉，ES-MS係電噴射質譜，EtOAc係乙酸乙酯，Fmoc係*N*-(9-芴基甲氧基羰基)，gly係甘胺酸，HATU係六氟磷酸O-(7-氮雜苯并三唑-1-基)-*N,N,N',N'*-四甲基脲鎓鹽，HOBt係1-羥基苯并三唑，HPLC係高壓液相層析，ile係異白胺酸，lys係離胺酸，MeCN (CH_3CN)係乙腈，MeOH係甲醇，Mtr係4-大茴香基二苯基甲基(或4-甲氧基三苯甲基)，NHS係N-羥基琥珀醯亞胺，PBS係磷酸鹽緩沖鹽水(pH 7)，PEG係聚乙二醇或乙二醇(-OCH_2CH_2-)之單元，Ph係苯基，Pnp係p-硝基苯基，MC係6-馬來醯亞胺基己醯基，phe係L-苯丙胺酸，PyBrop係六氟磷酸溴叁-吡咯啶基鏻鹽，SEC係尺寸排除層析，Su係琥珀醯亞胺，TFA係三氟乙酸，TLC係薄層層析，UV係紫外線，且val係纈胺酸。

半胱胺酸改造之抗體

本發明化合物包括包含半胱胺酸改造之抗體之抗體-藥物結合物，其中野生型或親代抗體之一或多個胺基酸經半胱胺酸胺基酸置換。任何形式之抗體亦可如此經改造，即突變。舉例而言，親代Fab抗體片段可經改造以形成半胱胺酸改造之Fab，本文中稱作「ThioFab」。類似地，親代單株抗體可經改造以形成「ThioMab」。應注意，單點突變在ThioFab中產生單一經改造之半胱胺酸殘基，同時

單點突變在ThioMab中產生兩個經改造之半胱胺酸殘基，此乃因IgG抗體之二聚體性質。評價具有置換(「改造」)半胱胺酸(Cys)殘基之突變的新引入之經改造半胱胺酸硫醇基團的反應性。硫醇反應性值係在0至1.0範圍內之相對的數值項且可針對任何半胱胺酸改造之抗體進行量測。本發明之半胱胺酸改造之抗體的硫醇反應性值在0.6至1.0、0.7至1.0或0.8至1.0範圍內。

半胱胺酸胺基酸可在抗體中之反應位點處經改造且其不形成鏈內或分子間二硫鍵(Junutula等人，2008b Nature Biotech., 26(8):925-932；Dornan等人，(2009) Blood 114(13):2721-2729；US 7521541；US 7723485；WO2009/052249, Shen等人，(2012) Nature Biotech., 30(2):184-191；Junutula等人，(2008) Jour of Immun.Methods 332:41-52)。經改造之半胱胺酸硫醇可與連接體試劑或本發明之連接體-藥物中間體反應，該中間體具有硫醇反應性親電基團(例如馬來醯亞胺或α-鹵基醯胺)以形成具有半胱胺酸改造之抗體(ThioMab)及藥物(D)部分之ADC。因此，可設計、控制且知曉藥物部分之位置。可控制藥物載量，此乃因經改造之半胱胺酸硫醇基團通常與硫醇反應性連接體試劑或連接體-藥物中間體以高產率反應。藉由於重鏈或輕鏈上之單一位點處取代來改造抗體以引入半胱胺酸胺基酸會在對稱抗體上產生兩個新的半胱胺酸。可達成接近2之藥物載量結合產物ADC之接近均質性。

本發明之半胱胺酸改造之抗體較佳保留其野生型親代抗體對應部分之抗原結合能力。因此，半胱胺酸改造之抗體能夠(較佳特異性)結合至抗原。該等抗原包括(例如)腫瘤相關之抗原(TAA)、細胞表面受體蛋白及其他細胞表面分子、跨膜蛋白、信號傳導蛋白、細胞存活調控因子、細胞增殖調控因子、與(例如，對於已知或懷疑在功能上促進)組織發育或分化相關之分子、淋巴因子、細胞介素、參與細胞

週期調控之分子、參與血管發生之分子及與(例如，對於已知或懷疑在功能上促進) 血管生成相關之分子。腫瘤相關之抗原可為簇分化因子(即，CD蛋白)。能夠與半胱胺酸改造之抗體結合之抗原可為上述類別中之一者之子集的成員，其中該類別之另一(其他)子集包含具有不同特徵(相對於目標抗原)之其他分子/抗原。

半胱胺酸改造之抗體係藉由還原及氧化還原鏈內二硫化物基團(實例19)製備用於與連接體-藥物中間體結合。

可用於本發明抗體-藥物結合物中用於治療癌症之半胱胺酸改造之抗體包括(但不限於)針對細胞表面受體及腫瘤相關抗原(TAA)之抗體。腫瘤相關抗原已為業內所知，且可使用業內熟知之方法及資訊製備用於生成抗體。試圖發現癌症診斷之療法之有效細胞靶標，研究者已嘗試鑑別跨膜或以其他方式腫瘤相關多肽，與一或多種正常非癌細胞相比其在一或多種特定類型之癌細胞之表面上特異性表現。與在非癌細胞表面上相比，該等腫瘤相關多肽經常在癌細胞表面上更豐富地表現。該等腫瘤相關細胞表面抗原多肽之鑑別已產生特異性靶向癌細胞的能力用於經由基於抗體之療法進行破壞。

腫瘤相關抗原TAA之實例包括(但不限於)下文列舉之TAA (1)-(51)。為方便起見，下文列舉與該等抗原相關之資訊(其皆為業內所知)且其包括名稱、替代名稱、Genbank登錄號及主要參考案、National Center for Biotechnology Information (NCBI)之以下核酸及蛋白質序列鑑別規則。對應於TAA (1)-(51)之核酸及蛋白質序列可在公共數據庫(例如GenBank)中獲得。由抗體靶向之腫瘤相關抗原包括相對於所引用參考文獻中鑑別之序列具有至少約70%、80%、85%、90%或95%序列一致性的所有胺基酸序列變體及同種型，或其與具有所引用參考文獻中發現之序列之TAA呈現實質上相同之生物性質或特徵。舉例而言，具有變體序列之TAA通常能夠特異性結合至抗體，該

抗體特異性結合至具有所列舉相應序列之TAA。本文中具體敘述之參考文獻中之序列及揭示內容以引用方式明確併入。

腫瘤相關抗原：

(1) BMPR1B（骨形態發生蛋白受體型IB，Genbank登錄號NM_001203)

ten Dijke,P.等人，Science 264 (5155):101-104 (1994), Oncogene 14 (11):1377-1382 (1997))；WO2004063362（技術方案2)；WO2003042661（技術方案12)；US2003134790-A1（第38-39頁)；WO2002102235（技術方案13；第296頁)；WO2003055443（第91-92頁)；WO200299122（實例2；第528-530頁)；WO2003029421（技術方案6)；WO2003024392 (技術方案2；圖112)；WO200298358 (技術方案1；第183頁)；WO200254940（第100-101頁)；WO200259377(第349-350頁)；WO200230268（技術方案27；第376頁)；WO200148204（實例；圖4)

NP_001194骨形態發生蛋白受體，類型IB /pid=NP_001194.1 -

交叉參考案：MIM:603248；NP_001194.1；AY065994

(2) E16 (LAT1、SLC7A5，Genbank登錄號NM_003486)

Biochem. Biophys. Res. Commun. 255 (2), 283-288 (1999), Nature 395 (6699):288-291 (1998), Gaugitsch, H.W.等人，(1992) J. Biol. Chem. 267 (16):11267-11273)；WO2004048938（實例2)；WO2004032842（實例IV)；WO2003042661（技術方案12)；WO2003016475 (技術方案1)；WO200278524 (實例2)；WO200299074 (技術方案19；第127-129頁)；WO200286443 (技術方案27；第222、393頁)；WO2003003906 (技術方案10；第293頁)；WO200264798 (技術方案33；第93-95頁)；WO200014228 (技術方案5；第133-136頁)；US2003224454 (圖3)；WO2003025138 (技術方案12；第150頁)；

NP_003477 溶質載劑家族7 (陽離子胺基酸轉運蛋白，y+系統)，成員5 /pid=NP_003477.3 - 智人

交叉參考案：MIM:600182；NP_003477.3；NM_015923；NM_003486_1

(3) STEAP1 (前列腺之六次跨膜上皮抗原，Genbank登錄號NM_012449)

Cancer Res.61 (15), 5857-5860 (2001), Hubert, R.S.等人，(1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96 (25):14523-14528)；WO2004065577 (技術方案6)；WO2004027049 (圖1L)；EP1394274 (實例11)；WO2004016225 (技術方案2)；WO2003042661 (技術方案12)；US2003157089 (實例5)；US2003185830 (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)；

NP_036581前列腺之六次跨膜上皮抗原

交叉參考案：MIM:604415；NP_036581.1；NM_012449_1

(4) 0772P (CA125、MUC16，Genbank登錄號AF361486)

J. Biol. Chem. 276 (29):27371-27375 (2001))；WO2004045553 (技術方案14)；WO200292836 (技術方案6；圖12)；WO200283866 (技術方案15；第116-121頁)；US2003124140 (實例16)；交叉參考案：GI:34501467；AAK74120.3；AF361486_1

(5) MPF (MPF、MSLN、SMR、巨核細胞增強因子、間皮素，Genbank登錄號NM_005823) Yamaguchi, N.等人，Biol. Chem. 269 (2), 805-808 (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96 (20):11531-11536 (1999), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93 (1):136-140 (1996), J. Biol. Chem. 270 (37):21984-21990 (1995))；WO2003101283 (技術方案14)；(WO2002102235 (技術方案13；第287-288頁)；WO2002101075 (技術

方案4；第308-309頁)；WO200271928 (第320-321頁)；WO9410312 (第52-57頁)；交叉參考案：MIM:601051；NP_005814.2；NM_005823_1

(6) Napi3b (NAPI-3B、NPTIIb、SLC34A2、溶質載劑家族34 (磷酸鈉)成員2、II型鈉依賴性磷酸鹽轉運蛋白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 (技術方案2)；EP1394274 (實例11)；WO2002102235 (技術方案13；第326頁)；EP875569 (技術方案1；第17-19頁)；WO200157188 (技術方案20；第329頁)；WO2004032842 (實例IV)；WO200175177 (技術方案24；第139-140頁)；

交叉參考案：MIM:604217；NP_006415.1；NM_006424_1

(7) Sema 5b (FLJ10372、KIAA1445、Mm.42015、SEMA5B、SEMAG、信號素5b Hlog(Semaphorin 5b Hlog)、sema結構域、7個血栓反應素重複(1型及類1型)、跨膜結構域(TM)及短的細胞質結構域、(信號素) 5B，Genbank登錄號AB040878)

Nagase T.等人，(2000) DNA Res.7 (2):143-150)；WO2004000997 (技術方案1)；WO2003003984 (技術方案1)；WO200206339 (技術方案1；第50頁)；WO200188133 (技術方案1；第41-43、48-58頁)；WO2003054152 (技術方案20)；WO2003101400 (技術方案11)；

登錄號：Q9P283；EMBL；AB040878；BAA95969.1. Genew；HGNC:10737；

(8) PSCA hlg (2700050C12Rik、C530008O16Rik、RIKEN cDNA 2700050C12、RIKEN cDNA 2700050C12基因，Genbank登錄號

AY358628)；Ross 等人，(2002) Cancer Res.62:2546-2553；US2003129192 (技術方案2)；US2004044180 (技術方案12)；US2004044179 (技術方案11)；US2003096961 (技術方案11)；US2003232056 (實例5)；WO2003105758 (技術方案12)；US2003206918 (實例5)；EP1347046 (技術方案1)；WO2003025148 (技術方案20)；

交叉參考案：GI:37182378；AAQ88991.1；AY358628_1

(9) ETBR (內皮素B型受體，Genbank登錄號AY275463)；

Nakamuta M.等人，Biochem. Biophys. Res. Commun. 177, 34-39, 1991；Ogawa Y.等人，Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 248-255, 1991；Arai H.等人，Jpn. Circ. J. 56, 1303-1307, 1992；Arai H.等人，J. Biol. Chem. 268, 3463-3470, 1993；Sakamoto A., Yanagisawa M.等人，Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 656-663, 1991；Elshourbagy N.A.等人，J. Biol. Chem. 268, 3873-3879, 1993；Haendler B.等人，J. Cardiovasc. Pharmacol. 20, s1-S4, 1992；Tsutsumi M.等人，Gene 228, 43-49, 1999；Strausberg R.L.等人，Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 16899-16903, 2002；Bourgeois C.等人，J. Clin. Endocrinol. Metab. 82, 3116-3123, 1997；Okamoto Y.等人，Biol. Chem. 272, 21589-21596, 1997；Verheij J.B.等人，Am. J. Med. Genet. 108, 223-225, 2002；Hofstra R.M.W.等人，Eur. J. Hum. Genet. 5, 180-185, 1997；Puffenberger E.G.等人，Cell 79, 1257-1266, 1994；Attie T.等人，Hum. Mol. Genet. 4, 2407-2409, 1995；Auricchio A.等人，Hum. Mol. Genet. 5:351-354, 1996；Amiel J.等人，Hum. Mol. Genet. 5, 355-357, 1996；Hofstra R.M.W.等人，Nat. Genet. 12, 445-447, 1996；Svensson P.J.等人，Hum. Genet. 103, 145-148, 1998；Fuchs S.等人，Mol. Med. 7, 115-124, 2001；Pingault V.等人，(2002) Hum.

Genet. 111, 198-206；WO2004045516 (技術方案1)；WO2004048938 (實例2)；WO2004040000 (技術方案151)；WO2003087768 (技術方案1)；WO2003016475 (技術方案1)；WO2003016475 (技術方案1)；WO200261087 (圖1)；WO2003016494 (圖6)；WO2003025138 (技術方案12；第144頁)；WO200198351 (技術方案1；第124-125頁)；EP522868 (技術方案8；圖2)；WO200177172 (技術方案1；第297-299頁)；US2003109676；US6518404 (圖3)；US5773223 (技術方案1a；第31-34行)；WO2004001004；

(10) MSG783 (RNF124，假設性蛋白FLJ20315，Genbank登錄號NM_017763)；

WO2003104275 (技術方案1)；WO2004046342 (實例2)；WO2003042661 (技術方案12)；WO2003083074 (技術方案14；第61頁)；WO2003018621 (技術方案1)；WO2003024392 (技術方案2；圖93)；WO200166689 (實例6)；

交叉參考案：LocusID:54894；NP_060233.2；NM_017763_1

(11) 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))；WO2003087306；US2003064397 (技術方案1；圖1)；WO200272596 (技術方案13；第54-55頁)；WO200172962 (技術方案1；圖4B)；WO2003104270 (技術方案11)；WO2003104270 (技術方案16)；US2004005598 (技術方案22)；WO2003042661 (技術方案12)；US2003060612 (技術方案12；圖10)；WO200226822 (技術方案23；圖2)；WO200216429 (技術方案12；圖10)；

交叉參考案：GI:22655488；AAN04080.1；AF455138_1

(12) TrpM4 (BR22450、FLJ20041、TRPM4、TRPM4B、瞬時受體電位陽離子通道、亞家族M成員4，Genbank登錄號NM_017636)

Xu, X.Z.等人，Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98 (19):10692-10697 (2001), Cell 109 (3):397-407 (2002), J. Biol. Chem. 278 (33):30813-30820 (2003))；US2003143557 (技術方案4)；WO200040614 (技術方案14；第100-103頁)；WO200210382 (技術方案1；圖9A)；WO2003042661 (技術方案12)；WO200230268 (技術方案27；第391頁)；US2003219806 (技術方案4)；WO200162794 (技術方案14；圖1A-D)；

交叉參考案：MIM:606936；NP_060106.2；NM_017636_1

(13) CRIPTO (CR、CR1、CRGF、CRIPTO、TDGF1、畸胎瘤衍生之生長因子，Genbank登錄號NP_003203或NM_003212)

Ciccodicola, A.等人，EMBO J. 8 (7):1987-1991 (1989), Am. J. Hum. Genet. 49 (3):555-565 (1991))；US2003224411 (技術方案1)；WO2003083041 (實例1)；WO2003034984 (技術方案12)；WO200288170 (技術方案2；第52-53頁)；WO2003024392 (技術方案2；圖58)；WO200216413 (技術方案1；第94-95、105頁)；WO200222808 (技術方案2；圖1)；US5854399 (實例2；第17-18行)；US5792616 (圖2)；

交叉參考案：MIM:187395；NP_003203.1；NM_003212_1

(14) CD21 (CR2 (補體受體2)或C3DR (C3d/艾伯斯坦巴爾病毒(Epstein Barr virus)受體)或Hs.73792 Genbank登錄號M26004)

Fujisaku等人，(1989) J. Biol. Chem. 264 (4):2118-2125)；Weis J.J.等人，J. Exp. Med. 167, 1047-1066, 1988；Moore M.等人，Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 9194-9198, 1987；Barel M.等人，Mol.

Immunol. 35, 1025-1031, 1998；Weis J.J.等人，Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 5639-5643, 1986；Sinha S.K.等人，(1993) J. Immunol. 150, 5311-5320；WO2004045520 (實例4)；US2004005538 (實例1)；WO2003062401 (技術方案9)；WO2004045520 (實例4)；WO9102536 (圖9.1-9.9)；WO2004020595 (技術方案1)；

登錄號：P20023；Q13866；Q14212；EMBL；M26004；AAA35786.1.

(15) CD79b (CD79B、CD79β、IGb (免疫球蛋白相關β)、B29，Genbank登錄號NM_000626或11038674)

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003) 100 (7):4126-4131, Blood (2002) 100 (9):3068-3076, Muller等人，(1992) Eur. J. Immunol. 22 (6):1621-1625)；WO2004016225 (技術方案2，圖140)；WO2003087768, US2004101874 (技術方案1，第102頁)；WO2003062401 (技術方案9)；WO200278524 (實例2)；US2002150573 (技術方案5，第15頁)；US5644033；WO2003048202 (技術方案1，第306及309頁)；WO 99/558658, US6534482 (技術方案13，圖17A/B)；WO200055351 (技術方案11，第1145-1146頁)；

交叉參考案：MIM:147245；NP_000617.1；NM_000626_1

(16) FcRH2 (IFGP4、IRTA4、SPAP1A (含有SH2結構域之磷酸酶錨固蛋白1a)、SPAP1B、SPAP1C，Genbank登錄號NM_030764，AY358130)

Genome Res.13 (10):2265-2270 (2003), Immunogenetics 54 (2):87-95 (2002), Blood 99 (8):2662-2669 (2002), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98 (17):9772-9777 (2001), Xu, M.J.等人，(2001) Biochem. Biophys. Res. Commun. 280 (3):768-775；WO2004016225 (技術方案2)；WO2003077836；WO200138490 (技術方案5；圖18D-1-18D-2)；

WO2003097803 (技術方案12)；WO2003089624 (技術方案25)；

交叉參考案：MIM:606509；NP_110391.2；NM_030764_1

(17) HER2 (ErbB2，Genbank登錄號M11730)

Coussens L.等人，Science (1985) 230(4730):1132-1139)；Yamamoto T.等人，Nature 319, 230-234, 1986；Semba K.等人，Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 6497-6501, 1985；Swiercz J.M.等人，J. Cell Biol.165, 869-880, 2004；Kuhns J.J.等人，J. Biol. Chem. 274, 36422-36427, 1999；Cho H.-S.等人，Nature 421, 756-760, 2003；Ehsani A.等人，(1993) Genomics 15, 426-429；WO2004048938 (實例2)；WO2004027049 (圖1I)；WO2004009622；WO2003081210；WO2003089904 (技術方案9)；WO2003016475 (技術方案1)；US2003118592；WO2003008537 (技術方案1)；WO2003055439 (技術方案29；圖1A-B)；WO2003025228 (技術方案37；圖5C)；WO200222636 (實例13；第95-107頁)；WO200212341 (技術方案68；圖7)；WO200213847 (第71-74頁)；WO200214503 (第114-117頁)；WO200153463 (技術方案2；第41-46頁)；WO200141787 (第15頁)；WO200044899 (技術方案52；圖7)；WO200020579 (技術方案3；圖2)；US5869445 (技術方案3；第31-38行)；WO9630514 (技術方案2；第56-61頁)；EP1439393 (技術方案7)；WO2004043361 (技術方案7)；WO2004022709；WO200100244 (實例3；圖4)；

登錄號：P04626；EMBL；M11767；AAA35808.1. EMBL；M11761；AAA35808.1.

(18) NCA (CEACAM6，Genbank登錄號M18728)；

Barnett T.等人，Genomics 3, 59-66, 1988；Tawaragi Y.等人，Biochem. Biophys. Res. Commun. 150, 89-96, 1988；Strausberg R.L.等人，Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99:16899-16903, 2002；

WO2004063709；EP1439393 (技術方案7)；WO2004044178 (實例4)；WO2004031238；WO2003042661 (技術方案12)；WO200278524 (實例2)；WO200286443 (技術方案27；第427頁)；WO200260317 (技術方案2)；

登錄號：P40199；Q14920；EMBL；M29541；AAA59915.1. EMBL；M18728；

(19) MDP (DPEP1，Genbank登錄號BC017023)

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (26):16899-16903 (2002))；WO2003016475 (技術方案1)；WO200264798 (技術方案33；第85-87頁)；JP05003790 (圖6-8)；WO9946284 (圖9)；

交叉參考案：MIM:179780；AAH17023.1；BC017023_1

(20) IL20Rα (IL20Ra、ZCYTOR7，Genbank登錄號AF184971)；

Clark H.F.等人，Genome Res.13, 2265-2270, 2003；Mungall A.J.等人，Nature 425, 805-811, 2003；Blumberg H.等人，Cell 104, 9-19, 2001；Dumoutier L.等人，J. Immunol. 167, 3545-3549, 2001；Parrish-Novak J.等人，J. Biol. Chem. 277, 47517-47523, 2002；Pletnev S.等人，(2003) Biochemistry 42:12617-12624；Sheikh F.等人，(2004) J. Immunol. 172, 2006-2010；EP1394274 (實例11)；US2004005320 (實例5)；WO2003029262 (第74-75頁)；WO2003002717 (技術方案2；第63頁)；WO200222153 (第45-47頁)；US2002042366 (第20-21頁)；WO200146261 (第57-59頁)；WO200146232 (第63-65頁)；WO9837193 (技術方案1；第55-59頁)；

登錄號：Q9UHF4；Q6UWA9；Q96SH8；EMBL；AF184971；AAF01320.1.

(21) 短蛋白聚糖(Brevican) (BCAN、BEHAB，Genbank登錄號AF229053)

Gary S.C.等人，Gene 256, 139-147, 2000；Clark H.F.等人，Genome Res.13, 2265-2270, 2003；Strausberg R.L.等人，Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 16899-16903, 2002；US2003186372 (技術方案11)；US2003186373 (技術方案11)；US2003119131 (技術方案1；圖52)；US2003119122 (技術方案1；圖52)；US2003119126 (技術方案1)；US2003119121 (技術方案1；圖52)；US2003119129 (技術方案1)；US2003119130 (技術方案1)；US2003119128 (技術方案1；圖52)；US2003119125 (技術方案1)；WO2003016475 (技術方案1)；WO200202634 (技術方案1)；

(22) EphB2R (DRT、ERK、Hek5、EPHT3、Tyro5，Genbank登錄號NM_004442)

Chan,J.及Watt, V.M., Oncogene 6 (6), 1057-1061 (1991) Oncogene 10 (5):897-905 (1995), Annu. Rev. Neurosci. 21:309-345 (1998), Int. Rev. Cytol. 196:177-244 (2000))；WO2003042661 (技術方案12)；WO200053216 (技術方案1；第41頁)；WO2004065576 (技術方案1)；WO2004020583 (技術方案9)；WO2003004529 (第128-132頁)；WO200053216 (技術方案1；第42頁)；

交叉參考案：MIM:600997；NP_004433.2；NM_004442_1

(23) ASLG659 (B7h，Genbank登錄號AX092328)

US20040101899 (技術方案2)；WO2003104399 (技術方案11)；WO2004000221 (圖3)；US2003165504 (技術方案1)；US2003124140 (實例2)；US2003065143 (圖60)；WO2002102235 (技術方案13；第299頁)；US2003091580 (實例2)；WO200210187 (技術方案6；圖10)；WO200194641 (技術方案12；圖7b)；WO200202624 (技術方案13；圖1A-1B)；US2002034749 (技術方案54；第45-46頁)；WO200206317 (實例2；第320-321頁，技術方案34；第321-322頁)；

WO200271928 (第468-469頁)；WO200202587 (實例1；圖1)；WO200140269 (實例3；第190-192頁)；WO200036107 (實例2；第205-207頁)；WO2004053079 (技術方案12)；WO2003004989 (技術方案1)；WO200271928 (第233-234、452-453頁)；WO 0116318；

(24) PSCA (前列腺幹細胞抗原前體，Genbank登錄號AJ297436)

Reiter R.E.等人，Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 1735-1740, 1998；Gu Z.等人，Oncogene 19, 1288-1296, 2000；Biochem. Biophys. Res. Commun. (2000) 275(3):783-788；WO2004022709；EP1394274 (實例11)；US2004018553 (技術方案17)；WO2003008537 (技術方案1)；WO200281646 (技術方案1；第164頁)；WO2003003906 (技術方案10；第288頁)；WO200140309 (實例1；圖17)；US2001055751 (實例1；圖1b)；WO200032752 (技術方案18；圖1)；WO9851805 (技術方案17；第97頁)；WO9851824 (技術方案10；第94頁)；WO9840403 (技術方案2；圖1B)；

登錄號：O43653；EMBL；AF043498；AAC39607.1.

(25) GEDA (Genbank登錄號AY260763)；

AAP14954脂肪瘤HMGIC融合-配偶體樣蛋白/pid=AAP14954.1 - 智人

物種：智人(人類)

WO2003054152 (技術方案20)；WO2003000842 (技術方案1)；WO2003023013 (實例3，技術方案20)；US2003194704 (技術方案45)；

交叉參考案：GI:30102449；AAP14954.1；AY260763_1

(26) BAFF-R (B細胞活化因子受體、BLyS受體3、BR3，Genbank登錄號AF116456)；BAFF受體/pid=NP_443177.1 - 智人

Thompson, J.S.等人，Science 293 (5537), 2108-2111 (2001)；

WO2004058309；WO2004011611；WO2003045422（實例；第32-33頁）；WO2003014294（技術方案35；圖6B）；WO2003035846（技術方案70；第615-616頁）；WO200294852（第136-137行）；WO200238766（技術方案3；第133頁）；WO200224909（實例3；圖3）；

交叉參考案：MIM:606269；NP_443177.1；NM_052945_1；AF132600

(27) CD22（B細胞受體CD22-B同種型、BL-CAM、Lyb-8、Lyb8、SIGLEC-2、FLJ22814，Genbank登錄號AK026467）；

Wilson等人，(1991) J. Exp. Med. 173:137-146；WO2003072036（技術方案1；圖1）；

交叉參考案：MIM:107266；NP_001762.1；NM_001771_1

(28) CD79a（CD79A、CD79α、免疫球蛋白相關α，即B細胞特異性蛋白，其與Ig β (CD79B)共價相互作用且在表面上與Ig M分子形成複合物、傳導參與B細胞分化之信號），pI：4.84，MW：25028 TM: 2 [P] Gene Chromosome: 19q13.2，Genbank登錄號NP_001774.10)

WO2003088808、US20030228319；WO2003062401（技術方案9）；US2002150573（技術方案4，第13-14頁）；WO9958658（技術方案13，圖16）；WO9207574（圖1）；US5644033；Ha等人，(1992) J. Immunol. 148(5):1526-1531；Mueller等人，(1992) Eur. J. Biochem. 22:1621-1625；Hashimoto等人，(1994) Immunogenetics 40(4):287-295；Preud'homme等人，(1992) Clin. Exp. Immunol. 90(1):141-146；Yu等人，(1992) J. Immunol. 148(2) 633-637；Sakaguchi等人，(1988) EMBO J. 7(11):3457-3464；

(29) CXCR5（伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)受體1，即由CXCL13趨化因子活化、在淋巴球遷移及體液防禦中起作用、在HIV-2感染及可能AIDS、淋巴瘤、骨髓瘤及白血病之發育中起作用的G蛋白

偶聯受體)；372 aa，pI：8.54 MW：41959 TM: 7 [P] Gene Chromosome: 11q23.3，Genbank登錄號NP_001707.1)

WO2004040000；WO2004015426；US2003105292 (實例2)；US6555339 (實例2)；WO200261087 (圖1)；WO200157188 (技術方案20，第269頁)；WO200172830 (第12-13頁)；WO200022129 (實例1，第152-153頁，實例2，第254-256頁)；WO9928468 (技術方案1，第38頁)；US5440021 (實例2，第49-52行)；WO9428931 (第56-58頁)；WO9217497 (技術方案7，圖5)；Dobner等人，(1992) Eur. J. Immunol. 22:2795-2799；Barella等人，(1995) Biochem. J. 309:773-779；

(30) HLA-DOB (結合肽並將其呈遞至CD4+ T淋巴球之MHC II類分子(Ia抗原)的β亞單元)；273 aa, pI：6.56 MW：30820 TM: 1 [P] Gene Chromosome: 6p21.3，Genbank登錄號NP_002111.1)

Tonnelle等人，(1985) EMBO J. 4(11):2839-2847；Jonsson等人，(1989) Immunogenetics 29(6):411-413；Beck等人，(1992) J. Mol. Biol. 228:433-441；Strausberg等人，(2002) Proc. Natl. Acad. Sci USA 99:16899-16903；Servenius等人，(1987) J. Biol. Chem. 262:8759-8766；Beck等人，(1996) J. Mol. Biol. 255:1-13；Naruse等人，(2002) Tissue Antigens 59:512-519；WO9958658 (技術方案13，圖15)；US6153408 (第35-38行)；US5976551 (第168-170行)；US6011146 (第145-146行)；Kasahara等人，(1989) Immunogenetics 30(1):66-68；Larhammar等人，(1985) J. Biol. Chem. 260(26):14111-14119；

(31) P2X5 (嘌呤型受體P2X配體門控離子通道5，即由細胞外ATP門控之離子通道，其可參與突觸傳遞及神經發生，其缺乏可促使特發性逼尿肌不穩定之病理生理學情況)；422 aa), pI：7.63，MW：47206 TM: 1 [P] Gene Chromosome: 17p13.3，Genbank登錄號NP_002552.2)

Le等人，(1997) FEBS Lett.418(1-2):195-199；WO2004047749；

WO2003072035 (技術方案10)；Touchman等人，(2000) Genome Res.10:165-173；WO200222660 (技術方案20)；WO2003093444 (技術方案1)；WO2003087768 (技術方案1)；WO2003029277 (第82頁)；

(32) CD72 (B細胞分化抗原CD72、Lyb-2)蛋白質完整序列 maeaity...tafrfpd (1..359；359 aa)，pI：8.66，MW：40225 TM: 1 [P] Gene Chromosome: 9p13.3，Genbank登錄號NP_001773.1)

WO2004042346 (技術方案65)；WO2003026493 (第51-52、57-58頁)；WO200075655 (第105-106頁)；Von Hoegen等人，(1990) J. Immunol. 144(12):4870-4877；Strausberg等人，(2002) Proc. Natl. Acad. Sci USA 99:16899-16903；

(33) LY64 (淋巴球抗原64 (RP105)，即富含白胺酸重複(LRR)家族之I型膜蛋白，調節B細胞活化及細胞凋亡，其功能損失與患有全身性紅斑狼瘡之患者的疾病活動增加相關)；661 aa，pI：6.20，MW：74147 TM: 1 [P] Gene Chromosome: 5q12，Genbank登錄號 NP_005573.1)

US2002193567；WO9707198 (技術方案11，第39-42頁)；Miura等人，(1996) Genomics 38(3):299-304；Miura等人，(1998) Blood 92:2815-2822；WO2003083047；WO9744452 (技術方案8，第57-61頁)；WO200012130 (第24-26頁)；

(34) FcRH1 (Fc受體樣蛋白1，即含有C2型Ig樣結構域及ITAM結構域之免疫球蛋白Fc結構域的推定受體，可能在B淋巴球分化中起作用)；429 aa，pI：5.28，MW：46925 TM: 1 [P] Gene Chromosome: 1q21-1q22，Genbank登錄號NP_443170.1)

WO2003077836；WO200138490 (技術方案6，圖18E-1-18-E-2)；Davis等人，(2001) Proc. Natl. Acad. Sci USA 98(17):9772-9777；WO2003089624 (技術方案8)；EP1347046 (技術方案1)；

WO2003089624 (技術方案7)；

(35) IRTA2 (免疫球蛋白超家族受體易位相關2，即在B細胞發育及淋巴瘤生成中具有可能的作用之推定的免疫受體；由於易位所導致之基因失調在某些B細胞惡性腫瘤中發生)；977 aa，pI：6.88 MW：106468 TM: 1 [P] Gene Chromosome: 1q21，Genbank登錄號人類：AF343662、AF343663、AF343664、AF343665、AF369794、AF397453、AK090423、AK090475、AL834187、AY358085；小鼠：AK089756、AY158090、AY506558；NP_112571.1

WO2003024392 (技術方案2，圖97)；Nakayama等人，(2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 277(1):124-127；WO2003077836；WO200138490 (技術方案3，圖18B-1-18B-2)；

(36) TENB2 (TMEFF2，腫瘤調節蛋白(tomoregulin)，TPEF，HPP1，TR，與EGF/調蛋白(heregulin)家族生長因子及濾泡抑素(follistatin)有關之推定的跨膜蛋白聚糖)；374 aa，NCBI登錄號：AAD55776, AAF91397, AAG49451, NCBI RefSeq: NP_057276；NCBI Gene: 23671；OMIM: 605734；SwissProt Q9UIK5；Genbank登錄號AF179274；AY358907, CAF85723, CQ782436

WO2004074320 (SEQ ID NO 810)；JP2004113151 (SEQ ID NO 2、4、8)；WO2003042661 (SEQ ID NO 580)；WO2003009814 (SEQ ID NO 411)；EP1295944 (第69-70頁)；WO200230268 (第329頁)；WO200190304 (SEQ ID NO 2706)；US2004249130；US2004022727；WO2004063355；US2004197325；US2003232350；US2004005563；US2003124579；Horie等人，(2000) Genomics 67:146-152；Uchida等人，(1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 266:593-602；Liang等人，(2000) Cancer Res.60:4907-12；Glynne-Jones等人，(2001) Int J Cancer. 10月15日；94(2):178-84；

(37) PMEL17 (銀同系物；SILV；D12S53E；PMEL17；(SI)；(SIL)；ME20；gp100) BC001414；BT007202；M32295；M77348；NM_006928；McGlinchey, R.P.等人，(2009) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106 (33), 13731-13736；Kummer, M.P.等人，(2009) J. Biol. Chem. 284 (4), 2296-2306；

(38) TMEFF1 (具有EGF樣結構域及兩個濾泡抑素樣結構域1之跨膜蛋白；腫瘤調節蛋白-1；H7365；C9orf2；C9ORF2；U19878；X83961) NM_080655；NM_003692；Harms, P.W. (2003) Genes Dev.17 (21), 2624-2629；Gery, S.等人，(2003) Oncogene 22 (18):2723-2727；

(39) GDNF-Ra1 (GDNF家族受體α 1；GFRA1；GDNFR；GDNFRA；RETL1；TRNR1；RET1L；GDNFR-α1；GFR-α-1；U95847；BC014962；NM_145793) NM_005264；Kim, M.H.等人，(2009) Mol. Cell. Biol. 29 (8), 2264-2277；Treanor, J.J.等人，(1996) Nature 382 (6586):80-83；

(40) Ly6E (淋巴球抗原6複合物，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；

(41) TMEM46 (shisa同系物2 (非洲爪蟾(Xenopus laevis))；SHISA2) NP_001007539.1；NM_001007538.1；Furushima, K.等人，(2007) Dev. Biol. 306 (2), 480-492；Clark, H.F.等人，(2003) Genome Res. 13 (10):2265-2270；

(42) Ly6G6D (淋巴球抗原6複合物，基因座G6D；Ly6-D、MEGT1) NP_067079.2；NM_021246.2；Mallya, M.等人，(2002) Genomics 80 (1):113-123；Ribas, G.等人，(1999) J. Immunol. 163 (1):278-287；

(43) LGR5 (含有富含白胺酸之重複的G蛋白偶聯受體5；GPR49、GPR67) NP_003658.1；NM_003667.2；Salanti, G.等人，(2009) Am. J. Epidemiol. 170 (5):537-545；Yamamoto, Y.等人，(2003) Hepatology 37 (3):528-533；

(44) RET (ret原致癌基因；MEN2A；HSCR1；MEN2B；MTC1；(PTC)；CDHF12；Hs.168114；RET51；RET-ELE1) NP_066124.1；NM_020975.4；Tsukamoto, H.等人，(2009) Cancer Sci.100 (10):1895-1901；Narita, N.等人，(2009) Oncogene 28 (34):3058-3068；

(45) LY6K (淋巴球抗原6複合物，基因座K；LY6K；HSJ001348；FLJ35226) NP_059997.3；NM_017527.3；Ishikawa, N.等人，(2007) Cancer Res.67 (24):11601-11611；de Nooij-van Dalen, A.G.等人，(2003) Int. J. Cancer 103 (6):768-774；

(46) GPR19 (G蛋白偶聯受體19；Mm.4787) NP_006134.1；NM_006143.2；Montpetit, A.及Sinnett, D. (1999) Hum. Genet. 105 (1-2):162-164；O'Dowd, B.F.等人，(1996) FEBS Lett. 394 (3):325-329；

(47) GPR54 (KISS1受體；KISS1R；GPR54；HOT7T175；AXOR12) NP_115940.2；NM_032551.4；Navenot, J.M.等人，(2009) Mol. Pharmacol. 75 (6):1300-1306；Hata, K.等人，(2009) Anticancer Res. 29 (2):617-623；

(48) ASPHD1 (含有天冬胺酸β-羥化酶結構域之1；LOC253982) NP_859069.2；NM_181718.3；Gerhard, D.S.等人，(2004) Genome Res.14 (10B):2121-2127；

(49)酪胺酸酶(TYR；OCAIA；OCA1A；酪胺酸酶；SHEP3) NP_000363.1；NM_000372.4；Bishop, D.T.等人，(2009) Nat. Genet. 41 (8):920-925；Nan, H.等人，(2009) Int. J. Cancer 125 (4):909-917；

(50) TMEM118 (環指蛋白，跨膜2；RNFT2；FLJ14627)

NP_001103373.1；NM_001109903.1；Clark, H.F.等人，(2003) Genome Res.13 (10):2265-2270；Scherer, S.E.等人，(2006) Nature 440 (7082):346-351

(51) GPR172A (G蛋白偶聯受體172A；GPCR41；FLJ11856；D15Ertd747e) NP_078807.1；NM_024531.3；Ericsson, T.A.等人，(2003) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (11):6759-6764；Takeda, S.等人，(2002) FEBS Lett. 520 (1-3):97-101。

親代抗體亦可為包含白蛋白-結合肽(ABP)序列之融合蛋白(Dennis等人，(2002)「Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins」J Biol Chem.277:35035-35043；WO 01/45746)。本發明之抗體包括具有由以下文獻中教示之ABP序列之融合蛋白，(i) Dennis等人，(2002) J Biol Chem.277:35035-35043，表III及IV，第35038頁；(ii) US 20040001827，[0076]；及(iii) WO 01/45746，第12-13頁，且所有案件皆以引用方式併入本文中。

為藉由誘變來製備半胱胺酸改造之抗體，編碼起始多肽之胺基酸序列變體之DNA係藉由業內已知之多種方法製備。該等方法包括(但不限於)藉由早期製備之編碼多肽之DNA之定點(或寡核苷酸調介)誘變、PCR誘變及盒式誘變來製備。重組抗體之變體亦可藉由限制片段操縱或藉由使用合成寡核苷酸之重疊延伸PCR構築。誘變引物編碼半胱胺酸密碼子替代物。可採用標準誘變技術以產生編碼該等突變半胱胺酸改造之抗體的DNA。一般指導可參見Sambrook等人，Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989；及Ausubel等人，Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, N.Y., 1993。

抗體可使用重組方法及組合物產生，例如如US 4816567中所

述。在一個實施例中，分離核酸編碼包含抗體之VL之胺基酸序列及/或包含抗體之VH之胺基酸序列(例如，抗體之輕鏈及/或重鏈)。在又一實施例中，提供一或多個包含此核酸之載體(例如，表現載體)。在又一實施例中，提供包含此核酸之宿主細胞。在一個此類實施例中，宿主細胞包含以下物質(例如，已經該等物質轉化)：(1)包含如下核酸之載體：其編碼包含抗體之VL之胺基酸序列及包含抗體之VH之胺基酸序列，或(2)包含編碼包含抗體之VL之胺基酸序列之核酸的第一載體，及包含編碼包含抗體之VH之胺基酸序列之核酸的第二載體。在一個實施例中，宿主細胞係真核細胞，如中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或淋巴樣細胞(例如，Y0、NS0、Sp20細胞)。在一個實施例中，方法包含在適於表現抗體之條件下培養包含編碼如上文所提供抗體之核酸的宿主細胞，及視情況自該宿主細胞(或宿主細胞培養基)回收該抗體。

對於重組產生，分離編碼抗體(例如，如上文所述)之核酸並將其插入一或多個載體中以進一步在宿主細胞中選殖及/或表現。此核酸可使用習用程序容易地分離出來並定序(例如，藉由使用能與編碼抗體之重鏈及輕鏈之基因特異性結合的寡核苷酸探針)。用於選殖或表現編碼抗體之載體之適宜宿主細胞包括本文所述的原核或真核細胞。舉例而言，抗體可在細菌中產生，尤其在無需糖基化及Fc效應子功能時。對於抗體片段及多肽在細菌中之表現，參見(例如) US 5648237、US 5789199及US 5840523。(亦參見Charlton, *Methods in Molecular Biology*，第*248*卷(B.K.C. Lo編輯，Humana Press, Totowa, NJ, 2003)，第245-254頁，其闡述抗體片段在大腸桿菌中之表現)。在表現後，可以可溶部分自細菌細胞膏糊分離抗體且可將其進一步純化。除原核生物外，真核微生物(例如絲狀真菌或酵母菌)亦係用於編碼抗體之載體之適宜選殖或表現宿主，包括糖基化途徑已「人類化」從而產生具有部分或完全人類糖基化模式之抗體的真菌及酵母菌株。參見

Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004)及Li等人，*Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006)。用於表現糖基化抗體之適宜宿主細胞亦源自多細胞有機體(無脊椎動物及脊椎動物)。無脊椎動物細胞之實例包括植物及昆蟲細胞。已確定多種桿狀病毒株可與昆蟲細胞聯合使用，尤其用於轉染草地貪夜蛾(Spodoptera frugiperda)細胞。亦可利用植物細胞培養物作為宿主，例如彼等闡述於US 5959177、US 6040498、US 6420548、US 7125978及US 6417429 (闡述產生轉基因植物中之抗體之PLANTIBODIES™技術)中者。亦可使用脊椎動物細胞作為宿主。舉例而言，可使用適於懸浮液生長之哺乳動物細胞系。有用之哺乳動物宿主細胞系之實例係藉由SV40轉化之猴腎臟CV1細胞系(COS-7)；人類胚胎腎臟細胞系(293或293細胞，如Graham等人，*J. Gen Virol.*36:59 (1977)中所述)；幼倉鼠腎細胞(BHK)；小鼠支持細胞(TM4細胞，如(例如) Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)中所述)；猴腎細胞(CV1)；非洲綠猴腎細胞(VERO-76)；人類子宮頸癌細胞(HELA)；犬腎細胞(MDCK)；布法羅大鼠肝細胞(buffalo rat liver cell) (BRL 3A)；人類肺細胞(W138)；人類肝細胞(Hep G2)；小鼠乳房腫瘤(MMT 060562)；TRI細胞，如(例如) Mather等人，*Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)中所述；MRC 5細胞；及FS4細胞。其他有用之哺乳動物宿主細胞系包括中國倉鼠卵巢(CHO)細胞，包括DHFR⁻ CHO細胞(Urlaub等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980))；及骨髓瘤細胞系，例如Y0、NS0及Sp2/0。關於適於抗體產生之某些哺乳動物宿主細胞系之綜述，例如，參見Yazaki及Wu，*Methods in Molecular Biology*，第248卷(B.K.C. Lo編輯，Humana Press, Totowa, NJ)，第255-268頁(2003)。

定點誘變係一種製備取代變體(即突變蛋白質)之方法(Carter (1985)等人，Nucleic Acids Res.13:4431-4443；Ho等人，(1989) Gene

(Amst.)77:51-59；及Kunkel等人，(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488)。藉由首先使編碼期望突變之寡核苷酸與起始DNA之單鏈雜交來改變該起始DNA。在雜交後，使用DNA聚合酶來合成整個第二鏈，其中使用雜交寡核苷酸作為引物且使用起始DNA之單鏈作為模板。因此，將編碼期望突變之寡核苷酸納入所得雙鏈DNA中。定點誘變可在欲在表現質粒中誘變之表現蛋白質之基因內實施且可對所得質粒進行測序以證實引入了期望半胱胺酸置換突變(Liu等人，(1998) J. Biol. Chem. 273:20252-20260)。定點誘變方案及模式係廣泛可得的，例如QuikChange®多定點誘變套組(Stratagene, La Jolla, CA)。

PCR誘變亦適於製備起始多肽之胺基酸序列變體。參見Higuchi, (1990) in PCR Protocols，第177-183頁，Academic Press；Ito等人，(1991) Gene 102:67-70；Bernhard等人，(1994) Bioconjugate Chem., 5:126-132；及Vallette等人，(1989) Nuc.Acids Res., 17:723-733。簡言之，當使用少量模板DNA作為PCR中之起始材料時，可使用在序列上與模板DNA中之相應區略有不同之引物來生成相對大量之特異性DNA片段，該片段僅在引物與模板不同之位置處與模板序列不同。

製備變體之另一方法(即盒式誘變)係基於由Wells等人，(1985) Gene, 34:315-323所述之技術。起始材料係包含欲突變之起始多肽DNA之質粒(或另一載體)。鑑別欲突變之起始DNA中之密碼子。在所鑑別突變位點之每側上必須存在獨特的限制性內切核酸酶位點。若不存在該限制位點，則其可使用上述寡核苷酸調介之誘變方法生成以將其於是當位置處引入起始多肽DNA中。於該等位點處切割質粒DNA以使其線性化。使用標準程序合成編碼在限制位點之間但含有期望突變之DNA序列的雙鏈寡核苷酸，其中分別合成寡核苷酸之兩條鏈且隨後使用標準技術一起雜交。此雙鏈寡核苷酸稱作盒。此盒經設計以具有與線性化質粒末端相容之5'及3'末端，使得其可以直接連接質粒。

此質粒現含有突變DNA序列。可藉由DNA測序證實含有經編碼半胱胺酸替代物之突變DNA。

亦可藉由寡核苷酸定向誘變藉由基於PCR之誘變使用雙鏈質粒DNA作為模板生成單一突變(Sambrook及Russel, (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual，第3版；Zoller等人，(1983) Methods Enzymol.100:468-500；Zoller, M.J.及Smith, M. (1982) Nucl.Acids Res. 10:6487-6500)。

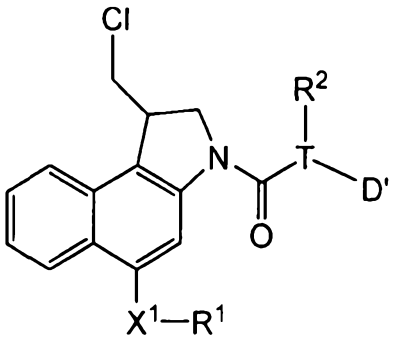
在某些實施例中，可將一或多個胺基酸修飾引入本文所提供抗體之Fc區中，藉此生成Fc區變體。Fc區變體可包含人類Fc區序列(例如人類IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc區)，該序列在一或多個胺基酸位置包含胺基酸修飾(例如取代)。

在某些實施例中，本發明涵蓋具有一些(但非全部)效應子功能之抗體變體，此情況使其成為許多應用之合意的候選物，在該等應用中抗體之活體內半衰期較為重要，但某些效應子功能(例如補體及ADCC)係不必要或有害的。可實施活體外及/或活體內細胞毒性分析來證實CDC及/或ADCC活性之降低/消耗。舉例而言，可實施Fc受體(FcR)結合分析以確保抗體缺乏FcγR結合能力(因此可能缺乏ADCC活性)，但保留FcRn結合能力。

CBI二聚體藥物部分

本發明之抗體-藥物結合物化合物包含CBI二聚體藥物部分D。CBI二聚體藥物部分可包括兩個CBI藥物單元或一個CBI藥物單元及一個PBD藥物單元。

CBI二聚體藥物部分D具有下式：



其中

R^1係選自H、$P(O)_3H_2$、$C(O)NR^aR^b$；

R^2係選自H、$P(O)_3H_2$、$C(O)NR^aR^b$；

R^a及R^b係獨立地選自H及視情況經一或多個F取代之C_1-C_6烷基，或R^a與R^b形成5或6員雜環基；

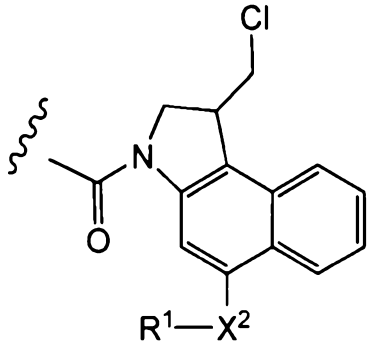
T係選自以下之繫鏈基團：C_3-C_{12}伸烷基、Y、(C_1-C_6伸烷基)-Y-(C_1-C_6伸烷基)、(C_1-C_6伸烷基)-Y-(C_1-C_6伸烷基)-Y-(C_1-C_6伸烷基)、(C_2-C_6伸烯基)-Y-(C_2-C_6伸烯基)及(C_2-C_6伸炔基)-Y-(C_2-C_6伸炔基)；

其中Y係獨立地選自O、S、NR^1、芳基及雜芳基；

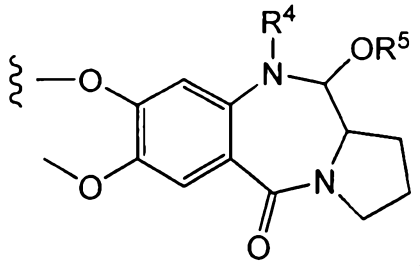
其中伸烷基、伸烯基、芳基及雜芳基獨立地且視情況經F、OH、O(C_1-C_6烷基)、NH_2、$NHCH_3$、$N(CH_3)_2$、$OP(O)_3H_2$及C_1-C_6烷基取代，其中烷基視情況經一或多個F取代；

或伸烷基、伸烯基、芳基及雜芳基獨立地且視情況經與L之鍵取代；

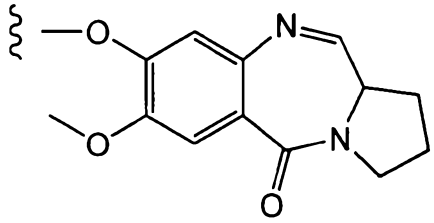
D'係選自以下之藥物部分：



、



及



其中波形線指示與T之附接位點；

X^1及X^2係獨立地選自O及NR^3，其中R^3係選自H及視情況經一或多個F取代之C_1-C_6烷基；

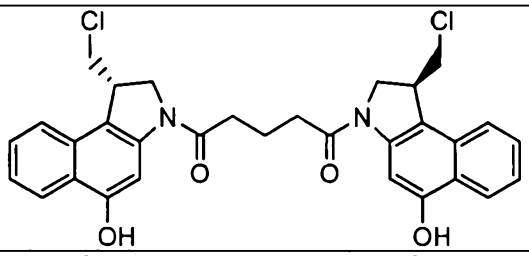
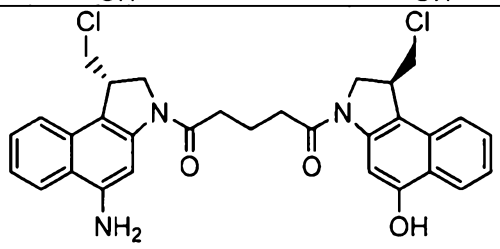
R^4係H、CO_2R，其中R係C_1-C_6烷基或苄基；且

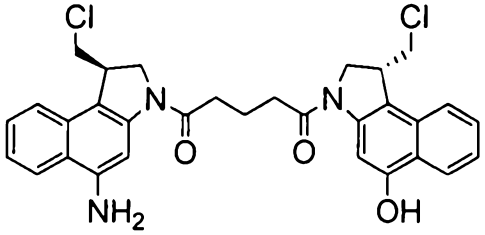
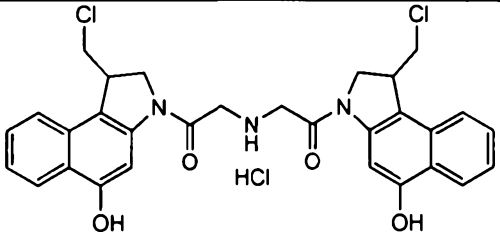
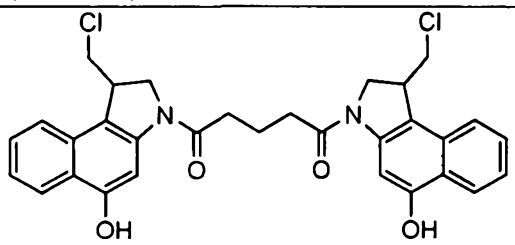
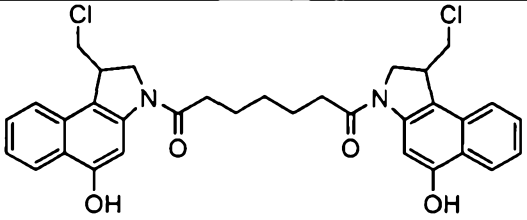
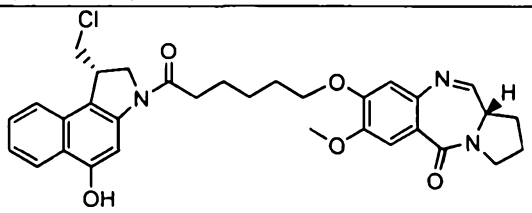
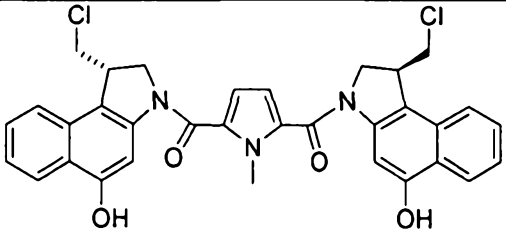
R^5係H或C_1-C_6烷基。

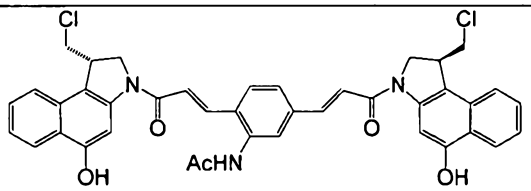
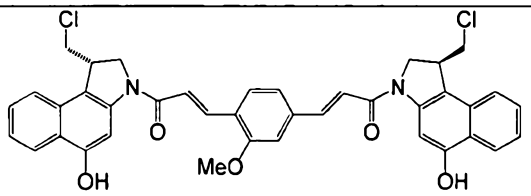
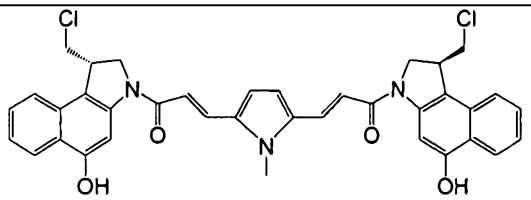
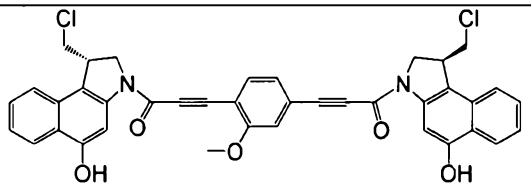
在某些實施例中，Y係苯基、吡啶基、1-甲基-1H-苯并[d]咪唑或[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶。

CBI二聚體藥物部分D化合物包括表1中之彼等化合物，其可用於製備表3之連接體-CBI藥物中間體。

表1 CBI二聚體藥物部分化合物

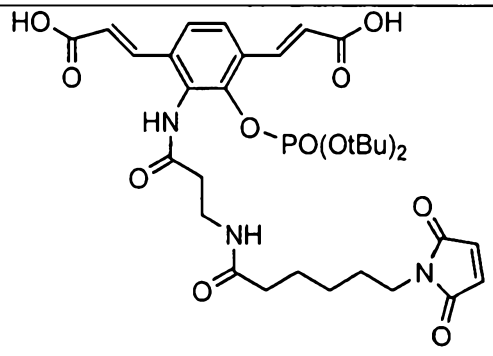
編號	結構	名稱	MW
51b		1,5-雙((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)戊烷-1,5-二酮	563.47
53j		1-((S)-5-胺基-1-(氯甲基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)戊烷-1,5-二酮	562.49

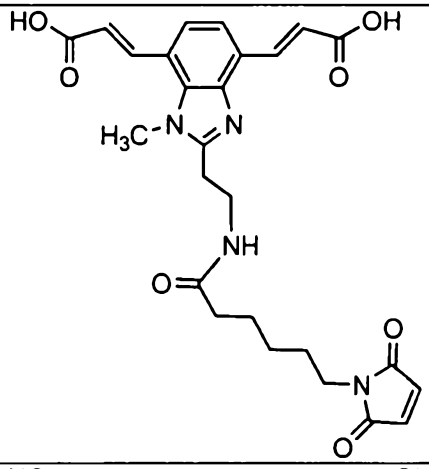
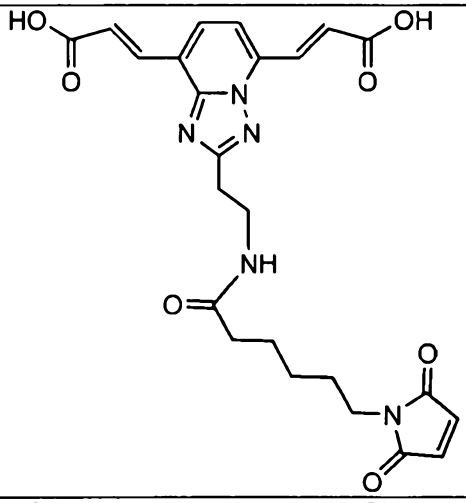
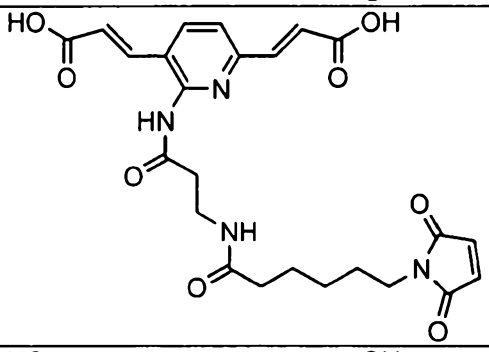
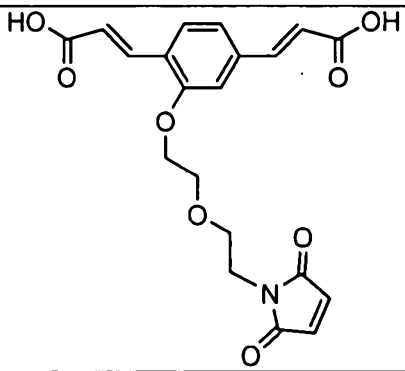
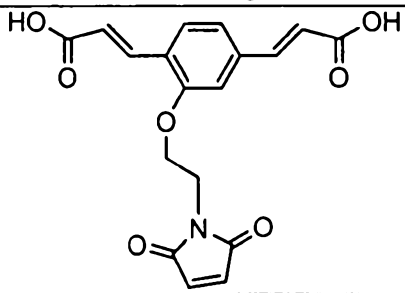
53p		1-((R)-5-胺基-1-(氯甲基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-((R)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)戊烷-1,5-二酮	562.49
11	 (外消旋)	2,2'-氮烷二基雙(1-(1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)乙酮)鹽酸鹽	600.92
12	 (外消旋)	1,5-雙(1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)戊烷-1,5-二酮	563.47
13	 (外消旋)	1,7-雙(1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)庚烷-1,7-二酮	591.52
14		(S)-8-(6-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-6-側氧基己基氧基)-7-甲氧基-2,3-二氫-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮呼-5(11aH)-酮	576.08
15		(S)-(1-甲基-1H-吡咯-2,5-二基)雙(((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)甲酮)	622.13

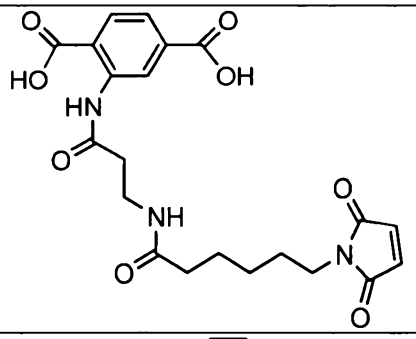
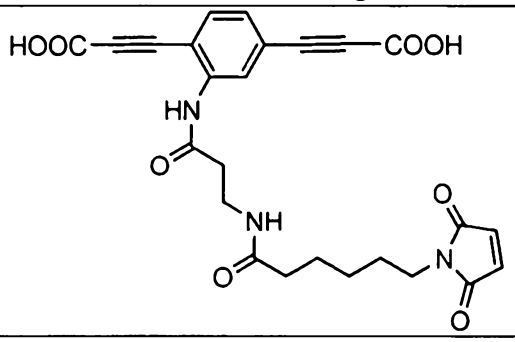
16		N-(2,5-雙((E)-3-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-3-側氧基丙-1-烯基)苯基)乙醯胺	728.17
17		(S,2E,2'E)-3,3'-(2-甲氧基-1,4-伸苯基)雙(1-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)丙-2-烯-1-酮)	701.16
18		(S,2E,2'E)-3,3'-(1-甲基-1H-吡咯-2,5-二基)雙(1-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)丙-2-烯-1-酮)	650.16
19		(S)-3,3'-(2-甲氧基-1,4-伸苯基)雙(1-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)丙-2-炔-1-酮)	697.13

可用於製備CBI二聚體藥物部分D化合物之繫鏈試劑包括表2中之彼等化合物

表2 繫鏈試劑

編號	結構	名稱	MW
21		(2E,2'E)-3,3'-(2-(二-第三丁氧基磷醯基氧基)-3-(3-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)丙醯胺基)-1,4-伸苯基)二丙烯酸	705.69

22		(2E,2'E)-3,3'-(2-(2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)乙基)-1-甲基-1H-苯并[d]咪唑-4,7-二基)二丙烯酸	508.52
23		(2E,2'E)-3,3'-(2-(2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)乙基)-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-5,8-二基)二丙烯酸	495.48
24		(2E,2'E)-3,3'-(6-(3-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)丙醯胺基)吡啶-2,5-二基)二丙烯酸	498.49
25		(2E,2'E)-3,3'-(2-(2-(2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙氧基)乙氧基)-1,4-伸苯基)二丙烯酸	401.37
26		(2E,2'E)-3,3'-(2-(2-(2,5- 二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙氧基)-1,4-伸苯基)二丙烯酸	357.08

27		2-(3-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)丙醯胺基)對苯二甲酸	445.42
28		3,3'-(2-(3-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)丙醯胺基)-1,4-伸苯基)二丙炔酸	493.47

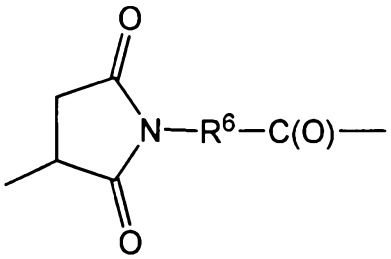
連接體

本發明之抗體-藥物結合物(ADC)化合物包含具有下式之連接體L：

$$\text{-Str-(Pep)}_m\text{-(Sp)}_n\text{-}$$

其中Str係共價附接至抗體之延伸體單元；Pep係2至12個胺基酸殘基之可選肽單元，Sp係共價附接至二聚體藥物部分之可選間隔體單元，且m及n係獨立地選自0及1。

在實例性實施例中，Str具有1,3-二取代之吡咯啶-2,5-二酮(琥珀醯亞胺)式：

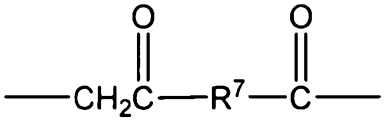


其中R^6係選自由以下組成之群：C_1-C_{10}伸烷基、C_3-C_8碳環基、O-(C_1-C_8烷基)、伸芳基、C_1-C_{10}伸烷基-伸芳基、伸芳基-C_1-C_{10}伸烷基、C_1-C_{10}伸烷基-(C_3-C_8碳環基)、(C_3-C_8碳環基)-C_1-C_{10}伸烷基、C_3-C_8雜環基、C_1-C_{10}伸烷基-(C_3-C_8雜環基)、(C_3-C_8雜環基)-C_1-C_{10}伸烷

基、C_1-C_{10}伸烷基-C(O)N(R^8)-C_2-C_6伸烷基-N(R^8)、N(R^8)-(C_2-C_6伸烷基)及$(CH_2CH_2O)_r$-CH_2；其中R^8係H或C_1-C_6烷基，且r係1至10範圍內之整數。

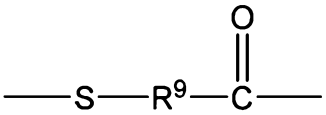
Str延伸體單元之1,3-二取代之吡咯啶-2,5-二酮實施例可自抗體之半胱胺酸硫醇與連接體-藥物中間體(例如表4中之彼等化合物)之馬來醯亞胺基團之結合形成。

在另一實例性實施例中，Str具有下式：



其中R^7係選自C_1-C_{10}伸烷基、C_1-C_{10}伸烷基-O、N(R^8)-(C_2-C_6伸烷基)-N(R^8)、N(R^8)-(C_2-C_6伸烷基)及$(CH_2CH_2O)_r$-CH_2；其中R^8係H或C_1-C_6烷基，且r係1至10範圍內之整數。

在另一實例性實施例中，Str具有下式：



其中R^9係選自C_1-C_{10}伸烷基、C_1-C_{10}伸烷基-O、(C_2-C_6伸烷基)-N(R^8)及$(CH_2CH_2O)_r$-CH_2；其中R^8係H或C_1-C_6烷基，且r係1至10範圍內之整數。

在另一實例性實施例中，L與抗體之半胱胺酸胺基酸形成二硫鍵，且R^9係C_2-C_6伸烷基-O，其中伸烷基視情況經F、OH、O(C_1-C_6烷基)、NH_2、$NHCH_3$、$N(CH_3)_2$、$OP(O)_3H_2$及C_1-C_6烷基取代，其中烷基視情況經一或多個F取代。

連接體試劑及連接體-藥物中間體可具有2至12或更多個胺基酸殘基之肽單元。

在實例性實施例中，m係1且Pep包含2至12個獨立地選自甘胺酸、丙胺酸、苯丙胺酸、離胺酸、精胺酸、纈胺酸及瓜胺酸之胺基酸

殘基。

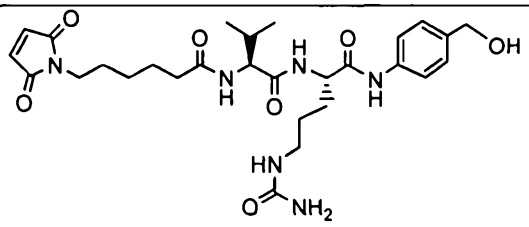
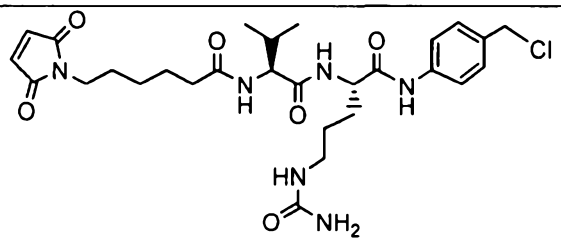
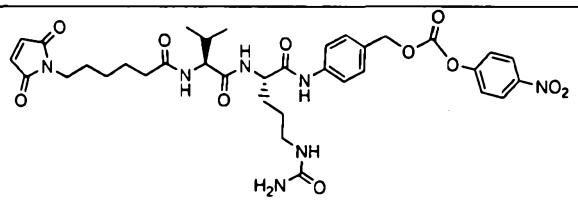
在實例性實施例中，Pep係纈胺酸-瓜胺酸。

肽-連接體試劑係如(WO 2012113847；US 7659241；US 7498298；US 2009/0111756；US 2009/0018086；US 6214345；Dubowchik等人，(2002) Bioconjugate Chem. 13(4):855-869)中所述製備。

在實例性實施例中，Sp包含對胺基苄基或對胺基苄基氧基羰基。

表3顯示可用於製備表4之連接體-CBI藥物中間體之實例性連接體試劑。

表3 肽-連接體試劑

編號	結構	名稱
41		6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-N-((S)-1-((S)-1-(4-(羥基甲基)苯基胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基胺基)-3-甲基-1-側氧基丁-2-基)己醯胺
42		N-((S)-1-((S)-1-(4-(氯甲基)苯基胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基胺基)-3-甲基-1-側氧基丁-2-基)-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺
43		碳酸4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苄基酯4-硝基苯基酯

可用於ADC之連接體-藥物中間體

可用於與抗體結合以製備抗體-藥物結合物之連接體-藥物中間體具有下式：

X-L-D

其中：

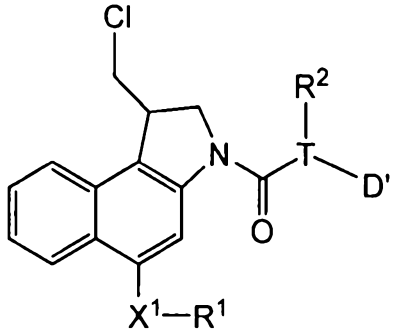
X係選自以下之反應性官能基：馬來醯亞胺、硫醇、胺基、溴化物、溴乙醯胺基、碘乙醯胺基、對甲苯磺酸酯、碘化物、羥基、羧基、吡啶基二硫化物及N-羥基琥珀醯亞胺；

L係具有下式之連接體：

$$-Str-(Pep)_m-(Sp)_n-$$

其中Str係共價附接至反應性官能基X之延伸體單元；Pep係2至12個胺基酸殘基之可選肽單元，Sp係共價附接至二聚體藥物部分之可選間隔體單元，且m及n係獨立地選自0及1；

D係具有下式之二聚體藥物部分：



其中

R^1係選自H、$P(O)_3H_2$、$C(O)NR^aR^b$或與L之鍵；

R^2係選自H、$P(O)_3H_2$、$C(O)NR^aR^b$或與L之鍵；

R^a及R^b係獨立地選自H及視情況經一或多個F取代之C_1-C_6烷基，或R^a與R^b形成5或6員雜環基；

T係選自以下之繫鏈基團：C_3-C_{12}伸烷基、Y、(C_1-C_6伸烷基)-Y-(C_1-C_6伸烷基)、(C_1-C_6伸烷基)-Y-(C_1-C_6伸烷基)-Y-(C_1-C_6伸烷基)、

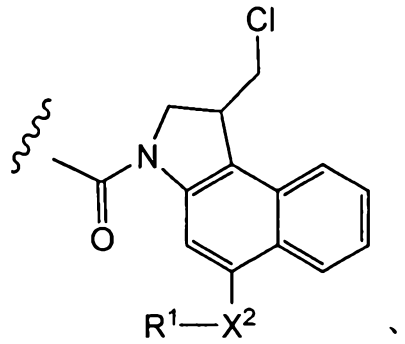
(C_2-C_6伸烯基)-Y-(C_2-C_6伸烯基)及(C_2-C_6伸炔基)-Y-(C_2-C_6伸炔基)；

其中Y係獨立地選自O、S、NR^1、芳基及雜芳基；

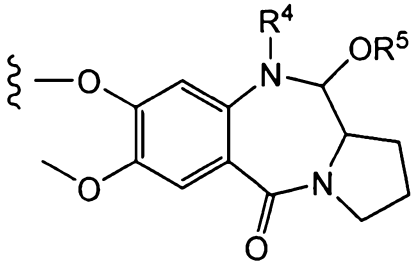
其中伸烷基、伸烯基、芳基及雜芳基獨立地且視情況經F、OH、O(C_1-C_6烷基)、NH_2、$NHCH_3$、$N(CH_3)_2$、$OP(O)_3H_2$及C_1-C_6烷基取代，其中烷基視情況經一或多個F取代；

或伸烷基、伸烯基、芳基及雜芳基獨立地且視情況經與L之鍵取代；

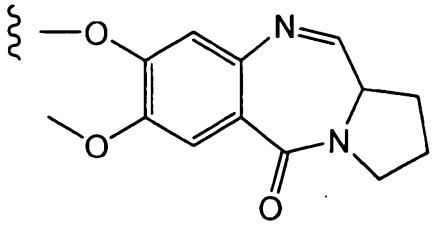
D'係選自以下之藥物部分：



、



及



其中波形線指示與T之附接位點；

X^1及X^2係獨立地選自O及NR^3，其中R^3係選自H及視情況經一或多個F取代之C_1-C_6烷基；

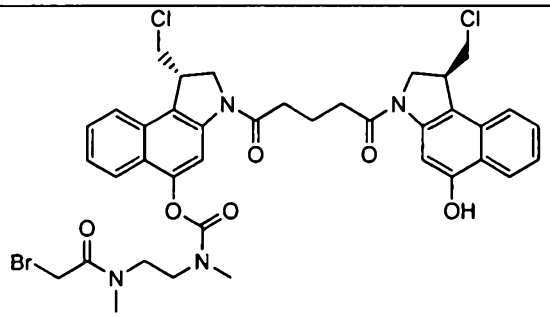
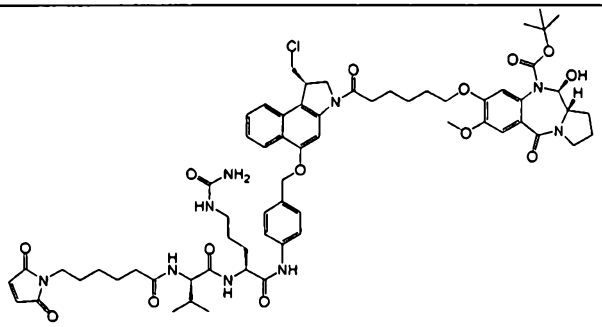
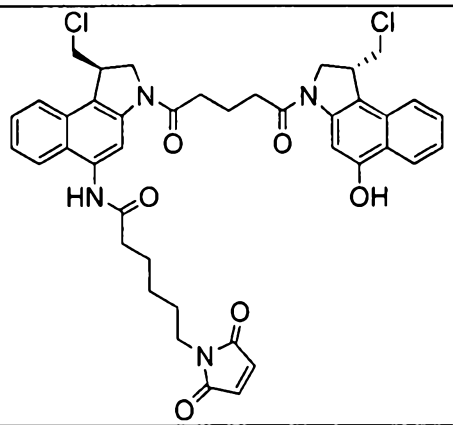
R^4係H、CO_2R或與L之鍵，其中R係C_1-C_6烷基或苄基；且

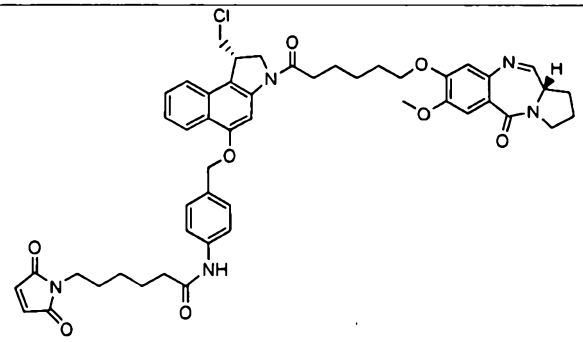
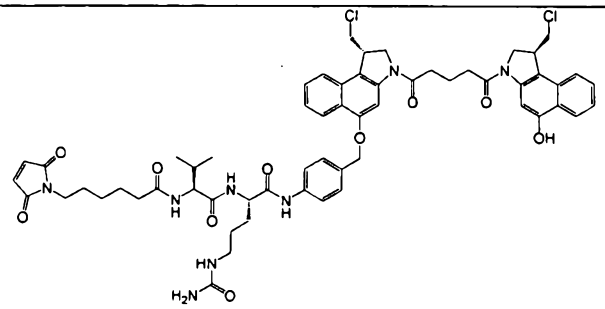
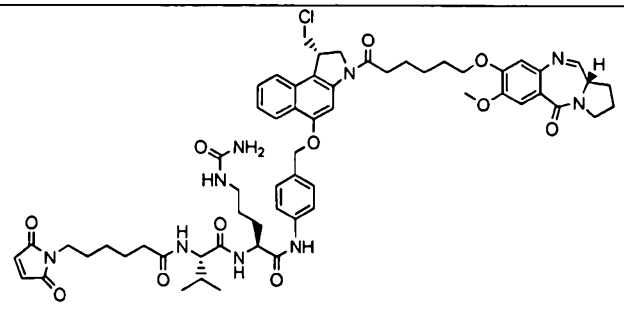
R^5係H或C_1-C_6烷基。

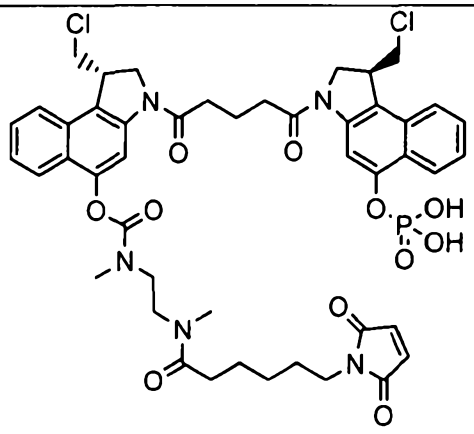
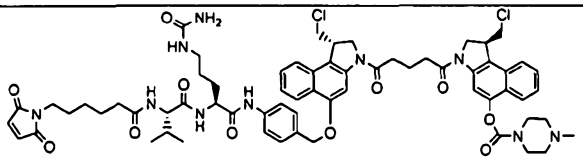
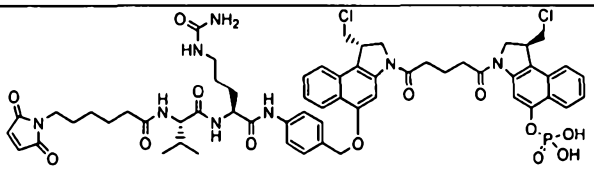
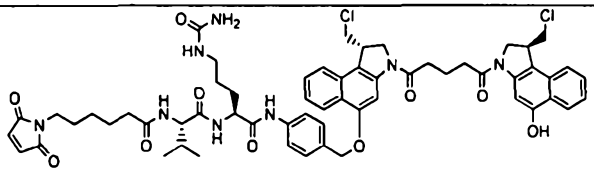
表4之連接體-藥物中間體係藉由將CBI二聚體藥物部分與連接體

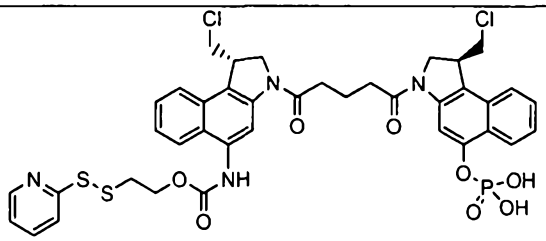
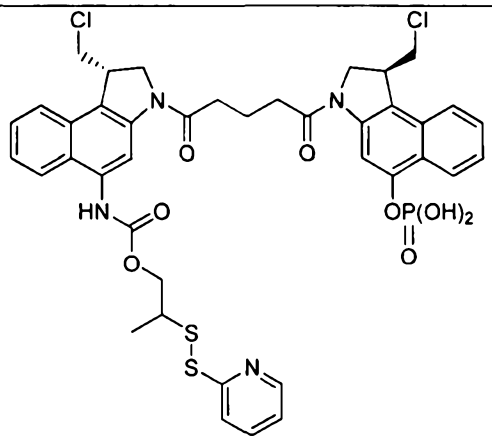
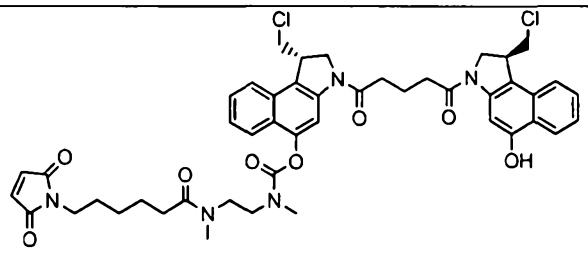
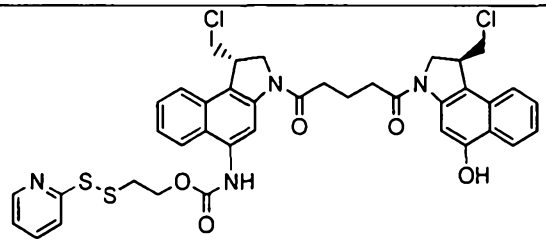
試劑偶合來製備，如實例1-18及圖1-24中所例示。

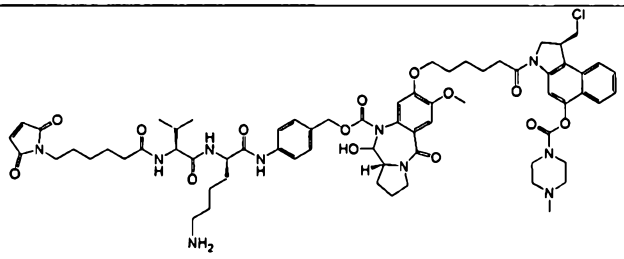
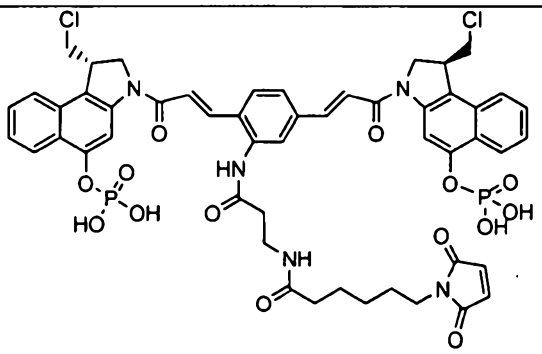
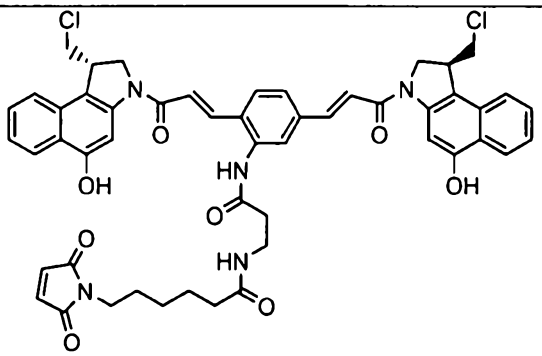
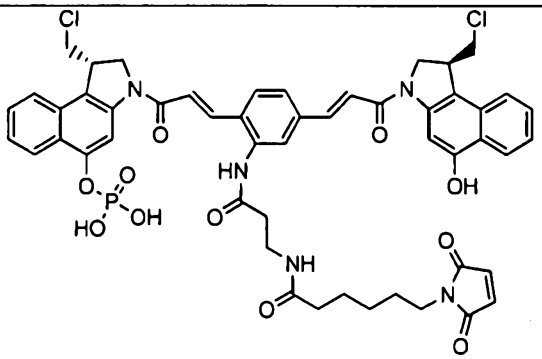
表4 連接體-CBI藥物中間體

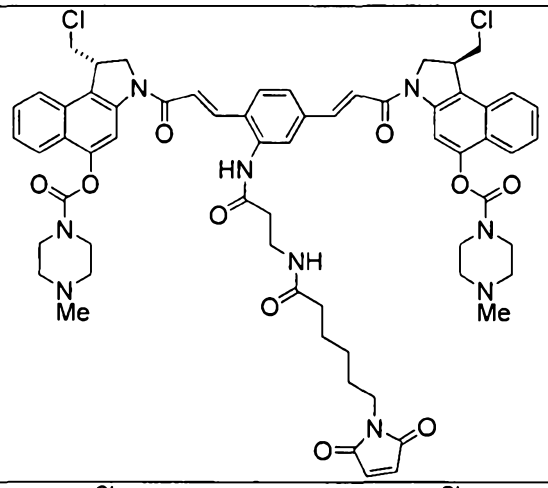
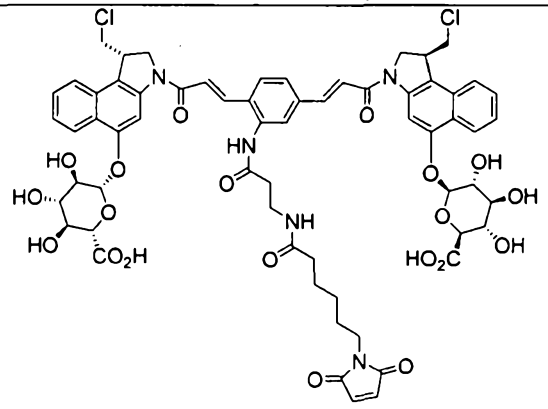
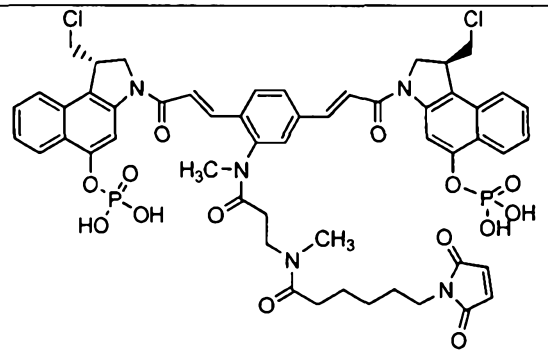
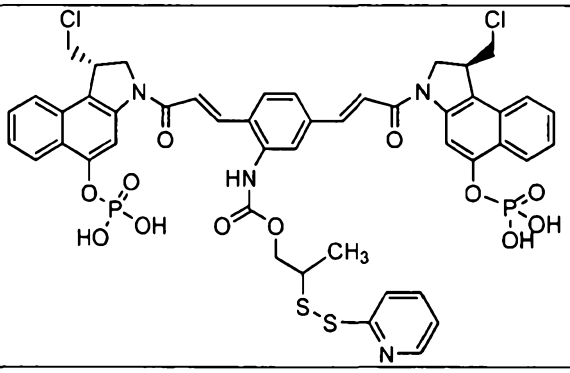
編號	結構	名稱
51		(S)-2-(2-溴-N-甲基乙醯胺基)乙基(甲基)胺基甲酸1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯
52		(11S,11aS)-8-(6-((S)-1-(氯甲基)-5-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苄基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-6-側氧基己基氧基)-11-羥基-7-甲氧基-5-側氧基-2,3,11,11a-四氫-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮呯-10(5H)-甲酸第三丁基酯
53		N-((R)-1-(氯甲基)-3-(5-((R)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基)-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺

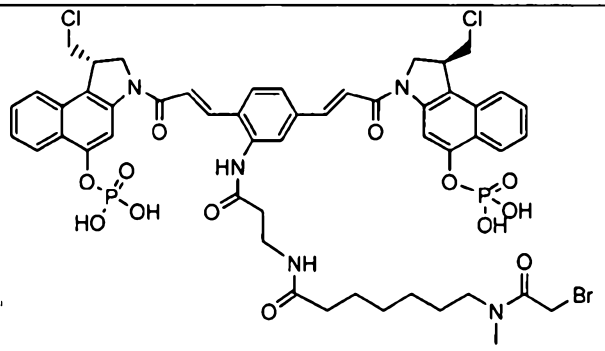
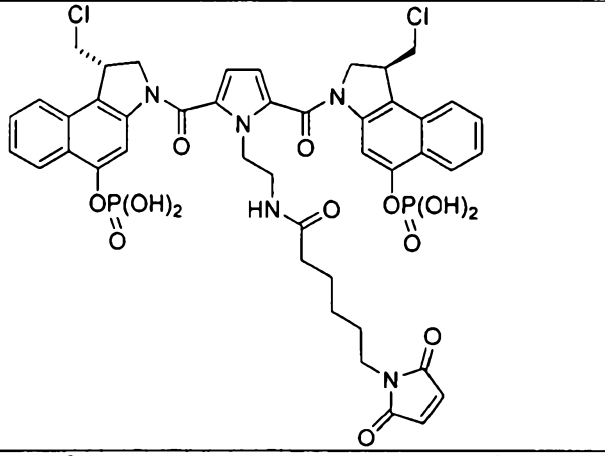
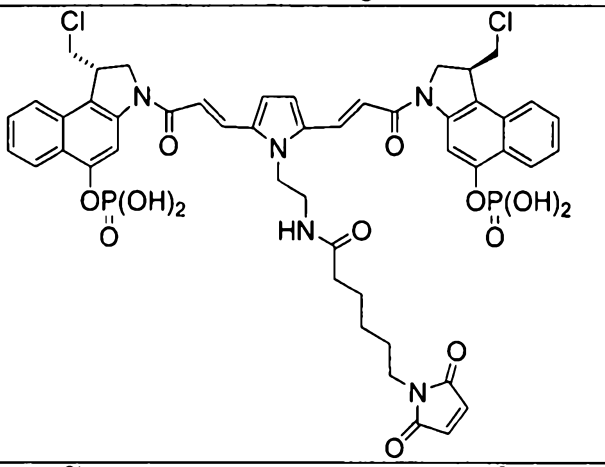
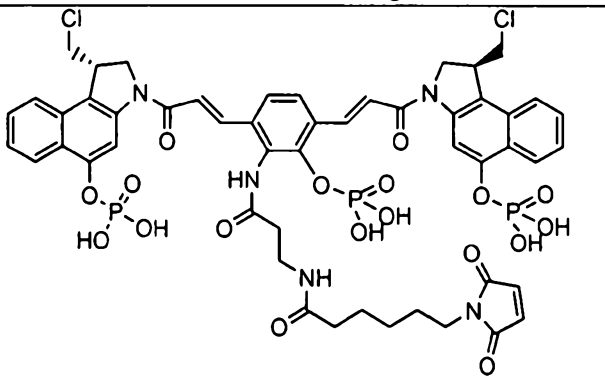
54		N-(4-(((S)-1-(氯甲基)-3-(6-((S)-7-甲氧基-5-側氧基-2,3,5,11a-四氫-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮呯-8-基氧基)己醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基氧基)甲基)苯基)-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺
55		N-((S)-1-((S)-1-(4-(((S)-1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基氧基)甲基)苯基胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基胺基)-3-甲基-1-側氧基丁-2-基)-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺
56		N-((S)-1-((S)-1-(4-(((S)-1-(氯甲基)-3-(6-((S)-7-甲氧基-5-側氧基-2,3,5,11a-四氫-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮呯-8-基氧基)己醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基氧基)甲基)苯基胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基胺基)-3-甲基-1-側氧基丁-2-基)-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺

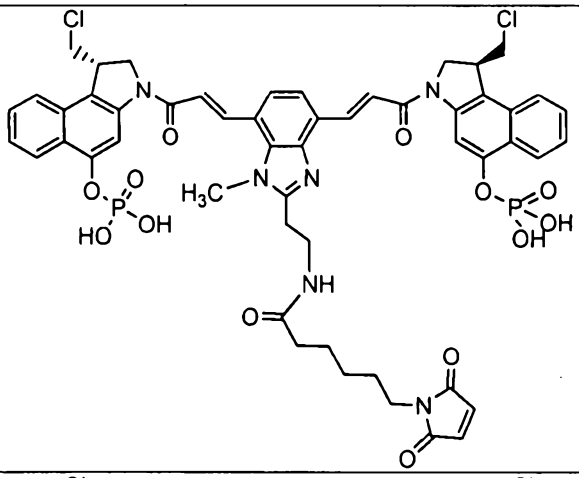
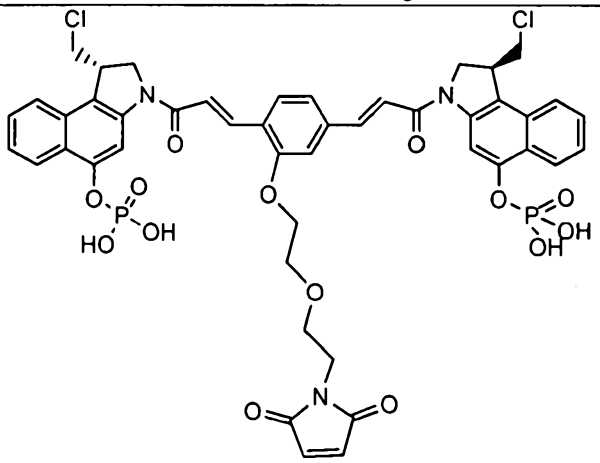
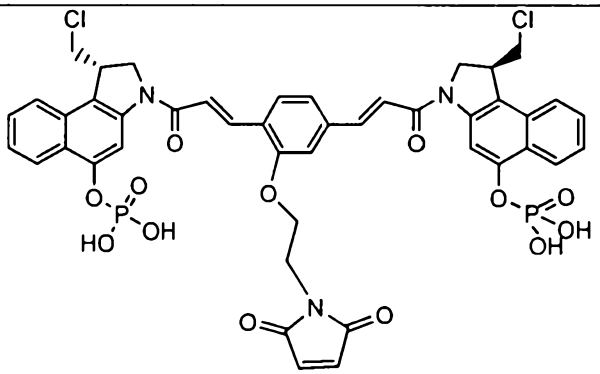
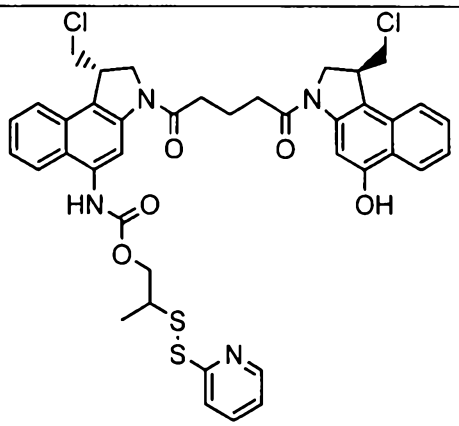
57		(S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-N-甲基己醯胺基)乙基(甲基)胺基甲酸1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-(膦醯基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯
58		(S)-4-甲基六氫吡嗪-1-甲酸1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苄基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯
59		(S)-磷酸二氫1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苄基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯
60		N-((S)-1-((S)-1-(4-(((S)-1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基氧基)甲

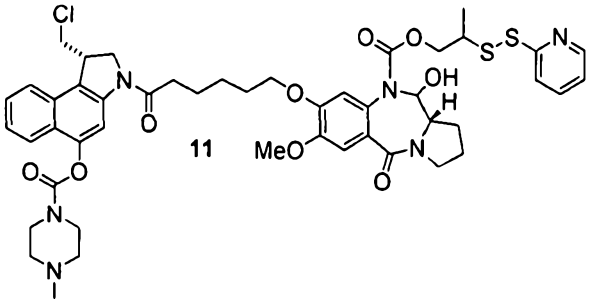
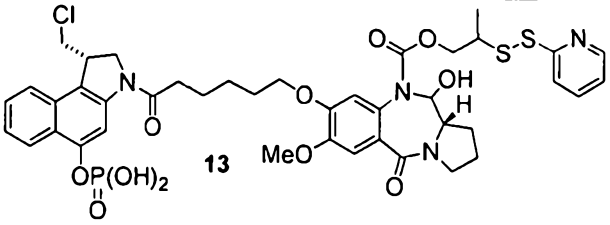
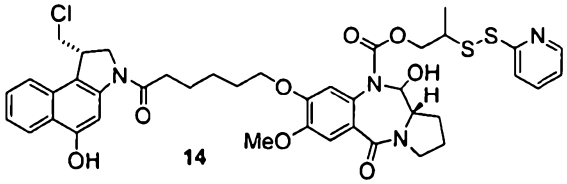
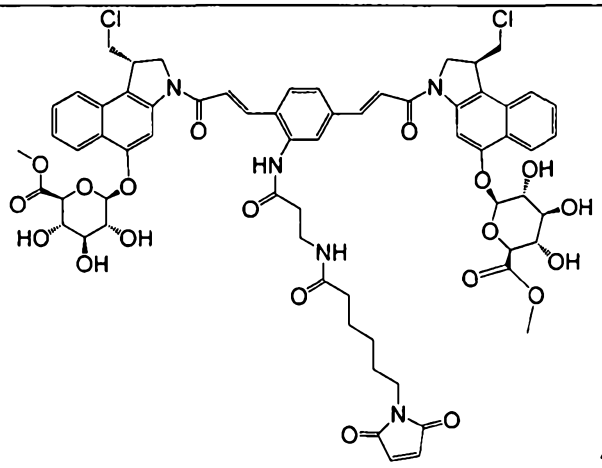
		基)苯基胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基胺基)-3-甲基-1-側氧基丁-2-基)-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺
61		(S)-1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-(膦醯基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基胺基甲酸2-(吡啶-2-基二硫烷基)乙基酯
62		(S)-1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-(膦醯基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基胺基甲酸2-(吡啶-2-基二硫烷基)丙基酯
63		(S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-N-甲基己醯胺基)乙基(甲基)胺基甲酸1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯
64		(S)-1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基胺基甲酸2-(吡啶-2-基二硫烷基)乙基酯

65		(11aS)-8-(6-((S)-1-(氯甲基)-5-(4-甲基六氫吡嗪-1-羰基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-6-側氧基已基氧基)-11-羥基-7-甲氧基-5-側氧基-2,3,11,11a-四氫-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮呯-10(5H)-甲酸4-((S)-6-胺基-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)己醯胺基)苄基酯
66		N-(3-(2,5-雙((E)-3-((S)-1-(氯甲基)-5-膦醯氧基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-3-側氧基丙-1-烯基)苯基胺基)-3-側氧基丙基)-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺
67		N-(3-(2,5-雙((E)-3-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-3-側氧基丙-1-烯基)苯基胺基)-3-側氧基丙基)-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺
68		(S)-磷酸二氫1-(氯甲基)-3-((E)-3-(4-((E)-3-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-3-側氧基丙-1-烯基)-2-(3-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)丙醯胺基)苯基)丙烯醯基)-2,3-

		二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯
69		N-(3-(2,5-雙((E)-3-((S)-1-(氯甲基)-5-(4-甲基六氫吡嗪-1-羰基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-3-側氧基丙-1-烯基)苯基胺基)-3-側氧基丙基)-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺
70		N-(3-(2,5-雙((E)-3-((S)-1-(氯甲基)-5-((2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-三羥基-四氫-2H-吡喃-2-羧基-6-氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-3-側氧基丙-1-烯基)苯基胺基)-3-側氧基丙基)-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺
71		N-(3-(2,5-雙((E)-3-((S)-1-(氯甲基)-5-膦醯氧基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-3-側氧基丙-1-烯基)苯基胺基)-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-N-甲基-N-(3-(甲基胺基)-3-側氧基丙基)己醯胺
72		2,5-雙((E)-3-((S)-1-(氯甲基)-5-(膦醯基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-3-側氧基丙-1-烯基)苯基胺基甲酸2-(吡啶-2-基二硫烷基)丙基酯

73		N-(3-(2,5- 雙 ((E)-3-((S)-1-(氯甲基)-5-膦醯氧基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-3-側氧基丙-1-烯基)苯基胺基)-7-(2-溴-N-甲基乙醯胺基)-N-(3-側氧基丙基)庚醯胺
74		N-(2-(2,5-雙((S)-1-(氯甲基)-5-膦醯氧基-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-3-羰基)-1H-吡咯-1-基)乙基)-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺
75		N-(2-(2,5- 雙 ((E)-3-((S)-1-(氯甲基)-5-膦醯氧基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-3-側氧基丙-1-烯基)-1H-吡咯-1-基)乙基)-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺
76		N-(3-(2,5- 雙 ((E)-3-((S)-1-(氯甲基)-5-膦醯氧基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-3-側氧基丙-1-烯基)苯基胺基,2-膦醯氧基)-3-側氧基丙基)-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺

77		N-(3-(2,5- 雙 ((E)-3-((S)-1-(氯甲基)-5-膦醯氧基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-3-側氧基丙-1-烯基)-1-甲基-1H-苯并[d]咪唑-2-基)乙基)-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺
78		磷酸二氫[(1S)-1-(氯甲基)-3-[(E)-3-[4-[(E)-3-[(1S)-1-(氯甲基)-5-膦醯基氧基-1,2-二氫苯并[e]吲哚-3-基]-3-側氧基-丙-1-烯基]-2-[2-[2-(2,5-二側氧基吡咯-1-基)乙氧基]乙氧基]苯基]丙-2-烯醯基]-1,2-二氫苯并[e]吲哚-5-基]酯
79		磷酸二氫[(1S)-1-(氯甲基)-3-[(E)-3-[4-[(E)-3-[(1S)-1-(氯甲基)-5-膦醯基氧基-1,2-二氫苯并[e]吲哚-3-基]-3-側氧基-丙-1-烯基]-2-[2-(2,5-二側氧基吡咯-1-基)乙氧基]苯基]丙-2-烯醯基]-1,2-二氫苯并[e]吲哚-5-基]酯
80		N-[1-(氯甲基)-3-[5-[1-(氯甲基)-5-羥基-1,2-二氫苯并[e]吲哚-3-基]-5-側氧基-戊醯基]-1,2-二氫苯并[e]吲哚-5-基]胺基甲酸2-(2-吡啶基二硫烷基)丙基酯

81		3-[6-[1-(氯甲基)-5-(4-甲基六氫吡嗪-1-羰基)氧基-1,2-二氫苯并[e]吲哚-3-基]-6-側氧基-己氧基]-6-羥基-2-甲氧基-11-側氧基-6a,7,8,9-四氫-6H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯二氮呯-5-甲酸2-(2-吡啶基二硫烷基)丙基酯
82		3-[6-[1-(氯甲基)-5-膦醯基氧基-1,2-二氫苯并[e]吲哚-3-基]-6-側氧基-己氧基]-6-羥基-2-甲氧基-11-側氧基-6a,7,8,9-四氫-6H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯二氮呯-5-甲酸2-(2-吡啶基二硫烷基)丙基酯
83		3-[6-[1-(氯甲基)-5-羥基-1,2-二氫苯并[e]吲哚-3-基]-6-側氧基-己氧基]-6-羥基-2-甲氧基-11-側氧基-6a,7,8,9-四氫-6H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯二氮呯-5-甲酸2-(2-吡啶基二硫烷基)丙基酯
84		(1*S*)-β-D-吡喃葡萄糖苷酸1-(氯甲基)-3-((2*E*)-3-{4-((1*E*)-3-{(1*S*)-1-(氯甲基)-5-[(6-甲基-β-D-吡喃葡糖基)氧基]-1,2-二氫-3*H*-苯并[*e*]吲哚-3-基}-3-側氧基-1-丙烯基)-2-[(3-{[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)己醯基]胺基}丙醯基)胺基]苯基}-2-丙烯醯基)-1,2-二氫-3*H*-苯并[*e*]吲哚-5-基酯甲基酯

抗體-藥物結合物(ADC)

本發明之抗體-藥物結合物(ADC)化合物包含對連接至有效CBI二聚體藥物部分之腫瘤相關抗原具有特異性之抗體，且包括彼等具有治療活性、有效抵抗多種過增殖性病症(包括癌症)者。藥物部分之生物活性係藉由結合至抗體調節。本發明之ADC將有效劑量之CBI二聚體藥物或毒素選擇性地遞送至腫瘤細胞或位點，藉此可達成較大選擇性(即較低有效劑量)，同時增加治療指數(「治療窗」)。在實例性實施例中，ADC化合物包括結合(即由連接體共價附接)至CBI二聚體藥物部分之半胱胺酸改造之抗體。

本發明之抗體-藥物結合物化合物具有下式：

$$Ab-(L-D)_p$$

其中：

Ab係抗體；

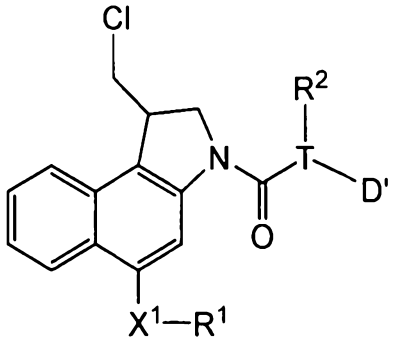
L係具有下式之連接體：

$$-Str-(Pep)_m-(Sp)_n-$$

其中Str係共價附接至抗體之延伸體單元；Pep係2至12個胺基酸殘基之可選肽單元，Sp係共價附接至二聚體藥物部分之可選間隔體單元，且m及n係獨立地選自0及1；

p係1至8之整數；

D係具有下式之二聚體藥物部分：



其中

R^1係選自H、$P(O)_3H_2$、$C(O)NR^aR^b$或與L之鍵；

R^2係選自H、$P(O)_3H_2$、$C(O)NR^aR^b$或與L之鍵；

R^a及R^b係獨立地選自H及視情況經一或多個F取代之C_1-C_6烷基，或R^a與R^b形成5或6員雜環基；

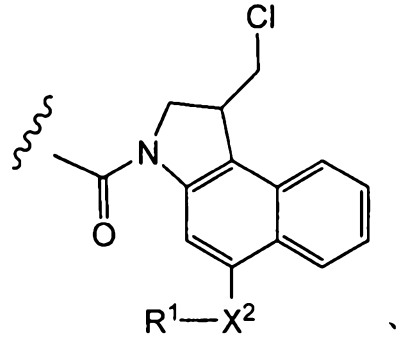
T係選自以下之繫鏈基團：C_3-C_{12}伸烷基、Y、(C_1-C_6伸烷基)-Y-(C_1-C_6伸烷基)、(C_1-C_6伸烷基)-Y-(C_1-C_6伸烷基)-Y-(C_1-C_6伸烷基)、(C_2-C_6伸烯基)-Y-(C_2-C_6伸烯基)及(C_2-C_6伸炔基)-Y-(C_2-C_6伸炔基)；

其中Y係獨立地選自O、S、NR^1、芳基及雜芳基；

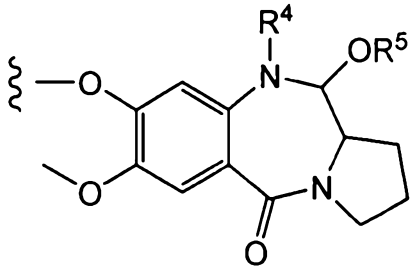
其中伸烷基、伸烯基、芳基及雜芳基獨立地且視情況經F、OH、O(C_1-C_6烷基)、NH_2、$NHCH_3$、$N(CH_3)_2$、$OP(O)_3H_2$及C_1-C_6烷基取代，其中烷基視情況經一或多個F取代；

或伸烷基、伸烯基、芳基及雜芳基獨立地且視情況經與L之鍵取代；

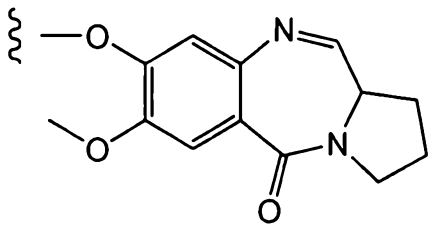
D'係選自以下之藥物部分：



、



及



其中波形線指示與T之附接位點；

X^1及X^2係獨立地選自O及NR^3，其中R^3係選自H及視情況經一或多個F取代之C_1-C_6烷基；

R^4係H、CO_2R，其中R係C_1-C_6烷基或苄基；且

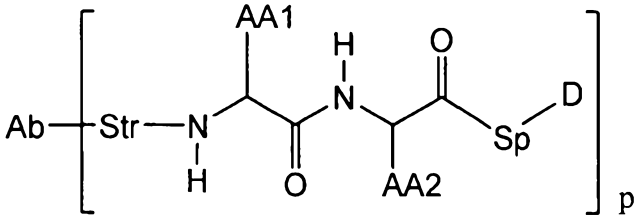
R^5係H。

在一個實施例中，R^a與R^b形成選自N-甲基六氫吡嗪基、嗎啉基、六氫吡啶基及吡咯啶基之5或6員雜環基。

在一個實施例中，藥物部分可經由組織蛋白酶B (在大多數哺乳動物細胞類型中發現之溶酶體蛋白酶)可裂解之蛋白酶可裂解之肽連接體接合至抗體(US 6214345；Dubowchik等人，(2002) Bioconj. Chem. 13:855-869)。儘管本發明並不受任何特定作用機制限制或界定，但ADC可用作前藥，其中藥物無活性直至連接體裂解為止。ADC能夠使活性藥物尤其在疾病藉由習用化學療法治療較差之腫瘤細胞位置中濃縮。在其他實施例中，藥物部分經由非肽、非蛋白酶可裂解之連接體附接至抗體，該連接體可包括官能基，例如二硫化物或琥珀醯亞胺基。

可經由反應性連接體部分結合至抗體分子之藥物部分的數目可受藉由本文所述方法引入之游離半胱胺酸殘基之數目限制。因此，實例性ADC包含具有1、2、3或4個經改造之半胱胺酸胺基酸之抗體(Lyon, R.等人，(2012) *Methods in Enzym.* 502:123-138)。

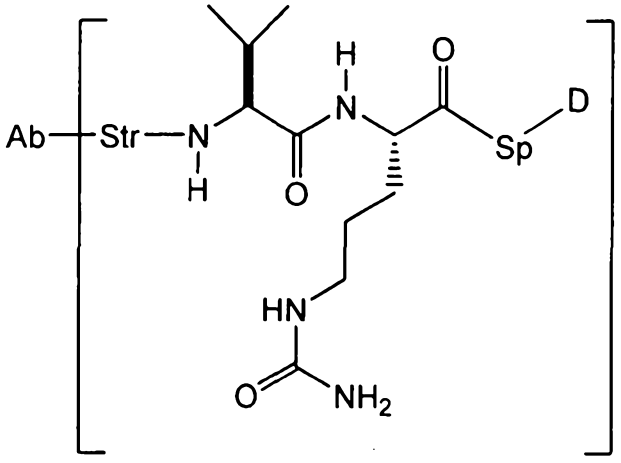
在一個實施例中，抗體-藥物結合物化合物具有下式：



其中AA1及AA2係獨立地選自胺基酸側鏈。胺基酸側鏈係獨立地選自H、$-CH_3$、$-CH_2(C_6H_5)$、$-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$、$-CH_2CH_2CH_2NHC(NH)NH_2$、$-CHCH(CH_3)CH_3$及-

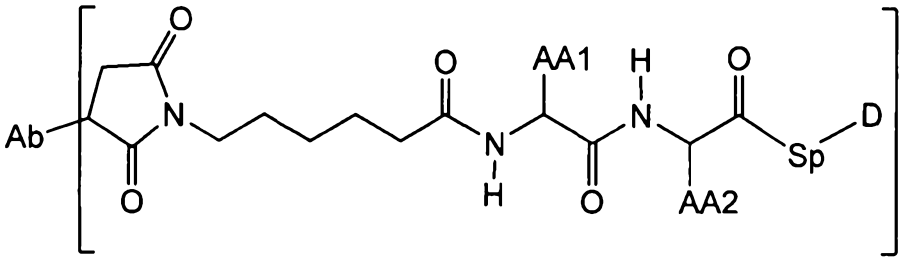
$CH_2CH_2CH_2NHC(O)NH_2$。

在一個實施例中，抗體-藥物結合物化合物具有下式：



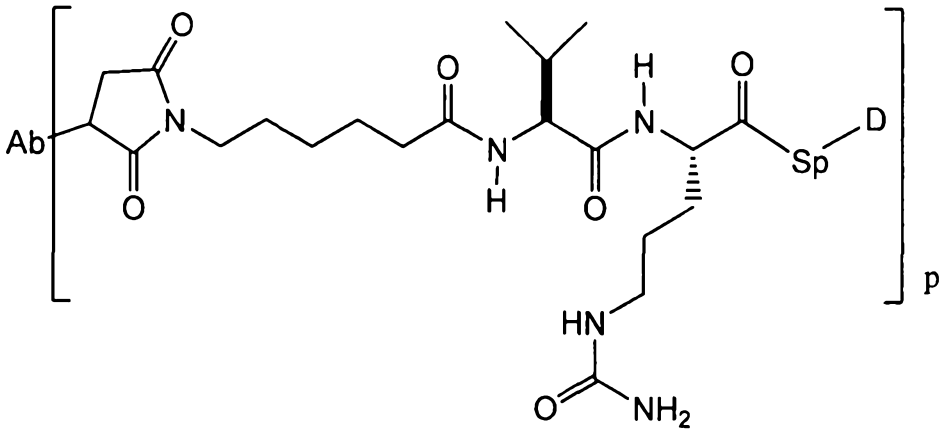
。

在一個實施例中，抗體-藥物結合物化合物具有下式：



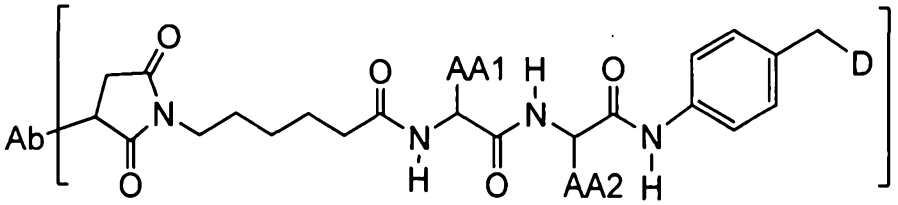
。

在一個實施例中，抗體-藥物結合物化合物具有下式：



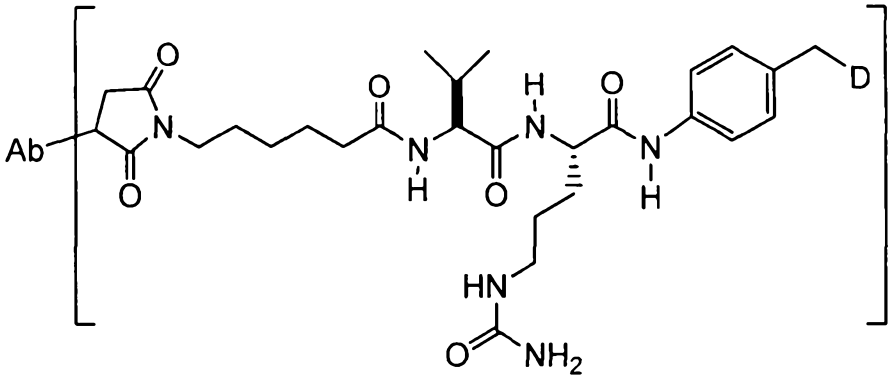
。

在一個實施例中，抗體-藥物結合物化合物具有下式：

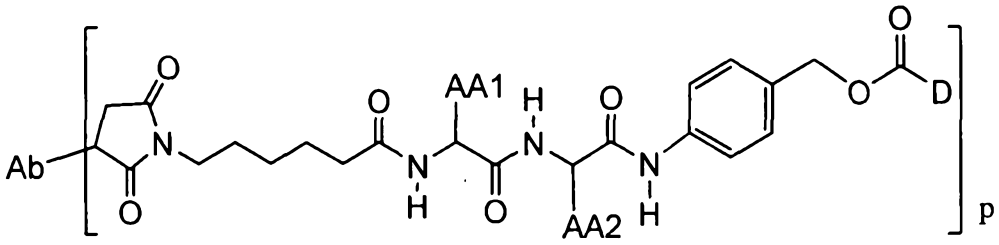


。

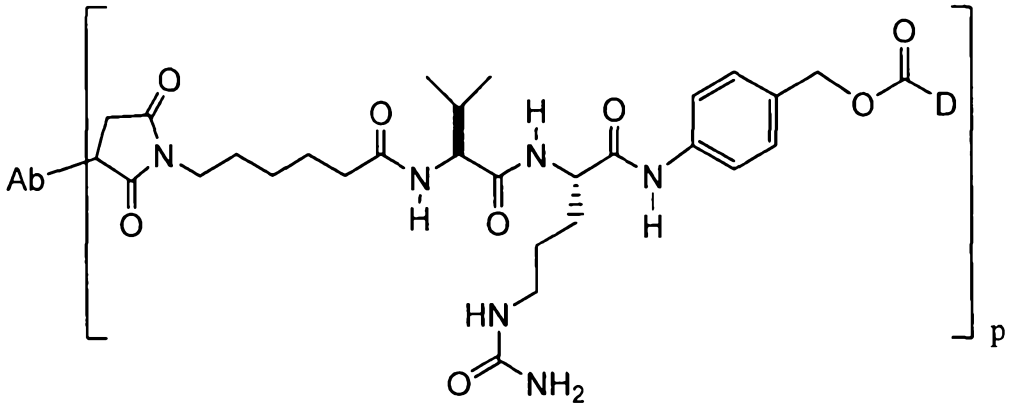
在一個實施例中，抗體-藥物結合物化合物具有下式：



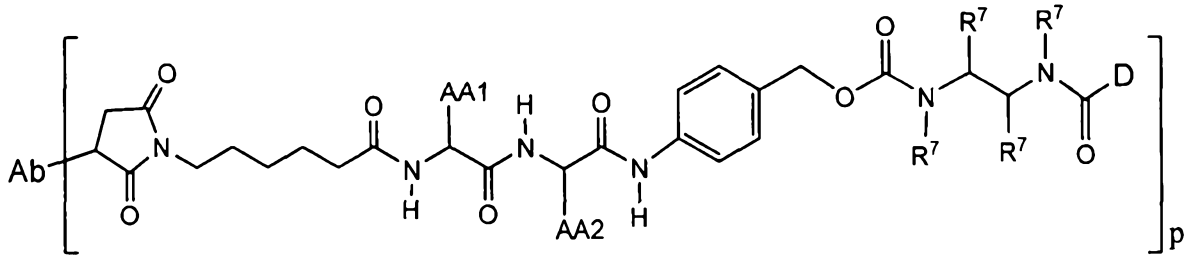
在一個實施例中，抗體-藥物結合物化合物具有下式：



在一個實施例中，抗體-藥物結合物化合物具有下式：



在一個實施例中，抗體-藥物結合物化合物具有下式：



其中R^7係獨立地選自H及C_1-C_{12}烷基。

在一個實施例中，p係1、2、3或4。

在一個實施例中，p係2。

在一個實施例中，D係選自表1中所列舉之化合物或其衍生物的部分。

在一個實施例中，L-D係選自表4中所列舉之化合物或其衍生物的部分。

在一個實施例中，本發明係關於選自表5中所列舉之分子的結合物。

ADC之藥物載量

藥物載量係每抗體之CBI藥物部分之平均數。藥物載量可在1至8個藥物(D)/抗體(Ab)範圍內，即其中1、2、3、4、5、6、7及8個藥物部分共價附接至抗體。ADC之組合物包括與多個(1至8個)藥物結合之抗體之集合。可藉由習用方式(例如質譜、ELISA分析、電泳及HPLC)表徵來自結合反應之ADC製劑中之每抗體之藥物平均數。亦可測定ADC之定量分佈(以p表示)。藉由ELISA，可測定ADC之特定製劑中之p之平均值(Hamblett等人，(2004) Clin.Cancer Res.10:7063-7070；Sanderson等人，(2005) Clin.Cancer Res.11:843-852)。然而，p(藥物)值分佈不能藉由ELISA之抗體-抗原結合及檢測極限來辨別。同樣，檢測抗體-藥物結合物之ELISA分析不能確定藥物部分附接至抗體之位點，例如重鏈或輕鏈片段，或特定胺基酸殘基。在一些情況下，自具有其他藥物載量之ADC分離、純化及表徵均質ADC (其中p係一定值)可藉助諸如逆相HPLC或電泳等方式來達成。

對於一些抗體-藥物結合物而言，p可受限於抗體上之附接位點之數目。舉例而言，抗體可僅具有一或若干個半胱胺酸硫醇基團，或可僅具有一或若干個足夠反應性硫醇基團，經由其可附接連接體。較高藥物載量(例如p >5)可引起某些抗體-藥物結合物聚集、不溶、毒性或損失細胞滲透性。

通常，在結合反應期間，少於理論最大值之藥物部分結合至抗體。抗體可含有(例如)許多不與連接體-藥物中間體(X-L-D)或連接體試劑反應之離胺酸殘基。僅最具反應性之離胺酸基團可與胺反應性連

接體試劑反應。同樣，僅最具反應性之半胱胺酸硫醇基團可與硫醇反應性連接體試劑或連接體-藥物中間體反應。通常，抗體不含許多(若存在)可連接至藥物部分之游離及反應性半胱胺酸硫醇基團。化合物之抗體中之大部分半胱胺酸硫醇殘基以二硫鍵形式存在且必須在部分或全還原條件下利用還原劑(例如二硫蘇糖醇(DTT)或TCEP)還原。ADC之載量(藥物/抗體比率，「DAR」)可以若干不同方式控制，該等方式包括：(i) 限制連接體-藥物中間體或連接體試劑相對於抗體之莫耳過量，(ii) 限制結合反應時間或溫度，及(iii) 用於半胱胺酸硫醇修飾之部分或限制還原條件。

若抗體之一個以上親核或親電基團與連接體-藥物中間體或連接體試劑、之後CBI二聚體藥物部分試劑反應，則所得產物係ADC化合物之混合物，且具有(例如) 1種、2種、3種等藥物部分附接至抗體之分佈。液相層析方法(例如聚合物逆相(PLRP)及疏水性相互作用)(HIC)可藉由藥物載量值分離混合物中之化合物。可分離具有單一藥物載量值(p)之ADC之製劑，然而，該等單一載量值ADC仍可為非均相混合物，此乃因藥物部分可在抗體上之不同位點經由連接體附接。因此，本發明之抗體-藥物結合物組合物包括抗體-藥物結合物化合物之混合物，其中抗體具有一或多個藥物部分且其中藥物部分可於不同胺基酸殘基處附接至抗體。

製備抗體-藥物結合物之方法

本發明之實例性抗體-藥物結合物(ADC)化合物**101-139**係自連接體-藥物中間體**51-68**根據實例20且如表4中所示製備。

表5 抗體-藥物結合物(ADC)

編號	ADC式	連接體-CBI中間體(表4)	DAR *
101	硫代hu抗CD22 HC A121C-MC-vc-PAB-(CBI二聚體)	55	1.7
102	硫代hu抗Her2 HC A121C-MC-vc-PAB-(CBI二聚體)	55	1.8
103	硫代Hu抗Her2 4D5 HC A118C-MC-vc-PAB-(CBI-PBD)	56	1.6
104	硫代Hu抗CD22 10F4v3 HC A118C-MC-vc-PAB-(CBI-PBD)	56	1.6
105	硫代Hu抗Her2 4D5 HC A118C-MC-vc-PAB-(CBI二聚體MePip)	58	1.7
106	硫代Hu抗Her2 4D5 HC A118C-MC-MMED-(CBI二聚體磷酸酯)	57	2.0
107	硫代Hu抗Her2 4D5 HC A118C-MC-vc-PAB-(CBI二聚體MePip)	58	1.6
108	硫代Hu抗CD22 10F4v3 HC A118C-MC-vc-PAB-(CBI二聚體MePip)	58	1.8
109	硫代Hu抗Her2 4D5 HC A118C-MC-MMED-(CBI二聚體磷酸酯)	57	1.9
110	硫代Hu抗CD22 10F4v3 HC A118C-MC-MMED-(CBI二聚體磷酸酯)	57	1.9
111	硫代Hu抗CD22 10F4v3 HC A118C-MC-vc-PAB-(CBI二聚體磷酸酯)	59	1.8
112	硫代Hu抗Her2 4D5 HC A118C-MC-vc-PAB-(CBI二聚體磷酸酯)	59	1.9
113	硫代Hu抗Her2 4D5 HC A118C-DSE-(CBI二聚體磷酸酯)	61	2.0

114	硫代Hu抗Her2 4D5 HC A118C-MC-MMED-(CBI二聚體磷酸酯)磷酸酶處理	57	1.9
115	硫代Hu抗CD22 10F4v3 HC A118C-MC-MMED-(CBI二聚體) 磷酸酶處理	63	1.9
116	硫代Hu抗CD22 10F4v3 HC A118C-MC-vc-PAB-(CBI二聚體) 磷酸酶處理	60	1.8
117	硫代Hu抗Her2 4D5 HC A118C-MC-vc-PAB-(CBI二聚體) 磷酸酶處理	60	1.9
118	硫代Hu抗Her2 4D5 HC A118C-DSE-(CBI二聚體)磷酸酶處理	64	2.0
119	硫代Hu抗Her2 4D5 HC A118C-DSE-(CBI二聚體磷酸酯)	61	1.9
120	硫代Hu抗CD22 10F4v3 HC A118C-DSE-(CBI二聚體磷酸酯)	61	1.8
121	硫代Hu抗Her2 4D5 HC A118C-DSP-(CBI二聚體磷酸酯)	62	1.8
122	硫代Hu抗CD22 10F4v3 HC A118C-DSE-(CBI二聚體磷酸酯)	62	1.6
123	硫代Hu抗Her2 4D5 HC A118C-MC-vc-PAB-(N10,PBD-CBI MePip)	65	1.9
124	硫代Hu抗CD22 10F4v3 HC A118C-MC-vc-PAB-(N10,PBD-CBI MePip)	65	1.7
125	硫代Hu抗CD33 15G15.33 HC A118C-MC-MMED-(CBI二聚體磷酸酯)	57	1.6
126	硫代Hu抗MUC16 3A5 HC A118C-MC-ED-(CBI二聚體DVB二磷酸酯)	66	1.8
127	硫代Hu抗CD33 15G15.33 HC A118C-MC-ED-(CBI二聚體DVB二磷酸酯)	66	1.5

128	硫代Hu抗MUC16 3A5 HC A118C-MC-MMED-(CBI二聚體磷酸酯)	57	1.95
129	硫代Hu抗CD33 15G15.33 HC A118C-MC-ED-(CBI二聚體DVB磷酸酯)	68	2.0
130	硫代Hu抗MUC16 3A5 HC A118C-MC-ED-(CBI二聚體DVB磷酸酯)	68	2.0
131	硫代Hu抗CD33 15G15.33 HC A118C-DSP-(CBI二聚體磷酸酯)	62	1.55
132	硫代Hu抗MUC16 3A5 HC A118C-DSP-(CBI二聚體磷酸酯)	62	
133	硫代Hu抗CD33 15G15.33 LC V205C-DSP-(CBI二聚體磷酸酯)	62	1.9
134	硫代Hu抗NaPi3b 10H1.11.4B HC A118C-(化合物81)	81	1.8
135	硫代Hu抗NaPi3b 10H1.11.4B HC A118C-(化合物78)	78	1.8
136	硫代Hu抗NaPi3b 10H1.11.4B HC A118C-(化合物72)	72	2
137	硫代HC抗CD33 (GM15.33)-(化合物81)	81	1.8
138	硫代Hu抗CD33 (GM15.33)-(化合物78)	78	1.9
139	硫代Hu抗CD33 (GM15.33)-(化合物72)	72	1.57

* DAR = 藥物/抗體比率平均值

** A118C (EU編號) = A121C (Sequential編號) = A114C (Kabat編號)

抗CD22抗體

根據US 8226945，表5中之ADC之抗CD22抗體包含三個輕鏈超變區(HVR-L1、HVR-L2及HVR-L3)及三個重鏈超變區(HVR-H1、HVR-H2及HVR-H3)：

HVR-L1 RSSQSIVHSVGNTFLE (SEQ ID NO:1)

HVR-L2 KVSNRFS (SEQ ID NO:2)

HVR-L3 FQGSQFPYT (SEQ ID NO:3)

HVR-H1 GYEFSRSWMN (SEQ ID NO:4)

HVR-H2 GRIYPGDGDTNYSGKFKG (SEQ ID NO:5)

HVR-H3 DGSSWDWYFDV (SEQ ID NO:6)

抗MUC16抗體

根據US 7989595，表5中之ADC之抗MUC16抗體包含三個輕鏈超變區(HVR-L1、HVR-L2及HVR-L3)及三個重鏈超變區(HVR-H1、HVR-H2及HVR-H3)：

HVR-L1 KASDLIHNWLA (SEQ ID NO:7)

HVR-L2 YGATSLET (SEQ ID NO:8)

HVR-L3 QQYWTTPFT (SEQ ID NO:9)

HVR-H1 GYSITNDYAWN (SEQ ID NO:10)

HVR-H2 GYISYSGYTTYNPSLKS (SEQ ID NO:11)

HVR-H3 ARWTSGLDY (SEQ ID NO:12)

表5中之ADC之抗MUC16抗體包含可變重鏈序列SEQ ID NO: 13及可變輕鏈序列SEQ ID NO:14。

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G Y S I T N D Y A W N W V R Q A P G K G L E W V G Y I S Y S G Y T T Y N P S L K S R F T I S R D T S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R W T S G L D Y W G Q G T L V T V S S (SEQ ID NO:13)

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S D L I H N W L A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y G A T S L E T G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y W T T P F T F G Q G T K V E I K R (SEQ ID NO:14)

在一個實施例中，本發明之ADC之抗MUC16抗體係半胱胺酸改

造之ThioMab，其包含一或多個位於選自SEQ ID NO: 15-32之輕鏈序列中或位於選自SEQ ID NO: 33-46之重鏈序列中之游離半胱胺酸胺基酸殘基：

EVQLCESGGG	SEQ ID NO:15
LRLSCCASGYS	SEQ ID NO:16
MNSLRCEDTAV	SEQ ID NO:17
TLVTVCSASTK	SEQ ID NO:18
VTVSSCSTKGP	SEQ ID NO:19
VSAASCKGPSV	SEQ ID NO:20
WYVDGCEVHNA	SEQ ID NO:21
KGFVPCDIAVE	SEQ ID NO:22
PPVLDCGDSFF	SEQ ID NO:23

DVQLCESGPG	SEQ ID NO:24
LSLTCCVTGYS	SEQ ID NO:25
LNSVTCEDTAT	SEQ ID NO:26
TLVTVCSASTK	SEQ ID NO:27
VTVSSCSTKGP	SEQ ID NO:28
VSAASCKGPSV	SEQ ID NO:29
WYVDGCEVHNA	SEQ ID NO:30
KGFVPCDIAVE	SEQ ID NO:31
PPVLDCDGSFF	SEQ ID NO:32

SLSASCGDRVT	SEQ ID NO:33
EIKRTCAAPSV	SEQ ID NO:34
TVAAPCVFIFP	SEQ ID NO:35
FIFPPCDEQLK	SEQ ID NO:36
DEQLKCGTASV	SEQ ID NO:37
VTEQDCKDSTY	SEQ ID NO:38
GLSSPCTKSFN	SEQ ID NO:39

FLSVSCGGRVT	SEQ ID NO:40
EIKRTCAAPSV	SEQ ID NO:41
TVAAPCVFIFP	SEQ ID NO:42
FIFPPCDEQLK	SEQ ID NO:43
DEQLKCGTASV	SEQ ID NO:44
VTEQDCKDSTY	SEQ ID NO:45
GLSSPCTKSFN	SEQ ID NO:46

在一個實施例中，抗MUC16半胱胺酸改造之ThioMab係包含重鏈序列SEQ ID NO:47之人類化抗體。

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSITNDYAWNWVRQAPG
KGLEWVGYISYSGYTTYNPSLKSRFTISRDTSKNTLYLQMNSLRAEDT
AVYYCARWTSGLDYWGQGTLVTVSSCSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO:47)

在一個實施例中，抗MUC16半胱胺酸改造之ThioMab係包含輕鏈序列SEQ ID NO:48之人類化抗體。

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASDLIHNWLAWYQQKPGKAP
KLLIYGATSLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYWT

TPFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO:48)

在一個實施例中，抗MUC16半胱胺酸改造之ThioMab係包含重鏈序列SEQ ID NO:49之嵌合抗體。

DVQLQESGPGLVNPSQSLSLTCTVTGYSITNDYAWNWIRQFPGN
KLEWMGYINYSGYTTYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLHLNSVTTEDTA
TYYCARWDGGLTYWGQGTLVTVSACSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO:49)

在一個實施例中，抗MUC16半胱胺酸改造之ThioMab係包含輕鏈序列SEQ ID NO:50之嵌合抗體。

DIQMTQSSSFLSVSLGGRVTITCKASDLIHNWLAWYQQKPGNAP
RLLISGATSLETGVPSRFSGSGSGNDYTLSIASLQTEDAATYYCQQYW
TTPFTFGSGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO:50)

抗HER2抗體

在某些實施例中，表5之ADC包含抗HER2抗體。在本發明之一個實施例中，本發明之ADC之抗HER2抗體包含人類化抗HER2抗體，例如 huMAb4D5-1 、 huMAb4D5-2 、 huMAb4D5-3 、 huMAb4D5-4 、 huMAb4D5-5 、 huMAb4D5-6 、 huMAb4D5-7 及 huMAb4D5-8 ，如 US 5821337之表3中所述。彼等抗體含有具有結合至HER2之鼠類抗體(4D5)之互補決定區的人類框架區。人類化抗體huMAb4D5-8亦稱作曲妥珠單抗(trastuzumab)，可以商品名HERCEPTIN®購得。在本發明之另一實施例中，本發明之ADC之抗HER2抗體包含人類化抗HER2抗體，例如人類化2C4，如US7862817中所述。實例性人類化2C4抗體係帕妥珠單抗(pertuzumab)，可以商品名PERJETA®購得。

用於製備表5之ADC之半胱胺酸改造之Thiomab抗體在重鏈之118-丙胺酸位點(EU編號)處引入半胱胺酸殘基。此位點由Sequential編號來編號為121或由Kabat編號來編號為114。

抗CD33抗體

表5中之ADC之抗CD33抗體15G15.33包含三個輕鏈超變區(HVR-L1 、 HVR-L2 及 HVR-L3)及三個重鏈超變區(HVR-H1 、 HVR-H2 及 HVR-H3)

HVR-L1 RSSQSLLHSNGYNYLD (SEQ ID NO:51)

HVR-L2 LGVNSVS (SEQ ID NO:52)

HVR-L3 MQALQTPWT (SEQ ID NO:53)

HVR-H1 NHAIS (SEQ ID NO:54)

HVR-H2 GIIPIFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO:55)

HVR-H3 EWADVFD (SEQ ID NO:56)

表5中之ADC之抗CD33抗體15G15.33包含SEQ ID NO: 57之輕鏈可變區及/或SEQ ID NO:58之重鏈可變區。

EIVLTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKP GQSPQLLIYLGVNSVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC MQALQTPWTFGQGTKVEIK(SEQ ID NO:57)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGIFSNHAISWVRQAPGQ GLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAFMELSSLRSEDTA VYYCAREWADVFDIWGQGTMVTVSS

(SEQ ID NO:58)

抗CD33抗體9C3及其他實施例

9C3-HVR L1 RASQGIRNDLG (SEQ ID No: 59)

9C3-HVR L2 AASSLQS (SEQ ID NO:60)

9C3-HVR L3 LQHNSYPWT(SEQ ID NO:61)

9C3-HVR H1 GNYMS (SEQ ID NO:62)

9C3-HVR H2 LIYSGDSTYYADSVKG (SEQ ID NO:63)

9C3-HVR H3 DGYYVSDMVV (SEQ ID NO:64)

9C3 V_L

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAP KRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNS YPWTFGQGTKLEIK

(SEQ ID NO:65)

9C3 V_H

EVQLVESGGALIQPGGSLRLSCVASGFTISGNYMSWVRQAPGKG

LEWVSLIYSGDSTYYADSVKGRFNISRDISKNTVYLQMNSLRVEDTAV
YYCVRDGYYVSDMVVWGKGTTVTVSS

(SEQ ID NO:66)

9C3.2 V_L

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAP
KRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNS
YPWTFGQGTKLEIK

(SEQ ID NO:67)

9C3.2 V_H

EVQLVESGGALIQPGGSLRLSCVASGFTISGNYMSWVRQAPGKG
LEWVSLIYSGDSTYYADSVKGRFTISRDISKNTVYLQMNSLRVEDTAV
YYCVRDGYYVSDMVVWGKGTTVTVSS

(SEQ ID NO:68)

9C3.3 V_L

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAP
KRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNS
YPWTFGQGTKLEIK

(SEQ ID NO:69)

9C3.3 V_H

EVQLVESGGALIQPGGSLRLSCVASGFTISGNYMSWVRQAPGKG
LEWVSLIYSGDSTYYADSVKGRFSISRDISKNTVYLQMNSLRVEDTAV
YYCVRDGYYVSDMVVWGKGTTVTVSS

(SEQ ID NO:70)

9C3.4 V_L

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAP KRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNS YPWTFGQGTKLEIK

(SEQ ID NO:71)

9C3.4 V_H

EVQLVESGGALIQPGGSLRLSCVASGFTISGNYMSWVRQAPGKG LEWVSLIYSGDSTYYADSVKGRFAISRDISKNTVYLQMNSLRVEDTAV YYCVRDGYYVSDMVVWGKGTTVTVSS

(SEQ ID NO:72)

在一些實施例中，本發明提供抗CD33抗體，其包含至少1個、2個、3個、4個、5個或6個選自以下之HVR：(a) HVR-H1，其包含胺基酸序列SEQ ID NO: 62；(b) HVR-H2，其包含胺基酸序列SEQ ID NO: 63；(c) HVR-H3，其包含胺基酸序列SEQ ID NO: 64；(d) HVR-L1，其包含胺基酸序列SEQ ID NO: 59；(e) HVR-L2，其包含胺基酸序列SEQ ID NO: 60；及(f) HVR-L3，其包含胺基酸序列SEQ ID NO: 61。

在一個態樣中，本發明提供包含至少1個、至少2個或所有3個選自以下之VL HVR序列之抗體：(a) HVR-H1，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:62；(b) HVR-H2，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:63；及(c) HVR-H3，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:64。在一個實施例中，抗體包含含有胺基酸序列SEQ ID NO:64之HVR-H3。在另一實施例中，抗體包含含有胺基酸序列SEQ ID NO:64之HVR-H3及包含胺基酸序列SEQ ID NO:61之HVR-L3。在又一實施例中，抗體包含含有胺基酸序列SEQ ID NO:64之HVR-H3、包含胺基酸序列SEQ ID NO:61之HVR-L3及包含胺基酸序列SEQ ID NO:63之HVR-H2。在又一實施例中，抗

體包含(a) HVR-H1，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:62；(b) HVR-H2，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:63；及(c) HVR-H3，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:64。

在另一態樣中，本發明提供抗體，其包含至少1個、至少2個或全部3個選自以下之VL HVR：(a) HVR-L1，其包含胺基酸序列SEQ ID NO: 59；(b) HVR-L2，其包含胺基酸序列SEQ ID NO: 60；及(c) HVR-L3，其包含胺基酸序列SEQ ID NO: 61。在一個實施例中，抗體包含(a) HVR-L1，其包含胺基酸序列SEQ ID NO: 59；(b) HVR-L2，其包含胺基酸序列SEQ ID NO: 60；及(c) HVR-L3，其包含胺基酸序列SEQ ID NO: 61。

在另一態樣中，本發明抗體包含(a) VH結構域，其包含至少1個、至少2個或全部3個選自以下之VH HVR：(i) HVR-H1，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:62，(ii) HVR-H2，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:63，及(iii) HVR-H3，其包含選自SEQ ID NO:64之胺基酸序列；及(b) VL結構域，其包含至少1個、至少2個或全部3個選自以下之VL HVR序列：(i) HVR-L1，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:59，(ii) HVR-L2，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:60；及(c) HVR-L3，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:61。

在另一態樣中，本發明提供抗體，其包含(a) HVR-H1，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:62；(b) HVR-H2，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:63；(c) HVR-H3，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:64；(d) HVR-L1，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:59；(e) HVR-L2，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:60；及(f) HVR-L3，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:61。

在上述實施例中之任一者中，抗CD33抗體經人類化。在一個實施例中，抗CD33抗體包含上文實施例中任一者中之HVR，且進一步包含人類受體框架，例如人類免疫球蛋白框架或人類共有框架。在某些實施例中，人類受體框架係人類VL κ I共有(VL_{KI})框架及/或VH框架VH_I。在某些實施例中，人類受體框架係人類VL κ I共有(VL_{KI})框架及/或VH框架VH_I，其包含以下突變中之任一者。

在另一態樣中，抗CD33抗體包含與胺基酸序列SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:70及/或SEQ ID NO:72具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之重鏈可變結構域(VH)序列。在某些實施例中，與胺基酸序列SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:70及/或SEQ ID NO:72具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之VH序列相對於參考序列含有取代(例如，保守取代)、插入或缺失，但包含該序列之抗CD33抗體保留結合CD33之能力。在某些實施例中，在SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:70及/或SEQ ID NO:72中總共1至10個胺基酸經取代、插入及/或缺失。在某些實施例中，在SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:70及/或SEQ ID NO:72中總共1至5個胺基酸經取代、插入及/或缺失。在某些實施例中，取代、插入或缺失出現於HVR外部之區中(*即*，FR中)。視情況，抗CD33抗體包含VH序列SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:70及/或SEQ ID NO:72，其包括該序列之轉譯後修飾。在特定實施例中，VH包含1個、2個或3個選自以下之HVR：(a) HVR-H1，其包含胺基酸序列SEQ ID NO: 62；(b) HVR-H2，其包含胺基酸序列SEQ ID NO: 63；及(c) HVR-H3，其包含胺基酸序列SEQ ID NO: 64。

在另一態樣中，提供抗CD33抗體，其中該抗體包含與胺基酸序列SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:69及/或SEQ ID NO:71具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之輕鏈可變結構域(VL)。在某些實施例中，與胺基酸序列SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:69及/或SEQ ID NO:71具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之VL序列相對於參考序列含有取代(例如，保守取代)、插入或缺失，但包含該序列之抗CD33抗體保留結合CD33之能力。在某些實施例中，在SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:69及/或SEQ ID NO:71中總共1至10個胺基酸經取代、插入及/或缺失。在某些實施例中，在SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:69及/或SEQ ID NO:71中總共1至5個胺基酸經取代、插入及/或缺失。在某些實施例中，取代、插入或缺失出現於HVR外部之區中(*即*，FR中)。視情況，抗CD33抗體包含VL序列SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:69及/或SEQ ID NO:71，其包括該序列之轉譯後修飾。在特定實施例中，VL包含1個、2個或3個選自以下之HVR：(a) HVR-L1，其包含胺基酸序列SEQ ID NO: 59；(b) HVR-L2，其包含胺基酸序列SEQ ID NO: 60；及(c) HVR-L3，其包含胺基酸序列SEQ ID NO: 61。

在另一態樣中，提供抗CD33抗體，其中該抗體包括如上文所提供任一實施例中之VH及如上文所提供任一實施例中之VL。

在一個實施例中，抗體分別包含SEQ ID NO:66及SEQ ID NO:65中之VH及VL序列，其包括彼等序列之轉譯後修飾。在一個實施例中，抗體分別包含SEQ ID NO:68及SEQ ID NO:67中之VH及VL序列，

其包括彼等序列之轉譯後修飾。在一個實施例中，抗體分別包含SEQ ID NO:70及SEQ ID NO:69中之VH及VL序列，其包括彼等序列之轉譯後修飾。在一個實施例中，抗體分別包含SEQ ID NO:72及SEQ ID NO:71中之VH及VL序列，其包括彼等序列之轉譯後修飾。

在又一態樣中，本文提供與本文提供之抗CD33抗體結合至相同表位之抗體。舉例而言，在某些實施例中，提供與分別包含VH序列SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:70及/或SEQ ID NO:72及VL序列SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:69及/或SEQ ID NO:71之抗CD33抗體結合至相同表位之抗體。

在本發明之又一態樣中，上文任一實施例之抗CD33抗體係單株抗體，包括人類抗體。在一個實施例中，抗CD33抗體係抗體片段，例如Fv、Fab、Fab'、scFv、雙價抗體或$F(ab')_2$片段。在另一實施例中，抗體係實質上全長抗體，例如IgG1抗體、IgG2a抗體或如本文所定義之其他抗體類別或同種型。

在又一態樣中，上文任一實施例之抗CD33抗體可單獨或組合納入下文所述特徵中之任一者：

活體外細胞增殖分析

通常，抗體-藥物結合物(ADC)之細胞毒性或細胞生長抑制活性可藉由以下來量測：使具有受體蛋白(例如HER2)之哺乳動物細胞暴露於存於細胞培養基中之ADC抗體；將細胞培養約6小時至約5天之時段；及量測細胞存活力。使用基於細胞之活體外分析來量測存活力(增殖)、本發明之ADC之細胞毒性及對細胞凋亡之誘導(半胱天冬酶活化)。

藉由細胞增殖分析(實例21)量測抗體-藥物結合物(ADC)之活體外效能。ADC顯示驚人且出乎意料之抑制腫瘤細胞增殖的效能。ADC之效能與細胞之靶抗原表現相關。圖25-30之數據證實，所測試結合物能夠結合至在細胞表面上表現之特異性抗原且引起彼等細胞在活體外死亡。

CellTiter-Glo®發光細胞存活力分析係有市售(Promega公司，Madison, WI)之基於鞘翅目(*Coleoptera*)螢光素酶之重組表現之均勻分析方法(US 5583024；US5674713；US5700670)。此細胞增殖分析基於所存在ATP (代謝活性細胞之指示劑)之定量測定培養基中之活細胞之數目(Crouch等人，(1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88；US 6602677)。CellTiter-Glo®分析係以96孔模式實施，使得適於自動化高通量篩選(HTS) (Cree等人，(1995) AntiCancer Drugs 6:398-404)。均勻分析程序設計向補充血清之培養基中培養之細胞中直接添加單一試劑(CellTiter-Glo®試劑)。無需細胞洗滌、培養基移除及多個移液步驟。該系統檢測在添加試劑及混合後10分鐘內384孔模式中的少至15個細胞/孔。該等細胞可用ADC連續處理，或其可經處理並自ADC分離。通常，簡單處理之細胞(即3小時)顯示與連續處理之細胞相同之效能效應。

均勻「添加-混合-量測」模式引起細胞裂解並產生與所存在ATP之量成正比之發光信號。ATP之量與培養基中存在之細胞之數目成正比。CellTiter-Glo®分析產生由螢光素酶反應產生之「輝光型」發光信號，端視所用細胞類型及培養基，其具有通常大於5個小時之半衰期。活細胞係以相對發光單位(RLU)來反映。藉由重組螢火蟲螢光素酶以氧化方式脫去受質(甲蟲螢光素(Beetle Luciferin))之羧基，同時ATP轉化成AMP且生成光子。

使用基於細胞之活體外分析量測存活力(增殖)、本發明之ADC之

細胞毒性及對細胞凋亡之誘導(半胱天冬酶活化)。通常，抗體-藥物結合物(ADC)之細胞毒性或細胞生長抑制活性係藉由以下來量測：使表現抗原(例如Her2或MUC16多肽)之哺乳動物細胞暴露於存於細胞培養基中之ADC；將細胞培養約6小時至約5天之時段；及量測細胞存活力。可用於抗MUC16 ADC之細胞增殖分析之哺乳動物細胞包括：(1)表現MUC16多肽之細胞系OVCAR-3；(2) 經改造以穩定表現MUC16多肽在其細胞表面之一部分上之PC3衍生之細胞系(PC3/MUC16)；(3)不表現MUC16多肽之親代PC3細胞系；及(4) 不表現MUC16多肽但載有用於驅動外源性MUC16表現之載體的PC3細胞系(PC3/neo)。

圖25顯示第3天時SK-BR-3活體外細胞存活力對硫代hu抗CD22 HC A121C-MC-vc-PAB-(CBI二聚體) **101**及硫代hu抗Her2 HC A121C-MC-vc-PAB-(CBI二聚體) **102**之濃度(μg/ml)之曲線中的抗體-藥物結合物之功效。Her2抗原在SK-BR-3細胞中高度表現。抗Her2 ADC **102**顯示線性、非劑量反應細胞殺死活性，而對照脫靶抗CD22 ADC **101**顯示較小活性。

圖26顯示第3天時SK-BR-3活體外細胞存活力對硫代Hu抗Her2 4D5 HC A118C-MC-vc-PAB-(CBI-PBD) **103**及硫代Hu抗CD22 10F4v3 HC A118C-MC-vc-PAB-(CBI-PBD) **104**之濃度(μg/ml)之曲線中的抗體-藥物結合物之功效。抗Her2 ADC **103**顯示線性、非劑量反應細胞殺死活性，而對照脫靶抗CD22 ADC **104**顯示較小活性。

圖27顯示第3天時SK-BR-3活體外細胞存活力對硫代Hu抗CD22 10F4v3 HC A118C-MC-vc-PAB-(CBI二聚體) **116**及硫代Hu抗Her2 4D5 HC A118C-MC-vc-PAB-(CBI二聚體) **117**之濃度(μg/ml)之曲線中的抗體-藥物結合物之功效。抗Her2 ADC **117**顯示線性、非劑量反應細胞殺死活性，而對照脫靶抗CD22 ADC **116**顯示較小活性。

圖28顯示第3天時EOL-1活體外細胞存活力對硫代Hu抗CD33

15G15.33 HC A118C-MC-MMED-(CBI二聚體磷酸酯) **125**之濃度(μg/ml)之曲線中的抗體-藥物結合物之功效，其顯示中等劑量反應細胞殺死活性。

圖29顯示第3天時EOL-1活體外細胞存活力對硫代Hu抗MUC16 3A5 HC A118C-MC-ED-(CBI二聚體DVB二磷酸酯) **126**及硫代Hu抗CD33 15G15.33 HC A118C-MC-ED-(CBI二聚體DVB二磷酸酯) **127**之濃度(μg/ml)之曲線中的抗體-藥物結合物之功效。抗CD33 ADC **127**顯示有效之劑量反應細胞殺死活性，而對照脫靶抗MUC16 ADC **126**顯示較小活性。

圖30顯示第3天時EOL-1活體外細胞存活力對硫代Hu抗CD33 15G15.33 HC A118C-MC-ED-(CBI二聚體DVB二磷酸酯) **127**、硫代Hu抗CD33 15G15.33 HC A118C-MC-ED-(CBI二聚體DVB磷酸酯) **129**及硫代Hu抗MUC16 3A5 HC A118C-MC-ED-(CBI二聚體DVB磷酸酯) **130**之濃度(μg/ml)之曲線中的抗體-藥物結合物之功效。抗CD33 ADC **127**及**129**顯示有效之劑量反應細胞殺死活性，而對照脫靶抗MUC16 ADC **130**顯示較小活性。

活體內功效

本發明之抗體-藥物結合物(ADC)之活體內功效可藉由小鼠中之腫瘤異種移植物研究(實例22)來量測。藉由小鼠中之腫瘤生長抑制來量測抗體-藥物結合物(ADC)之活體內功效(實例21)。ADC顯示驚人且出乎意料之抑制腫瘤生長的效能。ADC之功效與腫瘤細胞之靶抗原表現相關。

藉由在齧齒類動物之癌細胞中植入同種移植物或異種移植物並用ADC處理腫瘤在活體內量測抗體-藥物結合物之功效。端視細胞系、ADC與癌細胞上存在之受體之抗體結合特異性、給予方案及其他因素而定，預計各種結果。使用表現中等至高程度腫瘤相關抗原(例

如Her2、MUC16及CD33)之轉基因外植體小鼠模型量測ADC之活體內功效。將個體用ADC處理一次並在3-6週內進行監測以量測腫瘤倍增之時間、細胞殺死對數及腫瘤收縮率。實施隨訪劑量反應及多劑量實驗。

舉例而言，本發明之抗HER2 ADC之活體內功效可藉由高表現HER2轉基因外植體小鼠模型來量測(Phillips等人，(2008) Cancer Res. 68:9280-90)。同種移植物係自Fo5 mmtv轉基因小鼠繁殖，該小鼠對HERCEPTIN®療法無反應或反應較弱。將個體用特定劑量量(mg/kg)之ADC及安慰劑緩衝液對照(媒劑)處理一次並在兩週或更長時間內進行監測以量測腫瘤倍增之時間、細胞殺死對數及腫瘤收縮率。

圖31顯示在IV給予一次以下物質後接種至CRL nu/nu小鼠之哺乳動物脂肪墊中之MMTV-HER2 Fo5轉基因乳房瘤中活體內擬合腫瘤體積隨時間之變化的曲線中之抗體-藥物結合物的功效：(1) 媒劑：8號組胺酸緩衝液：20 mM組胺酸乙酸鹽，pH 5.5，240 mM蔗糖，0.02% PS 20，(2) 硫代Hu抗CD22 10F4v3 HC A118C-MC-MMED-(CBI二聚體磷酸酯) **110**，(3) 硫代Hu抗CD22 10F4v3 HC A118C-MC-vc-PAB-(CBI二聚體MePip) **108**，(4) 硫代Hu抗CD22 10F4v3 HC A118C-MC-vc-PAB-(CBI二聚體磷酸酯) **111**，(5) 硫代Hu抗Her2 4D5 HC A118C-MC-MMED-(CBI二聚體磷酸酯) **109**，(6) 硫代Hu抗Her2 4D5 HC A118C-MC-vc-PAB-(CBI二聚體MePip) **107**，(7) 硫代Hu抗Her2 4D5 HC A118C-MC-vc-PAB-(CBI二聚體磷酸酯) **112**。ADC係以10 mg/kg給予。

圖32顯示在IV給予一次以下物質後接種至CRL nu/nu小鼠之哺乳動物脂肪墊中之MMTV-HER2 Fo5轉基因乳房瘤中活體內擬合腫瘤體積隨時間之變化的曲線中之抗體-藥物結合物的功效：(1) 媒劑：8號組胺酸緩衝液：20 mM組胺酸乙酸鹽，pH 5.5，240 mM蔗糖，0.02%

PS 20，(2) 硫代Hu抗CD22 10F4v3 HC A118C-DSE-(CBI二聚體磷酸酯) **120**，10 mg/kg，(3) 硫代Hu抗CD22 10F4v3 HC A118C-DSE-(CBI二聚體磷酸酯) **122**，10 mg/kg，(4) 硫代Hu抗CD22 10F4v3 HC A118C-MC-vc-PAB-(N10,PBD-CBI MePip) **124**，10 mg/kg，(5) 硫代Hu抗Her2 4D5 HC A118C-DSE-(CBI二聚體磷酸酯) **119**，3 mg/kg，(6) 硫代Hu抗Her2 4D5 HC A118C-DSE-(CBI二聚體磷酸酯) **119**，10 mg/kg，(7) 硫代Hu抗Her2 4D5 HC A118C-DSP-(CBI二聚體磷酸酯) **121**，3 mg/kg，(8) 硫代Hu抗Her2 4D5 HC A118C-DSP-(CBI二聚體磷酸酯) **121**，10 mg/kg (9) 硫代Hu抗Her2 4D5 HC A118C-MC-vc-PAB-(N10,PBD-CBI MePip) **123**，3 mg/kg，(10) 硫代Hu抗Her2 4D5 HC A118C-MC-vc-PAB-(N10,PBD-CBI MePip) **123**，10 mg/kg。

圖33顯示在IV給予一次以下物質後接種至C.B-17 SCID小鼠中之OVCAR3X2.1人類卵巢腫瘤中活體內擬合腫瘤體積隨時間之變化之曲線中的抗體-藥物結合物的功效：(1) 媒劑：8號組胺酸緩衝液：20 mM組胺酸乙酸鹽，pH 5.5，240 mM蔗糖，0.02% PS 20，(2) 硫代Hu抗CD33 15G15.33 HC A118C-MC-ED-(CBI二聚體DVB二磷酸酯) **127**，3 mg/kg，(3) 硫代Hu抗MUC16 3A5 HC A118C-MC-ED-(CBI二聚體DVB二磷酸酯) **126**，3 mg/kg，(4) 硫代Hu抗MUC16 3A5 HC A118C-MC-ED-(CBI二聚體DVB二磷酸酯) **126**，1 mg/kg。

ADC **126**之抗MUC16抗體(且包括3A5及11D10變體)已闡述於WO 2007/001851、US 7989595、US 8449883中，該等案件之內容以引用方式併入本文中。3A5單株抗體藉由OVCAR-3 Scatchard分析以433 pM親和力結合MUC16多肽之多個位點(Chen等人，(2007) Cancer Res. 67(10): 4924-4932)。

圖34顯示在以20 μg/m2 IV給予一次以下物質後接種至C.B-17 SCID小鼠中之HL-60人類急性骨髓性白血病中活體內擬合腫瘤體積隨

時間之變化的曲線中之抗體-藥物結合物的功效：(1) 媒劑：8號組胺酸緩衝液：20 mM組胺酸乙酸鹽，pH 5.5，240 mM蔗糖，0.02% PS 20，(2) 硫代Hu抗CD33 15G15.33 HC A118C-MC-MMED-(CBI二聚體磷酸酯) **125**，(3) 硫代Hu抗CD33 15G15.33 HC A118C-MC-ED-(CBI二聚體DVB二磷酸酯) **127**，(4) 硫代Hu抗MUC16 3A5 HC A118C-MC-MMED-(CBI二聚體磷酸酯) **128**，(5) 硫代Hu抗MUC16 3A5 HC A118C-MC-ED-(CBI二聚體DVB二磷酸酯) **126**。

抗體-藥物結合物之投與

本發明之抗體-藥物結合物(ADC)可藉由適於欲治療病況之任一途徑投與。ADC通常將非經腸、即輸注、皮下、肌內、靜脈內、皮內、鞘內及硬膜外投與。

醫藥調配物

本發明之治療性抗體-藥物結合物(ADC)之醫藥調配物通常製備用於非經腸投與，即濃注、靜脈內、腫瘤內注射醫藥上可接受之非經腸媒劑且呈單位劑量可注射形式。視情況將具有期望純度之抗體-藥物結合物(ADC)與醫藥上可接受之稀釋劑、載劑、賦形劑或穩定劑混合(Remington's Pharmaceutical Sciences (1980)，第16版，Osol, A.編輯)，呈凍乾調配物或水溶液形式。

抗體-藥物結合物治療

預計本發明之抗體-藥物結合物(ADC)可用於治療(例如)特徵在於腫瘤抗原過表現之各種疾病或病症。實例性病況或過增殖性病症包括良性或惡性實體瘤及血液病症，例如白血病及淋巴樣惡性腫瘤。其他疾病包括神經元病症、神經膠質病症、星狀細胞病症、下丘腦病症、腺體病症、巨噬細胞病症、上皮病症、間質病症、囊胚腔病症、發炎病症、血管生成病症及免疫學病症(包括自體免疫病症)。

通常，欲治療之疾病或病症係過增殖性疾病，例如癌症。本文

中欲治療之癌症之實例包括(但不限於)癌瘤、淋巴瘤、母細胞瘤、肉瘤及白血病或淋巴樣惡性腫瘤。該等癌症之更具體實例包括鱗狀細胞癌(例如上皮鱗狀細胞癌)；肺癌，包括小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌及肺鱗狀癌；腹膜癌；肝細胞癌；胃癌(gastric cancer或stomach cancer)，包括胃腸癌；胰臟癌、膠質母細胞瘤、子宮頸癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝細胞瘤、乳癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮內膜癌或子宮癌、唾液腺癌、腎癌(kidney cancer或renal cancer)、前列腺癌、外陰癌、甲狀腺癌、肝癌、肛門癌、陰莖癌以及頭頸癌。

ADC化合物可用於治療之自體免疫性疾病包括風濕病症(例如，類風濕性關節炎、薛格連氏症候群(Sjögren's syndrome)、硬皮病、狼瘡(例如全身性紅斑狼瘡(SLE)及狼瘡性腎炎)、多肌炎/皮肌炎、冷沉球蛋白血症、抗磷脂抗體症候群及牛皮癬性關節炎)、骨關節炎、自體免疫性胃腸及肝病症(例如，發炎性腸病(例如，潰瘍性結腸炎及克羅恩氏病(Crohn's disease))、自體免疫性胃炎及惡性貧血、自體免疫性肝炎、原發性膽汁性肝硬化、原發性硬化性膽管炎急乳糜瀉)、血管炎(例如，ANCA相關之血管炎，包括丘-施二氏血管炎(Churg-Strauss vasculitis)、韋格納氏肉芽腫病(Wegener's granulomatosis)及多動脈炎)、自體免疫性神經病症(例如，多發性硬化、斜視性眼陣攣肌陣攣症候群、重症肌無力、視神經脊髓炎、帕金森氏病(Parkinson's disease)、阿茲海默氏病(Alzheimer's disease)及自體免疫性多發性神經病)、腎病症(例如，腎小球性腎炎、古德帕斯丘症候群(Goodpasture's syndrome)及巴爾熱氏病(Berger's disease))、自體免疫性皮膚病症(例如，牛皮癬、風疹、蕁麻疹、尋常天皰瘡、大皰性類天皰瘡及皮膚紅斑狼瘡)、血液病症(例如，血小板減少性紫癜、血栓性血小板減少性紫癜、輸血後紫癜及自體免疫性溶血性貧血)、動脈

粥樣硬化、葡萄膜炎、自體免疫性聽力疾病(例如，內耳疾病及聽力損失)、貝切特氏病(Behcet's disease)、雷諾氏症候群(Raynaud's syndrome)、器官移植及自體免疫性內分泌病症(例如，糖尿病相關性自體免疫疾病，例如胰島素依賴性糖尿病(IDDM)、阿狄森病(Addison's disease)及自體免疫性甲狀腺病(例如，格雷夫斯病(Graves' disease)及甲狀腺炎))。更佳地，該等疾病包括(例如)類風濕性關節炎、潰瘍性結腸炎、ANCA相關之血管炎、狼瘡、多發性硬化、薛格連氏症候群、格雷夫斯病、IDDM、惡性貧血、甲狀腺炎及腎小球性腎炎。

對於疾病之預防或治療而言，ADC之適當劑量將取決於如上文所定義欲治療疾病之類型、疾病之嚴重程度及進程、投與分子之目的係預防抑或治療、先前療法、患者之臨床史及對抗體之反應及主治醫師之決定。該分子適於向患者一次性地或經一系列治療投與。端視疾病類型及嚴重程度而定，不論係(例如)藉由一或多次分開投與或藉由連續輸注來投與，向患者投與之分子初始候選劑量為約1 μg/kg至15 mg/kg (例如0.1 mg/kg至20 mg/kg)。端視上文所提及之因素，典型日劑量可介於約1 μg/kg至100 mg/kg或更高範圍內。欲投與患者之ADC之實例性劑量在約0.1 mg/kg至約10 mg/kg患者體重範圍內。

製品

在本發明之另一實施例中，提供含有可用於治療上述病症之物質之製品或「套組」。該製品包含容器及位於該容器上或與該容器相連之標記或包裝插頁。適宜容器包括(例如)瓶、小瓶、注射器、泡罩包裝等。容器可自多種材料(例如玻璃或塑膠)形成。容器容納有效治療病況之抗體-藥物結合物(ADC)組合物，且可具有無菌入口埠(例如，容器可為靜脈內溶液袋或具有可由皮下注射針刺穿之塞子的小瓶)。組合物中之至少一種活性劑係ADC。標記或包裝插頁指明，組

合物係用於治療所選病況，例如癌症。另一選擇為或另外，該製品可另外包含第二(或第三)容器，其包含醫藥上可接受之緩衝液，例如抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸鹽緩衝鹽水、林格氏溶液(Ringer's solution)及右旋糖溶液。其可另外包括自商業及使用者角度來看期望之其他材料，包括其他緩衝液、稀釋劑、濾膜、針及注射器。

實例

實例1 (S)-2-(2-溴-N-甲基乙醯胺基)乙基(甲基)胺基甲酸1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**51**

遵循L. F. Tietze、J. M. von Hof、M. Müller、B. Krewer、I. Schuberth, *Angew. Chem. Int. Ed.* (2010) 49:7336-7339之程序，將(S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-甲酸第三丁基酯**51a**用HCl去保護並用戊二醯二氯醯基化(圖1)。代替製備型HPLC，在真空下移除反應溶劑並將所得殘餘物與甲醇一起研磨，以產生米色固體狀1,5-雙((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)戊烷-1,5-二酮**51b** (產率51%)。R_f = 0.50 (乙酸乙酯/石油醚=2:1)。NMR及MS數據與報告值相同。$[\alpha]_D^{26}$ = -46.3° (*c* = 0.41, DMA)。

向冰浴中冷卻之**51b** (650 mg, 1.15 mmol)存於DMA (5 mL)中之溶液中添加DIPEA (0.40 mL, 2.31 mmol)及氯甲酸4-硝基苯基酯(302 mg, 1.50 mmol)。在使混合物升溫至室溫並攪拌過夜後，添加甲基(2-(甲基胺基)乙基)胺基甲酸第三丁基酯(652 mg, 3.00 mmol)。將混合物於室溫下攪拌7 h且隨後重新分佈在乙酸乙酯與冷$NaHCO_3$稀釋水溶液之間。將水相用乙酸乙酯萃取三次。將合併之有機萃取物用水、之後鹽水洗滌，經無水Na_2SO_4乾燥並經由矽藻土過濾。移除溶劑並藉由管柱層析使用乙酸乙酯及石油醚(v/v 1:1至4:1)之梯度混合物且隨後僅使用乙酸乙酯作為洗脫劑進一步純化殘餘物，以產生米色固體狀甲基(2-

(甲基胺基)乙基)胺基甲酸Boc (S)-1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**51c** (359 mg, 40%)；mp 157℃(分解)。$[\alpha]_D^{26}$ = -45.4° (*c* = 1.08，乙酸乙酯)。^{1}H NMR (DMSO) (旋轉異構物之混合物) δ 10.35 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 8.08 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.87-7.77 (m, 2H), 7.58 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.50-7.42 (m, 2H), 7.31 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.42 (t, *J* = 9.7 Hz, 1H), 4.36-4.31 (m, 2H), 4.25 (d, *J* = 10.3 Hz, 1H), 4.19-4.13 (m, 2H), 4.05 (dd, *J* = 2.9, 11.0 Hz, 1H), 3.98 (dd, *J* = 2.6, 10.9 Hz, 1H),3.92 (dd, *J* = 7.2, 10.9 Hz, 1H), 3.79 (dd, *J* = 8.5, 10.2 Hz, 1H), 3.69 (br s, 1H), 3.52-3.42 (m, 3H),3.21-2.79 (m, 6H, 2NMe), 2.75-2.67 (m, 2H), 2.64-2.58 (m, 2H), 2.00-1.93 (m, 2H), 1.44-1.35 (m, 9H, Bu^t) ppm。MS (ESI)試驗值*m/z* 777.2801 (M + H)。$C_{41}H_{47}Cl_2N_4O_7$需要777.2816。

亦自相同層析分離獲得雙-Boc保護之**51d**及白色固體狀未經保護之回收起始材料**51b** (15 mg, 2%)。獲得米色固體狀**51d** (429 mg, 37%)。$[\alpha]_D^{26}$ = -32.0° (*c* = 1.00，乙酸乙酯)。^{1}H NMR (DMSO) (旋轉異構物之混合物) δ 8.25 (s, 2H),7.95 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.87-7.76 (m, 2H), 7.58 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.44 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 4.41 (t, *J* = 9.8 Hz, 2H), 4.32 (brs, 2H), 4.24 (d, *J* = 10.6 Hz, 2H), 4.06-4.03 (m, 2H), 3.98 (dd, *J* = 7.3, 10.8 Hz, 2H), 3.69 (brs, 2H), 3.52-3.43 (m, 6H), 3.21-2.79 (m, 12H, 4NMe), 2.75-2.69 (m, 2H), 2.66-2.58 (m, 2H), 1.99-1.95 (m, 2H), 1.44-1.35 (m, 18H, 2Bu^t) ppm。HRMS (ESI)試驗值*m/z* 1013.3991 (M + Na)。$C_{51}H_{64}Cl_2N_6NaO_{10}$需要1013.3991。

向冰浴中冷卻之**51c** (200 mg, 0.26 mmol)存於DCM (3 mL)中之溶液中逐滴添加三氟乙酸TFA (1.5 mL)。使混合物升溫至室溫並攪拌2 h。移除所有揮發性組份以產生色固體狀(S)-甲基(2-(甲基胺基)乙基)

胺基甲酸1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**51e**之粗製三氟乙酸鹽，其直接使用。^{1}H NMR (DMSO) (旋轉異構物之混合物) δ 10.36 (s, 1H), 8.64 (brs, 1H), 8.48 (brs, 1H), 8.35 (s, 1H), 8.08 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.97 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.94-7.88 (m, 1H), 7.78 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.61-7.57 (m, 2H), 7.51-7.45 (m, 2H), 7.34-7.30 (m, 1H), 4.43 (t, *J* = 9.8 Hz, 1H), 4.36-4.31 (m, 2H), 4.26 (d, *J* = 10.4 Hz, 1H), 4.18-4.14 (m, 2H), 4.06 (dd, *J* = 2.9, 11.0 Hz, 1H), 4.00 (dd, *J* = 2.7, 10.8 Hz, 1H), 3.94 (dd, *J* = 7.5, 11.0 Hz, 1H), 3.89-3.84 (m, 1H), 3.79 (dd, *J* = 8.1, 10.8 Hz, 1H), 3.63 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 3.33-3.30 (m, 6H, 2NMe), 2.78-2.55 (m, 6H), 2.00-1.94 (m, 2H) ppm。HRMS (ESI)試驗值*m/z* 677.2306 (M + H)。$C_{36}H_{39}Cl_2N_4O_5$需要677.2292。

於-5℃下向**51e**存於THF (4 mL)中之溶液中緩慢添加一滴DIPEA，之後添加溴乙醯溴(34 μL, 0.39 mmol)且隨後添加其餘DIPEA (448 μL，總共2.57 mmol)。使混合物升溫至室溫並攪拌1 h。藉由旋轉蒸發器及隨後高真空幫浦移除所有揮發性組份。將所得殘餘物與乙酸乙酯一起攪拌且過濾出不溶性固體，之後將濾液裝載於層析管柱上。使用乙酸乙酯及石油醚(v/v 1:4至1:1)之梯度混合物作為洗脫劑，以產生米色固體狀(S)-2-(2-溴-N-甲基乙醯胺基)乙基(甲基)胺基甲酸1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**51** (80 mg, 39%)；mp 167-170℃。$[\alpha]_D^{26}$ = -64.0° (*c* = 0.25，乙酸乙酯)。^{1}H NMR (DMSO) (旋轉異構物之混合物) δ 10.39 (s, 1H), 8.25-8.20 (m, 1H), 8.08 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.96 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.89 (d, *J* = 7.4 Hz, 0.34H), 7.82 (d, *J* = 7.4 Hz, 0.66H), 7.78 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.58 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.51-7.45 (m, 2H), 7.31 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 4.42 (t, *J* = 9.6

Hz, 1H), 4.36-4.31 (m, 1H), 4.24 (d, *J* = 10.7 Hz, 1H), 4.18-4.09 (m, 3H 包括CH_2Br), 4.07-4.03 (dd, *J* = 2.8, 10.9 Hz, 1H), 4.00-3.97 (dd, *J* = 2.6, 10.8 Hz, 1H), 3.96-3.91 (m, 1H), 3.82-3.75 (m, 1H), 3.70-3.68 (m, 1H), 3.58-3.43 (m, 3H),3.26-2.89 (m, 6H, 2NMe), 2.78-2.67 (m, 2H), 2.65-2.55 (m, 2H), 1.99-1.92 (m, 2H) ppm。HRMS (ESI)試驗值*m/z* 819.1316 (M + Na)。$C_{38}H_{38}BrCl_2N_4O_6$需要819.1322。

實例2 (11S,11aS)-8-(6-((S)-1-(氯甲基)-5-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苄基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-6-側氧基己基氧基)-11-羥基-7-甲氧基-5-側氧基-2,3,11,11a-四氫-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮呯-10(5H)-甲酸第三丁基酯**52**

遵循實例6之實驗程序，製備連接體-藥物中間體**52** (圖7及8)。HPLC：96.7%純；mp 210℃(分解)；^{1}H NMR [$(CD_3)_2SO$] δ 10.03 (s, 可與D_2O交換, 1 H), 8.23-8.11 (m, 2 H), 8.09 (d, *J* = 7.3 Hz, 可與D_2O交換, 1 H), 7.85 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H), 7.80 (d, *J* = 8.3 Hz, 可與D_2O交換, 1 H), 7.66 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H), 7.59-7.44 (m, 3 H), 7.38 (br t, *J* = 7.6 Hz, 1 H), 7.04 (s, 1 H), 6.99 (s, 2 H), 6.69 (s, 1 H), 6.38 (br s, 可與D_2O交換, 1 H), 5.99 (t, *J* = 5.5 Hz, 可與D_2O交換, 1 H), 5.49-5.34 (m, 3 H, 在D_2O後以d減少至1 H, *J* = 9.5 Hz), 5.20 (s, 2 H), 4.44-4.30 (m, 2 H), 4.26-4.13 (m, 3 H), 4.10-3.91 (m, 3 H), 3.88-3.76 (m, 1 H), 3.79 (s, 3 H), 3.53-3.44 (m, 1 H), 3.41-3.20 (m, 部分被水峰遮蓋，4 H), 3.09-2.88 (m, 2 H), 2.66-2.42 (m, 部分被DMSO峰遮蓋，2 H), 2.25-1.24 (m, 21 H), 1.31 (s, 9 H), 1.24-1.11 (m, 2 H), 0.86 (d, *J* = 6.8 Hz, 3 H), 0.82 (d, *J* = 6.7 Hz, 3 H)。分析型($C_{55}H_{71}ClN_8O_{11}\cdot H_2O$)計算值：C，61.53；H，6.85；N，10.44。試驗值：C，61.39；H，7.11；N，10.15。

實例3 N-((R)-1-(氯甲基)-3-(5-((R)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并

[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基)-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺**53**

於室溫(r.t.)下向(R)-1-(氯甲基)-5-(二苯基亞甲基胺基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-甲酸第三丁基酯**53a** (1.00 g, 2.01 mmol)存於THF-H_2O (150 mL/75 mL)中之攪拌溶液中添加乙酸(50 mL)並將混合物攪拌過夜(圖2)。19.5 h後，在真空下移除THF，將混合物用EtOAc稀釋，將層充分振盪且隨後分離。將有機層用飽和$NaHCO_3$水溶液(4 ×)洗滌，乾燥(Na_2SO_4)並在真空下移除溶劑。藉由矽膠上管柱層析使用己烷:EtOAc 100:0至90:10進行純化，從而產生橙色凝膠樣固體狀(R)-5-胺基-1-(氯甲基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-甲酸第三丁基酯**53b** (382 mg, 57%)。^{1}H NMR δ (400 MHz, DMSO-d_6) 8.01 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.64 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.42-7.38 (m, 1H), 7.37 (br s, 1H), 7.22-7.18 (m, 1H), 5.91 (s, 2H), 4.08-3.91 (m, 4H), 3.66 (dd, J = 10.6, 8.2 Hz, 1H), 1.53 (s, 9H)。

將**53b** (380 mg, 1.14 mmol)、6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己酸(361 mg, 1.71 mmol)、1-(3-二甲基胺基丙基)-3-乙基碳化二亞胺鹽酸鹽(EDCI.HCl, 765 mg, 3.99 mmol)及對甲苯磺酸(TsOH, 49 mg, 0.285 mmol)存於無水DMA (10 mL)中之混合物於r.t.下在氮下攪拌過夜。17 h後，在真空下移除溶劑。藉由矽膠上管柱層析使用DCM:己烷75:25至100:0、隨後DCM:MeOH 99:1至97:3純化粗產物且將含有產物之部分蒸發至乾燥。隨後將所得材料溶解於EtOAc中並將有機層用H_2O (2 ×)洗滌，乾燥(Na_2SO_4)並移除溶劑，以產生黃色固體狀(R)-1-(氯甲基)-5-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-甲酸第三丁基酯**53c** (282 mg, 47%)。^{1}H NMR δ (400 MHz, DMSO-d_6) 9.86 (s, 1H), 8.24 (br s, 1H), 7.99 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.88 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.55-7.51 (m, 1H), 7.43-7.39 (m, 1H),

7.01 (s, 2H), 4.21-4.11 (m, 2H), 4.08-4.00 (m, 2H), 3.87 (dd, *J* = 10.9, 6.9 Hz, 1H), 3.42 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.45 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.69-1.62 (m, 2H), 1.56-1.54 (m, 2H), 1.54 (s, 9H), 1.35-1.28 (m, 2H)。

於0℃下向**53c** (66 mg, 0.125 mmol)存於DCM (4 mL)中之溶液中添加三氟乙酸(3.9 mL)及H_2O (0.1 mL)。將混合物於0℃下攪拌1 h 20 min，隨後添加冰及H_2O。於0℃下將混合物用飽和$NaHCO_3$水溶液鹼化至pH 8。分離有機層及水層，將有機層用H_2O (1 ×)洗滌，乾燥(Na_2SO_4)並在真空下移除溶劑，以產生黃色固體狀(R)-N-(1-(氯甲基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基)-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺**53d** (50 mg, 94%)，其未經純化即用於下一步驟。^{1}H NMR δ (400 MHz, DMSO-d_6) 9.70 (s, 1H), 7.87 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.64 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.39 (ddd, *J* = 8.1, 6.9, 1.0 Hz, 1H), 7.21-7.15 (m, 2H), 7.01 (s, 2H), 5.92 (s, 1H), 4.02-3.96 (m, 1H), 3.85 (dd, *J* = 10.8, 3.5 Hz, 1H), 3.69 (t, *J* = 9.3 Hz, 1H), 3.63-3.55 (m, 2H), 3.42 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.42 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.64 (td, *J* = 15.2, 7.6 Hz, 2H), 1.55 (td, *J* = 14.5, 7.2 Hz, 2H), 1.35-1.26 (m, 2H)。

將**53d** (50 mg, 0.117 mmol)、(R)-5-(1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊酸**53e** (56 mg, 0.161 mmol)、1-(3-二甲基胺基丙基)-3-乙基碳化二亞胺鹽酸鹽EDCI.HCl (58 mg, 0.303 mmol)及TsOH (8 mg, 0.0465 mmol)存於無水DMA (2 mL)中之混合物於r.t.下在氮下攪拌過夜。19 h後，將混合物用H_2O稀釋並自溶液沈澱出固體。將水性懸浮液用EtOAc (1 ×)、DCM (1 ×)、DCM:MeOH 95:5 (1 ×)萃取並乾燥(Na_2SO_4)合併之有機物並在真空下移除溶劑。藉由矽膠上管柱層析使用DCM:MeOH 100:0至94:6純化粗產物，以產生黃色固體狀N-((S)-1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基)-6-(2,5-二

側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺**53** (15 mg，17%，HPLC純度：82.3%)。^{1}H NMR δ (400 MHz, DMSO-d_6) 10.35 (s, 1H), 9.88 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 8.08 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.96 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.92 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.78 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.55 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.51-7.47 (m, 1H), 7.46-7.42 (m, 1H), 7.33-7.30 (m, 1H), 7.01 (s, 2H), 4.42-4.28 (m, 3H), 4.25-4.13 (m, 3H), 4.01 (ddd, J = 19.6, 10.9, 2.6 Hz, 2H), 3.90 (dd, J = 10.9, 7.5 Hz, 1H), 3.79 (dd, J = 10.8, 8.1 Hz, 1H), 3.43 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 2.77-2.57 (m, 4H), 2.46-2.43 (m, 2H), 2.01-1.96 (m, 2H), 1.70-1.62 (m, 2H), 1.60-1.53 (m, 2H), 1.36-1.28 (m, 2H)。HRMS *m/z* 777.2186 [$(M+Na)^+$ 計算值 $C_{41}H_{40}Cl_2N_4NaO_6$ 777.2217]。

實例3a 1-((S)-5-胺基-1-(氯甲基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)戊烷-1,5-二酮**53j**

於-20℃下在氮下向(S)-5-(5-(苄基氧基)-1-(氯甲基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊酸**57c** (2.00 g, 4.57 mmol)存於THF-25% NH_4HCO_2水溶液(60 mL/23 mL)中之攪拌溶液中添加10% Pd/C (1.5 g)(圖3)。將反應混合物於-15℃至-10℃下攪拌3.5 hr。隨後將反應混合物保持於-20℃下過夜。17.5 h後，使混合物升溫至-10℃並於-10℃至-5℃下攪拌5 h。隨後使混合物升溫至0℃並於此溫度下攪拌30 min，隨後用MeOH稀釋，經由矽藻土過濾，將矽藻土塞用MeOH (3 x)洗滌並在真空下濃縮溶劑直至自溶液沈澱出固體為止。隨後將此物質用H_2O (150 mL)及己烷(150 mL)稀釋並於r.t.下攪拌，同時用濃HCl酸化至pH 1。將混合物再攪拌30 min且隨後藉由過濾收集固體並用H_2O及己烷洗滌並乾燥，以產生灰棕色固體狀(S)-5-(1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊酸**53h** (1.43 g, 90%)。^{1}H NMR δ (400 MHz, DMSO-d_6) 12.07 (br s, 1H), 10.35 (s, 1H), 8.08 (d, J

= 8.0 Hz, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.77 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.50-7.46 (m, 1H), 7.33-7.29 (m, 1H), 4.30 (t, *J* = 10.4 Hz, 1H), 4.14-4.12 (m, 2H), 3.98 (dd, *J* = 10.9, 2.8 Hz, 1H), 3.78 (dd, *J* = 10.8, 7.8 Hz, 1H), 2.63-2.45 (m, 2H), 2.35 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.89-1.78 (m, 2H)。

於r.t.下使氯化氫氣體(HCl)鼓泡通過(S)-1-(氯甲基)-5-(二苯基亞甲基胺基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-甲酸第三丁基酯**53f** (425 mg, 0.855 mmol)存於無水二噁烷(12 mL)中之溶液(經3 A分子篩) (圖3)。自溶液沈澱出固體並在15 min後在真空下移除溶劑。粗製固體(S)-1-(氯甲基)-N-(二苯基亞甲基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-胺**53g**未經純化即用於下一步驟。於r.t.下在氮下向**53g**、(S)-5-(1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊酸**53h** (327 mg, 0.941 mmol)、EDCI.HCl (573 mg, 2.99 mmol)及3A (埃)分子篩之混合物中添加無水DMA (10 mL)。2天及19.5 h後，在真空下移除溶劑。藉由矽膠上管柱層析使用DCM:MeOH 100:0至90:10純化粗物質，且隨後使用己烷:DCM 100:0至50:50至0:100、隨後DCM:MeOH 99:1至98:2再次層析該物質，以產生1-((S)-1-(氯甲基)-5-(二苯基亞甲基胺基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)戊烷-1,5-二酮**53i** (193 mg，經2個步驟自**53f**為31%)。^{1}H NMR δ (400 MHz, DMSO-d_6) 10.35 (s, 1H), 8.08 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.84 (t, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.79-7.74 (m, 3H), 7.62-7.57 (m, 2H), 7.54-7.46 (m, 4H), 7.40-7.36 (m, 1H), 7.33-7.29 (m, 1H), 7.27-7.22 (m, 3H), 7.09-7.08 (m, 2H), 4.34-4.26 (m, 2H), 4.22-4.12 (m, 4H), 4.01-3.97 (m, 2H), 3.83-3.76 (m, 2H), 2.69-2.50 (m, 4H), 1.93-1.86 (m, 2H)。HRMS *m/z* 726.2264 [(M+H)$^+$計算值$C_{44}H_{38}Cl_2N_3O_3$ 726.2285]。

於r.t.下向**53i** (190 mg, 0.261 mmol)存於THF-H_2O (24 mL/12 mL)中之攪拌溶液中添加乙酸(HOAc, 8 mL)並將混合物攪拌過夜。19 h

後，用H_2O稀釋混合物並沈澱出固體。在真空下移除THF並將水性懸浮液用DIPEA處理直至中性為止。藉由過濾收集固體，用H_2O洗滌並乾燥。將固體溶解於DMF (1.5 mL)中並用MeOH稀釋，從而使得固體沈澱。傾析溶劑並向固體中添加己烷:DCM 90:10，將懸浮液振盪並傾析溶劑。使用己烷:EtOAc 90:10、之後僅己烷重複此過程。隨後將固體溶解於DMF/THF中，吸附至矽膠上並使用DCM:MeOH 100:0至90:10洗脫產物。藉由製備型HPLC (管柱：Synergi-MAX RP 4 μ，21.20 x 250 mm；流速：13 mL/min；流動相：溶劑A：H_2O/TFA pH 2.5，溶劑B：MeCN/H_2O 90:10；方法：等梯度，溶劑A:溶劑B 20:80，15 min；波長：254 nm、330 nm)進一步純化該物質，以產生白色固體狀1-((S)-5-胺基-1-(氯甲基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)戊烷-1,5-二酮**53j**，30 mg，22%，HPLC純度：87.9%)。^{1}H NMR δ (400 MHz, DMSO-d_6) 10.36 (s, 1H), 8.08 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 8.04-8.02 (m, 2H), 7.79-7.77 (m, 2H), 7.69 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.51-7.47 (m, 1H), 7.42 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.34-7.30 (m, 1H), 7.23 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 5.91 (s, 2H), 4.36-4.26 (m, 2H), 4.19-4.13 (m, 3H), 4.08-4.04 (m, 1H), 4.01-3.93 (m, 2H), 3.79 (dd, J = 10.7, 8.2 Hz, 1H), 3.70 (dd, J = 10.5, 8.9 Hz, 1H), 2.75-2.66 (m, 2H), 2.63-2.54 (m, 2H), 2.00-1.93 (m, 2H)。HRMS *m/z* 584.1456 [$(M+Na)^+$計算值$C_{31}H_{29}Cl_2N_3NaO_3$ 584.1478]。$[\alpha]_D^{28}$ = -37.6° (c = 0.559, DMSO)。

實例3b 1-((R)-5-胺基-1-(氯甲基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-((R)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)戊烷-1,5-二酮**53p**

於0℃下向(R)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-甲酸第三丁基酯**53k** (1.00 g, 3.00 mmol)存於DCM (100 mL)中之攪拌溶液中添加三乙胺(Et_3N, 0.54 mL, 3.89 mmol)及三氟甲磺酸酐(0.60 mL, 3.60

mmol) (圖4)。將反應物於0℃下攪拌20 min，隨後用H_2O稀釋，分離各層並用DCM (1 ×)萃取水層。將經合併之有機層乾燥(Na_2SO_4)，並在真空下移除溶劑。藉由矽膠上管柱層析使用己烷:EtOAc 100:0至96:4進行純化，從而產生橙色發泡體固體狀(R)-1-(氯甲基)-5-(三氟甲基磺醯基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-甲酸第三丁基酯**53l** (1.30 g, 93%)。^{1}H NMR δ (400 MHz, $CDCl_3$) 8.30 (br s, 1H), 8.03 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.76 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.62-7.58 (m, 1H), 7.53-7.49 (m, 1H), 4.32 (br s, 1H), 4.20-4.15 (m, 1H), 4.09-4.03 (m, 1H), 3.92 (dd, J = 11.2, 2.8 Hz, 1H), 3.54-3.49 (m, 1H), 1.61 (s, 9H)。

在氮下向**53l** (1.30 g, 2.79 mmol)存於無水THF (60 mL，脫氣)中之溶液中添加Cs_2CO_3 (1.27 g, 3.91 mmol)、BINAP (209 mg, 0.336 mmol)及$Pd(OAc)_2$ (63 mg, 0.281 mmol)之混合物。隨後添加二苯基甲亞胺(0.56 mL, 3.34 mmol)並在氮下將混合物回流過夜。20 h後，將反應溫度降低至60℃至65℃並將反應物於此溫度下在氮下攪拌1天。添加額外THF (10 mL)並將混合物於相同溫度下再攪拌一天，之後向混合物中再次添加更多THF (25 mL)。再一天後，添加另一份$Pd(OAc)_2$ (19 mg, 0.0846 mmol)、BINAP (52 mg, 0.0835 mmol)及THF (30 mL)並將混合物於70℃下在氮下加熱過夜。再28 h後，再次添加另一份$Pd(OAc)_2$ (31 mg, 0.138 mmol)、BINAP (104 mg, 0.167 mmol)並繼續反應22 h。隨後將反應混合物冷卻至r.t.，用DCM稀釋，經由矽藻土過濾，將矽藻土塞用DCM洗滌直至洗滌物中不再有顏色為止並在真空下蒸發濾液。藉由矽膠上管柱層析使用己烷:DCM 100:0至50:50進行純化，從而產生黃色發泡體固體狀(R)-1-(氯甲基)-5-(二苯基亞甲基胺基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-甲酸第三丁基酯**53a** (1.19 g, 85%)。^{1}H NMR δ (400 MHz, DMSO-d_6) 7.85 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.80 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.75 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.61-7.57 (m, 1H), 7.54-7.49 (m, 3H),

7.37-7.33 (m, 1H), 7.30-7.23 (m, 3H), 7.06 (d, J = 6.8 Hz, 2H), 4.13-4.02 (m, 2H), 4.00-3.94 (m, 2H), 3.77 (dd, J = 10.9, 7.5 Hz, 1H), 1.46 (s, 9H), 1H未觀察到。$[\alpha]_D^{27}$ = +101° (c = 1.04, DCM)。

於r.t.下使氯化氫氣體(HCl (g))鼓泡通過**53a** (300 mg, 0.604 mmol)存於無水二噁烷(10 mL)中之溶液(經3 A分子篩)。10 min後固體自溶液沈澱出且20 min後在真空下移除溶劑。粗製固體(R)-1-(氯甲基)-N-(二苯基亞甲基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-胺**53m**未經純化即用於下一步驟。

於-10℃下在氮下向(R)-5-(5-(苄基氧基)-1-(氯甲基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊酸**53n** (1.38 g, 3.15 mmol)存於THF-25% NH_4HCO_2水溶液(40 mL/16 mL)中之攪拌溶液中添加炭載鈀10% Pd/C (690 mg)。將反應混合物於-10℃至-5℃下攪拌3 h。隨後將反應混合物保持在-20℃下過夜。於-20℃下15 h後，將混合物用MeOH稀釋，經由矽藻土過濾，將矽藻土塞用MeOH洗滌並在真空下濃縮溶劑直至自溶液沈澱出固體為止。隨後將懸浮液用H_2O (130 mL)及己烷(100 mL)稀釋並於r.t.下攪拌，同時用濃HCl酸化至pH 1。將混合物攪拌30 min，使其沉降並傾析己烷。添加額外己烷(120 mL)並將混合物再攪拌30 min，再次傾析己烷且隨後藉由過濾收集固體並用H_2O及己烷洗滌並乾燥，以產生灰棕色固體狀(R)-5-(1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊酸**53e** (925 mg, 84%)。^{1}H NMR δ (400 MHz, DMSO-d_6) 12.06 (br s, 1H), 10.35 (s, 1H), 8.08 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.77 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.50-7.46 (m, 1H), 7.33-7.29 (m, 1H), 4.30 (t, J = 10.5 Hz, 1H), 4.14-4.12 (m, 2H), 3.98 (dd, J = 10.9, 2.8 Hz, 1H), 3.78 (dd, J = 10.8, 7.9 Hz, 1H), 2.63-2.45 (m, 2H), 2.35 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.89-1.78 (m, 2H)。

於r.t.下在氮下向來自先前反應之**53m**、**53e** (241 mg, 0.693

mmol)、EDCI.HCl (404 mg, 2.11 mmol)及3A分子篩之混合物中添加無水DMA (8 mL)。將反應混合物攪拌過夜。19.5 h後，將混合物用H_2O稀釋並過濾所得懸浮液。將水性濾液用EtOAc (3 x)萃取並將所過濾固體溶解於EtOAc/MeOH中並與EtOAc萃取物合併。將合併之有機溶液吸附至矽膠上並使用己烷:DCM 50:50至0:100、隨後DCM:MeOH 99.5:0.5至97:3洗脫產物，以產生深黃色固體狀1-((R)-1-(氯甲基)-5-(二苯基亞甲基胺基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-((R)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)戊烷-1,5-二酮**53o** (155 mg，經2個步驟自**53a**為35%)。^{1}H NMR δ (400 MHz, DMSO-d_6) 10.35 (s, 1H), 8.08 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.85 (t, J = 8.9 Hz, 2H), 7.79-7.74 (m, 3H), 7.62-7.57 (m, 2H), 7.54-7.46 (m, 4H), 7.40-7.36 (m, 1H), 7.33-7.29 (m, 1H), 7.27-7.22 (m, 3H), 7.09-7.08 (m, 2H), 4.34-4.27 (m, 2H), 4.22-4.11 (m, 4H), 4.02-3.97 (m, 2H), 3.83-3.76 (m, 2H), 2.69-2.51 (m, 4H), 1.93-1.85 (m, 2H), NMR譜與**53i**之NMR譜匹配。HRMS *m/z* 748.2077 [$(M+Na)^+$計算值$C_{44}H_{37}Cl_2N_3NaO_3$ 748.2104]。

於r.t.下向**53o** (80 mg, 0.110 mmol)存於THF-H_2O (12 mL/6 mL)中之攪拌溶液中添加乙酸(HOAc, 4 mL)並將混合物攪拌過夜。18 h後，將混合物用H_2O稀釋並沈澱出固體。在真空下移除THF並將水性懸浮液用DIPEA處理直至pH 8，從而引起更多固體沈澱。藉由過濾收集固體，乾燥，並藉由矽膠上管柱層析使用DCM:MeOH 100:0至97:3純化，以產生棕褐色固體狀1-((R)-5-胺基-1-(氯甲基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-((R)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)戊烷-1,5-二酮**53p** (20 mg, 32%)。^{1}H NMR δ (400 MHz, DMSO-d_6) 10.36 (s, 1H), 8.08 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 8.04-8.02 (m, 2H), 7.79-7.77 (m, 2H), 7.69 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.51-7.47 (m, 1H), 7.42 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.34-7.30 (m, 1H), 7.23 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 5.91 (s, 2H), 4.36-4.26 (m,

2H), 4.19-4.13 (m, 3H), 4.08-4.04 (m, 1H), 4.01-3.93 (m, 2H), 3.79 (dd, *J* = 10.7, 8.3 Hz, 1H), 3.71 (dd, *J* = 10.5, 8.9 Hz, 1H), 2.75-2.66 (m, 2H), 2.63-2.53 (m, 2H), 2.00-1.93 (m, 2H), NMR譜與**53j**之NMR譜匹配。

實例4 N-(4-(((S)-1-(氯甲基)-3-(6-((S)-7-甲氧基-5-側氧基-2,3,5,11a-四氫-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮呼-8-基氧基)己醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基氧基)甲基)苯基)-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺**54**

將藉由Tercel等人(2003) J. Med. Chem 46:2132-2151之程序製備之(S)-(2-胺基-4-羥基-5-甲氧基苯基)(2-(羥基甲基)吡咯啶-1-基)甲酮**54a** (7.6 g, 28.6 mmol)及二碳酸二-第三丁基酯(12.48 g, 57.2 mmol)存於無水THF (140 mL)中之混合物在回流下在氮氣氛中攪拌18 h。將反應混合物冷卻至r.t.並添加2N NaOH (57.2 mL, 114 mmol)及MeOH (70 mL)。將混合物於r.t.下攪拌6 h。於35℃至40℃ (浴溫)下在減壓下蒸發揮發物。添加冰水(250 mL)並於0℃下將pH調節至8-9。於r.t.下將混合物與石油醚-乙酸乙酯(20:1) (2x400 mL)一起攪拌15 min。分離並棄去有機層。用DCM (4x300 mL)萃取水層並將合併之萃取物乾燥($MgSO_4$)並在減壓下蒸發，以產生粉白色固體狀(S)-5-羥基-2-(2-(羥基甲基)吡咯啶-1-羰基)-4-甲氧基苯基胺基甲酸第三丁基酯**54b** (9.36 g, 89%)；mp 154℃至156℃；^{1}H NMR [$(CD_3)_2SO$] δ 9.51 (s, 1 H), 8.90 (s, 1 H), 7.27 (s, 1 H), 6.91 (s, 1 H), 4.73 (t, *J* = 5.8 Hz, 1 H), 4.16-4.02 (m, 1 H), 3.73 (s, 3 H), 3.64-3.34 (m, 4 H), 1.99-1.60 (m, 4 H), 1.43 (s, 9 H).分析型($C_{18}H_{26}N_2O_6$)計算值：C，59.00；H，7.15；N，7.65.試驗值：C，58.94；H，7.31；N，7.39。

向**54b** (2.88 g, 7.87 mmol)及藉由Tercel等人，(2003) J. Med. Chem 46:2132-2151中之程序製備之6-溴己酸2,2,2-三氯乙基酯(3.86 g,

11.8 mmol)存於無水DMA (7 mL)中之溶液中添加無水K_2CO_3 (2.61 g, 18.9 mmol)。將所得混合物於r.t.下攪拌68 h。將其倒入冰水(600 mL)中並將產物萃取至乙酸乙酯(600 mL)中。將萃取物連續用冷(0℃)的2N Na_2CO_3水溶液(2x400 mL)及水(400 mL)洗滌且隨後乾燥($MgSO_4$)。蒸發溶劑，從而產生褐色油狀物，藉由SiO_2管柱層析(DCM-乙酸乙酯= 2:1)對其進行純化，以產生淺黃色發泡體狀純(S)-6-(5-(第三丁氧基羰基胺基)-4-(2-(羥基甲基)吡咯啶-1-羰基)-2-甲氧基苯氧基)己酸2,2,2-三氯乙基酯**54c** (3.62 g, 76%)；mp 36℃至39℃；^{1}H NMR [$(CD_3)_2SO$] δ 9.90 (s, 1 H), 7.33 (s, 1 H), 6.93 (s, 1 H), 4.89 (s, 2 H), 4.74 (t, *J* = 5.8 Hz, 1 H), 4.17-4.02 (m, 1 H), 3.94 (t, *J* = 6.4 Hz, 2 H), 3.73 (s, 3 H), 3.63-3.26 (m, 4 H), 2.55-2.46 (m, 2 H, 部分被DMSO峰遮蓋), 2.00-1.55 (m, 8 H), 1.53-1.36 (m, 11 H).分析型($C_{26}H_{37}N_2O_8$)計算值：C，51.03；H，6.09；N，4.58.試驗值：C，51.33；H，6.21；N，4.35。

於r.t.下經15 min向**54c** (3.62 g, 5.92 mmol)存於無水DCM (12 mL)中之溶液中逐份添加戴斯-馬丁過碘烷(Dess-Martin periodinane) (DMP, 1,1,1-三乙醯氧基-1,1-二氫-1,2-苯并碘氧雜環戊-3(1H)-酮，CAS註冊號87413-09-0) (3.27 g, 7.70 mmol)。將反應混合物於r.t.下攪拌45 min。將其用DCM (800 mL)稀釋並連續用10% $Na_2S_2O_3$ (100 mL)、冷(0℃)的$NaHCO_3$溶液(400 mL)及水(300 mL)洗滌且隨後乾燥($MgSO_4$)。蒸發溶劑，從而產生琥珀色固體，藉由SiO_2管柱層析(石油醚-乙酸乙酯= 3:4)對其進行純化，以產生黏稠發泡體狀(S)-11-羥基-7-甲氧基-5-側氧基-8-(6-側氧基-6-(2,2,2-三氯乙氧基)己基氧基)-2,3,11,11a-四氫-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮呯-10(5H)-甲酸第三丁基酯**54d** (2.61g, 72%)；^{1}H NMR [$(CD_3)_2SO$] δ 7.03 (s, 1 H), 6.67 (s, 1 H), 6.38 (s, 1 H), 5.41 (s, 1 H), 4.89 (s, 2 H), 4.06-3.87 (m, 2 H), 3.79 (s, 3 H), 3.52-3.43 (m, 1 H), 3.42-3.28 (m, 1 H, 部分被水峰遮蓋),

3.27-3.20 (m, 1 H), 2.08-1.82 (m, 5 H), 1.81-1.71 (m, 2 H), 1.71-1.61 (m, 2 H), 1.53-1.40 (m, 3 H), 1.31 (s, 9 H)。HRMS (ESI) *m/z*計算值 $C_{26}H_{35}Cl_3N_2NaO_8$: 631.1351，試驗值：631.1361 [MNa^+]。

在氮下向**54d** (1.80 g, 2.95 mmol)存於丙酮-水(3:2) (100 mL)中之攪拌溶液中添加Zn (7.72 g, 118 mmol)及NH_4Cl (6.32 g, 118 mmol)。將混合物於r.t.下攪拌28 h。傾析上清液並將Zn殘餘物用$NaHCO_3$水溶液(3x100 mL)洗滌。將洗滌物與上清液合併並與DCM (300 mL，隨後2x 100 mL)一起攪拌。分離並棄去DCM層。於0℃下將水層用濃HCl酸化至pH<1。將產物萃取至DCM (400 mL；2x200 mL)中，對其進行乾燥($MgSO_4$)並蒸發，以產生無色發泡體狀(S)-8-(5-過氧氫己-5-烯基氧基)-11-羥基-7-甲氧基-5-側氧基-2,3,11,11a-四氫-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮呼-10(5H)-甲酸第三丁基酯**54e** (1.34 g, 95%)；mp 65℃至67℃；^{1}H NMR [$(CD_3)_2SO$] δ 11.99 (br s, 1 H), 7.04 (s, 1 H), 6.67 (s, 1 H), 6.37 (br s, 1 H), 5.41 (d, *J* = 9.4 Hz, 1 H), 4.06-3.87 (m, 2 H), 3.79 (s, 3 H), 3.53-3.19 (m, 3 H, 部分被水峰遮蓋), 2.22 (t, *J* = 7.2 Hz, 2 H), 2.09-1.81 (m, 4 H), 1.80-1.67 (m, 2 H), 1.62-1.49 (m, 2 H), 1.49-1.37 (m, 2 H), 1.31 (s, 9 H)。分析型($C_{24}H_{34}N_2O_8 \cdot ¼H_2O$)計算值：C，59.68；H，7.20；N，5.80。試驗值：C，59.37；H，7.20；N，5.62。

將**54e** (1.16 g, 2.42 mmol)、(S)-1-(氯甲基)-5-(4-硝基苄基氧基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚**54f** (893 mg, 2.42 mmol)、EDCI.HCl (1.39 g, 7.26 mmol)及無水TsOH (83 mg, 0.48 mmol)存於DMA (7 mL)中之混合物於室溫下在氮氣氛下攪拌4 h。添加水(120 mL)並將混合物於r.t.下攪拌15 min。過濾出所沈澱固體，連續用水(4x40 mL)、0.01% NH_4OH (4x40 mL)及石油醚(4x40 mL)洗滌且隨後乾燥，以產生淺黃色固體狀N-Boc-(S)-8-(6-((S)-1-(氯甲基)-5-(4-硝基苄基氧基)-1H-苯并[e]

吲哚-3(2H)-基)-6-側氧基己基氧基)-11-羥基-7-甲氧基-2,3,11,11a-四氫-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮呯-5(10H)-酮**54g** (1.71 g, 85%)；mp 130℃至133℃；^{1}H NMR [$(CD_3)_2SO$] δ 8.30 (d, *J* = 8.8 Hz, 2 H), 8.23 (d, *J* = 8.1 Hz, 1 H), 8.18 (s, 1 H), 7.92-7.82 (m, 3 H), 7.57 (td, *J* = 8.2, 1.1 Hz, 1 H), 7.43 (t, *J* = 8.0 Hz, 1 H), 7.03 (s, 1 H), 6.69 (s, 1 H), 6.39 (br s, 1 H), 5.51-5.35 (m, 3 H), 4.36 (t, *J* = 9.5 Hz, 1 H), 4.28-4.15 (m, 2 H), 4.10-3.90 (m, 3 H), 3.85 (dd, *J* = 11.1, 7.8 Hz, 1 H), 3.79 (s, 3 H), 3.52-3.42 (m, 1 H), 3.42-3.20 (m, 2H, 部分被水峰遮蓋), 2.68-2.50 (m, 2 H, 部分被DMSO峰遮蓋), 2.11-1.95 (m, 1 H), 1.95-1.75 (m, 5 H), 1.75-1.61 (m, 2 H), 1.59-1.45 (m, 2 H), 1.31 (s, 9 H)。分析型($C_{44}H_{49}ClN_4O_{10}$)計算值：C，63.72；H，5.96；N，6.76。試驗值：C，63.33；H，5.97；N，6.92。

在氮下向**54g** (1.70 g, 2.05 mmol)存於THF (90 mL)、丙酮(70 mL)及水(40 mL)之混合物中之攪拌溶液中添加Zn (2.68 g, 41.0 mmol)及NH_4Cl (4.39 g, 82.0 mmol)。將混合物於r.t.下攪拌45 min，隨後經由矽藻土過濾，用THF洗滌若干次。在減壓下於r.t.下將濾液濃縮至約60 mL。添加0.01% NH_4OH溶液(400 mL)並將混合物於r.t.下攪拌15 min。收集固體並連續用0.01% NH_4OH (3x100 mL)、水(3x100 mL)及石油醚(3x100 mL)洗滌。乾燥固體，以產生**54g**之苯胺基衍生物(1.16 g, 100%)，將其用存於無水DMA (2 mL)中之6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己酸(253 mg, 1.20 mmol)、EDCI.HCl (576 mg, 3.00 mmol)及無水TsOH (34.4 mg, 0.20 mmol)處理。將混合物於r.t.下及在氮下攪拌17 h。添加$NaHCO_3$溶液(50 mL)並將混合物於r.t.下攪拌30 min。收集固體，用水洗滌，乾燥，並藉由二氧化矽管柱層析(DCM-乙酸乙酯= 1:1)純化，以產生黃色固體狀純(S)-8-(6-((S)-1-(氯甲基)-5-(4-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)苄基氧基)-1H-

苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-6-側氧基己基氧基)-11-羥基-7-甲氧基-5-側氧基-2,3,11,11a-四氫-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮呯-10(5H)-甲酸第三丁基酯**54h** (194 mg, 33%)，mp 128℃至132℃；^{1}H NMR [$(CD_3)_2SO$] δ 9.91 (s, 1 H), 8.20-8.11 (m, 2 H), 7.84 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H), 7.62 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H), 7.54 (br t, *J* = 8.1 Hz, 1 H), 7.47 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H), 7.38 (br t, *J* = 8.0 Hz, 1 H), 7.04 (s, 1 H), 7.00 (s, 2 H), 6.69 (s, 1 H), 6.38 (br s, 1 H), 5.45-5.37 (m, 1 H), 5.20 (s, 2 H), 4.36 (t, *J* = 10.2 Hz, 1 H), 4.26-4.13 (m, 2 H), 4.10-3.92 (m, 3 H), 3.88-3.79 (m, 1 H), 3.79 (s, 3 H), 3.52-3.30 (m, 4 H), 3.24 (br t, *J* = 8.9 Hz, 1 H), 2.66-2.50 (m, 2H, 部分被DMSO峰遮蓋), 2.28 (t, *J* = 7.3 Hz, 2 H), 2.08-1.95 (m, 1 H), 1.95-1.76 (m, 5 H), 1.76-1.64 (m, 2 H), 1.64-1.20 (m, 8 H), 1.31 (s, 9 H)。分析型($C_{54}H_{62}ClN_5O_{11}$)計算值：C，65.35；H，6.30；N，7.06.試驗值：C，65.08；H，6.39；N，6.67。

向於-10℃至-11℃下在氮氣氛下攪拌之N-(4-(((S)-1-(氯甲基)-3-(6-((S)-7-甲氧基-5-側氧基-2,3,5,11a-四氫-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮呯-8-基氧基)己醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基氧基)甲基)苯基)-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺**54h** (204 mg, 0.21 mmol)存於DCM (15 mL)中之溶液中逐滴添加(經30 min)含有2.5%水之TFA (15 mL)。在添加後，將混合物於此溫度下進一步攪拌4 h。於0℃下將混合物倒入冰、DCM及足夠飽和$NaHCO_3$溶液之混合物中以產生pH 7-8。將混合物於r.t.下攪拌15 min。分離DCM層並用更多$NaHCO_3$水溶液及水洗滌且隨後乾燥($MgSO_4$)。於25℃ (浴溫)下蒸發溶劑，以產生黃色固體(172 mg，回收94%物質)。藉由製備型HPLC (Synergi-Max RP管柱) (用30%甲酸銨緩衝液pH = 3.5、70%水性(10%)乙腈洗脫；流速：13 mL/min)純化此粗產物，以產生**54** (30 mg, 16%)，HPLC：98.8%純；mp 190℃(分解)；[α^{20}_D +320° (c 0.100,

DCM)；^{1}H NMR [$CDCl_3$] δ 8.29 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H), 8.18 (s, 1 H), 7.69-7.63 (m, 2 H), 7.61-7.44 (m, 6 H), 7.37 (br t, *J* = 7.3 Hz, 2 H), 6.82 (s, 1 H), 6.66 (s, 2 H), 5.24 (s, 2 H), 4.34-4.19 (m, 2 H), 4.19-4.00 (m, 3 H), 3.99-3.92 (m, 1 H), 3.89 (s, 3 H), 3.86-3.78 (m, 1 H), 3.76-3.70 (m, 1 H), 3.63-3.49 (m, 3H), 3.42 (t, *J* = 10.8 Hz, 1 H), 2.68-2.47 (m, 2 H), 2.40-2.27 (m, 3 H), 2.12-1.92 (m, 5 H), 1.92-1.82 (m, 2 H), 1.82-1.71 (m, 2 H), 1.71-1.54 (m, 4 H, 部分被水峰遮蓋), 1.43-1.32 (m, 2 H)。HRMS (ESI) *m/z* 計算值 $C_{49}H_{52}ClN_5NaO_8$：896.3397，試驗值：896.3375 [MNa^+]。

實例5 N-((S)-1-((S)-1-(4-(((S)-1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基氧基)甲基)苯基胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基胺基)-3-甲基-1-側氧基丁-2-基)-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺 **55**

於室溫下向(S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-甲酸第三丁基酯**51a** (2.01 g, 6.02 mmol)及1-(溴甲基)-4-硝基苯(5.20 g, 24.1 mmol)存於DMF (12 mL)中之混合物中添加碳酸鉀K_2CO_3 (2.50 g, 18.1 mmol) (圖6)。將反應混合物於r.t.下攪拌2 h，隨後用EtOAc及H_2O稀釋並分離各層。將有機層用H_2O (3×)、鹽水(1×)洗滌，乾燥(Na_2SO_4)並在真空下移除溶劑。藉由使用己烷:EtOAc 100:0至96:4矽膠上管柱層析兩次進行純化，從而產生亮黃色固體狀(S)-1-(氯甲基)-5-(4-硝基苄基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-甲酸第三丁基酯**55a** (2.17 g, 77%)。^{1}H NMR δ (400 MHz, $CDCl_3$) 8.31-8.27 (m, 3H), 7.85 (br s, 1H), 7.72 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.67 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.54 (ddd, *J* = 8.2, 6.8, 1.2 Hz, 1H), 7.38 (ddd, *J* = 8.2, 6.8, 1.1 Hz, 1H), 4.28-4.25 (m, 1H), 4.16-4.10 (m, 1H), 4.02-3.92 (m, 2H), 3.45 (t, *J* = 10.6 Hz, 1H), 1.60 (s, 9H)。

HRMS *m/z* 491.1338 [$(M+Na)^+$計算值$C_{25}H_{25}ClN_2NaO_5$ 491.1344]。

還原方法A：將**55a** (1.53 g, 3.26 mmol)溶解於THF-丙酮(75 mL/60 mL)中。在**55a**溶解後添加H_2O (30 mL)。添加NH_4Cl (10.5 g, 196 mmol)及Zn粉(6.40 g, 97.9 mmol)並將所得混合物於r.t.下在氮下攪拌1 h。隨後經由矽藻土過濾反應混合物，將矽藻土塞用DCM洗滌並將合併之濾液用H_2O (1×)洗滌，乾燥(Na_2SO_4)並在真空下移除溶劑，以產生橙色固體狀化合物**55b**。粗產物未經純化即用於下一步驟。

還原方法B：向**55a**存於THF-MeOH-H_2O (150 mL/50 mL/20 mL)中之溶液中添加汞-鋁汞齊。15 min後，將反應混合物用DCM稀釋，經由矽藻土過濾並將矽藻土塞用DCM洗滌。將有機物用H_2O洗滌，乾燥(Na_2SO_4)並在真空下移除溶劑，以產生橙色固體狀(S)-5-(4-胺基苄基氧基)-1-(氯甲基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-甲酸第三丁基酯**55b**。產物未經純化即用於下一步驟。^{1}H NMR δ (400 MHz, DMSO-d_6) 8.06 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.80 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.53-7.49 (m, 1H), 7.34-7.30 (m, 1H), 7.19 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 6.60 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 5.16 (s, 2H), 5.04 (d, J = 1.3 Hz, 2H), 4.18-4.05 (m, 3H), 4.00-3.97 (m, 1H), 3.81 (dd, J = 10.9, 6.9 Hz, 1H), 1.56 (s, 9H), 1H未觀察到。

將(S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基胺基)-5-脲基戊酸(Fmoc-L-瓜胺酸，3.26 g，8.20 mmol)及2-乙氧基-1-乙氧基羰基-1,2-二氫喹啉(EEDQ，CAS註冊號16357-59-8，3.12 g，12.6 mmol)存於DMA (15 mL)中之混合物於r.t.下在氮下攪拌20 min。隨後添加**55b** (2.77 g, 6.31 mmol)存於DMA (15 mL)中之溶液，將所得混合物用氮沖洗並攪拌過夜。16 h後，將反應混合物倒在冰上並用H_2O稀釋。過濾出所得沈澱，用H_2O洗滌，溶解於DCM/MeOH中，乾燥(Na_2SO_4)並在真空下移除溶劑。藉由研磨純化粗產物，其中用己烷:EtOAc 94:6沈澱產物，傾析溶劑並使用己烷:EtOAc 90:10及隨後己烷:EtOAc 95:5重複該過

程。隨後在矽膠上使用DCM:MeOH 100:0至95:5對該物質進行管柱層析，以產生黃色固體狀(S)-5-(4-((S)-2-(((9H-茀-9-基)甲氧基)羰基胺基)-5-脲基戊醯胺基)苄基氧基)-1-(氯甲基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-甲酸第三丁基酯**55c** (4.23 g，經2個步驟自**55a**為79%，HPLC純度：95.3%)。^{1}H NMR δ (400 MHz, DMSO-d_6) 10.12 (s, 1H), 8.12 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.89 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.82 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.77-7.74 (m, 2H), 7.70-7.67 (m, 3H), 7.55-7.49 (m, 3H), 7.42 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 7.37-7.31 (m, 3H), 6.00 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.22 (s, 2H), 4.29-4.27 (m, 2H), 4.24-4.05 (m, 6H), 4.01-3.98 (m, 1H), 3.82 (dd, J = 10.9, 7.0 Hz, 1H), 3.09-2.92 (m, 2H), 1.74-1.35 (m, 4H), 1.55 (s, 9H)。HRMS *m/z* 840.3101 [$(M+Na)^+$ 計算值 $C_{46}H_{48}ClN_5NaO_7$ 840.3134]。

於r.t.下向**55c** (4.18 g, 5.11 mmol)存於DMF (15 mL)中之攪拌溶液中添加六氫吡啶(1.5 mL, 10% v/v)。將反應混合物攪拌1 h。將所得懸浮液用己烷:EtOAc 90:10 (100 mL)稀釋並攪拌10 min。形成兩層並傾析出頂層。在真空下移除保留底層中之溶劑。藉由矽膠上管柱層析使用DCM:MeOH 100:0至85:15進行純化，從而產生黃色粉末狀(S)-5-(4-((S)-2-胺基-5-脲基戊醯胺基)苄基氧基)-1-(氯甲基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-甲酸第三丁基酯**55d** (2.97 g，97%，HPLC純度：99.1%)。^{1}H NMR δ (400 MHz, DMSO-d_6) 9.93 (br s, 1H), 8.12 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.82 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.70 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.55-7.48 (m, 3H), 7.37-7.33 (m, 1H), 5.94 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 5.37 (s, 2H), 5.22 (s, 2H), 4.19-4.05 (m, 4H), 4.01-3.98 (m, 1H), 3.82 (dd, J = 10.9, 7.0 Hz, 1H), 3.04-2.91 (m, 2H), 1.71-1.36 (m, 4H), 1.55 (s, 9H), 3H未觀察到。HRMS *m/z* 596.2627 [$(M+H)^+$計算值$C_{31}H_{39}ClN_5O_5$ 596.2634]。

於r.t.下在氮下將(S)-2-(((9H-茀-9-基)甲氧基)羰基胺基)-3-甲基丁

酸2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯(Fmoc-Val-OSu, 3.19 g, 7.31 mmol)及**55d** (2.91 g, 4.87 mmol)存於DMA (15 mL)中之混合物攪拌過夜。20 h後，添加己烷:EtOAc 80:20 (150 mL)並將懸浮液攪拌30 min。隨後傾析溶劑，留下固體。使用己烷:EtOAc 75:25將此過程重複若干次。隨後將固體懸浮於DCM:MeOH 75:25中並超音波處理懸浮液。將懸浮液用己烷(200 mL)稀釋並過濾出固體並用己烷:EtOAc 65:35洗滌並乾燥，以產生橙色粉末狀(S)-5-(4-((S)-2-((S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苄基氧基)-1-(氯甲基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-甲酸第三丁基酯**55e** (3.79 g，85%，HPLC純度：92.4%)。^{1}H NMR δ (400 MHz, DMSO-d_6) 10.12 (s, 1H), 8.14-8.12 (m, 2H), 7.89 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.82 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.75 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 7.66 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.55-7.48 (m, 3H), 7.45-7.30 (m, 6H), 5.98 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 5.41 (s, 2H), 5.22 (s, 2H), 4.45 (dd, J = 13.6, 7.7 Hz, 1H), 4.36-4.04 (m, 6H), 4.02-3.90 (m, 2H), 3.82 (dd, J = 10.8, 6.9 Hz, 1H), 3.08-2.91 (m, 2H), 2.05-1.96 (m, 1H), 1.76-1.34 (m, 4H), 1.55 (s, 9H), 0.89 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.86 (d, J = 6.8 Hz, 3H)。HRMS m/z 939.3808 [$(M+Na)^+$計算值$C_{51}H_{57}ClN_6NaO_8$ 939.3819]。

Boc移除方法A：於0℃下向**55e** (685 mg, 0.747 mmol)存於DCM (19 mL)中之懸浮液中逐份添加TFA (9.5 mL)。將反應混合物於0℃下攪拌1 h 45 min。隨後於0℃下向混合物中逐份添加NH_3水溶液(0.25%, 100 mL)，之後添加濃NH_3水溶液直至pH 9-10為止。隨後添加己烷:EtOAc 90:10並將混合物於0℃下攪拌40 min，超音波處理懸浮液並藉由過濾收集沈澱，用H_2O、H_2O:MeOH 80:20、己烷:EtOAc 60:40、己烷:Et_2O 50:50、己烷洗滌並乾燥，以產生褐色固體狀(S)-1-((S)-1-(4-(((S)-1-(氯甲基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基氧基)甲基)苯基胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基胺基)-3-甲基-1-側氧基丁-2-基胺基甲酸

(9H-芴-9-基)甲基酯**55f** (364 mg, 60%)。

Boc移除方法B：於0℃下向**55e** (0.106 g, 0.116 mmol)存於DCM (40 mL)中之懸浮液中添加$BF_3.Et_2O$ (0.07 mL, 0.552 mmol)。1 h 50 min後，於r.t.下在真空下濃縮懸浮液直至僅剩餘少量DCM為止。添加少量MeOH直至沈澱溶解並隨後用H_2O稀釋溶液。沈澱出固體並傾析H_2O。添加己烷:EtOAc 90:10 (20 mL)並超音波處理懸浮液，之後藉由過濾收集固體。將固體用H_2O及己烷洗滌並乾燥，以產生褐色固體狀(S)-1-((S)-1-(4-(((S)-1-(氯甲基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基氧基)甲基)苯基胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基胺基)-3-甲基-1-側氧基丁-2-基胺基甲酸(9H-芴-9-基)甲基酯**55f** (66 mg, 70%)。^{1}H NMR δ (400 MHz, DMSO-d_6) 10.10 (s, 1H), 8.12 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 8.00 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.89 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 7.74 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 7.64 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.58 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.46-7.37 (m, 5H), 7.34-7.30 (m, 2H), 7.13-7.09 (m, 1H), 6.55 (s, 1H), 5.97 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 5.41 (s, 2H), 5.17 (s, 2H), 4.43 (dd, J = 13.0, 7.5 Hz, 1H), 4.34-4.21 (m, 3H), 3.95-3.90 (m, 2H), 3.83 (dd, J = 10.7, 3.4 Hz, 1H), 3.70-3.66 (m, 1H), 3.61-3.51 (m, 2H), 3.08-2.90 (m, 2H), 2.04-1.96 (m, 1H), 1.76-1.33 (m, 4H), 0.89 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.86 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 2H未觀察到。HRMS *m/z* 839.3266 [$(M+Na)^+$計算值$C_{46}H_{49}ClN_6NaO_6$ 839.3294]。

將**55f** (485 mg, 0.593 mmol)、**53h** (206 mg, 0.593 mmol)、EDCI.HCl (293 mg, 1.48 mmol)及TsOH (26 mg, 0.151 mmol)存於DMA (10 mL)中之混合物用氮沖洗並於r.t.下攪拌過夜。19.5 h後，將反應混合物用H_2O稀釋並藉由過濾收集所得固體，用H_2O及己烷:EtOAc 50:50洗滌。在矽膠塞上使用DCM:MeOH 100:0至90:10進行過濾管柱層析，從而產生(S)-1-((S)-1-(4-(((S)-1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚

-5-基氧基)甲基)苯基胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基胺基)-3-甲基-1-側氧基丁-2-基胺基甲酸(9H-茀-9-基)甲基酯**55g** (391 mg)，其粗製用於下一步驟。HRMS *m/z* 1144.4169 [$(M-H)^+$計算值 $C_{64}H_{64}Cl_2N_7O_9$ 1144.4148]。

於r.t.下向**55g** (910 mg, 0.793 mmol)存於DMF (6 mL)中之懸浮液中添加六氫吡啶(0.39 mL, 3.95 mmol)。10 min後，在真空下濃縮混合物。藉由矽膠上管柱層析使用DCM:MeOH 95:5至85:15進行純化，置換藉由製備型HPLC (管柱：Synergi-MAX RP 4 μ，21.20 × 250 mm；流速：12 mL/min；流動相：溶劑A：H_2O/TFA pH 2.47，溶劑B：MeCN/H_2O 90:10；方法：梯度，溶劑A:溶劑B 60:40至22:78至60:40，24 min；波長：254 nm，330 nm)進一步純化，從而產生乳膏固體狀(S)-2-((S)-2-胺基-3-甲基丁醯胺基)-N-(4-(((S)-1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基氧基)甲基)苯基)-5-脲基戊醯胺三氟乙酸酯**55h** (75 mg, 9%)。^{1}H NMR δ (400 MHz, DMSO-d_6) 10.35 (s, 1H), 10.24 (s, 1H), 8.69 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 8.20 (s, 1H), 8.15 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.09-8.02 (m, 4H), 7.86 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.78 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.65 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.57-7.47 (m, 3H), 7.40-7.37 (m, 1H), 7.34-7.30 (m, 1H), 6.04 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 5.48 (br s, 2H), 5.22 (s, 2H), 4.57-4.51 (m, 1H), 4.40-4.33 (m, 2H), 4.25-4.14 (m, 4H), 4.03-3.98 (m, 2H), 3.85 (dd, J = 10.7, 7.6 Hz, 1H), 3.79 (dd, J = 10.3, 8.6 Hz, 1H), 3.66 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 3.09-2.97 (m, 2H), 2.75-2.57 (m, 4H), 2.11-2.06 (m, 1H), 2.01-1.96 (m, 2H), 1.78-1.70 (m, 1H), 1.68-1.58 (m, 1H), 1.53-1.40 (m, 2H), 0.95 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.94 (d, J = 6.8 Hz, 3H)。HRMS *m/z* 924.3672 [$(M+H)^+$計算值$C_{49}H_{56}Cl_2N_7O_7$ 924.3613]。

向**55h** (74 mg, 0.0712 mmol)及6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯

-1-基)己酸2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯(33 mg, 0.107 mmol)中添加存於DMF (3 mL)中之二異丙基乙胺DIPEA (10 mg, 0.0774 mmol)，並於r.t.下在氮下攪拌所得混合物。5.5 h後，添加另一份DIPEA (0.9 mg, 0.00693 mmol)及6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己酸2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯(4.4 mg, 0.0143 mmol)。再1 h後，添加另一份6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己酸2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯(8 mg, 0.0259 mmol)並將混合物於-20℃下保持過夜。15 h後，使混合物升溫至r.t.並添加另一份6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己酸2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯(4.4 mg, 0.0143 mmol)。再1 h後，添加另一份6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己酸2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯(7.5 mg, 0.0243 mmol)。1 h後，添加己烷:EtOAc 95:5 (25 mL)，之後添加DCM (5 mL)並將混合物攪拌20 min。經此時段自溶液沈澱出固體。使混合物沉降且隨後傾析溶劑。隨後添加己烷:DCM 95:5，攪拌懸浮液，使其沉降並傾析溶劑並乾燥固體。藉由製備型HPLC (管柱：Synergi-MAX RP 4 μ，21.20 × 250 mm；流速：13 mL/min；流動相：溶劑A：H_2O/TFA pH 2.47，溶劑B：MeCN/H_2O 90:10；方法：等梯度，溶劑A:溶劑B 35:65，35 min；波長：254 nm，330 nm)進行純化，從而產生淺黃色粉末狀N-((S)-1-((S)-1-(4-(((S)-1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基氧基)甲基)苯基胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基胺基)-3-甲基-1-側氧基丁-2-基)-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺**55** (13.7 mg，17%，HPLC純度：92.5%)。^{1}H NMR δ (400 MHz, DMSO-d_6) 10.35 (s, 1H), 10.02 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 8.15 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.08 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 8.02 (s, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.81-7.77 (m, 2H), 7.66 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.57-7.53 (m, 1H), 7.50-7.47 (m, 3H), 7.40-7.36 (m, 1H), 7.33-7.30 (m,

1H), 6.99 (s, 2H), 5.97 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 5.40 (br s, 2H), 5.21 (s, 2H), 4.42-4.32 (m, 3H), 4.22-4.14 (m, 4H), 4.03-3.98 (m, 2H), 3.87-3.77 (m, 2H), 3.34 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 3.07-3.05 (m, 2H), 2.76-2.59 (m, 4H), 2.22-2.08 (m, 2H), 2.02-1.92 (m, 3H), 1.74-1.57 (m, 2H), 1.51-1.33 (m, 6H), 1.23-1.14 (m, 3H), 0.85 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 0.82 (d, J = 6.8 Hz, 3H)。HRMS *m/z* 1115.4170 [$(M-H)^+$ 計算值 $C_{59}H_{65}Cl_2N_8O_{10}$ 1115.4206]。

實例6 N-((S)-1-((S)-1-(4-(((S)-1-(氯甲基)-3-(6-((S)-7-甲氧基-5-側氧基-2,3,5,11a-四氫-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮呯-8-基氧基)己醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基氧基)甲基)苯基胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基胺基)-3-甲基-1-側氧基丁-2-基)-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺**56**

將(S)-8-(6-((S)-1-(氯甲基)-5-(4-硝基苄基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-6-側氧基己基氧基)-11-羥基-7-甲氧基-5-側氧基-2,3,11,11a-四氫-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮呯-10(5H)-甲酸第三丁基酯**54g** (829 mg, 1.00 mmol)還原(Zn/NH_4Cl)成相應苯胺(藉由針對上文**54h**之合成報導之方法)並溶解於無水DMA (3 mL)中。向此溶液中添加藉由將存於無水DMA (4 mL)中之(S)-2-(((9H-茀-9-基)甲氧基)羰基胺基)-5-脲基戊酸(Fmoc-L-瓜胺酸，1.19 g，3.00 mmol)及2-乙氧基-1-乙氧基羰基-1,2-二氫喹啉EEDQ (0.99g, 4.00 mmol)於r.t.下攪拌40 min形成之混合物。將最終反應混合物於r.t.下及在氮氣氛下攪拌19 h。將混合物倒入水中並於r.t.下攪拌5 h。收集固體，用水洗滌若干次，乾燥，並藉由二氧化矽管柱層析(DCM-MeOH梯度0-5%)進行純化，以產生純灰棕色固體狀(S)-8-(6-((S)-5-(4-((S)-2-(((9H-茀-9-基)甲氧基)羰基胺基)-5-脲基戊醯胺基)苄基氧基)-1-(氯甲基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-6-側氧基己基氧基)-11-羥基-7-甲氧基-5-側氧基-2,3,11,11a-四氫-1H-苯

并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮呯-10(5H)-甲酸第三丁基酯**56a** (0.91 g, 77%)，mp 172℃；^{1}H NMR [$(CD_3)_2SO$] δ 10.10 (s, 1 H), 8.22-8.11 (m, 2 H), 7.94-7.62 (m, 8 H), 7.59-7.46 (m, 3 H), 7.46-7.27 (m, 5 H), 7.04 (s, 1 H), 6.69 (s, 1 H), 6.39 (br s, 1 H), 5.99 (t, *J* = 5.6 Hz, 1 H), 5.51-5.32 (m, 3 H), 5.22 (s, 2 H), 4.42-3.90 (m, 10 H), 3.88-3.75 (m, 1 H), 3.79 (s, 3 H), 3.53-3.18 (m, 3 H), 3.15-2.87 (m, 2 H), 2.66-2.44 (m, 2 H, 部分被DMSO峰遮蓋), 2.11-1.20 (m, 14 H), 1.31 (s, 9 H)。分析型($C_{65}H_{72}ClN_7O_{12}\cdot½H_2O$)計算值：C，65.73；H，6.20；N，8.26。試驗值：C，65.64；H，6.19；N，8.27。

於0℃下在氮氣氛下向N-Fmoc **56a** (0.91 g, 0.77 mmol)存於無水DMA (9 mL)中之攪拌溶液中添加六氫吡啶存於DMA (1.0 mmol/mL溶液)中之溶液(3.85 mL, 3.85 mmol)。在添加後，將混合物於此溫度下進一步攪拌2 h且隨後倒入乙酸乙酯-石油醚(1:10)之混合物(150 mL)中並於0℃下攪拌30 min。自不溶性物質傾析並棄去溶劑。於r.t.下用更多乙酸乙酯-石油醚(1:3) (2x150 mL)重複洗滌步驟。收集固體，用乙酸乙酯-石油醚(1:3)洗滌，並乾燥，以產生無色固體狀(S)-8-(6-((S)-5-(4-((S)-2-胺基-5-脲基戊醯胺基)苄基氧基)-1-(氯甲基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-6-側氧基己基氧基)-11-羥基-7-甲氧基-5-側氧基-2,3,11,11a-四氫-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮呯-10(5H)-甲酸第三丁基酯**56b** (0.73 g, 99%)；mp 223℃(分解)；^{1}H NMR [$(CD_3)_2SO$] δ 10.60-9.30 (br s, 3 H), 8.24-8.12 (m, 2 H), 7.84 (d, *J* = 8.2 Hz, 1 H), 7.70 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H), 7.54 (br t, *J* = 7.5 Hz, 1 H), 7.50 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H), 7.39 (br t, *J* = 7.6 Hz, 1 H), 7.04 (s, 1 H), 6.69 (s, 1 H), 6.39 (br s, 1 H), 5.93 (t, *J* = 5.7 Hz, 1 H), 5.47-5.28 (m, 3 H), 5.21 (s, 2 H), 4.36 (t, *J* = 10.8 Hz, 1 H), 4.28-4.13 (m, 2 H), 4.10-3.92 (m, 3 H), 3.90-3.77 (m, 1 H), 3.79 (s, 3 H), 3.54-3.20 (m, 3 H, 部分被水峰遮蓋), 3.06-2.89 (m, 2 H),

2.70-2.49 (m, 3 H, 部分被DMSO峰遮蓋), 2.10-1.25 (m, 14 H), 1.31 (s, 9 H)。分析型($C_{50}H_{62}ClN_7O_{10}\cdot\frac{3}{4}H_2O$)計算值：C，61.91；H，6.60；N，10.11。試驗值：C，62.05；H，6.96；N，10.08。

將胺**56b** (0.73 g, 0.763 mmol)及(S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基胺基)-3-甲基丁酸2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯(Fmoc-Val-Osu，0.50 g，1.15 mmol)存於無水DMA (7 mL)中之混合物於r.t.下及在氮氣氛下攪拌18 h。添加乙酸乙酯-石油醚(1:2) (100 mL)並將混合物於r.t.下攪拌30 min。自不溶性物質傾析溶劑並用更多乙酸乙酯-石油醚(1:1) (2×100 mL)重複洗滌步驟。乾燥無色固體，以產生(S)-8-(6-((S)-5-(4-((S)-2-((S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苄基氧基)-1-(氯甲基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-6-側氧基己基氧基)-11-羥基-7-甲氧基-5-側氧基-2,3,11,11a-四氫-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮呯-10(5H)-甲酸第三丁基酯**56c** (0.89 g, 91%)；mp 191℃(分解)；^{1}H NMR [$(CD_3)_2SO$] δ 10.11 (s, 1 H), 8.22-8.08 (m, 3 H), 7.92-7.81 (m, 3 H), 7.74 (t, J = 7.4 Hz, 2 H), 7.65 (d, J = 8.4 Hz, 2 H), 7.54 (br t, J = 7.2 Hz, 1 H), 7.48 (d, J = 8.4 Hz, 2 H), 7.46-7.35 (m, 4 H), 7.32 (br t, J = 7.4 Hz, 2 H), 7.04 (s, 1 H), 6.69 (s, 1 H), 6.39 (br s, 1 H), 5.97 (br s, 1 H), 5.47-5.34 (m, 3 H), 5.21 (s, 2 H), 4.53-4.13 (m, 7 H), 4.10-3.75 (m, 5 H), 3.79 (s, 3 H), 3.53-3.20 (m, 3 H, 部分被水峰遮蓋), 3.10-2.87 (m, 2 H), 2.69-2.45 (m, 2 H, 部分被DMSO峰遮蓋), 2.10-1.25 (m, 15 H), 1.31 (s, 9 H), 0.88 (d, J = 6.8 Hz, 3 H), 0.85 (d, J = 6.7 Hz, 3 H)。分析型($C_{70}H_{81}ClN_8O_{13}\cdot\frac{3}{4}H_2O$) 計算值：C，65.10；H，6.44；N，8.68。試驗值：C，64.85；H，6.48；N，8.67。

於0℃下在氮氣氛下向N-Fmoc化合物**56c** (0.89 g, 0.70 mmol)存於無水DMA (6 mL)中之攪拌溶液中添加六氫吡啶存於DMA (1.0 mmol/mL溶液)中之溶液(3.48 mL, 3.48 mmol)。在添加後，將混合物

於此溫度下進一步攪拌1.5 h。添加乙酸乙酯-石油醚(1:2)之混合物(90 mL)並將混合物於0℃下攪拌10 min。自不溶性物質傾析並棄去溶劑層。於r.t.下用更多乙酸乙酯-石油醚(1:2) (2x90 mL)重複洗滌步驟。將留下之無色固體乾燥，以產生(S)-8-(6-((S)-5-(4-((S)-2-((S)-2-胺基-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苄基氧基)-1-(氯甲基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-6-側氧基己基氧基)-11-羥基-7-甲氧基-5-側氧基-2,3,11,11a-四氫-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮呯-10(5H)-甲酸第三丁基酯**56d** (0.68 g, 93%)；mp 225℃(分解)；^{1}H NMR [$(CD_3)_2SO$] δ 10.16 (s, 可與D_2O交換, 1 H), 8.23-8.07 (m, 3 H, 在D_2O後減少至2 H), 7.84 (d, *J* = 8.2 Hz, 1 H), 7.65 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H), 7.59-7.45 (m, 3 H), 7.37 (br t, *J* = 7.5 Hz, 1 H), 7.04 (s, 1 H), 6.69 (s, 1 H), 6.38 (br s, 可與D_2O交換, 1 H), 5.96 (t, *J* = 5.8 Hz, 可與D_2O交換, 1 H), 5.45-5.30 (m, 3 H, 在D_2O後以d減少至1 H, *J* = 9.6 Hz), 5.21 (s, 2 H), 4.41 (br s, 在D_2O後變為dd, *J* = 8.4, 5.4 Hz, 1 H), 4.36 (br t, *J* = 10.7 Hz, 1 H), 4.26-4.13 (m, 2 H), 4.10-3.91 (m, 3 H), 3.88-3.76 (m, 1 H), 3.79 (s, 3 H), 3.53-3.43 (m, 1 H), 3.41-3.20 (m, 2 H), 3.09-2.88 (m, 3 H), 2.70-2.50 (m, 2 H, 部分被DMSO峰遮蓋), 2.10-1.20 (m, 15 H), 1.31 (s, 9 H), 0.88 (d, *J* = 6.9 Hz, 3 H), 0.79 (d, *J* = 6.8 Hz, 3 H), 2 H未觀察到。分析型($C_{55}H_{71}ClN_8O_{11}\cdot H_2O$)計算值：C，61.53；H，6.85；N，10.44。試驗值：C，61.39；H，7.11；N，10.15。

將胺**56d** (0.68 g, 0.64 mmol)及6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己酸2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯(馬來醯亞胺基-Osu，0.50 g，1.61 mmol)存於無水DMA (6 mL)中之混合物於0℃下在氮氣氛下攪拌1 h。添加乙酸乙酯-石油醚(1:2)之混合物(90 mL)並將混合物於0℃下攪拌15 min。自不溶性物質傾析並棄去溶劑層。於r.t.下用更多乙酸乙酯-石油醚(1:1) (90 mL)及隨後純乙酸乙酯(50 mL)重複洗滌步驟。將留

下之灰棕色固體乾燥，以產生(S)-8-(6-((S)-1-(氯甲基)-5-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苄基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-6-側氧基己基氧基)-11-羥基-7-甲氧基-5-側氧基-2,3,11,11a-四氫-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮呯-10(5H)-甲酸第三丁基酯**52** (0.72 g, 90%)；HPLC：96.7%純；mp 210℃(分解)；^{1}H NMR [$(CD_3)_2SO$] δ 10.03 (s, 可與D_2O交換, 1 H), 8.23-8.11 (m, 2 H), 8.09 (d, *J* = 7.3 Hz, 可與D_2O交換, 1 H), 7.85 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H), 7.80 (d, *J* = 8.3 Hz, 可與D_2O交換, 1 H), 7.66 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H), 7.59-7.44 (m, 3 H), 7.38 (br t, *J* = 7.6 Hz, 1 H), 7.04 (s, 1 H), 6.99 (s, 2 H), 6.69 (s, 1 H), 6.38 (br s, 可與D_2O交換, 1 H), 5.99 (t, *J* = 5.5 Hz, 可與D_2O交換, 1 H), 5.49-5.34 (m, 3 H, 在D_2O後以d減少至1 H, *J* = 9.5 Hz), 5.20 (s, 2 H), 4.44-4.30 (m, 2 H), 4.26-4.13 (m, 3 H), 4.10-3.91 (m, 3 H), 3.88-3.76 (m, 1 H), 3.79 (s, 3 H), 3.53-3.44 (m, 1 H), 3.41-3.20 (m, 部分被水峰遮蓋，4 H), 3.09-2.88 (m, 2 H), 2.66-2.42 (m, 部分被DMSO峰遮蓋，2 H), 2.25-1.24 (m, 21 H), 1.31 (s, 9 H), 1.24-1.11 (m, 2 H), 0.86 (d, *J* = 6.8 Hz, 3 H), 0.82 (d, *J* = 6.7 Hz, 3 H)。分析型($C_{55}H_{71}ClN_8O_{11}\cdot H_2O$)計算值：C，61.53；H，6.85；N，10.44。試驗值：C，61.39；H，7.11；N，10.15。

於-10℃至-12℃ (浴溫)下經10 min向N-^{t}Boc衍生物**52** (125 mg, 0.10 mmol)存於DCM (10 mL)中之攪拌溶液中逐滴添加水存於TFA (10 mL)中之2.5%溶液。在添加後，將混合物於此溫度下進一步攪拌3 h。添加冷(-25℃)的乙酸乙酯-石油醚(1:10) (300 mL)，之後於-10℃ (浴溫)下緩慢添加飽和$NaHCO_3$水溶液，以產生pH 6-7。移除有機層並用更多乙酸乙酯-石油醚(1:1) (300 mL)重複洗滌步驟。收集固體，連續用水及乙酸乙酯洗滌若干次，並乾燥，以產生淺黃色固體狀粗產物(102 mg)。藉由製備型HPLC [Genentech]對其進行純化，以產生N-

((S)-1-((S)-1-(4-(((S)-1-(氯甲基)-3-(6-((S)-7-甲氧基-5-側氧基-2,3,5,11a-四氫-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮呼-8-基氧基)己醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基氧基)甲基)苯基胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基胺基)-3-甲基-1-側氧基丁-2-基)-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺**56** (4.1 mg, 3.6%)；HRMS (ESI) *m/z*計算值 $C_{60}H_{72}ClN_9NaO_{11}$：1152.4932，試驗值：1152.4906 [MNa^+]。計算值 $C_{60}H_{73}ClN_9O_{11}$：1130.5113，試驗值：1130.5077 [MH^+]。

實例7 (S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-N-甲基己醯胺基)乙基(甲基)胺基甲酸1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-(膦醯基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**57**

於室溫下向(S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-甲酸第三丁基酯**51a** (2.00 g, 5.99 mmol)存於DMF (5 mL)中之溶液中添加苄基溴(7.13 mL, 59.90 mmol)、碘化鉀KI (50 mg, 0.30 mmol)及碳酸鉀 K_2CO_3 (4.14 g, 30.00 mmol)。參見圖9。將混合物攪拌2 h且隨後用乙酸乙酯稀釋。過濾沈澱。將濾液重新分佈在乙酸乙酯與水之間。將水相用乙酸乙酯萃取三次。將合併之有機萃取物用水及鹽水洗滌，經無水Na_2SO_4乾燥，並經由矽藻土過濾。藉由旋轉蒸發器移除溶劑並泵送出過量苄基溴。藉由管柱層析使用乙酸乙酯及石油醚(v/v 1:10)之混合物作為洗脫劑純化所得殘餘物，以產生白色固體狀(S)-5-(苄基氧基)-1-(氯甲基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-甲酸第三丁基酯**57a** (1.97 g, 78%)；mp 186℃至188℃。^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 8.29 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.86 (br s, 1H), 7.65 (d, J = 8.29 Hz, 1H), 7.55-7.49 (m, 3H), 7.45-7.41 (m, 2H), 7.38-7.31 (m, 2H), 5.26 (s, 2H), 4.26 (br s, 1H), 4.13 (t, J = 10.8 Hz, 1H), 4.00-3.92 (m, 2H), 3.44 (t, J = 10.5 Hz, 1H), 1.61 (s, 9H) ppm。LRMS (APCI)試驗值*m/z* 424.8 (M + H)。$C_{25}H_{27}ClNO_3$需要

424.2。(Boger D.、Ishizakilb T.、Kitos P.及Suntornwat O.,(1990) *J. Org. Chem.*, *55*, 5823-5832)。

進一步用乙酸乙酯及石油醚(v/v 1:1)之混合物洗脫，從而產生圖9中所示之黃色油狀環丙基產物(345 mg, 19%)。(Lajiness J.及Boger D., (2011) *J. Org. Chem.*, 76, 583-587)。

向冰浴中冷卻之**57a** (1.60 g, 3.77 mmol)存於DCM (15 mL)中之溶液中添加存於二噁烷(40 mL)中之4N HCl。使混合物升溫至室溫並攪拌3 h。泵送出所有揮發性組份，以產生鹽酸鹽形式之(S)-5-(苄基氧基)-1-(氯甲基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚**57b**。將鹽溶解於THF (15 mL)中並在冰浴中冷卻。添加戊二酸酐(646 mg, 5.66 mmol)、DMAP (46 mg, 0.38 mmol)及吡啶(5 mL)並將所得混合物於室溫下攪拌4 h。在泵送出所有揮發性組份後，將殘餘物溶解於稀釋$NaHCO_3$水溶液中並用乙酸乙酯洗滌3次。將水相使用1N HCl酸化至pH 2並用乙酸乙酯萃取三次。將合併之乙酸乙酯萃取物用水及鹽水洗滌，經無水Na_2SO_4乾燥，並經由矽膠墊過濾，用MeOH及乙酸乙酯(v/v 1:10)之混合物洗滌。移除溶劑，以產生米色固體狀(S)-5-(5-(苄基氧基)-1-(氯甲基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊酸**57c** (978 mg, 59%)。

於-10℃下，向**57c** (978 mg, 2.23 mmol)存於THF (20 mL)中之溶液中添加25%甲酸銨水溶液(20 mL)，之後添加Pd-C觸媒(10%，濕，500 mg)並將混合物於-10℃下攪拌7 h。添加更多Pd-C觸媒(500 mg)並將混合物於相同溫度下攪拌過夜。經由矽藻土過濾出觸媒並用THF洗滌矽藻土。自濾液泵送出THF並將剩餘水溶液用乙酸乙酯萃取三次。將合併之萃取物用水及鹽水洗滌，經無水Na_2SO_4乾燥並過濾。移除溶劑，從而產生米色固體狀(S)-5-(1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊酸**53h**(487 mg, 63%)；^{1}H NMR (DMSO) δ 12.08 (br s, 1H), 10.35 (br s, 1H), 8.08 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.98 (s, 1H),

7.77 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.50-7.46 (m, 1H), 7.33-7.29 (m, 1H), 4.30 (t, J = 10.5 Hz, 1H), 4.14-4.12 (m, 2H), 3.98 (dd, J = 2.8, 10.9 Hz, 1H), 3.78 (dd, J = 7.8, 10.8 Hz, 1H), 2.63-2.54 (m, 2H), 2.34 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.99-1.83 (m, 2H) ppm。LRMS (APCI)試驗值*m/z* 348.6 (M + H)。$C_{18}H_{19}ClNO_4$需要348.1。

向**53h** (500 mg, 1.44 mmol)存於THF (15 mL)中之溶液中添加四唑(3%，存於乙腈中，51 mL，17.25 mmol)，之後添加亞磷醯胺二-第三丁基-N,N-二異丙基酯(5.73 mL, 17.25 mmol)。將混合物於室溫下攪拌過夜，隨後在冰浴中冷卻並逐滴添加H_2O_2 (30%水溶液，3.53 mL，34.5 mmol)。使所得混合物升溫至室溫並攪拌5 h。藉由在冰浴中冷卻的同時添加10%亞硫酸鈉水溶液驟冷反應物。藉由旋轉蒸發器移除有機揮發物，以產生含有懸浮油狀物之水相。添加石油醚並將混合物攪拌半小時。藉由過濾收集所形成之沈澱，用水及石油醚洗滌，並在真空下乾燥，以產生米色發泡體狀(S)-5-(1-(氯甲基)-5-(二-第三丁氧基磷醯基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊酸**57d** (660 mg, 85%)；^{1}H NMR (DMSO) δ 12.07 (br s, 1H), 8.56 (s, 1H), 8.04 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.93 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.60-7.56 (m, 1H), 7.50-7.46 (m, 1H), 4.38 (t, J = 9.8 Hz, 1H), 4.32-4.26 (m, 1H), 4.20-4.18 (m, 1H), 4.02 (dd, J = 2.9, 11.0 Hz, 1H), 3.90 (dd, J = 7.1, 11.0 Hz, 1H), 2.67-2.53 (m, 2H), 2.34 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.87-1.78 (m, 2H), 1.481及1.476 (2xs, 18H) ppm。^{31}P NMR (DMSO) δ -15.46 ppm。HRMS (ESI)試驗值*m/z* 562.1719 (M + Na)。$C_{26}H_{35}ClNNaO_7P$需要562.1732。

向冰浴中冷卻之6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己酸(1.00 g, 4.73 mmol)存於DCM (20 mL)中之懸浮液中添加一滴DMF且隨後逐滴添加草醯氯(2.03 mL, 23.67 mmol)。參見圖10。使混合物升溫至室溫並攪拌過夜，從而產生深褐色溶液。藉由旋轉蒸發器及隨後高

真空幫浦移除所有揮發性組份。將所得殘餘物溶解於DCM (5 mL)中並藉由旋轉蒸發器及隨後高真空幫浦移除溶劑。再次重複上述溶解及移除程序，以產生深褐色油狀粗製6-馬來醯亞胺基己醯氯。向冰浴中冷卻之甲基(2-(甲基胺基)乙基)胺基甲酸第三丁基酯(891 mg, 4.73 mmol)存於DCM (5 mL)中之溶液中逐滴添加上述製備之6-馬來醯亞胺基己醯氯存於DCM (20 mL)中之溶液。使所得混合物升溫至室溫並攪拌過夜。移除DCM並將殘留物溶解於乙酸乙酯中。將溶液用$NaHCO_3$水溶液、冷的5%檸檬酸水溶液及鹽水洗滌，隨後經無水Na_2SO_4乾燥，並經由矽膠墊過濾，用乙酸乙酯洗滌。移除溶劑，以產生褐色油狀2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-N-甲基己醯胺基)乙基(甲基)胺基甲酸第三丁基酯**57e** (1.33 g, 74%)；^{1}H NMR (DMSO) (旋轉異構物之混合物) δ 7.006 & 7.005 (2×s, 1H), 3.39-3.36 (m, 4H), 3.29-3.25 (m, 2H), 2.92-2.75 (m, 6H, 2NMe), 2.21 (t, J = 7.38 Hz, 2H), 1.50-1.44 (m, 4H), 1.37 (s, 9H), 1.24-1.16 (m, 2H) ppm。HRMS (ESI)試驗值m/z 382.2338 (M + H)。$C_{19}H_{32}N_3O_5$需要382.2336。

向冰浴中冷卻之**57e** (274 mg, 0.72 mmol)存於DCM (5 mL)中之溶液中逐滴添加TFA (5 mL)。將混合物於相同溫度下攪拌2 h，之後藉由旋轉蒸發器及隨後高真空幫浦移除所有揮發性組份。所得殘餘物6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-N-甲基-N-(2-(甲基胺基)乙基)己醯胺三氟乙酸酯**57f**按原樣使用。

於室溫下，將**51a** (200 mg, 0.60 mmol)溶解於DCM (5 mL)中並添加DIPEA (0.3 mL, 1.72 mmol)，之後添加氯甲酸4-硝基苯基酯(145 mg, 0.72 mmol)以形成(S)-1-(氯甲基)-5-((4-硝基苯氧基)羰基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-甲酸第三丁基酯**57g**。在將混合物攪拌5 h後，添加粗製**57f**存於DCM (5 mL)及DIPEA (0.7 mL, 4.02 mmol)中之溶液，以產生亮黃色溶液，將其攪拌過夜。移除所有揮發性組份。將殘餘物溶解於乙酸乙酯中並用5%氨水溶液及鹽水洗滌。藉由管柱層析使用乙

酸乙酯、DCM及石油醚(v/v/v 1:2:1)之混合物、之後乙酸乙酯及DCM (v/v 1:2)之混合物作為洗脫劑進一步純化所得粗物質，以產生米色固體狀(S)-1-(氯甲基)-5-((2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-N-甲基己醯胺基)乙基)(甲基)胺甲醯基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-甲酸第三丁基酯**57h** (223 mg, 58%)；mp 53℃至56℃。^{1}H NMR ($CDCl_3$) (旋轉異構物之混合物) δ 8.04 (br s, 1H), 7.86-7.78 (m, 1H), 7.72-7.68 (m, 1H), 7.53-7.48 (m, 1H), 7.40-7.34 (m, 1H), 6.67 (s, 2H), 4.25 (br s, 1H), 4.46-4.10 (m, 1H), 4.06-3.98 (m, 1H), 3.92-3.72 (表觀d, J = 11.2 Hz, 1H), 3.72-3.42 (m, 7H), 3.28, 3.10, 3.09, 2.99 (4×s, 6H, 2NMe), 2.38-2.21 (m, 2H), 1.67-1.54 (m, 4H), 1.57 (s, 9H), 1.33-1.25 (m, 2H) ppm。HRMS (ESI)試驗值 m/z 641.2728 (M + H)。$C_{33}H_{42}ClN_4O_7$需要641.2737。

向冰浴中冷卻之**57h** (110 mg, 0.17 mmol)存於DCM (2 mL)中之溶液中逐滴添加TFA (2 mL)。將混合物於相同溫度下攪拌2 h且隨後移除所有揮發性組份。將所得殘餘物重新分佈在乙酸乙酯與冷的$NaHCO_3$稀釋水溶液之間。將水相用乙酸乙酯萃取三次。將合併之有機萃取物用水、之後鹽水洗滌，經無水Na_2SO_4乾燥，並經由矽藻土過濾。移除溶劑，以產生黃色固體狀(S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-N-甲基己醯胺基)乙基(甲基)胺基甲酸1-(氯甲基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**57i** (86 mg, 92%)，其未經進一步純化即按原樣使用；^{1}H NMR ($CDCl_3$) (旋轉異構物之混合物) δ 7.76 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.63-7.59 (m, 1H), 7.48-7.41 (m, 1H), 7.25-7.20 (m, 1H), 6.79 (s, 1H), 6.68 (s, 2H), 4.01-3.94 (m, 1H), 3.88-3.78 (m, 3H), 3.74-3.68 (m, 2H), 3.62-3.47 (m, 5H), 3.28, 3.10, 3.06, 3.00 (4×s, 6H, 2NMe), 2.38-2.21 (m, 2H), 1.69-1.50 (m, 4H), 1.33-1.25 (m, 2H) ppm。HRMS (ESI)試驗值 m/z 541.2217 (M + H)。$C_{28}H_{34}ClN_4O_5$需要

541.2212。

向冰浴中冷卻之**57i** (83 mg, 0.15 mmol)存於DMA (3 mL)中之溶液中添加(S)-5-(1-(氯甲基)-5-(二-第三丁氧基磷醯基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊酸**57d** (99 mg, 0.18 mmol)，之後添加EDCI鹽酸鹽(88 mg, 0.46 mmol)及隨後添加對甲苯磺酸(2.6 mg, 0.015 mmol)。參見圖11。使混合物升溫至室溫並攪拌過夜。將混合物重新分佈在乙酸乙酯與冷的$NaHCO_3$稀釋水溶液之間。將水相用乙酸乙酯萃取三次。將合併之有機萃取物用水、之後鹽水洗滌，經無水Na_2SO_4乾燥，並經由矽藻土過濾。移除溶劑並將所得殘餘物與石油醚一起研磨。自DCM及異丙醇重新沈澱所得固體，以產生黃色固體狀(S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-N-甲基己醯胺基)乙基(甲基)胺基甲酸1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-(二-第三丁氧基磷醯基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**57j** (116 mg, 71%)；mp 81℃(分解)。^{1}H NMR ($CDCl_3$) (旋轉異構物之混合物) δ 8.63 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 8.23 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.89-7.82 (m, 1H), 7.72-7.67 (m, 2H), 7.54-7.50 (m, 2H), 7.43-7.39 (m, 2H), 6.66 (s, 2H), 4.34-4.25 (m, 4H), 4.10-4.05 (m, 2H), 3.98-3.93 (m, 2H), 3.72-3.69 (m, 2H), 3.50-3.46 (m, 5H), 3.28, 3.10, 3.09, 2.99 (4×s, 6H, 2NMe), 2.79-2.73 (m, 2H), 2.70-2.62 (m, 2H), 2.38-2.32 (m, 1H), 2.27-2.20 (m, 3H), 1.67-1.54 (m, 3H), 1.56 (s, 9H), 1.55 (s, 9H), 1.33-1.25 (m, 4H) ppm。^{31}P NMR ($CDCl_3$) δ -15.71 ppm。HRMS (ESI)試驗值 *m/z* 1084.3755 (M + Na)。$C_{54}H_{66}Cl_2N_5NaO_{11}P$需要1084.3766。

向冰浴中冷卻之**57j** (55 mg, 0.052 mmol)存於DCM (1 mL)中之溶液中逐滴添加TFA (1 mL)。將混合物於相同溫度下攪拌1.5 h且隨後移除所有揮發性組份。自DCM及乙酸乙酯重新沈澱所得殘餘物，以產

生灰色固體狀(S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-N-甲基己醯胺基)乙基(甲基)胺基甲酸1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-(膦醯基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**57** (33 mg，67%，HPLC純度：89%)；mp 191℃至194℃(分解)。^{1}H NMR (DMSO) (旋轉異構物之混合物) δ 8.49 (s, 1H), 8.23-8.21 (m, 1H), 8.10 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.95-7.76 (m, 3H), 7.59-7.53 (m, 2H), 7.45-7.39 (m, 2H), 6.97, 6.96, 6.94, 6.90 (4×s, 總共2H, 馬來醯亞胺基), 4.34-4.21 (m, 4H), 4.06-4.01 (m, 2H), 3.95-3.85 (m, 2H), 3.71-3.61 (m, 2H), 3.54-3.30 (m, 5H), 3.23, 3.18, 3.04, 3.00, 2.97, 2.95, 2.89, 2.85 (8×s, 總共6H, 2NMe), 2.37-2.28 (m, 2H), 2.19 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 2.00-1.95 (m, 2H), 1.50-1.40 (m, 5H), 1.25-1.15 (m, 5H)ppm。^{31}P NMR (DMSO) δ -5.79 ppm。HRMS (ESI)試驗值*m/z* 972.2488 (M + Na)。$C_{46}H_{50}Cl_2N_5NaO_{11}P$需要972.2514。

實例8 (S)-4-甲基六氫吡嗪-1-甲酸1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苄基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**58**

將(*S*)-1-(氯甲基)-5-羥基-1*H*-苯并[*e*]吲哚-3(2*H*)-甲酸第三丁基酯**51a** (3.338 g, 10 mmol)、4-甲基六氫吡嗪-1-羰基氯鹽酸鹽(5.98 g, 30 mmol)、Et_3N (3.5 g, 35 mmol及DMAP (1.34 g, 11 mmol)存於CH_2Cl_2 (80 mL)中之混合物於室溫下攪拌2天。參見圖12。將混合物用水洗滌並將溶劑乾燥並在真空下移除，以產生定量產率之(S)-1-(氯甲基)-5-(4-甲基六氫吡嗪-1-羰基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-甲酸第三丁基酯**58a** (Boger D.L.等人，Synthesis, (1999), 1505-1509)：mp 98℃；^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 8.11 (br, 1H), 7.84 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.70 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.50 (ddd, J = 8.2, 6.9, 1.1 Hz, 1H), 7.37 (ddd, J = 8.1,

6.9, 1.0 Hz, 1H), 4.34-4.20 (m, 1H), 4.17-4.10 (m, 1H), 4.01-3.98 (m, 1H), 3.94 (dd, *J* = 9.6, 2.4 Hz, 1H), 3.87-3.80 (br, 2H), 3.68-3.60 (br, 2H), 3.47 (t, *J* = 10.8 Hz, 1H), 2.57-2.48 (m, 4H), 2.83 (s, 3H), 1.58 (s, 9H)；MS (APCI+) m/z 461.2 MH^+。分析型計算值$C_{24}H_{30}ClN_3O_4$：C，62.7；H，6.6；N，9.1。試驗值：C，62.5；H，6.8；N，9.2%。

於0℃下將**58a** (2.30 g, 5 mmol)存於CH_2Cl_2 (50 mL) 中之溶液用過量三氟乙酸(TFA)處理4 h，並用冷的NH_3水溶液中和混合物。用己烷稀釋，從而引起固體沈澱，藉由過濾收集，用水及己烷洗滌，並乾燥，以產生(S)-4-甲基六氫吡嗪-1-甲酸1-(氯甲基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**58b** (1.60 g, 89%)：mp 144℃至147℃；^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.69 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.63 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.45 (ddd, *J* = 8.3, 6.9, 1.2 Hz, 1H), 7.25 (ddd, *J* = 8.4, 6.8, 1.2 Hz, 1H), 6.82 (s, 1H), 5.30 (s, 1H), 4.17-4.05 (m, 2H), 4.03-3.96 (m, 2H), 3.89-3.77 (m, 4H), 3.54 (t, *J* = 10.9 Hz, 1H), 3.20-2.90 (m, 4H), 2.76 (s, 3H)。分析型計算值$C_{19}H_{22}ClN_3O_2$：C，63.4；H，6.2；N，11.7。試驗值：C，63.2；H，6.2；N，11.5%。

將**55a** (4.689 g, 10 mmol)存於二噁烷(30 mL)中之溶液用HCl (4M，存於二噁烷中，10 mL)處理並將混合物於室溫下攪拌過夜。添加氫氧化銨，移除溶劑以產生(S)-1-(氯甲基)-5-(4-硝基苄基氧基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚**54f**，將其與存於CH_2Cl_2 (50 mL)中之戊二酸酐(3.4 g, 30 mmol)混合。在冷卻至0℃後，添加Et_3N (5.05 g, 50 mmol)並使混合物緩慢升溫並於室溫下攪拌過夜。添加稀HCl，以產生固體，藉由過濾收集，用水及CH_2Cl_2洗滌並乾燥，以產生(S)-5-(1-(氯甲基)-5-(4-硝基苄基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊酸**58c** (2.95 g, 61 %)：^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 12.07 (br s, 1H), 8.30 (br d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 8.24 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.89-7.85 (m, 3H), 7.57

(ddd, J = 8.2, 6.9, 1.1 Hz, 1H), 7.43 (ddd, J = 8.1, 7.1, 1.0 Hz, 1H), 5.46 (s, 2H), 4.34 (t, J = 9.7 Hz, 1H), 4.25-4.13 (m, 2H), 4.01 (dd, J = 11.0, 2.8 Hz, 1H), 3.85 (dd, J = 10.9, 7.4 Hz, 1H), 2.66-2.57 (m, 1H), 2.55-2.46 (m, 1H), 2.35 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.87-1.79 (m, 2H)。

將存於DMA (25 mL)中之**58b** (1.33 g, 3.7 mmol)及**58c** (1.63 g, 3.38 mmol)與1-(3-二甲基胺基丙基)-3-乙基碳化二亞胺鹽酸鹽(EDCI.HCl, 3.26 g, 17.0 mmol)之混合物於室溫下攪拌過夜。將混合物用$NaHCO_3$水溶液稀釋並將所得沈澱連續用水及甲醇洗滌並乾燥。在二氧化矽上首先用EtOAc/MeOH 9:1及隨後用EtOAc/MeOH 4:1洗脫進行層析，從而產生(S)-4-甲基六氫吡嗪-1-甲酸1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-(4-硝基苄基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**58d** (0.98 g, 35 %)：^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 8.35 (s, 1H), 8.33-8.27 (m, 3H), 8.17 (s, 1H), 7.85 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.73-7.68 (m, 4H), 7.58-7.49 (m, 2H), 7.45-7.38 (m, 2H), 5.33 (q, J = 13.0 Hz, 2H), 4.39-4.27 (m, 4H), 4.14-4.06 (m, 2H), 4.01-3.95 (m, 2H), 3.83-3.77 (m, 2H), 3.64-3.59 (m, 2H), 3.48 (dt, J = 10.5, 7.3 Hz, 2H), 2.85-2.65 (m, 4H), 2.55-2.47 (m, 4H), 2.38 (s, 3H), 2.28-2.21 (m, 2H)。

於0℃下將**58d** (0.41 g, 5 mmol)存於THF (35 mL)、MeOH (15 mL)及水(5 mL)中之混合物中之懸浮液用鋁汞齊(2 g)處理並經3 h使攪拌之混合物升溫至室溫。在用MeOH稀釋後，將混合物經由矽藻土過濾並將濾液蒸發至乾燥，以產生(S)-4-甲基六氫吡嗪-1-甲酸3-(5-((S)-5-(4-胺基苄基氧基)-1-(氯甲基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-1-(氯甲基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**58e** (0.31 g, 78 %)，其直接用於下一步驟：^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 8.37 (s, 1H), 8.26 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 8.18 (s, 1H), 7.86 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.67 (d, J = 8.3 Hz,

1H), 7.60 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.49-7.43 (m, 2H), 7.39 (br t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.34-7.26 (m, 3H), 6.68 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 5.10 (q, *J* = 10.9 Hz, 2H), 4.32-4.15 (m, 4H), 4.07-3.97 (m, 2H), 3.94-3.90 (m, 2H), 3.86-3.79 (m, 2H), 3.66-3.60 (m, 2H), 3.50-3.40 (m, 2H), 2.77-2.58 (m, 4H), 2.56-2.48 (m, 4H), 2.27 (s, 3H), 2.22-2.14 (m, 2H)。

將2-乙氧基-1-乙氧基羰基-1,2-二氫喹啉(EEDQ, 0.58 g, 2.3 mmol)及(S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基胺基)-5-脲基戊酸(Fmoc-L-瓜胺酸，0.69 g，1.7 mmol)之混合物於無水DMA (10 mL)中在氮下攪拌10 min直至所有固體皆溶解為止。參見圖13。添加粗製**58e** (0.31 g, 0.39 mmol)並繼續攪拌過夜。將混合物用EtOAc稀釋並添加水以使產物沈澱，將其藉由過濾收集並與沸騰MeOH一起研磨，以產生粗製(S)-4-甲基六氫吡嗪-1-甲酸3-(5-((S)-5-(4-((S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基胺基)-5-脲基戊醯胺基)苄基氧基)-1-(氯甲基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-1-(氯甲基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**58f** (0.62 g, >100%)，將其於室溫下用存於無水DMF (20 mL)中之六氫吡啶(50 mg, 0.59 mmol)處理30 min。用EtOAc、己烷及水稀釋，從而產生沈澱，將其藉由過濾收集並用己烷及水洗滌，以產生粗製(S)-4-甲基六氫吡嗪-1-甲酸3-(5-((S)-5-(4-((S)-2-胺基-5-脲基戊醯胺基)苄基氧基)-1-(氯甲基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-1-(氯甲基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**58g** (0.33 g，89%，藉由HPLC為85%純度)，將其用1.5當量存於無水DMA (10 mL)中之Fmoc-Val-OSu (*N*-α-Fmoc-L-纈胺酸*N*-羥基琥珀醯亞胺酯，0.23 g，0.53 mmol)處理過夜。用EtOAc及水稀釋，從而產生固體，將其藉由過濾收集並乾燥，以產生粗製(S)-4-甲基六氫吡嗪-1-甲酸3-(5-((S)-5-(4-((S)-2-((S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苄基氧基)-1-(氯甲基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-1-(氯

甲基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**58h** (0.38 g, 85%)：^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 10.11 (s, 1H), 8.24-8.11 (m, 3H), 7.96 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.90-7.80 (m, 4H), 7.74 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 7.65 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.61-7.53 (m, 2H), 7.50-7.36 (m, 6H), 7.32 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 5.97 (t, J = 5.4 Hz, 1H), 5.40 (s, 2H), 5.20 (s, 2H), 4.44-4.19 (m, 9H), 4.08-3.81 (m, 5H), 3.74-3.70 (br, 2H), 3.50-3.42 (br, 2H), 3.07-2.89 (m, 2H), 2.77-2.55 (m, 4H), 2.52-2.36 (m, 4H), 2.25 (s, 3H), 2.03-1.94 (m, 3H), 1.76-1.53 (m, 2H), 1.49-1.30 (m, 2H), 0.87 (dd, J = 11.2, 6.8 Hz, 6H)。

將粗製**58h**(0.38 g, 0.3 mmol)與六氫吡啶在DMA中於室溫下反應1 h且將混合物用EtOAc及水稀釋，以產生固體，將其收集並乾燥，以產生(S)-4-甲基六氫吡嗪-1-甲酸3-(5-((S)-5-(4-((S)-2-((S)-2-胺基-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苄基氧基)-1-(氯甲基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-1-(氯甲基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**58i** (0.23 g，73%，藉由HPLC為83%純度)：^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 9.34 (br, 1H), 8.35 (br s, 1H), 8.28 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 8.14 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.86 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.75 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.70 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.65-7.60 (m, 2H), 7.54-7.47 (m, 2H), 7.46-7.33 (m, 4H), 7.29 (td, J = 7.4, 1.3 Hz, 1H), 5.20 (br s, 2H), 5.17-5.09 (m, 1H), 4.82-4.73 (m, 1H), 4.59-4.50 (m, 1H), 4.33-4.15 (m. 3H), 4.07-4.01 (m, 1H), 3.98-3.90 (m, 2H), 3.86-3.76 (m, 3H), 3.65-3.57 (m, 2H), 3.55-3.39 (m, 3H), 3.25 (br s, 1H), 2.81-2.60 (m, 3H), 2.59-2.41 (m, 6H), 2.37 (s, 3H), 2.27-2.16 (m, 3H), 1.55-1.48 (m, 2H), 0.98 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 0.83 (d, J = 6.6 Hz, 3H)。

將粗製**58i** (0.105 g, 0.1 mmol)及6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己酸2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯(62 mg, 0.2 mmol)存於無水DMF (10 mL)中之混合物於室溫下攪拌過夜並將混合物用EtOAc及水

稀釋，以產生固體，將其收集並乾燥，以產生粗物質(70 mg，藉由HPLC為71%純度)，藉由製備型HPLC對其進行純化，以產生(S)-4-甲基六氫吡嗪-1-甲酸1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苄基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**58**。MS *m/z* 1243.4 [$(M+H)^+$計算值$C_{65}H_{76}Cl_2N_{10}O_{11}$ 1243.5]。

實例9　(S)-磷酸二氫1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苄基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**59**

向(S)-5-(4-((S)-2-((S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苄基氧基)-1-(氯甲基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-甲酸第三丁基酯**55e** (1.00 g, 1.09 mmol)存於DMF (10 mL)中之溶液中添加六氫吡啶(1.08 mL, 10.90 mmol)。參見圖14。將混合物於室溫下攪拌2 h且隨後泵送出所有揮發性組份。將所得殘餘物與醚一起研磨，以產生白色固體狀(S)-5-(4-((S)-2-((S)-2-胺基-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苄基氧基)-1-(氯甲基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-甲酸第三丁基酯**59a** (700 mg, 92%)。^{1}H NMR (DMSO) δ 10.17 (s, 1H), 8.17 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.12 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.82 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.66 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.55-7.49 (m, 3H), 7.37-7.33 (m, 1H),5.98 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 5.41 (s, 2H), 5.22 (s, 2H),4.51-4.48 (m, 1H), 4.19-3.98 (m, 4H), 3.84-3.80 (m, 1H), 3.08-2.90 (m, 3H), 1.99-1.91 (m, 2H),1.75-1.65 (m, 2H), 1.55 (s, 9H), 1.49-1.33 (m, 2H), 0.89 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.80 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H) ppm。

將**59a** (688 mg, 0.99 mmol)、6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-

1-基)己酸2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯(SuOMC, 320 mg, 1.04 mmol)及DIPEA (190 μL, 1.09 mmol)存於DMSO (10 mL)中之混合物於室溫下攪拌過夜。泵送出所有揮發性組份。將所得殘餘物與一起乙酸乙酯研磨，以產生米色固體狀(S)-1-(氯甲基)-5-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苄基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-甲酸第三丁基酯**59b** (832 mg, 95%)。^{1}H NMR (DMSO) δ 10.03 (s, 1H), 8.13-8.08 (m, 2H), 7.83-7.79 (m, 2H), 7.66 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.55-7.48 (m, 3H), 7.35 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 6.99 (s, 2H), 5.97 (t, J = 5.4 Hz, 1H), 5.41 (s, 2H), 5.21 (s, 2H),4.43-4.38 (m, 1H), 4.22-3.98 (m, 4H), 3.84-3.80 (m, 1H),3.38-3.33 (m, 3H),3.08-2.90 (m, 2H), 2.24-2.06 (m, 2H), 2.01-1.91 (m, 1H), 1.74-1.14 (m, 10H), 1.55 (s, 9H), 0.86 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.83 (d, J = 6.7 Hz, 3H) ppm。HRMS (ESI)試驗值 m/z 910.3897 (M + Na)。$C_{46}H_{58}ClN_7NaO_9$需要910.3877。

向冰浴中冷卻之**59b** (100 mg, 0.11 mmol)存於DCM (2 mL)中之懸浮液中添加TFA (2 mL)。將混合物在冰浴中攪拌3 h。泵送出所有揮發性組份。將所得殘餘物溶解於THF中並重新分佈在乙酸乙酯與冷的5%氨水溶液之間。將水相用乙酸乙酯萃取三次。將合併之有機萃取物用水及鹽水洗滌，經無水Na_2SO_4乾燥，經由矽藻土過濾並移除溶劑，以產生淺綠色-褐色固體狀N-((S)-1-((S)-1-(4-(((S)-1-(氯甲基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基氧基)甲基)苯基胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基胺基)-3-甲基-1-側氧基丁-2-基)-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺**59c** (80 mg, 90%)，其直接使用。^{1}H NMR (DMSO) δ 10.02 (s, 1H), 8.09-8.07 (m, 1H), 7.99 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.80 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.65 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.56 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.45 (d, J = 8.4 Hz, 2H),7.38 (t, J = 7.1 Hz, 1H),7.09 (t, J = 7.4 Hz, 1H),6.99 (s,

2H), 5.97 (br s, 1H), 5.41 (s, 2H), 5.16 (s, 2H), 4.46-4.35 (m, 1H), 4.21-4.17 (m, 1H), 3.96-3.87 (m, 1H), 3.84-3.80 (m, 1H), 3.70-3.65 (m, 1H), 3.60-3.49 (m, 1H),3.38-3.33 (m, 3H), 3.06-2.92 (m, 2H), 2.22-2.08 (m, 2H), 2.02-1.92 (m, 1H), 1.75-1.14 (m, 10H), 0.86 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 0.82 (d, J = 6.7 Hz, 3H) ppm。HRMS (ESI)試驗值m/z 810.3332 (M + Na)。$C_{41}H_{50}ClN_7NaO_7$需要810.3352。

於室溫下，向**59c** (75 mg, 0.095 mmol)及(S)-5-(1-(氯甲基)-5-(二-第三丁氧基磷醯基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊酸**57d** (62 mg, 0.11 mmol)存於DMA (3 mL)中之溶液中添加EDCI鹽酸鹽(40 mg, 0.21 mmol)且隨後添加對甲苯磺酸(1.6 mg, 0.0095 mmol)。在將混合物攪拌5 h後，添加更多EDCI鹽酸鹽(35 mg, 0.18 mmol)並將混合物攪拌過夜。泵送出所有揮發性組份。將所得殘餘物溶解於THF中並重新分佈在乙酸乙酯與冷的稀釋$NaHCO_3$水溶液之間。將水相用乙酸乙酯萃取三次。將合併之有機萃取物用水及鹽水洗滌，經無水Na_2SO_4乾燥，經由矽藻土過濾並移除溶劑，以產生褐色固體狀磷酸二-第三丁基酯(S)-1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苄基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**59d** (104 mg, 83%)，其直接使用。^{1}H NMR (DMSO) δ 10.03 (s, 1H), 8.60 (s, 1H), 8.19-7.38 (m, 14H), 6.87 (s, 2H), 5.97 (br s, 1H), 5.40 (s, 2H), 5.20 (br s, 2H), 4.45-3.82 (m, 10H), 3.38-3.33 (m, 3H), 3.07-2.90 (m, 2H), 2.75-2.50 (m, 2H), 2.20-2.08 (m, 4H), 2.02-1.92 (m, 2H), 1.75-1.10 (m, 12H), 1.48 (s, 18H), 0.86-0.82 (m, 6H) ppm。^{31}P NMR (DMSO) δ -15.46 ppm。HRMS (ESI)試驗值m/z 1331.5071 (M + Na)。$C_{67}H_{83}Cl_2N_8NaO_{13}P$需要1331.5086。

向冰浴中冷卻之**59d** (95 mg, 0.073 mmol)存於DCM (2 mL)中之懸

浮液中添加TFA (1 mL)。將混合物在冰浴中攪拌1.5 h。泵送出所有揮發性組份。將所得殘餘物與乙酸乙酯一起研磨以產生藍灰色固體(77 mg, 90%)，藉由製備型HPLC (管柱：Synergi-Max RP 4 μ，250 × 21.20 mm；流動相：A/B = 30:70 (A：H_2O-TFA pH 2.56，B：90%乙腈，存於水中)；流速13 mL/min)對其進行進一步純化，以產生米色固體狀(S)-磷酸二氫1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苄基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**59** (5 mg，HPLC 純度97%)。^{1}H NMR (DMSO) δ 10.04 (s, 1H), 8.49 (s, 1H), 8.19-8.09 (m, 4H), 7.87-7.81 (m, 2H), 7.66 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.56-7.48 (m, 4H), 7.40-7.36 (m, 2H), 6.98 (s, 2H), 6.01 (br s, 1H), 5.43 (br s, 2H), 5.22 (s, 2H), 4.42-3.34 (m, 2H), 4.25-4.12 (m, 4H), 4.03-3.98 (m, 2H), 3.88-3.81 (m, 2H), 3.38-3.33 (m, 3H), 3.10-2.90 (m, 2H), 2.75-2.55 (m, 4H), 2.20-2.08 (m, 2H), 2.00-1.92 (m, 2H), 1.75-1.10 (m, 12H), 0.88-0.81 (m, 6H) ppm。^{31}P NMR (DMSO) δ -5.60 ppm。HRMS (ESI)試驗值 *m/z* 1219.3794 (M + Na)。$C_{59}H_{67}Cl_2N_8NaO_{13}P$需要1219.3834

實例10 N-((S)-1-((S)-1-(4-(((S)-1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基氧基)甲基)苯基胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基胺基)-3-甲基-1-側氧基丁-2-基)-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺 **60**

使(S)-磷酸二氫1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苄基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**59**以酶促方式去磷酸化，以產

生**60**。

實例11 (S)-1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-(膦醯基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基胺基甲酸2-(吡啶-2-基二硫烷基)乙基酯**61**

於r.t.下向(S)-5-胺基-1-(氯甲基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-甲酸第三丁基酯**61a** (150 mg, 0.451 mmol)及DMAP (386 mg, 3.16 mmol)存於無水DCM (30 mL)中之混合物中添加三光氣(136 mg, 0.458 mmol)存於無水DCM (10 mL)中之溶液。參見圖15。45 min後，添加2-(吡啶-2-基二硫烷基)乙醇(Chem. Eur. J. (2006) 12:3655-3671) (350 mg, 1.87 mmol)存於無水DCM (10 mL)中之溶液並將反應混合物攪拌過夜。20 h後，將混合物用MeOH (30 mL)稀釋並在真空下移除溶劑。藉由矽膠上管柱層析使用己烷:DCM 100:0至0:100、隨後DCM:EtOAc 100:0至95:5進行純化，從而產生化合物**61b**及起始材料2-(吡啶-2-基二硫烷基)乙醇(389 mg)之混合物。此混合物用於下一步驟。於0℃下向產物**61b**、2-(吡啶-2-基二硫烷基)乙醇及咪唑(118 mg, 1.74 mmol)存於DMF (4 mL)中之攪拌混合物中添加TBDMSCl (262 mg, 1.74 mmol)存於DMF (1.5 mL)中之溶液。使混合物升溫至r.t.，攪拌45 min且隨後用EtOAc及H_2O稀釋。分離各層並將有機層用H_2O (3 ×)洗滌，乾燥(Na_2SO_4)並在真空下移除溶劑。藉由矽膠上管柱層析使用己烷:DCM 50:50至0:100、隨後DCM:EtOAc 98:2至94:6進行純化，從而產生淺黃色發泡體固體狀(S)-1-(氯甲基)-5-((2-(吡啶-2-基二硫烷基)乙氧基)羰基胺基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-甲酸第三丁基酯**61b** (190 mg，經2個步驟自**61a**為77%)。^{1}H NMR δ (400 MHz, $CDCl_3$) 8.49 (br s, 1H), 8.48-8.47 (m, 1H), 7.84 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.71 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.63 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.54-7.50 (m, 1H), 7.40 (ddd, *J* = 8.2, 6.8, 1.1 Hz, 1H), 7.09 (ddd, *J* = 7.3, 4.9, 1.0 Hz, 1H), 6.93 (br s, 1H), 4.48 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H),

4.31-4.27 (m, 1H), 4.15-4.10 (m, 1H), 4.04-3.98 (m, 1H), 3.91 (dd, *J* = 11.1, 2.4 Hz, 1H), 3.45 (t, *J* = 10.7 Hz, 1H), 3.13 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 1.60 (s, 9H)。

於0℃下向**61b** (180 mg, 0.330 mmol)存於DCM (9.5 mL)中之溶液中緩慢添加TFA (4.8 mL)並將混合物於此溫度下攪拌1 h。隨後將反應混合物用DCM及H_2O稀釋並用飽和$NaHCO_3$水溶液中和直至pH 7-8。分離各層並將有機層用H_2O (1 ×)洗滌，乾燥(Na_2SO_4)並在真空下移除溶劑，以產生黃色固體狀(S)-1-(氯甲基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基胺基甲酸2-(吡啶-2-基二硫烷基)乙基酯**61c** (113 mg, 77%)，其未經純化即用於下一步驟。^{1}H NMR δ (400 MHz, DMSO-d_6) 9.52 (s, 1H), 8.48-8.46 (m, 1H), 7.88 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.83-7.78 (m, 2H), 7.64 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.39 (ddd, *J* = 8.1, 6.9, 1.0 Hz, 1H), 7.25 (ddd, J = 6.5, 4.8, 2.2 Hz, 1H), 7.14 (ddd, *J* = 8.2, 6.8, 1.0 Hz, 1H), 7.09 (s, 1H), 5.94 (br s, 1H), 4.33 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 4.02-3.96 (m, 1H), 3.85 (dd, *J* = 10.8, 3.5 Hz, 1H), 3.70 (t, *J* = 9.3 Hz, 1H), 3.63-3.55 (m, 2H), 3.18 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H)。

於r.t.下、在氮下向**61c** (110 mg, 0.247 mmol)及EDCI.HCl (116 mg, 0.605 mmol)之混合物中添加(S)-5-(1-(氯甲基)-5-(二-第三丁氧基磷醯基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊酸**57d** (135 mg, 0.250 mmol)存於DMA (6 mL)中之溶液並將混合物攪拌過夜。18.5 h後，添加**57d** (40 mg, 0.0741 mmol)存於DMA (0.5 mL)中之額外溶液及固體EDCI.HCl (28.4 mg, 0.148 mmol)並將混合物於r.t下在氮下攪拌。另一6 h後，添加另一份存於DMA (0.5 mL)中之**57d** (7 mg, 0.0130 mmol)及固體EDCI.HCl (24 mg, 0.125 mmol)並將混合物再攪拌2天及16.5 h。隨後將混合物用H_2O稀釋並沈澱出固體。藉由過濾收集固體，用H_2O、飽和$NaHCO_3$水溶液、H_2O及己烷洗滌。將固體溶解於

EtOAc中，將溶液用飽和$NaHCO_3$水溶液(3 ×)及H_2O (1 ×)洗滌且隨後乾燥(Na_2SO_4)並在真空下移除溶劑。隨後將固體重新溶解於DCM中並用用更多飽和$NaHCO_3$水溶液(3 ×)洗滌，乾燥(Na_2SO_4)並在真空下移除溶劑。隨後將固體與己烷:EtOAc 95:5至90:10一起研磨，以產生灰棕色固體狀(S)-1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-(二-第三丁氧基磷醯基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基胺基甲酸2-(吡啶-2-基二硫烷基)乙基酯**61d** (117 mg，HPLC純度：86.1%)，其未經進一步純化即用於下一步驟。HRMS *m/z* 989.2289 [$(M+Na)^+$計算值$C_{47}H_{53}Cl_2N_4NaO_8PS_2$ 989.2312]。

於0℃下向**61d**存於DCM (2 mL)中之攪拌溶液中逐滴添加TFA (1 mL)並將混合物於此溫度下攪拌70 min。隨後於25℃下在真空下移除溶劑。將所得黑色殘餘物溶解於DCM中並用EtOAc稀釋溶液。在真空下移除DCM，以產生存於EtOAc中之懸浮液。藉由過濾收集固體，與EtOAc及己烷一起研磨並乾燥，以產生綠色固體。藉由製備型HPLC (管柱：Synergi-MAX RP 4 μ，21.20 × 250 mm；流速：12 mL/min；流動相：溶劑A：H_2O/TFA pH 2.6，溶劑B：MeCN/H_2O 90:10；方法：梯度，溶劑A:溶劑B 60:40至2:98，35 min；波長：254 nm，330 nm)對其進一步純化，以產生**61**，16 mg，經2個步驟自**61c**為8%，HPLC純度：97.2%)。^{1}H NMR δ (400 MHz, DMSO-d_6) 9.69 (s, 1H), 8.57-8.46 (m, 3H), 8.09 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.01 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.91 (dd, J = 8.3, 2.4 Hz, 2H), 7.82 (d, J = 3.3 Hz, 2H), 7.59-7.52 (m, 2H), 7.47-7.40 (m, 2H), 7.27-7.23 (m, 1H), 4.42-4.22 (m, 8H), 4.06-4.01 (m, 2H), 3.90 (td, J = 11.2, 7.4 Hz, 2H), 3.19 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 2.77-2.59 (m, 4H), 2.01-1.94 (m, 2H)。2個質子未觀察到。^{31}P NMR δ (400 MHz, DMSO-d_6) -6.01。HRMS *m/z* 877.1053 [$(M+Na)^+$計算值$C_{39}H_{37}Cl_2N_4NaO_8PS_2$ 877.1060]。$[\alpha]_D^{24}$ = -42.3° (c = 0.213, DMSO)。

實例12 (S)-1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-(膦醯基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基胺基甲酸2-(吡啶-2-基二硫烷基)丙基酯**62**

於0℃下向**51a** (1.70 g, 5.09 mmol)存於DCM (160 mL)中之攪拌溶液中添加三乙胺Et_3N (0.92 mL, 6.62 mmol)及三氟甲磺酸酐(1.03 mL, 6.11 mmol)。參見圖16。將反應物於0℃下攪拌20 min，隨後用H_2O稀釋，分離層並用DCM (1 ×)萃取水層。將合併之有機層乾燥(Na_2SO_4)並在真空下移除溶劑。藉由矽膠上管柱層析使用己烷:EtOAc 100:0至95:5進行純化，從而產生灰棕色發泡體固體狀(S)-1-(氯甲基)-5-(三氟甲基磺醯基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-甲酸第三丁基酯**62a** (2.20 g, 93%)。^{1}H NMR δ (400 MHz, $CDCl_3$) 8.30 (br s, 1H), 8.03 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.76 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.62-7.59 (m, 1H), 7.53-7.49 (m, 1H), 4.32 (br s, 1H), 4.21-4.15 (m, 1H), 4.09-4.03 (m, 1H), 3.92 (dd, J = 11.2, 2.8 Hz, 1H), 3.54-3.49 (m, 1H), 1.61 (s, 9H)。

在氮下向密封管中之Cs_2CO_3 (2.10 g, 6.44 mmol)、BINAP (430 mg, 0.690 mmol)及$Pd(OAc)_2$ (155 mg, 0.690 mmol)之混合物中添加**62a** (2.15 g, 4.61 mmol)存於無水THF (60 mL)中之溶液。隨後向反應混合物中添加二苯基甲亞胺(1.0 mL, 5.98 mmol)並使氮鼓泡通過混合物達10 min。將密封管於60℃至65℃下加熱4天。隨後將反應混合物冷卻至r.t.，用DCM稀釋，經由矽藻土過濾，將矽藻土塞用DCM洗滌直至洗滌物中不再有顏色為止並在真空下蒸發濾液。藉由矽膠上管柱層析使用己烷:DCM 100:0至50:50純化殘餘物，從而產生黃色發泡體固體狀(S)-1-(氯甲基)-5-(二苯基亞甲基胺基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-甲酸第三丁基酯**53f** (2.09 g, 91%)。^{1}H NMR δ (400 MHz, DMSO-d_6) 7.85 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.80 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.75 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 7.61-7.57 (m, 1H), 7.54-7.49 (m, 3H), 7.37-7.33 (m, 1H), 7.30-7.23 (m,

3H), 7.06 (d, J = 6.7 Hz, 2H), 4.14-4.02 (m, 2H), 3.99-3.94 (m, 2H), 3.77 (dd, J = 10.8, 7.4 Hz, 1H), 1.46 (s, 9H), 1H未觀察到。HRMS m/z 497.1984 [$(M+H)^+$計算值$C_{31}H_{30}ClN_2O_2$ 497.1990]。$[\alpha]_D^{28}$ = -101.5° (c = 0.995, DCM)。

於r.t.下向**53f** (1.30 g, 2.62 mmol)存於THF及H_2O (195 mL/98 mL)中之攪拌溶液中添加冰乙酸HOAc (65 mL)並將混合物攪拌過夜。18 h後，在真空下濃縮反應混合物以移除大部分THF，而無需加熱至高於30℃。隨後將混合物用EtOAc (200 mL)稀釋，分離有機層，用飽和$NaHCO_3$水溶液洗滌(4 ×，直至洗滌物係pH 8)，乾燥(Na_2SO_4)並在真空下移除溶劑。藉由矽膠上管柱層析使用己烷:EtOAc 100:0至90:10純化殘餘物，從而產生(S)-5-胺基-1-(氯甲基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-甲酸第三丁基酯**61a** (503 mg, 58%)。^{1}H NMR δ (400 MHz, DMSO-d_6) 8.01 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.64 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.40 (ddd, J = 8.1, 6.8, 0.9 Hz, 1H), 7.36 (br s, 1H), 7.20 (ddd, J = 8.1, 6.8, 1.1 Hz, 1H), 5.91 (s, 2H), 4.11-3.91 (m, 4H), 3.66 (dd, J = 10.6, 8.2 Hz, 1H), 1.53 (s, 9H)。

於0℃下向$LiAlH_4$ (1.29 g, 34.0 mmol)存於無水THF (40 mL)中之攪拌懸浮液中逐滴添加2-巰基丙酸(3.02 g, 28.5 mmol)存於無水THF (10 mL)中之溶液。使反應混合物升溫至r.t.並攪拌3 h。隨後將混合物冷卻至0℃並用H_2O (5 mL)及5% NaOH水溶液(3 mL)驟冷。將混合物於0℃下攪拌20 min，經由矽藻土過濾，將矽藻土塞用Et_2O (3 ×)洗滌，將合併之有機物乾燥(Na_2SO_4)，過濾並移除溶劑，以產生2-巰基丙-1-醇(944 mg)，其未經純化即用於下一步驟。於r.t.下向2-巰基丙-1-醇存於MeOH (4 mL)中之溶液中添加1,2-二(吡啶-2-基)二硫烷(*Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2011)21:4985-4988.) (470 mg, 5.10 mmol)存於MeOH (7 mL)中之溶液並將混合物攪拌過夜。17.5 h後，在真空下

移除溶劑。藉由在氧化鋁(上)使用己烷:DCM 50:50至0:100、隨後DCM:EtOAc 99:1至75:25管柱層析進行純化，從而產生黃色油狀2-(吡啶-2-基二硫烷基)丙-1-醇(528 mg，經2個步驟自2-巰基丙酸為18%)。^{1}H NMR δ (400 MHz, $CDCl_3$) 8.50 (ddd, *J* = 5.0, 1.8, 0.9 Hz, 1H), 7.57 (ddd, *J* = 8.0, 7.4, 1.8 Hz, 1H), 7.39 (td, *J* = 8.1, 1.0 Hz, 1H), 7.15 (ddd, *J* = 7.4, 5.0, 1.1 Hz, 1H), 5.93 (dd, *J* = 8.8, 5.8 Hz, 1H), 3.68 (ddd, *J* = 12.5, 8.8, 3.8 Hz, 1H), 3.40 (ddd, *J* = 12.4, 7.8, 5.8 Hz, 1H), 3.14-3.06 (m, 1H), 1.31 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H)。

於r.t.下向**61a** (250 mg, 0.751 mmol)及DMAP (551 mg, 4.51 mmol)存於無水DCM (40 mL)中之混合物中緩慢添加三光氣(127 mg, 0.428 mmol)存於無水DCM (10 mL)中之溶液。立刻沈澱黃色固體。30 min後，添加2-(吡啶-2-基二硫烷基)丙-1-醇(420 mg, 2.09 mmol)存於無水DCM (6 mL)中之溶液並溶解沈澱。將反應混合物攪拌過夜。18 h後，添加1M NaOH (30 mL)並攪拌混合物。隨後分離各層並將有機層乾燥(Na_2SO_4)，用MeOH (15 mL)稀釋並吸附至矽膠上。使用己烷:DCM 100:0至50:50至0:100、隨後DCM:EtOAc 99:1至92:8洗脫產物。隨後在矽膠上使用己烷:DCM 100:0至50:50至0:100、隨後DCM:EtOAc 98:2至95:5再次層析該物質。此產生**62b**及2-(吡啶-2-基二硫烷基)丙-1-醇(385 mg)之混合物。此混合物用於下一步驟。於0℃下向**62b**及2-(吡啶-2-基二硫烷基)丙-1-醇及咪唑(36 mg, 0.535 mmol)存於DMF (2 mL)中之攪拌混合物中添加TBDMSCl (81 mg, 0.535 mmol)存於DMF (1 mL)中之溶液。使混合物升溫至r.t.，攪拌50 min且隨後用EtOAc及H_2O稀釋。將混合物充分攪拌，分離各層並將有機層用H_2O (3 ×)洗滌，乾燥(Na_2SO_4)並在真空下移除溶劑。藉由矽膠上管柱層析使用己烷:DCM 50:50至0:100、隨後DCM:EtOAc 95:5進行純化，從而產生淺黃色發泡體固體狀(1S)-1-(氯甲基)-5-((2-(吡啶-2-基二硫烷基)丙氧基)羰基胺

基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-甲酸第三丁基酯**62b** (295 mg，經2個步驟自化合物**61a**為70%)。^{1}H NMR δ (400 MHz, $CDCl_3$) 8.49 (br s, 1H), 8.46 (ddd, J = 4.8, 1.7, 0.8 Hz, 1H), 7.86 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.75-7.73 (m, 2H), 7.64-7.60 (m, 1H), 7.54 (ddd, J = 8.1, 6.9, 1.0 Hz, 1H), 7.42 (ddd, J = 8.2, 6.8, 1.1 Hz, 1H), 7.08 (ddd, J = 7.4, 4.9, 0.8 Hz, 1H), 6.97 (br s, 1H), 4.37-4.28 (m, 3H), 4.17-4.11 (m, 1H), 4.05-3.99 (m, 1H), 3.92 (dd, J = 11.1, 2.5 Hz, 1H), 3.47 (t, J = 10.7 Hz, 1H), 3.38-3.30 (m, 1H), 1.62 (s, 9H), 1.41 (d, J = 6.9 Hz, 3H)。HRMS *m/z* 582.1265 [$(M+Na)^+$計算值$C_{27}H_{30}ClN_3NaO_4S_2$ 582.1258]

於0℃下向**62b** (285 mg, 509 mmol)存於DCM (14 mL)中之溶液中緩慢添加TFA (7 mL)並將混合物於此溫度下攪拌1 h。隨後將反應混合物用DCM及H_2O稀釋並用飽和$NaHCO_3$水溶液中和直至pH 7。分離各層並將有機層用H_2O (1 ×)洗滌，乾燥(Na_2SO_4)並在真空下移除溶劑，以產生黃色固體狀(S)-1-(氯甲基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基胺基甲酸2-(吡啶-2-基二硫烷基)丙基酯**62c** (220 mg, 94%)，其未經純化即用於下一步驟。^{1}H NMR δ (400 MHz, DMSO-d_6) 9.52 (s, 1H), 8.45 (ddd, J = 4.8, 1.7, 0.8 Hz, 1H), 7.88 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.85-7.83 (m, 1H), 7.79-7.75 (m, 1H), 7.64 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.39 (ddd, J = 8.1, 6.8, 1.0 Hz, 1H), 7.23 (ddd, J = 7.3, 4.8, 1.0 Hz, 1H), 7.15 (ddd, J = 8.1, 6.8, 1.0 Hz, 1H), 7.08 (s, 1H), 5.93 (br s, 1H), 4.24-4.13 (m, 2H), 4.02-3.96 (m, 1H), 3.85 (dd, J = 10.8, 3.5 Hz, 1H), 3.70 (t, J = 9.3 Hz, 1H), 3.63-3.55 (m, 2H), 3.43-3.36 (m, 1H), 1.34 (d, J = 6.9 Hz, 3H)。

於r.t.下向**62c** (215 mg, 0.467 mmol)及EDCI.HCl (268 mg, 1.40 mmol)之混合物中添加(S)-5-(1-(氯甲基)-5-(二-第三丁氧基磷醯基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊酸**57d** (365 mg, 0.676 mmol)存於DMA (10 mL)中之溶液。添加TsOH (16 mg, 0.0929 mmol)並將混

合物在氮下攪拌過夜(且經3A分子篩)。27.5 h後，將混合物用EtOAc及H_2O稀釋，充分振盪並分離各層。將有機層用飽和$NaHCO_3$水溶液(3 ×)、鹽水(1 ×)洗滌，乾燥(Na_2SO_4)並在真空下移除溶劑。將所得殘餘物溶解於DCM中並用己烷稀釋直至自溶液沈澱出固體為止。在真空下移除溶劑並將固體與己烷:EtOAc 95:5一起研磨，以產生棕褐色固體狀(S)-1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-(二-第三丁氧基磷醯基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基胺基甲酸2-(吡啶-2-基二硫烷基)丙基酯**62d** (372 mg)，其未經進一步純化即用於下一步驟。HRMS *m/z* 1003.2445 [$(M+Na)^+$計算值$C_{48}H_{55}Cl_2N_4NaO_8PS_2$ 1003.2468]。

於0℃下向**62d** (如上文製備)存於DCM (7 mL)中之攪拌溶液中緩慢添加TFA (3.5 mL)。將混合物於此溫度下攪拌1 h。隨後於25℃下在真空下移除溶劑。將所得深綠色殘餘物溶解於DCM中並將溶液用EtOAc稀釋，從而引起自溶液沈澱出固體。於30℃下在真空下移除溶劑並將殘餘物再次溶解於DCM中並用EtOAc稀釋。在真空下移除DCM，以產生存於EtOAc中之懸浮液。藉由過濾收集固體且隨後將固體用EtOAc及己烷洗滌並乾燥，以產生綠色固體。藉由製備型HPLC (管柱：Synergi-MAX RP 4 μ，21.20 × 250 mm；流速：12 mL/min；流動相：溶劑A：H_2O/甲酸銨緩衝液pH 3.5，溶劑B：MeCN/H_2O 90:10；方法：梯度，溶劑A:溶劑B 25:75至0:100，經19 min)對其進行進一步純化，以產生乳膏粉末狀(S)-1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-(膦醯基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基胺基甲酸2-(吡啶-2-基二硫烷基)丙基酯**62**，78 mg，經2個步驟自**62c**為19%，HPLC純度：87.4%)。^{1}H NMR δ (400 MHz, DMSO-d_6) 9.69 (s, 1H), 8.56 (s, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.44 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 8.15 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.00 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.90 (d, J =

8.4 Hz, 1H), 7.85-7.76 (m, 3H), 7.55-7.48 (m, 2H), 7.44-7.40 (m, 1H), 7.36-7.32 (m, 1H), 7.24-7.21 (m, 1H), 4.41-4.14 (m, 8H), 4.05-3.99 (m, 2H), 3.91 (dd, J = 10.8, 7.2 Hz, 1H), 3.85-3.81 (m, 1H), 3.37-3.28 (m, 1H), 2.74-2.57 (m, 4H), 1.98-1.95 (m, 2H), 1.34 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 2個質子未觀察到。^{31}P NMR δ (400 MHz, DMSO-d_6) -5.09。HRMS m/z 891.1221 [$(M+Na)^+$計算值$C_{40}H_{39}Cl_2N_4NaO_8PS_2$ 891.1216]

實例13 (S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-N-甲基己醯胺基)乙基(甲基)胺基甲酸1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**63**

使(S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-N-甲基己醯胺基)乙基(甲基)胺基甲酸1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-(膦醯基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**57**以酶促方式去磷酸化以產生**63**。

實例14 (S)-1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基胺基甲酸2-(吡啶-2-基二硫烷基)乙基酯**64**

使(S)-1-(氯甲基)-3-(5-((S)-1-(氯甲基)-5-(膦醯基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-5-側氧基戊醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基胺基甲酸2-(吡啶-2-基二硫烷基)乙基酯**61**以酶促方式去磷酸化以產生**64**。

實例15 (11aS)-8-(6-((S)-1-(氯甲基)-5-(4-甲基六氫吡嗪-1-羰基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-6-側氧基己基氧基)-11-羥基-7-甲氧基-5-側氧基-2,3,11,11a-四氫-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮呯-10(5H)-甲酸4-((S)-6-胺基-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)己醯胺基)苄基酯**65**

於r.t.下向(S)-6-(5-(第三丁氧基羰基胺基)-4-(2-(羥基甲基)吡咯啶-1-羰基)-2-甲氧基苯氧基)己酸2,2,2-三氯乙基酯**54c** (1.66 g, 2.71 mmol)存於無水DCM (10 mL)中之攪拌溶液中添加乙酸酐(1.29 mL, 13.6 mmol)及三乙胺(2.27 mL, 16.3 mmol)。參見圖17。將反應混合物再攪拌4 h。添加無水MeOH (1.5 mL)並將混合物攪拌30 min。添加乙酸乙酯(200 mL)並分離乙酸乙酯層且隨後用水洗滌若干次。乾燥($MgSO_4$)並蒸發乙酸乙酯溶液，以產生淺黃色膠狀(S)-6-(4-(2-(乙醯氧基甲基)吡咯啶-1-羰基)-5-(第三丁氧基羰基胺基)-2-甲氧基苯氧基)己酸2,2,2-三氯乙基酯**65a** (1.8 g, 100%)；^{1}H NMR [$(CD_3)_2SO$] δ 8.82 (br s, 1 H), 7.27 (s, 1 H), 6.86 (s, 1 H), 4.89 (s, 2 H), 4.39-4.20 (m, 3 H), 3.93 (t, J = 6.4 Hz, 2 H), 3.74 (s, 3 H), 3.50-3.33 (m, 2 H), 2.10-1.94 (m, 4 H), 1.92-1.61 (m, 7 H), 1.53-1.42 (m, 2 H), 1.43 (s, 9 H), 2 H，被DMSO峰遮蓋。HRMS (ESI) *m/z*計算值$C_{28}H_{39}Cl_3N_2NaO_9$：675.1613，試驗值：675.1603 [MNa^+]。計算值$C_{28}H_{40}Cl_3N_2O_9$：653.1794，試驗值：653.1778 [MH^+]。

在氮下向**65a** (1.76 g, 2.69 mmol)存於丙酮(30 mL)、水(20 mL)及THF (12 mL)之混合物中之攪拌溶液中添加Zn (7.06 g, 108 mmol)及NH_4Cl (11.6 g, 216 mmol)。將混合物於r.t.下攪拌23 h。添加乙酸乙酯(100 mL)並將混合物攪拌15 min。傾析有機層。用更多乙酸乙酯(2×100 mL)重複此萃取。將合併之有機溶液用水(2×100 mL)洗滌，乾燥($MgSO_4$)，經由矽藻土過濾並蒸發，以產生黏稠無色發泡體狀(S)-6-(4-(2-(乙醯氧基甲基)吡咯啶-1-羰基)-5-(第三丁氧基羰基胺基)-2-甲氧基苯氧基)己酸**65b** (1.36 g, 96%)；^{1}H NMR [$(CD_3)_2SO$] δ 11.49 (極br s, 1 H), 8.83 (s, 1 H), 7.27 (s, 1 H), 6.86 (br s, 1 H), 4.39-4.02 (m, 3 H), 3.93 (t, J = 6.4 Hz, 2 H), 3.74 (s, 3 H), 3.51-3.33 (m, 2 H, 部分被水峰遮蓋), 2.21 (t, J = 7.1 Hz, 2 H), 2.11-1.93 (m, 4 H), 1.90-1.66 (m, 5 H),

1.62-1.50 (m, 2 H), 1.50-1.35 (m, 2 H), 1.43 (s, 9 H)。分析型($C_{26}H_{38}N_2O_9$)。計算值：C，59.76；H，7.33；N，5.36。試驗值：C，59.66；H，7.49；N，5.29。

於0℃下在氮氣氛下向**65b** (0.87 g, 2.41 mmol)及(S)-4-甲基六氫吡嗪-1-甲酸1-(氯甲基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**58b** (1.26 g, 2.41 mmol)存於無水DMA (5 mL)中之攪拌溶液中添加存於對二噁烷中之4M HCl (1.21 mL, 4.82 mmol)、之後添加EDCI.HCl (1.39 g, 7.23 mmol)及無水TsOH (83 mg, 0.48 mmol)。將反應混合物於0℃下在氮下攪拌21小時，隨後分配在乙酸乙酯(500 mL)與水(500 mL)之間。分離乙酸乙酯層並將水層用更多乙酸乙酯(200 mL)進一步萃取。將合併之乙酸乙酯萃取物連續用水(200 mL)、飽和$NaHCO_3$溶液(2x200 mL)及水(200 mL)洗滌。將乙酸乙酯層乾燥並蒸發，以產生灰棕色固體-發泡體狀(S)-4-甲基六氫吡嗪-1-甲酸3-(6-(4-((S)-2-(乙醯氧基甲基)吡咯啶-1-羰基)-5-(第三丁氧基羰基胺基)-2-甲氧基苯氧基)己醯基)-1-(氯甲基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**65c** (1.66 g, 80%)；mp 84℃至87℃；^{1}H NMR [$(CD_3)_2SO$] δ 8.84 (br s, 1 H), 8.21 (s, 1 H), 7.95 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H), 7.81 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H), 7.58 (br t, *J* = 7.7, 1 H), 7.46 (br t, *J* = 8.1 Hz, 1 H), 7.29 (s, 1 H), 6.86 (s, 1 H), 4.40 (t, *J* = 10.0 Hz, 1 H), 4.36-3.86 (m, 10 H), 3.83-3.74 (m, 1 H), 3.73 (s, 3 H), 3.54-3.36 (m, 4 H), 2.67-2.34 (m, 6 H, 部分被DMSO峰遮蓋), 2.26 (s, 3 H), 2.02 (br s, 3 H), 1.93-1.62 (m, 8 H), 1.60-1.47 (m, 2 H), 1.42 (s, 9 H)。分析型($C_{45}H_{58}ClN_5O_{10}\cdot 1½H_2O$)計算值：C，60.63；H，6.90；N，7.86。試驗值：C，60.39；H，6.66；N，8.08。

於0℃下在氮氣氛下向**65c** (2.17 g, 2.51 mmol)存於DCM (20 mL)中之攪拌溶液中添加TFA (20 mL)。在添加後，將混合物於此溫度下進一步攪拌2.5 h。將混合物倒入$NaHCO_3$ (50 g)、水(700 mL)及DCM

(500 mL)之冷的(0℃)混合物中並攪拌15 min。(pH約8)。分離DCM層並用更多$NaHCO_3$水溶液(200 mL)及水(200 mL)洗滌且隨後乾燥($MgSO_4$)。蒸發溶劑，以產生淺褐色固體-發泡體狀(S)-4-甲基六氫吡嗪-1-甲酸3-(6-(4-((S)-2-(乙醯氧基甲基)吡咯啶-1-羰基)-5-胺基-2-甲氧基苯氧基)己醯基)-1-(氯甲基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**65d** (1.76 g, 92%)；mp 62℃；^{1}H NMR [$(CD_3)_2SO$] δ 8.21 (s, 1 H), 7.95 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H), 7.81 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H), 7.57 (br t, *J* = 7.6 Hz, 1 H), 7.46 (br t, *J* = 7.2 Hz, 1 H), 6.67 (s, 1 H), 6.37 (s, 1 H), 5.09 (s, 2 H), 4.41 (t, *J* = 9.7 Hz, 1 H), 4.36-4.20 (m, 3 H), 4.17-4.00 (m, 3 H), 3.97-3.86 (m, 3 H), 3.81-3.70 (m, 2 H), 3.63 (s, 3 H), 3.54-3.32 (m, 5 H), 2.66-2.34 (m, 6 H, 部分被DMSO峰遮蓋), 2.26 (s, 3 H), 2.08-1.96 (m, 1 H), 2.10 (s, 3 H), 1.93-1.63 (m, 7 H), 1.57-1.45 (m, 2 H)。分析型($C_{40}H_{50}ClN_5O_8 \cdot ½H_2O$)計算值：C，62.13；H，6.65；N，9.06。試驗值：C，62.12；H，6.76；N，8.77。

將(S)-2-(烯丙基氧基羰基胺基)-6-(第三丁氧基羰基胺基)己酸**65e** (3.30 g, 10.0 mmol)及EEDQ (3.71 g, 15.0 mmol)存於無水DMA (10 mL)中之混合物於r.t.下在氮下攪拌15 min。參見圖18。向此預形成混合物中添加4-((第三丁基二甲基矽基氧基)甲基)苯胺(自相應對硝基苯甲醇及TBDMSCl在DMF中製備；之後使用Zn/NH_4Cl還原) (2.37 g, 10.0 mmol)存於無水DMA (3 mL)中之溶液。將最終反應混合物於r.t.下在氮氣氛下進一步攪拌23 h。將混合物分配在乙酸乙酯(500 mL)與水(500 mL)之間。分離乙酸乙酯層並連續用飽和$NaHCO_3$ (2×300 mL)及水(300 mL)洗滌且隨後乾燥($MgSO_4$)。蒸發溶劑，從而產生橙色油狀物，藉由二氧化矽管柱層析(石油醚-乙酸乙酯梯度10%至35%)對其進行純化，以得到黏稠灰棕色固體-發泡體狀TBDMS保護之離胺酸**65f** (4.87 g, 89%)；^{1}H NMR [$(CD_3)_2SO$] δ 9.97 (s, 1 H), 7.55 (d, *J* = 8.50

Hz, 2 H), 7.44 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H), 7.21 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H), 6.75 (t, *J* = 5.3 Hz, 1 H), 5.99-5.82 (m, 1 H), 5.28 (br d, *J* = 17.2 Hz, 1 H), 5.17 (br d, *J* = 10.5 Hz, 1 H), 4.64 (s, 2 H), 4.46 (d, *J* = 5.2 Hz, 2 H), 4.12-4.02 (m, 1 H), 2.93-2.83 (m, 2 H), 1.70-1.52 (m, 2 H), 1.46-1.20 (m, 4 H), 1.35 (s, 9 H), 0.89 (s, 9 H), 0.06 (s, 6 H)。HRMS (ESI) *m/z*計算值 $C_{28}H_{47}N_3NaO_6Si$：572.3126，試驗值：572.3136 [MNa^+]。

於r.t.下向**65f** (4.81 g, 8.75 mmol)存於THF (30 mL)中之攪拌溶液中添加四丁基氟化銨存於THF中之1M溶液(17.5 mL, 17.5 mmol)。在添加後，將混合物於此溫度下再攪拌2.5 h。添加NH_4Cl水溶液(300 mL)並將產物萃取至乙酸乙酯(500 mL)中。將乙酸乙酯用水(2×100 mL)洗滌並乾燥($MgSO_4$)。蒸發溶劑，以產生灰棕色固體狀苯甲醇離胺酸**65g** (3.81 g, 100%)；mp 101℃至103℃；^1H NMR [$(CD_3)_2SO$] δ 9.94 (s, 1 H), 7.52 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H), 7.44 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H), 7.23 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H), 6.76 (t, *J* = 5.4 Hz, 1 H), 5.97-5.84 (m, 1 H), 5.29 (br d, *J* = 17.2 Hz, 1 H), 5.17 (br d, *J* = 10.4 Hz, 1 H), 5.08 (t, *J* = 5.7 Hz, 1 H), 4.47 (d, *J* = 5.3 Hz, 2 H), 4.43 (d, *J* = 5.7 Hz, 2 H), 4.13-4.03 (m, 1 H), 2.96-2.82 (m, 2 H), 1.72-1.52 (m, 2 H), 1.46-1.20 (m, 4 H), 1.36 (s, 9 H)。HRMS (ESI) *m/z*計算值$C_{22}H_{33}N_3NaO_6$：458.2262，試驗值：458.2272 [MNa^+]；計算值$C_{22}H_{33}N_3KO_6$：474.2001，試驗值：474.1998 [MK^+]。

於r.t.下在氮下向**65d** (764 mg, 1.00 mmol)及DMAP (367 mg, 3.00 mmol)存於無水DCM (15 mL)中之攪拌溶液中添加雙光氣存於無水DCM (0.05 mmol/mL，12 mL，0.60 mmol)中之溶液並將混合物再攪拌20 min。參見圖19。向此混合物中添加**65g** (3.97 g, 9.13 mmol)存於無水DCM (80 mL)中之溶液、將最終反應混合物於r.t.下在氮氣氛下進一步攪拌48 h。將混合物分配在乙酸乙酯(500 mL)與水(300 mL)之

間。分離乙酸乙酯層並將水層用乙酸乙酯(2x200 mL)進一步萃取。將合併之乙酸乙酯溶液用更多水(2x200 mL)洗滌並乾燥($MgSO_4$)。於30 ℃ (浴溫)下蒸發溶劑，從而產生橙色油狀物，藉由二氧化矽管柱層析(乙酸乙酯-MeOH = 10:1)對其進行純化，以得到淺橙色固體狀(S)-4-甲基六氫吡嗪-1-甲酸3-(6-(4-((S)-2-(乙醯氧基甲基)吡咯啶-1-羰基)-5-((4-((S)-2-(烯丙基氧基羰基胺基)-6-(第三丁氧基羰基胺基)己醯胺基)苄基氧基)羰基胺基)-2-甲氧基苯氧基)己醯基)-1-(氯甲基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**65h** (1.04 g, 85%)；mp 90℃至93℃；^{1}H NMR [$(CD_3)_2SO$] δ 10.04 (s, 1 H), 9.10 (br s, 1 H), 8.21 (s, 1 H), 7.95 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H), 7.81 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H), 7.63-7.53 (m, 3 H), 7.51-7.42 (m, 2 H), 7.32 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H), 7.21 (br s, 1 H), 6.85 (br s, 1 H), 6.79-6.72 (m, 1 H), 5.97-5.83 (m, 1 H), 5.29 (br d, *J* = 17.2 Hz, 1 H), 5.17 (br d, *J* = 10.4 Hz, 1 H), 5.08-4.96 (m, 2 H), 4.52-4.37 (m, 3 H), 4.37-3.85 (m, 10 H), 3.83-3.66 (m, 2 H), 3.74 (s, 3 H), 3.54-3.41 (m, 2 H), 3.41-3.23 (m, 2 H, 部分被水峰遮蓋), 2.95-2.83 (m, 2 H), 2.66-2.34 (m, 6 H, 部分被DMSO峰遮蓋), 2.25 (s, 3 H), 2.07-1.92 (m, 4 H), 1.87-1.45 (m, 11 H), 1.45-1.20 (m, 4 H), 1.35 (s, 9 H)。HRMS (ESI) *m/z*計算值$C_{63}H_{82}ClN_8O_{15}$：1225.5583，試驗值：1225.5557 [MH^+]；計算值$C_{63}H_{81}ClN_8NaO_{15}$：1247.5402，試驗值：1247.5401 [MNa^+]；計算值$C_{63}H_{81}ClKN_8O_{15}$：1263.5142，試驗值：1263.5141 [MK^+]。

將**65h** (1.01 g, 0.824 mmol)及K_2CO_3 (1.14 g, 8.24 mmol)存於DCM (20 mL)及MeOH (10 mL)中之混合物於r.t.下攪拌1小時及40 min。將混合物用DCM (200 mL)稀釋並與冰水(200 mL)一起攪拌10 min。分離DCM層並將水層進一步用DCM (2x100 mL)萃取。將合併之DCM溶液用更多水(200 mL)洗滌並乾燥($MgSO_4$)。於25℃ (浴溫)下蒸發溶劑，從而產生灰棕色固體狀(S)-4-甲基六氫吡嗪-1-甲酸3-(6-(5-((4-((S)-2-

(烯丙基氧基羰基胺基)-6-(第三丁氧基羰基胺基)己醯胺基)苄基氧基)羰基胺基)-4-((S)-2-(羥基甲基)吡咯啶-1-羰基)-2-甲氧基苯氧基)己醯基)-1-(氯甲基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**65i** (0.94 g, 96%)；mp 104℃至107℃；^{1}H NMR [$(CD_3)_2SO$] δ 10.04 (s, 1 H), 9.17 (br s, 1 H), 8.21 (s, 1 H), 7.95 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 7.80 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H), 7.63-7.53 (m, 3 H), 7.51-7.42 (m, 2 H), 7.38-7.21 (m, 3 H), 6.93 (s, 1 H), 5.32 (t, *J* = 5.4 Hz, 1 H), 5.98-5.83 (m, 1 H), 5.30 (br d, *J* = 17.2 Hz, 1 H), 5.17 (br d, *J* = 11.7 Hz, 1 H), 5.03 (s, 2 H), 4.73 (t, *J* = 5.7 Hz, 1 H), 4.52-4.36 (m, 3 H), 4.36-4.17 (m, 2 H), 4.17-3.85 (m, 6 H), 3.83-3.66 (m, 2 H), 3.73 (s, 3 H), 3.61-3.40 (m, 4 H), 3.40-3.20 (m, 2 H, 部分被水峰遮蓋), 2.94-2.83 (m, 2 H), 2.67-2.34 (m, 6 H, 部分被DMSO峰遮蓋), 2.25 (s, 3 H), 1.96-1.45 (m, 12 H), 1.45-1.20 (m, 4 H), 1.35 (s, 9 H)。HRMS (ESI) *m/z*計算值$C_{61}H_{80}ClN_8O_{14}$：1183.5477，試驗值：1183.5445 [MH^+]；計算值$C_{61}H_{79}ClN_8NaO_{14}$：1205.5296，試驗值：1205.5256 [MNa^+]；計算值$C_{61}H_{79}ClKN_8O_{14}$：1221.5036，試驗值：1221.5026 [MK^+]。

於0℃下向**65i** (0.92 g, 0.78 mmol)存於無水DCM (20 mL)中之攪拌溶液中逐份(經8 min)添加戴斯-馬丁過碘烷(DMP，1,1,1-三乙醯氧基-1,1-二氫-1,2-苯并碘氧雜環戊-3(1H)-酮，CAS註冊號87413-09-0，492 mg，1.16 mmol)。在添加完成後，將反應混合物於0℃下進一步攪拌2 h，隨後於r.t.下攪拌45 h。將混合物用DCM (100 mL)稀釋並於r.t.下與10% $Na_2S_2O_3$ (100 mL)一起攪拌10 min。將所得混合物分配在DCM (400 mL)與飽和$NaHCO_3$溶液(400 mL)之間。分離DCM層並用DCM (2x100 mL)進一步萃取水層。將合併之DCM溶液進一步用飽和$NaHCO_3$溶液(200 mL)及水(200 mL)洗滌且隨後乾燥($MgSO_4$)。於25℃(浴溫)下蒸發溶劑，從而產生淺褐色固體，藉由SiO_2管柱層析(DCM-

乙酸乙酯-MeOH = 15:15:1，梯度至15:15:3)對其進行純化，以產生淺黃色固體狀(S)-8-(6-((S)-1-(氯甲基)-5-(4-甲基六氫吡嗪-1-羰基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-6-側氧基己基氧基)-11-羥基-7-甲氧基-5-側氧基-2,3,11,11a-四氫-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮呯-10(5H)-甲酸4-((S)-2-(烯丙基氧基羰基胺基)-6-(第三丁氧基羰基胺基)己醯胺基)苄基酯**65j** (0.64g, 70%)；mp 137℃(分解)；^{1}H NMR [$(CD_3)_2SO$] δ 10.02 (s, 1 H), 8.21 (s, 1 H), 7.95 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 7.80 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H), 7.65-7.38 (m, 5 H), 7.18 (d, *J* = 7.0 Hz, 2 H), 7.03 (s, 1 H), 6.82-6.63 (m, 2 H), 6.49 (較差拆分之d, *J* = 4.7 Hz, 可與D_2O交換, 1 H), 5.96-5.82 (m, 1 H), 5.46 (較差拆分之dd, *J* = 9.8, 4.7 Hz,在D_2O後變為d, *J* = 10.1 Hz, 1 H), 5.27 (br d, *J* = 17.1 Hz, 1 H), 5.21-5.10 (m, 2 H), 4.81 (br d, *J* = 12.3 Hz, 1 H), 4.51-4.17 (m, 5 H), 4.13-3.84 (m, 4 H), 3.84-3.67 (m, 2 H), 3.77 (s, 3 H), 3.55-3.20 (m, 6 H, 部分被水峰遮蓋), 2.66-2.30 (m, 6 H, 部分被DMSO峰遮蓋), 2.26 (s, 3 H), 2.10-1.20 (m, 16 H), 1.35 (s, 9 H)。HRMS (ESI) *m/z*計算值$C_{61}H_{78}ClN_8O_{14}$：1181.5321，試驗值：1181.5286 [MH^+]；計算值$C_{61}H_{77}ClN_8NaO_{14}$：1203.5140，試驗值：1203.5130 [MNa^+]；計算值$C_{61}H_{77}ClKN_8O_{14}$:1219.4879，試驗值：1219.4861 [MK^+]。

於0℃下在氮氣氛下向**65j** (623 mg, 0.53 mmol)存於無水DCM (15 mL)中之攪拌溶液中添加吡咯啶(0.86 mL, 10.5 mmol)，之後添加$Pd(Ph_3P)_4$ (30 mg, 9.8% Pd)。在添加後，將反應混合物於r.t.下進一步攪拌5 h。將混合物用石油醚(100 mL)稀釋並於r.t.下攪拌30 min。自不溶性物質傾析溶劑並用DCM-石油醚(1:10) (100 mL)重複洗滌步驟。將留下之黏稠固體溶解於DCM (200 mL)中並用水(3x100 mL)洗滌，隨後乾燥($MgSO_4$)，並通過短的SiO_2管柱以移除基線物質。使用DCM-MeOH梯度(2%至5%)洗脫所需化合物。於25℃ (浴溫)下蒸發溶劑，

從而產生淺黃色固體-發泡體(472 mg, 82%)，其直接用於下一步驟。於r.t.下在氮氣氛下將此粗製胺用存於無水DMA (8 mL)中之Fmoc-val-Osu (*N*-α-Fmoc-L-纈胺酸*N*-羥基琥珀醯亞胺酯，550 mg，1.26 mmol)處理並將混合物攪拌5 h。添加乙酸乙酯-石油醚(1:10, 100 mL)並將混合物於r.t.下攪拌20 min。自不溶性物質傾析溶劑並用更多乙酸乙酯-石油醚(1:10，2x50 mL)重複洗滌步驟。將留下之黏稠固體乾燥並藉由SiO_2管柱層析(DCM-乙酸乙酯-MeOH = 20:10:3)純化，以產生無色固體狀(S)-8-(6-((S)-1-(氯甲基)-5-(4-甲基六氫吡嗪-1-羰基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-6-側氧基己基氧基)-11-羥基-7-甲氧基-5-側氧基-2,3,11,11a-四氫-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮呯-10(5H)-甲酸4-((S)-2-((S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基胺基)-3-甲基丁醯胺基)-6-(第三丁氧基羰基胺基)己醯胺基)苄基酯**65k** (246 mg, 47%)；mp 143℃(分解)；^{1}H NMR [$(CD_3)_2SO$] δ 10.03 (s, 可與D_2O交換, 1 H), 8.21 (s, 1 H), 8.05 (br d, *J* = 7.5 Hz, 可與D_2O交換, 1 H), 7.95 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H), 7.87 (d, *J* = 7.4 Hz, 2 H), 7.81 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H), 7.72 (t, *J* = 7.0 Hz, 2 H), 7.62-7.25 (m, 10 H, 在D_2O後減少至9 H), 7.18 (較差拆分之d, *J* = 5.8 Hz, 2 H), 7.04 (s, 1 H), 6.70 (br s, 2 H, 在D_2O後減少至1 H), 6.50 (br s, 可與D_2O交換, 1 H), 5.53-5.40 (m, 在D_2O後變為d, *J* = 9.9 Hz, 1 H), 5.15 (br d, *J* = 12.4 Hz, 1 H), 4.82 (br d, *J* = 12.3 Hz, 1 H), 4.46-4.16 (m, 7 H), 4.07-3.85 (m, 4 H), 3.83-3.67 (m, 2 H), 3.76 (s, 3 H), 3.56-3.23 (m, 5 H, 部分被水峰遮蓋), 2.93-2.79 (m, 2 H), 2.64-2.32 (m, 6 H, 部分被DMSO峰遮蓋), 2.25 (s, 3 H), 2.09-1.20 (m, 17 H), 1.35 (s, 9 H), 0.87 (d, *J* = 7.0 Hz, 3 H), 0.83 (d, *J* = 6.8 Hz, 3 H)。HRMS (ESI) *m/z* 計算值 $C_{77}H_{93}ClN_9O_{15}$：1418.6474，試驗值：1418.6420 [MH^+]；計算值 $C_{77}H_{92}ClN_9NaO_{15}$：1440.6294，試驗值：1440.6231 [MNa^+]；計算值 $C_{77}H_{92}ClKN_9O_{15}$：1456.6033，試驗值：1456.6021

[MK^+]。

於0℃下在氮氣氛下向**65k** (224 mg, 0.158 mmol)存於無水DMA (2 mL)中之攪拌溶液中添加六氫吡啶存於N,N-二甲基乙醯胺(DMA，1.0 mmol/mL，1.58 mL，1.58 mmol)中之溶液。參見圖20。在添加後，將混合物於此溫度下再攪拌1 h及45 min。添加乙酸乙酯-石油醚之混合物(1:5, 50 mL)並將混合物於0℃下攪拌20 min。自不溶性物質傾析並棄去溶劑層。於r.t.下用更多乙酸乙酯-石油醚(1:5，2x30 mL)重複洗滌步驟。將留下之淺黃色固體乾燥，以產生(S)-8-(6-((S)-1-(氯甲基)-5-(4-甲基六氫吡嗪-1-羰基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-6-側氧基己基氧基)-11-羥基-7-甲氧基-5-側氧基-2,3,11,11a-四氫-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮呯-10(5H)-甲酸4-((S)-2-((S)-2-胺基-3-甲基丁醯胺基)-6-(第三丁氧基羰基胺基)己醯胺基)苄基酯**65l** (173 mg, 99%)；mp 74℃(分解)；^{1}H NMR [$(CD_3)_2SO$] δ 10.09 (s, 可與D_2O交換, 1 H), 8.21 (s, 1 H), 8.08 (br s, 可與D_2O交換, 1 H), 7.96 (d, J = 8.4 Hz, 1 H), 7.81 (d, J = 8.2 Hz, 1 H), 7.66-7.42 (m, 4 H), 7.19 (較差拆分之d, J = 7.5 Hz, 2 H), 7.04 (s, 1 H), 6.71 (br s, 2 H, 在D_2O後減少至1 H), 6.49 (br s, 可與D_2O交換, 1 H), 5.52-5.40 (m, 在D_2O後變為d, J = 10.6 Hz, 1 H), 5.16 (br d, J = 12.1 Hz, 1 H), 4.81 (br d, J = 11.7 Hz, 1 H), 4.49-4.18 (m, 4 H), 4.10-3.85 (m, 3 H), 3.85-3.67 (m, 2 H), 3.77 (s, 3 H), 3.59-3.22 (m, 5 H, 部分被水峰遮蓋), 3.03-2.97 (m, 在D_2O後變為d, J = 4.8 Hz, 1 H), 2.91-2.81 (m, 2 H), 2.71-2.33 (m, 7 H, 部分被DMSO峰遮蓋), 2.25 (s, 3 H), 2.11-1.20 (m, 17 H), 1.34 (s, 9 H), 0.86 (d, J = 6.5 Hz, 3 H), 0.76 (d, J = 6.7 Hz, 3 H), 2 H未觀察到。HRMS (ESI) *m/z*計算值 $C_{62}H_{83}ClN_9O_{13}$：1196.5793，試驗值：1196.5804 [MH^+]；計算值 $C_{62}H_{82}ClN_9NaO_{13}$：1218.5613，試驗值：1218.5612 [MNa^+]；計算值 $C_{62}H_{82}ClKN_9O_{13}$：1234.5352，試驗值：1234.5359 [MK^+]。

將**65l** (173 mg, 0.158 mmol)及6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己酸2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯(馬來醯亞胺基-Osu，122 mg，0.395 mmol)存於無水DMA (2 mL)中之混合物於0℃下在氮氣氛下攪拌1 h 45 min。添加乙酸乙酯-石油醚之混合物(1:5, 50 mL)並將所得混合物於0℃下攪拌15 min。自不溶性物質傾析並棄去溶劑層。於r.t.下用更多乙酸乙酯-石油醚(1:5，2x30 mL)重複洗滌步驟。將留下之固體乾燥並藉由二氧化矽管柱層析(DCM:乙酸乙酯:MeOH = 20:10:3)純化，以產生淺黃色固體狀(S)-8-(6-((S)-1-(氯甲基)-5-(4-甲基六氫吡嗪-1-羰基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-6-側氧基己基氧基)-11-羥基-7-甲氧基-5-側氧基-2,3,11,11a-四氫-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮呯-10(5H)-甲酸4-((S)-6-(第三丁氧基羰基胺基)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)己醯胺基)苄基酯**65m** (152 mg, 69%)；HPLC：90.6%；mp 120℃；^{1}H NMR [$(CD_3)_2SO$] δ 9.95 (s, 可與D_2O交換, 1 H), 8.21 (s, 1 H), 8.01 (d, *J* = 7.4 Hz, 可與D_2O交換, 1 H), 7.95 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 7.85-7.73 (m, 2 H, 在D_2O交換後減少至1 H), 7.63-7.50 (m, 3 H), 7.46 (t, *J* = 7.7 Hz, 1 H), 7.17 (較差拆分之d, *J* = 8.4 Hz, 2 H), 7.04 (s, 1 H), 6.98 (s, 2 H), 6.81-6.66 (m, 2 H, 在D_2O交換後減少至1 H), 6.49 (較差拆分之d, *J* = 5.3 Hz, 可與D_2O交換, 1 H), 5.51-5.41 (m, 在D_2O後變為d, *J* = 9.9 Hz, 1 H), 5.15 (d, *J* = 12.6 Hz, 1 H), 4.81 (br d, *J* = 11.3 Hz, 1 H), 4.41 (t, *J* = 9.7 Hz, 1 H), 4.37-4.27 (m, 2 H), 4.27-4.13 (m, 2 H), 4.10-3.85 (m, 3 H), 3.85-3.63 (m, 2 H), 3.77 (s, 3 H), 3.60-3.21 (m, 8 H, 部分被水峰遮蓋，1 H), 2.92-2.81 (m, 2 H), 2.67-2.33 (m, 6 H, 部分被DMSO峰遮蓋), 2.26 (s, 3 H), 2.23-1.11 (m, 25 H), 1.30 (s, 9 H), 0.84 (d, *J* = 6.8 Hz, 3 H), 0.81 (d, *J* = 6.7 Hz, 3 H)。HRMS (ESI) *m/z*計算值 $C_{72}H_{94}ClN_{10}O_{16}$：1389.6532，試驗值：1389.6478 [MH^+]；計算值

$C_{72}H_{94}ClN_{10}NaO_{16}$：706.3212，試驗值：706.3244 [$MH^+Na^+$]；計算值 $C_{72}H_{93}ClN_{10}Na_2O_{16}$：717.3122，試驗值：717.3121 [$MNa^+Na^+$]。

於0℃(浴溫)下在氮下向**65m** (32.2 mg, 0.023 mmol)存於DCM (0.4 mL)中之攪拌溶液中添加TFA (0.8 mL)，之後添加水存於TFA中之2%溶液(0.8 mL)。在添加後，將混合物於此溫度下再攪拌8 h。添加乙酸乙酯-石油醚(1:5, 25 mL)並將混合物於0℃下攪拌15 min。收集所沈澱固體，用乙酸乙酯-石油醚(1:5，2x30 ml)洗滌，並乾燥，以產生粗產物(30 mg)，藉由製備型HPLC [SynergiMaxRP管柱；水-TFA (pH = 2.56；95%至55%)/10% H_2O，存於CH_3CN中(5%至45%)；流速：12 mL/min]對其進行純化，以產生玻璃固體狀呈雙-三氟乙酸鹽形式之(S)-8-(6-((S)-1-(氯甲基)-5-(4-甲基六氫吡嗪-1-羰基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-6-側氧基己基氧基)-11-羥基-7-甲氧基-5-側氧基-2,3,11,11a-四氫-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮呯-10(5H)-甲酸4-((S)-6-胺基-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)己醯胺基)苄基酯**65** (22.2 mg, 64%)；HPLC：97.1%純；mp 114℃；$[\alpha]_D$ +43.6° (c 0.275, MeOH)；^1H NMR [$(CD_3)_2SO$] δ 9.97 (s, 1 H), 9.90 (br s, 1 H), 8.73 (br s, 2 H), 8.27 (s, 1 H), 8.09 (d, *J* = 7.6 Hz, 1 H), 8.04-7.93 (m, 2 H), 7.89 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 7.82 (d, *J* = 7.9 Hz, 1 H), 7.74-7.50 (m, 5 H), 7.46 (br t, *J* = 7.6 Hz, 1 H), 7.22 (m, 2 H), 7.04 (s, 1 H), 7.00 (s, 2 H), 6.75 (s, 1 H), 6.51 (br s,1 H), 5.52-5.40 (m, 1 H), 5.18-5.04 (m, 1 H), 4.94-4.82 (m, 1 H), 4.48-3.70 (m, 14 H), 3.43-3.20 (m, 4 H, 部分被水峰遮蓋), 3.17-3.05 (m, 3 H), 2.89 (s, 3 H), 2.82-2.70 (m, 2 H), 2.66-2.48 (m, 2 H, 部分被DMSO峰遮蓋), 2.25-1.08 (m, 25 H), 0.91-0.77 (m, 6 H), 2 H未觀察到。HRMS (ESI) *m/z* 計算值 $C_{67}H_{86}ClN_{10}O_{14}$：1289.6008，試驗值：1289.5975 [MH^+]；計算值 $C_{67}H_{85}ClN_{10}NaO_{14}$：1311.5827，試驗值：

1311.5772 [MNa^+]；計算值$C_{67}H_{85}ClN_{10}Na_2O_{14}$：667.2860，試驗值：667.2874 [$MNa^+Na^+$]；計算值$C_{67}H_{86}ClN_{10}NaO_{14}$：656.2950，試驗值：656.2963 [$MH^+Na^+$]；計算值$C_{67}H_{87}ClN_{10}O_{14}$：645.3040，試驗值：645.3052 [$MH^+H^+$]

實例16 N-(3-(2,5-雙((E)-3-((S)-1-(氯甲基)-5-膦醯氧基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-3-側氧基丙-1-烯基)苯基胺基)-3-側氧基丙基)-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺**66**

向冰浴中冷卻之於實例7中自**51a**製備之(S)-5-(苄基氧基)-1-(氯甲基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-甲酸第三丁基酯**57a** (1.595 g, 3.76 mmol)存於DCM (15 mL)中之溶液中添加存於二噁烷(40 mL)中之4N HCl。參見圖21。使混合物升溫至室溫並攪拌2 h。泵送出所有揮發性組份。將所得殘餘物重新分佈在乙酸乙酯與冷的5%氨水溶液之間。將水相用乙酸乙酯萃取三次。將合併之有機萃取物用水、之後鹽水洗滌，經無水Na_2SO_4乾燥，並經由矽藻土過濾。移除溶劑，以產生褐色膠狀(S)-5-(苄基氧基)-1-(氯甲基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚**57b**，其直接使用；^{1}H NMR (DMSO) δ 8.04 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.61 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.53 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.45-7.34 (m, 4H), 7.14 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 6.60 (s, 1H), 5.24 (s, 2H), 3.96-3.92 (m, 1H), 3.84 (dd, J = 3.4, 10.7 Hz, 1H), 3.70 (t, J = 9.3 Hz, 1H), 3.60 (dd, J = 2.4, 10.0 Hz, 1H), 3.55 (t, J = 10.3 Hz, 1H) ppm。HRMS (ESI)試驗值*m/z* 324.1150 (M + H)。$C_{20}H_{19}ClNO$需要324.1150。

在冰浴中冷卻中間體**57b**並添加吡啶(15 mL)，之後添加三氟乙酸酐(3.14 mL, 22.57 mmol)。將混所得合物攪拌10 min並添加冰。將混合物重新分佈在乙酸乙酯與水之間。將水相用乙酸乙酯萃取三次。將合併之有機萃取物用水、之後鹽水洗滌，經無水Na_2SO_4乾燥，並經由矽藻土過濾。移除溶劑並藉由管柱層析使用乙酸乙酯及石油醚(v/v

1:10)之混合物作為洗脫劑純化所得殘餘物，以產生白色固體狀(S)-1-(5-(苄基氧基)-1-(氯甲基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-2,2,2-三氟乙酮 **66a** (1.11 g, 70%)；mp 167-170℃. ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 8.37 (d, J = 8.3Hz, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.72 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.61-7.54 (m, 3H), 7.49-7.42 (m, 3H), 7.39-7.35 (m, 1H), 5.30 (AB q, J = 11.7, 15.7 Hz, 2H), 4.63-4.59 (m, 1H), 4.43-4.38 (m, 1H), 4.15-4.09 (m, 1H), 3.97-3.93 (m, 1H), 3.49 (dd, J = 9.9, 11.3 Hz, 1H) ppm。HRMS (ESI)試驗值*m/z* 442.0799 (M + Na)。$C_{22}H_{17}ClF_3NNaO_2$需要442.0795。

於-10℃下，向**66a** (1.10 g, 2.62 mmol)存於THF (20 mL)中之溶液中添加25%甲酸銨水溶液(20 mL)，之後添加Pd-C觸媒(10%，濕，550 mg)並將混合物攪拌2 h，之後添加更多Pd-C觸媒(550 mg)。將所得混合物於-10℃下攪拌過夜並經由矽藻土過濾出觸媒。自濾液移除THF並將殘餘物重新分佈在乙酸乙酯與水之間。將水相用乙酸乙酯萃取三次。將合併之有機萃取物用水、之後鹽水洗滌，經無水Na_2SO_4乾燥，並經由矽藻土過濾。移除溶劑並藉由管柱層析使用乙酸乙酯及石油醚(v/v 1:5)之混合物作為洗脫劑純化所得殘餘物，以產生米色固體狀(S)-1-(1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-2,2,2-三氟乙酮 **66b** (758 mg, 88%)；mp 209℃至212℃。^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 8.33 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.64 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.60-7.56 (m, 1H), 7.51-7.47 (m, 1H), 4.60-4.56 (m, 1H), 4.41-4.36 (m, 1H), 4.00-3.95 (m, 1H), 3.93-3.90 (m, 1H), 3.44 (dd, J = 9.8, 11.3 Hz, 1H) ppm。HRMS (ESI)試驗值*m/z* 352.0331 (M + Na)。$C_{15}H_{11}ClF_3NNaO_2$需要352.0323。

向**66b** (250 mg, 0.76 mmol)存於THF (15 mL)中之溶液中添加四唑(3%，存於乙腈中，13.5 mL，4.55 mmol)，之後添加亞磷醯胺二-第三丁基-N,N-二-異丙基酯(1.51 mL, 4.55 mmol)。將混合物於室溫下攪拌

過夜，隨後在冰浴中冷卻並逐滴添加H_2O_2 (30%水溶液，0.78 mL，7.58 mmol)。使所得混合物升溫至室溫並攪拌5 h。藉由在冰浴中冷卻的同時添加10%亞硫酸鈉水溶液驟冷反應物。藉由旋轉蒸發器移除有機揮發物。將所得混合物重新分佈在乙酸乙酯與水之間。將水相用乙酸乙酯萃取三次。將合併之有機萃取物用水、之後鹽水洗滌，經無水Na_2SO_4乾燥，並經由矽藻土過濾。移除溶劑並藉由Florisil® (US Silica)管柱層析使用乙酸乙酯及石油醚(v/v 1:6至1:3)之梯度混合物作為洗脫劑純化所得殘餘物，以產生無色油狀(S)-磷酸二-第三丁基酯1-(氯甲基)-3-(2,2,2-三氟乙醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**66c** (367 mg, 93%)；^{1}H NMR (DMSO) δ 8.44 (d, J = 1.0 Hz, 1H), 8.11 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 8.06 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.69-7.65 (m, 1H), 7.63-7.59 (m, 1H), 4.61-4.56 (m, 1H), 4.46-4.41 (m, 1H), 4.15-4.12 (m, 1H), 4.06-4.00 (m, 1H), 1.50 (s, 9H), 1.48 (s, 9H) ppm。^{31}P NMR (DMSO) δ -15.54 ppm。HRMS (ESI)試驗值 m/z 544.1236 (M + Na)。$C_{23}H_{28}ClF_3NNaO_5P$需要544.1238。

向冰浴中冷卻之**66c** (239 mg, 0.46 mmol)存於MeOH (2 mL)中之溶液中添加$CsCO_3$ (298 mg, 0.92 mmol)及若干滴水。將混合物在冰浴中攪拌1 h且隨後重新分佈在乙酸乙酯與水之間。將水相用乙酸乙酯萃取三次。將將合併之有機萃取物用水及鹽水洗滌，經無水Na_2SO_4乾燥，經由矽藻土過濾並移除溶劑。將所得殘餘物溶解於乙酸乙酯中並經由Florisil®墊(US Silica)管柱層析過濾，以產生米色膠狀(S)-磷酸二-第三丁基酯1-(氯甲基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**66d** (183 mg, 94%)，其未經進一步純化即直接使用；^{1}H NMR (DMSO) δ 8.08 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.58 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.46-7.42 (m, 1H), 7.25-7.21 (m, 1H), 7.13 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 4.00-3.93 (m, 1H), 3.87-3.78 (m, 2H), 3.54-3.42 (m, 2H), 1.50 (s, 9H), 1.49 (s, 9H) ppm。^{31}P NMR (DMSO)

δ -15.58 ppm。HRMS (ESI)試驗值 *m/z* 426.1587 (M + H)。$C_{21}H_{30}ClNO_4P$需要426.1595。

將2,5-二溴硝基苯(5.0 g, 17.8 mmol)及丙烯酸第三丁基酯(7.75 mL, 53.40 mmol)溶解於三乙胺(50 mL)中。參見圖22。藉由使氮鼓泡通過溶液沖洗燒瓶，隨後在氮流下添加三-對甲苯基膦(433 mg, 1.42 mmol)及乙酸鈀(80 mg, 0.36 mmol)。將混合物在回流下在氮下攪拌過夜。泵送出三乙胺。將所得殘餘物溶解於乙酸乙酯中並經由矽膠墊過濾。將濾液濃縮並裝載於層析管柱上。使用乙酸乙酯及石油醚(1:10)之混合物作為洗脫劑，以產生白色固體狀(2E,2'E)-3,3'-(2-硝基-1,4-伸苯基)二丙烯酸第三丁基酯**66e** (5.85 g, 88%)；mp 123℃至124℃。^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 8.14 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.99 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H), 7.74 (dd, *J* = 1.7, 8.2 Hz, 1H), 7.66 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.58 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 6.50 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 6.36 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H), 1.58 (s, 9H), 1.56 (s, 9H) ppm。HRMS (ESI)試驗值*m/z* 398.1574 (M + Na)。$C_{20}H_{25}NNaO_6$需要398.1574。

向冰浴中冷卻之**66e** (5.85 g, 15.58 mmol)存於丙酮(40 mL)中之溶液中添加鋅粉(8.15 g, 125.0 mmol)，之後添加NH_4Cl (3.33 g, 62.30 mmol)存於水(20 mL)中之溶液。將混合物於室溫下攪拌1 h。添加存於水(10 mL)中之更多鋅粉(4.00 g)及更多NH_4Cl (1.7 g)。1 h後，添加乙酸乙酯(100 mL)並藉由傾析收集上部澄清溶液。將洗滌及傾析步驟再重複兩次。將合併之有機溶液用水、之後鹽水洗滌，經無水Na_2SO_4乾燥，並經由矽膠墊過濾。移除溶劑，以產生黃色膠狀(2E,2'E)-3,3'-(2-胺基-1,4-伸苯基)二丙烯酸第三丁基酯**66f** (5.46 g, 100%)；mp 73℃至75℃。^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.68 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H), 7.46 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.37 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.92 (dd, *J* = 1.5, 8.1 Hz, 1H), 6.81 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 6.33 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 6.31 (d, *J* = 15.8 Hz,

1H), 3.99 (br s, 2H), 1.53 (s, 9H), 1.51 (s, 9H) ppm。HRMS (ESI)試驗值*m/z* 368.1830 (M + Na)。$C_{20}H_{27}NNaO_4$需要368.1832。

將**66f** (2.73 g, 7.90 mmol)、3-(((9H-茀-9-基)甲氧基)羰基胺基)丙酸(Fmoc-β-丙胺酸，3.69 g，11.85 mmol)、EDCI鹽酸鹽(7.58 g, 39.50 mmol)及對甲苯磺酸(136 mg, 0.79 mmol)存於DMA (25 mL)中之混合物於室溫下攪拌過夜。將混合物重新分佈在乙酸乙酯與水之間。將水相用乙酸乙酯萃取三次。將合併之有機萃取物用水、之後鹽水洗滌，經無水Na_2SO_4乾燥，並經由矽藻土過濾。移除溶劑以產生白色固體狀(2E,2'E)-3,3'-(2-(3-(((9H-茀-9-基)甲氧基)羰基胺基)丙醯胺基)-1,4-伸苯基)二丙烯酸第三丁基酯**66g** (4.89 g, 97%)；mp 102℃至105℃。^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.87 (s, 1H), 7.70-7.66 (m, 2H), 7.62-7.52 (m, 4H), 7.44 (br s, 1H), 7.38-7.34 (m, 3H), 7.29-7.25 (m, 2H), 6.41 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 6.34 (d, J = 15.7 Hz, 1H), 4.42 (br s, 2H), 4.19 (t, J = 6.4 Hz, 1H), 3.59 (br s, 2H), 2.67 (br s, 2H), 1.53 (s, 9H), 1.51 (s, 9H) ppm。HRMS (ESI)試驗值*m/z* 661.2878 (M + Na)。$C_{38}H_{42}N_2NaO_7$需要661.2884。

向冰浴中冷卻之**66g** (530 mg, 0.83 mmol)存於DCM (4 mL)中之溶液中添加TFA (1 mL, 12.98 mmol)。使混合物升溫至室溫並攪拌過夜，以產生白色懸浮液。添加乙酸乙酯以沈澱出更多固體，將其藉由過濾收集並用乙酸乙酯及石油醚洗滌，以產生白色固體狀(2E,2'E)-3,3'-(2-(3-(((9H-茀-9-基)甲氧基)羰基胺基)丙醯胺基)-1,4-伸苯基)二丙烯酸**66h** (404 mg, 92%)。mp 282℃(分解)。^{1}H NMR (DMSO) δ 12.46 (br s, 1H), 9.92 (s, 1H), 7.89-7.84 (m, 3H), 7.74-7.68 (m, 4H), 7.58-7.54 (m, 2H), 7.44-7.38 (m, 3H), 7.31-7.28 (m, 2H), 6.54 (dd, J = 3.2, 16.0 Hz, 2H), 4.30 (d, J = 6.5 Hz, 2H), 4.22 (t, J = 6.8 Hz, 1H), 3.30 (br s, 2H), 2.83-2.79 (m, 2H) ppm。HRMS (ESI)試驗值*m/z*

549.1643 (M + Na)。$C_{30}H_{26}N_2NaO_7$需要549.1632。

將**66d** (178 mg，粗製，約0.42 mmol)、**66h** (55 mg, 0.10 mmol)、EDCI鹽酸鹽(160 mg, 0.84 mmol)及對甲苯磺酸(1.8 mg, 0.01 mmol)存於DMA (2 mL)中之混合物於室溫下攪拌過夜。將混合物重新分佈在乙酸乙酯與冷的$NaHCO_3$稀釋水溶液之間。將水相用乙酸乙酯萃取三次。將合併之有機萃取物用水、之後鹽水洗滌，經無水Na_2SO_4乾燥，並經由矽藻土過濾。移除溶劑並藉由Florisil® (US Silica)管柱層析使用MeOH及乙酸乙酯(v/v 0.25-5%)之梯度混合物進一步純化殘餘物，以產生黃色固體狀3-(2,5-雙((E)-3-((S)-1-(氯甲基)-5-(二-第三丁氧基磷醯基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-3-側氧基丙-1-烯基)苯基胺基)-3-側氧基丙基胺基甲酸(9H-芴-9-基)甲基酯**66i** (62 mg, 44%)；^{1}H NMR (DMSO) δ 10.04 (s, 1H), 8.67 (s, 2H), 8.11-8.05 (m, 3H), 7.97 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.88-7.82 (m, 4H), 7.78 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.73-7.67 (m, 3H), 7.63-7.58 (m, 2H), 7.53-7.47 (m, 3H), 7.38 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 7.30-7.24 (m, 4H), 4.60-4.50 (m, 4H), 4.42-4.35 (m, 2H), 4.30 (d, J = 6.7 Hz, 2H), 4.22 (t, J = 6.6 Hz, 1H), 4.06-3.93 (m, 4H), 3.40-3.33 (m, 2H), 2.63-2.59 (m, 2H), 1.50 (2×s, 18H), 1.47 (2×s, 18H) ppm。^{31}P NMR (DMSO) δ -15.45 ppm。HRMS (ESI)試驗值*m/z* 1341.4677 (M + H)。$C_{72}H_{81}Cl_2N_4O_{13}P_2$需要1341.4647。

向**66i** (60 mg, 0.045 mmol)存於DMF (1 mL)中之溶液中添加六氫吡啶(44 μL, 0.45 mmol)。將混合物於室溫下攪拌3 h，隨後泵送出所有揮發性組份。將所得殘餘物與醚及石油醚(v/v 1:1)之混合物一起研磨，以產生白色固體狀游離胺**66j** (44 mg, 96%)。^{1}H NMR (DMSO) δ 8.68 (s, 2H), 8.11-8.05 (m, 3H), 7.98 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.91-7.86 (m, 2H), 7.78-7.85 (m, 1H), 7.70 (d, J = 15.3 Hz, 1H), 7.63-7.58 (m, 2H), 7.51 (t, J = 7.9 Hz, 2H), 7.26 (d, J = 15.3 Hz, 2H), 4.66-4.52 (m, 4H),

4.44-4.35 (m, 2H), 4.07-3.95 (m, 4H), 2.95 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.56-2.50 (m, 2H), 1.50-1.49 (m, 36H) ppm。^{31}P NMR (DMSO) δ -15.42, 15.45 ppm。HRMS (ESI)試驗值*m/z* 1119.3981 (M + H)。$C_{57}H_{71}Cl_2N_4O_{11}P_2$需要1119.3966。

將**66j** (40 mg, 0.036 mmol)、6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己酸2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯(SuOMC, 12 mg, 0.037 mmol)及DIPEA (6.8 μL, 0.039 mmol)存於DMSO (1 mL)中之混合物於室溫下攪拌過夜，之後泵送出所有揮發性組份。將所得殘餘物與醚一起研磨，以產生黃色固體狀雙(二-第三丁基磷酸酯) N-(3-(2,5-雙((E)-3-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-3-側氧基丙-1-烯基)苯基胺基)-3-側氧基丙基)-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺**66k** (32 mg, 67%)。^{1}H NMR (DMSO) δ 10.02 (s, 1H), 8.67 (s, 2H), 8.11-8.05 (m, 3H), 7.98-7.92 (m, 3H), 7.85-7.75 (m, 2H), 7.70 (d, *J* = 15.3 Hz, 1H), 7.63-7.58 (m, 2H), 7.51 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.26 (dd, *J* = 4.4, 15.4 Hz, 2H), 6.96 (s, 2H), 4.66-4.52 (m, 4H), 4.44-4.35 (m, 2H), 4.07-3.95 (m, 4H), 3.45-3.30 (m, 4H), 2.52-2.50 (m, 2H), 2.08 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.50-1.40 (m, 40H), 1.33-1.25 (m, 2H) ppm。^{31}P NMR (DMSO) δ -15.42, 15.45 ppm。HRMS (ESI)試驗值*m/z* 1334.4515 (M + Na)。$C_{67}H_{81}Cl_2N_5NaO_{14}P_2$需要1334.4525。

向冰浴中冷卻之**66k** (30 mg, 0.02 mmol)存於DCM (1 mL)中之溶液中添加TFA (1 mL, 12.98 mmol)。使混合物升溫至室溫並攪拌3 h。泵送出所有揮發性組份並將所得殘餘物與乙酸乙酯一起研磨，以產生黃色固體狀N-(3-(2,5-雙((E)-3-((S)-1-(氯甲基)-5-膦醯氧基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-3-側氧基丙-1-烯基)苯基胺基)-3-側氧基丙基)-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺**66** (20 mg，80%，HPLC純度95%)；^{1}H NMR (DMSO) δ 10.01 (s, 1H), 8.59 (s, 2H), 8.16-8.08 (m,

3H), 7.97-7.90 (m, 3H), 7.88-7.73 (m, 2H), 7.69 (d, *J* = 14.5 Hz, 1H), 7.61-7.55 (m, 2H), 7.46 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.29-7.24 (d, *J* = 14.0 Hz, 2H), 6.97 (s, 2H), 4.62-4.52 (m, 3H), 4.40-4.30 (m, 3H), 4.05-3.90 (m, 4H), 3.43-3.37 (m, 2H), 3.24-3.18 (m, 2H), 2.61-2.55 (m, 2H), 2.08 (br s, 2H), 1.54-1.44 (m, 4H), 1.27-1.15 (m, 2H) ppm。^{31}P NMR (DMSO) δ -5.81 ppm。HRMS (ESI負性)試驗值*m/z* 1086.2067 (M - H)。$C_{51}H_{48}Cl_2N_5O_{14}P_2$需要1086.2056。

實例17 N-(3-(2,5-雙((E)-3-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-3-側氧基丙-1-烯基)苯基胺基)-3-側氧基丙基)-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺**67**

向(2E,2'E)-3,3'-(2-(3-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基胺基)丙醯胺基)-1,4-伸苯基)二丙烯酸第三丁基酯**66g** (4.89 g, 7.66 mmol)存於DCM (30 mL)中之溶液中添加六氫吡啶(4.5 mL, 45.50 mmol)。參見圖23。將混合物於室溫下攪拌5 h，之後藉由旋轉蒸發器移除所有揮發性組份。使用乙酸乙酯、之後TEA、MeOH及乙酸乙酯(v/v 1:10:100)之混合物作為脫劑進行管柱層析，從而產生白色固體狀(2E,2'E)- 3,3'-(2-(3-胺基丙醯胺基)-1,4-伸苯基)二丙烯酸第三丁基酯**67a** (2.33 g, 73%)。mp 62℃至63℃。^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 11.04 (s, 1H), 8.32 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 7.91 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H), 7.54 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.24 (dd, *J* = 1.5, 8.2 Hz, 1H), 6.42 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 6.34 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 3.18 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 2.52 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 1.53 (s, 18H) ppm。HRMS (ESI)試驗值*m/z* 417.2394 (M + H)。$C_{23}H_{33}N_2O_5$需要417.2384。

將**67a** (1.00 g, 2.40 mmol)、6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己酸2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯(SuOMC, 740 mg, 2.40 mmol)及DIPEA (460 μL, 2.64 mmol)存於DMF (10 mL)中之混合物於室溫下攪

拌過夜。泵送出所有揮發性組份。藉由管柱層析使用乙酸乙酯及石油醚(v/v 2:1)之混合物作為洗脫劑、之後僅使用乙酸乙酯純化所得殘餘物，以產生白色固體狀(2E,2'E)-3,3'-(2-(3-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)丙醯胺基)-1,4-伸苯基)二丙烯酸第三丁基酯**67b** (1.00 g, 68%)。mp 69℃至72℃。^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.95 (s, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.65 (d, J = 15.9 Hz, 1H), 7.61 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.53 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 7.37 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.69 (br s, 1H), 6.64 (s, 2H), 6.39 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 6.38 (d, J = 15.8 Hz, 1H), 3.68-3.63 (m, 2H), 3.43 (d, J = 7.0 Hz, 2H), 2.69 (d, J = 5.5 Hz, 2H), 2.21 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.67-1.50 (m, 4H), 1.53 (s, 9H), 1.52 (s, 9H), 1.31-1.24 (m, 2H) ppm。HRMS (ESI)試驗值m/z 632.2931 (M + Na)。$C_{33}H_{43}N_3NaO_8$需要632.2942。

向冰浴中冷卻之**67b** (500 mg, 0.82 mmol)存於DCM (4 mL)中之溶液中逐滴添加TFA (2 mL)。使混合物升溫至室溫並攪拌4 h。在泵送出所有揮發性組份後，將所得殘餘物與乙酸乙酯一起研磨，以產生白色固體狀(2E,2'E)-3,3'-(2-(3-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)丙醯胺基)-1,4-伸苯基)二丙烯酸**67c** (380 mg, 93%)。mp 257℃至261℃。^{1}H NMR (DMSO) δ 12.47 (s, 2H), 9.90 (s, 1H), 7.89-7.83 (m, 2H), 7.71-7.67 (m, 2H), 7.57-7.53 (m, 2H), 6.99 (s, 2H), 6.53 (d, J = 15.9 Hz, 2H), 3.36-3.30 (m, 4H), 2.54-2.50 (m, 2H), 2.06 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.52-1.42 (m, 4H), 1.22-1.17 (m, 2H) ppm。HRMS (ESI)試驗值m/z 520.1683 (M + Na)。$C_{25}H_{27}N_3NaO_8$需要520.1690。

向冰浴中冷卻之(S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-甲酸第三丁基酯**51a** (298 mg, 0.89 mmol)存於DCM (5 mL)中之溶液中添加存於二噁烷(10 mL)中之4N HCl。使混合物升溫至室溫並攪拌3 h。泵送出所有揮發性組份，以產生呈鹽酸鹽形式之(S)-1-(氯甲基)-2,3-

二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-醇**67d**，向其中添加**67c** (185 mg, 0.37 mmol)、EDCI鹽酸鹽(428 mg, 2.23 mmol)、對甲苯磺酸(6 mg, 0.037 mmol)及DMA (5 mL)。在將混合物於室溫下攪拌6 h後，添加更多EDCI鹽酸鹽(285 mg, 1.49 mmol)及甲苯磺酸(6 mg, 0.037 mmol)。將混合物攪拌過夜且隨後重新分佈在乙酸乙酯與水之間。將水相用乙酸乙酯萃取三次。將合併之有機萃取物用水、之後鹽水洗滌，經無水Na_2SO_4乾燥，並經由矽藻土過濾。移除溶劑並藉由管柱層析使用MeOH及乙酸乙酯(v/v 1-15%)之梯度混合物作為洗脫劑進一步純化所得殘餘物，以產生黃色固體狀**67** (160 mg，46%，HPLC純度96%)；mp 230℃至234℃ (dec)。^{1}H NMR (DMSO) δ 10.43 (s, 1H), 10.40 (s, 1H), 10.00 (s, 1H), 8.14-8.08 (m, 5H), 7.95 (br s, 1H), 7.83-7.75 (m, 5H), 7.68 (d, J = 15.2 Hz, 1H), 7.52 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 7.35 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 7.28-7.23 (dd, J = 5.2, 15.2 Hz, 2H), 6.95 (s, 2H), 4.58-4.45 (m, 4H), 4.29-4.20 (m, 2H), 4.04-3.97 (m, 2H), 3.88-3.80 (m, 2H), 3.43-3.37 (m, 2H), 3.23 (d, J = 6.9 Hz, 2H), 2.60-2.56 (m, 2H), 2.09 (d, J = 7.1 Hz, 2H), 1.50-1.40 (m, 2H), 1.40-1.30 (m, 2H), 1.24-1.14 (m, 2H) ppm。HRMS (ESI)試驗值*m/z* 950.2672 (M + Na)。$C_{51}H_{47}Cl_2N_5NaO_8$需要950.2694。

實例18 (S)-磷酸二氫1-(氯甲基)-3-((E)-3-(4-((E)-3-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-3-側氧基丙-1-烯基)-2-(3-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)丙醯胺基)苯基)丙烯醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**68**

向冰浴中冷卻之(S)-磷酸二-第三丁基酯1-(氯甲基)-3-(2,2,2-三氟乙醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**66c** (125 mg, 0.24 mmol)存於MeOH (1 mL)中之溶液中添加$CsCO_3$ (298 mg, 0.92 mmol)及若干滴水。將混合物在冰浴中攪拌1 h且隨後重新分佈在乙酸乙酯與水之

間。將水相用乙酸乙酯萃取三次。將將合併之有機萃取物用水及鹽水洗滌，經無水Na_2SO_4乾燥，經由矽藻土過濾並移除溶劑。將所得殘餘物溶解於乙酸乙酯中並經由Florisil® (US Silica)墊過濾。移除溶劑，從而產生米色膠狀(S)-磷酸二-第三丁基酯1-(氯甲基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**66d**，其未經進一步純化即直接使用。

向冰浴中冷卻之(S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-甲酸第三丁基酯**51a** (80 mg, 0.24 mmol)存於DCM (2 mL)中之溶液中添加存於二噁烷(4 mL)中之4N HCl。使混合物升溫至室溫並攪拌2 h。泵送出所有揮發性組份且直接使用(S)-1-(氯甲基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-醇**67d**。

向在鹽-冰浴(-10℃)中冷卻之**66d**及**67d** (各自如上文製備)存於DMA (2 mL)中之溶液中添加(2E,2'E)-3,3'-(2-(3-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)丙醯胺基)-1,4-伸苯基)二丙烯酸**67c** (119 mg, 0.24 mmol)，之後添加EDCI鹽酸鹽(276 mg, 1.44 mmol)及對甲苯磺酸(4 mg, 0.024 mmol)。使混合物升溫至室溫，攪拌過夜，且隨後倒在冰上。藉由過濾收集所得沈澱，用水洗滌並在真空下乾燥。藉由Florisil® (US Silica)層析管柱使用MeOH及DCM (v/v 2-10%)之梯度混合物進行純化，從而產生黃色固體(50 mg)，藉由LC-MS將其鑑別為磷酸二-第三丁基酯((S)-1-(氯甲基)-3-((E)-3-(4-((E)-3-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-3-側氧基丙-1-烯-1-基)-2-(3-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)丙醯胺基)苯基)丙烯醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基)酯**68a**及磷酸二-第三丁基酯((S)-1-(氯甲基)-3-((E)-3-(4-((E)-3-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-3-側氧基丙-1-烯-1-基)-3-(3-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)丙醯胺基)苯基)丙烯醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基)酯**68b** (藉由HPLC分別為20%及23%)、**67** (藉由HPLC為44%)

及**66** (藉由HPLC為8%)的混合物。藉由製備型HPLC (管柱：Synergi-Max® RP 4μ，250 × 21.20 mm；流動相：A/B = 25%至0% (A：甲酸銨pH 3.45，B：90%乙腈，存於水中)；流速12 mL/min，梯度方法；波長：254 nm、325 nm)進一步純化混合物，以產生黃色固體狀**68a**及**68b**之混合物(18 mg, 8%)。HRMS (ESI)試驗值*m/z* 1142.3577 (M + Na)。$C_{59}H_{64}Cl_2N_5NaO_{11}P$需要1142.3609。

向冰浴中冷卻之**68a**及**68b** (17 mg, 0.015 mmol)存於DCM (0.5 mL)中之溶液中逐滴添加TFA (0.5 mL)。使混合物升溫至室溫並攪拌3 h。泵送出所有揮發性組份。將所得殘餘物與乙酸乙酯一起研磨，以產生橙色固體狀(S)-磷酸二氫1-(氯甲基)-3-((E)-3-(4-((E)-3-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-3-側氧基丙-1-烯基)-2-(3-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)丙醯胺基)苯基)丙烯醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**68**及磷酸酯區域異構物(S)-磷酸二氫1-(氯甲基)-3-((E)-3-(4-((E)-3-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-3-側氧基丙-1-烯基)-3-(3-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)丙醯胺基)苯基)丙烯醯基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚-5-基酯**68c**之混合物(11 mg，72%，HPLC純度：95%，異構物之比率為1:1)。^{1}H NMR (DMSO) δ 10.45 (s, 1H), 10.01 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 8.15-7.23 (m, 17H), 6.95 (s, 2H), 4.60-3.80 (m, 10H), 3.43-3.37 (m, 2H), 3.27-3.18 (m, 2H), 2.60-2.50 (m, 2H), 2.10-2.00 (m, 2H), 1.55-1.35 (m, 4H), 1.20-1.10 (m, 2H) ppm。^{31}P NMR (DMSO) δ -5.81 ppm。HRMS (ESI負性)試驗值*m/z* 1006.2394 (M - H)。$C_{51}H_{47}Cl_2N_5O_{11}P$需要1006.2392。

實例23 N-(3-(2,5-雙((E)-3-((S)-1-(氯甲基)-5-(4-甲基六氫吡嗪-1-羰基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-3-側氧基丙-1-烯基)苯基胺基)-3-側氧基丙基)-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺(化合物編

號69，表4，圖37)

向192 mg (0.53 mmol)存於DMA (2 mL)中之**1** (藉由上文所提及程序新鮮製得)中添加**2** (100 mg, 0.20 mmol)、EDCI鹽酸鹽(231 mg, 1.21 mmol)及甲苯磺酸(3.5 mg, 0.020 mmol)。將混合物攪拌過夜且隨後倒入氨水溶液及冰之混合物中。藉由過濾收集所得沈澱，用水洗滌，乾燥並藉由矽膠管柱層析純化。使用MeOH及DCM (v/v 1-15%)之梯度混合物作為洗脫劑以提供黃色固體狀N-(3-(2,5-雙((E)-3-((S)-1-(氯甲基)-5-(4-甲基六氫吡嗪-1-羰基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-3-側氧基丙-1-烯基)苯基胺基)-3-側氧基丙基)-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺(30 mg，13%，HPLC純度96%)。mp 268℃ (dec)。^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 8.60 (s, 1H), 8.46 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 7.87-7.84 (m, 3H), 7.75-7.60 (m, 5H), 7.40-7.33 (m, 5H), 7.22 (br s, 1H), 6.77 (t, J = 15.3 Hz, 2H), 6.56 (s, 2H), 4.46-4.40 (m, 2H), 4.30-4.25 (m, 2H), 4.11-4.00 (m, 2H), 3.95-3.90 (m, 7H), 3.68 (表觀s, 6H), 3.53-3.46 (m, 3H), 3.38 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.73 (表觀s, 2H), 2.59-2.55 (m, 8H), 2.42 (s, 6H), 2.28 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 1.56-1.49 (m, 2H), 1.31-1.23 (m, 2H) ppm。HRMS (ESI)試驗值m/z 1180.4416 (M + H)。$C_{63}H_{68}Cl_2N_9O_{10}$需要1180.4416。

實例24 2,5-雙((E)-3-((S)-1-(氯甲基)-5-(膦醯基氧基)-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-3-側氧基丙-1-烯基)苯基胺基甲酸2-(吡啶-2-基二硫烷基)丙基酯(表4，化合物編號72，圖38)

向207 mg (0.49 mmol) **1** (藉由上文所提及程序新鮮製得)中添加**2** (70 mg, 0.15 mmol)、EDCI鹽酸鹽(233 mg, 1.22 mmol)、甲苯磺酸(3 mg, 0.015 mmol)及DMA (0.5 mL)。在將混合物攪拌過夜後，在真空下移除大部分DMA並將殘餘物重新分佈在乙酸乙酯與水之間。將水相用乙酸乙酯萃取三次。將合併之有機萃取物用水、之後鹽水洗滌，經

無水Na_2SO_4乾燥，並經由矽藻土墊過濾。移除溶劑並所得殘餘物溶解於最少DCM中並藉由添加庚烷沈澱，以產生粗產物(156 mg)，藉由製備型HPLC (管柱：Synergi-Max RP 4μ, 250 x 21.20 mm；流動相：A/B = 10%至1% (A：甲酸銨pH 3.45，B：90%乙腈，存於水中)；流速12 mL/min，梯度方法；波長：254 nm、325 nm)對其進行進一步純化，以產生黃色固體狀**3** (78 mg, 40%)。^{1}H NMR (DMSO) δ 9.67 (s, 1H), 8.67 (s, 2H), 8.43 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 8.11-8.06 (m, 3H), 7.97 (表觀d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.92 (d, J = 15.3 Hz, 1H), 7.84-7.76 (m, 3H), 7.70 (d, J = 15.3 Hz, 2H), 7.61 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 7.51 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 7.28 (d, J = 15.3 Hz, 1H), 7.27 (d, J = 15.3 Hz, 1H), 7.23-7.19 (m, 1H), 4.62-4.53 (m, 4H), 4.43-4.37 (m, 2H), 4.23-4.13 (m, 2H), 4.05-3.95 (m, 4H), 3.42-3.37 (m, 1H), 1.51 (s, 9H), 1.50 (s, 9H), 1.49 (s, 9H), 1.48 (s, 9H), 1.34 (d, J = 6.5 Hz, 3H) ppm。^{31}P NMR (DMSO) δ -15.46 (s)及-15.48 (s) ppm。HRMS (ESI)試驗值 m/z 1297.3471 (M + Na)。$C_{63}H_{74}Cl_2N_4NaO_{12}P_2S_2$需要1297.3489。

向冰浴中冷卻之**3** (60 mg, 0.047 mmol)存於DCM (2 mL)中之溶液中添加TFA (1 mL, 6.49 mmol)。使混合物升溫至室溫並攪拌3 h。泵送出所有揮發性組份並將所得殘餘物與乙酸乙酯一起研磨，以產生黃色固體狀**4** (49 mg，99%，HPLC純度100%)；^{1}H NMR (DMSO) δ 9.65 (s, 1H), 8.59 (s, 2H), 8.46-8.44 (m, 1H), 8.15-8.08 (m, 3H), 7.96-7.90 (m, 3H), 7.82-7.70 (m, 3H), 7.70 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 7.59 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 7.48 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.31-7.22 (m, 3H), 5.75 (s, 1H), 4.64-4.53 (m, 4H), 4.40-4.33 (m, 3H), 4.25-4.15 (m, 3H), 4.06-3.93 (m, 3H), 1.35-1.32 (m, 3H) ppm。^{31}P NMR (DMSO) δ -5.95 (s) ppm。HRMS (ESI)試驗值 m/z 1073.0949 (M + Na)。$C_{47}H_{42}Cl_2N_4NaO_{12}P_2S_2$需要1073.0985。

實例25 磷酸二氫[(1S)-1-(氯甲基)-3-[(E)-3-[4-[(E)-3-[(1S)-1-(氯甲基)-5-膦醯基氧基-1,2-二氫苯并[e]吲哚-3-基]-3-側氧基-丙-1-烯基]-2-[2-[2-(2,5-二側氧基吡咯-1-基)乙氧基]乙氧基]苯基]丙-2-烯醯基]-1,2-二氫苯并[e]吲哚-5-基]酯(化合物編號78，表4，圖39)

中間體3

向76 mg (0.18 mmol) **1** (藉由上文所提及程序新鮮製得)中添加**2** (18 mg, 0.045 mmol)、EDCI鹽酸鹽(69 mg, 0.36 mmol)、甲苯磺酸(0.8 mg, 0.005 mmol)及DMA (0.25 mL)。在將混合物攪拌過夜後，在真空下移除大部分DMA並將殘餘物重新分佈在乙酸乙酯與水之間。將水相用乙酸乙酯萃取三次。將合併之有機萃取物用水、之後鹽水洗滌，經無水Na_2SO_4乾燥，並經由矽藻土墊過濾。移除溶劑並所得殘餘物溶解於最少DCM中並藉由添加庚烷沈澱，以產生粗產物(54 mg)，藉由製備型HPLC (管柱：Synergi-Max RP 4μ, 250 x 21.20 mm；流動相：A/B = 20%至1% (A：甲酸銨pH 3.45，B：90%乙腈，存於水中)；流速12 mL/min，梯度方法；波長：254 nm、325 nm)對其進行進一步純化，以產生黃色固體狀**3** (17 mg, 30%)。^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 8.72 (br s, 2H), 8.23 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.96 (d, J = 15.2 Hz, 1H), 7.83 (d, J = 15.3 Hz, 1H), 7.71 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.54-7.50 (m, 3H), 7.42-7.39 (m, 2H), 7.26-7.12 (m, 3H), 6.95-6.88 (m, 1H), 6.67 (s, 2H), 4.57-4.52 (m, 2H), 4.47-4.38 (m, 2H), 4.28-4.24 (m, 2H), 4.16-4.09 (m, 2H), 4.00-3.94 (m, 4H), 3.78 (表觀s, 4H), 3.55-.348 (m, 2H), 1.57 (s, 36H) ppm。^{31}P NMR ($CDCl_3$) δ -15.64 (s) ppm。HRMS (ESI)試驗值*m/z* 1238.3862 (M + Na)。$C_{62}H_{73}Cl_2N_3NaO_{14}P_2$需要1238.3837。

向冰浴中冷卻之**3**(16 mg, 0.013 mmol)存於DCM (1 mL)中之溶液中添加TFA (0.5 mL, 3.24 mmol)。使混合物升溫至室溫並攪拌3 h。泵送出所有揮發性組份並將所得殘餘物與乙酸乙酯一起研磨，以產生黃

色固體狀**化合物78** (13 mg，100%，HPLC純度100%)。^{1}H NMR (DMSO) δ 8.60 (s, 2H), 8.12 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.95-7.87 (m, 4H), 7.72 (d, J = 15.1 Hz, 1H), 7.61-7.57 (m, 2H), 7.53-7.45 (m, 4H), 7.38-7.32 (m, 2H), 6.97 (s, 2H), 4.60-4.48 (m, 4H), 4.30-4.28 (m, 4H), 4.08-3.88 (m, 6H), 3.68-3.58 (m, 4H)。^{31}P NMR (DMSO) δ -5.94 (s) ppm。HRMS (ESI) 試驗值 *m/z* 1014.1301 (M + Na)。$C_{46}H_{41}Cl_2N_3NaO_{14}P_2$需要1014.1333。

實例26 磷酸二氫[(1S)-1-(氯甲基)-3-[(E)-3-[4-[(E)-3-[(1S)-1-(氯甲基)-5-膦醯基氧基-1,2-二氫苯并[e]吲哚-3-基]-3-側氧基-丙-1-烯基]-2-[2-(2,5-二側氧基吡咯-1-基)乙氧基]苯基]丙-2-烯醯基]-1,2-二氫苯并[e]吲哚-5-基]酯(化合物編號79，表4，圖40)

中間體3

向52 mg (0.12 mmol) **1** (藉由上文所提及程序新鮮製得)中添加**2** (11 mg, 0.031 mmol)、EDCI鹽酸鹽(35 mg, 0.18 mmol)、甲苯磺酸(0.5 mg, 0.003 mmol)及DMA (0.25 mL)。在將混合物攪拌過夜後，在真空下移除大部分DMA並將殘餘物重新分佈在乙酸乙酯與水之間。將水相用乙酸乙酯萃取三次。將合併之有機萃取物用水、之後鹽水洗滌，經無水Na_2SO_4乾燥，並經由矽藻土墊過濾。移除溶劑並所得殘餘物溶解於最少DCM中並藉由添加庚烷沈澱，以產生粗產物(71 mg)，藉由製備型HPLC (管柱：Synergi-Max RP 4μ, 250 × 21.20 mm；流動相：A/B = 20%至1% (A：甲酸銨pH 3.45，B：90%乙腈，存於水中)；流速12 mL/min，梯度方法；波長：254 nm、300 nm)對其進行進一步純化，以產生黃色固體狀**3** (15 mg, 42%)。^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 8.71 (br s, 2H), 8.25 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.95 (d, J = 15.5 Hz, 1H), 7.83 (d, J = 15.3 Hz, 1H), 7.72 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.60-7.52 (m, 3H), 7.46-7.40 (m, 2H), 7.28-7.20 (m, 2H), 7.13-6.99 (m, 2H), 6.78 (s, 2H), 4.64-4.60 (m,

2H), 4.51-4.45 (m, 2H), 4.38-4.32 (m, 2H), 4.15-4.05 (m, 4H), 4.00-3.95 (m, 2H), 3.57-3.49 (m, 2H), 1.58 (s, 36H) ppm。^{31}P NMR ($CDCl_3$) δ -15.67 (s) ppm。HRMS (ESI)試驗值*m/z* 1194.3606 (M + Na)。$C_{60}H_{69}Cl_2N_3NaO_{13}P_2$需要1194.3575。

化合物編號79

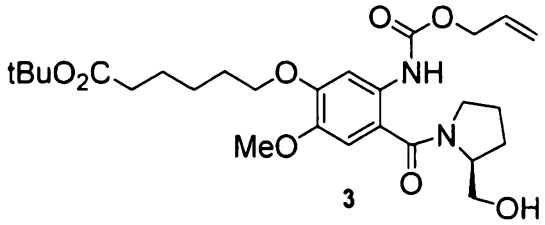
向冰浴中冷卻之**3**(13 mg, 0.011 mmol)存於DCM (0.5 mL)中之溶液中添加TFA (0.2 mL, 1.30 mmol)。使混合物升溫至室溫並攪拌0.5 h。添加二乙醚以產生沈澱，將其過濾出並用乙酸乙酯洗滌，以產生黃色固體狀4 (化合物編號79) (8.4 mg，80%，HPLC純度90%)。^{1}H NMR (DMSO) δ 8.59 (s, 2H), 8.13 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.97-7.82 (m, 4H), 7.71 (d, J = 15.1 Hz, 1H), 7.60-7.52 (m, 3H), 7.49-7.44 (m, 3H), 7.35-7.24 (m, 2H), 7.08 (s, 2H), 4.65-4.50 (m, 4H), 4.40-4.30 (m, 4H), 4.05-3.90 (m, 6H)。^{31}P NMR (DMSO) δ -5.81 (s) ppm。HRMS (ESI)試驗值*m/z* 970.1036 (M + Na)。$C_{44}H_{37}Cl_2N_3NaO_{13}P_2$需要970.1071。

實例27 N-[1-(氯甲基)-3-[5-[1-(氯甲基)-5-羥基-1,2-二氫苯并[e]吲哚-3-基]-5-側氧基-戊醯基]-1,2-二氫苯并[e]吲哚-5-基]胺基甲酸2-(2-吡啶基二硫烷基)丙基酯(化合物編號80，表4，圖41)

將**62c** (31.0 mg，0.0674 mmol，藉由上文所提及程序新鮮製得)、**53h** (23.0 mg，0.0674 mmol，藉由上文所提及程序新鮮製得)、EDCI.HCl (38.7 mg, 0.202 mmol)及TsOH (2.3 mg, 0.0135 mmol)存於無水DMA (2 mL)中之混合物於r.t.下在氮下攪拌過夜。18 h後，將反應混合物用EtOAc及H_2O稀釋並充分混合。分離各層並用H_2O (3 ×)洗滌有機層，乾燥(Na_2SO_4)並在真空下移除溶劑。藉由矽膠上管柱層析使用DCM:MeOH 100:0至98:2純化粗產物，之後與二異丙基醚一起研磨，以產生乳膏固體狀化合物1 (化合物編號80，26.0 mg，49%，HPLC純度：95.2%)。^{1}H NMR δ (400 MHz, DMSO-d_6) 10.36 (s, 1H),

9.69 (s, 1H), 8.56 (s, 1H), 8.44 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H), 8.08 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.02-8.00 (m, 2H), 7.92 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.85-7.77 (m, 3H), 7.57-7.53 (m, 1H), 7.51-7.47 (m, 1H), 7.45-7.41 (m, 1H), 7.34-7.30 (m, 1H), 7.24-7.21 (m, 1H), 4.42-4.29 (m, 3H), 4.25-4.13 (m, 5H), 4.05-3.97 (m, 2H), 3.91 (dd, *J* = 11, 7.2 Hz, 1H), 3.79 (dd, *J* = 11, 8.3 Hz, 1H), 3.43-3.36 (m, 1H), 2.77-2.56 (m, 4H), 2.01-1.93 (m, 2H), 1.34 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H)。HRMS *m/z* 811.1542 [$(M+Na)^+$計算值$C_{40}H_{38}Cl_2N_4NaO_5S_2$ 811.1553]。

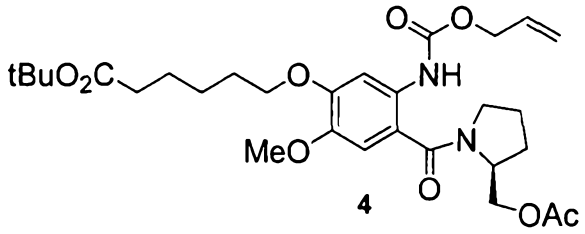
實例28 3-[6-[1-(氯甲基)-5-(4-甲基六氫吡嗪-1-羰基)氧基-1,2-二氫苯并[e]吲哚-3-基]-6-側氧基-己氧基]-6-羥基-2-甲氧基-11-側氧基-6a,7,8,9-四氫-6H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯二氮呯-5-甲酸2-(2-吡啶基二硫烷基)丙基酯、3-[6-[1-(氯甲基)-5-膦醯基氧基-1,2-二氫苯并[e]吲哚-3-基]-6-側氧基-己氧基]-6-羥基-2-甲氧基-11-側氧基-6a,7,8,9-四氫-6H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯二氮呯-5-甲酸2-(2-吡啶基二硫烷基)丙基酯及3-[6-[1-(氯甲基)-5-羥基-1,2-二氫苯并[e]吲哚-3-基]-6-側氧基-己氧基]-6-羥基-2-甲氧基-11-側氧基-6a,7,8,9-四氫-6H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯二氮呯-5-甲酸2-(2-吡啶基二硫烷基)丙基酯(化合物編號81-83，表4，圖42-43)



3

將**1** (1.40 g，4.00 mmol，遵循以下文獻程序製備：*J. Med. Chem.* **2003,** *46,* 2132-2151)、**2** (1.31 g，5.22 mmol，遵循以下文獻程序製備：WO2004065491 A1)及K_2CO_3 (829 mg, 6.00 mmol)存於無水DMA (15 mL)中之混合物於r.t.下攪拌43 h。隨後將混合物用EtOAc及H_2O稀釋，充分混合並分離各層。將有機層用H_2O (3 ×)、鹽水(1 ×)洗滌並乾

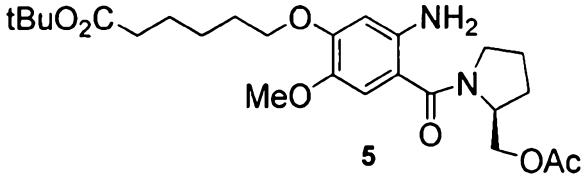
燥(Na_2SO_4)並在真空下移除溶劑。藉由矽膠上管柱層析使用EtOAc:Hex 50:50至67:33至100:0純化粗產物，以產生黃色油狀化合物**3** (1.74 g, 84%)。^{1}H NMR δ (400 MHz, $CDCl_3$) 8.77 (br s, 1H), 7.79 (s, 1H), 6.82 (s, 1H), 6.02-5.92 (m, 1H), 5.36 (dq, J = 17.2, 1.5 Hz, 1H), 5.26 (dq, J = 10.4, 1.2 Hz, 1H), 4.69-4.60 (m, 2H), 4.47-4.39 (m, 1H), 4.28 (br s, 1H), 4.09-4.05 (m, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.90-3.80 (m, 1H), 3.74-3.70 (m, 1H), 3.65-3.59 (m, 1H), 3.54-3.47 (m, 1H), 2.25 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.20-2.15 (m, 1H), 1.93-1.84 (m, 3H), 1.81-1.72 (m, 1H), 1.70-1.63 (m, 3H), 1.53-1.47 (m, 2H), 1.44 (s, 9H)。HRMS *m/z* 543.2666 [$(M+Na)^+$計算值$C_{27}H_{40}N_2NaO_8$ 543.2677]。



4

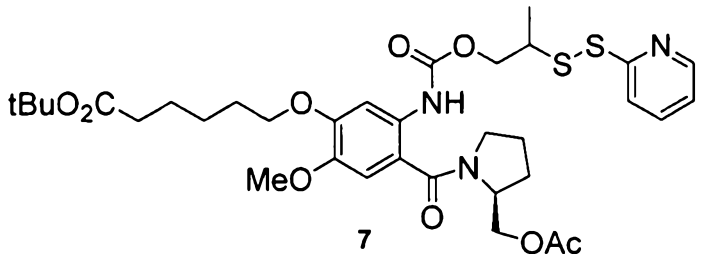
於r.t.下向**3** (821 mg, 1.58 mmol)存於無水DCM (6 mL)中之溶液中添加Et_3N (1.32 mL, 9.47 mmol)。隨後添加乙酸酐(0.75 mL, 7.93 mmol)並將混合物於r.t.下攪拌4.5 h。將反應混合物冷卻至0℃並添加無水MeOH (1 mL)並將混合物於0℃下攪拌15 min。隨後添加EtOAc (120 mL)並將混合物用H_2O (2 ×)、鹽水(1 ×)洗滌，乾燥(Na_2SO_4)並在真空下移除溶劑，以產生化合物**4** (891 mg，定量)，其未經純化即用於下一步驟。^{1}H NMR δ (400 MHz, $CDCl_3$) 8.88 (br s, 1H), 7.82 (s, 1H), 6.81 (s, 1H), 6.01-5.91 (m, 1H), 5.36 (dq, J = 17.2, 1.5 Hz, 1H), 5.25 (dq, J = 10.4, 1.3 Hz, 1H), 4.65-4.62 (m, 2H), 4.61-4.54 (m, 1H), 4.32-4.22 (m, 2H), 4.09-4.06 (m, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.55-3.47 (m, 2H), 2.26-2.23 (m, 2H), 2.18-2.12 (m, 1H), 2.07 (s, 3H), 1.97-1.77 (m, 5H), 1.70-1.63 (m, 2H), 1.54-1.47 (m, 2H), 1.44 (s, 9H)。HRMS *m/z*

585.2774 [$(M+Na)^+$計算值$C_{29}H_{42}N_2NaO_9$ 585.2783]。



5

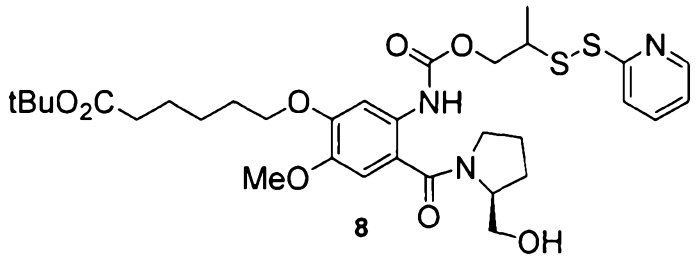
於r.t.下向**4** (1.06 g, 1.88 mmol)存於無水DCM (20 mL)中之溶液中添加吡咯啶(1.6 mL, 19.2 mmol)。隨後添加$Pd(PPh_3)_4$ (109 mg, 0.0943 mmol)並將反應混合物於r.t.下攪拌40 min。將反應混合物用0.25 M HCl溶液(2 × 75 mL)洗滌，乾燥(Na_2SO_4)並在真空下移除溶劑。藉由矽膠上管柱層析使用EtOAc:Hex 50:50至100:0純化粗產物，以產生黃色油狀化合物**5** (726 mg, 81%)。^{1}H NMR δ (400 MHz, DMSO-d_6) 6.67 (s, 1H), 6.35 (s, 1H), 5.08 (s, 2H), 4.35-4.30 (m, 1H), 4.13-4.06 (m, 2H), 3.87 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.63 (s, 3H), 3.50-3.44 (m, 1H), 3.42-3.35 (m, 1H), 2.21 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.07-2.00 (m, 1H), 2.01 (s, 3H), 1.89-1.82 (m, 1H), 1.77-1.67 (m, 4H), 1.59-1.51 (m, 2H), 1.44-1.36 (m, 2H), 1.39 (s, 9H)。HRMS *m/z* 501.2573 [$(M+Na)^+$計算值$C_{25}H_{38}N_2NaO_7$ 501.2571]。



7

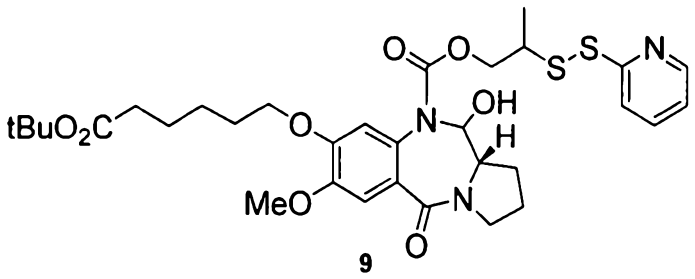
於r.t.下在氮下向**5** (726 mg, 1.52 mmol)及DMAP (557 mg, 4.56 mmol)存於無水DCM (25 mL)中之混合物中添加雙光氣(0.22 mL, 1.82 mmol)。30 min後，添加**6** (2.60 g，12.9 mmol；藉由上文所提及程序新鮮製得-無先前指派給醇之編號)存於無水DCM (25 mL)中之溶液並將混合物於r.t.下攪拌過夜。18 h後，將反應混合物用H_2O (1 ×)洗滌，乾燥(Na_2SO_4)並在真空下移除溶劑。藉由矽膠上管柱層析使用DCM:EtOAc 100:0至95:5至94:6直至洗脫過量**6**及隨後使用EtOAc:Hex

70:30來純化粗產物，以產生淺黃色油狀化合物**7** (920 mg, 86%)。^{1}H NMR δ (400 MHz, DMSO-d_6) 9.16 (br s, 1H), 8.45-8.43 (m, 1H), 7.83-7.78 (m, 2H), 7.25-7.21 (m, 1H), 7.15 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 6.87 (s, 1H), 4.29 (br s, 1H), 4.17-3.99 (m, 4H), 3.92 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.42-3.30 (m, 3H), 2.20 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.06-1.95 (m, 4H), 1.83 (br s, 1H), 1.77-1.68 (m, 4H), 1.58-1.49 (m, 2H), 1.43-1.36 (m, 2H), 1.39 (s, 9H), 1.29 (d, J = 6.8 Hz, 3H)。HRMS *m/z* 706.2832 [(M+H)$^+$計算值$C_{34}H_{48}N_3O_9S_2$ 706.2826]。



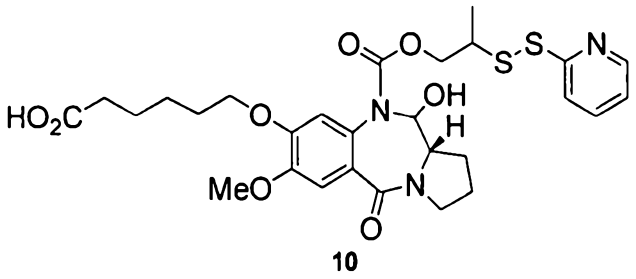
8

將**7** (949 mg, 1.34 mmol)及K_2CO_3 (1.85 g, 13.4 mmol)存於DCM-MeOH (34 mL/17 mL)中之混合物於r.t.下攪拌45 min。將混合物用DCM稀釋，倒入冰H_2O (200 mL)中，充分混合並分離各層。用DCM (1 ×)萃取水層，將合併之有機層乾燥(Na_2SO_4)並在真空下移除溶劑。藉由矽膠上管柱層析使用DCM:EtOAc 100:0至50:50純化粗產物，以產生淺黃色油狀化合物**8** (808 mg, 91%)。^{1}H NMR δ (400 MHz, DMSO-d_6) 9.20 (br s, 1H), 8.44 (d, J = 4.7 Hz, 1H), 7.81-7.80 (m, 2H), 7.25-7.20 (m, 2H), 6.94 (s, 1H), 4.75 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.17-3.99 (m, 3H), 3.92 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.74 (s, 3H), 3.60-3.46 (m, 2H), 3.37-3.20 (m, 3H), 2.20 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.93-1.76 (m, 3H), 1.75-1.68 (m, 3H), 1.58-1.51 (m, 2H), 1.44-1.36 (m, 2H), 1.39 (s, 9H), 1.29 (d, J = 6.9 Hz, 3H)。HRMS *m/z* 664.2721 [(M+H)$^+$計算值$C_{32}H_{46}N_3O_8S_2$ 664.2724]。



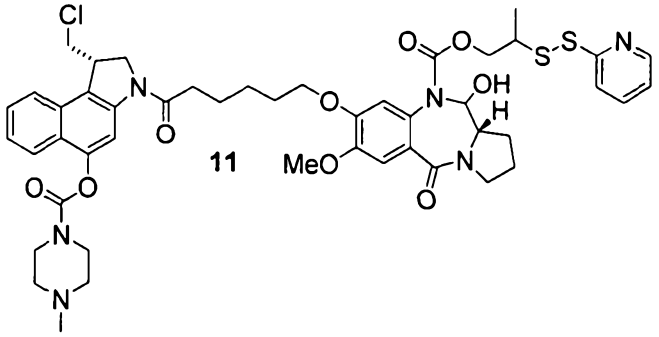
9

於r.t.下向**8** (349 mg, 0.526 mmol)及TEMPO (82.2 mg, 0.526 mmol)存於無水DCM (10 mL)中之混合物中添加(二乙醯氧基碘)苯(259 mg, 0.804 mmol)並將反應混合物攪拌過夜。24 h後，將混合物用DCM及飽和$Na_2S_2O_3$水溶液稀釋並充分混合。分離各層並將有機層用飽和$Na_2S_2O_3$水溶液(1 ×)、飽和$NaHCO_3$水溶液(1 ×)洗滌，乾燥(Na_2SO_4)並在真空下移除溶劑。藉由矽膠上管柱層析使用EtOAc:Hex 70:30至100:0純化粗產物，以產生白色發泡體狀化合物**9** (248 mg, 71%)。^{1}H NMR δ (400 MHz, DMSO-d_6) 8.45-8.43 (m, 1H), 7.79-7.69 (m, 1H), 7.51-7.48 (m, 1H), 7.24-7.20 (m, 1H), 7.10 (s, 1H), 6.96及6.91 (2s, 1H), 6.55 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 5.46 (dd, J = 8.9, 6.1 Hz, 1H), 4.31-4.21 (m, 1H), 4.02-3.84 (m, 3H), 3.80及3.79 (2s, 3H), 3.52-3.46 (m, 1H), 3.40-3.18 (m, 3H), 2.19-2.13 (m, 2H), 2.09-2.00 (m, 1H), 1.96-1.85 (m, 3H), 1.70-1.67 (m, 2H), 1.56-1.45 (m, 2H), 1.40-1.34 (m, 2H), 1.38及1.37 (2s, 9H), 1.15-1.10 (m, 3H)。HRMS *m/z* 662.2592 [(M+H)$^+$計算值 $C_{32}H_{44}N_3O_8S_2$ 662.2564]。



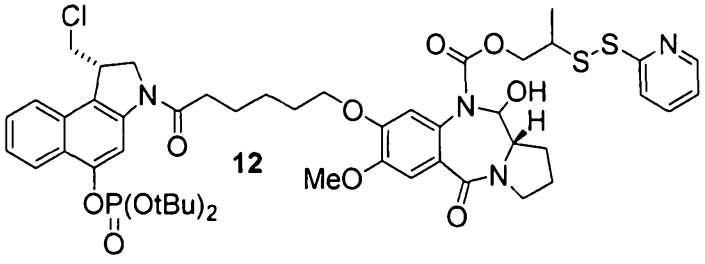
10

將**9** (254 mg, 0.384 mmol)及存於二噁烷(11 mL)中之4 M HCl之混合物於r.t.下攪拌1 h 15 min。於25℃至30℃下在真空下移除溶劑，以產生化合物**10** (162 mg, 70%)，其未經純化即用於下一步驟。



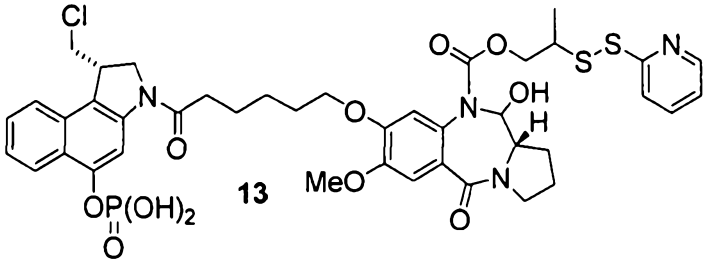
11

將**10** (161 mg, 0.266 mmol)、**58b** (195 mg，0.542 mmol，藉由上文所提及程序新鮮製得)、EDCI.HCl (253 mg, 1.32 mmol)及TsOH (19.5 mg, 0.113 mmol)存於無水DMA (5 mL)中之混合物於r.t.下在氮下攪拌過夜。23 h後，將反應混合物用EtOAc及飽和$NaHCO_3$水溶液稀釋並充分混合。分離各層並用EtOAc (1 ×)萃取水層。將合併之有機層用H_2O (1 ×)、鹽水(1 ×)洗滌，乾燥(Na_2SO_4)並在真空下移除溶劑。藉由矽膠上管柱層析使用DCM:MeOH 100:0至93:7純化粗產物並使用DCM:MeOH 99:1至94:6對物質重新管柱層析，以產生淺黃色發泡體狀11 (化合物編號81，118 mg，47%，HPLC純度：98.0%)。^{1}H NMR δ (400 MHz, DMSO-d_6) 8.43-8.41 (m, 1H), 8.22 (s, 1H), 7.96 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.83 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.73-7.66 (m, 1H), 7.61-7.56 (m, 1H), 7.51-7.45 (m, 2H), 7.22-7.17 (m, 1H), 7.10 (s, 1H), 6.97及6.92 (2s, 1H), 6.56 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 5.46 (dd, J = 9.1, 6.2 Hz, 1H), 4.42-4.20 (m, 4H), 4.05-3.76 (m, 7H), 3.80及3.79 (2s, 3H), 3.52-3.47 (m, 1H), 3.38-3.11 (m, 4H), 2.09-1.99 (m, 1H), 1.94-1.88 (m, 3H), 1.77-1.74 (m, 2H), 1.65-1.62 (m, 2H), 1.48-1.42 (m, 2H), 1.35-1.23 (m, 1H), 1.15-1.10 (m, 3H), 9H，部分被DMSO遮蓋。HRMS *m/z* 969.3070 [$(M+Na)^+$計算值 $C_{47}H_{55}ClN_6NaO_9S_2$ 969.3053]。



12

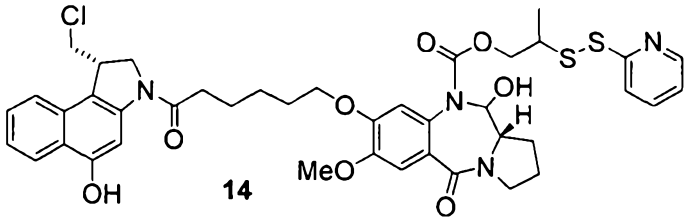
將**10** (162 mg, 0.267 mmol)、**66d** (178 mg，0.418 mmol，藉由上文所提及程序新鮮製得)、EDCI.HCl (184 mg, 0.960 mmol)及TsOH (11 mg, 0.0639 mmol)存於無水DMA (5 mL)中之混合物於r.t.下在氮下攪拌過夜。18.5 h後，將反應混合物用EtOAc及H_2O稀釋並充分混合。分離各層並將有機層用飽和$NaHCO_3$水溶液(1 ×)、H_2O (1 ×)、鹽水(1 ×)洗滌，乾燥(Na_2SO_4)並在真空下移除溶劑。藉由矽膠上管柱層析使用EtOAc:MeOH 100:0至95:5純化粗產物，以產生黃色殘餘物。藉由製備型HPLC (管柱：Synergi-MAX RP 4 μ，21.20 × 250 mm；流速：12 mL/min；流動相：溶劑A：H_2O/甲酸銨緩衝液pH 3.45，溶劑B：MeCN/H_2O 90:10；方法：梯度，溶劑A:溶劑B 90:10至10:90至0:100，經30 min)對其進一步純化，以產生白色發泡體狀化合物**12** (89.3 mg，33%，HPLC純度：99.5%)。^{1}H NMR δ (400 MHz, DMSO-d_6) 8.56 (s, 1H), 8.43-8.41 (m, 1H), 8.04 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.92 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.73-7.67 (m, 1H), 7.60-7.56 (m, 1H), 7.51-7.45 (m, 2H), 7.22-7.17 (m, 1H), 7.10 (s, 1H), 6.98及6.92 (2s, 1H), 6.55 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 5.47-5.44 (m, 1H), 4.40-4.36 (m, 1H), 4.30-4.19 (m, 3H), 4.04-3.86 (m, 4H), 3.86-3.75 (m, 1H), 3.80及3.79 (2s, 3H), 3.52-3.46 (m, 1H), 3.38-3.22 (m, 3H), 3.21-3.15 (m, 1H), 2.09-1.99 (m, 1H), 1.94-1.85 (m, 3H), 1.78-1.74 (m, 2H), 1.69-1.60 (m, 2H), 1.55-1.40 (m, 2H), 1.47及1.47 (2s, 18H), 1.28-1.23 (m, 1H), 1.15-1.10 (m, 3H)。HRMS *m/z* 1035.3162 [$(M+Na)^+$計算值$C_{49}H_{62}ClN_4NaO_{11}PS_2$ 1035.3175]。



13

將**12** (84.0 mg, 0.0829 mmol)及TFA (1 mL)存於無水DCM (2 mL)

中之混合物於r.t.下攪拌40 min。隨後於25℃下在真空下移除溶劑以產生綠色殘餘物。將殘餘物溶解於DCM中，將溶液用EtOAc稀釋並在真空下移除DCM，以產生白色固體並傾析剩餘溶劑。重複此過程並將所得固體與EtOAc一起研磨並乾燥，以產生白色固體狀化合物13 (化合物編號82，43.8 mg，59%，HPLC純度：93.8%)。^{1}H NMR δ (400 MHz, DMSO-d_6) 8.47 (s, 1H), 8.44-8.42 (m, 1H), 8.08 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.90 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.74-7.68 (m, 1H), 7.58-7.54 (m, 1H), 7.51-7.48 (m, 1H), 7.47-7.43 (m, 1H), 7.22-7.18 (m, 1H), 7.10 (s, 1H), 6.98及6.93 (2s, 1H), 5.46 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 4.39-4.18 (m, 4H), 4.04-3.95 (m, 3H), 3.90-3.85 (m, 1H), 3.84-3.76 (m, 1H), 3.80及3.80 (2s, 3H), 3.52-3.47 (m, 1H), 3.40-3.27 (m, 3H), 3.21-3.15 (m, 1H), 2.10-2.02 (m, 1H), 1.94-1.88 (m, 3H), 1.78-1.74 (m, 2H), 1.69-1.60 (m, 2H), 1.48-1.42 (m, 2H), 1.35-1.23 (m, 1H), 1.16-1.10 (m, 3H), 3H未觀察到。HRMS m/z 923.1938 [$(M+Na)^+$計算值$C_{41}H_{46}ClN_4NaO_{11}PS_2$ 923.1923]。



14

將**10** (45.0 mg, 0.0743 mmol)、**67d** (24.3 mg，0.0899 mmol，藉由上文所提及程序新鮮製得)、EDCI.HCl (42.7 mg, 0.223 mmol)及TsOH (3 mg, 0.0174 mmol)存於無水DMA (3 mL)中之混合物於r.t.下在氮下攪拌5 h。向混合物中添加另一份**67d** (24.3 mg, 0.0899 mmol)及EDCI.HCl (16.0 mg, 0.0835 mmol)並將反應物於r.t.下攪拌過夜。22 h後，將反應混合物用EtOAc稀釋並用H_2O (2 ×)、鹽水(1 ×)洗滌，乾燥(Na_2SO_4)並在真空下移除溶劑。藉由矽膠上管柱層析使用EtOAc純化粗產物，以產生綠色粉末。第二次實施矽膠上管柱層析使用EtOAc對其進一步純化，以產生灰棕色固體狀化合物14 (化合物編號83，8.3

mg，13.5%，HPLC純度：81.2%)。^{1}H NMR δ (400 MHz, DMSO-d_6) 10.33 (s, 1H), 8.43-8.42 (m, 1H), 8.07 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.77 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.74-7.67 (m, 1H), 7.50-7.46 (m, 2H), 7.33-7.29 (m, 1H), 7.24-7.18 (m, 1H), 7.10 (s, 1H), 6.98及6.92 (2s, 1H), 6.56 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 5.47-5.44 (m, 1H), 4.33-4.21 (m, 2H), 4.15-4.13 (m, 2H), 4.05-3.93 (m, 3H), 3.90-3.75 (m, 2H), 3.80及3.79 (2s, 3H), 3.52-3.47 (m, 1H), 3.38-3.13 (m, 4H), 2.10-1.99 (m, 1H), 1.94-1.89 (m, 3H), 1.77-1.74 (m, 2H), 1.66-1.62 (m, 2H), 1.52-1.41 (m, 2H), 1.32-1.24 (m, 1H), 1.15-1.10 (m, 3H)。HRMS *m/z* 843.2258 [$(M+Na)^+$計算值 $C_{41}H_{45}ClN_4NaO_8S_2$ 843.2260]。

實例29 (1*S*)-β-D-吡喃葡萄糖苷酸1-(氨甲基)-3-((2*E*)-3-{4-((1*E*)-3-{(1*S*)-1-(氨甲基)-5-[(6-甲基-β-D-吡喃葡糖基)氧基]-1,2-二氫-3*H*-苯并[*e*]吲哚-3-基}-3-側氧基-1-丙烯基)-2-[(3-{[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)己醯基]胺基}丙醯基)胺基]苯基}-2-丙烯醯基)-1,2-二氫-3*H*-苯并[*e*]吲哚-5-基酯甲基酯(化合物編號84，表4，圖44)

根據以下文獻程序製備三氯乙醯亞胺酯(**1**)：L. Lázár、E. Mezö、M. Herczeg、A. Lipták、S. Antus、A. Borbás，*Tetrahedron***2012**, *68*, 7386-7399；L. Tietze、H. Schuster、K. Schmuck、I. Schuberth、F. Alves，*Bioorg.& Med. Chem.* **2008**, *16*, 6312-6318。

將三氯乙醯亞胺酯(**1**) (360 mg, 0.75 mmol)、苯酚-CBI (**2**，第一專利文檔中之化合物**51a**) (200 mg, 0.60 mmol)及活化分子篩4 Å (1 g)存於無水CH_2Cl_2 (20 mL)中之懸浮液於RT下攪拌1 h。將混合物冷卻至-10℃，隨後逐滴添加$BF_3{\cdot}OEt_2$ (40 µl, 0.3 mmol)。將溫度保持介於-10℃與-5℃之間達1 h，隨後將其於0℃下攪拌30 min。隨後於0℃下逐滴添加$BF_3{\cdot}OEt_2$ (0.24 mL, 1.8 mmol)，使溫度升高至RT並將其攪拌2 h。

隨後經矽藻土過濾懸浮液並蒸發溶劑，以產生粗製CBI-葡萄糖醛酸苷(**3**)，其未經進一步純化即用於下一步驟。將胺(**3**)及雙酸(**4**，第一專利文檔中之化合物**66h**) (126 mg, 0.24 mmol)存於無水DMA (4 mL)中之溶液冷卻至0℃。隨後添加*p*TsOH (17 mg, 0.096 mmol)及EDCI·HCl (276 mg, 1.44 mmol)，使溫度升高至RT並將其攪拌16 h。在減壓下移除溶劑並藉由管柱層析(SiO_2，CH_2Cl_2/MeOH 0-2%)、隨後(SiO_2，CH_2Cl_2/MeOH 1-2%)純化殘餘物，以產生黃色固體狀(1*S*)-2,3,4-三-*O*-乙醯基-β-D-吡喃葡萄糖苷酸1-(氯甲基)-3-((2*E*)-3-{4-((1*E*)-3-{(1*S*)-1-(氯甲基)-5-[(2,3,4-三-*O*-乙醯基-6-甲基-β-D-吡喃葡糖基)氧基]-1,2-二氫-3*H*-苯并[*e*]吲哚-3-基}-3-側氧基-1-丙烯基)-2-[(3-{[(9*H*-芴-9-基甲氧基)羰基]胺基}丙醯基)胺基]苯基}-2-丙烯醯基)-1,2-二氫-3*H*-苯并[*e*]吲哚-5-基酯甲基酯(**5**) (127 mg, 27%)。^{1}H NMR (300 MHz, [$(CD_3)_2SO$]) δ 10.04 (s, 1 H, NH), 8.38 (br s, 2 H), 8.11 (d, *J* = 8.1 Hz, 1 H), 7.97 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H), 7.93 (d, *J* = 8.2 Hz, 2 H), 7.83-7.88 (m, 4 H), 7.78 (d, *J* = 7.6 Hz, 1 H), 7.68-7.72 (m, 3 H), 7.59 (t, *J* = 7.5 Hz, 2 H), 7.45-7.48 (m, 3 H), 7.38 (t, *J* = 7.4 Hz, 2 H), 7.25-7.29 (m, 4 H), 5.85 (d, *J* = 7.7 Hz, 1 H), 5.83 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H), 5.62-5.65 (m, 2 H), 5.32 (t, *J* = 8.7 Hz, 2 H), 5.14 (t, *J* = 9.6 Hz, 2 H), 4.78 (t, *J* = 8.2 Hz, 2 H), 4.55 (m, 4 H), 4.31-4.38 (m, 4 H), 4.22 (t, *J* = 6.9 Hz, 1 H), 4.01-4.03 (m, 2 H), 3.91-3.96 (m, 2 H), 3.65 (s, 3 H), 3.63 (s, 3 H), 3.36-3.38 (m, 2 H), 2.59-2.64 (m, 2 H), 1.98-2.03 (m, 18 H)；LC-MS (ESI)計算值 $C_{82}H_{79}Cl_2N_4O_{25}$ $(M+H)^+$ *m/z* 1591.4，試驗值 *m/z* 1591.4；計算值 $C_{82}H_{78}Cl_2N_4O_{25}Na$ $(M+Na)^+$ *m/z* 1613.4，試驗值*m/z* 1613.4。

將衍生物(**5**) (110 mg, 0.07 mmol)及六氫吡啶(468 μL, 0.7 mmol)存於無水DMF (5 mL)中之溶液於RT下攪拌30 min。在減壓下於RT下移除溶劑並將殘餘物與冷Et_2O一起研磨，以產生粗製(1*S*)-2,3,4-三-*O*-

乙醯基-β-D-吡喃葡萄糖苷酸3-{(2*E*)-3-[2-[(3-胺基丙醯基)胺基]-4-((1*E*)-3-{(1*S*)-1-(氯甲基)-5-[(2,3,4-三-*O*-乙醯基-6-甲基-β-D-吡喃葡糖基)氧基]-1,2-二氫-3*H*-苯并[*e*]吲哚-3-基}-3-側氧基-1-丙烯基)苯基]-2-丙烯醯基}-1-(氯甲基)-1,2-二氫-3*H*-苯并[*e*]吲哚-5-基酯甲基酯(**6**) (86 mg, 90%)，其未經進一步純化即用於下一步驟。^{1}H NMR (300 MHz, $[(CD_3)_2SO]$ δ 8.38 (br s, 2 H), 8.10 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 7.98 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H), 7.94 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H), 7.90 (s, 1 H), 7.88 (d, *J* = 15.1 Hz, 1 H), 7.76 (d, *J* = 7.6 Hz, 1 H), 7.70 (d, *J* = 15.1 Hz, 1 H), 7.59 (t, *J* = 7.9 Hz, 2 H), 7.47 (t, *J* = 7.9 Hz, 2 H), 7.27 (dd, *J* = 3.4, 15.3 Hz, 2 H), 5.85 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H), 5.84 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H), 5.63-5.68 (m, 2 H), 5.32 (dd, *J* = 7.8, 9.6 Hz, 2 H), 5.14 (dt, *J* = 1.5, 9.6 Hz, 2 H), 4.79 (d, *J* = 9.6 Hz, 2 H), 4.56-4.60 (m, 4 H), 4.29-4.41 (m, 2 H), 4.02-4.04 (m, 2 H), 3.92-3.97 (m, 2 H), 3.67 (s, 6 H), 2.93 (t, *J* = 6.4 Hz, 2 H), 2.03-2.04 (m, 18 H)，在DMSO峰下2 H，NH及NH_2未觀察到。

於0℃下向胺(**6**) (110 mg, 0.08 mmol)存於MeOH/CH_2Cl_2之(1:1)混合物(10 mL)中之攪拌溶液中逐滴添加NaOMe (8.7 mg, 0.16 mmol)存於MeOH (1 mL)中之溶液，並將反應混合物於0℃下攪拌2 h。隨後添加AcOH (8滴)並於RT下在減壓下移除溶劑並在高真空下乾燥，以產生橙色固體狀(1*S*)-β-D-吡喃葡萄糖苷酸3-{(2*E*)-3-[2-[(3-胺基丙醯基)胺基]-4-((1*E*)-3-{(1*S*)-1-(氯甲基)-5-[(6-甲基-β-D-吡喃葡糖基)氧基]-1,2-二氫-3*H*-苯并[*e*]吲哚-3-基}-3-側氧基-1-丙烯基)苯基]-2-丙烯醯基}-1-(氯甲基)-1,2-二氫-3*H*-苯并[*e*]吲哚-5-基酯甲基酯(**7**)，其未經進一步純化即用於下一步驟。向胺(**7**)及6-馬來醯亞胺基己酸*N*-琥珀醯亞胺基酯(24 mg, 0.077 mmol)存於無水DMF (5 mL)中之攪拌溶液中添加DIEA (78 μL, 0.1 mmol)並將混合物於RT下攪拌過夜。隨後於RT下在減壓下移除溶劑並藉由管柱層析(SiO_2，EtOAc/MeOH 10-20%)、隨後

兩次(SiO_2，EtOAc/MeOH 15%)純化殘餘物，以產生黃色固體狀(1*S*)-β-D-吡喃葡萄糖苷酸1-(氯甲基)-3-((2*E*)-3-{4-((1*E*)-3-{(1*S*)-1-(氯甲基)-5-[(6-甲基-β-D-吡喃葡糖基)氧基]-1,2-二氫-3*H*-苯并[*e*]吲哚-3-基}-3-側氧基-1-丙烯基)-2-[(3-{[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)己醯基]胺基}丙醯基)胺基]苯基}-2-丙烯醯基)-1,2-二氫-3*H*-苯并[*e*]吲哚-5-基酯甲基酯**8**(化合物編號84) (31 mg, 34%)。HPLC純度95.9%；^{1}H NMR (300 MHz, [$(CD_3)_2SO$] δ 10.01 (s, 1 H), 8.32 (s, 2 H), 8.31 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H), 8.09 (d, *J* = 8.2 Hz, 1 H), 7.89-7.95 (m, 3 H), 7.84 (t, *J* = 7.6 Hz, 2 H), 7.77 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H), 7.70 (d, *J* = 15.1 Hz, 1 H), 7.58 (t, *J* = 7.9 Hz, 2 H), 7.43 (t, *J* = 8.0 Hz, 2 H), 7.27 (d, *J* = 15.6 Hz, 2 H), 6.96 (s, 2 H), 5.67 (d, *J* = 5.3 Hz, 1 H), 5.66 (d, *J* = 5.3 Hz, 1 H), 5.45 (d, *J* = 5.6 Hz, 2 H), 5.35 (d, *J* = 4.6 Hz, 2 H), 5.16 (d, *J* = 7.5 Hz, 2 H), 4.52-4.62 (m, 4 H), 4.33 (br s, 2 H), 3.99-4.04 (m, 4 H), 3.93 (dd, *J* = 7.4, 10.5 Hz, 2 H), 3.68 (s, 3 H), 3.67 (s, 3 H), 3.37-3.48 (m, 8 H), 2.57-2.61 (m, 2 H), 2.09 (t, *J* = 7.3 Hz, 2 H), 1.41-1.54 (m, 4 H), 1.14-1.23 (m, 4 H)；HRMS (ESI)計算值$C_{65}H_{67}Cl_2N_5NaO_{20}$ ($M + Na^+$) m/z 1330.3649；試驗值m/z 1330.3600。

實例29 (S)-(1-甲基-1H-吡咯-2,5-二基)雙(((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)甲酮) (化合物編號15，表1，圖45)

將**1** (500 mg, 3.22 mmol)及N,N-二甲基甲醯胺二-第三丁基縮醛(**2**, 5.24 g, 25.77 mmol)存於NMP (10 mL)中之混合物加熱至100℃並攪拌過夜。在減壓下移除大部分揮發性組份並將所得殘餘物重新分佈在乙酸乙酯與水之間。將水相用乙酸乙酯萃取三次。將合併之有機萃取物用水、之後鹽水洗滌，經無水Na_2SO_4乾燥，並經由矽膠墊過濾。移除溶劑並獲得灰色結晶固體狀**3** (331 mg, 38%)；^{1}H NMR (DMSO) δ 12.26 (s, 1H), 6.68 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 1.51 (s, 18H) ppm。HRMS (ESI)

試驗值*m/z* 290.1362 (M + Na)。$C_{14}H_{21}NNaO_4$需要290.1363。

將**3** (50 mg, 0.18 mmol)、K_2CO_3 (52 mg, 0.37 mmol)、MeI (0.12 mL, 1.87 mmol)及四丁基碘化銨(3.5 mg, 0.0094 mmol)存於MeCN (1 mL)及水(0.01 mL)中之混合物於35℃至40℃下加熱並攪拌3天。將反應混合物重新分佈在乙酸乙酯與水之間。將水相用乙酸乙酯萃取三次。將合併之有機萃取物用水、之後鹽水洗滌，經無水Na_2SO_4乾燥，並經由矽膠墊過濾。移除溶劑並獲得灰色油狀**4**，其在數小時內變為無色結晶固體(45 mg, 86%)；^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 6.77 (s, 2H), 4.21 (s, 3H), 1.56 (s, 18H) ppm。HRMS (ESI)試驗值*m/z* 304.1512 (M + Na)。$C_{15}H_{23}NNaO_4$需要304.1519。

於室溫下向**4** (45 mg, 0.16 mmol)存於DCM (1 mL)中之溶液中添加TFA (0.5 mL, 6.49 mmol)。將混合物攪拌3 h，以產生粉色溶液。泵送出所有揮發性組份並將所得殘餘物與石油醚一起研磨，以產生粉色固體狀**5** (25 mg, 93%)。^{1}H NMR (DMSO) δ 12.81 (s, 2H), 6.80 (s, 2H), 4.15 (s, 3H) ppm。HRMS (ESI負性)試驗值*m/z* 168.0306 (M - H)。$C_7H_6NO_4$需要168.0302。

於室溫下向Boc-CBI-OH (化合物**51a**，130 mg，0.39 mmol)存於DCM (2 mL)中之溶液中添加存於二噁烷(2 mL)中之4N HCl。將混合物攪拌2.5 h。泵送出所有揮發性組份且所得殘餘物(**6**)直接原樣使用。

將**6** (上文製得)、**5** (22 mg, 0.13 mmol)、EDCI鹽酸鹽(150 mg, 0.78 mmol)及甲苯磺酸(2.2 mg, 0.013 mmol)存於DMA (2 mL)中之混合物於室溫下攪拌過夜。泵送出大部分溶劑並將所得殘餘物重新分佈在乙酸乙酯與水之間。將水相用乙酸乙酯萃取三次。將合併之有機萃取物用水、之後鹽水洗滌，經無水Na_2SO_4乾燥，並經由矽藻土墊過濾。移除溶劑並藉由矽膠管柱層析使用MeOH及DCM (v/v 2%)之混合物作

為洗脫劑純化所得殘餘物，以產生米色固體狀**7** (化合物編號15，表1) (60 mg, 77%)。^{1}H NMR (DMSO) δ 10.43 (s, 2H), 8.12 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.83 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.73 (br s, 2H), 7.52 (dd, *J* = 1.0, 8.0 Hz, 2H), 7.37 (dd, *J* = 0.4, 8.0 Hz, 2H), 6.77 (s, 2H), 4.62-4.57 (m, 2H), 4.31-4.27 (m, 2H), 4.10-4.07 (m, 2H), 4.02-4.00 (m, 2H), 3.88-3.85 (m, 5H) ppm。HRMS (ESI)試驗值 *m/z* 622.1255 (M + Na)。$C_{33}H_{27}Cl_2N_3NaO_4$需要622.1271。

實例30 N-(2,5-雙((E)-3-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)-3-側氧基丙-1-烯基)苯基)乙醯胺(化合物編號16，表1，圖46)

向冰浴中之**1** (**66f**, 500 mg, 1.45 mmol)存於THF (5 mL)及吡啶(5 mL)中之溶液中添加乙醯氯(0.50 mL, 7.03 mmol)。使混合物升溫至室溫並攪拌過夜。泵送出所有揮發性組份並將所得殘餘物重新分佈在乙酸乙酯與碳酸氫鈉水溶液之間。將水相用乙酸乙酯萃取三次。將合併之有機萃取物用水、之後鹽水洗滌，經無水Na_2SO_4乾燥，並經由矽藻土墊過濾。移除溶劑並藉由矽膠管柱層析使用乙酸乙酯及石油醚(v/v 1:2)之混合物作為洗脫劑純化所得殘餘物，以產生米色固體狀**2** (475 mg, 85%)；^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 8.00 (s, 1H), 7.70 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H), 7.55-7.51 (m, 2H), 7.31 (表觀d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.40 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 6.37 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H), 2.25 (s, 3H), 1.54 (s, 9H), 1.53 (s, 9H) ppm。HRMS (ESI)試驗值*m/z* 410.1921 (M + Na)。$C_{22}H_{29}NNaO_5$需要410.1938。

於室溫下向**2** (470 mg, 1.21 mmol)存於DCM (5 mL)中之溶液中添加TFA (2.5 mL, 32.40 mmol)。將混合物攪拌3 h，以產生白色懸浮液。添加更多DCM以沈澱出更多固體，將其藉由過濾收集並用乙酸乙酯及石油醚洗滌。獲得白色固體狀**3**(290 mg, 87%)。^{1}H NMR

(DMSO) δ 12.40 (br s, 2H), 9.89 (s, 1H), 7.85 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.70 (表觀d, *J* = 16.0 Hz, 2H), 7.57-7.53 (m, 2H), 6.54 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 6.53 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 2.09 (s, 3H) ppm。HRMS (ESI)試驗值*m/z* 298.0672 (M + Na)。$C_{14}H_{13}NNaO_5$需要298.0686。

於室溫下向Boc-CBI-OH (化合物**51a**，291 mg，0.87 mmol)存於DCM (3 mL)中之溶液中添加存於二噁烷(3 mL)中之4N HCl。將混合物攪拌2.5 h。泵送出所有揮發性組份且所得殘餘物(**4**)直接原樣使用。

將**4** (上文製得)、**3**(80 mg, 0.29 mmol)、EDCI鹽酸鹽(334 mg, 1.74 mmol)及甲苯磺酸(5 mg, 0.029 mmol)存於DMA (3 mL)中之混合物於室溫下攪拌過夜。泵送出所有揮發性組份並將所得殘餘物與甲醇一起研磨若干次，以產生粗產物(123 mg)，將其溶解於THF中並藉由添加MeOH沈澱，以產生黃色固體狀**5** (化合物編號16，表1) (96 mg，47%，HPLC純度97%)；^{1}H NMR (DMSO) δ 10.43 (s, 2H), 9.97 (s, 1H), 8.12-8.07 (m, 5H), 7.85-7.81 (m, 4H), 7.74 (表觀d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 7.68 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 7.73 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.35 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.26 (dd, *J* = 3.2, 15.3 Hz, 2H), 4.58-4.46 (m, 4H), 4.28-4.22 (m, 2H), 4.05-3.98 (m, 2H), 3.88-3.82 (m, 2H), 2.15 (s, 3H) ppm。HRMS (ESI)試驗值*m/z* 728.1662 (M + Na)。$C_{40}H_{33}Cl_2N_3NaO_5$需要728.1689。

實例31 (S,2E,2'E)-3,3'-(2-甲氧基-1,4-伸苯基)雙(1-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)丙-2-烯-1-酮) (化合物編號17，表1，圖47)

在N_2下於-30℃至-40℃下在乾冰-MeCN浴中向**1** (2.50 g, 13.30 mmol)存於無水THF (12 mL)中之溶液中逐滴添加三氟化硼二乙基醚化物($BF_3 \cdot Et_2O$, 4.92 mL, 39.90 mmol)。在將混合物於-30℃下攪拌10 min後，逐滴添加^{t}BuONO (2.39 mL, 19.94 mmol)。使反應混合物升溫至

室溫並攪拌1.5 h，以產生懸浮液。添加石油醚(50 mL)以產生更多沈澱。藉由傾析移除上清液並將留下之固體用石油醚洗滌，以得到白色固體。將此固體溶解於無水MeCN (20 mL)中並在冰浴中冷卻。添加KI (11.00 g, 66.26 mmol)及I_2 (6.00 g, 23.64 mmol)。將反應混合物於室溫下攪拌4 h，之後添加飽和$Na_2S_2O_3$溶液(50 mL)以驟冷反應物。將混合物用乙酸乙酯萃取三次。將合併之有機萃取物用水、之後鹽水洗滌，經無水Na_2SO_4乾燥，並經由矽藻土墊過濾。移除溶劑並藉由矽膠管柱層析使用乙酸乙酯及石油醚(v/v 1:9)之混合物作為洗脫劑純化所得殘餘物，以產生灰色固體狀**2** (2.83 g, 71%)；^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.50 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.16 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.84 (dd, *J* = 2.2, 8.5 Hz, 1H), 5.39 (s, 1H) ppm。

將**2** (500 mg, 1.67 mmol)、丙烯酸第三丁基酯(0.728 mL, 5.02 mmol)、乙酸鈀(II) (7.5 mg, 0.033 mmol)及三-鄰-甲苯基膦(41 mg, 0.13 mmol)存於再蒸餾三乙胺(5 mL)中之混合物在N_2下加熱回流過夜，以產生深灰色懸浮液。泵送出所有揮發性組份。將所得殘餘物溶解於乙酸乙酯中並過濾出沈澱。蒸發濾液並藉由管柱層析使用乙酸乙酯及石油醚(v/v 1:6)之混合物作為洗脫劑純化所得殘餘物，以產生米色固體狀**3** (160 mg, 28 %)。^{1}H NMR (DMSO) *δ* 10.43 (s, 1H), 7.75 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H), 7.63 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.45 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.18 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.07 (d, *J* = 0.8 Hz, 1H), 6.56 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H), 6.41 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 1.483 (s, 9H), 1.478 (s, 9H) ppm。HRMS (ESI)試驗值 *m/z* 369.1687 (M + Na)。$C_{20}H_{26}NaO_5$需要369.1672。

向**3** (160 mg, 0.46 mmol)存於DMF (2 mL)中之溶液中添加K_2CO_3 (254 mg, 1.84 mmol)及MeI (0.28 mL, 4.50 mmol)。將混合物於室溫下攪拌過夜並過濾出沈澱。將所得濾液用水、之後鹽水洗滌，經無水

Na_2SO_4乾燥，並經由矽藻土墊過濾。移除溶劑並藉由矽膠管柱層析使用乙酸乙酯及石油醚(v/v 1:10)之混合物作為洗脫劑純化所得殘餘物，以產生無色油狀**4** (72 mg, 43%)；^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.87 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 7.54 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.49 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.10 (dd, *J* = 1.3, 8.0 Hz, 1H), 7.00 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 6.47 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H), 6.38 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 3.91 (s, 3H), 1.539 (s, 9H), 1.533 (s, 9H) ppm。HRMS (ESI)試驗值*m/z* 383.1838 (M + Na)。$C_{21}H_{28}NaO_5$需要383.1829。

於室溫下向**4** (70 mg, 0.19 mmol)存於DCM (2 mL)中之溶液中添加TFA (1 mL, 12.98 mmol)。將混合物攪拌2.5 h，以產生白色懸浮液。泵送出所有揮發性組份並將所得殘餘物與DCM及乙酸乙酯一起研磨，以產生白色固體狀**5** (41 mg, 85%)。^{1}H NMR (DMSO) δ 12.41 (br s, 2H), 7.80 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 7.72 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.58 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.41 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.30 (dd, *J* = 1.0, 8.1 Hz, 1H), 6.47 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 6.38 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H), 3.92 (s, 3H) ppm。HRMS (ESI)試驗值*m/z* 271.0573 (M + Na)。$C_{13}H_{12}NaO_5$需要271.0577。

於室溫下向Boc-CBI-OH (化合物**51a**，161 mg，0.48 mmol)存於DCM (2 mL)中之溶液中添加存於二噁烷(2 mL)中之4N HCl。將混合物攪拌2.5 h。泵送出所有揮發性組份且所得殘餘物(**6**)直接原樣使用。

將**6** (上文製得)、**5**(40 mg, 0.16 mmol)、EDCI鹽酸鹽(185 mg, 0.97 mmol)及甲苯磺酸(2.8 mg, 0.016 mmol)存於DMA (1 mL)中之混合物於室溫下攪拌過夜。泵送出所有揮發性組份並將所得殘餘物與甲醇一起研磨，以產生黃色固體，將其溶解於THF中並藉由添加甲醇沈澱，以得到黃色固體狀**7** (化合物編號17，表1) (45 mg，41%，HPLC

純度98%)；^{1}H NMR (DMSO) δ 10.43 (s, 2H), 8.12-8.10 (m, 4H), 8.00-7.95 (m, 2H), 7.85-7.80 (m, 2H), 7.72 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 7.54-7.50 (m, 4H), 7.37-7.26 (m, 4H), 4.57-4.45 (m, 4H), 4.28-4.22 (m, 2H), 4.00-3.99 (m, 5H), 3.90-3.83 (m, 2H) ppm。HRMS (ESI)試驗值*m/z* 701.1596 (M + Na)。$C_{39}H_{32}Cl_2N_2NaO_5$需要701.1580。

實例32 (S,2E,2'E)-3,3'-(1-甲基-1H-吡咯-2,5-二基)雙(1-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)丙-2-烯-1-酮) (化合物編號18，表1，圖48)

1係使用文獻方法(Ref. *Russ J Org Chem,***2007**, 43, 855-860)製得。

2

將**1** (50 mg, 0.41 mmol)、K_2CO_3 (112 mg, 0.81 mmol)、MeI (0.25 mL, 4.06 mmol)及四丁基碘化銨(7.5 mg, 0.020 mmol)存於MeCN (2 mL)及水(0.02 mL)中之混合物於40℃下加熱並攪拌3 h。在減壓下移除大部分揮發性組份並將所得殘餘物重新分佈在乙酸乙酯與水之間。將水相用乙酸乙酯萃取三次。將合併之有機萃取物用水、之後鹽水洗滌，經無水Na_2SO_4乾燥，並經由矽膠墊過濾。移除溶劑並獲得白色固體狀**2** (47 mg, 84%)；其中^{1}H NMR譜與所報告之譜相同(Ref. C. E. Loader、G. H. Barnett及H. J. Anderson，*Can. J. Chem.,***1982**, *60*, 383)。

4

將**2** (40 mg, 0.29 mmol)及(三苯基亞膦基)乙酸甲基酯(**3**, 400 mg, 1.20 mmol)存於DCM (3 mL)中之混合物攪拌2天，以產生黃色溶液。藉由矽膠管柱層析使用乙酸乙酯及石油醚(v/v = 1:5、1:4及1:3)之梯度混合物作為洗脫劑純化混合物，以產生黃色固體狀**4** (63 mg, 87%)；^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.61 (d, *J* = 15.6 Hz, 2H), 6.70 (s, 2H), 6.26 (d, *J* =

15.6 Hz, 2H), 3.79 (s, 6H), 3.73 (s, 3H) ppm。HRMS (ESI)試驗值*m/z* 272.0898 (M + Na)。$C_{13}H_{15}NNaO_4$需要272.0893。

5

將**4** (60 mg, 0.24 mmol)及KOH (100 mg, 1.78 mmol)存於EtOH (2 mL)及THF (1 mL)中之混合物於70℃下攪拌2h。將混合物在減壓下蒸發乾燥。將所得殘餘物溶解於水中並用1N HCl酸化直至pH 5，以產生黃色沈澱，將其藉由過濾收集，且隨後用水及石油醚洗滌，以產生黃色固體狀**5** (51 mg, 96%)；^{1}H NMR (DMSO) δ 12.20 (s, 2H), 7.54 (d, *J* = 15.6 Hz, 2H), 6.89 (s, 2H), 6.30 (d, *J* = 15.6 Hz, 2H), 3.70 (s, 3H) ppm。HRMS (ESI)試驗值*m/z* 244.0590 (M + Na)。$C_{11}H_{11}NNaO_4$需要244.0580。

7

於室溫下向**Boc-CBI-OH** (化合物**51a**，200 mg，0.60 mmol)存於DCM (2 mL)中之溶液中添加存於二噁烷(10 mL)中之4N HCl。將混合物攪拌2 h。泵送出所有揮發性組份且所得殘餘物(**6**，化合物**67d**)直接原樣使用。

將**6** (上文製得)、**5**(49 mg, 0.22 mmol)、EDCI鹽酸鹽(255 mg, 1.33 mmol)及甲苯磺酸(3.8 mg, 0.022 mmol)存於DMA (2 mL)中之混合物於室溫下攪拌過夜。移除溶劑並藉由矽膠管柱層析使用MeOH及乙酸乙酯(v/v 3%)之混合物純化所得殘餘物並將粗產物與乙酸乙酯一起研磨，以產生橙色固體狀**7** (60 mg, 41%, HPLC 100%)；^{1}H NMR (DMSO) δ 10.41 (s, 2H), 8.11 (d, *J* = 8.2 Hz, 4H), 7.81 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.70 (d, *J* = 14.9 Hz, 2H), 7.50 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.33 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.12 (s, 2H), 7.01 (d, *J* = 14.9 Hz, 2H), 4.49-4.42 (m, 4H), 4.24-4.19 (m, 2H), 4.01-3.97 (m, 2H), 3.85-3.82 (m, 5H) ppm。HRMS (ESI負性)試驗值*m/z* 650.1600 (M - H)。$C_{37}H_{30}Cl_2N_3O_4$需要650.1619。

實例33 (S)-3,3'-(2-甲氧基-1,4-伸苯基)雙(1-((S)-1-(氯甲基)-5-羥基-1H-苯并[e]吲哚-3(2H)-基)丙-2-炔-1-酮) (化合物19，表1，圖49)

2

化合物**2**係藉由基於US2007/49758中所述之程序之改良程序合成。向**1** (5.50 g, 25.00 mmol)及乙酸銀(I)(6.26 g, 37.5 mmol)存於DCM (100 mL)中之懸浮液中逐滴添加碘(6.98 g, 27.50 mmol)存於DCM (150 mL)中之溶液。將所得混合物於室溫下攪拌過夜，且隨後經由矽藻土墊過濾。蒸發濾液並藉由矽膠管柱層析使用乙酸乙酯及石油醚(v/v 1:10)之混合物作為洗脫劑純化所得殘餘物，以產生白色固體狀**2** (966 mg, 11%)；mp 97℃至99℃。^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.342 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.339 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.00 (dd, *J* = 2.0, 8.3 Hz, 1H), 5.32 (s, 1H) ppm。^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100.6 MHz) δ 155.70, 139.46 (CH), 131.80 (CH), 124.44 (CH), 94.65, 85.52 ppm。

3

向**2** (270 mg, 0.78 mmol)存於DMF (4 mL)中之溶液中添加K_2CO_3 (162 mg, 1.17 mmol)及MeI (0.24 mL, 3.90 mmol)。將混合物於室溫下攪拌2 h。經由矽膠墊過濾混合物並蒸發濾液，以產生無色油狀**3** (277 mg, 99%)；^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.45 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.09 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.04 (dd, *J* = 1.8, 8.1 Hz, 1H), 3.87 (s, 3H) ppm。

4

將**3** (274 mg, 0.76 mmol)、丙炔酸第三丁基酯(0.314 mL, 2.28 mmol)、碘化銅(I) (5.8 mg, 0.030 mmol)、乙酸鈀(II) (3.4 mg, 0.015 mmol)及三苯基膦(12 mg, 0.046 mmol)存於再蒸餾三乙胺(5 mL)中之混合物於60℃下在N_2下加熱過夜，以產生深色懸浮液。泵送出所有揮發性組份。將所得殘餘物與DCM一起攪拌並過濾出沈澱。蒸發濾液並藉由矽膠管柱層析使用DCM及石油醚(v/v=1:1)之混合物作為洗脫劑

純化所得殘餘物，以產生米色固體狀**4** (195 mg, 72 %)。^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.48 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.13 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.06 (s, 1H), 3.89 (s, 3H), 1.545 (s, 9H)及1.514 (s, 9H) ppm。HRMS (ESI)試驗值*m/z* 379.1510 (M + Na)。$C_{21}H_{24}NaO_5$需要379.1516。

5

於室溫下向**4** (100 mg, 0.28 mmol)存於DCM (2 mL)中之溶液中添加TFA (1 mL, 12.98 mmol)。將混合物攪拌2.5 h，以產生白色懸浮液。泵送出所有揮發性組份並將所得殘餘物與DCM及石油醚(v/v=1:1)之混合物一起研磨，以產生白色固體狀**5** (66 mg, 96%)。^{1}H NMR (DMSO) δ 13.92 (br s, 2H), 7.61 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.37 (表觀s, 1H), 7.25 (dd, *J* = 1.1, 7.9 Hz, 1H), 3.90 (s, 3H) ppm。

7

於室溫下向Boc-CBI-OH (化合物**51a**，267 mg，0.80 mmol)存於DCM (3 mL)中之溶液中添加存於二噁烷(3 mL)中之4N HCl。將混合物攪拌2.5 h。泵送出所有揮發性組份且所得殘餘物(**6**)直接原樣使用。

將**6** (上文製得)、**5**(65 mg, 0.27 mmol)、EDCI鹽酸鹽(306 mg, 1.60 mmol)及甲苯磺酸(4.6 mg, 0.027 mmol)存於DMA (1 mL)中之混合物於室溫下攪拌過夜。泵送出所有揮發性組份並將所得殘餘物與甲醇一起研磨，以產生黃色固體，將其溶解於THF中並藉由添加甲醇沈澱，以得到黃色固體狀**7** (140 mg，78%，HPLC純度99%)；^{1}H NMR (DMSO) δ 10.52 (s, 2H), 8.12 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.90-7.85 (m, 4H), 7.76 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.56-7.50 (m, 3H), 7.41-7.37 (m, 3H), 4.63-4.49 (m, 4H), 4.29-4.21 (m, 2H), 4.09-4.06 (m, 2H), 4.01 (s, 3H), 3.99-3.94 (m, 1H), 3.91-3.86 (m, 1H) ppm。HRMS (ESI)試驗值*m/z* 697.1267 (M + Na)。$C_{39}H_{28}Cl_2N_2NaO_5$需要697.1267。

實例19 藉由還原及氧化還原之用於結合之半胱胺酸改造之抗體的製備

在某些條件下，可藉由用還原劑(例如DTT (Cleland試劑，二硫蘇糖醇)或TCEP (叁(2-羧基乙基)膦鹽酸鹽；Getz等人，(1999) Anal. Biochem. 第273卷：73-80；Soltec Ventures, Beverly, MA)處理使得半胱胺酸改造之抗體與本發明之連接體-藥物中間體(例如表4中之彼等化合物)之結合具有反應性。將在CHO細胞中表現之全長、半胱胺酸改造之單株抗體(ThioMab) (Gomez等人，(2010) Biotechnology and Bioeng.105(4):748-760；Gomez等人，(2010) Biotechnol. Prog. 26:1438-1445)利用(例如)約50倍過量DTT於室溫下還原過夜，以還原可在新引入之半胱胺酸殘基與培養基中存在之半胱胺酸之間形成二硫鍵。

根據Kabat對輕鏈胺基酸進行編號(Kabat等人，*Sequences of proteins of immunological interest*, (1991)，第5版，US Dept of Health and Human Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD)。根據EU編號系統對重鏈胺基酸進行編號(Edelman等人，(1969) Proc. Natl. Acad. of Sci.63(1):78-85)，只是標注為Kabat系統除外。使用單一字母胺基酸縮寫。

在CHO細胞中表現之全長、半胱胺酸改造之單株抗體(ThioMab)具有半胱胺酸加合物(胱胺酸)或由於細胞培養基條件在經改造半胱胺酸上麩胱苷肽化。為釋放經改造半胱胺酸之反應性硫醇基團，於約pH 8.0下將ThioMab溶解於500 mM硼酸鈉及500 mM氯化鈉中並於37℃下用約50至100倍過量1 mM TCEP (叁(2-羧基乙基)膦鹽酸鹽還原(Getz等人，(1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80；Soltec Ventures, Beverly, MA)約1-2 hr。或者，可使用DTT作為還原劑。藉由非還原SDS-PAGE或藉由變性逆相HPLC PLRP管柱層析監測鏈間二硫鍵之形

成。將經還原ThioMab稀釋並裝載於10 mM乙酸鈉(pH 5)中之HiTrap SP FF管柱上，並用含有0.3M氯化鈉之PBS或50 mM含有150 mM氯化鈉之Tris-Cl (pH 7.5)洗脫。

藉由實施氧化還原在親代Mab中存在之半胱胺酸殘基之間重新確立二硫鍵。將經洗脫還原之ThioMab用15×或2 mM去氫抗壞血酸(dhAA)於pH 7下處理3小時或在50 mM Tris-Cl (pH 7.5)中處理3 hr或用2 mM硫酸銅水溶液($CuSO_4$)於室溫下處理過夜。可使用業內已知之其他氧化劑(即氧化試劑)及氧化條件。環境空氣氧化亦可有效。此輕度、部分氧化還原步驟以高保真度有效形成鏈內二硫化物。藉由在Sephadex G25樹脂上洗脫更換緩衝液並將其用具有1mM DTPA之PBS洗脫。藉由自溶液在280 nm下之吸光度測定降低抗體濃度及藉由與DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI)之反應及測定在412 nm下之吸光度測定硫醇濃度來檢查硫醇/Ab值。

在具有延伸質量範圍之TSQ量子三重四極™ (Quantum Triple quadrupole™)質譜儀(Thermo Electron, San Jose California)上實施液相層析/質譜分析。在加熱至75℃之PRLP-S® 1000 A微孔管柱(50 mm × 2.1 mm, Polymer Laboratories, Shropshire, UK)上對試樣進行層析。使用30-40% B (溶劑A：存於水中之0.05% TFA，溶劑B：存於乙腈中之0.04% TFA)之線性梯度且使用電噴射來源直接離子化洗脫劑。藉由Xcalibur®數據系統收集數據且使用ProMass® (Novatia, LLC, New Jersey)實施重疊合法。在LC/MS分析之前，於37℃下將抗體或藥物結合物(50微克)用PNGase F (2單位/ml；PROzyme, San Leandro, CA)處理2小時以移除N連接之碳水化合物。

將疏水性相互作用層析(HIC)試樣注射至Butyl HIC NPR管柱(2.5微米粒徑，4.6 mm × 3.5 cm) (Tosoh Bioscience)上並用0%至70% B之線性梯度以0.8 ml/min洗脫(A：1.5 M硫酸銨，存於50 mM磷酸鉀中，

pH 7，B：50 mM磷酸鉀，pH 7，20%異丙醇)。使用配備有多波長檢測器及Chemstation軟體之Agilent 1100系列HPLC系統拆分並定量具有不同藥物/抗體比率之抗體物質。

實例20 連接體-藥物中間體與抗體之結合

在實例19之還原及氧化還原程序後，將抗體溶解於PBS (磷酸鹽緩衝鹽水)緩衝液中並在冰上冷凍。將過量之約1.5莫耳至20當量之具有硫醇-反應性官能基(例如馬來醯亞胺基或溴-乙醯胺)之連接體-藥物中間體(包括但不限於表4中之**51-68**)溶解於DMSO中，稀釋於乙腈及水中，並添加至PBS中之冷凍之經還原、氧化還原抗體中。約一小時後，添加過量馬來醯亞胺以驟冷反應物並封端任何未反應之抗體硫醇基團。可經由HiTrap SP FF管柱裝載並洗脫結合混合物以移除過量藥物-連接體中間體及其他雜質。藉由離心超濾濃縮反應混合物並藉由經由PBS中之G25樹脂洗脫純化半胱胺酸改造之抗體藥物結合物並使其脫鹽，在無菌條件下經由0.2 μm濾膜過濾，並冷凍用於儲存。

藉由上述程序，製備表3之半胱胺酸改造之抗體藥物結合物**101-133**。

實例21 活體外細胞增殖分析

藉由利用以下方案之細胞增殖分析量測ADC之功效(CELLTITER GLO™ Luminescent Cell Viability Assay, Promega公司. Technical Bulletin TB288；Mendoza等人，(2002) Cancer Res. 62:5485-5488)：

1.在96孔不透明壁板之每一孔中沈積培養基中含有約10^4個細胞(SKBR-3、BT474、MCF7或MDA-MB-468)之100 μl細胞培養物之等份試樣。

2.製備含有培養基且無細胞之對照孔。

3.向實驗孔中添加ADC並培育3至5天。

4.將板平衡至室溫並保持約30分鐘。

5.添加等於每一孔中存在之細胞培養基之體積之CELLTITER GLO™試劑之體積。

6.將內容物在定軌振盪器上混合2分鐘以誘導細胞裂解。

7.將板於室溫下培育10分鐘以穩定發光信號。

8.在圖表中將發光記錄並報告為RLU = 相對發光單位。

利用標准偏差誤差棒將數據繪示為每一組重複之發光之平均值。該方案係CELLTITER GLO™ Luminescent Cell之修改形式。

培養基：使SK-BR-3在50/50/10%FBS/麩醯胺酸/250 μg/mL G-418中生長，使OVCAR-3在RPMI/20%FBS/麩醯胺酸中生長

實例22 高表現HER2轉基因外植體小鼠及其他腫瘤模型中之腫瘤生長抑制、活體內功效

在第0天單一治療之前確立腫瘤並使其體積生長至150-200 mm^3 (如使用卡尺量測)。使用卡尺根據下式量測腫瘤體積：V (mm^3) = 0.5A x B^2，其中A及B分別係長直徑及短直徑。在腫瘤體積達到3000 mm^3之前或在腫瘤顯示即將潰瘍之體徵時，將小鼠無痛致死。自每一實驗組(10隻小鼠/組)收集之數據表示為平均值±SE。

利用Fo5小鼠乳房瘤模型以評價在單一劑量靜脈內注射後本發明之抗體-藥物結合物之活體內功效且如前文所述(Phillips GDL、Li GM、Dugger DL等人，Targeting HER2-Positive Breast Cancer with Trastuzumab -DM1, an Antibody-Cytotoxic Drug Conjugate. (2008)Cancer Res. 68:9280-90)，其以引用方式併入本文中。用Fo5模型(即轉基因小鼠模型)測試抗Her2 ADC，其中在鼠類乳房瘤病毒啟動子(MMTV-HER2)之轉錄調控下，人類HER2基因在哺乳動物上皮中過表現，如圖31及32中所示。HER2過表現引起乳房瘤自發形成。藉由腫瘤片段(大小為約2 x 2 mm)之連續移植使該等首建體動物(首建體編號5 [Fo5])之乳房瘤在FVB小鼠之後續代中繁殖。所有研究皆係根據

Guide for the Care and Use of Laboratory Animals實施。在研究開始及移植後14天時在9隻動物中靜脈內給予每一抗體-藥物結合物(單一劑量)。初始腫瘤大小係約200 mm^3體積。由本發明之抗體-藥物結合物及對照之隨時間之腫瘤生長抑制之量測示於圖31至34中。

如所述利用OVCAR-3哺乳動物脂肪墊移植功效模型(Chen等人，(2007) Cancer Res 67:4924-4932)，從而評價單一靜脈內劑量後之腫瘤體積並使用自具有腹膜內腫瘤之小鼠切除之腫瘤，隨後使其連續通過植入小鼠之哺乳動物脂肪墊中(圖33)。

在Igrov-1 (人類卵巢癌)之小鼠異種移植物模型中研究抗Napi2B抗體-藥物結合物(ADC)之功效。

將雌性C.B-17 SCID-灰棕色小鼠(Charles River Laboratories；San Diego, CA)各自在胸腔哺乳動物脂肪墊區域中接種500萬Igrov-1細胞。在異種移植物腫瘤達到100-300 mm^3之平均腫瘤體積時(稱作第0天)，將動物隨機化成各自7至10隻小鼠之組並使其接受ADC之單一靜脈內注射。貫穿研究，一週量測小鼠之腫瘤重量及體重1至2次。在體重損失係其開始重量之>20%時，迅速將小鼠無痛致死。在腫瘤達到3000 mm^3或顯示即將潰瘍之體徵之前將所有動物無痛致死。

在HL-60或EOL-1 (人類急性骨髓性白血病)之小鼠異種移植物模型中研究抗CD33抗體-藥物結合物(ADC)之功效。HL-60細胞系係自ATCC (American Type Culture Collection；Manassas, VA)獲得且EOL-1細胞系係源自DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures；Braunschweig, Germany)。

將雌性C.B-17 SCID小鼠(Charles River Laboratories；Hollister, CA)各自在肋腹區域中皮下接種500萬HL-60或EOL-1之細胞。在異種移植物腫瘤達到100-300 mm^3之平均腫瘤體積時(稱作第0天)，將動物隨機化成各自7至10隻小鼠之組並使其接受ADC之單一靜脈內注射。

在投與ADC之前約4小時，向動物腹膜內給予過量(30 mg/kg)抗gD對照抗體以封阻腫瘤細胞上之可能之非特異性抗體結合位點。貫穿研究，一週量測小鼠之腫瘤重量及體重1至2次。在體重損失係其開始重量之>20%時，迅速將小鼠無痛致死。在腫瘤達到3000 mm^3或顯示即將潰瘍之體徵之前將所有動物無痛致死。

儘管已出於理解清楚之目的藉由舉例闡釋及實例相當詳細地對上述發明進行闡述，但說明及實例不應解釋為限制本發明之範疇。貫穿說明書引用之所有專利、專利申請案及參考文獻皆以引用方式明確併入。

【符號說明】

無

【序列表】

<110> 美商建南德克公司

<120> 1-(氯甲基)-2,3-二氫-1H-苯并[E]吲哚二聚體抗體-藥物結合物化合物及使用與治療方法

<130> P5625R1

<140>
<141>

<150> 61/969,499
<151> 2014-03-24

<150> 61/916,388
<151> 2013-12-16

<150> 61/864,889
<151> 2013-08-12

<160> 74

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 1
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu
1 5 10 15

<210> 2
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 2
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 3

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 3
Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr
1 5

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 4
Gly Tyr Glu Phe Ser Arg Ser Trp Met Asn
1 5 10

<210> 5
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 5
Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys Phe
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 6

Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 7
Lys Ala Ser Asp Leu Ile His Asn Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 8
Tyr Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr
1 5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 9
Gln Gln Tyr Trp Thr Thr Pro Phe Thr
1 5

<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 10
Gly Tyr Ser Ile Thr Asn Asp Tyr Ala Trp Asn
1 5 10

<210> 11
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 11
Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Tyr Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 12
Ala Arg Trp Thr Ser Gly Leu Asp Tyr
1 5

<210> 13
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 13
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Val Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Tyr Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Thr Ser Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 14
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 14
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Asp Leu Ile His Asn Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Thr Thr Pro Phe

85 90 95

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

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 15
Glu Val Gln Leu Cys Glu Ser Gly Gly Gly
1 5 10

<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 16
Leu Arg Leu Ser Cys Cys Ala Ser Gly Tyr Ser
1 5 10

<210> 17
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 17
Met Asn Ser Leu Arg Cys Glu Asp Thr Ala Val
1 5 10

<210> 18
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223>人工序列之說明：合成肽

<400> 18
Thr Leu Val Thr Val Cys Ser Ala Ser Thr Lys
1 5 10

<210> 19
<211> 11
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列之說明：合成肽

<400> 19
Val Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys Gly Pro
1 5 10

<210> 20
<211> 11
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列之說明：合成肽

<400> 20
Val Ser Ala Ala Ser Cys Lys Gly Pro Ser Val
1 5 10

<210> 21
<211> 11
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列之說明：合成肽

<400> 21
Trp Tyr Val Asp Gly Cys Glu Val His Asn Ala
1 5 10

<210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列之說明：合成肽

<400> 22
Lys Gly Phe Val Pro Cys Asp Ile Ala Val Glu
1 5 10

<210> 23
<211> 11
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列之說明：合成肽

<400> 23
Pro Pro Val Leu Asp Cys Gly Asp Ser Phe Phe
1 5 10

<210> 24
<211> 10
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列之說明：合成肽

<400> 24
Asp Val Gln Leu Cys Glu Ser Gly Pro Gly
1 5 10

<210> 25
<211> 11
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列之說明：合成肽

<400> 25
Leu Ser Leu Thr Cys Cys Val Thr Gly Tyr Ser
1 5 10

<210> 26
<211> 11
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列之說明：合成肽

<400> 26
Leu Asn Ser Val Thr Cys Glu Asp Thr Ala Thr
1 5 10

<210> 27
<211> 11
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列之說明：合成肽

<400> 27
Thr Leu Val Thr Val Cys Ser Ala Ser Thr Lys
1 5 10

<210> 28
<211> 11
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列之說明：合成肽

<400> 28
Val Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys Gly Pro
1 5 10

<210> 29
<211> 11
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列之說明：合成肽

<400> 29
Val Ser Ala Ala Ser Cys Lys Gly Pro Ser Val
1 5 10

<210> 30
<211> 11
<212> PRT

<213>人工序列

<220>
<223>人工序列之說明：合成肽

<400> 30
Trp Tyr Val Asp Gly Cys Glu Val His Asn Ala
1 5 10

<210> 31
<211> 11
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列之說明：合成肽

<400> 31
Lys Gly Phe Val Pro Cys Asp Ile Ala Val Glu
1 5 10

<210> 32
<211> 11
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列之說明：合成肽

<400> 32
Pro Pro Val Leu Asp Cys Asp Gly Ser Phe Phe
1 5 10

<210> 33
<211> 11
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列之說明：合成肽

<400> 33
Ser Leu Ser Ala Ser Cys Gly Asp Arg Val Thr
1 5 10

<210> 34
<211> 11

<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列之說明：合成肽

<400> 34
Glu Ile Lys Arg Thr Cys Ala Ala Pro Ser Val
1 5 10

<210> 35
<211> 11
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列之說明：合成肽

<400> 35
Thr Val Ala Ala Pro Cys Val Phe Ile Phe Pro
1 5 10

<210> 36
<211> 11
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列之說明：合成肽

<400> 36
Phe Ile Phe Pro Pro Cys Asp Glu Gln Leu Lys
1 5 10

<210> 37
<211> 11
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列之說明：合成肽

<400> 37
Asp Glu Gln Leu Lys Cys Gly Thr Ala Ser Val
1 5 10

<210> 38

<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 38
Val Thr Glu Gln Asp Cys Lys Asp Ser Thr Tyr
1 5 10

<210> 39
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 39
Gly Leu Ser Ser Pro Cys Thr Lys Ser Phe Asn
1 5 10

<210> 40
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 40
Phe Leu Ser Val Ser Cys Gly Gly Arg Val Thr
1 5 10

<210> 41
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 41
Glu Ile Lys Arg Thr Cys Ala Ala Pro Ser Val
1 5 10

<210> 42
<211> 11
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列之說明：合成肽

<400> 42
Thr Val Ala Ala Pro Cys Val Phe Ile Phe Pro
1 5 10

<210> 43
<211> 11
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列之說明：合成肽

<400> 43
Phe Ile Phe Pro Pro Cys Asp Glu Gln Leu Lys
1 5 10

<210> 44
<211> 11
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列之說明：合成肽

<400> 44
Asp Glu Gln Leu Lys Cys Gly Thr Ala Ser Val
1 5 10

<210> 45
<211> 11
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列之說明：合成肽

<400> 45
Val Thr Glu Gln Asp Cys Lys Asp Ser Thr Tyr
1 5 10

<210> 46
<211>. 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 46
Gly Leu Ser Ser Pro Cys Thr Lys Ser Phe Asn
1 5 10

<210> 47
<211> 446
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 47
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Val Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Tyr Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Thr Ser Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 48
<211> 214
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列之說明：合成多肽

<400> 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Asp Leu Ile His Asn Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 49
<211> 446
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列之說明：合成多肽

<400> 49
Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Asn Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Asn Asp
20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Asn Tyr Ser Gly Tyr Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

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

Leu His Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Asp Gly Gly Leu Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ala Cys Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 50
<211> 214
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列之說明：合成多肽

<400> 50

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Ser Ser Phe Leu Ser Val Ser Leu Gly
1               5                  10                  15

Gly Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Asp Leu Ile His Asn Trp
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ala Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Ser Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 51
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 51
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp
1 5 10 15

<210> 52
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 52
Leu Gly Val Asn Ser Val Ser
1 5

<210> 53
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 53
Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Trp Thr
1 5

<210> 54
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 54
Asn His Ala Ile Ser
1 5

<210> 55
<211> 17
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列之說明：合成肽

<400> 55
Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 56
<211> 7
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列之說明：合成肽

<400> 56
Glu Trp Ala Asp Val Phe Asp
1 5

<210> 57
<211> 112
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列之說明：合成多肽

<400> 57
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Val Asn Ser Val Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Leu Gln Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 58
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 58
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Ile Phe Ser Asn His
20 25 30

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Phe
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Trp Ala Asp Val Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 59
<211> 11
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列之說明：合成肽

<400> 59
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp Leu Gly
1 5 10

<210> 60
<211> 7
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列之說明：合成肽

<400> 60
Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 61
<211> 9
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列之說明：合成肽

<400> 61
Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 62
<211> 5
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列之說明：合成肽

<400> 62
Gly Asn Tyr Met Ser
1 5

<210> 63
<211> 16
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列之說明：合成肽

<400> 63
Leu Ile Tyr Ser Gly Asp Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 64
<211> 10
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列之說明：合成肽

<400> 64
Asp Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Met Val Val
1 5 10

<210> 65
<211> 107
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列之說明：合成多肽

<400> 65
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 66
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 66
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ala Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Gly Asn
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Leu Ile Tyr Ser Gly Asp Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Asn Ile Ser Arg Asp Ile Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val
85 90 95

Arg Asp Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Met Val Val Trp Gly Lys Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 67
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 67
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 68
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 68
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ala Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Gly Asn
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Leu Ile Tyr Ser Gly Asp Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val
85 90 95

Arg Asp Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Met Val Val Trp Gly Lys Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 69
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 69
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 70
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 70
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ala Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Gly Asn
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Leu Ile Tyr Ser Gly Asp Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Ile Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val
85 90 95

Arg Asp Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Met Val Val Trp Gly Lys Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 71
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 71
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 72
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 72
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ala Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Gly Asn
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Leu Ile Tyr Ser Gly Asp Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Ile Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val
85 90 95

Arg Asp Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Met Val Val Trp Gly Lys Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 73
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 73
Met Ala Glu Ala Ile Thr Tyr
1 5

<210> 74
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 74
Thr Ala Phe Arg Phe Pro Asp
1 5

公告本

I636792

發明摘要

※ 申請案號：103120758

※ 申請日：103/06/16　　※IPC 分類：*A61K 47/50* (2017.01)
A61K 39/395 (2006.01)

【發明名稱】

1-(氯甲基)-2,3-二氫-1H-苯并[E]吲哚二聚體抗體-藥物結合物化合物及使用與治療方法

1-(CHLOROMETHYL)-2,3-DIHYDRO-1H-BENZO[E]INDOLE DIMER ANTIBODY-DRUG CONJUGATE COMPOUNDS, AND METHODS OF USE AND TREATMENT

【中文】

本發明提供包含經由連接體與1-(氯甲基)-2,3-二氫-1H-苯并[e]吲哚(CBI)二聚體藥物部分結合之抗體的抗體-藥物結合物及使用該等抗體-藥物結合物之方法。

【英文】

The invention provides antibody-drug conjugates comprising an antibody conjugated to a 1-(chloromethyl)-2,3-dihydro-1H-benzo[e]indole (CBI) dimer drug moiety via a linker, and methods of using the antibody-drug conjugates.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（1）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

申請專利範圍

1. 一種抗體-藥物結合物化合物，其具有下式：

$$Ab-(L-D)_p$$

其中：

Ab係選自下列之抗體：抗HER2、抗CD33、抗MUC16、抗CD22、抗CD79b或抗NaPi3b抗體；

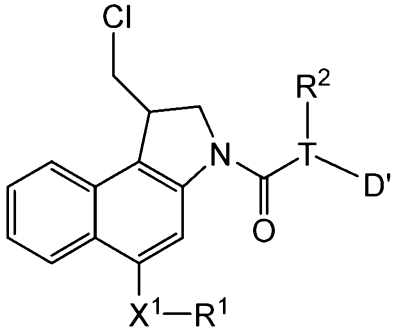
L係具有下式之連接體：

$$-Str-(Pep)_m-(Sp)_n-$$

其中Str係共價附接至該抗體之延伸體單元；Pep係2至12個胺基酸殘基之可選肽單元，Sp係共價附接至二聚體藥物部分之可選間隔體單元，且m及n係獨立地選自0及1；

p係1至8之整數；

D係具有下式之該二聚體藥物部分：



其中

R^1係選自H、$P(O)_3H_2$、$C(O)NR^aR^b$或與L之鍵；

R^2係選自H、$P(O)_3H_2$、$C(O)NR^aR^b$或與L之鍵；

R^a及R^b係獨立地選自H及視情況經一或多個F取代之C_1-C_6烷基，

或R^a與R^b形成5或6員雜環基；

T係選自以下之繫鏈基團：C_3-C_{12}伸烷基、Y、(C_1-C_6伸烷基)-

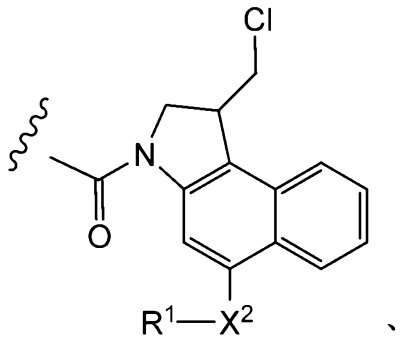
Y-(C_1-C_6伸烷基)、(C_1-C_6伸烷基)-Y-(C_1-C_6伸烷基)-Y-(C_1-C_6伸烷基)、(C_2-C_6伸烯基)-Y-(C_2-C_6伸烯基)及(C_2-C_6伸炔基)-Y-(C_2-C_6伸炔基)；

其中Y係獨立地選自O、S、NR^1、芳基及雜芳基；

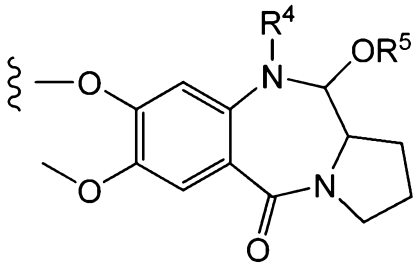
其中伸烷基、伸烯基、芳基及雜芳基獨立地且視情況經F、OH、O(C_1-C_6烷基)、NH_2、$NHCH_3$、$N(CH_3)_2$、$OP(O)_3H_2$及C_1-C_6烷基取代，其中烷基視情況經一或多個F取代；

或伸烷基、伸烯基、芳基及雜芳基獨立地且視情況經與L之鍵取代；

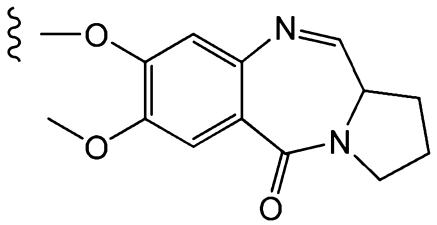
D'係選自以下之藥物部分：



、



及



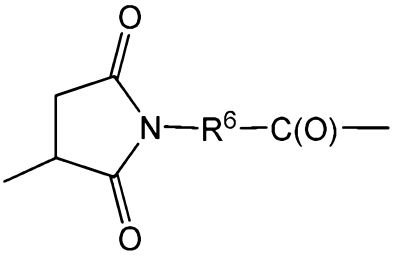
其中波形線指示與T之附接位點；

X^1及X^2係獨立地選自O及NR^3，其中R^3係選自H及視情況經一或多個F取代之C_1-C_6烷基；

R^4係H、CO_2R或與L之鍵，其中R係C_1-C_6烷基或苄基；且

R^5係H或C_1-C_6烷基。

2. 如請求項1之抗體-藥物結合物化合物，其中Str具有下式：



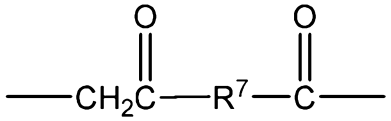
其中R^6係選自由以下組成之群：C_1-C_{10}伸烷基、C_3-C_8碳環基、O-(C_1-C_8烷基)、伸芳基、C_1-C_{10}伸烷基-伸芳基、伸芳基-C_1-C_{10}伸烷基、C_1-C_{10}伸烷基-(C_3-C_8碳環基)、(C_3-C_8碳環基)-C_1-C_{10}伸烷基、C_3-C_8雜環基、C_1-C_{10}伸烷基-(C_3-C_8雜環基)、(C_3-C_8雜環基)-C_1-C_{10}伸烷基、C_1-C_{10}伸烷基-C(O)N(R^8)-C_2-C_6伸烷基-N(R^8)、N(R^8)-(C_2-C_6伸烷基)及$(CH_2CH_2O)_r$-CH_2；其中R^8係H或C_1-C_6烷基，且r係1至10範圍內之整數。

3. 如請求項2之抗體-藥物結合物化合物，其中R^6係$(CH_2)_5$。

4. 如請求項1之抗體-藥物結合物化合物，其中m係0且n係0。

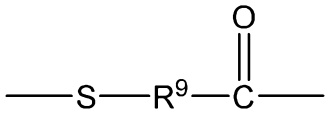
5. 如請求項1之抗體-藥物結合物化合物，其中m係0且n係1。

6. 如請求項1之抗體-藥物結合物化合物，其中Str具有下式：



其中R^7係選自C_1-C_{10}伸烷基、C_1-C_{10}伸烷基-O、N(R^8)-(C_2-C_6伸烷基)-N(R^8)、N(R^8)-(C_2-C_6伸烷基)及$(CH_2CH_2O)_r$-CH_2；其中R^8係H或C_1-C_6烷基，且r係1至10範圍內之整數。

7. 如請求項1之抗體-藥物結合物化合物，其中Str具有下式：



其中R^9係選自C_1-C_{10}伸烷基、C_1-C_{10}伸烷基-O、(C_2-C_6伸烷基)-N(R^8)及$(CH_2CH_2O)_r$-CH_2；其中R^8係H或C_1-C_6烷基，且r係1至10

範圍內之整數。

8. 如請求項7之抗體-藥物結合物化合物，其中L與該抗體之半胱胺酸胺基酸形成二硫鍵，且R^9係C_2-C_6伸烷基-O，其中伸烷基視情況經F、OH、O(C_1-C_6烷基)、NH_2、$NHCH_3$、$N(CH_3)_2$、$OP(O)_3H_2$及C_1-C_6烷基取代，其中烷基視情況經一或多個F取代。

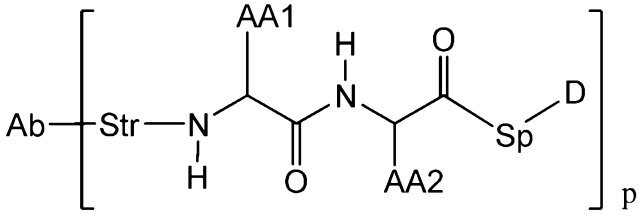
9. 如請求項1之抗體-藥物結合物化合物，其中m係1且n係1。

10. 如請求項1之抗體-藥物結合物化合物，其中m係1且Pep包含2至12個獨立地選自以下之胺基酸殘基：甘胺酸、丙胺酸、苯丙胺酸、離胺酸、精胺酸、纈胺酸及瓜胺酸。

11. 如請求項10之抗體-藥物結合物化合物，其中Pep係纈胺酸-瓜胺酸。

12. 如請求項1之抗體-藥物結合物化合物，其中n係1且Sp包含對胺基苄基或對胺基苄基氧基羰基。

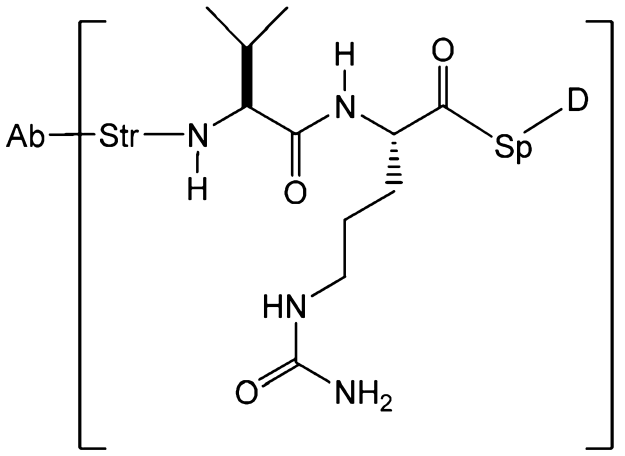
13. 如請求項9之抗體-藥物結合物化合物，其具有下式：



其中AA1及AA2係獨立地選自胺基酸側鏈；p係1至8之整數。

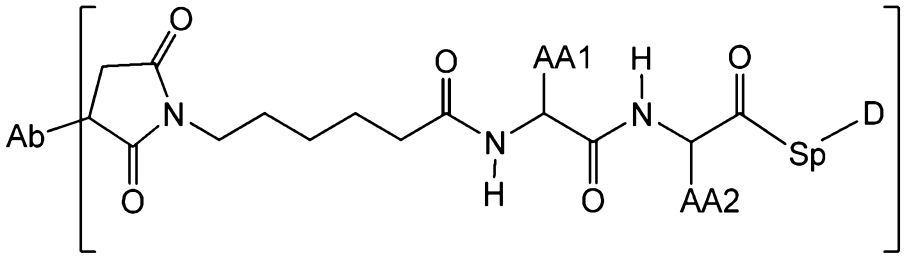
14. 如請求項13之抗體-藥物結合物化合物，其中該胺基酸側鏈係獨立地選自H、-CH_3、-$CH_2(C_6H_5)$、-$CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$、-$CH_2CH_2CH_2NHC(NH)NH_2$、-CHCH(CH_3)CH_3及-$CH_2CH_2CH_2NHC(O)NH_2$。

15. 如請求項14之抗體-藥物結合物化合物，其具有下式：



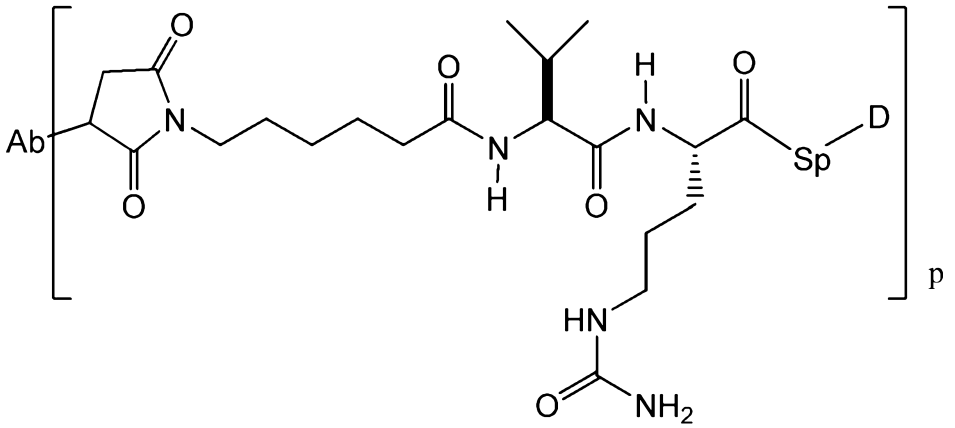
。

16. 如請求項13之抗體-藥物結合物化合物，其具有下式：



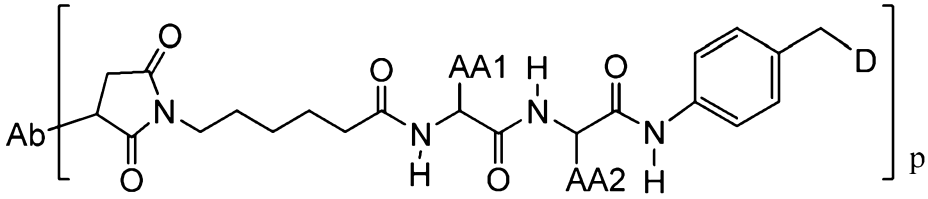
。

17. 如請求項16之抗體-藥物結合物化合物，其具有下式：



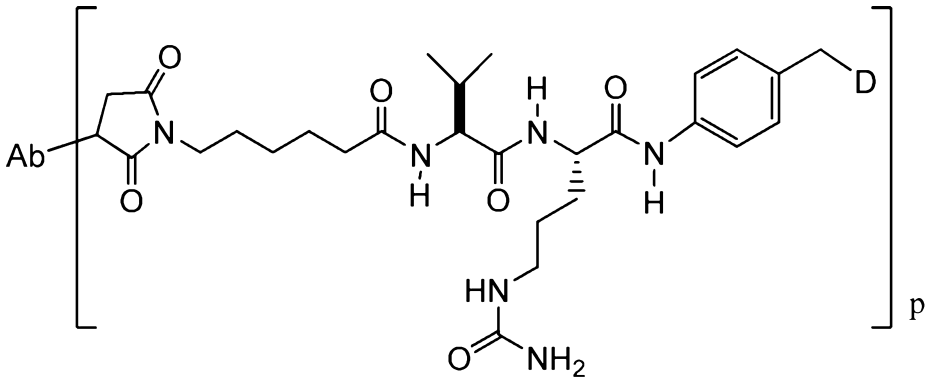
。

18. 如請求項9之抗體-藥物結合物化合物，其具有下式：



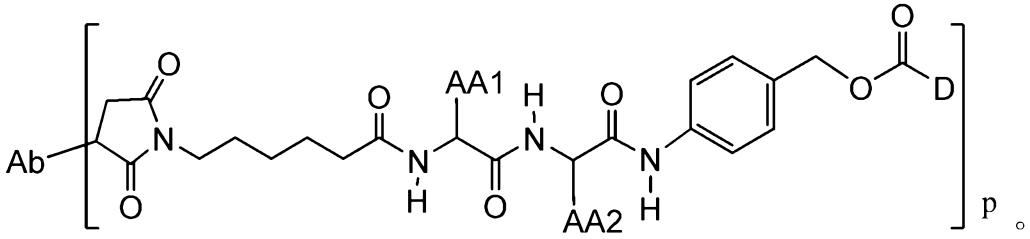
。

19. 如請求項18之抗體-藥物結合物化合物，其具有下式：



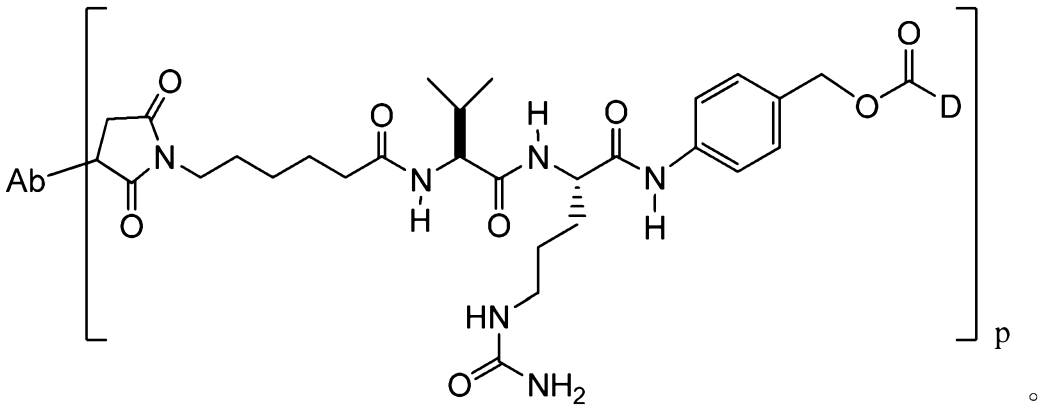
。

20. 如請求項9之抗體-藥物結合物化合物，其具有下式：



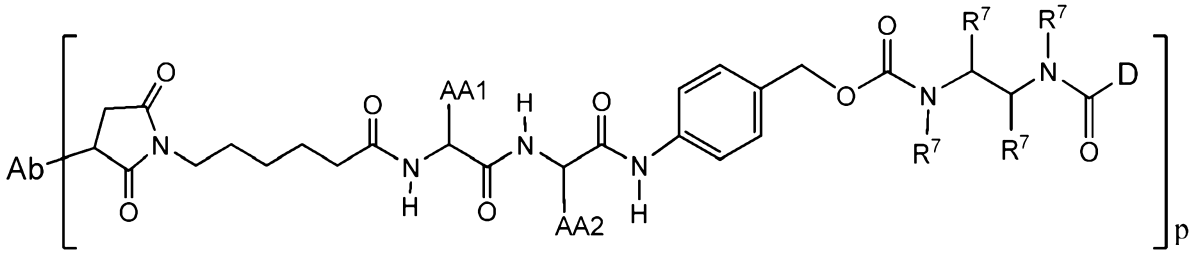
。

21. 如請求項20之抗體-藥物結合物化合物，其具有下式：



。

22. 如請求項13之抗體-藥物結合物化合物，其具有下式：



其中R^7係獨立地選自H及C_1-C_{12}烷基。

23. 如請求項1之抗體-藥物結合物化合物，其中R^a與R^b形成選自以下之5或6員雜環基：N-甲基六氫吡嗪基、嗎啉基、六氫吡啶基及吡咯啶基。

24. 如請求項1之抗體-藥物結合物化合物，其中T係C_3-C_5伸烷基。

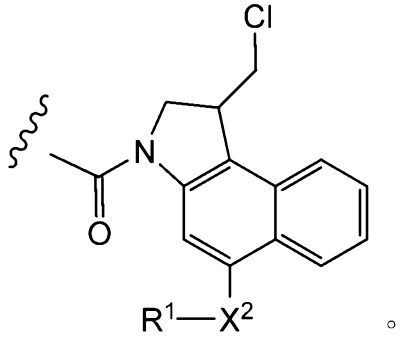
25. 如請求項24之抗體-藥物結合物化合物，其中T係選自$(CH_2)_3$、$(CH_2)_4$及$(CH_2)_5$。

26. 如請求項1之抗體-藥物結合物化合物，其中T係(C_1-C_6伸烷基)-Y-(C_1-C_6伸烷基)，其中Y係經與L之鍵取代之苯基。

27. 如請求項1之抗體-藥物結合物化合物，其中T係(C_2-C_6伸烯基)-Y-(C_2-C_6伸烯基)，其中Y係經與L之鍵取代之苯基。

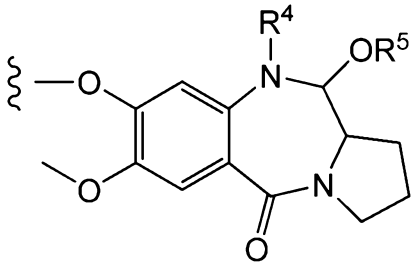
28. 如請求項1之抗體-藥物結合物化合物，其中Y係選自苯基、吡啶基、1-甲基-1H-苯并[d]咪唑及[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶。

29. 如請求項1之抗體-藥物結合物化合物，其中D'係：



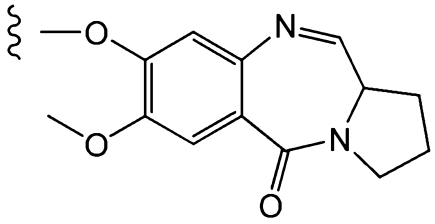
。

30. 如請求項1之抗體-藥物結合物化合物，其中D'係：



。

31. 如請求項1之抗體-藥物結合物化合物，其中D'係：



。

32. 如請求項1之抗體-藥物結合物化合物，其中該抗體係抗CD22抗體。

33. 如請求項32之抗體-藥物結合物化合物，其中該抗CD22抗體包含三個輕鏈超變區(HVR-L1、HVR-L2及HVR-L3)及三個重鏈超變區(HVR-H1、HVR-H2及HVR-H3)，其中：

HVR-L1包含胺基酸序列SEQ ID NO:1；

HVR-L2包含胺基酸序列SEQ ID NO:2；

HVR-L3包含胺基酸序列SEQ ID NO:3；

HVR-H1包含胺基酸序列SEQ ID NO:4；

HVR-H2包含胺基酸序列SEQ ID NO:5；且

HVR-H3包含胺基酸序列SEQ ID NO:6。

34. 如請求項1之抗體-藥物結合物化合物，其中該抗體係抗MUC16抗體。

35. 如請求項34之抗體-藥物結合物化合物，其中該抗MUC16抗體包含三個輕鏈超變區(HVR-L1、HVR-L2及HVR-L3)及三個重鏈超變區(HVR-H1、HVR-H2及HVR-H3)，其中：

HVR-L1包含胺基酸序列SEQ ID NO:7；

HVR-L2包含胺基酸序列SEQ ID NO:8；

HVR-L3包含胺基酸序列SEQ ID NO:9；

HVR-H1包含胺基酸序列SEQ ID NO:10；

HVR-H2包含胺基酸序列SEQ ID NO:11；且

HVR-H3包含胺基酸序列SEQ ID NO:12。

36. 如請求項34之抗體-藥物結合物化合物，其中該抗MUC16抗體係半胱胺酸改造之抗體，其包含一或多個位於選自SEQ ID NO: 15至32之輕鏈序列中或位於選自SEQ ID NO: 33至46之重鏈序列中之游離半胱胺酸胺基酸殘基。

37. 如請求項1之抗體-藥物結合物化合物，其中該抗體係抗HER2抗體。

38. 如請求項1之抗體-藥物結合物化合物，其中該抗HER2抗體係曲妥珠單抗(trastuzumab)。

39. 如請求項1之抗體-藥物結合物化合物，其中該抗體係抗CD33抗體。

40. 如請求項39之抗體-藥物結合物化合物，其中該抗CD33抗體包含三個輕鏈超變區(HVR-L1、HVR-L2及HVR-L3)及三個重鏈超變區(HVR-H1、HVR-H2及HVR-H3)，其中：

HVR-L1包含胺基酸序列SEQ ID NO:51；

HVR-L2包含胺基酸序列SEQ ID NO:52；

HVR-L3包含胺基酸序列SEQ ID NO:53；

HVR-H1包含胺基酸序列SEQ ID NO:54；

HVR-H2包含胺基酸序列SEQ ID NO:55；且

HVR-H3包含胺基酸序列SEQ ID NO:56。

41. 如請求項39之抗體-藥物結合物化合物，其中該抗CD33抗體包含SEQ ID NO:57之輕鏈超變區或SEQ ID NO:58之重鏈可變區。

42. 如請求項39之抗體-藥物結合物化合物，其中該抗CD33抗體包含三個輕鏈超變區(HVR-L1、HVR-L2及HVR-L3)及三個重鏈超變區(HVR-H1、HVR-H2及HVR-H3)，其中：

HVR-L1包含胺基酸序列SEQ ID NO:59；

HVR-L2包含胺基酸序列SEQ ID NO:60；

HVR-L3包含胺基酸序列SEQ ID NO:61；

HVR-H1包含胺基酸序列SEQ ID NO:62；

HVR-H2包含胺基酸序列SEQ ID NO:63；且

HVR-H3包含胺基酸序列SEQ ID NO:64。

43. 如請求項39之抗體-藥物結合物化合物，其中該抗CD33抗體包含選自SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:69及SEQ ID

NO:71之輕鏈超變區；或選自SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:70及SEQ ID NO:72之重鏈可變區。

44. 一種醫藥組合物，其包含如請求項1至43中任一項之抗體-藥物結合物化合物及醫藥上可接受之賦形劑。

45. 一種如請求項44之醫藥組合物之用途，其用於製造用於治療癌症之藥劑。

46. 一種用於治療癌症之套組，其包含：

a) 如請求項44之醫藥組合物；及

b) 使用說明書。

47. 一種連接體-藥物中間體，其具有下式：

X-L-D

其中：

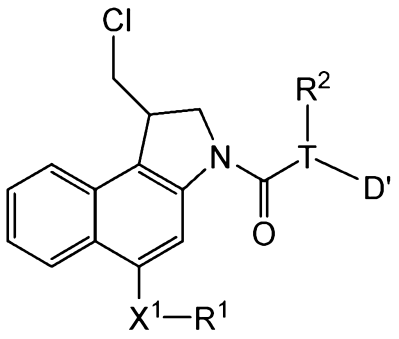
X係選自以下之反應性官能基：馬來醯亞胺、硫醇、胺基、溴化物、溴乙醯胺基、碘乙醯胺基、對甲苯磺酸酯、碘化物、羥基、羧基、吡啶基二硫化物及N-羥基琥珀醯亞胺；

L係具有下式之連接體：

$$-Str-(Pep)_m-(Sp)_n-$$

其中Str係共價附接至X之延伸體單元；Pep係2至12個胺基酸殘基之可選肽單元，Sp係共價附接至二聚體藥物部分之可選間隔體單元，且m及n係獨立地選自0及1；

D係具有下式之該二聚體藥物部分：



其中

R^1係選自H、$P(O)_3H_2$、$C(O)NR^aR^b$或與L之鍵；

R^2係選自H、$P(O)_3H_2$、$C(O)NR^aR^b$或與L之鍵；

R^a及R^b係獨立地選自H及視情況經一或多個F取代之C_1-C_6烷基，或R^a與R^b形成5或6員雜環基；

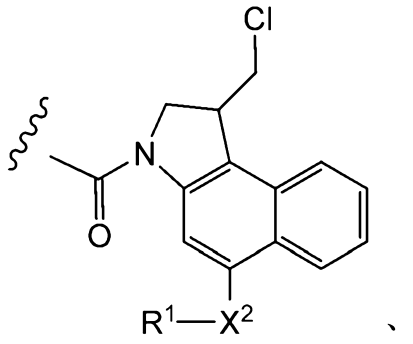
T係選自以下之繫鏈基團：C_3-C_{12}伸烷基、Y、(C_1-C_6伸烷基)-Y-(C_1-C_6伸烷基)、(C_1-C_6伸烷基)-Y-(C_1-C_6伸烷基)-Y-(C_1-C_6伸烷基)、(C_2-C_6伸烯基)-Y-(C_2-C_6伸烯基)及(C_2-C_6伸炔基)-Y-(C_2-C_6伸炔基)；

其中Y係獨立地選自O、S、NR^1、芳基及雜芳基；

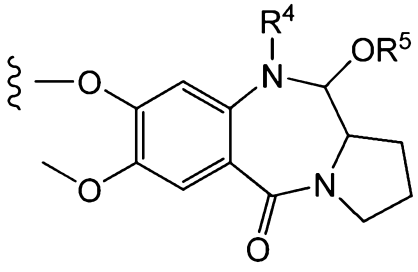
其中伸烷基、伸烯基、芳基及雜芳基獨立地且視情況經F、OH、O(C_1-C_6烷基)、NH_2、$NHCH_3$、$N(CH_3)_2$、$OP(O)_3H_2$及C_1-C_6烷基取代，其中烷基視情況經一或多個F取代；

或伸烷基、伸烯基、芳基及雜芳基獨立地且視情況經與L之鍵取代；

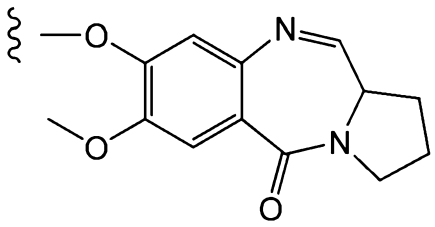
D'係選自以下之藥物部分：



、



及



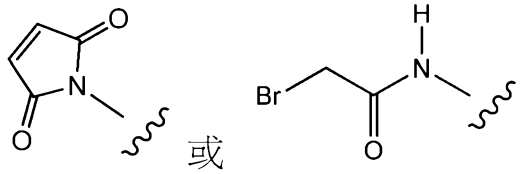
其中波形線指示與T之附接位點；

X^1及X^2係獨立地選自O及NR^3，其中R^3係選自H及視情況經一或多個F取代之C_1-C_6烷基；

R^4係H、CO_2R或與L之鍵，其中R係C_1-C_6烷基或苄基；且

R^5係H或C_1-C_6烷基。

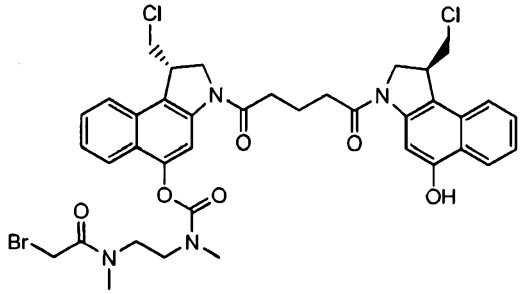
48. 如請求項47之連接體-藥物中間體，其中X係



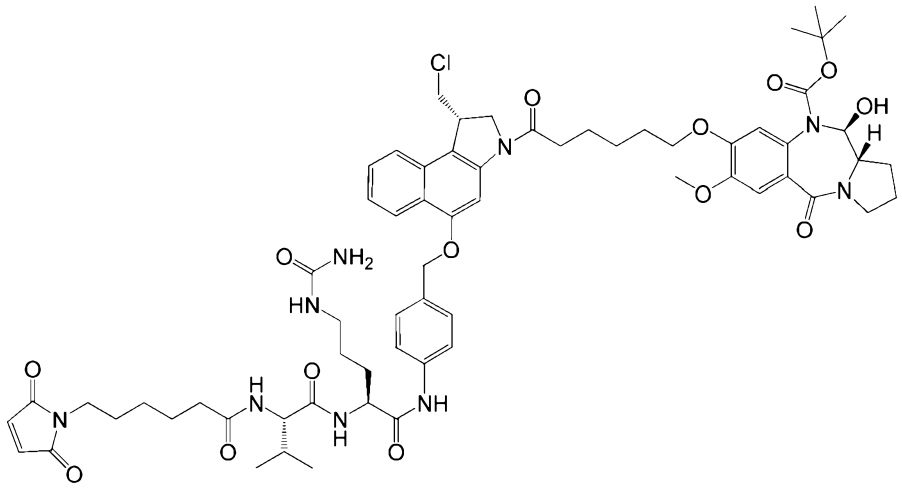
或

。

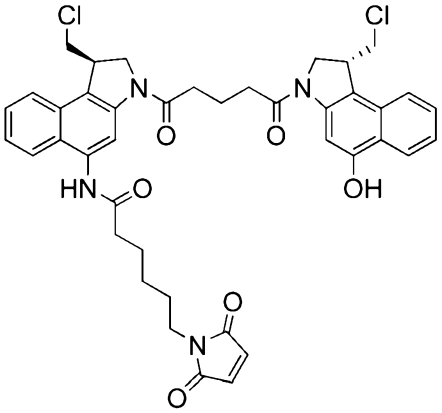
49. 如請求項47之連接體-藥物中間體，其係選自：



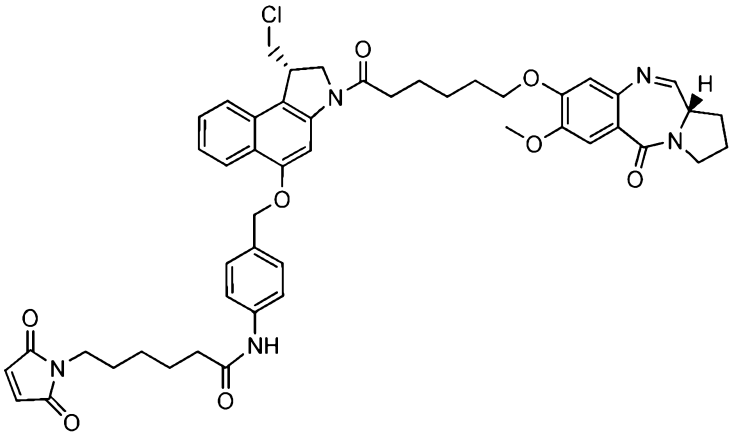
；



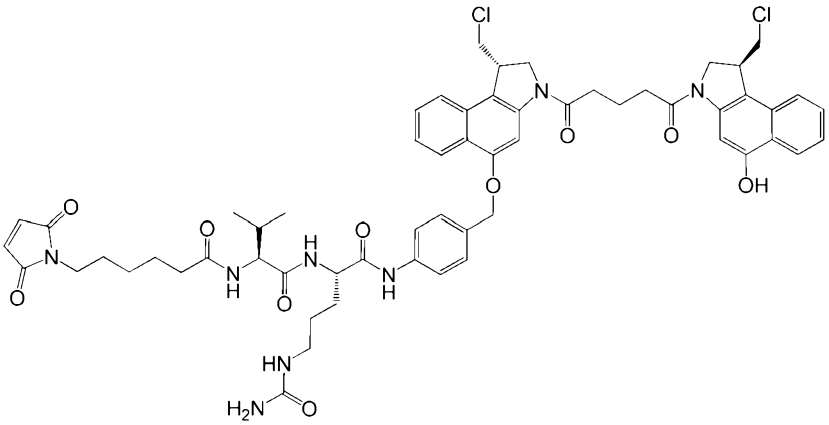
；



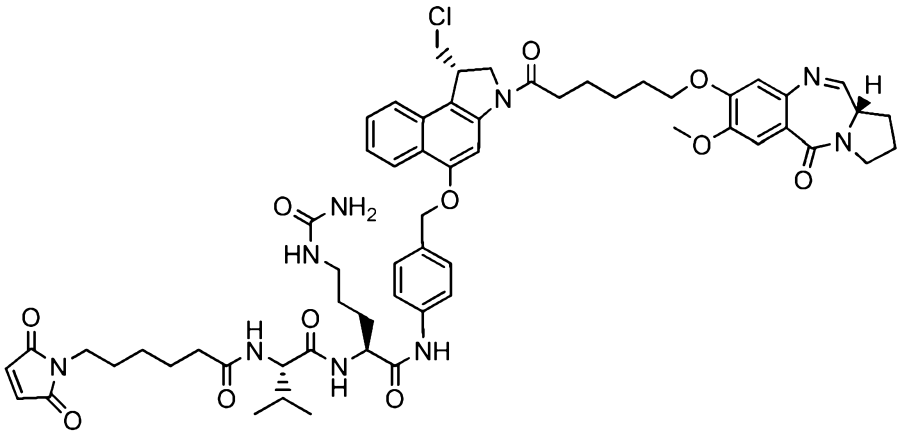
;



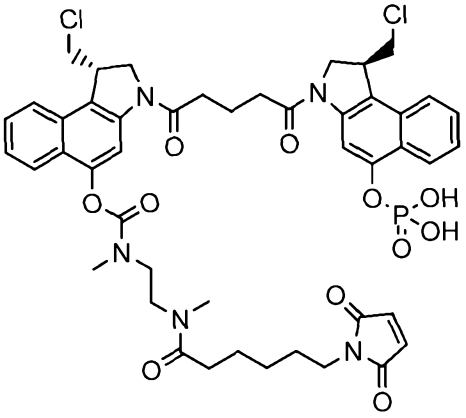
;



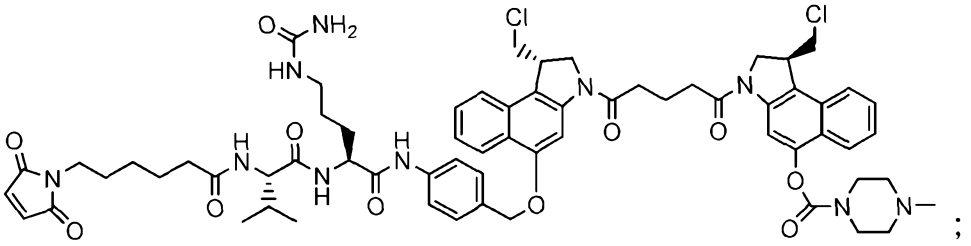
;



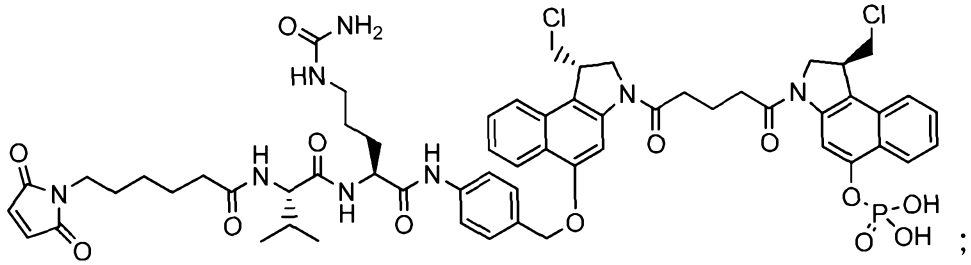
;



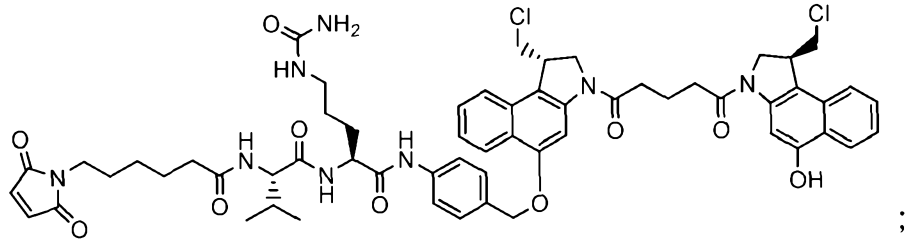
;



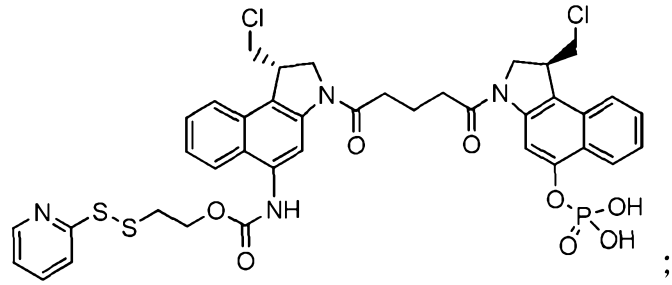
;



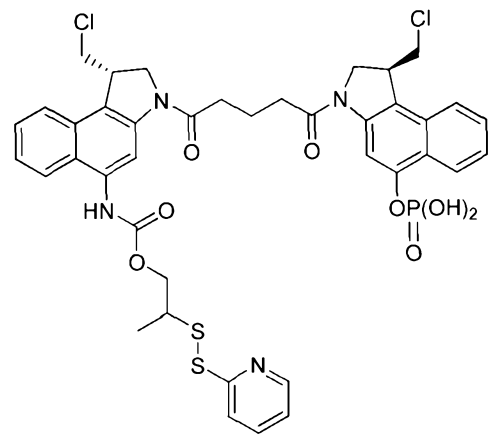
;



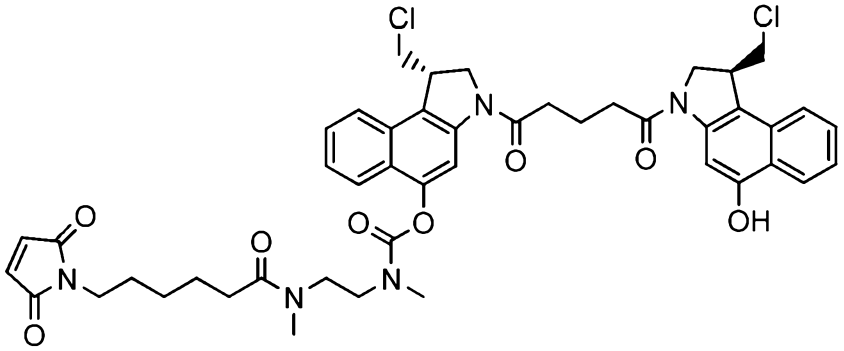
;



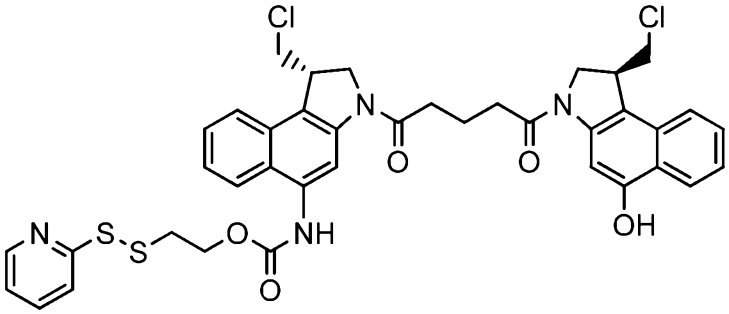
;



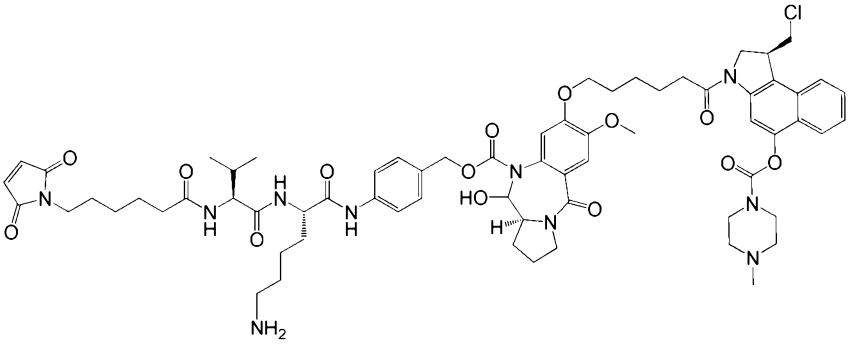
;



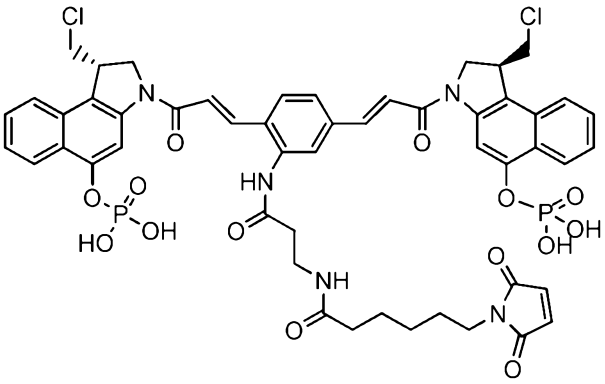
;



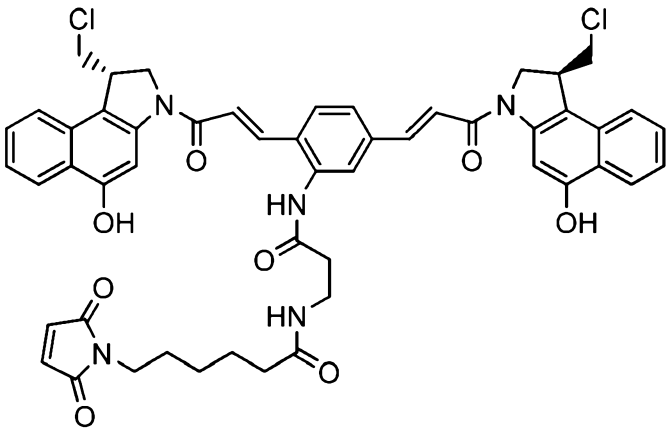
;



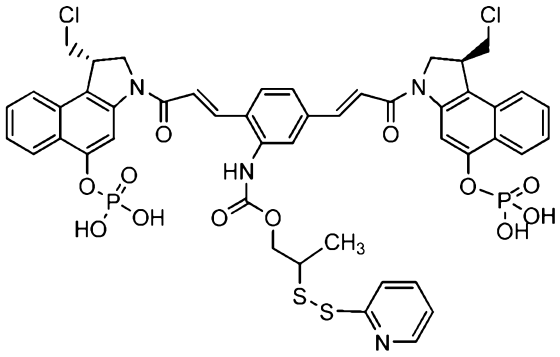
;



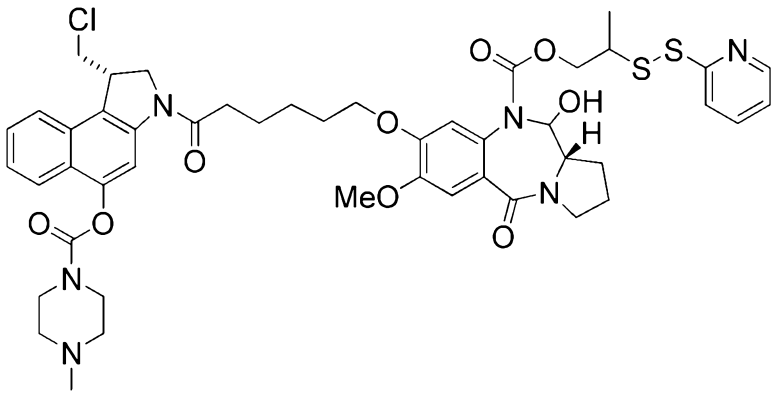
;



;

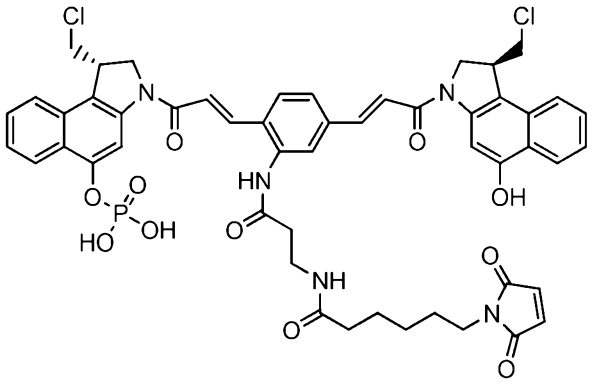


;



;

及



。

50. 一種製備如請求項1之抗體-藥物結合物化合物之方法，其包含使該抗體與具有下式之連接體-藥物中間體結合：

X-L-D

其中：

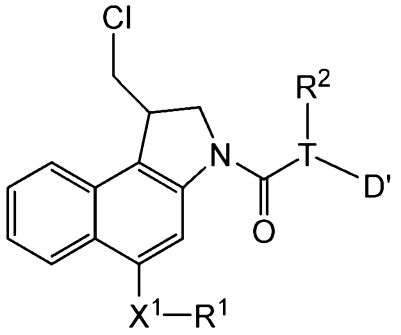
X係選自以下之反應性官能基：馬來醯亞胺、硫醇、胺基、溴化物、溴乙醯胺基、碘乙醯胺基、對甲苯磺酸酯、碘化物、羥基、羧基、吡啶基二硫化物及N-羥基琥珀醯亞胺；

L係具有下式之連接體：

$-Str-(Pep)_m-(Sp)_n-$

其中Str係共價附接至X之延伸體單元；Pep係2至12個胺基酸殘基之可選肽單元，Sp係共價附接至二聚體藥物部分之可選間隔體單元，且m及n係獨立地選自0及1；

D係具有下式之該二聚體藥物部分：



其中

R^1係選自H、$P(O)_3H_2$、$C(O)NR^aR^b$或與L之鍵；

R^2係選自H、$P(O)_3H_2$、$C(O)NR^aR^b$或與L之鍵；

R^a及R^b係獨立地選自H及視情況經一或多個F取代之C_1-C_6烷基，或R^a與R^b形成5或6員雜環基；

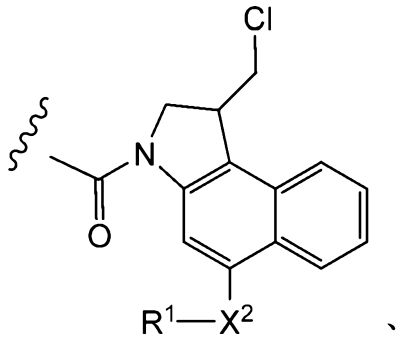
T係選自以下之繫鏈基團：C_3-C_{12}伸烷基、Y、(C_1-C_6伸烷基)-Y-(C_1-C_6伸烷基)、(C_1-C_6伸烷基)-Y-(C_1-C_6伸烷基)-Y-(C_1-C_6伸烷基)、(C_2-C_6伸烯基)-Y-(C_2-C_6伸烯基)及(C_2-C_6伸炔基)-Y-(C_2-C_6伸炔基)；

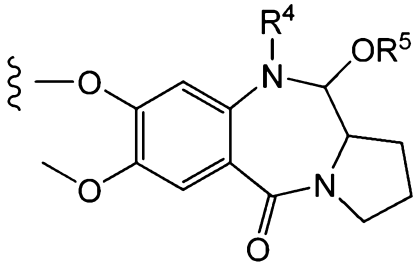
其中Y係獨立地選自O、S、NR^1、芳基及雜芳基；

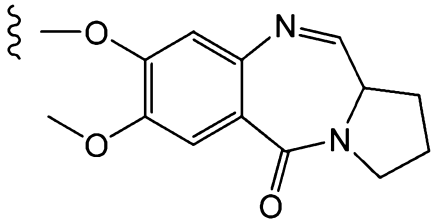
其中伸烷基、伸烯基、芳基及雜芳基獨立地且視情況經F、OH、O(C_1-C_6烷基)、NH_2、$NHCH_3$、$N(CH_3)_2$、$OP(O)_3H_2$及C_1-C_6烷基取代，其中烷基視情況經一或多個F取代；

或伸烷基、伸烯基、芳基及雜芳基獨立地且視情況經與L之鍵取代；

D'係選自以下之藥物部分：


、


及



其中波形線指示與T之附接位點；

X^1及X^2係獨立地選自O及NR^3，其中R^3係選自H及視情況經一或多個F取代之C_1-C_6烷基；

R^4係H、CO_2R或與L之鍵，其中R係C_1-C_6烷基或苄基；且

R^5係H或C_1-C_6烷基，

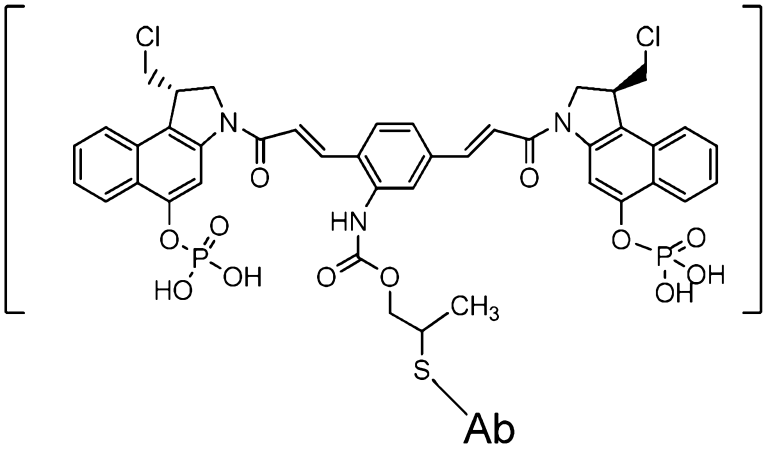
藉此形成該抗體-藥物結合物化合物。

51. 一種製備如請求項38之抗體-藥物結合物化合物之方法，其中該抗體係半胱胺酸改造之抗體且該連接體-藥物中間體之X係馬來醯亞胺。

52. 如請求項1至22中任一項之抗體-藥物結合物化合物，其中p係1、2、3或4。

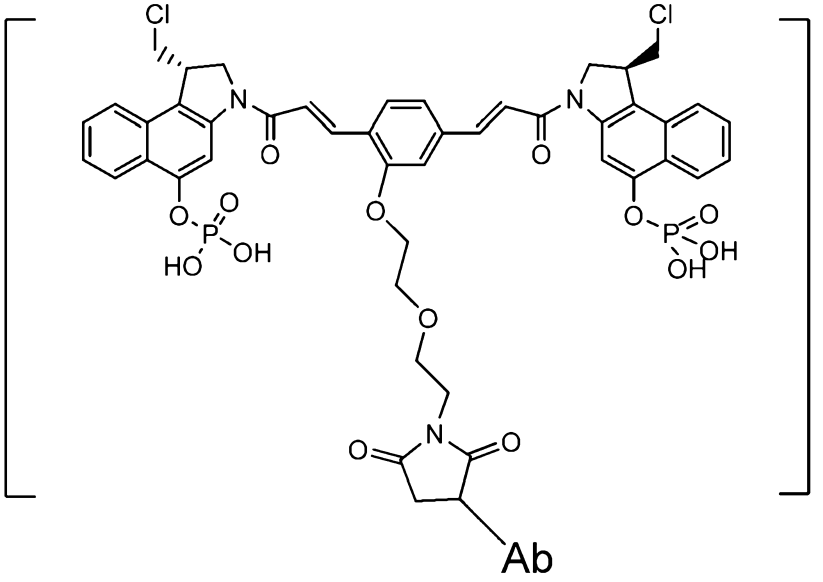
53. 如請求項1至22中任一項之抗體-藥物結合物化合物，其中p係1或2。

54. 如請求項1之抗體-藥物結合物化合物，其係



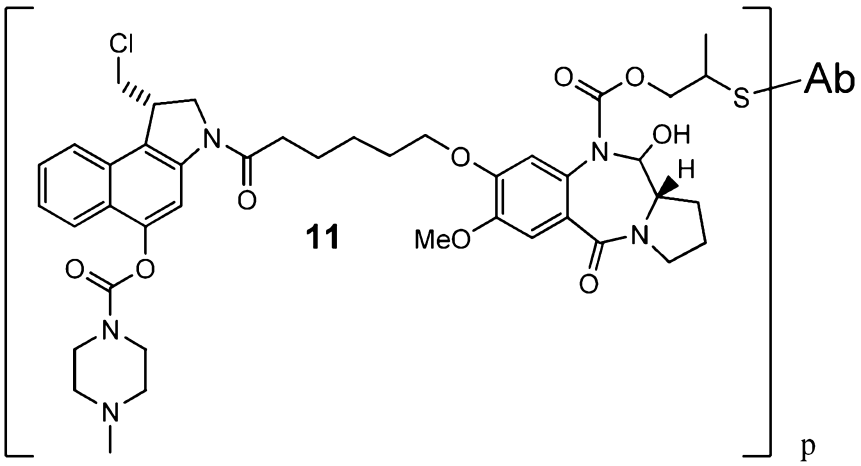
其中p係1至4。

55. 如請求項1之抗體-藥物結合物化合物，其係



其中p係1至4。

56. 如請求項1之抗體-藥物結合物化合物，其係



其中p係1至4。

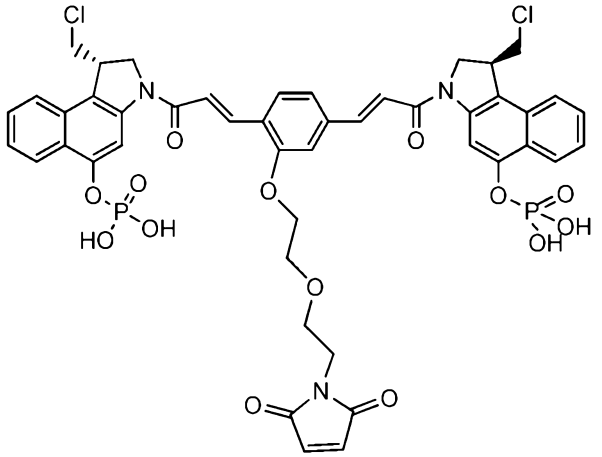
57. 如請求項54至56中任一項之抗體-藥物結合物化合物，其中Ab係抗HER2抗體。

58. 如請求項54至56中任一項之抗體-藥物結合物化合物，其中Ab係抗CLL-1抗體。

59. 如請求項54至56中任一項之抗體-藥物結合物化合物，其中Ab係抗CD22抗體。

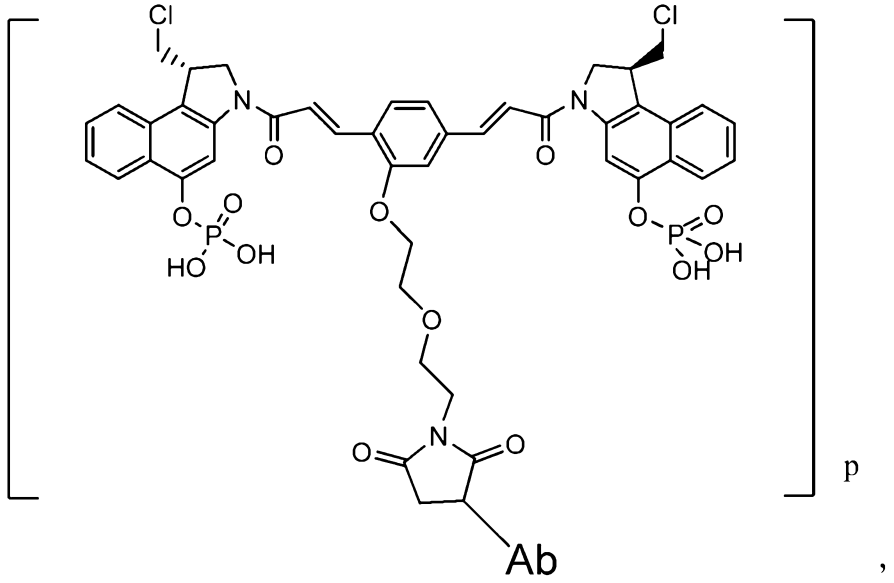
60. 如請求項54至56中任一項之抗體-藥物結合物化合物，其中Ab係抗CD79b抗體。

61. 一種具下式之連接體-藥物中間體：



。

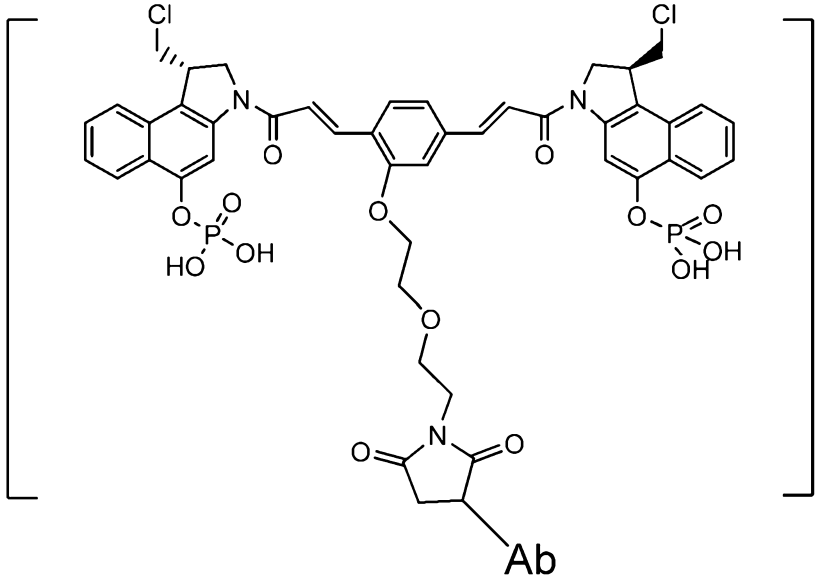
62. 一種具下式之抗體-藥物結合物化合物：



，

其中p係1至4，且Ab係抗CD22抗體。

63. 一種具下式之抗體-藥物結合物化合物：



，

其中p係1至4，且Ab係抗CD22抗體，其包含三個輕鏈超變區(HVR-L1、HVR-L2及HVR-L3)及三個重鏈超變區(HVR-H1、HVR-H2及HVR-H3)，其中：

HVR-L1包含胺基酸序列SEQ ID NO:1；

HVR-L2包含胺基酸序列SEQ ID NO:2；

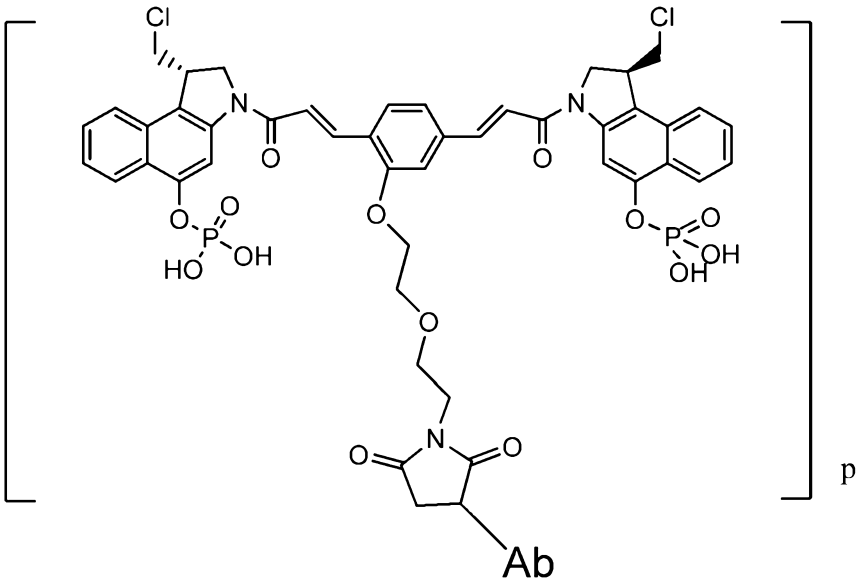
HVR-L3包含胺基酸序列SEQ ID NO:3；

HVR-H1包含胺基酸序列SEQ ID NO:4；

HVR-H2包含胺基酸序列SEQ ID NO:5；且

HVR-H3包含胺基酸序列SEQ ID NO:6。

64. 一種具下式之抗體-藥物結合物化合物：



，

其中p係1至4，且Ab係抗CD22抗體，其包含三個輕鏈超變區(HVR-L1、HVR-L2及HVR-L3)及三個重鏈超變區(HVR-H1、HVR-H2及HVR-H3)，其中：

HVR-L1包含胺基酸序列SEQ ID NO:1；

HVR-L2包含胺基酸序列SEQ ID NO:2；

HVR-L3包含胺基酸序列SEQ ID NO:3；

HVR-H1包含胺基酸序列SEQ ID NO:4；

HVR-H2包含胺基酸序列SEQ ID NO:5；且

HVR-H3包含胺基酸序列SEQ ID NO:6；及

該抗CD22抗體半胱胺酸改造之抗體。

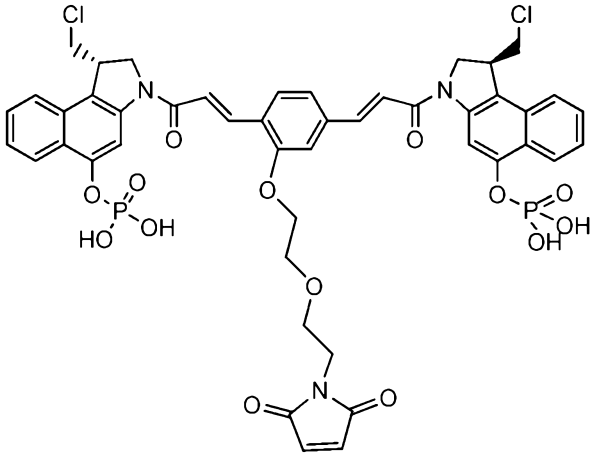
65. 一種醫藥組合物，其包含如請求項62至64中任一項之抗體-藥物結合物化合物及醫藥上可接受之賦形劑。

66. 一種如請求項62至64中任一項之抗體-藥物結合物化合物用於製備治療血液病症的藥物之用途。

67. 一種如請求項62至64中任一項之抗體-藥物結合物化合物用於製備治療白血病的藥物之用途。

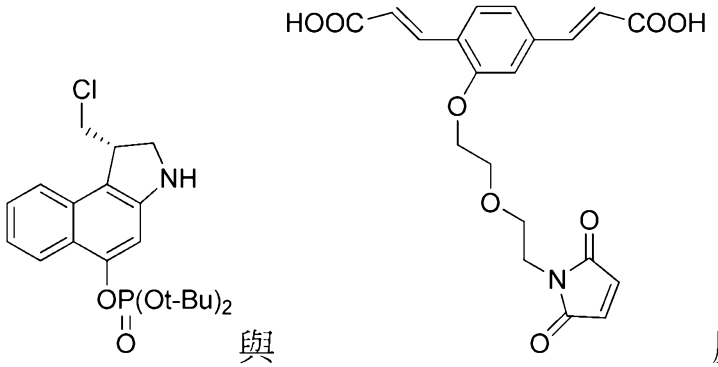
68. 一種如請求項62至64中任一項之抗體-藥物結合物化合物用於製備治療淋巴瘤的藥物之用途。

69. 一種製造具下式之連接體-藥物中間體之方法，

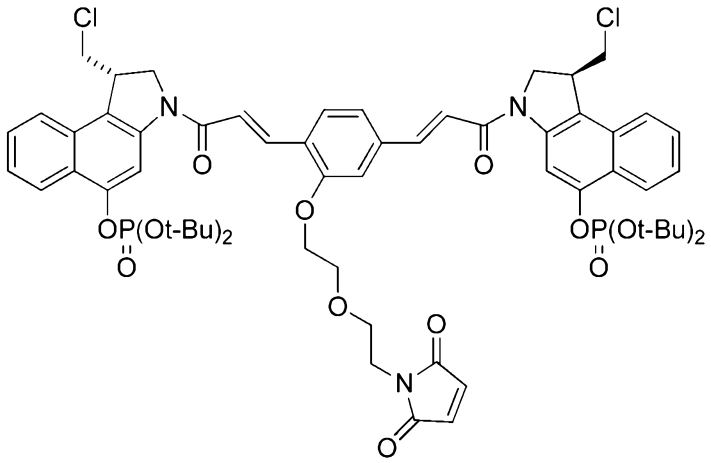


，

該方法包含將



與

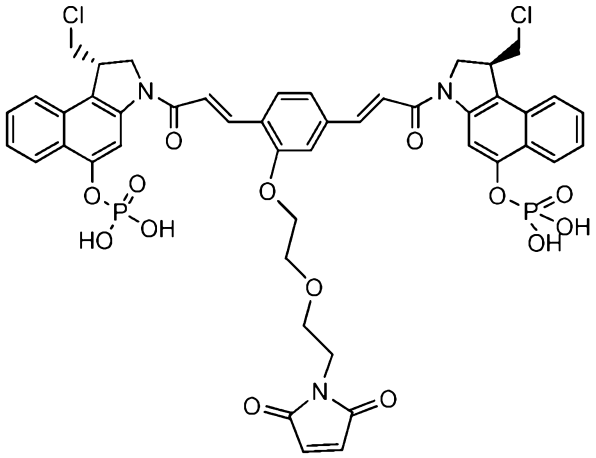


反應，

以形成

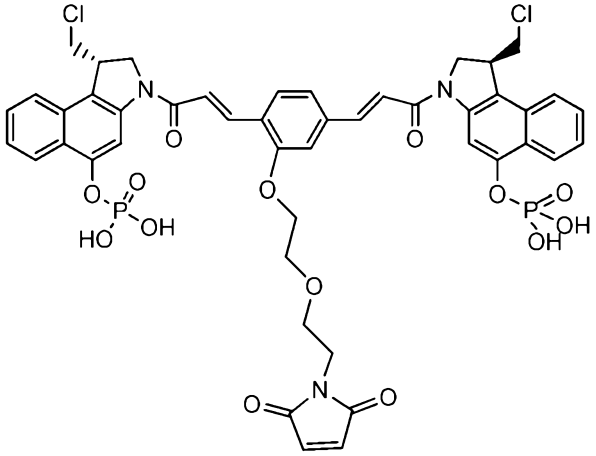
，

其而後係經水解以形成

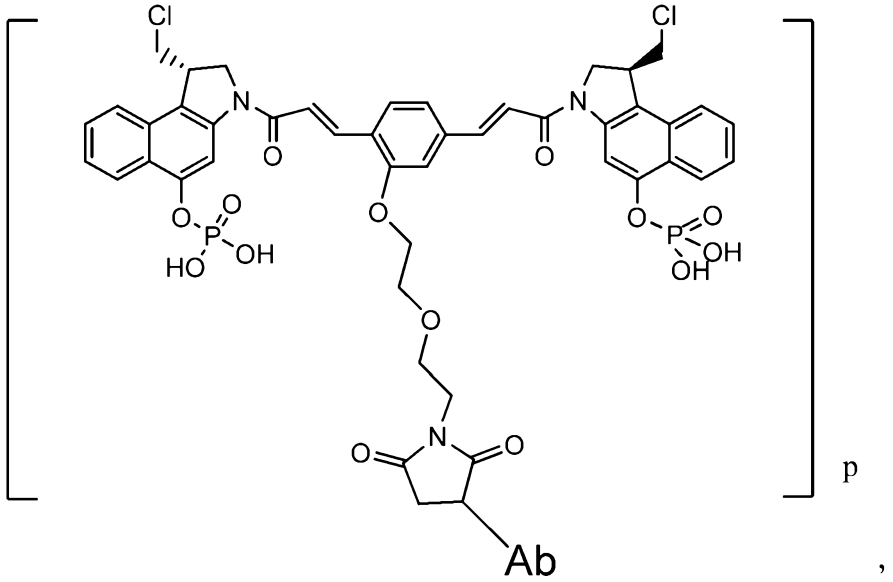


。

70. 如請求項69之方法，其中該



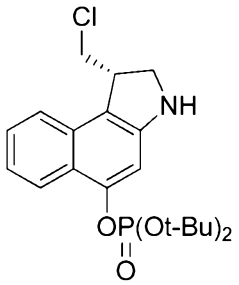
係進一步與抗CD22抗體(Ab)反應，以形成



，

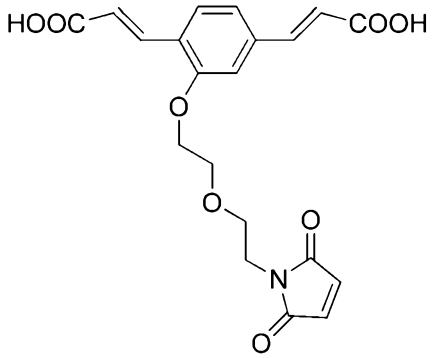
其中p係1至4。

71. 一種化合物，其具下式：



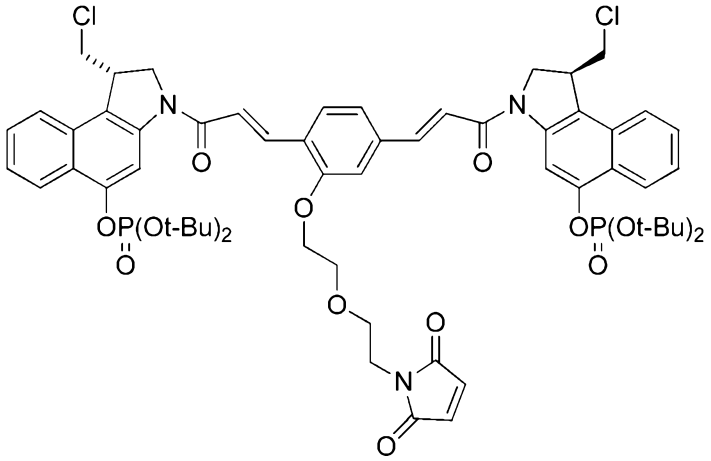
。

72. 一種化合物，其具下式：



。

73. 一種化合物，其具下式：



。

第103120758號專利申請案
中文圖式替換本(105年4月14日)

圖式

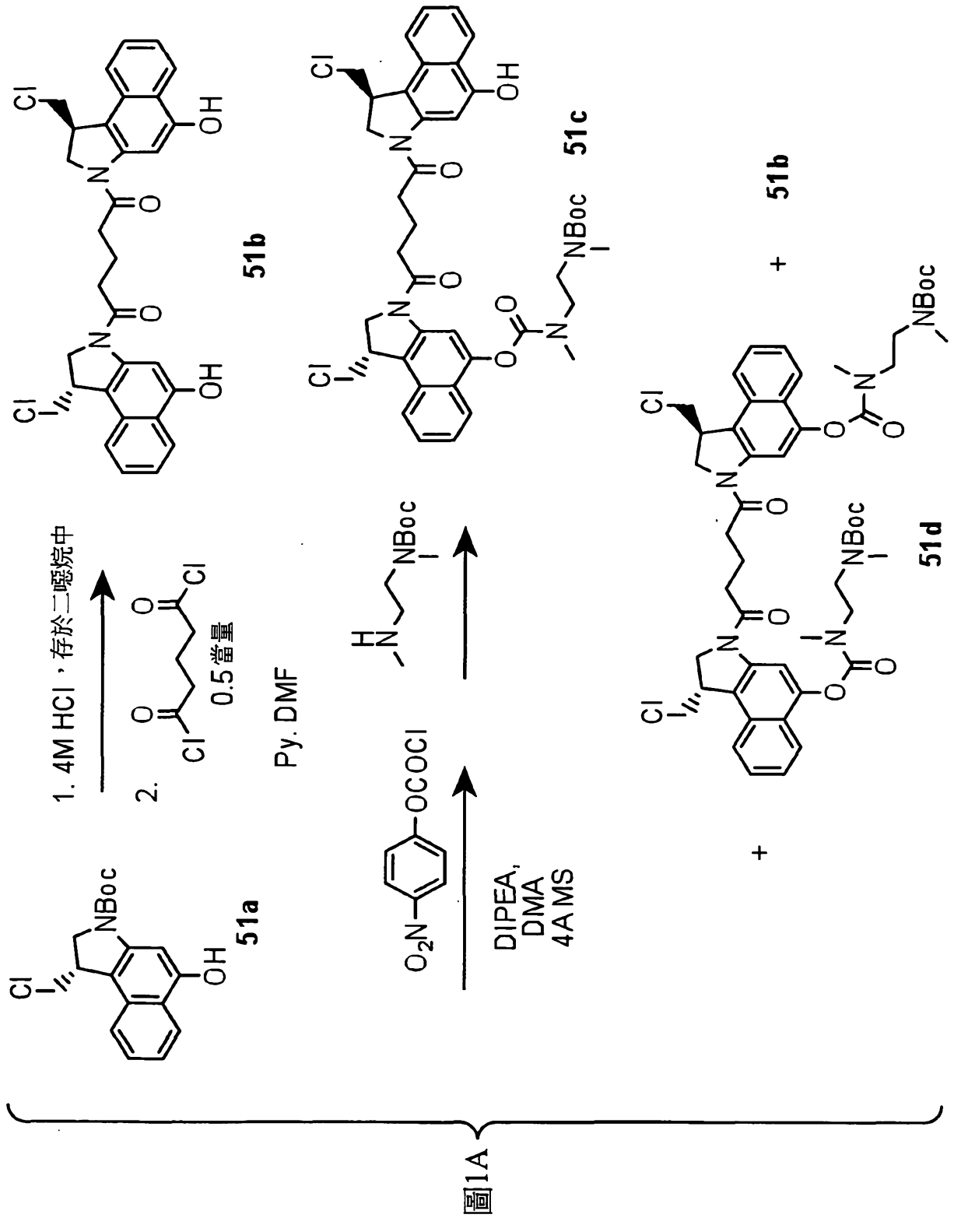


圖1A

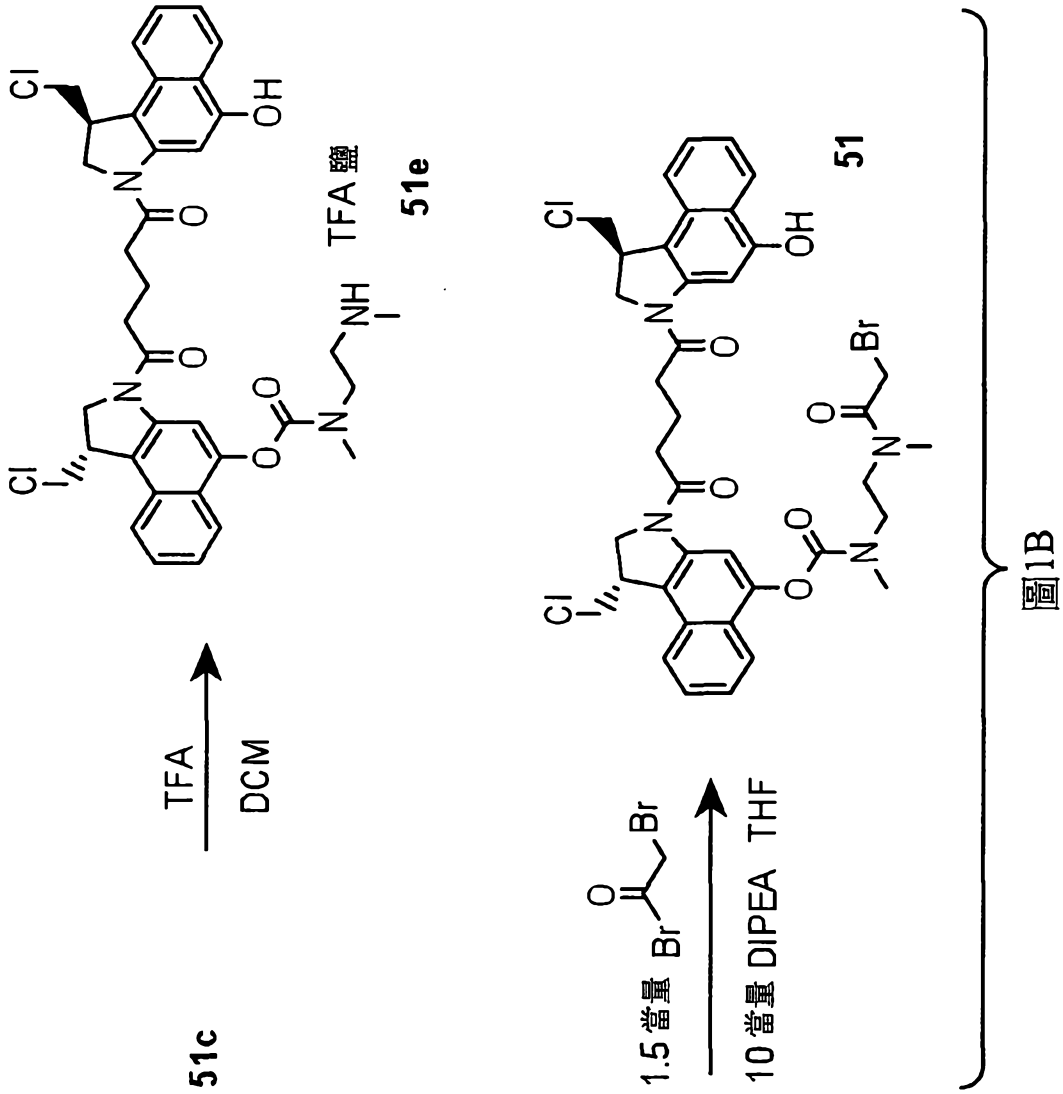


圖1B

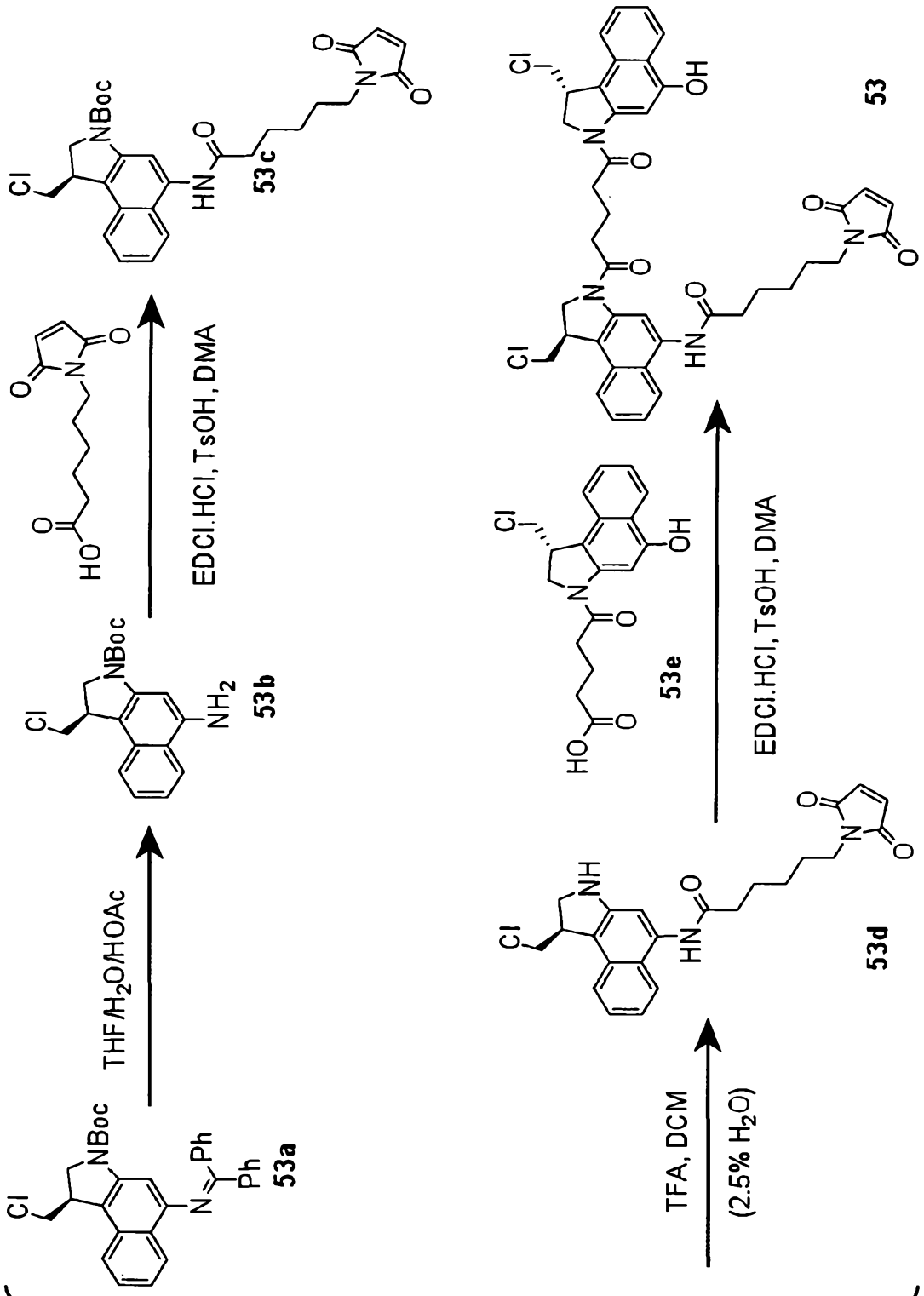

THF/H2O/HOAc
EDCI.HCl, TsOH, DMA
TFA, DCM
(2.5% H2O)
EDCI.HCl, TsOH, DMA
53a
53b
53c
53d
53e
53

圖2

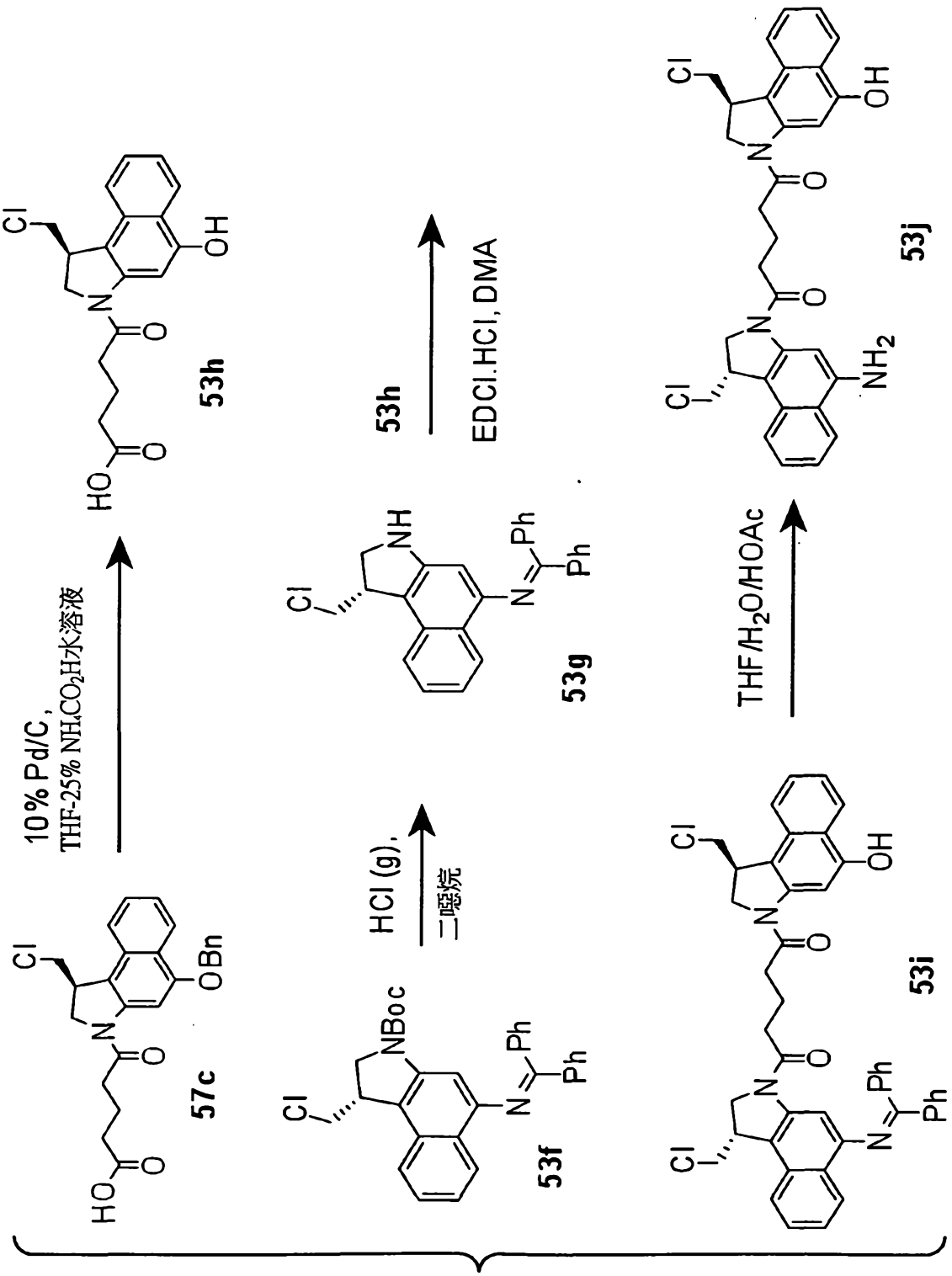

10% Pd/C,
THF-25% NH4CO2H水溶液
HCl (g),
二噁烷
EDCI.HCl, DMA
THF/H2O/HOAc
57c
53h
53f
53g
53i
53j

圖3

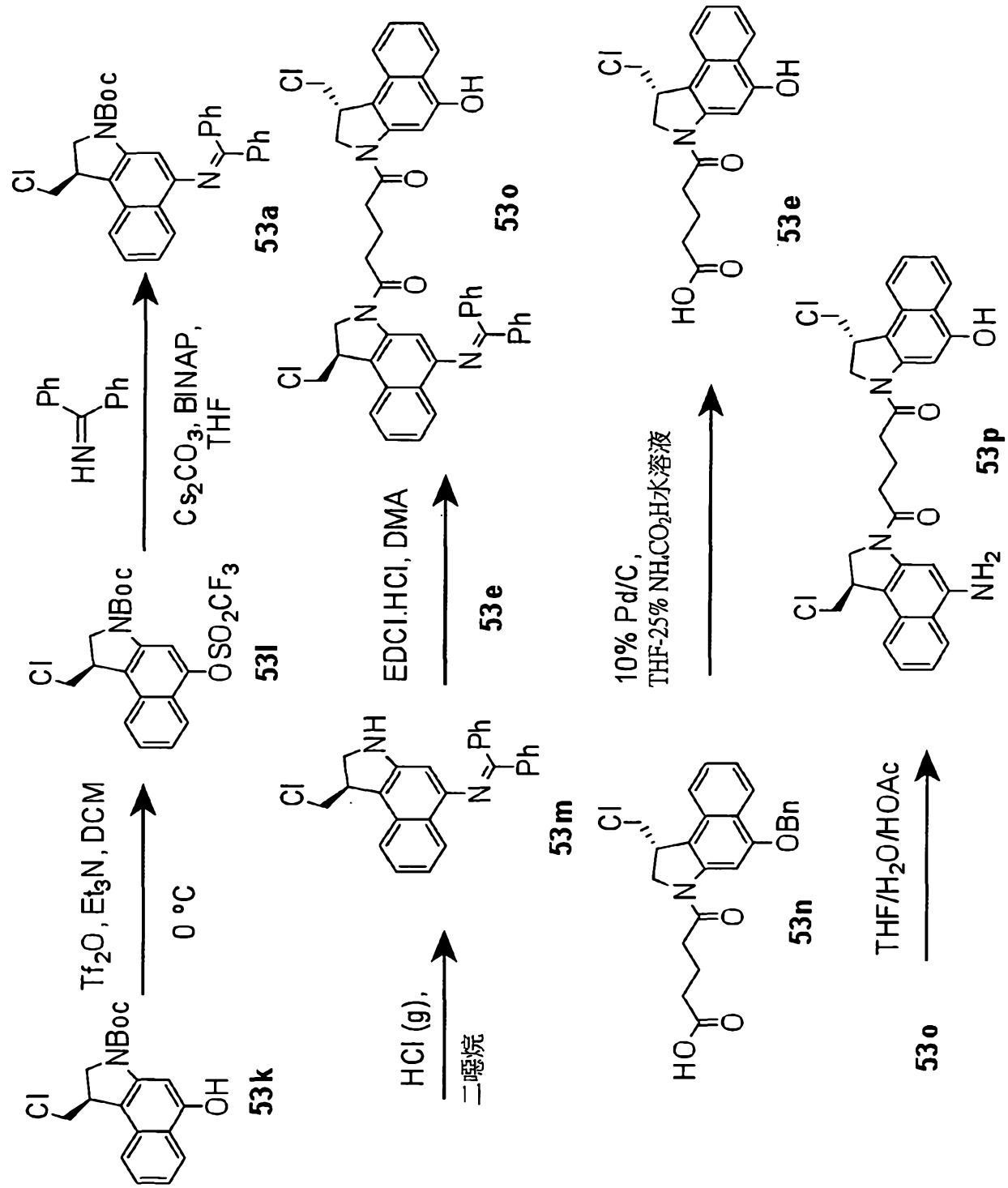

Tf2O, Et3N, DCM
0 °C
53k
Cs2CO3, BINAP, THF
53a
53l
HCl (g), 二噁烷
53m
EDCI.HCl, DMA
53e
53o
10% Pd/C, THF-25% NH4CO2H水溶液
53n
53e
THF/H2O/HOAc
53o
53p

圖4

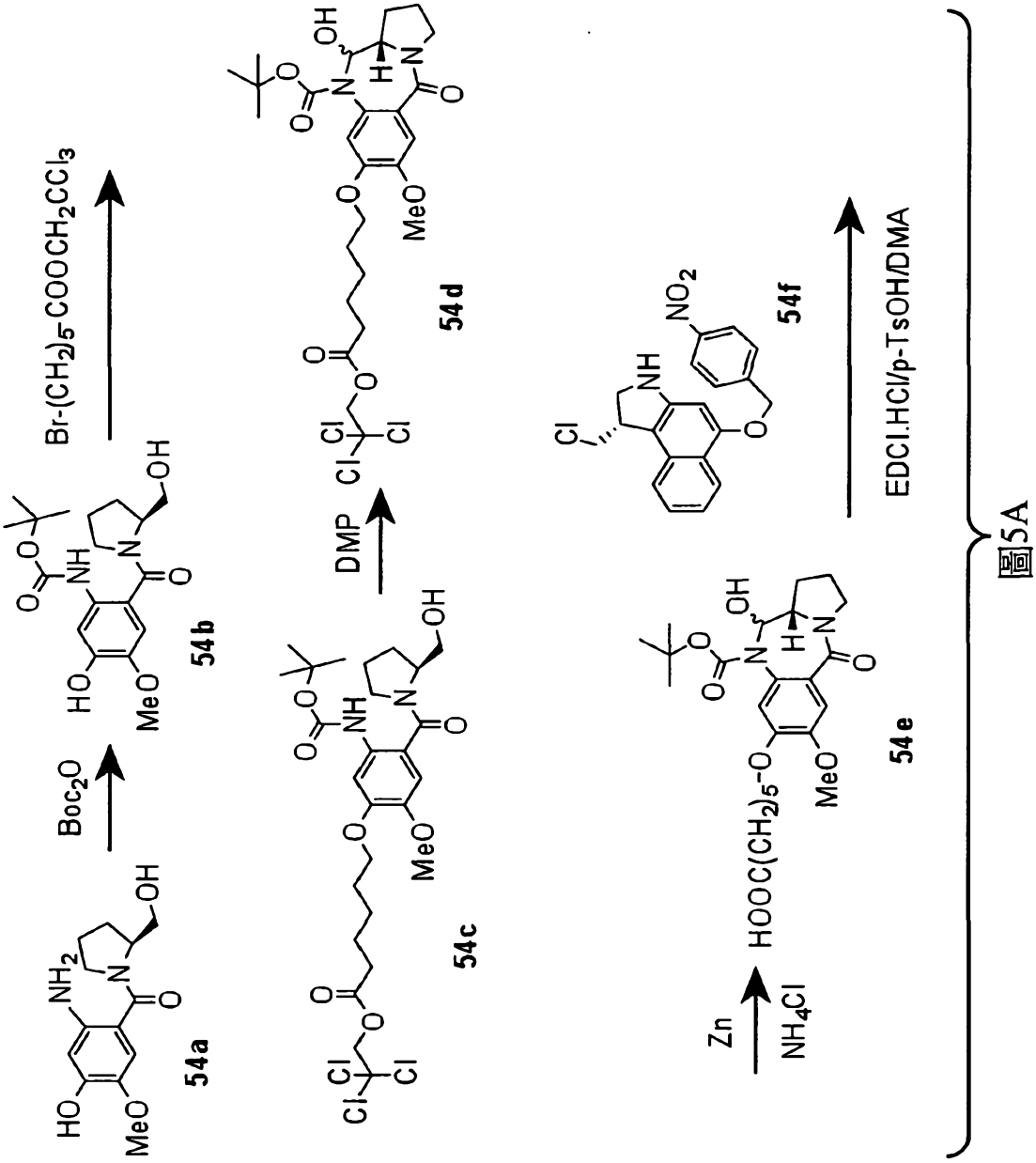

Br-(CH2)5-COOCH2CCl3
Boc2O
DMP
Zn
NH4Cl
HOOC(CH2)5-O
EDCI.HCl/p-TsOH/DMA
54a
54b
54c
54d
54e
54f

圖5A

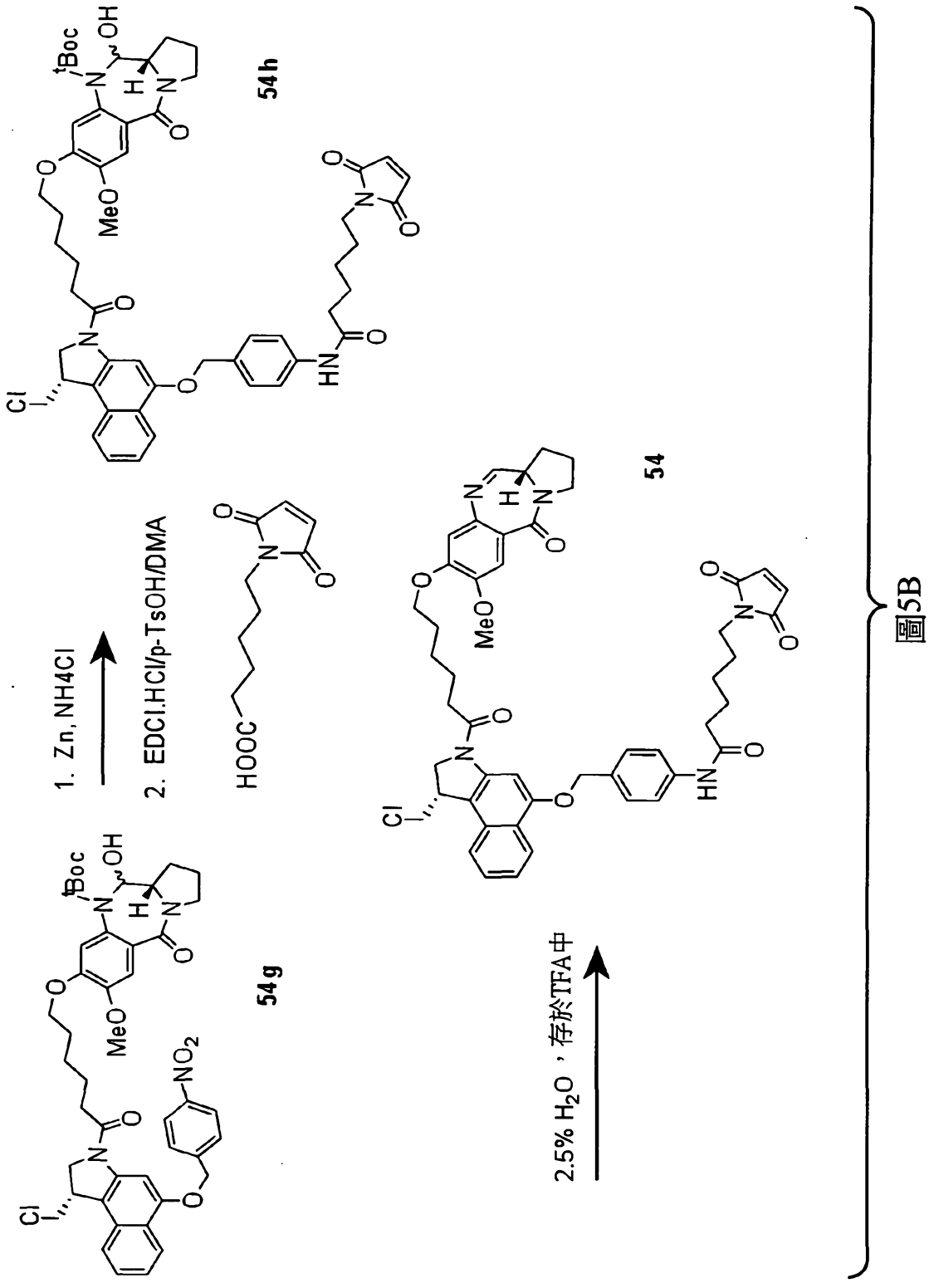


圖5B

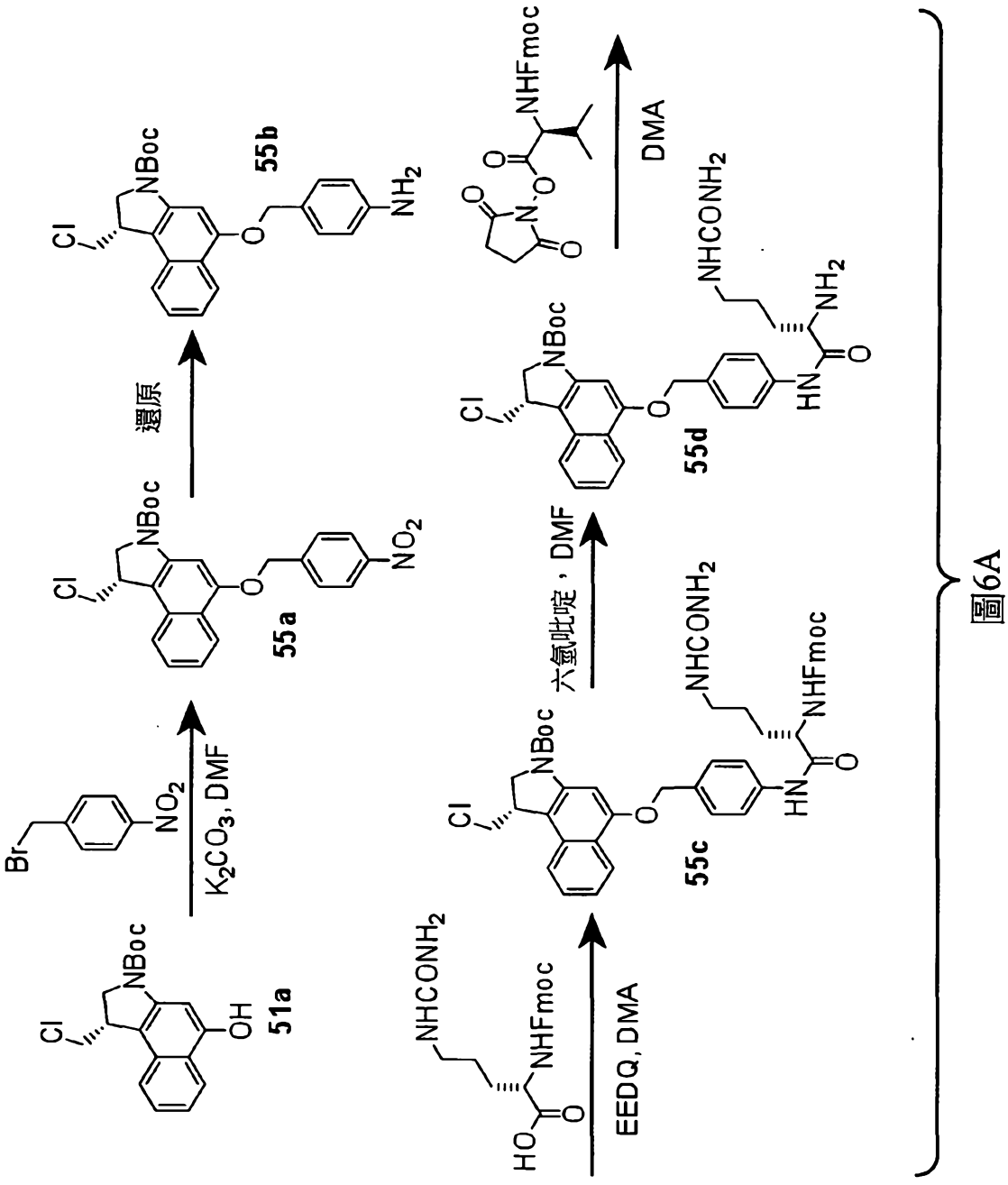


圖6A

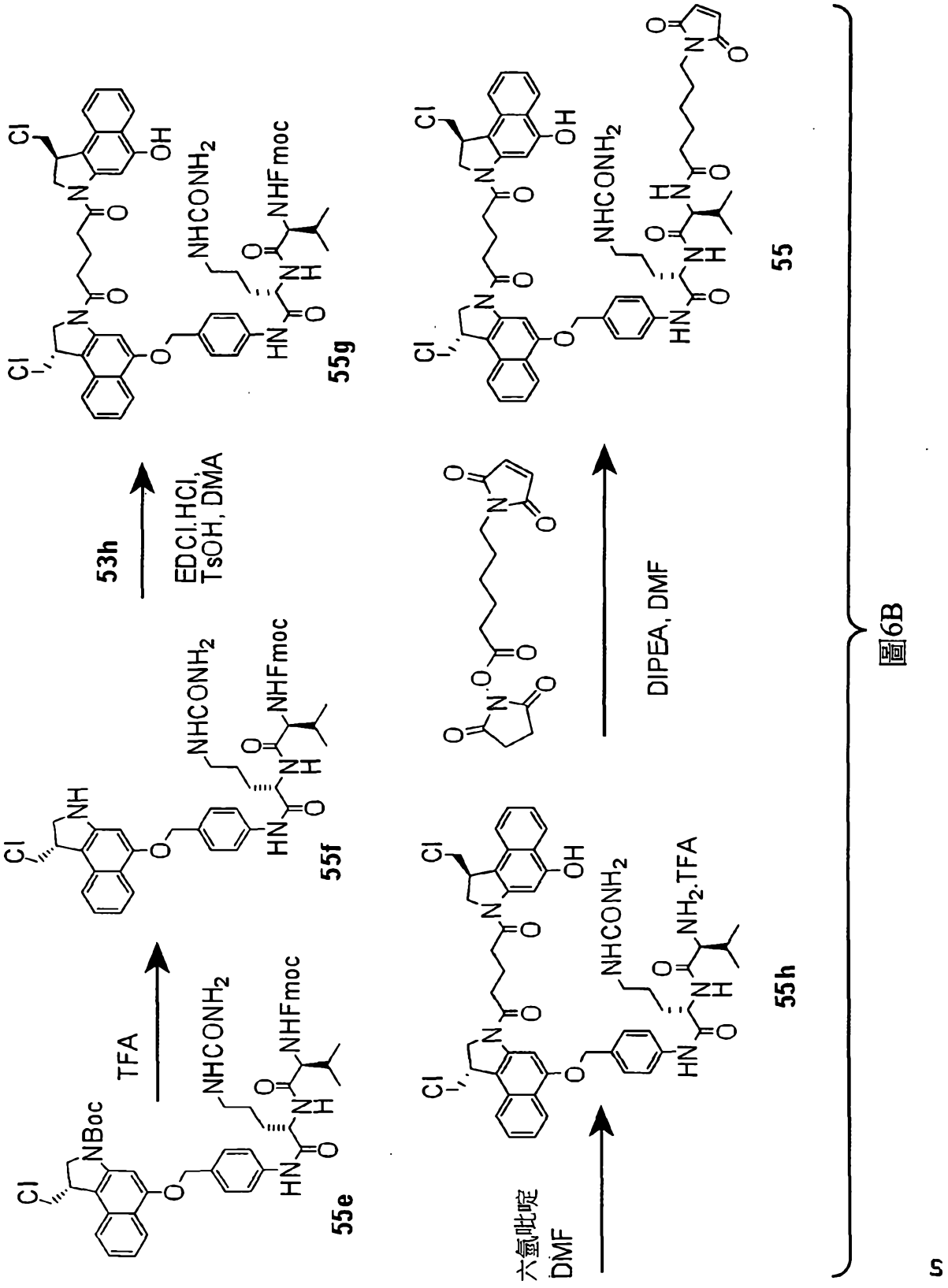


圖6B

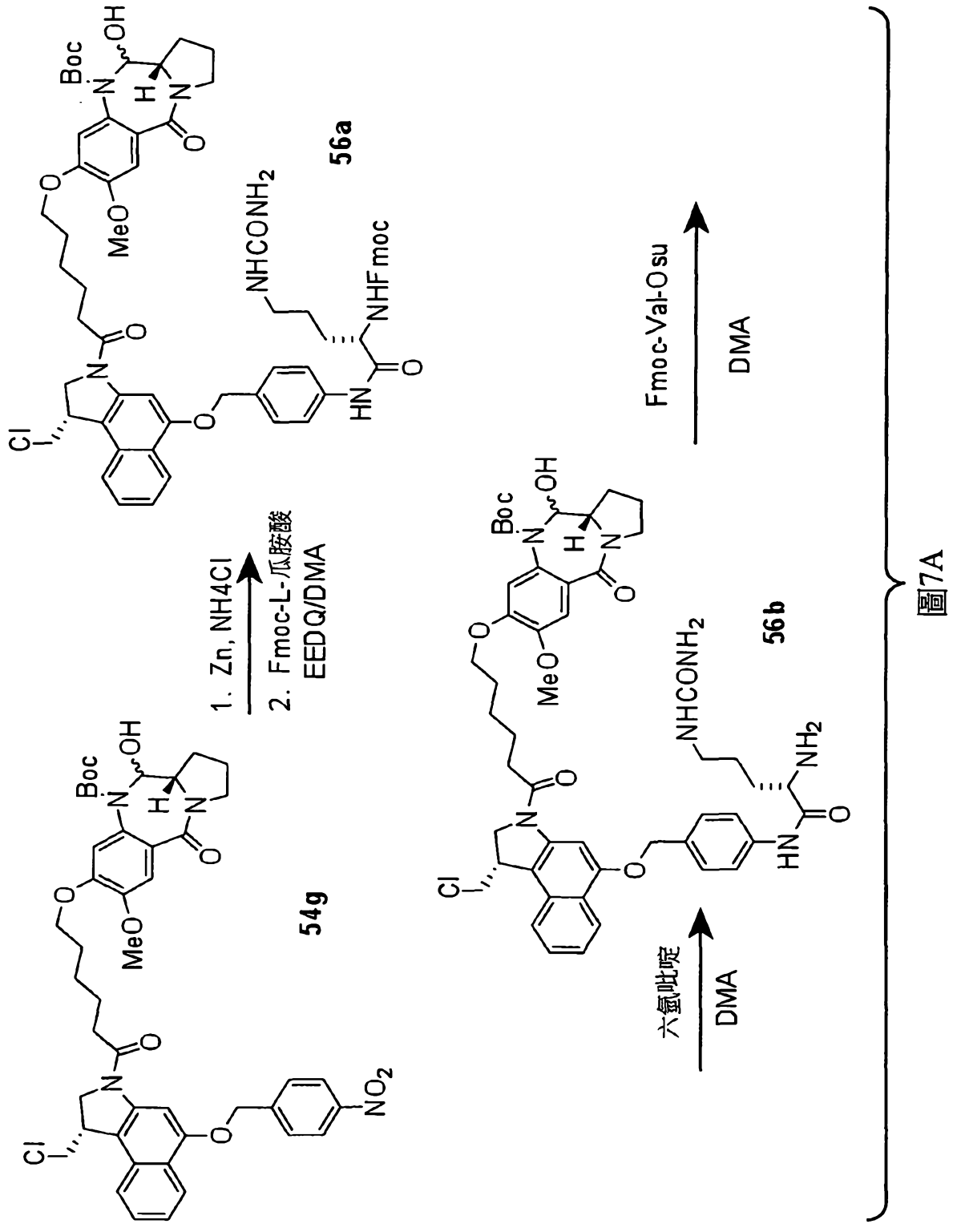

Boc
OH
N
H
N
O
MeO
O
NHCONH2
NHFmoc
HN
O
Cl
56a
1. Zn, NH4Cl
2. Fmoc-L-瓜胺酸
EEDQ/DMA
54g
NO2
Fmoc-Val-Osu
DMA
NH2
56b
六氫吡啶
DMA

圖7A

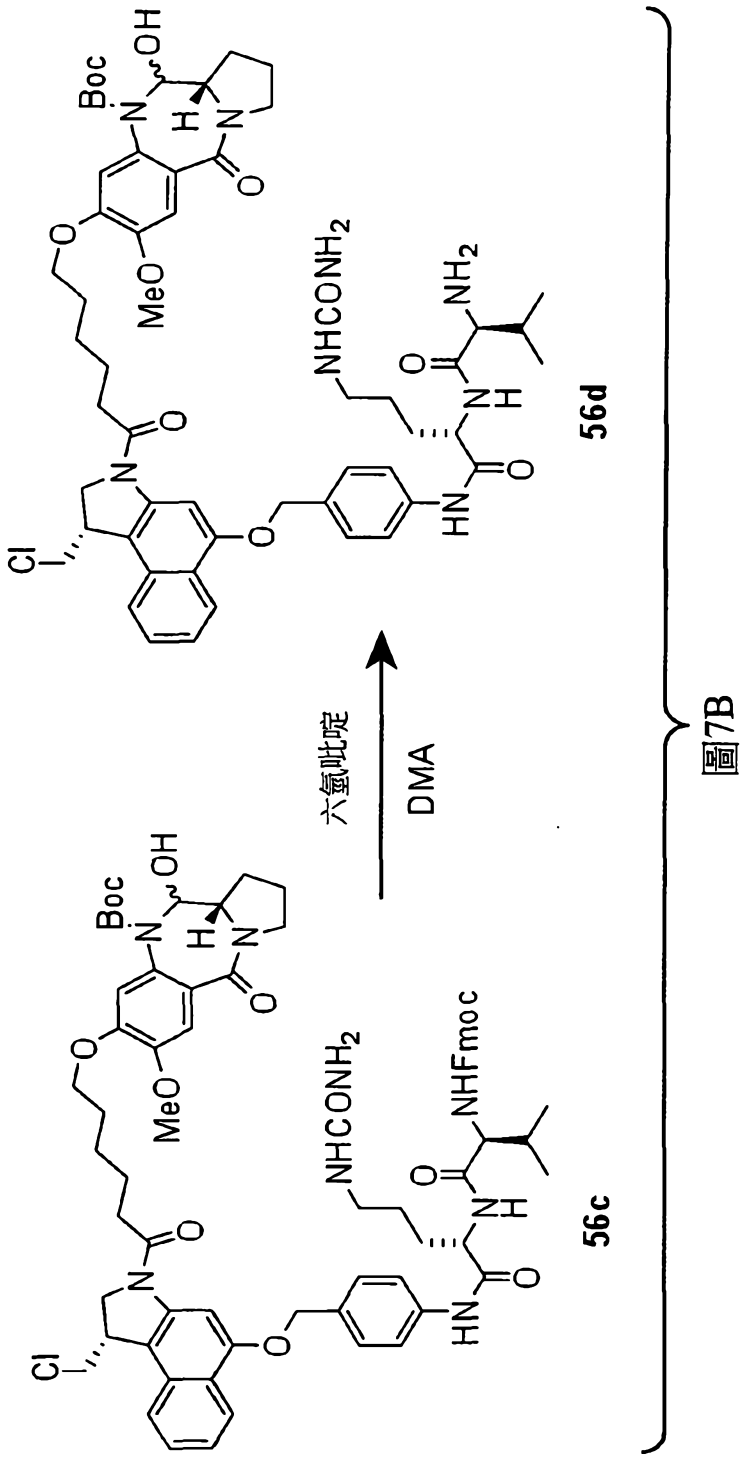


圖7B

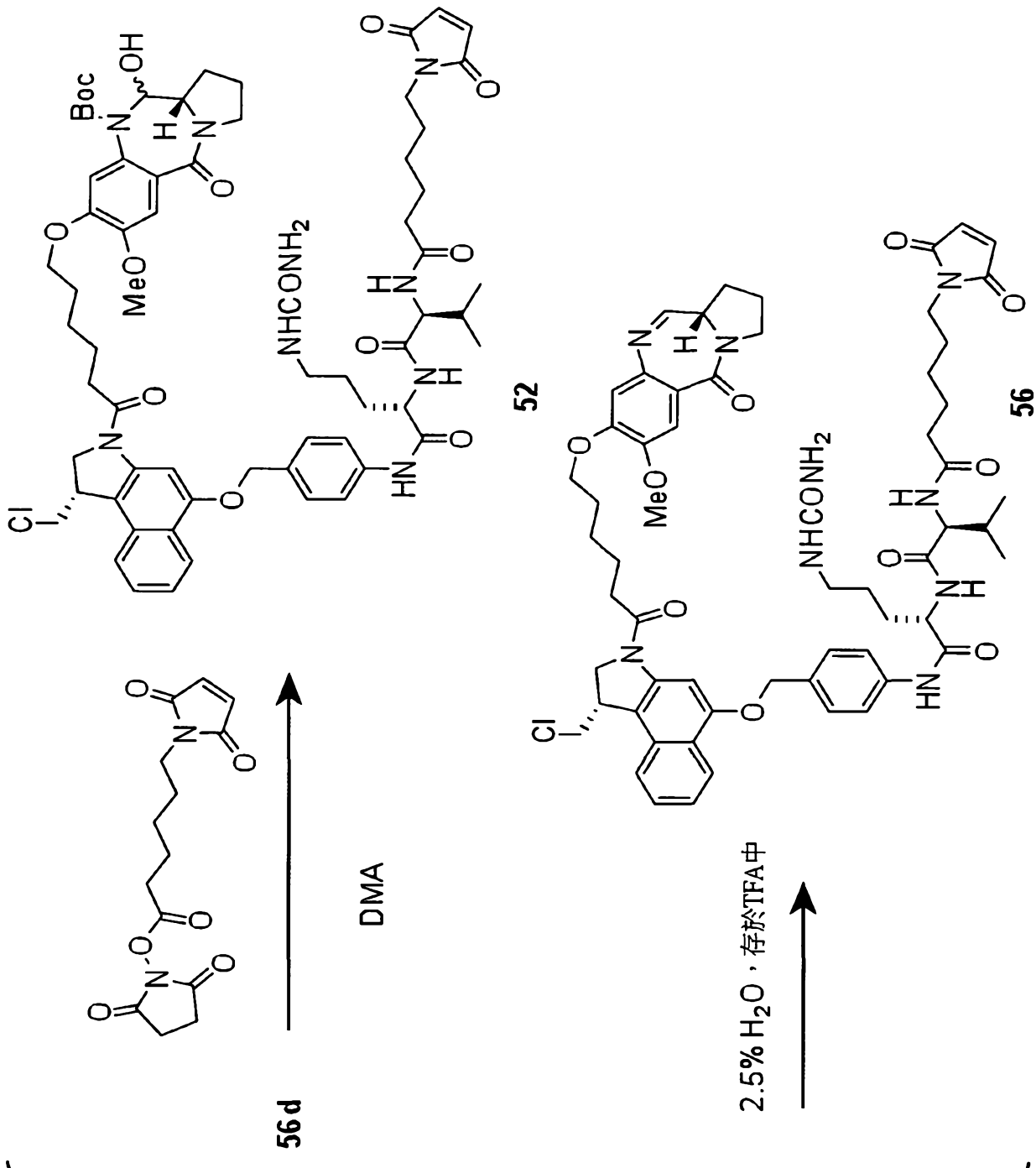


圖8

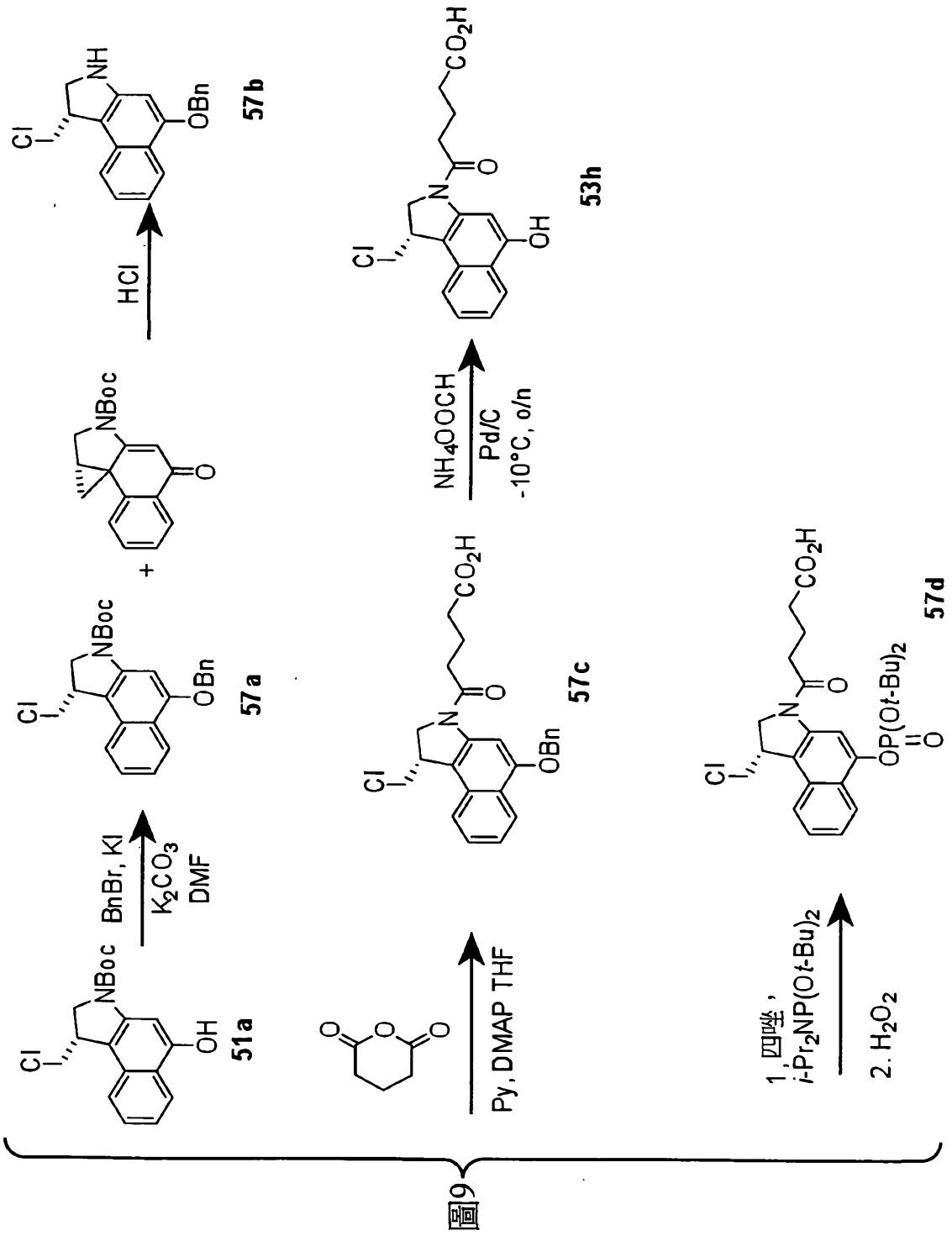

51a
BnBr, KI
K2CO3
DMF
57a
HCl
57b
Py, DMAP THF
57c
NH4OOCH
Pd/C
-10°C, o/n
53h
1. 四唑,
i-Pr2NP(Ot-Bu)2
2. H2O2
57d

圖9

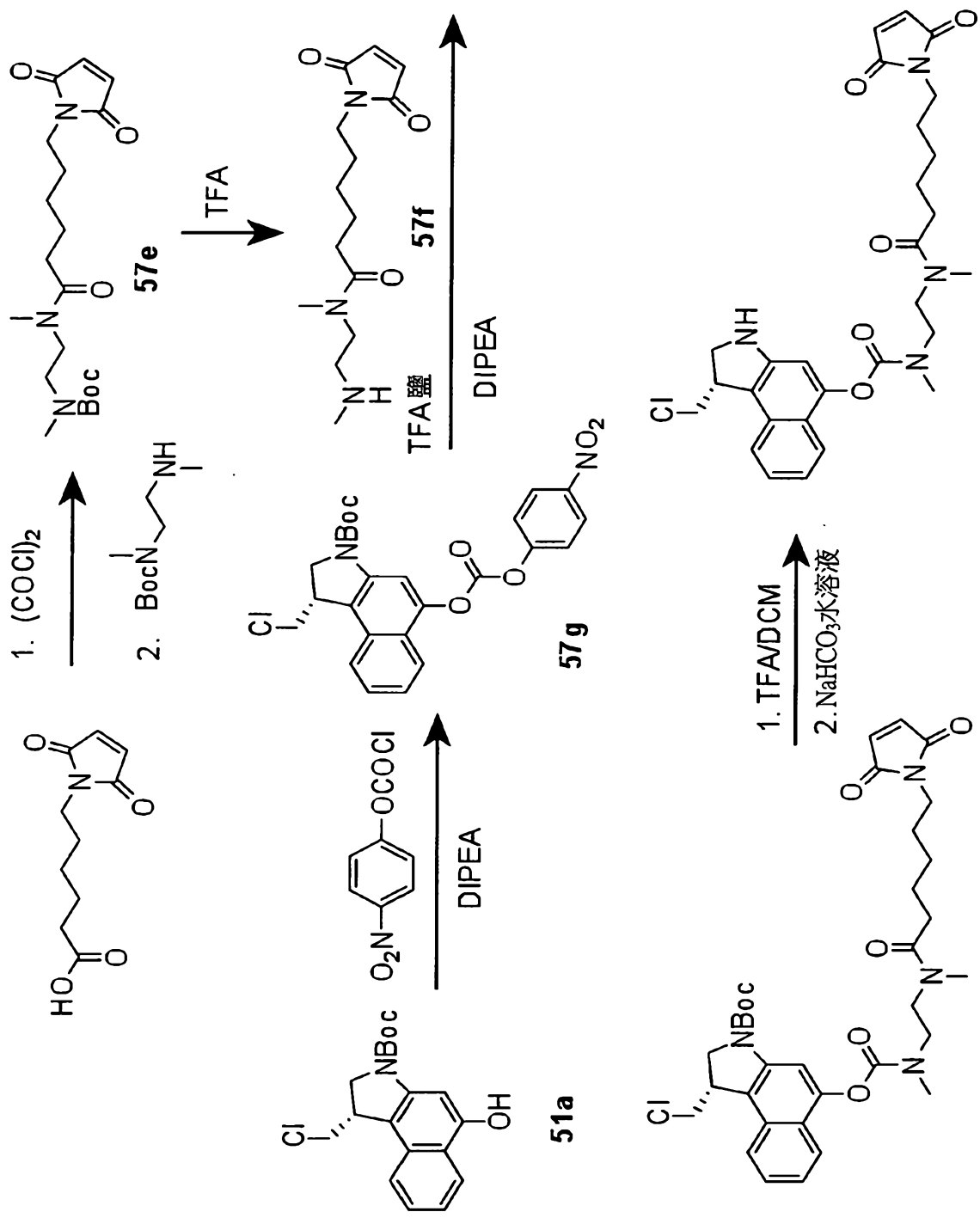

1. (COCl)2
2. BocN NH
TFA
57e
57f
TFA鹽
DIPEA
57 g
51a
DIPEA
1. TFA/DCM
2. NaHCO3水溶液
57h
57i

圖10

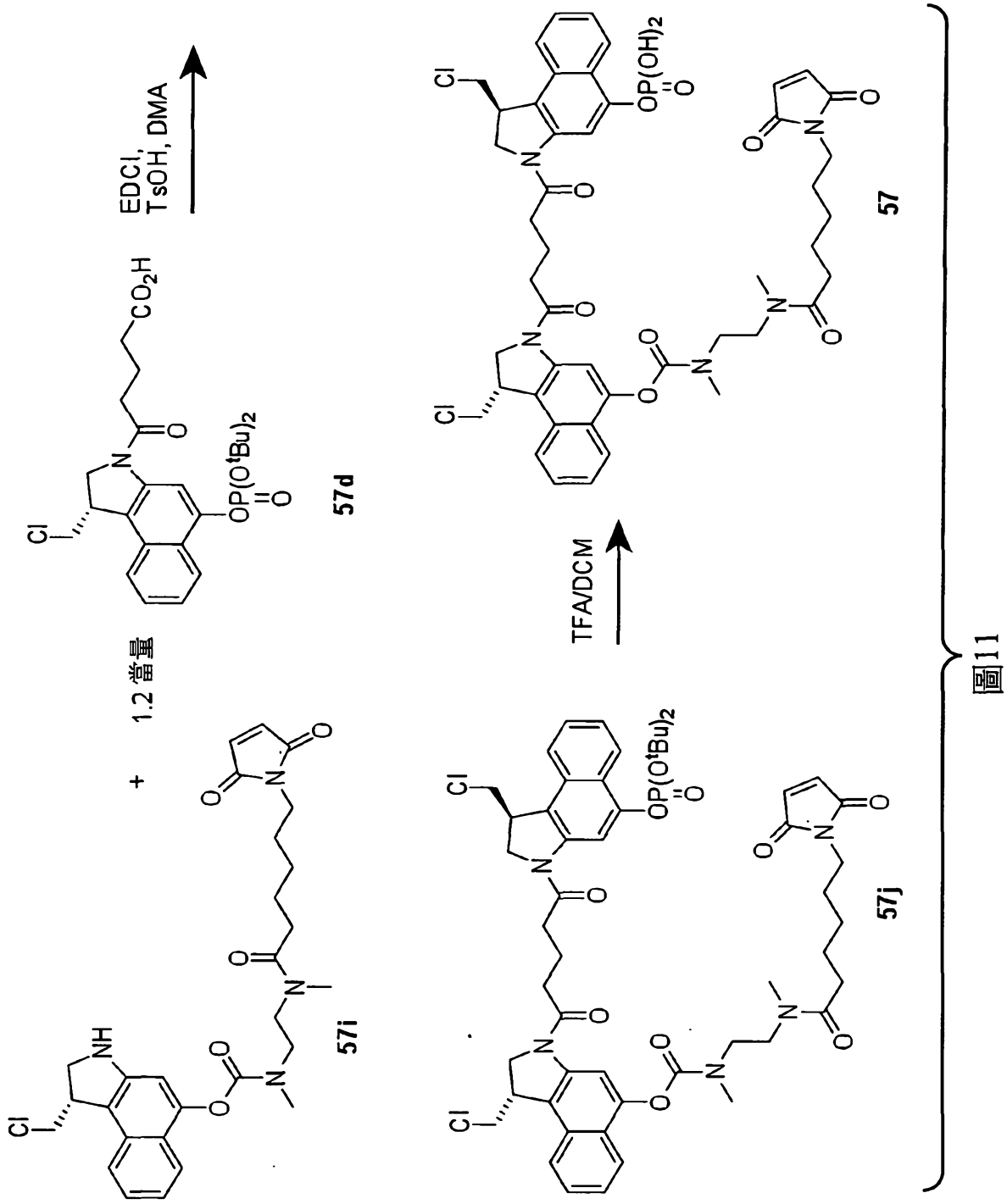


圖11

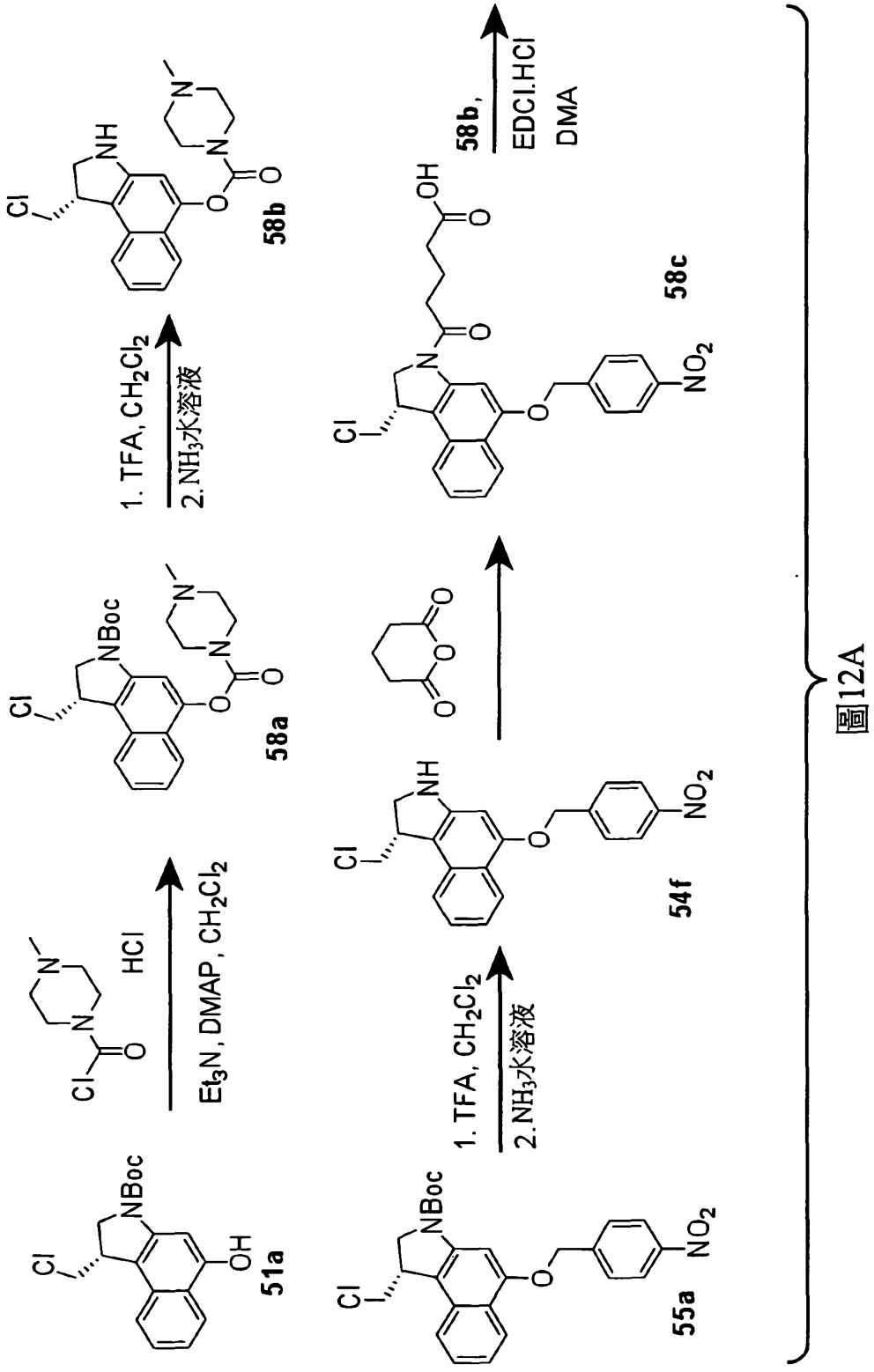

51a
Et3N, DMAP, CH2Cl2
58a
1. TFA, CH2Cl2
2. NH3水溶液
58b
55a
1. TFA, CH2Cl2
2. NH3水溶液
54f
58b,
EDCI.HCl
DMA
58c

圖12A

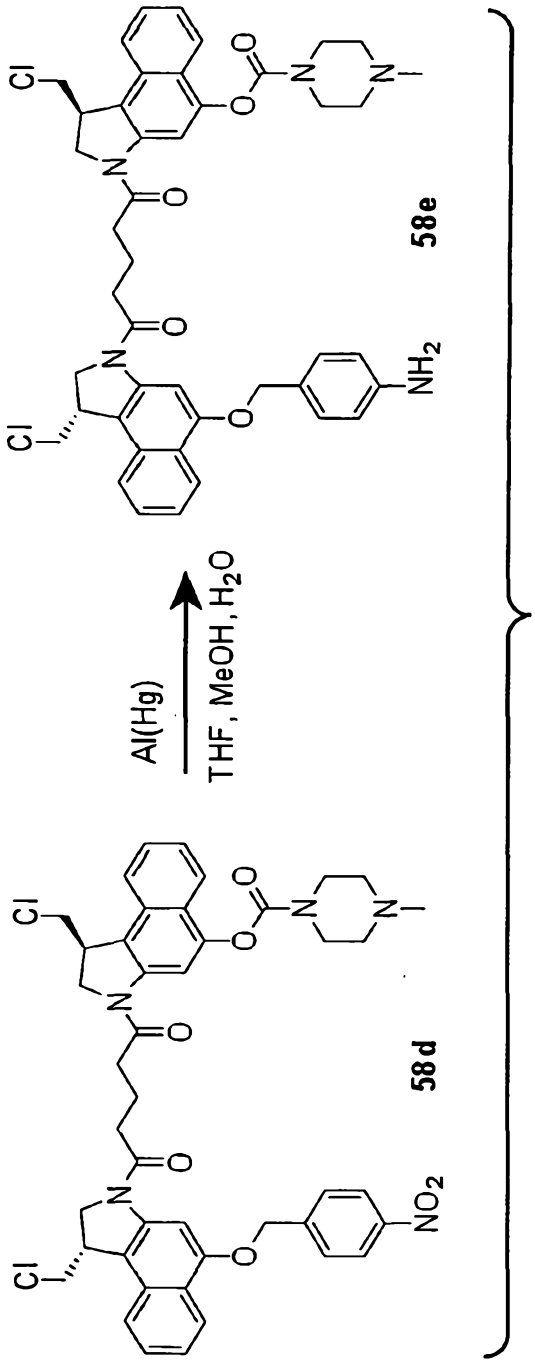


圖12B

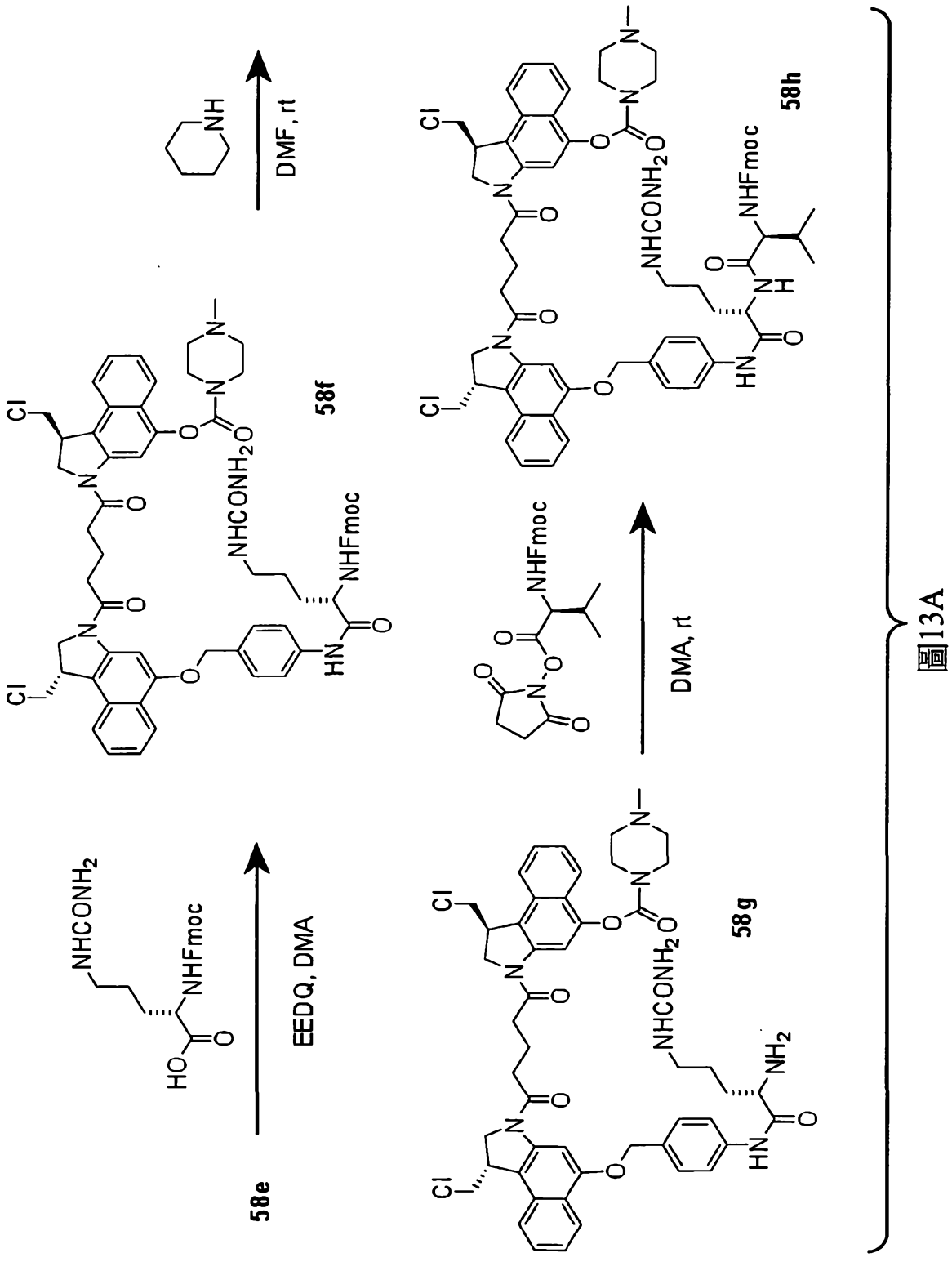


圖13A

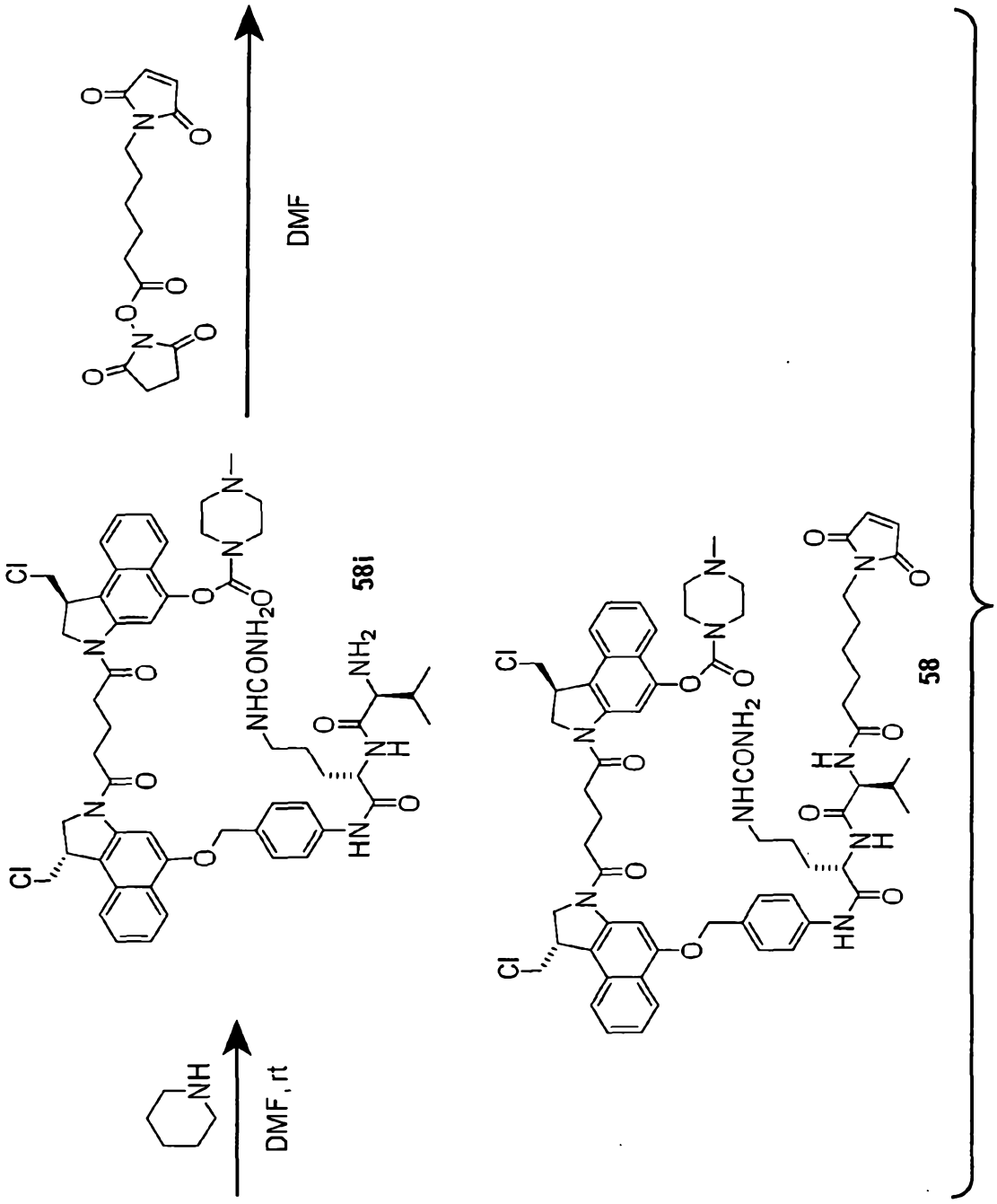


圖13B

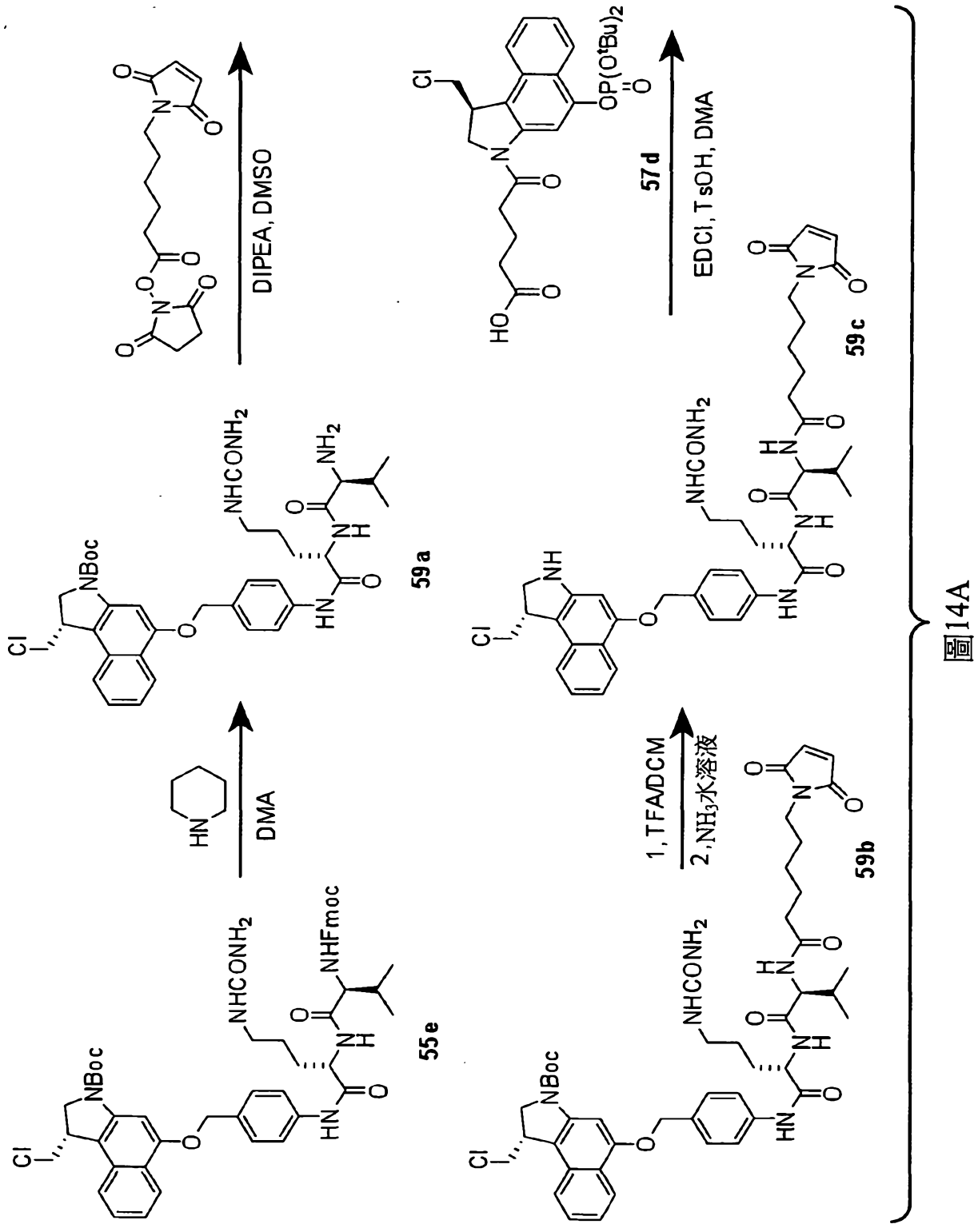

DIPEA, DMSO
DMA
57d
EDCI, TsOH, DMA
1, TFA/DCM
2, NH3水溶液
55e
59a
59b
59c

圖14A

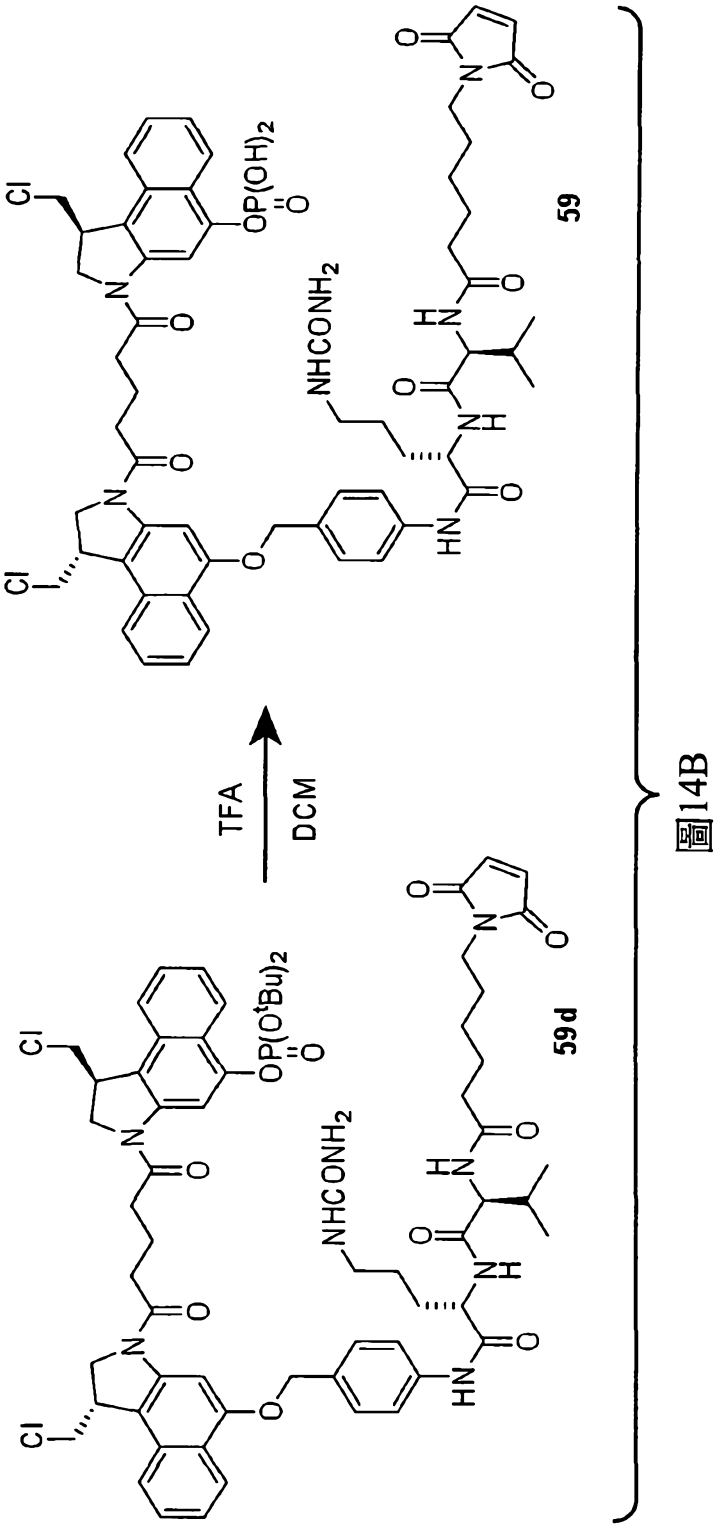


圖14B

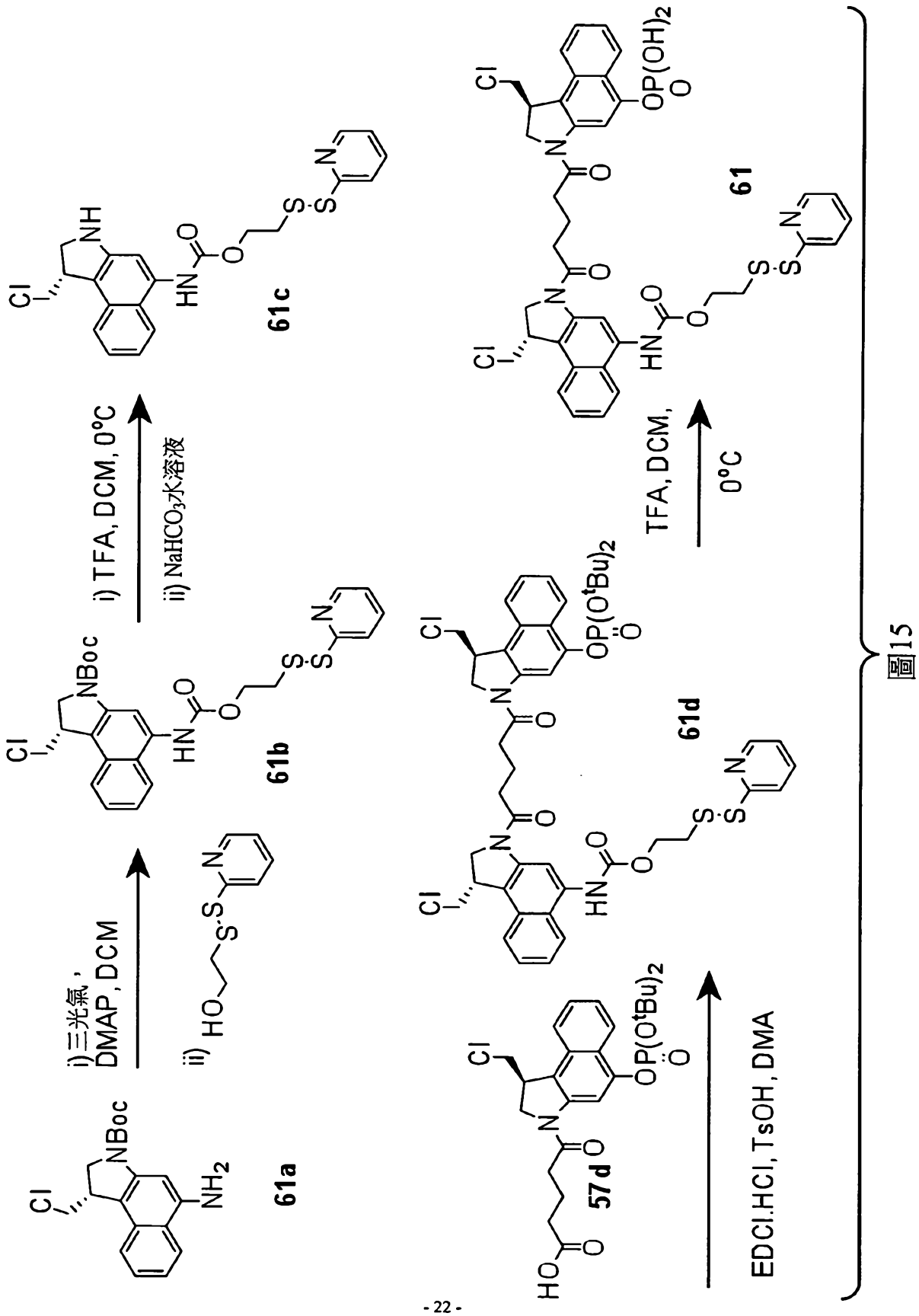

i)三光氣，
DMAP, DCM
ii)
i) TFA, DCM, 0°C
ii) NaHCO3水溶液
TFA, DCM,
0°C
EDCI.HCl, TsOH, DMA
61a
61b
61c
61d
61
57d

圖15

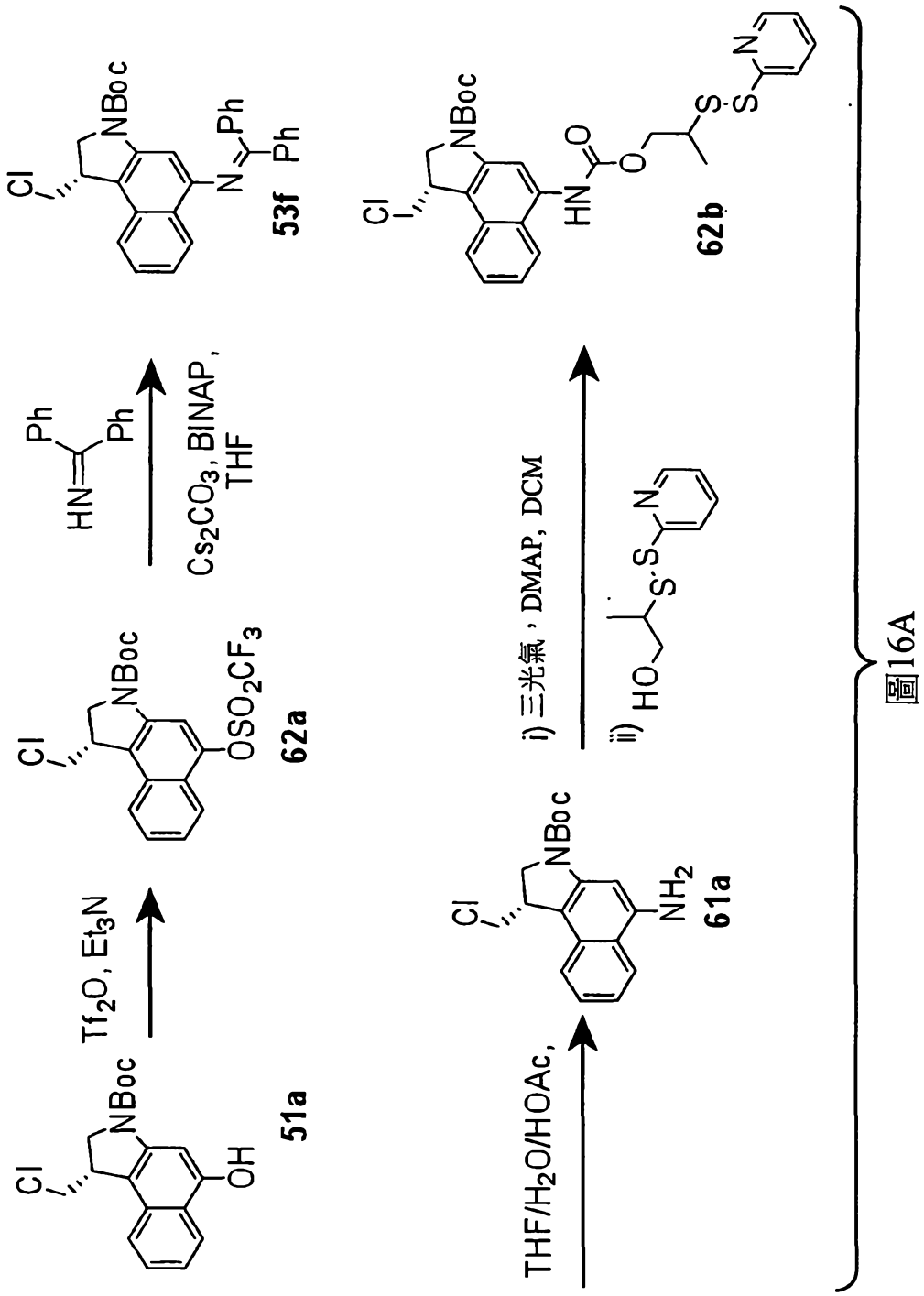

NBoc
Cl
OH
51a
Tf_2O, Et_3N
OSO_2CF_3
62a
Ph
HN
Ph
Cs_2CO_3, BINAP, THF
N
Ph
Ph
53f
NH_2
61a
THF/H_2O/HOAc,
i) 三光氣，DMAP, DCM
ii) HO
S
S
N
62b
O
HN
O

圖16A

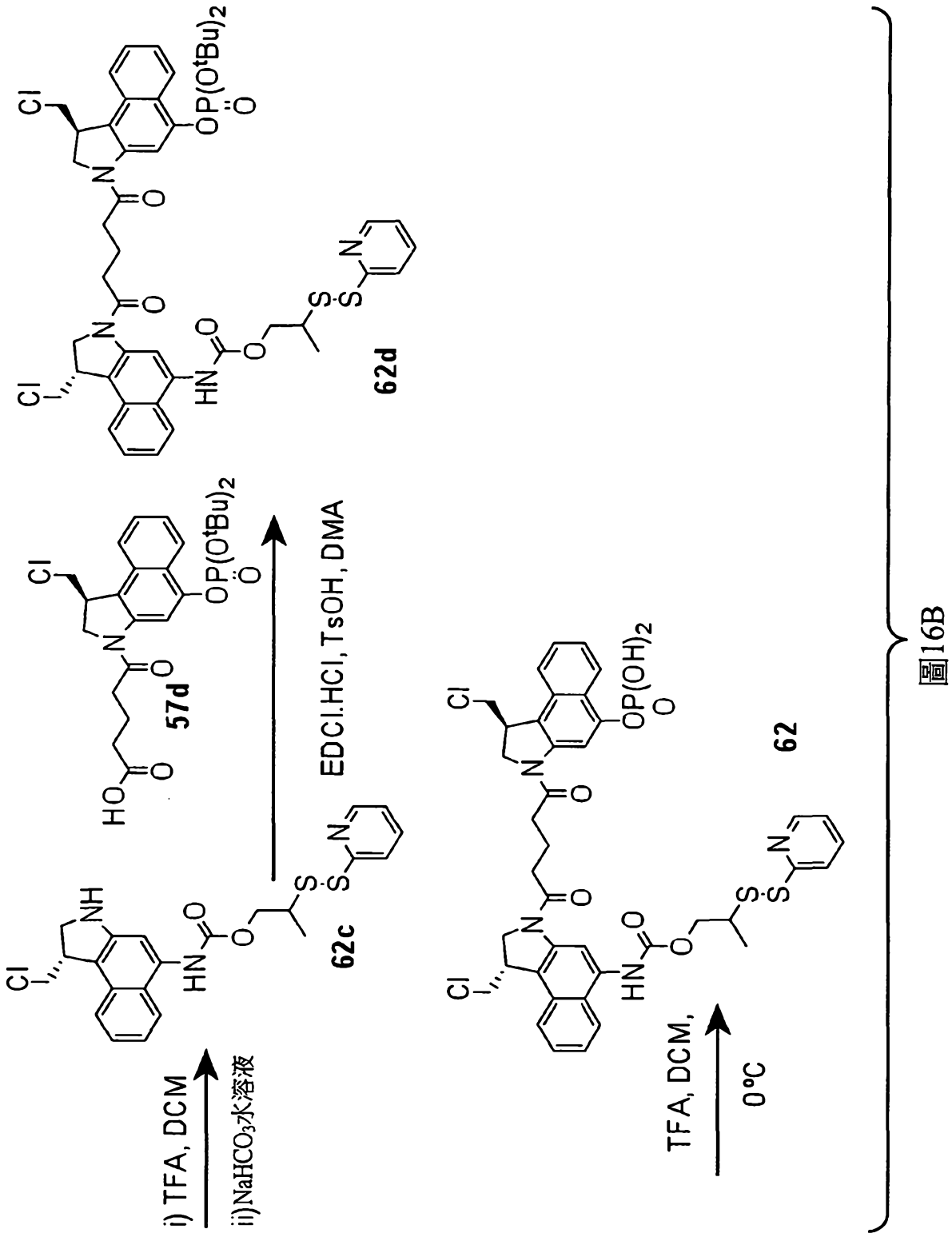

i) TFA, DCM
ii)NaHCO3水溶液
62c
57d
EDCI.HCl, TsOH, DMA
62d
TFA, DCM,
0°C
62

圖16B

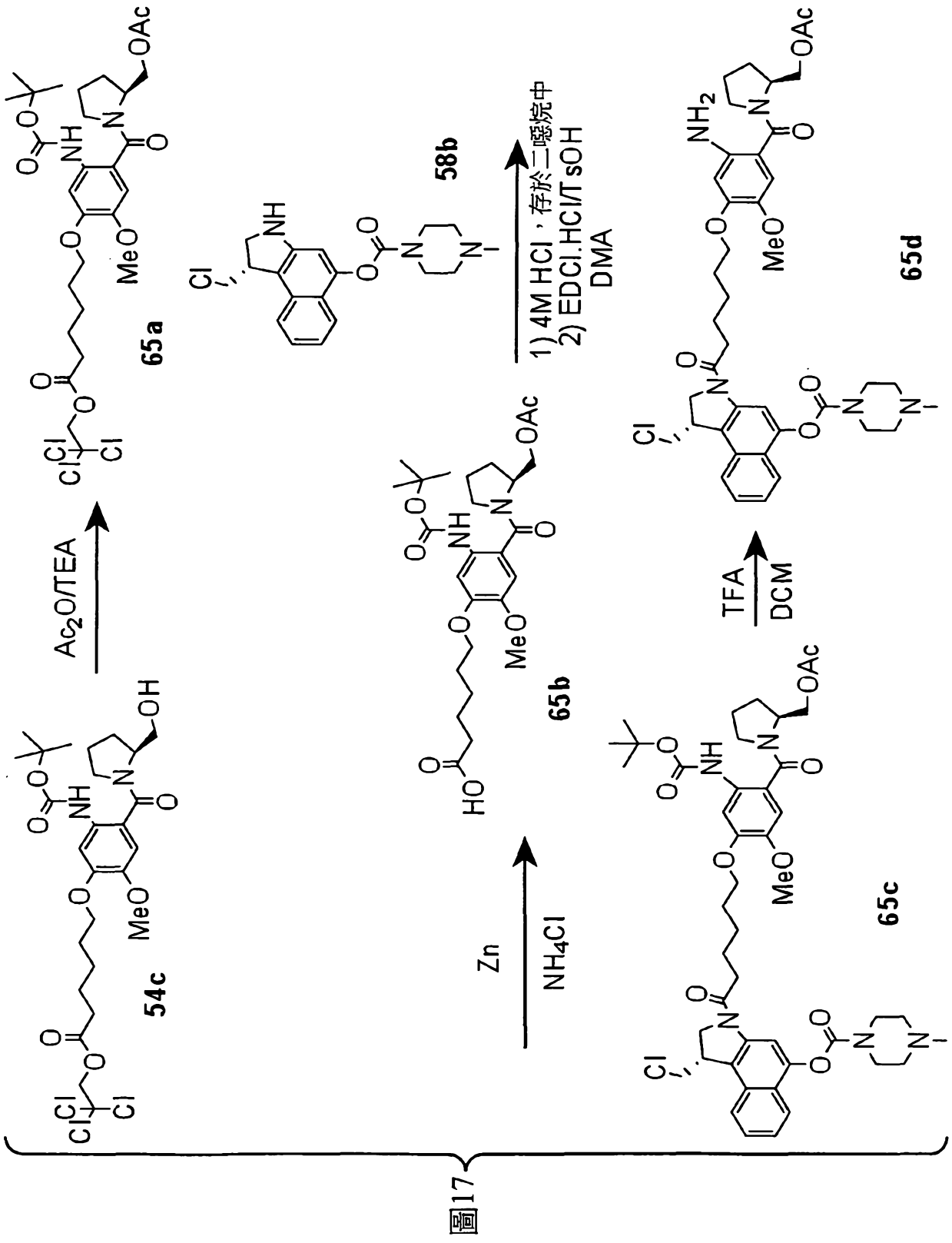

54c
65a
65b
65c
65d
58b
Ac2O/TEA
Zn
NH4Cl
TFA
DCM
1) 4M HCl，存於二噁烷中
2) EDCI.HCl/TsOH
DMA

圖17

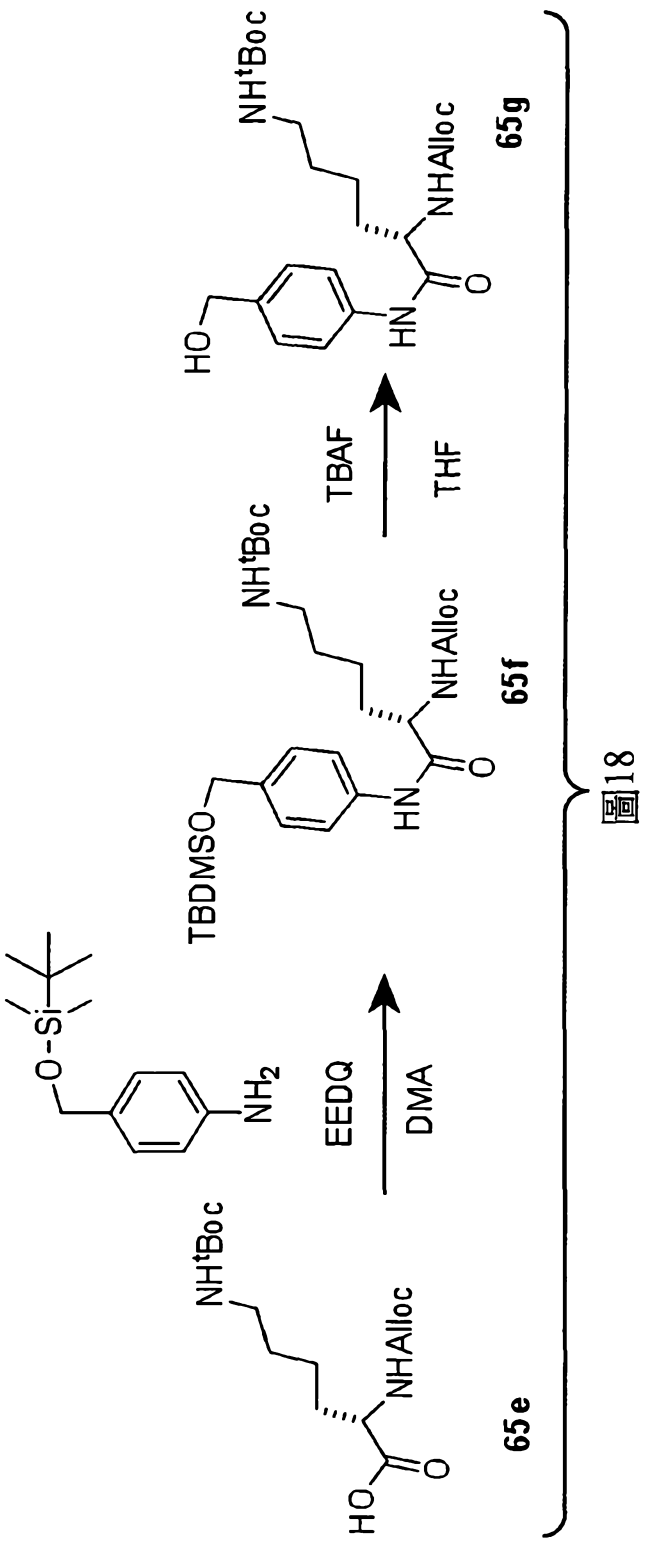

NH^{t}Boc
NHAlloc
HO
O
65e
EEDQ
DMA
O-Si
NH$_2$
TBDMSO
HN
O
65f
TBAF
THF
HO
65g

圖18

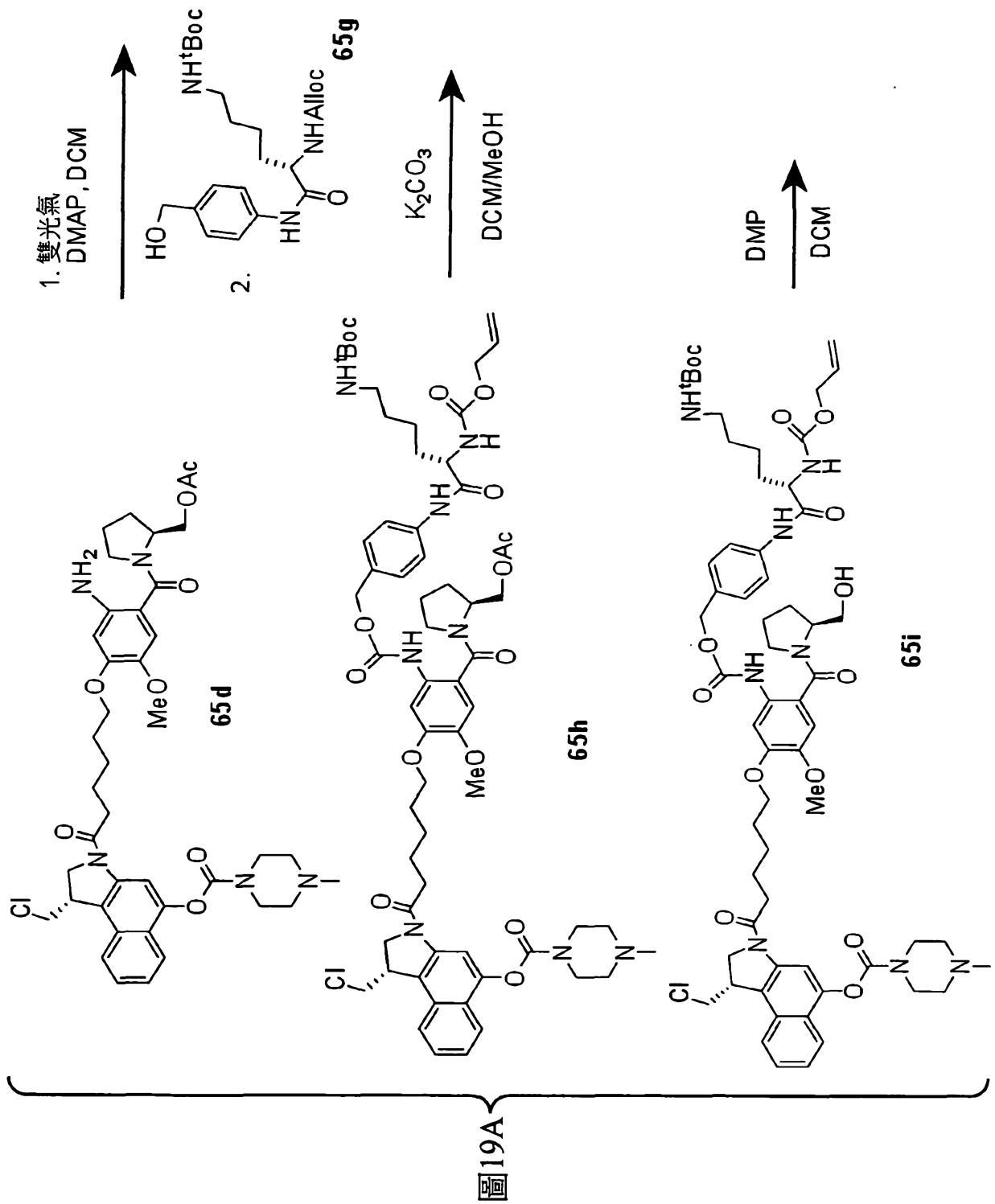


圖19A

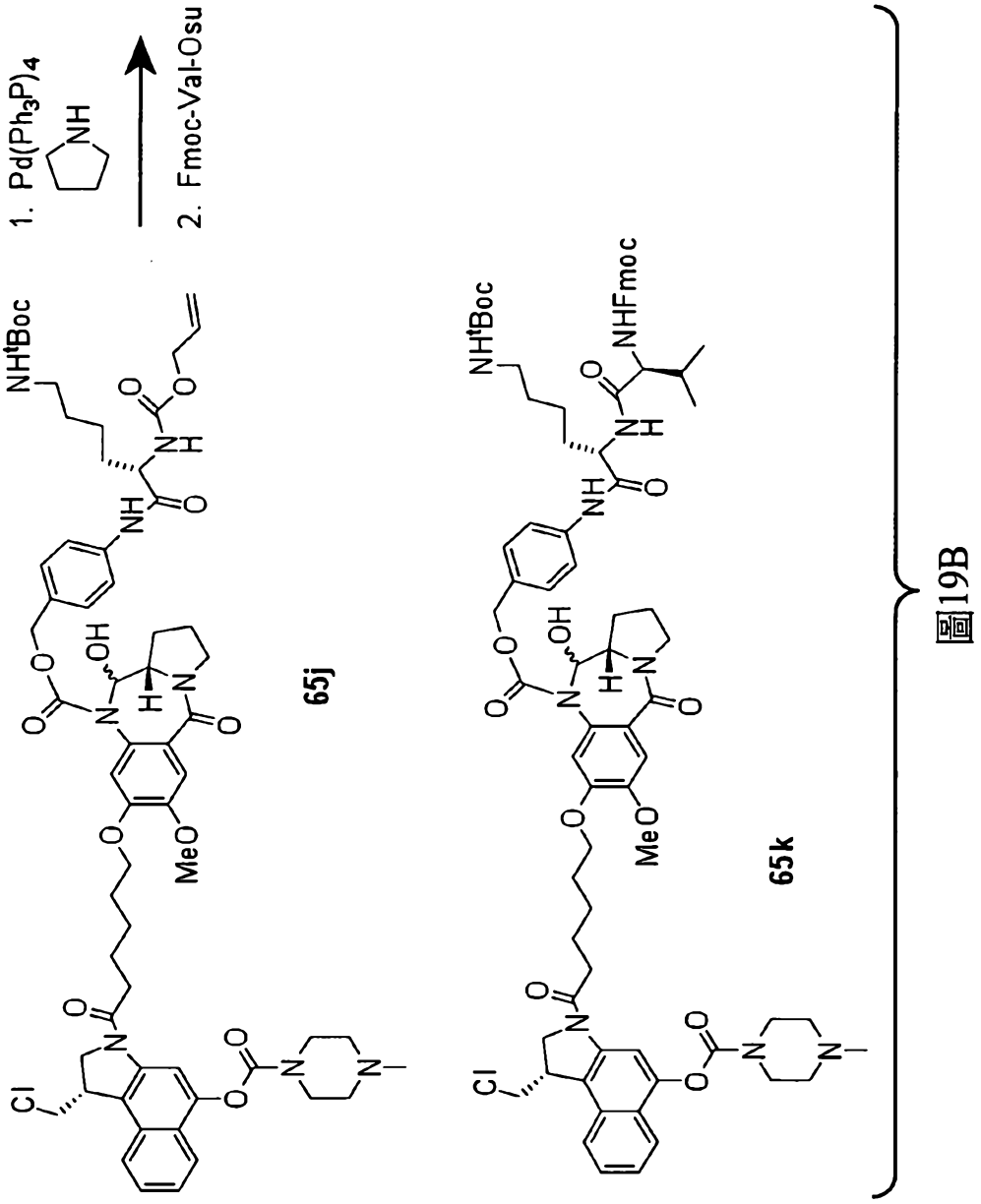


圖19B

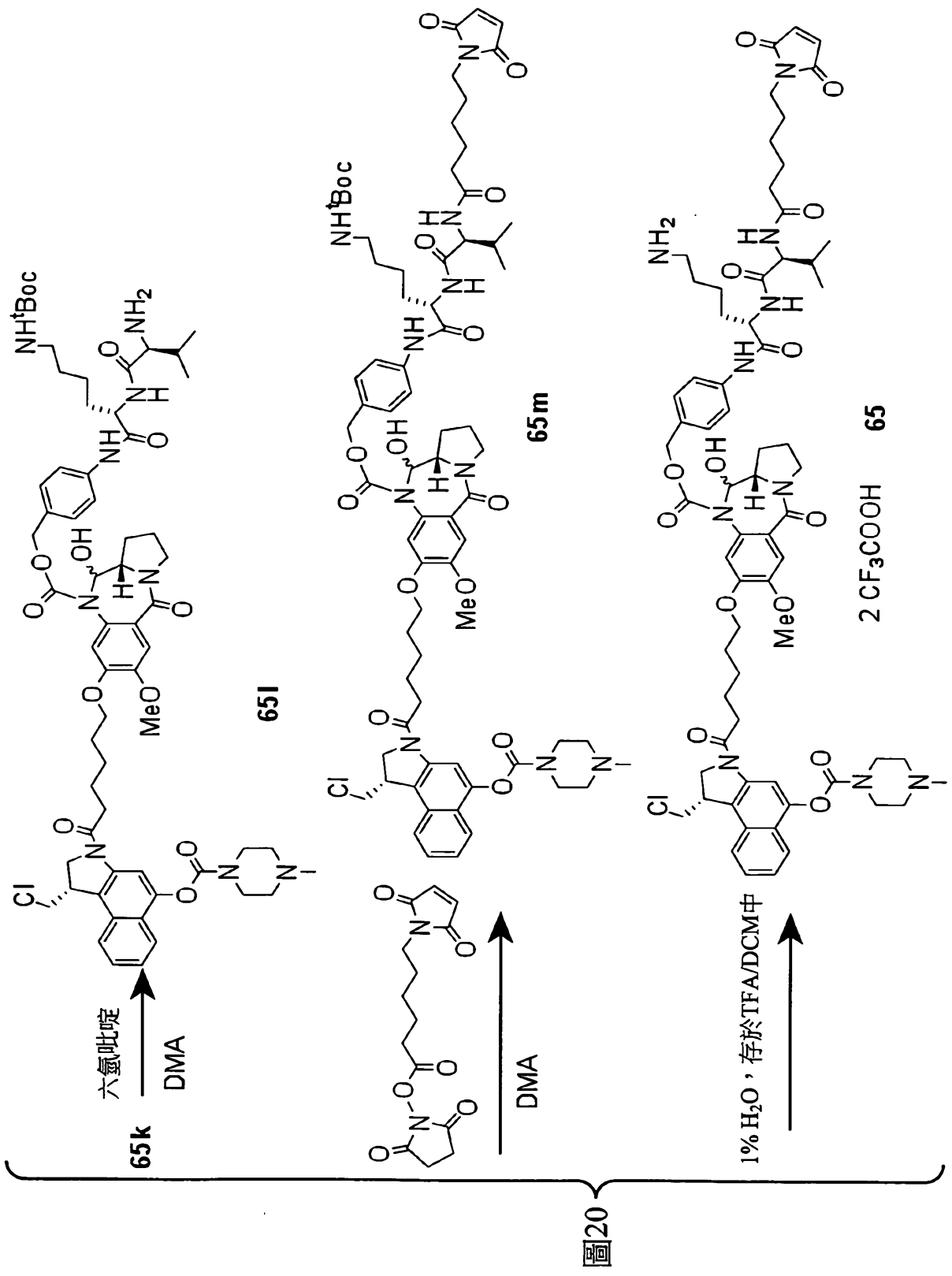


圖20

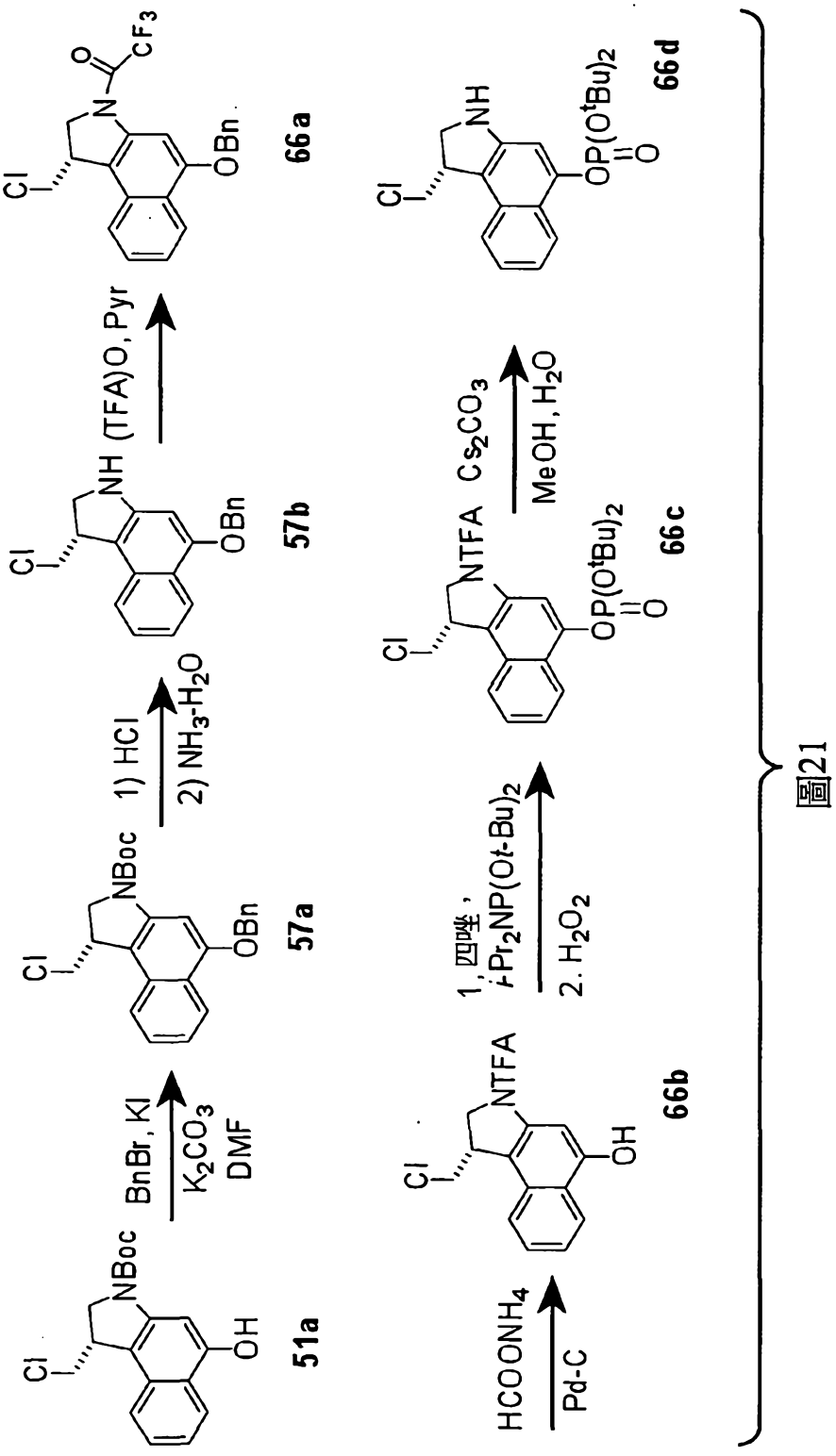

BnBr, KI
K_2CO_3
DMF
1) HCl
2) NH_3-H_2O
(TFA)O, Pyr
Cs_2CO_3
MeOH, H_2O
1, 四唑,
$iPr_2NP(Ot\text{-}Bu)_2$
2. H_2O_2
$HCOONH_4$
Pd-C
NBoc
NH
NTFA
OH
OBn
$OP(O^tBu)_2$
Cl
51a
57a
57b
66a
66b
66c
66d

圖21

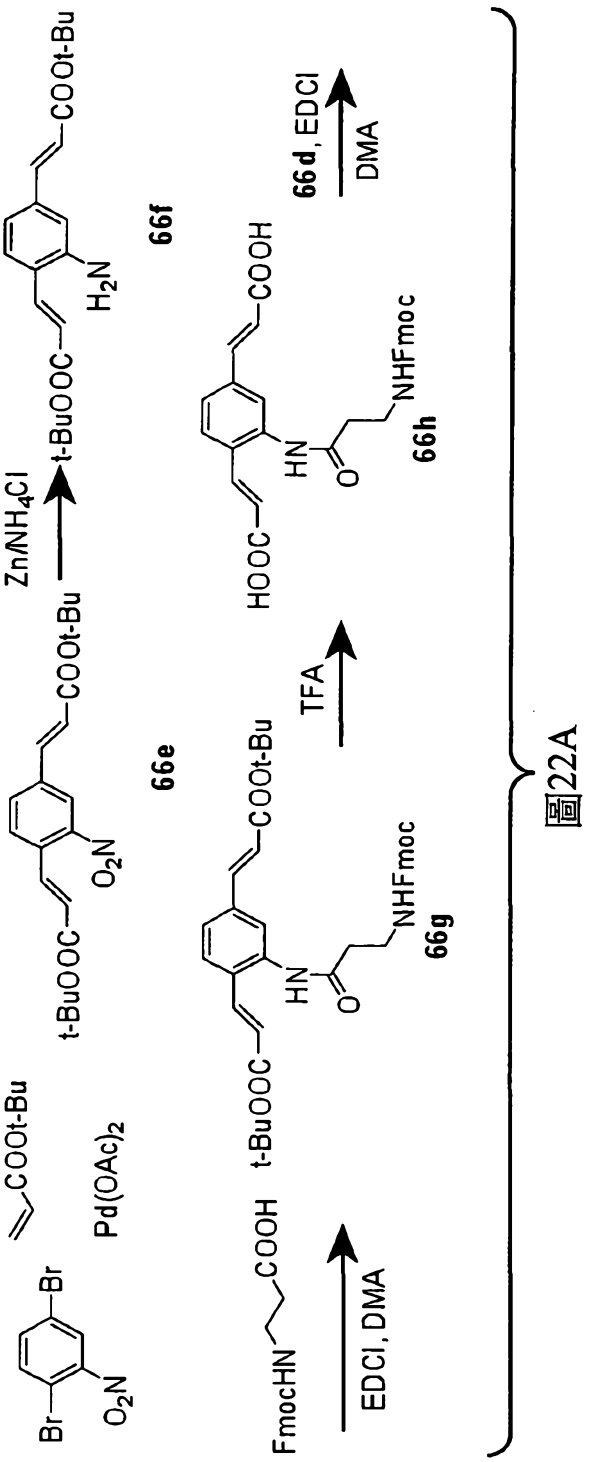

Br
Br
O2N
COOt-Bu
Pd(OAc)2
t-BuOOC
COOt-Bu
O2N
66e
Zn/NH4Cl
t-BuOOC
COOt-Bu
H2N
66f
FmocHN
COOH
EDCI, DMA
t-BuOOC
COOt-Bu
HN
O
NHFmoc
66g
TFA
HOOC
COOH
HN
O
NHFmoc
66h
66d, EDCI
DMA

圖22A

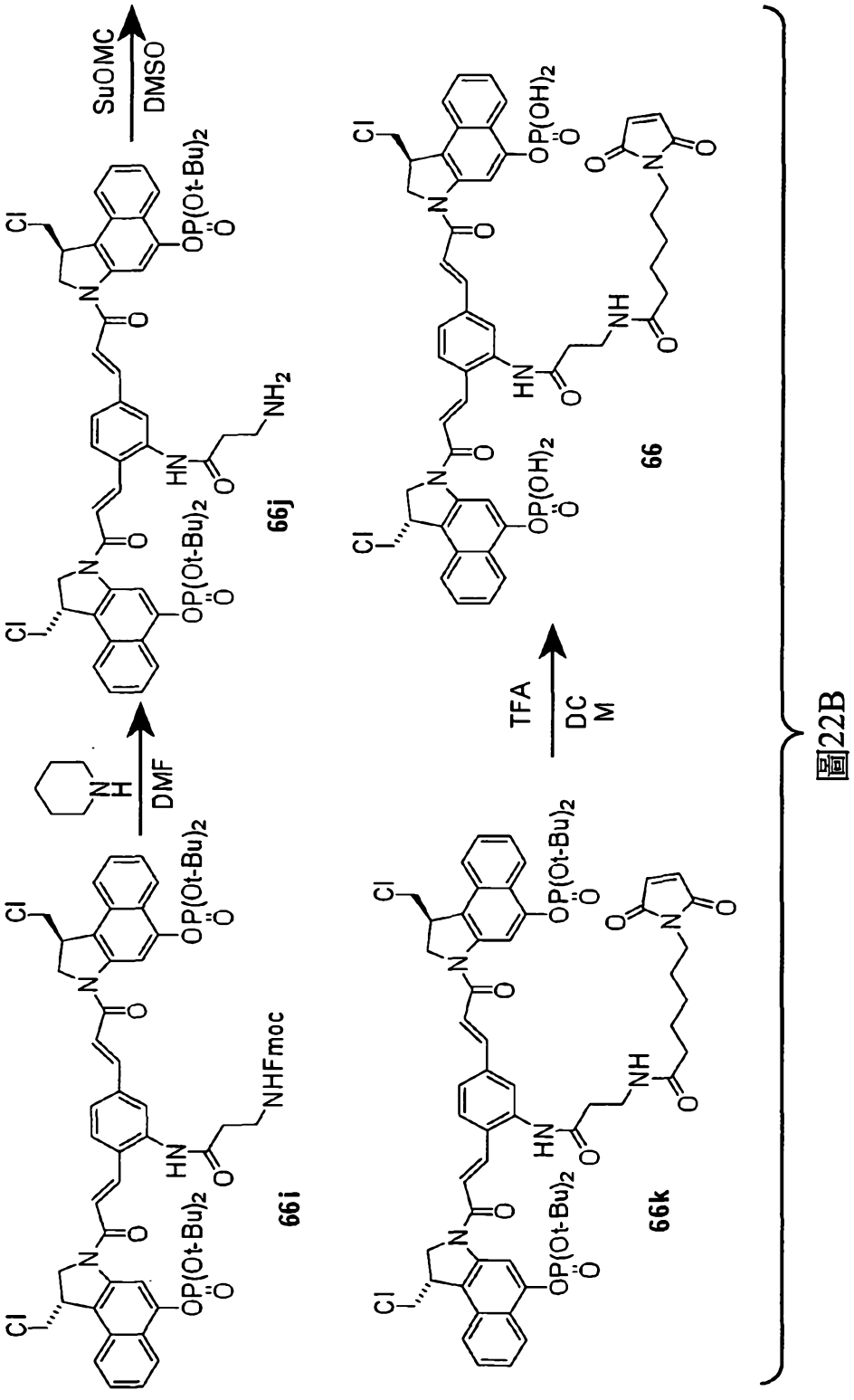


圖22B

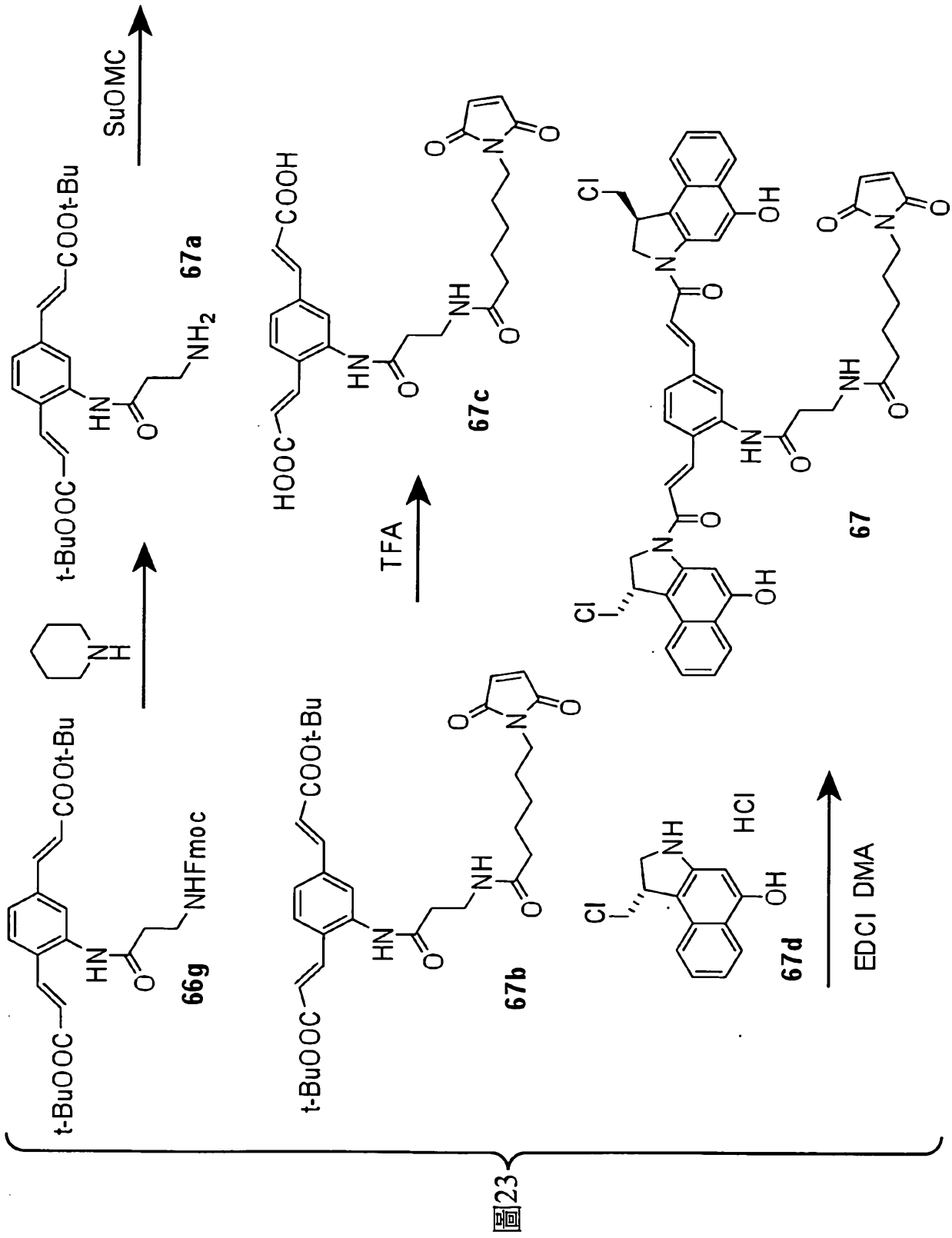

t-BuOOC
COOt-Bu
HN
NHFmoc
66g
SuOMC
NH2
67a
TFA
HOOC
COOH
67c
67b
Cl
OH
67
HCl
67d
EDCI DMA

圖23

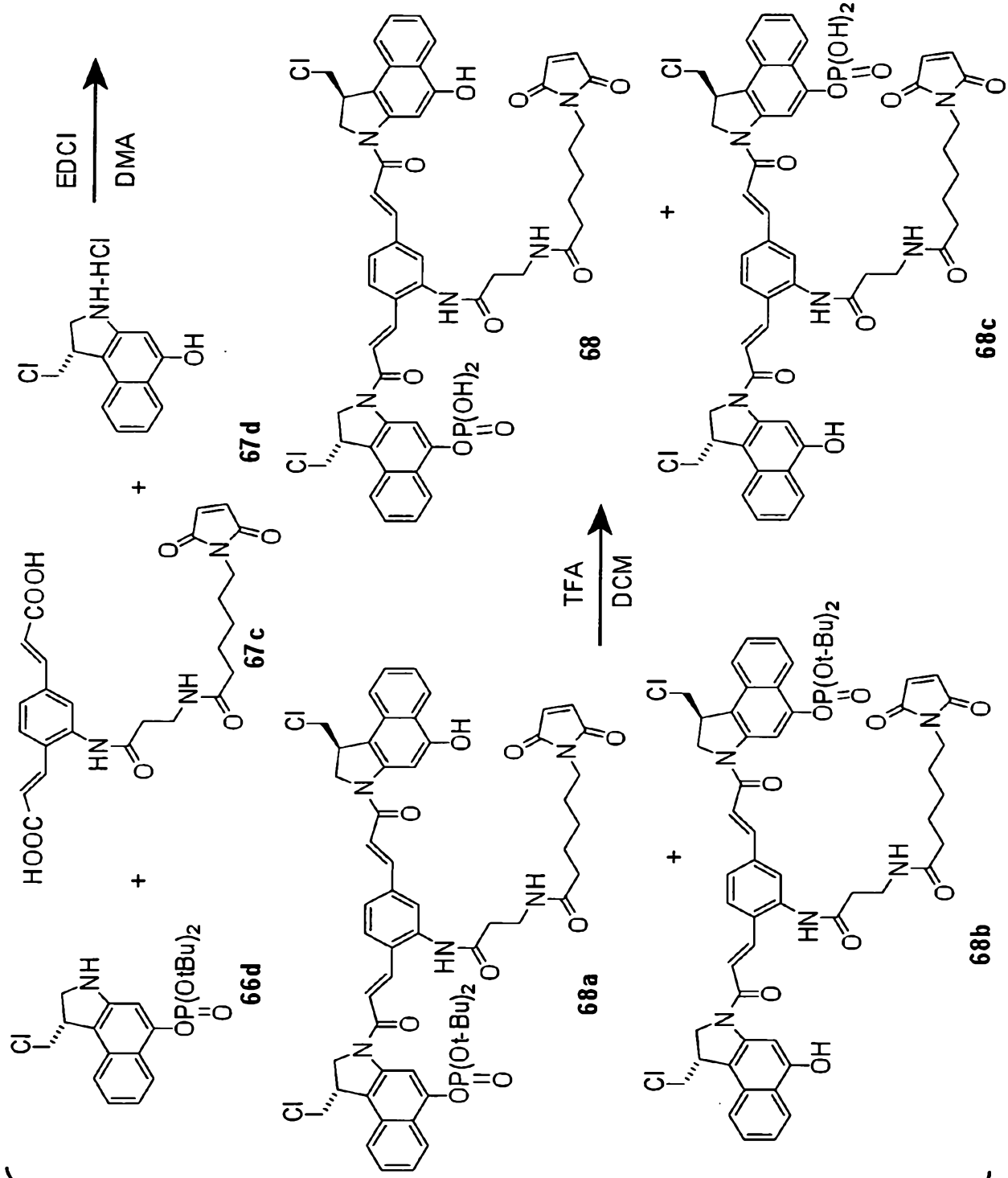


圖24

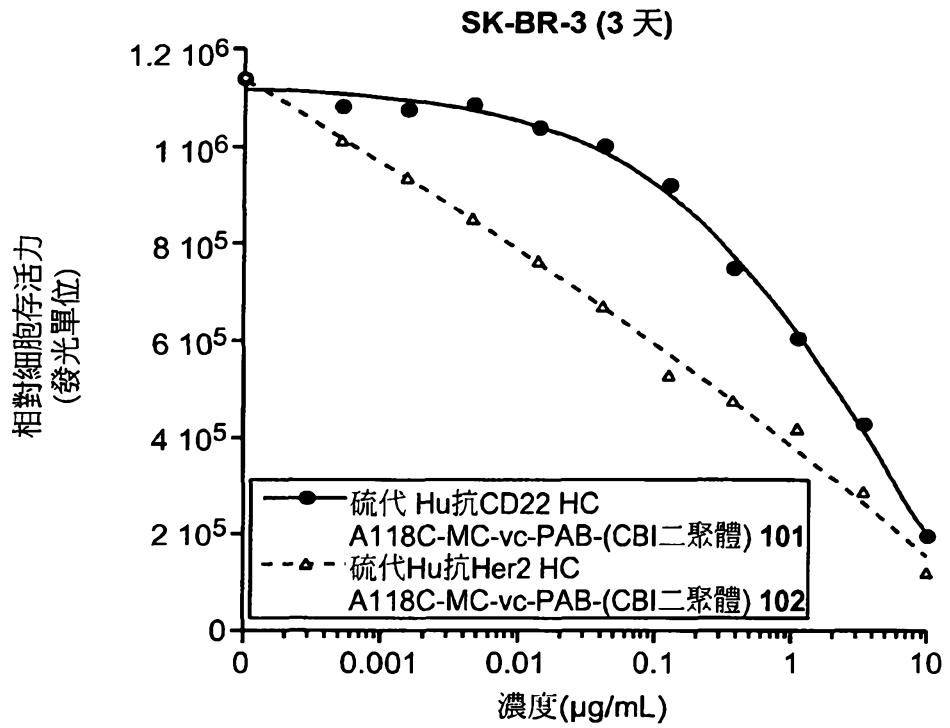

SK-BR-3 (3 天)
1.2 10^6
1 10^6
8 10^5
6 10^5
4 10^5
2 10^5
0
0
0.001
0.01
0.1
1
10
相對細胞存活力
(發光單位)
濃度(μg/mL)
硫代 Hu抗CD22 HC
A118C-MC-vc-PAB-(CBI二聚體) 101
硫代Hu抗Her2 HC
A118C-MC-vc-PAB-(CBI二聚體) 102

圖25

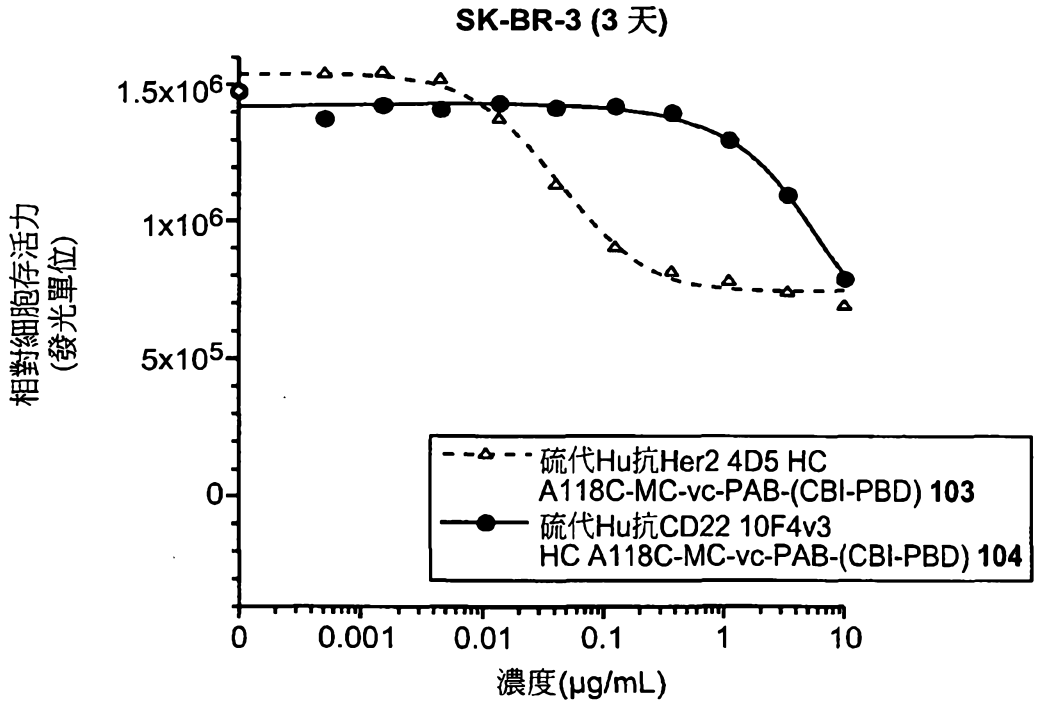

SK-BR-3 (3 天)
1.5x10^6
1x10^6
5x10^5
0
0
0.001
0.01
0.1
1
10
相對細胞存活力
(發光單位)
濃度(μg/mL)
硫代Hu抗Her2 4D5 HC
A118C-MC-vc-PAB-(CBI-PBD) 103
硫代Hu抗CD22 10F4v3
HC A118C-MC-vc-PAB-(CBI-PBD) 104

圖26

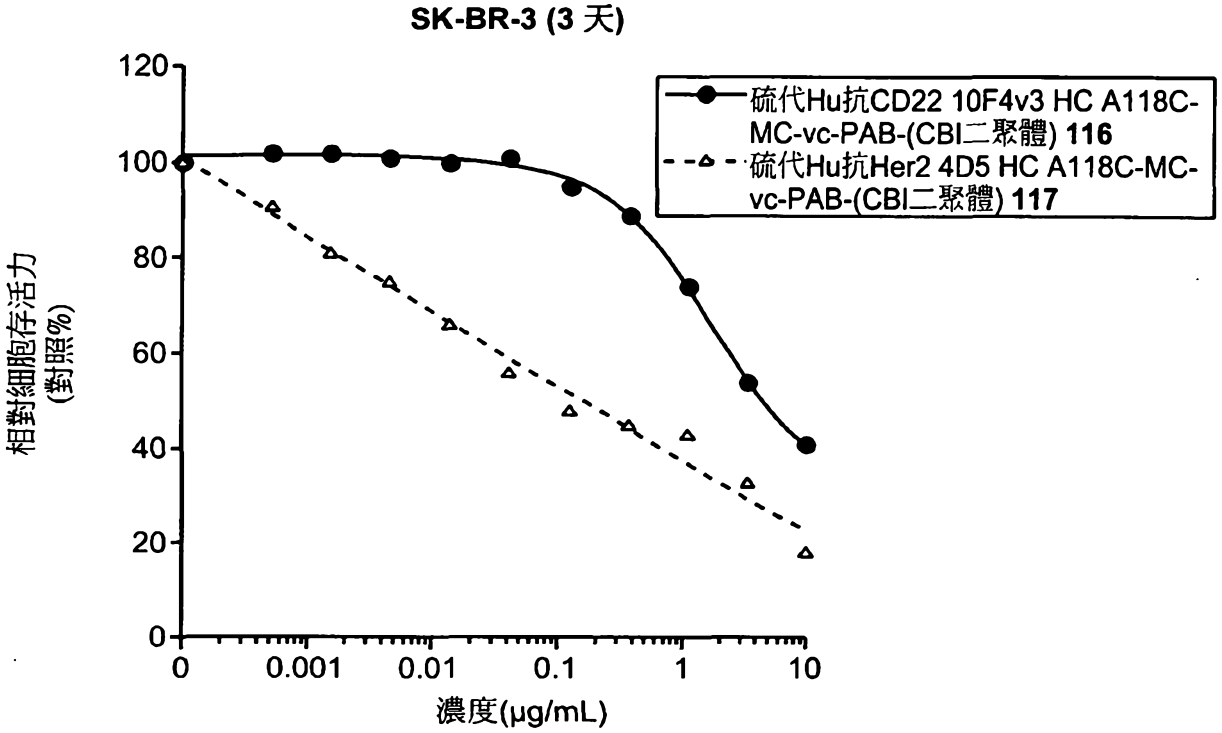

SK-BR-3 (3 天)
硫代Hu抗CD22 10F4v3 HC A118C-MC-vc-PAB-(CBI二聚體) 116
硫代Hu抗Her2 4D5 HC A118C-MC-vc-PAB-(CBI二聚體) 117
相對細胞存活力 (對照%)
濃度(μg/mL)
120
100
80
60
40
20
0
0
0.001
0.01
0.1
1
10

圖27

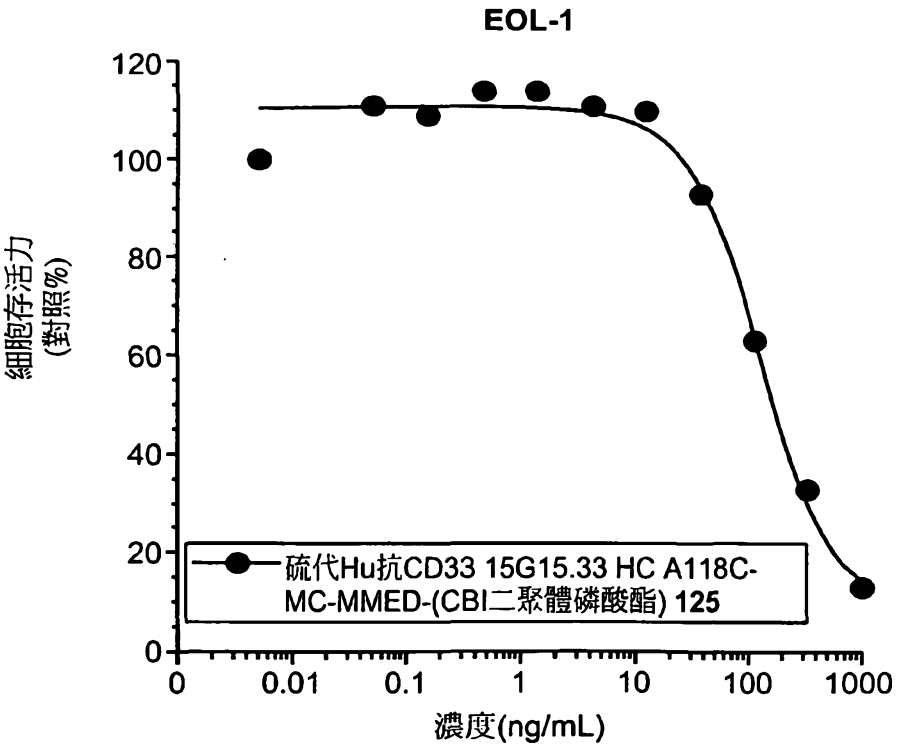

EOL-1
硫代Hu抗CD33 15G15.33 HC A118C-MC-MMED-(CBI二聚體磷酸酯) 125
細胞存活力 (對照%)
濃度(ng/mL)
120
100
80
60
40
20
0
0
0.01
0.1
1
10
100
1000

圖28

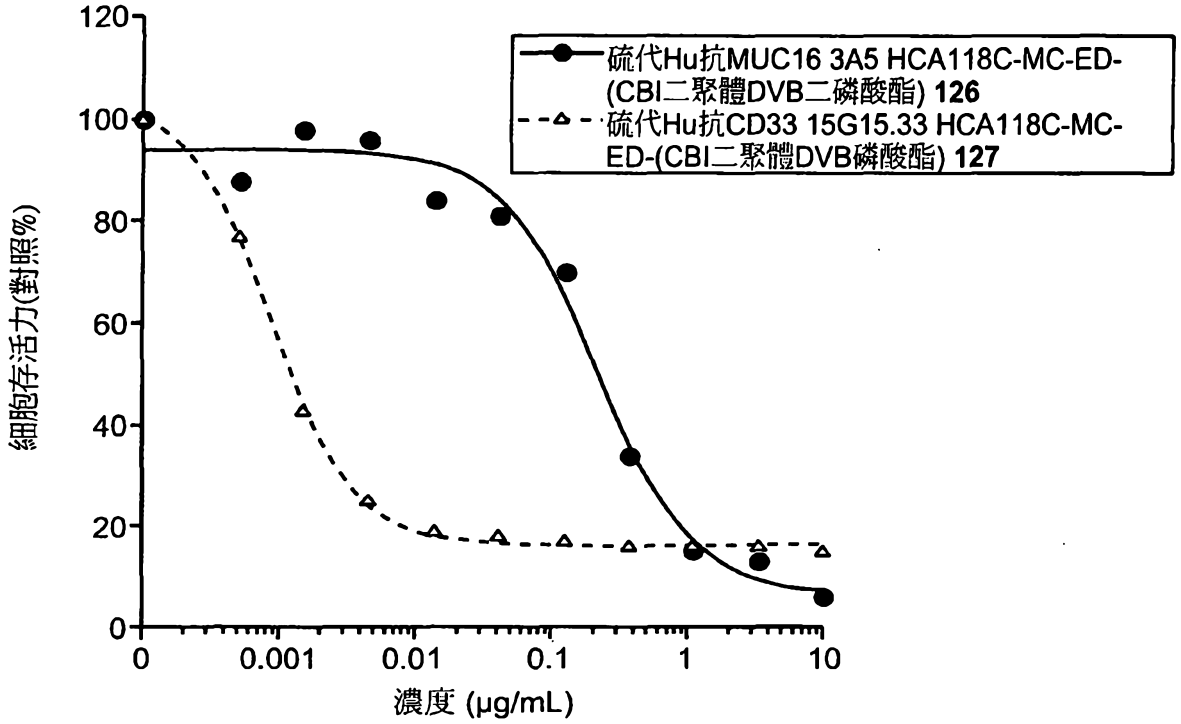

硫代Hu抗MUC16 3A5 HCA118C-MC-ED-(CBI二聚體DVB二磷酸酯) 126
硫代Hu抗CD33 15G15.33 HCA118C-MC-ED-(CBI二聚體DVB磷酸酯) 127
細胞存活力(對照%)
濃度 (μg/mL)
120
100
80
60
40
20
0
0
0.001
0.01
0.1
1
10

圖29

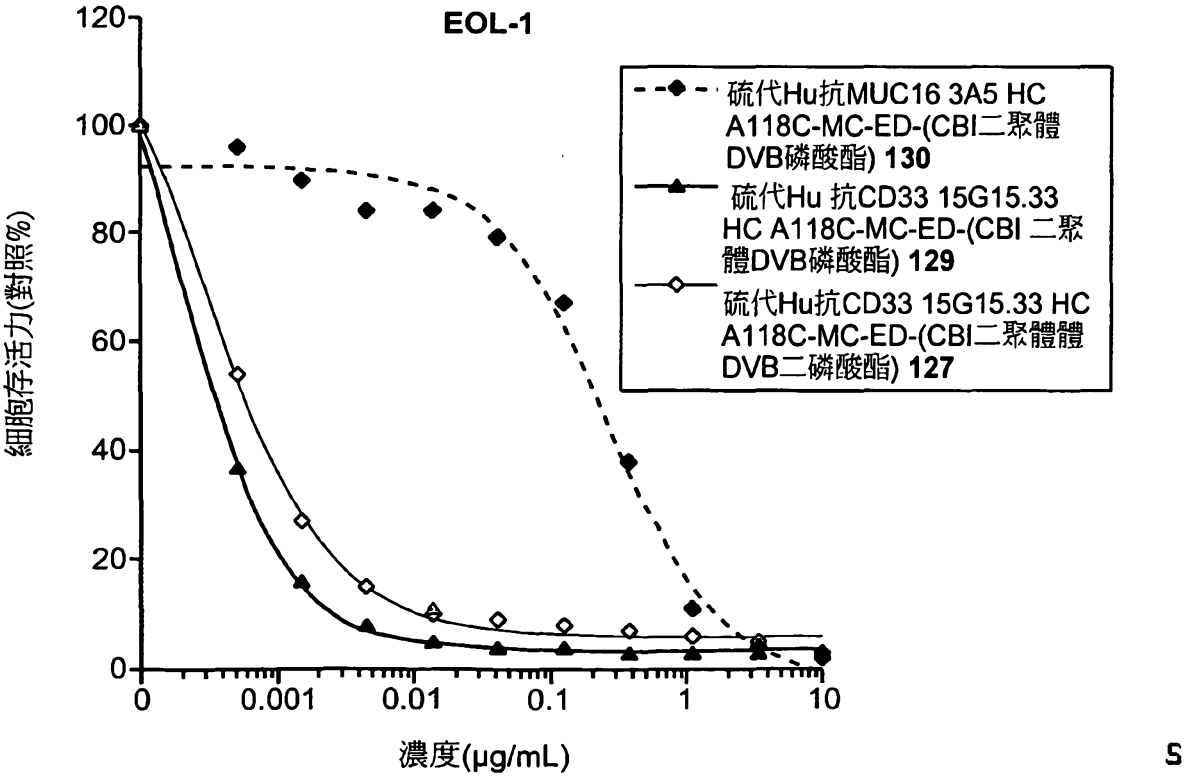

EOL-1
硫代Hu抗MUC16 3A5 HC A118C-MC-ED-(CBI二聚體DVB磷酸酯) 130
硫代Hu 抗CD33 15G15.33 HC A118C-MC-ED-(CBI 二聚體DVB磷酸酯) 129
硫代Hu抗CD33 15G15.33 HC A118C-MC-ED-(CBI二聚體體DVB二磷酸酯) 127
細胞存活力(對照%)
濃度(μg/mL)
120
100
80
60
40
20
0
0
0.001
0.01
0.1
1
10

圖30

C182779DBX20160414C.pdf

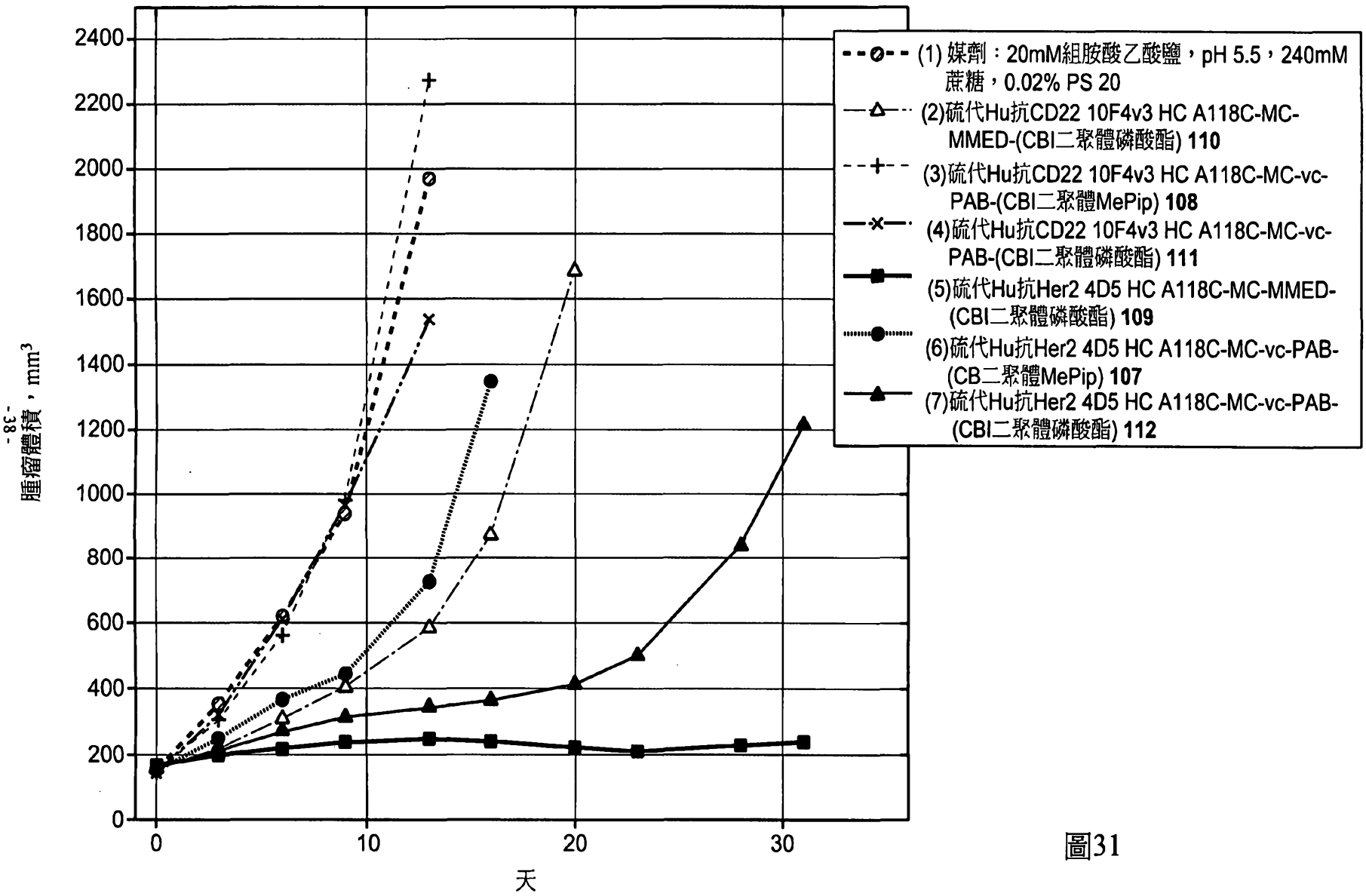


圖31

C182779DBX20160414C.pdf

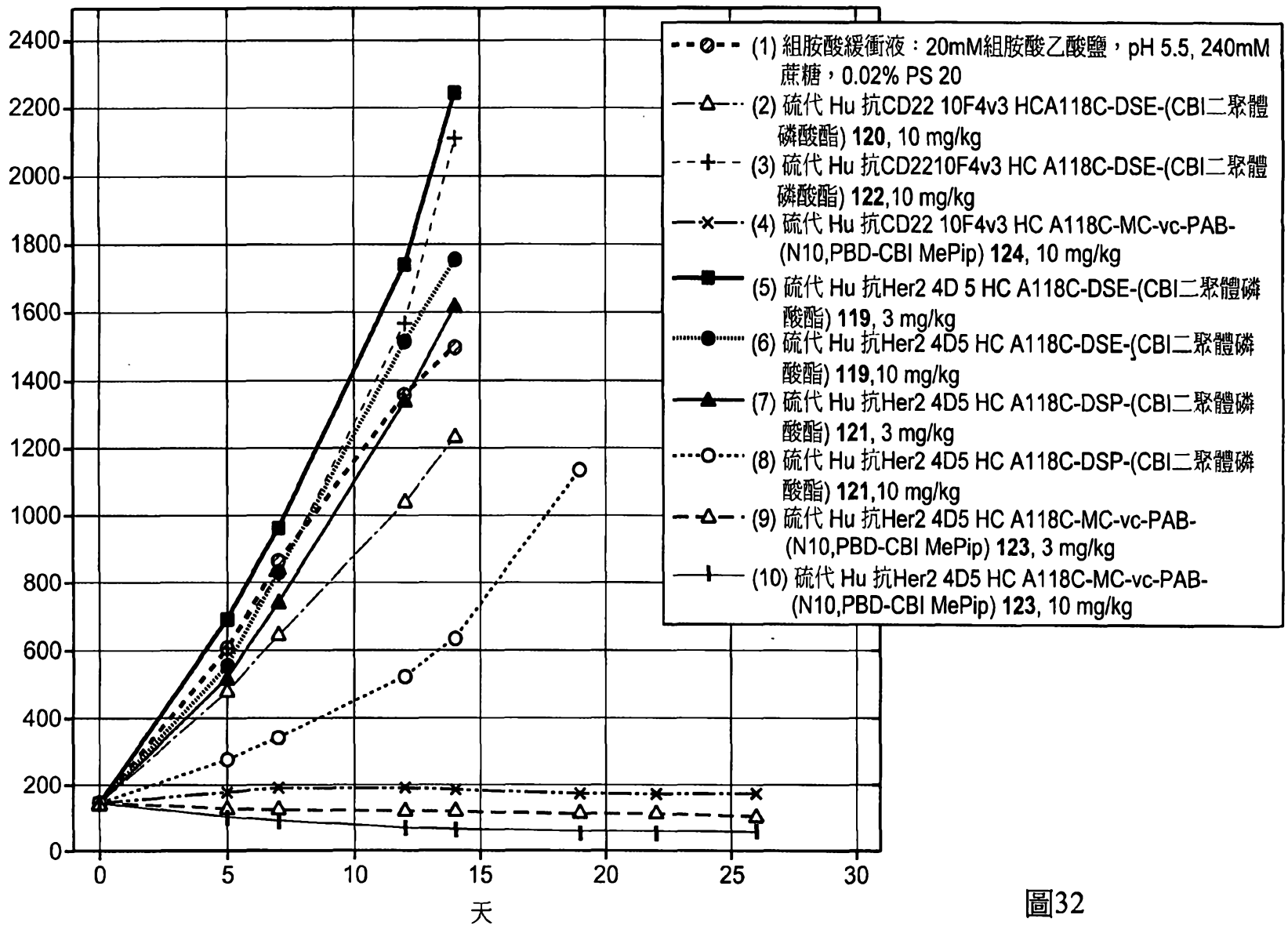


圖32

C182779DBX20160414C.pdf

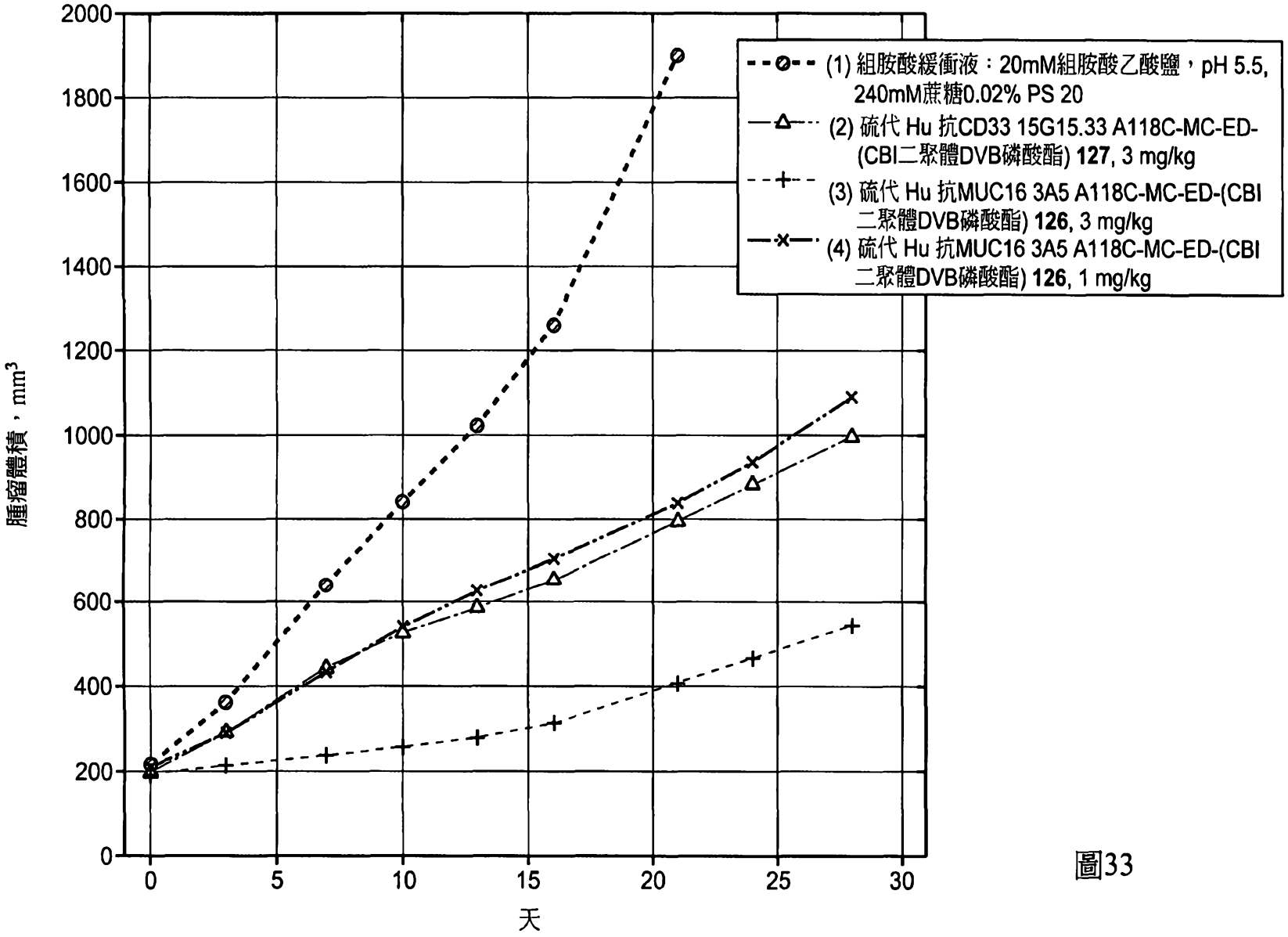


圖33

C182779DBX20160414C.pdf

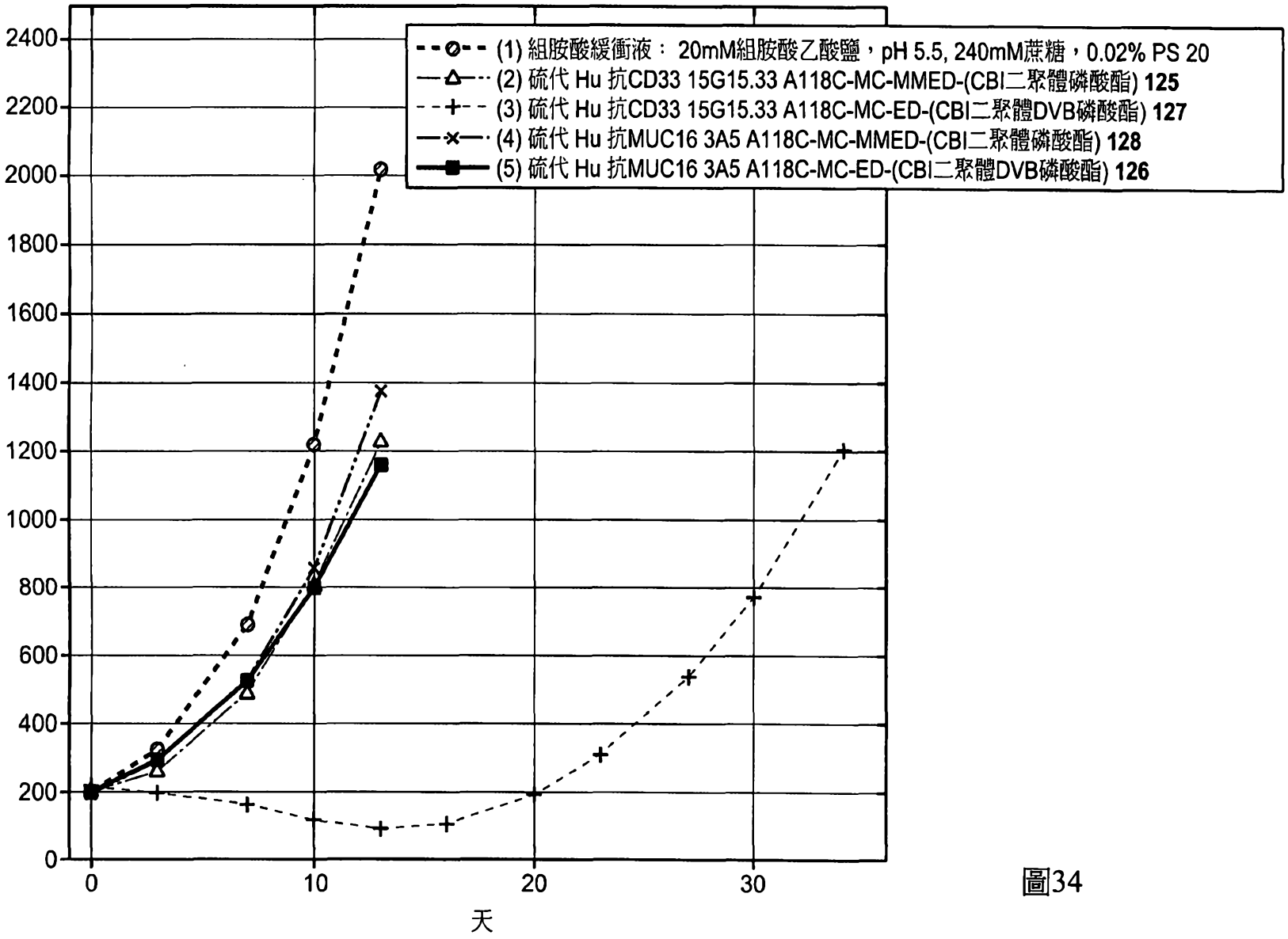


圖34

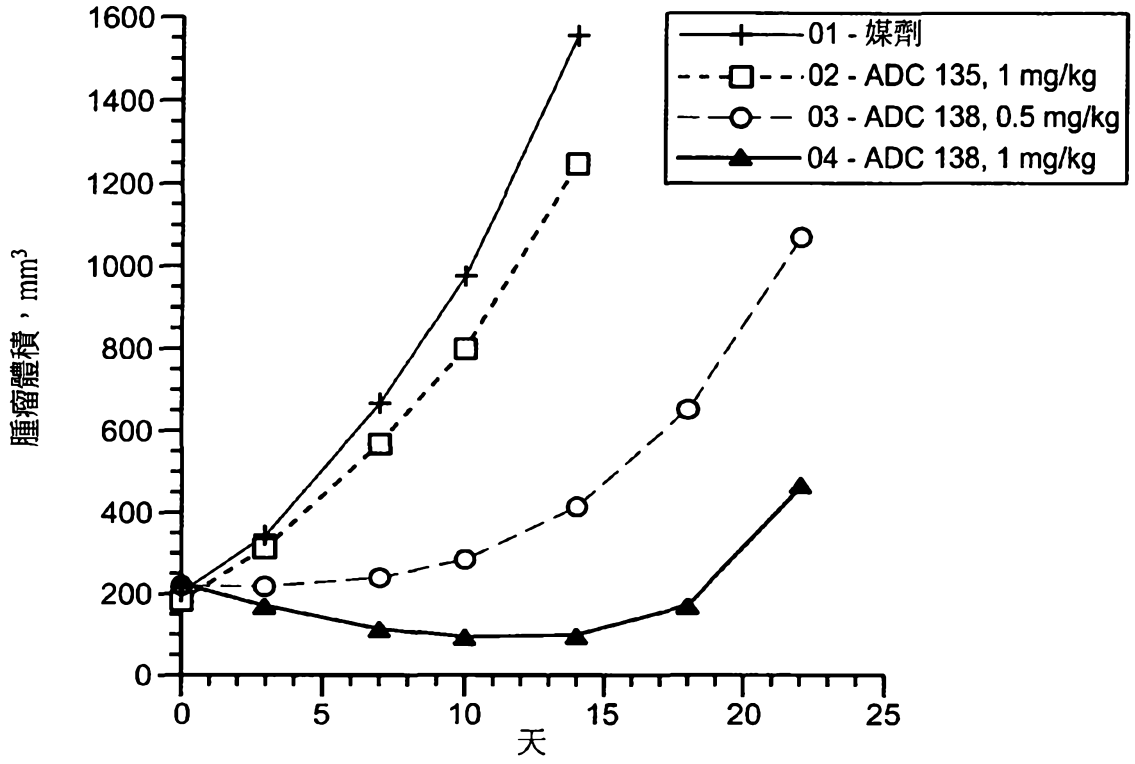

01 - 媒劑
02 - ADC 135, 1 mg/kg
03 - ADC 138, 0.5 mg/kg
04 - ADC 138, 1 mg/kg
腫瘤體積，mm3
天
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
0
5
10
15
20
25

圖35A

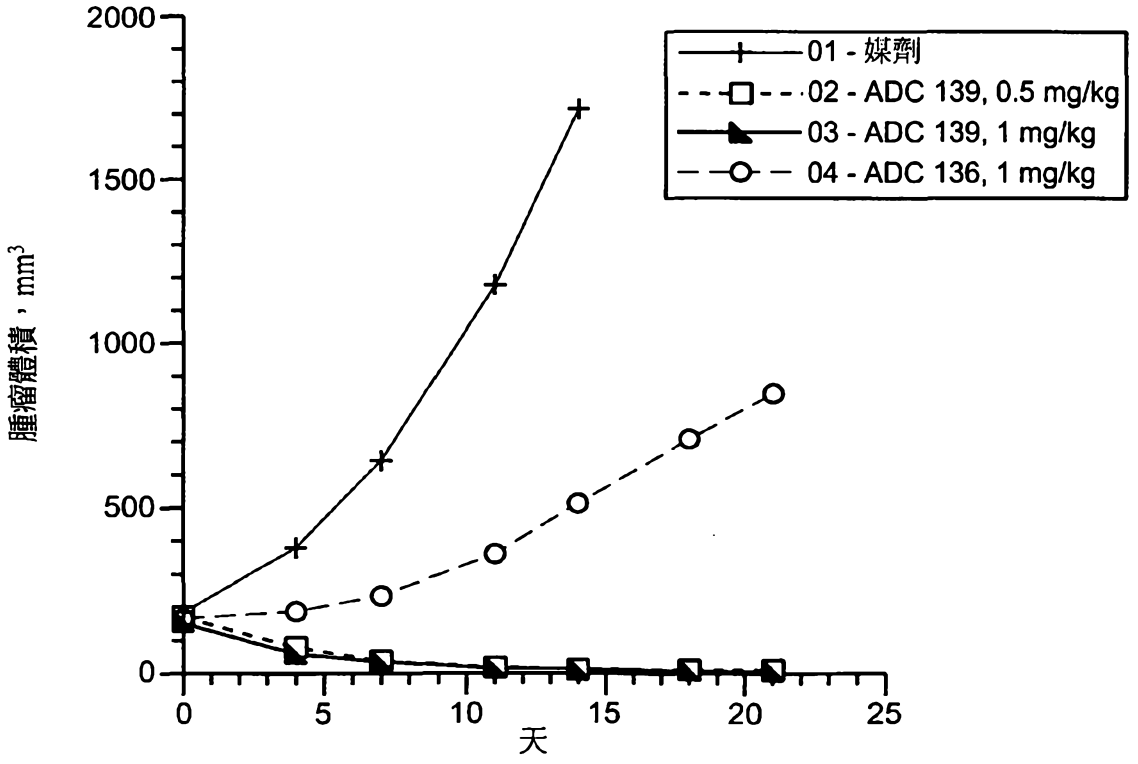

01 - 媒劑
02 - ADC 139, 0.5 mg/kg
03 - ADC 139, 1 mg/kg
04 - ADC 136, 1 mg/kg
腫瘤體積，mm3
天
0
500
1000
1500
2000
0
5
10
15
20
25

圖35B

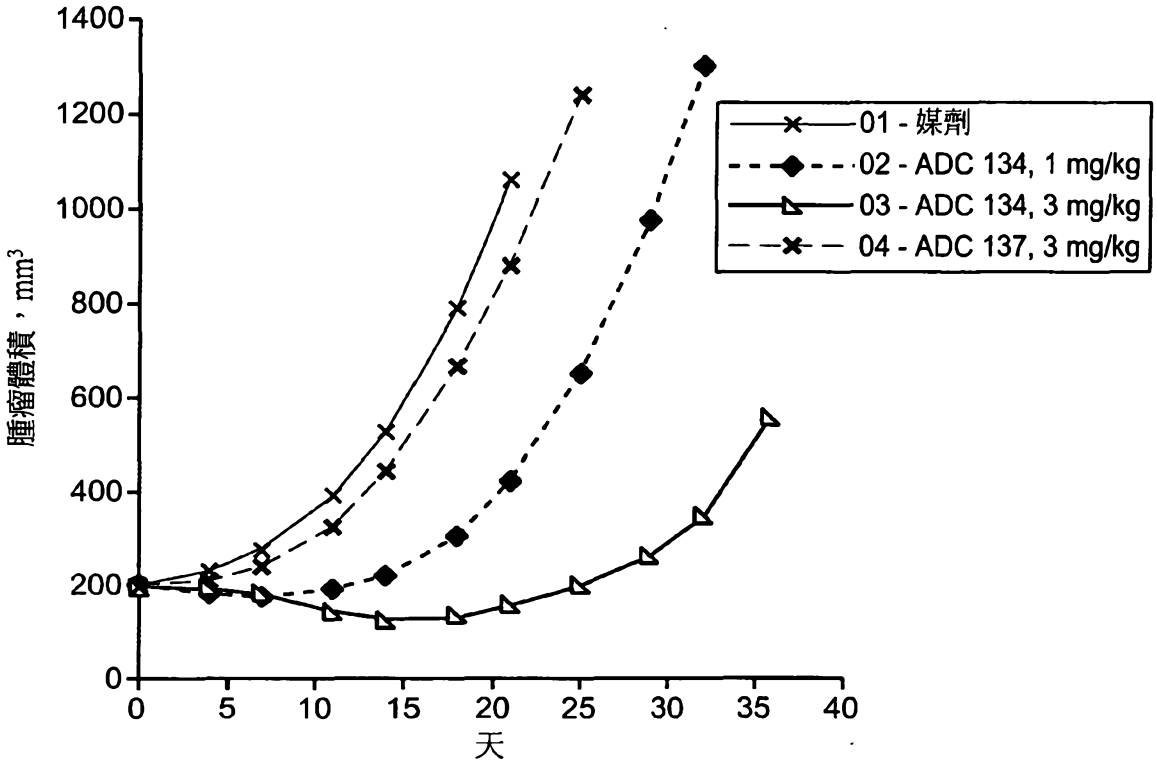

1400
1200
1000
800
600
400
200
0
腫瘤體積，mm3
0
5
10
15
20
25
30
35
40
天
01 - 媒劑
02 - ADC 134, 1 mg/kg
03 - ADC 134, 3 mg/kg
04 - ADC 137, 3 mg/kg

圖36

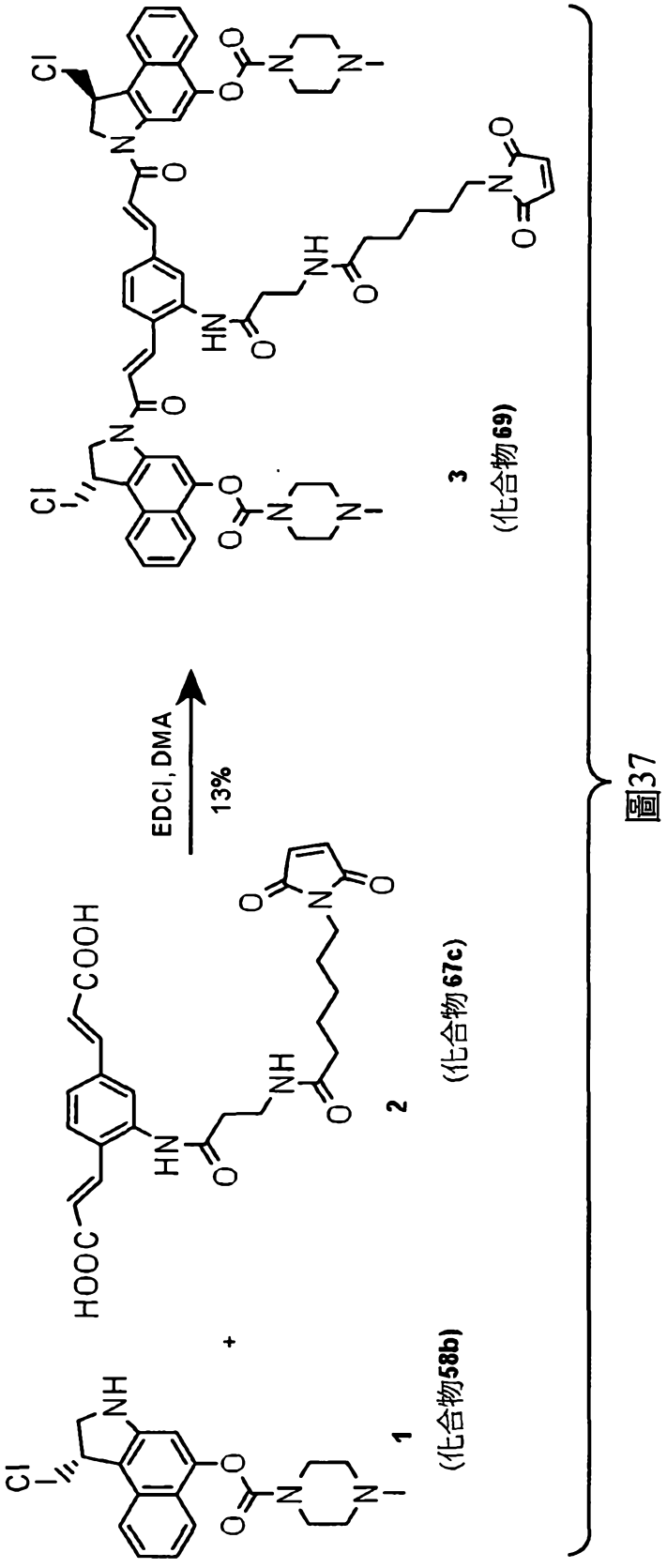


圖37

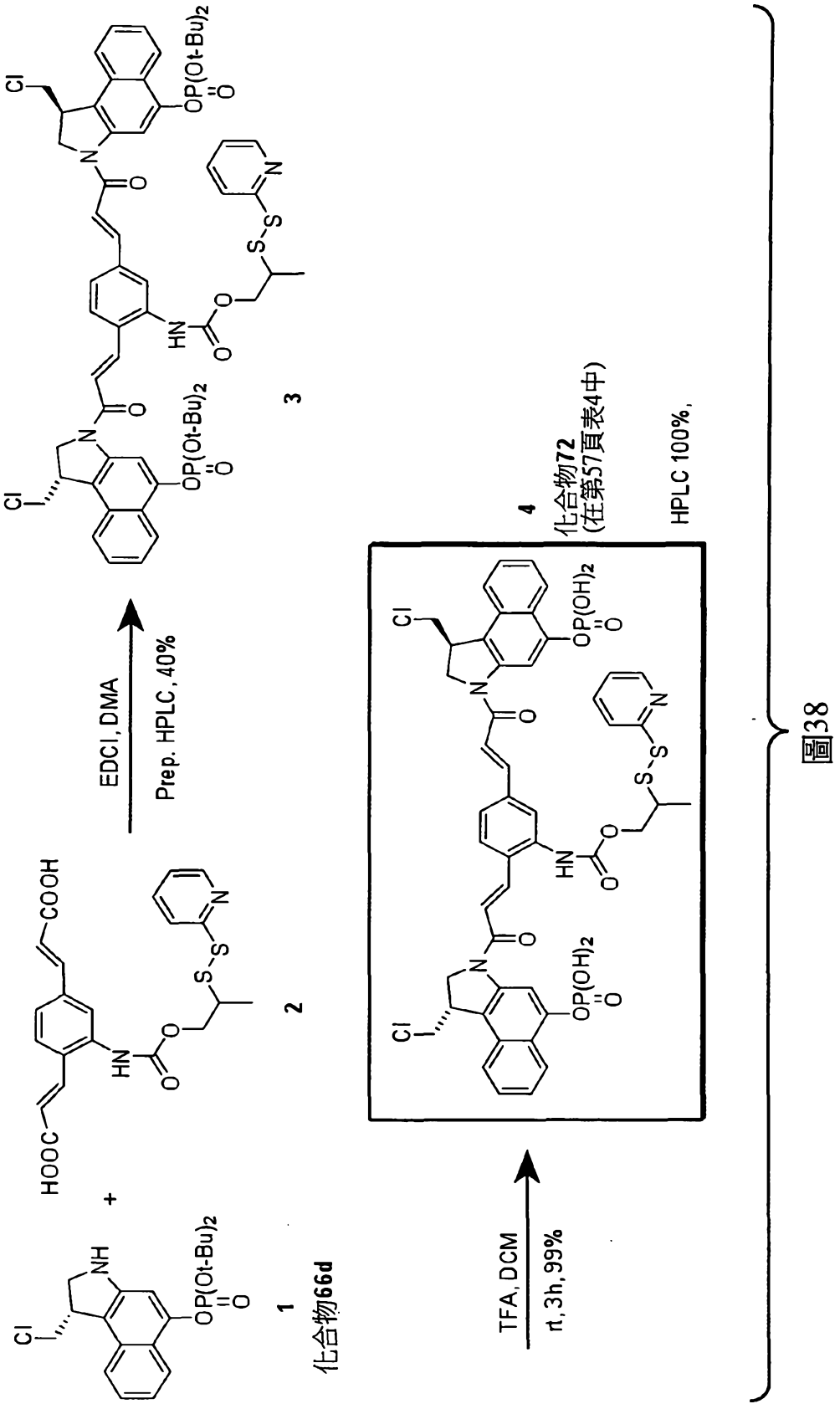

EDCI, DMA
Prep. HPLC, 40%
TFA, DCM
rt, 3h, 99%
HPLC 100%,
化合物66d
1
2
3
4
化合物72
(在第57頁表4中)

圖38

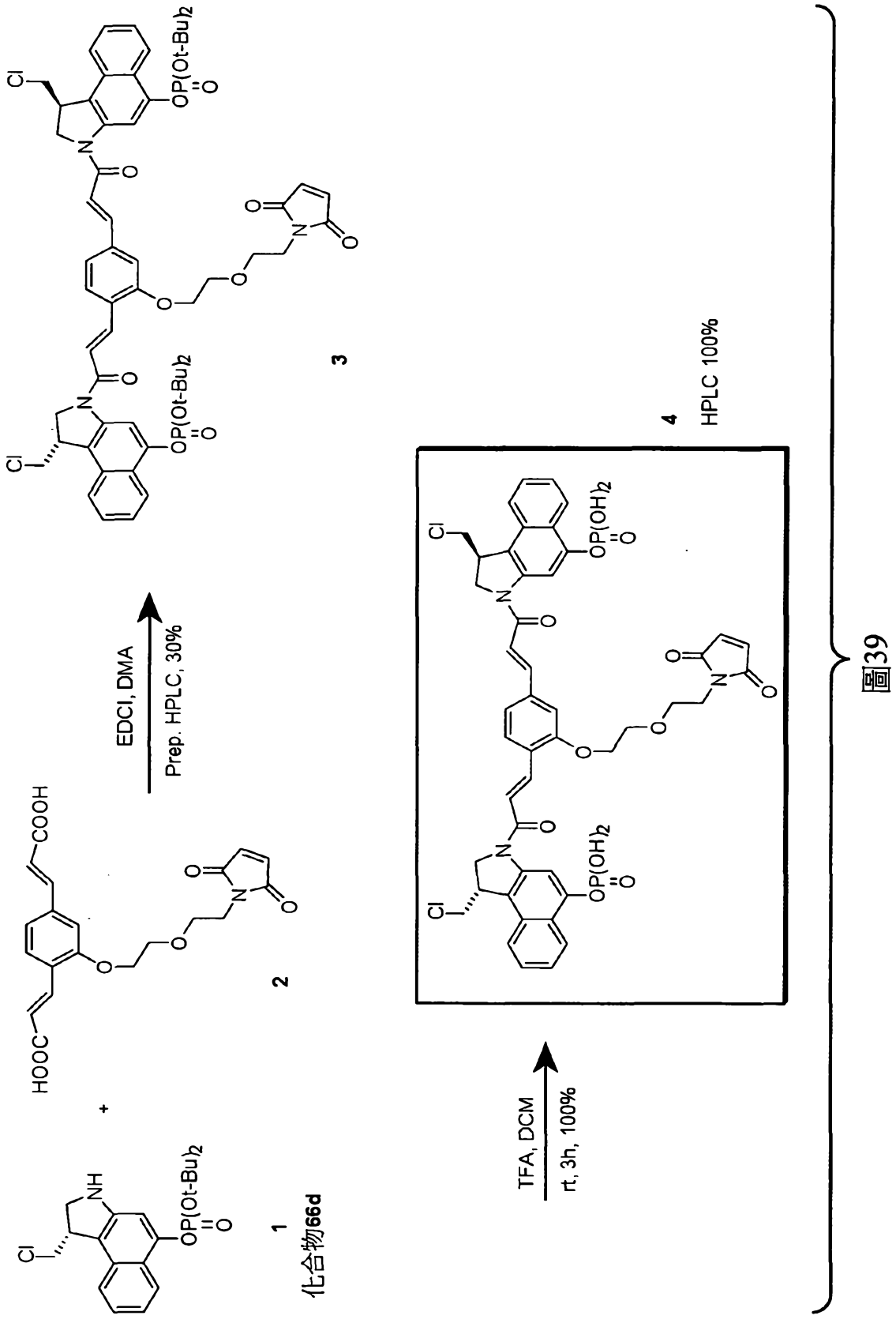


圖39

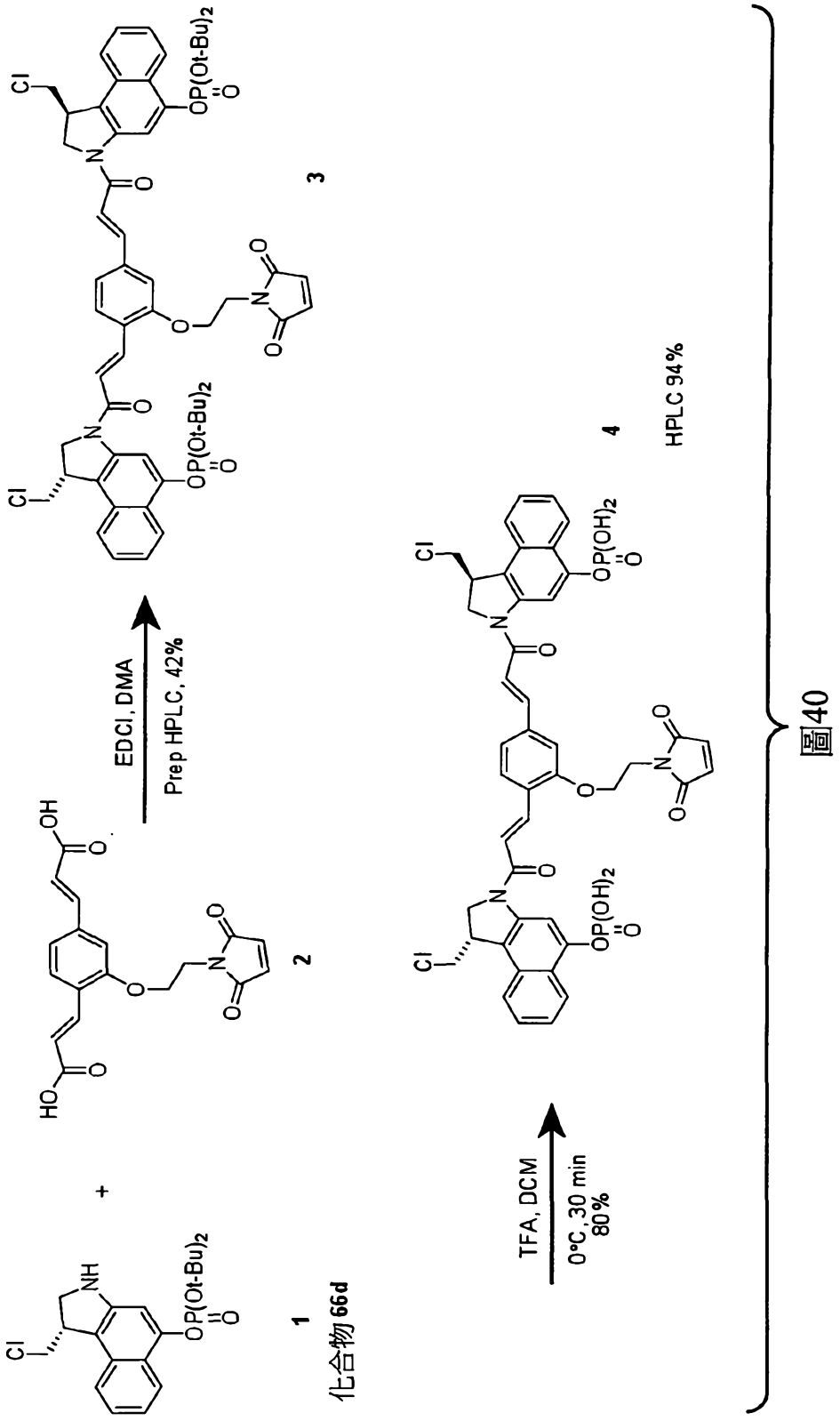


圖40

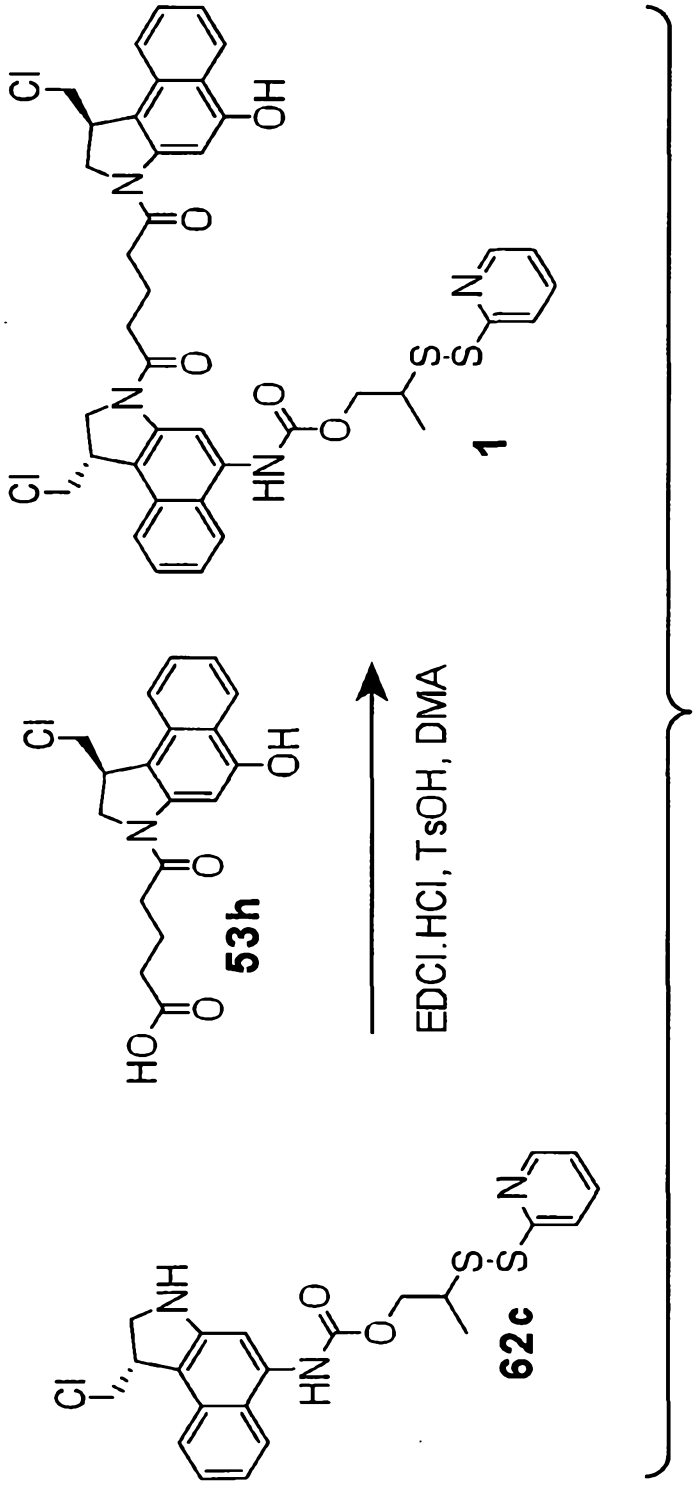


圖41

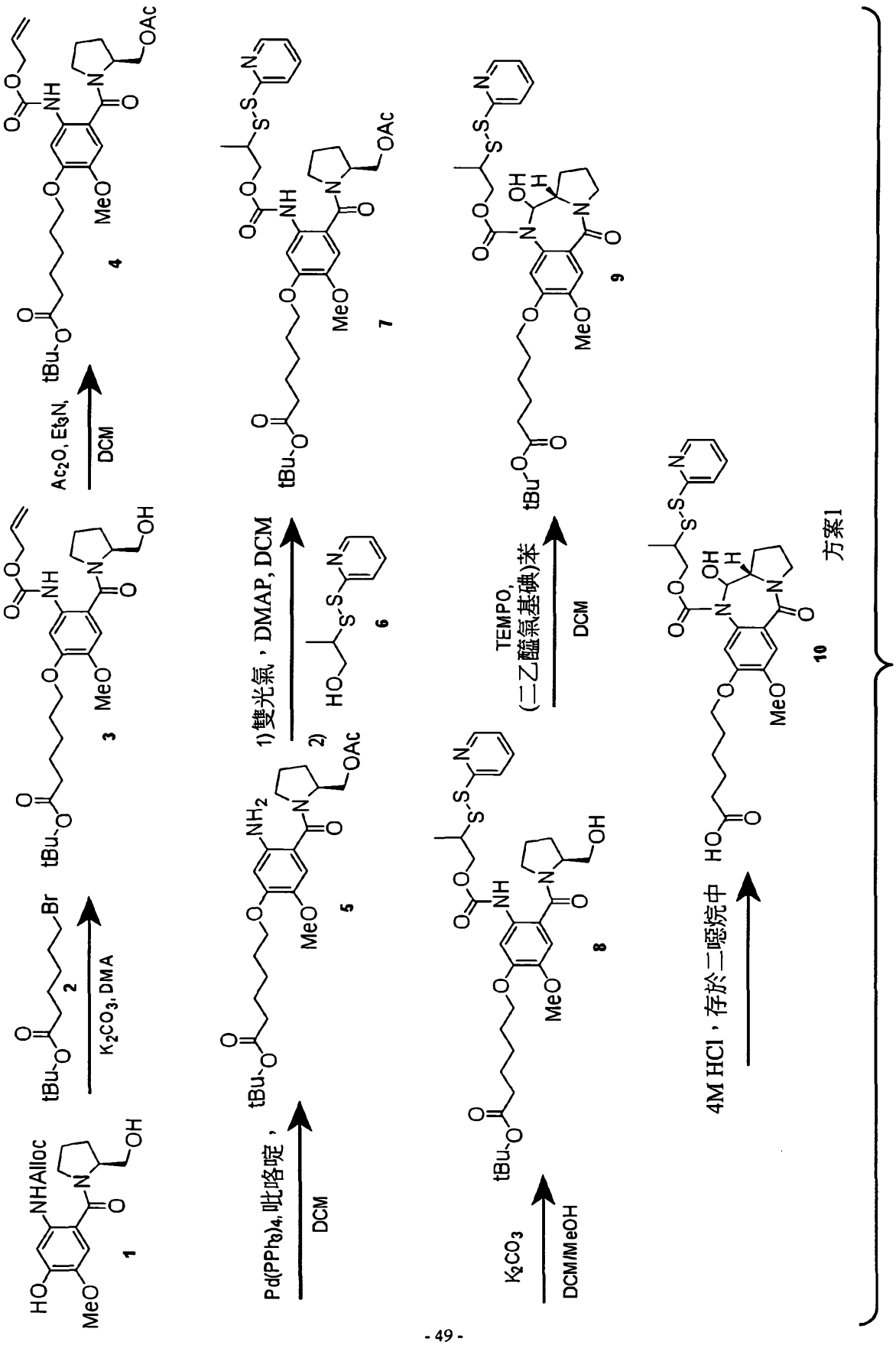
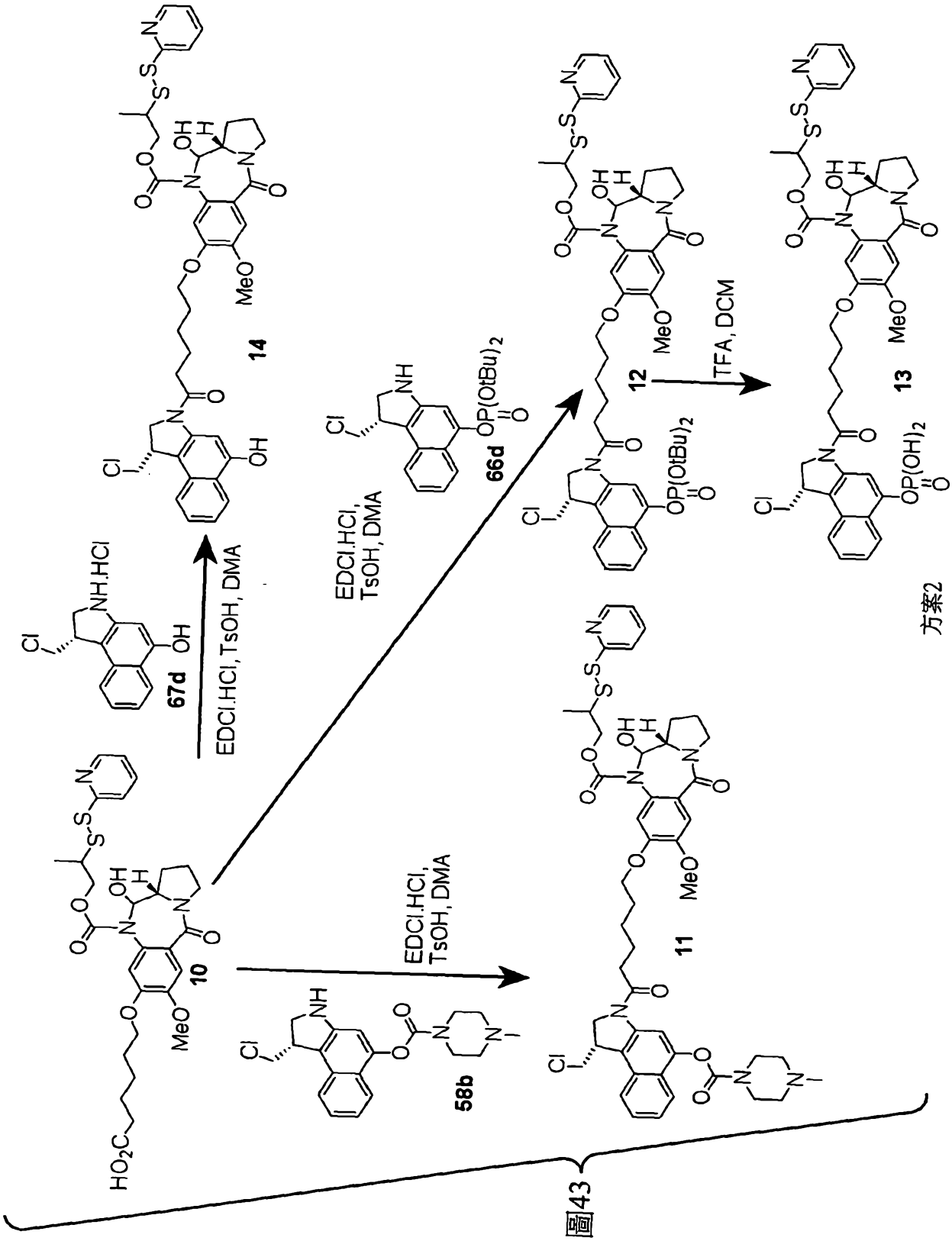

NHAlloc
HO
MeO
1
tBu
Br
2
K_2CO_3, DMA
3
Ac_2O, Et_3N,
DCM
4
$Pd(PPh_3)_4$, 吡咯啶，
DCM
NH_2
5
1) 雙光氣，DMAP, DCM
2)
HO
6
7
K_2CO_3
DCM/MeOH
8
TEMPO,
(二乙醯氧基碘)苯
DCM
9
4M HCl，存於二噁烷中
10
方案1

圖42


67d
EDCI.HCl, TsOH, DMA
14
10
EDCI.HCl,
TsOH, DMA
66d
12
TFA, DCM
13
EDCI.HCl,
TsOH, DMA
58b
11
MeO
OH
Cl
NH.HCl
OP(OtBu)2
OP(OH)2
HO2C

方案2

圖43

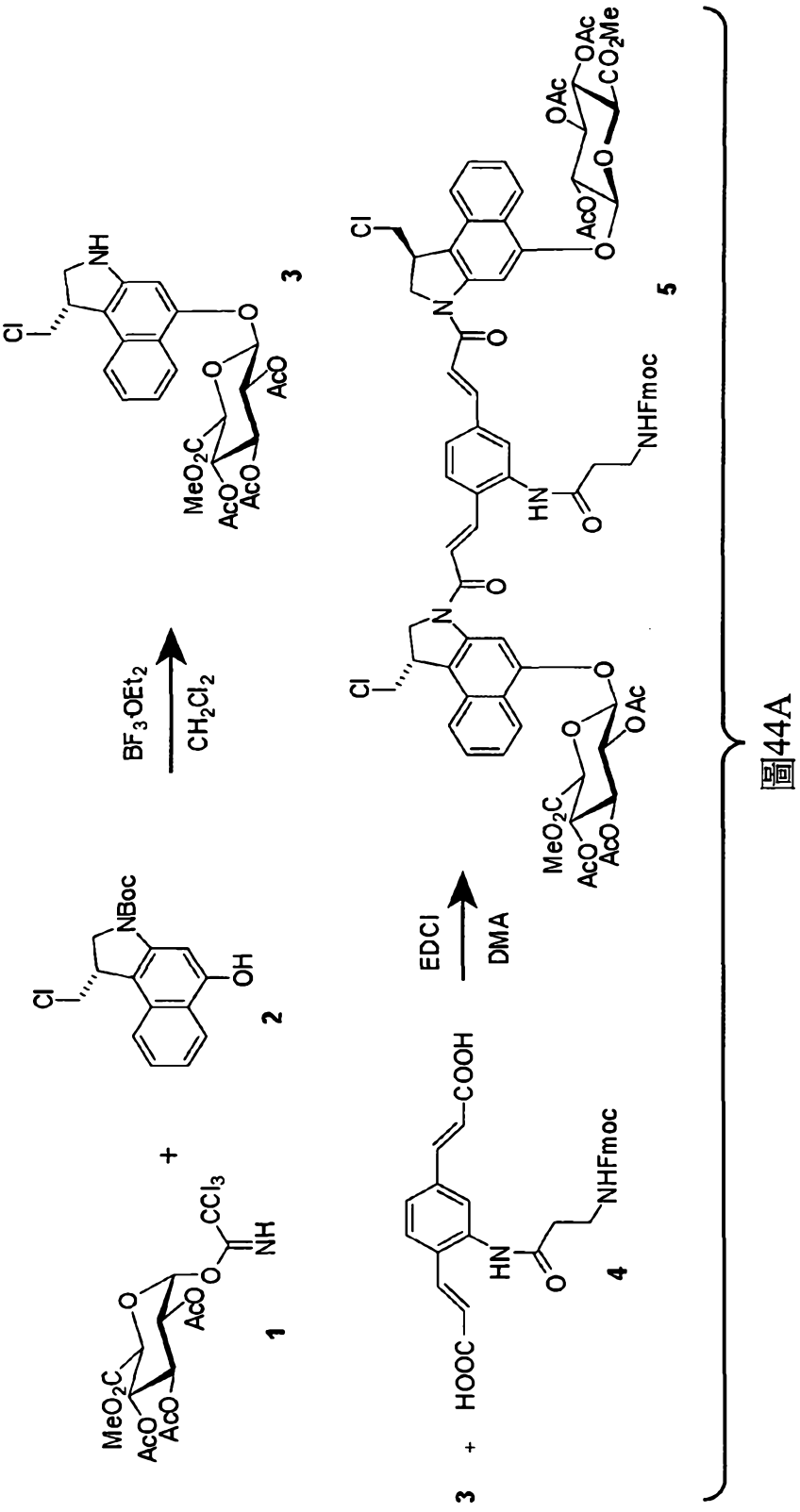


圖44A

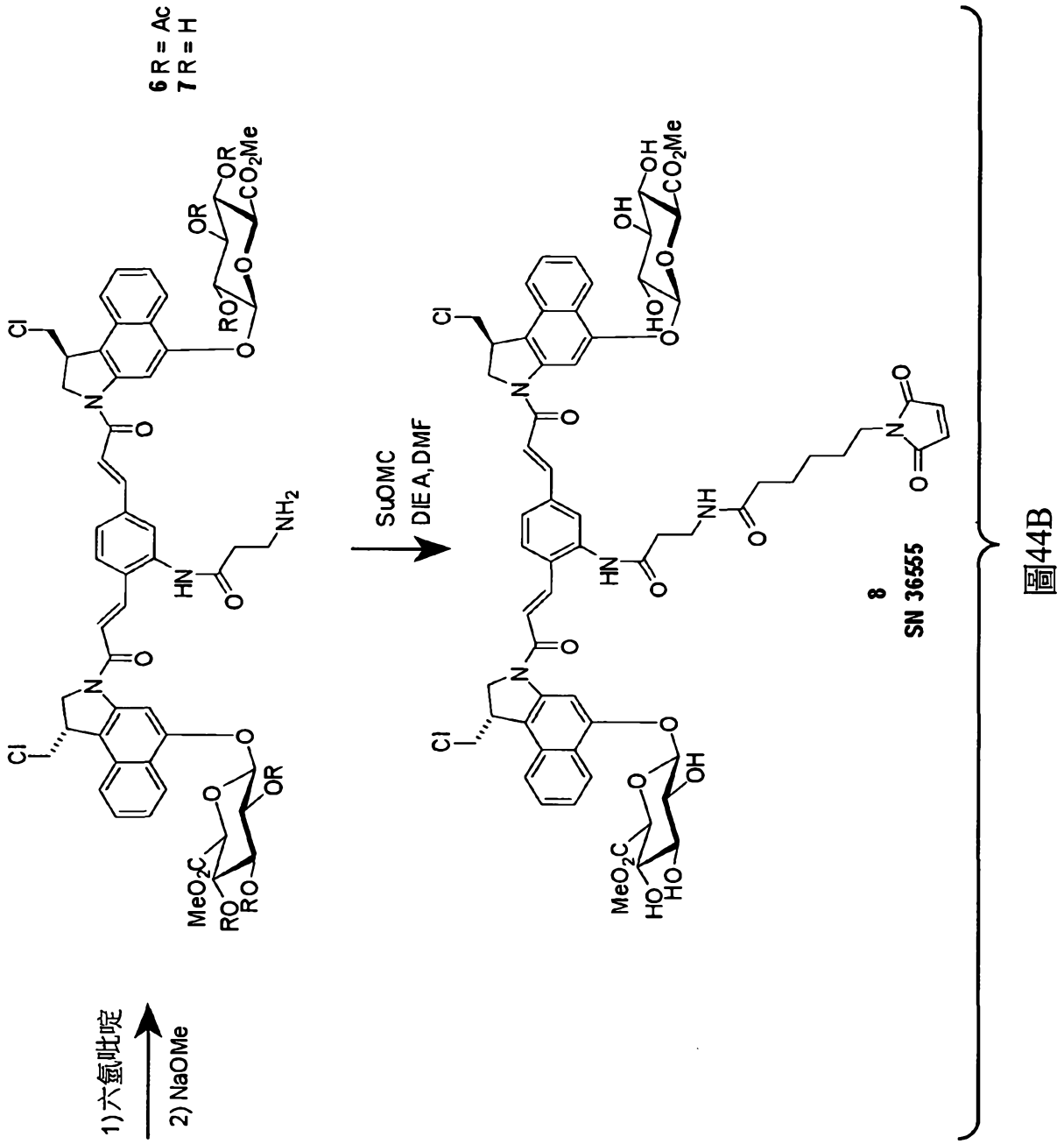


圖44B

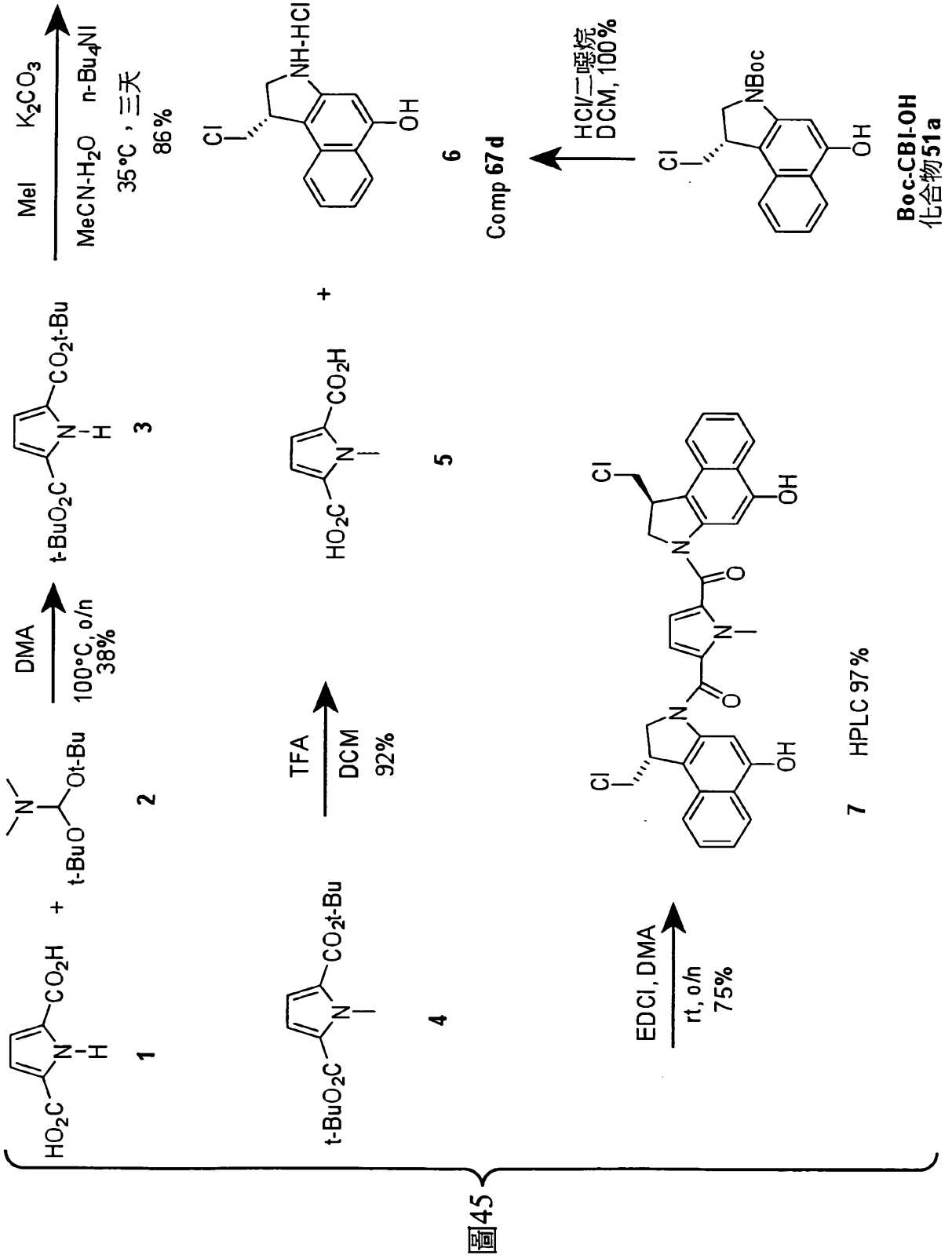

MeI K2CO3
MeCN-H2O n-Bu4NI
35°C，三天
86%
DMA
100°C, o/n
38%
TFA
DCM
92%
EDCI, DMA
rt, o/n
75%
HCl/二噁烷
DCM, 100%
1
2
3
4
5
6
7
Comp 67d
Boc-CBI-OH
化合物51a
HPLC 97%

圖45

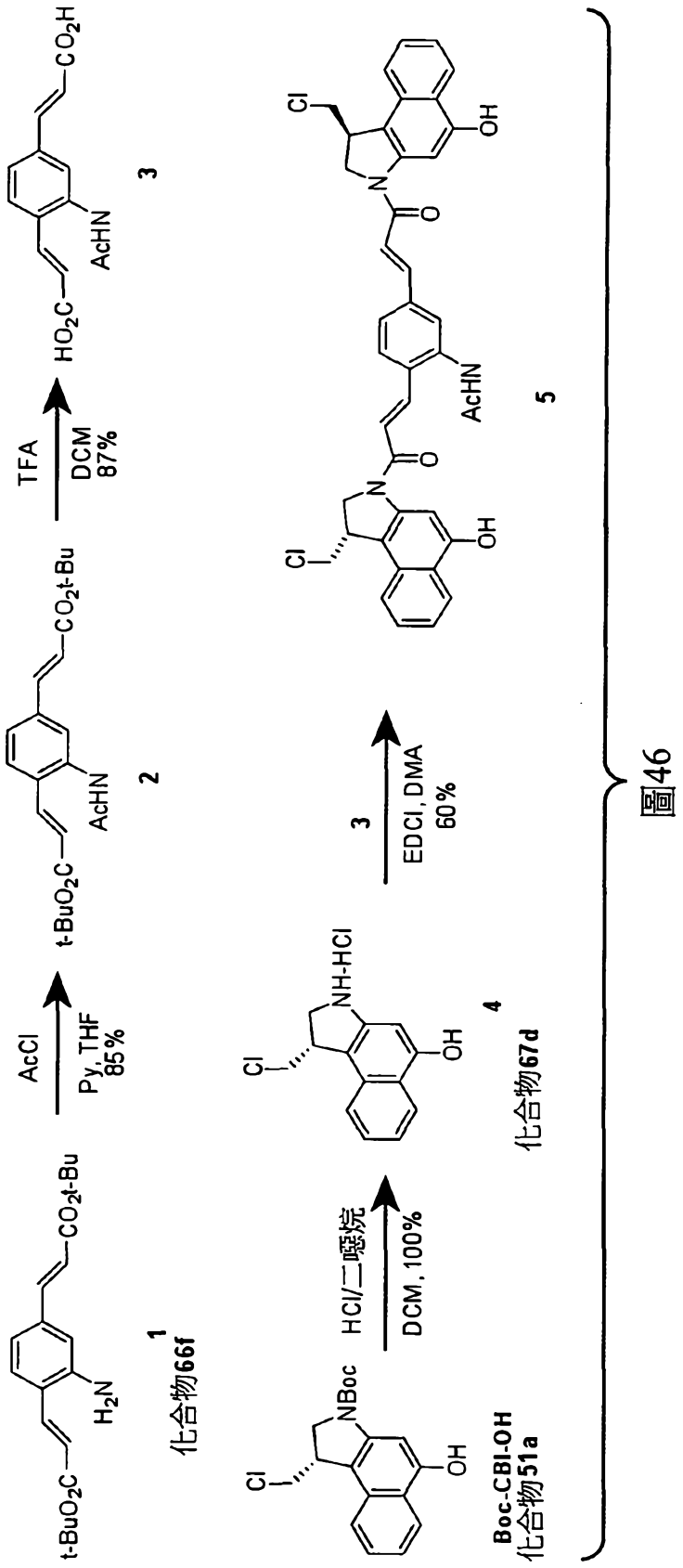

AcCl
Py, THF
85%
TFA
DCM
87%
HCl/二噁烷
DCM, 100%
EDCI, DMA
60%
3
化合物66f
1
2
3
4
5
Boc-CBI-OH
化合物51a
化合物67d

圖46

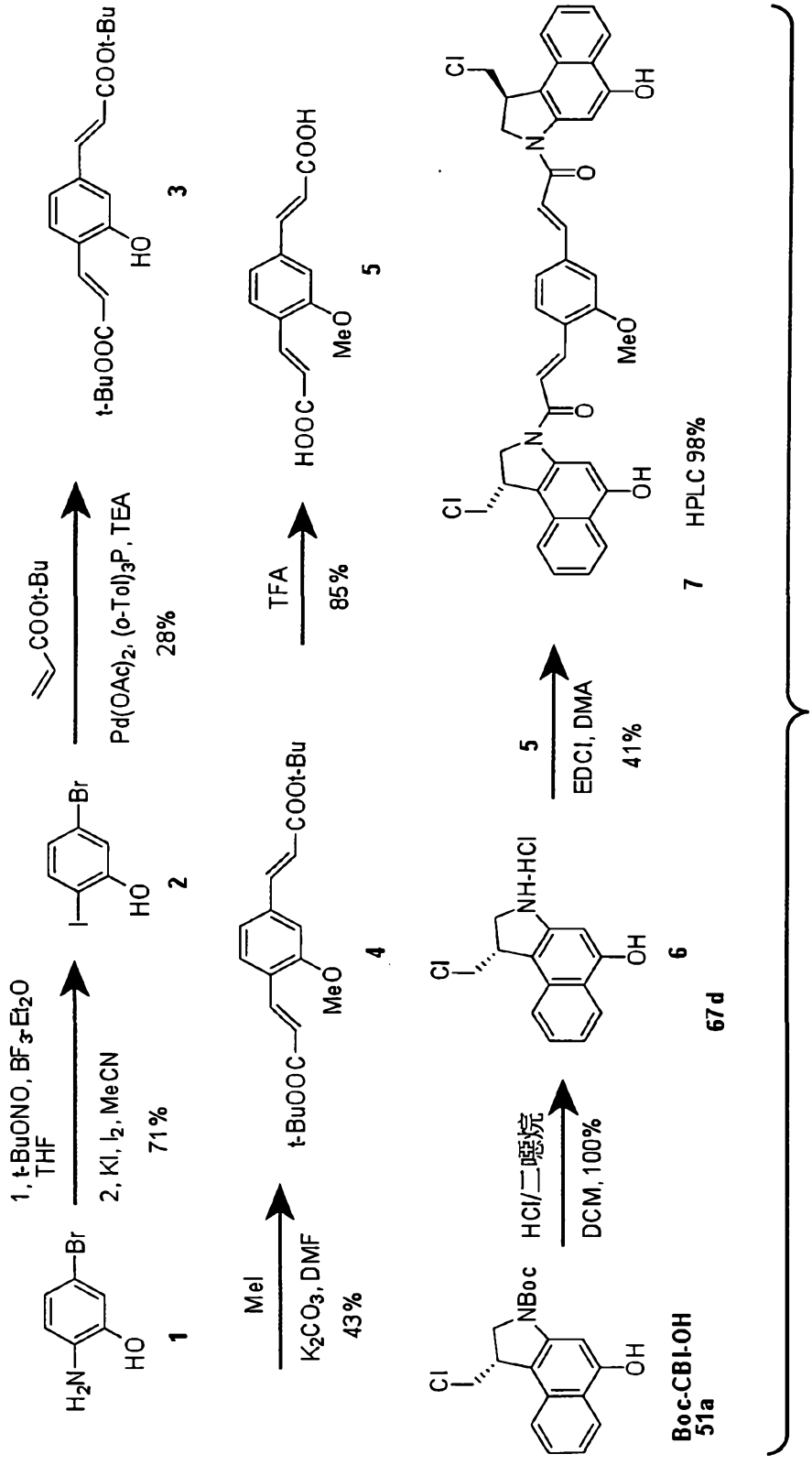

1, t-BuONO, BF3-Et2O
THF
2, KI, I2, MeCN
71%
Pd(OAc)2, (o-Tol)3P, TEA
28%
Mel
K2CO3, DMF
43%
TFA
85%
5
EDCI, DMA
41%
HCl/二噁烷
DCM, 100%
Boc-CBI-OH
51a
67d
7 HPLC 98%

圖47

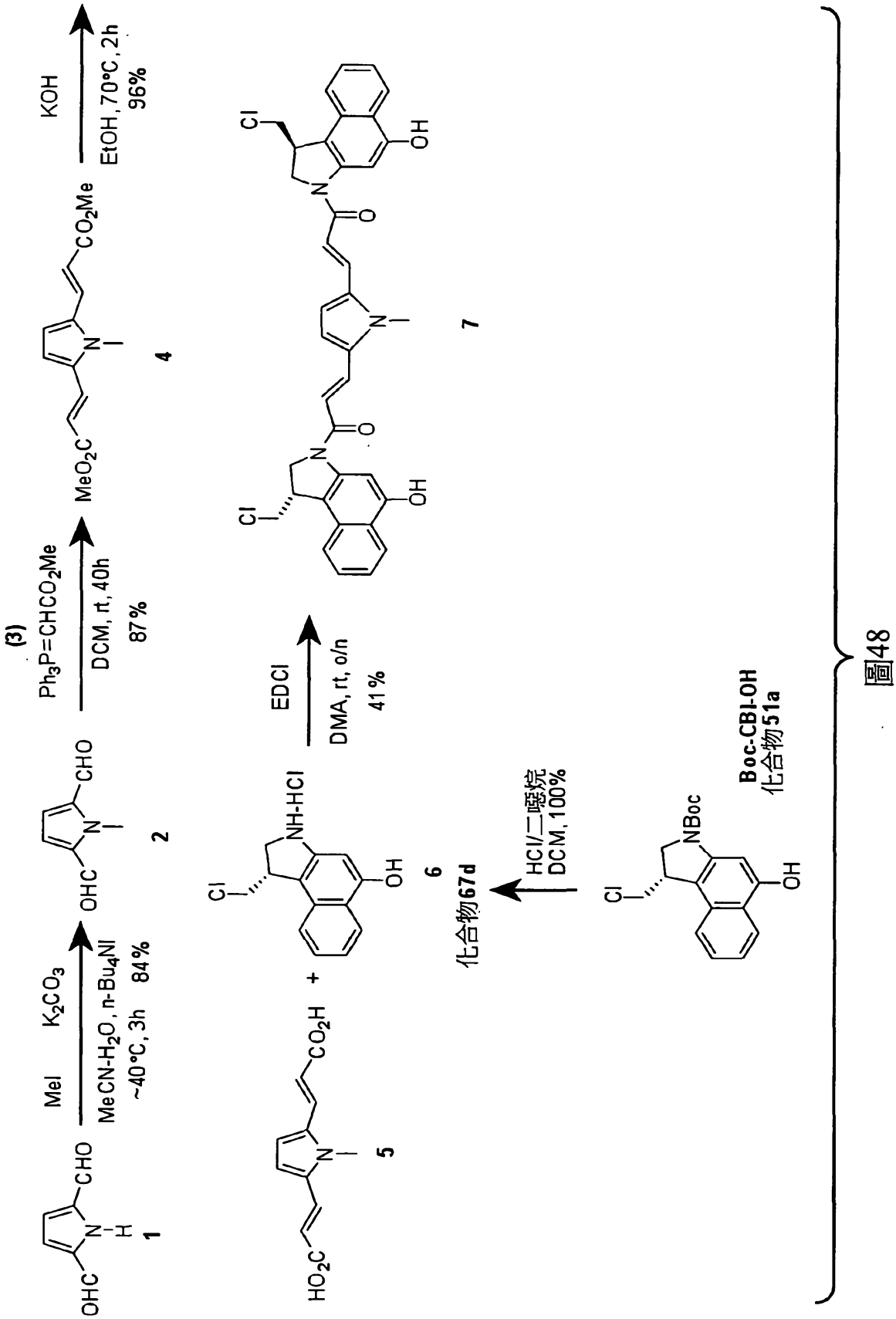

MeI
K2CO3
MeCN-H2O, n-Bu4NI
~40°C, 3h 84%
(3)
Ph3P=CHCO2Me
DCM, rt, 40h
87%
KOH
EtOH, 70°C, 2h
96%
EDCI
DMA, rt, o/n
41%
HCl/二噁烷
DCM, 100%
Boc.CBI-OH
化合物51a
化合物67d

圖48

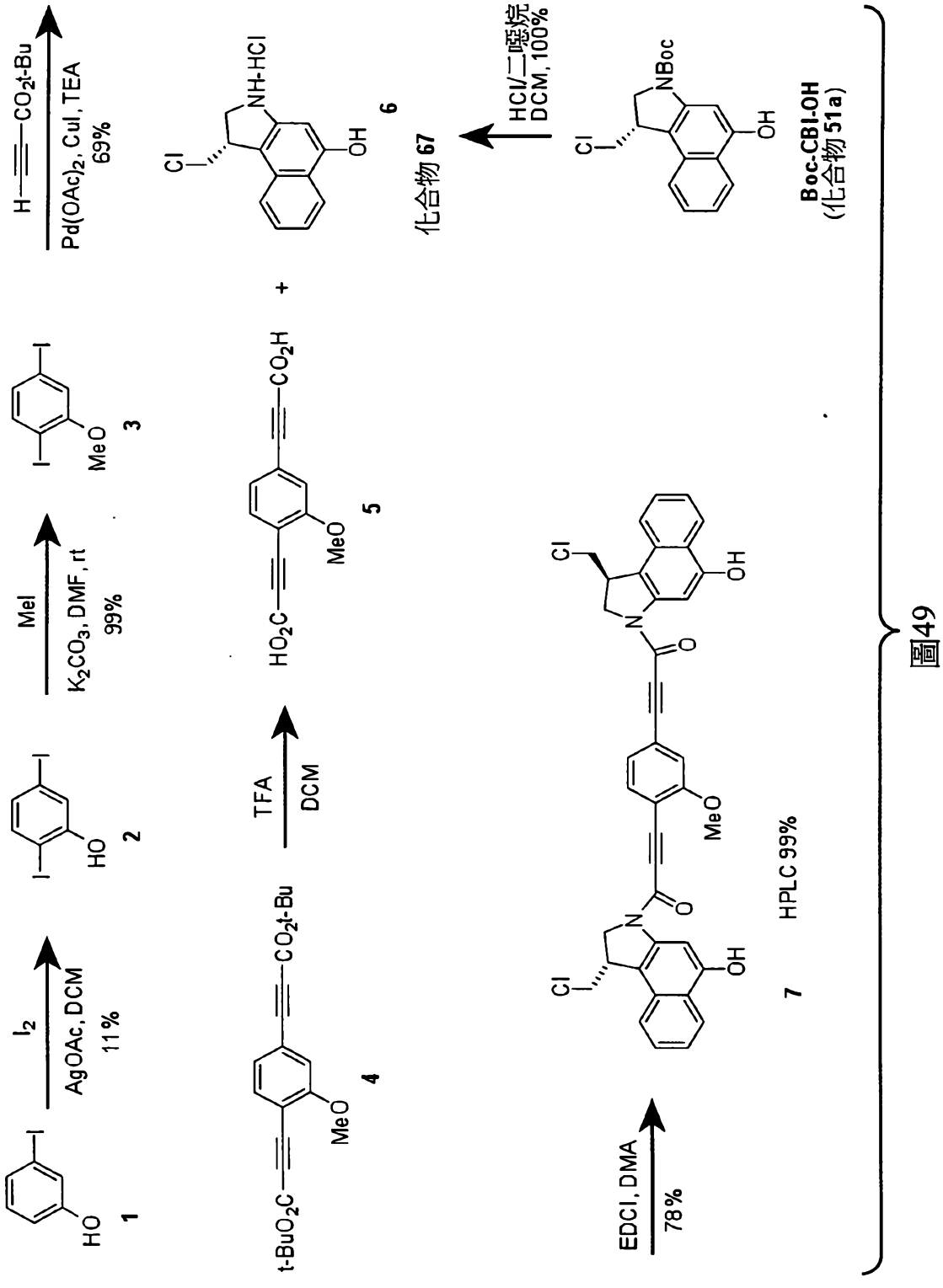

I2
AgOAc, DCM
11%
MeI
K2CO3, DMF, rt
99%
Pd(OAc)2, CuI, TEA
69%
TFA
DCM
HCl/二噁烷
DCM, 100%
EDCI, DMA
78%
HPLC 99%
Boc-CBI-OH
(化合物51a)
化合物67
1
2
3
4
5
6
7

圖49