202506738

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202506738 A

(43)公開日： 中華民國 114 (2025) 年 02 月 16 日

(21)申請案號：113142378 (22)申請日： 中華民國 111 (2022) 年 10 月 28 日

(51)Int. Cl.： *C07K16/28 (2006.01)* *A61K47/68 (2017.01)*
A61K39/395 (2006.01) *A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2021/11/03 世界智慧財產權組織 PCT/CN2021/128453

(71)申請人：中國大陸商杭州多禧生物科技有限公司 (中國大陸) HANGZHOU DAC BIOTECH CO., LTD (CN)
中國大陸

(72)發明人：趙 永新 ZHAO, ROBERT (US) ；楊慶良 YANG, QINGLIANG (CN) ；劉曉磊 LIU, XIAOLEI (CN) ；張齡莉 ZHANG, LINGLI (CN) ；黃圓圓 HUANG, YUANYUAN (CN) ；李雯君 LI, WENJUN (CN) ；葉杭波 YE, HANGBO (CN) ；王娟 WANG, JUAN (CN) ；郭輝輝 GUO, HUIHUI (CN) ；周游 ZHOU, YOU (CN)

(74)代理人：陳長文；王淑靜；呂光

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：7 項 圖式數：27 共 678 頁

(54)名稱

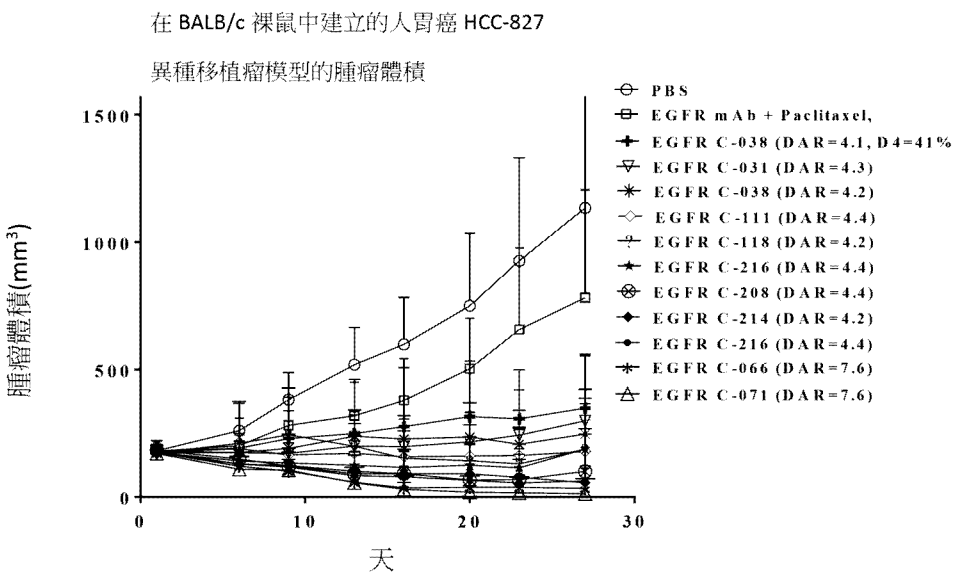
抗體的特異性偶聯

(57)摘要

本發明涉及藉由連接 IgG 抗體或類抗體蛋白重輕鏈之間半胱氨酸位點的製備均一的抗體偶聯物或類抗體蛋白的偶聯物的方法。本發明還涉及以特定方式製備偶聯物的方法，包括生成抗體或類抗體蛋白試劑的特異性巰基，然後與藥物/連接子複合物反應，或生成抗體或類抗體蛋白質試劑的蛋白分子，同時在一鍋中與合成製備的連接子-藥物組裝體反應以提供超過 75%，在大多數情況下超過 80%的有效載荷連接在 IgG 抗體或抗體樣蛋白的重-輕鏈之間的特定半胱氨酸位點的綴合物。它還涉及均一偶聯物在靶向預防或治療癌症、感染和免疫疾病的方法。

The invention relates to a process for preparing a homogeneous conjugate of an antibody or antibody-like protein via linkage of cysteine sites between heavy-light chains in the IgG antibody or antibody-like protein. The present invention also relates to methods of making the conjugates in a specific manner comprising either generation of specific thiols of an antibody or antibody-like protein agent, followed by reaction with drug/linker complexes, or generation of specific thiols of an antibody or antibody-like protein agent and conjugation of a synthetic linker-drug assembly with the thiols simultaneously in one pot reaction, to provide conjugates with over 75%, in most cases more than 80% of payloads linked at the specific cysteine sites between heavy-light chains of the IgG antibody or antibody-like protein. It also relates to methods of using the homogeneous conjugate in targeted prophylaxis or treatment of cancer, infection and immunological disorders.

指定代表圖：


在 BALB/c 裸鼠中建立的人胃癌 HCC-827
異種移植瘤模型的腫瘤體積
腫瘤體積(mm3)
1500
1000
500
0
0
10
20
30
天
PBS
EGFR mAb + Paclitaxel,
EGFR C-038 (DAR=4.1, D4=41%
EGFR C-031 (DAR=4.3)
EGFR C-038 (DAR=4.2)
EGFR C-111 (DAR=4.4)
EGFR C-118 (DAR=4.2)
EGFR C-216 (DAR=4.4)
EGFR C-208 (DAR=4.4)
EGFR C-214 (DAR=4.2)
EGFR C-216 (DAR=4.4)
EGFR C-066 (DAR=7.6)
EGFR C-071 (DAR=7.6)

【圖 25】

20250715
2025070715
專利案號：113142378
原申請案號：111141166

【發明摘要】

【中文發明名稱】

抗體的特異性偶聯

【英文發明名稱】

SPECIFIC CONJUGATION OF AN ANTIBODY

【中文】

本發明涉及藉由連接IgG抗體或類抗體蛋白重輕鏈之間半胱氨酸位點的製備均一的抗體偶聯物或類抗體蛋白的偶聯物的方法。本發明還涉及以特定方式製備偶聯物的方法，包括生成抗體或類抗體蛋白試劑的特異性巯基，然後與藥物/連接子複合物反應，或生成抗體或類抗體蛋白質試劑的蛋白分子，同時在一鍋中與合成製備的連接子-藥物組裝體反應以提供超過75%，在大多數情況下超過80%的有效載荷連接在IgG抗體或抗體樣蛋白的重-輕鏈之間的特定半胱氨酸位點的綴合物。它還涉及均一偶聯物在靶向預防或治療癌症、感染和免疫疾病的方法。

【英文】

The invention relates to a process for preparing a homogeneous conjugate of an antibody or antibody-like protein via linkage of cysteine sites between heavy-light chains in the IgG antibody or antibody-like protein. The present invention also relates to methods of making the conjugates in a specific manner comprising either generation of specific thiols of an antibody or antibody-like protein agent, followed by reaction with drug/linker complexes, or generation of specific thiols of an antibody or antibody-like protein agent and conjugation of a synthetic

linker-drug assembly with the thiols simultaneously in one pot reaction, to provide conjugates with over 75%, in most cases more than 80% of payloads linked at the specific cysteine sites between heavy-light chains of the IgG antibody or antibody-like protein. It also relates to methods of using the homogeneous conjugate in targeted prophylaxis or treatment of cancer, infection and immunological disorders.

【指定代表圖】

圖25

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

抗體的特異性偶聯

【英文發明名稱】

SPECIFIC CONJUGATION OF AN ANTIBODY

【技術領域】

【0001】 本發明涉及藉由連接抗體中某些半胱氨酸位點的硫基製備均一的抗體偶聯物或類抗體蛋白分子/試劑的偶聯物的方法。本發明還涉及以特定方式製備偶聯物的方法，包括生成抗體或類抗體蛋白試劑的特異性巯基，然後與藥物/連接子複合物反應，或生成抗體或類抗體蛋白質試劑的特異性巯基，同時在一鍋中與合成製備的連接子-藥物組裝體反應。它還涉及均一偶聯物在靶向預防或治療癌症、感染和免疫疾病的方法。

【先前技術】

【0002】 如今，ADC 的發展步伐正在加快，過去 5 年的臨床試驗數量增加了三倍多，12 個上市 ADC 中有 7 個在過去 2 年中，獲得了美國 FDA 的批准，凸顯了對這種變革性癌症治療方法的熱情。藉由連接子將有效載荷和抗體偶聯是決定 ADC 品質、安全性、療效和整體成功的關鍵方面（M. Acchione、H. Kwon 等人，2012，mAbs 4：3，362-372；M. J. Birrer，K. N. Moore 等人，2019，J. National Cancer Inst.，111（6），538-549）。美國 FDA 發佈的一份報告指出，對於目前處於臨床開發階段的大多數 ADC，劑量限制性毒性 （DLT） 似乎與靶向抗原無關，而是由有效載荷/連接子複合物有關（H. Saber 和 J. K. Leighton，Regulatory Toxicology and Pharmacology 71 （2015） 444–452）；眾

所周知，ADC 的連接子和偶聯位點對 ADC在製備和儲存過程中的穩定性，以及體內血液迴圈中的毒性強弱，也起重要作用（J. R. McCombs 和 S. C. Owen，2015，AAPS Journal 17，339– 351）。

【0003】 因此，現在對 ADC 化學和設計的研究和發展方向之一就是擴展連接子-有效載荷和偶聯化學，以解決 ADC 對目標疾病的劑量限制性毒性 （DLT） 問題（Lambert，J. M. 2016，Ther. Deliv. 7，279-82；Zhao，R. Y. 等人，2011，J. Med. Chem. 54，3606-23）。目前，為擴展 ADC 治療視窗 （TW），主要的研發工作集中在開發新型的可靠的定點ADC偶聯方法，獲得的ADC似乎具有迴圈半衰期更長，療效更高，更能降低脫靶毒性，更優的體內藥代動力學（PK），生產工藝批間一致性更好等特性（Hussain，A. F.，等，Pharmaceuticals （Basel），2021，14（4），343；Sadiki，A.，等，Antib Ther. 2020，3（4），271-284；Wolska-Washer，A.；Robak，T.，Drug Saf，2019，42（2），295-314；Tsuchikama，K.，An，Z.，Protein Cell. 2018，9（1），33-46；Thomas，A.等，Lancet Oncol. 2016，17（6），e254-e262；Strop，P.，等 2013 Chem. Biol. 20，161−67；Wakankar，A. mAbs，2011，3，161–172；Zhao，R. Y.等，2011，J. Med. Chem. 54，3606-23）。

【0004】 近年來開發了幾種用於定點偶聯製備ADC的方法，（Panowski，S，2014，mAbs 6，34）。它們包括在抗體上引入未配對的半胱氨酸，例如經改造的反應性半胱氨酸殘基，即Genentech 的 THIOMAB 技術（Junutula，J. R.，等 2010 Clin. Cancer Res. 16，4769；Junutula，J. R.，等 2008 Nat Biotechnol. 26，925-32；美國專利

8,309,300；7,855,275；7,521,541；7,723,485，WO2008/141044），用茂原鏈輪絲菌轉穀氨醯胺酶引入穀氨醯胺標籤（mTG）（Strop，P.，*Bioconjugate Chem.*，**2014**，*25*，855–862；Strop，P.，等.，2013，Chem. Biol. 20，161–167；美國專利 8,871,908，專利權人 Rinat-Pfizer）或是用微生物轉穀氨醯胺酶（MTGase）引入（Dennler，P.，等，2014，Bioconjug. Chem. 25，569–578. 美國專利申請20130189287 Innate Pharma；美國專利7,893,019 Bio-Ker S.r.l.（IT）），引入硫代海藻糖（Okeley，N. M.，等 2013 Bioconjugate Chem. 24，1650），藉由 突變誘發引入非天然胺基酸（Axup，J.Y.，等，2012，Proc. Natl. Acad. Sci. 109，16101–16106；Zimmerman，E.S.，等，2014，Bioconjug. Chem. 25，351–361；Wu，P.，等，2009 Proc. Natl. Acad. Sci. 106，3000-5；Rabuka，D.，等，2012 Nat. Protoc. 7，1052–67；美國專利 8,778,631 和 美國專利申請 20100184135，WO2010/081110，申請人 Sutro Biopharma；WO2006/069246，2007/059312，美國專利 7,332,571，7,696,312，和 7,638,299，專利權人，Ambrx；WO2007/130453，美國專利 7,632,492 和 7,829,659，專利權人 Allozyne），引入硒代半胱氨酸（Hofer，T.，等 2009，Biochemistry 48，12047–12057；美國專利 8,916,159，專利權人 US National Cancer Institute），使用甲醯甘氨酸生成酶（FGE）將位於 CXPXR 共有序列中的半胱氨酸轉化為甲醯甘氨酸（FGly）（Drake，P.M.，等，2014，Bioconjug. Chem. 25，1331–1341；Carrico，I. S. 等 7,985,783；8,097,701；8,349,910，和 美國專利申請 20140141025，20100210543，申請人Redwood Bioscience）；使用半乳糖基和唾液酸轉移酶通，過糖工

程引入唾液酸（Zhou，Q.，等 2014，*Bioconjug.Chem.*，25，510-520，美國專利申請 20140294867，申請人 Sanofi-Genzyme）；引入賴氨酸的環丙烯衍生物，然後與四嗪衍生物進行 Diels-Alder 環加成反應，產生 1,4-二氫噠嗪 （Oller-Salvia，B.等，2018 Angew Chem Int Ed Engl，57，2831-2834）。

【0005】 然而，上述方法均需要對抗體進行工程改造和重新優化細胞培養條件，通常還有蛋白表達低、偶聯產量低或偶聯位點有限等問題。因此，研究者開發了藉由重新橋接天然抗體鏈間二硫鍵的簡單的均一偶聯方法，例如使用溴或二溴馬來醯亞胺連接子（下一代馬來醯亞胺，NGM）（Schumacher，F.F.，等 2014，Org. Biomol. Chem. 12，7261–69；UCL Cancer Institute），或使用二溴嘧啶二酮 （A. Maruani，等，Nat. Commun.，2015，6，6645；M. T. Lee，等，Chem. Sci.，2017，8，2056），或三碳橋的雙烷基化試劑 （Badescu，G.，等，2014，Bioconjug. Chem. 25，1124–36；WO2013/190272，WO2014/064424，申請人PolyTherics Ltd），或藉由亞芳基二丙腈 （ADPN） 分子（Koniev，O.，等，2018 MedChemComm. 2018，9，827-830）。最近，Coumans 等人使用 2-（二苯基磷基）-苯磺酸 （diPPBS） 作為還原劑，可以僅還原工程化的半胱氨酸而不破壞抗體中的鏈間二硫鍵，用於製備 ADC（R. G. E. Coumans，等，Bioconjugate Chem. 2020，31，2136−2146）。Wuxi Biologics Co.，應用 Zn^{2+} 離子（$ZnCl_2$緩衝液）控制抗體中的胱氨酸選擇性還原，然後與含有馬來醯亞胺連接子的有效負載反應以提高 ADC 生產的均一性（PCT/CN2020/075162）。然而，大多數抗體儲存在基於磷酸鹽的緩衝液中，例如 PBS 緩衝液，鋅陽離子在磷酸

鹽緩衝液中會迅速沉澱形成磷酸鋅，因為磷酸鋅在中性或鹼性 pH 條件下的溶解度常數為 9.1 x 10^{-33}（Martin，R. Bruce. “Solubility and Solubility Products（about J. Chem. Educ. 1998，75，1179-1181 and J. Chem. Educ. 1998，75，1182-1185）”*J. Chem. Educ.* **2000**，*77*，1558；Dupuis，V.，等，1992，Biomaterials，13（7），467-470；https/www.chm.uri.edu/weuler/chm112/refmater /KspTable.html）。因此，當在還原抗體時使用 $ZnCl_2$，必須精確控制磷酸根陰離子的量和緩衝液的 pH 值，以避免形成磷酸鋅沉澱。

【0006】吾人曾經公開了幾種將天然抗體鏈間二硫化物被還原產生的一對巯基重新橋接的偶聯方法，例如使用溴馬來醯亞胺和二溴馬來醯亞胺連接子（WO2014/009774），2,3-二取代琥珀酸/2-單取代/2,3-二取代富馬酸或馬來酸連接子（WO2015/155753，WO2016/596228），乙炔二羧基連接子（WO2015/151080，WO2016/596228），肼連接子（WO2015/151081）和丙烯醯基或丙醯基連接子（WO2018/086139）。在本專利申請中，吾人擴展了早期專利申請中製備均一偶聯物方法的範疇，在鋅胺基錯合物/螯合物配位作用下控制抗體鏈間二硫鍵選擇性的還原，然後進行偶聯或同時偶聯。與$ZnCl_2$相比，鋅胺基配合物在抗體中二硫鍵被配位還原時具有更多優勢。首先，鋅胺基錯合物比 $ZnCl_2$ 體積大得多，可以更有3D空間選擇性地插入某些位置（更具體地，如插入 IgG1 抗體的重輕鏈之間的二硫鍵位置）；其次，鋅胺基錯合物在水基溶液中更穩定，例如，鋅氨錯合物離子的穩定常數為 2.9 x 10^9（https：//chempedia. info/info/stability_constants/），因而會減緩在中性 pH 磷酸鹽緩衝液中沉澱。更重要的是，使用鋅胺基配合物以化學計量比例還原

IgG 抗體輕鏈和重鏈之間二硫鍵，而不還原抗體重鏈（在鉸鏈區）之間的二硫鍵，可以實現輕重鏈鏈間兩個相鄰巰基的雙烷基化。吾人之前的資料（WO2016/059622） 和其他研究結果 （S. Shao，等，Bioorg Med Chem Lett. 2018，28，1363） 均證明了雙烷基化更容易在鉸鏈區重鏈鏈內方式進行，而不是在鏈間二硫鍵之間偶聯。總之，本發明的偶聯方法生產工藝穩健，能高產率獲得均一的偶聯物，無需抗體工程改造，解決了目前ADC製備方法中的一個短板。這種偶聯方法也可以直接應用於其它類抗體蛋白質。與傳統異質 ADC 相比，所得的均一 ADC 顯示出良好的藥代動力學特徵，更優的療效和更低的體內毒性。

【發明內容】

【0007】 本發明提供一種將抗體偶聯物或類抗體蛋白偶聯物的，特別是抗體-藥物偶聯物（ADC）的均一性提高的偶聯方法，其中超過75%的有效載荷（藥物）特異性結合至抗體的重輕鏈之間二硫鍵位點。

【0008】 這種均一偶聯包括以下三個關鍵步驟：

（a）在包含有效量的過渡金屬陽離子-胺基螯合物/錯合物 （$M(NR_1R_2R_3)_{m1}^{m2+}$） 和還原劑（例如三（2-羧乙基）膦 （TCEP）） 存在的緩衝體系（例如 PBS、Mes、Bis-Tris、Bis-Tris 丙烷、Pipes、Aces、Mopso、Bes、Mops、Hepes、Tes、Pipps、Dipso、Tapso、Heppso、Tris-up、Tris-HCl 、Tricine、Hepps、Gly-Gly、Bicine、Taps、Hepee、Acetates、Histidine、Citrates、MES 或 Borates 等）中，孵育類抗體蛋白，特別是 IgG 抗體，選擇性地還原抗體或類抗體蛋白的鏈間二硫鍵，產生巰基；

（b）加入有效量的帶有巰基反應基團的連接子，或有效負載/連接子

複合物/組合物（例如，含有馬來醯亞胺末端的藥物），與步驟（a）產生的巯基反應；和

（c）加入有效量的氧化劑（例如脫氫抗壞血酸（DHAA））以重新氧化未反應的巯基，然後純化所得偶聯物；

（d）步驟（c）也可以被替換為：加入有效量的胱氨酸或相關二硫化合物以淬滅未反應的還原劑，同時胱氨酸被還原產生半胱氨酸，可以淬滅含有巯基反應基團（例如馬來醯亞胺）的過量連接子或連接子/有效負載複合物。

過渡金屬陽離子-胺基螯合物/錯合物，$M(NR_1R_2R_3)_{m1}^{m2+}$，其中M選自由下列組成之群組但不限於Zn^{2+}、Cu^{2+}、Fe^{2+}、Cd^{2+}、Ni^{2+}、Cr^{2+}、Cr^{3+}、Ti^{2+}、Ti^{3+}、Co^{2+}、Mn^{2+}、Mn^{3+}、Ag^{+}、Hg^{2+}，其中R_1、R_2和R_3獨立地選自由下列組成之群組C_1-C_8烷基、C_2-C_8的雜烷基、烷基環烷基、雜環烷基、C_3-C_8的芳基、芳基-烷基、雜環、碳環、環烷基、雜烷基環烷基、烷基羰基、雜芳基；m1選自由下列組成之群組1、2、3、4、5、6、7或8；m2選自由下列組成之群組1、2、3、4、5或6；較佳M為Zn，m1 為1、2、3 或 4；m2 為 1、2、3 或 4。

【0009】 此外，$(NR_1R_2R_3)_{m1}$可以形成二聚體、三聚體、四聚體、五聚體或六聚體，這些聚合物在N、R_1、R_2和R_3之間共價連接；N、R_1、R_2或R_3本身可以形成雜環、碳環、二雜環或二碳環。

【0010】 步驟（a） 中使用的過渡金屬陽離子-胺基螯合物/錯合物 M $(NR_1R_2R_3)_{m1}^{m2+}$ 的濃度為 0.01 mM – 1.0 mM，或0.5~20蛋白質摩爾當量，可溶解在水溶性有機溶劑，選自由下列組成之群組乙醇、甲醇、丙醇、丙二醇、DMA、DMF、DMSO、THF、CH_3CN，再加入到反應體

系中。

【0011】 還原劑是有機膦，較佳為三（2-羧乙基）膦（TECP）或三（羥丙基）膦，其在反應溶液中的濃度為0.02 mM-1.0 mM，或1.0-20 蛋白質摩爾當量。步驟（c）中加入的氧化劑可以是DHAA、Fe^{3+}、I_2、Cu^{2+}、Mn^{3+}、MnO_2、或Fe^{3+}/I^-的混合物。反應溶液中所用氧化劑的濃度為0.02 mM -1.0 mM，或1 -100的蛋白質摩爾當量。偶聯反應的較佳pH通常在約5.0至8.0之間，更較佳為約5.5至7.5。偶聯反應的較佳溫度通常為約-5至約40℃，更佳為約0至37℃；最佳為約2至8℃。偶聯反應的較佳時間通常為約15分鐘至約48小時，更佳為約30分鐘至隔夜（10～16小時）。最佳反應條件（例如 pH、溫度、緩衝液、反應物濃度）當然具體取決於所使用的類抗體蛋白、有效負載/連接子複合物、還原劑和/或 $M(NR_1R_2R_3)_{m1}^{m2+}$。

【0012】 偶聯過程中的抗體或類抗體蛋白可以是任何類型的抗體或蛋白，只要蛋白中含有兩個或多個在被還原時能被區分的二硫鍵即可。有效負載/連接子複合物可以是任何類型或形式，只要它包含一個巰基反應基團即可。

【0013】 總之，藉由本發明的方法製備的ADC，超過80%的有效載荷偶聯在抗體的Fab區域中，而習知方法中約40%的有效載荷在抗體的Fab區域中，使用 WO2020164561 的方法，約 70% 的有效載荷位於抗體的Fab 區域。從以下實施例、實驗和附圖的詳細描述中，本發明以及改進的偶聯工藝對於提高ADC均一性的優點將變得更加明顯。

【圖式簡單說明】

【0014】

圖 1a至1c. 鋅胺基錯合物配合抗體中二硫鍵還原的建議機理。

圖 2. N-去糖基化和還原後 ADC 的中等水準表徵。（a） 去糖基化和 DTT 還原後獲得的 ADC 片段的 rpHPLC 層析圖。連接有零個或一個藥物分子的輕鏈 （LC）（L0 和 L1），以及連接有零個、一個、兩個或三個藥物分子的重鏈（H0、H1、H2 和 H3）。（b） 表格總結了不同 ADC 片段的品質和比例以及從峰面積量測的平均 DAR。結果表明，有效載荷主要結合在輕重鏈之間的位點。

圖 3. 載有藥物/連接子 （C-408b） 的肽的 MS 和 MS/MS 譜圖。（a） [GEC] + 1 個有效載荷，（b） [SCDK] + 1 個有效載荷，表明有效載荷主要在輕重鏈之間的位點偶聯。

圖 4. UPLC-MS 分析的BCMA 偶聯物 C-408b 經過水解酶水解產生載藥肽百分比。（a）輕鏈 （LC） 肽 [GEC]連接了零個或一個藥物分子（D0 和 D1），（b）重鏈 （HC） 肽 [SCDK]臂上的連接零個或一個藥物分子（D0 和 D1），（c） HC 肽 [THTCPPCPAPELLXXXXXXXXXXXXXX XX] 在鉸鏈處連接了零個、一個或兩個藥物分子（D0、D1 和 D2）。（這裡的 X 指胺基酸，將在單獨的專利申請中公開）。結果表明，有效載荷主要（超過 85%）在抗體輕重鏈之間的半胱氨酸位點偶聯。

圖 5. BCMA 抗體與C-406偶聯物的HIC-HPLC 分析，習知偶聯工藝製備（無鋅胺基錯合物，2.2 ~ 4.0 當量的TCEP，pH 7.0 ~7.2）。（5a）：室溫，6.0當量的 化合物 406，4小時偶聯，DAR = 4.0，D4 =41.96%；（5b）： 4 ± 2 °C，6.0當量的化合物 406，5小時偶聯，DAR = 4.2，D4 =47.16%；（5c）：4 ± 2 °C，6.5當量的化合物406，5小時偶

聯，DAR=5.1，D4 =40.03%。

圖6. BCMA抗體與C-406偶聯物的HIC-HPLC分析，製備過程使用了2.0~2.4當量的氯化鋅，pH=7.2，4±2 °C，持續15±2小時。（6a）：2.0當量的$ZnCl_2$，4.0當量的 TCEP，6.0當量的化合物406，DAR=4.2，D4=68.15%；（6b）：2.2當量的$ZnCl_2$，4.0當量的 TCEP，6.5當量的化合物406，DAR=4.7，D4=68.39%；（6c）：2.4當量的$ZnCl_2$，3.5當量的TCEP，6.5當量的化合物406，DAR=4.6，D4=62.53%；（6d）：2.4當量的$ZnCl_2$，4.0當量 的TCEP，6.5當量的化合物406，DAR=5.1，D4=65.16%。

圖7. BCMA抗體與C-406偶聯物的HIC-HPLC分析，製備過程使用了2.4當量的 Z-11，4.0當量TCEP，6.5當量的化合物406，pH=7.2，4±2℃，5小時，DAR=4.6，D4=79.81%。

圖8. EGFR抗體與C-038偶聯物的HIC-HPLC分析，製備過程使用了2.4當量的 Z-28，3.6當量的TCEP，6.0當量的化合物038，pH=7.2，4±2℃，5小時，DAR=4.2，D4=79.68%。

圖9. EGFR抗體與C-111偶聯物的HIC-HPLC分析，製備過程使用了2.4當量的 Z-28，3.4當量的 TCEP，6.0當量的化合物111，pH=7.2，4±2℃，5小時，DAR=4.4，D4=80.39%。

圖10. EGFR抗體與C-226的偶聯物的HIC-HPLC分析，製備過程使用了2.4當量的 Z-28，3.4當量的 TCEP，6.0當量的 化合物226，pH=7.2，4±2℃，5小時，DAR=4.4，D4=77.94%

圖11. EGFR抗體與C-227的偶聯物的HIC-HPLC分析，製備過程使用了2.4當量的 Z-28，3.4當量的TCEP，6.0當量的化合物038，pH=7.2，

4±2℃，5小時，DAR=4.0，D4=78.73%。

圖12. BCMA抗體與C-325偶聯物的HIC-HPLC分析，製備過程使用了2.4當量的 Z-28，3.6當量的 TCEP，6.0當量的化合物325，pH=7.2，4±2℃，5小時，DAR=4.1，D4=80.11%。

圖13. Trop2抗體與C-334偶聯物的HIC-HPLC分析，製備過程使用了2.4當量的Z-28，3.6當量的 TCEP，6.0當量的化合物334，pH=7.2，4±2℃，5小時，DAR=4.2，D4=81.15%。

圖14. Her2抗體與C-334偶聯物的HIC-HPLC分析，製備過程使用了2.4當量的 Z-28，3.6當量的TCEP，6.0當量的化合物334，pH=7.2，4±2℃，5小時，DAR=4.4，D4=80.82%。

圖15. CD33抗體與C-334偶聯物的HIC-HPLC分析，製備過程使用了2.4當量的 Z-28，3.6當量的 TCEP，6.0當量的化合物334，pH=7.2，4±2℃，5小時，DAR=4.4，D4=79.93%。

圖16. EGFR抗體與C-379偶聯物的HIC-HPLC分析，製備過程使用了2.4當量的 Z-28，3.6當量的 TCEP，6.0當量的化合物379，pH=7.2，4±2℃，5小時，DAR=4.4，D4=79.02%。

圖17. EGFR抗體與C-385偶聯物的HIC-HPLC分析，製備過程使用了2.2當量的 Z-21，3.6當量的 TCEP，6.0當量的化合物385，pH=7.2，4±2℃，5小時，DAR=3.8，D4=69.54%。

圖18. EGFR抗體與C-387偶聯物的HIC-HPLC分析，製備過程使用了2.2當量的Z-21，3.6當量的TCEP，6.0當量的化合物387，pH=7.2，4±2℃，5小時，DAR=4.1，D4=77.25%。

圖19. CD33抗體與C-413d偶聯物的HIC-HPLC分析，製備過程使用

了2.2當量的 Z-21，3.6當量的 TCEP，6.0當量的化合物413d，pH=7.2，4±2℃，5小時，DAR=4.1，D4=76.70%。

圖20. EGFR抗體與C-422a偶聯物的HIC-HPLC分析，製備過程使用了2.2當量的 Z-21，3.4當量的 TCEP，6.0當量的化合物422a，pH=7.2，4±2℃，5小時，DAR=4.2，D4=76.58%。

圖21. EGFR抗體與C-431a偶聯物的HIC-HPLC分析，製備過程使用了2.2當量的 Z-21，3.6當量的 TCEP，6.0當量的化合物431a，pH=7.2，4±2℃，5小時，DAR=4.1，D4=77.97%。

圖22. Her2抗體與C-431a偶聯物的HIC-HPLC分析，製備過程使用了2.2當量 Z-21，3.6當量 TCEP，6.0當量化合物431a，pH=7.2，4±2℃，5小時，DAR=4.2，D4=79.44%。

圖23. Steap1抗體與C-412c偶聯物的HIC-HPLC分析，製備過程使用了2.2當量的 Z-21，3.6當量的TCEP，6.0當量的化合物412c，pH=7.2，4±2℃，5小時，DAR=4.4，D4=80.01%。

圖24. Steap1抗體與C-428c偶聯物的HIC-HPLC分析，製備過程使用了2.2當量的 Z-21，3.6當量的 TCEP，6.0當量的化合物428c，pH=7.2，4±2℃，5小時，DAR=4.4，D4=79.83%。

圖25. 顯示了藉由本專利申請的方法製備的EGFR抗體與C-031、C-038、C-066、C-071、C-093、C-111、C-118、C-208、C-214和C-216的偶聯物（除C-066和C-071具有D8>75%外，所有D4>75%），以及紫杉醇加EGFR裸抗，習知偶聯的方法製備的D4=41% C-038偶聯物和PBS緩衝液，在人肺腺癌HCC-827細胞模型上的抗腫瘤效果的比較，劑量為6mg/kg，靜脈一次注射。該圖表明，所有10種偶聯物具有比紫杉醇加

EGFR裸抗更好的抗腫瘤活性（6mg/kg EGFR抗體和10mg/kg紫杉醇，靜脈注射，3xQW（每週注射連續3周）），並且用本發明方法製備的C-038偶聯物比藉由習知方法製備的偶聯物具有更好的體內活性。

圖26顯示了藉由本發明方法製備的Trop2抗體與C-216，C-218，C-328，C-384，C-408b，C-412c，C-422a，C-425a和C-431c的偶聯物（D4>75%（78~83%），DAR=4.2~4.4）以及習知方法製備C-408b偶聯物（D4=42%，DAR=4.2）和PBS緩衝液的抗腫瘤作用的比較，使用人胃癌NCI-N87細胞模型，劑量為6mg/kg，靜脈一次注射。該圖表明所有9種偶聯物都具有抗腫瘤活性，用本發明方法製備的C-408b偶聯物比習知方法製備的偶聯物具有更好的體內活性。

圖27. 顯示了藉由本發明的方法製備的BCMA-抗體與C-227，C-403a，C-403b，C-408b，C-412e，C-412f，C-428c和C-431a的偶聯物（D4>75%（78~83%），DAR=4.1~4.4），以及習知偶聯方法製備的C-408b偶聯物（D4=47%，DAR=4.2）和PBS緩衝液的抗腫瘤作用的比較，使用人多發性骨髓瘤NCI-H929細胞模型，劑量為6mg/kg，靜脈一次注射。該圖表明所有9種偶聯物都具有抗腫瘤活性，用本發明方法製備的C-408b偶聯物比習知方法製備的偶聯物具有更好的體內活性。

【實施方式】

【0015】 定義

【0016】 “烷基”是指在烷烴上除去一個或兩個氫原子而產生的脂肪烴基團或單價基團。它可以是直鏈或是支鏈的，在鏈中具有 C_1-C_8 （1-8個碳原子）。“支鏈”是指直鏈烷基上連接有一個或多個低碳數的烷基，如甲基、乙基或丙基。示例性的烷基包括甲基、乙基、正丙基、異丙基、正

丁基、第三丁基、正戊基、3-戊基、辛基、壬基、癸基、環戊基、環己基、2，2-二甲基丁基、2，3-二甲基丁基、2，2-二甲基戊基、2，3-二甲基戊基、3，3-二甲基戊基、2，3，4-三甲基戊基、3-甲基-己基、2，2-二甲基己基、2,4-二甲基己基、2,5-二甲基己基、3，5-二甲基己基、2,4-二甲基戊基、2-甲基庚基、3-甲基庚基、正庚基、異庚基、正辛基和異辛基。C_1-C_8烷基可以是未被取代的或被一個或多個基團取代，包括但不限於 C_1-C_8烷基、-O-（C_1-C_8烷基）、-芳基、-C（O）R'、-OC（O）R'、-C（O）OR'、-C（O）NH_2，-C（O）NHR'、-C（O）N（R'）$_2$、-NHC（O）R'、-SR'、-S（O）$_2$R'、-S（O）R'、-OH、-鹵素、-N_3、-NH_2、-NH（R'）、-N（R'）$_2$和-CN；其中每個R'獨立地選自由下列組成之群組C_1-C_8烷基和芳基。

【0017】“鹵素”指氟、氯、溴或碘原子；較佳氟和氯原子。

【0018】“雜烷基”指其中1至4個碳原子獨立地被選自由下列組成之群組O、S和N的雜原子所取代的C_2-C_8烷基。

【0019】“碳環”指含有3到8個碳原子的飽和或不飽和單環，或含有7到13個碳原子的飽和或不飽和雙環。單環碳環有3到6個環原子，典型的有5或6個環原子。雙環碳環有7到12個環原子，構成 [4，5]、[5，5]、[5，6]或[6，6]的雙環系統，或有9個或10個環原子，構成 [5、6]或[6，6]的雙環系統。具有代表性的C_3-C_8的碳環包括但不限於：-環丙基、-環丁基、-環戊基、-環戊二烯基、-環己基、-環己烯基、-1,3-環己二烯基、-1,4-環己二烯基、-環庚基、-1,3-環庚二烯基、-1,3，5-環庚三烯基、-環辛基和-環辛二烯基。

【0020】“C3-C8碳環”是指3-、4-、5-、6-、7-或8-元飽和或不飽

和非芳族碳環。“C_3-C_8碳環”可以是未被取代的或被一個或多個基團取代，包括但不限於C_1-C_8烷基、-O-（C_1-C_8 烷基）、-芳基、-C（O）R'、-OC（O）R'、-C（O）OR'、-C（O）NH_2、-C（O）NHR'、-C（O）N（R'）$_2$、-NHC（O）R'、-SR'、-S（O）R'、-S（O）$_2$R'、-OH、-鹵素、-N_3、-NH_2、-NH（R'）、-N（R'）$_2$及-CN；其中每個R'獨立地選自由下列組成之群組C1-C_8烷基和芳基。

【0021】“烯基”指含有碳-碳雙鍵的直鏈或支鏈脂肪烴基團，鏈內含有2-8個碳原子。示例性的烯基包括乙烯基、丙烯基、正丁烯基、異丁烯基、3-甲基丁-2-烯基、正戊烯基、己烯基、庚烯基、辛烯基。

【0022】“炔基”指含有碳-碳三鍵的直鏈或支鏈脂肪烴基團，鏈內含有2-8個碳原子。示例性的炔基包括乙炔基、丙炔基、正丁炔基、2-丁炔基、3-甲基丁炔基、5-戊炔基、正戊炔基、己炔基、庚炔基和辛炔基。

【0023】“伸烷基”是指含1-18個碳原子的飽和的支煉或直鏈或環狀烴基，並帶有兩個藉由從母體烷烴的相同或兩個不同碳原子上除去兩個氫原子而產生的一價自由基。典型的伸烷基包括但不限於：亞甲基（-CH_2-）、1,2-乙基（-CH_2CH_2-）、1,3-丙基（-$CH_2CH_2CH_2$-）、1,4-丁基（-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-）等。

【0024】“亞烯基”指含2-18個碳原子的不飽和的支煉或直鏈或環狀烴基，並帶有兩個藉由從母體烯烴的相同或兩個不同碳原子上除去兩個氫原子而產生的一價自由基。典型的亞烯基包括但不限於：1,2-亞乙基（-CH = CH-）。

【0025】“亞炔基”指含2-18個碳原子的不飽和的支煉或直鏈或環狀烴基，並帶有兩個藉由從母體炔的相同或兩個不同碳原子上除去兩個氫原

子而產生的一價自由基。典型的亞炔基包括但不限於：乙炔、炔丙基和4-戊炔基。

【0026】“芳基”或“芳香基”指由一個或多個環組成的芳香或雜芳香基團，包含三至十四個碳原子，較佳六至十個碳原子。術語“雜芳基團”是指芳香基團上的一個或幾個碳，最優是一個、兩個、三個或四個碳原子，被氧（O）、氮（N）、矽（Si）、硒（Se）、磷（P）或（S）所取代，較佳被氧、硫和氮所取代而產生的基團。術語“芳基”或“芳香基”也指其中一個或幾個氫原子獨立地被-R’、鹵素、-OR’，-SR’、-NR’R’’、-N=NR’、-N=R’、-NR’R’’、-NO2、-S（O）R’、-S（O）$_2$R’、-S（O）$_2$OR’、-OS（O）$_2$OR’、-PR’R’’、-P（O）R’R’’、-P（OR’）（OR’’）、-P（O）（OR’）（OR’’）或-OP（O）（OR’）（OR’’）所取代而產生的芳基團。其中R’和R’’獨立地為氫、烷基、烯基、炔基、雜烷基、芳基、芳烷基、羰基或其藥用鹽。

【0027】“雜環”指其中一到四個環碳原子獨立地被O、N、S、Se、B、Si或P等雜原子所取代而產生的的環結構。較佳的雜原子是O、N和S。在《化學與物理手冊》第78版的225-226頁（The Handbook of Chemistry and Physics，78th Edition，CRC Press，Inc.，1997 -1998，p. 225 to 226）上也有雜環化合物的相關描述，在此引作參考。較佳的非芳基雜環包括環氧基、氮丙啶基、硫雜丙基、吡咯啶基、吡唑啶基、咪唑啶基、環氧乙烷基、四氫呋喃基、二氧戊環基、四氫呱喃基、二惡烷基、二氧戊環基、呱啶基、呱嗪基、嗎啉基、呱喃基、咪唑啉基、吡咯啉基、吡唑啉基、噻唑烷基、四氫噻喃基、二噻烷基、硫代嗎啉基、二氫呱喃基、四氫呱喃基、二氫呱喃基、四氫吡啶基、二氫吡啶基、四氫嘧啶基、

二氫噻喃基、氮雜環庚烷基，以及上述基團與苯基縮合得到的稠環體系。

【0028】 術語“雜芳基”或“芳基雜環”是指含3到14，較佳5至10個原子的芳香性雜環、包含單環、雙環或多環。示例包括吡咯基、吡啶基、吡唑基、噻吩基、嘧啶基、吡嗪基、四唑基、吲哚基、喹啉基、嘌呤基、咪唑基、噻吩基、噻唑基、苯並噻唑基、呋喃基、苯並呋喃基、1,2,4-噻二唑基、異噻唑基、三唑基、四唑基、異喹啉基、苯並噻吩基、異苯並呋喃基、吡唑基、哢唑基、苯並咪唑基、異惡唑基、吡啶基-N-氧化物，以及上述基團與苯基縮合得到的稠環體系。

【0029】 “烷基”、“環烷基”、“烯基”、“炔基”、“芳基”、“雜芳基”、“雜環”等，也包含各自對應的“伸烷基”、“亞環烷基”、“亞烯基”、“亞炔基”、“亞芳基”、“亞雜芳基”、“亞雜環”等，為論述方便，本專利申請對它們未做完全區分。

【0030】 “芳烷基”指一類非環烷基，其中一個與碳原子（通常為末端或sp3碳原子）鍵合的氫原子被芳基取代。典型的芳烷基包括苄基、2-苯基乙-1-基、2-苯基乙烯-1-基、萘基甲基、2-萘基乙-1-基、2-萘基乙-1-基、萘並苄基、2-萘基苯基-1-基等。

【0031】 “雜芳烷基”指一類非環烷基，其中一個與碳原子（通常為末端或sp^3碳原子）鍵合的氫原子被雜芳基取代。雜芳烷基的實例有2-苯並咪唑基甲基、2-呋喃基乙基。

【0032】 “羥基保護基”的實例包括甲氧基甲基醚、2-甲氧基乙氧基甲基醚、四氫呱喃基醚、苄基醚、對甲氧基苄基醚、三甲基甲矽醚、三乙基矽醚、三異丙基矽醚、第三丁基二甲基矽醚、三苯基甲基矽醚、乙酸酯、取代乙酸酯、特戊酸酯、苯甲酸酯、甲磺酸酯和對甲苯磺酸酯。

【0033】“脫離基”是指可以被另一個官能團取代的官能團。此種脫離基是本領域所習知，實例包括鹵化物（例如，氯化物、溴化物和碘化物）、甲磺醯基（mesyl）、對甲苯磺醯基（tosyl）、三氟-甲基磺醯基（triflate）及三氟甲基磺酸鹽。較佳的脫離基係選自硝基苯酚；N-羥基琥珀醯亞胺（NHS）；苯酚；二硝基苯酚；五氟苯酚；四氟苯酚；二氟苯酚；一氟苯酚；五氯苯酚；三氟甲磺酸；咪唑；二氯苯酚；四氯苯酚；1-羥基苯并三唑；甲苯磺酸鹽；甲磺酸鹽；2-乙基-5-苯基異噁唑鎓-3'-磺酸鹽，酸酐自身形成，或與其他酸酐形成，例如，乙醯酐、甲醯酐；或用縮合試劑生成的中間分子，用於肽偶聯反應或光延反應(Mitsunobu)反應。

【0034】以下縮寫為本發明所採用，其定義為：Boc，第三丁氧基羰基；BroP，溴代十四烷基鏻六氟磷酸鹽；CDI，1,1'-羰基二咪唑；DCC，二環己基碳二亞胺；DCE，二氯乙烷；二氯甲烷，二氯甲烷；DIAD，偶氮二甲酸二異丙基酯；DIBAL-H，二異丁基氫化鋁；DIPEA，二異丙基乙胺；DEPC，二乙基氰基磷酸酯；DMA，N,N-二甲基乙醯胺；DMAP，4-（N,N-二甲基胺基）吡啶；DMF，N,N-二甲基甲醯胺；DMSO，二甲基亞碸；DTT，二硫蘇糖醇；EDC，1-（3-二甲基胺基丙基）-3-乙基碳二亞胺鹽酸鹽；ESI-MS，電噴霧質譜；HATU，O-（7-氮雜苯並三唑-1-基）-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸鹽；HOBt，1-羥基苯並三唑；HPLC，高效液相層析；NHS，N-羥基琥珀醯亞胺；MMP，4-甲基嗎啉；PAB，對胺基苯甲酸；PBS，磷酸鹽緩衝液（pH 7.0-7.5）；PEG，聚乙二醇；SEC，尺寸排阻層析；TCEP，三（2-羧乙基）膦；TFA，三氟乙酸；THF，四氫呋喃；Val，纈氨酸。

【0035】“胺基酸”可以是天然或非天然的，較佳α-胺基酸。天然胺

基酸可以由遺傳密碼所編碼，它們是丙氨酸、精氨酸、天冬醯胺、天冬氨酸、半胱氨酸、麩胺酸、穀氨醯胺、甘氨酸、組氨酸、異亮氨酸、亮氨酸、賴氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、絲氨酸、蘇氨酸、酪氨酸、色氨酸和纈氨酸。非天然胺基酸是蛋白質胺基酸的衍生物，包括羥脯氨酸、羊毛硫氨酸、2-胺基異丁酸、脫氫丙氨酸、γ-胺基丁酸（神經遞質）、鳥氨酸、瓜氨酸、β-丙氨酸（3 -胺基丙酸）、γ-羧基麩胺酸、硒代半胱氨酸（存在於許多非真核以及大多數真核細胞中、但不是由DNA直接進行編碼）、吡咯賴氨酸（僅在一些古細菌和一種細菌中發現）、N-甲醯基甲硫氨酸（通常是細菌、線粒體和葉綠體中蛋白質中最初的胺基酸）、5-羥色氨酸、L-二羥基苯丙氨酸、三碘甲腺原氨酸、L-3,4-二羥基苯丙氨酸（DOPA）和O-磷酸絲氨酸。術語“胺基酸”還包括胺基酸類似物和模擬物。類似物是具有與天然胺基酸相同結構通式H_2N（R）$CHCO_2H$的化合物，其中R在天然胺基酸裡。類似物的實例包括高絲氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸-亞碸和甲硫氨酸甲基銃。更優的是胺基酸模擬物，它是具有與α-胺基酸的化學結構不同、但是作用方式類似的化合物。天然胺基酸多為“L”立體化學構型，“非天然胺基酸”也用於代表“D”構型的胺基酸。在本專利申請中使用1至8個胺基酸時、其序列較佳為蛋白水解酶可識別的序列。許多水解酶識別序列是業內已知的，可以參見：Matayoshi 等. Science 247： 954 （1990）；Dunn 等. Meth. Enzymol. 241： 254 （1994）；Seidah 等. Meth. Enzymol. 244： 175 （1994）；Thornberry，Meth . Enzymol. 244： 615 （1994）；Weber 等. Meth. Enzymol. 244： 595 （1994）；Smith 等. Meth. Enzymol. 244： 412 （1994）；及Bouvier 等. Meth. Enzymol. 248 ： 614 （1995）；此處引

作參考。特別是選自由下列組成之群組以下序列：Val-Cit、Ala-Val、Val-Ala-Val、Lys-Lys、Ala-Asn-Val、Val-Leu-Lys、Cit -Cit、Val-Lys、Ala-Ala-Asn、Lys、Cit、Ser及Glu。

【0036】“藥學上”或“藥學上可接受的”是指當分子實體和組合物酌情施用於動物或人時，不會產生不利、過敏或其他不良反應。

【0037】“藥學上可接受的溶劑化物”或“溶劑化物”是指一種或多種溶劑分子與本發明公開的化合物的結合物。形成藥學上可接受的溶劑合物，溶劑的實例包括但不限於水、異丙醇、乙醇、甲醇、DMSO、乙酸乙酯、乙酸和乙醇胺。

【0038】“藥學上可接受的輔料”包括任何載體、稀釋劑、佐劑或其它，例如防腐劑或抗氧化劑、填充劑、崩解劑、潤濕劑、乳化劑、懸浮劑、溶劑、分散介質、包衣劑、抗細菌劑和抗真菌劑、等滲劑和吸收延遲劑等。這些介質和藥劑用於藥物活性物質在業內是熟知的。任何傳統介質或藥劑，除非與活性成分不相容，也可以考慮將其用於治療組合物中。補充活性成分也可以加入組合物中，成為合適的治療組合。

【0039】本專利申請中，“藥用鹽”是指所公開化合物的衍生物，藉由製備母體化合物的酸鹽或鹼鹽來獲得。藥學上可接受的鹽包括由無毒無機酸或有機酸與母體化合物形成的習知無毒鹽或季銨鹽。例如，所述習知無毒鹽包括衍生自無機酸（例如鹽酸、氫溴酸鹽、硫酸、胺基磺酸、磷酸、硝酸等）的鹽；以及由有機酸（例如乙酸、丙酸、琥珀酸、酒石酸、檸檬酸、甲磺酸、苯磺酸、葡萄糖醛酸、麩胺酸、苯甲酸、水楊酸、甲苯磺酸、草酸、富馬酸、馬來酸及乳酸等製備的鹽。另外的加成鹽包括銨鹽，如三甲胺、葡甲胺、丙三醇等的鹽、金屬鹽、如鈉、鉀、鈣、鋅或鎂

鹽。

【0040】 本發明的藥用鹽可由含有鹼性或酸性部分的母體化合物，藉由習知化學方法合成。通常，此類鹽可經由這些化合物的游離酸或鹼形式與化學計量的適當鹼或酸在水中或有機溶劑中或在兩者的混合物中反應來製備。一般來說，乙醚、乙酸乙酯、乙醇、異丙醇或乙腈是非水介質的首選。適用鹽的列表見於1985年由麥克出版公司出版的《雷明頓藥物科學》（Remington' s Pharmaceutical Sciences）第17版，Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985, p. 1418，其公開內容納入本文作參考。

【0041】 “施用”或“投予”是指以任何方式向受試者轉移、遞送、引入或運輸藥物或其他藥劑。這些方式包括口服用藥、局部接觸、靜脈內、腹膜內、肌肉內、病灶內、鼻內、皮下或鞘內投予。本發明還考慮使用裝置或器械來施用藥劑。這種裝置可以使用主動或被動型傳輸，而且可以是緩釋或快速釋放遞送裝置。

【0042】 生物緩衝液的縮寫及化學名稱如下：

ACES（N-（2-乙醯胺基）-2-胺基乙磺酸），pH 6.1-7.5 （pKa = 6.88）的緩衝體系。

ADA（N-（2-乙醯胺基）亞胺基二乙酸，N-（胺基甲醯甲基）亞胺基二乙酸），pH 6.0-7.2（pKa = 6.65）的緩衝體系。

AMPD（2-胺基-2-甲基-1,3-丙二醇），pH 7.8 -9.7的緩衝體系。

AMPSO （N-（1,1-二甲基-2-羥乙基）-3-胺基-2-羥基丙磺酸）。

BES （N,N-雙（2-羥乙基）-2-胺基乙磺酸）。

Bicine （雙（N,N-雙（2-羥乙基）甘氨酸），雙（2-羥乙基）胺基-三（羥甲基）甲烷），pH 5.8-7.2 （pKa = 8.35）的緩衝體系。

BisTris（雙-（2-羥乙基）胺基-三（羥甲基）甲烷））。

BisTris丙烷（1,3-雙[三（羥甲基）甲胺基]丙烷）。

DIPSO （N,N-雙（2-羥乙基）-3-胺基-2-羥基丙磺酸），pH 7.0-8.2的緩衝體系。

Gly-Gly（雙甘氨酸，甘氨醯-甘氨酸），pH 7.5-8.9 （pKa = 8.30）的緩衝體系。

HEBPS（N-（2-羥乙基）呱嗪-N'-（4-丁磺酸））是HEPES和EPPS的同系物，具有較高的pKa （pKa= 8.30），pH 7.6-9.0的緩衝體系。

HEPES（4-（2-羥乙基）-1-呱嗪乙磺酸，2-嗎啉乙烷磺酸，2-（4-嗎啉代）乙磺酸，2-（N-嗎啉代）乙磺酸，嗎啉-4-乙磺酸水合物），pH 6.8 -8.2緩衝體系；20℃下的pKa 7.45-7.65）

HEPPS或EPPS（3-[4-（2-羥乙基）-1-呱嗪基]丙磺酸水合物，4-（2-羥乙基）呱嗪-1-（2-羥基丙磺酸）水合物），pH 7.3-8.7（pKa = 8.00/呱嗪環）的緩衝體系。

HEPPSO （4-（2-羥乙基）呱嗪-1-（2-羥基丙磺酸）水合物）。

MES（2-（N-嗎啉代）乙磺酸一水合物），pH 5.2-7.1（pKa 6.16）的緩衝體系。

MOBS（4-嗎啉丁烷磺酸，3-（N-嗎啉代）丁磺酸半鈉鹽）是具有較高pKa的MES和MOPS的同系物，pH 6.9-8.3 （pKa 7.6）的緩衝體系。

MOPS（4-嗎啉丙磺酸鈉鹽）。

MOPSO（β-羥基-4-嗎啉代丙磺酸，3-嗎啉代-2-羥基丙磺酸）。

PIPES（呱嗪-1,4-雙（2-乙磺酸），pH 6.1-7.5 （pKa = 6.80）緩衝體系。

POPSO（呱嗪-1,4-雙（2-羥基丙磺酸）二水合物）。

TAPS（[（2-羥基-1,1-雙（羥甲基）乙基）胺基]-1-丙磺酸）。

TAPSO（2-羥基-3-[三（羥甲基）甲胺基]-1-丙磺酸）。

TES（2-[（2-羥基-1,1-雙（羥甲基）乙基）胺基]乙磺酸）。

Tricine（呱嗪-N,N'-雙[2-羥基丙磺酸]），pH 7.4-8.8 （pKa 8.16）緩衝體系。

【0043】 術語“抗體”在本專利申請中以最廣義使用，涵蓋各種抗體結構，包括但不限於單克隆抗體、多克隆抗體、多特異性抗體（例如雙特異性抗體）和抗體片段（只要它們具有所需的抗原結合活性），含抗體的融合蛋白，以及任何其他構型修飾的包含抗原識別位點的免疫球蛋白分子。抗體包括任何種類的抗體，例如IgG、IgA或IgM（或其亞類），並且該抗體不需要是任何特定種類的。根據抗體重鏈恒定區的胺基酸序列，免疫球蛋白可以分為不同的類型。免疫球蛋白有五種主要類型：IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM，其中一些可進一步分為亞類（同種型），例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2。對應於不同類別免疫球蛋白的重鏈恒定區分別稱為α、δ、ε、γ和μ。不同類別的免疫球蛋白的亞基結構和三維構型是眾所周知的。不同類型的免疫球蛋白的亞基結構和三維構型是眾所周知的。“抗體片段”是指不同於完整抗體的分子，其包含完整抗體的一部分並且與完整抗體所結合的抗原結合。抗體片段的實例包括但不限於Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F（ab'）2；雙抗；線性抗體；單鏈抗體分子（例如 scFv）；以及由抗體片段形成的多特異性抗體。“人源化”抗體是指包含來自非人HVR的胺基酸殘基和來自人FR的胺基酸殘基的嵌合抗體。在某些實施例中，人源化抗體將包含基本上所有的，至少一個，通

常是兩個可變結構域，其中所有或基本上所有的HVR（例如，CDR）源自非人抗體HVR，所有或基本上所有的FR源自人抗體的FR。人源化抗體任選地，可包含至少一部分源自人抗體的抗體恒定區。抗體的“人源化形式”，例如非人抗體，是指經過人源化的抗體。術語“可變區”或“可變結構域”是指涉及抗原結合的抗體重鏈或輕鏈的結構域。天然抗體的重鏈和輕鏈可變域（分別為 VH 和 VL）通常具有相似的結構，每個域包含四個保守框架區（FR）和三個高變區（HVR）。（參見，如Kindt等人編寫 Kuby Immunology，第 6 版，W.H. Freeman and Co.，第 91 頁（2007））。單個 VH 或 VL 結構域可能足以賦予抗原結合特異性。與特定抗原結合的抗體，可以藉由任意與該抗原結合的一個抗體的VH或VL，在互補的VL或VH展示庫中篩選，而獲得。（參見，如Portolano 等人，J. Immunol. 150： 880-887 （1993）；Clarkson等，Nature 352：624-628 （1991））。

【0044】 本專利申請中，“單克隆抗體”是指獲得自基本同質的抗體群的抗體，即構成群體的個體抗體是相同的，除了可能少量存在的自然發生的突變。單克隆抗體具有高度特異性，靶向單個抗原位點。此外，與多克隆抗體製品相反，它們通常包含靶向不同決定簇（抗原決定基）的不同種抗體，每種單克隆抗體只靶向抗原上的單一決定簇。

【0045】 修飾語 “單克隆”表示抗體的特徵是指獲得自基本上同質的抗體群體，不應被理解為需要藉由任何特定方法製備抗體。例如，根據本發明使用的單克隆抗體可以藉由由 Kohler 和 Milstein在 Nature 256：495，1975 中首先描述的雜交瘤方法製備，或者可以藉由重組 DNA 方法製備，例如美國專利4816567 中描述的重組 DNA 方法。另外，也可以藉

由使用 McCafferty 等人在Nature 348：552-554，1990 中描述的技術，將單克隆抗體從噬菌體文庫中單離出來。

【0046】 本專利申請中，“人源化”抗體是指非人（例如鼠）抗體，為嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白鏈或其片段（例如Fv、Fab、Fab'、F（ab'）2或其他抗體的抗原結合子序列），其中包含最少的源自非人免疫球蛋白序列。較佳地，人源化抗體是人免疫球蛋白（受體抗體），其中受體互補決定區（CDR）的殘基被來自非人物種（供體抗體）例如小鼠、大鼠或兔的，且具有所需的特異性、親合力和功能的CDR的殘基所替換。在一些情況下，人免疫球蛋白的Fv框架區（FR）殘基被相應的非人殘基取代。此外，人源化抗體中引入的殘基既不在受體抗體中，也不在導入的CDR或框架序列中，目的是進一步改進和優化抗體性能。一般而言，人源化抗體將包含基本上所有，至少一個，通常是兩個可變結構域，其中所有或基本上所有的CDR區對應於非人免疫球蛋白的CDR區，所有或基本上所有的FR區都是人免疫球蛋白共有序列的區。較佳的人源化抗體還包含至少一部分免疫球蛋白恒定區或結構域（Fc），通常是源自人免疫球蛋白。較佳的是具有如WO 99/58572中所述修飾的Fc區的抗體。其他形式的人源化抗體，具有相對於原始抗體改變了的一個或多個 CDR （CDR L1、CDR L2、CDR L3、CDR H1、CDR H2 或 CDR H3），也稱為“衍生” 來自原始抗體的一個或多個CDR。

【0047】 本專利申請中，“人抗體”意指包含與由人類產生的抗體的胺基酸序列相對應的胺基酸序列和/或藉由熟習此項技術者已知的或本專利申請公佈的，製備人源抗體的任何技術所製備的抗體。人抗體包括含有至少一種人重鏈多肽或至少一種人輕鏈多肽的抗體。其中一個例子是由鼠

輕鏈和人重鏈多肽構成的抗體。可以使用業內已知的各種技術製備人源抗體。在一個實施例中，人抗體選自由下列組成之群組噬菌體文庫，其中該噬菌體文庫表達人抗體（Vaughan 等，Nature Biotechnology，14：309-314，1996；Sheets 等，Proc. Natl. Acad. Sci. （USA） 95：6157-6162，1998；Hoogenboom 和 Winter，J. Mol. Biol.，227：381，1991；Marks等，J. Mol. Biol.，222：581，1991）。人抗體也可以免疫動物製備，將動物，如鼠的內源性免疫球蛋白基因部分或完全失活，再將人類免疫球蛋白基因轉入動物內源性基因座。此方法記載在美國專利5,545,807 ； 5,545,806 ； 5,569,825 ； 5,625,126 ； 5,633,425 ； 和5,661,016。或者，可以藉由將產生靶向目標抗原的抗體的人B淋巴細胞永生化，來製備人抗體（這種B淋巴細胞可以從個體或cDNA的單細胞克隆中回收，也可以在體外免疫）。參考如Cole等. Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy，Alan R. Liss，p. 77，1985；Boerner等.，J. Immunol.，147 （1）：86-95，1991；和 美國專利 5,750,373。

【0048】 術語“嵌合抗體”是指其可變區序列來源於一個物種而恒定區序列來源於另一物種的抗體，例如可變區序列來源於小鼠抗體而恒定區序列來源於人抗體的抗體。

【0049】 術語“多肽”、“寡肽”、“肽”和“蛋白質”在本文中可互換使用，以指代任何長度的胺基酸鏈，較佳為相對短的（例如，10-100個胺基酸）。該鏈可以是線鏈或支鏈，可以包含修飾的胺基酸，和/或可以被非胺基酸隔斷。該術語還包括天然或藉由干預修飾的胺基酸鏈；例如，二硫鍵形成、糖基化、脂化、乙醯化、磷酸化或任何其他操作或修飾，例如與標記組分偶聯。該定義還包括，例如含有一種或多種胺基酸類似物（包

括，例如非天然胺基酸等）以及業內已知的其他修飾的多肽。應當理解，多肽可以以單鏈或關聯鏈存在。

【0050】“單價抗體”的每分子包含一個抗原結合位點（例如 IgG 或 Fab）。在一些情況下，單價抗體可以具有多個抗原結合位點，但所述結合位點應來自不同的抗原。

【0051】“單特異性抗體”的每個分子包含兩個相同的抗原結合位點（例如 IgG），兩個結合位點結合抗原上的相同抗原決定基。因此，它們互相競爭結合一種抗原分子。自然界中發現的大多數抗體都是單特異性的。在一些情況下，單特異性抗體也可以是單價抗體（例如Fab）。

【0052】“二價抗體”的每個分子包含兩個抗原結合位點（例如，IgG）。在一些情況下，兩個結合位點具有相同的抗原特異性。然而，二價抗體可能是雙特異性的。

【0053】“雙特異性”或“雙重特異性”抗體是具有兩個不同抗原結合位點的雜交抗體。雙特異性抗體的兩個抗原結合位點結合兩個不同的抗原決定基，這些抗原決定基可能位於相同或不同的蛋白質標靶上。

【0054】“雙功能”抗體是指在兩臂上具有相同抗原結合位點（即相同胺基酸序列），但每個結合位點可以識別兩種不同的抗原。

【0055】“異多聚體”、“異多聚體複合物”或“異多聚體多肽”是包含至少第一多肽和第二多肽的分子，其中第二多肽與第一多肽至少差一個胺基酸殘基。異多聚體可以包含由第一和第二多肽形成的“異二聚體”或當除了第一和第二多肽之外還存在多肽時，形成的更高級的三級結構。

【0056】“異二聚體”、“異二聚體蛋白質”、“異二聚體複合物”或“異多聚體多肽”是由第一多肽和第二多肽的分子構成的分子，其中第二多肽

的胺基酸序列與第一多肽的胺基酸序列相差至少一個胺基酸殘基。

【0057】 本專利申請中，“鉸鏈區”、“鉸鏈序列”及其它變異體的含義，為業內公知，在如Janeway 等，ImmunoBiology： the immune system in health and disease，（Elsevier Science Ltd.，NY）（4th ed.，1999）；Bloom 等，Protein Science （1997），6：407-415；Humphreys 等，J. Immunol. Methods （1997），209：193-202 中有所描述。

【0058】 本專利申請中，“類免疫球蛋白鉸鏈區”、“類免疫球白鉸鏈序列”及其變異體是指類免疫球蛋白或類抗體分子（例如，免疫粘附素）的鉸鏈區和鉸鏈序列。在一些實施例中，類免疫球蛋白鉸鏈區可以來自或衍生自任何IgG1，IgG2，IgG3，或 IgG4亞型，或者來自IgA，IgE，IgD 或 IgM，包括其嵌合形式，例如嵌合IgG1/2鉸鏈區。

【0059】 本專利申請中的術語“免疫效應細胞”或“效應細胞”是指人免疫系統中天然細胞庫內的細胞，可以將其啟動以影響靶細胞的活力。靶細胞的活力可以包括細胞生存、增生和/或與其他細胞交互作用的能力。

【0060】 本發明中的抗體可以藉由業內公知的技術而製備，例如重組技術，噬菌體展示技術、合成技術或這類技術的組合，或者業內中的其他已有技術（參見，如Jayasena S. D.，Clin. Chem.，45： 1628-50，1999 以及Fellouse F. A.，等，J. Mol. Biol.，373（4）： 924-40，2007）。

【0061】 本專利申請中，術語“細胞毒劑”是指能夠抑制或阻止細胞功能和/或導致細胞死亡或被破壞的物質。細胞毒劑包括但不限於放射性同位素（例如 At211、I131、I125、Y90、In111、Re186、Re188、

Sm153、Bi212、P32、Pb212、Zr89、F18 和 Lu 的放射性同位素，例如 Lu177）；化學治療劑或藥物（例如，tubulysin、美登素、澳瑞他汀、DNA小溝結合劑（例如PBD二聚體）、杜卡黴素、拓撲異構酶抑制劑、RNA聚合酶抑制劑、DNA烷基化劑、甲氨蝶呤、阿得拉黴素、長春花生物鹼（長春新鹼、長春鹼、依託泊苷），阿黴素、美法侖、絲裂黴素 C、苯丁酸氮芥、柔紅黴素或其他嵌入劑）；生長抑制劑；酶及其片段，例如溶核酶；抗生素；毒素，例如小分子毒素，來源於細菌、真菌、植物或動物的酶活毒素，包括它們的片段和/或變異體；以及本專利申請中公開的各種抗腫瘤或抗癌劑。

【0062】“連接子”是一個化學結構片斷，為一個共價鍵或原子鏈，將抗體共價連接至藥物部分。在各種實施例中，連接子包括二價基團例如烷基二基、芳基二基、雜芳基二基，片斷例如：-（CR2）nO（CR2）n--、烷氧基（例如聚氧乙烯基、PEG、聚亞甲氧基）和 烷基胺基（例如聚乙烯胺基）的重複單元；和二酸酯和醯胺，包括琥珀酸酯、琥珀醯胺、二乙醇酸酯、丙二酸酯和己醯胺。在各種實施例中，連接子可以包含一個或多個胺基酸殘基，例如纈氨酸、苯丙氨酸、賴氨酸和鳥氨酸。

【0063】在本說明書和申請專利範圍中，詞語“包括（comprise）”、“包括（comprising）”、“包含（including）”和“包含（includes）”用於說明所述特徵、整數、組份或步驟的存在，但它們不排除一個或多個其他特徵、整數、組份、步驟或其組份的存在或共存。本發明申請公開的新型偶聯物使用橋連接子。一些合適的連接子和它們的合成的示例記載在說明書實施例1-468中。

【0064】 本發明的偶聯方法

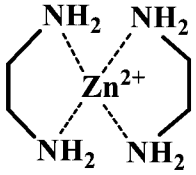
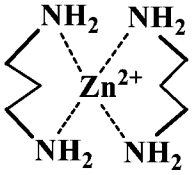
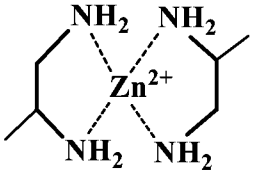
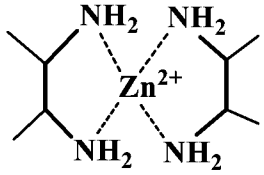
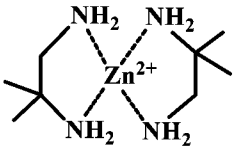
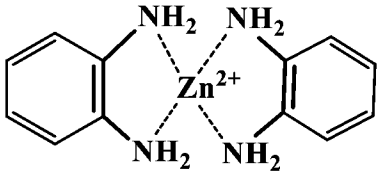
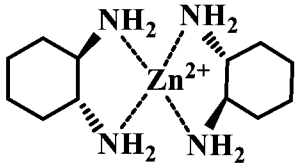
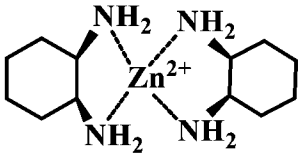
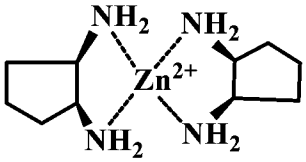
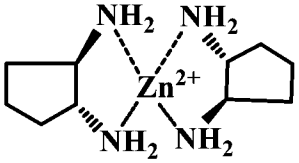
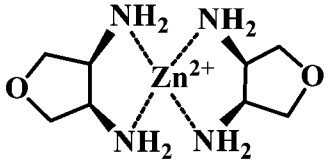
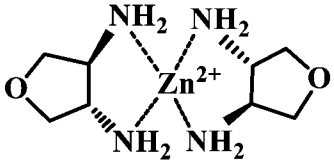
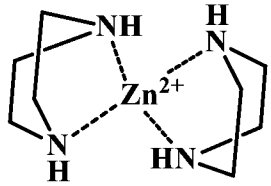
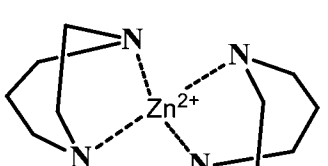
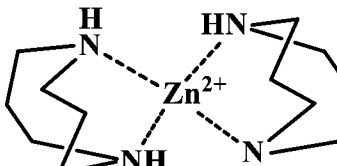
【0065】 如上所述，本發明的偶聯過程中的一個關鍵因素是過渡金屬陽離子-胺基錯合物M （$NR_1R_2R_3$）$_{m1}^{m2+}$，它配位生物分子的某些二硫鍵，較佳抗體中的某些鏈間二硫鍵，使其被選擇性還原。前期的LC-MS研究表明，IgG抗體的鏈間二硫鍵比鏈內二硫鍵更容易被還原，輕鏈和重鏈之間的二硫鍵比兩條重鏈之間的二硫鍵更容易被還原。IgG抗體的兩個重鏈間上部二硫鍵比下部的二硫鍵更容易被還原。此外，CH2 結構域中的二硫鍵最容易被還原。VL、CL、VH 和 CH1 結構域中的二硫鍵具有相似且中等的可被還原性，而 CH3 結構域中的二硫鍵最不易於還原（Liu H，等 Anal. Chem.，2010，82，5219–5226 ）。在2～8℃的低溫下，使用$ZnCl_2$ 鹽與發明WO2020164561的IgG抗體的二硫鍵配位，可以區分進行上述的的還原。這裡，用於本發明偶聯過程中的過渡金屬陽離子-胺基配合物M （$NR_1R_2R_3$）$_{m1}^{m2+}$ 體積很大，不僅可以配位二硫鍵進行還原，而且在空間上阻礙還原劑（如TCEP） 接近 IgG 抗體的兩條重鏈之間的二硫鍵，從而產生更好的還原選擇性，隨後與藥物/連接子複合物偶聯。

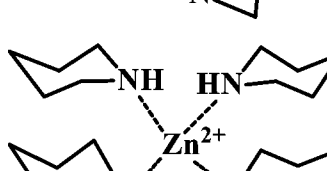
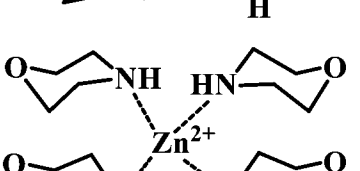
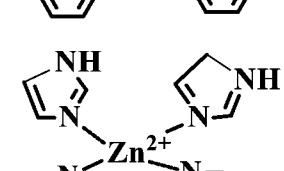
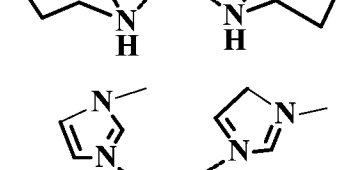
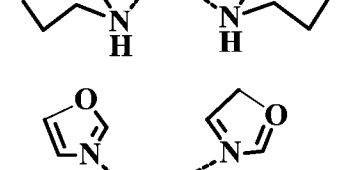
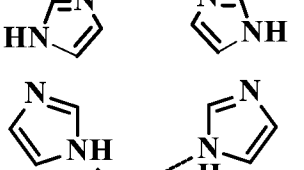
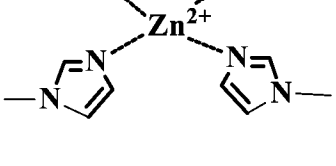
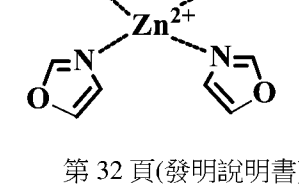
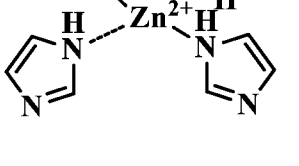
【0066】 過渡金屬陽離子-胺基螯合物/錯合物，M（$NR_1R_2R_3$）$_{m1}^{m2+}$，其中 M 選自由下列組成之群組，但不限於，Zn^{2+}、Cu^{2+}、Fe^{2+}、Cd^{2+}、Ni^{2+}、Cr^{2+}、Cr^{3+}、Ti^{2+}、Ti^{3+}、Co^{2+}、Mn^{2+}、Mn^{3+}、Ag^{+}、Hg^{2+}；其中 R_1、R_2 和 R_3 獨立地選自由下列組成之群組C_1-C_8 烷基；C_2-C_8的雜烷基、烷基環烷基、雜環烷基；C_3-C_8的芳基、芳基烷基、雜芳基、雜環、碳環、環烷基、雜烷基環烷基、烷基羰基、雜芳基；m1 選自由下列組成之群組 1、2、3、4、5、6、7、或 8；m_2選自由下列組成之群組 1、2、3、4、5、6、或 7。較佳的，M為Zn^{2+}，m_1 選自由下列組成之群組 1、2、3、或 4，且 m_2 是 2、3 或 4。更佳m_1為2。

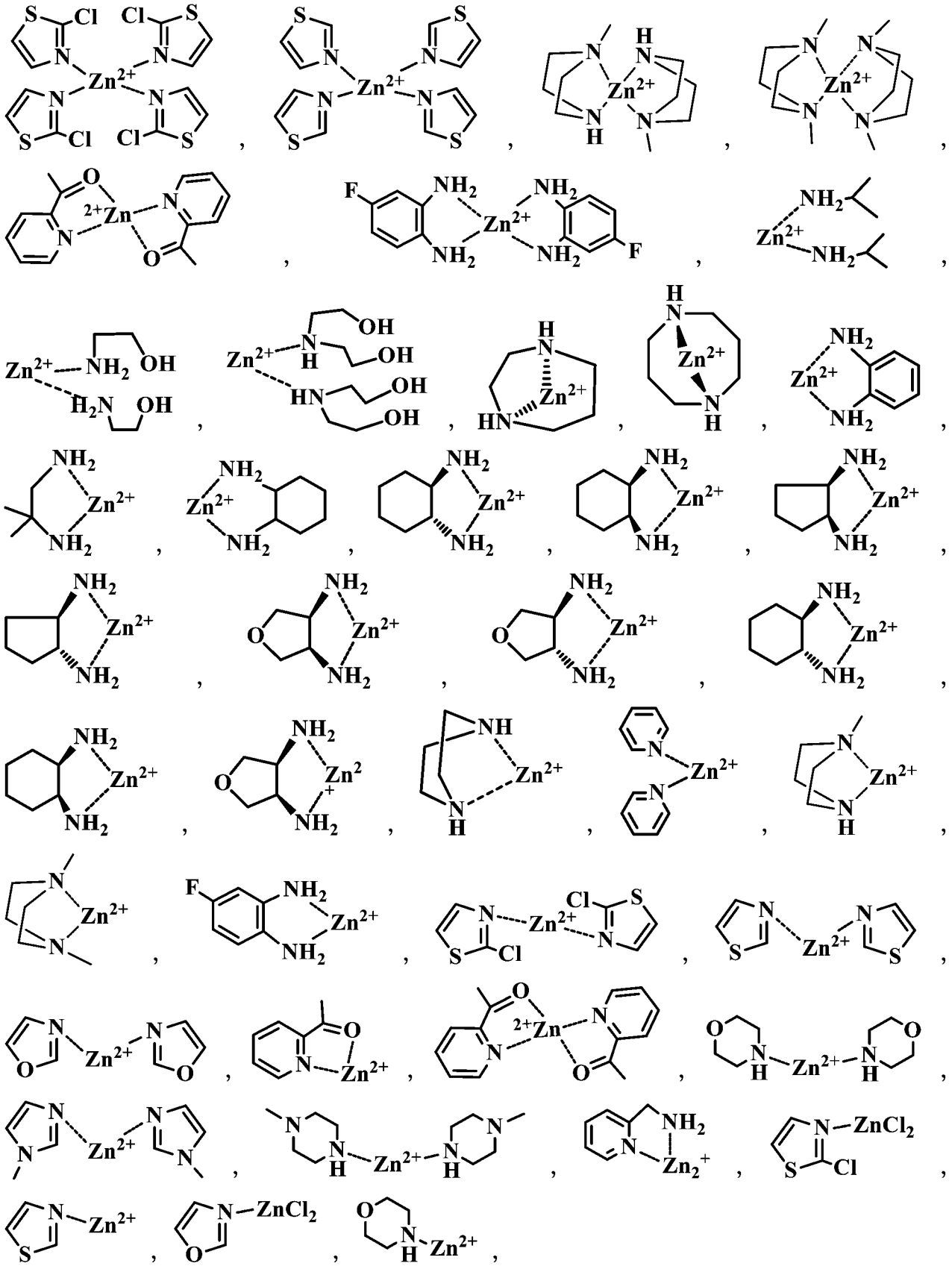
【0067】此外，（$NR_1R_2R_3$）$_{m1}$能夠形成二聚體、三聚體、四聚體、五聚體或六聚體，其中這些聚合物在N、R_1、R_2和R_3之間共價連接；N、R_1、R_2和/或R_3自身可以形成雜環、碳環、二雜環或二碳環。

【0068】當較佳的M為Zn時，較佳的M（$NR_1R_2R_3$）$_{m1}^{m2+}$示例如下：Zn（NH_2CH_3）$_2^{2+}$、Zn（$NH_2CH_2CH_3$）$_2^{2+}$、Zn（$NH_2CH_2CH_2CH_3$）$_2^{2+}$、Zn（$NH_2CH(CH_3)_2$）$_2^{2+}$、Zn（$NH_2C(CH_3)_3$）$_2^{2+}$、Zn（$NH_2CH_2C(CH_3)_3$）$_2^{2+}$、Zn（$NH(CH_3)_2$）$_2^{2+}$、Zn（$NH(CH_2CH_3)_2$）$_2^{2+}$、Zn（$NH(CH(CH_3)_2)_2$）$_2^{2+}$、Zn（$NH(C(CH_3)_3)_2$）$_2^{2+}$、Zn（$NH(CH(CH_2CH_3)_2)_2$）$_2^{2+}$、Zn（$NH(CH_2C(CH_3)_3)_2$）$_2^{2+}$、Zn（$NH(CH_2C(CH_2CH_3)_3)_2$）$_2^{2+}$、Zn（$NH(CH_2CH_2C(CH_3)_3)_2$）$_2^{2+}$、Zn（$NH_2CH_2CH_2OH$）$_2^{2+}$、Zn（$NH(CH_2CH_2OH)_2$）$_2^{2+}$、Zn（$N(CH_2CH_2OH)_3$）$_2^{2+}$、Zn（NH_2CH_2COOH）$_2^{2+}$、Zn（$NH_2CH_2CONH_2$）$_2^{2+}$、Zn（$NH_2CH_2COOCH_3$）$_2^{2+}$、Zn（$NH_2CH_2COOCH_2CH_3$）$_2^{2+}$、Zn（$NH_2CH_2COOC(CH_3)_3$）$_2^{2+}$、Zn（$NH_2CH_2COOCH(CH_3)_2$）$_2^{2+}$、Zn（$NH_2CH_2CH_2COOH$）$_2^{2+}$、Zn（$NH(CH_2COOH)_2$）$_2^{2+}$、Zn（$N(CH_2CH_2COOH)_3$）$_2^{2+}$、Zn（NH_2CH_3）$_4^{2+}$、Zn（$NH_2CH_2CH_3$）$_4^{2+}$、Zn（$NH_2CH_2CH_2CH_3$）$_4^{2+}$、Zn（$NH_2CH(CH_3)_2$）$_4^{2+}$、Zn（$NH_2C(CH_3)_3$）$_4^{2+}$、Zn（$NH_2CH_2C(CH_3)_3$）$_4^{2+}$、Zn（$NH(CH_3)_2$）$_4^{2+}$、Zn（$NH(CH_2CH_3)_2$）$_4^{2+}$、Zn（$NH(CH(CH_3)_2)_2$）$_4^{2+}$、Zn（$NH(C(CH_3)_3)_2$）$_4^{2+}$、Zn（$NH(CH(CH_2CH_3)_2)_2$）$_4^{2+}$、Zn（$NH(CH_2C(CH_3)_3)_2$）$_4^{2+}$、Zn（$NH(CH_2C(CH_2CH_3)_3)_2$）$_4^{2+}$、Zn（$NH(CH_2CH_2C(CH_3)_3)_2$）$_4^{2+}$、Zn（$NH_2CH_2CH_2OH$）$_4^{2+}$、Zn

$(NH(CH_2CH_2OH)_2)_4^{2+}$、$Zn(N(CH_2CH_2OH)_3)_4^{2+}$、$Zn(NH_2CH_2COOH)_4^{2+}$、$Zn(NH_2CH_2CONH_2)_4^{2+}$、$Zn(NH_2CH_2COOCH_3)_4^{2+}$、$Zn(NH_2CH_2COOCH_2CH_3)_4^{2+}$、$Zn(NH_2CH_2COOC(CH_3)_3)_4^{2+}$、$Zn(NH_2CH_2COOCH(CH_3)_2)_4^{2+}$、$Zn(NH_2CH_2CH_2COOH)_4^{2+}$、$Zn(NH(CH_2COOH)_2)_4^{2+}$、$Zn(N(CH_2CH_2COOH)_3)_4^{2+}$、


,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,



上述所有絡合陽離子對應的陰離子選自由下列組成之群組，但不限於Cl^-、Br^-、I^-、SO_4^{2-}、HSO_4^-、NO_3^-、PO_4^{3-}、HPO_4^{2-}、$H_2PO_4^-$、CO_3^{2-}

、HCO_3^-、$HCOO^-$、CH_3COO^-、F_3CCOO^-、Cl_3CCOO^-、FCH_2COO^-、$ClCH_2COO^-$、F_2CHCOO^-、Cl_2CHCOO^-、BF_4^-、SO_3^{2-}、HSO_3^-、CH_3SO^{3-}、$C_6H_5CH_2SO^{3-}$、$C_6H_5SO^{3-}$、$C_6H_5COO^-$、$C_6H_5CH_2COO^-$、$C_6F_5O^-$、C_6H_4（OH）COO^-、$C_6H_2F_3O^-$、C_6H_4（NO_2）O^-、C_6H_2（NO_2）$_3O^-$、等。

【0069】反應液中的過渡金屬陽離子-胺基錯合物當量為抗體摩爾數的0.5～20倍，較佳1.0 -5.0倍，更佳1.5 -3.0倍。可以將過渡金屬陽離子-胺基錯合物與水混溶性有機溶劑一起加入到反應溶液中，有機溶劑選自由下列組成之群組，但不限於乙醇、甲醇、丙醇、丙二醇、DMA、DMF、DMSO、THF或 CH_3CN。

【0070】在反應溶液中，與過渡金屬陽離子-胺基錯合物一起使用的還原劑選自由下列組成之群組三（2-羧乙基）膦（TCEP），（P（CH_2CH_2COOH）$_3$） 。可以是其他還原劑，例如 三（羥丙基）-膦（P（$CH_2CH_2CH_2OH$）$_3$）、P（CH_2CH_3）$_3$、P（$CH_2CH_2CH_3$）$_3$、P（CH_2CH_2-CH_2CH_3）$_3$、P（CH（CH_3）$_2$）$_3$、P（CH_2CH=CH_2）$_3$、P（CH_2CH_2CN）$_3$、P（CH（CH_3）$_2$）$_2$（$CH_2CH_2NH_2$）、P（$CH_2CH_2CONH_2$）$_3$、P（$CH_2CH_2CONHCH_3$）$_3$、P（$CH_2CH_2CH_2NHCOCH_3$）$_3$、NaB（CN）H_3、（C_6H_{11}）$_2$P（CH_2）$_4$P（C_6H_{11}）$_2$、（C_6H_{11}）$_2$P（CH_2）$_3$P-（C_6H_{11}）$_2$、二環己基（乙基）膦、雙[2-（二第三丁基膦基）乙基]胺、三環己基膦、1,2-乙二基雙[二環己基]-膦、雙[2-（二環己基膦基）乙基]胺、三[2-（ 二苯基膦基）乙基]-膦（[（C_6H_5）$_2PCH_2CH_2$]$_3$P）、三苯基膦、磺醯化三苯基膦（2-（二苯基膦基）苯磺酸（diPPBS）、3-（二苯基膦基）苯磺酸、

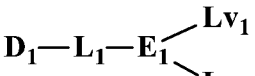
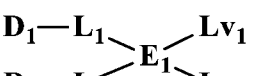
4-（二苯基膦基）苯磺酸、3,3',3''-膦三基三苯磺酸）。較佳還原劑為TECP或P（$CH_2CH_2CH_2OH$）$_3$，更較佳為TECP。反應溶液中還原劑的濃度可以是0.04 mM -0.4 mM，或為使用的抗體摩爾數的1.0 -10.0當量。較佳地，還原劑以抗體的2.0-4.0當量使用。

【0071】 用於選擇性還原的最佳緩衝液選自由下列組成之群組，但不限於 PBS、Mes、Bis-Tris、Bis-Tris 丙烷、Pipes、Aces、Mopso、Bes、Mops、Hepes、Tes、Pipps、Dipso、Tapso、Heppso、Tris-up、Tris-HCl、Tricine、Hepps、Gly-Gly、Bicine、Taps、Hepee、乙酸鹽、組氨酸、檸檬酸鹽、MES、硼酸鹽，或上述兩種、三種或四種緩衝液組分的組合。緩衝液的pH為4.0 -9.0，較佳為5.0 -7.5，更較佳為5.5 -7.5。反應中緩衝液的濃度為 0.02 – 1.0 M，較佳為 20 – 200 mM，更佳為20 – 100 mM。並且可以加入最多 30%可與水混合（混溶）的有機溶劑，如DMA、DMF、乙醇、甲醇、丙酮、乙腈、四氫呋喃、異丙醇、二惡烷、丙二醇或乙二醇均可作為共溶劑加入水基緩衝溶液中。

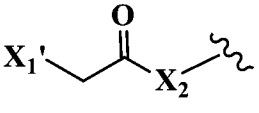
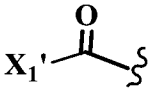
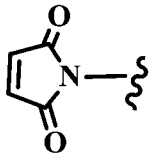
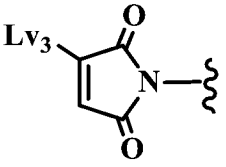
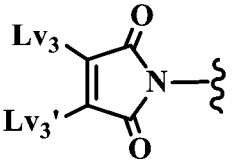
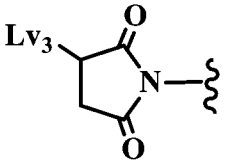
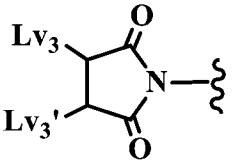
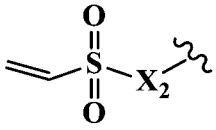
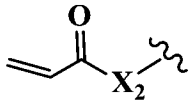
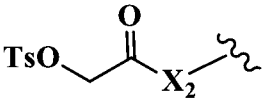
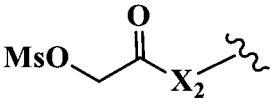
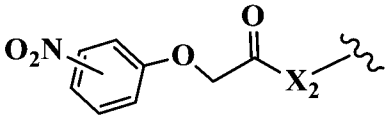
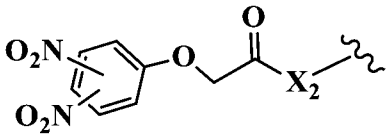
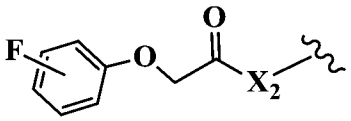
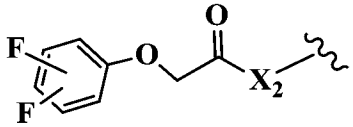
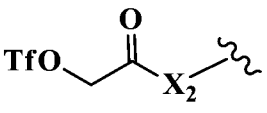
【0072】 還原反應的最佳溫度一般控制在-5～40℃左右，反應時間為15分鐘～48小時。但在蛋白偶聯領域中，反應時間和溫度可以由熟習此項技術者根據具體的蛋白，如抗體來確定，這是很好理解的。例如，還原反應可以控制在通常在約-5至約40℃之間，較佳為約0至37℃的溫度；更佳為約 2 至 8 ℃，更確切地為 4±1℃。偶聯過程反應時間為15分鐘至12小時，較佳在約2至8℃的溫度下，反應時間為約30分鐘至15小時（隔夜反應）。

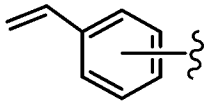
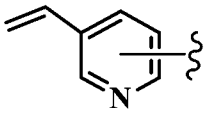
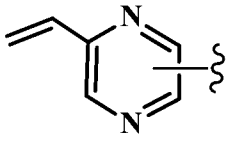
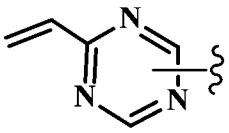
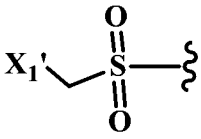
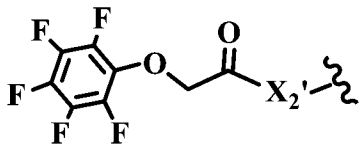
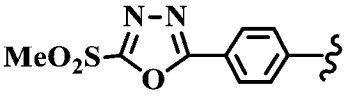
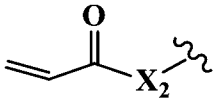
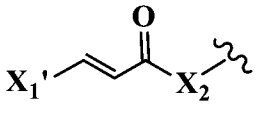
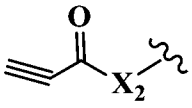
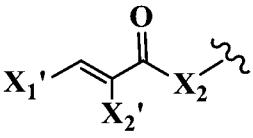
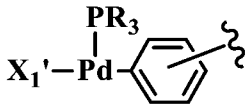
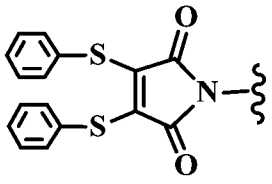
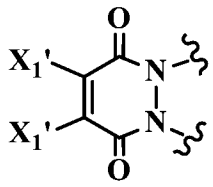
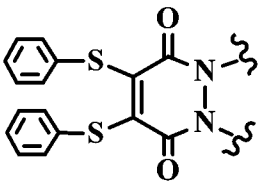
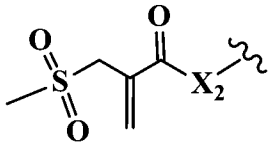
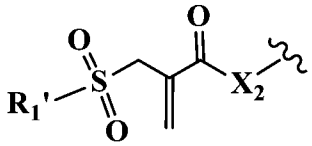
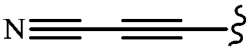
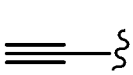
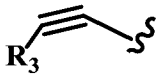
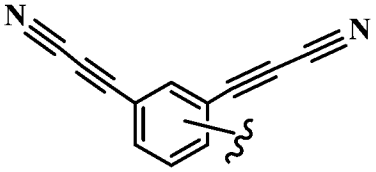
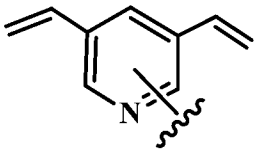
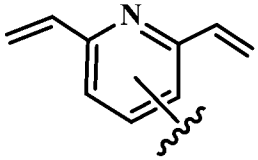
【0073】 在還原過程中或還原完成後，將藥物/連接子複合物/組合物直接加入到還原反應的溶液中進行偶聯。藥物/連接子複合物/組合物結

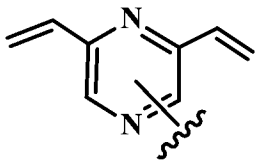
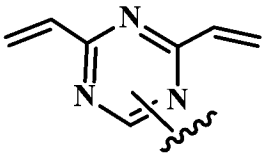
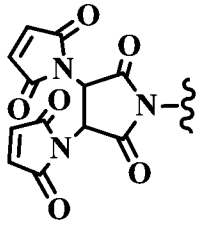
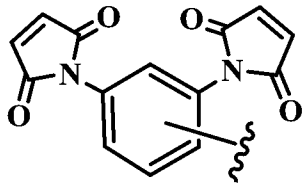
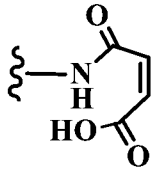
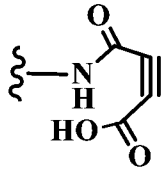
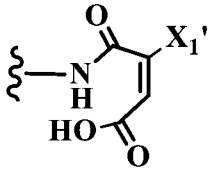
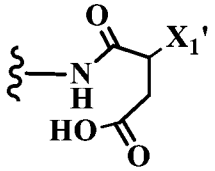
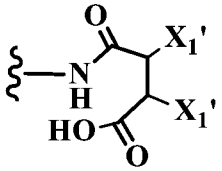
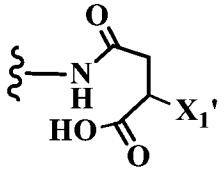
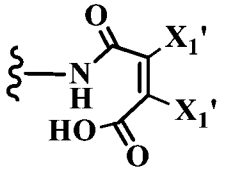
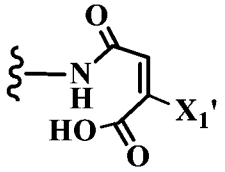
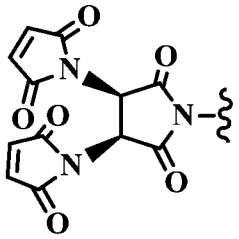
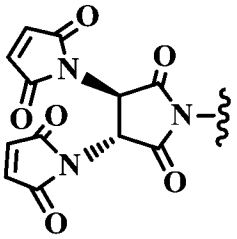
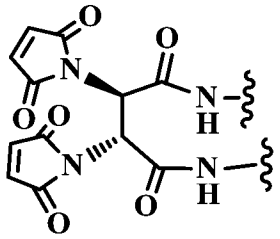
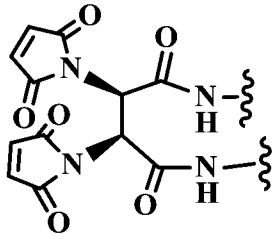
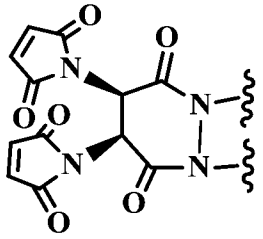
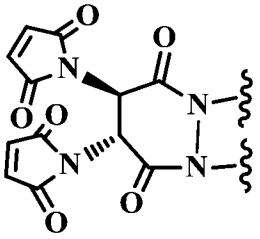
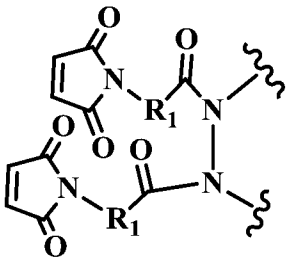
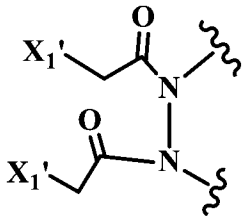
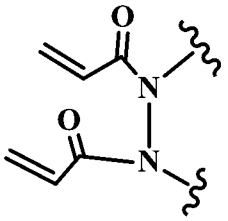
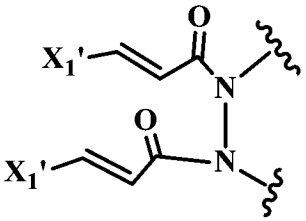
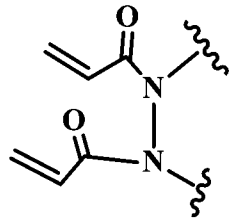
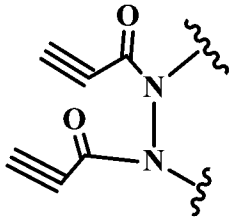
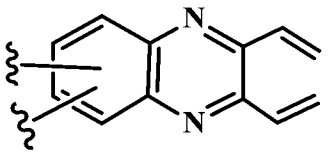
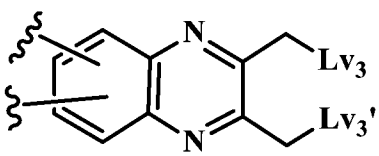
構式表示為（I），（II）或（III）：

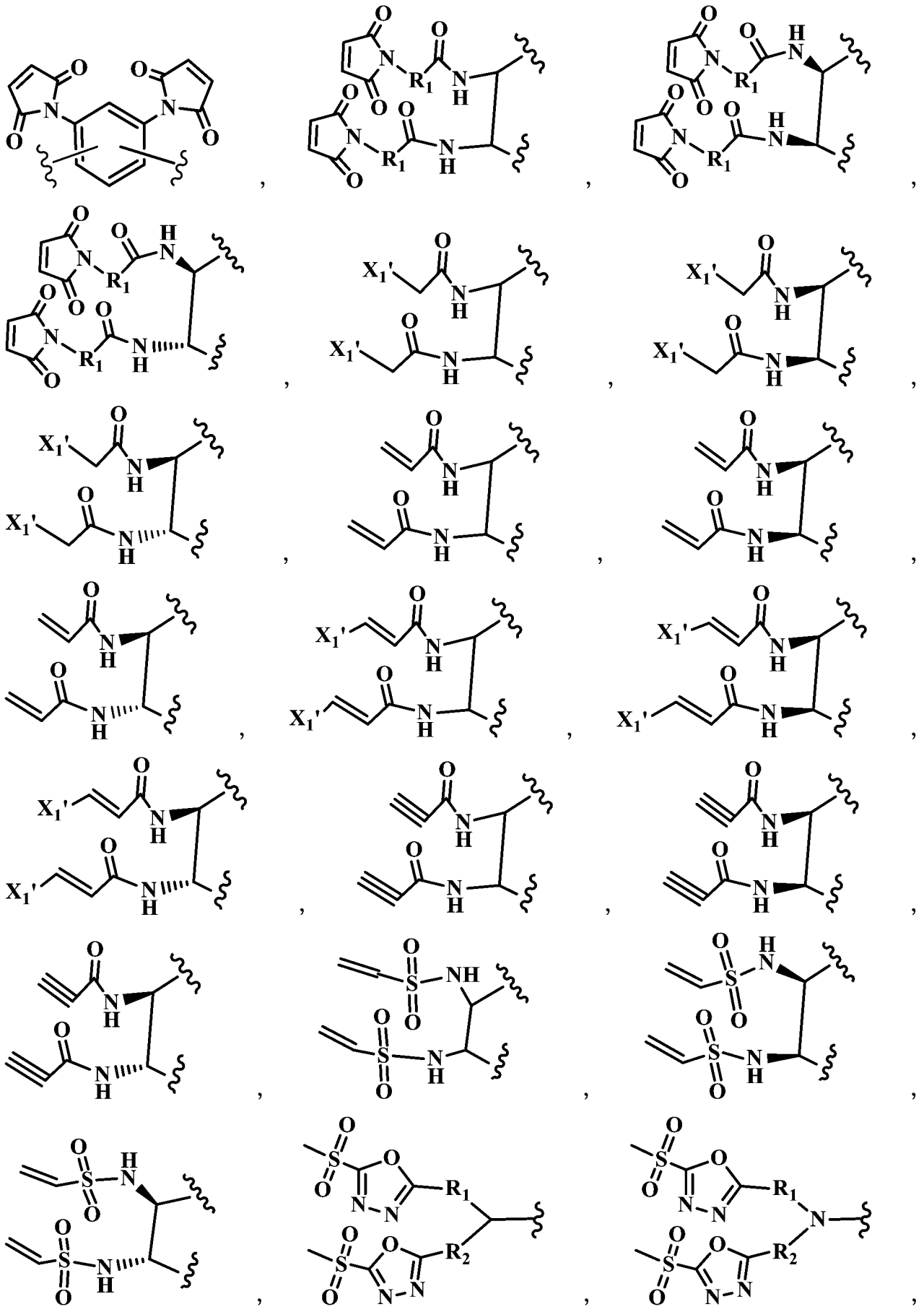
（I），或  （II），或  （III），

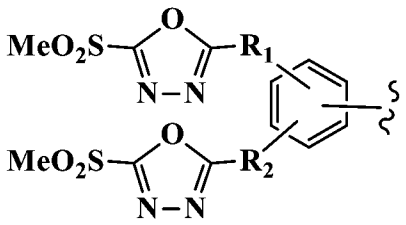
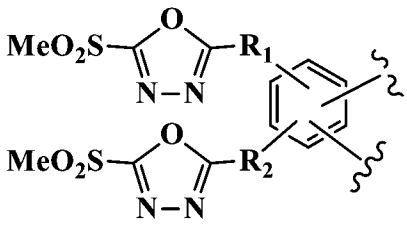
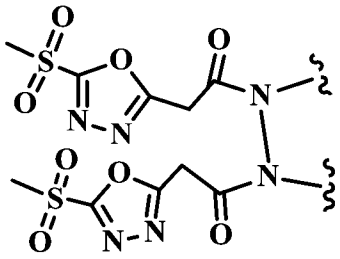
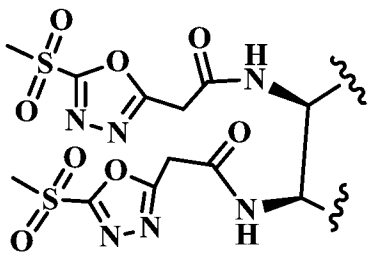
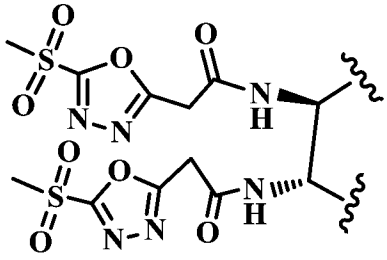
其中： Lv_1 和 Lv_2 是巰基反應基團，獨立地選自由下列組成之群組：

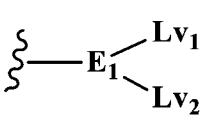
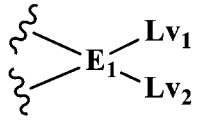
 鹵代乙醯基；  醯鹵基；  馬來醯亞胺；  單取代馬來醯亞胺；  二取代馬來醯亞胺；  單取代的琥珀醯亞胺；  二取代琥珀醯亞胺；-CHO 醛；  乙烯磺醯基；  丙烯醯基；  2-（甲苯磺醯氧基）乙醯基；  2-（甲磺醯氧基）乙醯基；  2-（硝基苯酚基）乙醯基；  2-（二硝基苯基）乙醯基；  2-（氟代苯酚基）-乙醯基；  2-（二氟苯酚基）-乙醯基；  2-（（三氟甲基磺醯基）氧基）乙醯基；

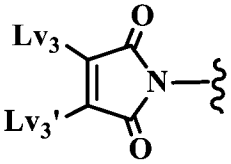
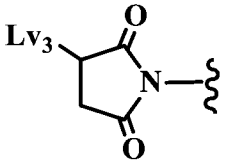

苯乙烯， 
乙烯基吡啶， 
乙烯基吡嗪， 
乙烯基-1,3,5-三嗪， 
取代的甲磺醯基， 
2-（五氟苯氧基）乙醯基； 
，甲基碸苯基惡二唑（ODA）； 
丙烯醯基， 
鹵代丙烯醯基， 
丙炔醯基， 
2,3-二鹵代丙烯醯基， 
芳基鈀配合物， 
雙（苯磺醯基）-馬來醯亞胺， 
雙鹵代噠嗪二酮， 
雙苯硫基噠嗪二酮， 
2-（（甲基磺醯基）甲基）丙烯醯基， 
2-（（烷基或芳基-磺醯基）甲基）丙烯醯基， 
氰乙炔基， 
乙炔基； 
炔基， 
亞芳基二丙腈（ADPN）， 
或 
二乙烯基吡啶，

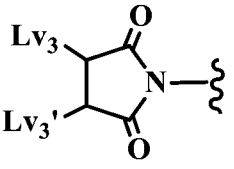
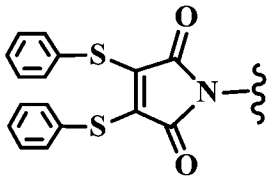
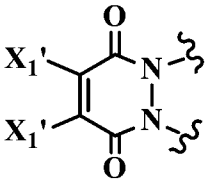
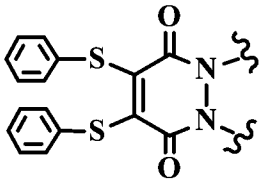
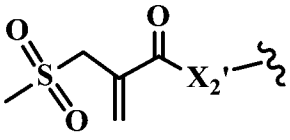
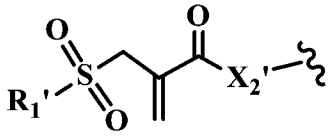
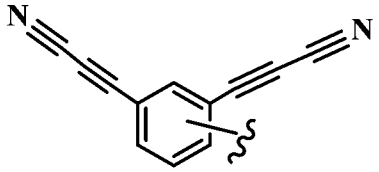
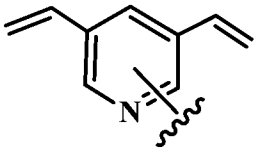
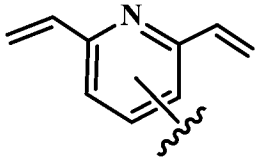
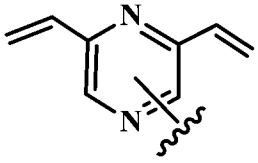
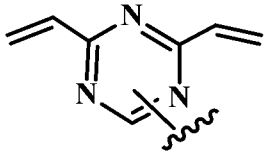
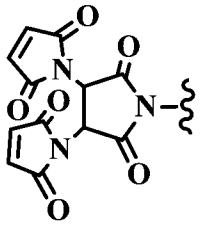
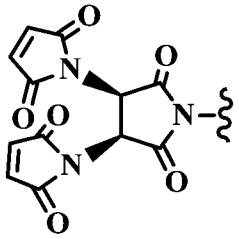
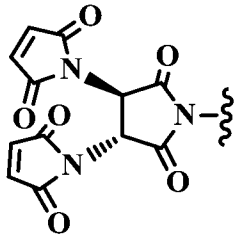
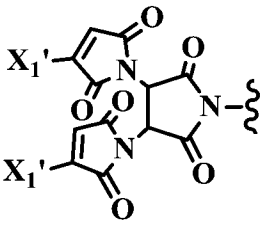
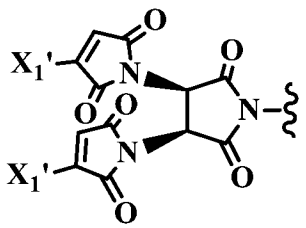
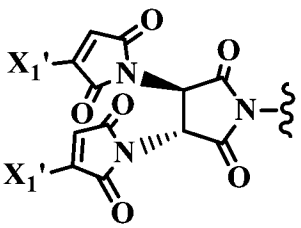
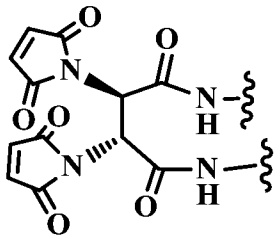

二乙烯基吡嗪，

二乙烯基三嗪，或

3，4-雙（馬來醯亞胺）-2,5-二側氧基吡咯啶，

，

，

，

，，

，

，

，

，

，

，

，

，

，

，

，

，

，

，

，

，

，

，

，

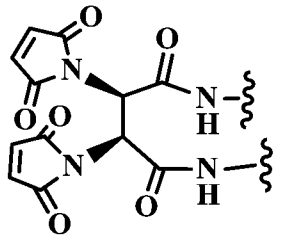
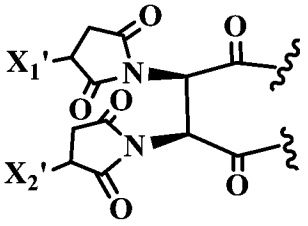
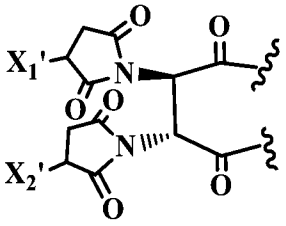


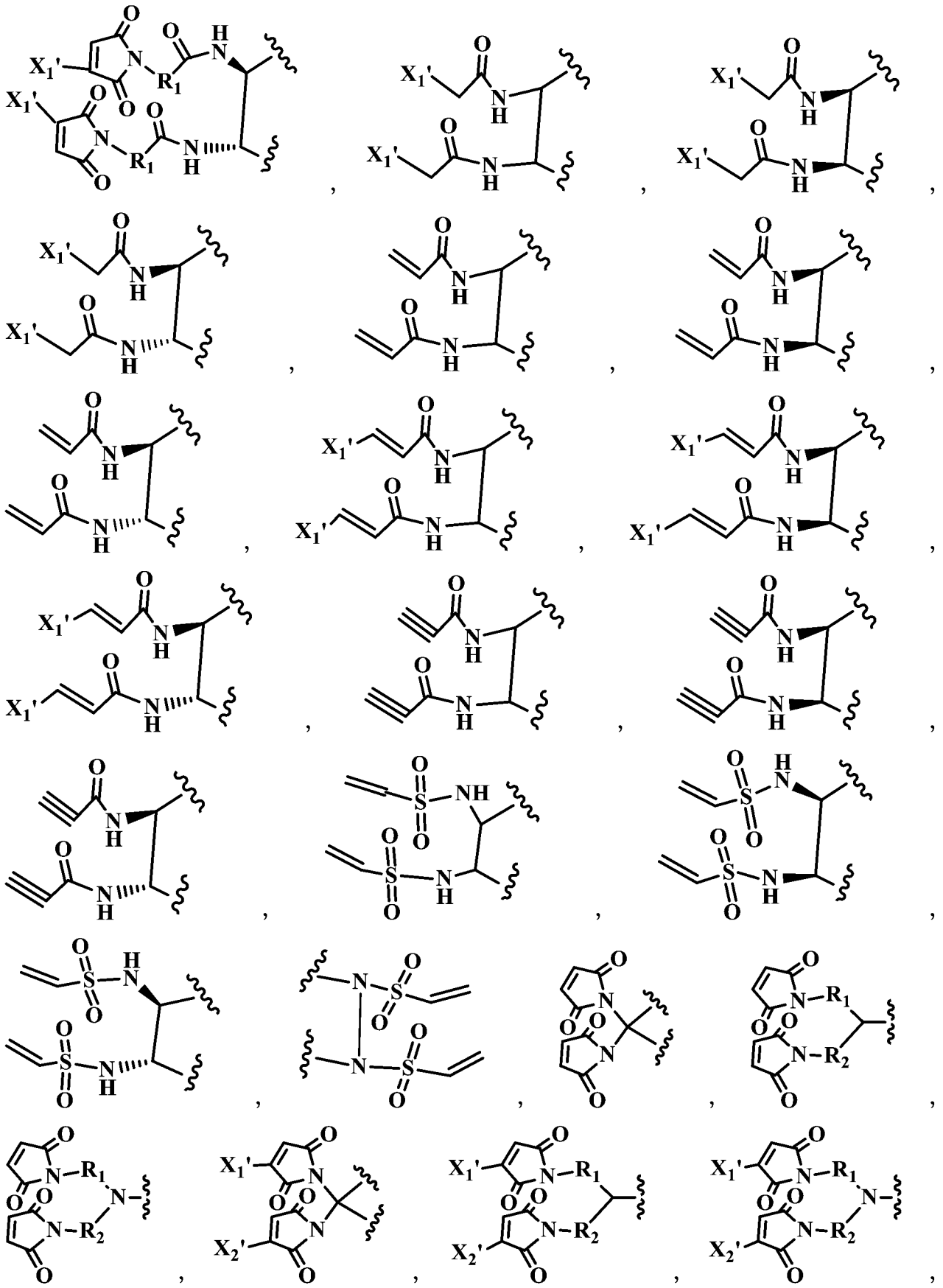

，

，

，

，

，其中 X_1’ 和X_2’ 獨立地為 F 、 Cl 、 Br 、 I 、 OTf 、 OMs 、 OC_6H_4（NO_2）、OC_6H_3（NO_2）$_2$、OC_6F_5、OC_6HF_4、或 Lv_3；X_2 是 O、NH、N（R_1）、或 CH_2；R_3 和 R_5 獨立地為 H、R_1、芳基團、雜芳香族或芳香族、其中 一個或幾個 H 原子獨立地被-R_1、-鹵素、-OR_1、-SR_1、-NR_1R_2、-NO_2、-S（O）R_1、-S（O）$_2R_1$ 或 -$COOR_1$ 取代；Lv_3 和 Lv_3’ 獨立地為 離去基團，選自由下列組成之群組F 、 Cl 、 Br 、 I 、硝基苯氧基；N-羥基琥珀醯亞胺（NHS）；苯氧基；苯巰基、二硝基苯氧基；五氟苯氧基；四氟苯氧基；二氟苯氧基；單氟苯氧基；五氯苯酚；三氟甲磺酸酯；咪唑；二氯苯氧基；四氯苯氧基；1-羥基苯並三唑；對甲苯磺酸；甲磺酸；2-乙基-5-苯基異惡唑-3'-磺酸酯，自身形成的酸酐，或與其他酸酐，例如乙酸酐、甲酸酐形成的酸酐；或使用縮合試劑生成的多肽偶聯反應中間物或Mitsunobu反應的中間物；

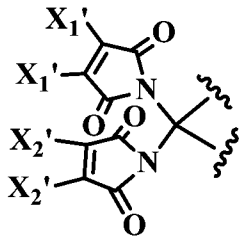
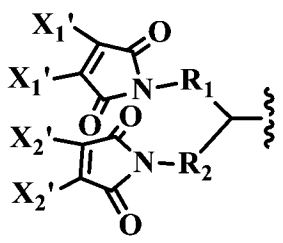
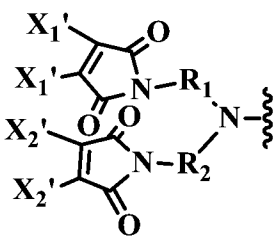
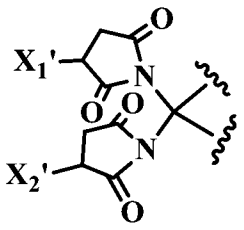
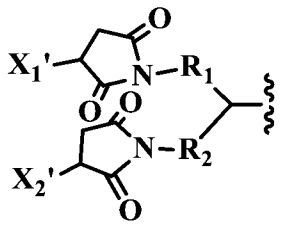
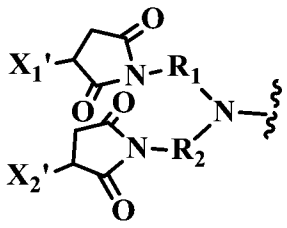
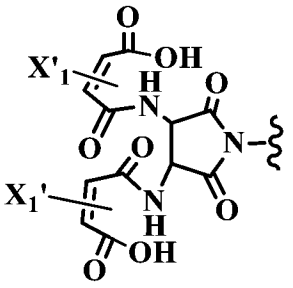
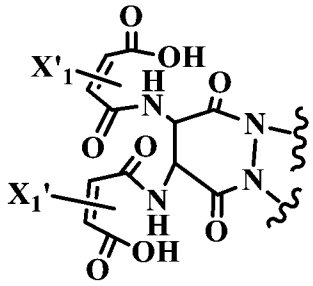
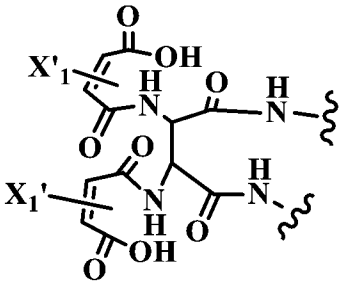
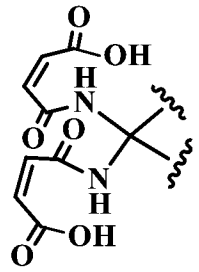
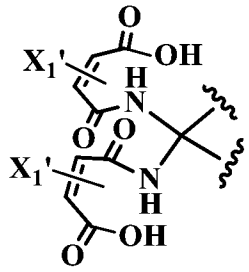
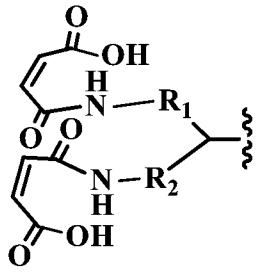
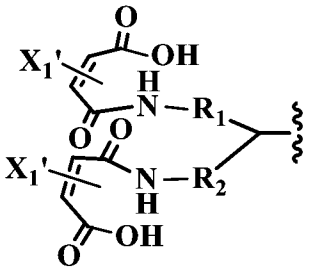
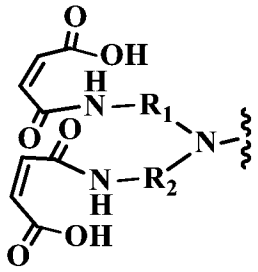
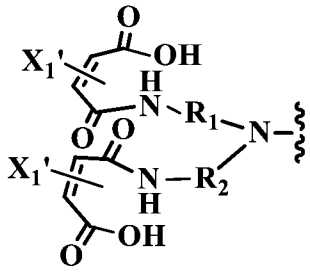
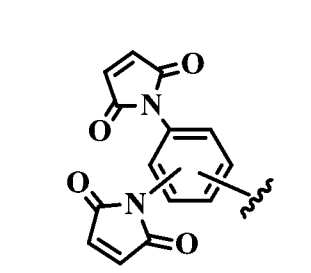
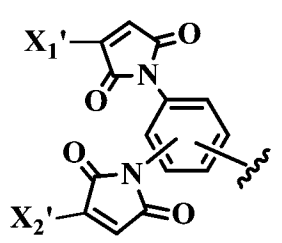
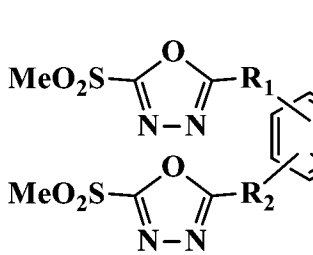
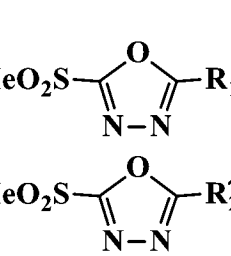
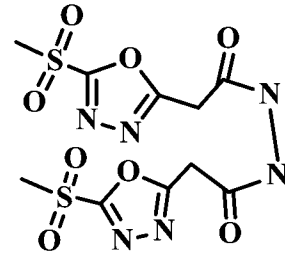
在式 （II） 和式 （III） 中，其中  和  選自由下列組成之群組：

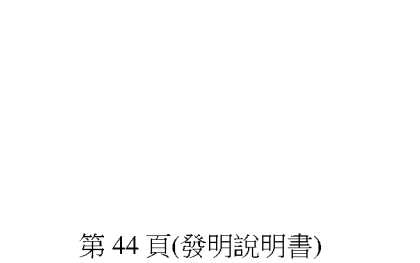
 雙取代馬來醯亞胺；  單取代琥珀醯亞

胺；  二取代琥珀醯亞胺；  雙苯硫基馬來醯亞胺，  雙鹵代噠嗪二酮，  雙苯硫基噠嗪二酮，  2-（（甲基磺醯基）甲基）丙烯醯基，  2-（（烷基或芳基磺醯基）甲基）丙烯醯基，  亞芳基二丙腈（ADPN），  或  二乙烯基吡啶，  二乙烯基吡嗪，  二乙烯基三嗪，或  3，4-雙（馬來醯亞胺）-2,5-二側氧基吡咯啶，  ，  ，  ，  ，  ，  ，

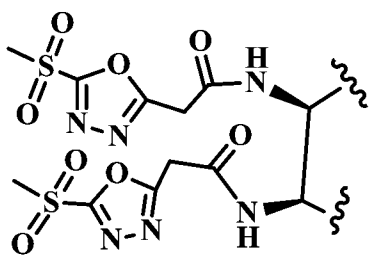
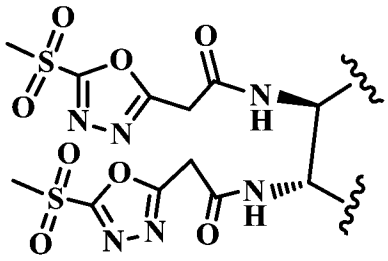

,

,

,




,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

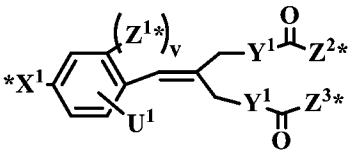

，

，其中 Lv_3、Lv_3’、X_1’和 X_2’如前文所述；兩個原子中間的連接鍵“— ”表示可以連接兩個原子中的任何一個。

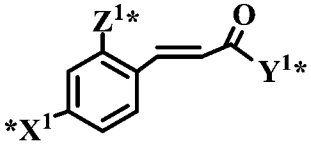
【0074】L_1 和 L_2 是，相同或不同，獨立地選自由下列組成之群組 O、NH、S、NHNH、N（R_3）、N（R_3）N（R_3·）、結構式為（OCH_2CH_2）$_pOR_3$、或（OCH_2CH（CH_3））$_pOR_3$、或 NH（CH_2CH_2O）$_pR_3$、或 NH（CH_2CH（CH_3）O）$_pR_3$·或N[（CH_2CH_2O）$_pR_3$][（CH_2CH_2O）$_p$·R_3·]、或（OCH_2CH_2）$_pCOOR_3$、或CH_2CH_2（OCH_2CH_2）$_pCOOR_3$的聚乙二醇單元、其中 p 和 p’獨立地選自由下列組成之群組0 至約1000的整數、或上述組合；C_1-C_8 烷基；C_2-C_8 雜烷基、烷基環烷基、雜環烷基；C_3-C_8 芳基、芳基烷基、雜環、碳環、環烷基、雜烷基環烷基、烷基羰基、雜芳基；其中 R_3 和 R_3· 獨立地為 H；C_1-C_8 烷基；C_2-C_8 雜烷基、烷基環烷基、雜環烷基；C_3-C_8 芳基、芳基烷基、雜環、碳環、環烷基、雜烷基環烷基、烷基羰基、雜芳基；或 1-8 個碳原子的酯、醚或醯胺；或定義中所述的1~8個天然或非天然胺基酸；或結構式為（OCH_2CH_2）$_p$或（OCH_2CH（CH_3））$_p$的聚乙二醇單元、其中p是0至約1000的整數，或上述組合；

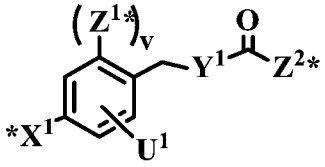
L_1 和 L_2獨立地可以含有自我毀滅或非自我毀滅的組分、肽單元、脲鍵、二硫化物、酯、肟、醯胺或硫醚鍵。自我毀滅單元包括但不限於，與對胺基苄基氨甲醯基（PAB）的電子結構相似的芳香化合物，例如2-胺基咪唑-5-甲醇的衍生物、雜環PAB類似物、β-葡糖醛酸苷、以及鄰或對胺

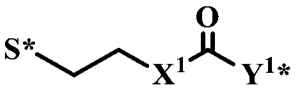
基苄基縮醛。

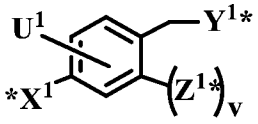
較佳的自我毀滅型連接子組分具有以下結構之一：


；


；

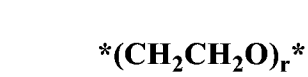

；.

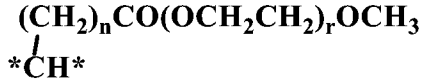

；或

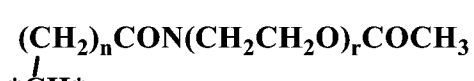


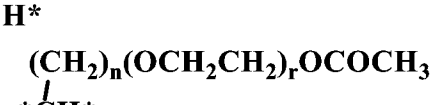
其中（*）是另外的間隔體或可斷裂的連接子單元，或細胞毒劑、和/或細胞結合分子（CBA）的連接點；X^1、Y^1、Z^2 和 Z^3 獨立地為 NH、O、或 S；Z^1 獨立地為 H、NH、O 或 S；v 是 0 或 1；U^1 獨立地為 H、OH、C_1~C_6 烷基、$(OCH_2CH_2)_nF$、Cl、Br、I、OR_5、SR_5、NR_5R_5’、$N=NR_5$、$N=R_5$、NR_5R_5’、NO_2、SOR_5R_5’、SO_2R_5、SO_3R_5、OSO_3R_5、PR_5R_5’、POR_5R_5’、$PO_2R_5R_5$’、OPO（OR_5）（OR_5’）、或 OCH_2PO（OR_5（OR_5’）其中 R_5 和 R_5’ 如前文所定義；較佳地 R_5和 R_5’ 獨立地選自由下列組成之群組 H、C_1~C_8 烷基、C_2~C_8 烯基、炔基或雜烷基、C_3~C_8 芳基、雜環、碳環、環烷基、雜環烷基、雜芳烷基、烷基羰基或糖苷；或藥用陽離子鹽。

【0075】非自我毀滅型連接子組分為以下結構之一：

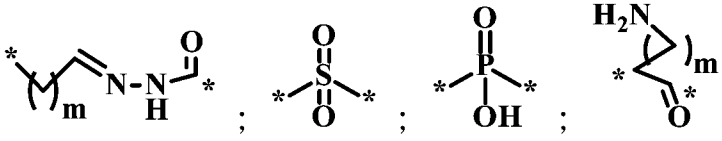

；

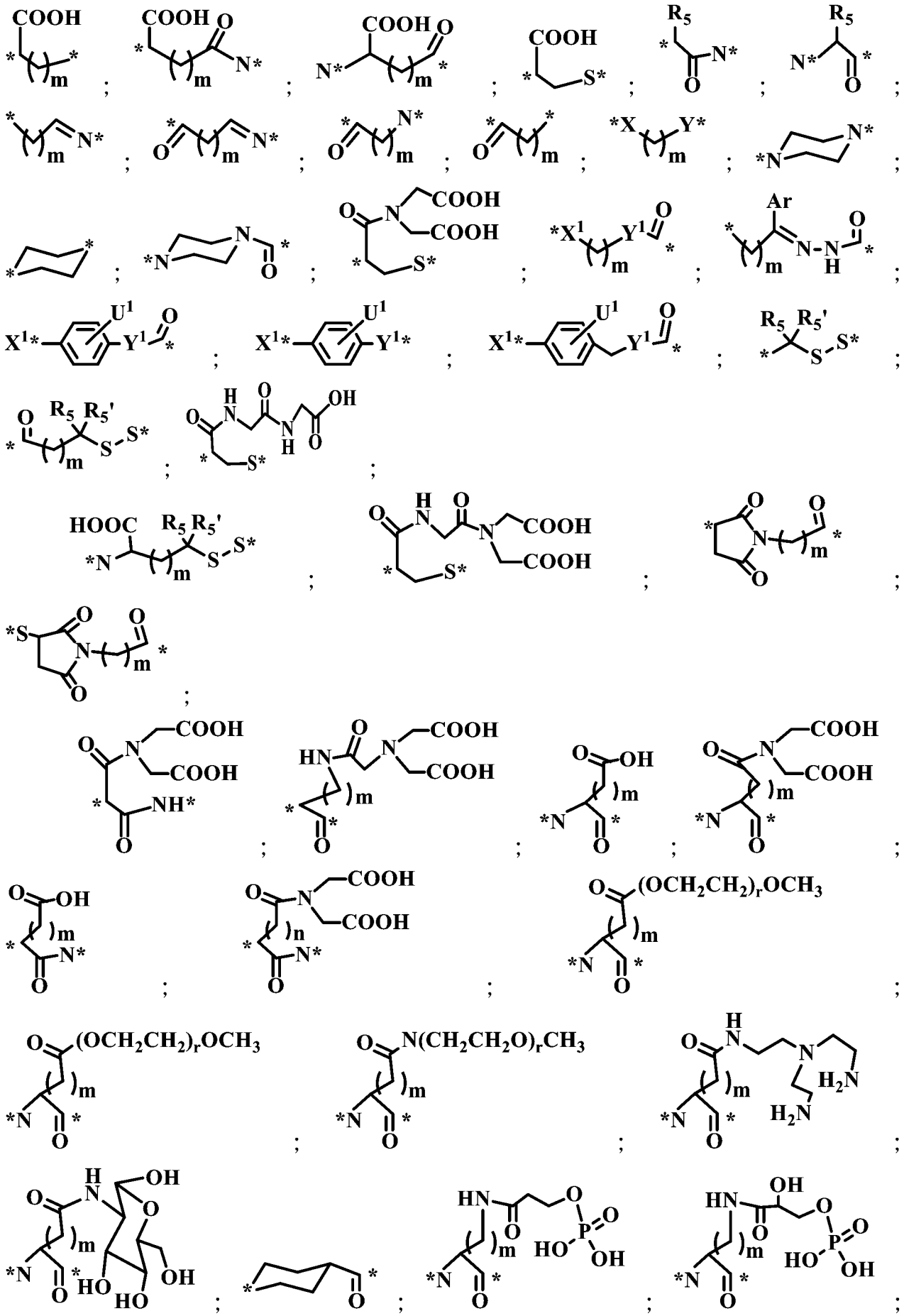

；

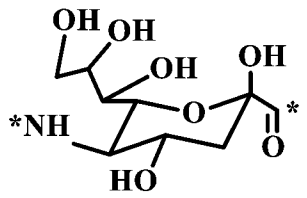
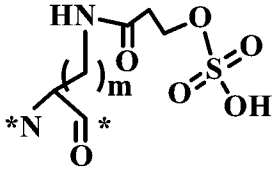
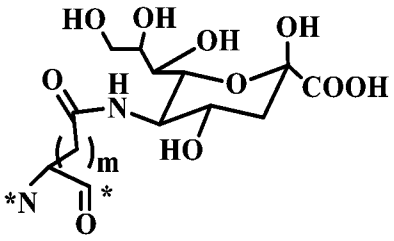
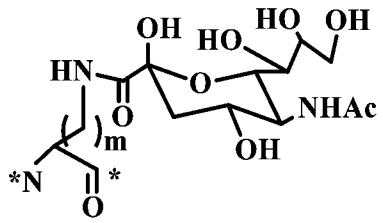
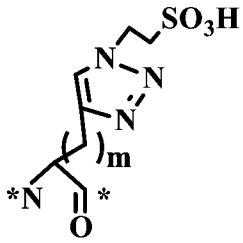
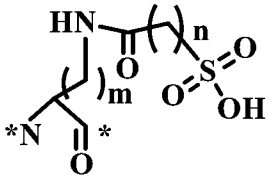
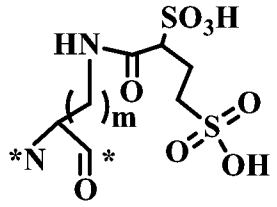
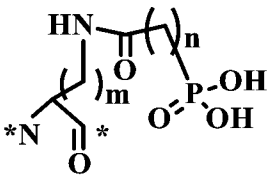

；


；


；






;

;

;

;

;

;

;

;

其中（*）是另外的間隔體R_1或可斷裂的連接子單元、或細胞毒性分子和/或細胞結合分子的連接點；X^1、Y^1、U^1、R_5、R_5'如前文所定義；r是0-100；m和n獨立地為0-6。

【0076】 更佳地，L_1或L_2可獨立地由一個或多個下列連接子組分構成：6-馬來醯亞胺基己醯基（“MC”）、馬來醯亞胺丙醯基（“MP”）、纈氨酸-瓜氨酸（“val-cit”或“vc”）、丙氨酸-苯丙氨酸（“ala-phe”或“af”）、對胺基苄氧基羰基（“PAB”）、4-硫代戊醯基（“SPP”）、4-（N-馬來醯亞胺甲基）環己烷-1醯基（“MCC”）、（4-乙醯基）胺基苯醯基（“SIAB”）、4-硫丁醯基（SPDB）、4-硫-2-羥基磺醯基-丁醯基（2-Sulfo-SPDB），或含有1-8個天然或非天然胺基酸單元的天然或非天然肽。

【0077】 進一步較佳地，L_1和L_2獨立地是可斷裂連接子。術語“可斷裂”是指連接子上包含至少一個可在生理條件下被破壞的鍵，例如pH、酸、鹼、氧化作用、代謝、生化或酶不穩定的鍵。應當理解，導致鍵斷裂

不一定是生物或代謝過程，而可能是一個標準化學反應，例如水解或取代反應。這種生理條件的例子有 pH值比細胞漿內pH低的內涵體，和/或它能夠與細胞內巰基發生二硫鍵交換反應，惡性細胞記憶體在的毫摩爾濃度的大量谷胱甘肽。

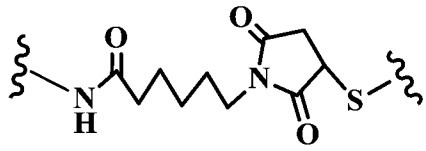
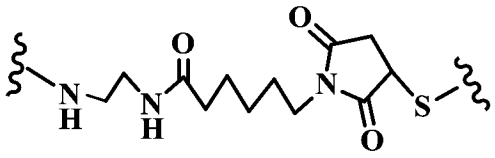
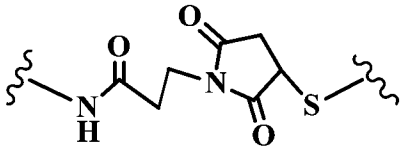
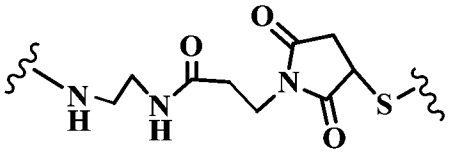
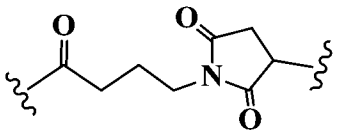
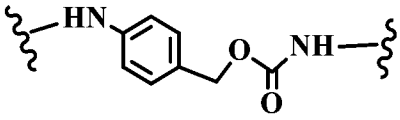
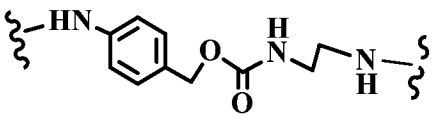
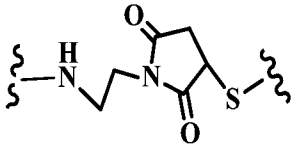
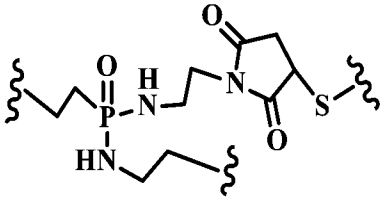
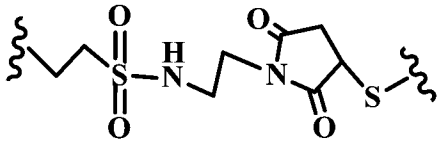
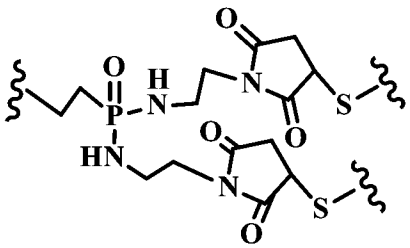
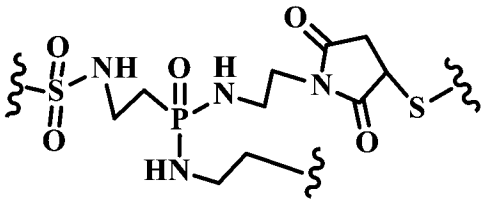
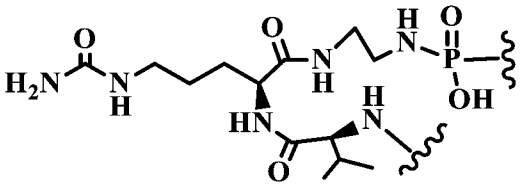
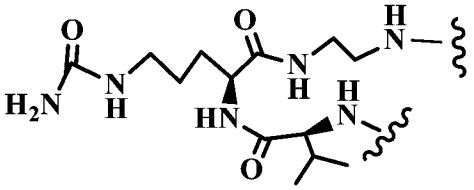
【0078】 可斷裂連接子（L，L_1 或 L_2）的實例包括但不限於：

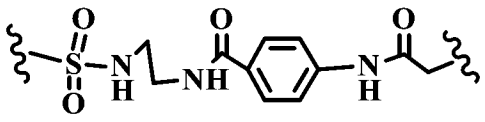
-（CR_5R_6）$_m$（Aa）r（CR_7R_8）$_n$（OCH_2CH_2）$_t$-、-（CR_5R_6）$_m$（CR_7R_8）$_n$（Aa）$_r$（OCH_2CH_2）$_t$-、-（Aa）$_r$-（CR_5R_6）$_m$（CR_7R_8）$_n$（OCH_2CH_2）$_t$-、-（CR_5R_6）$_m$（CR_7R_8）$_n$（OCH_2CH_2）$_r$（Aa）$_t$-、-（CR_5R_6）$_m$-（CR_7=CR_8）（CR_9R_{10}）$_n$（Aa）$_t$（OCH_2CH_2）$_r$-、-（CR_5R_6）$_m$（$NR_{11}CO$）（Aa）$_t$（CR_9R_{10}）$_n$-（OCH_2CH_2）$_r$-、-（CR_5R_6）$_m$（Aa）$_t$（$NR_{11}CO$）（CR_9R_{10}）$_n$（OCH_2CH_2）$_r$-、-（CR_5R_6）$_m$（OCO）（Aa）$_t$（CR_9R_{10}）$_n$-（OCH_2CH_2）$_r$-、-（CR_5R_6）$_m$（$OCNR_7$）（Aa）$_t$（CR_9R_{10}）$_n$（OCH_2CH_2）$_r$-、-（CR_5R_6）$_m$（CO）（Aa）$_t$-（CR_9R_{10}）$_n$（OCH_2CH_2）$_r$-、-（CR_5R_6）$_m$（$NR_{11}CO$）（Aa）$_t$（CR_9R_{10}）$_n$（OCH_2CH_2）$_r$-、-（CR_5R_6）$_m$-（OCO）（Aa）$_t$（CR_9R_{10}）$_n$-（OCH_2CH_2）$_r$-、-（CR_5R_6）$_m$（$OCNR_7$）（Aa）$_t$（CR_9R_{10}）$_n$（OCH_2CH_2）$_r$-、-（CR_5R_6）$_m$（CO）（Aa）$_t$（CR_9R_{10}）$_n$-（OCH_2CH_2）$_r$-、-（CR_5R_6）$_m$-苯基-CO（Aa）$_t$（CR_7R_8）$_n$-、-（CR_5R_6）$_m$-呋喃-CO（Aa）$_t$（CR_7R_8）$_n$-、-（CR_5R_6）$_m$-惡唑-CO（Aa）$_t$（CR_7R_8）$_n$-、-（CR_5R_6）$_m$惡唑-CO-（Aa）$_t$（CCR_7R_8）$_n$-、-（CR_5R_6）$_t$-噻吩-CO（CR_7R_8）$_n$-、-（CR_5R_6）$_t$-咪唑-CO-（CR_7R_8）$_n$-、-（CR_5R_6）$_t$-嗎啉-CO（Aa）$_t$-（CR_7R_8）$_n$-、-（CR_5R_6）$_t$呱嗪-CO（Aa）$_t$（CR_7R_8）$_n$-、-（CR_5R_6）$_t$-N-甲基呱嗪-CO（Aa）$_t$-（CR_7R_8）$_n$-、-（CR_5R）$_m$-（Aa）$_t$苯基-、-（CR_5R_6）$_m$-（Aa）$_t$呋喃-、-（CR_5R_6）$_m$-惡唑（Aa）$_t$-、-（CR_5R_6）$_m$-惡唑（Aa）$_t$-、-（CR_5R_6）$_m$-噻吩-（Aa）$_t$-、-（CR_5R_6）$_m$-咪唑（Aa）$_t$-、-（C R_5R_6）$_m$-嗎啉-（Aa）$_t$-、-（CR_5R_6）$_m$-呱嗪-（Aa）$_t$-、-（CR_5R_6）$_m$-N-甲基呱嗪-（Aa）$_t$-、-K

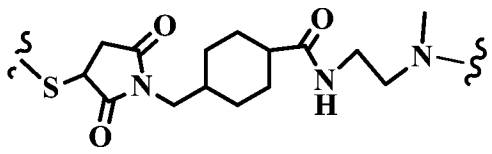
（CR_5R_6）$_m$（Aa）r（CR_7R_8）$_n$（OCH_2CH_2）$_t$-、-K（CR_5R_6）$_m$（CR_7R_8）$_n$-（Aa）$_r$（OCH_2CH_2）$_t$-、-K（Aa）$_r$（CR_5R_6）$_m$（CR_7R_8）$_n$（OCH_2CH_2）$_t$-、-K（CR_5R_6）$_m$（CR_7R_8）$_n$-（OCH_2CH_2）$_r$（Aa）$_t$-、-K（CR_5R_6）$_m$（CR_7=CR_8）（CR_9R_{10}）$_n$（Aa）$_t$（OCH_2CH_2）$_r$-、-K（CR_5R_6）$_m$-（$NR_{11}CO$）（Aa）$_t$（CR_9R_{10}）$_n$（OCH_2CH_2）$_r$-、-K（CR_5R_6）$_m$（Aa）$_t$（$NR_{11}CO$）（CR_9R_{10}）$_n$（OCH_2CH_2）$_r$-、-K（CR_5R_6）$_m$（OCO）（Aa）$_t$（CR_9R_{10}）$_n$-（OCH_2CH_2）$_r$-、-K（CR_5R_6）$_m$（$OCNR_7$）（Aa）$_t$（CR_9R_{10}）$_n$-（OCH_2CH_2）$_r$-、-K（CR_5R_6）$_m$（CO）（Aa）$_t$-（CR_9R_{10}）$_n$（OCH_2CH_2）$_r$-、-K（CR_5R_6）$_m$（$NR_{11}CO$）-（Aa）$_t$（CR_9R_{10}）$_n$（OCH_2CH_2）$_r$-、-K（CR_5R_6）$_m$-（OCO）（Aa）$_t$（CR_9R_{10}）$_n$（OCH_2CH_2）$_r$-、-K（CR_5R_6）$_m$（$OCNR_7$）（Aa）$_t$（CR_9R_{10}）$_n$（OCH_2CH_2）$_r$-、-K（CR_5R_6）$_m$（CO）（Aa）$_t$（CR_9R_{10}）$_n$-（OCH_2CH_2）$_r$-、-K（CR_5R_6）$_m$-苯基-CO（Aa）$_t$（CR_7R_8）$_n$-、-K-（CR_5R_6）$_m$-呋喃-CO（Aa）$_t$-（CR_7R_8）$_n$-、-K（CR_5R_6）$_m$-惡唑-CO（Aa）$_t$（CR_7R_8）$_n$-、-K（CR_5R_6）$_m$-惡唑-CO（Aa）$_t$-（CR_7R_8）$_n$-、-K（CR_5R_6）$_t$-噻吩-CO（CR_7R_8）$_n$-、-K（CR_5R_6）$_t$咪唑-CO-（CR_7R_8）$_n$-、-K（CR_5R_6）$_t$嗎啉-CO（Aa）$_t$（CR_7R_8）$_n$-、 -K（CR_5R_6）$_t$吡嗪-CO（Aa）$_t$-（CR_7R_8）$_n$-、-K（CR_5R_6）$_t$-N-甲基吡嗪CO（Aa）$_t$（CR_7R_8）$_n$-、-K（CR_5R）$_m$（Aa）$_t$苯基、-K-（CR_5R_6）$_m$-（Aa）$_t$呋喃-、-K（CR_5R_6）$_m$-惡唑（Aa）$_t$-、-K（CR_5R_6）$_m$-惡唑（Aa）$_t$-、-K（CR_5R_6）$_m$-噻吩-（Aa）$_t$-、-K（CR_5R_6）$_m$-咪唑（Aa）$_t$-、-K（CR_5R_6）$_m$-嗎啉（Aa）$_t$-、-K（CR_5R_6）$_m$-吡嗪-（Aa）$_t$G、-K（CR_5R_6）$_m$N-甲基吡嗪（Aa）$_t$-；其中 m、Aa、m、n、R_3、R_4、和 R_5 定義如前文所描述；t和 r 獨立地為 0 – 100；R_6、R_7、和 R_8獨立地選自由下列組成之群組 H；鹵化物；C_1~C_8烷基、芳基、烯基、炔基、醚、酯、胺或醯胺，任選地被一種或多種鹵化物取代，CN、NR_1R_2、CF_3、OR_1、Aryl、雜環、S（O）R_1、SO_2R_1、-CO_2H、-SO_3H、-OR_1、-CO_2R_1、-$CONR_1$、-$PO_2R_1R_2$、-PO_3H 或 P（O）

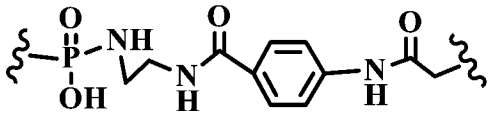
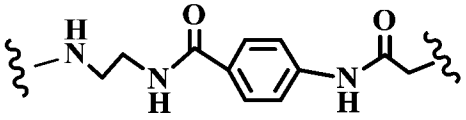
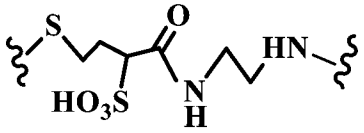
$R_1R_2R_3$；K 是 NR_1、-SS-、-C（=O）-、-C（=O）NH-、-C（=O）O-、-C=NH-O-、-C=N-NH-、-C（=O）NH-NH-、O、S、Se、B 或 C_3-C_6 雜芳基。

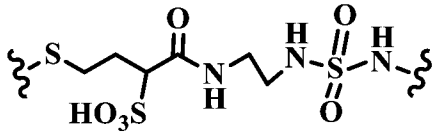
【0079】 連接子L_1和L_2的組分的示例結構有：

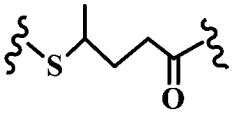
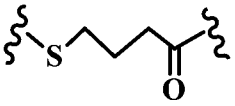
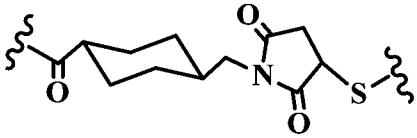
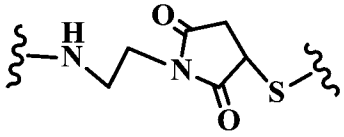
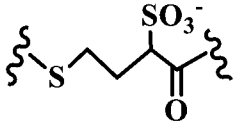
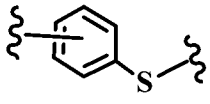
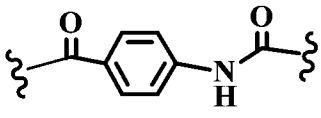
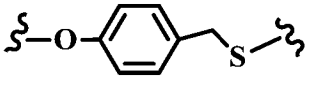
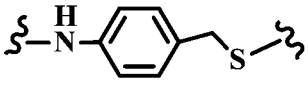
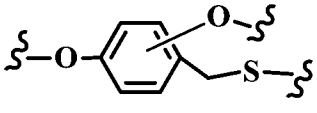
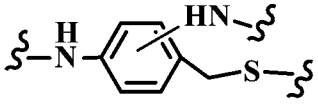
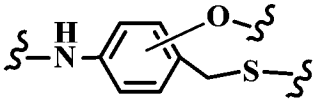
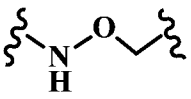
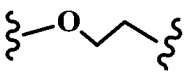

，

（包含 MC，6-馬來醯亞胺己醯基），

，

（MP，馬來醯亞胺丙醯基），

，

，

（PAB，p-對胺基苄氧基醯胺基），

，

，

，

，

，

，

（含纈氨酸-

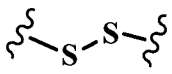
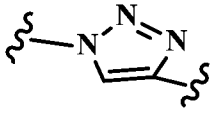
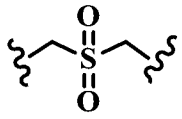
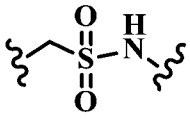
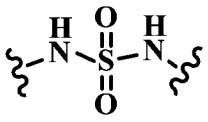
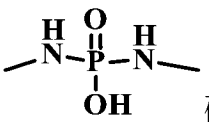
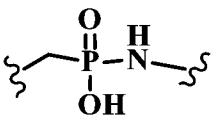
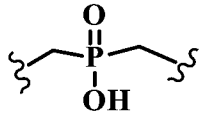
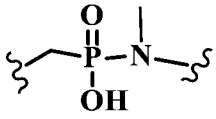
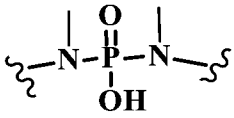
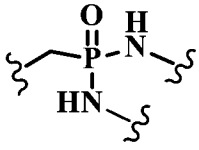
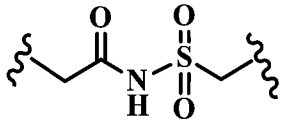
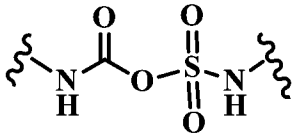
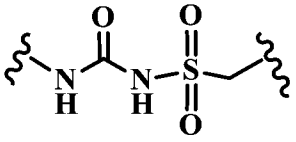
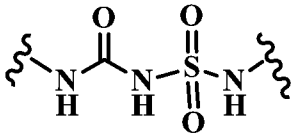
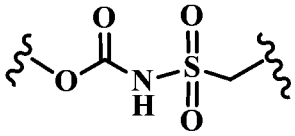
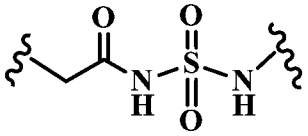
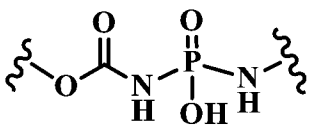
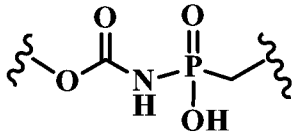
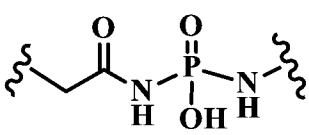
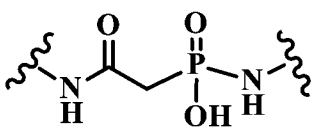
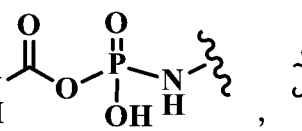
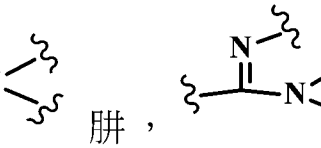
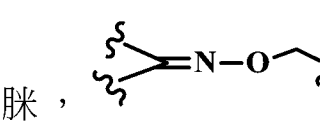
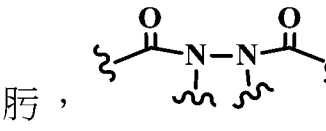
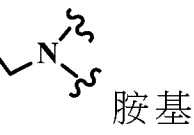
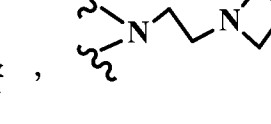
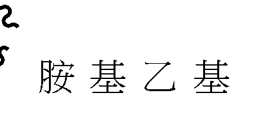
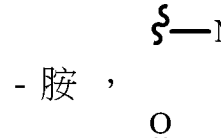
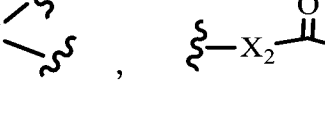
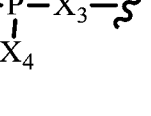
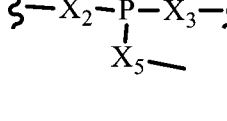
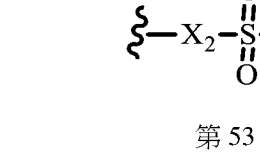
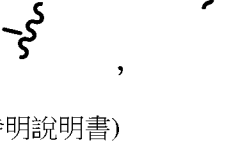
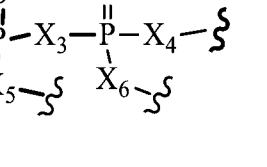
瓜氨酸（VC）），  ，

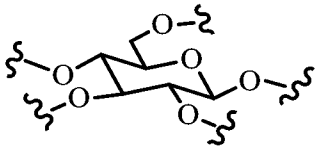
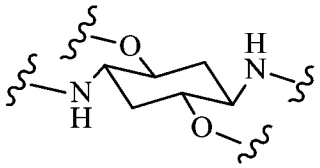
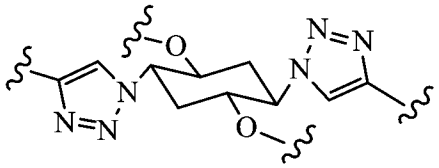
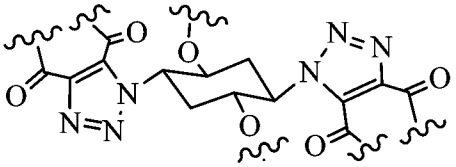
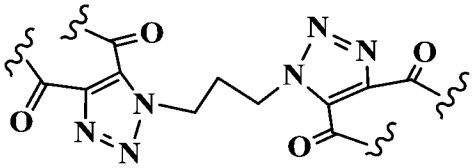
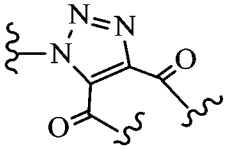
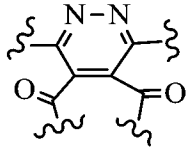
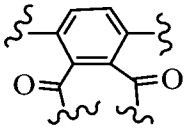
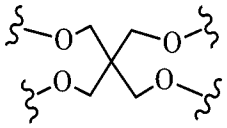
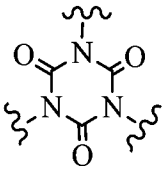
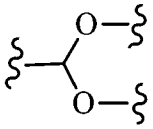
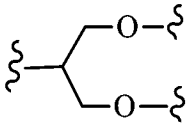
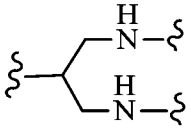
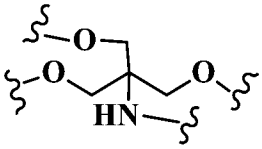
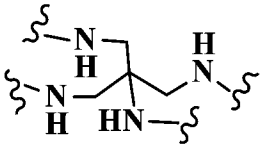
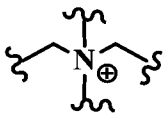
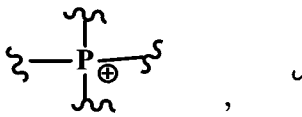
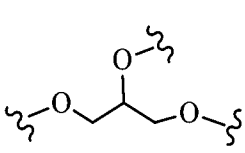
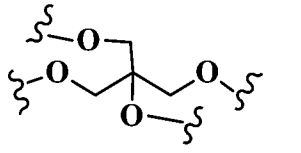
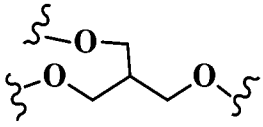
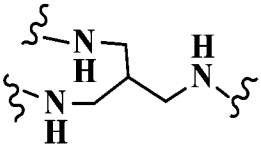
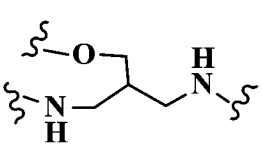
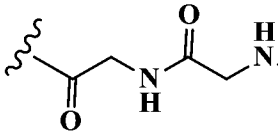
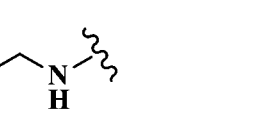
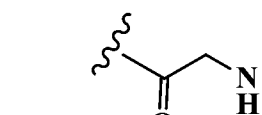
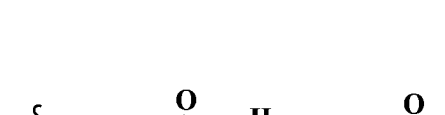
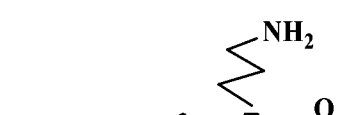


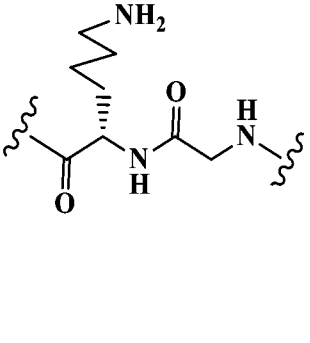
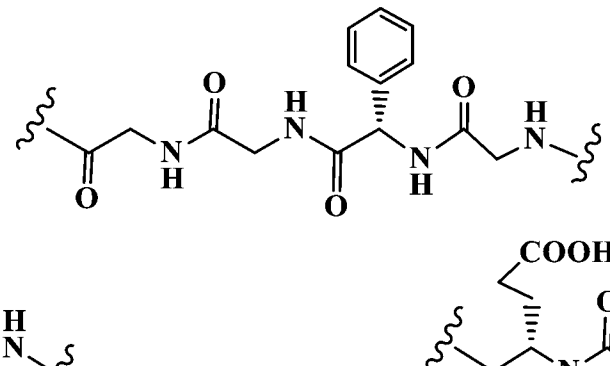
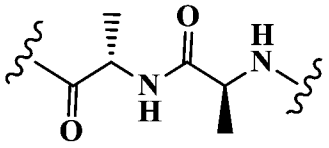
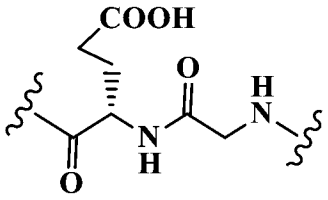
（MCC，4-（N-馬來醯亞胺甲基）環己烷-1羧酸酯），  ，  （（4-乙醯基）胺基苯甲酸酯），  ，

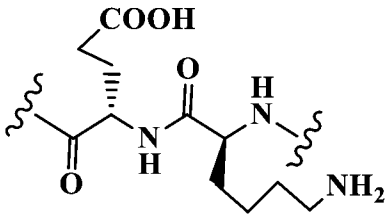
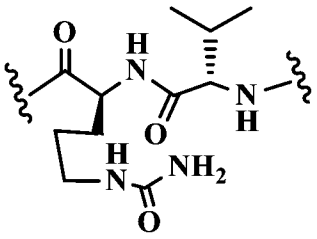
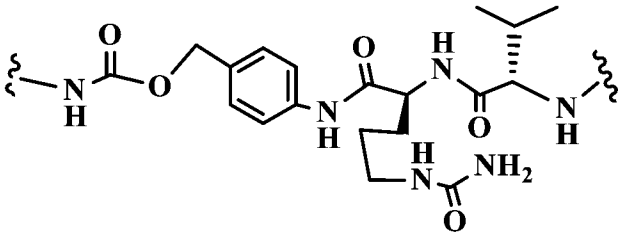
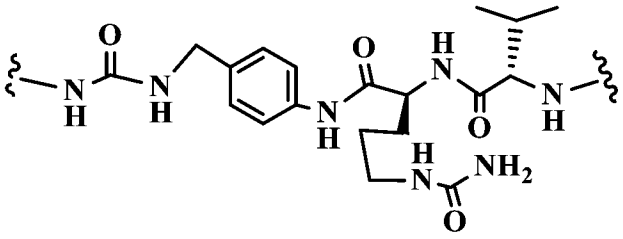
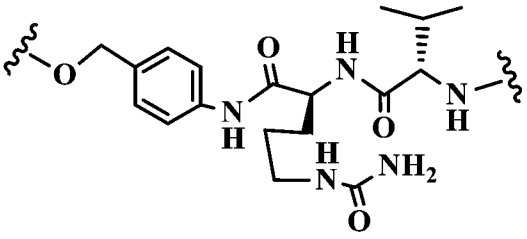
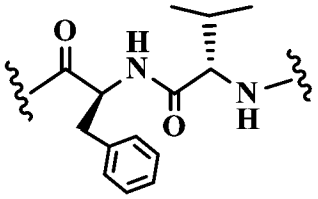
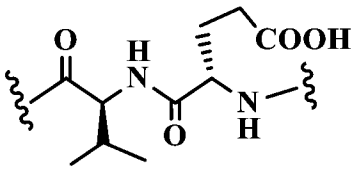
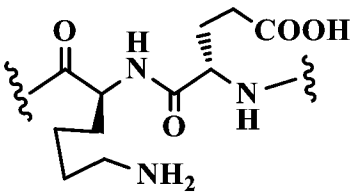
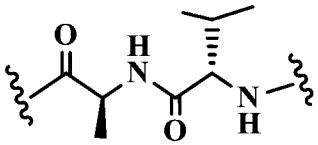
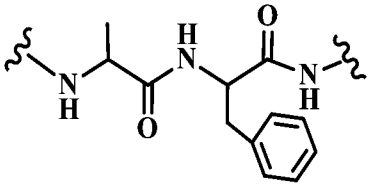
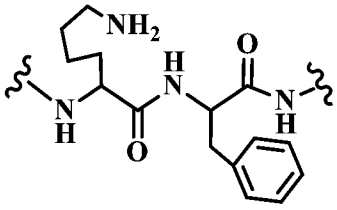


（4-硫代-2-羥基磺醯丁酸酯，2-磺基-SPDB），  4-硫代戊酸酯（SPP），  4-硫代丁醯基（SPDB），（PAB），  4-（N-馬來醯亞胺基甲基）環己烷-1-醯基（MCC），  馬來醯亞胺乙胺基（ME），  4-硫代-2-羥基磺醯基丁醯基（2-Sulfo-SPDB），  芳基氨醚基（PhSS），  （4-乙醯基）胺基苯醯基（SIAB），  ，氧苄基硫醚基，  胺基苄基硫醚基，  二氧基苄基硫醚基，  二胺基苄基硫醚基，  胺基氧基苄基硫醚基，  烷氧基胺基（AOA），  亞乙基氧基

（EO），  二硫，  4-甲基-4-二硫代戊酸（MPDP），  三唑，  烷基磺醯基，  烷基磺胺，  碸基二磺胺，  磷二醯胺，  烷基膦醯胺，  膦酸，  N-甲基烷基膦醯胺，  N,N’-二甲基磷二醯胺，  N,N'-二甲基膦二胺，  ，  ，  ，  ，  ，  ，  ，  ，  ，  ，  ，  ，  ，  ，  肼，  乙脒，  肟，  二乙醯肼，  胺基乙基胺，  胺基乙基-胺基乙基-胺，  ，  ，  ，  ，  ，  ，，  ，


,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

gly-gly-gly ,

gly-gly ,

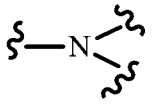
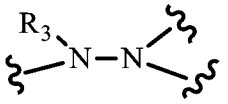
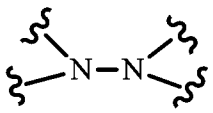
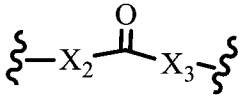
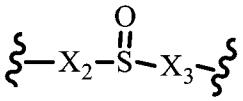
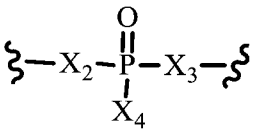
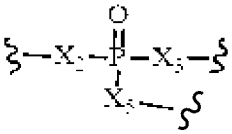
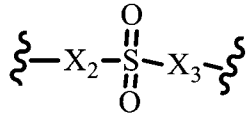
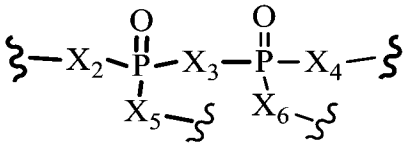
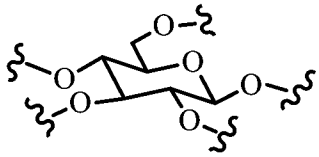
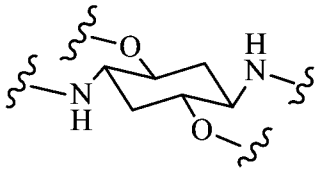
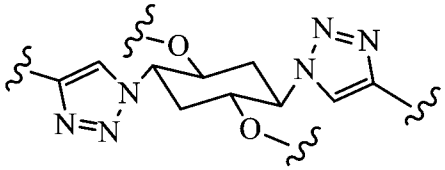
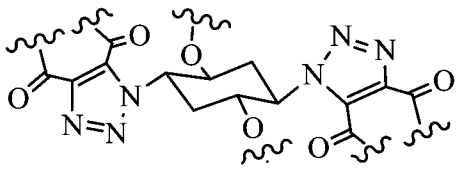
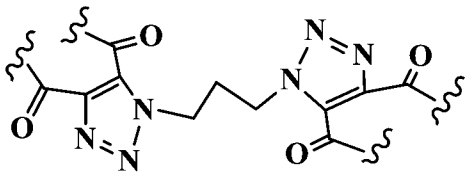
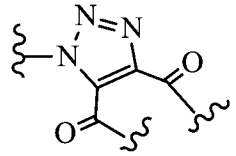
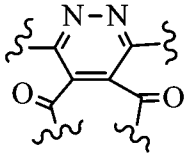
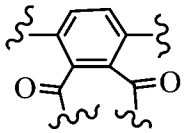
gly-gly-gly-gly ,

Lys-gly ,

gly-gly-phe-gly ,

ala-ala ,

glu-gly ,

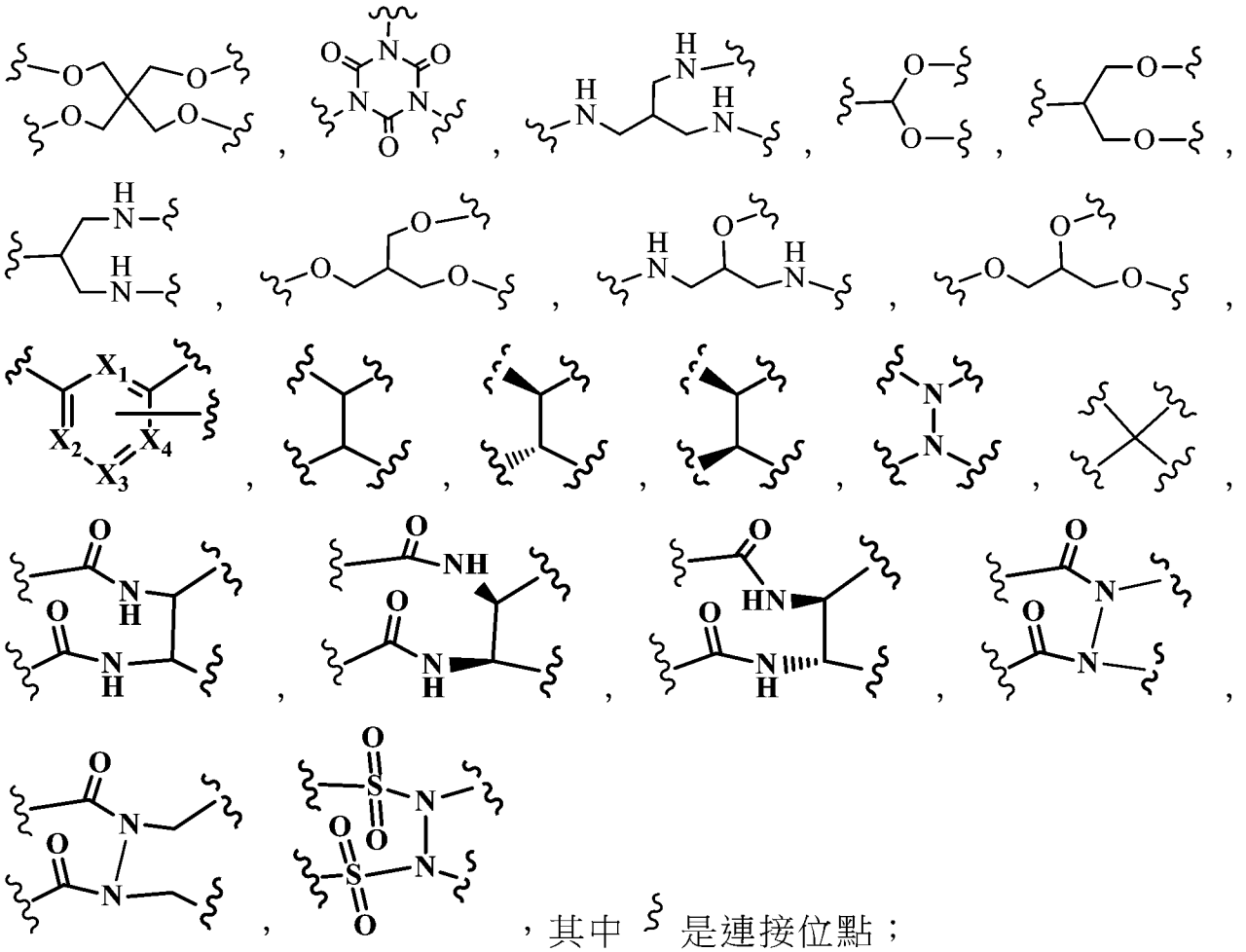

glu-lys，  （VC），  ，  ，  ，  ，  ，  ，  ，  （ala-phe），  （lys-phe），或兩個或多個的組合；其中 $\S$ 是連接位點；X_2、X_3、X_4、X_5、或 X_6，獨立地選自由下列組成之群組 NH、NHNH、N（R_{12}）、N（R_{12}）N（$R_{12'}$）、O、S、C_1-C_6 烷基、C_2-C_6 雜烷基、烷基環烷基、雜環烷基、C_3-C_8 芳基、芳基烷基、雜環、碳環、環烷基、雜烷基環烷基、烷基羰基、雜芳基、CH_2OR_{12}、CH_2SR_{12}、CH_2NHR_{12}、或 1~8 胺基酸；其中 R_{12} 和 $R_{12'}$ 獨立地為 H、C_1-C_8烷基、C_2-C_8 雜烷基、烷基環烷基、雜環烷基；C_3-C_8 芳基、芳基烷基、雜環、

碳環、環烷基、雜烷基環烷基、烷基羰基、雜芳基；或C_1-C_8酯、醚或醯胺；或結構式為 （OCH_2CH_2）$_p$ 或 （OCH_2CH（CH_3））$_p$的聚乙二醇單元， 其中p是0至約100的整數，或兩個或多個的組合。

【0080】 另外，L_1、L_2、X_1、X_2、X_3、$X_{1'}$、$X_{2'}$、和 $X_{3'}$可獨立地缺省。

【0081】 E_1是連接兩個巯基可反應基團Lv_1和Lv_2的連接基團。E_1選自由下列組成之群組CH、CH_2、NH、NHNH、N（R_3）、N（R_3）N（$R_{3'}$）、N=N、N-N、P、P（=O）、S、Si、C_2-C_8 烷基、雜烷基、烷基環烷基、雜環烷基；C_3-C_8芳基、芳基烷基、雜環、碳環、環烷基、雜烷基環烷基、烷基羰基、雜芳基；含有1~4個胺基酸殘基的肽、較佳自天冬氨酸、麩胺酸、精氨酸、組氨酸、賴氨酸、絲氨酸、蘇氨酸、天冬醯胺、穀氨醯胺、半胱氨酸、硒代半胱氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、脯氨酸、色氨酸、丙氨酸；或以下結構之一：


，

，

，

，

，

，

，

，

，

，

，

，

，

，

，

，

，



，其中 ≈ 是連接位點；

D是細胞毒性藥物、或治療性藥物、或免疫治療性蛋白、或用於增強細胞結合蛋白試劑的結合力或穩定性的功能性分子、或細胞表面受體結合劑，例如抗體或抗體片段、或siRNA或DNA分子。

【0082】 細胞毒藥物選自由下列組成之群組但不限於：

1）化療藥物：a）烷基化劑，氮芥：氯苯那普，氯普那嗪，環磷醯胺，達卡巴嗪，雌二醇氮芥，異環磷醯胺，氮芥，鹽酸二甲氧胺，氧化二氮芥，鹽酸氨氯地平，麥考酚酸，衛矛醇，呱泊溴烷，新氮芥，苯芥膽甾醇，松龍苯芥，噻替呱，曲磷胺對，尿嘧啶；CC-1065（包括其阿多來新、卡折來新、比折來新及其合成類似物）；多卡黴素（包括KW-2189和CBI-TMI、及其合成類似物）；苯並二氮卓二聚體（包括吡咯並苯二氮卓（PBD）或托美黴素，吲哚並苯並二氮卓，咪唑並苯並噻二氮卓或惡唑

烷並苯並二氮卓的二聚體）；亞硝基脲（卡莫司汀，洛莫司汀，氯化梭菌素，福莫司汀，尼莫司汀，拉莫司汀）；烷基磺酸酯（白蘇芬、樹蘇芬、磺胺異丙磺胺和皮蘇芬）；三氮烯（達卡巴嗪）；含鉑化合物（卡鉑，順鉑，奧沙利鉑）；吖丙啶類，苯並二氫呱喃酮，卡洛酮，美妥替派和烏雷多巴；乙烯亞胺和甲基三聚氰胺，包括六甲蜜胺，三亞乙基三胺，三乙基磷醯胺，三亞乙基硫代磷醯胺和三羥甲基甲基胺；b）植物生物鹼：長春花生物鹼（長春新鹼，長春鹼，長春地辛，長春瑞濱，去甲長春鹼）；紫杉醇類（紫杉醇，多西紫杉醇及其類似物）；美登素類（DM1、DM2、DM3、DM4、美登素、安沙黴素及其類似物）；cryptophycin（特別是cryptophycin 1和cryptophycin 8）；埃博黴素，軟珊瑚醇，迪莫利德，草苔蟲內酯，海兔毒素，奧瑞他汀，微管毒素，cephalostatin；pancratistatin；sarcodictyin；海綿抑制素；c）DNA拓撲異構酶抑制劑，依託泊苷替尼（9-胺基喜樹鹼，喜樹鹼，克立那托，朵拉黴素，依託泊苷，磷酸依託泊苷，伊立替康，米托蒽醌，諾消靈，視黃酸（視黃醇），替尼泊苷，拓撲替康，9-硝基喜樹鹼（RFS 2000））；絲裂黴素（絲裂黴素C）；d）抗代謝物，抗葉酸劑，DHFR抑制劑（甲氨蝶呤，曲麥克特，二甲葉酸，蝶羅呤，氨喋呤（4-胺基苯甲酸）或其他葉酸類似物）；IMP脫氫酶抑制劑 （麥考酚酸，噻唑呋林，利巴韋林，EICAR）；核糖核苷酸還原酶抑制劑（羥基脲，去鐵胺）；嘧啶類似物，尿嘧啶類似物（安西他濱，阿紮胞苷，6-氮尿嘧啶，卡培他濱（希羅達），卡莫氟，阿糖胞苷，雙去氧尿苷，去氧氟尿苷，依諾他濱，5-氟尿嘧啶，氟尿苷，ratitrexed（Tomudex）；胞嘧啶類似物（阿糖胞苷，胞嘧啶阿拉伯糖苷，氟達拉濱）；嘌呤類似物（硫唑嘌呤，氟達拉濱，巯嘌呤，硫胺素，

硫鳥嘌呤）；葉酸補充劑，弗洛林酸；e）激素療法劑，受體拮抗劑，抗雌激素（甲地孕酮，雷洛昔芬，他莫昔芬），LHRH興奮劑（戈斯他林，醋酸亮丙瑞林）；抗雄激素藥（比卡魯胺，氟他胺，卡魯司酮，丙酸倍他雄酮，表雄甾醇，戈舍瑞林，亮丙瑞林，美替利定，尼魯米特，睾內酯，曲洛司坦及其他雄激素抑制劑）；維甲類化合物，維生素D3類似物（CB1093，EB1089，KH1060，膽鈣化醇，麥角鈣化甾醇）；光動力療法劑（維替泊芬，酞菁，光敏劑Pc4，去甲氧基-竹紅菌素A）；細胞因數（干擾素-α，干擾素-γ，腫瘤壞死因數（TNF），含TNF的人蛋白）；f）激酶抑制劑，BIBW 2992（抗-EGFR/Erb2），伊馬替尼，吉非替尼，呱加他尼，索拉非尼，達沙替尼，舒尼替尼，厄洛替尼，尼洛替尼，拉帕替尼，阿西替尼，帕唑帕尼，凡德他尼，E7080（抗VEGFR2），mubritinib，普納替尼（AP24534），bafetinib（INNO-406），bosutinib（SKI-606），卡博替尼，維莫德吉，iniparib，盧梭利替尼，CYT387，阿西替尼，tivozanib，索拉非尼，貝伐單抗，西妥昔單抗，曲妥珠單抗，雷珠單抗，帕尼單抗，伊斯平斯；g）抗生素，如烯二炔類抗生素（加利車黴素，特別是加利車黴素γ1，δ1，α1和β 1，參見，例如，*J. Med. Chem.*, 39 (11), 2103–2117 (1996)，Angew Chem Intl. Ed. Engl. 33:183-186 (1994)。達因黴素，包括達因黴素A和去氧米黴素，埃斯培拉黴素，卡達黴素，C-1027，maduropeptin，新卡嗪奧斯丁和相關色蛋白烯二炔抗生素），aclacinomysins，放線菌素，安麴黴素，重氮絲氨酸，博來黴素，卡諾黴素，卡拉黴素，洋紅黴素，嗜癌素，色黴素，達金黴素，柔紅黴素，去柔紅黴素，6-重氮-5-側氧基-L-去甲亮氨酸，阿黴素，嗎啉-阿黴素，氰基嗎啉-阿黴素，2-吡咯啉阿黴素和去氧柔紅黴素，表柔

比星，阿柔比星，伊達比星，馬可黴素，nitomycin，黴酚酸，諾加黴素，橄欖黴素，Peplomycin，potfiromycin，嘌呤黴素，奎拉黴素，羅道黴素，鏈黑黴素，鏈脲黴素，殺結核菌素，烏苯美司，淨司他丁，佐柔比星；i）聚酮化合物（番荔素），特別是bullatacin和bullatacinone；吉西他濱，環氧酶素（如卡菲偌米布），硼替佐米，沙利度胺，來那度胺，pomalidomide，tosedostat，zybrestat，PLX4032，STA-9090，Stimuvax，allovectin-7，Xegeva，Provenge，Yervoy，異戊二烯化抑制劑（如洛伐他汀），多巴胺能神經毒素（如星形孢菌素），放線菌素（如放線菌素D，更生黴素），博萊黴素（如博來黴素A2，博萊黴素B2，培洛黴素），蒽環類抗生素（如柔紅黴素），鵝膏毒素，阿黴素（亞德里亞黴素），伊達比星，表柔比星，吡柔比星，佐柔比星，米托蒽醌，MDR抑制劑（如維拉帕米），Ca^{2+} ATP酶抑制劑（如毒胡蘿蔔素），組蛋白去乙醯酶抑制劑（伏立諾他，羅米地辛，帕比司他，丙戊酸，Mocetinostat（MGCD0103），Belinostat，PCI-24781，恩替諾特，SB939，Resminostat，Givinostat，AR-42，CUDC-101，蘿蔔硫素，曲古抑菌素A）；塞來昔布，格列酮類，表沒食子兒茶素沒食子酸酯，雙硫侖，Salinosporamide A；抗腎上腺藥物，氨魯米特，米托坦，曲洛司坦，醋葡醛內酯，醛磷醯胺，胺基乙醯丙酸，安吖啶，阿拉伯糖苷，bestrabucil，比生群，edatraxate，defofamine，美可辛，地吖醌，依氟鳥氨酸（DFMO），elfomithine，依利醋銨，依託格魯，硝酸鎵，胞嘧啶，羥基脲，伊班膦酸鹽，香菇多糖，氯尼達明，米托胍腙，米托蒽醌，莫呱達醇，二胺硝吖啶，噴司他丁，蛋氨氮芥，吡柔比星，鬼臼酸，2-乙肼，甲基苄肼；呱嗪二酮丙烷；根黴素；西佐；螺環鍺；細格孢氮雜酸；

三亞胺醌；2, 2', 2''-三氯三乙胺；單端孢黴烯（特別是T-2毒素，疣孢菌素A，杆孢菌素A和anguidine），聚氨酯，siRNA，反義藥物和核酸分解酶。

2）自身免疫疾病藥物選自由下列組成之群組環孢菌素，環孢菌素A，胺基己酸，硫唑嘌呤，溴隱亭，苯丁酸氮芥，氯喹，環磷醯胺，皮質類固醇（例如安西奈德，倍他米松，布地奈德，氫化可的松，氟尼縮松，丙酸氟替卡松，氟可龍達那唑，地塞米松，曲安奈德，二丙酸倍氯米松），DHEA，依那西普，羥基氯喹，英夫利昔單抗，美洛昔康，甲氨蝶呤，麥考酚酸酯，潑尼松，西羅莫司，他克莫司。

3）抗感染性疾病藥物，包括但不限於a）胺基糖苷類：阿米卡星，阿司米星，慶大黴素（奈替米星，西索米星，異帕米星），潮黴素B，卡那黴素（阿米卡星，阿貝卡星，胺基去氧卡那黴素，地貝卡星，妥布黴素），新黴素（framycetin，巴龍黴素，核糖黴素），奈替米星，壯觀黴素，鏈黴素，妥布黴素，甲基姿蘇黴素；b）醯胺醇類：迭氮氯黴素，氯黴素，氟苯尼考，甲碸黴素；c）安沙黴素：格爾德黴素，除莠黴素；d）碳青黴烯類：比阿培南，多利培南，厄他培南，亞胺培南/西司他丁，美羅培南，帕尼培南；e）頭孢烯：碳頭孢烯（洛拉卡比），頭孢乙腈，氯氨苄青黴素，頭孢拉定，頭孢羥氨，頭孢洛寧，頭孢噻啶，頭孢噻吩或頭孢金素，頭孢氨苄，頭孢來星，頭孢孟多，頭孢匹林，羥胺唑頭孢菌素，氟唑頭孢菌素，孢西酮，唑啉頭孢菌素，頭孢拉宗，頭孢卡品，頭孢達肟，頭孢吡，頭孢克肟，頭孢西丁，頭孢羅齊，頭孢甲氧環烯胺，頭孢替唑，頭孢呋辛，頭孢克肟，頭孢地尼，頭孢托侖，頭孢吡，頭孢他美，頭孢甲肟，頭孢地嗪，頭孢尼西，頭孢呱酮，頭孢雷特，頭孢噻肟，噻乙胺

唑頭孢菌素，頭孢唑蘭，頭孢氨苄，頭孢咪唑，頭孢匹胺，頭孢匹羅，頭孢泊肟，頭孢羅齊，頭孢喹諾，頭孢磺啶，頭孢他啶，頭孢特侖，頭孢布騰，頭孢噻林，頭孢唑肟，頭孢吡普，頭孢曲松，頭孢呋辛，頭孢唑南，頭黴素（頭孢西丁，頭孢替坦，頭孢氧唑），氧（碳）頭孢烯（氟氧頭孢，拉氧頭孢）；f）糖肽：博來黴素，萬古黴素（奧利萬星，特拉萬星），替考拉甯（達巴萬星），雷莫拉寧；g）甘氨醯環素：如替加環素；h）β-內醯胺酶抑制劑：青黴烷（舒巴坦，他唑巴坦），氧青黴烷（克拉維酸）；i）林可醯胺：克林黴素，林可黴素；j）脂肽：達托黴素，A54145，鈣依賴性抗生素（CDA）；k）大環內酯類：阿奇黴素，克黴素，克拉黴素，地紅黴素，紅黴素，氟雷黴素，交沙黴素，酮內酯（泰利黴素，塞紅黴素），麥迪黴素，米卡黴素，竹桃黴素，利福黴素（異煙肼、利福平，利福布丁，利福噴汀），羅匹黴素，羅紅黴素，大觀黴素，螺旋黴素，他克莫司（FK506），醋竹桃黴素，泰利黴素；l）單環胺：氨曲南，替吉莫南；m）惡唑烷酮類：利奈唑胺；n）青黴素類：阿莫西林，氨苄青黴素（匹氨西林，海洛西林，巴氨西林，氨苄青黴素，阿黴素），阿替代西林，阿洛西林，苄青黴素，苄星青黴素苄青黴素，苄星青黴素苯氧甲基青黴素，克洛西林，普魯卡因青黴素（美替西林），美洛西林，甲氧西林，萘夫西林，苯唑西林，醋甲西林，青黴素，非奈西林，苯氧基甲基青黴素，呱拉西林，氨苄西林，磺苯西林，替莫西林，替凱西林；o）多肽：桿菌肽，粘菌素，多粘菌素B；p）喹諾酮類：阿拉曲沙星，巴羅沙星，環丙沙星，克林沙，達氟沙星，二氟沙星，依諾沙星，恩諾沙星，加雷沙星，加替沙星，吉米沙星，格帕沙星，卡諾曲伐沙星，左氧氟沙星，洛美沙星，麻保沙星，莫西沙星，那氟沙星，諾氟沙星，奧比

沙星，氧氟沙星，培氟沙星，曲伐沙星，格帕沙星，西他沙星，司帕沙星，替馬沙星，托沙星，曲伐沙星；q）鏈陽性菌素：普那黴素，奎奴普丁/達福普汀；r）磺胺類：氨苄磺胺，偶氮磺胺，磺胺嘧啶，磺胺甲異唑、磺胺醯亞胺、磺胺吡啶、磺胺異惡唑、甲氧苄啶、磺胺甲惡唑（複方磺胺甲惡唑）；s）類固醇抗菌藥物：如夫西地酸；t）四環素類：強力黴素，金黴素，氯米西環素，地美環素，雷莫昔林，美西環素，美他環素，米諾環素，土黴素，潘美環素，吡咯啶甲基四環素，四環素，甘氨醯環素（如替加環素）；u）其他類型的抗生素：番荔枝素，胂凡納明，細菌萜醇抑制劑（桿菌肽），DANAL/AR抑制劑（環絲氨酸），dictyostatin，圓皮海綿內酯，軟珊瑚醇，埃博黴素，乙胺丁醇，依託泊苷，法羅培南，夫西地酸，呋喃唑酮，異煙肼，laulimalide，甲硝唑，莫匹羅星，NAM合成抑制劑（例如磷黴素），呋喃妥因，紫杉醇，普蘭西黴素，吡嗪醯胺，奎奴普丁/達福普汀，利福平，他唑巴坦替硝唑，烏菊花素。

4）抗病毒藥物：a）侵入/融合抑制劑：阿帕韋洛，馬拉韋羅，vicriviroc，gp41（恩夫韋肽），PRO 140，CD4（艾巴厘珠單抗）；b）整合酶抑制劑：雷特格韋，elvitegravir，globoidnan A；c）成熟抑制劑：bevirimat，vivecon；d）神經氨酸酶抑制劑：奧司他韋，紮那米韋，帕拉米韋；e）核苷和核苷酸：阿巴卡韋，阿昔單韋，阿德福韋，阿莫西韋，阿昔單抗，溴夫定，西多福韋，克拉夫定，地塞米松，去羥肌苷（ddI），elvucitabine，恩曲他濱（FTC），恩替卡韋，泛昔洛韋，氟拉西林（5-FU），3’-氟取代的2’,3’-去氧核苷類似物，如3’-氟-2’,3’-雙去氧胸苷（FLT）和3’-氟-2’,3’-雙去氧鳥苷（FLG），福米韋生，9-鳥嘌呤，碘苷，拉米夫定（3TC），1-核苷（例如β-1-胸苷和β-1-2'-去氧胞

苷），噴昔洛韋，racivir，利巴韋林，迪替丁，司他夫定（d4T），塔利巴韋林（viramidine），替比夫定，替諾福韋，三氟尿苷伐昔洛韋，纈更昔洛韋，紮西他濱（ddC），齊多夫定（AZT）；f）非核苷類：金剛烷胺，阿替吡啶，卡普韋林，二芳基嘧啶（依曲韋林，rilpivirine），地拉夫定，二十二烷醇，乙米韋林，依法韋侖，膦甲酸（磷醯基甲酸），咪喹莫特，聚乙二醇干擾素，洛韋胺，洛德腺苷，甲吲噻腙，奈韋拉平，NOV-205，長效干擾素α，鬼臼毒素，利福平，金剛乙胺，瑞喹莫德（R-848），醋胺金剛烷；g）蛋白酶抑制劑：安普那韋，阿紮那韋，boceprevir，darunavir，福沙那韋，印地那韋，洛匹那韋，奈非那韋，普來可那立，利托那韋，沙奎那韋，telaprevir（VX-950），替拉那韋；h）其它類型的抗病毒藥物：抗體酶，阿比朵爾，calanolide a，ceragenin，氰維林-n，二芳基嘧啶，表沒食子兒茶素沒食子酸酯（EGCG），膦甲酸，格裡菲辛，taribavirin（viramidine），羥基脲，KP-1461，米替福新，普來可那立，混成抑制劑，利巴韋林，seliciclib。

5）藉由本發明的橋連接子偶聯的藥物還包括放射性同位素。其中實例有^{3}H，^{11}C，^{14}C，^{18}F，^{32}P，^{35}S，^{64}Cu，^{68}Ga，^{86}Y，^{99}Tc，^{111}In，^{123}I，^{124}I，125I，^{131}I，^{133}Xe，^{177}Lu，^{211}At或^{213}Bi。放射性同位素標記的抗體可用于受體靶向成像實驗，或者可用於如抗體藥物偶聯物的靶向治療（Wu等，Nature Biotechnology 2005，23（9）： 1137-1146）。細胞結合分子，例如抗體可以連結配位體試劑，用文獻（Current Protocols in Immunology，卷1和2，Coligen等編寫，Wiley-Interscience，New York，N.Y.，Pubs.（1991））所述的方法與放射性金屬結合、螯合或生成錯合物。可以絡合金屬離子的螯合配位體包括DOTA，DOTP，

DOTMA，DTPA和TETA（Macrocyclics，Dallas，美國德州）等 。

6）上述任何藥物的藥學上可接受的鹽，酸或其衍生物。

【0083】 在另一個實施例中，藥物可以是發色分子，得到的偶聯物可用於檢測，監測或研究細胞結合分子與靶細胞的交互作用。發色分子可以吸收一種光，如紫外光，螢光，紅外光，近紅外光或可見光；發色分子包括黃色素，紅細胞，虹彩色素，白細胞，黑色素和藍綠色素的一類或一個亞類，螢光分子（吸收光後再發光的螢光化學物質）的一類或一個亞類，視覺光轉導分子的一類或一個亞類，光子分子的一類或一個亞類，冷光分子的一類或一個亞類和螢光素化合物的一類或一個亞類。

【0084】 發色分子可選自由下列組成之群組，但不限於，非蛋白質有機螢光團，例如氧雜蒽衍生物（螢光素，羅丹明，俄勒岡綠，伊紅和德克薩斯紅）；花青衍生物（花青，吲哚羰花青，氧雜花青，硫代花青和部花青）；方酸衍生物和環取代的方酸，包括Seta，SeTau和Square染料；萘衍生物（丹醯和氟矽酸鈉衍生物）；香豆素衍生物；惡二唑衍生物（吡啶基惡唑，硝基苯並惡唑和苯並惡二唑）；蒽衍生物（蒽醌類，包括DRAQ5，DRAQ7和CyTRAK橙）；芘衍生物（級聯藍等）；惡嗪衍生物（尼祿紅，尼祿藍，甲酚紫，惡嗪170等）；吖啶衍生物（黃醇黃素，吖啶橙，吖啶黃等）；芳基甲胺衍生物（金胺，結晶紫，孔雀石綠）和四吡咯衍生物（卟吩，酞菁，膽紅素）。

【0085】 生色分子選自由下列組成之群組以下螢光化合物的任何類似物和衍生物：CF染料（Biotium），DRAQ和CyTRAK探針（BioStatus），BODIPY（Invitrogen），Alexa Fluor（Invitrogen），DyLight Fluor（Thermo Scientific，Pierce），Atto和Tracy（Sigma Aldrich），

FluoProbes（Interchim），Abberior 染料（Abberior），DY 和 MegaStokes染料（Dyomics），Sulfo Cy染料（Cyandye），HiLyte Fluor（AnaSpec），Seta，SeTau 及 Square Dyes (SETA BioMedicals)，Quasar及Cal Fluor染料 (Biosearch Technologies)，SureLight 染料（APC，RPEPerCP，Phycobilisomes）（Columbia Biosciences），APC，APCXL，RPE，BPE（Phyco-Biotech）。

【0086】廣泛使用的可與本發明連接子反應或偶聯的螢光化合物的實例有：別藻藍蛋白（APC），胺基胭脂蛋白，APC-Cy7偶聯物，BODIPY-FL，Cascade Blue，Cy2，Cy3，Cy3.5，Cy3B，Cy5，Cy5.5，Cy7，螢光素，FluorX，羥基香豆素，IR-783，麗絲胺羅丹明B，螢光黃，Me-甲氧基香豆素，NBD，Pacific Blue，Pacific Orange，PE-Cy5偶聯物，PE-Cy7偶聯物，PerCP，R-藻紅蛋白 (PE)，Red 613，Seta-555-Azide，Seta-555-DBCO，Seta-555-NHS，Seta-580-NHS，Seta-680-NHS，Seta-780-NHS，Seta-APC-780，Seta-PerCP-680，Seta-R-PE-670，SeTau-380-NHS，SeTau-405-馬來醯亞胺，SeTau-405-NHS，SeTau-425-NHS，SeTau-647-NHS，Texas Red，TRITC，TruRed，X-Rhodamine。

【0087】可以與本發明的連接子相連，用於研究核酸或蛋白質的螢光化合物，選自由下列組成之群組下列化合物或其衍生物：7-AAD（7-胺基放線菌素D，CG-選擇性的），吖啶橙，色黴素A3，CyTRAK橙（Biostatus，紅激發暗），DAPI，DRAQ5，DRAQ7，溴化乙錠，Hoechst33258，Hoechst33342，LDS 751，光輝黴素，碘化丙啶（PI），SYTOX藍，SYTOX 綠，SYTOX橙，噻唑橙，TO-PRO，菁染料單體，

TOTO-1，TO-PRO-1，TOTO-3，TO-PRO-3，YOSeta-1，YOYO-1。可以與本發明的連接子相連，用於研究細胞的螢光化合物，選自由下列組成之群組下列化合物或其衍生物：DCFH（2',7'-二氯二氫螢光素，氧化形式），DHR（二氫羅丹明123，氧化形式，光催化氧化），Fluo-3（AM酯，pH> 6），Fluo-4（AM酯，pH7.2），Indo-1（AM酯，低/高鈣（Ca 2+）），SNARF（pH 6/9）。可與本發明的連接子連接以用於研究蛋白質/抗體的較佳螢光團化合物係選自以下化合物或其衍生物：別藻藍蛋白（APC），AmCyan1（四聚體，Clontech），AsRed2（四聚體，Clontech），薊綠（單體，MBL），Azurite，B-藻紅蛋白（BPE），Cerulean，CyPet，DsRed單體（Clontech），DsRed2（“RFP”，Clontech），EBFP，EBFP2，ECFP，EGFP（弱二聚體，Clontech），Emerald（弱二聚體，Invitrogen），EYFP（弱二聚體，Clontech），GFP（S65A突變），GFP（S65C突變），GFP（S65L突變），GFP（Y66H突變），GFP（Y66W突變），GFPuv，HcRed1，J-Red，Katusha，Kusabira Orange（單聚體，MBL），mCFP，mCherry，mCitrine，Midoriishi Cyan（二聚體，MBL)，mKate（TagFP635，單體，Evrogen），mKeima-Red（單體，MBL），mKO，mOrange，mPlum，mRaspberry，mRFP1（單體，Tsien實驗室），mStrawberry，mTFP1，mTurquoise2，P3（藻膽體錯合物），多甲藻黃素-葉綠素-蛋白質錯合物（PerCP），R-phycoerythrin（RPE），T-Sapphire，TagCFP（二聚體，Evrogen），TagGFP（二聚體，Evrogen），TagRFP（二聚體，Evrogen），TagYFP（二聚體，Evrogen），tdTomato（串聯二聚體），Topaz，TurboFP602（二聚體，Evrogen），TurboFPP635（二聚體，

Evrogen），TurboGFP（二聚體，Evrogen），TurboRFP（二聚體，Evrogen），TurboYFP（二聚體，Evrogen），Venus，野生型GFP型，YPet，ZsGreen1（四聚體，Clontech），ZsYellow1（四聚體，Clontech）。

【0088】在另一個實施例中，藥物可以是聚伸烷基二醇，哺乳動物投予時，用於延長細胞結合分子抗體，或類抗體蛋白分子的半衰期。聚伸烷基二醇包括但不限於聚乙二醇（PEG），聚丙二醇以及環氧乙烷和環氧丙烷的共聚物；較佳的是PEG，更佳的是單官能活化的羥基PEG（例如，單個末端活化的羥基PEG，包括羥基PEG-活性酯，羥基PEG-單醛，羥基PEG-單胺，羥基PEG-單醯肼，羥基PEG-單肼基甲酸酯，羥基PEG-單碘乙醯胺，羥基PEG-單馬來醯亞胺，羥基PEG-鄰二硫吡啶，羥基PEG-單肟，羥基PEG-單苯基碳酸酯，羥基PEG-單苯基乙二醛，羥基PEG-單噻唑烷-2-硫酮，羥基PEG-單硫代酯，羥基PEG-單巰基，羥基PEG-單三嗪和羥基PEG-單乙烯基碸）。

【0089】在某些實施例中，聚伸烷基二醇分子量為約10Da至約200kDa，較佳約88Da至約40kDa的分子量；具有兩個分支，每個分支分子量為約88Da至約40kDa；更佳的具有兩個分支，每個分支約88Da至約20kDa。在一個具體實施例中，聚伸烷基二醇是聚乙二醇，分子量為約10kDa，20kDa，或40kDa。在具體的實施例中，PEG是PEG 10kDa（直鏈或支鏈），PEG 20kDa（直鏈或支鏈）或PEG 40kDa（直鏈或支鏈）。許多美國專利公開了直鏈或支鏈“非抗原性”PEG聚合物及其衍生物或偶聯物的製備，見美國專利5,428,128；5,621,039；5,622,986；5,643,575；5,728,560；5,730,990；5,738,846；5,811,076；5,824,701；

5,840,900；5,880,131；5,900,402；5,902,588；5,919,455；5,951,974；5,965,119；5,965,566；5,969,040；5,981,709；6,011,042；6,042,822；6,113,906；6,127,355；6,132,713；6,177,087,和 6,180,095。

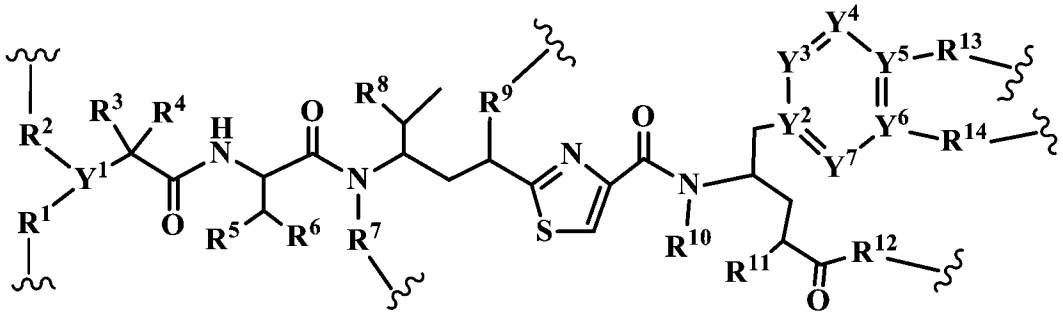
【0090】在另一個實施例中，D更佳為有效的細胞毒劑，選自由下列組成之群組tubulysin 及其類似物、美登素及其類似物、紫杉烷（taxane）及其類似物、CC-1065 及其類似物、柔紅黴素或多柔比星及他們的類似物、鵝膏毒素及其類似物、苯並二氮卓二聚體（例如吡咯並苯二氮卓（PBD）、托美黴素、氨茴黴素、吲哚並苯並二氮卓、咪唑並苯並噻二氮卓或惡唑烷並苯並二氮卓的二聚體）及其類似物、加利車黴素類和烯二炔類抗生素類似物、放線菌素 及其類似物、氮絲菌素及其類似物、博來黴素及其類似物、表柔比星及其類似物、他莫昔芬及其類似物、伊達比星及其類似物、朵拉司他汀及其類似物、澳瑞他汀 （包括單甲基澳瑞他汀 （MMAE）、MMAF、澳瑞他汀PYE、澳瑞他汀 TP、澳瑞他汀 2-AQ、6-AQ、EB （AEB）、和 EFP （AEFP）） 及其類似物、康普瑞汀、多卡黴素及其類似物、喜樹鹼、格爾德黴素 及其類似物、甲氨喋呤及其類似物、噻替派及其類似物、長春地辛及其類似物、長春新鹼及其類似物、半米塔林及其類似物、nazumamide 及其類似物、spliceostatin、pladienolide、微晶蛋白及其類似物、放射敏素及其類似物、alterobactin 及其類似物、microsclerodermin 及其類似物、theonellamide 及其類似物、esperamicin 及其類似物、PNU-159682 及其類似物、蛋白激酶抑制劑、MEK抑制劑、KSP抑制劑、煙醯胺磷酸核糖轉移酶（NAMPT）抑制劑、免疫毒素和立體異構體、等排體、類似物、或以上衍生物。

【0091】Tubulysin 及其類似物為本領域專業技術人員熟知，可以

根據已知方法從天然來源單離或者根據已知方法製備合成（例如Balasubramanian R.，等，J. Med. Chem.，2009，52，238–40；Wipf P.，等，Org. Lett.，2004，6，4057–60；Pando O.，等，J. Am. Chem. Soc.，2011，133，7692–5；Reddy，J. A.，等，Mol. Pharmaceutics，2009，6，1518–25；Raghavan B.，等，J. Med. Chem.，2008，51，1530–33；Patterson A. W.，等，J. Org. Chem.，2008，73，4362–9；Pando O.，等，Org. Lett.，2009，11（24），5567–9；Wipf，P.，等，Org. Lett.，2007，9（8），1605–7；Friestad，G. K.，Org. Lett.，2004，6，3249–52；Peltier，H. M.，等，J. Am. Chem. Soc.，2006，128，16018–9；Chandrasekhar S.，等，J. Org. Chem.，2009，74，9531–4；Liu Y.，等，Mol. Pharmaceutics，2012，9，168–75；Friestad G. K.，等，Org. Lett.，2009，11，1095–8；Kubicek K.，等，Angew Chem Int Ed Engl，2010.49： 4809-12；Chai Y.，等，Chem Biol，2010，17： 296-309；Ullrich A.，等，Angew Chem Int Ed Engl，2009，48，4422-5；Sani M.，等，Angew Chem Int Ed Engl，2007，46，3526-9；Domling A.，等，Angew Chem Int Ed Engl，2006，45，7235-9；專利申請： Zanda M.，等，加拿大專利申請 CA 2710693（2011）；Chai Y.，等，歐洲專利申請2174947（2010），WO 2010034724；Leamon，C. 等，WO2010033733，WO 2009002993；Ellman，J.，等，PCT WO2009134279；WO 2009012958，美國專利申請20110263650，20110021568； Matschiner G.，等，WO2009095447；Vlahov I.，等，WO2009055562，WO 2008112873；Low P.，等，WO2009026177；Richter W.，

WO2008138561；Kjems J.，等，WO 2008125116；Davis M.；等，WO2008076333；Diener J.；等，美國專利申請20070041901，WO2006096754；Matschiner G.，等，WO2006056464；Vaghefi F.，等，WO2006033913；Doemling A.，德國專利申請DE102004030227，WO2004005327，WO2004005326，WO2004005269；Stanton M.，等，美國專利申請20040249130；Hoefle G.，等，德國專利申請DE10254439，DE10241152，DE10008089；Leung D.，等，WO2002077036；Reichenbach H.，等，德國專利申請DE19638870；Wolfgang R.，US20120129779；Chen H.，美國專利申請20110027274。在專利PCT/IB2012/053554中描述了能應用本申請中的工藝與細胞結合分子偶聯的tubulysin的較佳結構。

【0092】 Tubulysin 類似物具有式（IV）的結構：



（IV）

或藥學上可接受的鹽，水合物或水合鹽；或多晶結構；或其旋光異構體，外消旋體，非鏡像異構物或鏡像異構物；

其中 〰 是獨立地連接到L_1和/或L_2的連接位點；

其中 R^1、R^2、R^3、和 R^4 獨立地為 H、C_1~C_8 烷基、C_2~C_8 雜烷基或雜環、C_3~C_8 芳基、芳基烷基、環烷基、烷基環烷基、雜環烷基、雜烷基環烷基、碳環或烷基羰基；或 R^1R^2、R^1R^3、R^2R^3、R^3R^4、R^5R^6、

$R^{11}R^{12}$ 或 $R^{13}R^{14}$ 形成的 3~7 元碳環、環烷基、雜環、雜環烷基、芳基或雜芳基環體系；當獨立或同時連接到L_1或L_2時，R^1 和 R^2可以獨立地缺省，Y^1 是 N或 CH；

其中 R^5、R^6、R^8、R^{10}和 R^{11} 獨立地為 H、或 C_1~C_4 烷基或雜烷基；

其中 R^7 獨立地為 H、R^{14}、$-R^{14}C(=O)X^1R^{15}$；或 $-R^{14}X^1R^{15}$；X^1是O、S、S-S、NH、CH_2 或 NR^{14}；

其中R^9 選自由下列組成之群組於 H、OH、-O-、=O、$-OR^{14}$、$-OC(=O)R^{14}$、$-OC(=O)NHR^{14}-$、$-OC(=O)R^{14}SSR^{15}-$、$OP(=O)(OR^{14})-$、$-OC(=O)NR^{14}R^{15}$、$OP(=O)(OR^{14})$、或 $OR^{14}OP(=O)(OR^{15})$；

其中 R^{11}獨立地為H、R^{14}、$-R^{14}C(=O)R^{16}$、$-R^{14}X^2R^{16}$、$-R^{14}C(=O)X^2$、其中 X^2 是 -O-、-S-、-NH-、$-N(R^{14})-$、$-O-R^{14}-$、$-S-R^{14}-$、$-S(=O)-R^{14}-$、或 $-NHR^{14}$；

其中 R^{12}是 R^{15}、-OH、-SH、$-NH_2$、NH、$NHNH_2$、$-NH(R^{15})$、$-OR^{15}$、$-R^{15}COR^{16}$、$-R^{15}COOR^{16}$、$-R^{15}C(O)NH_2$、$-R^{15}C(O)NHR^{17}$、$-SR^{16}$、$R^{15}S(=O)R^{16}$、$-R^{15}P(=O)(OR^{17})_2$、$-R^{15}OP(=O)(OR^{17})_2$、$-CH_2OP(=O)(OR^{17})_2$、$-R^{15}SO_2R^{17}$、$-R^{15}X^2R^{16}$、$-R^{15}C(=O)X^2$、其中 X^2 是 -O-、OH、SH、-S-、NH_2、-NH-、$-N(R^{15})-$、$-O-R^{15}-$、$-S-R^{15}-$、$-S(=O)-R^{15}-$、CH_2 或$-NHR^{15}-$；

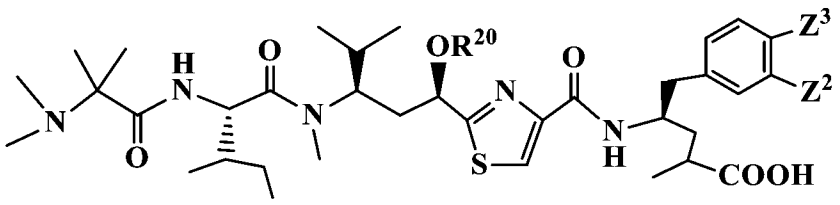
R^{13}和R^{14} 獨立地為 H、O、S、NH、$N(R^{15})$、NHNH、-OH、-SH、$-NH_2$、NH、$NHNH_2$、$-NH(R^{15})$、$-OR^{15}$、CO、$-COX^2$、-

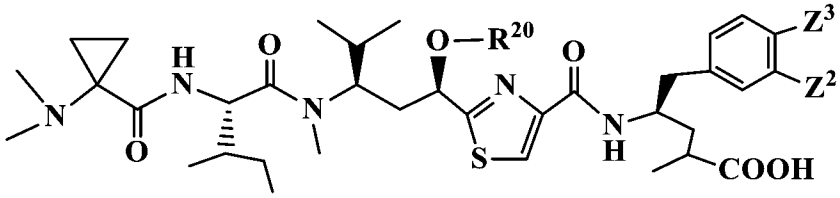
COX^2R^{16}、R^{17}、F、Cl、Br、I、SR^{16}、$NR^{16}R^{17}$、$N=NR^{16}$、$N=R^{16}$、NO_2、$SOR^{16}R^{17}$、SO_2R^{16}、SO_3R^{16}、OSO_3R^{16}、$PR^{16}R^{17}$、$POR^{16}R^{17}$、$PO_2R^{16}R^{17}$、OP（O）（OR^{17}）$_2$、OCH_2OP（O）（OR^{17}）$_2$、OC（O）R^{17}、OC（O）OP（O）（OR^{17}）$_2$、PO（OR^{16}）（OR^{17}）、OP（O）（OR^{17}）OP（O）（OR^{17}）$_2$、OC（O）NHR^{17}；-O-（C_4-C_{12} 糖苷）、-N-（C_4-C_{12} 糖苷）、C_1~C_8烷基、雜烷基、C_2-C_8 烯基、炔基、雜烷基，雜環烷基；C_3-C_8芳基、芳基烷基、碳環、環烷基、雜烷基環烷基、烷基羰基、雜芳基，或2-8個碳原子的酯、醚或醯胺；或包含1-8個胺基酸的肽（NH（Aa）$_{1\sim8}$ 或 CO（Aa）$_{1\sim8}$，N-端 或 C-端 1 -8 個相同或不同的胺基酸），或具有式（OCH_2CH_2）$_p$ 或 （OCH_2CH（CH_3））$_p$的聚氧乙烯基單元，其中p是0至約1000的整數，或上述基團的組合；X^2 是 O、S、S-S、NH、CH_2、OH、SH、NH_2、CHR^{14} 或 NR^{14}；

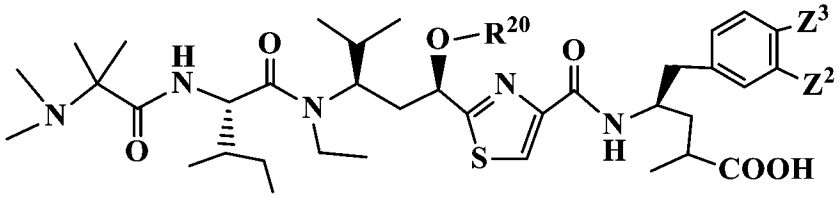
R^{15}、R^{16}和 R^{17} 獨立地為 H、C_1~C_8烷基、雜烷基；C_2-C_8 烯基、炔基、雜烷基、雜環烷基；C_3-C_8 芳基、芳基烷基、碳環、環烷基、雜烷基環烷基、烷基羰基、雜芳基、烷基羰基、或 Na^+、K^+、Cs^+、Li^+、Ca^{2+}、Mg^+、Zn^{2+}、N^+（R^1）（R^2）（R^3）（R^4）、HN^+（C_2H_5OH）$_3$鹽；

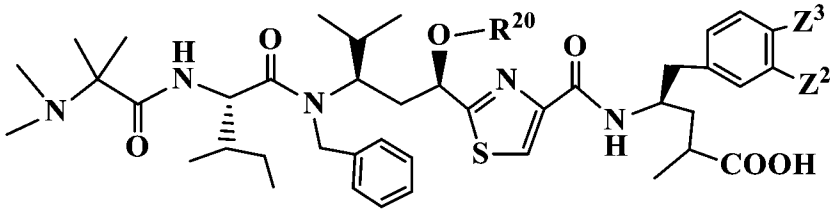
Y^1 和 Y^2 獨立地為 N 或 CH；q 是 0 或 1；當 q=0，Y^3 不存在，Y^4、Y^5、Y^6 和 Y^7 獨立地為 CH、N、NH、O、S、或N （R1），所以 Y^2、Y^4、Y^5、Y^6 和 Y^7形成 呋喃、吡咯噻吩、噻唑、噁唑和咪唑、吡唑、三唑、四唑、噻二唑雜芳環；當 q=1、Y^3、Y^4、Y^5、Y^6 和 Y^7 獨立地為 CH 或 N時，Y^2、Y^3、Y^4、Y^5、Y^6和 Y^7 形成 苯、吡啶、噠嗪、嘧啶、吡嗪、三嗪、四嗪、五嗪的芳環；

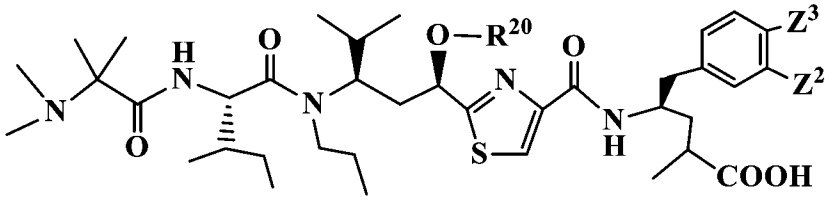
Tubulysin類似物的結構實例如下所示：

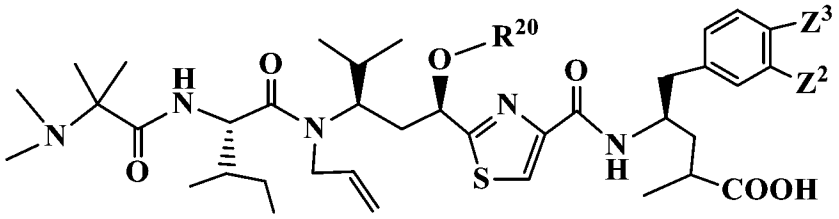

IV-01，

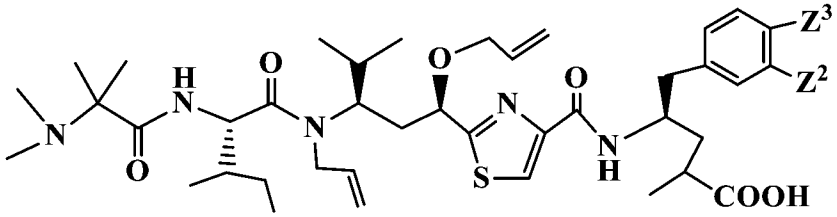

IV-02，

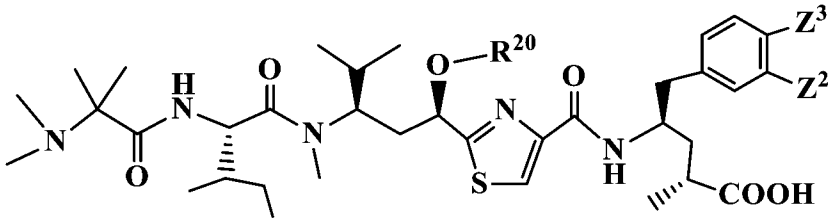

IV-03，

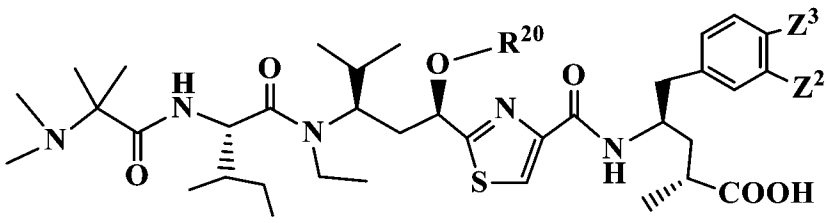

IV-04，

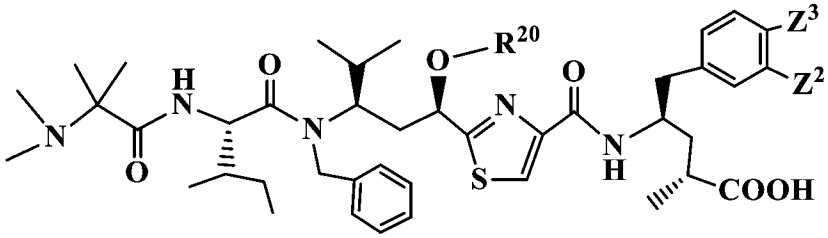

I-05，

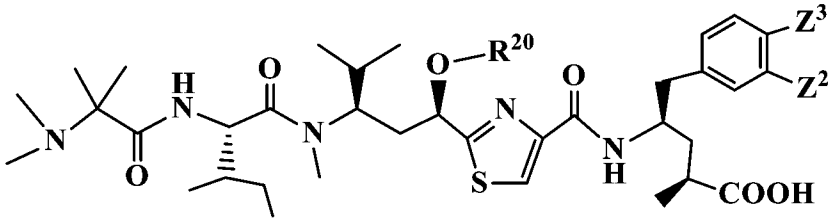

IV-06，

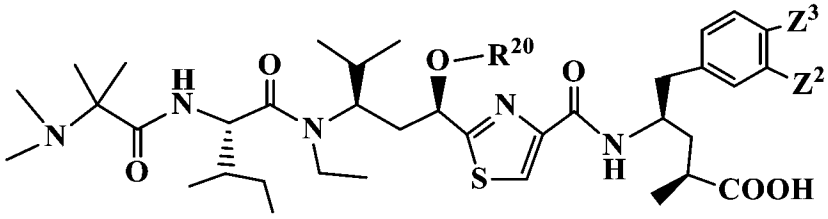

IV-07，

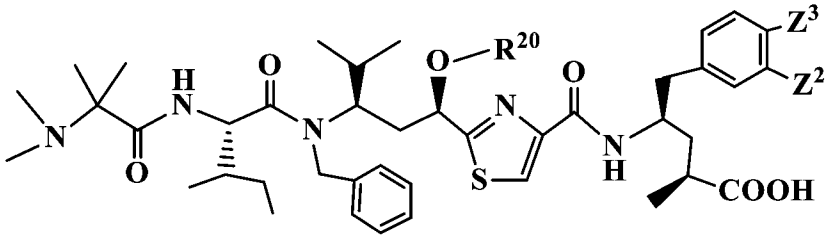

IV-08，

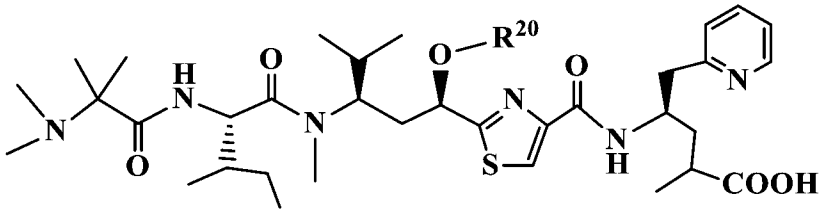

IV-09，

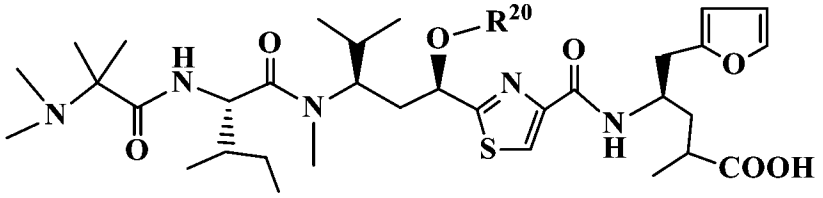

IV-10，

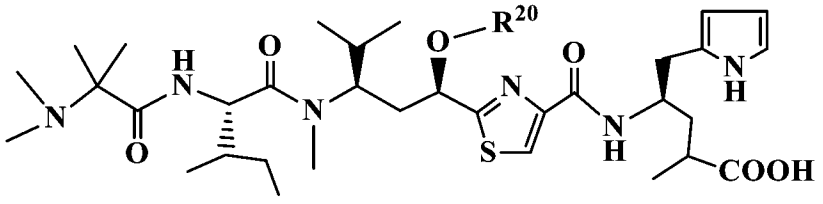

IV-11，

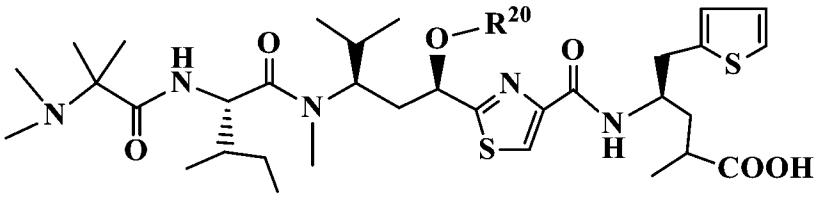

IV-12，

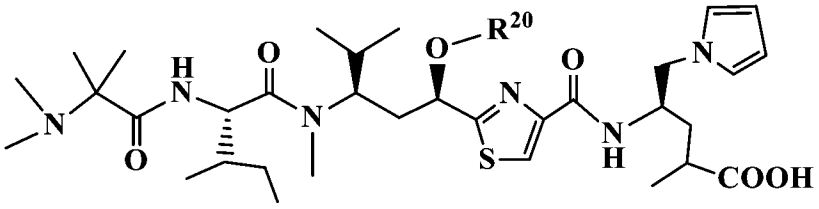

IV-13，

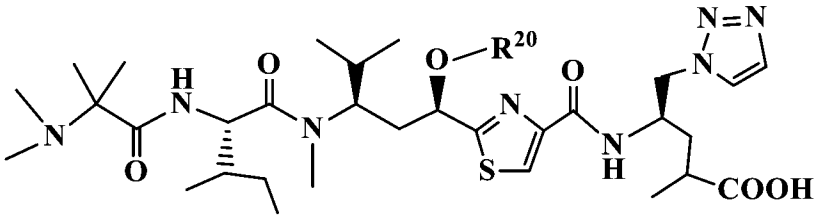

IV-14，

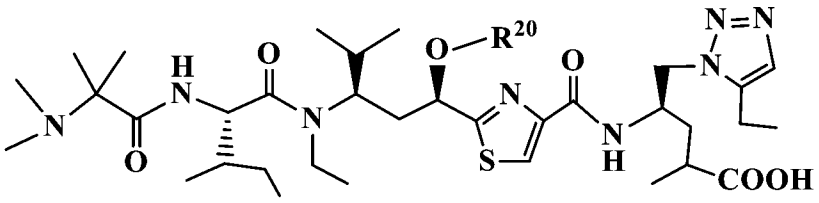

IV-15，

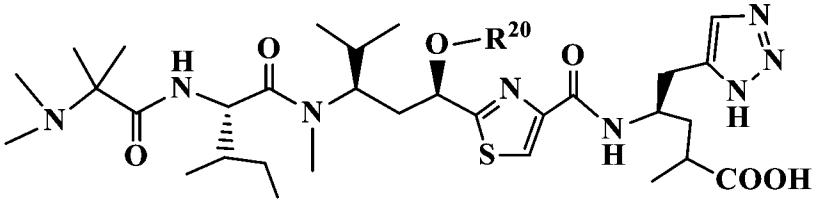

IV-16，

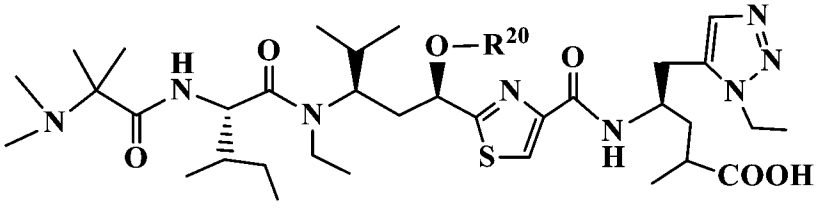

IV-17，

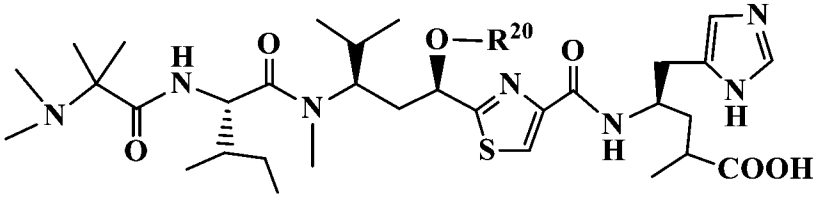

IV-18，

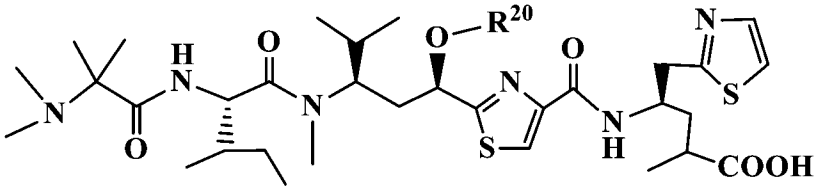

I-19，

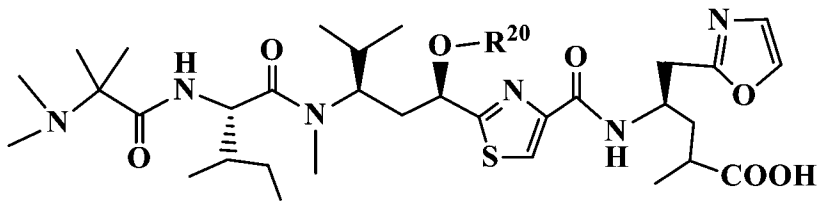

IV-20，

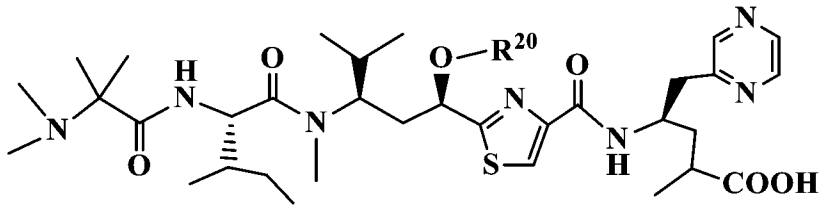

IV-21，

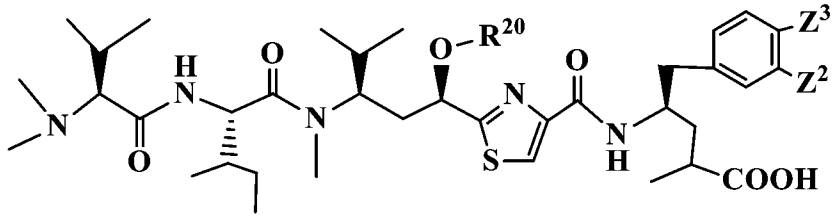

IV-22，

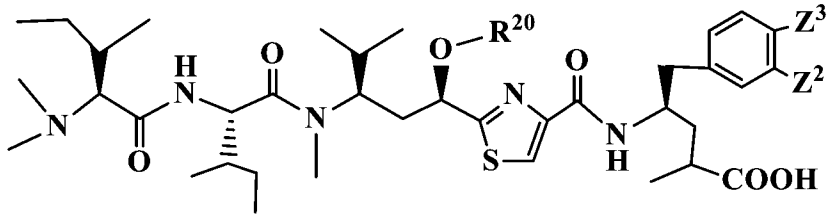

IV-23，

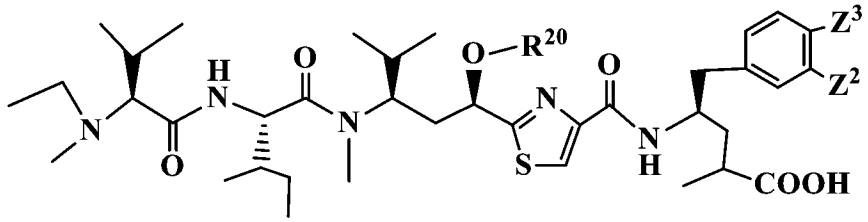

IV-24，

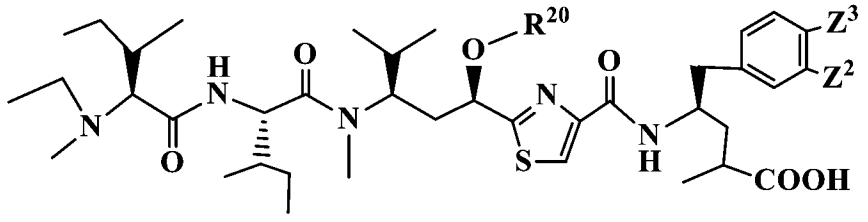

IV-25，

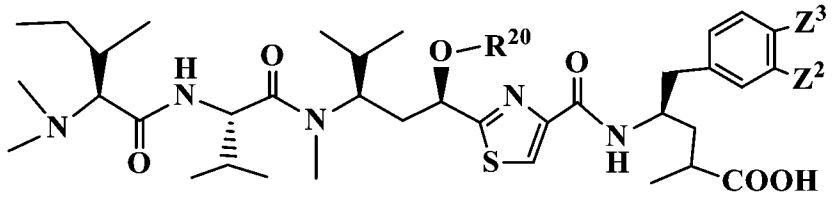

IV-26，

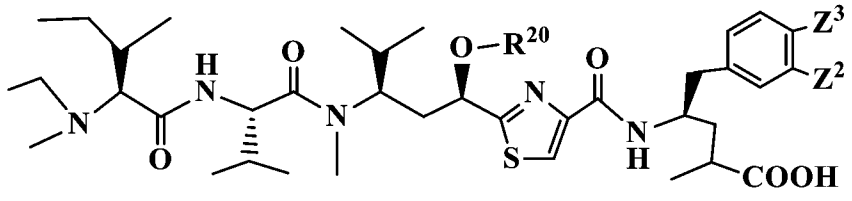

IV-27，

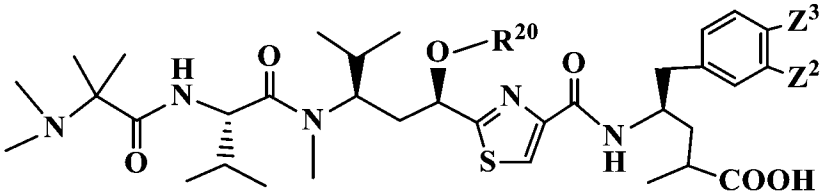

IV-28，

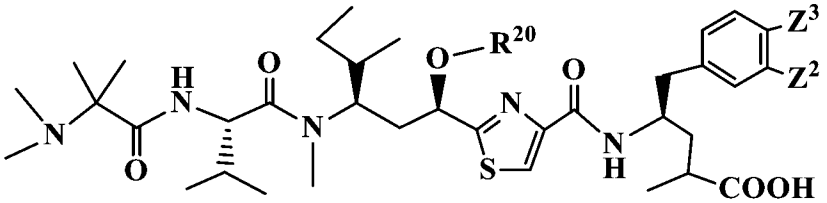

IV-29，

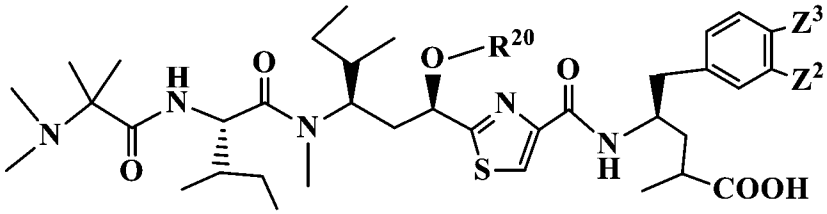

IV-30，

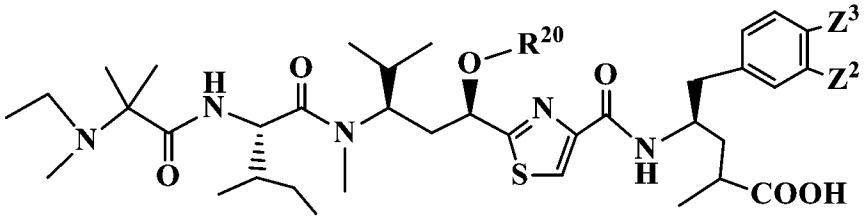

IV-31，

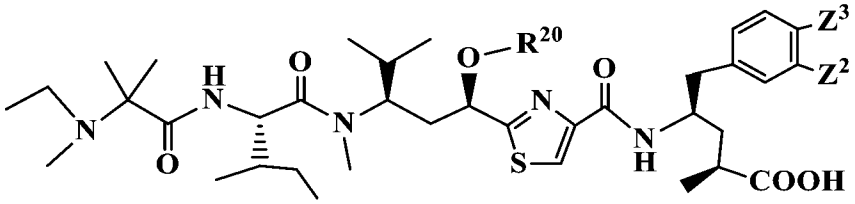

IV-32，

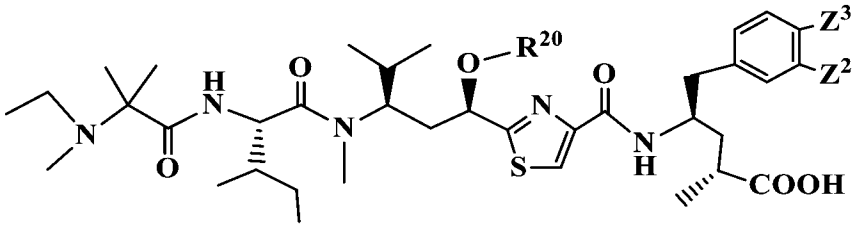

IV-33，

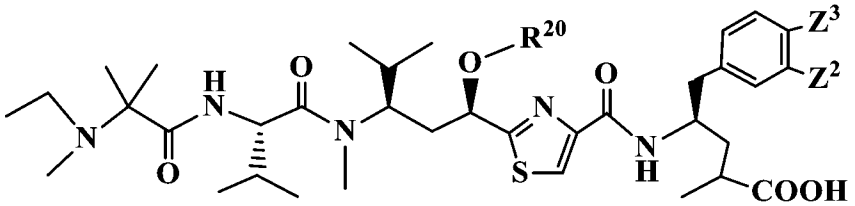

IV-34，

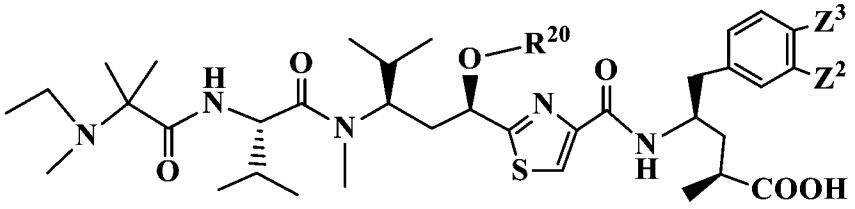

IV-35，

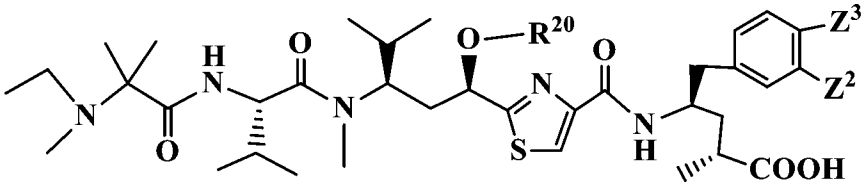

IV-36，

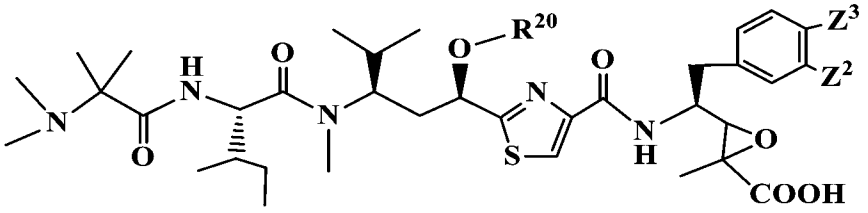

IV-37，

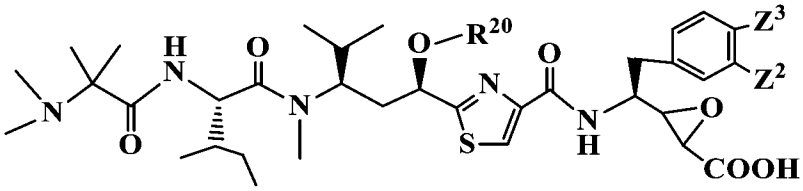

IV-38，

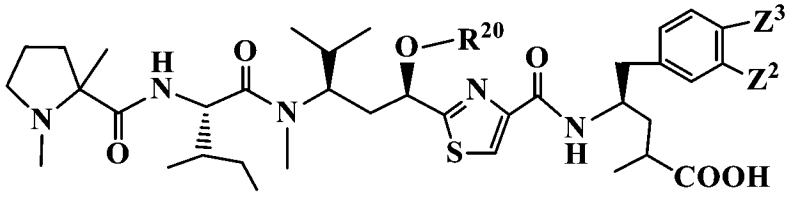

IV-39，

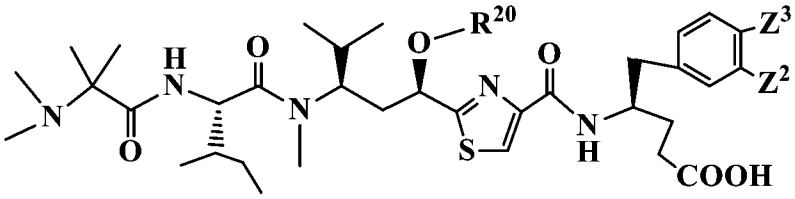

IV-40，

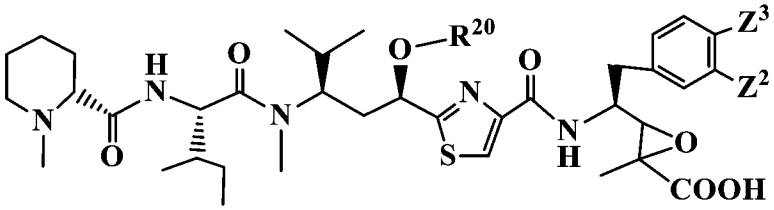

IV-41，

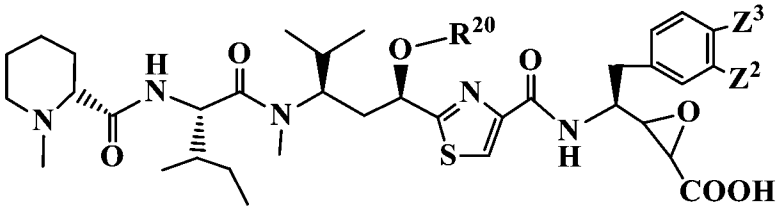

IV-42，

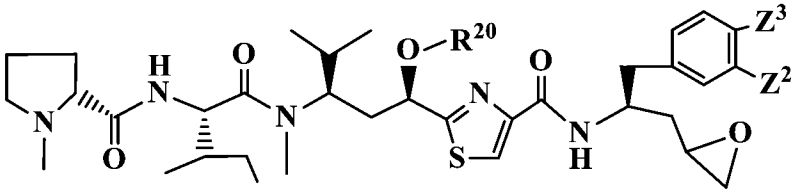

IV-43，

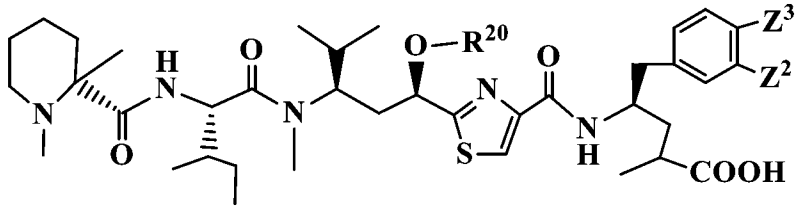

IV-44，


IV-45，

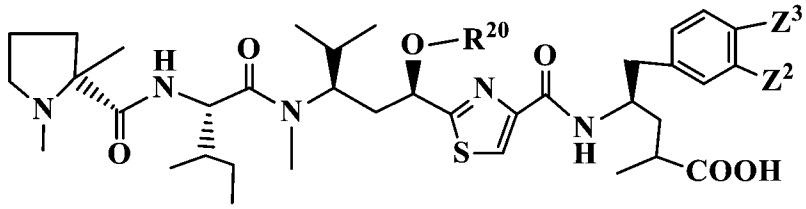

IV-46，


IV-47，

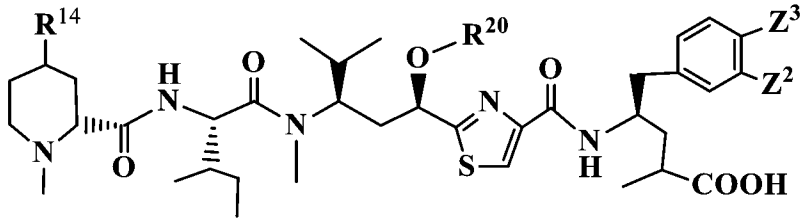

IV-48，



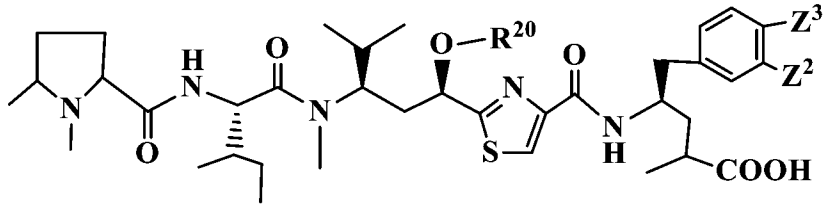
IV-49，



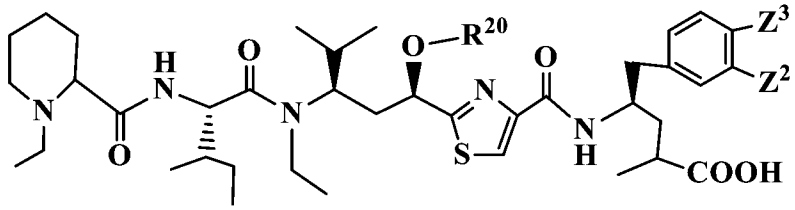
IV-50，



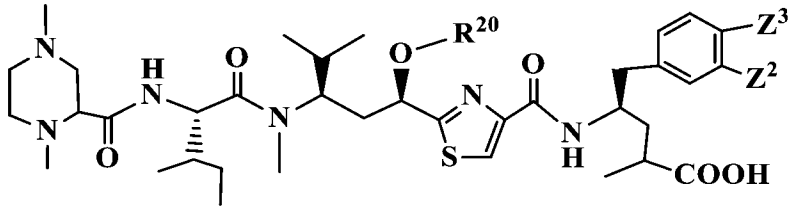
IV-51，



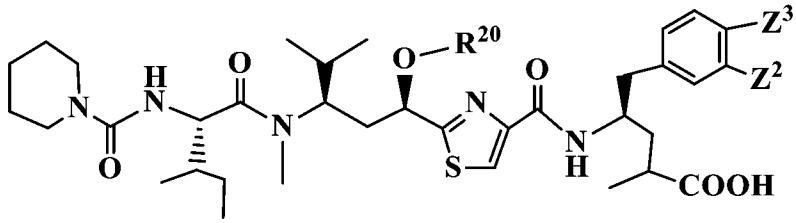
IV-52，



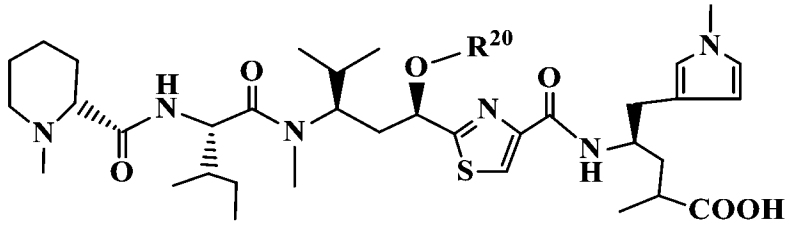
IV-53，



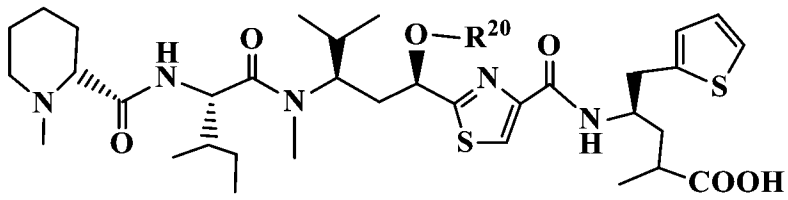
IV-54，

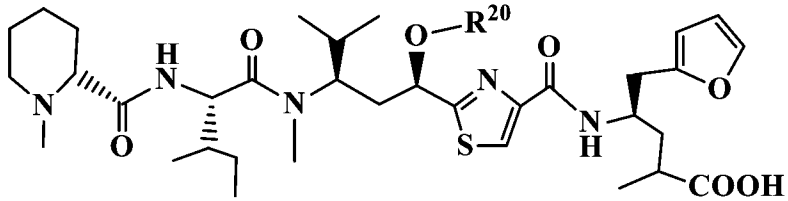


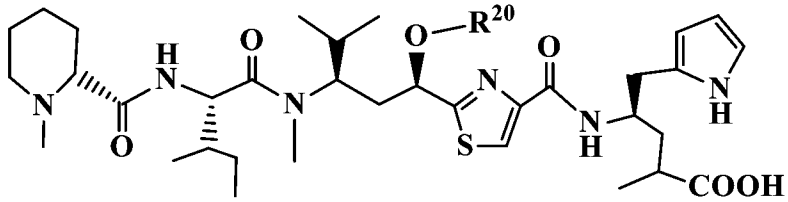
IV-55，

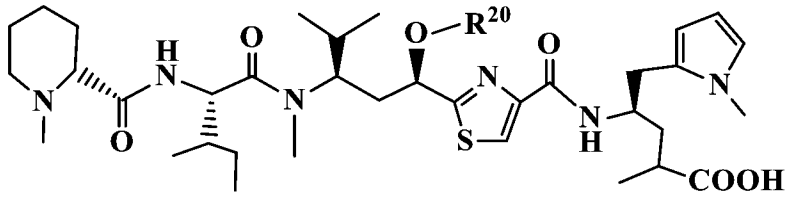


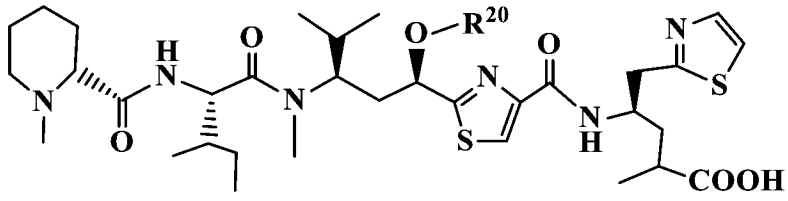
IV-56，

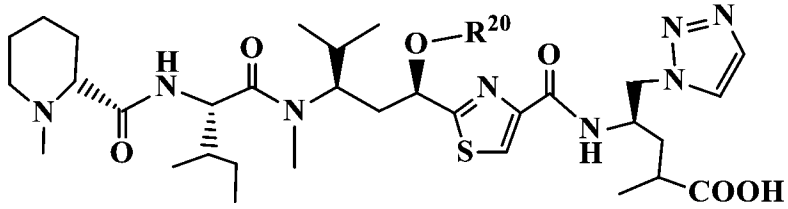

IV-57，

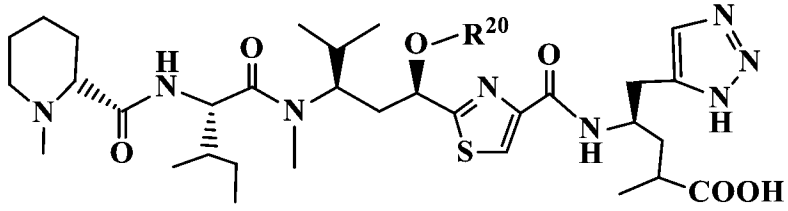

IV-58，

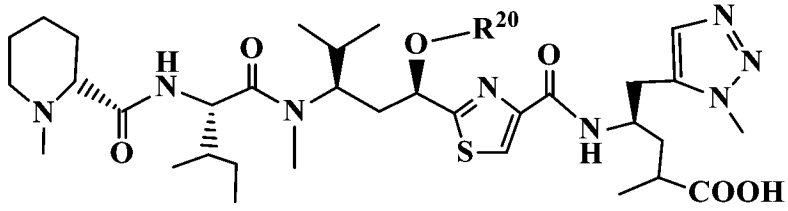

IV-59，

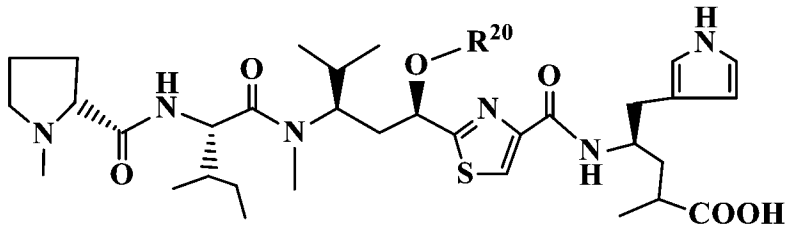

IV-60，


IV-61，

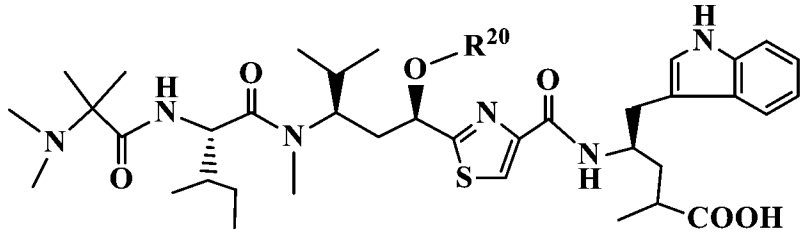

IV-62，


IV-63，

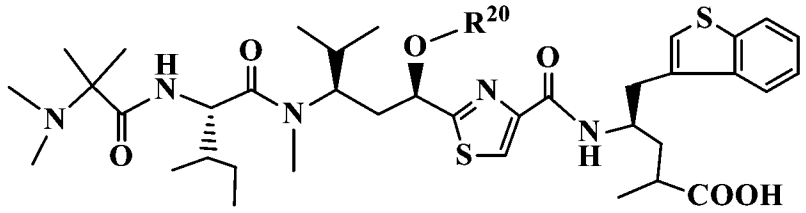

IV-64，



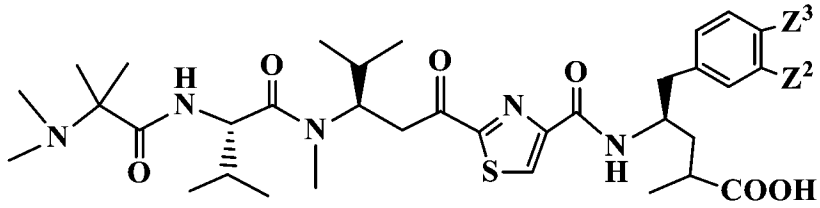
IV-65，



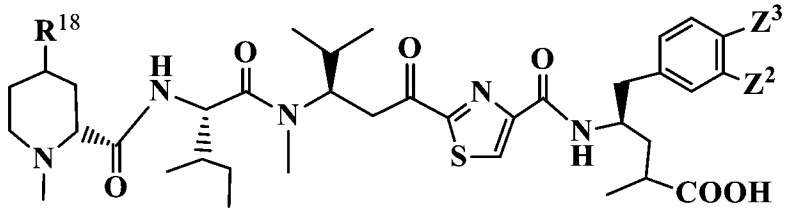
IV-66，



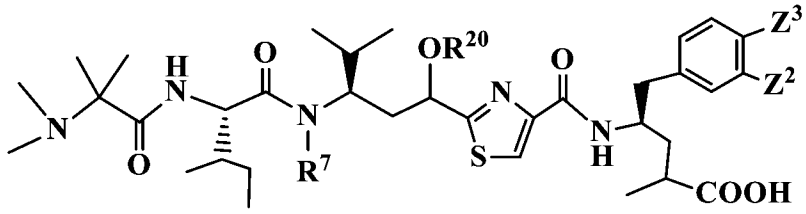
IV-67，



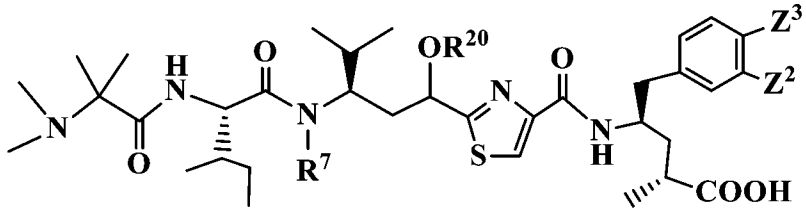
IV-68，



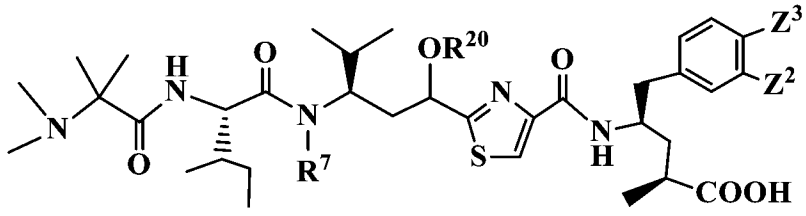
IV-69，



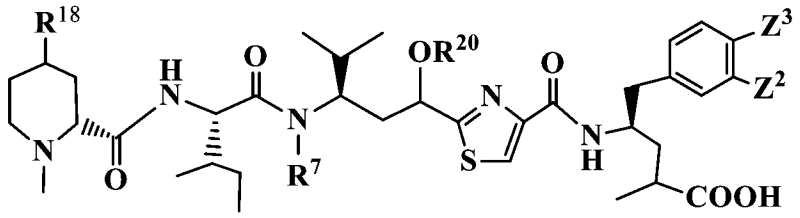
IV-70，

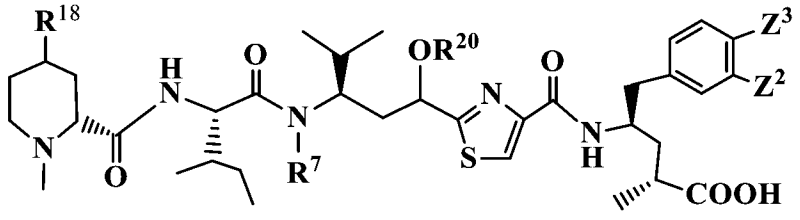


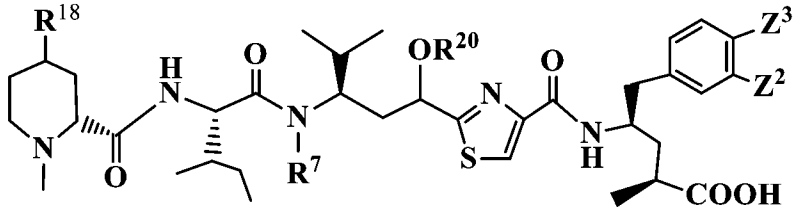
IV-71，

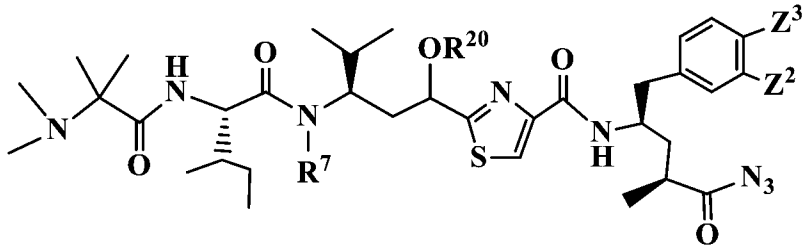


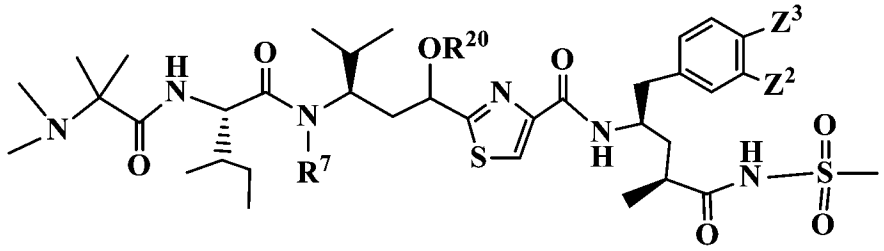
IV-72，

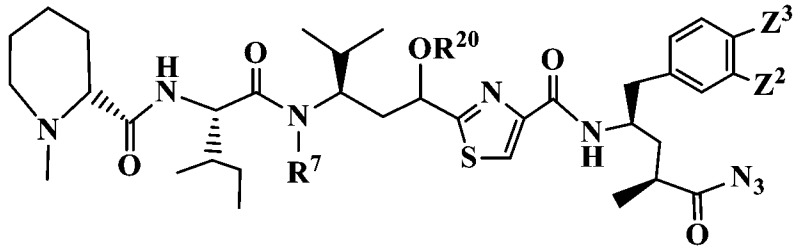

IV-73，

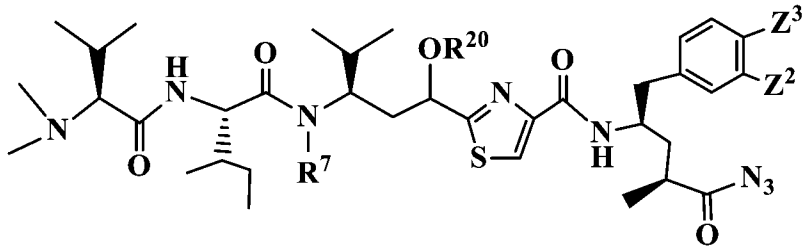

IV-74，


IV-75，


IV-76，


IV-77，


IV-78，

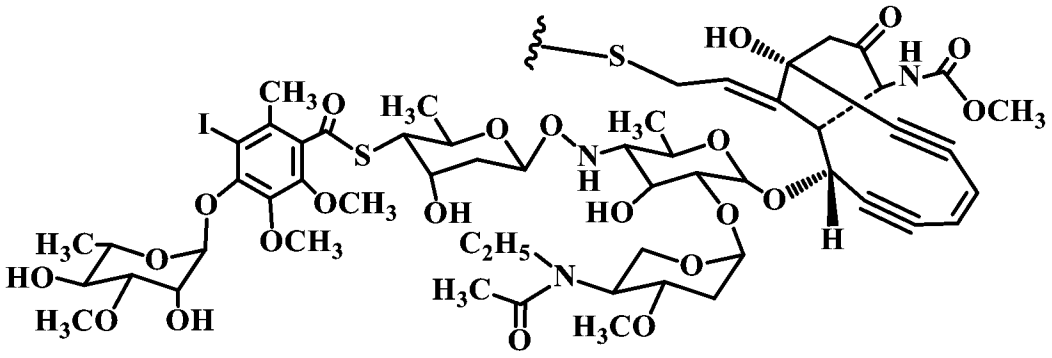

IV-79，

其中 R^{20} 是 H；C_1-C_8直鏈或支鏈烷基或雜烷基、C_2-C_8直鏈或支鏈

烯基、炔基、烷基環烷基、雜環烷基、C_3-C_8 芳基、芳烷基、雜環基、碳環基、環烷基、雜烷基環烷基、烷基羰基、雜芳基的直鏈或支鏈；碳酸酯（-C（O）OR^{17}），胺基甲酸酯 （-C（O）$NR^{17}R^{18}$）；或 1-8 碳的羧酸鹽、酯、醚或醯胺；或 1~8個胺基酸；或具有式 （OCH_2CH_2）$_p$ 或（$OCH_2CH(CH_3)$）$_p$的聚乙烯氧基單元，其中p是0至約1000的整數；或 R^{20}缺省氧與碳形成酮，或上述組合；Z^3和 Z^3 獨立地為 H、OH、NH_2、O、NH、COOH、COO、C（O）、C（O）、C（O）NH、C（O）NH_2、R^{18}、$OCH_2OP(O)(OR^{18})_2$、$OC(O)OP(O)(OR^{18})_2$、$OPO(OR^{18})_2$、$NHPO(OR^{18})_2$、$OP(O)(OR^{18})OP(O)(OR^{18})_2$、$OC(O)R^{18}$、$OC(O)NHR^{18}$、$OSO_2(OR^{18})$、O-（$C_4$-$C_{12}$-糖苷）、直鏈或支鏈烷基或雜烷基；$C_2$-$C_8$直鏈或支鏈烯基、炔基、烷基環烷基、雜環烷基；$C_3$-$C_8$芳基、芳烷基、雜環基、碳環基、環烷基、雜烷基環烷基、烷基羰基、雜芳基的直鏈或支鏈；碳酸酯 （-C（O）OR^{17}）、胺基甲酸酯 （-C（O）$NR^{17}R^{18}$）；R^{17}和 R^{18}獨立地為 H、直鏈或支鏈烷基或雜烷基；C_2-C_8直鏈或支鏈烯基、炔基、烷基環烷基、雜環烷基；C_3-C_8 直鏈或支鏈的芳基、烷基、雜環、碳環、環烷基、雜烷基環烷基、烷基羰基、雜芳基；碳酸酯 （-C（O）OR^{17}）、胺基甲酸酯 （-C（O）$NR^{17}R^{18}$）；R^{19}是 H、OH、NH_2、$OSO_2(OR^{18})$、$XCH_2OP(O)(OR^{18})_2$、$XPO(OR^{18})_2$、$XC(O)OP(O)(OR^{18})_2$、$XC(O)R^{18}$、$XC(O)NHR^{18}$、C_1~C_8 烷基或羧酸酯；C_2~C_8 烯基、炔基、烷基環烷基、雜環烷基；C_3~C_8 芳基或烷基羰基；或藥用鹽；X 是O、S、NH、NHNH、或 CH_2；R^7 定義同上；其中連接位點“〰”在式IV-01-IV-79中，與根據式（IV）中所示相同。

【0093】加利車黴素及其相關的烯二炔抗生素的描述見於：Nicolaou K. C.等，Science 1992，256，1172-1178；Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1993，90，5881-8；美國專利4,970,198；5,053,394；5,108,912；5,264,586；5,384,412；5,606,040；5,712,374；5,714,586；5,739,116；5,770,701；5,770,710；5,773,001；5,877,296；6,015,562；6,124,310；8,153,768。示例性烯二炔包括但不限於，加利車黴素、埃斯培拉黴素、uncialamicin、達內黴素和它們的衍生物。

【0094】加利車黴素的結構較佳下式：



（Ia），

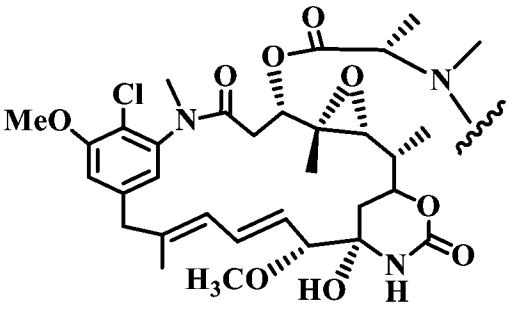
或元素同位素取代物，或藥學上可接受的鹽，水合物或水合鹽；或多晶結構；或其旋光異構體，外消旋體，非鏡像異構物或鏡像異構物；

其中 ～～ 是與 L_1 或 L_2連接的位點；

格爾德黴素是與Hsp90（熱休克蛋白 90）結合的苯醌安沙黴素抗生素，已被用作抗腫瘤藥物。示例性的格爾德黴素包括但不限於17-AAG（17-N-烯丙基胺基-17-去甲氧基格爾德黴素）和17-DMAG（17-二甲基胺基乙基胺基-17-去甲氧基格爾德黴素）。

【0095】美登素或其衍生物美登素類化合物藉由抑制微管蛋白的聚合，來抑制有絲分裂期間微管的形成，從而抑制細胞增生。見 Remillard 等，Science 189：1002-1005 （1975）。

【0096】示例性的美登素和美登素類化合物包括但不限於mertansines（DM1、DM4）、美登素及其衍生物，以及安司黴素。美登素記載在下列美國專利中：4,256,746；4,361,650； 4,307,016；4,294,757；4,294,757；4,371,533；4,424,219；4,331,598；4,450,254；4,364,866 ； 4,313,946 ； 4,315,929 ； 4,362,663 ； 4,322,348 ；4,371,533；4,424,219；5,208,020；5,416,064；5,208,020；5,416,064；6,333.410；6,441,163；6,716,821；7,276,497；7,301,019；7,303,749；7,368,565；7,411,063；7,851,432 和 8,163,888。美登素的結構較佳如下式：



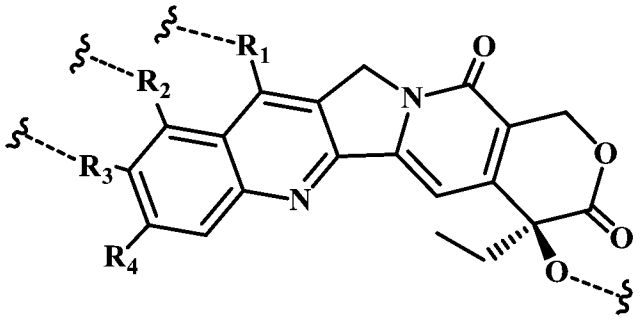
（Ib），

其中 〰是與 L_1 或 L_2連接的位點。

【0097】喜樹鹼（CPTs）及其衍生物是拓撲異構酶抑制劑，可阻止DNA重新連接，因此引起DNA損傷並導致細胞凋亡，其描述見於：Shang，X. F.等，Med Res Rev. 2018，38（3）：775-828；Botella，P.和Rivero-Buceta，E. J Control Release. 2017，247： 28-54；Martino，E.等，Bioorg Med Chem Lett. 2017，27（4）：701-707；Lu，A.，等，Acta Pharmacol Sin 2007，28（2）： 307–314。它包括SN-38，拓撲替康，伊立替康（CPT-11），西利替康（DB-67，AR-67），科西特康（BNP-1350），Etirinotecan，依喜替康，Lurtotecan，Gimatecan（ST1481），貝洛替康（CKD-602），魯比替康（Rubitcan）和其他

（Shang，X.F.等，Med Res Rev. 2018，38（3）：775-828）。迄今為止，已有三種CPT類似物，拓撲替康，伊立替康和貝洛特康獲批用於癌症化學療法（Palakurthi，S.，Expert Opin Drug Deliv. 2015；12（12）：1911-21；Shang，X.F. 等，Med Res Rev. 2018，38（3）：775-828），SN-38和Exatecan還被用於臨床試驗中ADC偶聯物的有效荷載（Ocean，A. J.，Cancer.2017，123（19）： 3843-3854；Starodub，A. N.等，Clin Cancer Res.2015，21（17）：3870-8；Cardillo，T. M. 等，Bioconjug Chem.2015，26（5）：919-31；Ogitani，Y.等，Bioorg Med Chem Lett.2016，26（20）：5069-5072；Takegawa，N.等，Int J Cancer.2017 Oct 15；141（8）：1682-1689；美國專利7,591,994；7,999,083、8,080,250、8,268,317；美國專利申請20130090458、20140099258、20150297748、20160279259）。

【0098】 喜樹鹼（CPT）的結構如下式所示：



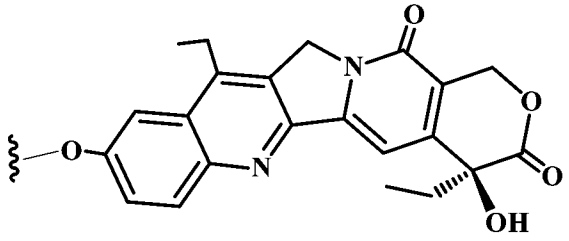
（Ic）

或一種或多種元素同位素取代物，或藥學上可接受的鹽，水合物或水合鹽；或多晶結構；或其旋光異構體，外消旋體，非鏡像異構物或鏡像異構物；

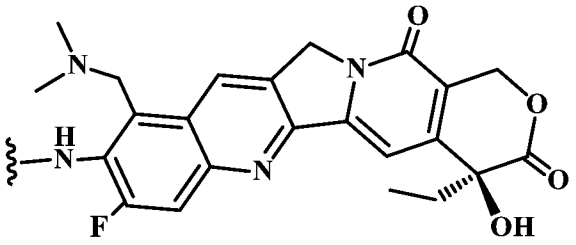
其中R_1，R_2和R_4獨立地選自由下列組成之群組H、F、Cl、Br、CN、NO_2、C_1-C_8烷基；O-C_1-C_8烷基、NH-C_1-C_8烷基；C_2-C_8雜烷基、烷基環烷基、雜環烷基；C_3-C_8芳基、芳基烷基、雜環、碳環、環烷基、

雜烷基環烷基、烷基羰基、雜芳基；C_2-C_8酯、醚、醯胺、碳酸酯、尿素或胺基甲酸酯；R_3為H、OH、NH_2、C_1-C_8烷基、O-C_1-C_8烷基；NH-C_1-C_8烷基；C_2-C_8雜烷基、烷基環烷基、雜環烷基；C_2-C_8 酯、醚、醯胺、碳酸酯、尿素或胺基甲酸酯；或R_1R_2、R_2R_3和R_3R_4獨立形成5～7元碳環、雜環、雜環烷基、芳基或雜芳基環系統。其中 〰 是分子中與 L_1 或 L_2連接的位點。

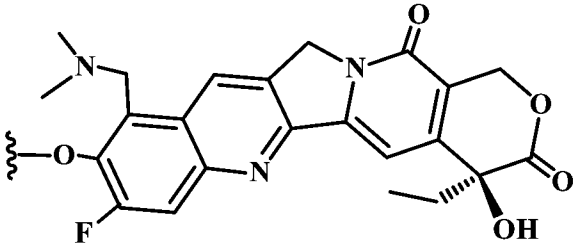
【0099】 喜樹鹼較佳自下列的結構：



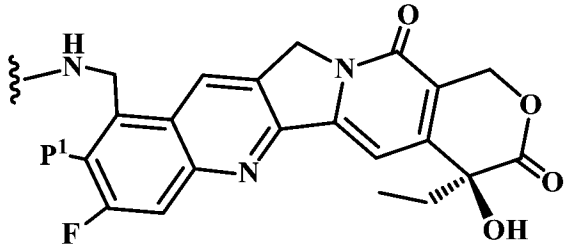
（Ic-01），SN-38，



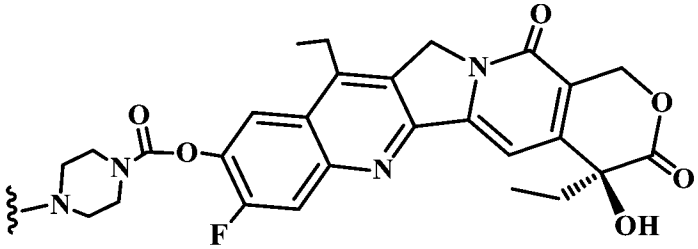
（Ic-02）



（Ic-03），拓撲替康類似物，

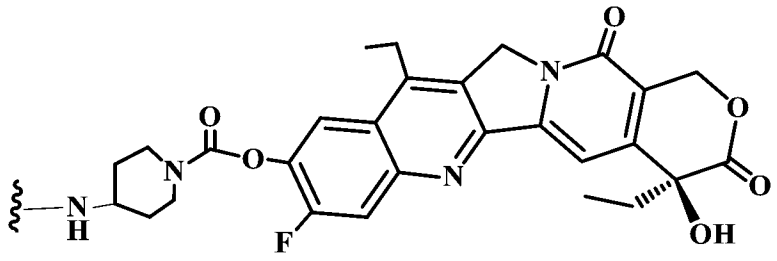


（Ic-04），

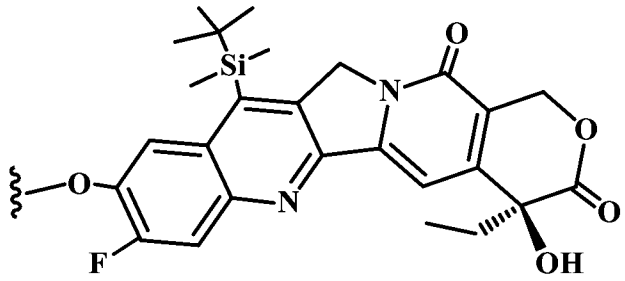


（Ic-05），伊立替康類似

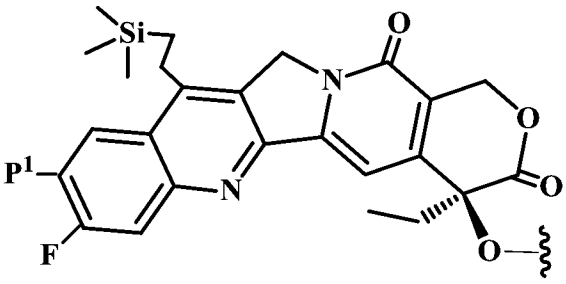
物，



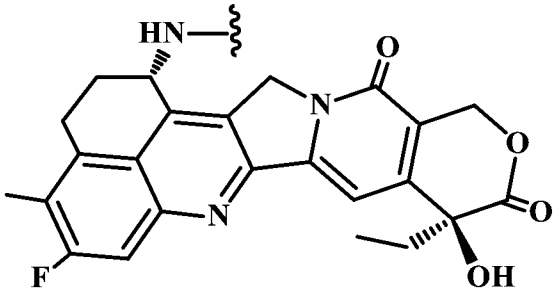
（Ic-06），伊立替康類似物，



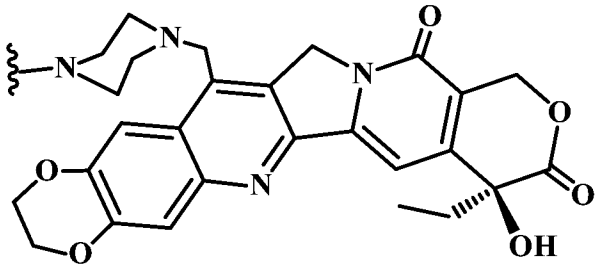
（Ic-07），西利替康，



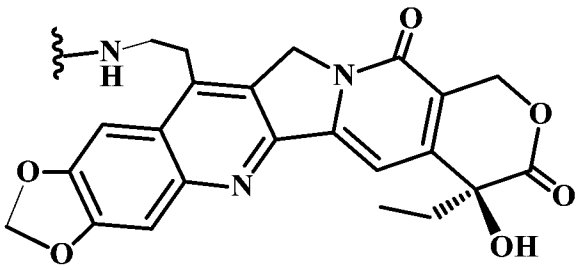
（Ic-08），科西特康



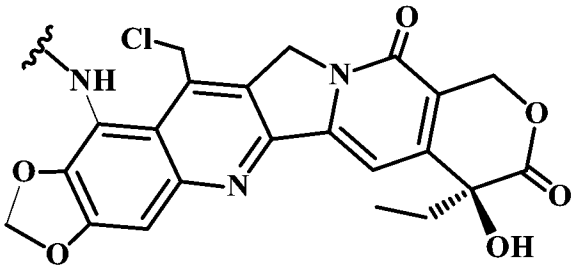
（Ic-09），依喜替康，



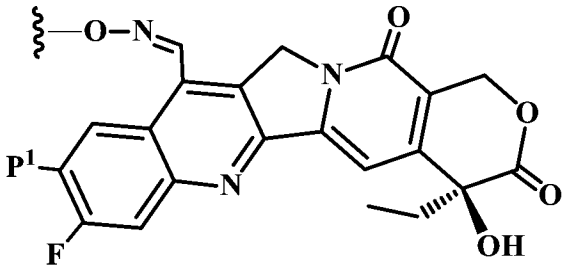
（Ic-10），Lurtotecan，



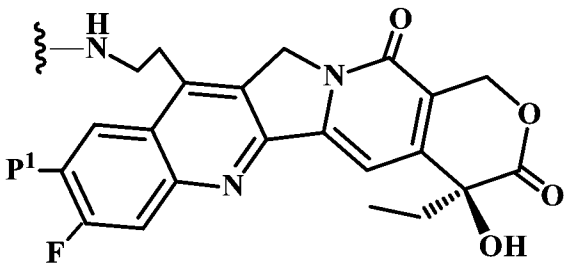
（Ic-11），



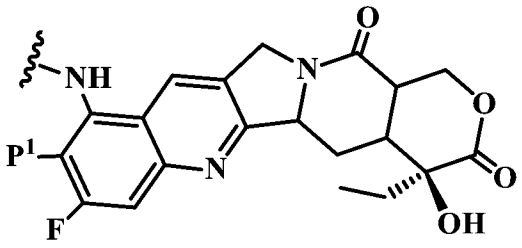
（Ic-12），GI-149893 類似物，



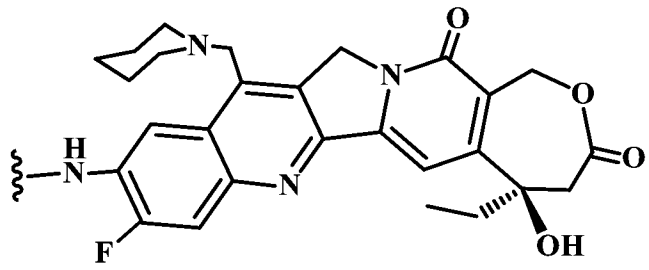
（Ic-13），Gimatecan 類似物，



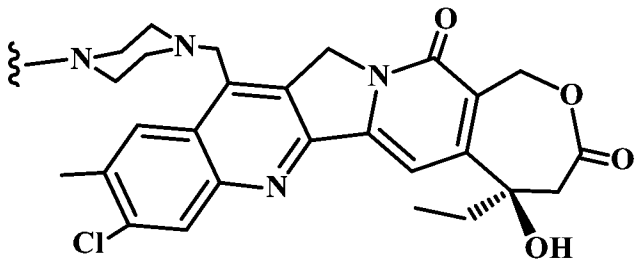
（Ic-14），貝洛替康類似物，



（Ic-15），魯比替康或IDEC-132 類似物，



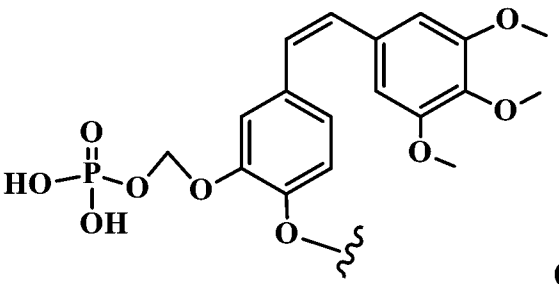
（Ic-16），BN-80927 類似物，



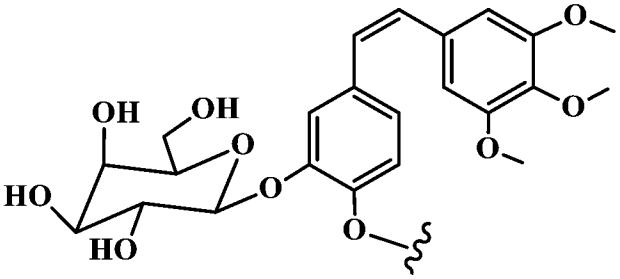
（Ic-17），BN-80927 類似物，

或一種或多種元素同位素取代物，或藥學上可接受的鹽，水合物或水合鹽；或這些化合物的多晶結構；或旋光異構體，外消旋體，非鏡像異構物或鏡像異構物；其中〰是連接到L_1 或 L_2的位點；P^1 是 H、OH、NH_2、COOH、C（O）NH_2、OCH_2OP（O）（OR^{18}）$_2$、OC（O）OP（O）（OR^{18}）$_2$、OPO（OR^{18}）$_2$、NHPO（OR^{18}）$_2$、OC（O）R^{18}、OP（O）（OR^{18}）OP（O）（OR^{18}）$_2$、OC（O）NHR^{18}、OC（O）N（C_2H_4）$_2NCH_3$、OSO_2（OR^{18}）、O-（C_4-C_{12}-糖苷）、OC（O）N（C_2H_4）$_2CH_2N$（C_2H_4）$_2CH_3$、O-（C_1-C_8支鏈或支鏈的烷基）、C_1-C_8直鏈或支鏈烷基或雜烷基、C_2 -C_8直鏈或支鏈烯基、炔基、烷基環烷基、雜環烷基；C_3-C_8直鏈或支鏈的芳基、芳基烷基、雜環、碳環、環烷基、雜烷基環烷基、烷基羰基、雜芳基、碳酸酯（-C（O）OR^{17}）、胺基甲酸酯（-C（O）$NR^{17}R^{18}$）；R^{17}和R^{18}獨立地為H、直鏈或支鏈烷基或雜烷基；C_2 -C_8直鏈或支鏈烯基、炔基、烷基環烷基、雜環烷基；C_3-C_8直鏈或支鏈的芳基、芳基烷基、雜環、碳環、環烷基、雜烷基環烷基、烷基羰基、雜芳基、碳酸酯（-C（O）OR^{17}）、胺基甲酸酯（-C（O）$NR^{17}R^{18}$）。

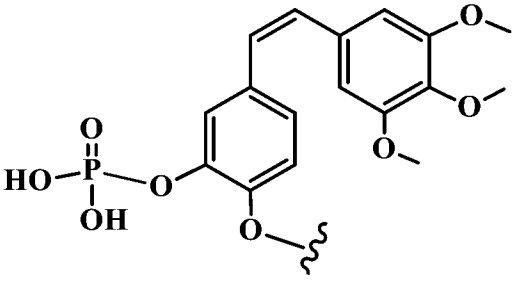
【0100】 Combretastatins 是天然酚類，在腫瘤中具有破壞血管的作用。示例性combretastatins及其衍生物包括但不限於combretastatin A-4（CA-4）、CA4-βGals、CA-4PD、CA4-NPs 和 ombrabulin。



CA-01

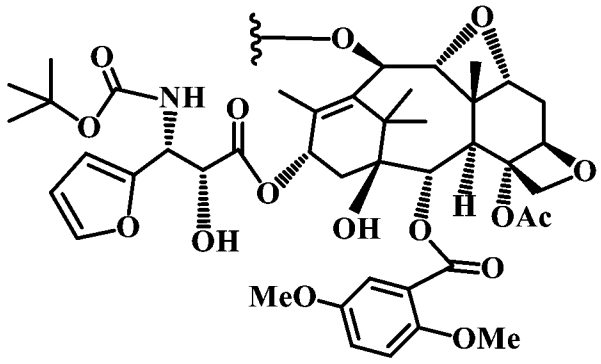


CA-02（CA4-βGal），

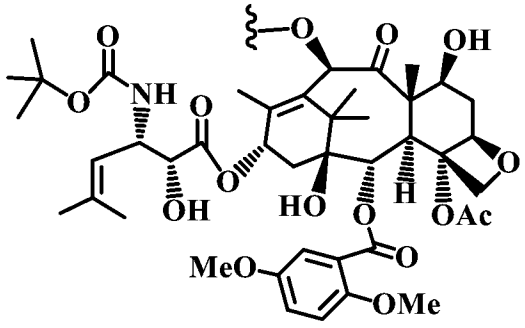


CA-03，

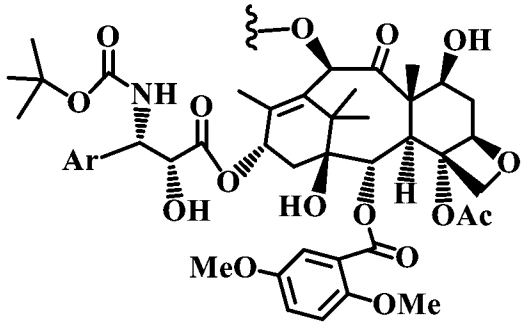
紫杉烷類，包括細胞毒性天然產物紫杉醇（Taxol）和半合成衍生物多西紫杉醇（Taxotere），以及它們的類似物，較佳可用於偶聯，可參考下列文獻：K C. Nicolaou等.，J. Am. Chem. Soc. 117，2409-20，（1995）；Ojima等，J. Med. Chem. 39：3889-3896（1996）；40：267-78（1997）；45，5620-3（2002）；Ojima等.，Proc. Natl. Acad. Sci.，96：4256-61（1999）；Kim等.，Bull. Korean Chem. Soc.，20，1389-90（1999）；Miller，等. J. Med. Chem.，47，4802-5（2004）；U.S. Patent No. 5,475,011；5,728,849；5,811,452；6,340,701；6,372,738；6,391,913；6.436,931；6,589,979；6,596,757；6,706,708；7,008,942；7,186,851；7,217,819；7,276,499；7,598,290；7,667,054。紫杉烷較佳結構如下：



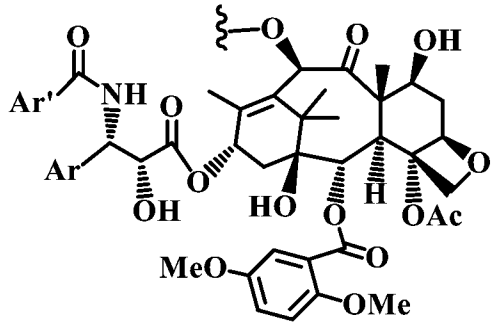
（Id-01），



（Id-02），



（Id-03），



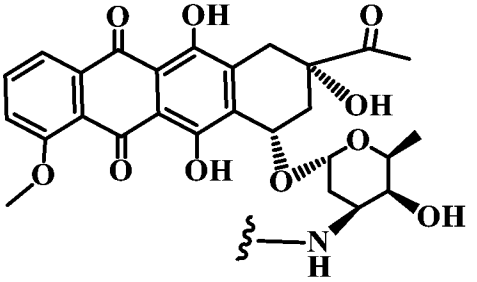
（Id-04），

其中〰是連接到L_1 或 L_2的位點；Ar和Ar’獨立地是芳基或雜芳基。

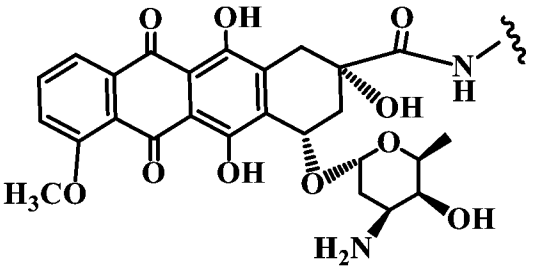
【0101】 蒽環類藥物是哺乳動物DNA拓撲異構酶II抑制劑，能夠穩定DNA鏈被切斷並與類抗體蛋白質共價連接處的DNA-酶錯合物。在過去的幾十年中，這些抗癌劑在治療多種形式的實體瘤和急性白血病中一直發揮著重要作用。然而，蒽環類藥物會導致心血管疾病的發病和死亡

（Sagi，J. C.，等，Pharmacogenomics. 2016，17（9），1075-87；McGowan，J. V.，等，Cardiovasc Drugs Ther. 2017，31（1），63-75）。因此，為了增強此類分子的比活性同時降低心臟毒性，研究人員將蒽環類藥物與細胞結合抗體，或類抗體蛋白質分子偶聯，以提高這些藥物治療指數（Mollaev，M.等，Int J Pharm. 2018 Dec 29. pii： S0378-5173（18） 30991-8；Rossin，R.，等，Bioconjug Chem. 2016，27（7）：1697-706； Dal Corso，A.，等，J Control Release. 2017，264：211-218）。

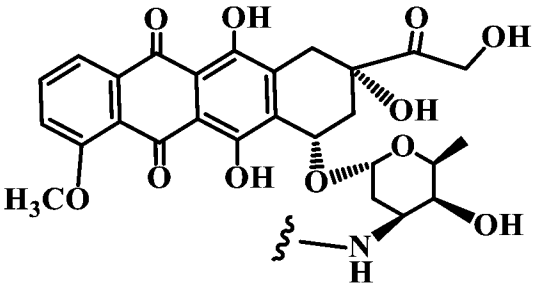
【0102】 示例性蒽環類藥物包括但不限於柔紅黴素、多柔比星（即阿黴素）、表柔比星、伊達比星、伐柔比星和米托蒽醌。本申請中的蒽環類藥物的結構較佳自下式：



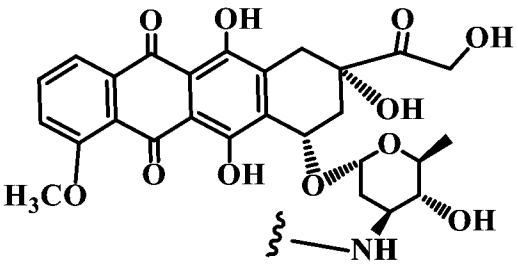
（Ie-01），柔紅黴素類似物，



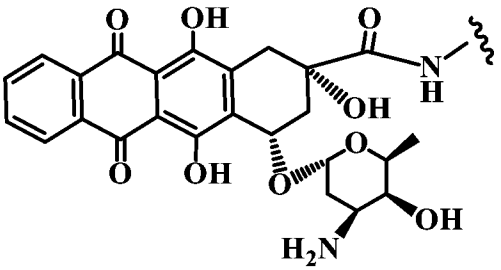
（Ie-02），柔紅黴素類似物，



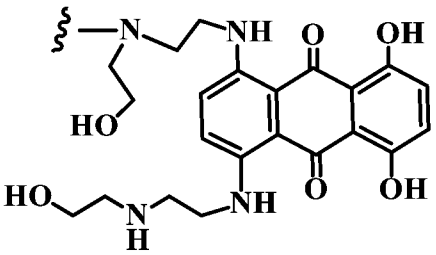
（Ie-03），多柔比星類似物，



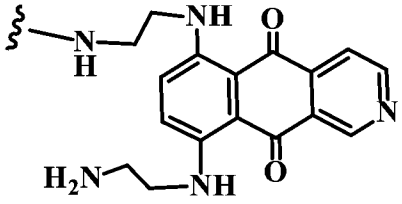
（Ie-04），表柔比星類似物，



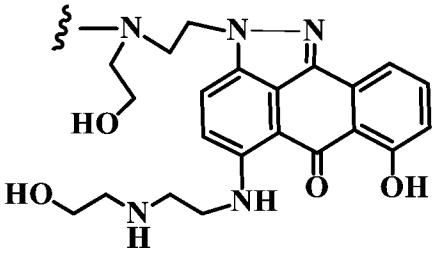
（Ie-05），伊達比星類似物，



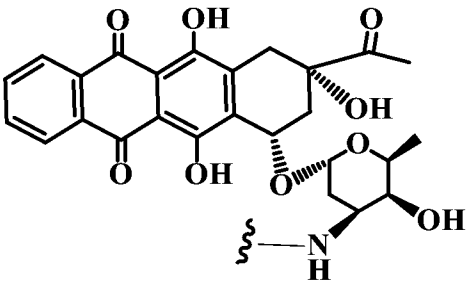
（Ie-06），米托蒽醌類似物，

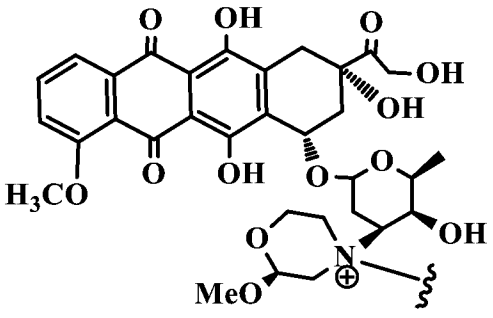


（Ie-07），Pixantrone 類似物，

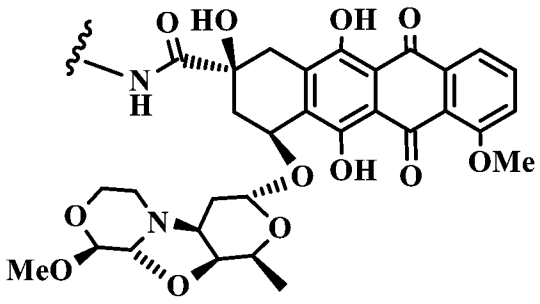


（Ie-08），Losoxantrone 類似物，

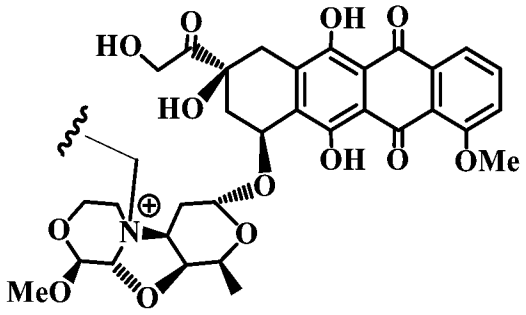




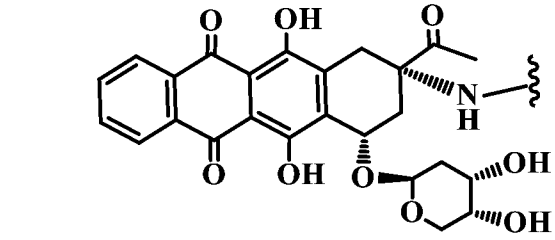
（Ie-09），



（ Ie-10 ），



（ Ie-11 ），

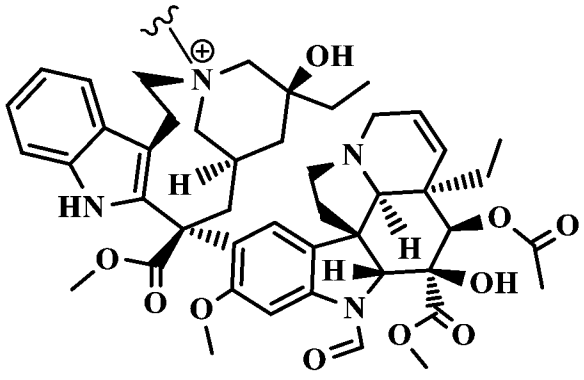


（Ie-12），

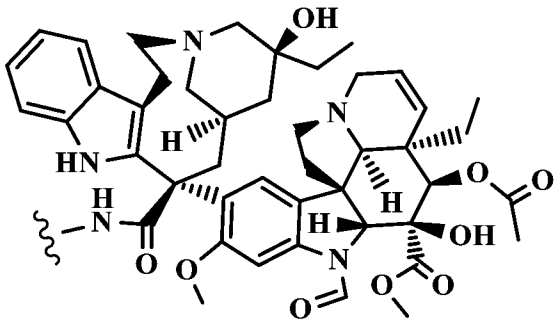
（Ie-13），Amrubicin 類似物.

其中 〰是與 L_1 或 L_2連接的位點。

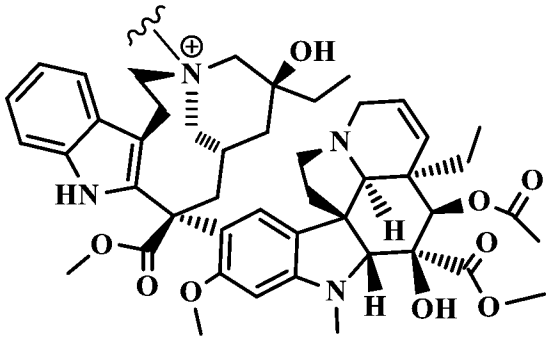
【0103】 長春花生物鹼是一類抗有絲分裂和抗微管生物鹼，藉由抑制癌細胞分裂而起作用。長春花生物鹼包括長春鹼，長春新鹼，長春地辛，環氧長春鹼，長春瑞濱，長春質鹼，長春花鹼，長春胺醇，維尼丁，米諾維辛，甲氧基米諾維辛，長春花草鹼，去氧長春氨醇，長春蔓晶，長春胺，長春西汀，長春布寧。長春花生物鹼較佳長春鹼，長春新鹼，結構式如下：



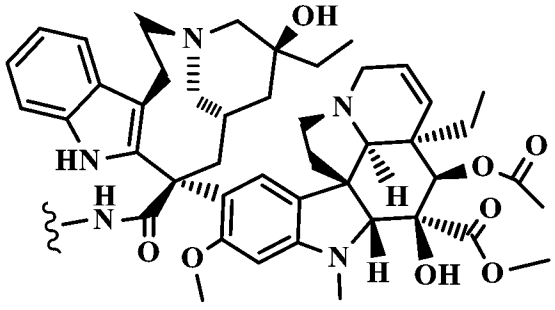
（If-01），長春新鹼，



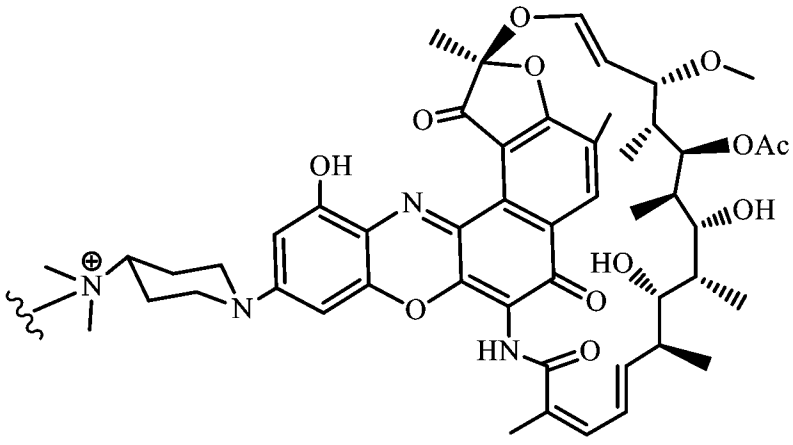
（If-02），長春新鹼，



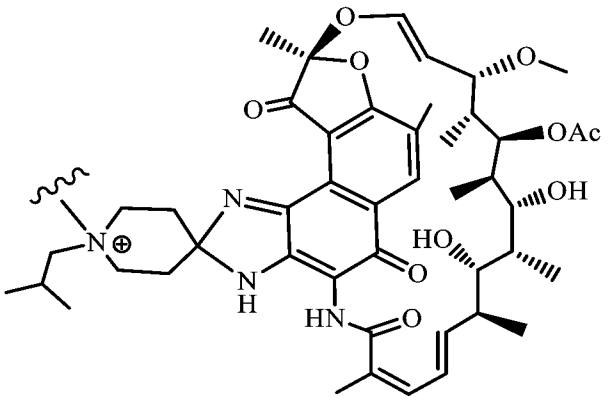
（If-03），長春鹼，



（If-04），長春鹼；



（If-05），利福布汀類似物，

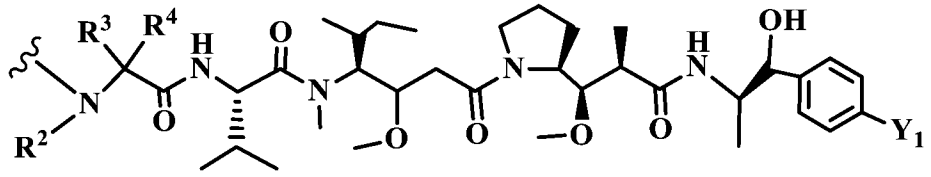


（If-06），利福布汀類似物，

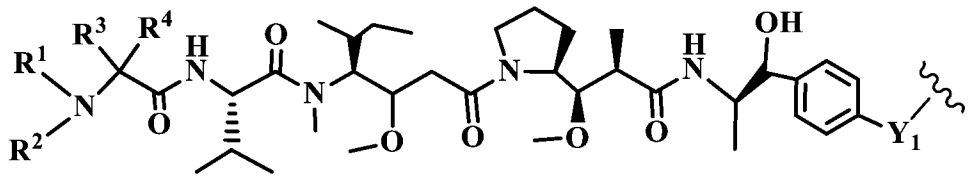
其中 〰 是連接到 L_1 或 L_2位點；

海兔毒素（Dolastatins）及其肽類似物和衍生物，澳瑞他汀（auristatins），是高效的抗有絲分裂劑，已被證明具有抗癌和抗真菌活性。參見，如美國專利申請5,663,149 和 Pettit等，Antimicrob. Agents Chemother. 42：2961-2965，1998。示例性的海兔毒素和澳瑞他汀包括但不限於海兔毒素 10、澳瑞他汀 E （AE）、澳瑞他汀 EB （AEB）、澳瑞他汀 EFP （AEFP）、MMAD （單甲基澳瑞他汀 D 或單甲基海兔毒素 10 ）、MMAF（單甲基澳瑞他汀 F 或 N-甲基纈氨酸-纈氨酸-dolaisoleuine-dolaproine-苯丙氨酸）、MMAE（單甲基澳瑞他汀 E 或 N-甲基纈氨酸-纈氨酸-dolaisoleuine-dolaproine-norephedrine）、5-苯甲醯基戊酸-AE 酯 （AEVB），澳瑞他汀 F 苯二胺 （AFP） 和其他新型澳瑞他汀化合物。澳瑞他汀在以下文獻中都有描述： Int. J. Oncol. 15： 367-72 （1999）；Molecular Cancer Therapeutics，vol. 3，No. 8，pp. 921-32 （2004）；美國專利申請11134826，20060074008，2006022925，美國專利 4414205 ， 4753894 ， 4764368 ， 4816444 ， 4879278 ， 4943628 ， 4978744 ， 5122368 ， 5165923 ， 5169774 ， 5286637 ， 5410024 ， 5521284 ， 5530097 ， 5554725 ， 5585089 ， 5599902 ， 5629197 ， 5635483 ， 5654399 ， 5663149 ， 5665860 ， 5708146 ，

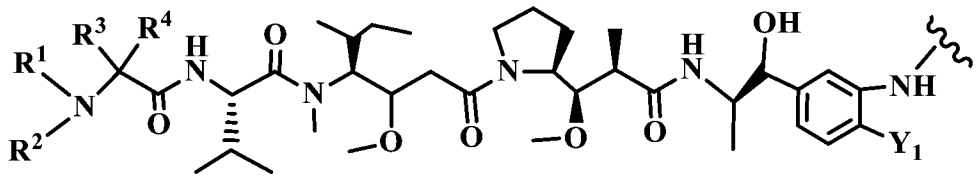
5714586，5741892，5767236，5767237，5780588，5821337，5840699，5965537，6004934，6033876，6034065，6048720，6054297，6054561，6124431，6143721，6162930，6214345，6239104，6323315，6342219，6342221，6407213，6569834，6620911，6639055，6884869，6913748，7090843，7091186，7097840，7098305，7098308，7498298，7375078，7462352，7553816，7659241，7662387，7745394，7754681，7829531，7837980，7837995，7902338，7964566，7964567，7851437，7994135。澳瑞他汀的結構較佳自以下結構：式（Ih-01）、（Ih-02）、（Ih-03）、（Ih-04）、（Ih-05）、（Ih-06）、（Ih-07）、（Ih-08）、（Ih-09）、（Ih-10）、和（Ih-11）。



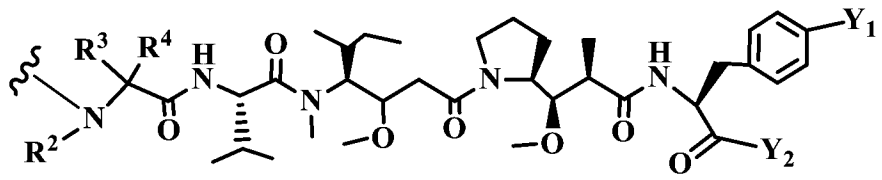
（Ih-01），



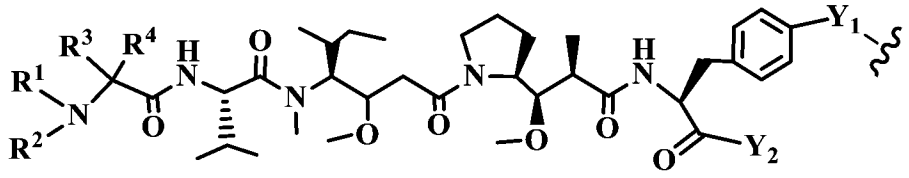
（Ih-02），



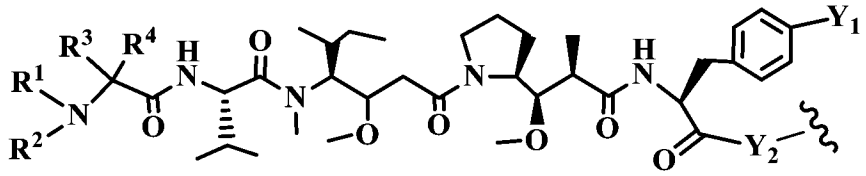
（Ih-03），



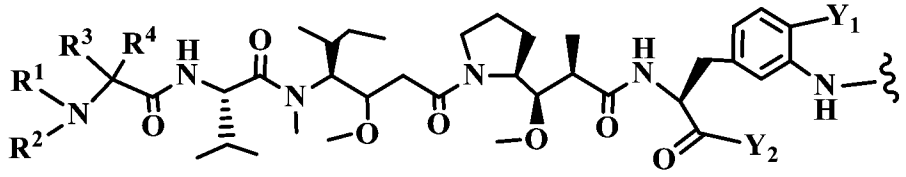
（Ih-04），



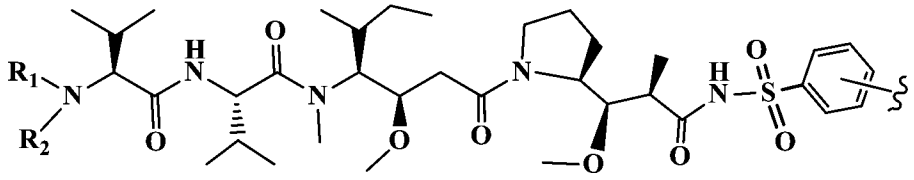
（Ih-05），



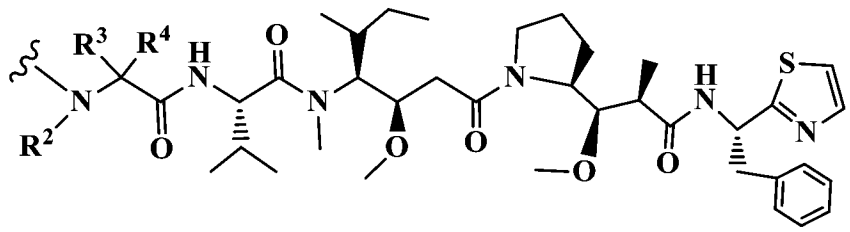
（Ih-06），



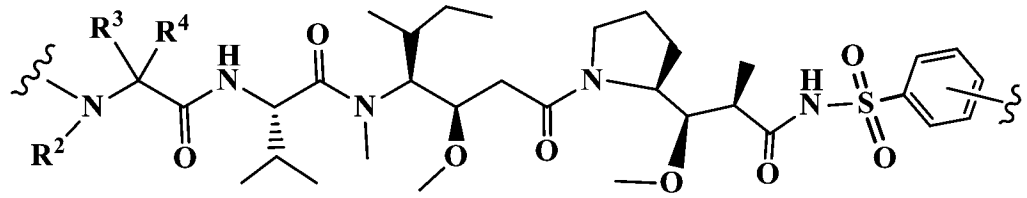
（Ih-07），



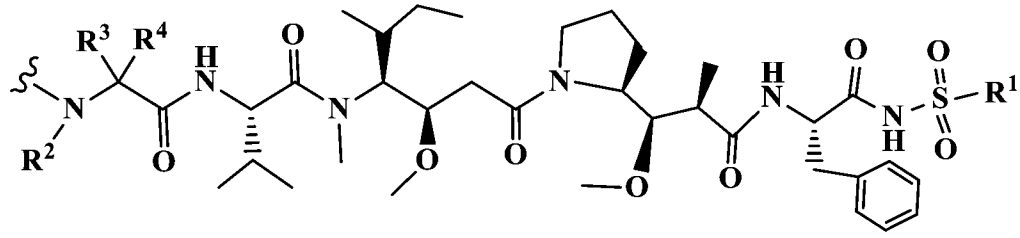
（Ih-08）



（Ih-09），



（Ih-10），



（Ih-11），

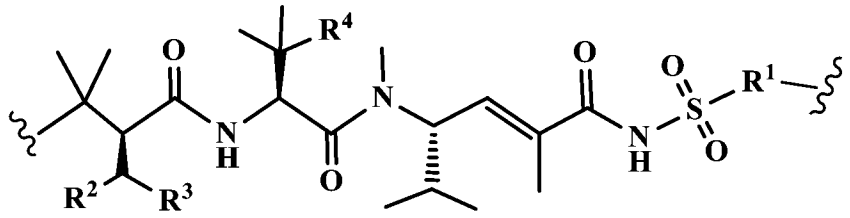
或一種或多種元素的同位素取代物，或藥學上可接受的鹽，水合物或水合鹽；或這些化合物的多晶結構；或旋光異構體，外消旋體，非鏡像異構物或鏡像異構物；其中R^1、R^2、R^3、R^4和R^5獨立地為H；C_1-C_8直鏈或支鏈烷基、芳基、雜芳基、雜烷基、烷基環烷基、酯、醚、醯胺、胺、雜環烷基或醯氧基胺；或包含1-8個胺基酸的肽，或具有式（OCH_2CH_2）

p或（$OCH_2CH（CH_3）$）p的聚氧乙烯基單元，其中p為1至約1000的整數。兩個 Rs： R^1R^2、R^2R^3、R^1R^3 或 R^3R^4 可以形成烷基、芳基、雜芳基、雜烷基或烷基環烷基的3~8元環狀；

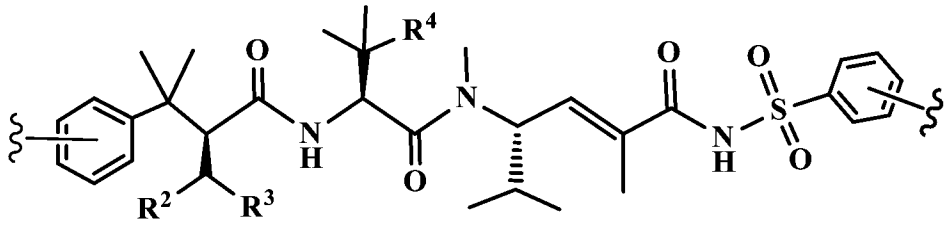
當連接到位點 “〰”時，Y_1 和 Y_2獨立地為 O、NH、NHNH、NR_5、S、C（O）O、C（O）NH、OC（O）NH、OC（O）O、NHC（O）NH、NHC（O）S、OC（O）N（R_1）、N（R_1）C（O）N（R_2）、C（O）NHNHC（O） 和C（O）NR_1；當未連接到位點“〰”時，（獨立地 與L_1 和/或 L_2連接）為 OH、NH_2、$NHNH_2$、NHR_5、SH、C（O）OH、C（O）NH_2、OC（O）NH_2、OC（O）OH、NHC（O）NH_2、NHC（O）SH、OC（O）NH（R_1）、N（R_1）C（O）NH（R_2）、C（O）NHNHC（O）OH 和 C（O）NHR_1；R_{12} 是 OH、NH_2、NHR_1、$NHNH_2$、NHNHCOOH、O-R_1-COOH、NH-R_1-COOH、NH-（Aa）$_n$COOH、O（CH_2CH_2O）$_p$$CH_2CH_2OH$、O（$CH_2CH_2O$）$_p$$CH_2CH_2NH_2$、NH（$CH_2CH_2O$）$_p$$CH_2CH_2NH_2$、$NR_1R_1$’、NHOH、$NHOR_1$、O（$CH_2CH_2O$）$_p$$CH_2CH_2COOH$、NH（$CH_2CH_2O$）$_p$$CH_2CH_2COOH$、NH-Ar-COOH、NH-Ar-$NH_2$、O（$CH_2CH_2O$）$_p$$CH_2CH_2NH$-$SO_3H$、NH（$CH_2CH_2O$）$_p$$CH_2CH_2NHSO_3H$、$R_1$-$NHSO_3H$、NH-$R_1$-$NHSO_3H$、O（$CH_2CH_2O$）$_p$$CH_2$-$CH_2NHPO_3H_2$、NH（$CH_2CH_2O$）$_p$$CH_2CH_2NHPO_3H_2$、$OR_1$、$R_1$-$NHPO_3H_2$、$R_1$-$OPO_3H_2$、O（$CH_2CH_2O$）$_p$$CH_2CH_2OPO_3H_2$、$OR_1$-$NHPO_3H_2$、NH-$R_1$-$NHPO_3H_2$、NH（$CH_2CH_2NH$）$_p$$CH_2$-$CH_2NH_2$、NH（$CH_2CH_2S$）$_p$$CH_2CH_2NH_2$、NH（$CH_2CH_2NH$）$_p$$CH_2CH_2OH$、NH（$CH_2CH_2S$）$_p$$CH_2$-$CH_2OH$、NH-$R_1$-$NH_2$、或NH（$CH_2CH_2O$）$_p$$CH_2CH_2NHPO_3H_2$、其中 Aa 是 1-8 個相同或

者不同的胺基酸；p是 1 -5000；R_1、 R_2、R_3、R_4、R_5、R_5'、Z_1、Z_2和n的定義同前文。

【0104】 Hemiasterlin 及其類似物（例如，HTI-286）與微管蛋白結合，破壞正常的微管動力學，以化學計量數解聚微管蛋白。美登素的結構較佳下式：



（Hs-01）

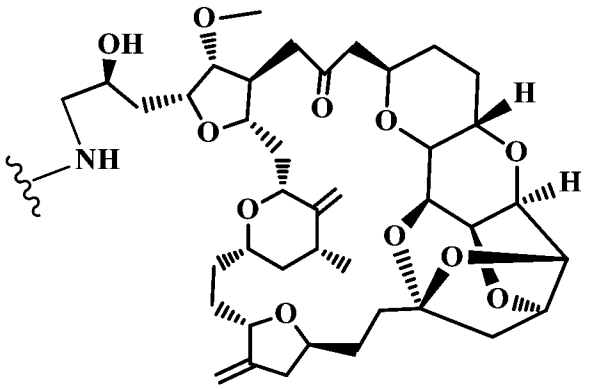


（Hs-02）

其中 R^1、R^2、R^3、R^4 和 R^5 獨立地為 H；C_1-C_8 直鏈或支鏈烷基、芳基、雜芳基、雜烷基、烷基環烷基、酯、醚、醯胺、胺、雜環烷基或醯氧基胺；或含有1-8個胺基酸的肽、或具有式（OCH_2CH_2）$_p$或（OCH_2CH（CH_3））$_p$的聚氧乙烯單元、其中p是1至約5000的整數；另外，R^2R^3可以形成3~8個環的烷基、芳基、雜芳基、雜烷基或烷基環烷基。

【0105】 艾日布林（Eribulin）主要與微管正端的少數高親和力位點結合，具有細胞毒性和非細胞毒性作用機制。它的細胞毒性作用與其抗有絲分裂活性有關，在長期且不可逆的有絲分裂阻斷後誘導了癌細胞的凋亡（Kuznetsov，G.等，Cancer Research.2004，64（16）：5760-6；Towle，M. J，et al，Cancer Research。2010，71（2）：496-505）。除了基於細胞毒性和抗有絲分裂的機制外，在人類乳腺癌模型中的臨床前研究還表明，Eribulin還對存活的癌細胞和殘餘腫瘤的生物學功能產生複雜影響，而這些似乎與它的抗有絲分裂作用無關。Eribulin已被美國FDA

批准用於治療轉移性乳腺癌，這些乳腺癌病人已接受至少兩種針對晚期疾病的前期化療方案，包括基於蒽環類和紫杉烷類的化學療法，以及用於治療不能藉由手術去除（無法切除）或已進展（轉移）的脂肪肉瘤（一種軟組織肉瘤）。Eribulin已被用作ADC偶聯物的有效荷載（US20170252458）。其較佳結構如下式Eb01：

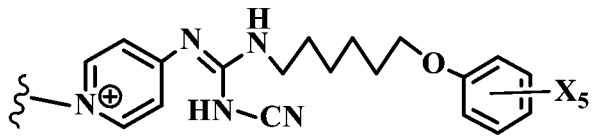


Eb01，

〰 是獨立地連接到 L_1 和/或 L_2 的位點；

煙醯胺磷酸核糖基轉移酶抑制劑（NAMPT）可以是ADC有效荷載，因為它們具有獨特的高活性的機制（Sampath D等，Pharmacol Ther 2015；151，16-31）。NAMPT調節細胞中煙醯胺腺嘌呤二核苷酸（NAD）的水準，而NAD是維持能量和組成代謝的重要氧化還原輔助因數。NAD在新陳代謝中具有幾個重要作用。它在氧化還原反應中充當輔酶，在ADP-核糖基化反應中作為ADP-核糖部分的供體，作為第二信使分子環狀ADP-核糖的前體，並作為細菌DNA連接酶的受質，和一類被稱為Sirtuins的酶使用NAD +去除蛋白質中乙醯基。除了這些代謝功能外，NAD +還是可以自發地或藉由調節機制從細胞中釋放出腺嘌呤核苷酸（Smyth L. M.，等，J. Biol. Chem. 2004，279（47），48893–903；Billington R. A.，等，Mol Med. 2006，12，324–7），因此可能具有重要的細胞外功能（Billington R. A.，等，Mol Med. 2006，12，324–

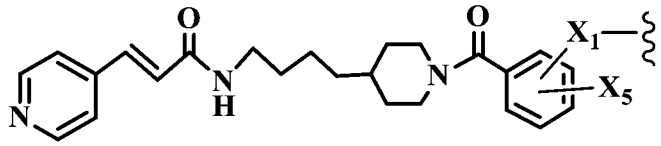
7）。當存在NAMPT抑制劑時，NAD的水準降至代謝所需的水準以下，從而產生能量危機並因此導致細胞死亡。到目前為止，NAMPT抑制劑候選藥物FK-866，CHS-828和GMX-1777已經進入臨床試驗，但每種藥物在發生任何客觀緩解之前都遇到了劑量限制的毒性作用（Holen K.，等，Invest New Drugs 2008，26，45-51；Hovstadius，P.，等，Clin Cancer Res 2002，8，2843-50；Pishvaian，M. J.，等，J Clin Oncol 2009，27，3581）。因此，使用ADC靶向遞送NAMPT抑制劑可能會避免全身毒性，從而獲得更大的治療指標。NAMPT抑制劑的結構較佳為下式NP01、NP02、NP03、NP04、NP05、NP06、NP07、NP08和NP09：



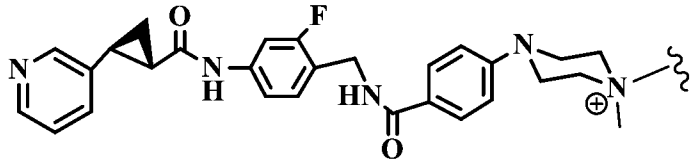
NP01，



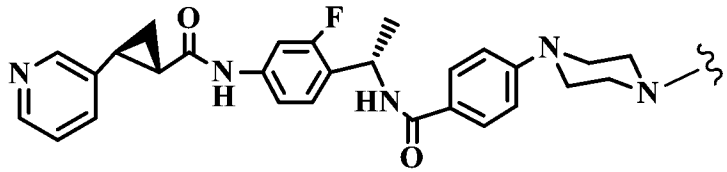
NP02，



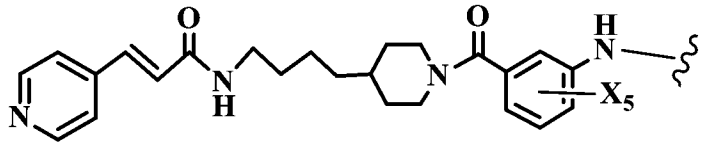
NP03，



NP04，



NP05，



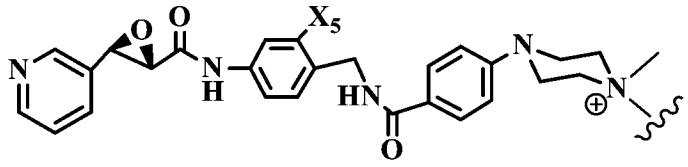
NP06，



NP07，



NP08，

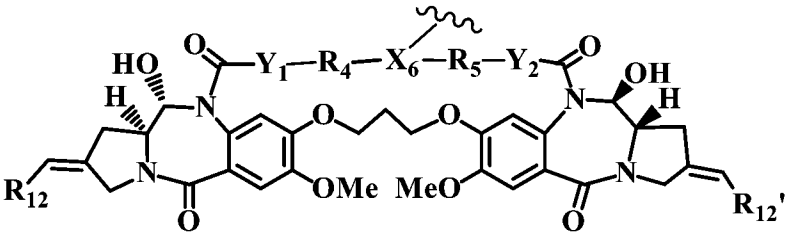


NP09，

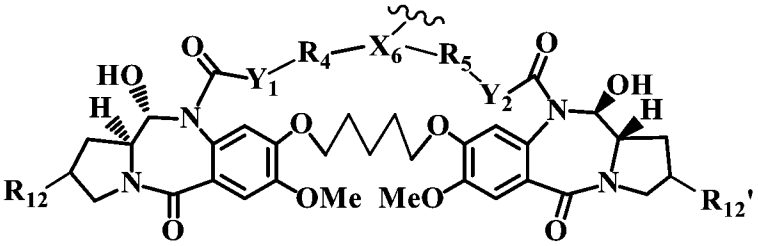
或一種或多種元素的同位素取代物，或藥學上可接受的鹽，水合物或水合鹽；或這些化合物的多晶結構；或旋光異構體，外消旋體，非鏡像異構物或鏡像異構物；其中“〰”與前文相同；X_5是F、Cl、Br、I、OH、OR_1、R_1、OPO_3H_2、OSO_3H、NHR_1、$OCOR_1$、$NHCOR_1$。

【0106】苯二氮卓二聚體及其類似物（例如，吡咯並苯二氮䓬（PBD）或（tomaymycin）的二聚體、吲哚並苯二氮䓬（IGN）二聚體、咪唑並苯並噻二氮雜二聚體或惡唑烷基苯並二氮雜二聚體）含有一個或多個能與雙鏈 DNA 結合的亞胺官能團或其等效物。PBD 和 IGN 分子基於天然產物安麴黴素，以序列選擇性方式與 DNA 交互作用，優先選擇嘌呤-鳥嘌呤-嘌呤序列。根據本發明較佳的苯二氮䓬二聚體的例子出現在下列文獻：美國專利8,163,736；8,153,627；8,034,808；7,834,005；7,741,319；7,704,924；7,691,848；7,678,787；7,612,062；7,608,615；7,557,099；7,528,128；7,528,126；7,511,032；7,429,658；7,407,951；7,326,700；7,312,210；7,265,105；7,202,239；7,189,710；7,173,026；7,109,193；7,067,511；7,064,120；7,056,913；7,049,311；7,022,699；7,015,215；6,979,684；6,951,853；6,884,799；6,800,622；6,747,144；6,660,856；6,608,192；6,562,806；6,977,254；6,951,853；6,909,006；6,344,451；5,880,122；4,935,362；4,764,616；4,761,412；4,723,007；4,723,003；4,683,230；4,663,453；4,508,647；4,464,467；4,427,587；

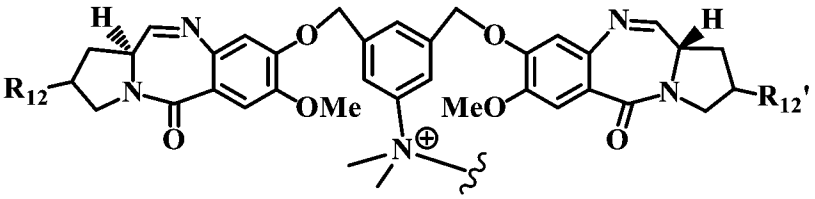
4,000,304；美國申請20100203007，20100316656，20030195196。抗體-苯二氮䓬二聚體偶聯物的結構示例如下所示： PB01、PB02、PB03、PB04、PB05、PB06、PB07、PB08、PB09、PB10、PB11、PB12、PB13、PB14、PB15和 PB16。



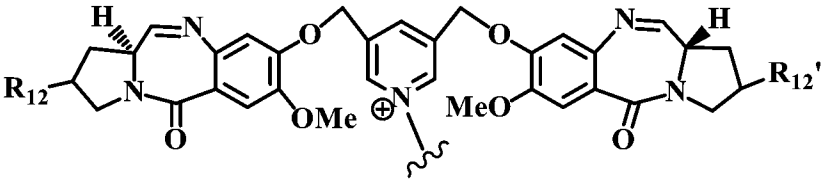
PB01，



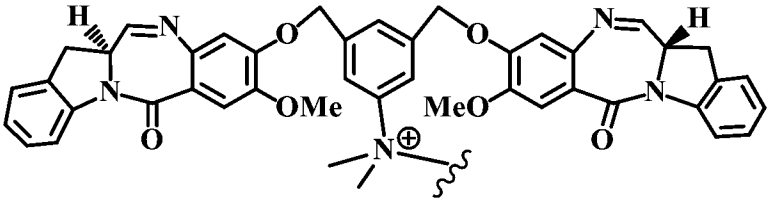
PB02，



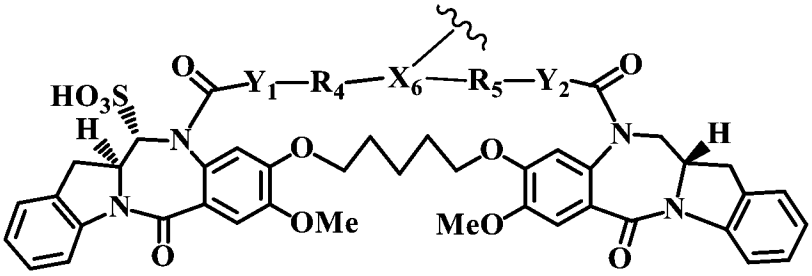
PB03，



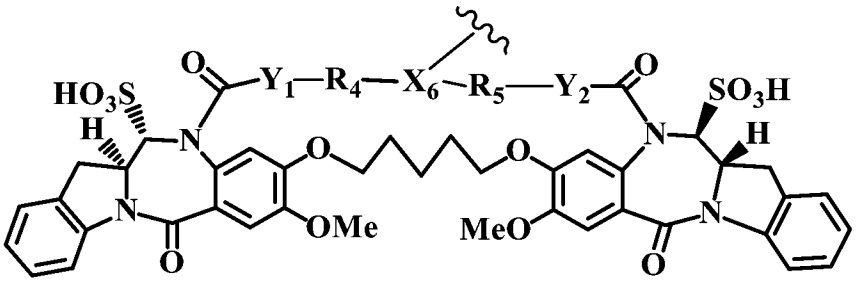
PB04，

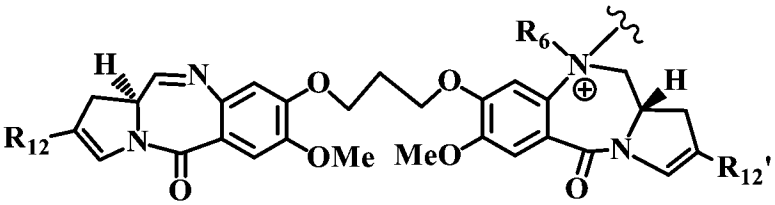


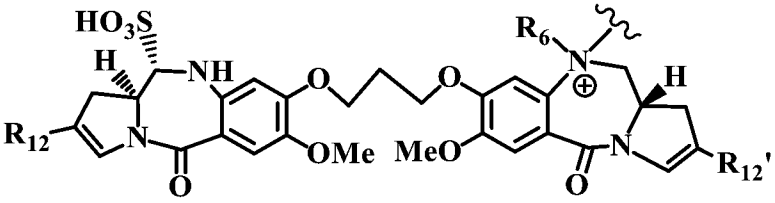
PB05，

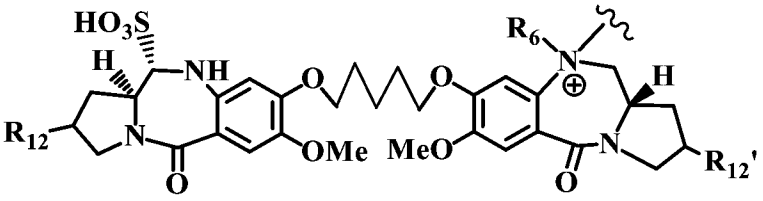


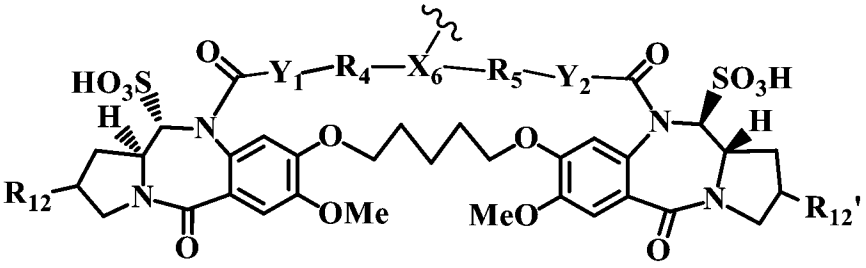
PB06，

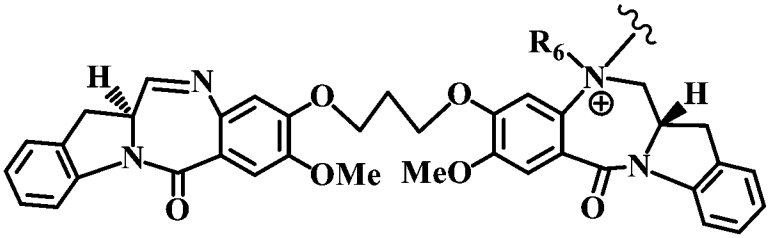

PB07，

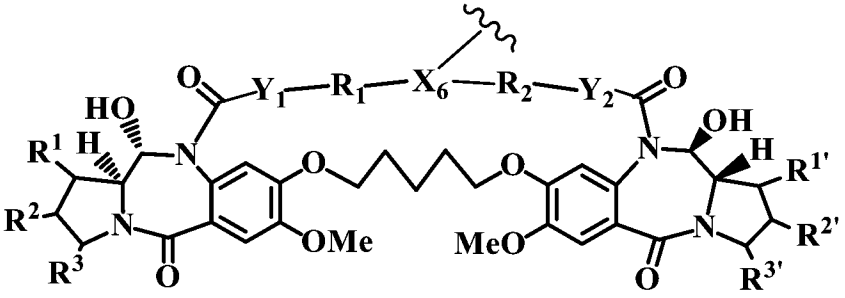

PB08，

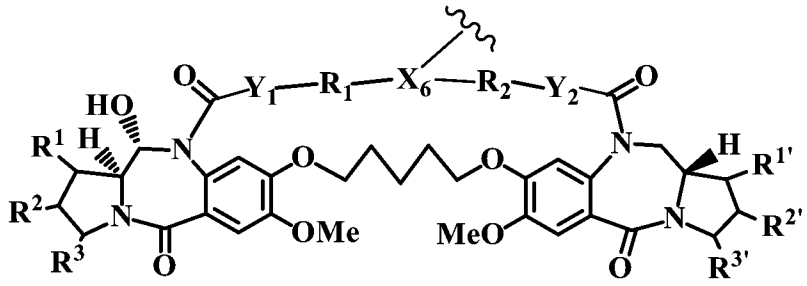

PB09，


PB10，

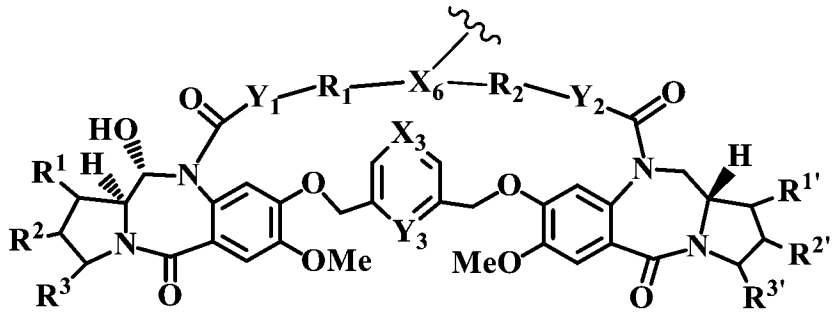

PB11，


PB12，

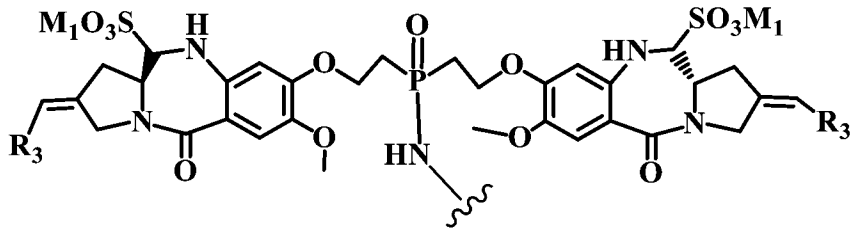

PB13，



PB14，



PB15，



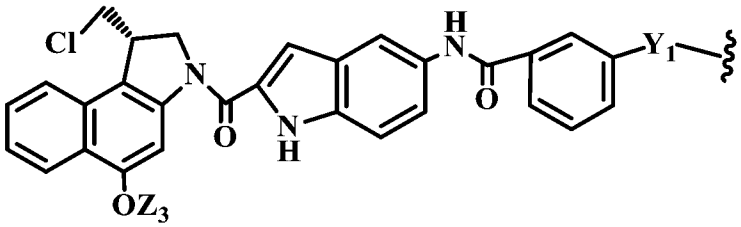
PB16，

或一種或多種元素的同位素取代物，或藥學上可接受的鹽，水合物或水合鹽；或這些化合物的多晶結構；或旋光異構體，外消旋體，非鏡像異構物或鏡像異構物；其中 X_1、X_2、Y_1、Y_2、Z_1、Z_2和 n 的定義如前文所述；較佳的X_1、X_2、Y_1 和Y_2 獨立地為 O、N、NH、NHNH、NR_5、S、C（O）O、C（O）NH、OC（O）NH、OC（O）O、NHC（O）NH、NHC（O）S、OC（O）N（R_1）、N（R_1）C（O）N（R_1）、CH、C（O）NHNHC（O） 和 C（O）NR_1；R^1、R^2、R^3、$R^{1'}$、$R^{2'}$、和 $R^{3'}$ 獨立地為 H、F、Cl、=O、=S、OH、SH、C_1-C_8 直鏈或支鏈的苄基、芳基、烯基、雜芳基、雜烷基、烷基環烷基、酯（$COOR_5$ 或 –OC（O）R_5）、醚（OR_5）、醯胺（$CONR_5$）、胺基甲酸酯（$OCONR_5$）、胺類（NHR_5，NR_5R_5'）、雜環烷基、或醯氧基胺（-C（O）NHOH、-ONHC（O）R_5）、或含有1-20個天然或非天然胺基酸的肽、或結構式如

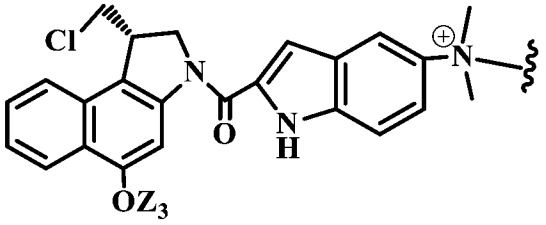
（OCH_2CH_2）$_p$ 或（OCH_2CH（CH_3））$_p$的聚氧乙烯基單元、其中 p 是1至 5000的整數。兩個R基團、如 R^1R^2、R^2R^3、R^1R^3、 $R^{1'}R^{2'}$、$R^{2'}R^{3'}$或$R^{1'}R^{3'}$ 可以獨立地形成 3~8元環的烷基、芳基、雜芳基、雜烷基或烷基環烷基；X_3 和 Y_3 獨立地為 N、NH、CH_2 或CR_5，X_3 和 Y_3 之一可以缺省；其中 R_1，和 R_2是 C_1-C_8 直鏈或支鏈烷基，雜烷基；C_3-C_8 芳基、雜芳基、烷基環烷基、醯氧基、烷基芳基、烷基芳氧基、烷基芳基胺基、烷基芳基巯基；或 1-6 相同或不同的胺基酸/肽序列 （Ar）r，r =1 -6；其中 R_4、R_5、R_5'、R_6、R_{12}和 $R_{12'}$獨立地為 H、OH、NH_2、NH（CH_3）、$NHNH_2$、COOH、SH、OZ_3、SZ_3、F、Cl、或C_1-C_8直鏈或支鏈烷基、芳基、雜芳基、雜烷基、烷基環烷基、醯氧基胺；Z_3 是H、OP（O）（OM_1）（OM_2）、OCH_2OP（O）（OM_1）（OM_2）、OSO_3M_1、或 O-糖苷（葡萄糖苷、半乳糖苷、甘露糖苷、葡糖醛酸苷/葡糖醛酸、阿洛糖苷、果糖苷等）、NH-糖苷、S-糖苷或CH_2-糖苷；M_1和M_2獨立地為H、Na、K、Ca、Mg、NH_4或 $NR_1R_2R_3$；X_6是 CH、N、P（O）NH、P（O）NR_1、CHC（O）NH、C_3-C_8 芳基、雜芳基、烷基環烷基、醯氧基、烷基芳基、烷基芳氧基、烷基芳基胺基或Aa （胺基酸，較佳自Lys、Phe、Asp、Glu、Ser、Thr、His、Cys、Tyr、Trp、Gln、Asn、Arg）；“〰”的定義如前所述。

【0107】 CC-1065類似物和多卡黴素類似物較佳用於本專利申請的偶聯物。CC-1065 類似物和多卡黴素類似物的例子以及它們的合成記載於： Warpehoski，等，J. Med. Chem. 31：590-603 （1988）；D. Boger等.，J. Org. Chem；66；6654-61，2001；美國專利： 4169888，4391904 ， 4671958 ， 4816567 ， 4912227 ， 4923990 ， 4952394 ，

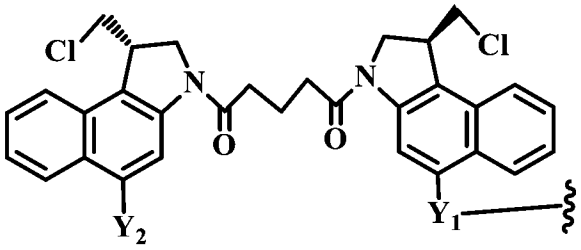
4975278，4978757，4994578，5037993，5070092，5084468，5101038，5117006，5137877，5138059，5147786，5187186，5223409，5225539，5288514，5324483，5332740，5332837，5334528，5403484，5427908，5475092，5495009，5530101，5545806，5547667，5569825，5571698，5573922，5580717，5585089，5585499，5587161，5595499，5606017，5622929，5625126，5629430，5633425，5641780，5660829，5661016，5686237，5693762，5703080，5712374，5714586，5739116，5739350，5770429，5773001，5773435，5786377，5786486，5789650，5814318，5846545，5874299，5877296，5877397，5885793，5939598，5962216，5969108，5985908，6060608，6066742，6075181，6103236，6114598，6130237，6132722，6143901，6150584，6162963，6172197，6180370，6194612，6214345，6262271，6281354，6310209，6329497，6342480，6486326，6512101，6521404，6534660，6544731，6548530，6555313，6555693，6566336，6586618，6593081，6630579，6756397，6759509，6762179，6884869，6897034，6946455，7049316，7087600，7091186，7115573，7129261，7214663，7223837，7304032，7329507，7329760，7388026，7 655660，7655661，7906545，和 8 012978。應用本發明的連接子的抗體-CC-1065類似物的偶聯物的結構示例如CC01、CC02、CC03、CC04、CC05、CC06 和 CC07：



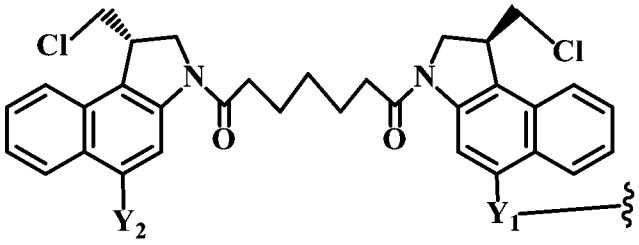
CC01，



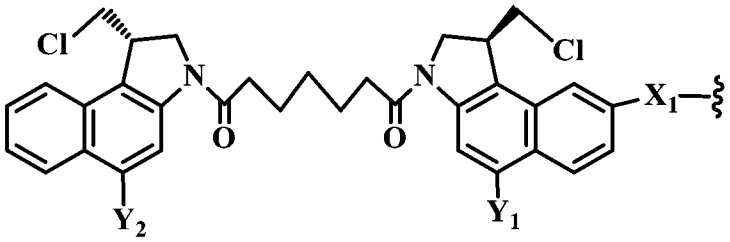
CC02，



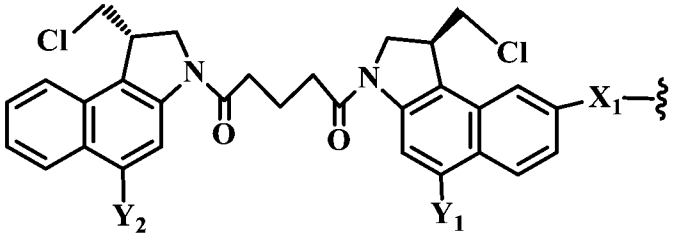
CC03，



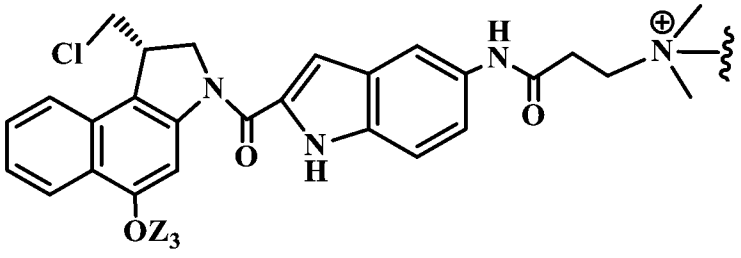
CC04，



CC05，



CC06，



CC07，

其中當連接到位點“〰”時，X_1、X_2、Y_1 和 Y_2 獨立地為O、NH、

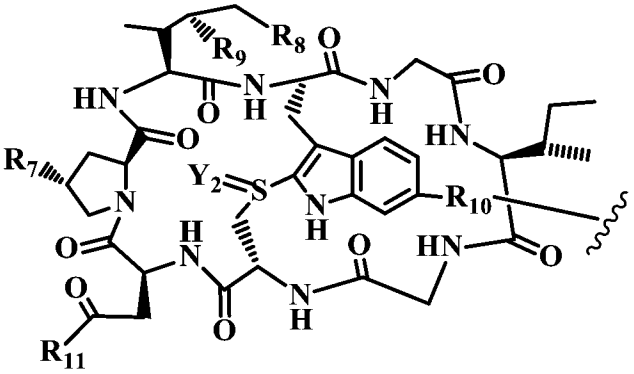
NHNH、NR_5、S、C（O）O、C（O）NH、OC（O）NH、OC（O）O、NHC（O）NH、NHC（O）S、OC（O）N（R_1）、N（R_1）C（O）N（R_2）、C（O）NHNHC（O）和C（O）NR_1；或者當未連接到連接位點“〰”時，為OH、NH_2、$NHNH_2$、NHR_1、SH、C（O）OH、C（O）NH_2、OC（O）NH_2、OC（O）OH、NHC（O）NH_2、NHC（O）SH、OC（O）NH（R_1）、N（R_1）C（O）NH（R_2）、C（O）NHNHC（O）OH和C（O）NHR_1；Z_3是H、PO（OM_1）（OM_2）、SO_3M_1、CH_2PO（OM_1）（OM_2）、CH_3N（CH_2CH_2）$_2$NC（O）-、O（CH_2CH_2）$_2$NC（O）-、R_1、或糖苷；其中R_1、R_2、R_3、M_1、M_2和n的定義同前文所述。

【0108】毒傘肽及其類似物是包含至少十種有毒化合物的亞組，最初在一些有毒蘑菇屬中發現的，最著名的是傘形毒蕈和其他幾種蘑菇，也較佳用於本專利偶聯物。這十種毒傘肽，即α-鵝膏毒素，β-鵝膏毒素，γ-鵝膏毒素，ε-鵝膏毒素，Amanullin，Amanullinic acid，Amaninamide，Amanin，Proamanullin，其合成前體為含35個胺基酸的蛋白，被脯氨醯寡肽酶切割後，得到含8個胺基酸的剛性雙環肽（Litten，W. 1975 Scientific American232（3）：90–101；H. E. Hallen，等 2007 Proc. Nat. Aca. Sci. USA 104，19097–101；K. Baumann，等，1993 Biochemistry 32（15）：4043–50；Karlson-Stiber C，Persson H. 2003，Toxicon 42（4）：339–49；Horgen，P. A.等. 1978 Arch. Microbio. 118（3）：317–9）。毒傘肽藉由抑制RNA聚合酶II（Pol II），關閉基因轉錄和蛋白質生物合成而殺死細胞（Brodner，O. G. 和 Wieland，T. 1976 *Biochemistry*，15（16）：3480–4；Fiume，L.，

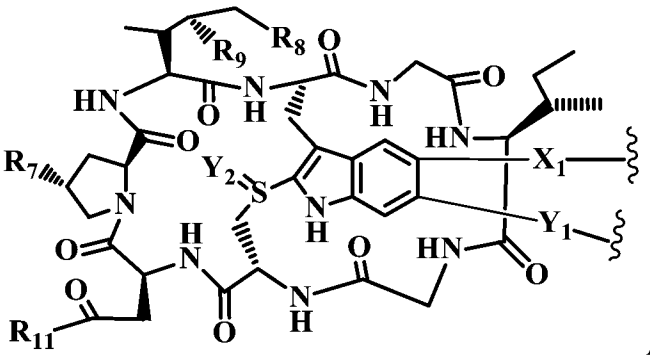
Curr Probl Clin Biochem，1977，7： 23-8；Karlson-Stiber C，Persson H. 2003，Toxicon 42（4）： 339–49；*Chafin，D. R.，Guo，H. & Price，D. H. 1995 J. Biol. Chem. 270（32）： 19114–19；*Wieland（1983） Int. J. Pept. Protein Res. 22（3）： 257-76）。*可以從收集的傘形毒蕈蘑菇中產生毒傘肽（*Yocum，R. R. 1978 Biochemistry 17（18）： 3786-9；*Zhang，P.等，2005，FEMS Microbiol. Lett.252（2），223-8），或使用擔子菌（Muraoka，S. and Shinozawa T.，2000 J. Biosci. Bioeng. 89（1）：73-6）或A. fissa發酵（Guo，X. W.，等，2006 Wei Sheng Wu Xue Bao 46（3）：373-8），或藉由培養Galerina fasciculata 或 Galerina helvoliceps 而製備（*WO/1990/009799，JP11137291）。但是，這些單離和發酵的產量很低（少於 5 mg/L 培養物）。在過去的三十年中，已經報導了幾種毒傘肽及其類似物的製備（W. E. Savige，A. Fontana，Chem. Commun. 1976，600–1；Zanotti，G.，等，Int J Pept Protein Res，1981. 18（2）： 162-8；Wieland，T.，等，Eur. J. Biochem. 1981，117，161–4；P. A. Bartlett 等，Tetrahedron Lett. 1982，23，619–22；Zanotti，G.，等，Biochim Biophys Acta，1986. 870（3）： 454-62；Zanotti，G. 等，Int. J. Peptide Protein Res. 1987，30，323–9；Zanotti，G.， 等，Int. J. Peptide Protein Res. 1987，30，450–9；Zanotti，G.，等，Int J Pept Protein Res，1988. 32（1）： 9-20； G. Zanotti，T.等，Int. J. Peptide Protein Res. 1989，34，222–8；Zanotti，G.，等，Int J Pept Protein Res，1990. 35（3）： 263-70；Mullersman，J. E. and J. F. Preston，3rd，Int J Pept Protein Res，1991. 37（6）： 544-51；Mullersman，

J.E.，等，Int J Pept Protein Res，1991. 38（5）： 409-16；Zanotti，G. 等，Int J Pept Protein Res，1992. 40（6）： 551-8；Schmitt，W. 等，J. Am. Chem. Soc. 1996，118，4380–7；Anderson，M.O.，等， J. Org. Chem.，2005，70（12）： 4578-84；J. P. May，等， J. Org. Chem. 2005，70，8424–30；F. Brueckner，P. Cramer，Nat. Struct. Mol. Biol. 2008，15，811–8；J. P. May，D. M. Perrin，Chem. Eur. J. 2008，14，3404–9；J. P. May，等，Chem. Eur. J. 2008，14，3410–17；Q. Wang，等，Eur. J. Org. Chem. 2002，834–9；May，J. P. and D. M. Perrin，Biopolymers，2007. 88（5）： 714-24；May，J. P.，等.，Chemistry，2008. 14（11）： 3410-7；S. De Lamo Marin，等，Eur. J. Org. Chem. 2010，3985–9；Pousse，G.，等.，Org Lett，2010. 12（16）： 3582-5；Luo，H.，等.，Chem Biol，2014. 21（12）： 1610-7；Zhao，L.，等，Chembiochem，2015. 16（10）： 1420-5），其中大多數是部分合成的方法。由於其極強的效力和獨特的細胞毒性機制，毒傘肽已被用作偶聯物的有效荷載（Fiume，L.，Lancet，1969. 2（7625）： 853-4；Barbanti-Brodano，G. and L. Fiume，Nat New Biol，1973. 243（130）： 281-3；Bonetti，E.，M.等，Arch Toxicol，1976. 35（1）： p. 69-73；Davis，M. T.，Preston，J. F. Science 1981，213，1385–1388；Preston，J.F.，等，Arch Biochem Biophys，1981. 209（1）： 63-71；H. Faulstich，等，Biochemistry 1981，20，6498–504；Barak，L.S.，等.，Proc Natl Acad Sci U S A，1981. 78（5）： 3034-8；Faulstich，H. and L. Fiume，Methods Enzymol，1985. 112： 225-37；Zhelev，Z.，A.等，Toxicon，1987. 25（9）：

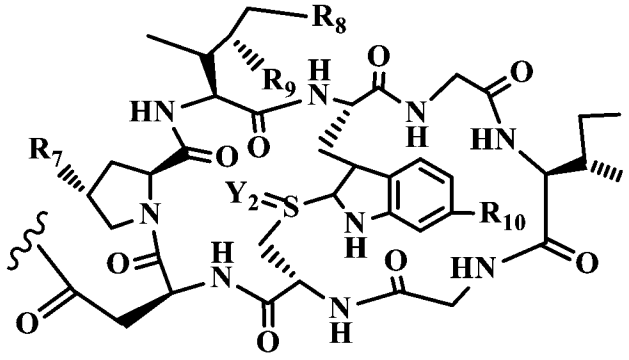
981-7；Khalacheva，K.，等，Eksp Med Morfol，1990. 29（3）： 26-30；U. Bermbach，H. Faulstich，Biochemistry 1990，29，6839–45；Mullersman，J. E. and J. F. Preston，Int. J. Peptide Protein Res. 1991，37，544–51；Mullersman，J.E. and J.F. Preston，Biochem Cell Biol，1991. 69（7）： 418-27；J. Anderl，H. Echner，H. Faulstich，Beilstein J. Org. Chem. 2012，8，2072–84；Moldenhauer，G.，等，J. Natl. Cancer Inst. 2012，104，622–34；A. Moshnikova，等；Biochemistry 2013，52，1171–8；Zhao，L.，等.，Chembiochem，2015. 16（10）： 1420-5；Zhou，B.，等.，Biosens Bioelectron，2015. 68： 189-96；WO2014/043403，US20150218220，EP 1661584）。吾人一直在研究毒傘肽。應用在本發明申請中的毒傘肽的實例較佳以下Am01，Am02和Am03 結構：



Am01，



Am02，

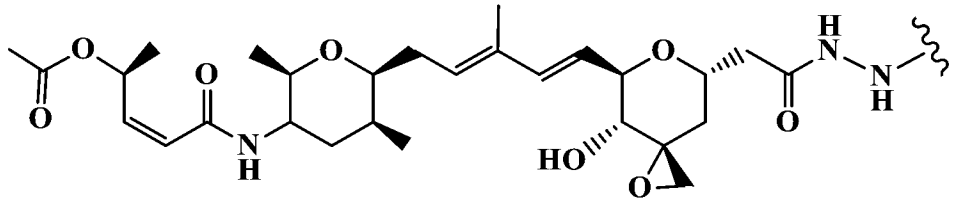


Am03，

或一種或多種化學元素的同位素取代物，或藥學上可接受的鹽，水合物或水合鹽；或這些化合物的多晶結構；或旋光異構體，外消旋體，非鏡像異構物或鏡像異構物；其中 X_1，和Y_1 獨立地為 O、NH、NHNH、NR_5、S、C（O）O、C（O）NH、OC（O）NH、OC（O）O、NHC（O）NH、NHC（O）S、OC（O）N（R_1）、N（R_1）C（O）N（R_1）、CH_2、CHNH、CH_2O、C（O）NHNHC（O）和 C（O）NR_1；R_7、R_8、和 R_9獨立地為H、OH、OR_1、NH_2、NHR_1、C_1-C_6 烷基、或缺省；Y_2 是 O、O_2、NR_1、NH、或缺省；R_{10} 是 CH_2、O、NH、NR_1、NHC（O）、NHC（O）NH、NHC（O）O、OC（O）O、C（O）、OC（O）、OC（O）（NR_1）、（NR_1）C（O）（NR_1）、C（O）R_1 或缺省；R_{11} 是 OH、NH_2、NHR_1、$NHNH_2$、NHNHCOOH、O-R_1-COOH、NH-R_1-COOH、NH-（Aa）$_r$COOH、O（CH_2CH_2O）$_p$$CH_2CH_2OH$、O（$CH_2CH_2O$）$_p$$CH_2CH_2NH_2$、NH（$CH_2CH_2O$）$_p$$CH_2CH_2NH_2$、$NR_1R_2$、O（$CH_2CH_2O$）$_p$$CH_2CH_2$-COOH、NH（$CH_2CH_2O$）$_p$$CH_2CH_2COOH$、NH-Ar-COOH、NH-Ar-$NH_2$、O（$CH_2CH_2O$）$_p$$CH_2CH_2$-$NHSO_3H$、NH（$CH_2CH_2O$）$_p$$CH_2CH_2NHSO_3H$、$R_1$-$NHSO_3H$、NH-$R_1$-$NHSO_3H$、O（$CH_2CH_2O$）$_p$-$CH_2CH_2NHPO_3H_2$、NH（$CH_2CH_2O$）$_p$$CH_2CH_2NHPO_3H_2$、$OR_1$、$R_1$-$NHPO_3H_2$、$R_1$-$OPO_3H_2$、O（$CH_2CH_2O$）$_p$$CH_2CH_2OPO_3H_2$、$OR_1$-$NHPO_3H_2$、NH-$R_1$-$NHPO_3H_2$、或 NH

（CH_2CH_2O）$_pCH_2$-$CH_2NHPO_3H_2$、其中 （Aa）$_r$ 指1-8 個胺基酸；n 和 m_1 獨立地為 1-20；p 是1 -5000；R_1、R_2和 Ar的定義 在本專利申請中前後相同；“〰”的定義如前文所述。

【0109】 Spliceostatins 和 pladienolides 是抗腫瘤化合物，它們與剪接體 SF3b 交互作用，抑制剪接。Spliceostatin 的例子包括但不限於 spliceostatin A 、 FR901464 和 （2S,3Z）-5-{[（2R,3R,5S,6S）-6-{（2E,4E）-5-[（3R,4R,5R,7S）-7-（2-肼基-2-氧乙基）-4-羥基-1,6-二氧雜吡啶[2.5]辛-5-基]-3-五甲基-2,4-二烯-1-基-l}-2,5-二甲基四氫-2H-呱喃-3-基] 胺基}-5-氧基-3-烯-2-基醋酸酯，其母核結構如下：

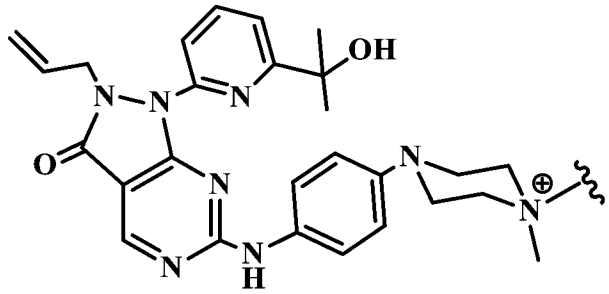


（Sp-01），

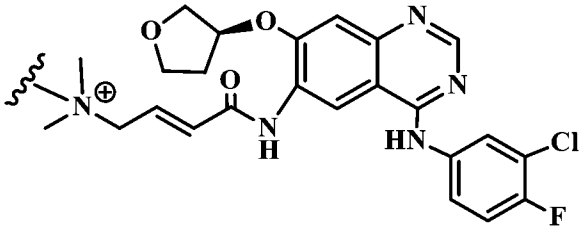
Pladienolide的示例包括但不限於Pladienolide B 、Pladienolide D和 E7107。

【0110】 蛋白激酶抑制劑可以抑制催化類抗體上絲氨酸，蘇氨酸或酪氨酸殘基磷酸化的激酶的活性，並調節蛋白質的功能。蛋白激酶抑制劑可用於治療由於過度活躍的蛋白激酶（包括突變或過表達的激酶）引起的癌症，或調節細胞功能以克服其他疾病驅動因素。蛋白質激酶抑制劑較佳 Adavosertib、阿法替尼、阿昔替尼、巴非替尼、博舒替尼、柯美替尼、克唑替尼、卡波替尼、達沙替尼、恩曲替尼、厄達非替尼、厄洛替尼、福他替尼、吉非替尼、依魯替尼 、伊馬替尼、拉帕替尼、樂伐替尼、莫比替尼、尼洛替尼、帕唑帕尼、帕那替尼、波納替尼、Rebastinib、瑞戈非尼、盧梭替尼、索拉非尼、舒尼替尼、SU6656、托法替尼 、凡德替尼 、維羅非尼、 恩曲替尼 、帕博西 、Ribociclib、阿貝西利 、達可替尼 、來

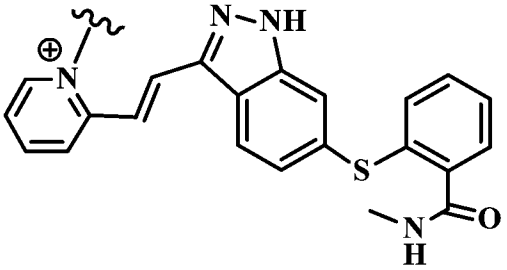
那替尼、（CO-1686）、奧希替尼、AZD3759、納紮替尼（EGF816），具有下示結構，PK01 ~ PK40：



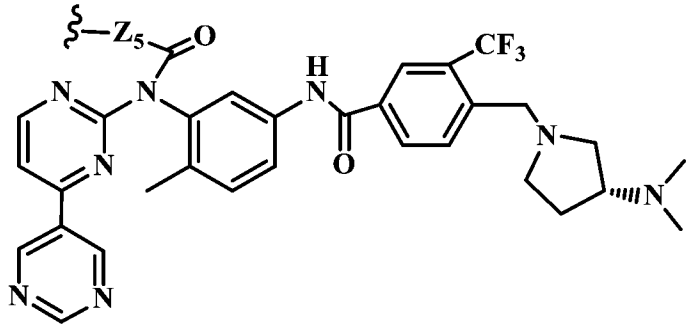
PK01，Adavosertib，



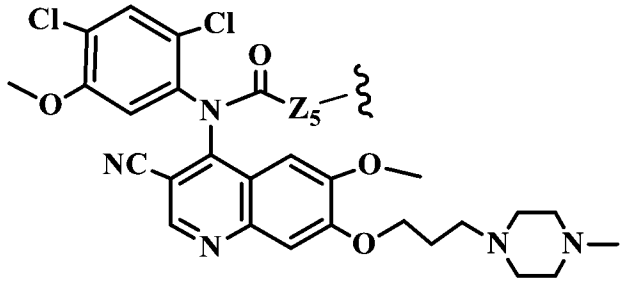
PK02，阿法替尼，



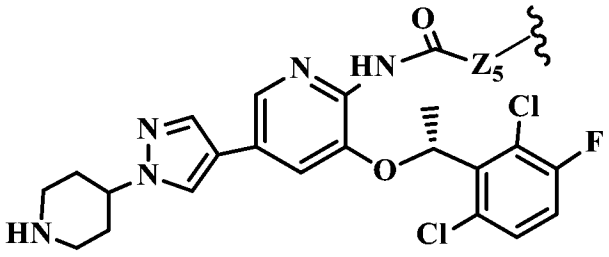
PK03，阿昔替尼，



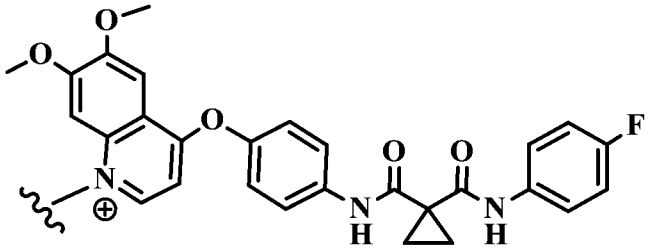
PK04，巴非替尼



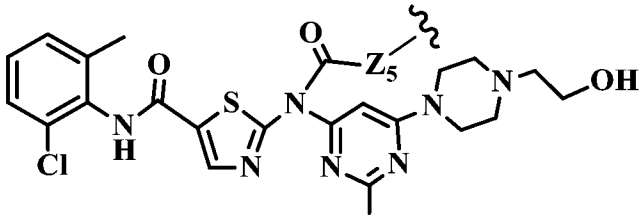
PK05，博舒替尼，



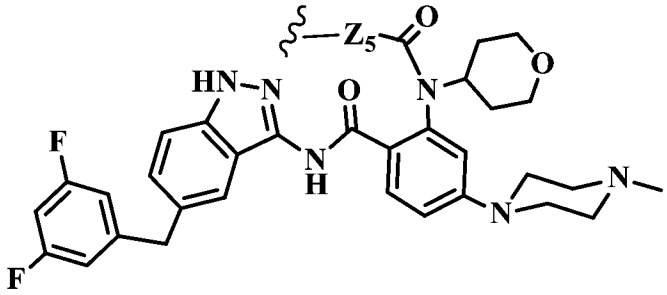
PK06， 柯美替尼，



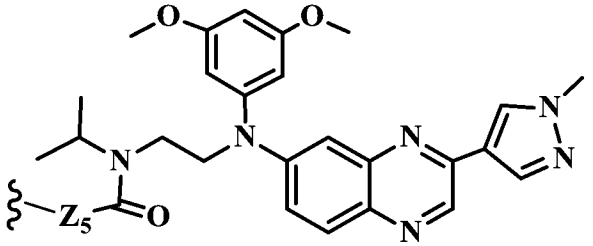
PK07，克唑替尼，



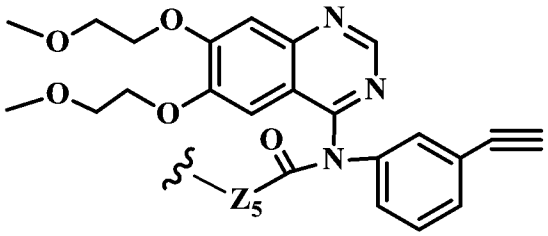
PK08，達沙替尼，



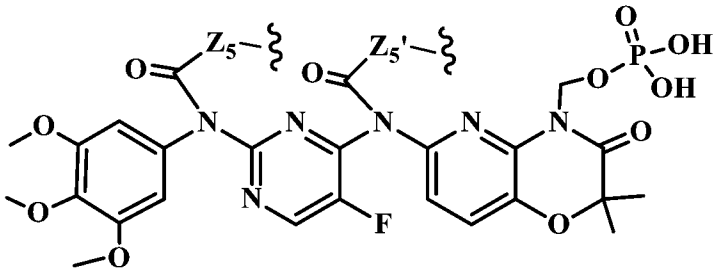
PK09，恩曲替尼，



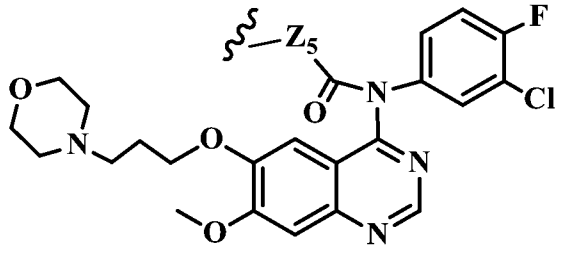
PK10，厄達非替尼，



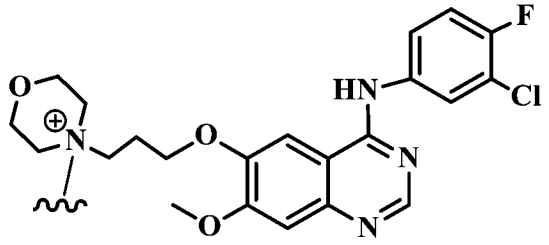
PK11，厄洛替尼，



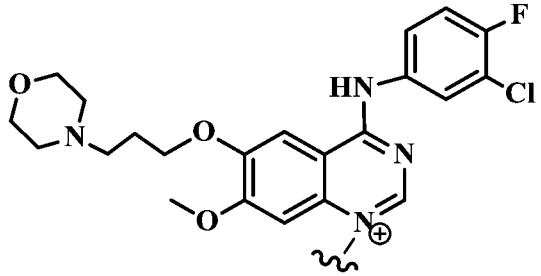
PK12，福他替尼，



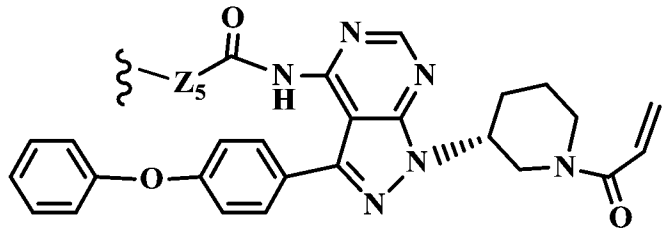
PK13，吉非替尼，



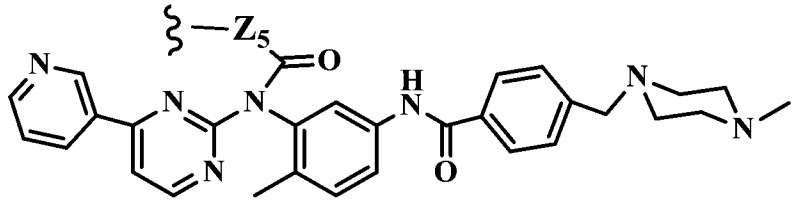
PK14，吉非替尼，



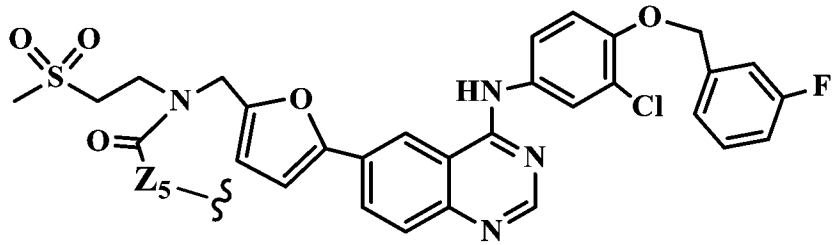
PK15，吉非替尼，



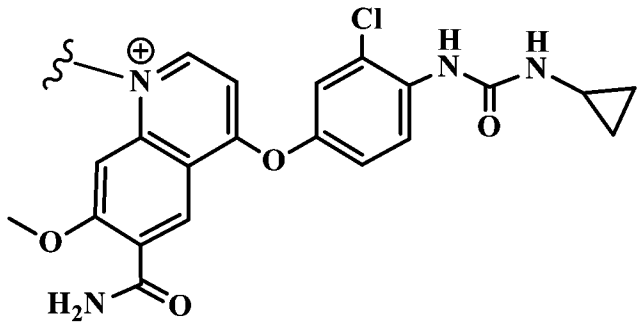
PK16，吉非替尼，



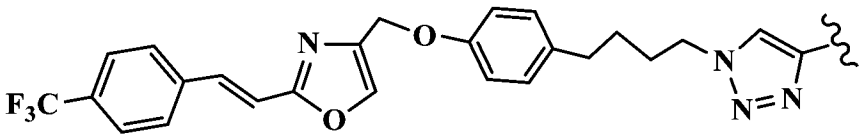
PK17，伊馬替尼，



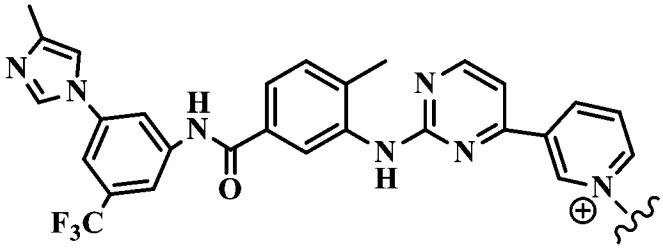
PK18，拉帕替尼，



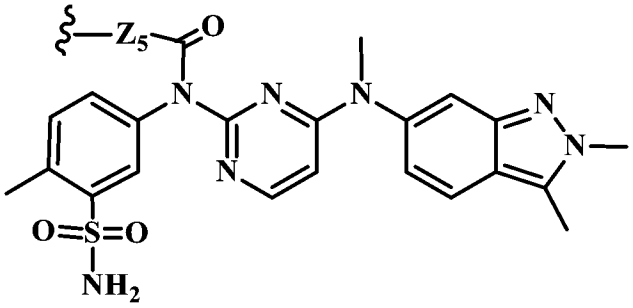
PK19，樂伐替尼，



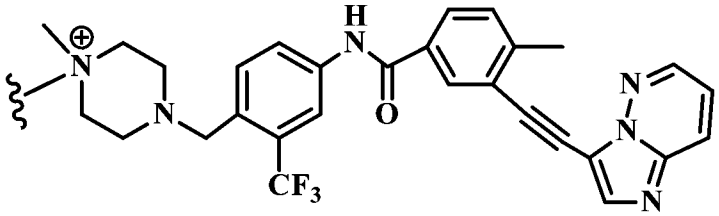
PK20，莫比替尼，



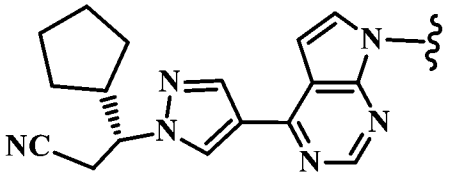
PK21，尼洛替尼，



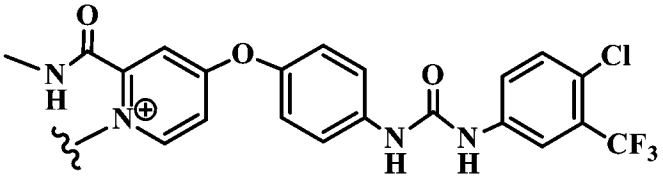
PK22，帕唑帕尼，



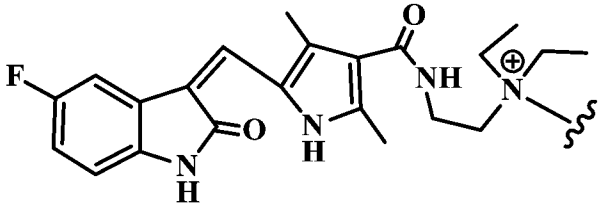
PK23，帕那替尼，



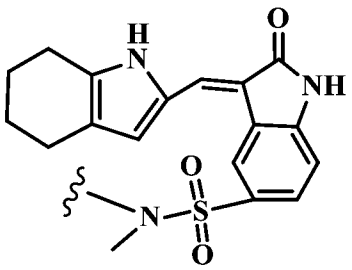
PK24，盧梭替尼，



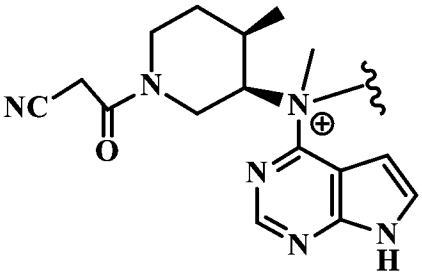
PK25，索拉非尼，



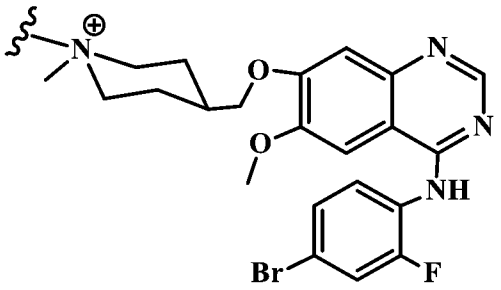
PK26，舒尼替尼，



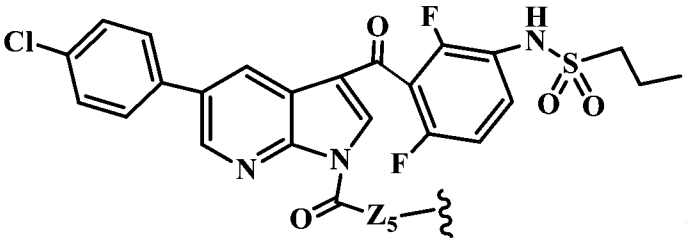
PK27，SU6656，



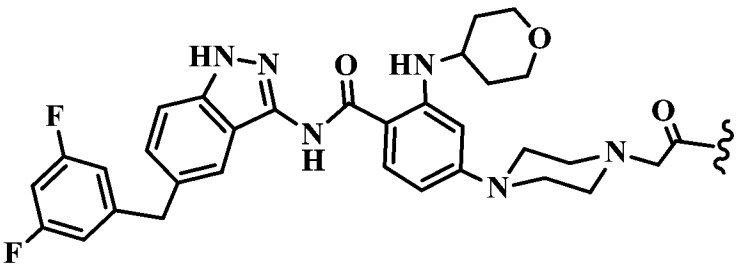
PK28，托法替尼，



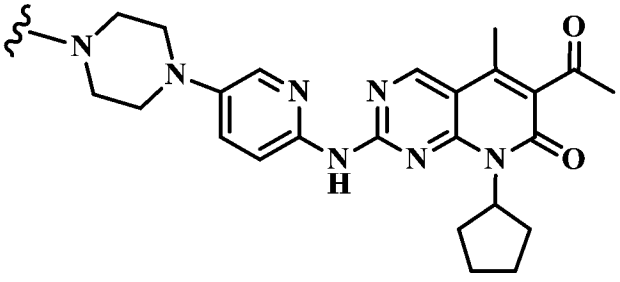
PK29，凡德替尼，



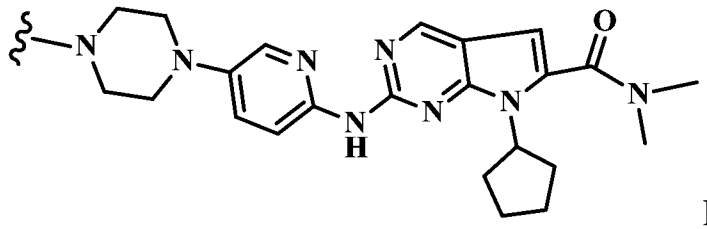
PK30，維羅非尼，



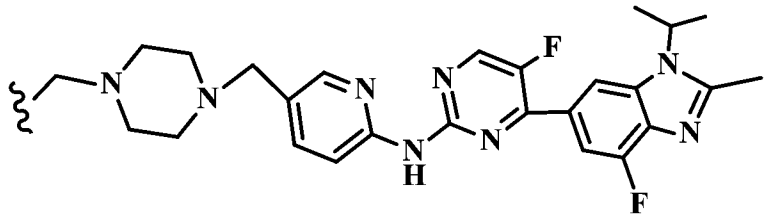
PK 31，恩曲替尼；



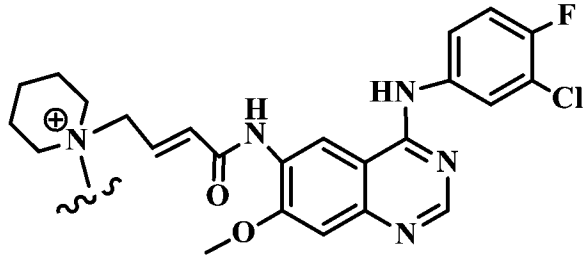
PK-32，帕博西尼類似物，



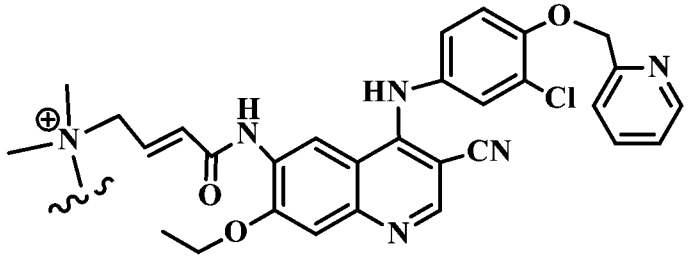
PK-33，Ribociclib，



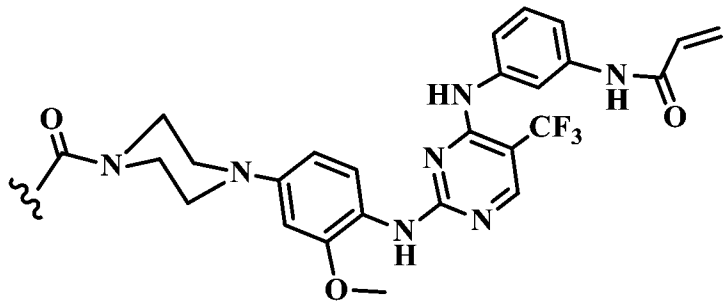
PK-34，阿貝西利，



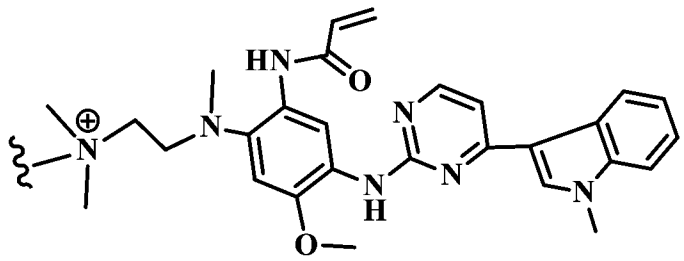
PK-35，達可替尼，



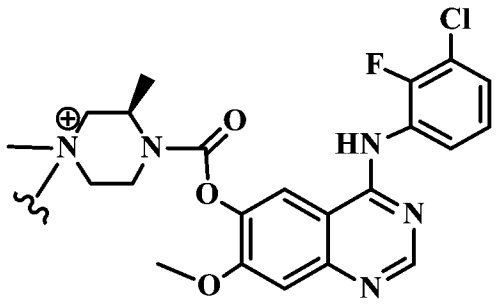
PK-36，來那替尼，



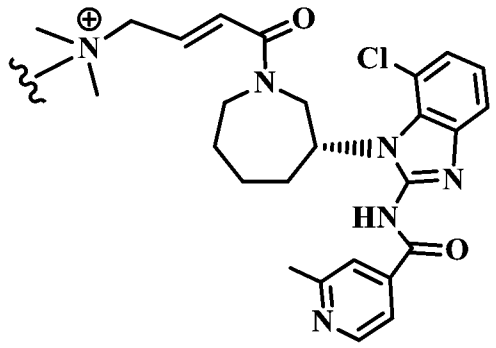
PK-37 ， Rociletinib （**CO-1686**），



PK-38，奧希替尼，



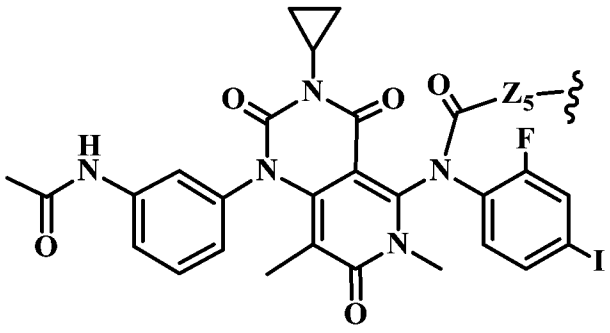
PK-39，AZD3759，



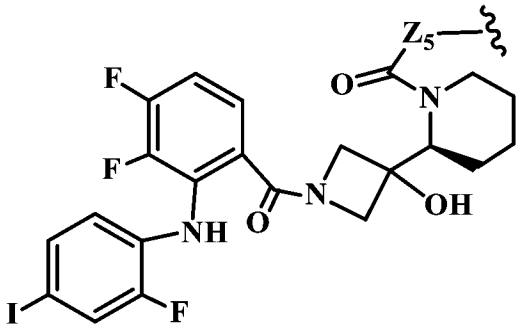
PK-40，納紮替尼（EGF816），

其中 Z_5 和 Z_5' 獨立地選自由下列組成之群組 O、NH、NHNH、NR_5、S、C（O）O、C（O）NH、OC（O）NH、OC（O）O、NHC（O）O、NHC（O）NH、NHC（O）S、OC（O）N（R_1）、N（R_1）C（O）N（R_2）、C（O）NHNHC（O） 和C（O）NR_1。

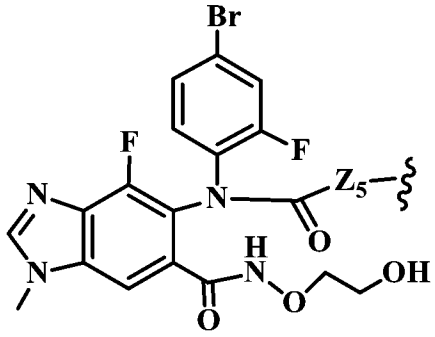
【0111】 MEK抑制劑可抑制在某些癌症中過度活躍的絲裂原活化蛋白激酶MEK1和/或MEK2。MEK抑制劑特別適用於治療BRAF突變的黑色素瘤和KRAS / BRAF突變的結腸直腸癌、乳腺癌和非小細胞肺癌（NSCLC）。MEK抑制劑選自由下列組成之群組PD0325901、塞魯替尼（AZD6244）、cobimetinib（XL518）、瑞法替尼、曲美替尼（GSK1120212）、pimasertib、比美替尼（MEK162）、AZD8330、RO4987655、RO5126766、WX-554、E6201、GDC-0623、PD-325901和TAK-733。較佳的MEK抑制劑為曲美替尼（GSK1120212）、考美替尼（XL518）、比尼替尼（MEK162）、塞魯替尼，結構如下：



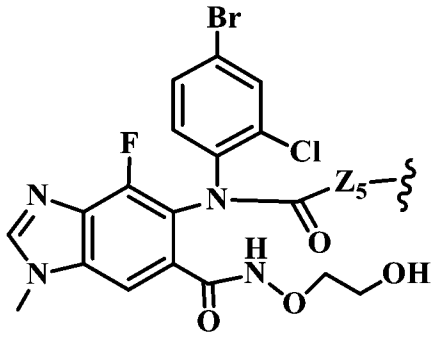
MEK01，曲美替尼，



MEK02，卡比替尼，



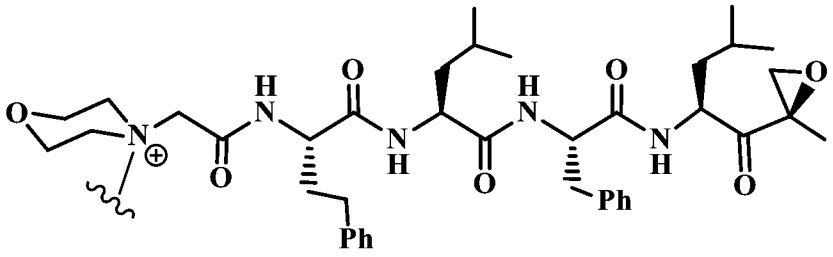
MEK03，比美替尼，



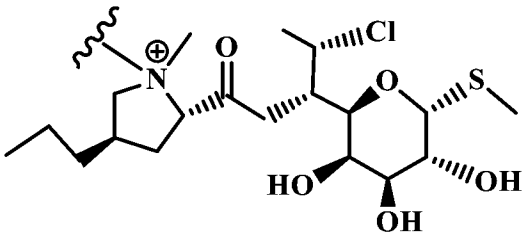
MEK04，司美替尼，

其中 Z_5選自由下列組成之群組 O、NH、NHNH、NR_5、S、C（O）O、C（O）NH、OC（O）NH、OC（O）O、NHC（O）O、NHC（O）NH、NHC（O）S、OC（O）N（R_1）、N（R_1）C（O）N（R_2）、C（O）NHNHC（O）和C（O）NR_1。

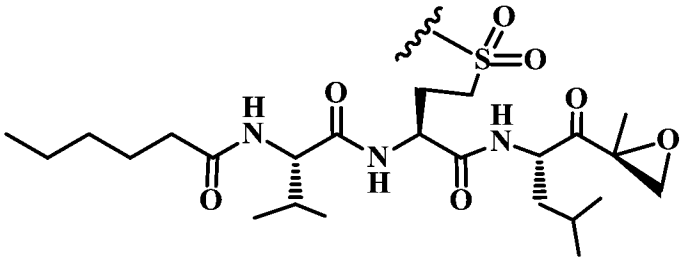
【0112】用作偶聯物有效載荷的蛋白酶抑制劑較佳自：卡非佐米、克林黴素、瑞他莫林、Indibulin，結構如下所示：



PI01，卡非佐米，



PI02，克林黴素 ，



PI03 ， Carmaphycin 類似物，

免疫毒素是一種大分子藥物，通常是由細菌或植物蛋白衍生的細胞毒蛋白，如白喉毒素（DT）、霍亂毒素（CT）、天花粉蛋白（TCS）、澱粉酶、假單胞菌外毒素A（ETA）、紅原毒素、白喉毒素、AB毒素、III型外毒素等。它也可能是一種劇毒的細菌成孔原毒素，需要蛋白水解處理才能啟動。這種原毒素的一個例子是前溶氧素及其基因修飾形式topalysin。Topalysin是一種修飾的重組蛋白，經過工程設計，可以被前列腺中的一種酶選擇性啟動，從而在不損傷鄰近組織和神經的情況下導致局部細胞死亡和組織破壞。本發明中的免疫毒素較佳地藉由本發明中的方法，與具有游離胺基、巰基或羧酸基的胺基酸結合；並且更佳地與N-末端胺基酸結合。

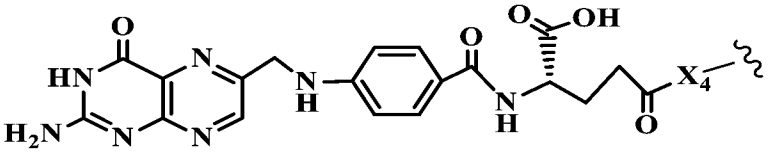
【0113】 此外，細胞受體激動劑、細胞刺激分子或細胞內信號分子也可以作為藥物藉由本發明的方法偶聯。細胞結合配位體或受體激動劑選

自由下列組成之群組：葉酸衍生物、麩胺酸脲衍生物、生長抑素及其類似物（選自由下列組成之群組奧曲肽（Sandostatin）和蘭瑞肽（Somatuline））、芳基磺胺、垂體腺苷酸環化酶啟動肽（PACAP）（PAC1）、血管活性腸肽（VIP/PACAP）（VPAC1，VPAC2）、黑色素細胞刺激激素（α-MSH）、膽囊收縮素（CCK）/胃泌素受體激動劑、鈴蟾素（選自由下列組成之群組 Pyr-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH_2）/胃泌素釋放肽（GRP）。神經降壓素受體配位體（NTR1，NTR2，NTR3）；物質 P（NK1 受體）配位體；神經肽 Y（Y1–Y6）；歸巢肽包括 RGD（Arg-Gly-Asp），NGR（Asn-Gly-Arg），二聚體和多聚體環狀RGD肽（選自由下列組成之群組 cRGDfV），TAASGVRSMH 和 LTLRWVGLMS（硫酸軟骨素蛋白聚糖 NG2受體配位體）和 F3 肽；細胞穿透肽（CPPs）；肽激素選自由下列組成之群組促黃體激素釋放激素（LHRH）激動劑和拮抗劑，以及促性腺激素釋放激素（GnRH）激動劑，藉由靶向卵泡刺激素（FSH）促黃體激素（LH），以及睾酮產生而作用，如布舍瑞林（Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser（OtBu）-Leu-Arg-Pro-NHEt），戈那瑞林（Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2），戈舍瑞林（Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser（OtBu）-Leu-Arg-Pro-AzGly-NH_2），組氨瑞林（Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-His（N-benzyl）-Leu-Arg-Pro-NHEt），亮丙瑞林（Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-Pro-NHEt），那法瑞林（Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-2Nal-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2），曲普瑞林（Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2），納法瑞林、地洛林、阿貝瑞林（Ac-D-2Nal-D-4-chloroPhe-D-3-（3-pyridyl）Ala-Ser-（N-Me）Tyr-

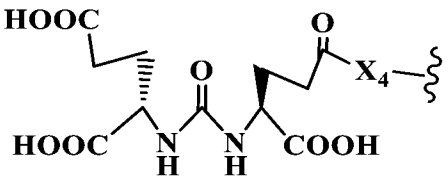
D-Asn-Leu-異丙基Lys-Pro-DAla-NH_2），西曲瑞克 （Ac-D-2Nal-D-4-chloroPhe-D-3-（3-pyridyl） Ala-Ser-Tyr-D-Cit-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH_2），地加瑞克（Ac-D-2Nal-D-4-chloroPhe-D-3-（3-pyridyl）Ala-Ser-4-aminoPhe（L-hydroorotyl）-D-4-aminoPhe（carba-moyl）-Leu-異丙基Lys-Pro-D-Ala-NH_2），和地加瑞克 （Ac-D-2Nal-D-4-chloroPhe-D-3-（3-pyridyl）Ala-Ser-Tyr-D-（N9，N10-diethyl）-homoArg-Leu-（N9，N10-diethyl）-homoArg-Pro-D-Ala-NH_2）；模式識別受體（PRRs），選自由下列組成之群組類Toll受體（TLRs） 配位體，C型凝集素和結節狀的受體 （NLRs） 配位體；降鈣素受體激動劑；整合素受體及其受體子類（選自由下列組成之群組$\alpha_V\beta_1$、$\alpha_V\beta_3$、$\alpha_V\beta_5$、$\alpha_V\beta_6$、$\alpha_6\beta_4$、$\alpha_7\beta_1$、$\alpha_L\beta_2$、$\alpha_{IIb}\beta_3$） 激動劑 （選自由下列組成之群組GRGDSPK，cyclo（RGDfV）（L1） 及其衍生物 [環狀（-N（Me）R-GDfV），環狀（R-Sar-DfV），環狀（RG-N（Me）D-fV），環狀（RGD-N（Me）f-V），環狀（RGDf-N（Me）V-）（西侖吉肽）]；Anticalin（脂質運載蛋白的衍生物）；Adnectins （10個FN3 （纖連蛋白））；設計的錨蛋白重複蛋白 （DARPins）；Avimers；EGF受體，或 VEGF受體激動劑。

【0114】 細胞結合分子/配位體或細胞受體激動劑選自由下列組成之群組LB01（葉酸）、LB02（PMSA配位體）、LB03（PMSA配位體）、LB04（PMSA配位體）、LB05 （生長抑制素）、LB06（生長抑制素）、LB07（奧曲肽、生長抑制素類似物）、LB08（蘭瑞肽、生長抑制素類似物）、LB09（伐普肽（Sanvar）、生長抑制素類似物）、LB10（CAIX配位體）、LB11（CAIX配位體） 、LB12（胃泌素釋放肽受體（GRPr）、MBA）、LB13（促黃體激素釋放激素（LH-RH）和GnRH配

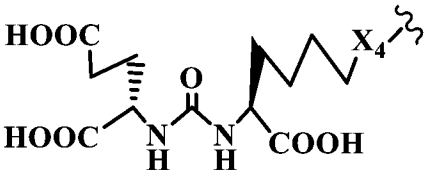
位體 ）、LB14（促黃體激素釋放激素（LH-RH）和GnRH配位體）、LB15（ GnRH拮抗劑、Abarelix）、LB16（鈷胺素、維生素B12類似物）、LB17（鈷胺素、維生素B12類似物）、LB18（用於αvβ3整聯蛋白受體、環狀RGD五肽）、LB19（VEGF受體的異二價肽配位體）、LB20（神經髓質素B）、LB21（蛙皮素，作用於G蛋白偶聯受體）、LB22（TLR2，作用於類Toll受體）、LB23（作用於雄性激素受體）、LB24（西侖吉肽或環（-RGDfV-）αv整合素受體、LB23（氟可的松）、LB25（利福布汀類似物）、LB26（利福布汀類似物）、LB27（利福布汀類似物）、LB28（氟氫可的松）、LB29（地塞米松）、LB30（丙酸氟替卡松）、LB31（丙酸倍氯米松）、LB32（醋酸曲安奈德）、LB33（潑尼松龍）、LB34（潑尼松龍）、LB35（甲基強的松龍）、LB36（倍他米松）、LB37（伊立替康類似物）、LB38（克唑替尼類似物）、LB39（硼替佐米類似物）、LB40（卡菲佐米類似物）、LB41（卡非佐米類似物）、LB42（亮丙瑞林類似物）、LB43（曲普瑞林類似物）、LB44（克林黴素）、LB45（利拉魯肽類似物）、LB46（半長春新鹼類似物）、LB47（瑞他帕林類似物）、LB48（丁布林類似物）、LB49（長春鹼類似物）、LB50（利西森肽類似物）、LB51（奧西丁尼類似物）、LB52（核苷類似物）、LB53（厄洛替尼類似物）和LB54（拉帕替尼類似物），其結構如下所示：



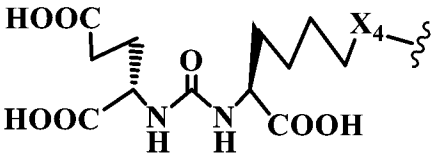
LB01（葉酸），



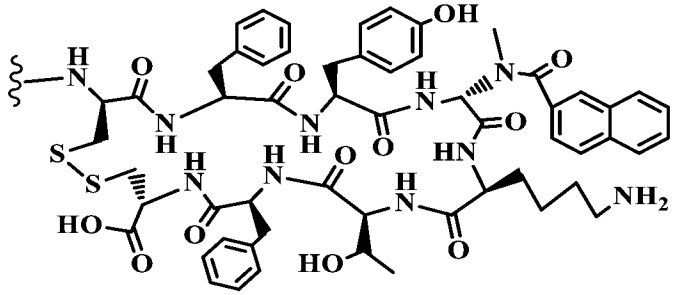
LB02（PMSA配位體偶聯物），



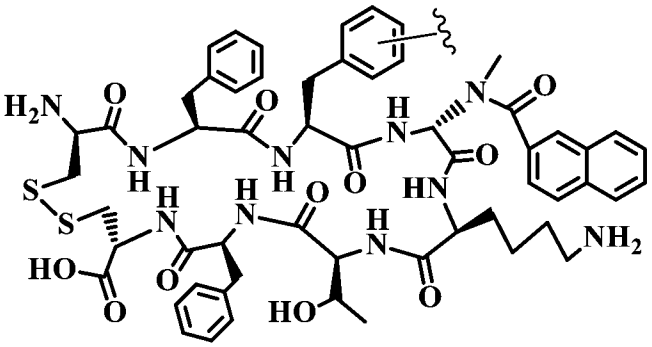
LB03（PMSA 配位體），



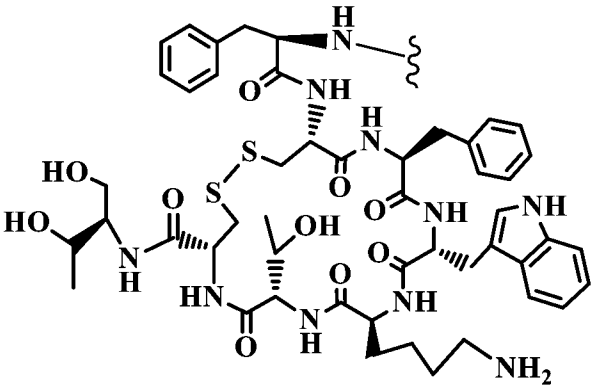
LB04（PMSA 配位體），



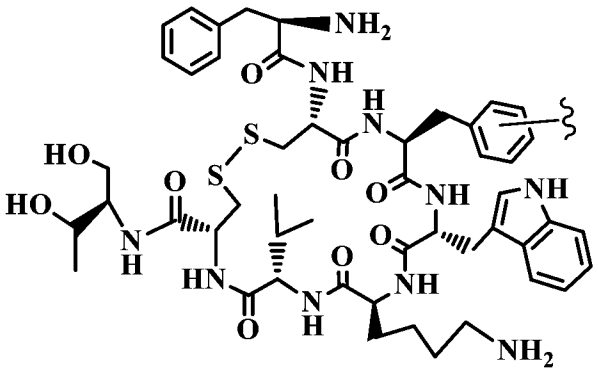
LB05（生長激素抑制素），



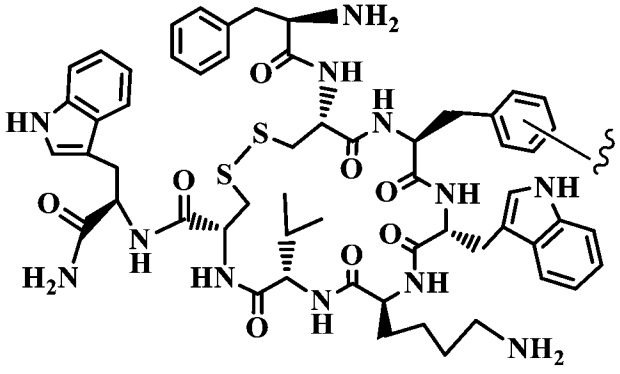
LB06（生長激素抑制素），



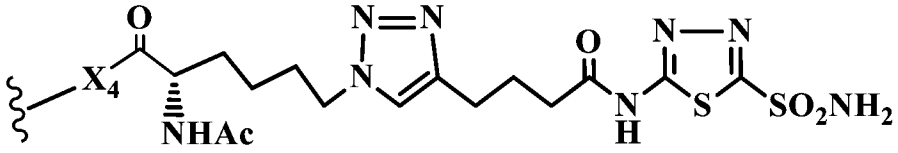
LB07（奧曲肽、生長抑制素類似物），



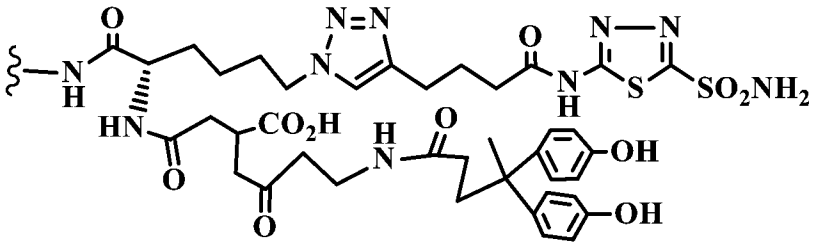
LB08（蘭肽、生長抑制素類似物），



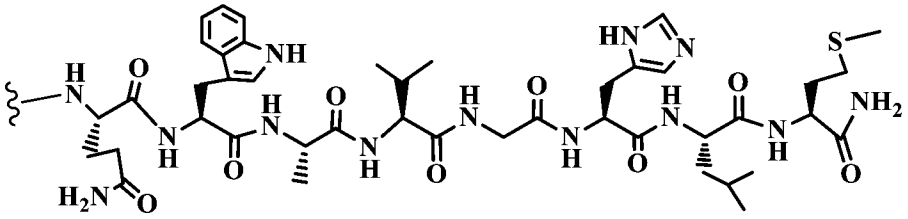
LB09（氨肽（Sanvar），生長抑制素類似物），



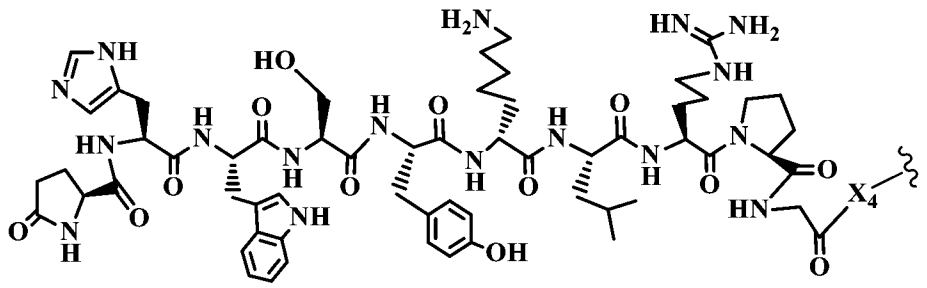
LB10（CAIX 配位體），



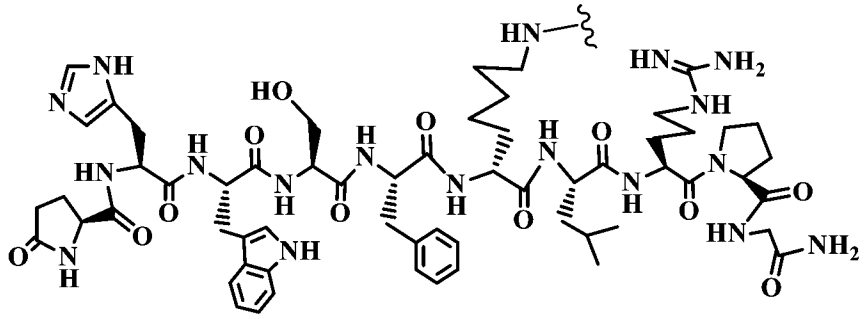
LB11（CAIX 配位體），



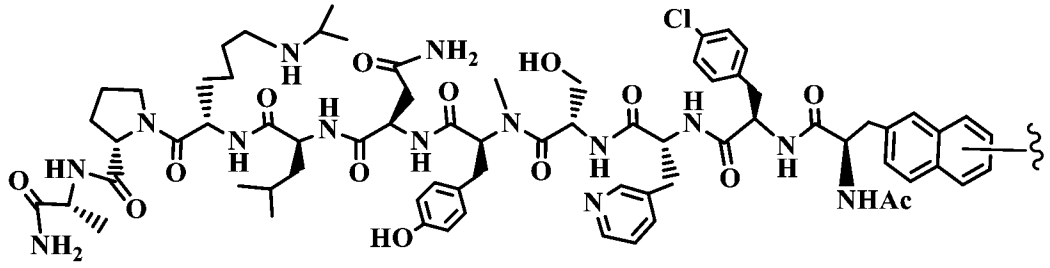
LB12（胃泌素釋放肽受體（GRPr），MBA），



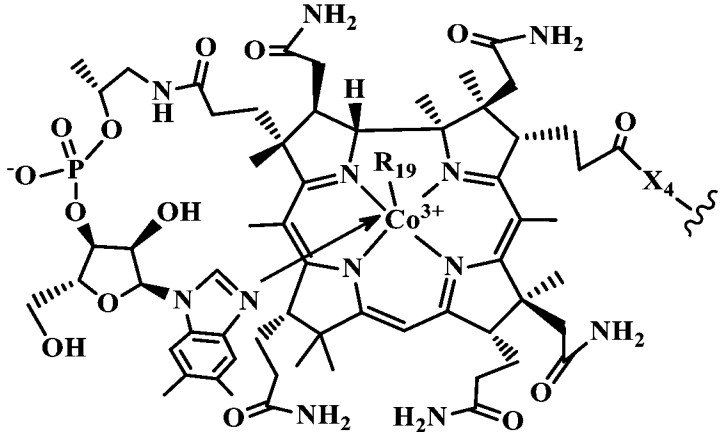
LB13（促黃體激素釋放激素（LH-RH）和促性腺激素釋放激素GnRH配位體），



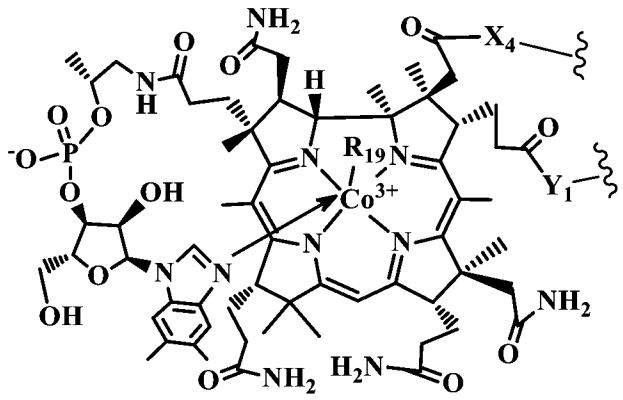
LB14（促黃體激素釋放激素（LH-RH）和促性腺激素釋放激素GnRH配位體），



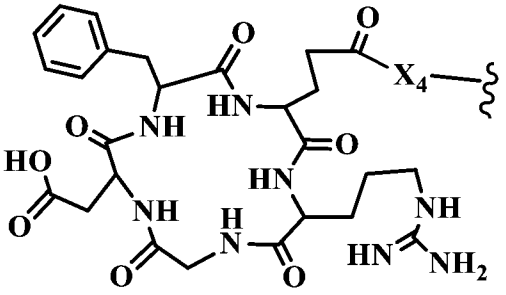
LB15（GnRH拮抗物、阿巴瑞克），



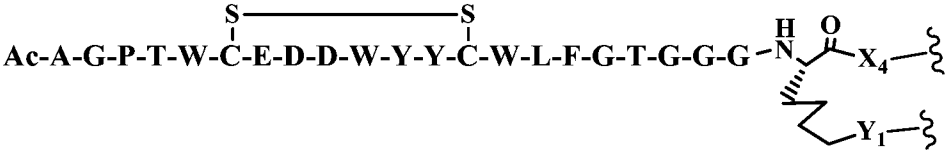
R_{19}是 5’去氧腺苷、Me、OH、CN；LB16（鈷胺素，維生素B12類似物），



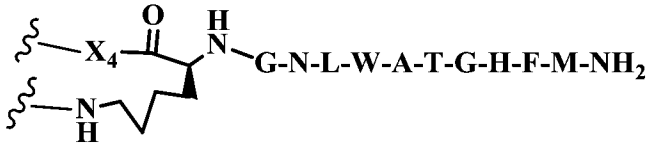
R_{19}是 5’去氧腺苷、Me、OH、CN；LB17（鈷胺素，維生素B12類似物），



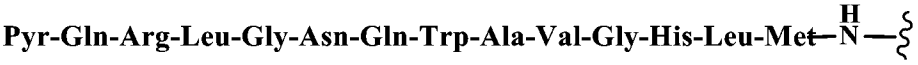
LB18（環RGD五肽，作用於$\alpha_v\beta_3$整聯蛋白受體），



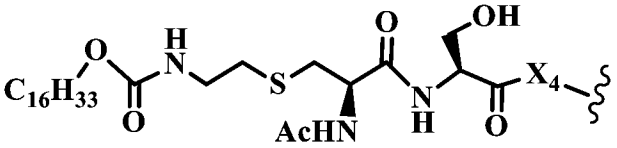
LB19（異源二價肽配位體偶聯物，作用于血管內皮生長因數VEGF受體），



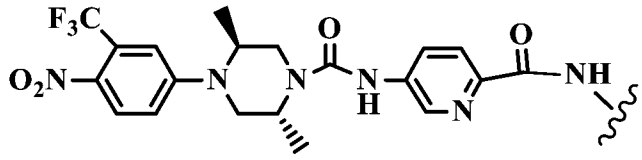
LB20（神經髓質素B），



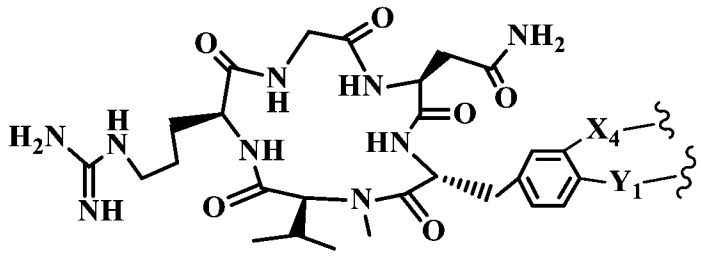
LB21（蛙皮素偶聯物，作用於G蛋白偶聯受體），



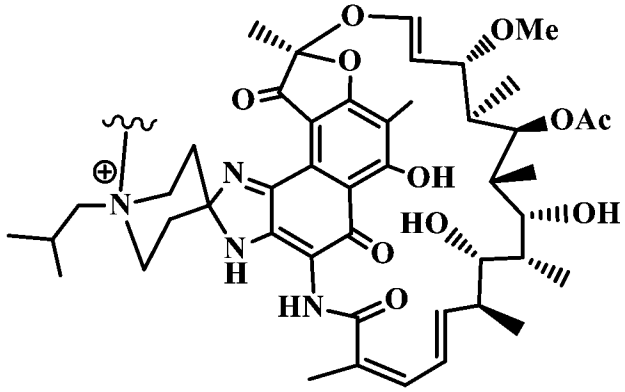
LB22（TLR2偶聯物，作用於類Toll受體），



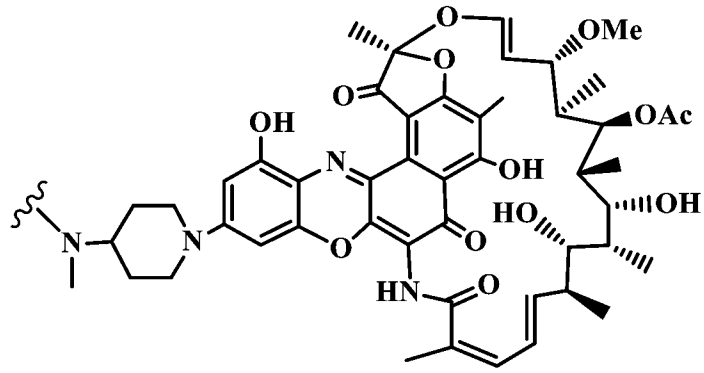
LB23（雄激素受體），



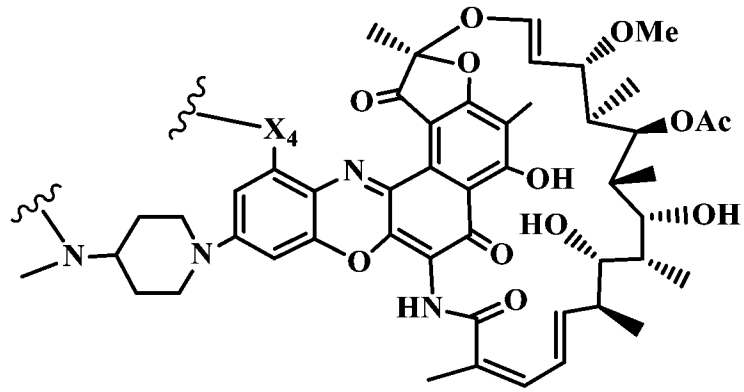
LB24（西倫吉肽/環（-RGDfV-）偶聯物，作用於α_v整合素受體）



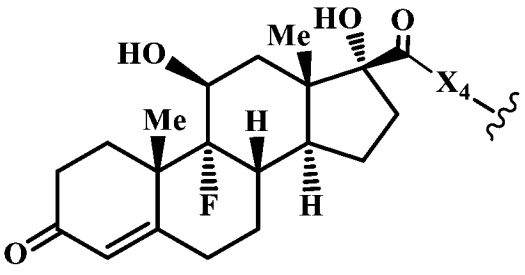
LB25（利福布汀類似物），



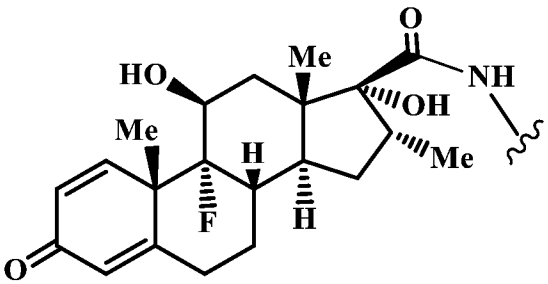
LB26（利福布汀類似物），



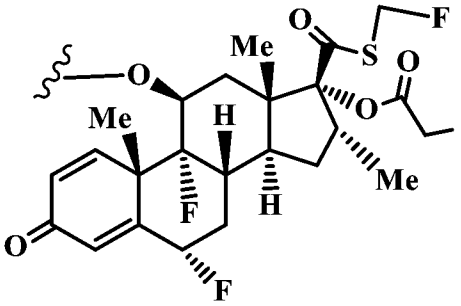
LB27（利福布汀類似物），



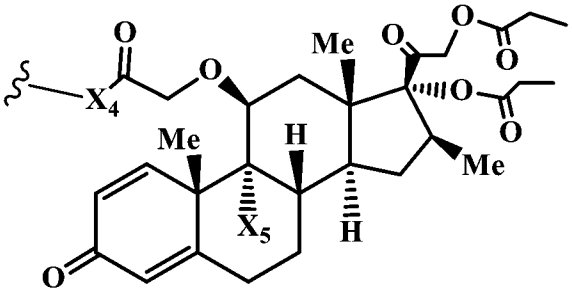
LB28（氟氫可的松），



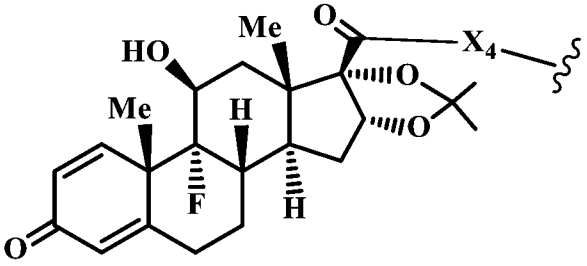
LB29（地塞米松），



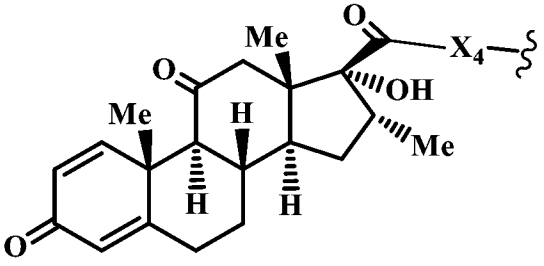
LB30（丙酸氟替卡松），



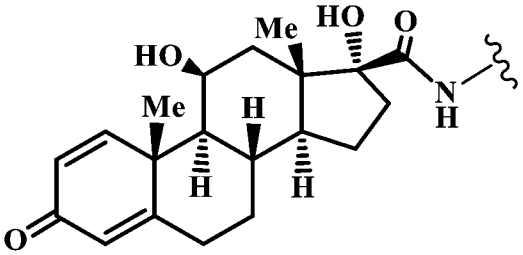
LB31（倍氯米松丙酸酯），



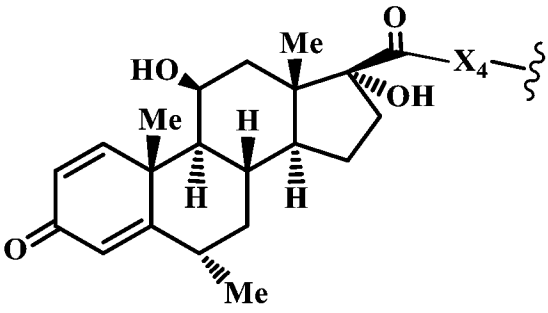
LB32（曲安奈德），



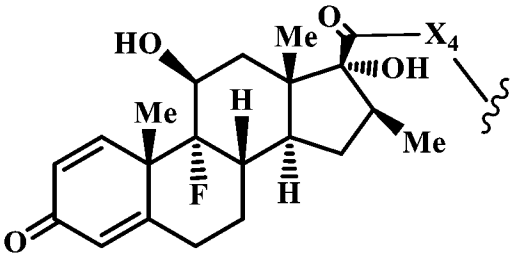
LB33（潑尼松），



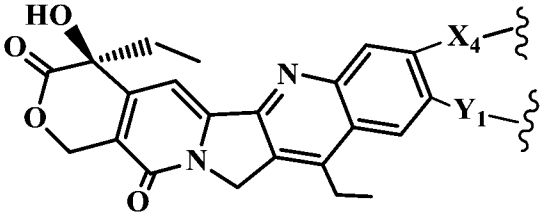
LB34（潑尼松龍），



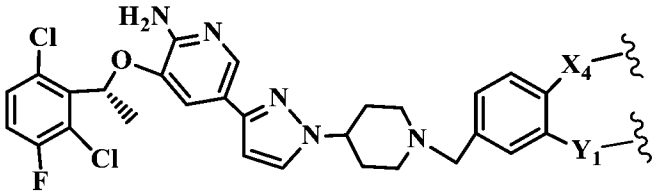
LB35（甲基強的松龍），



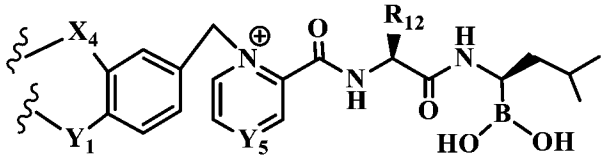
LB36（倍氟美松），



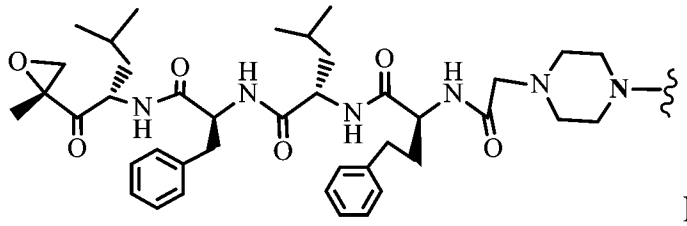
LB37（伊立替康類似物），



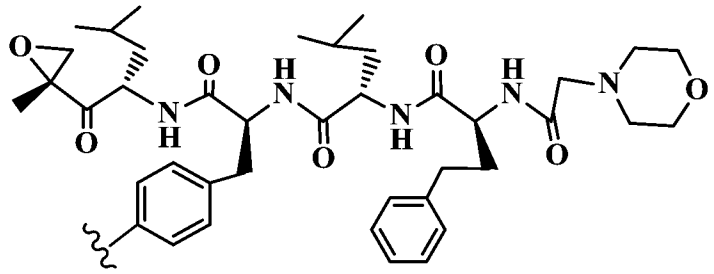
LB38（克唑替尼類似物），



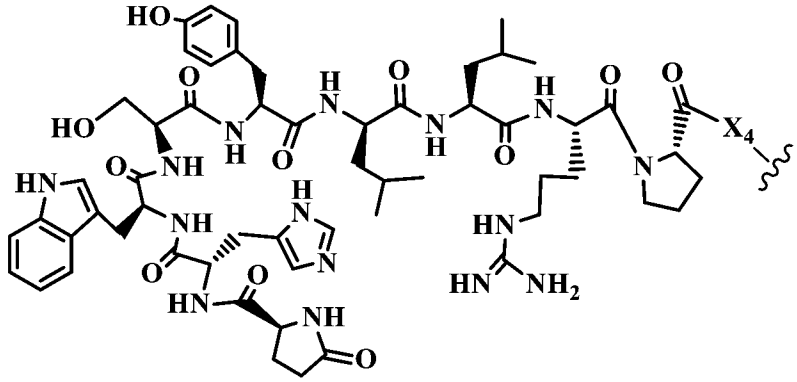
LB39（硼替佐米類似物），其中Y_5是N、CH、C（Cl）、C（CH_3）或C（$COOR_1$）；R_1是H、C_1-C_6烷基、C_3-C_8 Ar；



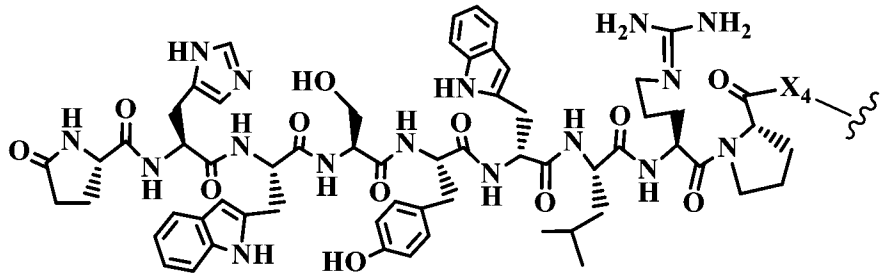
LB40（卡菲佐米類似物），



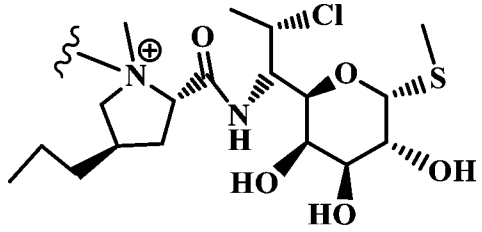
LB41（卡菲佐米類似物），



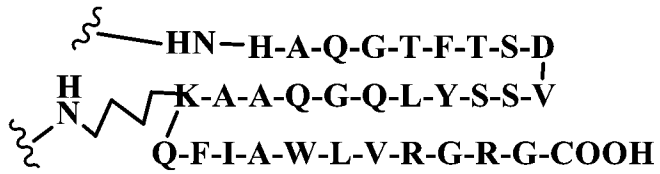
LB42（亮丙瑞利類似物），



LB43（曲普瑞林類似物），

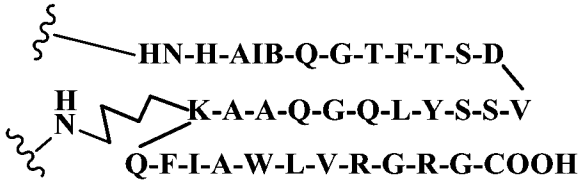


LB44（克林黴素），

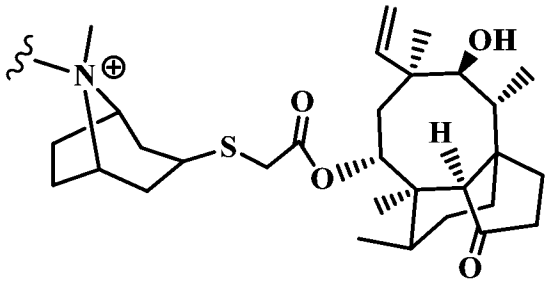


LB45（利拉魯肽類似

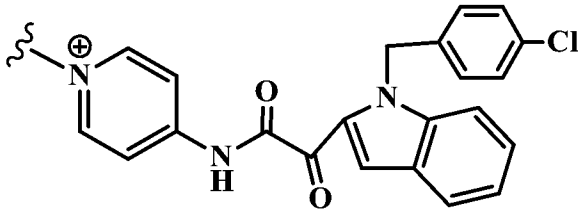
物），



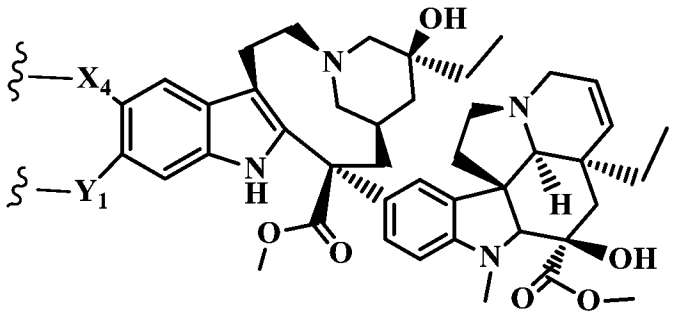
LB46（索馬魯肽類似物），



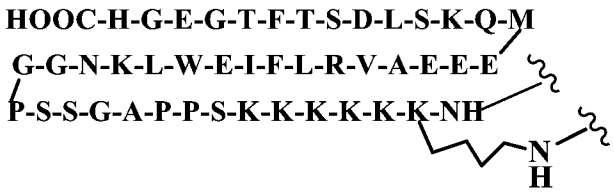
LB47（瑞他帕林類似物），



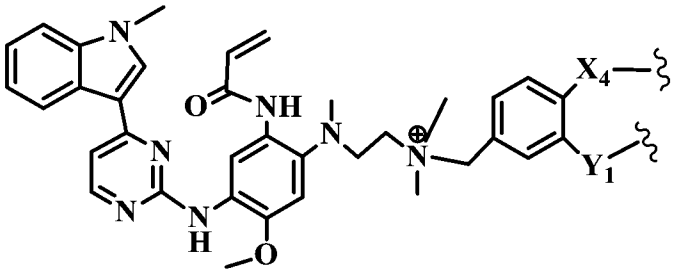
LB48（丁布林類似物），



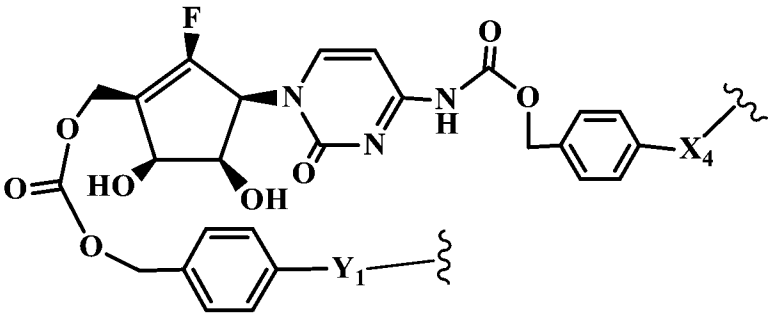
LB49（長春鹼類似物），



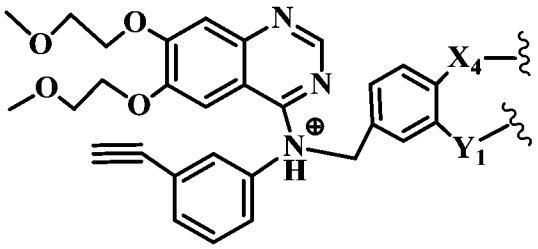
LB50（利西森肽類似物），



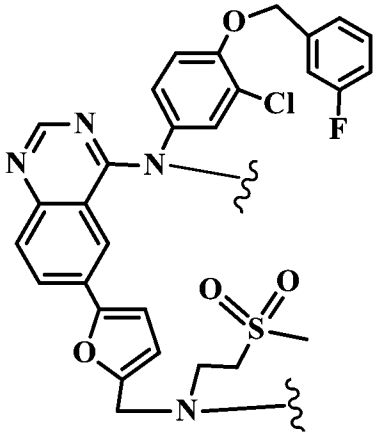
LB51（奧西丁尼類似物），



LB52（核苷類似物），



LB53（埃羅替尼類似物），



LB54（拉帕替尼類似物）；

其中 X_4、和 Y_1獨立地為 O、NH、NHNH、NR_1、S、C（O）O、C（O）NH、OC（O）NH、OC（O）O、NHC（O）NH、NHC（O）S、OC（O）N（R_1）、N（R_1）C（O）N（R_1）、CH_2、C（O）NHNHC（O）和C（O）NR_1。

【0115】在另一個實施例中，一種，兩種或更多種DNA、RNA、mRNA、小干擾RNA（siRNA）、微RNA（miRNA）和PIWI交互作用RNA（piRNA）作為藥物，藉由本發明的方法偶聯：



，SI01，



，SI02；

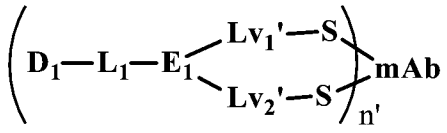
其中“〰”是連接本專利的支鏈連接子的位點；  是單鏈或雙鏈的DNA、RNA、mRNA、siRNA、miRNA、或piRNA；X_1、和 Y 獨立地為 O、NH、NHNH、NR_1、S、C（O）O、C（O）NH、OC（O）NH、OC（O）O、NHC（O）NH、NHC（O）S、OC（O）N（R_1）、N（R_1）C（O）N（R_1）、CH_2、C（O）NHNHC（O）和C（O）NR_1。

【0116】在一些實施例中，本發明方法中步驟（c）中（在偶聯反應步驟之後）加入氧化劑，較佳為脫氫抗壞血酸（DHAA），以再次氧化未反應的巰基，從而將使抗體或類抗體蛋白中的二硫鍵重構，使抗體具有更長的半衰期。反應溶液中氧化劑的濃度可以是0.01mM-1.0mM。

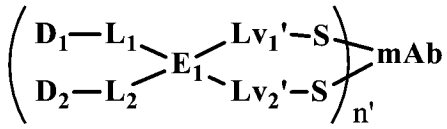
【0117】除了在本發明方法中加入DHAA以外，也可以在步驟（c）中加入過量的二硫化合物如胱氨酸來替代DHAA。因此，二硫化合物可以被過量的還原劑，例如步驟（b）中的TCEP還原，形成巰基化合物，該巰基化合物同時與過量的含有巰基反應基團的連接子或連接子/有效負載複合物（例如馬來醯亞胺）反應，生成的巰基-琥珀醯亞胺連接子/有效負載複合物隨後藉由層析法被去除。

【0118】在一些實施例中，在本發明的偶聯過程中，在抗體或類抗體蛋白中引入特定巰基（在本發明的偶聯方法下，當抗體或類抗體蛋白是IgG抗體時，很可能僅重-輕鏈之間的二硫鍵被還原，產生巰基），然後巰基在偶聯過程中同時或依次與式（I）、（II）或（III）中的結構反應，形成如下所示式（V）、（VI）或（VII）中的偶聯物：

$$(D_1—L_1—Lv_1'—S)_n—mAb \quad （V），$$

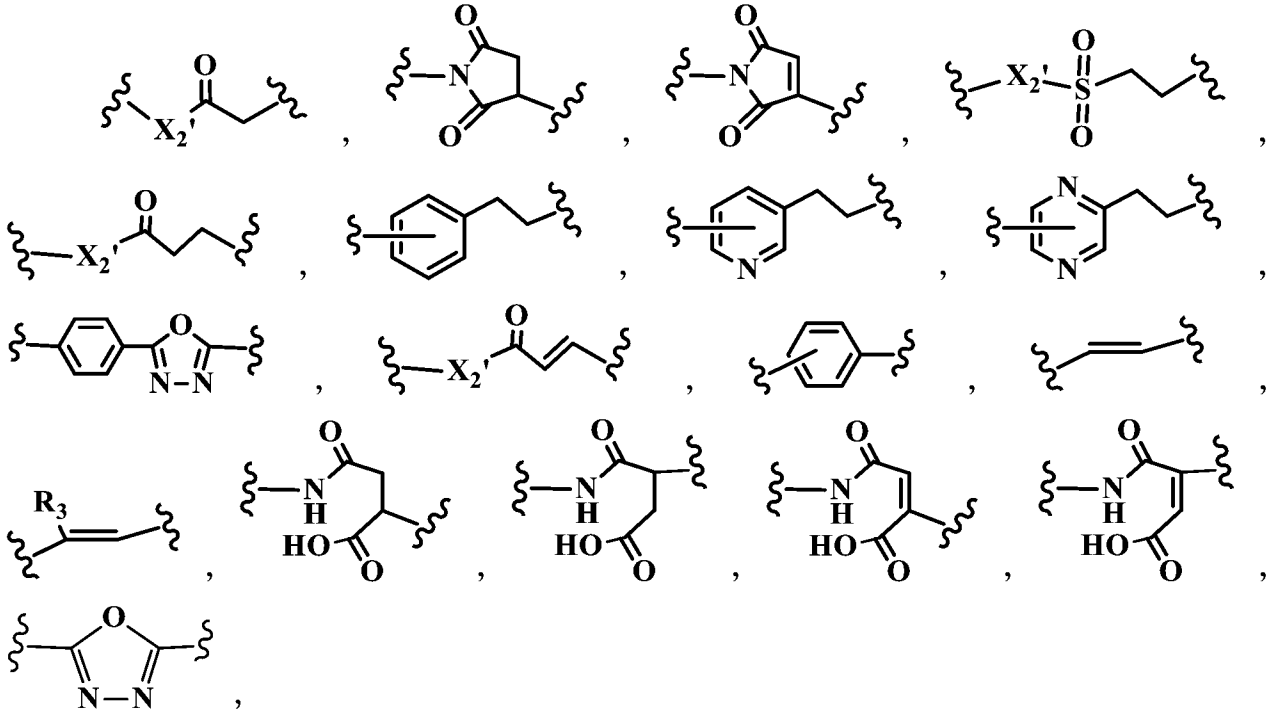


（VI），

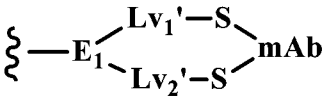
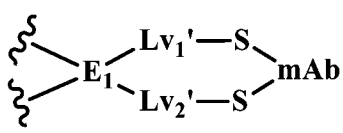
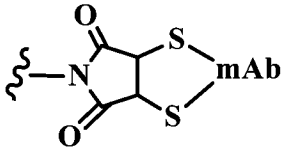


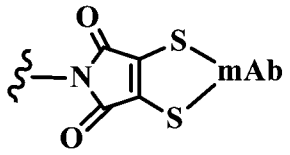
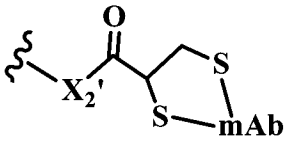
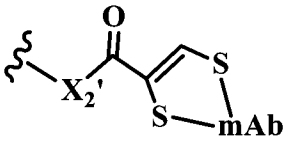
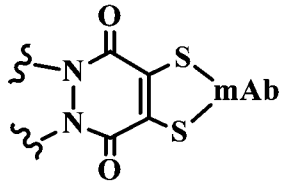
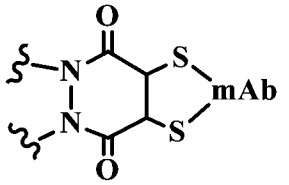
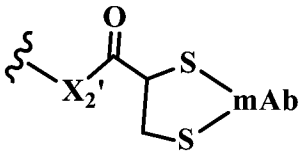
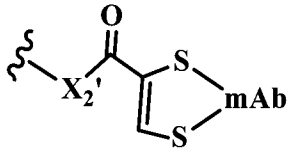
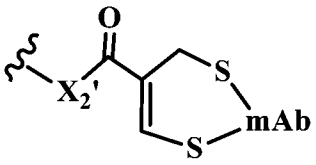
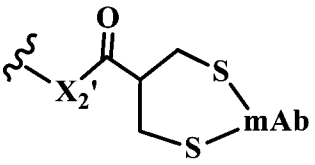
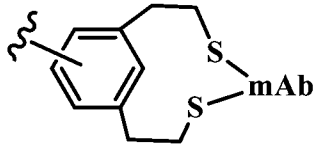
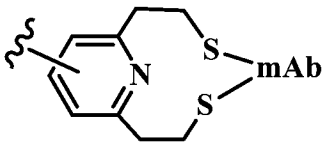
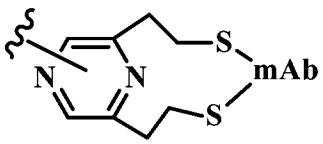
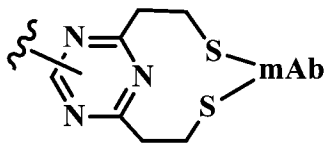
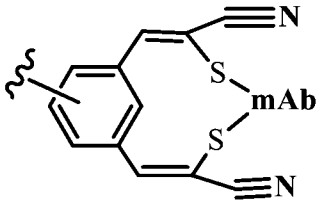
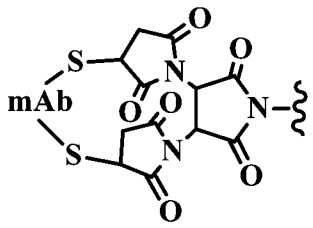
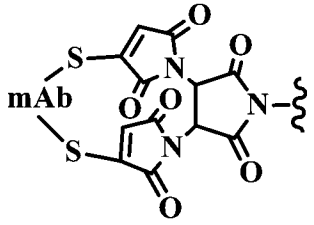
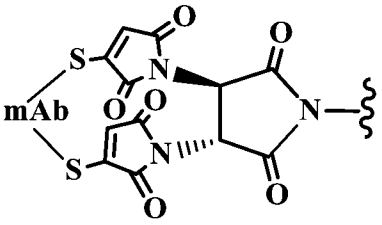
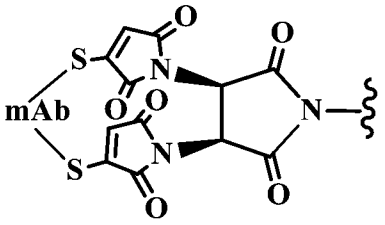
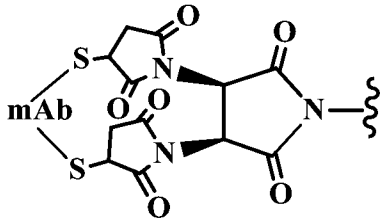
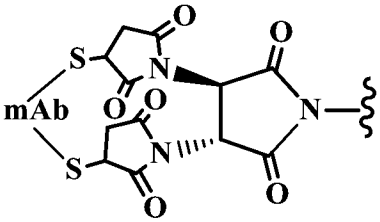
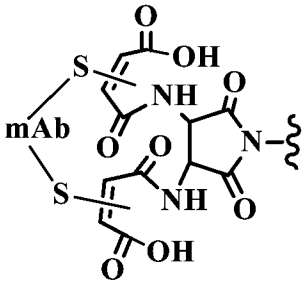
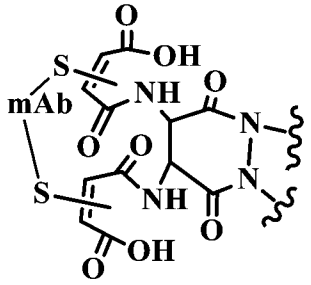
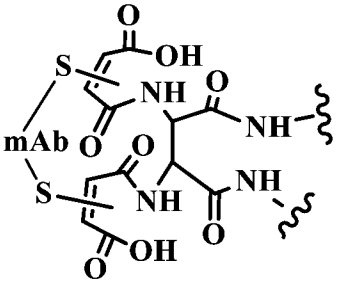
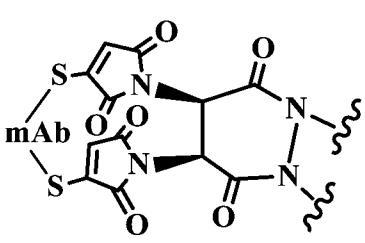
（VII），

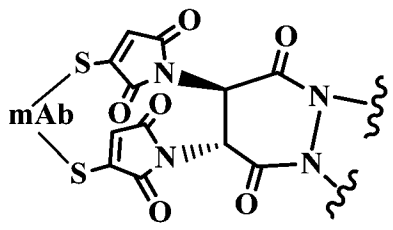
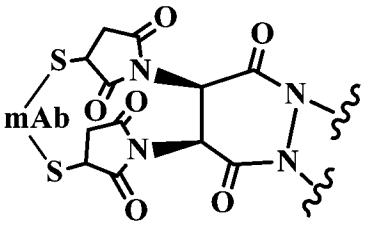
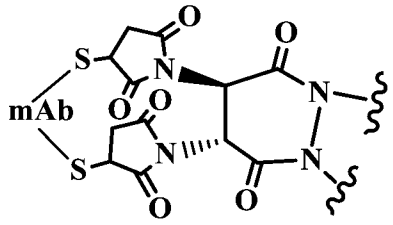
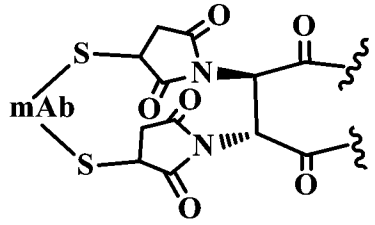
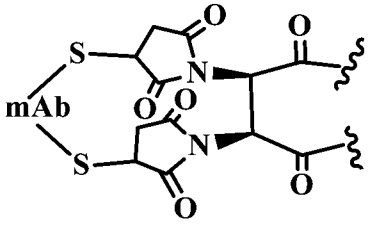
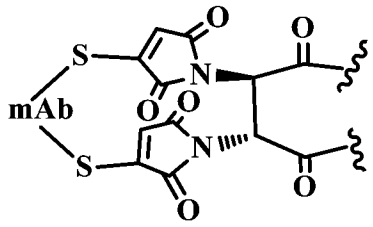
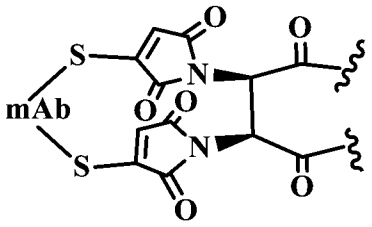
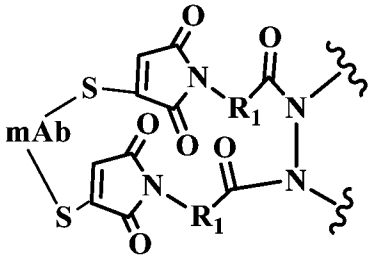
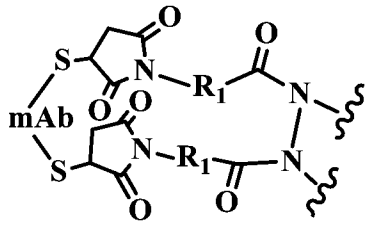
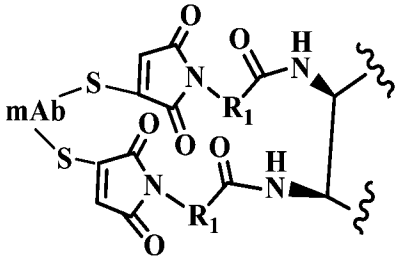
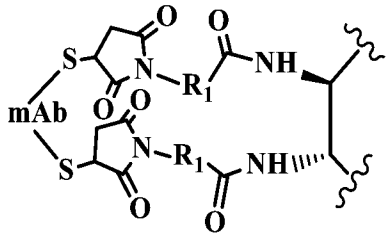
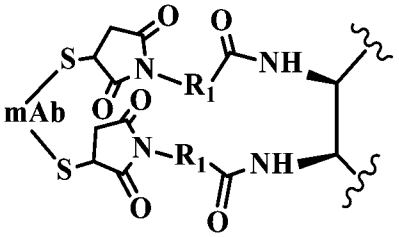
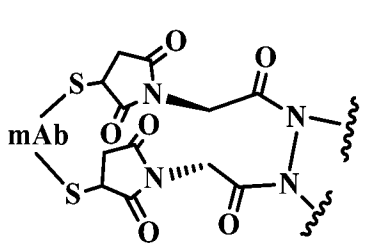
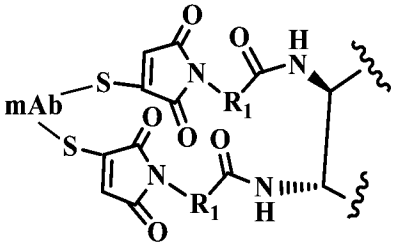
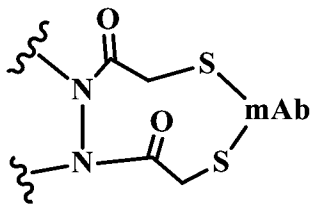
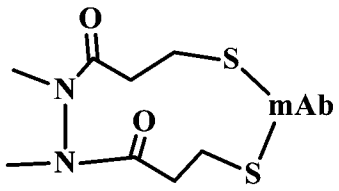
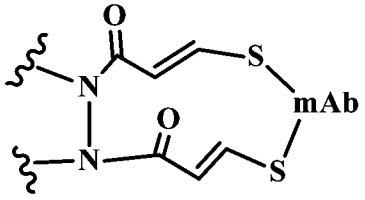
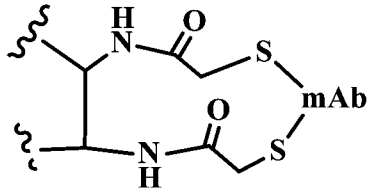
其中 n 是1 – 20；n’ 是 1-10；較佳地 n 是 1 -8 和 n’ 是1 -4；更佳地 n是 2 -4 且 n’ 是 1 -2；D_1、D_2、L_1、L_2和E_1如前文所述；S（硫）由類抗體蛋白質（例如抗體）中二硫鍵，在本發明的方法下被還原而產生；mAb是一種類抗體蛋白；其中$L_{v1'}$和$L_{v2'}$獨立地是mAb中的巰基與前文所述的Lv_1和Lv_2反應得到的基團。L_{v1}’和$L_{v2'}$獨立具有以下結構：

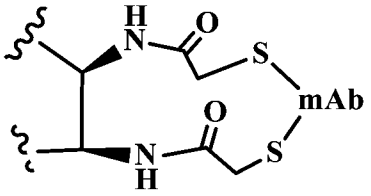
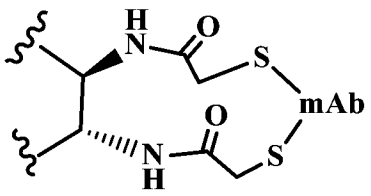
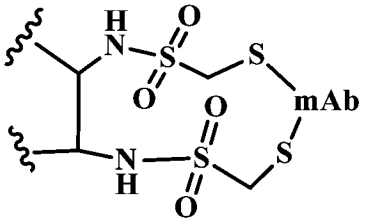
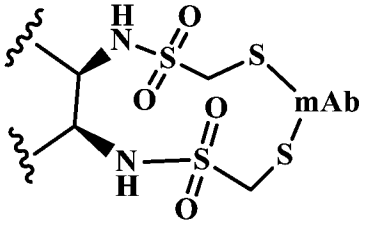
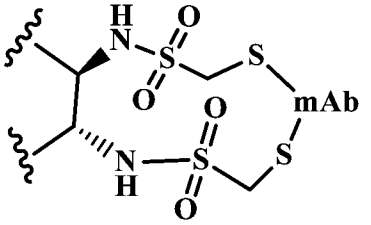
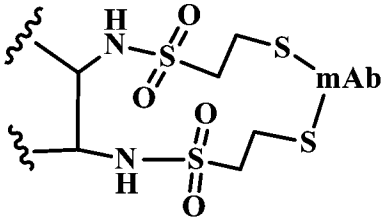
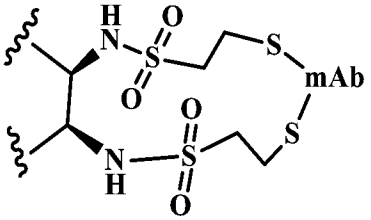
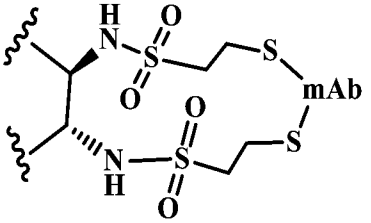
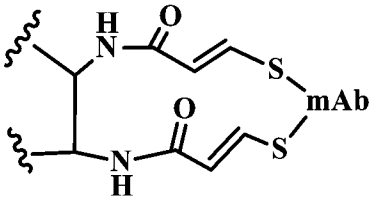
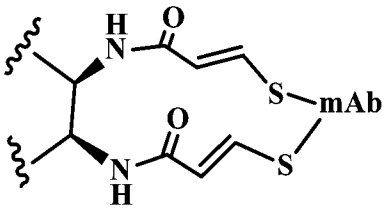
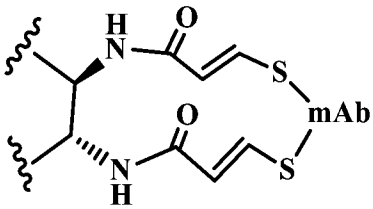
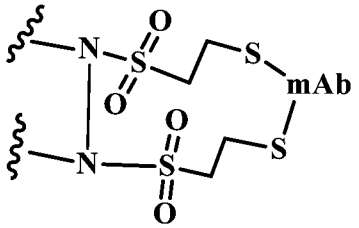
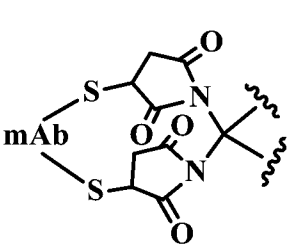
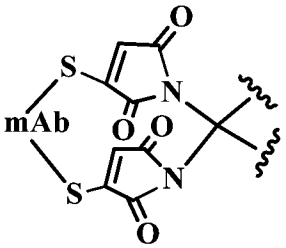
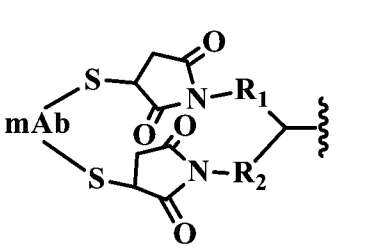
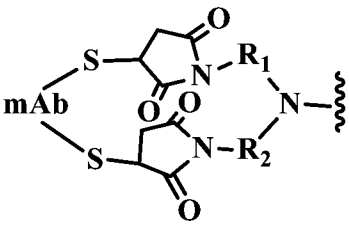
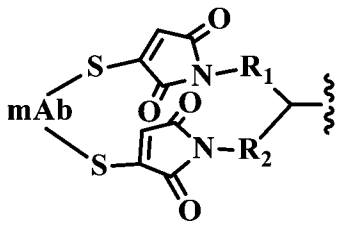
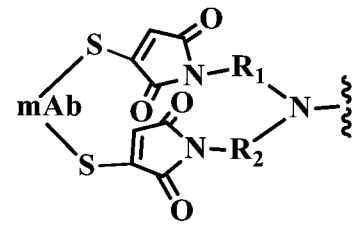
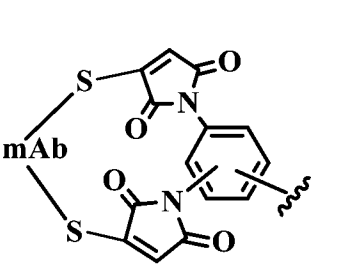
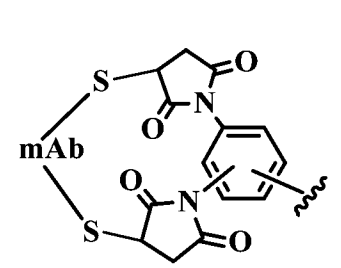
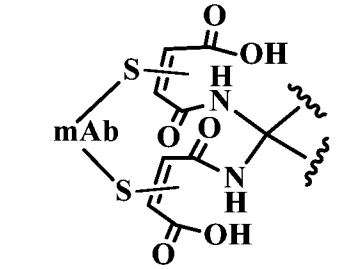


其中 X_2’ 和 R_3定義與前文相同。

【0119】在式（VI）和式（VII）中，片段  和  獨立地選自由下列組成之群組：  ，


,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

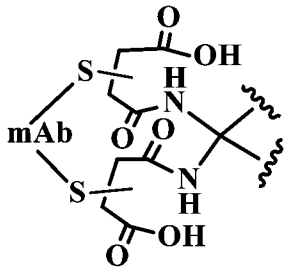
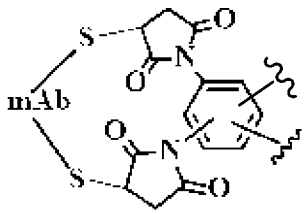
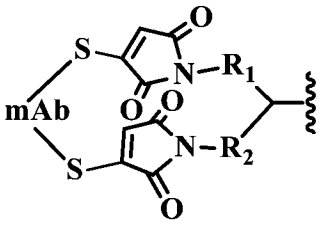
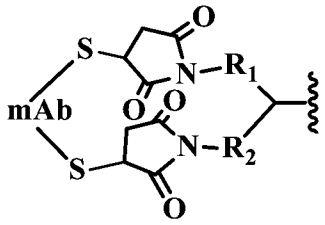
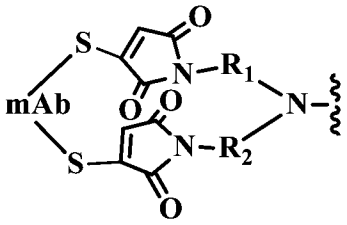
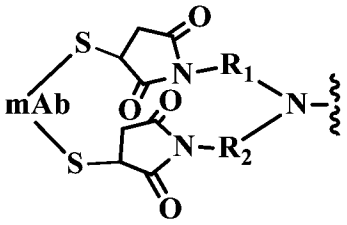
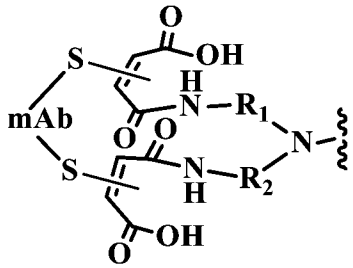
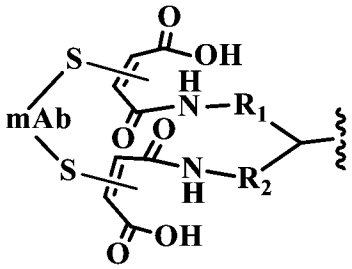
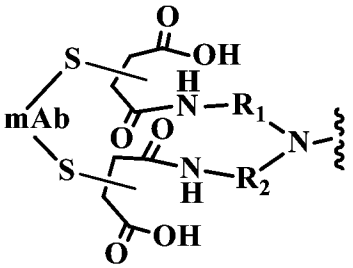
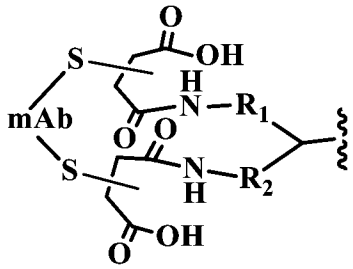
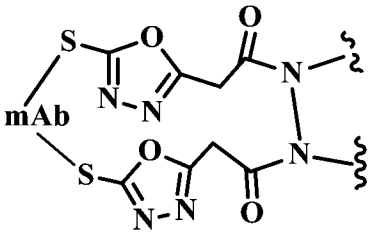
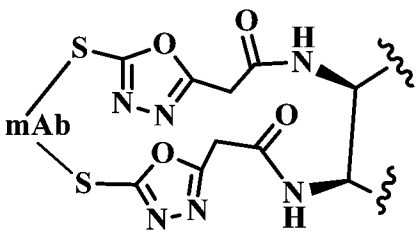
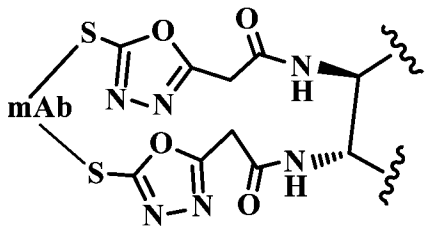

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,


,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

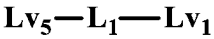
,

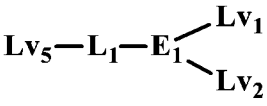
,

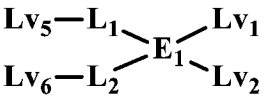
,


， 
， 
， 
， 
， 
， 
， 
， 
， 
， 
， 
， 
，其中R_1、R_2、X_2的定義同前文所述；mAb是類抗體蛋白，較佳抗體。較佳地，當類抗體蛋白是抗體時，偶聯特異性地在抗體的重輕鏈之間的巰基上進行。

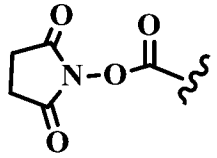
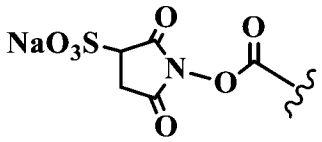
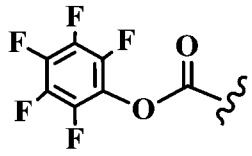
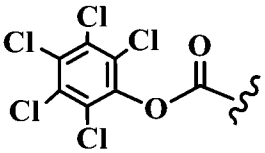
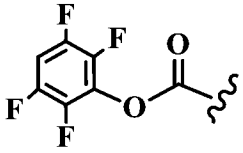
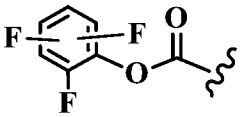
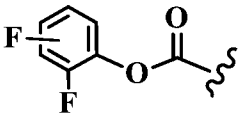
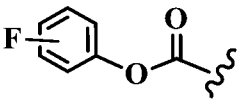
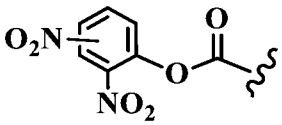
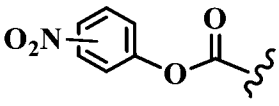
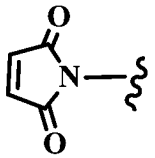
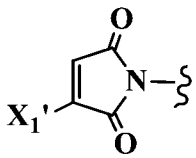
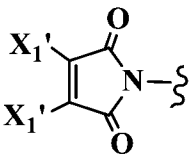
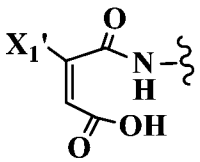
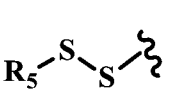
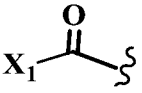
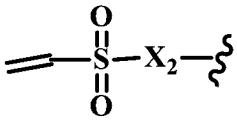
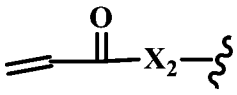
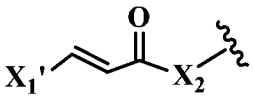
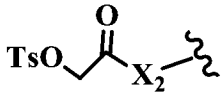
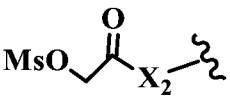
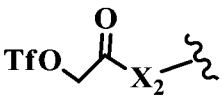
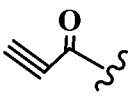
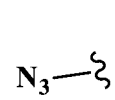
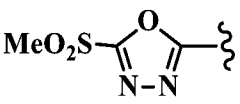
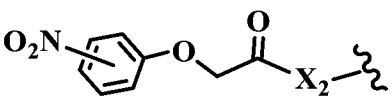
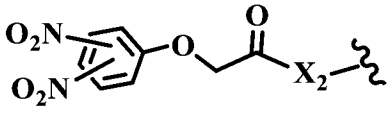
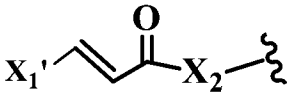
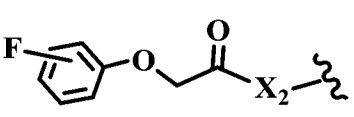
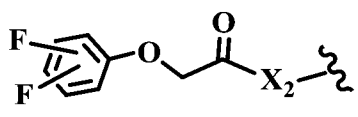
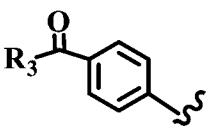
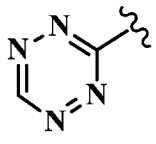
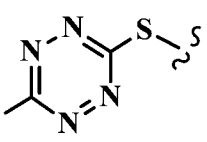
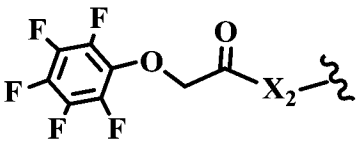
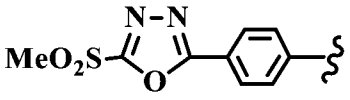
【0120】在一些實施例中，根據本專利發明的方法，其中具有下述式（VIII）、（IX）或（X）的連接子可以先與抗體或類抗體蛋白中的巰基（當抗體或類抗體蛋白是 IgG 抗體時，通常是重輕鏈之間的巰基）選擇性還原，然後與細胞毒性藥物或細胞毒性藥物/連接子複合物縮合，形成如式（V）、（VI）或（VII）的偶聯物：

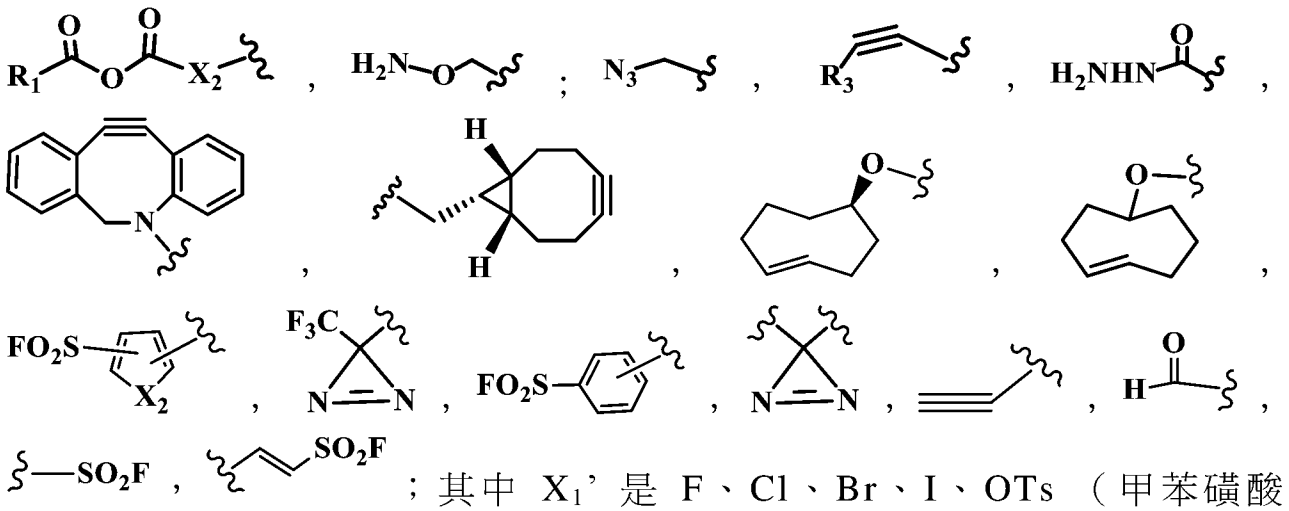

（VIII），


（IX），


（X），

其中 L_1、L_2、E_1、Lv_1和 Lv_2與式 （I），（II）和（III） 中的定義相同；其中 Lv_5 和 Lv_6 獨立地選自由下列組成之群組：

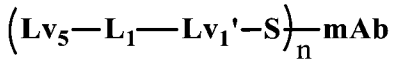

，

，

，

，

，

，

，

，

，

，

；

，

，

，

；

，

；

，

，

，

，

，

，

，

，

，

；

，

；

，

，

，

，

；

，



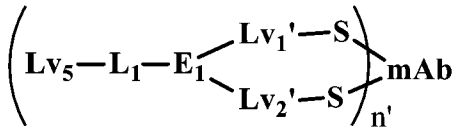
；其中 X_1’ 是 F、Cl、Br、I、OTs （甲苯磺酸酯）、OTf （三氟甲磺酸酯）、OMs （甲磺酸酯）、OC_6H_4（NO_2）、OC_6H_3（NO_2）$_2$、OC_6F_5、OC_6HF_4或 Lv_3；X_2’ 是 O、NH、N（R_1）或 CH_2；R_3 和 R_5獨立地為 H、R_1、芳香基、雜芳基或其中 一個或多個 H 原子 獨立地被 -R_1、-鹵素、-OR_1、-SR_1、-NR_1R_2、-NO_2、-S（O）R_1、-S（O）$_2R_1$、或 -$COOR_1$取代的芳香基團；Lv_3 和 Lv_3’ 為離去基團，獨立地選自由下列組成之群組F、Cl、Br、I、硝基苯氧基、N-羥基琥珀醯亞胺 （NHS）、 苯氧基、苯巰基、二硝基苯氧基、五氟苯氧基、四氟苯氧基、二氟苯氧基、一氟苯氧基、五氯苯氧基、三氟甲磺酸酯、咪唑、二氯苯氧基、四氯苯氧基、1-羥基苯並三唑、甲苯磺酸酯、甲磺酸酯、2-乙基-5-苯基異惡唑鎓-3'-磺酸酯，自身形成的酸酐，或與其他酸酐形成的酸酐，例如乙酸酐、甲酸酐、或肽偶聯反應或與Mitsunobu反應的縮合試劑反應產生的中間分子；其中官能團Lv_5和/或Lv_6也可以與細胞毒性藥物中的巰基反應，只要其反應速率比Lv_1或Lv_2與類抗體蛋白，特別如抗體中的巰基速率快或慢至少一倍。

【0121】 在一些實施例中，在本發明的偶聯過程中，在抗體或類抗體蛋白中引入特定巰基（在本發明的偶聯方法下，當抗體或類抗體蛋白是IgG抗體時，很可能僅重-輕鏈之間的二硫鍵被還原，產生巰基），然後巰

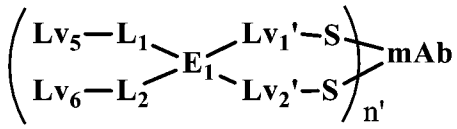
基在偶聯過程中同時或依次與上述式（VIII）、（IX）或（X）的連接子反應，形成以下式（XI）、（XII）或（XIII）的類抗體蛋白/連接子複合分子，然後與細胞毒性藥物D_1或D_2獨立地反應，形成如式（V）、（VI）或（VII）的偶聯物。



（XI），



（XII），



（XIII），

其中 Lv_5、Lv_6、L_1、L_2、E_1、Lv_1’ Lv_2’、mAb、n 和 n’ 定義如前文所述。

【0122】在一些實施例中，根據本發明的方法，其中上述式（VIII）、（IX）或（X）的連接子可以首先與細胞毒性藥物反應形成如式（I）、（II）或（III）的細胞毒性藥物/連接子複合物分子，然後根據本發明的方法與抗體或類抗體蛋白中的被還原產生的巰基獨立地反應，形成如式（V）、（VI）或（VII）的偶聯物。式（VIII）、（IX）或（X）中的結構與細胞毒性藥物的第一步縮合反應可以在單獨的容器中進行，得到如式（I）、（II）或（III）的細胞毒藥物/連接子複合物分子，任選地，在與類抗體蛋白中的巰基偶聯之前可以藉由層析、萃取或沉澱進行純化。較佳地，類抗體蛋白中二硫鍵特異性還原和與式（I）、（II）或（III）進行偶聯反應在同一鍋中進行，中間物不單離。

【0123】為了區分 Lv_5 和/或 Lv_6 與細胞毒性藥物之間的反應，以及 Lv_1 和/或 Lv_2 與類抗體蛋白中的巰基之間的反應，式 （VIII）、

（IX）或（X）中的連接子參與的反應可以在獨立或不同的反應容器中進行。例如，含有胺基的藥物可以在縮合試劑，如EDC、TBTU或BrOP的存在下與連接子中的羧酸基團發生縮合，得到帶有醯胺鍵的如式（I）、（II）或（III），經修飾的藥物/連接子複合物。該縮合反應可以在生理緩衝溶液中進行，其中式（VIII）、（IX）或（X）連接子一端的羧酸基團被N-羥基琥珀醯亞胺基（NHS）、五氟苯基、二硝基苯基酯，或羧醯氯等基團活化，再與帶有胺基的藥物反應，以產生如式（I）、（II）或III）的藥物/連接子複合物，應用本申請的方法，隨後或同步與類抗體蛋白質上的巰基偶聯，形成如式（V）、（VI）或（VII）的偶聯物。

【0124】在另一個實施例中，式（VIII）、（IX）或（X）的連接子的一個末端帶有巰基反應性基團（例如馬來醯亞胺基、乙烯基磺醯基、鹵代乙醯基、丙烯酸基、取代丙炔基），另一個末端帶有可與藥物反應的基團（例如羥基琥珀醯亞胺基（NHS）、五氟苯基、二硝基苯基酯、胺基、烷氧基胺基，或可進行點擊化學反應的基團（例如疊氮化物、炔烴、二苯並環辛基、BCN（（1R，8S，9s）-雙環[6．1．0]九-4-炔-9-基甲醇））。應用本申請的方法，在pH 4.5 -7.5、2 ºC – 40 ºC（較佳2 ºC -8 ºC）的緩衝溶液中，在加入或不加入0~30%可與水混合（可混溶）的有機溶劑的情況下，與類抗體蛋白質（較佳抗體）的巰基偶聯，以獨立地得到如式（XI），（XII）或（XIII）的類抗體蛋白質-連接子偶聯物。然後，將帶有能與式（XI）、（XII）或（XIII）上的反應性基團反應的藥物，依次或同時加入到反應溶液中，得到如式（V）、（VI）或（VII）的偶聯物。任選地，可以在第二步，與藥物進行縮合之前，純化如式（XI）、

（XII）或（XIII）的類抗體蛋白-連接子偶聯物，並且可以改變縮合條件，例如將pH調節至6.5-8.0，和/或將溫度調節至20-45℃。

【0125】在一些實施例中，在本發明的偶聯工藝中，在與藥物偶聯之前，類抗體蛋白可以藉由連接如式（XI）、（XII）或（XIII）的異源雙功能交聯劑來修飾，例如用胺至巰基（琥珀醯亞胺基（NHS）酯/馬來醯亞胺、NHS酯/吡啶基二巰基、NHS酯/鹵乙醯基），二氮雜嗪啶（SDA）至巰基、疊氮基至巰基、炔基至巰基、巰基至糖（馬來醯亞胺/醯肼、吡啶基二硫酚/醯肼、鹵代乙醯基/醯肼）、羥基至巰基（異氰酸酯/馬來醯亞胺）、巰基至 DNA（馬來醯亞胺/psoralen、吡啶基二硫酚/psoralen、鹵代乙醯基/psoralen）、巰基至羧基（碳二亞胺） 的連接子。

【0126】藥物/細胞毒性劑的反應基團以不同的方式，與如式（XI）、（XII）或（XIII）的經修飾的抗體-連接子偶聯物反應，制得最終偶聯物。例如，藉由二硫鍵連接的偶聯物，第一步，如式（VIII）、（IX）或（X）的連接子，應用本發明的類抗體蛋白的還原和偶聯方法，在2 °C -8 °C，pH 4.5-6.0下與類抗體蛋白偶聯，隨後在20 °C -40 °C，pH 6.5 – 8.0下，含有游離巰基的藥物和連接於修飾的類抗體蛋白的連接子中的二硫鍵（例如吡啶基二硫部分）之間，進行二硫鍵交換。在加入含有游離巰基的藥物之前，反應中過量的還原劑（例如TCEP或三（3-羥丙基）膦）最好能被去除。

【0127】藉由硫醚連接的偶聯物，首先使兩個末端均含有馬來醯亞胺基或鹵代乙醯基或乙基磺醯基或取代的丙炔基等具有巰基反應性基團的連接子，與抗體中的巰基反應來實現，所述巰基為抗體藉由本專利申請的

方法，在2℃至8℃，pH 4.5至6.0下還原獲得，得到如式（XI）、（XII）或（XIII）的抗體-連接子偶聯物，隨後與含有巰基的藥物在pH 6.5至8.0下、20℃至40℃下反應，得到如式（V）、（VI）或（XIII）的偶聯物。如果兩步反應選擇相同的pH和/或溫度條件，則使用超過四倍當量的含有雙末端巰基反應性基團的連接子進行偶聯。應當注意，較佳的二硫化物或巰基-醚連接的偶聯物的合成方法，是先化學合成具有式（I）、（II）或（III）的含二硫化物或巰基-醚鍵的藥物-連接子複合物；之後根據本發明的方法，與蛋白質（抗體）中的巰基反應。

【0128】 酸不穩定腙鍵連接的偶聯物的合成，可以應該業內已知的方法，藉由羰基與連接子中的醯肼部分的反應來實現。（例如，P. Hamann 等，Cancer Res. 53，3336-34，1993；B. Laguzza 等，J. Med. Chem.，32；548-55，1959；P. Trail 等，Cancer Res.，57；100-5，1997）。帶有三唑鍵的偶聯物的合成可以應用點擊化學，藉由藥物的1-炔基團與連接子中的疊氮基部分反應來實現（Huisgen cycloaddition）（Lutz，J-F. 等，2008，Adv. Drug Del. Rev. 60，958–70；Sletten，E. M. 等 2011，AccChem. Research 44，666–76）。肟連接的偶聯物的合成是藉由含有酮或醛的修飾類抗體蛋白與含有氧胺基的藥物反應實現的。帶有羥基或巰基的藥物可以與如式（XI）、（XII）或（XIII）的，帶有鹵素的改性連接子，特別是羧酸酯的α鹵化物，在溫和的鹼存在，如pH 8.0~9.5條件下反應，得到如式（I），（II），或（III）的，帶有醚或巰基醚鍵的改性藥物/連接子複合物。在脫水劑如EDC或DCC的存在下，含有羥基的藥物可以與如式（XI）、（XII）或（XIII）的帶有羧基的連接子縮合，得到酯鍵，然後應用本發明的方法，使藥物/連接子複合物與類

抗體蛋白發生偶聯。含有胺基的藥物可以與如式（VIII）或（XI），類抗體蛋白連接子上的羧酸 NHS酯、咪唑、硝基苯氧基；N-羥基琥珀醯亞胺（NHS）；甲基磺醯基苯氧基；二硝基苯氧基；五氟苯氧基；四氟苯氧基；二氟苯氧基；單氟苯氧基；五氯苯氧基；三氟甲磺酸酯；咪唑；二氯苯氧基；四氯苯氧基；1-羥基苯並三唑；甲苯磺酸酯；甲磺酸酯；2-乙基-5-苯基異噁唑-3'-磺酸酯，進行反應，藉由式（V）、（VI）、或（VII）的醯胺鍵形成偶聯物。

【0129】在進一步的實施例中，在本專利發明的方法下，所得式（V）、（VI）、或（VII）的偶聯物與抗體的重-輕鏈之間的半胱氨酸位點的連接超過75%，與抗體的重-重鏈之間的半胱氨酸位點（鉸鏈區）的連接少於15%。通常，對於式（V）或（VII），當藥物/抗體比（DAR）為4時，抗體中藥物數量的百分比分佈為：D0 <1%、D2<10%、D4>75%、D6<10%、D8 < 10%；對於式（VI）、當藥物/抗體比（DAR） 為4時，抗體中藥物數量的百分比分佈為：D0 <1%，D1<10%，D2>75%，D3<10%，D4<10%。

【0130】可藉由標準生化手段純化所得偶聯物，如Sephadex G25或Sephacryl S300柱凝膠過濾、吸附層析、離子（陽離子或陰離子）交換層析或透析（超濾（UF）和滲濾（DF））。在一些情況下，與小分子藥物偶聯的類抗體蛋白小分子（如< 10 KD）可藉由層析法純化，如HPLC、中壓柱層析法或離子交換層析法。

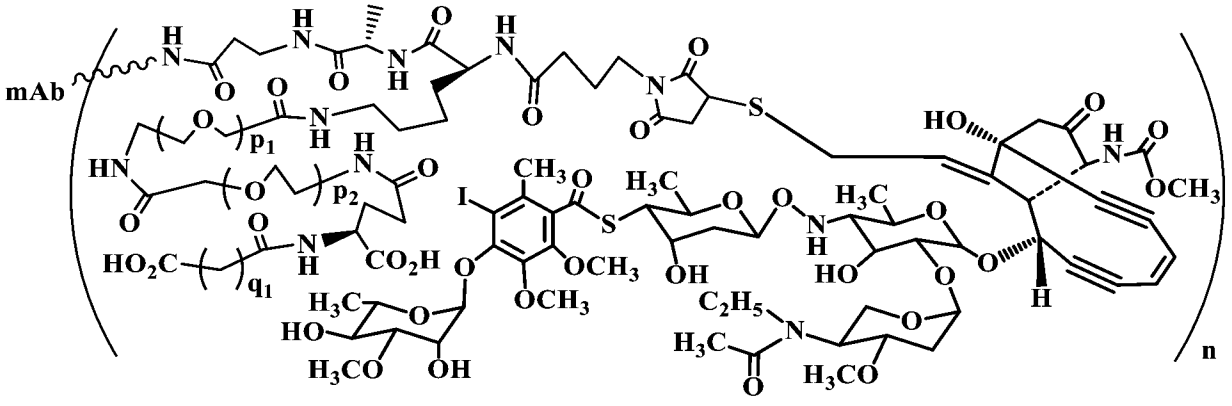
【0131】通常，式（V），（VI），或 （VII）的偶聯物較佳地由式（I）、（XII）或（XIII）的藥物/連接子複合物在一鍋反應中製備。當類抗體蛋白還原生成的巯基與式（I）、（XII）或（XIII）的藥物/接頭複

合物末端的巰基反應性基團反應時，可以使用Ellman試劑，量測反應過程中游離巰基的數量，進而監測二硫鍵的還原和巰基的偶聯。可使用波長範疇為190-390 nm，較佳240-380 nm，更佳240-330 nm的紫外光譜來監測偶聯反應。因此，可以在控制溫度環境下，在石英比色皿或Pyrex管中進行和監測偶聯反應。偶聯物的藥物/蛋白質（抗體）比（DAR）也可藉由藥物和蛋白在240-380 nm波長範疇內的吸光度，計算濃度而獲得，或者藉由量測每種藥物/蛋白質片段的疏水交互作用層析（HIC-HPLC）積分面積而獲得，或者藉由毛細管電泳（CE），和/或LC-MS或LC-MS/MS或CE-MS（液相層析（LC）或CE與質譜（MS）聯用，量測每種藥物/蛋白質片段LC或CE積分面積和MS峰強度）。還應注意，本發明的偶聯方法中，當藥物或藥物/連接子複合物在水基緩衝溶液中的溶解性不好時，可加入最多30%的可與水混合（混溶）的有機溶劑，例如DMA、DMF、乙醇、甲醇、丙酮、乙腈、四氫呋喃、異丙醇、二惡烷、丙二醇或乙二醇，作為在水基緩衝溶液中的共溶劑。

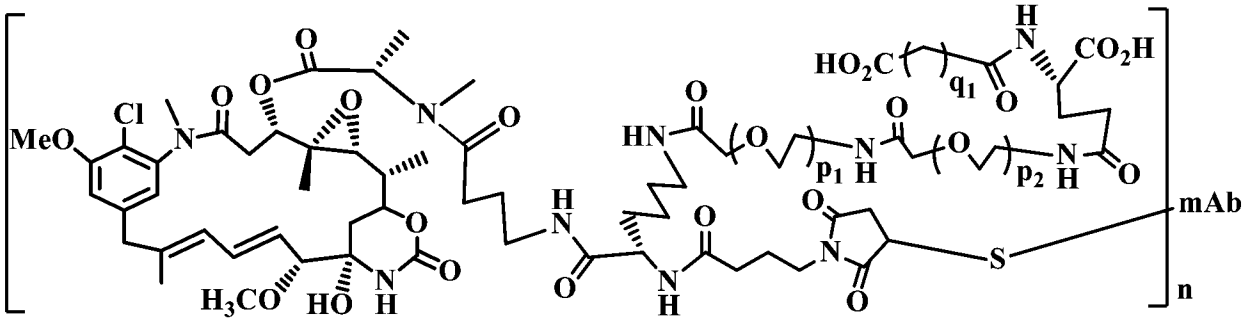
【0132】類抗體蛋白修飾反應的水溶液緩衝體系的pH在 4和9之間，較佳在6.0和7.5之間，並且可以包含任何在這些pH範疇可用的非親核性緩衝鹽。典型的緩衝液包括磷酸鹽、乙酸鹽、三乙醇胺鹽酸、HEPES和MOPS緩衝液，其中可含有其他組分，如環糊精、蔗糖和鹽，例如NaCl和KCl。本專利申請的定義部分列出了可用於偶聯過程的其他生物緩衝液。反應進程可以藉由量測在特定紫外波長（如254 nm）或其他合適波長下的吸光度減少量，或在特定紫外波長（如280 nm）或其他合適波長下吸光度增加量。反應完成後，經修飾的細胞結合類抗體蛋白的單離可以用習知方式進行，例如使用凝膠過濾層析法或吸附層析法。

【0133】當使用二硫化物交換反應修飾類抗體蛋白時，可藉由量測藉由釋放的硝基吡啶硫酮、二硝基吡啶二硫酮、吡啶硫酮、羧基胺基吡啶二硫酮或二羧基胺基吡啶二硫酮基團的紫外光譜吸光度來評估修飾進行的程度。若不含發色基團，可藉由LC-MS（較佳UPLC-QTOF質譜），或毛細管電泳-質譜（CE-MS））監測修飾或偶聯反應。連接子化合物可與具有合適取代基的藥物，較佳細胞毒性劑，發生反應。例如，帶有胺基或羥基取代基的經修飾類抗體蛋白，可以與帶有N-羥基琥珀醯亞胺（NHS）酯的藥物反應，帶有巰基取代基的經修飾類抗體蛋白，可以與帶有馬來醯亞胺基或鹵乙醯基的藥物反應。此外，帶有羰基（酮或醛）取代基的經修飾類抗體蛋白，可以與帶有醯肼或烷氧基胺的藥物反應。熟習此項技術者可以根據連接子上可用官能團的反應活性，容易地確定使用哪種連接子。

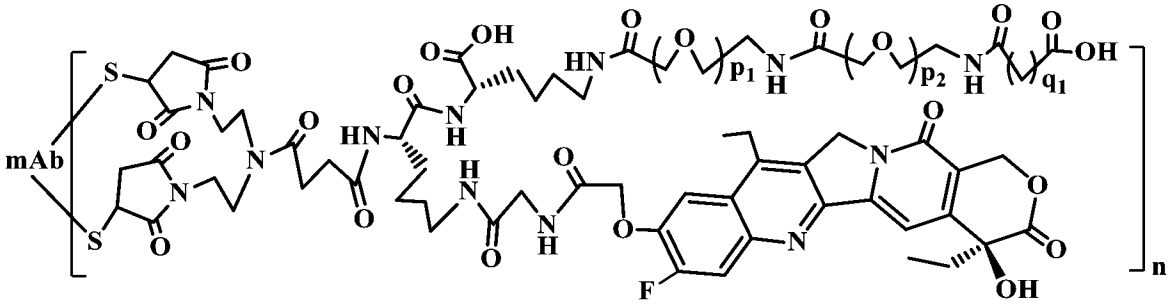
【0134】藉由本發明的方法製備的如式（V）、（VI）、和（VII）的偶聯物，超過80%的藥物在抗體的重-輕鏈之間的半胱氨酸連接，示例如下：



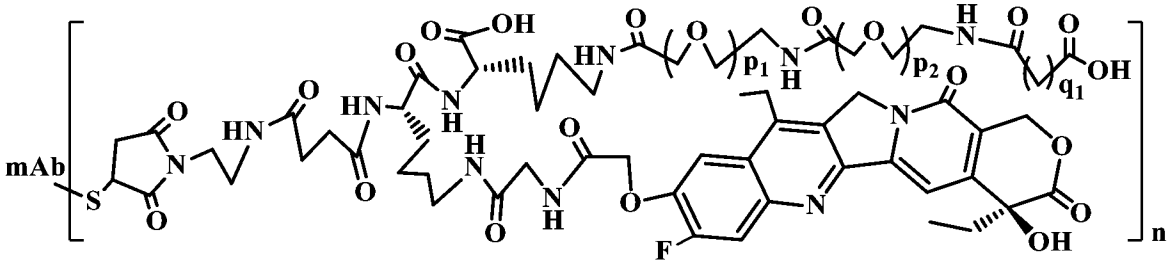
a001，



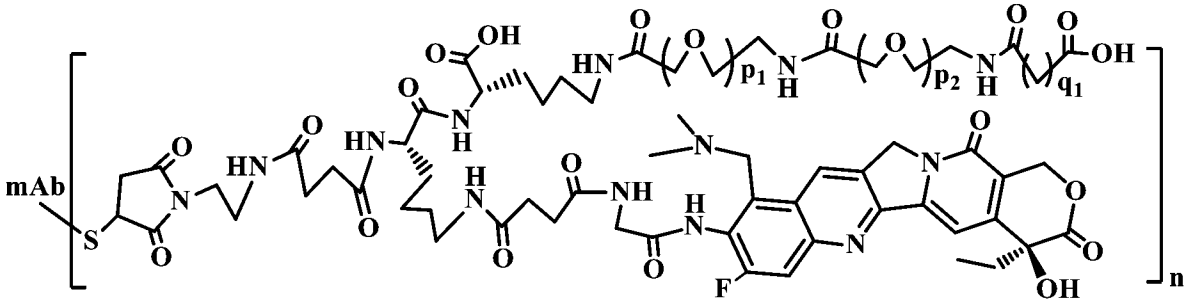
a002，



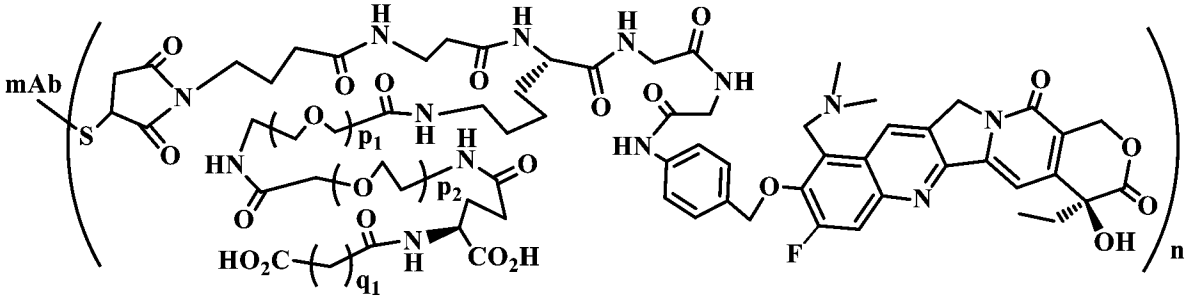
a003，



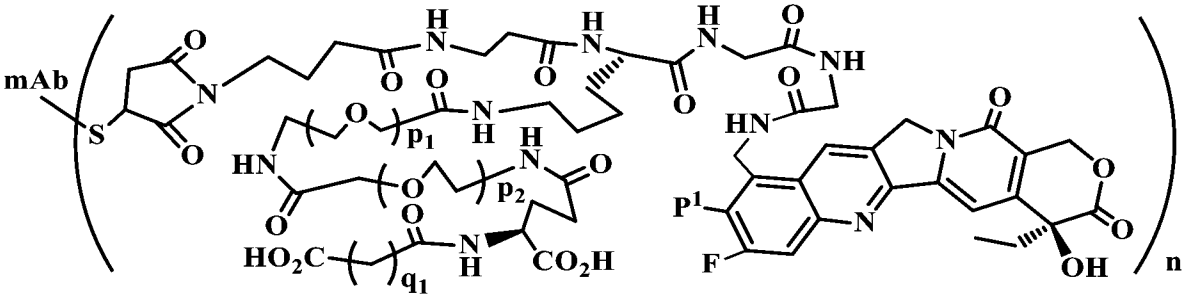
a004，



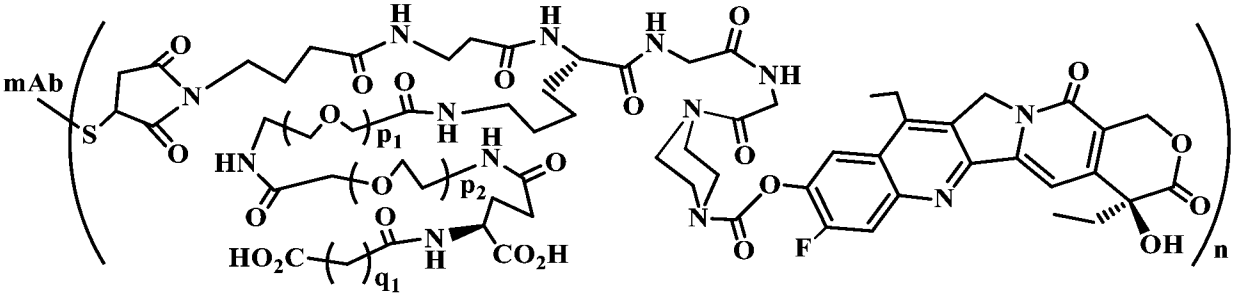
a005，



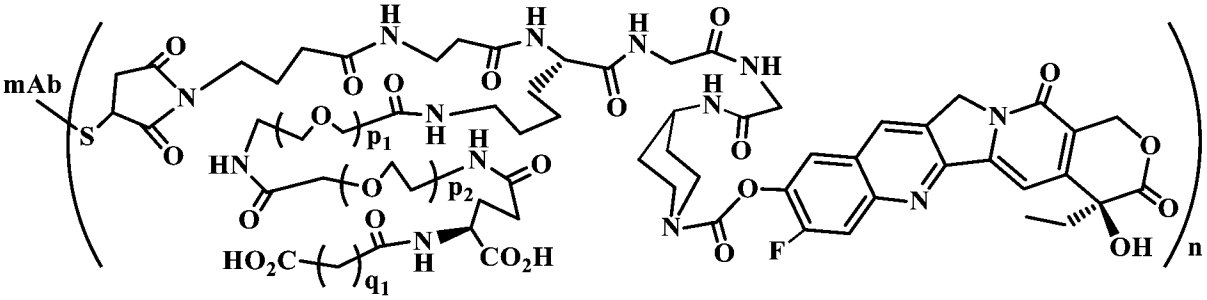
a006，



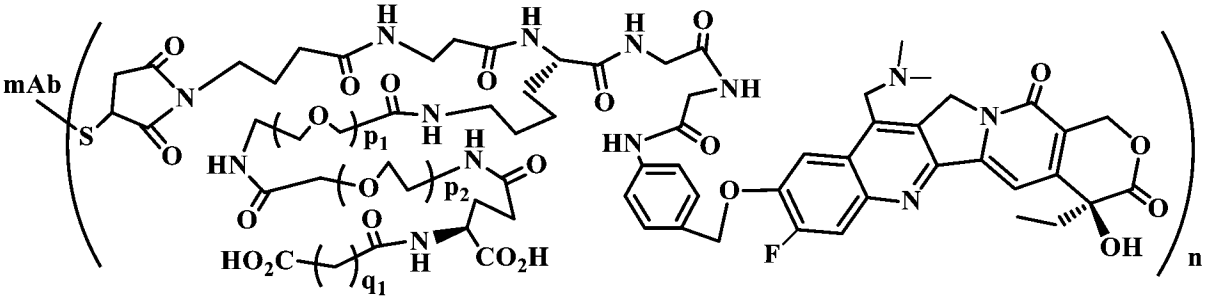
a007，



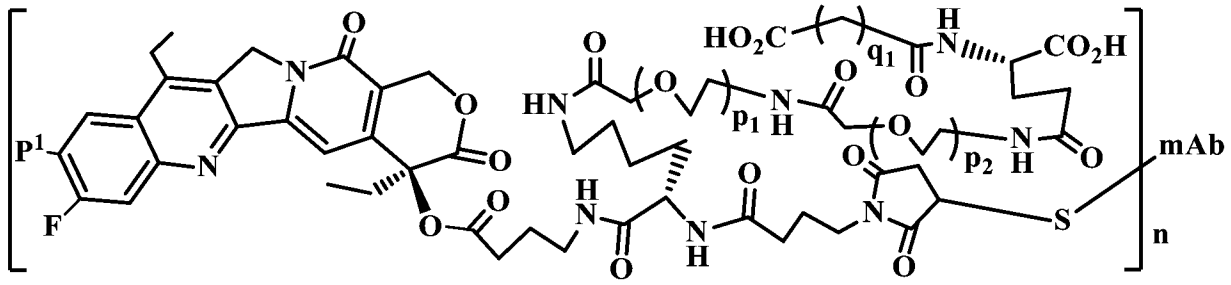
a008，



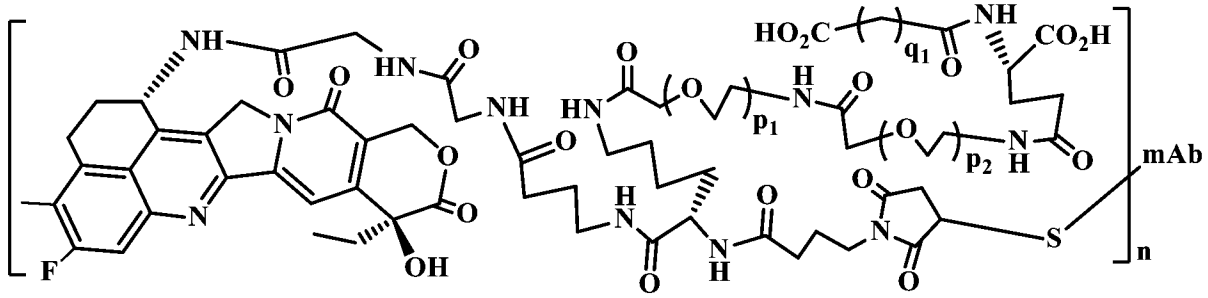
a009，



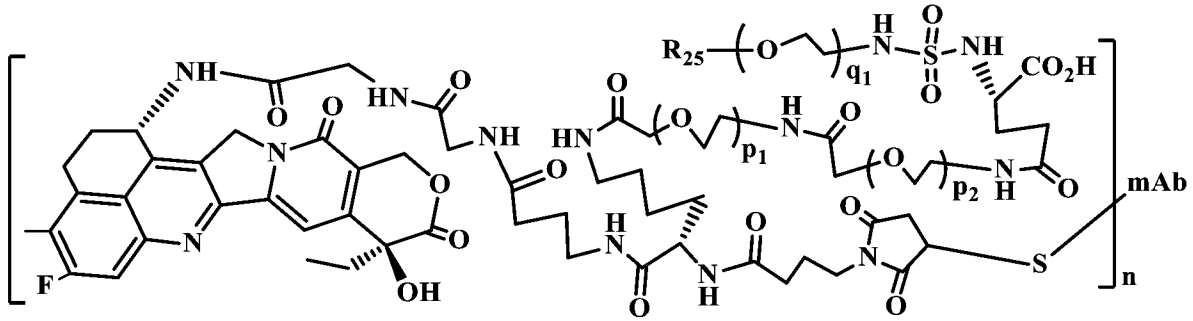
a010，



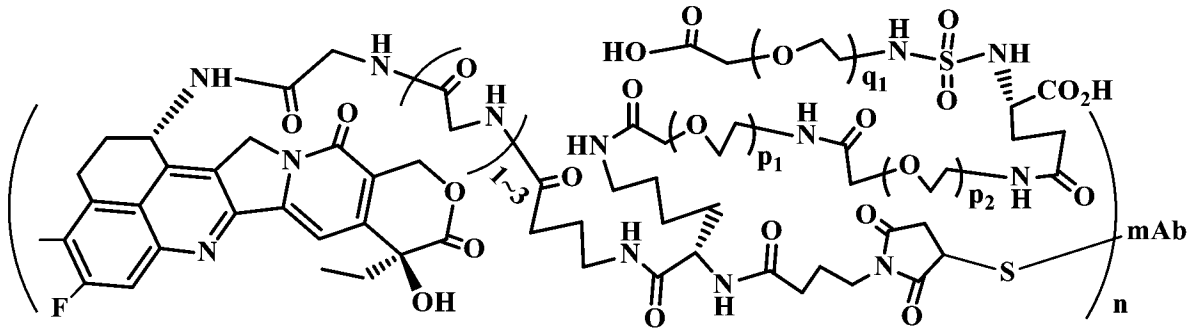
a011，



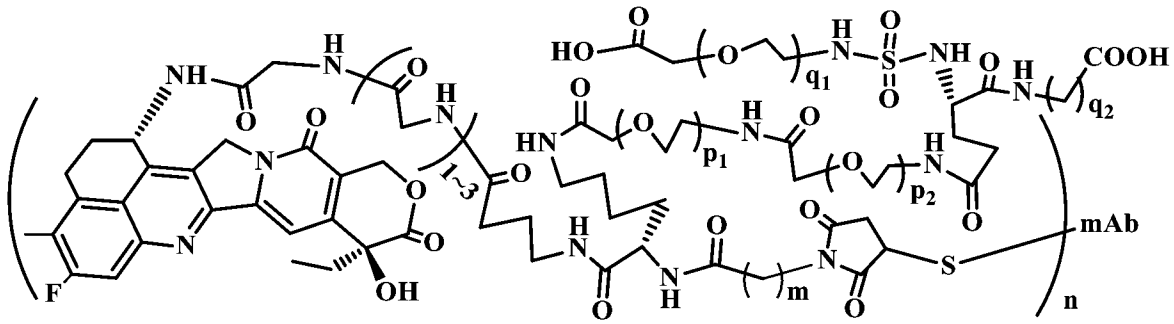
a012，



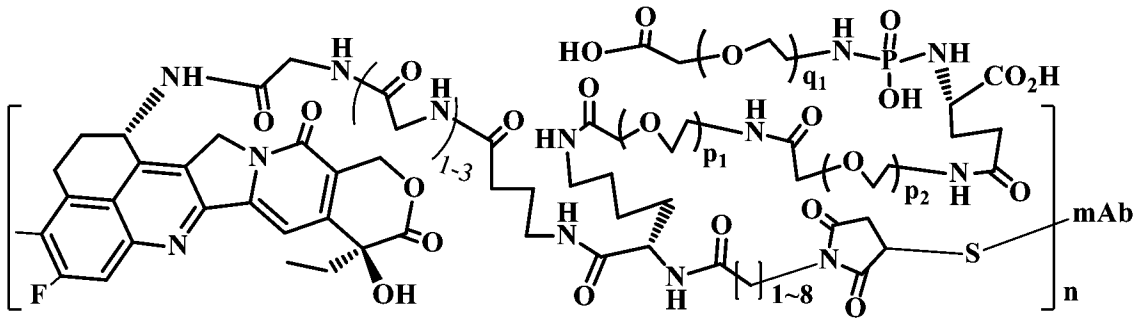
a013，



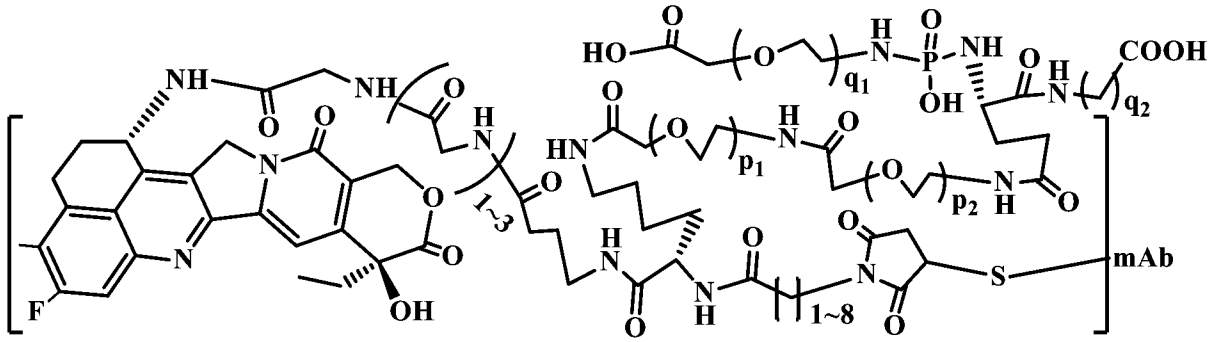
a014，



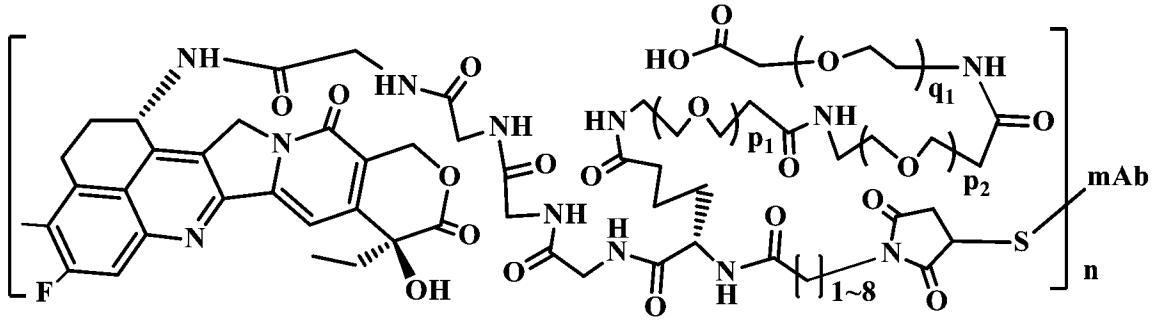
a015，



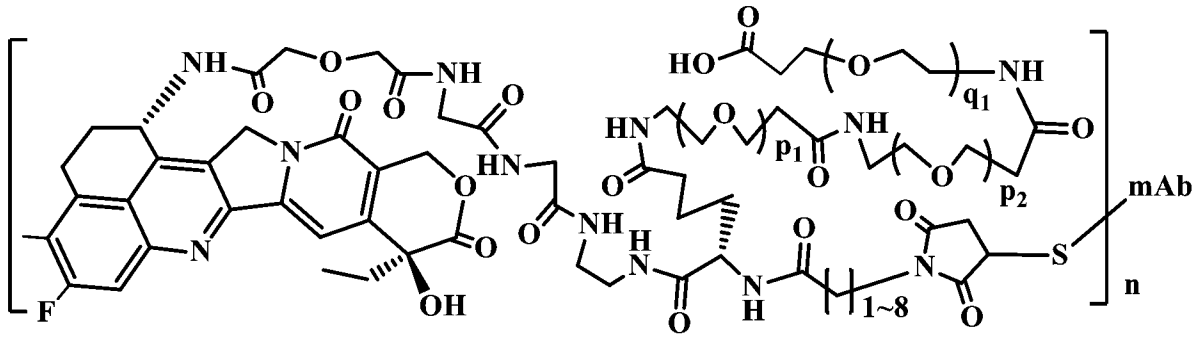
a016，



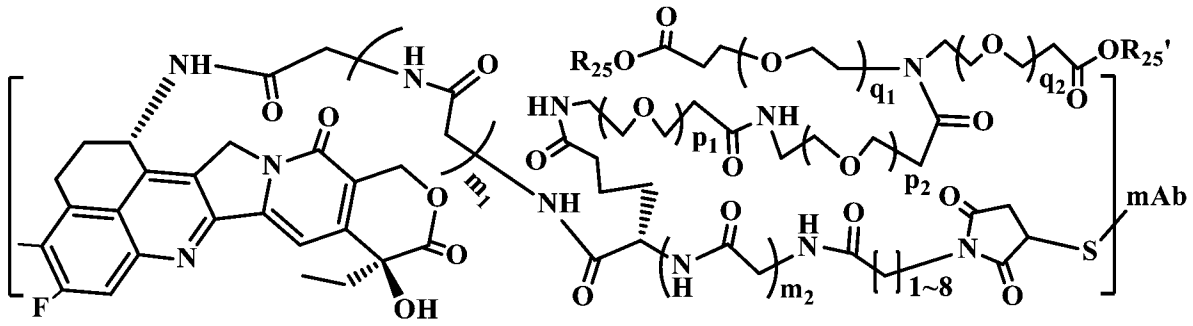
a017，



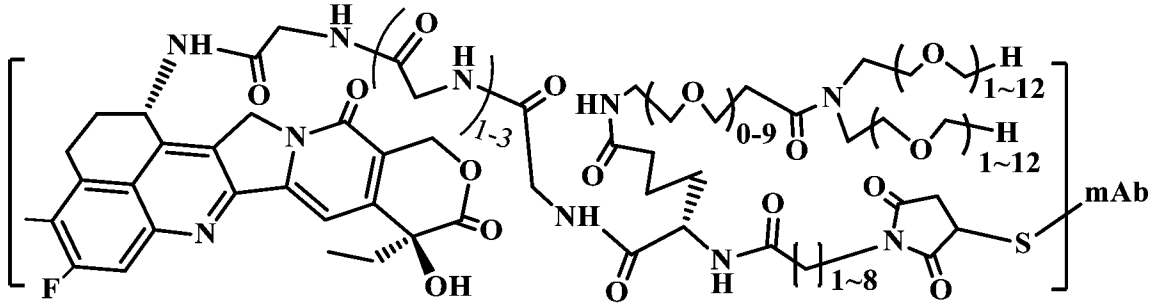
a018，



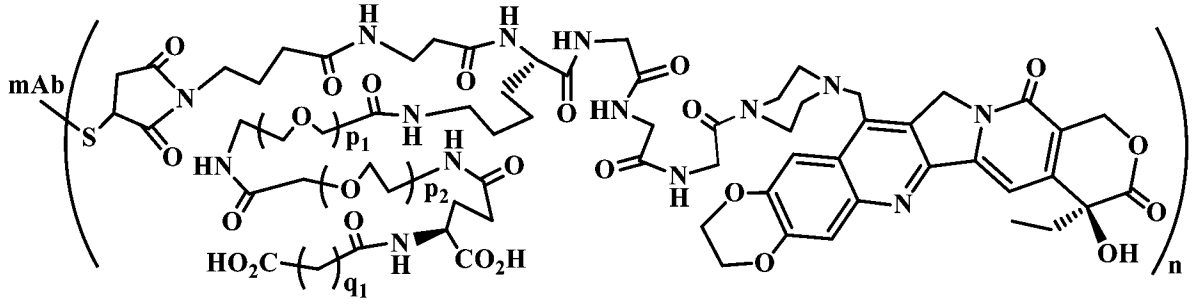
a019，



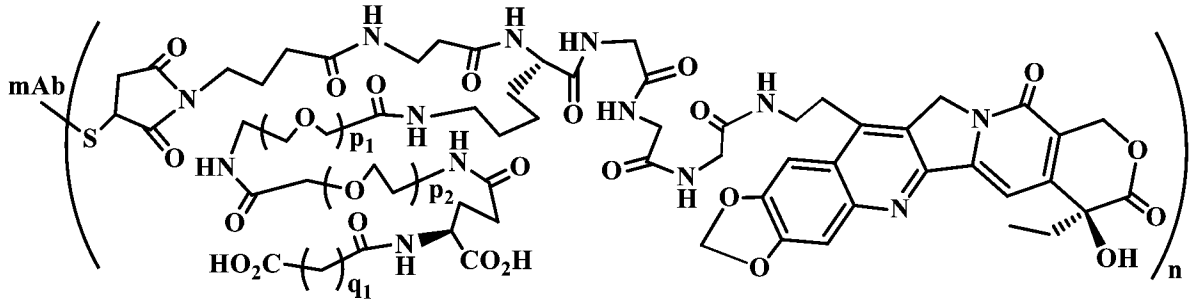
a020，



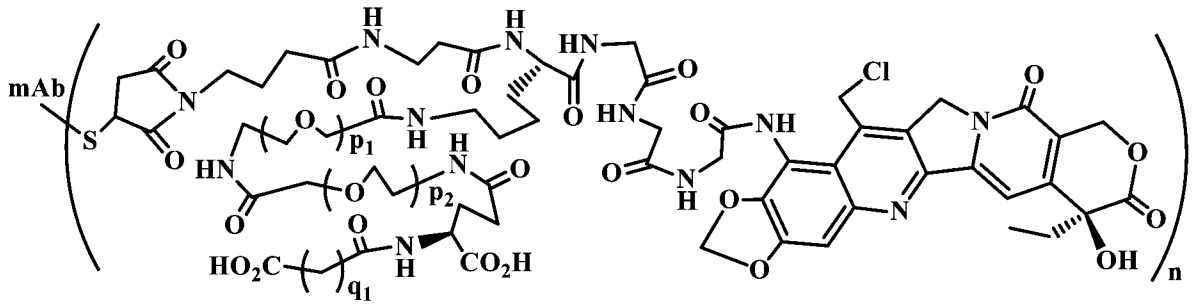
a021，



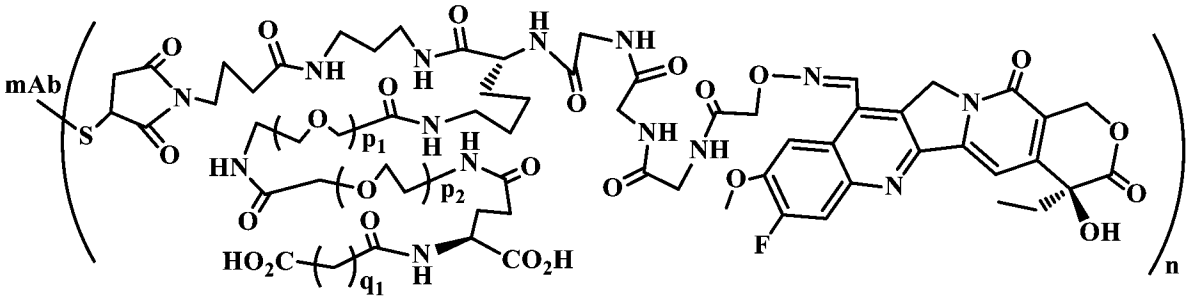
a022，



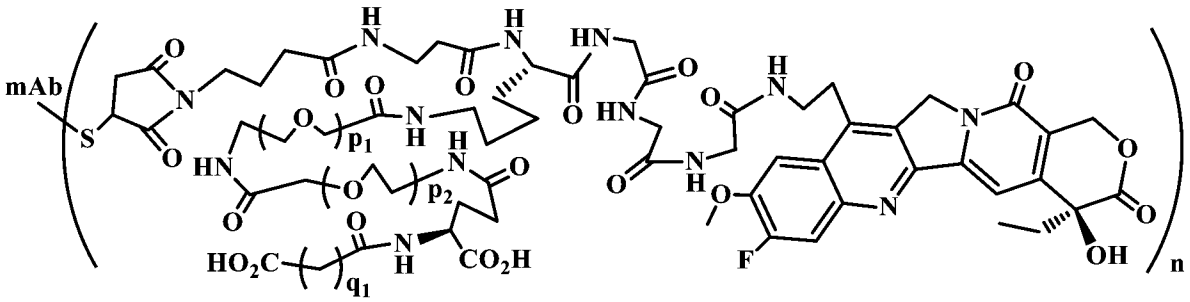
a023，



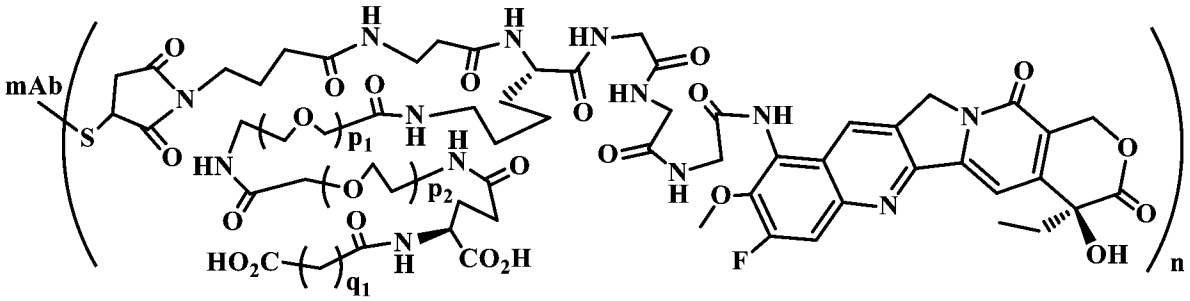
a024，



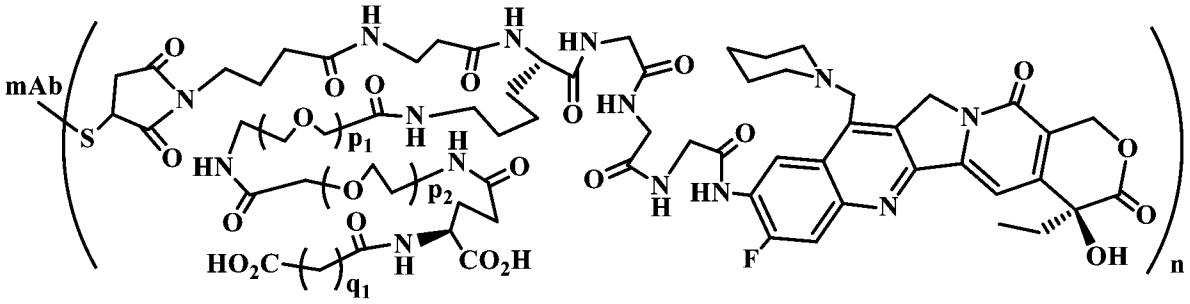
a025，



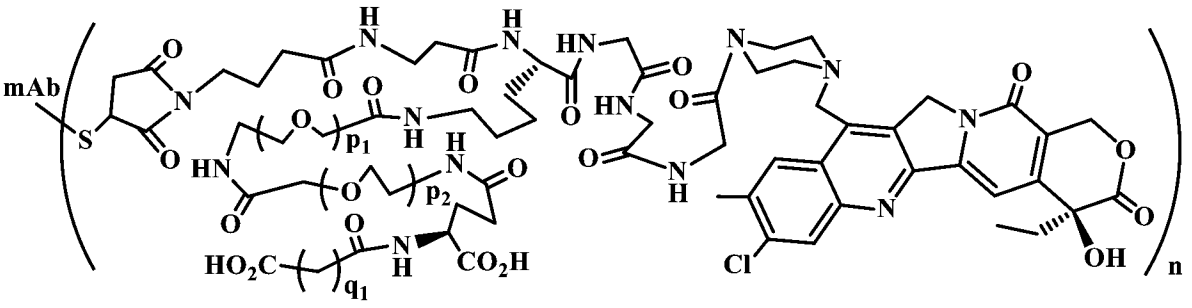
a026，



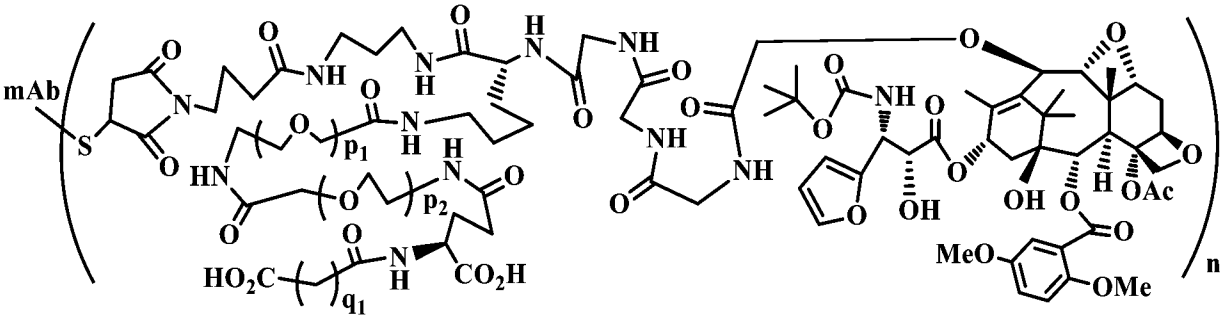
a027，



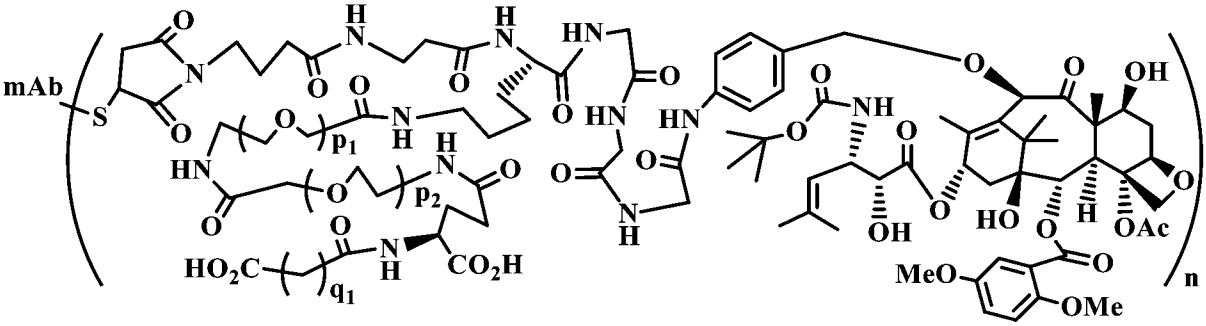
a028，



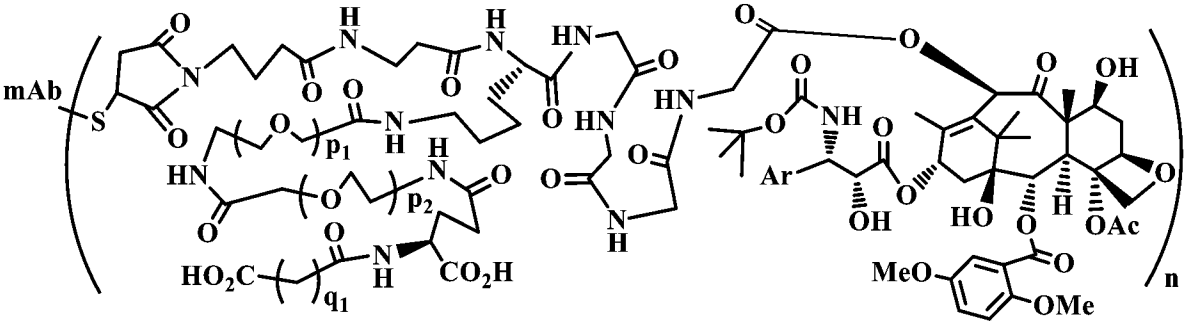
a029，



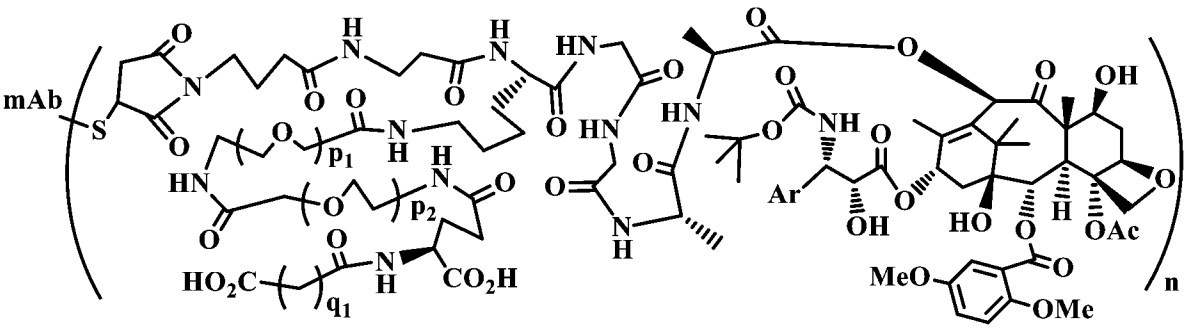
a030，



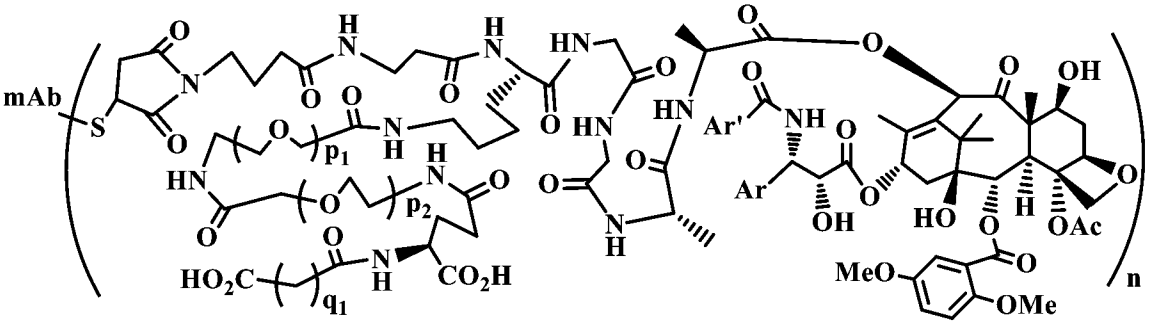
a031，



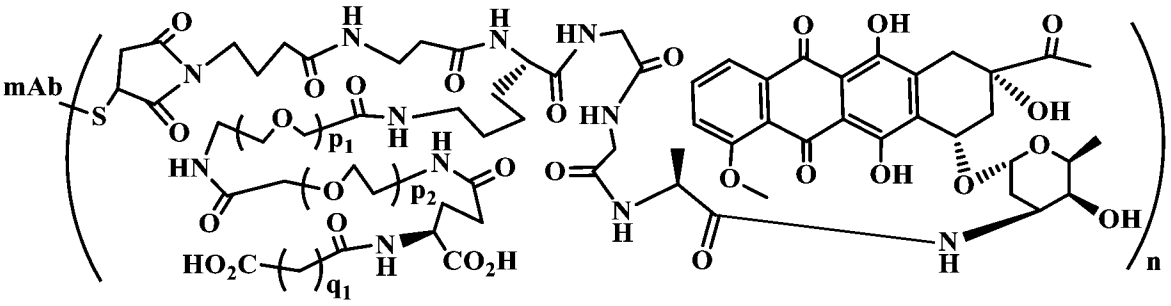
a032，



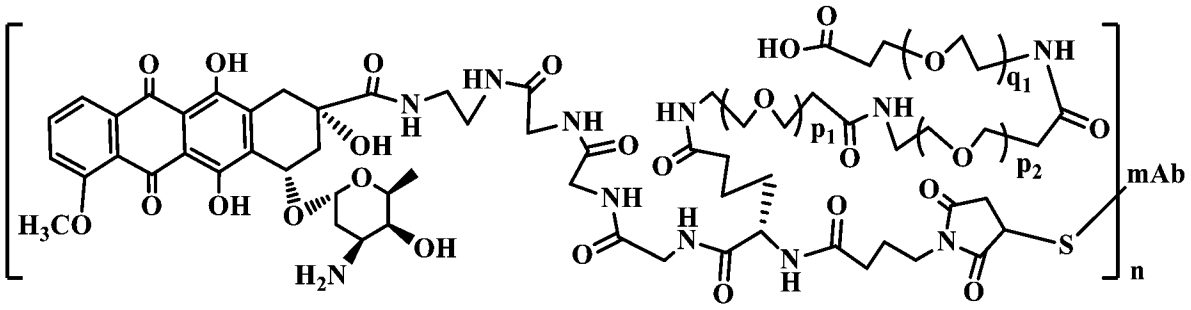
a033，



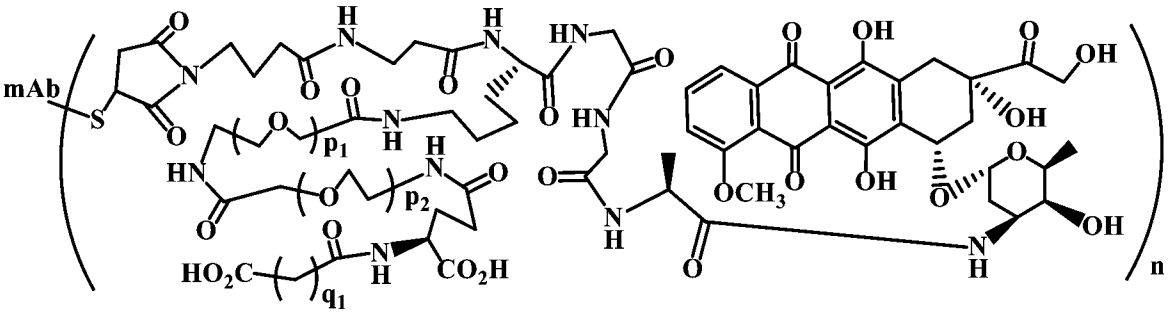
a034，



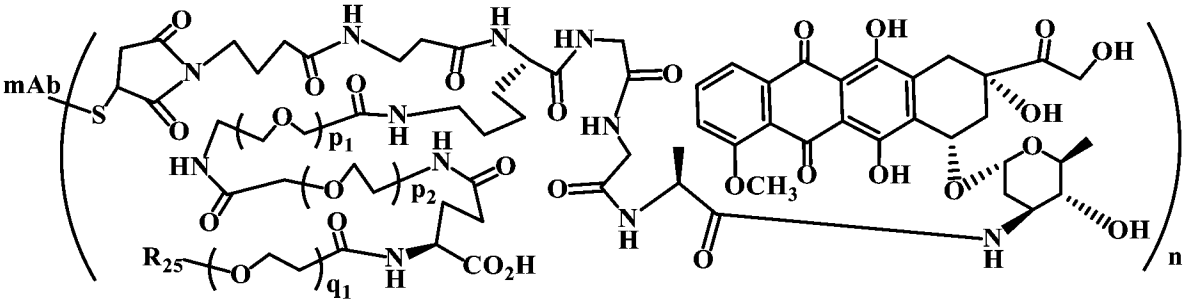
a035，



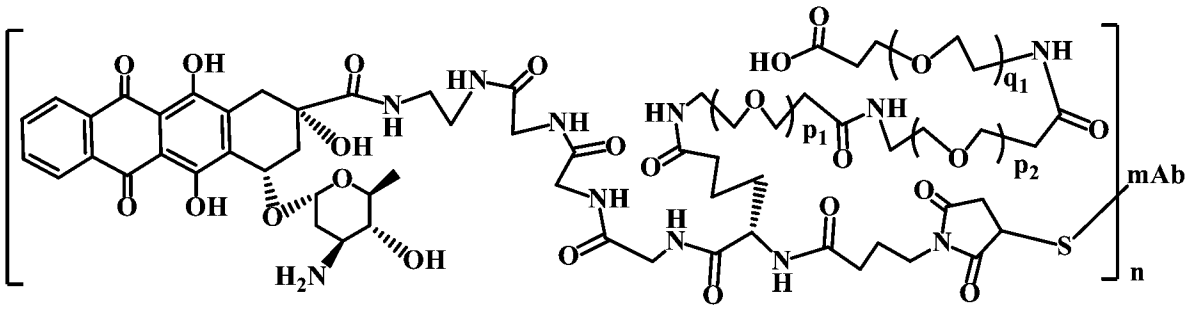
a036，



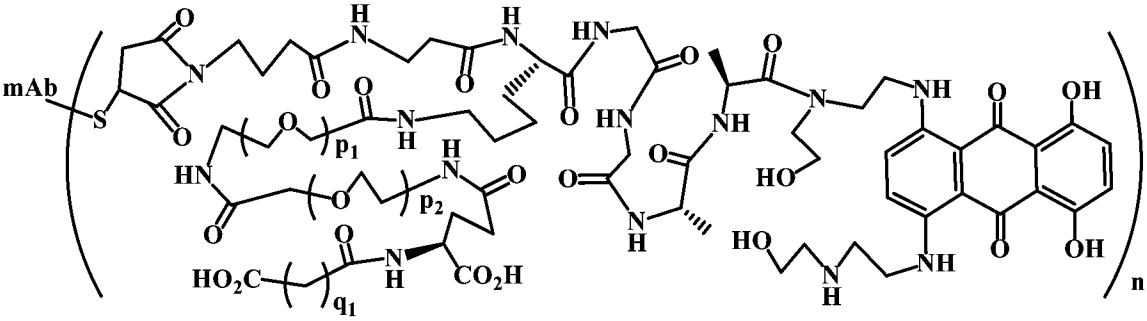
a037，



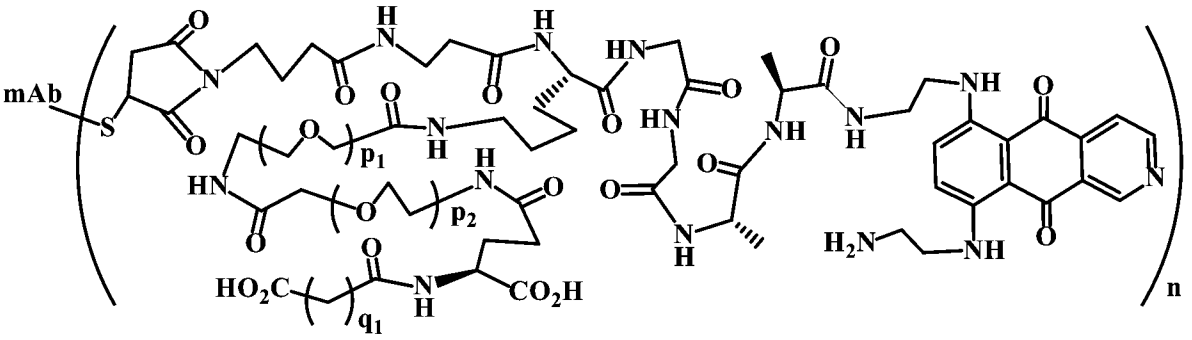
a038，



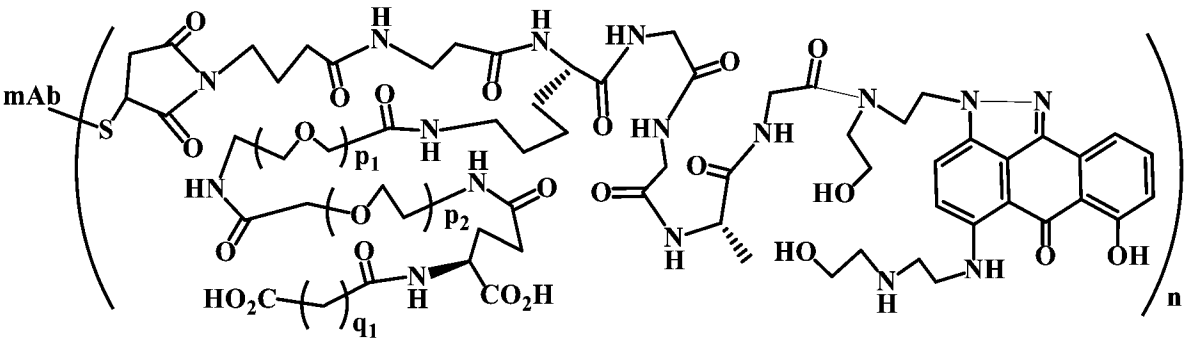
a039，



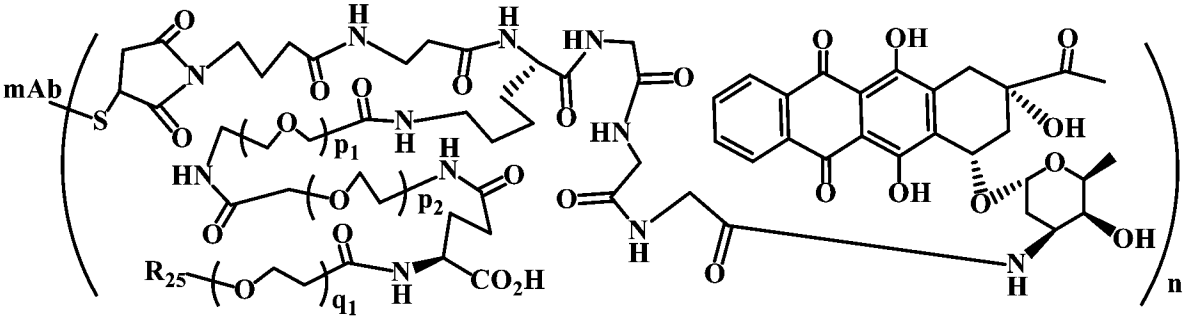
a040，



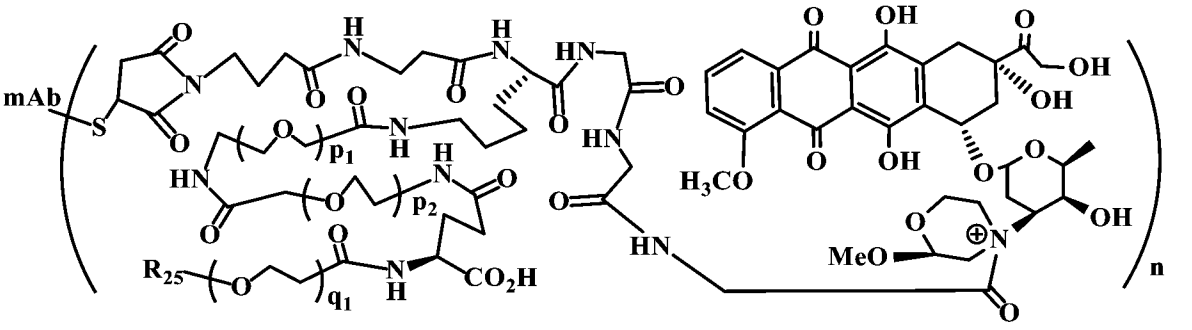
a041，



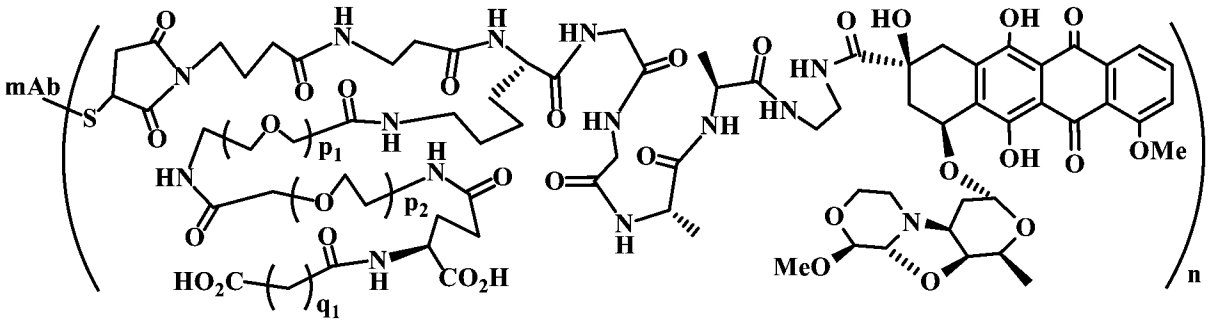
a042，



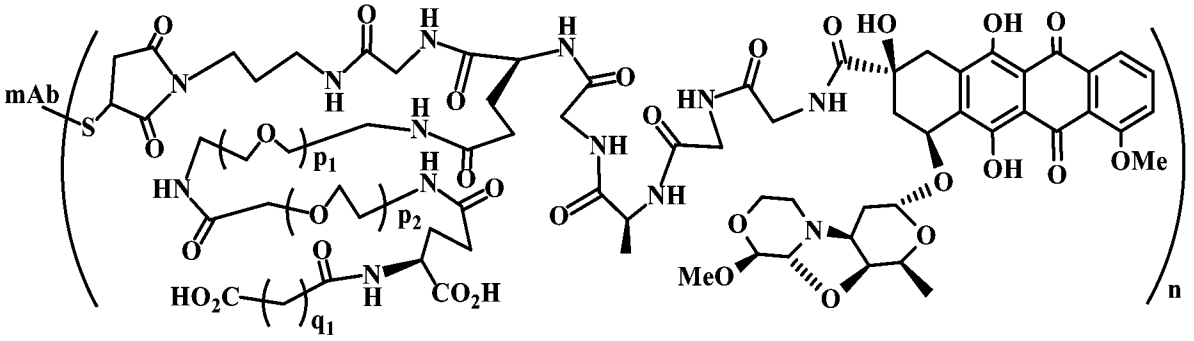
a043，



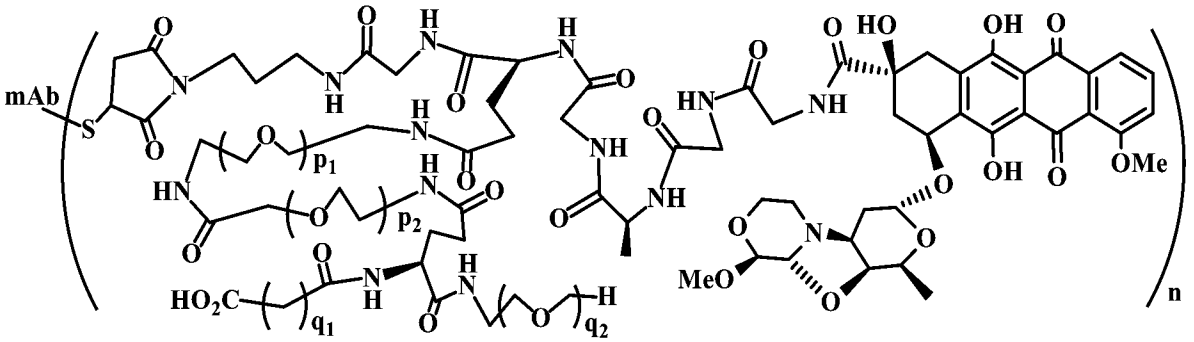
a044，



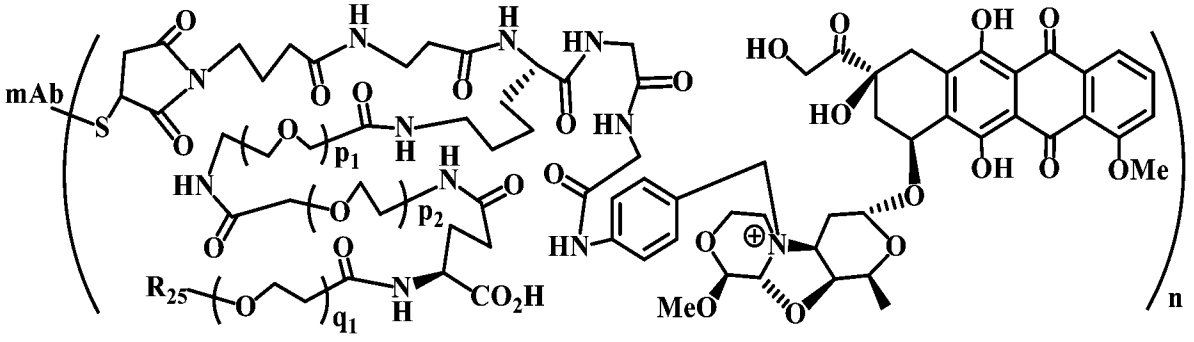
a045，



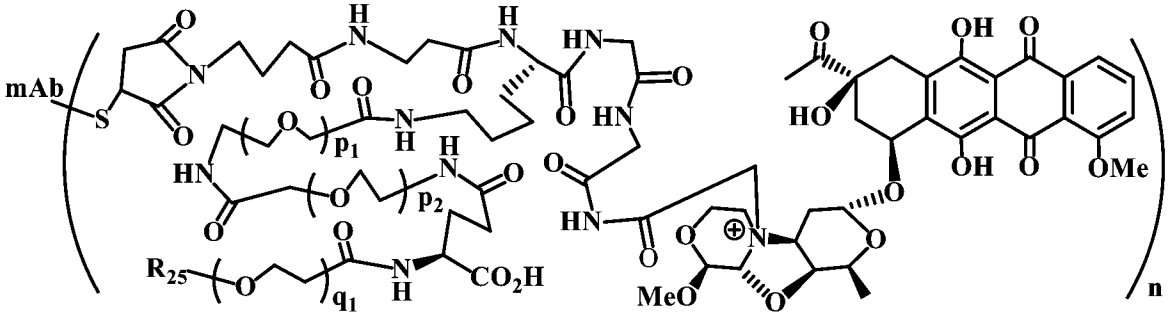
a046，



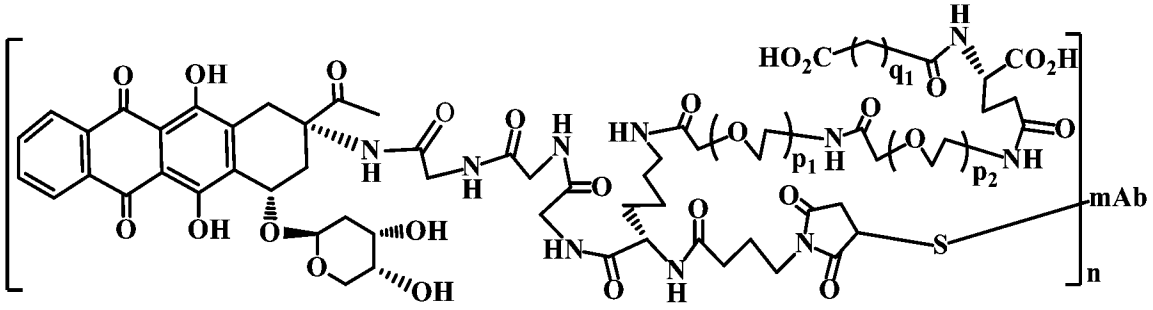
a047，



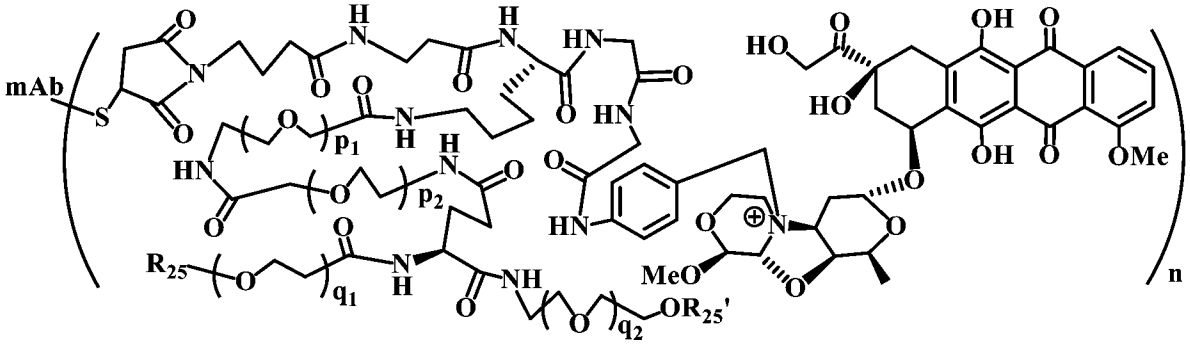
a048，



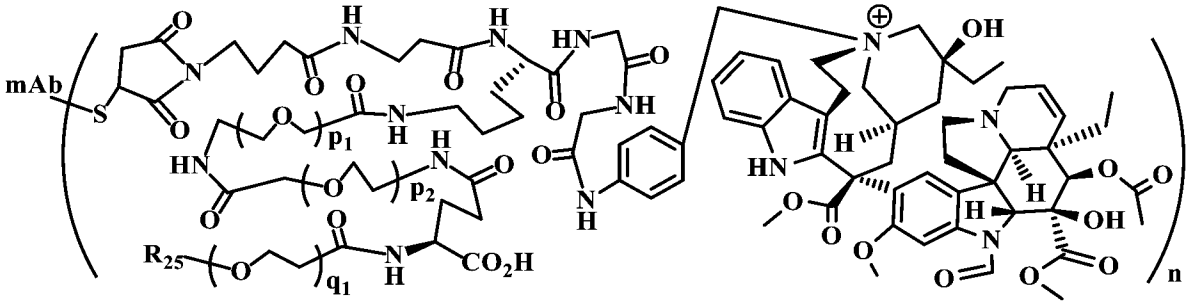
a049，



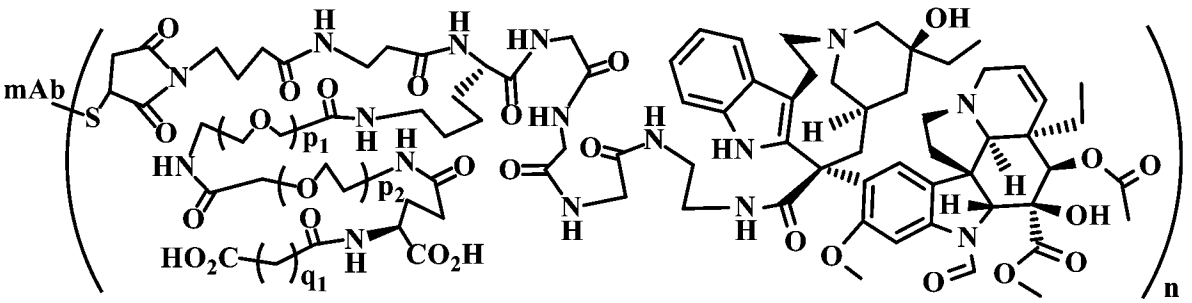
a050，



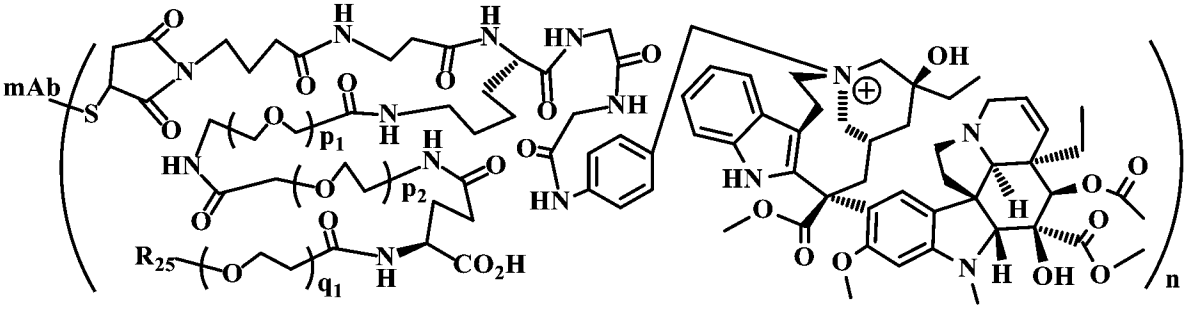
a051，



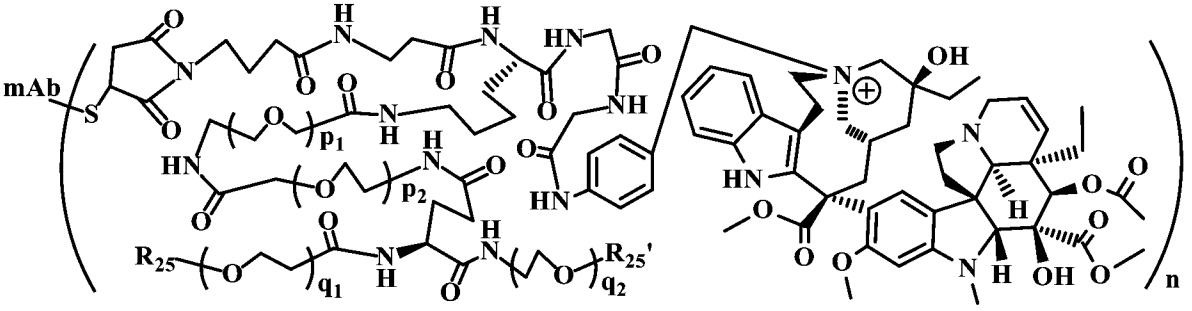
a052，



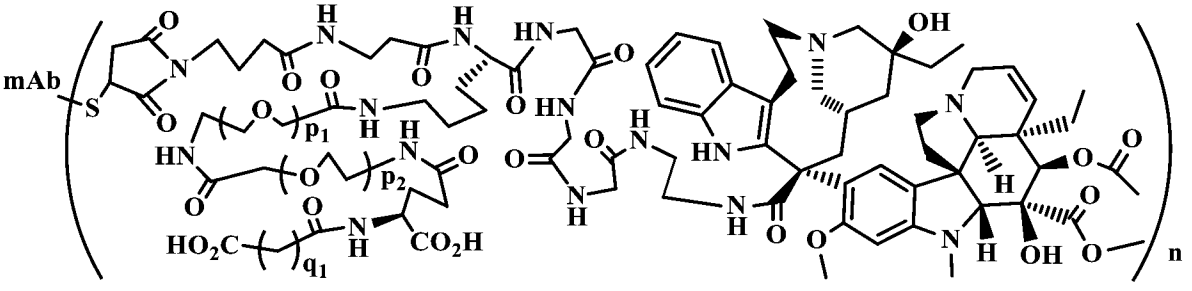
a053，



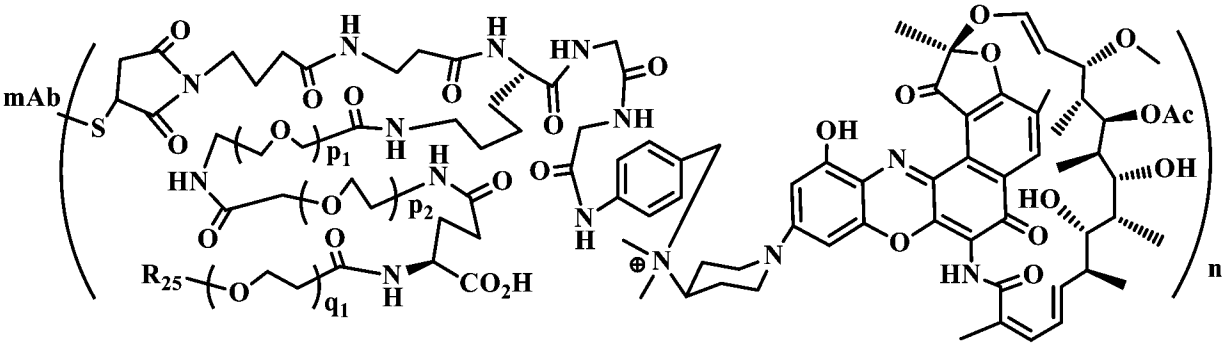
a054，



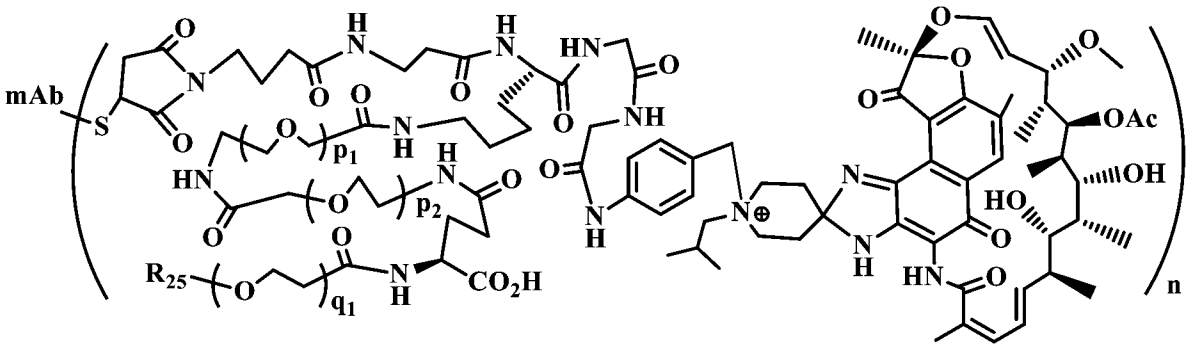
a055，



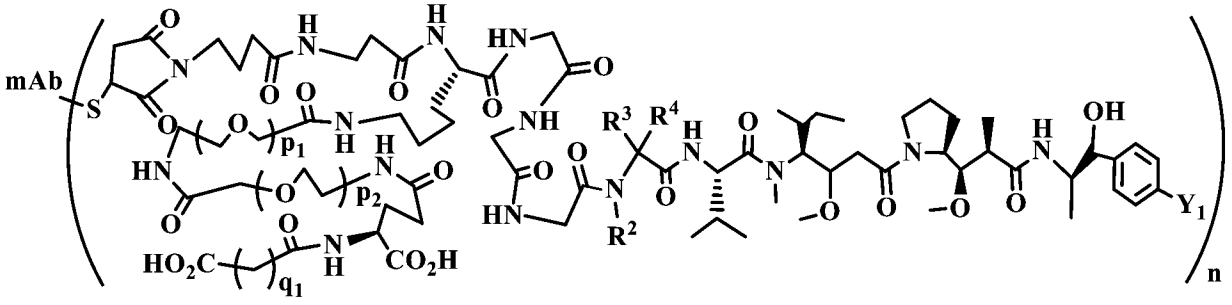
a056，



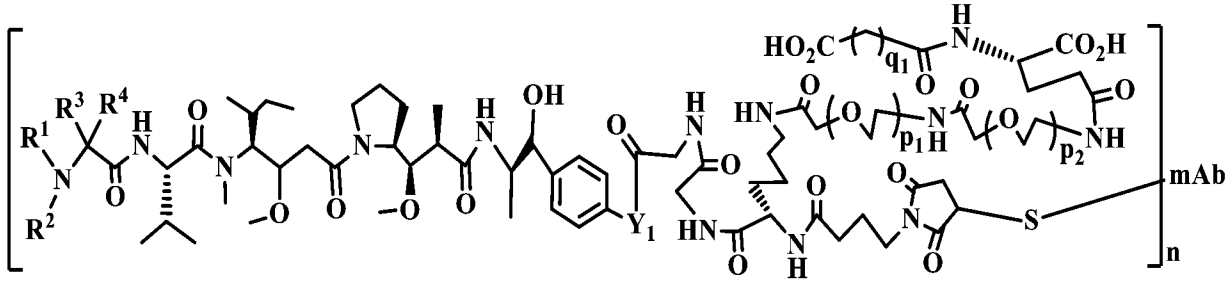
a057，



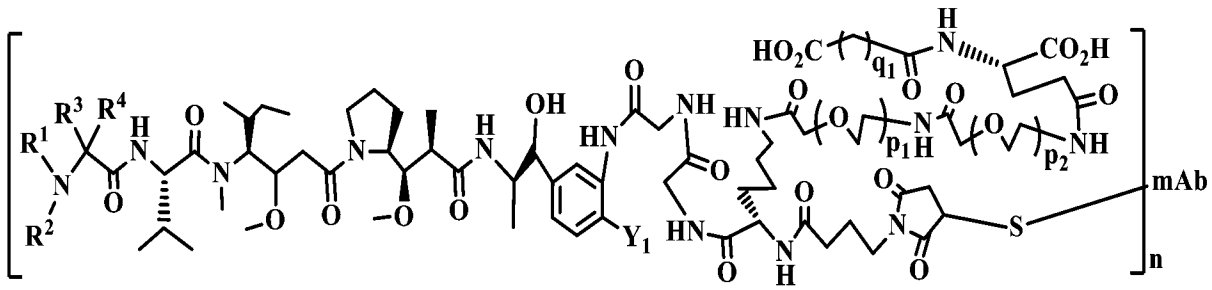
a058，



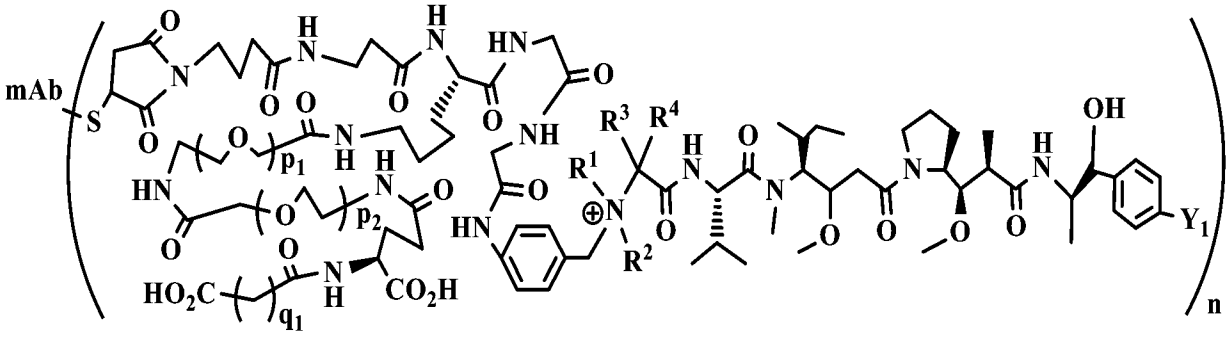
a059，



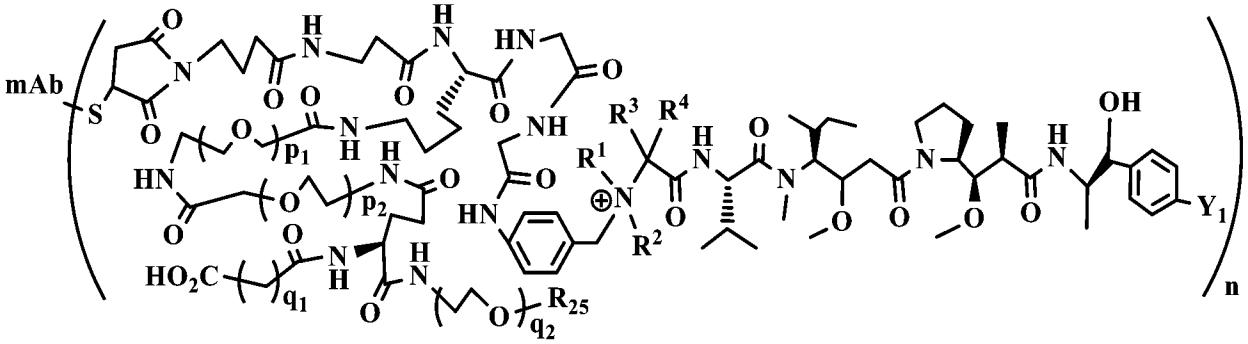
a060，



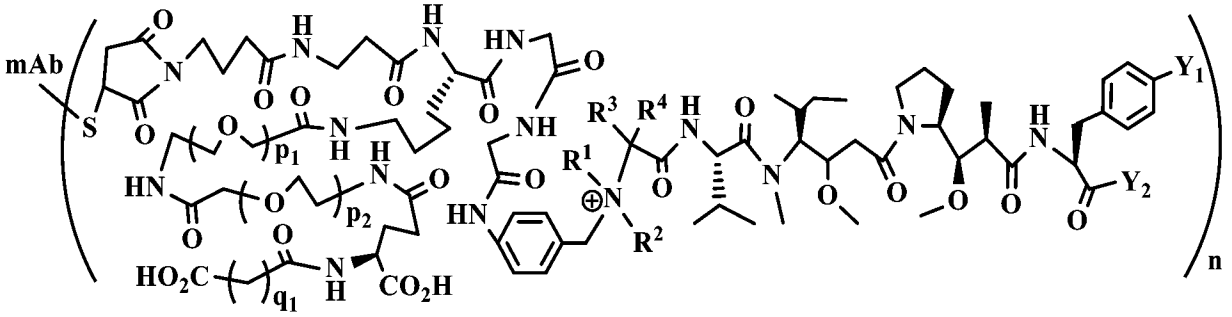
a061，



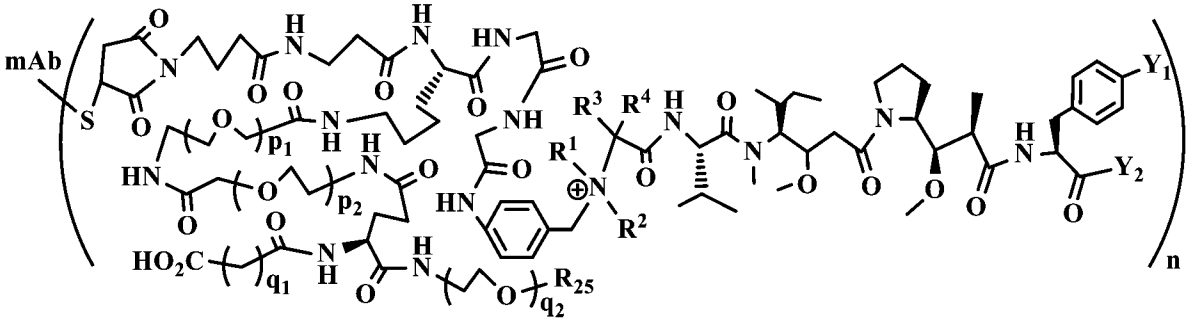
a062，



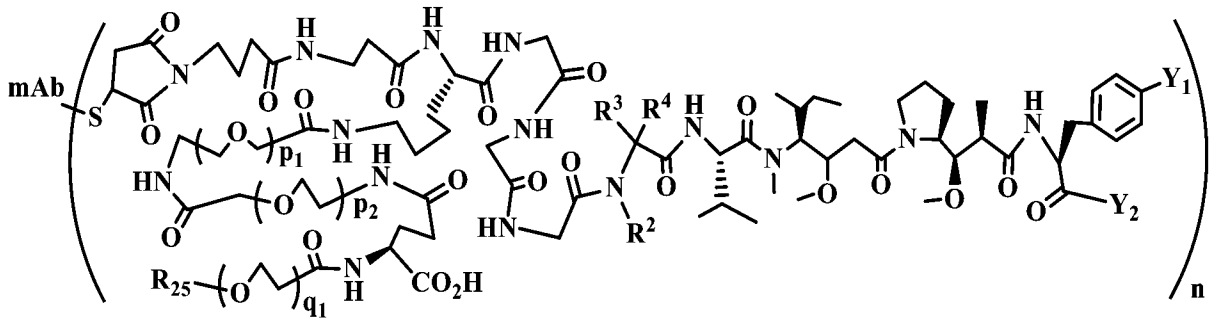
a063，



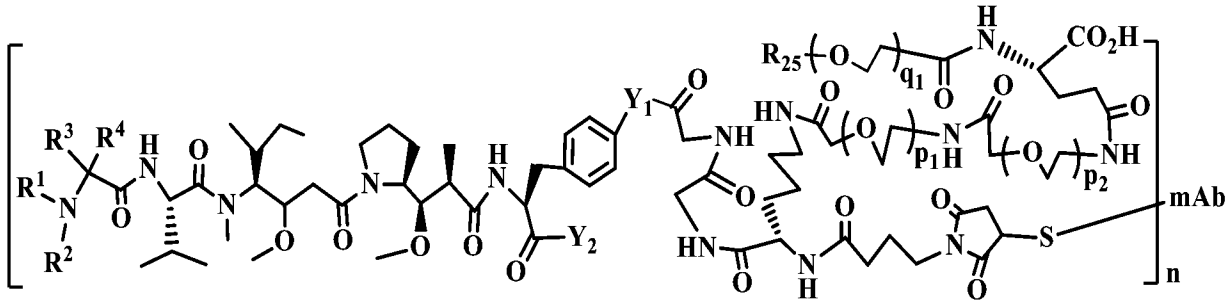
a064，



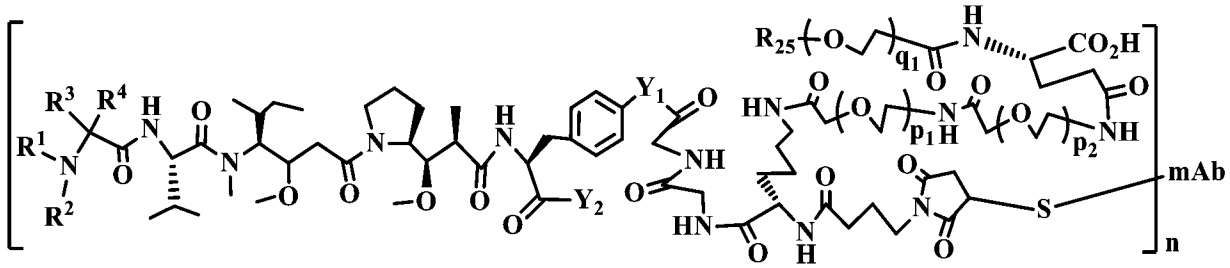
a065，



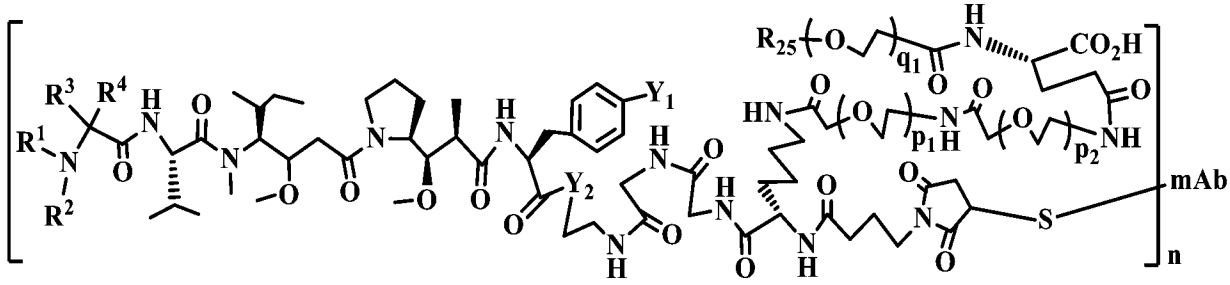
a066，



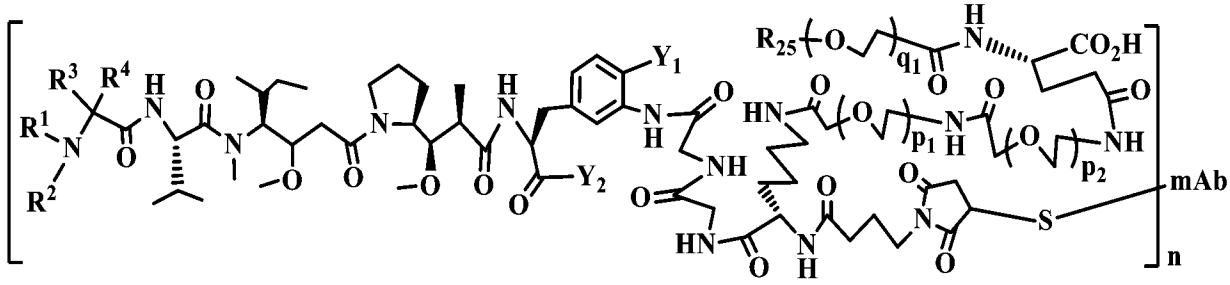
a067，



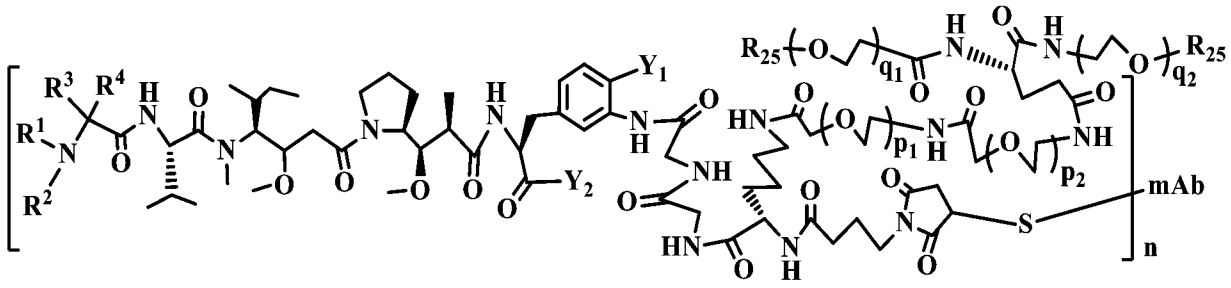
a068，



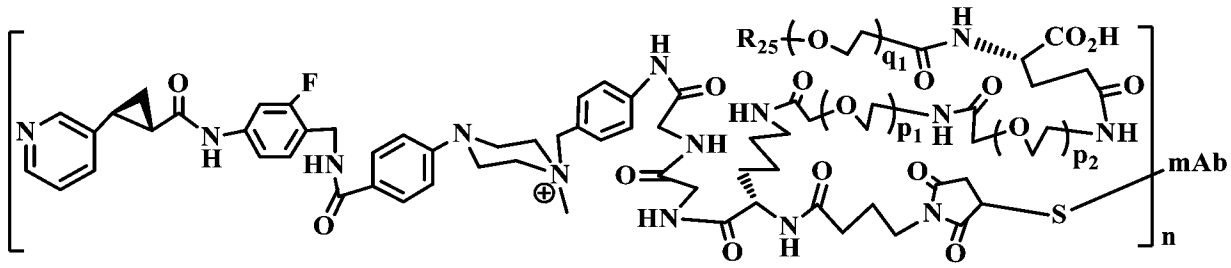
a069，



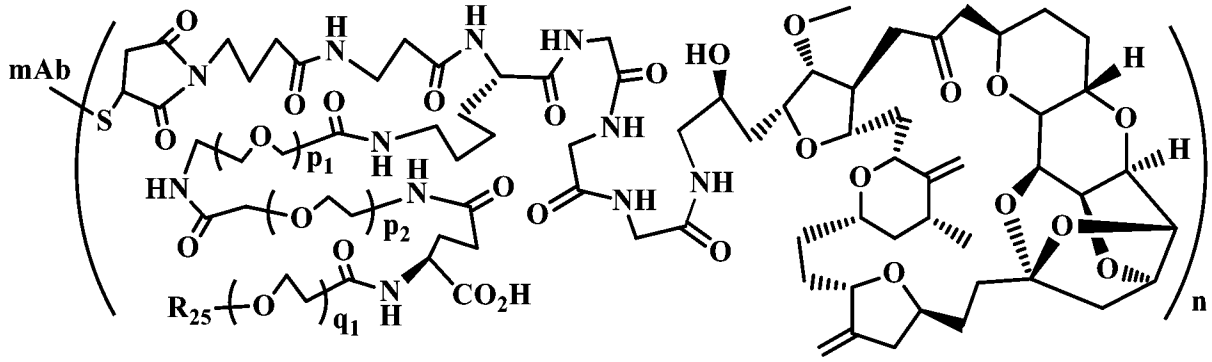
a070，



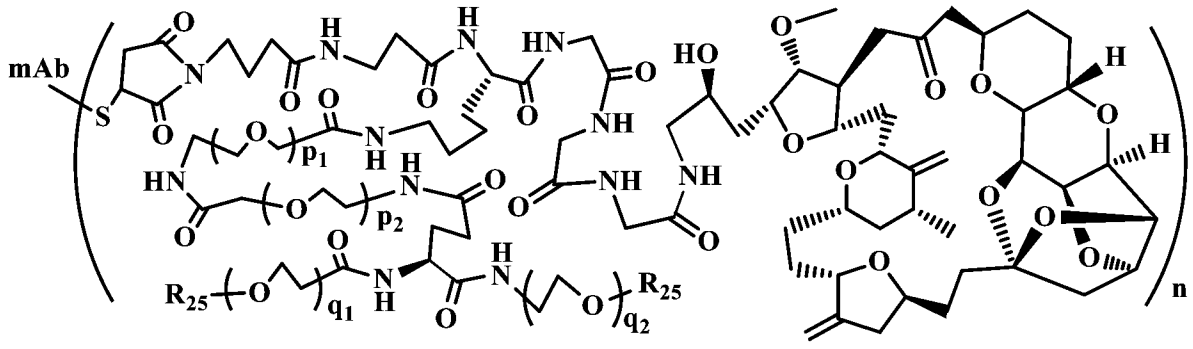
a071，



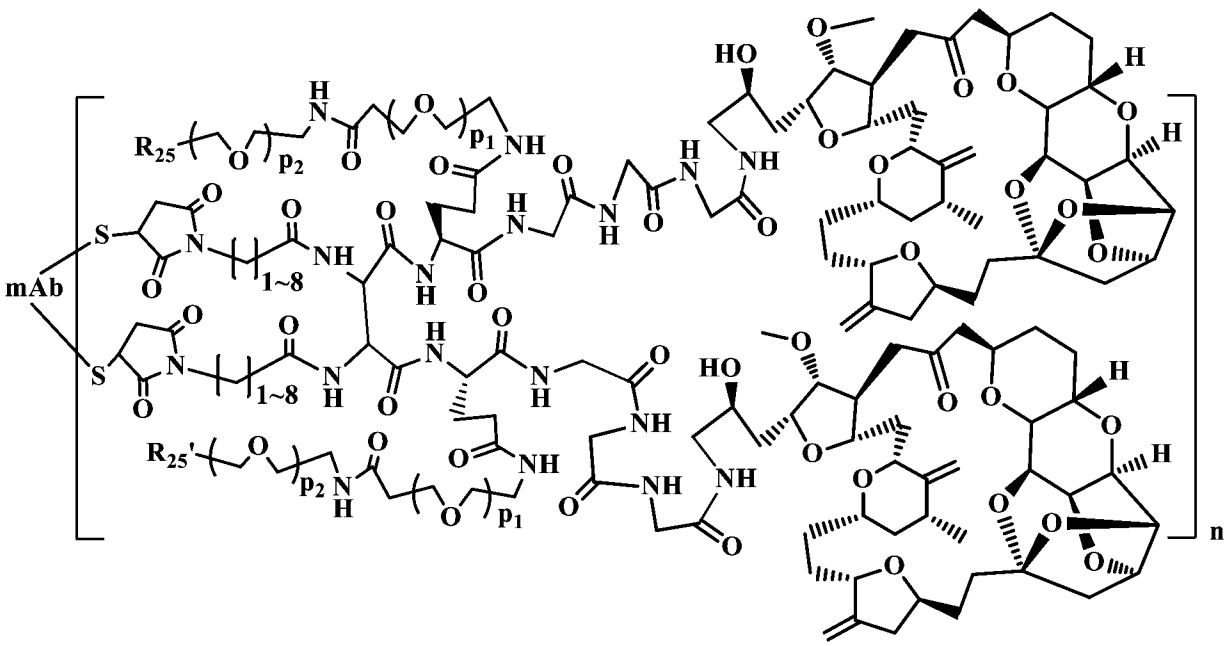
a072，



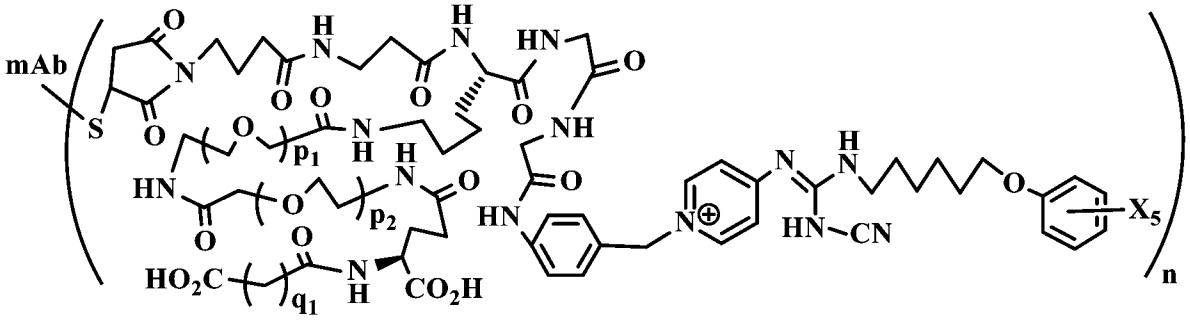
a073，



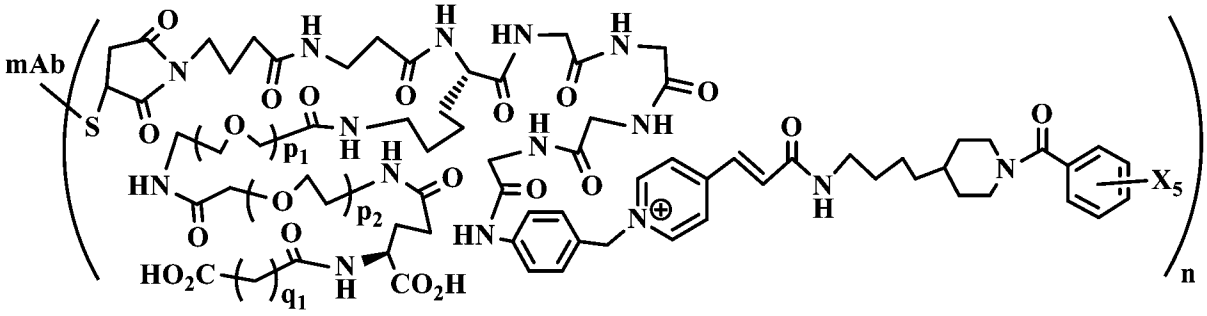
a074，



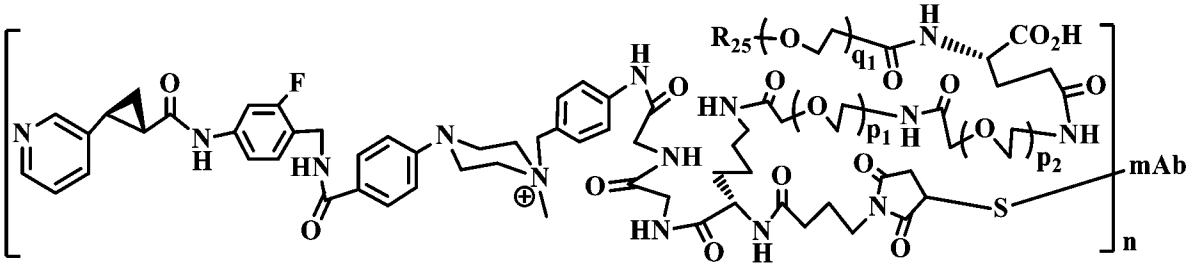
a075，



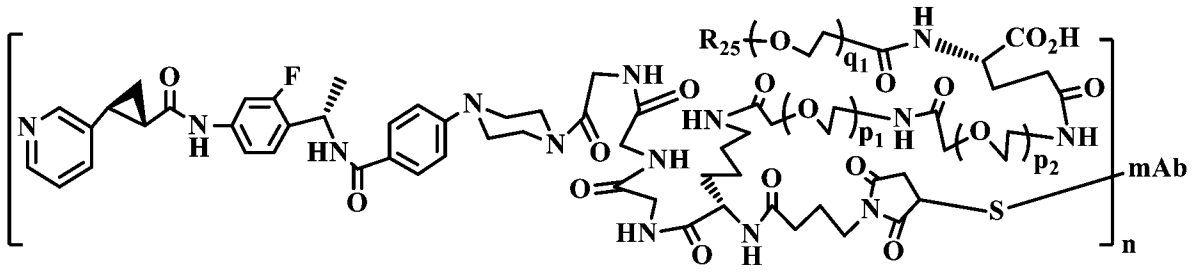
a076，



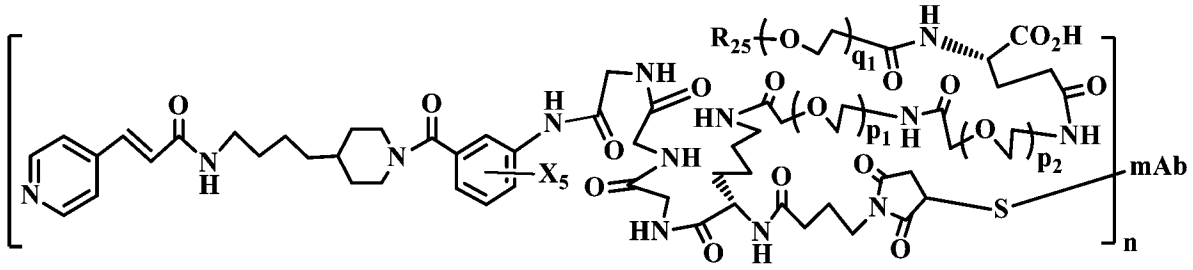
a077，



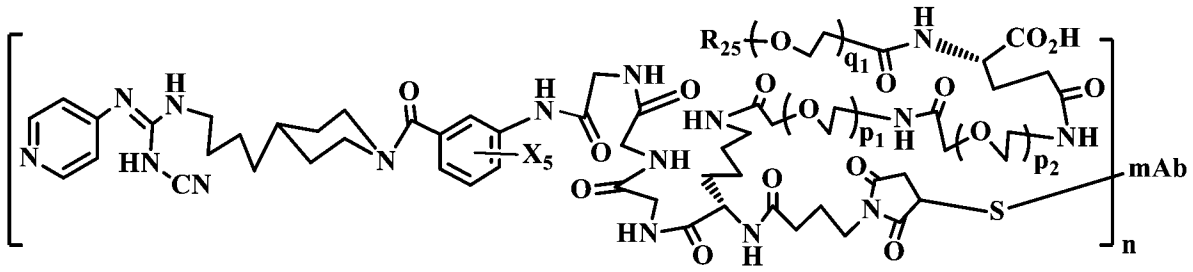
a078，



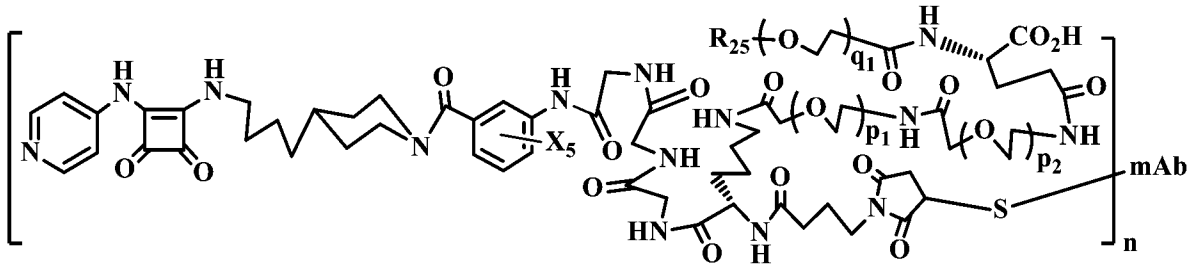
a079，



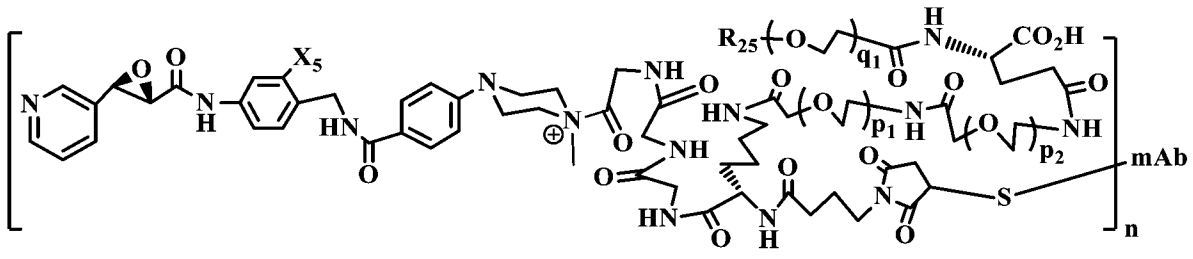
a080，



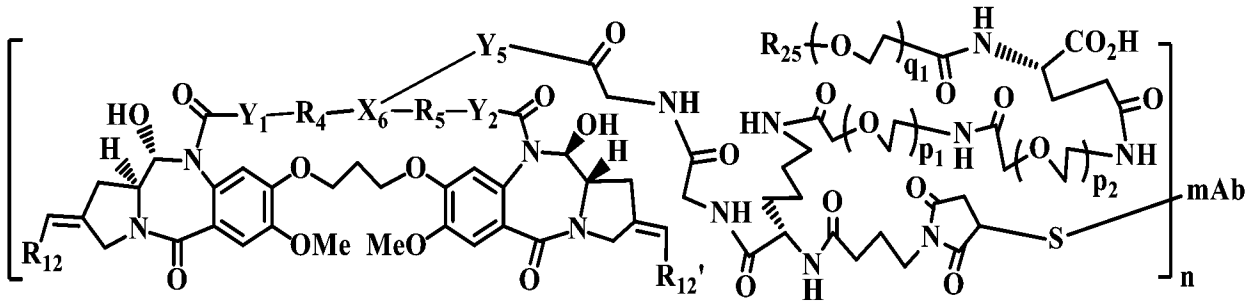
a081，



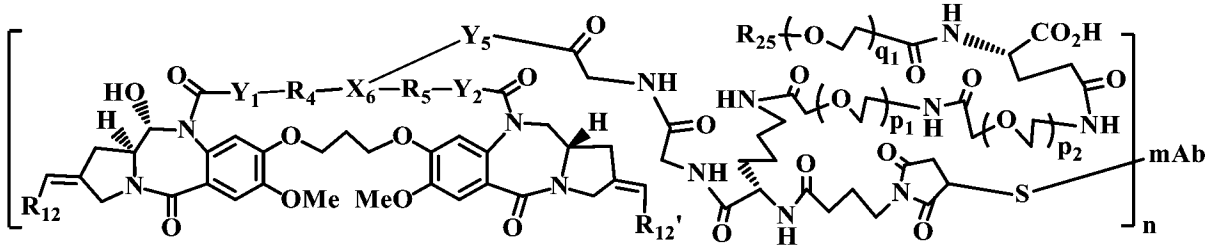
a082，



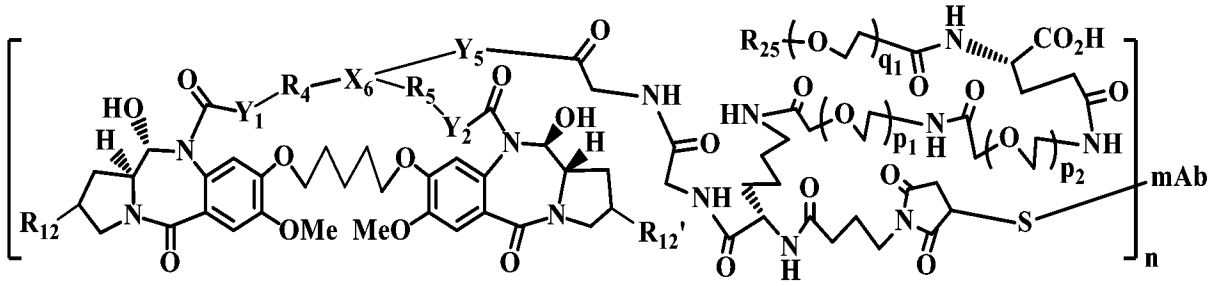
a083，



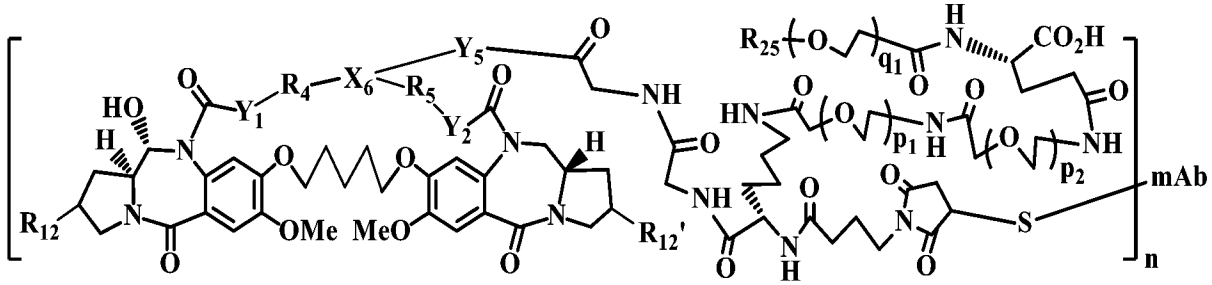
a084，



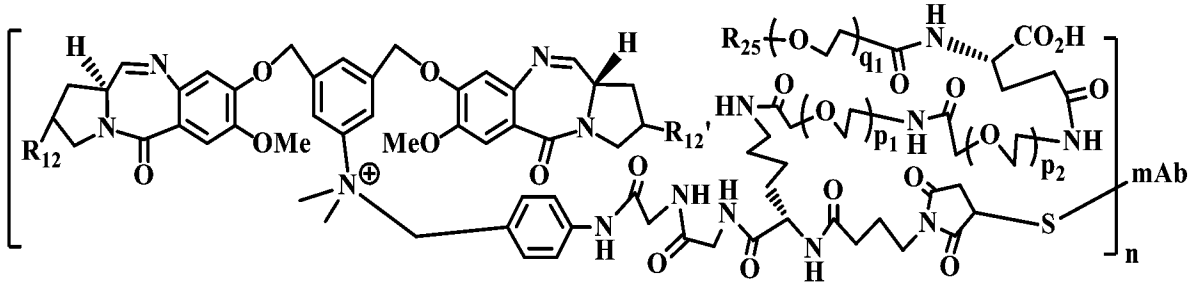
a085，



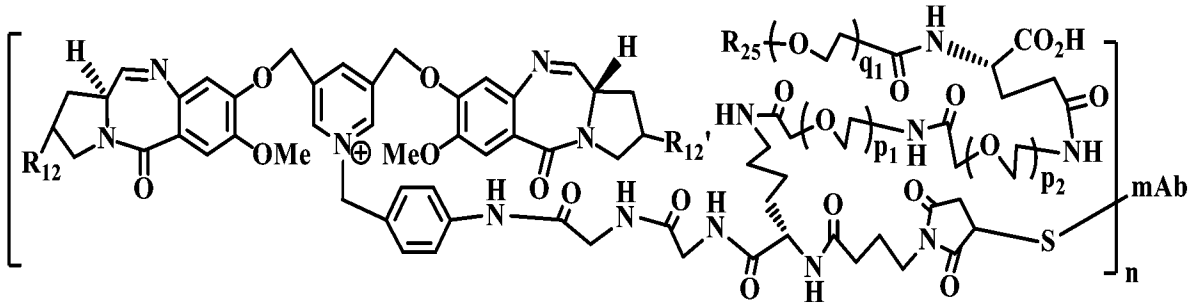
a086，



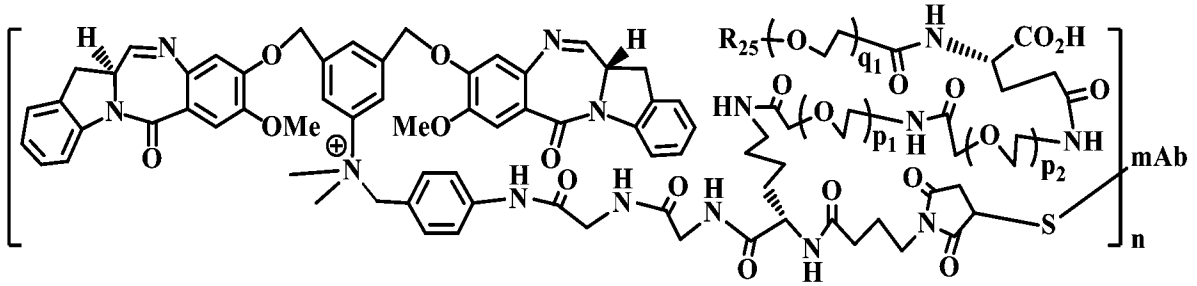
a087，



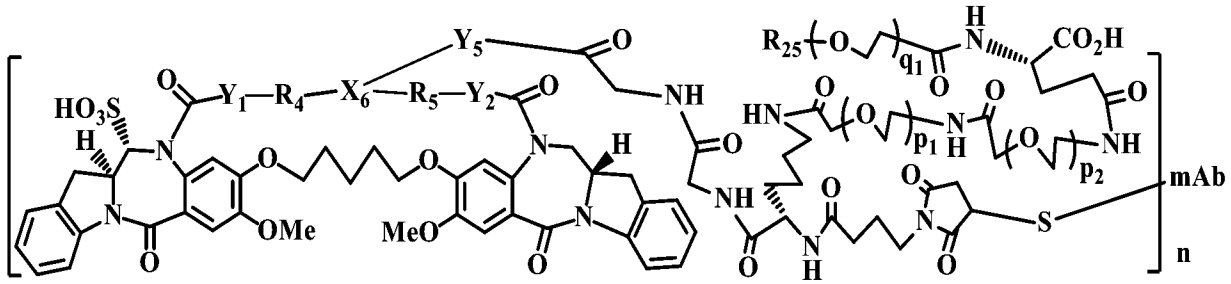
a088，



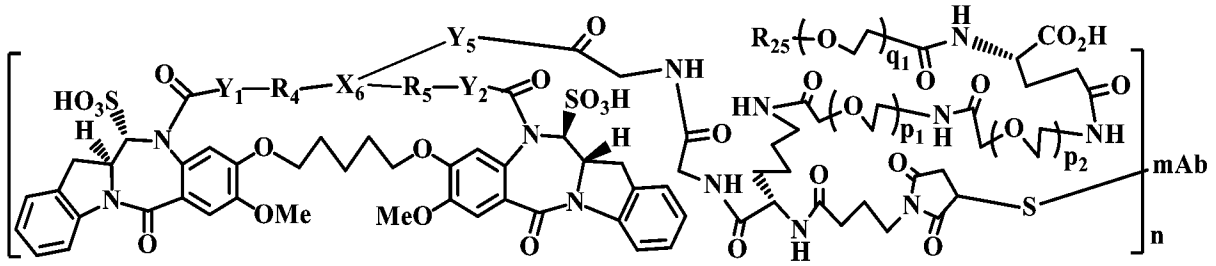
a089，



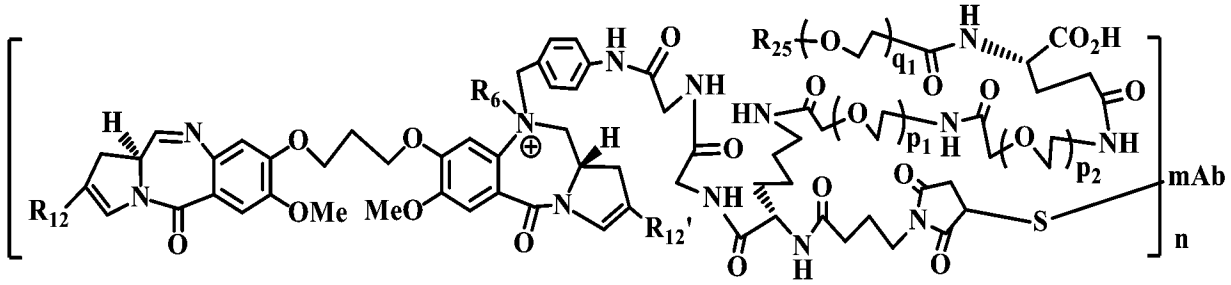
a090，



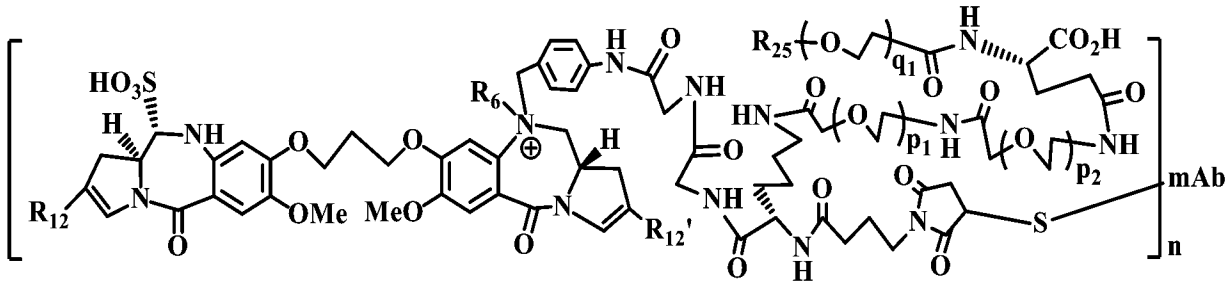
a091，



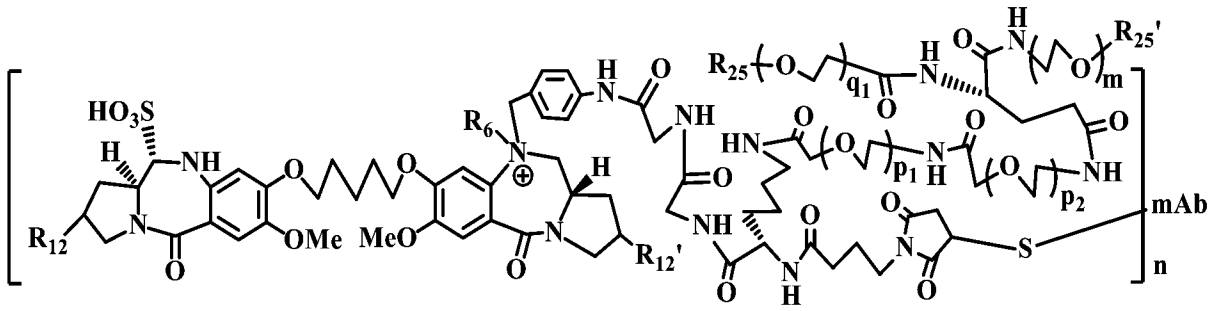
a092，



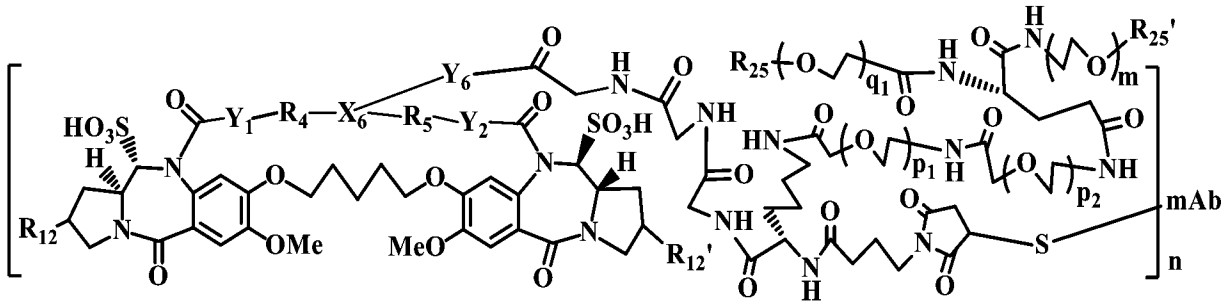
a093，



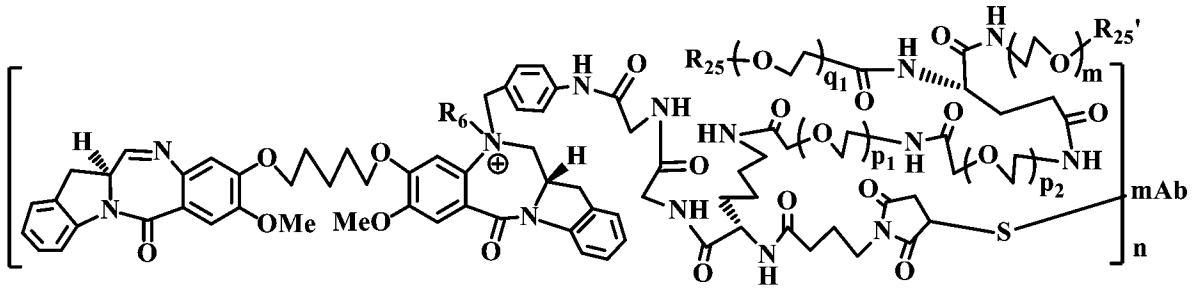
a094，



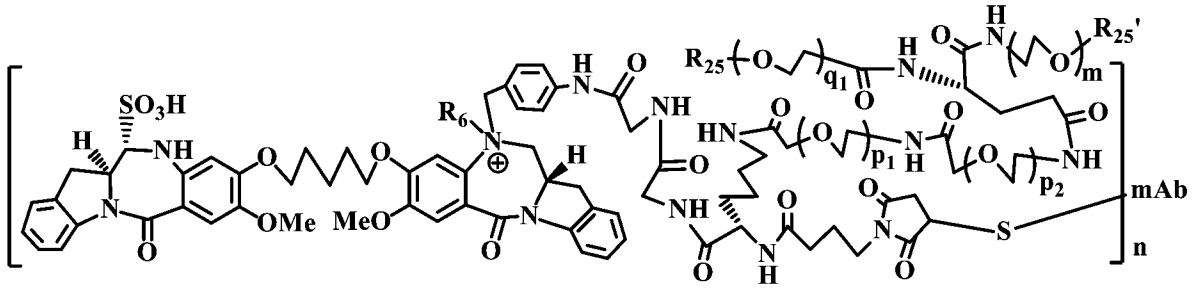
a095，



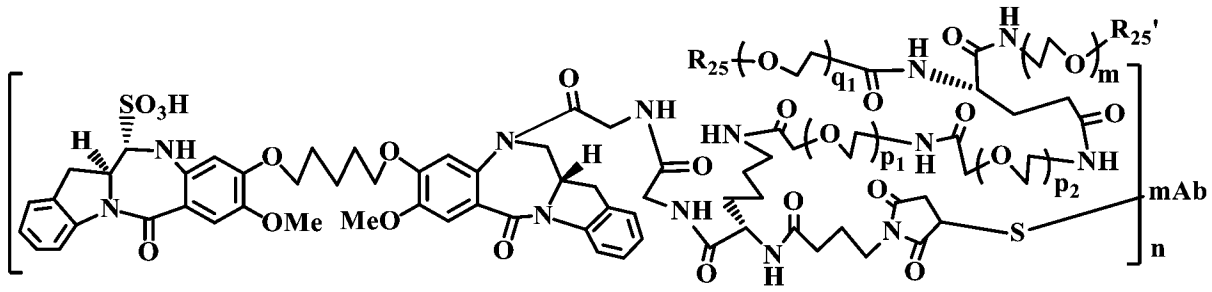
a096，



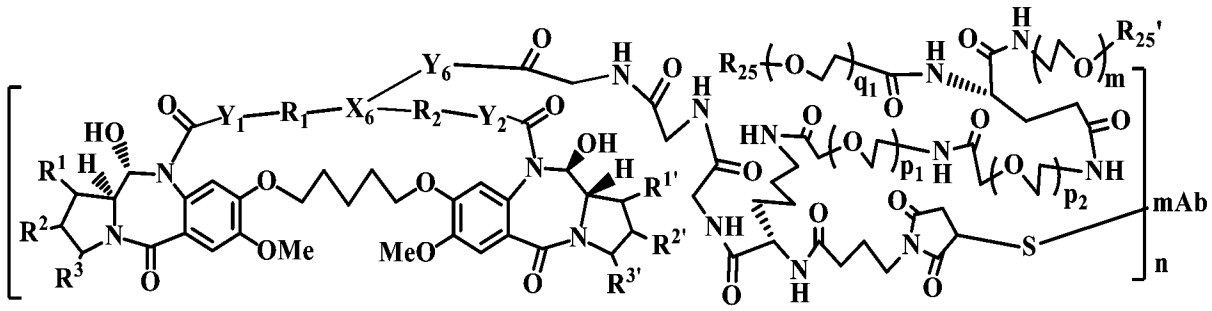
a097，



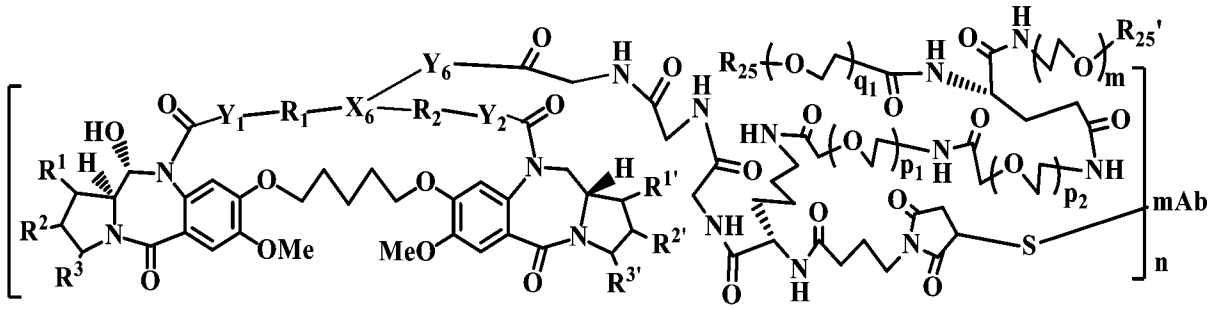
a098，



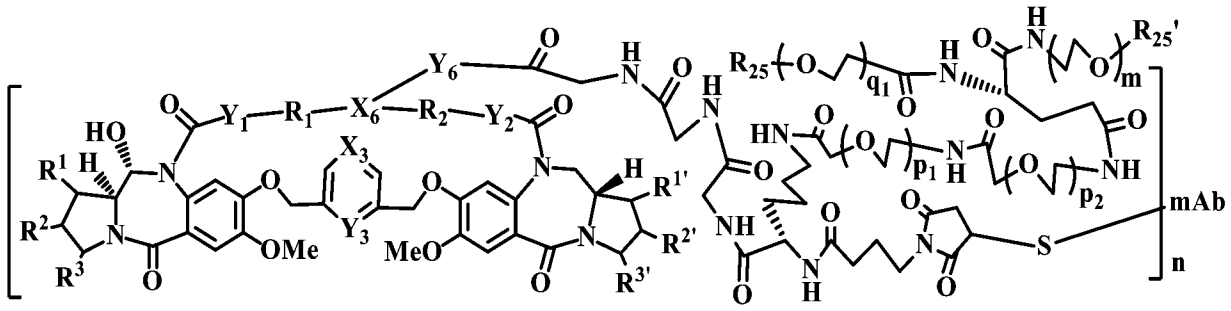
a099，



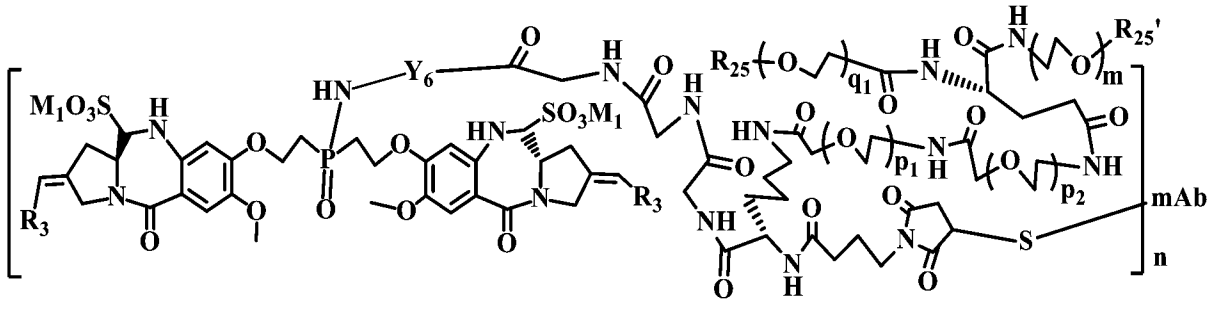
a100，



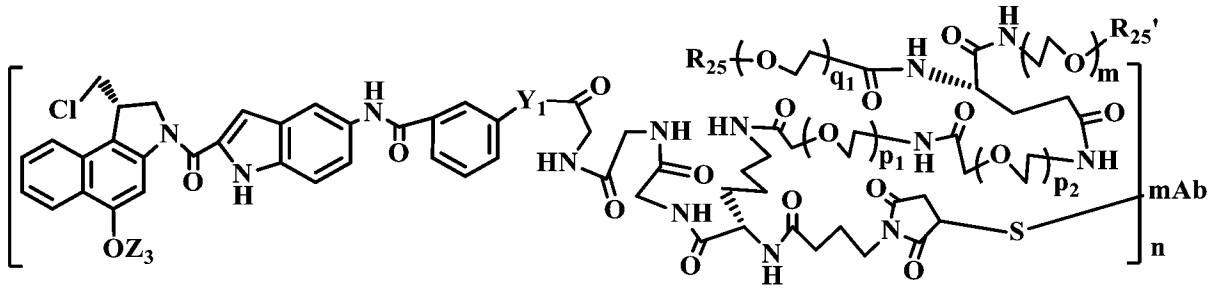
a101，



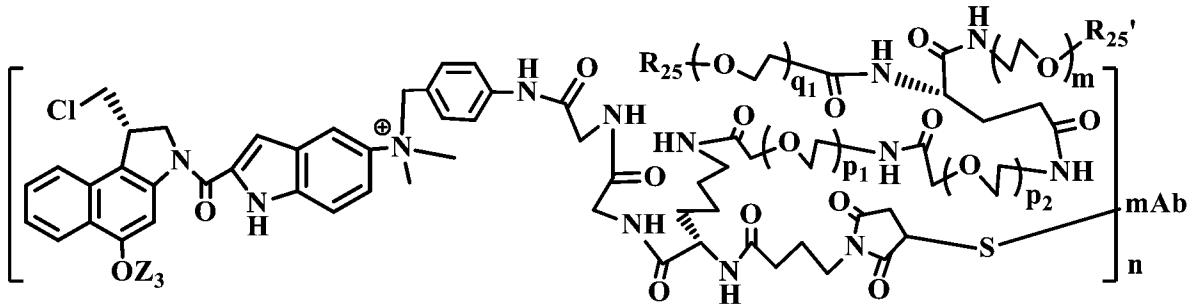
a102，



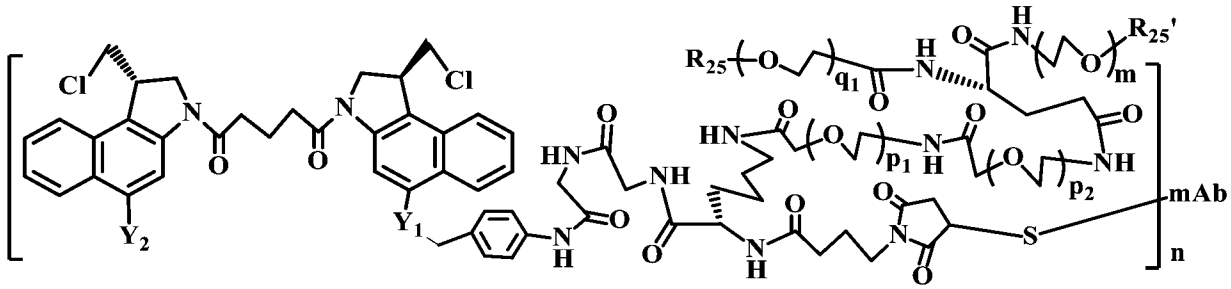
a103，



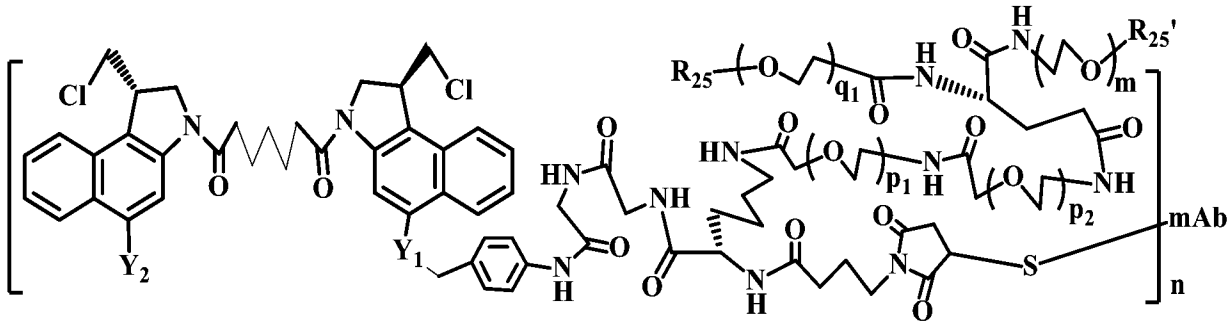
a104，



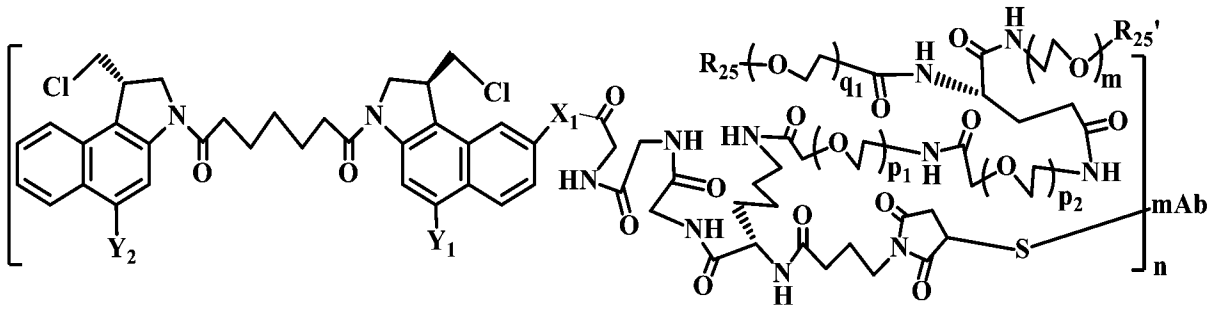
a105，



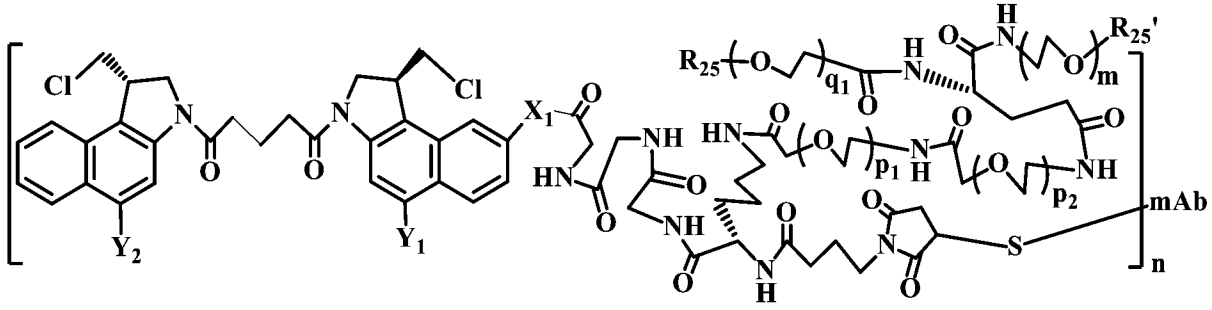
a106，



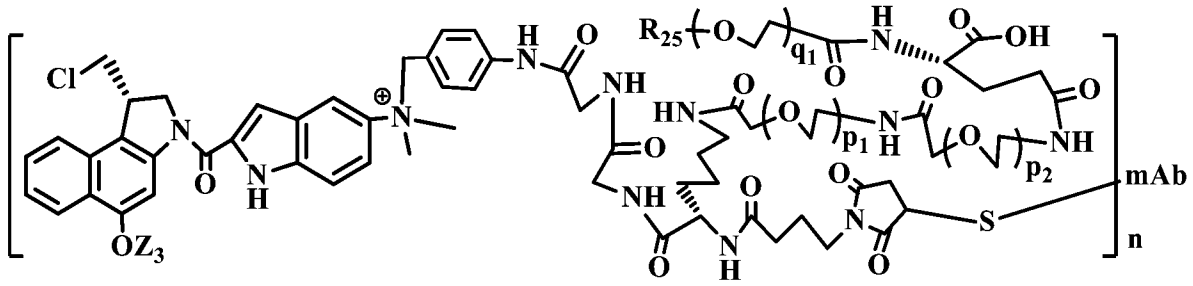
a107，



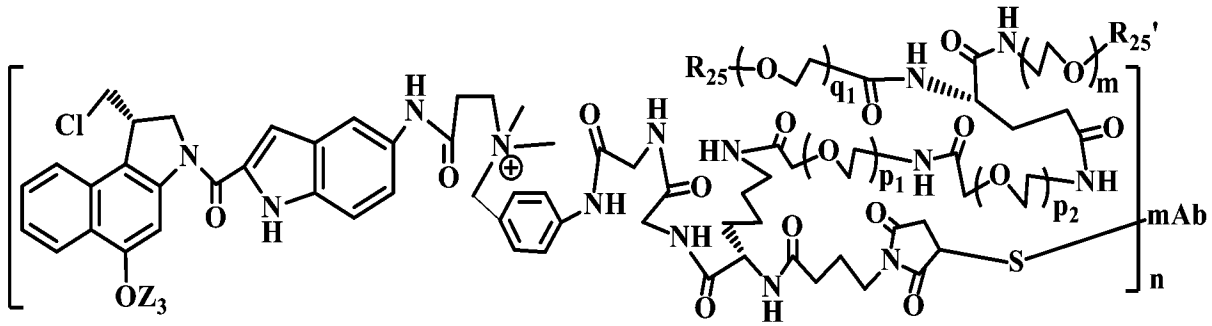
a108，



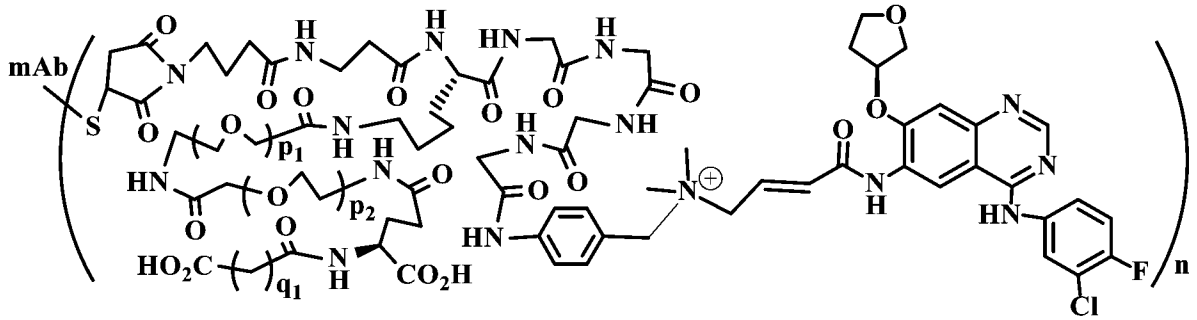
a109，



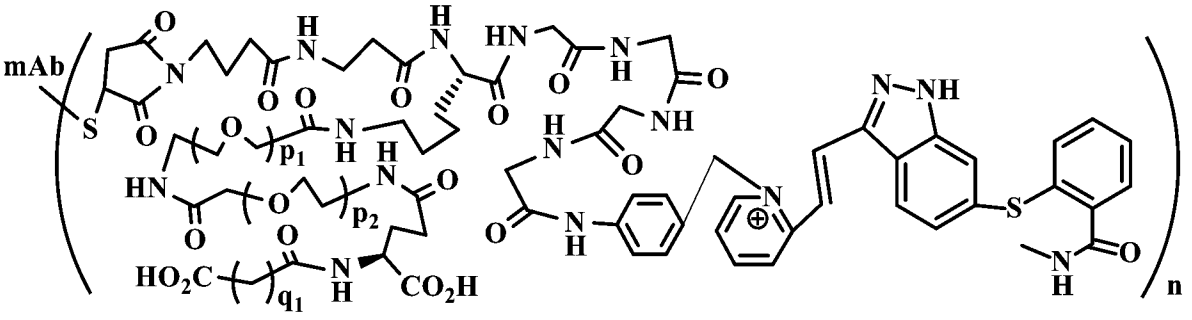
a110，



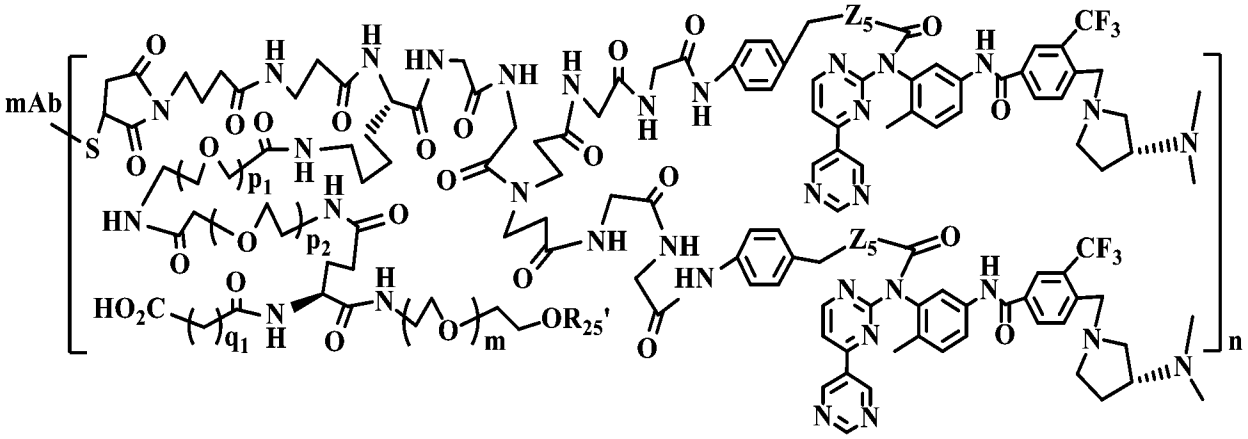
a111，



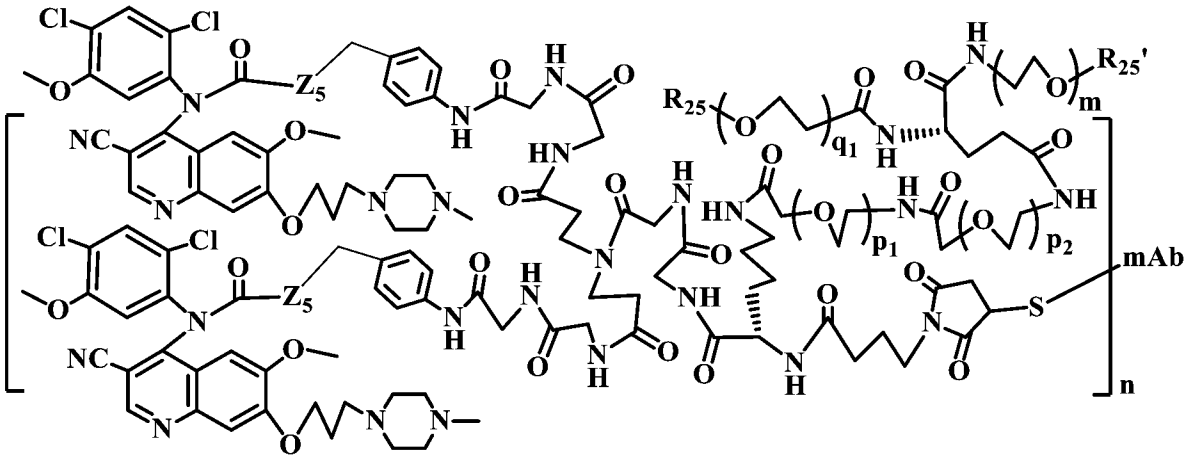
a112，



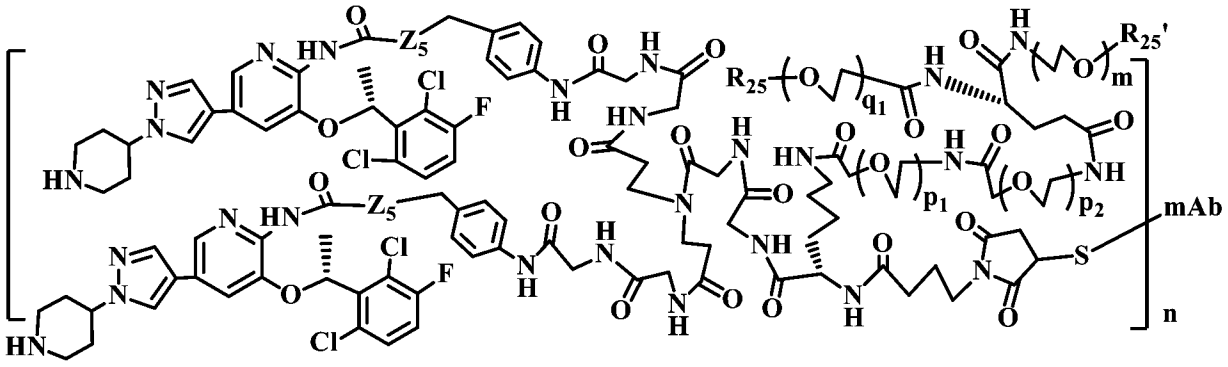
a113，



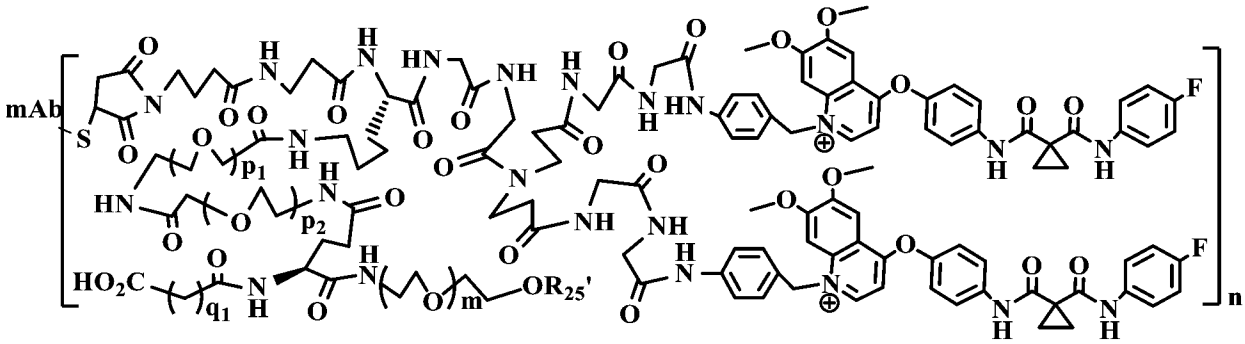
a114，



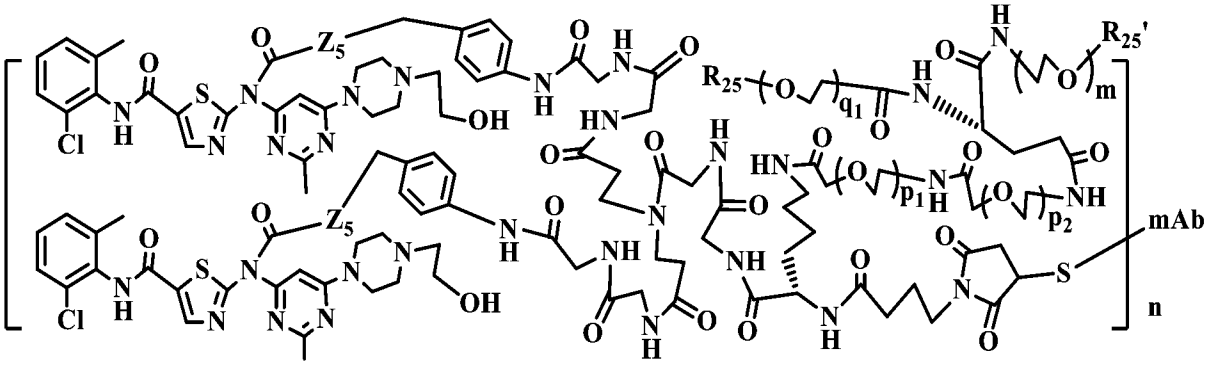
a115，



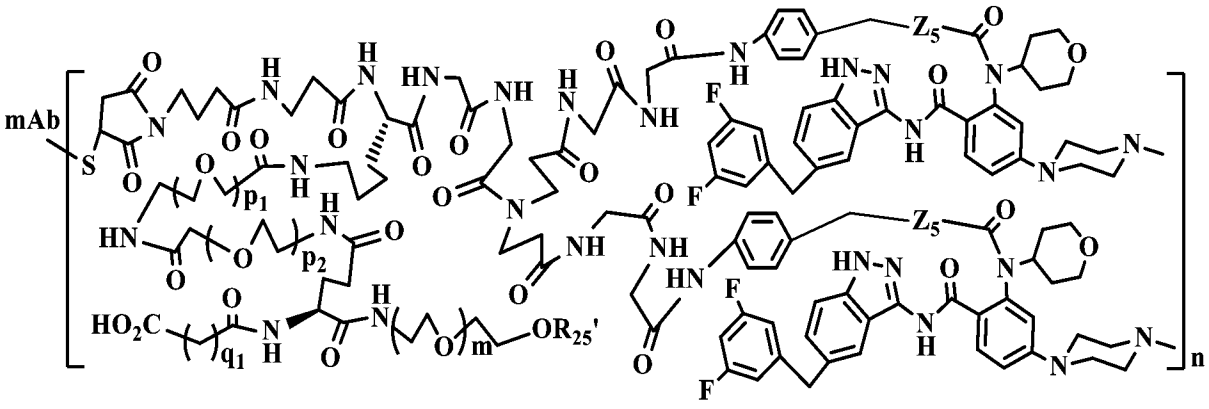
a116，



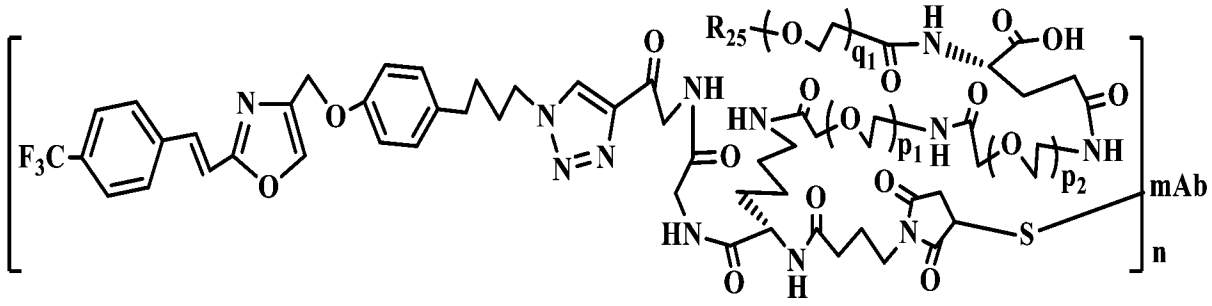
a117，



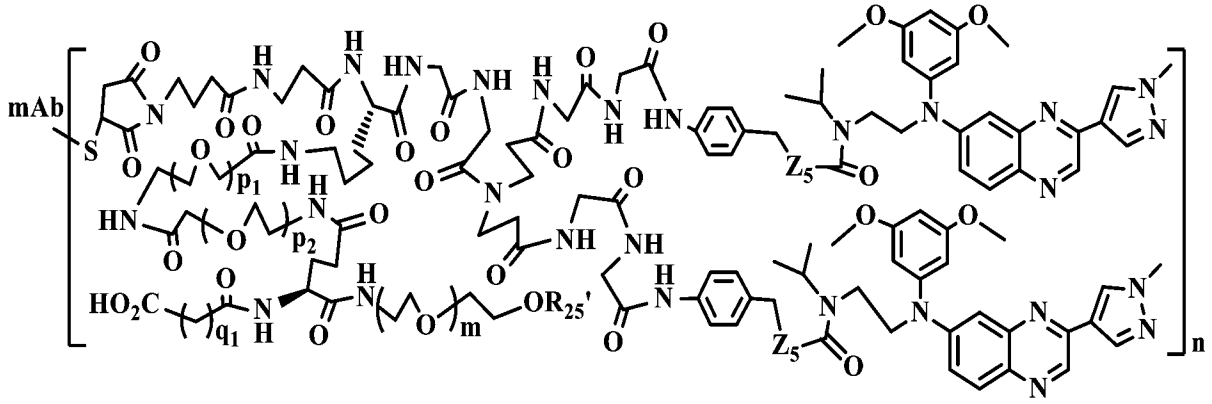
a118，



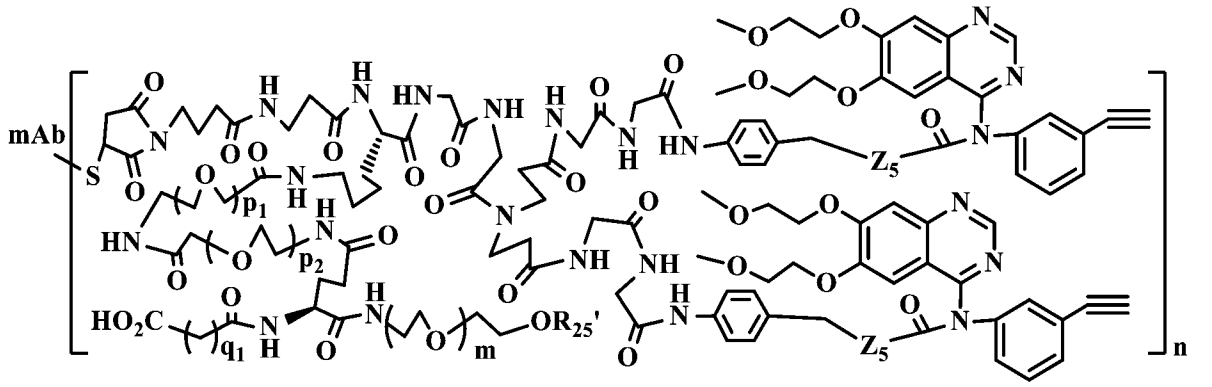
a119，



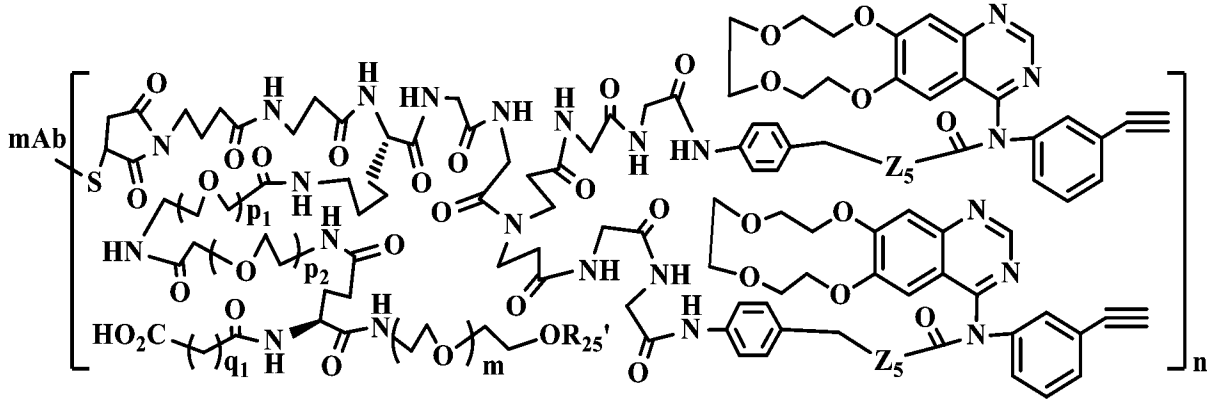
a120，



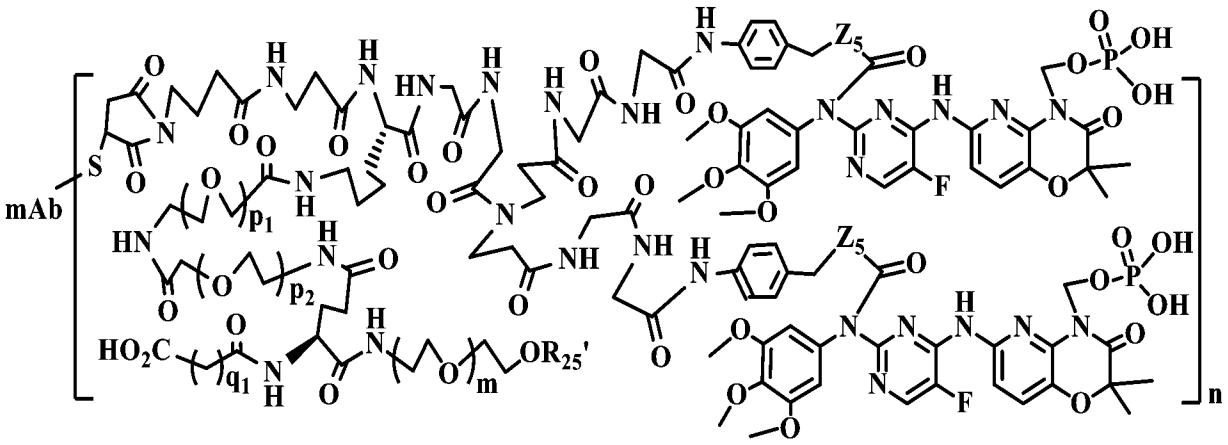
a121，



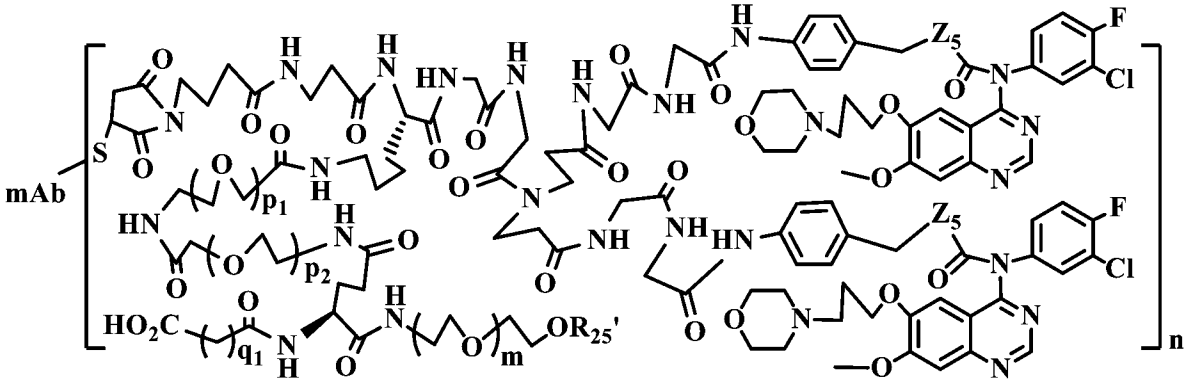
a122，



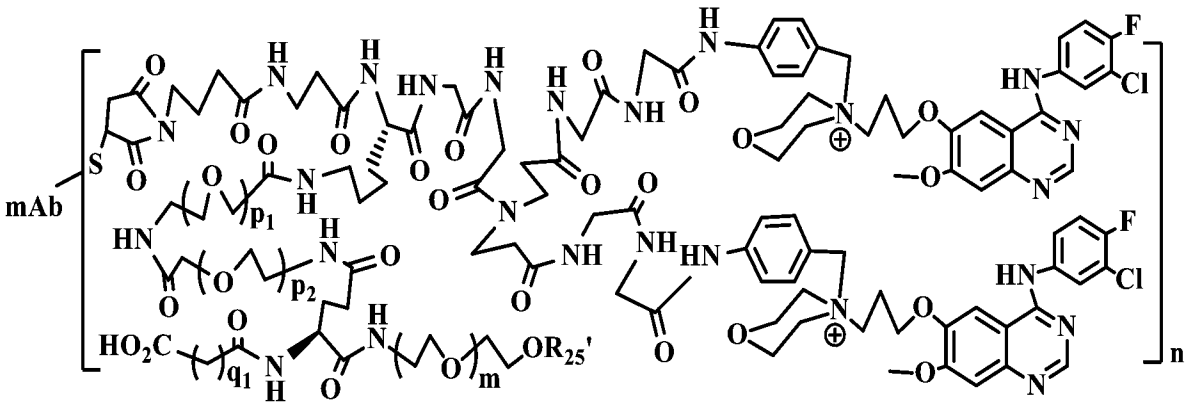
a123，



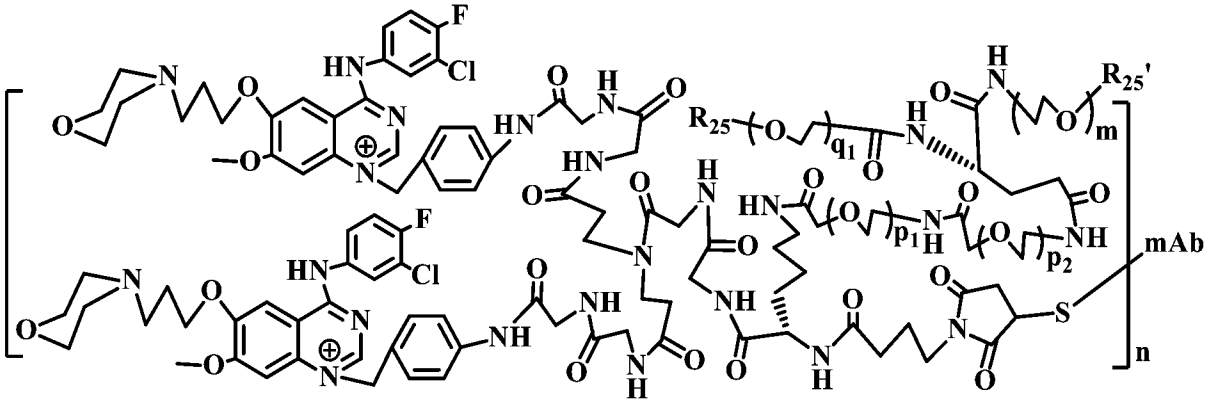
a124，



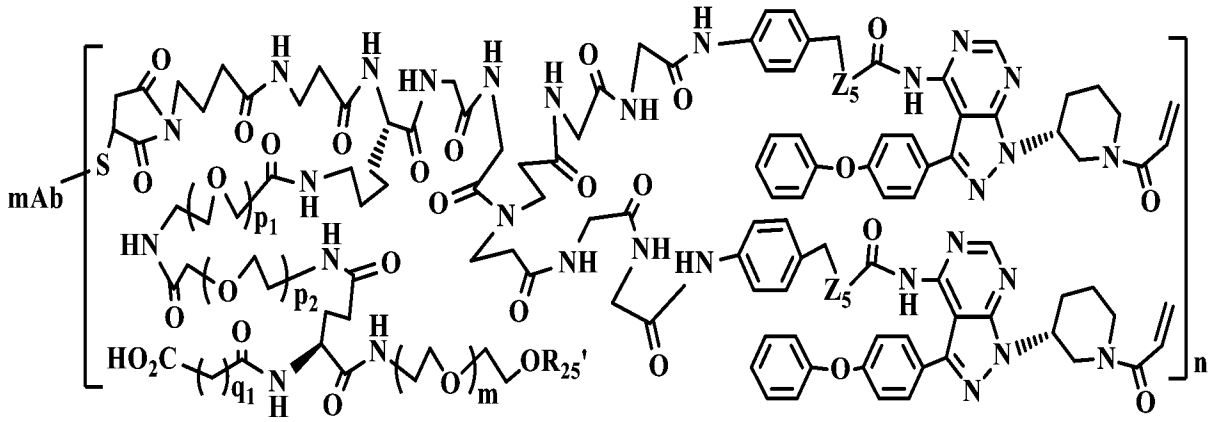
a125，



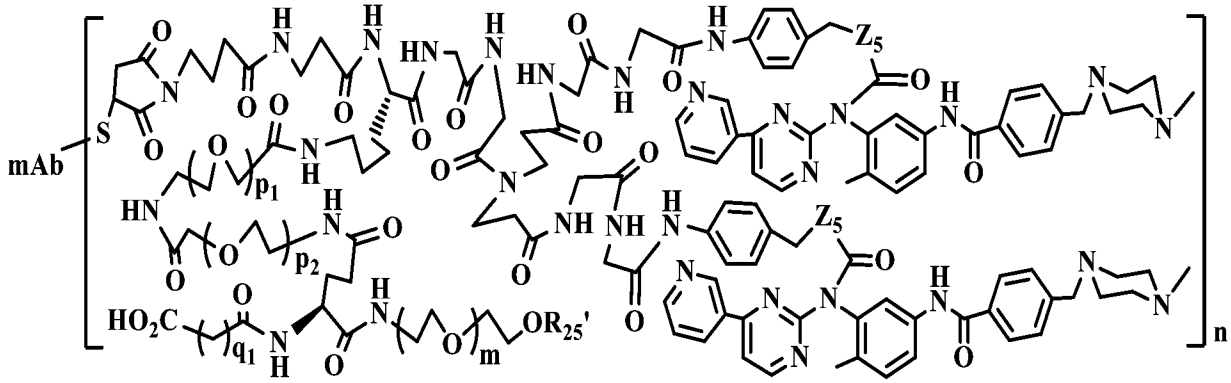
a126，



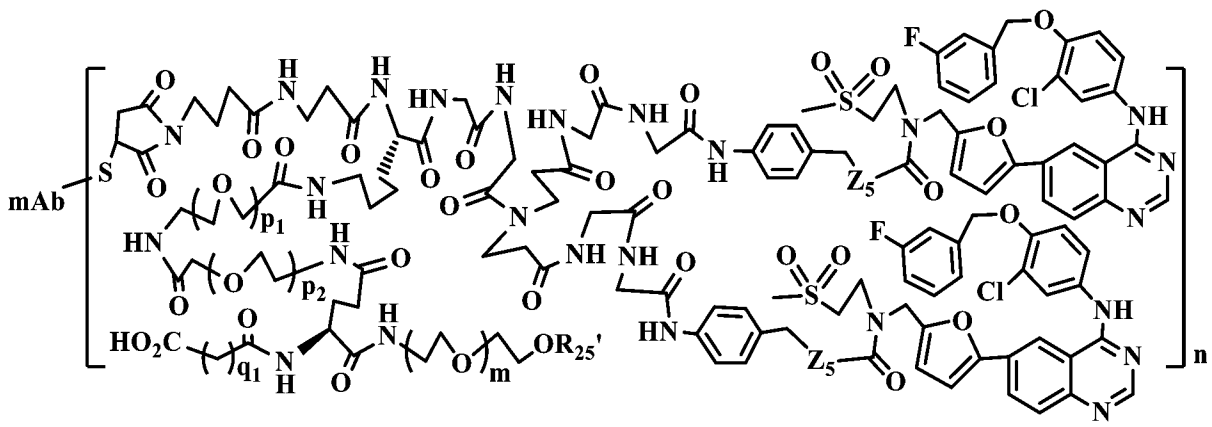
a127，



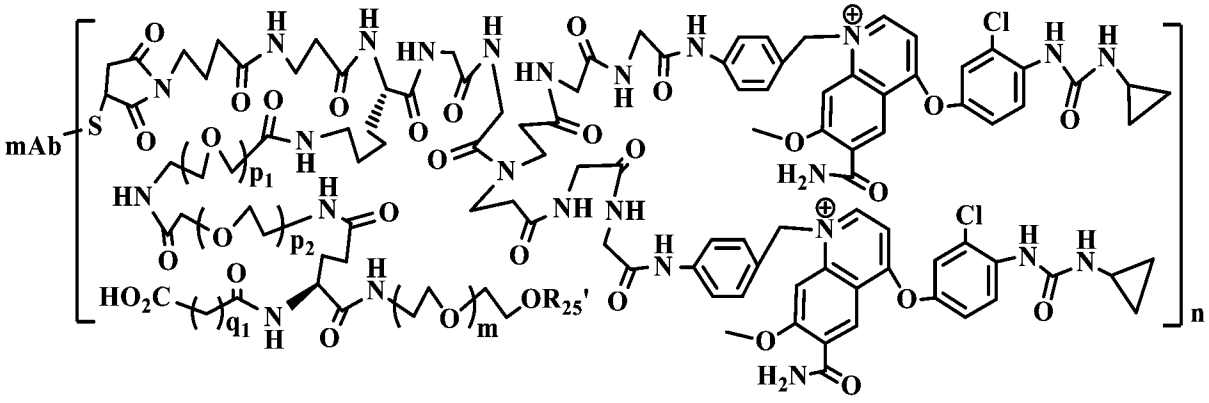
a128，



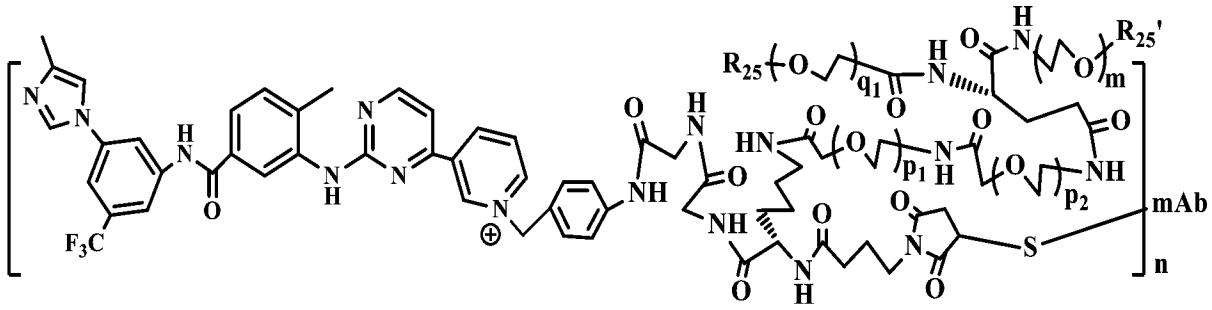
a129，



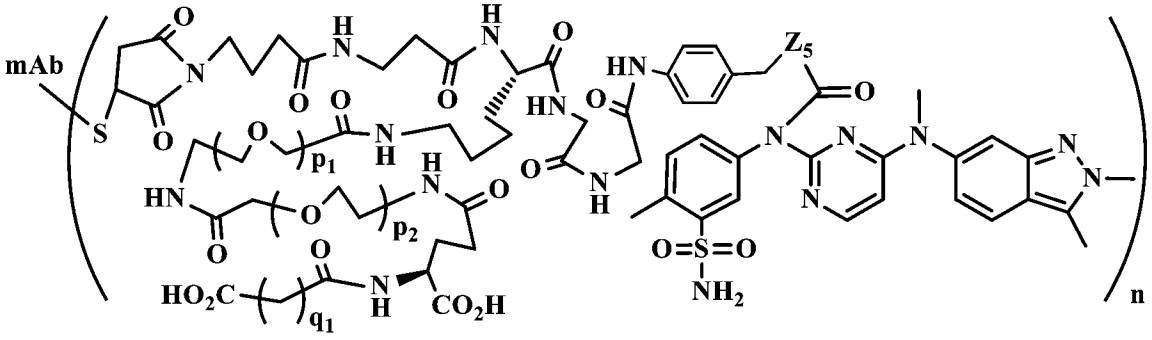
a130，



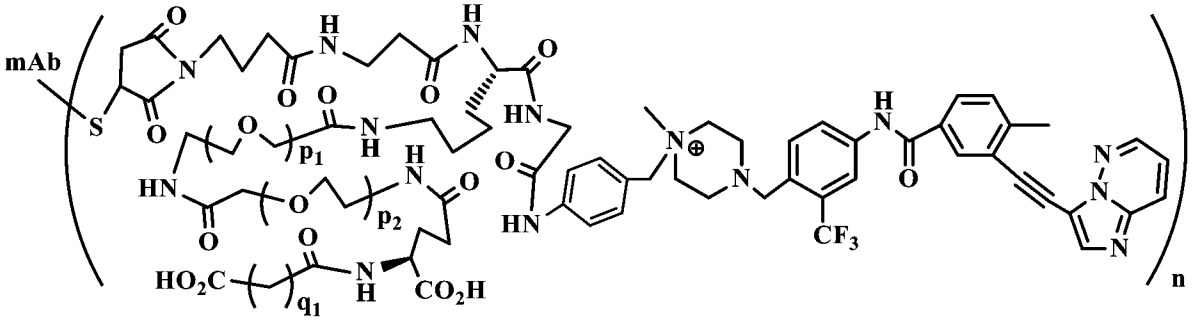
a131，



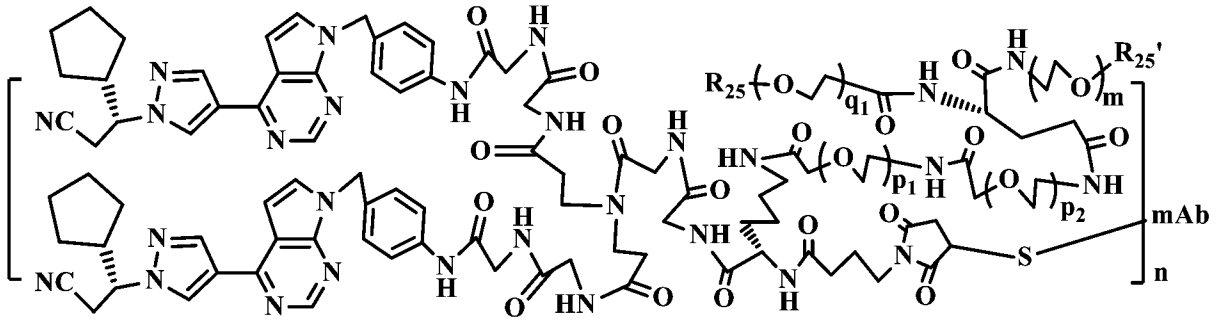
a132，



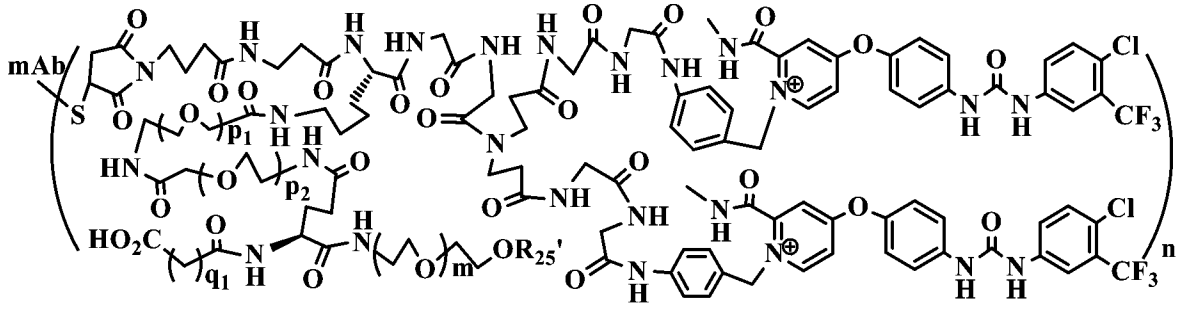
a133，



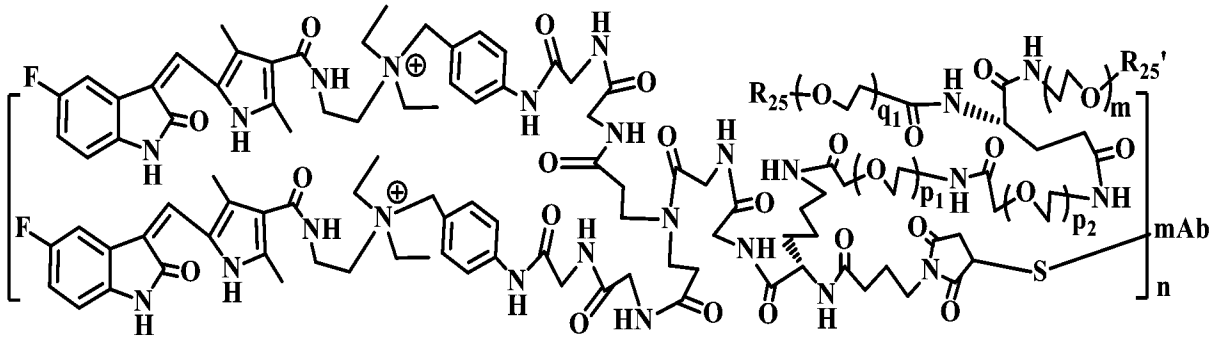
a134，



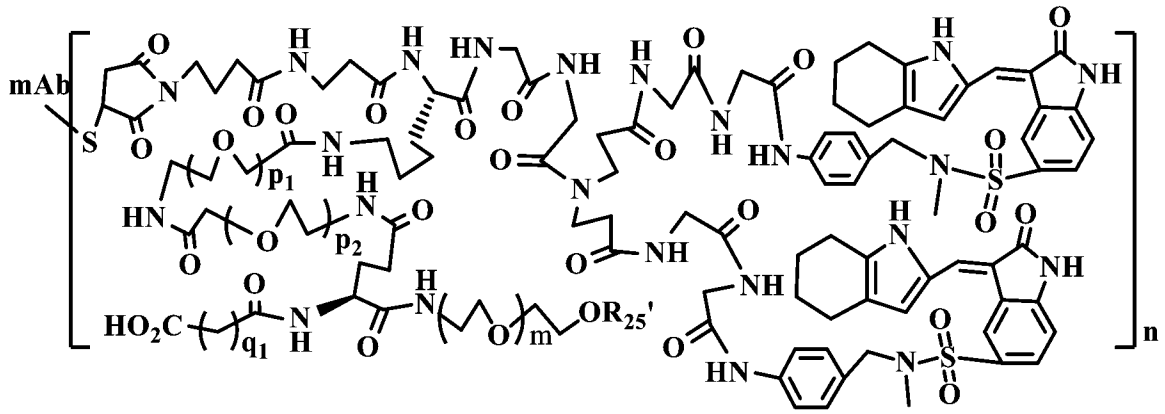
a135，



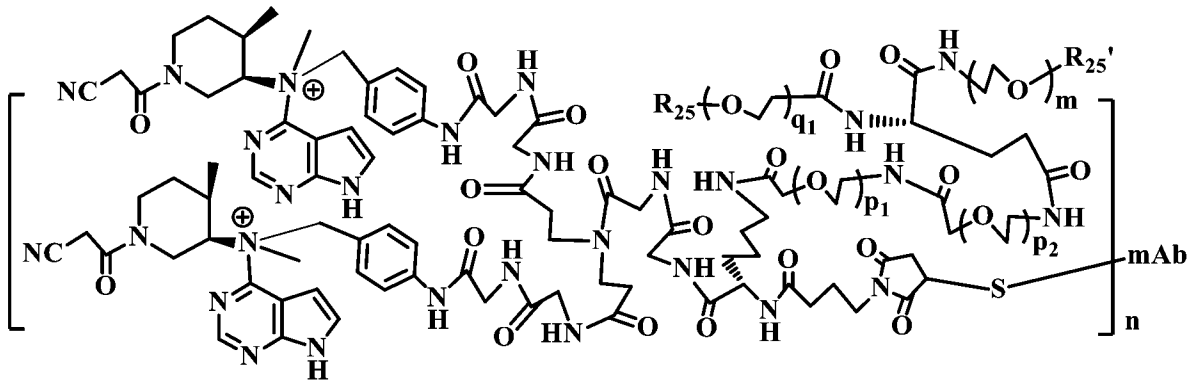
a136，



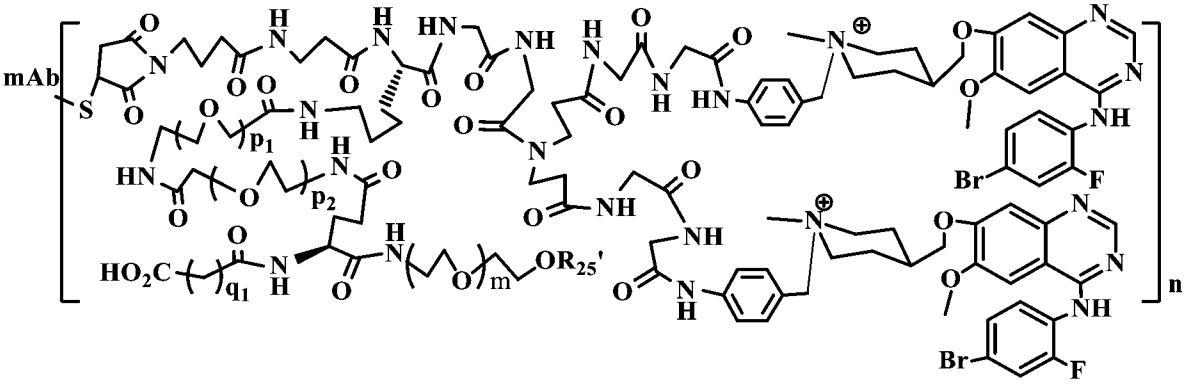
a137，



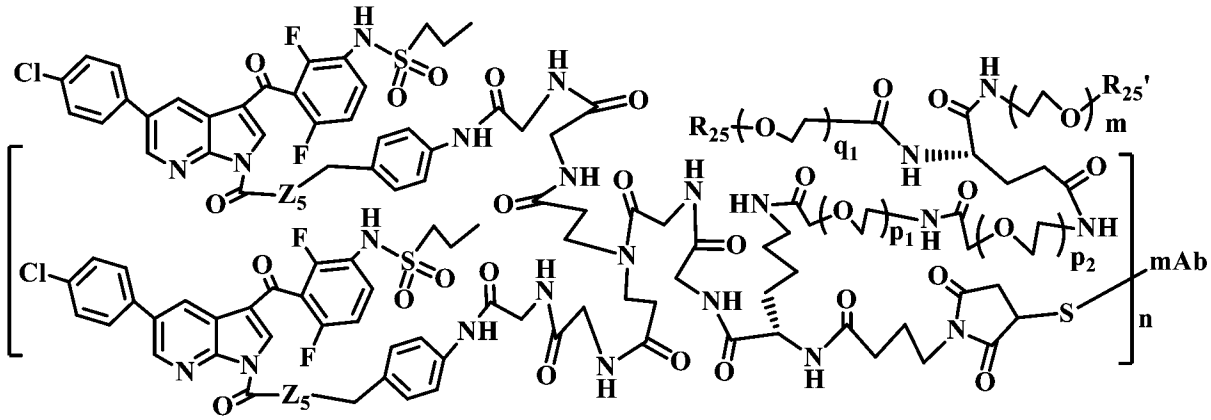
a138，



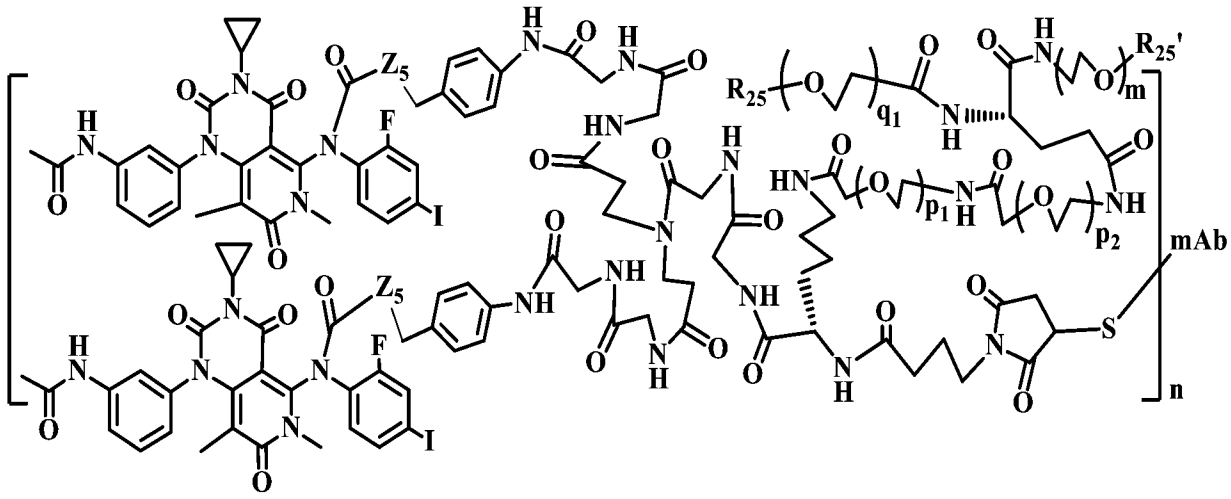
a139，



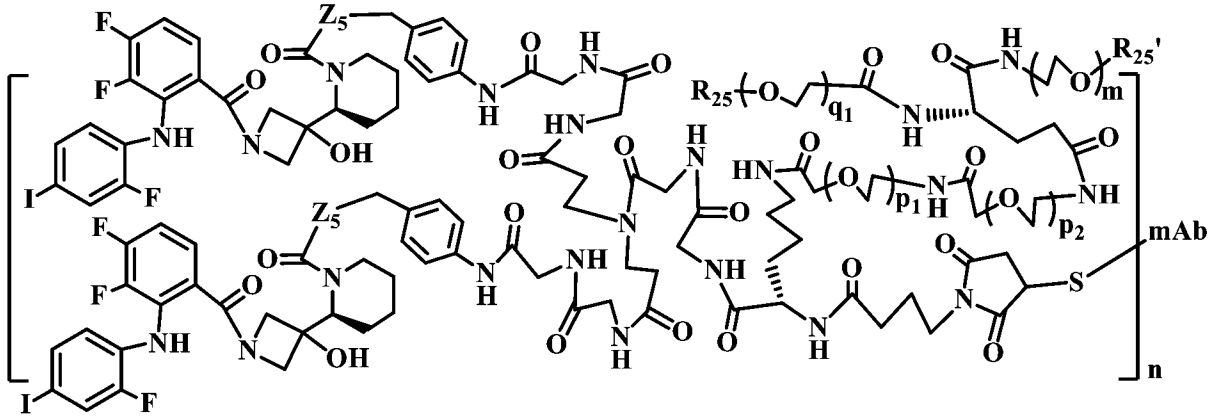
a140，



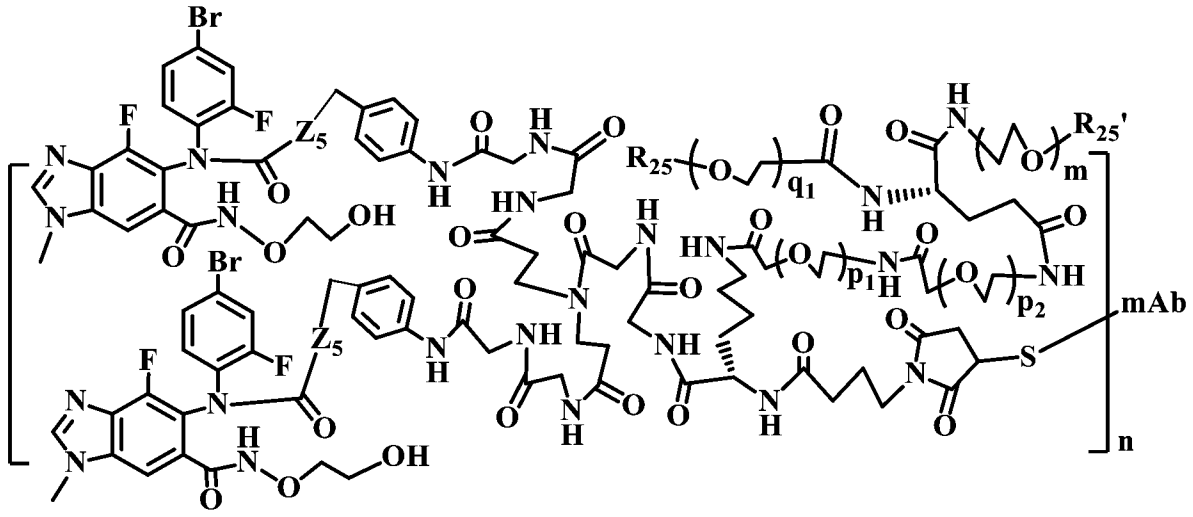
a141，



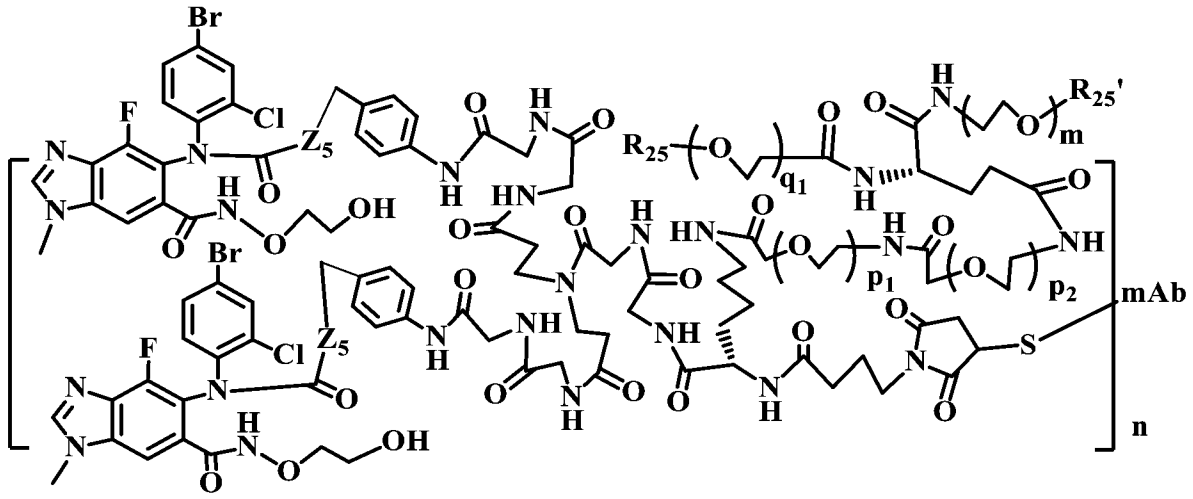
a142，



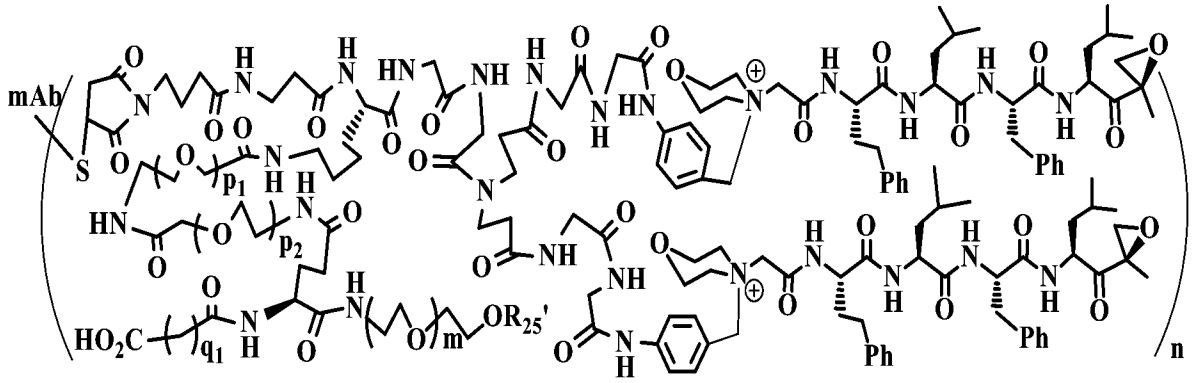
a143，



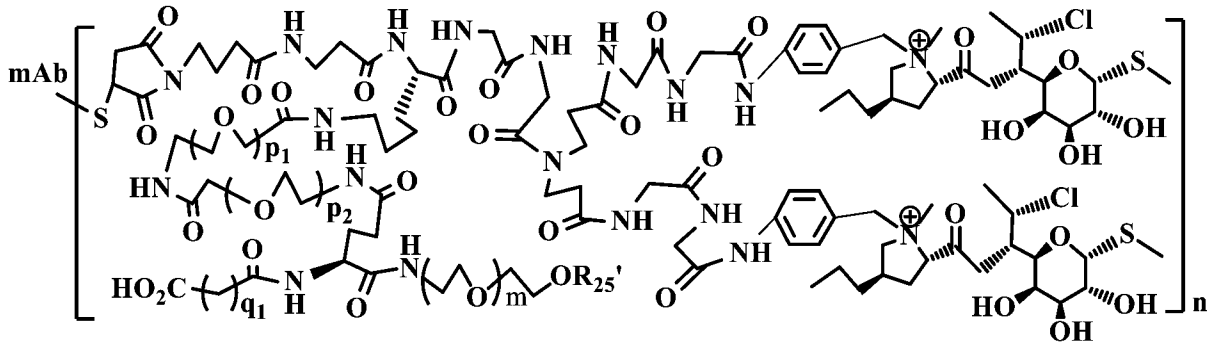
a144，



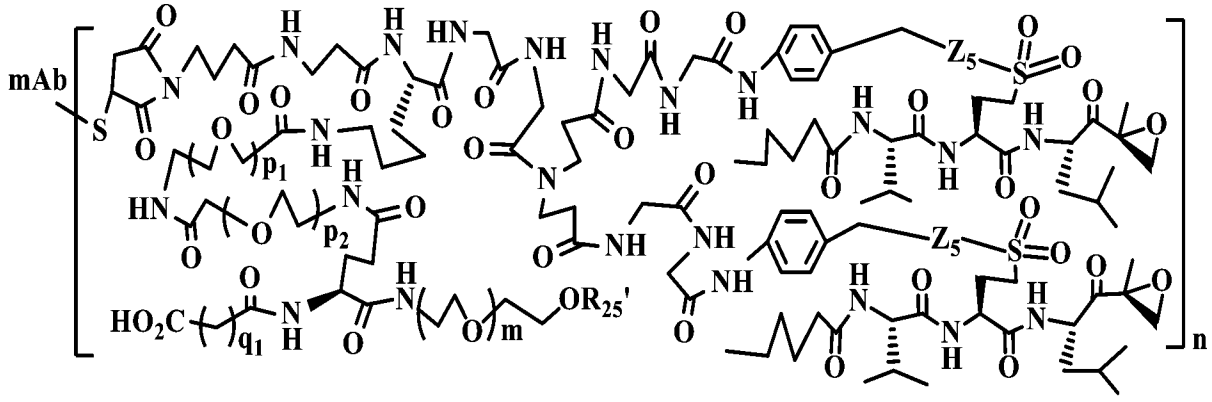
a145，



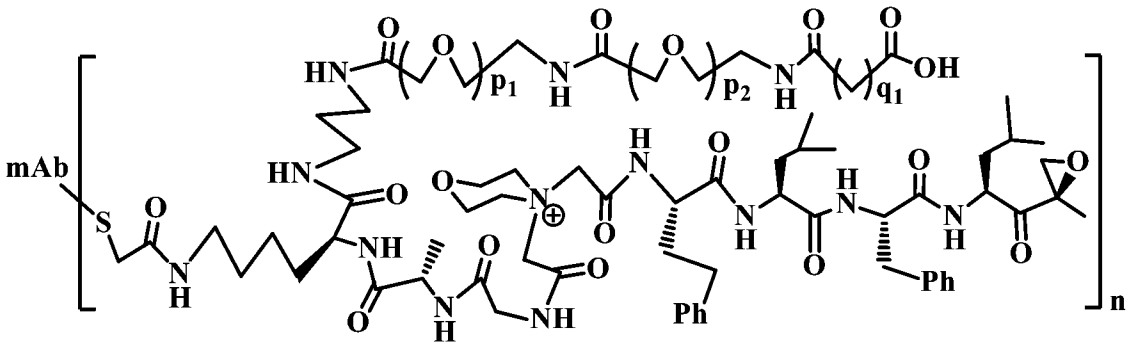
a146，



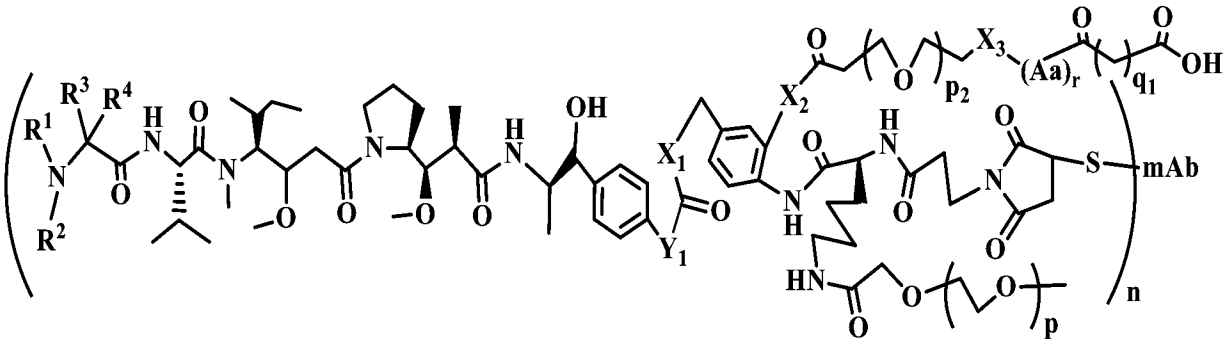
a147，



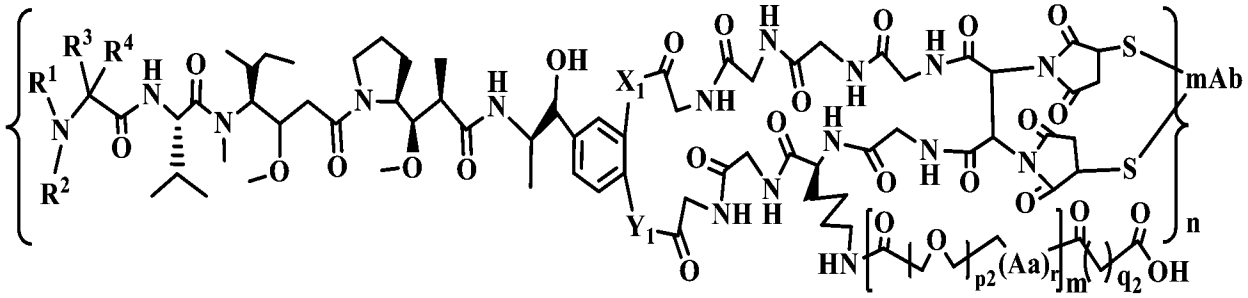
a148，



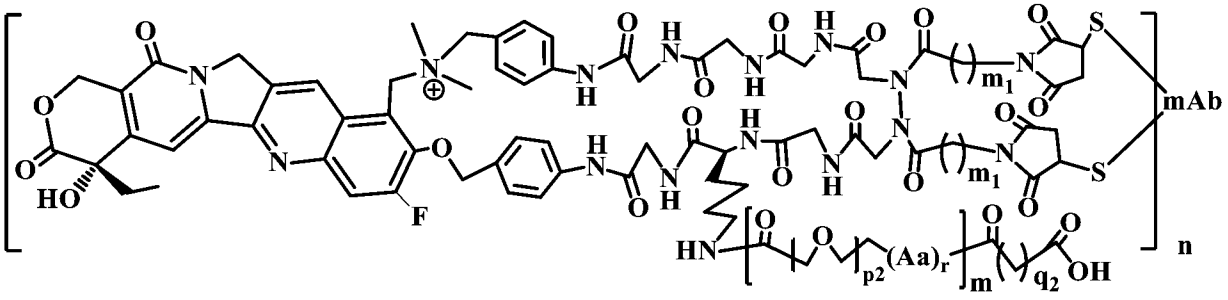
a149，



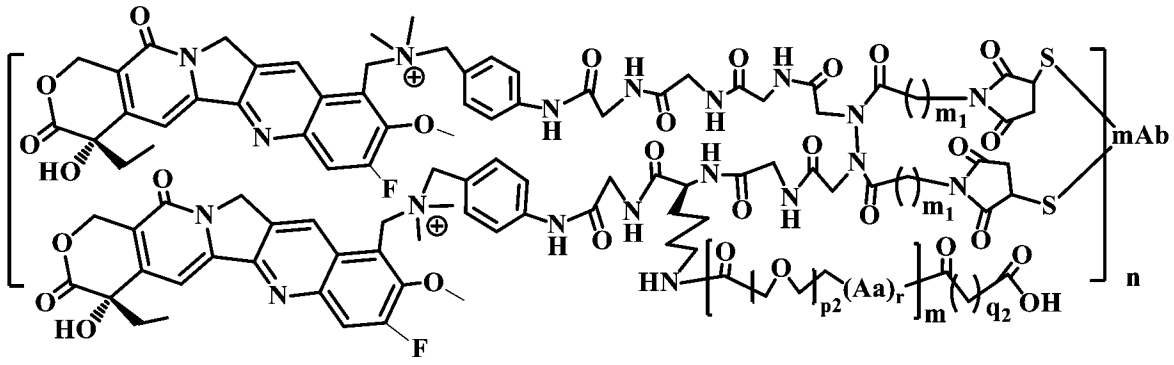
a150，



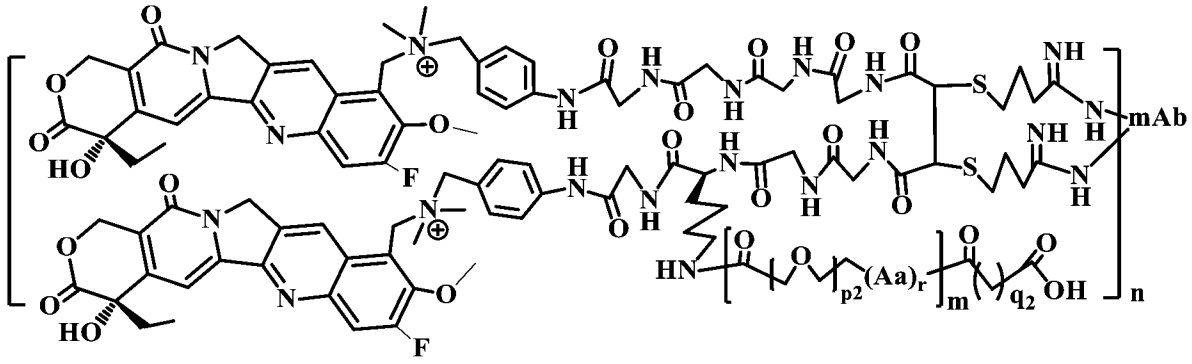
a151，



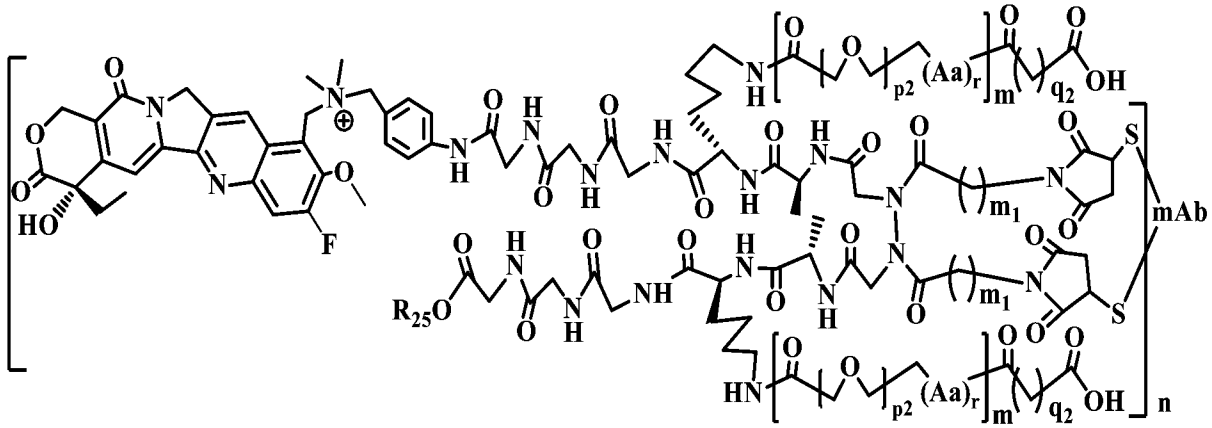
a152，



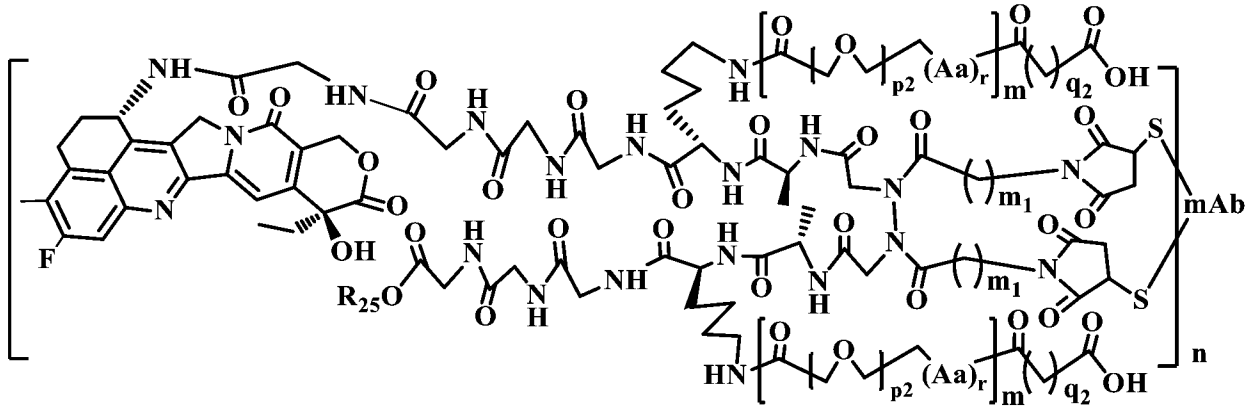
a153，



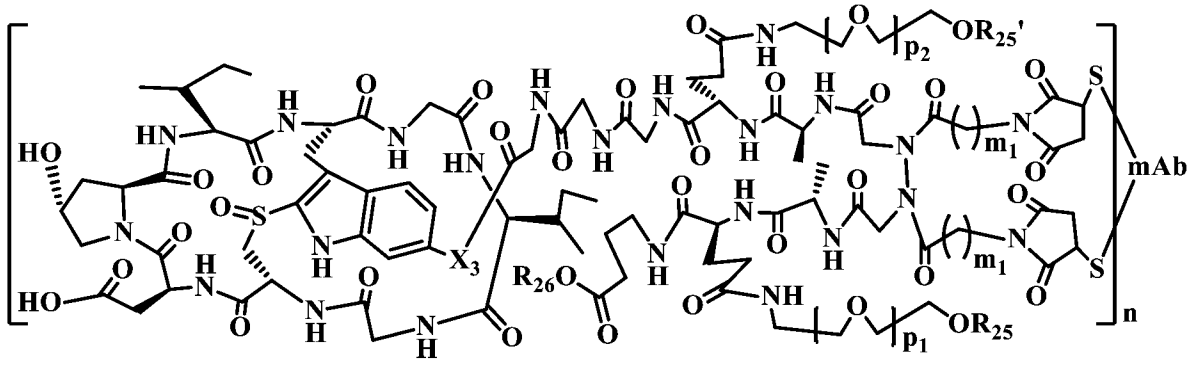
a154，



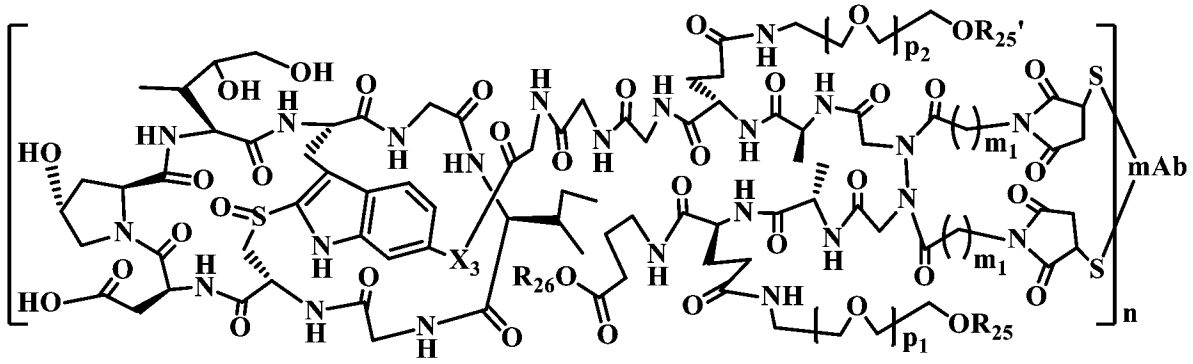
a155，



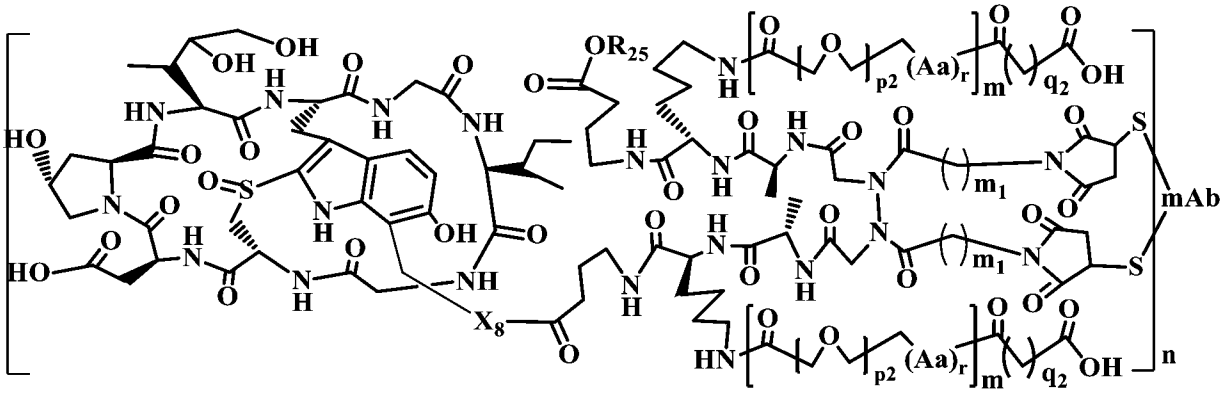
a156，



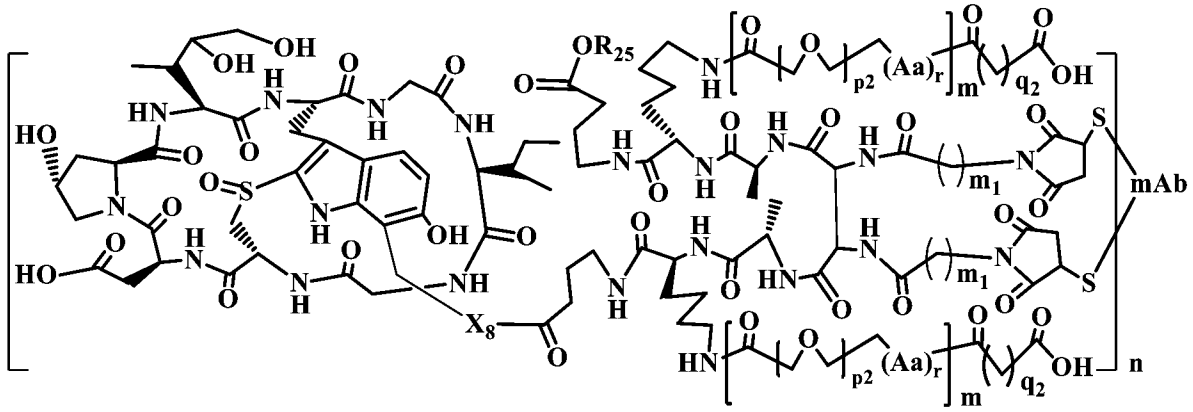
a157，



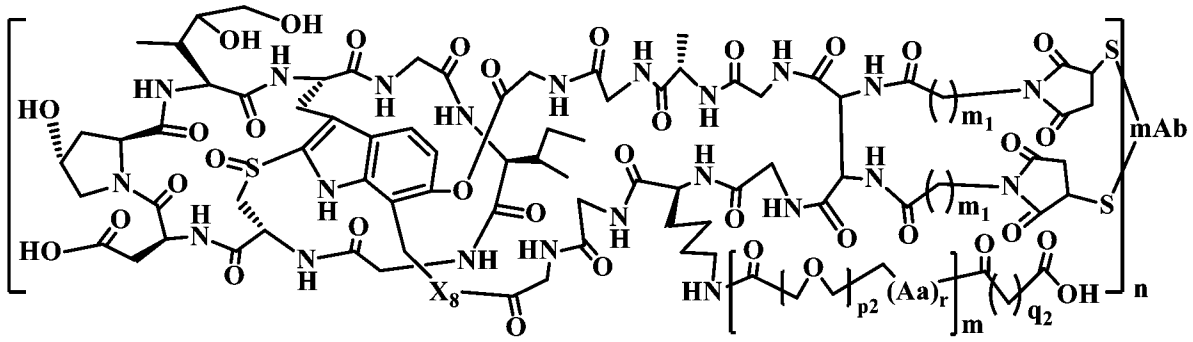
a158，



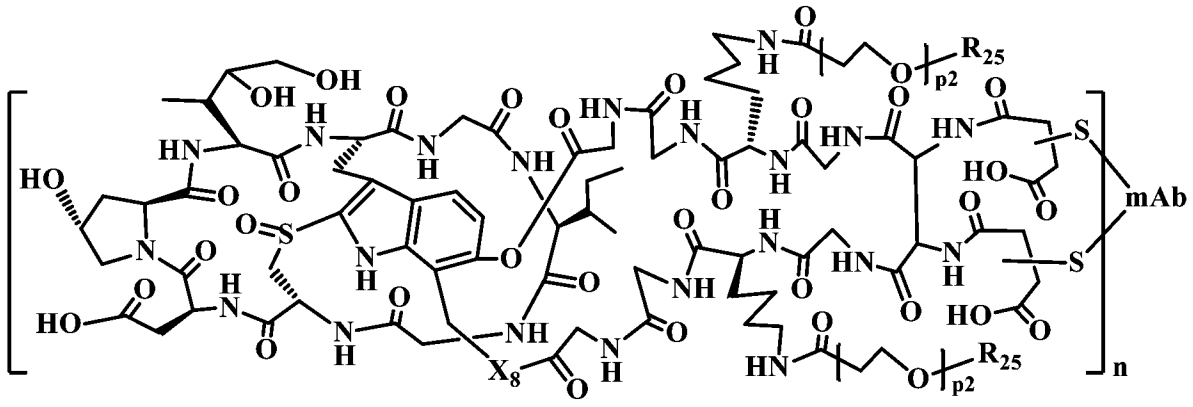
a159，



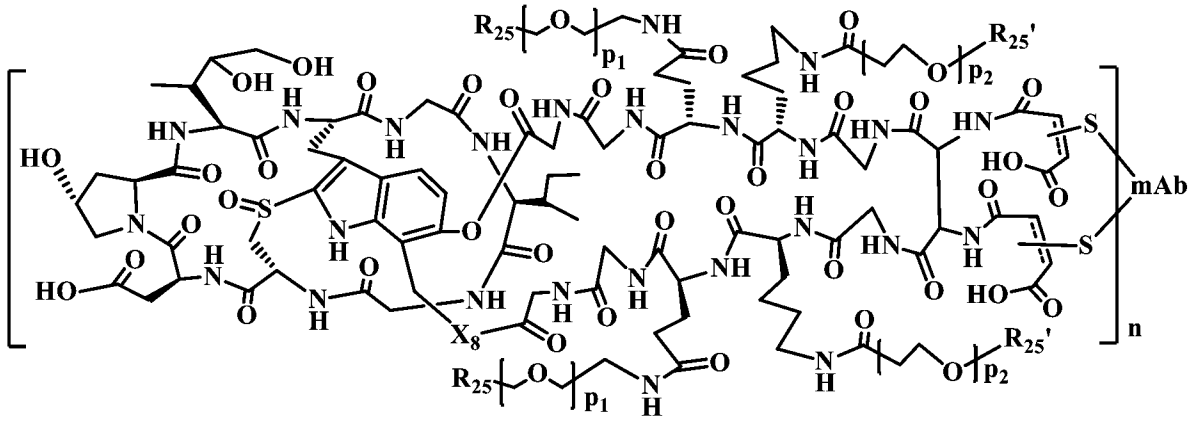
a160，



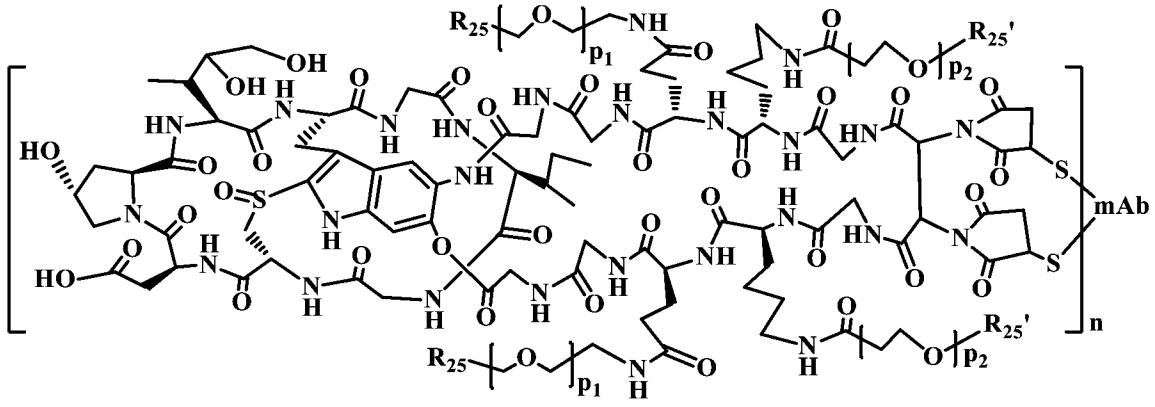
a161，



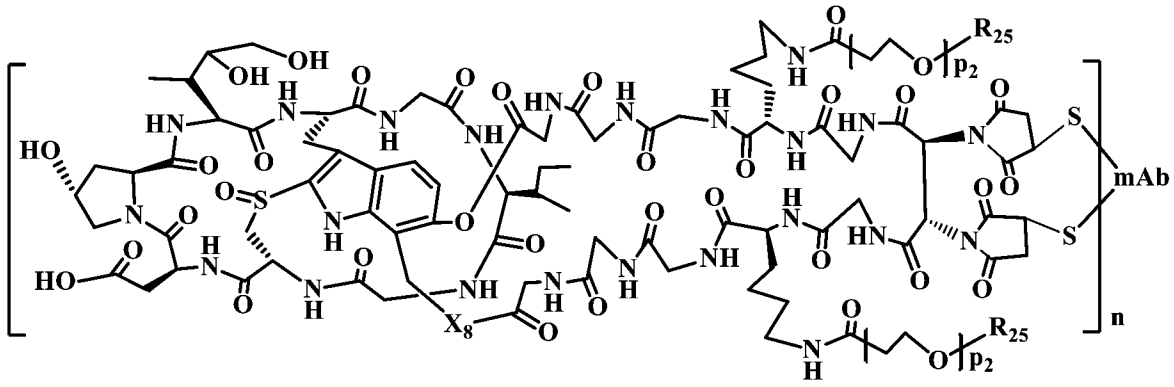
a162，



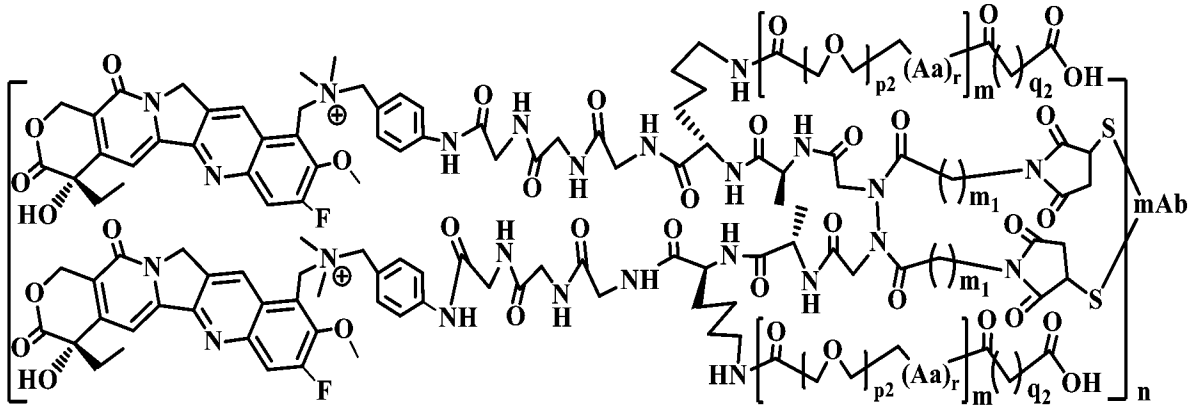
a163，



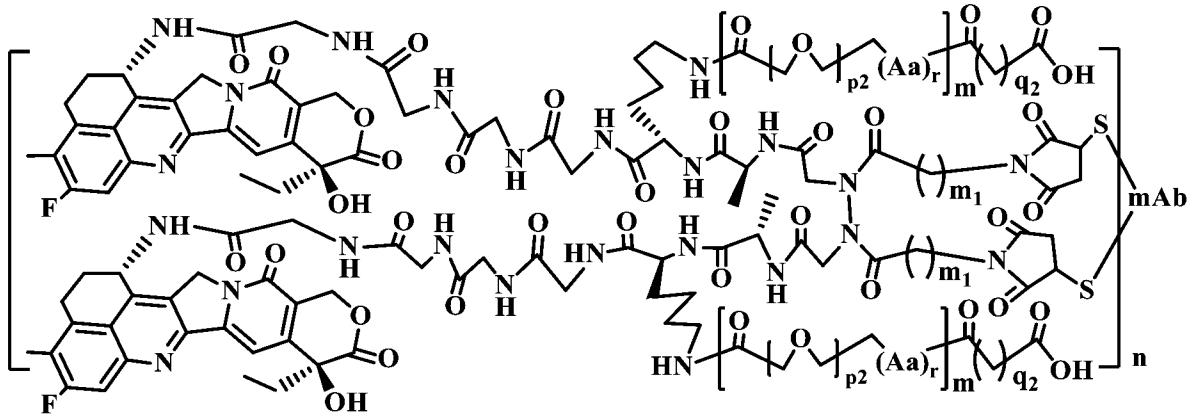
a164.



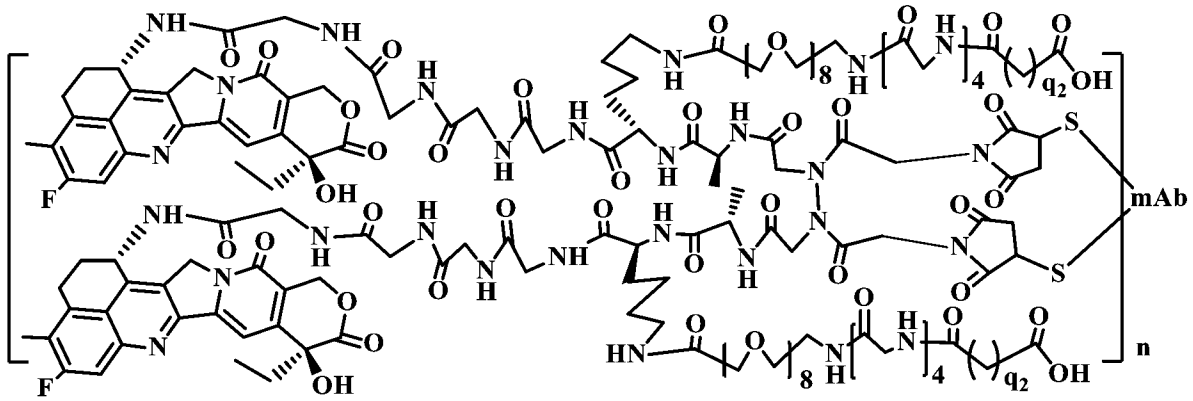
a165，



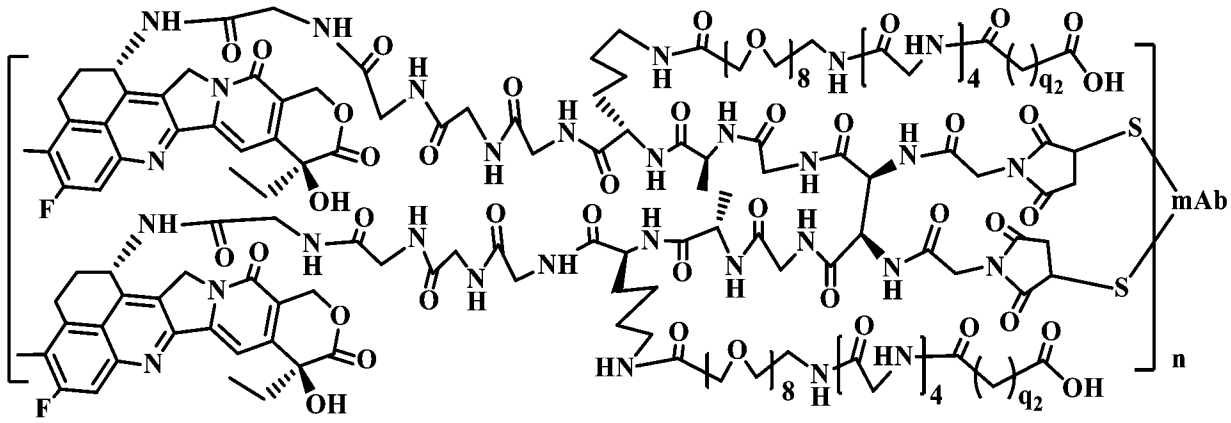
a166，



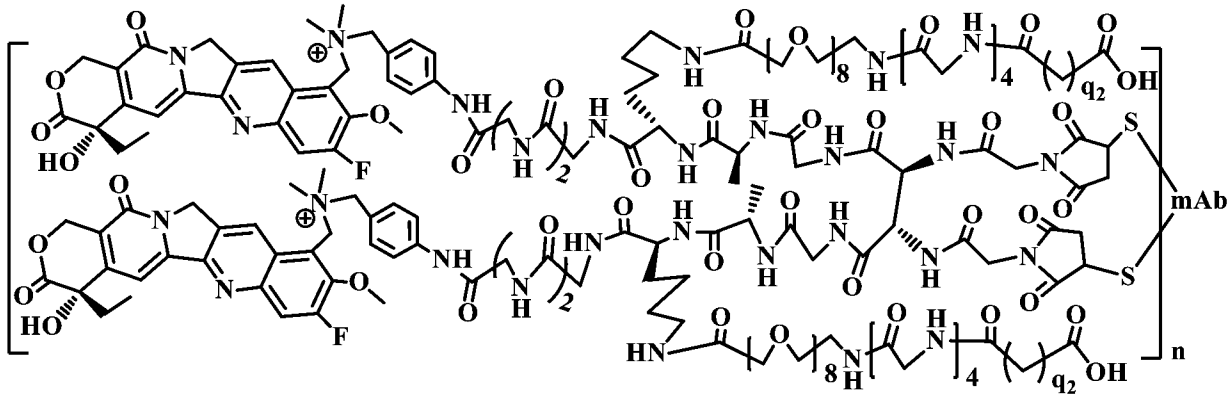
a167，



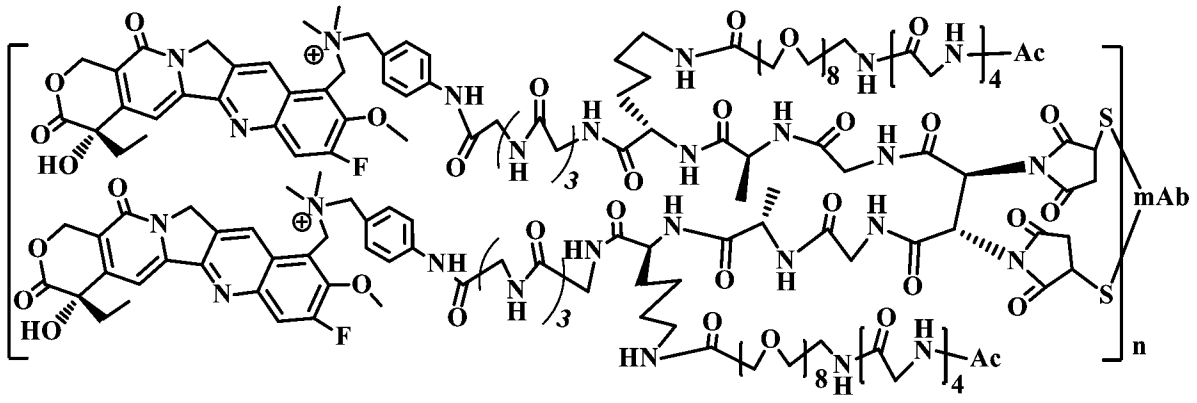
a168，



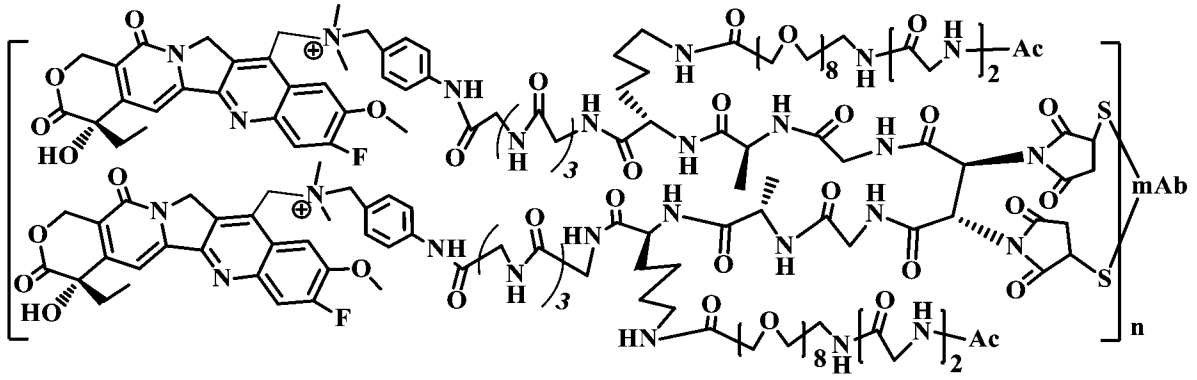
a169，



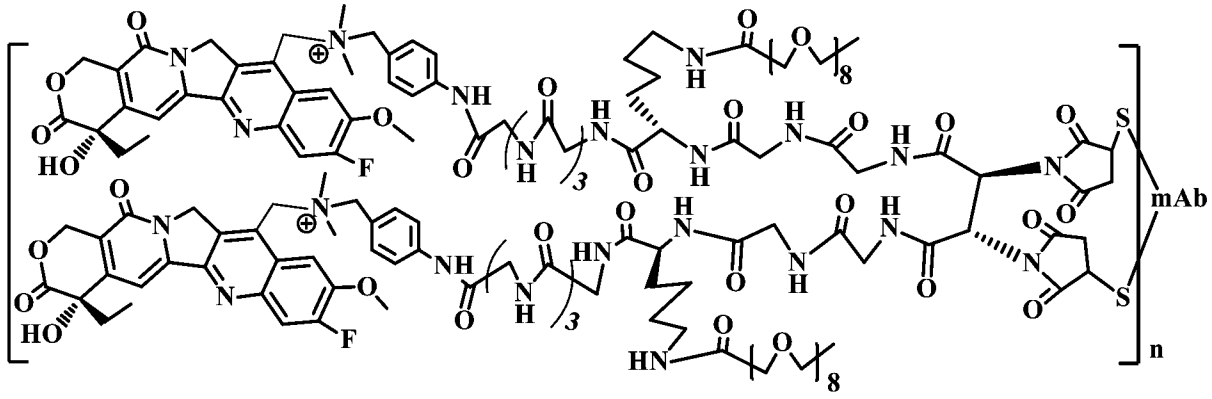
a170，



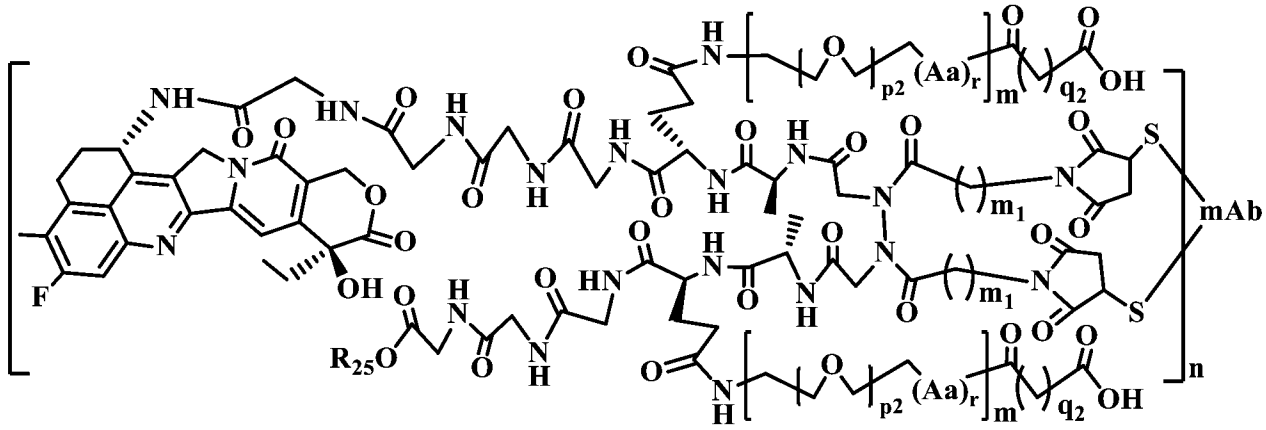
a171，



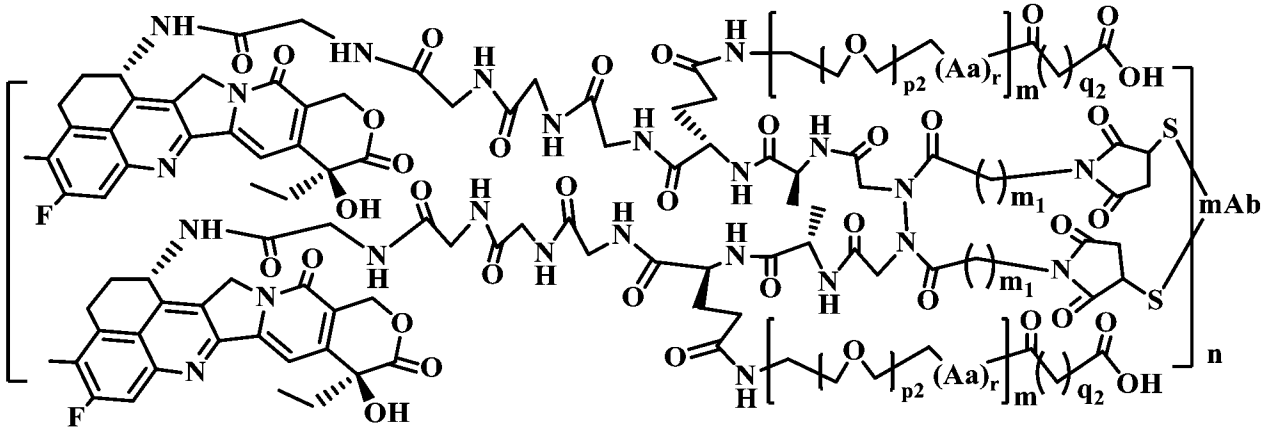
a172，



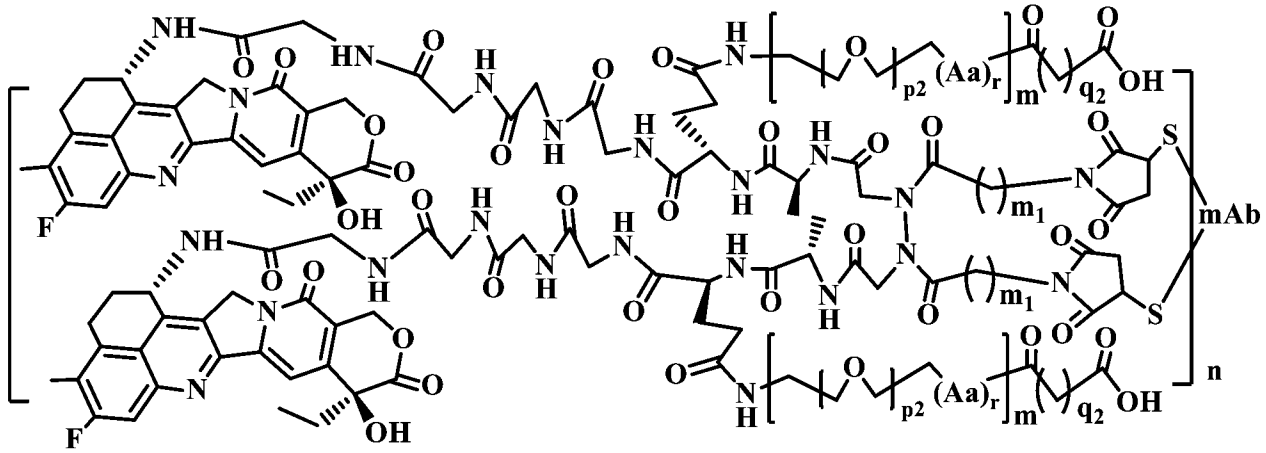
a173，



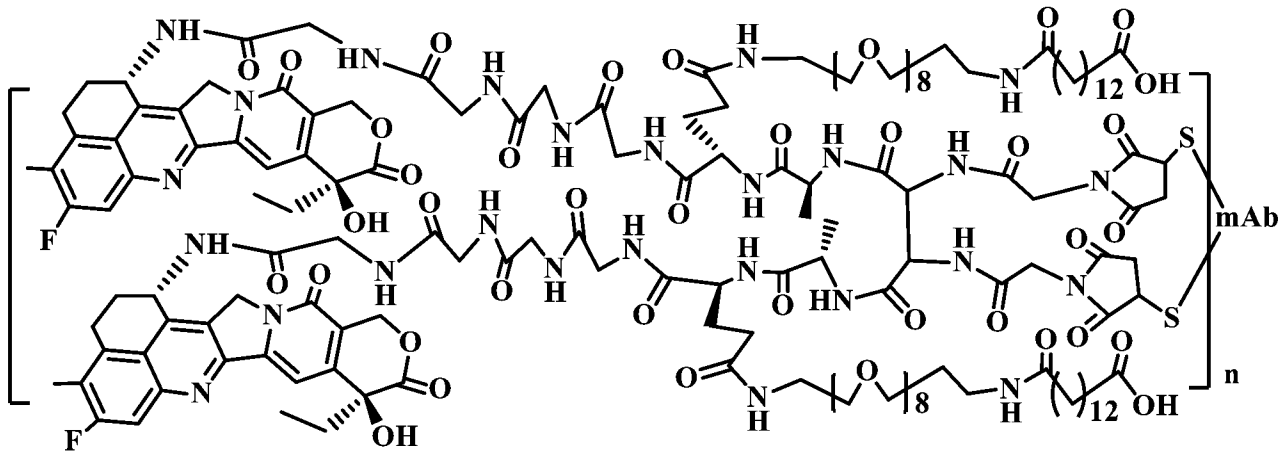
a174 ，



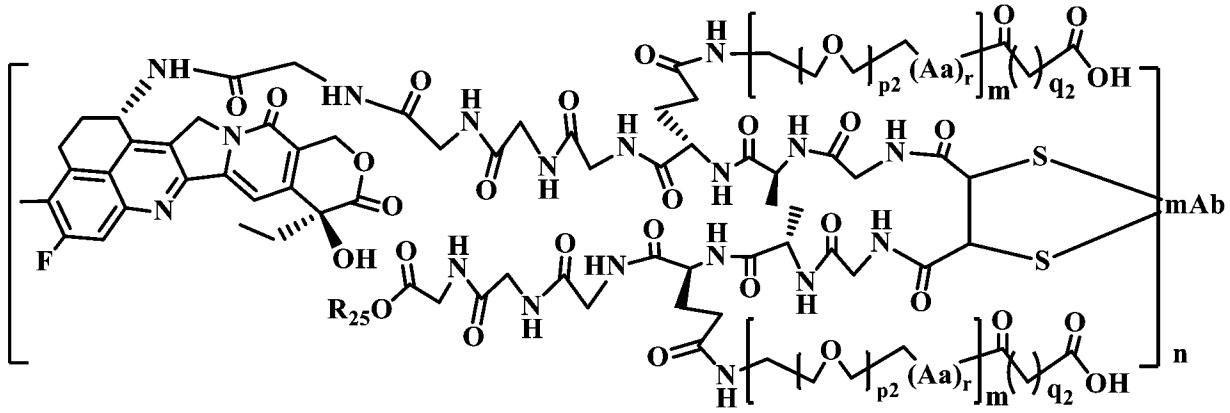
a175 ，



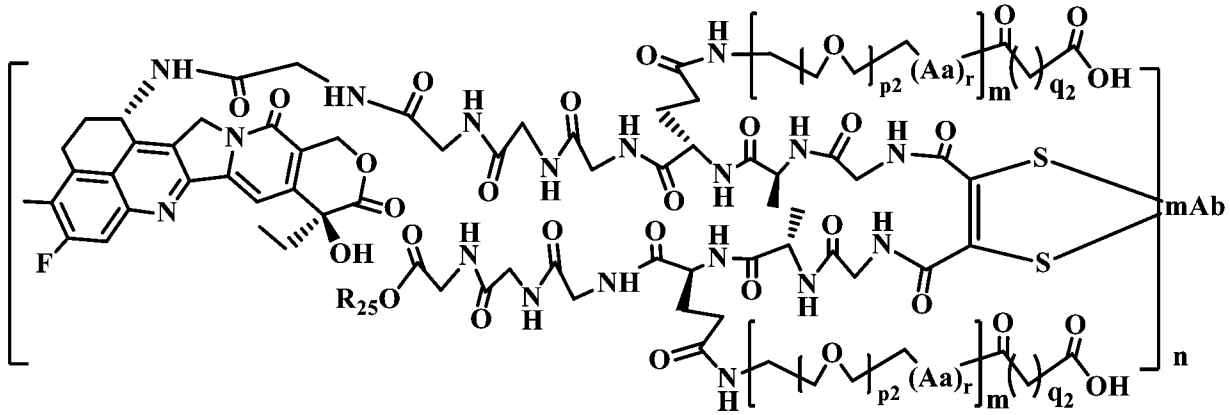
a176 ，



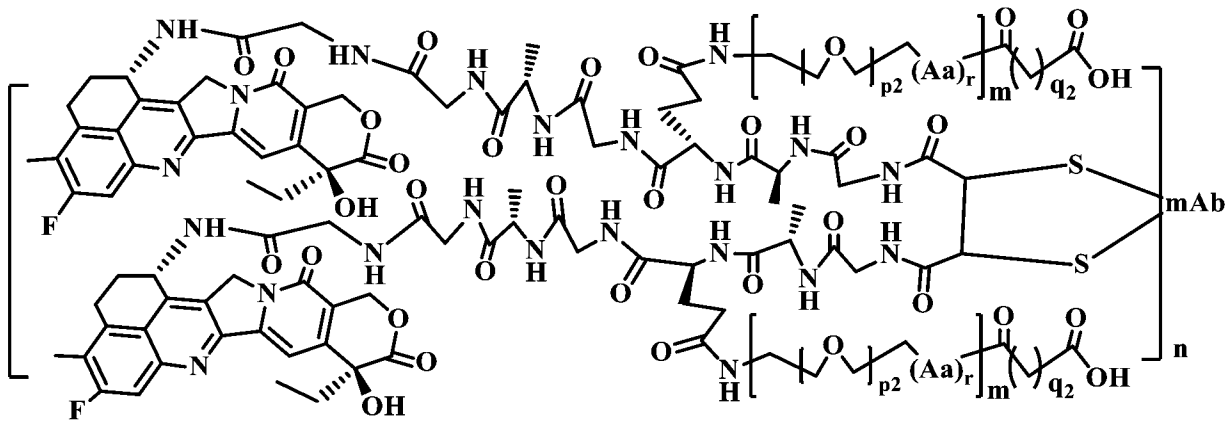
a177，



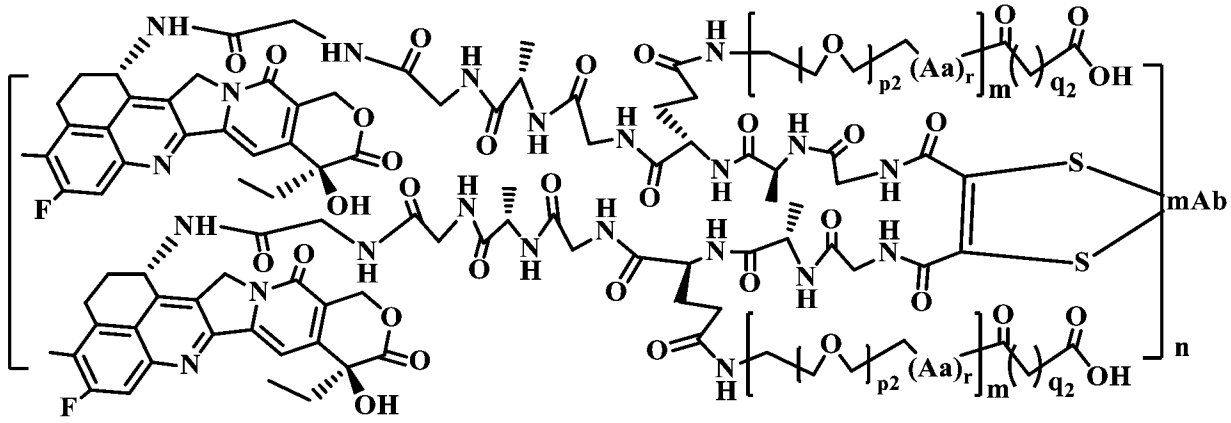
a178，



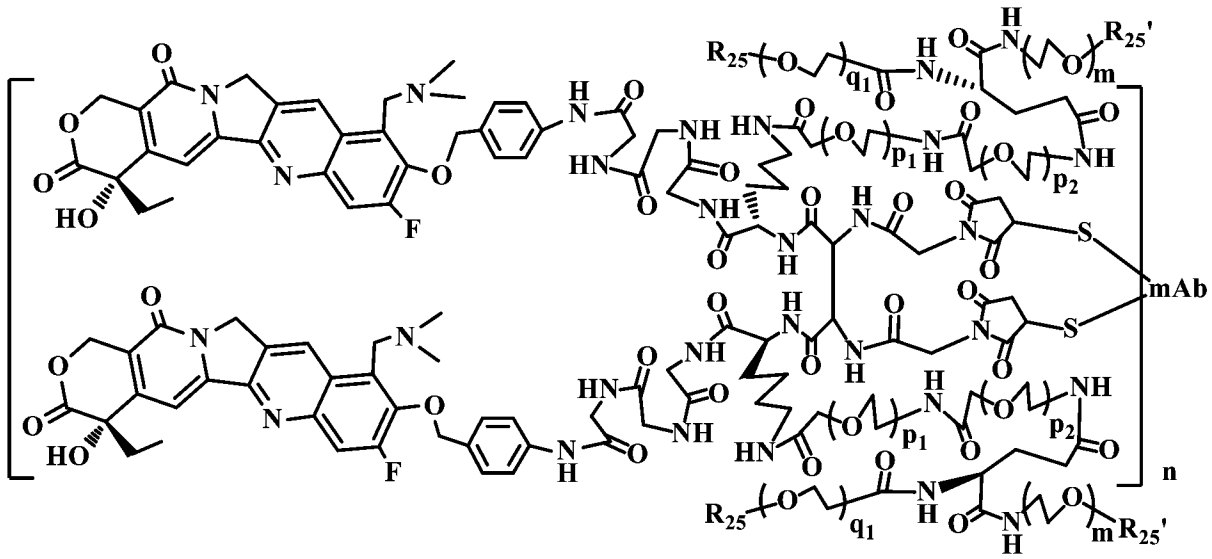
a179，



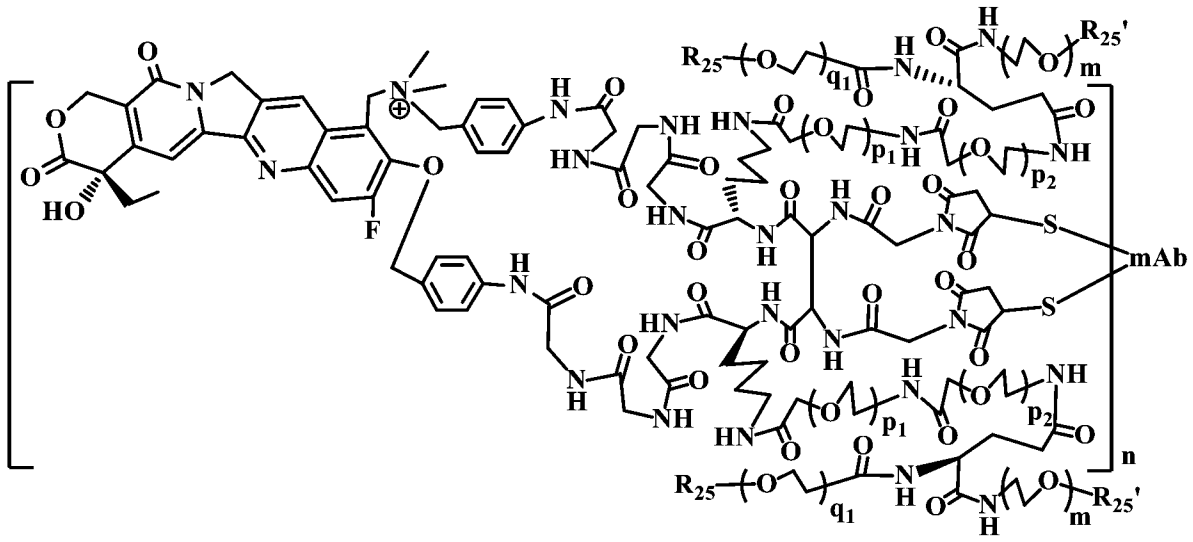
a180，



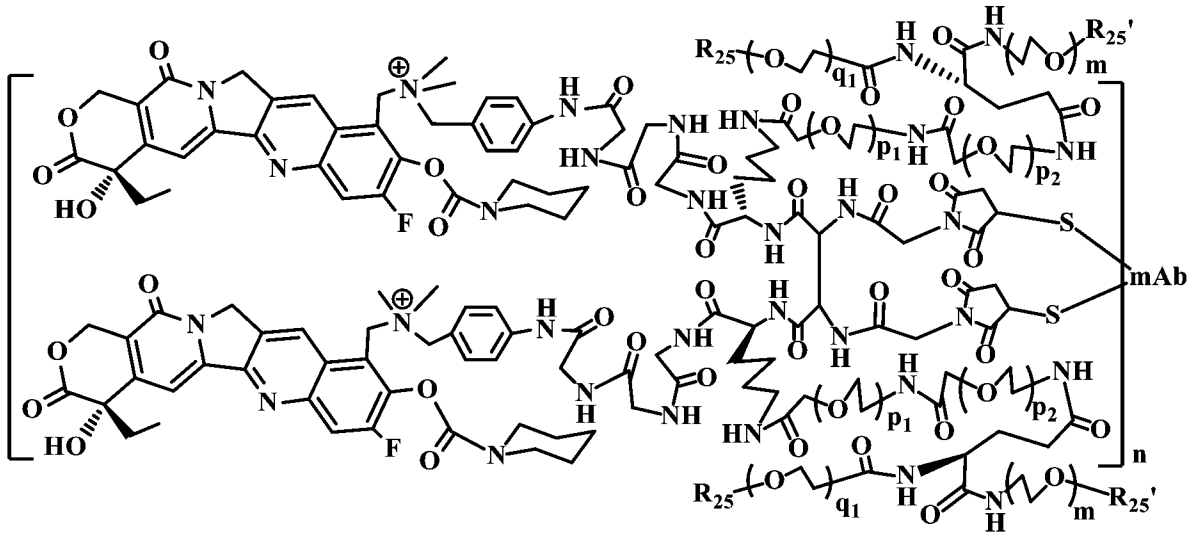
a181，



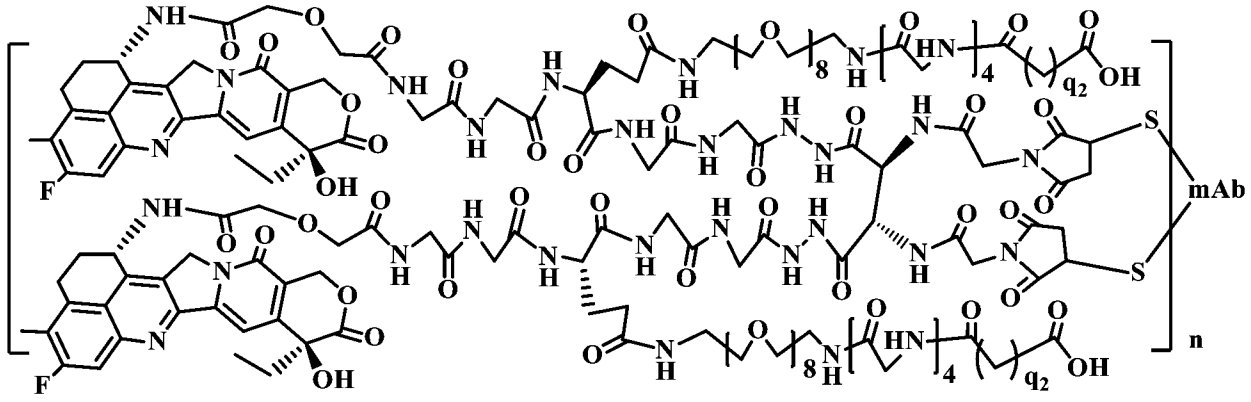
a182，



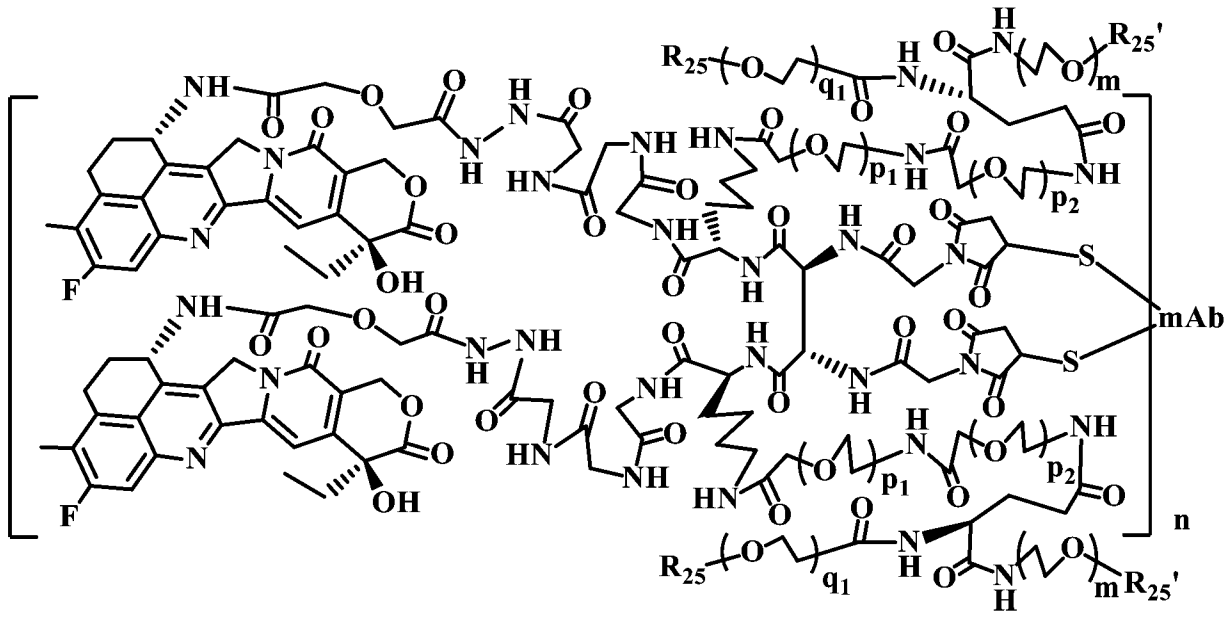
a183，



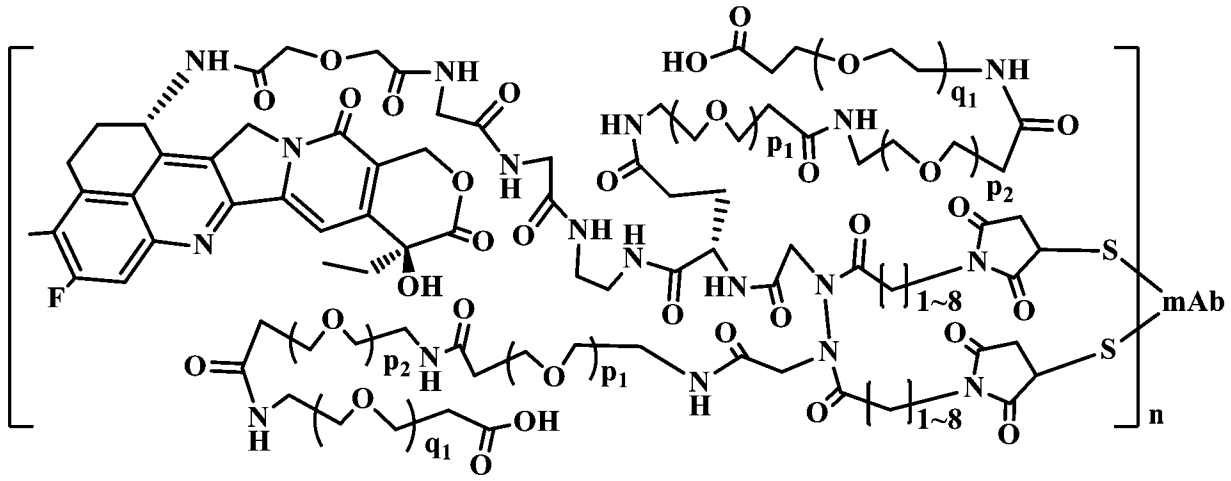
a184，



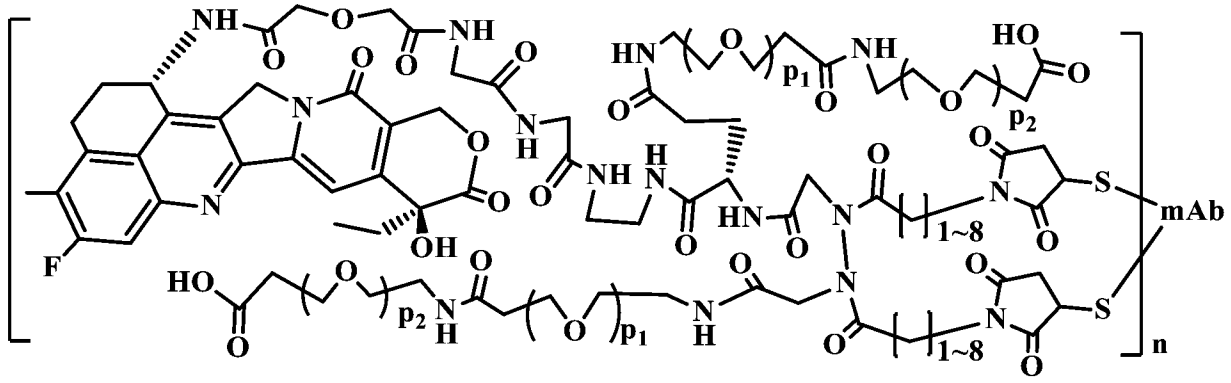
a185，



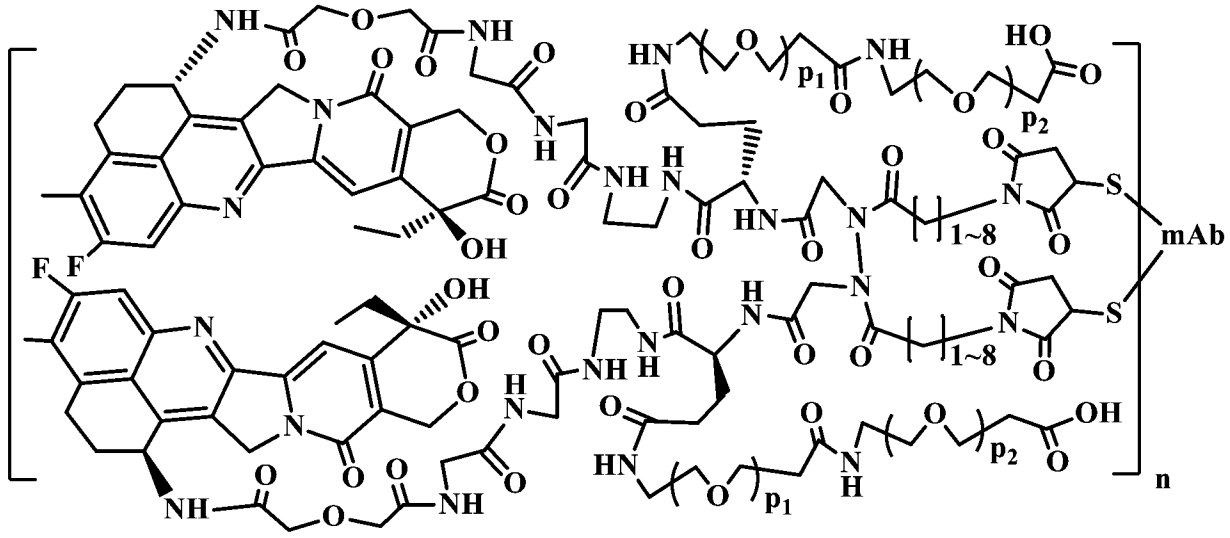
a186，



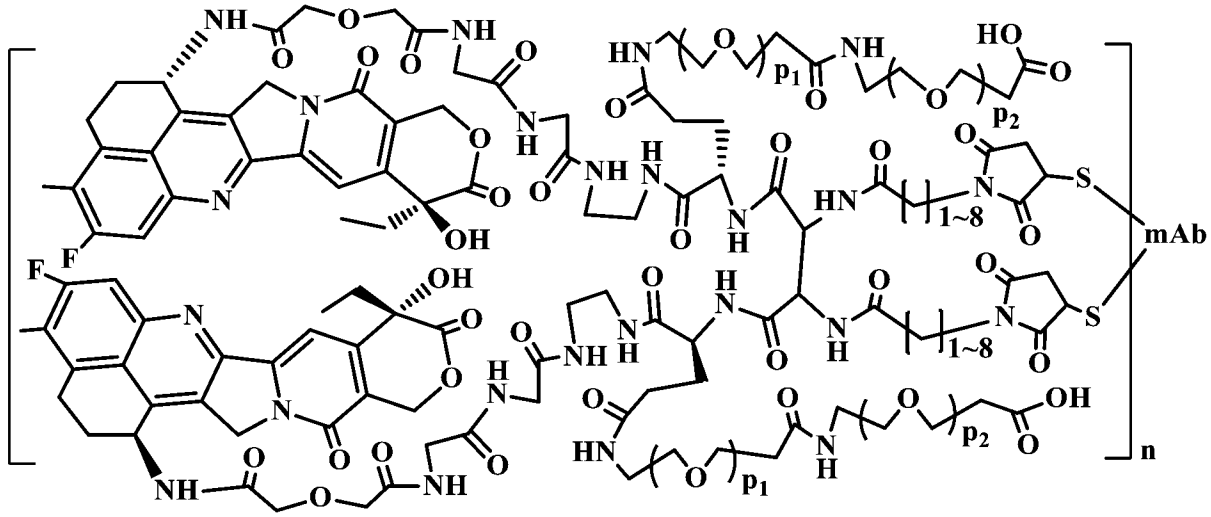
a187，



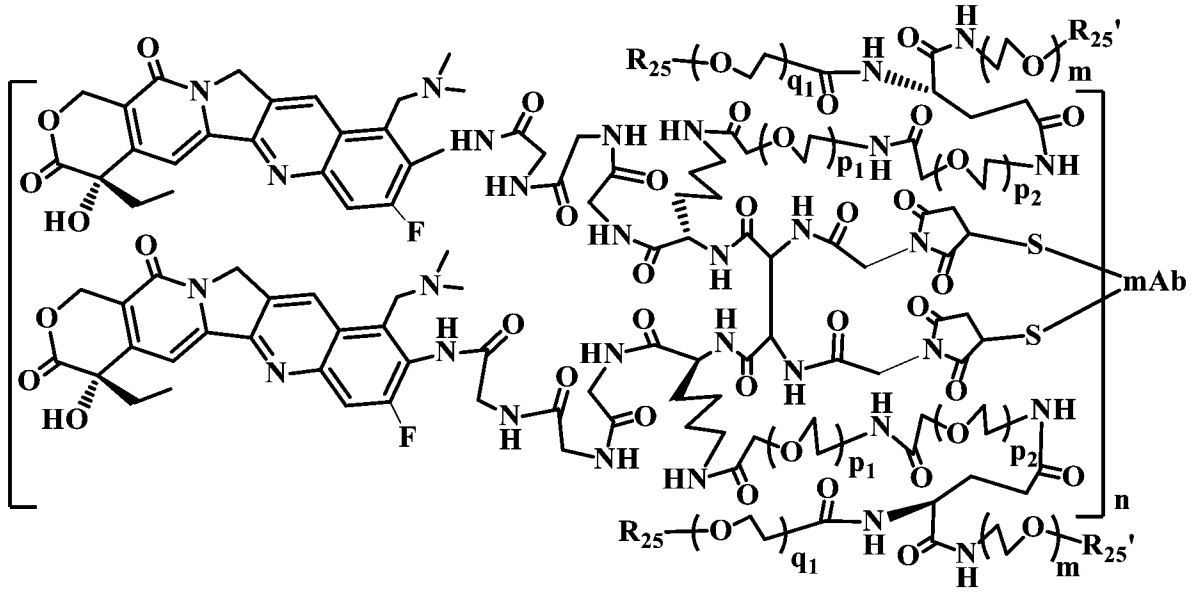
a188，



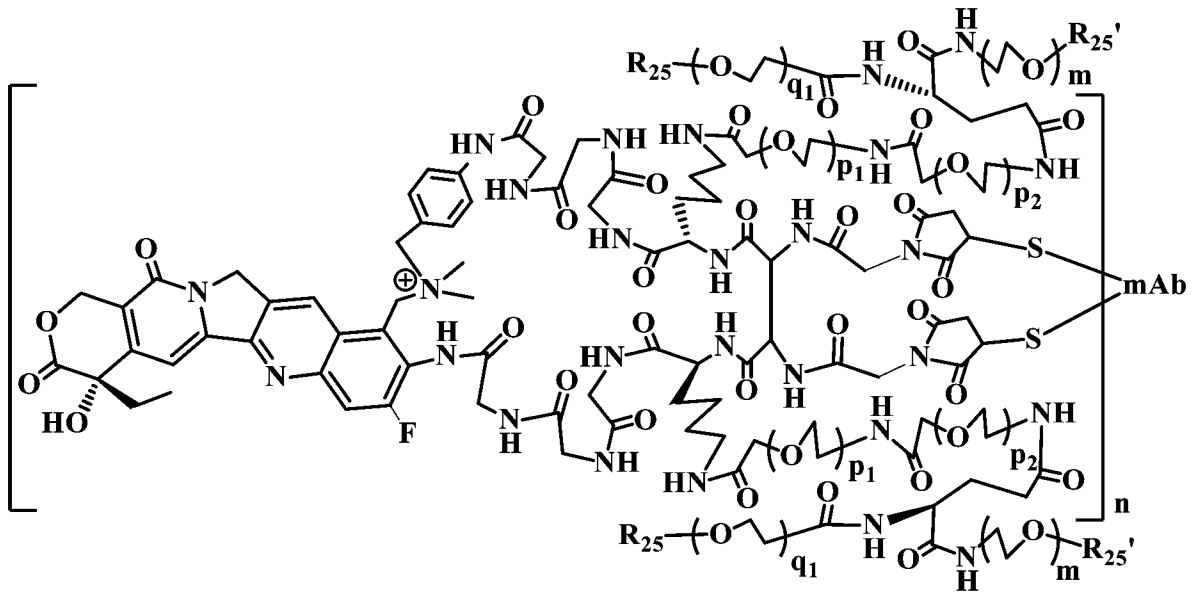
a189，



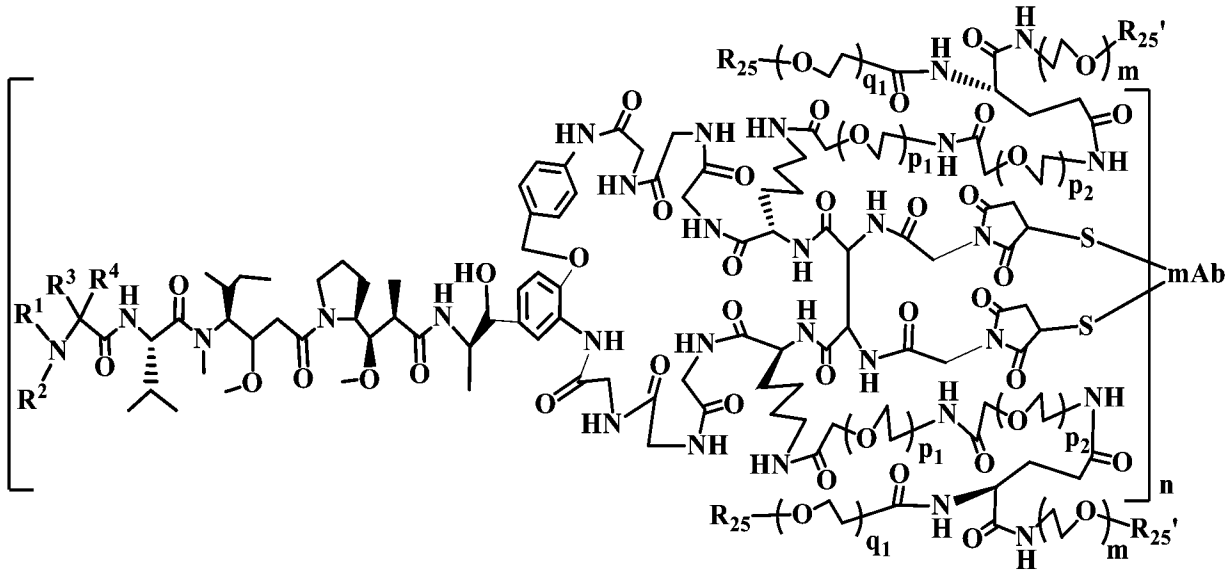
a190，



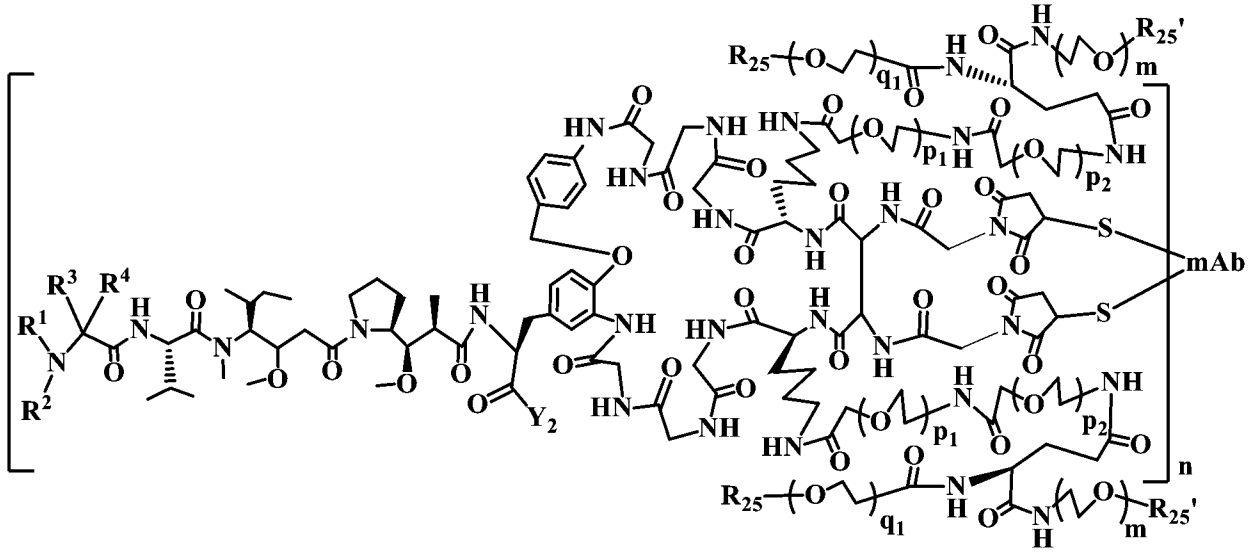
a191，



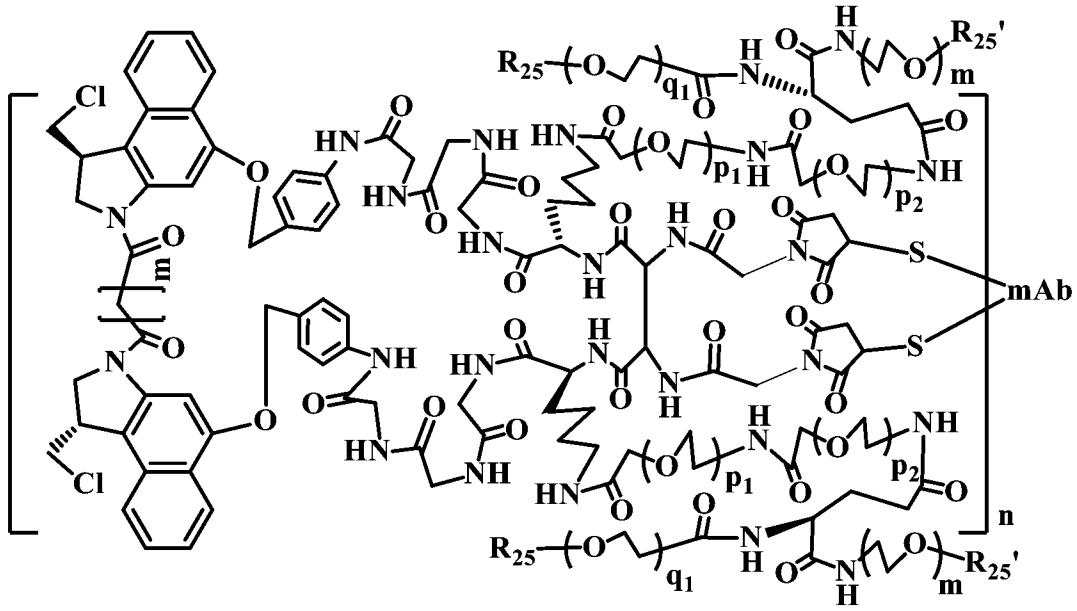
a192，



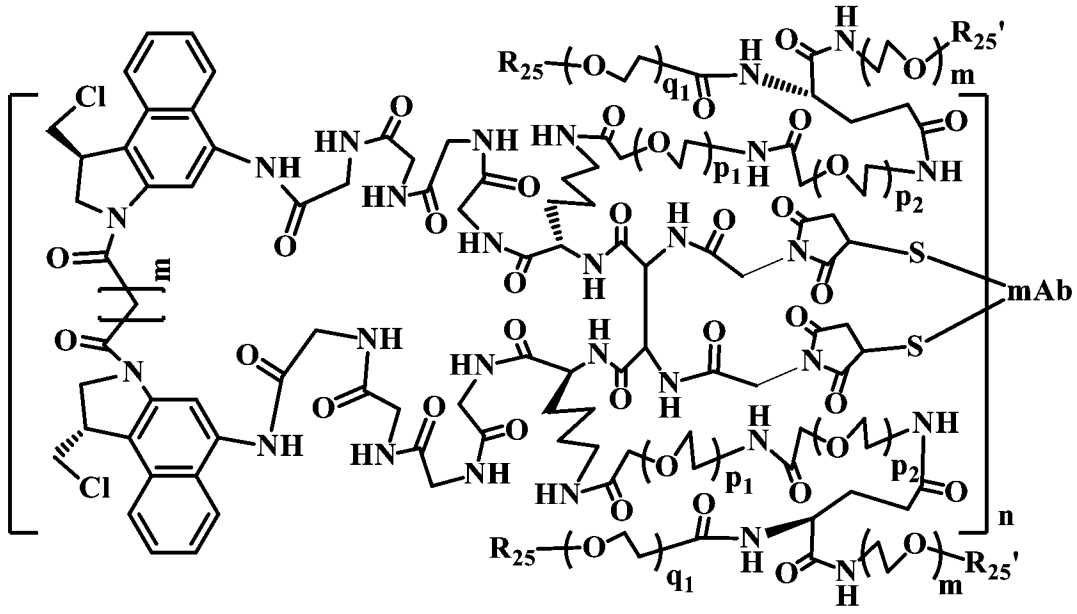
a193，



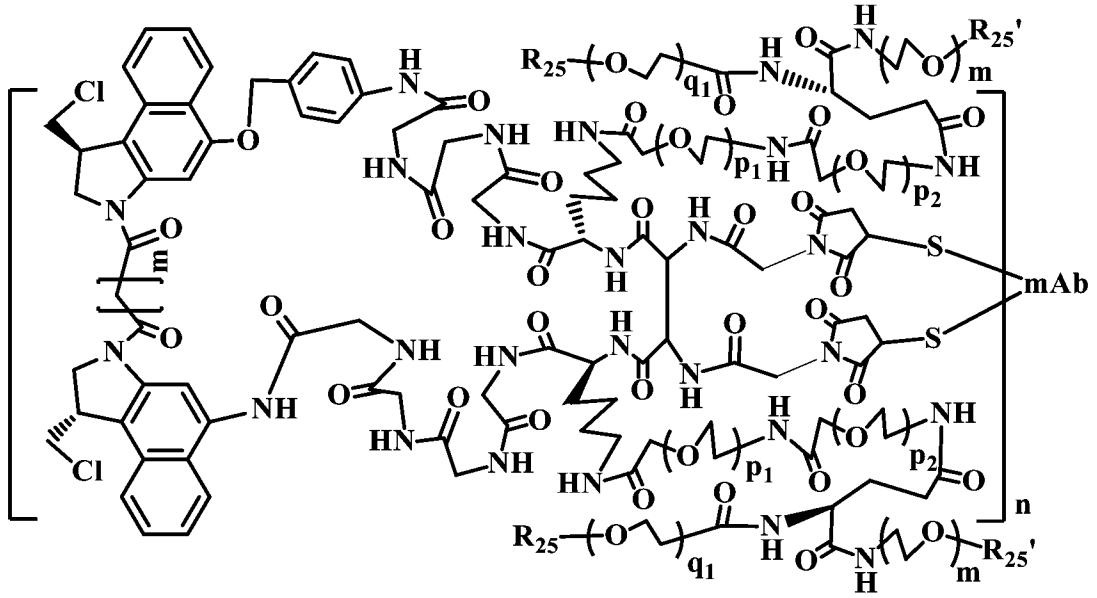
a194，



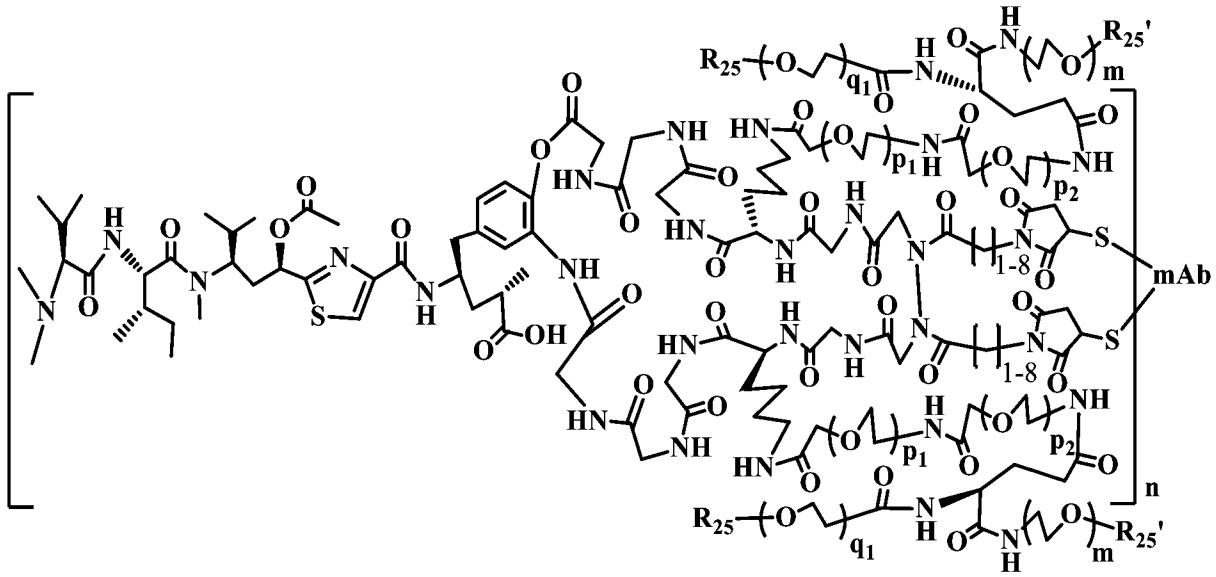
a195，



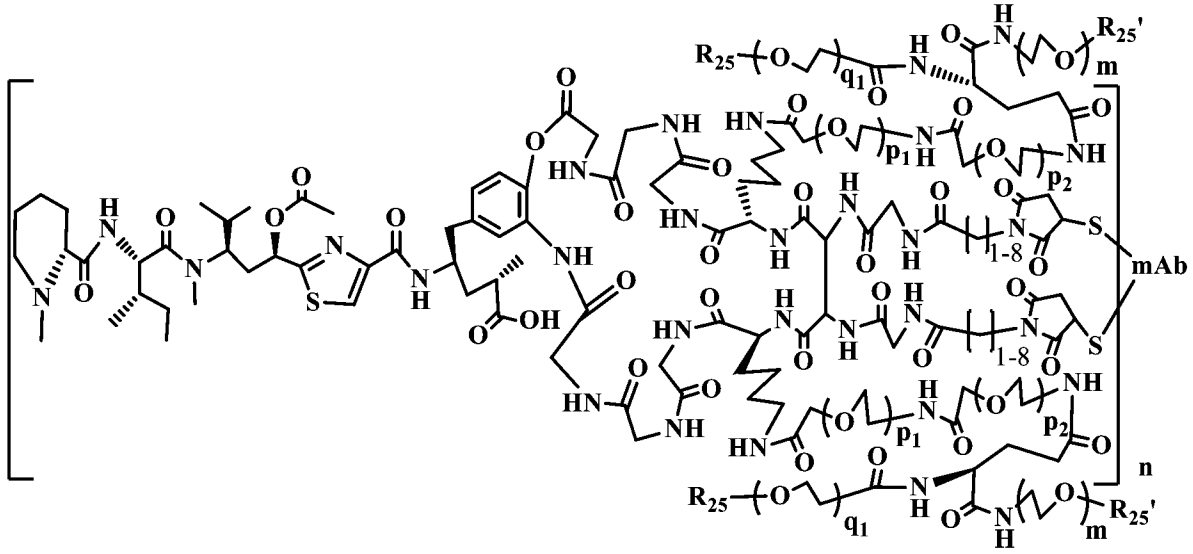
a196，



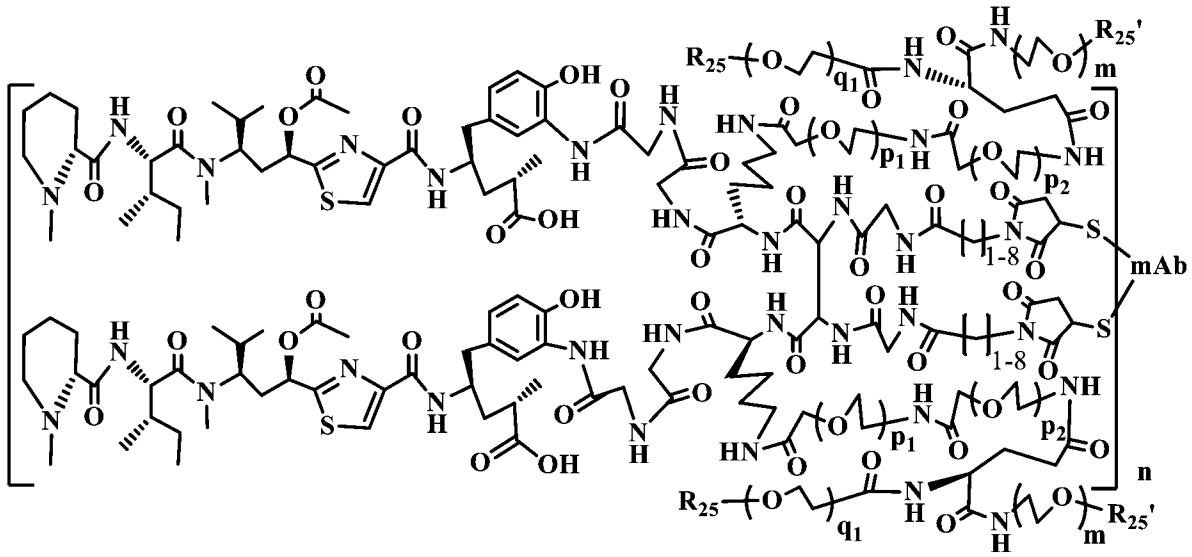
a197，



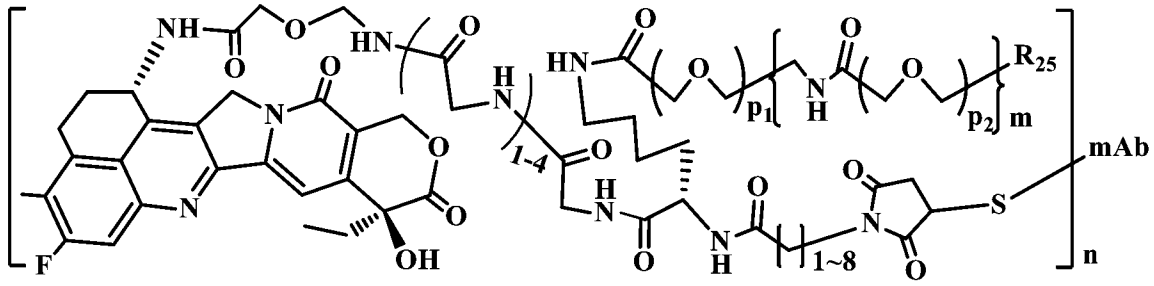
a198，



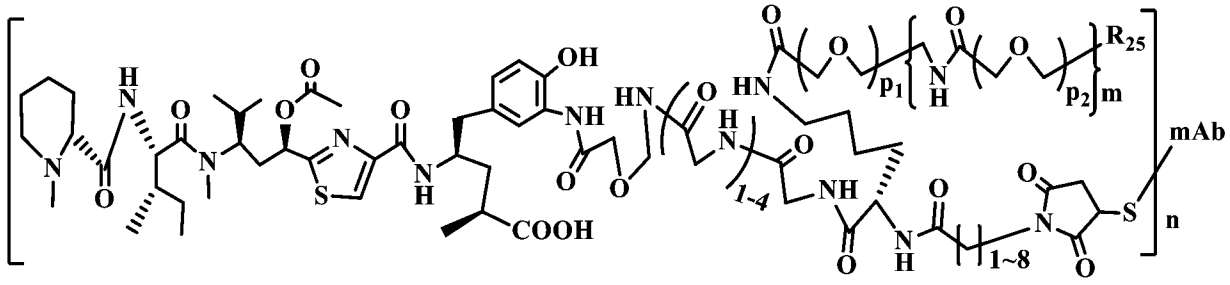
a199，



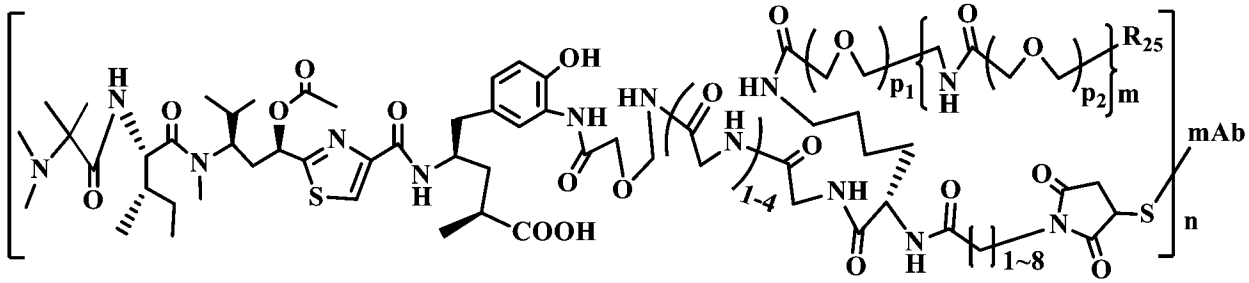
a200，



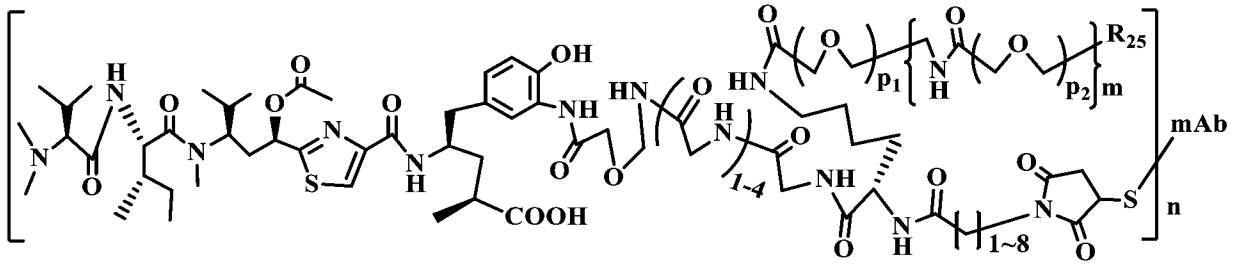
a201，



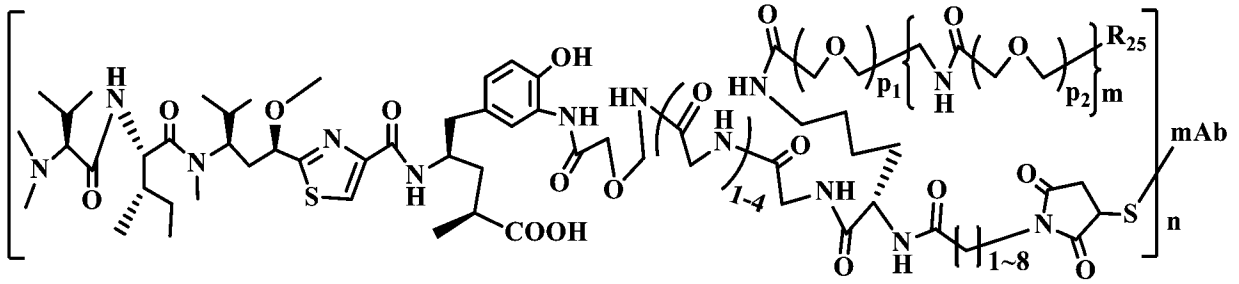
a202，



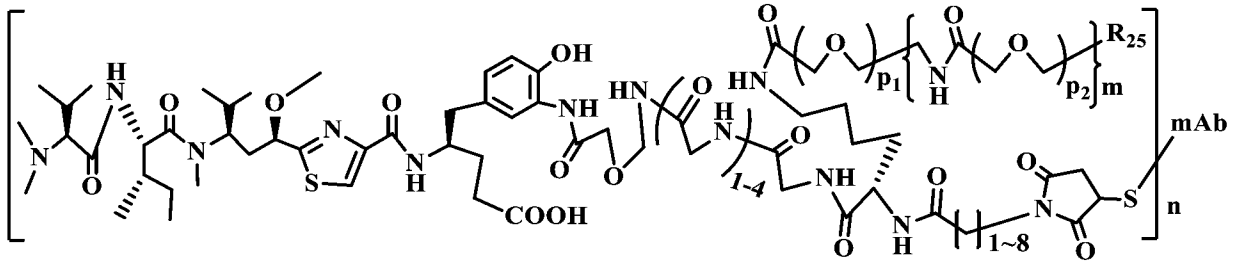
a203，



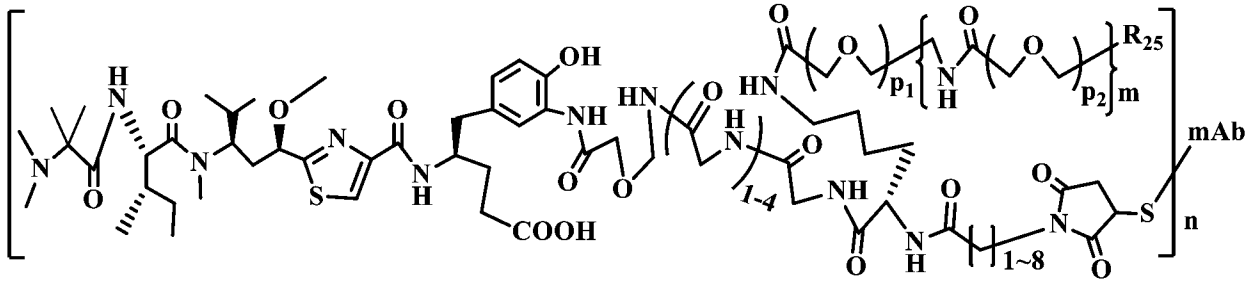
a204，



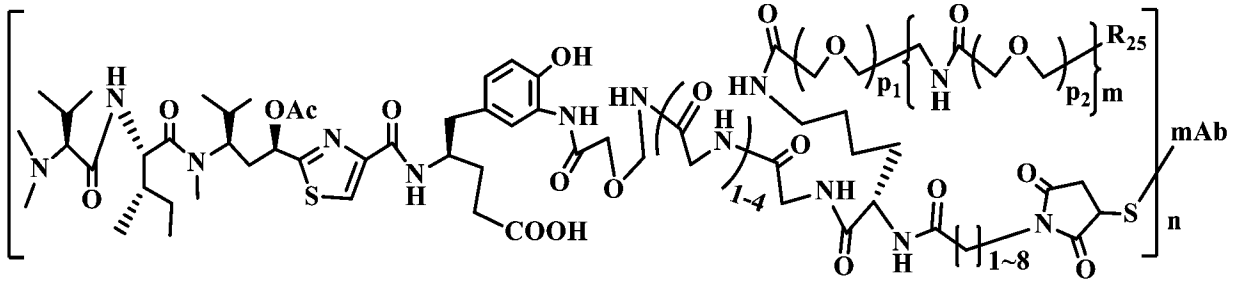
a205，



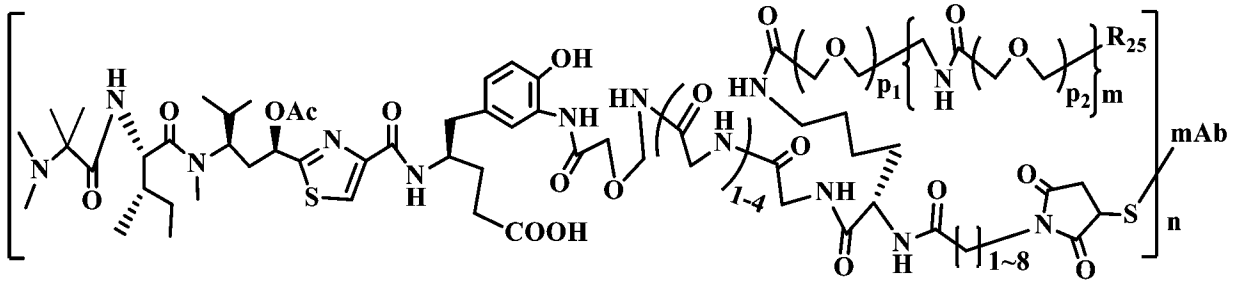
a206，



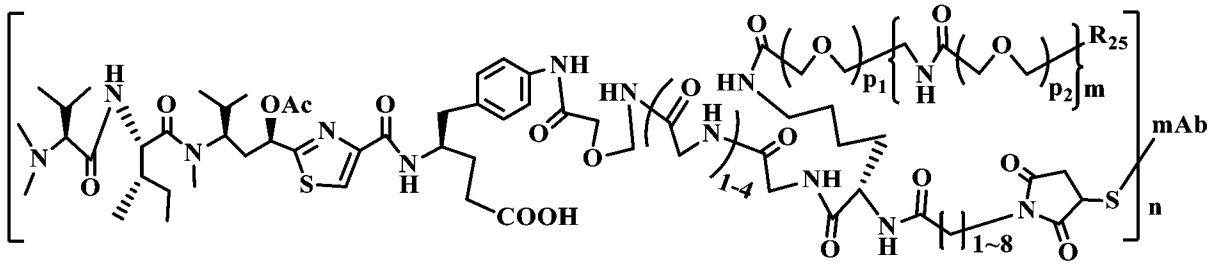
a207，



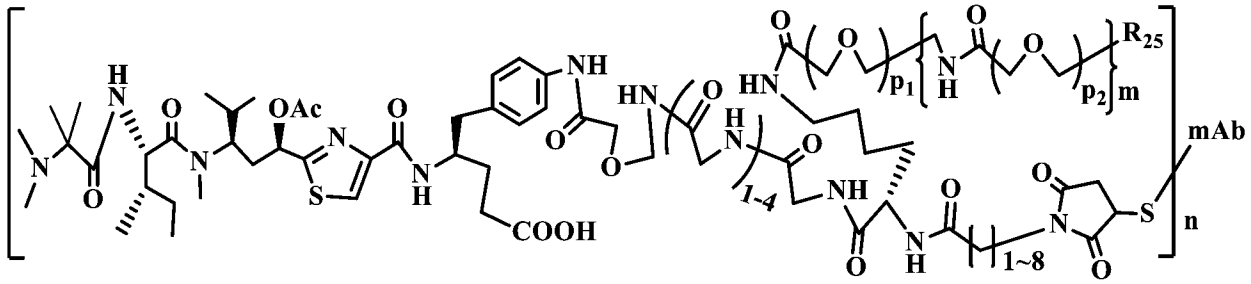
a208，



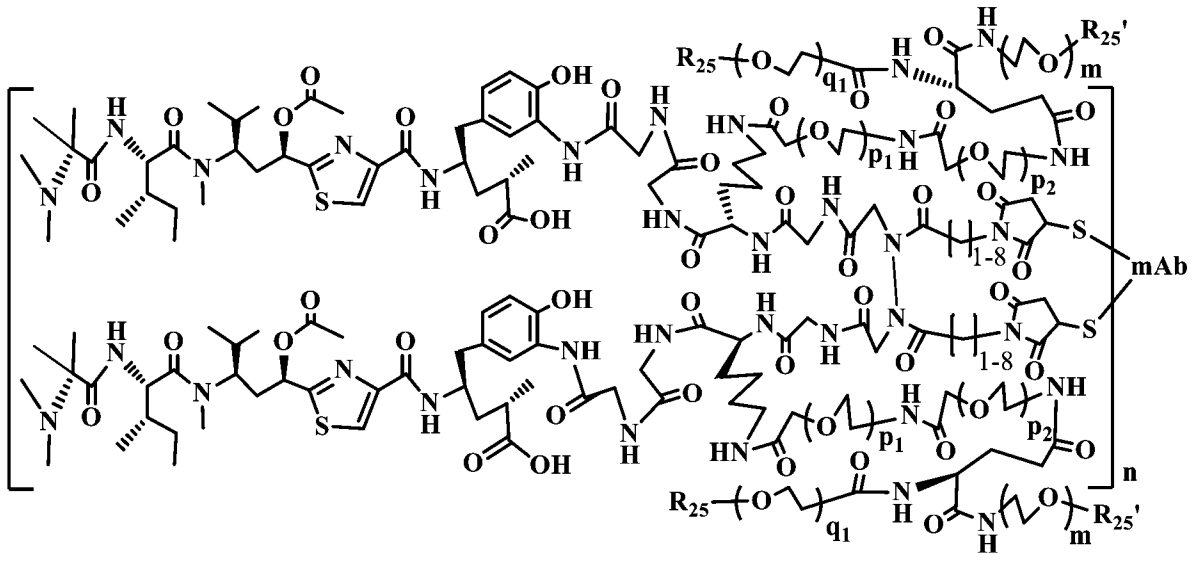
a209，



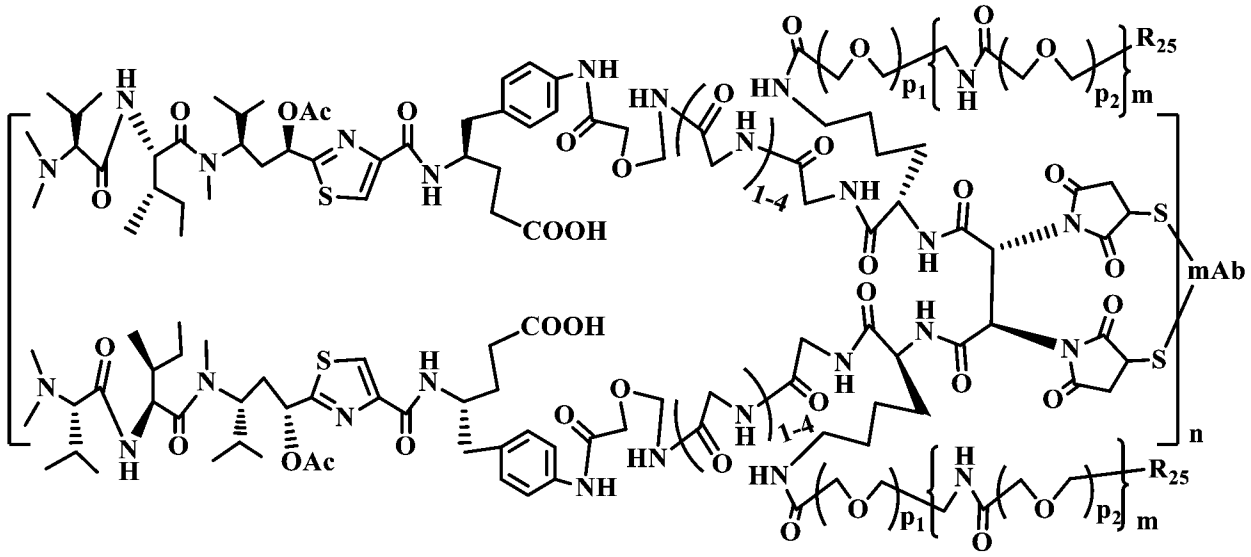
a210，



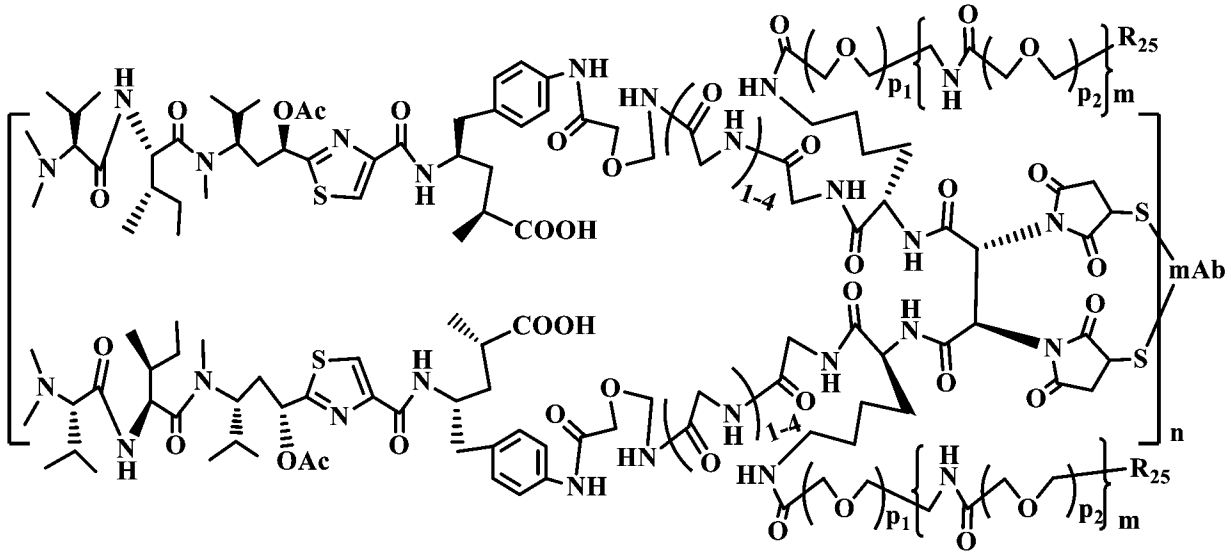
a211，



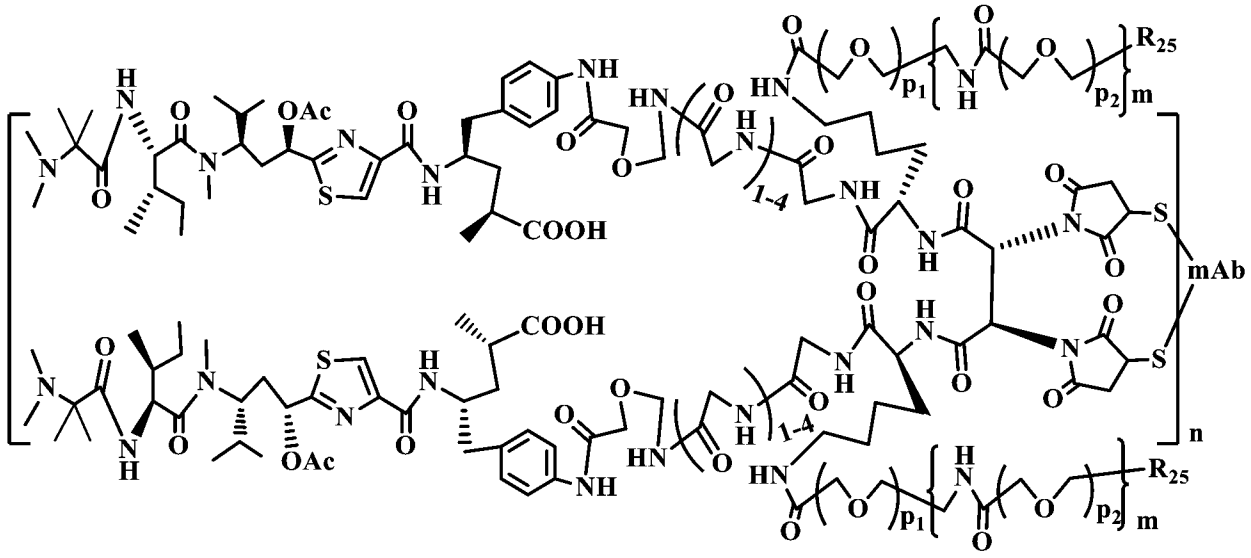
a212，



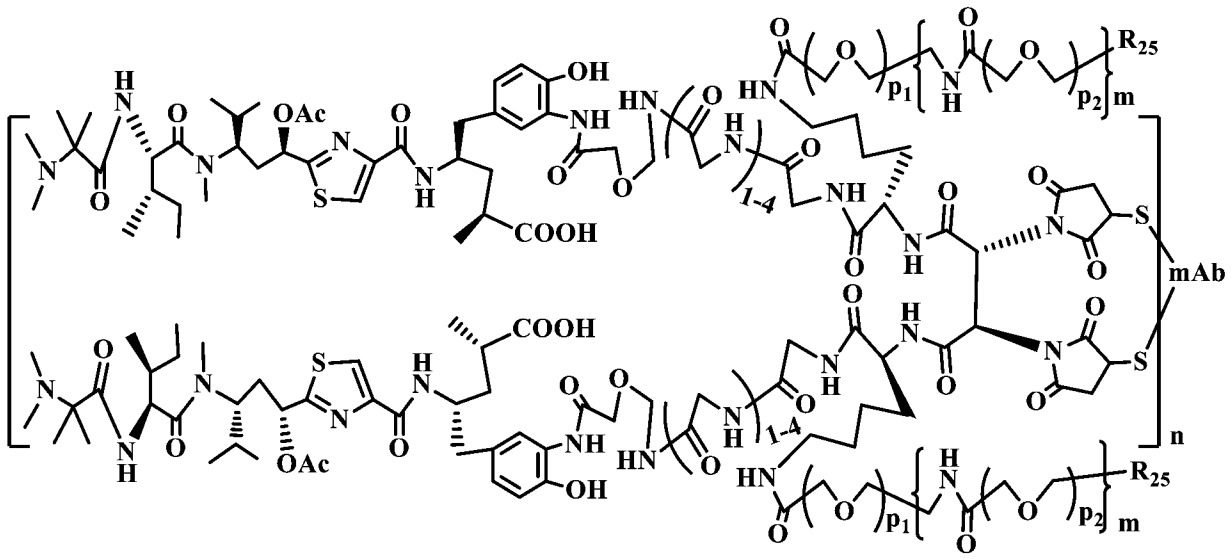
a213，



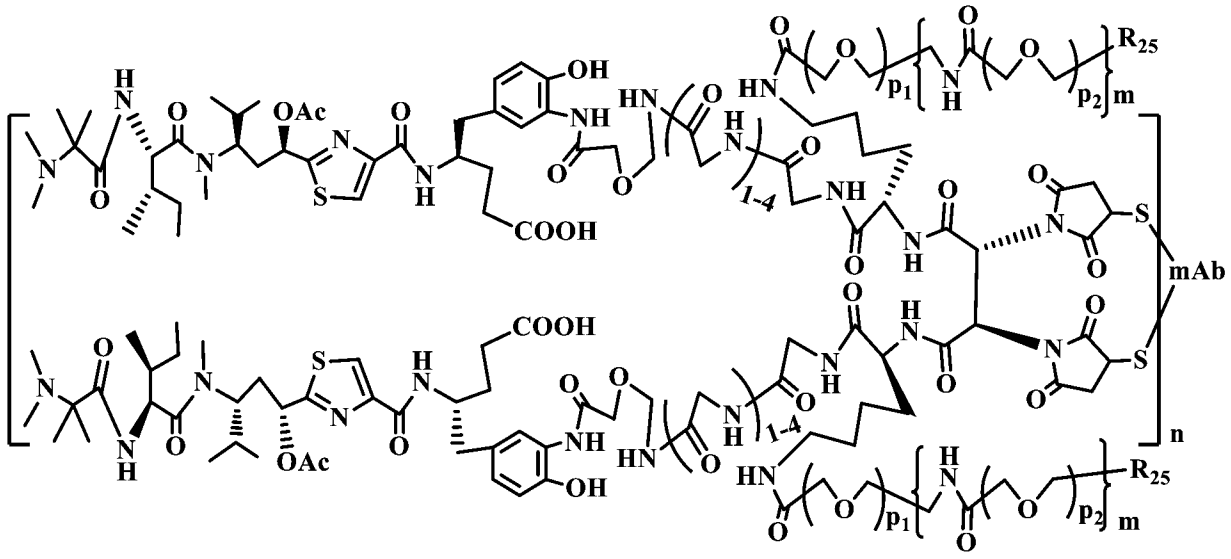
a214，



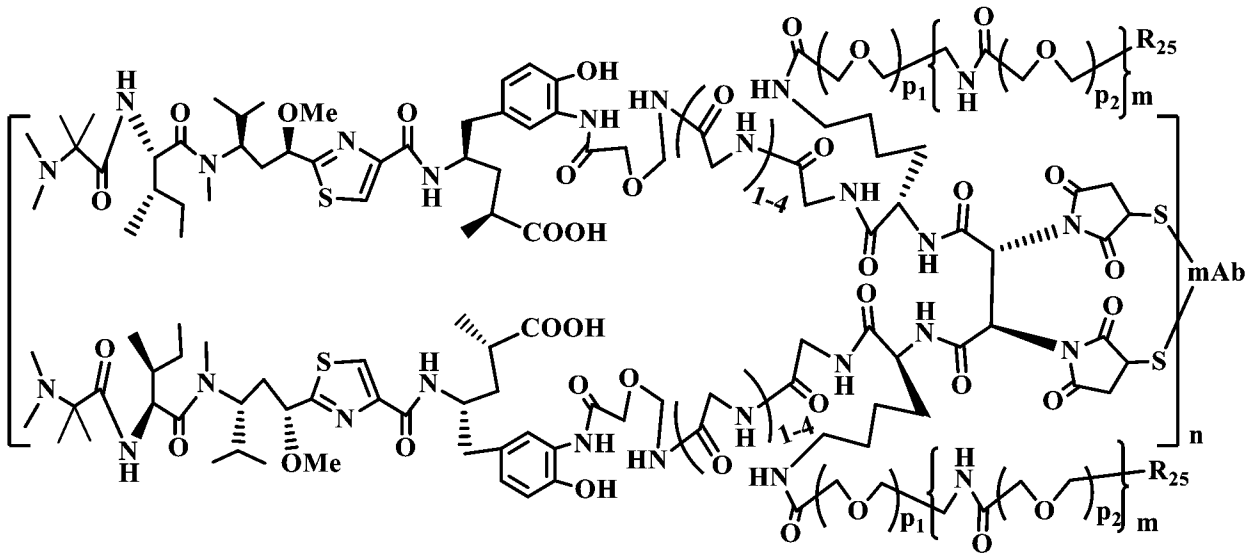
a215，



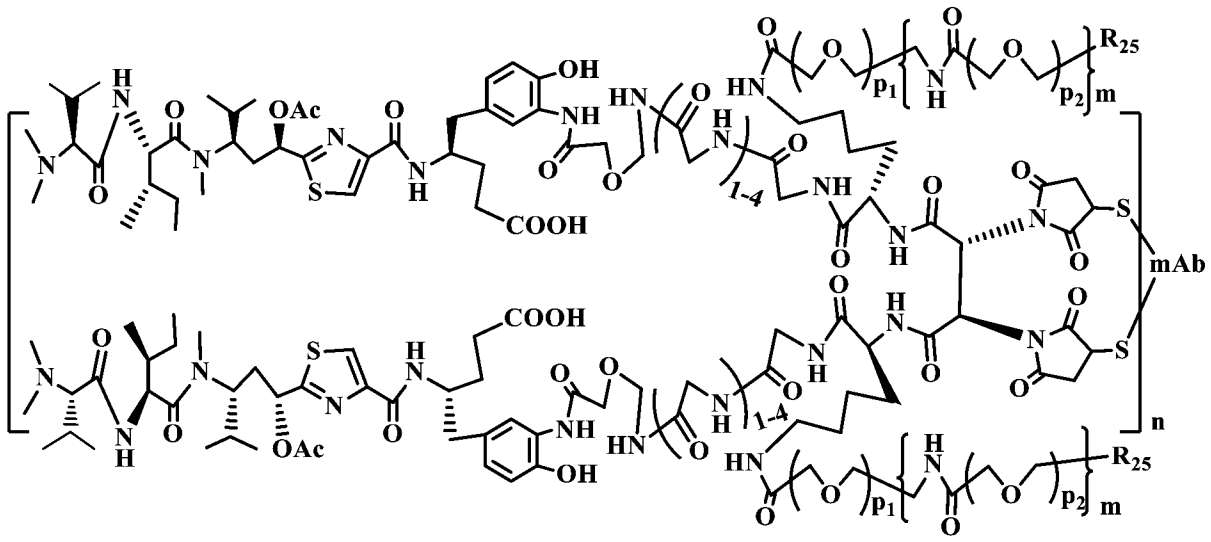
a216，



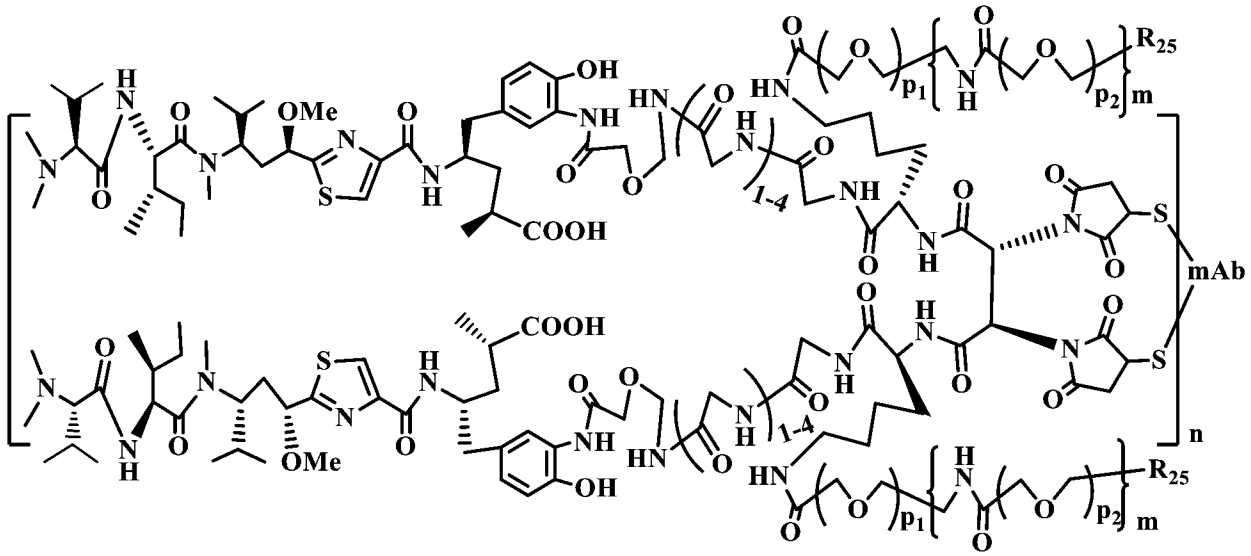
a217，



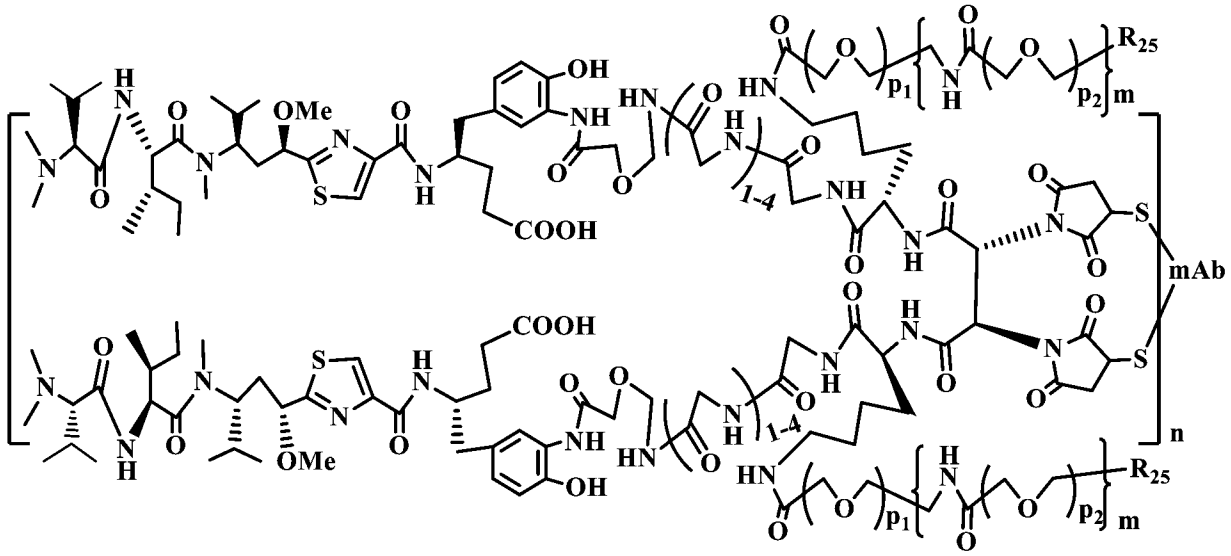
a218，



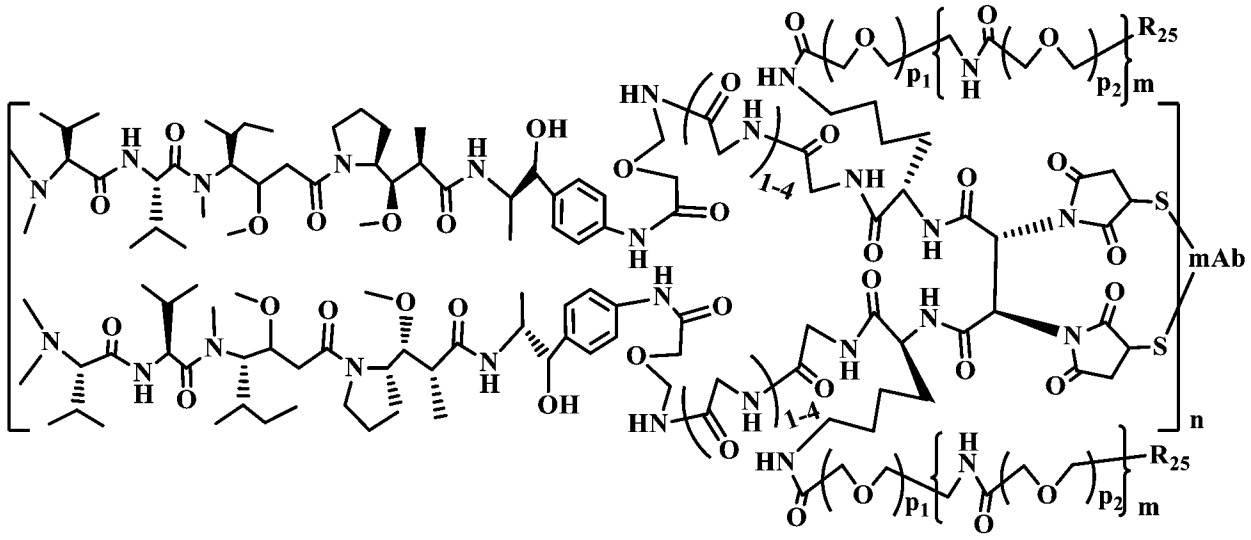
a219，



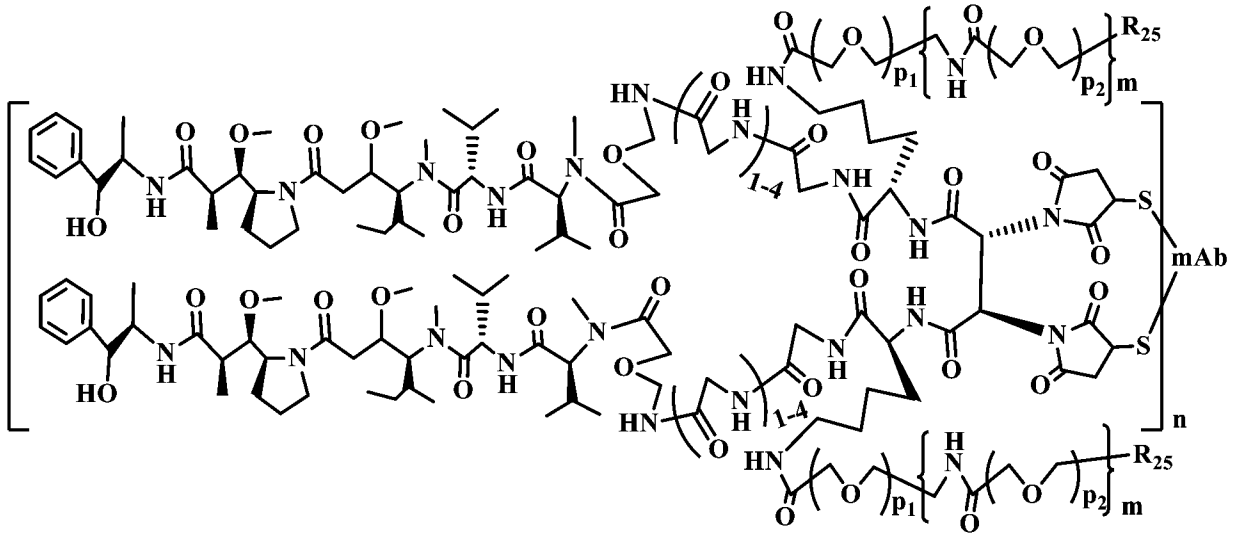
a220，



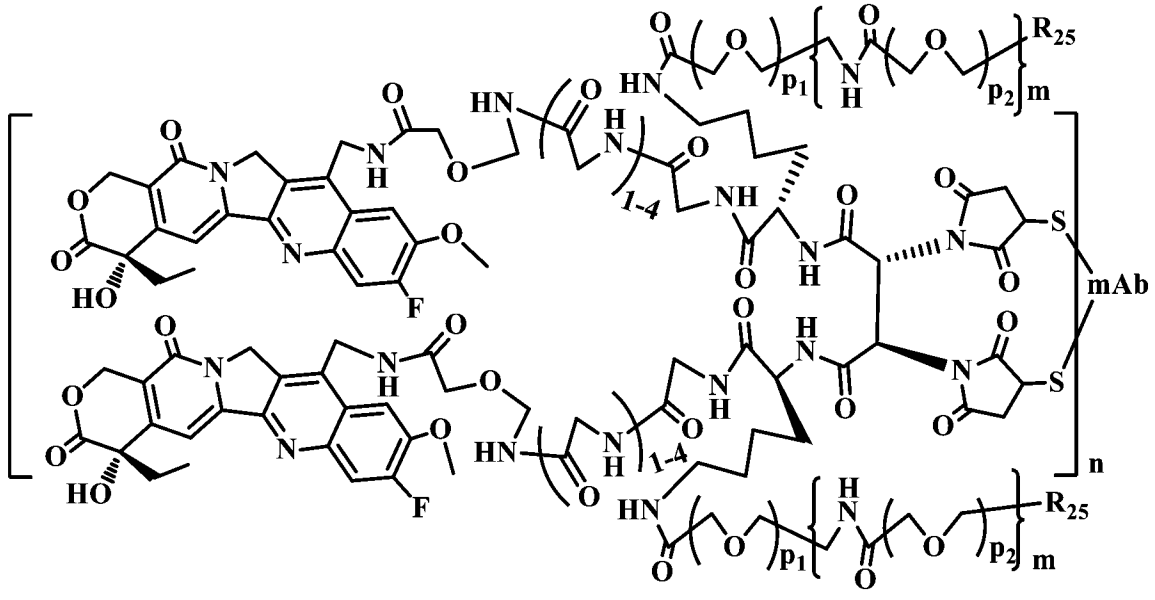
a221，



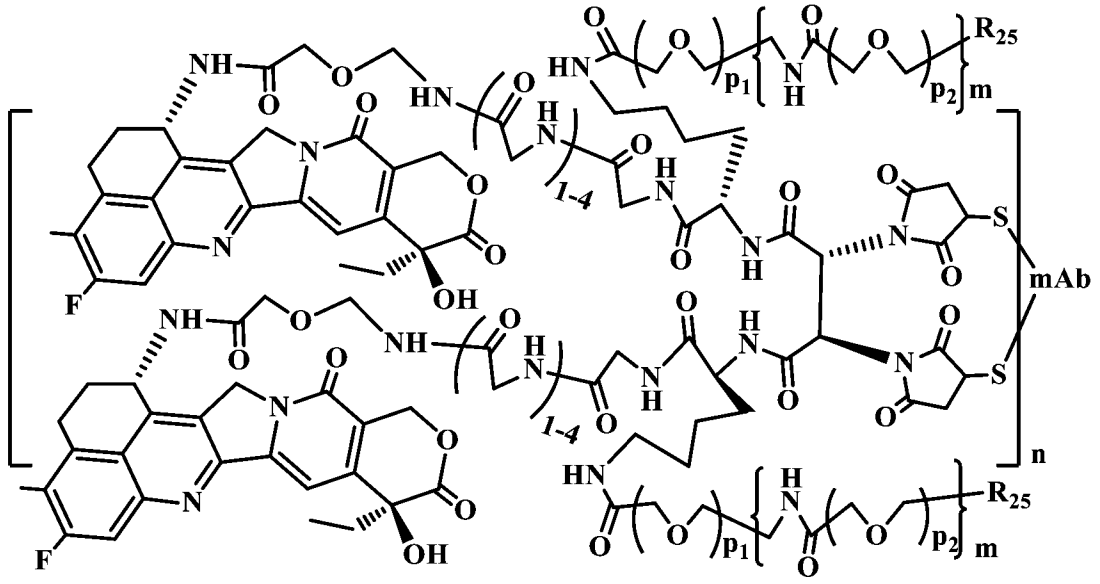
a222，



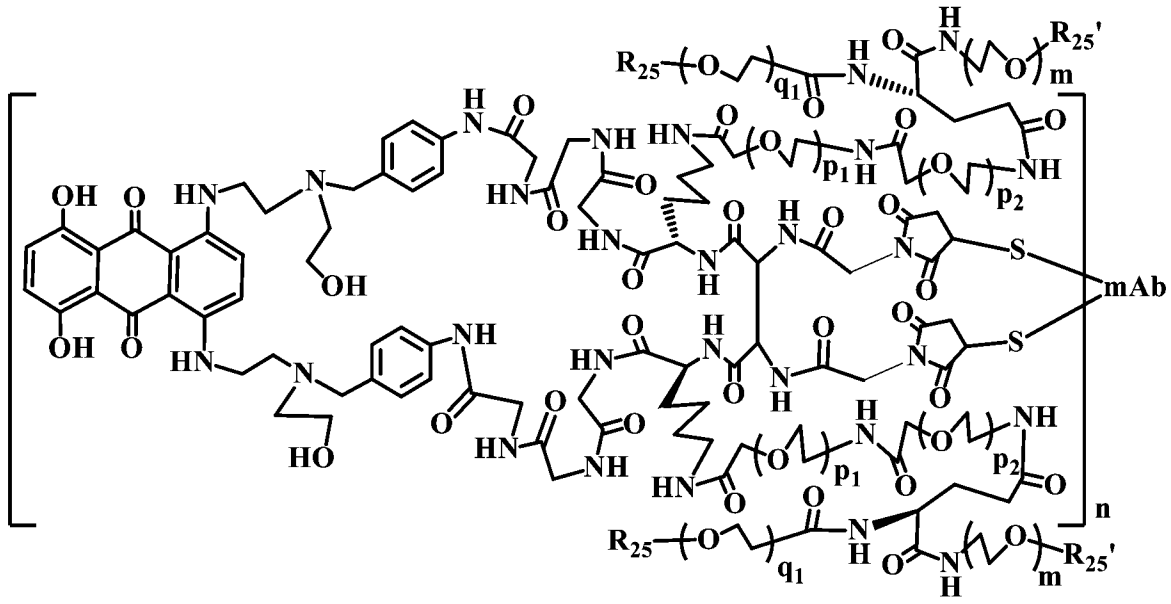
a223，



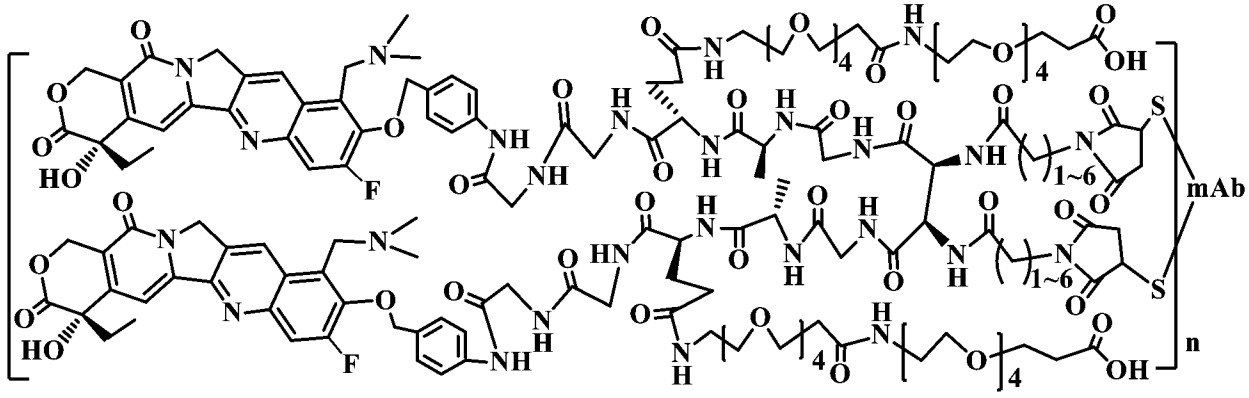
a224，



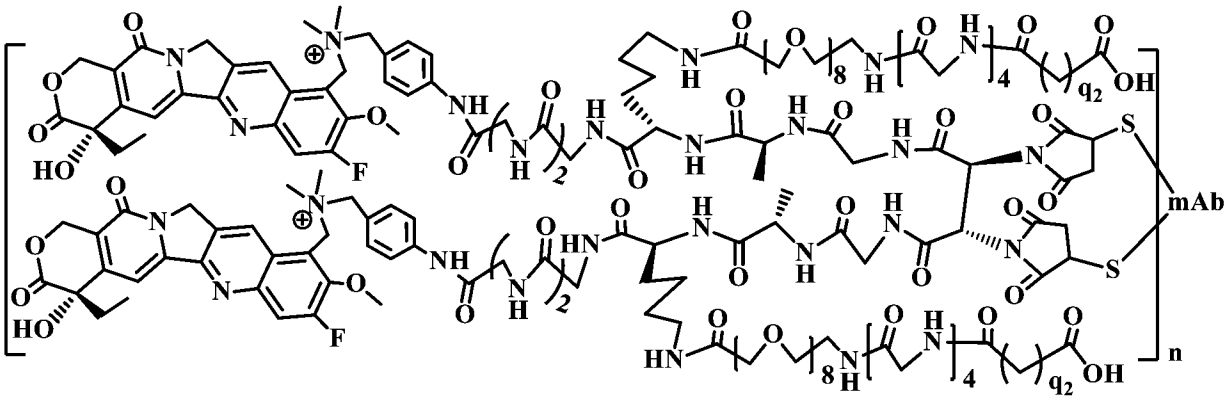
a225，



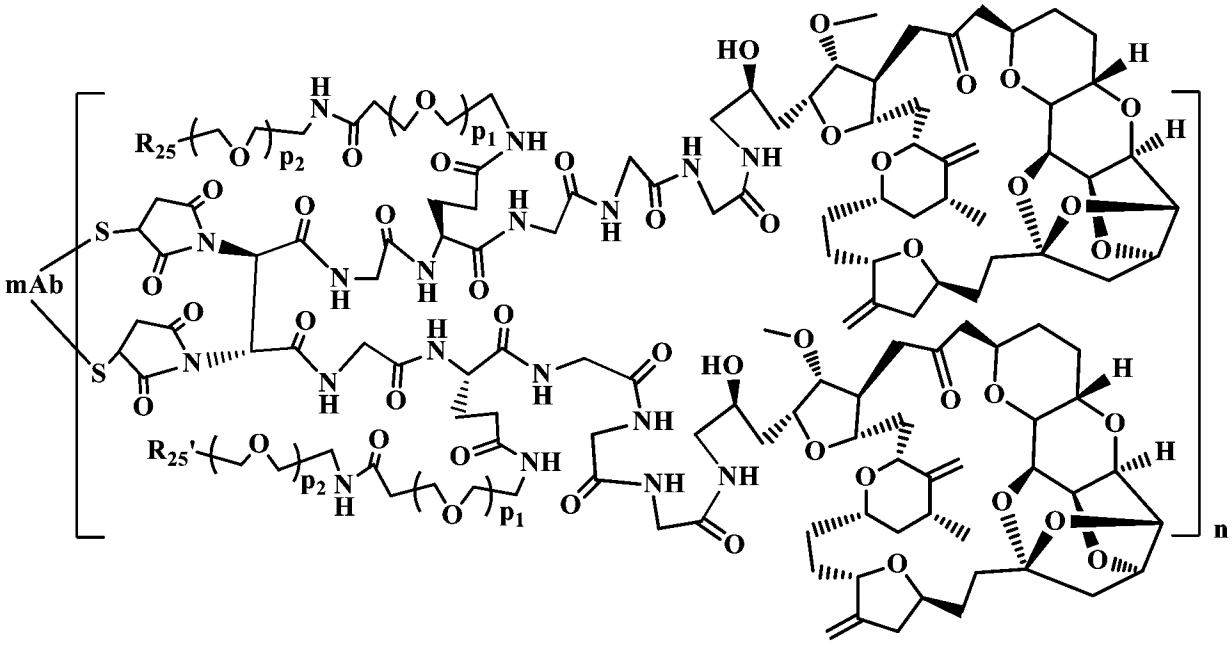
a226，



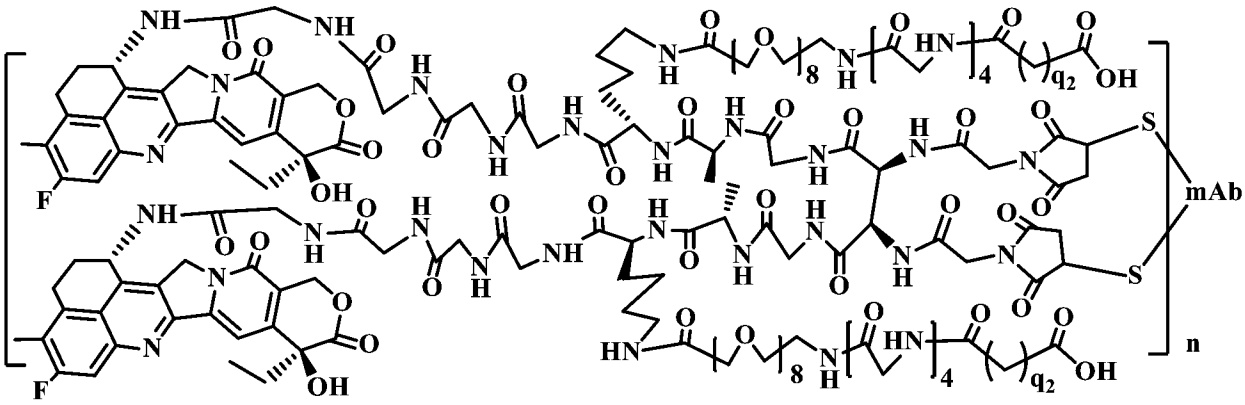
a227，



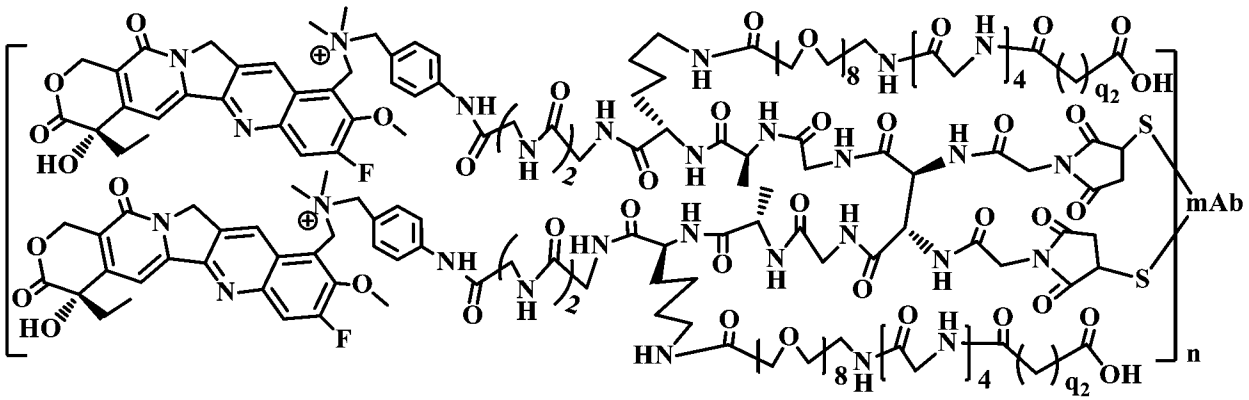
a228，



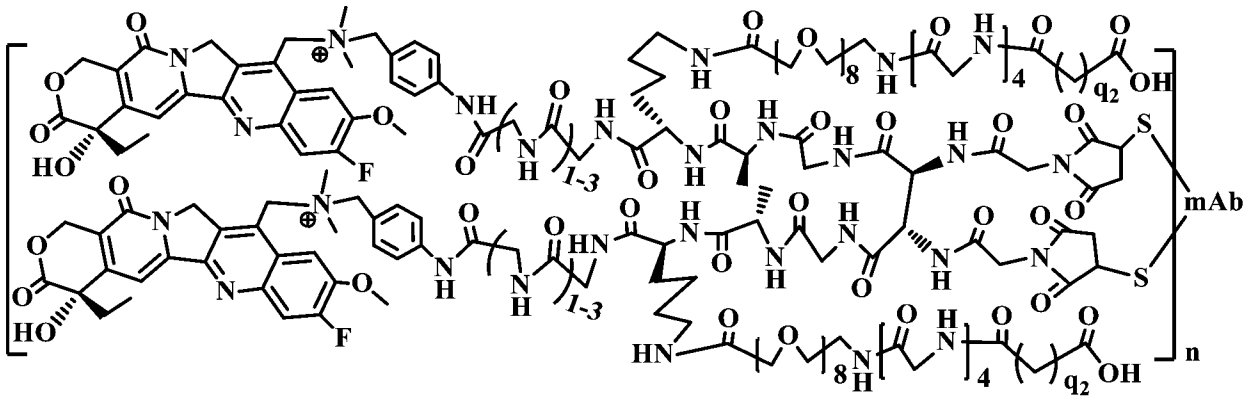
a229，



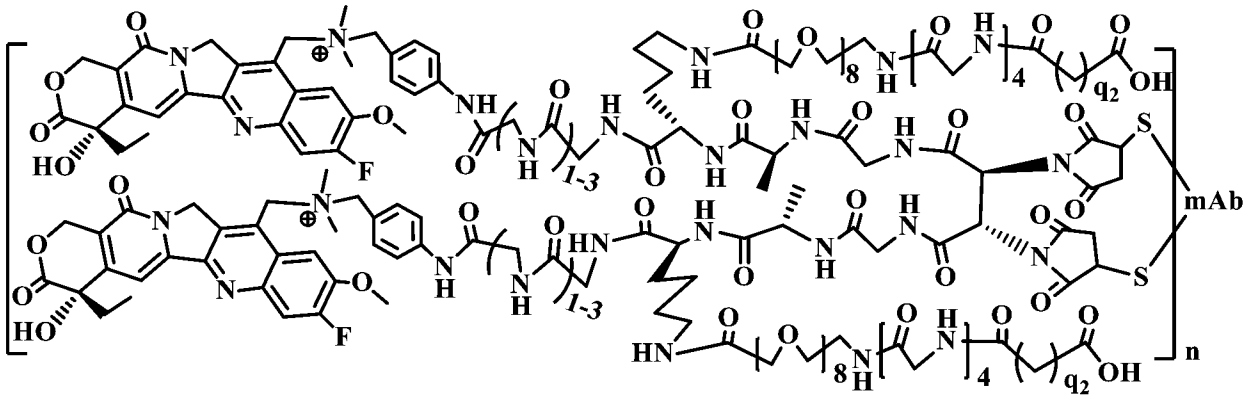
a230，



a231，



a232，



a233，

或一種或多種元素同位素取代物，或藥學上可接受的鹽，水合物或水合鹽；或這些化合物的多晶結構；或旋光異構體，外消旋體，非鏡像異構物或鏡像異構物；

其中 p、p_1、p_2、和 p_3獨立地為 0 -100；m、m_1、和 m_2 獨立地為 0-20；n 是 1 -10；

P^1 是 H、OH、NH_2、COOH、C（O）NH_2、OCH_2OP（O）（OR^{18}）$_2$、OC（O）OP（O）（OR^{18}）$_2$、OPO（OR^{18}）$_2$、NHPO（OR^{18}）$_2$、OC（O）R^{18}、OP（O）（OR^{18}）OP（O）（OR^{18}）$_2$、OC（O）NHR^{18}、OC（O）N（C_2H_4）$_2NCH_3$、OSO_2（OR^{18}）、O-（C_4-C_{12}-糖苷）、OC（O）N（C_2H_4）$_2CH_2N$（C_2H_4）$_2CH_3$、O-（C_1-C_8 直鏈或支鏈烷基）、C_1-C_8 直鏈或支鏈烷基或雜烷基；C_2-C_8 直鏈或支鏈烯基、炔基、烷基環烷基、雜環烷基；C_3-C_8 直鏈或支鏈芳基、芳基烷基、雜環、碳環、環烷基、雜烷基環烷基、烷基羰基、雜芳基；碳酸脂（-C（O）OR^{17}），胺基甲酸酯（-C（O）$NR^{17}R^{18}$）；R^{17}和R^{18} 獨立地為H、鏈或支鏈烷基或雜烷基；C_2-C_8 直鏈或支鏈烯基、炔基、烷基環烷基、雜環烷基；C_3-C_8直鏈或支鏈的芳基、芳基烷基、雜環、碳環、環烷基、雜烷基環烷基、烷基羰基、雜芳基；碳酸酯（-C（O）OR^{17}）、胺基甲酸酯（-C（O）$NR^{17}R^{18}$）；

R^1、R^2、R^3、$R^{1'}$、$R^{2'}$、$R^{3'}$、和 R^4 獨立地為H、C_1~C_8 烷基；C_2~C_8 雜烷基、或 雜環；C_3~C_8芳基、芳基烷基、環烷基、烷基環烷基、雜環烷基、雜烷基環烷基、碳環或烷基羰基；或 R^1R^2、R^1R^3、R^2R^3、R^3R^4、$R^{1'}R^{2'}$、$R^{1'}R^{3'}$、或 $R^{2'}R^{3'}$ 形成3~7元碳環、環烷基、雜環、雜環烷基、芳香基或雜芳香基環系；

R_4、R_5、R_5’、和 R_6，獨立地為 H、C_1-C_8直鏈或支鏈烷基、C_3-C_8芳基、雜芳基、雜烷基、烷基環烷基、醯氧基胺、或（Ar）r、r =1 -6（胺基酸或具有相同或不同胺基酸序列的肽）；

R_7、R_8、和 R_9 獨立地為 H、OH、OR_1、NH_2、NHR_1、C_1-C_6 烷基、或缺省；

R_{10} 是CH_2、O、NH、NR_1、NHC（O）、NHC（O）NH、NHC（O）O、OC（O）O、C（O）、OC（O）、OC（O）（NR_1）、（NR_1）C（O）（NR_1）、C（O）R_1 或缺省；

R_{11} 是 OH、NH_2、NHR_1、$NHNH_2$、NHNHCOOH、O-R_1-COOH、NH-R_1-COOH、NH-（Aa）$_r$COOH、O（CH_2CH_2O）$_p$$CH_2CH_2OH$、O（$CH_2CH_2O$）$_p$$CH_2CH_2NH_2$、NH（$CH_2CH_2O$）$_p$$CH_2CH_2NH_2$、$NR_1R_2$、O（$CH_2CH_2O$）$_p$$CH_2CH_2$-COOH、NH（$CH_2CH_2O$）$_p$$CH_2CH_2COOH$、NH-Ar-COOH、NH-Ar-$NH_2$、O（$CH_2CH_2O$）$_p$$CH_2CH_2$-$NHSO_3H$、NH（$CH_2CH_2O$）$_p$$CH_2CH_2NHSO_3H$、$R_1$-$NHSO_3H$、NH-$R_1$-$NHSO_3H$、O（$CH_2CH_2O$）$_p$-$CH_2CH_2NHPO_3H_2$、NH（$CH_2CH_2O$）$_p$$CH_2CH_2NHPO_3H_2$、$OR_1$、$R_1$-$NHPO_3H_2$、$R_1$-$OPO_3H_2$、O（$CH_2CH_2O$）$_p$$CH_2CH_2OPO_3H_2$、$OR_1$-$NHPO_3H_2$、NH-$R_1$-$NHPO_3H_2$、或 NH（$CH_2CH_2O$）$_p$$CH_2$-$CH_2NHPO_3H_2$、其中（Aa）r是1-8個胺基酸；n和$m_1$獨立地為1-20；p 是 1 -1000；$R_1$、$R_2$ 和 Ar，的定義如本申請中前文所述；“〰”定義同上；

R_{12} 和 R_{12}’獨立地為 H、=O、OR_1、NH_2、NH（CH_3）、$NHNH_2$、COOH、SH、OZ_3、SZ_3、F、Cl、或 C_1-C_8直鏈或支鏈烷基、C_3-C_8 芳基、雜芳基、雜烷基、烷基環烷基、醯氧基胺；

R_{25}、R_{26} 和 R_{25}’獨立地為 H、Ac、R_1、C（O）NHR_1、C（O）R_1、R_1COOH、R_1COOR_2、R_1OR_2、R_1CONHR_2、CH_2OAc、CH_2NHAc、R_1NH_2、NR_1R_2、$N^+R_1R_2R_3$、CH_2CONH（CH_2）$_{q1}$COOH、CH_2CONH（CH_2）$_{q1}$$COOR_1$、$CH_2CONH$（$CH_2$）$_{q1}$$N^+R_1R_2R_3$、或（Aa）r；

X_1、X_2、X_4、Y_1 和 Y_2，當與“〰“位點連接，獨立地為 O、NH、

NHNH、NR_5、S、C（O）O、C（O）NH、OC（O）NH、OC（O）O、NHC（O）NH、NHC（O）S、OC（O）N（R_1）、N（R_1）C（O）N（R_2）、CH_2、CHNH、CH_2O、C（O）NHNHC（O）、$OCH_2C_6H_4NH$、$NHCH_2C_6H_4NH$、$SCH_2C_6H_4NH$ 和 C（O）NR_1；當未與“〰”位點連接，為OH、NH_2、$NHNH_2$、NHR_1、SH、C（O）OH、C（O）NH_2、OC（O）NH_2、OC（O）OH、NHC（O）NH_2、NHC（O）SH、OC（O）NH（R_1）、N（R_1）C（O）NH（R_2）、C（O）NHNHC（O）OH 和 C（O）NHR_1；另外，當與S連接時 Y_2 可以是 O、O_2、NR_1、NH、或缺省；

X_3 和 Y_3 獨立地為 N、NH、CH、CH_2 或 CR_1，或X_3 和 Y_3 之一可以缺省；其中R_1 是 C_1-C_8 直鏈或支鏈烷基、雜烷基；C_3-C_8 芳基、雜芳基、烷基環烷基、醯氧基、烷基芳基、烷基芳氧基、烷基芳基胺基、烷基芳基巯基；（Ar）r、r =1 -6 （胺基酸或具有相同或不同胺基酸序列的肽）；

X_3 是 H、CH_3 或 X_1’R_1’、其中 X_1’是NH、N（CH_3）、NHNH、O、或 S；且 R_1’是H、C_1-C_8 直鏈或支鏈烷基、C_3-C_8 芳基、雜芳基、雜烷基、烷基環烷基、醯氧基胺；

Z_3’是 H、$COOR_1$、NH_2、NHR_1、OR_1、$CONHR_1$、$NHCOR_1$、$OCOR_1$、OP（O）（OM_1）（OM_2）、OCH_2OP（O）（OM_1）（OM_2）、OSO_3M_1、R_1、或 O-糖苷 （葡萄糖苷、半乳糖苷、甘露糖苷、葡糖醛酸苷/葡糖苷酸、阿洛苷、果糖苷等）、NH-糖苷、S-糖苷或CH_2-糖苷；M_1和M_2 獨立地為H、Na、K、Ca、Mg、NH_4、$NR_1R_2R_3$；

Z_3 是H、OP（O）（OM_1）（OM_2）、OCH_2OP（O）（OM_1）

（OM_2）、OSO_3M_1、PO（OM_1）（OM_2）、SO_3M_1、CH_2PO（OM_1）（OM_2）、CH_3N（CH_2CH_2）$_2NC$（O）-、O（CH_2CH_2）$_2NC$（O）-、R_1、或 O-糖苷 （葡萄糖苷、半乳糖苷、甘露糖苷、葡糖醛酸苷/葡糖苷酸、阿洛苷、果糖苷等）、NH-糖苷、S-糖苷 或CH_2-糖苷；M_1 和 M_2 獨立地為 H、Na、K、Ca、Mg、NH_4、$NR_1R_2R_3$；

X_5是 F、Cl、Br、I、OH、OR_1、R_1、OPO_3H_2、OSO_3H、NHR_1、$OCOR_1$、$NHCOR_1$、CN或OCH_2OP（O）（OM_1）（OM_2）；

Y_5 是 NH、NHNH、NR_1、O、$OCH_2C_6H_4NH$、$NHCH_2C_6H_4NH$、$SCH_2C_6H_4NH$、R_1、（Ar）r，r =1 -6 （具有相同或不同胺基酸序列的胺基酸或肽）；

X_6 和 Y_6 獨立地為 CH、C（O）、N、P（O）NH、P（O）NR_1、CHC（O）NH、C_1-C_8直鏈或支鏈烷基、或雜烷基；C_3-C_8 芳基、雜芳基、烷基環烷基、醯氧基、烷基芳基、烷基芳氧基、烷基芳基胺基或 Aa（胺基酸、較佳自Lys、Phe、Asp、Glu、Ser、Thr、His、Cys、Tyr、Trp、Gln、Asn、Arg）；

Z_5 和 Z_5’ 獨立地選自由下列組成之群組 O、NH、NHNH、NR_5、S、C（O）O、C（O）NH、OC（O）NH、OC（O）O、NHC（O）O、NHC（O）NH、NHC（O）S、OC（O）N（R_1）、N（R_1）C（O）N（R_2）、C（O）NHNHC（O）或C（O）NR_1；

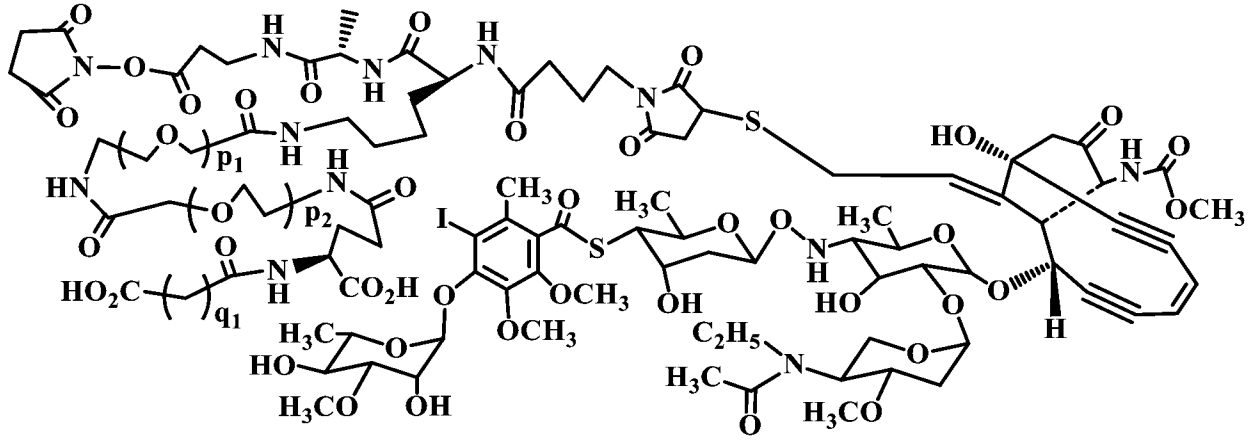
X_8 是 O、S、NH、NHNH、NHR_1、SR_{12}、SSR_{12}、SSCH（CH_3）R_1、SSC（CH_3）$_2R_1$、或R_1；

其中 R_1、R_2 和 R_3 獨立地為 H、C_1-C_8 直鏈或支鏈烷基、C_3-C_8芳基、雜芳基、雜烷基、烷基環烷基、醯氧基胺；

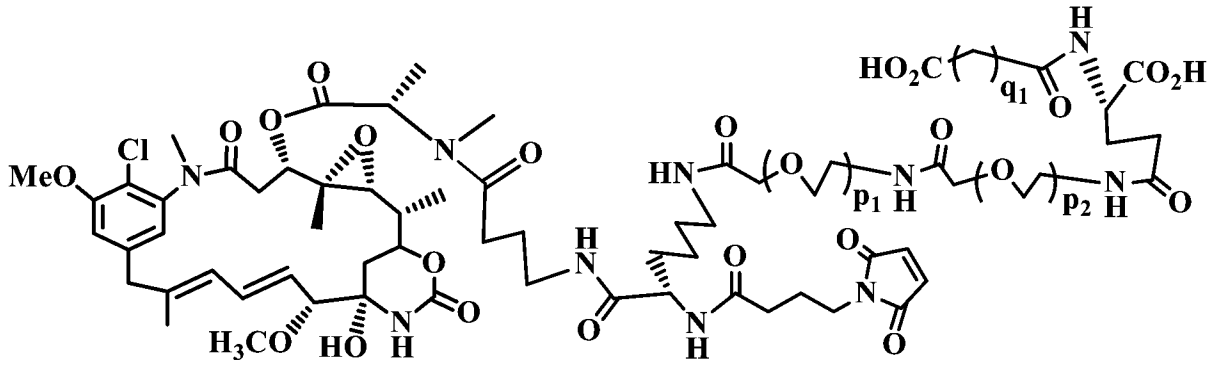
Lv_1是同前文定義的離去基團。較佳地 Lv_1為F、Cl、Br、I、OTs、OMS、$OC_6H_3(NO_2)_2$、OC_6F_5、$OC_6H_4(NO_2)$、OC_6Cl_5；

M_1 和 M_2 獨立地為 H、Na、K、Ca、Mg、NH_4、$NR_1R_2R_3$；“〰”的定義與前文相同。

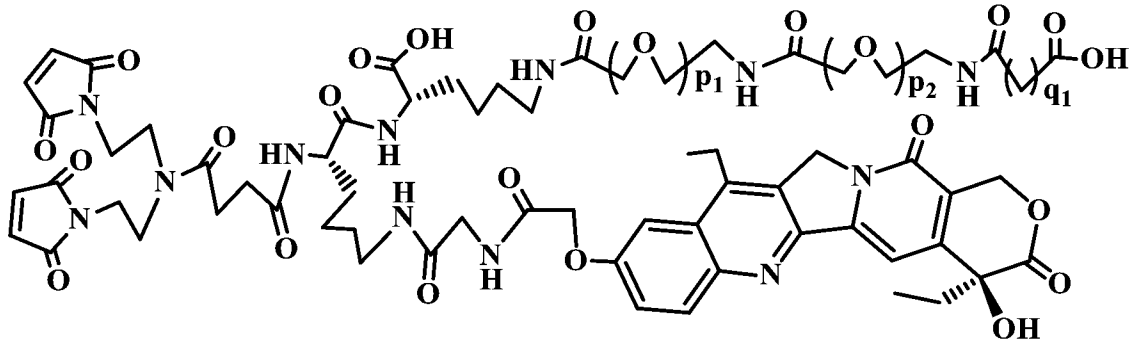
【0135】較佳的如式（I）、（II）和（III）的藥物/連接子複合物，應用本發明的方法，超過80%的總藥物在重-輕鏈之間的半胱氨酸連接，結構如下圖所示：



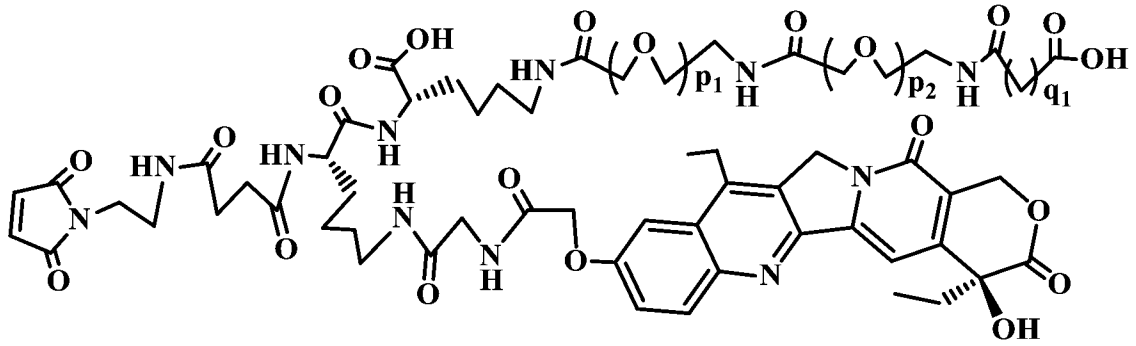
b001，



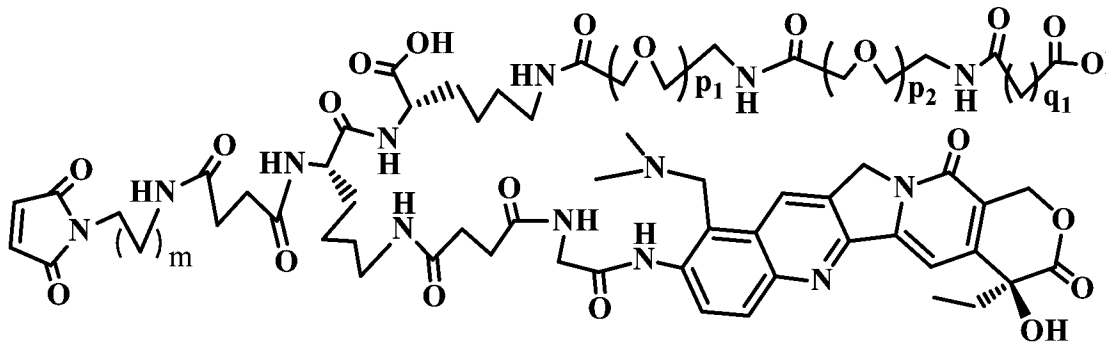
b002，



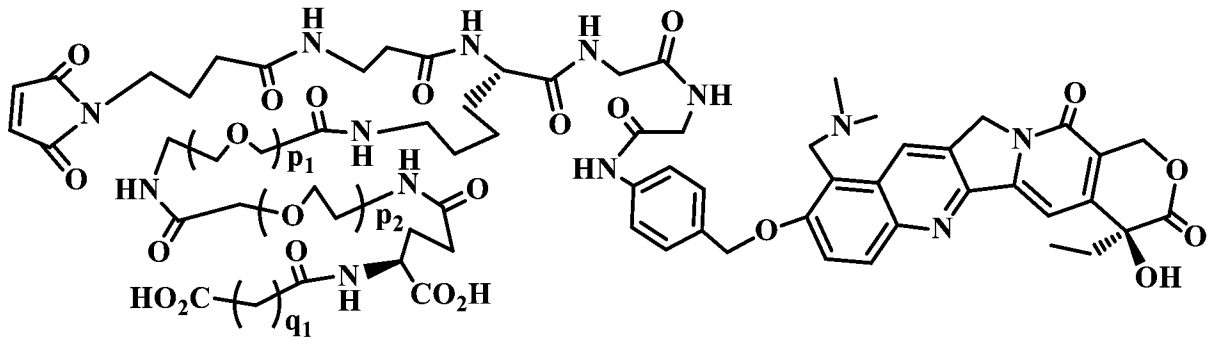
b003，



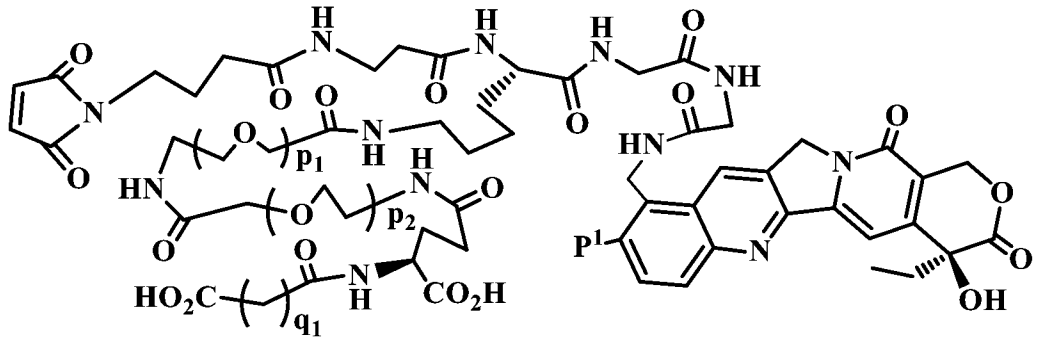
b004，



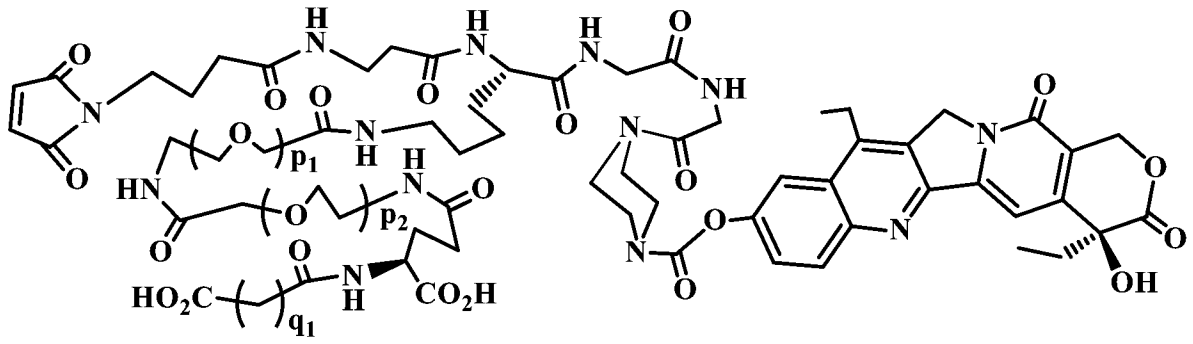
b005，



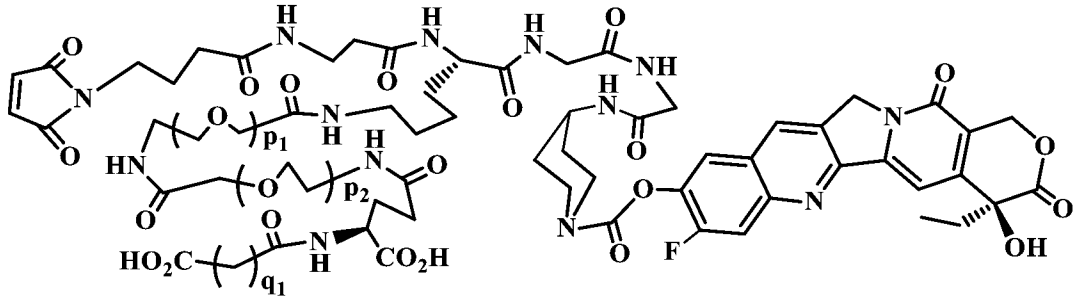
b006，



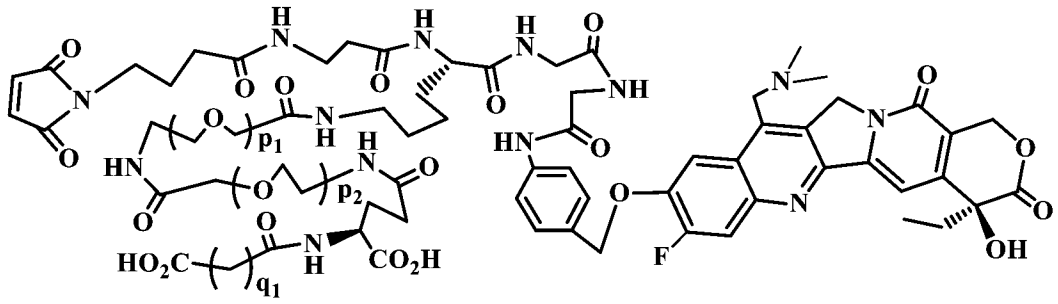
b007，



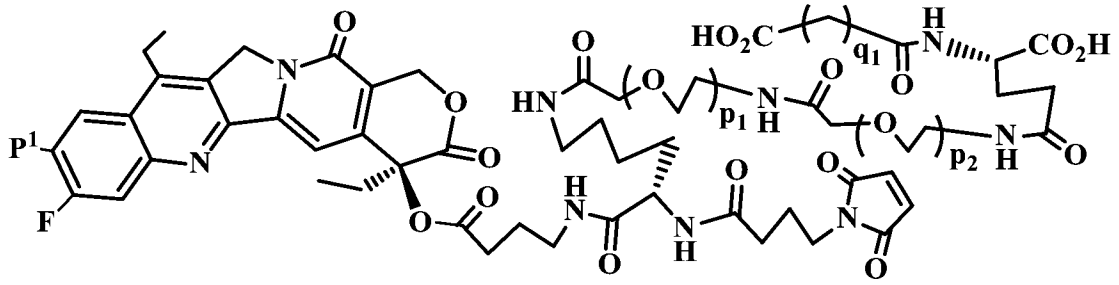
b008，



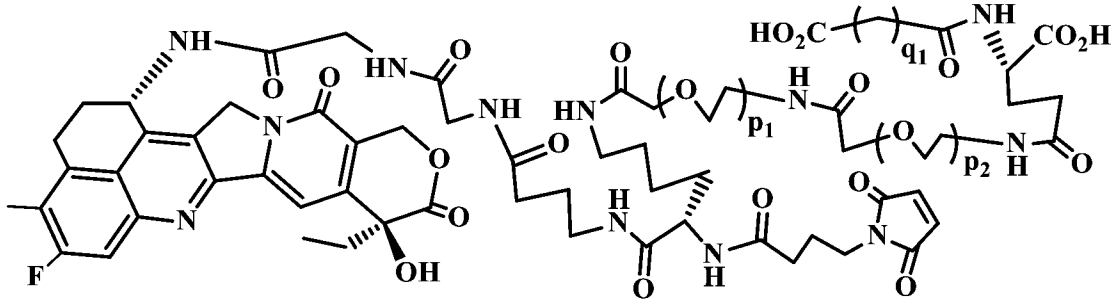
b009，



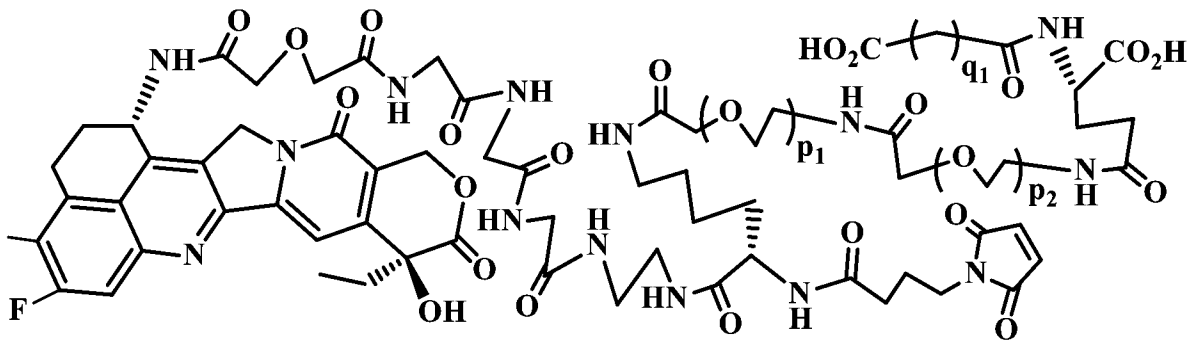
b010，



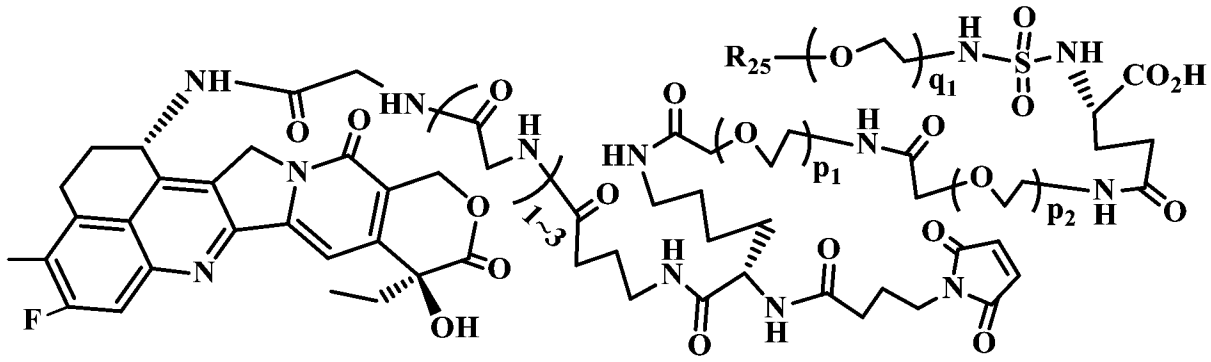
b011，



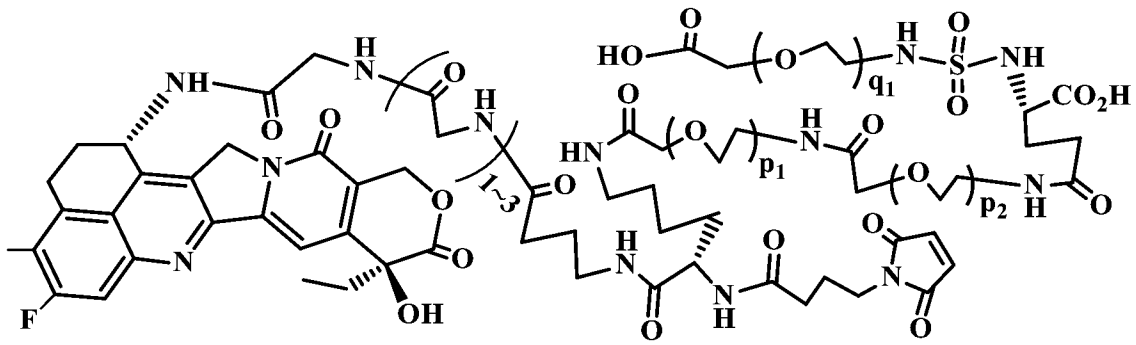
b012，



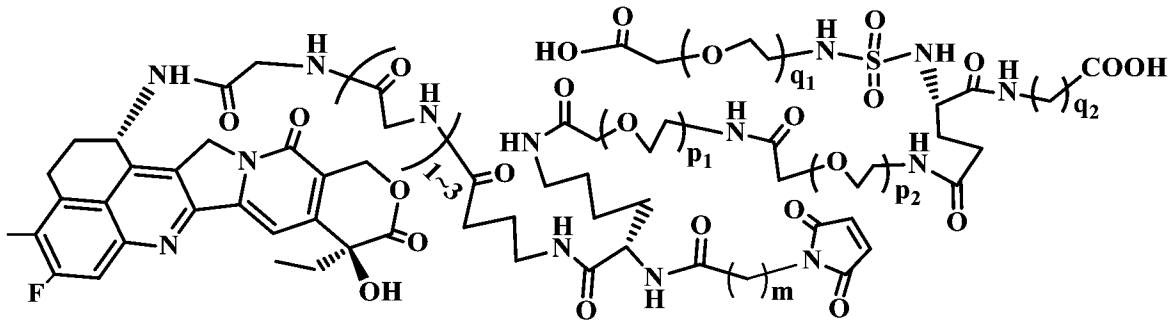
b013，



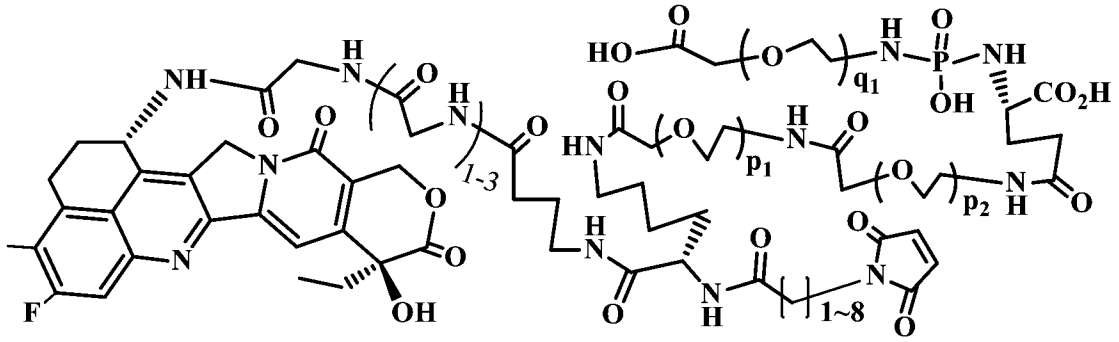
b014，



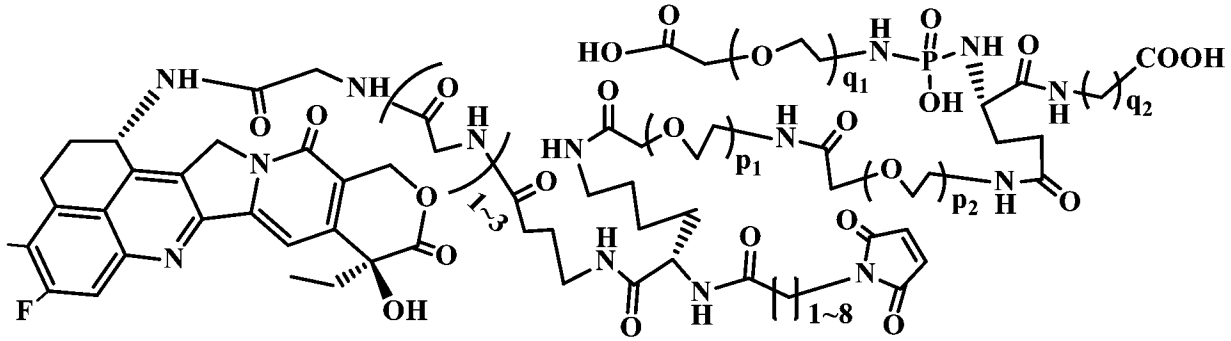
b015，



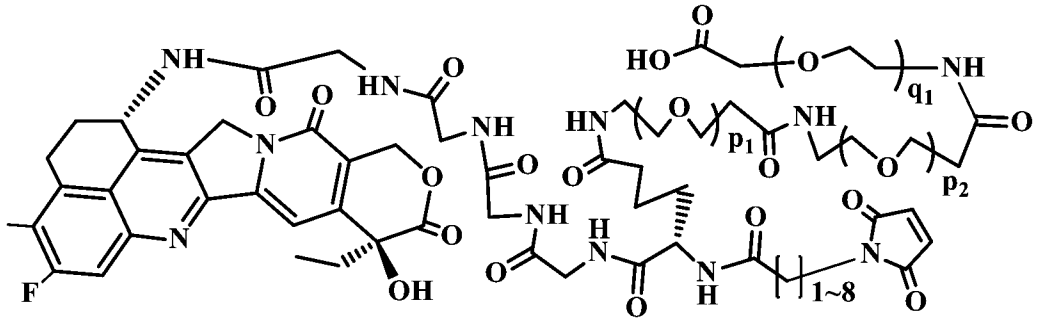
b016，



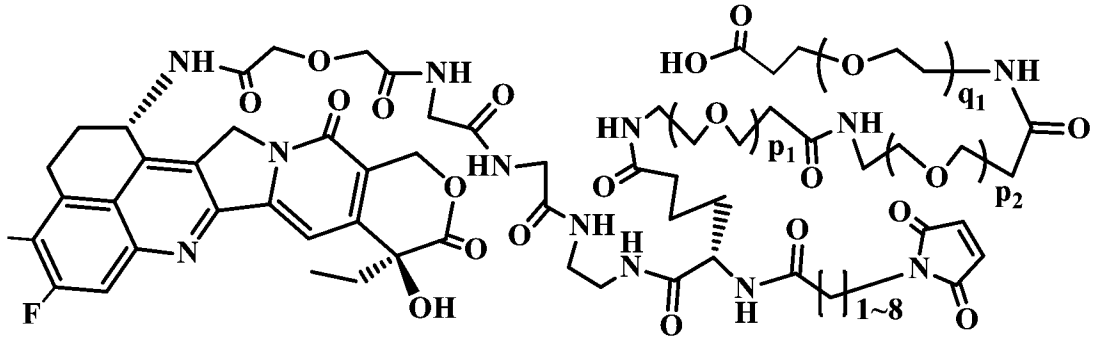
b017，



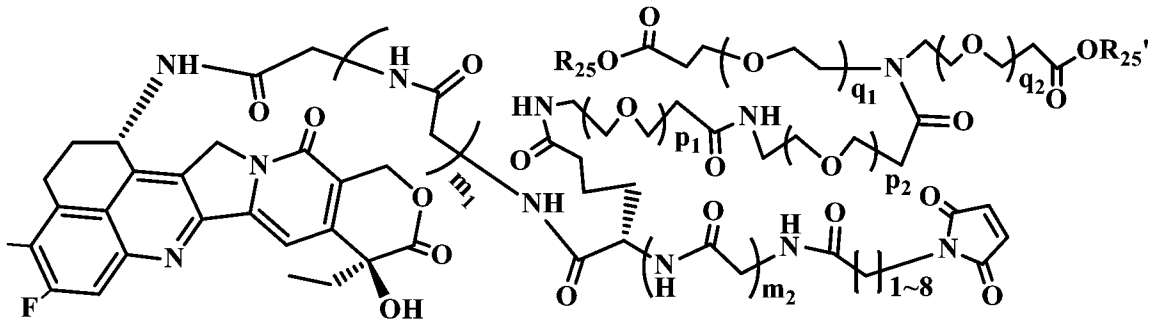
b018，



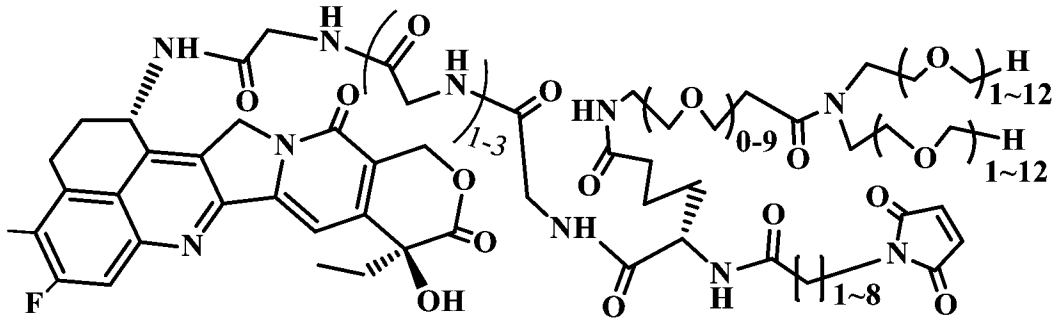
b019，



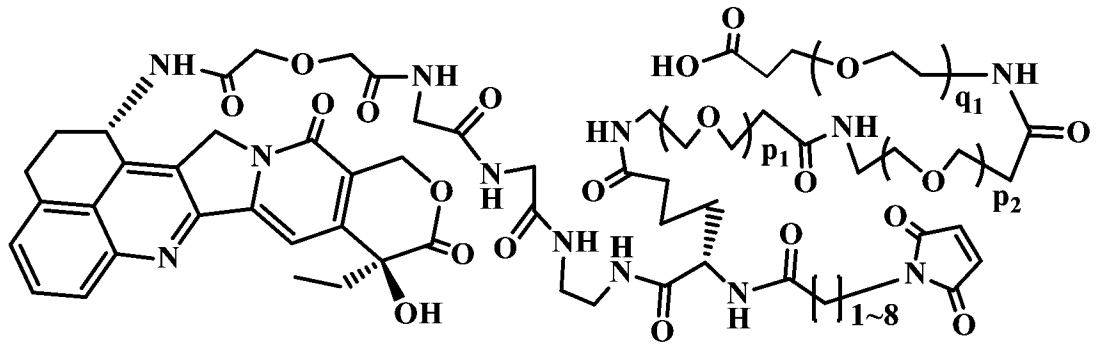
b020，



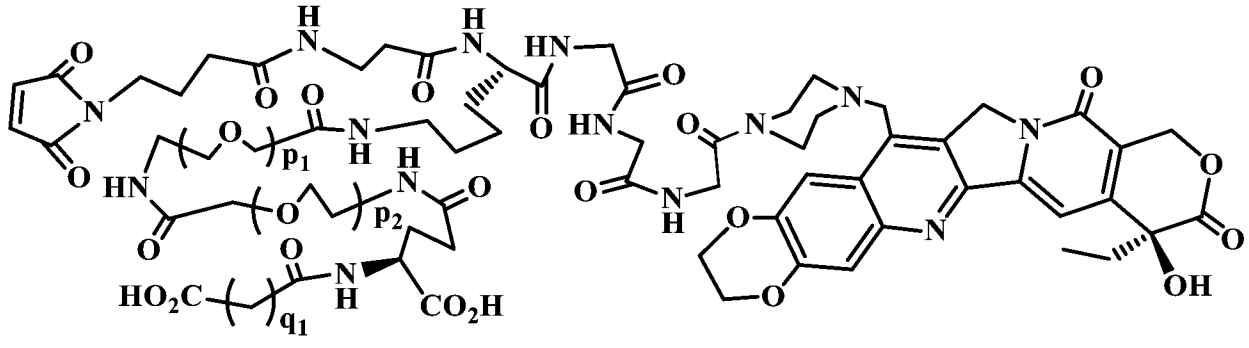
b021，



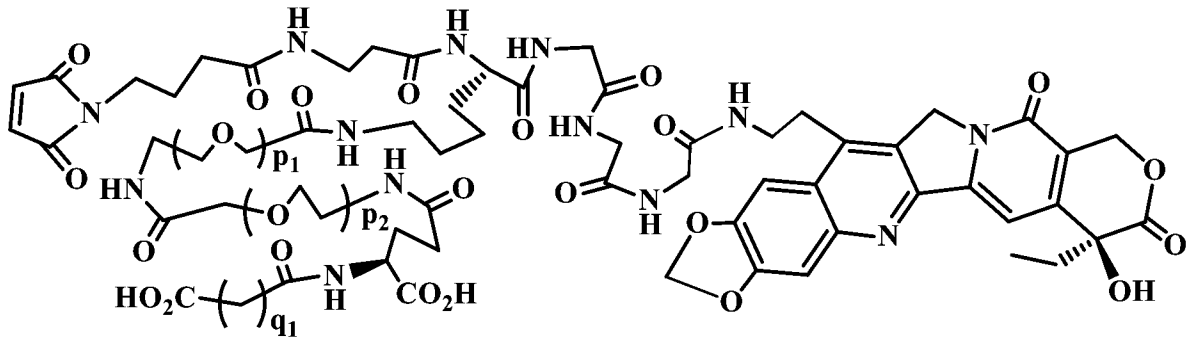
b022，



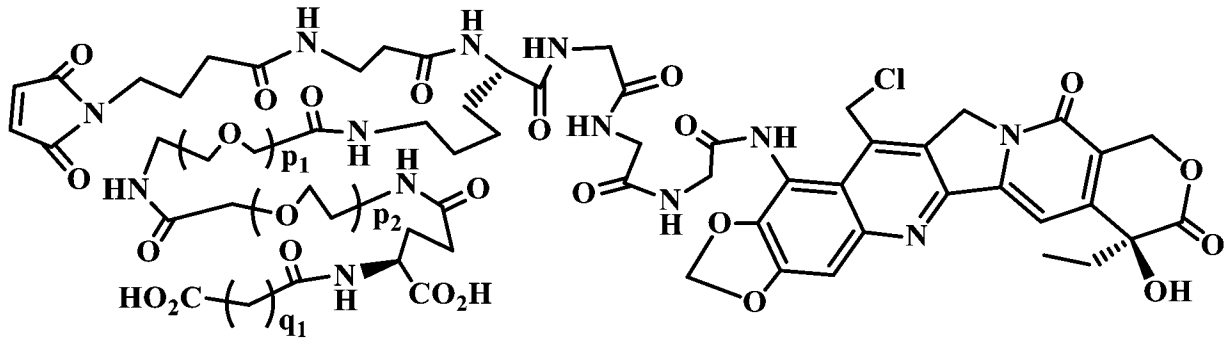
b023，



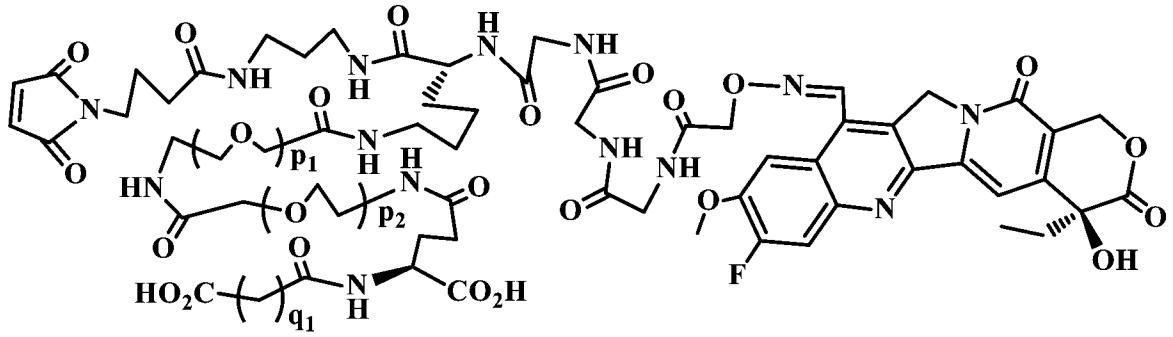
b024，



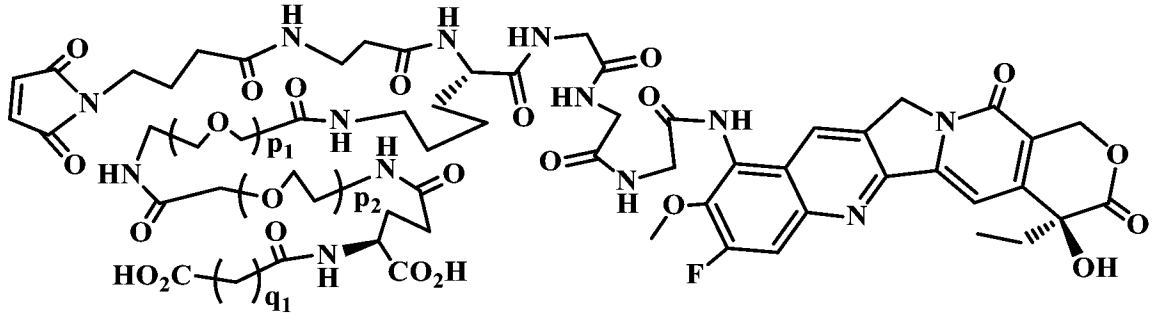
b025，



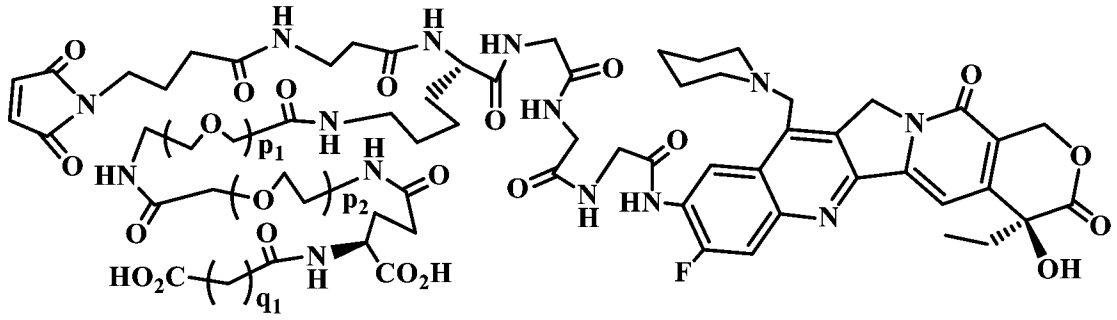
b026，



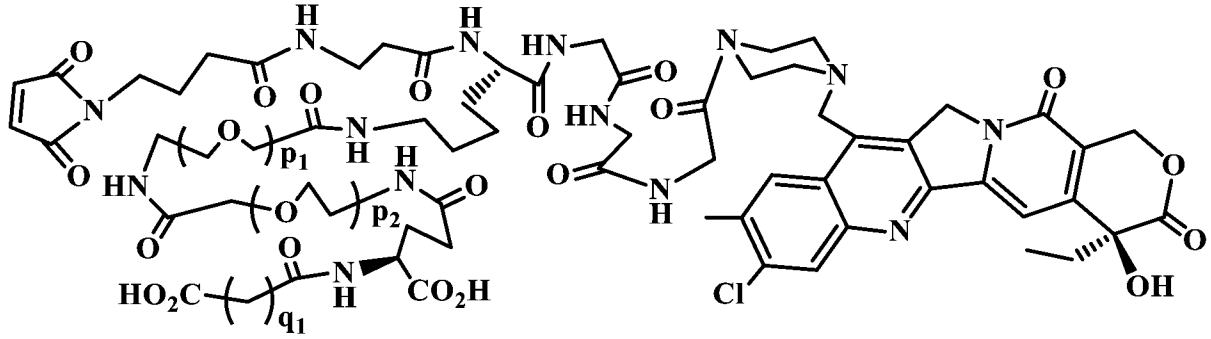
b027，



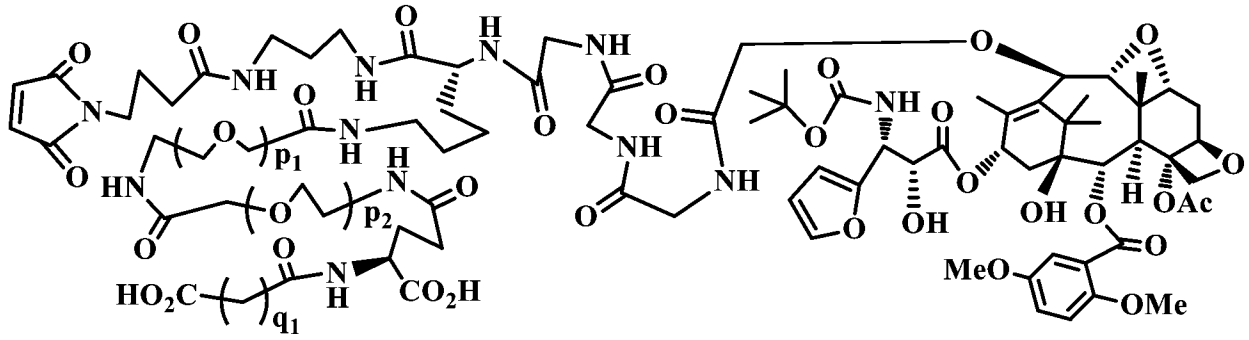
b028，



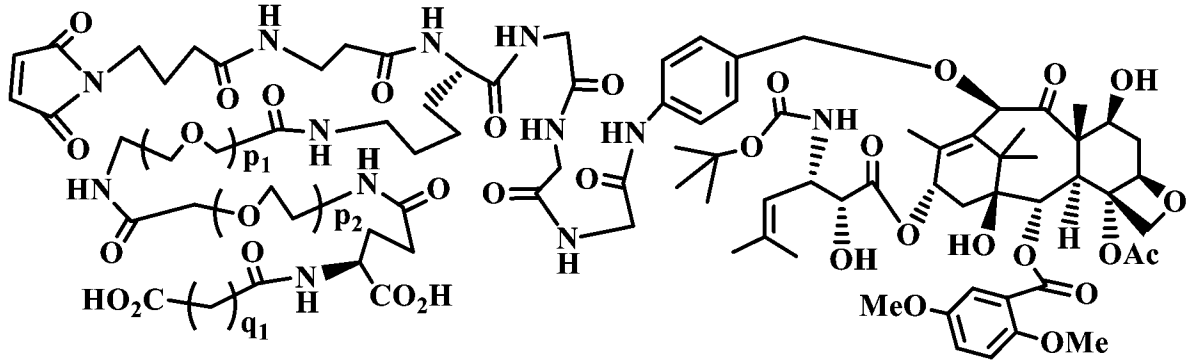
b029，



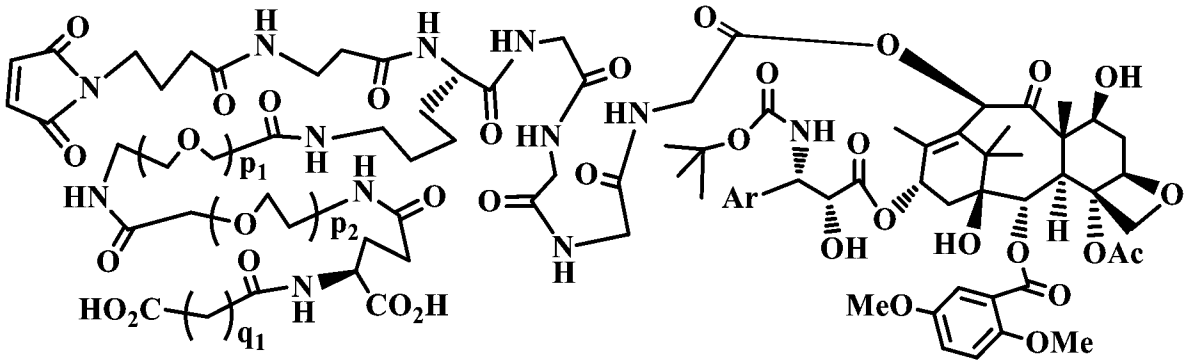
b030，



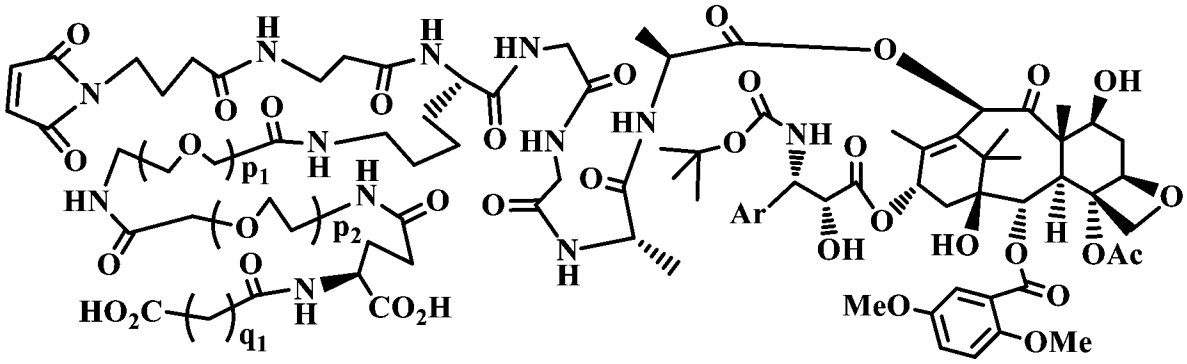
b031，



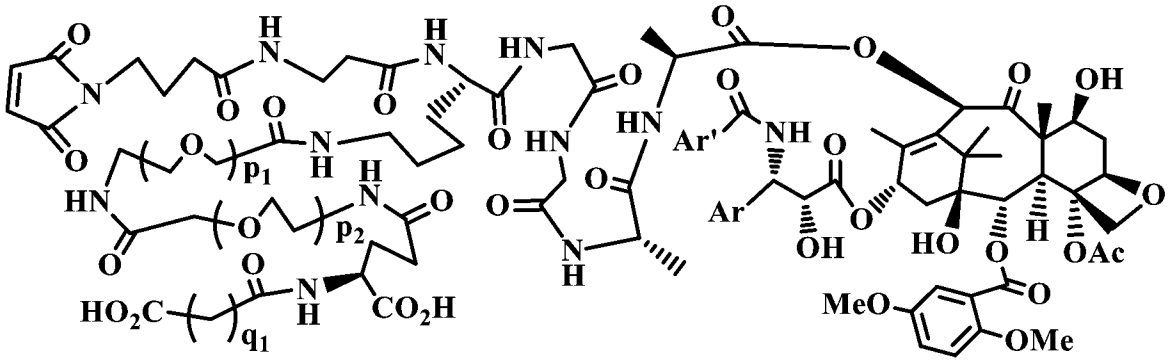
b032，



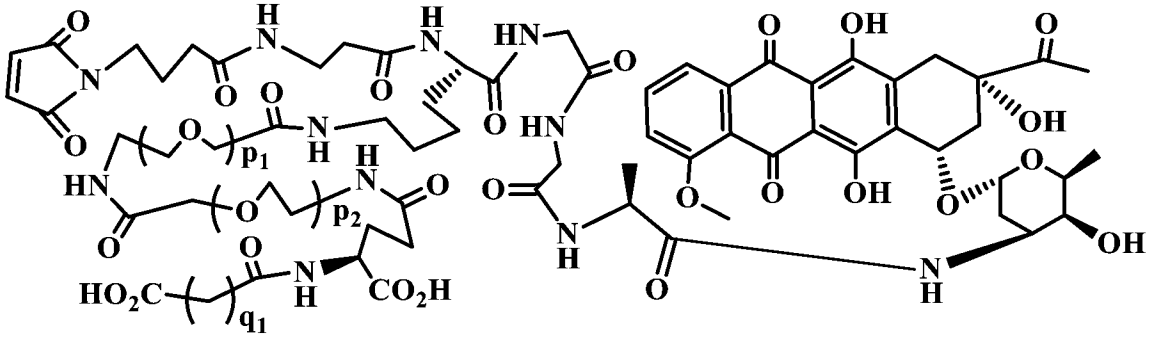
b033，



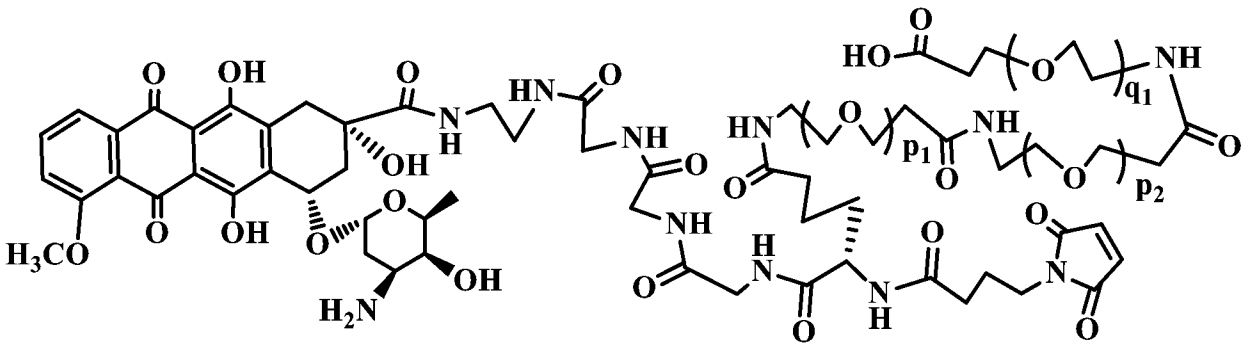
b034，



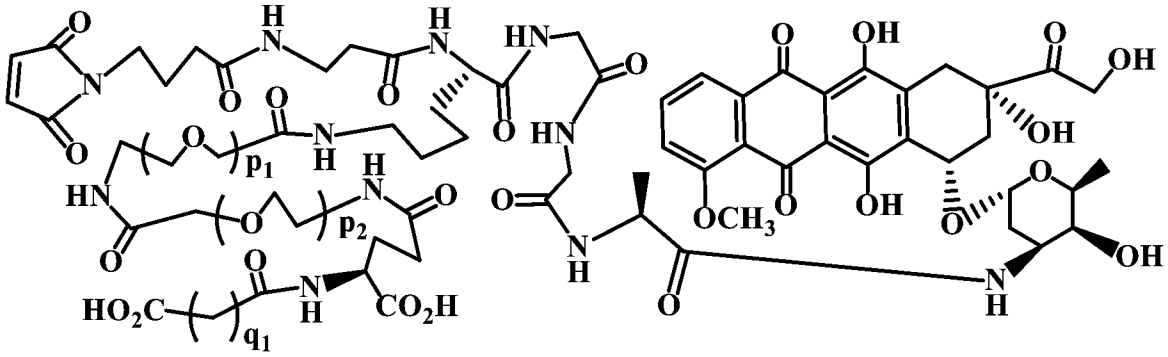
b035，



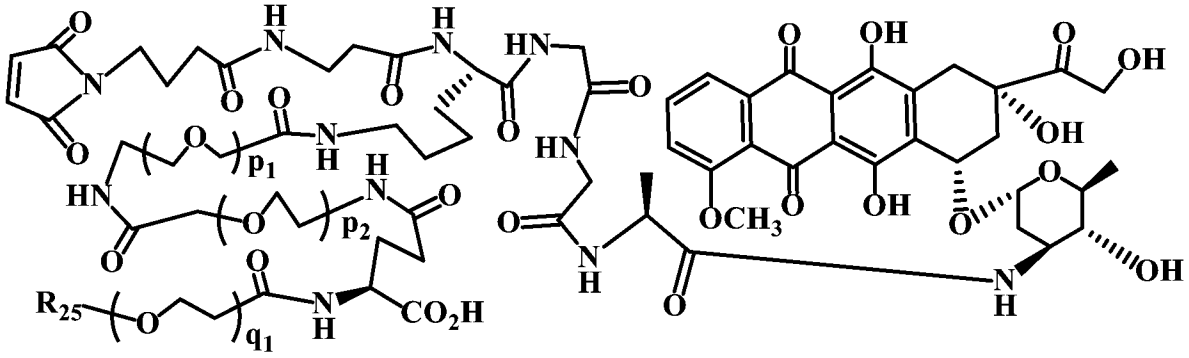
b036，



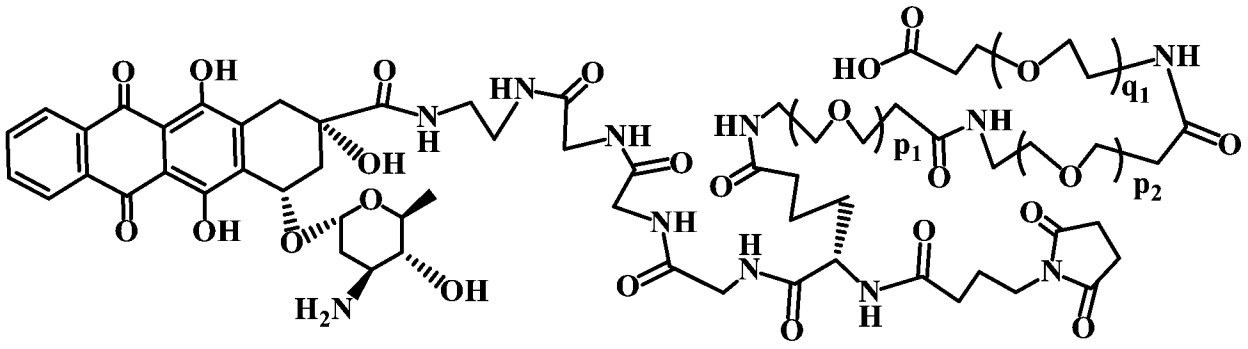
b037，



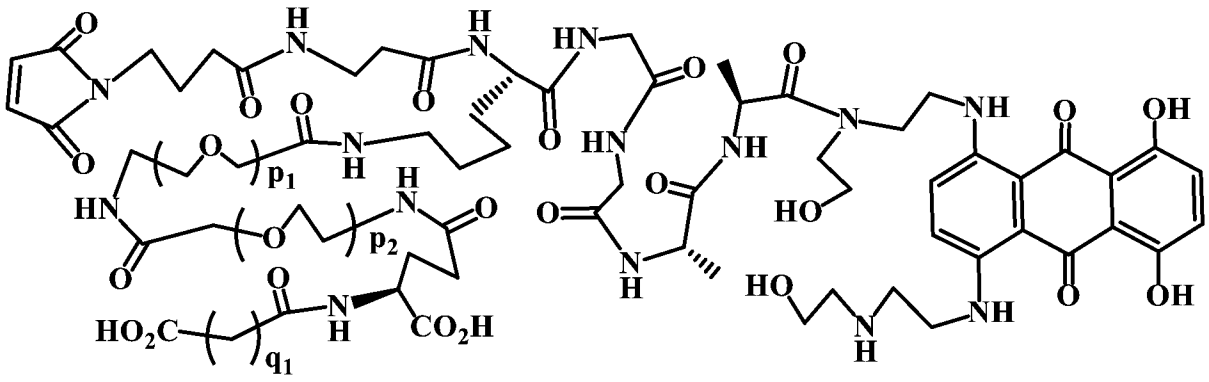
b038，



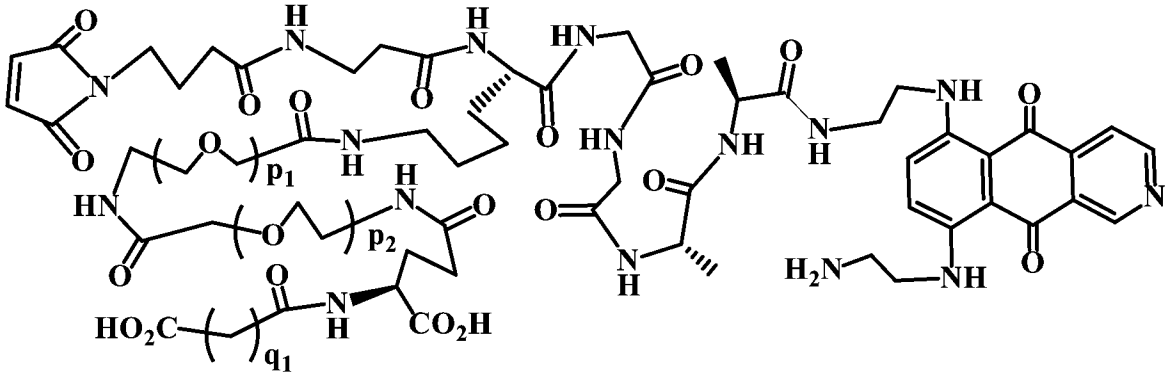
b039，



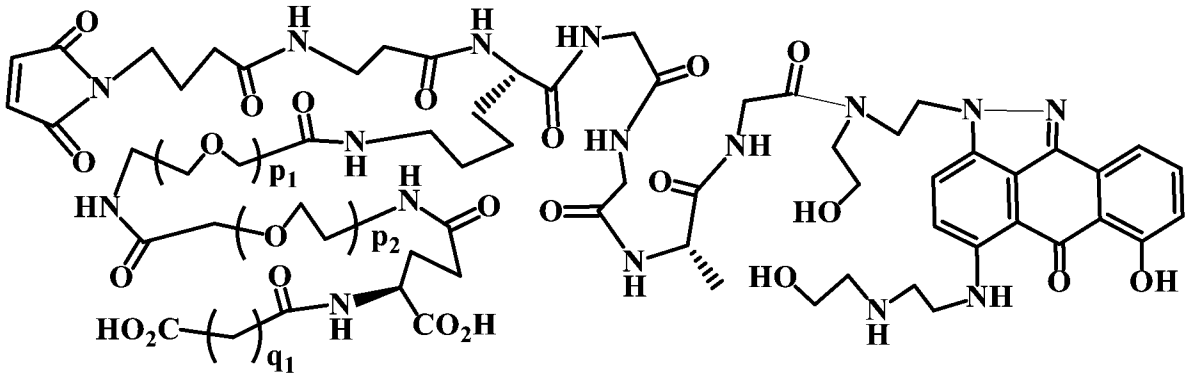
b040，



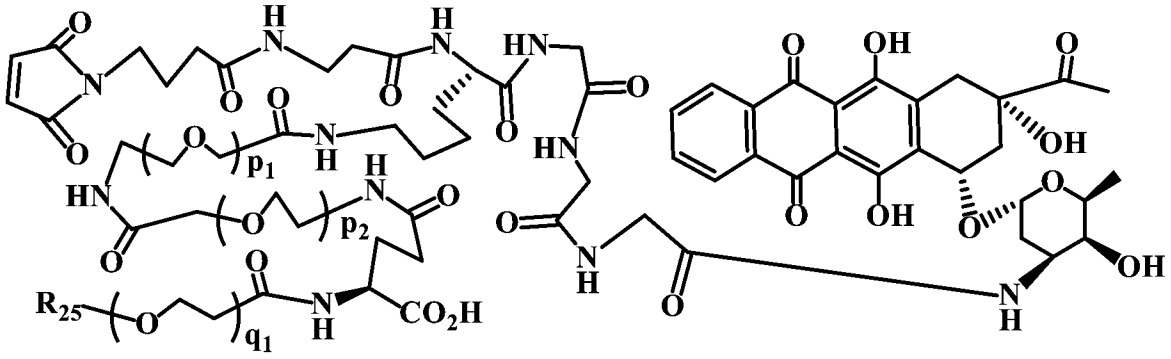
b041，



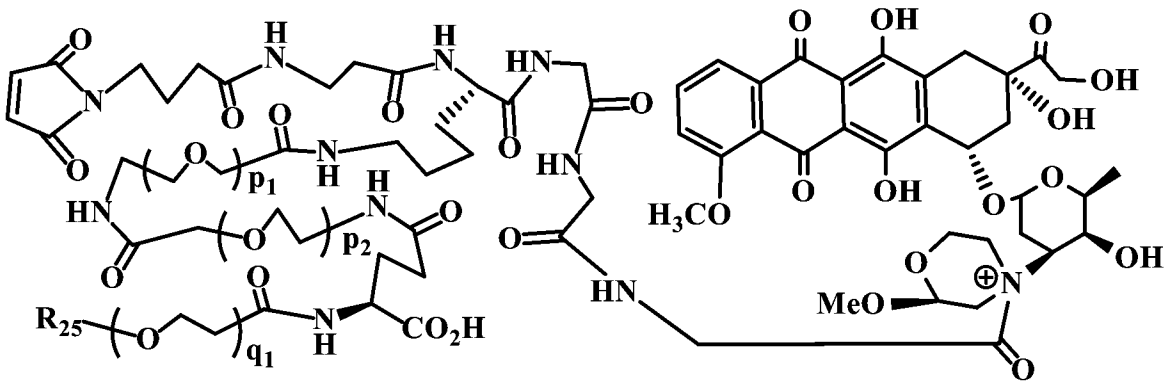
b042，



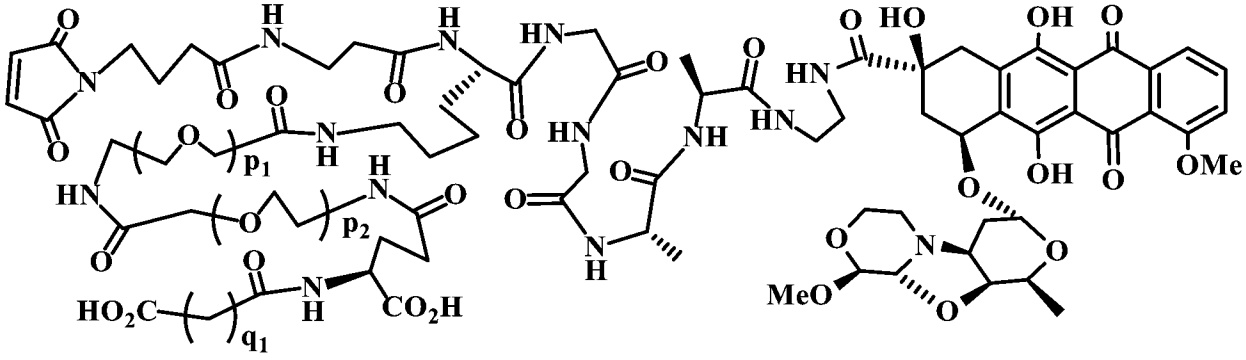
b043，



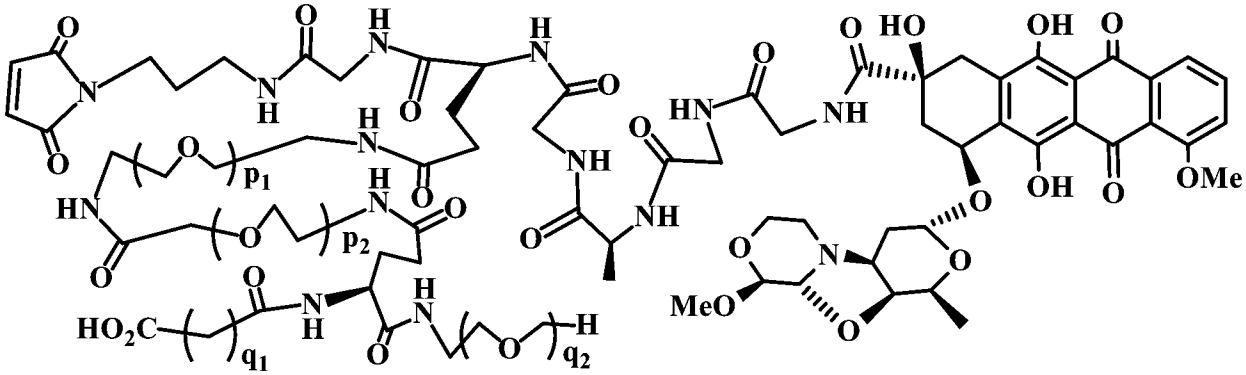
b044，



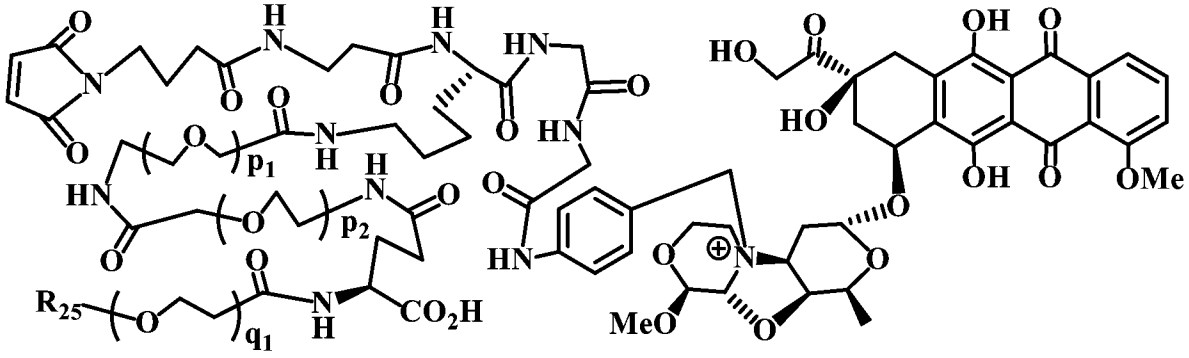
b045，



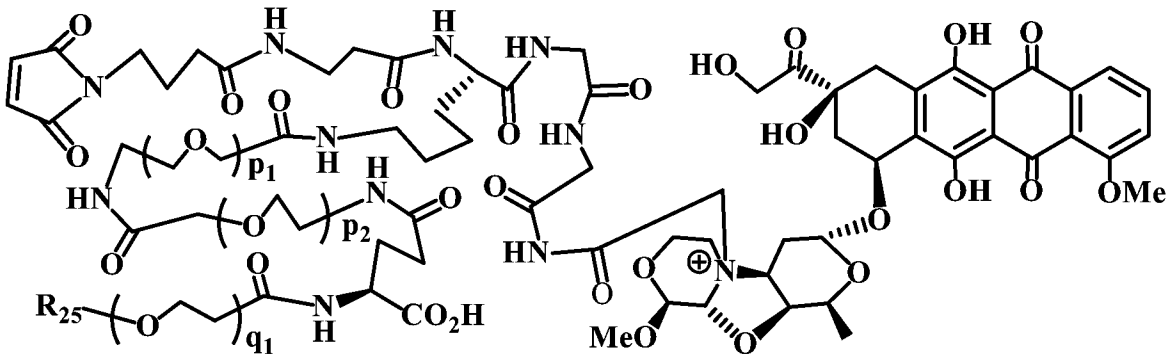
b046，



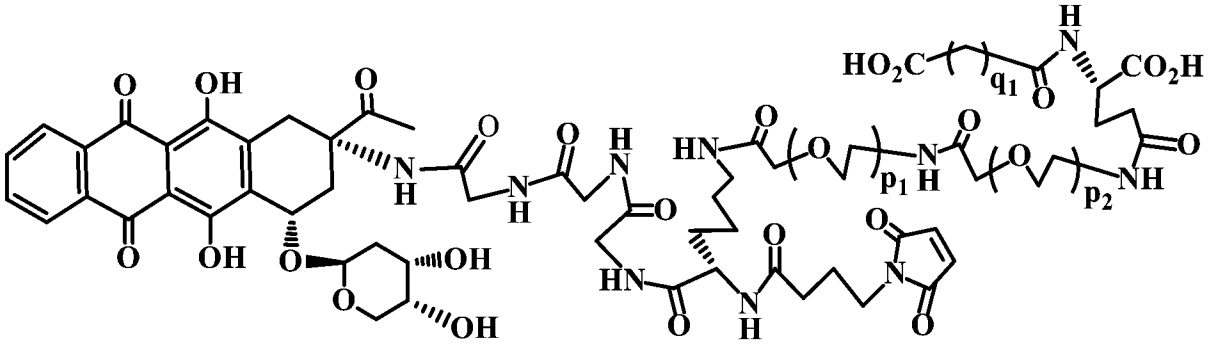
b047，



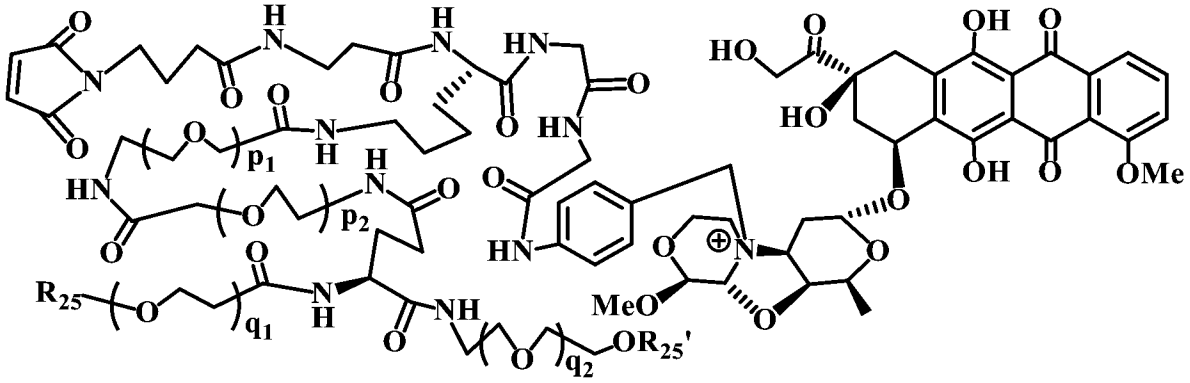
b048，



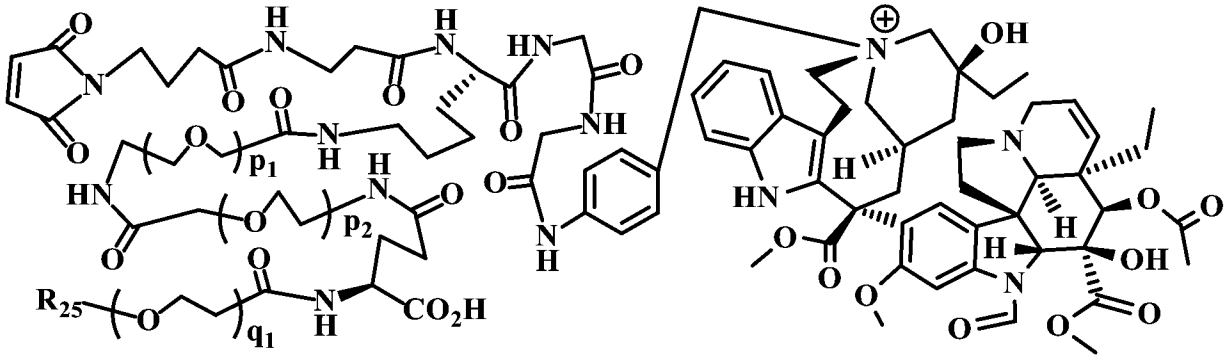
b049，



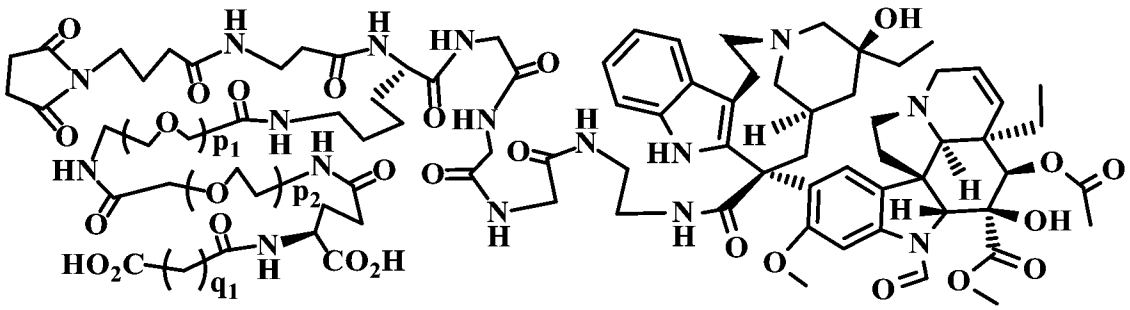
b050，



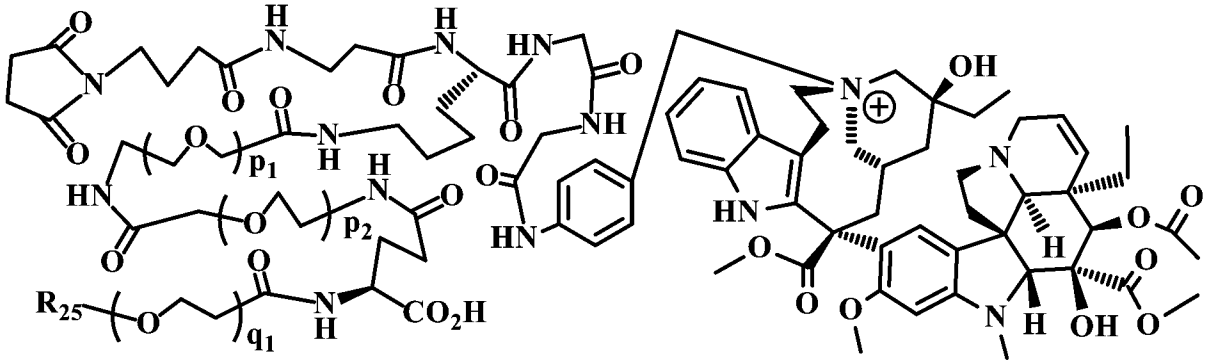
b051，



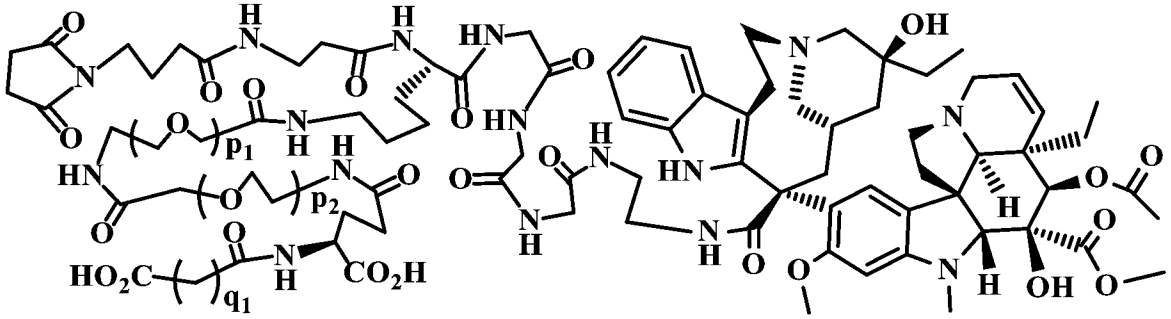
b052，



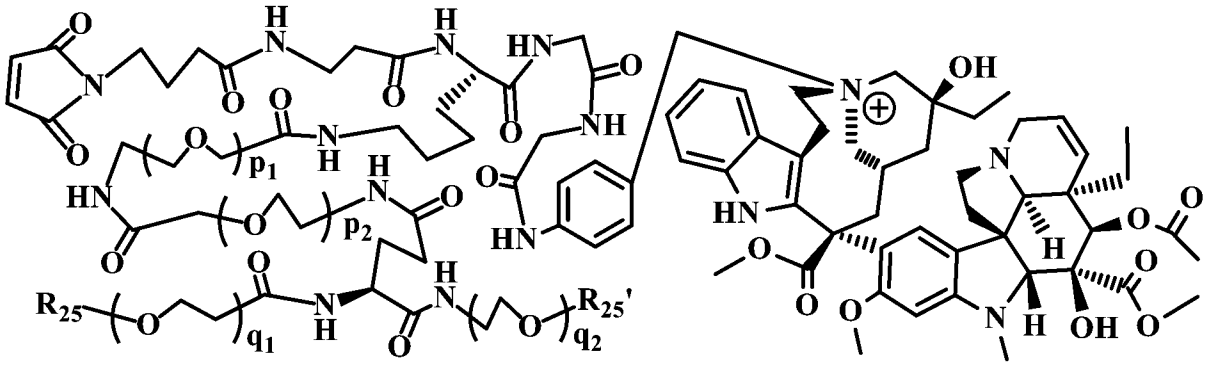
b053，



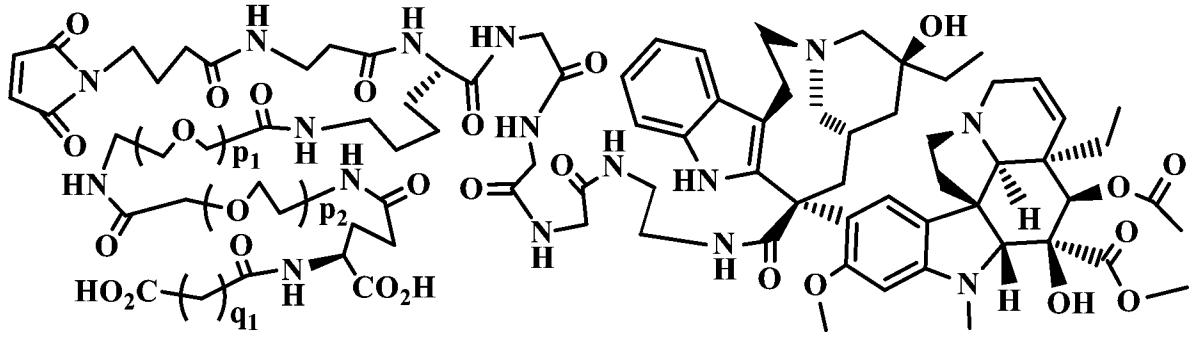
b054，



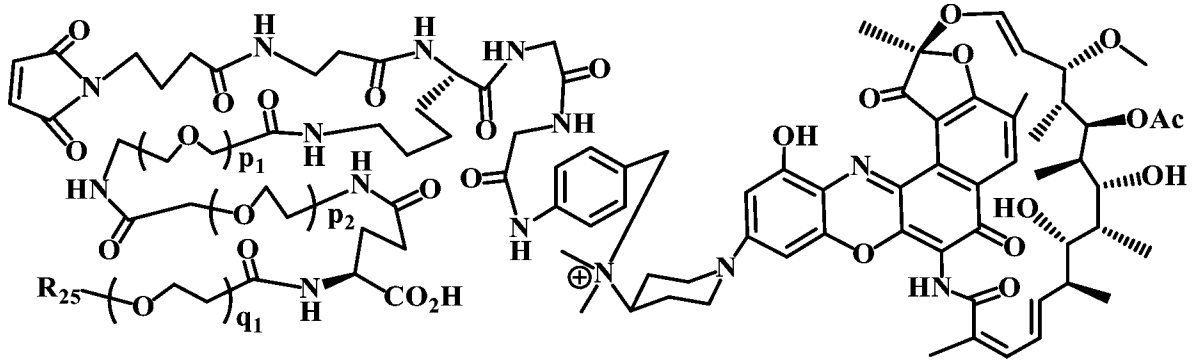
b055，



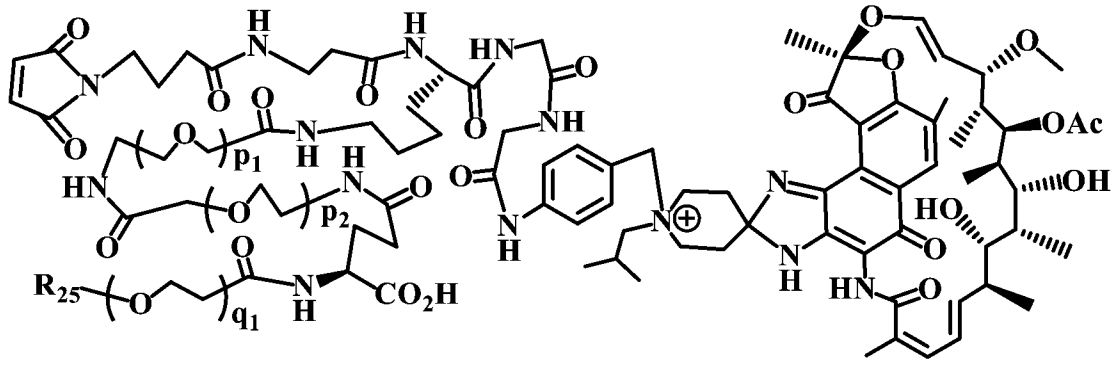
b056，



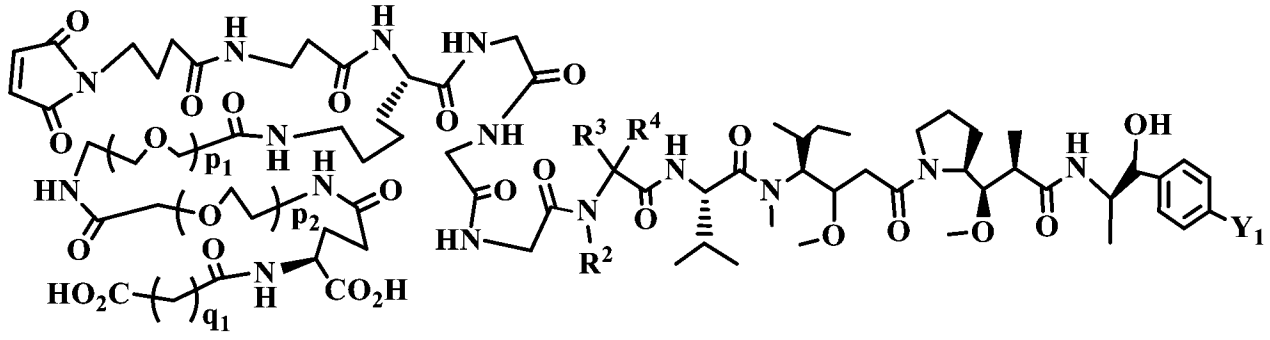
b057，



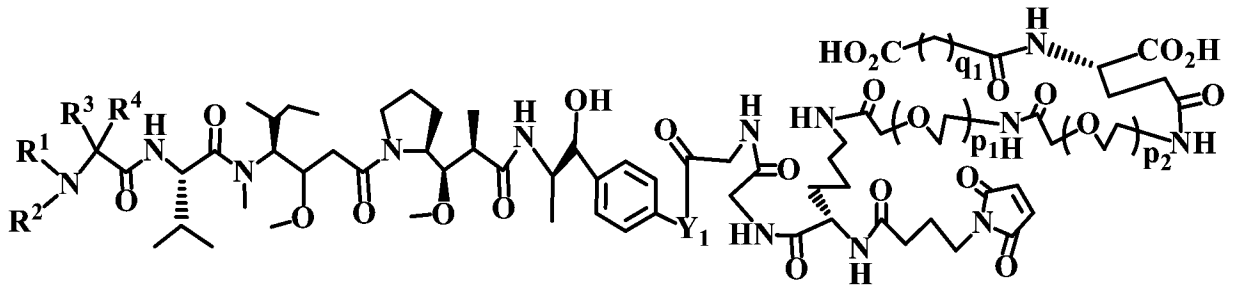
b058，



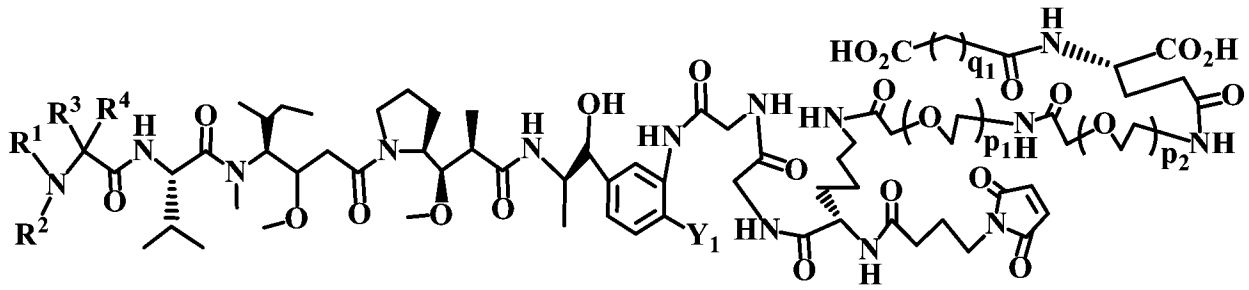
b059，



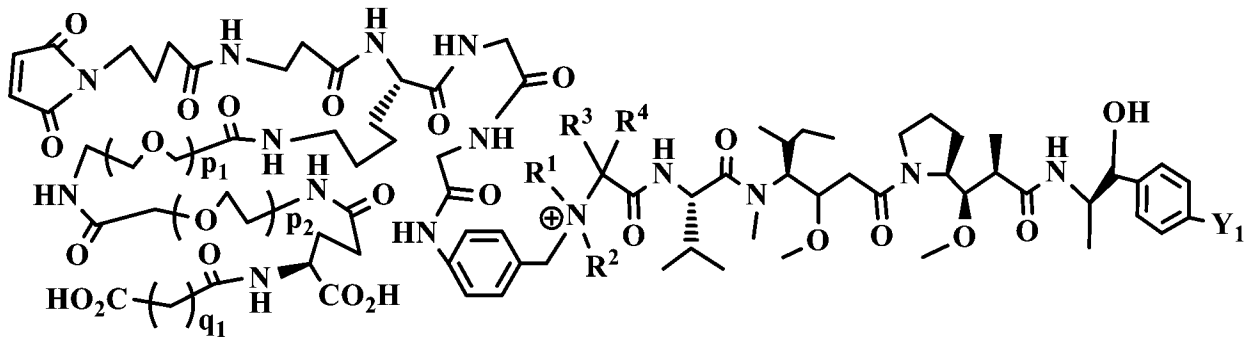
b060，



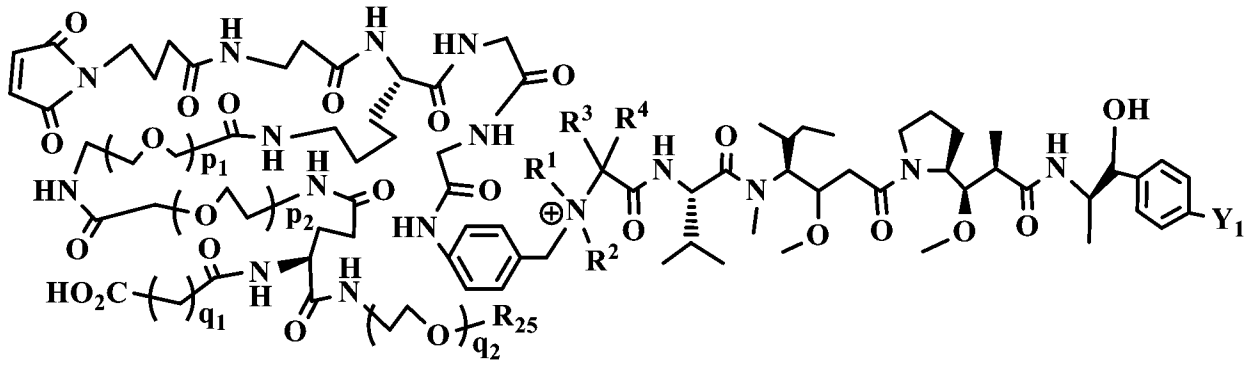
b061，



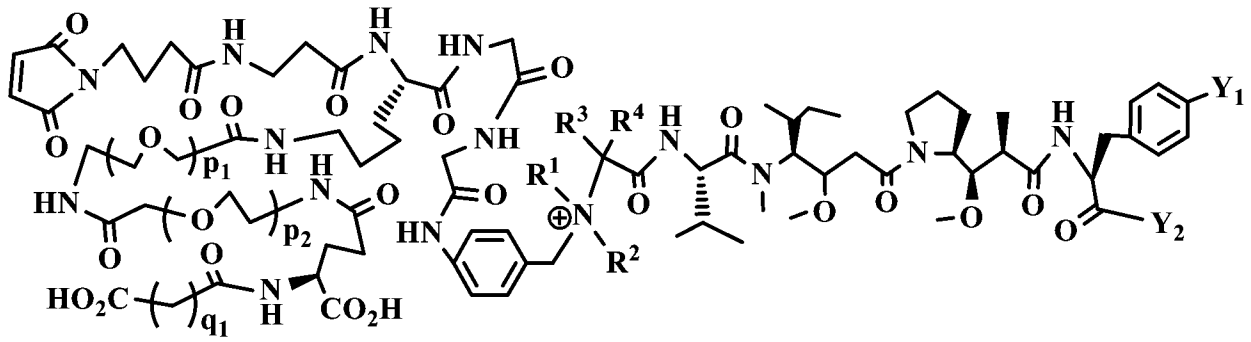
b062，



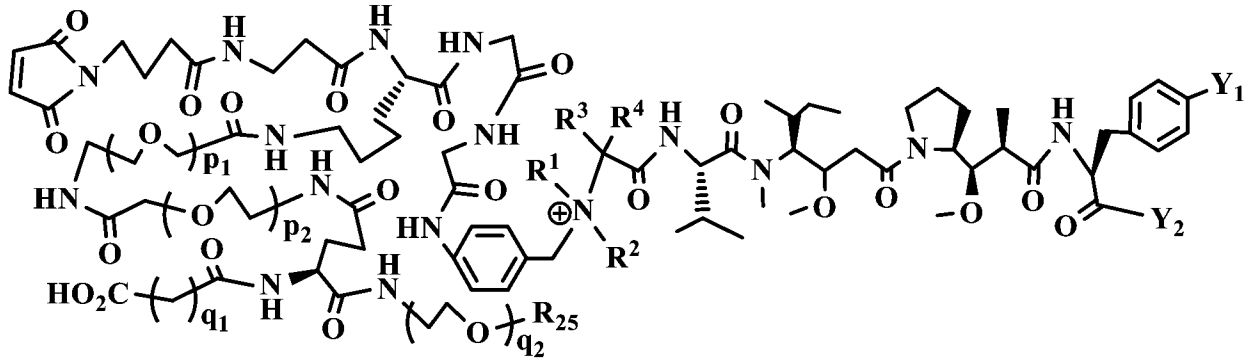
b063，



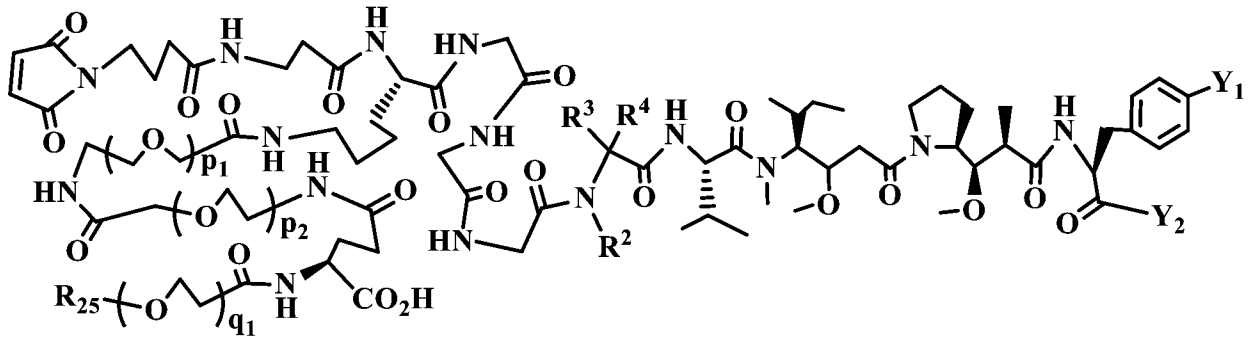
b064，



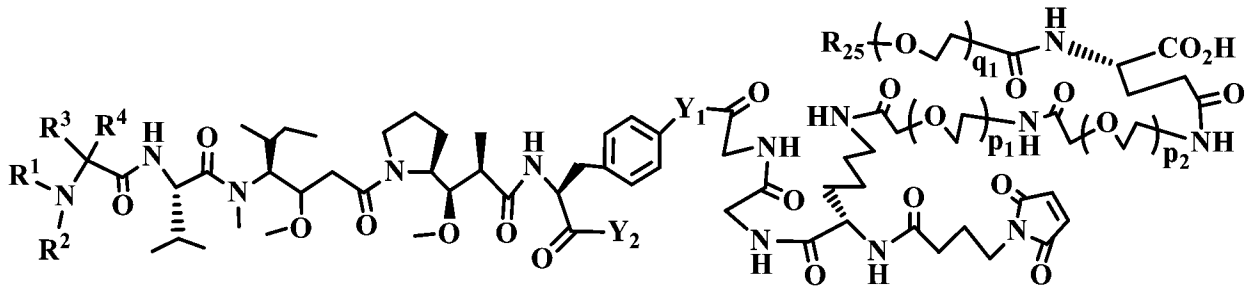
b065，



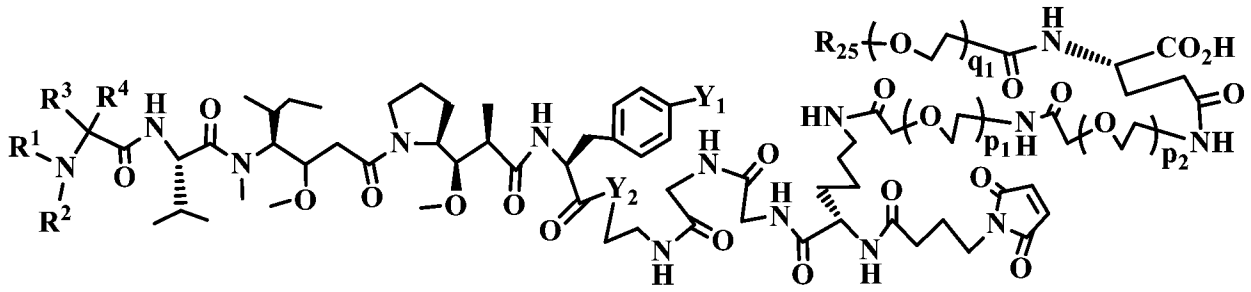
b066，



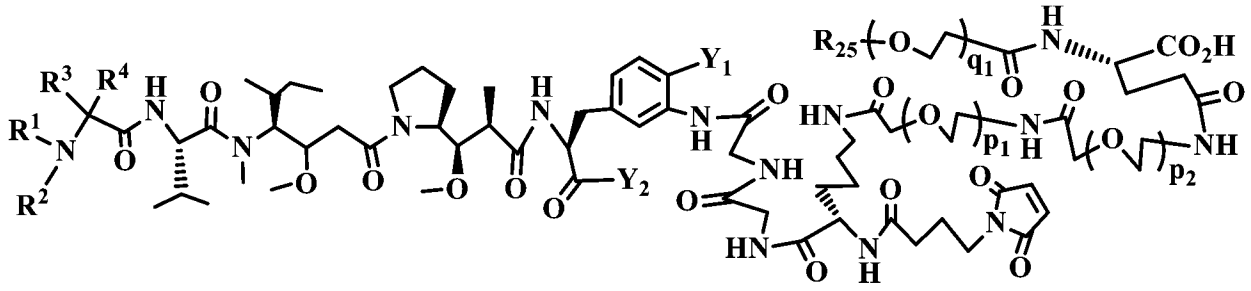
b067，



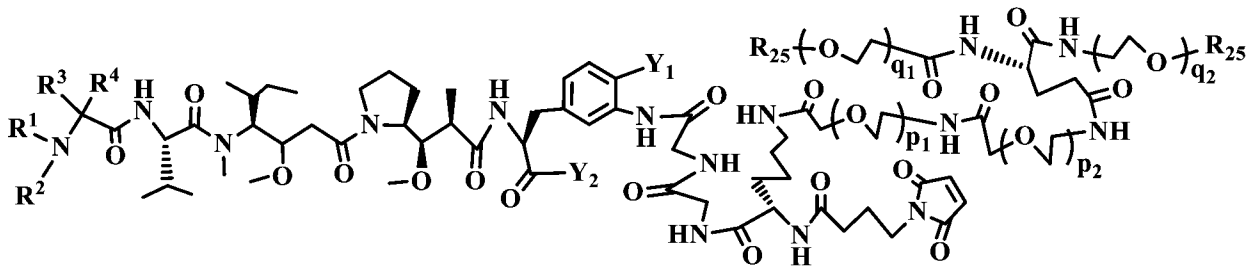
b068，



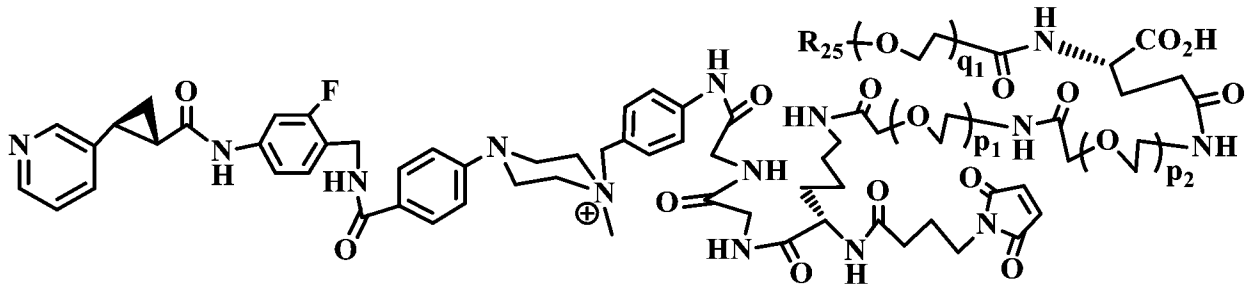
b069，



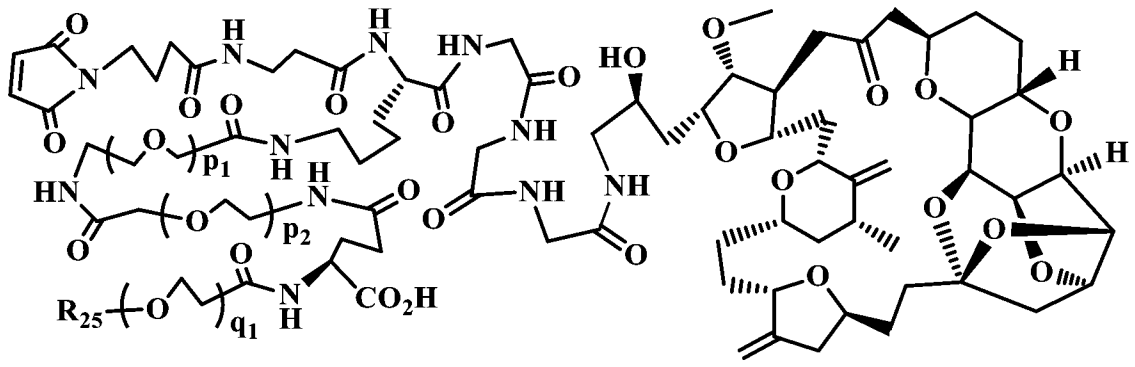
b070，



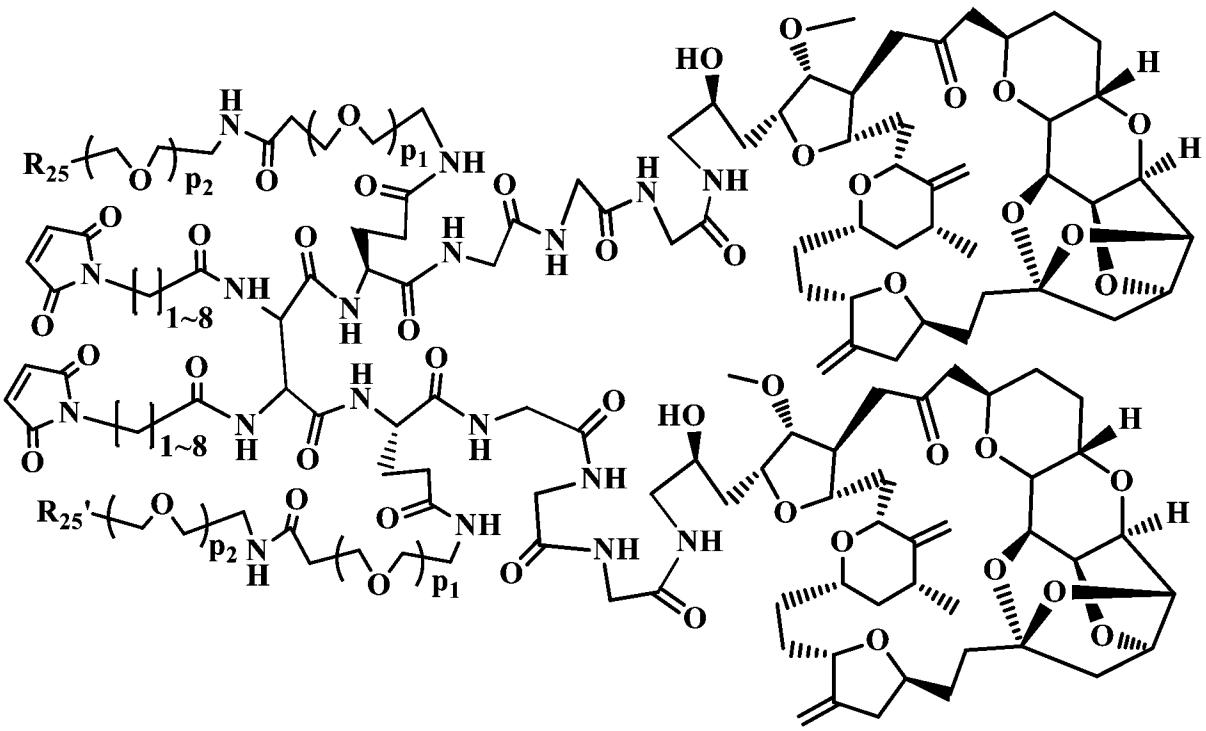
b071，



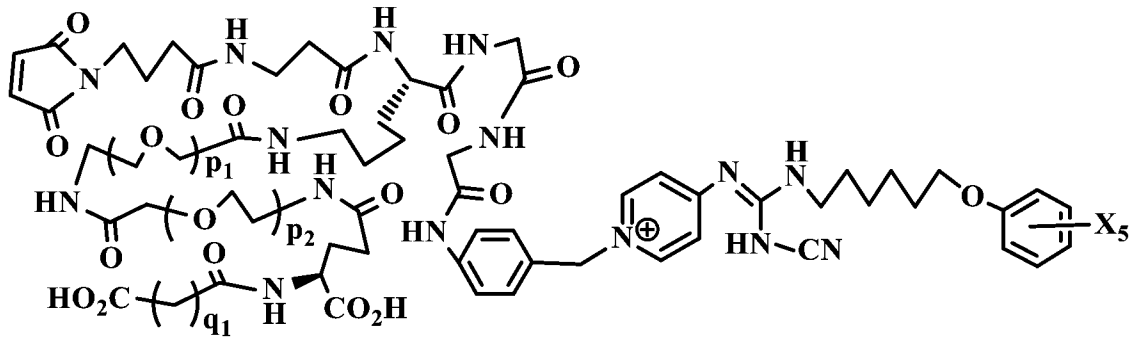
b072，



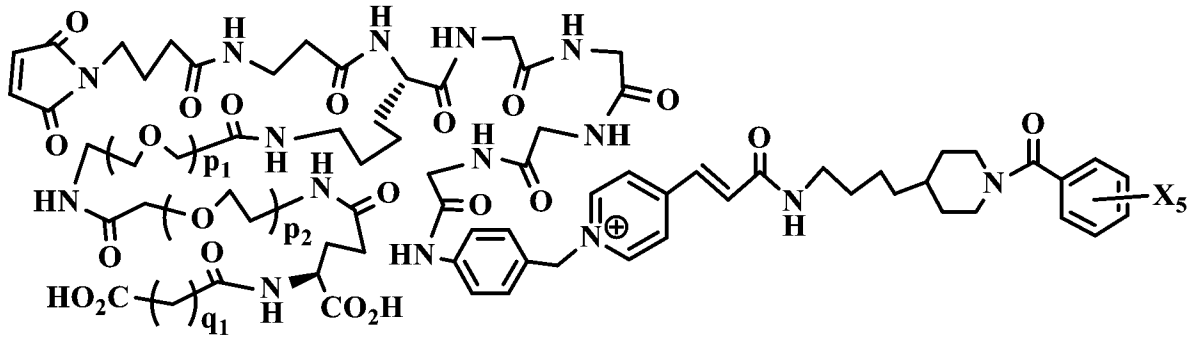
b073，



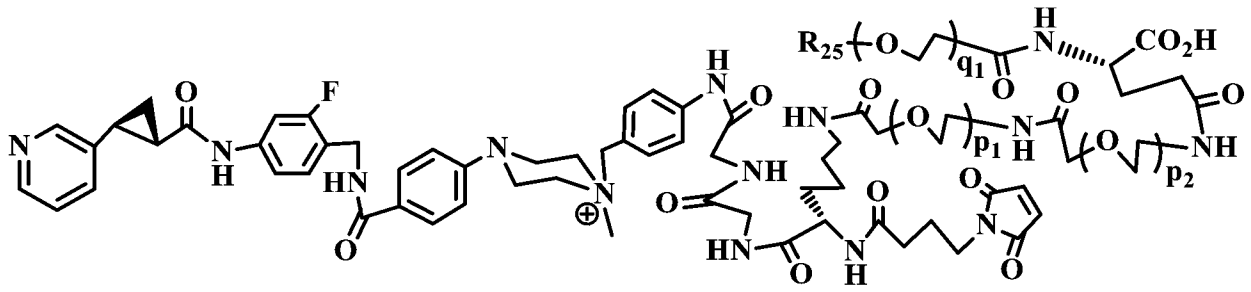
b074，



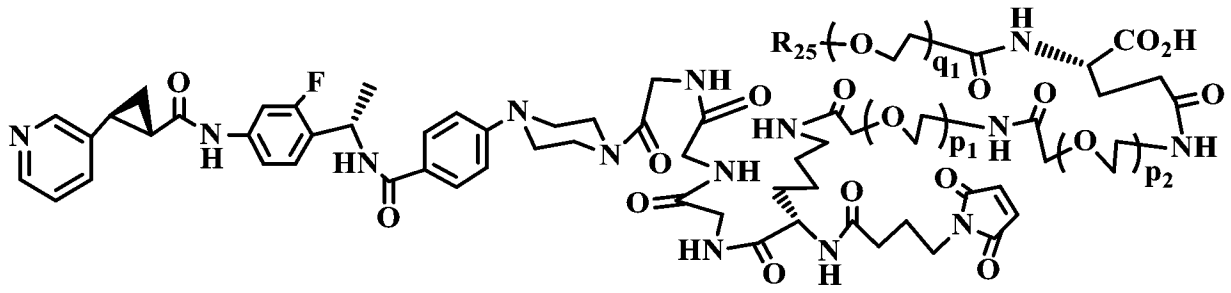
b075，



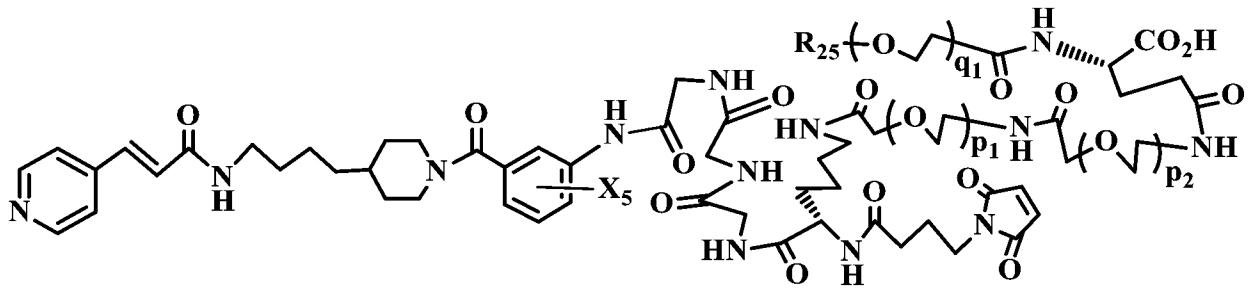
b076，



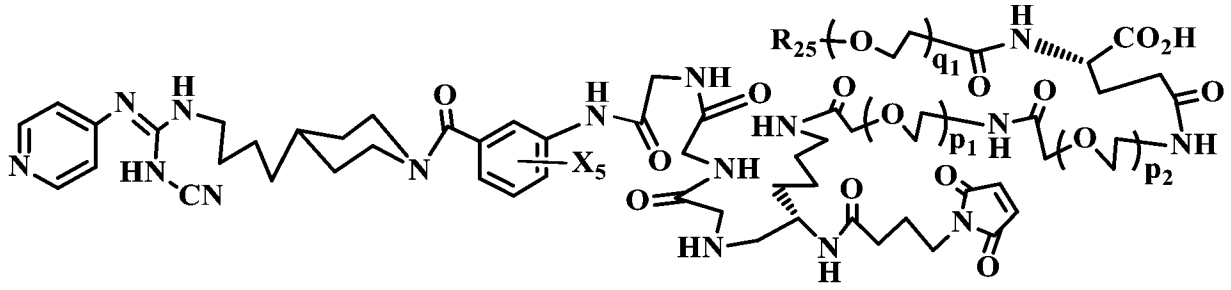
b077，



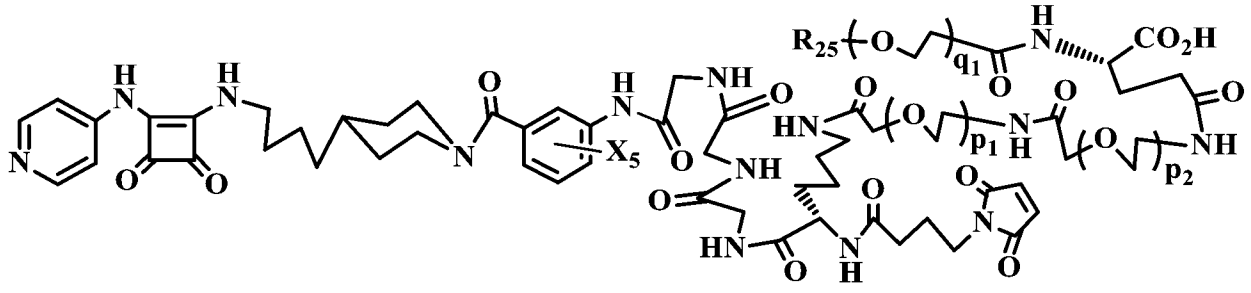
b078，



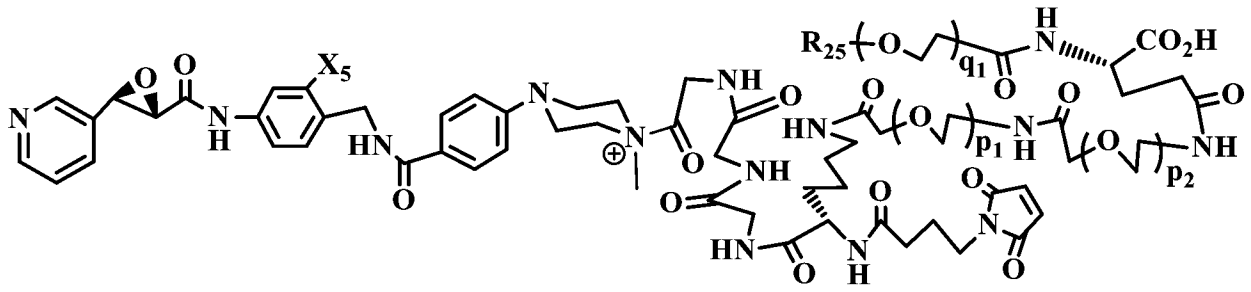
b079，



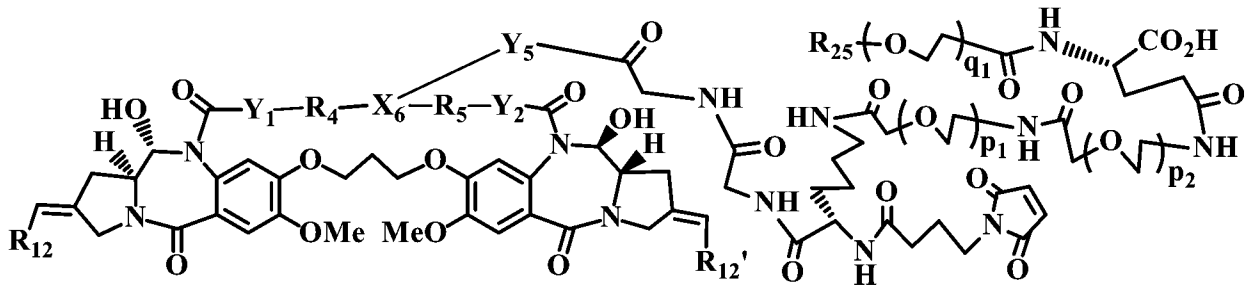
b080，



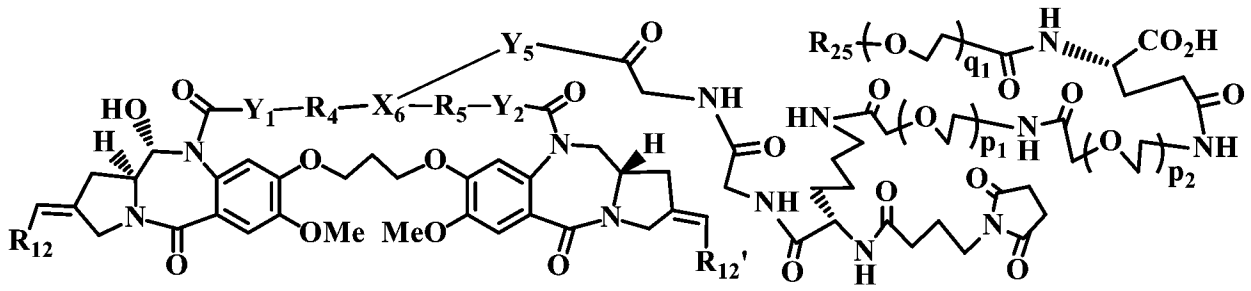
b081，



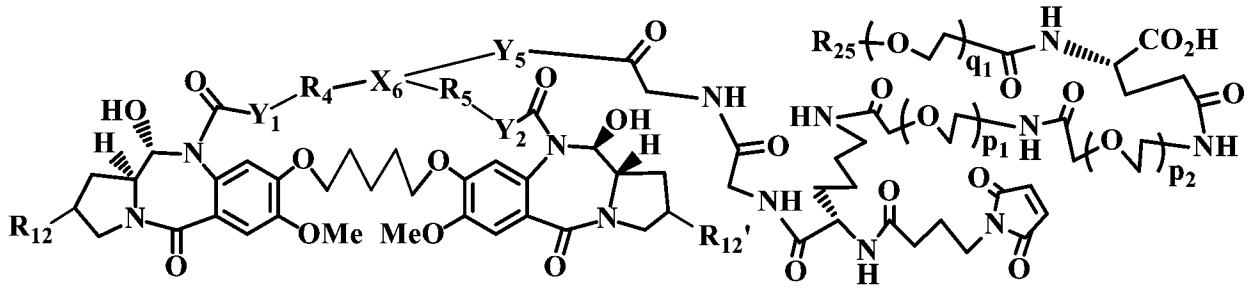
b082，



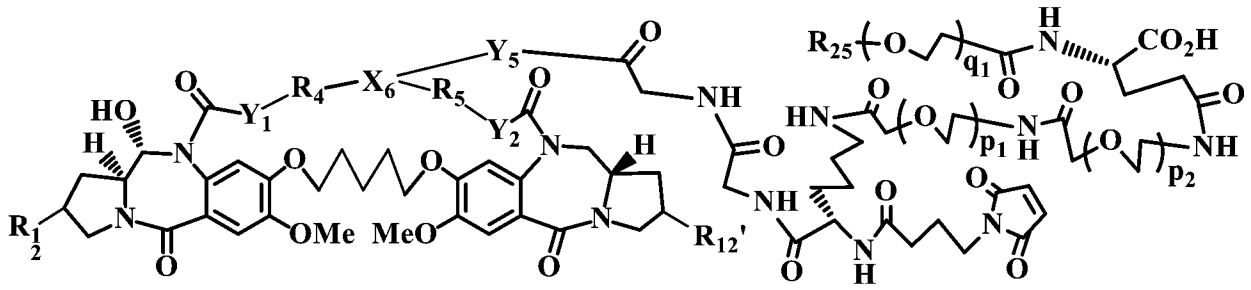
b083，



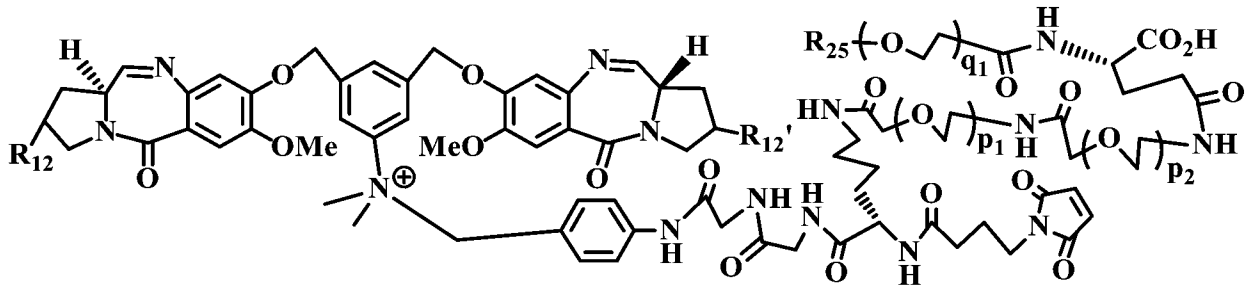
b084，



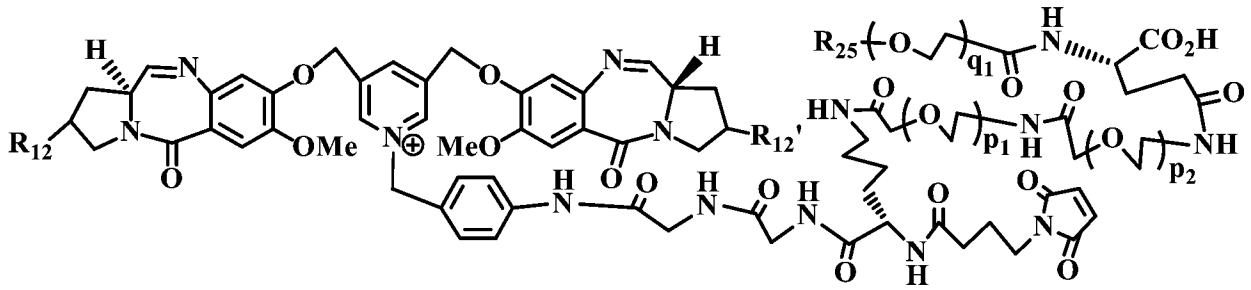
b085，



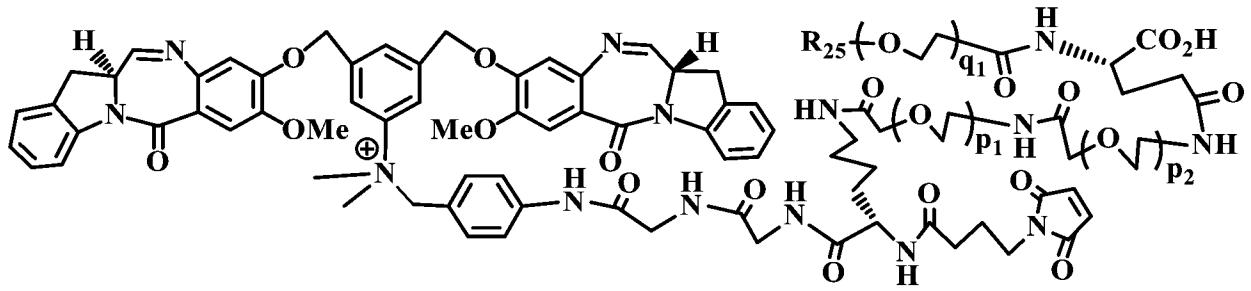
b086，



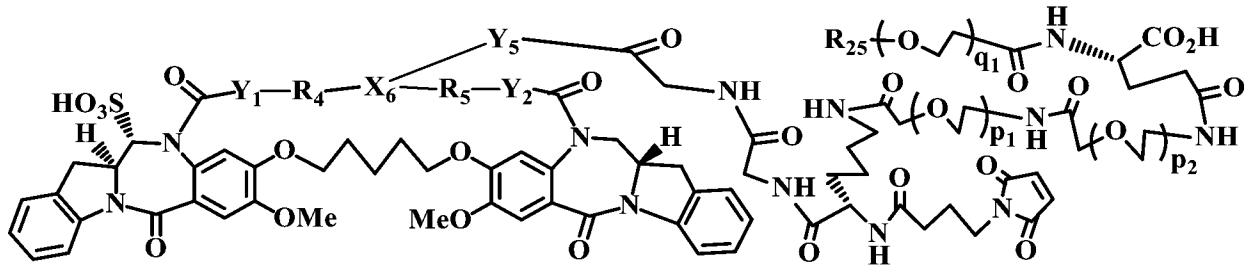
b087，



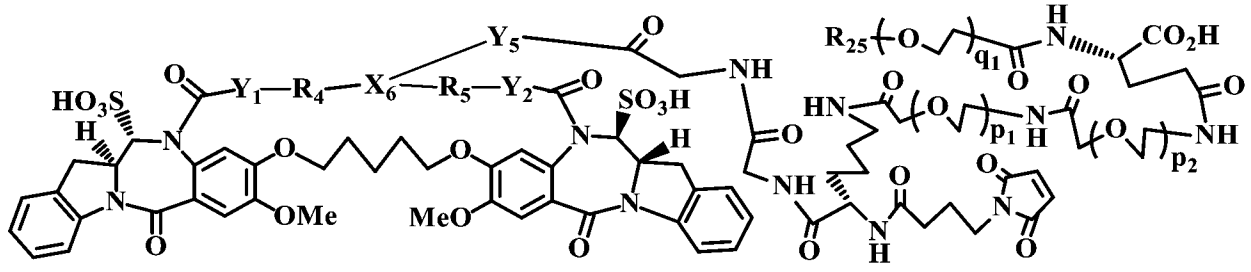
b088，



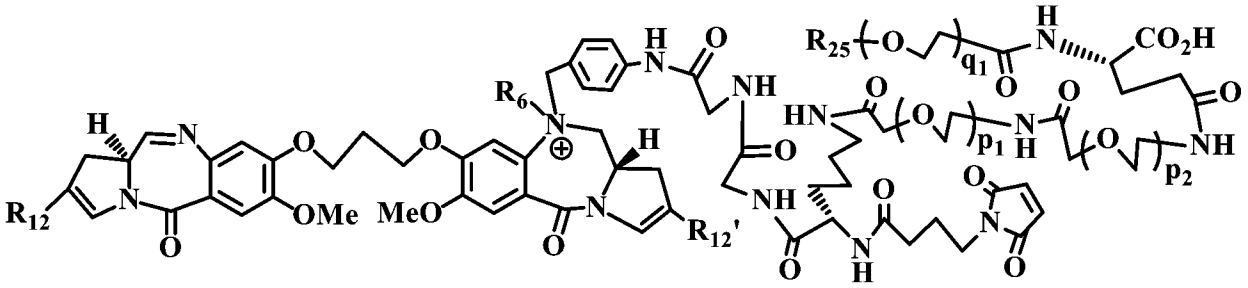
b089，



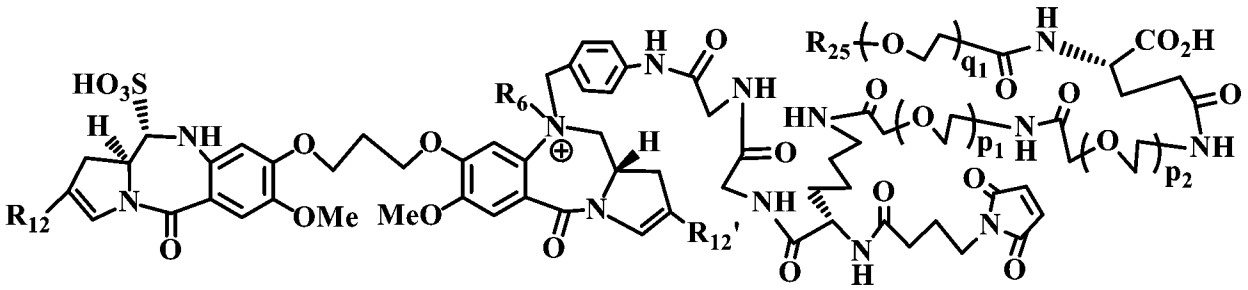
b090，



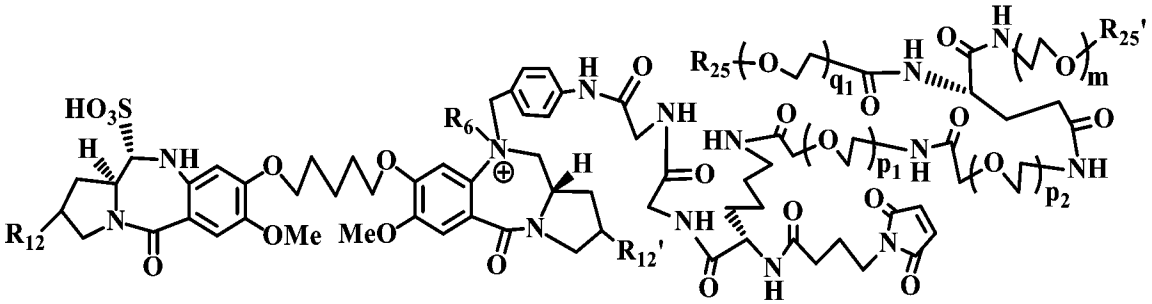
b091，



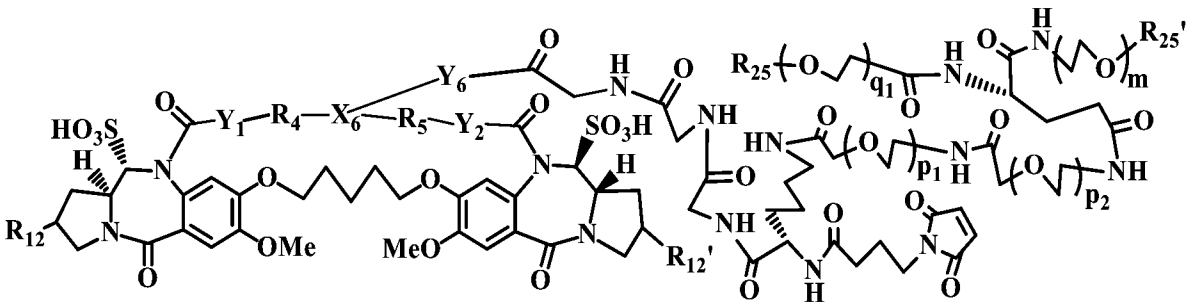
b092，



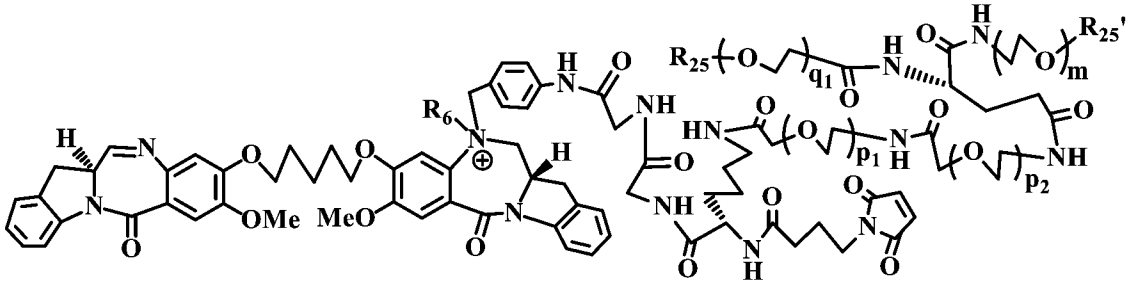
b093，



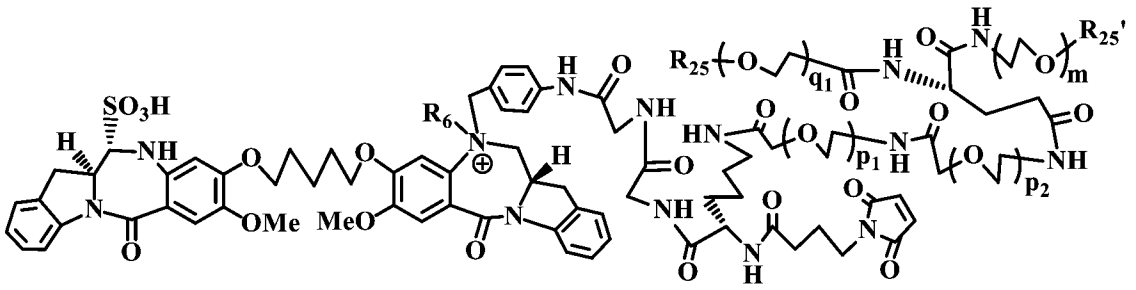
b094，



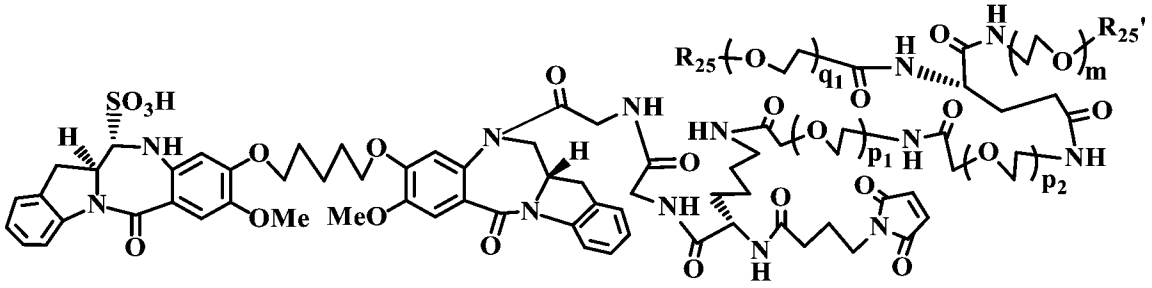
b095，



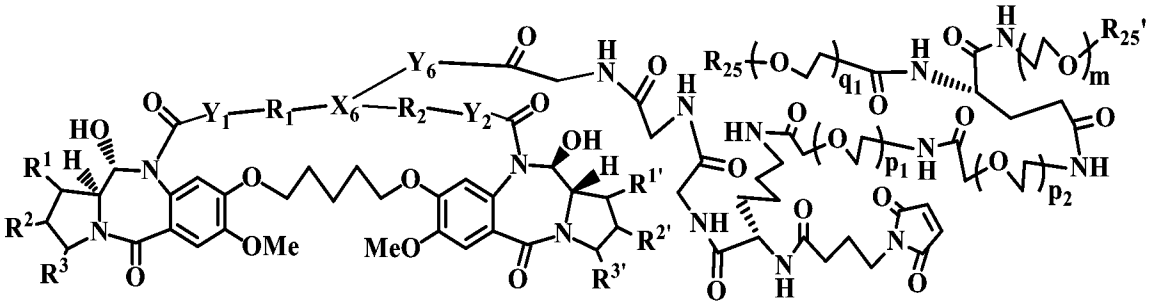
b096，



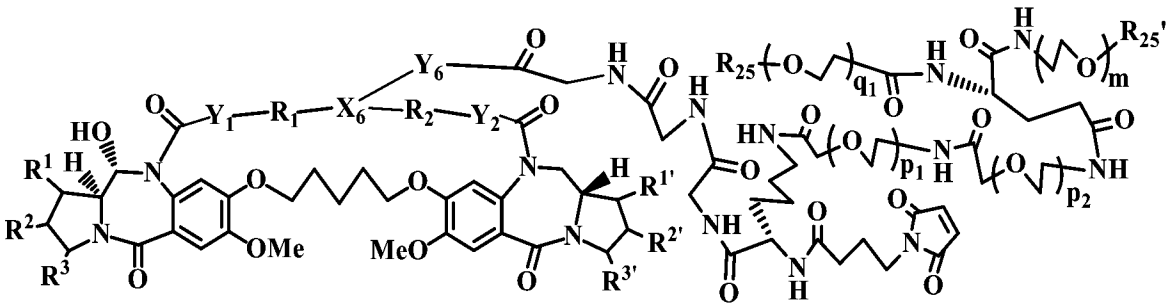
b097，



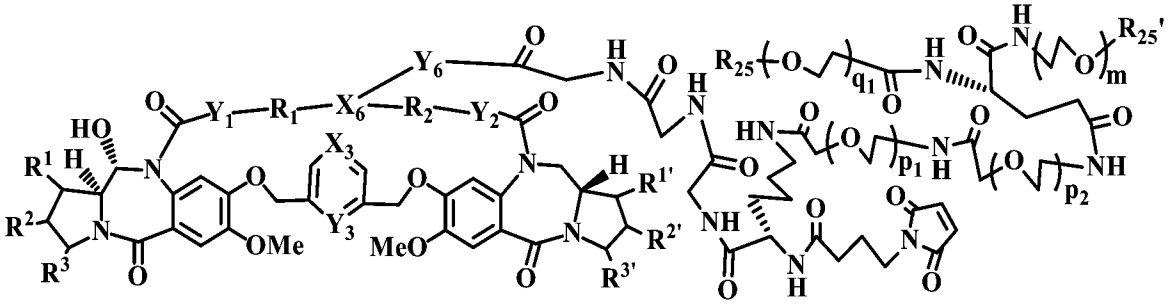
b098，



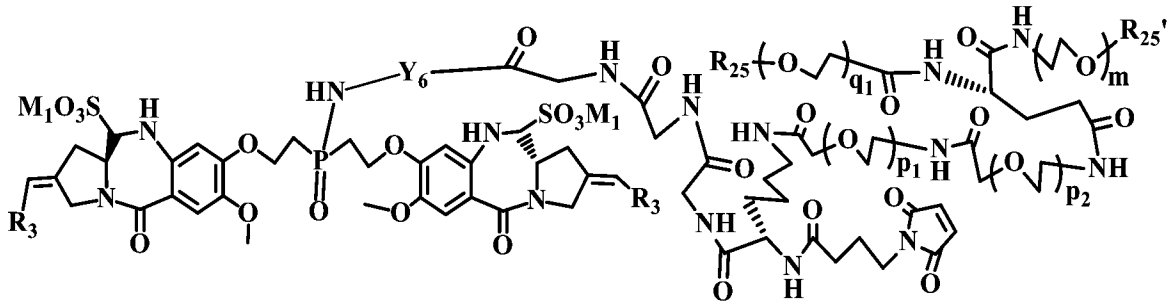
b099，



b100，

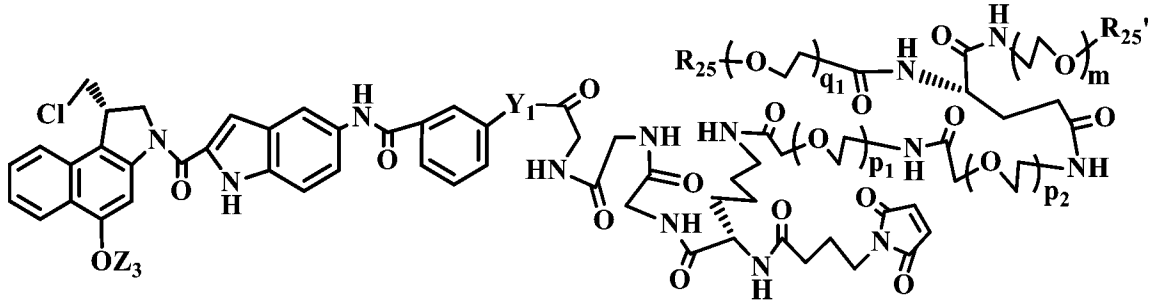


b101，

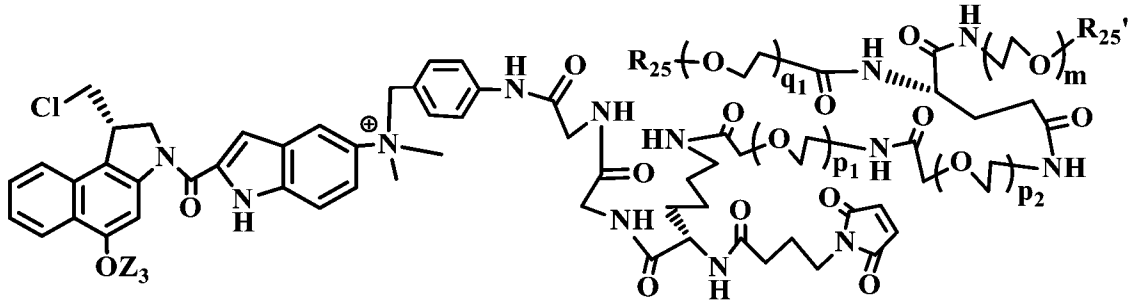


b102，

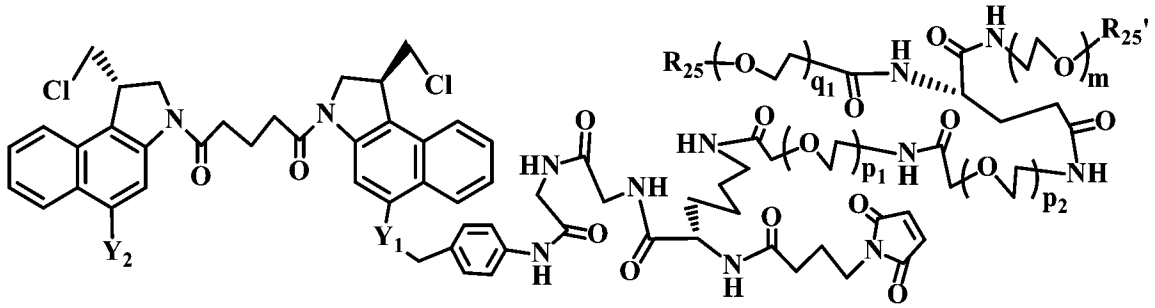
，



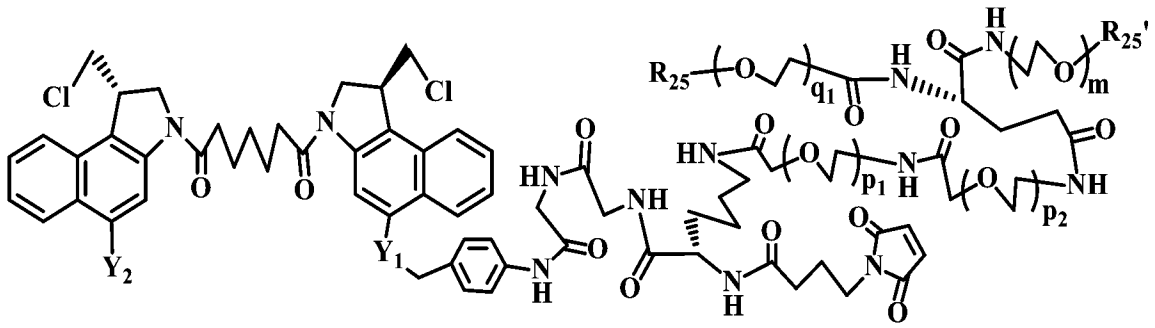
b103，



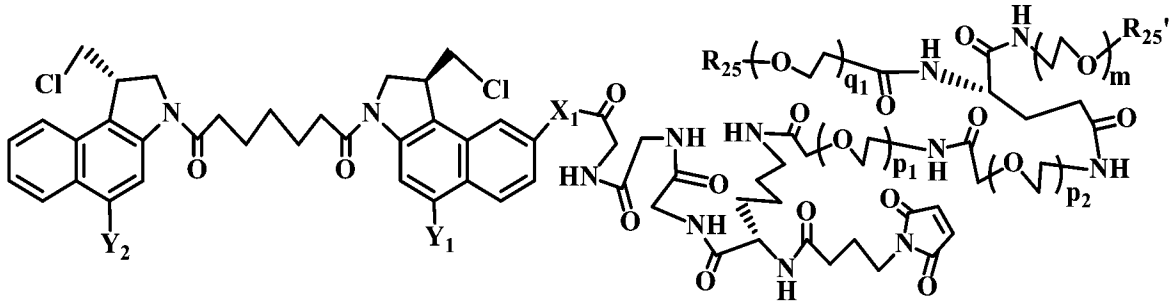
b104，



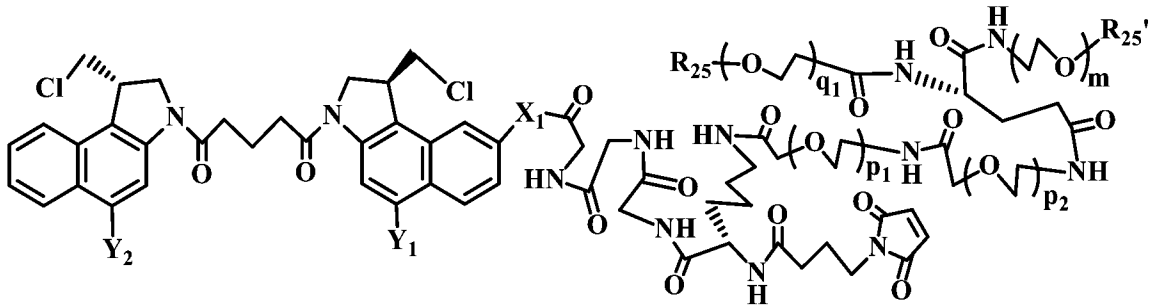
b105，



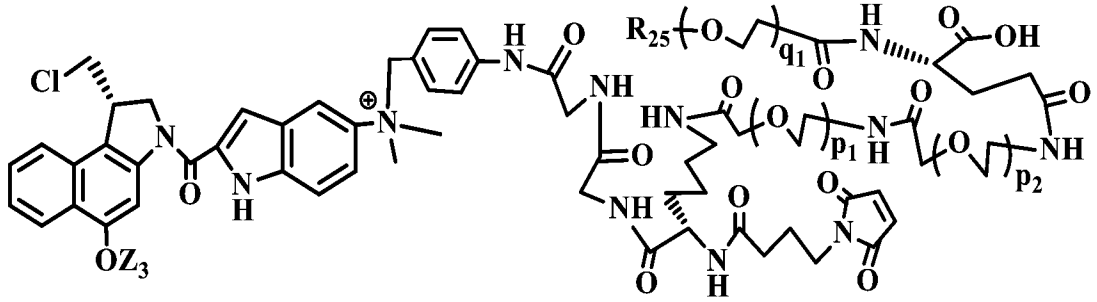
b106，



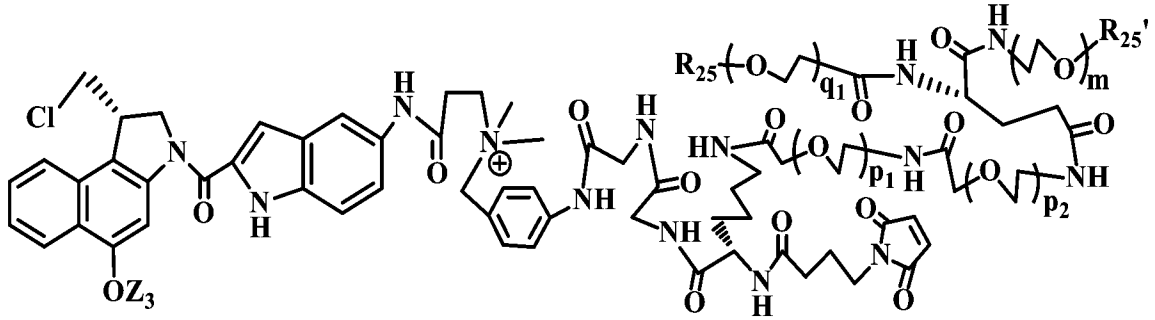
b107，



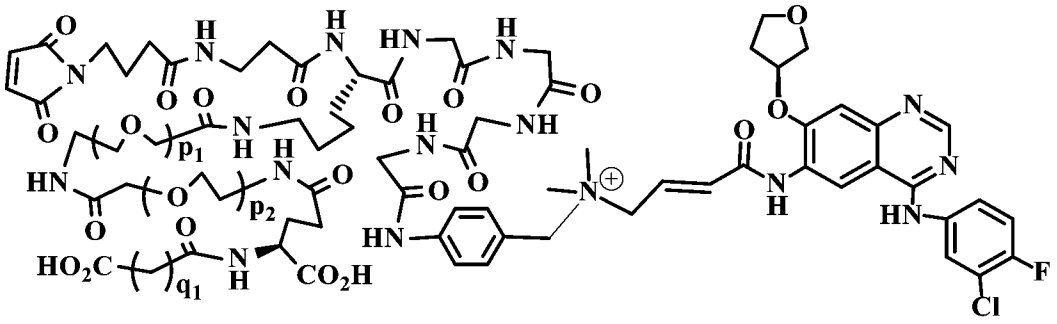
b108，



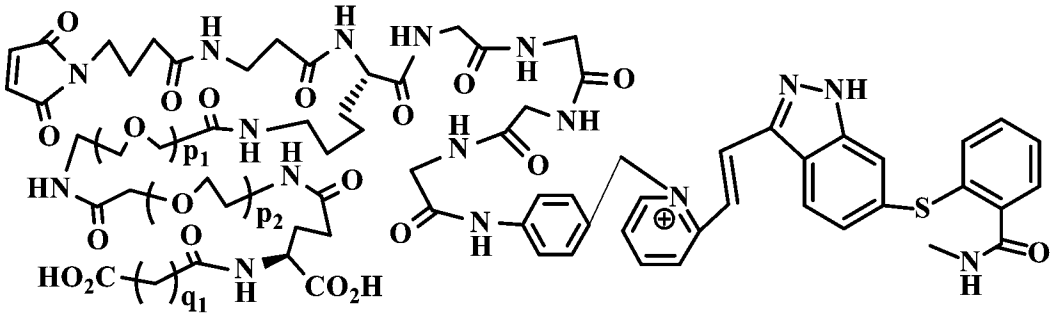
b109，



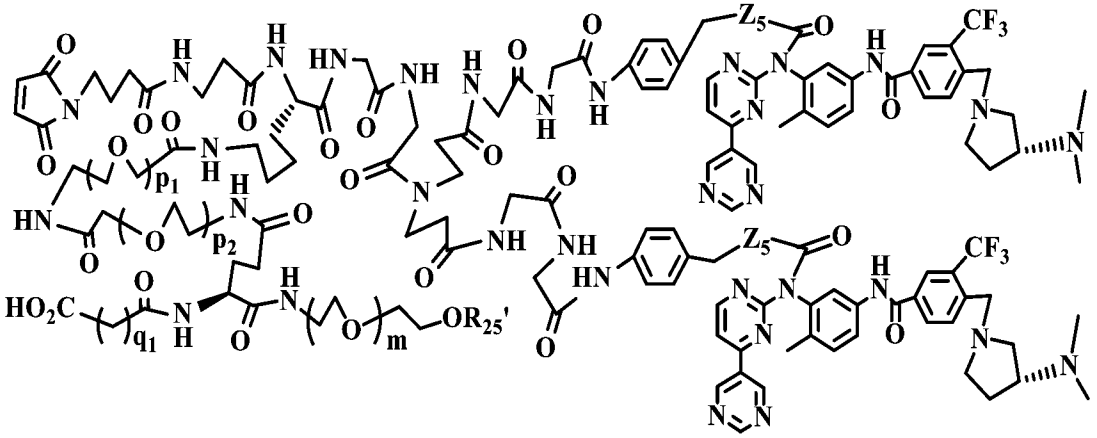
b110，



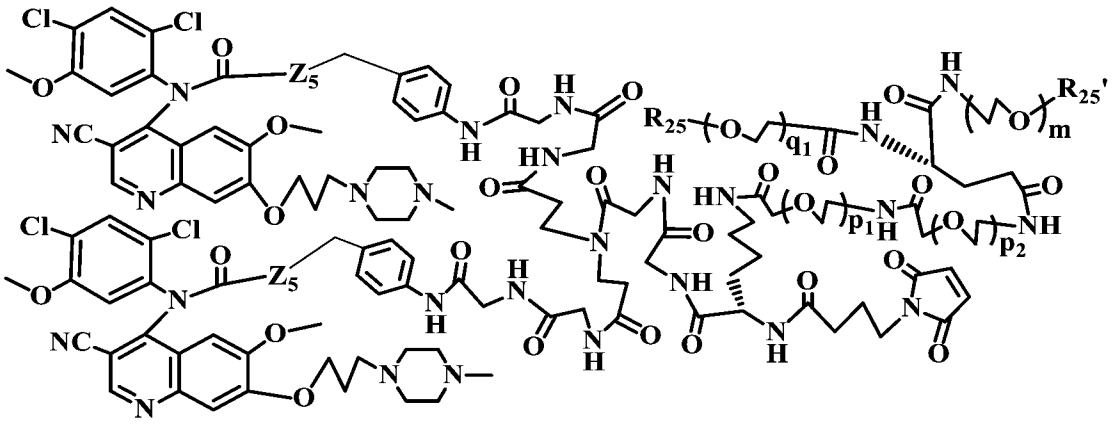
b111，



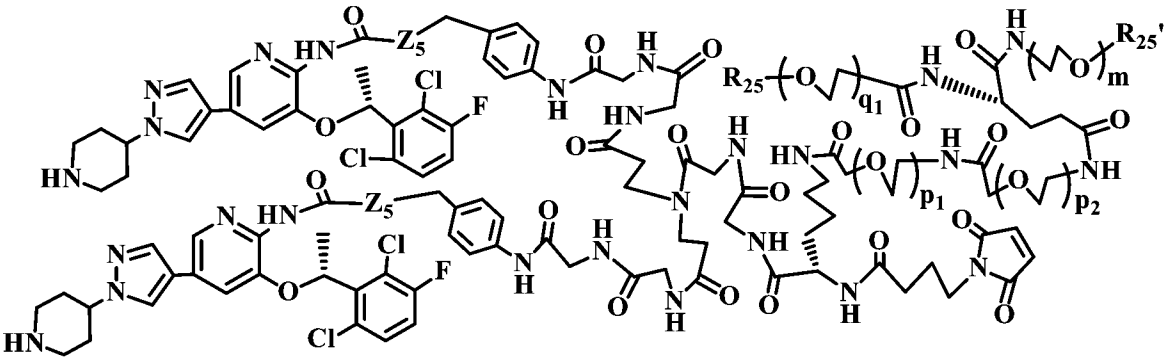
b112，



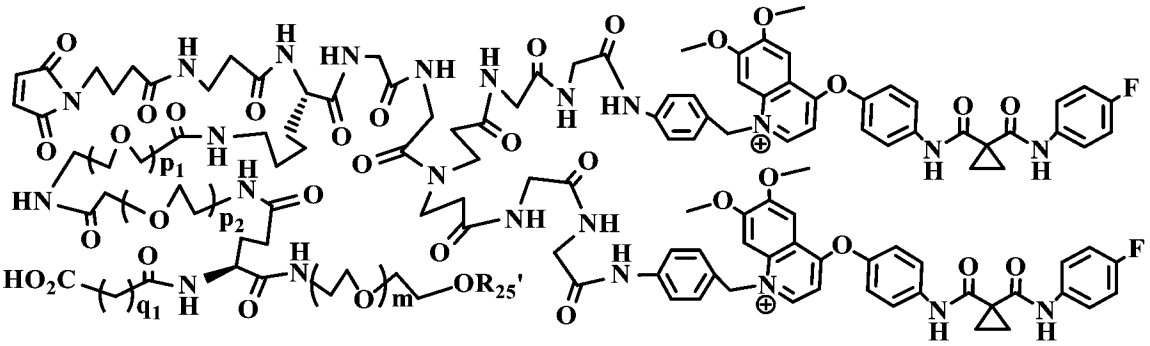
b113，



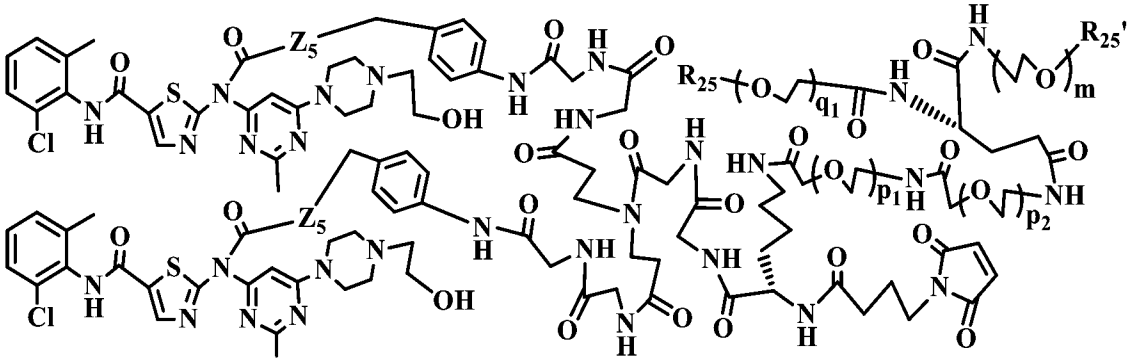
b114，



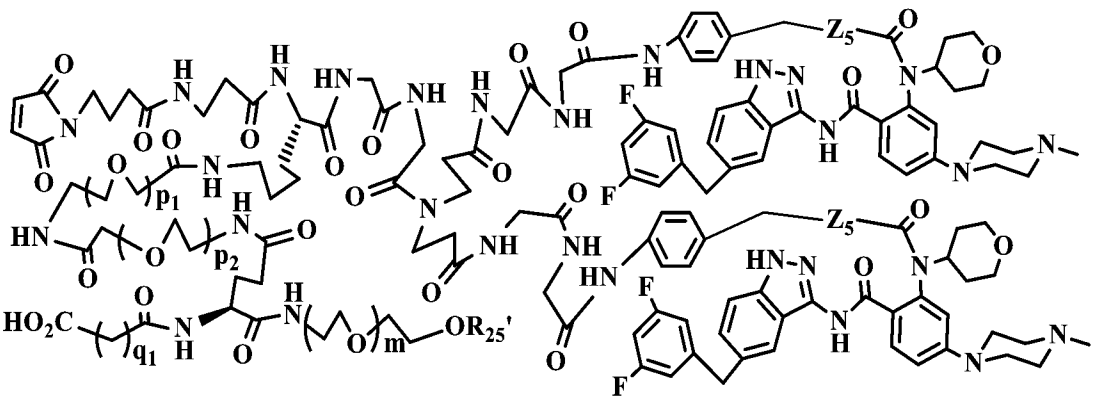
b115，



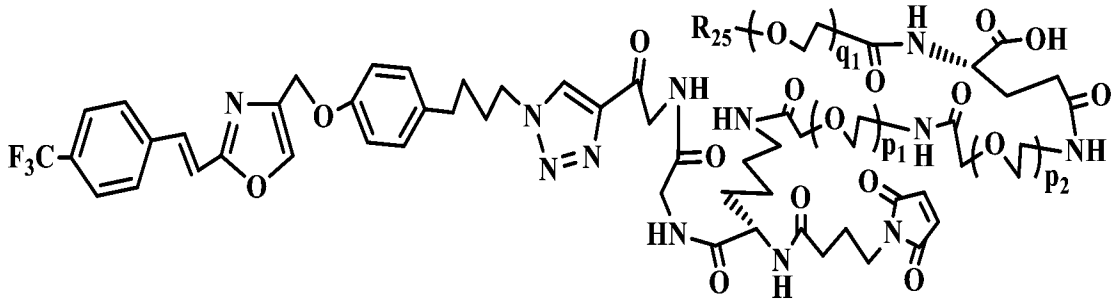
b116，



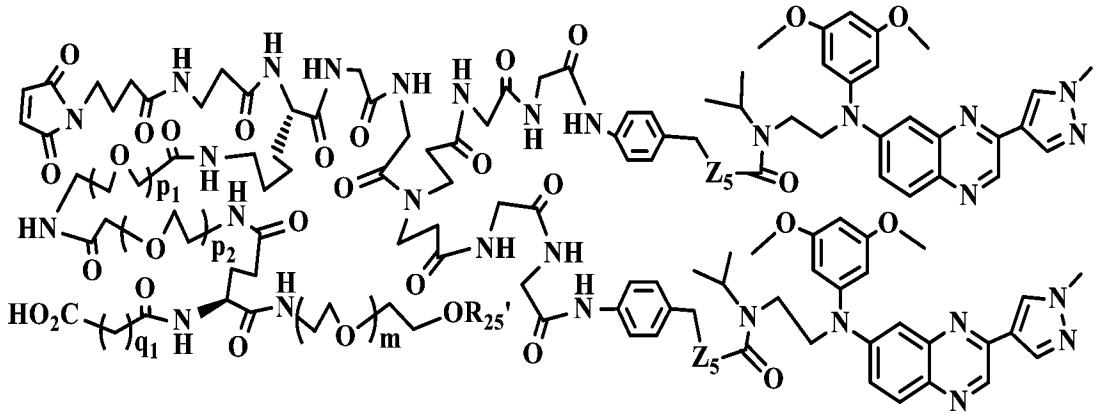
b117，



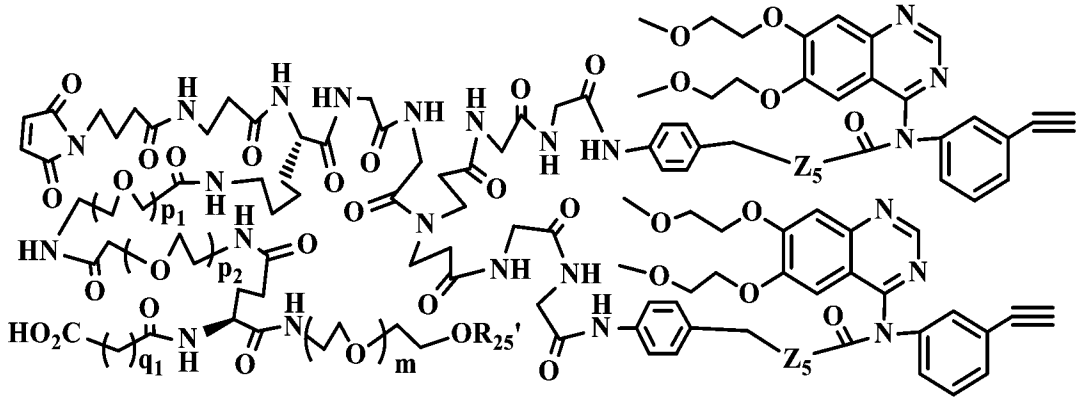
b118，



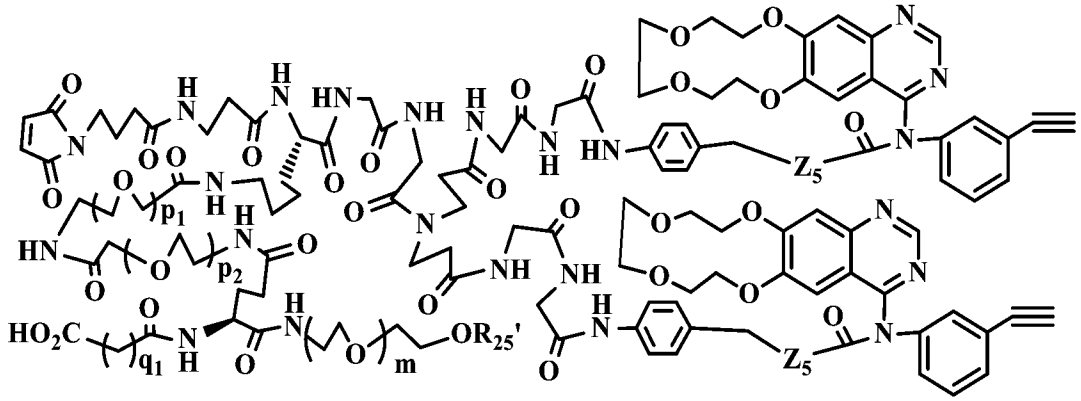
b119，



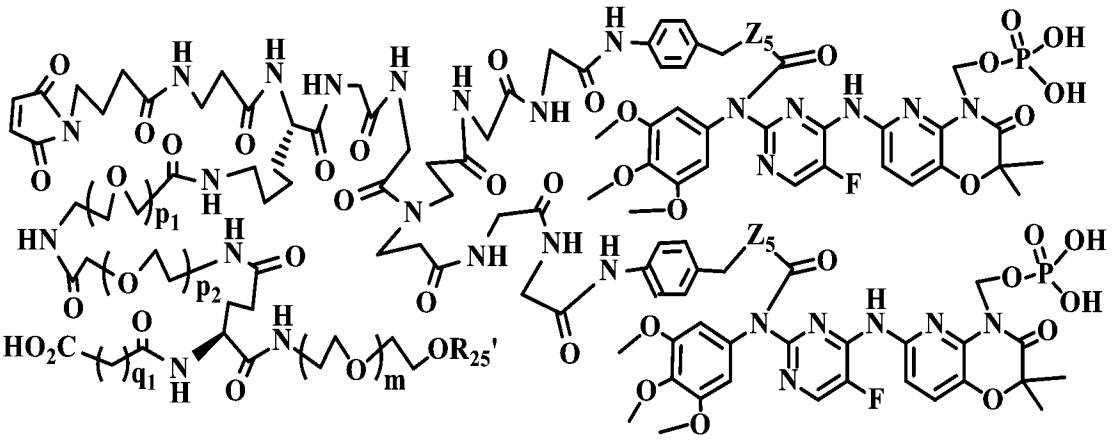
b120，



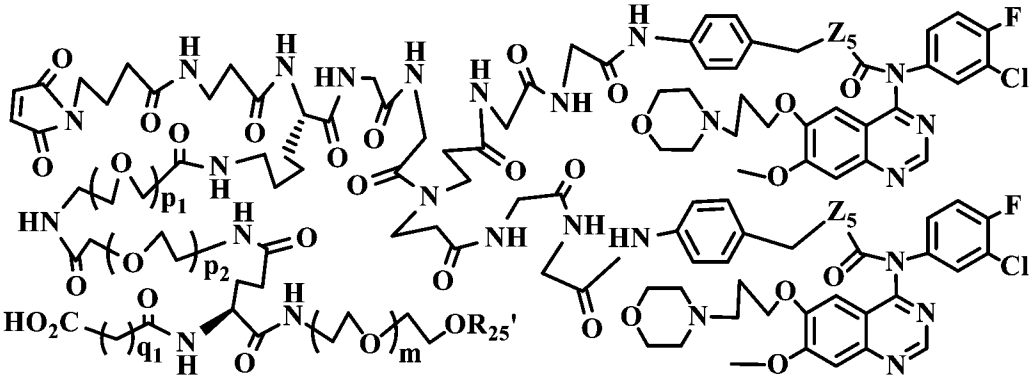
b121，



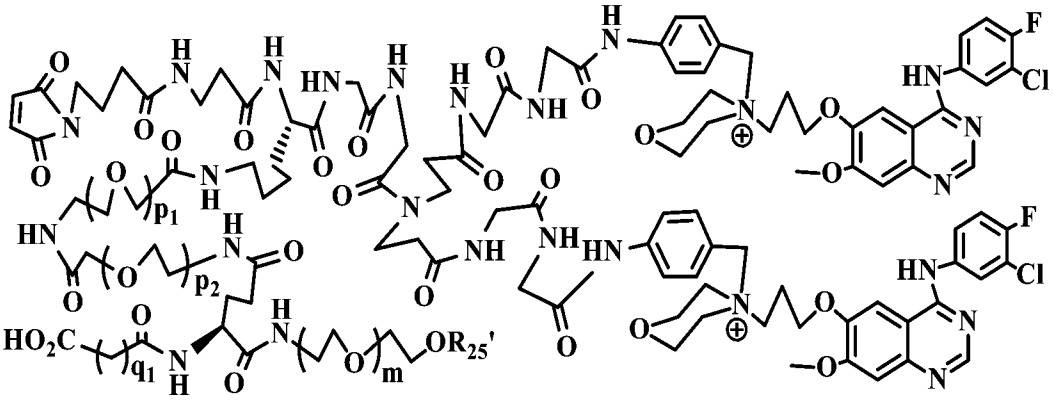
b122，



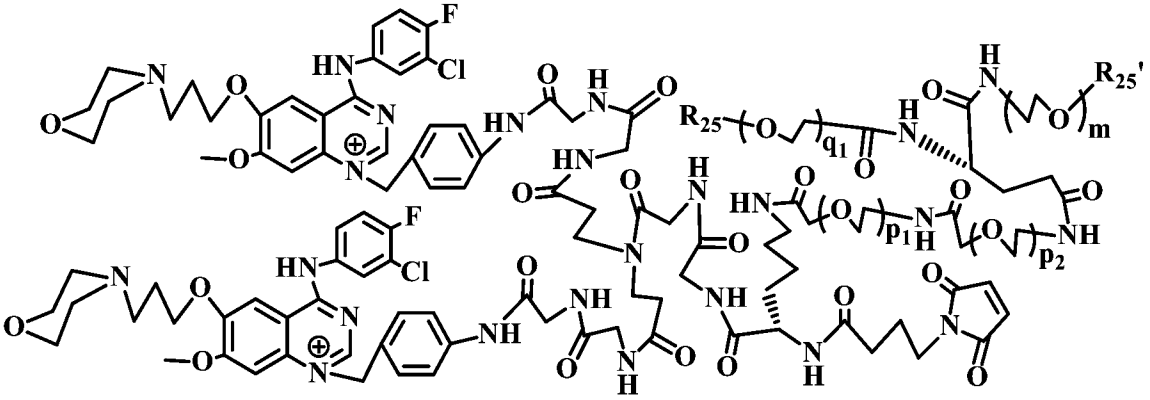
b123，



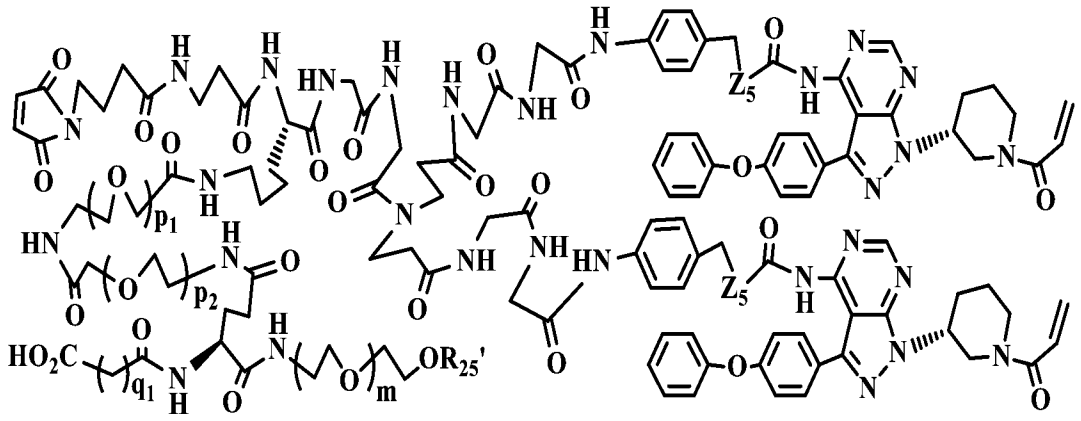
b124，



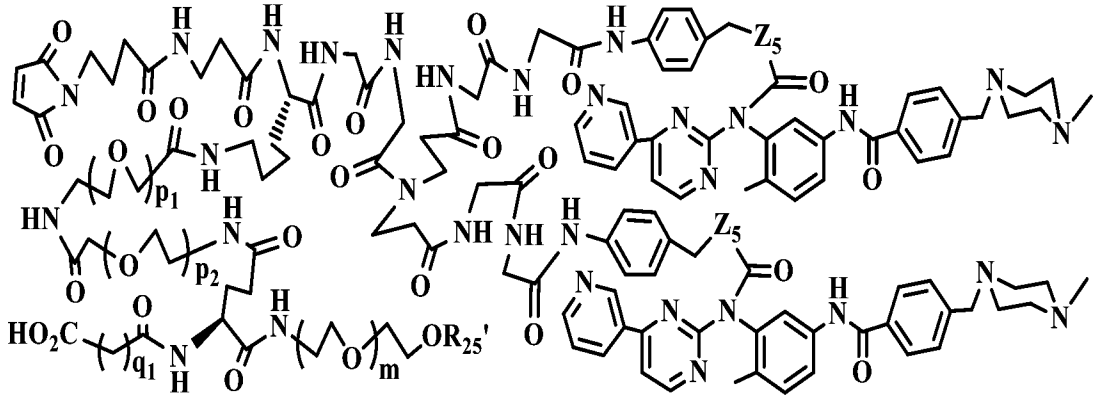
b125，



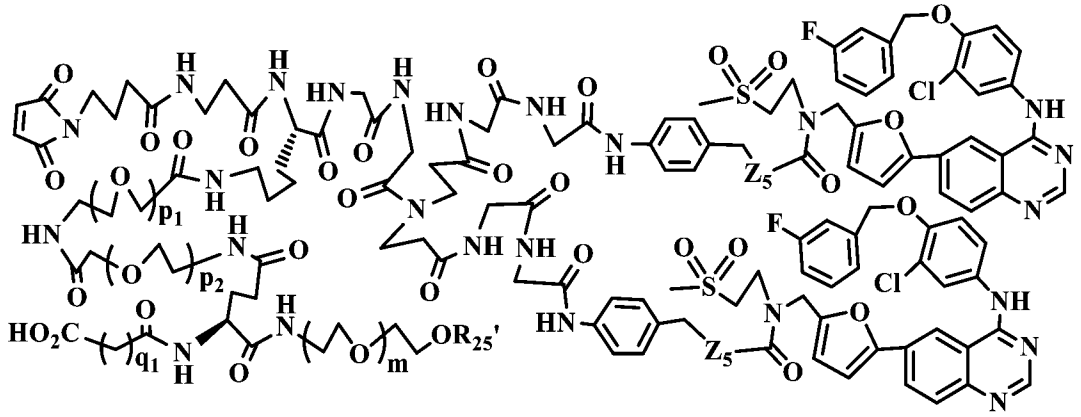
b126，



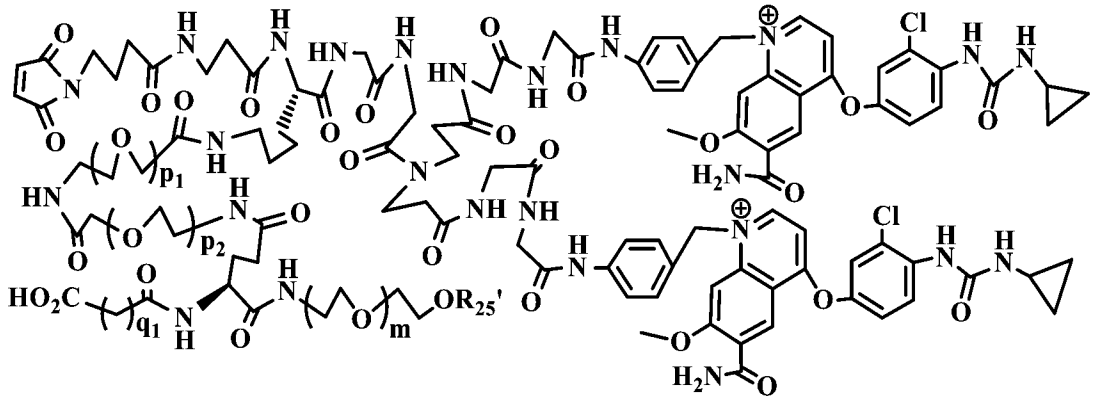
b127，



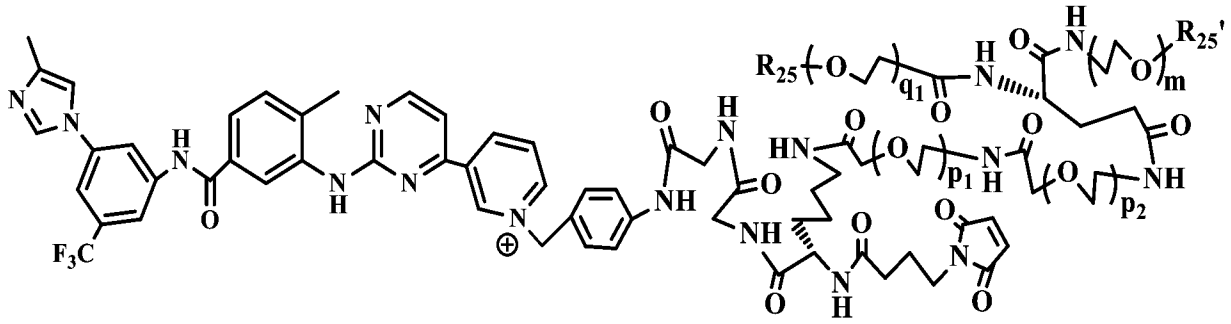
b128，



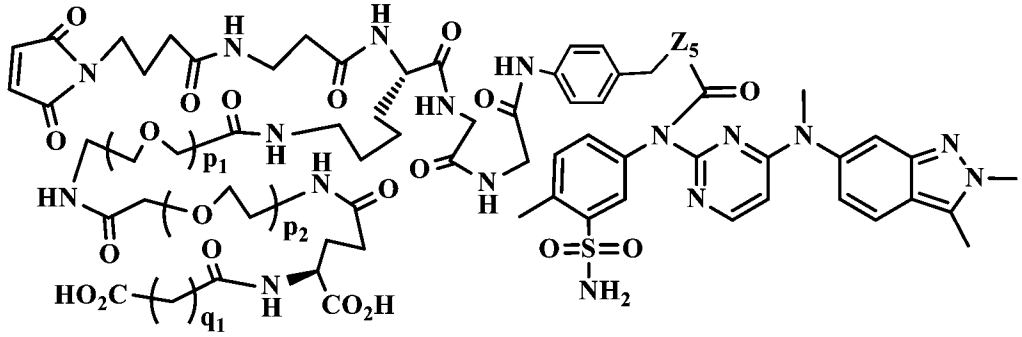
b129，



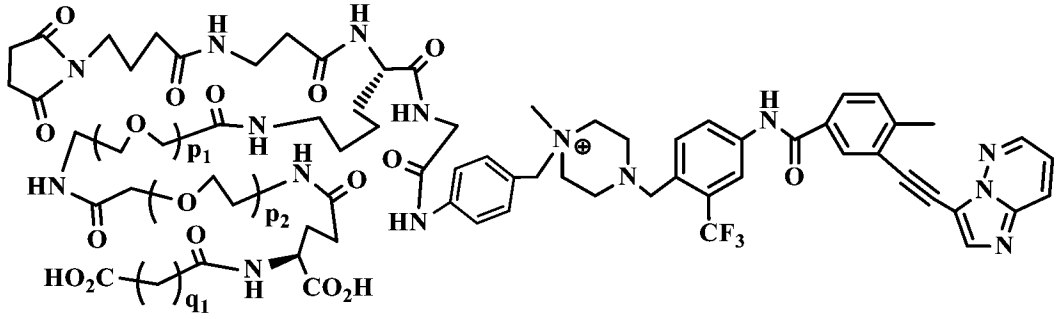
b130，



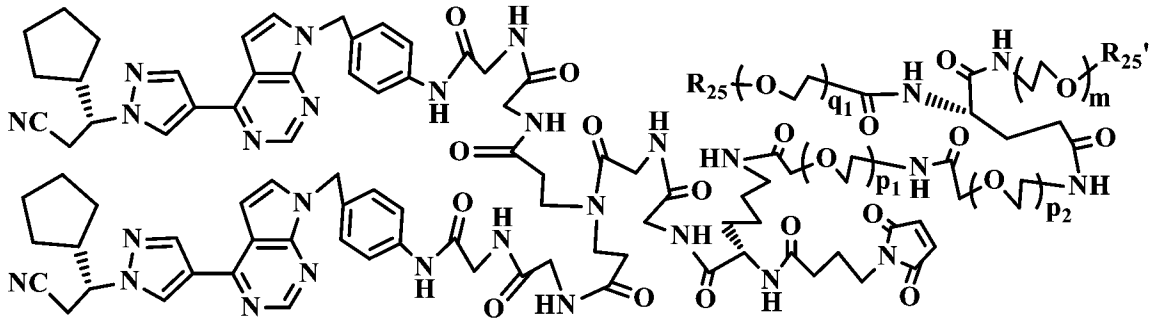
b131，



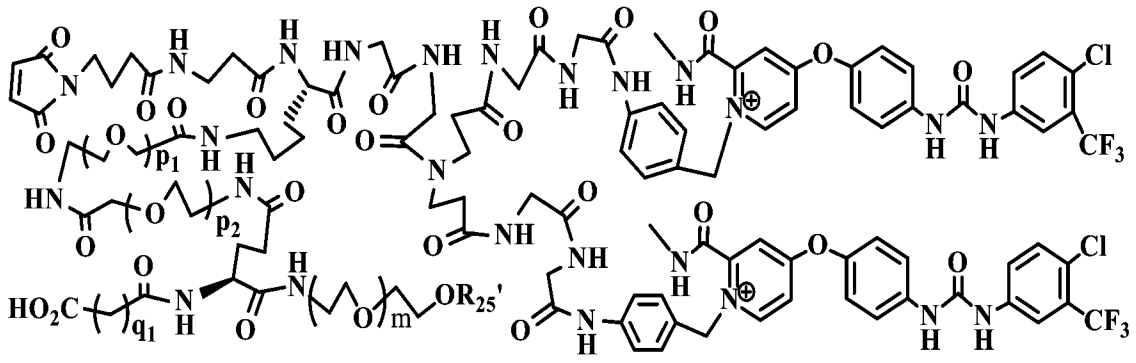
b132，



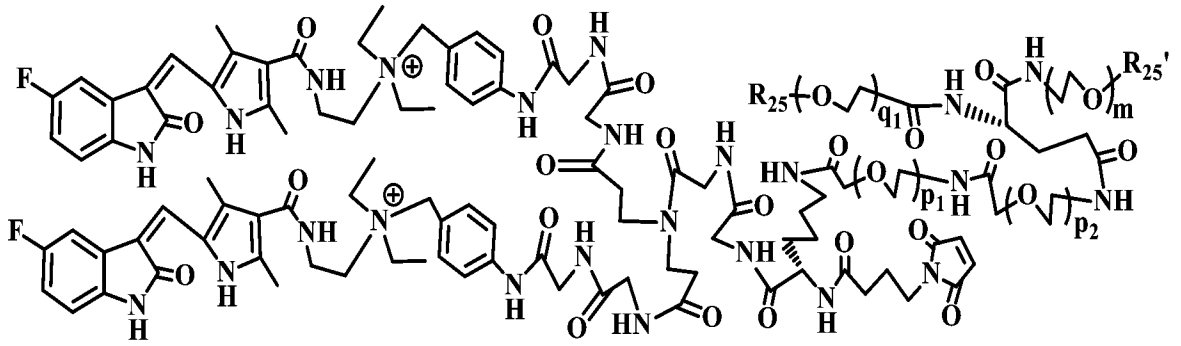
b133，



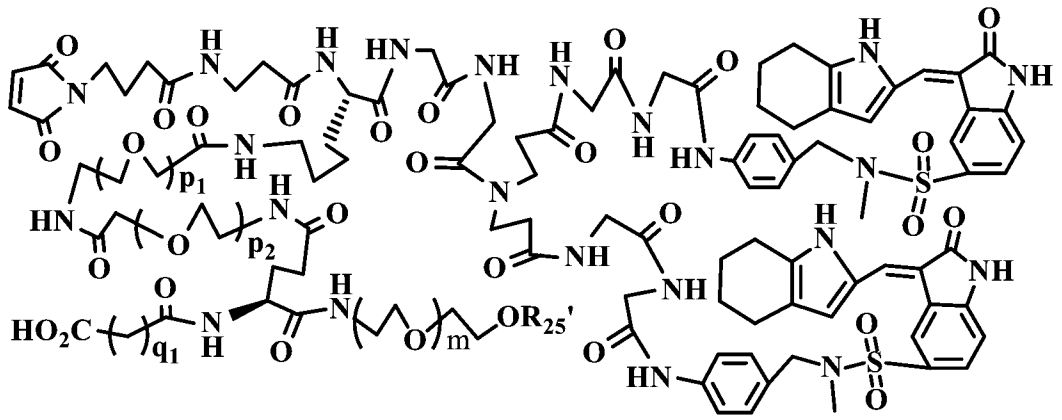
b134，



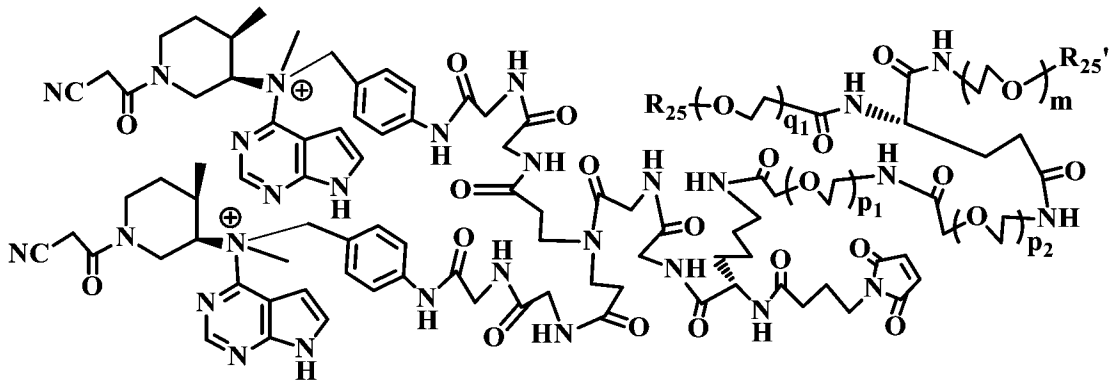
b135，



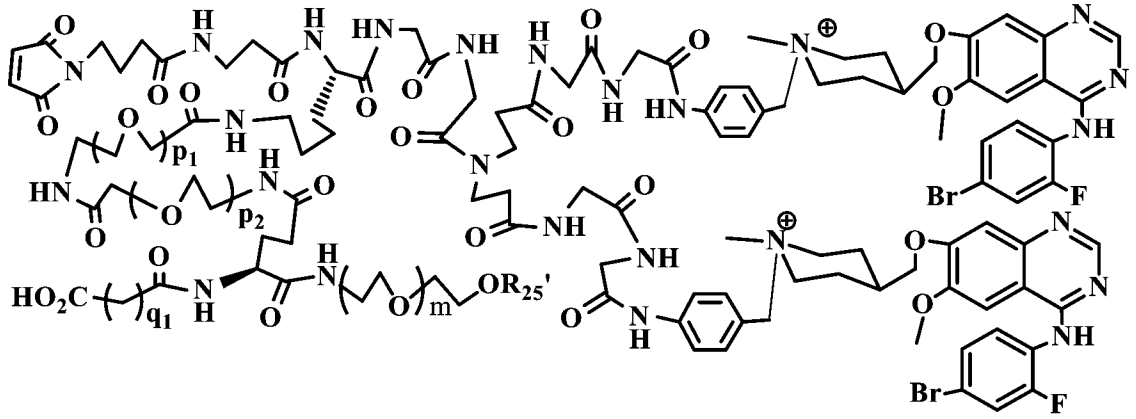
b136，



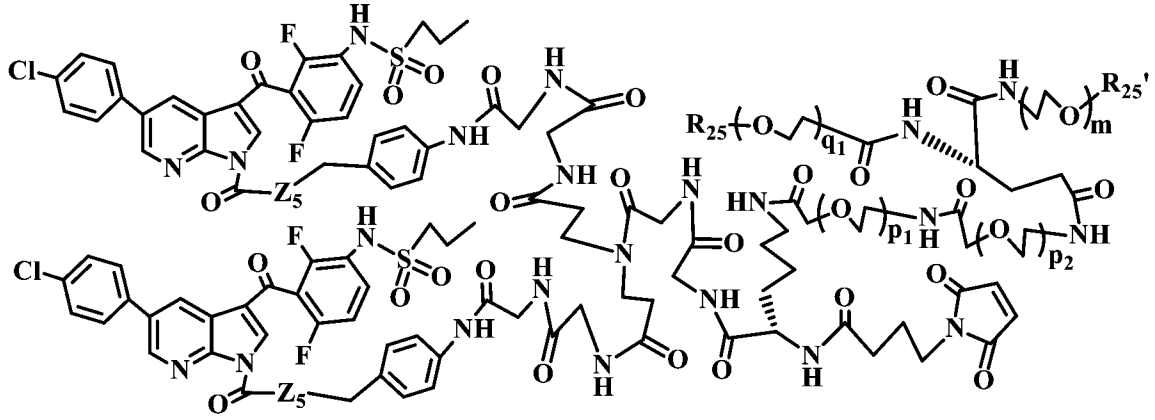
b137，



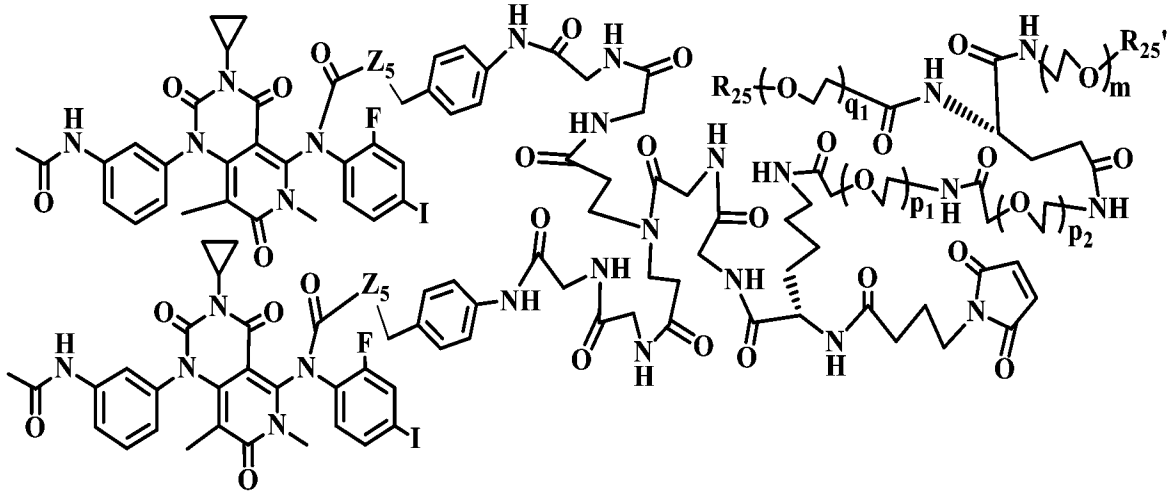
b138，



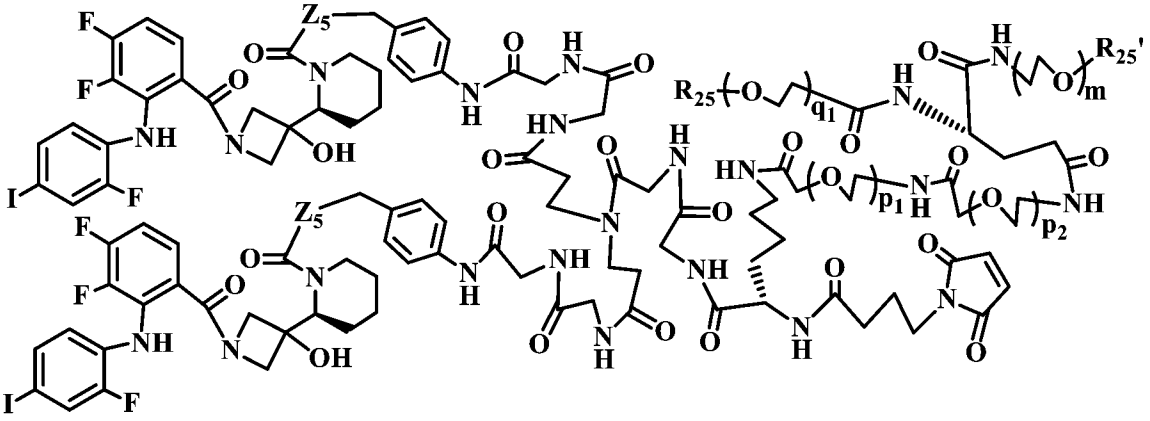
b139，



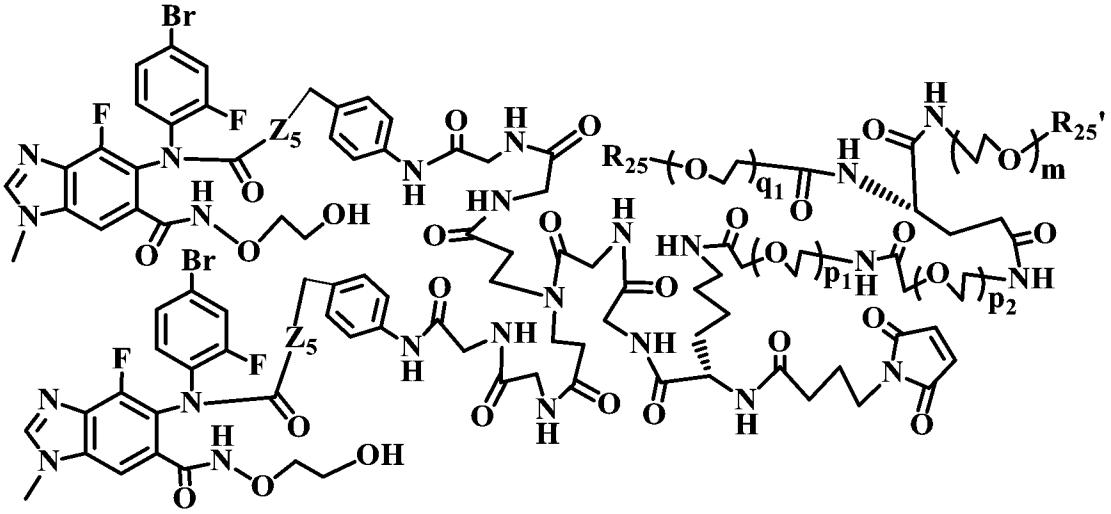
b140，



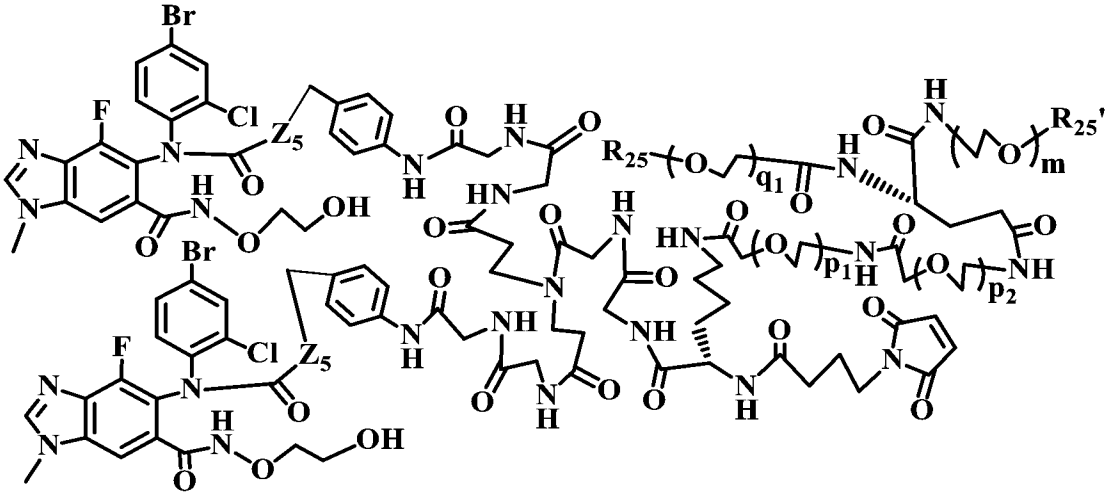
b141，



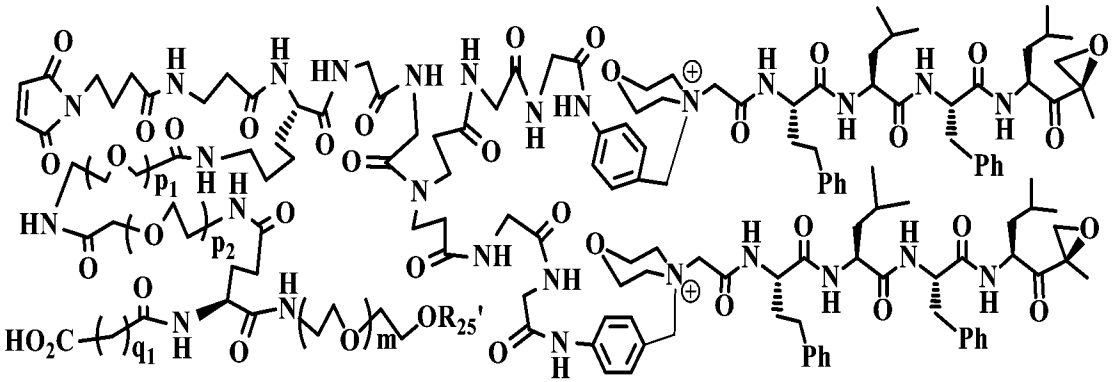
b142，



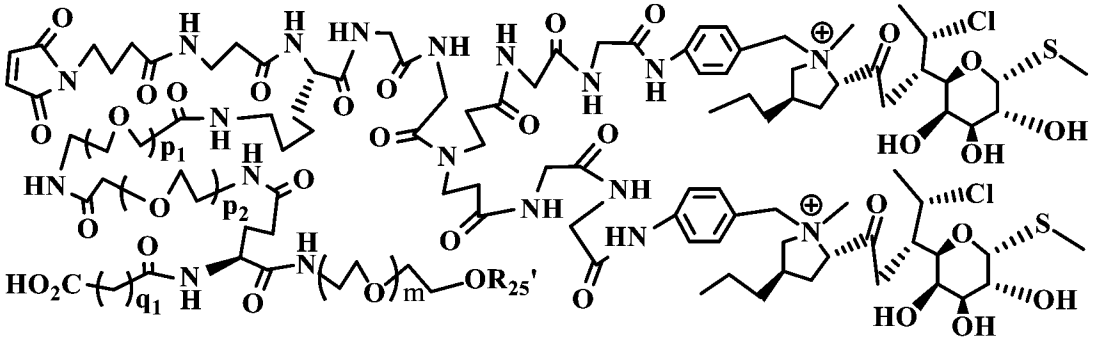
b143，



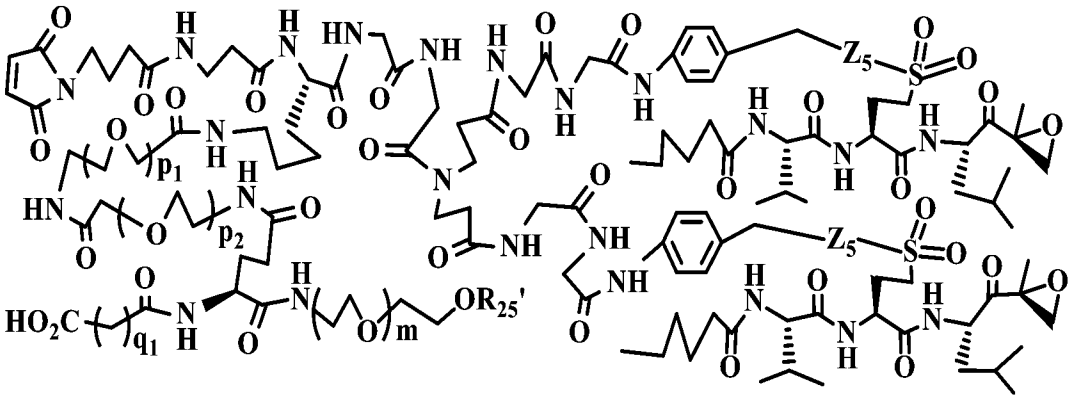
b144，



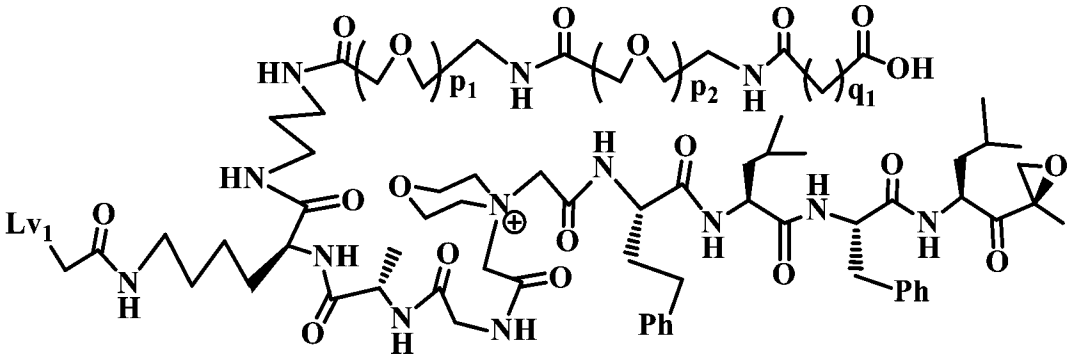
b145，



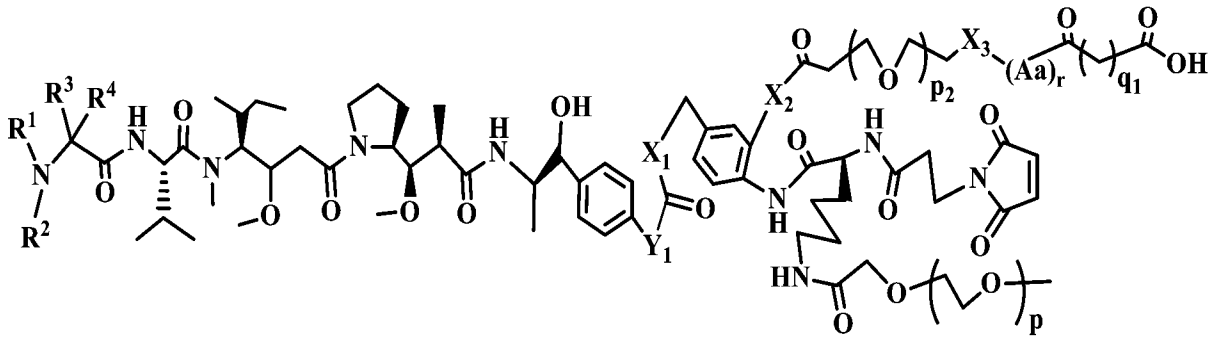
b146，



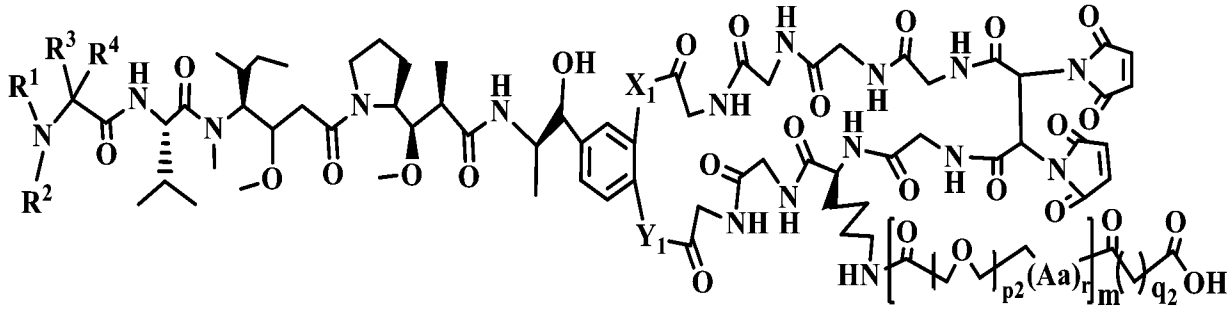
b147，



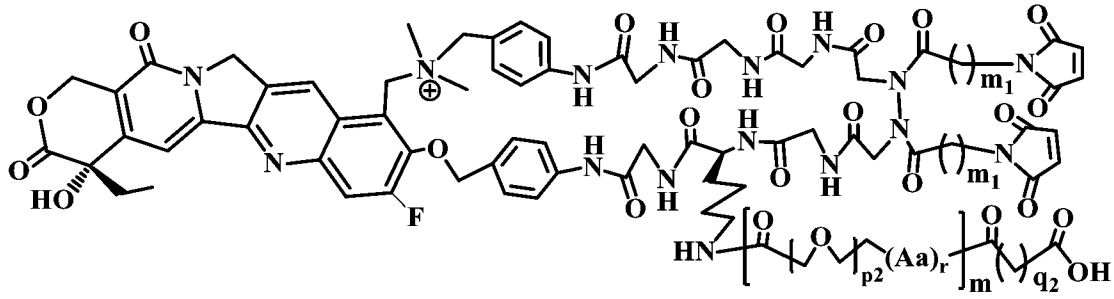
b148，



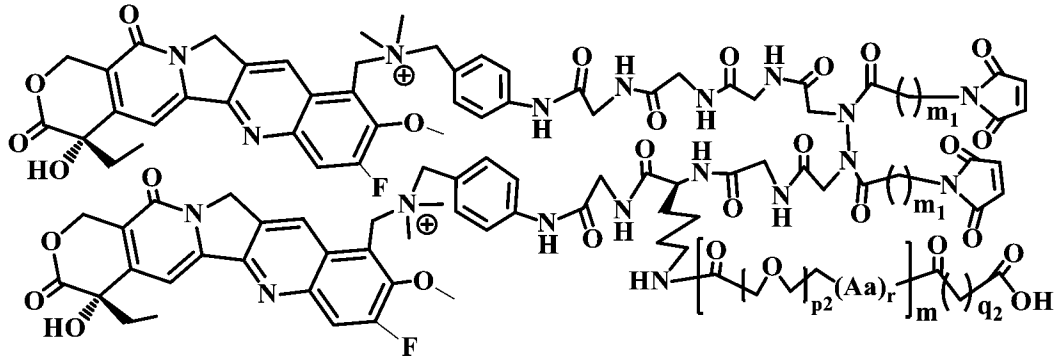
b149，



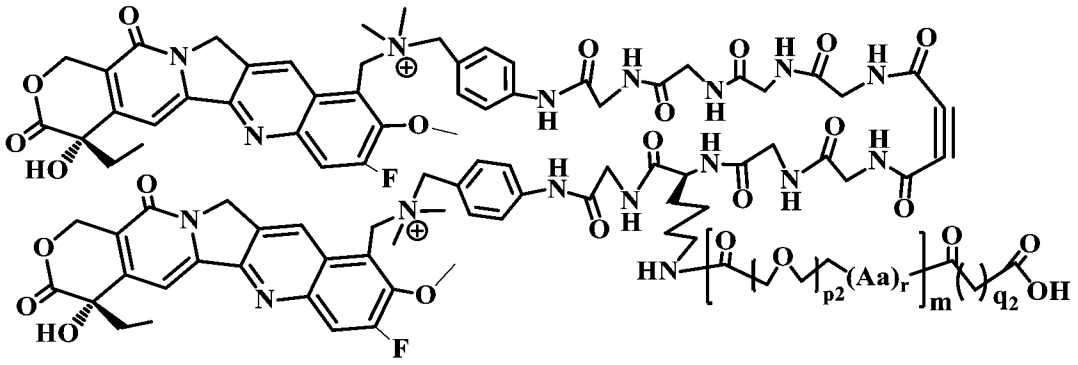
b150，



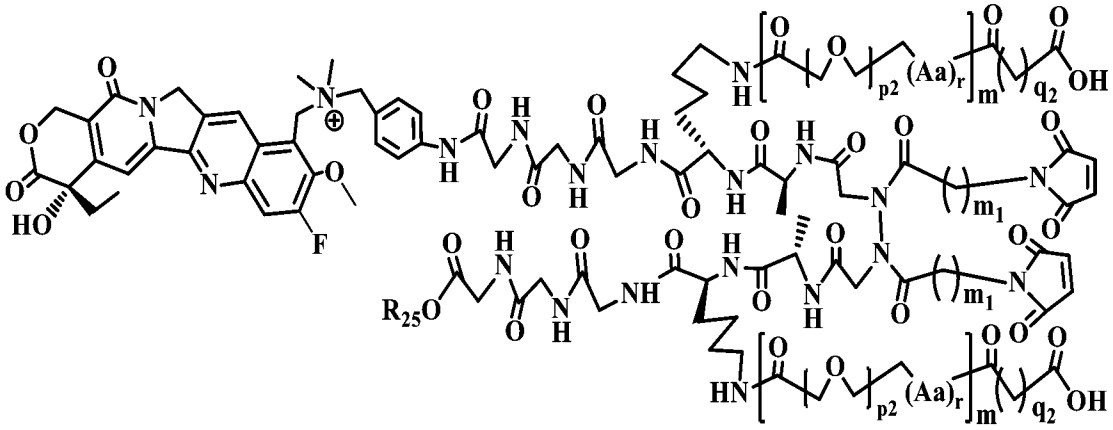
b151，



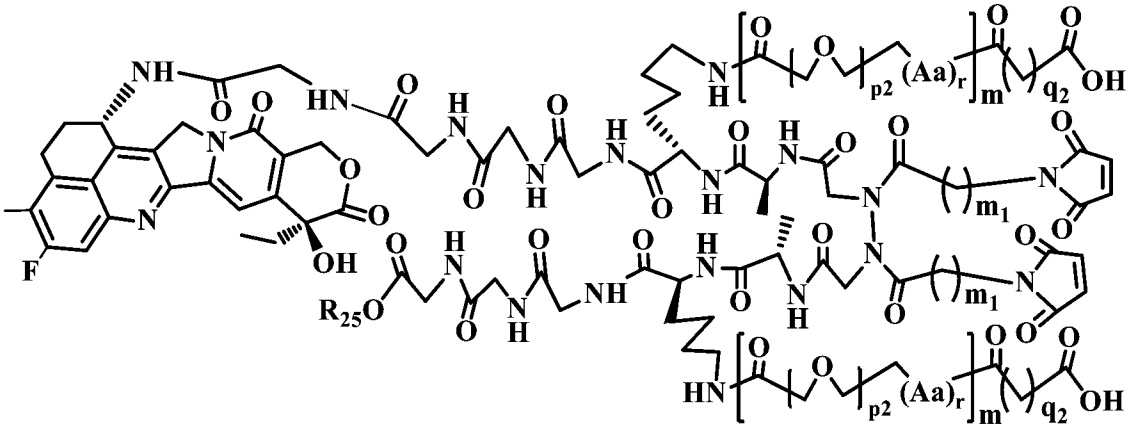
b152，



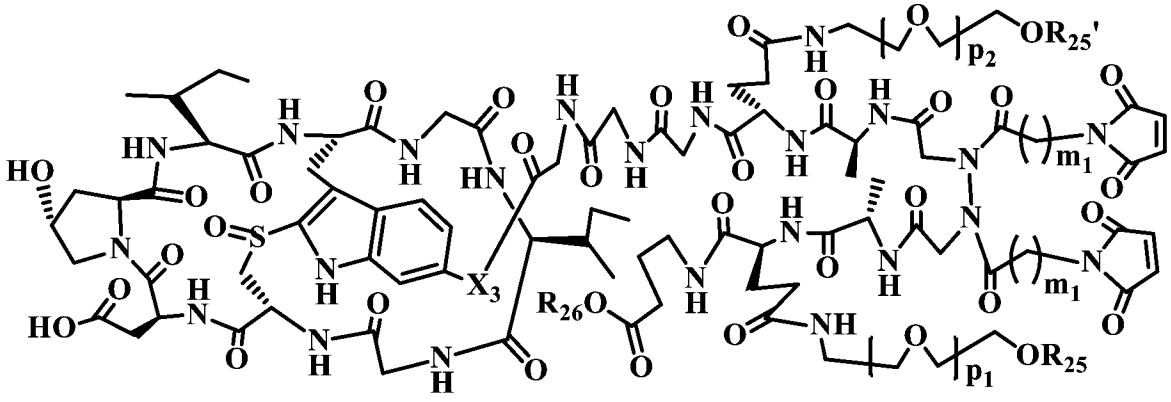
b153，



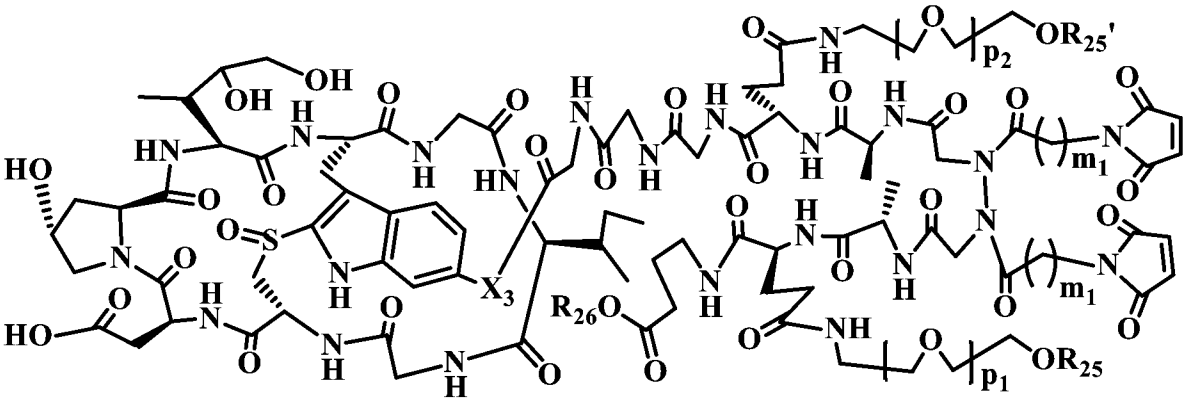
b154，



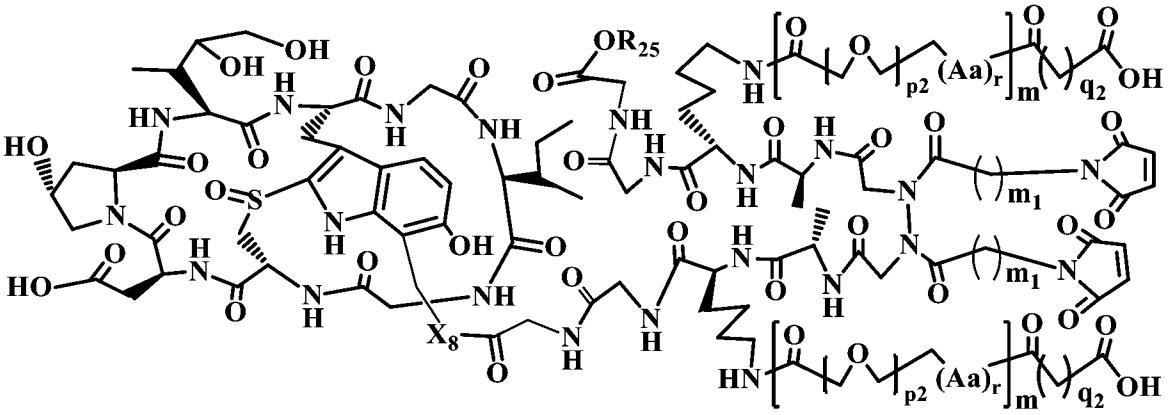
b155，



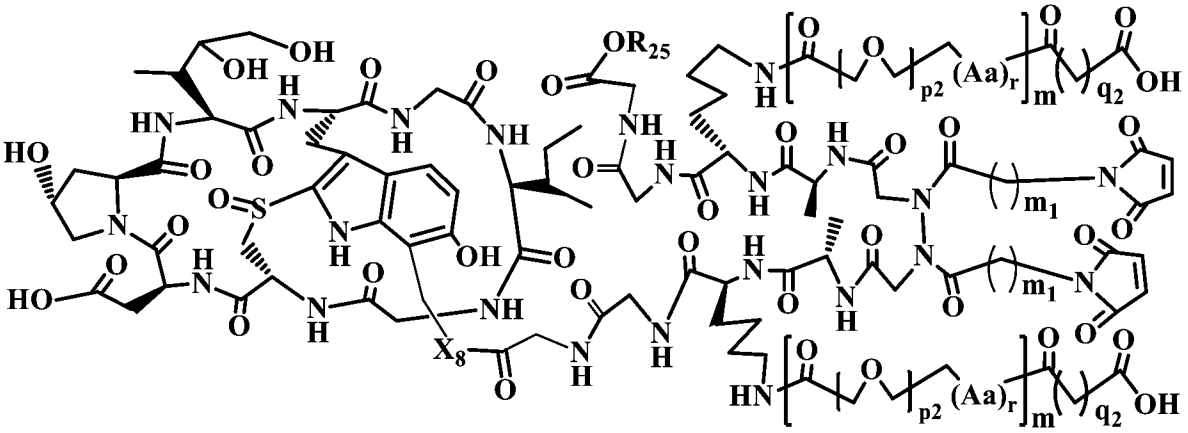
b156，



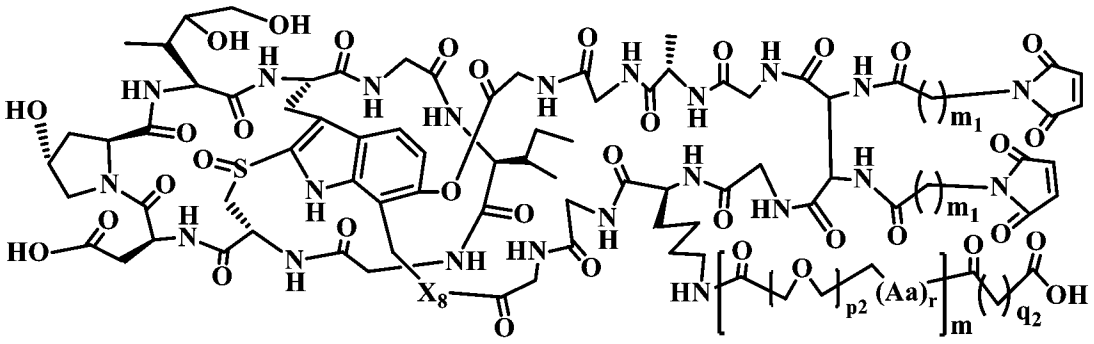
b157，



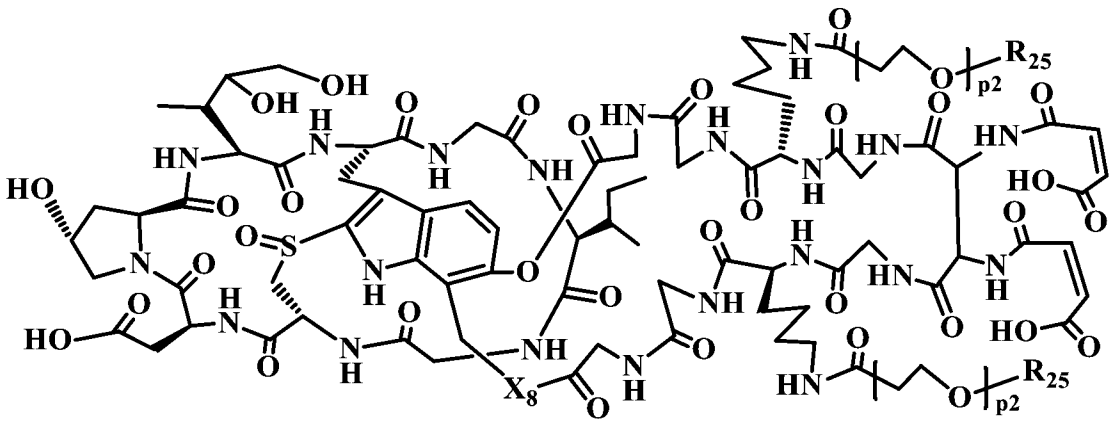
b158，



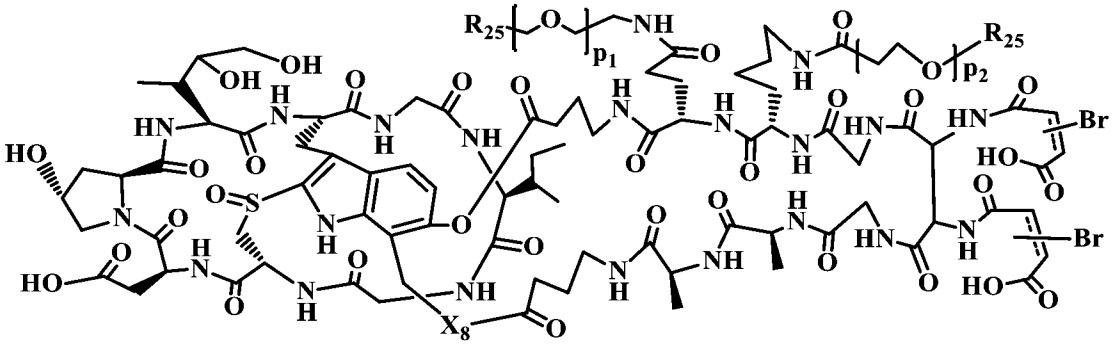
b159，



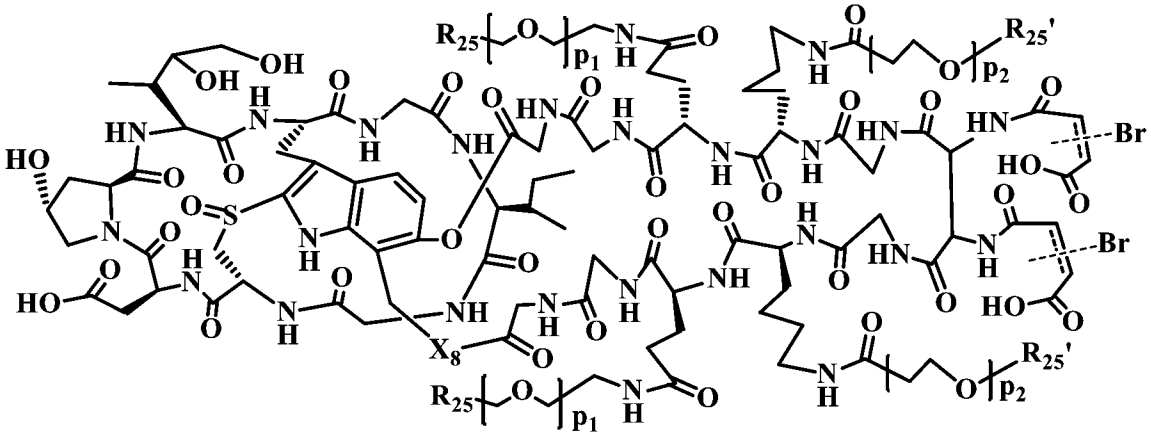
b160，



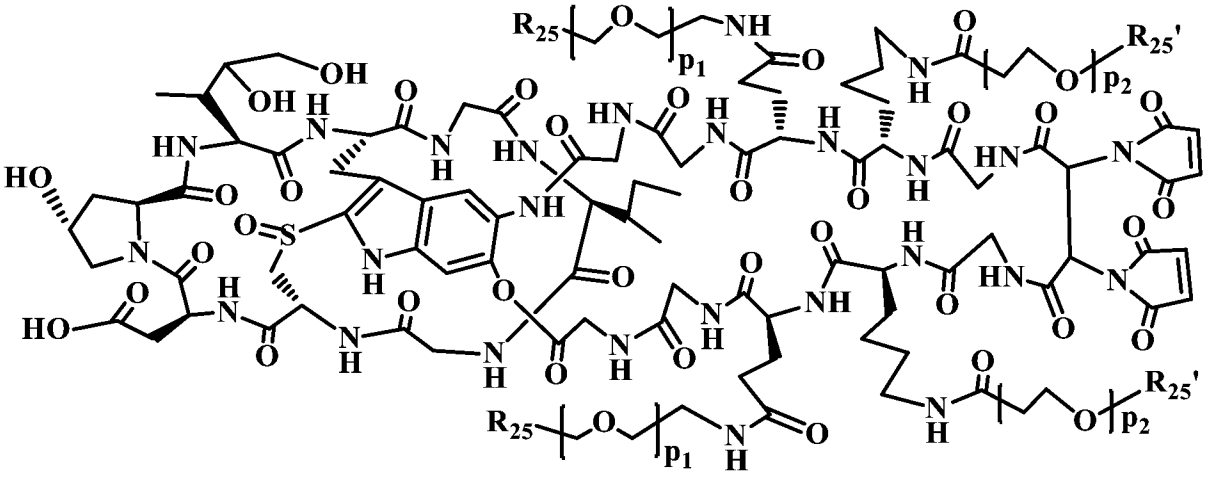
b161，



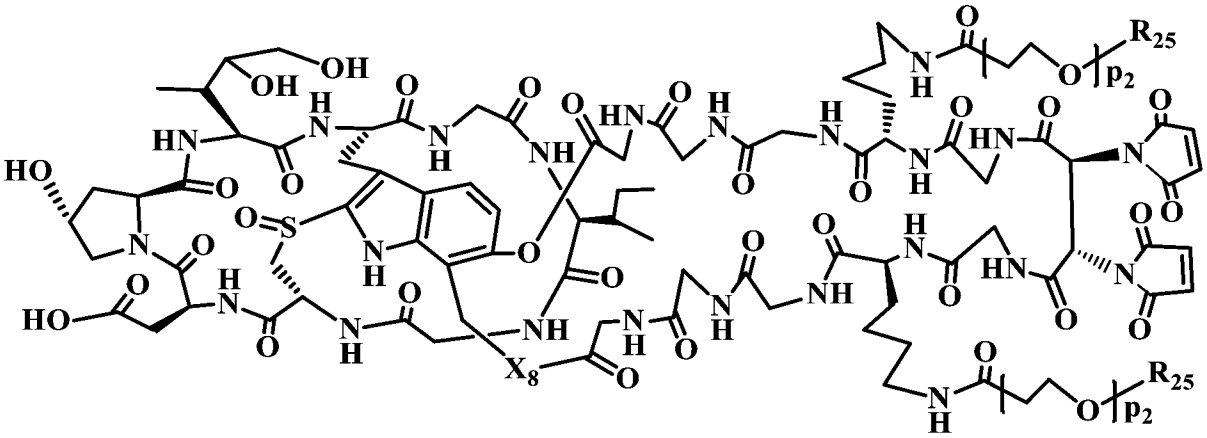
b162，



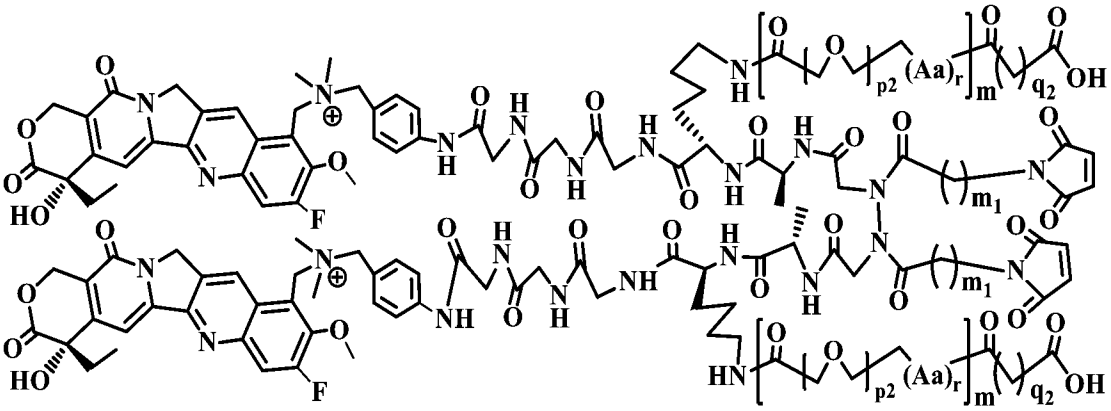
b163，



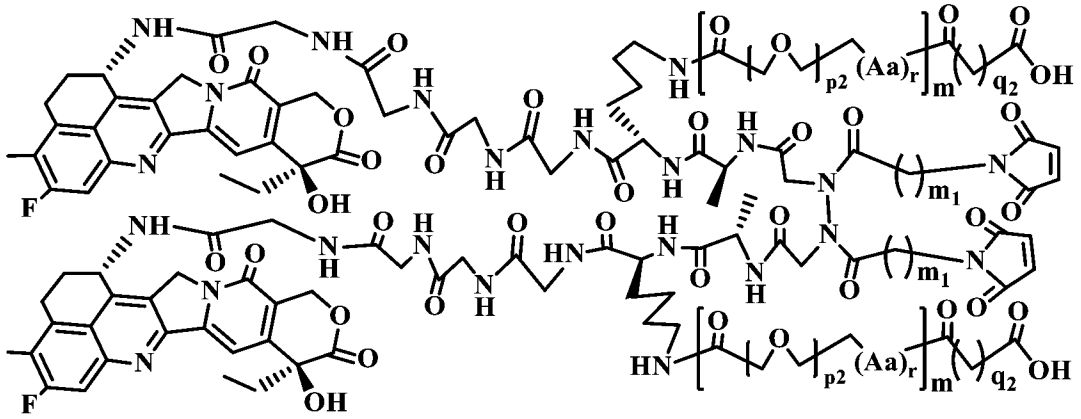
a164.



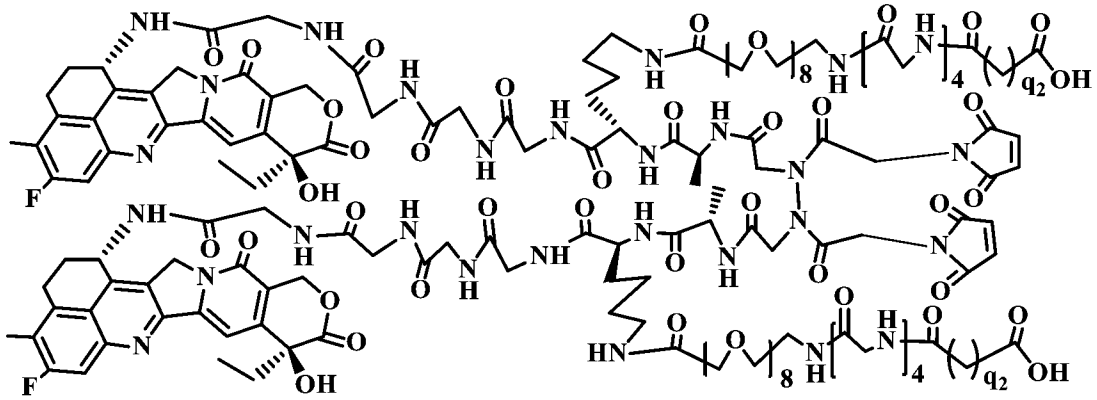
a165，



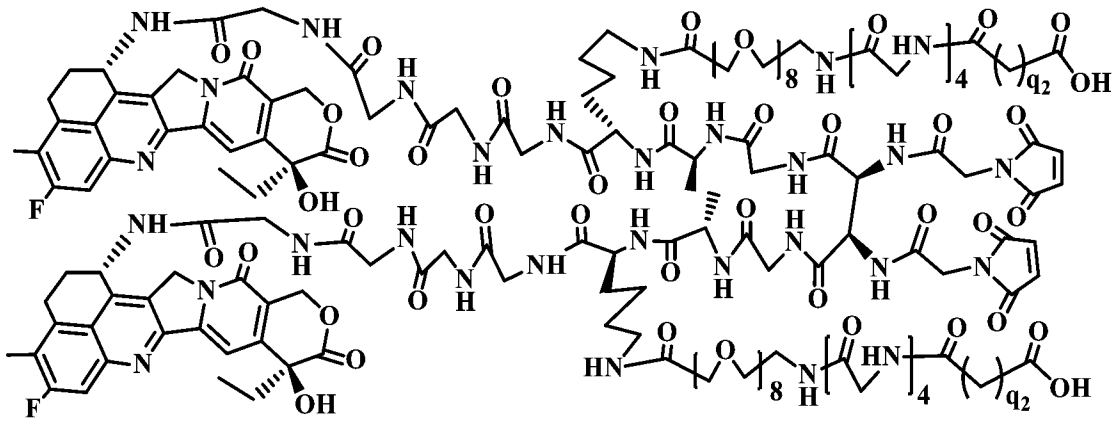
b166，



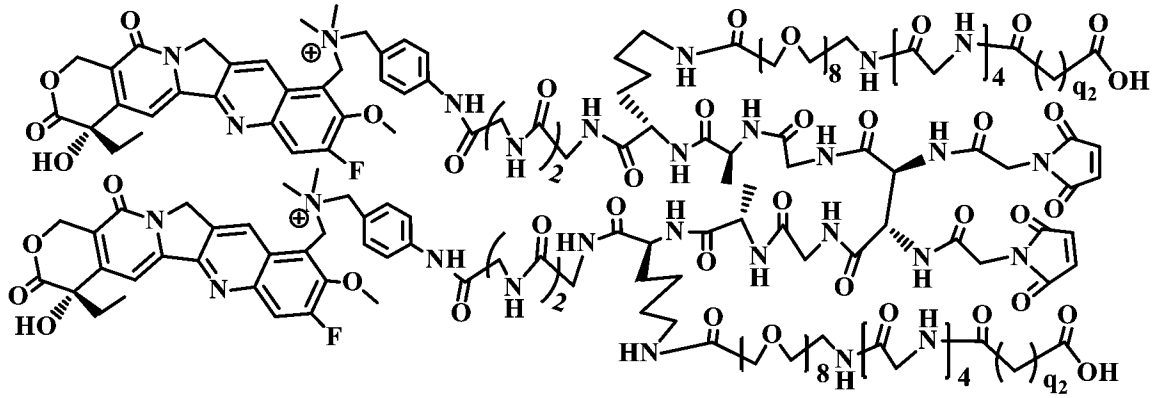
b167，



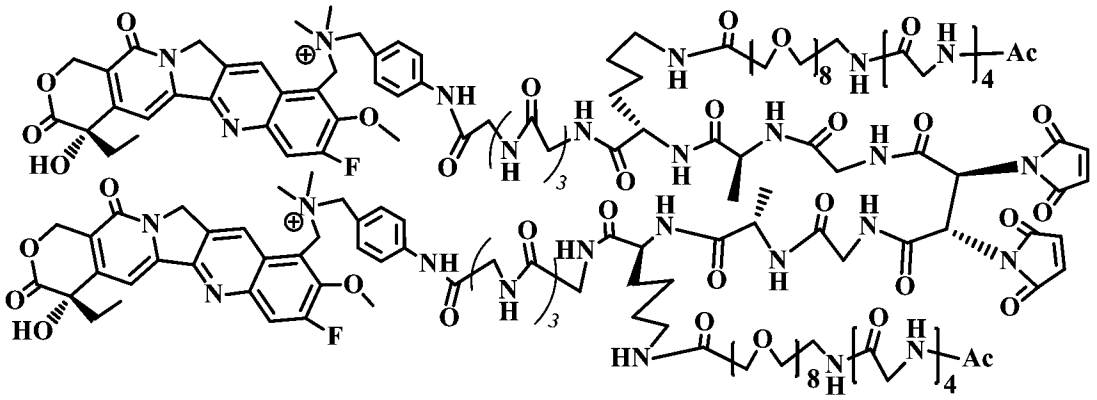
b168，



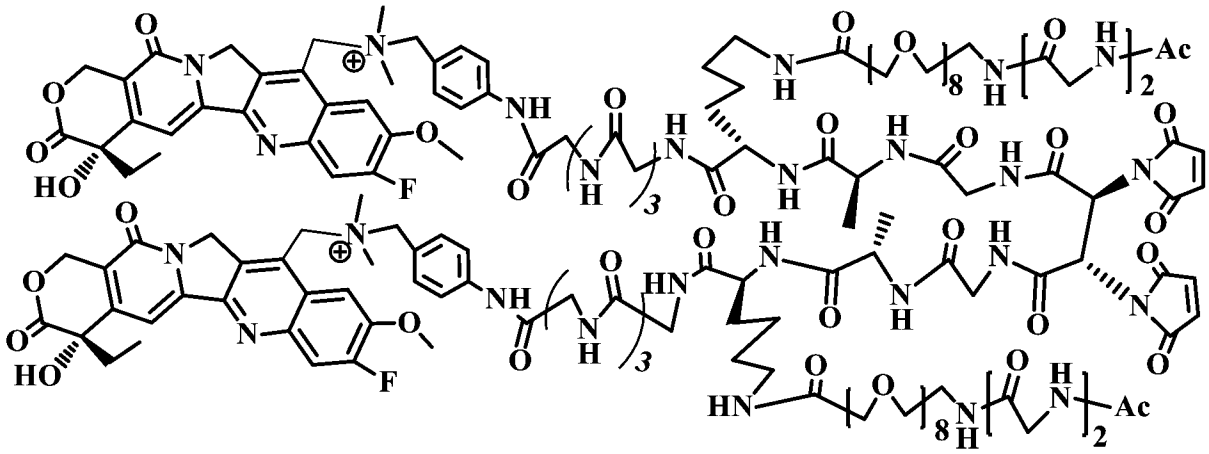
b169，



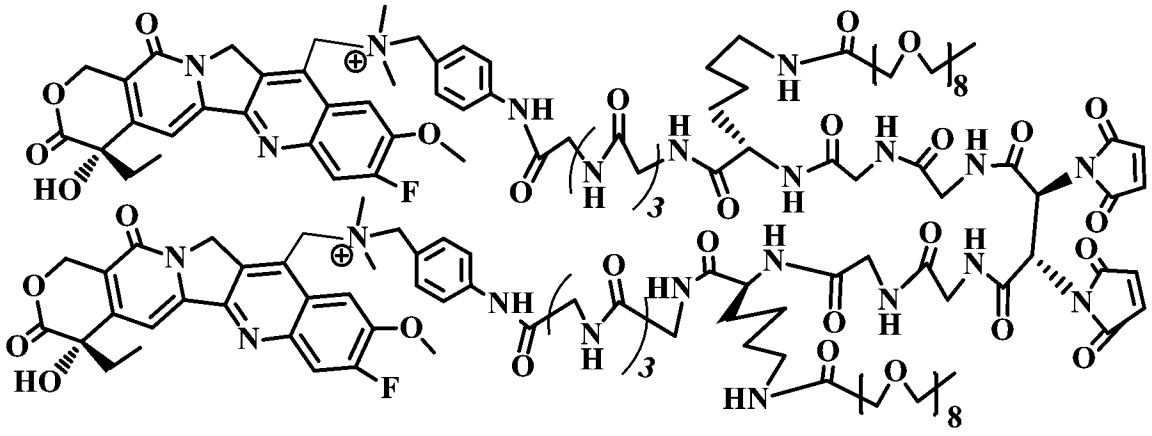
b170，



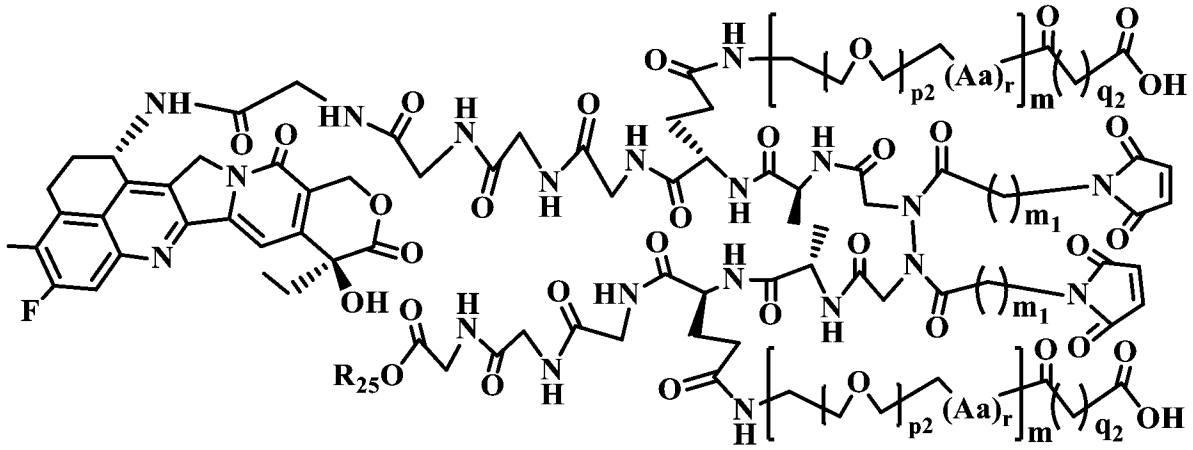
b171，



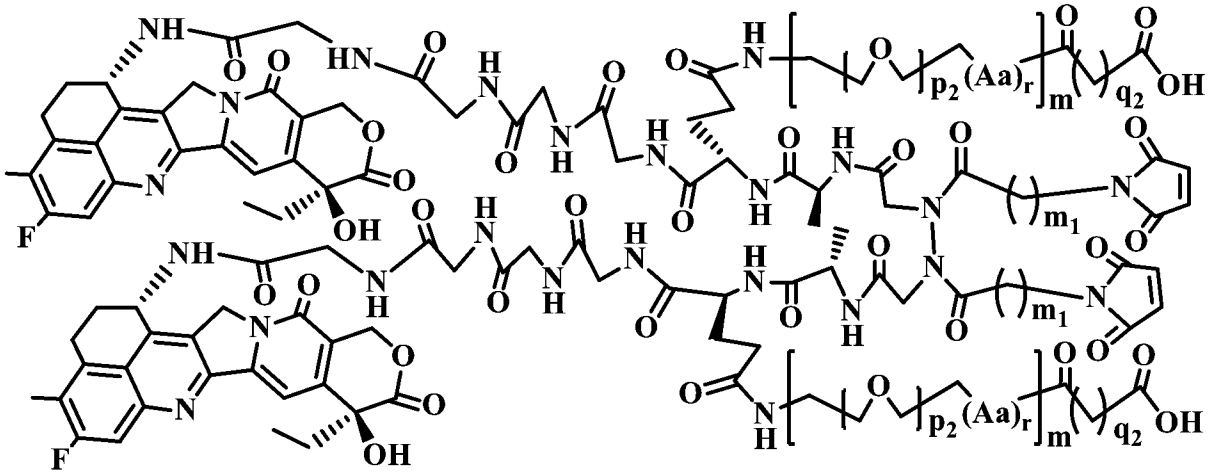
b172，



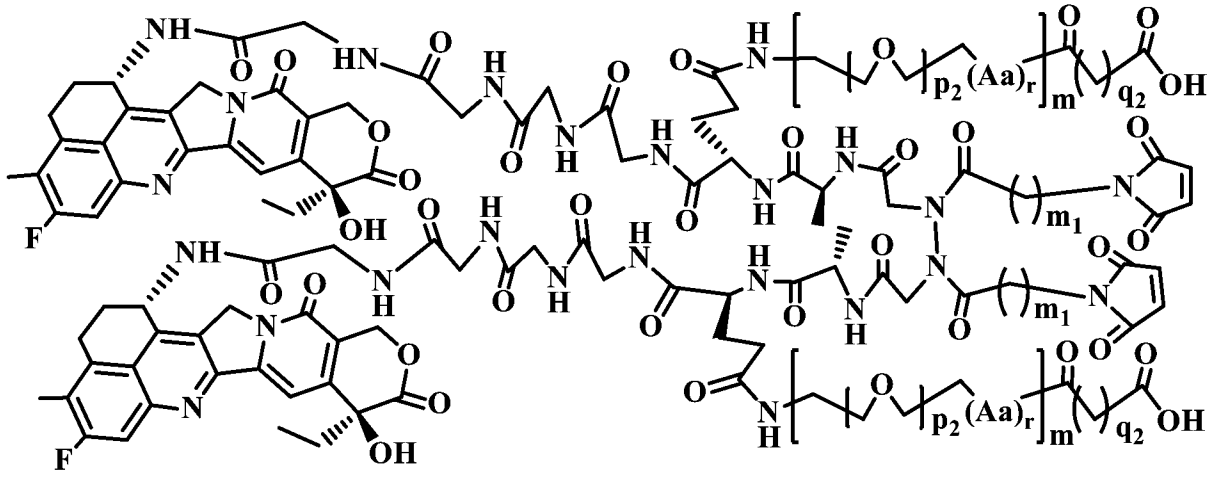
b173，



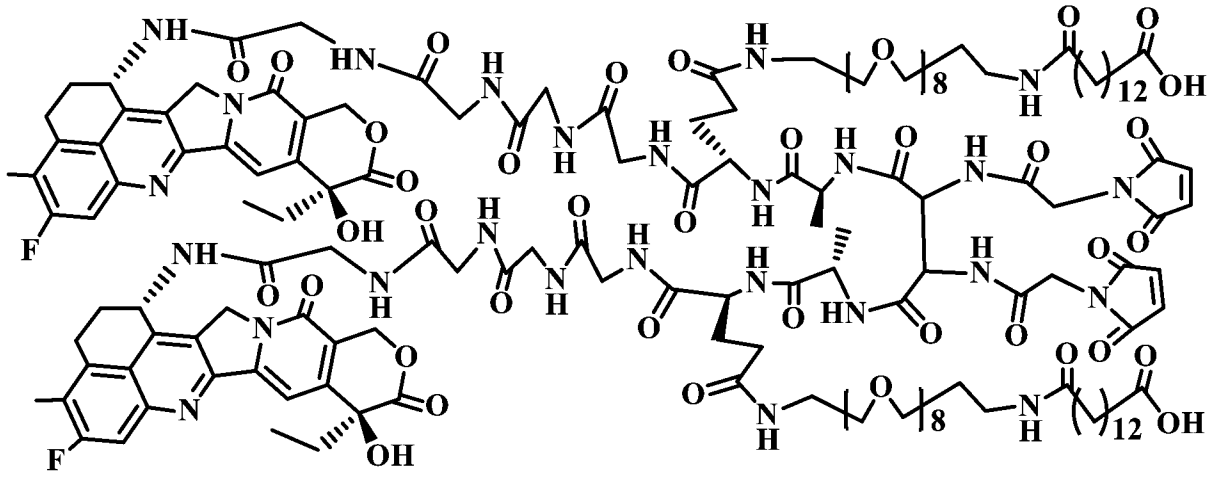
b174 ，



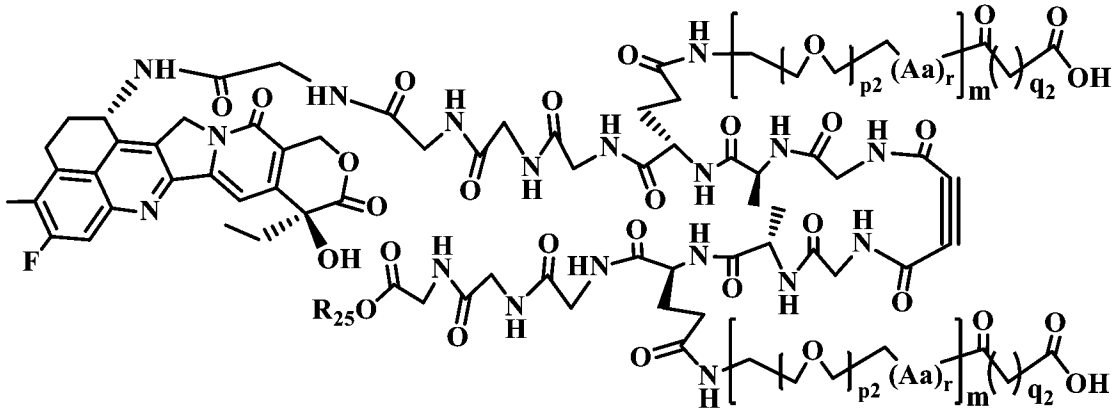
b175，



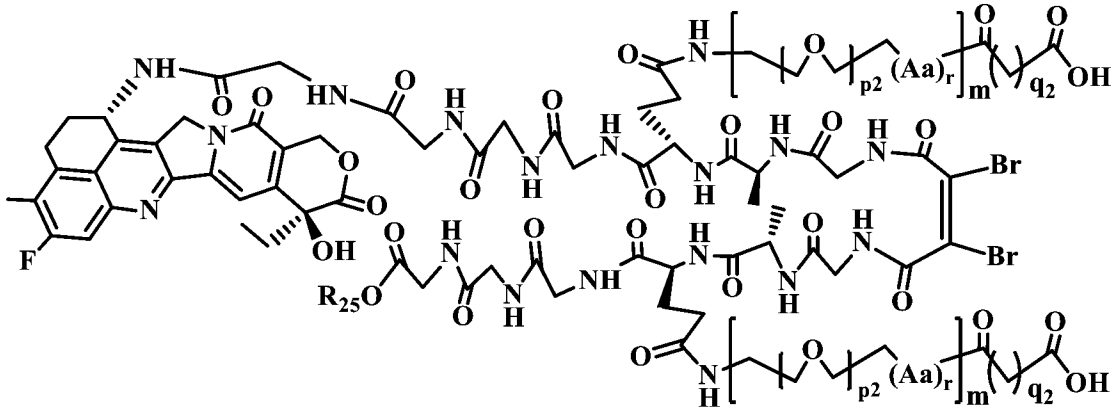
b176，



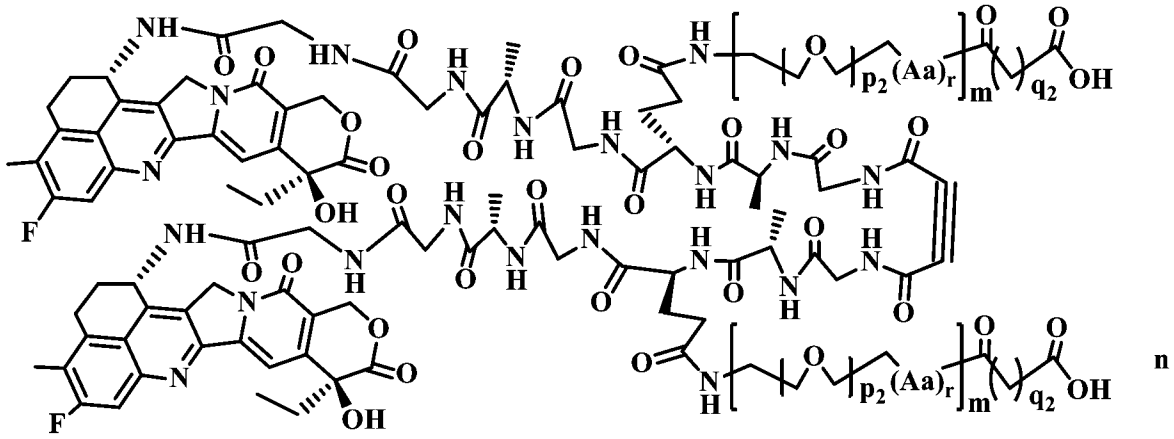
b177，



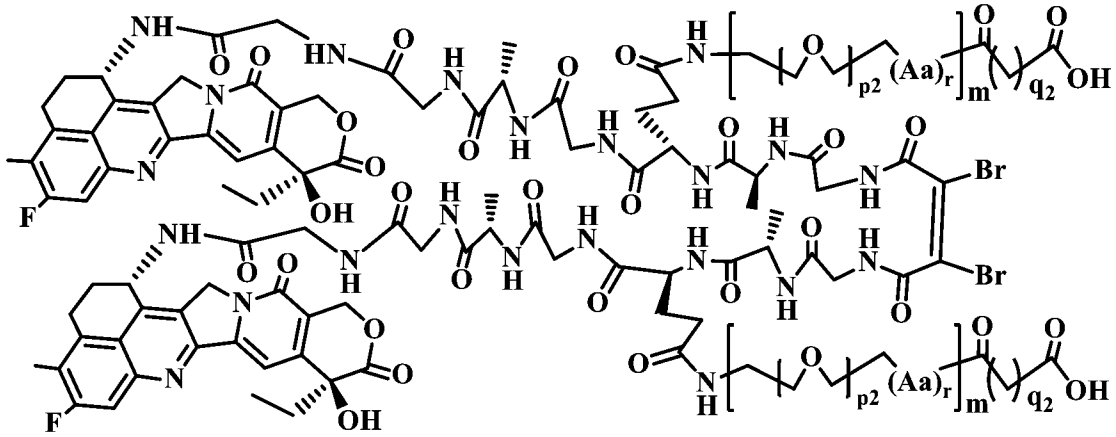
b178，



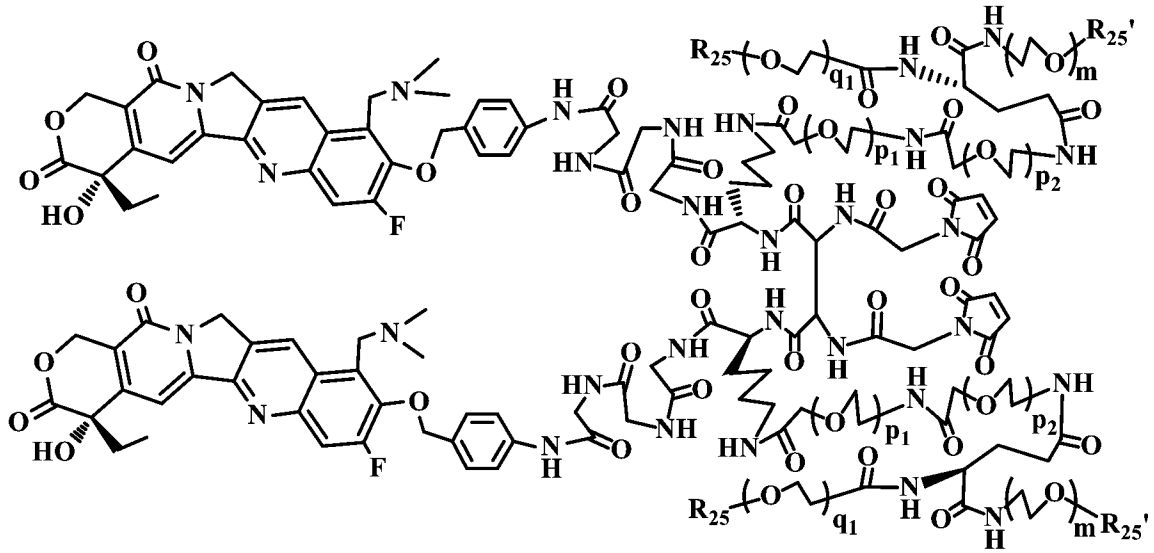
b179，



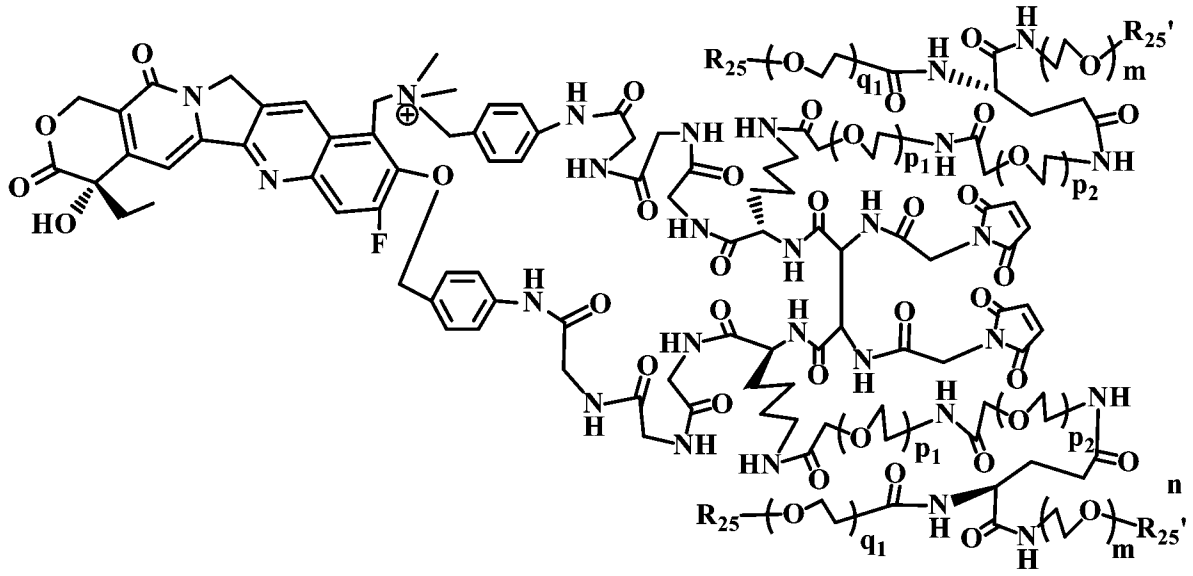
b180，



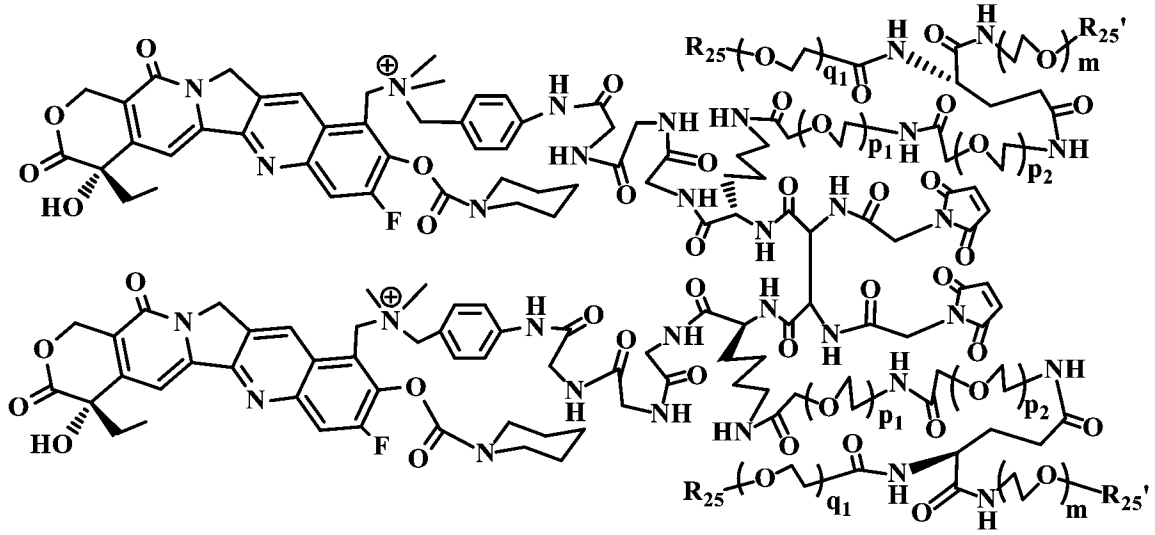
b181，



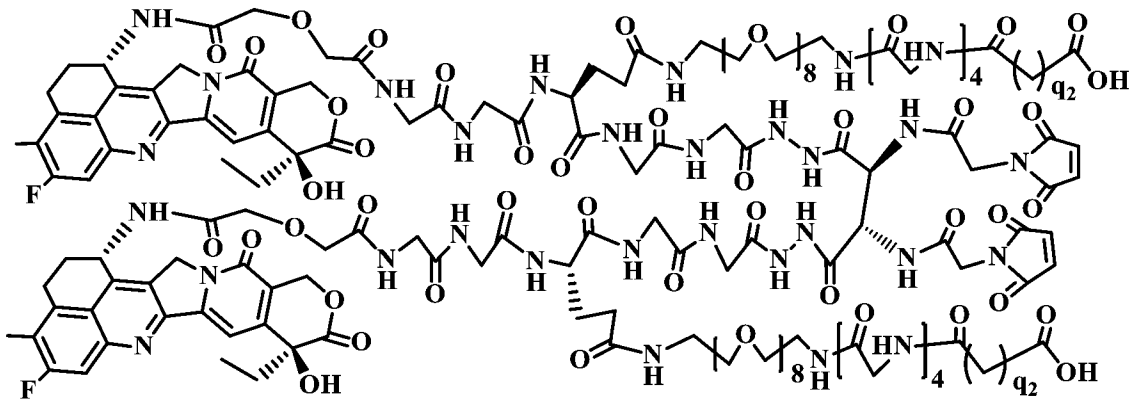
b182，



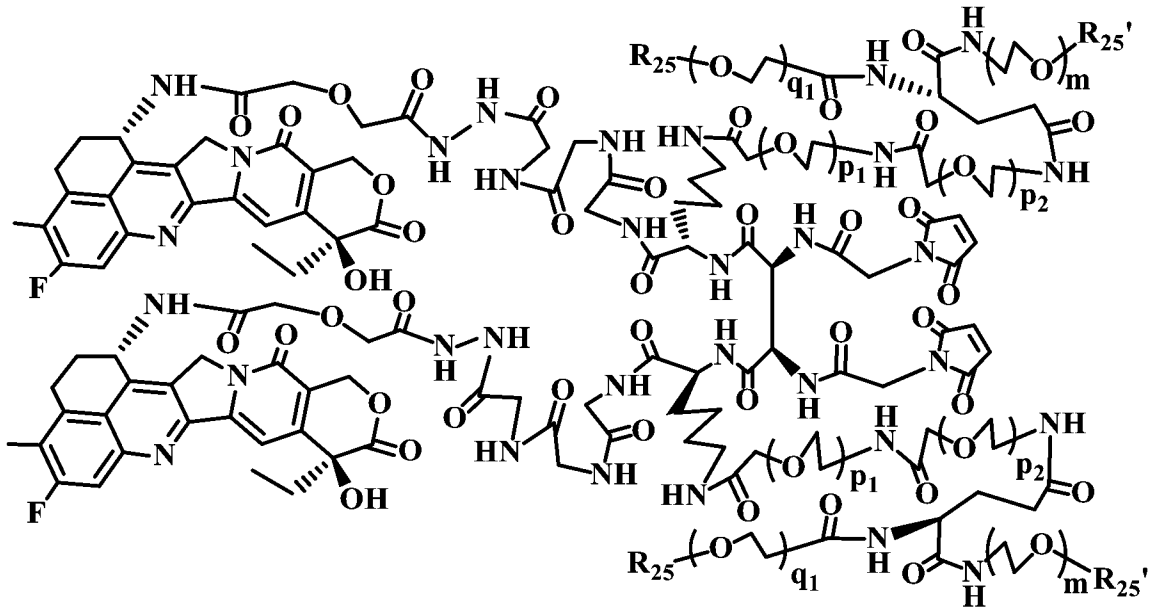
b183，



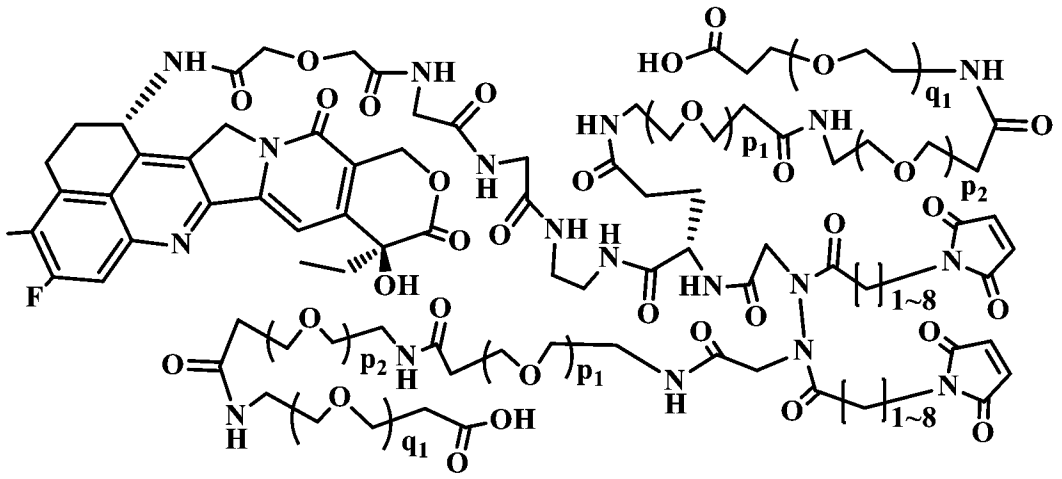
b184，



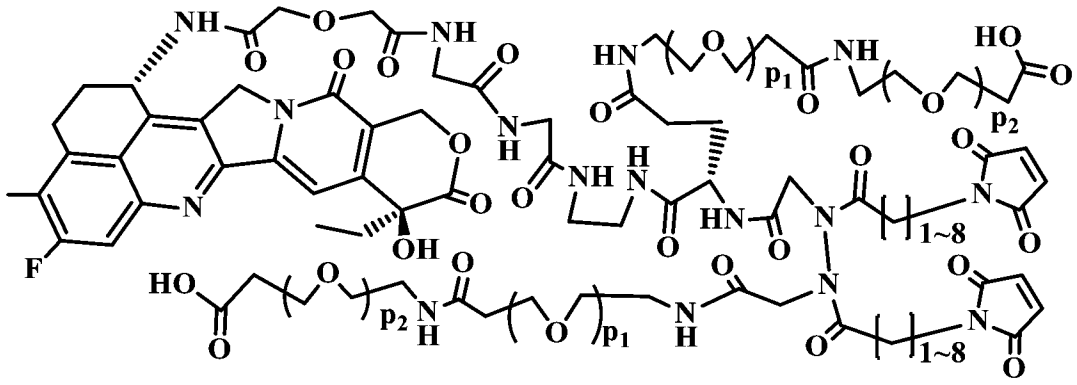
b185，



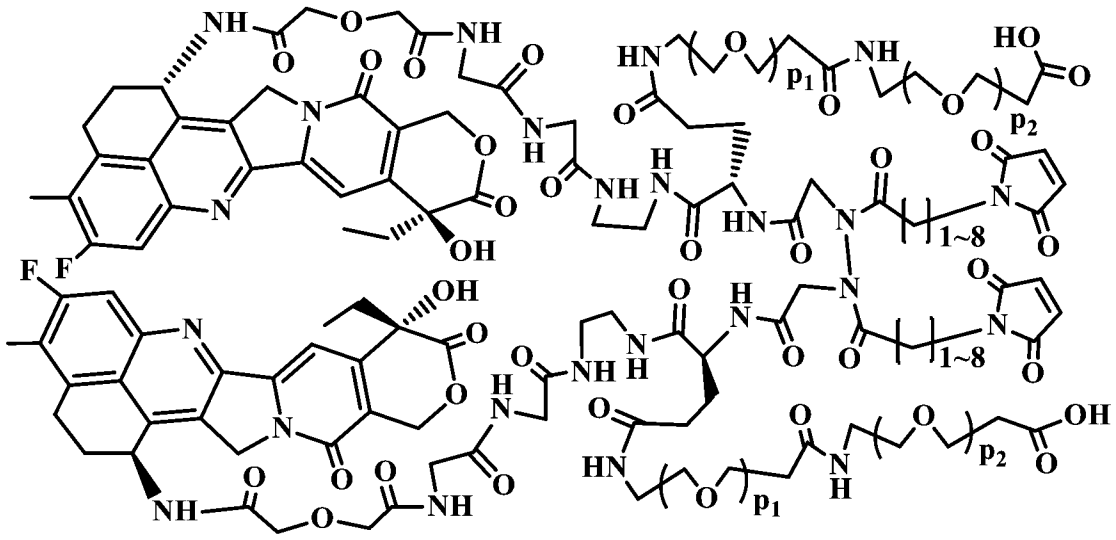
b186，



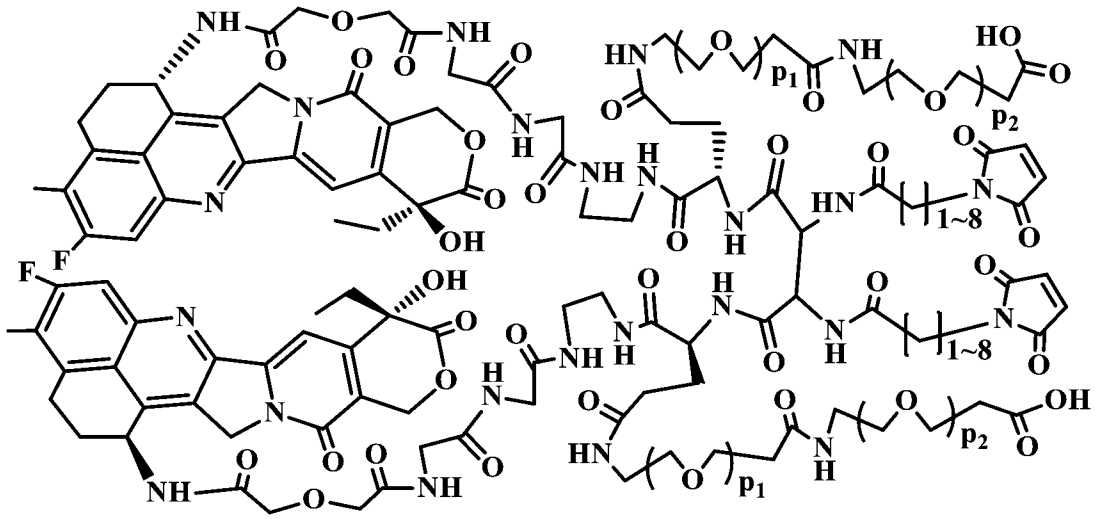
b187，



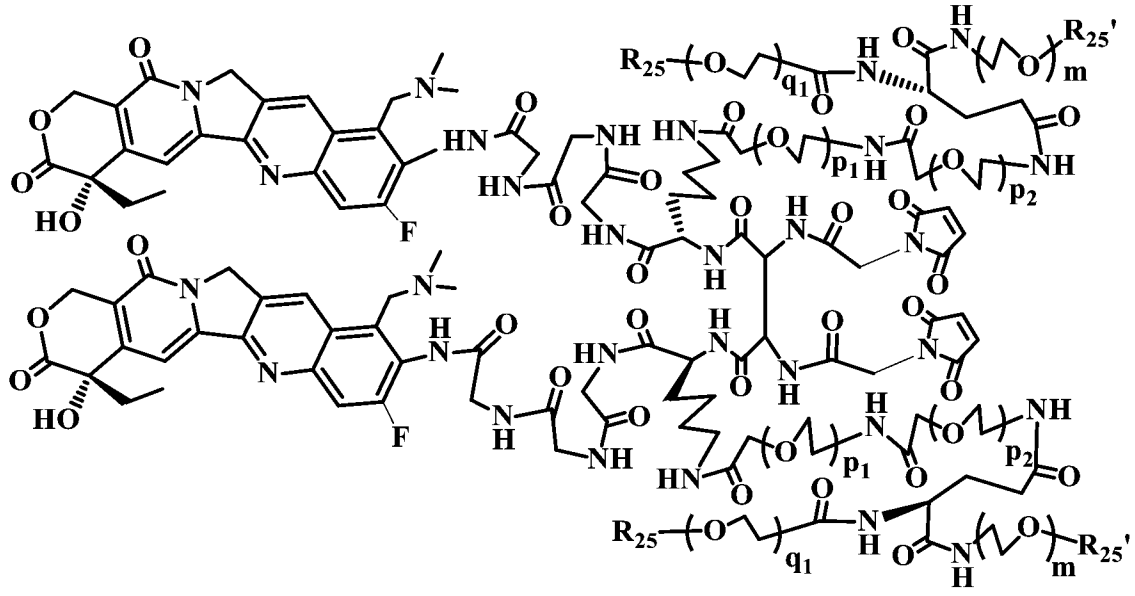
b188，



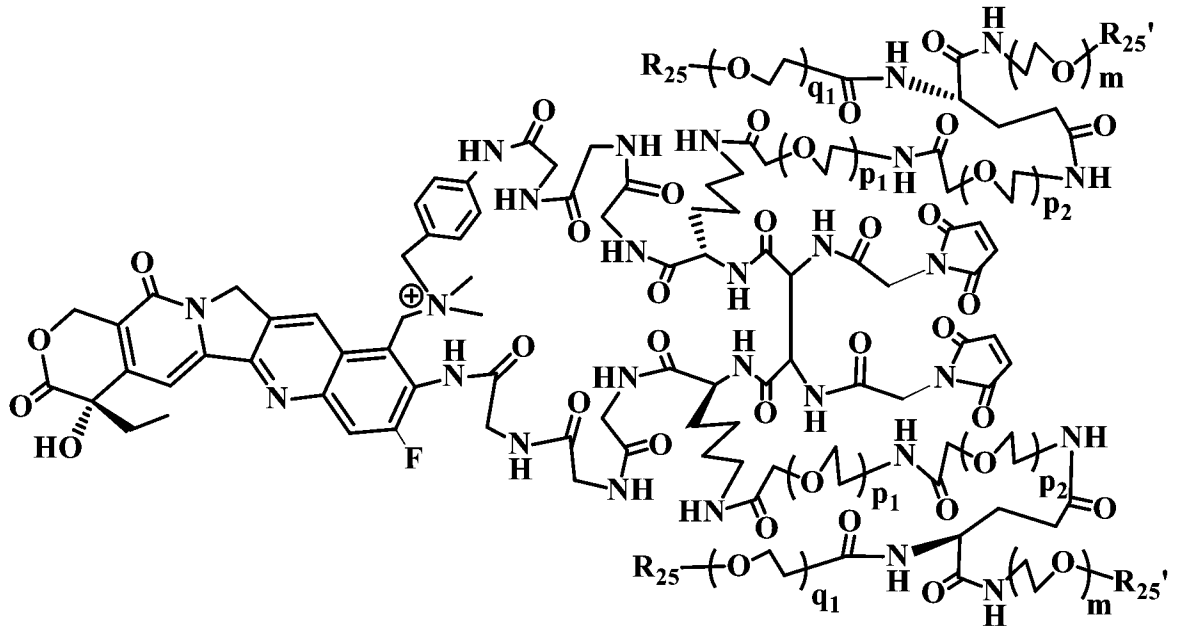
b189，



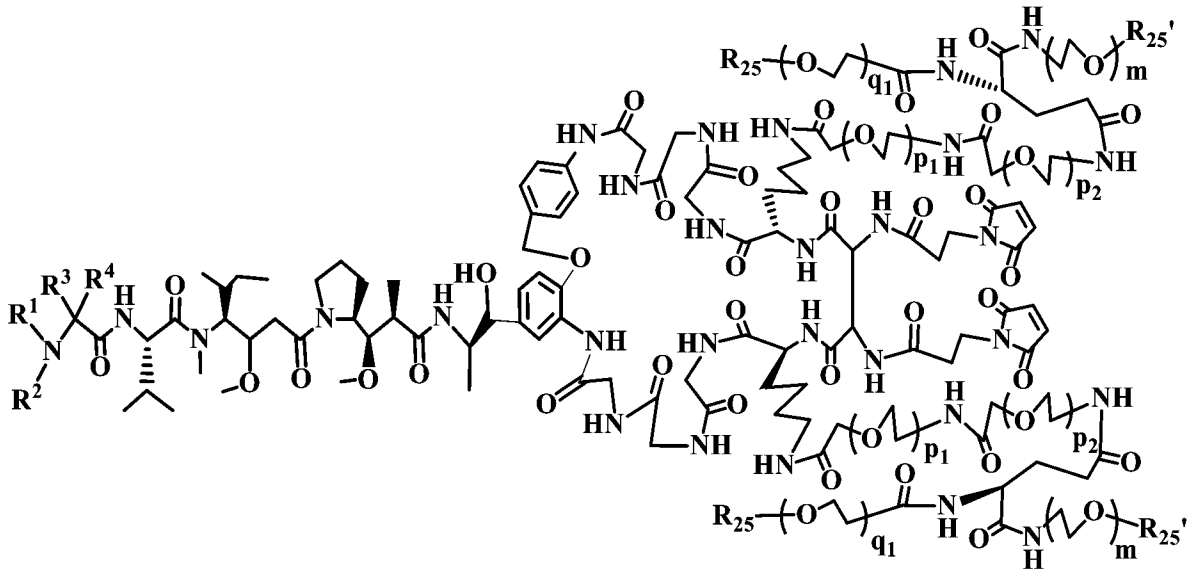
b190，



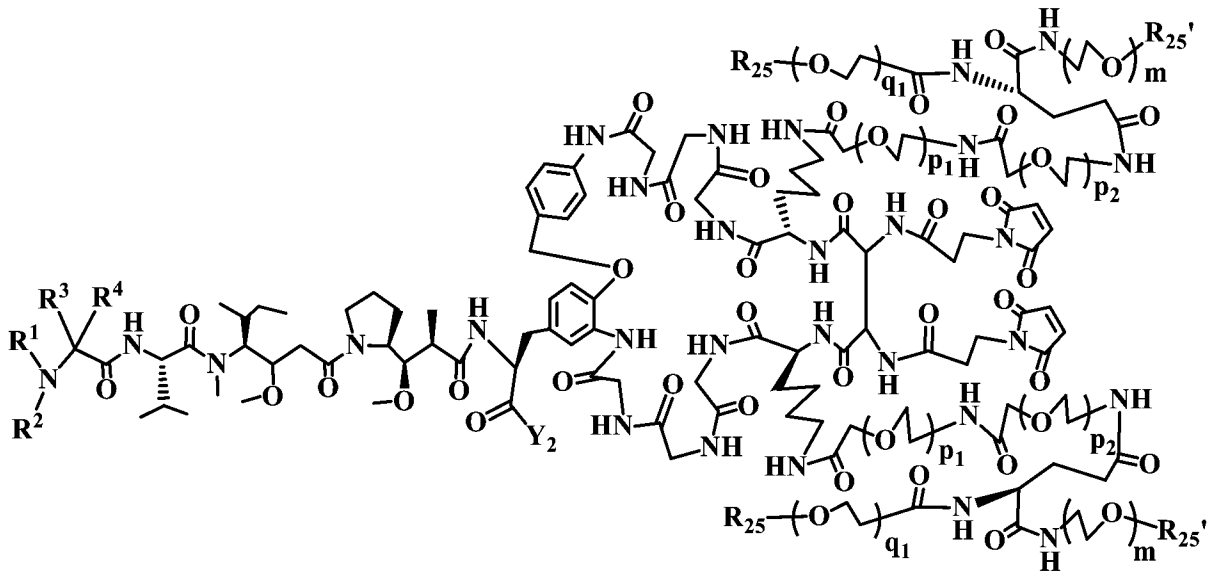
b191，



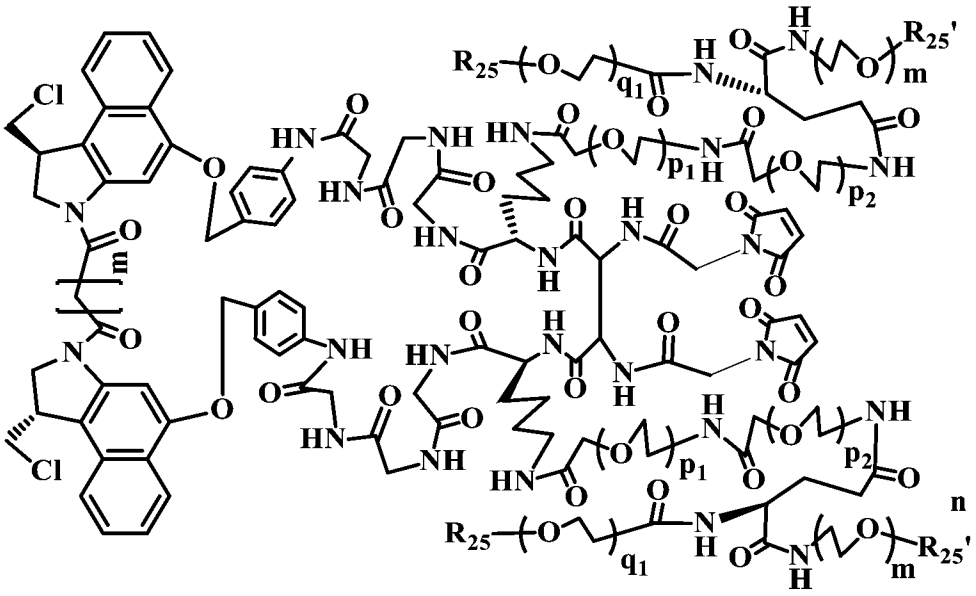
b192，



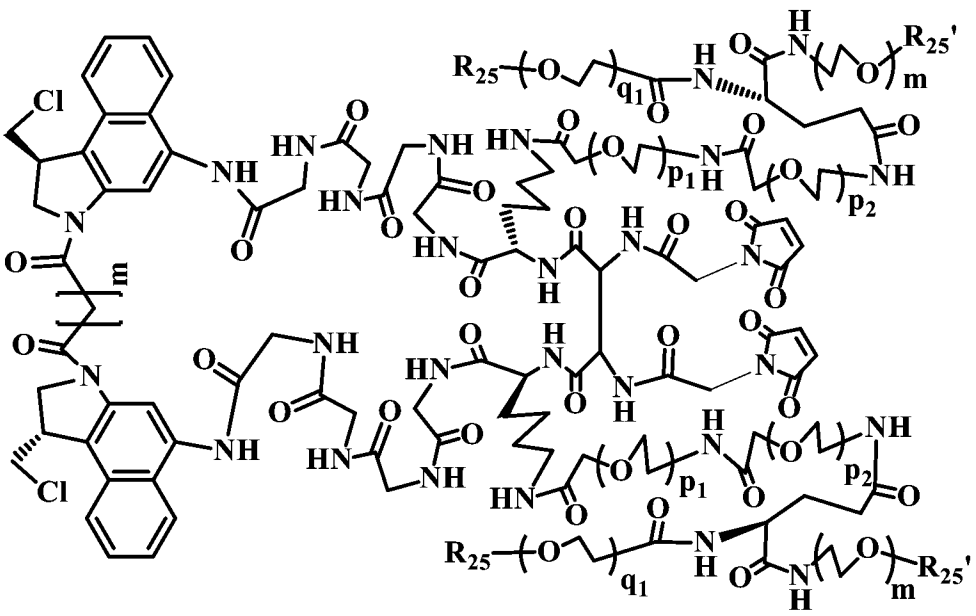
b193，



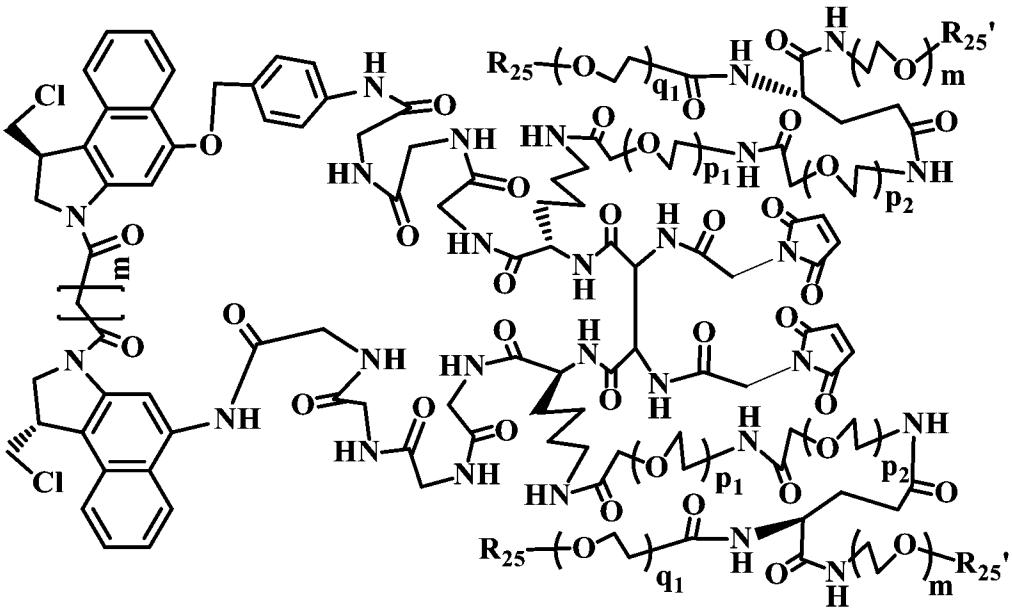
b194，



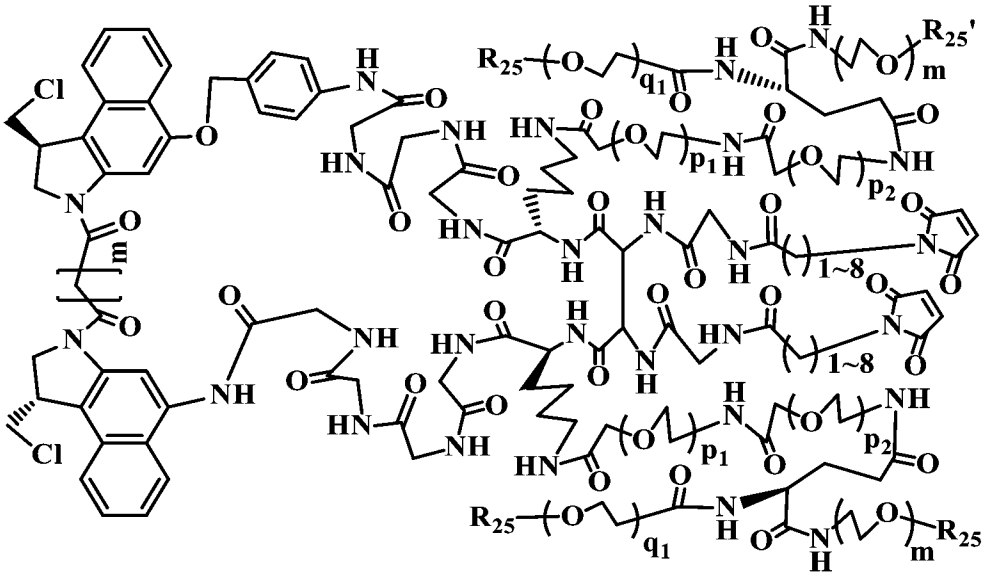
b195，



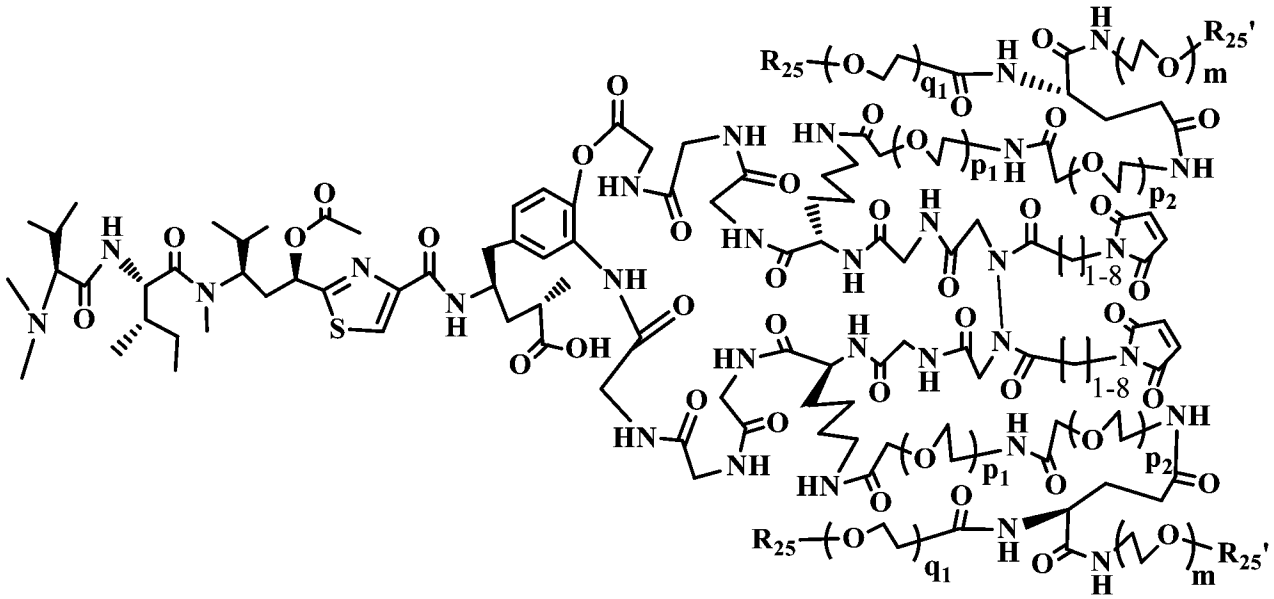
b196，



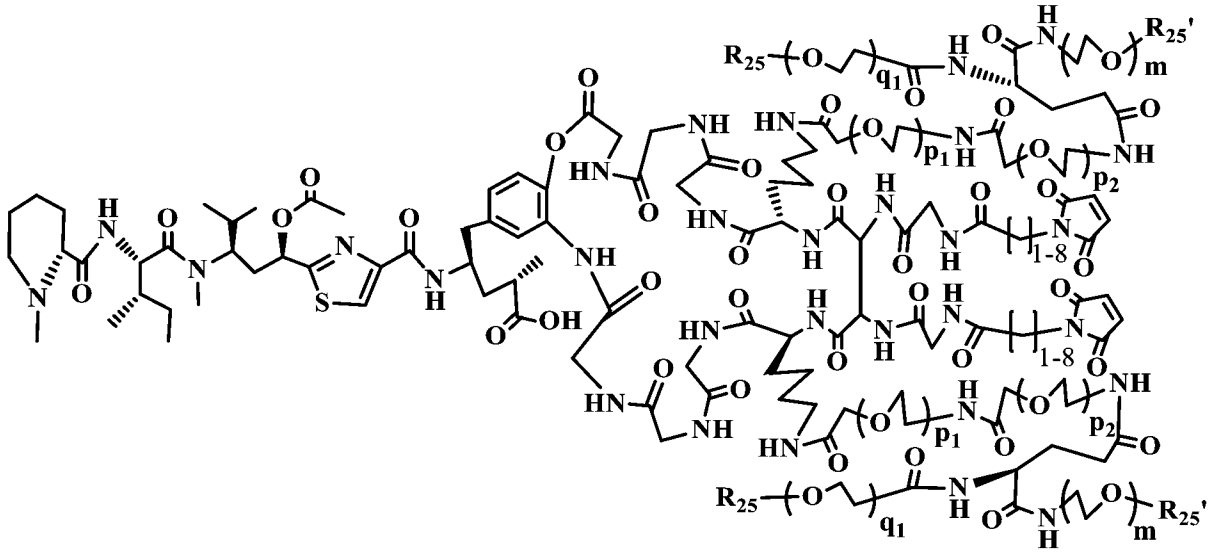
b197，



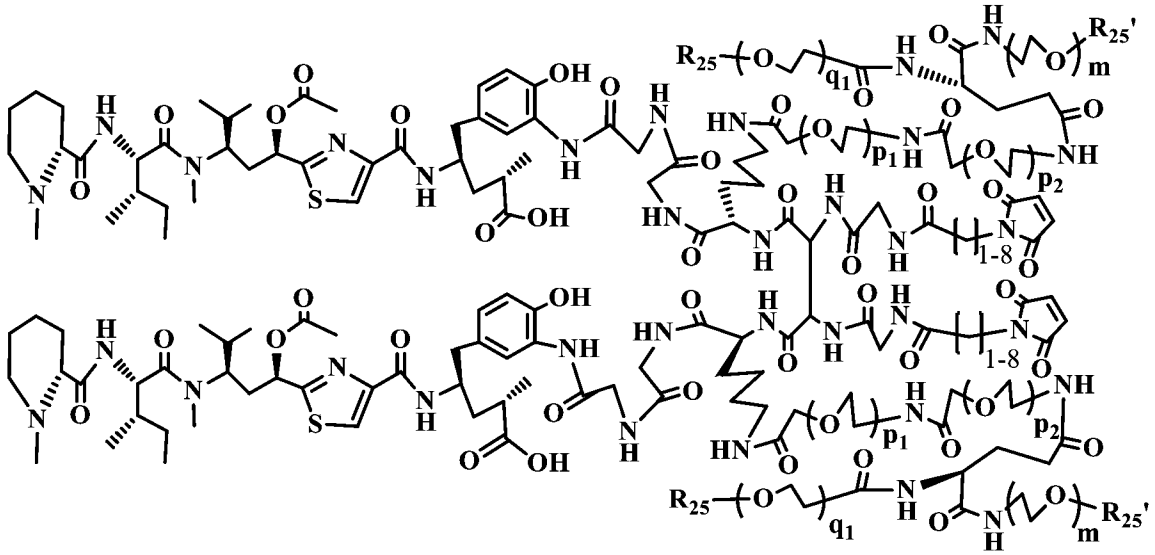
b198 ，



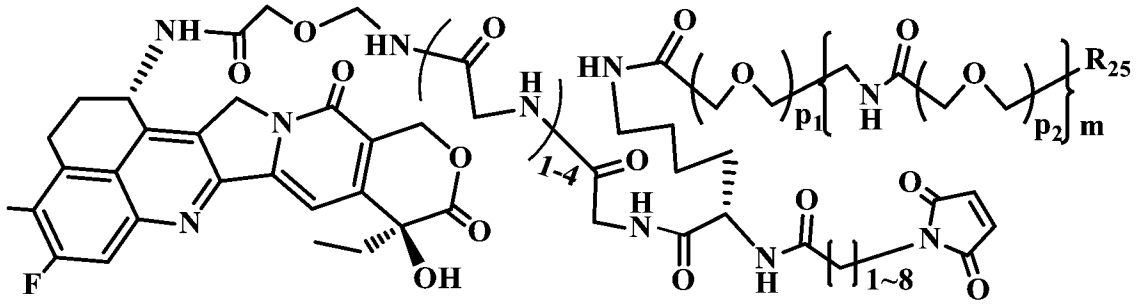
b199，



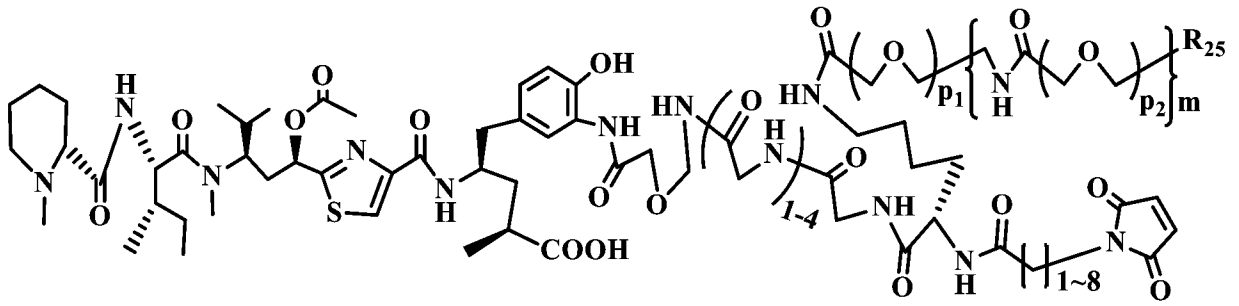
b200，



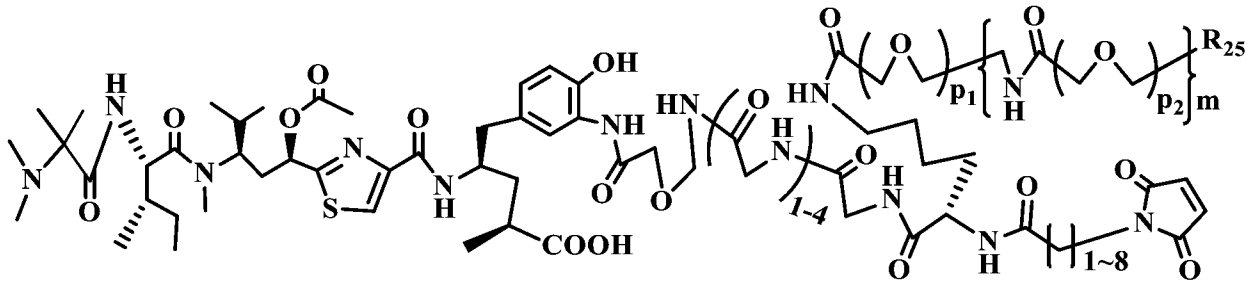
b201，



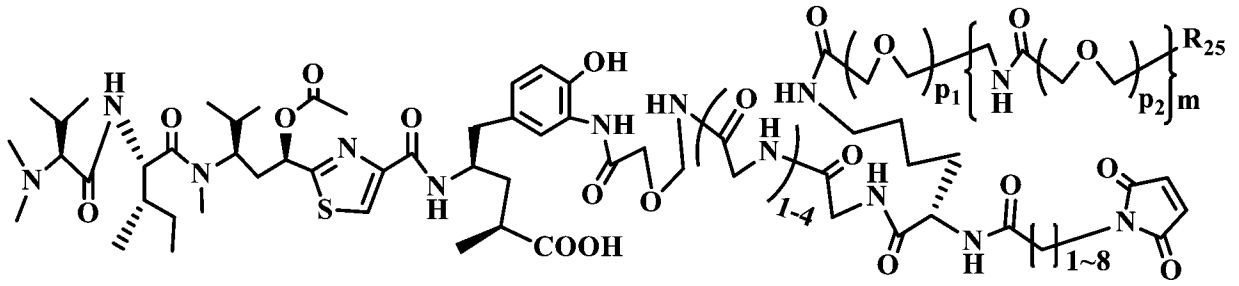
b202，



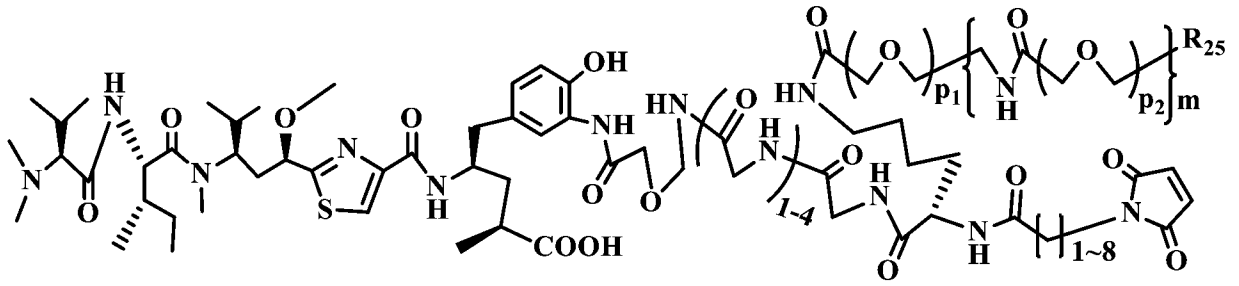
b203，



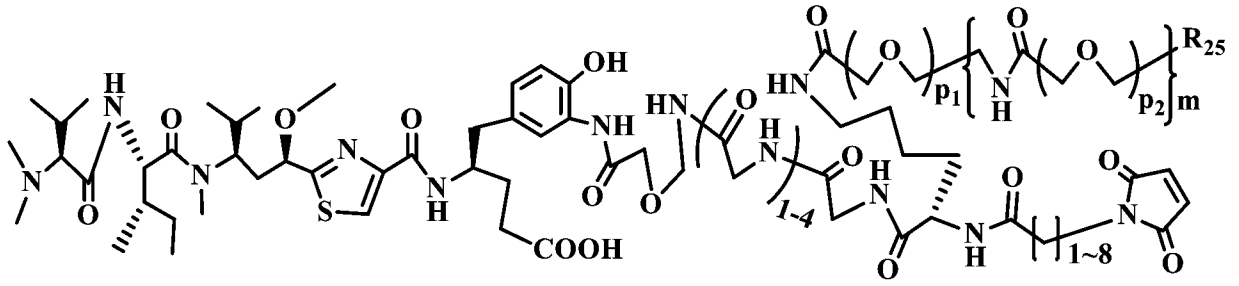
b204，



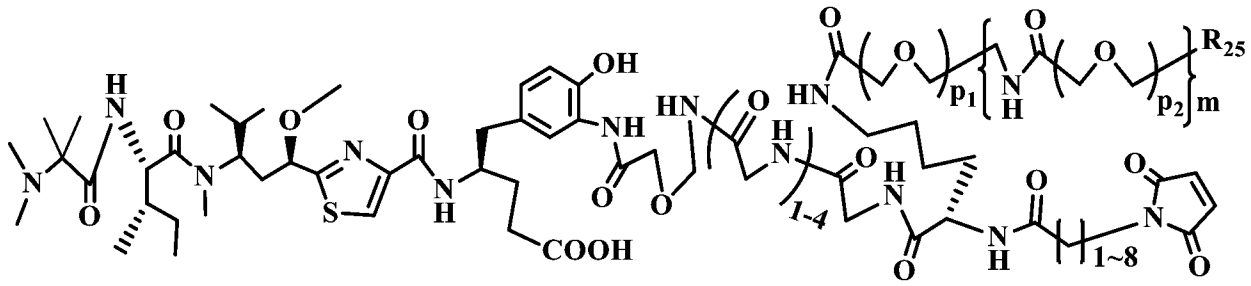
b205，



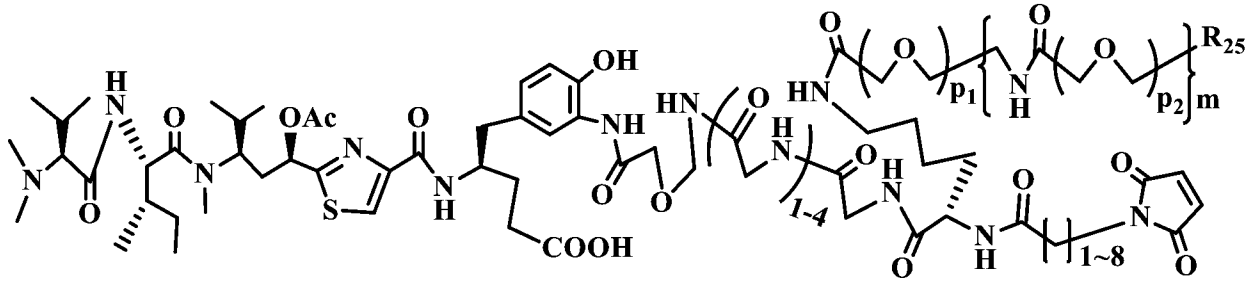
b206，



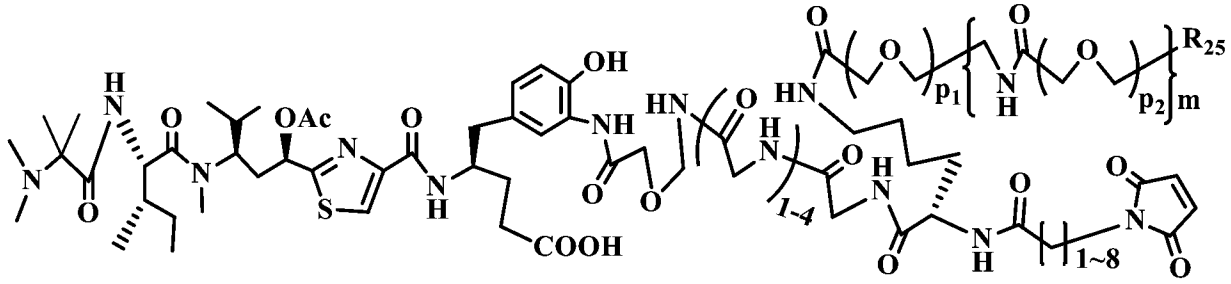
b207，



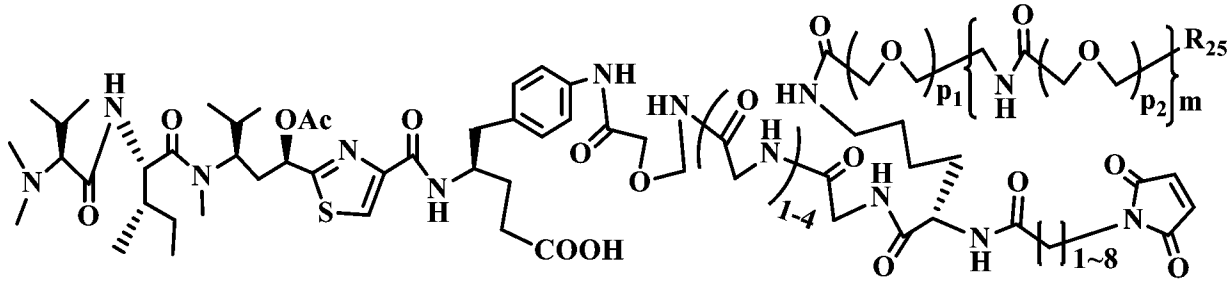
b208，



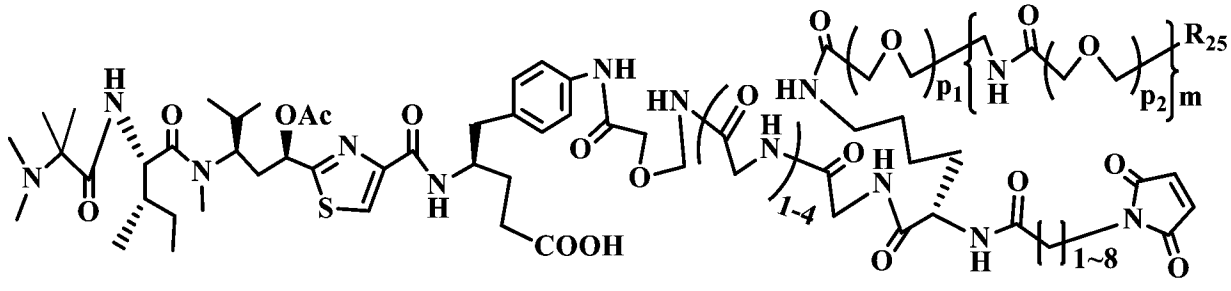
b209，



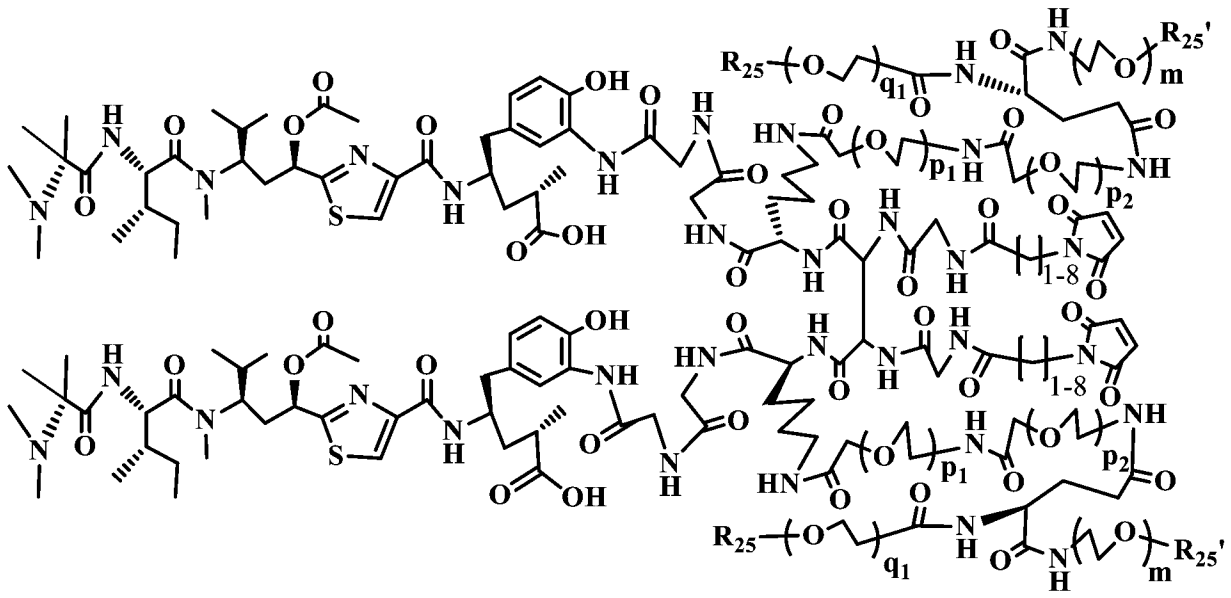
b210，



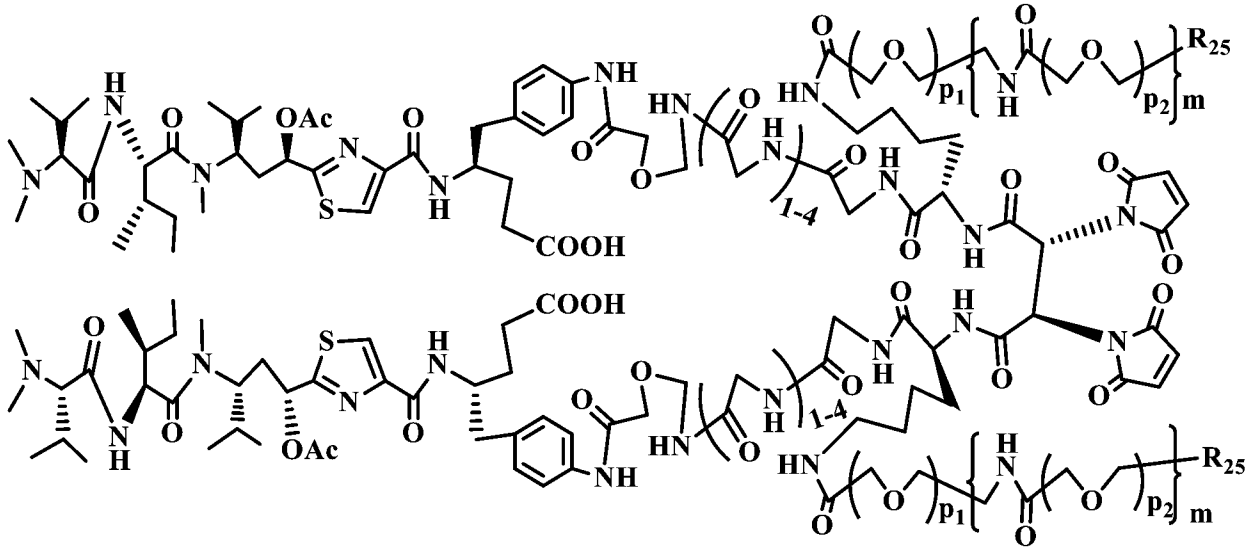
b211，



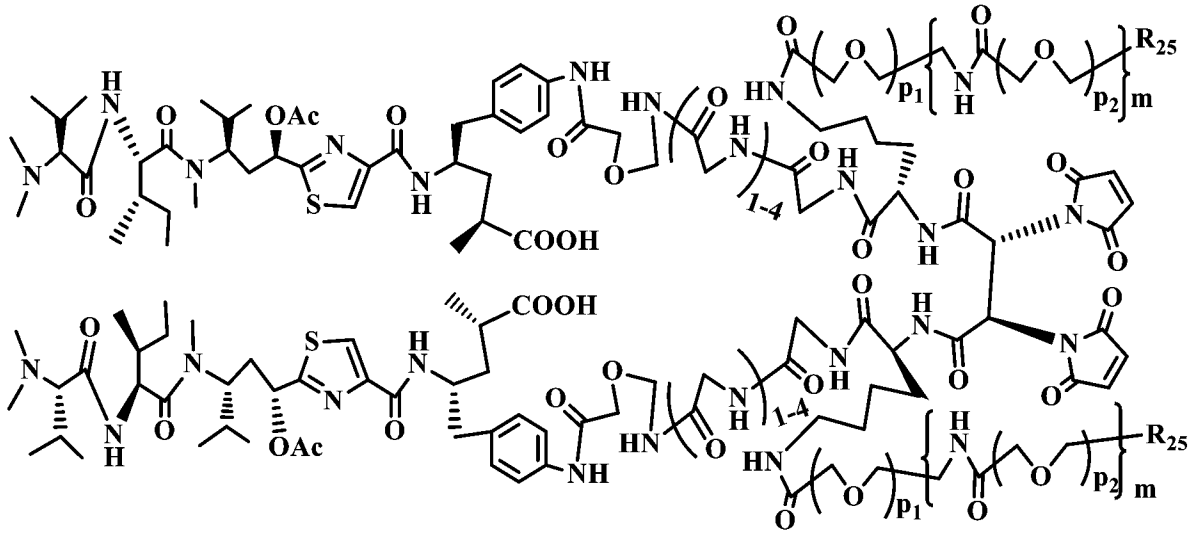
b212，



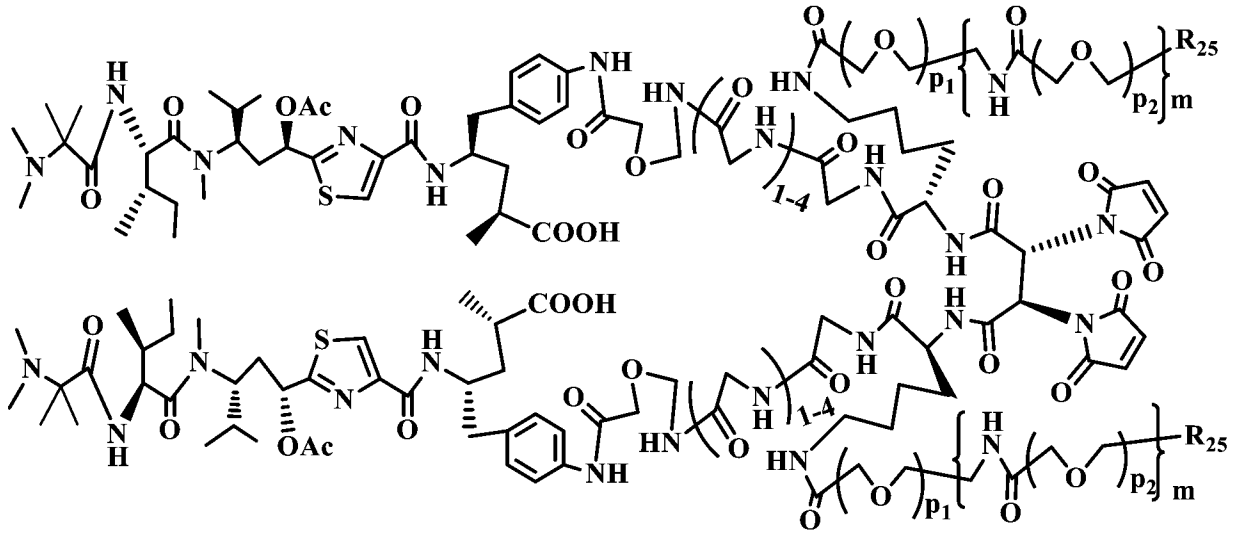
b213，



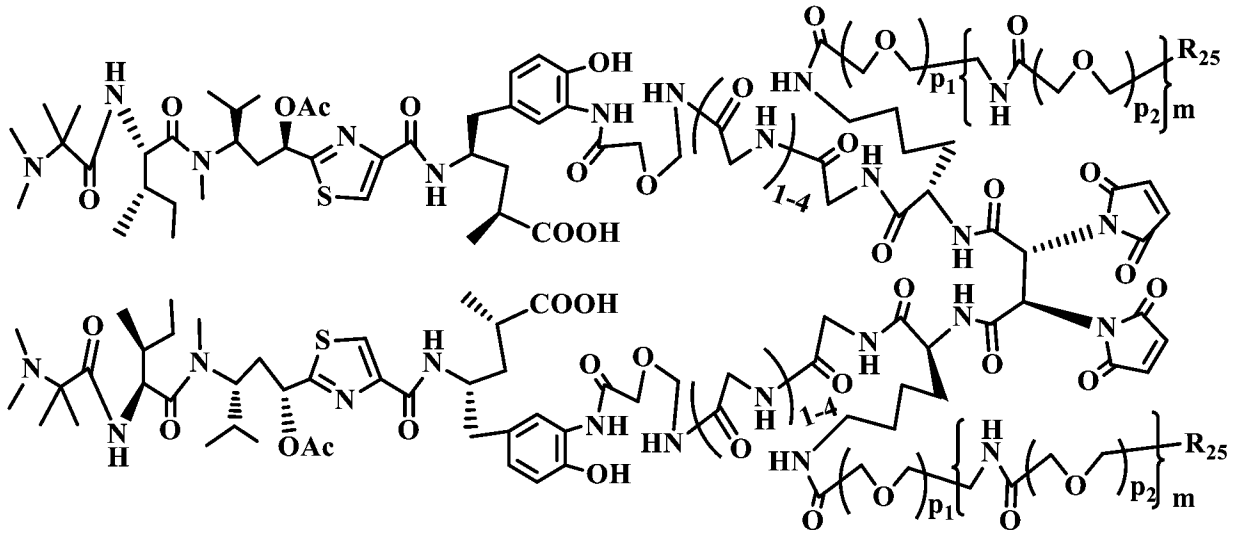
b214，



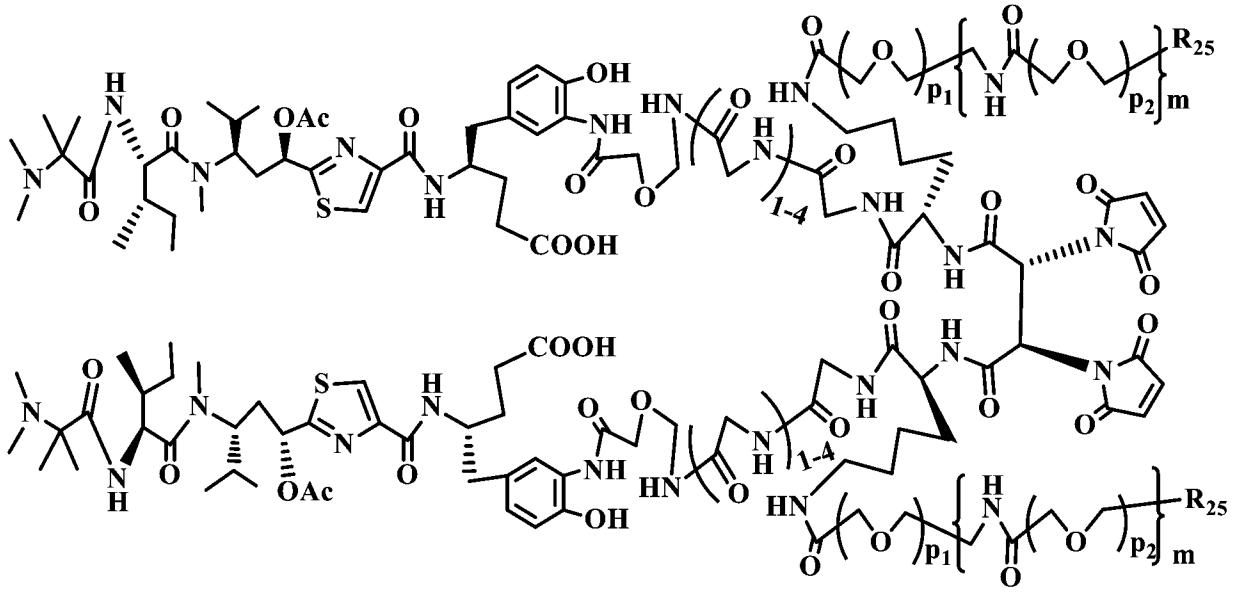
b215，



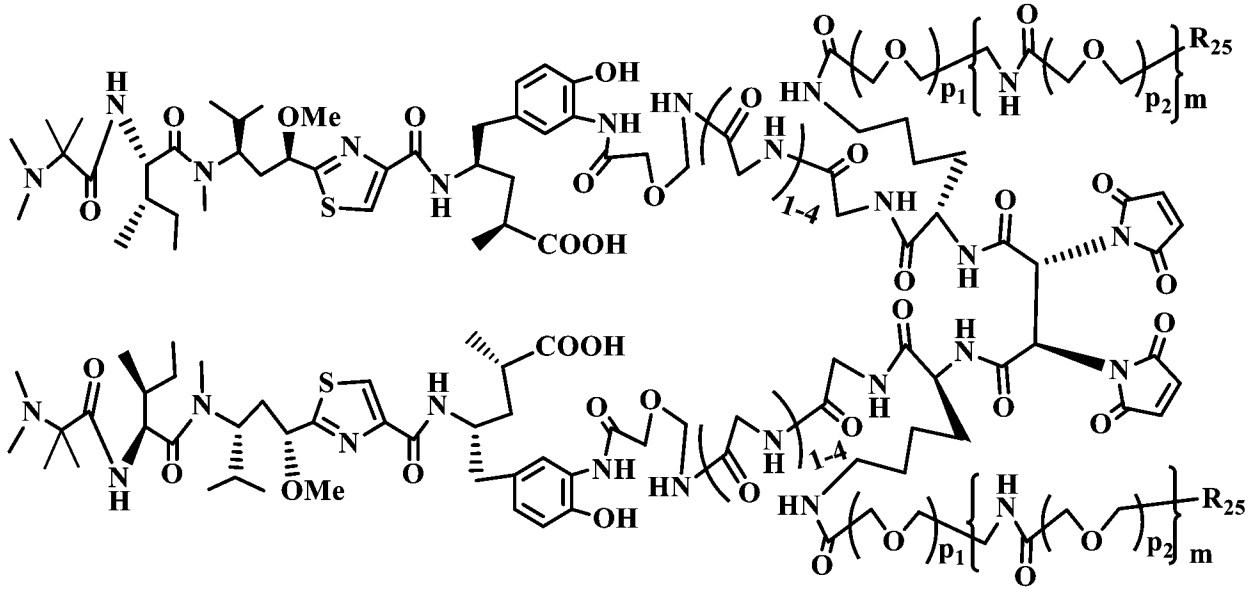
b216，



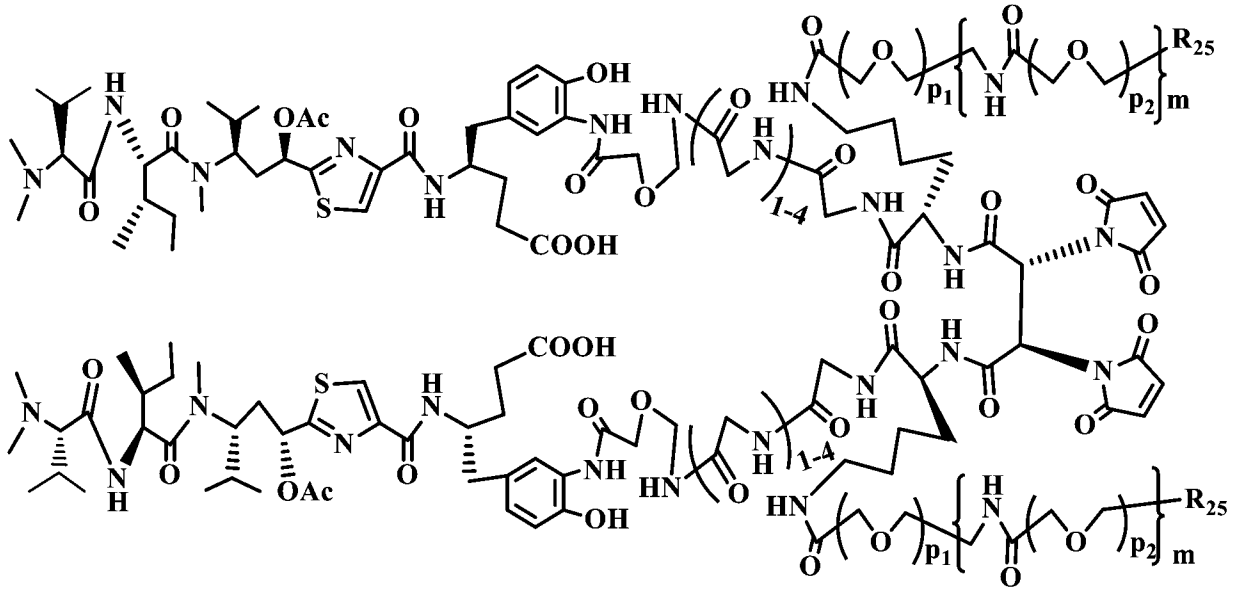
b217，



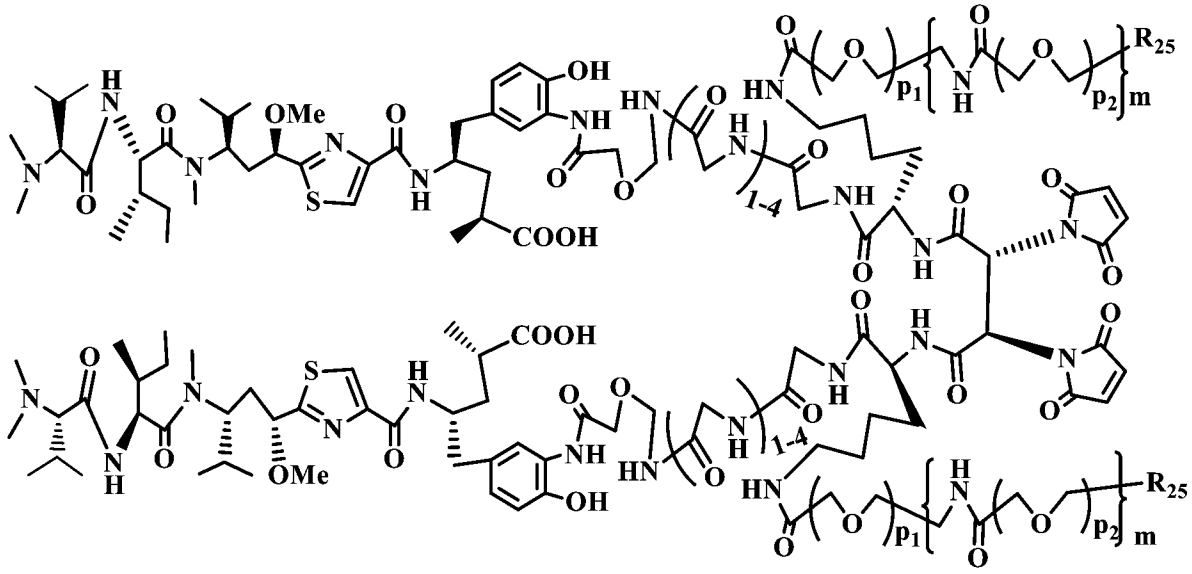
b218，



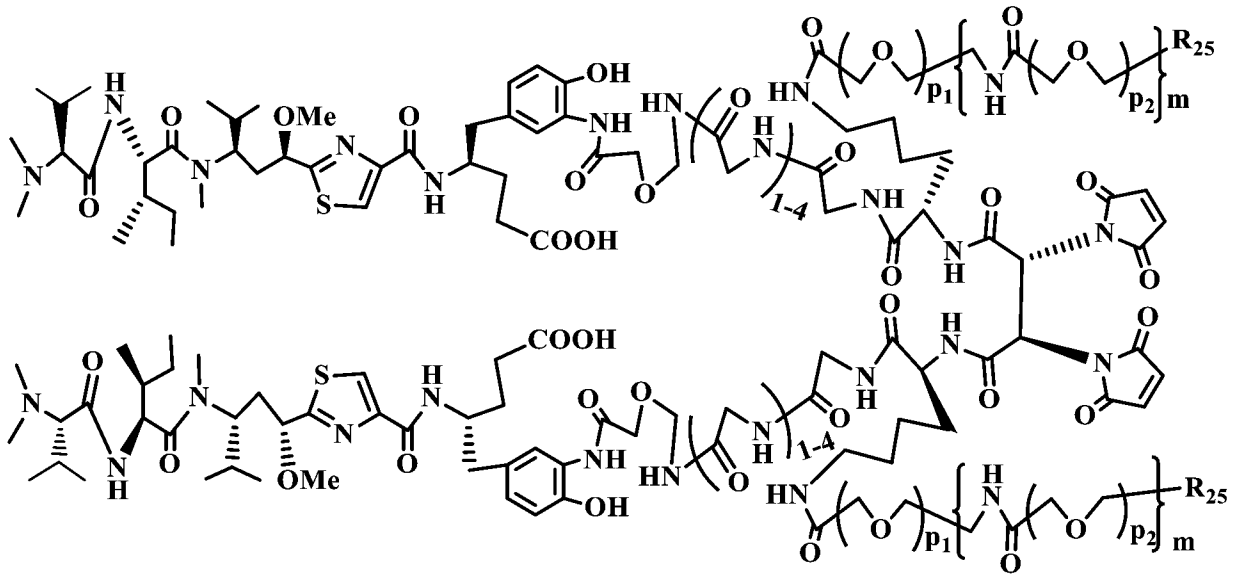
b219，



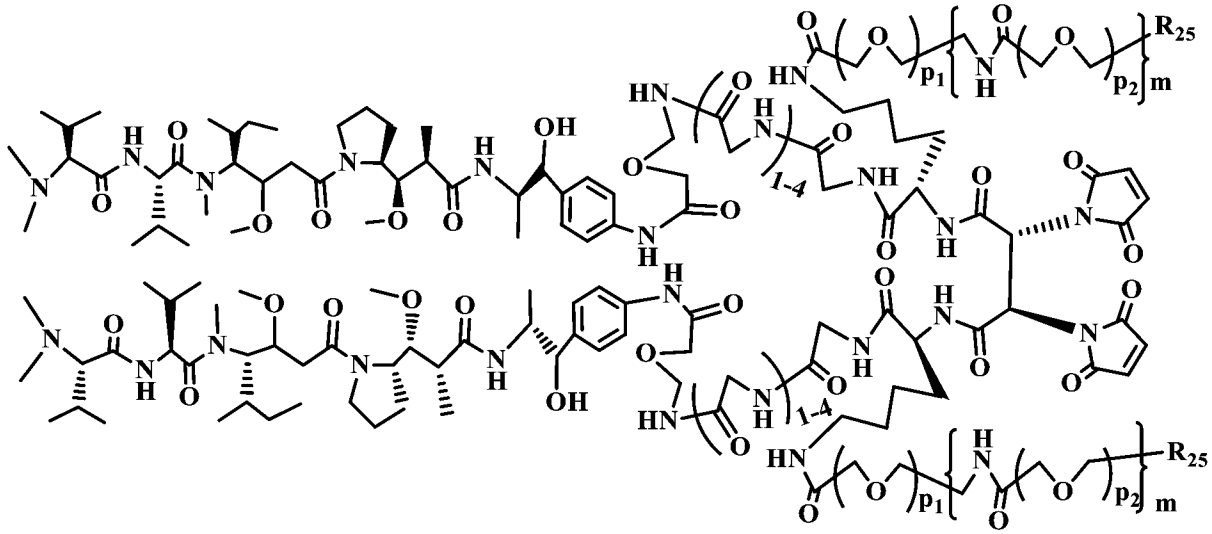
b220，



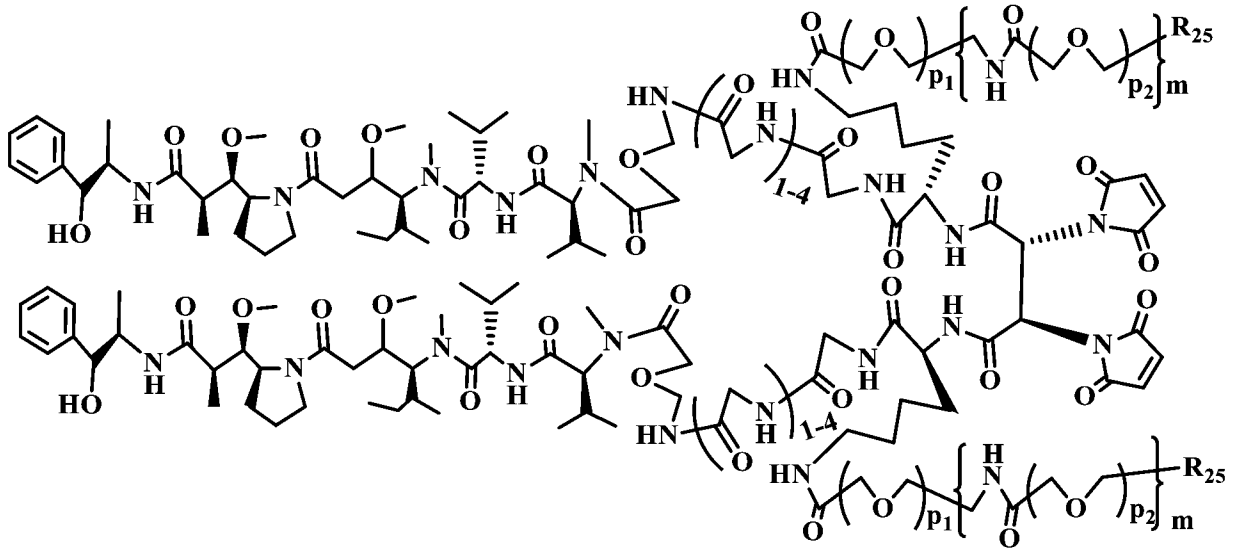
b221，



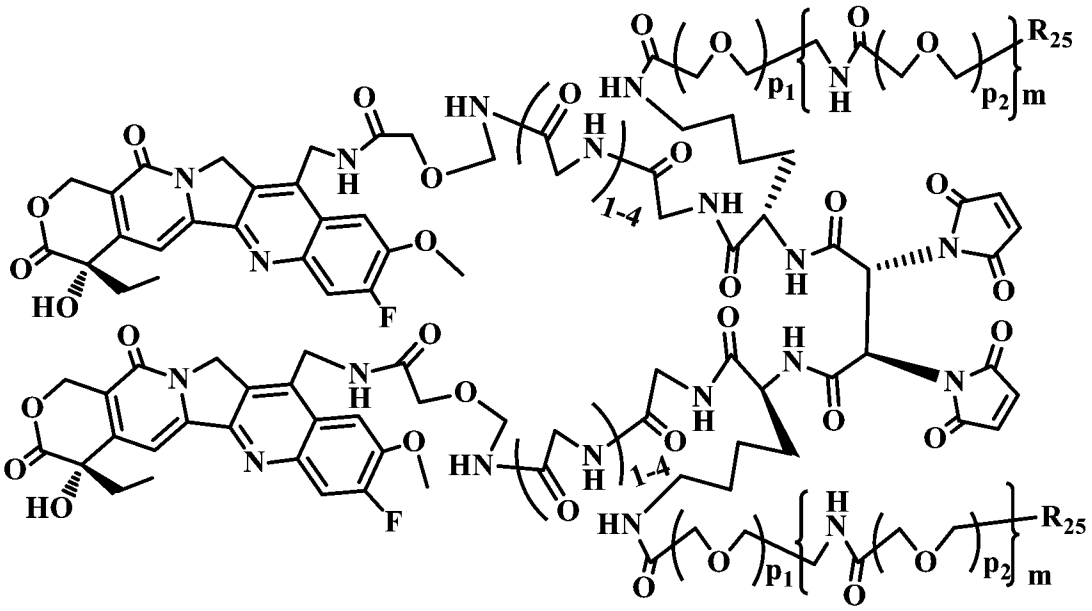
b222，



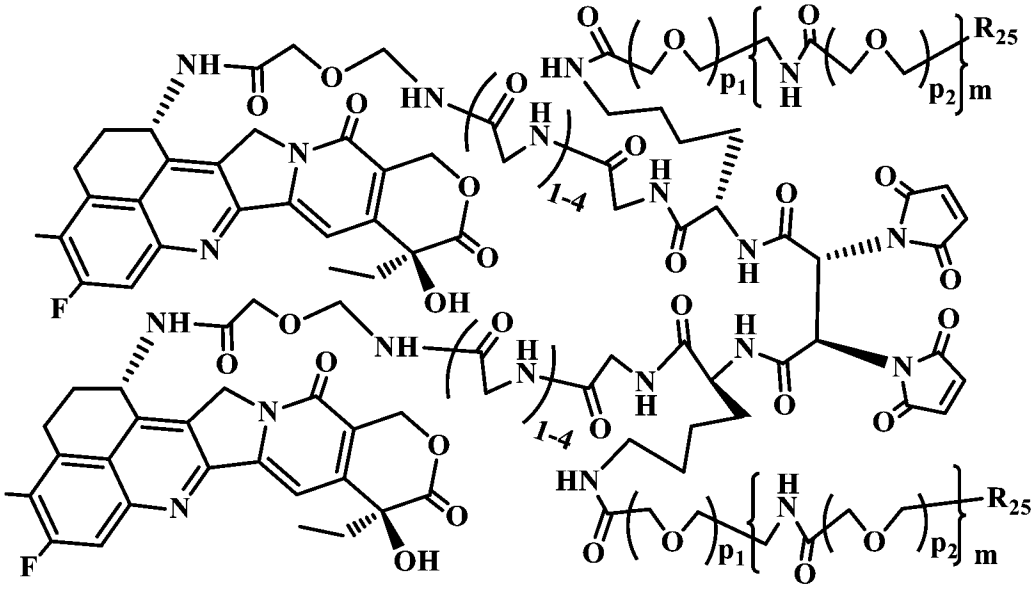
b223，



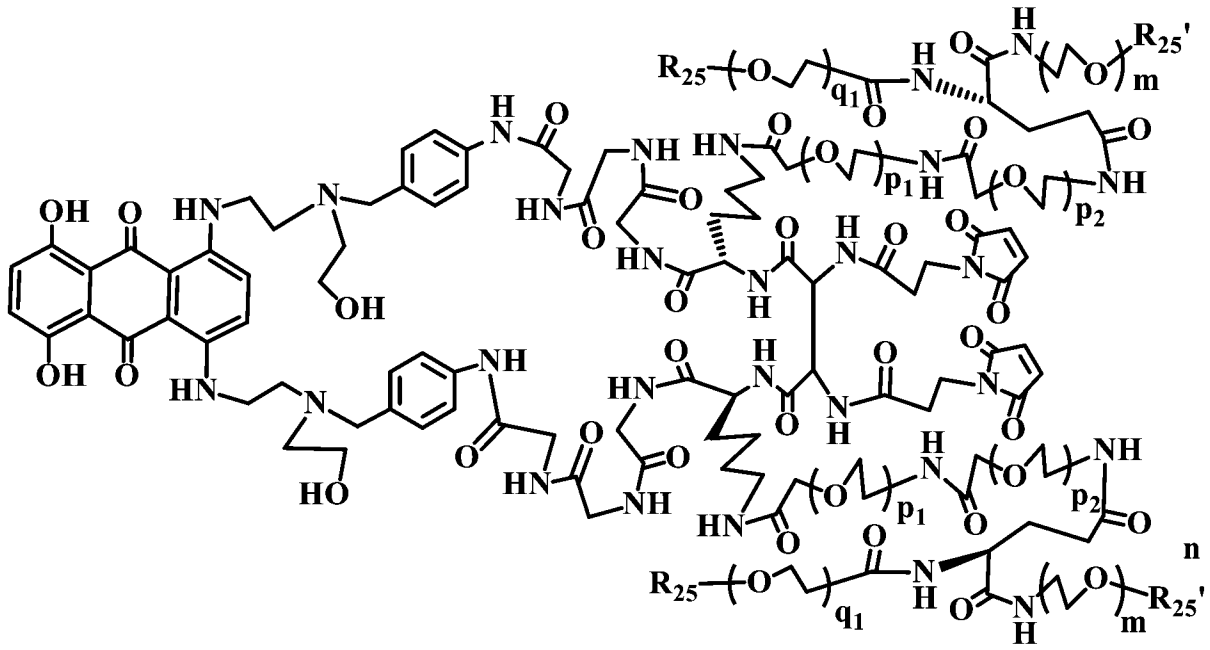
b224，



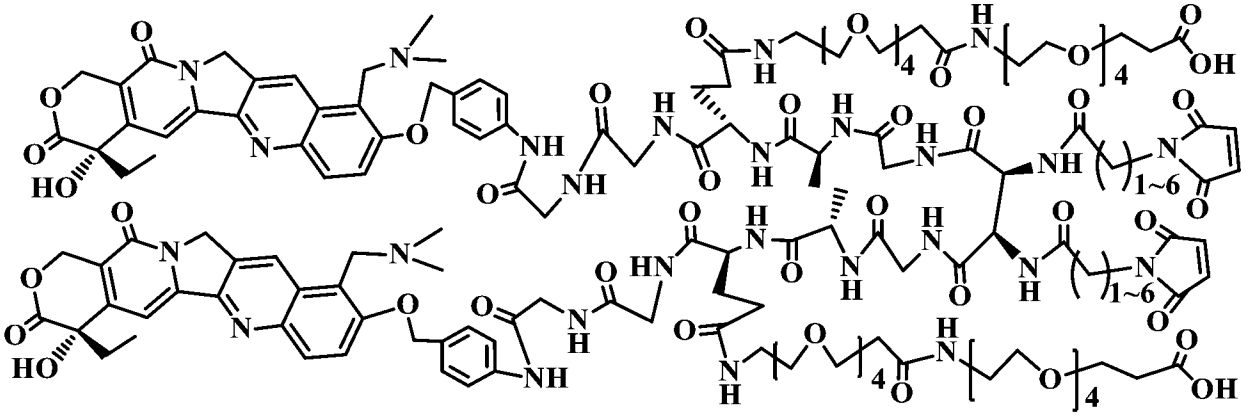
b225，



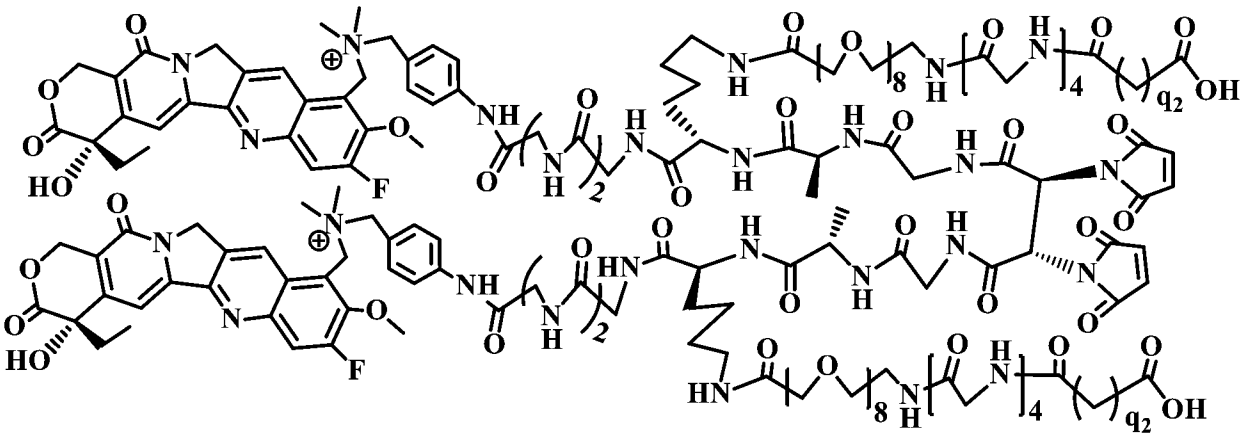
b226，



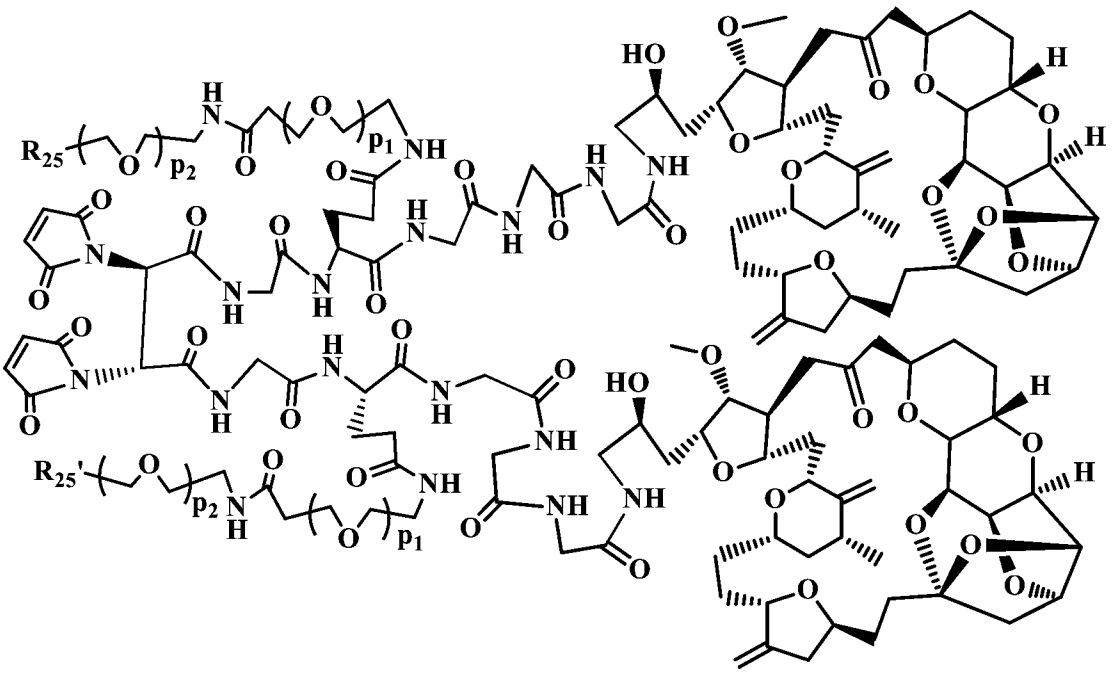
b227，



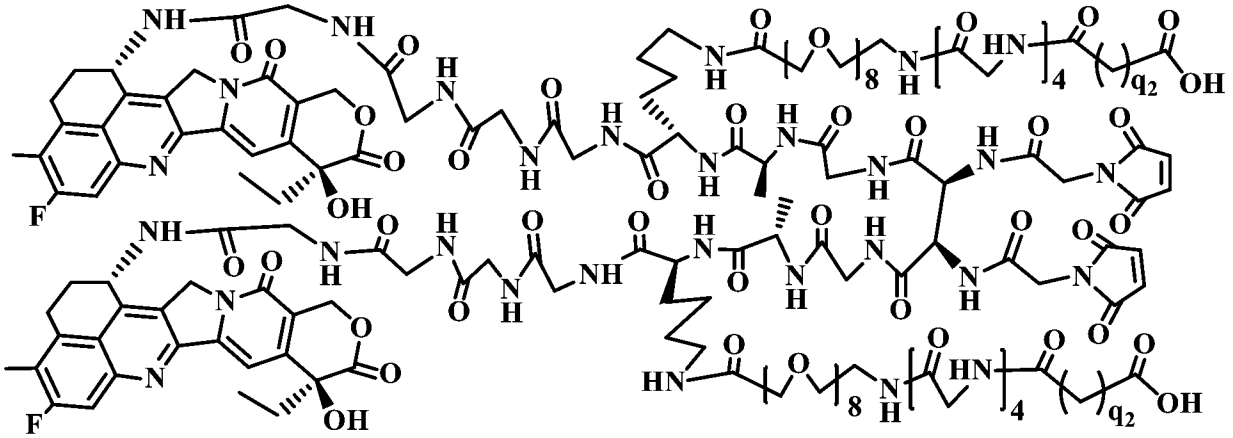
b228，



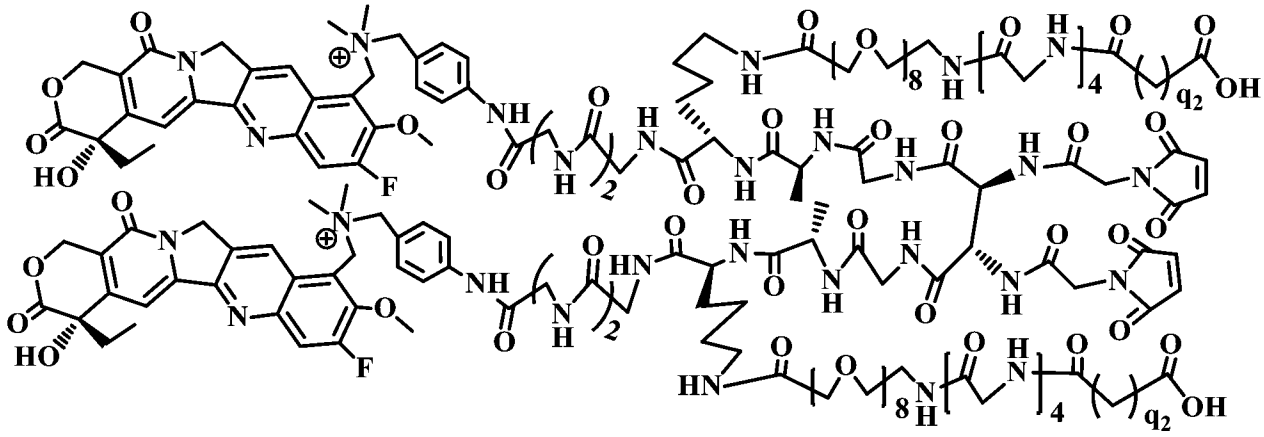
b229，



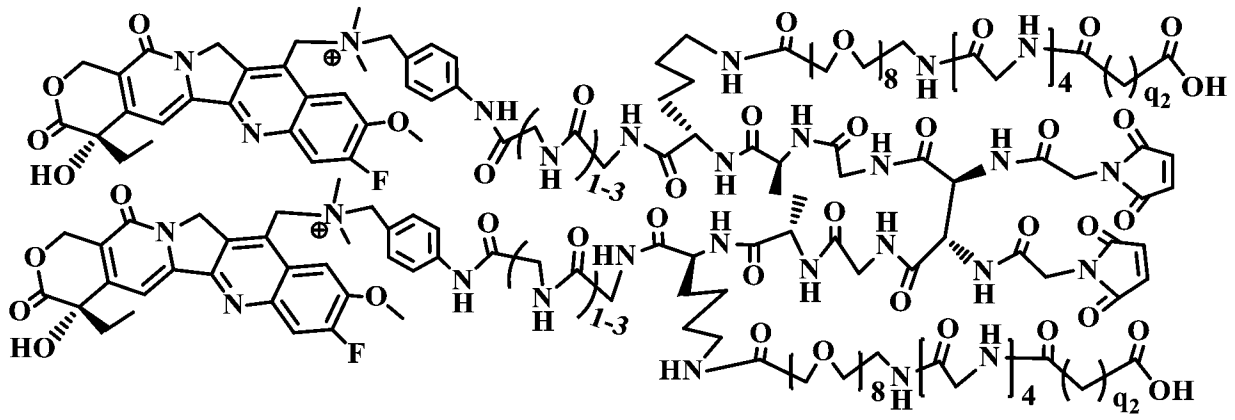
b230，



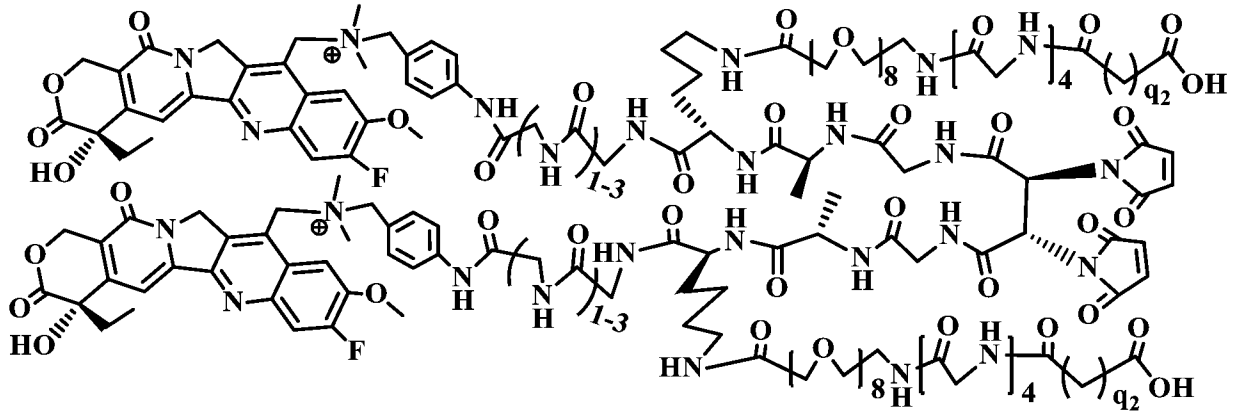
b231，



b232，



b233，



b234，

或一種或多種元素同位素取代物，或藥學上可接受的鹽，水合物或水合鹽；或這些化合物的多晶結構；或旋光異構體，外消旋體，非鏡像異構物或鏡像異構物；其中 m、m_1、m_2、n、P^1、R^1、R^2、R^3、R^4、$R^{1'}$、$R^{2'}$、$R^{3'}$、R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、R_6、R_{12}、$R_{12'}$、R_{25}、R_{26}、$R_{25'}$、X_1、X_2、X_3、X_5、X_6、Y_1、Y_2、Y_6、Z_3、Z_5、p、p_1、p_2、p_3、q_1、q_2、Lv_1、Aa、（Aa）r、Ar 和 mAb 的定義同前文一致。

【0136】 類抗體蛋白

【0137】 用於偶聯的類抗體蛋白較佳是一種細胞結合類抗體蛋白分子，能夠與具有治療意義或者能被生物學修飾的細胞群體結合、形成複合物或反應。

【0138】 為方便本節和其他地方的討論，“類抗體蛋白”應理解為包

括“類抗體蛋白和肽”，除非上下文另有說明。可以應用于本發明申請的偶聯物的類抗體蛋白，包括比如肽、多肽、抗體、抗體片段、酶、細胞因數、趨化因數、受體、血液因數、肽激素、毒素、轉錄類抗體蛋白或多聚體類抗體蛋白，它們在結構上具有鏈間二硫鍵。

【0139】酶包括糖特異性酶、蛋白水解酶等，例如美國專利4179337中公開的氧化還原酶、轉移酶、水解酶、裂解酶、異構酶和連接酶。值得注意的特定酶包括天冬醯胺酶、精氨酸酶、腺苷脫氨酶、超氧化物歧化酶、過氧化氫酶、胰凝乳蛋白酶、脂肪酶、尿酸酶、膽紅素氧化酶、葡萄糖氧化酶、葡萄糖醛酸苷酶、半乳糖苷酶、葡萄糖苷酯酶和穀氨醯胺酶。

【0140】血液類抗體蛋白包括白蛋白、轉鐵蛋白、因數VII、因數VII或因數IX、血管性血友病因數、胰島素、促腎上腺皮質激素、胰高血糖素、生長抑素、生長激素、胸腺素、甲狀旁腺激素、色素激素、生長調節素、紅細胞生成素、促黃體生成素、下丘腦釋放因數、抗利尿激素、催乳素、白細胞介素、干擾素，例如IFN-α，或IFN-β、集落刺激因數、血紅蛋白、細胞因數、抗體、抗體片段、絨毛膜促性腺激素、促卵泡激素、促甲狀腺激素和組織纖溶酶原啟動劑。

【0141】其他值得關注的類抗體蛋白是Dreborg 等在Crit. Rev. Therap.Drug Carrier Syst. （1990） 6 315-365公開的過敏原類抗體蛋白，其當與聚合物如聚（烯化氧）偶聯時具有降低過敏性的作用，因此適合用作耐受性誘導劑。公開的過敏原中有豚草抗原E、蜜蜂毒液、蠕過敏原等。

【0142】值得關注的還有糖多肽如免疫球蛋白、卵清蛋白、脂肪

酶、葡糖腦苷脂酶、凝集素、組織纖溶酶原啟動劑和糖基化白細胞介素、干擾素和集落刺激因數，免疫球蛋白如IgG、IgE、IgM、IgA、IgD及其片段。特別值得關注的是用於臨床醫學的診斷和治療目的受體和配位元體結合類抗體蛋白，以及抗體和抗體片段。

【0143】本專利申請中較佳的類抗體蛋白為：（A）由抗體、類抗體蛋白分子、前抗體、納米抗體、肽、包被在聚合物膠束上的抗體、抗體-脂質體、基於脂蛋白的藥物載體、包被在納米顆粒上的抗體、抗體-樹枝狀聚合物、以及包被或連接有類抗體蛋白（抗體）的上述顆粒，或上述物質的組合；

【0144】（B）類抗體蛋白、全長抗體（多克隆抗體、單克隆抗體、二聚體、多聚體、多特異性抗體（例如雙特異性抗體、三特異性抗體或四特異性抗體））、單鏈抗體、結合靶細胞的抗體片段、單克隆抗體、單鏈單克隆抗體、結合靶細胞的單克隆抗體片段、嵌合抗體、結合靶細胞的嵌合抗體片段、結構域抗體、結合靶細胞的結構域抗體片段、表面重塑抗體、表面重塑單鏈抗體、或結合靶細胞的表面重塑抗體片段、人源化抗體或表面重塑抗體，人源化單鏈抗體或與靶細胞結合的人源化抗體片段、抗獨特型（抗-Id）抗體、CDR's、雙抗體、三抗體、四抗體、小抗體、前抗體、前抗體片段、小免疫類抗體蛋白（SIP）、淋巴因數類抗體蛋白、激素型類抗體蛋白、生長因數類抗體蛋白、集落刺激因數類抗體蛋白、營養轉運類抗體蛋白、大分子量類抗體蛋白、融合類抗體蛋白、激酶抑制劑類抗體蛋白、基因靶向類抗體蛋白，包被在納米顆粒上的類抗體蛋白，或抗體或大分子量類抗體蛋白修飾的高分子。

【0145】抗體片段包括Fab、Fab'、F（ab'）$_2$、F_v（Parham、J.

Immunol. 1983，131，2895-2902）；由Fab表達庫產生的片段，上述任何抗體的抗原決定基結合片段，能免疫特異性結合癌細胞抗原、病毒抗原、微生物抗原；由免疫系統產生的類抗體蛋白質，能夠識別、結合特定抗原或具有期望的生物學活性（Miller等 J. of Immunology 2003，170，4854-4861）；干擾素（如I、II、III型）；多肽；淋巴因數如IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、GM-CSF、干擾素-γ（IFN-γ）；激素例如胰島素、TRH（促甲狀腺激素釋放激素）、MSH（促黑素細胞激素）、類固醇激素，例如雄激素和雌激素，促黑素細胞激素 (MSH)；生長因數和集落刺激因數、如表皮生長因數（EGF）、粒細胞巨噬細胞集落刺激因數（GM-CSF）、轉化生長因數（TGF）如TGFα、TGFβ、胰島素和胰島素樣生長因數（IGF-I、IGF-II）、G-CSF、M-CSF和GM-CSF（Burgess，Immunology Today 1984，5，155-158）、牛痘生長因數（VGF）、成纖維細胞生長因數（FGF）、小分子量的蛋白質、多肽、肽和肽激素，如鈴蟾肽，胃泌素，胃泌素釋放肽、血小板衍生的生長因數、白細胞介素和細胞因數，例如，白細胞介素-2（IL-2），白細胞介素-6（IL-6），白血病抑制因數，粒細胞巨噬細胞集落刺激因數（GM-CSF）；維生素，如葉酸；脫輔基蛋白和糖蛋白，如轉鐵蛋白（O'Keefe等，J. Biol. Chem. 1985 260 932-937）；糖結合蛋白或脂蛋白，如凝集素；細胞營養傳遞分子；小分子抑制劑，如前列腺特異性膜抗原（PSMA）抑制劑和小分子酪氨酸激酶抑制劑（TKI），非肽或任何其它細胞結合分子或物質，如生物活性聚合物（Dhar，等，Proc. Natl. Acad. Sci. 2008，105，17356-61），融合蛋白，激酶抑制劑，基因靶向劑，生物活性樹枝狀大分子（Lee，等，Nat. Biotechnol. 2005，23，1517-26；

Almutairi，等；Proc. Natl. Acad. Sci. 2009，106，685-90），納米粒子（Liong，等，ACS Nano，2008，19，1309-12；Medarova，等，Nat. Med. 2007，13，372-7；Javier，等，Bioconjugate Chem. 2008，19，1309-12），脂質體（Medinai，等，Curr. Phar. Des. 2004，10，2981-9）和病毒外殼（Flenniken，等，Viruses Nanotechnol. 2009，327，71-93）。

【0146】一般而言，如果適當的單克隆抗體是可用的，則較佳單克隆抗體作為細胞表面結合劑。抗體可以是鼠源，人源，人源化，嵌合或源於其他物種。

【0147】用於本發明中的抗體的生產包括體內或體外方法或其組合。生產多克隆抗受體肽抗體的方法在業內是公知的，例如美國專利4,493,795中所述。通常是藉由將骨髓瘤細胞，與已經用所需抗原免疫的小鼠的脾細胞融合，來製備單克隆抗體（Köhler，G.；Milstein，C. Nature 1975，256： 495-497）。詳細的過程在“Antibodies--A Laboratory Manual，Harlow and Lane，eds.，Cold Spring Harbor Laboratory Press，New York （1988）”中有描述，此處引作參考。具體地，可以用目標抗原，如從靶細胞、完整的病毒、滅活的全病毒和病毒蛋白質單離的抗原，來免疫小鼠，大鼠，倉鼠或任何其它哺乳動物而製備。通常使用聚乙二醇（PEG）6000將脾細胞與骨髓瘤細胞融合。藉由對HAT（次黃嘌呤-胺基蝶呤-胸腺嘧啶）的敏感性來篩選融合細胞。藉由它們免疫反應特異性受體的能力或抑制靶細胞上的受體活性的能力，可以確定實施本發明的單克隆抗體的雜交瘤。

【0148】用於本發明中的單克隆抗體的生產在單克隆雜交瘤培養物

裡進行，其中包含營養培養基和能分泌具有合適抗原特異性的抗體分子的雜交瘤。培養物在合適的條件下保持足夠長的一段時間，以使雜交瘤將抗體分子分泌到培養基。然後收集含有抗體的培養基。使用藉由公知的技術進一步單離抗體分子，如蛋白質A親和層析，陰離子、陽離子、疏水或體積排阻層析法（特別是藉由蛋白質A親和層析和體積排阻層析法），離心，差異溶解度或任何其他純化蛋白質的標準技術。

【0149】 可用於製備這些組合物的培養基在業內中是公知的，並且可商業獲得，也包括合成培養基。一個合成的培養基的例子是Dulbecco最少必需培養基（DMEM；Dulbecco等.，Virol. 1959，8，396 ）補充有4.5gm/l葡萄糖，0-20mM穀氨醯胺，0-20%胎牛血清，幾個ppm的Cu，Mn，Fe或Zn等重金屬或/和重金屬鹽，以及消泡劑如聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物。

【0150】 另外，生產抗體的細胞株也可以藉由融合以外的技術來獲得，例如將成瘤DNA移植至B淋巴細胞，或成瘤病毒轉染，如愛潑斯坦-巴爾病毒（EBV，也稱為人類皰疹病毒4（HHV-4））或卡波西肉瘤相關皰疹病毒（KSHV），見於美國專利4,341,761；4,399,121；4,427,783；4,444,887；4,451,570；4,466,917；4,472,500；4,491,632；4,493,890。單克隆抗體也可以藉由含末端羧基的抗受體肽或肽製備，這些都為如業內所公知，可參考文獻 Niman等.，Proc. Natl. Acad. Sci. USA，1983，80： 4949-4953；Geysen等.，Proc. Natl. Acad. Sci. USA，1985，82：178-182；Lei等. Biochemistry 1995，34（20）： 6675-6688。通常，作為產生抗受體肽單克隆抗體免疫原，抗受體肽或肽類似物可以單獨使用或連接至免疫原性載體。

【0151】用作本發明中結合分子的單克隆抗體也可以藉由其他業內已知的技術獲得。特別有用的是製造完整人源抗體的方法。一種方法是噬菌體顯示技術，它使用親和富集的方式，可用於選擇能與抗原特異性結合的人源抗體。噬菌體展示技術在文獻中也有詳細描述，噬菌體展示庫的構建和篩選在業內也是眾所周知的，可參考文獻：Dente等，Gene. 1994，148（1）：7-13；Little等，Biotechnol Adv. 1994，12（3）：539-55；Clackson等.，Nature 1991，352：264-628；Huse等.，Science 1989，246：1275-1281。

【0152】藉由與非人如小鼠細胞融合的雜交瘤產生的單克隆抗體，可以被人源化以避免產生人類抗小鼠抗體。常見的抗體人源化方法是互補決定區移植技術，這些方法也已被詳細地描述，如美國專利5,859,205 和6,797,492；Liu等，Immunol Rev. 2008，222：9-27；Almagro等，Front Biosci. 2008，13： 1619-33；Lazar等，MolImmunol. 2007，44（8）：1986-98；Li等，Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2006，103（10）：3557-62，此處引為參考。完整人抗體也可以藉由用免疫原免疫攜帶大部分的人類球蛋白重輕鏈的轉基因小鼠、兔子、猴子或其他哺乳動物來製備。這些老鼠的例子有：Xenomouse （Abgenix/Amgen），HuMAb-Mouse （Medarex/BMS）和VelociMouse （Regeneron），參考美國專利6,596,541、6,207,418、6,150,584、6,111,166、6,075,181、5,922,545、5,661,016、5,545,806、5,436,149和5,569,825。用於人類治療時，小鼠的可變區域和人的恒定區域也可以被融合，成為“嵌合抗體”，它在人類身上的免疫原性顯著低於小鼠單抗（Kipriyanov等，MolBiotechnol. 2004，26：39-60 ；Houdebine，CurrOpinBiotechnol.

2002，13：625-9）。另外，在抗體可變區域的定點 能導致抗體具有較高的親和性和特異性（Brannigan等，Nat Rev Mol Cell Biol. 2002，3：964-70；Adams等，J Immunol Methods. 1999，231：249-60），抗體恒定區域的改變可以提高其介導結合和細胞毒性的效應功能。

【0153】 惡性腫瘤細胞抗原的免疫特異性抗體也可以從商業路徑獲得或藉由任何已知方法生產，例如化學合成或重組表達技術。對惡性腫瘤細胞抗原具有免疫特異性的抗體的核苷酸序列編碼可以商業獲得，例如從GenBank資料庫或類似資料庫，文獻出版物獲得，或從習知克隆和測序得到。

【0154】 除了抗體之外，與目標細胞上的抗原決定基或相應的受體交互作用（結合、阻斷、靶向或其他類型作用）的一種肽或蛋白質也可以作為結合分子。這些類抗體肽或蛋白質可能是任何隨機的類抗體肽或蛋白質，它們對抗原決定基或相應的受體有親和力，不一定非得是免疫球蛋白家族成員。這些肽可以藉由類似噬菌體顯示抗體的技術單離出來（Szardenings，J Recept Signal Transduct Res. 2003；23（4）：307-49）。從隨機肽庫中獲得的肽可以同抗體和抗體片段類似地被使用。類抗體肽或蛋白質結合分子可以偶聯或連接至大分子或其他物質，包括但不限於白蛋白、聚合物、脂質體、納米粒子、樹形分子，只要這樣的連接能保留肽或蛋白質的抗原結合特異性。

【0155】 在治療癌症、自身免疫性疾病和/或傳染性疾病的偶聯物上，和藥物分子藉由本發明的連接子連接的抗體的例子包括，但不限於3F8（抗GD2）、阿巴單抗（抗CA-125）、阿昔單抗（抗CD41（整聯蛋白α-IIb）、阿達木單抗（抗TNF-α）、Adecatumumab（抗EpCAM、

CD326）、阿非莫單抗（抗TNF-α）、Afutuzumab（抗CD20）、Alacizumab 單抗（抗VEGFR2）、ALD518（抗IL-6）、Alemtuzumab（Campath、MabCampath、抗CD52）、Altumomab（抗CEA）、Anatumomab（抗TAG-72）、Anrukinzumab（IMA-638、抗-IL-13）、Apolizumab（抗-HLA-DR）、阿奇單抗（抗-CEA）、阿塞珠單抗（抗-L-選擇蛋白CD62L）、Atlizumab（tocilizumab、Actemra、RoActemra、抗-IL-6 受體）、Atorolimumab（抗-Rhesus 因數）、Bapineuzumab（抗-β澱粉樣蛋白）、Basiliximab（Simulect、抗CD25（IL-2受體的α鏈））、Bavituximab（抗磷脂醯絲氨酸）、Bectumomab（LymphoScan、抗-CD22）、貝利單抗（Benlysta、LymphoStat-B、抗BAFF）、Benralizumab（抗CD125）、Bertilimumab（抗CCL11（eotaxin-1））、Besilesomab（Scintimun、抗CEA相關抗原）、貝伐單抗（Avastin、抗VEGF-A）、Biciromab（FibriScint、抗纖維蛋白IIβ鏈）、Bivatuzumab（抗-CD44v6）、Blinatumomab（BiTE、抗CD19）、Brentuximab（cAC10、抗-CD30 TNRSF8）、Briakinumab（抗IL-12、IL-23）、Canakinumab（Ilaris、抗IL-1）、Cantuzumab（C242、抗CanAg）、Capromab、Catumaxomab（Removab、抗EpCAM、抗CD3）、CC49（抗TAG-72）、Cedelizumab（抗CD4）、Certolizumab 單抗（Cimzia抗TNF-α）、西妥昔單抗（愛必妥、IMC-C225、抗EGFR）、Citatuzumab bogatox（抗EpCAM）、Cixutumumab（抗IGF-1）、Clenoliximab（抗CD4）、Clivatuzumab（抗MUC1）、Conatumumab（抗TRAIL-R2）、CR6261（抗流感A血凝素）、Dacetuzumab（抗CD40）、Daclizumab（Zenapax、抗CD25（IL-2受體

α鏈））、Daratumumab（抗CD38（環ADP核糖水解酶）、Denosumab（Prolia、抗RANKL）、Detumomab（抗B淋巴瘤細胞）、Dorlimomab、Dorlixizumab、Ecromeximab（抗GD3神經節苷脂）、Eculizumab（Soliris、抗-C5）、Edobacomab（抗內毒素）、Edrecolomab（Panorex、MAb17-1A、抗-EpCAM）、Efalizumab（Raptiva、抗LFA-1（CD11a））、Efungumab（Mycograb、抗Hsp90）、Elotuzumab（抗SLAMF7）、Elsilimomab（抗IL-6）、Enlimomab 單抗（抗ICAM-1（CD54）））、Epitumomab（抗episialin）、依他珠單抗（抗-CD22）、Erlizumab（抗-ITGB2（CD18））、Ertumaxomab（Rexomun、抗HER2/neu、CD3）、依他拉單抗（Abegrin、抗整聯蛋白αvβ3）、Exbivirumab（抗乙肝表面抗原）、Fanolesomab（NeutroSpec、抗CD15）、Faralimomab（抗干擾素受體）、Farletuzumab（抗葉酸受體1）、Felvizumab（抗呼吸道合胞病毒）、Fezakinumab（抗-IL-22）、Figitumumab（抗-IGF-1受體）、Fontolizumab（抗-IFN-γ）、Foravirumab（抗狂犬病病毒糖蛋白）、Fresolimumab（抗TGF-β）、Galiximab（抗CD80）、Gantenerumab（抗β澱粉樣蛋白）、Gavilimomab（抗CD147（basigin））、Gemtuzumab（抗CD33）、Girentuximab（抗碳酸酐酶9）、Glembatumumab（CR011、抗GPNMB）、Golimumab（Simponi、抗-TNF-α）、Gomiliximab（抗-CD23（IgE受體））、Ibalizumab（抗-CD4）、Ibritumomab（抗CD20）、Igovomab（Indimacis-125、抗CA-125）、Imciromab（Myoscint、抗心肌肌凝蛋白）、Infliximab（Remicade、抗TNF-α）、Intetumumab（抗CD51）、Inolimomab（抗

CD25（IL-2受體α鏈）、伊珠單抗（抗-CD22）、Ipilimumab（抗CD152）、Iratumumab（抗CD30（TNFRSF8））、Keliximab（抗-CD4）、Labetuzumab（CEA-Cide、抗CEA）、Lebrikizumab（抗IL-13）、Lemalesomab（抗NCA-90（粒細胞抗原））、Lerdelimumab（抗TGFβ2）、Lexatumumab（抗TRAIL-R2）、Libivirumab（抗乙肝表面抗原）、Lintuzumab（抗CD33）、魯米木單抗（抗CD40）、魯米單抗（抗CD23（IgE受體）、Mapatumumab（抗TRAIL-R1）、馬西莫單抗（抗T-細胞受體）、馬妥珠單抗（抗EGFR）、Mepolizumab（Bosatria、抗IL-5）、Metelimumab（抗TGFβ1）、Milatuzumab（抗CD74）、Minretumomab（抗TAG-72）、Mitumomab（BEC-2、抗GD3神經節苷脂）、Morolimumab（抗恒河猴因數）、Motavizumab（Numax、抗呼吸道合胞病毒）、Muromonab-CD3（Orthoclone OKT3、抗CD3）、Nacolomab（抗C242）、Naptumomab（抗5T4）、那他珠單抗（Tysabri、抗整聯蛋白α_4）、奈巴單抗（抗內毒素）、Necitumumab（抗EGFR）、Nerelimomab（抗-TNF-α）、Nimotuzumab（Theracim、Theraloc、抗-EGFR）、Nofetumomab、Ocrelizumab（抗CD20）、奧利木單抗（Afolimomab、抗LFA-1（CD11a））、Ofatumumab（Arzerra、抗CD20）、Olaratumab（抗PDGF-Rα）、Omalizumab（Xolair、抗IgE Fc區） Oportuzumab（抗EpCAM）、Oregovomab（OvaRex、抗CA-125）、Otelixizumab（抗CD3）、Pagibaximab（抗脂磷壁酸）、Palivizumab（Synagis、Abbosynagis、抗呼吸道合胞病毒）、帕尼單抗（Vectibix、ABX-EGF、抗EGFR）、Panobacumab（抗銅綠假單胞菌（Pseudomonas aeruginosa））、帕考

珠單抗（抗IL-4）、Pemtumomab（Theragyn、抗MUC1）、Pertuzumab（Omnitarg、2C4、抗HER2/neu）、Pexelizumab（抗C5）、Pintumomab（抗腺癌抗原）、Priliximab（抗-D4）、Pritumumab（抗波形蛋白）、PRO140（抗-CCR5） Racotumomab（1E10、抗-N-羥乙醯神經氨酸（NeuGc、NGNA）-神經節苷脂GM3））、Rafivirumab（抗狂犬病病毒糖蛋白）、Ramucirumab（抗VEGFR2）、Ranibizumab（Lucentis、抗VEGF-A）、Raxibacumab（抗炭疽毒素、保護性抗原）、Regavirumab（抗巨細胞病毒糖蛋白B）、Reslizumab（抗-IL-5）、Rilotumumab（抗-HGF）、Rituximab（MabThera、Rituxanmab、抗-CD20）、Robatumumab（抗-IGF-1受體）、Rontalizumab（抗IFN-α）、Rovelizumab（LeukArrest、抗CD11、CD18）、Ruplizumab（Antova、抗CD154（CD40L））、Satumomab（抗TAG-72）、Sevirumab（抗巨細胞病毒）、Sibrotuzumab（抗FAP）、西法木單抗（抗IFN-α）、Siltuximab（抗IL-6）、Siplizumab（抗CD2）、Smart MI95（抗CD33）、Solanezumab（抗β澱粉狀蛋白）、Sonepcizumab（抗鞘氨醇-1-磷酸）、Sontuzumab（抗-episialin）、Stamulumab（抗-myostatin）、Sulesomab（LeukoScan、抗NCA-90（粒細胞抗原））、Tacatuzumab（抗α甲胎蛋白）、Tadocizumab（抗整聯蛋白$\alpha_{IIb}\beta_3$）、Talizumab（抗IgE）、Tanezumab（anti-NGF）、Taplitumomab（抗CD19）、Tefibazumab（Aurexis、（抗凝聚因數A））、Telimomab、Tenatumomab（抗腱生蛋白C）、Teneliximab（抗CD40）、Teplizumab（抗CD3）、TGN1412（抗CD28）、Ticilimumab（Tremelimumab、抗-CTLA-4）、Tigatuzumab（抗TRAIL-R2）、TNX-650（抗IL-13）、

Tocilizumab（Atlizumab、Actemra、RoActemra、IL-6受體）、Toralizumab（抗CD154（CD40L））、Tositumomab（抗CD20）、曲妥珠單抗（赫賽汀、抗HER2/neu）、Tremelimumab（抗CTLA-4）、Tucotuzumab celmoleukin（抗EpCAM）、Tuvirumab（抗乙型肝炎病毒）、Urtoxazumab（抗大腸桿菌）、Ustekinumab（Stelara、抗-IL-12、IL-23）、Vapaliximab（抗-AOC3（VAP-1））、維多珠單抗（抗整聯蛋白$\alpha_4\beta_7$）、維妥珠單抗（抗CD20）、Vepalimomab（抗AOC3（VAP-1））、Visilizumab（Nuvion、抗CD3）、Vitaxin（抗血管整合素avb3）、Volociximab（抗整聯蛋白$\alpha_5\beta_1$）、Votumumab（HumaSPECT、抗腫瘤抗原CTAA16.88）、Zalutumumab（HuMax-EGFr，（抗EGFR）、Zanolimumab（HuMax-CD4、抗-CD4）、Ziralimumab（抗-CD147（basigin））、Zolimomab（抗-CD5）、依那西普（Enbrel®）、Alefacept（Amevive®）、Abatacept（Orencia®）、Rilonacept（Arcalyst）、14F7（抗IRP-2（鐵調節蛋白2））、14G2a（抗GD2神經節苷脂、源於Nat.Cancer Inst.、治療黑素瘤和實體瘤）、J591（抗-PSMA、源於Weill Cornell醫學院、治療前列腺癌）、225.28S（抗HMW-MAA（高分子量黑素瘤相關抗原）、Sorin Radiofarmaci SRL（源於義大利米蘭、治療黑色素瘤）、COL-1（抗CEACAM3、CGM1、源於Nat Cancer Inst. 治療結腸直腸癌和胃癌）、CYT-356（oncoltad®，治療前列腺癌）、HNK20（OraVax Inc.治療呼吸道合胞病毒感染）、ImmuRAIT（源於Immunomedics、治療NHL）、Lym-1（抗HLA-DR10，Peregrine Pharm）、MAK-195F（抗TNF（腫瘤壞死因數、TNFA、TNF-α，TNFSF2，源於Abbott/Knoll，治療膿毒症中

毒性休克）、MEDI-500 （T10B9、抗CD3、TRαβ（T細胞受體α/β）、源於MedImmune Inc、用於移植物抗主體疾病病）、RING SCAN （抗TAG 72（腫瘤相關糖蛋白72）、源於Neoprobe Corp.、用於乳腺癌、結腸癌和直腸癌）、Avicidin（抗EPCAM（上皮細胞粘附分子））、抗-TACSTD1（腫瘤相關鈣信號轉導1）、抗GA733-2（胃腸腫瘤相關蛋白2）、抗EGP-2（上皮糖蛋白2）、抗KSA、KS1/4抗原、M4S、腫瘤抗原17-1A、CD326（源於NeoRx公司、治療結腸癌、卵巢癌、前列腺癌和NHL）、LymphoCide（源於Immunomedics, NJ）、Smart ID10（源於Protein Design Labs）、Oncolym （源於Techniclone Inc, CA）、Allomune（源於BioTransplant, CA）、抗VEGF（源於Genentech, CA）、CEAcide（源於Immunomedics, NJ）、IMC-1C11（源於ImClone, NJ）和Cetuximab（源於ImClone, NJ）。

【0156】其他可作為細胞結合分子/配位體的抗體，包括但不限於，以下抗原的抗體：氨肽酶N（CD13）、膜聯蛋白A1、B7-H3（CD276、各種癌症）、CA125（卵巢癌）、CA15-3（各種癌症）、CA19-9（各種癌症）、L6（各種癌症）、路易士Y（各種癌症）、路易士X（各種癌症）、甲胎蛋白（各種癌症）、CA242（結直腸癌）、胎盤鹼性磷酸酶（各種癌症）、前列腺特異抗原（前列腺癌）、前列腺酸磷酸酶（前列腺癌）、表皮生長因數（各種癌症）、CD2（霍奇金症、NHL淋巴瘤、多發性骨髓瘤）、CD3 ε （T細胞淋巴瘤、肺癌、乳腺癌、胃癌、卵巢癌、自身免疫性疾病、惡性腹水）、CD19 （B細胞惡性腫瘤）、CD20（非霍奇金淋巴瘤）、CD22（白血病、淋巴瘤、多發性骨髓瘤、SLE）、CD30（霍奇金淋巴瘤）、CD33（白血病、自身免疫性疾病）、CD38（多發性

骨髓瘤）、CD40（淋巴瘤、多發性骨髓瘤、白血病（CLL））、CD51（轉移性黑色素瘤、肉瘤）、CD52（白血病）、CD56（小細胞肺癌、卵巢癌、梅克細胞癌、以及液體腫瘤、多發性骨髓瘤）、CD66e（各種癌症）、CD70（轉移性腎細胞癌和非霍奇金淋巴瘤）、CD74（多發性骨髓瘤）、CD80（淋巴瘤）、CD98（各種癌症）、粘液素（各種癌症）、CD221（實體腫瘤）、CD227（乳腺癌、卵巢癌）、CD262 （非小細胞肺癌及其他癌症）、CD309（卵巢癌）、CD326（實體腫瘤）、CEACAM3（結腸直腸癌、胃癌）、CEACAM5（癌胚抗原、CEA、CD66e）（乳腺、結直腸癌和肺癌）、DLL3或DLL4（delta-like-3 或delta-like-4）、EGFR（表皮生長因數受體、各種癌症）、CTLA4（黑色素瘤）、CXCR4 （CD184、血液腫瘤，實體腫瘤）、Endoglin（CD105、實體瘤）、EPCAM（上皮細胞粘附分子、膀胱癌、頭頸癌、結腸癌、NHL前列腺癌、卵巢癌）、ERBB2（表皮生長因數受體2、肺癌、乳腺癌、前列腺癌）、FCGR1（自身免疫性疾病）、FOLR（葉酸受體、卵巢癌）、GD2神經節苷（各種癌症）、G-28（細胞表面抗原糖脂質、黑色素瘤）、GD3獨特型（各自癌症）、熱休克蛋白（各種癌症）、HER1（肺癌、胃癌）、HER2（乳腺癌、肺癌和卵巢癌）、HLA-DR10（NHL）、HLA-DRB （NHL、B細胞白血病）、人絨毛膜促性腺激素（各種癌症）、IGF1R（類胰島素生長因數1受體、實體瘤、血癌）、IL-2受體（白介素2受體、T細胞白血病和淋巴瘤）、IL-6R（白介素6受體、多發性骨髓瘤、風濕性關節炎、Castleman病、白細胞介素6依賴腫瘤）、整合蛋白（αvβ3、α5β1、α6β4、αIIβ3、α5β5、αvβ5、各種癌症）、MAGE-1（各種癌症）、MAGE-2（各種癌症）、MAGE-3（各種癌

症）、MAGE 4（各種癌症）、抗轉鐵蛋白受體（各種癌症）、p97（黑色素瘤）、MS4A1（跨膜4結構域亞家族A成員1、非霍奇金B細胞淋巴瘤、白血病）、MUC1或MUC1-KLH（乳腺癌、卵巢癌、子宮頸癌、支氣管癌和α胃腸道癌）、MUC16 （CA125）（卵巢癌）、CEA（結直腸癌）、gp100（黑色素瘤）、MART1（黑色素瘤）、MPG（黑素瘤）、MS4A1（跨膜4結構域亞家族A成員1、小細胞肺癌、NHL）、Nucleolin、Neu癌基因產物（各自癌症）、P21（各種癌）、抗（N-羥乙醯神經氨酸）抗體結合部位（乳腺癌、黑色素瘤）、類PLAP睾丸鹼性磷酸酶（卵巢癌、睾丸癌）、PSMA（前列腺瘤）、PSA（前列腺癌）、ROBO4、TAG 72（腫瘤相關糖蛋白72、AML、胃癌、結腸直腸癌、卵巢癌）、T細胞跨膜蛋白（各種癌症）、Tie （CD202b）、TNFRSF10B（腫瘤壞死因數受體超家族成員10B、各種癌症）、TNFRSF13B（腫瘤壞死因數受體超家族成員13B、多發性骨髓瘤、NHL、其他癌症、RA和SLE）、TPBG（滋養細胞糖蛋白、腎細胞癌）、TRAIL-R1（TNF相關壞死誘導配位體受體1、淋巴瘤、NHL、結直腸癌、肺癌）、VCAM-1（CD106、黑色素瘤）、VEGF、VEGF-A、VEGF-2 （CD309）（各種癌症）。其它可被抗體識別的、腫瘤相關抗原已被總結和評述（Gerber，等，mAbs 2009，1：3，247-253、Novellino 等，Cancer Immunol Immunother. 2005，54（3），187-207；Franke，等，Cancer Biother Radiopharm.2000，15，459-76）。

【0157】類抗體蛋白，較佳為IgG抗體，能夠抗腫瘤細胞、病毒感染細胞、微生物感染細胞、寄生蟲感染細胞、自身免疫性疾病細胞、活化的腫瘤細胞、髓樣細胞、活化的T細胞、受影響的B細胞或黑素細胞。更

具體地，所述抗體能夠抗表達以下抗原或受體中任一種的異常細胞：CD1、CD1a、CD1b、CD1c、CD1d、CD1e、CD2、CD3、CD3d、CD3e、CD3g、 CD4、CD5、CD6、CD7、CD8、CD8a、CD8b、CD9、CD10、CD11a、CD11b、CD11c、CD11d、CD12w、CD14、CD15、CD16、CD16a、CD16b、CDw17、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD26、CD27、CD28、CD29、CD30、CD31、CD32、CD32a、CD32b、CD33、CD34、CD35、CD36、CD37、CD38、CD39、CD40、CD41、CD42、CD42a、CD42b、CD42c、CD42d、CD43、CD44、CD45、CD46、CD47、CD48、CD49b、CD49c、CD49d、CD49f、CD50、CD51、CD52、CD53、CD54、CD55、CD56、CD57、CD58、CD59、CD60、CD60a、CD60b、CD60c、CD61、CD62E、CD62L、CD62P、CD63、CD64、CD65、CD65s、CD66、CD66a、CD66b、CD66c、CD66d、CD66e、CD66f、CD67、CD68、CD69、CD70、CD71、CD72、CD73、CD74、CD75、CD75s、CD76、CD77、CD78、CD79、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CD84、CD85、CD85a、CD85b、CD85c、CD85d、CD85e、CD85f、CD85g、CD85h、CD85i、CD85j、CD85k、CD85m、CD86、CD87、CD88、CD89、CD90、CD91、CD92、CD93、CD94、CD95、CD96、CD97、CD98、CD99、CD100、CD101、CD102、CD103、CD104、CD105、CD106、CD107、CD107a、CD107b、CD108、CD109、CD110、CD111、CD112、CD113、CD114、CD115、CD116、CD117、CD118、CD119、CD120、CD120a、CD120b、CD121、CD121a、CD121b、CD122、

CD123、CD123a、CD124、CD125、CD126、CD127、CD128、CD129、CD130、CD131、CD132、CD133、CD134、CD135、CD136、CD137、CD138、CD139、CD140、CD140a、CD140b、CD141、CD142、CD143、CD144、CD145、CDw145、CD146、CD147、CD148、CD149、CD150、CD151、CD152、CD153、CD154、CD155、CD156、CD156a、CD156b、CD156c、CD156d、CD157、CD158、CD158a、CD158b1、CD158b2、CD158c、CD158d、CD158e1、CD158e2、CD158f2、CD158g、CD158h、CD158i、CD158j、CD158k、CD159、CD159a、CD159b、CD159c、CD160、CD161、CD162、CD163、CD164、CD165、CD166、CD167、CD167a、CD167b、CD168、CD169、CD170、CD171、CD172、CD172a、CD172b、CD172g、CD173、CD174、CD175、CD175s、CD176、CD177、CD178、CD179、CD179a、CD179b、CD180、CD181、CD182、CD183、CD184、CD185、CD186、CDw186、CD187、CD188、CD189、CD190、CD191、CD192、CD193、CD194、CD195、CD196、CD197、CD198、CD199、CDw198、CDw199、CD200、CD201、CD202、CD202（a，b）、CD203、CD203c、CD204、CD205、CD206、CD207、CD208、CD209、CD210、CDw210a、CDw210b、CD211、CD212、CD213、CD213a1、CD213a2、CD214、CD215、CD216、CD217、CD218、CD218a、CD218、CD21b9、CD220、CD221、CD222、CD223、CD224、CD225、CD226、CD227、CD228、CD229、CD230、CD231、CD232、CD233、CD234、CD235、CD235a、CD235b、CD236、

CD237、CD238、CD239、CD240、CD240ce、CD240d、CD241、CD242、CD243、CD244、CD245、CD246、CD247、CD248、CD249、CD250、CD251、CD252、CD253、CD254、CD255、CD256、CD257、CD258、CD259、CD260、CD261、CD262、CD263、CD264、CD265、CD266、CD267、CD268、CD269、CD270、CD271、CD272、CD273、CD274、CD275、CD276、CD277、CD278、CD279、CD281、CD282、CD283、CD284、CD285、CD286、CD287、CD288、CD289、CD290、CD291、CD292、CD293、CD294、CD295、CD296、CD297、CD298、CD299、CD300、CD300a、CD300b、CD300c、CD301、CD302、CD303、CD304、CD305、CD306、CD307、CD307a、CD307b、CD307c、CD307d、CD307e、CD307f、CD308、CD309、CD310、CD311、CD312、CD313、CD314、CD315、CD316、CD317、CD318、CD319、CD320、CD321、CD322、CD323、CD324、CD325、CD326、CD327、CD328、CD329、CD330、CD331、CD332、CD333、CD334、CD335、CD336、CD337、CD338、CD339、CD340、CD341、CD342、CD343、CD344、CD345、CD346、CD347、CD348、CD349、CD350、CD351、CD352、CD353、CD354、CD355、CD356、CD357、CD358、CD359、CD360、CD361、CD362、CD363、CD364、CD365、CD366、CD367、CD368、CD369、CD370、CD371、CD372、CD373、CD374、CD375、CD376、CD377、CD378、CD379、CD381、CD382、CD383、CD384、CD385、CD386、CD387、CD388、

CD389、CRIPTO、CR、CR1、CRGF、CRIPTO、CXCR5、LY64、TDGF1、4-1BB、APO2、ASLG659、BMPR1B、5AC、5T4（Trophoblast糖蛋白、TPBG、WNT-活化抑制因數1或WAIF1）、腺癌抗原、AGS-5、AGS-22M6、啟動素受體激酶1、AFP、AKAP-4、ALK、α整合素、αvβ6、胺基肽酶N、澱粉樣蛋白β、雄激素受體、促血管新生蛋白因數2、促血管新生蛋白因數3、膜聯蛋白A1、炭疽毒素保護性抗原、抗轉移蛋白受體、AOC3（VAP-1）、B7-H3、炭疽桿菌、BAFF（B細胞啟動因數）、BCMA、B淋巴瘤細胞、bcr-abl、蛙皮素、BORIS、C5、C242抗原、CA125（糖抗原125、MUC16）、CA-IX（或CAIX、碳酸酐酶9）、CALLA、CanAg、犬紅斑狼瘡IL31、碳酸酐酶IX、心肌肌凝蛋白、CCL11（C-C片段趨化因數11）、CCR4（C-C趨化因數受體4）、CCR5、CD3E（ε）、CEA（癌胚抗原）、CEACAM3、CEACAM5（癌胚抗原）、CFD（因數D）、Ch4D5、膽囊收縮素2（CCK2R）、CLDN18（Claudin-18）、叢生因數A、cMet、CRIPTO、FCSF1R（集落刺激因數1受體）、CSF2（集落刺激因數2、粒細胞-巨噬細胞集落刺激因數（GM-CSF））、CSP4、CTLA4（細胞毒性T淋巴細胞相關蛋白4）、CTAA16.88腫瘤抗原、CXCR4、C-X-C趨化因數受體4、環狀ADP核糖核酸酶、細胞週期蛋白B1、CYP1B1、巨細胞病毒、巨細胞病毒糖蛋白B、Dabigatran、DLL3（類Δ配位體 3）、DLL4（類Δ配位體 4）、DPP4（雙肽-肽酶4）、DR5（死亡受體5）、大腸桿菌shiga毒素類型-1、大腸桿菌shiga毒素類型-2、ED-B、EGFL7（類EGF結構域蛋白7）、EGFR、EGFRII、EGFRvIII、內皮因數、內皮素B受體、內毒素、EpCAM（上皮細胞粘附分子）、EphA2、Episialin、

ERBB2（表皮生長因數受體2）、ERBB3、ERG （TMPRSS2 ETS融合基因）、大腸桿菌、ETV6-AML、FAP（成纖維細胞活化蛋白α）、FCGR1、甲胎蛋白、纖維蛋白II β鏈、纖連蛋白額外結構域-B、FOLR（葉酸受體）、葉酸受體α、葉酸水解酶、Fos相關抗原1、呼吸道合胞病毒的F蛋白、捲曲受體、岩藻糖GM1、GD2神經節苷脂、G-28（細胞表面抗原糖脂）、GD3獨特型、GloboH、Glypican 3、N-羥乙醯神經氨酸、GM3、GMCSF受體α鏈、生長分化因數8、GP100、GPNMB（跨膜糖蛋白NMB）、GUCY2C（鳥苷酸環化酶2 C）、鳥苷酸環化酶C（GC-C）、腸鳥苷酸環化酶、鳥苷酸環化酶C受體、熱穩定腸毒素受體（hSTAR）、熱休克蛋白、血凝素、乙肝表面抗原、乙型肝炎病毒、HER1（人類表皮生長因數受體1）、HER2、HER2/neu、HER3（ERBB-3）、IgG4、HGF/SF（肝細胞生長因數/分散因數）、HHGFR、HIV-1、組蛋白錯合物、HLA-DR（人類白細胞抗原）、HLA-DR10、HLA-DRB、HMWMAA、人類絨毛膜促性腺激素、HNGF、人類分散因數受體激酶、HPV E6/E7、Hsp90、hTERT、ICAM-1（細胞間粘附分子1）、獨特型、IGF1R（IGF－1、類胰島素生長因數1受體）、IGHE、IFN-γ、流感血凝素、IgE、IgE Fc區、IGHE、白介素（包括 IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-6R、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、IL-17A、IL-18、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-27、或 IL-28）、IL31RA、ILGF2（類胰島素生長因數2）、整合蛋白（α4、αIIbβ3、αvβ3、α4β7、α5β1、α6β4、α7β7、αIIβ3、α5β5、αvβ5）、干擾素γ誘導蛋白質、ITGA2、ITGB2、KIR2D、Kappa Ig、LCK、Le、Legumain、Lewis-Y抗原、LFA-1（淋巴細胞功能相關抗

原1、CD11a）、LHRH、LINGO-1、脂磷壁酸、LIV1A、LMP2、LTA、MAD-CT-1、MAD-CT-2、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、MAGE A1、MAGE A3、MAGE 4、MART1、MCP-1、MIF（巨噬細胞遷移抑制因數、或糖基抑制因數（GIF））、MS4A1（跨膜4結構域亞家族A成員1）、MSLN（間皮素）、MUC1（粘蛋白1、細胞表面相關（MUC1）或多態性上皮粘蛋白（PEM））、MUC1-KLH、MUC16（CA125）、MCP1（單核細胞趨化蛋白1）、MelanA/MART1、ML-IAP、MPG、MS4A1（跨膜4域亞科A）、MYCN、髓磷脂相關糖蛋白、Myostatin、NA17、NARP-1、NCA-90（粒細胞抗原）、Nectin-4（ASG-22ME）、NGF、神經細胞凋亡調控蛋白酶1、NOGO-A、Notch受體、核仁素、Neu致癌基因產物、NY-BR-1、NY-ESO-1、OX-40、OxLDL（氧化低密度脂蛋白）、OY-TES1、P21、p53非突變體、P97、PAP、抗（N-羥乙醯神經氨酸）抗體結合部位、PAX3、PAX5、PCSK9、PDCD1（PD-1、程式性細胞死亡蛋白1）、PDGF-Rα（α血小板源生長因數受體）、PDGFR-β、PDL-1、PLAC1、類PLAP睾丸鹼性磷酸酶、血小板衍生生長因數受體β、磷酸鈉聯合轉運體、PMEL 17、聚唾液酸、蛋白酶3（PR1）、前列腺癌、PS（磷脂醯絲氨酸）、前列腺癌細胞、銅綠假單胞菌、PSMA、PSA、PSCA、狂犬病病毒糖蛋白、RHD（Rh多肽1（RhPI））、Rhesus因數、RANKL、RhoC、Ras突變、RGS5、ROBO4、呼吸道合胞病毒、RON、ROR1、肉瘤易位中斷點、SART3、Sclerostin、SLAMF7（SLAM成員7）、Selectin P、SDC1（多配位體蛋白聚糖1）、系統性紅斑狼瘡（a）、生長調節素C、SIP（1-磷酸鞘氨醇）、生長激素抑制素、精子蛋白17、SSX2、STEAP1（6-跨膜

上皮前列腺抗原1）、STEAP2、STn、TAG-72（腫瘤相關糖蛋白72）、存活素、T細胞受體、T細胞跨膜蛋白、TEM1（腫瘤血管內皮標記1）、TENB2、Tenascin C（TN-C）、TGF-α、TGF-β（轉化生長因數β）、TGF-β1、TGF-β2（轉化生長因數2）、Tie（CD202b）、Tie2、TIM-1（CDX-014）、Tn、TNF、TNF-α、TNFRSF8、TNFRSF10B（腫瘤壞死因數受體超家族成員10 B）、TNFRSF13B（腫瘤壞死因數受體超家族成員13B）、TPBG（滋養細胞糖蛋白）、TRAIL-R1（TNF相關壞死誘導配位體受體1）、TRAILR2（死亡受體5 （DR5））、腫瘤相關的鈣信號傳感子2、腫瘤特異糖基化的MUC1、TWEAK受體、TYRP1（糖蛋白75）、TRP-1 （Trop1）、TRP-2（Trop2）、酪氨酸酶、VCAM-1、VEGF、VEGF-A、VEGF-2、VEGFR-1、VEGFR-2、vimentin、WT1、XAGE 1、表達胰島素生長因數受體的細胞、或表達表皮生長因數受體的細胞。

【0158】 在另一個具體實施例中，本發明的抗體-藥物偶聯物用於癌症的靶向治療。目標癌症包括但不限於、腎上腺皮質癌、肛門癌、膀胱癌、大腦腫瘤（腦幹神經膠質瘤、小腦星形細胞瘤、腦星形細胞瘤、室管膜瘤、成神經管細胞瘤、幕上原始神經外胚層和松果體腫瘤、視覺通路和下丘腦膠質瘤）、乳腺癌、類癌腫瘤、胃腸道癌症、未知小細胞癌、宮頸癌、結腸癌、子宮內膜癌、食道癌、肝外膽管癌、尤因家族腫瘤（PNET）、顱內生殖細胞腫瘤、眼癌、眼內黑色素瘤、膽囊癌、胃癌（胃癌）、性腺外生殖細胞瘤、孕周滋養細胞瘤、頭頸癌、下嘸癌、胰島細胞癌、腎癌（腎細胞癌）、喉癌、白血病（急性淋巴細胞、急性髓系、慢性淋巴細胞、慢性粒細胞、毛細胞）、嘴唇和口腔癌症、肝癌、肺癌

（非小細胞、小細胞）、淋巴瘤（愛滋病相關、中樞神經系統、皮膚T細胞、霍奇金病、非霍奇金病）、惡性間皮瘤、黑色素瘤、梅克爾細胞癌、轉移性鱗狀頸癌與隱匿性原發性癌、多發性骨髓瘤和其他漿細胞腫瘤、蕈樣肉芽腫、骨髓增生異常綜合征、骨髓增生異常、鼻咽癌、神經母細胞瘤、口腔癌、口咽癌、骨肉瘤、卵巢癌（上皮、生殖細胞瘤、低惡性腫瘤）、胰腺癌（外分泌、胰島細胞癌）、副鼻竇和鼻腔癌、甲狀旁腺癌、陰莖癌、嗜鉻細胞瘤、垂體腫瘤、漿細胞腫瘤、前列腺癌橫紋肌肉瘤、直腸癌、腎細胞癌（腎癌）、腎盂和輸尿管（移行細胞）、唾腺癌、賽塞裡綜合症、皮膚癌（皮膚T細胞淋巴瘤、卡波西氏肉瘤、黑色素瘤）、小腸腫瘤、軟組織肉瘤、胃癌、睾丸癌、胸腺瘤（惡性）、甲狀腺癌、尿道癌症、子宮癌、不尋常的少年癌症、陰道腫瘤、外陰腫瘤和維爾姆斯瘤。

【0159】在另一個具體的實施例中、本發明過的抗體-藥物偶聯物，可用作治療或預防自身免疫疾病的成分和方法。自身免疫性疾病包括但不限於，Achlorhydra自身免疫性活動性慢性肝炎、急性播散性腦脊髓炎、急性出血性腦白質炎、艾迪生病、無精症、斑禿、肌萎縮側索硬化症、強直性脊柱炎、抗GBM/TBM腎炎、抗磷脂綜合征、抗異常酶綜合征、關節炎、特應性過敏、特應性皮炎、自身免疫性再生障礙性貧血、自身免疫性心肌病、自身免疫性溶血性貧血、自身免疫性肝炎、自身免疫性內耳疾病、自身免疫性淋巴組織增生綜合征、自身免疫性周圍神經病、自身免疫性胰腺炎、自身免疫性多內分泌綜合征I、II和III型、自身免疫性黃體酮皮炎、自身免疫性血小板減少性紫癜、自身免疫性葡萄膜炎、Balo病/Balo同心硬化症、Bechets綜合征、Berger氏病、Bickerstaff腦炎、Blau綜合征、大皰性類天皰瘡、Castleman病、Chagas病、慢性疲勞免疫功能

障礙綜合征、慢性炎性脫髓鞘性多發性神經病、慢性復發性多灶性骨髓炎、慢性萊姆病、慢性阻塞性肺病、Churg-Strauss綜合征、瘢痕性類天皰瘡、乳糜泄、Cogan綜合征、冷凝集素病、補體成分2缺乏症、顱骨動脈炎、CREST綜合征、Crohns病（特發性炎症性腸病）、庫欣綜合征、皮膚白細胞增多性血管炎、德戈氏病、Dercum氏病、皰疹樣皮炎、皮肌炎、1型糖尿病、彌漫性皮膚系統性硬化症、Dressler綜合征、盤狀紅斑狼瘡、濕疹、子宮內膜異位症、附著點炎相關的關節炎、Eosinophilic筋膜炎、大皰性表皮松解症、結節性紅斑、特發性混合性冷球蛋白血症、伊文氏綜合征、纖維發育不良性骨化症、纖維肌痛、纖維化性肌炎、纖維性肺泡炎、胃炎、胃腸類天皰瘡、巨細胞動脈炎、腎小球腎炎、古德帕斯丘爾綜合征、格雷夫斯病、格林-巴厘綜合征、橋本氏腦炎、橋本氏甲狀腺炎、溶血性貧血、過敏性紫癜、妊娠性肝炎、化膿性汗腺炎、休斯綜合征（抗磷脂綜合征）、低丙球蛋白血症、特發性炎性脫髓鞘疾病、特發性肺纖維化、特發性血小板減少性紫癜（自身免疫性血小板減少性紫癜）、IgA腎病（伯傑氏病）、包涵體肌炎、炎性脫髓鞘性多神經炎、間質性膀胱炎、過敏性腸綜合征、少年特發性關節炎、青少年類風濕性關節炎、川崎氏病、朗伯-伊頓重症肌無力綜合征、白細胞碎屑性血管炎、扁平苔癬、硬化性硬化症、線狀IgA疾病（LAD）、Lou Gehrig病（也稱肌萎縮側索硬化症）、狼瘡性肝炎、紅斑狼瘡、Majeed綜合征、美尼爾氏病、顯微鏡下多動脈炎、米勒-費希爾綜合征、混合性結締組織病、硬斑病、穆罕默德-哈貝曼病、麥考利綜合征、多發性骨髓瘤、多發性硬化症、重症肌無力、肌炎、嗜睡症、視神經脊髓炎（Devic病）、神經性肌強直、眼瞼瘢痕性類天皰瘡、Opsoclonus myoclonus綜合征、Ord甲狀腺炎、回

文風濕病、PANDAS（與鏈球菌相關的小兒自身免疫性神經精神病）、Paraneoplastic小腦變性、陣發性睡眠性血紅蛋白尿症、Parry Romberg綜合征、Parsonnage-Turner綜合征、睫狀體平部炎、天皰瘡、尋常型天皰瘡、貧血、周圍腦脊髓炎、POEMS綜合征、結節性多動脈炎、風濕性多肌痛、多發性肌炎、原發性膽汁性肝硬化、原發性硬化性膽管炎、進行性炎症性神經病變、牛皮癬、牛皮癬性關節炎、壞疽性皮膚炎、純紅細胞再生障礙、Rasmussen腦炎、雷諾現象、復發性多軟骨炎、賴特綜合征、不寧腿綜合症、後神經纖維化、類風濕性關節炎、類風濕熱、結節病、精神分裂症、施密特綜合征、Schnitzler綜合征、施尼茨勒綜合征、鞏膜炎、硬皮病、乾燥綜合征、脊椎關節病、粘稠血症、Still病、僵人綜合征、亞急性細菌性心內膜炎、蘇薩克綜合征、Sweet綜合征、小舞蹈病、交感神經性貧血、Takayasu動脈炎、顳動脈炎（巨細胞動脈炎）、Tolosa-Hunt綜合征、橫貫性脊髓炎、潰瘍性結腸炎（特發性炎性腸病）、未分化結締組織病、未分化脊柱關節病、血管炎、白癜風、韋格納肉芽腫病、威爾遜氏綜合征、威斯科特-奧爾德里奇綜合征。

【0160】在另一個具體的實施例中，在用於治療或預防自身免疫性疾病的偶聯物上的抗體，包括但不限於，抗彈性蛋白抗體、Abys抗上皮細胞抗體、抗基底膜膠原蛋白IV型蛋白抗體、抗核抗體、抗ds DNA、抗ss DNA、抗心磷脂抗體IgM、IgG、抗乳糜瀉抗體、抗磷脂抗體IgK、IgG、抗SM抗體、抗線粒體抗體、甲狀腺抗體、微粒體抗體、T細胞抗體、甲狀腺球蛋白抗體、抗SCL-70、抗Jo、抗U.sub.1RNP、抗La/SSB、抗SSA、抗SSB、抗壁細胞抗體、抗組蛋白、抗RNP、C-ANCA、P-ANCA、抗著絲粒、抗纖維蛋白原、抗GBM抗體、抗神經節苷脂抗

體、抗Desmogein 3抗體、抗p62抗體、抗sp100抗體、抗線粒體（M2）抗體、類風濕因數抗體、抗MCV抗體、抗拓撲異構酶抗體、抗中性粒細胞胞質（cANCA）抗體。

【0161】在某些較佳的實施例中，本專利中偶聯物上的結合分子，可以與自身免疫性疾病相關的啟動淋巴細胞上表達的受體或受體錯合物相結合。受體或受體錯合物包含，免疫球蛋白基因超家族成員（例如CD2、CD3、CD4、CD8、CD19、CD20、CD22、CD28、CD30、CD33、CD37、CD38、CD56、CD70、CD79、CD79b、CD90、CD125、CD137、CD138、CD147、CD152/CTLA-4、PD-1或ICOS）、TNF受體超家族成員（例如CD27、CD40、CD95/Fas、CD134/OX40、CD137/4-1BB、INF-R1、TNFR-2、RANK、TACI、BCMA、骨保護素、Apo2/TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRAIL-R3、TRAIL-R4和APO-3）、整合蛋白、細胞因數受體、趨化因數受體、主要組織相容性蛋白、凝集素（C型、S型或I型）或補體控制蛋白。

【0162】在另一個具體實施例中，可用的對病毒或微生物抗原具有免疫特異性的細胞結合配位體是人源化或人單克隆抗體。“病毒抗原”包括但不限於，任何能夠引發免疫應答的病毒肽，多肽蛋白（例如HIV gp120、HIV nef、RSV F糖蛋白、流感病毒神經氨酸苷酶、流感病毒血凝素、HTLV Tax、皰疹單純皰疹病毒糖蛋白（例如gB、gC、gD和gE）和乙型肝炎表面抗原）。“微生物抗原”包括但不限於，任何能夠引發免疫應答的微生物肽，多肽，蛋白質，糖，多糖或脂質分子（例如細菌、真菌、致病原生動物或酵母多肽、包括如LPS和莢膜多糖5/8）。可用於治療病毒或微生物感染的抗體的實例、包括但不限於：帕利珠單抗、它是用

於治療RSV感染的、人源化抗呼吸道合胞病毒單克隆抗體；PRO542，是一種CD4融合抗體，用於治療HIV感染；奧斯他韋，是一種用於治療乙型肝炎病毒的人抗體；PROTVIR，是一種人源化IgG1抗體，用於治療巨細胞病毒，和抗LPS抗體。

【0163】本專利的抗體藥物偶聯物可用於治療感染性疾病。這些感染性疾病包括但不限於，不動桿菌屬感染、放線菌病、非洲昏睡病（非洲錐蟲病）、愛滋病（獲得性免疫缺陷綜合症）、阿米巴病、無形體病、炭疽、溶血性耶爾森菌感染、阿根廷出血熱、蛔蟲病、麯黴病、星狀病毒感染、巴貝斯蟲病、蠟狀芽孢桿菌感染、細菌性肺炎、細菌性陰道炎、類桿菌感染、小袋蟲病、蛔蟲感染、BK病毒感染、黑色發結節病、人芽囊原蟲感染、芽生菌病、玻利維亞出血熱、疏螺旋體感染、肉毒中毒（和嬰兒肉毒中毒）、巴西出血熱、布魯氏桿菌病、伯克霍爾德氏菌感染、布魯裡潰瘍、杯狀病毒感染（諾如病毒和沙波病毒）、彎曲桿菌病、念珠菌病（念珠菌病、鵝口瘡）、貓抓病、蜂窩組織炎、Chagas病（美洲錐蟲病）、子囊、水痘、衣原體、肺炎衣原體感染、霍亂、色素母細胞瘤、華支睾吸蟲、艱難梭狀芽孢桿菌感染、球孢子菌病、科羅拉多蜱熱病、普通感冒（急性病毒性鼻咽炎、急性鼻炎）、克雅氏病、克裡米亞-剛果出血熱、隱球菌病、隱孢子蟲病、皮膚幼蟲遷徙、環孢子蟲病、腸桿菌感染、腸道病毒感染、流行性斑疹傷寒、傳染性紅斑（第五種疾病）、急疹、薑片蟲病、肝片吸蟲病、致命性家族性失眠、絲蟲病、產氣莢膜梭菌食物中毒、自由活體阿米巴感染、梭桿菌感染、氣性壞疽（梭菌性肌壞死）、地絲菌病、格斯特曼-斯特拉斯勒-謝克爾病綜合征、賈第鞭毛蟲病、馬鼻疽、淋病、肉芽腫性腹瀉（第五性病）、A群鏈球菌感染、B群鏈球菌感

染、流感嗜血桿菌感染、手足口病（HFMD）、漢坦病毒肺綜合征、幽門螺桿菌感染、溶血性尿毒綜合征、腎綜合征出血熱、甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎、丁型肝炎、戊型肝炎、單純性皰疹、組織胞漿菌病、鉤蟲感染、人類博卡病毒感染、人類ewingii埃裡希體病、人類粒細胞無形體病、人類偏肺病毒感染、人類單核細胞埃裡希體病、人乳頭瘤病毒感染、人副流感病毒感染、膜殼絛蟲病、艾巴氏病毒傳染性單核細胞增多症（單）、流行性感冒、等孢子蟲病、川崎病、角膜炎、金格桿菌感染、庫魯病、拉沙熱、軍團病（退伍軍人症）、軍團病（皮蒂亞克熱）、利什曼病、萊姆病、淋巴絲蟲病（象皮病）、淋巴細胞性脈絡叢腦膜炎、癘疾、瑪律堡出血熱、麻疹、類鼻疽病（惠氏病）、腦膜炎、腦膜炎球菌病、後殖吸蟲病、微孢子蟲病、傳染性軟疣、腮腺炎、小鼠斑疹傷寒（地方性斑疹傷寒）、支原體肺炎、足菌腫、蠅蛆病、新生兒結膜炎（新生兒眼病）、變異型克雅氏病（vCJD、nvCJD）、諾卡氏菌病、盤尾絲蟲病（河盲症）、副球孢子菌病（南美芽生菌病）、肺吸蟲病、巴斯德氏菌病、頭蝨、體虱、陰虱、盆腔炎、百日咳、鼠疫、肺炎球菌感染、肺孢子蟲肺炎、肺炎、脊髓灰質炎、普氏菌感染、原發性阿米巴腦膜腦炎、進行性多灶性白質腦病、鸚鵡熱、Q熱、狂犬病、鼠咬熱、呼吸道合胞病毒感染、鼻孢子蟲病、鼻病毒感染、立克次體感染、立克次體痘、裂谷熱、洛磯山斑疹熱、輪狀病毒感染、風疹、沙門氏菌病、SARS（嚴重急性呼吸綜合征）、疥瘡、血吸蟲病、敗血症、志賀氏菌病（Bacillary痢疾）、帶狀皰疹（帶狀皰疹）、天花（天花）、孢子絲菌、葡萄球菌食物中毒、感染金黃色葡萄球菌、蠕類圓線蟲病、梅毒、絛蟲病、破傷風、須癬（Barber癢）、頭皮癬、體癬、股癬、手癬、掌黑癬、足癬（香港腳）、

甲癬（灰指甲）、花斑癬、弓蛔蟲病（眼幼蟲移行症）、弓蛔蟲病（內臟幼蟲移行症）、弓形體病、旋毛蟲病、滴蟲病、鞭蟲病（鞭蟲感染）、肺結核、兔熱病、解脲脲原體感染、委內瑞拉馬腦炎、委內瑞拉出血熱、病毒性肺炎、西尼羅河熱、白毛結節病（白癬）、假結核耶爾森氏菌、耶爾森氏鼠疫桿菌腸道病、黃熱病、接合菌病。

【0164】本發明的細胞結合分子，更佳為抗體，對抗的病原菌株包括但不限於，鮑氏不動桿菌、以色列放線菌、放線菌和丙酸桿菌、布氏錐蟲、HIV（人免疫缺陷病毒病毒）、溶組織內阿米巴、無形體屬、炭疽芽孢桿菌、溶血弧菌、胡寧病毒、蛔蟲屬、麯黴屬、星狀病毒科、巴貝蟲屬、蠟狀芽孢桿菌、多種細菌、擬桿菌屬、大腸桿菌、蛔蟲屬、BK病毒、結節菌 、人芽囊原蟲、皮炎芽生菌、馬丘波病毒、疏螺旋體屬、肉毒梭菌、清風藤屬、布魯氏菌屬、通常為洋蔥伯克霍爾德菌和其他伯克霍爾德氏菌種、潰瘍分枝桿菌、杯狀病毒科、彎曲桿菌屬、通常為白色假絲酵母和其他假絲酵母屬、漢賽巴爾通體、A群鏈球菌和葡萄球菌、克氏錐蟲、杜克雷嗜血桿菌、VZV、沙眼衣原體、科羅拉多蜱熱病毒、鼻病毒、冠狀病毒、CJD朊病毒、克裡米亞-剛果出血熱病毒、新型隱球菌、隱孢子蟲屬、巴西鉤蟲、多種寄生蟲、環孢子蟲、帶狀絛蟲、巨細胞病毒、登革熱病毒（DEN-1、DEN-2、DEN-3和DEN-4）-黃病毒、脆弱雙歧桿菌、白喉棒狀桿菌、裂頭絛蟲、麥迪那龍線蟲、埃博拉病毒、棘球絛蟲屬、埃立克體腸球菌屬、腸道病毒屬、普氏立克次體、細小病毒B19、人皰疹病毒6和人皰疹病毒7、布氏薑片蟲、肝片吸蟲和巨大片吸蟲、FFI朊病毒、絲蟲目超家族、產氣莢膜梭菌、梭桿菌屬、其他梭狀芽孢桿菌、白地黴、GSS朊病毒、腸道賈第蟲、伯克霍爾德氏菌、刺孢小芽孢桿菌和革

蘭氏假絲酵母、淋球菌、肉芽腫克雷伯氏菌、化膿性鏈球菌、無乳鏈球菌、流感嗜血桿菌、腸道病毒、主要是柯薩奇A病毒和腸道病毒71、無名病毒、幽門螺旋桿菌、大腸桿菌O157：H7、布尼亞病毒科、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒、戊型肝炎病毒、單純皰疹病毒1、單純皰疹病毒2、莢膜組織胞漿菌、十二指腸腺瘤和壺腹癌流感嗜血桿菌、人博卡病毒、埃裡希體、嗜吞噬細胞無嗜血桿菌、人偏肺病毒、查菲埃裡希體、人乳頭瘤病毒、人副流感病毒、微小膜殼絛蟲和縮小膜殼絛蟲、艾巴氏病毒、正粘病毒科家族、貝氏等孢球蟲、金格桿菌、肺炎克雷伯菌、克雷伯氏菌、嗜肺軍團菌、嗜肺軍團菌、嗜肺軍團菌、利什曼原蟲屬、麻風分枝桿菌和結核分枝桿菌、鉤端螺旋體屬、單核細胞增多性李斯特氏菌、伯氏疏螺旋體和其他疏螺旋體屬物種、班氏旋毛蟲和馬來絲蟲、淋巴細胞脈絡叢腦膜炎病毒（LCMV）癟原蟲屬、瑪律堡病毒、麻疹病毒、類鼻疽伯克霍爾德氏菌、腦膜炎奈瑟氏球菌、橫川後殖吸蟲、小孢子蟲目門、傳染性軟疣病毒（MCV）、腮腺炎病毒、傷寒立克次氏體、肺炎支原體、多種細菌和真菌寄生雙翅蠅幼蟲、沙眼衣原體和淋病奈瑟菌、vCJD朊病毒、諾卡氏菌和其他諾卡氏菌屬、盤尾絲蟲屬、盤鮑擬亞科、副龍屬西馬尼和其他副屬 、巴斯德氏菌屬、頭蝨、人體虱、百日咳博多特氏菌鼠疫耶爾森氏菌、肺炎鏈球菌、肺炎球菌、脊髓灰質炎病毒、普雷沃氏菌屬、奈氏格氏桿菌、JC病毒、鸚鵡熱衣原體、伯氏考克斯體、狂犬病病毒、單鏈球菌和螺旋菌、呼吸道合胞病毒、鼻孢子菌、鼻病毒、立克次體屬、由小株立克次體、裂谷熱病毒、立克次體立克次體、輪狀病毒、風疹、沙門氏菌屬、SARS 冠狀病毒、人疥螨、血吸蟲屬、體細胞屬、志賀菌屬、水痘帶狀皰疹病毒、天花少校或天花小、申克孢子絲

菌、金黃色葡萄球菌屬、金黃色葡萄球菌、鏈球菌化膿、圓線蟲、梅毒螺旋體、絛蟲屬、破傷風、癬屬癬音鈾、癬屬、絮狀表皮癬菌、紅色毛癬菌、須毛癬菌、紅色毛癬菌、威尼克外瓶黴、毛癬菌屬屬、細胞死亡屬、弓箭毒或弓箭毒、剛地弓形蟲、旋毛蟲、陰道毛滴蟲、三丘裡三種、結核分枝桿菌、弗朗西拉圖拉菌、尿素和馬腦炎病毒、委內瑞拉馬腦炎病毒、霍亂弧菌、瓜納裡托病毒、西尼羅河病毒、beigelii絲孢、假結核耶爾森氏菌、小腸結腸炎耶爾森氏菌、黃熱病病毒、毛黴菌目階（毛黴菌病）和蟲黴目階（蟲黴屬真菌病）、毛黴菌目綠膿桿菌、彎曲桿菌（弧菌）、氣單胞菌、艾氏菌、耶爾森氏菌、志賀痢疾桿菌、志賀氏桿菌、志賀氏菌、沙門氏菌、傷寒沙門氏菌、雅司螺旋體、奮森氏螺旋體、伯氏疏螺旋體、細螺旋體、卡氏肺孢子蟲、流產布魯氏菌、布魯桿菌、布魯氏菌、支原體屬、普氏立克次體、恙蟲病立克次氏體、衣原體屬、致病性真菌（煙麴黴、白色念珠菌、莢膜組織胞漿菌）、原生動物（溶組織內阿米巴、Tenas毛滴蟲、Hominis毛滴蟲、甘比亞錐蟲、羅得西亞錐蟲、羅氏利什曼原蟲、熱帶利什曼原蟲、巴西利什曼原蟲、肺孢子蟲肺炎、間日瘧原蟲、惡性瘧原蟲、瘧原蟲瘧疾）或Helminiths（日本血吸蟲、曼氏血吸蟲、埃及血吸蟲和鉤蟲）。

【0165】本發明申請的偶聯物用作治療病毒性疾病，其中作為細胞結合配位體的其他抗體，包括但不限於靶向下列致病病毒抗原的抗體：痘病毒、皰疹病毒、腺病毒、小黃病毒、腸病毒、小核糖核酸病毒、細小病毒、呼腸病毒、逆轉錄病毒、流感病毒、副流感病毒、腮腺炎、麻疹、呼吸道合胞病毒、風疹、蟲媒病毒、彈狀病毒、沙門氏菌、非a/非b型肝炎病毒、鼻病毒、冠狀病毒、羅托病毒、致癌病毒、如HBV（肝細胞

癌）、人乳頭狀瘤病毒（宮頸癌、肛門癌）、卡波濟氏肉瘤相關的皰疹病毒（卡波濟氏肉瘤肉瘤）、人類皰疹病毒第四型（鼻咽癌、伯基特淋巴瘤、原發性中樞神經系統淋巴瘤）、瘤病毒（默克爾細胞癌）、SV40（猿猴病毒40）、HCV（肝細胞癌）、HTLV-1 （成人T細胞白血病/淋巴瘤）、免疫紊亂導致病毒、如人類免疫缺陷病毒（愛滋病）、中樞神經系統病毒、如JCV（進行性多灶性腦白質病）、丙型肝炎病毒（亞急性硬化性全腦炎）、LCV（淋巴細胞性脈絡叢腦膜炎）、亞博病毒腦炎、正粘病毒 （腦炎性腦炎）、RV（狂犬病）、長鼻病毒、皰疹病毒腦膜炎、拉姆齊亨特綜合征II型、脊髓灰質炎病毒（脊髓灰質炎病毒、後脊髓灰質炎綜合征）、HTLV-1（熱帶麻痹性麻痹））、巨細胞病毒（巨細胞病毒視網膜炎、HSV（皰疹性角膜炎）、心血管病毒、如CBV（心包炎，心肌炎）、呼吸系統/急性病毒性鼻內炎/病毒性肺炎、如愛潑斯坦-巴爾病毒（EBV感染/傳染性單核病）、巨細胞病毒、非典冠狀病毒（嚴重急性呼吸綜合征）或正黏液病毒、流感病毒a/b/c（流感/禽流感）、副粘病毒、人類副流感病毒、RSV（人類呼吸道合胞病毒）、hMPV；消化系統病毒（腮腺炎病毒、巨細胞病毒（巨細胞病毒食管炎）、腺病毒（腺病毒感染）、輪狀病毒、諾瓦克病毒、星狀病毒、冠狀病毒、乙型肝炎病毒、CBV、甲型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒、戊型肝炎病毒、HGV）；泌尿生殖病毒，如BK病毒，MuV（腮腺炎）。

【0166】 更進一步，本發明也包括用本發明中偶聯物和藥學上可接受的載劑，稀釋劑或輔料構成的組合物，以治療癌症、感染或自身免疫性疾病。治療癌症、感染和自身免疫性疾病的方法可以在體外，體內或離體實施。體外用途的實例包括用它處理細胞培養物，以殺死除了不表達靶抗

原的變異體以外的所有細胞；或者殺死表達不需要的抗原的變異體。離體使用的例子包括在進行移植（HSCT）之前對造血幹細胞（HSC）進行處理，以殺死患病或惡性腫瘤細胞。例如，在癌症治療中的自體移植之前或在自身免疫性疾病的治療中從骨髓中去除腫瘤細胞或淋巴細胞，或在移植之前為了防止移植物抗主體疾病從同種異體骨髓或組織中除去T細胞和其他淋巴細胞。這樣的臨床離體治療可以按如下步驟進行：從患者或其他個體收穫骨髓，然後在含有血清的培養基中約37 °C下孵育約30分鐘至約48小時，在該培養基中加入本發明的偶聯物，濃度範疇從約1pM至0.1mM。具體的藥物濃度和孵育時間應當由專業臨床醫師決定。孵育後，用含血清的培養基洗滌骨髓細胞，並按照已知的方法藉由靜脈注射給患者。若患者在骨髓採集和再輸注治療細胞之間，還接受其它治療（例如消融化療或全身輻射療程）的情況下，應使用標準醫療設備將處理後的骨髓細胞在液氮中冷凍儲存。

【0167】 製劑與應用

【0168】 本專利申請的偶聯物被配製成液體，或者適於凍乾的形態，凍乾後被重新製成液體製劑。液體配方或配製的凍乾粉末中的偶聯物，為配方的主要成分，占0.01%-99%的重量。一般而言，可在病人上施用，無高水準抗體聚集的液體製劑除了包含0.1g/L -300 g/L的偶聯物活性成分，還包括一種或多種多元醇（例如糖）、pH值為4.5至7.5的緩衝液、表面活性劑（如聚山梨酸20或80）、抗氧化劑（例如抗壞血酸和/或蛋氨酸）、強化劑（如甘露醇、山梨醇或氯化鈉）、螯合劑（如EDTA）、金屬錯合物（如鋅-蛋白錯合物）、可生物降解聚合物（如聚酯）、防腐劑（如苯甲醇）和/或游離胺基酸。

【0169】 用於製劑的合適緩衝液包括但不限於，有機酸鹽，例如檸檬酸、抗壞血酸、葡糖酸、碳酸、酒石酸、琥珀酸、乙酸或鄰苯二甲酸的鈉、鉀、銨或三羥乙基胺基鹽，胺基丁三醇鹽酸、硫酸或磷酸緩衝液。此外，胺基酸陽離子也可用作緩衝液。這些胺基酸包括但不限於，精氨酸、甘氨酸、甘氨醯甘氨酸和組氨酸。精氨酸緩衝液包括精氨酸乙酸鹽、精氨酸氯化物、精氨酸磷酸鹽、精氨酸硫酸鹽，精氨酸琥珀酸鹽等。在一個實施例中，精氨酸緩衝液是精氨酸乙酸鹽。組氨酸緩衝液的實例包括組氨酸氯化物-精氨酸氯化物、組氨酸乙酸鹽-精氨酸乙酸鹽、組氨酸磷酸鹽-精氨酸磷酸鹽、組氨酸硫酸鹽-精氨酸硫酸鹽、組氨酸琥珀酸鹽-精氨酸琥珀酸鹽等。緩衝液的pH是4.5至pH7.5，較佳約4.5至約6.5，更佳約5.0至約6.2。在一些實施例中，緩衝液中有機酸鹽的濃度為約10mM至約500mM。

【0170】 在製劑中可選地的“多元醇”是具有多個羥基的物質。多元醇可用作液體和凍乾製劑中的穩定輔料和/或等滲劑。多元醇可以保護生物藥物免受物理和化學降解。最好能被排除的共溶劑增加了蛋白質介面處溶劑的有效表面張力，能量最有利的結構構像是表面積最小的那些溶劑。多元醇包括糖（還原和非還原糖）、糖醇和糖酸。“還原糖”是指含有半縮醛基團的糖，它能夠還原金屬離子，或與蛋白質中的賴氨酸和其他胺基發生反應，“非還原糖”是指不具有還原糖性質的糖。還原糖的例子有果糖、甘露糖、麥芽糖、乳糖、阿拉伯糖、木糖、核糖、鼠李糖、半乳糖和葡萄糖。非還原糖包括蔗糖、海藻糖、山梨糖、松解糖和棉子糖。糖醇選自由下列組成之群組甘露醇、木糖醇、赤蘚糖醇、麥芽糖醇、乳糖醇、赤蘚糖醇、蘇糖醇、山梨醇和甘油。糖酸包括L-葡萄糖酸鹽及其金屬鹽。液

體配方或凍乾製劑中的多元醇含量，按重量計，為0.0%-20%。在配方中較佳濃度約為0.1%到15%的非還原糖，蔗糖或海藻糖，其中由於更好溶液穩定性，海藻糖更優。

【0171】 在製劑中可選的表面活性劑可選自由下列組成之群組聚山梨醇酯（聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯40、聚山梨醇酯65、聚山梨醇酯80、聚山梨醇酯81、聚山梨醇酯85等）；泊洛沙姆（如泊洛沙姆188、聚（環氧乙烷）-聚（環氧丙烷）、泊洛沙姆407或聚丙二醇-丙二醇等）；Triton；十二烷基硫酸鈉（SDS）；月桂基硫酸鈉；辛基糖苷鈉；十二烷基、肉荳蔻醯基、亞油基或硬脂基磺基甜菜鹼；十二烷基、肉荳蔻醯基、亞油基或 硬脂基肌氨酸；亞油酸、肉荳蔻基或十六烷基甜菜鹼；月桂醯胺基丙基、椰油醯胺丙基、亞油醯胺基丙基、肉荳蔻醯基丙基、棕櫚醯基丙基或異硬脂醯胺基丙基-甜菜鹼（例如月桂醯胺丙基）；肉荳蔻醯胺丙基、棕櫚醯丙基或異硬脂醯胺基丙基-二甲胺；甲基椰油醯基鈉或甲基油基牛磺酸二鈉；十二烷基甜菜鹼、十二烷基二甲基氧化胺、椰油醯胺丙基甜菜鹼和可哥兩性甘氨酸酯；MONAQUAT™系列（如異硬脂基乙基亞胺鎓乙基硫酸鹽）；聚乙二醇，聚丙二醇，乙二醇和丙二醇的共聚物（如Pluronic、PF68等）。較佳的表面活性劑是聚氧乙烯山梨糖醇脂肪酸酯，如聚山梨醇酯20、40、60 或80（Tween20、40、60 或80）。製劑中表面活性劑的濃度範疇，按照重量計，為0.0%至約2.0%。在某些特定實施例中，表面活性劑濃度為約0.01%至約0.2%。在一個實施例中，表面活性劑濃度為約0.02%。

【0172】 在製劑中可選的“防腐劑”是可以抑制細菌的化合物。防腐劑的實例包括十八烷基二甲基苄基氯化銨、六甲基氯化銨、苯紮氯銨（烷

基苄基二甲基氯化銨的混合物，其中烷基為長鏈烷基）和苄索氯銨。其他類型的防腐劑包括芳香醇如苯酚，丁基和苄基醇，對羥基苯甲酸烷基酯，如甲酯或丙酯，兒茶酚、間苯二酚、環己醇、3-戊醇和間甲酚。液體配方或凍乾粉末中的防腐劑含量，按照重量計，為0.0%-5.0%。在一個實施例中，所用防腐劑是苯甲醇。

【0173】 在製劑中作為填充物質或張力劑或滲透壓調節劑的游離胺基酸，選自由下列組成之群組但不限於精氨酸、胱氨酸、甘氨酸、賴氨酸、組氨酸、鳥氨酸、異亮氨酸、亮氨酸、丙氨酸、甘氨酸麩胺酸或天冬氨酸中的一種或多種。較佳鹼性胺基酸為精氨酸、賴氨酸和/或組氨酸。如果組成中包含組氨酸，它可以充當緩衝劑和游離胺基酸，但是當使用組氨酸緩衝液時，通常還要包含一個非組氨酸的游離胺基酸，如賴氨酸。胺基酸可以以D-和/或L-型存在，但L-型比較常見。胺基酸可以任何合適的鹽的形式存在，如精氨酸鹽酸鹽。液體配方或凍乾粉末中的胺基酸含量，以重量計，為0.0%-30%。

【0174】 可選地，製劑還包含甲硫氨酸，谷胱甘肽、半胱氨酸、胱氨酸或抗壞血酸作為抗氧化劑，在液體配方中濃度最多為約5mg/mL，在凍乾粉末中的含量，以重量計，為0.0%-5.0%；可選地，製劑包含金屬螯合劑，例如EDTA，EGTA等，在液體配方中濃度為約2mM，在凍乾粉末中的含量，以重量計，為0.0%-0.3%。

【0175】 最終的製劑可以用緩衝液調節劑（如酸，包括HCl、H_2SO_4、乙酸，H_3PO_4、檸檬酸等，或是鹼，如NaOH、KOH、NH_4OH、乙醇胺、二乙醇胺或三乙醇胺、磷酸鈉、磷酸鉀、檸檬酸三鈉、胺基丁三醇等）調節至較佳的pH值。製劑還應當被調節至“等滲”，即目標製劑具

有與人血基本相同的滲透壓。等滲製劑滲透壓通常為250至350mOsm。可以使用蒸氣壓或冰凍型滲透壓計量測等滲性。等滲劑選自由下列組成之群組甘露醇、山梨糖醇、乙酸鈉、氯化鉀、磷酸鈉、磷酸鉀、檸檬酸三鈉或NaCl。通常，緩衝鹽和等滲劑在製劑中含量最多為30%（重量）。

【0176】在液體或凍乾製劑中可能有用的其他輔料包括，例如，岩藻糖、纖維二糖、麥芽三糖、褪黑糖、辛酮糖、核糖、木糖醇、精氨酸、組氨酸、甘氨酸、丙氨酸、蛋氨酸、麩胺酸、賴氨酸、咪唑、甘氨酸、甘露糖基甘油酯、Triton X-100，Puloronic F-127，纖維素，環糊精，（2-羥丙基）-β-環糊精，右旋糖酐（10，40和/或70 kD），聚葡萄糖，麥芽糊精，無花果膠，明膠，羥丙基甲基，磷酸鈉，磷酸鉀，氯化鋅，鋅，氧化鋅，檸檬酸鈉，檸檬酸三鈉，氨丁三胺，銅，纖維粘連蛋白，肝素，人血清白蛋白，魚精蛋白，甘油、EDTA、間甲酚、苯甲醇、苯酚、多元醇，被還原的碳水化合物，其中一羰基被還原為一級或二級醇。

【0177】其它可以在本專利申請的液體製劑中使用的輔料還包括：例如調味劑、抗微生物劑、甜味劑、抗氧化劑、抗靜電劑、脂質如磷脂或脂肪酸脂、類固醇如膽固醇、蛋白質輔料如血清白蛋白（人血清白蛋白）、重組人白蛋白、明膠、酪蛋白、成鹽反離子如鈉等。這些和另外已知的適用于本發明製劑的藥物輔料和/或添加劑為業內公知，如在由美國醫藥協會羅威（Rowe）等人編著的第四版《藥用輔料手冊》（The Handbook of Pharmaceutical Excipients）中所列；以及由威爾金斯出版公司出版（2005），熱納羅（Gennaro）等人編著的第21版《雷明頓：藥學科學與實踐》（Remington： the Science and Practice of Pharmacy）中所列。

【0178】 容納本專利申請中的偶聯物製劑的藥物容器或器具有：小瓶，瓶，預填充注射器，預填充或自動注射器。液體配方可以在硼矽酸鹽或鈉鈣玻璃小瓶中冷凍乾燥，或滾筒乾燥，成餅或粉末形式。固體粉末也可以藉由有效的噴霧乾燥製備，然後用小瓶或藥物容器包裝，用於儲存和配送。

【0179】 在更進一步的實施例中，本發明提供了製劑的製備方法，包括以下步驟：（a）凍乾包含偶聯物，輔料和緩衝體系的液體；（b）在介質中複溶步驟（a）中的凍乾混合物，以使得複溶的製劑穩定。步驟（a）重的液體可進一步包含穩定劑和一種或多種輔料，選自由下列組成之群組前述填充劑、鹽、表面活性劑和防腐劑。作為複溶介質，可以使用幾種經稀釋的有機酸或水，即無菌水、抑菌性注射用水（BWFI）或。複溶介質可選用水，如無菌水，抑菌性注射用水（BWFI）、乙酸、丙酸、琥珀酸、氯化鈉、氯化鎂、氯化鈉的酸性溶液、氯化鎂的酸性溶液或精氨酸的酸性溶液，其含量為約10至約250mM。

【0180】 本專利申請的偶聯物的液體製劑應具有各種設定的特徵。需要考慮的主要問題之一是其穩定性，因為蛋白質/抗體在製造和儲存期間，常會形成可溶及不溶的聚集體。此外，溶液中會發生各種化學反應（脫醯胺、氧化、剪切、異構化等），導致降解產物水準增加和/或生物活性喪失。液體或凍乾製劑中的偶聯物最好應在25 °C下，具有超過6個月的貨架期。更優的液體或凍乾製劑中的偶聯物應在25 °C下具有超過12個月的貨架期。最為較佳的液體製劑應該在2-8 °C下具有約24至36個月的貨架期，凍乾粉末在2-8 °C下，應該具有長達約60個月的貨架期。液體製劑和凍乾製劑應該具有在-20 °C或-70 °C下至少兩年貨架期。

【0181】在一些實施例中，製劑在冷凍（例如-20℃或-70℃）和融化之後是穩定的，例如在1、2或3個冷凍和融化迴圈之後。可以用不同的方式定性和/或定量地評估穩定性，包括評估藥物/抗體（蛋白質）的比和聚集體的形成（例如，使用UV，尺寸排阻層析法，藉由量測濁度和/或藉由目測）；藉由使用陽離子交換層析，圖像毛細管等電聚焦（icIEF）或毛細管區帶電泳評估電荷異質性；胺基末端或羧基末端序列分析；質譜分析、基質輔助鐳射解吸電離/飛行時間質譜（MALDI / TOF MS）、HPLC-MS / MS 或SDS-PAGE分析以比較還原抗體和完整抗體；肽圖分析（例如胰蛋白酶或LYS-C）；評估抗體的生物學活性或抗原結合功能。不穩定可能由於以下一種或多種原因：聚集，脫醯胺作用（例如Asn脫醯胺作用），氧化作用（例如Met氧化作用），異構化作用（例如Asp異構化作用），剪切/水解/斷裂作用（例如鉸鏈區斷裂），琥珀醯亞胺形成，未成對半胱氨酸，N末端延伸，C末端加工，糖基化差異等。

【0182】穩定的偶聯物應當在藥物製劑中“保持其生物學活性”，例如，如果偶聯物的生物活性在給定時間內，例如24個月，按照抗原結合測定和/或體外細胞毒性測定的方法，生物活性可以保持在相差20%，較佳10%以內（在測定誤差內）。

【0183】對於臨床體內使用，本發明的偶聯物將以溶液或凍乾固體的形式提供，可以重新溶解在無菌水中以用於注射。偶聯物投予方式的實例如下： 每天一次，每週一次，每兩週一次，每三週一次，每次四周一次或每月一次，共8～54周，靜脈推注。在50至1000 mL生理鹽水中投予，任選地可向其中添加人血清白蛋白（例如0.5至1mL人血清白蛋白濃縮溶液，100mg / mL）。每週的劑量約為50 μg至20 mg / kg體重，靜脈

投予（每次注射10 μg至200 mg / kg）。治療後4～54周，患者可能會接受第二個療程。關於投予方式，輔料，稀釋劑，劑量，時間等的具體臨床方案可以由熟練的臨床醫生確定。

【0184】 用體內或體外的方法殺死選定的細胞群體，進行治療的醫學病症包括任何類型的癌症的惡性腫瘤，自身免疫性疾病，移植排斥和感染（病毒，細菌或寄生蟲）。

【0185】 實現所需生物學效應所需的偶聯物的量將取決於許多因素，包括偶聯物的化學特性、效力和生物利用度、疾病類型、患者所屬的人種、屬於患者的疾病狀態、投予路徑、這些因素都決定著所需劑量、投予方式和投予方案。

【0186】 一般而言，本發明的偶聯物以0.1至10%w / v偶聯物含量的生理緩衝液的形式，供腸胃外施用。典型劑量範疇為1 μg/kg至0.1 g/kg體重，每天、每週、每兩周、每三周或每月一次，較佳的劑量範疇是人體等效劑量0.01 mg/kg至25mg/kg體重，每週、每兩周、每三周或每月一次。藥物的較佳劑量可能取決於下列變數，如疾病或病症的進展的類型和程度，特定患者的總體健康狀況，所選化合物的相對生物學功效，藥物的製劑，投予方式（靜脈內，肌肉內或其他），結合物藉由所選遞送路徑的藥代動力學特性，投予速度（推注或連續輸注）和投予方案（在給定時間內重複次數）。

【0187】 經由本發明的偶聯物也能夠以單位劑型投予，其中術語“單位劑量”是指能夠施用于患者並且易於處理和包裝的單劑量，如下所述，可以是保持物理和化學穩定單位劑量，可以是具有活性的偶聯物或者藥學上可接受的組合物。因此，典型的每日/每週/每兩周/每月的總劑量範

疇是0.01至100mg / kg體重。作為一般指導，人類的單位劑量範疇為1mg至3000mg，每天或每週，每兩周，每三周或每月一次。較佳地，單位劑量範疇是1至500mg，每月一次至四次，甚至更佳地，1mg至100mg每兩週一次，每兩週一次或每三週一次。藉由與一種或多種藥學上可接受的輔料混合，可以將本發明提供的偶聯物配製成醫藥組合物。這樣的單位劑量組合物可以藉由口服使用，特別是以片劑，簡單膠囊或軟膠囊的形式；或鼻內投予，特別如散劑，滴鼻劑或氣霧劑形式；或在皮膚上使用，例如局部使用藥膏、乳霜、乳液、凝膠或噴霧劑，或藉由透皮貼劑。所述組合物可以方便地以單位劑量形式投予，並且可以藉由藥學領域公知的任何方法製備，例如，*Remington*中所記載：*The Science and Practice of Pharmacy*，21th ed.；Lippincott Williams & Wilkins： Philadelphia，PA，2005。

【0188】所述製劑包括醫藥組合物，其中本發明的化合物配製用於口服或腸外投予。對於口服投予，片劑、丸劑、粉末、膠囊、片劑等可含有一種或多種以下成分或類似性質的化合物：粘合劑如微晶纖維素或黃著膠，稀釋劑如澱粉或乳糖，崩解劑如澱粉和纖維素衍生物，潤滑劑如硬脂酸鎂，助流劑如膠體二氧化矽，甜味劑如蔗糖或糖精，調味劑如薄荷或水楊酸甲酯。膠囊可以是硬膠囊或軟膠囊的形式，其通常由明膠混合物，任選地可與增塑劑混合，以及澱粉膠囊製成。此外，投予劑型也包含改變其物理形式的各種其他材料，例如糖、蟲膠或腸溶劑塗層。其他口服劑型的糖漿或丹藥可能含有甜味劑、防腐劑、染料、著色劑和調味劑。此外，活性化合物可以製成快速溶解、改性釋放或緩釋製劑，其中緩釋製劑較佳為雙峰型。較佳的片劑含有任何組合的乳糖、玉米澱粉、矽酸鎂、交聯羧甲

基纖維素鈉、聚維酮、硬脂酸鎂或滑石。

【0189】 用於非腸道投予的液體製劑包括無菌水溶液或非水溶液、懸浮液和乳劑的劑型。液體組合物可以包括粘合劑、緩衝劑、防腐劑、螯合劑、甜味劑、調味劑和著色劑等。非水性溶劑包括醇、丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄欖油，和有機酯如油酸乙酯。水性載劑包括醇和水的混合物、緩衝介質和鹽水。尤其是，生物相容的、可生物降解的丙交酯聚合物、丙交酯/乙交酯共聚物或聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物可以被用作輔料，控制活性化合物釋放。靜脈注射載劑可包括液體和營養補充劑、電解質補充劑，例如基於林格葡萄糖的補充劑等。其他可能有用的活性化合物的腸外遞送系統包括乙烯-乙酸乙烯酯共聚物顆粒、滲透幫浦、可植入輸注系統和脂質體。

【0190】 替代的投予方式包括吸入製劑，包括乾粉、氣霧劑或滴劑。它們可以是水溶液，含有如聚氧乙烯-9-脲基醚、甘膽酸酯和去氧膽酸酯，油狀溶液，以滴鼻液形式投予，或是鼻內施用的凝膠。用於口腔投予的製劑，包括錠劑或錠片，還可以含調味基料，如蔗糖或阿拉伯膠，以及其他輔料，如甘膽酸鹽。適合直腸投予的製劑較佳單位劑量栓劑，具有固體基載劑，如可哥脂，並且可以包括柳酸鹽。局部應用於皮膚的製劑較佳軟膏、乳膏、乳液、膏劑、凝膠、噴霧、氣霧劑或油的形式。可使用的載劑包括凡士林、羊毛脂、聚乙二醇、醇或它們的組合。適用于透皮投予的製劑可以是離散的貼片，可以是親脂性乳液或緩衝水溶液，溶解和/或分散在聚合物或粘合劑中。

【0191】 在另一個實施例中，包含治療有效量的如式（V），（VI），（VII）的偶聯物或本申請所述的任何偶聯物的醫藥組合物，可

以與其他治療劑同時施用，例如化學治療劑，放射療法，免疫治療劑，自身免疫疾病劑，抗感染劑或其他偶聯物，協同有效地治療或預防癌症，自身免疫性疾病或傳染性疾病。協同藥物或放射治療可以在施用偶聯物之前或之後施用，或者在施用本發明的偶聯物前或之後至少一小時、12小時、一天、一周、兩周、三周、一個月，或者是在數個月之前或之後。

【0192】協同劑較佳自以下藥物中的一種或幾種：根據請求項20所述的增效劑係選自下列藥物中的一種或幾種：阿巴西普，阿貝西比利，醋酸阿比特龍，Abraxane，對乙醯胺基酚/氫可酮，Acalabrutinib，Aducanumab，Adalimumab，ADXS31-142，ADXS-HER2，阿法替尼雙馬來酸酯，Aldesleukin，Alectinib，Alemtuzumab，Alitretinoin，ado-trastuzumab emtansine，安非他命/右旋苯丙胺，阿那曲唑，阿立呱唑，蒽環類藥物，阿立呱唑，阿紮那韋，阿妥唑單抗，阿托伐他汀，阿韋拉單抗，阿昔布西汀，Brentuximab vedotin，Brigatinib，Budesonide，Budesonide /福莫特羅，Buprenorphine，Cabazitaxel，Cabozantinib，Capmatinib，Capecitabine，carfilzomib，嵌合抗原受體工程T（CAR-T）細胞，Celecoxib，Ceritinib，Cetuximab，克唑替尼，克比美替尼，科森蒂斯，克唑替尼，CTL019，達比加群，達布拉非尼，達卡巴嗪，達克珠單抗，達科替尼，達托黴素，達拉他珠單抗，達比波錫阿爾法，達魯那韋，達沙替尼，地尼洛芬，地諾單抗，Depakote，地蘭索拉唑，地塞呱甲酯，地塞米松，Dinutuximab，多西環素，度洛西汀，Duvelisib，Durvalumab，依洛珠單抗，恩曲他濱（Emtricitabine）/利匹韋林（Rilpivirine）/替諾福韋（Tenofovir），富馬酸地索普西（Disoproxil fumarate），恩曲他濱（Emtricitbine）/替諾福韋（tenofovir）/依非韋倫

（efavirenz），依諾肝素，恩沙替尼，恩紮魯胺，依泊汀阿爾法，厄洛替尼，埃索美拉唑，依佐匹克隆，依那西普，依維莫司，依西美坦，依維莫司，艾塞那肽ER，依澤替米貝，依澤替米貝/辛伐他汀，非諾貝特，非格拉斯汀，芬戈利莫德，丙酸氟替卡松，氟替卡松/沙美特羅，Fulvestrant，Gazyva，吉非替尼，Glatiramer，醋酸高斯瑞林，伊克替尼，伊馬替尼，伊布替尼，伊布替尼，依德利西布，異環磷醯胺，英夫利昔單抗，咪喹莫特，ImmuCyst，Immuno BCG，伊尼帕裡、阿斯巴肽胰島素、地塞米爾胰島素、甘精胰島素、利斯普洛胰島素、α-干擾素、α-1b干擾素、α-2a干擾素、α-2b干擾素、β-干擾素、β-1a干擾素、β-1b干擾素、γ-1a干擾素、拉帕蒂尼、伊普利單抗、異丙托品溴銨/沙丁胺醇、異唑MIB、卡努馬、醋酸蘭諾肽、利奈多明，利奈醯胺，甲磺酸利奈替尼，來曲唑，左旋甲狀腺素，左旋甲狀腺素，利多卡因，利奈唑胺，利拉魯肽，利地塞米松，LN-144氯雷替尼，美金剛，甲基六氫吡啶酮，美托洛爾，Mekinist，美西他濱/利吡韋林/替諾福韋，莫達非尼，莫米松，Mycidac-C，尼西妥單抗，Neratinib，尼洛替尼，尼拉帕利布，尼古拉單抗，Ofatumumab，奧比妥珠單抗，奧拉帕尼，奧美沙坦，奧美沙坦/氫氯噻嗪，奧馬珠單抗，Omega-3脂肪酸乙酯，Oncorine，Oseltamivir，Osimertinib，羥考酮，Palbociclib，帕利珠單抗，帕尼單抗，Panobinostat，帕唑帕尼，Pembrolizumab，PD-1抗體，PD-L1抗體，培美曲塞，帕妥珠單抗，肺炎球菌結合疫苗，泊馬利度胺，普瑞巴林，ProscaVax，普萘洛爾，喹硫平，雷貝拉唑，普魯巴新223氯化鐳，雷洛昔芬，雷洛昔韋，雷莫昔單抗，雷珠單抗，雷戈非尼，利妥昔單抗，利伐沙班，羅米地辛，瑞舒伐他汀，盧梭替尼磷酸鹽，沙丁胺醇，

Savolitinib，Semaglutide，Sevelamer，西地那非，Siltuximab，Sipuleucel-T，西他列汀，西他列汀/二甲雙胍，Solifenacin，Solanezumab，Sonidegib，索拉非尼，舒尼替尼，Tacrolimus，他克莫司（Tacrimus，他達拉非（Tadalafil），他莫昔芬（Tamoxifen），他非拉（Tafinlar），Talimogene laherparepvec，他拉唑帕尼（Talazoparib），特拉瑞韋（Telaprevir），他拉唑帕尼（Talazoparib），替莫唑胺（Temozolomide），替西羅莫司（Temsirolimus），替諾福韋（Tenofovir）/恩曲他濱（emtricitabine），富馬酸替諾福韋地索普西（Tenofovir disoproxil fumarate），睪酮凝膠（Testosterone gel），沙利度胺（Thalidomide），TICE BCG，碘托溴銨，替沙吉林，托瑞米芬，曲美替尼，曲妥珠單抗，曲貝汀（Ecteinascidin 743），曲美替尼，曲美單抗，三氟吡啶/替吡西酯，維甲酸，Uro-BCG，Ustekinumab，Valsartan，Veliparib，Vandetanib，Vemurafenib，Venetoclax，Vorinostat，Ziv-aflibercept，Zostavax及其類似物，衍生物，藥學上可接受的鹽，載劑，稀釋劑或輔料，或其組合。

【0193】本專利申請中用於偶聯的藥物/細胞毒性劑可以是本專利中描述的任何藥物/細胞毒性劑的類似物和/或衍生物。藥物/細胞毒性劑領域的技術人員將容易理解，本文所述的每種藥物/細胞毒性劑都可以以一定的方式被修飾，使所得化合物仍保留原始化合物的特異性和/或活性。技術人員還將理解，可以使用許多這些類似物或衍生物來代替本文所述的藥物類似物。因此，本發明的藥物/細胞毒性劑也包括這些類似物和衍生物。

【0194】另一態樣，本發明的偶聯物和工藝可以應該熟習此項技術者眾所周知的許多方式實現。例如偶聯物中使用的喜樹鹼類似物可以應用或採用下文中的合成方法，或如熟習此項技術者所瞭解的其它調整的技術方案。對熟習此項技術者而言，適當的修飾和取代是顯而易見的，且眾所周知的，或易於從科學文獻中獲得的。特別地，例如，這些方法是可以從R.C.Larock，Comprehensive Organic Transformations，2nd Edition，Wiley-VCH Publishers，1999得到。

【0195】在下文所述的反應中，可能需要保護最終產物中所需的反應性官能團，例如羥基，胺基，亞胺基，硫代或羧基，以避免它們參與反應。可以根據標準操作規程，使用習知保護基團，例如P.G.Wuts和T.W.Greene，Greene's Protective groups in Organic Synthesis，Wiley Interscience第四版（2006）中所述。一些反應可以在鹼，酸或合適的溶劑存在下進行。對該反應中使用的鹼，酸和溶劑的性質沒有特別的限制，並且在這種類型的反應中習知使用的任何鹼，酸或溶劑，亦可在此同等地使用，只要它對分子其他部分沒有不利影響。反應可以在很寬的溫度範疇內進行。通常，吾人發現在-80℃至150℃（更佳為約室溫至100℃）的溫度下進行反應是方便的。反應所需的時間也可以在較大範疇內變化，這取決於許多因素，特別是反應溫度和試劑的性質。但是，如果反應在上述較佳條件下進行，則3小時至20小時的時間通常就足夠了。

【0196】反應後處理可以藉由習知方法進行。比如，可以藉由從反應混合物中蒸餾出溶劑後得到反應產物，或者如果需要，在從反應混合物中蒸餾出溶劑後，將殘餘物倒入水中，然後用與水不混溶的有機溶劑萃取，再從中蒸餾出溶劑。另外，如果需要，可以使用眾所周知的技術進一

步純化產物，例如重結晶，再沉澱或各種層析技術，特別是柱層析或製備型薄層層析。

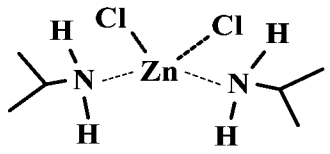
【0197】 本發明的工藝過程可以用以下實施例進一步說明，但本申請不受限於以下實施例中的描述。前文和以下實施例中引用的所有文獻均以其全部內容引做參考。

【0198】 **實施例**

【0199】 下文的實施例進一步描述本發明，但這些實施例無意于限制本發明的範疇。以下示例中的細胞株除非另有說明，根據美國典型培養物保藏中心（ATCC）或德國Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH（DMSZ）或中國科學院上海細胞培養所指定的條件進行培養。除非另有說明，細胞培養試劑來自Invitrogen Corp.。所有無水溶劑都藉由商業路徑獲得，並在氮氣下儲存在Sure-Seal瓶中。PEG化合物購自中國嘉興的BiomatrikInc。一些化合物，當未明確來源時，由中國境內CRO公司（例如藥明康得，皓元生物，瑞博製藥）提供。實驗動物藉由GemPharmatech. Co.，Ltd，Najing，China和 Shanghai SLAC Laboratory Animal Co.，Ltd.，Shanghai，China，採購自國家遺傳工程小鼠資源庫。T-DM1藉由中國香港的一家藥房從羅氏公司購買。所有其他試劑和溶劑均以市售最高等級購買，無需進一步純化即使用。用Varain PreStar HPLC進行製備HPLC單離。HPLC分析在Agilent 1260上進行。質譜資料來自配備有Waters Acquity UPLC單離模組和Acquity TUV檢測器的Waters Xevo QTOF質譜儀。NMR光譜分析在浙江理工大學化學系WNMR-I 400 MHz儀器上進行。化學位移（δ）以百萬分率（ppm）報告，以四甲基矽烷0.00ppm作基準，偶合常數（J）以Hz報

告。C，H和/或N的元素分析由浙江理工大學化學系提供，在Elementar UNICUBE上進行。在Agilent ICPOES 730 ICP-MS上進行金屬原子的定量分析。

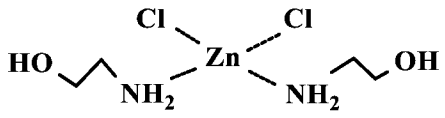
【0200】 實施例 1. 丙-2-胺氯化鋅錯合物（**Z-01**）的合成



Z-01

將氯化鋅（6.0 g，44.03 mmol）溶解在50 mL甲醇中並在冰水浴中冷卻至約5 ℃。將丙-2-胺（10.4 g，176.11 mmol）溶解在60 mL甲醇中，然後滴加進氯化鋅的甲醇溶液，同時保持溶液溫度低於5 ℃。在胺溶液滴加過程中，緩慢出現白色固體沉澱。滴加完成後，將溶液自然升溫至室溫並緩慢攪拌隔夜，產生更多的白色固體沉澱。將200mL乙酸乙酯加入到混合物中，並將混合物攪拌10分鐘。將得到的白色固體過濾，用甲醇洗滌，之後用真空幫浦乾燥，得到8.9g 鋅丙烷-2-胺氯化錯合物，為灰白色固體，79.4%收率。^{1}HNMR （400MHz，DMSO-d6）： δ = 3.61 （s，4H），3.12-3.06 （m，2H），1.12 （d，J = 6.3Hz，12H）。元素分析，計算值： C，28.32；H，7.13；N，11.01；實測值： C，28.08；H，7.10；N，11.20。

【0201】 實施例 2. 乙醇胺氯化鋅錯合物（Z-02）的合成



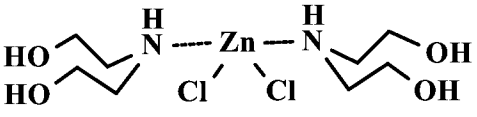
Z-02

實驗步驟同實施例1，將氯化鋅（6.0g，44.03mmol）和乙醇胺（10.8g，176.11mmol）作為起始物，得到8.2g氯化乙醇胺鋅錯合物，為灰白色固體，72.6% 收率。^{1}H NMR （400 MHz，DMSO） δ 3.77 （s，2H），3.50 （t，J = 5.6 Hz，2H），2.69 （t，J = 5.7 Hz，2H）. 元素

分析，計算值： C，18.59；H，5.46；N，10.84；實測值： C，18.25；H，5.02；N，10.30。

【0202】 實施例 3. 二乙醇胺氯化鋅錯合物（Z-03）的合成

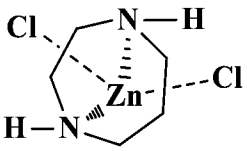
（**Z-03**）



Z-03

實驗步驟同實施例1，以氯化鋅（6.0g，44.03mmol）和二乙醇胺（18.5g，176.11mmol）為起始物，得到12.2g二乙醇胺氯化鋅錯合物，為灰白色固體，80.4%收率。^{1}H NMR （400 MHz，DMSO） δ 4.60（s，2H），3.59 （m，8H），3.35 （m，4H），2.72 （s，8H）。元素分析，計算值： C，27.73；H，6.40；N，8.08；實測值： C，27.25；H，6.05；N，7.80。

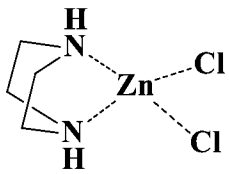
【0203】 實施例 4. 高呱嗪氯化鋅配合物（**Z-04**）的合成



Z-04

實驗步驟與實施例1相同，將氯化鋅（6.0 g，44.03 mmol）和呱嗪（15.2 g，176.11 mmol）作為起始物，得到9.2 g氯化高呱嗪鋅錯合物，為灰白色固體，73.6% 收率。^{1}H NMR （400 MHz，DMSO） δ 4.34（s，2H），3.01 – 2.85 （m，8H），1.87 – 1.75 （m，2H）. 元素分析，計算值： N，11.85；實測值： N，11.50。

【0204】 實施例 5.呱嗪氯化鋅錯合物（**Z-05**）的合成

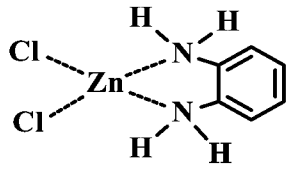


Z-05

步驟同實施例1，以氯化鋅（6.0 g，44.03 mmol）和呱嗪（15.2 g，

176.11 mmol）為起始物，得到7.6 g呱嗪氯化鋅錯合物，為灰白色固體，收率94.0% 。^{1}H NMR （400 MHz，DMSO） δ 2.73 （s，8H）。元素分析，計算值： C，21.60；H，4.53；N，12.59；實測值： C，21.10；H，4.69；N，12.30。

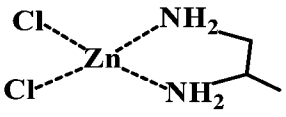
【0205】 實施例 6. 鄰苯二胺氯化鋅錯合物（**Z-06**）的合成



Z-06

步驟與實施例1相同，將氯化鋅（6.0 g，44.03 mmol）和鄰苯二胺（19.1 g，176.11 mmol）作為起始物，得到9.5 g鄰苯二胺氯化鋅錯合物，為灰白色固體，88.3%收率。^{1}HNMR （400MHz，DMSO-d6）： δ= 6.55-6.51 （m，2H），6.43-6.39 （m，2H），4.43 （s，4H）. 元素分析，計算值： C，29.48；H，3.30；N，11.46；實測值： C，29.70；H，3.63；N，11.30。

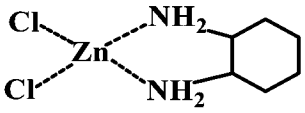
【0206】 實施例 7. 丙二胺氯化鋅錯合物（**Z-07**）的合成



Z-07

步驟同實施例1，將氯化鋅（6.0g，44.03mmol）和丙二胺（13.0g，176.11mmol）作為起始物，得到8.1g丙二胺氯化鋅錯合物，為灰白色固體，87.4%收率 。^{1}H NMR （400 MHz，DMSO） δ 3.93 （s，2H），3.82 （s，2H），2.86 – 2.66 （m，2H），2.24 （s，1H），1.09 （d，J = 6.5 Hz，3H）。元素分析，$C_3H_{10}Cl_2N_2Zn$ （207.95）計算值： C，17.12；H，4.79；Cl，33.70；N，13.31；Zn，31.07。

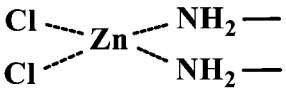
【0207】 實施例 8. 1，2-環己烷二胺氯化鋅錯合物（**Z-08**）的合成



Z-08

步驟同實施例1，將氯化鋅（6.0 g，44.03 mmol）和1,2-環己二胺（20.1 g，176.11 mmol）作為起始物，得到8.5 g 1,2-環己二胺氯化鋅錯合物，為灰白色固體，77.7%收率。^{1}H NMR （400 MHz，DMSO） δ 3.89 （s，4H），2.27 – 2.11 （m，2H），1.65 （d，J = 9.9 Hz，2H），1.59 – 1.45 （m，2H），1.32-1.26 （m，2H），1.19-1.14 （m，2H）。元素分析，計算值 $C_6H_{14}Cl_2N_2Zn$ （247.98）： N，11.18；Zn，26.10，實測值N，10.88；Zn，25.95。

【0208】 實施例 9.甲胺氯化鋅錯合物（**Z-09**）的合成



Z-09

步驟同實施例1，將氯化鋅（6.0g，44.03mmol）和甲胺鹽酸鹽（20.1g，176.11mmol）作為起始物，得到9.5g甲胺氯化鋅錯合物，為灰白色固體，94.0% 收率。^{1}H NMR （400 MHz，DMSO） δ 7.71 （s，6H），2.37 （d，J = 3.6 Hz，6H）。元素分析，計算值 $C_2H_{10}Cl_2N_2Zn$ （195.95）： N，14.12；Zn，32.95，實測值N，13.96；Zn，32.82。

【0209】 實施例 10. 乙胺氯化鋅錯合物（**Z-10**）的合成

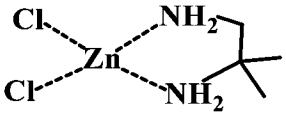


Z-10

步驟同實施例1，將氯化鋅（6.0 g，44.03 mmol）和乙胺溶液（19.9 g，176.11 mmol，40% w.t）作為起始物，得到8.3 g乙胺氯化鋅錯合物，為灰白色固體，84.0%收率。^{1}H NMR （400 MHz，DMSO） δ 3.76 – 3.50 （m，4H），2.66 （q，J = 7.2 Hz，4H），1.10 （t，J = 7.2 Hz，6H）。元素分析，$C_4H_{14}Cl_2N_2Zn$ （223.98）計算值： N，12.37；Zn，

28.87，實測值N，12.08；Zn，28.72。

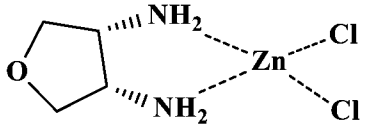
【0210】 實施例 11. 2-甲基丙烷-1,2-二胺氯化鋅錯合物（**Z-11**）的合成



Z-11

步驟與實施例1相同，將氯化鋅（6.0 g，44.03 mmol）和2-甲基丙烷-1,2-二胺（15.5 g，176.11 mmol）作為起始物，得到7.8 g 2-甲基丙烷-1,2-二胺氯化鋅錯合物，為灰白色固體，收率79.6%。^{1}H NMR （400 MHz，DMSO）δ 4.02 （s，2H），3.78 （s，2H），2.43 （d，J = 5.6 Hz，2H），1.12 （s，6H）。元素分析，$C_4H_{12}Cl_2N_2Zn$ （221.97）計算值： N，12.48；Zn，28.80；實測值： N，12.35；Zn，28.58。

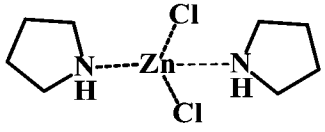
【0211】 實施例 12.（3R,4S）-四氫呋喃-3,4-二胺氯化鋅錯合物（**Z-12**）的合成



Z-12

步驟與實施例1相同，將氯化鋅（2.0 g，14.68 mmol）和（3R,4S）-四氫呋喃-3,4-二胺（5.1 g，29.35 mmol）作為起始物，得到3.8 g（3R,4S）-四氫呋喃-3,4-二胺氯化鋅錯合物，為灰白色固體，83.7%收率。

【0212】 實施例 13.吡咯啶氯化鋅錯合物（**Z-13**）的合成

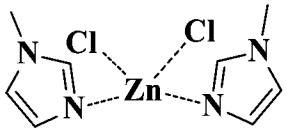


Z-13

步驟與實施例1相同，將氯化鋅（6.0 g，44.03 mmol）和吡咯啶（15.5 g，176.11 mmol）作為起始物，得到11.0 g吡咯啶氯化鋅錯合

物，為灰白色固體，90.4%收率。^{1}H NMR （400 MHz，DMSO） δ 4.46 （s，2H），2.85 （t，J = 6.2 Hz，8H），1.81 – 1.65 （m，8H）。元素分析，計算值 $C_8H_{18}Cl_2N_2Zn$ （276.01）： N，10.06；Zn，23.47. 實測值： N，9.88；Zn，23.59。

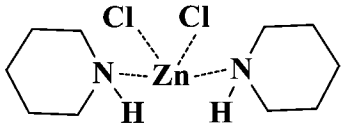
【0213】 實施例 14. N-甲基咪唑氯化鋅錯合物（**Z-14**）的合成



Z-14

步驟與實施例1相同，將氯化鋅（6.0 g，44.03 mmol）和N-甲基咪唑（14.5 g，176.11 mmol）作為起始物，得到10.0 g N-甲基咪唑氯化鋅錯合物，為灰白色固體，90.4%收率。^{1}H NMR （400 MHz，DMSO） δ 8.09 （s，2H），7.39 （d，J = 1.4 Hz，2H），7.06 （t，J = 1.3 Hz，2H），3.77 （s，6H）。元素分析，計算值 $C_8H_{12}Cl_2N_4Zn$ （297.97）： N，18.64；Zn，21.76；實測值： N，18.40；Zn，21.58。

【0214】 實施例 15.六氫吡啶氯化鋅錯合物（**Z-15**）的合成



Z-15

步驟與實施例1相同，將氯化鋅（6.0 g，44.03 mmol）和六氫吡啶（15.0 g，176.11 mmol）作為起始物，得到10.5 g六氫吡啶氯化鋅錯合物，為灰白色固體，收率77.8%。^{1}H NMR （400 MHz，DMSO） δ 4.00 （s，2H），2.80 （t，J = 4.6 Hz，8H），1.61 – 1.45 （m，12H）。元素分析，$C_{10}H_{22}Cl_2N_2Zn$ （304.04）計算值： N，9.14；Zn，21.33；實測值： N，8.83；Zn，21.50。

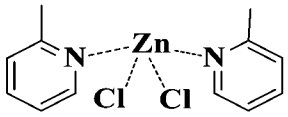
【0215】 實施例 16. 吡啶氯化鋅錯合物（**Z-16**）的合成



Z-16

步驟與實施例1相同，將氯化鋅（6.0 g，44.03 mmol）和吡啶（13.9 g，176.11 mmol）作為起始物，得到9.5 g吡啶氯化鋅錯合物，為灰白色固體的，73.2%收率。^{1}H NMR （400 MHz，DMSO） δ 8.61 （dt，J = 4.4，1.7 Hz，4H），7.94 – 7.86 （m，2H），7.49 （ddd，J = 7.6，4.4，1.5 Hz，4H）。元素分析： 計算值 $C_{10}H_{10}Cl_2N_2Zn$ （291.95）： N，9.51；Zn，22.20. 實測值： N，9.35，Zn，21.90。

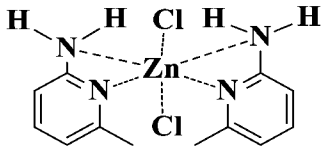
【0216】 實施例 17. 2-甲基吡啶氯化鋅錯合物（**Z-17**）的合成



Z-17

步驟與實施例1相同，將氯化鋅（6.0 g，44.03 mmol）和2-甲基吡啶（16.1 g，176.11 mmol）作為起始物，得到11.3 g 2-甲基吡啶氯化鋅錯合物，為灰白色固體，79.6%收率。^{1}H NMR （400 MHz，DMSO） δ 8.48 （ddd，J = 5.0，1.9，0.9 Hz，2H），7.72 （td，J = 7.7，1.9 Hz，2H），7.29 （d，J = 7.8 Hz，2H），7.22 （ddd，J = 7.7，5.4，1.2 Hz，2H），2.50 （s，6H）。元素分析： 計算值 $C_{12}H_{14}Cl_2N_2Zn$ （319.98）： N，8.69；Zn，20.27；實測值： N，8.35，Zn，20.12。

【0217】 實施例 18. 6-甲基吡啶-2-胺氯化鋅錯合物（**Z-18**）的合成

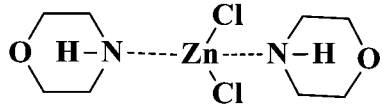


Z-18

步驟與實施例1相同，將氯化鋅（4.0 g，29.35 mmol）和6-甲基吡啶-2-胺（12.7 g，117.41 mmol）作為起始物，得到2.3 g 6-甲基吡啶-2-胺氯化鋅錯合物，為灰白色固體，32.0%收率。^{1}H NMR （400 MHz，

DMSO）δ 7.25 （dd，J = 8.2，7.2 Hz，1H），6.34 （d，J = 7.2 Hz，1H），6.23 （d，J = 8.2 Hz，1H），5.75 （s，2H），2.23 （s，3H）。元素分析： 計算值 $C_6H_8Cl_2N_2Zn$ （241.94）： N，11.46；Zn，26.75；實測值： N，11.25，Zn，26.48。

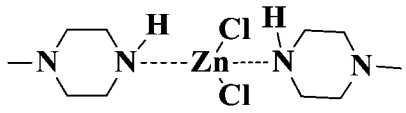
【0218】 實施例 19. 嗎啉氯化鋅錯合物（**Z-19**）的合成



Z-19

步驟與實施例1相同，將氯化鋅（6.0 g，44.03 mmol）和嗎啉（15.2 g，176.11 mmol）作為起始物，得到8.1 g嗎啉氯化鋅錯合物，為灰白色固體，收率為89.5%。^{1}H NMR （400 MHz，DMSO） δ 3.64 – 3.59 （m，8H），2.79 （dd，J = 5.6，4.0 Hz，8H）。化學結構： $C_8H_{18}Cl_2N_2O_2Zn$；精確分子量： 308.0037；元素分析： N，9.02；Zn，21.05，實測值： N，8.81；Zn，20.75。

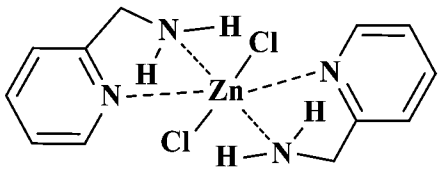
【0219】 實施例 20.甲基呱嗪氯化鋅錯合物（**Z-20**）的合成



Z-20

步驟與實施例1相同，將氯化鋅（4.0 g，29.35 mmol）和甲基呱嗪（11.8 g，117.41 mmol）作為起始物，得到8.1 g甲基呱嗪氯化鋅錯合物，為灰白色固體，收率為82.5%。^{1}H NMR （400 MHz，DMSO） δ 2.81 （t，J = 5.0 Hz，8H），2.37 （s，8H），2.15 （s，6H）。化學式： $C_{10}H_{24}Cl_2N_4Zn$；精確分子量： 334.0669；元素分析： N，16.64；Zn，19.42，實測值： N，16.80；Zn，18.98。

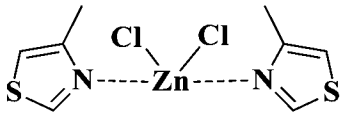
【0220】 實施例 21.吡啶-2-基甲烷胺氯化鋅錯合物（**Z-21**）的合成



Z-21

步驟與實施例1相同，將氯化鋅（4.0 g，29.35 mmol）和吡啶-2-基甲烷胺（12.7 g，117.41 mmol）作為起始物，得到6.2 g吡啶-2-基甲烷胺氯化鋅錯合物，為灰白色固體，收率為86.8%。^{1}H NMR （400 MHz，DMSO）δ 8.55 （dt，J = 5.2，1.4 Hz，1H），7.99 （td，J = 7.7，1.7 Hz，1H），7.58 – 7.53 （m，1H），7.51 （ddd，J = 7.5，5.2，1.2 Hz，1H），4.09 （s，2H），4.06 （s，2H）。化學式：$C_{12}H_{16}Cl_2N_4Zn$；精確分子量： 350.0043；元素分析： N，15.89；Zn，18.54，實測值： N，16.21；Zn，18.72。

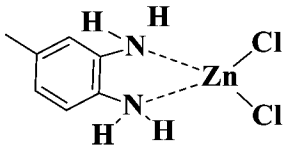
【0221】 實施例 22. 4-甲基噻唑氯化鋅錯合物（**Z-22**）的合成



Z-22

步驟與實施例1相同，將氯化鋅（4.0 g，29.35mmol）和4-甲基噻唑（11.6 g，117.41 mmol）作為起始物，得到6.5 g 4-甲基噻唑氯化鋅錯合物，為灰白色固體，66.2%收率。^{1}H NMR （400 MHz，DMSO）δ 9.02（d，J = 2.0 Hz，2H），7.33 （dt，J = 2.0，1.0 Hz，2H），2.43（d，J = 1.0 Hz，6H）。

【0222】 實施例 23. 4-甲苯-1,2-二胺氯化鋅錯合物（**Z-23**）的合成

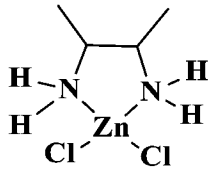


Z-23

步驟與實施例1相同，將氯化鋅（4.0 g，29.35 mmol）和4-甲苯-1,2-二胺（14.3 g，117.41 mmol）作為起始物，得到5.8 g 4-甲苯-1,2-二胺氯化鋅錯合物，為灰白色固體，77.0%收率。^{1}H NMR （400 MHz，

DMSO）δ 6.42 （d，J = 7.7 Hz，1H），6.36 （d，J = 2.0 Hz，1H），6.21 （dd，J = 7.7，2.0 Hz，1H），4.30 （s，4H），2.08 （s，3H）。化學式： $C_7H_{10}Cl_2N_2Zn$；精確分子量： 255.9513；元素分析： N，10.84；Zn，25.30；實測值： N，10.42；Zn，25.73。

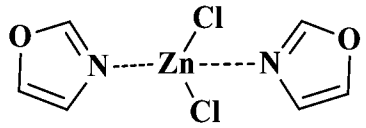
【0223】 實施例 24. 2,3-丁二胺氯化鋅錯合物的合成（**Z-24**）



Z-24

步驟與實施例1相同，將氯化鋅（800 mg，5.87 mmol）和2,3-丁二胺（939.2 mg，5.87 mmol）作為起始物，得到1.90 g 2,3-丁二胺氯化鋅錯合物，為灰白色固體，87.1%收率。^{1}H NMR （400 MHz，DMSO） δ 8.61 （s，5H），3.54-3.47 （m，2H），1.29 （d，J = 6.5 Hz，6H）。

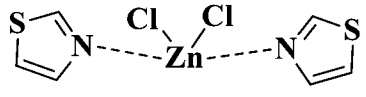
【0224】 實施例 25.惡唑氯化鋅錯合物（**Z-25**）的合成



Z-25

步驟與實施例1相同，將氯化鋅（4.0 g，29.35 mmol）和惡唑（8.1g，117.41mmol）作為起始物，得到7.8 g 惡唑氯化鋅錯合物，為灰白色固體，收率為96.8%。^{1}H NMR （400 MHz，DMSO） δ 8.41 （d，J = 0.9 Hz，2H），8.16 （t，J = 0.9 Hz，2H），7.27 （d，J = 0.9 Hz，2H）。化學式： $C_6H_6Cl_2N_2O_2Zn$；精確分子量： 271.9098；元素分析： N，10.21；Zn，23.83；實測值： N，9.91；Zn，23.70。

【0225】 實施例 26. 噻唑氯化鋅錯合物（**Z-26**）的合成

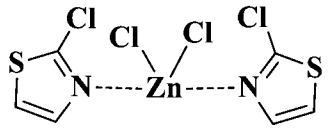


Z-26

步驟與實施例 1相同，將氯化鋅（4.0g，29.35mmol）和噻唑

（10.1g，117.41mmol）作為起始物，得到6.5g噻唑氯化鋅錯合物，為灰白色固體，72.3%收率。^{1}H NMR （400 MHz，DMSO） δ 9.17 （d，J = 1.9 Hz，2H），7.99 （d，J = 3.2 Hz，2H），7.82 （dd，J = 3.2，1.9 Hz，2H）。化學式： $C_6H_6Cl_2N_2S_2Zn$；精確分子量： 303.8641；元素分析： N，9.14；Zn，21.33；實測值： N，8.96；Zn，20.94。

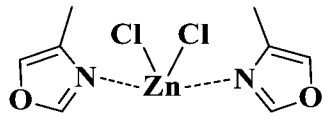
【0226】 實施例 27. 2-氯噻唑氯化鋅錯合物（**Z-27**）的合成



Z-27

步驟與實施例 1相同，將氯化鋅(4.0 g，29.35 mmol)和2-氯噻唑(14.0 g，117.41 mmol)作為起始物，得到7.0 g的2-氯噻唑氯化鋅錯合物，為灰白色固體，63.5%收率。^{1}H NMR （400 MHz，DMSO） δ 7.78 （d，J = 3.6 Hz，2H），7.72 （d，J = 3.6 Hz，2H）.化學式： $C_6H_4Cl_4N_2S_2Zn$；精確分子量： 371.7861；元素分析： N，7.46；Zn，17.41；實測值： N，7.11；Zn，17.72。

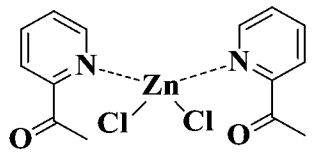
【0227】 實施例 28. 4-甲基噁唑氯化鋅錯合物（**Z-28**）的合成



Z-28

步驟與的實施例1相同，將氯化鋅(4.0 g，29.35 mmol)和4-甲基噁唑(9.8 g，117.41 mmol)作為起始物，得到6.0 g 4-甲基噁唑氯化鋅錯合物，為灰白色固體，67.5%收率。^{1}H NMR （400 MHz，DMSO） δ 8.26 （s，2H），7.82 （p，J = 1.2 Hz，2H），2.11 （d，J = 1.3 Hz，6H）。元素分析： 計算值 $C_8H_{10}Cl_2N_2O_2Zn$ （299.94）： N，9.34. 實測值： N，8.95。

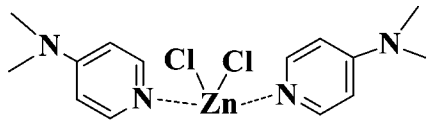
【0228】 實施例 29. 2-乙醯吡啶氯化鋅錯合物（**Z-29**）的合成



Z-29

步驟與的實施例1相同，將氯化鋅(4.0 g，29.35 mmol)和2-乙醯吡啶(14.2 g，117.41 mmol)作為起始物，得到9.0 g的2-乙醯吡啶氯化鋅錯合物，為灰白色固體，81.0%收率。^{1}H NMR （400 MHz，DMSO） δ 8.75（ddd，J = 4.7，1.7，1.0 Hz，1H），8.05 – 7.95 （m，2H），7.68（ddd，J = 7.3，4.7，1.5 Hz，1H），2.65 （s，3H）。

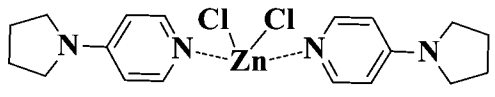
【0229】 實施例 30. 4-二甲基胺基吡啶氯化鋅錯合物（**Z-30**）的合成



Z-30

步驟與實施例1相同，將氯化鋅(4.0 g，29.35 mmol)和4-二甲基胺基吡啶(7.2 g，58.70 mmol)作為起始物，得到9.1g 4-二甲基胺基吡啶氯化鋅錯合物，為灰白色固體，81.5%收率。^{1}H NMR （400 MHz，DMSO-d6） δ 8.08 – 8.02 （m，4H），6.80 – 6.76 （m，4H），3.04 （s，12H）。元素分析： 計算值 $C_{14}H_{20}Cl_2N_4Zn$： Zn，16.80；N，14.71. 實測值： Zn，17.23；N，14.80。

【0230】 實施例 31. 4-(吡咯-1-基)吡啶氯化鋅錯合物（**Zn-31**）的合成

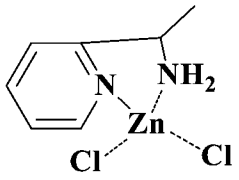


Zn-31

步驟與實施例1相同，將氯化鋅(4.0 g，29.35 mmol)和4-(吡咯-1-基)吡啶(7.2 g，58.70 mmol)，得到8.5g 4-(吡咯-1-基)吡啶氯化鋅錯合物，為灰白色固體，66.8%收率。

^{1}H NMR （400 MHz，DMSO-d6） δ 8.07 – 8.01 （m，4H），6.66 – 6.59 （m，4H），2.02 – 1.93 （m，8H）。

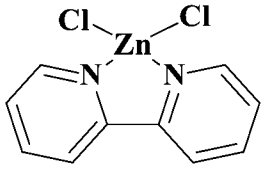
【0231】 實施例 32. 1-(吡啶-2-基)乙基-1-胺氯化鋅錯合物（**Zn-32**）的合成



Zn-32

步驟與實施例1相同，將氯化鋅(4.0 g，29.35 mmol)和1-(吡啶-2-基)乙基-1-胺(3.6 g，29.35 mmol)作為起始物，得到6.6g 1-(吡啶-2-基)乙基-1-胺氯化鋅錯合物，為灰白色固體，87.1%收率。1H NMR （400 MHz，DMSO-d6） δ 8.61 （dt，J = 5.0，1.4 Hz，1H），8.10 （td，J = 7.7，1.7 Hz，1H），7.67 （dt，J = 8.1，1.1 Hz，1H），7.62 （ddd，J = 7.5，5.2，1.2 Hz，1H），4.51 （s，2H），4.43 （q，J = 6.8 Hz，1H），1.49 （d，J = 6.7 Hz，3H）。元素分析：計算值 $C_7H_{10}Cl_2N_2Zn$： Zn，24.74；N，10.83。實測值： Zn，25.19；N，10.84。

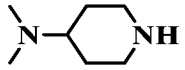
【0232】 實施例 33. 2,2'-聯吡啶氯化鋅錯合物（**Zn-33**）的合成



Z-33

將氯化鋅(4.0 g，29.35 mmol)和2,2'-聯吡啶(4.6 g，29.35 mmol)作為起始物，得到6.5g 2,2'-聯吡啶氯化鋅錯合物，為灰白色固體，75.2%收率。^{1}H NMR （400 MHz，DMSO-d6） δ 8.77 – 8.54 （m，4H），8.22 （t，J = 7.9 Hz，2H），7.76 – 7.63 （m，2H）。元素分析：計算值 $C_{10}H_8Cl_2N_2Zn$： Zn，21.86；N，9.57. 實測值： Zn，22.56；N，9.58。

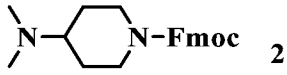
【0233】 實施例 34. N,N-二甲基六氫吡啶-4-胺（1）的合成



1

將 N-Boc六氫吡啶酮（10 g，0.05 mol）溶於甲醇（100 mL）中，加入二甲胺水溶液（25 mL，0.22 mol）和10%Pd/C（1 g），將反應燒瓶抽空並重新充滿氫氣，然後在室溫下攪拌。過濾後，將濾液濃縮並與二氯甲烷共沸濃縮三次（3×80 mL），在真空幫浦濃縮以除去所有二甲胺。將鹽酸 / 甲醇 （4 M，50 mL） 加入殘餘物中並在室溫攪拌30 分鐘。大量白色固體沉澱出來，過濾混合物得到白色固體1（9g，90%收率）。ESI-MS m/z： $[M + H]^+$ 計算值 $C_7H_{16}N_2$，129.13；實測值129.13。

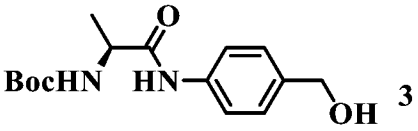
【0234】 實施例 35. （9H-芴-9-基）4-（二甲胺基）六氫吡啶-1-羧酸甲酯（**2**）的合成



2

將化合物13（2.0 g，9.9 mmol）溶於1,4-二惡烷和水（30 mL/50 mL）的混合溶液中，加入碳酸氫鈉（2.5 g，29.8 mmol），將混合物冷卻至 0℃。滴加9-芴基甲氧基碳醯氯（3.1 g，11.9 mmol）的1,4-二惡烷（10 mL）溶液。加入後，溫度逐漸升高至室溫。並將反應攪拌1小時。加入100 mL 1M 鹽酸，用乙酸乙酯（3 × 50 mL）洗滌混合物，水相用碳酸鈉調節至pH ~ 10，然後用二氯甲烷（3 × 50 mL）萃取。合併的有機相用水（50 mL）洗滌，經硫酸鈉乾燥，過濾，濃縮，並藉由柱層析法（甲醇/二氯甲烷）純化，得到化合物2（2.75 g，79%收率）。ESI-MS m/z： $[M + H]^+$ 計算值 $C_{22}H_{26}N_2O_2$，351.20；實測值351.20。

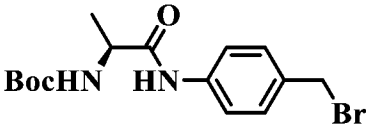
【0235】 實施例 36. （S）-第三丁基（1-（（4-（羥甲基）苯基）胺基）-1-側氧基丙烷-2-基）胺基甲酸酯（**3**）的合成



3

將對胺基苯甲醇（5.0 g，0.04 mol）和 Boc-L-丙氨酸（8.0 g，0.042 mol）溶于無水 四氫呋喃（100 mL），加入 2-乙氧基-1-乙氧基羰基-1,2-二氫喹啉（11 g，0.044 mol）並在室溫下攪拌隔夜。將反應混合物倒入水（300mL）中，用乙酸乙酯（3×100mL）萃取，合併的有機相用水（100mL）洗滌，硫酸鈉乾燥，過濾，濃縮。粗產物用乙酸乙酯/石油醚（1：3）打漿，過濾得到化合物3（9.8g，84%收率），為白色固體。ESI-MS m/z： [M + H] $^{+}$ 計算值 $C_{15}H_{22}N_2O_4$： 295.16；實測值 295.16。

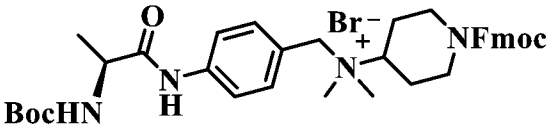
【0236】 實施例 37. （S）-第三丁基（1-（（4-（溴甲基）苯基）胺基）-1-側氧基丙烷-2-基）胺基甲酸酯（4）的合成



4

將化合物3（3.5 g，11.9 mmol）和四溴化碳（5.9 g，17.8 mmol）溶於二氯甲烷（80 mL）中，冷卻至約0℃，加入三苯膦（4.7 g，17.8 mmol）。將反應升溫至室溫，攪拌30分鐘後，加入矽膠20g，混勻，用旋轉蒸發儀濃縮，上樣到矽膠柱（矽膠100g），用石油醚/乙酸乙酯溶離，得到化合物**4**（ 2.6 克，62% 收率）。ESI-MS m/z： [M + H]$^{+}$ 計算值 $C_{15}H_{21}BrN_2O_3$： 357.07；實測值357.07。

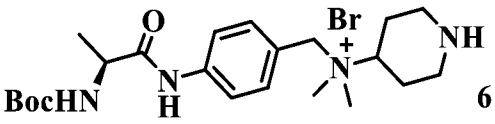
【0237】 實施例 38. （S）-1-（（（9H-芴-9-基）甲氧基）羰基）-N-（4-（2-（（第三丁氧基羰基）胺基）丙醯胺基）苄基）-N,N-二甲基六氫吡啶-4-溴化銨 （**5**） 的合成



5

將化合物4（2.3 g，6.4 mmol）和化合物2（2.7 g，7.7 mmol）溶解于無水四氫呋喃（50 mL）中，並在室溫下攪拌隔夜。在旋轉蒸發儀上除去大部分 四氫呋喃 後，將乙酸乙酯 （50 mL） 加入到殘餘物中。將所得漿液過濾，得到白色固體（4.5 g，100%收率）。ESI-MS m/z： M^+計算值 $C_{37}H_{47}N_4O_5$： 627.35；實測值627.35。

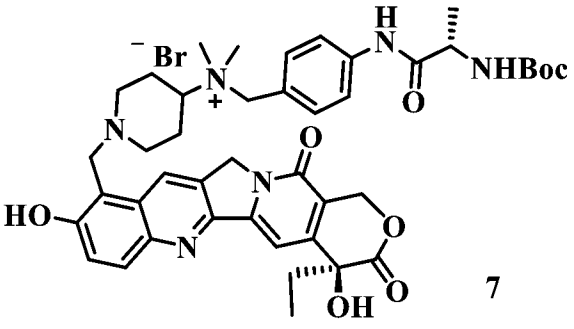
【0238】 實施例 39. （S）-N-（4-（2-（（第三丁氧基羰基）胺基）丙醯胺基）苄基）-N,N-二甲基六氫吡啶-4-溴化銨 （6） 的合成



6

將化合物5（1.0 g，1.41 mmol）溶於DMF（5 mL）中，加入六氫吡啶（1 mL）。在室溫攪拌30分鐘後，加入30mL乙酸乙酯，攪拌10分鐘。過濾混合物得到白色粉末狀固體（550mg，80%收率）。ESI-MS m/z： M^+：計算值 $C_{22}H_{37}N_4O_3$： 405.29；實測值405.29。

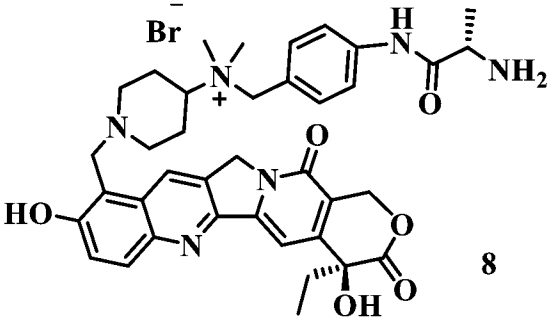
【0239】 實施例 40. N-（4-（（S）-2-（（第三丁氧基羰基）胺基）丙醯胺基）苄基）-1-（（（S）-4-乙基-4,9-二羥基-3,14-二側氧基-3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7] 吲哚嗪並[1,2-b] 喹啉-10-基）甲基）-N,N-二甲基六氫吡啶-4-溴化銨 （7） 的合成



7

向 10-羥基喜樹鹼（375 mg，1.03 mmol）的乙酸（5 mL）溶液中加入化合物 6（550 mg，1.13 mmol）和 37% 甲醛（92 mg，1.13 mmol）的乙酸溶液（ 5 mL）。將混合物加熱至約65°C並攪拌1小時，然後濃縮，與無水甲醇共沸濃縮。在二氯甲烷和少量甲醇中重結晶，得到化合物7（0.5 g，63%收率），為黃色粉末。ESI-MS m/z： M^+ $C_{43}H_{53}N_6O_8$： 計算值781.39；實測值781.39.

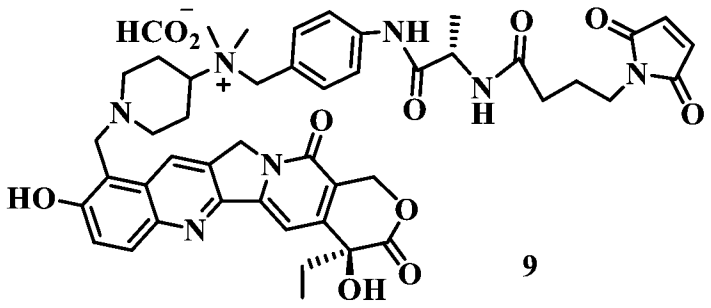
【0240】 實施例 41. N-（4-（S）-2-胺基丙胺基）苄基）-1-（S）-4-乙基-4,9-二羥基-3,14-二氧基-3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7]吲哚嗪並[1,2-b]喹啉-10-基）甲基）-N,N-二甲基六氫吡啶-4-溴化銨（8）的合成



8

將化合物7（50 mg，0.058 mmol）溶解於二氯甲烷和三氟乙酸的混合物（2 mL/6 mL）中，並在室溫下攪拌30分鐘。然後將混合物濃縮並在真空幫浦上乾燥，得到化合物8（44 mg，100%收率），為黃色固體。ESI-MS m/z： M^+ $C_{38}H_{45}N_6O_6$： 計算值 681.34；實測值681.34。

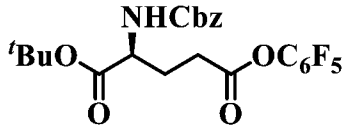
【0241】 實施例 42. N-（4-（S）-2-（4-（2,5-二氧-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁胺基）丙胺基）苄基）-1-（S）-4-乙基-4,9-二羥基-3,14-二氧-3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7]吲哚嗪並[1,2-b]喹啉-10-基）甲基）-N,N-二甲基六氫吡啶-4-甲酸銨（9）的合成



9

將化合物8（88 mg，0.116 mmol）和N-琥珀醯亞胺基4-馬來醯亞胺-丁酸酯（49 mg，0.140 mmol）溶解於DMF（5 mL）中，冷卻至約0℃，然後加入N,N-二異丙基乙胺（40μL，0.232 mmol）。將反應加熱至室溫，攪拌2小時，濃縮，並藉由製備HPLC（乙腈/含甲酸的水）純化，得到化合物9（66 mg，68%收率）。ESI-MS m/z： M^+ 計算值 $C_{46}H_{52}N_7O_9$： 846.38；實測值846.38。

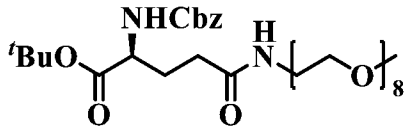
【0242】 實施例 43. 1-（第三丁基）5-（五氟苯基）（（苄氧基）羰基）-L-麩胺酸（11）的合成



11

向Cbz-L-Glu-OtBu（135 g，0.40 mol）的二氯甲烷（2.0 L）溶液中加入五氟苯酚（147 g，0.80 mol）和DIC（202 g，1.6 mol）。在室溫下攪拌1小時，然後濃縮得到標題化合物的粗品（500 g）。

【0243】 實施例 44.（S）-30-（苄氧基羰基）胺基）-27-側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23-八側氧基-26-氮雜三十一烷-31-甲酸第三丁基酯的合成（12）

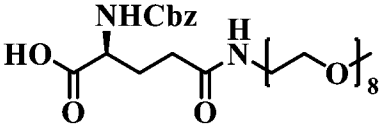


12

向$mPEG_8$-NH_2（153 g，0.4 mol）的DMF（2.5 L）溶液中加入N,N-二異丙基乙胺（206 g，1.6 mol）和化合物11（500 g，0.4 mol，粗

品），並在室溫下攪拌1小時。所得溶液用二氯甲烷共沸濃縮，稀釋，用水洗滌。用二氯甲烷反萃取水層。用0.2 N 鹽酸和鹽水洗滌合併的有機相，在無水硫酸鈉上乾燥，過濾並濃縮。藉由柱層析法純化（50%乙酸乙酯/石油醚至純乙酸乙酯，然後10%甲醇/二氯甲烷）得到標題化合物（260 g，93%收率）。

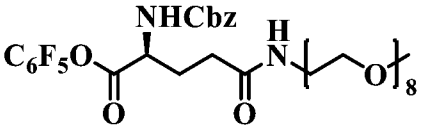
【0244】 實施例 45. （S）-30-（（苄氧基）羰基）胺基）-27-側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23-八側氧基-26-氮雜三十一烷-31-甲酸（13）的合成



13

將化合物12（255 g，363 mmol）溶於二氯甲烷（500 mL）和HCOOH（1.0 L）中，然後在室溫下攪拌隔夜。將反應混合物用二氯甲烷（3 L）稀釋並用水（1.5 L × 3）洗滌。將有機相濃縮並用乙酸乙酯（1.5 L）稀釋，用5% $NaHCO_3$溶液（3 L）萃取。使用濃鹽酸將水層調節至pH 2～3，然後用二氯甲烷萃取，用硫酸鈉乾燥，過濾並濃縮，得到標題化合物（230 g，98%收率）。

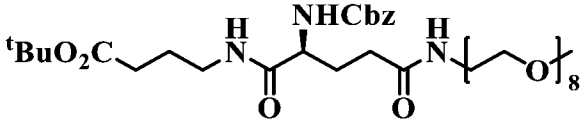
【0245】 實施例 46. 五氟苯酚基（S）-30-（（（苄氧基）羰基）胺基）-27-氧雜-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧雜-26-氧雜三十一烷-31-酯（14）的合成



14

向化合物 13 （220 g，340 mmol） 的二氯甲烷 （2.5 L）的溶液中加入五氟苯酚 （125 g，680 mmol） 和 DIC （171 g，1.36 mol）。將反應在室溫下攪拌1 小時，然後濃縮得到標題化合物的粗品（550 g）。

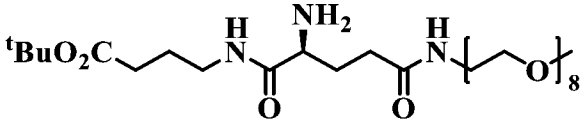
【0246】實施例 47. （S）-30-（（（苄氧基）羰基）胺基）-27,31-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧雜-26,32-二氧雜三十六烷-36第三丁基酯（15）的合成



15

向 4-胺基丁酸第三丁酯（65.0 g，410 mmol）的 DMF（2.5 L）溶液中加入 N,N-二異丙基乙胺（175 g，1.36 mol）。然後在 10-20°C 下加入化合物 14 （550 g，0.34 mol，粗品），並將所得混合物在室溫下攪拌1小時。真空除去DMF，殘餘物用二氯甲烷（2 L）稀釋，用水、0.2 N 鹽酸和鹽水洗滌兩次，用無水硫酸鈉乾燥，過濾並濃縮。用柱層析法純化（50% 乙酸乙酯/石油醚至純乙酸乙酯，然後 0 至 5% 甲醇/二氯甲烷）得到標題化合物，為黃色油狀物（240 g，90% 收率）。

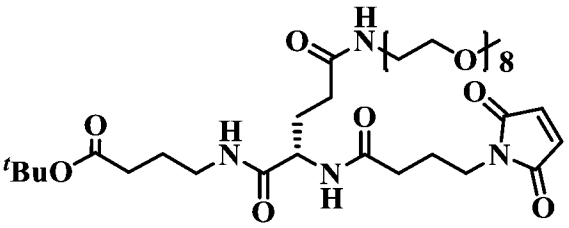
【0247】實施例 48. （S）-30-胺基-27,31-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23-八側氧基-26,32-二氮雜三十六烷-36-第三丁基酯（16）的合成



16

向化合物 15 （220 g，0.28 mol） 的 甲醇 （1.0 L）溶液中加入 Pd/C （20 g，10% Pd/C，含水50% ）。混合物在室溫下催化加氫 （1 atm H_2 ）隔夜，然後過濾並濃縮，得到標題化合物（167 g，91%收率）。

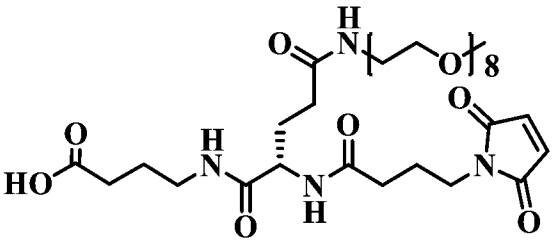
【0248】實施例 49.（S）-30-（4-（2,5-二氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁胺基）-27,31-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧雜-26,32-二氮雜三十六烷-36-第三丁基酯（17）的合成



17

向化合物 16 （167 g，0.26 mmol） 的 DMF （1.0 L）中加入N,N-二異丙基乙胺 （132 g，1.02 mol） 和五氟苯基 4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁酸酯（250 g，0.26 mol，粗品）。將混合物攪拌1小時，然後濃縮並用二氯甲烷（2.0 L）稀釋，用水、0.2 N 鹽酸和鹽水洗滌兩次，用無水硫酸鈉乾燥，過濾，濃縮並藉由矽膠柱層析法（50-100% 乙酸乙酯/石油醚和 0-10% 甲醇/二氯甲烷），得到標題化合物，為淡黃色油狀物（201 g，94% 收率）。

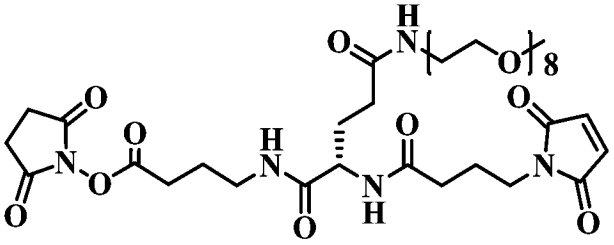
【0249】 實施例 50. （S）-30-（4-（2,5-二側氧基-2,5二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-27,31-二氧基-2,4,8,11,14,17,20,23-八側氧基-26,32-二氮雜三十六烷-36-乙酸（18）的合成



18

將化合物17（16.8 g，20.5 mmol）溶於二氯甲烷（60 mL）和甲酸（120 mL）中，然後在室溫下攪拌隔夜。將反應混合物濃縮並用乙酸乙酯（150mL）萃取。將氯化鈉固體加入到水相中直至飽和，並用二氯甲烷（200 mL × 2） 萃取溶液。有機相用硫酸鈉乾燥，過濾，濃縮，柱層析（0～20%甲醇/二氯甲烷）純化，得到標題化合物（16.4g，含甲酸的粗品）。ESI MS m/z： $[M+H]^+$ 計算值 $C_{34}H_{59}O_{15}N_4$ 763.39；實測值 763.29。

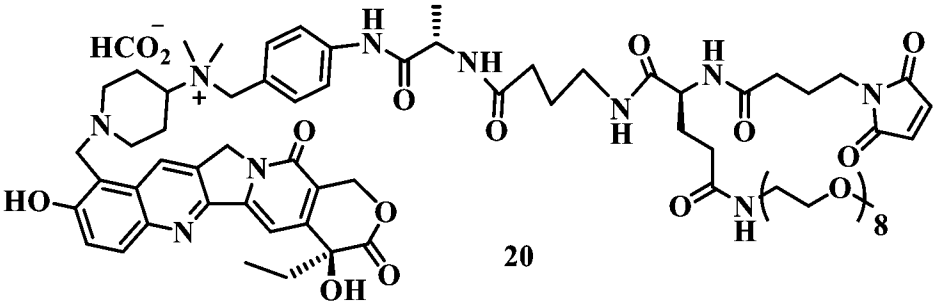
【0250】實施例 51. 2,5-二氧吡咯啶-1-基（S）-30-（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁胺基）-27,31-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧基-26,32-二氮雜三十六烷-36-酯（19）的合成



19

向化合物18（15.6 g，20.5 mol）的二氯甲烷（200 mL）的溶液中加入NHS（3.7 g，32.3 mmol）和EDC·HCl（8.3 g，43.0 mmol），並在室溫下攪拌反應30 min，然後用鹽水洗滌，在無水硫酸鈉上乾燥，過濾並濃縮，得到無色油化合物（17.6 g、100%收率）。ESI MS m/z：$[M+H]^+$ 計算值 $C_{38}H_{62}O_{17}N_5$ 860.41；實測值860.29。

【0251】實施例 52. N-（4-（9S，17S）-9-（4-（2,5-二氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-17-甲基-6,10,15-三側氧基-2-氧雜-5,11,16-三氮雜十八醯胺）苄基）-1-（（S）-4-乙基-4,9-二羥基-3,14-二氧-3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7]吲哚嗪並[1,2-b]喹啉-10-基）甲基-N,N-二甲基六氫吡啶-4-甲酸銨（20）的合成

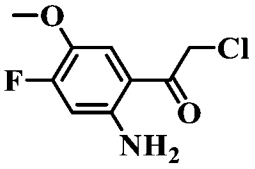


20

將化合物8（44 mg，0.058 mmol）和化合物19（60 mg，0.065 mmol）溶解於DMF（5 mL）中，冷卻至約0°C，然後加入N,N-二異丙基乙胺（20 μL，0.116 mmol）。將反應升溫至室溫，攪拌2小時，濃縮，

藉由製備HPLC（乙腈/含甲酸水）純化，得到化合物20（51mg，58%收率）。ESI-MS m/z： M^+ 計算值 $C_{72}H_{101}N_{10}O_{20}$： 1425.72；實測值1425.72。

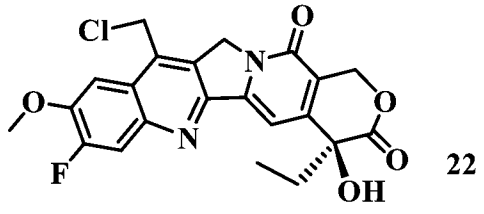
【0252】實施例 53. 1-（2-胺基-4-氟-5-甲氧基苯基）-2-氯乙酮（21）的合成



21

將3-氟-4-甲氧基苯胺（5g，35.4mmol）的二氯甲烷（20mL）溶液滴加到冰水冷卻的三氯化硼（1M在二氯甲烷中，38.9mL）溶液中。將反應攪拌10分鐘，然後加入氯乙腈（3.2 g，42.5 mmol）和三氯化鋁（5.2 g，38.9 mmol）。加入完成後，將反應升溫至室溫。然後回流隔夜。然後將反應混合物冷卻至約0°C，用2 M 鹽酸 （80 mL）淬滅並在室溫下攪拌2個小時。單離各層，水相用二氯甲烷 （3 × 80 mL） 萃取。合併的有機相用水（100mL）洗滌，硫酸鈉乾燥，過濾，濃縮，在矽膠柱上純化，用石油醚/乙酸乙酯溶離，得到化合物21（2g，26%收率），為黃色固體。ESI-MS m/z： $[M + H]^+$ $C_9H_9ClFNO_2$計算值： 218.03；實測值218.03。

【0253】實施例 54.（S）-11-（氯甲基）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-1H-呱喃並[3',4'：6,7] 吲嗪並[1,2-b] 喹啉-3,14（4H,12H）-二酮（22） 的合成

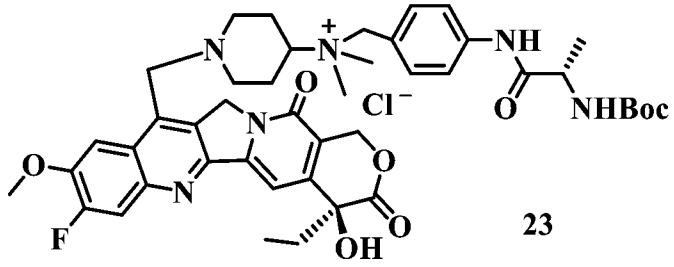


22

將化合物 21 （0.50 g，2.29 mmol） 和 （S）-4-乙基-4-羥基-7，8-

二氫-1H-吼喃並[3，4-f] 吲嗪-3，6，10（4H）-三酮 （0.57 g，2.19 mmol）溶解于無水甲苯（40 mL）中，加入對甲苯磺酸（42 mg，0.219 mmol）。將懸浮液加熱回流2天並冷卻至室溫。除去約三分之二的甲苯後，過濾殘餘物，濾餅用二氯甲烷洗滌，自然乾燥，得到化合物22（0.7g，72%收率），為灰色粉末狀固體。ESI-MS m/z： $[M + H]^+$ $C_{22}H_{18}ClFN_2O_5$計算值： 445.09；實測值445.09。

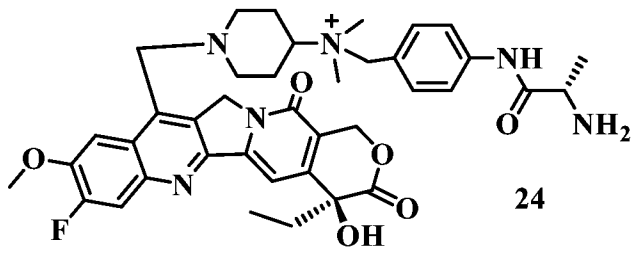
【0254】 實施例 55.N-（4-（（S）-2-（（第三丁氧羰基）胺基）丙胺基）苄基）-1-（（（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二側氧基-3,4,12,14-四氫-1H-吼喃[3',4'：6,7]吲嗪[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）-N,N-二甲基六氫吡啶-4-氯化銨（23）的合成



23

在 0°C，將化合物 22 （218 mg，0.49 mmol）、化合物 6 （200 mg，0.49 mmol） 在 DMF （5 mL）中的混合物攪拌 30 分鐘，然後加入三乙胺 （63 μL，0.45 mmol） 並繼續攪拌1小時。將反應濃縮並藉由製備HPLC（含有甲酸的乙腈/水）純化，得到黃色固體狀的化合物23（240mg，59%收率）。ESI-MS m/z：M^+ $C_{44}H_{54}FN_6O_8$計算值：813.40；實測值813.40。

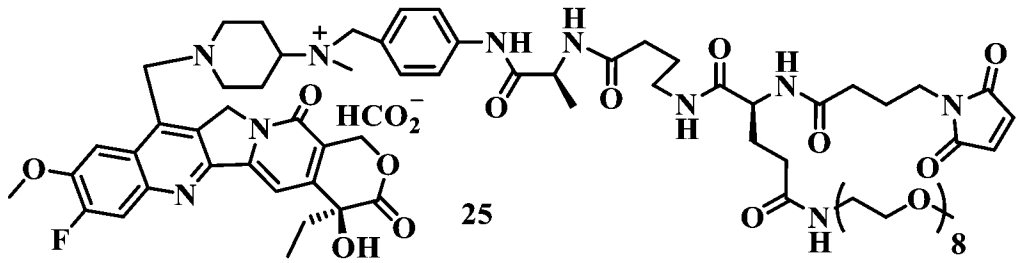
【0255】 實施例 56. N-（4-（（S）-2-胺基丙醯胺）苄基）-1-（（（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二氧基-4,4,12,14-四氫-1H-吼喃並[3',4'：6,7]吲嗪並[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）-N,N-二甲基六氫吡啶-4-胺（24）的合成



24

將化合物23 （50 mg，0.06 mmol）溶解於二氯甲烷和三氟乙酸（2 mL/6 mL）的混合物中，並在室溫下攪拌30 分鐘。然後將混合物濃縮並在真空幫浦上乾燥，得到化合物24（42mg，100%收率），為黃色固體。ESI-MS m/z： M^+ $C_{39}H_{46}FN_6O_6$計算值： 713.35；實測值713.35。

【0256】 實施例 57. N-（4-（（30S，38S）-30-（4-（2,5-二氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-38-甲基-27,31,36-三氧基-1,5,8,11,14,17,20,23-八氧基-26,32,37-三氮雜三十九醯胺基）-1-（（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二氧-3,4,12,14-四氫-4-呱喃並[3',4'：6,7] 吲嗪並[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）-N,N-二甲基六氫吡啶-4-甲酸銨（25）

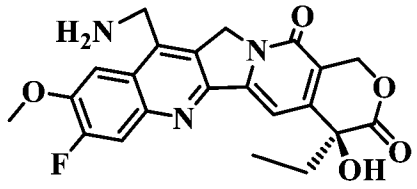


25

將化合物24（47mg，0.060mmol）和化合物19（60mg，0.66mmol）溶解於DMF（5ml）中，冷卻至約0℃，然後加入N,N-二異丙基乙胺（21μL，0.12mmol）。將反應物自然升溫至室溫並攪拌2小時，濃縮，並藉由製備HPLC（含甲酸的乙腈/水）純化，得到化合物25（23 mg，25%收率）。ESI-MS m/z： M^+ $C_{73}H_{102}FN_{10}O_{20}$計算值： 1457.73；實測值1457.73。

【0257】 實施例 58. （S）-11-（胺基甲基）-4-乙基-8-氟-4-羥基-

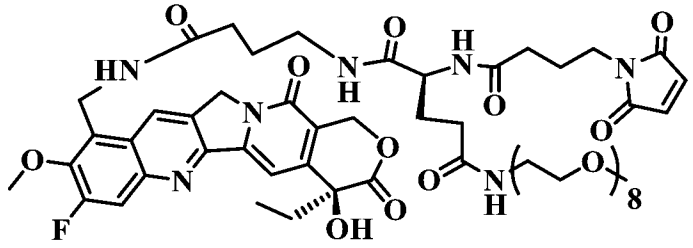
9-甲氧基-1H-呱喃並[3',4'：6,7] 吲嗪並[1,2-b]喹啉-3,14-（4H,12H）-二酮（26）的合成



26

將化合物22（80mg，0.18mmol）溶於乙醇（5mL）中，加入六亞甲基四胺（76mg，0.54mmol），將混合物回流90分鐘，然後冷卻至室溫。加入濃鹽酸（100μL），攪拌30分鐘。濃縮後，得到灰白色固體，將其藉由製備HPLC（含有甲酸的乙腈/水）純化，得到化合物26（40mg，52%收率）。ESI-MS m/z： $[M + H]^+$ $C_{22}H_{20}FN_3O_5$計算值： 426.14；實測值426.14。

【0258】 實施例 59. （S）-2-（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-N1-（4-（（（（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二側氧基-3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7]吲哚並[1,2-b]喹啉-10-基）甲基）-4-側氧基丁基）-N5-（2,5,8,11,14,17,20,23-八氧雜二十五烷-25-基）戊二醯胺（27）

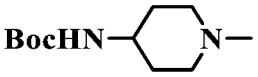


27

將化合物26（40mg，0.094mmol）和化合物19（120mg，0.13mmol）溶於DMF（5mL）中，冷卻至約0℃，然後加入N,N-二異丙基乙胺（33μL，0.188mmol）。將反應自然升溫至室溫，並攪拌2小時，濃縮，藉由製備HPLC（含有甲酸的乙腈/水）純化，得到化合物27（55mg，50%收率。）ESI-MS m/z： $[M + H]^+$ $C_{56}H_{76}FN_7O_{19}$計算值：

1170.52；實測值1170.52。

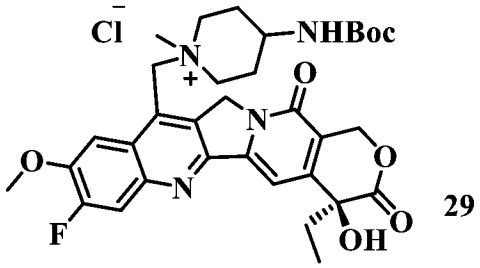
【0259】 實施例 60.（1-甲基六氫吡啶-4-基）胺基甲酸第三丁酯的合成（**28**）



28

將4-（第三丁氧基羰基胺基）六氫吡啶（2g，10mmol）溶於甲醇（30mL）中，然後加入37%甲醛（1.6g，20mmol）和10%Pd/C（0.2g）。將反應在1atm氫氣下攪拌隔夜後過濾。濃縮濾液，得到化合物28（2.1g，100%收率）。ESI-MS m/z： $[M + H]^+$ $C_{11}H_{22}N_2O_2$計算值：215.17；實測值215.17。

【0260】 實施例 61.（S）-4-（（第三丁氧羰基）胺基）-1-（（4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二側氧基-3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7]吲哚並[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）-1-甲基六氫吡啶-1-氯化鎓（29）的合成

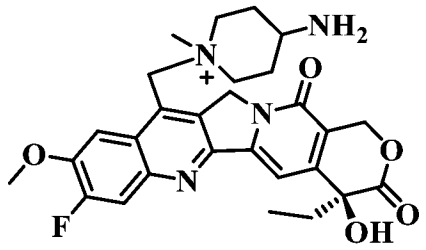


29

將化合物 22（50 mg，0.112 mmol）和化合物 28（26 mg，0.123 mmol）的DMF（3 mL）溶液在室溫下攪拌2個小時。將反應溶液藉由製備HPLC（含有甲酸的乙腈/水）純化，得到化合物29（33mg，47%收率）。ESI-MS m/z： $[M]^+$ $C_{33}H_{40}FN_4O_7$計算值： 623.29；實測值623.29。

【0261】 實施例 62.（S）-4-胺基-1-（（4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二側氧基-3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7]吲哚並[1,2-b]

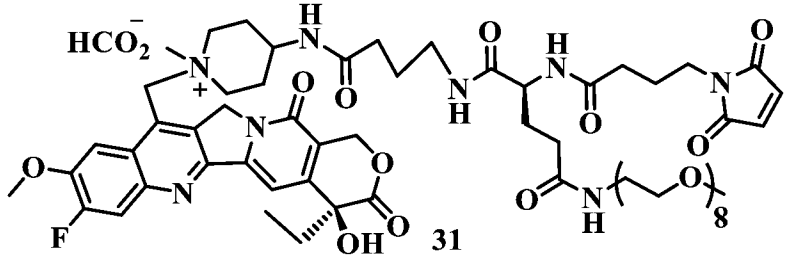
喹啉-11-基）甲基）-1-甲基六氫吡啶-1-鎓（30）的合成



30

將化合物29（30mg，0.053mmol）溶於二氯甲烷和三氟乙酸（3mL/1mL）的混合物中，並在室溫下攪拌30分鐘。然後濃縮並在真空幫浦上乾燥，得到化合物30（33mg，100%收率）。ESI-MS m/z： $[M]^+$ $C_{28}H_{32}N_4O_5$計算值： 477.21；實測值477.21。

【0262】 實施例 63. 4-（（S）-30-（4-（2,5-二氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁胺基）-27,31-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23-八側氧基-26,32-二氮雜三十六醯胺）-1-（（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二氧-3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7]吲哚唑並[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）-1-甲基六氫吡啶-1-甲酸鎓（31）的合成

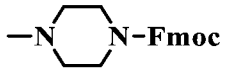


31

將化合物30（30 mg，0.053 mmol）和化合物19（60 mg，0.079 mmol）溶於DMF（5 mL）中，冷卻至約0℃，然後加入N,N-二異丙基乙胺（18 μL，0.106 mmol）。將反應升溫至室溫。攪拌2小時，濃縮，藉由製備HPLC（含甲酸的乙腈/水）純化，得到化合物31（15mg，21%收率）。ESI-MS m/z： $[M]^+$ $C_{62}H_{88}FN_8O_{19}$計算值： 1267.61；實測值1267.61。

【0263】 實施例 64. （9H-芴-9-基）甲基4-甲基呱嗪-1-羧酸酯

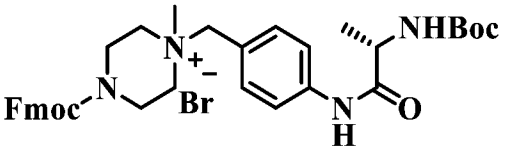
（32）的合成



32

將1-甲基呱嗪（5.0 g，50.0 mmol）溶於1,4-二惡烷和水（60 mL/100 mL）中，加入碳酸氫鈉（12.6 g，150 mmol），冷卻混合物 至0°C。滴加9-芴基甲氧基碳醯氯（15.5 g，60.0 mmol）的1,4-二惡烷（20 mL）溶液。加入後，溫度逐漸升高至室溫，並將反應攪拌3小時。加入300 mL 1M 鹽酸，混合物用乙酸乙酯 （2 × 100 mL） 洗滌，水相用碳酸鈉調節至 pH ~ 10，然後用乙酸乙酯 （2 × 100 mL） 萃取。合併的有機相用水（250 mL）洗滌，經硫酸鈉乾燥，過濾，濃縮，並藉由柱層析法（甲醇/二氯甲烷）純化，得到化合物32 （6.5 g，40%收率）。ESI-MS m/z： $[M + H]^+$ 計算值 $C_{20}H_{22}N_2O_2$，323.17；實測值323.19。

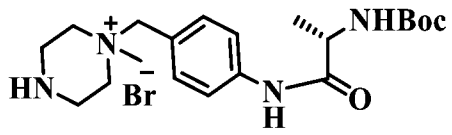
【0264】 實施例 65. （S）-4-（（（9H-芴-9-基）甲氧基）羰基）-1-（4-（2-（（第三丁氧基羰基）胺基）丙醯胺基）苄基）-1-甲基呱嗪-1-溴化鎓 （33） 的合成



33

將化合物4（2.3 g，6.4 mmol）和化合物32（2.1 g，6.4 mmol）溶解在無水四氫呋喃（100 mL）中，並在室溫下攪拌隔夜。在旋轉蒸發儀上除去大部分四氫呋喃後，將乙酸乙酯 （200 mL） 加入到殘餘物中。將所得漿液過濾，得到白色固體（3.8 g，87%收率）。ESI-MS m/z： M^+ 計算值 $C_{35}H_{43}N_4O_5$： 599.32；實測值599.32。

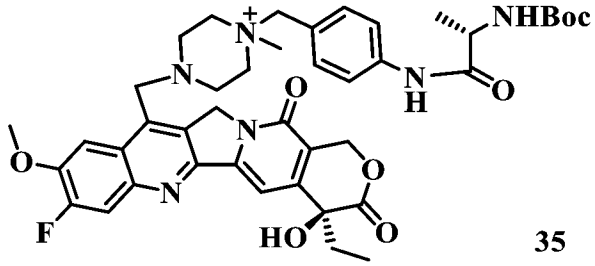
【0265】 實施例 66. （S）-1-（4-（2-（（第三丁氧基羰基）胺基）丙醯胺基）苄基）-1-甲基呱嗪-1-溴化銨（34）的合成



34

將化合物33（3.12 g，4.6 mmol）溶於DMF（25 mL）中，加入六氫吡啶（3 mL）。在室溫攪拌後 2小時後，加入200mL乙酸乙酯，攪拌10分鐘。過濾混合物得到白色固體（1.54 g，77%收率）。ESI-MS m/z：M^+ 計算值 $C_{20}H_{33}N_4O_3$： 377.26；實測值377.26。

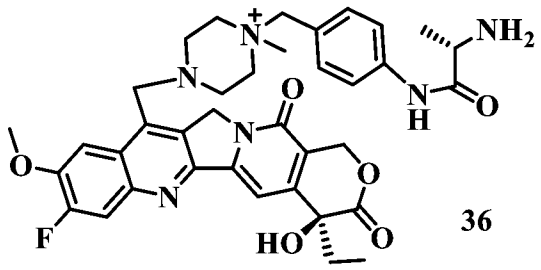
【0266】實施例 67. 1-（4-（（S）-2-（（第三丁氧羰基）胺基）丙醯胺）苄基）-4-（（（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二氧基-2,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4'：6,7]吲嗪並[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）-1-甲基吡嗪-1-鎓（35）的合成



35

將化合物34（0.30 g，0.66 mmol）、化合物22（0.25 g，0.56 mmol）在DMF（10 mL）中的混合物在0℃攪拌30分鐘，然後將N,N-二異丙基乙胺（49 μL，0.28 mmol））加入並將反應自然升溫至室溫。攪拌隔夜，濃縮，藉由製備HPLC純化（含甲酸的乙腈/水），得到化合物35（0.40g，80%收率）。ESI-MS m/z： M^+ $C_{42}H_{50}FN_6O_8$ 計算值：785.37；實測值785.37。

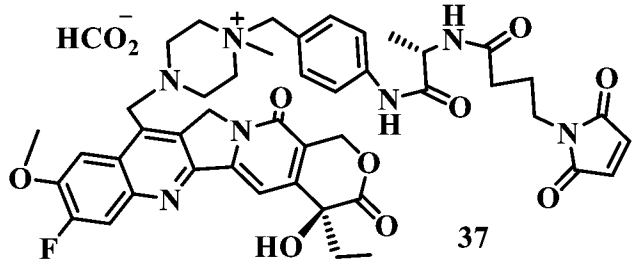
【0267】實施例 68. 1-（4-（（S）-2-胺基丙烷基）苄基）-4-（（（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二氧基-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4'：6,7]吲嗪並[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）-1-甲基吡嗪-1-鎓（36）的合成



36

將化合物35 （0.30 g，0.35 mmol）溶於二氯甲烷和三氟乙酸（3 mL/3 mL）的混合物中，並在室溫下攪拌30 分鐘。然後將混合物濃縮並在真空幫浦上乾燥，得到化合物36（0.27g，100%收率），為黃色固體。ESI-MS m/z： M^+ $C_{37}H_{42}FN_6O_6$計算值： 477.21；實測值477.21。

【0268】 實施例 69. 1-（4-（（S）-2-（4-（2,5-二氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丙胺基）苄基）-4-（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二氧-3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7]吲唑並[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）-1-甲基呱嗪-1-甲酸鎓（37）的合成

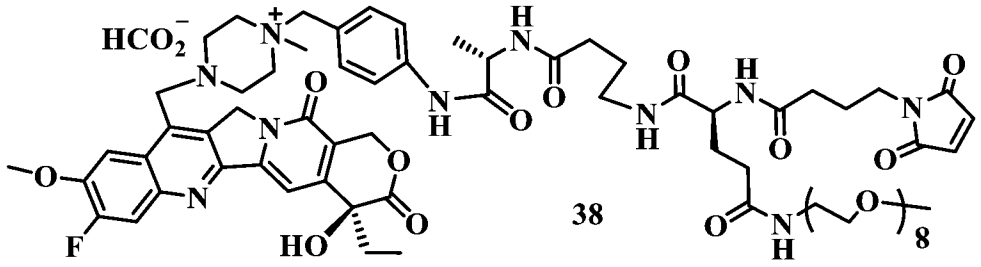


37

將化合物36（50 mg，0.065 mmol）和N-琥珀醯亞胺4-馬來醯亞胺基丁酸酯（30 mg，0.098 mmol）溶於DMF（3 mL）中，然後加入N,N-二異丙基乙胺（45 μL，0.26 mmol），將反應在室溫攪拌30分鐘，濃縮，並藉由製備C-18 HPLC（含有甲酸的乙腈/水）純化，得到化合物37（37mg，61%收率）。ESI-MS m/z： M^+ 計算值 $C_{45}H_{49}FN_7O_9$：850.36；實測值850.36。

【0269】 實施例 70. 1-（4-（（30S，38S）-30-（4-（2,5-二氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-38-甲基-27,31,36-三氧基-1,5,8,11,14,17,20,23-八氧基-26,32,37-三氮雜三十九醯胺基）-4-

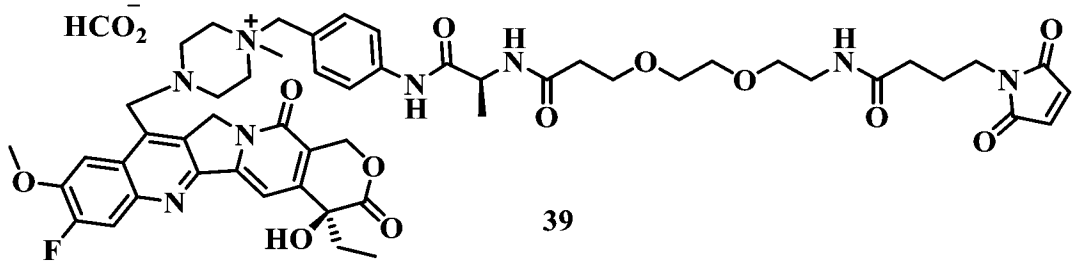
（（（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二氧-3,4,12,14-四氫-4-吡喃並[3',4'：6,7]吲嗪並[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）-1-甲基吡嗪-1-甲酸鎓（38）的合成



38

將化合物36（70 mg，0.092 mmol）溶解於DMF（2 mL）中，向其中加入化合物18（70 mg，0.092 mmol）的DMF（2 mL）溶液中，濃縮後，依次加入HATU（52 mg，0.138 mmol）和三乙胺（52μL，0.368 mmol），並在室溫下攪拌反應30分鐘。濃縮後，藉由製備HPLC（含甲酸的乙腈/水）純化殘餘物，得到化合物38（50.9mg，37%收率）。ESI-MS m/z： $[M]^+$ $C_{71}H_{98}FN_{10}O_{20}$計算值： 1429.69；實測值1429.69。

【0270】 實施例 71. 1-（4-（（S）-17-（2,5-二氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）-2-甲基-4,14-二側氧基-7,10-二氧-3,13-二氮雜十七醯胺）苄基）-4-（（（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二氧基-4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4'：6,7]吲嗪並[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）-1-甲基-1-甲基吡嗪-1-甲酸鎓（39）的合成

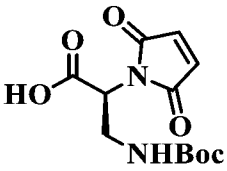


39

將化合物 36 （0.10 g，0.13 mmol） 的 DMF （1 mL）溶液 和 2,5-二氧吡咯啶-1-基3-（2-（2-（4-（2,5-二氧基-2,5二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）乙氧基）丙酸酯 （57 mg，0.13 mmol） 的 DMF （2 mL） 溶

液混合，然後加入 N,N-二異丙基乙胺 （90 μL，0.52 mmol）。將反應混合物在室溫攪拌1小時，濃縮，用製備HPLC純化（含甲酸乙腈/水），得到化合物39（50.9mg，39%收率）。ESI-MS m/z： M^+ $C_{52}H_{62}N_8O_{12}$計算值： 1009.45；實測值1009.45。

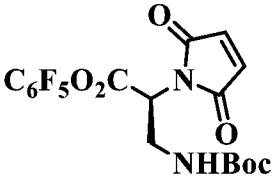
【0271】 實施例 72. （S）-3-（（第三丁氧羰基）胺基）-2-（2,5-二氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丙酸（40） 的合成



40

冰水浴中，向2-胺基-3-（（第三丁氧羰基）胺基）丙酸（1g，4.90mmol）和$NaHCO_3$飽和溶液（20ml）中加入2,5-二氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-羧酸甲酯（1.52g，9.80mmol）。將反應攪拌30分鐘，然後倒入含有100ml乙酸乙酯的分液漏斗中，單離有機相，用50ml水和50ml鹽水洗滌，無水硫酸鈉乾燥，過濾並濃縮，得到化合物40（1.39g，72%收率）。

【0272】 實施例 73. （S）-五氟苯基3-（（第三丁氧羰基）胺基）-2-（2,5-二氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丙酸酯（41）的合成

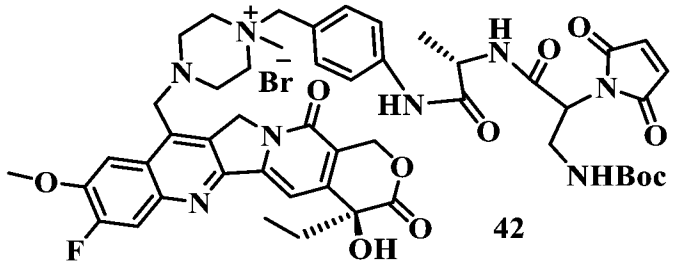


41

將化合物40（0.10 g，0.35 mmol）溶解於二氯甲烷（30 mL）中，然後加入五氟苯酚（97 mg，0.52 mmol）和1-（3-二甲基胺基丙基）-3-乙基碳二亞胺鹽酸鹽（0.13 g，0.7 mmol）。將反應在室溫下攪拌2小時，用二氯甲烷（50mL）稀釋，水（200mL）洗滌，硫酸鈉乾燥，過濾，濃縮，得到化合物41（0.16g，100%收率）。ESI-MS m/z： [M +

H]$^+$ 計算值 $C_{18}H_{15}F_5N_2O_6$： 451.09；實測值451.09。

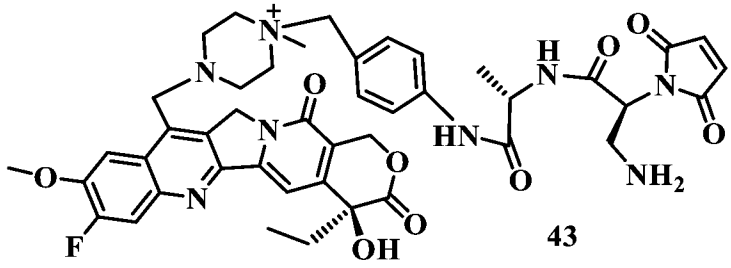
【0273】 實施例 74. 化合物42的合成



42

將化合物36（0.05 g，0.065 mmol）和化合物41（45 mg，0.10 mmol）溶於DMF（3 mL）中，然後加入N,N-二異丙基乙胺（45 μL，0.26 mmol）。將反應在室溫下攪拌1小時，濃縮並藉由製備HPLC（含有甲酸的乙腈/水）純化，得到化合物42（35mg，52%收率）。ESI-MS m/z： M^+ $C_{49}H_{56}FN_8O_{11}$計算值： 951.41；實測值951.41。

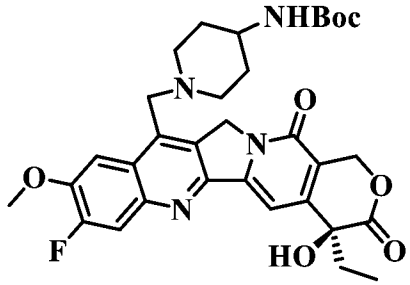
【0274】 實施例 75. 1-（4-（S）-2-（（S）-3-胺基-2-（2,5-二氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丙醯胺）丙醯胺）苄基）-4-（（（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二氧基-4，12，14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7] 吲嗪並[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）-1-甲基呱嗪-1-鎓（43）的合成



43

將化合物42 （35 mg，0.03 mmol）溶解於二氯甲烷（2 mL），並與三氟乙酸（1 mL）反應。在室溫攪拌後 1小時，濃縮反應混合物，與二氯甲烷共沸蒸發兩次，用真空幫浦乾燥，得到化合物43（30.4mg，96%收率）。ESI-MS m/z： M^+ $C_{44}H_{48}FN_8O_9$計算值： 851.35；實測值851.35。

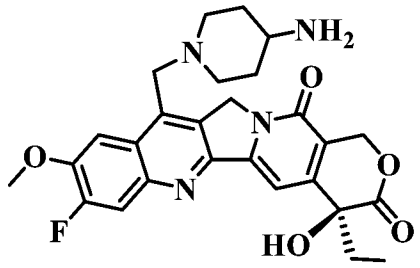
【0275】 實施例 76. （S）-第三丁基（1-（（4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二氧-3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7] 吲嗪並[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）六氫吡啶-4-基）胺基甲酸酯（44）的合成



44

將化合物22 （50 mg，0.11 mmol）溶於DMF （3 mL）中，然後加入六氫吡啶-4-基-胺基甲酸第三丁酯（25 mg，0.12 mmol）並在室溫下攪拌5小時。將混合物濃縮並藉由製備HPLC（含有甲酸的乙腈/水）純化，得到化合物44（30mg，45%收率）。ESI-MS m/z： $[M + H]^+$ 計算值 $C_{32}H_{37}FN_4O_7$： 609.26；實測值609.26。

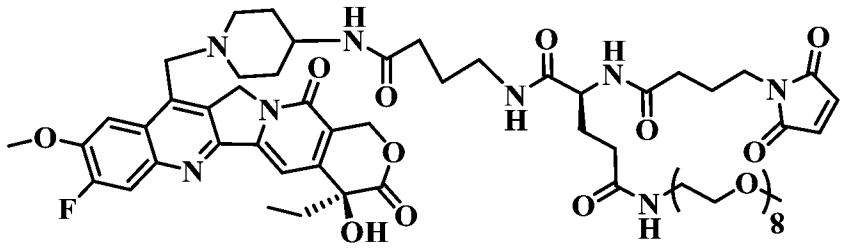
【0276】 實施例 77.（S）-11-（（4-胺基六氫吡啶-1-基）甲基）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-1H-呱喃並[3',4'：6,7] 吲嗪並[1,2-b]喹啉-3,14-（4H,12H）-二酮（45）的合成



45

將化合物44 （30 mg，0.03 mmol）溶解在二氯甲烷（2 mL）中，並與三氟乙酸（2 mL）反應。在室溫攪拌1小時後，濃縮混合物，與二氯甲烷共沸蒸發兩次，真空幫浦乾燥，得到化合物45（25.4mg，100%收率）。ESI-MS m/z： $[M + H]^+$ $C_{27}H_{30}FN_{45}$計算值： 509.21；實測值509.21。

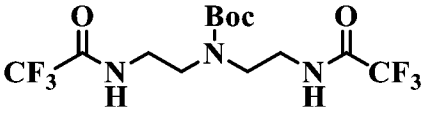
【0277】 實施例 78. （S）-2-（4-（2,5-二氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-N1-（4-（1-（（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二氧-3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7] 吲嗪並[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）六氫吡啶-4-胺基）-4-氧丁基）-N5-（2,5,8,11,14,17,20,23-八氧雜二十五烷-25-基）戊二醯胺（46）的合成



46

將化合物 45 （25.4 mg，0.05 mmol） 溶解於 DMF （2 mL） 中，向其中加入化合物 19 （38.1 mg，0.05 mmol），然後依次加入 HATU （28.5 mg，0.08 mmol） 和三乙胺 （14 μL，0.1 mmol），將反應在室溫下攪拌1小時，濃縮並藉由製備HPLC（乙腈/含有甲酸的水）純化，得到化合物46（14.4mg，23%收率）。ESI-MS m/z： $[M + H]^+$ $C_{61}H_{85}FN_8O_{19}$計算值： 1253.59；實測值1253.59。

【0278】 實施例 79. 雙（2-（2,2,2-三氟乙醯胺基）乙基）胺基甲酸第三丁酯 （47） 的合成

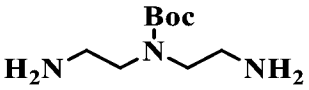


47

在 0°C 下，向二亞乙基三胺 （6.18 g，60 mmol） 的二氯甲烷（120 mL）溶液中滴加三氟乙酸乙酯 （18.75 g，132 mmol） 的二氯甲烷 （60 mL）溶液。將溶液攪拌 30 分鐘，然後升溫至室溫，並攪拌1小時。在室溫下滴加二碳酸二第三丁酯（28.78 g，132 mmol）和三乙胺（13.33 g，132 mmol）的二氯甲烷（60 mL）溶液，並攪拌隔夜。將反應混合物用飽和碳酸鈉（2×200mL）、水（2×200mL）、鹽水

（200mL）洗滌，硫酸鈉乾燥，過濾並濃縮。殘餘物藉由矽膠柱（石油醚/乙酸乙酯）純化，得到白色固體（17.4 g，73.3%收率）。ESI-MS m/z： $[M + H]^+$ $C_{13}H_{19}F_6N_3O_4$計算值： 396.30；實測值396.28。

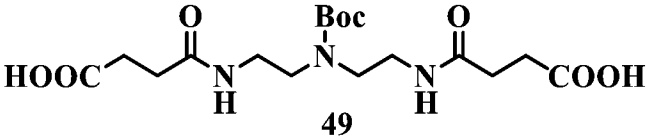
【0279】 實施例 80. 雙（2-胺基乙基）胺基甲酸第三丁酯（48） 的合成



48

將化合物 47 （4.28 g，10.8 mmol） 溶解在 甲醇 （50 mL） 中，並在室溫下與氫氧化鈉 （5.42 g，135 mmol） 的水 （50 mL）溶液一起攪拌3小時。將反應濃縮，用二氯甲烷（3×100mL）萃取，有機相用鹽水（100mL）洗滌，硫酸鈉乾燥，過濾並濃縮，得到化合物3（1.8g，82%收率）。ESI-MS m/z： $[M + H]^+$ $C_9H_{21}N_3O_2$計算值： 204.28；實測值204.12。

【0280】 實施例 81. 4,4'-（（（第三丁氧羰基）氮雜二基）雙（乙烷-2,1-二基））雙（氮雜二基））二（4-側氧基丁酸）（49）的合成

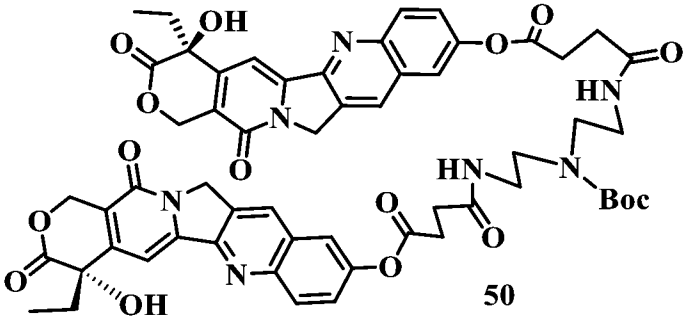


49

將化合物48（1.8 g，8.8 mmol）溶於二氯甲烷（150 mL）中，加入琥珀酸酐（2.2 g，22.1 mmol）。在室溫攪拌隔夜，將反應濃縮並在矽膠柱上純化，用二氯甲烷/甲醇溶離，得到化合物49（2.99 g，84%收率）。ESI-MS m/z： $[M + H]^+$ $C_{17}H_{29}N_3O_8$計算值： 404.43；實測值404.11。

【0281】 實施例 82. 雙（（S）-4-乙基-4-羥基-3,14-二氧基-3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7]吲嗪並[1,2-b]喹啉-9-基）4,4'-（（第三丁氧羰基）氮雜二基）雙（乙烷-2,1-二基））雙（氮雜二基）雙

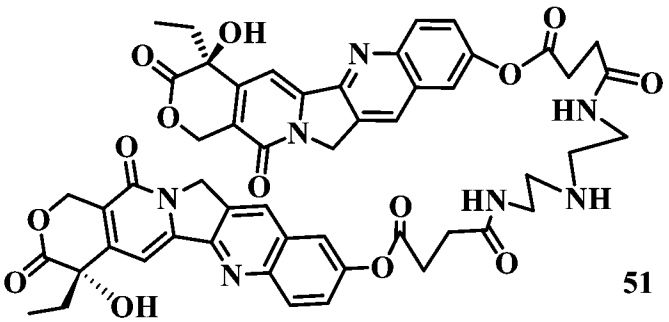
（4-側氧基丁烷酸酯）（50）的合成



50

向化合物49（853 mg，2.1 mmol）和（S）-4-乙基-4,9-二羥基-1,12-二氫-14H-吡喃並[3',4'：6,7]吲嗪並[1,2-b]喹啉-3,14（4H）-二酮（1.71 g，4.7 mmol）的DMF（100 mL）溶液中，依次加入三乙胺（948 mg，9.4 mmol）以及HATU（1.79 g，4.7 mmol）。將所得混合物攪拌隔夜，然後濃縮，藉由矽膠柱（二氯甲烷/甲醇）純化，得到化合物50（2.84g，100%收率）。ESI-MS m/z： $[M + H]^+$ $C_{57}H_{57}N_7O_{16}$計算值：1097.10；實測值1097.65。

【0282】實施例 83. 雙（（S）-4-乙基-4-羥基-3,14-二氧基-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4'：6,7] 吲嗪並[1,2-b]喹啉-9-基）4,4'-（（氮雜二基雙（乙烷-2,1-二基））雙（氮雜二苯基））雙（4-側氧基丁酸酯）（51）的合成

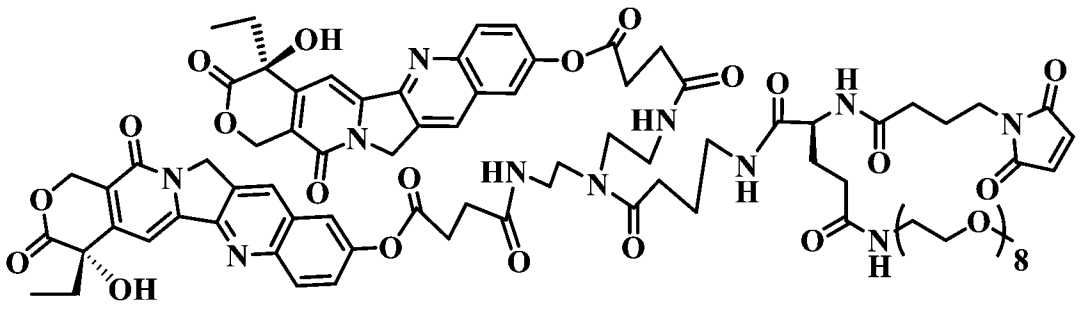


51

將化合物50（2.84 g，2.1 mmol）溶於二氯甲烷（40 mL），加入三氟乙酸（20 mL）。反應在室溫下攪拌1小時，然後濃縮，得到化合物51（3.3 g，100%收率）。ESI-MS m/z： $[M + H]^+$ $C_{52}H_{49}N_7O_{14}$計算值：

996.98；實測值996.60。

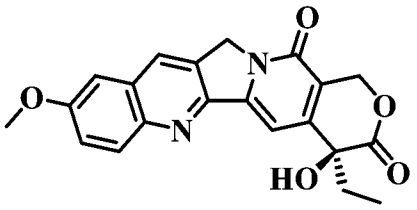
【0283】實施例 84.（S）-（S）-4-乙基-4-羥基-3,14-二氧基-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4'：6,7] 吲嗪並[1,2-b]喹啉-9-基30-（4-（2,5-二氧-2,5-氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-37-（2-（4-（（S）-4-4-乙基-4-羥基-3,14-二氧雜-3,4,12,14-四羥基-1H-吡喃並[3',4'：6,7] 吲嗪並[1,2-b]喹啉-9-基）氧基）-4-側氧基丁胺基）乙基）-27,31,36,41-四氧基-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧基-26,32,37,40-四氮雜四十四烷-44-酯（52）的合成



52

向化合物 51（614 mg，0.60 mmol）和化合物 19（470 mg，0.60 mmol）的 DMF（20 mL）溶液中依次加入三乙胺（249 mg，2.5 mmol）和 HATU（234 mg，0.60 mmol）。將混合物攪拌40分鐘，然後濃縮，藉由矽膠柱純化（甲醇/二氯甲烷），得到化合物52（46mg，5%收率）。ESI-MS m/z：[M + H]$^+$ 計算值 $C_{86}H_{105}N_{11}O_{28}$：17410.81；實測值1742.01。

【0284】實施例 85.（S）-4-乙基-4-羥基-9-甲氧基-1H-吡喃並[3',4'：6,7] 吲嗪並[1,2-b]喹啉-3,14（4H,12H）-二酮（53）的合成

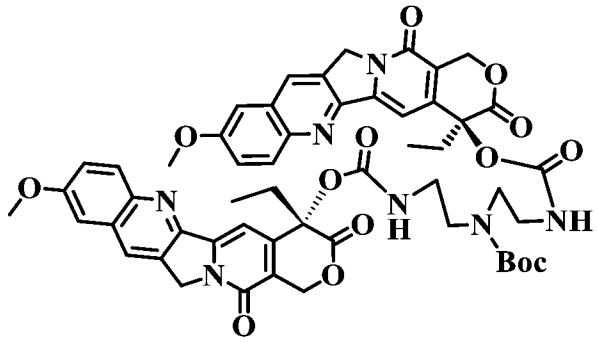


53

將10-羥基喜樹鹼（2.5 g，6.86 mmol）溶解於DMF（150 mL）中，

加入碳酸鉀（1.90 g，13.72 mmol）和甲基碘（1.17 g，8.23 mmol），在室溫下攪拌反應隔夜，向反應混合物中加入石油醚（150mL）和乙酸乙酯（150mL）的混合溶劑並攪拌。沉澱出黃色固體並過濾收集，然後分散在水（20mL）中。滴加1N鹽酸至pH 7，再次過濾，得到化合物53（1.0g，38%收率）。ESI-MS m/z： $[M + H]^+$ 計算值 $C_{21}H_{18}N_2O_5$ 379.38；實測值379.05。

【0285】實施例 86. 雙（（S）-4-乙基-9-甲氧基-3,14-二氧基-2,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7] 吲嗪[1,2-b]喹啉-4-基）（（（第三丁氧羰基）氮雜二基）雙（乙烷-2,1-二基））二胺基甲酸酯的合成（54）

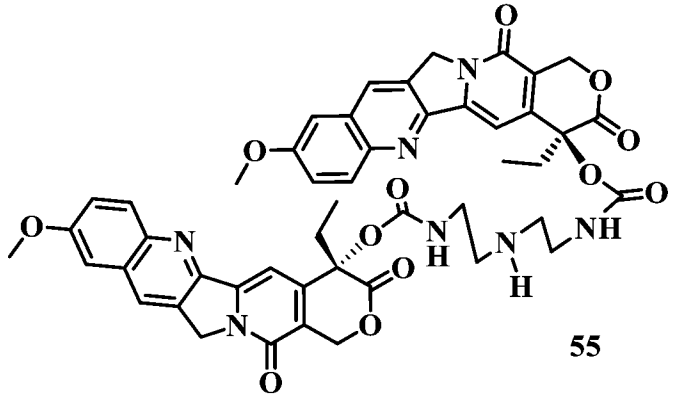


54

將化合物53（350 mg，0.9 mmol），4-二甲胺基吡啶（339 mg，2.8 mmol）和三光氣（93 mg，0.34 mmol）在N_2下碾碎並均勻混合，然後滴加無水二氯甲烷（8 mL）並攪拌10分鐘。向混合物中加入化合物48（64 mg，0.34 mmol）的無水二氯甲烷（4 mL）溶液，最後加入三乙胺（93 mg，0.9 mmol）。攪拌15分鐘後，濃縮溶液，並藉由矽膠柱（甲醇/二氯甲烷）純化，得到化合物54（200mg，22%收率）。ESI-MS m/z：$[M + H]^+$ 計算值 $C_{53}H_{53}N_7O_{14}$： 1013.03；實測值1013.26。

【0286】實施例 87. 雙（（S）-4-乙基-9-甲氧基-3,14-二側氧基-3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7] 吲嗪並[1,2-b]喹啉-4-基）（氮雜二

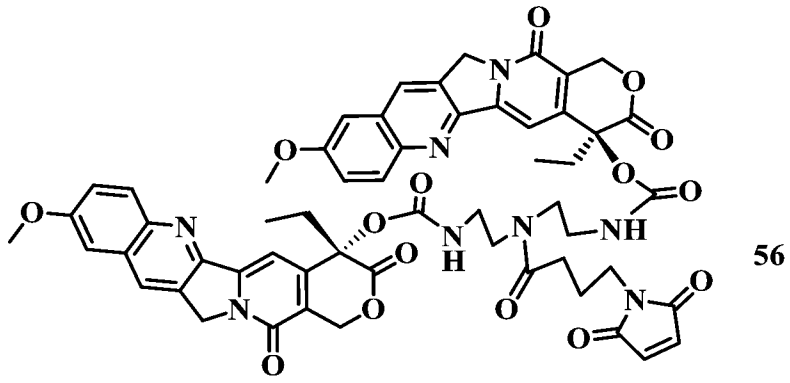
碘（乙烷-2,1-二基））二胺基甲酸酯（55）的合成



55

將化合物54（200mg，0.2mmol）溶解於二氯甲烷（10ml）中，並與三氟乙酸（5ml）反應4小時。濃縮反應混合物得到化合物55（0.43g，100%收率）。ESI-MS m/z： $[M + H]^+$ $C_{48}H_{45}N_7O_{12}$計算值： 912.91；實測值912.62。

【0287】實施例 88. 雙（（S）-4-乙基-9-甲氧基-3,14-二氧基-3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7] 吲嗪並[1,2-b]喹啉-4-基）（（（4-（2,5-二氧-2,5-氫-1H-吡咯-1-基）丁醯基）氮雜二醯基）雙（乙烷-2,1-二醯基））二胺基甲酸酯（56）的合成

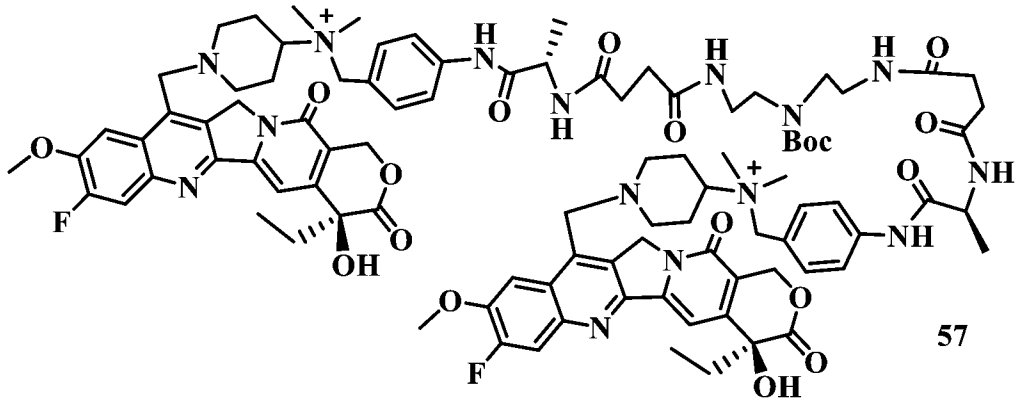


56

向化合物55（249mg，0.27mmol）和4-（2,5-二氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁酸（60mg，0.32mmol）的二氯甲烷（10ml）溶液中加入三乙胺（112μL，0.81mmol）和HATU（104mg，0.27 mmol）。攪拌反應40分鐘，然後用水（20ml）洗滌。有機相濃縮後藉由製備HPLC（含甲酸的乙腈/水）純化，得到化合物56（50mg）。ESI-MS m/z： $[M + H]^+$

$C_{56}H_{52}N_8O_{15}$ 計算值1078.06；實測值1078.77。

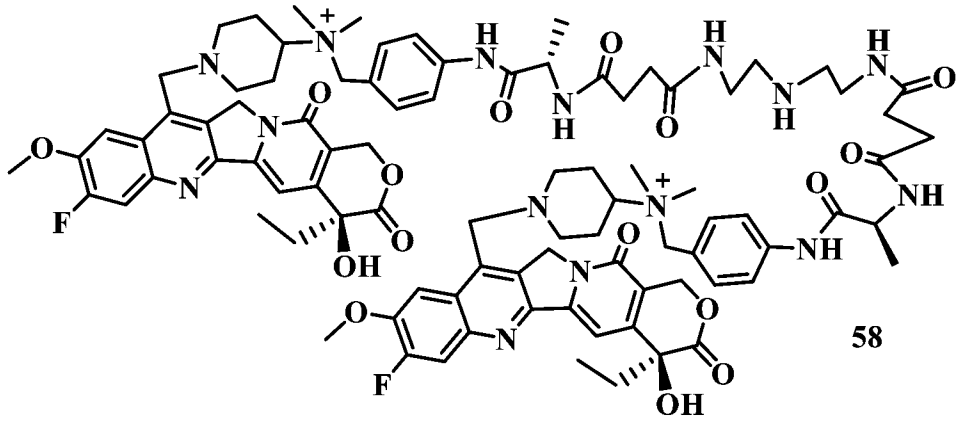
【0288】 實施例 89.（S）-N,N'-（（（（（2S,20S）-11-（第三丁氧羰基）-2,20-二甲基-4,7,15,18-四氧基-3,8,11,14,19-五氮雜二十一烷-1,21-二醯基）雙（氮雜二醯基））雙（4,1-亞苯基））雙（亞甲基）雙（1-（（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-2,14-二氧基-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4'：6,7] 吲嗪並[1,3-b]喹啉-11-基）甲基）-N,N-二甲基六氫吡啶-4-鎓）（57）的合成



將化合物24（96 mg，0.132 mmol）和化合物49（26 mg，0.066 mmol）溶解在DMF（3 mL）中，並冷卻至0℃。加入HATU（50 mg，0.132 mmol）和N,N-二異丙基乙胺（46μL，0.264 mmol），加入完成後在0°C下攪拌30分鐘。將反應粗品在製備HPLC（含甲酸的乙腈/水）（含有0.1%甲酸的乙腈/水）上直接純化，得到化合物57（80mg，67%收率）。ESI-MS m /z： $[M]^{2+}$ 計算值 $C_{91}H_{109}F_2N_{15}O_{18}$： 868.90；實測值 868.90.

【0289】 實施例 90.（S）-N,N'-（（（（（2S,20S）-2,20-二甲基-4,7,15,18-四氧基-3,8,11,14,19-五氮二十一烷-1,21-二醯基）雙（氮雜二基））雙（4,1-亞苯基））雙（亞甲基）雙（1-（（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二氧基-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4'：6,7] 吲嗪並

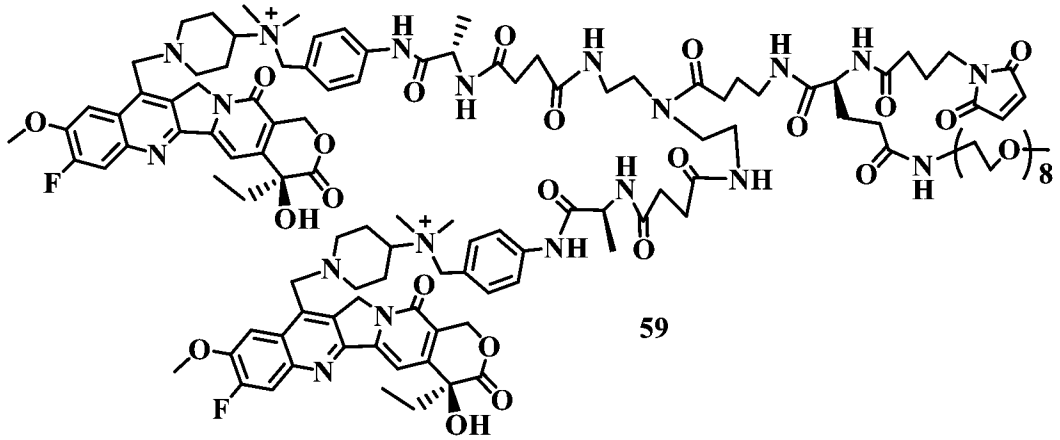
[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）-N,N-二甲基六氫吡啶-4-鎓）（58）的合成



58

將化合物57（80mg，0.043mmol）溶解在二氯甲烷和三氟乙酸（3ml/1ml）的混合物中，並在室溫下攪拌30分鐘。將反應混合物濃縮，得到化合物58（100%收率）。ESI-MS m/z：$[M]^{2+}$ 計算值 $C_{86}H_{101}F_2N_{15}O_{16}$：818.87；實測值818.87。

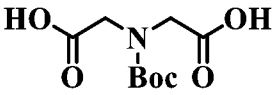
【0290】實施例 91.（S）-N,N'-（（（（（2S,20S）-11-（（S）-30-（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-27,31-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧雜-26,32-二氮雜三十六烷-36-醯基）-2,20-二甲基-4,7,15,18-四側氧基-3,8,11,14,19-戊氮雜二十一烷-1,21-二醯基）雙（氮雜二基）雙（4,1-亞苯基））雙（亞甲基）雙（1-（（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二側氧基-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4'：6,7] 吲嗪並[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）-N,N-二甲基六氫吡啶-4-鎓）（**59**）的合成



59

在0℃下，向化合物58（74 mg，0.043 mmol）和化合物19（39 mg，0.0516 mmol）的DMF（3 mL）溶液中加入N,N-二異丙基乙胺（15 μL，0.086 mmol）。將反應升溫至室溫並攪拌2小時。濃縮後，藉由製備HPLC（含有甲酸的乙腈/水）純化殘餘物，得到化合物59（12mg）。ESI-MS m/z： $[M]^{2+}$ 計算值 $C_{120}H_{157}F_2N_{19}O_{30}$： 1191.06；實測值1191.06。

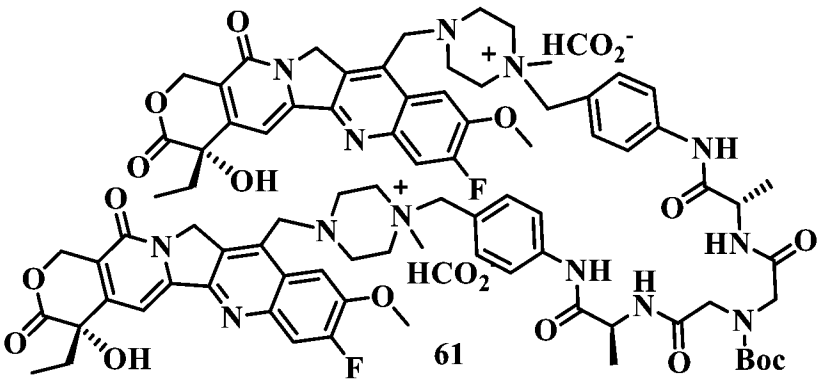
【0291】實施例 92. 2,2'-（（第三丁氧羰基）氮雜二基）二乙酸（60）的合成



60

將亞胺基二乙酸（5.0 g，37.6 mmol）溶解在四氫呋喃（50 mL）和水（50 mL）中，與 $NaHCO_3$（12.6 g，150 mmol）混合。在約 5 °C 下緩慢加入 Boc_2O （9.8 g，45.1 mmol），然後將反應升溫至室溫並攪拌2天。將反應混合物用水（100 mL）稀釋，用乙酸乙酯（2 × 30 mL）洗滌，然後用濃鹽酸調節至pH 1.0。溶液用乙酸乙酯（3×50mL）萃取，合併的有機相用水（50mL）洗滌，無水硫酸鈉乾燥，過濾並濃縮，用乙酸乙酯/石油醚打漿得到白色固體（5.5 g，63%收率）。ESI-MS m/z： $[M + H]^+$ 計算值 $C_9H_{15}NO_6$： 234.09；實測值234.09。

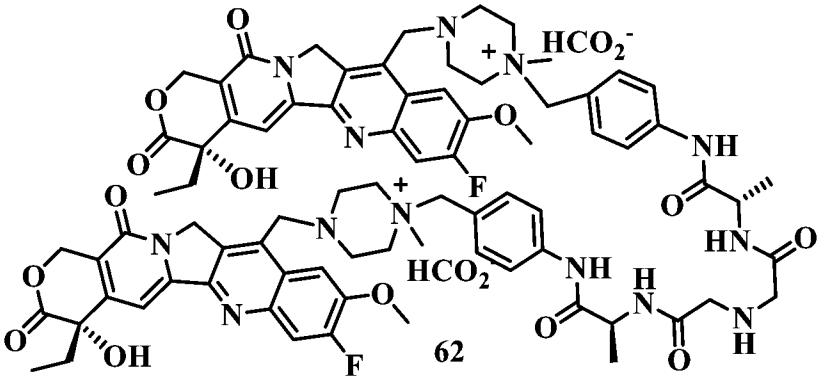
【0292】實施例 93.（S）-1,1'-（（（（2S,2'S）-2,2'-（（第三丁氧羰基）氮雜二基）雙（乙醯基））雙（氮雜二基））雙丙醯基）雙（氮雜二基）雙（4,1-亞苯基）雙（亞甲基））雙（4-（（（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二側氧基-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃[3',4'：6,7] 吲嗪並[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）-1-甲基吡嗪-1-鎓）甲酸鹽（61）的合成



61

將化合物 36 （109 mg，0.12 mmol） 和化合物 60 （14 mg，0.06 mmol）的 DMF （3 mL）溶液冷卻至 0 °C，加入 HATU （50 mg，0.132 mmol） 和 N,N -二異丙基乙胺（84 μL，0.48mmol）。將反應在0℃攪拌30分鐘，然後藉由製備C-18 HPLC（含有甲酸的乙腈/水）純化，得到化合物61（61mg，62%收率）。ESI-MS m/z： $[M]^{2+}$ 計算值 $C_{83}H_{95}F_2N_{13}O_{16}$： 783.85；實測值783.85。

【0293】 實施例 94.（S）-1，1'-（（（（（2S,2'S）-2,2'-（（2,2'-氮雜二基雙（乙醯基））雙（氮雜二基））雙（丙醯基））雙（（4,1-亞苯基））雙（亞甲基））雙（4-（（（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二氧基-3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7] 吲嗪並[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）-1-甲基呱嗪-1-鎓）甲酸鹽（62）的合成

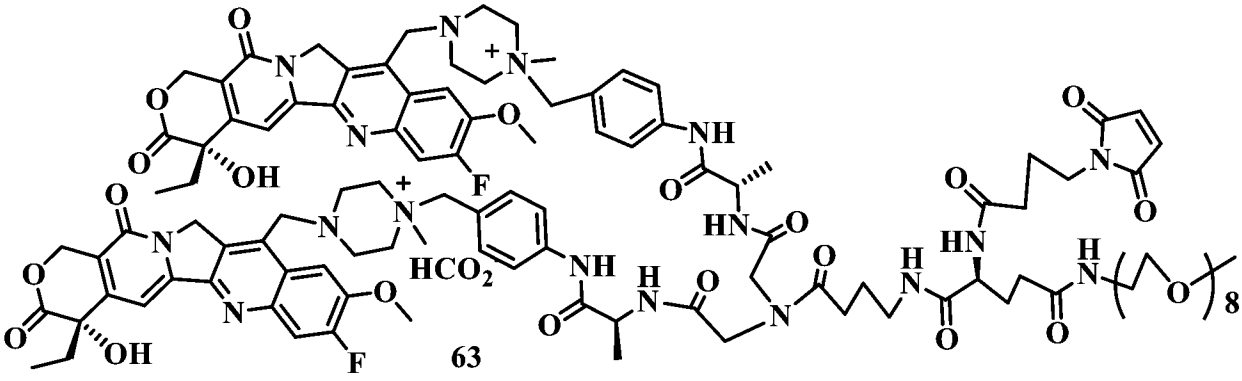


62

將化合物 61 （61 mg，0.036 mmol） 溶解在三氟乙酸 /二氯甲烷（1 mL/3 mL） 中並在室溫下攪拌30分鐘。將反應混合物用甲苯（4mL）稀釋並濃縮至乾，得到化合物62（59.3mg，>100%收率）。

ESI-MS m/z： $[M]^{2+}$ 計算值 $C_{78}H_{87}F_2N_{13}O_{14}$： 733.82；實測值733.82。

【0294】 實施例 95. 1-（4-（（30S,41S）-30-（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-37-（2-（（S）-1-（（4-）（（4-（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二側氧基-3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7]吲嗪[1,2-b]喹啉-11-甲基）-1-甲基-呱嗪-1-鎓-1-基）甲基）苯基）胺基）-1-側氧基丙烷-2-基）胺基）-2-側氧基乙基）-41-甲基-27,31,36,39-四側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧基-26,32,37,40-四氮雜四十二醯胺基）-苄基）-4-（（（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二側氧基-3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7] 吲嗪並[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）-1-甲基呱嗪-1-鎓-甲酸鹽（63）的合成

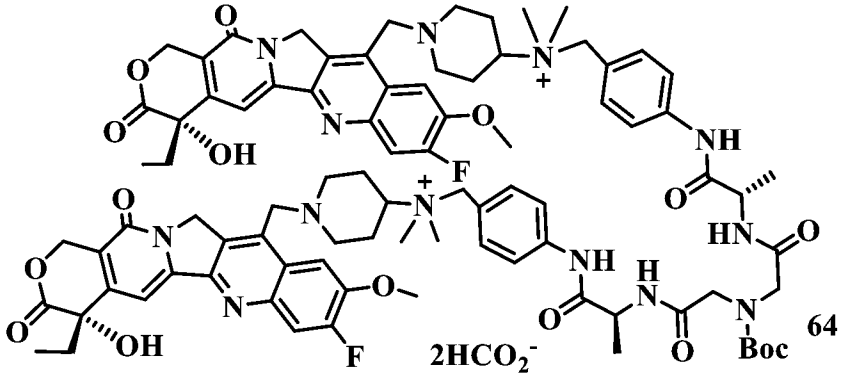


63

將化合物 62 （65 mg，0.036 mmol） 和化合物 18 （27 mg，0.036 mmol） 的 DMF （3 mL）溶液冷卻至 0 °C，加入 HATU （17.5 mg，0.046 mmol） 和 N,N -二異丙基乙胺（26 μL，0.144 mmol）。在0°C攪拌30分鐘，然後藉由製備C-18 HPLC（含有2%甲酸的乙腈/水）純化，得到化合物63（39 mg，62%收率）。ESI-MS m/z： $[M]^{2+}$ 計算值 $C_{112}H_{143}F_2N_{17}O_{28}$： 1106.01；實測值1106.01。

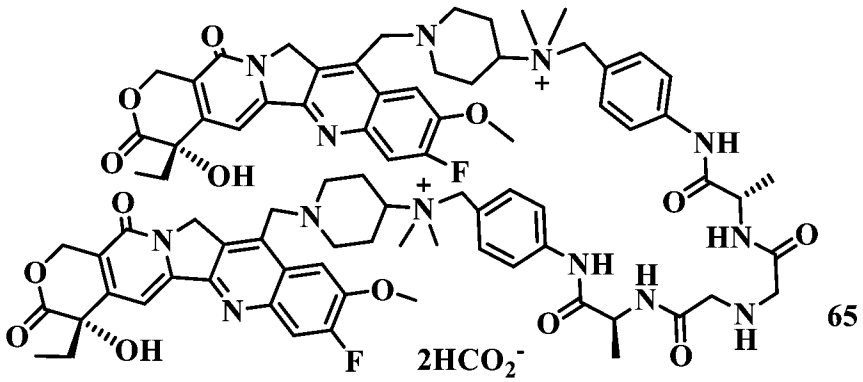
【0295】 實施例 96.（S）-N,N'-（（（（2S,2's）-2,2'-((2,2'-（（第三丁氧羰基）氮雜二基）雙（乙醯基））雙（氮雜二基））雙（丙醯基））雙（氮雜二基）雙（4,1-亞苯基））雙（亞甲基）雙（1-

（（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二側氧基-3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7]吲嗪並[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）-N,N-二甲基六氫吡啶-4-鎓）甲酸鹽（64）的合成



向冷卻至 0 °C的化合物 24 （106 mg，0.113 mmol） 和化合物 60 （13 mg，0.056 mmol） 的 DMF （3 mL）溶液中，加入 HATU （43 mg，0.113 mmol） 和 N,N -二異丙基乙胺（39 μL，0.226 mmol）。將反應攪拌4小時，然後藉由製備C-18 HPLC（含有甲酸的乙腈/水）純化，得到化合物64（71mg，74%收率）。ESI-MS m/z： $[M]^{2+}$ 計算值 $C_{87}H_{103}F_2N_{13}O_{16}$： 811.8801；實測值811.8875。

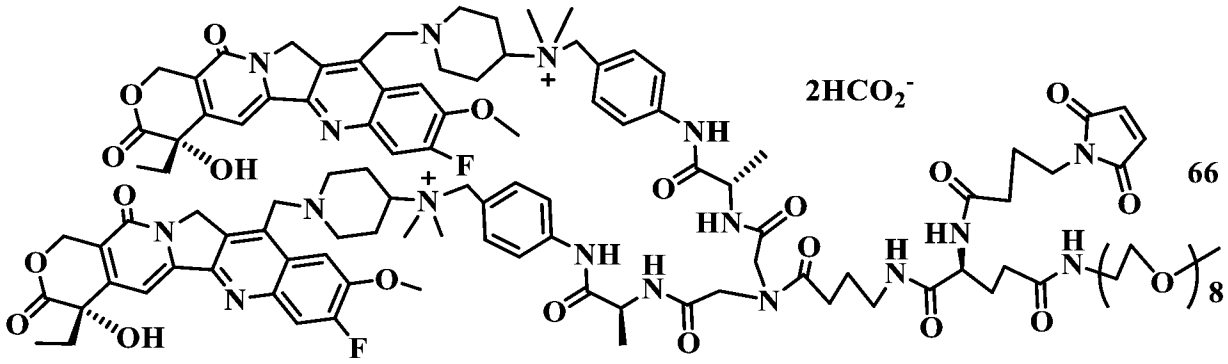
【0296】實施例 97. （S）-N,N'-（（（（（2S,2's）-2，2'-（（2,2'-氮雜二基雙（乙醯基））雙-（氮雜二基））雙（丙醯基））雙（氮雜二基）雙（4,1-亞苯基））雙（亞甲基）雙（1-（（（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二側氧基-3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7] 吲嗪並[1,2-b]喹啉-11-基）甲基-N,N-二甲基六氫吡啶-4-鎓）甲酸鹽（65）的合成



65

將化合物 64 （71 mg，0.041 mmol） 溶解在三氟乙酸 /二氯甲烷（1 mL/3 mL） 中並在室溫下攪拌30分鐘。將反應混合物用甲苯（5mL）稀釋並濃縮至乾，得到化合物65（70mg，>100收率）。ESI-MS m/z： $[M]^{2+}$ 計算值 $C_{82}H_{95}F_2N_{13}O_{14}$： 761.8539；實測值761.8595。

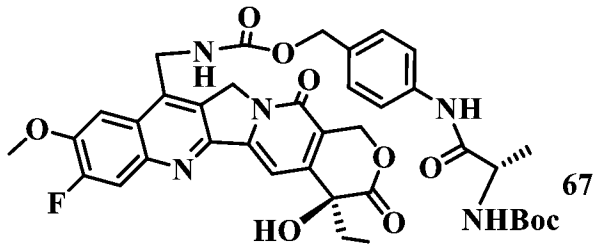
【0297】 實施例 98. S N-（4-（（30S,41S）-30-（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-37-（2-（（（S）-1-（（4-（（（1-）（（（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二側氧基-3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7]吲嗪並[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）六氫吡啶-4-基）二甲基胺）甲基）苯基）胺基）-1-側氧基丙烷-2-基）胺基）-2-側氧基乙基）-41-甲基-27,31,36,39-四側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧基-26,32,37,40-四氮雜四十二醯胺基）-苄基）-1-（（（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二側氧基-3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7]吲嗪並[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）-N,N-二甲基六氫吡啶-4-鎓甲酸鹽（66）的合成



66

向冷卻至 0 °C的化合物 65（70 mg，~0.041 mmol）和化合物 18（32 mg，0.041 mmol）的 DMF（4 mL）的溶液中，加入 HATU（19 mg，0.049 mmol）和 N,N-二異丙基乙胺（28 μL，0.164 mmol）。將反應攪拌4小時，然後藉由製備C-18 HPLC（含有甲酸的乙腈/水）純化，得到化合物66（43mg，45%收率）。ESI-MS m/z： $[M]^{2+}$ 計算值 $C_{116}H_{151}F_2N_{17}O_{28}$： 1134.04；實測值1134.04。

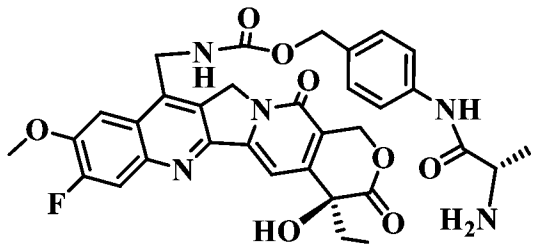
【0298】 實施例 99. 4-（（S）-2-（（第三丁氧羰基）胺基）丙醯胺）苄基（（（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7]吲嗪[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）胺基甲酸酯（67）的合成



67

向化合物3（83 mg，0.282 mmol）的二氯甲烷（2 mL）溶液中加入三光氣（30 mg，0.094 mmol）和三乙胺（37μL，0.282 mmol）。然後將反應物自然升溫至室溫並攪拌1小時，濃縮至乾。將化合物26（100mg，0.235mmol）溶於DMF（2ml）中並冷卻至0℃，向其中加入三乙胺（37μL，0.282mmol）和上述氯甲酸酯。加入完成後，將所得混合物在0°C下攪拌1小時，然後藉由製備C-18 HPLC（含甲酸的乙腈/水）純化，得到化合物67（122 mg，70%收率）。ESI-MS m/z： $[M + H]^+$ 計算值 $C_{38}H_{40}FN_5O_{10}$： 746.2838；實測值746.2898。

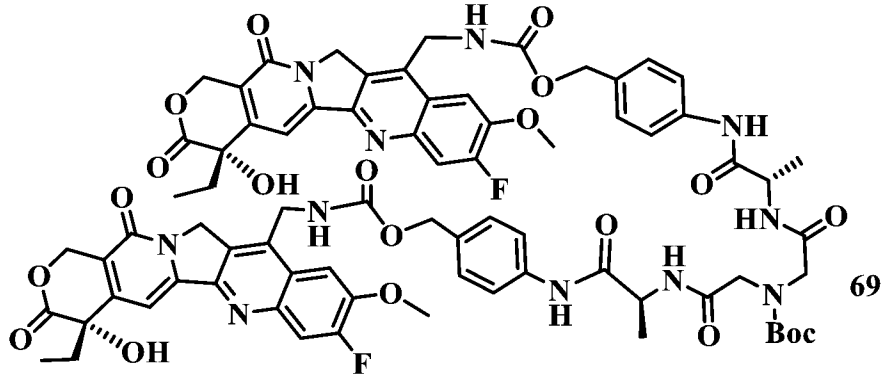
【0299】 實施例 100. 4-（S）-2-胺基丙烷）苄基（（（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二側氧基-3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7]吲嗪並[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）胺基甲酸酯的合成（68）



68

將化合物67（122.5mg，0.164mmol）溶解在三氟乙酸 /二氯甲烷（1ml/3ml）中，並在室溫下攪拌30分鐘。將反應混合物用甲苯（4mL）稀釋並濃縮至乾，得到化合物68（120.2mg，100%收率）。ESI-MS m/z： $[M + H]^+$ 計算值 $C_{33}H_{32}FN_5O_8$： 646.22；實測值646.22。

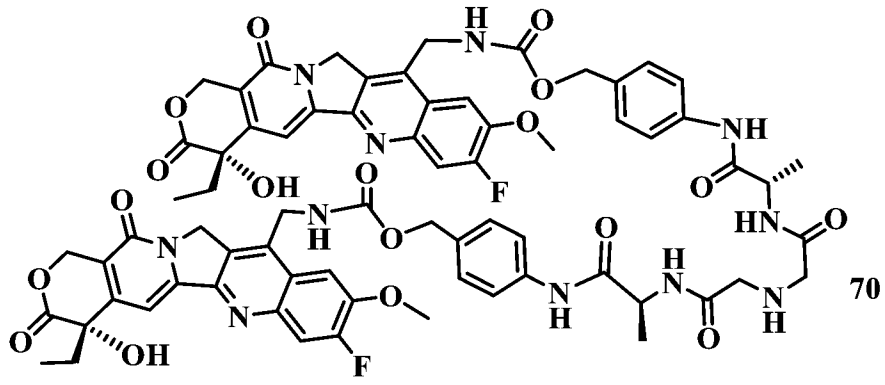
【0300】實施例 101. 第三丁基雙（2-（（（S）-1-（（4-（（（（（（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二側氧基-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4'：6,7]吲嗪並[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）氨甲醯）氧基）苯基）胺基-1-側氧基丙烷-2-基）胺基）-2-氧乙基甲酸酯的合成（69）



69

向冷卻至 0 °C的化合物 68 （120 mg，0.164 mmol） 和化合物 60 （19 mg，0.082 mmol） 的 DMF （3 mL）溶液中，加入 HATU （62 mg，0.164 mmol） 和 N,N -二異丙基乙胺（57 μL，0.328 mmol）。將反應攪拌8小時，濃縮，然後藉由製備C-18 HPLC（含有甲酸的乙腈/水）純化，得到化合物69（171mg，70%收率）。ESI-MS m/z： $[M + H]^+$ 計算值 $C_{75}H_{76}F_2N_{11}O_{20}$： 1488.5237；實測值1488.5295。

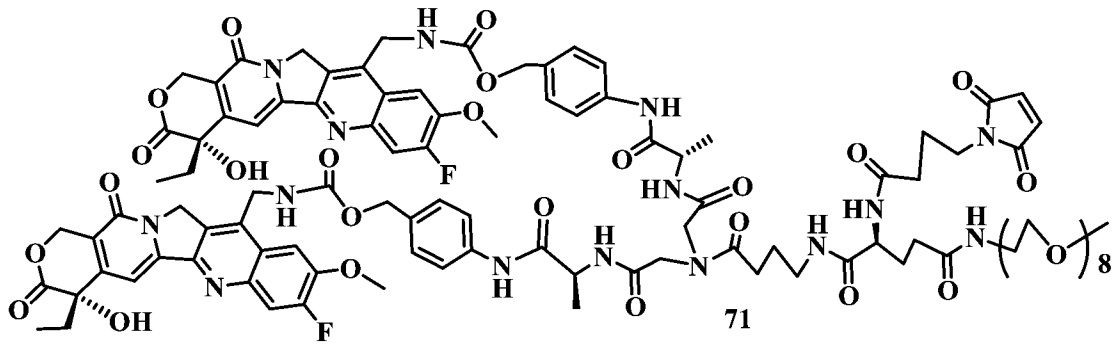
【0301】實施例 102.（（（（2S,2's）-2,2'-（（2,2'-氮雜二基雙（乙醯基）雙（氮雜二基）-雙（丙炔基）雙（（4,1-亞苯基））雙（亞甲基）雙（（（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二側氧基3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4'：6,7]吲嗪並[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）胺基甲酸酯的合成（70）



70

將化合物69（171 mg，0.115 mmol）溶解在三氟乙酸 /二氯甲烷（1 mL/3 mL）中，並在室溫下攪拌30分鐘。將反應混合物濃縮至乾，得到化合物70（172 mg，>100%收率）。ESI-MS m/z： $[M + H]^+$ 計算值 $C_{70}H_{68}F_2N_{11}O_{18}$： 1388.46；實測值1388.46。

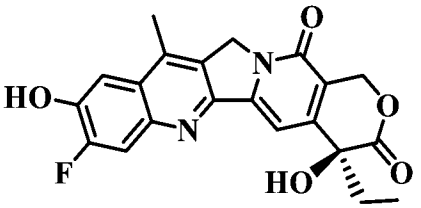
實施例 103.（（（（2S,2's）-2,2'-（（（S）-30-（4-（2,5-二氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-27,31,36-三側氧基-37-（2-側氧基乙基）-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧雜-26,32,37-三氮雜三十九烷-39-醯基）雙（氮雜二基））雙（丙醯基））雙（氮雜二基））雙（4,1-亞苯基）雙（亞甲基）雙（（（（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二側氧基-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4'：6,7] 吲嗪[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）胺基甲酸酯）（71）的合成



71

向冷卻至 0 °C 的化合物 70 （172 mg，0.115 mmol） 和化合物 18 （87 mg，0.115 mmol） 的 DMF （3 mL）溶液中，加入 HATU （52 mg，0.138 mmol） 和 N,N -二異丙基乙胺（40 μL，0.23 mmol）。將反應攪拌4小時，然後藉由製備C-18 HPLC（含有甲酸的乙腈/水）純化，得到化合物71（122mg，50%收率）。ESI-MS m/z： $[M + H]^+$ 計算值 $C_{104}H_{123}F_2N_{15}O_{32}$： 2132.84；實測值2132.84。

【0302】 實施例 104. （S）-4-乙基-8-氟-4,9-二羥基-11-甲基-1H-吡喃並[3',4'：6,7] 吲嗪[1,2-b]喹啉-3,14（4H,12H）-二酮（72）的合成

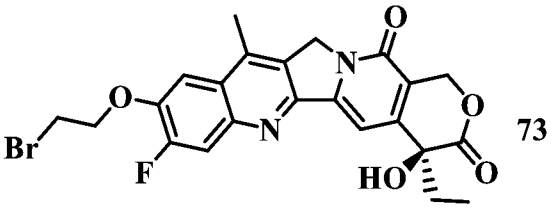


72

將1-（2-胺基-4-氟-5-羥基苯基）乙酮（0.41 g，2.5 mmol）和（S）-4-乙基-4-羥基-7，8-二氫-1H-吡喃[3，4-f] 吲嗪-3，6，10（4H）-三酮（0.62 g，2.5 mmol）溶于無水甲苯（40 mL）中，並加入對甲苯磺酸（46 mg，0.25 mmol）。將懸浮液回流加熱3天，冷卻至室溫除去溶劑後，用柱層析純化殘餘物，得到化合物72（0.69克，收率73%），為灰色粉末狀固體。ESI-MS m/z： $[M + H]^+$ 計算值 $C_{21}H_{17}FN_2O_5$： 397.11；實測值397.16。

【0303】 實施例 105. （S）-9-（2-溴乙氧基）-4-乙基-8-氟-4-羥基

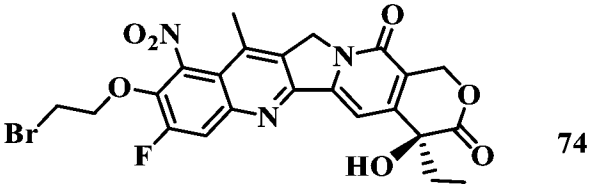
-11-甲基-1H-呱喃並 [3',4' ： 6,7] 吲嗪-3,14（4H,12H）-二酮的合成（73）



73

將化合物72（0.69 g，1.74 mmol），無水1，2-二溴乙烷（6.4 g，34.8 mmol）和無水K_2CO_3（1.2 g，8.7 mmol）在無水DMF（10 mL）中，80°C下機械攪拌16小時。將反應混合物藉由矽藻土墊過濾，過濾後的殘留物用DMF充分洗滌。將合併的濾液和洗滌液真空濃縮至乾，得到深色殘留物，用柱層析純化（0-5%甲醇/二氯甲烷），得到化合物73（0.74g，85%）。ESI-MS m/z： $[M + H]^+$ 計算值 $C_{23}H_{20}BrFN_2O_5$：503.05；實測值503.05。

【0304】實施例 106.（S）-9-（2-溴乙氧基）-4-乙基-8-氟-4-羥基-11-甲基-10-硝基-1H-呱喃並[3',4' ： 6,7 吲嗪並[1,2-b]喹啉-3,14（4H,12H）-二酮的合成（74）

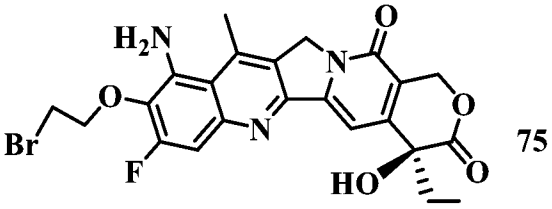


74

在0°C下，向攪拌的濃H_2SO_4（1 mL）中緩慢加入化合物73（0.74 g，1.47 mmol），將所得澄清溶液冷卻至-10°C。將濃硫酸（0.5 mL）和發煙硝酸（0.5 mL）的混合物預冷卻至-10°C，在-10°C下滴加到上述冷卻的反應混合物中。將反應混合物升溫至0°C，再攪拌1小時，然後緩慢倒在冰片上。將黃色沉澱物過濾收集，並用水，冷的乙醇和乙醚洗滌。洗滌液藉由矽藻土墊再次過濾，然後用30%甲醇 / 二氯甲烷（50mL）洗滌

矽藻土濾餅。將有機溶劑蒸發得到了更多的黃色固體。將所有黃色固體合併，用乙醇打漿得到化合物74（0.74g，92%）。ESI-MS m/z $[M + H]^+$：計算值 $C_{23}H_{19}BrFN_3O_7$： 548.04；實測值548.14。

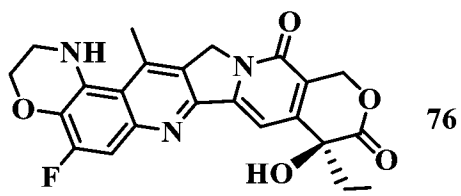
【0305】 實施例 107.（S）-10-胺基-9-（2-溴乙氧基）-4-乙基-8-氟-4-羥基-11-甲基-1H-呱喃 並[3',4'：6,7] 吲嗪並[1,2-b]喹啉-3,14（4H,12H）-二酮的合成（75）



75

0℃下，向攪拌的濃鹽酸溶液（18mL）中，分小份加入化合物74（0.50g，0.91mmol），15分鐘後將所得澄清溶液冷卻至-10℃。向反應混合物中分小份加入$SnCl_2$（0.86 g，4.55 mmol），並自然升溫至室溫，攪拌 1.5 小時，然後慢慢倒在冰塊上。過濾收集沉澱，用乙醇和Et_2O洗滌，洗滌液用10% 甲醇/二氯甲烷萃取。將有機溶液與過濾的沉澱溶解在 30% 甲醇/二氯甲烷中，然後藉由短矽膠墊純化，用 30% 甲醇/二氯甲烷溶離。除去有機溶劑，得到化合物75（0.44 g，94%），無需進一步純化即可用於下一步。

【0306】 實施例 108.（S）-9-乙基-5-氟-9-羥基-16-甲基-2,3,12,15-四氫-[1,4]惡嗪並[3,2-f]呱喃並[3',4'：6,7] 吲嗪並[1,2-b]喹啉-10,13（1H,9H）-二酮（76）的合成

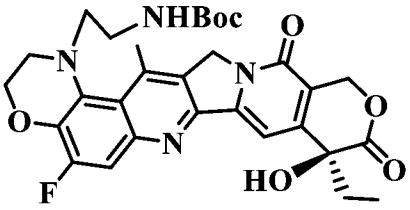


76

將化合物 75 （0.44 g，0.85 mmol） 的 DMSO （4 mL）溶液 和

$NaHCO_3$ （0.10 g，1.19 mmol）在 70 °C 下攪拌 4小時，然後用鹽酸（0.1 M，8 mL） 和 水 （ 40 mL）稀釋。將析出的固體過濾，溶解在少量10% 甲醇/二氯甲烷中，用（1：20 -1：6） 甲醇/二氯甲烷作為溶離液進行柱層析純化，得到化合物76 （0.24 g，66%）。ESI-MS m/z： [M + H]$^+$ 計算值 $C_{23}H_{20}FN_3O_5$： 438.14；實測值438.14。

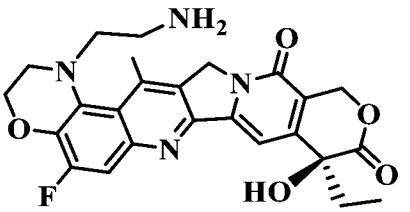
【0307】 實施例 109. （S）-第三丁基（2-（9-乙基-5-氟-9-羥基-16-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10-四氫-[1,4]惡嗪並 [3,2-f]呱喃並[3',4'：6,7] 吲嗪[1,2-b]喹啉-1（12H,13H,15H）-基）乙基）胺基甲酸酯（77）的合成



77

向化合物 76 （0.20 g，0.456 mmol） 的無水 DMF （2 mL） 溶液中加入 NaI （0.68 g，4.56 mmol） 和 （2-氯乙基） 胺基甲酸第三丁酯（0.82 g，4.56 mmol），將混合物在120°C加熱18小時。將反應混合物冷卻至室溫，真空蒸乾，藉由柱層析純化（0-5% 甲醇/二氯甲烷），得到化合物77（0.19 g，75%）。ESI-MS m/z： [M + H]$^+$ 計算值 $C_{30}H_{33}FN_4O_7$： 581.23；實測值581.40。

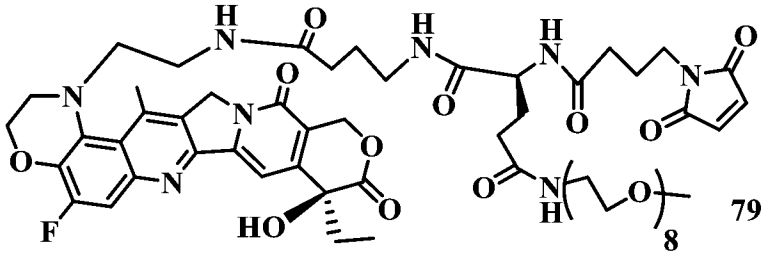
【0308】 實施例 110.（S）-1-（2-胺基乙基）-9-乙基-5-氟-9-羥基-16-甲基-2,3,12,15-四氫-[1,4]惡嗪並[3,2-f]呱喃並[3',4'：6,7]吲嗪並[1,2-b]喹啉-10,13（1H,9H）-二酮（78）的合成



78

向化合物 77 （0.19 g，0.327 mmol） 的二氯甲烷 （5 mL）溶液 中加入 TFA （2.5 mL），並在室溫下攪拌反應30分鐘。將反應混合物濃縮，與二氯甲烷共沸蒸發3次，得到化合物78，其無需進一步純化直接用於下一步。

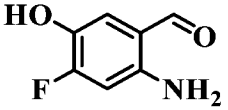
【0309】 實施例 111.化合物79的合成



79

將上一步得到的化合物78和化合物19（0.45 g，0.49 mmol）溶解在DMF（5 mL）中，冷卻至約0℃，然後加入N,N-二異丙基乙胺（172 μL，0.98 mmol）。將反應升溫至室溫。攪拌2小時，濃縮，用製備HPLC（含甲酸的乙腈/水）純化，得到化合物79（359mg，60%收率）。ESI-MS m/z： $[M + H]^+$ $C_{59}H_{81}FN_8O_{19}$計算值： 1224.56；實測值1224.78。

【0310】 實施例 112. 2-胺基-4-氟-5-羥基苯甲醛（80）的合成

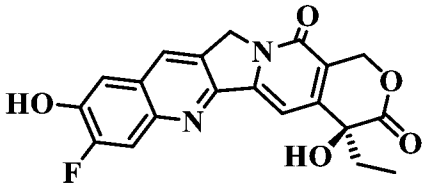


80

在 0℃下，向 4-氟-3-甲氧基苯甲醛（770 mg，5.0 mmol）的濃硫酸（10 mL）溶液中滴加發煙硝酸（95%，315 mg，4.8 mmol）。將混合物在室溫攪拌1小時，然後倒入冰水中，過濾，濾餅用水洗滌，然後乾燥。將所得固體溶於DMF（20 mL）中，加入氯化鋰（1.6 g，25 mmol）並將混合物回流4小時，然後倒入水中，滴加濃鹽酸至pH 4。溶液用乙酸乙酯萃取，有機層用鹽水洗滌，乾燥並真空濃縮。向所得殘餘物中加入乙醇/水（25 mL，4：1）、鐵粉（1.21 g，22 mmol）和氯化銨（433 mg，8.1 mmol）。將混合物在80℃攪拌2h，然後濾出固體。向濾液中加入水，所

得混合物用乙酸乙酯萃取。有機層用鹽水洗滌，乾燥，濃縮，柱層析純化，得到標題化合物（125mg，16收率）。ESI-MS m/z： [M + H]$^+$ $C_7H_6FNO_2$計算值： 156.04；實測值156.04。

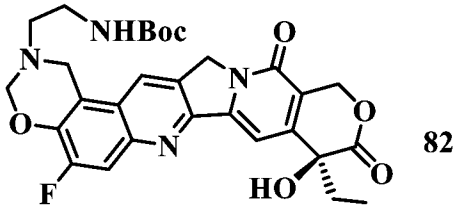
【0311】 實施例 113.（S）-4-乙基-8-氟-4,9-二羥基-1H-吡喃並[3',4'：6,7]吲嗪並[1,2-b]喹啉-3,14（4H,12H）-二酮（81）的合成



81

將化合物80（0.125 g，0.805 mmol）和（S）-4-乙基-4-羥基-7,8-二氫-1H-吡喃並[3,4-f]吲嗪-3,6,10（4H）-三酮（0.202 g，0.76 mmol）溶于無水甲苯（40 mL）中，並加入對甲苯磺酸（13 mg，0.076 mmol）。將懸浮液回流加熱2天，冷卻至室溫，除去約三分之二甲苯後，過濾殘餘物並用二氯甲烷洗滌濾料，自然晾乾得到化合物81（0.26g，90%收率），為灰色粉末狀固體。ESI-MS m/z： [M + H]$^+$ $C_{20}H_{16}FN_2O_5$計算值： 383.10；實測值383.10。

【0312】 實施例 114.（S）-第三丁基（2-（9-乙基-5-氟-9-羥基-10,13-二側氧基-9,10-二氫-[1,3]惡嗪並[5,6-f]吡喃並[3',4'：6,7]吲嗪並[1,2-b]喹啉-2（1H,3H,12H,13H,15H）-基）乙基）胺基甲酸乙酯（82）的合成

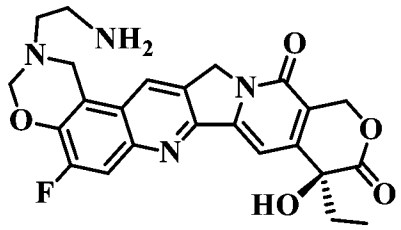


82

將 N-Boc-乙二胺 （50 mg，0.31 mmol） 和多聚甲醛 （70 mg，0.78 mmol） 的 1,4-二惡烷 （5 mL）溶液在約 100 °C 下加熱 2小時，然

後冷卻至室溫，加入化合物81（100mg，0.26mmol）。將反應再次加熱至 100°C 並攪拌 2 天，冷卻至室溫。並藉由製備C-18 HPLC（含有甲酸的乙腈/水）純化，得到化合物82（117mg，80%收率）。ESI-MS m/z：$[M + H]^+$ $C_{29}H_{31}FN_4O_7$計算值： 567.22；實測值567.22。

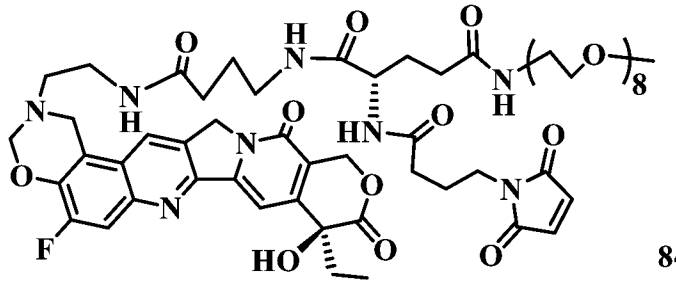
【0313】 實施例 115.（S）-2-（2-胺基乙基）-9-乙基-5-氟-9-羥基-2,3,12,15-四氫-[1,3]惡嗪並[5,6-f]呱喃並[3',4'：6,7]吲嗪並[1,2-b]喹啉-10,13（1H,9H）-二酮（83）的合成



423

將化合物82 （117 mg，0.208 mmol）溶解於三氟乙酸 /二氯甲烷（2 mL/6 mL）並在室溫下攪拌1小時。將反應混合物濃縮至乾，得到黃色固體83（117g，>100收率）。ESI-MS m/z： $[M + H]^+$ $C_{24}H_{23}FN_4O_5$計算值： 467.17；實測值467.17。

【0314】 實施例 116.（S）-2-（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯啶-1-基）丁醯胺-N1-（4-（（2-（S）-9-乙基-5-氟-9-羥基-10,13-二側氧基-9,10-二氫-[1,3]惡嗪並[5,6-f]呱喃並[3',4'：6,7]吲嗪並[1,2-b]喹啉-2（1H,3H,12H,13H,15H）-基）乙基）胺基）-4-側氧基丁基）-N5-（2,5,8,11,14,17,20,23-八氧雜二十五烷-25-基）戊二醯胺 （84）

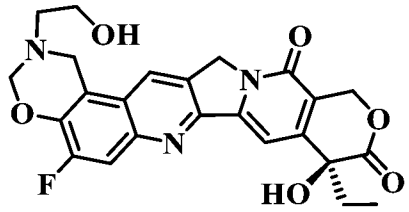


84

將化合物 83 （120 mg，0.208 mmol） 和化合物 19 （193 mg，

0.208 mmol） 的 DMF （5 mL）溶液冷卻至 0 °C，加入 N,N-二異丙基乙胺 （72 μL，0.416 mmol）。將反應升溫至室溫。攪拌2小時，濃縮，藉由製備HPLC（含甲酸的乙腈/水）純化，得到化合物84（100mg，40%收率）。ESI-MS m/z： $[M + H]^+$ $C_{58}H_{79}FN_8O_{19}$計算值： 1211.54；實測值1211.54。

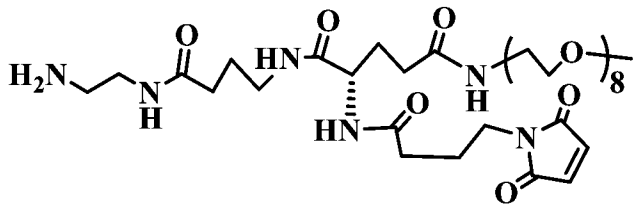
【0315】 實施例 117. （S）-9-乙基-5-氟-9-羥基-2-（2-羥乙基）-2,3,12,15-四氫-[1，3]惡嗪並[5,6-f]呱喃並[3',4'：6,7]吲嗪並[1,2-b]喹啉-10,13（1H,9H）-二酮的合成 （85）



85

將乙醇胺（19 mg，0.31 mmol）和多聚甲醛（70 mg，0.78 mmol）的 1,4-二惡烷（5 mL）溶液在約 100 °C 下加熱 2 小時，然後冷卻至室溫，加入化合物81（100mg，0.26mmol）。將反應再次加熱至 100°C 並攪拌 2 天，冷卻至室溫，藉由製備HPLC（含有甲酸的乙腈/水）純化，得到化合物85（91mg，75%收率）。ESI-MS m/z： $[M + H]^+$ $C_{24}H_{22}FN_3O_6$ 計算值： 468.15；實測值468.15。

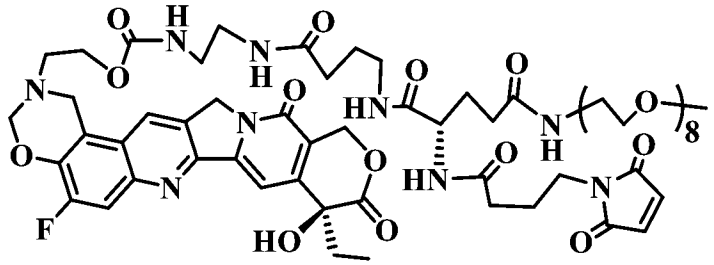
【0316】 實施例 118. （S）-N1-（4-（（2-胺基乙基）胺基）-4-側氧基丁基）-2-（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-N5-（2,5,8,11,14,17,20,23-八氧雜二十五烷-25-基）戊二醯胺（86）的合成



86

將1，2-二乙基二胺（300mg，4.99 mmol）的四氫呋喃（15 mL）溶液和1.0 M NaH_2PO_4（15 mL）用0.1 M H_3PO_4調節至pH 7.5。將混合物冷卻至4～10°C，並在1小時內，分四份將化合物19（700mg，0.75mmol）加入。再攪拌2小時，將混合物濃縮並藉由製備HPLC（含有1%甲酸的乙腈/水）純化，得到化合物86（528mg，收率82%）。ESI-MS m/z： $[M + H]^+$ $C_{36}H_{65}N_6O_{14}$計算值： 805.4560；實測值805.4595。

【0317】 實施例 119. 2-（（S）-9-乙基-5-氟-9-羥基-10,13-二側氧基-9，10-二氫-[1，3]惡嗪並[5,6-f]吼喃並[3',4'：6,7]吲嗪並[1,2-b]喹啉-2（1H,3H,12H,13H,15H）-基）乙基（S）-30-（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-27,31,36-三側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧雜-26,32,37-三氮雜三十九烷-39-基）胺基甲酸酯（87）的合成

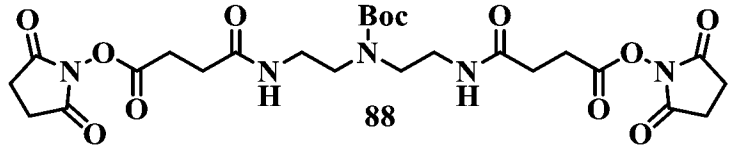


87

在0 °C下，向化合物85（30mg，0.0642 mmol）的四氫呋喃（5mL）溶液和N,N-二異丙基乙胺（15μl，0.091mmol）中，加入4-硝基苯基氯甲酸酯（13mg，0.0646 mmol）。將混合物在0 °C下攪拌4小時，並加入化合物86（55mg，0.0643mmol）和N,N-二異丙基乙胺（10ml，61.2mmol）。將混合物攪拌4小時，濃縮並用製備C-18 HPLC（含1%甲酸的乙腈/水）純化，得到化合物87（39mg，47%收率）。ESI-MS m/z： $[M + H]^+$ $C_{61}H_{85}FN_9O_{21}$計算值： 1298.5845；實測值1298.5935。

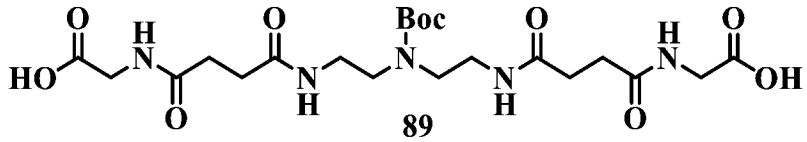
【0318】 實施例 120. 雙（2,5-二側氧基吡咯啶-1-基） 4,4'-

（（（第三丁氧羰基）氮雜二醯基）雙（乙烷-2,1-二基）雙（氮雜二基）雙（4-側氧基丁酸酯）（88）的合成



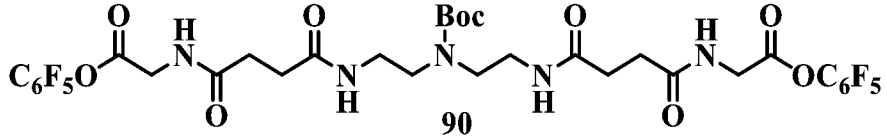
向化合物 49 （201 mg，0.5 mmol） 的 二氯甲烷 （10 mL）溶液中加入 EDC·HCl （287 mg，1.5 mmol） 和 NHS （173 mg，1.5 mmol）。反應在室溫下攪拌1小時，然後用二氯甲烷 （50 mL）稀釋，用水（2 × 10 mL）洗滌，無水硫酸鈉乾燥，過濾並濃縮，得到化合物88（297 mg，100%收率）。ESI-MS m/z： $[M + H]^+$ $C_{25}H_{35}N_5O_{12}$計算值：598.22；實測值598.22。

【0319】 實施例 121. 11-（第三丁氧羰基）-4,7,15,18-四側氧基-3,8,11,14,19-五氮雜二十一烷-1,21-二酸酯（89）的合成



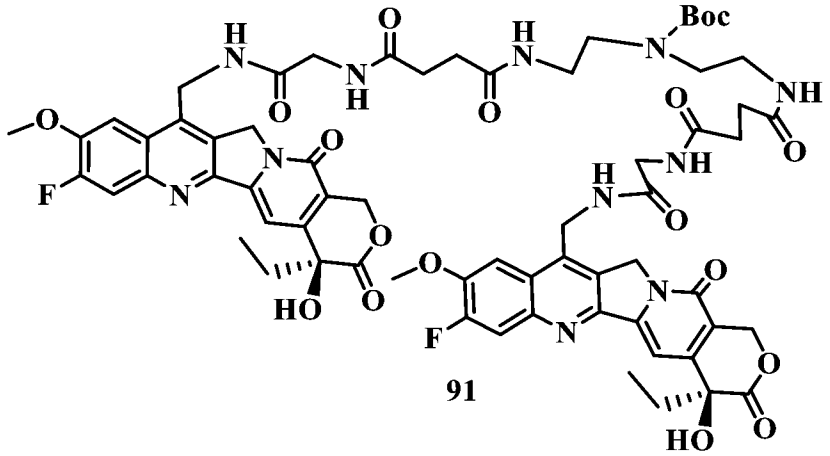
將 H-Gly-OH （94 mg，1.25 mmol） 溶解在水 （10 mL） 中並加入 $NaHCO_3$ （168 mg，2.00 mmol），然後加入化合物 88 （297 mg，0.5 mmol）。將反應在室溫下攪拌1小時並濃縮，藉由製備HPLC（含有甲酸的乙腈/水）純化，得到化合物89（155mg，60%收率）。ESI-MS m/z： $[M + H]^+$ $C_{21}H_{35}N_5O_{10}$計算值： 518.23；實測值518.23。

【0320】 實施例 122. 雙（五氟苯基）11-（第三丁氧羰基）-4,7,15,18-四側氧基-3,8,11,14,19-五氮雜二十一烷-1,21-二酯（90）的合成



向化合物 89 （110 mg，0.12 mmol） 的 二氯甲烷 （5 mL） 溶液中加入五氟苯酚 （48 mg，0.26 mmol） 和 EDC·HCl （50 mg，0.26 mmol）。反應在室溫下攪拌2小時，然後用二氯甲烷（50mL）稀釋，用水（2×10mL）洗滌，用無水硫酸鈉乾燥，過濾並濃縮，得到化合物90（180mg，100%收率）。ESI-MS m/z： $[M + H]^+$ $C_{33}H_{33}F_{10}N_5O_{10}$計算值： 850.20；實測值850.20。

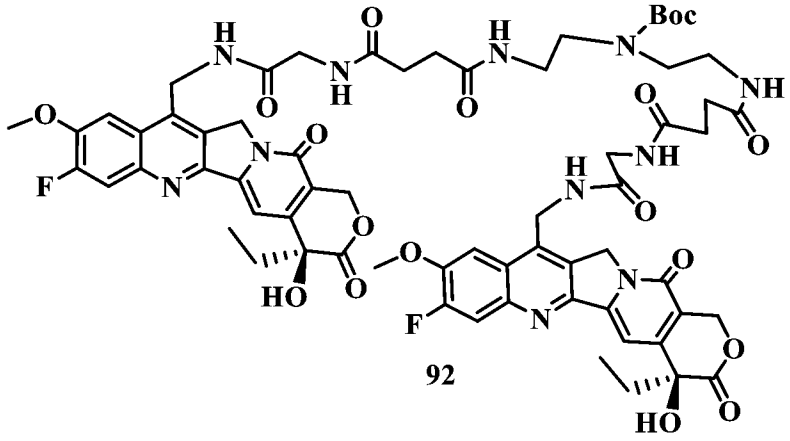
【0321】 實施例 123. 雙（2-（4-（（2-（（（（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二側氧基-3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7]吲嗪並[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）胺基）-2-側氧基乙基）胺基）-4-側氧基丁醯胺基）乙基）胺基第三丁基甲酸酯（91）的合成



在冰水浴上向化合物26（55mg，0.13mmol）的DMF（1 mL）溶液中加入N,N-二異丙基乙胺（27mg，0.21mmol）和化合物90（50mg，0.06mmol）。將反應物升溫至室溫並攪拌1小時，然後濃縮，藉由製備HPLC（含甲酸的乙腈/水）純化，得到化合物91（20mg，收率為25%）。ESI-MS m/z： $[M + H]^+$ $C_{65}H_{72}F_2N_{11}O_{18}$計算值： 1332.49；實測值1332.49。

【0322】 實施例 124. N1，N1'-（氮雜二基雙（乙烷-2,1-二基））雙（N4-（（（（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二側氧基-

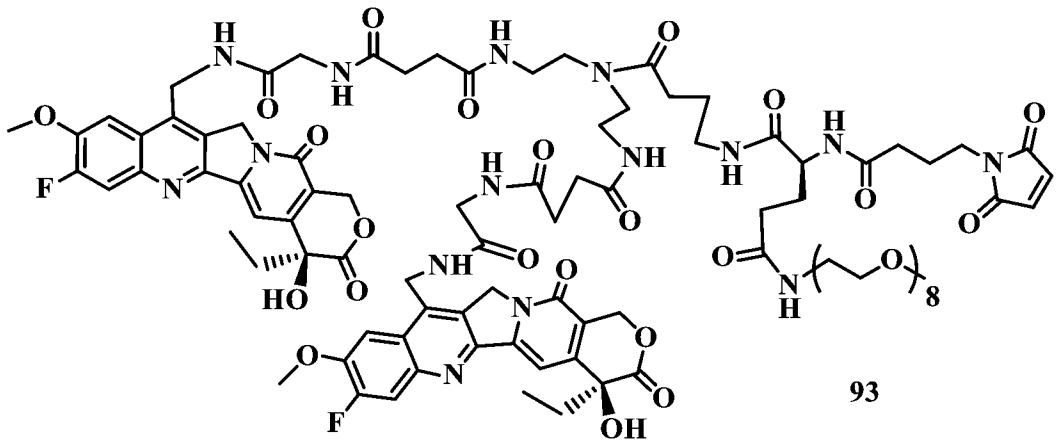
3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7]吲嗪並[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）胺基）-2-側氧基乙基）琥珀醯胺（92）的合成



92

將化合物91（20mg，0.015mmol）溶解在TFA / 二氯甲烷（0.5mL / 1 mL）中，並在室溫下攪拌2小時。將反應混合物濃縮至乾，生成黃色固體（18.5mg，100%收率）。ESI-MS m/z： $[M + H]^+$ $C_{60}H_{63}F_2N_{11}O_{16}$計算值： 1232.44；實測值1232.44。

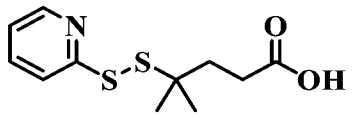
【0323】 實施例 125. （S）-2-（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-N1-（1-（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二側氧基-3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7]吲嗪並[1,2-b]喹啉-11-基）-13-（2-（4-（（2-（（（（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基 -9-甲氧基-3,14-二側氧基-3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7]吲嗪並[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）胺基）-2-側氧基乙基）-4-側氧基丁醯胺基）乙基）-3,6,9,14-四氧雜環氧雜-2,5,10,13-四氮雜十七烷-17-基）-N5-（2,5,8,11,14,17,20,23-八氧雜二十五烷-25-基）戊二醯胺 （93）的合成



93

在冰浴下，向化合物 18（11 mg，0.015 mmol）的 DMF （1 mL）溶液中加入 HATU （11.4 mg，0.03 mmol）和 N,N-二異丙基乙胺 （10 μL，0.06 mmol），然後加入化合物 92 （18.5 mg，0.015 mmol）。將反應在0℃攪拌1小時，然後藉由製備HPLC（含有甲酸的乙腈/水）純化，得到化合物93（10mg，34%收率）。ESI-MS m/z： $[M + H]^+$ $C_{94}H_{119}F_2N_{15}O_{30}$計算值： 1976.82；實測值1976.82。

【0324】實施例 126. 4-（2-吡啶基二硫代）-4-甲基戊酸（94）的合成

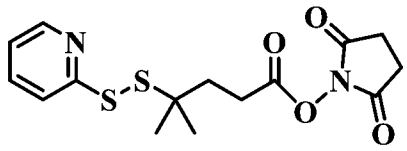


94

將4-巰基-4-甲基戊酸（Goff，D.等，BioConjugate Chem. 1990，1，381-386）（4.67 g，31.5 mmol）的甲醇 （15 mL）溶液加入2,2'-二硫代二吡啶 （30.0 g，136.2 mmol）的甲醇 （80 mL）和 100 mM 磷酸鈉緩衝溶液 （pH 7.5，70 mL）的混合物中。攪拌6小時後，將混合物濃縮，用乙酸乙酯/正己烷（1：1）萃洗。將水相調節至pH 3並用乙酸乙酯（3×100mL）萃取。將有機層合併，用硫酸鈉乾燥，過濾，蒸發濃縮，在矽膠柱（甲醇 /二氯甲烷 / HOAc，1：15：0.01）上純化，得到標題化合物（7.05g，87%）。ESI-MS m/z： $[M + H]^+$ $C_{11}H_{15}NO_2S_2$計算

值： 258.05；實測值258.05。

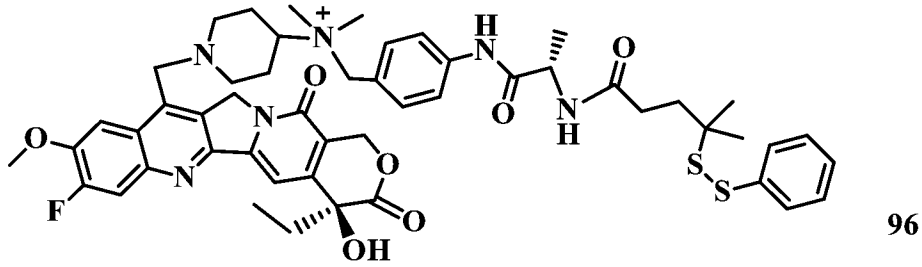
【0325】 實施例 127. 4-（2-吡啶基二硫代）-4-甲基戊酸N-琥珀醯亞胺酯（95）的合成



95

向4-（2-吡啶基二硫代）-4-甲基戊酸（2.0 g，7.78 mmol）的二氯甲烷（20 mL）溶液中加入N-羥基琥珀醯亞胺（1.10 g，9.56 mmol）和EDC·HCl（4.0g，20.8 mmol），將混合物攪拌隔夜，蒸發濃縮後在矽膠柱（乙酸乙酯/二氯甲烷，1:10）上純化，得到標題化合物（2.48g，90%）。ESI-MS m/z： $[M + Na]^+$ 計算值 $C_{15}H_{18}N_2O_4S_2$ 377.07；實測值377.08。

【0326】 實施例 128. 1-（（（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二側氧基-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4'：6,7]吲嗪並[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）-N,N-二甲基-N-（4-（（S）-2-（4-甲基-4-（苯基二硫基）戊醯胺）丙醯胺）苄基）六氫吡啶-4-鎓（96）的合成

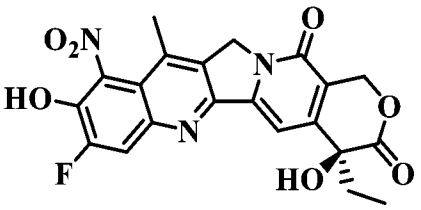


96

在0℃下，將化合物95（15 mg，0.04 mmol）溶解在DMA（2 mL）中，向其中加入化合物24（56.8 mg，0.08 mmol）和N,N-二異丙基乙胺（0.020 mL，0.12 mmol）。將反應升溫至室溫並攪拌2小時，濃縮，用製備HPLC（含有甲酸的乙腈/水）純化，得到化合物96（32mg，86%收率）。ESI-MS m/z： M^+ 計算值 $C_{51}H_{60}FN_6O_7S_2$： 951.39；實測值

951.39。

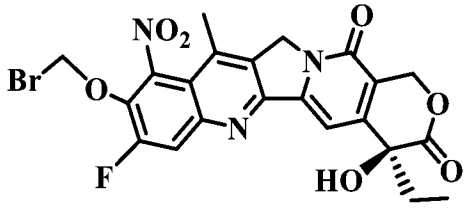
【0327】 實施例 129.（S）-4-乙基-8-氟-4,9-二羥基-11-甲基-10-硝基-1H-吡喃並[3',4'：6,7]吲嗪並[1,2-b]喹啉-3,14（4H,12H）-二酮（97）的合成



97

向化合物 72 （451.1 mg，1.139 mmol） 的二氯甲烷 （10 mL）溶液 中加入 HOAc （1 mL）、Ac_2O （0.2 mL） 和濃 HNO_3 （0.3 mL，4.665 mmol）。將混合物攪拌3小時，用水（10mL）稀釋，單離並用二氯甲烷（3×25mL）萃取水溶液。合併有機層，用硫酸鈉乾燥，過濾，在短矽膠柱上純化，用甲醇/二氯甲烷（1：10）溶離，得到標題化合物（361.6 mg，72% 收率）。ESI-MS m/z： （M+H）$^+$ 計算值 $C_{21}H_{17}FN_3O_7$： 442.3739；實測值442.3810。

【0328】 實施例 130. （S）-9-（溴甲氧基）-4-乙基-8-氟-4-羥基-11-甲基-10-硝基-1H-吡喃並[3',4'：6,7]吲嗪並[1,2-b]喹啉-3,14（4H,12H）-二酮（98）的合成

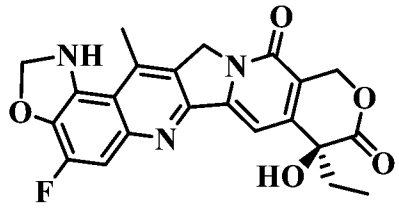


98

向化合物 97（350.3 mg，0.793 mmol），CH_2Br_2（1 mL，14.41 mmol）和 $NaHCO_3$（0.25 g，2.97 mmol）的四氫呋喃溶液在 70 °C下攪拌 8 小時。將混合物濃縮並用鹽酸 （0.1 M，8 mL） 和 水 （40 mL）稀釋。將析出的固體過濾收集，溶於少量（1：10）乙酸乙酯/二氯甲烷，藉由柱層析純化，用甲醇/二氯甲烷（1：10-1：6）溶離，得到標題化合

物（0.366 g，86% 的收率）。ESI-MS m/z： $[M + H]^+$ $C_{22}H_{18}BrFN_3O_7$計算值： 534.0313；實測值534.0385。

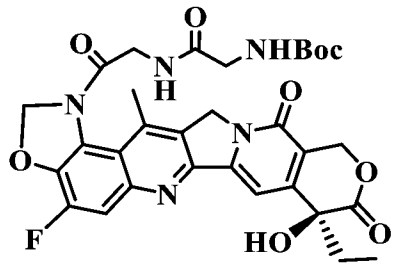
【0329】 實施例 131. （S）-8-乙基-4-氟-8-羥基-15-甲基-11,14-二氫-1H-惡唑並[4,5-f]吡喃並[3',4'：6,7]吲嗪並[1,2-b]喹啉-9,12（2H,8H）-二酮（99）的合成



99

在 0°C，攪拌下向四氫呋喃（10 mL） 和濃鹽酸 （5 mL） 的溶液中，分小份加入化合物 98 （0.360 g，0.675 mmol），15分鐘後將所得澄清溶液冷卻至 -10°C。向反應混合物中分小份加入$SnCl_2$ （0.384 g，2.022 mmol），自然升溫至室溫，攪拌 1.5 小時，然後放在冰上冷卻。在冰上緩慢加入 $NaHCO_3$中和混合物至 pH 5.5 -6.0，然後在 70°C下回流 6 小時後真空濃縮。過濾收集沉澱，用乙醇和Et_2O洗滌，洗滌液用10% 甲醇/二氯甲烷萃取。將有機溶液與溶解在 30% 甲醇/二氯甲烷中的過濾沉澱合併，藉由短矽膠柱，然後用 20% 甲醇/二氯甲烷溶離。將有機溶劑去除，得到標題化合物（0.120 g，兩步收率42%），無需進一步純化直接用於下一步。ESI-MS m/z： $[M + H]^+$ 計算值 $C_{22}H_{18}FN_3O_5$：424.1309；實測值424.1375。

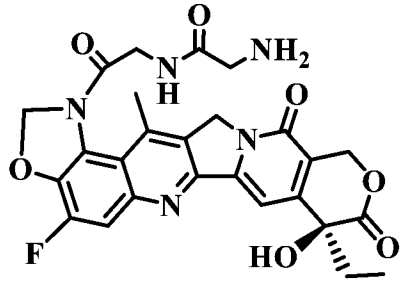
【0330】 實施例 132. （S）-第三丁基（2-（（2-（8-乙基-4-氟-8-羥基-15-甲基-9,12-二側氧基-2,8,9,11,12,14-六氫-1H-惡唑並[4,5-f]吡喃並[3',4'：6,7]吲嗪並[1,2-b]喹啉-1-基）-2-氧乙基）胺基甲酸酯（100）的合成



100

將化合物 99（158.3 mg，0.344 mmol），2-（2-（（第三丁氧基羰基）胺基）乙醯胺基）乙酸（Boc-Gly-Gly-OH）（103.9 mg，0.447 mmol）和 EDC（153.5 mg，0.799 mmol）的 DMA （10 mL）溶液攪拌8小時。將混合物濃縮並在矽膠柱上純化，用乙酸乙酯/二氯甲烷 （1：10 – 1：3） 溶離，得到標題化合物 （182.6 mg，82% 收率）。ESI-MS m/z： （M+H）$^+$ $C_{31}H_{33}FN_5O_9$計算值： 638.2263；實測值638.2295。

【0331】 實施例 133. （S）-2-胺基-N-（2-（8-乙基-4-氟-8-羥基-15 -甲基-9,12-二側氧基-2,8,9,11,12,14-六氫-1H-惡唑並[4,5-f]呱喃並[3',4'：6,7]吲嗪並[1,2-b]喹啉-1-基）-2-氧乙基）乙醯胺鹽酸鹽（101）的合成

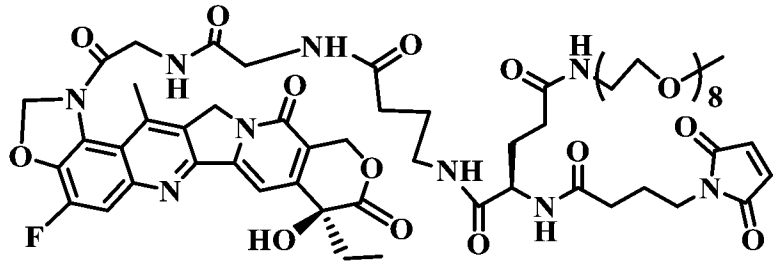


101

將化合物100（175.6 mg，0.275 mmol），濃鹽酸（1 mL）和二惡烷（4 mL）的混合物攪拌30分鐘。將混合物用甲苯（5 mL）稀釋，濃縮，與二氯甲烷/甲苯（5：5 mL，2次）共沸濃縮，得到標題化合物，無需進一步純化用於下一步（154.6 mg、98%收率）。ESI-MS m/z：（M+H）$^+$ $C_{26}H_{25}FN_5O_7$計算值： 538.1739；實測值538.1780。

【0332】 實施例 134.（R）-2-（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡

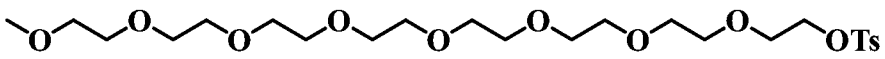
咯-1-基）-丁醯胺基）-N1-（4-（2-（2-（S）-8-乙基-4-氟-8-羥基-15-甲基-9,12-二側氧基-2,8,9,11,12,14-六氫-1H-惡唑並[4,5-f]呱喃並[3',4'：6,7]吲嗪並[1,2-b]喹啉-1-基）-2-側氧基乙基）胺基）-2-側氧基乙基）胺基）-4-側氧基丁基）-N5-（2,5,8,11,14,17,20,23-八氧雜二十五烷-25-基）戊二醯胺 （102）的合成



102

向化合物101（47.3mg，0.088mmol）和化合物18（70.1mg，0.092mmol）的DMF（5mL）溶液中加入EDC（55mg，0.286mmol）。攪拌反應8小時，濃縮之後，將殘留物藉由矽膠柱純化，用甲醇 / 二氯甲烷（1：6 – 1：3）溶離，得到標題化合物102（89.3mg，79%收率）。ESI-MS m/z： （M+H）$^+$ $C_{60}H_{81}FN_9O_{21}$計算值： 1282.5532；實測值1282.5590。

【0333】 實施例 135. 2,5,8,11,14,17,20,23-八氧二十五烷-25-基4-甲基苯磺酸酯（103）的合成

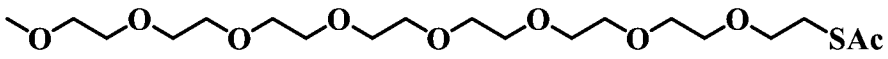


103

向 2,5,8,11,14,17,20,23-八氧雜二十五烷-25-醇 （50.0 g，0.130 mol） 的二氯甲烷 （200 mL） 和吡啶 （100 mL）溶液中加入 TsCl （30.2 g，0.159 mol）。將混合物攪拌隔夜，蒸發濃縮後在矽膠柱上純化，用丙酮/二氯甲烷（1：1至4：1）溶離，在真空幫浦上乾燥，得到標題化合物57.34 g（82.0%收率）。ESI-MS m/z 539.40 （[M + H]$^+$）。

【0334】 實施例 136. S-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧雜二十五烷-25-

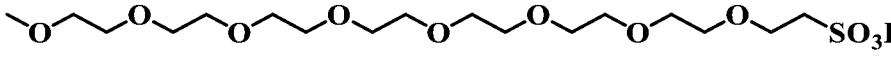
基硫代乙烷（**104**）的合成



104

向2,5,8,11,14,17,20,23-八氧雜二十五烷-25-基4-甲基苯磺酸酯（57.30g，0.106 mol）的四氫呋喃（300 mL）溶液和N,N-二異丙基乙胺（50 mL）混合物中加入HSAc（10.0g，0.131 mol）。將混合物攪拌隔夜，濃縮並在矽膠柱上純化，用乙酸乙酯/二氯甲烷（1：2至4：1）溶離，並在真空幫浦上乾燥，得到40.51g標題化合物（收率86%）。ESI-MS m/z 443.35（$[M + H]^+$）。

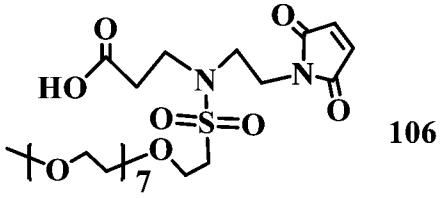
【0335】實施例 137. 2,5,8,11,14,17,20,23-八氧雜二十五烷-25-磺酸（105）的合成



105

將S-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧雜二十五烷-25-基硫代乙烷（40.40g，0.091 mol）的乙酸（200 mL）溶液和30% H_2O_2（100 mL）的混合物在35°C下攪拌隔夜。將混合物濃縮，用純水（200mL）和甲苯（150mL）稀釋，單離並用水（2×25mL）萃取有機層。將水溶液混合，蒸發濃縮並在真空幫浦上乾燥，得到40.50g的標題化合物（99%的收率，95%的LC-MS純度）。ESI-MS m/z 449.30（$[M + H]^+$）。

【0336】實施例 138. 3,3-N,N-（2''-馬來醯亞胺乙基）（2',5',8',11',14',17',20',23',26'-九氧雜二十八烷-28'-磺基）胺基丙酸（106）的合成

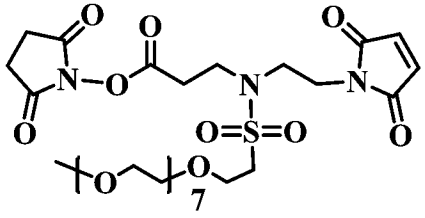


106

向2,5,8,11,14,17,20,23-八氧雜二十五烷-25-磺酸（20.0g，44.62

mmol）的四氫呋喃（100 mL）和二氯甲烷（100 mL）混合溶液中依次加入（COCl）$_2$（25.21g，200.19 mmol）和DMF（0.015 mmol）。將混合物在室溫下攪拌2小時，濃縮，與二氯甲烷/甲苯（1：1，2 × 50mL）共沸濃縮，然後重新溶解在四氫呋喃（50mL）中。向化合物3-（2-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯啶-1-基）乙基）胺基）-丙酸（7.50g，35.36 mmol）的四氫呋喃（100 mL）溶液中加入上述磺醯氯溶液。將混合物攪拌隔夜，真空濃縮並在矽膠柱上純化，用甲醇/二氯甲烷（1：6至1：5）溶離，並在真空幫浦上乾燥，得到標題化合物14.76g（65%收率）。ESI-MS m/z 643.35 （[M + H]$^+$）。

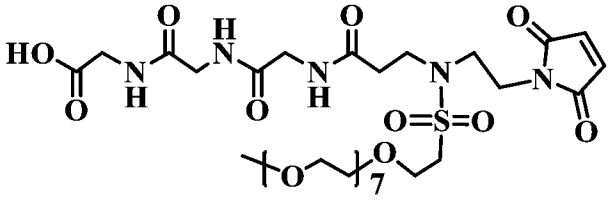
【0337】 實施例 139. N-N-琥珀醯亞胺基3，3-N,N-（2''-馬來醯亞胺乙基）（2',5',8',11',14',17',20',23',26'-九氧雜二十八烷-28'-磺基）胺基丙酸酯（107）的合成



107

將化合物106（7.50g，11.67 mmol），N-羥基琥珀醯亞胺（1.50g，13.04 mmol）和EDC·HCl（10.10 g，52.60 mmol）在四氫呋喃（100 mL）中的混合物攪拌隔夜，真空下濃縮並在矽膠柱上純化，用乙酸乙酯 / 二氯甲烷（1：4至2：1）溶離，並在真空幫浦上乾燥，得到標題化合物6.30g（73%收率）。ESI-MS m/z 740.40 （[M + H]$^+$）。

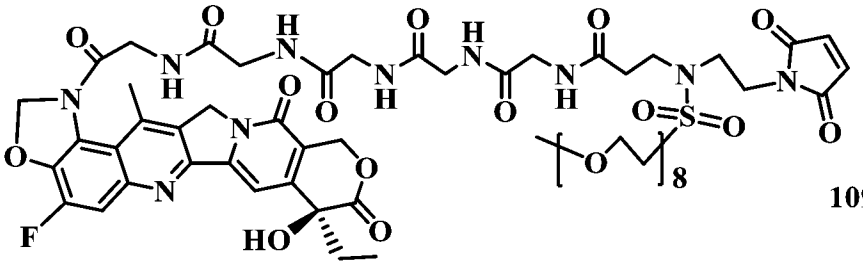
【0338】 實施例 140. 化合物108的合成



108

在0°C，向H-Gly-Gly-Gly-OH（0.50g，2.03 mmol）和化合物107（1.65g，2.22 mmol）的DMF（15 mL）溶液中加入N,N-二異丙基乙胺（3 mL）。將反應混合物在0°C下攪拌0.5小時，在室溫下攪拌4小時。然後將反應混合物濃縮，用矽膠柱純化（用含0.1%甲酸的95:5乙腈/水溶離），得到標題化合物（1.04g，收率63%）。ESI-MS m/z $[M + H]^+$：$C_{32}H_{56}N_5O_{17}S$計算值 814.33；實測值，814.46。

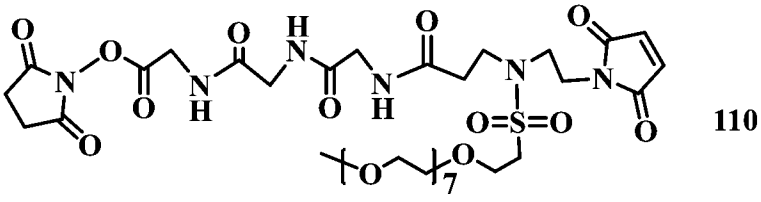
【0339】 實施例 141. 化合物109的合成



109

向化合物108（83.2mg，0.102 mmol）和化合物101（55.1mg，0.0960 mmol）的DMA（8 mL）溶液中加入EDC（95.5mg，0.497 mmol）。將混合物攪拌隔夜，濃縮並在矽膠柱上純化，用甲醇/二氯甲烷（1：6-1：3）溶離，得到標題化合物（103.3 mg，81%收率）。ESI-MS m/z：（M+H）$^+$ $C_{58}H_{78}FN_{10}O_{23}S$ 計算值：1333.4947；實測值 1333.5015。

【0340】 實施例 142. 化合物110的合成

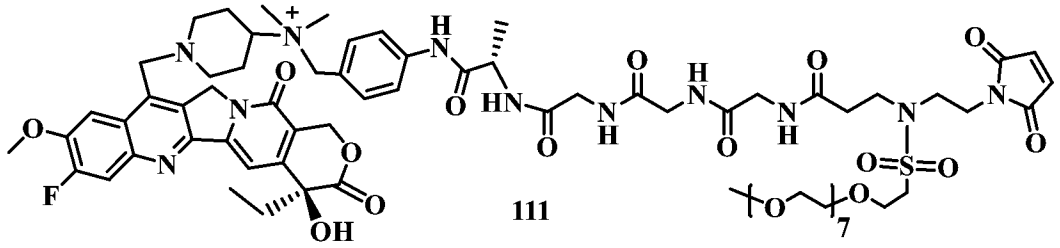


110

將化合物 108（0.70 g，0.86 mmol）、N-羥基琥珀醯亞胺（0.20 g，1.73 mmol）和 EDC·HCl（1.21 g，6.36 mmol）在四氫呋喃（20 mL）中的混合物攪拌隔夜，真空濃縮蒸發，用矽膠柱純化，用乙酸乙酯/

二氯甲烷（1：4～2：1）溶離，真空幫浦濃縮乾燥得到標題化合物（0.540 g，69%收率）。ESI-MS m/z [M + H]$^+$：計算值$C_{36}H_{59}N_6O_{19}S$，911.34；實測值911.42。

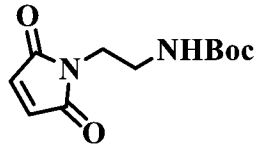
【0341】實施例 143. 化合物111的合成



111

在0℃下，將化合物110（36 mg，0.04 mmol）溶解於DMF（5 mL）中，向其中加入化合物24（56.8 mg，0.08 mmol）和N,N-二異丙基乙胺（0.020 mL，0.12 mmol）。將反應升溫至室溫並攪拌2小時，濃縮，藉由製備HPLC（含甲酸的乙腈/水）純化，得到化合物111（48mg，80%收率）。ESI-MS m/z： M$^+$ $C_{71}H_{99}FN_{11}O_{22}S$計算值：1508.67；實測值1508.86。

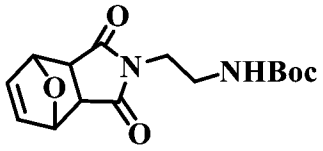
【0342】實施例 144.（2-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）乙基）胺基甲酸第三丁基酯的合成（112）



112

將 N-Boc-乙二胺（5.6 mL，35.4 mmol，1.1 eq.）和飽和$NaHCO_3$（60 mL）的混合物冷卻至 0 °C，然後分批加入N-甲氧基羰基馬來醯亞胺（5.00 g，32.2 mmol，1.0 eq.）。在 0°C 攪拌 30 分鐘後，將反應升溫至室溫並攪拌1小時。過濾收集沉澱，冷水洗滌，溶於乙酸乙酯，鹽水洗滌，無水硫酸鈉乾燥，濃縮，得到白色固體（6.69g，87%收率）。ESI MS m/z 241.12（[M+H]$^+$）。

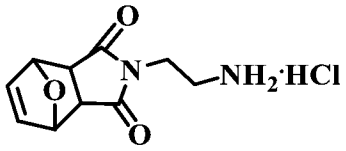
【0343】實施例 145.（2-（1,3）-二側氧基-3a,4,7,7a-四氫-1H-4,7-環氧異吲哚-2（3H）-基）乙基）胺基甲酸第三丁基酯（113）的合成



113

在高壓管中，將化合物112（6.00 g，25.0 mmol），呋喃（18.0 mL）和甲苯（120 mL）的溶液加熱回流，攪拌16小時。無色溶液在反應過程中變成黃色。然後將混合物冷卻至室溫並濃縮。所得白色固體用乙醚打漿，得到化合物113（6.5g，84%收率）。ESI MS m/z 309.13（$[M+H]^+$）。

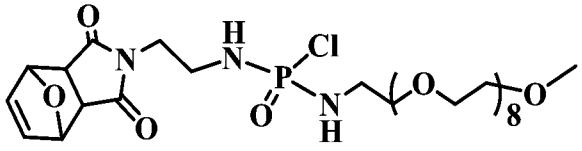
【0344】實施例 146. 2-（2-胺基乙基）-3a,4,7,7a-四氫-1H-4,7-環氧異吲哚-1,3（2H）-二酮鹽酸鹽（114）的合成



114

在室溫下，向化合物 113 （9.93 g，32.2 mmol） 的二惡烷 （15 mL） 溶液中加入濃 鹽酸 （15 mL），反應3 小時。將反應物濃縮，過濾收集所得固體，用乙酸乙酯洗滌濾餅。將固體在烘箱（50℃）中乾燥隔夜，得到化合物114（6.94g，88%收率）。ESI MS m/z 206.05（$[M+H]^+$）。

【0345】實施例 147. 化合物115的合成

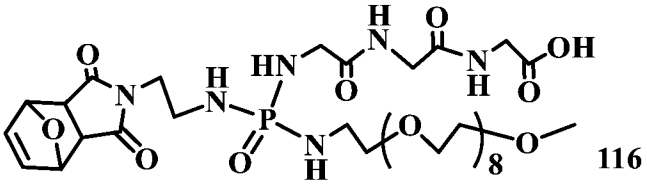


115

在-10°C下，向化合物114 （1.22 g，5 mmol）的四氫呋喃 （10 mL）和CH_3CN （10 mL）溶液中加入$POCl_3$ （0.47 mL，5 mmol）。攪拌10分鐘後，加入2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜二十八烷-28-胺 （2.14

g，5 mmol），然後加入 N,N-二異丙基乙胺 （0.87 mL，5 mmol）。將反應升溫至0℃並攪拌3小時，然後濃縮。殘餘物用二氯甲烷（10mL）稀釋，並藉由矽藻土過濾，濾液真空濃縮，得到粗品（～3.7g，～50%純度），直接用於下一步。ESI MS m/z 716.29 （$[M+H]^+$）。

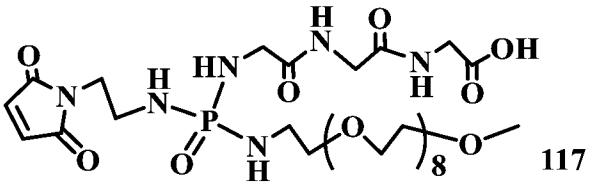
【0346】 實施例 148.化合物116的合成



116

向2-（2-（2-胺基乙醯胺）乙醯胺）乙酸（Gly-Gly-Gly，0.501 g，2.644 mmol）的CH_3CN（20 mL）溶液和N,N-二異丙基乙胺（0.87 mL，5 mmol）中加入化合物115（1.00g，50%純，~0.699 mmol）。將混合物在40℃下攪拌6小時，濃縮後藉由製備HPLC（含甲酸的乙腈/水，Φ=5釐米，v=30mL/分鐘，從70%水到25%水，45分鐘）純化，得到化合物116（321.5mg，收率約53%）。ESI-MS m/z： （M+H）$^+$ $C_{35}H_{62}N_6O_{17}P$計算值： 869.3910；實測值869.3995。

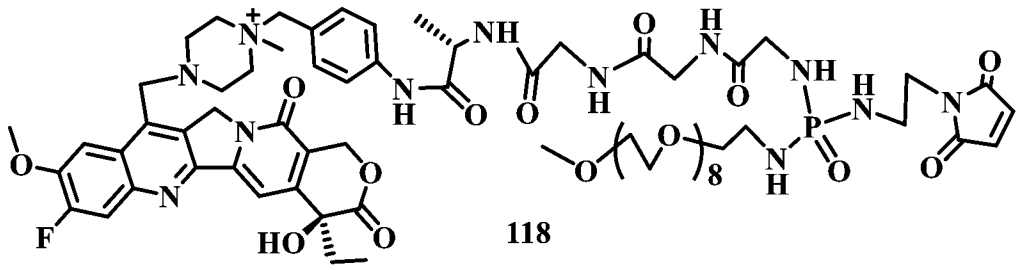
【0347】 實施例 149.化合物117的合成



117

將化合物 116 （160.1 mg，0.184 mmol） 在 DMA （10 mL） 和甲苯 （10 mL） 中的溶液回流 8小時，濃縮並藉由製備C-18 HPLC 純化（含1% 甲酸的乙腈/水，Φ = 3 cm，v = 20 mL/min，45 分鐘，從70%水到25%水），凍乾後得到化合物117（125.5 mg，85%收率）。ESI-MS m/z： （M+H）$^+$計算值 $C_{35}H_{62}N_6O_{17}P$： 801.3648；實測值801.3725。

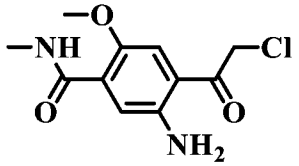
【0348】 實施例 150.化合物118的合成



118

向化合物 36 （50 mg，0.064 mmol） 和化合物 117 （51.5 mg，0.064 mmol） 的 DMF （5 mL）溶液中加入EDC （99.5 mg，0.517 mmol） 和 N,N-二異丙基乙胺 （45 μL，0.26 mmol）。將反應在室溫攪拌 6 小時，濃縮，並藉由製備C-18 HPLC 純化（含有 0.5% 甲酸的乙腈/水，Φ = 3 cm，v = 20 mL/min，從70% 水至 25% 水，45 分鐘） 得到化合物 118 （66.7 mg，71% 收率）。ESI-MS m/z： M^+ $C_{45}H_{49}FN_7O_9$計算值： 1467.6607；實測值1467.6675。

【0349】 實施例 151. 5-胺基-4-（2-氯乙醯基）-2-甲氧基-N-甲基苯甲醯胺（119）的合成

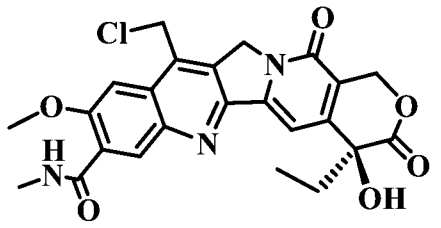


119

將5-胺基-2-甲氧基-N-甲基苯甲醯胺（5.00g，27.76mmol）溶解在二氯甲烷（20mL）中，然後滴加到冰水冷卻的三氯化硼（1M二氯甲烷溶液，38.9mL）溶液中。將反應攪拌10分鐘，然後加入氯乙腈（3.2 g，42.5 mmol）和三氯化鋁（5.2 g，38.9 mmol）。加入完成後，將反應升溫至室溫。然後回流隔夜。然後將反應混合物冷卻至約0°C，用2 M 鹽酸（80 mL）淬滅並在室溫下持續攪拌2個小時。單離各層並用二氯甲烷（3×80mL）萃取水相。合併的有機相用水（100mL）洗滌，用硫酸鈉乾燥，過濾，濃縮，在C-18柱上純化，用乙醇/水（1：6至1：1）溶離，得到化合物119（3.05g，43%收率），為黃色固體。ESI-MS m/z： [M +

H]$^+$ $C_{11}H_{14}ClN_2O_3$計算值： 257.0693；實測值257.0725。

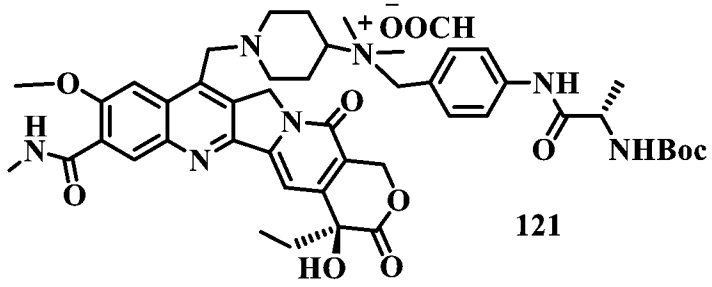
【0350】 實施例 152. （S）-11-（氯甲基）-4-乙基-4-羥基-9-甲氧基-N-甲基-3,14 -二側氧基-3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7]吲哚並[1,2-b]喹啉-8-甲醯胺（120）的合成



120

將化合物119（0.59g，2.30 mmol）和（S）-4-乙基-4-羥基-7,8-二氫-1H-呱喃並[3,4-f]吲嗪-3,6,10（4H）-三酮（0.57g，2.19 mmol）溶解在無水甲苯（40 mL）中，加入對甲苯磺酸（42 mg，0.219 mmol）。將懸浮液加熱回流2天並冷卻至室溫。除去約三分之二的甲苯後，過濾殘餘物，用二氯甲烷洗滌濾餅，自然晾乾，得到灰色粉末狀固體化合物120（0.74 g，70%收率）。ESI-MS m/z： [M + H]$^+$ 計算值 $C_{24}H_{23}ClN_3O_6$：484.1276；實測值484.1220。

【0351】 實施例 153. N-（4-（（S）-2-（（第三丁氧羰基）胺基）丙醯胺基）苄基）-1-（（（S）-4-乙基-4-羥基-9-甲氧基-8-（甲基胺基甲醯基）-3,14 -二側氧基-3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7]吲哚並[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）-N,N-二甲基六氫吡啶-4-鎓甲酸鹽（121）的合成

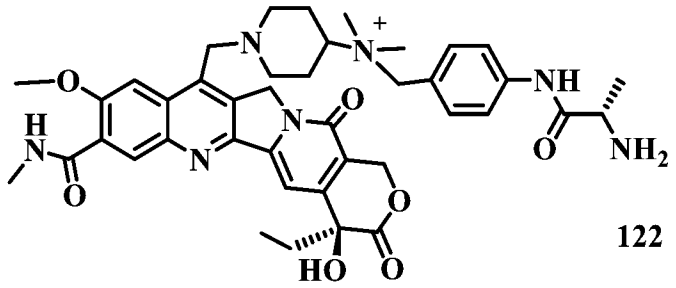


121

將化合物 120 （238 mg，0.49 mmol），化合物 6 （200 mg，0.49 mmol） 的 DMF （5 mL） 溶液在 0°C 下攪拌 30 分鐘，然後加入三乙胺

（63 μL，0.45 mmol）並繼續攪拌1小時。將反應液濃縮並藉由製備HPLC 純化（乙腈/含有甲酸的水，Φ = 5 cm，v = 30 mL/min，45分鐘，從 100% 水至 50% 水），得到化合物 121（242 mg，55% 收率 ），為黃色固體。ESI-MS m/z： M^+ 計算值 $C_{46}H_{58}N_7O_9$： 852.4291；實測值852.4355。

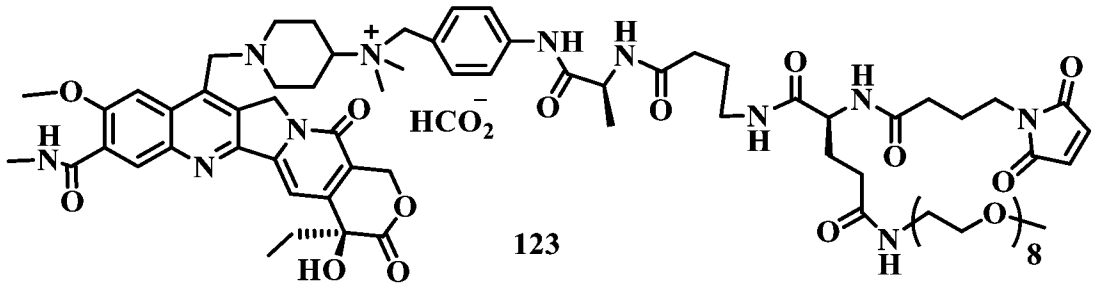
【0352】 實施例 154. N-（4-（（S）-2-胺基丙醯胺基）苄基）-1-（（（S）-4-乙基-4-羥基-9-甲氧基-8-（甲基胺基甲醯基）-3,14 -二側氧基-3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7]-吲哚並[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）-N,N-二甲基六氫吡啶-4-鎓三氟乙酸鹽（122）的合成



122

將化合物 121 （95 mg，0.111 mmol） 溶解在二氯甲烷和三氟乙酸（2 mL/ 6 mL）中，並在室溫下攪拌30 分鐘。將混合物用甲苯（10mL）稀釋，然後濃縮並在真空幫浦上乾燥，得到化合物122（108mg，100%收率），為黃色固體。ESI-MS m/z： M^+ 計算值 $C_{41}H_{50}N_7O_7$： 752.3766；實測值752.3710。

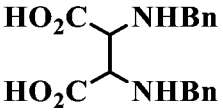
【0353】 實施例 155. N-（4-（（30S,38S）-30-（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-38-甲基-27,31,36-三氧基-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧雜-26,32,37-三氮雜三烷醯胺基）苄基）-1-（（（S）-4-乙基-4-羥基-9-甲氧基-8-（甲基胺基甲醯基）-3,14-二側氧基-3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7]吲哚並[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）-N,N-二甲基六氫吡啶-4-鎓甲酸鹽（123）的合成



123

將化合物122（60 mg，0.061 mmol）和化合物19（60 mg，0.064 mmol）溶解在DMF（5 mL）中，冷卻至約0℃，然後加入N,N-二異丙基乙胺（21 μL，0.12 mmol）。將反應升溫至室溫並攪拌2小時，濃縮，用製備HPLC純化（含甲酸的乙腈/水，Φ =3 cm，v = 20 mL/min，45 分鐘，從100%水至50%水），得到化合物123（38.5 mg，41%收率）。ESI-MS m/z： M^+ $C_{75}H_{106}N_{11}O_{21}$ 計算值：1496.7559；實測值1496.7595。

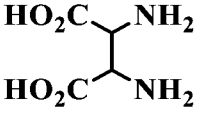
【0354】實施例 156. 內消旋2，3-雙（苄基胺基）琥珀酸（化合物124）的合成



124

向內消旋2，3-二溴丁二酸（50g，181mmol）的乙醇（400mL）溶液中逐滴加入苄胺（150mL）。加入完成後，將混合物加熱至90℃並攪拌隔夜。將混合物冷卻至室溫並用水稀釋。加入6N 鹽酸直至達到pH 4，得到白色沉澱。過濾沉澱物，用水洗後乾燥，得到內消旋2，3-雙（苄基胺基）琥珀酸（50g，152mmol，84%）。

【0355】實施例 157. 內消旋-2,3-二胺基琥珀酸（125）的合成

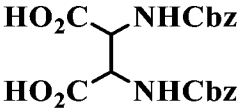


125

向內消旋2，3-雙（苄胺基）琥珀酸（18 g，55 mmol）的AcOH（100 mL）和鹽酸（100 mL）溶液中加入Pd / C（3 g，10 wt%），並將

混合物在1 atm H_2環境中，在50℃下攪拌48小時。過濾除去觸媒，並用水洗滌。濃縮濾液，並將殘餘物溶於1N NaOH（200mL）中。加入乙酸直至達到pH 5，得到白色沉澱。過濾沉澱物，用水洗並乾燥，得到內消旋的2，3-二胺基琥珀酸（8.7g，＞ 100%）。

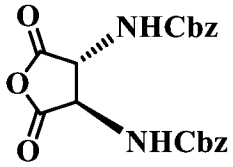
【0356】 實施例 158.內消旋2，3-雙（（（苄氧基）羰基）胺基）琥珀酸（126）的合成



126

在0℃下，向內消旋2，3-二胺基琥珀酸（31.74g，214mmol）的四氫呋喃（220mL）和4N NaOH（214mL）溶液中滴加氯甲酸苄酯（61mL，428mmol）。加完後，將混合物升溫至室溫並攪拌2小時。將反應用水（1600mL）稀釋，並用乙酸乙酯（2×1500mL）洗滌。單離出水層，並用濃鹽酸酸化直至達到pH 2。將所得溶液攪拌1小時並在5℃下靜置以產生白色沉澱。過濾沉澱物，用水洗並乾燥，得到內消旋2，3-雙（（（（苄氧基）羰基）胺基）琥珀酸琥珀酸酯（52.2g，125mmol，59%）。

【0357】 實施例 159.（3R,4S）-2,5-二氧四氫呋喃-3,4-二基）二胺基甲酸二苄酯（**127**）的合成

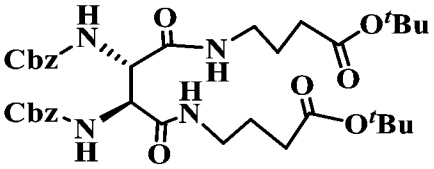


127

將內消旋2，3-雙（（（苄氧基）羰基）胺基）琥珀酸（5.0 g，12 mmol）在乙酸酐（37.5 mL）的溶液中回流20 min，冷卻並濃縮，得到酸酐。加入$CHCl_3$（37mL）並攪拌，過濾不溶的內消旋異構體，向濾液中加入石油醚，過濾收集固體，得到二苄基（（3R,4S）-2,5-二氧四氫呋喃

-3,4-二基 ）二胺基甲酸酯（外消旋混合物，2.0 g，5 mmol，42%）。

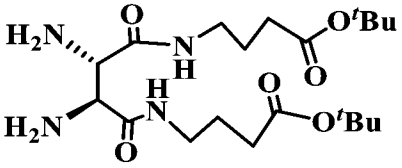
【0358】 實施例 160. 4,4'-（（（2S,3S）-2,3-雙（（（苄氧基）羰基）胺基）琥珀醯基）雙（氮雜二基））二丁酸二第三丁酯（128）的合成



128

在約0°C，向二苄基（（3S,4S）-2,5-二側氧基四氫呋喃-3,4-二基）二胺基甲酸酯（200mg，0.5mmol）的DMF（5ml）溶液中加入胺基丁酸第三丁酯（80mg，0.5mm）。將混合物在0℃攪拌30分鐘，然後在室溫下攪拌30分鐘。將反應溶液重新冷卻至約0℃，然後加入N,N-二異丙基乙胺（64 mg，0.5 mmol），胺基丁酸第三丁酯（80 mg，0.5 mmol）和HATU（190 mg，0.5 mmol）。將反應混合物自然升溫至室溫並攪拌2小時，然後用二氯甲烷（50 ml）稀釋，用飽和$NaHCO_3$（20 ml），水（10 ml）洗滌，無水硫酸鈉乾燥，過濾並濃縮。殘餘物藉由柱層析法純化（二氯甲烷/甲醇=100：0至10：1），得到標題化合物（262mg，75%收率）。MS-ESI m/z： $[M+H]^+$ $C_{36}H_{50}N_4O_{10}$計算值，699.35；實測值，699.35。

【0359】 實施例 161. 4,4'-（（（2S,3S）-2,3-二胺基琥珀醯基）雙（氮雜二基））-二丁酸二第三丁酯（129）的合成

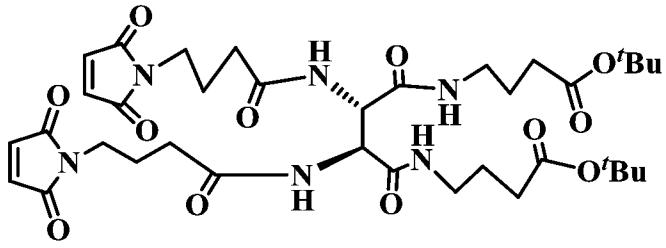


129

將上述化合物（100mg，0.14mmol），10%Pd/C（10mg）和甲醇（5ml）的混合物在氫氣（5psi）下攪拌隔夜。過濾固體並濃縮濾液，得

到無色油標題化合物，無需純化用於下一步（61mg，100%收率）。MS-ESI m/z： $[M+H]^+$ $C_{20}H_{38}N_4O_6$計算值，431.28；實測值，431.28。

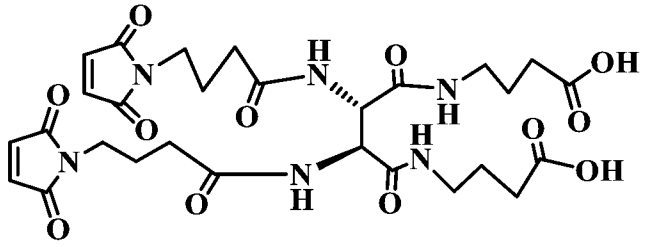
【0360】實施例 162. 4,4'-（（2S,3S）-2,3-雙（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）琥珀醯基）雙（氮雜二基））二丁酸二第三丁酯（130）的合成



130

向化合物129（61mg，0.14mmol）在乙醇（5ml）和PBS（0.1M，pH 7.5，1.0ml）混合物的溶液中，加入2,5-二氧吡咯啶-1-基4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-醯基）丁酸酯（118mg，0.42mmol）。將反應混合物攪拌隔夜，濃縮，在矽膠柱（二氯甲烷/甲醇=100：0至10：1）上純化，得到標題化合物（65mg，60%收率）。MS-ESI m/z： $[M+H]^+$ 計算值 $C_{37}H_{56}N_6O_{12}$，777.40；實測值，777.41。

【0361】實施例 163. 4,4'-（（2S,3S）-2,3-雙（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）琥珀醯基）雙（氮雜二基））二丁酸（131）的合成

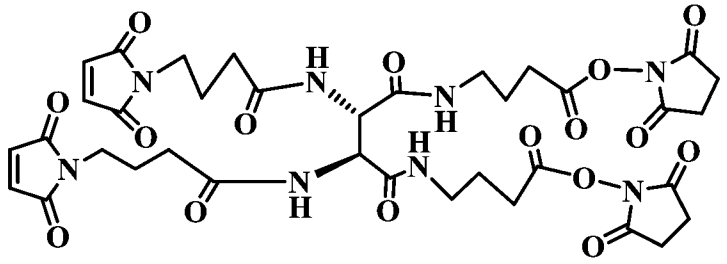


131

將化合物130（65 mg，0.083 mmol）溶於二氯甲烷（6 mL），與三氟乙酸（2 mL）反應2小時。反應混合物用甲苯（5 mL）稀釋，濃縮得到標題化合物（53 mg，100%收率）。MS-ESI m/z： $[M+H]^+$ $C_{28}H_{36}N_6O_{12}$

計算值，649.24；實測值，649.24。

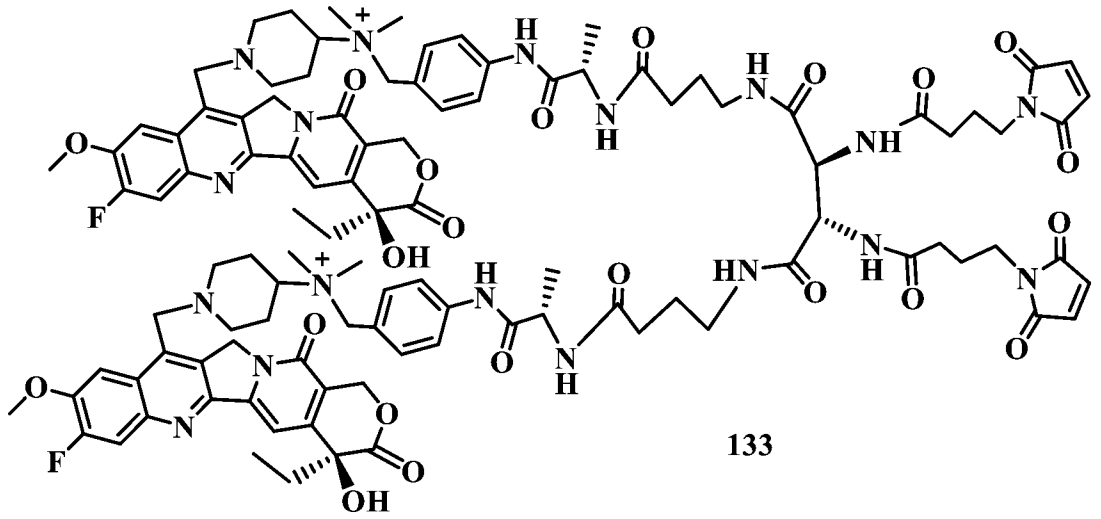
【0362】實施例 164. 雙（2,5）-二側氧基吡咯啶-1-基）4,4'-（（2R,3R）-2,3-雙（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）琥珀醯基）雙（氮雜二基））二丁酸酯（132）的合成



132

向化合物 131（1.10 g，1.69 mmol）的 DMA（30 mL）溶液中加入 N-羥基琥珀醯亞胺（1-羥基吡咯啶-2,5-二酮）（0.58 g，5.08 mmol）和 EDC·HCl（1.25 g，6.54 mmol）。將混合物攪拌隔夜，濃縮並在矽膠柱上純化，用乙酸乙酯/二氯甲烷（1：10）溶離，得到標題化合物（1.30 g，91%收率）。ESI-MS m/z $[M + H]^+$ ： 計算值$C_{36}H_{42}N_8O_{16}$ 843.27，實測值843.50.

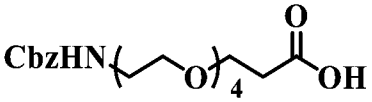
【0363】實施例 165.（S）-N,N'-N（（（（（（2S,10S,11S,19S）-10,11雙（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-2,19-二甲基-4,9,12,17-四側氧基-3,8,13,18-四氮雜二十烷-1,20-二醯基）雙（氮雜二基））雙（4,1-亞苯基）雙（亞甲基）雙（1-（（（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二側氧基-3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7]吲哚並[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）-N,N-二甲基六氫吡啶-4-鎓）（133）的合成



133

將化合物24（94 mg，0.12 mmol）和化合物132（55 mg，0.066 mmol）溶於DMA（5 mL）中，冷卻至約0℃，然後加入N,N-二異丙基乙胺（84 μL，0.48 mmol）。將反應升溫至室溫並攪拌2小時，濃縮，用製備HPLC（含甲酸的乙腈/水）純化，得到化合物133（23mg，19%收率）。ESI-MS m/z： M^{2+} $C_{106}H_{124}F_2N_{18}O_{22}$計算值： 1019.46；實測值1019.50。

【0364】 實施例 166. 3-側氧基-1-苯基-2,7,10,13,16-五氧雜-4-氮雜十九烷-酸（134）的合成

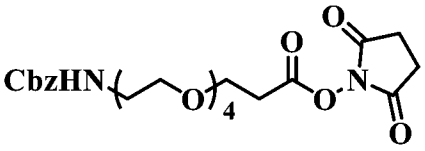


134

在 500 mL 燒瓶中，將 H_2N-PEG_4-$CH_2CH_2CO_2H$（3.0 g，11.3 mmol，1.0 eq.）和 K_2CO_3（4.7 g，33.93 mmol，3.0 eq.）溶于 50 mL 水中，冰水浴冷卻，然後滴加CbzCl （2.50 g，14.7 mmol，1.3 eq.）的四氫呋喃（50 mL）溶液。將反應升溫至室溫並攪拌隔夜。用 1N $KHSO_4$ 將反應混合物的 pH 值調節至 4-5，用二氯甲烷（200 mL × 1，100 mL × 3）萃取，用水（500 mL）和鹽水（500 mL）洗滌，用無水硫酸鈉乾燥並濃縮。將殘餘物溶解在少量二氯甲烷中，然後上樣到矽膠柱上，用2-

4% 甲醇/二氯甲烷溶離，將組分合併濃縮，得到3.8 g無色油狀物（收率84%）。ESI-MS m/z [M + H]$^+$： 計算值 $C_{19}H_{29}NO_8$ 400.2，實測值：400.2。

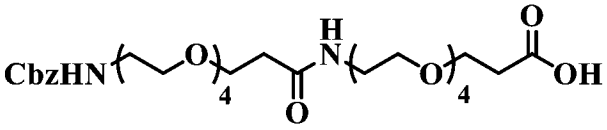
【0365】 實施例 167. 2，5 -二側氧基吡咯啶-1-基3-側氧基-1-苯基-2,7,10,13,16-五氧雜-4-氮雜十九烷-19-酯（135）的合成



135

向CbzHN-PEG$_4$-$CH_2CH_2CO_2H$ （3.8 g，9.5 mmol，1.0 eq.） 的50 mL 無水二氯甲烷溶液中加入N-羥基琥珀醯亞胺（1.3 g，11.4 mmol，1.2 eq.）和 EDC·HCl（9.1 g，47.5 mmol，5.0 eq.）。反應在室溫下攪拌隔夜，然後用水（50 mL × 2）和鹽水（100 mL × 1）洗滌，無水硫酸鈉乾燥，濃縮。粗產物直接用於下一步。ESI-MS m/z [M + H]$^+$：$C_{23}H_{32}N_2O_{10}$計算值 497.2，實測值： 497.2。

【0366】實施例 168. 3,19-二側氧基-1-苯基-2,7,10,13,16,23,26,29,32-九氧雜-4，20-二氮雜三十五烷-35-甲酸（136）的合成

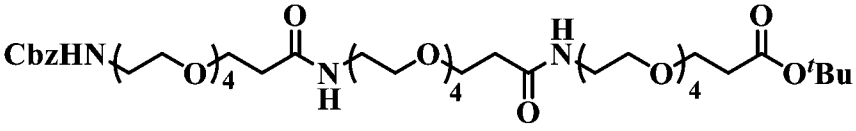


136

在 300 mL 燒瓶中，將 H_2N-PEG$_4$-$CH_2CH_2CO_2H$（2.6 g，9.5 mmol，1.0 eq.）和 K_2CO_3（3.9 g，28.5 mmol，3.0 eq.）溶于 40 mL 水中，冰水浴冷卻，滴加上述N-羥基琥珀醯亞胺酯粗品（3.8 g，9.5 mmol）溶在40 mL 四氫呋喃的溶液，升溫至室溫並攪拌隔夜。使用 1N $KHSO_4$ 將反應混合物的 pH 值調節至 4-5，用二氯甲烷（150 mL × 1，100 mL × 2）萃取，用水（200 mL）和鹽水（200 mL）洗滌，無水硫酸

鈉乾燥並濃縮。將殘餘物溶解在少量二氯甲烷中，上樣到矽膠柱上，用4-6% 甲醇/二氯甲烷溶離，得到無色油狀物（4.91 g，80%收率）。ESI-MS m/z $[M + H]^+$： $C_{30}H_{50}N_2O_{13}$ 計算值646.3，實測值： 646.3。

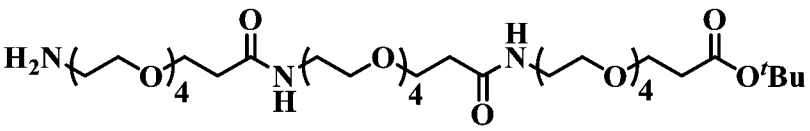
【0367】實施例 169. 3,19,35-三氧-1-苯基-2,7,10,13,16,23,26,29,32,39,42,45,48-十三氧雜-4,20,36-三氮五十一烷-51-甲酸第三丁酯（137）的合成



137

將H_2N-PEG_4-$CH_2CH_2CO_2{}^tBu$（0.48 g，1.5 mmol，1.0 eq.）溶解在3 mL DMF 中，冰水浴冷卻，然後加入N,N-二異丙基乙胺（0.78 g，6.0 mmol，4.0 eq.），化合物136（0.97 g，1.5 mmol，1.0 eq.）的7 mL DMF溶液和HATU（1.72 g，4.5 mmol，3.0 eq.）。將反應液在冰浴上攪拌 2 小時，用 100 mL 水稀釋，用二氯甲烷 （100 mL × 3） 萃取，用 1N $KHSO_4$ （200 mL）、飽和碳酸氫鈉 （200 mL） 和鹽水 （ 200 mL）洗，無水硫酸鈉乾燥，濃縮。將殘餘物溶解在少量二氯甲烷中，上樣到矽膠柱上，用0-5% 甲醇/二氯甲烷溶離。合併組分並濃縮，得到1.22g淡黃色油狀物（86%收率）。ESI-MS m/z $[M + H]^+$： $C_{45}H_{79}N_3O_{18}$ 計算值 950.5，實測值： 950.5。

【0368】實施例 170. 1-胺基-15,31-二側氧基-3,6,9,12,19,22,25,28,35,38,41,44-十二氧雜-16,32-二氮雜四十七烷-47-第三丁基酯（138）的合成

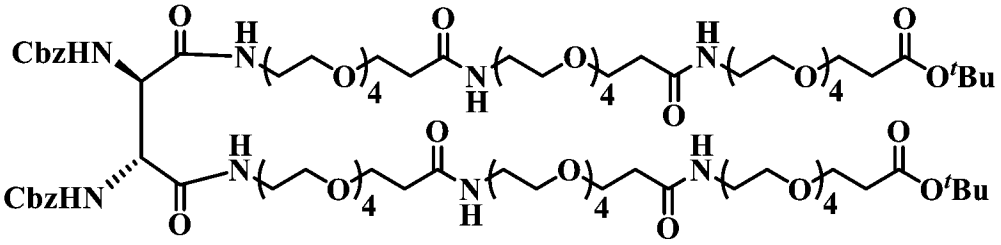


138

將化合物137 （1.22 g，1.28 mmol）的二氯甲烷（5 mL）溶液與

Pd/C（5 wt%，500 mg）在1 atm H_2 下攪拌2小時。然後將反應藉由矽藻土過濾，濾餅用甲醇洗滌。合併濾液和洗滌液並濃縮，得到淡黃色油狀物（1.04 g，100%收率）。ESI-MS m/z $[M + H]^+$： $C_{37}H_{73}N_3O_{16}$計算值816.5，實測值： 816.5。

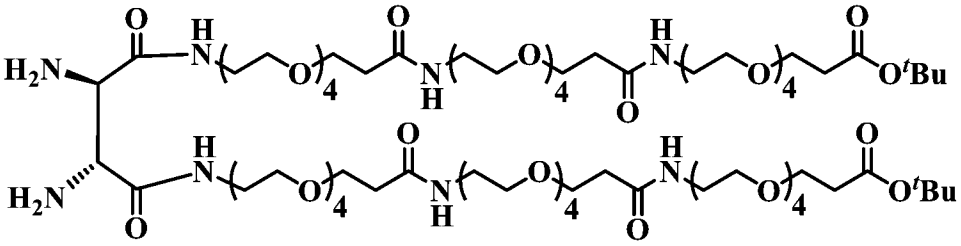
【0369】實施例 171.（50R，51R）-二第三丁基50，51-雙（（（苄氧基）羰基）胺基）-17,33,49,52,68,84-六側氧基-4,7,10,13,20,23,26,29,36,39,42,45,56,59,62,65,72,75,78,81,88,91,94,97-二十四氧雜-16,32,48,53,69,85-六氮雜一百烷-1-100二酯（139）的合成



139

向化合物 127（0.26 g，0.64 mmol）的 DMA（10 mL）溶液中加入化合物 138（1.04 g，1.28 mmol）的二氯甲烷（5 mL）溶液，然後加入 DMAP（0.23 g，1.92 mmol）和EDC·HCl（0.36 g，1.92 mmol）。將混合物攪拌隔夜，濃縮，用矽膠柱純化，甲醇/二氯甲烷（1：10）溶離，得到化合物139（0.81 g，63%收率）。ESI-MS m/z：$[M+2H]^{2+}$ $C_{94}H_{162}N_8O_{38}$計算值 1006.55；實測值1006.70。

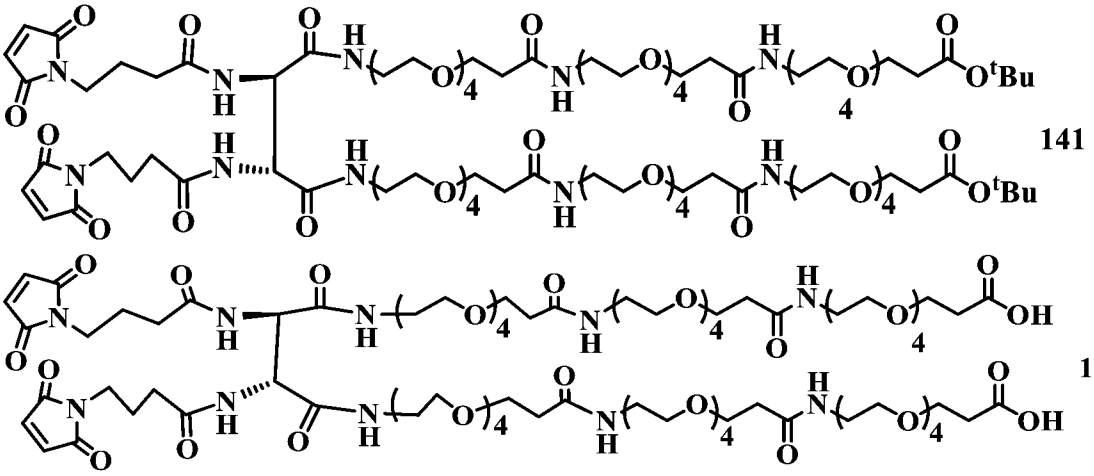
【0370】實施例 172.（50R，51R）-二第三丁基50,51-二胺基-17,33,49,52,68,84-六側氧基-4,7,10,13,20,23,26,29,36,39,42,45,56,59,62,65,72,75,78,81,88,91,94,97-二十四氮雜-16,32,48,53,69,85-六氮雜一百烷-1-100二酯（140）的合成



140

向化合物 139 （0.81 g，0.40 mmol） 的 甲醇 （5 mL） 溶液中加入10%Pd/C （100 mg，5wt%），並將混合物在氫氣環境下於室溫攪拌18小時。然後藉由矽藻土過濾除去Pd/C觸媒，濾餅用甲醇洗滌。將濾液和洗滌液合併並濃縮，得到化合物140（0.70 g，100%收率）。ESI-MS m/z： $[M+2H]^{2+}$ $C_{78}H_{150}N_8O_{34}$計算值： 872.52；實測值872.55。

【0371】 實施例 173. （50R，51R）-二第三丁基50,51-雙（4-（2,5）-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-17,33,49,52,68,84-六側氧基-4,7,10,13,20,23,26,29,36,39,42,45,56,59,62,65,72,75,78,81,88,91,94,97-四二十氧雜-16,32,48,53,69,85-六氮雜一百烷-1,100二酯（141）和（50S,51S）-50,51雙（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-17,33,49,52,68,84-六側氧基-4,7,10,13,20,23,26,29,36,39,42,45,56,59,62,65,72,75,78,81,88,91,94,97-二十四氧雜-16,32,48,53,69,85-六氮雜一百烷-1,100二酸（142）的合成



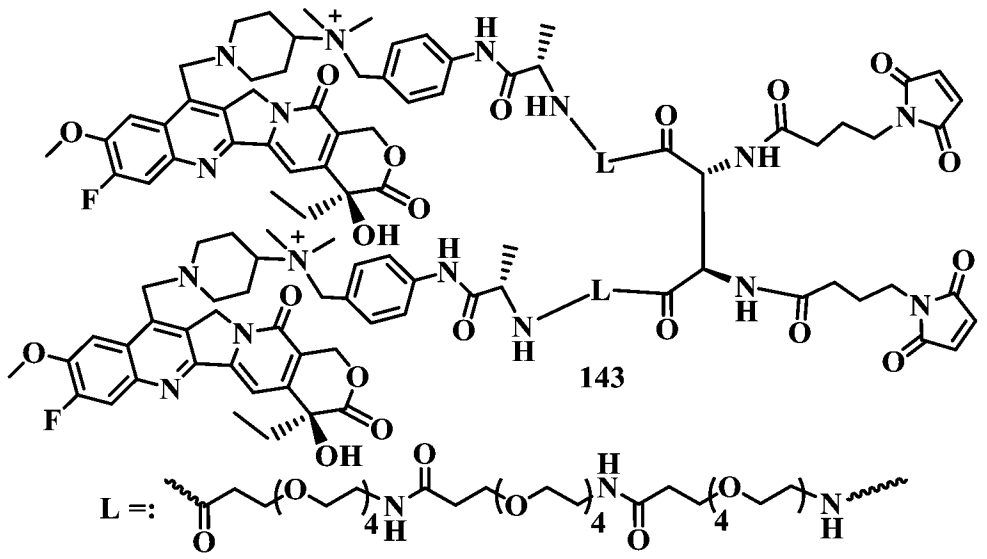
141

142

向 4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基） 丁酸 （0.17 g，1.00 mmol） 和化合物 140 （0.70 g，0.40 mmol） 的 DMF （5 mL）溶液中加入N,N-二異丙基乙胺（0.88 mL，5 mmol）和HATU（1.90 g，12.56 mmol）。將混合物攪拌隔夜，濃縮並在矽膠柱上純化，用1-10% 甲醇/二氯甲烷溶離，得到油狀化合物141，（0.548 g，66%收率）。ESI-MS m/z $[M+2H]^{2+}$： $C_{94}H_{166}N_{10}O_{40}$ 計算值2075.1264；實測值2075.1350。

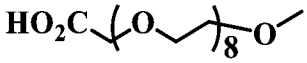
將化合物141 （0.54 g，0.26 mmol）溶解於二氯甲烷（5 mL）並與TFA （2.5 mL）反應。將混合物在室溫下攪拌30 min，用甲苯（20 mL）稀釋，濃縮，得到標題化合物142（0.488，96%收率），無需進一步純化即可用於下一步。ESI-MS m/z $[M+H]^{+}$： $C_{86}H_{149}N_{10}O_{40}$ 計算值1961.9933；實測值1961.9987。

【0372】實施例174.（S）-N,N'-N（（（（（（2S,53S,54S,105S）-53,54-雙（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-2,105-二甲基-4,20,36,52,55,71,87,103-八側氧基-7,10,13,16,23,26,29,32,39,42,45,48,59,62,65,68,75,78,81,84,91,94,97,100- 二十四氧雜-3,19,35,51,56,72,88,104-八氮雜一百零六烷-1,106二醯基）雙（氮雜二基）雙（4,1-亞苯基）雙（亞甲基））雙（1-（（（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二側氧基-3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7]吲哚並[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）-N,N-二甲基六氫吡啶-4-鎓）（143）的合成



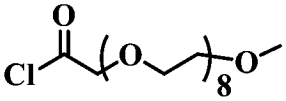
將化合物24（47 mg，0.060 mmol）和化合物142（59 mg，0.030 mmol）溶解於DMA（5 mL）中，冷卻至約0℃，然後加入EDC（23.1 mg，0.12 mmol）和N,N-二異丙基乙胺（21 μL，0.12 mmol）。將反應升溫至室溫並攪拌2小時，濃縮，藉由製備HPLC（含甲酸的乙腈/水）純化，得到化合物143（36mg，36%收率）。ESI-MS m/z： M^{2+} $C_{164}H_{238}F_2N_{22}O_{50}$計算值： 1675.8279；實測值1675.8392。

【0373】 實施例 175. 2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜二十八烷-28-酸（144）的合成



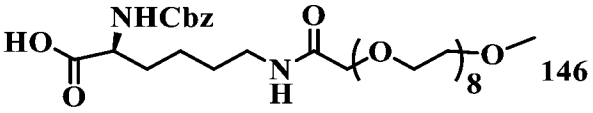
將 2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜二十八烷-28-第三丁基酯 （210 g，422 mmol） 溶解於二氯甲烷 （400 mL） 和無水甲酸 （1 L） 中。將所得溶液在室溫下攪拌隔夜。真空除去所有揮發物，得到標題化合物，為黃色油狀物（200 g，>100% 收率）。

【0374】 實施例 176. 2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜二十八烷-28-醯氯（145）的合成



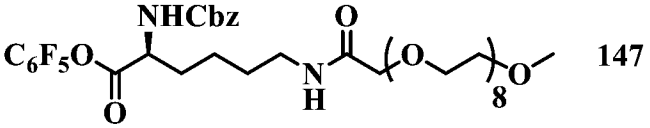
將 2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜二十八烷-28-酸 （198 g，422 mmol） 溶於二氯甲烷 （2.6 L），在室溫下加入（COCl）$_2$ （275 mL） 和 DMF （0.5 mL）。將所得溶液在室溫下攪拌3 小時。真空除去所有揮發物，得到標題化合物，為黃色油狀物（210 g，>100% 收率）。

【0375】 實施例 177. （S）-34-（（（苄氧基）羰基）胺基）-28-側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29-氮雜三十五烷-35酸（146）的合成



將 Z-L-Lys-OH （236 g，844 mmol），Na_2CO_3 （89.5 g，844 mmol） 和 NaOH （33.8 g，844 mmol） 溶解于水 （1.6 L） 中。將混合物用冰鹽浴冷卻至 0 °C，向其中加入 2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜二十八烷-28-醯氯 （210 g，422 mmol） 的 四氫呋喃（160mL）溶液。將所得混合物在室溫下攪拌 1 小時，然後用 乙酸乙酯 （1 L） 稀釋。單離水層，在冰冷下向其中加入濃鹽酸直到達到pH 3。用二氯甲烷萃取後，用鹽水洗滌有機層，用硫酸鈉乾燥並濃縮，得到標題化合物，為黃色油狀物（290 g，97%收率）。

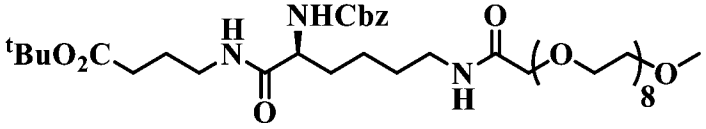
【0376】 實施例 178. （S）-五氟苯基34-（（（苄氧基）羰基）胺基）-28-側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29-氮雜三十五烷-35-酸酯（147）的合成



向化合物 146 （183 g，260 mmol） 的二氯甲烷 （2 L）溶液中加入五氟苯酚 （95.4 g，520 mmol） 和 DIC （131 g，1.04 mol）。反應

在室溫下攪拌1 小時，濃縮得標題產物粗品（430 g）。

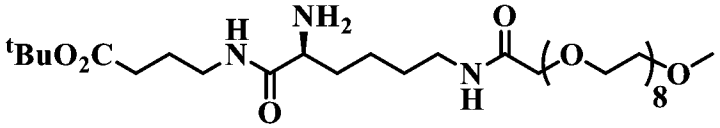
【0377】 實施例 179. （S）-第三丁基34-（（苄氧基）羰基）胺基）-28,35-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29,36-二氮雜四十烷-40-酸酯（148）的合成



148

在 0°C下，向 4-胺基丁酸第三丁酯（62.0 g，390 mmol）的 DMF（1.5 L）溶液中加入 N,N-二異丙基乙胺（134 g，1.04 mol）。然後在 10-20 °C，加入化合物 147 （430 g，粗品），將所得混合物在室溫下攪拌1小時。真空除去DMF，殘餘物用二氯甲烷稀釋，用水洗滌。水相用二氯甲烷反萃取。合併的有機相用0.2 N 鹽酸和鹽水洗滌，用無水硫酸鈉乾燥，過濾並濃縮。柱層析法純化（25% 乙酸乙酯/石油醚至純乙酸乙酯，然後 0 至 5% 甲醇/二氯甲烷）得到標題化合物，為黃色油狀物（180 g，82% 收率）。

【0378】 實施例 180. （S）-第三丁基34-胺基-28，35 -二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29,36-二氮雜四十烷-40-酯（149）的合成

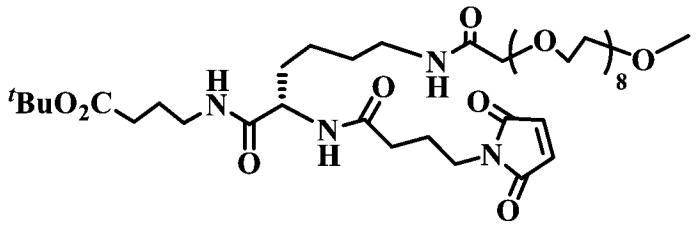


149

向化合物 148 （78.0 g，92.3 mmol，1.0 eq.） 的 甲醇 （500 mL）溶液中加入 Pd/C （13 g，10 wt%，含水50%）。1 atm催化加氫反應隔夜，然後過濾並濃縮。將殘餘物藉由柱層析法（0至20% 甲醇/二氯甲烷）純化，得到標題化合物，為黃綠色油狀物（70.2 g，92%收率）。

【0379】 實施例 181. （S）-第三丁基34-（4-（2,5）-二側氧基-

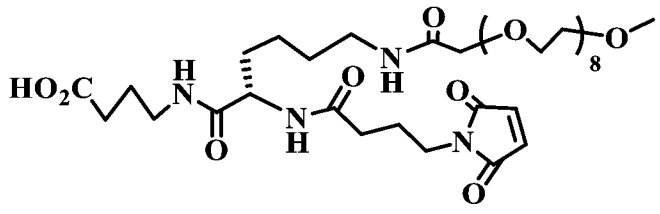
2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-28,35-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29,36-二氮雜四十烷-40-酯（150）的合成



150

向（S）-第三丁基 34-胺基-28,35-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29,36-二氮雜四十烷-40-酯 （149，0.93 g，1.18 mmol）的 95% 乙醇（50 mL）和 NaH_2PO_4溶液（0.1 M，pH 5.0，10 mL）中，加入N-琥珀醯亞胺基 4-馬來醯亞胺基丁酸酯（0.50 g，1.77 mmol，1.5 eq.）。將混合物攪拌隔夜，然後濃縮並用水（50 mL）稀釋，用二氯甲烷（80 mL×3）萃取，無水硫酸鈉乾燥，過濾，濃縮並藉由矽膠柱層析法（25：1二氯甲烷/甲醇）純化得到標題化合物，為淡黃色油狀物（0.82 g，80% 收率）。ESI MS m/z 877.52（$[M+H]^+$）。

【0380】實施例 182.（S）-34-（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-28,35-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29,36-二氮雜四十烷-40-酸（151）的合成

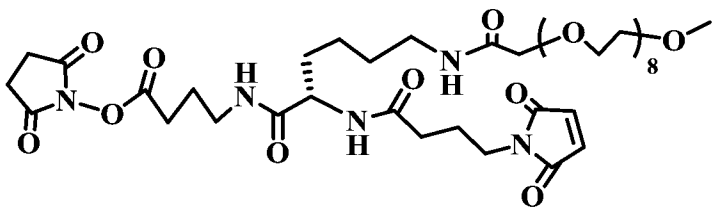


151

將（S）-第三丁基 34-（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-28,35-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29,36-二氮雜四十烷-40-酯 （0.82 g，0.94 mmol）溶解在甲酸（50 mL）中並在室

溫下攪拌1小時。將反應混合物濃縮並與甲苯共沸蒸發兩次，將殘餘物置於真空幫浦上，得到標題化合物（0.80 g，粗品）。ESI MS m/z 820.45（$[M+H]^+$）。

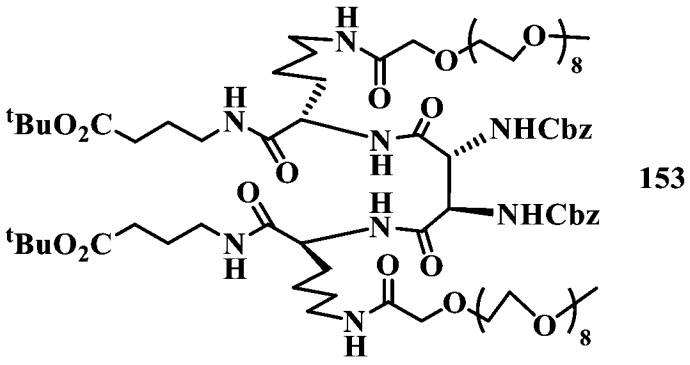
【0381】實施例 183.（S）-2,5-二側氧基吡咯啶-1-基34-（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-28,35-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29,36-二氮雜四十烷-40-酯（152）的合成



152

向（S）-34-（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-28,35-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29,36-二氮雜四十烷-40-酸（0.80 g粗品，0.94 mmol）的 DMA（5.0 mL）溶液中加入NHS（0.12 g，1.03 mmol）和 EDC· HCl （0.27 g，1.41 mmol），反應在室溫下攪拌2 小時，然後用水 （15 mL） 稀釋並用乙酸乙酯 （3 × 10 mL）萃取。合併的有機相用鹽水（10mL）洗，經無水硫酸鈉乾燥，過濾並濃縮。殘餘物藉由矽膠柱（10-50%乙酸乙酯/石油醚）純化，得到無色油狀化合物（0.67g，78%收率）。ESI MS m/z 918.55 （$[M+H]^+$）。

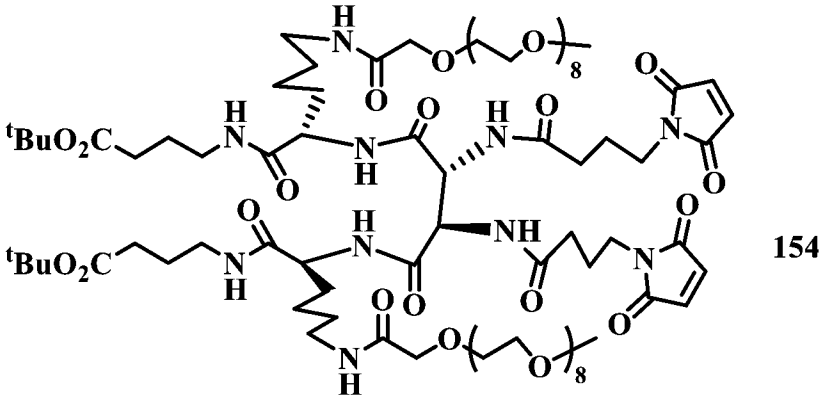
【0382】實施例 184.（7S,10R,11R,14S）-二第三丁基10,11雙（（（苄氧基）羰基）胺基）-6,9,12,15-四側氧基-7,14雙（28-側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29-氮雜三十三烷-33-基）-5,8,13,16-四氮雜二十烷-1,20-酯（153）的合成



153

向化合物 127 （0.85 g，2.00 mmol） 的DMA （10 mL）溶液中加入化合物 149 （3.20 g，4.50 mmol） 的二氯甲烷 （10 mL）溶液，DMAP （1.50 g，12 mmol） 和 EDC ·HCl（2.3g，12 mmol）。將混合物攪拌隔夜，濃縮並在矽膠柱上純化，用乙酸乙酯/二氯甲烷（1：10）溶離，得到化合物153（3.33 g，88%收率）。ESI-MS m/z： $[M+2H]^{2+}$ $C_{86}H_{146}N_8O_{32}$ 計算值902.50；實測值902.55。

【0383】 實施例 185. （7S,10R,11R,14S）-二第三丁基10，11雙（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-6,9,12,15-四側氧基-7,14雙（28-側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29-氮雜三十三烷-33-基）-5,8,13,16-四氮雜二十烷-1,20二酯（154）

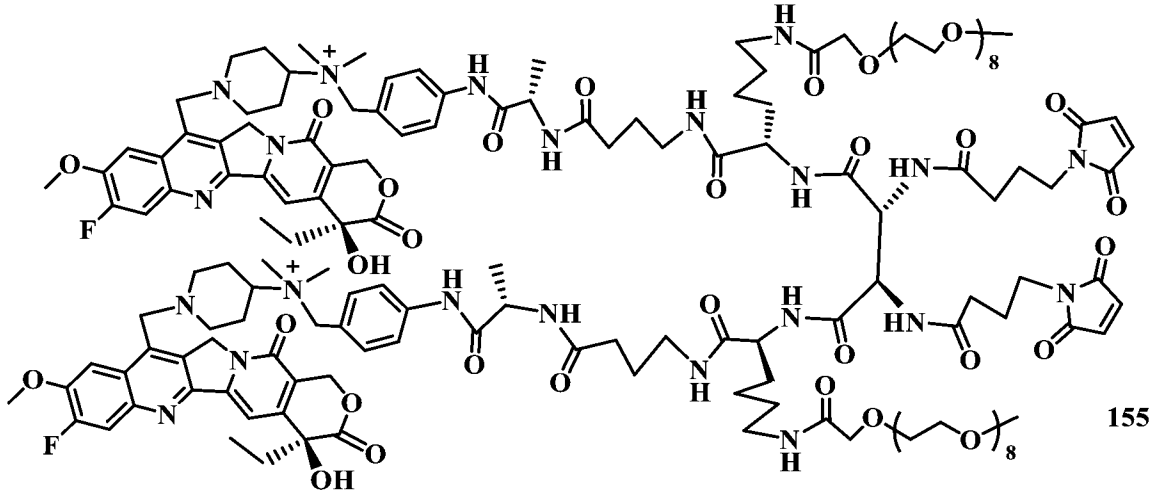


154

將化合物153 （3.33 g，1.76 mmol）和Pd/C （5 wt%，0.10 g）在二氯甲烷（50 mL）中的混合物在1 atm H_2 壓力下氫化隔夜，然後經矽藻土（助濾劑）過濾。將濾液濃縮，然後溶解在 DMF （10 mL） 中，向其中加入 EDC·HCl （1.00 g，5.28 mmol） 和 4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-

1H-吡咯-1-基）丁酸（1.84 g，5.28 mmol）。將混合物在室溫下攪拌16小時，濃縮，用矽膠柱層析（1：4 甲醇/二氯甲烷）純化，得到油狀物（2.56 g，78%收率）。ESI-MS m/z： $[M+2H]^{2+}$ $C_{86}H_{148}N_{10}O_{34}$ 計算值933.51；實測值933.55。

【0384】實施例186.（S）-N,N'-（（（（（（2S,10S,13R,14R,17S,25S）-13,14雙（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-2,25-二甲基-4,9,12,15,18,23-六側氧基-10,17雙（28-側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29-氮雜三十三烷-33-基）-3,8,12,16,19,24-六氮雜二十六烷-1,26-二醯）雙（氮雜二基）雙（4,1-亞苯基）雙（亞甲基）雙（1-（（（（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二側氧基-3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7]吲哚並[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）-N,N-二甲基六氫吡啶-4-鎓）甲酸鹽（155）

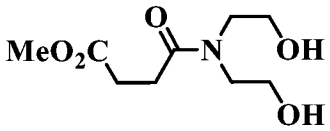


155

將化合物 154 （1.00 g，0.536 mmol） 的二氯甲烷 （5 mL）溶液和甲酸 （5 mL）的混合物在室溫下攪拌24 小時，然後濃縮。將殘餘物溶解在DMA（5mL）中，加入化合物24（0.64g，0.89mmol），三乙胺（0.15mL，1.07mmol）和HATU（0.41g，1.07mmol）並在室溫下攪拌16 小時。在高真空下除去溶劑後，藉由製備HPLC（含有甲酸的乙腈/

水）純化殘餘物，得到標題化合物155（1.06 g，63%收率）。ESI-MS m/z： M^{2+} $C_{156}H_{220}F_2N_{22}O_{44}$計算值 1571.78；實測值1571.78。

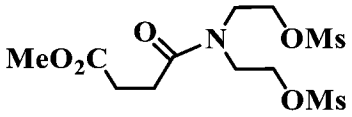
【0385】 實施例 187. 4-（雙（2-羥乙基）胺基）-4-側氧基丁酸甲酯（156）的合成



156

將琥珀酸二甲酯（20.0g，136.9mmol）和二羥基乙胺（7.20g，68.7mmol）在無水甲苯（500mL）和吡啶（50mL）中的混合物在150°C下加熱28小時。將混合物濃縮並在矽膠柱上純化，用5-25%乙酸乙酯/二氯甲烷溶離，得到標題化合物（12.5g，83%收率）。ESI-MS m/z 242.42（$[M + Na]^+$）。

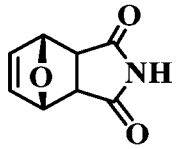
【0386】 實施例 188. 4-（雙（2-（甲基磺醯基）氧基）乙基）胺基）-4-側氧基丁酸甲酯（157）的合成



157

向 4-（雙（2-羥乙基）胺基）-4-側氧基丁酸甲酯（12.0 g，49.56 mmol）的無水吡啶（350 mL）溶液中加入甲磺醯氯（20.0 g，175.4 mmol）。攪拌隔夜後，濃縮混合物，用乙酸乙酯（350mL）稀釋，用冷的1M NaH_2PO_4 （2×300mL）洗滌，用硫酸鈉乾燥，過濾並蒸發濃縮得到粗產物（~18.8g，>100%收率 ）。粗產物不經進一步純化用於下一步。ESI-MS m/z 376.06 （$[M + H]^+$）。

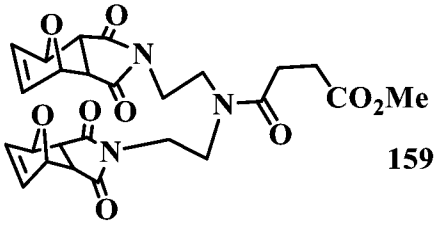
【0387】 實施例 189. 3，6-內氧-Δ-四氫鄰苯二甲醯亞胺（158）的合成



158

向馬來醯亞胺（10.0 g，103.0 mmol）的甲苯（200 mL）溶液中加入呋喃（10.0 mL，137.4 mmol）。將混合物在 1 L高壓滅菌釜中100 °C加熱 8 小時。然後冷卻到室溫，並用甲醇沖洗出固體，濃縮，在乙酸乙酯/正己烷中結晶，得到16.7 g （99%）的標題化合物。^{1}H NMR（CDCl3）：11.12（s，1H），6.68~6.64（m，2H），5.18~5.13（m，2H），2.97~2.92（m，2H）；ESI-MS m/z 188.04 （[M + Na]$^+$）。

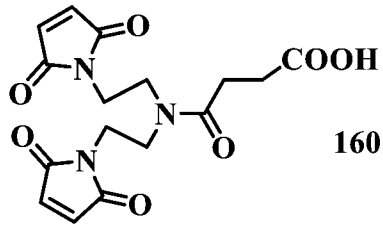
【0388】 實施例 190. 甲基4-（（2-（（3aR,4R,7S,7aS）-1,3）-二側氧基-3a,4,7,7a-四氫-1H-4,7-環氧異吲哚-2（3H）-基）乙基）（2-（（4R,7S,7aS）-1,3-二側氧基-3a,4,7,7a-四氫-1H-4,7-環氧異吲哚-2（3H）-基）乙基）胺基）-4-側氧基丁酸酯（159）的合成



159

向 4-（雙（2-（（甲基磺醯基）氧基）乙基）胺基）-4-側氧基丁酸甲酯 （157，新製備，90% 純度，8.5 g，~20 mmol） 的 DMA （350 mL）溶液中，加入3，6-內側氧基-Δ-四氫鄰苯二甲醯亞胺（158，10.2 g，61.8 mmol），碳酸鈉（8.0 g，75.5 mmol）和碘化鈉（0.3 g，2.0 mmol）。混合物在室溫下攪拌隔夜，濃縮，用乙酸乙酯 （350 mL） 稀釋，用飽和 $NaHCO_3$ 溶液 （300 mL），鹽水 （300 mL） 和 1 M NaH_2PO_4 （300 mL） 洗滌。有機層用硫酸鈉乾燥，過濾，蒸發濃縮，上樣到矽膠柱，用10-30%乙酸乙酯/正己烷溶離，得到標題化合物（7.9g，77%收率）。ESI-MS m/z 536.4 （[M + Na]$^+$）。

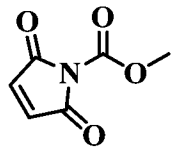
【0389】 實施例 191. 4-（雙（2-（2,5）-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）乙基）胺基）-4-側氧基丁酸（160）的合成



160

將化合物159（3.0 g，5.8 mmol）和三甲基錫醇（4.8 g，26.4 mmol）的1，2-二氯乙烷（150 mL）溶液於80 ℃回流8小時，然後冷卻至室溫。將殘餘物上樣至短矽膠柱，用二氯甲烷/甲醇溶離以除去過量的氫氧化三甲基錫。然後將組分合併，濃縮並用DMA和甲苯稀釋，加熱至120℃並攪拌隔夜。將反應混合物上樣到矽膠柱上，用5-10% 甲醇/二氯甲烷溶離，得到標題化合物（1.62 g，76%收率）。ESI-MS m/z 386.2（$[M + Na]^+$）。

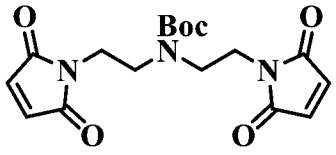
【0390】 實施例 192. N-（甲氧基羰基）馬來醯亞胺（161）的合成



161

在 250 mL 圓底燒瓶中，將馬來醯亞胺 （12.0 g，123.7 mmol） 溶於乙酸乙酯 （150 mL） 中，並將溶液冷卻至約 0°C。然後在15分鐘內滴加N-甲基嗎啉（14.1mL，12.8g，126.2mmol）的乙酸乙酯（10mL）溶液。之後滴加氯甲酸甲酯（9.60mL，11.5g，123.7mmol）的乙酸乙酯（50mL）中的溶液，並將溶液自然升溫至室溫，攪拌2小時。將溶液用乙酸乙酯（100mL）稀釋並用飽和碳酸氫鈉水溶液，水和飽和氯化鈉溶液洗滌。將有機層單離，用硫酸鈉乾燥，然後過濾。濾液減壓濃縮，得到標題化合物固體（15.9g，102.5mmol，82.9%收率）。^{1}H NMR （500 MHz，$CDCl_3$）：δ 6.84 （s，2H），3.97 （s，3H）。

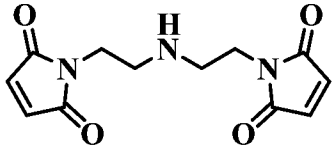
【0391】 實施例 193. 雙（2-（2,5）-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）乙基）胺基第三丁基甲酸酯（162）的合成



162

將雙（2-胺基乙基）胺基甲酸第三丁酯（4.00 g，19.68 mmol）溶解在飽和$NaHCO_3$（80 mL）和 甲醇（10 mL）溶液中之後冷卻至 0 °C中。將N-（甲氧基羰基）馬來醯亞胺（6.20 g，40.00 mmol）加入攪拌的溶液中。在 20分鐘之後，將反應混合物用水（150mL）稀釋並在室溫攪拌30分鐘。將反應混合物冷卻至0℃，將反應混合物過濾並用冰冷的水（100mL）洗滌。高真空乾燥得到標題化合物（5.51 g，77.1%收率），為白色固體。ESI MS m/z $C_{17}H_{22}N_3O_6$ $[M+H]^+$，計算值363.15，實測值364.20。

【0392】 實施例 194. 1，1'-（氮雜二基雙（乙烷-2,1-二基））雙（1H-吡咯-2,5-二酮）鹽酸鹽（163）的合成

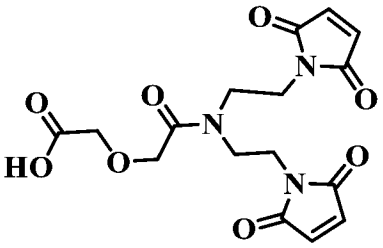


163

在 0 °C 下，向雙（2-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）乙基）胺基第三丁基甲酸酯（5.50 g，15.14 mmol）的二惡烷 （40 mL）中加入 濃鹽酸 （37% 濃度，10 mL）。將混合物在冰浴上攪拌 30 分鐘，蒸發，濃縮並與二惡烷/甲苯 （1：1，3×40 mL） 共沸蒸發，高真空乾燥，得到標題化合物 （4.40 g，97%），無需進一步純化即可用於下一步。ESI MS m/z $C_{12}H_{14}N_3O_4$ $[M+H]^+$，計算值264.09，實測值264.20。

【0393】 實施例 195. 2-（2-（雙（2-（2,5）-二側氧基-2,5-二氫-

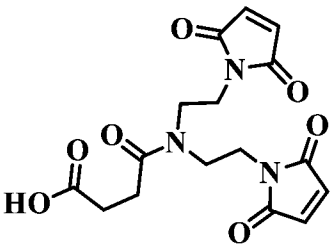
1H-吡咯-1-基）乙基）胺基）-2-側氧基乙氧基）乙酸（164）的合成



164

在冰浴上，向1，1'-（氮雜二基雙（乙烷-2,1-二基）雙（1H-吡咯-2,5-二酮）鹽酸鹽 （2.01 g，6.70 mmol） 的乙醇 （50 mL）溶液 和 NaH_2PO_4 緩衝液（100 mL，100 mM，pH 7.0）中加入1,4-二惡烷-2，6-二酮（0.80 g，6.89 mmol）。然後將混合物在室溫下攪拌4 小時，濃縮，藉由矽膠柱純化，水/CH_3CN（1：99-3：97）溶離，得到標題化合物（2.16 g，85%收率）。ESI MS m/z $C_{16}H_{18}N_3O_8$ $[M+H]^+$計算值380.11，實測值380.20。

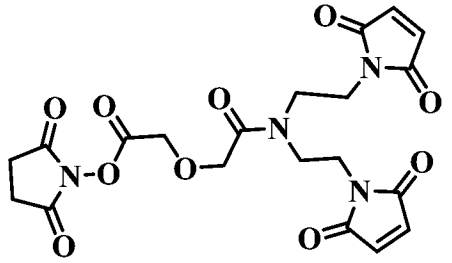
【0394】 實施例 196. 4-（雙（2-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）乙基）胺基）-4-側氧基丁酸（165）的合成



165

在冰浴上，向1,1'-（氮雜二基雙（乙烷-2,1-二基）雙（1H-吡咯-2,5-二酮），鹽酸 鹽 （2.01 g，6.70 mmol） 的乙醇 （50 mL） 溶液和 NaH_2PO_4緩衝液（100 mL，100 mM，pH 7.0）中加入二氫呋喃-2,5-二酮（0.68 g，6.80 mmol）。然後將混合物在室溫下攪拌4小時，濃縮，藉由矽膠柱純化，用水/CH_3CN（100% CH_3CN至3% CH_3CN/水溶液）溶離，得到標題化合物（2.09 g，86%收率）。ESI MS m/z $C_{16}H_{18}N_3O_7$ $[M+H]^+$計算值364.11，實測值364.20。

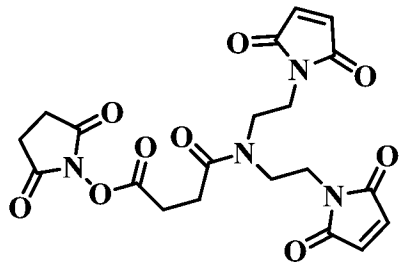
【0395】實施例 197. 2,5 -二側氧基吡咯啶-1-基2-（2-（雙（2-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）乙基）胺基）-2-側氧基乙氧基）乙酸酯（166）的合成



166

向2-（2-（雙（2-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）乙基）胺基）-2-側氧基乙氧基）乙酸（1.10g，2.90 mmol）和 N-羥基琥珀醯亞胺 （0.36 g，3.12 mmol） 的乾燥 DMA （40 mL） 中加入 EDC （1.20 g，6.25 mmol）。將反應混合物攪拌4小時，然後濃縮，用矽膠柱層析（10：1至5：1 /乙酸乙酯）純化，得到標題化合物（1.09 g，79%收率）。ESI MS m/z： $C_{20}H_{21}N_4O_{10}$ $[M+H]^+$ 計算值 477.12，實測值 477.20。

【0396】實施例 198. 2,5-二側氧基吡咯啶-1-基 4-（雙（2-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）乙基）胺基）-4-側氧基丁酸酯（167）的合成

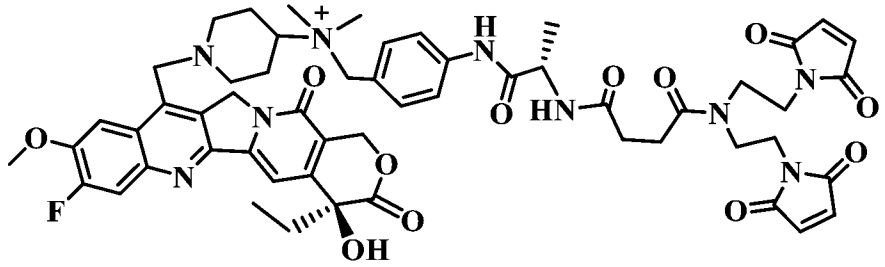


167

向4-（雙（2-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯啶-1-基）乙基）胺基）-4-側氧基丁酸（1.05g，2.89 mmol）和N-羥基丁二醯亞胺（0.36克，3.12 mmol）的DMA （40 mL）溶液中加入EDC（1.20g，6.25 mmol）。將反應混合物攪拌4小時，然後濃縮並用矽膠柱層析純化（10:1

至5:1 二氯甲烷/乙酸乙酯），得到標題化合物（1.10g，收率83%）。ESI MS m/z： $C_{20}H_{21}N_4O_9$ $[M+H]^+$ 計算值 461.12，實測值461.20。

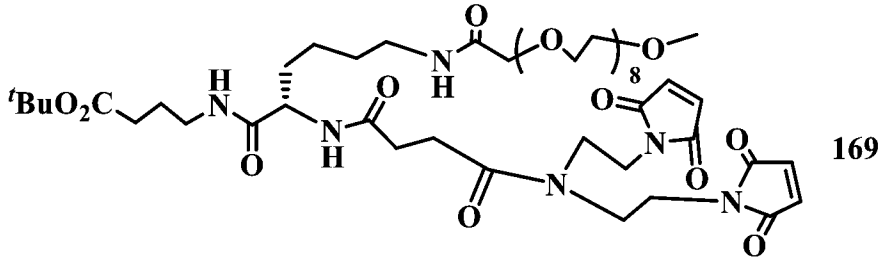
【0397】 實施例 199. N-（4-（（S）-2-（4-（雙）2-（2,5）-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）乙基）胺基）-4-側氧基丁醯胺基）丙醯胺基）苄基）-1-（（（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二側氧基-3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7]吲哚並[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）-N,N-二甲基六氫吡啶-4-鎓（168）的合成



168

將前一步的粗產物（0.20g）溶解在DMA（5 mL）中，在0°C下加入化合物24（0.71g，1.00 mmol）和N,N-二異丙基乙胺（0.20g，1.20 mmol）。將反應物自然升溫至室溫並攪拌2小時，濃縮，並用製備HPLC（乙腈/含甲酸的水）純化，得到化合物168（0.85g，80%收率）。ESI-MS m/z： M^+ $C_{55}H_{61}FN_9O_{12}$計算值： 1058.44；實測值1058.60.

【0398】 實施例 200. （S）-第三丁基34-（4-（雙（2-（2,5）-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）乙基）胺基）-4-側氧基丁醯胺基）-28,35-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29,36-二氮雜四十烷-40-酸酯（169）的合成

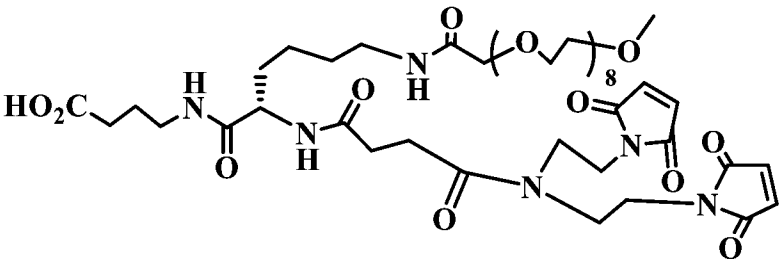


169

向化合物149（2.98g，4.20 mmol）和化合物165（1.39g，3.82

mmol）的DMA（20 mL）溶液中加入EDC·HCl（0.80g，4.20 mmol）。將反應物在室溫下攪拌隔夜，然後加入水（50mL）並用乙酸乙酯（3×40mL）萃取。將合併的有機相用鹽水（40mL）洗滌，無水硫酸鈉乾燥，過濾濃縮。殘餘物經柱層析純化（10-50%乙酸乙酯/石油醚）得到無色油狀物（3.23g，80%收率）。ESI-MS m/z 1057.85 （$[M + H]^+$）。

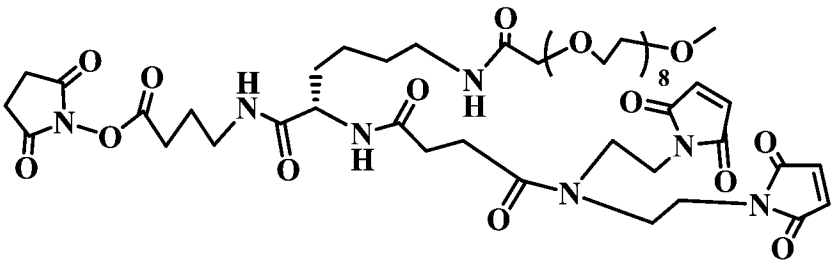
【0399】 實施例 201. （S）-34-（4-（雙（2-（2,5）-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）乙基）胺基）-4-側氧基丁醯胺基）-28,35-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29,36-二氮雜四十烷-40-甲酸（170）的合成



170

將化合物169（3.20g，3.03 mmol）在甲酸（10 mL）和二氯甲烷（5 mL）中的溶液室溫攪拌隔夜。然後將溶液濃縮並與甲苯共沸濃縮三次，得到無色油狀物（3.00g，粗品），無需進一步純化即可使用。ESI-MS m/z 1001.50 （$[M + H]^+$）。

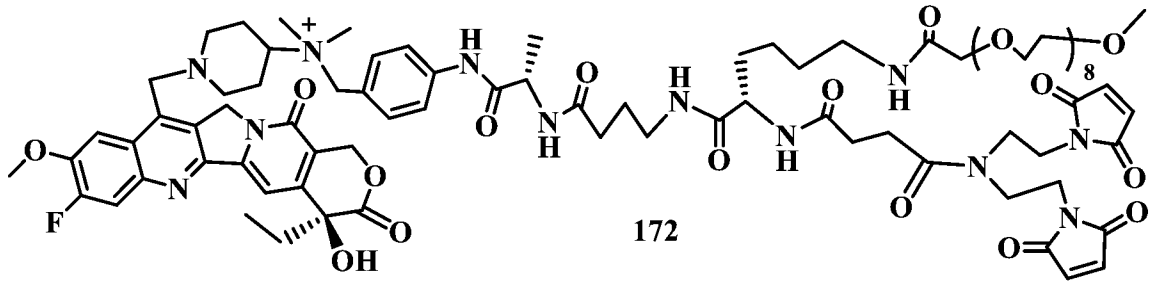
【0400】 實施例 202. （S）-2,5-二側氧基吡咯啶-1-基34-（4-（雙（2-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）乙基）胺基）-4-側氧基丁醯胺基）-28,35-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29,36-二氮雜四十烷-40-酯（171）的合成



171

向化合物170（3.00 g粗品，3.03 mmol）的DMA（15.0 mL）溶液中加入N-羥基琥珀醯亞胺（0.38 g，3.33 mmol）和EDC·HCl（0.87g，4.55mmol），反應在室溫下攪拌2小時，然後用水（50mL）稀釋，並用乙酸乙酯（3×30mL）萃取。將合併的有機相用鹽水（30mL）洗滌，無水硫酸鈉乾燥，過濾濃縮。殘餘物用矽膠柱（10-50%乙酸乙酯/石油醚）純化，得到無色油（2.90g，90%收率）。ESI-MS m/z 1098.50 （[M + H]$^+$）。

【0401】實施例 203. N-（4-（（（34S,42S）-34-（4-（雙（2-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）乙基）胺基）-4-側氧基丁醯胺基）-42-甲基-28,35,40-三側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29,36,41三氮雜四十三烷醯胺基）苄基）-1-（（（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二側氧基-3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7]吲哚並[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）-N,N-二甲基六氫吡啶-4-鎓（172）的合成

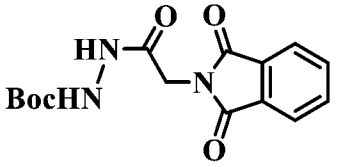


172

將化合物171（0.10g，0.091 mmol）溶於DMA（5 mL），然後在0°C下加入化合物24（56.8mg，0.08 mmol）和N,N-二異丙基乙胺（0.020 mL， 0.12 mmol）。將反應物升溫至室溫並攪拌2小時，濃縮，用製備HPLC（含甲酸的乙腈/水）純化，得到化合物172（84mg，62%收率）。ESI-MS m/z： M^+ $C_{84}H_{116}FN_{12}O_{24}$計算值： 1695.82；實測值 1695.82。

【0402】實施例 204. 第三丁基2-（2-（1,3-二側氧基異吲哚啉-2-

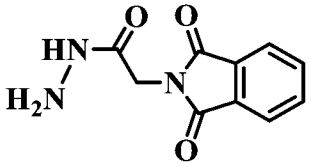
基）乙醯基）肼基羧酸酯（173）的合成



173

在0°C下，向第三丁氧肼（7.08.g，53.5 mmol）的二氯甲烷（200 mL）溶液中，依次加入三乙胺（13.5 mL，97.4 mmol）和2-（1,3-二側氧基異吲哚啉-2-基）乙醯氯（10.8g，48.7 mmol）。在室溫下攪拌30分鐘後，將混合物倒入冰水（100mL）中並用二氯甲烷（3×100mL）萃取。將合併的有機相用水（100mL）和鹽水（100mL）洗滌，無水硫酸鈉乾燥，過濾濃縮，得到白色固體（15.5g，收率100%）。ESI-MS m/z 320.12（$[M + H]^+$）。

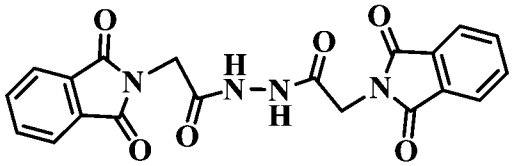
【0403】實施例 205. 2-（1,3）-二側氧基異吲哚啉-2-基）乙醯肼（174）的合成



174

將化合物173（15.5g，48.7mmol）溶於1,4-二惡烷（150mL）中，並與25%鹽酸（50mL）在室溫下反應1小時。將反應混合物濃縮，然後與甲苯共沸濃縮，得到白色固體（10.6g，100%收率）。ESI-MS m/z 220.06（$[M + H]^+$）。

【0404】實施例 206. 2-（1,3）-二側氧基異吲哚啉-2-基）-N'-（2-（1,3-二側氧基異吲哚啉-2-基）乙醯基）乙醯肼（175）的合成

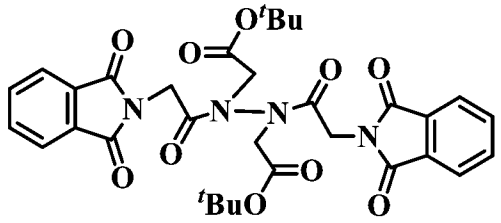


175

在0°C下，向化合物174（10.6g，48.7mmol）的四氫呋喃

（200mL）溶液中加入三乙胺（13.5mL，97.4mmol）和2-（1,3-二側氧基異吲哚啉-2-基）乙醯氯（10.8g，48.7mmol）。將反應物升溫至室溫並攪拌隔夜。藉由過濾收集沉澱物，懸浮在水（100mL）中並攪拌20分鐘。再次過濾混合物並收集白色固體，得到化合物175（15.7g，80%收率）。ESI-MS m/z 407.09 （$[M + H]^+$）。

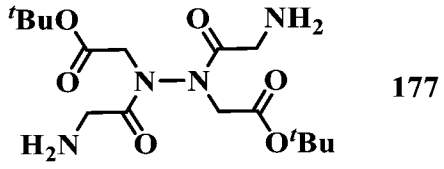
【0405】 實施例 207. 2,2'-（1,2-雙（2-（1,3）-二側氧基異吲哚啉-2-基）乙醯基）肼-1,2-二基）二乙酸二第三丁基酯（176）的合成



176

在0°C下，將NaH（0.5g，12.3 mmol）分批加入化合物175（2.0 g，4.92 mmol）的DMF （40 mL）溶液。將混合物升溫至室溫並攪拌3小時。加入溴乙酸第三丁酯（2.0g，10.3mmol）並攪拌反應隔夜，然後倒入冰水（100mL）中，並用二氯甲烷（3×50mL）萃取。將合併的有機相用水（50 mL），鹽水（50 mL）洗滌，無水硫酸鈉乾燥，過濾濃縮，用矽膠柱層析純化，得到白色固體（1.5g，收率50%）。ESI-MS m/z 635.23 （$[M + H]^+$）。

【0406】 實施例 208. 2,2'-（1,2-雙（2-胺基乙醯基）肼-1,2-二基）二乙酸二第三丁基酯（177）的合成

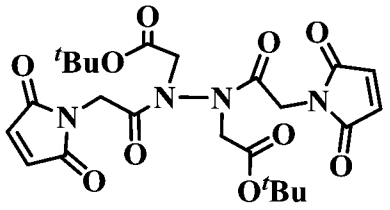


177

將化合物176（1.5g，2.36 mmol）和肼（442mg，7.08mmol）在乙醇（30mL）中的混合物回流1小時，然後冷卻至室溫並過濾。將濾液濃縮

並用乙酸乙酯（20mL）稀釋，再次過濾。將濾液濃縮，得到白色固體177（750mg，85%收率）。ESI-MS m/z 375.22 （[M + H]$^+$）。

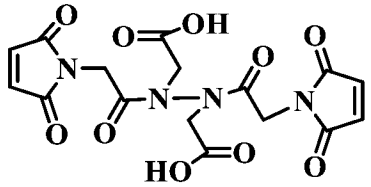
【0407】 實施例 209. 2,2'-（1,2-雙（2-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）乙醯基）肼-1,2-二基）二乙酸二第三丁基酯（178）的合成



178

在0°C下，向化合物177（750mg，2mmol）的四氫呋喃（20mL）溶液中加入飽和$NaHCO_3$水溶液（30mL）和N-甲氧基羰基馬來醯亞胺（622mg，4mmol）。將反應混合物在0°C下攪拌1小時。過濾收集白色固體，得到化合物178（854mg，收率80%）。ESI-MS m/z 535.20 （[M + H]$^+$）。

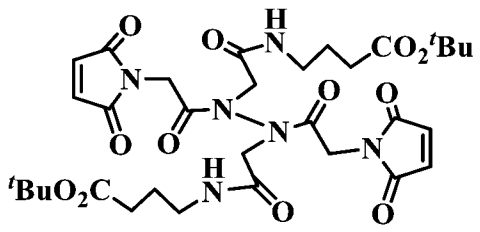
【0408】 實施例 210. 2,2'-（1,2-雙（2-（2,5）-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）乙醯基）肼-1,2-二基）二乙酸（179）的合成



179

將化合物178（854mg，1.6mmol）溶解於二惡烷（3mL）中，並與25%鹽酸（3mL）在室溫下反應2小時。然後濃縮反應物，得到化合物179（675mg，100%收率）。ESI-MS m/z 423.07 （[M + H]$^+$）。

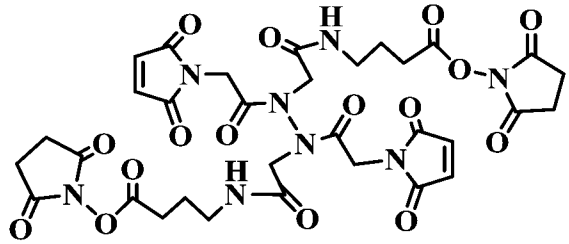
【0409】 實施例 211. 4,4'-（（2,2'-（1,2-雙（2-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）乙醯基）肼-1，2-二基）雙（乙醯基））雙（氮雜二基））二丁酸二第三丁基酯（180）



180

在0°C下，向化合物179（200mg，0.47mmol）的DMF（5mL）溶液中加入4-胺基丁酸第三丁酯（158mg，0.99mmol）和EDC·HCl （189.7 mg，0.99 mmol）。將反應混合物升溫至室溫並攪拌隔夜，倒入冰水中，用二氯甲烷（3×10mL）萃取。將合併的有機相用0.2 N 鹽酸（5 mL），水（5 mL），鹽水（5 mL）洗滌，無水硫酸鈉乾燥，過濾濃縮，得到白色固體（330mg，100%收率）。

【0410】實施例 212. 雙（2,5）-二側氧基吡咯啶-1-基）4,4'-（（2,2'-（1,2-雙（2-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）乙醯基）肼-1,2-二基）雙（乙醯基））雙（氮雜二基））二丁酸酯（181）的合成

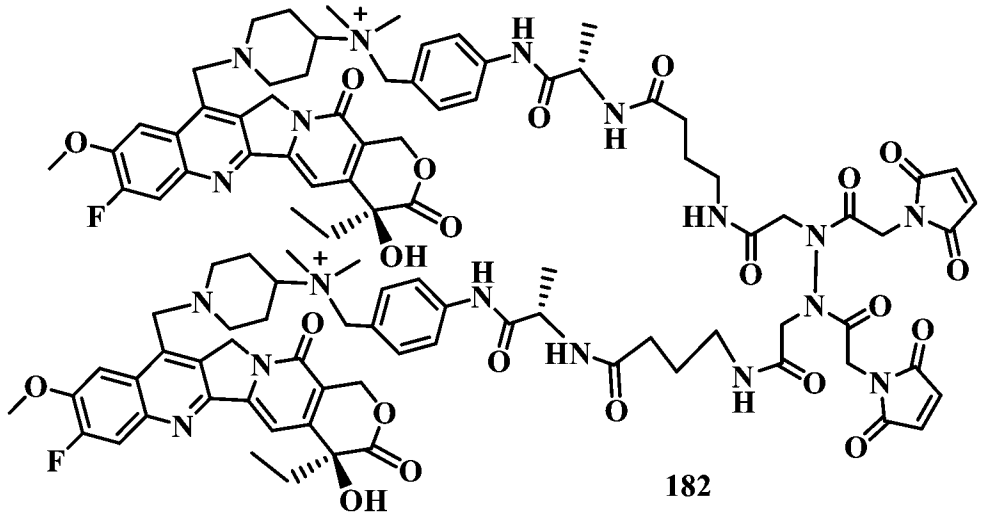


181

將化合物180（330mg，0.47mmol）溶於二惡烷（3mL）中，與25%鹽酸（3mL）在室溫下反應2小時。濃縮反應物，重新溶於DMF（5 mL）中，冷卻至0°C，然後依次加入N-羥基琥珀醯亞胺（113 mg，0.98 mmol）和EDC·HCl（189mg，0.98mmol）。將反應物升溫至室溫並攪拌隔夜，倒入冰水中，用二氯甲烷（3×20mL）萃取。將合併的有機相用水（5 mL），鹽水（5 mL）洗滌，無水硫酸鈉乾燥，過濾濃縮，得到白色固體181（369 mg，收率100%）。ESI-MS m/z 787.21 （$[M + H]^+$）。

【0411】實施例 213. （S）-N,N'-（（（（（2S,21S）-11,12雙

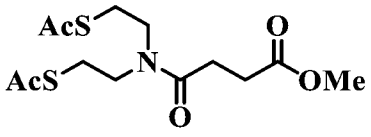
（2-（2,5）-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）乙醯基）-2,21-二甲基-4,9,14,19-四側氧基-3,8,11,12,15,20-六氮雜二十二烷-1,22二醯基）雙（氮雜二基）雙（4,1-亞苯基））雙（亞甲基）雙（1-（（（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二側氧基-3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7]吲哚並[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）-N,N-二甲基六氫吡啶-4-鎓）（182）的合成



182

在0°C下，將化合物181（31.5mg，0.04mmol）溶於DMA（5mL），然後加入化合物24（56.8mg，0.08 mmol）和N,N-二異丙基乙胺（0.020mL，0.12mmol）。將反應物升溫至室溫並攪拌2小時，濃縮，用製備HPLC（含甲酸的乙腈/水）純化，得到化合物182（57mg，收率72%）。ESI-MS m/z： M^{2+} $C_{102}H_{116}F_2N_{18}O_2$計算值： 991.42；實測值991.86。

【0412】實施例 214. 4-（雙（2-（乙醯硫基）乙基）胺基）-4-側氧基丁酸甲酯（183）的合成

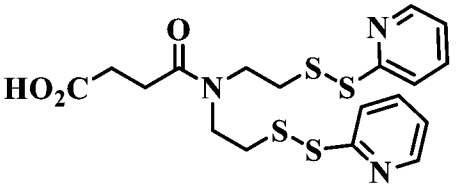


183

在0°C下，向4-（雙（2-（（（甲基磺醯基）氧基）乙基）胺基）-4-

側氧基丁酸甲酯（新製備，90%純，8.5 g，～20 mmol）的DMA（350 mmol）溶液中加入硫代乙酸（10 mL，134 mmol），之後加入三乙胺（30 mL，215 mmol）。將混合物在室溫下攪拌隔夜，濃縮，用乙酸乙酯（350mL）稀釋，用飽和$NaHCO_3$（300mL），鹽水（300mL）和1M NaH_2PO_4（300mL）洗滌。將有機層用硫酸鈉乾燥，過濾，蒸發濃縮，在矽膠柱上純化，用乙酸乙酯/正己烷（10%～25%乙酸乙酯）溶離，得到標題化合物（5.1g，76%收率）。ESI-MS m/z $[M + Na]^+$：計算值 $C_{13}H_{21}NO_5S_2$ 358.1；實測值358.2。

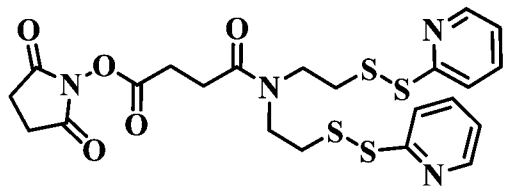
【0413】實施例 215. 4-（雙（2-（吡啶-2-基二磺醯基）乙基）胺基）-4-側氧基丁酸（184）的合成



184

向4-（雙（2-（乙醯硫基）乙基）胺基）-4-側氧基丁酸甲酯（5.0g，14.9mmol）的四氫呋喃（150mL）溶液中加入NaOH（5.0g，125mmol）的水（100mL）溶液。將混合物在室溫下攪拌35分鐘，用H_3PO_4中和至pH 7。然後加入PySSPy（26.0 g，118 mmol）的四氫呋喃（100 mL）溶液，將混合物攪拌4小時，濃縮並在矽膠柱上純化，用甲醇/二氯甲烷/ HOAc溶離（1：20 / 0.2），得到標題產物（5.8g，收率85.6%）。ESI-MS m/z $[M + Na]^+$：$C_{18}H_{21}N_3O_3S_4$計算值 478.0；實測值478.2。

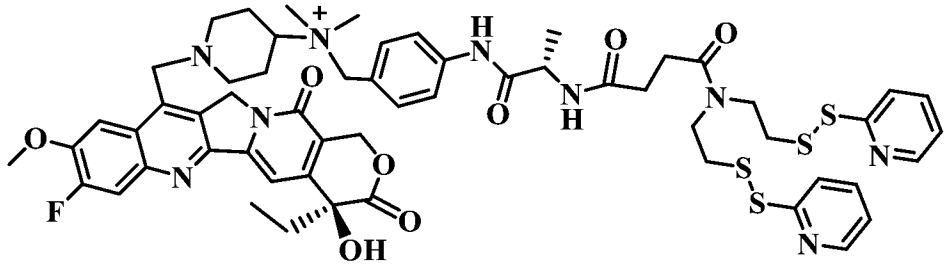
【0414】實施例 216. 2,5 -二側氧基吡咯啶-1-基4-（雙（2-（吡啶-2-基二磺醯基）乙基）胺基）-4-側氧基丁酸酯（185）的合成



185

向4-（雙（2-（吡啶-2-基二硫基）乙基）胺基）-4-側氧基丁酸（5.2 g，11.5 mmol）的DMA（100 mL）溶液中加入N-羥基丁二醯亞胺（1.6 g，13.9 mmol）和EDC·HCl（5.0g，26.1mmol）。將混合物攪拌隔夜，蒸發濃縮，在矽膠柱上純化，用乙酸乙酯/二氯甲烷（5%至15%乙酸乙酯）溶離，得到標題產物（5.8g，85.6%收率）。ESI-MS m/z [M + Na]$^+$ ： $C_{22}H_{24}N_4O_5S_4$ 計算值575.1；實測值575.2。

【0415】 實施例 217. N-（4-（（S）-2-（4-（雙（2-（吡啶-2-基二磺醯基）乙基）胺基）-4-側氧基丁醯胺基）丙醯胺基）苄基）-1-（（（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14）-二側氧基-3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7]吲哚並[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）-N,N-二甲基六氫吡啶-4-鎓（186）的合成

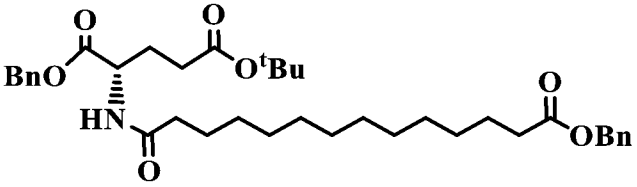


186

在0°C下，將化合物185（23mg，0.04mmol）溶於DMA（5mL），然後加入化合物24（56.8mg，0.08 mmol）和N,N-二異丙基乙胺（0.020mL，0.12mmol）。將反應物升溫至室溫並攪拌2小時，濃縮，並用製備HPLC（含甲酸的乙腈/水）純化，得到化合物186（39mg，85%收率）。ESI-MS m/z： M^+ $C_{57}H_{65}FN_9O_8S_4$計算值： 1150.38；實測值1150.45。

【0416】 實施例 218.（S）-1-苄基5-第三丁基-2-（14-（苄氧基）-

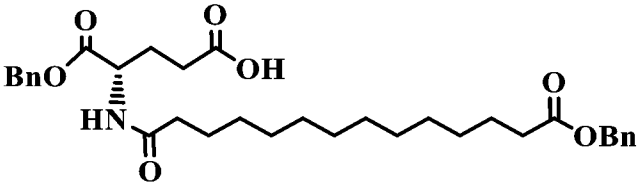
14-側氧基四胺基）戊二酸酯（187）的合成



187

將（S）-1-苄基5-第三丁基2-胺基戊二酸酯鹽酸鹽（8.70g，26.39mmol），14-（苄氧基）-14-側氧基十四烷酸（9.19mmol），N,N-二異丙基乙胺（8.0mL，46.0 mmol）和EDC（15.3g，80.50 mmol）的二氯甲烷（200 mL）溶液室溫攪拌6小時。將混合物用水（100mL）稀釋並單離。用二氯甲烷（100mL）萃取水相。將有機相合併，用鹽水洗，硫酸鈉乾燥，過濾，濃縮並在矽膠柱上純化（二氯甲烷/ 乙酸乙酯 = 20：1至5：1），得到標題化合物（13.65g，83%收率）。MS-ESI m/z： $[M+H]^+$ $C_{37}H_{54}NO_7$計算值，624.38；實測值，624.38。

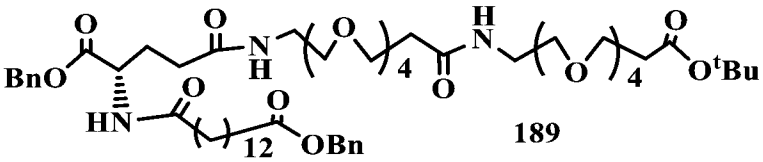
【0417】 實施例 219. （S）-5-（苄氧基）-4-（14-（苄基氧基）-14-側氧基十四烷醯胺基）-5-側氧基戊酸（188）的合成



188

在4 °C下，將化合物187 （12.50 g，20.05 mmol）溶解於二惡烷（30mL）中，並與鹽酸（10mL，36%濃鹽酸）反應0.5小時。將反應混合物用甲苯（20mL）和DMF（20mL）稀釋，在15°C下濃縮，得到標題化合物188（11.26g，99%收率）。MS-ESI m/z： $[M+H]^+$ $C_{33}H_{46}NO_7$計算值，568.32；實測值，568.34。

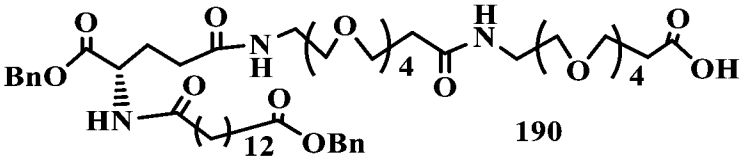
【0418】 實施例 220. （S）-35,49二苄基1-第三丁基16,32,37-三側氧基-3,6,9,12,19,22,25,28-八氧雜-15,31,36-三氮雜四十九烷-1,35,49-三羧酸酯（189）的合成



189

將化合物188（10.70g，18.86mmol），1-胺基-15-側氧基-3,6,9,12,19,22,25,28-八氧雜-16-氮雜三十一烷-31-第三丁基酯鹽酸鹽（11.45g，18.93mmol），EDC（9.51g，50.01mmol）和N,N-二異丙基乙胺（4.00mL，23.00 mmol）在二氯甲烷（200mL）中的混合物攪拌隔夜，用鹽水（100mL）稀釋並單離。用二氯甲烷（100mL）萃取水相。將有機相合併，用鹽水洗滌，硫酸鈉乾燥，過濾，濃縮並在矽膠柱上純化（二氯甲烷/ 乙酸乙酯 = 10：1至4：1），得到標題化合物189（18.15g，86%收率）。MS-ESI m/z： $[M+H]^+$ $C_{59}H_{96}N_3O_{17}$計算值，1118.67；實測值，1118.80。

【0419】實施例 221.（S）-18-（（苄氧基）羰基）-3,16,21,37-四側氧基-1-苯基-2,25,28,31,34,41,44,47,50-九氧雜-17,22,38-三氮雜五十三烷-53-酸（190）的合成

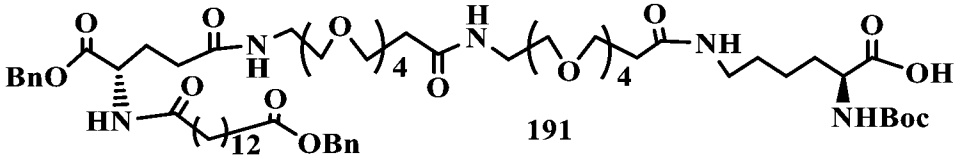


190

在4 °C下，將化合物**189**（10.50 g，9.39 mmol）溶解於二惡烷（45mL）中，並與鹽酸（15mL，36%濃度）反應0.5小時。將反應混合物用甲苯（20 mL）和DMF（20 mL）稀釋，在15 °C下濃縮並在矽膠柱上純化（二氯甲烷/ 甲醇 = 10：1至6：1），得到標題化合物190（8.67g，87%收率）。MS-ESI m/z： $[M+H]^+$ $C_{55}H_{88}N_3O_{17}$計算值，1062.60；實測值，1062.68。

【0420】實施例 222.（18S,59S）-18-（（苄氧基）羰基）-59-

（（第三丁氧基羰基）胺基）-3,16,21,37,53-五氧基-1-苯基-2,25,28,31,34,41,44,47,50-九氧雜-17,22,38,54-四氮雜六十烷-60-酸（191）的合成

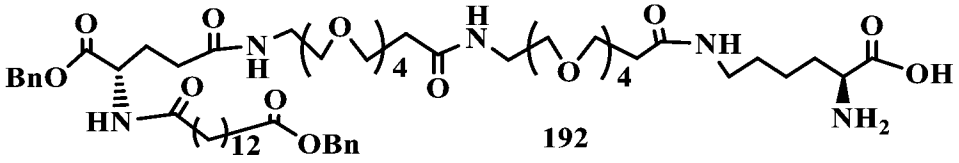


191

將化合物190（8.50g，8.01mmol），N-羥基琥珀醯亞胺（3.20g，27.82mmol）、EDC（10.28g，54.10mmol）和N,N-二異丙基乙胺（6.00mL，34.51mmol）的四氫呋喃（150mL）溶液攪拌6小時並真空濃縮，得到NHS酯粗產物。

向（S）-6-胺基-2-（第三丁氧羰基）胺基）己酸鹽酸鹽（2.75g，9.73mmol）的DMF（100mL）溶液和1.0 M Na_2PO_4（pH 7.5，55mL）中，在1小時內分四批，加入上述製備的酯。將反應混合物在室溫下再攪拌3小時。濃縮後，將殘餘物在矽膠柱上純化（二氯甲烷/甲醇 = 10:1至4:1），得到標題化合物（8.16g，收率79%）。MS-ESI m/z： $[M+H]^+$ $C_{66}H_{108}N_5O_{20}$計算值，1289.75；實測值，1289.90。

【0421】實施例 223.（18S,59S）-59-胺基-18-（（苄氧基）羰基）-3,16,21,37,53-五側氧基-1-苯基-2,25,28,31,34,41,44,47,50-九氧雜-17,22,38,54-四氮雜六十烷-60-酸鹽酸鹽（192）的合成

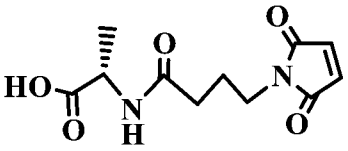


192

在4 °C下，將化合物191（8.10g，6.28mmol）溶解在二惡烷（40mL）中，並與鹽酸（15mL，36%濃鹽酸）反應0.5小時。將反應混合物用甲苯（20 mL）和DMF（20 mL）稀釋，在15°C下濃縮，得到標題

化合物粗品192（7.71g，收率100%），無需進一步純化進行下一步。MS-ESI m/z： $[M+H]^+$ $C_{61}H_{88}N_3O_{17}$計算值，1190.70；實測值，1190.78。

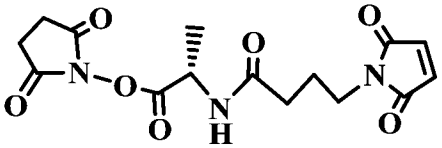
【0422】實施例 224.（S）-2-（4-（2,5）-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-丙酸（193）的合成



193

在0°C下，向N-琥珀醯亞胺基4-馬來醯亞胺丁酸酯（7.10g，25.35mmol）和丙氨酸（3.01g，33.80mmol）的DMF（50mL）溶液中加入N,N-二異丙基乙胺（10mL）。將反應混合物在0°C下攪拌0.5小時，然後在室溫下攪拌1小時。將反應混合物濃縮並在矽膠柱上純化（移動相為二氯甲烷/甲醇=10:1，含0.1%甲酸），得到化合物193（5.21g，81%收率）。MS-ESI m/z： $[M+H]^+$ $C_{11}H_{14}N_2O_5$計算值，255.09；實測值，255.15。

【0423】實施例 225.（S）-2,5 -二側氧基吡咯啶-1-基2-（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）丙酸酯（194）的合成

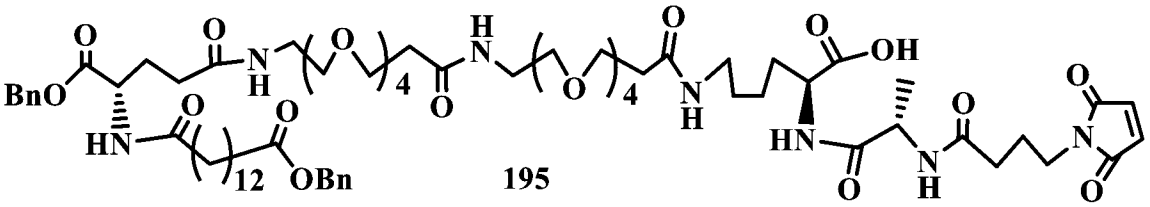


194

將化合物193（5.15g，20.26mmol），N-羥基琥珀醯亞胺（2.80g，24.34mmol），EDC（10.28g，54.10mmol）和N,N-二異丙基乙胺（5.50mL，31.63mmol）的二氯甲烷（70mL）溶液攪拌6小時，真空濃縮並在矽膠柱上純化（移動相為二氯甲烷 / 乙酸乙酯 = 10：1），得到化合物194（5.83g，82%收率）。MS-ESI m/z： $[M+H]^+$ $C_{15}H_{17}N_3O_7$計算

值，351.11；實測值，351.20。

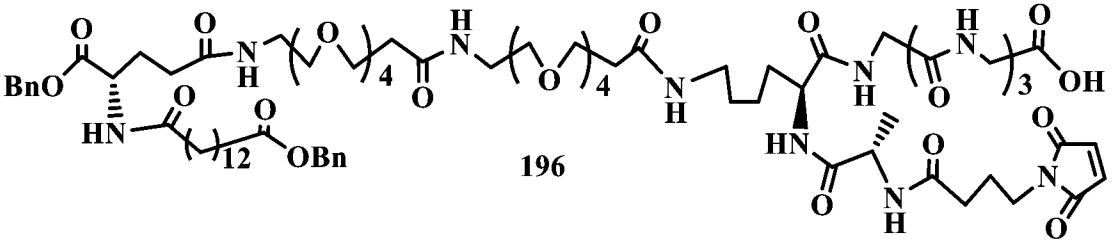
【0424】實施例 226.（18S,59S）-18-（（苄氧基）羰基）-59-（（S）-2-（4-（2,5）-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）丙醯胺基）-3,16,21,37,53-五側氧基-1-苯基-2,25,28,31,34,41,44,47,50-九氧雜-17,22,38,54-四氮雜六十烷-60-酸（195）的合成



195

在0°C下，向化合物192（7.61g，6.39 mmol）和化合物194（2.90g，8.280 mmol）的DMF（40 mL）的溶液中加入N,N-二異丙基乙胺（7 mL）。將反應混合物在0°C下攪拌0.5小時，然後在室溫下攪拌1小時。將反應混合物濃縮並在矽膠柱上純化（移動相為二氯甲烷/甲醇=10:1，含0.1%甲酸），得到化合物195（7.10g，78%收率）。MS-ESI m/z： $[M+H]^+$ $C_{72}H_{112}N_7O_{22}$計算值，1426.7782；實測值，1426.7820。

【0425】實施例 227.（18S,59S）-18-（（苄氧基）羰基）-59-（（S）-2-（4-（2,5）-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）丙醯胺基）-3,16,21,37,53,60,63,66,69-九側氧基-1-苯基-2,25,28,31,34,41,44,47,50-九氧雜-17,22,38,54,61,64,67,70-八氮雜七十二烷-72-酸（196）的合成



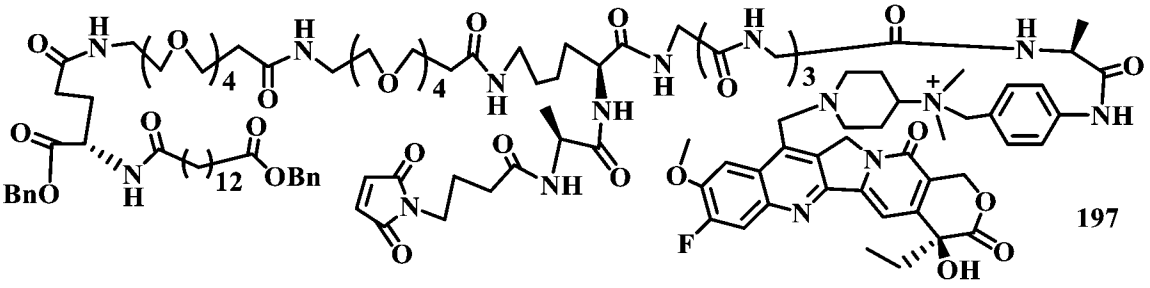
196

將化合物195（7.05g，4.94mmol），N-羥基琥珀醯亞胺（0.92g，8.00mmol），EDC（3.01g，15.84mmol）和N,N-二異丙基乙胺

（1.00mL，5.75mmol）的四氫呋喃（50mL）溶液攪拌6小時並真空濃縮，得到NHS酯粗品。

向2-（2-（2-胺基乙醯胺基）乙醯胺基）乙酸（Gly-Gly-Gly）鹽酸鹽（1.67g，7.40mmol）的DMF（40mL）溶液和1.0M Na_2PO_4（pH 7.5，15mL）中，在1小時內將上述酯分四批加入。將反應混合物在室溫下再攪拌3小時。濃縮後，將殘餘物在矽膠柱上純化（二氯甲烷/甲醇 = 10:1至7:1），得到標題化合物196（8.16g，收率為79%）。MS-ESI m/z： $[M+H]^+$ $C_{78}H_{121}N_{10}O_{25}$計算值，1597.8426；實測值，1597.8495。

【0426】 實施例 228. N-（4-（（18S,61S,76S）-18-（（苄氧基）羰基）-61-（（S）-2-（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）丙醯胺基）-76-甲基-3,16,21,38,55,62,65,68,71,74-十二側氧基-1-苯基-2,25,29,32,35,42,46,49,52-九氧雜-17,22,39,56,63,66,69,72,75-九氧雜七十七烷醯胺基）苄基）-1-（（（（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二側氧基-3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7]吲哚並[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）-N,N-二甲基六氫吡啶-4-鎓甲酸鹽（197）的合成

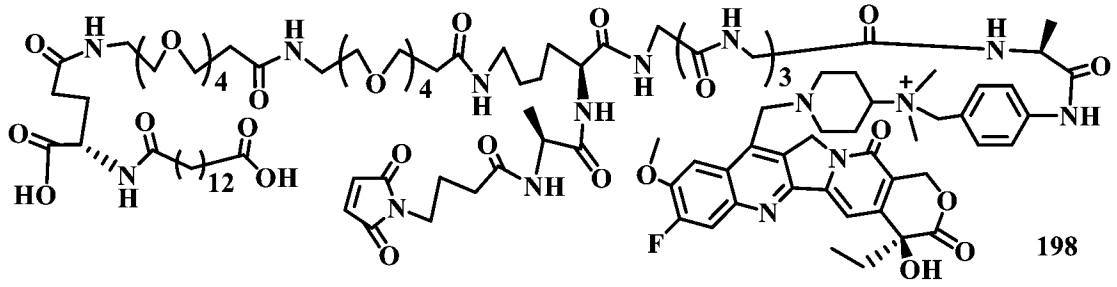


197

將化合物196（251mg，0.157mmol），化合物24（147.8mg，0.157mmol），EDC（101mg，0.526mmol）和DPEA（0.10mL，0.575mmol）的DMA溶液在室溫下攪拌6小時。真空蒸發濃縮混合物，用製備C-18 HPLC（含0.5%甲酸的乙腈/水，Φ = 3 cm，v = 20 mL / min，45分鐘，從90%水到30%水）純化，得到化合物197（235.8mg，62%收

率）。ESI-MS m/z： M^+ $C_{121}H_{171}FN_{17}O_{31}$計算值： 2377.2305；實測值2377.2415。

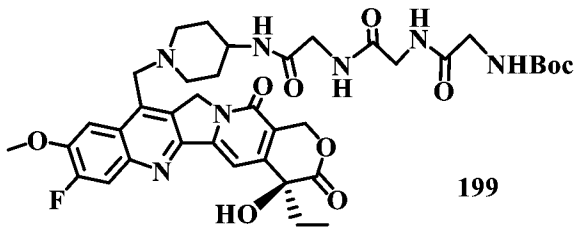
【0427】實施例 229. N-（4-（（（2S,17S,60S）-60,74-二羧基-17-（（S）-2-（4-（2,5）-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）丙醯胺基）-2-甲基-4,7,10,13,16,23,40,57,62-九側氧基-26,29,32,36,43,46,49,53-八氧雜-3,6,9,12,15,22,39,56,61-九氮雜七十四烷醯胺基）苄基）-1-（（（（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二側氧基-3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7]吲哚並[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）-N,N-二甲基六氫吡啶-4-鎓（198）的合成



198

化合物197（110 g，0.0454mmol）的二氯甲烷（2mL）溶液與TFA（4mL）反應1小時。將反應混合物用甲苯（5 mL）和DMF（5 mL）稀釋，蒸發濃縮，並藉由製備C-18 HPLC（含0.5%甲酸的乙腈/水，Φ = 3 cm，v = 20 mL /min，45分鐘，從95%水到30%水）純化，得到化合物198（70.2mg，69%收率）。ESI-MS m/z： M^+ $C_{107}H_{159}FN_{17}O_{31}$計算值：2197.1366；實測值2197.1410。

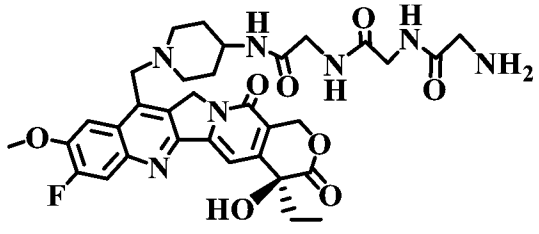
【0428】實施例 230.（S）-第三丁基（2-（（2-（（2-（（1-（（4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二側氧基-3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7]吲哚嗪並[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）六氫吡啶-4-基）胺基）-2-氧乙基）胺基）-2-氧乙基）胺基）-2-羰基乙基）胺基甲酸酯（199）



199

向（S）-11-（（4-胺基六氫吡啶-1-基）甲基）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-1H-吡喃並[3',4'：6,7]吲嗪並[1,2-b]喹啉-3,14（4H,12H）-二酮鹽酸鹽（49）（0.805g，1.478mmol）的DMF（25mL）溶液和0.1 M NaH_2PO_4 pH 7.5（50 mL）中，3小時內分四份加入2,5-二側氧基吡咯啶-1-基2,2-二甲基-4,7,10-三側氧基-3-氧雜-5,8,11-三氮雜十三烷-13-酯（0.855g，2.214mmol）。加入後，將混合物再攪拌2小時，濃縮，用乙酸乙酯/ 正丁醇（1：1，15mL × 3）萃取。將有機層合併，濃縮並在矽膠柱上純化（二氯甲烷/ 甲醇 = 12:1至7:1），得到標題化合物199（0.841g，73%收率）。MS-ESI m/z： $[M+H]^+$ $C_{38}H_{47}FN_7O_{10}$計算值，780.3369；實測值，780.3415。

【0429】 實施例 231. （S）-2-胺基-N-（2-（2-（1-（4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14）-二側氧基-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4'：6,7]吲哚嗪並[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）六氫吡啶-4-基）胺基）-2-氧乙基）胺基）-2-氧乙基）乙醯胺鹽酸鹽（200）的合成

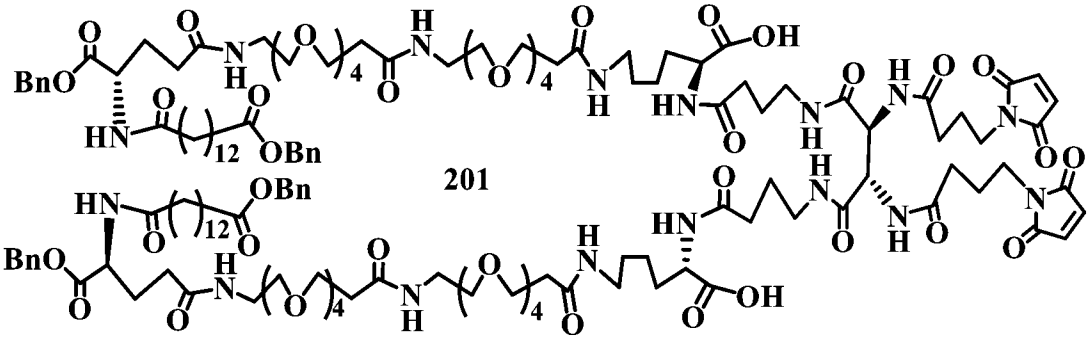


200

在4℃下，將化合物199（0.810g，1.039mmol）溶解於二惡烷（25ml）中，並與鹽酸（10ml，36%濃鹽酸）反應0.5小時。將反應混合物用甲苯（15ml）和DMF（15ml）稀釋，在15℃下濃縮，得到標題化合物200粗品（0.744g，100%收率），無需進一步純化直接用於下一步。

MS-ESI m/z： $[M+H]^+$ $C_{33}H_{39}FN_7O_8$計算值，680.2845；實測值，680.2895。

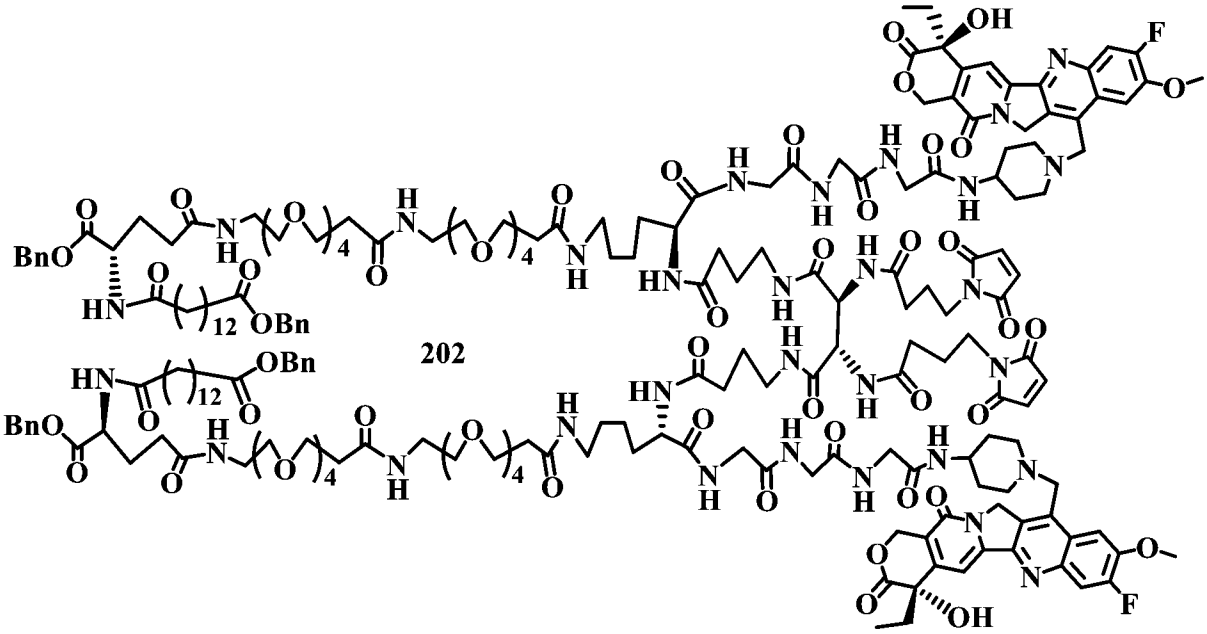
【0430】實施例 232.（2S,10S,11S,19S）-2,19雙（（S）-18-（（苄氧基）羰基）-3,16,21,37,53-五氧基-1-苯基-2,25,28,31,34,41,44,47,50-九氧雜-17,22,38,54-四氮雜五十八烷-58-基）-10,11雙（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-4,9,12,17-四側氧基-3,8,13,18-四氮雜二十烷-1,20二酸（201）



在0°C，向化合物192（2.78 g，2.267 mmol）和化合物132（0.951 g，1.129 mmol）的DMF（40 mL）溶液中加入N,N-二異丙基乙胺（6 mL）。將反應混合物在0°C攪拌0.5小時，然後在室溫攪拌1小時。將反應混合物濃縮並在矽膠柱上純化（移動相：二氯甲烷/甲醇 = 10：1至3：1，含0.1%甲酸），得到化合物201（2.432 g，72%收率）。MS-ESI m/z： $[M+H]^+$ $C_{150}H_{231}N_{16}O_{46}$計算值，2992.6229；實測值，2992.6295。

【0431】實施例 233.（15S,56S,64S,65S,73S,114S）-四苄基64,65-雙（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-56,73-雙（（2-（2-（（2-（1-（（（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二側氧基-3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7]吲哚嗪並[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）-六氫吡啶-4-基）胺基）-2-氧乙基）胺基）-2氧乙基）胺基）

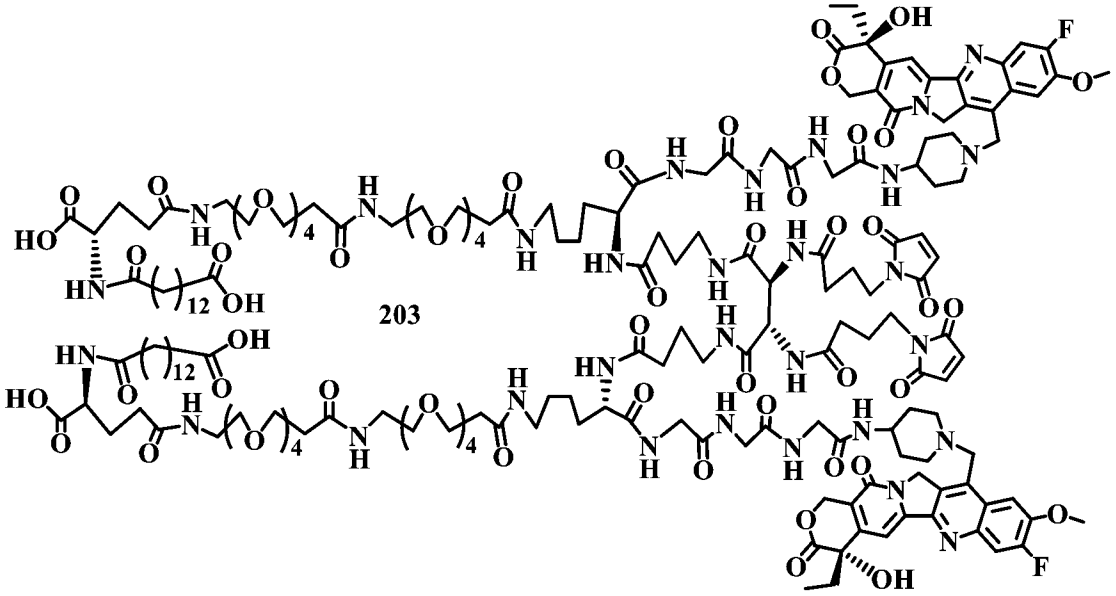
-2-（氧乙基）氨甲醯基）-13,18,34,50,58,63,66,71,79,95,111,116-十二烷側氧基-22,25,28,31,38,41,44,47,82,85,88,91,98,101,104,107-十六烷氧雜-14,19,35,51,57,62,67,72,78,94,110,115-十二氮雜一百二十八烷-1,15,114,128-四羧酸酯（202）的合成



將化合物 201 （0.150 g，0.209 mmol），化合物 200 （0.312 g，0.104 mmol）、EDC （0.252 g，1.311 mmol） 的 DMF （8 mL）溶液攪拌 8小時，真空蒸發濃縮並在矽膠柱上純化（二氯甲烷/甲醇 = 10：1至7：1），得到標題化合物202（0.301 g，67%收率）。MS-ESI m/z：$[M+H]^+$ $C_{216}H_{303}F_2N_{30}O_{60}$計算值，4315.1550；實測值，4315.1685。

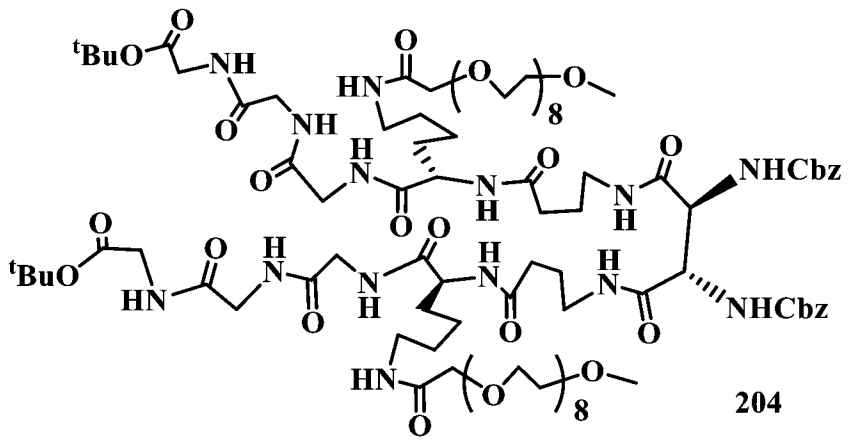
【0432】實施例 234.（15S,56S,64S,65S,73S,114S）-64,65-雙（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-56,73-雙（（2-（2-（（2-（1-（（（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二側氧基-3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7]吲哚嗪並[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）六氫吡啶-4-基）胺基）-2-氧乙基）胺基）-2氧乙基）胺基）-2-羰基）胺基甲醯基）-13,18,34,50,58,63,66,71,79,95,111,116-十二烷側氧基

-22,25,28,31,38,41,44,47,82,85,88,91,98,101,104,107-十六烷氧雜-14,19,35,51,57,62,67,72,78,94,110,115-十二氮雜一百二十八烷-1,15,114,128四羧酸（203）



化合物202 （105 mg，0.0243 mmol）的二氯甲烷 （2 mL）溶液與TFA （4 mL）反應1小時。將反應混合物用甲苯 （5 mL） 和 DMF （5 mL） 稀釋，濃縮，並藉由製備C-18 HPLC 純化（含有 0.5% 甲酸的乙腈/水，Φ = 3 cm，v = 20 mL/min，45 分鐘，95% 的水到30% 的水），得到化合物 203（65.3 mg，68% 收率）。ESI-MS m/z： $[M+H]^+$ $C_{188}H_{279}F_2N_{30}O_{60}$計算值： 3954.9672；實測值3954.9785。

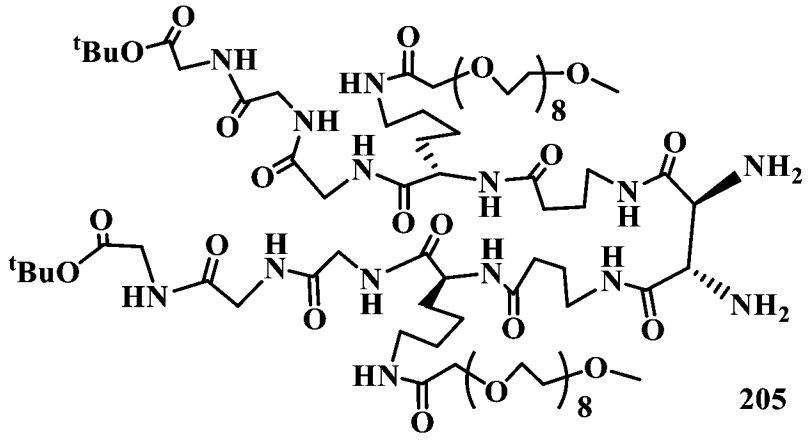
【0433】實施例 235.（11S,19S,20S,28S）-二第三丁基19,20雙（（苄氧基）-羰基）胺基）-4,7,10,13,18,21,26,29,32,35-十側氧基-11,28雙（28-側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29-氮雜三十三烷-33-基）-3,6,9,12,17,22,27,30,33,36-十氮雜三十八烷-1,38-二酯（204）的合成



204

向（S）-第三丁基34-（4-胺基丁醯胺）-28,35,38,41-四側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29,36,39,42-四氧雜四十四烷-44-酯（4.427 g，5.01 mmol）的 DMF （80 mL）溶液中加入 N,N-二異丙基乙胺 （2.0 mL，11.503 mmol） 和化合物 127 （2.001 g，5.02 mmol）。混合物在室溫下攪拌隔夜，然後加入 EDC （3.851 g，20.05 mmol）。混合物繼續攪拌8小時，減壓濃縮，矽膠柱層析純化，溶離梯度為5-20%甲醇/二氯甲烷，得到標題產物（8.491 g，79%收率）。MS ESI m/z $C_{98}H_{165}N_{14}O_{38}$ $[M+H]^+$ 計算值2146.1410，實測值2146.1985。

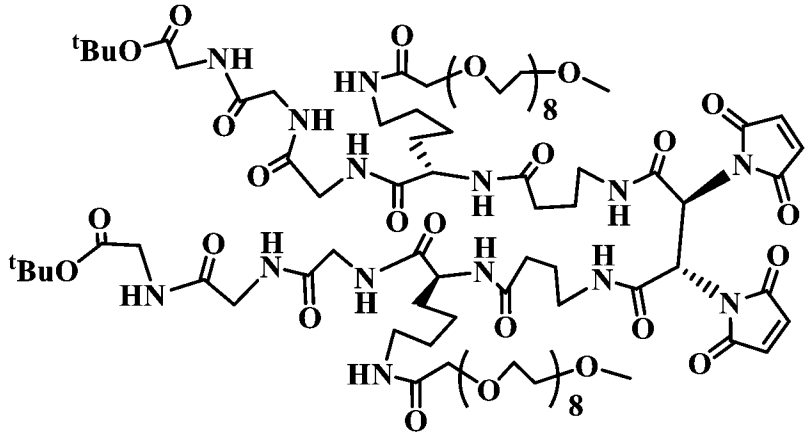
【0434】 實施例 236.（11S,19S,20S,28S）-二第三丁基19,20-二胺基-4,7,10,13,18,21,26,29,32,35-十側氧基-11,28雙（28-側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-二氧雜-29-氮雜三十三烷-33-基）-3,6,9,12,17,22,27,30,33,36-十氮雜三十八烷-1,38二酯（205）的合成



205

在氫化瓶中，向化合物 204（8.450 g，3.939 mmol）的 DMA（100 mL）溶液中加入 Pd/C（1.00 g，10 wt%，50%wet）。將混合物與 40 psi 的 H_2 一起振搖隔夜，藉由矽藻土（助濾劑）過濾，將濾液濃縮，得到淺棕色膠狀物（7.2458 g，98% 收率），無需進一步純化即可用於下一步。MS ESI m/z $C_{82}H_{153}N_{14}O_{34}$ $[M + H]^{2+}$計算值 939.5377，實測值939.5485。

【0435】實施例 237.（11S,19R,20S,28S）-二第三丁基19,20雙（2,5）-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）-4,7,10,13,18,21,26,29,32,35-十側氧基-11,28雙（28-側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氮雜-29-氮雜三十三烷-33-基）-3,6,9,12,17,22,27,30,33,36-十氮雜三十八烷-1,38二酯（206）的合成

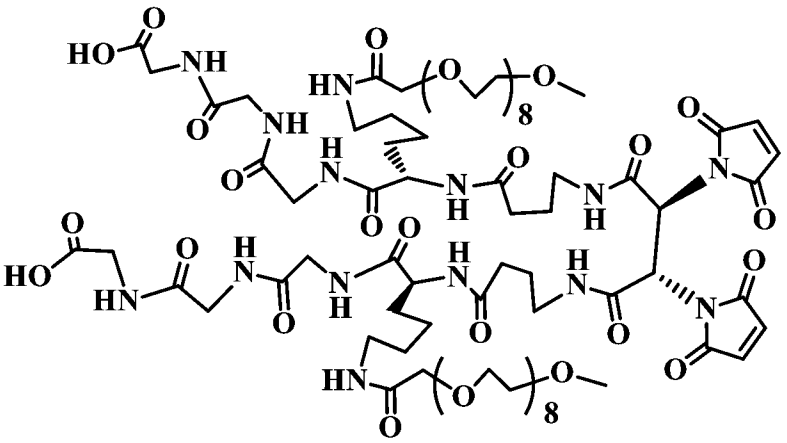


206

將化合物 205（7.201 g，3.836 mmol）在飽和$NaHCO_3$（90 mL）和 甲醇（10 mL）中的混合物在0 °C下冷卻，然後加入 N-（甲氧基羰基）馬來醯亞胺（3.10 g，20.00 mmol）。攪拌溶液20分鐘後，將反應混合物用水（150mL）稀釋並在室溫攪拌30分鐘。將反應混合物在2-8°C濃縮至～100mL，並用二氯甲烷（4×60mL）萃取。合併有機相，用硫酸鎂乾燥，過濾，濃縮，用矽膠柱層析純化，溶離梯度為5-20%甲醇/二氯

甲烷，得到標題產物（8.491 g，79%收率）。MS ESI m/z $C_{90}H_{153}N_{14}O_{38}$ $[M+H]^+$ 計算值2038.0471，實測值2038.0545。

【0436】 實施例 238. （11S,19R,20S,28S）-19,20-雙（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）-4,7,10,13,18,21,26,29,32,35-十側氧基-11,28-雙（28-側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氮雜-29-氮雜三十三烷-33-基）-3,6,9,12,17,22,27,30,33,36-十氮雜三十八烷-1,38二酸（207）的合成

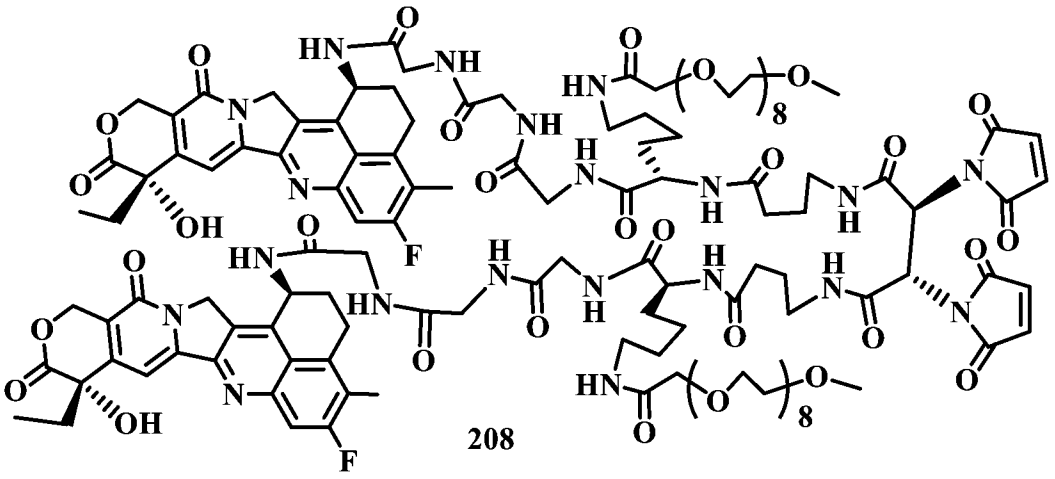


207

在冰浴上，向化合物206（8.451 g，4.148 mmol）的二惡烷（50 mL）溶液中加入濃鹽酸（12 mL）。將混合物在冰浴上攪拌 45 分鐘，用二惡烷 （50 mL） 和甲苯 （50 mL） 稀釋，濃縮，並與二惡烷/甲苯（1：1，2 × 50 mL） 真空共沸濃縮，得到無色膠狀物（7.745 g，97%收率），HPLC純度為93%，無需進一步純化即可用於下一步。粗品可藉由矽膠柱層析純化，溶離梯度為3-10%水/丙酮，得到標題產物（7.141 g，84%收率）。MS ESI m/z $C_{82}H_{137}N_{14}O_{38}$ $[M + H]^+$ 計算值 1925.9219，實測值1925.9395。

【0437】 實施例 239. （2R,3S）-2,3-雙（2,5）-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）-N1,N4雙（（S）-34-（（2-（（2-（（（1S,9S）-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-1,2,3,9,10,12,13,15-八氫苯並[de]

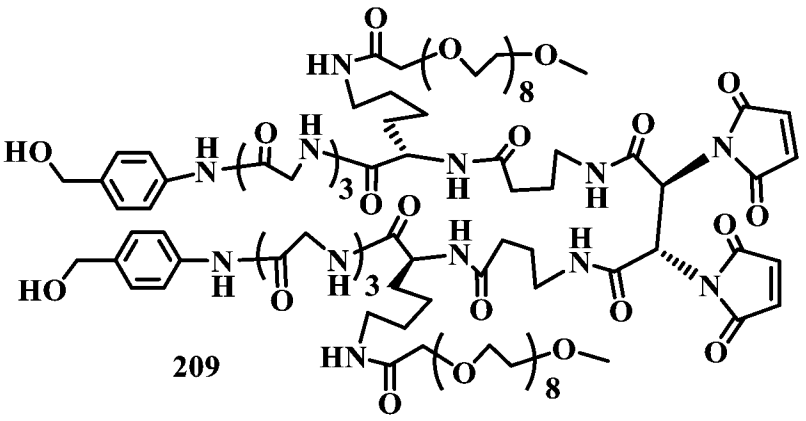
呱喃並[3',4'：6,7]吲哚嗪並[1,2-b]喹啉-1-基）胺基）-2-氧乙基）胺基）-2-氧乙基）胺基）-2-氧乙基）氨甲醯基）-28,36-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29,35-二氮雜三十九烷-39-基）丁二醯胺（208）的合成



208

向化合物207（0.301 g，0.156 mmol），依喜替康鹽酸鹽（0.151 g，0.318 mmol）、EDC（0.150 g，0.781 mmol）的DMA（8 mL）溶液中加入N,N-二異丙基乙胺（0.080 mL，0.460 mmol）。然後將混合物在室溫下攪拌6 小時，減壓濃縮，用矽膠柱層析純化，溶離梯度為3-18%甲醇/二氯甲烷，得到標題產物（0.207 g，72%收率）。MS ESI m/z $C_{130}H_{176}F_2N_{20}O_{44}$ $[M+H]^+$ 計算值2760.2196，實測值2760.2450。

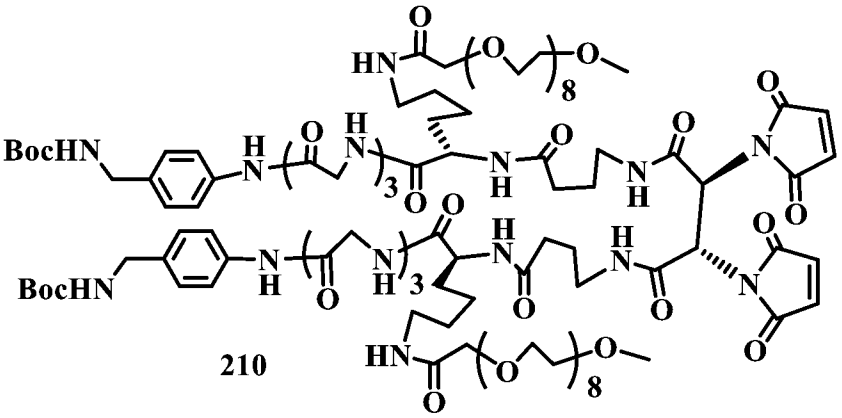
【0438】 實施例 240.（2R,3S）-2,3-雙（2,5）-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）-N^1,N^4-雙（（S）-34-（（2-（2-（（4-（羥甲基）苯基）胺基）-2-氧乙基）胺基）-2-氧乙基）胺基）-2-羰基乙基）氨甲醯基）-28,36-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29,35-二氮雜三十九烷-39-基）丁二醯胺（209）的合成



209

向化合物 207 （1.008 g，0.523 mmol） 和 （4-胺基苯基） 甲醇鹽酸鹽 （0.261 g，1.635 mmol） 的 DMA （15 mL）溶液中加入 EDC （0.401 g，2.088 mmol） 和 N,N-二異丙基乙胺 （0.20 mL，1.15 mmol）。將混合物攪拌8小時，減壓濃縮並藉由矽膠柱層析純化，5-15%甲醇/二氯甲烷的梯度溶離，得到標題產物（0.904 g，81%收率）。MS ESI m/z 計算值 $C_{96}H_{150}N_{16}O_{38}$ $[M+H]^+$ 2136.0376，實測值2136.0520。

【0439】實施例 241. （（（（（（11S,19R,20S,28S）-19,20雙（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）-4,7,10,13,18,21,26,29,32,35-十側氧基-11,28-雙（28-側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29-氮雜三十三烷-33-基）-3,6,9,12,17,22,27,30,33,36-十氮雜三十八烷-1,38二醯基）雙（氮雜二基）雙（4,1-亞苯基）雙（亞甲基））-二胺基甲酸酯（210）的合成

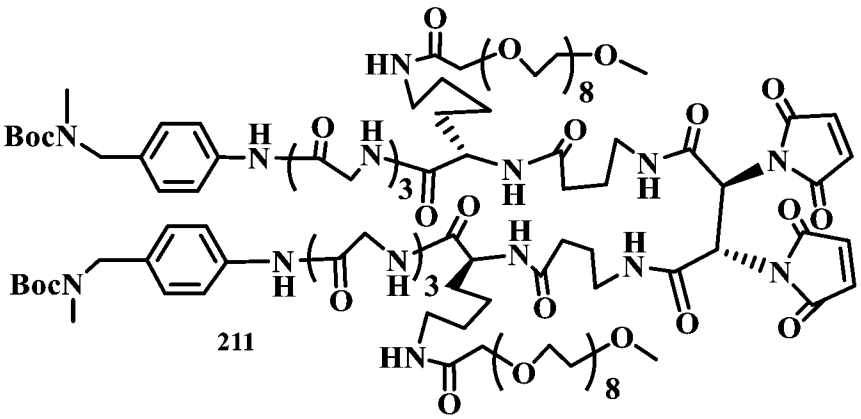


210

向化合物 207 （1.001 g，0.520 mmol） 和 4-胺基苄基胺基甲酸第

三丁酯鹽酸鹽 （0.301 g，1.163 mmol）的 DMA （20 mL）溶液中加入 EDC （0.401 g，2.088 mmol） 和 N,N-二異丙基乙胺 （0.20 mL，1.15 mmol）。將混合物攪拌8小時，減壓濃縮並藉由矽膠柱層析法純化，5-15%甲醇/二氯甲烷的梯度溶離，得到標題產物（1.007 g，83%收率）。MS ESI m/z $C_{106}H_{169}N_{18}O_{40}$ $[M+H]^+$ 計算值 2334.1744，實測值 2334.1980。

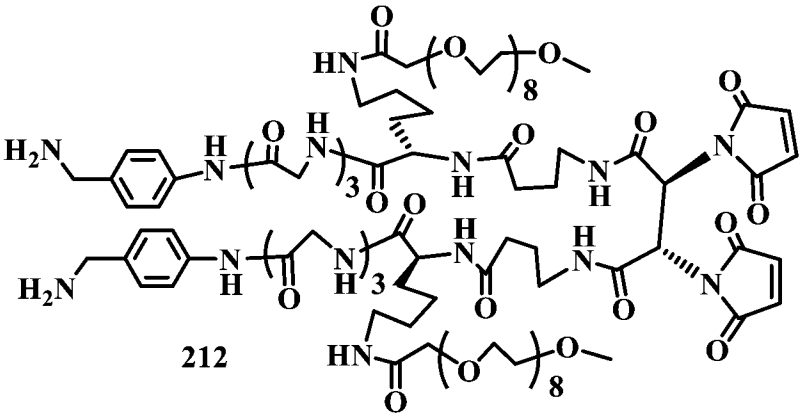
【0440】 實施例 242. 二第三丁基-（（（（（11S,19R,20S,28S）-19,20 雙（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）-4,7,10,13,18,21,26,29,32,35-十側氧基-11,28-雙（28-側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29-氮雜三十三烷-33-基）-3,6,9,12,17,22,27,30,33,36-十氮雜三十八烷-1,38二醯基）雙（氮雜二烷基））雙（4,1-亞苯基）雙（亞甲基）雙（甲基胺基甲酸酯）（211）的合成



向化合物 207 （1.001 g，0.520 mmol） 和 4-胺基苄基（甲基）胺基甲酸第三丁酯鹽酸鹽 （0.300 g，1.100 mmol）的 DMA （20 mL） 溶液中加入 EDC （0.401 g，2.088 mmol） 和 N,N-二異丙基乙胺（0.20 mL，1.15 mmol）。將混合物攪拌8小時，減壓濃縮並藉由矽膠柱層析法純化，5-15%甲醇/二氯甲烷的梯度溶離，得到標題產物（0.988 g，81%

收率）。MS ESI m/z $C_{108}H_{173}N_{18}O_{40}$ $[M+H]^+$ 計算值 2362.2056，實測值 2362.2230。

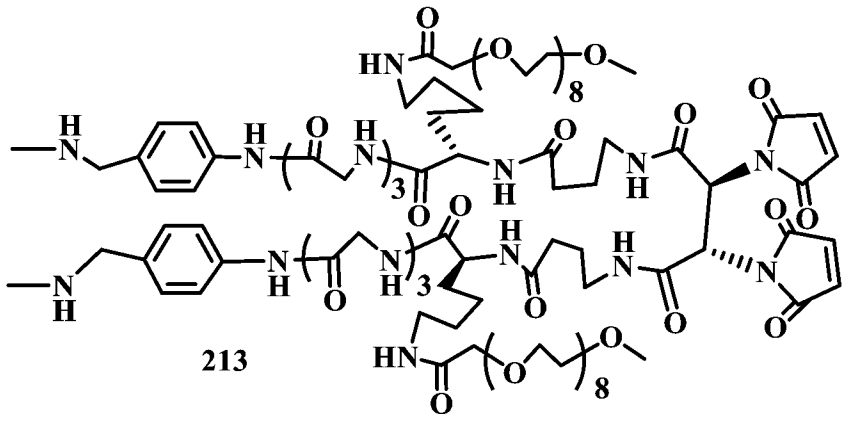
【0441】實施例 243.（2R,3S）-N^1,N^4雙（（S）-34-（（2-（2-（（2-）（（4-（胺基甲基）苯基）-胺基）-2-氧乙基）胺基）-2-氧乙基）胺基）-2-羰基乙基）氨甲醯基）-28,36-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29,35-二氮雜三十九烷-39-基）-2,3-雙（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁二醯胺（212）的合成



212

在冰浴上，向化合物210（0.2511 g，0.107 mmol）的二惡烷（10 mL）溶液中加入鹽酸（濃2 mL）。將混合物在冰浴上攪拌 30 分鐘，用二惡烷（10 mL）和甲苯（10 mL）稀釋，濃縮並與二惡烷/甲苯（1：1，2 × 10 mL）真空共沸蒸發，得到 212 鹽酸鹽（0.2373 g，100%收率），HPLC純度為95%，無需進一步純化即可用於下一步。MS ESI m/z $C_{96}H_{154}N_{18}O_{36}$ $[M + 2H]^{2+}$ 計算值1067.5388，實測值1067.5445。

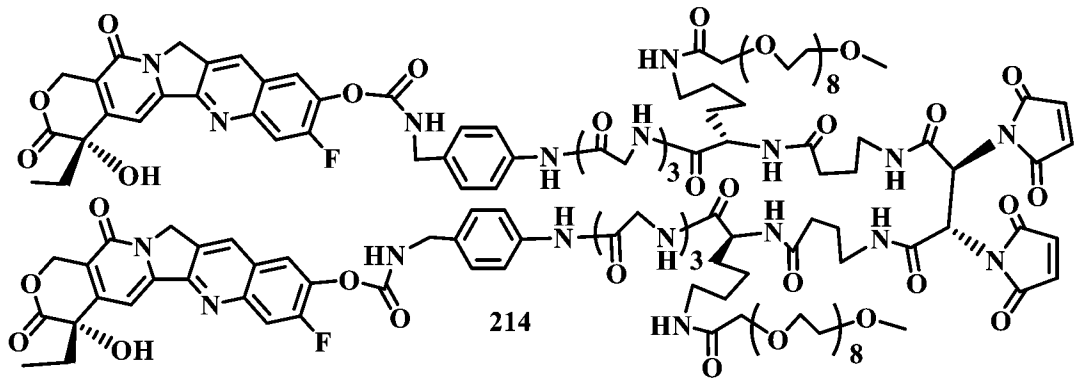
【0442】實施例 244.（2R,3S）-N^1,N^4雙（（S）-34-（（2-（2-（（2-）（4-（甲基胺基甲基）苯基）-胺基）-2-氧乙基）胺基）-2-氧乙基）胺基）-2-羰基乙基）氨甲醯基）-28,36-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29,35-二氮雜三十九烷-39-基）-2,3-雙（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁二醯胺（213）的合成



213

在冰浴上，向化合物211 （0.2501 g，0.106 mmol）的二惡烷（10 mL）溶液中加入濃鹽酸（2 mL）。將混合物在冰浴上攪拌 30 分鐘，用二惡烷 （10 mL） 和甲苯 （10 mL） 稀釋，濃縮，與二惡烷/甲苯 （1：1，2 × 10 mL） 真空共沸蒸發，得到 213 鹽酸鹽（0.2292 g，100%收率），HPLC純度為95%，無需進一步純化即可用於下一步。MS ESI m/z $C_{98}H_{158}N_{18}O_{36}$ $[M + 2H]^{2+}$ 計算值 1082.5622，實測值1082.5815。

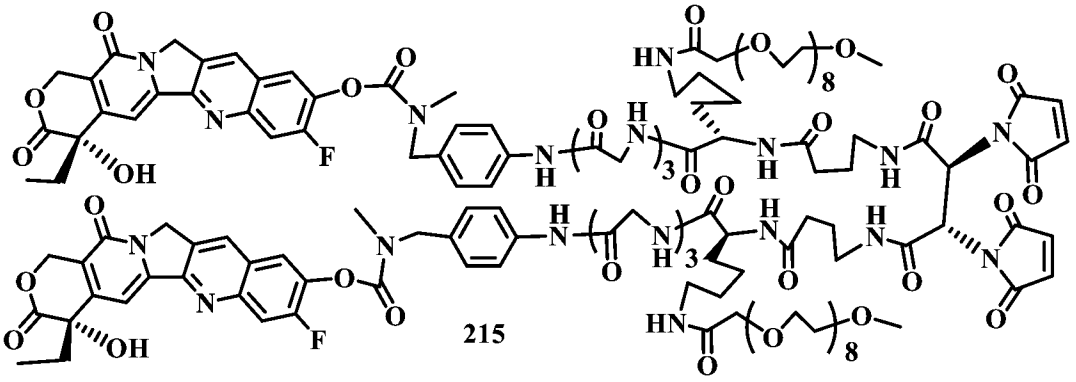
【0443】 實施例 245. 雙（（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-3,14 -二側氧基-3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7]吲哚並[1,2-b]喹啉-9-基）-3-（（（（（（（11S,19R,20S,28S）-19,20-雙（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）-4,7,10,13,18,21,26,29,32,35-十側氧基-11,28-雙（28-側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26- 九 氧 雜 -29- 氮 雜 三 十 三 烷 -33- 基 ） -3,6,9,12,17,22,27,30,33,36-十氮雜三十八烷-1,38二醯基）雙（氮雜二基）雙（4,1-亞苯基）雙（亞甲基）-二胺基甲酸酯（214）的合成



214

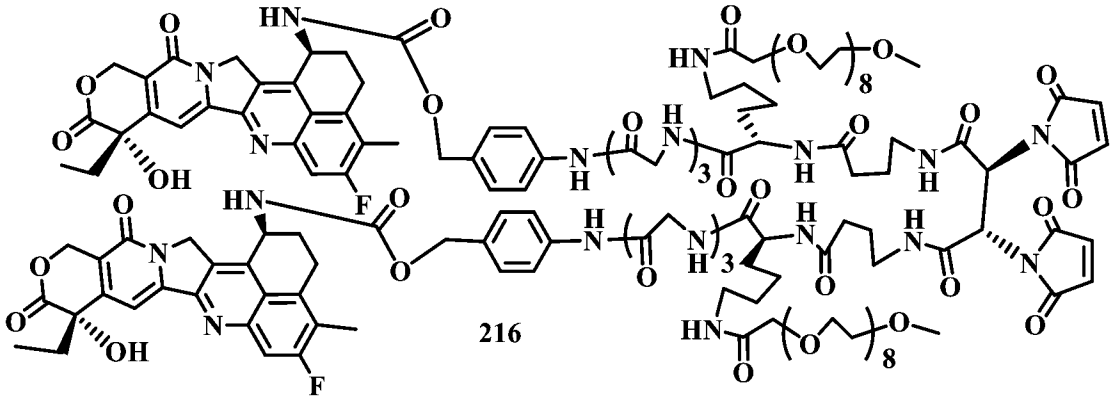
在冰浴中，向（S）-4-乙基-8-氟-4,9-二羥基-1H-吡喃並[3',4'：6,7]吲嗪並[1,2-b]喹啉-3,14（4H,12H）-二酮（0.101 g，0.264 mmol）的二氯甲烷（10 mL）溶液中，加入N,N-二異丙基乙胺（0.050 mL，0.287 mmol）和4-硝基苯基氯甲酸酯（0.056 g，0.279 mmol）。然後將混合物在室溫下攪拌2小時，然後加入化合物212（0.288g，0.135mmol）和N,N-二異丙基乙胺（0.060mL，0.345mmol）。將反應混合物繼續攪拌隔夜，減壓濃縮並用矽膠柱層析純化，5-15%甲醇/二氯甲烷的梯度溶離，得到標題產物（0.303g，76%收率）。MS ESI m/z $C_{138}H_{178}F_2N_{22}O_{48}$ $[M+H]^+$ 計算值2590.2211，實測值2950.2390。

【0444】 實施例 246. 雙（（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-3,14 -二側氧基-3,4,12,14-四氫-1H-吡喃並[3',4'：6,7]吲哚並[1,2-b]喹啉-9-基）-3-（（（（（（（11S,19R,20S,28S）-19,20雙（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）-4,7,10,13,18,21,26,29,32,35-十側氧基-11,28-雙（28-側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26- 九 氧 雜 -29- 氮 雜 三 十 三 烷 -33- 基 ）-3,6,9,12,17,22,27,30,33,36-十氮雜三十八烷-1,38二醯基）雙（氮雜二基））雙（4,1-亞苯基））雙（亞甲基））雙（胺基甲酸甲酯）（215）的合成


O
N
O
O
OH
F
O
N
H
N
O
O
HN
O
8
O
O
O

氯甲烷（10 mL）溶液中，加入N,N-二異丙基乙胺（0.050 mL，0.287 mmol）和4-硝基苯基氯甲酸酯（0.056 g，0.279 mmol）。將混合物在室溫下攪拌2小時，然後加入化合物213（0.295g，0.136mmol）和N,N-二異丙基乙胺（0.060mL，0.345mmol）。將反應混合物繼續攪拌隔夜，減壓濃縮並用矽膠柱層析純化，用5-15%甲醇/二氯甲烷梯度純化，得到標題產物（0.303g，收率76%）。MS ESI m/z $C_{140}H_{184}F_2N_{22}O_{48}$ $[M+H]^+$ 計算值 2979.2601，實測值2979.2890。

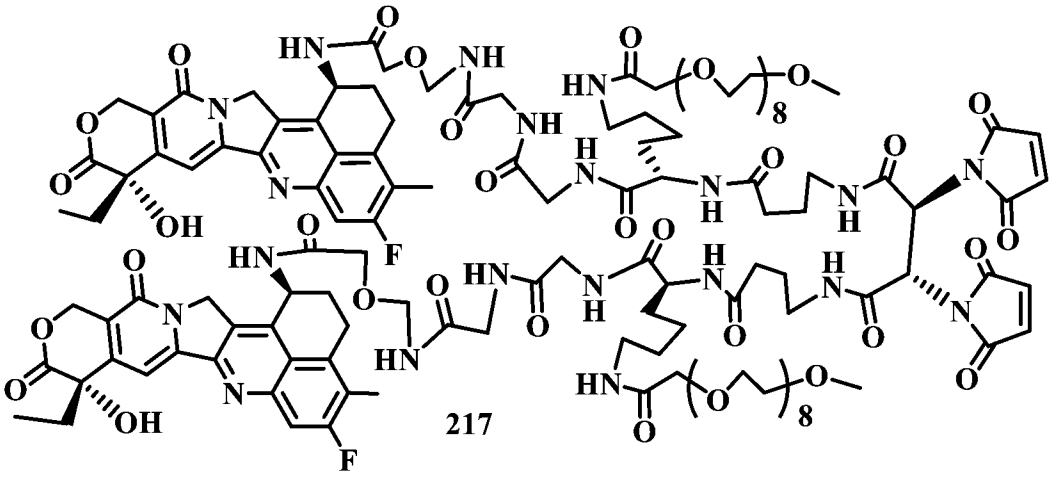
【0445】實施例 247.（（（（11S,19R,20S,28S）-19,20-雙（2,5）-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）-4,7,10,13,18,21,26,29,32,35-十側氧基-11,28-雙（28-側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29-氮雜三十三烷-33-基）-3,6,9,12,17,22,27,30,33,36-十氮雜三十八烷-1,38二醯基）雙（氮雜二基））雙（4,1-亞苯基）雙（亞甲基）雙（（（1S,9S）-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-1,2,3,9,10,12,13,15-八氫苯並[de]吡喃[3',4'：6,7]-吲哚嗪並[1,2-b]喹啉-1-基）胺基甲酸酯）（216）的合成



在冰浴上，N_2保護下，向化合物209（0.201 g，0.094 mmol）的二氯甲烷（5 mL）溶液中，加入三光氣（0.0575 g，0.191 mmol）和N,N-二異丙基乙胺（0.040 mL，0.230 mmol）。將混合物在0°C攪拌30分鐘，

室溫下攪拌 30 min，然後在冰浴上加入依喜替康鹽酸鹽（0.110 g，0.233 mmol）和 N,N-二異丙基乙胺 （0.045 mL，0.258 mmol）。將混合物在室溫下攪拌2小時，減壓濃縮，矽膠柱層析純化，3-18%甲醇/二氯甲烷梯度溶離，得到標題產物（0.207 g，72%收率）。MS ESI m/z $C_{146}H_{190}F_2N_{22}O_{48}$ $[M+H]^+$ 計算值 3058.3150，實測值3058.3345。

【0446】實施例 248.（2R,3S）-2,3-雙（2,5）-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）-N1,N4-雙（（S）-34-（（2-（（2-（（（2-（（（（1S,9S）-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-1,2,3,9,10,12,13,15-八氫苯並[de]呱喃[3',4'：6,7]吲哚嗪並[1,2-b]喹啉-1-基）胺基）-2-側氧基乙氧基）甲基）胺基）-2-側氧基乙基）胺基）-2側氧基乙基（胺基甲醯基）-28,36-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29,35-二氮雜三十九烷-39-基）丁二醯胺（217）的合成

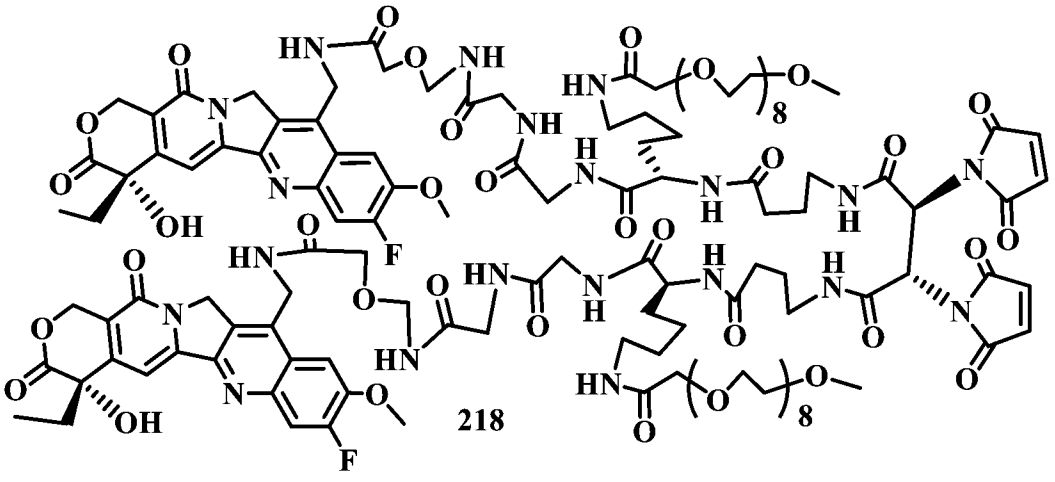


217

向（11S,19R,20S,28S）-19,20-雙（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）-4,7,10,13,18,21,26,29,32,35-十側氧基-11,28-雙（28-側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29-氮雜三十三烷-33-基）-3,6,9,12,17,22,27,30,33,36-十氮雜三十八烷-1,38-二酸 （0.301 g，0.156 mmol），2-（胺基甲氧基）-N-（1S，9S）-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-

10,13-二側氧基-1,2,3,9,10,12,13,15-八氫苯並[de]呱喃並[3',4'：6,7]吲嗪並[1,2-b]喹啉-1-基）乙醯胺（0.185 g，0.354 mmol），EDC（0.150 g，0.781 mmol）的DMA（8 mL）溶液中加入N,N-二異丙基乙胺（0.080 mL，0.460 mmol）。然後將混合物在室溫下攪拌6小時，減壓濃縮並用矽膠柱層析純化，3-18%甲醇/二氯甲烷溶液梯度溶離，得到標題產物（0.308g，收率70%）。MS ESI m/z $C_{132}H_{181}F_2N_{20}O_{46}$ $[M+H]^+$ 計算值2820.2408，實測值2820.2635。

【0447】 實施例 249. （2R,3S）-2,3-雙（2,5）-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）-N1,N4雙（（S）-34-（（1-（S）-4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二側氧基-3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7]吲哚並[1,2-b]喹啉-11-基）-3,8,11-三側氧基-5-氧雜-2,7,10-三氮雜十二烷-12-基）胺基甲醯基）-28,36-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29,35-二氮雜三十九烷-39-基）丁二醯胺（218）的合成

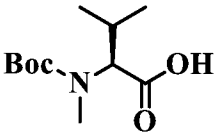


218

向（11S,19R,20S,28S）-19,20-雙（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）-4,7,10,13,18,21,26,29,32,35-十側氧基-11,28-雙（28-側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29-氮雜三十三烷-33-基）-3,6,9,12,17,22,27,30,33,36-十氮雜三十八烷-1,38-二氧二酸 （0.251 g，

0.130 mmol），（S）-2-（胺基甲氧基）-N-（4-乙基-8-氟-4-羥基-9-甲氧基-3,14-二側氧基-3,4,12,14-四氫-1H-呱喃並[3',4'：6,7]加入吲嗪並[1,2-b]喹啉-11-基）甲基）乙醯胺（0.158g，0.308 mmol）和EDC（0.150g，0.781 mmol）的DMA（8 mL）溶液中加入N,N-二異丙基乙胺（0.070 mL、0.402 mmol）。然後將混合物在室溫下攪拌6小時，減壓濃縮並用矽膠柱層析法純化，藉由 3-18%甲醇/二氯甲烷的溶液梯度溶離，得到標題產物（0.265g，73%收率）。MS ESI m/z $C_{128}H_{177}F_2N_{20}O_{48}$ $[M+H]^+$ 計算值2800.1993，實測值2800.2120。

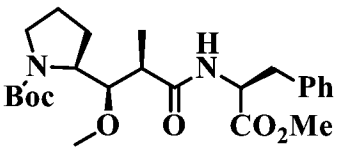
【0448】實施例 250.Boc-N-Me-L-Val-OH（219）的合成



219

在 0 °C 下，向 Boc-L-Val-OH（2.00 g，9.2 mmol）和碘甲烷（5.74 mL，92 mmol）的無水四氫呋喃（40 mL）溶液中加入氫化鈉（3.68 g，92 mmol）。將反應混合物在 0°C 攪拌 1.5 小時，然後升溫至室溫並攪拌24小時。用冰水（50mL）淬滅反應。加入水（100 mL）後，反應混合物用乙酸乙酯（3 × 50 mL）洗滌，水溶液酸化至pH 3，然後用乙酸乙酯（3 × 50 mL）萃取。合併的有機相用硫酸鈉乾燥並濃縮，得到Boc-N-Me-Val-OH（2.00 g，94%收率），為白色固體。^{1}H NMR （500 MHz，$CDCl_3$）δ 4.10 （d，*J* = 10.0 Hz，1H），2.87 （s，3H），2.37 – 2.13 （m，1H），1.44 （d，*J* = 26.7 Hz，9H），1.02 （d，*J* = 6.5 Hz，3H），0.90 （t，*J* = 8.6 Hz，3H）。

【0449】實施例 251.（S）第三丁基 2-（（1R，2R）-1-甲氧基-3-（（（S）-1-甲氧基-3-苯基丙-2-基）胺基）-2-甲基-3-側氧基丙基）吡咯啶-1-羧酸酯（220）的合成



220

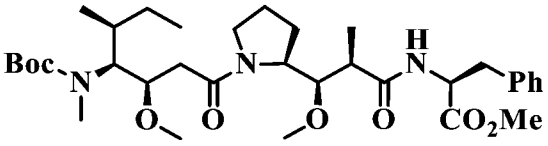
在0°C下，向（2R,3R）-3-（S）-1-（第三丁氧羰基）吡咯啶-2-基）-3-甲氧基-2-甲基丙酸（100 mL，0.347mmol）和L-苯丙氨酸甲酯鹽酸鹽（107.8mg，0.500 mmol）的DMF（5 mL）溶液中加入氰基膦酸二乙酯（75.6μL，0.451 mmol），然後加入Et_3N（131μL，0.94 mmol）。將反應混合物在0°C下攪拌2小時，然後升溫至室溫並攪拌隔夜。將反應混合物用乙酸乙酯（80mL）稀釋，用1 N硫酸氫鉀水溶液（40mL），水（40mL），飽和碳酸氫鈉水溶液（40mL）和飽和氯化鈉水溶液（40mL）洗滌，用硫酸鈉乾燥，真空濃縮。殘餘物用柱層析（15-75%乙酸乙酯/正己烷）純化，得到標題化合物（130mg，83%收率），為白色固體。^{1}H NMR （500 MHz，$CDCl_3$） δ 7.28 （dd，*J* = 7.9，6.5 Hz，2H），7.23 （t，*J* = 7.3 Hz，1H），7.16 （s，2H），4.81 （s，1H），3.98 – 3.56 （m，5H），3.50 （s，1H），3.37 （d，*J* = 2.9 Hz，3H），3.17 （dd，*J* = 13.9，5.4 Hz，2H），3.04 （dd，*J* = 14.0，7.7 Hz，1H），2.34 （s，1H），1.81 – 1.69 （m，2H），1.65（s，3H），1.51 – 1.40 （m，9H），1.16 （d，*J* = 7.0 Hz，3H）。

【0450】 實施例 252.用三氟乙酸脫Boc基團的一般步驟

向N-Boc胺基酸（1.0 mmol）的二氯甲烷（2.5 mL）溶液中加入三氟乙酸（1.0 mL）。在室溫下攪拌1-3小時後，將反應混合物真空濃縮。與甲苯共沸蒸發得到脫保護產物，其無需進一步純化即可使用。

【0451】 實施例 253.（S）-甲基 2-（（2R,3R）-3-（（S）-1-（（3R,4S,5S）-4-（（第三丁氧羰基）（甲基）胺基）-3-甲氧基-5-甲基

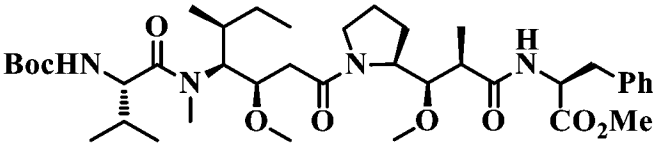
庚醯基）吡咯啶-2-基）-3-乙氧基-2-甲基丙醯胺）-3-苯基丙酸酯（221）的合成



221

在 0°C下，向（S）-第三丁基2-（（1R,2R）-1-甲氧基-3-（（（S）-1-甲氧基-1-側氧基-3-苯基丙-2-基）胺基）-2-甲基 -3-側氧基丙基）吡咯啶-1-羧酸酯（0.29 mmol）的脫Boc保護產物和（3R,4S,5S）-4-（（第三丁氧基羰基）（甲基）胺基）-3-甲氧基-5-甲基庚酸（96.6 mg，0.318 mmol）的 DMF（5 mL）溶液中加入氰基膦酸二乙酯（58 μL，0.347 mmol），然後加入 Et_3N（109 μL，0.78 mmol）。在0℃下將反應混合物攪拌 2 小時，然後升溫至室溫並攪拌隔夜。將反應混合物用乙酸乙酯（80mL）稀釋，用1N硫酸氫鉀水溶液（40mL）、水（40mL）、飽和碳酸氫鈉水溶液（40mL）和飽和氯化鈉水溶液（40mL）洗滌，硫酸鈉乾燥並真空濃縮。將殘餘物藉由柱層析法（15-75%乙酸乙酯/正己烷）純化，得到標題化合物（150mg，81%收率），為白色固體。LC-MS （ESI）m/z $C_{34}H_{55}N_3O_8$ $[M+H]^+$ 計算值： 634.40，實測值： 634.40。

【0452】 實施例 254. （S）-甲基 2-（（2R,3R）-3-（（S）-1-（（3R,4S,5S）-4-（（S）-2-（（第三丁氧基羰基）胺基）-N,3-二甲基丁醯胺基）-3-甲氧基-5-甲基庚醯基）吡咯啶-2-基）-3-甲氧基-2-甲基丙醯胺基）-3-苯基丙酸酯（222）的合成

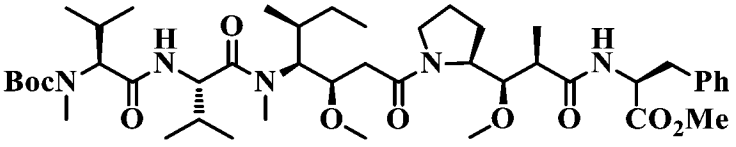


222

在 0 °C 下，向 （S）-甲基 2-（（2R,3R）-3-（（S）-1-

（（3R,4S,5S）-4-（（第三丁氧羰基）（甲基）胺基）-3-甲氧基-5-甲基庚醯基）-吡咯啶-2-基）-3-甲氧基-2-甲基丙醯胺基）-3-苯基丙酸酯（0.118 mmol） 的脫Boc保護產物和Boc-Val-OH （51.8 mg，0.236 mmol）的二氯甲烷（5 mL）溶液中加入BroP（70.1 mg，0.184 mmol），然後加入二異丙基乙胺 （70 μL，0.425 mmol）。將混合物避光並在0°C攪拌30分鐘，然後在室溫攪拌2天。將反應混合物用乙酸乙酯（80mL）稀釋，用1N硫酸氫鉀水溶液（40mL）、水（40mL）、飽和碳酸氫鈉水溶液（40mL）和飽和氯化鈉水溶液（40mL）洗滌，硫酸鈉乾燥並真空濃縮。將殘餘物藉由柱層析法（20-100%乙酸乙酯/正己烷）純化，得到標題化合物（67mg，77%收率），為白色固體。LC-MS（ESI） m/z $C_{39}H_{64}N_4O_9$ $[M+H]^+$ 計算值： 733.47，實測值： 733.46。

【0453】 實施例 255. （S）-甲基 2-（（2R,3R）-3-（（S）-1-（（6S,9S,12S,13R）-12-（（S）-第二丁基）-6,9-二異丙基-13-甲氧基-2,2,5,11-四甲基-4,7,10-三側氧基-3-氧雜-5,8,11-三氮雜十五烷-15-醯基）吡咯啶-2-基）-3-甲氧-2-甲基丙醯胺）-3-苯基丙酸酯（223）的合成

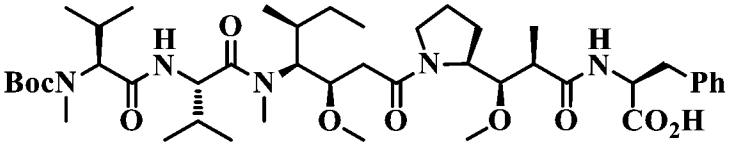


223

在0°C下，向（S）-甲基 2-（（2R,3R）-3-（（S）-1-（（3R,4S,5S）-4-（（S）-2）-（（第三丁氧基羰基）胺基）-N,3-二甲基丁醯胺基）-3-甲氧基-5-甲基庚醯基）吡咯啶-2-基）-3-甲氧基-2-甲基丙醯胺基）-3-苯基丙酸酯（0.091 mmol） 的Boc脫保護產物和Boc -N-Me-Val-OH （127 mg，0.548 mmol） 的 DMF （5 mL）溶液中加入氰基膦酸二乙酯 （18.2 μL，0.114 mmol），然後加入 N-甲基嗎啉 （59

μL，0.548 mmol）。將反應混合物在 0°C 攪拌 2 小時，然後升溫至室溫並攪拌隔夜。將反應混合物用乙酸乙酯（80mL）稀釋，用1N硫酸氫鉀水溶液（40mL）、水（40mL）、飽和碳酸氫鈉水溶液（40mL）和飽和氯化鈉水溶液（40mL）洗滌，硫酸鈉乾燥，真空濃縮。將殘餘物藉由柱層析法（20-100%乙酸乙酯/己烷）純化，得到標題化合物（30mg，39%收率），為白色固體。LC-MS （ESI） m/z $C_{45}H_{75}N_5O_{10}$ $[M+H]^+$ 計算值：846.55，實測值： 846.56。

【0454】實施例 256. （S）-2-（（2R,3R）-3-（（S）-1-（（6S,9S,12S,13R）-12-（（S）-第二丁基）-6,9-二異丙基-13-甲氧基-2,2,5,11-四甲基-4,7,10-三氧基-3-氧雜-5,8,11-三氮雜戊烷-15-醯基）吡咯啶-2-基）-3-甲氧-2-甲基丙醯胺）-3-苯基丙酸（224）的合成

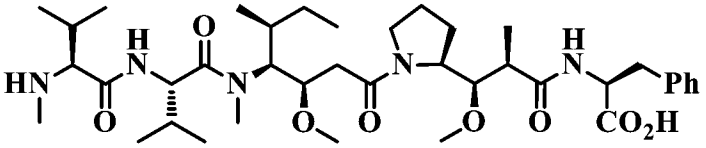


224

向（S）-甲基2-（2R,3R）-3-（S）-1-（（6S,9S,12S,13R）-12-（（S）-第二丁基）-6,9-二異丙基-13-甲氧基-2,2,5,11-四甲基-4,7,10-三側氧基-3-氧雜-5,8,11-三氮雜十五烷-15-醯基）吡咯啶-2-基）-3-甲氧基-2-甲基丙醯胺）-3-苯基丙酸酯（30 mg，0.035 mmol）的四氫呋喃 （1.0 mL）溶液中加入LiOH（1.0M的水溶液，0.8 mL）。混合物在室溫下攪拌35 min，用0.5 M H_3PO_4中和至pH 6，濃縮，矽膠柱層析（CH_3OH/二氯甲烷/HOAc 1：10：0.01）純化，得到標題化合物（25.0 mg，85%收率）。LC-MS （ESI） m/z $C_{44}H_{74}N_5O_{10}$ $[M+H]^+$ 計算值： 832.54，實測值： 832.60。

【0455】實施例 257. （S）-2-（（2R,3R）-3-（S）-1-

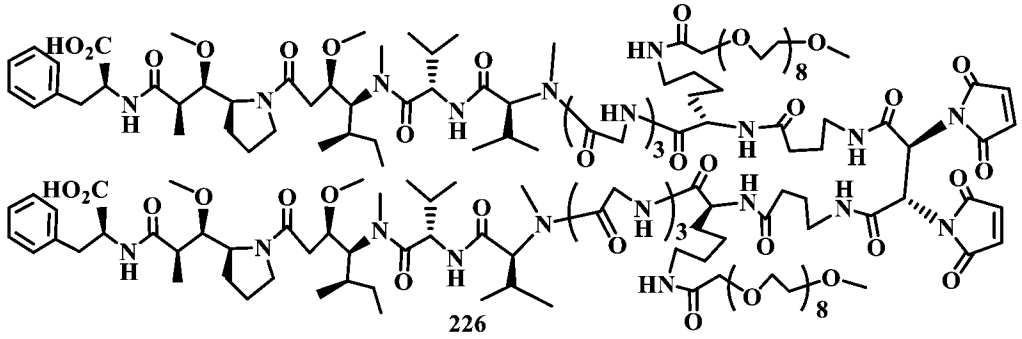
（（3R,4S,5S）-4-（（S）-N，3-二甲基-2-（S）-3-甲基-2-甲基胺基）丁醯胺基）丁醯胺基）-3-甲氧基-5-甲基庚醯基）-吡咯啶-2-基）-3甲氧基-2-甲基丙醯胺基）-3-苯基丙酸（MMAF）（225）的合成



225

將（S）-甲基 2-（（2R,3R）-3-（（S）-1-（（3R,4S,5S）-4-（（S）-N,3-二甲基-2-（（S）-3-甲基-2-（甲基胺基）丁醯胺基）丁醯胺基）-3-甲氧基-5-甲基-庚醯基）吡咯啶-2-基）-3-甲氧基-2-甲基丙醯胺基）-3-苯基丙酸酯（25 mg，0.030 mmol），濃鹽酸 （0.3 mL） 和 1,4-二惡烷 （0.9 mL） 的混合物在室溫下攪拌 35分鐘。將混合物用 乙醇（1.0 mL） 和甲苯 （1.0 mL） 稀釋，濃縮，與 乙醇/甲苯 （2：1） 共沸濃縮，得到標題化合物（22 mg，~100% 收率），為白色固體，不經進一步純化用於下一步。LC-MS （ESI） m/z $C_{39}H_{66}N_5O_8$ $[M+H]^+$ 計算值： 732.48，實測值： 732.60。

【0456】 實施例 258. 化合物226的合成

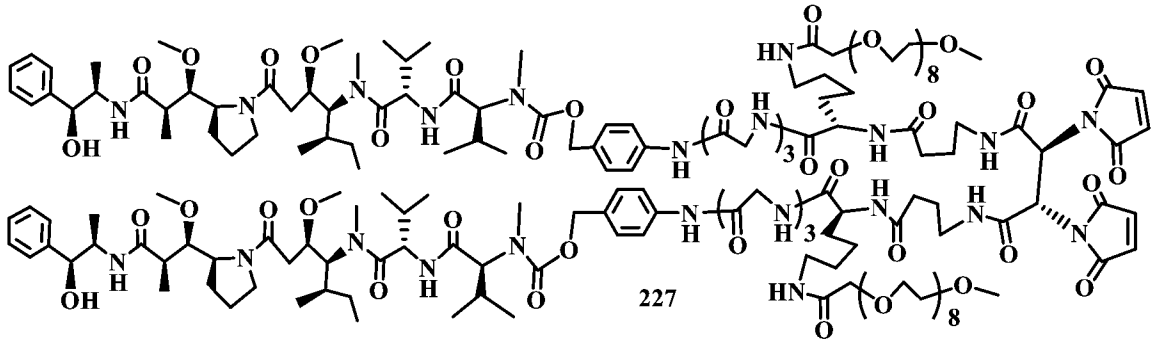


226

向化合物 207 （0.101 g，0.052 mmol），N-羥基琥珀醯亞胺（NHS）（0.020 g，0.173 mmol），EDC （0.050 g，0.260 mmol） 的 DMA （4 mL）溶液中加入 N,N-二異丙基乙胺 （0.020 mL，0.115 mmol） 。將混合物在室溫下攪拌6 小時。然後將混合物加入MMAF

（0.095 g，0.130 mmol）的 DMA （1 mL） 溶液和 NaH_2PO_4 （5 mL，0.1 M，pH 7.5）中。將混合物攪拌4小時，減壓濃縮並藉由C-18 HPLC層析法純化（10 mL/min，5% -50%甲醇/水梯度溶離），凍乾後得到標題產物（0.120 g，69% 收率）。MS ESI m/z $C_{160}H_{263}N_{24}O_{52}$ $[M+H]^+$ 計算值3352.8674，實測值3352.8935。

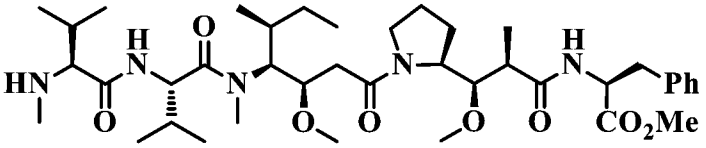
實施例 259. 化合物227的合成



在冰浴上，N_2下，向化合物209（0.101 g，0.047 mmol）的二氯甲烷（5 mL）溶液中，加入三光氣（0.0285 g，0.096 mmol）和N,N-二異丙基乙胺（0.020 mL，0.115 mmol）。將混合物在0℃攪拌30分鐘，在室溫下攪拌 30分鐘，然後在冰浴上加入（S）-N-（（3R,4S,5R）-1-（（S）-2-（（1R,2R）-3-（（（1S,2R）-1 -羥基-1-苯基丙-2-基）胺基）-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧基丙基）吡咯啶-1-基）-3-甲氧基-5-甲基-1-側氧基庚烷-4-基）-N,3-二甲基-2-（（S）-3-甲基-2-（甲基胺基）丁醯胺基）丁醯胺（MMAE） （0.080 g，0.111 mmol）和N,N-二異丙基乙胺（0.025 mL，0.144 mmol）。將混合物在室溫下攪拌2 小時，減壓濃縮，用矽膠柱層析純化，溶離梯度為3-18%甲醇/二氯甲烷，得到標題產物（0.124 g，73%收率）。MS ESI m/z $C_{176}H_{280}N_{27}O_{54}$ $[M+H]^+$ 計算值3623.0042，實測值3623.0250。

【0457】 實施例 260. （S）-甲基2-（（2R,3R）-3-（（S）-1-

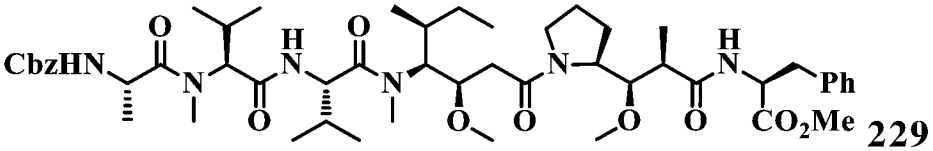
（（3R,4S,5S）-4-（S）-N,3-二甲基-2-（S）-3-甲基-2-（甲基胺基）丁醯胺）丁醯胺基）-3-甲氧基-5-甲基庚醯基）吡咯啶-2-基）-3甲氧基-2-甲基丙醯胺）-3-苯基丙酸酯（228）的合成



228

向（S）-甲基2-（2R,3R）-3-（S）-1-（（6S,9S,12S,13R）-12-（S）-第二丁基）-6,9-二異丙基-13-甲氧基-2,2,5,11-四甲基-4,7,10-三側氧基-3-氧雜-5,8,11-三氮雜十五烷-15-醯基）吡咯啶-2-基）-3-甲氧基-2-甲基丙醯胺）-3-苯基丙酸酯（75.0 mg，0.0886 mmol）的二氯甲烷（5 mL）溶液中，在室溫下加入三氟乙酸（2 mL）。在室溫下攪拌1小時後，將反應混合物真空濃縮。與甲苯共沸蒸發得到去保護的標題產物，其無需進一步純化即可使用。

【0458】實施例 261. （S）-甲基2-（（2R,3R）-3-（（S）-1-（（5S,8S,11S,14S,15R）-14-（（S）-第二丁基）-8,11-二異丙基-15-甲氧基-5,7,13-三甲基-3,6,9,12-四側氧基-1-苯基-2-氧雜-4,7,10,13-四氮雜庚烷-17-醯基）吡咯啶-2-基）-3-甲側氧基-2-甲基丙醯胺）-3-苯基丙酸酯（229）的合成

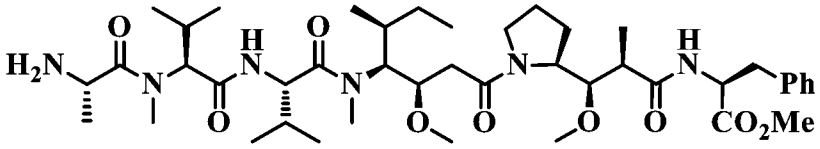


229

在 0 °C，向 MMAF-OMe （0.132 g，0.178 mmol，1.0 eq.） 和 Z-L-丙氨酸 （0.119 g，0.533 mmol，3.0 eq.） 的無水 二氯甲烷 （10 mL） 溶液中依次加入 HATU （0.135 g，0.356 mmol，2.0 eq.） 和 NMM （0.12mL，1.07 mmol，6.0 eq.）。將反應在 0 °C 攪拌 10 分鐘，

然後升溫至室溫並攪拌隔夜。將混合物用二氯甲烷稀釋並用水和鹽水洗滌，用無水硫酸鈉乾燥，濃縮並藉由矽膠柱層析法（20：1 二氯甲烷/甲醇）純化，得到標題化合物，為白色泡沫狀固體（0.148 g，88% 收率）。ESI MS m/z： $C_{51}H_{79}N_6O_{11}$ $[M+H]^+$ 計算值951.6，實測值951.6。

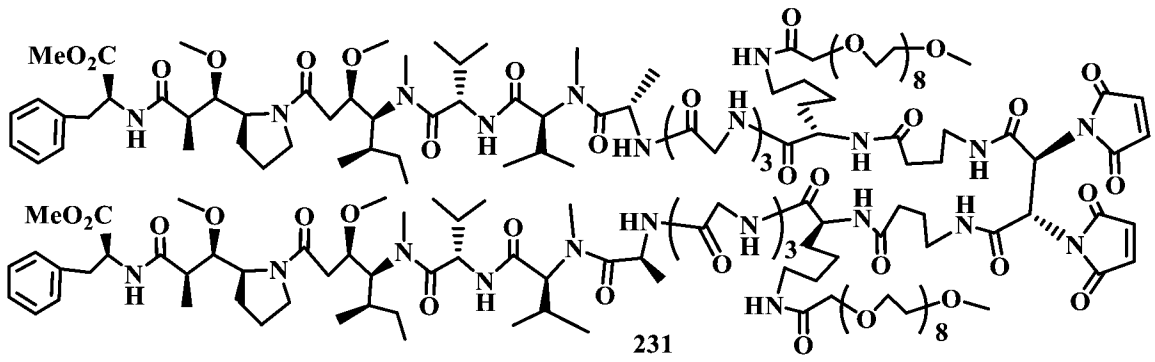
【0459】 實施例 262. （S）-甲基2-（（2R,3R）-3-（（S）-1-（（3R,4S,5S）-4-（（S）-2-（（S）-2-（（S）-2-胺基-N-甲基丙醯胺基）-3-甲基丁醯胺基）-N,3-二甲基丁醯胺基）-3-甲氧基-5-甲基庚醯基）吡咯啶-2-基）-3-甲氧基-2-甲基丙醯胺基）-3-苯丙酸酯（230）的合成



230

在氫化瓶中，向（S）-甲基2-（（2R,3R）-3-（（S）-1-（（5*S*,8*S*,11*S*,14*S*,15*R*）-14-（（S）-第二丁基）-8,11-二異丙基-15-甲氧基-5,7,13-三甲基-3,6,9,12-四氧基-1-苯基-2-氧雜-4,7,10,13-七氮雜十七烷-17-醯基）吡咯啶-2-基）-3-甲氧基-2-甲基丙烷胺基）-3-苯基丙酸酯（0.148 g，0.156 mmol，1.0 eq.uiv）的甲醇（5 mL）溶液中加入10% Pd/C（0.100 g，含水 50%）。將混合物振搖5小時，然後藉由矽藻土墊過濾。將濾液濃縮，得到標題化合物，為白色泡沫狀固體（0.122 g，96%收率）。ESI MS m/z： $C_{43}H_{73}N_6O_9$ $[M+H]^+$ 計算值 817.5，實測值817.5。

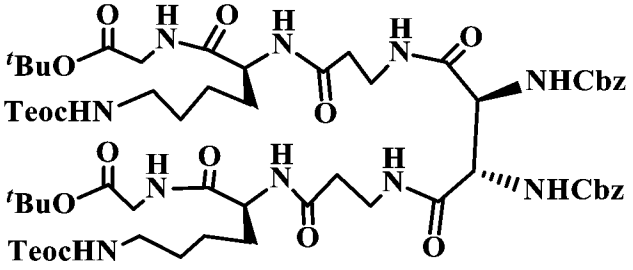
【0460】 實施例 263. 化合物263的合成



231

向化合物 207 （0.101 g，0.052 mmol），化合物 230 （0.106 g，0.130 mmol），EDC （0.100 g，0.521 mmol） 的 DMA （4 mL）溶液中加入 N,N-二異丙基乙胺 （0.040 mL，0.230 mmol）。然後將混合物在室溫下攪拌6 小時，減壓濃縮，矽膠柱層析純化，藉由3-15%甲醇/二氯甲烷的梯度溶離，得到標題產物（0.135 g，74%收率）。MS ESI m/z $C_{168}H_{277}N_{26}O_{54}$ $[M+H]^+$ 計算值 3522.9729，實測值3522.9980。

【0461】 實施例 264. （5S,12S,13S,20S）-二第三丁基12,13-雙（（（苄氧基）羰基）胺基）-4,7,11,14,18,21-六側氧基-5,20-雙（4-（（（2,2,2-三氯乙氧基））胺基）-丁基）-3,6,10,15,19,22-六氮雜二十四烷-1,24-二酯（232）的合成

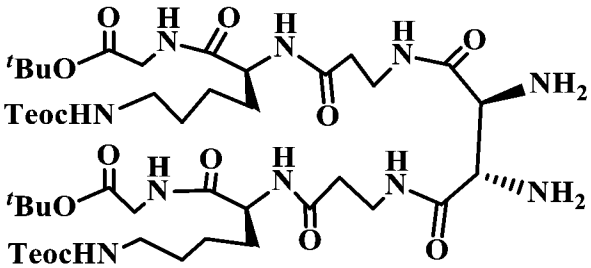


232

向（S）-第三丁基2-（2-（3-胺基丙醯胺基）-6-（（（（2,2,2-三氯乙氧基）-羰基）胺基）六醯胺基）乙酸酯（6.05 g，12.0 mmol） 和（2S,3S）-2,3-雙（（（苄氧基）-羰基）胺基）丁二酸（2.48 g，5.96 mmol） 的DMA（60 mL）溶液中加入EDC·HCl（5.01 g，26.09 mmol）和N,N-二異丙基乙胺 （4.7 mL，26.4 mmol）。將反應混合物在室溫攪

拌隔夜，然後用 150 mL 二氯甲烷稀釋並倒入裝有 100 mL 水的分液漏斗中。單離有機相，用鹽水（2 × 80 mL）洗滌，無水硫酸鈉乾燥，過濾並濃縮。將殘餘物藉由柱層析法（10-80%乙酸乙酯/石油醚）純化，得到標題化合物232（7.03 g，85%收率）。ESI MS m/z 1389.50 （[M+H]$^+$）。

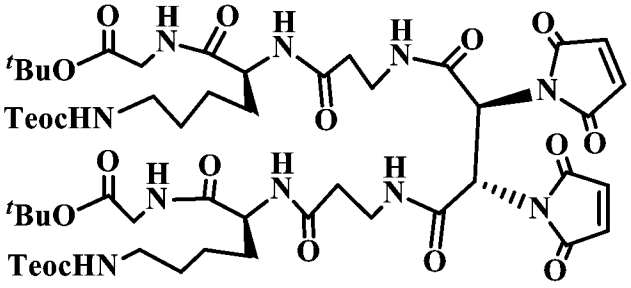
【0462】 實施例 265. （5S,12S,13S,20S）-二第三丁基12,13-二胺基-4,7,11,14,18,21-六側氧基-5,20-雙（4-（（2,2,2-三氯乙氧基）羰基）胺基）丁基）-3,6,10,15,19,22-六氮雜十四烷-1,24-二酸酯（233）的合成



233

在氫化瓶中，向化合物 232（7.01 g，5.02 mmol）的甲醇（100 mL）溶液中加入 Pd/C（10 wt%，0.80 g）。將混合物振盪2小時，藉由矽藻土（助濾劑）過濾，將濾液濃縮，得到化合物233（5.57g，99%收率），為無色油狀物。ESI MS m/z 1121.55 （[M+H]$^+$）。

【0463】 實施例 266. （5S,12S,13S,20S）-二第三丁基12,13-雙（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）-4,7,11,14,18,21-六側氧基-5,20-雙（4-（（（2,2,2-三氯乙氧基）羰基）胺基）丁基）-3,6,10,15,19,22-六氮雜二十四烷-1,24-二酸酯（234）

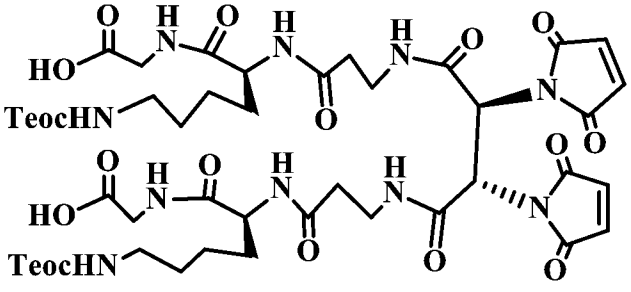


234

攪拌下向冷卻至 0 °C 的化合物 233 （5.49 g，4.90 mmol） 的飽和

$NaHCO_3$（90 mL）和甲醇（10 mL）溶液中加入 N-（甲氧基羰基）馬來醯亞胺（3.10 g，20.00 mmol）。20分鐘後，將反應混合物用水（150mL）稀釋並在室溫攪拌30分鐘。將反應混合物在2-8°C濃縮至～100mL並用二氯甲烷（4×60mL）萃取。合併有機層，用硫酸鎂乾燥，過濾，濃縮，矽膠柱層析純化，5-10%甲醇/二氯甲烷梯度溶離，得到標題產物234（4.893 g，78%收率）。MS ESI $[M+H]^+$ 1281.55。

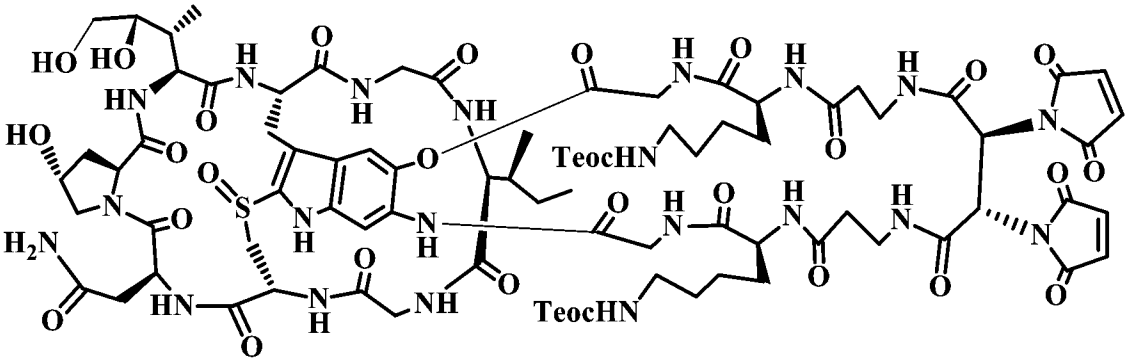
【0464】實施例 267.（5S,12S,13S,20S）-12,13-雙（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）-4,7,11,14,18,21-六側氧基-5,20-雙（4-（（（2,2,2-三氯乙氧基）羰基）胺基）丁基）-3,6,10,15,19,22-六氮雜二十四烷-1,24-二酸（235）



235

在 0 °C 下，將化合物 234（4.88 g，3.81 mmol）的二惡烷（15 mL）的溶液與 4 N 鹽酸（5 mL）反應 30 min，用甲苯（10 ml）稀釋，然後濃縮，並用短矽膠層析純化，0-18%甲醇/二氯甲烷溶離，得到無色油狀物（4.01 g，90%收率）。ESI MS m/z 1169.25（$[M+H]^+$）。

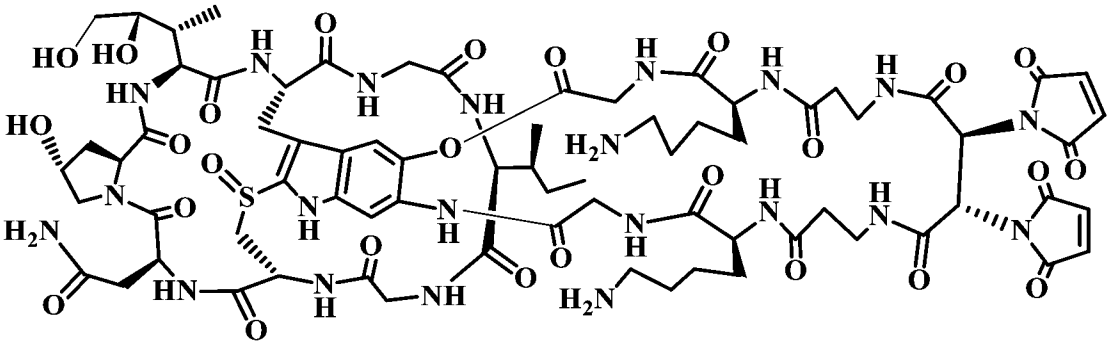
【0465】實施例 268. 化合物236的合成



236

向化合物 235 （130.0 mg，0.111 mmol） 和鵝膏毒素衍生物（104.0 mg，0.111 mmol，WO2020/155017） 的 DMF （10 mL）溶液中，加入 TBTU （140.6 mg，0.442 mmol），N,N-二異丙基乙胺 （40.0 μL，0.229 mmol），並將混合物在室溫下攪拌4小時。在高真空下去除 DMF 後，藉由製備 C-18 HPLC純化殘餘物（5% -50% 乙腈/水，45分鐘，d 20 × 250 mm，10 ml/min），得到無色油狀物（133.2 mg，58% 收率）。ESI MS m/z 2066.70 （$[M+H]^+$）。

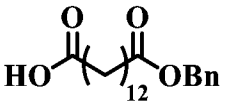
【0466】 實施例 269. 化合物237的合成



237

在 0 °C 下，將化合物 236（120.0 mg，0.058 mmol）的 四氫呋喃（10 mL）溶液與 TBAF（1.0 M 的四氫呋喃溶液，350 μL）攪拌 30 min，然後濃縮並藉由 C-18 製備HPLC純化（5% -40% 乙腈/水，45分鐘，d 20 × 250 mm，10 ml/min），得到油狀物 237（79.2 mg，79% 收率）。ESI MS m/z 1718.85 （$[M+H]^+$）。

【0467】 實施例 270. 14-（苄氧基）-14-側氧基十四烷酸（238）的合成

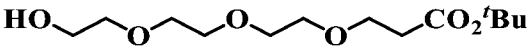


238

向十四烷二酸（2.06 g，8 mmol）的 DMF（30 mL）溶液中加入

K_2CO_3（1.1 g，8 mmol）和 BnBr（1.36 g，8 mmol）。混合物在室溫下攪拌隔夜，濃縮，柱層析（乙酸乙酯/石油醚）純化，得到標題化合物238（1.2g，45%收率）。ESI MS m/z 349.23 （$[M+H]^+$）。

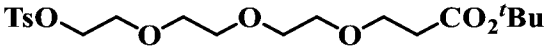
【0468】 實施例 271. 3-（2-（2-（2-羥基乙氧基）乙氧基）乙氧基）丙酸第三丁酯（239）的合成



239

向 2,2'-乙烷-1,2-二烷基雙氧基二乙醇 （55.0 mL，410.75 mmol，3.0 eq.） 的無水四氫呋喃 （200 mL）溶液中加入鈉 （0.1 g）。攪拌混合物直至鈉消失，然後滴加丙烯酸第三丁酯（20.0 mL，137.79 mmol，1.0 eq.）。將混合物攪拌隔夜，然後在 0 °C 用鹽酸溶液 （20.0 mL，1N） 淬滅。藉由旋轉蒸發除去四氫呋喃，加入鹽水（300 mL），用乙酸乙酯（3 × 100 mL）萃取所得混合物。有機層用鹽水（3×300mL）洗滌，無水硫酸鈉乾燥，過濾並濃縮，得到標題化合物（30.20g，79.0%收率），為無色油狀物，其無需進一步純化即可使用。MS ESI m/z 278.17（$[M+H]^+$）。

【0469】 實施例 272. 3-（2-（2-（2-（甲苯磺醯氧基）乙氧基）乙氧基）乙氧基）丙酸第三丁酯（240）的合成



240

在 0 °C 下，向3-（2-（2-（2-羥基乙氧基）乙氧基）乙氧基）丙酸第三丁酯 （30.20 g，108.5 mmol，1.0 eq.） 和 TsCl （41.37 g，217.0 mmol，2.0 eq.）的無水 二氯甲烷 （220 mL）溶液中，加入 TEA （30.0 mL，217.0 mmol，2.0 eq.）。將混合物在室溫下攪拌隔夜，然後用水（3×300 mL）和鹽水（300 mL）洗滌，無水硫酸鈉乾燥，過濾，濃縮並

藉由矽膠柱層析（3：1正己烷/乙酸乙酯）純化，得到無色油狀物（39.4 g，84.0%收率）。MS ESI m/z 433.28 （[M+H]$^+$）。

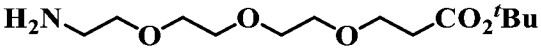
【0470】 實施例 273. 3-（2-（2-（2-疊氮乙氧基）乙氧基）乙氧基）丙酸第三丁酯（241）的合成



241

向3-（2-（2-（2-（甲苯磺醯氧基）乙氧基）乙氧基）乙氧基）丙酸第三丁酯（39.4 g，91.1 mmol，1.0 eq.）的無水DMF（100 mL）溶液中加入NaN_3 （20.67 g，316.6 mmol，3.5 eq.）。將混合物在室溫下攪拌隔夜。加入水 （500 mL） 並用乙酸乙酯 （3 × 300 mL） 萃取。合併的有機層用水 （3 × 900 mL） 和鹽水 （900 mL） 洗滌，無水硫酸鈉乾燥，過濾，濃縮並藉由矽膠柱層析法（5：1 正己烷/乙酸乙酯）純化，得到淺黃色油狀物（23.8 g，85.53% 收率）。MS ESI m/z 326.2 （[M + Na]$^+$ ）。

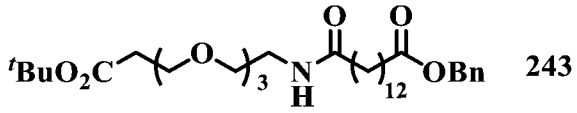
【0471】 實施例 274. 3-（2-（2-（2-胺基乙氧基）乙氧基）乙氧基）丙酸第三丁酯（242）的合成



242

用水（3 次）和異丙醇（3 次）洗滌 Raney-Ni（7.5 g，懸浮在水中），然後與化合物 241的（5.0 g，16.5 mmol）異丙醇溶液混合。將混合物在H_2氣球下於室溫攪拌16 小時，然後在矽藻土墊上過濾，用異丙醇洗滌濾墊。濾液濃縮，用柱層析純化（5-25%甲醇/二氯甲烷），得到淡黃色油狀物（2.60g，57%收率）。MS ESI m/z 279.19 （[M+H]$^+$）。

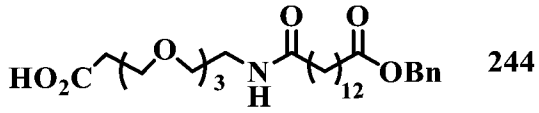
【0472】 實施例 275. 27-苄基1-第三丁基14-側氧基-4,7,10-三氧雜-13-氮雜十七烷-1,27-二酸酯（243）的合成



243

向化合物 238 （2.60 g，9.35 mmol） 和化合物 242 （3.91 g，11.2 mmol） 的二氯甲烷 （50 mL）溶液中加入 EDC·HCl （2.15 g，11.2 mmol） 和 N,N-二異丙基乙胺 （3.6 mL，20.6 mmol）。將反應混合物在室溫攪拌1 小時，然後用 50 mL 二氯甲烷稀釋，倒入裝有 50 mL 水的分液漏斗中。單離有機相，用鹽水（50mL）洗滌，用無水硫酸鈉乾燥，過濾並濃縮。殘餘物藉由柱層析法（0-10%甲醇/二氯甲烷）純化，得到標題化合物（4.94 g，87%收率）。ESI m/z 608.40 （$[M+H]^+$）。

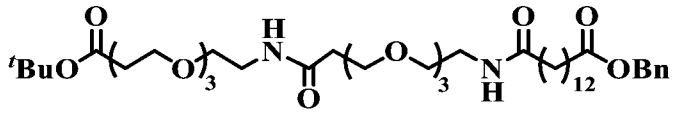
【0473】 實施例 276. 3,16-二側氧基-1-苯基-2,20,23,26-四氧雜-17-氮雜二十九烷-29-酸（244） 的合成



244

向化合物243 （4.94 g，8.14 mmol）的二氯甲烷（20 mL）溶液中，加入TFA （20 mL）。反應在室溫下攪拌1小時，濃縮至乾，與二氯甲烷共沸蒸發2次，將殘餘物置於幫浦上乾燥，得到化合物244（4.50g，粗品）。ESI MS m/z 552.35 （$[M+H]^+$）。

【0474】 實施例 277. 40-苄基1-第三丁基14,27-二側氧基-4,7,10,17,20,23-六氧雜-13,26-二氮雜四十烷-1,40-二酸酯（245） 的合成

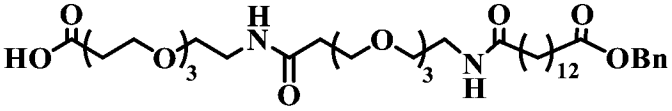


245

向化合物 244（4.50 g，粗品，8.14 mmol）和化合物 242（1.95 g，7.00 mmol）的二氯甲烷（50 mL）溶液中加入 EDC·HCl（1.56 g，8.14 mmol）和 N,N-二異丙基乙胺（2.7 mL，15.4 mmol）。將反應混合物在室溫攪拌1 小時，然後用 50 mL 二氯甲烷稀釋，倒入裝有 50 mL 水

的分液漏斗中。單離有機相，用鹽水（50mL）洗滌，用無水硫酸鈉乾燥，過濾並濃縮。將殘餘物藉由柱層析法（0-10%甲醇/二氯甲烷）純化，得到標題化合物245（5.22g，92%收率）。ESI m/z 811.52（$[M+H]^+$）。

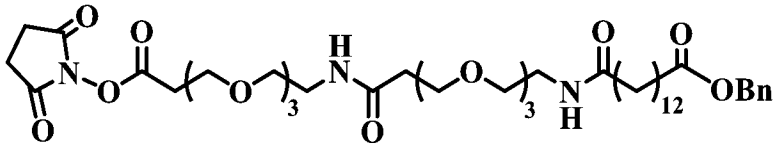
【0475】實施例 278. 3,16,29-三側氧基-1-苯基-2,20,23,26,33,36,39-七氧雜-17,30-二氮雜四十二烷-42-酸（246）的合成



246

向化合物245（5.22 g，6.44 mmol）的二氯甲烷（20 mL）的溶液中加入TFA（5 mL）。在室溫下攪拌1小時，濃縮至乾，與二氯甲烷共沸蒸發2次，將殘餘物置於幫浦上乾燥，得到化合物246（4.90g，粗品）。ESI MS m/z 755.46（$[M+H]^+$）。

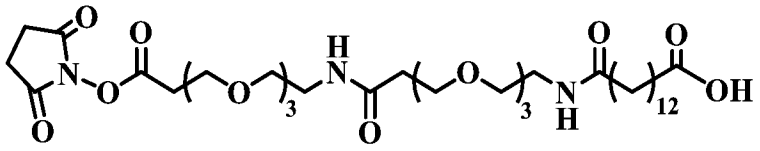
【0476】實施例 279. 40-苄基1-（2,5-二側氧基吡咯啶-1-基）14,27-二側氧基-4,7,10,17,20,23-六氧雜-13,26-二氮雜四十烷-1,40-二酯（247）的合成



247

向化合物246（4.90 g，粗品，6.44 mmol）的二氯甲烷（30mL）溶液中加入NHS（0.81 g，7.08 mmol），EDC·HCl（1.85 g，9.66 mmol），N,N-二異丙基乙胺（2.8 mL，16.1 mmol）。將反應混合物在室溫攪拌2小時，然後用水（50 mL）稀釋並用乙酸乙酯（3 × 30 mL）萃取。合併的有機相用鹽水（30mL）洗滌，經無水硫酸鈉乾燥，過濾並濃縮。殘餘物藉由矽膠柱（10-50%乙酸乙酯/石油醚）純化，得到無色油狀物247（4.90g，90%收率）。ESI MS m/z 852.48（$[M+H]^+$）。

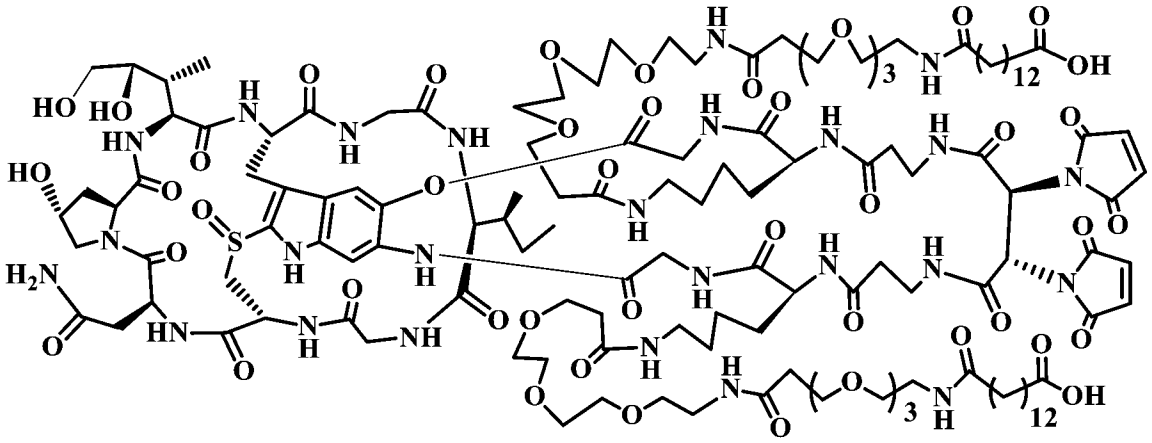
【0477】 實施例 280. 1-（（2,5-二側氧基吡咯啶-1-基）氧基）-1,14,27-三氧-4,7,10,17,20,23-六氧雜-13,26-二氮雜四十烷-40-酸（248）



248

向氫化瓶中的化合物 247 （4.90 g，5.75 mmol） 的 四氫呋喃 （20 mL）溶液中，加入 Pd/C （10 wt%，0.20 g）。將混合物在1atm H_2下攪拌隔夜，藉由矽藻土（助濾劑）過濾，將濾液濃縮，得到化合物248（4.50 g，>100%收率）。ESI MS m/z 762.44 （$[M+H]^+$）。

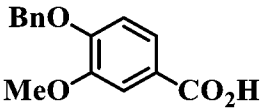
【0478】 實施例 281.化合物249的合成



249

將化合物 237 （60.2 mg，0.0349 mmol） 和化合物 248 （110.2 mg，0.146 mmol） 的四氫呋喃 （10 mL）溶液和磷酸鹽緩衝溶液 （10 mL，0.2 M，pH 7.7）在室溫下攪拌隔夜，然後濃縮，藉由 C-18製備HPLC純化（5% -40% 乙腈/水，MeCN/H_2O，45分鐘，d20 × 250 mm，10 ml/min），得到白色泡沫（80.2 mg，76 % 收率）。ESI MS m/z 3011.65 （$[M+H]^+$）。

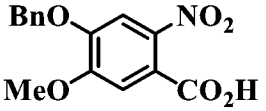
【0479】 實施例 282. 4-（苄氧基）-3-甲氧基苯甲酸（250）的合成



250

向 4-羥基-3-甲氧基苯甲酸 （50.0 g，297.5 mmol） 在乙醇 （350 mL）和NaOH 水溶液 （2.0 M，350 mL）的混合物中，加入 BnBr （140.0 g，823.5 mmol）。將混合物在 65°C 攪拌 8 小時，濃縮，與水（2 × 400 mL） 共沸蒸發並濃縮至 ~400 mL，用 6 N 鹽酸酸化至 pH 3.0。過濾收集固體，用乙醇結晶，45℃真空乾燥，得到標題化合物（63.6g，83%收率）。ESI MS m/z 281.2 （[M+Na]$^+$）。

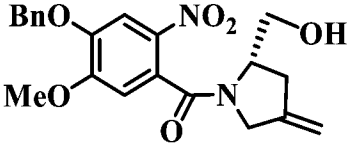
【0480】 實施例 283. 4-（苄氧基）-5-甲氧基-2-硝基苯甲酸（251）的合成



251

向 4-（苄氧基）-3-甲氧基苯甲酸 （63.5 g，246.0 mmol） 的 二氯甲烷 （400 mL） 和 HOAc （100 mL）溶液中加入 發煙HNO_3 （25.0 mL，528.5 mmol）。將混合物攪拌6小時，濃縮，用乙醇結晶，40℃真空乾燥，得到標題化合物（63.3g，85%收率）。ESI MS m/z 326.1 （[M+Na]$^+$）。

【0481】 實施例 284.（S）-（4-（苄氧基）-5-甲氧基-2-硝基苯基）（2-（羥甲基）-4-亞甲基吡咯啶-1-基）甲酮（252）的合成

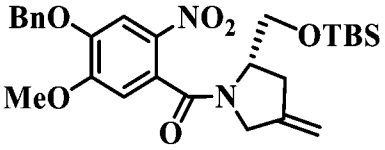


252

向4-（苄氧基）-5-甲氧基-2-硝基苯甲酸 （2.70 g，8.91 mmol） 和草醯氯 （2.0 mL，22.50 mmol） 的無水二氯甲烷 （ 70mL）溶液中加入催化量的 DMF （30 µl）,並將所得混合物在室溫攪拌2小時。用旋轉蒸發

儀除去過量的二氯甲烷 和草醯氯。在0 °C，N_2保護下將乙醯氯重新懸浮在新鮮的二氯甲烷 （70 mL） 中並緩慢加入 （S）-（4-亞甲基吡咯啶-2-基）甲醇鹽酸鹽 （1.32 g，8.91 mmol） 和Et_3N （6 mL） 的 二氯甲烷溶液。使反應混合物升溫至室溫，繼續攪拌8小時。除去二氯甲烷 和Et_3N 後，將殘餘物在水和 乙酸乙酯 （70/70 mL） 之間分配。用 乙酸乙酯 （2 × 60 mL） 進一步萃取水層。合併的有機層用鹽水（40mL）洗滌，硫酸鎂乾燥並濃縮。用快速柱層析法（矽膠，2：8 正己烷/乙酸乙酯）純化殘餘物，得到標題化合物（2.80 g，79%收率）。EI MS m/z 421.2 （$[M+Na]^+$）。

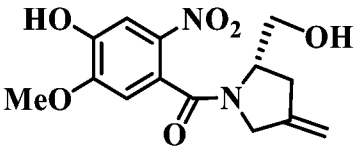
【0482】 實施例 285. （S）-（4-（苄氧基）-5-甲氧基-2-硝基苯基）（2-（（（第三丁基二甲基矽基）氧基）甲基）-4-亞甲基吡咯啶-1-基）甲酮（253）的合成



253

向（S）-（4-（苄氧基）-5-甲氧基-2-硝基苯基）（2-（羥甲基）-4-亞甲基吡咯啶-1-基）甲酮（2.78 g，8.52 mmol）的二氯甲烷（10 mL）和吡啶（10 mL）溶液中加入第三丁基二甲基氯矽烷（2.50 g，16.66 mmol）。將混合物攪拌隔夜，濃縮並在矽膠柱上純化，用乙酸乙酯/二氯甲烷（1：6）溶離，得到標題化合物（3.62 g，83%收率，~95%純度）。MS ESI m/z $C_{27}H_{37}N_2O_6Si$ $[M+H]^+$ 計算值513.23，實測值513.65。

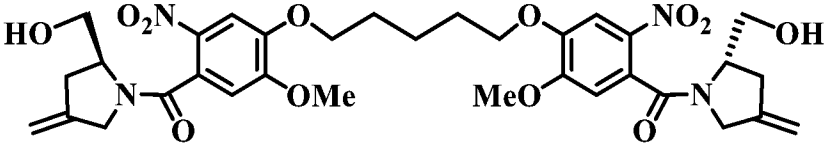
【0483】 實施例 286. （S）-（4-羥基-5-甲氧基-2-硝基苯基）（2-（羥甲基）-4-亞甲基吡咯啶-1-基）甲酮（254）的合成



254

向（S）-（4-（苄氧基）-5-甲氧基-2-硝基苯基）（2-（羥甲基）-4-亞甲基吡咯啶-1-基）甲酮（2.80 g，7.03 mmol）在二氯甲烷（30 mL）和 CH_3SO_3H （8 mL） 的混合物中加入 $PhSCH_3$ （2.00 g，14.06 mmol）。將混合物攪拌 0.5 小時，用 二氯甲烷 （40 mL） 稀釋，小心加入 0.1 M Na_2CO_3 溶液中和。單離兩相並用二氯甲烷（2×10mL）萃取水相。將有機層合併，用硫酸鈉乾燥，濃縮並在矽膠柱上純化，用甲醇/二氯甲烷（1：15至1：6）溶離，得到標題化合物（1.84 g，85%收率，純度~95%）。MS ESI m/z $C_{14}H_{17}N_2O_6$ $[M+H]^+$ 計算值309.10，實測值309.30。

【0484】 實施例 287. （S）-（（戊烷-1,5-二（氧基））雙（5-甲氧基-2-硝基-4,1-亞苯基））雙（（S）-2-（羥甲基）-4-亞甲基吡咯啶-1-基）甲酮 （255） 的合成

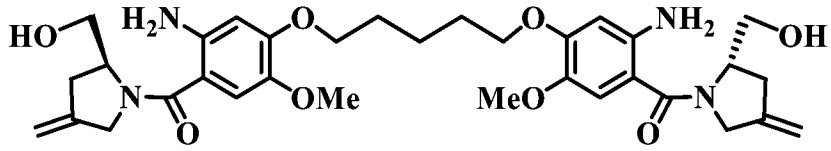


255

向化合物 254（0.801 g，2.60 mmol）的丁酮（10 mL）溶液中加入 Cs_2CO_3（2.50 g，7.67 mmol），然後加入 1，5-二碘戊烷（415 mmol，1.28 mmol）。將混合物攪拌26小時，濃縮並在矽膠柱上純化，用甲醇/二氯甲烷（1：15至1：5）溶離，得到標題化合物（0.675 g，77%收率，~95%純度）。MS ESI m/z $C_{33}H_{41}N_4O_{12}$ $[M+H]^+$ 計算值685.26，實測值685.60。

【0485】 實施例 288. （S）-（（戊烷-1,5-二（氧基））雙（2-胺基-5-甲氧基-4,1-亞苯基））雙（（S）-2-（羥甲基）-4-亞甲基吡咯啶-1-

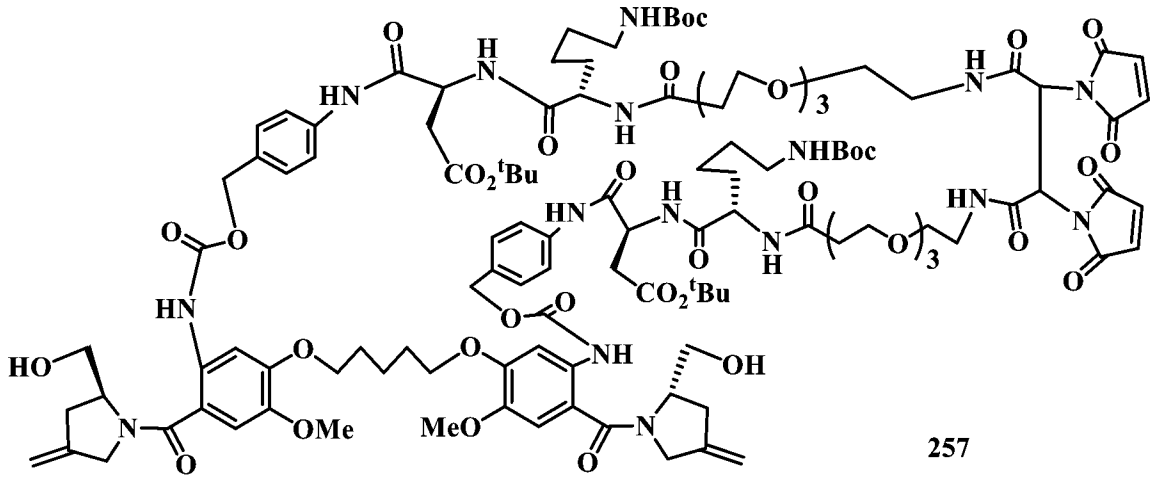
基）甲酮 （256） 的合成



256

向化合物 255 （0.670 g，0.98 mmol） 的 CH_3OH （10 mL）溶液中加入 $Na_2S_2O_4$ （1.01 g，5.80 mmol） 的 水 （8 mL）溶液。將混合物在室溫攪拌30小時。將反應混合物在高真空下蒸發濃縮，並與 DMA （2 x 10 mL） 和 乙醇 （2 x 10 mL） 共沸蒸發至乾，得到含有無機鹽的標題化合物 （總重量 1.63 g），直接用於下一步反應（無需進一步單離）。EIMS m/z 647.32 （$[M+Na]^+$）。

【0486】 實施例 289. 化合物257的合成



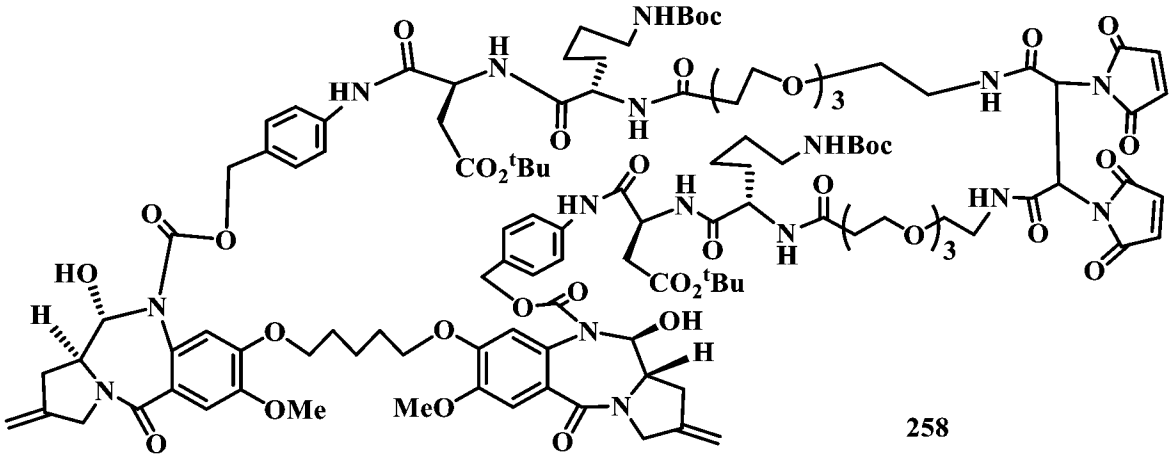
257

在0℃下，向含（3S,6S,39S,42S）-二第三丁基6,39雙（4-（（第三丁氧基羰基）胺基）丁基）-22,23雙（2,5-二氧基-2,5二氫-1H-吡咯-1-基）-3,42雙（（4-（羥甲基）苯基）氨甲醯基）-5,8,21,24,37,40-六側氧基-11,14,17,28,31,34-六氧雜-4,7,20,25,38,41-六氮雜四十四烷-1,44-二甲酸酯（0.840g 0.488mmol）和吡啶（0.100mL，1.24mmol）的四氫呋喃（8mL）溶液中，滴加三光氣（0.290mg，0.977mmol）的四氫呋喃（3.0mL）溶液。將反應混合物在0℃攪拌15分鐘，然後直接用於下一

步。

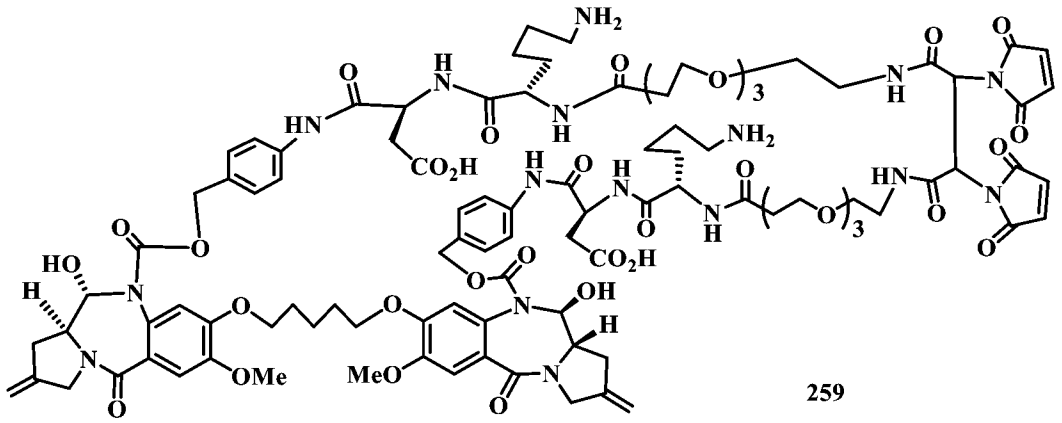
在0℃下，向化合物256（0.842 mg，~0.49 mmol，含無機鹽）的乙醇（10 mL）懸浮液中加入上述製備的氯化物。將混合物在0℃攪拌4小時，然後升溫至室溫反應1小時，濃縮，並藉由反相HPLC（250（L）mm×10（d）mm，C18柱，10-80%乙腈/水，40分鐘，v=8 mL/min）純化，得到標題化合物（561.1 mg，三步收率48%）。ESI MS m/z：$C_{117}H_{163}N_{16}O_{38}$ $[M+H]^+$ 計算值 2400.12，實測值2400.90。

【0487】 實施例 290.化合物258的合成



在0℃下，將Dess-Martin高碘烷（138.0 mg，0.329 mmol）加入到化合物257（132.0 mg，0.055 mmol）的二氯甲烷（5.0 mL）的溶液中。將反應混合物升溫至室溫 並攪拌2小時。然後加入飽和$NaHCO_3/Na_2SO_3$溶液（5.0mL/5.0mL），混合物用二氯甲烷（3×25mL）萃取。合併的有機層用 $NaHCO_3/Na_2SO_3$ （5.0 mL/5.0 mL）、鹽水 （10 mL） 洗滌，經硫酸鈉 乾燥，過濾，濃縮並藉由反相 HPLC （250 （L） mm×10（d） mm，C18 柱，10-80% 乙腈/水，40 分鐘的時間，v =8 mL/min）純化，得到標題化合物（103.1 mg，78% 收率），為泡沫狀物。ESI MS m/z：$C_{117}H_{158}N_{16}O_{38}$ $[M+H]^+$ 計算值 2396.09，實測值2396.65。

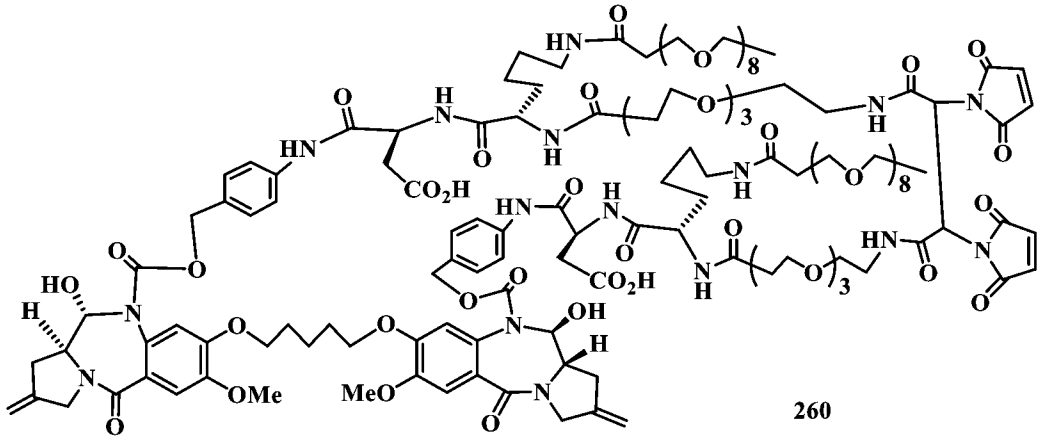
【0488】 實施例 291. 化合物259的合成



259

將化合物258（55.0 mg，0.023 mmol）溶解於二氯甲烷（3 mL）中，並在4 °C加入TFA（3 mL）。然後將反應混合物在室溫下攪拌1 小時，濃縮，與二氯甲烷/甲苯共蒸乾，得粗品C-3（48.0 mg，100%收率，反相HPLC純化92%），再經反相HPLC（250（ L） mm×20（d） mm，C18柱，5-60%乙腈/水，40分鐘的時間，v =8 mL/min）純化，得到純產物C-3（42.1 mg，88%收率，96%純 ） 得到泡沫。ESI MS m/z：$C_{99}H_{126}N_{16}O_{34}$ $[M+H]^+$ 計算值2083.86，實測值2084.35。

【0489】 實施例 292.化合物260的合成

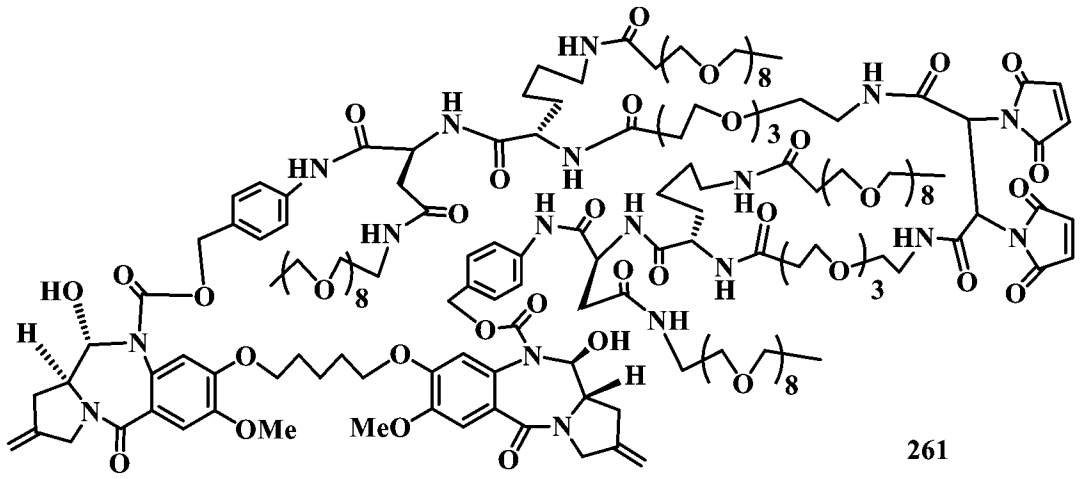


260

將化合物 259 （35.0 mg，0.017 mmol）溶於 四氫呋喃 （3 mL）和 0.1 M 、NaH_2PO_4 （3 mL）、pH 7.5 和 N-琥珀醯亞胺基 2,5,8,11,14,17,20,23-十氧雜二十六烷-26-酯 （43.0 mg，0.084 mmol）的混合溶液在2小時內分4份加入。然後在室溫下繼續攪拌反應混合物4 小時，與DMF（10 mL）共沸蒸發至乾得到粗品，經反相HPLC進一步純化

（250（L） mm × 20（d） mm，C18柱，20-60%乙腈 /水，40分鐘的時間，v =8 mL/min），得到泡沫狀的純產物260（39.4 mg，81%收率，96%純度）。ESI MS m/z： $C_{135}H_{195}N_{16}O_{52}$ $[M+H]^+$ 計算值 2872.30，實測值2871.65。

【0490】 實施例 293. 化合物261的合成

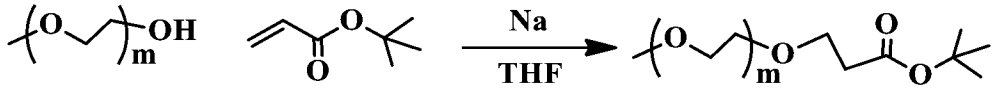


261

將化合物 260 （35.0 mg，0.012 mmol） 和 2,5,8,11,14,17,20,23-十氧雜二十五烷-25-胺 （15.1 mg，0.0394 mmol） 的無水 DMA （2 mL）的溶液中加入 EDC （30.0 mg，0.156 mmol）。

將反應混合物在室溫攪拌14 小時，濃縮，（反相 HPLC （250（L） mm × 20（d） mm，C18柱，20-60%乙腈/水，40 分鐘的時間，v =8 mL/min）純化得到純品 261 （31.2 mg，77% 收率，97% 純度藉由 HPLC） 得到泡沫。ESI MS m/z： $C_{161}H_{249}N_{18}O_{62}$ $[M+H]^+$ 計算值 3426.68，實測值3427.21。

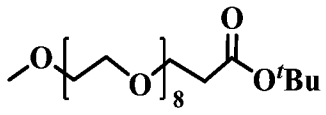
【0491】 實施例 294. 3-（ω-甲氧基聚乙二醇）丙酸第三丁酯的合成



在N_2 保護下把鈉切成小塊，向攪拌中的PEG（1 eq.）的無水四氫呋

喃（0.1～0.3M PEG）中加入鈉（0.1～0.3 eq.）。待鈉消失後，加入丙烯酸第三丁酯（1.0～1.5eq.）。將混合物攪拌隔夜，真空濃縮並用矽膠層析法純化，用乙酸乙酯/二氯甲烷（1：10至100：1）溶離，得到標題化合物（70%~95%收率）。

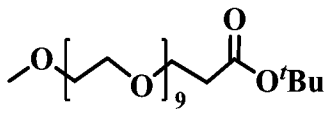
【0492】 實施例 295. 2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜二十九烷-29-第三丁基酯（262）的合成



262

在N_2 保護下把鈉切成小塊，向攪拌中的2,5,8,11,14,17,20,23-十氧雜二十五烷-25-醇 （25.00 g，65.06 mmol）的無水 四氫呋喃 （450 mL）中加入鈉 （0.25 g，10.86 mmol）。待 鈉消失後，加入丙烯酸第三丁酯（9.21g，71.90mmol），攪拌隔夜。將混合物真空濃縮並用矽膠層析法純化，用乙酸乙酯/二氯甲烷（1：5至1：2）溶離，得到標題化合物（30.97g，93%收率）。ESI m/z $C_{24}H_{49}O_{11}$ $[M+H]^+$： 計算值513.3276，實測值512.3298。

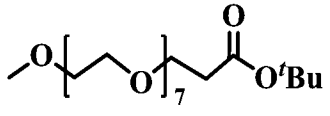
【0493】 實施例 296. 2,5,8,11,14,17,20,23,26,29-十二氧雜三十二烷-32-第三丁酯（263）的合成



263

收率92%，純度95%（HPLC）。ESI m/z 計算值 $C_{26}H_{53}O_{12}$ $[M+H]^+$： 557.3538，實測值557.3580。

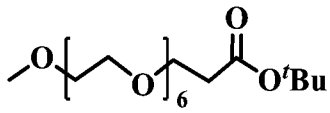
【0494】 實施例 297. 2,5,8,11,14,17,20,23-八氧雜二十六烷-26-第三丁基酯（264）的合成



264

收率93%，純度95%（HPLC）。ESI m/z 計算值 $C_{22}H_{45}O_{10}$ $[M+H]^+$：469.3013，實測值469.3077。

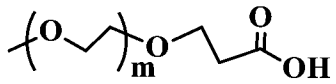
【0495】實施例298. 2,5,8,11,14,17,20-十七氧雜二十三烷-23-第三丁基酯（265）的合成



265

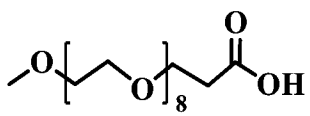
收率94%，純度95%（HPLC）。ESI m/z 計算值 $C_{20}H_{41}O_9$ $[M+H]^+$：425.2771，實測值425.2811.

【0496】實施例299. 3-（ω-甲氧基聚乙二醇）丙酸的一般合成



向3-（ω-甲氧基聚乙二醇）丙酸第三丁酯的二惡烷（0.1 ~ 0.3 M）中加入濃鹽酸（36%，1/3 vol 的二惡烷）。混合物在室溫下攪拌30分鐘，用甲苯（1/4 ~1/2 的二惡烷）稀釋，真空濃縮，與乙醇/甲苯（1：1，2×（1/4 ~1/2 vol 的二惡烷）共沸蒸發）並經真空幫浦乾燥，得到標題化合物（92% -99%收率），其直接用於下一步。產物也在短矽膠柱上純化，用3% -10% CH_3CN /水溶離或用含有 1% 乙酸的甲醇/二氯甲烷（1：8 – 1：3）溶離，得到產物 收率75% -90%，純度95%（HPLC）。

【0497】實施例300. 2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜二十九烷-29-酸（266）的合成

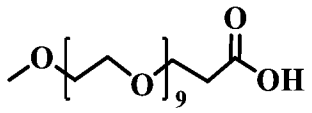


266

向2,5,8,11,14,17,20,23,26-九側氧基二十九烷-29-酯（10.01 g，19.53 mmol）的二惡烷（75 mL）中加入濃鹽酸（25 mL，36%），將

混合物在室溫下攪拌30 分鐘，用甲苯（50 mL）稀釋，真空濃縮，與乙醇/甲苯（1：1，2×50 mL）共濃縮，真空幫浦乾燥得到標題化合物（8.55 g，96%收率）） 藉由 HPLC 分析純度為 95%。ESI m/z $C_{20}H_{41}O_{11}$ $[M+H]^+$ 計算值： 457.2650，實測值457.2683。

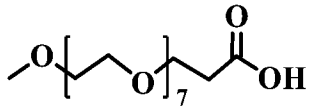
【0498】 實施例 301. 2,5,8,11,14,17,20,23,26,29-十氧雜三十二烷-32-酸（267）的合成



267

收率95%，純度94%（HPLC）。ESI m/z 計算值 $C_{22}H_{45}O_{12}$ $[M+H]^+$： 501.2912，實測值501.2935。

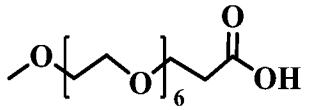
【0499】 實施例 302. 2,5,8,11,14,17,20,23-八氧雜二十六烷-酸（268）的合成



268

收率95%，純度95%（HPLC）。ESI m/z 計算值 $C_{18}H_{37}O_{10}$ $[M+H]^+$： 413.2387，實測值413.2395。

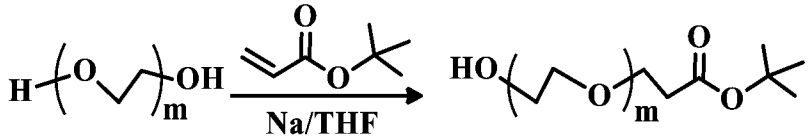
【0500】 實施例 303. 2,5,8,11,14,17,20-十七氧雜二十三烷-23-酸（269）的合成



269

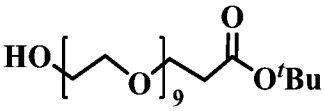
收率95%，純度95%（HPLC）。ESI m/z 計算值 $C_{16}H_{33}O_9$ $[M+H]^+$： 369.2125，實測值369.2148。

【0501】 實施例 304. 3-（聚乙二醇）丙酸第三丁酯的一般合成



在N_2 保護下把鈉切成小塊，向攪拌中的PEG（1eq.）的無水四氫呋喃（0.1～0.3M PEG）中加入鈉（0.1～0.2eq.）。待鈉消失後，加入丙烯酸第三丁酯（1/4 eq.）。將混合物攪拌隔夜，真空濃縮並用矽膠層析法純化，用甲醇/二氯甲烷（1：8至1：4）溶離，得到標題化合物（65%~83%收率）。

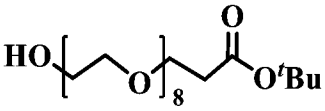
【0502】 實施例 305. 1-羥基-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜三十烷-30-第三丁基酯（270）的合成



270

在N_2 保護下把鈉切成小塊，向攪拌中的3,6,9,12,15,18,21,24-八氧雜二十六烷-1,26-二醇 （40.01 g，96.58 mmol）的無水 四氫呋喃 （600 mL） 中加入鈉 （0.40 g，17.39 mmol）。待鈉消失後，加入丙烯酸第三丁酯（3.11g，24.28mmol），攪拌隔夜。將混合物真空濃縮並用矽膠層析法純化，用甲醇/二氯甲烷（1：8至1：4）溶離，得到標題化合物（10.27g，78% 收率）。ESI m/z $C_{25}H_{51}O_{12}$ $[M+H]^+$ 計算值：543.3381，實測值543.3416。

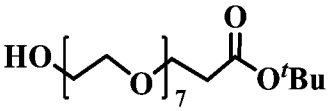
【0503】 實施例 306. 1-羥基-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧二十七烷-27-第三丁基酯（271）的合成



271

收率79%。ESI m/z 計算值 $C_{23}H_{47}O_{11}$ $[M+H]^+$： 499.3119，實測值499.3145。

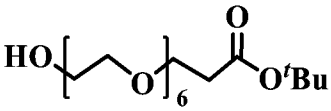
【0504】 實施例 307. 1-羥基-3,6,9,12,15,18,21-七氧雜二十四烷-24-第三丁基酯（272）的合成



272

收率79%。ESI m/z 計算值 $C_{21}H_{43}O_{10}$ $[M+H]^+$： 455.2857，實測值 455.2885。

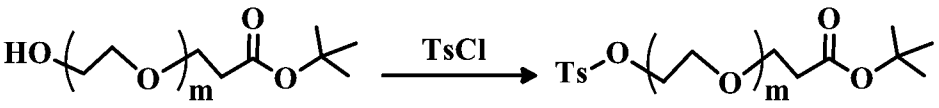
【0505】 實施例 308. 1-羥基-3,6,9,12,15,18-六氧雜二十一烷-21-第三丁基酯（273）的合成



273

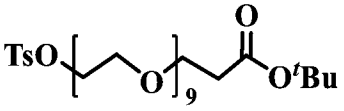
收率80%。ESI m/z 計算值 $C_{19}H_{39}O_9$ $[M+H]^+$： 411.2595，實測值 411.2570。

【0506】 實施例 309. 3-（ω-甲苯磺醯基-聚乙二醇）丙酸第三丁酯的合成



在 4 °C 下，向3-（PEGyl） 丙酸第三丁酯 （1 eq.）的無水 四氫呋喃/二氯甲烷 （1：3） 和 N,N-二異丙基乙胺 （10 eq.） 的混合物中加入甲苯磺醯氯 （1.2 ~ 1.5 eq.）。然後將混合物升溫至室溫，攪拌隔夜，濃縮並用短矽膠柱純化，用含有0.2%乙酸的甲醇/二氯甲烷（1：10 –1：8）溶離，得到標題化合物（78~90%收率）。

【0507】 實施例 310. 1-（甲苯磺醯氧基）-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜三十烷-30-第三丁基酯（274）的合成

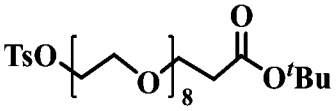


274

向1-羥基-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜三十烷-30-酯（7.82g，14.41 mmol）的乾燥四氫呋喃 / 二氯甲烷（1：3，120 mL）和N,N-二異丙基乙胺（8 mL）的混合物中加入對甲苯磺醯氯（3.57g，18.72

mmol）。然後將混合物自然升溫至室溫，攪拌隔夜，濃縮並用短矽膠柱純化，用甲醇/二氯甲烷（1：10-1：8）溶離，得到標題化合物（8.62 g，86%收率）。ESI m/z $C_{32}H_{57}O_{14}S$ $[M+H]^+$：計算值 697.3480，實測值 697.3522。

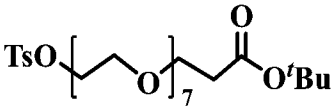
【0508】 實施例 311. 1-（甲苯磺醯氧基）-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧雜十七烷-27-第三丁基酯（275）的合成



275

收率85%。ESI m/z 計算值 $C_{30}H_{53}O_{13}S$ $[M+H]^+$： 653.3208，實測值653.3240。

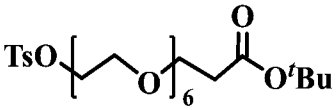
【0509】 實施例 312. 1-（甲苯磺醯氧基）-3,6,9,12,15,18,21-七氧雜二十烷-24-第三丁基酯（276）的合成



276

收率86%。ESI m/z 計算值 $C_{28}H_{49}O_{12}S$ $[M+H]^+$： 609.2945，實測值609.2968。

【0510】 實施例 313 1-（甲苯磺醯氧基）-3,6,9,12,15,18-六氧雜二十烷-21-甲酸第三丁酯（277）的合成



277

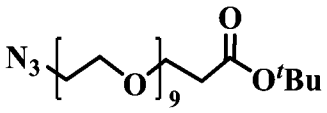
收率87%。ESI m/z 計算值 $C_{26}H_{45}O_{11}S$ $[M+H]^+$： 565.2683，實測值565.2705。

【0511】 實施例 314. 3-（ω-疊氮基-聚乙二醇）丙酸第三丁酯的合成



向攪拌中的NaN_3（1.5～3eq.）的DMF（60mL）中加入3-（ω-甲苯磺醯氧基-PEG基）丙酸第三丁酯（1eq.）。將混合物攪拌隔夜，濃縮並用短矽膠柱純化，用甲醇/二氯甲烷（1：15 – 1：8）溶離，得到標題化合物（83%~91%收率）。

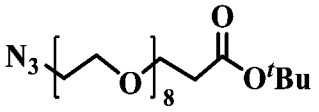
【0512】實施例 315. 1-疊氮基-3,6,9,12,15,18,21,24,27-十九氧雜三十烷-30-第三丁基酯（278）的合成



278

向攪拌中的NaN_3（2.00g，30.76mmol）的DMF（60mL）中加入1-（對甲苯磺醯氧基）-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜三十烷-30-酯（7.51g，10.78mmol）。將混合物攪拌隔夜，濃縮並用短矽膠柱純化，用甲醇 / 二氯甲烷溶離（1：15 – 1：10）得到標題化合物（5.32g，84%收率）。ESI m/z $C_{25}H_{50}N_3O_{11}$ $[M+H]^+$：計算值 568.3446，實測值 568.3467。

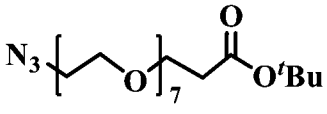
【0513】實施例 316. 1-疊氮基-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧十七碳-27-甲酸第三丁酯（279）的合成



279

收率84%。ESI m/z 計算值 $C_{23}H_{46}N_3O_{10}$ $[M+H]^+$： 524.3184，實測值524.3205。

【0514】實施例 317. 1-疊氮基-3,6,9,12,15,18,21-七氧雜二十四烷-24-甲酸第三丁酯（280）的合成

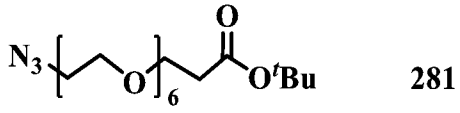


280

收率85%。ESI m/z 計算值 $C_{21}H_{42}N_3O_9$ $[M+H]^+$： 480.2922，實測

值480.2945。

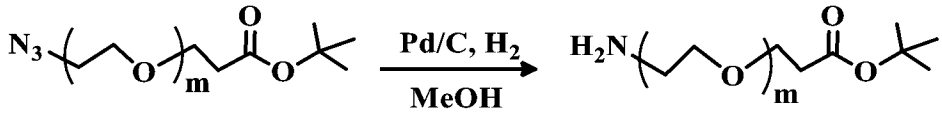
【0515】 實施例 318. 1-疊氮基-3,6,9,12,15,18-六氧雜環己烷-21-甲酸第三丁酯（281）的合成



281

收率85%。ESI m/z 計算值 $C_{19}H_{38}N_3O_8$ $[M+H]^+$： 436.2660，實測值436.2695。

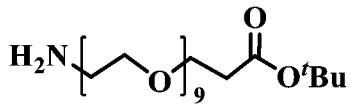
【0516】 實施例 319. 3-（ω-胺基-聚乙二醇）丙酸第三丁酯的一般合成路線



向第三-3-（ω-疊氮基-聚乙二醇）丙酸酯（1 eq.）的甲醇（0.15~0.2M濃度）中加入Pd/C（10%Pd，2%～10重量%的原料）。然後將混合物與H_2在5~50 psi下進行，振盪2~12 h，藉由矽藻土過濾，濃縮並真空乾燥，得到標題化合物（收率為87～95%），用於下一步無需進一步純化。

【0517】 實施例 320.

1-胺基-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜三十烷-30-甲酸第三丁酯（282）的合成

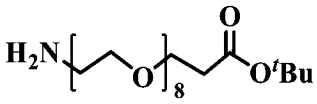


282

向1-疊氮基-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧雜三十烷-30-酯（3.22g，5.67mmol）加入含有Pd/C（0.20g，10%Pd）的元醇（80mL）中。向混合物通入氫氣（25 psi），搖動6小時，藉由矽藻土過濾，濃縮並在真空中乾燥以得到標題化合物（90%收率），其用於下一步而無需進一步純

化。ESI m/z 計算值 $C_{25}H_{52}NO_{11}$ $[M+H]^+$： 542.3541，實測值542.3575。

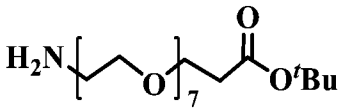
【0518】實施例 321. 1-胺基-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧十七碳-27-甲酸第三丁酯（283）的合成



283

收率>90%。ESI m/z 計算值 $C_{23}H_{48}NO_{10}$ $[M+H]^+$： 498.3279，實測值498.3315。

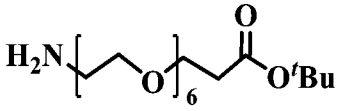
【0519】實施例 322. 1-胺基-3,6,9,12,15,18,21-七氧雜二十四烷-24-甲酸第三丁酯（284）的合成



284

收率>90%。ESI m/z 計算值 $C_{21}H_{44}NO_9$ $[M+H]^+$： 454.3017，實測值454.3035。

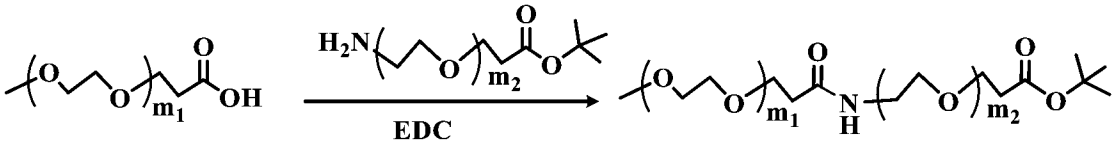
【0520】實施例 323. 1-胺基-3,6,9,12,15,18-六氧雜環己烷-21-甲酸第三丁酯（285）的合成



285

收率>90%。ESI m/z 計算值 $C_{19}H_{40}NO_8$ $[M+H]^+$： 410.2755，實測值410.2780。

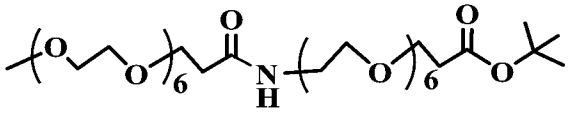
【0521】實施例 324. 第三丁基 3-(ω -(3'-(ω'-甲氧基PEG基)-丙醯胺基)-PEG基)丙酸酯的一般合成



向3-（ω-胺基PEGyl）丙酸第三丁酯（1 eq.）和3-（ω-甲氧基

PEGyl）丙酸（1 eq.）的 DMF（0.1-3.0 M起始原料）中加入EDC（1.2～3.0eq.）。將混合物攪拌隔夜，真空濃縮並用矽膠層析純化，用甲醇/二氯甲烷溶離（1:8~1:2）得到標題化合物（收率63%～88%）。

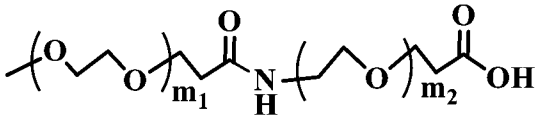
【0522】實施例325. 23-側氧基-2,5,8,11,14,17,20,27,30,33,36,39,42-十三氧雜-24-氮雜十五碳四烯-45-甲酸第三丁酯（286）的合成



286

2,5,8,11,14,17,20-七氧雜二十三烷-23-酸酯（5.011 g，13.60）和第三丁基 1-胺基-3,6,9,12,15,18-六氧雜二十一烷-21-酯（5.57 g，13.60 mmol）的 DMF（75 mL）中加入 EDC（5.25 g，27.34 mmol）。將混合物攪拌6小時，真空濃縮並用矽膠層析法純化，用甲醇 / 二氯甲烷（1:8至1:5）溶離以得到標題化合物（8.882g，86%收率）。ESI m/z 計算值 $C_{35}H_{70}NO_{16}$ $[M+H]^+$： 760.4695，實測值760.4735。

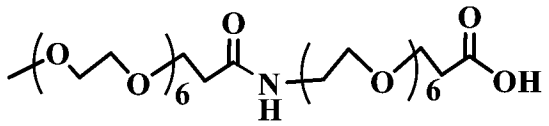
【0523】實施例 326. 3-（ω-（3 '-（ω'-甲氧基聚乙二醇）-丙醯胺基）-聚乙二醇）丙酸的一般合成



向 3-（ω-（3'-（ω'-甲氧基 PEGyl）-丙醯胺基）-PEGyl）丙酸第三丁酯（0.2 -1.0 M 起始材料濃度）的二惡烷中加入 鹽酸（濃度為 25% v/ v 二惡烷）。將混合物攪拌0.5小時，用甲苯稀釋，真空濃縮，得到標題化合物（90 -102%收率）。

【0524】實施例327. 23-側氧基-2,5,8,11,14,17,20,27,30,33,36,39,42-十三氧雜-24-氮雜戊二十四烷-45-酸

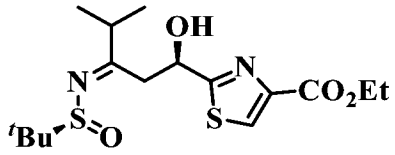
（287）的合成



287

向23-側氧基-2,5,8,11,14,17,20,27,30,33,36,39,42-十三氧雜-24-氮雜四十五烷-45-第三丁基酯 （5.25 g，6.91 mmol） 的二惡烷 （20 mL） 中加入 鹽酸 （濃，5 mL）。將混合物攪拌0.5小時，用甲苯稀釋，真空濃縮，得到標題化合物（4.85g，99%收率）。ESI m/z 計算值 $C_{31}H_{62}NO_{16}$ $[M+H]^+$： 704.4069，實測值704.4105。

【0525】 實施例 328. 2-（（R,E）-3-（（（S）-第三丁基亞磺醯基）亞胺基）-1-羥基-4-甲基戊基）噻唑-4-羧酸乙酯（288）的合成

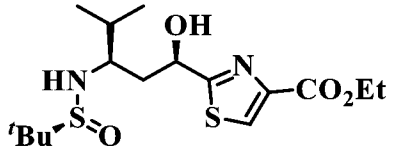


288

在 -78 °C 和 N_2 保護下，向二異丙胺（121 mL，0.86 mol，4.0 eq.）的無水 四氫呋喃（300 mL）溶液中加入正丁基鋰（2.5 M，302 mL，0.76 mol 3.5 eq.）。反應混合物在30分鐘內升溫至0°C，然後冷卻回-78°，然後加入（S,E）-2-甲基-N-（3-甲基丁烷-2-亞乙基） 丙烷-2-磺醯胺 （57 g，0.3 mol，1.4 eq.）的 四氫呋喃 （200 mL） 溶液。將反應混合物攪拌1小時，然後滴入ClTi（OiPr）$_3$ （168.5g，0.645mol，3.0eq.）的四氫呋喃（350mL）溶液。攪拌1小時後，滴加2-甲醯基噻唑-4-甲酸乙酯（40g，0.215mol，1.0eq.） 的四氫呋喃（175mL）溶液的並將所得反應混合物攪拌2小時。TLC分析表明反應完成。用乙酸和 四氫呋喃 （v/v 1：4，200 mL） 的混合物淬滅反應，然後倒入冰水中，用乙酸乙酯 （4 × 500 mL） 萃取。有機相用水和鹽水洗滌，用無水硫酸鈉乾燥，過濾並濃縮。將殘餘物藉由柱層析法（二氯甲烷/乙酸乙酯/PE 2：

1：2）純化，得到標題化合物（60 g，74%收率），為無色油狀物。^{1}H NMR （500 MHz，$CDCl_3$）δ 8.13 （s，1H），6.63 （d，J = 8.2 Hz，1H），5.20 – 5.11 （m，1H），4.43 （q，J = 7.0 Hz，2H），3.42 – 3.28 （m，2H），2.89 （dt，J = 13.1，6.5 Hz，1H），1.42 （t，J = 7.1 Hz，3H），1.33 （s，9H），1.25 – 1.22 （m，6H）. ESI MS m/z 計算值 $C_{16}H_{26}NaN_2O_4S_2$ $[M+Na]^+$ 397.13，實測值397.11。

【0526】 實施例 329. 2-（（1R,3R）-3-（（S）-1,1-二甲基乙基亞磺醯胺基）-1-羥基-4-甲基戊基）噻唑-4-羧酸乙酯（289）的合成

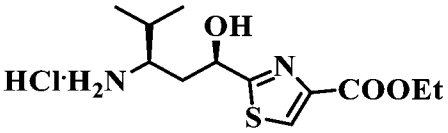


289

將2-（R，E）-3-（（S）-第三丁基亞磺醯基）亞胺基）-1-羥基-4-甲基戊基噻唑-4-羧酸乙酯（23.5克，62.7mmol）溶解於四氫呋喃（200mL）中冷卻至-45°C，緩慢加入Ti（OEt）$_4$（42.9 mL，188 mmol，3.0 eq.）。加入完成後，將混合物攪拌1小時，然後分批加入$NaBH_4$（4.75g，126mmol，2.0 eq.）。將反應混合物在-45°C下攪拌3小時，TLC分析顯示仍殘留一些原料。用HOAc / 四氫呋喃（v / v 1：4，25 mL）淬滅反應物，然後用乙醇（25 mL）淬滅反應。將反應混合物倒入冰中（100g）並加熱至室溫。在矽藻土上過濾後，單離有機相並用水和鹽水洗滌，用無水硫酸鈉乾燥，過濾並濃縮。殘餘物藉由柱層析（乙酸乙酯 / PE 1：1）純化，以白色固體的形式提供標題產物（16.7g，71%收率）。^{1}H NMR （500 MHz，$CDCl_3$）δ 8.10 （s，1H），5.51 （d，J = 5.8 Hz，1H），5.23 – 5.15 （m，1H），4.41 （q，J = 7.0 Hz，2H），3.48 – 3.40 （m，1H），3.37 （d，J = 8.3 Hz，1H），2.29 （t，J =

13.0 Hz，1H），1.95 – 1.87 （m，1H），1.73 – 1.67 （m，1H），1.40 （t，*J* = 7.1 Hz，3H），1.29 （s，9H），0.93 （d，*J* = 7.3 Hz，3H），0.90 （d，*J* = 7.2 Hz，3H）. ESI MS m/z 計算值 $C_{16}H_{28}NaN_2O_4S_2$ $[M+Na]^+$ 399.15，實測值399.14。

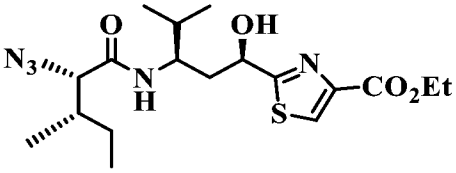
【0527】 實施例 330. 2-（（1R,3R）-3-胺基-1-羥基-4-甲基戊基）噻唑-4-羧酸乙酯鹽酸鹽（290）的合成



290

在0°C下，向2-（（1R,3R）-3-（S）-1,1-二甲基乙基亞磺醯胺基）-1-羥基-4-甲基戊基）噻唑-4-羧酸乙酯（6.00g，16.0mmol，1.0eq.）的乙醇（40mL）溶液中，緩慢加入4 N 鹽酸的二惡烷（40mL）中。將反應物加熱至室溫並攪拌2.5小時，然後濃縮並用石油醚打漿。收集白色固體標題化合物（4.54 g，收率92%）並在下一步中使用。

【0528】 實施例 331. 2-（（1R3R）-3-（（2S,3S）-2-疊氮基-3-甲基戊醯胺基）-1-羥基-4-甲基戊基）噻唑-4-羧酸乙酯（291）的合成

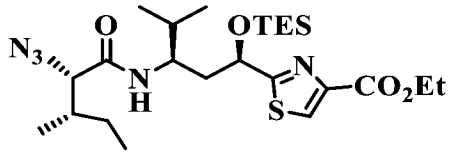


291

將（2S,3S）-2-疊氮基-3-甲基戊酸（5.03g，28.8mmol，2.0eq.）溶於四氫呋喃（120 mL）並冷卻至0°C，然後依次加入NMM（6.2 mL，56.0 mmol，4.0eq.）和氯甲酸異丁酯（3.7 mL，28.8 mmol，2.0eq.）。將反應物在0°C下攪拌30分鐘並在室溫下攪拌1.0小時，然後冷卻回0°C。然後分批加入 2-（（1R,3R）-3-胺基-1-羥基-4-甲基戊基）噻唑-4 -羧酸乙酯鹽酸鹽（4.54克，14.7mmol，1.0eq.）。在0°C下攪拌30分鐘後，將反應物升溫至室溫並攪拌2小時。在0°C下加入水以淬滅反應，並將所得

混合物用乙酸乙酯萃取三次。將合併的有機層用1N 鹽酸、飽和$NaHCO_3$和鹽水洗滌，用無水硫酸鈉乾燥，過濾濃縮。殘餘物用柱層析（0-30%乙酸乙酯/PE）純化，得到白色固體標題化合物（4.55g，收率74%）。

【0529】 實施例 332. 2-（（1R,3R）-3-（（2S,3S）-2-疊氮基-3-甲基戊醯胺基）-4-甲基-1-（（三乙基矽基）氧基）戊基）噻唑-4-羧酸乙酯（292）的合成

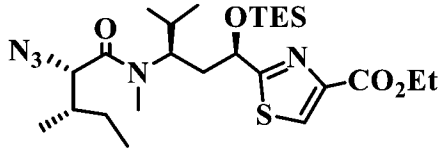


292

向於二氯甲烷（50 mL）中之2-（1R,3R）-3-（（2S,3S）-2-疊氮基-3-甲基戊醯胺基）-1-羥基-4-甲基戊基）噻唑-4-羧酸乙酯（5.30克，12.8mmol，1.0 eq.）加入咪唑（1.75克，25.6mmol，2.0eq.），然後在0°C下加入氯三乙基矽烷（4.3 mL，25.6 mmol，2.0eq.）。將反應混合物加熱至室溫超過1小時，並再攪拌一小時。將鹽水加入到反應混合物中，單離有機層並用乙酸乙酯提取水層。將合併的有機相乾燥，過濾，減壓濃縮，並用柱層析法純化，用15-35%乙酸乙酯/石油醚梯度純化，得到標題產物（6.70g，99%收率）為白色固體。

^{1}H NMR （500 MHz，$CDCl_3$） δ 8.12 （s，1H），6.75 （d，*J* = 8.0 Hz，1H），5.20 – 5.12 （m，1H），4.44 （q，*J* = 7.0 Hz，2H），4.06 – 3.97 （m，1H），3.87 （d，*J* = 3.8 Hz，1H），2.14 （d，*J* = 3.8 Hz，1H），2.01 – 1.91 （m，3H），1.42 （t，*J* = 7.1 Hz，3H），1.34 – 1.25 （m，2H），1.06 （d，*J* = 6.8 Hz，3H），1.00 – 0.93 （m，18H），0.88 （dd，*J* = 19.1，6.8 Hz，6H）。ESI MS m/z 計算值 $C_{24}H_{44}N_5O_4SSi$ $[M+H]^+$ 526.28，實測值526.28.

【0530】實施例 333. 2-（（1R,3R）-3-（（2S,3S）-2-疊氮基-N,3-二甲基戊醯胺基）-4-甲基-1-（（三乙基矽基）氧基）戊基）噻唑-4-羧酸乙酯（293）的合成

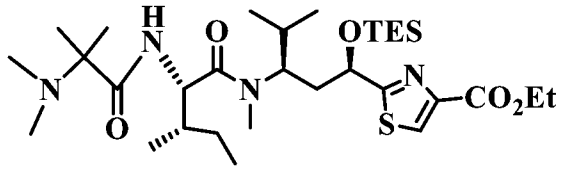


293

向2-（（1R,3R）-3-（（2S,3S）-2-疊氮基-3-甲基戊醯胺基）-4-甲基-1-（（三乙基矽基）氧基）戊基）噻唑-4-羧酸乙酯（5.20克，9.9mmol，1.0 eq.）的四氫呋喃（50mL）中冷卻至-45°C，然後加入KHMDS（甲苯1M，23.8mmol，2.4 eq.）的溶液。將所得混合物在-45 °C下攪拌20分鐘，然後加入甲基碘（1.85mL，29.7mmol，3.0eq.）。將反應混合物加熱至室溫4.5小時，然後用乙醇（10mL）淬滅反應物。用乙酸乙酯（250mL）稀釋粗產物並用鹽水（100mL）洗滌。用水層用乙酸乙酯（3×50mL）萃取。將有機層乾燥，過濾，濃縮並在柱層析中用15-35%乙酸乙酯/石油醚中梯度溶離，得到淡黃色油狀標題產物（3.33g，63%收率）。^{1}H NMR （500 MHz，$CDCl_3$）δ 8.09 （s，1H），4.95 （d，*J* = 6.6 Hz，1H），4.41 （q，*J* = 7.1 Hz，2H），3.56 （d，*J* = 9.5 Hz，1H），2.98 （s，3H），2.27 – 2.06 （m，4H），1.83 – 1.70 （m，2H），1.41 （t，*J* = 7.2 Hz，3H），1.29 （ddd，*J* = 8.9，6.8，1.6 Hz，3H），1.01 （d，*J* = 6.6 Hz，3H），0.96 （dt，*J* = 8.0，2.9 Hz，15H），0.92 （d，*J* = 6.6 Hz，3H），0.90 （d，*J* = 6.7 Hz，3H）. ESI MS m/z 計算值 $C_{25}H_{46}N_5O_4SSi$ $[M+H]^+$ 540.30，實測值540.30。

【0531】實施例 334. 乙基2-（（6S，9R，11R）-6-（（S）-第二丁基）-13,13-二乙基-9-異丙基-2,3,3,8-四甲基-4,7-二側氧基-12-氧雜-

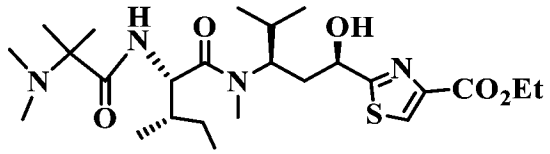
2,5,8-三氮雜-13-矽十五烷-11-基）噻唑-4-羧酸酯（294）的合成



294

向乾燥的Pd/C（10重量%，300mg）和2-（1R,3R）-3-（（2S,3S）-2-疊氮基-N,3-二甲基戊醯胺）-4-甲基-1-（（三乙基矽基）氧基）戊基）噻唑-4-羧酸乙酯（3.33g，6.16mmol）加入五氟苯基2-（二甲基胺基）-2-甲基丙酸酯（~2.75g，1.5eq.）的乙酸乙酯中。將反應混合物在氫氣下攪拌27小時，然後藉由塞鋁榴石過濾，用乙酸乙酯洗滌過濾墊。將合併的有機組分濃縮並藉由柱層析純化，以0-5%乙酸乙酯/甲醇梯度溶離得到標題產物（3.24g，84%收率）。ESI MS m/z 計算值 $C_{31}H_{59}N_4O_5SSi$ $[M+H]^+$ 626.39，實測值626.95。

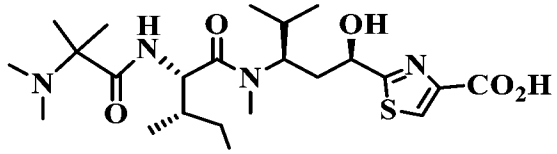
【0532】實施例 335. 2-（（1R,3R）-3-（（2S,3S）-2-（2-（二甲胺基）-2-甲基丙胺基）-N,3-二甲基戊胺基）-1-羥基-4-甲基戊基）噻唑-4-羧酸乙酯（295）的合成



295

將2-（（6S，9R，11R）-6-（S）-第二丁基）-13,13-二乙基-9-異丙基-2,3,3,8-四甲基-4,7-二側氧基-12-氧雜-2,5,8-三氮雜-13-矽十四烷-11-基）噻唑-4-羧酸乙酯（3.20g，5.11 mmol）溶解在去氧AcOH/水/四氫呋喃（v/v/v 3：1：1，100 mL）中，並在室溫下攪拌48小時。然後將反應物濃縮並在矽膠柱層析（2:98至15:85 甲醇/乙酸乙酯）上純化，得到標題化合物（2.33克，89%收率）。ESI MS m/z 計算值 $C_{25}H_{45}N_4O_5S$ $[M+H]^+$ 512.30，實測值512.45。

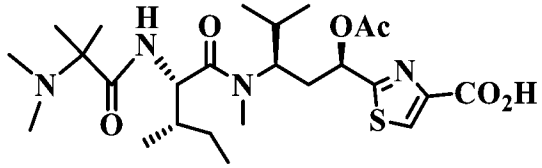
【0533】 實施例 336. 2-（（1R,3R）-3-（（2S,3S）-2-（2-（二甲胺基）-2-甲基丙胺基）-N,3-二甲基戊胺基）-1-羥基-4-甲基戊基）噻唑-4-羧酸（296）的合成



296

向LiOH（0.4 N，47.7 mL，19.1 mmol，4.0 eq.）的水溶液中加入2-（（1R,3R）-3-（2S,3S）-2-（2-（二甲基胺基）-2-甲基丙醯胺基）-N，3-二甲基戊醯胺基）-1-羥基-4-甲基戊基）噻唑-4-羧酸乙酯（2.30 g，4.50 mmol，1.0eq.）的甲醇（50 mL）溶液。將反應混合物在室溫下攪拌2小時，然後濃縮。矽膠柱層析純化（100%二氯甲烷再用二氯甲烷/甲醇/NH_4OH 80:20:1）得到標題化合物（2.13克，收率98%）為無定形固體。ESI MS m/z 計算值 $C_{23}H_{41}N_4O_5S$ $[M+H]^+$ 485.27，實測值485.55.

【0534】 實施例 337. 2-（（6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-9-異丙基-2,3,3,8-四甲基-4,7,13-三側氧基-12-氧雜-2,5,8-三氮雜十四烷-11-基）噻唑-4-羧酸（297）的合成

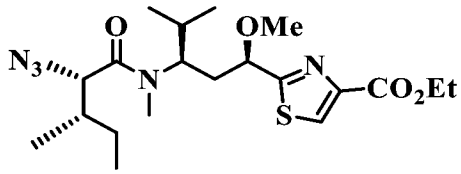


297

在0℃下，向2-（（1R,3R）-3-（（2S,3S）-2-（2-（二甲基胺基）-2-甲基丙醯胺基）-N,3-二甲基戊醯胺基）-1-羥基-4-甲基戊基）噻唑-4-羧酸（2.10g，4.33mmol）的溶液中加入吡啶（50mL），緩慢加入乙酸酐（2.25mL，24mmol）。將反應混合物加熱至室溫超過2小時，並在室溫下攪拌24小時。濃縮反應物，殘餘物在反相HPLC（C18柱，50 mm×250（mm），50mL / min，10-90%乙腈/水，45分鐘的時間）上純化，得到

標題化合物（1.95g，86%收率），為無定形白色固體。ESI MS m/z 計算值 $C_{25}H_{43}N_4O_6S$ $[M+H]^+$ 526.28，實測值526.80。

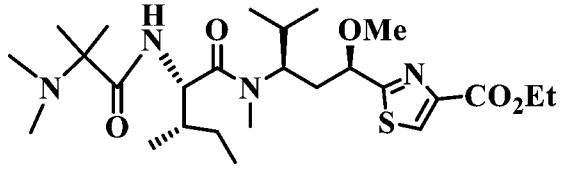
【0535】 實施例 338. 2-（（1R,3R）-3-（（2S,3S）-2-疊氮基-N，3-二甲基戊醯胺）-1-甲氧基-4-甲基戊基）噻唑-4-羧酸乙酯（298）的合成



298

將化合物 291（130 g，0.30 mol）溶解在無水四氫呋喃（1.6 L）中，在冰浴上向其中加入甲基碘（255 g，1.80 mol），然後分三份加入NaH（60g，60 wt%，0.45 mol）。反應自然升溫至室溫，攪拌隔夜。HPLC-MS分析表明，起始原料被完全消耗，有少量單甲基取代的副產物。將反應液倒入2L冰冷卻的飽和NH_4Cl中，用乙酸乙酯（2L，1L）萃取。有機相用水洗滌兩次，鹽水洗滌一次，無水硫酸鈉乾燥，濃縮得到粗品。將粗產物與石油醚一起打漿，得到108g白色固體（78%收率）。

【0536】 實施例 339. 乙基2-（（6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-9-異丙基-2,3,3,8-四甲基-4,7-二側氧基-12-氧雜-2,5,8-三氮雜癸-11-基）噻唑-4-羧酸酯（299）的合成

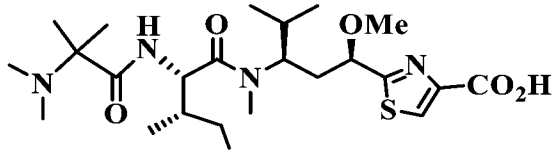


299

向化合物 298（100 g，0.23 mol）的 200 mL 乙酸乙酯中的溶液中加入 2-（二甲胺基）-2-甲基丙酸五氟苯酯（0.57 mol，在 1000 mL 乙酸乙酯中）和Pd/C（10 g，5 wt %，50% 濕）。將混合物在氫氣球下攪拌，並在交換氮氣數次後，將反應攪拌隔夜。HPLC-MS表明原料完全消

耗。過濾反應液，濾餅用乙酸乙酯洗滌，收集合併的濾液，濃縮，柱層析（20%-60% 乙酸乙酯/PE）純化，得標題產物（84% 收率）。

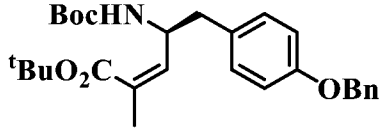
【0537】 實施例 340. 2-（（6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-9-異丙基-2,3,3,8-四甲基-4,7-二側氧基-12-氧雜-2,5,8-三氮雜癸-11-基）噻唑-4-羧酸（300）的合成



300

向化合物 299 （121 g，0.23 mol） 的 1,4-二惡烷 （1000 mL） 和水 （100 mL） 溶液中，緩慢加入LiOH （22 g，0.92 mol） 的水溶液（300 mL）。室溫攪拌2小時後，HPLC-MS顯示反應完成。將反應物濃縮並與200 g矽膠混合，上柱，並用50%-100% 乙酸乙酯/PE和0%-20% 甲醇/二氯甲烷溶離，得到標題化合物（94 g，84%收率）。

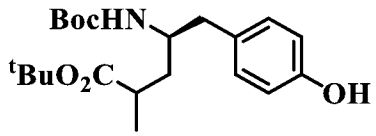
【0538】 實施例 341. （S，Z）-5-（4-（苄氧基）苯基）-4-（（第三丁氧羰基）胺基）-2-甲基戊-2-烯酸第三丁酯（301）的合成



301

將（S）-第三丁基（1-（4-（苄氧基）苯基）-3-側氧基丙烷-2-基）胺基甲酸酯（0.84 g，2 mmol，1.0 eq.）溶于無水二氯甲烷（50 mL）中，然後加入2-（三苯基-正膦亞基）丙酸第三丁酯（1.6 g，4 mmol，2.0 eq.）並在室溫下攪拌溶液1.5 小時，由 TLC 確定反應完成。藉由柱層析法（10-50% 乙酸乙酯/己烷）純化得到標題化合物（1.16g，98%收率）。

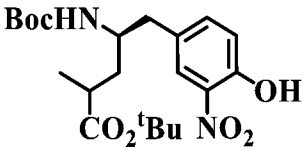
【0539】 實施例 342. （4R）-4-（（第三丁氧羰基）胺基）-5-（4-羥基苯基）-2-甲基戊酸第三丁酯（302）的合成



302

在室溫下，將（S，Z）-第三丁基5-（4-（苄氧基）苯基）-4-（（第三丁氧羰基）胺基）-2-甲基戊-2-烯酸酯（467mg，1mmol）和Pd/C觸媒（10重量%，250mg）在甲醇（30mL）的混合物中，在H_2氣球下攪拌隔夜（1 atm H_2）。過濾掉觸媒，濾液減壓濃縮，得到標題化合物（379mg，99%收率）。

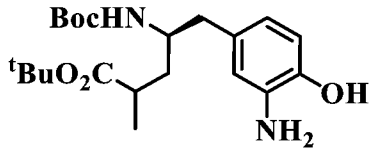
【0540】實施例 343.（4R）-4-（（第三丁氧羰基）胺基）-5-（4-羥基-3-硝基苯基）-2-甲基戊酸第三丁酯（303）的合成



303

將（4R）-第三丁基4-（（第三丁氧基羰基）胺基）-5-（4-羥基苯基）-2-戊酸甲酯（379 mg，1 mmol，1.0 eq.）溶解於四氫呋喃（20 mL）中，然後加入了亞硝酸第三丁酯（315 mg，3 mmol，3.0 eq.）的四氫呋喃 （2 mL）溶液。反應在室溫下攪拌3小時然後倒入水中，用乙酸乙酯（2×50 mL）萃取，並用鹽水（50 mL）洗滌合併的有機相，在無水硫酸鈉，過濾和濃縮上乾燥。藉由層析柱層析法（10-50%乙酸乙酯/己烷）純化得到具有標題化合物（300 mg，71%收率）。

【0541】實施例 344.（4R）-5-（3-胺基-4-羥基苯基）-4-（（第三丁氧基羰基）胺基）-2-甲基戊酸第三丁酯（304）的合成

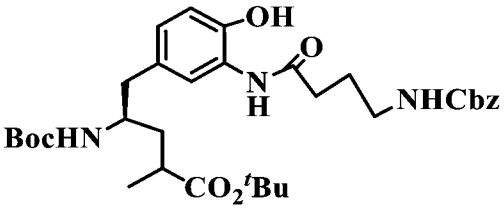


304

在室溫下，將 （4R）-第三丁基 4-（（第三丁氧基羰基）胺基）-5-（4-羥基-3-硝基苯基）-2-甲基戊酸酯 （200 mg，0.47 mmol），乙酸乙

酯（30 mL）和Pd/C（10 % 碳，100 mg）混合，在H_2（1 atm）下攪拌2 小時。濾出觸媒，真空除去所有揮發物，得到標題化合物（185mg，99%）。ESI MS m/z 計算值 $C_{21}H_{35}N_2O_5$ $[M+H]^+$ 395.25，實測值395.26.

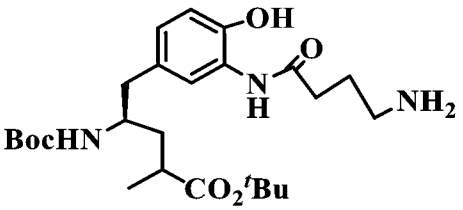
【0542】實施例 345.（4R）-5-（3-（4-（（（苄氧基）羰基）胺基）丁醯胺基）-4-羥基苯基）-4-（（第三丁氧基羰基）胺基）-2-甲基戊酸第三丁酯（305）的合成



305

將 HATU（39.9 g，105 mmol）加入到到 4-（（（苄氧基）羰基）胺基）丁酸（26.1 g，110 mmol）的 DMF（300 mL）溶液中。在室溫攪拌後 30分鐘，將混合物加入到化合物304（39.4 g，100 mmol）和TEA（20.2 g，200 mmol）的DMF（300 mL）溶液中。將所得混合物在室溫攪拌2 小時。然後加入水，用乙酸乙酯萃取，有機層用鹽水洗滌，硫酸鈉乾燥。藉由柱層析法純化（20%-70% 乙酸乙酯/PE），得到標題產物，為白色固體（45 g，73%收率）。ESI m/z 計算值 $C_{33}H_{48}N_3O_8$ $[M+H]^+$：614.34，實測值614.15。

【0543】實施例 346.（4R）-5-（3-（4-胺基丁醯胺基）-4-羥基苯基）-4-（（第三丁氧羰基）胺基）-2-甲基戊酸第三丁酯（306）的合成

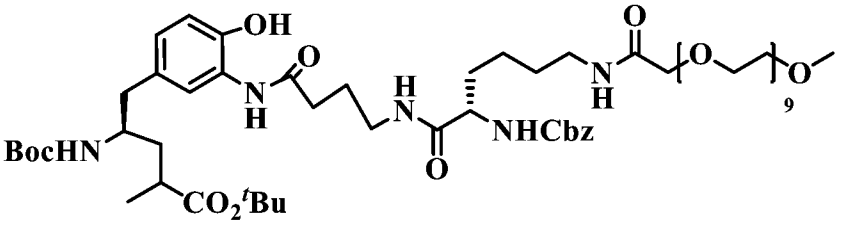


306

在室溫下，將化合物 305（100 g，163 mmol）和Pd/C（10 wt%，10 g）的甲醇（500 mL）混合物，催化加氫（1 atm H_2），攪拌

隔夜。濾除觸媒，減壓濃縮濾液，得到標題化合物（75.8g，97%收率），為棕色泡沫狀固體。^{1}H NMR （400 MHz，CDCl3） δ 7.11 （s，1H），6.83 （d，J = 10.3 Hz，2H），5.04 – 4.52 （m，6H），3.90 – 3.56 （m，1H），2.81 （d，J = 5.3 Hz，2H），2.63 （dd，J = 12.5，6.1 Hz，2H），2.54-2.26 （dd，J = 14.0，7.6 Hz，4H），1.94-1.64 （m，3H），1.44 – 1.36 （m，18H），1.08 （d，J = 6.9 Hz，3H）。ESI m/z 計算值 $C_{25}H_{42}N_3O_6$ $[M+H]^+$： 480.30，實測值480.59。

【0544】 實施例 347. （4R）-第三丁基5-（3-（（S）-37-（（（苄氧基）羰基）胺基）-31,38-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29-十二氧雜-32,39-二氮雜三環四胺基）-4-羥基苯基）-4-（（第三丁氧基羰基）胺基）-2-甲基戊酸酯（307）的合成

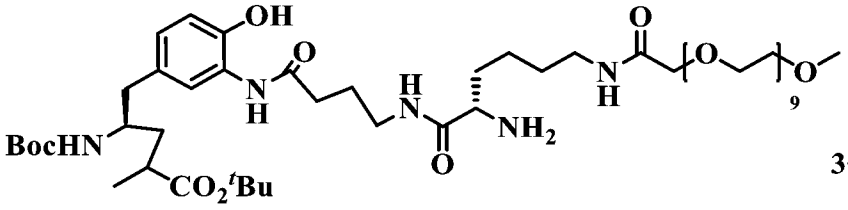


307

在0℃下，將（S）-37-（（（苄氧基）羰基）胺基）-31-側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29-十二氧雜-32-氮雜三十八烷-38-油酸 （130 g，174 mmol，1.1eq.） 的DMF （500 mL） 中的依次加入 TEA （66 mL，474 mmol，3eq.） 和 HATU （72 g，190 mmol，1.2 eq.）。然後將反應混合物升溫至室溫並攪拌2小時。在0°C將化合物306（75.8 g，158 mmol，1.0 eq.）的DMF（500 mL）溶液中加入到上述溶液中，並在室溫下攪拌反應混合物1小時。將反應混合物倒入水（4 L）中，水層用乙酸乙酯（3 × 500 mL）萃取，合併有機層，用鹽水（2 L）洗滌，硫酸鈉乾燥，濃縮，得到粗標題產物（190 g）直接用於下一步。ESI MS m/z：

計算值 $C_{60}H_{100}N_5O_{20}$ $[M+H]^+$： 1210.69，實測值1210.69。

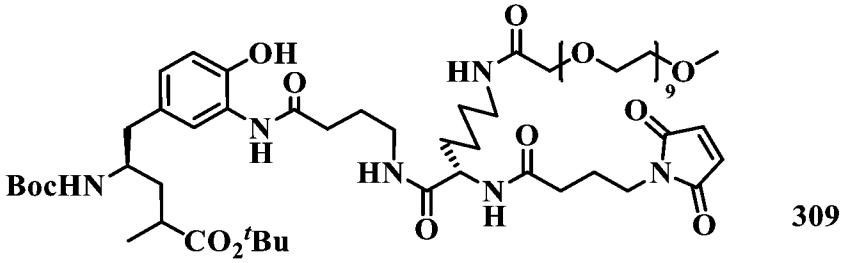
【0545】 實施例 348. （4R）-5-（3-（（S）-37-胺基-31,38-第三丁基二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29-十二氧雜-32,39-二氮雜三環四胺基）-4-羥基苯基）-4-（（第三丁氧基羰基）胺基）-2-甲基戊酸酯（308）的合成



308

在室溫下，將先前反應得到的粗產物307（190 g）溶於甲醇（900 mL）中，加入和Pd/C（10 wt%，19 g），催化加氫（1 atm H_2）攪拌隔夜。將觸媒過濾並在減壓濃縮濾液，並用矽膠柱純化粗化合物，用二氯甲烷/甲醇梯度溶離，以給出標題產物（105 g，在兩個步驟中的62%的產物），為棕色油。ESI MS m/z 計算值 $C_{52}H_{95}N_5O_{18}$ $[M+H]^+$： 1077.65，實測值1077.65。

【0546】 實施例 349. （4R）-第三丁基4-（（第三丁氧羰基）胺基）-5-（3-（（S）-37-（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-31,38-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29-十二氧雜-32,39-二氮雜四十三烷醯胺基）-4-羥基苯基）-2-甲基戊酸酯（309）的合成

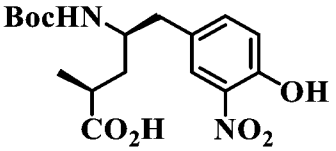


309

在室溫下，向化合物 308（105 g，97.1 mmol，1.0 eq.）的 乙醇（5.3 L）溶液中加入 N-琥珀醯亞胺基 4-馬來醯亞胺基丁酸酯（54.4 g，

194.2 mmol，2.0 eq.）。然後加入0.1M NaH_2PO_4溶液（1.1 L），將反應混合物在室溫下攪拌隔夜。然後在真空下蒸發乙醇並將殘餘物倒入水（3L）中。水溶液用乙酸乙酯（4×500mL）萃取，合併有機層，用鹽水（2L）洗滌，硫酸鈉乾燥，濃縮，粗品經矽膠柱純化，同甲醇 /二氯甲烷梯度溶離 得到標題化合物（100 g，83% 收率），為黃色油狀物。^{1}H NMR （400 MHz，$CDCl_3$） δ 9.43 （s，1H），7.35 （s，1H），7.23 （t，*J* = 5.1 Hz，1H），7.01 （d，*J* = 4.5 Hz，2H），6.89 （s，2H），6.70 （s，2H），4.56 – 4.45 （m，1H），4.30 （t，*J* = 9.7 Hz，1H），3.97 （s，2H），3.86-3.74 （m，1H），3.66 – 3.63 （m，36H），3.58 – 3.52 （m，5H），3.38 （s，3H），3.33 – 3.19 （m，3H），2.47 （d，*J* = 6.2 Hz，4H），2.23 （dd，*J* = 11.6，6.1 Hz，2H），1.91 （dtd，*J* = 26.8，13.6，6.5 Hz，7H），1.71 （d，*J* = 7.7 Hz，2H），1.56 – 1.49 （m，2H），1.42 （s，9H），1.39 （s，9H），1.10 （d，*J* = 6.5 Hz，3H）. ESI m/z 計算值 $C_{60}H_{101}N_6O_{21}$ $[M+H]^+$： 1241.69，實測值1241.69。

【0547】 實施例 350. （2S，4R）-4-（（第三丁氧羰基）胺基）-5-（4-羥基-3-硝基苯基）-2-甲基戊酸（310）的合成

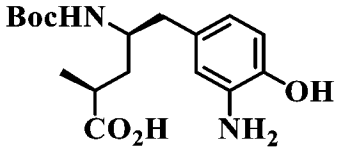


310

在 0°C 下，將 （2S，4R）-4-（（第三丁氧基羰基）胺基）-5-（4-羥基苯基）-2-甲基戊酸 （0.57 g，1.76 mmol，1.0 eq.）的 四氫呋喃（10 mL）加入 t-BuONO （0.63 mL，5.28 mmol，3.0 eq.）。將反應在0℃攪拌1小時，然後在室溫攪拌1小時。加入水 （50 mL） 後，反應混合

物用乙酸乙酯 （3 × 30 mL） 萃取。合併的有機層用鹽水（100 mL）洗滌，經無水硫酸鈉乾燥，過濾，濃縮並藉由矽膠柱層析法（2：1己烷/乙酸乙酯，含有1% HOAc）純化，得到標題化合物，為黃色固體（0.50 g，77%收率）。^{1}H NMR （400 MHz，DMSO） δ7.92 （s，1H），7.47 （d，*J* = 8.3 Hz，1H），7.05 （d，*J* = 8.5 Hz，1H），3.73 （s，1H），2.78 （dd，*J* = 13.6，5.3 Hz，1H），2.69 – 2.47 （m，2H），1.87 （t，*J* = 11.9 Hz，1H），1.47 – 1.37 （m，1H），1.32 （s，9H），1.17 （d，*J* = 7.2 Hz，3H）. ESI MS m/z $C_{17}H_{25}N_2O_7$ $[M+H]^+$ 計算值 369.15，實測值369.14。

【0548】 實施例 351. （2S,4R）-5-（3-胺基-4-羥基苯基）-4-（（第三丁氧羰基）胺基）-2-甲基戊酸（311）的合成

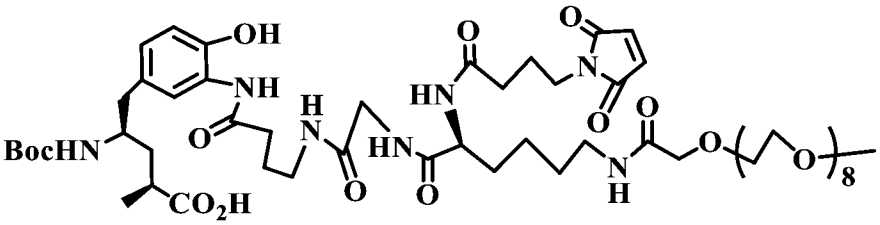


311

在室溫下，將化合物 310 （0.50 g，1.36 mmol，1.0 eq.） 和 Pd/C （10 wt%，0.02 g） 的甲醇 （10 mL）混合物中，催化加氫（1 atm H_2）反應一小時，然後藉由矽藻土（助濾劑）過濾。將濾液濃縮，得到標題化合物，為白色泡沫狀物（0.43g，93%收率）。ESI MS m/z 計算值 $C_{17}H_{27}N_2O_5$ [M+H]+ 339.18，實測值339.17。^{1}H NMR （400 MHz，MeOD） δ 6.60 （d，*J* = 7.9 Hz，2H），6.44 （d，*J* = 7.3 Hz，1H），3.71 （d，*J* = 6.3 Hz，1H），2.62 – 2.37 （m，3H），1.83 （ddd，*J* = 13.7，9.9，3.7 Hz，1H），1.39 （s，9H），1.13 （d，*J* = 7.1 Hz，3H）。

【0549】 實施例 352. （2S,4R）-4-（（第三丁氧羰基）胺基）-5-

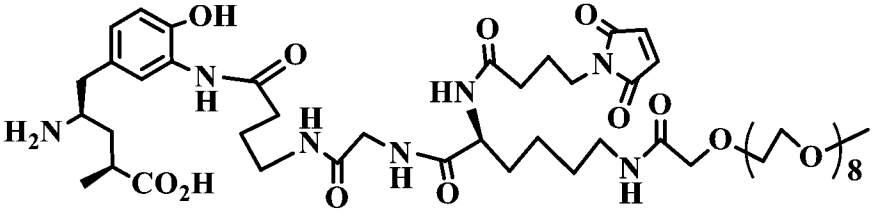
（3-（（S）-34-（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-28,35,38-三側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29,36,39-三氮雜四十三烷-43-醯胺基）-4-羥基苯基）-2-甲基戊酸（313）的合成



313

在室溫下,向化合物311（78.0 g,85.0 mmol,1.0eq.）和 2,5-二氧吡咯啶-1-基-34-（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-28,35,38-三氧-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29,36,39-三氮雜四十三烷-43-甲酸酯（93.3 g，95.8 mmol，1.1 eq.）的 95% 乙醇（3.3 L）中加入 NaH_2PO_4（0.1 M，660 mL）。反應在室溫下攪拌隔夜然後用二氯甲烷稀釋並用鹽水洗滌，用無水硫酸鈉乾燥，過濾並濃縮。將殘餘物藉由柱層析法（3-10% 甲醇/二氯甲烷）純化，得到標題化合物，為黃色油狀物（43 g，37%收率）。

【0550】實施例 353.（2S,4R）-4-胺基-5-（3-（（S）-34-（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-28,35,38-三側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29,36,39-三氮雜四十三烷-43-醯胺基）-4-羥基苯基）-2-甲基戊酸（314）的合成

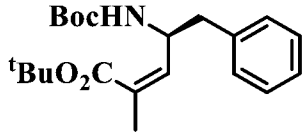


314

在室溫下，化合物 313（2.25 g，1.78 mmol）的二惡烷（10 mL）與濃鹽酸（3 mL）反應 1小時，濃縮，與甲苯/乙醇蒸發至乾得到粗品標題產物（1.97 g，100%收率），直接用於下一步。ESI m/z

$C_{53}H_{88}N_7O_{20}$ $[M+H]^+$ 計算值： 1142.6085，實測值： 1142.6140。

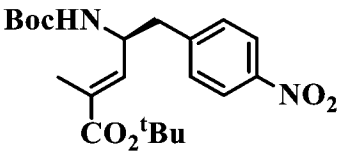
【0551】 實施例 354.（S，Z）-4-（（第三丁氧羰基）胺基）-2-甲基-5-苯基戊-2-烯酸第三丁酯（315）的合成



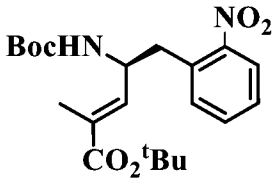
315

將（S）-第三丁基（1-側氧基-3-苯基丙-2-基）胺基甲酸酯（1.01 g，4.0 mmol）溶解于無水二氯甲烷（50 mL）中，然後加入2-（三苯基-亞磷醯亞胺） -第三丁基丙酸酯（3.20 g，8 mmol）並將溶液在室溫下攪拌1.5 小時，由 TLC 分析表明反應完成。藉由柱層析法（10-50% 乙酸乙酯/己烷）純化得到標題化合物（1.38g，96%收率）。ESI m/z 計算值 $C_{21}H_{31}NO_4$ $[M+H]^+$： 362.2332，實測值： 362.2350。

【0552】 實施例 355.（S，E）-4-（（第三丁氧基羰基）胺基）-2-甲基-5-（4-硝基苯基）戊-2-烯酸第三丁酯（316）和（S，E）-4-（（第三丁氧基羰基）胺基）-2-甲基-5-（2-硝基苯基）戊-2-烯酸第三丁酯（317）的合成



316，

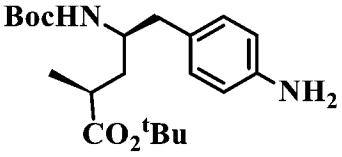


317

將（S，Z）-第三丁基4-（（第三丁氧羰基）胺基）-2-甲基-5-苯基戊-2-烯酸酯（1.320 g，3.65 mmol）溶於四氫呋喃（45 mL），然後加入亞硝酸第三丁酯（1.151 g，10.95 mmol）的四氫呋喃（6 mL）。反應在室溫下攪拌3小時然後倒入水中，用乙酸乙酯（3×50mL）萃取，合併的有機相用鹽水（50mL）洗滌，無水硫酸鈉乾燥，過濾並濃縮。藉由層析柱層析法純化（10-50%乙酸乙酯/正己烷）得到316（907 mg，61%收

率） ESI m/z $C_{21}H_{31}N_2O_6$ $[M+H]^+$ 計算值： 407.2183，實測值： 407.2230，和 **317** （133 mg，9.0% 收率），ESI m/z $C_{21}H_{31}N_2O_6$ $[M+H]^+$ 計算值： 407.2183，實測值： 407.2245。

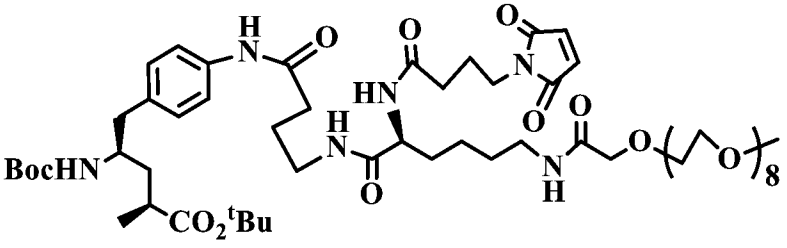
【0553】 實施例 356. （2S,4R）-5-（4-胺基苯基）-4-（（（第三丁氧羰基）胺基）-2-甲基戊酸第三丁酯（318）的合成



318

將（S，E）-第三丁基4-（（第三丁氧羰基）胺基）-2-甲基-5-（4-硝基苯基）戊-2-烯酸酯（15.0g，36.9mmol，1.0eq.），手性螺銨觸媒（1.50 g，0.78 mmol） （Zhu，S.-F.；等，J. Am. Chem. Soc. 2006，128，12886；Song，S.，等，Org. Lett.，2013，15，3722） 和 Et_3N（4.26 g，41.0 mmol）的150 mL 甲醇混合物 在加氫容器中攪拌並在 60 °C 下充入 6 atm H_2 反應20 小時。放出氫氣後，將混合物濃縮並用C-8柱用水/甲醇（5%甲醇至50%甲醇）溶離純化，得到12.8g（92%收率）的標題化合物，直接用於下一步。ESI m/z $C_{21}H_{35}N_2O_4$ $[M+H]^+$ 計算值： 379.2578，實測值： 379.2610。

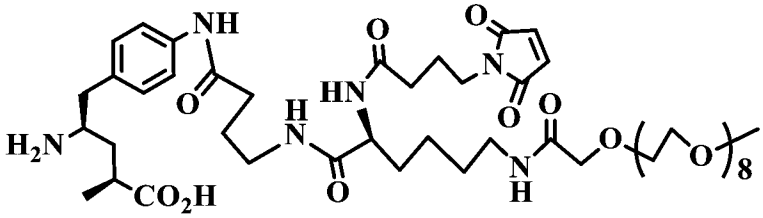
【0554】 實施例 357. （2S,4R）-第三丁基4-（（第三丁氧羰基）胺基）-5-（4-（（S）-34-（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-28,35-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29,36-二氮雜四十三醯胺基）苯基）-2-甲基戊酸酯（319）的合成



319

將（2S,4R）-第三丁基5-（4-胺基苯基）-4-（（第三丁氧基-羰基）胺基）-2-甲基戊酸（3.511g，9.28mmol）和（S）-34-（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯啶-1-基）丁醯胺基）-28,35-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29,36-二氮雜四十烷-40-酸（7.613g，9.28mmol）的二氯甲烷 （75 mL）加入EDC（3.50g，18.23mmol）。將混合物攪拌12小時，濃縮，在矽膠柱上純化，用30%乙酸乙酯/二氯甲烷溶離，合併組分，用油幫浦蒸發，得到標題化合物（8.98g，82%收率）。ESI m/z $C_{58}H_{97}N_6O_{29}$ $[M+H]^+$ 計算值： 1181.6809，實測值： 1181.6880。

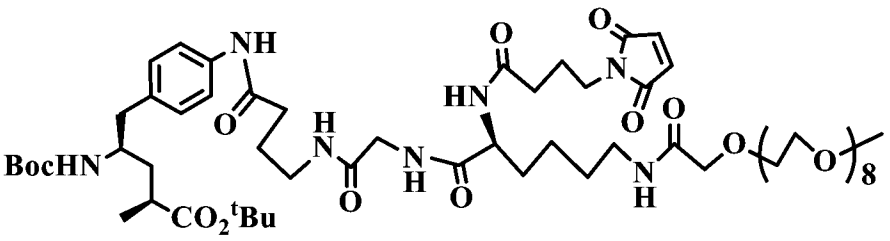
【0555】 實施例 358. （2S,4R）-4-胺基-5-（4-（（S）-37-（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-31,38-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29-十二氧雜-32,39-二氮雜四十三醯胺基）苯基）-2-甲基戊酸（320） 的合成



320

在室溫下，將化合物319（2.01 g，1.70 mmol）的二惡烷（10 mL）的溶液與鹽酸（3 mL）反應1小時，然後濃縮並與甲苯/乙醇蒸發至乾，得到粗標題產物（1.82g，100%收率），直接用於下一步。ESI m/z $C_{51}H_{85}N_6O_{18}$ $[M+H]^+$ 計算值： 1069.5921，實測值： 1069.5990。

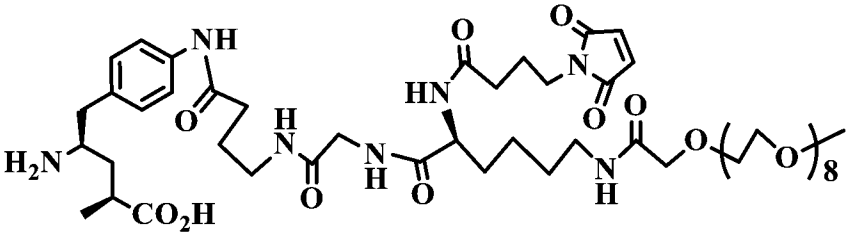
【0556】 實施例 359. （2S,4R）-第三丁基4-（（第三丁氧羰基）胺基）-5-（4-（（S）-37-（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-31,38,41-三側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29-十二氧雜-32,39,42-三氮雜四十六醯胺基）苯基）-2-甲基戊酸酯（321）的合成



321

向 （2S,4R）-第三丁基5-（4-胺基苯基）-4-（第三丁氧羰基）胺基-2-甲基戊酸第三丁酯（3.012 g，7.96 mmol）和（S）-37-（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺）-31,38,41-三側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29-十二氧雜-32,39,42-三氮雜四十六烷-46-酸（7.346 g，9.97 mmol）的二氯甲烷（75 mL）中加入EDC（3.50 g，18.23 mmol）。將混合物攪拌12小時，濃縮，在矽膠柱上純化，用30%乙酸乙酯/二氯甲烷溶離，合併組分，用油幫浦蒸發，得到標題化合物（8.672g，收率為85%）。ESI m/z $C_{62}H_{104}N_7O_{21}$ $[M+H]^+$ 計算值：1282.7286，實測值： 1282.7365。

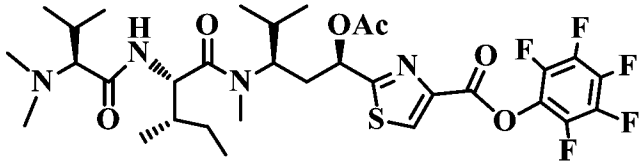
【0557】 實施例 360. （2S,4R）-4-胺基-5-（4-（（S）-37-（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-31,38,41-三側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29-十二氧雜-32,39,42-三氮雜四十六醯胺基）苯基）-2-甲基戊酸（322） 的合成



322

在室溫下，將化合物 321 （1.951 g，1.52 mmol） 的二惡烷 （10 mL）溶液與鹽酸 （3 mL） 反應1 小時，濃縮，與甲苯/乙醇蒸發至乾得到粗品標題產物（1.71 g，100%收率），直接用於下一步。ESI m/z $C_{53}H_{88}N_7O_{19}$ $[M+H]^+$ 計算值： 1126.6136，實測值： 1126.6265。

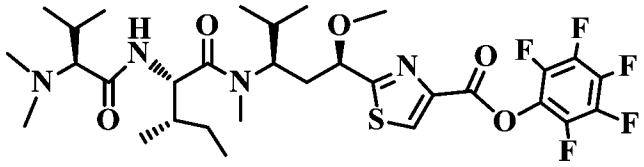
【0558】 實施例 361. 五氟苯基2-（（3S,6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-3,9-二異丙基-2,8-二甲基-4,7,13-三側氧基-12-氧雜-2,5,8-三氮雜十四烷-11-基）噻唑-4-羧酸酯（323）的合成



323

向2-（（3S,6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-3,9-二異丙基-2,8-二甲基-4,7,13-三側氧基-12 -氧雜-2,5,8-三氮雜十四烷-11-基）噻唑-4-羧酸（2.210 g，4.090 mmol）和五氟苯酚（1.00 g，5.430 mmol）的二氯甲烷（60 mL）溶液中加入EDC（1.580 g，8.22 mmol）。將反應混合物攪拌隔夜。減壓除去溶劑後，將反應混合物濃縮，矽膠柱層析（1：15至1：4 乙酸乙酯/二氯甲烷）純化，得到標題化合物（2.455 g，85%收率），使用 直接進入下一步。ESI MS m/z $C_{32}H_{44}F_5N_4O_6S$ $[M+H]^+$ 計算值 707.2902，實測值707.2970。

【0559】 實施例 362. 五氟苯基2-（（3S,6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-3,9-二異丙基-2,8-二甲基-4,7-二側氧基-12-氧雜-2,5,8-三氮雜十三烷-11-基）噻唑-4-羧酸酯（324） 的合成

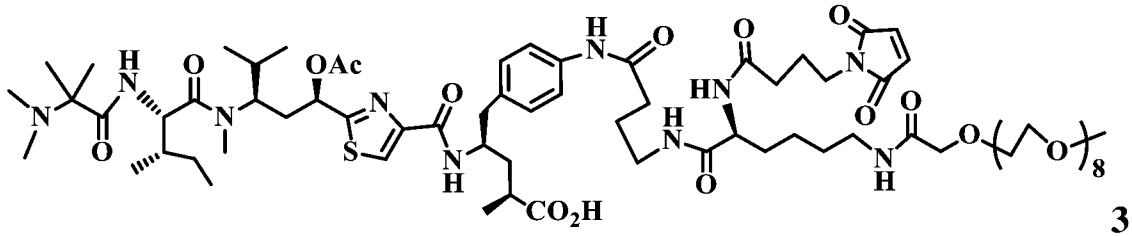


324

向2-（（3S,6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-3,9-二異丙基-2,8-二甲基-4,7-二側氧基-12-氧雜-2,5,8-三氮雜十三烷-11-基）噻唑-4-甲酸（2.285 g，4.460 mmol）和五氟苯酚（1.00 g，5.430 mmol）的二氯甲烷（60 mL）溶液中加入EDC（1.580 g，8.22 mmol） ）。將反應混合物攪拌隔夜。減壓除去溶劑後，將反應混合物濃縮，藉由矽膠柱層析（1：

15至1：4 乙酸乙酯/二氯甲烷）純化，得到標題化合物（2.510 g，83%收率），使用直接進入下一步。ESI MS m/z $C_{31}H_{44}F_5N_4O_5S$ $[M+H]^+$ 計算值679.2953，實測值679.2995。

【0560】實施例 363.（2S,4R）-4-（2-（（6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-9-異丙基-2,3,3,8-四甲基-4,7,13-三側氧基-12-氧雜-2,5,8-三氮雜十四烷-11-基）噻唑-4-甲醯胺基）-5-（4-（（S）-34-（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-28,35-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29,36-二氮雜四十醯胺基）苯基）-2-甲基戊酸（325）的合成

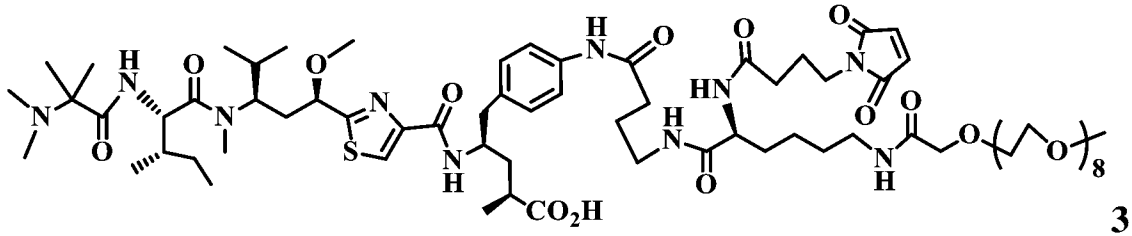


325

將五氟苯基2-（（6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-9-異丙基-2,3,3,8-四甲基-4,7,13-三氧雜-12 -氧雜-2,5,8-三氮雜十四烷-11-基）噻唑-4-甲酸（1.001 g，1.444 mmol）和化合物 320（1.543 g，1.442 mmol），以及 N,N-二異丙基乙胺（0.6 mL）的 DMF（30 mL）在室溫下攪拌隔夜。將反應液在高真空下濃縮，溶于少量水，然後藉由製備HPLC純化（C18柱，10-90% 乙腈/水），合併含有產物的組分，濃縮並凍乾，得到標題化合物（1.437 g，65% 收率）。ESI MS m/z $C_{74}H_{121}N_{10}O_{22}S$ $[M+H]^+$ 計算值1533.8378，實測值1533.8470。

【0561】實施例 364.（2S,4R）-4-（2-（（6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-9-異丙基-2,3,3,8-四甲基-4,7-的合成二側氧基-12-氧雜-2,5,8-三氮雜十三烷-11-基）噻唑-4-甲醯胺基）-5-（4-（（S）-34-

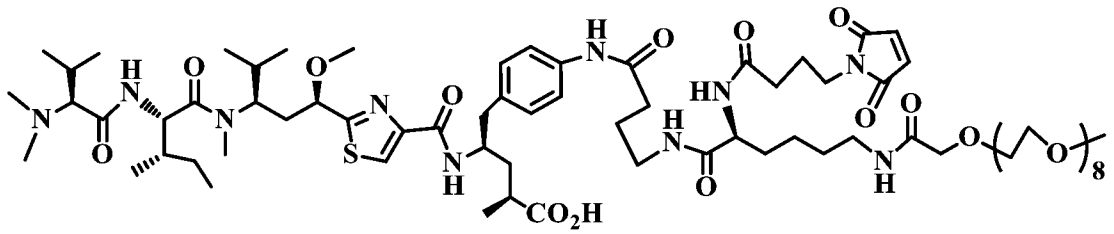
（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-28,35-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29,36-二氮雜四十醯胺基）苯基）-2-甲基戊酸（326）的合成



326

將五氟苯基2-（（6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-9-異丙基-2,3,3,8-四甲基-4,7-二側氧基-12-氧雜-2,5,8-三氮雜十四烷-11-基）噻唑-4-甲酸（1.011 g，1.521 mmol），化合物 320（1.550 g，1.444 mmol），和 N,N-二異丙基乙胺（0.6 mL）的 DMF（30 mL）的混合物在室溫下攪拌隔夜。將反應液在高真空下濃縮，溶于少量水，然後藉由製備HPLC（C18柱，10-90% 乙腈/水）純化，合併含有產物的組份，濃縮並凍乾，得到標題化合物（ 1.401 g，63% 收率）。ESI MS m/z $C_{73}H_{121}N_{10}O_{21}S$ $[M+H]^+$ 計算值1505.8429，實測值1505.8510。

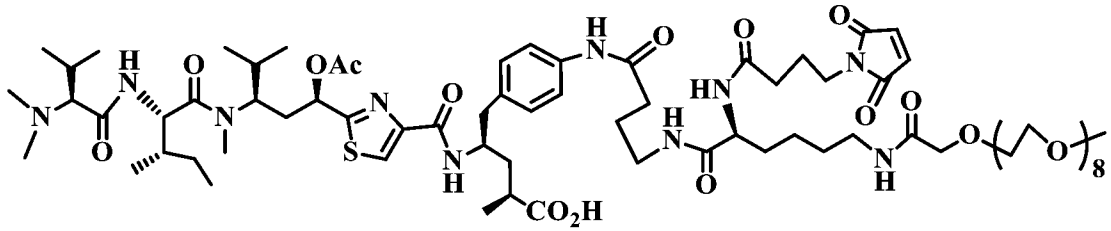
【0562】實施例 365.（2S,4R）-4-（2-（（3S,6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-3,9-二異丙基-2,8-二甲基-4,7-二側氧基-12-氧雜-2,5,8-三氮雜十三烷-11-基）噻唑-4-甲醯胺基）-5-（4-（（S）-34-（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-28,35-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29,36-二氮雜四十醯胺基）苯基）-2-甲基戊酸（327）的合成



327

將五氟苯基2-（（3S,6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-3,9-二異丙基-2,8-二甲基-4,7-二側氧基-12-氧雜-2,5,8-三氮雜十四烷-11-基）噻唑-4-甲酸（1.015 g，1.496 mmol），化合物 320（1.545 g，1.443 mmol），和N,N-二異丙基乙胺（0.6 mL）的 DMF（30 mL）的混合物在室溫下攪拌隔夜。將反應液在高真空下濃縮，溶于少量水，然後藉由製備HPLC（C18柱，10-90% 乙腈/水）純化，合併含有產物的組份，濃縮並凍乾，得到標題化合物（ 1.357 g，61% 收率）。ESI MS m/z $C_{74}H_{123}N_{10}O_{21}S$ $[M+H]^+$ 計算值1519.8586，實測值1519.8650。

【0563】實施例 366. （2S,4R）-4-（2-（（3S,6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-3,9-二異丙基-2,8-二甲基-4,7,13-三側氧基-12-氧雜-2,5,8-三氮雜十四烷-11-基）噻唑-4-甲醯胺基）-5-（4-（（S）-34-（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-28,35-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29,36-二氮雜四十醯胺基）苯基）-2-甲基戊酸（328）的合成

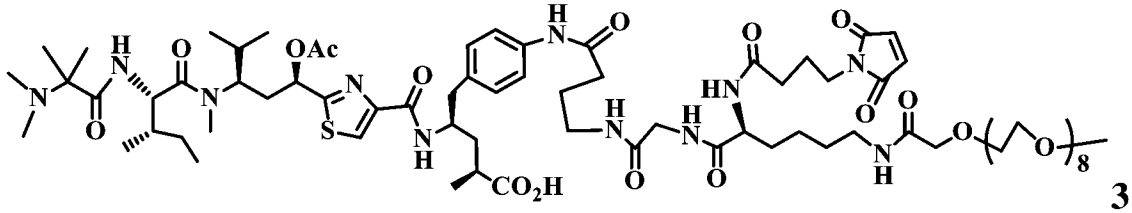


328，

將五氟苯基2-（（3S,6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-3,9-二異丙基-2,8-二甲基-4,7,13-三側氧基-12 -氧雜-2,5,8-三氮雜十四烷-11-基）噻唑-4-甲酸（1.020 g，1.444 mmol）和化合物 320（1.540 g，1.442 mmol），和 N,N-二異丙基乙胺（0.6 mL）的 DMF（30 mL）的混合物在室溫下攪拌隔夜。將反應液在高真空下濃縮，溶于少量水，然後藉由

製備HPLC（C18柱，10-90% 乙腈/水）純化，合併含有產物的組份，濃縮並凍乾，得到標題化合物（ 1.338 g，60% 收率）。ESI MS m/z $C_{75}H_{123}N_{10}O_{22}S$ $[M+H]^+$ 計算值1547.8535，實測值1547.8595。

【0564】實施例 367. （2S,4R）-4-（2-（（6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-9-異丙基-2,3,3,8-四甲基-4,7,13-三側氧基-12-氧雜-2,5,8-三氮雜十四烷-11-基）噻唑-4-甲醯胺基）-5-（4-（（S）-34-（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-28,35,38-三側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29,36,39-三氮雜四十三醯胺基）苯基）-2-甲基戊酸（329）

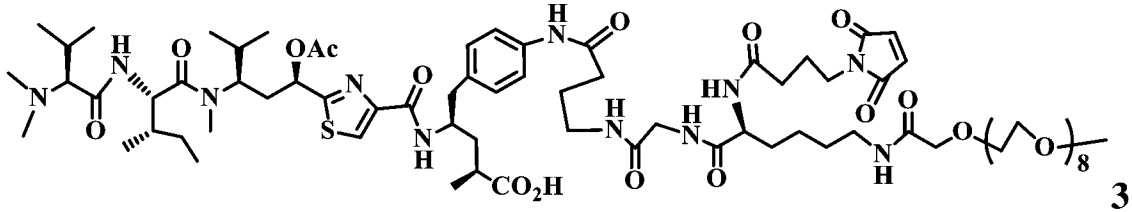


329

將五氟苯基2-（（6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-9-異丙基-2,3,3,8-四甲基-4,7,13-三氧雜-12 -氧雜-2,5,8-三氮雜十四烷-11-基） 噻唑-4-甲酸 （1.003 g，1.444 mmol） 和化合物 322 （1.535 g，1.363 mmol），和 N,N-二異丙基乙胺 （0.6 mL） 的 DMF （30 mL）的混合物 在室溫下攪拌隔夜。將反應液在高真空下濃縮，溶于少量水，然後藉由製備HPLC純化（C18柱，10-90% 乙腈/水），合併含有產物的組份，濃縮並凍乾，得到標題化合物（1.365 g，65% 收率）。ESI MS m/z $C_{76}H_{124}N_{11}O_{23}S$ $[M+H]^+$ 計算值 1590.8593，實測值1590.8670。

【0565】實施例 368. （2S,4R）-4-（2-（（3S,6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-3,9-二異丙基-2,8-二甲基-4,7,13-三側氧基-12-氧雜-2,5,8-三氮雜十四烷-11-基）噻唑-4-甲醯胺基）-5-（4-（（S）-34-（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-28,35,38-三側氧基-

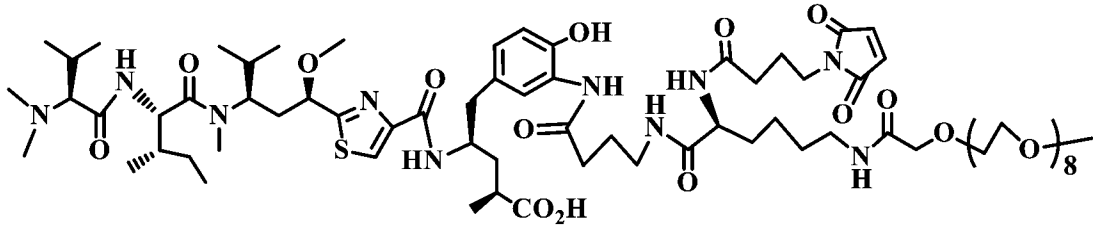
2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29,36,39-三氮雜四十三醯胺基）苯基）-2-甲基戊酸（330）的合成



330

將五氟苯基2-（（3S,6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-3,9-二異丙基-2,8-二甲基-4,7,13-三氧雜-12 -氧雜-2,5,8-三氮雜十四烷-11-基）噻唑-4-甲酸 （1.020 g，1.444 mmol） 和化合物 322 （1.540 g，1.367 mmol），和 N,N-二異丙基乙胺 （0.6 mL） 的 DMF （30 mL） 的混合物在室溫下攪拌隔夜。將反應液在高真空下濃縮，溶于少量水，然後藉由製備HPLC（C18柱，10-90% 乙腈/水）純化，合併含有產物的組份，濃縮並凍乾，得到標題化合物（ 1.315 g，60% 收率）。ESI MS m/z $C_{77}H_{126}N_{11}O_{23}S$ $[M+H]^+$ 計算值1604.8750，實測值1604.8835。

【0566】實施例 369. （2S,4R）-4-（2-（（3S,6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-3,9-二異丙基-2,8-二甲基-4,7-二側氧基-12-氧雜-2,5,8-三氮雜十三烷-11-基）噻唑-4-甲醯胺基）-5-（3-（（S）-34-（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-28,35-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29,36-二氮雜四十烷醯胺基）-4-羥基苯基）-2-甲基戊酸（331）的合成

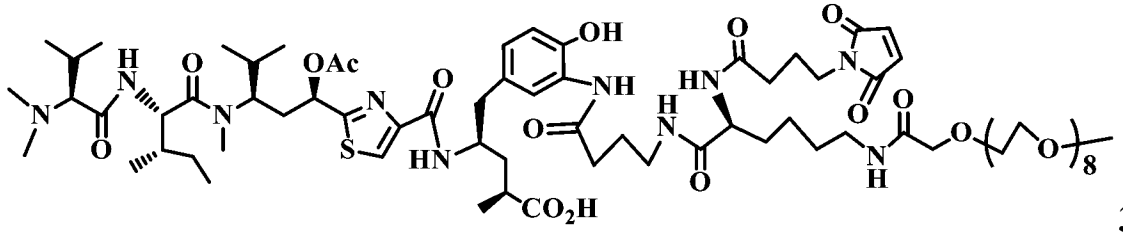


331

將五氟苯基2-（（3S,6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-3,9-二異丙基-2,8-二甲基-4,7-二側氧基-12-氧雜-2,5,8-三氮雜十四烷-11-基） 噻

唑-4-甲酸 （1.015 g，1.496 mmol），化合物 314 （1.458 g，1.401 mmol），和 N,N-二異丙基乙胺 （0.6 mL） 的 DMF （30 mL）的混合物在室溫下攪拌隔夜。將反應液在高真空下濃縮，溶于少量水，然後藉由製備HPLC（C18柱，10-90% 乙腈/水）純化，合併含有產物的組份，濃縮並凍乾，得到標題化合物（ 1.338 g，62% 收率）。ESI MS m/z $C_{74}H_{123}N_{10}O_{22}S$ $[M+H]^+$ 計算值 1535.8535，實測值1535.8655。

【0567】 實施例 370. （2S,4R）-4-（2-（（3S,6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-3,9-二異丙基-2,8-二甲基-4,7,13-三側氧基-12-氧雜-2,5,8-三氮雜十四烷-11-基）噻唑-4-甲醯胺基）-5-（3-（（S）-34-（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-28,35-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29,36-二氮雜四十醯胺基）-4-羥基苯基）-2-甲基戊酸（332） 的合成

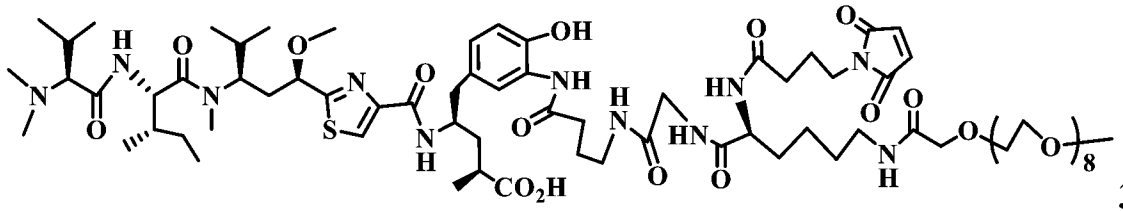


332

將五氟苯基2-（（3S,6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-3,9-二異丙基-2,8-二甲基-4,7,13-三側氧基-12 -氧雜-2,5,8-三氧雜十四烷-11-基）噻唑-4-甲酸 （1.020 g，1.444 mmol） 和 （2S,4R）-4-胺基-5-（3-（（S）-34-（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-28,35-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26 -九氧雜-29,36-二氮雜四十醯胺基）-4-羥基苯）-2-甲基戊酸 （1.455 g，1.395 mmol） 和 N,N-二異丙基乙胺 （0.5 mL） 的 DMF （35 mL） 的混合物在室溫下攪拌隔夜。反應在高真空下濃縮，溶于少量水，然後藉由製備HPLC（C18柱，10-90% 乙

腈/水）純化，合併含有產物的組份，濃縮並凍乾，得到標題化合物（1.333 g，61% 收率）。ESI MS m/z $C_{75}H_{123}N_{10}O_{23}S$ $[M+H]^+$ 計算值1563.8484，實測值1563.8550。

【0568】實施例 371. （2S,4R）-4-（2-（（3S,6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-3,9-二異丙基-2,8-二甲基-4,7-二側氧基-12-氧雜-2,5,8-三氮雜十三烷-11-基）噻唑-4-甲醯胺基）-5-（3-（（S）-34-（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-28,35,38-三側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29,36,39-三氮雜四十三醯胺基）-4-羥基苯基）-2-甲基戊酸（333） 的合成

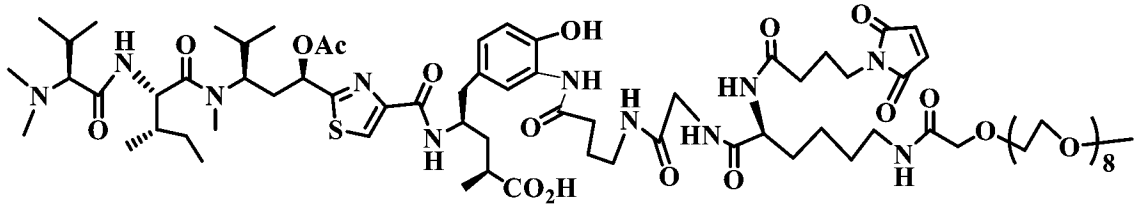


333

將五氟苯基2-（（3S,6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-3,9-二異丙基-2,8-二甲基-4,7-二側氧基-12-氧雜-2,5,8-三氮雜十四烷-11-基） 噻唑-4-甲酸 （1.015 g，1.496 mmol），化合物 314 （1.523 g，1.387 mmol），和 N,N-二異丙基乙胺 （0.6 mL） 的 DMF （30 mL） 的的混合物在室溫下攪拌隔夜。將反應液在高真空下濃縮，溶于少量水，然後藉由製備HPLC純化（C18柱，10-90% 乙腈/水），合併含有產物的組份，濃縮並凍乾，得到標題化合物（ 1.326 g，60% 收率）。ESI MS m/z $C_{76}H_{126}N_{11}O_{23}S$ $[M+H]^+$ 計算值1592.8750，實測值1592.8845。

【0569】實施例 372. （2S,4R）-4-（2-（（3S,6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-3,9-二異丙基-2,8-二甲基-4,7,13-三側氧基-12-氧雜-2,5,8-三氮雜十四烷-11-基）噻唑-4-甲醯胺基）-5-（3-（（S）-34-（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-28,35,38-三側氧基-

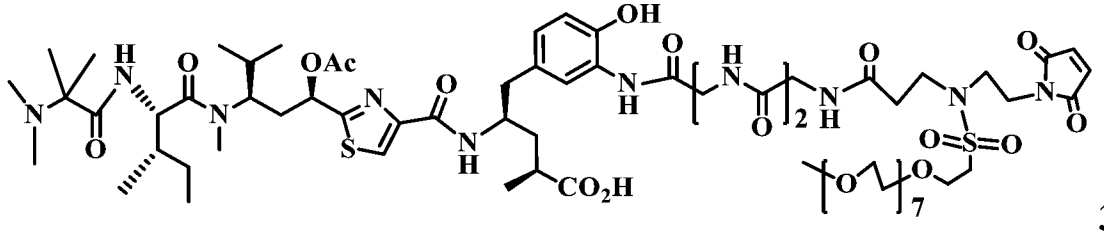
2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29,36,39-三氮雜四十醯胺基）-4-羥基苯基）-2-甲基戊酸（334） 的合成



334

將五氟苯基2-（（3S,6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-3,9-二異丙基-2,8-二甲基-4,7,13-三側氧基-12 -氧雜-2,5,8-三氮雜十四烷-11-基）噻唑-4-甲酸 （1.020 g，1.444 mmol），化合物 314 （1.520 g，1.384 mmol），和 N,N-二異丙基乙胺 （0.5 mL） 的 DMF （35 mL） 的混合物在室溫下攪拌隔夜。反應在高真空下濃縮，溶于少量水，然後藉由製備 HPLC（C18柱，10-90% 乙腈/水）純化，合併含有產物的組份，濃縮並凍乾，得到標題化合物（ 1.391 g，62% 收率）。ESI MS m/z $C_{77}H_{126}N_{11}O_{24}S$ $[M+H]^+$ 計算值1620.8699，實測值1620.8790。

【0570】實施例 373. （2S,4R）-5-（3-（13-（2',5',8',11',14',17',20',23'-八氧雜二十五烷-25 '-磺醯基）-15-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）-4,7,10-三側氧基-3,6,9,13-四氮雜十五醯胺基）-4-羥基苯基）-4-（2-（（6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-9-異丙基-2,3,3,8-四甲基-4,7,13-三側氧基-12-氧雜-2,5,8-三氮雜十四烷-11-基）噻唑-4-羧醯胺基）-2-甲基戊酸 （**335**） 的合成

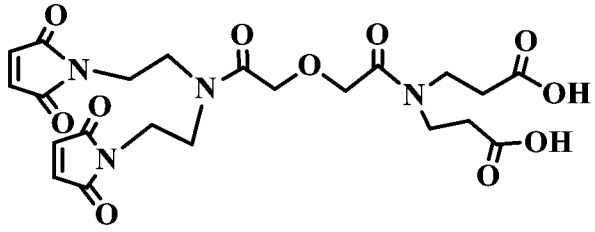


335

在 0 °C 下，向（2S,4R）-5-（3-胺基-4-羥基苯基）-4-（2-

（（6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-9-異丙基-2,3,3,8-四甲基-4,7,13-三側氧基-12-氧雜-2,5,8-三氧雜十四烷-11-基） 噻唑-4-羧醯胺基）-2-甲基戊酸鹽酸鹽 （Tub-039，R. Zhao，et al，PCT/CN2017/120454；R. Zhao，et al，14th PEGS Boston，Boston，MA，USA，2018 年 5 月 3 日）（83 mg，0.106 mmol）和化合物 110（122 mg，0.134 mmol）的 DMF （8 mL） 中加入 N,N-二異丙基乙胺（2 mL）。將反應混合物在0℃攪拌0.5小時，然後在室溫攪拌4小時。然後將反應混合物濃縮，藉由製備HPLC（移動相：乙腈/水=10%至80%，含0.1%甲酸）純化，得到標題產物（95.5 mg，58%收率）。MS-ESI m/z： $[M+H]^+$ $C_{69}H_{112}N_{11}O_{24}S$計算值，1542.72；實測值，1542.73。

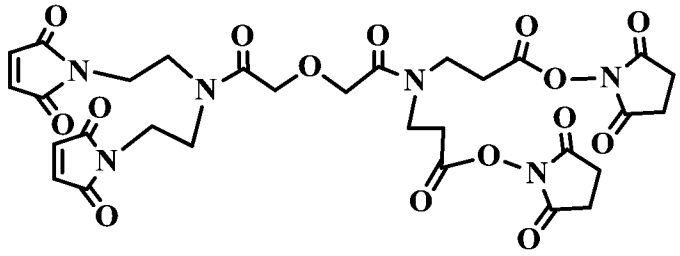
【0571】 實施例 374. 3,3'-（（2-（2-（雙（2-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）乙基）胺基）-2-氧乙氧基）乙醯基）氮雜二基）二丙酸（336） 的合成



336

向 3,3'-氮雜二基二丙酸 （1.00 g，6.20 mmol） 的 DMA （25 mL） 和 NaH_2PO_4 緩衝液 （30 mL，100 mM，pH 7.0） 中加入2,5-二氧吡咯啶-1-基2-（2-（雙（2-（2,5-二氧-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）乙基）胺基）-2-氧乙氧基）乙酸酯 （3.00 g，6.30 mmol）。然後將混合物在室溫下攪拌4小時，濃縮，矽膠柱純化，用水/CH_3CN（3% 水的CH_3CN溶液至5% 水的CH_3CN溶液）溶離，得到標題化合物（2.52 g，78%收率）。ESI MS m/z $C_{22}H_{27}N_4O_{11}$ $[M+H]^+$ 計算值 523.17，實測值523.20。

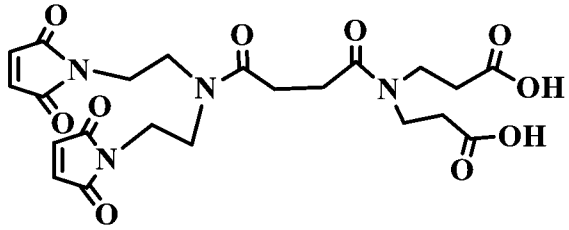
【0572】 實施例 375. 雙（2,5-二側氧基吡咯啶-1-基）3,3’-（（2-（2-（雙（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）乙基）胺基）-2-氧乙氧基）乙醯基）氮雜二基）二丙酸酯（337） 的合成



337

向化合物336（1.20 g，2.30 mmol）和N-羥基琥珀醯亞胺（0.34 g，2.95 mmol）的無水DMA（30 mL）中加入EDC（1.00 g，5.23 mmol）。將反應混合物攪拌4小時，然後濃縮並藉由矽膠柱層析法（4：1至5：3 二氯甲烷/乙酸乙酯）純化，得到標題化合物（1.26 g，77%收率）。ESI MS m/z： $C_{30}H_{33}N_6O_{15}$ $[M+H]^+$ 計算值717.20，實測值717.30。

【0573】 實施例 376. 3,3’-（（4-（雙（2-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）乙基）胺基）-4-側氧基丁醯基）氮雜二基）二丙酸（338）

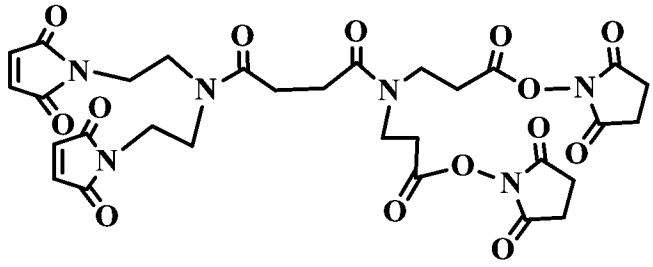


338

向 3,3'-氮雜二基二丙酸 （1.00 g，6.20 mmol） 的 DMA （25 mL） 和 NaH_2PO_4 緩衝液 （30 mL，100 mM，pH 7.0） 中加入2,5-二氧吡咯啶-1-基4-（雙（2-（2,5-二氧-2,5二氫-1H-吡咯-1-乙基）胺基）-4-側氧基丁酸酯（2.90 g，6.30 mmol）。然後將混合物在室溫下攪拌4小時，濃縮，矽膠柱純化，用水/CH_3CN（3% 水的CH_3CN溶液至5% 水的

CH_3CN溶液）得到標題化合物（2.51 g，80%收率）。ESI MS m/z $C_{22}H_{27}N_4O_{10}$ $[M+H]^+$，計算值 507.17，實測值507.20。

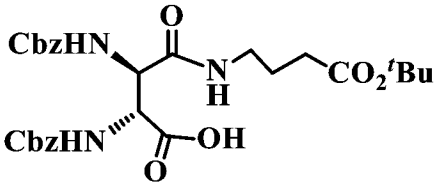
【0574】實施例 377. 雙（2,5-二側氧基吡咯啶-1-基）3,3'-（（4-（雙（2-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）乙基）胺基）-4-側氧基丁醯基）氮雜二基）二丙酸酯（339）的合成



339

向化合物338（1.15 g，2.27 mmol）和N-羥基琥珀醯亞胺（0.34 g，2.95 mmol）的無水DMA（30 mL）混合溶液中加入EDC（1.00 g，5.23 mmol）。將反應混合物攪拌4小時，然後濃縮並藉由矽膠柱層析（4：1至5：3 二氯甲烷/乙酸乙酯）純化，得到標題化合物（1.27 g，80%收率）。ESI MS m/z： $C_{30}H_{33}N_6O_{14}$ $[M+H]^+$ 計算值 701.20，實測值701.30。

【0575】實施例 378.（2R,3R）-2,3-雙（（苄氧基）羰基）胺基）-4-（（4-（第三丁氧基）-4-側氧基丁基）胺基）-4-側氧基丁酸（340）的合成

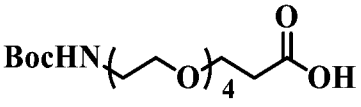


340

向二苄基 （（3R,4S）-2,5-二側氧基四氫呋喃-3,4-二基）-二胺基甲酸酯 （4.25 g，10.68 mmol，1.0 eq.） 和 DMAP （13 mg，0.11 mmol，0.01 eq.） 的20 mL 無水 二氯甲烷 中，加入胺基丁酸第三丁酯

（1.78 g，11.21 mmol，1.05 eq.）的 10 mL 無水 二氯甲烷的溶液。加完後，原料完全溶解，反應在室溫下攪拌隔夜。將粗產物裝載在矽膠柱上並用3-5% 甲醇/二氯甲烷溶離。合併組份並蒸發，將殘餘物與石油醚/二氯甲烷 （1：1）一起打漿，得到3.3 g白色固體（55.9%收率）。ESI m/z $C_{28}H_{36}N_3O_9$ $[M+H]^+$ 計算值： 558.2，實測值： 558.2。

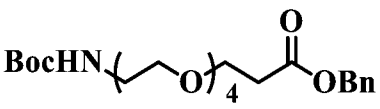
【0576】 實施例 379. 2,2-二甲基-4-側氧基-3,8,11,15,18-五氧雜-5-氮雜二十一烷-21-酸（341）的合成



341

在 500 mL 燒瓶中，將 H_2N-PEG_4-$CH_2CH_2CO_2H$（3.0 g，11.3 mmol，1.0 eq.）和 K_2CO_3（4.7 g，33.93 mmol，3.0 eq.）溶于 50 mL 水中，冰水浴冷卻，滴加Boc_2O （3.2 g，14.7 mmol，1.3）的50 mL 四氫呋喃。使反應升溫至室溫並攪拌隔夜。將反應混合物用1N $KHSO_4$調節至 pH 4-5，用二氯甲烷（200mL×1，100mL×3）萃取，用水（500mL×1）和鹽水（500mL×1）洗滌，無水硫酸鈉乾燥，並濃縮。將殘餘物溶解在少量二氯甲烷中，然後上樣到矽膠柱，用2-4% 甲醇/二氯甲烷溶離，合併組份並濃縮，得到3.8 g無色油狀物（93%收率）。ESI m/z $C_{16}H_{32}NO_8$ $[M+H]^+$ 計算值： 366.2，實測值： 366.2。

【0577】 實施例 380. 2,2-二甲基-4-側氧基-3,8,11,15,18-五氧雜-5-氮雜二十一烷-酯（342）的合成

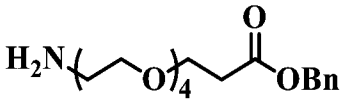


342

在 50 mL 單頸燒瓶中，將BocHN-PEG_4-$CH_2CH_2CO_2H$（0.81 g，2.22 mmol，1.0 eq.），K_2CO_3（0.92 g，6.66 mmol，3.0 eq.）和 NaI

（0.033 g，0.222 mmol，0.1 eq.）） 混合在 10 mL DMF 中，冰水浴冷卻，滴加 BnBr （0.57 g，3.33 mmol，1.5 eq.），將混合物升溫至室溫並攪拌隔夜。反應混合物用 100 mL 水稀釋，用 二氯甲烷 （100 mL × 2） 萃取，用水 （200 mL × 1） 和鹽水 （200 mL × 1） 洗滌，用無水硫酸鈉乾燥，濃縮。將殘餘物溶解在少量二氯甲烷中，上樣到矽膠柱，用70-90% EA/PE溶離，得到0.69 g無色油狀物（69%收率）。ESI m/z $C_{23}H_{38}NO_8$ $[M+H]^+$：計算值 446.3，實測值： 446.3。

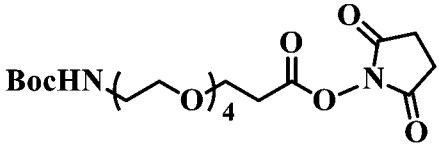
【0578】 實施例 381. 1-胺基-3,6,10,13-四氧雜十六烷-16-酯（343）的合成



343

將 BocHN-PEG_4-$CH_2CH_2CO_2Bn$（0.69 g，1.5 mmol，1.0 eq.）的 6 mL 二氯甲烷 和 3 mL TFA的溶液在室溫下攪拌30分鐘。除去溶劑，殘餘物與二氯甲烷共沸蒸發3次，置於高真空幫浦上。粗品直接用於下一步反應ESI m/z $C_{18}H_{30}NO_6$ $[M+H]^+$ 計算值： 356.2，實測值： 356.2。

【0579】 實施例 382. 2,5-二側氧基吡咯啶-1-基1-胺基-3,6,10,13-四氧雜十六烷-16-酯（344） 的合成

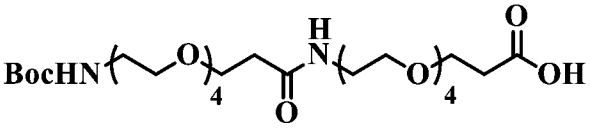


344

向BocHN-PEG_4-$CH_2CH_2CO_2H$（3.8 g，10.4 mmol，1.0 eq.）的 50 mL 無水 二氯甲烷 中加入NHS（1.4 g，12.5 mmol，1.2 eq.）和 EDC（10.0g，52.0mmol，5.0eq.）。反應在室溫下攪拌隔夜，然後用水（50 mL × 2）、鹽水（100 mL × 1）洗滌，用無水硫酸鈉乾燥，濃縮。粗產物直接用於下一步。ESI m/z $C_{20}H_{35}N_2O_{10}$ $[M+H]^+$ 計算值： 463.2，實

測值：463.2。

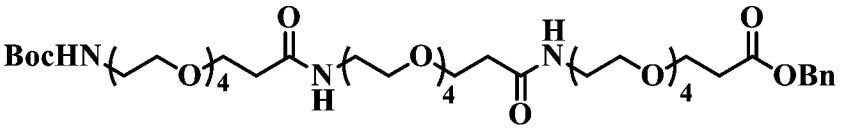
【0580】實施例 383. 2,2-二甲基-4,20-二側氧基-3,8,11,14,17,24,27,30,33-九氧雜-5,21-二氮雜三十六烷-36-酸（345）的合成



345

在 300 mL 燒瓶中，將 H_2N-PEG_4-$CH_2CH_2CO_2H$（2.8 g，10.4 mmol，1.0 eq.）和 K_2CO_3（4.3 g，31.2 mmol，3.0 eq.）溶于 40 mL 水中，冰水浴冷卻，並滴加上述NHS酯粗品（3.8 g，10.4 mmol，1.0 eq.）的40 mL 四氫呋喃溶液，將混合物升溫至室溫並攪拌隔夜。使用 1N $KHSO_4$ 將反應混合物的 pH 值調節至 4-5，用 二氯甲烷 （150 mL × 1，100 mL × 2） 萃取，用水 （200 mL × 1） 和鹽水 （200 mL × 1） 洗滌，用 無水硫酸鈉濃縮。將殘餘物溶解在少量二氯甲烷中，上樣到矽膠柱，用4-6% 甲醇/二氯甲烷溶離，得到無色油狀物（5.18 g，81%收率）。ESI m/z $C_{27}H_{53}N_2O_{13}$ $[M+H]^+$ 計算值： 613.3，實測值： 613.3。

【0581】實施例 384. 2,2-二甲基-4,20,36-三側氧基-3,8,11,14,17,24,27,30,33,40,43,46,49-十三氧雜-5,21,37-三氮雜五十二烷-52-酯（346）的合成

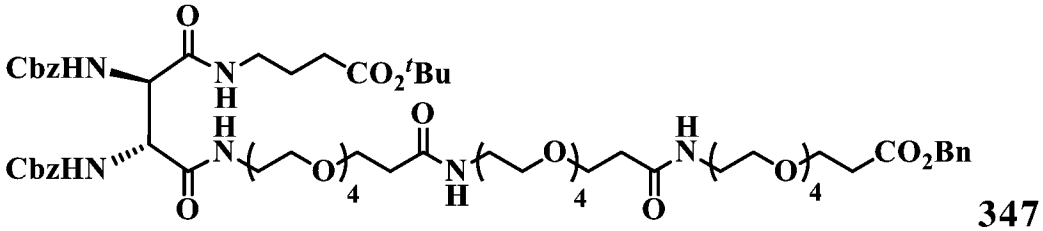


346

將H_2N-PEG_4-$CH_2CH_2CO_2Bn$ （上一步的粗產物）溶解在 3 mL DMF 中的溶液中，在冰/水浴上冷卻，加入 N,N-二異丙基乙胺（0.78 g，6.0 mmol，4.0 eq.），然後加入2,2-二甲基-4,20-二側氧基-3,8,11,14,17,24,27,30,33-九氧雜-5,21-二氮雜三十六烷-36-酸（0.93 g，

1.5 mmol，1.0 eq.） 的7 mL DMF 和 HATU （1.72 g，4.5mmol，3.0eq.）。反應液在冰浴上攪拌 2 小時，用 100 mL 水稀釋，用 二氯甲烷（100 mL × 3） 萃取，用 1N $KHSO_4$ （200 mL × 1）、飽和碳酸氫鈉（200 mL × 1） 洗滌，和鹽水（200 mL × 1），用無水硫酸鈉乾燥，濃縮。將殘餘物溶解在少量二氯甲烷中，上樣到矽膠柱上純化，用0-5% 甲醇/二氯甲烷溶離。合併組份並濃縮，得到1.0g淡黃色油狀物（71%收率）。ESI m/z $C_{45}H_{80}N_3O_{18}$ $[M+H]^+$ 計算值： 950.5，實測值： 950.5。

【0582】 實施例 385.（50R,51R）-1-苄基57-第三丁基50,51-雙（（苄氧基）羰基）胺基）-17,33,49,52- 四側氧基-4,7,10,13,20,23,26,29,36,39,42,45-十二氧雜-16,32,48,53-四氮雜五十七烷-1,57-二酯（347）的合成



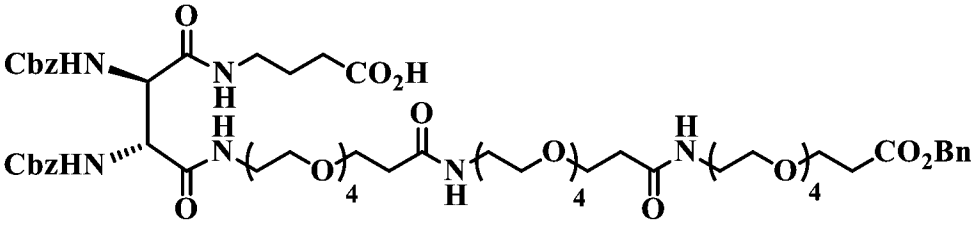
347

將 2,2- 二 甲 基 -4,20,36- 三 側 氧 基 -3,8,11,14,17,24,27,30,33,40,43,46,49-十三氧雜-5,21,37-三氮雜五十二烷-52-甲酸酯 （1.0 g，1.03 mmol，1.0 eq.） 的 6 mL 二氯甲烷 和 3 mL TFA 在室溫下攪拌 1 h。除去溶劑，殘餘物與二氯甲烷共沸蒸發3次，置於高真空幫浦上。

將粗產物重新溶於10 mL DMF中，用冰水浴冷卻。依次加入N,N-二異丙基乙胺（0.53 g，4.12 mmol，4.0 eq.）、化合物340（0.56 g，1.03 mmol，1.0 eq.）和HATU（1.17 g，3.09 mmol，3.0 eq.）。在冰浴上攪拌1小時後，加入100mL水，沉澱出固體。過濾收集固體並用水洗滌，溶

解在二氯甲烷中，用無水硫酸鈉乾燥，過濾並濃縮。將殘留物溶解在少量二氯甲烷中，上樣到矽膠柱上純化，用0-10% 甲醇/二氯甲烷溶離。合併組份並濃縮，得到0.93g淺黃色泡沫（收率65%）。ESI m/z $C_{68}H_{107}N_8O_{26}$ $[M+H]^+$ 計算值： 1451.7，實測值： 1451.7。

【0583】實施例 386. （52R,53R）-52,53-雙（（苄氧基）羰基）胺基）-3,19,35,51,54-五側氧基-1-苯基-2,6,9,12,15,22,25,28,31,38,41,44,47-十三氧雜-18,34,50,55-四氮雜五十九烷-59-酸（348）的合成

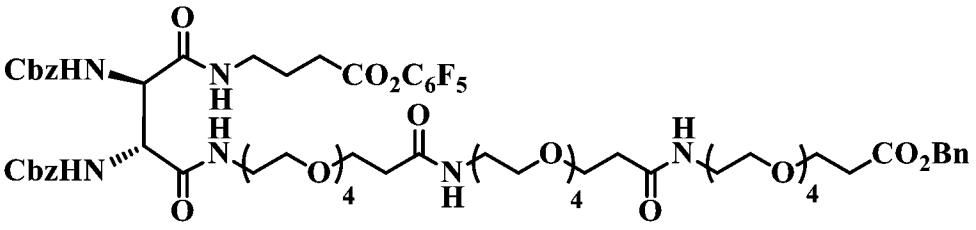


348

將（50R，51R）-1-苄基57-第三丁基50,51-雙（（苄氧基）羰基）胺基）-17,33,49,52-四側氧基-4,7,10,13,20,23,26,29,36,39,42,45-十二氧雜-16,32,48,53-四氮雜五十七烷-1,57-二酯（0.93 g，0.67 mmol，1.0 eq.）的 6 mL 二氯甲烷 與3 mL TFA在室溫下攪拌1 小時（藉由 LC-MS 監測反應的完成）。除去溶劑，殘餘物與二氯甲烷共沸蒸發3次，置於高真空幫浦上。將粗品溶於少量二氯甲烷中，上樣到矽膠柱上純化，用15-20% 甲醇/二氯甲烷溶離。合併組份並濃縮，得到0.53g白色泡沫（收率60%）產物。ESI m/z $C_{64}H_{99}N_8O_{26}$ $[M+H]^+$ 計算值： 1395.7，實測值： 1395.7。

【0584】實施例 387. （50R,51R）-1-苄基57-（五氟苯基）50,51-雙（（苄氧基）羰基）胺基）-17,33,49,52-四側氧基-4,7,10,13,20,23,26,29,36,39,42,45-十二氧雜-16,32,48,53-四氮雜五十七

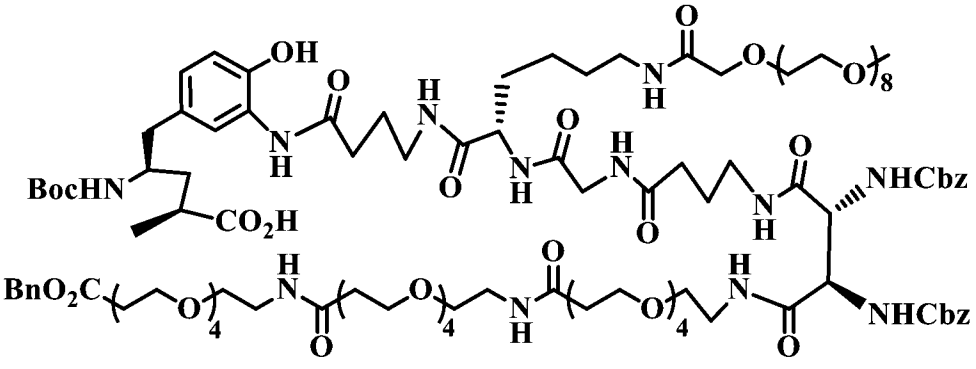
烷-1,57-二酯（349）的合成



349

向化合物 348（0.53 g，0.40 mmol，1.0 eq.）的 10 mL 二氯甲烷的溶液中加入五氟苯酚（0.081 g，0.44 mmol，1.1 eq.）和 EDC（0.38 g，2.0 mmol，5.0 eq.）。將反應混合物在室溫攪拌隔夜，然後用冷水（5 mL × 2）和鹽水（10 mL × 1）洗滌，用無水硫酸鈉乾燥，過濾並濃縮。粗產物直接用於下一步。ESI m/z $C_{70}H_{98}F_5N_6O_{26}$ $[M+H]^+$ 計算值：1561.6，實測值： 1561.6。

【0585】 實施例 388. （2S,4R）-5-（3-（（52S,53S,64S）-52,53-雙（（苄氧基）羰基）胺基）-3,19,35,51,54,59,62,65-八側氧基-64-（28-側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29-氮雜三十三烷-33-基）-1-苯基-2,6,9,12,15,22,25,28,31,38,41,44,47-十三氧雜-18,34,50,55,60,63,66-七氮雜七十醯胺基）-4-羥基苯基）-4-（（第三丁氧基羰基）胺基）-2-甲基戊酸（350） 的合成

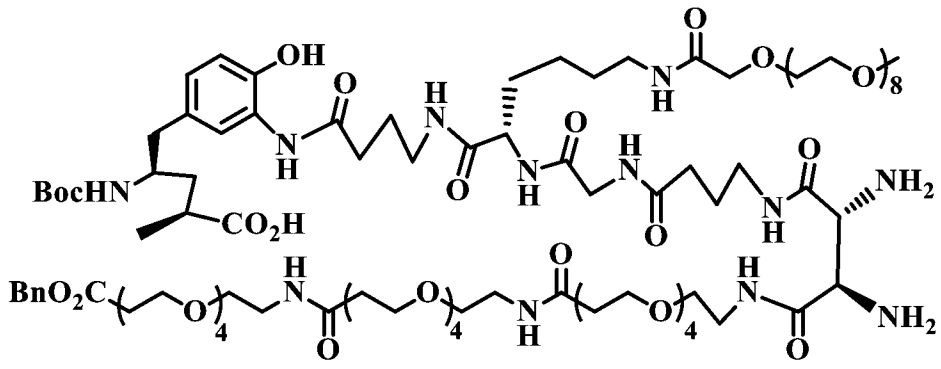


350

將上一步的粗品（0.40 mmol，1.0 eq.）溶解於10 mL DMF中，冰水浴冷卻，依次加入（2S,4R）-5-（3-（（S）-34-（2-胺基乙醯胺）-28,35-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29,36-二氮雜四胺基）-

4-羥基苯基）-4-（（第三丁氧基羰基）胺基）-2-甲基戊酸（0.420 g，0.406 mmol）和N,N-二異丙基乙胺（0.15 g，1.2 mmol）。冰浴攪拌1小時後，濃縮反應液，重新溶解在少量二氯甲烷中，上樣到矽膠柱上，用0-20% 甲醇/二氯甲烷溶離，得到無色油狀物（0.531 g，56%收率）。ESI m/z $C_{112}H_{179}N_{12}O_{41}$ $[M+H]^+$ 計算值： 2348.2291，實測值： 2348.2380。

【0586】 實施例 389. （2S,4R）-4-（（第三丁氧羰基）胺基）-5-（3-（（52S,53S,64S）-52,53-二胺基-3,19,35,51,54,59,62,65-八側氧基-64-（28-側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29-氮雜三十三烷-33-基）-1-苯基-2,6,9,12,15,22,25,28,31,38,41,44,47-十三氧雜-18,34,50,55,60,63,66-七氮雜七十醯胺基）-4-羥基苯基）-2-甲基戊酸（351）的合成

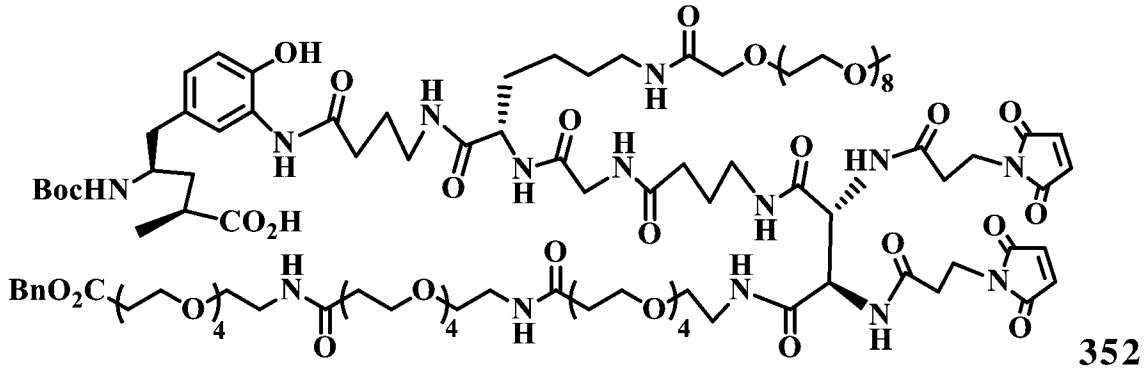


351

將化合物 350 （0.53 g，0.22 mmol） 和乾燥Pd/C（0.1 g，10% wt） 的 10 mL 甲醇混合物在 H_2 氣球下在室溫下攪拌隔夜。將反應液過濾，濾液濃縮，得粗品0.35g（收率76%），直接用於下一步反應。ESI m/z $C_{96}H_{167}N_{12}O_{37}$ $[M+H]^+$ 計算值： 2080.1556，實測值： 2080.1645。

【0587】 實施例 390. （2S,4R）-5-（3-（（52S,53S,64S）-52,53-雙（3-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丙醯胺基）-3,19,35,51,54,59,62,65-八側氧基-64-（28-側氧基-

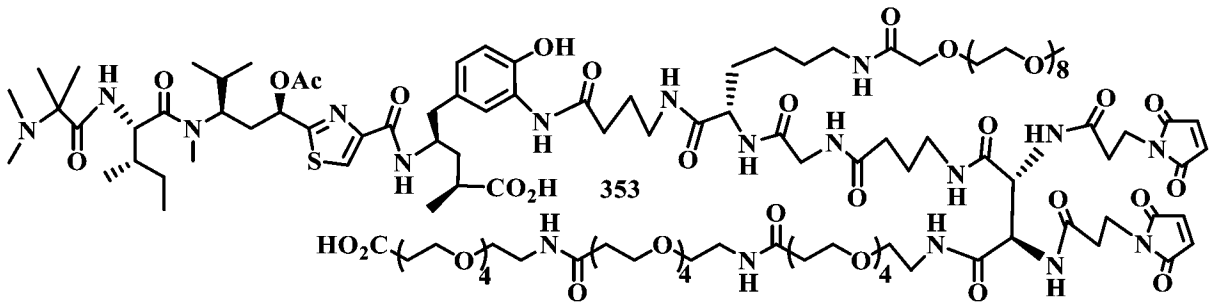
2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29-氮雜三十三烷-33-基）-1-苯基-2,6,9,12,15,22,25,28,31,38,41,44,47-十三氧雜-18,34,50,55,60,63,66-七氮雜七十醯胺基）-4-羥基苯基）-4-（（第三丁氧基羰基）胺基）-2-甲基戊酸（352）的合成



352

將上一步粗產物（0.350 g，0.168 mmol）溶解於5 mL乙醇和0.5 mL的 0.1M NaH_2PO_4混合物中，加入N-琥珀醯亞胺（3-馬來醯亞胺）丙酸酯（0.200 g，0.751 mmol）。將反應混合物在室溫攪拌隔夜，然後濃縮。將殘渣溶于少量水，上C-18凝膠柱，用100-20%水/甲醇溶離，合併含產物組份，濃縮冷凍乾燥得無色油狀產品（0.23 g，57%收率）。ESI m/z $C_{110}H_{177}N_{14}O_{43}$ $[M+H]^+$ 計算值： 2382，2095，實測值：2382.2190。

【0588】 實施例 391. （34S,45S,46S）-34-（（4-（（2S,4S）-2-（2-（（6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-9-異丙基-2,3,3,8-四甲基-4,7,13-三側氧基-12-氧雜-2,5,8-三氮雜十四烷-11-基）噻唑-4-甲醯胺基）-4-羧基戊基）-2-羥基苯基）胺基）二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丙醯胺基）-28,36,39,44,47,63,79-七側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26,51,54,57,60,67,70,73,76,83,86,89,92-二十一氧雜-29,35,38,43,48,64,80-七氮雜九十五烷-95-酸（353） 的合成



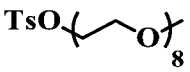
353

將化合物 352 （0.131 g，0.0546 mmol） 溶解於 2 mL 的二氯甲烷中，並在室溫下與 2 mL 的TFA 一起攪拌3 小時。除去溶劑，殘餘物與二氯甲烷共濃縮3次，置於高真空幫浦上。

將粗產物重新溶解於DMF（1.2mL）中並在冰水浴上冷卻。五氟苯基2-（（6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-9-異丙基-2,3,3,8-四甲基-4,7,13-三側氧基-12-氧雜-2,5,8-三氮雜十一烷-11-基）噻唑-4-羧酸酯（五氟苯酚） （0.048 g，0.0690 mmol），然後加入 N,N-二異丙基乙胺（0.10 g）。將反應在冰浴上攪拌1小時，然後使用甲酸將pH調節至4-5。將混合物濃縮，再溶於少量二氯甲烷，上樣到矽膠柱，用甲醇/二氯甲烷（1：10至1：4，均含0.1%甲酸）溶離。

合併含有產物的級分並濃縮，得到0.112g黃色泡沫（兩步收率為75%）。產物藉由製備HPLC（15-50% 乙腈/水，含有0.1%甲酸）進一步純化。將組分合併並濃縮，得到無色油狀物（0.084 g，57%收率）。ESI m/z $C_{123}H_{203}N_{18}O_{46}S$ $[M+H]^+$ 計算值： 2700.3820，實測值：2700.3925。

【0589】 實施例 392. 2,5,8,11,14,17,20,23-八氧雜二十五烷-25-基4-甲基苯磺酸酯（354）的合成

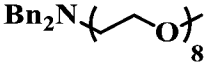


354

在冰浴上，向$mPEG_8$-OH（10 g，26 mmol，1.0eq）的100 mL無水

二氯甲烷中的溶液中，依次加入TEA（10.5 g，104 mmol，4.0eq），DMAP（32 mg，0.26 mmol，0.01eq）和TsCl（14.9g，78mmol，3.0eq）。將反應在0℃下攪拌10分鐘，然後升溫至室溫，攪拌隔夜，將反應液用1N 鹽酸（100mL×1），水（100mL×1）和鹽水（100mL×1）洗，用無水硫酸鈉乾燥，過濾並濃縮。將殘餘物溶於少量二氯甲烷中，並上樣至矽膠柱，用乙酸乙酯 / PE（5-100%）和1-3%甲醇 / 二氯甲烷溶離。合併組分並濃縮，得到黃色油狀物（11.6g，83%收率）。ESI m / z $C_{24}H_{43}O_{11}S$ $[M+H]^+$：計算值539.2，實測值539.2。

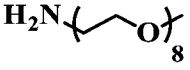
【0590】實施例 393. N,N-二苄基-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧雜二十五烷-25-胺（355）的合成



355

將2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23-八氧雜二十五烷-25-基 4-甲基苯磺酸鹽（11.6g，21.5mmol，1.0eq）和二苄基胺（5.5g，27.8mmol，1.5eq）的20mL無水DMF的混合物攪拌加熱至100℃。反應用300mL 二氯甲烷稀釋，用水（300mL×3）和鹽水（300mL×1）洗滌，用無水硫酸鈉乾燥，過濾並濃縮。將殘餘物在矽膠柱上純化（50-100%乙酸乙酯 / PE），得到淺黃色油狀物（8.2g，66%收率）。ESI m / z $C_{31}H_{50}NO_8$ $[M+H]^+$：計算值564.3，實測值 564.3。

【0591】實施例 394. 2,5,8,11,14,17,20,23-八氧雜二十五烷-25-胺（356）的合成

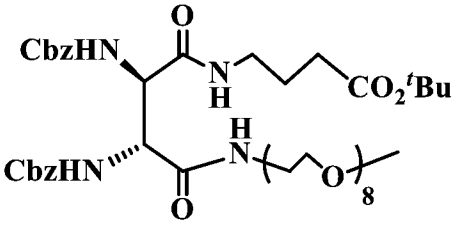


356

將N,N-二苄基-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧雜二十五烷-25-胺的溶液混合物（8.6g，15.2mmol，1.0eq）及乾燥的Pd/C（0.9g，10wt%）和

100mL無水甲醇混合物在H_2氣球下回流隔夜。濾出觸媒並用甲醇洗滌，濃縮濾液，得到5.3g無色油狀物（收率90%）。ESI m / z計算值$C_{17}H_{38}NO_8$ $[M+H]^+$：計算值384.3，實測值 384.3。

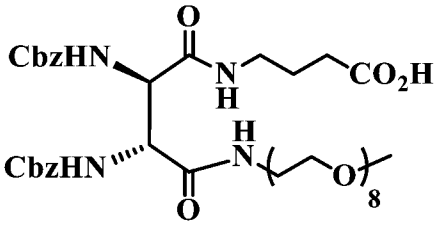
【0592】實施例 395.（28R,29R）-第三丁基28,29-雙（（苄氧基）羰基）胺基）-27,30-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧雜-26,31-二氮雜三十五烷-35-酯（357）的合成



357

向化合物340（1.6 g，2.84 mmol，1.0 eq）和2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23-八氧雜二十五烷-25-胺（1.2 g，2.84 mmol，1.0 eq）的5 mL無水DMF溶液中，在冰水浴上依次加入HATU（3.2 g，8.52 mmol，3.0 eq）和N,N-二異丙基乙胺（ 1.5g，11.36mmol，4.0eq）。將反應在冰浴上攪拌2小時，然後加入150mL水，並用二氯甲烷（150mL×1、100mL×1）萃取。有機相用1N 鹽酸（200mL×1），飽和碳酸氫鈉（200mL×1）和鹽水（200mL×1）洗滌，用無水硫酸鈉乾燥，過濾並濃縮。將粗產物溶於少量二氯甲烷中，並上樣至矽膠柱，然後用0-5%甲醇 / 二氯甲烷溶離。合併組分並濃縮，得到2.29g白色固體（87%收率）。ESI m / z $C_{45}H_{71}N_4O_{16}$ $[M+H]^{++}$：計算值923.5，實測值 923.5。

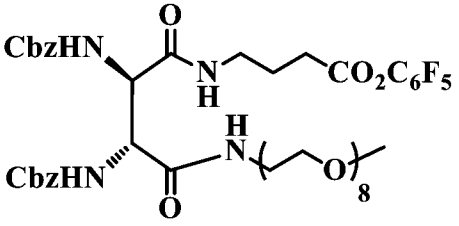
【0593】實施例 396.（28R,29R）-28,29-雙（（苄氧基）羰基）胺基）-27,30-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧雜-26,31-二氮雜三十五烷-35-酸（358）的合成



358

將化合物 357 （2.29 g，2.48 mmol） 的 5 mL 二氯甲烷 和 5 mL TFA混合物在室溫下攪拌3 小時。除去溶劑，殘渣與二氯甲烷共沸蒸發3次，殘渣溶於少量二氯甲烷，上樣到矽膠柱上，5-8% 甲醇/二氯甲烷溶離。合併組份並濃縮，得到2.09g白色膠狀固體（97%收率）。ESI m/z $C_{41}H_{63}N_4O_{16}$ $[M+H]^+$ 計算值： 867.4，實測值：867.4。

【0594】 實施例 397. （28R,29R）-五氟苯基28,29-雙（（苄氧基）羰基）胺基）-27,30-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧雜-26,31-二氮雜三十五烷-35-酯（359） 的合成

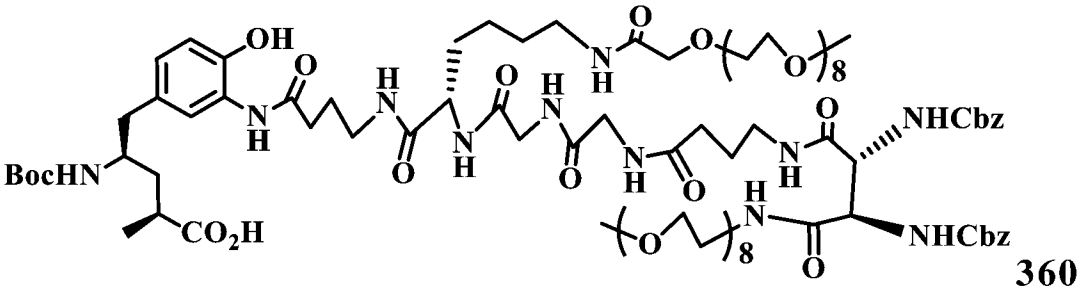


359

在冰水浴上，向化合物**358** （1.5 g，1.73 mmol，1.0 eq.） 的 10 mL 二氯甲烷中加入五氟苯酚（0.35 g，1.90 mmol，1.1 eq.）和 EDC （1.7 g，8.66 mmol，5.0 eq.）。將反應升溫至室溫。攪拌5小時，用水（10mL×2）、鹽水（20mL×1）洗滌，無水硫酸鈉乾燥，過濾濃縮，得粗品1.07g，60%收率。ESI m/z $C_{47}H_{62}F_5N_4O_{16}$ $[M+H]^+$ 計算值：1033.4，實測值：1033.4。

【0595】 實施例 398. （2S,4R）-5-（3-（（28S,29S,43S）-28,29-雙（（苄氧基）羰基）胺基）-27,30,35,38,41,44-六側氧基-43-（28-側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29-氮雜三十三烷-33-基）-

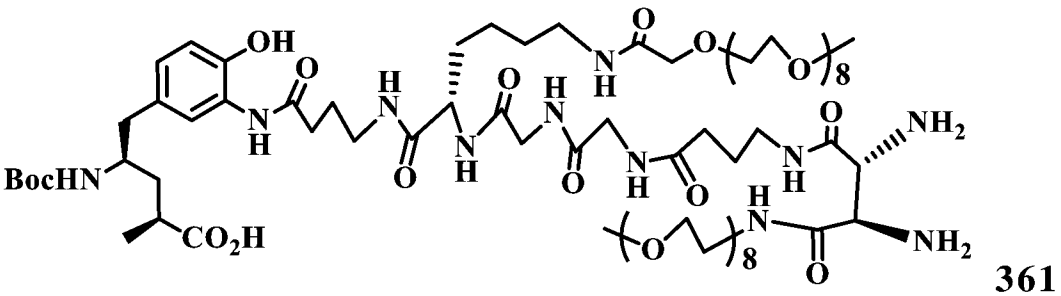
2,5,8,11,14,17,20,23-八氧雜-26,31,36,39,42,45-六氮雜二十九烷胺基）-4-羥基苯基）-4-（（第三丁氧基羰基）胺基）-2-甲基戊酸（360）的合成



360

在冰水浴中，向上述粗品（1.07 g，1.00 mmol）的10 mL DMF溶液中，加入（2S,4R）-5-（3-（（S）-34-（2-（2-胺基乙醯胺基）乙醯胺基））-28,35-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29,36-二氮雜四十四醯胺）-4-羥基苯基）-4-（（第三丁氧基羰基）胺基）-2-甲基戊酸（1.091 g，1.00 mmol）和N,N-二異丙基乙胺（0.39 g，3.0 mmol）。將反應在冰水浴中攪拌 1 小時，並用 1N 鹽酸 調節 pH 4-5，用 乙酸乙酯（100 mL） 稀釋，用水 （30 mL × 5） 萃取。濃縮水相，然後重新溶解於少量二氯甲烷中，上樣至矽膠柱，用15-18% 甲醇 / 二氯甲烷溶離。將合併組分並濃縮，得到0.88g無色油狀物（51%收率）。ESI m/z $C_{91}H_{148}N_{11}O_{34}$ $[M+H]^+$ 計算值： 1939.0191，實測值：1939.0280。

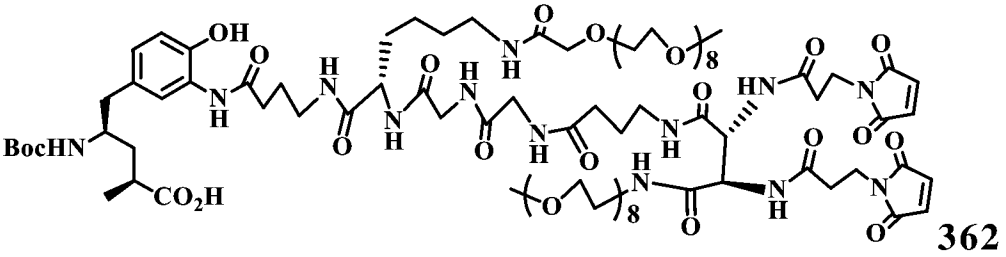
【0596】 實施例 399. （2S,4R）-4-（（第三丁氧羰基）胺基）-5-（3-（（28S,29S,43S）-28,29-二胺基-27,30,35,38,41,44-六側氧基-43-（28-側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29-氮雜三十三烷-33-基）-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧雜-26,31,36,39,42,45-六氮雜九十四醯胺基）-4-羥基苯基）-2-甲基戊酸（361）的合成



361

將前述化合物（0.921 g，0.475 mmol）和Pd/C（0.10 g，10 wt%）的 15 mL 甲醇混合物在 H_2 氣球下在室溫下攪拌隔夜。過濾觸媒，濃縮濾液，得粗品0.780g（97%收率），直接用於下一步反應。ESI m/z 計算值 $C_{75}H_{136}N_{11}O_{30}$ $[M+H]^+$： 1670.9455，實測值：1670.9560。

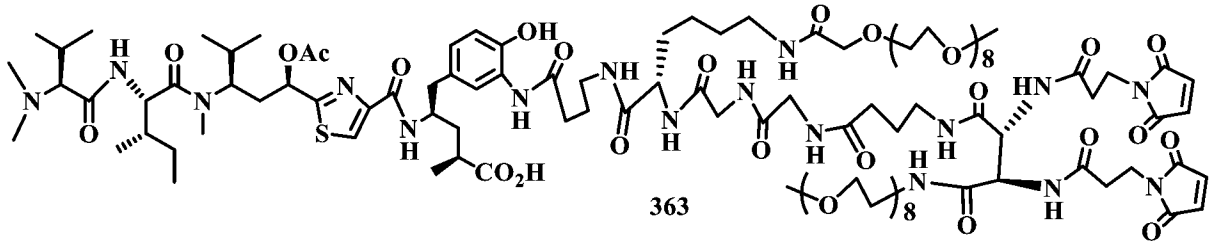
【0597】 實施例 400. （2S,4R）-5-（3-（（28S,29S,43S）-28,29-雙（3-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丙醯胺基）-27,30,35,38,41,44-六側氧基-43-（28-側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29-氮雜三十三烷-33-基）-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧雜-26,31,36,39,42,45-六氮雜九十四醯胺基基）-4-羥基苯基）-4-（（第三丁氧基羰基）胺基）-2-甲基戊酸（362）的合成



362

將上一步的粗品（0.751 g，0.450 mmol）溶於8 mL乙醇和1.2 mL 0.1 M NaH_2PO_4的混合物中，加入N-琥珀醯亞胺（3-馬來醯亞胺）丙酸酯（0.202 g，0.758 mmol）。將反應混合物在室溫攪拌隔夜，然後濃縮。將殘餘物溶解在少量水中，上樣到C-18凝膠柱上，用0-50% 甲醇/水溶離，得到無色油狀物（0.603 g，68%收率）。ESI m/z $C_{89}H_{146}N_{13}O_{36}$ $[M+H]^+$ 計算值： 1972.9994，實測值：1973.0090。

【0598】實施例 401.（2S,4S）-5-（3-（（28S,29S,43S）-28,29-雙（3-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丙醯胺基）-27,30,35,38,41,44-六側氧基-43-（28-側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29-氮雜三十三烷-33-基）-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧雜-26,31,36,39,42,45-六氮雜四十九醯胺基）-4-羥基苯基）-4-（2-（（3S,6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-3,9-二異丙基-2,8-二甲基-4,7,13-三側氧基-12-氧雜-2,5,8-三氮雜十四烷-11-基）噻唑-4-甲醯胺基）-2-甲基戊酸（363）



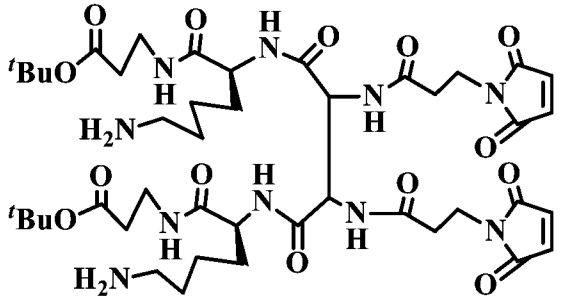
363

將化合物 362（0.291 g，0.147 mmol）的 3 mL 二氯甲烷和 1 mL TFA 溶液在室溫下攪拌0.5 小時。除去溶劑，殘餘物與二氯甲烷/甲苯共沸蒸發3次，置於高真空幫浦上。

將粗產物重新溶解在5mL DMF中並在冰水浴上冷卻。五氟苯基2-（（3S,6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-3,9-二異丙基-2,8-二甲基-4,7,13-三側氧基-12-氧雜-2,5,8-三氮雜十四烷-11-基）噻唑-4-甲酸酯（0.121g，0.171 mmol）和N,N-二異丙基乙胺（0.265 g，2.07 mmol）。反應在冰浴上攪拌1小時，然後用甲酸酸化至 pH 4-5。將混合物濃縮，重新溶解在少量二氯甲烷中，上樣到矽膠柱上，用甲醇/二氯甲烷（1：6至1：3，含0.1%甲酸）溶離。將組份合併並濃縮，得到0.213g黃色泡沫產物（兩步收率為61%）。產物藉由製備C-18 HPLC（25-50%乙腈/水，含有0.1%甲酸）進一步純化。將組份合併濃縮，凍乾得到無色

油狀物（0.171 g，兩步收率48%）。ESI m/z $C_{110}H_{180}N_{17}O_{39}S$ $[M+H]^+$ 計算值： 2395.2346，實測值： 2395.2440。

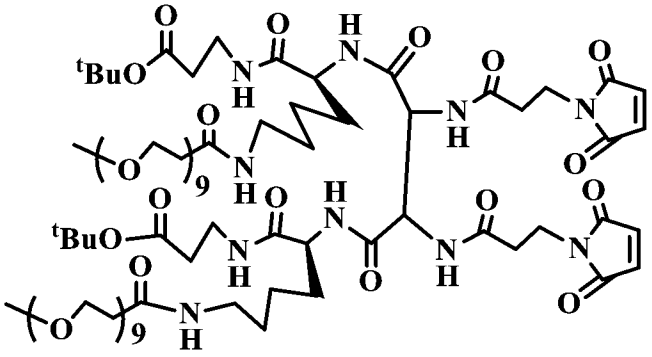
【0599】 實施例 402. （6S,13S）-二第三丁基6,13-雙（4-胺基丁基）-9,10-雙（3-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丙醯胺基）-5,8,11,14-四側氧基-4,7,12,15-四氮雜十八烷-1,18-二酯（364）的合成



364

向化合物 234 （8.50 g，6.80 mmol） 的甲醇 （100 mL）溶液中加入NH_4F （0.80 g，21.62 mmol） 和一滴 1.0 M 鹽酸 （~0.010 mL）。反應在室溫下繼續攪拌 2 小時，然後在 50 ℃下攪拌 2 小時。然後將混合物用DMF（30 mL）稀釋，真空蒸發並用油真空幫浦乾燥，得到粗產物（8.19 g，>100%收率），無需進一步純化即可用於下一步。ESI MS m/z 961.53 （$[M+H]^+$）。

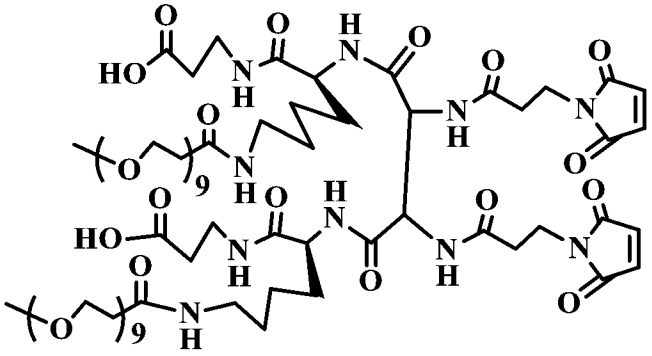
【0600】 實施例 403. （6S,13S）-二第三丁基9,10-雙（3-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丙醯胺基）-5,8,11,14-四側氧基-6,13-雙（29-側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-30-氮雜三十四烷-34-基）-4,7,12,15-四氮雜十八烷-1,18-二酯（365） 的合成



365

向上述粗化合物 （8.19 g，~ 6.80 mmol） 的 DMA（100 mL）溶液中加入 2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29-酸 （6.92 g，15.17 mmol） 和 EDC·HCl （6.30 g，33.15 mmol）。將反應混合物在室溫攪拌8 小時，然後濃縮，用水 （50 mL） 稀釋並用乙酸乙酯 （3 × 80 mL） 萃取。合併有機相用無水硫酸鈉乾燥，過濾，濃縮，上樣到矽膠柱上（10% -30% 甲醇/二氯甲烷）純化，得到無色油狀物（6.51 g，兩步收率 52%）。ESI MS m/z 1839.09 $[M+H]^+$。

【0601】 實施例 404.（6S,13S）-9,10-雙（3-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丙醯胺基）-5,8,11,14-四側氧基-6,13-雙（29-側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-30-氮雜三十四烷-34-基）-4,7,12,15-四氮雜十八烷-1,18-二酸（366）

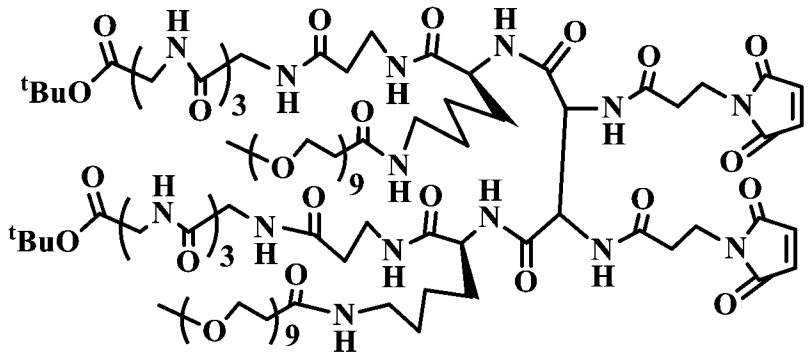


366

將上述化合物 （6.49 g，3.53 mmol） 的二惡烷 （30 mL） 溶液在 0 °C 下與濃 鹽酸 （10 mL） 反應 30 min，然後用甲苯 （50 mL） 稀釋，濃縮並上樣到短矽膠柱上，用10 -25%甲醇/二氯甲烷溶離，得到無色油狀物（5.47 g，90%收率）。ESI MS m/z 1725.88 （$[M+H]^+$）。

【0602】 實施例 405. （18S,25S）-二第三丁基21,22-雙（3-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丙醯胺基）-4,7,10,13,17,20,23,26,30,33,36,39-十二側氧基-18,25-雙（29-側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九側氧基-30-氮雜三十四烷-34-基）-

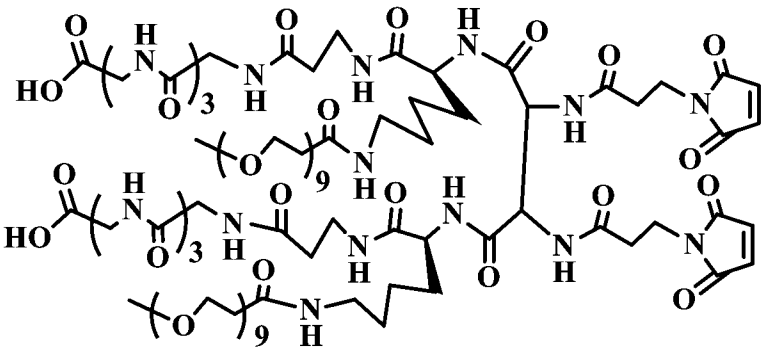
3,6,9,12,16,19,24,27,31,34,37,40-十二氮雜四十二烷-1,42-二酯（367）的合成



367

向化合物 366 （5.40 g，3.13 mmol） 的 DMA （100 mL）溶液中加入 2-（2-（2-（2-胺基乙醯胺基）乙醯胺基）乙醯胺基）乙酸第三丁酯（H-Gly-Gly-Gly-Gly-OtBu） （2.50 g，8.27 mmol） 和 EDC·HCl （5.50 g，28.94 mmol）。將反應混合物在室溫攪拌8 小時，然後濃縮，用水 （50 mL） 稀釋並用乙酸乙酯 （3 × 80 mL） 萃取。合併的有機相用無水硫酸鈉乾燥，過濾，濃縮，用矽膠柱（5% -20% 甲醇/二氯甲烷）純化，得到無色油狀產物（5.95 g，83%收率）。ESI MS m/z 2294.52（$[M+H]^+$）。

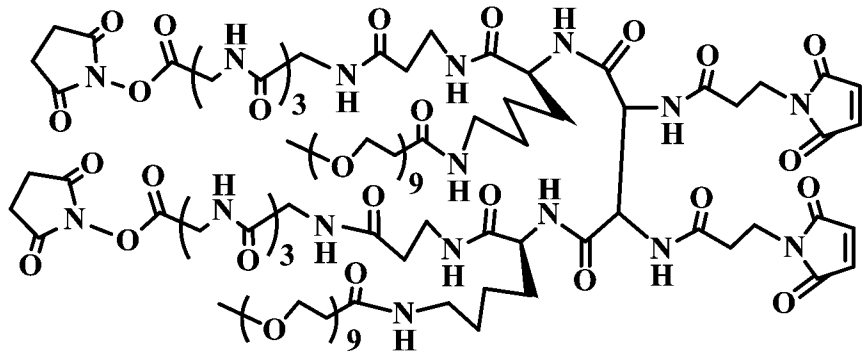
【0603】實施例 406. （18S,25S）-21,22-雙（3-（2,5-二側氧基-2,5- 二 氫 -1H- 吡 咯 -1- 基 ） 丙 醯 胺 基 ） -4,7,10,13,17,20,23,26,30,33,36,39-十二側氧基-18,25-雙（29-側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26- 九 氧 雜 -30- 氮 雜 三 十 四 烷 -34- 基 ） -3,6,9,12,16,19,24,27,31,34,37,40-十二氮雜四十二烷-1,42-二酸 （**368**）的合成



368

在 0 °C 下，將化合物 367 （5.90 g，2.57 mmol） 的二惡烷 （30 mL）溶液與濃 鹽酸 （10 mL） 反應 30 分鐘，然後用甲苯 （50 mL） 稀釋，濃縮並上樣到 矽膠柱上，用10 -30%甲醇/二氯甲烷溶離，得到無色油狀產物（4.60 g，82%收率）。ESI MS m/z 2182.33 （$[M+H]^+$）.

【0604】 實施例 407. （17S,24S）-雙（2,5-二側氧基吡咯啶-1-基） 20,21-雙（3-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丙醯胺基）-4,7,9,12,16,19,22,25,29,32,35,38-十二側氧基-17,24-雙（29-側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-30-氮雜三十四烷-34-基）-3,6,8,11,15,18,23,26,30,33,36,39-十二氮雜四十一烷-1,41-二酯（369）的合成

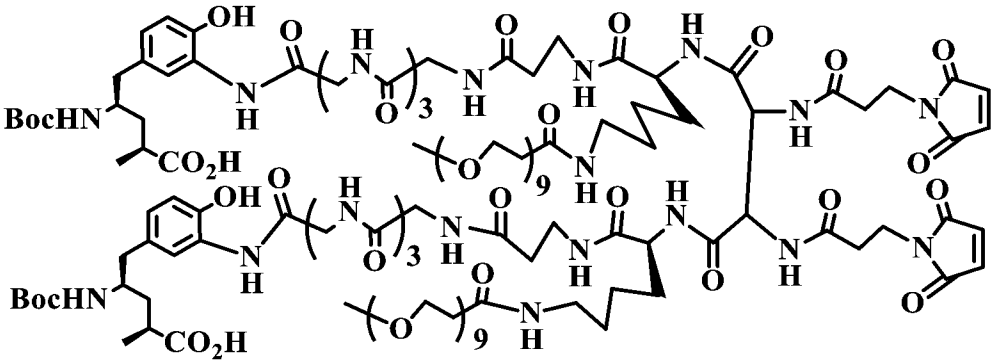


369

向化合物 368 （2.30 g，1.05 mmol） 和 NHS （0.270 g，2.34 mmol） 的 DMF （25 mL）的混合物中加入 EDC （0.785 g，4.08 mmol）。將混合物攪拌6小時，濃縮並在矽膠柱上純化，用乙酸乙酯/二氯甲烷（1：5-1：1）溶離，得到標題化合物（1.88 g，76%收率）。ESI

MS m/z 2362.05 （[M+H]$^+$）。

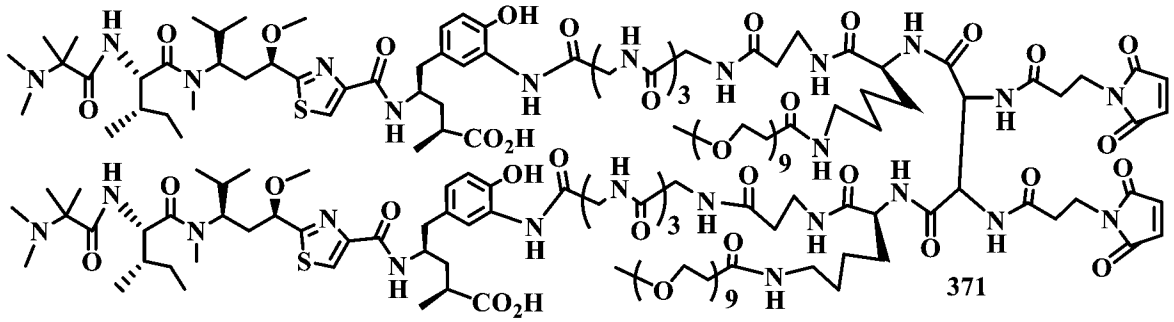
【0605】 實施例 408. （2S,2's,4R,4'R）-5,5'-（（（（17S,24S）-20,21-雙（3-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丙醯胺基）-4,7,9,12,16,19,22,25,29,32,35,38-十二側氧基-17,24-雙（29-側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-30-氮雜三十四烷-34-基）-3,6,8,11,15,18,23,26,30,33,36,39-十二氮雜四十一烷-1,41-二醯基）雙（氮雜二基））雙（4-羥基-3,1-亞苯基））雙（4-（（第三丁氧基羰基）胺基）-2-甲基戊酸）（370） 的合成



370

向（2S,4R）-5-（3-胺基-4-羥基苯基）-4-（（第三丁氧基羰基）胺基）-2-甲基戊酸 （201 mg，0.594 mmol） 的 DMA （10 mL） 和0.1M NaH_2PO_4（pH 7.5，5mL）緩衝液的混合物中在1小時內分四份加入化合物369（712mg，0.301mmol）。將混合物再攪拌 2 小時，濃縮，在 C-18 HPLC 上純化，用水/甲醇（從 100% 水至 50% 水）溶離，合併組份並濃縮，並在真空油幫浦上乾燥 得到標題化合物（519 mg，62%收率）。MS-ESI m/z： [M+H]$^+$ $C_{125}H_{199}N_{22}O_{50}$計算值，2808.3706；實測值，2808.3790。

【0606】 實施例 409. 化合物 **371的合成**

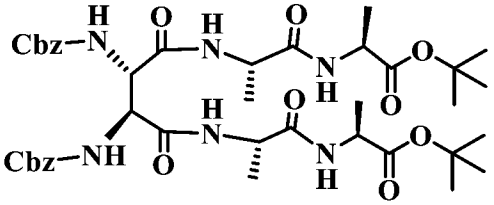


371

將化合物 370 （251 mg，0.0894 mmol）溶解於 2 mL 二惡烷溶液中，加入 鹽酸 （濃 0.5 mL）。混合物在室溫下攪拌45 min，用甲苯稀釋，濃縮，殘渣與DMF（5 mL）共濃縮3次，置於高真空幫浦上。

將粗產物重新溶解在DMF（4mL）中並在冰水浴上冷卻。然後加入五氟苯基 2-（（6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-9-異丙基-2,3,3,8-四甲基-4,7-二側氧基-12-氧雜-2,5,8-三氮雜十一烷-11-基） 噻唑-4-羧酸酯 （145 mg，0.218 mmol），再加入N,N-二異丙基乙胺 （0.4 mL）。反應在室溫下攪拌1 小時，然後濃縮，用 DMF （4 mL） 稀釋，用甲酸調節 pH 至 4-5，並藉由製備型 C-18 HPLC 純化（15-50% 乙腈/水，含 0.1% 甲酸）。合併組份濃縮，凍乾，得到無色泡沫（193mg，兩步收率 61%）產物。ESI m/z $C_{163}H_{263}N_{30}O_{54}S_2$ $[M+H]^+$ 計算值： 3568.8198，實測值： 3588.8320。

【0607】 實施例 410. （2S,5S,8S,9S,12S,15S）-二第三丁基8,9-雙（（苄氧基）羰基）胺基）-2,5,12,15-四甲基-4,7,10,13-四側氧基-3,6,11,14-四氮雜十六烷-1,16-二酯（372）的合成

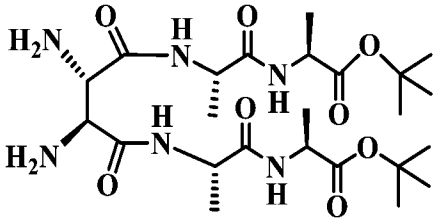


372

在約 0 °C 下，向 （S）-2-（（S）-2-胺基丙醯胺基）丙酸第三丁酯（2.00 g，5.0 mmol） 的 DMF （30 mL）溶液中加入二苄基

（（3S,4S）-2,5-二側氧基四氫呋喃-3,4-二基）二胺基甲酸酯（127，2.16 g，10.0 mmol）。將混合物在0°C攪拌30分鐘，然後室溫攪拌45分鐘，然後重新冷卻至約0°C，然後加入N,N-二異丙基乙胺（640 mg，5.0 mmol）和EDC（5.21 g，27.1 mmol）。將反應混合物升溫至室溫並攪拌1小時，然後用二氯甲烷（350mL）稀釋，用飽和$NaHCO_3$（150mL）、水（100mL）洗滌，用無水硫酸鈉乾燥，過濾並濃縮。殘餘物經柱層析（100：0至10：1二氯甲烷/甲醇）純化，得到標題化合物（2.71 g，67%收率）。MS-ESI m/z： $[M+H]^+$ $C_{40}H_{56}N_6O_{12}$計算值，813.40；實測值，813.40。

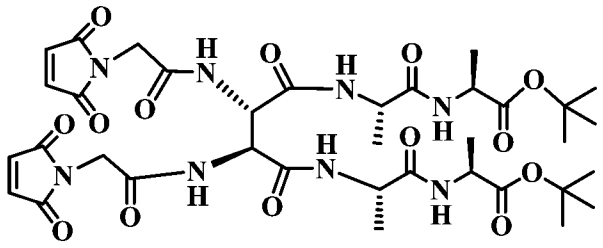
【0608】實施例 411.（2S,5S,8S,9S,12S,15S）-二第三丁基8,9-二胺基-2,5,12,15-四甲基-4,7,10,13-四側氧基-3,6,11,14-四氮雜十六烷-1,16-二酯（373）的合成



373

將化合物372 （2.65 g，3.21 mmol），10%Pd/C（100 mg）和甲醇（60 mL）的混合物在氫氣下攪拌隔夜。濾出固體並濃縮濾液，得到無色油狀物（1.762g，100%收率）。ESI m/z： $[M+H]^+$ 計算值 $C_{24}H_{44}N_6O_8$，545.32；實測值，545.32。

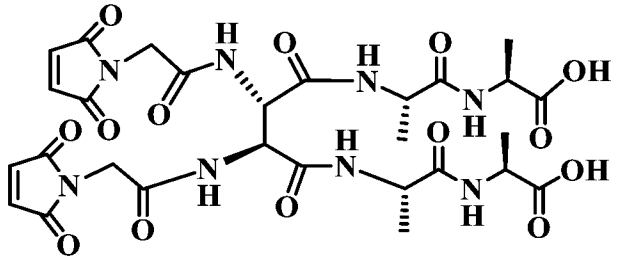
【0609】實施例 412.（2S,5S,8S,9S,12S,15S）-二第三丁基8,9-雙（2-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）乙醯胺基）-2,5,12,15-四甲基-4,7,10,13-四側氧基-3,6,11,14-四氮雜十六烷-1,16-二酯（374）的合成



374

向化合物 373（1.76 g，3.23 mmol）的 DMF（50 mL）溶液中加入 2-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）乙酸（1.25 g，8.06 mmol）和 EDC（2.82 g，14.68 mmol）。將反應混合物攪拌隔夜，濃縮，藉由矽膠柱純化（二氯甲烷/甲醇=100：0-10：1），得到標題化合物（2.21g，78%收率）。MS-ESI m/z： $[M+H]^+$ $C_{40}H_{58}N_8O_{14}$計算值，875.41；實測值875.41。

【0610】實施例 413.（2S,5S,8S,9S,12S,15S）-8,9-雙（2-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）乙醯胺基）-2,5,12,15-四甲基-4,7,10,13-四側氧基-3,6,11,14-四氮雜十六烷-1,16-二酸（375）的合成

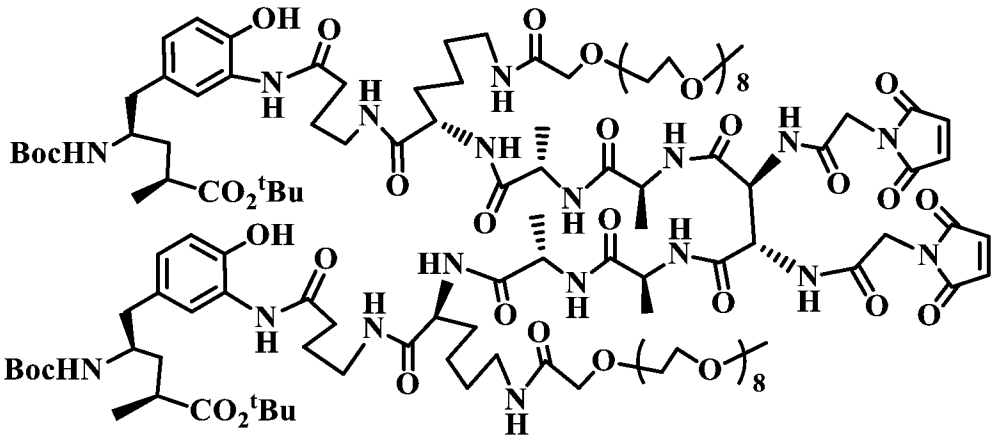


375

將化合物 374（1.21 g，1.38 mmol）的二惡烷（20 mL）和濃鹽酸（5 mL）反應0.5 小時。將反應混合物用甲苯（10mL）稀釋，蒸發並用油真空幫浦乾燥，得到標題產物（1.05g，100%收率），其無需進一步純化直接用於下一步。MS-ESI m/z： $[M+H]^+$ $C_{32}H_{42}N_8O_{14}$計算值，763.28；實測值，763.28。

【0611】實施例 414.（2S,2's,4R,4'R）-二第三丁基 5,5'-（（（（7S,10S,13S,16S,17S,20S,23S,26S）-16,17-雙（2-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）乙醯胺基）-10,13,20,23-四甲基-

6,9,12,15,18,21,24,27-八側氧基-7,26-雙（28-側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29-氮雜三十三烷-33-基）-5,8,11,14,19,22,25,28-八氮雜三十二烷-1,32-二醯基）雙（氮雜二基））雙（4-羥基-3,1-亞苯基））雙（4-（（（第三丁氧基羰基）胺基）-2-甲基戊酸酯）（376）的合成

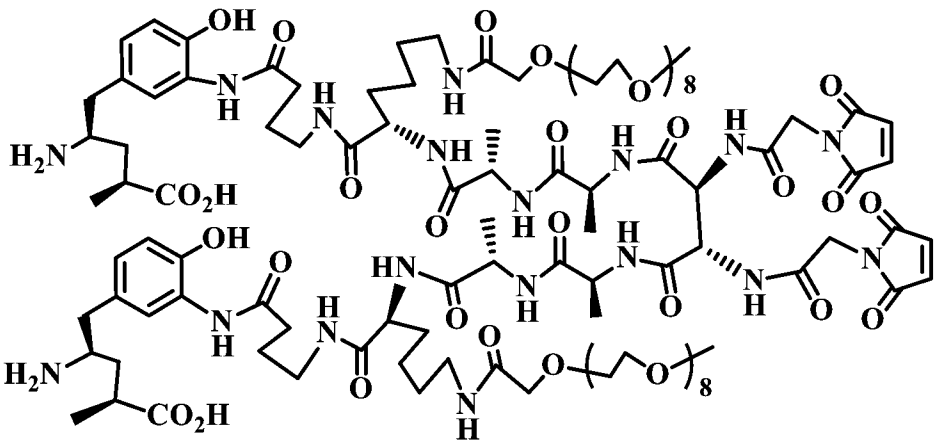


376

向上述步驟化合物 375 （1.001 g，1.31 mmol） 的 四氫呋喃 （50 mL） 溶液中加入 （2S,4R）-5-（3-（（S）-34-胺基-28,35-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29,36-二氮雜四十四醯胺）-4-羥基苯基）-4-（（第三丁氧基羰基）胺基）-2-甲基戊酸第三丁酯 （2.801 g，2.650 mmol）、溴代三吡咯啶基鏻六氟磷酸鹽 （PyBroP） （1.842 g，3.951 mmol） 和 DMAP （0.311 g，2.536 mmol）。將混合物攪拌隔夜，蒸發，上樣到矽膠柱上純化，用甲醇/二氯甲烷（1：10）溶離，得到標題化合物（2.613 g，73% 收率）。MS-ESI m/z： $[M+H]^+$ $C_{128}H_{209}N_{18}O_{46}$計算值，2734.4569；實測值2734.4675。

【0612】實施例 415. （2S,2's,4R,4'R）-5,5'-（（（（7S,10S,13S,16S,17S,20S,23S,26S）-16,17-雙（2-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）乙醯胺基）-10,13,20,23-四甲基-6,9,12,15,18,21,24,27-八側氧基-7,26-雙（28-側氧基-

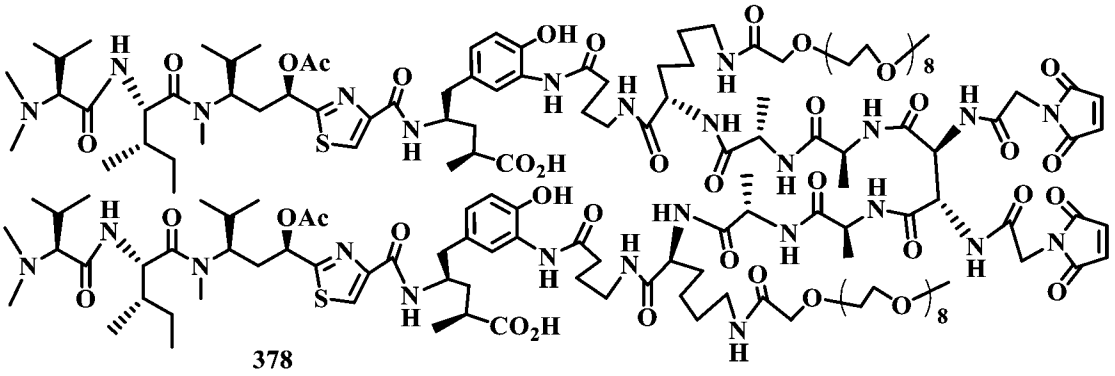
2,5,8,11,14,17,20,23,26- 九 氧 雜 -29- 氮 雜 三 十 三 烷 -33- 基 ） -5,8,11,14,19,22,25,28-八氮雜三十二烷-1,32-二醯基）雙（氮雜二基））雙（4-羥基-3,1-亞苯基））雙（4-胺基-2-甲基戊酸）鹽酸鹽（377） 的合成



377

化合物 376（2.610 g，0.954 mmol）的二惡烷（20 mL）溶液 和鹽酸（濃 5 mL）反應0.5 小時。將反應混合物用甲苯（10mL）稀釋，蒸發並在油真空幫浦上乾燥，得到標題產物（2.315g，100%收率），其無需進一步純化直接用於下一步。MS-ESI m/z： $[M+H]^+$ $C_{110}H_{177}N_{18}O_{42}$計算值，2422.2269；實測值，2422.2375。

【0613】 實施例 416. 化合物**378的合成**

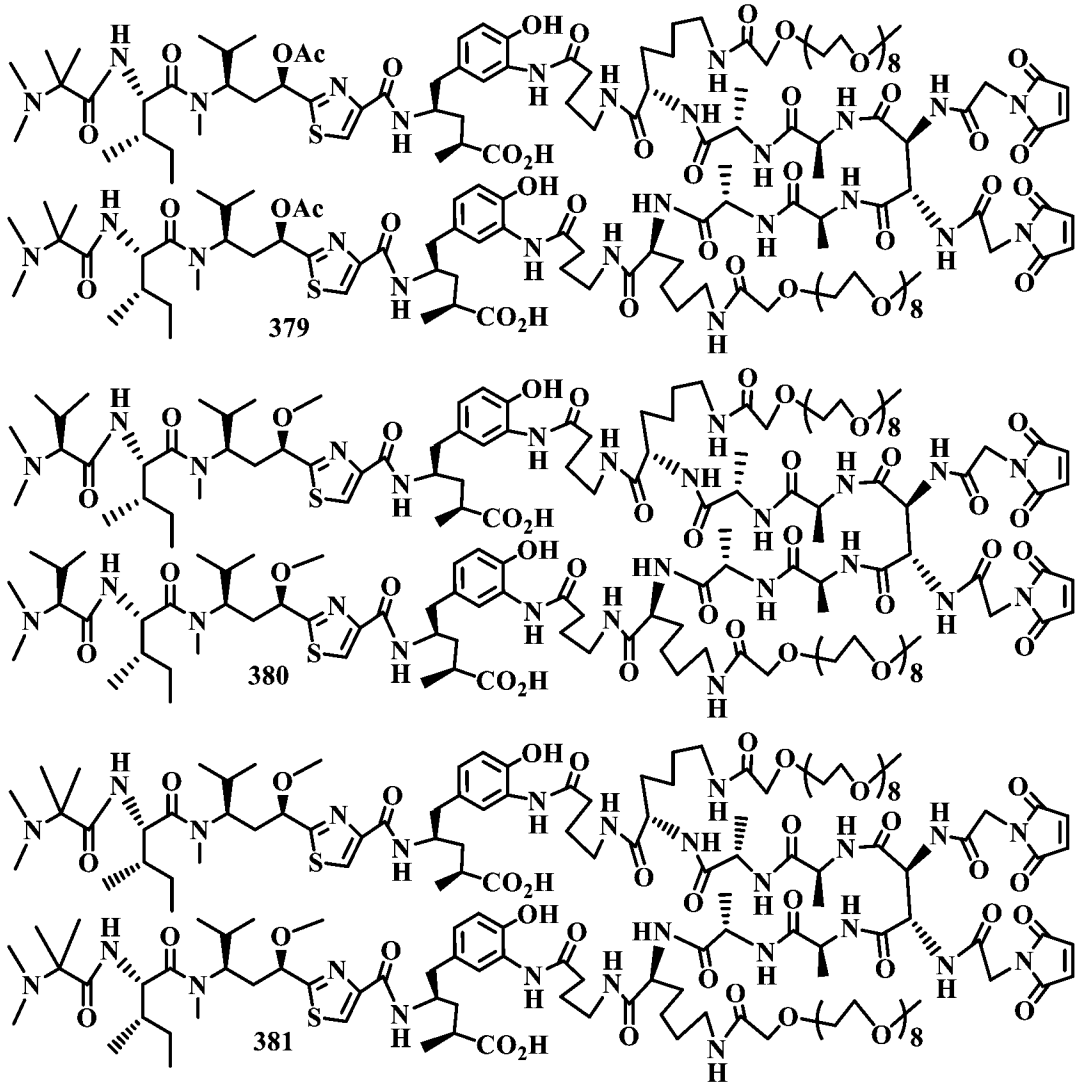


378

將化合物 377 （0.521 g，0.215 mmol）溶解於 DMF （8 mL） 中並在冰水浴上冷卻加入五氟苯基 2-（（3S,6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-3,9-二異丙基-2,8-二甲基-4,7,13-三側氧基-12-氧雜-2,5,8-三氮雜

十一烷-11-基）噻唑-4-甲酸酯（0.362 g，0.515 mmol），然後加入 N,N-二異丙基乙胺 （0.50 mL）。然後將反應在室溫下攪拌1 小時，然後使用甲酸將 pH 值調節至 4-5。將混合物濃縮，重新溶于少量水中，並藉由製備C-18 HPLC（10-60% 乙腈/水，含0.1%甲酸）純化。合併組份，濃縮並凍乾，得到無色泡沫（462 mg，62% 收率）。ESI m/z $C_{162}H_{261}N_{26}O_{52}S_2$ $[M+H]^+$ 計算值： 3466.7979，實測值： 3466.8070。

【0614】 實施例 417. 化合物 379，**380** 和 **381**的合成



將化合物377 （200mg，0.0825mmol）溶解於二甲基甲醯胺（5mL）中並在冰水浴上冷卻加入五氟苯基2-（（6S,9R,11R）-6-（（S）第二丁基）-9-異丙基-2,3,3,8-四甲基-4,7,13-三側氧基-12-氧雜-

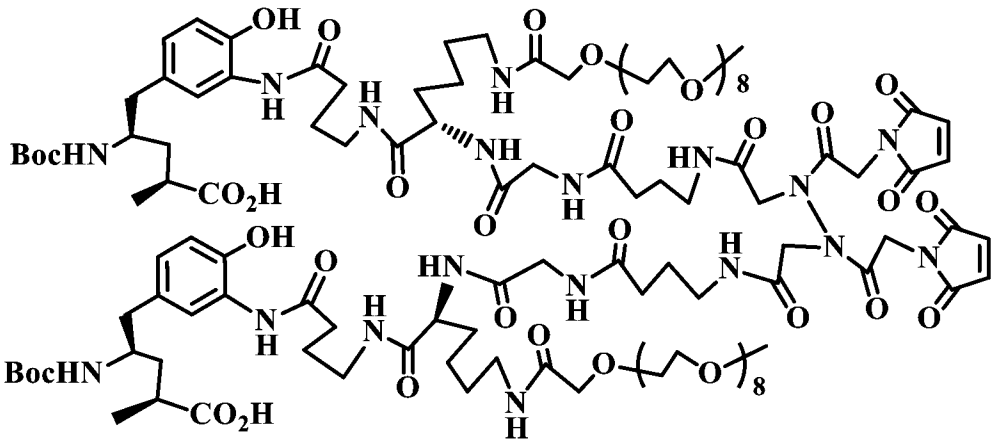
2,5,8-三氮雜十四烷-11-基）噻唑-4-羧酸酯（0.20mmol）,或五氟苯酚基2-（（3S,6S,9R,11R）-6-（（S）第二丁基）-3,9-二異丙基-2,8-二甲基-4,7-二側氧基-12-氧雜-2,5,8-三氮雜十四烷-11-基）噻唑-4-羧酸酯（0.20mmol）,或五氟苯酚基2-（（6S,9R,11R）-6-（（S）第二丁基）-9-異丙基-2,3,3,8-四甲基-4,7-二側氧基12-氧雜-2,5,8-三氮雜十四烷-11-基）噻唑-4-羧酸酯（0.20mmol），然後加入 N,N-二異丙基乙胺（0.40mL）。然後將反應在室溫下攪拌1 小時，然後使用甲酸將 pH 值調節至 4-5。將混合物濃縮，重新溶于少量水中，並藉由製備C-18 HPLC（10-60% 乙腈/水，含0.1%甲酸）純化。合併組分濃縮並凍乾，得到無色泡沫（60 -65% 收率）。

379（175 mg，62% 收率），ESI m/z $C_{160}H_{257}N_{26}O_{52}S_2$ $[M+H]^+$ 計算值： 3438.7707，實測值： 3438.7830。

380（168 mg，60%收率），ESI m/z $C_{160}H_{261}N_{26}O_{50}S_2$ $[M+H]^+$ 計算值： 3410.8122，實測值： 3410.8245。

381（162 mg，58% 收率），ESI m/z $C_{158}H_{257}N_{26}O_{50}S_2$ $[M+H]^+$ 計算值： 3382.7809，實測值： 3382.7940。

【0615】實施例 418.（2S,2's,4R,4'R）-5,5'-（（（（7S,32S）-19,20-雙（2-（2,5-二側氧基-2, 5-二氫-1H-吡咯-1-基）乙醯基-6,9,12,17,22,27,30,33-八側氧基-7,32-雙（28-側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29-氮雜三十三烷-33-基）-5,8,11,16,19,20,23,28,31,31,34-十氮雜三十八烷-1,38-二醯基）雙（氮雜二基））雙（4-羥基-3,1-亞苯基））雙（4-（（第三丁氧基羰基）胺基）-2-甲基戊酸）（382）的合成

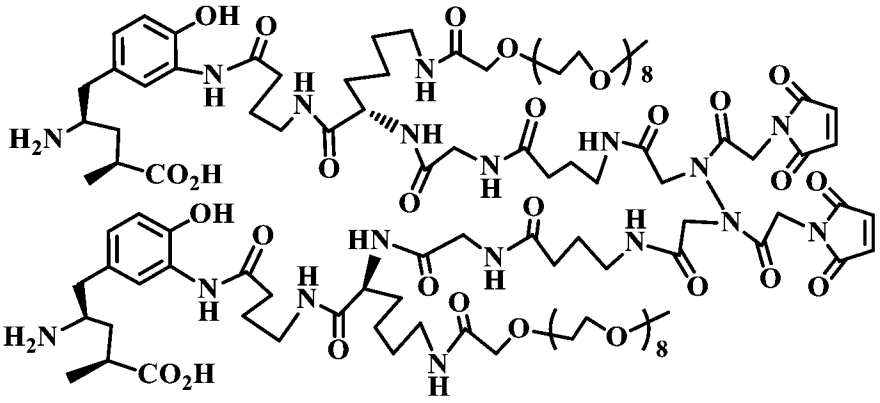


382

（2S,4R）-5-（3-（（S）-34-（2-胺基乙醯胺）-28,35-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29,36-二氮雜四十四醯胺基）-4-羥基苯基）-4-（（第三丁氧基羰基）胺基）-2-甲基戊酸（852 mg，0.825 mmol）的四氫呋喃（30 mL）和 0.1 M NaH_2PO_4 緩衝液（20 mL，pH 7.5）加入雙（2,5-二側氧基吡咯啶-1-基）4,4'-（（2,2'-（1,2-雙（2-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）乙醯基）肼-1,2-二基）雙（乙醯基））雙（氮雜二基））二丁酯（322 mg，0.409 mmol）。將混合物攪拌隔夜，蒸發，在 C-18 HPLC（250 mm（L）×50 mm（d））上純化，用甲醇/水（v= 40 mL/min，5% 至 50% 的甲醇在 45 min），合併含有產物的組分，濃縮並凍乾，得到標題化合物（568 mg，53%收率）。MS-ESI m/z： $[M+H]^+$ $C_{120}H_{193}N_{18}O_{46}$計算值，2622.3317；實測值2622.3420。

【0616】實施例 419.（2S,2's,4R,4'R）-5,5'-（（（（7S,32S）-19,20-雙（2-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）乙醯基）-6,9,12,17,22,27,30,33-八側氧基-7,32-雙（28-側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29-氮雜三十三烷-33-基）-5,8,11,16,19,20,23,28,31,34-十氮雜三十八烷-1,38-二醯基）雙（氮雜二基））雙（4-羥基-3,1-亞苯基））雙（4-胺基-2-甲基戊酸）鹽酸鹽形成

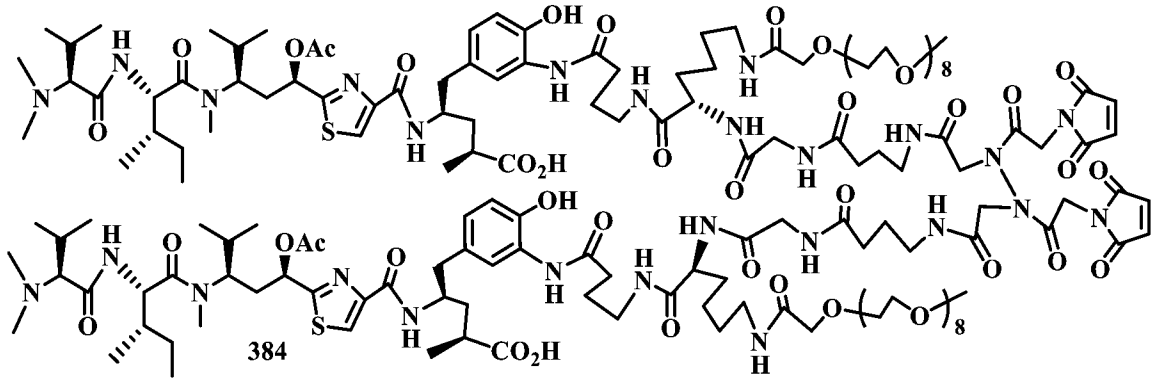
化合物（383）的溶液的合成



383

化合物 382 （561 mg，0.214 mmol），二惡烷 （6 mL）的溶液與濃鹽酸 （2 mL） 反應0.5 小時。將反應混合物用甲苯（10mL）稀釋，蒸發並在油真空幫浦上乾燥，得到產物（520mg，101%收率），其無需進一步純化直接用於下一步。MS-ESI m/z： $[M+H]^+$ $C_{110}H_{177}N_{18}O_{42}$計算值，2422.2269；實測值，2422.2380。

【0617】 實施例 420. 化合物**384的合成**

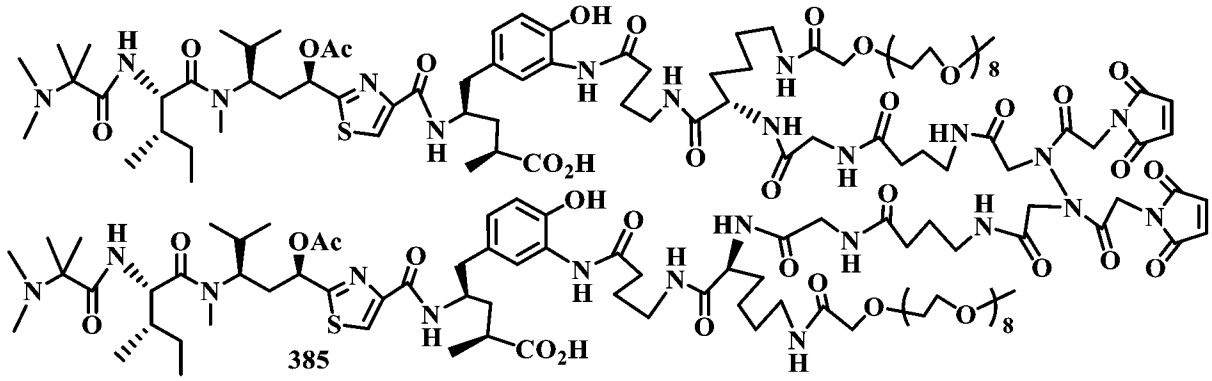


384

將化合物 383 （0.121 g，0.050 mmol）溶解在 DMF （3 mL） 中並在冰水浴上冷卻的的溶液中加入五氟苯基 2-（（3S,6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-3,9-二異丙基-2,8-二甲基-4,7,13-三側氧基-12-氧雜-2,5,8-三氮雜十四烷-11-基）噻唑-4-羧酸酯（80.1 mg，0.113 mmol），然後加入 N,N-二異丙基乙胺 （0.15 mL）。然後將反應在室溫下攪拌2小時，然後使用甲酸調節至 pH4-5。將混合物濃縮，重新溶于少量水中，

並藉由製備C-18 HPLC（10-60% 乙腈/水，含0.1%甲酸）純化。合併含有產物的組分，濃縮並凍乾，得到無色泡沫（109.1 mg，63%收率）。ESI m/z $C_{162}H_{261}N_{26}O_{52}S_2$ $[M+H]^+$ 計算值： 3466.8020，實測值：3466.8130。

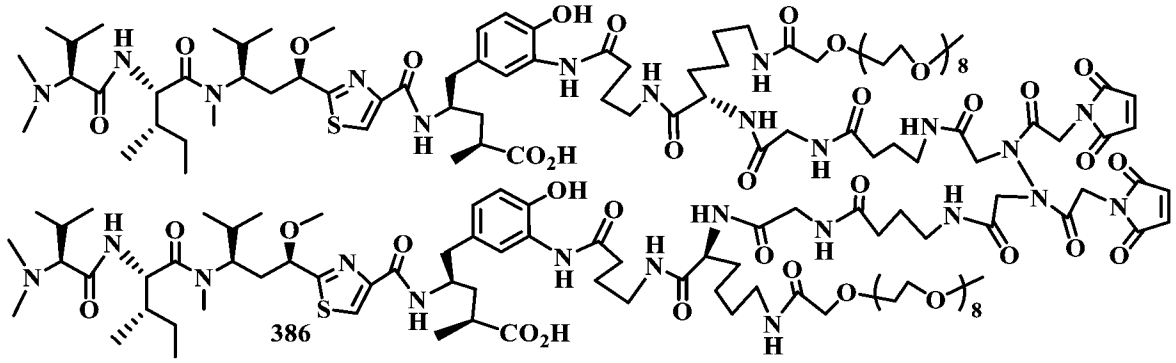
【0618】 實施例 421. 化合物 **385**的合成



385

將化合物 383 （0.121 g，0.050 mmol）溶解於 DMF （3 mL） 中並在冰水浴上冷卻，加入五氟苯酚基 2-（（6S,9R,11R）-6-（（S）-第二-丁基）-9-異丙基-2,3,3,8-四甲基-4,7,13-三側氧基-12-氧雜-2,5,8-三氮雜十一烷-11-基） 噻唑-4-羧酸酯（83.1 mg，0.120 mmol），然後加入 N,N-二異丙基乙胺 （0.15 mL）。然後將反應在室溫下攪拌2 小時，然後使用甲酸將 pH 值調節至 4-5。將混合物濃縮，重新溶于少量水中，並藉由製備C-18 HPLC（10-60% 乙腈/水，含0.1%甲酸）純化。合併含有產物的組分，濃縮並凍乾，得到無色泡沫（104.7 mg，61%收率）。ESI m/z $C_{160}H_{257}N_{26}O_{52}S_2$ $[M+H]^+$ 計算值： 3438.7707，實測值：3438.7840。

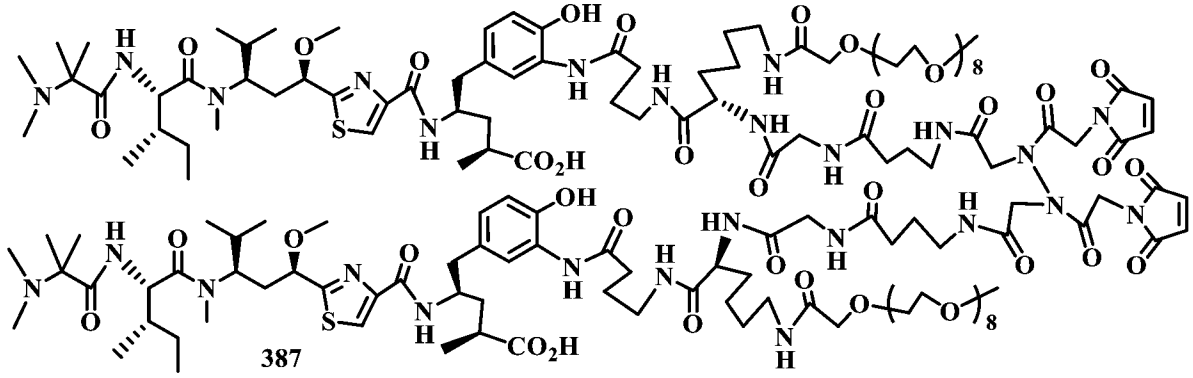
【0619】 實施例 422. 化合物 **386**的合成



386

將化合物 383 （121 mg，0.050 mmol） 溶解於DMF （3 mL）中並在冰水浴上冷卻，加入五氟苯酚 2-（（3S,6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-3,9-二異丙基-2,8-二甲基-4,7-二側氧基-12-氧雜-2,5,8-三氮雜十三烷-11-基）噻唑-4-羧酸酯（82.0 mg，0.121 mmol ），然後加入 N,N-二異丙基乙胺 （0.15 mL）。然後將反應在室溫下攪拌2 小時，然後使用甲酸調節至 pH4-5。將混合物濃縮，重新溶于少量水中，並藉由製備C-18 HPLC（10-60% 乙腈/水，含0.1%甲酸）純化。合併含有產物的組份，濃縮並凍乾，得到無色泡沫（110.2 mg，65%收率）。ESI m/z 計算值 $C_{160}H_{261}N_{26}O_{50}S_2$ $[M+H]^+$： 3410.8122，實測值： 3410.8240。

【0620】 實施例 423. 化合物**387**的合成

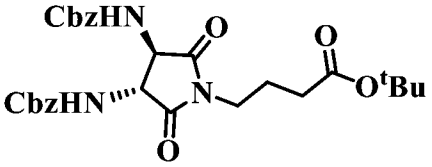


387

將化合物 383（121 mg，0.050 mmol）溶解於 DMF （3 mL） 中並在冰水浴上冷卻，加入五氟苯基 2-（（6S,9R,11R）-6-（（S）-第二-丁基）-9-異丙基-2,3,3,8-四甲基-4,7-二側氧基-12-氧雜-2,5,8-三氮雜十四烷-11-基） 噻唑-4-羧酸酯 （80.0 mg，0.120 mmol ），然後加入 N,N-二

異丙基乙胺 （0.15 mL）。然後將反應在室溫下攪拌2 小時，然後使用甲酸將 pH 值調節至 4-5。將混合物濃縮，重新溶于少量水中，並藉由製備 C-18 HPLC（10-60% 乙腈/水，含0.1%甲酸）純化。合併含有產物的組份，濃縮並凍乾，得到無色泡沫（106.2 mg，63%收率）。ESI m/z $C_{158}H_{257}N_{26}O_{50}S_2$ $[M+H]^+$ 計算值： 3382.7809，實測值： 3382.7940。

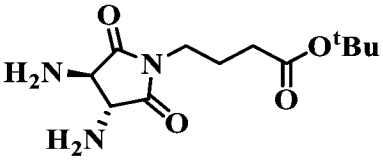
【0621】 實施例 424. 化合物 **388的合成**



388

在0°C，向化合物127（12.4 g，22.2 mmol）的DMF（100 mL）的溶液中加入HATU（16.9 g，44.5 mmol）和TEA（6.2 mL，44.5 mmol）。將混合物在室溫下攪拌隔夜，然後濃縮，然後用水（200mL）稀釋，用乙酸乙酯（3×100mL）萃取。有機相用水（50 mL）、5% $NaHCO_3$（50 mL）、2 N 鹽酸 （50 mL）洗滌，用無水硫酸鈉乾燥，過濾並濃縮。殘餘物用石油和乙酸乙酯重結晶，得到標題化合物，為黃色固體（10.0 g，83.3%收率）。ESI-MS m/z： $C_{28}H_{34}N_3O_8$ $[M+H]^+$ 計算值 ： 540.23；實測值540.23。

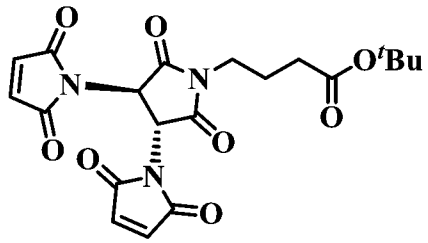
【0622】 實施例 425. 化合物 389的合成



389

將化合物388（10.0 g，18.5 mmol）溶解於甲醇（100 mL），加入10%Pd/C（1.0 g）催化加氫攪拌3小時。濾出固體並濃縮濾液，得到無色油狀物（4.6g，91%收率）。ESI m/z： $C_{12}H_{22}N_3O_4$ $[M+H]^+$ 計算值： 272.15；實測值272.15。

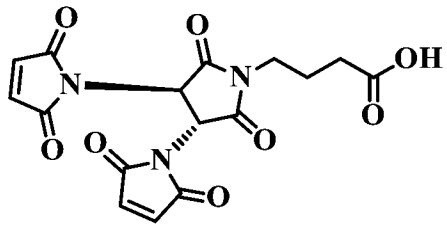
【0623】 實施例 426. 化合物**390**的合成



390

將化合物389（2.8 g，10.4 mmol）溶解於飽和$NaHCO_3$溶液（40 mL）中並冷卻至約5℃，在攪拌的溶液中加入N-（甲氧羰基）馬來醯亞胺（3.2 g，20.8 mmol）。將混合物在 0°C 攪拌 2 小時並在室溫攪拌 2 小時，然後用冰水（100 mL）稀釋，用乙酸乙酯（3×50 mL）萃取。合併的有機相用水（50mL）洗滌，無水硫酸鈉乾燥，過濾濃縮，藉由柱層析純化（1-70%乙酸乙酯/石油醚），得到化合物390（750mg，17%收率）. ESI m/z： $C_{20}H_{22}N_3O_8$ $[M+H]^+$ 計算值： 432.13，實測值432.13。

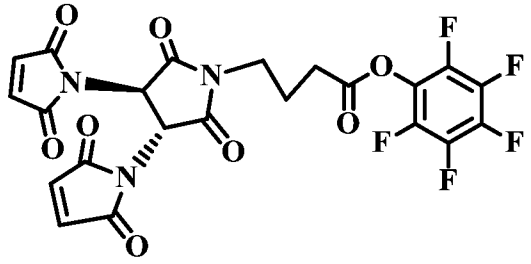
【0624】 實施例 427. 化合物 391的合成



391

將化合物 390 （750 mg，1.7 mmol） 溶解於二氯甲烷 （5 mL） 中，並在室溫下與 TFA （5 mL） 反應2個小時。濃縮混合物得到白色固體（652mg，100%收率）。ESI-MS m/z： $C_{16}H_{14}N_3O_8$ $[M+H]^+$ 計算值： 376.07，實測值376.07。

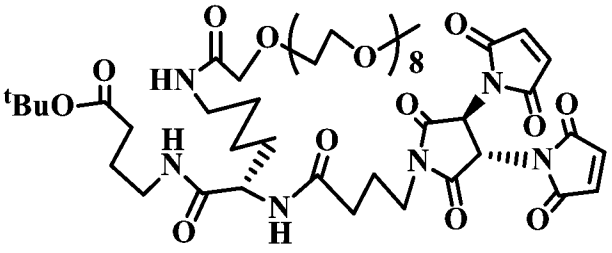
【0625】 實施例 428. 化合物 392的合成



392

向化合物 391 （400 mg，1.07 mmol） 的二氯甲烷 （5 mL） 中加入 EDC （410 mg，2.14 mmol） 和五氟苯酚 （394 mg，2.14 mmol）。將反應混合物攪拌1小時，然後用二氯甲烷（50mL）稀釋，用水（10mL）洗滌，用無水硫酸鈉乾燥，過濾並濃縮，得到標題化合物（578mg，100%收率）。ESI-MS m/z $C_{22}H_{13}F_5N_3O_8$ $[M+H]^+$ 計算值542.05，實測值542.05。

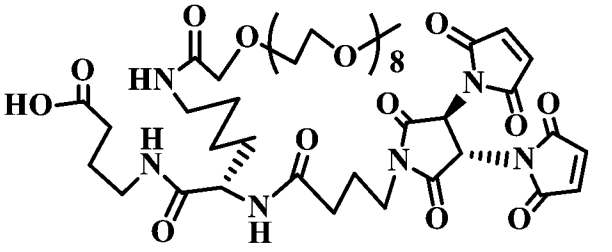
【0626】 實施例 429. 化合物 393的合成



393

在0℃下，向化合物149（0.91 g，1.28 mmol）和化合物392（578 mg，1.07 mmol）的DMF（8 mL）溶液中加入N,N-二異丙基乙胺（373 μL，2.14 mmol）。將混合物升溫至室溫。攪拌1小時，然後用二氯甲烷（50mL）稀釋，用水（20mL）、2N 鹽酸（20mL）和水（20mL）洗滌，無水硫酸鈉乾燥，過濾，濃縮，藉由矽膠柱層析（100：1至10：1二氯甲烷/甲醇）純化得到標題化合物（0.60 g，55%收率）。ESI-MS m/z： $C_{49}H_{77}N_6O_{20}$ $[M+H]^+$ 計算值： 1069.51，實測值1069.51。

【0627】 實施例 430. 化合物 394的合成

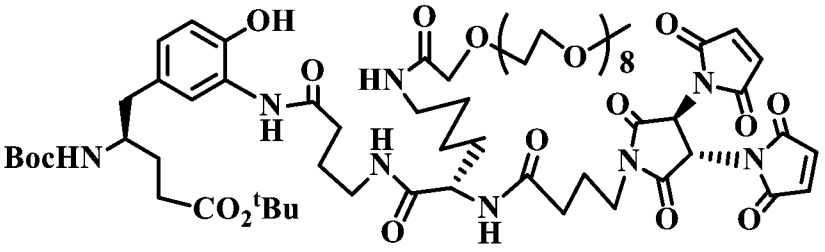


394

將化合物393 （0.60 g，0.56 mmol）溶解於TFA （3 mL）和二氯甲烷（3 mL）中並在室溫下攪拌2小時。將反應混合物濃縮並與甲苯共沸蒸

發兩次，將殘餘物置於真空幫浦上，得到標題化合物（0.32 g，57%收率）。ESI MS m/z $C_{45}H_{69}N_6O_{20}$ $[M+H]^+$ 計算值： 1013.45，實測值1013.45。

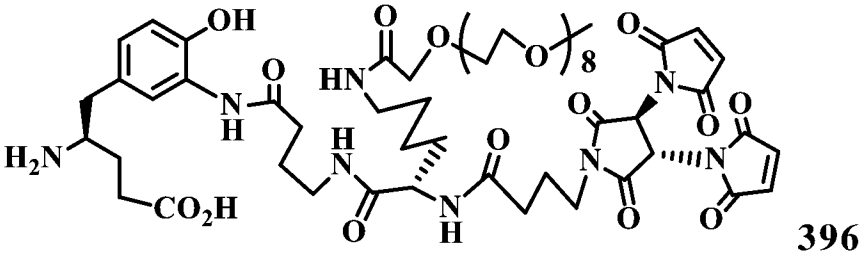
【0628】 實施例 431. 化合物 395的合成



395

向化合物 394 （0.20 g，0.197 mmol） 和 （R）-5-（3-胺基-4-羥基苯基）-4-（（第三丁氧基羰基）胺基）戊酸第三丁酯 （90 mg，0.237 mmol） 的溶液的二氯甲烷 （10 mL） 中加入 EDC·HCl （76 mg，0.394 mmol）。將混合物攪拌1小時，然後用二氯甲烷（50 mL）稀釋並用水（20 mL）洗滌，用無水硫酸鈉乾燥，過濾，濃縮並在矽膠柱上純化，用甲醇/二氯甲烷 （1：10）溶離，得到化合物 395 （150 mg，56% 收率）。ESI-MS m/z： $C_{65}H_{99}N_8O_{24}$ $[M+H]^+$ 計算值： 1375.67，實測值1375.67。

【0629】 實施例 432.化合物 396的合成

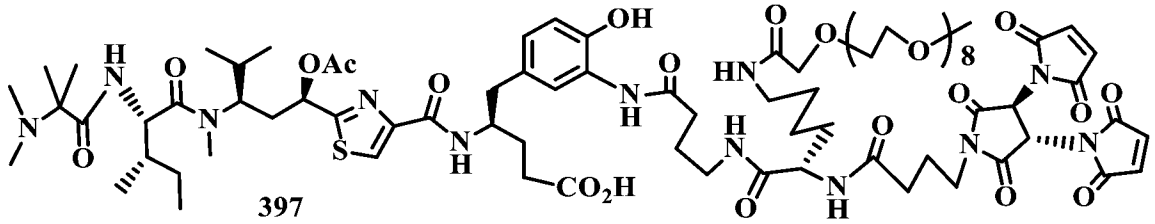


396

將化合物395 （0.60 g，0.044 mmol）溶解於TFA （3 mL）和二氯甲烷（3 mL）中並在室溫下攪拌2小時。將反應混合物濃縮並與甲苯共沸蒸發兩次，將殘餘物置於真空幫浦上，得到標題化合物（53 mg，100%收率）。ESI-MS m/z： 計算值 $C_{56}H_{83}N_8O_{22}$ $[M+H]^+$： 1219.55，實測值

1219.55。

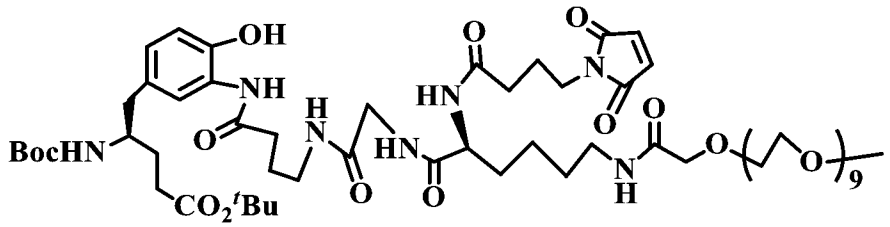
【0630】 實施例 433.化合物 397的合成



397

化合物 396 （53 mg，0.044 mmol） 和五氟苯酚基 2-（（6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-9-異丙基-2,3,3,8-的溶液 將4,7,13-三側氧基-12-氧雜-2,5,8-三氮雜十一烷-11-基） 噻唑-4-羧酸酯（30 mg，0.044 mmol） 溶解於 DMF （3 mL） 中並在冰水浴上冷卻，加入 N,N-二異丙基乙胺（30 μL，0.176 mmol）。然後將反應在室溫下攪拌1 小時並藉由製備型 C-18 HPLC（10-60% 乙腈/水，含 0.1% 甲酸）純化。合併含有產物的組分，濃縮並凍乾，得到無色泡沫（35 mg，46% 收率）。ESI-MS m/z $C_{81}H_{123}N_{12}O_{27}S$ $[M+H]^+$ 計算值： 1727.83，實測值： 1727.83。

【0631】 實施例 434. 化合物 398的合成

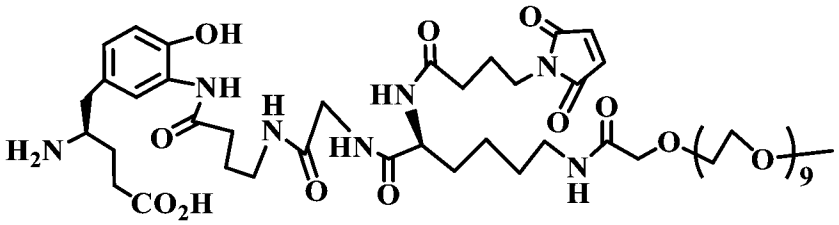


398

向（S）-37-（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基） 丁醯胺基）-31,38,41-三側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29-十二氧雜-32,39,42-三氮雜四十六烷-46-酸（0.30 g，0.30 mmol）和（R）-5-（3-胺基 -4-羥基苯基）-4-（（第三丁氧基羰基）胺基）-戊酸第三丁基酯（0.12g，0.40mmol） 的二氯甲烷（20mL）中加入EDC（0.96g，0.50mmol）。將混合物攪拌2小時，用水和鹽水洗滌，用無水硫酸鈉乾燥，過濾並濃縮，

得到標題化合物（0.60 g，100%收率）。ESI m/z $C_{61}H_{101}N_7O_{22}$ $[M+H]^+$ 計算值： 1285.51，實測值： 1284.97。

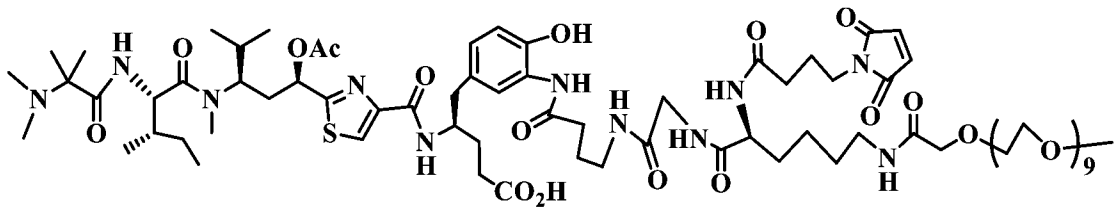
【0632】 實施例 435. 化合物399的合成



399

在室溫下，化合物398（0.51 g，0.40 mmol）的二氯甲烷（10 mL）與甲酸（5 mL）反應 1 小時，然後藉由反相HPLC（C18柱，10-80%乙腈/水，40 min，v = 8 mL/min）濃縮純化，得到標題化合物（0.21 g，48%收率）。ESI-MS m/z $C_{52}H_{85}N_7O_{20}$ $[M+H]^+$ 計算值： 1129.28，實測值： 1128.85。

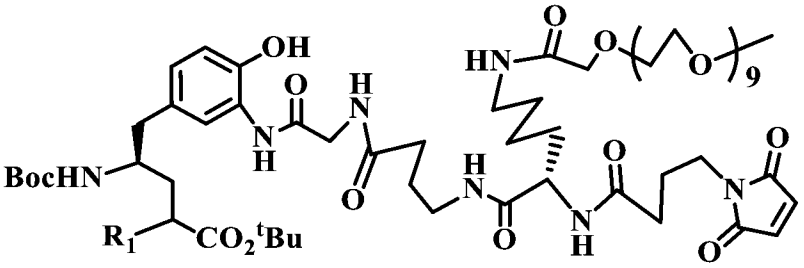
【0633】 實施例 436. 化合物 400的合成



400

在 0 °C，向五氟苯酚基2-（（6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-9-異丙基-2,3,3,8-四甲基-4,7,13-三側氧基-12-氧雜-2,5,8-三氮雜十一烷-11-基） 噻唑-4-羧酸酯 （0.13 g，0.19 mmol） 和化合物 399 （0.21 g，0.19 mmol） 的 DMF （5 mL） 中加入 N,N-二異丙基乙胺 （74 mg，0.57 mmol）。將反應在0℃攪拌1小時，室溫攪拌1小時，高真空濃縮，溶于少量水，然後藉由製備HPLC（C18柱，10-90% 乙腈/水）純化，得到 標題化合物（54 mg，17% 收率）。ESI MS m/z $C_{77}H_{125}N_{11}O_{25}S$ $[M+H]^+$ 計算值1637.96，實測值1638.40。

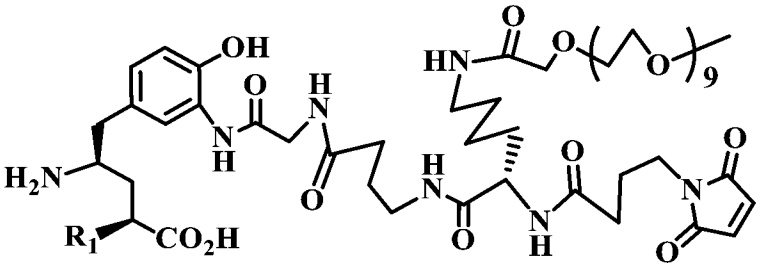
【0634】 實施例 437. 化合物 401a/b的合成



R_1= H, 401a;
R_1=CH_3, 401b.

向2,5-二側氧基吡咯啶-1-基 （S）-（37-（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫 -1H- 吡 咯 -1- 基 ） 丁 醯 胺 基 ） -31,38- 二 側 氧 基 -2,5,8,11,14,17,20,23,26,29-十二氧雜-32,39-三氮雜四十三烷-43-醯基）甘氨酸酯 （1.00 g，0.98 mmol） 和第三丁基 （R）-5-（3-胺基-4-羥基苯基）-4-（（第三丁氧基羰基）胺基）戊酸酯（0.315 g，0.98 mmol）或（2S,4R）-第三丁基5-（3-胺基-4-羥基苯基） ）-4-（（第三丁氧基羰基）胺基）-2-甲基戊酸酯 （0.386g，0.98 mmol） 的 四氫呋喃 （15 mL） 溶液在 60 °C 下加熱隔夜，然後濃縮，藉由柱層析法純化 （甲醇/二氯甲烷 1：10 ） 得到化合物 401a （0.75 g，59% 收率）。ESI MS m/z $C_{61}H_{101}N_7O_{22}$ $[M+H]^+$ 計算值： 1283.70，實測值： 1284.71；或 401b （0.801 g，63% 收率）。ESI MS m/z $C_{62}H_{103}N_7O_{22}$ $[M+H]^+$ 計算值： 1297.72，實測值： 1298.85。

【0635】 實施例 438. 化合物402a/b的合成

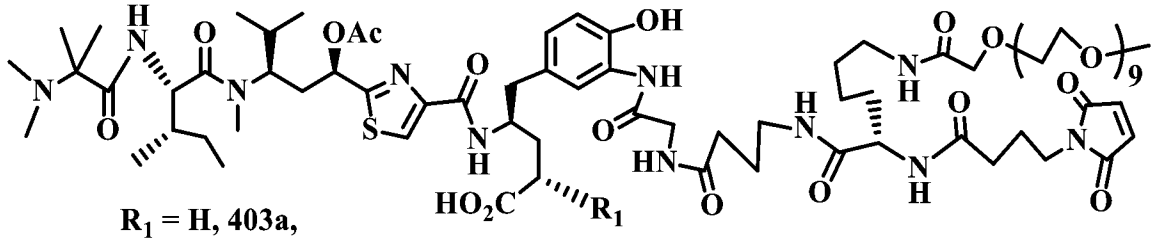


R_1= H, 402a;
R_1=CH_3, 402b.

在室溫下，化合物 401a 或 401b （0.58 mmol） 的二氯甲烷 （5 mL）與 TFA （3 mL） 反應 0.5小時，用甲苯稀釋，然後濃縮，用油幫浦乾燥，得到標題化合物402a或402b，為黃色油狀物（～99%收率），其

無需進一步純化即可用於下一步。402a，ESI-MS m/z $C_{52}H_{85}N_7O_{20}$ $[M+H]^+$ 計算值： 1127.58，實測值： 1128.60；402 b，ESI-MS m/z $C_{53}H_{87}N_7O_{20}$ $[M+H]^+$ 計算值： 1141.59，實測值： 1141.61。

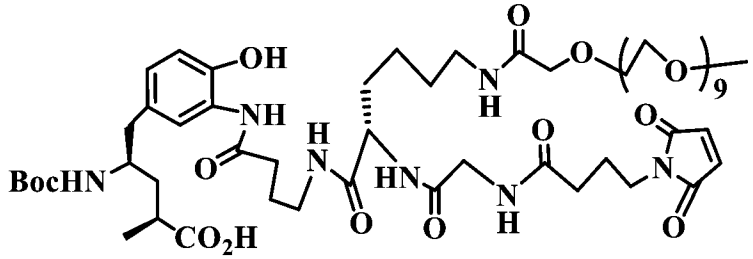
【0636】 實施例 439. 化合物**403a/b**的合成



R_1 = H, 403a,
R_1 = Me, 403b

在 0 °C，向 五氟苯酚基2-（（6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-9-異丙基-2,3,3,8-四甲基-4,7,13-三側氧基-12-氧雜-2,5,8-三氮雜十四烷-11-基） 噻唑-4-羧酸酯 （0.32 g，0.47 mmol） 和化合物 **402a** 或**402b** （0.47 mmol） 的DMF （5 mL） 中加入 N,N-二異丙基乙胺 （120 mg，0.94 mmoL）。將反應在室溫下攪拌 1 小時，高真空濃縮，溶于少量水，然後藉由 prep-HPLC （C18 柱，10-90% 乙腈/水） 純化，得到化合物 403a 或 403b （42 %~65% 收率）。403a ESI MS m/z $C_{77}H_{125}N_{11}O_{25}S$ $[M+H]^+$ 計算值 1635.86，實測值 1636.87；403b ESI MS m/z $C_{78}H_{127}N_{11}O_{25}S$ $[M+H]^+$ 計算值1649.87，實測值1650.89。

【0637】 實施例 440. 化合物的合成 **404**

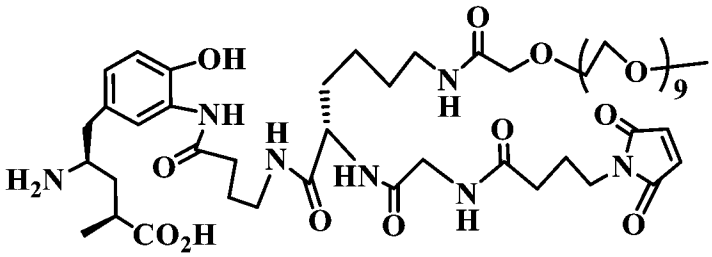


404

向2,5-二側氧基吡咯啶-1-基 （S）-37-（2-（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基） 乙醯胺基） -31,38-二側氧基-

2,5,8,11,14,17,20,23,26,29-十二氧雜-32,39-二氮雜四十三烷-43-酯（1.56 g，1.64 mmol）和化合物 311（0.67 g，1.97 mmol） 的 四氫呋喃 （20 mL）溶液在 60 °C 下加熱隔夜，然後濃縮，藉由柱層析法純化 （甲醇/二氯甲烷 1：10），得到標題化合物 （1.72 g，84%收率）。ESI MS m/z $C_{58}H_{95}N_7O_{22}$ $[M+H]^+$ 計算值： 1243.43，實測值： 1242.65。

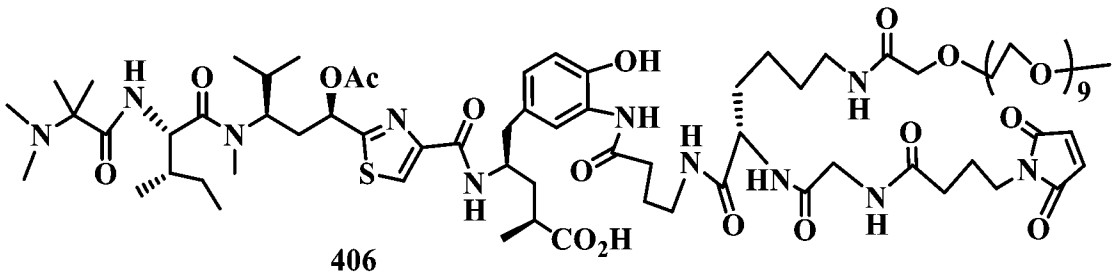
【0638】 實施例 441. 化合物**405**的合成



405

在室溫下，化合物 404 （1.72 g，1.38 mmol） 的二氯甲烷 （10 mL）與 TFA （5 mL） 反應 0.5 h，然後濃縮，得到標題化合物，為黃色油狀物（0.62 g，>100%收率）。ESI-MS m/z $C_{53}H_{87}N_7O_{20}$ $[M+H]^+$ 計算值： 1143.31，實測值： 1142.60。

【0639】 實施例 442. 化合物的合成 **406**

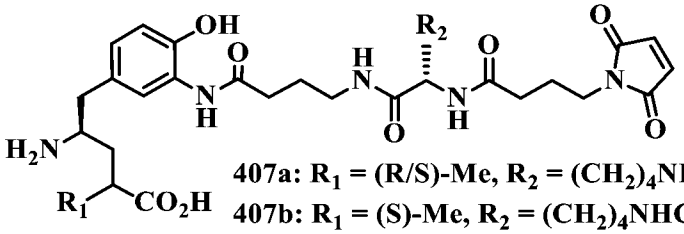


406

在 0 °C，向五氟苯酚基 2-（（6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-9-異丙基-2,3,3,8-四甲基-4,7,13-三側氧基-12-氧雜-2,5,8-三氮雜十四烷-11-基）噻唑-4-羧酸酯 （0.45，0.65mol） 和上步所得的化合物 **405** （0.57 g，0.50 mmol） 的 DMF （5 mL） 中加入N,N-二異丙基乙胺（ 260 mg，2.0 mmol）。將反應物在室溫下攪拌1小時，高真空濃縮，

溶于少量水，然後藉由製備HPLC（C18柱，10-90% 乙腈/水）純化，得到標題化合物（0.28 g，34% 的收率）。ESI MS m/z $C_{78}H_{127}N_{11}O_{25}S$ $[M+H]^+$ 計算值1651.99，實測值1650.87。

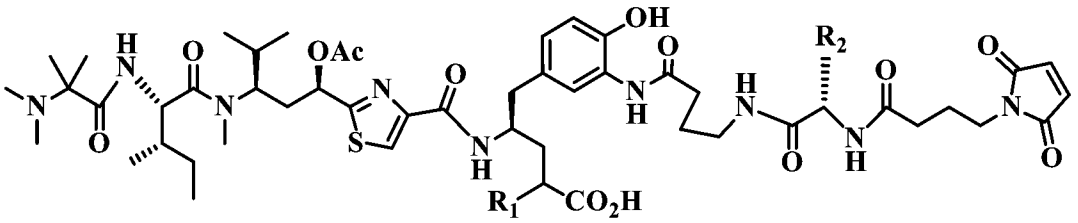
【0640】 實施例 443. 化合物**407a/b/c/d/e/f**的合成



407a: R_1 = (R/S)-Me, R_2 = $(CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_9Me$
407b: R_1 = (S)-Me, R_2 = $(CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_9Me$
407c: R_1 = (S)-Me, R_2 = $(CH_2)_2CONH(CH_2CH_2O)_8Me$
407d: R_1 = H, R_2 = $(CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_8Me$
407e: R_1 = H, R_2 = $(CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_9Me$
407f: R_1 = H, R_2 = $(CH_2)_2CONH(CH_2CH_2O)_8Me$

在室溫下，Boc 保護的胺 （7.0 mmol） 的二氯甲烷 （10 mL） 與 TFA （10 mL）反應2小時濃縮，與甲苯共沸蒸發，分別得到粗品407a、407b、407c、407d、407e或407f，直接用於下一步。

【0641】 實施例 444. 化合物**408a/b/c/d/e/f**的合成

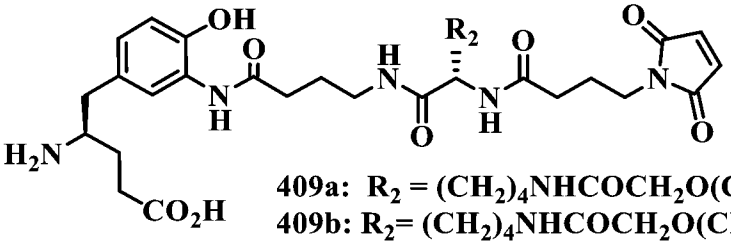


408a: R_1 = (R/S)-Me, R_2 = $(CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_9Me$
408b: R_1 = (S)-Me, R_2 = $(CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_9Me$
408c: R_1 = (S)-Me, R_2 = $(CH_2)_2CONH(CH_2CH_2O)_8Me$
408d: R_1 = H, R_2 = $(CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_8Me$
408e: R_1 = H, R_2 = $(CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_9Me$
408f: R_1 = H, R_2 = $(CH_2)_2CONH(CH_2CH_2O)_8Me$

將化合物 407a，407b，407c，407d，407e 或 407f （7.0 mmol） 分別和五氟苯酚基 2-（（6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-9-異丙基-2,3,3,8-四甲基-4,7,13-三氧雜-12-氧雜-2,5,8-三氮雜十四烷-11-基） 噻唑-4-羧酸酯 （5.2 g，7.5 mmol） 溶解於 DMA （20 mL） . 然後加入

N,N-二異丙基乙胺 （4.8 mL，28 mmol）。將所得混合物在室溫攪拌3小時。真空除去溶劑後，將殘餘物在製備HPLC（C18柱，10-90% 乙腈/水）上純化，分別得到標題產物408a、408b、408c、408d、408e或408f。**408a**： 9.26 g，83% 收率，MS ESI m/z $C_{76}H_{124}N_{10}O_{24}S$ $[M+H]^+$ 計算值： 1593.85，實測值： 1594.06；**408b**： 9.32 g，86% 收率，MS ESI m/z 計算值 $C_{74}H_{120}N_{10}O_{23}S$ $[M+H]^+$： 1549.82，實測值： 1549.74；**408c**： 8.76 g，84% 收率，MS ESI m/z $C_{71}H_{114}N_{10}O_{22}S$ $[M+H]^+$ 計算值： 1491.78，實測值： 1491.87；**408d**： 8.49 g，79% 收率，MS ESI m/z $C_{73}H_{118}N_{10}O_{23}S$ $[M+H]^+$ 計算值： 1535.81，實測值： 1535.93；**408e**： 8.73 g，78% 收率，MS ESI m/z 計算值 $C_{75}H_{122}N_{10}O_{24}S$ $[M+H]^+$： 1579.84，實測值： 1579.92；**408f**： 8.27 g，80% 收率，MS ESI m/z 計算值 $C_{70}H_{112}N_{10}O_{22}S$ $[M+H]^+$： 1477.77 實測值： 1476.82。

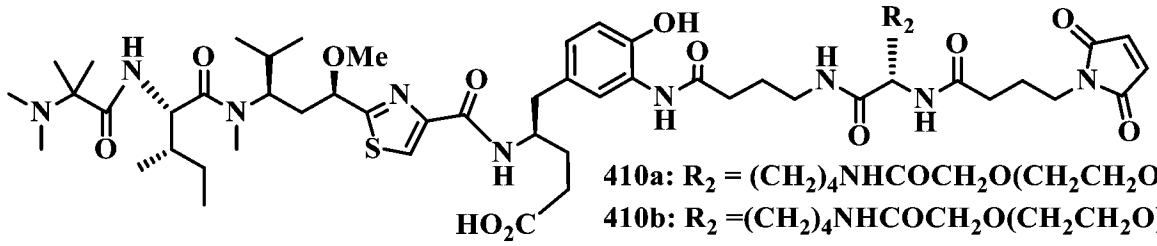
【0642】 實施例 445. 化合物**409a/b/c**的合成



409a: $R_2 = (CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_9Me$
409b: $R_2 = (CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_8Me$
409c: $R_2 = (CH_2)_2CONH(CH_2CH_2O)_8Me$

在室溫下， Boc 保護的胺 （5.0 mmol） 的二氯甲烷 （5 mL） 與 TFA （5 mL）反應 2小時後濃縮，與甲苯共沸蒸發得到粗品409a、409b或409c，直接用於下一步。

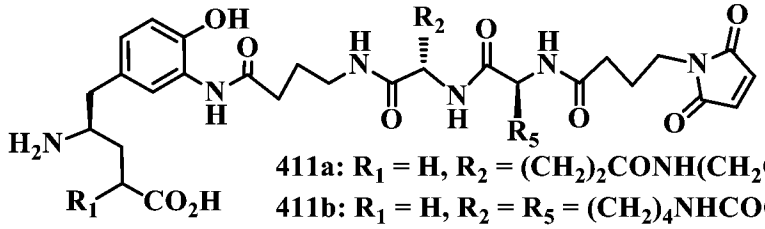
【0643】 實施例 446. 化合物**410a/b/c**的合成



410a: $R_2 = (CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_8Me$
410b: $R_2 = (CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_9Me$
410c: $R_2 = (CH_2)_2CONH(CH_2CH_2O)_8Me$

化合物 409a、409b 或 409c （1.0 mmol） 分別和五氟苯酚基 2-（（6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-9-異丙基-2,3,3,8-四甲基-將4,7-二側氧基-12-氧雜-2,5,8-三氮雜十四烷-11-基）噻唑-4-羧酸酯（4.98g，1.2 mmol） 溶解於 DMF （10 mL） 中。然後加入 N,N-二異丙基乙胺 （0.86 mL，5.0 mmol）。將所得混合物在室溫攪3 小時。真空除去溶劑後，將殘餘物在製備HPLC（C18柱，10-90% 乙腈/水）上純化，分別得到標題產物410a、410b或410c。**410a**： 1.25 g，82% 收率，MS ESI m/z $C_{73}H_{120}N_{10}O_{22}S$ $[M+H]^+$ 計算值： 1521.83，實測值： 1522.54；**410b**： 1.38 g，88% 收率，MS ESI m/z $C_{75}H_{124}N_{10}O_{23}S$ $[M+H]^+$ 計算值： 1565.86，實測值： 1566.58；**410c**： 1.20 g，83% 收率，MS ESI m/z $C_{69}H_{112}N_{10}O_{21}S$ $[M+H]^+$ 計算值： 1449.77 實測值： 1449.45。

【0644】 實施例 447. 化合物**411a/b/c/d/e/f**的合成

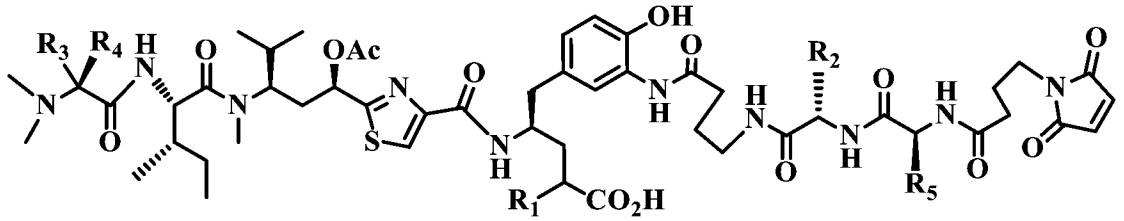


411a: R_1 = H, $R_2 = (CH_2)_2CONH(CH_2CH_2O)_8Me$, R_5= H
411b: R_1 = H, $R_2 = R_5 = (CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_9Me$
411c: R_1 = (S)-Me, $R_2 = R_5 = (CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_8Me$
411d: R_1 = H, $R_5 = (CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_8Me$, R_2= H
411e: R_1 = (S)-Me, $R_2 = (CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_8Me$, R_5= H
411f: R_1 = (S)-Me, $R_5 = (CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_8Me$, R_2= H

在室溫下，Boc 保護的胺 （7.0 mmol） 的二氯甲烷 （20 mL） 與 TFA （5 mL） 反應 0.5h後濃縮，並與甲苯共沸蒸發，分別得到粗品

411a、411b、411c、411d、411e或411f，直接用於下一步。

【0645】 實施例 448. 化合物**412a/412b/412c/412d/412e/412f.**的合成

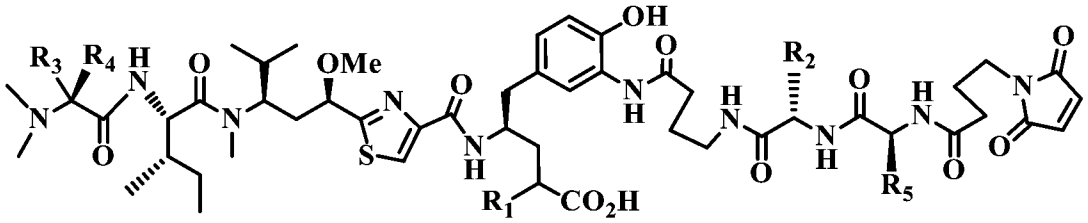


412a: R_3 = H, R_4= $(CH_3)_2CH$, R_1 = H, R_2 = $(CH_2)_2CONH(CH_2CH_2O)_8Me$, R_5 = H;
412b: R_3 = R_4 = CH_3, R_1 = H, R_2 = R_5 = $(CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_9Me$;
412c: R_3 = R_4 = CH_3, R_1 = (S)-Me, R_2 = R_5 = $(CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_8Me$;
412d: R_3 = H, R_4= $(CH_3)_2CH$, R_1 = H, R_5 = $(CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_8Me$, R_2= H;
412e: R_3 = R_4 = CH_3, R_1 = (S)-Me, R_2 = $(CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_8Me$, R_5= H;
412f: R_3 = R_4 = CH_3, R_1 = (S)-Me, R_5 = $(CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_8Me$, R_2= H;

將化合物 411a、411b、411c、411d、411e 或 411f （1.0 mmol）分別和化合物五氟苯酚基 2-（（6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-9-異丙基-2,3,3,8-四甲基-4,7,13-三氧雜-12-氧雜-2,5,8-三氮雜十四烷-11-基） 噻唑-4-羧酸酯 或 五氟苯酚 2-（（3S,6S,9R,11R） -6-（（S）-第二丁基）-3,9-二異丙基-2,8-二甲基-4,7,13-三氧雜-12-氧雜-2,5,8-三氮雜十四烷-11-基 ） 4-羧酸噻唑（1.2 mmol）溶解於DMF（5 mL）中。然後加入 N,N-二異丙基乙胺 （0.86 mL，5 mmol）。將所得混合物在室溫攪拌 3 小時。真空除去溶劑後，將殘餘物在製備HPLC（C18柱，10-90% 乙腈/水）上純化，分別得到產物412a、412b、412c、412d、412e或412f。**412a**： 1.27 g，82% 收率，MS ESI m/z $C_{73}H_{117}N_{11}O_{23}S$ $[M+H]^+$ 計算值： 1548.80 實測值： 1549.35；**412b**： 1.68 g，78% 收率，MS ESI m/z $C_{102}H_{174}N_{12}O_{36}S$ $[M+H]^+$ 計算值： 2176.19 實測值： 2177.95；**412c**： 1.61 g，77% 收率，MS ESI m/z $C_{99}H_{169}N_{12}O_{34}S$ $[M+H]^+$ 計算值： 2102.16 實測值： 2104.15；**412d**： 1.17 g，73% 收率，MS ESI

m/z $C_{76}H_{124}N_{11}O_{24}S$ $[M+H]^+$ 計算值： 1606.85 實測值： 1607.95；**412e**： 1.20 g，75% 收率，MS ESI m/z $C_{76}H_{124}N_{11}O_{24}S$ $[M+H]^+$ 計算值： 1606.85 實測值： 1607.70；**412f**： 1.19 g，74% 收率，MS ESI m/z $C_{76}H_{124}N_{11}O_{24}S$ $[M+H]^+$ 計算值： 1606.85 實測值： 1607.90。

【0646】 實施例 449. 化合物**413a/b/c/d**的合成

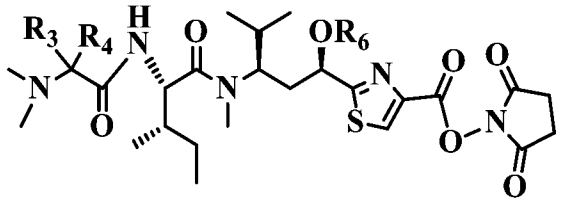


413a: R_3 = H, R_4= $(CH_3)_2CH$, R_1 = H, R_2 = $(CH_2)_2CONH(CH_2CH_2O)_8Me$, R_5 = H;
413b: R_3 = R_4 = CH_3, R_1 = H, R_2 = R_5 = $(CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_9Me$;
413c: R_3 = R_4 = CH_3, R_1 = (S)-Me, R_2 = R_5 = $(CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_8Me$;
413d: R_3 = H, R_4= $(CH_3)_2CH$, R_1 = H, R_5 = $(CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_8Me$, R_2= H;
413e: R_3 = R_4 = CH_3, R_1 = (S)-Me, R_2 = $(CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_8Me$, R_5= H;
413f: R_3 = R_4 = CH_3, R_1 = (S)-Me, R_5 = $(CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_8Me$, R_2= H;

將化合物 411a、411b、411c、411d、411e 或 411f （1.0 mmol）分別和五氟苯酚基 2-（（6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-9-異丙基-2,3,3,8-四甲基-4,7-二側氧基-12-氧雜-2,5,8-三氮雜十四烷-11-基） 噻唑-4-羧酸酯 或 五氟苯基 2-（（3S,6S,9R,11R）-6 -（（S）-第二丁基）-3,9-二異丙基-2,8-二甲基-4,7-二側氧基-12-氧雜-2,5,8-三氮雜十四烷-11-基） 噻唑-4-羧酸酯 （1.15 mmol） 溶解在 DMF （20 mL） 中。然後加入 N,N-二異丙基乙胺 （4.8 mL，28 mmol）。將所得混合物在室溫下攪拌3 小時。真空除去溶劑後，將殘餘物在製備HPLC（C18柱，10-90% 乙腈/水）上純化，分別得到產物413a、413b、413c、413d、413e或413f。**413a**： 1.20 g，78% 收率，MS ESI m/z $C_{72}H_{117}N_{11}O_{22}S$ $[M+H]^+$ 計算值： 1520.80 實測值： 1521.65；**412b**： 1.33 g，62% 收率，MS ESI m/z $C_{101}H_{174}N_{12}O_{35}S$ $[M+H]^+$ 計算值： 2148.19 實測值： 2149.95；

412c： 1.55 g，74% 收率，MS ESI m/z $C_{98}H_{169}N_{12}O_{33}S$ $[M+H]^+$ 計算值： 2074.16 實測值： 2075.15；**412d**： 1.14 g，72% 收率，MS ESI m/z $C_{75}H_{124}N_{11}O_{23}S$ $[M+H]^+$ 計算值： 1578.85 實測值： 1579.90；**412e**： 1.18 g，75% 收率，MS ESI m/z $C_{75}H_{124}N_{11}O_{23}S$ $[M+H]^+$ 計算值： 1578.85 實測值： 1579.55；**412f**： 1.16 g，73% 收率，MS ESI m/z $C_{75}H_{124}N_{11}O_{23}S$ $[M+H]^+$ 計算值： 1578.85 實測值： 1579.75。

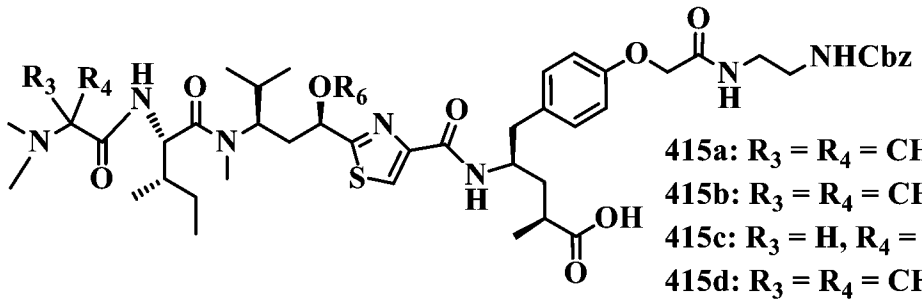
【0647】 實施例 450. 化合物**414a/b/c/d**的合成



414a: $R_3 = R_4 = CH_3$, R_6 = Ac
414b: $R_3 = R_4 = CH_3$, R_6 = Me
414c: R_3 = H, $R_4 = (CH_3)_2CH$, R_6 = Ac
414d: R_3 = H, $R_4 = (CH_3)_2CH$, R_6 = Me

向酸（10.0 mmol）的二氯甲烷（30 mL）溶液中加入N-羥基琥珀醯亞胺（1.38 g，12.0 mmol）和EDC HCl（2.30 g，12.0 mmol）。將反應混合物在室溫攪拌3 小時，然後濃縮。將殘餘物上樣至矽膠柱（50%-80% PE/乙酸乙酯）上純化，分別得到標題化合物414a、414b、414c或414d。**414a**： 5.47 g，88% 收率，ESI MS m/z $C_{29}H_{45}N_5O_8S$ $[M+H]^+$ 計算值 624.28，實測值624.58；**414b**： 4.87 g，82% 收率，ESI MS m/z $C_{28}H_{45}N_5O_7S$ $[M+H]^+$ 計算值 596.29，實測值596.25；**414c**： 5.41 g，85% 收率，ESI MS m/z $C_{30}H_{47}N_5O_8S$ $[M+H]^+$ 計算值 638.30，實測值638.85；**414d**： 5.17 g，85% 收率，ESI MS m/z $C_{29}H_{47}N_5O_7S$ $[M+H]^+$ 計算值 610.30，實測值610.56。

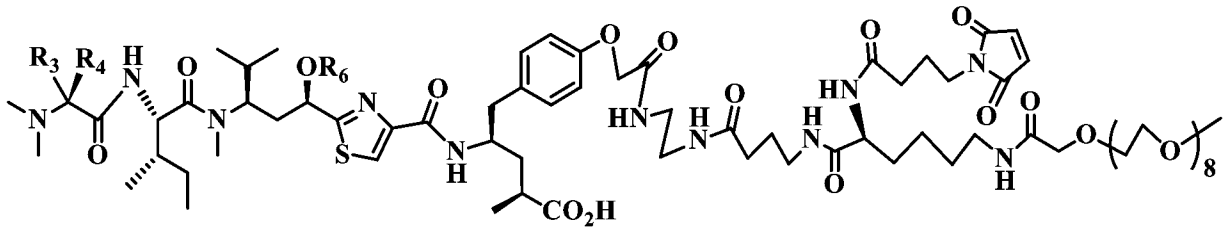
【0648】 實施例 451. 化合物**415a/b/c/d**的合成



415a: $R_3 = R_4 = CH_3$, $R_6 = Ac$
415b: $R_3 = R_4 = CH_3$, $R_6 = Me$
415c: $R_3 = H$, $R_4 = (CH_3)_2CH$, $R_6 = Ac$
415d: $R_3 = R_4 = CH_3$, $R_6 =$ Me

在室溫下，將（2S,4R）-4-胺基-5-（4-（2-（（2-（（（苄氧基）羰基）胺基）乙基）胺基）-2-側氧基乙氧基）苯基）-2-甲基戊酸（457 mg，1.0 mmol）和化合物414a、414b、414c或414d （1.0 mmol）分別在0.1 M NaH_2PO_4 （10 mL）和乙醇 （10 mL）中攪拌隔夜，然後濃縮，用SiO_2柱層析（5% -20% 甲醇/二氯甲烷）純化，分別得到標題化合物415a、415b、415c或415d。**415a**： 733 mg，76% 收率，ESI MS m/z $C_{49}H_{72}N_7O_{11}S$ $[M+H]^+$ 計算值966.50，實測值966.50. **415b**： 685 mg，73% 收率，ESI MS m/z $C_{48}H_{72}N_7O_{10}S$ $[M+H]^+$ 計算值 938.50，實測值938.50；**415c**： 713 mg，72% 收率，ESI MS m/z $C_{50}H_{74}N_7O_{11}S$ $[M+H]^+$ 計算值 980.51，實測值980.55；**415d**： 667 mg，70% 收率，ESI MS m/z $C_{49}H_{74}N_7O_{10}S$ $[M+H]^+$ 計算值 952.52，實測值952.55。

【0649】 實施例 452. 化合物**416a/416b/416c/416d**的合成



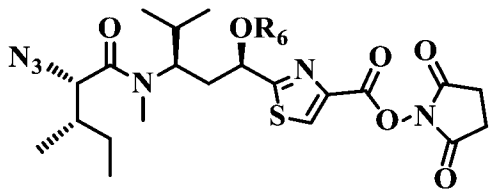
416a: $R_3 = R_4 = CH_3$, $R_6 = Ac$; 416b: $R_3 = R_4 = CH_3$, $R_6 = Me$
416c: $R_3 = H$, $R_4 = (CH_3)_2CH$, $R_6 = Ac$; 416d: $R_3 = R_4 = CH_3$, $R_6 =$ Me

在室溫下，將化合物 415a、415b、415c 或 415d （0.20 mmol） 分別溶解於甲醇 （20 mL） 加入 Pd/C （10 wt%，20 mg） 催化加氫 （1 atm H_2） 4小時。濾出觸媒，減壓濃縮濾液，得到胺基中間物化合物（97%-102%收率），為棕色泡沫狀固體，其無需進一步純化直接用於下

一步。

向製備的胺基化合物和五氟苯基酯（0.23 mmol）的DMF（8 mL）中中加入Et_3N（0.17 mL，1.2 mmol）。混合物在室溫下攪拌6 h，高真空濃縮，溶于少量水，在製備HPLC純化（C-18柱，10-90% 乙腈/水）。合併含有產物的組分，濃縮並凍乾，分別得到標題化合物416a、416b、416c或416d。**416a**： 197 mg，61% 收率 （two steps），ESI MS m/z $C_{77}H_{126}N_{11}O_{24}S$ $[M+H]^+$ 計算值1620.8699，實測值1620.8810；**416b**：189 mg，59% 收率 （兩步），ESI MS m/z $C_{76}H_{126}N_{11}O_{23}S$ $[M+H]^+$ 計算值1592.8750，實測值1592.8845；**416c**： 209.1 mg，64% 收率，ESI MS m/z $C_{78}H_{128}N_{11}O_{24}S$ $[M+H]^+$ 計算值1634.8855，實測值1634.8980；**416d**： 196 mg，61% 收率 （兩步），ESI MS m/z $C_{77}H_{128}N_{11}O_{23}S$ $[M+H]^+$ 計算值1606.8906，實測值1606.9035。

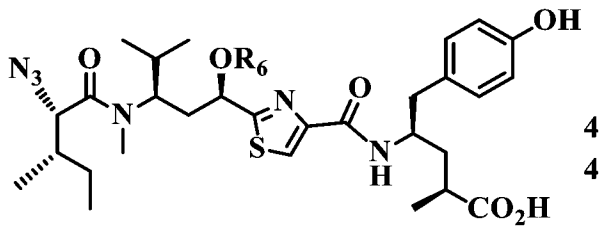
【0650】 實施例 453. 化合物**417a/b**的合成



417a: R_6 = Ac
417b: R6 = Me

向酸（10.0 mmol）的二氯甲烷（40 mL）溶液中加入N-羥基琥珀醯亞胺（1.38 g，12.0 mmol）和EDC HCl（2.30 g，12.0 mmol）。將反應混合物在室溫攪拌3 h，然後濃縮。將殘餘物在矽膠柱上（50%-80% 乙酸乙酯/石油醚）純化，得到標題化合物417a或417b。**417a**： 4.60 g，86% 收率，ESI MS m/z $C_{23}H_{32}N_6O_7S$ $[M+H]^+$ 計算值537.19，實測值537.88；**417b**： 4.56 g，90% 收率，ESI MS m/z $C_{22}H_{32}N_6O_6S$ $[M+H]^+$ 計算值509.19，實測值509.56。

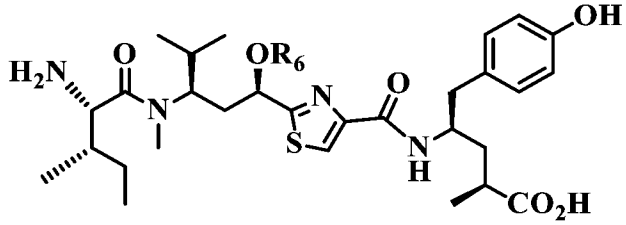
【0651】 實施例 454. 化合物**418a/b**的合成



418a: R_6 = Ac
418b: R6 = Me

將（2S,4R）-4-胺基-5-（4-羥基苯基）-2-甲基戊酸（1.78 g，8.0 mmol）和化合物 417a 或 417b（8.0 mmol）的 0.1 M NaH_2PO_4（10 mL）和乙醇 （10 mL）混合物和 在室溫下攪拌隔夜，然後濃縮，藉由柱層析法（50% 乙酸乙酯/石油醚，0-5% 甲醇/二氯甲烷）純化，得到標題化合物418a或418b。**418a**： 4.13 g，80% 收率，ESI MS m/z $C_{31}H_{44}N_6O_7S$ $[M+H]^+$ 計算值645.30，實測值645.96；**418b**： 4.34 g，88% 收率，ESI MS m/z $C_{30}H_{44}N_6O_6S$ $[M+H]^+$ 計算值617.30，實測值617.52。

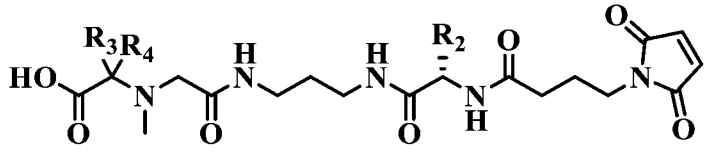
【0652】 實施例 455. 化合物**419a/b**的合成



419a: R_6 = Ac
419b: R6 = Me

將化合物 418a 或 418b （6.0 mol） 溶解於甲醇 （10 mL） 中，加入 Pd/C （10 mg，5 wt%），並將混合物在氫氣球 （1 atm H_2） 下攪拌隔夜，然後過濾。將濾液濃縮得到標題產物（假設100%收率），無需進一步純化，可用於下一步。

【0653】 實施例 456. 化合物**420a/b**的合成



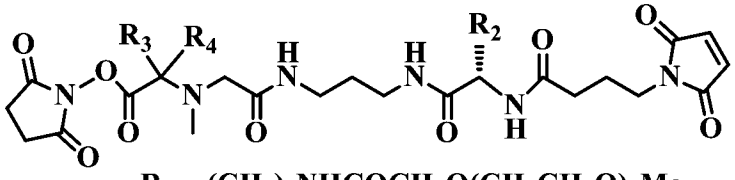
R_2 = $(CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_8Me$

420a: R_3 = R_4 = CH_3
420b: R_3 = H, R_4 = $(CH_3)_2CH$

將化合物（S）-N-（6-（（3-胺基丙基）胺基）-5-（4-（2,5-二側氧

基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基）-6-側氧基六基）-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜二十八烷-28-醯胺（15.8 g，20 mmol），3,3,4-三甲基嗎啉-2,6-二酮 或 3-異丙基-4-甲基嗎啉-2,6-二酮（25 mmol）的 四氫呋喃 （100 mL）回流 2.0 h，冷卻至室溫並集中。藉由製備HPLC（C18柱，10-90% 乙腈/水）純化殘餘物，得到標題化合物420a或420b。**420a**： 9.48 g，50% 收率，ESI MS m/z $C_{43}H_{76}N_6O_{17}$ $[M+H]^+$ 計算值949.53，實測值949.89；**420b**： 11.8 g，62% 收率，ESI MS m/z $C_{44}H_{78}N_6O_{17}$ $[M+H]^+$ 計算值 963.54，實測值963.52。

【0654】 實施例 457. 化合物**421a/b**的合成

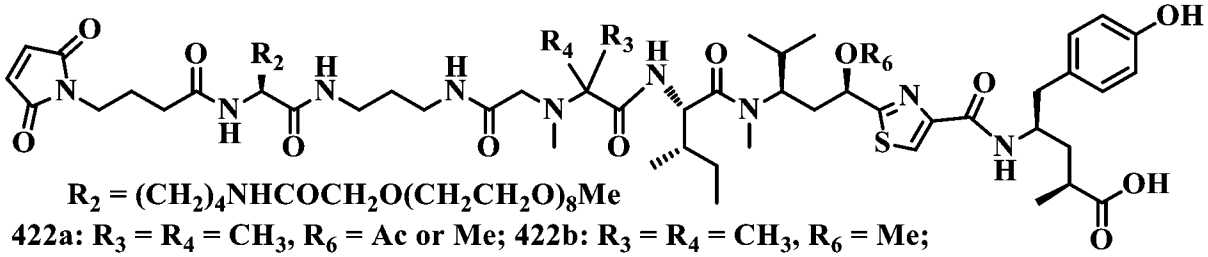


$R_2 = (CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_8Me$

421a: $R_3 = R_4 = CH_3$
421b: $R_3 = H$, $R_4 = (CH_3)_2CH$

向化合物420a或420b （10.0 mmol）的二氯甲烷（40 mL）溶液中加入N-羥基琥珀醯亞胺（1.38 g，12.0 mmol）和EDC HCl（2.30 g，12.0 mmol）。將反應混合物在室溫攪拌3 小時，然後濃縮。將殘餘物在矽膠柱上（50%-80% 乙酸乙酯/石油醚）純化，得到標題化合物421a或421b。**421a**： 9.31 g，89% 收率，ESI MS m/z $C_{47}H_{79}N_7O_{19}$ $[M+H]^+$ 計算值1046.54，實測值1046.98；**421b**： 9.33 g，88% 收率，ESI MS m/z $C_{48}H_{81}N_7O_{19}$ $[M+H]^+$ 計算值1060.56，實測值1060.48。

【0655】 實施例 458. 化合物**422a/b/c/d**的合成

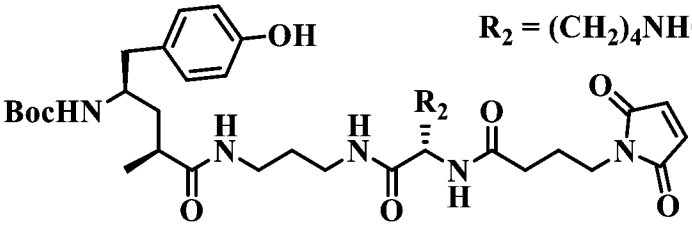


$R_2 = (CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_8Me$

422a: $R_3 = R_4 = CH_3$, R_6 = Ac or Me; 422b: $R_3 = R_4 = CH_3$, R_6 = Me;
422c: $R_3 = H$, $R_4 = (CH_3)_2CH$, R_6 = Ac;422d: $R_3 = H$, $R_4 = (CH_3)_2CH$, R_6 = Me

將化合物 421a 或 421b （1.00 mmol） 和化合物 419a （0.50 g，0.80 mmol） 或 419b （0.47 g，0.80 mmol） 的 0.1 M NaH_2PO_4 （1.0 mL） 和 乙醇 （1.0 mL） 中的混合物在室溫下攪拌隔夜，然後濃縮，溶于水並藉由製備HPLC（C18柱，10-90% 乙腈/水）純化，得到標題化合物422a、422b、422c或422d。**422a （R_6 = Ac）**： 1.05 g，85% 收率，ESI MS m/z $C_{74}H_{120}N_{10}O_{23}S$ $[M+H]^+$ 計算值1549.82，實測值1551.33；**422b （R_6 = Me）**： 1.02 g，82% 收率，ESI MS m/z $C_{73}H_{120}N_{10}O_{22}S$ $[M+H]^+$ 計算值 1521.83，實測值1522.33；**422c （R_6 = Ac）**： 0.94 g，75% 收率，ESI MS m/z $C_{75}H_{122}N_{10}O_{23}S$ $[M+H]^+$ 計算值1562.84，實測值1562.88；**422d （R_6 = Me）**： 0.76 g，62% 收率，ESI MS m/z $C_{74}H_{122}N_{10}O_{22}S$ $[M+H]^+$ 計算值1534.85，實測值1536.88。

【0656】 實施例 459. （（34S,42S,44R）-34-（4-（2,5-二側氧基2,5-二氫1H吡咯-1-基）丁醯胺基）-45-（4-羥基苯基）-42-甲基-28,35,41-三氧雜-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜-29,36,40-三氮雜四十四烷-44-基）胺基第三丁基酯（423） 的合成

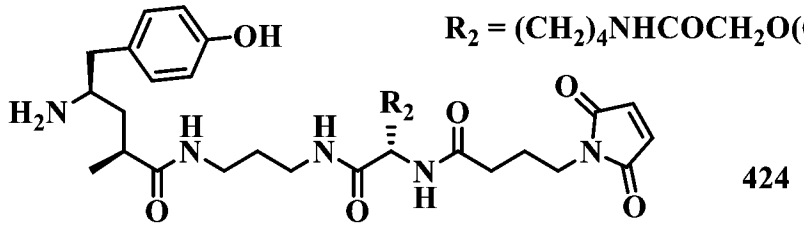


423

向（S）-N-（6-（（3-胺基丙基）胺基）-5-（4-（2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基）丁醯胺基） -6-側氧基六基）-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜二十八烷-28-醯胺（7.91 g/，10.0 mmol）的 四氫呋喃/二氯甲烷（40/40 mL）溶液中加入（ 2S,4R）-4-（（第三丁氧基羰基）胺基）-5-（4-羥基苯基）-2-甲基戊酸（3.88 g，

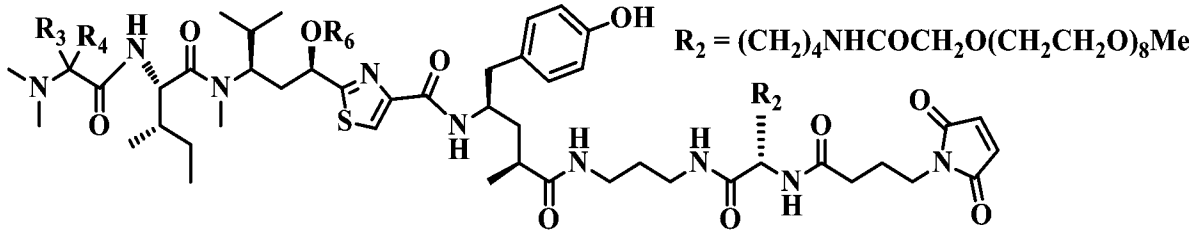
12.0 mmol）和EDC HCl（2.30 g，12.0 mmol）。將反應混合物在室溫攪拌3小時，然後濃縮。殘餘物經矽膠柱純化（50%-80% 乙酸乙酯/石油醚），得到標題化合物（6.90 g，63%收率）。ESI MS m/z $C_{53}H_{88}N_6O_{18}$ $[M+H]^+$ 計算值1097.62，實測值1098.52。

【0657】 實施例 460. N-（（S）-6-（（3-（（2S,4R）-4-胺基-5-（4-羥基苯基）-2-甲基戊醯胺基）丙基）胺基）-5-（4-（2,5-二側氧基2,5-二氫1H吡咯-1-基丁醯胺基）-6-側氧基六基）-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜二十八烷-28-醯胺（424）的合成



在室溫下，化合物 423 （0.88 g，0.8 mmol） 的二氯甲烷 （2.5 mL） 與TFA （2.5 mL）反應 2 小時後濃縮，與甲苯共沸蒸發得到粗品424（假設收率100%），直接用於下一步。

【0658】 實施例 461. 化合物**425a/b/c/d**的合成

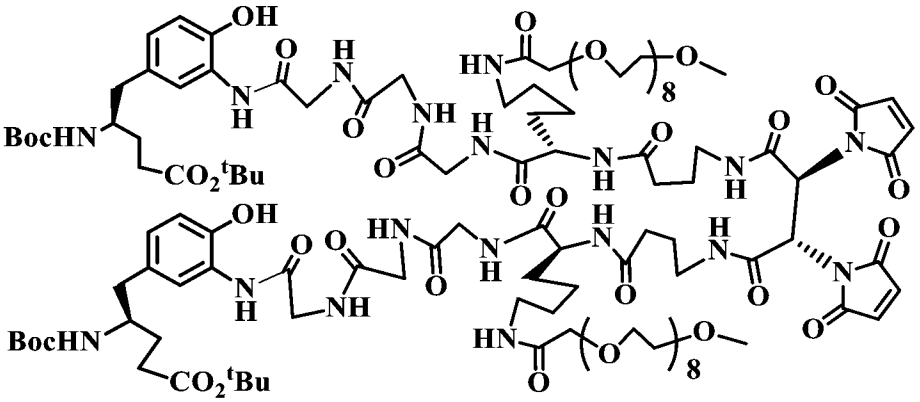


425a: $R_3 = R_4 = CH_3$, R_6 = Ac; 425b: $R_3 = R_4 = CH_3$, R_6 = Me;
425c: R_3 = H, $R_4 = (CH_3)_2CH$, R_6 = Ac; 425d: R_3 = H, $R_4 = (CH_3)_2CH$, R_6 = Me

將化合物 414a、414b、414c 或 414d （1.0 mmol） 和化合物 424 （0.80 g，0.8 mmol） 的 0.1 M NaH_2PO_4 （2.5 mL） 和乙醇 （5 mL） 的混合物在室溫下攪拌隔夜，然後濃縮，溶于水並藉由製備HPLC（C18柱，10-90% 乙腈/水）純化，得到標題化合物425a、425b、425c或

425d。**425a**： 1.02 g，85% 收率，ESI MS m/z $C_{73}H_{120}N_{10}O_{21}S$ $[M+H]^+$ 計算值1505.84，實測值1506.62；**425b**： 0.93 g，79% 收率，ESI MS m/z $C_{72}H_{120}N_{10}O_{20}S$ $[M+H]^+$ 計算值 1477.84，實測值1477.60；**425c**：0.85 g，70% 收率，ESI MS m/z $C_{74}H_{122}N_{10}O_{21}S$ $[M+H]^+$ 計算值1519.85，實測值1520.20；**425d**： 0.85 g，71% 收率，ESI MS m/z $C_{73}H_{122}N_{10}O_{20}S$ $[M+H]^+$ 計算值1491.86，實測值1491.80。

【0659】實施例 462. （4R,4 ' R）-二第三丁基5,5'-（（（（11S,19S,20S,28S）-19,20-雙（2,5-二側氧基2,5-二氫1H吡咯-1-基）-4,7,10,13,18,21,26,29,32,35-十側氧基-11,28-雙（28-側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜29-氮雜三十三烷-33-基）-3,6,9,12,17,22,27,30,33,36-十氮雜三十八烷-1,38-二醯基）雙（氮雜二基））雙（4-羥基-3,1-亞苯基））雙（4-（（第三丁氧基羰基）胺基）戊酸酯）（426）的合成

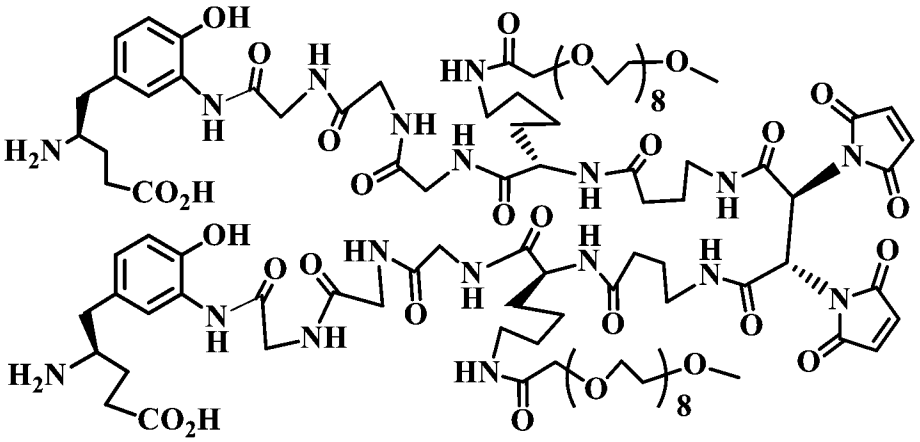


426

向化合物 207 （1.001 g，0.520 mmol） 和 （R）-5-（3-胺基-4-羥基苯基）-4-（（第三丁氧基羰基）胺基）戊酸第三丁酯 （0.401 g，1.054 mmol）的 DMA （40 mL） 中加入 EDC （0.701 g，3.651 mmol） 和 N,N-二異丙基乙胺 （0.20 mL，1.15 mmol）。將混合物攪拌8小時，減壓濃縮並藉由矽膠柱層析法純化，使用梯度為5-15%甲醇/二氯

甲烷的溶液，得到標題產物（1.033 g，75%收率）。MS ESI m/z 計算值 $C_{122}H_{197}N_{18}O_{46}$ $[M+H]^+$ 2650.3630，實測值2650.3820。

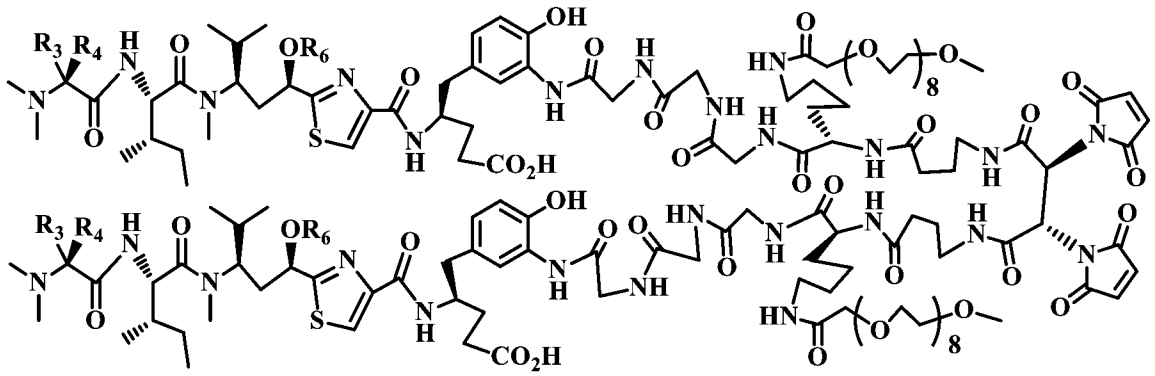
【0660】 實施例 463. （4R,4'R）-5,5'-（（（（11S,19S,20S,28S）-19,20- 雙（2,5- 二側氧基 2,5- 二氫 -1H- 吡咯 -1- 基）-4,7,10,13,18,21,26,29,32,35- 十側氧基 -11,28- 雙（28- 側氧基 -2,5,8,11,14,17,20,23,26- 九氧雜 29- 氮雜三十三烷 -33- 基）-3,6,9,12,17,22,27,30,33,36-十氮雜三十八烷-1,38-二醯基）雙（氮雜二基））雙（4-羥基-3,1-亞苯基））雙（4-胺基戊酸）（427）的合成



427

在室溫下，化合物 426（1.00 g，0.377 mmol）的二惡烷（10 mL）與濃鹽酸（3 mL）反應 0.5 h，用甲苯和二惡烷（10/10 ml）稀釋並濃縮，得到標題化合物，為黃色油狀物（0.891 g，>100%收率）。ESI-MS m/z $C_{104}H_{165}N_{18}O_{42}$ $[M+H]^+$ 計算值：2338.1330，實測值：2318.1560；$C_{104}H_{166}N_{18}O_{42}$ $[M+2H]^{2+}$：1169.5704，實測值：1169.5785。

【0661】 實施例 464. 化合物428a，428b，428c 和 428d的合成

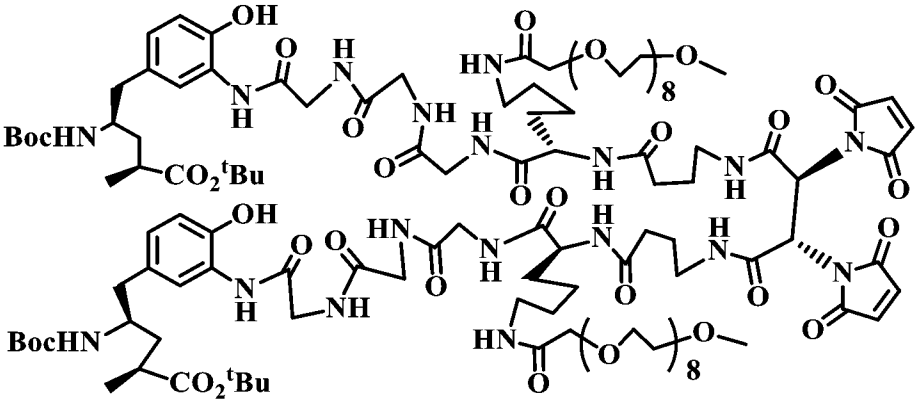


428a: $R_3 = R_4 = CH_3$, R_6 = Ac;
428b: $R_3 = R_4 = CH_3$, R_6 = Me;
428c: R_3 = H, $R_4 = (CH_3)_2CH$, R_6 = Ac;
428d: R_3 = H, $R_4 = (CH_3)_2CH$, R_6 = Me

將化合物 427 （200 mg，0.0856 mmol） 和五氟苯基 2-（（6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-9-異丙基-2,3,3,8-四甲基-4,7,13-三氧雜-12-氧雜-2,5,8-三氮雜十四烷-11-基） 噻唑-4-羧酸酯（120 mg,0.173 mmol）,五氟苯基 2-（（6S,9R,11R）-6-（ （S）-第二丁基）-9-異丙基-2,3,3,8-四甲基-4,7-二側氧基-12-氧雜-2,5,8-三氮雜-11-基） 噻唑-4-羧酸酯（120 mg，0.180 mmol），五氟苯酚基 2-（（3S,6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-3,9-二異丙基-2,8-二甲基-4,7,13-三氧雜-12-氧雜-2,5,8-三氮雜十四烷-11-基） 噻唑-4-羧酸酯（126 mg,0.178 mmol）,五氟苯基 2-（（3S,6S,9R,11R）-6-（ （S）-第二丁基）-3,9-二異丙基-2,8-二甲基-4,7-二側氧基-12-氧雜-2,5,8-三氮雜十三烷-11-基）噻唑-4-羧酸酯（122 mg，0.180 mmol）分別溶解於 DMA（10 mL）中。然後將 N,N-二異丙基乙胺 （0.1 mL，0.575 mmol）加入到每個反應中。將所得混合物在室溫攪拌3 小時。真空除去溶劑後，將殘餘物在製備HPLC上純化（C18柱，10-60% 乙腈/水，50 min，d 20 x 250 mm，v = 10 ml/min），得到標題產物428a，分別為 428b、428c 和 428d。**428a**： 192.3 mg，67% 收率，MS ESI m/z $C_{154}H_{245}N_{26}O_{52}S_2$ $[M+H]^+$ 計算值： 3354.6768，實測值： 3354.6915；

428b： 193.6 mg，69% 收率，MS ESI m/z $C_{152}H_{245}N_{26}O_{50}S_2$ $[M+H]^+$ 計算值： 3298.6870，實測值： 3298.7025；**428c**： 188.6 mg，65% 收率，MS ESI m/z $C_{156}H_{249}N_{26}O_{52}S_2$ $[M+H]^+$ 計算值： 3382.7081，實測值： 3382.7140；**428d**： 199.3 mg，69% 收率，MS ESI m/z $C_{154}H_{249}N_{26}O_{50}S_2$ $[M+H]^+$ 計算值： 3326.7183，實測值： 3326.7980。

【0662】實施例 465. （2S,2'S,4R,4 ' R）-二第三丁基5,5'-（（（（11S,19S,20S,28S）-19,20-雙（2,5-二側氧基2,5-二氫1H吡咯-1-基）-4,7,10,13,18,21,26,29,32,35-十側氧基-11,28-雙（28-側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜29-氮雜三十三烷-33-基）-3,6,9,12,17,22,27,30,33,36-十氮雜三十八烷-1,38-二醯基）雙（氮雜二基））雙（4-羥基-3,1-亞苯基））雙（4-（（第三丁氧基羰基）胺基）-2-甲基戊酸酯）（429）的合成

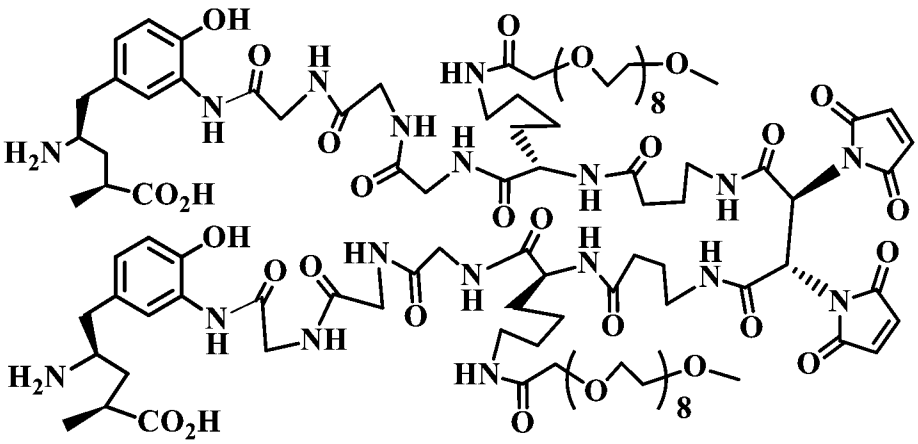


429，

向化合物 207 （1.051 g，0.546 mmol） 和 （2S,4R）-5-（3-胺基-4-羥基苯基）-4-（（第三丁氧基羰基）胺基）-2-甲基戊酸第三丁酯（0.451 g，1.143 mmol）的DMA （40 mL） 中加入 EDC （0.851 g，4.432 mmol） 和 N,N-二異丙基乙胺 （0.30 mL，1.725 mmol）。將混合物攪拌8小時，減壓濃縮並藉由矽膠柱層析法純化，5-15%甲醇/二氯甲烷梯度梯度溶離，得到標題產物（1.155 g，79%收率）。MS ESI m/z

$C_{124}H_{201}N_{18}O_{46}$ $[M+H]^+$ 計算值2678.3943，實測值2678.4025。

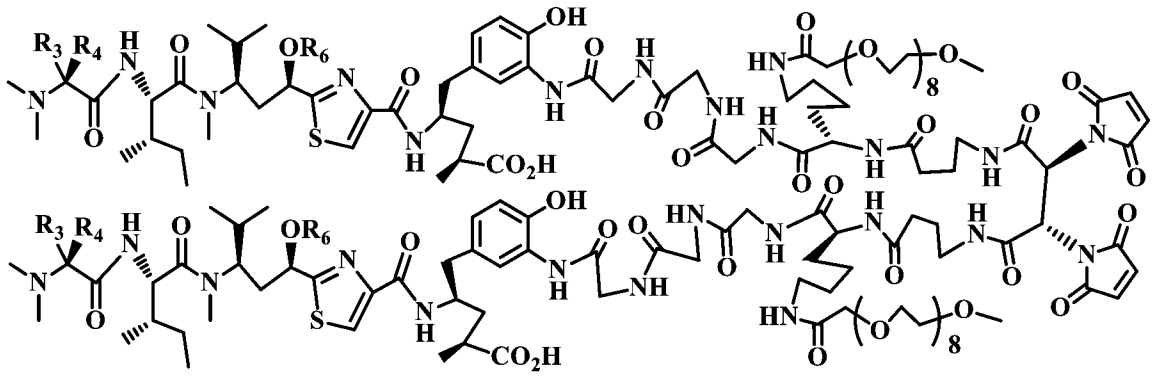
【0663】實施例 466.（2S,2'S,4R,4'R）-5,5'-（（（（11S,19S,20S,28S）-19,20-雙（2,5-二側氧基2,5-二氫1H-吡咯-1-基）-4,7,10,13,18,21,26,29,32,35-十側氧基-11,28-雙（28-側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26-九氧雜29-氮雜三十三烷-33-基）-3,6,9,12,17,22,27,30,33,36-十氮雜三十八烷-1,38-二醯基）雙（氮雜二基））雙（4-羥基-3,1-亞苯基））雙（4-胺基-2-甲基戊酸）（430）的合成



430，

在室溫下，化合物 429（1.03 g，0.384 mmol）的二惡烷（10 mL）與鹽酸（濃 3 mL）反應 0.5 h，用甲苯和二惡烷（10/10 ml）稀釋並濃縮，得到標題化合物，為黃色油狀物（0.911 g，>100%收率）。ESI-MS m/z $C_{106}H_{169}N_{18}O_{42}$ $[M+H]^+$ 計算值：2366.1642，實測值：2366.1795；$C_{106}H_{170}N_{18}O_{42}$ $[M+2H]^{2+}$：1183.5861，實測值：1183.5970。

【0664】實施例 467. 化合物431a，431b，431c 和 431d的合成



431a: $R_3 = R_4 = CH_3$, R_6 = Ac;
431b: $R_3 = R_4 = CH_3$, R_6 = Me;
431c: R_3 = H, $R_4 = (CH_3)_2CH$, R_6 = Ac;
431d: R_3 = H, $R_4 = (CH_3)_2CH$, R_6 = Me

將化合物 429（210 mg，0.0887 mmol） 和五氟苯基 2-（（6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-9-異丙基-2,3,3,8-四甲基-4,7,13-三氧雜-12-氧雜-2,5,8-三氮雜十四烷-11-基） 噻唑-4-羧酸酯（130 mg，0.187 mmol），五氟苯基 2-（（6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-9-異丙基-2,3,3,8-四甲基-4,7-二側氧基-12-氧雜-2,5,8-三氮雜-11-基）噻唑-4-羧酸酯（128 mg，0.192 mmol），五氟苯基2-（（3S,6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-3,9-二異丙基-2,8-二甲基-4,7,13-三氧雜-12-氧雜-2,5,8-三氮雜十四烷-11-基） 噻唑-4-羧酸酯（135 mg,0.191 mmol）,五氟苯基 2-（（3S,6S,9R,11R）-6-（（S）-第二丁基）-3,9-二異丙基-2,8-二甲基-4,7-二側氧基-12-氧雜-2,5,8-三氮雜十三烷-11-基）噻唑-4-羧酸酯（131 mg，0.193 mmol）分別溶解於 DMA（10 mL）中。然後將 N,N-二異丙基乙胺 （0.1 mL，0.575 mmol） 加入到每個反應中。將所得混合物在室溫攪拌3 小時。真空除去溶劑後，將殘餘物在製備HPLC上純化（C18柱，10-60% 乙腈/水，50 min，d 20 x 250 mm，v = 10 ml/min），得到標題產物431a，分別為 431b、431c 和 431d。**431a**： 210.2 mg，70% 收率，MS ESI m/z $C_{156}H_{249}N_{26}O_{52}S_2$ $[M+H]^+$ 計算值： 3382.7081，實測值： 3382.7210；

431b： 207.7 mg，69% 收率，MS ESI m/z $C_{154}H_{249}N_{26}O_{50}S_2$ $[M+H]^+$ 計算值： 3326.7183，實測值： 3326.7320；**431c**： 206.3 mg，68% 收率，MS ESI m/z $C_{158}H_{253}N_{26}O_{52}S_2$ $[M+H]^+$ 計算值： 3410.7394，實測值： 3410.7515；**431d**： 211.5 mg，71% 收率，MS ESI m/z $C_{156}H_{253}N_{26}O_{50}S_2$ $[M+H]^+$ 計算值： 3354.7496，實測值： 3354.7665。

【0665】 實施例 468. 偶聯反應

將鋅胺基錯合物（在 10 -60 mM 中，使用 1.0-5.0 eq. 的抗體）和 TCEP（在 100 mM 中，使用 2.5 -4.5 eq. 的抗體）依次加入到含有抗體的溶液中（例如BCMA、Her2、EGFR、CD33、Trop2、Steap1、CD56、PSMA 和 Her3 抗體的10 -30 mg/mL，20 mM pH 5.5 – 7.5PBS 緩衝液，2-8 °C）。在 2-8 °C 孵育 12-16 小時（隔夜）後，引入有效載荷/連接子複合物（100-200 mM，2.0-8 .0 eq. 所用抗體）並在 2 -8 °C再孵育 2-4 小時。孵育後，加入半胱氨酸（100 -200 mM，4.0 -8.0 eq.的抗體）以去除多餘的TCEP，加入半胱氨酸（100 -200 mM，2.0 -6.0 eq.的抗體）以去除多餘的有效載荷，加入EDTA（100 -200 mM，4.0 – 6.0 eq. 的抗體）以收集鋅，並加入DHAA（100 -200 mM，8.0 – 30.0 eq.的抗體）以氧化游離巰基蛋白質中的基團。最後使用脫鹽柱（Zeba Spin Desalting Columns，40K MWCO）或UF/DF，或離子交換層析純化反應混合物，並使用HIC-HPLC或HPLC-MS分析藥物/抗體比（DAR）。HIC-HPLC 結果如表 1 和表 2 所示。

【0666】 實施例 469. DAR分析

DAR採用HIC-HPLC分析，HPLC參數如下：

HPLC	Agilent 1260					
柱子	Thermo HIC butyl 4.6 × 100 mm					
相 A	PBS緩衝液含有（NH_4）$_2SO_4$，					
相 B	PBS 緩衝液					
樣本	注射體積 10 μL					
比例	0.8 mL/min					
波長	280 nm					
比重	時間（min）	0	35	40	42	48
	相 A（%）	80	0	0	80	80
	相 B（%）	20	100	100	20	20

表 1. BCMA-ADC （C-408b） 的藥物分佈藉由 HIC-HPLC 分析，偶聯條件是在 3.6 當量的TCEP 與不同當量的鋅錯合物，pH 7.2，4 °C，偶聯時間 13 -16 小時：

鋅的錯合物	**鋅的錯合物的當量**	**DAR**	**D0**	**D2**	**D4**	**D6**	**D8**
$ZnCl_2$	2.0	4.51	0.88	10.96	64.81	8.48	14.87
	2.2	4.47	0.92	11.72	64.48	8.62	14.26
Z-01	1.8	4.69	0.77	5.92	69.24	5.99	18.08
	2.0	4.59	0.23	8.02	69.77	6.25	15.74
	2.2	4.67	0.19	7.50	68.42	6.36	17.53
	2.4	4.77	0.29	6.68	66.59	7.02	19.42
Z-02	2.0	4.72	0.14	6.74	68.57	6.37	18.19
	2.2	4.72	0.18	6.99	68.09	6.25	18.49
	2.4	4.59	0.21	7.73	70.31	5.81	15.93
	2.6	4.63	0.25	7.61	69.12	6.33	16.69
Z-03	1.8	4.39	0.30	10.79	70.67	5.51	12.72

	2.0	4.36	0.38	11.63	69.85	6.04	12.11
	2.2	4.35	0.37	11.31	70.59	5.99	11.74
	2.4	4.18	0.64	15.12	68.37	6.13	9.74
Z-04	1.8	4.52	0.42	7.77	71.79	5.37	14.64
	2.0	4.47	1.17	6.80	73.44	4.69	13.90
	2.2	4.47	0.89	7.28	72.90	5.13	13.79
	2.4	4.52	0.21	7.82	72.12	5.45	14.40
Z-05	1.8	4.56	0.68	8.08	69.20	6.67	15.37
	2.0	4.54	0.66	8.21	68.76	8.12	14.25
	2.2	4.53	0.72	8.43	68.45	8.41	13.99
Z-06	2.0	4.46	0.40	8.31	72.43	5.69	13.17
	2.2	4.42	0.27	8.09	74.11	5.34	12.19
	2.4	4.37	0.59	8.02	74.73	5.44	11.22
	2.6	4.38	0.60	8.12	74.02	5.78	11.48
Z-07	2.0	4.65	0.23	7.33	69.18	6.46	16.80
	2.2	4.63	0.17	6.93	70.46	6.13	16.31
	2.4	4.57	0.63	5.73	73.04	5.61	14.99
	2.6	4.50	0.60	7.03	72.33	6.39	13.65
Z-08	2.0	4.52	1.20	6.85	71.59	5.59	14.77
	2.2	4.56	0.34	8.25	69.99	5.85	15.57
	2.4	4.49	0.76	7.40	72.34	5.39	14.12
	2.6	4.49	0.71	7.92	71.43	5.72	14.22
Z-09	2.0	4.68	0.82	6.17	68.58	6.81	17.62
	2.2	4.66	1.30	5.48	69.56	6.24	17.42
	2.4	4.65	0.22	6.88	69.97	5.84	17.10
	2.6	4.64	0.71	6.67	69.51	6.10	17.01
Z-10	2.0	4.55	0.86	7.74	70.30	5.32	15.78
	2.2	4.50	1.41	6.86	71.75	5.47	14.51

	2.4	4.41	1.08	9.08	71.30	5.46	13.08
	2.6	4.45	0.98	8.61	71.01	5.42	13.98
Z-11	2.0	4.56	0.29	7.58	70.84	6.49	14.81
	2.2	4.50	0.58	6.71	73.13	6.24	13.34
	2.4	4.48	0.14	6.19	75.46	5.86	12.35
	2.6	4.49	0.31	6.65	74.35	5.81	12.88
Z-13	1.8	4.52	0	8.37	70.66	7.47	13.50
	2.0	4.54	0	6.35	73.92	5.98	13.76
	2.2	4.44	0	7.66	74.76	5.71	11.87
	2.4	4.40	0.08	8.18	74.89	5.43	11.42
	2.6	4.42	0.10	7.99	74.52	5.67	11.72
Z-14	1.8	4.48	0	8.63	72.34	5.60	13.42
	2.0	4.45	0	7.71	74.46	5.48	12.35
	2.2	4.41	0	8.88	73.72	5.55	11.85
	2.4	4.39	0	9.35	73.64	5.40	11.62
	2`6	4.39	0.08	9.11	73.48	5.63	11.70
Z-15	1.8	4.61	0	6.62	71.87	5.69	15.82
	2.0	4.48	0.98	7.67	71.47	5.96	13.92
	2.2	4.46	0	8.44	73.09	5.36	13.11
	2.4	4.43	0	8.07	74.56	5.38	11.99
	2.6	4.45	0.11	8.11	73.98	5.48	12.32
Z-16	1.8	4.46	0	8.59	72.73	5.74	12.94
	2.0	4.41	0	9.47	72.69	5.91	11.93
	2.2	4.35	0	10.68	72.33	5.64	11.35
	2.4	4.42	0	7.70	75.35	5.88	11.07
	2.6	4.35	0.08	8.91	74.82	5.71	10.48
Z-17	1.8	4.46	0	8.44	72.72	6.03	12.81
	2.0	4.41	0	10.48	70.86	6.23	12.43

	2.2	4.44	0	8.89	72.57	6.08	12.46
	2.4	4.42	0	8.06	74.59	5.74	11.61
	2.6	4.43	0.07	8.11	73.82	5.98	12.02
Z-19	2.0	4.18	0.51	12.52	73.42	4.74	8.80
	2.2	4.20	0.52	12.92	71.90	5.29	9.37
Z-20	2.0	4.32	0.36	10.17	73.54	5.01	10.91
	2.2	4.29	0.38	10.75	73.19	5.16	10.51
Z-21	2.0	4.42	0.39	7.84	74.76	4.57	12.44
	2.2	4.33	0.40	8.34	76.09	4.68	10.49
	2.4	4.34	0.38	8.38	75.78	4.59	10.87
Z-22	2.0	4.42	0.36	9.99	71.29	5.13	13.23
	2.2	4.41	0.34	8.14	74.38	4.99	12.14
	2.4	4.40	0.41	8.49	73.82	5.07	12.21
Z-23	2.0	4.49	0.16	8.10	72.55	5.27	13.92
	2.2	4.41	0.15	8.42	74.25	5.02	12.16
	2.4	4.42	0.21	8.40	73.79	5.11	12.49
Z-25	2.2	4.26	0.54	11.43	72.87	5.03	10.13
Z-26	2.0	4.48	0.41	9.25	70.44	5.65	14.25
	2.2	4.29	0.43	10.32	73.86	4.86	10.53
	2.4	4.32	0.62	10.01	73.11	4.92	11.34
Z-27	2	4.39	0.36	8.62	74.18	4.96	11.88
	2.2	4.37	0.32	9.26	73.80	5.07	11.55
	2.4	4.36	0.41	9.41	73.53	5.05	11.60
Z-28	2.0	4.39	0.36	8.02	75.08	4.96	11.59
	2.2	4.31	0.43	9.24	75.20	4.57	10.56
	2.4	4.32	0.47	9.01	74.90	5.09	10.53
Z-29	2.0	4.08	6.50	8.07	70.53	4.50	10.40
	2.2	4.04	6.93	8.14	70.70	4.34	9.89

	2.4	4.07	6.41	8.49	70.11	4.77	10.22
Z-31	1.5	4.94	0	1.75	69.81	8.26	20.19
	1.8	4.89	0	1.53	71.70	7.61	19.16
	2.0	4.87	0	1.45	72.38	7.18	18.99
	2.2	4.78	0	2.65	73.24	6.64	17.47
	2.4	4.83	0	1.56	73.46	6.98	18.01
	2.6	4.82	0	1.83	73.18	6.82	18.17
Z-32	1.5	4.85	0	1.49	72.98	7.00	18.52
	1.8	4.80	0	1.42	74.04	7.53	17.01
	2.2	4.71	0	1.32	77.34	5.98	15.36
	2.4	4.65	0	1.66	78.21	5.91	14.22
	2.6	4.69	0	2.07	76.60	5.95	15.37
Z-33	1.5	4.9	0	1.59	69.64	10.82	17.95
	2.0	4.93	0	1.90	68.33	11.12	18.65
	2.2	4.96	0	1.27	67.92	12.14	18.67
	2.4	5.04	0	0.90	66.62	11.78	20.70
	2.6	5.08	0	0.86	65.16	12.90	21.08

表 2. BCMA-ADC （C-408b） 的藥物分佈藉由 HIC-HPLC 分析，偶聯條件是在 3.0 -4.0當量的TCEP，2.2 或 2.4當量的 Z-11，Z-16，Z-21，Z-28 和 Z-32，6.0當量的化合物408b，pH 7.0，4 °C，偶聯時間 15 小時：

胺基鋅錯合物	錯合物的當量	TCEP的當量	DAR	D0	D2	D4	D6	D8
Z-11	2.2	3.0	3.8	1.10	17.37	73.57	5.39	2.57
Z-11	2.2	3.2	3.9	1.04	13.1	77.47	5.37	3.02
Z-11	2.2	3.4	4.0	0.04	10.84	79.51	5.78	3.83
Z-11	2.2	3.6	4.2	0.03	7.03	80.43	6.05	6.46
Z-11	2.2	3.8	4.4	0.09	4.32	80.82	5.24	9.53

Z-11	2.2	4.0	4.4	0.02	3.57	80.57	4.92	10.92
Z-11	2.4	3.0	4.0	0.32	12.88	77.57	5.21	4.02
Z-11	2.4	3.2	4.0	0.22	10.40	79.57	5.20	4.61
Z-11	2.4	3.4	4.2	0.10	7.59	80.81	5.48	6.02
Z-11	2.4	3.6	4.1	0.21	8.06	81.08	5.04	5.61
Z-11	2.4	3.8	4.3	0.19	5.87	80.63	6.14	7.17
Z-11	2.4	4.0	4.3	0.29	6.39	79.98	4.16	9.18
Z-16	2.4	3.2	3.9	1.50	14.46	75.54	4.50	4.00
Z-16	2.4	3.4	4.0	0.08	11.71	78.57	5.38	4.26
Z-16	2.4	3.6	4.0	0.35	11.53	77.7	6.13	4.29
Z-16	2.4	3.8	4.1	0.14	10.32	77.58	6.05	6.91
Z-21	2.4	3.2	4.0	0.10	10.58	78.97	6.34	4.01
Z-21	2.4	3.4	4.1	0.15	8.48	80.46	5.87	5.04
Z-21	2.4	3.6	4.3	0.08	5.15	81.05	4.68	9.04
Z-21	2.4	3.8	4.3	0.15	5.22	80.84	4.62	9.17
Z-28	2.4	3.0	4.0	0.34	11.32	79.74	4.56	4.04
Z-28	2.4	3.2	4.1	0.19	9.2	81.12	4.75	4.74
Z-28	2.4	3.4	4.2	0.02	6.78	83.15	4.68	5.37
Z-28	2.4	3.6	4.3	0.29	4.58	81.82	4.27	9.04
Z-28	2.4	3.8	4.4	0.07	4.15	80.94	4.23	10.61
Z-28	2.4	4.0	4.4	0.03	4.99	80.03	4.16	10.79
Z-32	2.4	3.0	4.0	0.34	11.32	79.74	4.56	4.04
Z-32	2.4	3.2	4.1	0.16	9.01	81.11	5.71	4.01
Z-32	2.4	3.4	4.2	0.12	6.68	82.17	5.18	5.85
Z-32	2.4	3.6	4.3	0.19	4.63	81.82	4.29	9.07
Z-32	2.4	3.8	4.4	0.07	4.15	80.94	4.22	10.62
Z-32	2.4	4.0	4.4	0.03	4.99	80.03	4.17	10.78

【0667】 實施例 470. 偶聯物製劑的一般偶聯方法

在每種偶聯物80mg的液體製劑中（使用 BCMA、Her2、EGFR、CD33、Trop2、Steap1、CD56、PSMA 和 Her3抗體）： C-009、C-020、C-025、C-027、C-031、C-037、C-038、C-039、C-043、C-046、C-052、C-056、C-059、C-063、C-066、C-071、C-079、C-084、C-087、C-093、C-096、C-102、C-109、C-111、C-118、C-123、C-133、C-143、C-155、C-168、C-172、C-182、C-186、C-198、C-203、C-208、C-214、C-215、C-216、C-217、C-218、C-226、C-227、C-231、C-237、C-249、C-259、C-260、C-261、C-325、C-326、C-327、C-328、C-329、C-330、C331、C-332、C-333、C-334、C-335、C-353、C-363、C-371、C-378、C-379、C-380、C-381、C-384、C-385、C-386、C-387、C-397、C-400、C-403a、C-403b、C-406、C-408a、C-408b、C-408c、C-408d、C-408e、C-408f、C-410a、C-410b、C-410c、C-412a、C-412b、C-412c、C-412d、C-412e、C-412f、C-413a、C-413b、C-413c、C-413d、C-413e、C-413f、C-416a、C-416b、C-416c、C-416d、C-422a、C-422b、C-422c、C-422d、C-425a、C-425b、C-425c、C-425d、C-428a、C-428b、C-428c、C-428d、C-431a、C-431b、C-431c、C-431d，在含有240 mg蔗糖，0.8 mg聚山梨酯-80，10 mL硼矽酸鹽小瓶中，用24 mg檸檬酸鈉的4 mL無菌水用檸檬酸將其調節至pH 6.0。然後將每種錯合物溶液在-65 ºC至0 ºC然後至室溫溫度下凍乾，並在減壓(5 ~10 torr)，得到乾燥濾餅。將濾餅錯合物儲存在2 ~ 8 ºC，然後用4 mL無菌水重新配製以備進一步使用。

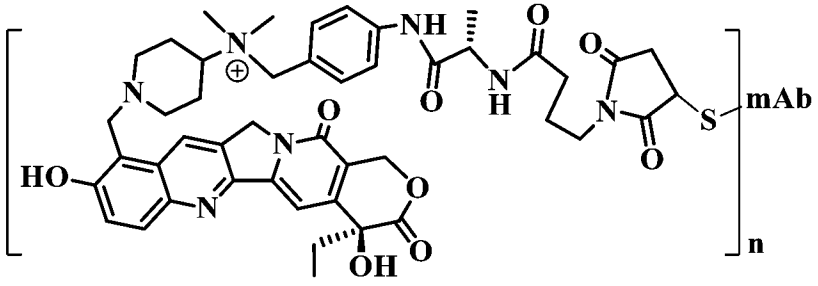
【0668】 實施例 471. 偶聯物的體外細胞毒性評價 （ 使用BCMA、Her2、EGFR、Trop2、Steap1、CD56、PSMA 和 Her3抗體）： C-

009、C-020、C-025、C-027、C-031、C-037、C-038、C-039、C-043、C-046、C-052、C-056、C-059、C-063、C-066、C-071、C-079、C-084、C-087、C-093、C-096、C-102、C-109、C-111、C-118、C-123、C-133、C-143、C-155、C-168、C-172、C-182、C-186、C-198、C-203、C-208、C-214、C-215、C-216、C-217、C-218、C-226、C-227、C-231、C-237、C-249、C-259、C-260、C-261、C-325、C-326、C-327、C-328、C-329、C-330、C331、C-332、C-333、C-334、C-335、C-353、C-363、C-371、C-378、C-379、C-380、C-381、C-384、C-385、C-386、C-387、C-397、C-400、C-403a、C-403b、C-406、C-408a、C-408b、C-408c、C-408d、C-408e、C-408f、C-410a、C-410b、C-410c、C-412a、C-412b、C-412c、C-412d、C-412e、C-412f、C-413a、C-413b、C-413c、C-413d、C-413e、C-413f、C-416a、C-416b、C-416c、C-416d、C-422a、C-422b、C-422c、C-422d、C-425a、C-425b、C-425c、C-425d、C-428a、C-428b、C-428c、C-428d、C-431a、C-431b、C-431c、C-431d，與紫杉醇相比。為了評估her2-ADC，選擇T-DM1進行比較。

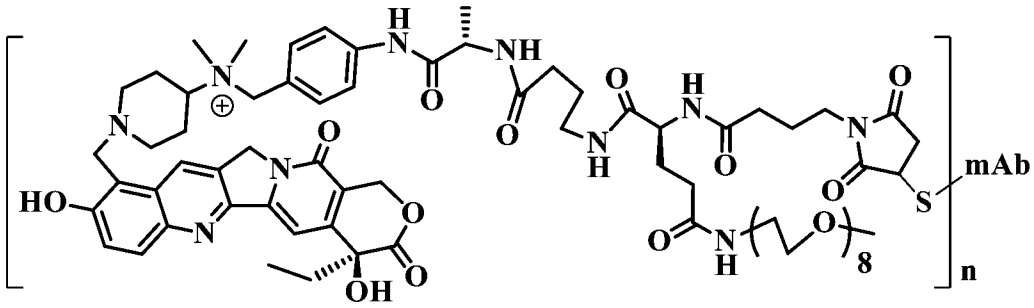
細胞毒性試驗中使用的細胞株是(1).骨髓瘤(+)細胞、NCI-H929、MM1S來源於ATCC，8226-2A1細胞為ATCC RPMI-8226經培養、克隆挑選得到的骨髓瘤抗原表達細胞；(2).EGFR (+)細胞：HCC-827為肺癌細胞，LN229、U87MG為人膠質瘤細胞株；(3).MUC-1 (+)細胞：Colo205為結腸癌細胞株；(4).Trop2 (+)細胞：MDA-MB-468細胞為人三陰性乳腺癌細胞株，Calu-3為人肺腺癌或黏膜下腺細胞株；(5).Her2(+)細胞：BT-474為人乳腺癌細胞株，NCI-N87為人胃癌細胞株(NCI-N87細胞也表

達Trop2抗原)；SK-OV-3是人卵巢癌細胞株，A431是人上皮癌細胞株。根據提供者手冊培養細胞，例如，在RPMI-1640培養基中用10%胎牛血清培養N87細胞。測定時，將細胞(180μl，6000個細胞)加入到96孔板中的每個孔中，並在37°C和5% CO_2下溫育24小時。接下來，在適當的細胞培養基裡，用不同濃度的測試化合物（20μL）處理細胞（總體積，0.2 mL）。對照孔含有細胞和培養基但無測試化合物。將孔板在37°C和5%CO2下溫育120小時，然後向孔中加入MTT（5 mg/mL）（20μL），並將孔板在37°C下孵育1.5小時。小心去除培養基，然後加入DMSO（180μL），振盪15分鐘，在490nm和570nm處量測吸光度，620nm為參考。依照以下公式計算抑制率：抑制率% = [1-（分析值-空白對照值）/（控制值-空白對照值）]×100。表4列出了BCMA-ADC的MTT結果。

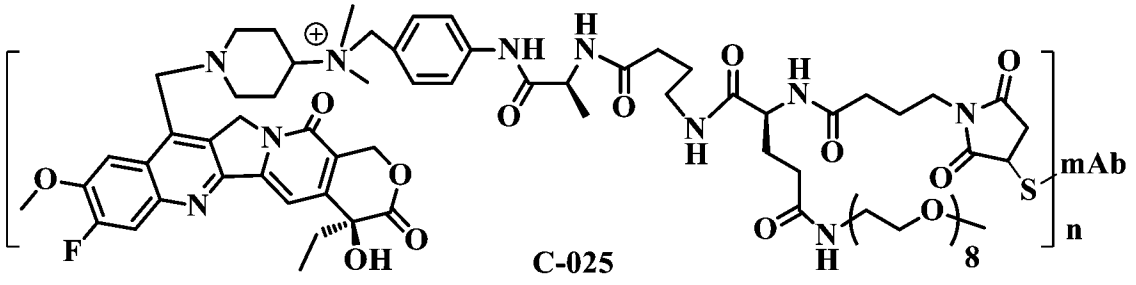
表3.本專利申請的ADC偶聯物的結構：



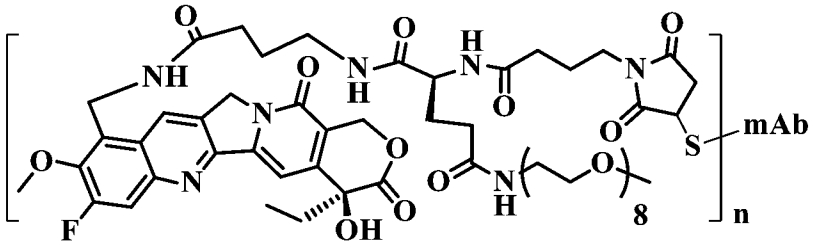
C-009，



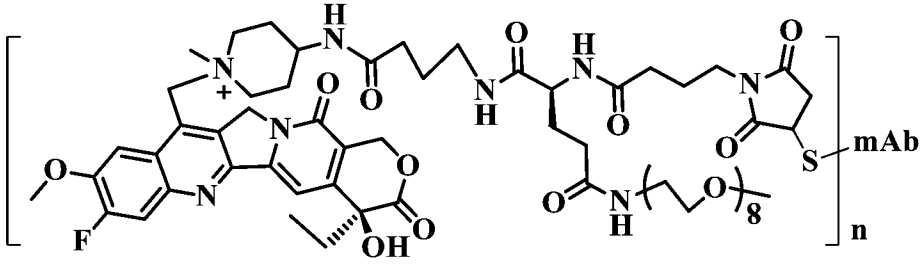
C-020，



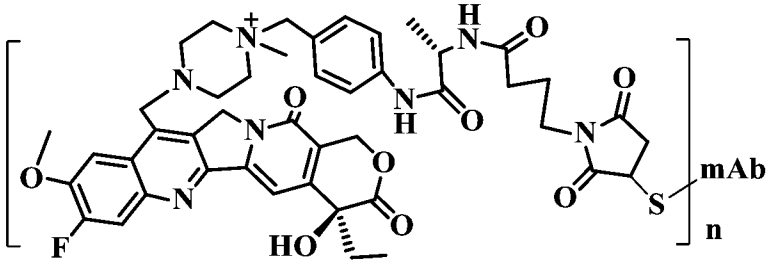
C-025，



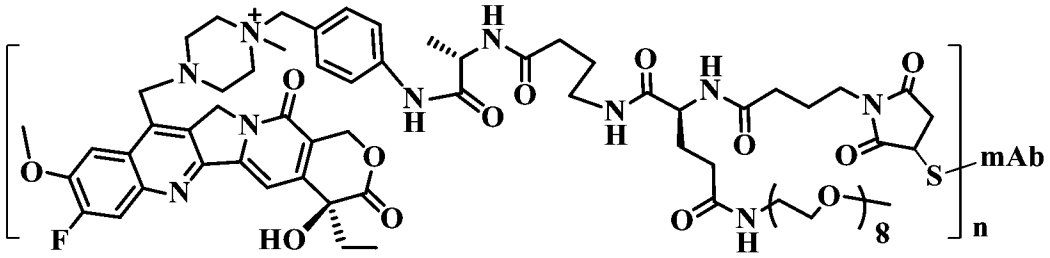
C-027 ,



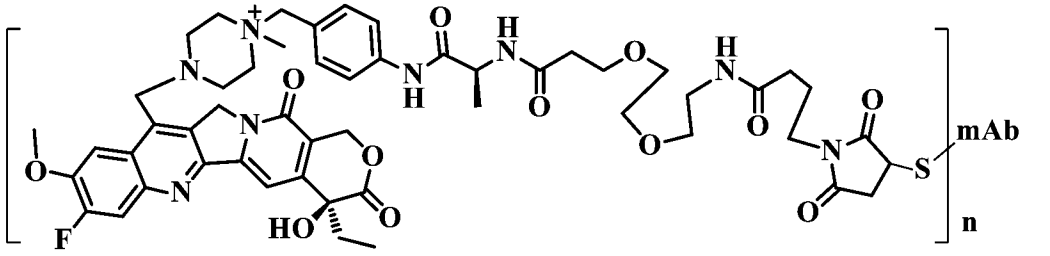
C-031



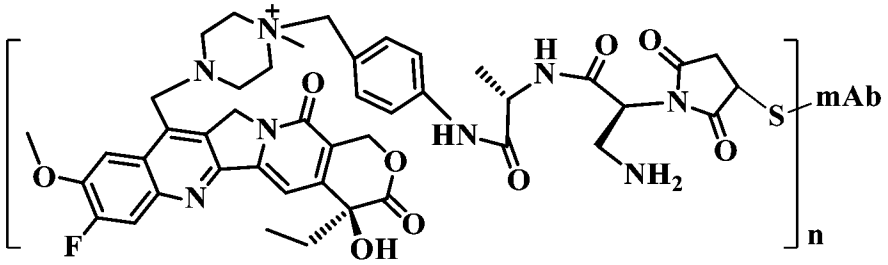
C-037 ,



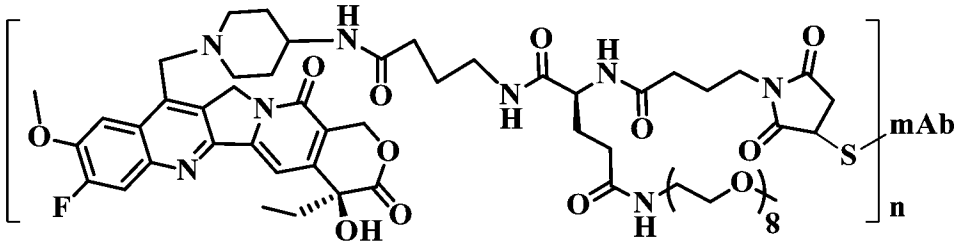
C-038 ,



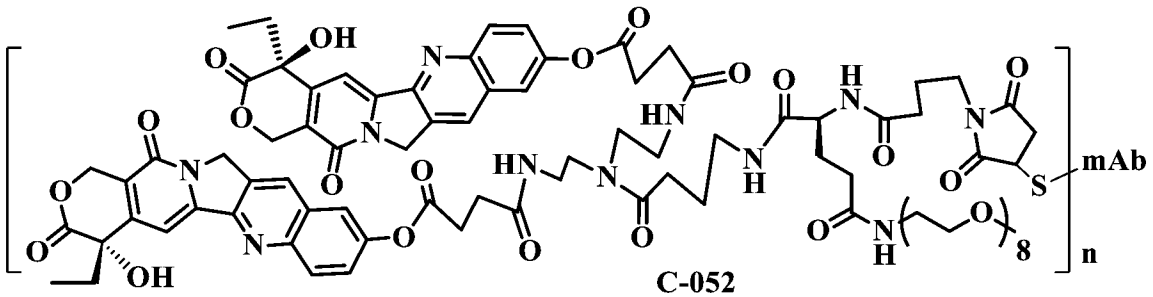
C-039 ,



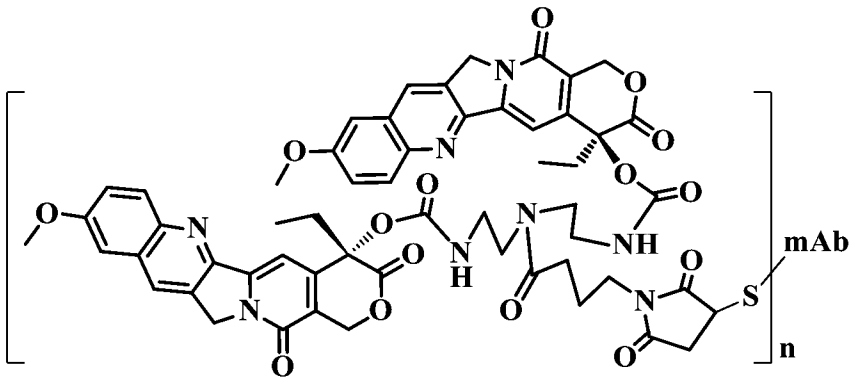
C-043 ,



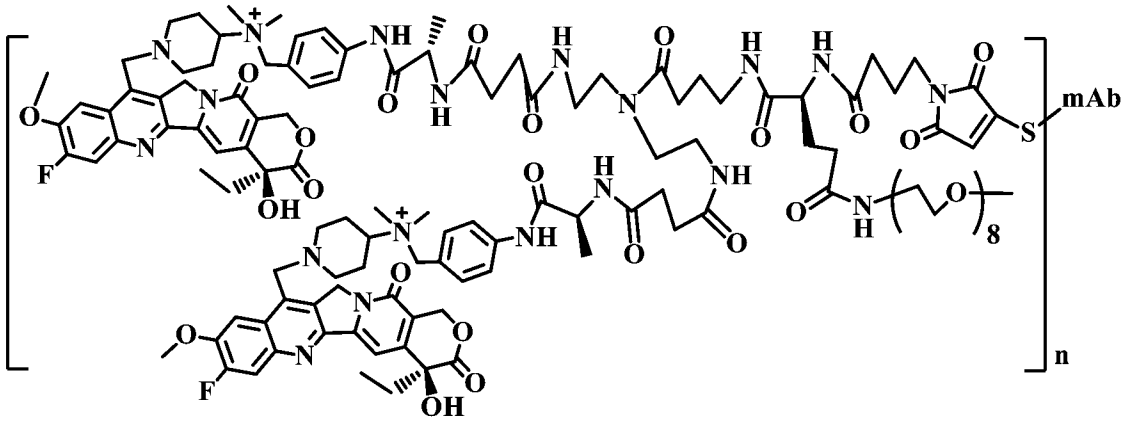
C-046 ,



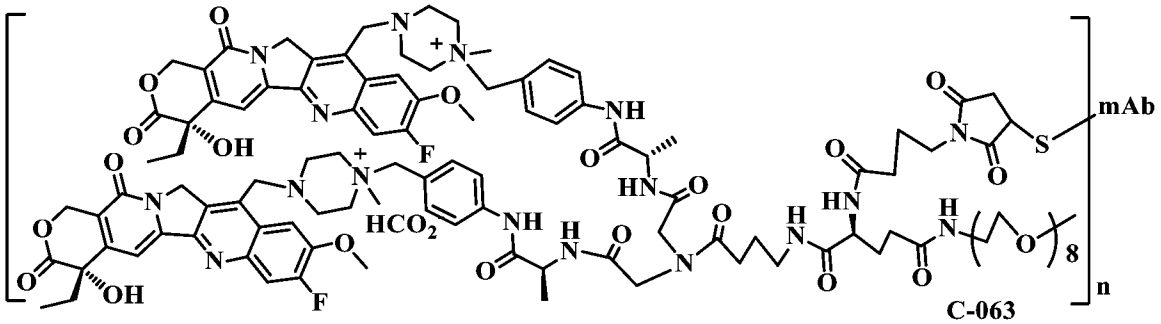
C-052 ,



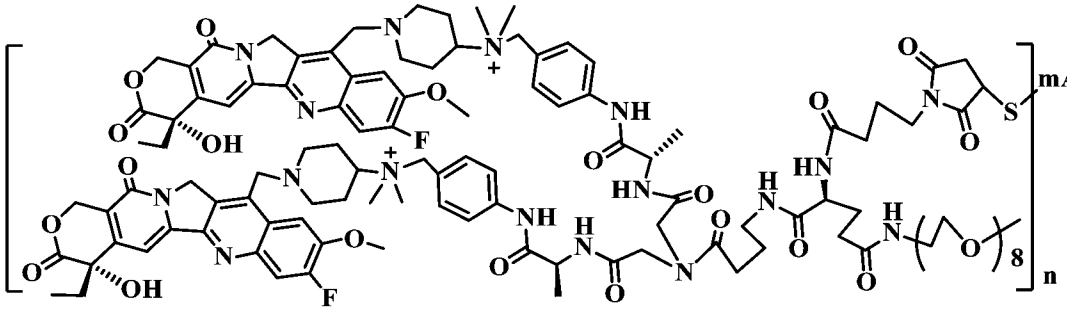
C-056 ,



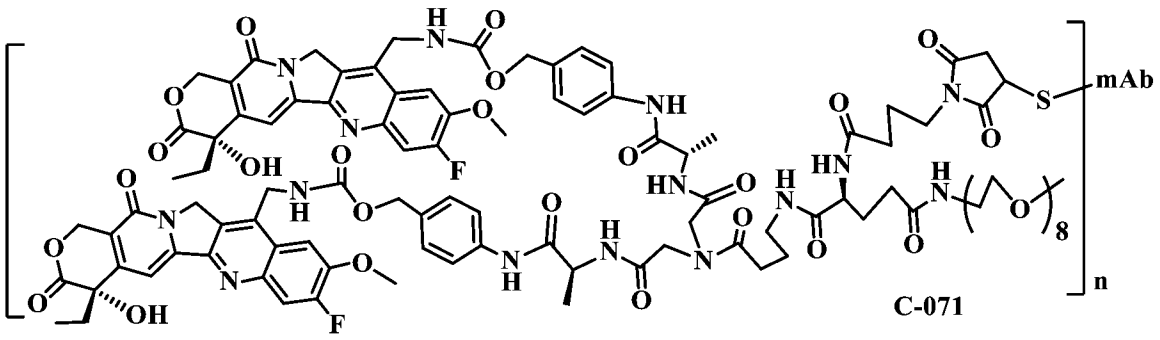
C-059



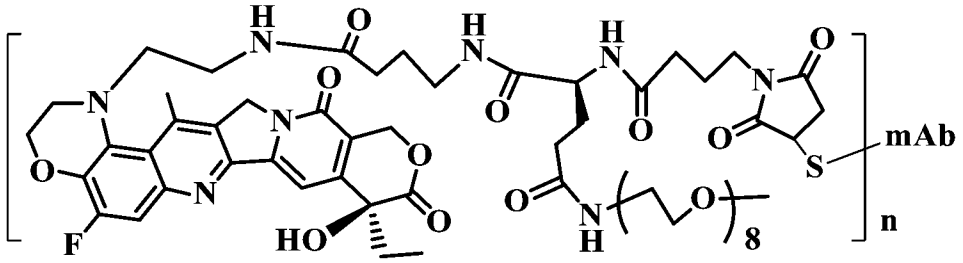
C-063 ,



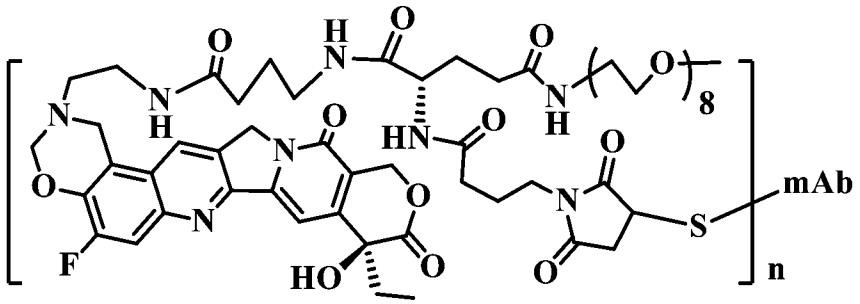
C-066 ,



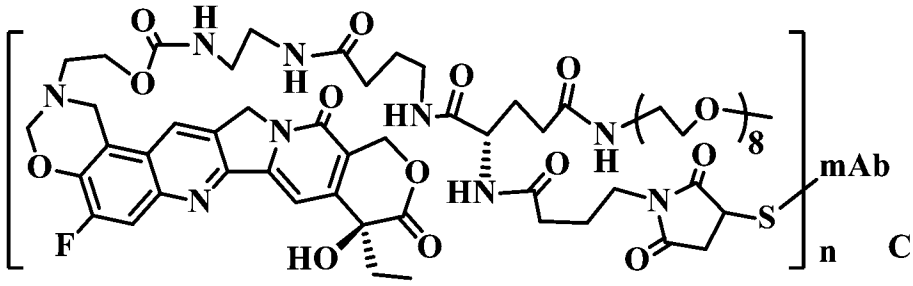
C-071 ,



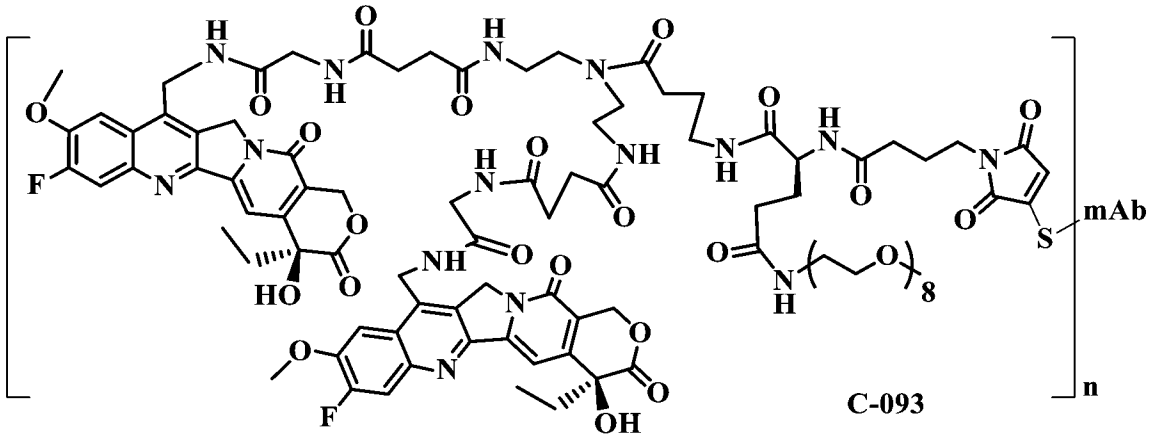
C-079 ,



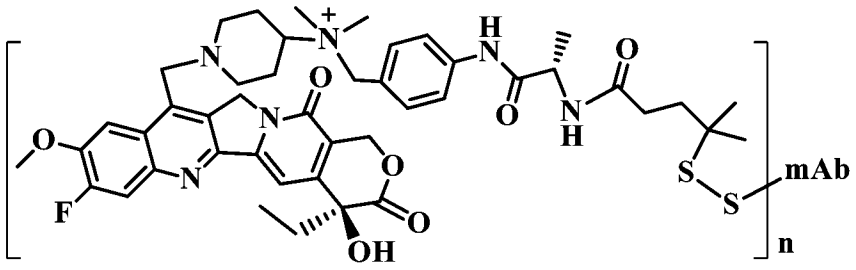
C-084 ,



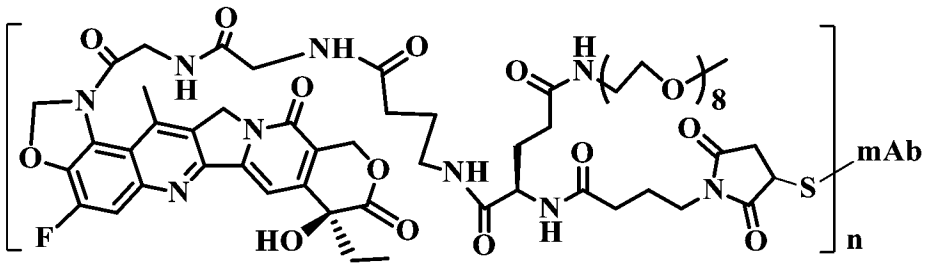
C-087 ,



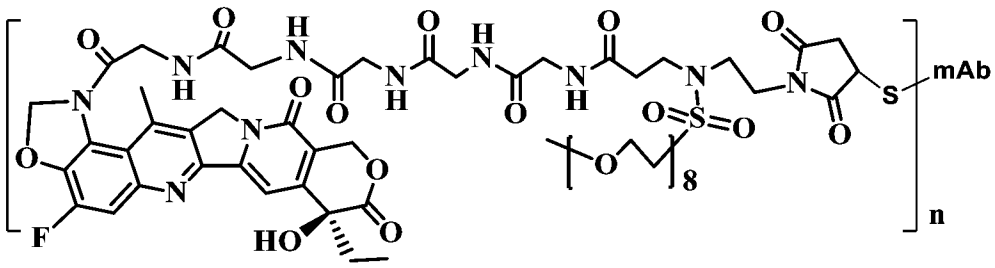
C-093 ,



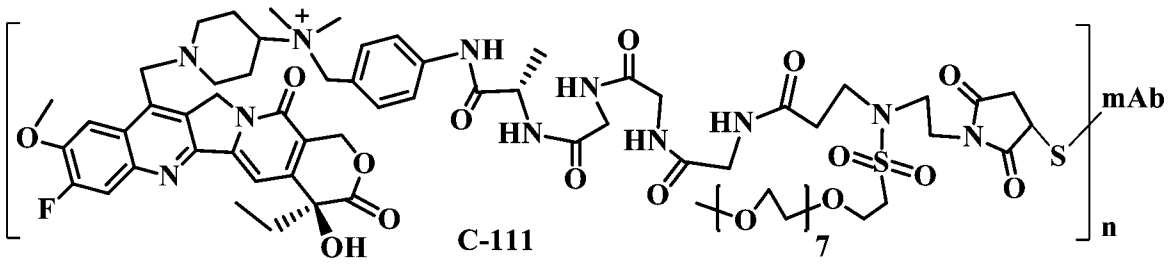
C-096 ,



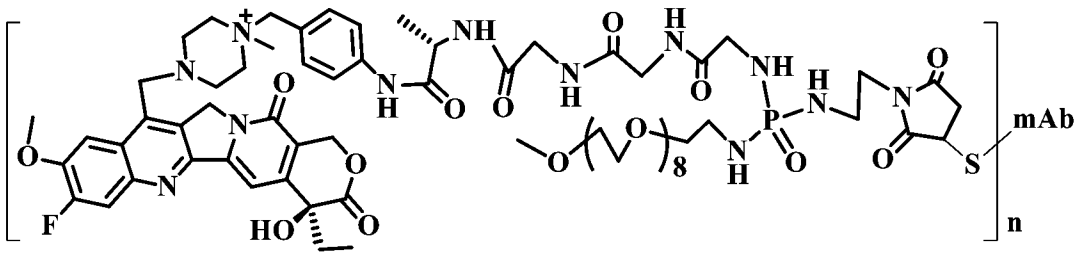
C-102 ,



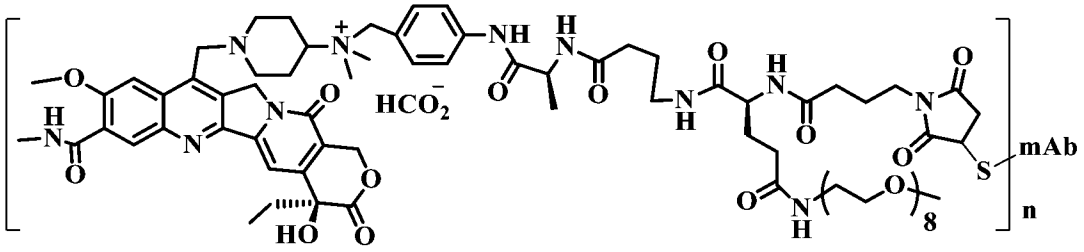
C-109 ,



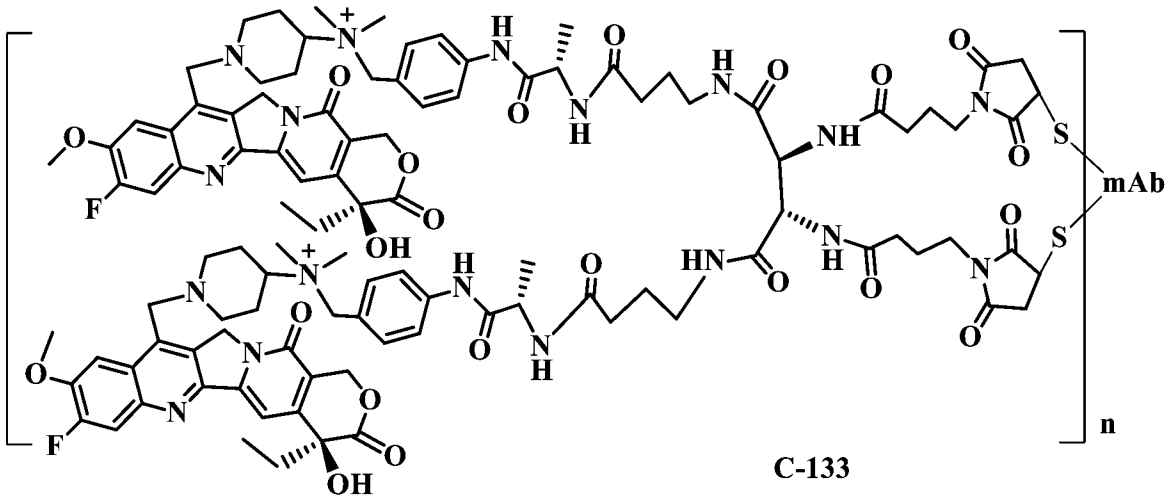
C-111 ,



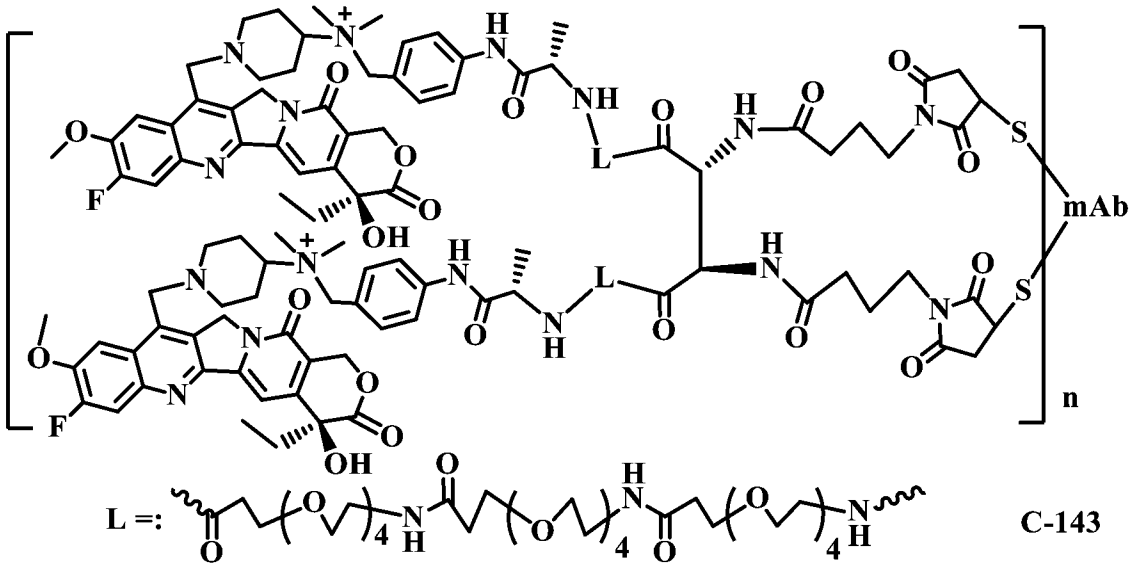
C-118 ,



C-123 ,

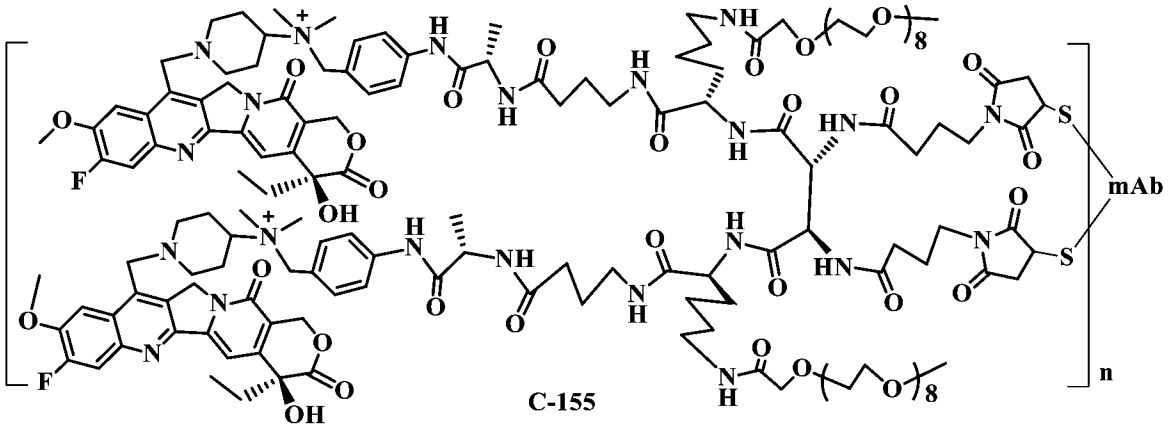


C-133 ,

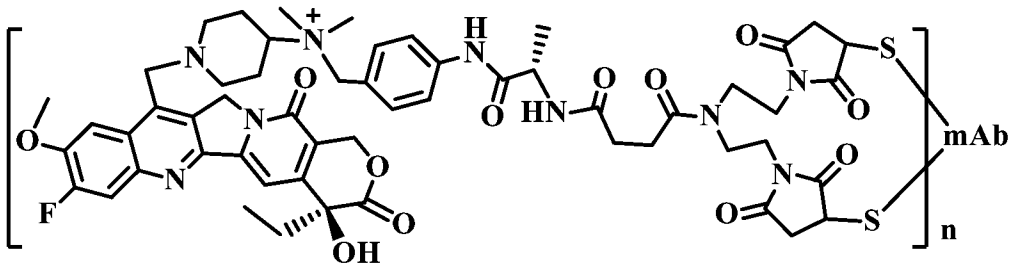


L =:

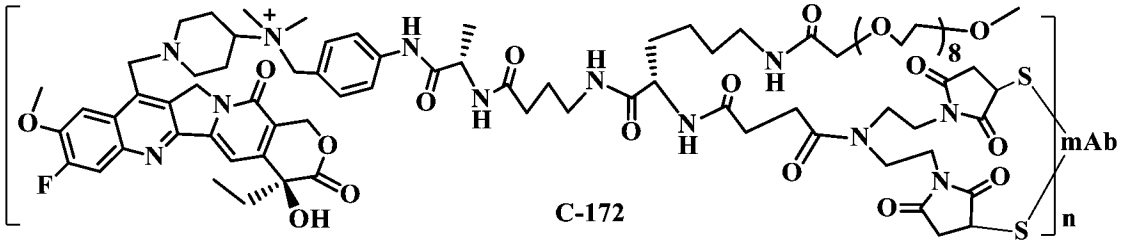
C-143 ,



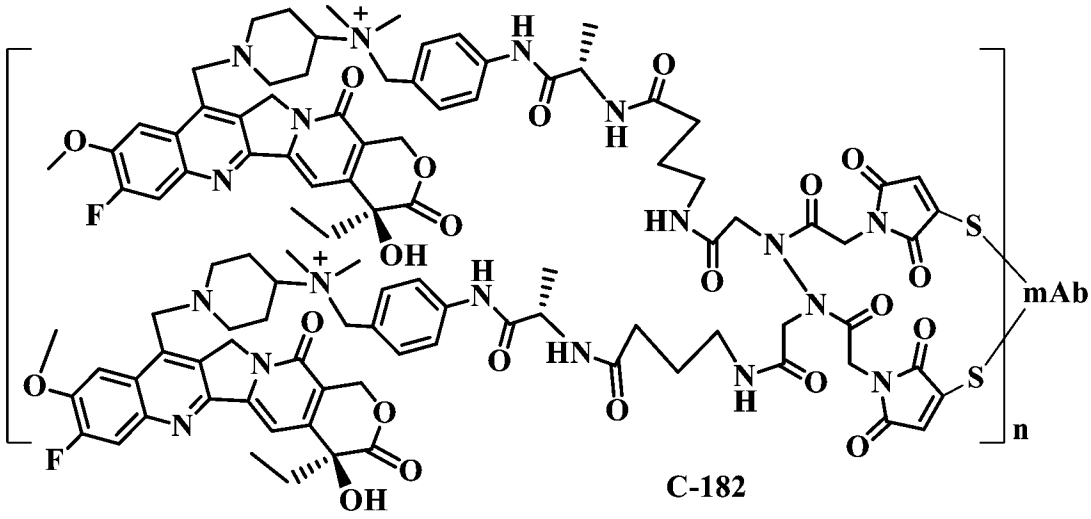
C-155 ,



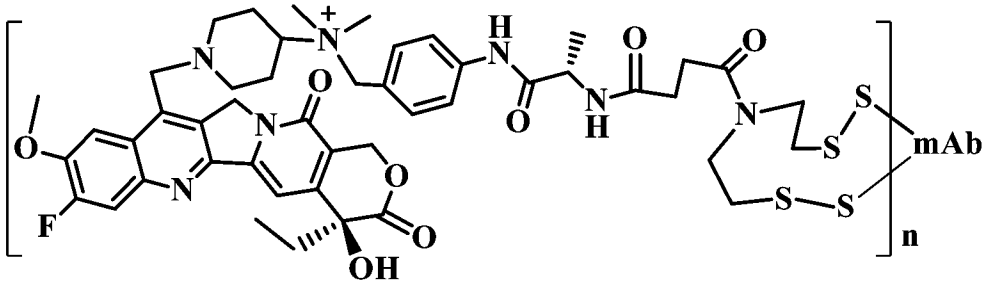
C-168 ,



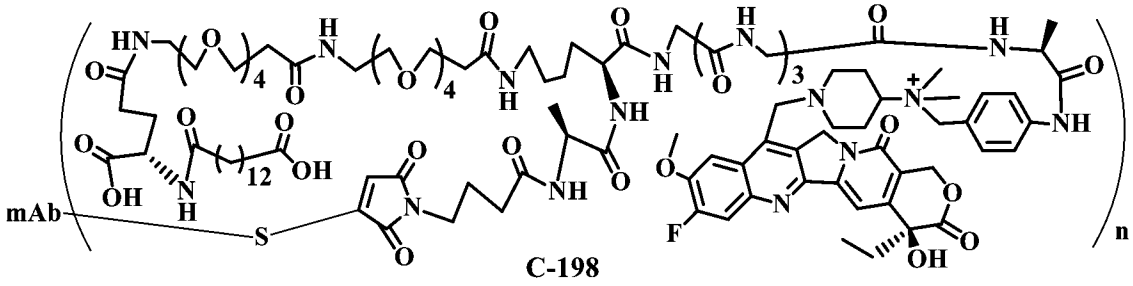
C-172 ,



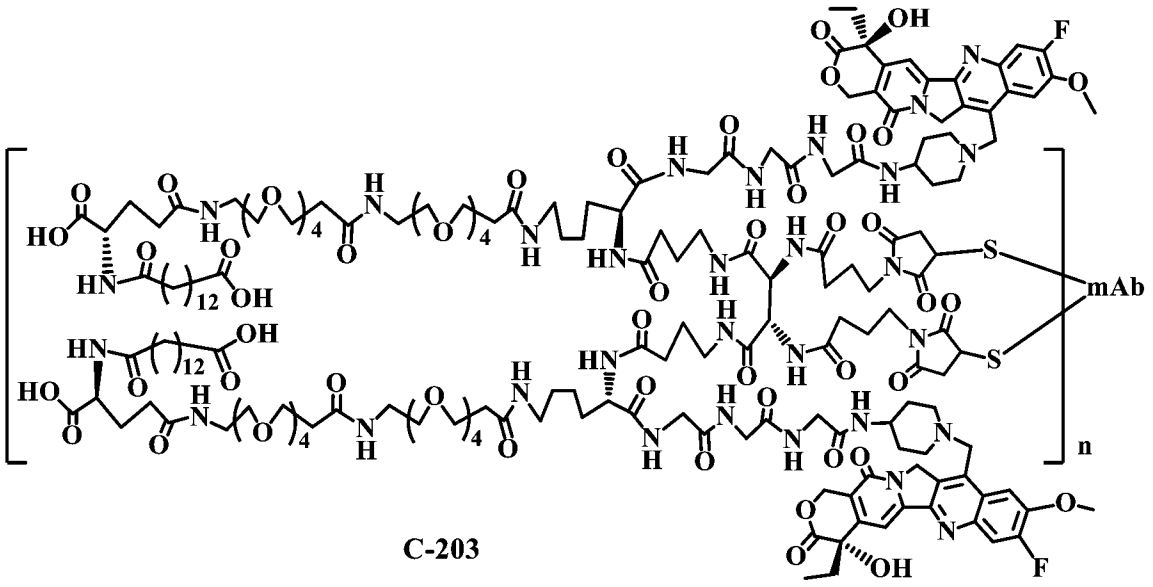
C-182 ,



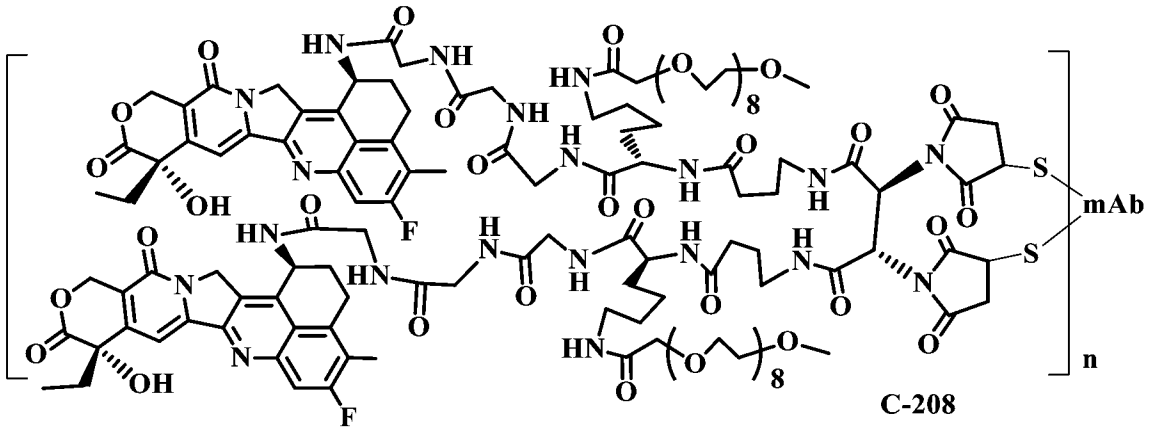
C-186 ,



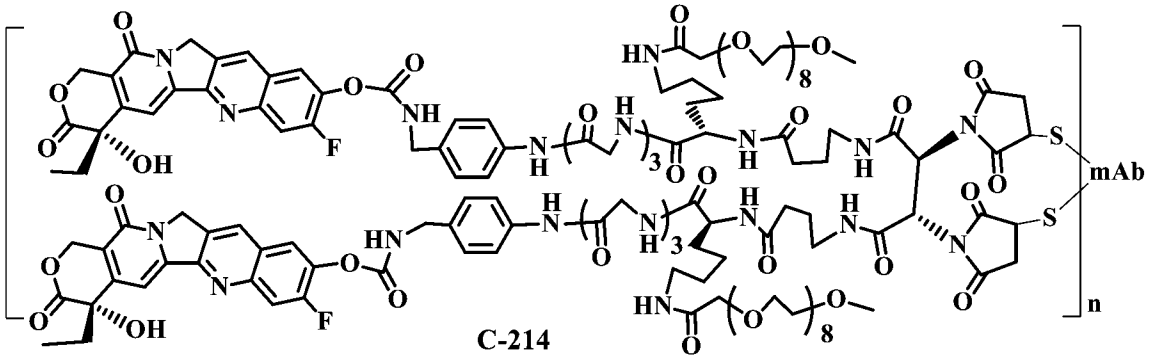
C-198 ,



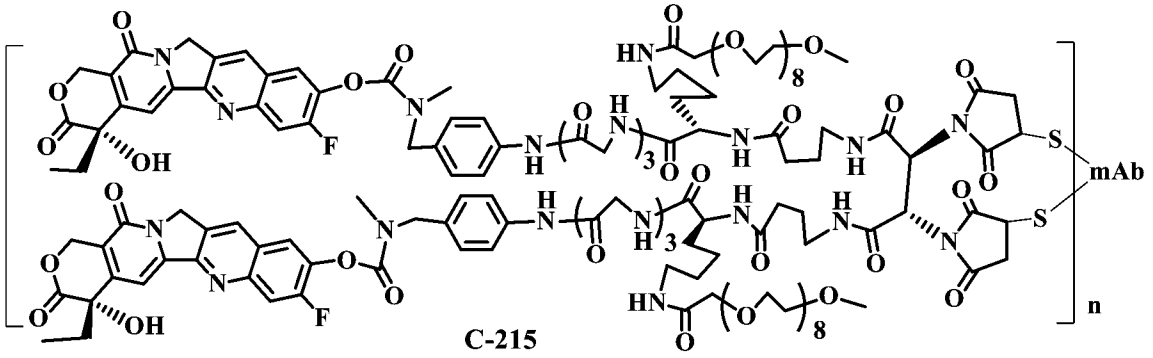
C-203 ,



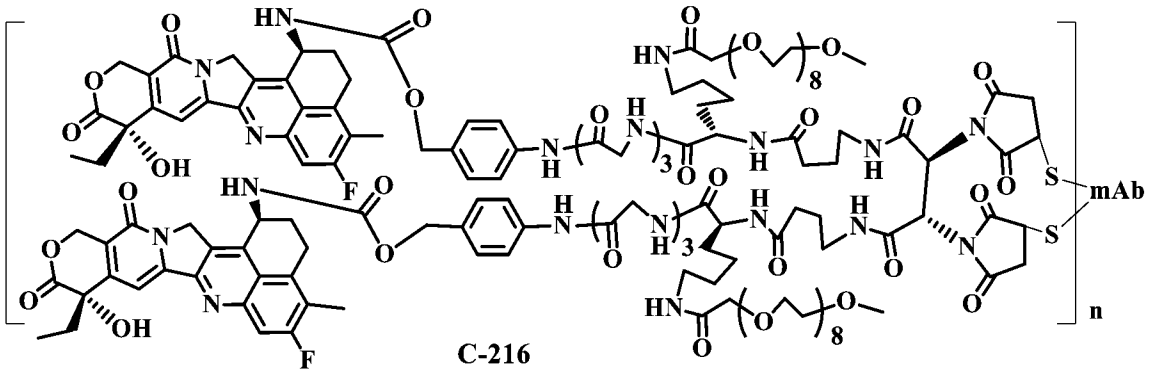
C-208 ,



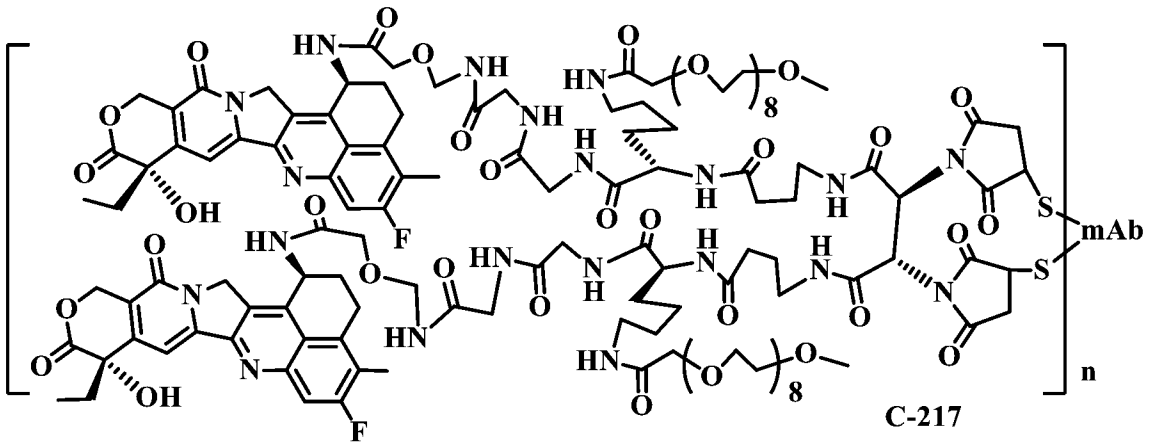
C-214 ,



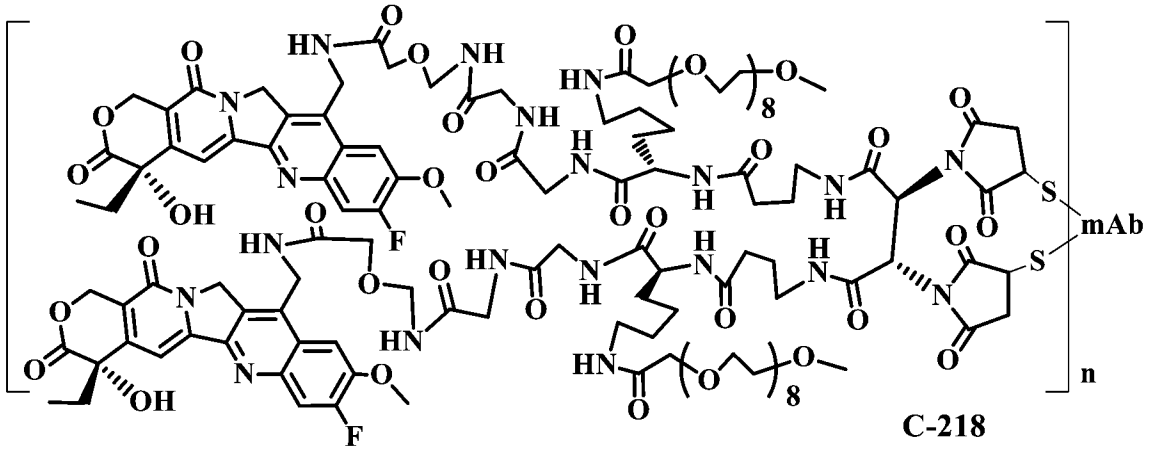
C-215 ,



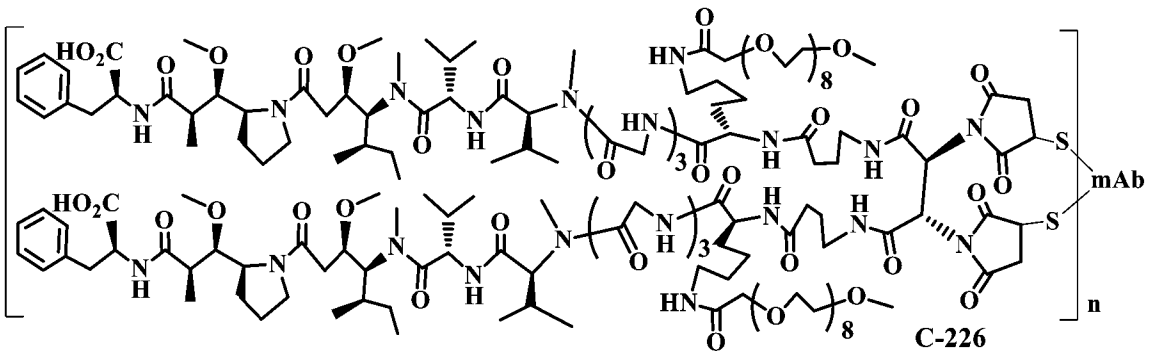
C-216 ,



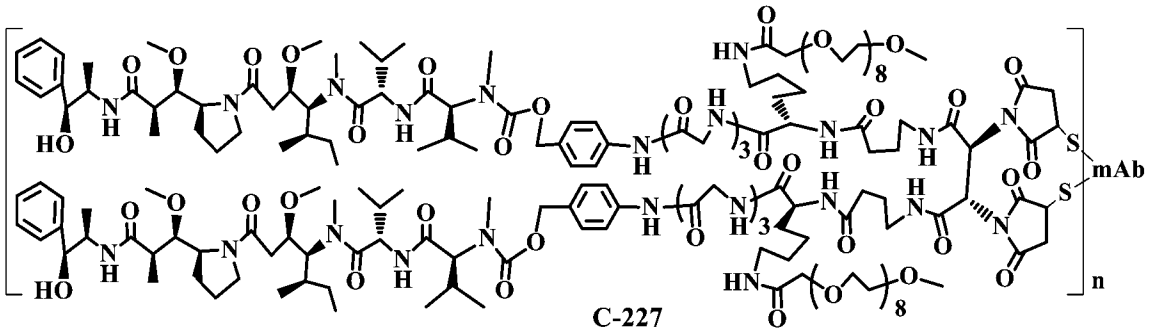
C-217 ,



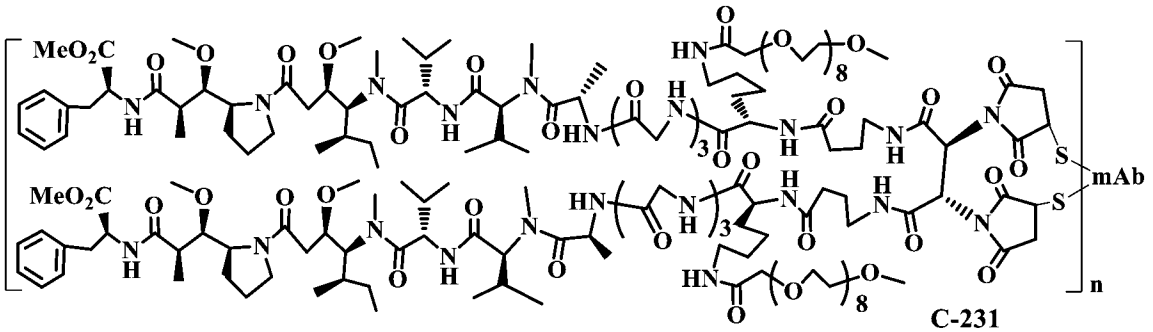
C-218 ,



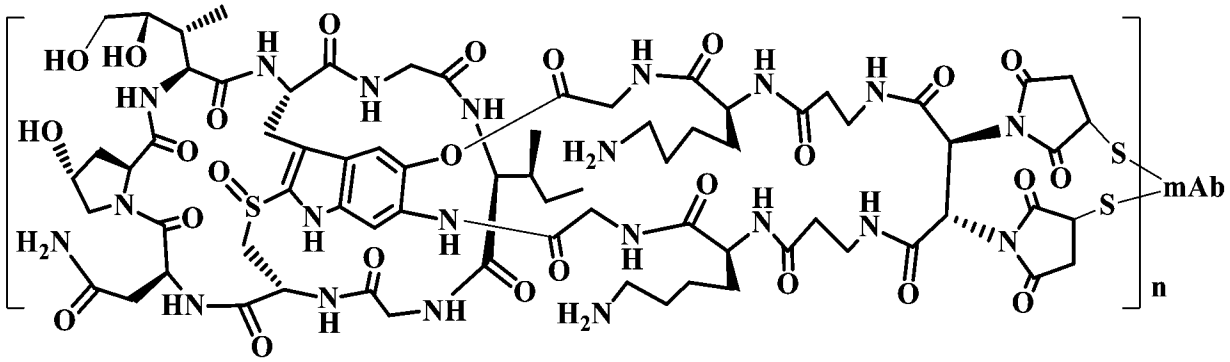
C-226 ,



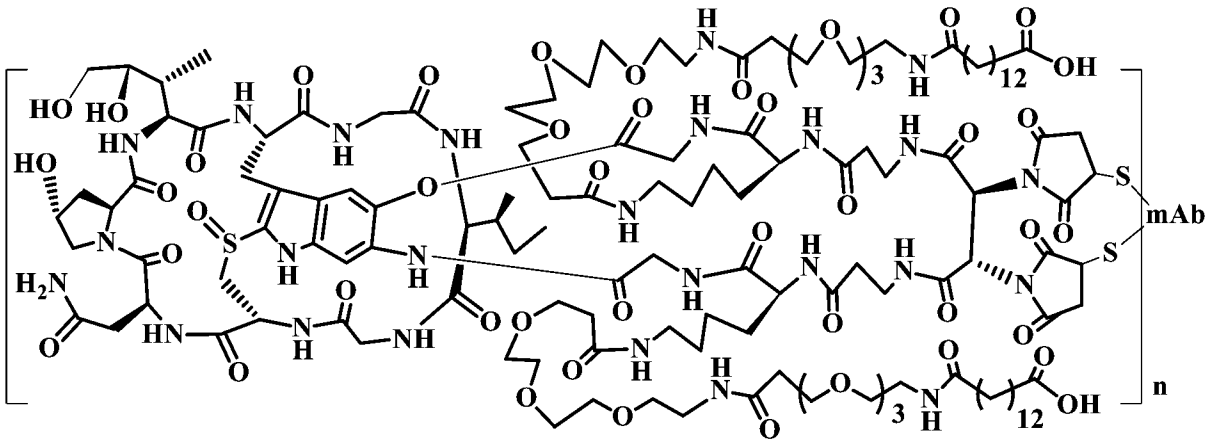
C-227 ,



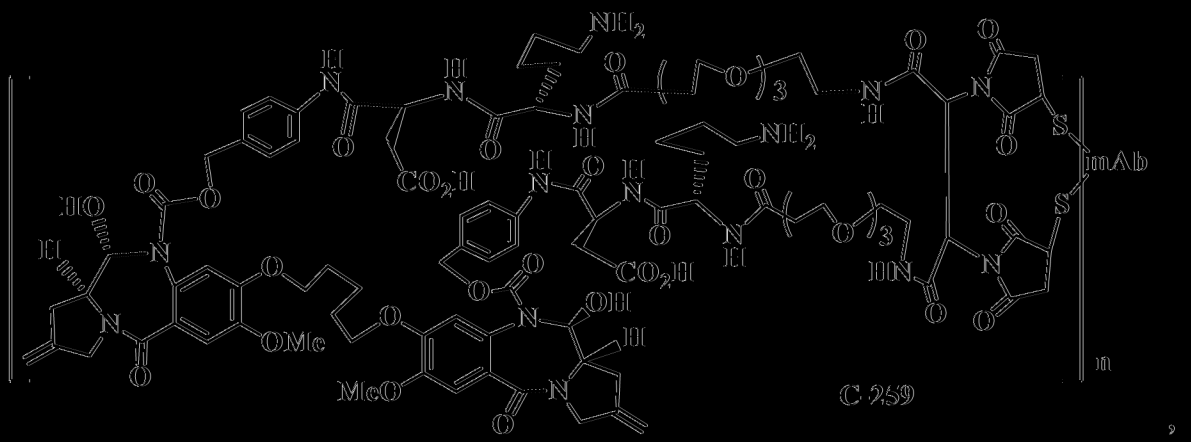
C-231 ,



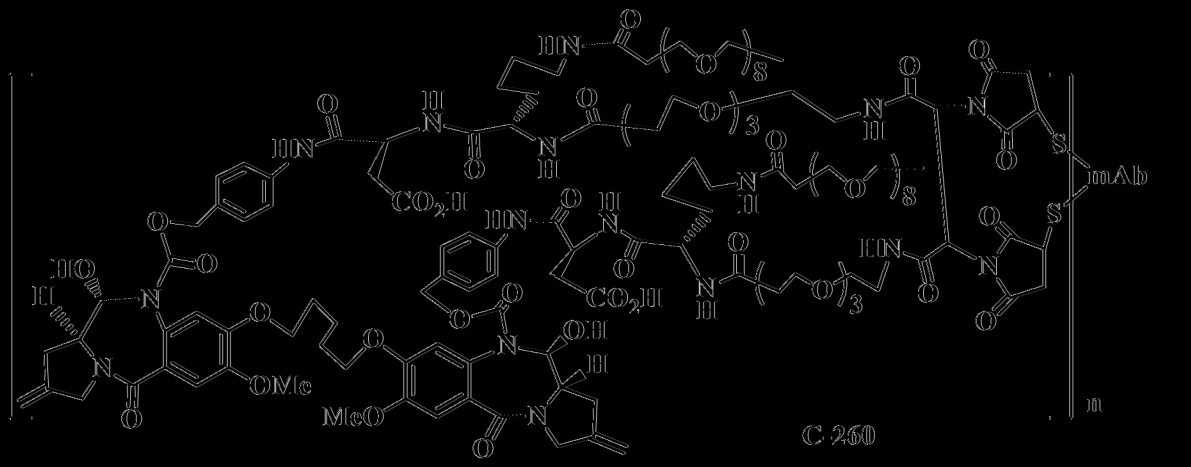
C-**237** ,



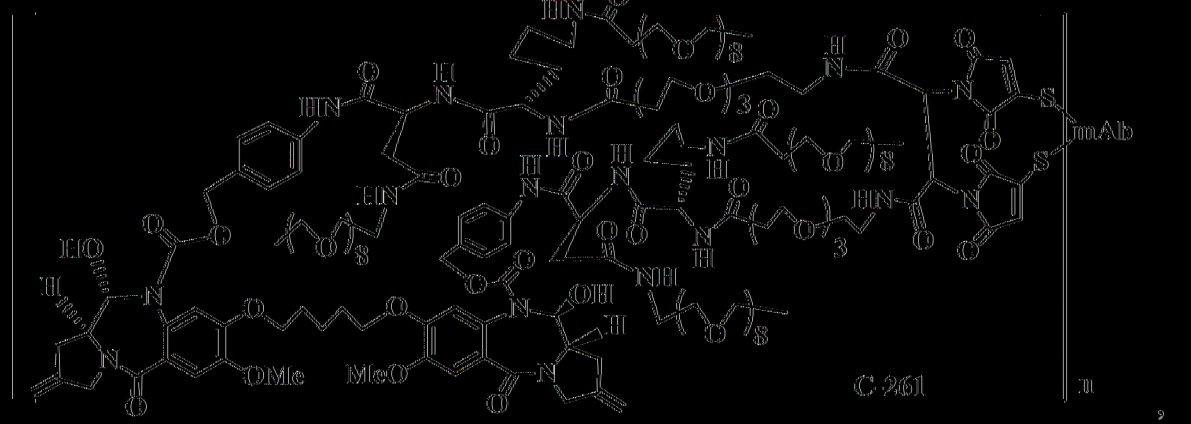
C-**249** ,



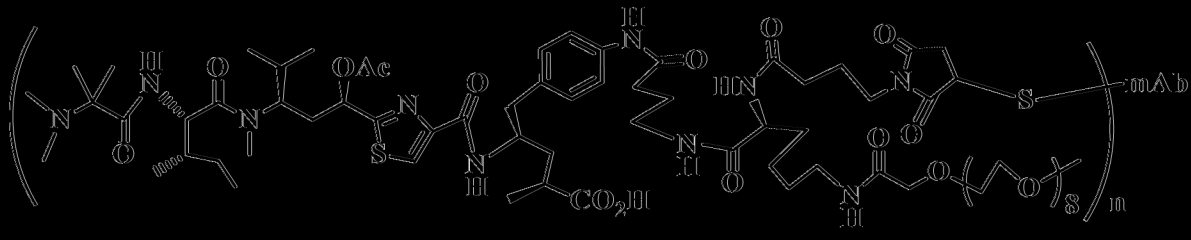
C-259，



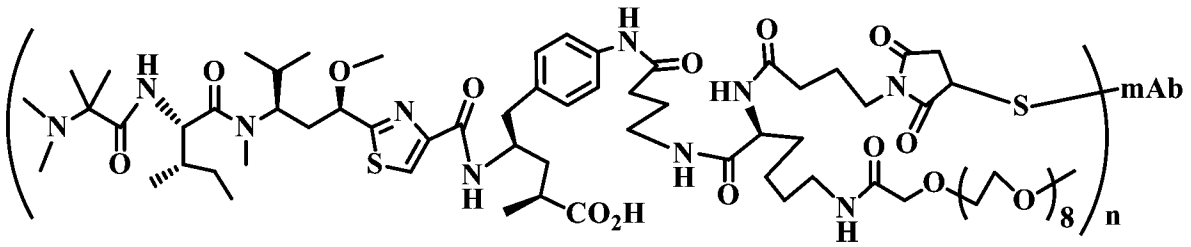
C-260



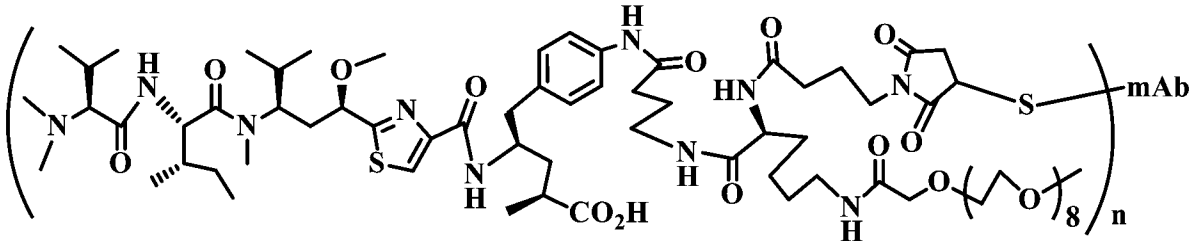
C-261，



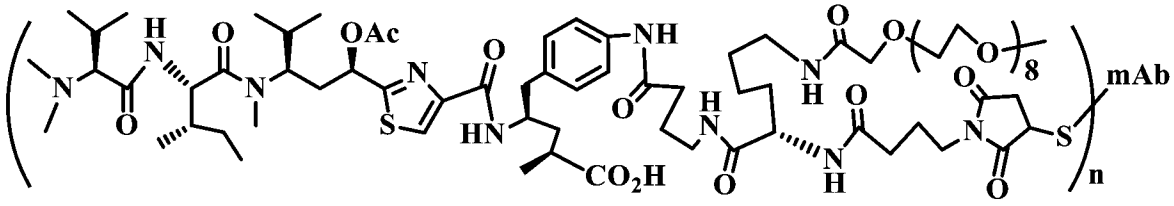
C-325，



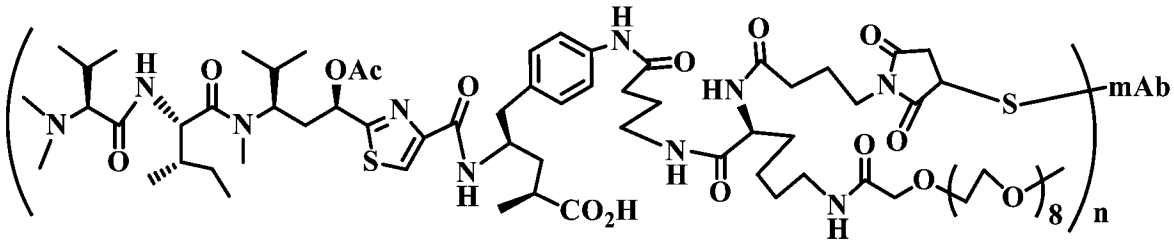
C-326，



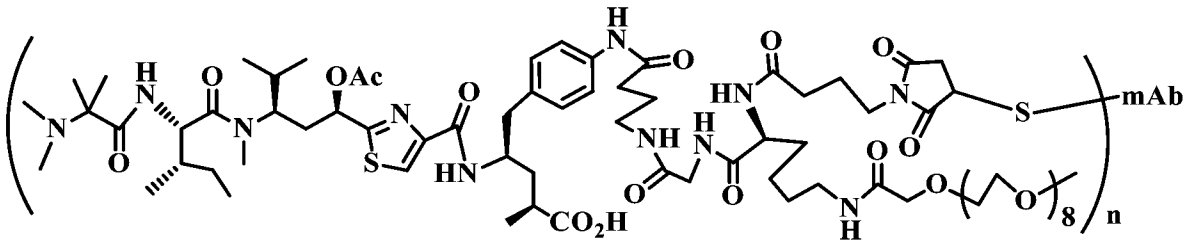
C-327，



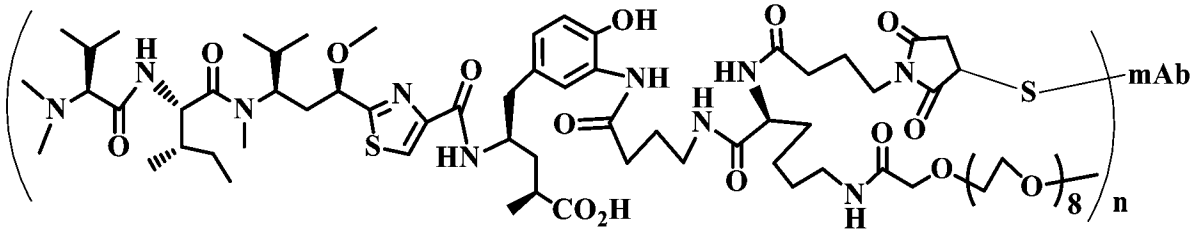
C-328，



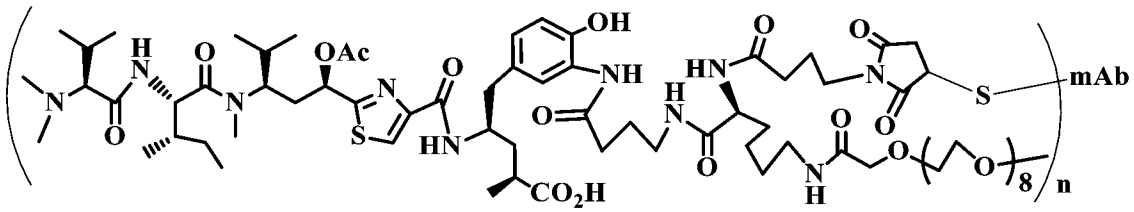
C-329，



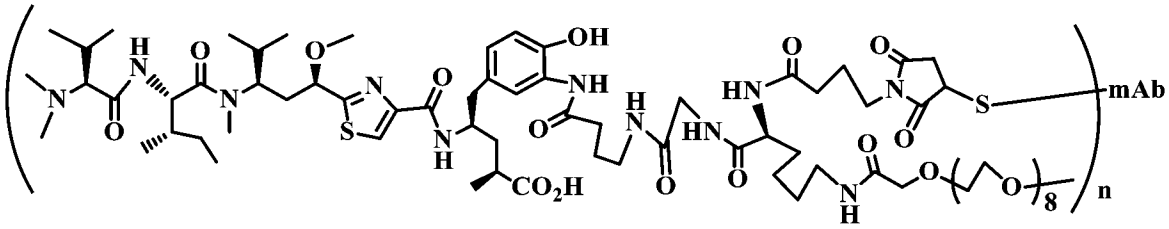
C-330，



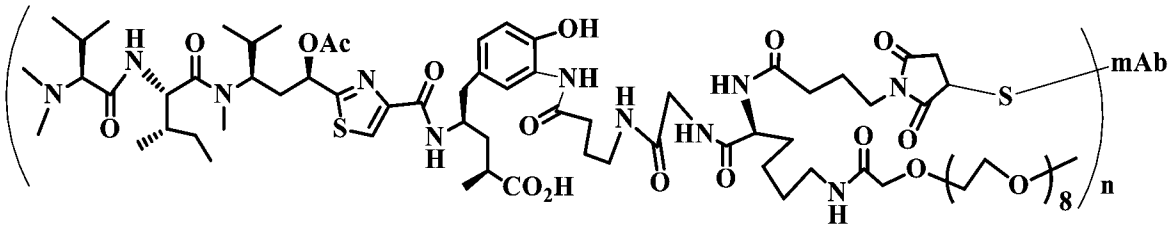
C-331，



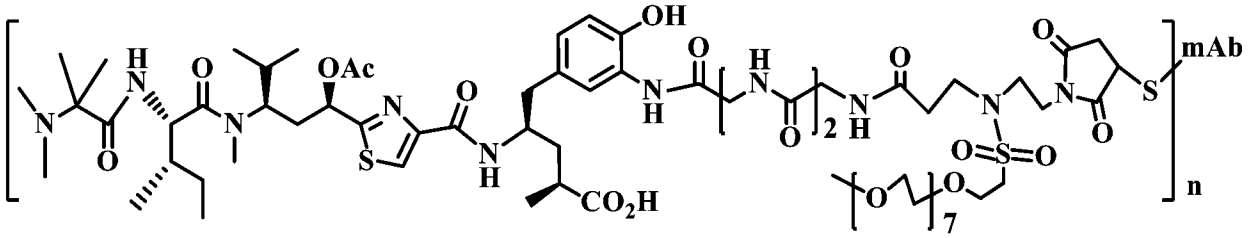
C-332，



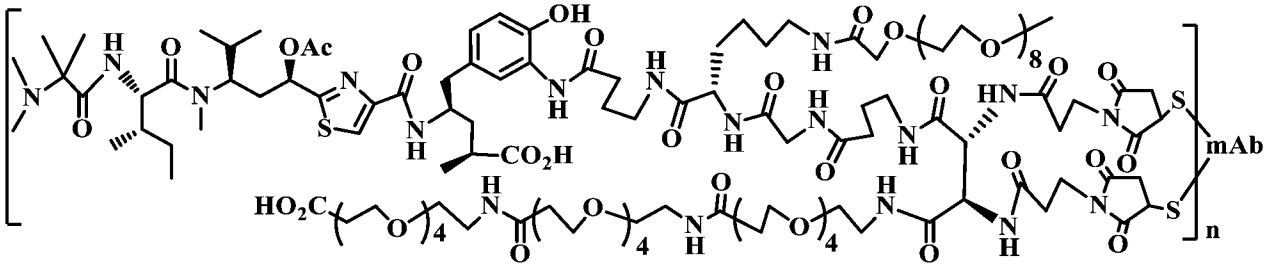
C-333，



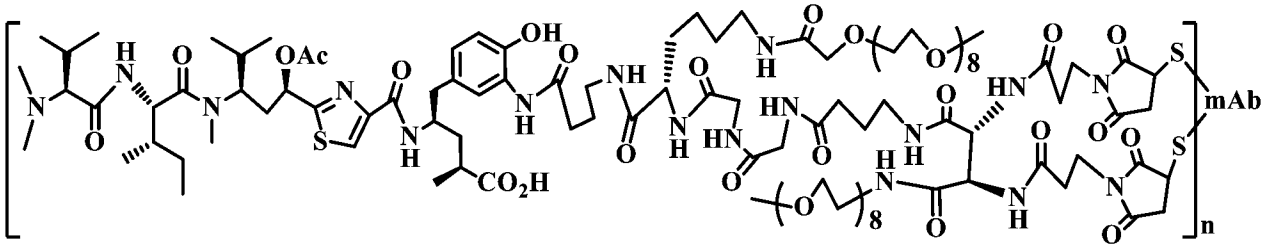
C-334，



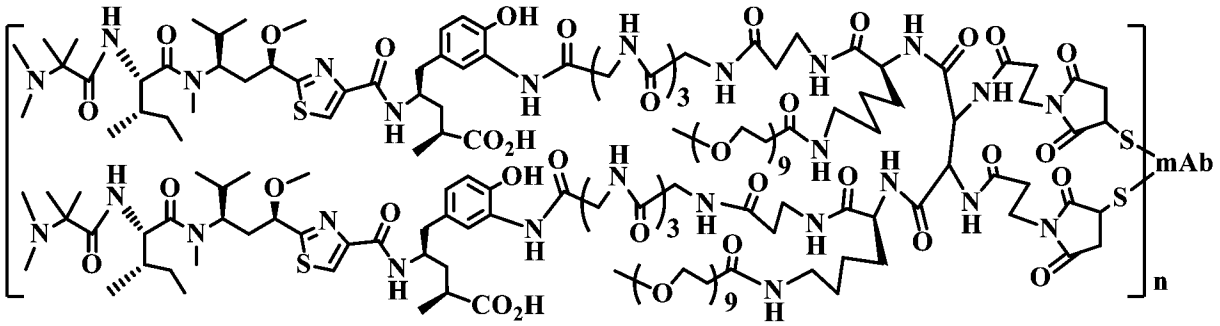
C-335，



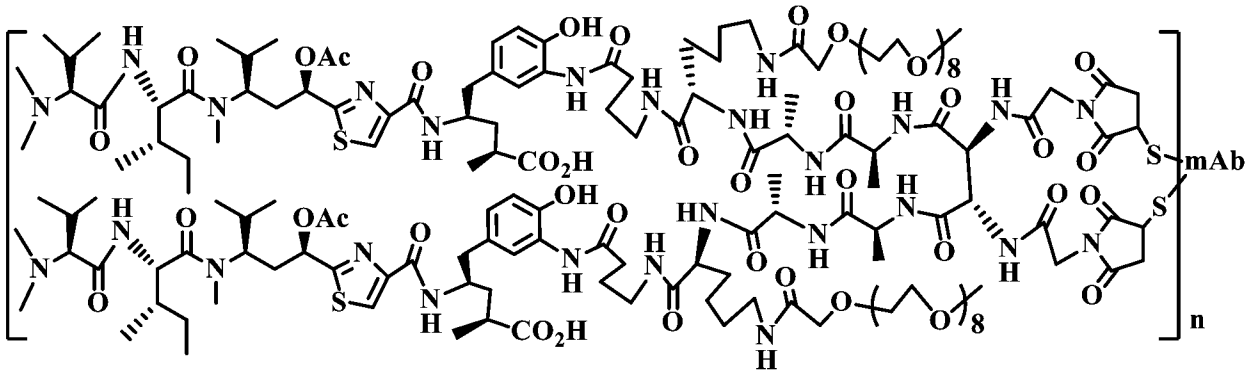
C-353，



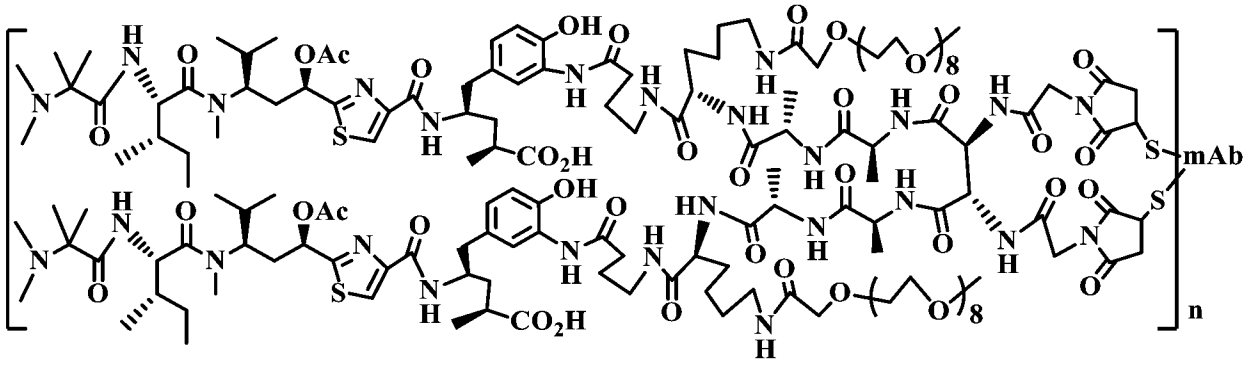
C-363，



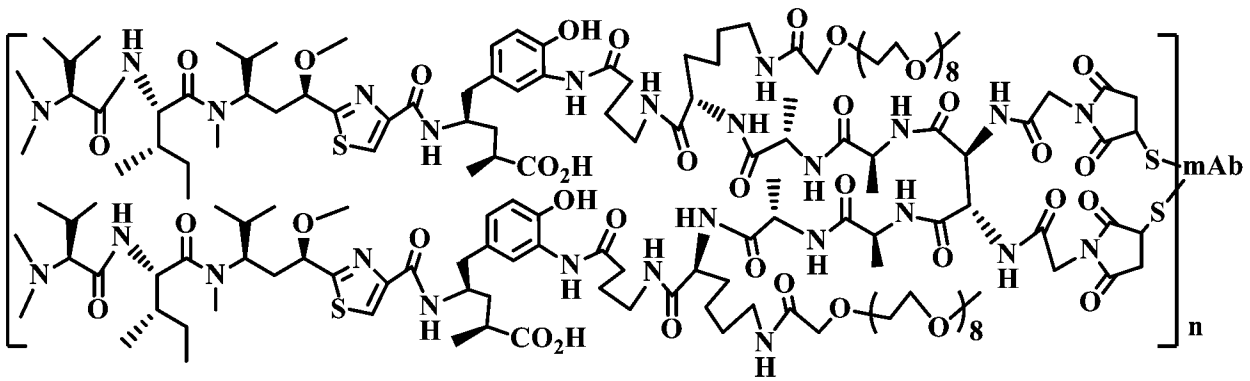
C-371，



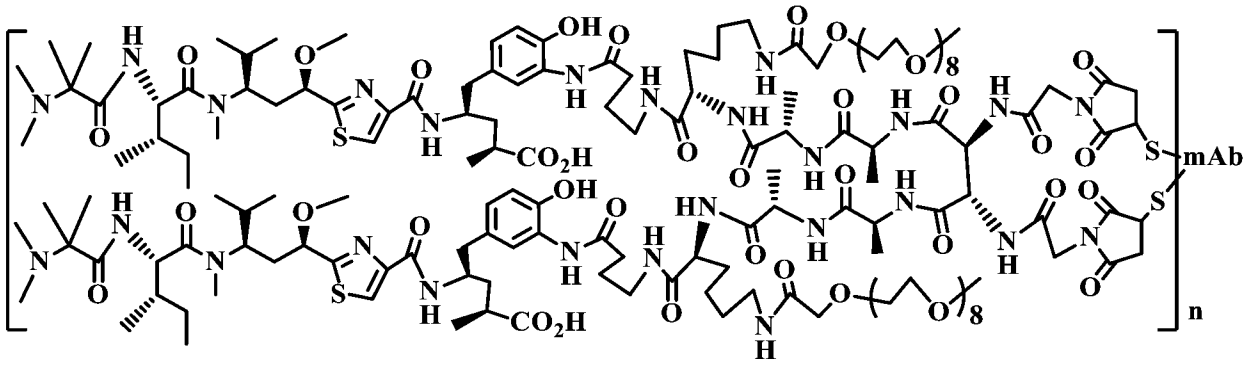
C-378，



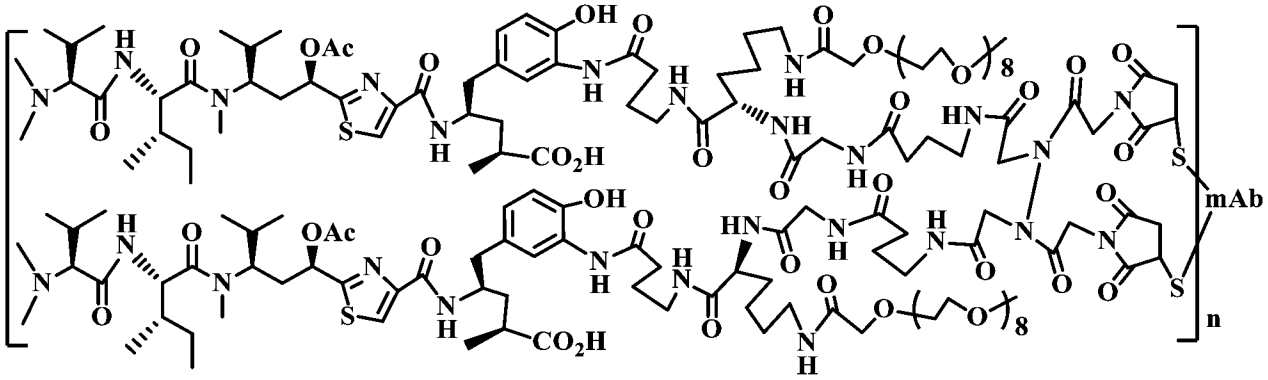
C-379，



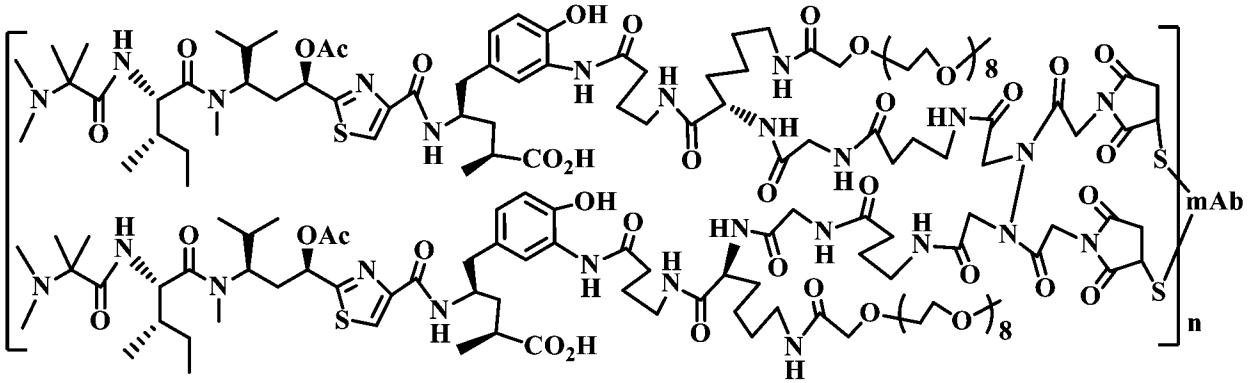
C-380，



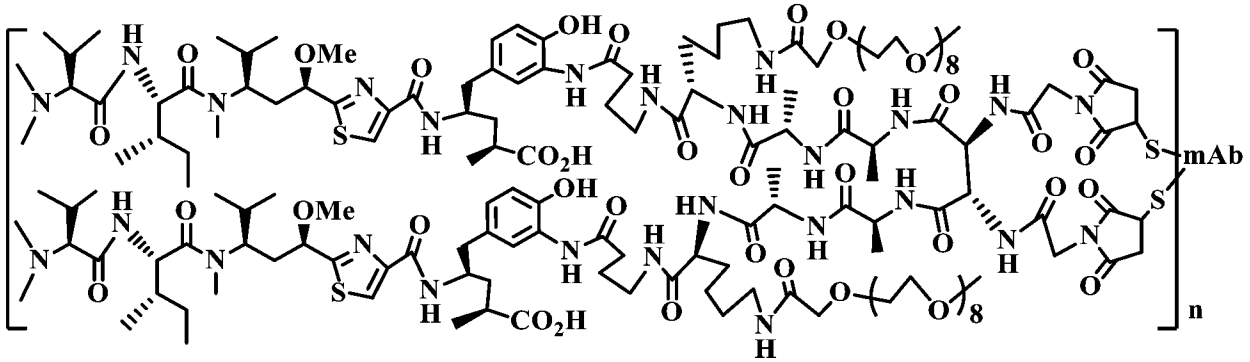
C-381，



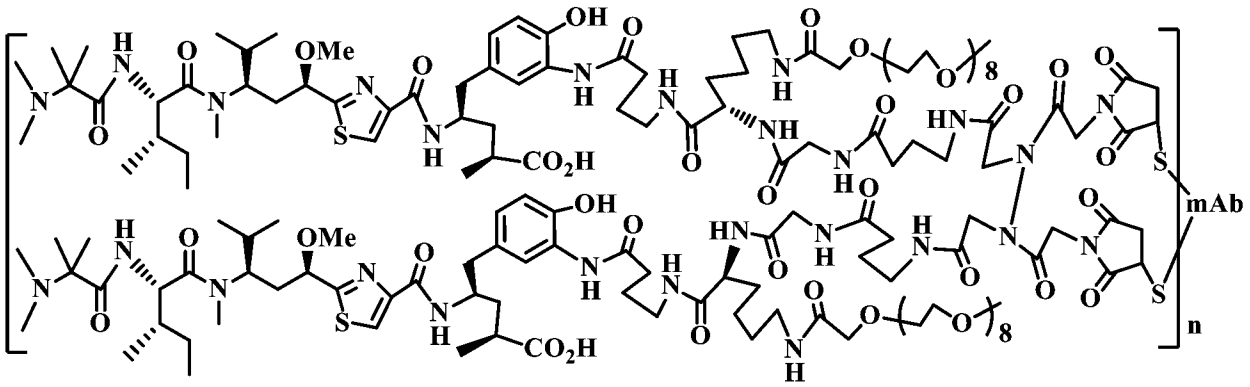
C-384，



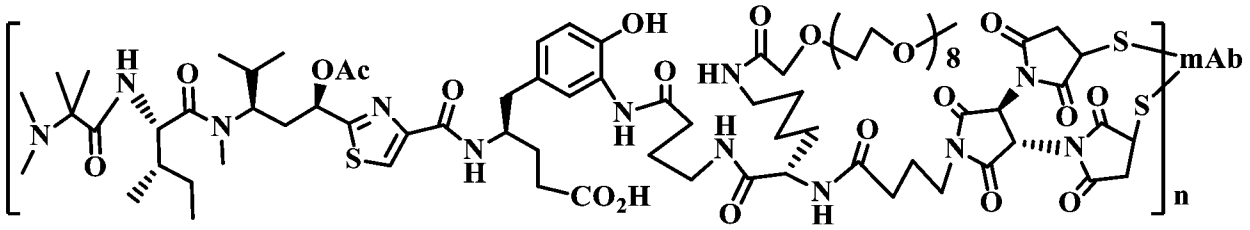
C-385，



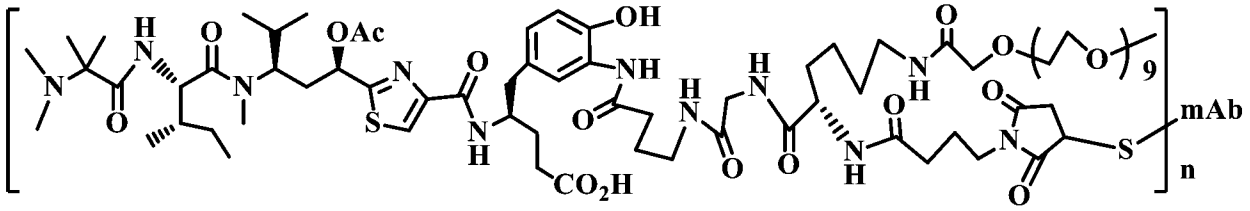
C-386，



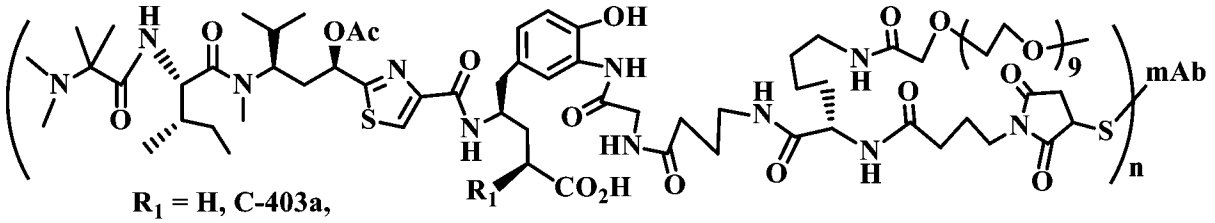
C-387，



C-397，

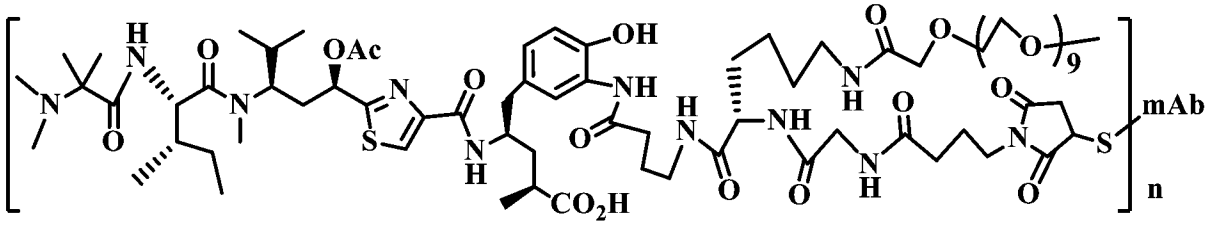


C-400，

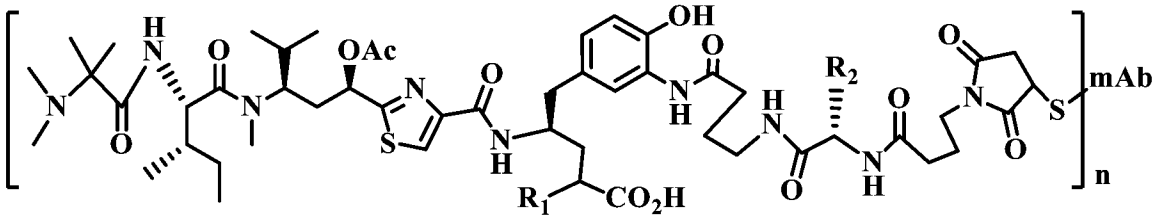


R_1 = H, C-403a,
R_1 = Me, C-403b

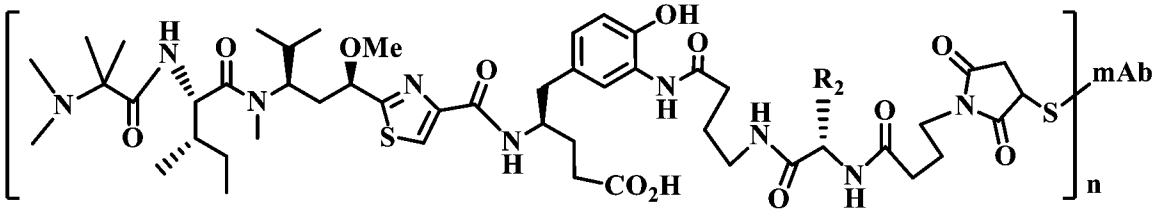
C-403a，or C-403b，



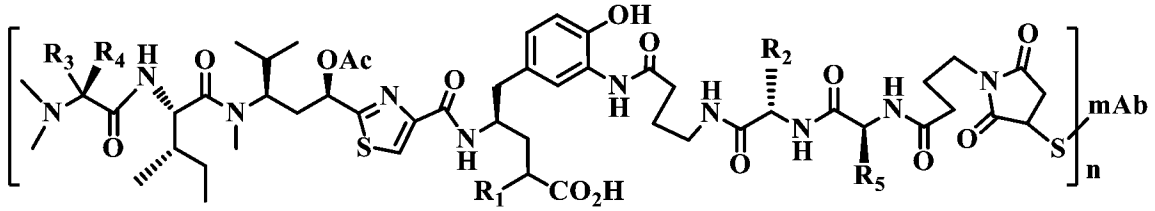
C-406，



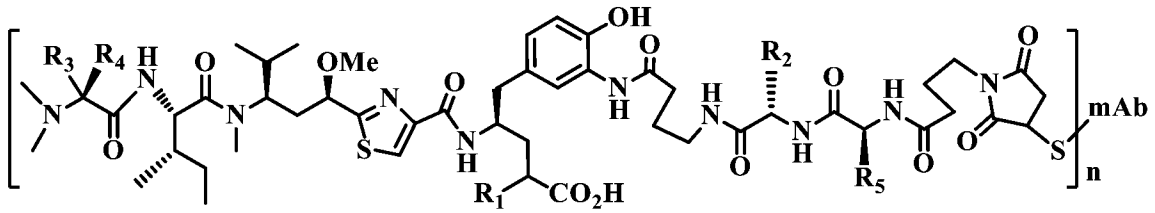
C-408a: R_1 = (R/S)-Me, R_2 = $(CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_9Me$
C-408b: R_1 = (S)-Me, R_2 = $(CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_9Me$
C-408c: R_1 = (S)-Me, R_2 = $(CH_2)_2CONH(CH_2CH_2O)_8Me$
C-408d: R_1 = H, R_2 = $(CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_8Me$
C-408e: R_1 = H, R_2 = $(CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_9Me$
C-408f: R_1 = H, R_2 = $(CH_2)_2CONH(CH_2CH_2O)_8Me$,



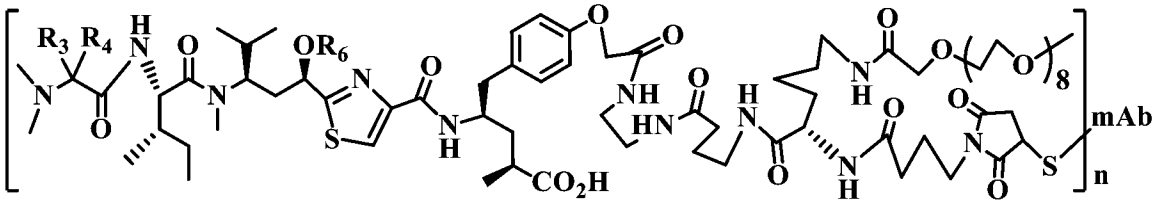
C-410a: R_2 = $(CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_8Me$
C-410b: R_2 = $(CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_9Me$
C-410c: R_2 = $(CH_2)_2CONH(CH_2CH_2O)_8Me$,



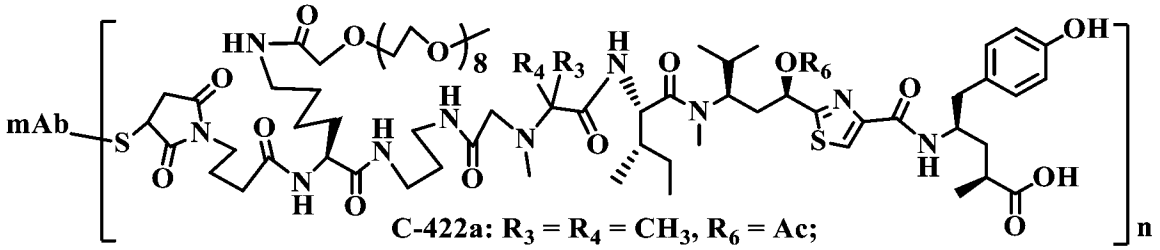
C-412a: R_3 = H, R_4= $(CH_3)_2CH$, R_1 = H, R_2 = $(CH_2)_2CONH(CH_2CH_2O)_8Me$, R_5 = H;
C-412b: R_3 = R_4 = CH_3, R_1 = H, R_2 = R_5 = $(CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_9Me$;
C-412c: R_3 = R_4 = CH_3, R_1 = (S)-Me, R_2 = R_5 = $(CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_8Me$;
C-412d: R_3 = H, R_4= $(CH_3)_2CH$, R_1 = H, R_5 = $(CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_8Me$, R_2= H;
C-412e: R_3 = R_4 = CH_3, R_1 = (S)-Me, R_2 = $(CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_8Me$, R_5= H;
C-412f: R_3 = R_4 = CH_3, R_1 = (S)-Me, R_5 = $(CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_8Me$, R_2= H;



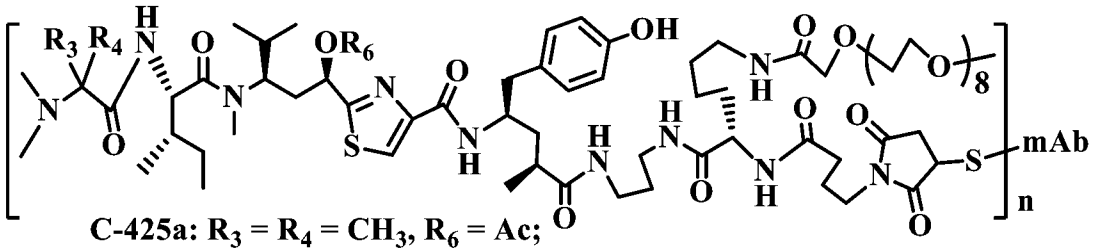
C-413a: R_3 = H, R_4= $(CH_3)_2CH$, R_1 = H, R_2 = $(CH_2)_2CONH(CH_2CH_2O)_8Me$, R_5 = H;
C-413b: R_3 = R_4 = CH_3, R_1 = H, R_2 = R_5 = $(CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_9Me$;
C-413c: R_3 = R_4 = CH_3, R_1 = (S)-Me, R_2 = R_5 = $(CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_8Me$;
C-413d: R_3 = H, R_4= $(CH_3)_2CH$, R_1 = H, R_5 = $(CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_8Me$, R_2= H;
C-413e: R_3 = R_4 = CH_3, R_1 = (S)-Me, R_2 = $(CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_8Me$, R_5= H;
C-413f: R_3 = R_4 = CH_3, R_1 = (S)-Me, R_5 = $(CH_2)_4NHCOCH_2O(CH_2CH_2O)_8Me$, R_2= H; ,



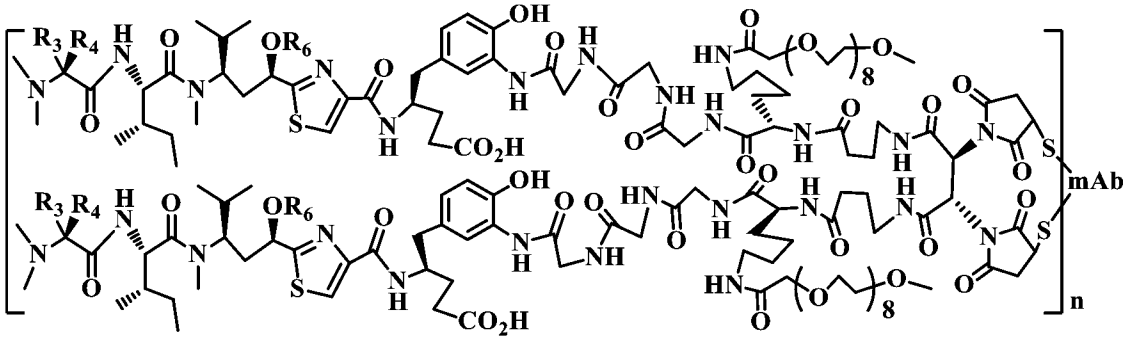
C-416a: $R_3 = R_4 = CH_3$, $R_6 = Ac$;
C-416b: $R_3 = R_4 = CH_3$, $R_6 = Me$;
C-416c: $R_3 = H$, $R_4 = (CH_3)_2CH$, $R_6 = Ac$;
C-416d: $R_3 = R_4 = CH_3$, $R_6 = Me$;



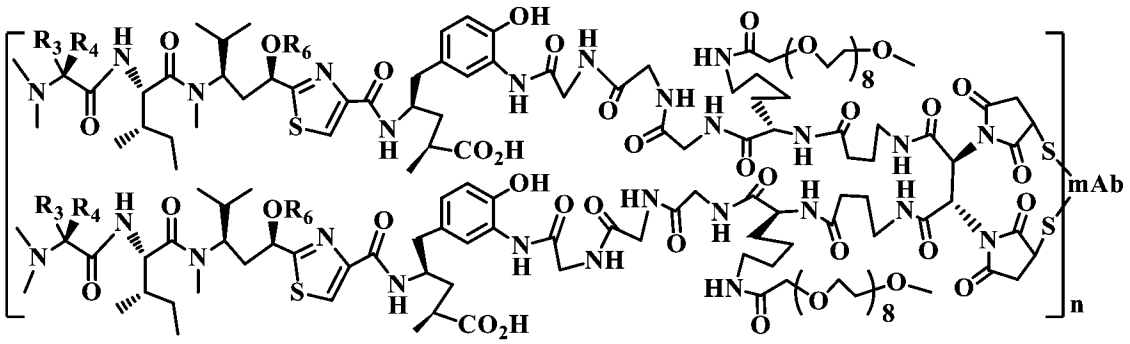
C-422a: $R_3 = R_4 = CH_3$, $R_6 = Ac$;
C-422b: $R_3 = R_4 = CH_3$, $R_6 = Me$;
C-422c: $R_3 = H$, $R_4 = (CH_3)_2CH$, $R_6 = Ac$;
C-422d: $R_3 = H$, $R_4 = (CH_3)_2CH$, $R_6 = Me$



C-425a: $R_3 = R_4 = CH_3$, $R_6 = Ac$;
C-425b: $R_3 = R_4 = CH_3$, $R_6 = Me$;
C-425c: $R_3 = H$, $R_4 = (CH_3)_2CH$, $R_6 = Ac$;
C-425d: $R_3 = H$, $R_4 = (CH_3)_2CH$, $R_6 = Me$



C-428a: $R_3 = R_4 = CH_3$, $R_6 = Ac$;
C-428b: $R_3 = R_4 = CH_3$, $R_6 = Me$;
C-428c: $R_3 = H$, $R_4 = (CH_3)_2CH$, $R_6 = Ac$;
C-428d: $R_3 = H$, $R_4 = (CH_3)_2CH$, $R_6 = Me$



C-431a: $R_3 = R_4 = CH_3$, $R_6 = Ac$;
C-431b: $R_3 = R_4 = CH_3$, $R_6 = Me$;
C-431c: $R_3 = H$, $R_4 = (CH_3)_2CH$, $R_6 = Ac$;
C-431d: $R_3 = H$, $R_4 = (CH_3)_2CH$, $R_6 = Me$ 。

表 4，BCMA 抗體偶聯物，NCI-H929、MM1S、8226-2A1 腫瘤細胞的 MTT 測定，15000 個細胞，96 小時孵育：

ADC 化合物	DAR 比率	IC50（nM）NCI-H929	IC50（nM）MM1S	IC50（nM）8226-2A1
C-009	4.6	21.6	17.8	18.7
C-020	4.5	18.7	19.1	17.5
C-025	4.6	0.68	0.92	0.46
C-027	4.6	1.82	1.58	1.47
C-031	4.6	1.65	1.63	1.18
C-037	4.6	0.48	0.85	0.63
C-038	4.6	0.56	0.48	0.65
C-039	4.6	1.59	1.35	1.75
C-043	4.5	1.22	1.48	1.89
C-046	4.4	1.13	1.62	1.38
C-052	7.6	2.58	3.31	3.22
C-056	7.8	10.3	8.2	9.75
C-059	7.6	0.02	0.20	0.08
C-063	7.6	0.09	0.08	0.06
C-066	7.8	0.02	0.07	0.04
C-071	7.6	0.08	0.05	0.04

C-079	4.0	2.89	4.04	5.22
C-084	4.0	3.48	4.85	5.73
C-087	4.2	3.86	5.23	5.13
C-093	7.7	0.03	0.04	0.02
C-096	3.6	0.38	0.81	0.72
C-102	4.6	0.47	0.28	0.19
C-109	4.4	0.55	0.37	0.31
C-111	4.5	0.17	0.23	0.36
C-118	4.6	0.38	0.33	0.19
C-123	4.6	0.30	0.27	0.25
C-133	3.6	0.39	0.29	0.18
C-143	3.8	0.28	0.36	0.25
C-155	3.8	0.22	0.28	0.21
C-168	2.2	1.25	1.43	1.09
C-172	2.4	1.15	1.20	1.12
C-182	4.2	0.51	0.50	0.38
C-186	2.8	1.68	1.11	1.28
C-198	4.8	1.07	1.13	1.07
C-203	3.6	1.12	1.18	1.29
C-208	4.6	0.28	0.27	0.22
C-214	4.6	0.30	0.46	0.30
C-215	4.5	0.22	0.25	0.28
C-216	4.6	0.48	0.32	0.38
C-217	4.4	0.31	0.33	0.24
C-218	4.5	0.19	0.28	0.15
C-226	4.4	0.06	0.05	0.03
C-227	4.4	0.18	0.10	0.07
C-231	4.5	0.14	0.13	0.08
C-237	4.2	0.51	0.80	1.08

C-249	4.1	0.82	1.10	1.56
C-259	4.0	0.02	0.08	0.03
C-260	4.1	0.05	0.09	0.03
C-261	4.2	0.01	0.06	0.03
C-325	4.4	0.19	0.15	0.09
C-326	4.4	0.10	0.17	0.12
C-327	4.5	0.24	0.19	0.17
C-328	4.4	0.15	0.16	0.13
C-329	4.5	0.13	0.15	0.11
C-330	4.4	0.22	0.20	0.18
C-331	4.4	0.25	0.34	0.39
C-332	4.5	0.25	0.29	0.23
C-333	4.5	0.36	0.37	0.29
C-334	4.5	0.22	0.23	0.19
C-335	4.5	0.40	0.39	0.37
C-353	2.1	1.20	1.73	0.92
C-363	1.9	1.03	1.42	0.93
C-371	4.1	0.62	0.66	0.91
C-378	4.0	0.47	0.42	0.77
C-379	4.1	0.51	0.53	0.65
C-380	4.0	0.53	0.50	0.57
C-381	4.2	0.63	0.54	0.67
C-384	4.1	0.40	0.52	0.48
C-385	4.1	0.46	0.62	0.66
C-386	4.2	0.30	0.46	0.39
C-387	4.0	0.48	0.62	0.57
C-397	2.2	1.10	1.39	1.27
C-400	4.4	0.62	0.67	0.69
C-403a	4.5	0.60	0.69	0.65

C-403b	4.4	0.19	0.22	0.29
C-406	4.5	0.37	0.51	0.43
C-408a	4.5	0.51	0.53	0.67
C-408b	4.4	0.41	0.43	0.49
C-408d	4.5	0.59	0.77	0.82
C-408e	4.5	0.62	0.77	0.80
C-408f	4.4	0.65	0.76	0.85
C-410a	4.5	0.64	0.78	0.81
C-410b	4.5	0.63	0.78	0.80
C-410c	4.6	0.65	0.79	0.81
C-412a	4.3	0.51	0.70	0.60
C-412b	4.4	0.69	0.82	0.82
C-412c	4.5	0.61	0.77	0.65
C-413a	4.5	0.48	0.49	0.51
C-413b	4.5	0.52	0.72	0.77
C-413c	4.5	0.39	0.52	0.51
C-413d	4.4	0.31	0.46	0.51
C-416a	4.5	0.30	0.31	0.32
C-416b	4.4	0.30	0.45	0.53
C-416c	4.4	0.28	0.35	0.48
C-416d	4.5	0.38	0.51	0.61
C-422a	4.6	0.72	0.83	0.89
C-422b	4.6	0.79	0.89	1.06
C-422c	4.6	0.62	0.77	0.83
C-422d	4.5	0.68	0.82	0.91
C-425a	4.4	0.41	0.47	0.62
C-425b	4.5	0.43	0.53	0.59
C-425c	4.5	0.31	0.37	0.48
C-425d	4.5	0.37	0.39	0.53

C-428a	4.4	0.52	0.69	0.77
C-428b	4.4	0.49	0.73	0.71
C-428c	4.4	0.37	0.53	0.60
C-428d	4.5	0.42	0.55	0.69
C-431a	4.5	0.23	0.34	0.47
C-431b	4.6	0.27	0.39	0.47
C-431c	4.5	0.20	0.33	0.35
C-431d	4.4	0.25	0.37	0.39
紫杉醇		2.89	3.28	3.71

【0669】實施例 472. 體內抗腫瘤活性（獨立地攜帶HCC-827，NCI-N87，NCI-H929，BT-474，SK-OV-3，OE-19，Calu-3，HCT-116，Mz-ChA-1，UCC異種移植腫瘤 BALB/c裸鼠）。

在人肺腺癌HCC-827細胞株腫瘤異種移植模型中評估了EGFR偶聯物C-031、C-038、C-066、C-071、C-093、C-111、C-118、C-208、C-214和C-216的體內療效。在人胃癌N-87細胞株評估了Trop2偶聯物C-216、C-218、C-328、C-384、C-408b、C-412c、C-422a、C-425a和C-431c。在人多發性骨髓瘤NCI-H929細胞株腫瘤異種移植模型評估了BCMA偶聯物C-227, C-403a, C-403b, C-408b, C-412e, C-412f, C-428c,和 C-431a。將5周齡雌性BALB/c裸鼠（每組6只動物）在右肩下區域皮下接種0.1-0.2ml無血清培養基中的相應癌細胞（5×10 6個細胞/小鼠）。腫瘤生長6-8天至平均大小150 mm^3，或8-9天至平均大小18 mm^3。然後將動物隨機分成不同組（每組6只動物）。

第一組小鼠作為對照組，注射磷酸緩衝鹽水（PBS）載劑。其他組用偶聯物靜脈注射，劑量6mg/Kg。每3或4天（每週兩次）量測腫瘤的三維尺寸，並使用公式：腫瘤體積=1/2（長×寬×高）計算腫瘤體積。同時

還量測動物的體重。當滿足以下任何一個準則時，處死小鼠：（1）體重減少超過處理前體重的20%，（2）腫瘤體積大於1500mm ^{3}，（3）病情嚴重無法進食和水，或（4）皮膚壞死。如果腫瘤無法被感知，則認為小鼠是無腫瘤的。

結果繪製在圖25-27中。所有偶聯物在6.0mg/Kg的劑量下不引起動物體重減輕。與PBS緩衝液相比，所有偶聯物均顯示出抗腫瘤活性。

【0670】 實施例 473. 藉由UPLC-MS分析DAR和偶聯位點：

DAR量測：ADC的還原（5mM二硫蘇糖醇在37℃下約2小時），然後進行去糖基化步驟（快速PNGase F在50℃下約15分鐘）可以產生六個片段，如圖2-4所示。HC和LC存在作為裸露或偶聯形式，最多可承載3個有效載荷。使用Acquity UPLC（Waters），BEH 300 C 41.7μm 2.1×50mm柱與Xevo G2XS Q-TOF質譜儀（Waters）聯聯，用MS檢測對這些片段進行層析單離。使用移動相B（具有0.1%FA的ACN）的線性梯度從5%至85%在4分鐘內以0.25ul/min的流速進行層析單離。使用MassLynx軟體進行資料獲取，並使用500 Da至4000 Da的品質採集範疇。使用UNIFI軟體（Waters）進行資料分析。以下等式用於習知偶聯ADC的平均DAR計算。

平均 DAR = L1/（L0+L1）*2 + H1/（H0+H1+H2+H3）*2 + H2/（H0+H1+H2+H3）*2 + H3/（H0+H1+H2+H3）*2

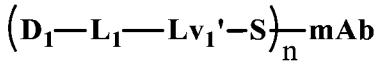
偶聯位點：將ADC樣品變性並還原（6M尿素，10mM二硫蘇糖醇，56℃約40分鐘），烷基化（約30mM碘乙醯胺，室溫黑暗中40分鐘），用50mM NH_4HCO_3稀釋並用胰蛋白酶消化。（1/50酶/受質重量比，4小時，37℃）。使用Acquity UPLC（Waters），使用BEH C18 1.7μm

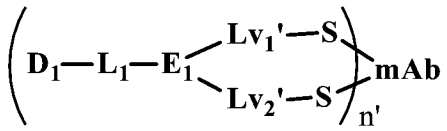
2.1×100mm柱與Xevo G2XS Q-TOF質譜儀（Waters）偶聯，用MS檢測進行肽的層析單離。使用移動相B（含有0.1%FA的ACN）的線性梯度從1%到40%在95分鐘內以0.2ul/min的流速進行層析單離。使用MassLynx軟體進行資料獲取，並使用品質採集範疇從100 Da到2500 Da。使用UNIFI軟體（Waters）進行資料分析。

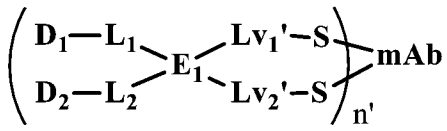
【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種式（V）、（VI）或（VII）偶聯物，


（V），


（VI），


（VII），

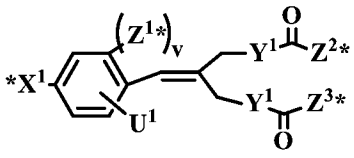
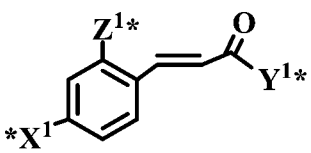
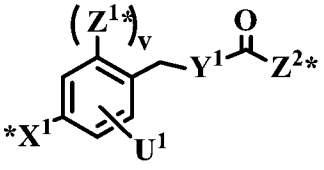
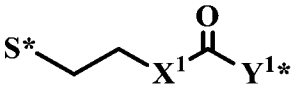
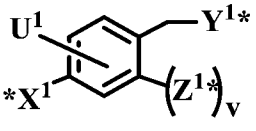
其中 n 是 1-20；n’ 是 1-10；mAb 是抗體或類抗體蛋白；

其中 L_1 和 L_2 是相同或不同，獨立地選自由下列組成之群組：O、NH、S、NHNH、N（R_3）、N（R_3）N（$R_{3'}$）、（OCH_2CH_2）$_pOR_3$、（OCH_2CH（CH_3））$_pOR_3$、NH（CH_2CH_2O）$_pR_3$、或 NH（CH_2CH（CH_3）O）$_pR_3$、N[（CH_2CH_2O）$_pR_3$][（CH_2CH_2O）$_{p'}R_{3'}$]、（OCH_2CH_2）$_pCOOR_3$、CH_2CH_2（OCH_2CH_2）$_p$COOR的聚乙二醇單元$_3$，其中 p 和 p’ 獨立地選自由下列組成之群組：0 至約1000的整數、C_1-C_8烷基、C_2-C_8 雜烷基、烷基環烷基、雜環烷基、C_3-C_8 芳基、Ar-烷基、雜環、碳環、環烷基、雜烷基環烷基、烷基羰基、雜芳基；其中 R_3 和 $R_{3'}$ 獨立地為 H、C_1-C_8 烷基、C_2-C_8 雜烷基、烷基環烷基、雜環烷基、C_3-C_8 芳基、Ar-烷基、雜環、碳環、環烷基、雜烷基環烷基、烷基羰基、雜芳基、或 1-8 個碳原子的酯、醚或醯胺；或定義中所述的1~8個天然或非天然胺基酸；或結構式為（OCH_2CH_2）$_p$ 或（OCH_2CH（CH_3））$_p$的聚乙二醇單元、 其中p是0至約1000的整數、或以上一種或兩種的組合；

其中L_1或L_2獨立地可以含有自我毀滅或非自我毀滅的組分、肽單

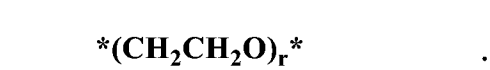
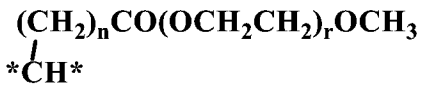
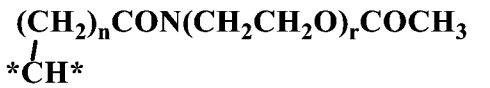
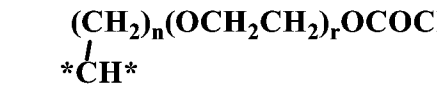
元、腙鍵、二硫化物、酯、肟、醯胺或硫醚鍵，該自我毀滅的組分為與對胺基苄基胺甲醯基（PAB）的電子結構相似的芳香化合物選自由下列組成之群組：2-胺基咪唑-5-甲醇的衍生物、雜環PAB類似物、β-葡糖苷酸、以及鄰或對胺基苄基縮；

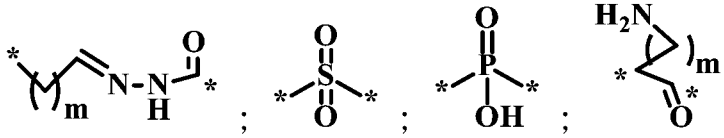
其中該自我毀滅的組分具有以下結構之一：

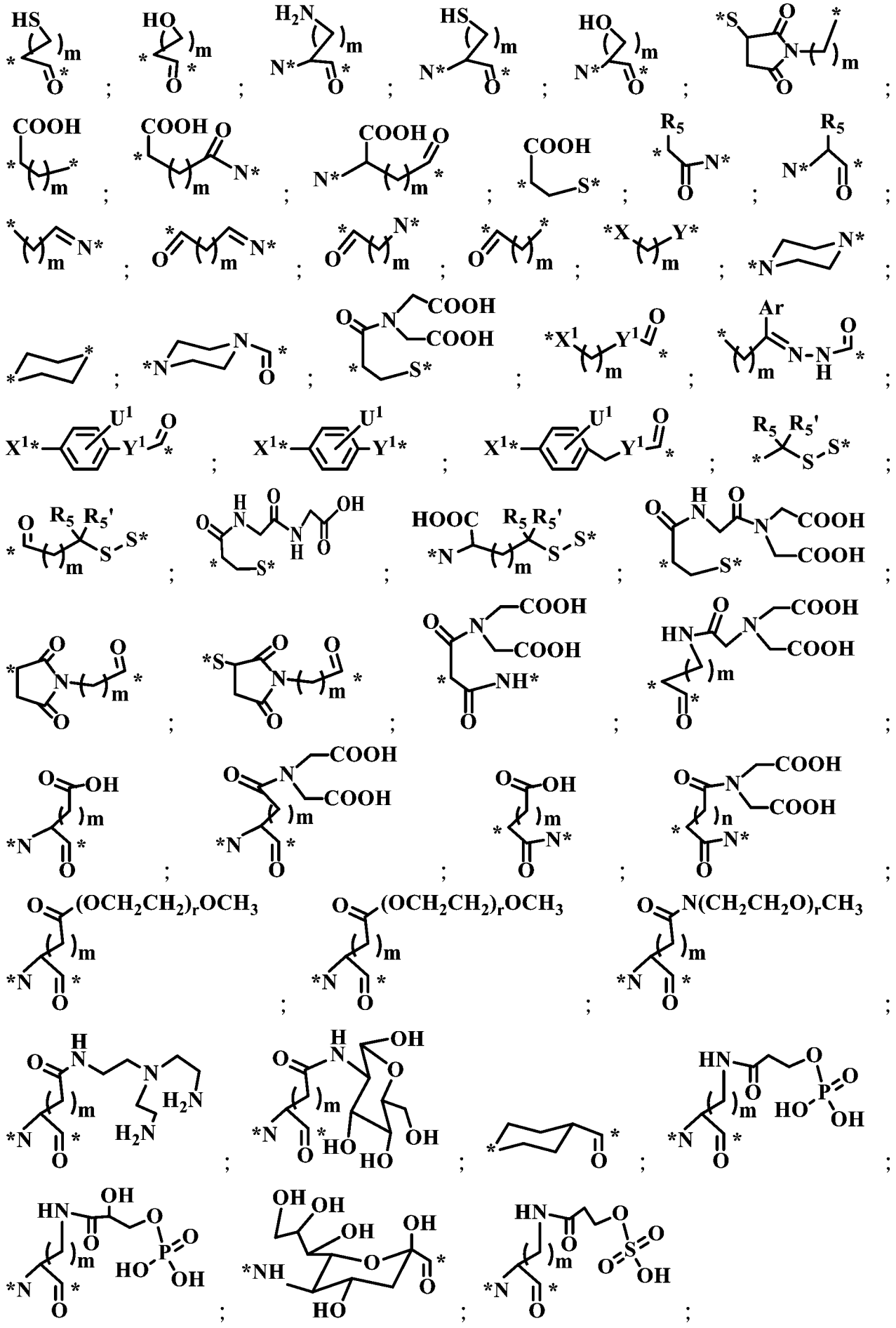

；

；

；

；


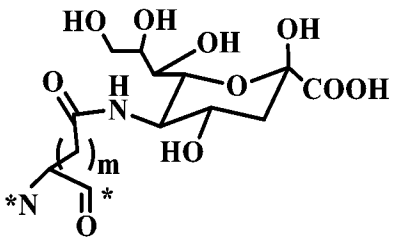
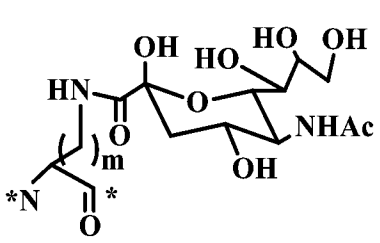
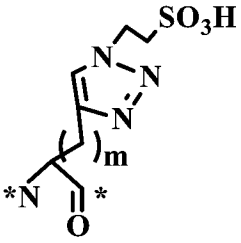
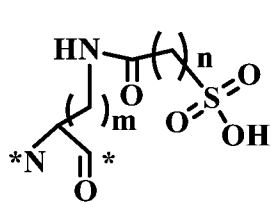
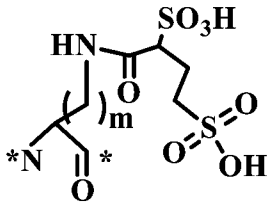
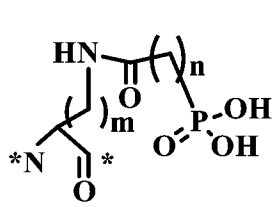
其中（*）是另外的間隔體或可斷裂的連接子單元，或細胞毒劑、和/或細胞結合分子（CBA）的連接點；X^1、Y^1、Z^2 和 Z^3 獨立地為 NH、O、或 S；Z^1 獨立地為 H、NH、O 或 S；v 是 0 或 1；U^1 獨立地為 H、OH、C_1-C_6 烷基、$(OCH_2CH_2)_nF$、Cl、Br、I、OR_5、SR_5、NR_5R_5’、$N{=}NR_5$、$N{=}R_5$、NR_5R_5’、NO_2、SOR_5R_5’、SO_2R_5、SO_3R_5、OSO_3R_5、PR_5R_5’、POR_5R_5’、$PO_2R_5R_5$’、$OPO(OR_5)(OR_5$’），或 $OCH_2PO(OR_5(OR_5$’），其中 R_5和R_5’獨立地為 H、C_1-C_8直鏈或支鏈烷基、C_3-C_8 芳基、雜芳基、雜烷基、烷基環烷基、醯氧基胺、或（Ar）r、r =1 -6（胺基酸或具有相同或不同胺基酸序列的肽）；

其中該非自我毀滅的組分為以下結構之一：


；

；

；

；

；

；



其中（*）是另外的間隔體R_1或可斷裂的連接子單元、細胞毒性分子和/或細胞結合分子的連接點；X^1、Y^1、U^1、R_1、R_5、R_5'如上所定義；r是0-100；m和n獨立地為0-6；

其中L_1或L_2可獨立地由一個或多個下列連接子組分構成：6-馬來醯亞胺基己醯基（“MC”）、馬來醯亞胺丙醯基（“MP”）、纈胺酸-瓜胺酸（“val-cit”或“vc”）、丙胺酸-苯丙胺酸（“ala-phe”或“af”）、對胺基苄氧基羰基（“PAB”）、4-硫代戊醯基（“SPP”）、4-（N-馬來醯亞胺甲基）環己烷-1醯基（“MCC”）、（4-乙醯基）胺基苯醯基（“SIAB”）、4-硫丁醯基（SPDB）、4-硫-2-羥基磺醯基-丁醯基（2-Sulfo-SPDB），或具有1-8個天然或非天然胺基酸單元的天然或非天然肽；

其中L_1和L_2獨立地是可斷裂連接子；

其中該可斷裂連接子（L_1 或 L_2）包括：

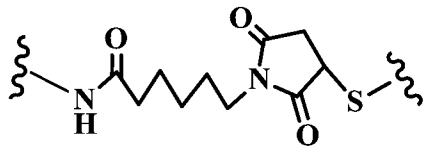
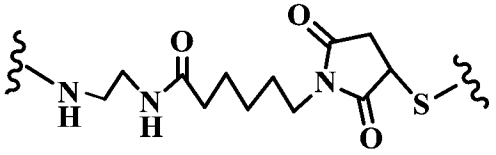
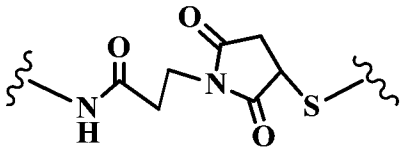
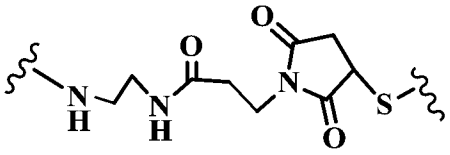
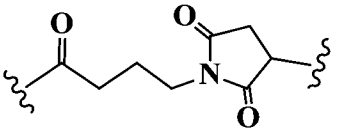
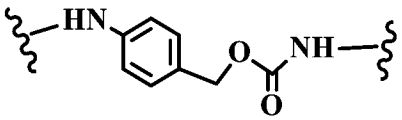
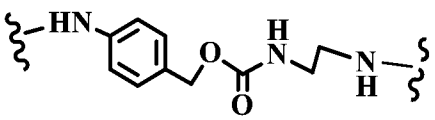
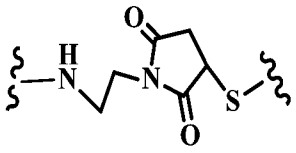
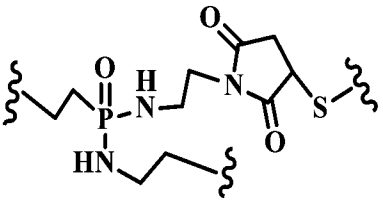
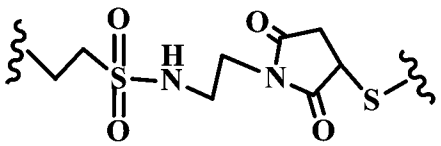
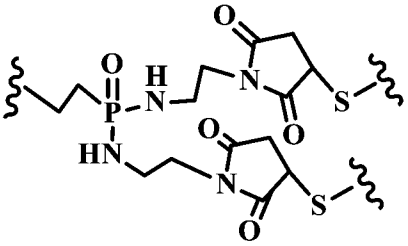
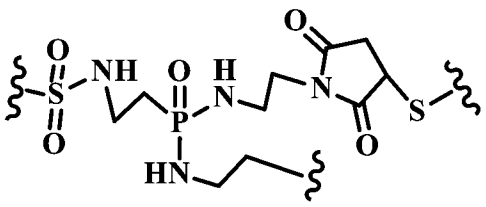
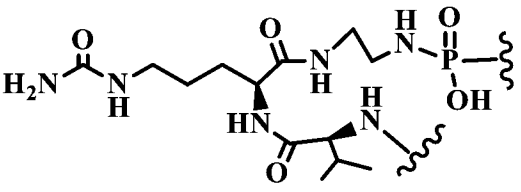
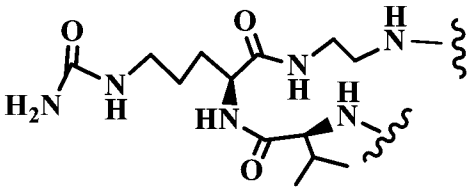
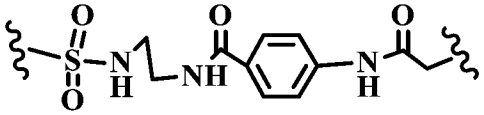
-（CR_5R_6）$_m$（Aa）r（CR_7R_8）$_n$（OCH_2CH_2）$_t$-，-（CR_5R_6）$_m$（CR_7R_8）$_n$（Aa）$_r$（OCH_2CH_2）$_t$-，-（Aa）$_r$-（CR_5R_6）$_m$（CR_7R_8）$_n$（OCH_2CH_2）$_t$-，-（CR_5R_6）$_m$（CR_7R_8）$_n$（OCH_2CH_2）$_r$（Aa）$_t$-，-（CR_5R_6）$_m$-（CR_7=CR_8）（CR_9R_{10}）$_n$（Aa）$_t$（OCH_2CH_2）$_r$-，-（CR_5R_6）$_m$（$NR_{11}CO$）（Aa）$_t$（CR_9R_{10}）$_n$-（OCH_2CH_2）$_r$-，-

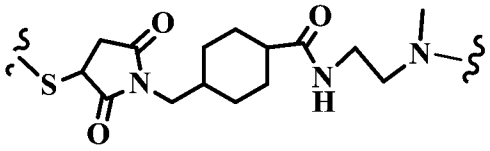
（CR_5R_6）$_m$（Aa）$_t$（$NR_{11}CO$）（CR_9R_{10}）$_n$（OCH_2CH_2）$_r$-，-（CR_5R_6）$_m$（OCO）（Aa）$_t$（CR_9R_{10}）$_n$-（OCH_2CH_2）$_r$-，-（CR_5R_6）$_m$（OCNR$_7$）（Aa）$_t$（CR_9R_{10}）$_n$（OCH_2CH_2）$_r$-，-（CR_5R_6）$_m$（CO）（Aa）$_t$-（CR_9R_{10}）$_n$（OCH_2CH_2）$_r$-，-（CR_5R_6）$_m$（$NR_{11}CO$）（Aa）$_t$（CR_9R_{10}）$_n$（OCH_2CH_2）$_r$-，-（CR_5R_6）$_m$-（OCO）（Aa）$_t$（CR_9R_{10}）$_n$-（OCH_2CH_2）$_r$-，-（CR_5R_6）$_m$（OCNR$_7$）（Aa）$_t$（CR_9R_{10}）$_n$（OCH_2CH_2）$_r$-，-（CR_5R_6）$_m$（CO）（Aa）$_t$（CR_9R_{10}）$_n$-（OCH_2CH_2）$_r$-，-（CR_5R_6）$_m$-苯基-CO（Aa）$_t$（CR_7R_8）$_n$-，-（CR_5R_6）$_m$-呋喃-CO（Aa）$_t$（CR_7R_8）$_n$-，-（CR_5R_6）$_m$-惡唑-CO（Aa）$_t$（CR_7R_8）$_n$-，-（CR_5R_6）$_m$-噻唑-CO（Aa）$_t$（CCR_7R_8）$_n$-，-（CR_5R_6）$_t$-噻吩-CO（CR_7R_8）$_n$-，-（CR_5R_6）$_t$-咪唑-CO-（CR_7R_8）$_n$-，-（CR_5R_6）$_t$-嗎啉-CO（Aa）$_t$-（CR_7R_8）$_n$-，-（CR_5R_6）$_t$吡嗪-CO（Aa）$_t$-（CR_7R_8）$_n$-，-（CR_5R_6）$_t$-N-甲基吡嗪-CO（Aa）$_t$-（CR_7R_8）$_n$-，-（CR_5R）$_m$-（Aa）$_t$苯基-，-（CR_5R_6）$_m$-（Aa）$_t$呋喃-，-（CR_5R_6）$_m$-惡唑（Aa）$_t$-，-（CR_5R_6）$_m$-噻唑（Aa）$_t$-，-（CR_5R_6）$_m$-噻吩-（Aa）$_t$-，-（CR_5R_6）$_m$-咪唑（Aa）$_t$-，-（C R_5R_6）$_m$-嗎啉-（Aa）$_t$-，-（CR_5R_6）$_m$-吡嗪-（Aa）$_t$-，-（CR_5R_6）$_m$-N-甲基吡嗪-（Aa）$_t$-，-K（CR_5R_6）$_m$（Aa）r（CR_7R_8）$_n$（OCH_2CH_2）$_t$-，-K（CR_5R_6）$_m$（CR_7R_8）$_n$（Aa）$_r$（OCH_2CH_2）$_t$-，-K（Aa）$_r$-（CR_5R_6）$_m$（CR_7R_8）$_n$（OCH_2CH_2）$_t$-，-K（CR_5R_6）$_m$（CR_7R_8）$_n$（OCH_2CH_2）$_r$（Aa）$_t$-，-K（CR_5R_6）$_m$-（CR_7=CR_8）（CR_9R_{10}）$_n$（Aa）$_t$（OCH_2CH_2）$_r$-，-K（CR_5R_6）$_m$（$NR_{11}CO$）（Aa）$_t$（CR_9R_{10}）$_n$（OCH_2CH_2）$_r$-，-K（CR_5R_6）$_m$（Aa）$_t$（$NR_{11}CO$）（CR_9R_{10}）$_n$（OCH_2CH_2）$_r$-，-K

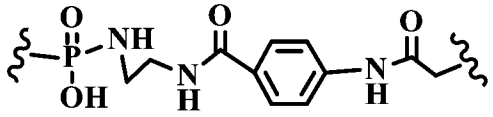
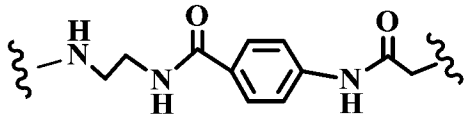
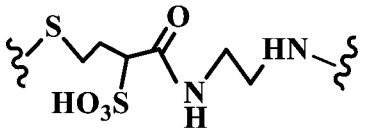
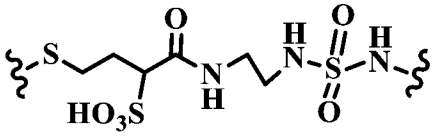
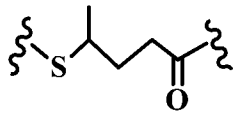
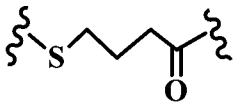
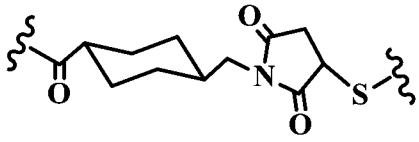
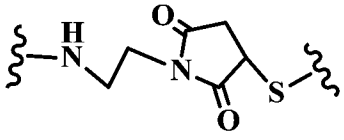
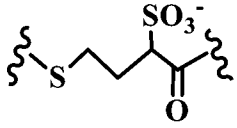
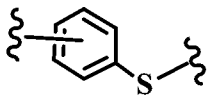
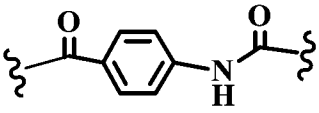
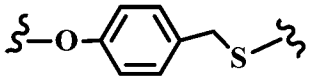
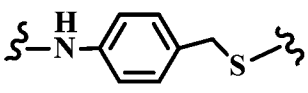
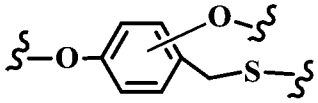
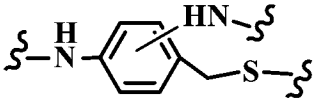
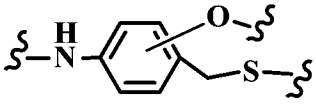
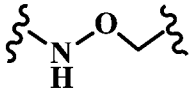
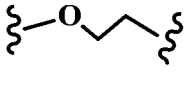
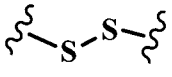
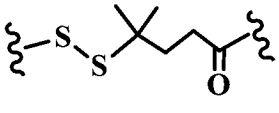
（CR_5R_6）$_m$（OCO）（Aa）$_t$（CR_9R_{10}）$_n$-（OCH_2CH_2）$_r$-，-K（CR_5R_6）$_m$（$OCNR_7$）（Aa）$_t$（CR_9R_{10}）$_n$（OCH_2CH_2）$_r$-，-K（CR_5R_6）$_m$（CO）（Aa）$_t$-（CR_9R_{10}）$_n$（OCH_2CH_2）$_r$-，-K（CR_5R_6）$_m$（$NR_{11}CO$）（Aa）$_t$（CR_9R_{10}）$_n$（OCH_2CH_2）$_r$-，-K（CR_5R_6）$_m$-（OCO）（Aa）$_t$（CR_9R_{10}）$_n$（OCH_2CH_2）$_r$-，-K（CR_5R_6）$_m$（$OCNR_7$）（Aa）$_t$（CR_9R_{10}）$_n$（OCH_2CH_2）$_r$-，-K-（CR_5R_6）$_m$（CO）（Aa）$_t$（CR_9R_{10}）$_n$（OCH_2CH_2）$_r$-，-K（CR_5R_6）$_m$-苯基-CO（Aa）$_t$（CR_7R_8）$_n$-，-K-（CR_5R_6）$_m$-呋喃-CO（Aa）$_t$-（CR_7R_8）$_n$-，-K（CR_5R_6）$_m$-惡唑-CO（Aa）$_t$（CR_7R_8）$_n$-，-K（CR_5R_6）$_m$-噻唑-CO（Aa）$_t$-（CR_7R_8）$_n$-，-K（CR_5R_6）$_t$-噻吩-CO（CR_7R_8）$_n$-，-K（CR_5R_6）$_t$咪唑-CO-（CR_7R_8）$_n$-，-K（CR_5R_6）$_t$嗎啉-CO（Aa）$_t$（CR_7R_8）$_n$-，-K（CR_5R_6）$_t$吡嗪-CO（Aa）$_t$-（CR_7R_8）$_n$-，-K（CR_5R_6）$_t$-N-甲基吡嗪CO（Aa）$_t$（CR_7R_8）$_n$-，-K（CR_5R）$_m$（Aa）$_t$苯基，-K-（CR_5R_6）$_m$-（Aa）$_t$呋喃-，-K（CR_5R_6）$_m$-惡唑（Aa）$_t$-，-K（CR_5R_6）$_m$-噻唑（Aa）$_t$-，-K（CR_5R_6）$_m$-噻吩-（Aa）$_t$-，-K（CR_5R_6）$_m$-咪唑（Aa）$_t$-，-K（CR_5R_6）$_m$-嗎啉（Aa）$_t$-，-K（CR_5R_6）$_m$-吡嗪-（Aa）$_t$G，-K（CR_5R_6）$_m$N-甲基吡嗪（Aa）$_t$-；其中Aa 是 1-8 個相同或者不同的胺基酸；m、n、R_3 和 R_5 定義如上所描述；t和 r 獨立地為 0 – 100；R_6、R_7、和 R_8獨立地選自H、鹵化物、C_1~C_8烷基、芳基、烯基、炔基、醚、酯、胺或醯胺，任選地被一種或多種鹵化物取代，CN、NR_1R_2、CF_3、OR_1、Aryl、雜環、S（O）R_1、SO_2R_1、-CO_2H、-SO_3H、-OR_1、-CO_2R_1、-$CONR_1$、-$PO_2R_1R_2$、-PO_3H 或 P（O）$R_1R_2R_3$；K 是 NR_1、-SS-、-C（=O）-、-C（=O）NH-、-C（=O）O-、

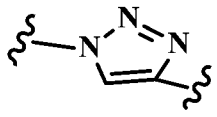
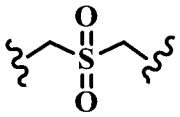
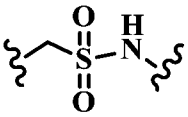
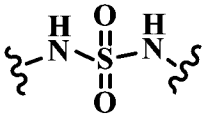
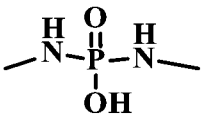
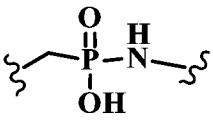
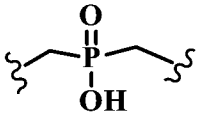
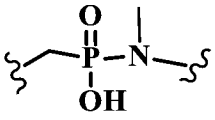
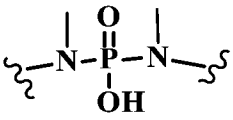
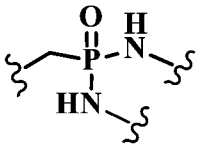
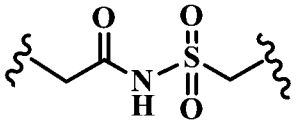
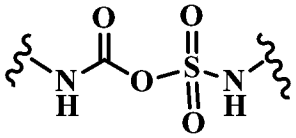
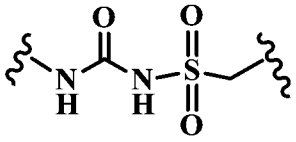
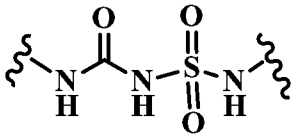
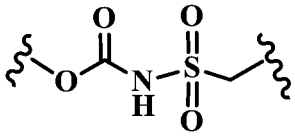
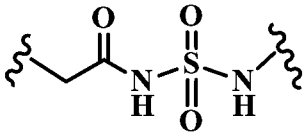
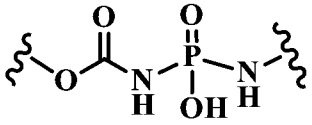
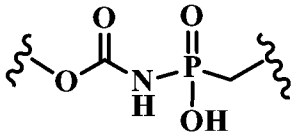
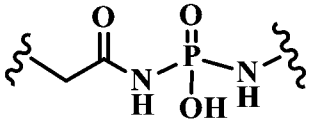
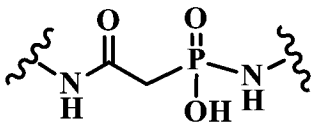
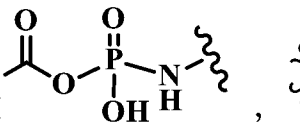
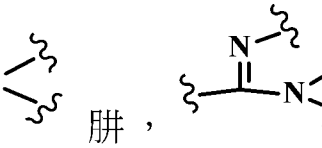
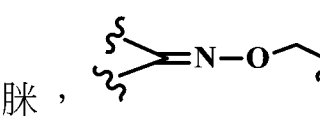
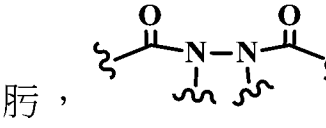
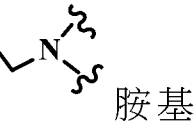
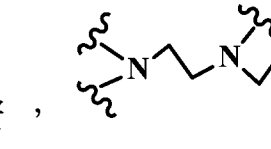
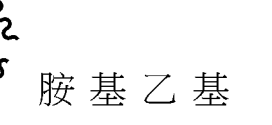
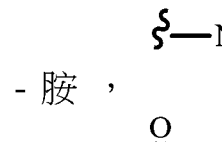
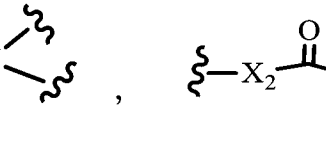
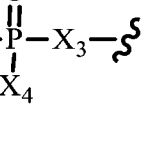
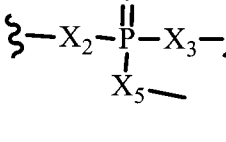
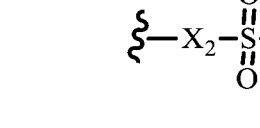
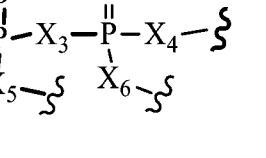
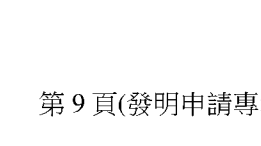
-C=NH-O-、-C=N-NH-、-C（=O）NH-NH-、O、S、Se、B 或 C_3-C_6 雜芳基；

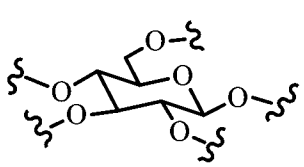
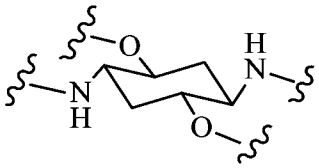
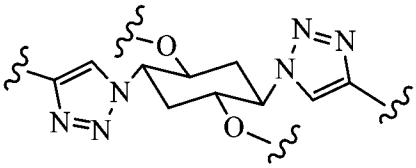
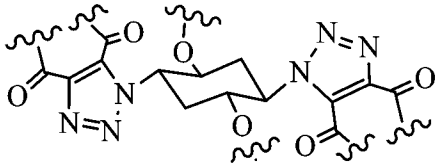
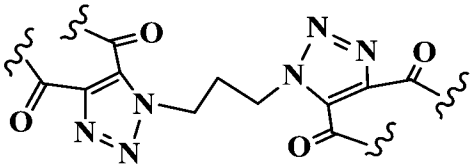
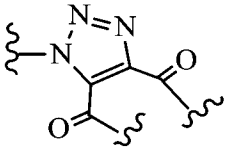
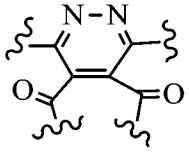
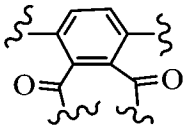
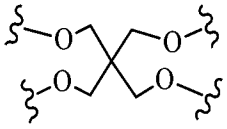
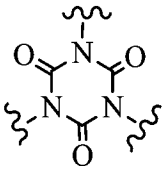
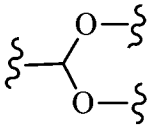
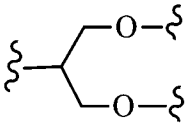
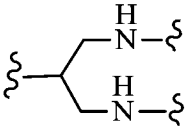
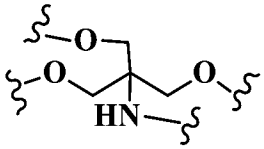
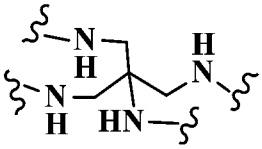
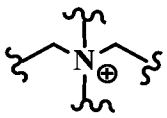
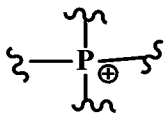
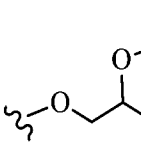
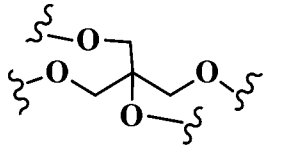
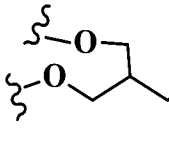
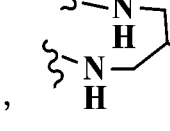
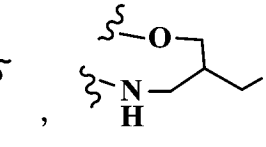
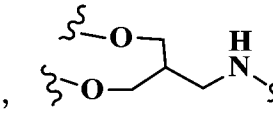
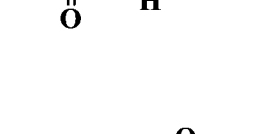
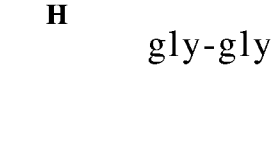
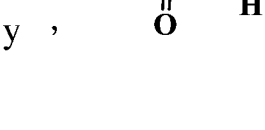
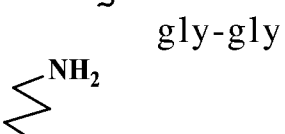
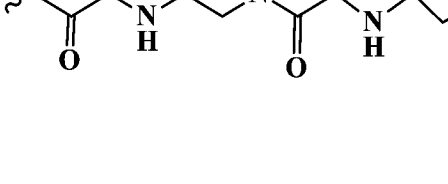
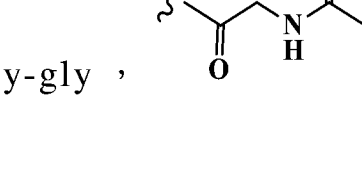
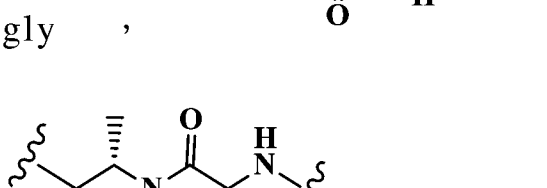
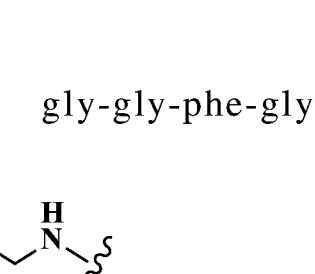
其中該連接子L_1和L_2的組分的結構為：


，

（包含MC，6-馬來醯亞胺己醯基），

，

（MP，馬來醯亞胺丙醯基），

，

，

（PAB，p-對胺基苄氧基醯胺基），

，

，

，

，

，

，

（含纈胺酸-脲胺酸（VC）），

，



（MCC，4-（N-馬來醯亞胺甲基）環己烷-1-羧酸酯），  ，  ，  （（4-乙醯基）胺基苯甲酸酯），  ，（4-硫代-2-羥基磺醯丁酸酯，2-磺基-SPDB），  4-硫代戊酸酯（SPP），  4-硫代丁醯基（SPDB），  4-（N-馬來醯亞胺基甲基）環己烷-1-醯基（MCC），  馬來醯亞胺乙胺基（ME），  4-硫代-2-羥基磺醯基丁醯基（2-Sulfo-SPDB），  芳基硫醚基（PhSS），  （4-乙醯基）胺基苯醯基（SIAB），  ，氧苄基硫醚基，  胺基苄基硫醚基，  二氧基苄基硫醚基，  二胺基苄基硫醚基，  胺基氧基苄基硫醚基，  烷氧基胺基（AOA），  亞乙基氧基（EO），  二硫，  4-甲基-4-二硫代戊酸

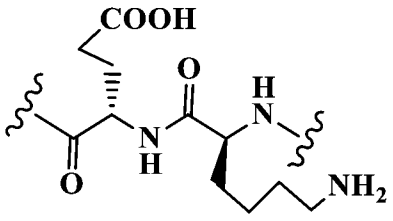
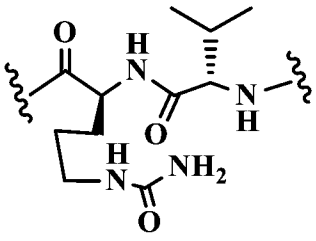
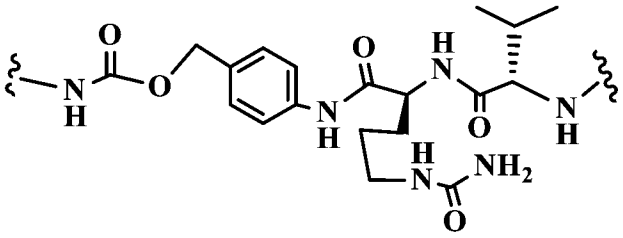
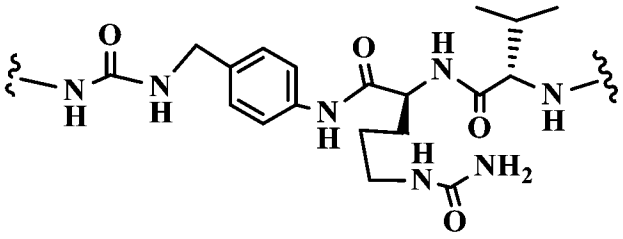
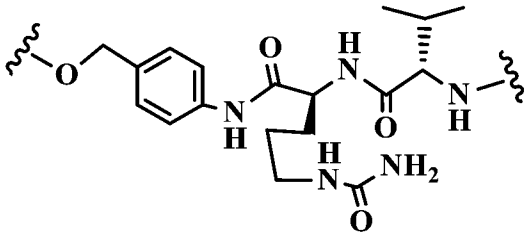
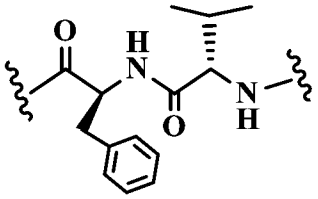
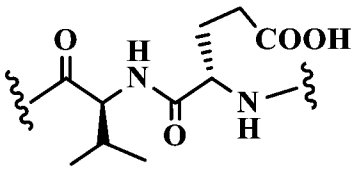
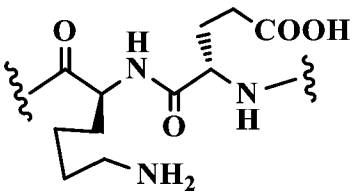
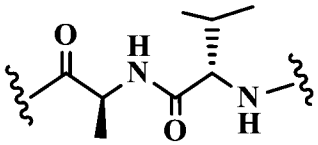
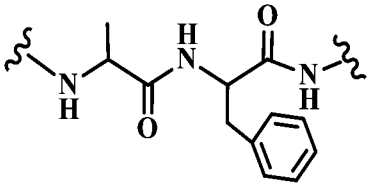
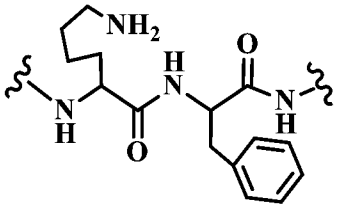
（MPDP），  三唑，  烷基磺醯基，  烷基磺胺，  碸基二磺胺，  磷二醯胺，  烷基膦醯胺，  膦酸，  N-甲基烷基膦醯胺，  N,N’-二甲基磷二醯胺，  N,N’-烷基膦二醯胺，  ，  ，  ，  ，  ，  ，  ，  ，  ，  ，  ，  ，  ，  ，  肼，  乙脒，  肟，  二乙醯肼，  胺基乙基胺，  胺基乙基-胺基乙基-胺，  ，  ，  ，  ，  ，，  ，，


,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

gly-gly-gly ,

gly-gly ,

gly-gly-gly-gly ,

Lys-gly ,

gly-gly-phe-gly ,

ala-ala ,

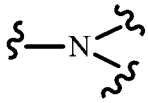
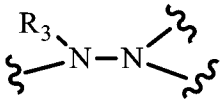
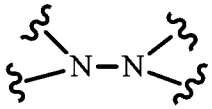
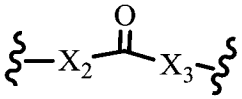
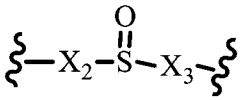
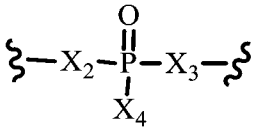
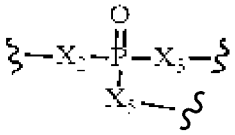
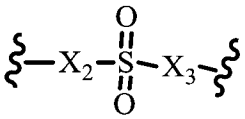
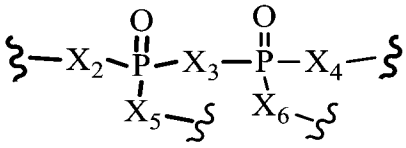
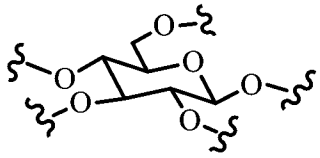
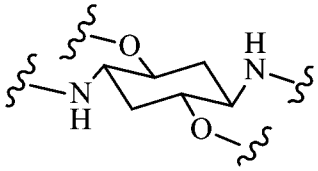
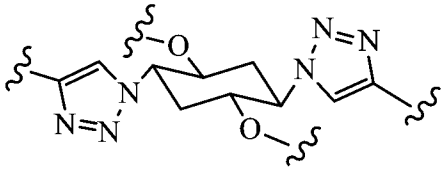
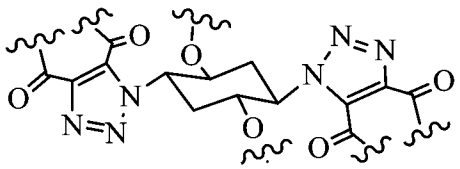
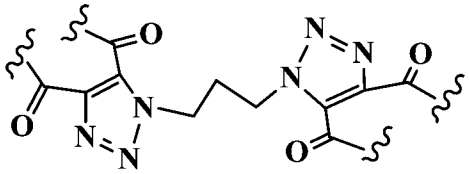
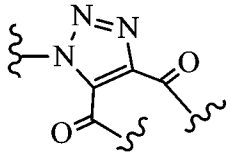
glu-gly ,

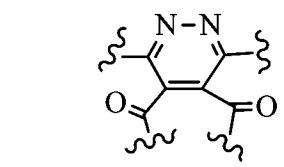
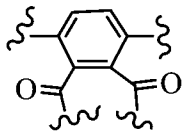
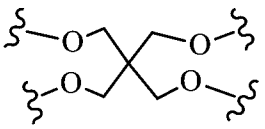
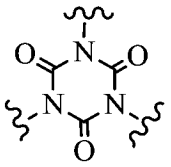
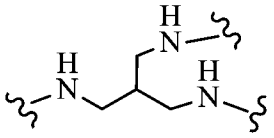
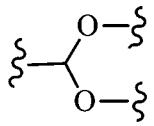
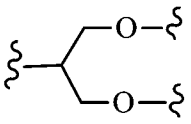
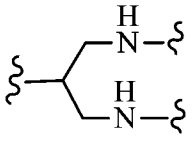
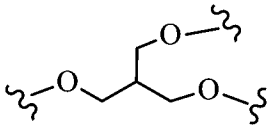
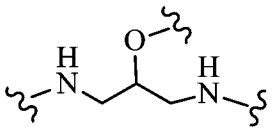
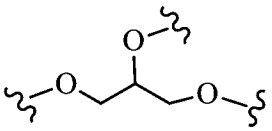
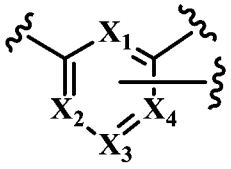
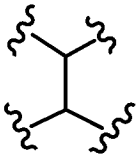
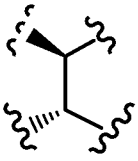
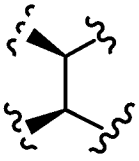
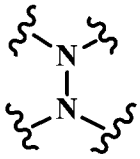
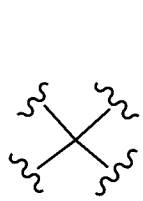
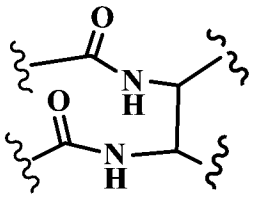
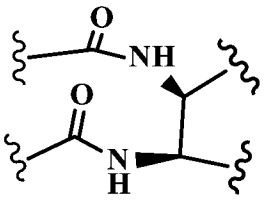
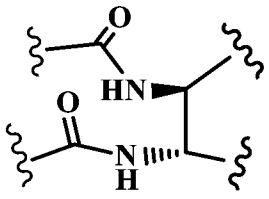
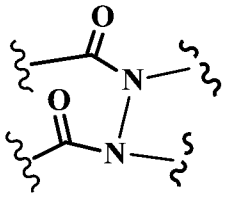
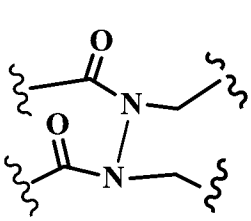

glu-lys ，  （VC），  ，  ，  ，  ，  ，  ，  ，  （ala-phe），  （lys-phe），或兩個或多個的組合；其中 ξ 是連接位點；X_2、X_3、X_4、X_5、或 X_6獨立地選自由下列組成之群組：NH、NHNH、N（R_{12}）、N（R_{12}）N（$R_{12'}$）、O、S、C_1-C_6 烷基、C_2-C_6 雜烷基、烷基環烷基、雜環烷基、C_3-C_8 芳基、芳基烷基、雜環、碳環、環烷基、雜烷基環烷基、烷基羰基、雜芳基、CH_2OR_{12}、CH_2SR_{12}、CH_2NHR_{12}及1~8 胺基酸；其中 R_{12} 和 $R_{12'}$ 獨立地為 H、C_1-C_8烷基、C_2-C_8 雜烷基、烷基環烷基、雜環烷基、C_3-C_8 芳基、芳基烷基、雜環、碳

環、環烷基、雜烷基環烷基、烷基羰基、雜芳基、或C_1-C_8酯、醚或醯胺；或結構式為 （OCH_2CH_2）$_p$ 或 （OCH_2CH（CH_3））$_p$的聚乙二醇單元，其中p是0至約1000的整數，或兩個或多個的組合；

其中 L_1、L_2、X_1、X_2、X_3、$X_{1'}$、$X_{2'}$ 和 $X_{3'}$ 可獨立地缺省；

其中 E_1是連接兩個巯基可反應基團L_{v1}'和L_{v2}'的連接基團，且E_1選自由下列組成之群組：CH、CH_2、NH、NHNH、N（R_3）、N（R_3）N（$R_{3'}$）、N=N、N-N、P、P（=O）、S、Si、C_2-C_8烷基、雜烷基、烷基環烷基、雜環烷基、C_3-C_8芳基、芳基烷基、雜環、碳環、環烷基、雜烷基環烷基、烷基羰基、雜芳基、含有1~4個胺基酸殘基的肽、及以下結構之一：


，

，

，

，

，

，

，

，

，

，

，

，

，

，

，


， 
， 
， 
， 
， 
， 
， 
， 
， 
， 
， 
， 
， 
， 
， 
， 
， 
， 
， 
， 
， 
，其中 $\sim$ 是連接位點；

其中D_1和D_2是細胞毒性藥物、或治療性藥物、免疫治療性短類抗體蛋白、用於增強或穩定細胞結合類抗體蛋白試劑的功能性分子、細胞表面受體結合劑、抗體片段、siRNA或DNA分子，且選自以下：

1） 化療藥物：

a）烷基化劑：氮芥：氯苯那普、氯普那嗪、環磷醯胺、達卡巴嗪、雌二醇氮芥、異環磷醯胺、氮芥、鹽酸二甲氧胺、氧化二氮芥、鹽酸胺氯地平、麥考酚酸、衛矛醇、呱泊溴烷、新氮芥、苯芥膽甾醇、松龍苯芥、噻替呱、曲磷胺對、尿嘧啶、CC-1065、多卡黴素、苯並二氮卓二聚體、亞硝基脲、烷基磺酸酯、三氮烯、含鉑化合物、吖丙啶類、苯並二氫吡喃酮、卡洛酮、美妥替派和烏雷多巴、乙烯亞胺和甲基三聚氰胺；

b）植物生物鹼：長春花生物鹼、紫杉醇類、美登素類、cryptophycin、埃博黴素、軟珊瑚醇、迪莫利德、草苔蟲內酯、海兔毒素、奧瑞他汀、微管毒素、cephalostatin、pancratistatin、sarcodictyin、海綿抑制素；

c）DNA拓撲異構酶抑制劑：依託泊苷替尼、絲裂黴素；

d）抗代謝物：抗葉酸劑、DHFR抑制劑、IMP脫氫酶抑制劑、核糖核苷酸還原酶抑制劑、嘧啶類似物、尿嘧啶類似物、胞嘧啶類似物、嘌呤類似物、葉酸補充劑、弗洛林酸；

e）激素療法劑：受體拮抗劑、Retinoids/Deltoids；

f）激酶抑制劑：BIBW 2992（抗-EGFR/Erb2）、伊馬替尼、吉非替尼、呱加他尼、索拉非尼、達沙替尼、舒尼替尼、厄洛替尼、尼洛替尼、拉帕替尼、阿西替尼、帕唑帕尼、凡德他尼、E7080（抗VEGFR2）、mubritinib、普納替尼（AP24534）、bafetinib（INNO-406）、bosutinib（SKI-606）、卡博替尼、維莫德吉、iniparib、盧梭利替尼、CYT387、阿西替尼、tivozanib、索拉非尼、貝伐單抗、西妥昔單抗、曲妥珠單抗、雷珠單抗、帕尼單抗、伊斯平斯；

g）抗生素、aclacinomysins、放線菌素、安麯黴素、重氮絲胺酸、

博來黴素、卡諾黴素、卡拉黴素、洋紅黴素、嗜癌素、色黴素、達金黴素、柔紅黴素、去柔紅黴素、6-重氮-5-側氧基-L-去甲亮胺酸、阿黴素、嗎啉-阿黴素、氰基嗎啉-阿黴素、2-吡咯啉阿黴素和去氧柔紅黴素、表柔比星、阿柔比星、伊達比星、馬可黴素、nitomycin、黴酚酸、諾加黴素、橄欖黴素、Peplomycin、potfiromycin、嘌呤黴素、奎拉黴素、羅道黴素、鏈黑黴素、鏈脲黴素、殺結核菌素、烏苯美司、淨司他丁、佐柔比星；

h） 聚酮化合物（番荔素）：bullatacin、bullatacinone、吉西他濱、環氧酶素、硼替佐米、沙利度胺、來那度胺、pomalidomide、tosedostat、zybrestat、PLX4032、STA-9090、Stimuvax、allovectin-7、Xegeva、Provenge、Yervoy、異戊二烯化抑制劑、多巴胺能神經毒素、細胞週期抑制劑、放線菌素、博萊黴素、蒽環類抗生素、阿黴素（亞德里亞黴素）、伊達比星、表柔比星、吡柔比星、佐柔比星、米托蒽醌、MDR抑制劑、Ca^{2+} ATP酶抑制劑、組蛋白去乙醯酶抑制劑、塞來昔布、格列酮類、表沒食子兒茶素沒食子酸酯、雙硫侖、Salinosporamide A、抗腎上腺藥物、胺魯米特、米托坦、曲洛司坦、醋葡醛內酯、醛磷醯胺、胺基乙醯丙酸、安吖啶、阿拉伯糖苷、bestrabucil、比生群、edatraxate、defofamine、美可辛、地吖醌、依氟鳥胺酸（DFMO）、elfomithine、依利醋銨、依託格魯、硝酸鎵、胞嘧啶、羥基脲、伊班膦酸鹽、香菇多糖、氯尼達明、米托胍腙、米托蒽醌、莫呱達醇、二胺硝吖啶、噴司他丁、蛋胺氮芥、吡柔比星、鬼臼酸、2-乙肼、甲基苄肼、呱嗪二酮丙烷、根黴素、西佐、螺環鍺、細格孢氮雜酸、三亞胺醌、2,2',2''-三氯三乙胺、單端孢黴烯、聚胺酯、siRNA、反義藥物和核酸分解酶；

2） 自身免疫疾病藥物選自由下列組成之群組：環孢菌素、環孢菌素A、胺基己酸、硫唑嘌呤、溴隱亭、苯丁酸氮芥、氯喹、環磷醯胺、皮質類固醇、DHEA、依那西普、羥基氯喹、英夫利昔單抗、美洛昔康、甲胺蝶呤、麥考酚酸酯、潑尼松、西羅莫司、及他克莫司；

3） 抗感染性疾病藥物：

a）胺基糖苷類：阿米卡星、阿司米星、慶大黴素、潮黴素B、卡那黴素、新黴素、壯觀黴素、鏈黴素、妥布黴素、甲基姿蘇黴素；

b）醯胺醇類：迭氮氯黴素、氯黴素、氟苯尼考、甲碸黴素；

c）安沙黴素：格爾德黴素、除莠黴素；

d）碳青黴烯類：比阿培南、多利培南、厄他培南、亞胺培南/西司他丁、美羅培南、帕尼培南；

e）頭孢烯：碳頭孢烯（洛拉卡比）、頭孢乙腈、氯胺苄青黴素、頭孢拉定、頭孢羥胺、頭孢洛寧、頭孢噻啶、頭孢噻吩或頭孢金素、頭孢胺苄、頭孢來星、頭孢孟多、頭孢匹林、羥胺唑頭孢菌素、氟唑頭孢菌素、孢西酮、唑啉頭孢菌素、頭孢拉宗、頭孢卡品、頭孢達肟、頭孢吡、頭孢克肟、頭孢西丁、頭孢羅齊、頭孢甲氧環烯胺、頭孢替唑、頭孢呋辛、頭孢克肟、頭孢地尼、頭孢托侖、頭孢吡、頭孢他美、頭孢甲肟、頭孢地嗪、頭孢尼西、頭孢呱酮、頭孢雷特、頭孢噻肟、噻乙胺唑頭孢菌素、頭孢唑蘭、頭孢胺苄、頭孢咪唑、頭孢匹胺、頭孢匹羅、頭孢泊肟、頭孢羅齊、頭孢喹諾、頭孢磺啶、頭孢他啶、頭孢特侖、頭孢布騰、頭孢噻林、頭孢唑肟、頭孢吡普、頭孢曲松、頭孢呋辛、頭孢唑南、頭黴素（頭孢西丁、頭孢替坦、頭孢氧唑）、氧（碳）頭孢烯（氟氧頭孢、拉氧頭孢）；

f）糖肽：博來黴素、萬古黴素（奧利萬星、特拉萬星）、替考拉甯

（達巴萬星）、雷莫拉寧；

g）甘胺醯環素：

h）β-內醯胺酶抑制劑：青黴烷（舒巴坦、他唑巴坦），氧青黴烷（克拉維酸）；

i）林可醯胺：克林黴素，林可黴素；

j）脂肽：達托黴素，A54145，鈣依賴性抗生素（CDA）；

k）大環內酯類：阿奇黴素、克黴素、克拉黴素、地紅黴素、紅黴素、氟雷黴素、交沙黴素、酮內酯、麥迪黴素、米卡黴素、竹桃黴素、利福黴素、羅匹黴素、羅紅黴素、大觀黴素、螺旋黴素、他克莫司（FK506）、醋竹桃黴素、泰利黴素；

l）單環胺：胺曲南、替吉莫南；

m）惡唑烷酮類：利奈唑胺；

n）青黴素類：阿莫西林、胺苄青黴素、阿替代西林、阿洛西林、苄青黴素、苄星青黴素苄青黴素、苄星青黴素苯氧甲基青黴素、克洛西林、普魯卡因青黴素（美替西林）、美洛西林、甲氧西林、萘夫西林、苯唑西林、醋甲西林、青黴素、非奈西林、苯氧基甲基青黴素、呱拉西林、胺苄西林、磺苯西林、替莫西林、替凱西林；

o）多肽：桿菌肽、粘菌素、多粘菌素B；

p）喹諾酮類：阿拉曲沙星、巴羅沙星、環丙沙星、克林沙、達氟沙星、二氟沙星、依諾沙星、恩諾沙星、加雷沙星、加替沙星、吉米沙星、格帕沙星、卡諾曲伐沙星、左氧氟沙星、洛美沙星、麻保沙星、莫西沙星、那氟沙星、諾氟沙星、奧比沙星、氧氟沙星、培氟沙星、曲伐沙星、格帕沙星、西他沙星、司帕沙星、替馬沙星、托沙星、曲伐沙星；

q）鏈陽性菌素：普那黴素、奎奴普丁/達福普汀；

r）磺胺類：胺苄磺胺、偶氮磺胺、磺胺嘧啶、磺胺甲異唑、磺胺醯亞胺、磺胺吡啶、磺胺異惡唑、甲氧苄啶、磺胺甲惡唑（複方磺胺甲惡唑）；

s）類固醇抗菌藥物；

t）四環素類：強力黴素、金黴素、氯米西環素、地美環素、雷莫昔林、美西環素、美他環素、米諾環素、土黴素、潘美環素、吡咯烷甲基四環素、四環素、甘胺醯環素；

u）其他類型的抗生素：番荔枝素、胂凡納明、細菌萜醇抑制劑（桿菌肽）、DANAL/AR抑制劑（環絲胺酸）、dictyostatin、圓皮海綿內酯、軟珊瑚醇、埃博黴素、乙胺丁醇、依託泊苷、法羅培南、夫西地酸、呋喃唑酮、異煙肼、laulimalide、甲硝唑、莫匹羅星、NAM合成抑制劑、呋喃妥因、紫杉醇、普蘭西黴素、吡嗪醯胺、奎奴普丁/達福普汀、利福平、他唑巴坦替硝唑、烏菊花素；

4） 抗病毒藥物：

a）侵入/融合抑制劑：阿帕韋洛、馬拉韋羅、vicriviroc、gp41（恩夫韋肽）、PRO 140、CD4（艾巴厘珠單抗）；

b）整合酶抑制劑：雷特格韋、elvitegravir、globoidnan A；

c）成熟抑制劑：bevirimat、vivecon；

d）神經胺酸酶抑制劑：奧司他韋、紮那米韋、帕拉米韋；

e）核苷和核苷酸：阿巴卡韋、阿昔單韋、阿德福韋、阿莫西韋、阿昔單抗、溴夫定、西多福韋、克拉夫定、地塞米松、去羥肌苷（ddI）、elvucitabine、恩曲他濱（FTC）、恩替卡韋、泛昔洛韋、氟拉西林（5-

FU）、3’-氟取代的2’,3’-去氧核苷類似物、噴昔洛韋、racivir、利巴韋林、迪替丁、司他夫定（d4T）、塔利巴韋林（viramidine）、替比夫定、替諾福韋、三氟尿苷伐昔洛韋、纈更昔洛韋、紮西他濱（ddC）、齊多夫定（AZT）；

f）非核苷類：金剛烷胺、阿替吡啶、卡普韋林、二芳基嘧啶（依曲韋林、rilpivirine）、地拉夫定、二十二烷醇、乙米韋林、依法韋侖、膦甲酸（磷醯基甲酸）、咪喹莫特、聚乙二醇干擾素、洛韋胺、洛德腺苷、甲吲噻腙、奈韋拉平、NOV-205、長效干擾素α、鬼臼毒素、利福平、金剛乙胺、瑞喹莫德（R-848）、醋胺金剛烷；

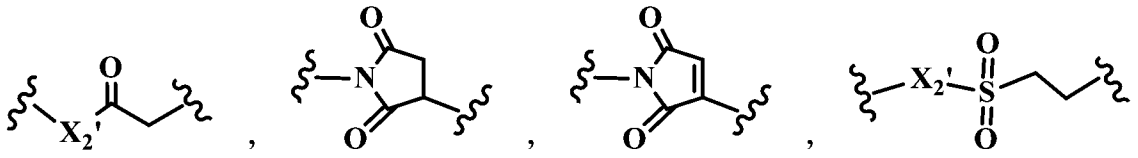
g）蛋白酶抑制劑：安普那韋、阿紮那韋、boceprevir、darunavir、福沙那韋、印地那韋、洛匹那韋、奈非那韋、普來可那立、利托那韋、沙奎那韋、telaprevir（VX-950）、替拉那韋；

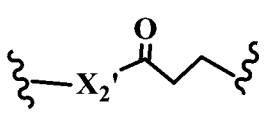
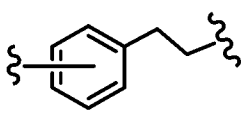
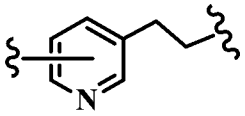
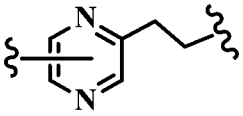
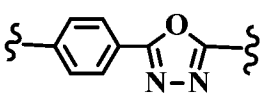
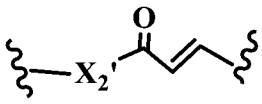
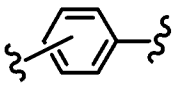
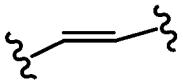
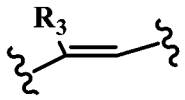
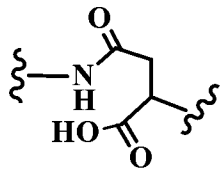
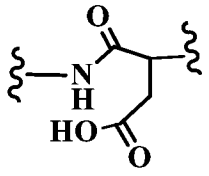
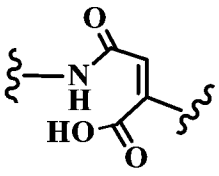
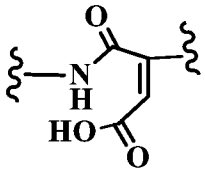
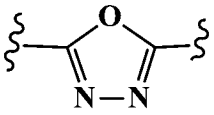
h）抗病毒藥物：抗體酶、阿比朵爾、calanolide a、ceragenin、氰維林-n、二芳基嘧啶、表沒食子兒茶素沒食子酸酯（EGCG）、膦甲酸、格裡菲辛、taribavirin（viramidine）、羥基脲、KP-1461、米替福新、普來可那立、混成抑制劑、利巴韋林、seliciclib；

5） 放射性同位素（放射性核素）：^{3}H、^{11}C、^{14}C、^{18}F、^{32}P、^{35}S、^{64}Cu、^{68}Ga、^{86}Y、^{99}Tc、^{111}In、^{123}I、^{124}I、^{125}I、^{131}I、^{133}Xe、^{177}Lu、^{211}At、和 ^{213}Bi；

6） 任何上述藥物的藥學上可接受的鹽、酸或衍生物；

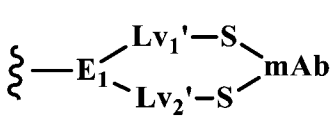
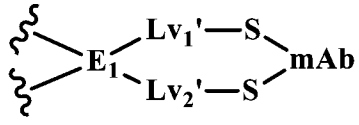
其中 L_{v1}’和L_{v2}’獨立具有以下結構之一：

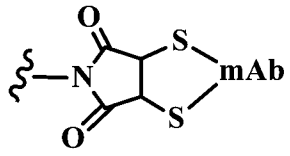
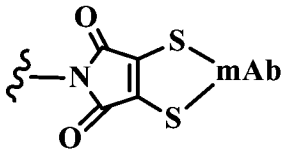
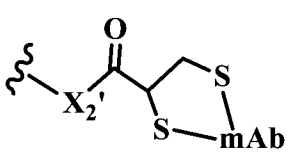


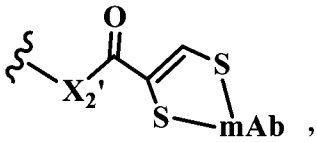
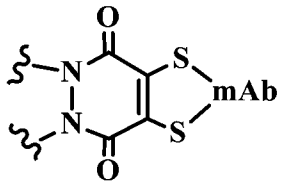
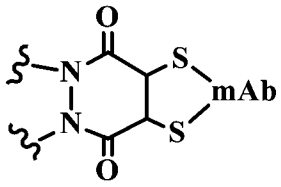
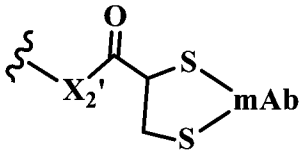
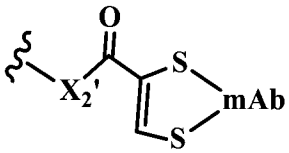
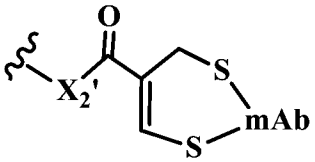
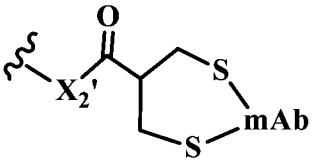
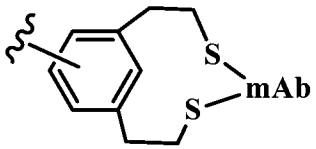
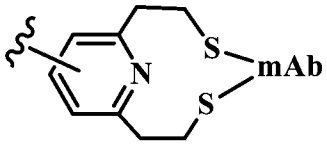
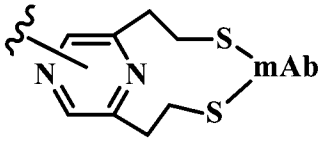
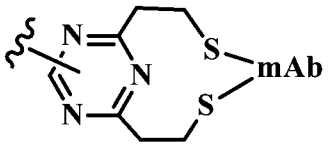
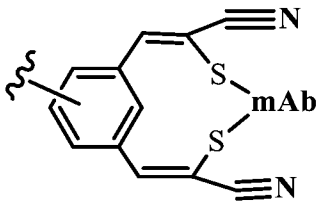
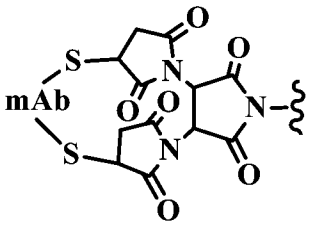
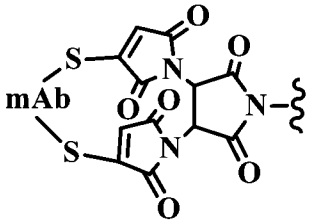
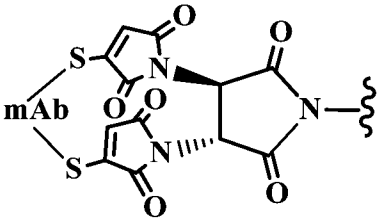
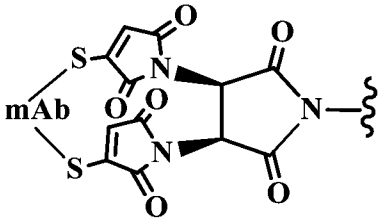
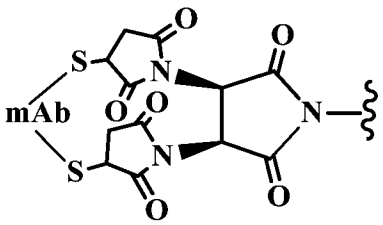
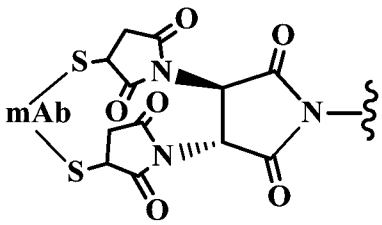
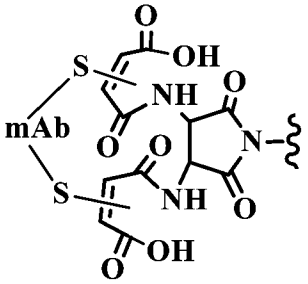
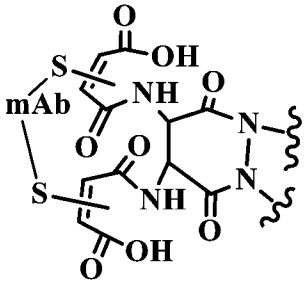
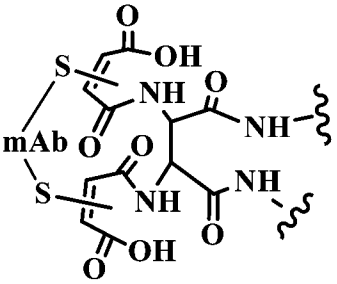
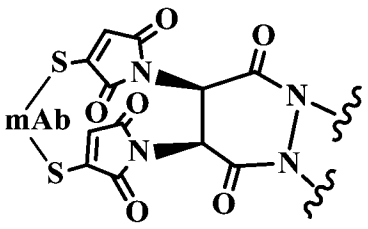

， 
， 
， 
， 
， 
， 
， 
， 
， 
， 
， 
， 
， 
，

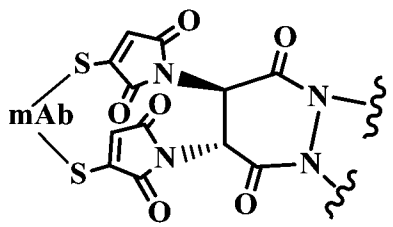
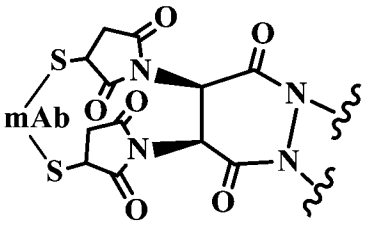
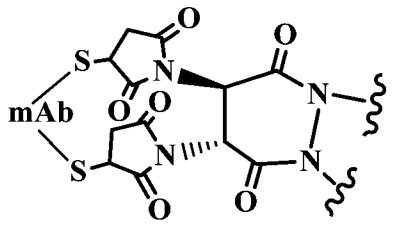
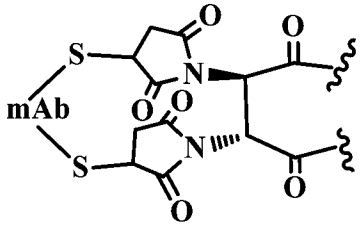
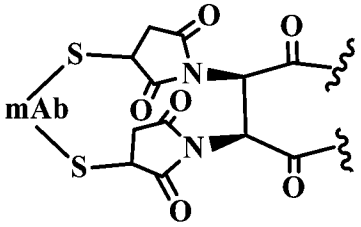
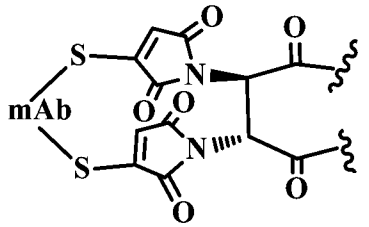
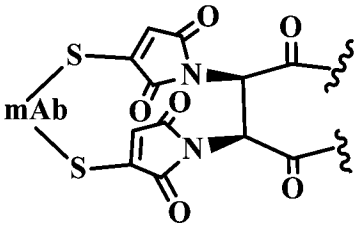
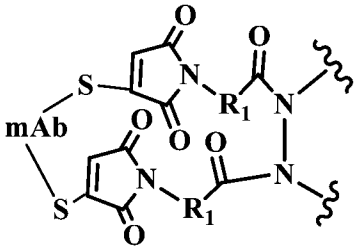
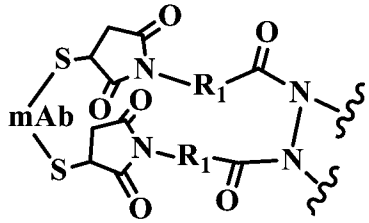
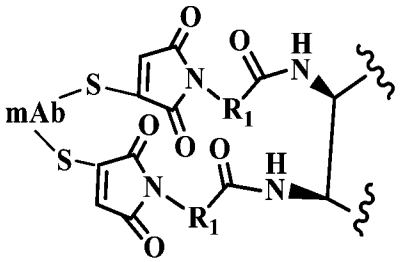
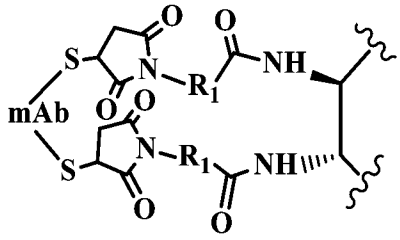
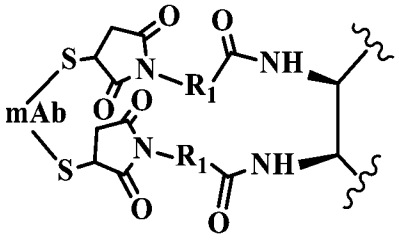
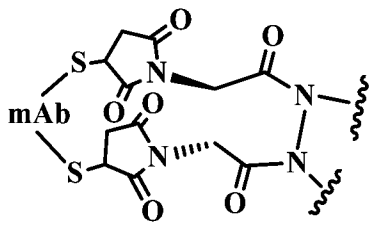
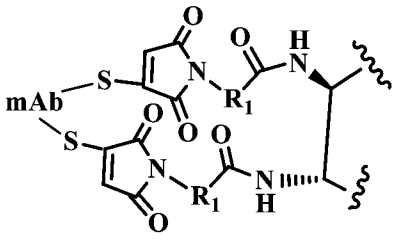
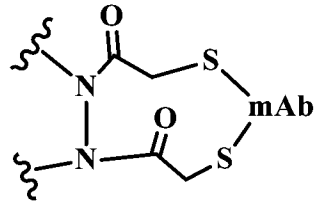
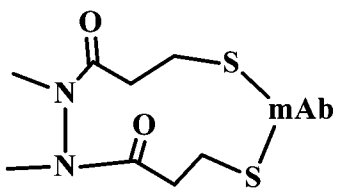
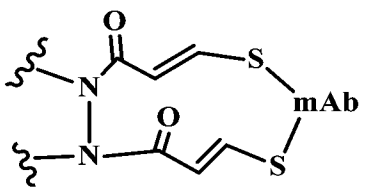
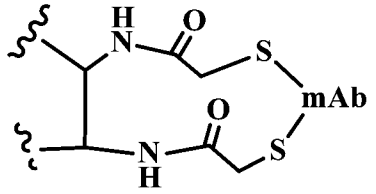
其中 X_2'為 F、Cl、Br、I、OTf、OMs、OC_6H_4（NO_2）、OC_6H_3（NO_2）$_2$、OC_6F_5、OC_6HF_4、或 Lv_3，Lv_3為選自由下列組成之群組的離去基團：F、Cl、Br、I、硝基苯氧基、N-羥基琥珀醯亞胺（NHS）、苯氧基、苯巯基、二硝基苯氧基、五氟苯氧基、四氟苯氧基、二氟苯氧基、單氟苯氧基、五氯苯酚、三氟甲磺酸酯、咪唑、二氯苯氧基、四氯苯氧基、1-羥基苯並三唑、對甲苯磺酸、甲磺酸、2-乙基-5-苯基異惡唑-3'-磺酸酯、自身形成的酸酐、與其他酸酐形成的酸酐、及使用縮合試劑生成的多肽偶聯反應中間物或Mitsunobu反應的中間物；

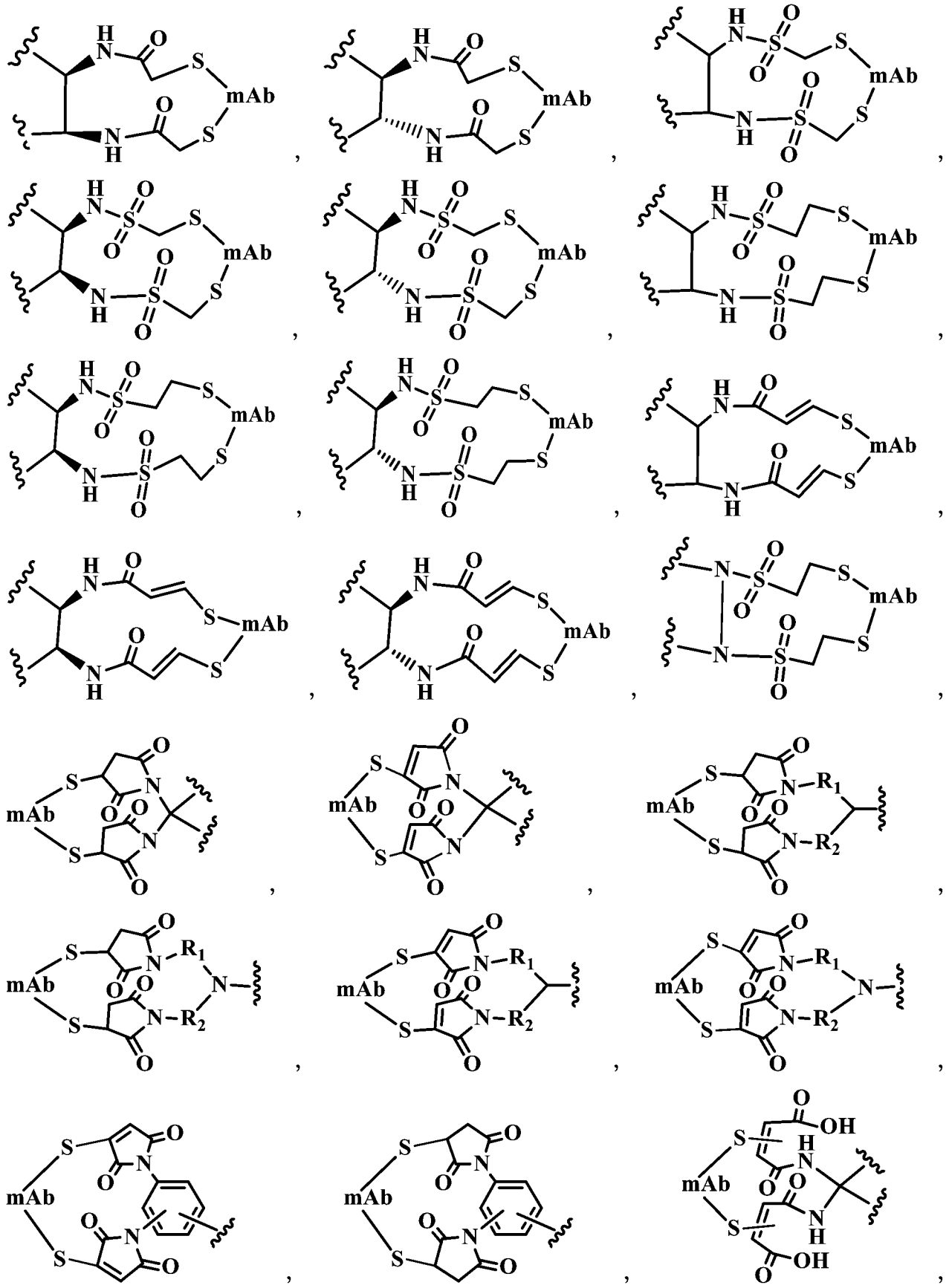
其中在式（VI）和式（VII）中，

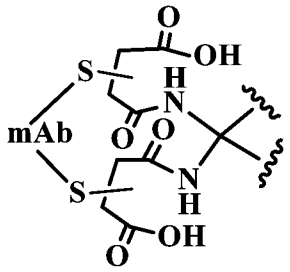
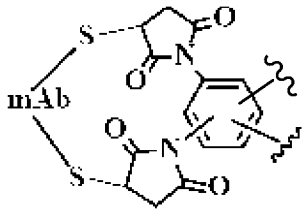
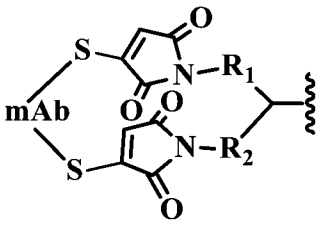
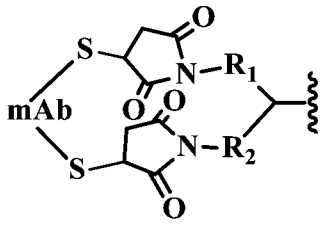
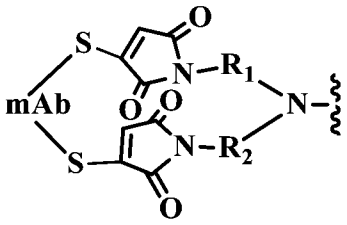
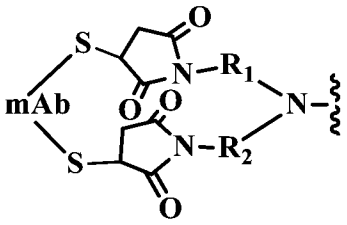
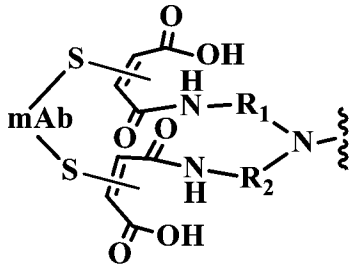
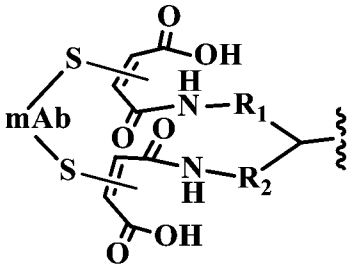
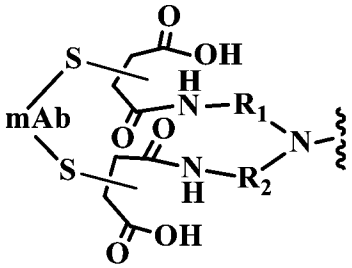
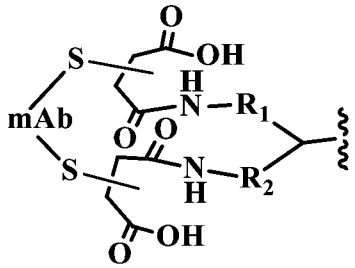
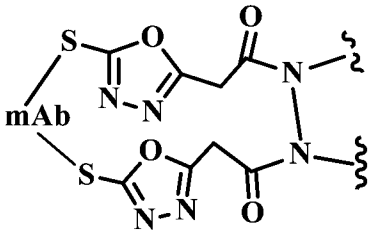
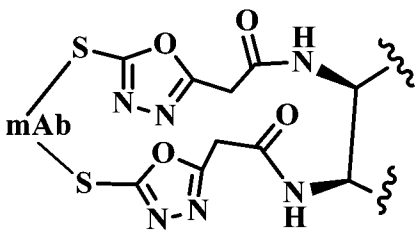
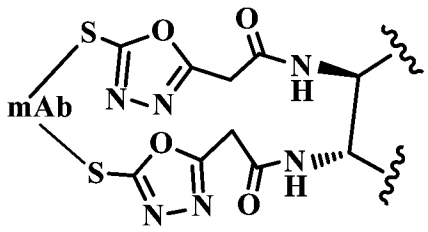

和 
之部分(moiety)獨立地選自由下列組成之群組：


， 
， 
，


,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,


,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,




， 
， 
， 
， 
， 
， 
， 
， 
， 
， 
， 
， 
，其中R_1、X_2及mAb係如上所定義；R_2是H、C_1-C_8烷基、C_2-C_8雜烷基或雜環基、C_3-C_8 芳基、Ar-烷基、環烷基、烷基環烷基、雜環烷基、雜烷基環烷基、碳環或烷基羰基。

【請求項2】

如請求項1之偶聯物，其具有體外、體內或離體細胞殺傷活性。

【請求項3】

一種醫藥組合物，其包含治療有效量之如請求項1或2之偶聯物，及其藥學上可接受的鹽、載劑、稀釋劑或輔料，或兩種或多種偶聯物的組

合，以治療或預防癌症、自身免疫性疾病或感染性疾病。

【請求項4】

如請求項3之醫藥組合物，其為液體製劑或配製的凍乾固體/粉末，依重量占比包含：0.01%-99%的一種或多種偶聯物；0.0%-20.0%的一種或多種多元醇；0.0%-2.0%的一種或多種表面活性劑；0.0%-5.0%的一種或多種防腐劑；0.0%-30%的一種或多種胺基酸；0.0%-5.0%的一種或多種抗氧化劑；0.0%-0.3%的一種或多種金屬螯合劑；0.0%-30.0%的一種或多種緩衝鹽，用於將該組合物的pH調節至pH 4.5-7.5；和0.0%-30.0%的一種或多種等滲劑(tonicity agent)，用於在被重構以施用給患者時將滲透壓調節在約250-350 mOsm之間；

其中該多元醇選自由下列組成之群組：果糖、甘露糖、麥芽糖、乳糖、阿拉伯糖、木糖、核糖、鼠李糖、半乳糖、葡萄糖、蔗糖、海藻糖、山梨糖、松解糖、棉子糖、甘露醇、木糖醇、赤蘚糖醇、麥芽糖醇、乳糖醇、蘇糖醇、山梨糖醇、甘油、及L-葡萄糖酸鹽及其金屬鹽；

其中該表面活性劑選自由下列組成之群組：聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯40、聚山梨醇酯65、聚山梨醇酯80、聚山梨醇酯81、或聚山梨醇酯85、泊洛沙姆、聚（環氧乙烷）-聚（環氧丙烷）、聚丙二醇-丙二醇 、Triton、十二烷基硫酸鈉（SDS）、月桂基硫酸鈉、辛基糖苷鈉、十二烷基、肉荳蔻醯基、亞油基或硬脂基磺基甜菜鹼、十二烷基、肉荳蔻醯基、亞油基或 硬脂基肌胺酸、亞油酸、肉荳蔻基或十六烷基甜菜鹼、月桂醯胺基丙基、椰油醯胺丙基、亞油醯胺丙基、肉荳蔻醯基丙基、棕櫚醯基丙基或異硬脂醯胺基丙基-甜菜鹼（月桂醯胺丙基）、肉荳蔻醯胺丙基、棕櫚醯丙基或異硬脂醯胺基丙基-二甲胺、甲基椰油醯基鈉或甲基油基牛磺

酸二鈉、十二烷基甜菜鹼、十二烷基二甲基氧化胺、椰油醯胺丙基甜菜鹼和可哥兩性甘胺酸酯、異硬脂基乙基亞胺鎓乙基硫酸鹽、聚乙二醇、聚丙二醇、及乙二醇和丙二醇的共聚物；

其中該防腐劑選自由下列組成之群組：苄醇、十八烷基二甲基苄基氯化銨、六甲基氯化銨、苯紮氯銨和苄索氯銨、苯酚、丁醇和苯甲醇，對羥基苯甲酸烷基酯例、鄰苯二酚、間苯二酚、環己醇、3-戊醇及間甲酚；

其中該胺基酸選自由下列組成之群組：精胺酸、胱胺酸、甘胺酸、賴胺酸、組胺酸、鳥胺酸、異亮胺酸、亮胺酸、丙胺酸、甘胺酸、谷胺酸及天冬胺酸；

其中抗氧化劑選自由下列組成之群組：抗壞血酸、谷胱甘肽、胱胺酸或及蛋胺酸；

其中該螯合劑是EDTA或EDTA；

其中該緩衝鹽選自由下列組成之群組：檸檬酸、抗壞血酸、葡萄糖酸、碳酸、酒石酸、琥珀酸、乙酸或鄰苯二甲酸的鈉鹽、鉀鹽、銨鹽或三羥乙基胺基鹽、胺基丁三醇鹽酸鹽、磷酸鹽或硫酸鹽、精胺酸、甘胺酸、甘胺醯甘胺酸或組胺酸的乙酸鹽、氯化物、磷酸鹽、硫酸鹽及琥珀酸鹽；

其中該等滲劑選自由下列組成之群組：甘露醇、山梨糖醇、乙酸鈉、氯化鉀、磷酸鈉、磷酸鉀、檸檬酸三鈉及氯化鈉。

【請求項5】

如請求項3或4之醫藥組合物，其以液體或凍乾固體的形式保持在小瓶(vial)、瓶、預填充注射器或預填充自動注射器。

【請求項6】

一種如請求項3或4之醫藥組合物的用途，其係用於製備用於協同治

療或預防癌症、自身免疫病或傳染病的藥物，其中該藥物與化療劑、放射治療劑、免疫治療劑、自身免疫失調劑、抗感染劑或另一種偶聯物的協同劑一起施用。

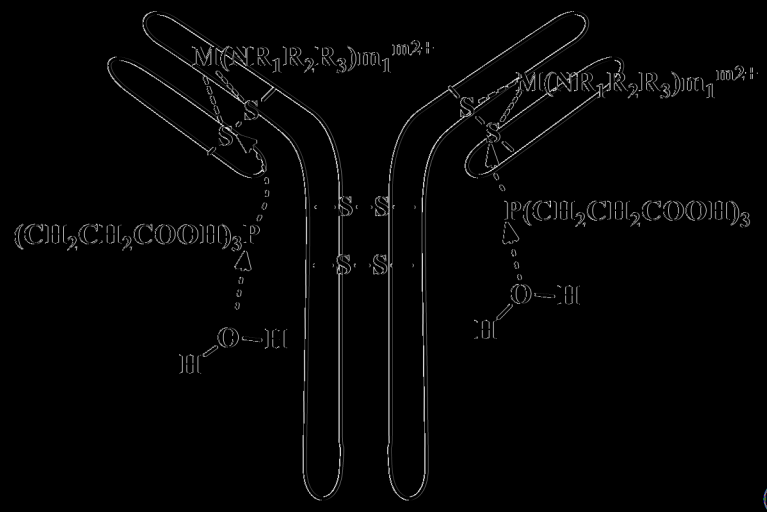
【請求項7】

如請求項6之用途，其中該協同劑選自由下列組成之群組之一種或多種：阿巴西普、阿貝西比利、醋酸阿比特龍、Abraxane、對乙醯胺基酚/氫可酮、Acalabrutinib、Aducanumab、Adalimumab、ADXS31-142、ADXS-HER2、阿法替尼雙馬來酸酯、Aldesleukin Alectinib、Alemtuzumab、Alitretinoin、ado-trastuzumab emtansine、安非他命/右旋苯丙胺、阿那曲唑、阿立呱唑、蒽環類藥物、阿立呱唑、阿紮那韋、阿妥唑單抗、阿托伐他汀、阿韋拉單抗、阿昔布西汀、Brentuximab vedotin、Brigatinib、Budesonide、Budesonide / 福莫特羅、Buprenorphine、Cabazitaxel、Cabozantinib、Capmatinib、Capecitabine、carfilzomib、嵌合抗原受體工程T（CAR-T）細胞、Celecoxib、Ceritinib、Cetuximab、Chidamide、Ciclosporin, Cinacalcet、Crizotinib、Cobimetinib、Cosentyx、Crizotinib、CTL019、達比加群、達布拉非尼、達卡巴嗪、達克珠單抗、達科替尼、達托黴素、達拉他珠單抗、達比波錫阿爾法、達魯那韋、達沙替尼、地尼洛芬、地諾單抗、Depakote、地蘭索拉唑、地塞呱甲酯、地塞米松、Dinutuximab、多西環素、度洛西汀、Duvelisib、Durvalumab、依洛珠單抗、/埃洛珠單抗/艾美洛韋、依諾肝素、恩沙替尼、恩紮魯胺、依泊汀阿爾法、厄洛替尼、埃索美拉唑、依佐匹克隆、依那西普、依維莫司、依西美坦、依維莫司、艾塞那肽ER、依澤替米貝、依澤替米貝/辛伐他汀、

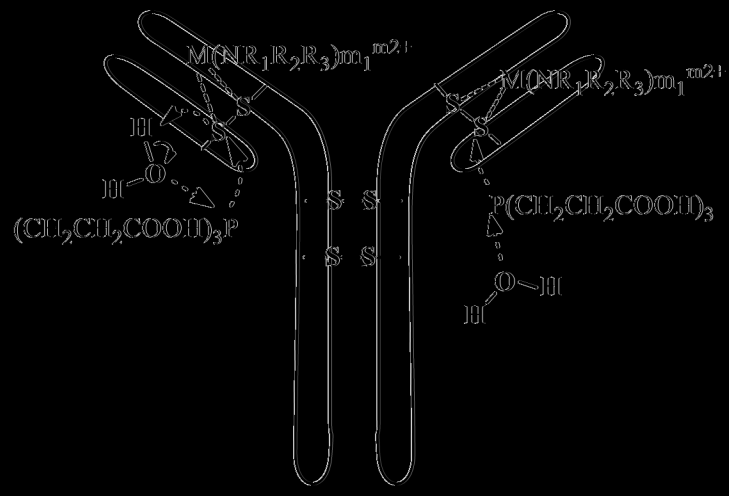
非諾貝特、非格拉斯汀、芬戈利莫德、丙酸氟替卡松、氟替卡松/沙美特羅、Fulvestrant、Gazyva、吉非替尼、Glatiramer、醋酸高斯瑞林、伊克替尼、伊馬替尼、伊布替尼、伊布替尼、依德利西布、異環磷醯胺、英夫利昔單抗、咪喹莫特、ImmuCyst、Immuno BCG、伊尼帕裡、阿斯巴肽胰島素、地塞米爾胰島素、甘精胰島素、利斯普洛胰島素、α-干擾素、α-1b干擾素、α-2a干擾素、α-2b干擾素、β-干擾素、β-1a干擾素、β-1b干擾素、γ-1a干擾素、拉帕蒂尼、伊普利單抗、異丙托品溴銨/沙丁胺醇、異唑MIB、卡努馬、醋酸蘭諾肽、利奈多明、利奈醯胺、甲磺酸利奈替尼、來曲唑、左旋甲狀腺素、左旋甲狀腺素、利多卡因、利奈唑胺、利拉魯肽、利地塞米松、LN-144氯雷替尼、美金剛、甲基呱啶酮、美托洛爾、Mekinist、美西他濱/利吡韋林/替諾福韋、莫達非尼、莫米松、Mycidac-C、尼西妥單抗、Neratinib、尼洛替尼、尼拉帕利布、尼古拉單抗、Ofatumumab、奧比妥珠單抗、奧拉帕尼、奧美沙坦、奧美沙坦/氫氯噻嗪、奧馬珠單抗、Omega-3脂肪酸乙酯、Oncorine、Oseltamivir、Osimertinib、羥考酮、Palbociclib、帕利珠單抗、帕尼單抗、Panobinostat、帕唑帕尼、Pembrolizumab、PD-1抗體、PD-L1抗體、培美曲塞、帕妥珠單抗、肺炎球菌結合疫苗、泊馬利度胺、普瑞巴林、ProscaVax、普萘洛爾、喹硫平、雷貝拉唑、普魯巴新223氯化鐳、雷洛昔芬、雷洛昔韋、雷莫昔單抗、雷珠單抗、雷戈非尼、利妥昔單抗、利伐沙班、羅米地辛、瑞舒伐他汀、盧梭替尼磷酸鹽、沙丁胺醇、Savolitinib、Semaglutide、Sevelamer、西地那非、Siltuximab、Sipuleucel-T、西他列汀、西他列汀/二甲雙胍、Solifenacin、Solanezumab、Sonidegib、索拉非尼、舒尼替尼、Tacrolimus、

Tacrimus、塔帕西拉非、Tacrimus tataparal 、他唑帕尼、替莫唑胺、替西羅莫司、替諾福韋/恩曲他濱、替諾福韋二吡呋酯富馬酸酯、睪丸激素凝膠、沙利度胺、TICE BCG、碘托溴銨、替沙吉林、托瑞米芬、曲美替尼、曲妥珠單抗、曲貝汀（Ecteinascidin 743）、曲美替尼、曲美單抗、三氟吡啶/替吡西酯、維甲酸、Uro-BCG、Ustekinumab、Valsartan、Veliparib、Vandetanib、Vemurafenib、Venetoclax、Vorinostat、Ziv-aflibercept、Zostavax及其類似物、衍生物、藥學上可接受的鹽、載劑、稀釋劑或輔料，及兩種或多種化合物的組合。

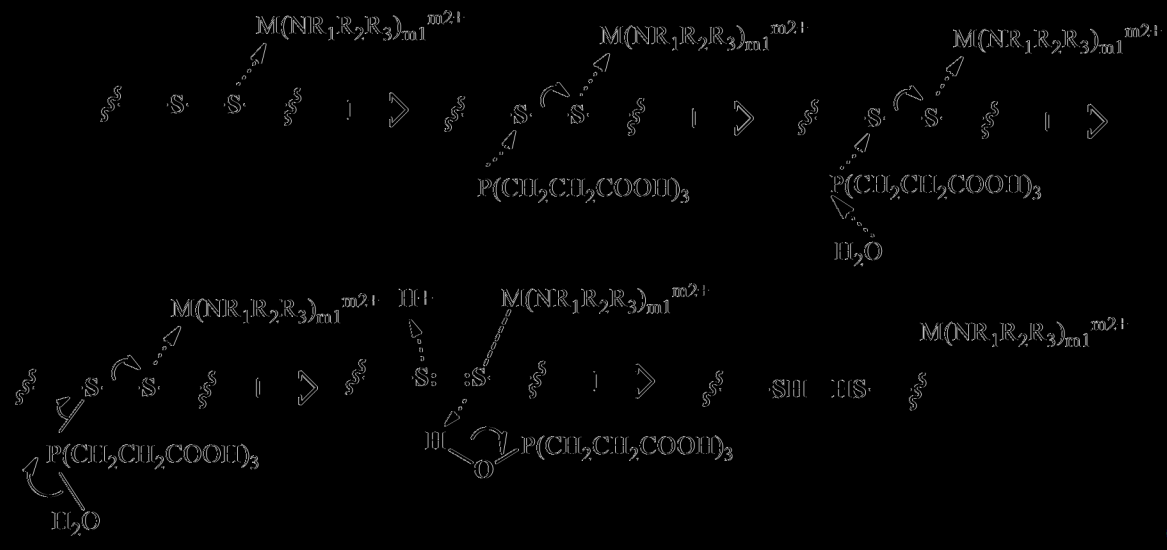
【発明の詳細な説明】



(1a),



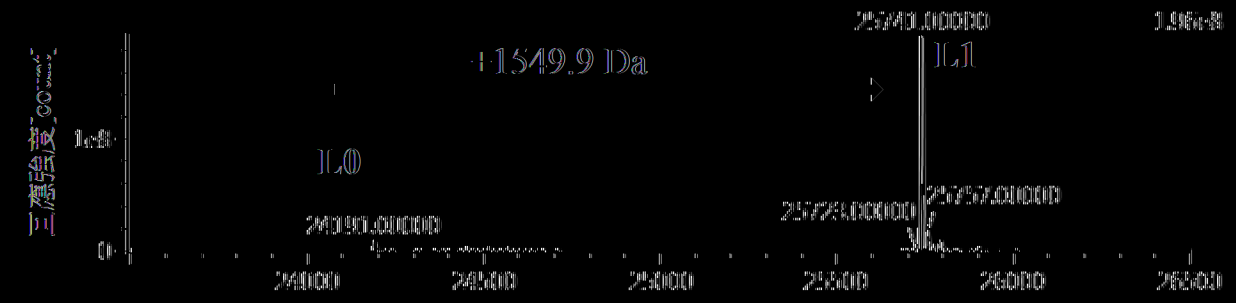
(1b),



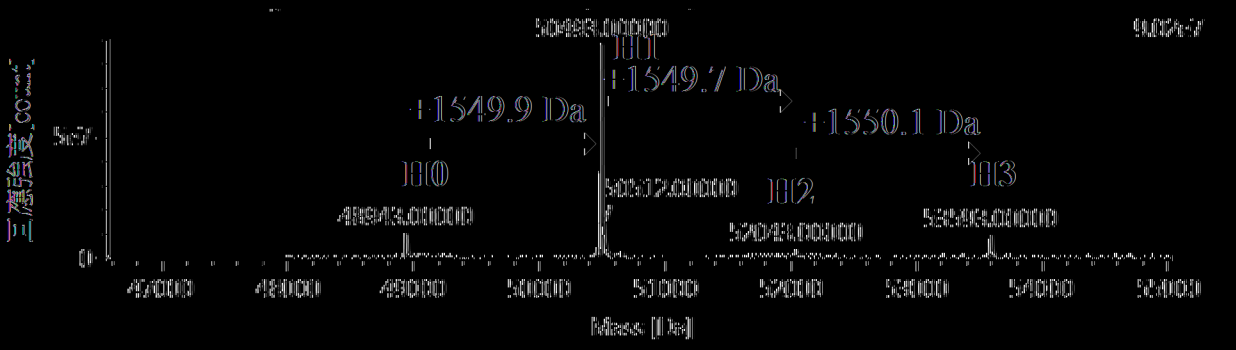
(1c),

【図１】

a)抗體偶聯藥物輕鏈



抗體偶聯藥物重鏈



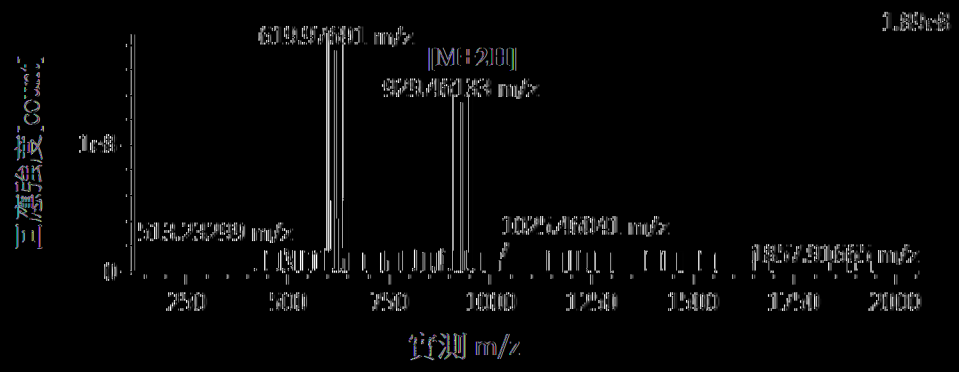
相應強度/分子量(amu)

(b)

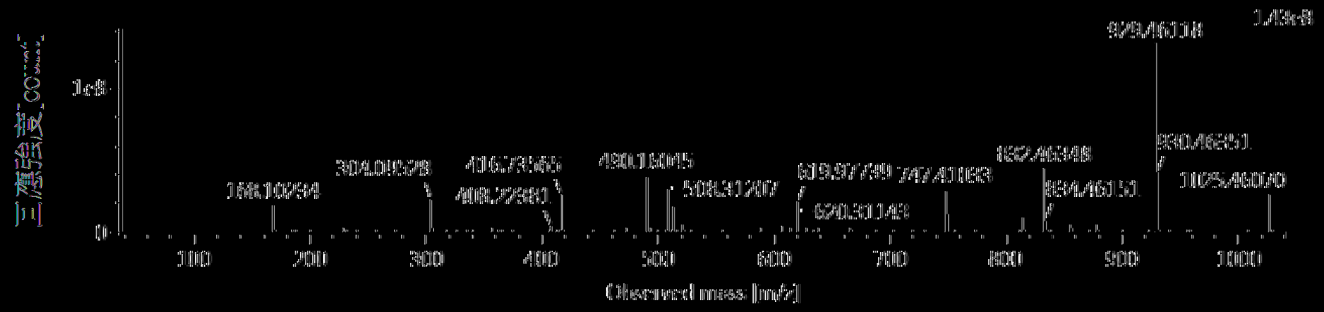
種類	理論分子量 (Da)	實測分子量 (Da)	偏差 (ppm)	分佈 (%)	平均 DAR
L0	24195.7284	24191.565	-152.1	4.50	
L1	25745.5912	25741.5072	-158.7	95.50	
H0	48950.659	48948.5982	-144.3	9.45	4.21
H1	50500.5218	50493.5119	-138.8	75.93	
H2	52050.3846	52048.1627	-138.8	4.60	
H3	53600.2474	53593.2505	-130.6	10.02	

(圖 2)

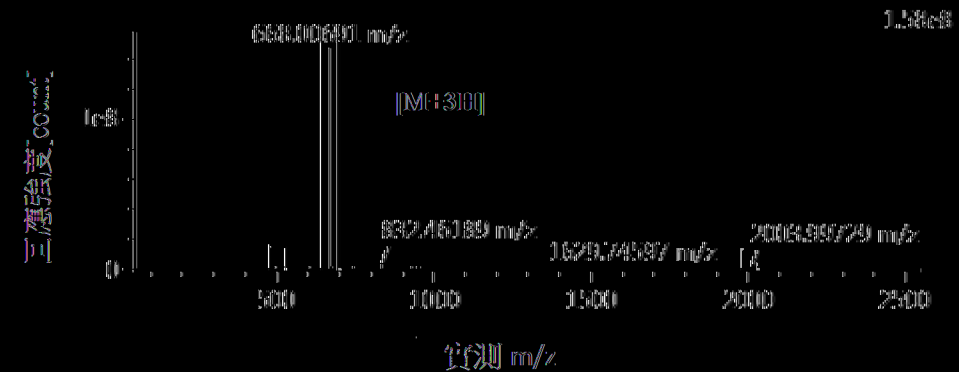
(a). [GEC] 與 1 藥物



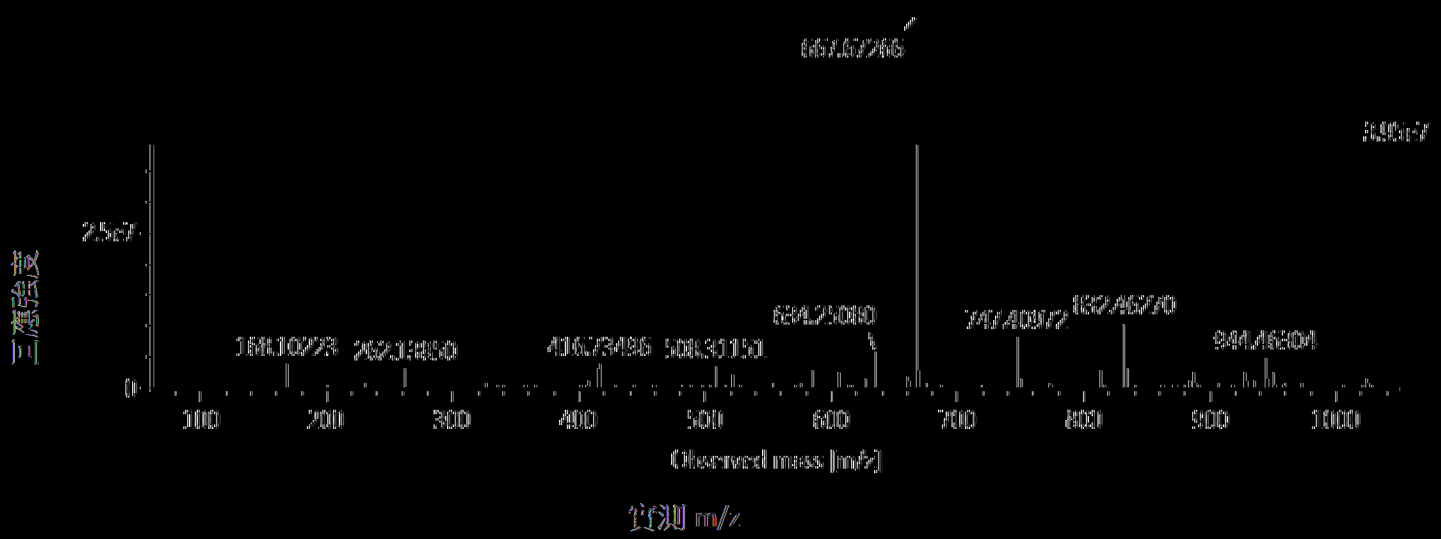
藥物片段



(b). [SCDK] 與 1 藥物

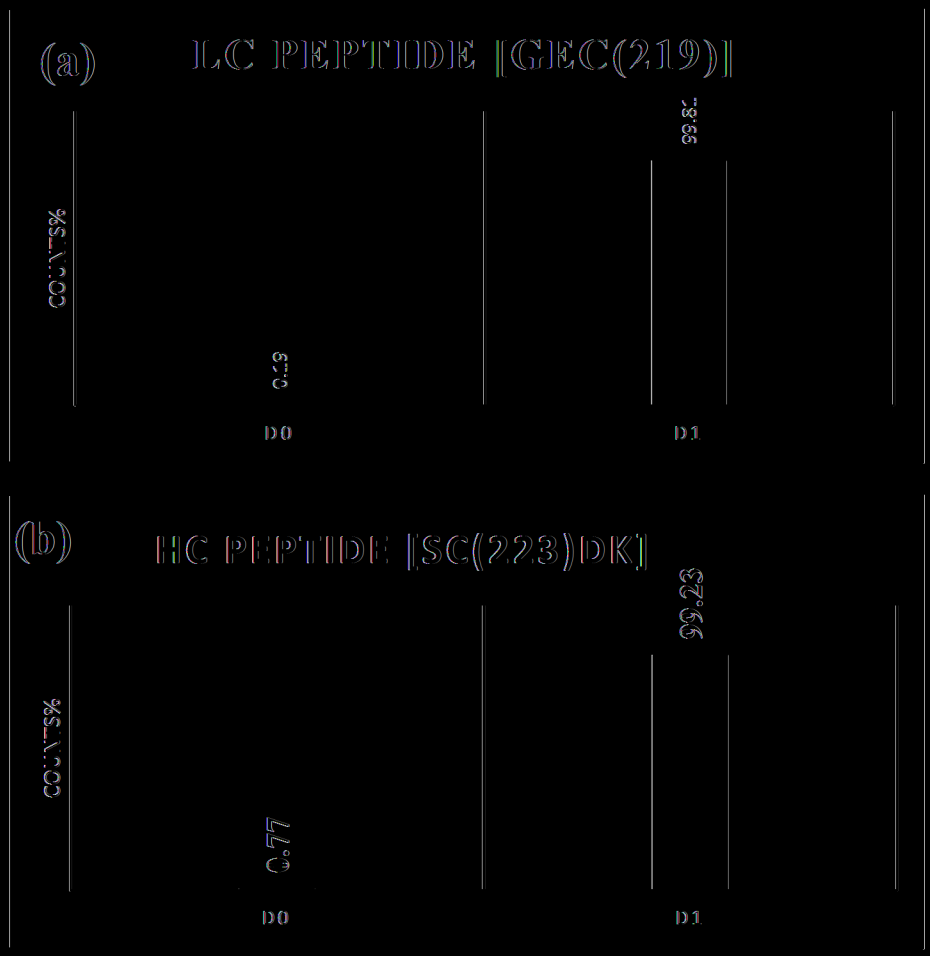


|(圖 3)|

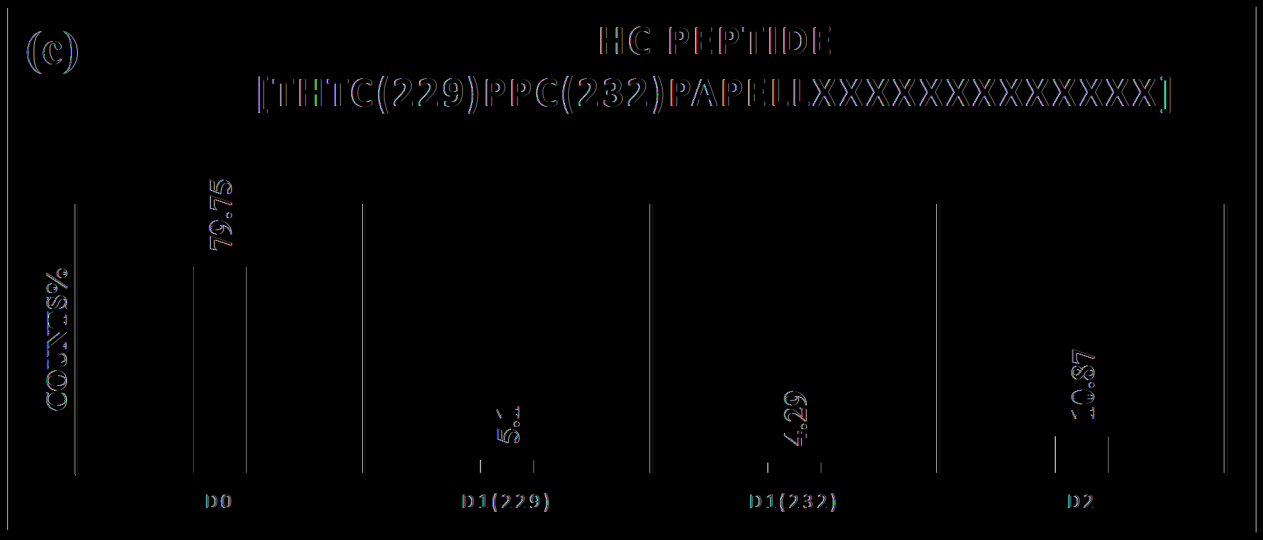

Observed mass [m/z]
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1000

預測 m/z

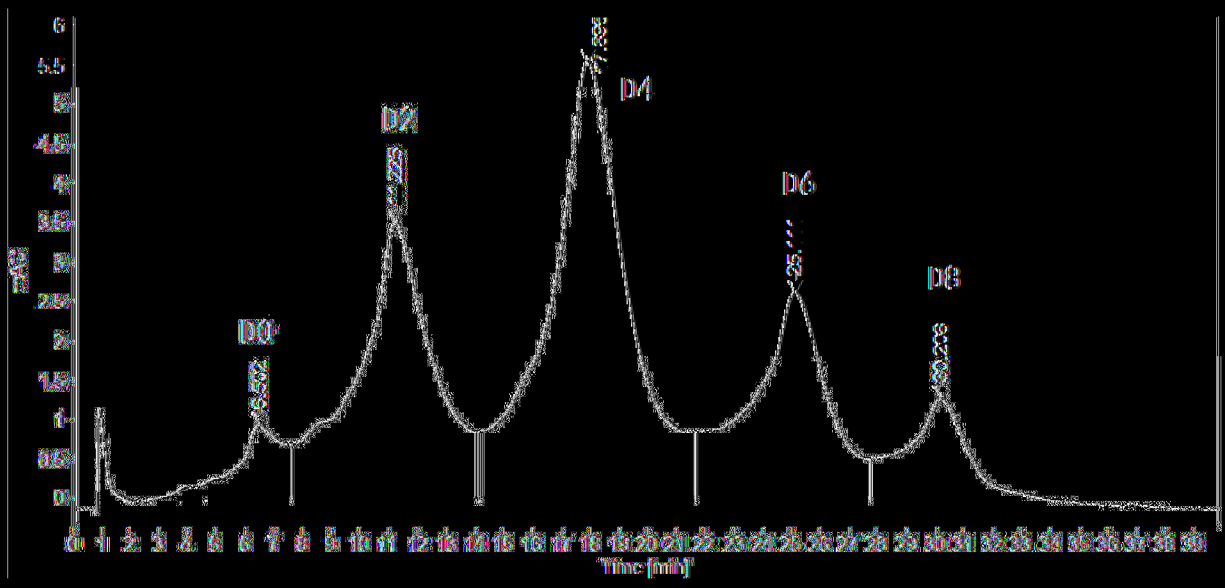
[圖 3] (續)


(a)
LC PEPTIDE [GEC(219)]
D0
D1
(b)
HC PEPTIDE [SC(223)DK]
D0
D1

[圖 4]



圖(圖 4)(續)



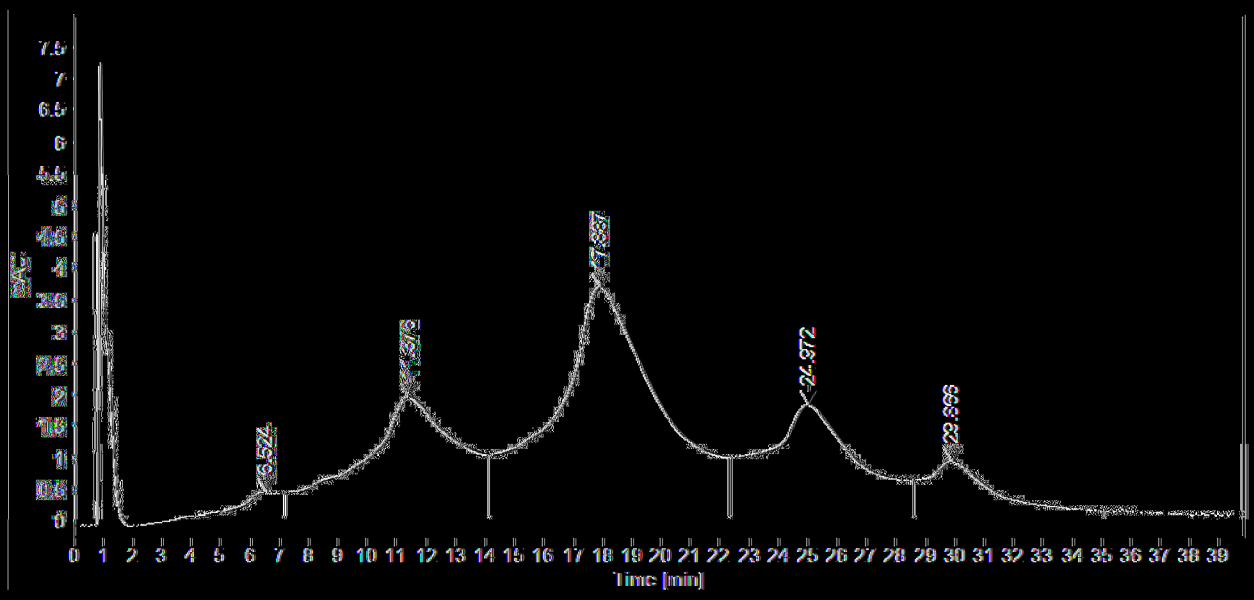
VWD1A,波長: 280nm

峰名稱	峰面積	峰高	峰面積 %	峰寬
6.502	124.16	0.86	4.85	4.912
11.225	660.27	3.53	25.80	6.502
17.896	1076.90	5.58	47.96	7.557
25.111	496.10	2.65	19.42	6.070
30.208	264.07	1.30	10.97	6.553

DAR：4.0,

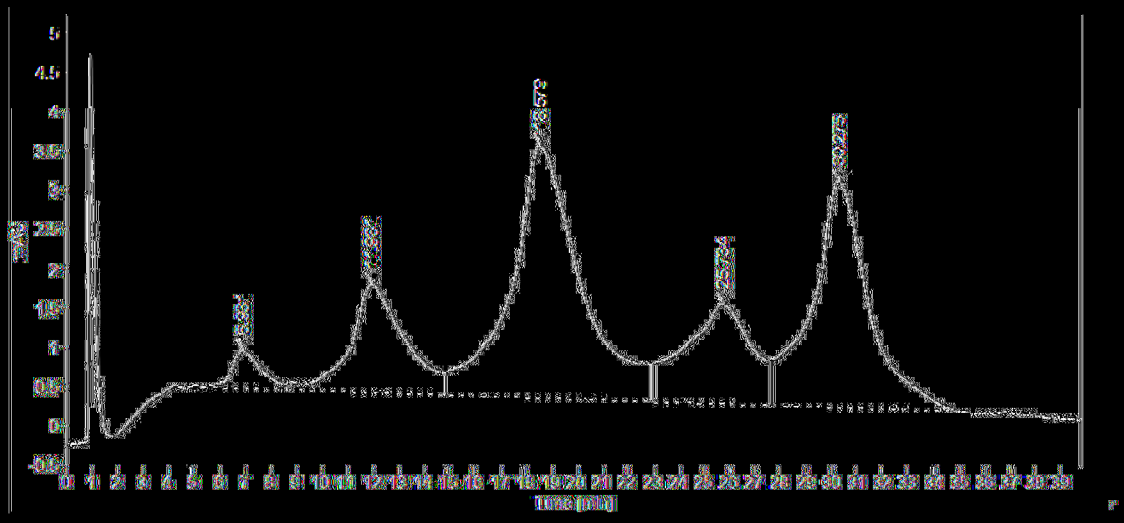
(5a)

圖(圖 5)



[illegible]	[illegible]	[illegible]	峰面積百分比	峰寬	
6.527	35.03	0.38	1.82	2.932	
11.376	434.97	1.69	22.60	6.992	
17.887	907.76	3.62	47.16	6.285	
24.972	394.01	1.77	20.47	6.177	
29.666	153.01	0.87	7.95	6.465	DAM = 4.3,

(5b)



[圖 5] (續)

VWD1A, 波長: 280nm

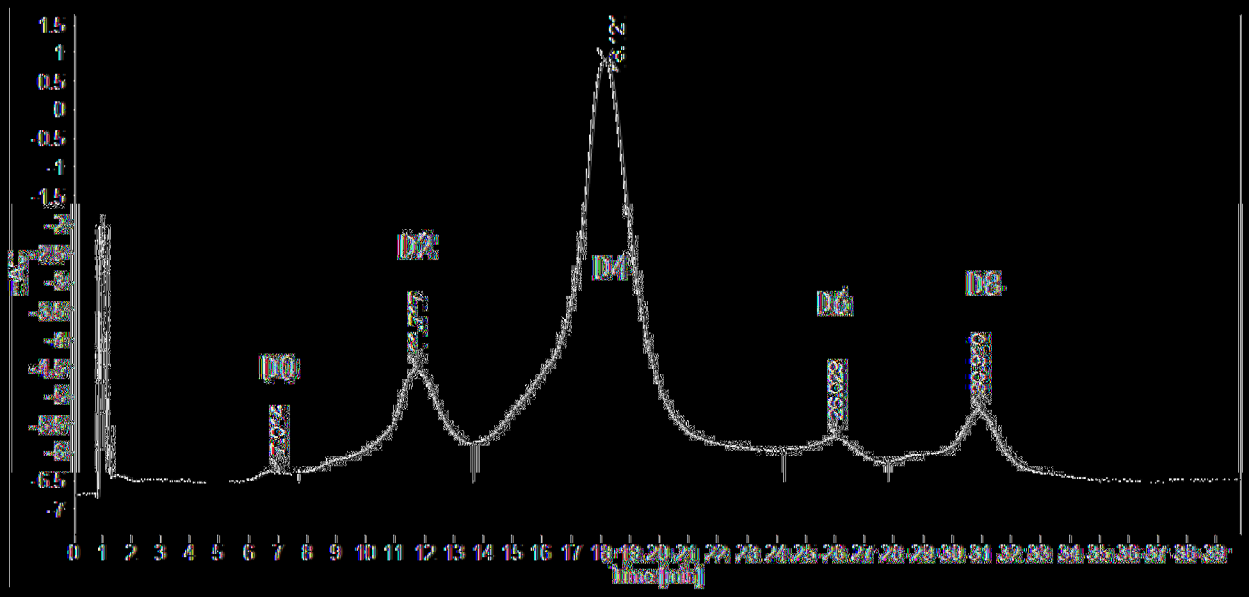
RT[分鐘]	峰面積	峰高	峰面積百分比	峰寬
6.931	36.73	0.47	2.43	2.915
11.961	200.19	1.36	13.22	6.167
19.679	605.15	3.18	40.03	8.116
26.734	226.24	1.26	14.94	4.627
30.266	444.78	2.86	29.38	7.459

DAR：5.1

(5c)

圖(圖 5) (續)

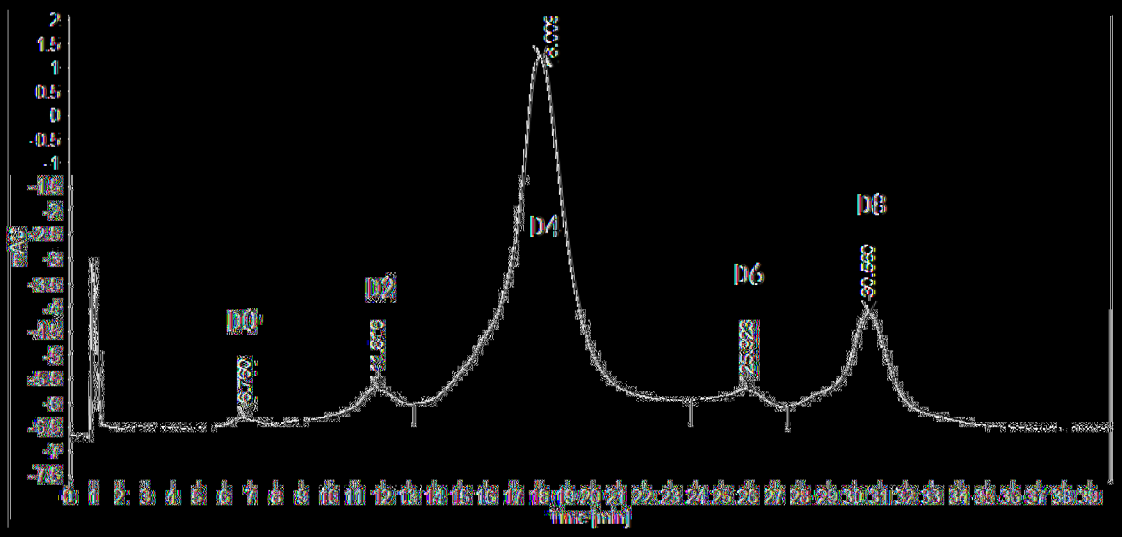
(a).



RT 時間	峰面積	峰高	峰面積百分比	峰寬
7.014	12.65	0.16	0.63	1.347
11.717	290.88	1.95	14.55	2.127
18.121	1366.66	7.37	68.15	10.698
26.029	125.26	0.75	6.25	3.546
30.910	204.05	1.25	10.02	7.228

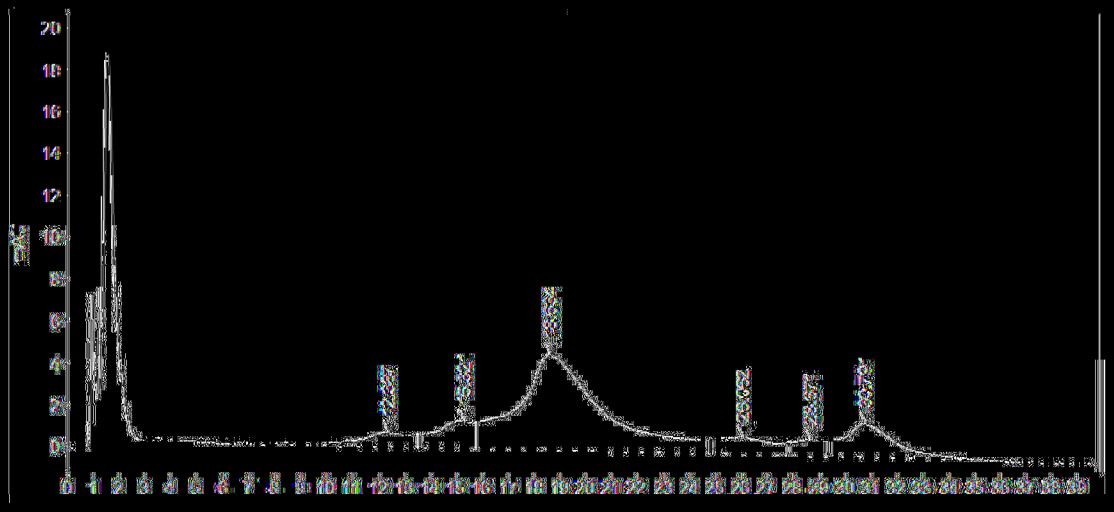
DAR：4.2 (5a)

圖(圖 6)



RT 時間	峰面積	峰高	峰面積百分比	峰寬
6.760	16.85	0.19	0.63	2.670
11.916	126.20	0.82	6.16	5.276
18.009	1396.06	7.76	68.39	10.531
26.923	136.95	0.81	6.66	5.662
30.569	362.34	2.41	17.75	7.576

DAR：4.7, (6b);



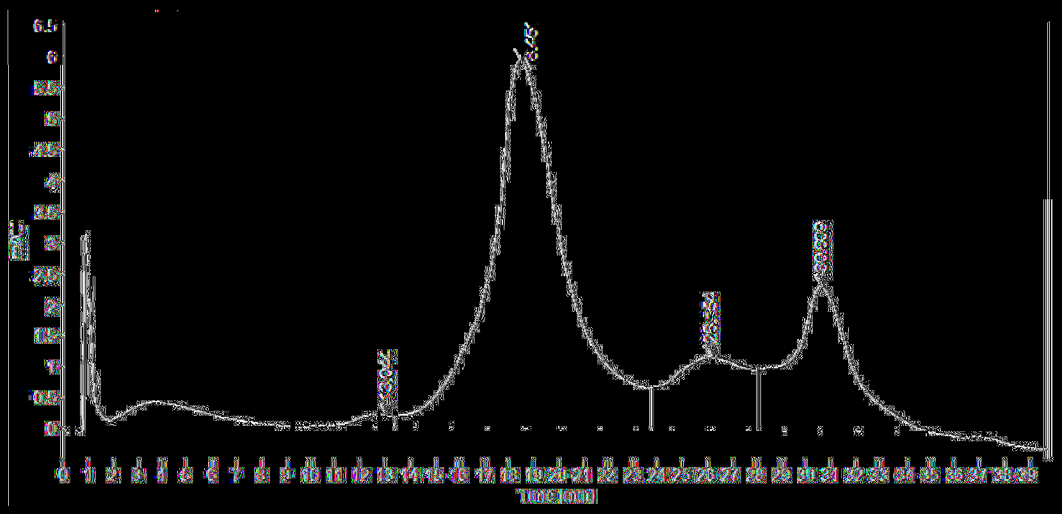
[圖 6] (續)

VWD1A, 波長: 280nm

RT 時間	峰面積	峰高	峰面積百分比	峰寬
12.987	96.39	0.64	5.48	6.427
16.321	130.37	1.27	7.42	2.282
18.634	1029.57	4.83	58.59	3.958
26.062	128.47	0.78	7.32	2.992
28.671	65.08	0.71	3.71	1.561
30.301	229.06	1.84	13.04	5.744

DAR: 4.59

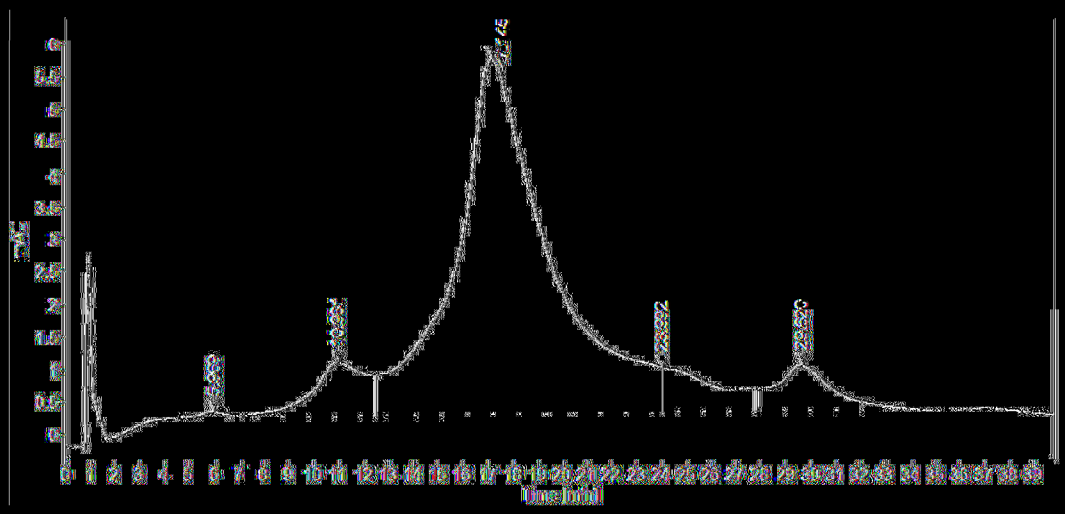
(6c)



13.044	18.75	0.17	0.85	1.267
19.451	1362.74	4.92	65.16	3.017
26.157	269.57	1.18	12.90	4.253
30.669	409.28	2.31	21.08	7.014

DAR: 5.08; (6d)

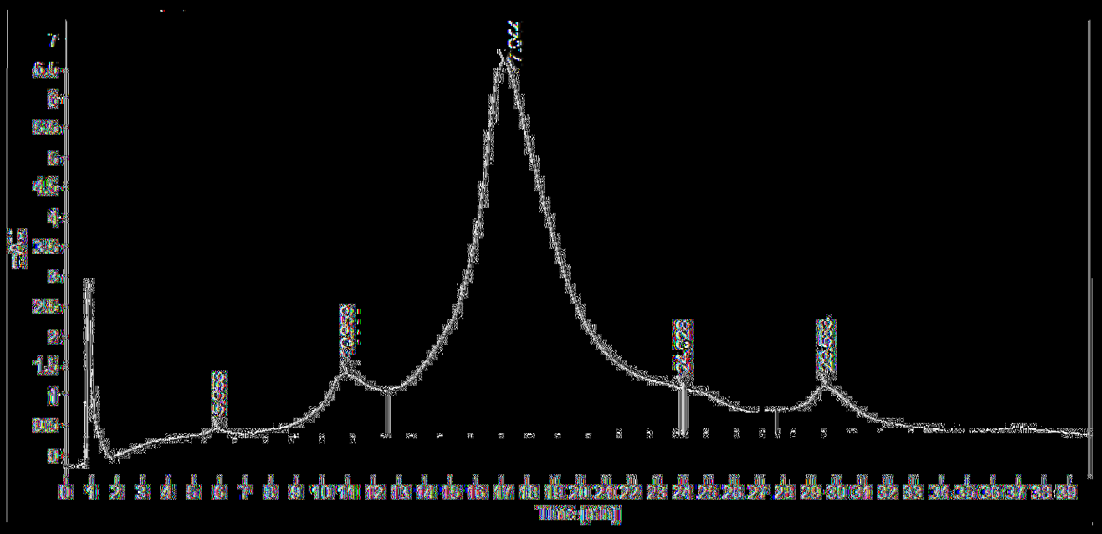
[(圖 6)] (續)



VWD1A, 波長: 280nm

RT[分鐘]	峰面積	峰高	峰面積百分比	峰寬
5.969	9.13	0.11	0.50	1.238
10.961	130.34	0.84	7.15	2.585
12.145	1446.78	6.47	79.61	3.499
23.992	166.59	0.71	5.99	2.545
29.620	167.92	0.71	6.61	2.310

圖(圖 7)

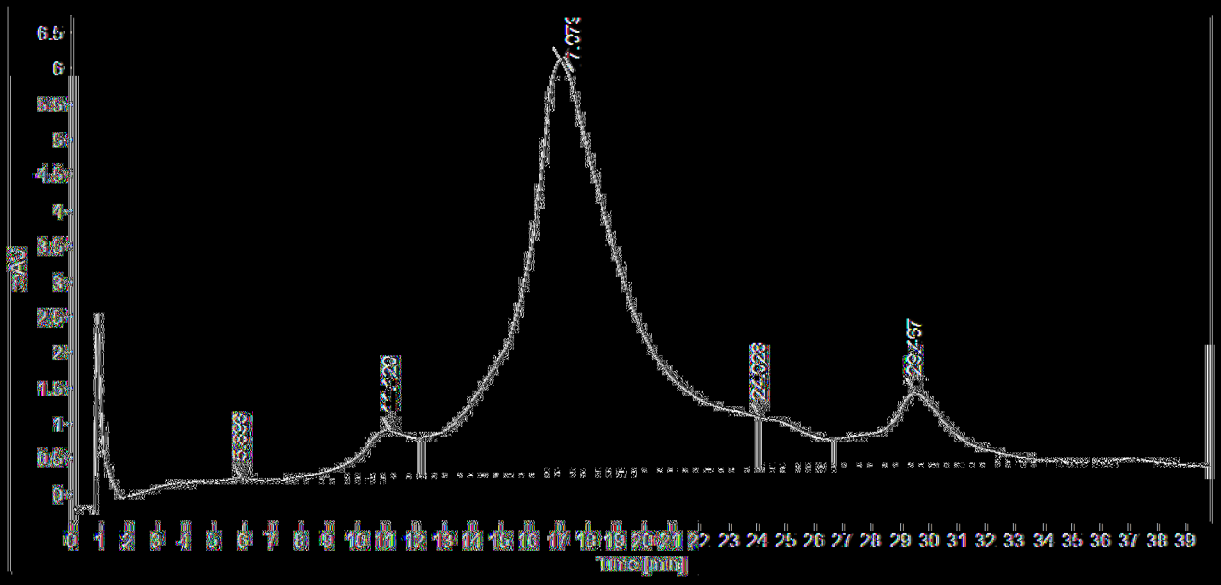


圖(圖 8)

VWD1A, 波長: 280nm

RT[分鐘]	峰面積	峰高	峰面積百分比	峰寬
5.953	14.86	0.15	0.71	1.392
10.959	172.65	1.67	8.26	2.222
17.074	1666.20	6.28	79.68	3.506
24.029	109.68	0.76	5.25	2.403
29.563	127.56	0.76	6.10	2.315

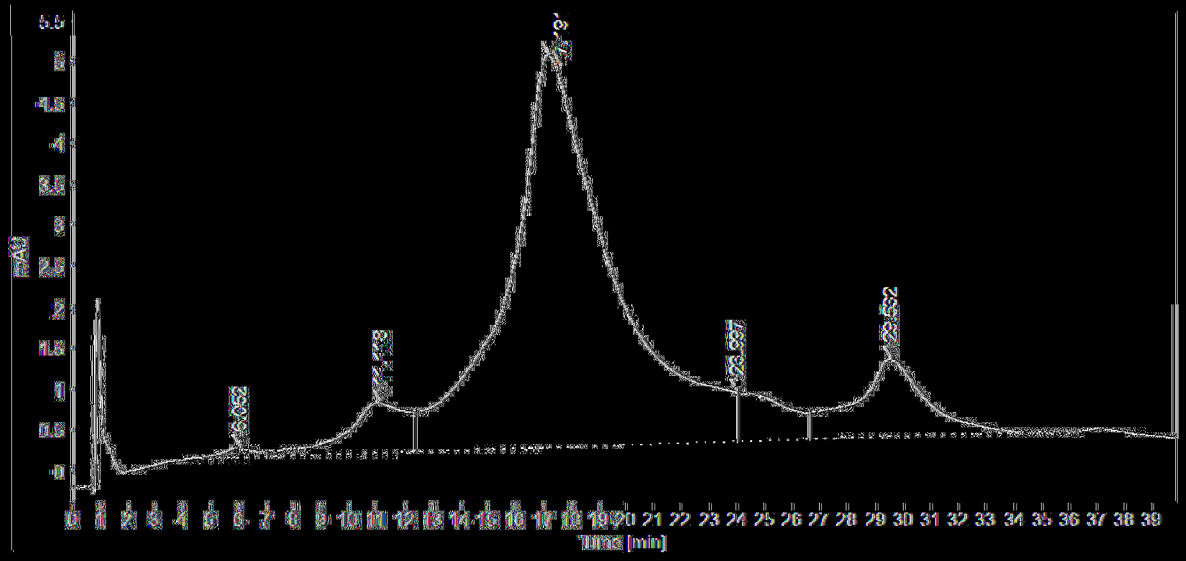
[(圖 8)] (續)



VWD1A, 波長: 280nm

RT[分鐘]	峰面積	峰高	峰面積百分比	峰寬
5.993	3.80	0.05	0.20	1.229
11.190	90.03	0.87	4.77	1.928
17.074	1520.54	6.50	80.39	3.477
24.029	86.15	0.73	4.63	2.022
29.457	190.49	1.02	10.01	3.123

[(圖 9)]



VWD1A, 波長: 280nm

RT[分鐘]	峰面積	峰高	峰面積百分比	峰寬
6.682	11.21	0.12	0.69	1.323
11.115	88.20	0.62	5.39	2.137
17.191	1259.76	4.80	77.04	3.463
28.997	74.93	0.61	4.64	2.061
29.552	175.27	0.96	10.84	2.551

圖 10

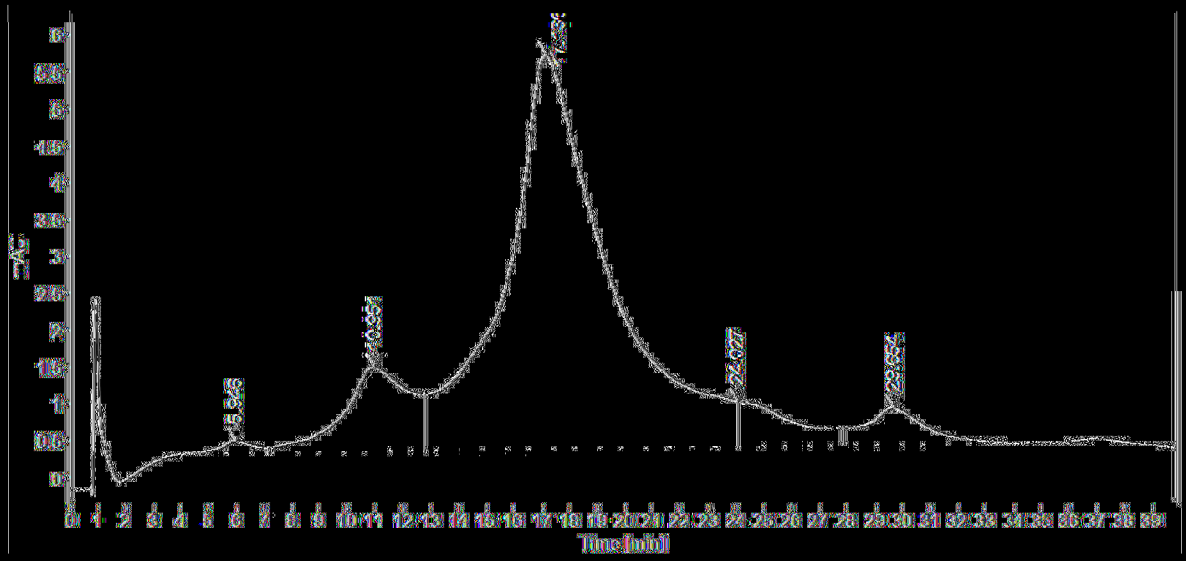
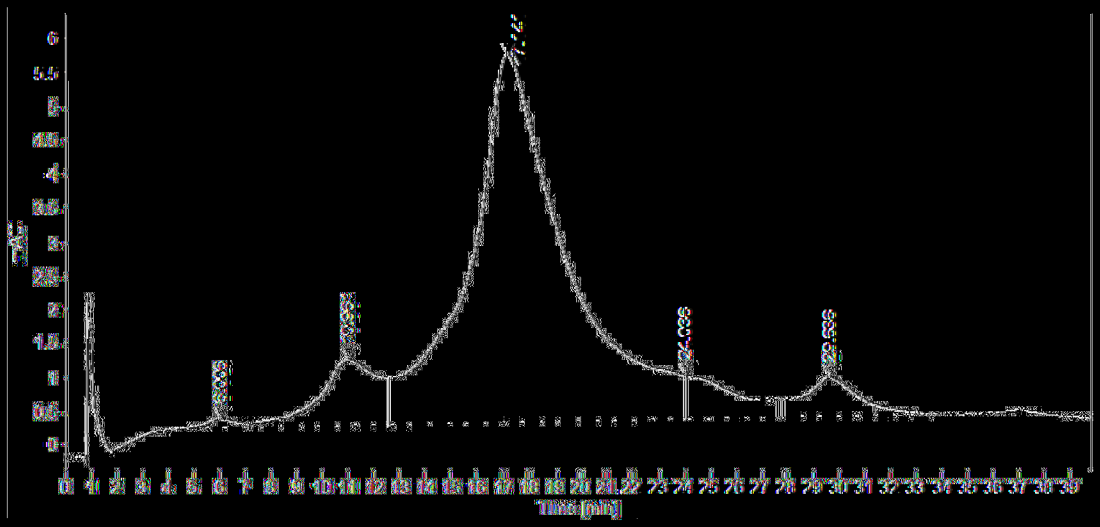


圖 11

VWD1A, 波長: 280nm

RT[分鐘]	峰面積	峰高	峰面積百分比	峰寬
5.946	14.81	0.16	0.84	1.502
10.951	190.64	1.14	10.82	2.294
17.136	1387.08	5.32	78.73	3.442
24.027	89.43	0.62	5.08	2.414
29.654	79.67	0.51	4.52	6.087

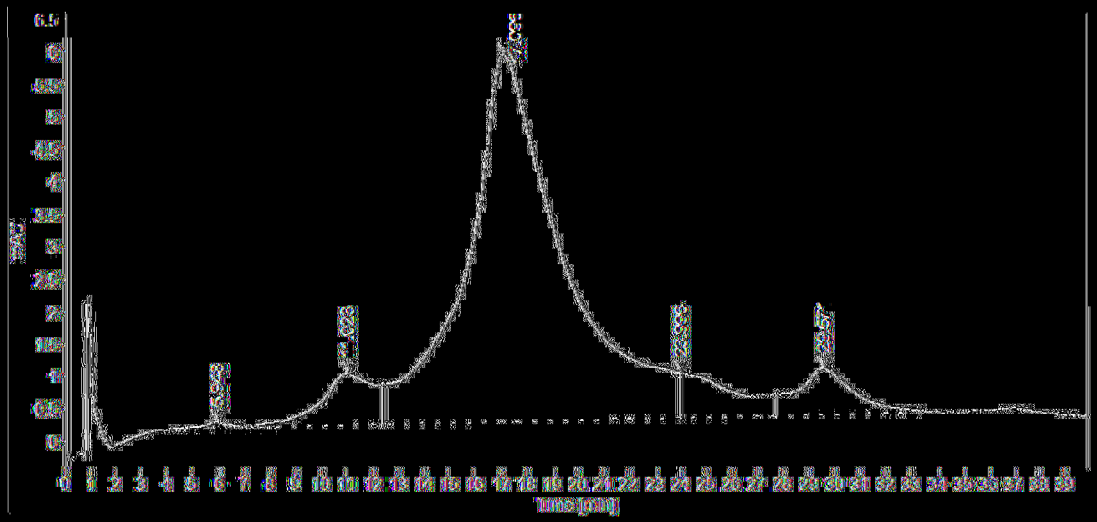
[(圖 11)] (續)



VWD1A, 波長: 280nm

RT[分鐘]	峰面積	峰高	峰面積百分比	峰寬
6.006	12.39	0.14	0.69	1.286
10.961	155.18	0.97	8.70	2.653
17.141	1426.21	5.42	80.11	3.472
24.036	90.44	0.64	5.24	2.396
29.636	96.62	0.58	5.25	6.172

[(圖 12)]



VWD1A, 波長: 280nm

RT[分鐘]	峰面積	峰高	峰面積百分比	峰寬
5.948	7.62	0.09	0.42	1.340
11.023	116.82	0.90	6.38	2.084
17.093	1487.01	6.66	81.15	3.464
23.996	104.85	0.70	5.69	2.472
29.571	116.46	0.72	6.36	7.110

圖 13

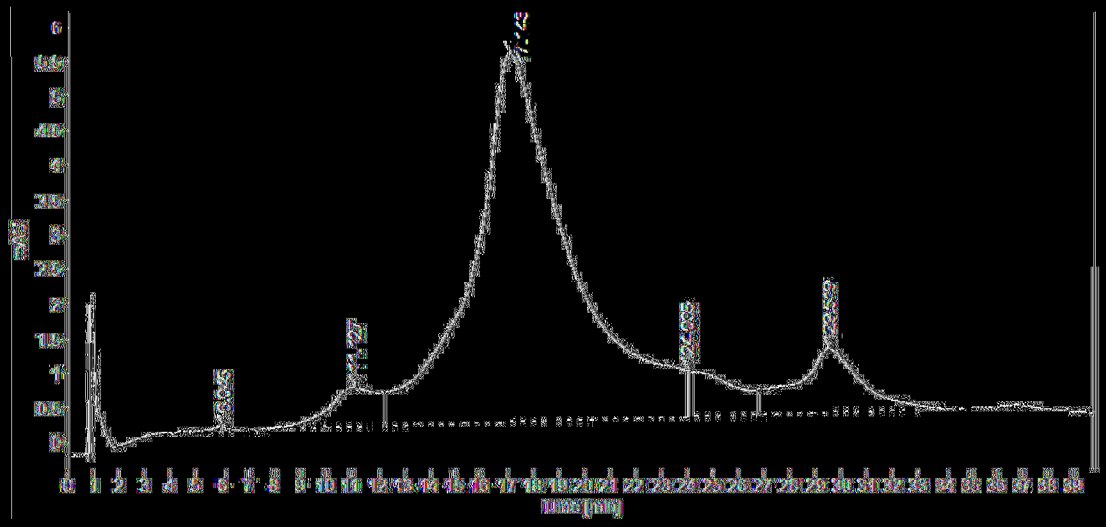
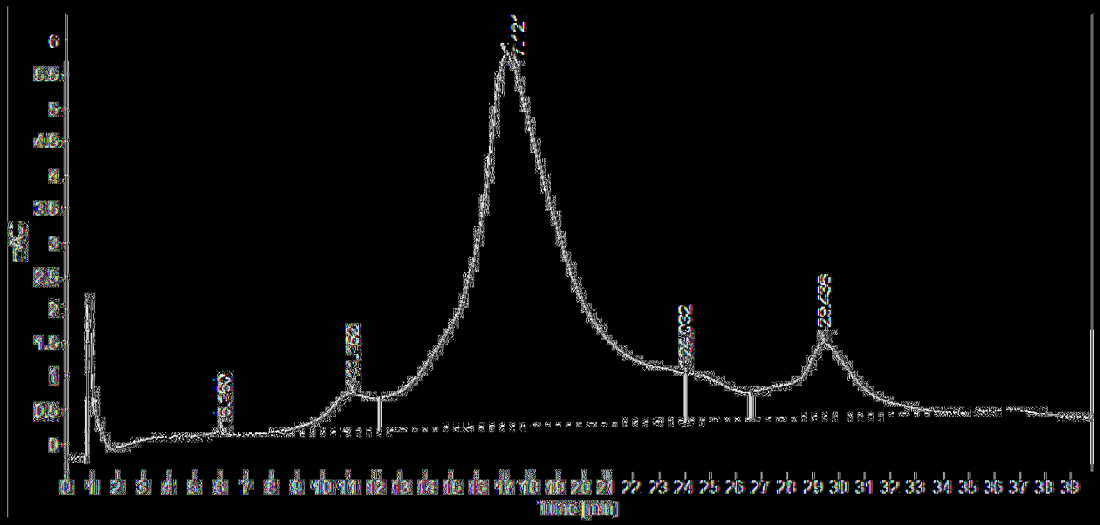


圖 14

VWD1A, 波長: 280nm

RT[分鐘]	峰面積	峰高	峰面積百分比	峰寬
6.046	3.28	0.03	0.18	2.625
11.127	76.66	0.58	4.13	4.896
17.143	1803.64	5.37	97.02	3.470
24.063	83.62	0.69	4.76	2.027
29.519	170.38	0.92	9.81	8.137

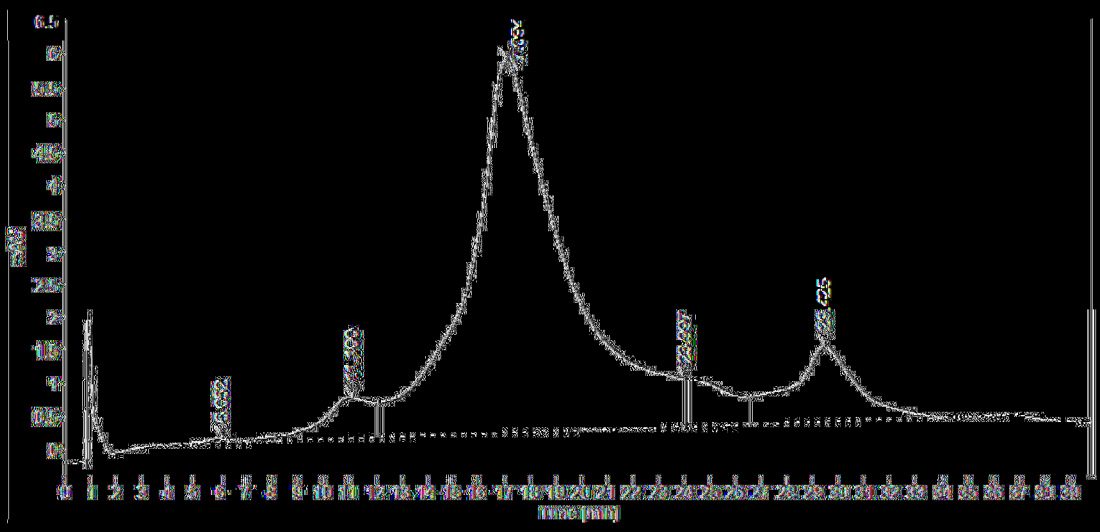
[(圖 14)] (續)



VWD1A, 波長: 280nm

RT[分鐘]	峰面積	峰高	峰面積百分比	峰寬
6.060	3.09	0.04	0.17	1.170
11.152	74.21	0.67	4.05	1.853
17.121	1463.04	6.53	79.98	3.470
24.032	86.08	0.72	4.70	1.989
29.436	204.00	1.10	11.14	2.501

[(圖 15)]



VWD1A, 波長: 280nm

RT[分鐘]	峰面積	峰高	峰面積百分比	峰寬
6.052	6.38	0.08	0.33	1.361
11.100	89.56	0.53	4.69	1.987
14.034	1507.66	5.67	78.97	3.501
25.907	88.37	0.73	4.63	2.006
29.425	215.98	1.16	11.32	8.325

圖 16

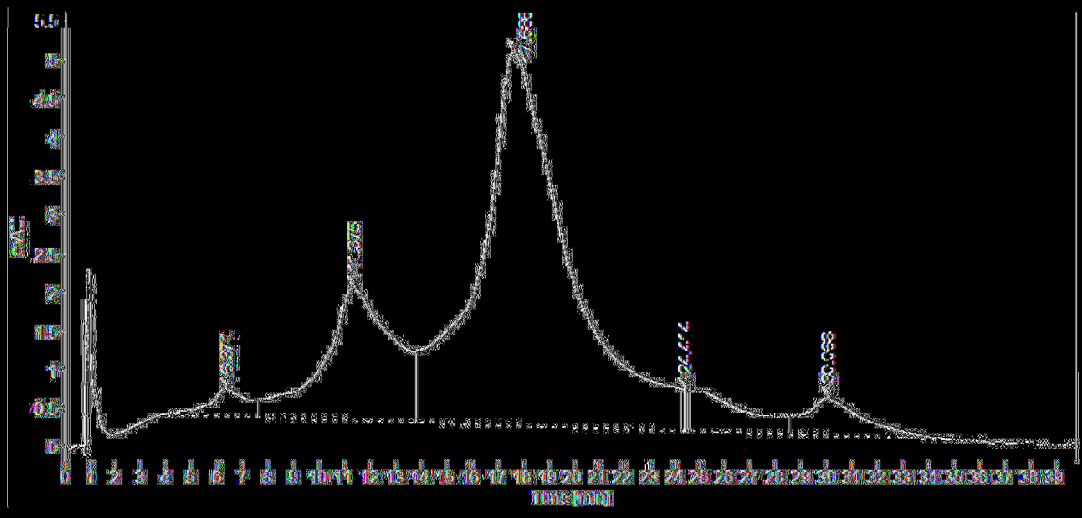
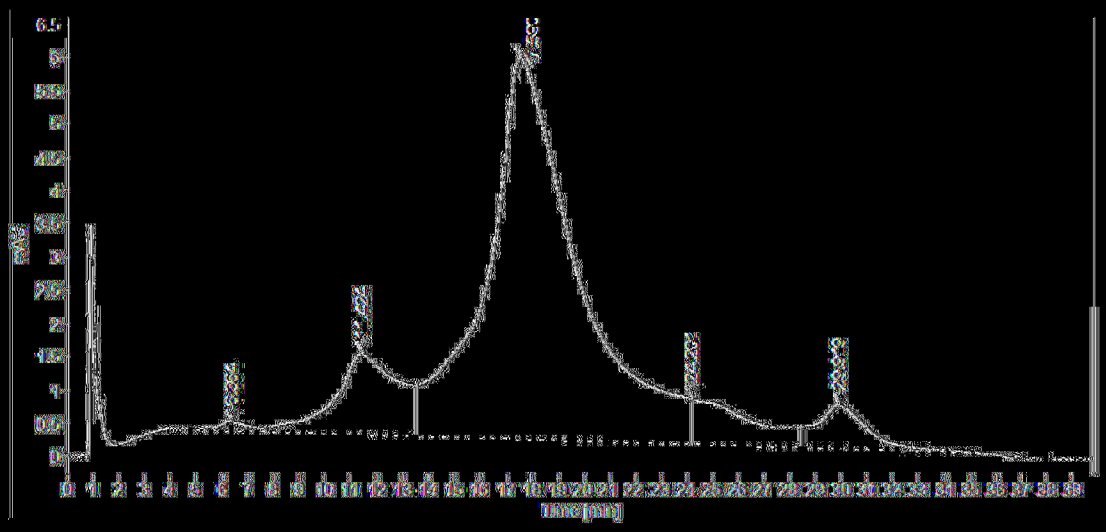


圖 17

VWD1A, 波長: 280nm

RT[分鐘]	峰面積	峰高	峰面積百分比	峰寬
6.344	34.06	0.34	2.00	1.421
11.275	323.06	1.70	18.96	2.510
17.686	1104.71	4.80	64.84	3.262
24.714	85.26	0.53	5.00	2.697
30.063	76.64	0.46	4.50	2.220

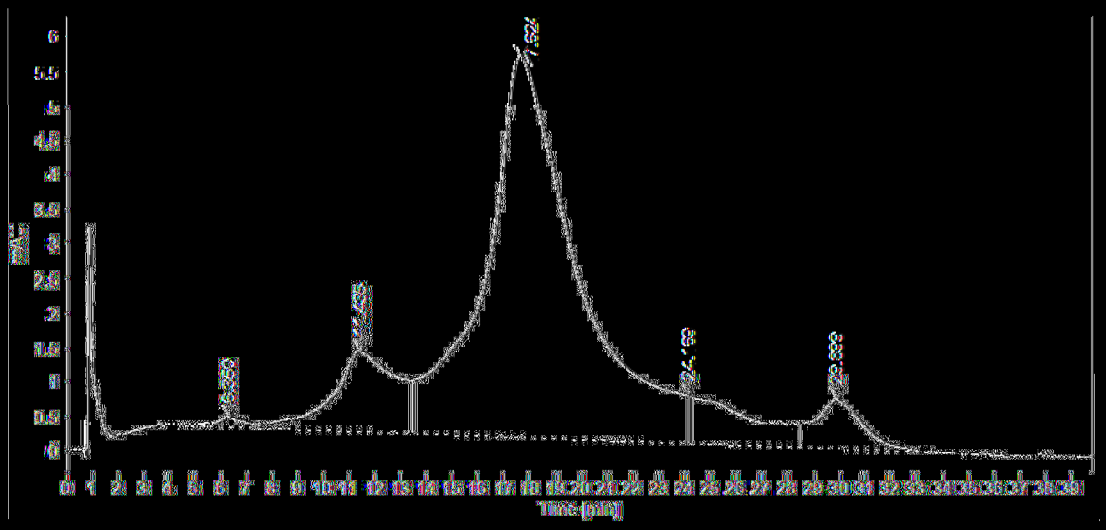
[圖 17] (續)



VWD1A, 波長: 280nm

RT[分鐘]	峰面積	峰高	峰面積百分比	峰寬
6.364	10.60	0.13	0.58	2.390
11.424	204.04	1.20	11.21	5.836
17.580	1406.23	5.73	77.25	3.505
24.201	112.50	0.68	6.18	2.759
29.919	87.10	0.64	4.78	6.599

[圖 18]



VWDIA, 波長: 780nm

RT[分鐘]	峰面積	峰高	峰面積百分比	峰寬
6.350	5.04	0.12	0.51	2.204
11.435	109.61	1.16	11.13	5.976
17.024	1508.75	5.48	76.70	8.325
24.169	116.23	0.68	6.68	2.870
29.699	89.77	0.69	5.03	6.613

圖 19)

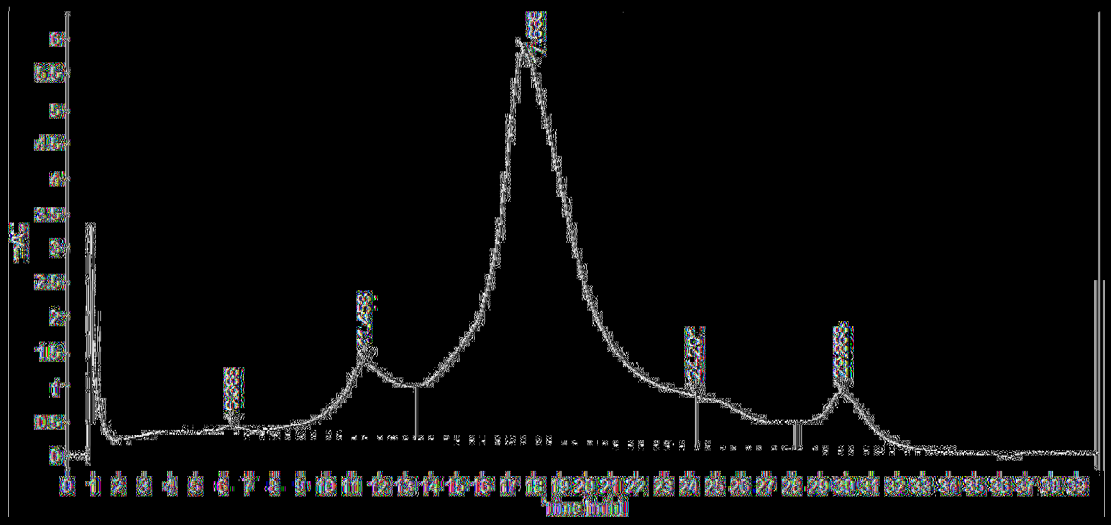
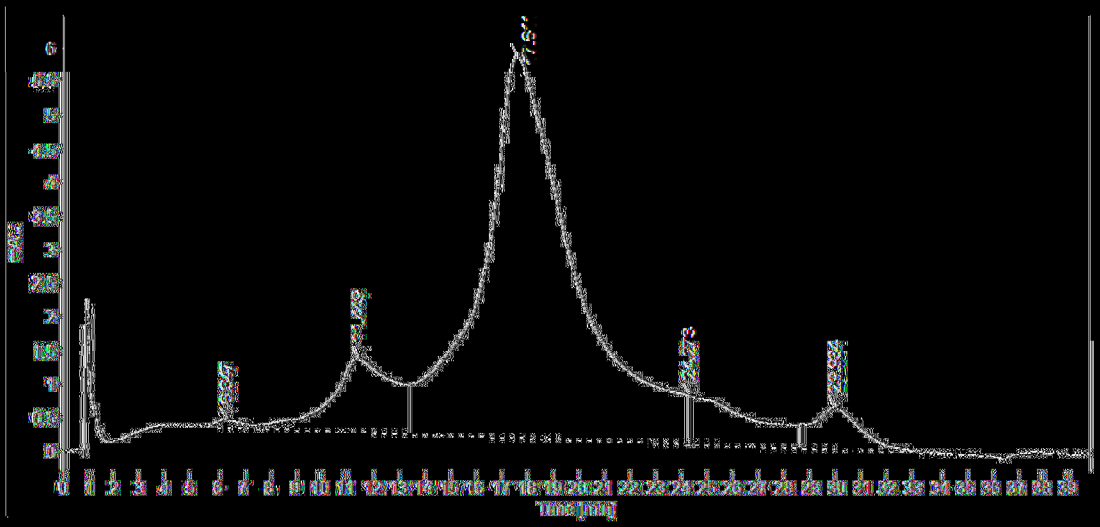


圖 20)

VWD1A, 波長: 280nm

RT[分鐘]	峰面積	峰高	峰面積百分比	峰寬
6.368	7.97	0.10	0.44	2.202
11.458	183.25	1.06	10.02	5.894
17.633	1400.26	6.68	76.58	3.341
24.201	119.79	0.73	6.55	2.751
29.868	117.22	0.81	6.41	6.933

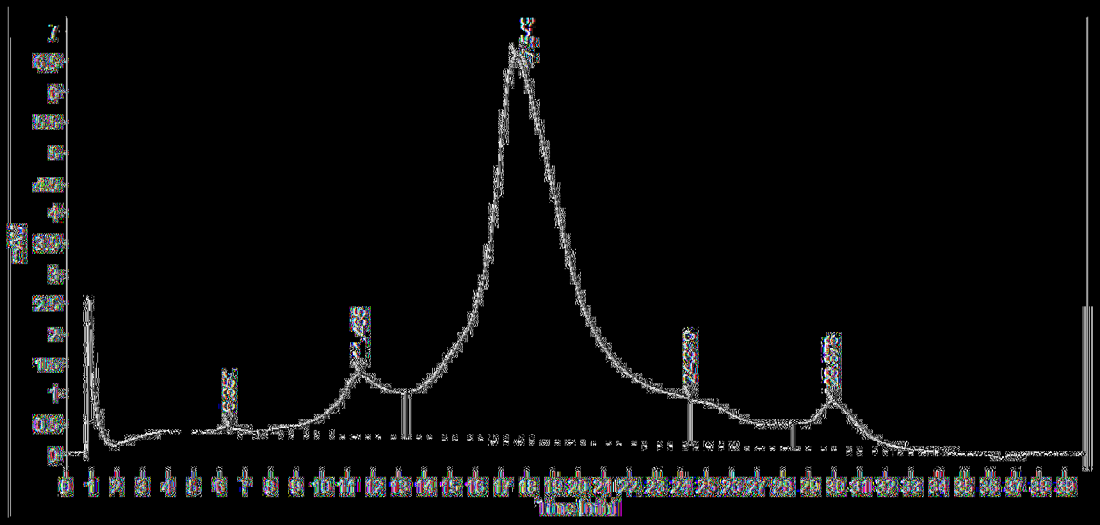
圖 20 (續)



[illegible]

RT[分鐘]	峰面積	峰高	峰面積百分比	峰寬
6.347	9.05	0.11	0.50	2.276
11.449	185.47	1.09	10.18	5.815
17.611	1420.21	6.65	77.97	3.561
24.273	124.74	0.72	6.85	2.886
29.934	82.06	0.61	4.50	6.483

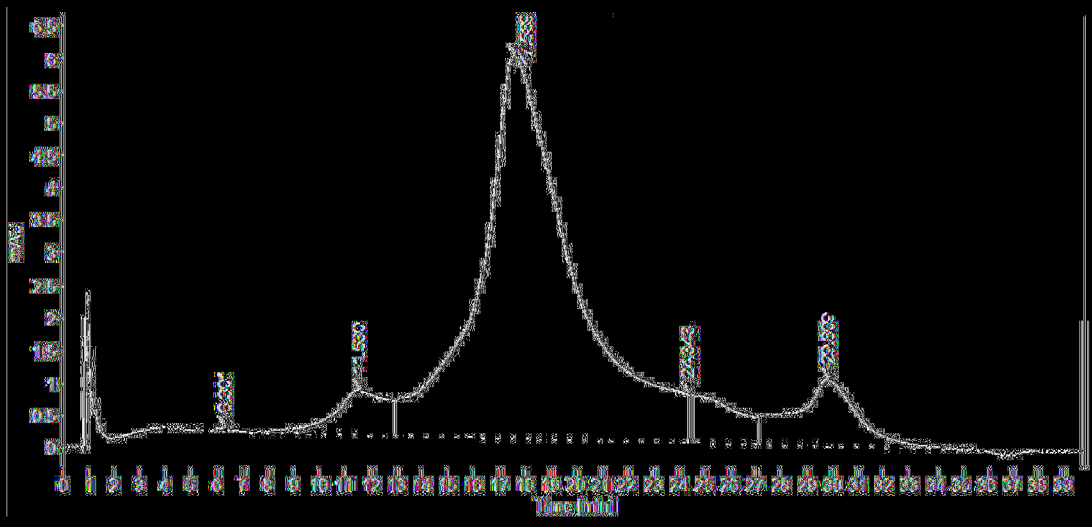
圖 21



VWD1A, 波長: 280nm

RT[分鐘]	峰面積	峰高	峰面積百分比	峰寬
6.351	7.08	0.10	0.35	2.122
11.465	164.05	1.02	8.30	5.700
17.549	1380.43	6.35	69.44	3.580
24.340	125.22	0.78	6.37	2.746
29.876	111.56	0.78	5.54	6.720

[圖 22]

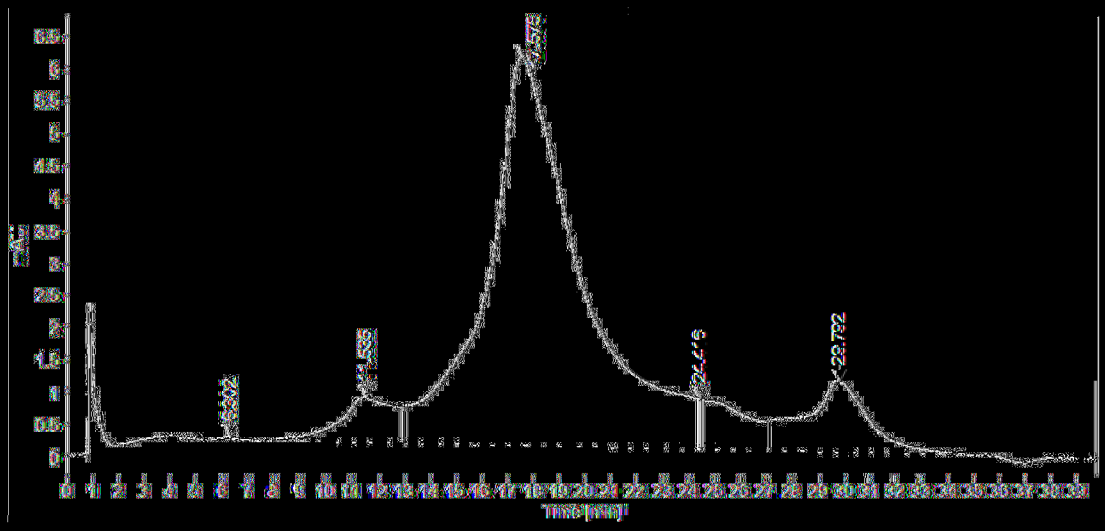


[圖 23]

VWD1A, 波長: 280nm

RT[分鐘]	峰面積	峰高	峰面積百分比	峰寬
6.301	1.41	0.03	0.06	1.982
11.530	95.57	0.67	4.17	5.397
17.589	1468.14	5.89	63.91	3.676
24.343	95.78	0.75	4.18	2.134
29.809	176.90	1.04	7.57	7.983

接(圖 23) (續)

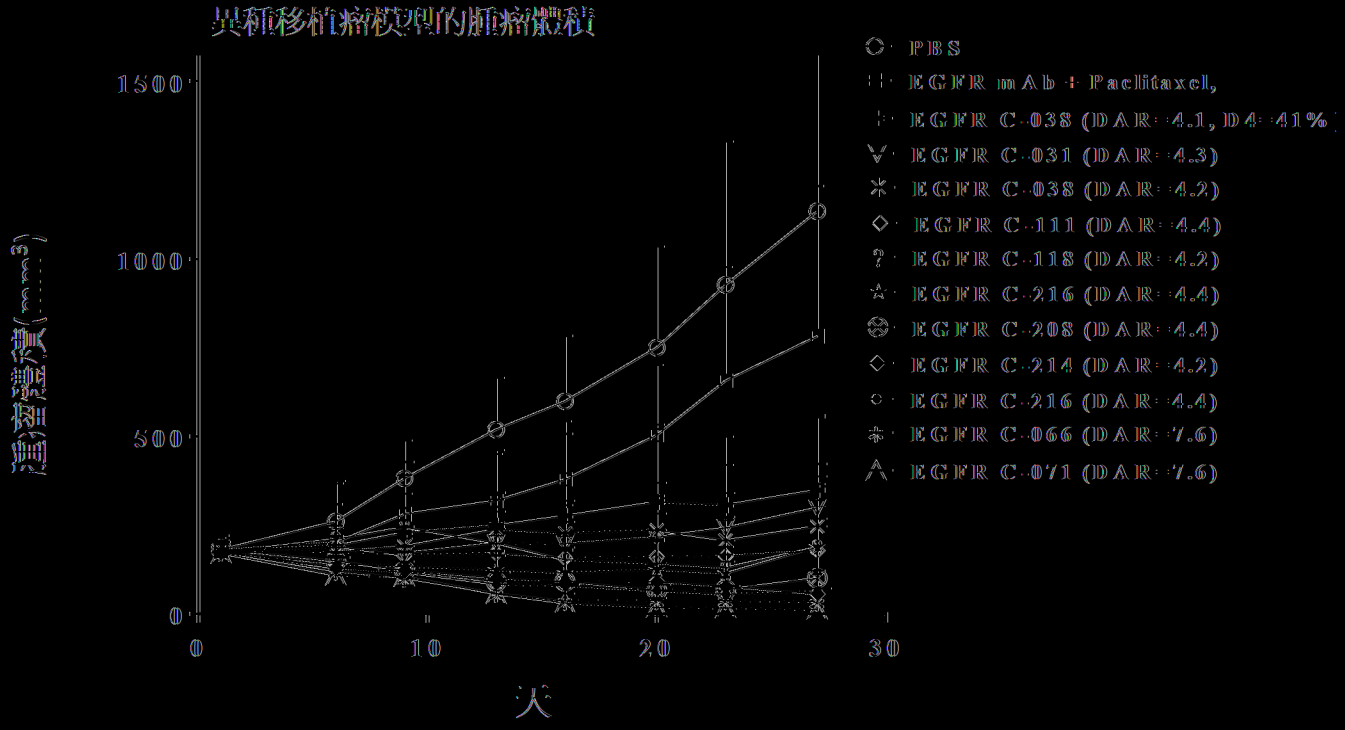


VWD1A, 波長: 280nm

RT[分鐘]	峰面積	峰高	峰面積百分比	峰寬
6.302	0.91	0.02	0.05	0.548
11.528	97.38	0.68	5.12	1.562
17.575	1510.60	5.99	79.83	3.403
24.416	87.24	0.77	4.12	2.102
29.782	197.72	1.08	9.88	2.438

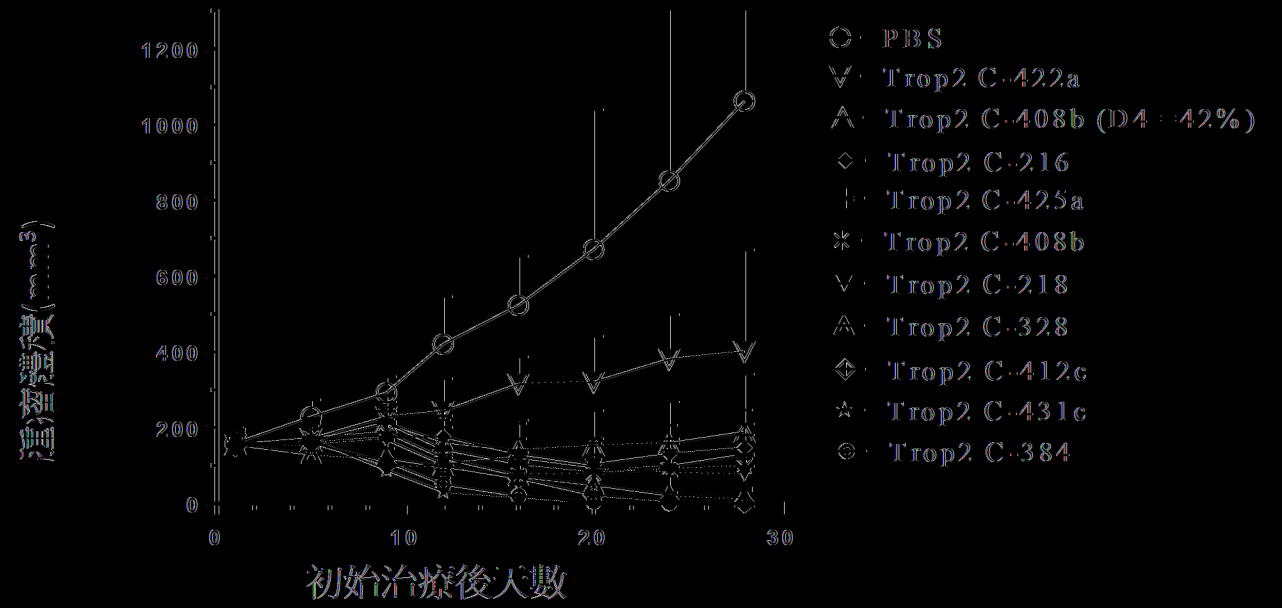
接(圖 24)

在 BALB/c 裸鼠中建立的人胃癌 HCC 827 異種移植癌模型的腫瘤體積

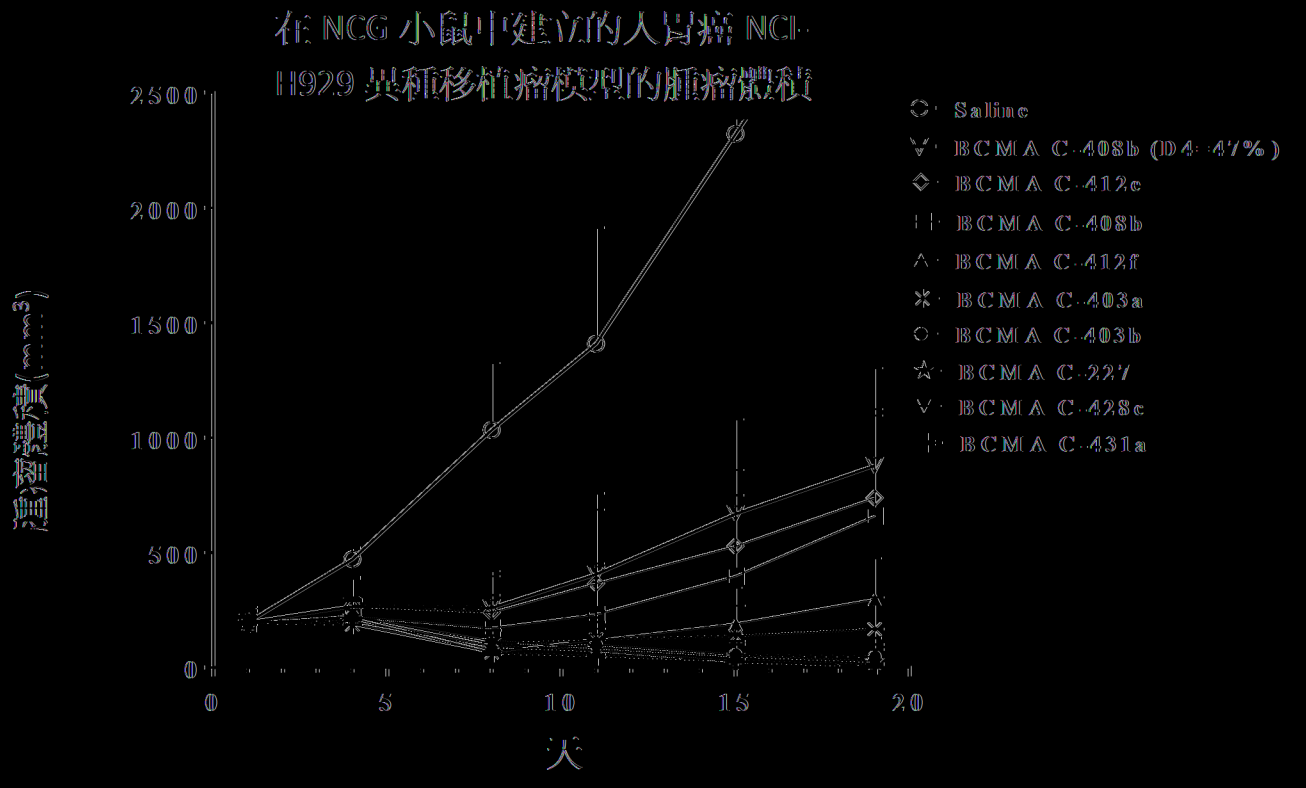


[圖 25]

在 BALB/c 裸鼠中建立的人胃癌 NCI-N87 異種移植癌模型的腫瘤體積



[圖 26]


在 NCG 小鼠中建立的人胃癌 NCI-H929 異種移植癌模型的腫瘤體積
腫瘤體積 (mm³)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
天
Saline
BCMA C-408b (D4: 47%)
BCMA C-412c
BCMA C-408b
BCMA C-412f
BCMA C-403a
BCMA C-403b
BCMA C-227
BCMA C-428c
BCMA C-431a

[圖 27]