



(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 201629087 A

(43)公開日：中華民國 105 (2016) 年 08 月 16 日

(21)申請案號：104142843

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 12 月 18 日

(51)Int. Cl.：

C07K7/56 (2006.01)

A61K38/12 (2006.01)

A61P31/12 (2006.01)

(30)優先權：2014/12/19

美國

62/094,281

(71)申請人：必治妥美雅史谷比公司 (美國) BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (US)
美國(72)發明人：孫 力強 SUN, LI-QIANG (US)；趙倩 ZHAO, QIAN (CN)；吉利斯 艾瑞克 P
GILLIS, ERIC P. (US)；米勒 麥可 馬修 MILLER, MICHAEL MATTHEW
(US)；亞倫 馬丁 派翠克 ALLEN, MARTIN PATRICK (US)；莫 艾瑞克 MULL,
ERIC (US)；史格拉 保羅 麥可 SCOLA, PAUL MICHAEL (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：17 項 圖式數：0 共 156 頁

(54)名稱

免疫調節劑

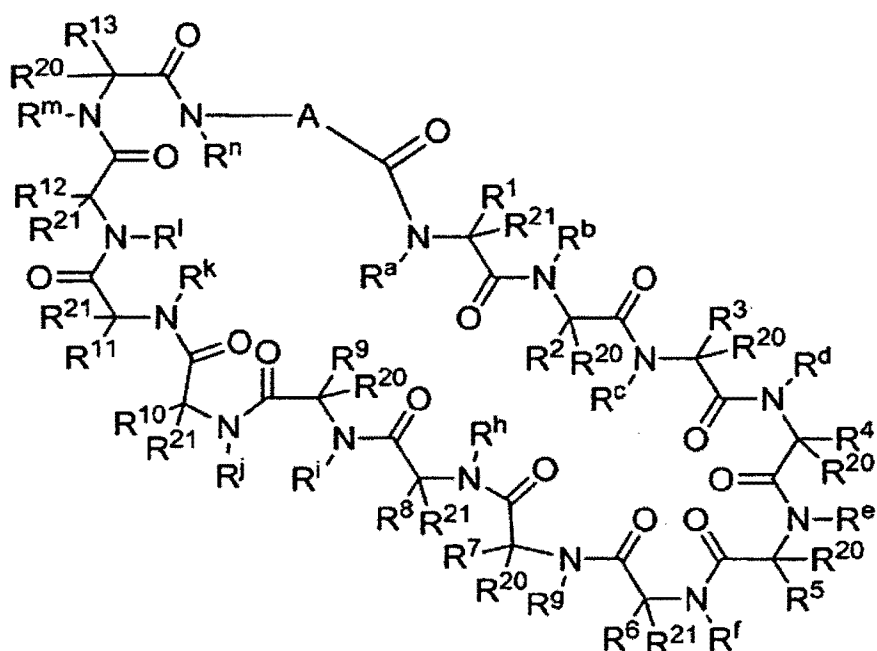
IMMUNOMODULATORS

(57)摘要

本發明提供新穎的大環肽，其抑制 PD-1/PD-L1 及 PD-L1/CD80 蛋白質/蛋白質相互作用，及因此適用於改善各種疾病，包括癌症及傳染性疾病。

The present disclosure provides novel macrocyclic peptides which inhibit the PD-1/PD-L1 and PD-L1/CD80 protein/protein interaction, and thus are useful for the amelioration of various diseases, including cancer and infectious diseases.

特徵化學式：



~~201629087~~

發明摘要

※ 申請案號：104142843

※ 申請日：104.12.18

※IPC 分類：C07K 7/36 (2006.01)

A61K 38/12 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

【發明名稱】

免疫調節劑

IMMUNOMODULATORS

【中文】

本發明提供新穎的大環肽，其抑制PD-1/PD-L1及PD-L1/CD80蛋白質/蛋白質相互作用，及因此適用於改善各種疾病，包括癌症及傳染性疾病。

【英文】

The present disclosure provides novel macrocyclic peptides which inhibit the PD-1/PD-L1 and PD-L1/CD80 protein/protein interaction, and thus are useful for the amelioration of various diseases, including cancer and infectious diseases.

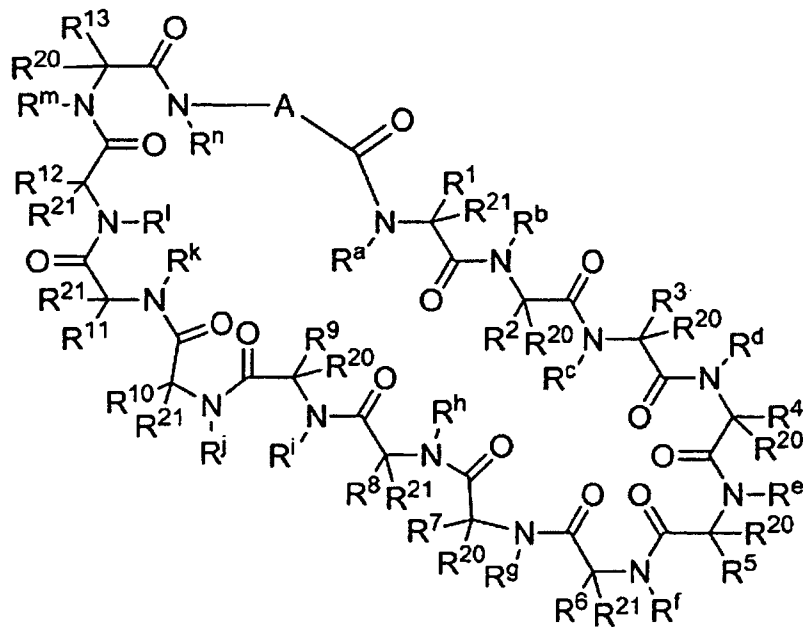
【代表圖】

【本案指定代表圖】：無。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：



發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

免疫調節劑

IMMUNOMODULATORS

相關申請案之交叉參考

本申請案主張2014年12月19日申請之美國臨時申請案序號62/094,281之權益，該案係以其全文引用的方式併入本文中。

本發明提供新穎的大環肽，其抑制PD-1/PD-L1及CD80/PD-L1蛋白質/蛋白質相互作用，及因此適用於改善各種疾病，包括癌症及傳染性疾病。

蛋白質程式化死亡1(PD-1)為CD28受體家族中的一個抑制成員，該家族亦包括CD28、CTLA-4、ICOS及BTLA。PD-1表現於活化B細胞、T細胞及骨髓細胞上(Agata等人，同前述；Okazaki等人，*Curr.Opin.Immunol.*, 14:779-782 (2002)；Bennett等人，*J. Immunol.*, 170:711-718 (2003))。

PD-1蛋白為作為Ig基因超家族一部分之55 kDa I型跨膜蛋白(Agata等人，*Int. Immunol.*, 8:765-772 (1996))。PD-1包含膜近端免疫受體酪胺酸抑制基元(ITIM)及基於膜遠端酪胺酸之切換基元(ITSM)(Thomas, M.L., *J. Exp.Med.*, 181:1953-1956 (1995)；Vivier, E.等人，*Immunol.Today*, 18:286-291 (1997))。雖然在結構上類似於CTLA-4，但PD-1缺少對CD80 CD86(B7-2)結合至為關鍵之MYPPY基元。已識別得PD-1的兩個配體PD-L1(B7-H1)及PD-L2(b7-DC)。已顯示表現PD-1之T細胞的活化在與表現PD-L1或PD-L2之細胞相互作用後下調(Freeman等人，*J. Exp.Med.*, 192:1027-1034 (2000)；Latchman

S

等人，*Nat. Immunol.*, 2:261-268 (2001)；Carter 等人，*Eur.J. Immunol.*, 32:634-643 (2002))。PD-L1及PD-L2均為結合至PD-1但不結合至其他CD28家族成員之B7蛋白質家族成員。PD-L1配體大量存於多種人類癌症中(Dong等人，*Nat. Med.*, 8:787-789 (2002))。PD-1與PD-L1間之相互作用導致腫瘤浸潤性淋巴細胞之減少、T-細胞受體介導之增殖之減少及由癌細胞引起之免疫逃避(Dong等人，*J. Mol.Med.*, 81:281-287 (2003)；Blank 等人，*Cancer Immunol.Immunother.*, 54:307-314 (2005)；Konishi等人，*Clin.Cancer Res.*, 10:5094-5100 (2004))。免疫抑制可藉由抑制PD-1與PD-L1局部相互作用逆轉，及該效應當在PD-1與PD-L2相互作用亦遭受阻斷時係累加(Iwai等人，*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 99:12293-12297 (2002)；Brown 等人，*J. Immunol.*, 170:1257-1266 (2003))。

亦已顯示 PD-L1 與 CD80 相互作用 (Butte MJ 等人，*Immunity*;27:111-122 (2007))。已顯示表現免疫細胞上PD-L1/CD80之相互作用係一種抑制相互作用。已顯示此相互作用之阻斷使得此抑制相互作用消除(Paterson AM等人，*J Immunol.*, 187:1097-1105 (2011)；Yang J等人，*J Immunol.* 8月1日；187(3):1113-9 (2011))。

當表現PD-1之T細胞與表現其配體之細胞接觸時，回應於抗原刺激之功能性活性(包括增殖、細胞介素分泌及細胞毒性)減少。PD-1/PD-L1或PD-L2相互作用在解析感染或腫瘤期間或在發展自身耐受性期間下調免疫反應(Keir, M.E.等人，*Annu.Rev. Immunol.*, 26:Epub (2008))。長期性抗原刺激(諸如，在腫瘤疾病或慢性感染中發生之抗原刺激)產生出表現提高水平之PD-1且相對對慢性抗原活性而言係功能障礙之T細胞(參見Kim等人，*Curr.Opin.Imm.*(2010))。此稱之為「T細胞耗盡」。B細胞亦展現PD-1/PD配體抑制作用及「耗盡」。

已證實使用針對PD-L1之抗體阻斷PD-1/PD-L1連接恢復並增強在

許多系統中之T細胞活化。罹患晚期癌症之病患從針對PD-L1之單株抗體之療法獲益(Brahmer等人, *New Engl. J. Med.*(2012))。腫瘤及慢性感染之臨床前動物模型已顯示藉由單株抗體阻斷PD-1/PD-L1路徑可增強免疫反應且導致腫瘤排斥作用或對感染之控制。經由PD-1/PD-L1阻斷之抗腫瘤免疫療法可增強對許多組織學不同腫瘤之治療免疫反應(Dong, H.等人, 「B7-H1 pathway and its role in the evasion of tumor immunity」, *J. Mol.Med.*, 81(5):281-287 (2003); Dong, H.等人, 「Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion」, *Nat. Med.*, 8(8):793-800 (2002))。

干擾PD-1/PD-L1相互作用引起具有慢性感染之系統中T細胞活性之增強。阻斷PD-L1引起具有慢性淋巴細胞脈絡叢腦膜炎病毒感染之小鼠中病毒清除率之提高及免疫之恢復(Barber, D.L.等人, 「Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection」, *Nature*, 439(7077):682-687 (2006))。感染HIV-1之人類化小鼠顯示增強之抵抗病毒血症之保護作用及CD4+ T細胞之病毒耗盡(Palmer等人, *J. Immunol.*(2013))。經由針對PD-L1之單株抗體阻斷PD-1/PD-L1可恢復對來自以下病患之T細胞之活體外抗原特異性功能：HIV病患(Day, *Nature* (2006); Petrovas, *J. Exp.Med.*(2006); Trautman, *Nature Med.*(2006); D'Souza, *J. Immunol.*(2007); Zhang, *Blood* (2007); Kaufmann, *Nature Imm.*(2007); Kasu, *J. Immunol.*(2010); Porichis, *Blood* (2011))、HCV病患(Golden-Mason, *J. Virol.*(2007); Jeung, *J. Leuk.Biol.*(2007); Urbani, *J. Hepatol.*(2008); Nakamoto, *PLoS Path.*(2009); Nakamoto, *Gastroenterology* (2008))及HBV病患(Boni, *J. Virol.*(2007); Fisicaro, *Gastro.*(2010); Fisicaro等人, *Gastroenterology* (2012); Boni等人, *Gastro.*(2012); Penna等人, *J. Hep.*(2012); Raziorrough, *Hepatology* (2009); Liang, *World J. Gastro.*(2010);

Zhang, *Gastro.*(2008))。

亦已顯示PD-L1/CD80相互作用之阻斷可刺激免疫性(Yang J.等人, *J Immunol.* 8月1日; 187(3):1113-9 (2011))。已顯示自阻斷PD-L1/CD80相互作用產生之免疫刺激經由組合阻斷進一步的PD-1/PD-L1或PD-1/PD-L2相互作用得以增強。

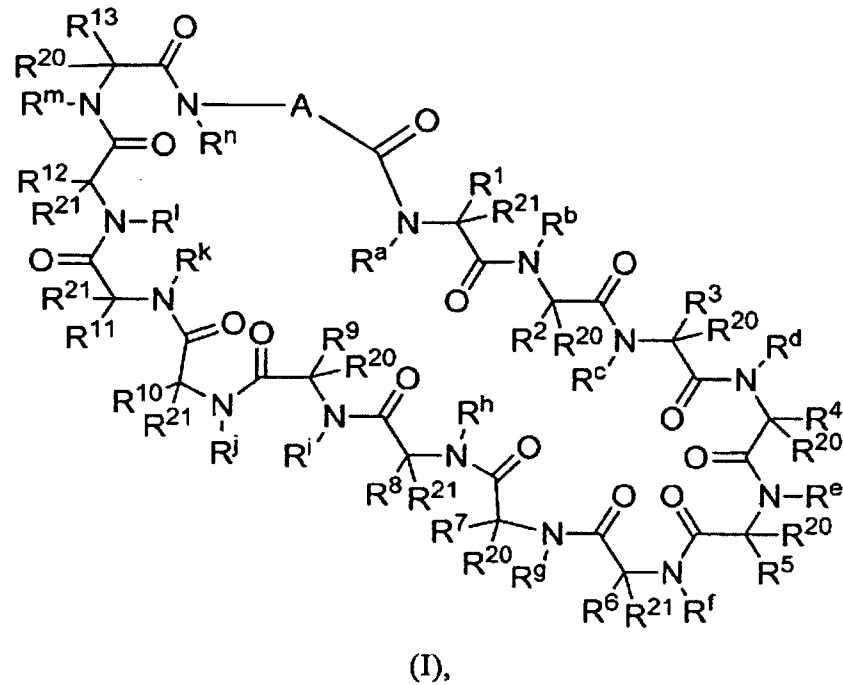
假設免疫細胞表型之改變為敗血性休克之一個重要的因素(Hotchkiss等人, *Nat Rev Immunol* (2013))。此等包括PD-1及PD-L1之水平之提高(Guignat等人, *Crit.Care* (2011))，來自PD-1及PD-L1水平提高之敗血性休克病患的細胞展現提高之T細胞凋亡水平。針對於PD-L1之抗體可降低免疫細胞凋亡水平(Zhang等人, *Crit.Care* (2011))。另外，缺乏PD-1表現之小鼠比野生型小鼠對敗血性休克症狀更具抗性。Yang J.等人, *J Immunol.* 8月1日; 187(3):1113-9 (2011))。研究已顯示使用抗體阻斷PD-L1之相互作用可抑制不適當的免疫反應並改善疾病症狀。

除了增強對慢性抗原之免疫反應外，亦已顯示阻斷PD-1/PD-L1路徑可增強對疫苗接種(包括慢性感染情境中之治療性疫苗接種)之反應(Ha, S.J.等人, 「Enhancing therapeutic vaccination by blocking PD-1-mediated inhibitory signals during chronic infection」, *J. Exp.Med.*, 205(3):543-555 (2008); Finnefrock, A.C.等人, 「PD-1 blockade in rhesus macaques: impact on chronic infection and prophylactic vaccination」, *J. Immunol.*, 182(2):980-987 (2009); Song, M.-Y.等人, 「Enhancement of vaccine-induced primary and memory CD8+ t-cell responses by soluble PD-1」, *J. Immunother.*, 34(3):297-306 (2011))。

本文中所述的分子證實在基於生化及細胞之兩種實驗系統中阻斷PD-L1與PD-1相互作用之能力。此等結果與治療性投藥以增強在癌症或慢性感染中之免疫性(包括治療性疫苗)之潛力一致。

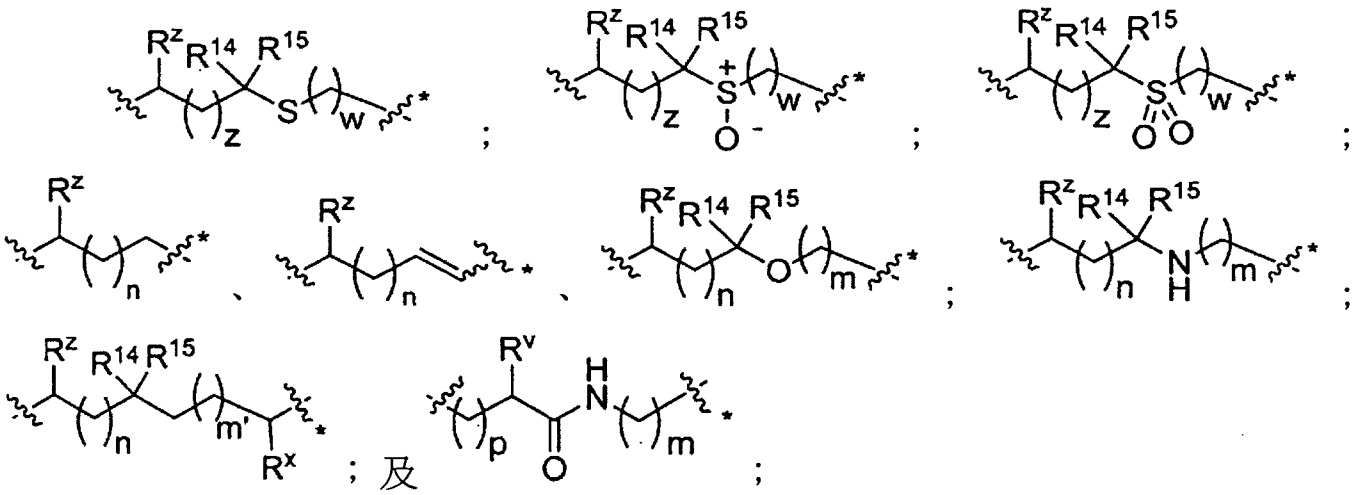
本文中所所述的大環肽能夠抑制PD-L1與PD-1以及與CD80間的相互作用。此等化合物已證實高度有效地結合PD-L1，阻斷PD-L1與PD-1或CD80中任一者之相互作用，且能夠促進增強T細胞功能活性，因此使得該等化合物成為非經腸、口服、肺部、鼻、頰及持續釋放型調配物之候選者。

在一個態樣中，本發明提供式(I)之化合物



或其醫藥上可接受之鹽，其中：

A係選自鍵、



 表示與羰基的連接點及  表示與氮原子的連接點；

z 為 0、1 或 2；

w 為 1 或 2；

n 為 0 或 1；

m 為 1 或 2；

m' 為 0 或 1；

p 為 0、1 或 2；

R^x 係選自氫、胺基、羥基及甲基；

R^{14} 及 R^{15} 獨立地選自氫及甲基；及

R^z 係選自氫及 $-C(O)NHR^{16}$ ；其中 R^{16} 係選自氫、
 $CHR^{17}C(O)NH_2$ 、 $-CHR^{17}C(O)NHCHR^{18}C(O)NH_2$ 及
 $CHR^{17}C(O)NHCHR^{18}C(O)NHCH_2C(O)NH_2$ ；其中 R^{17} 係選自氫及
 CH_2OH 及其中 R^{18} 係選自氫及甲基；

R^v 為氫或天然胺基側鏈；

R^c 、 R^f 、 R^h 、 R^i 及 R^m 為氫；

R^n 為氫或甲基或 R^v 與 R^n 形成吡咯啉環；

R^a 、 R^e 、 R^j 及 R^k 各自獨立地選自氫及甲基；

各 R^{20} 獨立地選自氫及 C_1 - C_6 烷基；

各 R^{21} 獨立地選自氫及 C_1 - C_6 烷基；

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 及 R^{13} 獨立地選自天然胺基側鏈及非天然胺基側鏈或可各自獨立地與對應之偕位 R^{20} 基團形成含有氧或氮原子之三員至六員碳環狀環或六員環，其中該環係視需要經一個、兩個或三個獨立選自 C_1 - C_3 烷氧基、 C_1 - C_3 烷基、 C_2 - C_4 烯基、鹵基、羥基及胺基之取代基取代且其中該五員及六員環係視需要與苯環稠合；或

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 及 R^{13} 可各自獨立地與如下文所述之對應鄰位R基團形成環；

R^e 及 R^k 可各自與對應鄰位R基團及其所連接的原子形成選自氮雜環丁烷、吡咯啉、嗎啉、哌啉、哌嗪及四氫噻唑之環；其中各環係視需要經一至四個獨立選自胺基、氰基、甲基、鹵基及羥基之基團取代；

R^b 為甲基，或 R^b 及 R^2 與其所連接的原子共同形成選自氮雜環丁烷、吡咯啉、嗎啉、哌啉、哌嗪及四氫噻唑之環；其中各環係視需要經一至四個獨立選自胺基、氰基、甲基、鹵基及羥基之基團取代；或當 R^2 及偕位 R^{20} 均不為氫， R^b 為氫；

R^d 為氫或甲基，或 R^d 及 R^4 可與其所連接的原子共同形成選自氮雜環丁烷、吡咯啉、嗎啉、哌啉、哌嗪及四氫噻唑之環；其中各環係視需要經一至四個獨立選自胺基、氰基、甲基、鹵基、羥基及苯基之基團取代；

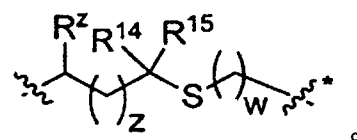
R^g 為氫或甲基或 R^g 及 R^7 可與其所連接的原子共同形成選自氮雜環丁烷、吡咯啉、嗎啉、哌啉、哌嗪及四氫噻唑之環；其中各環係視需要經一至四個獨立選自胺基、視需要經鹵基取代之苄基、苄氧基、氰基、環己基、甲基、鹵基、羥基、視需要經甲氧基取代之異喹啉基氧基、視需要經鹵基取代之喹啉基氧基及四唑基之基團取代；且其中該吡咯啉及哌啉環係視需要與環己基、苯基或吡啶基稠合；及

R^1 為甲基，或 R^1 及 R^{12} 與其所連接的原子共同形成選自氮雜環丁烷及吡咯啉之環，其中各環係視需要經一至四個獨立選自胺基、氰基、甲基、鹵基及羥基之基團取代；

其限制條件為式(I)之化合物在具有四個不為氫之取代基且不為 α -甲基取代環之環之骨架上含有至少一個碳。

在本發明第一態樣之第一實施例中提供一種技術方案1之化合物s

或其醫藥上可接受之鹽，其中A為



在第二實施例中， z 及 w 各為1； R^{14} 及 R^{15} 為氫；及 R^z 為 $-C(O)NHR^{16}$ ；其中 R^{16} 為 $-CHR^{17}C(O)NH_2$ 。在第三實施例中， R^1 為視需要經羥基取代之苄基； R^2 為甲基或與偕位 R^{20} 共同形成環丙基環； R^8 為各視需要經 $-CH_2CO_2H$ 取代之 $-(CH_2)$ 吡啶基； R^{10} 係選自 $-(CH_2)$ 吡啶基及 $-(CH_2)$ 苯并噻吩基； R^{11} 為丁基； R^{12} 為丁基； R^a 為氫； R^e 為氫； R^j 為甲基； R^k 為甲基；及 R^l 為氫。

在另一實施例中，本發明提供一種增強、刺激且/或增加有此需要的個體之免疫反應之方法，該方法包括向該個體投與治療上有效量之式(I)之化合物或其治療上可接受之鹽。在另一實施例中，該方法進一步包括在式(I)之化合物或其治療上可接受之鹽之前、之後或同時投與另一藥劑。在另一實施例中，該另一藥劑為抗微生物劑、抗病毒劑、細胞毒性劑及/或免疫反應調節劑。在另一實施例中，該另一藥劑為HDAC抑制劑。在另一實施例中，該另一藥劑為TLR7及/或TLR8促效劑。

在另一實施例中，本發明提供一種抑制有此需要的個體之癌細胞生長、增殖或轉移之方法，該方法包括向該個體投與治療上有效量之式(I)之化合物或其治療上可接受之鹽。應明瞭該抑制作用可係直接或間接的。在另一實施例中，該癌症係選自黑色素瘤、腎細胞癌、鱗狀非小細胞肺癌(NSCLC)、非鱗狀NSCLC、結腸直腸癌、去勢抗性前列腺癌、卵巢癌、胃癌、肝細胞癌、胰臟癌、頭部及頸部鱗狀細胞癌、食道癌、胃腸道癌及乳癌及血液惡性疾病。

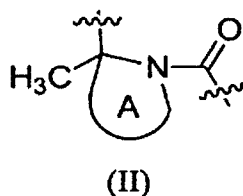
在另一實施例中，本發明提供一種治療有此需要的個體之傳染

性疾病之方法，該方法包括向該個體投與治療上有效量之式(I)之化合物或其治療上可接受之鹽。在另一實施例中，該傳染性疾病係由病毒引起。在另一實施例中，該病毒係選自HIV、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、疱疹病毒及流感病毒。

在另一實施例中，本發明提供一種治療有此需要的個體之敗血性休克之方法，該方法包括向該個體投與治療上有效量之一或多種本文中所述之大環肽。

在另一實施例中，本發明提供一種阻斷個體之PD-L1與PD-1及/或CD80相互作用之方法，該方法包括向該個體投與治療上有效量之至少一種本文中所述之大環肽。

在R側鏈為經甲基取代之環的一部分之式(I)之化合物中，應明瞭該甲基可在環中任何可取代碳原子(包括為大環母結構的一部分之碳)上。在本發明之化合物中，在具有四個不為氫之取代基且不為式(II)之 α -甲基取代環之環骨架上存在至少一個碳



其中A為技術方案中所述之環且其中 指示與大環結構其餘部分的連接點。

在式(I)之化合物中，較佳的R¹側鏈為：苯丙胺酸、酪胺酸、3-噻吩-2-基、4-甲基苯基丙胺酸、4-氯苯基丙胺酸、3-甲氧基苯基丙胺酸、異色胺酸、3-甲基苯基丙胺酸、1-萘基丙胺酸、3,4-二氟苯基丙胺酸、4-氟苯基丙胺酸、3,4-二甲氧基苯基丙胺酸、3,4-二氯苯基丙胺酸、4-二氟甲基苯基丙胺酸、2-甲基苯基丙胺酸、2-萘基丙胺酸、色胺酸、4-吡啶基、4-溴苯基丙胺酸、3-吡啶基、4-三氟甲基苯基丙

胺酸、4-羧基苯基丙胺酸、4-甲氧基苯基丙胺酸、聯苯基丙胺酸及3-氯苯基丙胺酸；及2,4-二胺基丁烷。

在 R^2 不為環之一部分的式(I)之化合物中，較佳的 R^2 側鏈為：丙胺酸、絲胺酸及甘胺酸。

在式(I)之化合物中，較佳的 R^3 側鏈為：天冬醯胺、天冬胺酸、麩胺酸、麩胺醯胺、絲胺酸、鳥胺酸、離胺酸、組胺酸、蘇胺酸、白胺酸、丙胺酸、2,3-二胺基丙烷及2,4-二胺基丁烷。

在 R^4 不為環之一部分的式(I)之化合物中，較佳的 R^4 側鏈為：纈胺酸、丙胺酸、異白胺酸及甘胺酸。

在式(I)之化合物中，較佳的 R^5 側鏈為：胺基甲烷、組胺酸、天冬醯胺、2,3-二胺基丙烷、絲胺酸、甘胺酸、2,4-二胺基丁烷、蘇胺酸、丙胺酸、離胺酸、天冬胺酸、丙胺酸及3-噻唑基丙胺酸。

在式(I)之化合物中，較佳的 R^6 側鏈為：白胺酸、天冬胺酸、天冬醯胺、麩胺酸、麩胺醯胺、絲胺酸、離胺酸、3-環己烷、蘇胺酸、鳥胺酸、2,4-二胺基丁烷、丙胺酸、精胺酸及鳥胺酸(COCH_3)。

在 R^7 不為環之一部分的式(I)之化合物中，較佳的 R^7 側鏈為：甘胺酸、2,4-二胺基丁烷、絲胺酸、離胺酸、精胺酸、鳥胺酸、組胺酸、天冬醯胺、麩胺醯胺、丙胺酸及2,4-二胺基丁烷(C(O) 環丁烷)。

在式(I)之化合物中，較佳的 R^8 側鏈為色胺酸及1,2-苯并異噻唑啉基丙胺酸。

在式(I)之化合物中，較佳的 R^9 側鏈為：絲胺酸、組胺酸、離胺酸、鳥胺酸、2,4-二丁基胺、蘇胺酸、離胺酸、甘胺酸、麩胺酸、纈胺酸、2,3-二胺基丙烷、精胺酸、天冬胺酸及酪胺酸。

在式(I)之化合物中，較佳的 R^{10} 側鏈為：視需要經取代之色胺酸、苯并異噻唑基苯丙胺酸、1-萘基丙胺酸及甲硫胺酸。

在式(I)之化合物中，較佳的 R^{11} 側鏈為：正白胺酸、白胺酸、天冬醯胺、苯丙胺酸、甲硫胺酸、乙氧基甲烷、丙胺酸、色胺酸、異白胺酸、苯基丙烷、麩胺酸、己烷及庚烷。

在 R^{12} 不為環之一部分的式(I)之化合物中，較佳的 R^{12} 側鏈為：正白胺酸、丙胺酸、乙氧基甲烷、甲硫胺酸、絲胺酸、苯丙胺酸、甲氧基乙烷、白胺酸、色胺酸、異白胺酸、麩胺酸、己烷、庚烷及甘胺酸。

在式(I)之化合物中，較佳的 R^{13} 側鏈為：精胺酸、鳥胺酸、丙胺酸、2,4-二胺基丁烷、2,3-二胺基丙烷、白胺酸、天冬胺酸、麩胺酸、絲胺酸、離胺酸、蘇胺酸、環丙基甲烷、甘胺酸、纈胺酸、異白胺酸、組胺酸及2-胺基丁烷。

根據本發明，吾人已發現特異性結合至PD-L1且能夠抑制PD-L1與PD-1及CD80相互作用之肽。此等大環肽展現活體外免疫調節療效，因此使得該等大環肽成為用於治療各種疾病(包括癌症及傳染性疾病)之治療性候選者。

術語「特異性結合」或「特異地結合」係指蛋白質及結合性分子諸如化合物或配體間之相互作用。該相互作用取決於蛋白質之由結合性分子識別之特定結構(亦即，酶結合位點、抗原決定子或抗原決定基)之存在。例如，若化合物具有對蛋白質結合位點「A」之特異結合性，則該化合物存在於包含含有結合位點A之蛋白質之反應中，及特異結合至蛋白質結合位點A之經標記肽將減少結合至蛋白質之經標記肽的量。相反地，化合物與蛋白質之非特異性結合不導致經標記肽自蛋白質發生濃度依賴性置換。

本發明意欲包括本發明化合物中出現的原子之所有同位素。同位素包括彼等具有相同原子數但具有不同質量數之原子。作為一般實例且無限制地，氫之同位素包括氕及氘。碳之同位素包括 ^{13}C 及 ^{14}C 。s

通常，可藉由熟習此項技術者已知的習知技術或藉由與彼等本文所述者類似的方法使用適當同位素標記之試劑代替否則使用的非標記試劑來製備同位素標記之本發明化合物。此等化合物可具有多種潛在用途，例如，用作測定生物活性中之標準品及試劑。就穩定同位素而言，此等化合物可具有有利地調節生物學、藥理學或藥物動力學性質之潛力。

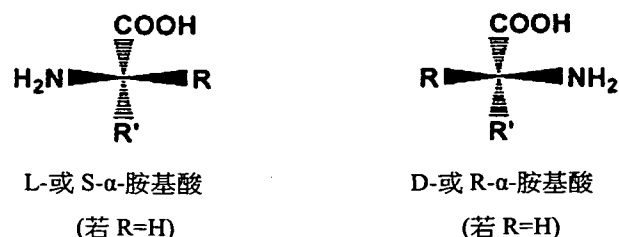
本文中所述標的的另一態樣為一種所揭示肽用作放射性標記配體用於開發配體結合分析法或用於監測活體內吸收、代謝、分佈、受體結合或佔有或化合物定位之用途。例如，可使用放射性同位素 ^{125}I 製備本文中所述的大環肽及所得的放射性標記肽可用於開發結合分析法或用於代謝研究。或者且就相同目的而言，本文中所述的大環肽可藉由使用熟習此項技術者已知的方法催化氙化轉化為放射標記形式。

本發明之大環肽亦可藉由使用熟習此項技術者已知的方法添加放射性示蹤物用作PET造影劑。

較佳的肽包含至少一種本文所提供的大環肽及此等肽可包含於醫藥組合物及組合中。

除非在特定情況中另作限制，否則本文中所提供的定義無限制性地適用於如本說明書全文所使用的術語。

熟習胺基酸及肽化學技術者知曉胺基酸包括由一般結構式表示之化合物：



其中R及R'係如本文中所論述。

除非另有指示，否則如本文中單獨地或作為另一基團的一部分使用，術語「胺基酸」包括(但不限於)連接至相同碳(稱之為「 α 」碳)之胺基及羧基，其中R及/或R'可為天然或非天然側鏈，包括氫。在「 α 」碳之絕對「S」構形通常稱為「L」或「自然」構形。在「R」及「R'」(主要)取代基同時為氫之情況中，胺基酸為甘胺酸但不具對掌性。

如本文中所使用，術語「天然胺基酸側鏈」及「天然生成之胺基酸側鏈」係指任何的通常呈S-構形(亦即，L-胺基酸)之天然生成之胺基酸(亦即，丙胺酸、精胺酸、天冬醯胺、天冬胺酸、半胱胺酸、麩胺醯胺、麩胺酸、甘胺酸、組胺酸、異白胺酸、白胺酸、離胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、脯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、色胺酸、酪胺酸及纈胺酸)之側鏈。

如本文中所使用，術語「非天然胺基酸側鏈」及「非天然生成之胺基酸側鏈」係指任何的通常呈R-構形(亦即，D-胺基酸)之天然生成之胺基酸之側鏈或係指選自以下之除呈R-或S-構形(亦即，分別為D-或L-胺基酸)之天然生成之胺基酸側鏈外之基團：

C₂-C₇烯基、C₁-C₃烷氧基C₁-C₃烷基、C₁-C₆烷氧基羰基C₁-C₃烷基、C₁-C₇烷基、C₁-C₃烷基硫基C₁-C₃烷基、醯胺基C₁-C₃烷基、胺基C₁-C₃烷基、氮雜吡啶基C₁-C₃烷基、苯并噻唑基C₁-C₃烷基、苯并噻吩基C₁-C₃烷基、苄氧基C₁-C₃烷基、羧基C₁-C₃烷基、C₃-C₁₄環烷基C₁-C₃烷基、聯苯基甲基、呋喃基C₁-C₃烷基、咪唑基C₁-C₃烷基、蔡基C₁-C₃烷基、吡啶基C₁-C₃烷基、噻唑基C₁-C₃烷基、噻吩基C₁-C₃烷基；

聯苯基C₁-C₃烷基，其中該聯苯基係視需要經甲基取代；

視需要經一個、兩個、三個、四個或五個獨立選自C₁-C₄烷氧基、C₁-C₄烷基、C₁-C₃烷基磺醯基胺基、醯胺基、胺基、胺基C₁-C₃烷基、胺基磺醯基、羧基、氰基、鹵基、鹵代C₁-C₃烷基、羥基、-s

NC(NH₂)₂、硝基及-OP(O)(OH)₂之基團取代之雜環基；

吡啶基C₁-C₃烷基，其中該吡啶基部分係視需要經一個選自C₁-C₃烷基、羧基C₁-C₃烷基、鹵基、羥基及苯基之基團取代，其中該苯基係視需要進一步經一個、兩個或三個獨立選自C₁-C₃烷氧基、C₁-C₃烷基及鹵基之基團取代；

NR^yR^{y'}(C₁-C₇烷基)，其中R^y及R^{y'}獨立地選自氫、C₂-C₄烯氧基羰基、C₁-C₃烷基、C₁-C₃烷基羰基、C₃-C₁₄環烷基羰基、呋喃基羰基及苯基羰基。當烷基連接子含有多於一個碳時，另一NR^yR^{y'}基可在鏈上。

NR^qR^t羰基C₁-C₃烷基，其中R^q及R^t獨立地選自氫、C₁-C₃烷基及三苯基甲基；

視需要經一個、兩個、三個、四個或五個獨立選自C₁-C₄烷氧基、C₁-C₄烷基、C₁-C₃烷基磺醯基胺基、醯胺基、胺基、胺基C₁-C₃烷基、胺基磺醯基、羧基、氰基、鹵基、鹵代C₁-C₃烷基、羥基、-NC(NH₂)₂、硝基及-OP(O)(OH)₂之基團取代之苯基；

NR^{a'}R^{b'}(C₁-C₇烷基)，其中R^{a'}及R^{b'}獨立地選自氫、C₂-C₄烯基氧基羰基、C₁-C₃烷基、C₁-C₃烷基羰基、C₃-C₆環烷基羰基、呋喃基羰基及苯基羰基。當烷基連接子含有多於一個碳時，另一NR^{a'}R^{b'}基可在鏈上。

NR^{c'}R^{d'}羰基C₁-C₃烷基，其中R^{c'}及R^{d'}獨立地選自氫、C₁-C₃烷基及三苯基甲基；

苯基C₁-C₃烷基，其中該苯基部分係視需要經一個、兩個、三個、四個或五個獨立選自C₁-C₄烷氧基、C₁-C₄烷基、C₁-C₃烷基磺醯基胺基、醯胺基、胺基、胺基C₁-C₃烷基、胺基磺醯基、羧基、氰基、鹵基、鹵代C₁-C₃烷基、羥基、-NC(NH₂)₂、硝基及-OP(O)(OH)₂之基團取代；及

苯氧基C₁-C₃烷基，其中該苯基係視需要經C₁-C₃烷基取代。

如本文中所使用，術語「C₂-C₄烯基」係指含有至少一個碳-碳雙鍵之兩個至四個碳原子之直鏈或分支鏈基團。

如本文中所使用，術語「C₂-C₇烯基」係指含有至少一個碳-碳雙鍵之兩個至七個碳原子之直鏈或分支鏈基團。

如本文中所使用，術語「C₂-C₄烯氧基」係指經氧原子連接至母分子部分之C₂-C₄烯基。

如本文中所使用，術語「C₁-C₃烷氧基」係指經氧原子連接至母分子部分之C₁-C₃烷基。

如本文中所使用，術語「C₁-C₄烷氧基」係指經氧原子連接至母分子部分之C₁-C₄烷基。

如本文中所使用，術語「C₁-C₆烷氧基」係指經氧原子連接至母分子部分之C₁-C₆烷基。

如本文中所使用，術語「C₁-C₃烷氧基C₁-C₃烷基」係指經C₁-C₃烷基連接至母分子部分之C₁-C₃烷氧基。

如本文中所使用，術語「C₁-C₆烷氧基羰基」係指經羰基連接至母分子部分之C₁-C₆烷氧基。

如本文中所使用，術語「C₁-C₆烷氧基羰基C₁-C₃烷基」係指經C₁-C₃烷基連接至母分子部分之C₁-C₆烷氧基羰基。

如本文中所使用，術語「C₁-C₃烷基」係指衍生自含有一至三個碳原子之直鏈或分支鏈飽和烴之基團。

如本文中所使用，術語「C₁-C₄烷基」係指衍生自含有一至四個碳原子之直鏈或分支鏈飽和烴之基團。

如本文中所使用，術語「C₁-C₆烷基」係指衍生自含有一至六個碳原子之直鏈或分支鏈飽和烴之基團。

如本文中所使用，術語「C₁-C₃烷基羰基」係指經羰基連接至母⁵

分子部分之C₁-C₃烷基。

如本文中所使用，術語「C₁-C₃烷基硫基」係指經硫原子連接至母分子部分之C₁-C₃烷基。

如本文中所使用，術語「C₁-C₃烷基硫基C₁-C₃烷基」係指經C₁-C₃烷基連接至母分子部分之C₁-C₃烷基硫基。

如本文中所使用，術語「C₁-C₃烷基磺醯基」係指經磺醯基連接至母分子部分之C₁-C₃烷基。

如本文中所使用，術語「C₁-C₃烷基磺醯基胺基」係指經胺基連接至母分子部分之C₁-C₃烷基磺醯基。

如本文中所使用，術語「醯胺基」係指-C(O)NH₂。

如本文中所使用，術語「醯胺基C₁-C₃烷基」係指經C₁-C₃烷基連接至母分子部分之醯胺基。

如本文中所使用，術語「胺基」係指-NH₂。

如本文中所使用，術語「胺基C₁-C₃烷基」係指經C₁-C₃烷基連接至母分子部分之胺基。

如本文中所使用，術語「胺基磺醯基」係指經磺醯基連接至母分子部分之胺基。

如本文中所使用，術語「氮雜吡啶基C₁-C₃烷基」係指經C₁-C₃烷基連接至母分子之氮雜吡啶基。氮雜吡啶基可經該基團中之任何可取代原子連接至烷基部分。

如本文中所使用，術語「苯并噻唑基C₁-C₃烷基」係指經C₁-C₃烷基連接至母分子之苯并噻唑基。苯并噻唑基可經該基團中任何可取代原子連接至烷基部分。

如本文中所使用，術語「苯并噻吩基C₁-C₃烷基」係指經C₁-C₃烷基連接至母分子之苯并噻吩基。苯并噻吩基可經該基團中之任何可取代原子連接至烷基部分。

如本文中所使用，術語「苺氧基」係指經氧原子連接至母分子部分之苺基。

如本文中所使用，術語「苺氧基C₁-C₃烷基」係指經C₁-C₃烷基連接至母分子部分之苺氧基。

如本文中所使用，術語「聯苺基C₁-C₃烷基」係指經C₁-C₃烷基連接至母分子部分之聯苺基。聯苺基可經該基團中之任何可取代原子連接至烷基部分。

如本文中所使用，術語「羰基」係指-C(O)-。

如本文中所使用，術語「羧基」係指-CO₂H。

如本文中所使用，術語「羧基C₁-C₃烷基」係指經C₁-C₃烷基連接至母分子部分之羧基。

如本文中所使用，術語「氰基」係指-CN。

如本文中所使用，術語「C₃-C₁₄環烷基」係指具有三個至十四個碳原子及零個雜原子之飽和單環狀、雙環狀或三環狀烴環體系。雙環狀及三環狀環可係稠合、螺環狀或橋聯。環烷基之代表性實例包括(但不限於)環丙基、環戊基、雙環[3.1.1]庚基及金剛烷基。

如本文中所使用，術語「C₃-C₁₄環烷基C₁-C₃烷基」係指經C₁-C₃烷基連接至母分子部分之C₃-C₁₄環烷基。

如本文中所使用，術語「C₃-C₁₄環烷基羰基」係指經羰基連接至母分子部分之C₃-C₁₄環烷基。

如本文中所使用，術語「呋喃基C₁-C₃烷基」係指經C₁-C₃烷基連接至母分子部分之呋喃基。呋喃基可經該基團中任何可取代原子連接至烷基部分。

如本文中所使用，術語「呋喃基羰基」係指經羰基連接至母分子部分之呋喃基。

如本文中所使用，術語「鹵基」及「鹵素」係指F、Cl、Br或I。 5

如本文中所使用，術語「鹵代C₁-C₃烷基」係指經一個、兩個或三個鹵原子取代之C₁-C₃烷基。

如本文中所使用，術語「鹵代甲基」係指經一個、兩個或三個鹵原子取代之甲基。

如本文中所使用，術語「雜環基」係指含有一個、兩個或三個獨立選自氮、氧及硫之雜原子之五-、六-或七員環。五員環具有零個至兩個雙鍵及六-及七員環具有零個至三個雙鍵。術語「雜環基」亦包括其中雜環基環稠合至四-至六員芳族或非芳族碳環狀環或另一單環狀雜環基的雙環狀基團。本發明之雜環基係經該基團中之碳原子連接至母分子部分。雜環基之實例包括(但不限於)苯并噻吩基、呋喃基、咪唑基、吡啶基、吡咯基、異噻唑基、異噁唑基、嗎啉基、噁唑基、哌嗪基、哌啶基、吡嗪基、吡啶基、吡咯啶基、吡咯并吡啶基、吡咯基、噻唑基、噻吩基及硫代嗎啉基。

如本文中所使用，術語「羥基」係指-OH。

如本文中所使用，術語「咪唑基C₁-C₃烷基」係指經C₁-C₃烷基連接至母分子部分之咪唑基。咪唑基可經該基團中任何可取代基團連接至烷基部分。

如本文中所使用，術語「吡啶基C₁-C₃烷基」係指經C₁-C₃烷基連接至母分子部分之吡啶基。吡啶基可經該基團中之任何可取代原子連接至烷基部分。

如本文中所使用，術語「萘基C₁-C₃烷基」係指經C₁-C₃烷基連接至母分子部分之萘基。萘基可經該基團中之任何可取代原子連接至烷基部分。

如本文中所使用，術語「硝基」係指-NO₂。

如本文中所使用，術語「NR^{a'}R^{b'}」係指兩個經氮原子連接至母分子部分之基團R^{a'}及R^{b'}。R^{a'}及R^{b'}獨立地選自氫、C₂-C₄烯基氧基羰基、

C₁-C₃烷基羰基、C₃-C₆環烷基羰基、呋喃基羰基及苯基羰基。

如本文中所使用，術語「NR^{a'}R^{b'}(C₁-C₃)烷基」係指經C₁-C₃烷基連接至母分子部分之NR^{a'}R^{b'}基。

如本文中所使用，術語「NR^{c'}R^{d'}」係指兩個經氮原子連接至母分子部分之基團R^{c'}及R^{d'}。R^{c'}及R^{d'}獨立地選自氫、C₁-C₃烷基及三苯基甲基。

如本文中所使用，術語「NR^{c'}R^{d'}羰基」係指經羰基連接至母分子部分之NR^{c'}R^{d'}基。

如本文中所使用，術語「NR^{c'}R^{d'}羰基C₁-C₃烷基」係指經C₁-C₃烷基連接至母分子部分之NR^{c'}R^{d'}羰基。

如本文中所使用，術語「苯氧基」係指經氧原子連接至母分子部分之苯基。

如本文中所使用，術語「苯氧基C₁-C₃烷基」係指經C₁-C₃烷基連接至母分子部分之苯氧基。

如本文中所使用，術語「苯基C₁-C₃烷基」係指經C₁-C₃烷基連接至母分子部分之苯基。

如本文中所使用，術語「苯基羰基」係指經羰基連接至母分子部分之苯基。

如本文中所使用，術語「吡啶基C₁-C₃烷基」係指經C₁-C₃烷基連接至母分子部分之吡啶基。吡啶基可經該基團中之任何可取代原子連接至烷基部分。

如本文中所使用，術語「硫基」係指-S-。

如本文中所使用，術語「磺醯基」係指-SO₂-。

如本文中所使用，術語「噻唑基C₁-C₃烷基」係指經C₁-C₃烷基連接至母分子部分之噻唑基。噻唑基可經該基團中之任何可取代原子連接至烷基部分。

如本文中所使用，術語「噻吩基C₁-C₃烷基」係指經C₁-C₃烷基連接至母分子部分之噻吩基。噻吩基可經該基團中之任何可取代原子連接至烷基部分。

如本文中所使用，術語「治療」係指：(i)預防可能易患疾病、病症及/或病狀但尚未診斷為患有該疾病、病症及/或病狀之病患中出現之該疾病、病症或病狀；(ii)抑制疾病、病症或病狀，亦即，阻止其發展；及(iii)緩解疾病、病症或病狀，亦即，引起疾病、病症及/或病狀及/或與該疾病、病症及/或病狀相關聯之症狀消退。

可例如藉由諸如均相時間解析熒光(HTRF)、表面電漿共振(SPR)、等位滴定量熱法(ITC)、核磁共振光譜法(NMR)及類似之方法測量大環肽與PD-L1之結合性。另外，可如本文在細胞結合分析中所述測量大環肽與表現於細胞表面上之PD-L1之結合性。

投與本文所述之治療劑包括(但不限於)投與治療上有效量之治療劑。如本文中所使用，術語「治療上有效量」係指(但不限於)治療或預防可藉由投與本文所述之PD-1/PD-L1結合抑制劑之組合物治療的病狀之治療劑的量。該量為足以顯示可檢測治療或預防或改善效果的量。該效果可包括(例如但不限於)治療或預防本文中所列的病狀。針對個體之精確有效量將隨著個體大小及健康狀態、所治療病狀之性質及程度、主治醫生之建議及針對投藥所選擇之治療劑或治療劑之組合而改變。因此，提前指定精確有效量是沒有用的。

在另一態樣中，本發明係關於使用本發明之大環肽抑制個體中腫瘤細胞生長之方法。如本文中所證實，本發明之大環肽能夠結合至PD-L1，中斷PD-L1與PD-1間之相互作用，與已知阻斷與PD-1相互作用之抗-PD-1單株抗體競爭結合PD-L1，增強CMV特異性T細胞IFN γ 分泌，及增強HIV特異性T細胞IFN γ 分泌。結果，本發明之大環肽可用於改良免疫反應，治療疾病(諸如癌症或傳染性疾病)，刺激保護性自

體免疫反應或刺激抗原特異性免疫反應(例如，藉由共同投與PD-L1阻斷肽與受關注抗原)。

為可更輕易地明瞭本發明，首先定義特定術語。其他定義述於詳細說明中。

術語「程式化死亡配體1」、「程式化細胞死亡配體1」、「蛋白質PD-L1」、「PD-L1」、「PDL1」、「PDCDL1」、「hPD-L1」、「hPD-LI」、「CD274」及「B7-H1」可互換使用，且包括人類PD-L1之變體、同功異型物、物種同源物及具有至少一個與PD-L1共同的抗原決定基之類似物。完整PD-L1序列可以GENBANK®寄存編號NP_054862找到。

術語「程式化死亡1」、「程式化細胞死亡1」、「蛋白質PD-1」、「PD-1」、「PD1」、「PDCD1」、「hPD-1」及「hPD-I」可互換使用，且包括人類PD-1之變體、同功異型物、物種同源物、及具有至少一個與PD-1共同的抗原決定基之類似物。完整PD-1序列可以GENBANK®寄存編號U64863找到。

術語「與細胞毒性T淋巴細胞相關聯之抗原-4」、「CTLA-4」、「CTLA4」、「CTLA-4抗原」及「CD152」(參見，例如，Murata, *Am. J. Pathol.*, 155:453-460 (1999))可互換使用，且包括人類CTLA-4之變體、同功異型物、物種同源物、及具有至少一個與CTLA-4共同的抗原決定基之類似物(參見，例如，Balzano, *Int. J. Cancer Suppl.*, 7:28-32 (1992))。完整CTLA-4核酸序列可以GENBANK®寄存編號L15006找到。

術語「免疫反應」係指例如淋巴細胞、抗原呈現細胞、吞噬細胞、粒細胞及由上述細胞或肝臟產生之可溶性大分子(包括大環肽、細胞介素及補體)會導致選擇性損傷、破壞或自人體消除侵入病原體、經病原體感染之細胞或組織、癌細胞或在自體免疫性或病理性發炎情況下之正常人類細胞或組織之作用。

如本文中所使用，「不良事件」(AE)為與採用醫學治療相關聯之任何不利且一般非期望、甚至不想要出現之徵兆(包括異常性實驗室發現)、症狀或疾病。例如，不良事件可與回應於治療之免疫系統之活化或免疫系統細胞(例如，T細胞)增殖相關聯。醫學治療可具有一或多種相關聯之AE且各AE可具有相同或不同的嚴重度。提及能夠「改變不良事件」之方法意指降低一或多種與採用不同治療療程相關聯之AE之發病率及/或嚴重度之治療療程。

如本文中所使用，「過度增生性疾病」係指細胞生長增加超過正常水平之病狀。例如，過度增生性疾病或病症包括惡性疾病(例如，食道癌、結腸癌、膽囊癌)及非惡性疾病(例如，動脈粥樣硬化、良性增生及良性前列腺過度生長)。

如本文中所使用，「約」或「基本上由.....組成」意指在如由熟習此項技術者所測定之特定值之可接受誤差範圍內，該誤差範圍將部分地取決於該值係如何測得或確定，亦即，測量系統之限制。例如，「約」或「基本上由.....組成」可意指在按照相關技術實務之一個或多於一個標準偏差內。或者，「約」或「基本上由.....組成」可意指至多20%之範圍。另外，尤其相對於生物系統或過程而言，該等術語可意指值之至多一個數量級或至多5倍。當申請案及申請專利範圍中提供特定值時，除非有相反規定，否則「約」或「基本上由.....組成」之含義應假設為在該特定值之可接受誤差範圍內。

如本文所述，除非另外說明，否則任何濃度範圍、百分率範圍、比率範圍或整數範圍應理解為包括所述範圍中任何整數及若適宜其分數(諸如整數之十分之一及百分之一)之值。

競爭分析法

本發明亦關於能夠競爭參照抗-PD-L1抗體(MDX-1105)之結合至少約20%、至少約30%、至少約40%、至少約50%、至少約60%、至少

約70%、至少約80%、至少約90%及至少約100%的大環肽。此等大環肽可與一或多種本文中所揭示之大環肽共有結構同源性，本文中所揭示之巨環大環肽包括突變體、保守取代、功能性取代及缺失形式，條件係其特異性結合PD-L1。例如，若大環肽實質上結合至PD-L1之與參照抗-PD-L1抗體相同之區域，則該大環肽應結合至PD-L1之至少與抗-PD-L1單株抗體所結合的PD-L1抗原決定基重疊之抗原決定基。重疊區域可在一個胺基酸殘基至數百個胺基酸殘基範圍內。在競爭分析法中，大環肽則應競爭且/或阻斷抗-PD-L1單株抗體結合至PD-L1及由此減少抗-PD-L1單株抗體與PD-L1之結合，較佳減少至少約50%。

相關技術中已知出於競爭分析目的可用作參照抗體之抗-PD-L1抗體。例如，可使用以下代表性抗-PD-L1抗體：MDX-1105(BMS)；L01X-C(Serono)、L1X3(Serono)、MSB-0010718C(Serono)及PD-L1 Probody(CytomX)、及揭示於共同擁有之WO 2007/005874中之PD-L1抗體。

相關技術中已知出於競爭分析目的可用作參照抗體之抗-PD-1抗體。例如，可使用以下代表性抗-PD-1抗體：納武單抗(nivolumab)(BMS)；各揭示於共同擁有之美國專利第8,008,449號(BMS)中之17D8、2D3、4H1、4A11、7D3及5F4、MK-3475(Merck, 揭示於美國專利第8,168,757號中)及揭示於美國專利第7,488,802號中之抗體。

醫藥組合物

在另一態樣中，本發明提供一種含有與醫藥上可揭示之載劑共同調配之一種或組合之本發明大環肽的組合物，例如，醫藥組合物。此等組合物可包括一種或組合(例如，兩種或更多種不同)之本發明大環肽、或免疫偶聯物或雙特異性分子。例如，本發明醫藥組合物可包括結合至靶抗原上之不同抗原決定基或具有互補活性之大環肽(或免⁵

疫偶聯物或雙特異性分子)之組合。

本發明醫藥組合物亦可以組合療法(亦即，與其他藥劑組合)投與。例如，組合療法可包括大環肽與至少一種其他抗發炎藥或免疫抑制劑之組合。下文在關於本發明大環肽之用途的段落中更詳細地描述可用於組合療法中之治療劑之實例。

如本文中所使用，「醫藥上可接受之載劑」包括任何及所有的生理上相容之溶劑、分散介質、包衣、抗細菌劑及抗真菌劑、等滲劑及吸收延緩劑及類似。較佳地，載劑適用於靜脈內、肌肉內、皮下、非經腸、脊柱或表皮投與(例如，藉由注射或輸注)。根據投藥途徑，活性化合物(亦即，大環肽、免疫偶聯物或雙特異性分子)可以材料塗覆以保護化合物免遭酸及其他的可能使化合物失活之自然條件作用。

本發明醫藥化合物可包含一或多種醫藥上可接受之鹽。「醫藥上可接受之鹽」或「治療上可接受之鹽」係指保留母體化合物之所期望的生物活性但不賦予任何非所欲毒物學效應之鹽(參見，例如，Berge, S.M.等人，*J. Pharm.Sci.*, 66:1-19 (1977))。此等鹽之實例包括酸加成鹽及鹼加成鹽。酸加成鹽包括彼等衍生自無毒無機酸諸如鹽酸、硝酸、磷酸、硫酸、氫溴酸、氫碘酸、亞磷酸等以及衍生自無毒無機酸諸如脂族單-及二羧酸、經苯基取代之鏈烷酸、羥基鏈烷酸、芳族酸、脂族及芳族磺酸等之鹽。鹼加成鹽包括彼等衍生自鹼土金屬諸如鈉、鉀、鎂、鈣等以及衍生自無毒有機胺諸如N,N'-二苳基乙二胺、N-甲基葡糖胺、氯普魯卡因、膽鹼、二乙醇胺、乙二胺、普魯卡因等之鹽。

本發明醫藥組合物亦可包含醫藥上可接受之抗氧化劑。醫藥上可接受之抗氧化劑之實例包括：(1)水溶性抗氧化劑，諸如抗壞血酸、半胱胺酸鹽、硫酸氫鈉、偏亞硫酸氫鈉、亞硫酸鈉等；(2)油溶性抗氧化劑，諸如抗壞血酸棕櫚酸酯、丁基化羥基苯甲醚

(BHA)、丁基化羥基甲苯(BHT)、卵磷脂、沒食子酸丙酯、 α -生育酚等；及(3)金屬螯合劑，諸如檸檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨糖醇、酒石酸、磷酸等。

可用於本發明醫藥組合物中之適宜水性及非水性載劑之實例包括水、乙醇、多元醇(諸如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其適宜混合物、植物油(諸如橄欖油)及可注射之有機酯(諸如油酸乙酯)。可例如藉由使用諸如卵磷脂之包衣材料、若為分散液則藉由維持所需粒度、及藉由使用表面活性劑來維持適度流動性。

此等組合物亦可含有佐劑，諸如防腐劑、濕潤劑、乳化劑及分散劑。可同時藉由滅菌程序(同前述)及藉由包含多種抗細菌劑及抗真菌劑(例如，對羥基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸等)來防止微生物存在。亦可能期望該等組合物中包含等滲劑，諸如蔗糖、氯化鈉等。此外，可藉由包含延緩吸收之試劑諸如單硬脂酸鋁及明膠使得可注射醫藥形式之吸收時間延長。

醫藥上可接受之載劑包括無菌水溶液或分散液及用於無菌可注射溶液或分散液之臨時製備的無菌粉末。相關技術中已知此等介質及試劑於醫藥活性物質之用途。除了在任何習知介質或試劑與活性化合物不相容之範圍外，包括其在本發明醫藥組合物中之用途。組合物中亦可併入補充活性化合物。

治療性組合物通常必須無菌且在製造及儲藏條件下穩定。該組合物可調配為溶液、微乳液、脂質體或其他的適於高藥物濃度之有序結構。載劑可為包含(例如)水、乙醇、多元醇(例如，甘油、丙二醇及液體聚乙二醇等)及其適宜混合物之溶劑或分散液介質。可例如藉由使用諸如卵磷脂之包衣、若為分散液則藉由維持所需粒度、及藉由使用表面活性劑維持適度流動性。在許多情況中，組合物中將較佳包含等滲劑，例如糖、多元醇(諸如甘露醇、山梨醇)或氯化鈉。可藉由在

組合物中包含延緩吸收之試劑例如單硬脂酸鹽及明膠使得可注射組合物之吸收時間延長。

可藉由將所需量的活性化合物與按需要一種或組合之以上所例舉成分併入適宜溶劑中接著無菌微過濾來製備無菌可注射溶液。一般而言，藉由將活性化合物併入含有鹼性分散液介質及自上文所列舉之其等之所需要的其他成分之無菌媒劑中製備分散液。就用於製備無菌可注射溶液之無菌粉末而言，較佳的製備方法為真空乾燥及冷凍乾燥(凍乾)，其自經其先前無菌過濾溶液產生出活性成分加上任何其他所需成分之粉末。

可與載劑材料組合以產生出單一劑型之活性成分的量將取決於所治療的個體及特定投藥模式而變化。可與載劑材料組合以產生出單一劑型之活性成分的量將一般為產生出治療效應之組合物的量。一般而言，以與醫藥上可接受之載劑組合為100%計，該量將在約0.01%至約99%活性成分，較佳約0.1%至約70%，最佳約1%至約30%活性成分範圍內。

調整給藥方案以提供最佳所需反應(例如，治療反應)。例如，可投與單一團注劑，可隨時間投與若干分次劑量或可如治療情況之緊急狀態所指示按比例減少或增加劑量。尤其宜將非經腸式組合物調配呈單元劑型來方便投藥及劑量均勻性。如本文中所使用之單元劑型係指適用作針對待治療個體之單位劑型的物理上離散單元；各單元包含經計算以產生出所需治療效應的預定量的活性化合物以及所需醫藥載劑。依照及直接根據(a)活性化合物之獨特特徵及意欲達成之特定治療效應、及(b)複合此活性化合物用於治療個體敏感性之技術中固有的限制，來決定本發明之單元劑型之規格。

對於大環肽之投與，劑量在約0.0001至100 mg/kg，及更通常0.01至5 mg/kg宿主體重範圍內。例如，劑量可為0.3 mg/kg體重、1 mg/kg

體重、3 mg/kg體重、5 mg/kg體重或10 mg/kg體重或在1至10 mg/kg範圍內。一例示性治療療程需要每天一次、每天兩次、每週兩次、每週三次、每週一次、每兩週一次、每三週一次、每四週一次、每月一次、每3個月一次或每3至6個月一次投與。本發明大環肽之較佳給藥方案包括經靜脈內投與1 mg/kg體重或3 mg/kg體重，且採用一種以下給藥時間表提供該大環化合物：(i)每四週6次劑量，接著每三個月；(ii)每三週；(iii) 每三週3 mg/kg體重一次，接著1 mg/kg體重。

在一些方法中，同時投與兩種或更多種具有不同結合特異性之大環肽，於該情況中，所投與的各化合物的劑量落在指定的範圍內。通常在多種情況下投與該等化合物。單次劑量間的時間間隔可係例如每週、每月、每三個月或每年一次。如藉由測量病患中針對靶抗原之大環肽之血液水平所指示，時間間隔亦可係不規則的。在一些方法中，調整劑量以達成約1至1000 $\mu\text{g/ml}$ 及在一些方法中約25至300 $\mu\text{g/ml}$ 之血漿濃度。

或者，大環肽可呈持續釋放型調配物投與，於該情況中，需較不頻繁地投藥。投藥之劑量及頻率可取決於治療是預防性還是治療性而改變。在預防性應用中，於一段長的時間期內以相對不頻繁的時間間隔投與相對低的劑量。一些病患在其後半生繼續接受治療。在治療性應用中，有時需要相對短的時間間隔下相對高的劑量直到減慢或終止疾病之進展，且較佳直到病患顯示疾病症狀部分或完全地改善。此後，病患可投與預防性方案。

可改變本發明醫藥組合物中活性成分之實際劑量水平以便達成活性成分之可有效實現針對特定病患、組合物及投藥模式之所需治療反應而對病患無毒的量。所選劑量水平將取決於多種藥物動力學因素而改變，該等因素包括所使用的本發明特定組合物或其酯、鹽或醯胺之活性、投藥途徑、投藥時間、所使用的特定化合物之排泄率、治療⁵

的持續時間、其他的組合所使用的特定組合物使用之藥物、化合物及/或材料、所治療的病患之年齡、性別、體重、病狀、一般健康及以往的病史、及醫學技術中熟知的類似因素。

本發明大環肽之「治療上有效劑量」較佳導致疾病症狀嚴重度之降低、無疾病症狀期之頻率及持續時間之增加、或因疾病折磨所致之受損或殘疾之防止。例如，就治療腫瘤而言，「治療上有效劑量」較佳使得細胞生長或腫瘤生長相對於未治療個體抑制至少約20%，更佳至少約40%，甚至更佳至少約60%，及又更佳至少約80%。可在預測人類腫瘤效力或病毒效力之動物模型系統中評估化合物抑制腫瘤生長及/或HIV之能力。或者，可藉由熟練專業者已知的分析法檢驗化合物之抑制(該種活體外抑制作用)之能力來評估組合物之該種性質。治療上有效量之治療性化合物可減小腫瘤尺寸，減小病毒負載，或是改善個體症狀。熟習此項技術者將可基於此等因素諸如個體尺寸、個體症狀嚴重度及所選的特定組合物或投藥途徑來確定該等量。

在另一態樣中，本發明提供一種含有如本文中所述之大環肽及另一免疫調節劑之醫藥成分套組。該套組亦可進一步包括用於治療過度增生性疾病(諸如，如本文中所述之癌症)及/或抗病毒疾病之使用說明。

可使用相關技術中已知的多種方法中之一或多種方法經一或多種投藥途徑投與本發明組合物。如熟習此項技術者所瞭解，投藥途徑及/或模式將取決於所需結果而改變。本發明大環肽之較佳投藥途徑包括靜脈內、肌肉內、皮內、腹膜內、皮下、脊柱或其他非經腸投藥途徑(例如，藉由注射或輸注)。如本文中所使用，詞語「非經腸投與」意指除經腸及局部投與之外之投藥模式(通常藉由注射)，且包括(但不限於)靜脈內、肌肉內、動脈內、鞘內、囊內、眶內、心臟內、皮內、腹膜內、經氣管、皮下、表皮下、關節內、囊下、蛛網膜下、

脊柱內、硬膜外及胸骨內注射及輸注。

或者，可經由非注射途徑，諸如局部、表皮或黏膜投藥途徑，例如，經鼻內、經口、經陰道、經直腸、經舌下或經局部，來投與本發明大環肽。

可用將保護化合物以防快速釋放之載劑製備活性化合物，諸如控制釋放型調配物，包括植入物、經皮貼劑及微囊化遞送系統。可使用生物可降解、生物相容性聚合物，諸如乙烯乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、膠原蛋白、聚原酸酯及聚乳酸。用於製備此等調配物之許多方法獲得專利或通常為熟習此項技術者已知。參見，例如，Robinson, J.R. 編，*Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, Marcel Dekker, Inc., New York (1978)。

可用相關技術中已知的醫學裝置投與治療性組合物。例如，在一較佳實施例中，可用皮下無針注射裝置，諸如，揭示於美國專利第 5,399,163 號、第 5,383,851 號、第 5,312,335 號、第 5,064,413 號、第 4,941,880 號、第 4,790,824 號或第 4,596,556 號中之裝置投與本發明之治療性組合物。適用於本發明之熟知的植入物及模組之實例包括：美國專利第 4,487,603 號，其揭示一種用於以受控速率施配藥物之植入式微量注射泵；美國專利第 4,486,194 號，其揭示一種用於經由皮膚投與藥物之治療裝置；美國專利第 4,447,233 號，其揭示一種用於以精確輸注速率遞送藥物之藥物輸注泵；美國專利第 4,447,224 號，其揭示一種用於連續藥物遞送之可變流量植入式輸注設備；美國專利第 4,439,196 號，其揭示一種具有多腔區室之滲透藥物遞送系統；及美國專利第 4,475,196 號，其揭示一種滲透藥物遞送系統。此等專利係以引用的方式併入本文中。熟習此項技術者已知許多其他此等植入物、遞送系統及模組。

在某些實施例中，本發明大環肽可經調配以確保適當的活體內⁵

分佈。例如，血液-腦障壁(BBB)排斥許多高度親水性化合物。為確保本發明之治療性化合物跨越BBB(若需要)，其可調配呈(例如)脂質體。對於製造脂質體之方法，參見，例如，美國專利第4,522,811號、第5,374,548號及第5,399,331號。該等脂質體可包含一或多個選擇性地被運輸至特定細胞或器官中由此增強靶向藥物遞送之部分(參見，例如，Ranade, V.V., *J. Clin.Pharmacol.*, 29:685 (1989))。例示性靶向部分包括葉酸鹽或生物素(參見，例如，Low等人之美國專利第5,416,016 號) ； 甘 露 糖 苷 (Umezawa 等 人 ， *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 153:1038 (1988))；大環肽(Bloeman, P.G. 等人， *FEBS Lett.*, 357:140 (1995)；Owais, M. 等人， *Antimicrob.Agents Chemother.*, 39:180 (1995))；表面活性劑蛋白A受體(Briscoe等人， *Am. J. Physiol.*, 1233:134 (1995))；p120 (Schreier等人， *J. Biol.Chem.*, 269:9090 (1994))；亦參見Keinanen, K.等人， *FEBS Lett.*, 346:123 (1994)；Killion, J.J.等人， *Immunomethods* 4:273 (1994)。

本發明之用途及方法

本發明大環肽、組合物及方法具有許多活體外及活體內效用，其包括(例如)檢測PD-L1或藉由阻斷PD-L1增強免疫反應。例如，可將此等分子投與培養中之細胞(活體外或間接活體內)或投與人類個體(例如，活體內)以增強多種情況中之免疫。因此，在一個態樣中，本發明提供一種改良個體之免疫反應之方法，其包括向該個體投與本發明大環肽使得該個體中之免疫反應得以改良。較佳地，增強、刺激或上調該反應。在其他態樣，大環肽可具有抗食蟹獼猴、抗小鼠及/或抗土撥鼠結合及治療活性。

如本文中所使用，術語「個體」意欲包括人類及非人類動物。非人類動物包括所有脊椎動物，例如，哺乳動物及非哺乳動物，諸如

非人類的靈長類動物、羊、狗、貓、牛、馬、雞、土撥鼠、兩棲類動物及爬行類動物，然而，較佳為哺乳動物，諸如非人類的靈長類動物、羊、狗、貓、牛及馬。較佳之個體包括需要增強免疫反應之人類病患。該等方法尤其適於治療具有可藉由強化T細胞介導之免疫反應治療之病症之人類病患。在一特定實施例中，該等方法尤其適於治療活體內癌細胞。為達成抗原特異性增強免疫，大環肽可連同受關注抗原一起投與。當針對PD-L1之大環肽連同另一藥劑一起投與時，此兩者可以任一順序或同時投與。

本發明進一步提供檢測樣品中人類、土撥鼠、食蟹獼猴及/或小鼠PD-L1抗原之存在或測量人類、土撥鼠、食蟹獼猴及/或小鼠PD-L1抗原的量之方法，其包括使該樣品及對照樣品與特異性地結合至人類、土撥鼠、食蟹獼猴及/或小鼠PD-L1之參照大環肽在容許大環分子與人類、土撥鼠、食蟹獼猴及/或小鼠PD-L1間形成複合物之條件下接觸。接著檢測複合物之形成，其中樣品與對照樣品間之複合物形成差異指示樣品中存在人類、土撥鼠、食蟹獼猴及/或小鼠PD-L1抗原。

考慮到相較於CD28、ICOS及CTLA-4，本發明大環肽對PD-L1之特異結合性，本發明大環肽可用於特異性檢測細胞表面上之PD-L1表現及此外可用於藉由免疫親和純化法純化PD-L1。

癌症

藉由大環肽阻斷PD-1可增強病患之對癌細胞之免疫反應。PD-1之配體PD-L1並不表現於正常人類細胞中，但大量存於多種人類癌症中(Dong等人，*Nat. Med.*, 8:787-789 (2002))。PD-1與PD-L1間之相互作用導致腫瘤浸潤性淋巴細胞之減少、T-細胞受體介導之增殖之減少及由癌細胞引起之免疫逃避(Dong等人，*J. Mol.Med.*, 81:281-287 (2003)；Blank等人，*Cancer Immunol.Immunother.*, 54:307-314 (2005)；Konishi等人，*Clin.Cancer Res.*, 10:5094-5100 (2004))。免疫^S

抑制可藉由抑制PD-1與PD-L1之局部相互作用逆轉及當PD-1與PD-L2相互作用亦被阻斷時效應係累加的(Iwai等人, *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 99:12293-12297 (2002); Brown等人, *J. Immunol.*, 170:1257-1266 (2003))。雖然以往的研究已顯示可藉由抑制PD-1與PD-L1相互作用恢復T細胞增殖, 但尚未報導藉由阻斷PD-1/PD-L1相互作用對活體內癌症腫瘤生長之直接效應。在一個態樣中, 本發明係關於使用大環肽活體內治療個體使得癌性腫瘤之生長得以抑制。大環肽可單獨使用以抑制癌性腫瘤之生長。或者, 大環肽可結合其他免疫原性劑、標準癌症治療法或其他的如下文所述之大環肽使用。

因此, 在一個實施例中, 本發明提供一種抑制個體之腫瘤細胞生長之方法, 其包括向該個體投與治療上有效量之大環肽。

可使用本發明大環肽抑制生長的較佳癌症包括通常對免疫療法反應之癌症。用於治療之較佳癌症之非限制性實例包括黑色素瘤(例如, 轉移性惡性黑色素瘤)、腎細胞癌(例如, 透明細胞癌)、前列腺癌(例如, 激素難治性前列腺腺癌及去勢抗性前列腺癌)、乳癌、結腸直腸癌及肺癌(例如, 鱗狀及非鱗狀非小細胞肺癌)。另外, 本發明包括可使用本發明大環肽抑制生長的難治性或復發性惡性病。

可採用本發明方法治療的其他癌症之實例包括骨癌、胰臟癌、皮膚癌、頭部或頸部癌症、皮膚或眼內惡性黑色素瘤、子宮癌、卵巢癌、結腸癌、直腸癌、肛門部位之癌症、胃癌、睪丸癌、子宮癌、輸卵管癌、子宮內膜癌、子宮頸癌、陰道癌、外陰癌、霍奇金氏病(Hodgkin's Disease)、非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)、食道癌、小腸癌、內分泌系統癌、甲狀腺癌、副甲狀腺癌、腎上腺癌、軟組織肉瘤、尿道癌、陰莖癌、慢性或急性白血病(包括急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、急性淋巴母細胞性白血病、慢性淋巴細胞性白血病)、兒童實體腫瘤、淋巴細胞性淋巴瘤、膀胱癌、腎

臟或輸尿管癌、腎盂癌、中樞神經系統(CNS)贅瘤、原發性CNS淋巴瘤、腫瘤血管生成、脊椎軸腫瘤、腦幹膠質瘤、垂體腺瘤、卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、表皮樣癌、鱗狀細胞癌、T細胞淋巴瘤、環境引起之癌症(包括由石棉引起之癌症)及該等癌症之組合。本發明亦適用於治療轉移性癌症，特別是表現PD-L1之轉移性癌症(Iwai等人，*Int. Immunol.*, 17:133-144 (2005))。

視情況，針對PD-L1之大環肽可組合免疫原性劑，諸如癌細胞、經純化之腫瘤抗原(包括重組蛋白、肽及碳水化合物分子)、細胞及經編碼免疫刺激細胞介素之基因轉染之細胞(He等人，*J. Immunol.*, 173:4919-4928 (2004))。可使用的腫瘤疫苗之非限制性實例包括黑色素瘤抗原之肽，諸如gp100之肽、MAGE抗原、Trp-2、MART1及/或酪胺酸酶、或經轉染以表現細胞介素GM-CSF之腫瘤細胞(於下文中進一步論述)。

人類中，已顯示一些腫瘤為免疫原性，諸如黑色素瘤。預期藉由經PD-L1阻斷升高T細胞活化之臨限，吾人可期望活化宿主中之腫瘤反應。

PD-L1阻斷有可能係在組合免疫接種方案時最有效。已設計出針對腫瘤之疫苗接種之許多實驗策略(參見Rosenberg, S., *Development of Cancer Vaccines*, ASCO Educational Book Spring:60-62 (2000); Logothetis, C., *ASCO Educational Book Spring:300-302* (2000); Khayat, D., *ASCO Educational Book Spring:414-428* (2000); Foon, K., *ASCO Educational Book Spring:730-738* (2000); 亦參見Restifo, N.等人，*Cancer Vaccines*, 第61章，第3023-3043頁，在DeVita, V.等人編，*Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 第五版(1997)中)。其中一種此等策略中，使用自體性或同種異體腫瘤細胞製備疫苗。已顯示此等細胞疫苗在腫瘤細胞經轉導以表現GM-CSF時最有效。已顯示

GM-CSF為腫瘤疫苗接種之抗原呈現之強效活化劑(Dranoff等人, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 90:3539-3543 (1993))。

在各種腫瘤中探討基因表現及大規模基因表現模式之研究已產生出所謂的腫瘤特異性抗原之定義(Rosenberg, S.A., *Immunity*, 10:281-287 (1999))。在許多情況中，此等腫瘤特異性抗原為表現於腫瘤及產生腫瘤的細胞中之分化抗原，例如黑色素細胞抗原gp100、MAGE抗原及Trp-2。更重要的是，許多此等抗原可顯示為存於宿主中之腫瘤特異性T細胞之標靶。PD-L1阻斷可與表現於腫瘤中之重組蛋白質及/或肽集合聯合使用，以產生對此等蛋白質之免疫反應。此等蛋白質通常由免疫系統視為自體抗原且因此對其具耐受性。腫瘤抗原亦可包含蛋白質端粒酶，其為合成染色體之端粒酶所需要且表現於多於85%之人類癌症及僅有限數目之體細胞組織中(Kim, N等人, *Science*, 266:2011-2013 (1994))。(可藉由各種方法保護此等體細胞組織免遭免疫攻擊)。由於會改變蛋白質序列或在兩種非相關序列間產生融合蛋白(亦即，費城染色體(Philadelphia chromosome)中之bcr-abl)之體細胞突變、或來自B細胞腫瘤之獨特型，腫瘤抗原亦可為表現於癌細胞中之「新抗原」。

其他腫瘤疫苗可包括來自與人類癌症牽連之病毒(諸如人乳頭瘤病毒(HPV)、肝炎病毒(HBV及HCV)及卡波西氏疱疹肉類病毒(KHSV))之蛋白質。可結合PD-L1阻斷使用的腫瘤特異性抗原之另一形式為單離自腫瘤組織本身之經純化熱休克蛋白(HSP)。此等熱休克蛋白包含來自腫瘤細胞之蛋白質之片段及此等HSP遞送至抗原呈現細胞時可高度有效地引起腫瘤免疫(Suot, R.等人, *Science*, 269:1585-1588 (1995); Tamura, Y.等人, *Science*, 278:117-120 (1997))。

樹突細胞(DC)為可用於準備抗原特異性反應之強效抗原呈現細胞。DC可在間接活體內產生且載有各種蛋白質及肽抗原以及腫瘤細

胞提取物(Nestle, F.等人, *Nat. Med.*, 4:328-332 (1998))。DC亦可藉由遺傳手段轉導以亦表現此等腫瘤抗原。DC亦已出於免疫接種之目的而直接融合至腫瘤細胞(Kugler, A.等人, *Nat. Med.*, 6:332-336 (2000))。作為一種免疫接種之方法, DC免疫接種可有效地組合PD-L1阻斷以活化更強效之抗腫瘤反應。

PD-L1阻斷亦可組合標準癌症治療。PD-L1阻斷可有效地組合化學治療方案。在此等實例中, 可降低所投與的化療劑的劑量(Mokyr, M.等人, *Cancer Res.*, 58:5301-5304 (1998))。此種組合之一個實例為大環肽與用於治療黑色素瘤之達卡巴嗪(decarbazine)之組合。此種組合之另一實例為大環肽與用於治療黑色素瘤之介白素-2(IL-2)之組合。PD-L1阻斷與化學療法之組合使用背後的科學原理是, 細胞死亡(為大多數化學治療性化合物之細胞毒性作用的後果)將導致抗原呈現路徑中腫瘤抗原之水平增加。經由細胞死亡可導致與PD-L1阻斷協同作用之其他組合療法為放射、手術及激素剝奪(hormone deprivation)。此等方案之各者產生出宿主中之腫瘤抗原源。血管生成抑制劑亦可組合PD-L1阻斷。血管生成之抑制導致腫瘤細胞死亡, 其可饋送腫瘤抗原至宿主抗原呈現路徑中。

阻斷PD-L1之大環肽亦可組合靶向表現Fc α 或Fc γ 受體之效應子細胞至腫瘤細胞之雙特異性大環肽使用(參見, 例如, 美國專利第5,922,845號及第5,837,243號)。雙特異性大環肽可用於靶向兩個不同的抗原。例如, 抗-Fc受體/抗腫瘤抗原(例如, Her-2/neu)雙特異性大環肽已用於靶向巨噬細胞至腫瘤的位點。此種靶向可更有效地活化腫瘤特異性反應。此等反應之T細胞組將藉由使用PD-L1阻斷強化。或者, 抗原可藉由使用結合至腫瘤抗原及樹突細胞特異性細胞表面標記物之雙特異性大環肽直接遞送至DC。

腫瘤藉由多種機制避開宿主免疫監視。許多此等機制藉由使藉 S

由腫瘤表現且為免疫抑制性之蛋白質失活而被克服。此等尤其包括 TGF- β (Kehrl, J. 等人, *J. Exp.Med.*, 163:1037-1050 (1986))、IL-10(Howard, M.等人, *Immunology Today*, 13:198-200 (1992))及Fas配體(Hahne, M.等人, *Science*, 274:1363-1365 (1996))。針對此等實體各者之大環肽可組合抗-PD-L1使用以反作用於免疫抑制劑之效應及有利於宿主之腫瘤免疫反應。

可用於活化宿主免疫響應性的其他大環肽可組合抗-PD-L1使用。此等肽包括活化DC功能及抗原呈現之樹突細胞表面上之分子。抗-CD40大環肽能夠有效地取代T細胞輔助活性(Ridge, J. 等人, *Nature*, 393:474-478 (1998))且可結合PD-1抗體使用(Ito, N. 等人, *Immunobiology*, 201(5):527-540 (2000))。活化針對T細胞共刺激分子諸如CTLA-4(例如, 美國專利第5,811,097號)、OX-40(Weinberg, A. 等人, *Immunol.*, 164:2160-2169 (2000))、4-1BB(Melero, I. 等人, *Nat. Med.*, 3:682-685(1997)及ICOS(Hutloff, A. 等人, *Nature*, 397:262-266(1999))之大環肽亦可提供提高之T細胞活化水平。

目前, 骨髓移植用於治療多種造血源性腫瘤。雖然移植物抗宿主疾病係此種治療之結果, 但可自移植物抗腫瘤反應獲得治療效益。PD-L1阻斷可用於增加供者移植之腫瘤特異性T細胞之有效性。

亦存在數種實驗治療方案, 其涉及為了抗原特異性T細胞抗腫瘤, 間接活體內活化及增殖抗原特異性T細胞及將此等細胞過繼性轉移至接受者中(Greenberg, R. 等人, *Science*, 285:546-551 (1999))。此等方法亦可用於活化對感染劑諸如CMV之T細胞反應。可預期存在大環肽下之間接活體內活化會增加過繼性轉移之T細胞之頻率及活性。

傳染性疾病

使用本發明之其他方法以治療已暴露於特定毒素或病原體之病患。因此, 本發明之另一態樣提供一種治療個體之傳染性疾病之方

法，其包括向該個體投與本發明大環肽使得該個體之傳染性疾病得以治療。

類似於其針對如上所述腫瘤之應用，PD-L1阻斷可單獨地或作為佐劑組合疫苗使用以刺激對病原體、毒素及自體抗原之免疫反應。此治療方法可尤其可用的病原體之實例包括目前無有效疫苗之病原體或習知疫苗不完全有效之病原體。此等病原體包括(但不限於)HIV、肝炎(A型、B型及C型)、流感病毒、疱疹、梨形鞭毛蟲病(*Giardia*)、瘧疾(Butler, N.S.等人，*Nature Immunology* 13, 188-195 (2012)；Hafalla, J.C.R. 等人，*PLOS Pathogens*；2012年2月2日)、利什曼體病(*Leishmania*)、金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、銅綠假單胞菌(*Pseudomonas Aeruginosa*)。PD-L1阻斷尤其可用於抗藉由試劑已確認的感染，諸如在感染過程中呈現改變之抗原之HIV。此等新穎的抗原決定基在抗人類PD-L1投與的時間被識別係外來物，因此經由PD-L1激發不會被負信號減弱之強T細胞反應。

引起可由本發明方法治療之感染之致病病毒之一些實例包括HIV、肝炎(A型、B型或C型)、疱疹病毒(例如，VZV、HSV-1、HAV-6、HSV-II及CMV、愛潑斯坦-巴爾病毒(Epstein Barr virus))、腺病毒、流感病毒、黃病毒屬(flaviviruses)、伊科病毒(echovirus)、鼻病毒(rhinovirus)、科沙奇病毒(coxsackie virus)、豇豆花葉病毒屬(cornovirus)、呼吸道融合病毒、腮腺炎病毒、輪狀病毒(rotavirus)、麻疹病毒、風疹病毒、小病毒、疫苗病毒、HTLV病毒、登革熱病毒、乳頭瘤病毒、軟疣病毒、脊髓灰質炎病毒、狂犬病病毒、JC病毒及蟲媒病毒腦炎病毒。

引起可由本發明方法治療之感染之致病細菌之一些實例包括衣原體、立克次體細菌、分支桿菌、葡萄球菌、鏈球菌、肺炎球菌、腦膜炎雙球菌及淋球菌(conococci)、克雷伯氏菌(klebsiella)、變形桿

菌、沙雷氏菌(*serratia*)、假單胞菌、軍團菌(*legionella*)、白喉菌、沙門氏菌(*salmonella*)、桿菌、霍亂(*cholera*)、破傷風菌、肉毒桿菌、炭疽菌、鼠疫菌、鉤端螺旋體病(*leptospirosis*)細菌及萊姆病(*Lyme disease*)細菌。

引起可由本發明方法治療之感染之致病真菌之一些實例包括念珠菌屬(白色念珠菌、克柔念珠菌(*krusei*)、光滑念珠菌(*glabrata*)、熱帶念珠菌(*tropicalis*)等)、新型隱球菌(*Cryptococcus neoformans*)、曲黴菌屬(煙曲黴(*fumigatus*)、黑曲黴(*niger*)等)、麴藻菌目(*Genus Mucorales*)(毛黴(*mucor*)、犁頭黴(*absidia*)、根黴(*rhizopus*))、申克氏胞絲菌(*Sporothrix schenckii*)、皮炎芽生菌(*Blastomyces dermatitidis*)、巴西副球孢子菌(*Paracoccidioides brasiliensis*)、粗球孢子菌(*Coccidioides immitis*)及荚膜組織漿菌(*Histoplasma capsulatum*)。

引起可由本發明方法治療之感染之致病寄生蟲之一些實例包括溶組織內阿米巴原蟲(*Entamoeba histolytica*)、結腸小袋纖毛蟲(*Balantidium coli*)、福氏耐格里阿米巴原蟲(*Naegleria fowleri*)、棘阿米巴科(*Acanthamoeba sp.*)、蘭氏賈第鞭毛蟲(*Giardia lamblia*)、隱孢子蟲科(*Cryptosporidium sp.*)、卡式肺囊蟲(*Pneumocystis carinii*)、間日瘧原蟲(*Plasmodium vivax*)、巴貝斯原蟲(*Babesia microti*)、布氏錐蟲(*Trypanosoma brucei*)、克氏錐蟲(*Trypanosoma cruzi*)、杜氏利什曼原蟲(*Leishmania donovani*)、岡地弓漿蟲(*Toxoplasma gondi*)及巴西日圓線蟲(*Nippostrongylus brasiliensis*)。

在所有上述方法中，PD-L1阻斷可組合免疫療法之其他形式，諸如細胞介素治療(例如，干擾素、靶向VEGF活性或VEGF受體之藥劑、GM-CSF、G-CSF、IL-2)或雙特異性抗體療法，此提供腫瘤抗原之增強呈現(參見，例如，Holliger, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 90:6444-6448 (1993); Poljak, *Structure*, 2:1121-1123 (1994))。

自體免疫反應

大環肽可激發並增強自體免疫反應。實際上，使用腫瘤細胞及肽疫苗引起抗腫瘤反應顯示，許多抗腫瘤反應涉及抗自身反應性(抗-CTLA-4+GM-CSF改質B 16黑色素瘤中所觀察到的色素脫落，van Elsas等人，同前述；經Trp-2疫苗接種之小鼠中之色素脫落(Overwijk, W.等人，*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 96:2982-2987 (1999))；藉由TRAMP腫瘤細胞疫苗引起之自體免疫前列腺炎(Hurwitz, A., 同前述(2000))、黑色素瘤肽抗原疫苗接種及在人類臨床試驗中所觀察到的白斑病(Rosenberg, S.A. 等人，*J. Immunother.Emphasis Tumor Immunol.*, 19(1):81-84 (1996))。

因此，可考慮結合各種自體蛋白使用抗-PD-L1阻斷以設計出可有效產生抵抗此等自體蛋白之免疫反應以用於疾病治療之疫苗接種方案。例如，阿茲海默氏症(Alzheimer's disease)涉及A.β肽呈澱粉樣沉積物不適當的積聚在腦中；抵抗澱粉樣之抗體反應能夠清除此等澱粉樣沉積物(Schenk等人，*Nature*, 400:173-177 (1999))。

其他自體蛋白亦可用作標靶，諸如，用於治療過敏及哮喘之IgE及用於類風濕性關節炎之TNF.α。最終，可藉由使用本文中所揭示之大環分子引起對各種激素之抗體反應。中和抗體對生殖激素之反應可用於避孕。中和抗體對激素及其他的為特定腫瘤之生長所需要的可溶性因子之反應亦可視為可能的疫苗接種標靶。

如上所述的針對使用抗-PD-L1大環分子之類似方法可用於引起治療性自體免疫反應以治療具有其他自體抗原之不適當積聚，諸如澱粉樣沉積物，包括阿茲海默氏症中之A.β、細胞介素(諸如TNF.α)及IgE之病患。

疫苗

大環肽可用於藉由共同投與抗-PD-1大環分子與受關注抗原(例 5

如，疫苗)刺激抗原特異性免疫反應。因此，在另一態樣中，本發明提供一種增強個體之對抗原之免疫反應之方法，其包括向該個體投與：(i)抗原；及(ii)抗-PD-1大環分子，使得個體中對抗原之免疫反應增強。抗原可為(例如)腫瘤抗原、病毒抗原、細菌抗原或來自病原體之抗原。此等抗原之非限制性實例包括彼等述於上節中者，諸如上文所述之腫瘤抗原(或腫瘤疫苗)或來自病毒、細菌或其他的上文所述之病原體之抗原。

活體內及活體外投與本發明組合物(例如，大環肽、多特異性及雙特異性分子及免疫偶聯物)之適宜途徑為相關技術所熟知且可由熟習此項技術者選擇。例如，該等組合物可藉由注射(例如，靜脈內或皮下)投與。所使用的分子之適宜劑量將取決於個體之年齡及體重及組合物之濃度及/或調配而改變。

如前面所述，本發明大環肽可與一種或多種其他治療劑，例如，細胞毒性劑、放射毒性劑或免疫抑制劑共同投與。肽可聯結至該藥劑(作為免疫複合物)或可與該藥劑分開投與。在後一情況(分開投與)中，肽可在藥劑之前、之後或與其同時投與或可與其他已知的療法(例如，抗癌療法，例如，放射)共同投與。此等治療劑尤其包括抗癌藥物，諸如多柔比星(doxorubicin)(阿黴素(adriamycin))、順鉑、硫酸博來黴素(bleomycin sulfate)、卡莫司汀(carmustine)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、達卡巴嗪及環磷醯胺羥基脲，其等單獨地僅在對病患毒性或亞毒性之水平下有效。順鉑係每四週一次以100 mg/劑量經靜脈內投與及阿黴素係每21天一次以60至75 mg/ml劑量經靜脈內投與。本發明大環肽與化療劑之共同投與可提供兩種經由不同的對人類腫瘤細胞產生細胞毒性效應之機制起作用之抗癌藥物。此種共同投與可解決由於藥物抗性發展或將致使其與肽無反應之腫瘤細胞之抗原性改變所致之問題。

包括本發明組合物(例如，大環肽、雙特異性或多特異性分子或免疫偶聯物)及使用說明之套組亦屬於本發明之範圍內。該套組可進一步包含至少一種額外的試劑或一或多種額外的本發明大環肽(例如，具有互補活性之人類抗體，其結合至PD-L1抗原中與大環分子不同之抗原決定基)。套組通常包括指明套組內容物之所欲用途之標籤。術語標籤包括任何的套組上或與套組一起提供或以其他方式隨附套組之書面或記錄材料。

組合療法

本發明大環肽與另一PD-L1拮抗劑及/或其他免疫調節劑之組合適用於增強抵抗過度增生性疾病之免疫反應。例如，可將此等分子投與培養中之細胞(活體外或間接活體內)或投與人類個體(例如，活體內)以增強多種情況中之免疫。因此，在一個態樣中，本發明提供一種改良個體之免疫反應之方法，其包括向該個體投與本發明之大環肽使得該個體之免疫反應得以改良。較佳地，增強、刺激或上調反應。在另一實施例中，本發明提供一種改變與以免疫刺激性治療劑治療過度增生性疾病相關聯之不良事件之方法，其包括向該個體投與本發明大環肽及亞治療劑量之另一免疫調節劑。

藉由大環肽阻斷PD-L1可增強病患中對癌細胞之免疫反應。可使用本發明大環肽抑制生長的癌症包括通常對免疫療法回應之癌症。適合用本發明組合療法治療之癌症之代表性實例包括黑色素瘤(例如，轉移性惡性黑色素瘤)、腎癌、前列腺癌、乳癌、結腸癌及肺癌。其他的可使用本發明方法治療之癌症之實例包括骨癌、胰臟癌、皮膚癌、頭部或頸部癌症、皮膚或眼內惡性黑色素瘤、子宮癌、卵巢癌、直腸癌、肛門部位之癌症、胃癌、睪丸癌、子宮癌、輸卵管癌、子宮內膜癌、子宮頸癌、陰道癌、外陰癌、霍奇金氏病、非霍奇金氏淋巴瘤、食道癌、小腸癌、內分泌系統癌、甲狀腺癌、副甲狀腺癌、腎上 S

腺癌、軟組織肉瘤、尿道癌、陰莖癌、慢性或急性白血病(包括急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、急性淋巴母細胞性白血病、慢性淋巴細胞性白血病)、兒童實體腫瘤、淋巴細胞性淋巴瘤、膀胱癌、腎臟或輸尿管癌、腎盂癌、中樞神經系統(CNS)贅瘤、原發性CNS淋巴瘤、腫瘤血管生成、脊椎軸腫瘤、腦幹膠質瘤、垂體腺瘤、卡波西氏肉瘤、表皮樣癌、鱗狀細胞癌、T細胞淋巴瘤、環境引起之癌症(包括由石棉引起之癌症)及該等癌症之組合。本發明亦適用於治療轉移性癌症。

在某些實施例中，含有至少一種本文中所述之大環肽之治療劑之組合可呈含在醫藥上可接受之載劑中之單一組合物並行投與、或呈各藥劑可按順序投與之分開組合物並行投與。例如，第二免疫調節劑及本發明大環肽可按順序投與，諸如，先投與第二免疫調節劑接著投與大環肽，或先投與大環肽接著投與第二免疫調節劑。另外，若按順序投與多於一個劑量之組合療法，則按順序投與之順序在各投與時間點可相反或保持相同順序，按順序投與可組合並行投與或其任何組合。例如，第一次投與第二免疫調節劑及大環肽可係並行，第二次投與可係按順序先投與第二免疫調節劑接著投與大環肽，及第三次投與可係按順序先投與大環肽接著投與第二免疫調節劑等。另一代表性給藥方案可涉及第一次投與為按順序先大環肽接著投與第二免疫調節劑，及隨後的投與可係並行。

視情況，大環肽及第二免疫調節劑之組合可進一步組合免疫原性劑，諸如癌細胞、經純化之腫瘤抗原(包括重組蛋白、肽及碳水化合物分子)、細胞及經編碼免疫刺激細胞介素之基因轉染之細胞(He等人，*J. Immunol.*, 173:4919-4928 (2004))。可使用的腫瘤疫苗之非限制性實例包括黑色素瘤抗原之肽，諸如gp100之肽、MAGE抗原、Trp-2、MART1及/或酪胺酸酶、或經轉染以表現細胞介素GM-CSF之腫瘤

細胞(於下文中進一步論述)。

PD-L1大環肽及第二免疫調節劑之組合可進一步組合疫苗接種方案。已設計出用於抗腫瘤之疫苗接種之許多實驗策略(參見Rosenberg, S., *Development of Cancer Vaccines*, ASCO Educational Book Spring:60-62 (2000) ; Logothetis, C., ASCO Educational Book Spring:300-302 (2000) ; Khayat, D., ASCO Educational Book Spring:414-428 (2000) ; Foon, K., ASCO Educational Book Spring:730-738 (2000) ; 亦參見Restifo等人, *Cancer Vaccines*, 第61章, 第3023-3043頁, 在DeVita等人編, *Cancer:Principles and Practice of Oncology*, 第五版(1997)中)。在一種此等策略中, 使用自體性或同種異體腫瘤細胞製備疫苗。已顯示此等細胞疫苗在腫瘤細胞經轉導以表現GM-CSF時最有效。已顯示GM-CSF為腫瘤疫苗接種之抗原呈現之強效活化劑(Dranoff等人, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 90:3539-3543 (1993))。

各種腫瘤中基因表現及大規模基因表現模式之研究已產生出所謂的腫瘤特異性抗原之定義(Rosenberg, *Immunity*, 10:281-287 (1999))。在許多情況中, 此等腫瘤特異性抗原為表現於腫瘤及產生腫瘤的細胞中之分化抗原, 例如黑色素細胞抗原gp100、MAGE抗原及Trp-2。更重要的是, 許多此等抗原可顯示為存於宿主中之腫瘤特異性T細胞之標靶。在某些實施例中, PD-L1大環肽及第二免疫調節劑之組合可與表現於腫瘤中之重組蛋白及/或肽集合聯合使用, 以產生對此等蛋白質之免疫反應。此等蛋白質通常由免疫系統視為自體抗原且因此對其具耐受性。腫瘤抗原亦可包含蛋白質端粒酶, 其為合成染色體之端粒酶所需要且表現於多於85%之人類癌症及僅有限數目之體細胞組織中(Kim等人, *Science*, 266:2011-2013 (1994))。(可藉由各種方法保護此等體細胞組織免遭免疫攻擊)。由於會改變蛋白質序列或在兩種非相關序列間產生融合蛋白(亦即, 費城染色體(Philadelphia 5

chromosome)中之bcr-abl)之體細胞突變、或來自B細胞腫瘤之獨特型，腫瘤抗原亦可為表現於癌細胞中之「新抗原」。

其他腫瘤疫苗可包括來自與人類癌症牽連之病毒(諸如人乳頭瘤病毒(HPV)、肝炎病毒(HBV及HCV)及卡波西氏疱疹肉類病毒(KHSV))之蛋白質。可結合PD-L1大環肽阻斷使用的腫瘤特異性抗原之另一形式為單離自腫瘤組織本身之經純化熱休克蛋白(HSP)。此等熱休克蛋白包含來自腫瘤細胞之蛋白質之片段及此等HSP遞送至抗原呈現細胞時可高度有效地引起腫瘤免疫(Suot等人，*Science*, 269:1585-1588 (1995)；Tamura等人，*Science*, 278:117-120 (1997))。

樹突細胞(DC)為可用於準備抗原特異性反應之強效抗原呈現細胞。DC可在間接活體內產生且載有各種蛋白質及肽抗原以及腫瘤細胞提取物(Nestle等人，*Nat. Med.*, 4:328-332 (1998))。DC亦可藉由遺傳手段轉導以亦表現此等腫瘤抗原。DC亦已出於免疫接種之目的而直接融合至腫瘤細胞(Kugler等人，*Nat. Med.*, 6:332-336 (2000))。作為一種免疫接種之方法，DC免疫接種可有效地進一步組合抗-PD-L1大環肽及第二免疫調節劑之組合以活化更強效之抗腫瘤反應。

抗-PD-L1大環肽及另一免疫調節劑之組合亦可進一步組合標準癌症治療。例如，大環肽及第二免疫調節劑之組合可有效地組合化學治療方案。在此等實例中，如利用大環肽及第二免疫調節劑之組合所觀察到，可降低與本發明組合投與之其他化療劑的劑量(Mokyr等人，*Cancer Res.*, 58:5301-5304 (1998))。此種組合之一個實例為大環肽及第二免疫調節劑之組合進一步與用於治療黑色素瘤之達卡巴嗪的組合。另一實例為大環肽及第二免疫調節劑之組合進一步與用於治療黑色素瘤之介白素-2(IL-2)的組合。PD-L1大環肽及另一免疫調節劑與化學療法之組合使用背後的科學原理是，細胞死亡(為大多數化學治療性化合物之細胞毒性作用的後果)將導致抗原呈現路徑中腫瘤抗原之

水平增加。經由細胞死亡可導致與抗-PD-L1大環肽及另一免疫調節劑之組合協同作用之其他組合療法包括放射、手術或激素剝奪。此等方案之各者產生出宿主中之腫瘤抗原源。血管生成抑制劑亦可組合PD-L1及第二免疫調節劑之組合。血管生成之抑制導致腫瘤細胞死亡，此亦可係意欲饋送腫瘤抗原至宿主抗原呈現路徑中之腫瘤抗原之來源。

PD-L1及另一免疫調節劑之組合亦可組合靶向表現Fc α 或Fc γ 受體之效應子細胞至腫瘤細胞之雙特異性大環肽使用(參見，例如，美國專利第5,922,845號及第5,837,243號)。雙特異性大環肽可用於靶向兩個不同的抗原。例如，抗-Fc受體/抗腫瘤抗原(例如，Her-2/neu)雙特異性大環肽已用於靶向巨噬細胞至腫瘤的位點。此種靶向可更有效地活化腫瘤特異性反應。此等反應之T細胞組將藉由使用PD-L1與第二免疫調節劑之組合強化。或者，抗原可藉由使用結合至腫瘤抗原及樹突細胞特異性細胞表面標記物之雙特異性大環肽直接遞送至DC。

在另一實例中，大環肽及第二免疫調節劑之組合可結合抗癌大環藥劑，諸如RITUXAN®(利妥昔單抗(rituximab))、HERCEPTIN®(曲妥珠單抗(trastuzumab))、BEXXAR®(托西莫單抗(tositumomab))、ZEVALIN®(替伊莫單抗(ibritumomab))、CAMPATH®(阿來珠單抗(alemtuzumab))、Lymphocide(依帕珠單抗(epratuzumab))、AVASTIN®(貝伐單抗(bevacizumab))及TARCEVA®(厄洛替尼(erlotinib))等使用。舉例而言但不希望受理論限制，用抗癌抗體或與毒素偶聯之抗癌抗體治療可導致癌細胞死亡(例如，腫瘤細胞)，此將強化藉由第二免疫調節劑標靶或PD-L1介導之免疫反應。在一例示性實施例中，過度增生性疾病(例如，癌症腫瘤)之治療可包括並行或按順序或其任何組合組合大環肽及第二免疫調節劑之抗癌抗體，此可強宿主之抗腫瘤免疫反應。

腫瘤藉由多種機制避開宿主免疫監視。許多此等機制藉由使藉 5

由腫瘤表現且為免疫抑制性之蛋白質失活而被克服。此等尤其包括 TGF- β (Kehrl, J. 等人, *J. Exp.Med.*, 163:1037-1050 (1986))、IL-10(Howard, M.等人, *Immunology Today*, 13:198-200 (1992))及Fas配體(Hahne, M.等人, *Science*, 274:1363-1365 (1996))。在另一實例中, 針對此等實體各者之抗體可進一步組合大環肽及另一免疫調節劑以反作用於免疫抑制劑之效應及有利於宿主之抗腫瘤免疫反應。

可用於活化宿主免疫響應性的其他藥劑可進一步組合本發明大環肽使用。此等包括活化DC功能及抗原呈現之樹突細胞表面上之分子。抗-CD40大環肽能夠有效地取代T細胞輔助活性(Ridge, J.等人, *Nature*, 393:474-478 (1998))且可結合本發明大環肽(單獨或呈與抗-CTLA-4 組合之組合形式)使用(Ito, N. 等人, *Immunobiology*, 201(5):527-540 (2000))。活化針對T細胞共刺激分子諸如OX-40(Weinberg, A. 等人, *Immunol.*, 164:2160-2169 (2000))、4-1BB(Melero, I.等人, *Nat. Med.*, 3:682-685(1997)及ICOS(Hutloff, A. 等人, *Nature*, 397:262-266(1999))之大環肽亦可提供提高之T細胞活化水平。

目前, 骨髓移植用於治療多種造血源性腫瘤。雖然移植物抗宿主疾病係此種治療之結果, 但可自移植物抗腫瘤反應獲得治療效益。單獨或組合另一免疫調節劑之本發明大環肽可用於增加供者移植之腫瘤特異性T細胞之有效性。

亦存在數種實驗治療方案, 其涉及為了抗原特異性T細胞抗腫瘤, 間接活體內活化及增殖抗原特異性T細胞及將此等細胞過繼性轉移至接受者中(Greenberg, R.等人, *Science*, 285:546-551 (1999))。此等方法亦可用於活化對感染劑諸如CMV之T細胞反應。可預期存在本發明大環肽(單獨或與另一免疫調節劑之組合)下之間接活體內活化會增加過繼性轉移之T細胞之頻率及活性。

在某些實施例中，本發明提供一種改變與用免疫刺激劑治療過度增生性疾病相關聯之不良事件之方法，其包括向該個體投與本發明大環肽與亞治療劑量之另一免疫調節劑之組合。例如，本發明方法提供一種藉由向病患投與非吸收性類固醇來降低免疫刺激治療性抗體引起之結腸炎或腹瀉之發病率之方法。因為任何將接受免疫刺激治療性抗體的病患處在發展出因該治療引起之結腸炎或腹瀉之風險，故該整個病患群體適合根據本發明方法之療法。雖然已投與類固醇以治療發炎性腸病(IBD)及防止IBD之惡化，但其尚未用於預防診斷未罹患IBD之患者中的IBD(降低IBD之發病率)。與類固醇、甚至非吸收性類固醇相關聯之顯著副作用使預防性用途受到限制。

在其他實施例中，本發明大環肽(單獨或與另一免疫調節劑組合)可進一步組合使用任何非吸收性類固醇使用。如本文中所使用，「非吸收性類固醇」為展現廣泛首過代謝使得肝臟中代謝後類固醇之生物可利用率低(亦即，低於約20%)之糖皮質激素。在本發明之一個實施例中，該非吸收性類固醇為布地奈德(budesonide)。布地奈德為在口服投與後主要藉由肝臟廣泛代謝之局部作用的糖皮質激素。ENTOCORT® EC(Astra-Zeneca)為經開發使藥物遞送至迴腸且遍及結腸最佳化之布地奈德之pH-及時間-依賴性口服調配物。在美國已核准ENTOCORT® EC用於治療輕度至中度的涉及迴腸及/或上升結腸之克羅恩氏病。ENTOCORT® EC用於治療克羅恩氏病之常用的口服劑量為6至9 mg/天。ENTOCORT® EC在被吸收前釋放於腸中並留在腸黏膜中。一旦其通過腸黏膜靶組織，ENTOCORT® EC經肝臟中的細胞色素P450系統廣泛代謝成具有可忽視的糖皮質激素活性之代謝產物。因此，生物可利用率低(約10%)。布地奈德之低生物可利用率導致與具有較不廣泛首過代謝之其他糖皮質類固醇相比其治療比提高。布地奈德與全身作用的腎上腺皮質類固醇相比其不良作用更小，包括更小 5

的下視丘-垂體抑制。然而，長期性投與ENTOCORT® EC可導致全身糖皮質激素效應，諸如腎上腺皮質功能亢進及腎上腺抑制。參見 *Physicians' Desk Reference Supplement*, 第58版, 608-610 (2004)。

在還有其他實施例中，結合非吸收性類固醇之PD-L1與另一免疫調節劑之組合可進一步組合水楊酸酯。水楊酸酯包括5-ASA藥劑，諸如(例如)：柳氮磺吡啶(sulfasalazine)(AZULFIDINE®, Pharmacia & Upjohn)；奧沙拉嗪(olsalazine)(DIPENTUM®, Pharmacia & Upjohn)；巴柳氮(balsalazide)(COLAZAL®, Salix Pharmaceuticals, Inc.)；及美沙拉嗪(mesalamine)(ASACOL®, Procter & Gamble Pharmaceuticals；PENTASA®, Shire US；CANASA®, Axcan Scandipharm, Inc.；ROWASA®, Solvay)。

劑量及調配物

適宜之式I之肽、或更特定言之本文中所述之大環肽可呈單獨的化合物或與可接受之載劑混合呈醫藥調配物之形式投與病患以治療糖尿病及其他相關疾病。熟習治療糖尿病技術者可輕易地確定針對需要此種治療的哺乳動物(包括人類)之化合物之劑量及投藥途徑。投藥途徑可包括(但不限於)經口、口腔內、直腸、經皮、頰、鼻內、肺、皮下、肌肉內、皮內、舌下、結腸內、眼內、靜脈內或腸投與。該化合物係根據投藥途徑基於可接受之醫藥實務基礎上進行調配(Fingl等人，在 *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 第1章，第1頁(1975)中；*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 第18版，Mack Publishing Co., Easton, PA (1990))。

本文中所述之醫藥上可接受之肽組合物可呈多種劑型諸如錠劑、膠囊(其各者包含持續釋放型或定時釋放型調配物)、丸劑、粉末、粒子、酏劑、原位凝膠、微球體、晶型錯合物、脂質體、微乳液、酏劑、懸浮液、糖漿、氣溶膠噴霧及乳液投與。本文中所述之組

合物亦可呈口服、靜脈內(團注或點滴輸注)、腹膜內、皮下、經皮或肌肉內形式投與，其等均採用熟習醫藥技術之一般技術者熟知的劑型。該等組合物可單獨地投與，但一般將併與根據所選投藥途徑及標準醫藥實務而選擇的醫藥載劑一起投與。

本文中所述之組合物之給藥方案當然將取決於已知的因素，諸如特定藥劑之藥效動力學特徵及其投藥模式及途徑；接受者之物種、年齡、性別、健康狀況、醫學病狀及體重；症狀之性質及程度；合併治療類型；治療之頻率；投藥途徑、病患之腎功能及肝功能、及所期望的效應而改變。醫師或獸醫可決定並開立預防、反轉或抑制疾病狀態進展所需要之有效量藥物處方。

依據一般指南，活性成分當在用於指定效應時之口服日劑量將在約0.001與1000 mg/kg體重間，較佳在約0.01與100 mg/kg體重/天間，且最佳在約0.6與20 mg/kg/天間之範圍內。活性成分當在用於指定效應時，在恆定速率輸注期間之靜脈內日劑量將在0.001 ng與100.0 ng/min/Kg體重間之範圍內。此恆定速率靜脈內輸注可較佳依0.01 ng至50 ng/min/Kg體重且最佳依0.01 ng至10.0 mg/min/Kg體重之速率投與。本文中所述之組合物可依單次日劑量投與，或總日劑量可以每天分成兩次、三次或四次之小劑量投與。本文中所述之組合物亦可藉由儲積調配物投與，其可依需要在數天/數週/數月時間內持續釋放藥物。

本文中所述之組合物可呈鼻內用形式藉由局部使用適當的鼻內媒劑投與，或藉由經皮途徑使用經皮皮膚貼劑投與。當呈經皮遞送系統形式投與時，整個給藥方案中劑量之投與當然將係連續性而非間斷性。

該等組合物通常呈與針對所欲投藥形式適宜選擇(亦即，口服錠劑、膠囊、酏劑、需要或無需推進劑產生之氣溶膠噴霧及糖漿)並符 S

合習知醫藥操作之合適醫藥稀釋劑、賦形劑或載劑(本文中統稱為醫藥載劑)之混合物投與。

例如，對於呈錠劑或膠囊形式之經口投藥法，可將活性藥物組分與口服非毒性醫藥上可接受之惰性載劑諸如(但不限於)乳糖、澱粉、蔗糖、葡萄糖、甲基纖維素、硬脂酸鎂、磷酸二鈣、硫酸鈣、甘露醇及山梨糖醇組合；對於呈液體形式之口服投與，可將口服藥物組分與任何口服非毒性醫藥上可接受之惰性載劑諸如(但不限於)乙醇、甘油及水組合。除此之外，當需要或必需時，適宜的黏合劑、潤滑劑、崩解劑及著色劑亦可併入混合物中。適宜的黏合劑包括(但不限於)澱粉、明膠、天然糖類(諸如(但不限於)葡萄糖或 β -乳糖)、玉米甜味劑、天然及合成膠(諸如阿拉伯膠、黃蓍膠或海藻酸鈉)、羧甲基纖維素、聚乙二醇及蠟。用於此等劑型中之潤滑劑包括油酸鈉、硬脂酸鈉、硬脂酸鎂、苯甲酸鈉、乙酸鈉及氯化鈉。崩解劑包括(但不限於)澱粉、甲基纖維素、瓊脂、膨潤土及黃原膠。

本文中所述之組合物亦可呈混合膠束或脂質體遞送系統(諸如小型單層微脂粒、大型單層微脂粒及多薄片層微脂粒)之形式投與。脂質體可由多種磷脂諸如膽固醇、硬脂胺或磷脂醯膽鹼形成。可添加滲透增強劑以增強藥物吸收。

由於已知前藥可增強藥品之許多期望之品質(亦即，溶解度、生物可利用率、製造等)，故本文中所述之化合物可呈前藥形式遞送。因此，本文中所述之標的意欲涵蓋目前所主張化合物之前藥、遞送其之方法、及含有其之組合物。

本文中所述之組合物亦可與作為可標靶之藥物載劑之可溶性聚合物偶聯。此等聚合物可包括聚乙烯吡咯啉酮、吡喃共聚物、聚羥基丙基-甲基丙烯醯胺-苯酚、聚羥基乙基天冬醯胺苯酚或經棕櫚醯基殘基取代之聚環氧乙烷-聚離胺酸。另外，本文中所述之組合物可與一

類可用於達成藥物之控制釋放之生物可降解聚合物組合，例如，聚乳酸、聚乙醇酸、聚乳酸與聚乙醇酸之共聚物、聚 ϵ -己酸內酯、聚羥基丁酸、聚原酸酯、聚縮醛類、聚二氫吡喃、聚氰基丙烯酸酯、及水凝膠之交聯或兩性嵌段共聚物。

適於投與之劑型(醫藥組合物)每劑量單位可含有約0.01毫克至約500毫克之活性成分。在此等醫藥組合物中，活性成分將通常以佔組合物總重量約0.5至95重量%的量存在。

明膠膠囊可含有活性成分及粉狀載劑，諸如乳糖、澱粉、纖維素衍生物、硬脂酸鎂及硬脂酸。類似的稀釋劑可用於製備壓縮錠劑。錠劑及膠囊均可呈持續釋放型產品製得以在數小時的時間內持續釋放藥物。壓縮錠劑可經糖包衣或經膜包衣以掩蔽任何令人不悅的氣味並保護錠劑免遭氣氛影響、或經腸衣包衣以選擇性地崩解於胃腸道中。

適於口服投與之液態劑型可含有著色劑及矯味劑以增加病患可接受度。

一般而言，水、適宜的油、鹽水、右旋糖(葡萄糖)水溶液、及相關之糖溶液及二醇(諸如丙二醇或聚乙二醇)為非經腸溶液之適宜載劑。用於非經腸投與之溶液較佳含有活性成分之水溶性鹽、適宜的穩定劑、及視需要之緩衝物質。單獨或組合之諸如亞硫酸氫鈉、亞硫酸鈉或抗壞血酸之抗氧化劑為適宜的穩定劑。亦使用檸檬酸及其鹽及EDTA鈉。此外，非經腸溶液可含有防腐劑，諸如氯化苄二甲胺、對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯及氯丁醇。

適宜的醫藥載劑述於 *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 第十九版, Mack Publishing Company (1995)(為此項領域中之標準參考文本)中。

可如下說明適用於本文中所述化合物之投與之代表性醫藥劑型：

膠囊

大數目之單位膠囊可藉由將標準兩片式硬明膠膠囊填充100毫克粉狀活性成分、150毫克乳糖、50毫克纖維素及6毫克硬脂酸鎂製得。

軟明膠膠囊

可製得活性成分含在可消化油諸如大豆油、棉籽油或橄欖油中之混合物及借助於正排量泵注入明膠中以形成含有100毫克活性成分之軟明膠膠囊。應洗滌並乾燥該等膠囊。

錠劑

可藉由習知程序製得錠劑，使得其劑量單位為(例如)100毫克活性成分、0.2毫克膠態二氧化矽、5毫克硬脂酸鎂、275毫克微晶纖維素、11毫克澱粉及98.8毫克乳糖。可施用適宜之包衣以增加可口性或延遲吸收。

可注射液

本文中所述之肽組合物之可注射調配物可能需要或可能不需要使用賦形劑，諸如，彼等已經過監管機構核准之賦形劑。此等賦形劑包括(但不限於)溶劑及共溶劑、增溶劑、乳化劑或增稠劑、螯合劑、抗氧化劑及還原劑、抗微生物防腐劑、緩衝劑及pH調整劑、增積劑、保護劑及張度調整劑及特殊添加劑。可注射調配物必須是無菌、無熱原且就溶液而言無粒子物質。

可藉由在可含有或可不含共溶劑或其他賦形劑的醫藥上可接受之緩衝液中攪拌例如1.5重量%活性成分製得適於注射投與之非經腸組合物。應利用氯化鈉使溶液等滲並滅菌。

懸浮液

可製得用於口服及/或非經腸投與之水性懸浮液，使得(例如)每5 mL中含有100 mg細分散之活性成分、20 mg羧甲基纖維素鈉、5 mg苯甲酸鈉、1.0 g山梨糖醇溶液(U.S.P.)及0.025 mL香草醛或其他可口的

矯味劑。

生物可降解微粒子

可例如藉由將適宜的生物可降解聚合物溶於溶劑中，將待併入的活性劑添加至聚合物溶液，及自基質移除溶劑由此形成聚合物之基質(其中活性劑分佈遍及基質)製得適於注射投與之持續釋放型非經腸組合物。

肽合成

本發明之描述在本文中應根據化學結合之定律及原理來理解。應明瞭本發明包含的化合物為適當地穩定以用作藥劑之其等化合物。熟習此項技術者將知曉哪些化合物基於化學結合及穩定性之一般原理基礎上將係穩定的及將係不穩定的。

可採用多種相關技術認可的方法，包括經由肽片段之構形輔助再連接、選殖或合成肽片段之酶連接、及化學連接之逐步固相合成、半合成，進行本發明大環肽之化學合成。合成本文中所述之大環肽及其類似物之一種較佳方法為使用各種固相技術，諸如，彼等述於 Chan, W.C.等人編，*Fmoc Solid Phase Synthesis*, Oxford University Press, Oxford (2000)；Barany, G.等人，*The Peptides:Analysis, Synthesis, Biology*, 第2卷：「Special Methods in Peptide Synthesis, Part A」，第3-284頁，Gross, E.等人編，Academic Press, New York (1980)；及在Stewart, J.M.等人，*Solid-Phase Peptide Synthesis*, 第2版，Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1984)中之技術之化學合成。較佳的策略係基於Fmoc(9-芴基甲基甲氧基羰基)基來暫時保護 α -胺基結合第三丁基來暫時保護胺基側鏈(參見(例如)Atherton, E.等人，「The Fluorenylmethoxycarbonyl Amino Protecting Group」，在*The Peptides:Analysis, Synthesis, Biology*, 第9卷：「Special Methods in Peptide Synthesis, Part C」，第1-38頁，Undenfriend, S.等人編，⁵

Academic Press, San Diego (1987)中。

可以逐步方式在不溶性聚合物擔體(亦稱為「樹脂」)上自肽的C端開始合成該等肽。合成係藉由通過形成醯胺或酯鍵將肽的C端胺基酸附接至樹脂開始。此允許所得肽最終分別以C端醯胺或羧酸釋放。

C端胺基酸及所有其他的用於合成中之胺基酸需要差別性地保護其 α -胺基及側鏈官能度(若存在)使得 α -胺基保護基可在合成期間選擇性地脫去。胺基酸之偶聯係藉由活化其羧基為活性酯及其與附接至樹脂之N-端胺基酸之未封端 α -胺基反應進行。重複 α -胺基脫除保護基及偶聯之順序直到組裝成整個肽序列。接著通常在適宜的清除劑之存在下自樹脂釋放肽同時使側鏈官能度脫除保護基以限制副反應。最終藉由逆相HPLC純化所得肽。

如前驅物至最終肽所需要的肽基-樹脂之合成係使用市售交聯聚苯乙烯聚合物樹脂 (Novabiochem, San Diego, CA ; Applied Biosystems, Foster City, CA)。較佳的固體擔體為：4-(2',4'-二甲氧基苯基-Fmoc-胺基甲基)-苯氧乙醯基-對甲基二苯甲基胺樹脂(Rink醯胺 MBHA樹脂)；9-Fmoc-胺基-咕啉-3-基氧基-Merrifield樹脂(Sieber醯胺樹脂)；4-(9-Fmoc)胺基甲基-3,5-二甲氧基苯氧基)戊醯基-胺基甲基-Merrifield樹脂(PAL樹脂)(對於C端羧醯胺)。第一個及隨後的胺基酸之偶聯可分別使用HOBt、6-Cl-HOBt或自DIC/HOBt、HBTU/HOBt、BOP、PyBOP或自DIC/6-Cl-HOBt、HCTU、DIC/HOAt或HATU製得之HOAt活性酯達成。較佳的固體擔體為：氯化2-氯三苯甲基樹脂及9-Fmoc-胺基-咕啉-3-基氧基-Merrifield樹脂(Sieber醯胺樹脂)(對於經保護肽片段)。第一個胺基酸負載至氯化2-氯三苯甲基樹脂上最佳藉由使經Fmoc保護之胺基酸與該樹脂在二氯甲烷及DIEA中反應來達成。若需要，則可添加少量的DMF以促使胺基酸溶解。

本文中所述之肽類似物之合成可藉由使用單或多通道肽合成

儀，諸如 CEM Liberty 微波合成儀或 Protein Technologies, Inc. Prelude(6個通道)或Symphony(12個通道)合成儀進行。

可使用任何標準程序裂解其各自肽之肽基樹脂前驅物並脫除保護基(參見，例如，King, D.S.等人，*Int. J. Peptide Protein Res.*, 36:255-266 (1990))。一種期望的方法係存在水及TIS作為清除劑下使用TFA。通常，室溫下使肽基樹脂在TFA/水/TIS(94:3:3, v:v:v；1 mL/100 mg肽基樹脂)中攪拌2至6 h。接著濾出廢樹脂且在減壓下濃縮或乾燥TFA溶液。沉澱所得肽粗產物並用Et₂O洗滌、或直接再溶解於DMSO或50%乙酸水溶液中以藉由製備型HPLC純化。

可藉由使用製備型HPLC，例如，在Waters型號4000或Shimadzu型號LC-8A液相層析儀上純化獲得具有所需純度之肽。將肽粗產物之溶液注射至YMC S5 ODS(20X 100 mm)柱中及以MeCN含在水(二者均經0.1% TFA緩衝)中之線性梯度洗脫，利用14至20 mL/min之流速且藉由在220 nm下之UV吸光度監測流出物。可藉由電子噴霧MS分析證實經純化肽之結構。

實例

熟習此項技術者熟知本申請案中所使用的縮寫，包括尤其在隨後的說明性方案及實例中所使用的縮寫。一些所用縮寫係如下：HOBt為1-羥基苯并三唑；HBTU為六氟磷酸O-(苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎘；BOP為六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基-三(二甲基胺基)鎘；PyBOP為(六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯啶基鎘)；HCTU為六氟磷酸O-(6-Cl-1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎘；TFA為三氟乙酸；TIS為三異丙基矽烷；DMSO為二甲亞砜；MeCN或ACN為乙腈；DCM為1,1-二氯甲烷；DIEA或DIPEA為二異丙基乙胺乙胺；Fmoc為9-芴甲氧羰基；NMM為N-甲基嗎啉；NMP為N-甲基吡咯啶酮；Ac為乙醯基；及Et為乙基。

分析數據：

質譜法：「ESI-MS(+)」表示以正離子模式進行的電噴霧電離質譜法；「ESI-MS(-)」表示以負離子模式進行的電噴霧電離質譜法；「ESI-HRMS(+)」表示以正離子模式進行的高解析電噴霧電離質譜法；「ESI-HRMS(-)」表示以負離子模式進行的高解析電噴霧電離質譜法。檢出的質量在「m/z」單位命名後面報告。準確質量大於1000之化合物經常呈二價或三價離子檢測到。

分析型LCMS條件A：

管柱：BEH C18，2.1×50 mm，1.7- μ m粒子；流動相A：具有0.05% TFA之水；流動相B：具有0.05% TFA之乙腈；溫度：50℃；梯度：在2分鐘內從2% B變為98% B，接著，0.5分鐘維持在98% B；流速：0.8 mL/min；檢測：在220 nm下之UV。

分析型LCMS條件B：

管柱：BEH C18，2.1×50 mm，1.7- μ m粒子；流動相A：5:95 乙腈:水(具有0.05% TFA)；流動相B：95:5 乙腈:水(具有0.05% TFA)；溫度：50℃；梯度：在3分鐘內從0% B變為100% B，接著，0.75分鐘維持在100% B；流速：1.11 mL/min。

分析型LCMS條件C：

管柱：BEH C18，2.1×50 mm，1.7- μ m粒子；流動相A：具有0.2%甲酸及0.01% TFA之水；流動相B：具有0.2%甲酸及0.01% TFA之乙腈；溫度：50℃；梯度：在2分鐘內從2% B變為80% B，在0.1分鐘內從80% B變為98% B，接著，0.5分鐘維持在98% B；流速：0.8 mL/min；檢測：在220 nm下之UV。

分析型LCMS條件D：

管柱：Waters Acquity UPLC BEH C18，2.1×50 mm，1.7- μ m粒子；流動相A：5:95 乙腈:水(具有10 mM乙酸銨)；流動相B：95:5 乙

腈:水(具有10 mM乙酸銨)；溫度：50℃；梯度：在3分鐘內從0% B變為100% B，接著，0.75分鐘維持在100% B；流速：1.11 mL/min；檢測：在220 nm下之UV。

分析型LCMS條件E：

管柱：Waters Acquity UPLC BEH C18，2.1×50 mm，1.7-μm粒子；流動相A：5:95 乙腈:水(具有0.1%三氟乙酸)；流動相B：95:5 乙腈:水(具有0.1%三氟乙酸)；溫度：50℃；梯度：在3分鐘內從0% B變為100% B，接著，0.75分鐘維持在100% B；流速：1.11 mL/min；檢測：在220 nm下之UV。

分析型LCMS條件F：

管柱：Waters Xbridge C18，2.1×50 mm；流動相A：5:95 乙腈:水(具有10 mM乙酸銨)；流動相B：95:5 乙腈:水(具有10 mM乙酸銨)；溫度：35℃；梯度：在4分鐘內從0% B變為100% B，接著，1分鐘維持在100% B；流速：4 mL/min；檢測：在220 nm下之UV。

分析型LCMS條件G：

Finnigan LTQ質譜儀；管柱：Phenomenex Jupiter C4，1×50 mm；流動相A：1%甲酸含於水中；流動相B：0.1%甲酸含於乙腈中；溫度：30℃；梯度：1 min維持在1% B；在3 min內從1% B變為95% B，接著，3-min維持在95% B；流速：0.15 mL/min。

分析型LCMS條件H：

管柱：Waters BEH C18，2.0×50 mm，1.7-μm粒子；流動相A：5:95 乙腈:水(具有10 mM乙酸銨)；流動相B：95:5 乙腈:水(具有10 mM乙酸銨)；溫度：50℃；梯度：在3分鐘內從0% B變為100% B，接著，0.5分鐘維持在100% B；流速：1.0 mL/min；檢測：在220 nm下之UV。

分析型LCMS條件I：

管柱：Waters BEH C18，2.0×50 mm，1.7- μ m 粒子；流動相A：5:95 甲醇:水(具有10 mM乙酸銨)；流動相B：95:5 甲醇:水(具有10 mM乙酸銨)；溫度：50℃；梯度：在3分鐘內從0% B變為100% B，接著，0.5分鐘維持在100% B；流速：0.5 mL/min；檢測：在220 nm下之UV。

分析型HPLC條件A：

管柱：YMC Pack ODS-AQ 3 μ m 150×4.6 mm 流動相A：具有0.1% TFA之水；流動相B：具有0.1% TFA之乙腈；溫度：60℃；梯度：在25 min內從35% B變為80% B；流速：1 mL/min；檢測：在217 nm下之UV。

分析型HPLC條件B：

管柱：YMC Pack ODS-AQ 3 μ m 150×4.6 mm 流動相A:水(具有0.1% TFA)；流動相B：具有0.1% TFA之乙腈；溫度：60℃；梯度：在25 min內從25% B變為75% B；流速：1 mL/min；檢測：在217 nm下之UV。

分析型HPLC條件C：

管柱：YMC Pack ODS-AQ 3 μ m 150×4.6 mm 流動相A：具有0.1% TFA之水；流動相B：具有0.1% TFA之乙腈；溫度：60℃；梯度：在25 min內從20% B變為70% B；流速：1 mL/min；檢測：在217 nm下之UV。

分析型HPLC條件D：

管柱：YMC Pack ODS-AQ 3 μ m 150×4.6 mm 流動相A：具有0.1% TFA之水；流動相B：具有0.1% TFA之乙腈；溫度：60℃；梯度：在25 min內從15% B變為65% B；流速：1 mL/min；檢測：在217 nm下之UV。

分析型HPLC條件E：

管柱：YMC Pack ODS-AQ 3 μ m 150 $\times$ 4.6 mm 流動相A：具有0.1% TFA之水；流動相B：具有0.1% TFA之乙腈；溫度：60 $^{\circ}$ C；梯度：在20 min內從25% B變為60% B；流速：1.25 mL/min；檢測：在217 nm下之UV。

分析型HPLC條件F：

管柱：YMC Pack ODS-AQ 3 μ m 150 $\times$ 4.6 mm 流動相A：具有0.1% TFA之水；流動相B：具有0.1% TFA之乙腈；溫度：60 $^{\circ}$ C；梯度：在20 min內從25% B變為65% B；流速：1.25 mL/min；檢測：在217 nm下之UV。

分析型HPLC條件G：

管柱：Sunfire C18 3.5 μ m, 3.0 $\times$ 150mm；流動相A：5:95 乙腈:水(具有0.05%三氟乙酸)；流動相B：95:5 乙腈:水(具有0.05%三氟乙酸)；溫度：50 $^{\circ}$ C；梯度：在12分鐘內從10% B變為100% B，接著，3分鐘維持在100% B；流速：1 mL/min；檢測：在220 nm下之UV。

分析型HPLC條件H：

管柱：Xbridge Phenyl 3.5 $\times$ 150 μ m，流動相A：5:95 乙腈:水(具有0.05%三氟乙酸)；流動相B：95:5 乙腈:水(具有0.05%三氟乙酸)；溫度：50 $^{\circ}$ C；梯度：在12分鐘內從10% B變為100% B，接著，3分鐘維持在100% B；流速：1 mL/min；檢測：在220 nm下之UV。

分析型HPLC條件I：

管柱：Phenomenex Luna 5 μ C18(2) 150 $\times$ 4.6 mm；流動相A：具有0.1%三氟乙酸之水，流動相B：具有0.1%三氟乙酸之乙腈，梯度在20 min內從5% B變為100% B，接著，5分鐘維持在100% B；流速1 mL/min，檢測：在220 nm下之UV

分析型HPLC條件J：

管柱：Phenomenex Luna 5 μ C18(2) 150 $\times$ 4.6 mm；流動相A：具⁵

有0.1%三氟乙酸之水，流動相B：具有0.1%三氟乙酸之乙腈，梯度在20 min內從10% B變為100% B，接著，5分鐘維持在100% B；流速1 mL/min，檢測：在220 nm下之UV

一般程序：

*Prelude*法A：

在*Prelude*肽合成儀(Protein Technologies)上於自動化下進行所有操作。除非註明，否則在裝有底部玻璃濾片的10或45 mL聚丙烯管中進行所有程序。該管通過該管的底部及頂部兩者連接至*Prelude*肽合成儀。可通過管的頂部添加DMF及DCM，此可均勻地向下沖洗管的側部。通過管的底部添加剩餘的試劑且向上通過玻璃濾片而與樹脂接觸。通過管的底部移去所有溶液。「週期性地攪拌」描述短暫脈衝N₂氣通過底部玻璃濾片；該脈衝持續約5秒且以每30秒進行。胺基酸溶液自製備超過三週後一般不使用。DMF=二甲基甲醯胺；DIC= N,N'-二異丙基碳化二亞胺；HOAt=1-羥基7-氮雜苯并三唑；Sieber=Fmoc-胺基-佔噸-3-基氧基，其中「3-基氧基」描述對聚苯乙烯樹脂連接的位置及種類。所使用的樹脂為具有Sieber連接子(在氮經Fmoc保護)之Merrifield聚合物(聚苯乙烯)；100至200網目，1% DVB，0.71 mmol/g負載。下文列出所使用的常見胺基酸，圓括號內指示側鏈保護基。Fmoc-Ala-OH；Fmoc-Arg(Pbf)-OH；Fmoc-Asn(Trt)-OH；Fmoc-Asp(OtBu)-OH；Fmoc-Bzt-OH；Fmoc-Cys(Trt)-OH；Fmoc-Dab(Boc)-OH；Fmoc-Dap(Boc)-OH；Fmoc-Gln(Trt)-OH；Fmoc-Gly-OH；Fmoc-His(Trt)-OH；Fmoc-Hyp(tBu)-OH；Fmoc-Ile-OH；Fmoc-Leu-OH；Fmoc-Lys(Boc)-OH；Fmoc-Nle-OH；Fmoc-Met-OH；Fmoc-[N-Me]Ala-OH；Fmoc-[N-Me]Nle-OH；Fmoc-Phe-OH；Fmoc-Pro-OH；Fmoc-Sar-OH；Fmoc-Ser(tBu)-OH；Fmoc-Thr(tBu)-OH；Fmoc-Trp(Boc)-OH；Fmoc-Tyr(tBu)-OH；Fmoc-Val-OH。

「Prelude法A」之程序描述依0.100 mmol規格進行的實驗，其中該規格係由結合至樹脂之Sieber連接子的量決定。此規格相當於約140 mg的上述Sieber-Merrifield樹脂。所有程序可藉由依規格倍數調整所述體積擴大規格超過0.100 mmol規格。在胺基酸偶聯之前，以樹脂膨脹程序(下文描述作「樹脂膨脹程序」)開始所有肽合成序列。胺基酸與一級胺N端之偶聯採用下文所述之「單偶聯程序」。Fmoc-N-甲基胺基酸之偶聯及與二級胺N端之偶聯採用下文所述之「二級胺偶聯程序」。氯乙醯基與肽的N端之偶聯由文詳述之「氯乙醯氯偶聯程序」或「氯乙酸偶聯程序」描述。

樹脂膨脹程序：

將Merrifield:Sieber樹脂(140 mg, 0.100 mmol)添加至40 mL聚丙烯固相反應容器。如下洗滌樹脂三次：將DMF(5.0 mL)及DCM(5.0 mL)添加至反應容器，此後，藉由從反應容器底部N₂鼓泡週期性地攪拌該混合物10分鐘，然後除去溶劑。

單偶聯程序：

將哌啶:DMF(20:80 v/v, 5.0 mL)添加至含有來自前一步驟之樹脂之反應容器。週期性地攪拌該混合物3分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。將哌啶:DMF(20:80 v/v, 5.0 mL)添加至反應容器。週期性地攪拌該混合物3分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。可如下連續地洗滌樹脂五次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(4.0 mL)且週期性地攪拌所得混合物60秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將胺基酸及HOAt(0.2 M含於DMF中, 5.0 mL, 10 eq)之溶液添加至反應容器，接著添加DIC(0.2 M含於DMF中, 5.0 mL, 10 eq)。週期性地攪拌該混合物60 min，接著通過玻璃濾片除去反應溶液。如下連續地洗滌樹脂四次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(4.0 mL)且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將乙酸⁵

酞:DIEA:DMF(10:1:89 v/v/v, 5.0 mL)之溶液添加至反應容器。週期性地攪拌該混合物10分鐘，接著通過玻璃濾片除去溶液。如下連續地洗滌樹脂四次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(4.0 mL)且週期性地攪拌所得混合物90秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將所得樹脂直接用於下一步驟。

二級胺偶聯程序：

將哌啶:DMF(20:80 v/v, 5.0 mL)添加至含有來自前一步驟之樹脂之反應容器。週期性地攪拌該混合物3分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。將哌啶:DMF(20:80 v/v, 5.0 mL)添加至反應容器。週期性地攪拌該混合物3分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。可如下連續地洗滌樹脂五次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(4.0 mL)且週期性地攪拌所得混合物60秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將胺基酸及HOAt(0.2 M含於DMF中, 5.0 mL, 5 eq)之溶液添加至反應容器，接著添加DIC(0.2 M含於DMF中, 5.0 mL, 5 eq)。週期性地攪拌該混合物300 min，接著通過玻璃濾片除去反應溶液。如下連續地洗滌樹脂四次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(4.0 mL)且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將乙酸酞:DIEA:DMF(10:1:89 v/v/v, 5.0 mL)之溶液添加至反應容器。週期性地攪拌該混合物10分鐘，接著通過玻璃濾片除去溶液。如下連續地洗滌樹脂四次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(4.0 mL)且週期性地攪拌所得混合物90秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將所得樹脂直接用於下一步驟。

氯乙醯氯偶聯程序：

將哌啶:DMF(20:80 v/v, 5.0 mL)添加至含有來自前一步驟之樹脂之反應容器。週期性地攪拌該混合物3分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。將哌啶:DMF(20:80 v/v, 5.0 mL)添加至反應容器。週期性地攪

拌該混合物3分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。可如下連續地洗滌樹脂五次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(4.0 mL)且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將3.0 mL之DIPEA(4.0 mmol, 0.699 mL, 40 eq)及氯乙醯氯(2.0 mmol, 0.160 mL, 20 eq)含在DMF中之溶液添加至反應容器。週期性地攪拌該混合物12至18小時，接著除去溶液。如下連續地洗滌樹脂三次：每次洗滌，添加DMF(4.0 mL)於容器頂部且週期性地攪拌所得混合物90秒，然後除去溶液。如下連續地洗滌樹脂四次：每次洗滌，添加DCM(4.0 mL)於容器頂部且週期性地攪拌所得混合物90秒，然後除去溶液。

Prelude法B：

於自動化下在Prelude肽合成儀(Protein Technologies)上進行所有操作。在裝有底部玻璃濾片之10或45 mL聚丙稀中進行所有程序。可通過管的頂部添加DMF及DCM，此可均勻地向下沖洗管的側部。通過管的底部添加剩餘的試劑且向上通過玻璃濾片而與樹脂接觸。通過管的底部移去所有溶液。「週期性地攪拌」描述短暫脈衝N₂氣通過底部玻璃濾片；該脈衝持續約5秒且以每30秒進行。胺基酸溶液自製備超過三週後一般不使用。DMF=二甲基甲醯胺；HCTU=2-(6-氯-1-H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎗；DIPEA=二異丙基乙胺；Sieber=Fmoc-胺基-佔噸-3-基氧基，其中「3-基氧基」描述對聚苯乙烯樹脂連接的位置及種類。所使用的樹脂為具有Sieber連接子(在氮經Fmoc保護)之Merrifield聚合物(聚苯乙烯)；100至200網目，1% DVB，0.71 mmol/g負載。下文列出所使用的常見胺基酸，圓括號內指示側鏈保護基。Fmoc-Ala-OH；Fmoc-Arg(Pbf)-OH；Fmoc-Asn(Trt)-OH；Fmoc-Asp(OtBu)-OH；Fmoc-Bzt-OH；Fmoc-Cys(Trt)-OH；Fmoc-Dab(Boc)-OH；Fmoc-Dap(Boc)-OH；Fmoc-Gln(Trt)-OH；Fmoc-Gly-OH；Fmoc-His(Trt)-OH；Fmoc-Hyp(tBu)-OH；Fmoc-Ile-⁵

OH ; Fmoc-Leu-OH ; Fmoc-Lys(Boc)-OH ; Fmoc-Nle-OH ; Fmoc-Met-OH ; Fmoc-[N-Me]Ala-OH ; Fmoc-[N-Me]Nle-OH ; Fmoc-Phe-OH ; Fmoc-Pro-OH ; Fmoc-Sar-OH ; Fmoc-Ser(tBu)-OH ; Fmoc-Thr(tBu)-OH ; Fmoc-Trp(Boc)-OH ; Fmoc-Tyr(tBu)-OH ; Fmoc-Val-OH 。

「Prelude法B」之程序描述依0.100 mmol規格進行的實驗，其中該規格係由結合至樹脂之Sieber連接子的量決定。此規格相當於約140 mg的上述Sieber-Merrifield樹脂。所有程序可藉由依規格倍數調整所述體積擴大規格超過0.100 mmol規格。在胺基酸偶聯之前，以樹脂膨脹程序(下文描述作「樹脂膨脹程序」)開始所有肽合成序列。胺基酸與一級胺N端之偶聯採用下文所述之「單偶聯程序」。胺基酸與二級胺N端之偶聯採用下文所述之「二級胺偶聯程序」。氯乙醯基與肽的N端之偶聯由文詳述之「氯乙醯氯偶聯程序」或「氯乙酸偶聯程序」描述。

樹脂膨脹程序：

將Merrifield:Sieber樹脂(140 mg, 0.100 mmol)添加至40 mL聚丙烯固相反應容器。如下洗滌(膨脹)樹脂三次：將DMF(5.0 mL)及DCM(5.0 mL)添加至反應容器，此後，藉由從反應容器底部N₂鼓泡週期性地攪拌該混合物10分鐘，然後通過玻璃濾片除去溶劑。

單偶聯程序：

將哌啶:DMF(20:80 v/v, 5.0 mL)添加至含有來自前一步驟之樹脂之反應容器。週期性地攪拌該混合物3分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。將哌啶:DMF(20:80 v/v, 5.0 mL)添加至反應容器。週期性地攪拌該混合物3分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。可如下連續地洗滌樹脂五次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(4.0 mL)且週期性地攪拌所得混合物60秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將胺基酸(0.2 M含於DMF中, 5.0 mL, 10 eq)添加至反應容器，接著添加HCTU(0.2 M含

於DMF中，5.0 mL，10 eq)，且最後添加DIPEA(0.8 M含於DMF中，2.5 mL，20 eq)。週期性地攪拌該混合物30分鐘，接著通過玻璃濾片除去反應溶液。如下連續地洗滌樹脂四次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(4.0 mL)且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將乙酸酐:DIEA:DMF(10:1:89 v/v/v，5.0 mL)之溶液添加至反應容器。週期性地攪拌該混合物10分鐘，接著通過玻璃濾片除去溶液。如下連續地洗滌樹脂四次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(4.0 mL)且週期性地攪拌所得混合物90秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將所得樹脂直接用於下一步驟。

雙偶聯程序：

將哌啶:DMF(20:80 v/v，5.0 mL)添加至含有來自前一步驟之樹脂之反應容器。週期性地攪拌該混合物3分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。將哌啶:DMF(20:80 v/v，5.0 mL)添加至反應容器。週期性地攪拌該混合物3分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。可如下連續地洗滌樹脂五次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(4.0 mL)且週期性地攪拌所得混合物60秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將胺基酸(0.2 M含於DMF中，5.0 mL，10 eq)添加至反應容器，接著添加HCTU(0.2 M含於DMF中，5.0 mL，10 eq)，且最後添加DIPEA(0.8 M含於DMF中，2.5 mL，20 eq)。週期性地攪拌該混合物15分鐘，接著通過玻璃濾片除去反應溶液。通過容器頂部用DMF(4.0 mL)連續地洗滌樹脂3次且週期性地攪拌所得混合物60秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將胺基酸(0.2 M含於DMF中，5.0 mL，10 eq)添加至反應容器，接著添加HCTU(0.2 M含於DMF中，5.0 mL，10 eq)，且最後添加DIPEA(0.8 M含於DMF中，2.5 mL，20 eq)。週期性地攪拌該混合物15分鐘，接著通過玻璃濾片除去反應溶液。如下連續地洗滌樹脂四次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(4.0 mL)且週期性地攪拌所得混合物30秒，然

後通過玻璃濾片除去溶液。將所得樹脂直接用於下一步驟。

二級胺偶聯程序：

將哌啶:DMF(20:80 v/v, 5.0 mL)添加至含有來自前一步驟之樹脂之反應容器。週期性地攪拌該混合物3分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。將哌啶:DMF(20:80 v/v, 5.0 mL)添加至反應容器。週期性地攪拌該混合物3分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。可如下連續地洗滌樹脂五次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(4.0 mL)且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將胺基酸(0.2 M含於DMF中, 2.5 mL, 10 eq)添加至反應容器，接著添加HCTU(0.2 M含於DMF中, 2.5 mL, 10 eq)，且最後添加NMM(0.8 M含於DMF中, 1.5 mL, 12 eq)。週期性地攪拌該混合物12 h，接著通過玻璃濾片除去反應溶液。如下連續地洗滌樹脂四次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(4.0 mL)且週期性地攪拌所得混合物90秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將所得樹脂直接用於下一步驟。

氯乙醯氯偶聯程序A：

將哌啶:DMF(20:80 v/v, 5.0 mL)添加至含有來自前一步驟之樹脂之反應容器。週期性地攪拌該混合物3分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。將哌啶:DMF(20:80 v/v, 5.0 mL)添加至反應容器。週期性地攪拌該混合物3分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。可如下連續地洗滌樹脂五次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(4.0 mL)且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將3.0 mL之DIPEA(4.0 mmol, 0.699 mL, 40 eq)及氯乙醯氯(2.0 mmol, 0.160 mL, 20 eq)含在DMF中之溶液添加至反應容器。週期性地攪拌該混合物12至18小時，接著通過玻璃濾片除去溶液。如下連續地洗滌樹脂三次：每次洗滌，添加DMF(4.0 mL)於容器頂部且週期性地攪拌所得混合物90秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。如下連續地洗滌樹脂四次：

每次洗滌，添加 CH_2Cl_2 (2.0 mL)於容器頂部且週期性地攪拌所得混合物90秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。

氯乙酸偶聯程序B：

將哌啶:DMF(20:80 v/v, 5.0 mL)添加至含有來自前一步驟之樹脂之反應容器。週期性地攪拌該混合物3分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。將哌啶:DMF(20:80 v/v, 5.0 mL)添加至反應容器。週期性地攪拌該混合物3分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。可如下連續地洗滌樹脂五次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(4.0 mL)且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將DMF(2.0 mL)、氯乙酸(1.2 mmol, 113 mg, 12 eq)及N,N'-二異丙基碳化二亞胺(1.2 mmol, 0.187 mL, 12 eq)添加至反應容器。週期性地攪拌該混合物12至18小時，接著通過玻璃濾片除去溶液。如下連續地洗滌樹脂三次：每次洗滌，添加DMF(4.0 mL)於容器頂部且週期性地攪拌所得混合物90秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。如下連續地洗滌樹脂四次：每次洗滌，添加 CH_2Cl_2 (2.0 mL)於容器頂部且週期性地攪拌所得混合物90秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。

Prelude法C：

於自動化下在Prelude肽合成儀(Protein Technologies)上進行所有操作。除非註明否則在裝有底部玻璃濾片的10或45 mL聚丙烯管中進行所有程序。該管通過該管的底部及頂部兩者連接至Prelude肽合成儀。可通過管的頂部添加DMF及DCM，此可均勻地向下沖洗管的側部。通過管的底部添加剩餘的試劑且向上通過玻璃濾片而與樹脂接觸。通過管的底部移去所有溶液。「週期性地攪拌」描述短暫脈衝 N_2 氣通過底部玻璃濾片；該脈衝持續約5秒且以每30秒進行。胺基酸溶液自製備超過三週後一般不使用。HATU溶液在製備5天內使用。DMF=二甲基甲醯胺；HCTU=2-(6-氯-1-H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四

甲基脲鎘；HATU=3-氧化六氟磷酸1-[雙(二甲基胺基)亞甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎘；DIPEA=二異丙基乙胺；Sieber=Fmoc-胺基-佔噸-3-基氧基，其中「3-基氧基」描述對聚苯乙烯樹脂連接的位置及種類。所使用的樹脂為具有Sieber連接子(在氮經Fmoc保護)之Merrifield聚合物(聚苯乙烯)；100至200網目，1% DVB，0.71 mmol/g負載。下文列出所使用的常見胺基酸，圓括號內指示側鏈保護基。Fmoc-Ala-OH；Fmoc-Arg(Pbf)-OH；Fmoc-Asn(Trt)-OH；Fmoc-Asp(OtBu)-OH；Fmoc-Bzt-OH；Fmoc-Cys(Trt)-OH；Fmoc-Dab(Boc)-OH；Fmoc-Dap(Boc)-OH；Fmoc-Gln(Trt)-OH；Fmoc-Gly-OH；Fmoc-His(Trt)-OH；Fmoc-Hyp(tBu)-OH；Fmoc-Ile-OH；Fmoc-Leu-OH；Fmoc-Lys(Boc)-OH；Fmoc-Nle-OH；Fmoc-Met-OH；Fmoc-[N-Me]Ala-OH；Fmoc-[N-Me]Nle-OH；Fmoc-Phe-OH；Fmoc-Pro-OH；Fmoc-Sar-OH；Fmoc-Ser(tBu)-OH；Fmoc-Thr(tBu)-OH；Fmoc-Trp(Boc)-OH；Fmoc-Tyr(tBu)-OH；Fmoc-Val-OH。

「Prelude法C」之程序描述依0.100 mmol規格進行的實驗，其中該規格係由結合至樹脂之Sieber連接子的量決定。此規格相當於約140 mg的上述Sieber-Merrifield樹脂。所有程序可藉由依規格倍數調整所述體積擴大規格超過0.100 mmol規格。在胺基酸偶聯之前，以樹脂膨脹程序(下文描述作「樹脂膨脹程序」)開始所有肽合成序列。胺基酸與一級胺N端之偶聯採用下文所述之「單偶聯程序」。胺基酸與二級胺N端之偶聯採用下文所述之「二級胺偶聯程序」。樹脂之最後一次洗滌使用下文所述之「最終洗滌程序」

樹脂膨脹程序：

將Merrifield:Sieber樹脂(140 mg, 0.100 mmol)添加至40 mL聚丙稀固相反應容器。如下洗滌(膨脹)樹脂三次：將DMF(5.0 mL)及DCM(5.0 mL)添加至反應容器，此後，藉由從反應容器底部N₂鼓泡週

期性地攪拌該混合物10分鐘，然後通過玻璃濾片除去溶劑。

單偶聯程序：

將哌啶:DMF(20:80 v/v, 5.0 mL)添加至含有來自前一步驟之樹脂之反應容器。週期性地攪拌該混合物3分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。將哌啶:DMF(20:80 v/v, 5.0 mL)添加至反應容器。週期性地攪拌該混合物3分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。可如下連續地洗滌樹脂五次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(4.0 mL)且週期性地攪拌所得混合物60秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將胺基酸(0.2 M含於DMF中, 5.0 mL, 10 eq)添加至反應容器，接著添加HATU(0.2 M含於DMF中, 5.0 mL, 10 eq)，且最後添加DIPEA(0.8 M含於DMF中, 2.5 mL, 20 eq)。週期性地攪拌該混合物60分鐘，接著通過玻璃濾片除去反應溶液。如下連續地洗滌樹脂四次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(4.0 mL)且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將乙酸酐:DIEA:DMF(10:1:89 v/v/v, 5.0 mL)之溶液添加至反應容器。週期性地攪拌該混合物10分鐘，接著通過玻璃濾片除去溶液。如下連續地洗滌樹脂四次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(4.0 mL)且週期性地攪拌所得混合物90秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將所得樹脂直接用於下一步驟。

二級胺偶聯程序：

將哌啶:DMF(20:80 v/v, 5.0 mL)添加至含有來自前一步驟之樹脂之反應容器。週期性地攪拌該混合物3分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。將哌啶:DMF(20:80 v/v, 5.0 mL)添加至反應容器。週期性地攪拌該混合物3分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。可如下連續地洗滌樹脂五次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(4.0 mL)且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將胺基酸(0.2 M含於DMF中, 2.5 mL, 5 eq)添加至反應容器，接著添加HATU(0.2 M含

於DMF中，2.5 mL，5 eq)，且最後添加DIPEA(0.8 M含於DMF中，1.5 mL，12 eq)。週期性地攪拌該混合物300分鐘，接著通過玻璃濾片除去反應溶液。如下洗滌樹脂兩次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(4.0 mL)且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將胺基酸(0.2 M含於DMF中，2.5 mL，5 eq)添加至反應容器，接著添加HATU(0.2 M含於DMF中，2.5 mL，5 eq)，且最後添加DIPEA(0.8 M含於DMF中，1.5 mL，12 eq)。週期性地攪拌該混合物300分鐘，接著通過玻璃濾片除去反應溶液。如下洗滌樹脂兩次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(4.0 mL)且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將乙酸酐:DIEA:DMF(10:1:89 v/v/v，5.0 mL)之溶液添加至反應容器。週期性地攪通過玻璃濾片除去。如下連續地洗滌樹脂四次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(4.0 mL)且週期性地攪拌所得混合物90秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將所得樹脂直接用於下一步驟。

定制的胺基酸偶聯程序：

將吡啶:DMF(20:80 v/v，5.0 mL)添加至含有來自前一步驟之樹脂之反應容器。週期性地攪拌該混合物3分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。將吡啶:DMF(20:80 v/v，5.0 mL)添加至反應容器。週期性地攪拌該混合物3分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。可如下連續地洗滌樹脂五次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(4.0 mL)且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將胺基酸(0.2 M含於DMF中，0.5至2.5 mL，1至5 eq)添加至反應容器，接著添加HATU(0.2 M含於DMF中，0.5至2.5 mL，1至5 eq)，且最後添加DIPEA(0.8 M含於DMF中，0.5至1.5 mL，4至12 eq)。週期性地攪拌該混合物60分鐘至600分鐘，接著通過玻璃濾片除去反應溶液。如下洗滌樹脂兩次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(2.0 mL)且週期性地

攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將乙酸酐:DIEA:DMF(10:1:89 v/v/v, 5.0 mL)之溶液添加至反應容器。週期性地攪拌該混合物10分鐘，接著通過玻璃濾片除去溶液。如下連續地洗滌樹脂四次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(4.0 mL)且週期性地攪拌所得混合物90秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將所得樹脂直接用於下一步驟。

最後一次洗滌程序：

如下連續地洗滌樹脂兩次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(4.0 mL)且週期性地攪拌所得混合物90秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。如下連續地洗滌樹脂四次：每次洗滌，通過容器頂部添加DCM(4.0 mL)且週期性地攪拌所得混合物90秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將所得樹脂直接用於下一步驟。

氯乙酸偶聯程序：

注意手動步驟。將哌啶:DMF(20:80 v/v, 5.0 mL)添加至含有來自前一步驟之樹脂之反應容器。在室溫振盪該混合物5分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。如下連續地洗滌樹脂五次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(4.0 mL)且攪拌所得混合物，然後通過玻璃濾片除去溶液。將DMF(2.0 mL)、氯乙酸(1.2 mmol, 113 mg, 12 eq)及N,N'-二異丙基碳化二亞胺(1.2 mmol, 0.187 mL, 12 eq)添加至反應容器。在室溫振盪該混合物12至18小時，接著通過玻璃濾片除去溶液。如下連續地洗滌樹脂三次：每次洗滌，添加DMF(4.0 mL)於容器頂部且攪拌所得混合物90秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。如下連續地洗滌樹脂四次：每次洗滌，添加CH₂Cl₂(4.0 mL)於容器頂部且週期性地攪拌所得混合物90秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。

Prelude法D：

於自動化下在Prelude肽合成儀(Protein Technologies)上進行所有 5

操作。除非註明否則在裝有底部玻璃濾片的10或45 mL聚丙烯管中進行所有程序。該管通過該管的底部及頂部兩者連接至Prelude肽合成儀。可通過管的頂部添加DMF及DCM，此可均勻地向下沖洗管的側部。通過管的底部添加剩餘的試劑且向上通過玻璃濾片而與樹脂接觸。通過管的底部移去所有溶液。「週期性地攪拌」描述短暫脈衝N₂氣通過底部玻璃濾片；該脈衝持續約5秒且以每30秒進行。胺基酸溶液自製備超過三週後一般不使用。HATU溶液在製備5天內使用。DMF=二甲基甲醯胺；HCTU=2-(6-氯-1-H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎧；HATU=3-氧化六氟磷酸1-[雙(二甲基胺基)亞甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎧；DIPEA=二異丙基乙胺；Sieber=Fmoc-胺基-佔噸-3-基氧基，其中「3-基氧基」描述對聚苯乙烯樹脂連接的位置及種類。所使用的樹脂為具有Sieber連接子(在氮經Fmoc保護)之Merrifield聚合物(聚苯乙烯)；100至200網目，1% DVB，0.71 mmol/g負載。下文列出所使用的常見胺基酸，圓括號內指示側鏈保護基。Fmoc-Ala-OH；Fmoc-Arg(Pbf)-OH；Fmoc-Asn(Trt)-OH；Fmoc-Asp(OtBu)-OH；Fmoc-Bzt-OH；Fmoc-Cys(Trt)-OH；Fmoc-Dab(Boc)-OH；Fmoc-Dap(Boc)-OH；Fmoc-Gln(Trt)-OH；Fmoc-Gly-OH；Fmoc-His(Trt)-OH；Fmoc-Hyp(tBu)-OH；Fmoc-Ile-OH；Fmoc-Leu-OH；Fmoc-Lys(Boc)-OH；Fmoc-Nle-OH；Fmoc-Met-OH；Fmoc-[N-Me]Ala-OH；Fmoc-[N-Me]Nle-OH；Fmoc-Phe-OH；Fmoc-Pro-OH；Fmoc-Sar-OH；Fmoc-Ser(tBu)-OH；Fmoc-Thr(tBu)-OH；Fmoc-Trp(Boc)-OH；Fmoc-Tyr(tBu)-OH；Fmoc-Val-OH。

「Prelude法D」之程序描述依0.100 mmol規格進行的實驗，其中該規格係由結合至樹脂之Sieber連接子的量決定。此規格相當於約140 mg的上述Sieber-Merrifield樹脂。所有程序可藉由依規格倍數調整所述體積擴大規格超過0.100 mmol規格。在胺基酸偶聯之前，以樹脂膨

脹程序(下文描述作「樹脂膨脹程序」)開始所有肽合成序列。胺基酸與一級胺N端之偶聯採用下文所述之「單偶聯程序」。胺基酸與二級胺N端之偶聯採用下文所述之「二級胺偶聯程序」。樹脂之最後一次洗滌使用下文所述之「最後一次洗滌程序」

樹脂膨脹程序：

將Merrifield:Sieber樹脂(140 mg, 0.100 mmol)添加至40 mL聚丙烯固相反應容器。如下洗滌(膨脹)樹脂三次：將DMF(5.0 mL)及DCM(5.0 mL)添加至反應容器，此後，藉由從反應容器底部N₂鼓泡10分鐘週期性地攪拌混合物，然後通過玻璃濾片除去溶劑。

單偶聯程序：

將哌啶:DMF(20:80 v/v, 5.0 mL)添加至含有來自前一步驟之樹脂之反應容器。週期性地攪拌該混合物3分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。將哌啶:DMF(20:80 v/v, 5.0 mL)添加至反應容器。週期性地攪拌該混合物3分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。可如下連續地洗滌樹脂五次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(4.0 mL)且週期性地攪拌所得混合物60秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將胺基酸(0.2 M含於DMF中，1.25 mL, 2.5 eq)添加至反應容器，接著添加HATU(0.2 M含於DMF中，1.25 mL, 2.5 eq)，且最後添加DIPEA(0.8 M含於DMF中，0.75 mL, 5 eq)。週期性地攪拌該混合物30分鐘，接著通過玻璃濾片除去反應溶液。如下連續地洗滌樹脂四次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(4.0 mL)且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將乙酸酐:DIEA:DMF(10:1:89 v/v/v, 5.0 mL)之溶液添加至反應容器。週期性地攪拌該混合物15分鐘，接著通過玻璃濾片除去溶液。如下連續地洗滌樹脂四次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(4.0 mL)且週期性地攪拌所得混合物90秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將所得樹脂直接用於下一步驟。

二級胺偶聯程序：

將哌啶:DMF(20:80 v/v, 5.0 mL)添加至含有來自前一步驟之樹脂之反應容器。週期性地攪拌該混合物3分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。將哌啶:DMF(20:80 v/v, 5.0 mL)添加至反應容器。週期性地攪拌該混合物3分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。可如下連續地洗滌樹脂五次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(4.0 mL)且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將胺基酸(0.2 M含於DMF中, 1.25 mL, 2.5 eq)添加至反應容器，接著添加HATU(0.2 M含於DMF中, 1.25 mL, 2.5 eq)，且最後添加DIPEA(0.8 M含於DMF中, 0.75 mL, 5 eq)。週期性地攪拌該混合物30分鐘，接著通過玻璃濾片除去反應溶液。如下洗滌樹脂兩次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(4.0 mL)且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將胺基(0.2 M含於DMF中, 1.25 mL, 2.5 eq)添加至反應容器，接著添加HATU(0.2 M含於DMF中, 1.25 mL, 2.5 eq)，且最後添加DIPEA(0.8 M含於DMF中, 0.75 mL, 5 eq)。週期性地攪拌該混合物30分鐘，接著通過玻璃濾片除去反應溶液。如下洗滌樹脂兩次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(4.0 mL)且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將乙酸酐:DIEA:DMF(10:1:89 v/v/v, 5.0 mL)之溶液添加至反應容器。週期性地攪拌該混合物15分鐘，接著通過玻璃濾片除去溶液。如下洗滌樹脂兩次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(4.0 mL)且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將乙酸酐:DIEA:DMF(10:1:89 v/v/v, 5.0 mL)之溶液添加至反應容器。週期性地攪拌該混合物15分鐘，接著通過玻璃濾片除去溶液。如下連續地洗滌樹脂四次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(4.0 mL)且週期性地攪拌所得混合物90秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將所得樹脂直接用於下一步驟。

最後一次洗滌程序：

如下連續地洗滌樹脂兩次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(4.0 mL)且週期性地攪拌所得混合物90秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。如下連續地洗滌樹脂四次：每次洗滌，通過容器頂部添加DCM(4.0 mL)且週期性地攪拌所得混合物90秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將所得樹脂直接用於下一步驟。

氯乙酸偶聯程序：

注意手動步驟。將哌啶:DMF(20:80 v/v, 5.0 mL)添加至含有來自前一步驟之樹脂之反應容器。在室溫振盪該混合物5分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。如下連續地洗滌樹脂五次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(4.0 mL)且攪拌所得混合物，然後通過玻璃濾片除去溶液。將DMF(2.0 mL)、氯乙酸(1.2 mmol, 113 mg, 12 eq)及N,N'-二異丙基碳化二亞胺(1.2 mmol, 0.187 mL, 12 eq)添加至反應容器。在室溫振盪該混合物12至18小時，接著通過玻璃濾片除去溶液。如下連續地洗滌樹脂三次：每次洗滌，添加DMF(4.0 mL)於容器頂部且攪拌所得混合物90秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。如下連續地洗滌樹脂四次：每次洗滌，添加CH₂Cl₂(4.0 mL)於容器頂部且週期性地攪拌所得混合物90秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。

CEM法A：

於自動化下在CEM Liberty微波肽合成儀(CEM Corporation)上進行所有操作。除非註明否則在CEM Discovery微波單元裝有底部玻璃濾片的30或125 mL聚丙烯管中進行所有程序。該管通過該管的底部及頂部兩者連接至CEM Liberty合成儀。可通過管的頂部及底部添加DMF及DCM，此可均勻地向下沖洗管的側部。除了從頂部轉移樹脂時，通過管的底部移去所有溶液。「週期性鼓泡」描述短暫地鼓泡N₂氣通過底部玻璃濾片。胺基酸溶液自製備超過三週後一般不使用。 5

HATU溶液在製備5天內使用。DMF=二甲基甲醯胺；HCTU=2-(6-氯-1-H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎘；HATU=3-氧化六氟磷酸1-[雙(二甲基胺基)亞甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎘；DIPEA=二異丙基乙胺；Sieber=Fmoc-胺基-佔噸-3-基氧基，其中「3-基氧基」描述對聚苯乙烯樹脂連接的位置及種類。所使用的樹脂為具有Sieber連接子(在氮經Fmoc保護)之Merrifield聚合物(聚苯乙烯)；100至200網目，1% DVB，0.71 mmol/g負載。可在合成中使用其他常見的樹脂諸如Rink、氯三苯甲基(ChloroTrityl)或其他酸敏感連接子，除非另外註明，否則在特定實例中使用Seiber醯胺樹脂。下文列出所使用的常見胺基酸，圓括號內指示側鏈保護基。Fmoc-Ala-OH；Fmoc-Arg(Pbf)-OH；Fmoc-Asn(Trt)-OH；Fmoc-Asp(OtBu)-OH；Fmoc-Bzt-OH；Fmoc-Cys(Trt)-OH；Fmoc-Dab(Boc)-OH；Fmoc-Dap(Boc)-OH；Fmoc-Gln(Trt)-OH；Fmoc-Gly-OH；Fmoc-His(Trt)-OH；Fmoc-Hyp(tBu)-OH；Fmoc-Ile-OH；Fmoc-Leu-OH；Fmoc-Lys(Boc)-OH；Fmoc-Nle-OH；Fmoc-Met-OH；Fmoc-[N-Me]Ala-OH；Fmoc-[N-Me]Nle-OH；Fmoc-Orn(Boc)-OH；Fmoc-Phe-OH；Fmoc-Pro-OH；Fmoc-Sar-OH；Fmoc-Ser(tBu)-OH；Fmoc-Thr(tBu)-OH；Fmoc-Trp(Boc)-OH；Fmoc-Tyr(tBu)-OH；Fmoc-Val-OH。

「CEM法A」之程序描述依0.100 mmol規格進行的實驗，其中該規格係由結合至樹脂之Sieber連接子的量決定。此規格相當於約140 mg的上述Sieber-Merrifield樹脂。所有程序可藉由依規格倍數調整所述體積擴大規格超過0.100 mmol規格。在胺基酸偶聯之前，以樹脂膨脹程序(下文描述作「樹脂膨脹程序」)開始所有肽合成序列。胺基酸與一級胺N端之偶聯採用下文所述之「單偶聯程序」。胺基酸與二級胺N端之偶聯採用下文所述之「二級胺偶聯程序」。氯乙醯基與肽的N端之偶聯由上文詳述之「氯乙醯氯偶聯程序」或「氯乙酸偶聯程序」

描述。

樹脂膨脹程序：

將Merrifield:Sieber樹脂(140 mg, 0.100 mmol)添加至50 mL聚丙烯圓錐形管。然後，將DMF(7 mL)添加至該管，接著添加DCM(7 mL)。接著將樹脂從容器頂部轉移至反應容器。另重複該程序兩次。添加DMF(7 mL)，接著添加DCM(7 mL)。藉由從反應容器底部N₂鼓泡15分鐘使樹脂膨脹，然後通過玻璃濾片除去溶劑。

標準偶聯程序：

將哌啶:DMF(20:80 v/v, 5.0 mL)之溶液添加至含有來自前一步驟之樹脂之反應容器。週期性地攪拌該混合物3分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。將哌啶:DMF(20:80 v/v, 5.0 mL)之溶液添加至反應容器。週期性地攪拌該混合物3分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。如下連續地洗滌樹脂三次：用DMF(7 mL)從頂部洗滌，接著用DMF(7 mL)從底部洗滌及最後用DMF(7 mL)從頂部洗滌。將胺基酸(0.2 M含於DMF中，2.5 mL, 5 eq)、HATU(0.5 M含於DMF中，1.0 mL, 5 eq)及DIPEA(2 M含於NMP中，0.5 mL, 10 eq)添加至反應容器。除了在50 °C 偶聯之Fmoc-Cys(Trt)-OH及Fmoc-His(Trt)-OH之外，針對所有胺基酸藉由在75 °C N₂鼓泡5分鐘混合該混合物，通過玻璃濾片除去反應溶液。如下連續地洗滌樹脂三次：用DMF(7 mL)從頂部洗滌，接著用DMF(7 mL)從底部洗滌及最後用DMF(7 mL)從頂部洗滌。將乙酸酐:DIEA:DMF(10:1:89 v/v/v, 5.0 mL)之溶液添加至反應容器。在65 °C 週期性地鼓泡該混合物2分鐘，接著通過玻璃濾片除去溶液。如下連續地洗滌樹脂三次：用DMF(7 mL)從頂部洗滌，接著用DMF(7 mL)從底部洗滌及最後用DMF(7 mL)從頂部洗滌。將所得樹脂直接用於下一步驟。

雙偶聯偶聯程序：

5

將哌啶:DMF(20:80 v/v, 5.0 mL)之溶液添加至含有來自前一步驟之樹脂之反應容器。週期性地攪拌該混合物3分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。將哌啶:DMF(20:80 v/v, 5.0 mL)之溶液添加至反應容器。週期性地攪拌該混合物3分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。如下連續地洗滌樹脂三次：用DMF(7 mL)從頂部洗滌，接著用DMF(7 mL)從底部洗滌及最後用DMF(7 mL)從頂部洗滌。將胺基酸(0.2 M含於DMF中, 2.5 mL, 5 eq)、HATU(0.5 M含於DMF中, 1.0 mL, 5 eq)及DIPEA(2 M含於NMP中, 0.5 mL, 10 eq)添加至反應容器。除了在50 °C 偶聯之Fmoc-Cys(Trt)-OH及Fmoc-His(Trt)-OH之外，針對所有胺基酸藉由在75 °C N₂鼓泡5分鐘混合該混合物，通過玻璃濾片除去反應溶液。如下連續地洗滌樹脂三次：用DMF(7 mL)從頂部洗滌，接著用DMF(7 mL)從底部洗滌及最後用DMF(7 mL)從頂部洗滌。將胺基酸(0.2 M含於DMF中, 2.5 mL, 5 eq)、HATU(0.5 M含於DMF中, 1.0 mL, 5 eq)及DIPEA(2 M含於NMP中, 0.5 mL, 10 eq)添加至反應容器。除了在50 °C 偶聯之Fmoc-Cys(Trt)-OH及Fmoc-His(Trt)-OH之外，針對所有胺基酸藉由在75 °C N₂鼓泡5分鐘混合該混合物，通過玻璃濾片除去反應溶液。如下連續地洗滌樹脂三次：用DMF(7 mL)從頂部洗滌，接著用DMF(7 mL)從底部洗滌及最後用DMF(7 mL)從頂部洗滌。將乙酸酐:DIEA:DMF(10:1:89 v/v/v, 5.0 mL)之溶液添加至反應容器。在65 °C 週期性地鼓泡該混合物2分鐘，接著通過玻璃濾片除去溶液。如下連續地洗滌樹脂三次：用DMF(7 mL)從頂部洗滌，接著用DMF(7 mL)從底部洗滌及最後用DMF(7 mL)從頂部洗滌。將所得樹脂直接用於下一步驟。

二級胺偶聯程序：

將5%哌啶及0.1 M HOBt含在DMF(7 mL)中之溶液添加至含有來自前一步驟之樹脂之反應容器。在75 °C 週期性地振盪該混合物3分鐘

且接著除去溶液。再次重複此程序。如下連續地洗滌樹脂三次：用DMF(7 mL)從頂部洗滌，接著用DMF(7 mL)從底部洗滌及最後用DMF(7 mL)從頂部洗滌。將胺基酸(0.2 M含於DMF中，2.5 mL，5 eq)、HCTU(0.5 M含於DMF中，1.0 mL，5 eq)及DIPEA(2 M含於NMP中，0.5 mL，10 eq)添加至反應容器。針對所有胺基酸藉由在75°C N₂鼓泡5分鐘(Fmoc-Cys(Trt)-OH及Fmoc-His(Trt)-OH在50°C)混合該混合物，接著的6 h不加熱。除去後，如下連續地洗滌樹脂三次：用DMF(7 mL)從頂部洗滌，接著用DMF(7 mL)從底部洗滌及最後用DMF(7 mL)從頂部洗滌。將乙酸酐:DIEA:DMF(10:1:89 v/v/v，5.0 mL)之溶液添加至反應容器。在65°C週期性地鼓泡該混合物2分鐘，接著除去溶液。如下連續地洗滌樹脂三次：用DMF(7 mL)從頂部洗滌，接著用DMF(7 mL)從底部洗滌及最後用DMF(7 mL)從頂部洗滌。將所得樹脂直接用於下一步驟。

定制的胺基酸偶聯程序：

將哌啶:DMF(20:80 v/v，5.0 mL)之溶液添加至含有來自前一步驟之樹脂之反應容器。週期性地攪拌該混合物3分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。將哌啶:DMF(20:80 v/v，5.0 mL)之溶液添加至反應容器。週期性地攪拌該混合物3分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。如下連續地洗滌樹脂三次：用DMF(7 mL)從頂部洗滌，接著用DMF(7 mL)從底部洗滌及最後用DMF(7 mL)從頂部洗滌。將含有HATU(2.5 eq至10 eq)之胺基酸溶液(1.25 mL至5 mL，2.5 eq至10 eq)添加至反應容器，及最後添加DIPEA(2 M含於NMP中，0.5 mL至1 mL，20 eq)。藉由在25°C至75°C N₂鼓泡5分鐘至2小時混合該混合物，接著通過玻璃濾片除去反應溶液。如下連續地洗滌樹脂三次：用DMF(7 mL)從頂部洗滌，接著用DMF(7 mL)從底部洗滌及最後用DMF(7 mL)從頂部洗滌。將乙酸酐:DIEA:DMF(10:1:89 v/v/v，5.0 mL)之溶液添加至反應 s

容器。在65℃週期性地鼓泡該混合物2分鐘，接著通過玻璃濾片除去溶液。如下連續地洗滌樹脂三次：用DMF(7 mL)從頂部洗滌，接著用DMF(7 mL)從底部洗滌及最後用DMF(7 mL)從頂部洗滌。將所得樹脂直接用於下一步驟。

*Symphony*法A：

於自動化下在Symphony肽合成儀(Protein Technologies)上進行所有操作。除非註明否則在裝有底部玻璃濾片的Symphony聚丙烯管中進行所有程序。該管通過該管的底部及頂部兩者連接至Symphony肽合成儀。通過管的底部添加所有溶劑、DMF、DCM、胺基酸及試劑且向上通過玻璃濾片而與樹脂接觸。通過管的底部移去所有溶液。

「週期性地攪拌」描述短暫脈衝N₂氣通過底部玻璃濾片；該脈衝持續約5秒且以每15秒進行。胺基酸溶液自製備超過三週後一般不使用。HATU溶液在製備5天內使用。DMF=二甲基甲醯胺；HCTU=2-(6-氯-1-H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎗；HATU=3-氧化六氟磷酸1-[雙(二甲基胺基)亞甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎗；NMM=n-甲基嗎啉；DIPEA=二異丙基乙胺；Sieber=Fmoc-胺基-佔噸-3-基氧基，其中「3-基氧基」描述對聚苯乙烯樹脂連接的位置及種類。所使用的樹脂為具有Sieber連接子(在氮經Fmoc保護)之Merrifield聚合物(聚苯乙烯)；100至200網目，1% DVB，0.71 mmol/g負載。亦可在合成中使用其他常見的酸敏感樹脂，諸如Rink或官能化氯三苯甲基樹脂。下文列出所使用的常見胺基酸，圓括號內指示側鏈保護基。

Fmoc-Ala-OH ; Fmoc-Arg(Pbf)-OH ; Fmoc-Asn(Trt)-OH ; Fmoc-Asp(OtBu)-OH ; Fmoc-Bzt-OH ; Fmoc-Cys(Trt)-OH ; Fmoc-Dab(Boc)-OH ; Fmoc-Dap(Boc)-OH ; Fmoc-Gln(Trt)-OH ; Fmoc-Gly-OH ; Fmoc-His(Trt)-OH ; Fmoc-Hyp(tBu)-OH ; Fmoc-Ile-OH ; Fmoc-Leu-OH ; Fmoc-Lys(Boc)-OH ; Fmoc-Nle-OH ; Fmoc-Met-OH ; Fmoc-[N-

Me]Ala-OH ; Fmoc-[N-Me]Nle-OH ; Fmoc-Phe-OH ; Fmoc-Pro-OH ; Fmoc-Sar-OH ; Fmoc-Ser(tBu)-OH ; Fmoc-Thr(tBu)-OH ; Fmoc-Trp(Boc)-OH ; Fmoc-Tyr(tBu)-OH ; Fmoc-Val-OH 。

「Symphony法A」之程序描述依0.050 mmol規格進行的實驗，其中該規格係由結合至樹脂之Sieber連接子的量決定。此規格相當於約70 mg的上述Sieber-Merrifield樹脂。所有程序可藉由依規格倍數調整所述體積擴大規格超過0.050 mmol規格。在胺基酸偶聯之前，以樹脂膨脹程序(下文描述作「膨脹程序」)開始所有肽合成序列。胺基酸與一級胺N端之偶聯採用下文所述之「標準偶聯程序」。胺基酸與二級胺N端之偶聯使用「雙偶聯」，定制的胺基酸通過下文所述之胺基酸「空白偶聯」之手動空白添加進行偶聯。

膨脹程序：

將Merrifield:Sieber樹脂(70 mg, 0.050 mmol)添加至Symphony聚丙烯固相反應容器。如下洗滌(膨脹)樹脂三次：將DMF(2.5 mL)添加至反應容器，此後，藉由從反應容器底部N₂鼓泡週期性地攪拌該混合物10分鐘，然後通過玻璃濾片除去溶劑。將哌啶:DMF(20:80 v/v，2.5 mL)添加至反應容器。週期性地攪拌該混合物2.5分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。如下連續地洗滌樹脂六次：每次洗滌，通過容器底部添加DMF(2.5 mL)且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將胺基酸(0.2 M含於DMF中，1.25 mL，5 eq)添加至反應容器，接著添加HATU(0.2 M含於DMF中，1.25 mL，5 eq)，且最後添加NMM(0.8 M含於DMF中，1.25 mL，10 eq)。週期性地攪拌該混合物10分鐘，接著通過玻璃濾片除去反應溶液。以通過容器底部添加的DMF(6.25 mL)洗滌樹脂且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將胺基酸(0.2 M含於DMF中，1.25 mL，5 eq)添加至反應容器，接著添加HATU(0.2 M含於DMF中，1.25 mL，5

eq)，且最後添加NMM(0.8 M含於DMF中，1.25 mL，10 eq)。週期性地攪拌該混合物10分鐘，接著通過玻璃濾片除去反應溶液。如下洗滌樹脂三次：將DMF(2.5 mL)添加至反應容器，此後，藉由從反應容器底部N₂鼓泡週期性地攪拌該混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶劑。將所得樹脂直接用於下一步驟。

標準偶聯程序：

如下洗滌樹脂三次：將DMF(2.5 mL)添加至反應容器，此後，藉由從反應容器底部N₂鼓泡週期性地攪拌該混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶劑。將哌啶:DMF(20:80 v/v，2.5 mL)添加至反應容器。週期性地攪拌該混合物2.5分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。如下洗滌樹脂6次：每次洗滌，通過容器底部添加DMF(2.5 mL)且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將胺基酸(0.2 M含於DMF中，1.25 mL，5 eq)添加至反應容器，接著添加HATU(0.2 M含於DMF中，1.25 mL，5 eq)，且最後添加NMM(0.8 M含於DMF中，1.25 mL，10 eq)。週期性地攪拌該混合物10分鐘，接著通過玻璃濾片除去反應溶液。以通過容器底部添加的DMF(6.25 mL)洗滌樹脂且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將胺基酸(0.2 M含於DMF中，1.25 mL，5 eq)添加至反應容器，接著添加HATU(0.2 M含於DMF中，1.25 mL，5 eq)，且最後添加NMM(0.8 M含於DMF中，1.25 mL，10 eq)。週期性地攪拌該混合物10分鐘，接著通過玻璃濾片除去反應溶液。如下連續地洗滌樹脂三次：每次洗滌，通過容器底部添加DMF(2.5 mL)且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將所得樹脂直接用於下一步驟。

二級胺偶聯程序：

如下洗滌樹脂三次：將DMF(2.5 mL)添加至反應容器，此後，藉由從反應容器底部N₂鼓泡週期性地攪拌該混合物30秒，然後通過玻璃

濾片除去溶劑。將哌啶:DMF(20:80 v/v, 2.5 mL)添加至反應容器。週期性地攪拌該混合物2.5分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。如下洗滌樹脂6次：每次洗滌，通過容器底部添加DMF(2.5 mL)且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將胺基酸(0.2 M含於DMF中, 1.25 mL, 5 eq)添加至反應容器，接著添加HATU(0.2 M含於DMF中, 1.25 mL, 5 eq)，且最後添加NMM(0.8 M含於DMF中, 1.25 mL, 10 eq)。週期性地攪拌該混合物300分鐘，接著通過玻璃濾片除去反應溶液。以通過容器底部添加的DMF(6.25 mL)洗滌樹脂且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將胺基酸(0.2 M含於DMF中, 1.25 mL, 5 eq)添加至反應容器，接著添加HATU(0.2 M含於DMF中, 1.25 mL, 5 eq)，且最後添加NMM(0.8 M含於DMF中, 1.25 mL, 10 eq)。週期性地攪拌該混合物300分鐘，接著通過玻璃濾片除去反應溶液。如下連續地洗滌樹脂三次：每次洗滌，通過容器底部添加DMF(2.5 mL)且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將所得樹脂直接用於下一步驟。

定制的胺基酸偶聯程序：

如下洗滌樹脂三次：將DMF(2.5 mL)添加至反應容器，此後，藉由從反應容器底部N₂鼓泡週期性地攪拌該混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶劑。將哌啶:DMF(20:80 v/v, 2.5 mL)添加至反應容器。週期性地攪拌該混合物2.5分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。如下洗滌樹脂6次：每次洗滌，通過容器底部添加DMF(2.5 mL)且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。藉由Symphony軟體暫停合成以將定制的胺基酸(0.2 M含於DMF中, 1.25 mL, 5 eq)手動添加至反應容器，接著重新啟動自動化：以添加HATU(0.2 M含於DMF中, 1.25 mL, 5 eq)，且最後添加NMM(0.8 M含於DMF中, 1.25 mL, 10 eq)。週期性地攪拌該混合物300分鐘，接著通過玻璃濾

片除去反應溶液。如下以通過容器底部添加的DMF(2.5 mL)洗滌樹脂六次且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將Ac₂O/DIPEA/DMF(v/v/v 1:1:3 2.5 mL)添加至反應容器，週期性地攪拌該混合物10分鐘，接著通過玻璃濾片除去反應溶液。如下連續地洗滌樹脂三次：每次洗滌，通過容器底部添加DMF(2.5 mL)且週期性地攪拌所得混合物90秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將所得樹脂直接用於下一步驟。

*Symphony*法B：

於自動化下在Symphony肽合成儀(Protein Technologies)上進行所有操作。除非註明否則在裝有底部玻璃濾片的Symphony聚丙烯管中進行所有程序。該管通過該管的底部及頂部兩者連接至Symphony肽合成儀。通過管的底部添加所有溶劑、DMF、DCM、胺基酸及試劑且向上通過玻璃濾片而與樹脂接觸。通過管的底部移去所有溶液。

「週期性地攪拌」描述短暫脈衝N₂氣通過底部玻璃濾片；該脈衝持續約5秒且以每15秒進行。胺基酸溶液自製備超過三週後一般不使用。HATU溶液在製備5天內使用。DMF=二甲基甲醯胺；HCTU=2-(6-氯-1-H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎘；HATU=3-氧化六氟磷酸1-[雙(二甲基胺基)亞甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎘；NMM=n-甲基嗎啉；DIPEA=二異丙基乙胺；Sieber=Fmoc-胺基-佔噸-3-基氧基，其中「3-基氧基」描述對聚苯乙烯樹脂連接的位置及種類。所使用的樹脂為具有Sieber連接子(在氮經Fmoc保護)之Merrifield聚合物(聚苯乙烯)；100至200網目，1% DVB，0.71 mmol/g負載。亦可在合成中使用其他常見的酸敏感樹脂，諸如Rink或官能化基氯三苯甲基樹脂。下文列出所使用的常見胺基酸，圓括號內指示側鏈保護基。Fmoc-Ala-OH；Fmoc-Arg(Pbf)-OH；Fmoc-Asn(Trt)-OH；Fmoc-Asp(OtBu)-OH；Fmoc-Bzt-OH；Fmoc-Cys(Trt)-OH；Fmoc-Dab(Boc)-

OH ; Fmoc-Dap(Boc)-OH ; Fmoc-Gln(Trt)-OH ; Fmoc-Gly-OH ; Fmoc-His(Trt)-OH ; Fmoc-Hyp(tBu)-OH ; Fmoc-Ile-OH ; Fmoc-Leu-OH ; Fmoc-Lys(Boc)-OH ; Fmoc-Nle-OH ; Fmoc-Met-OH ; Fmoc-[N-Me]Ala-OH ; Fmoc-[N-Me]Nle-OH ; Fmoc-Phe-OH ; Fmoc-Pro-OH ; Fmoc-Sar-OH ; Fmoc-Ser(tBu)-OH ; Fmoc-Thr(tBu)-OH ; Fmoc-Trp(Boc)-OH ; Fmoc-Tyr(tBu)-OH ; Fmoc-Val-OH 。

「Symphony法B」之程序描述依0.050 mmol規格進行的實驗，其中該規格係由結合至樹脂之Sieber連接子的量決定。此規格相當於約70 mg的上述Sieber-Merrifield樹脂。所有程序可藉由依規格倍數調整所述體積擴大規格超過0.050 mmol規格。在胺基酸偶聯之前，以樹脂膨脹程序(下文描述作「膨脹程序」)開始所有肽合成序列。胺基酸與一級胺N端之偶聯採用下文所述之「標準偶聯程序」。胺基酸與二級胺N端之偶聯使用「二級胺基酸偶聯程序B」，定制的胺基酸通過下文所述之胺基酸「定制的胺基酸偶聯程序」之手動空白添加偶聯，及使用下文所述之「最終封端程序」添加氯乙醯基酸酐至序列的最後位置。

膨脹程序：

將Merrifield:Sieber樹脂(70 mg, 0.050 mmol)添加至Symphony聚丙烯固相反應容器。如下洗滌(膨脹)樹脂三次：將DMF(2.5 mL)添加至反應容器，此後，藉由從反應容器底部N₂鼓泡週期性地攪拌該混合物10分鐘，然後通過玻璃濾片除去溶劑。將吡啶:DMF(20:80 v/v, 2.5 mL)添加至反應容器。週期性地攪拌該混合物2.5分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。如下連續地洗滌樹脂六次：每次洗滌，通過容器底部添加DMF(2.5 mL)且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將胺基酸(0.2 M含於DMF中，1.25 mL, 5 eq)添加至反應容器，接著添加HATU(0.2 M含於DMF中，1.25 mL, 5 eq)，且最後S

添加NMM(0.8 M含於DMF中，1.25 mL，10 eq)。週期性地攪拌該混合物10分鐘，接著通過玻璃濾片除去反應溶液。以通過容器底部添加的DMF(6.25 mL)洗滌樹脂且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將胺基酸(0.2 M含於DMF中，1.25 mL，5 eq)添加至反應容器，接著添加HATU(0.2 M含於DMF中，1.25 mL，5 eq)，且最後添加NMM(0.8 M含於DMF中，1.25 mL，10 eq)。週期性地攪拌該混合物10分鐘，接著通過玻璃濾片除去反應溶液。如下洗滌樹脂三次：將DMF(2.5 mL)添加至反應容器，此後，藉由從反應容器底部N₂鼓泡週期性地攪拌該混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶劑。將所得樹脂直接用於下一步驟。

標準偶聯程序：

如下洗滌樹脂三次：將DMF(2.5 mL)添加至反應容器，此後，藉由從反應容器底部N₂鼓泡週期性地攪拌該混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶劑。將哌啶:DMF(20:80 v/v，2.5 mL)添加至反應容器。週期性地攪拌該混合物2.5分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。如下洗滌樹脂6次：每次洗滌，通過容器底部添加DMF(2.5 mL)且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將胺基酸(0.2 M含於DMF中，1.25 mL，5 eq)添加至反應容器，接著添加HATU(0.2 M含於DMF中，1.25 mL，5 eq)，且最後添加NMM(0.8 M含於DMF中，1.25 mL，10 eq)。週期性地攪拌該混合物15分鐘，接著通過玻璃濾片除去反應溶液。如下洗滌樹脂6次：通過容器底部添加DMF(2.5 mL)且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將Ac₂O/DIPEA/DMF(v/v/v 1:1:3 2.5 mL)添加至反應容器，週期性地攪拌該混合物10分鐘，接著通過玻璃濾片除去反應溶液。如下連續地洗滌樹脂六次：每次洗滌，通過容器底部添加DMF(2.5 mL)且週期性地攪拌所得混合物90秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將所得樹脂直接

用於下一步驟。

二級胺偶聯程序：

如下洗滌樹脂三次：將DMF(2.5 mL)添加至反應容器，此後，藉由從反應容器底部N₂鼓泡週期性地攪拌該混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶劑。將哌啶:DMF(20:80 v/v, 2.5 mL)添加至反應容器。週期性地攪拌該混合物2.5分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。如下洗滌樹脂6次：每次洗滌，通過容器底部添加DMF(2.5 mL)且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將胺基酸(0.2 M含於DMF中，1.25 mL，5 eq)添加至反應容器，接著添加HATU(0.2 M含於DMF中，1.25 mL，5 eq)，且最後添加NMM(0.8 M含於DMF中，1.25 mL，10 eq)。週期性地攪拌該混合物15分鐘，接著通過玻璃濾片除去反應溶液。以通過容器底部添加的DMF(6.25 mL)洗滌樹脂且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將胺基酸(0.2 M含於DMF中，1.25 mL，5 eq)添加至反應容器，接著添加HATU(0.2 M含於DMF中，1.25 mL，5 eq)，且最後添加NMM(0.8 M含於DMF中，1.25 mL，10 eq)。週期性地攪拌該混合物15分鐘，接著通過玻璃濾片除去反應溶液。如下連續地洗滌樹脂三次：每次洗滌，通過容器底部添加DMF(2.5 mL)且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將Ac₂O/DIPEA/DMF(v/v/v 1:1:3 2.5 mL)添加至反應容器，週期性地攪拌該混合物10分鐘，接著通過玻璃濾片除去反應溶液。如下連續地洗滌樹脂六次：每次洗滌，通過容器底部添加DMF(2.5 mL)且週期性地攪拌所得混合物90秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將所得樹脂直接用於下一步驟。

定制的胺基酸偶聯程序：

如下洗滌樹脂三次：將DMF(2.5 mL)添加至反應容器，此後，藉由從反應容器底部N₂鼓泡週期性地攪拌該混合物30秒，然後通過玻璃

濾片除去溶劑。將哌啶:DMF(20:80 v/v, 2.5 mL)添加至反應容器。週期性地攪拌該混合物2.5分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。如下洗滌樹脂6次：每次洗滌，通過容器底部添加DMF(2.5 mL)且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。藉由用於手動添加定制的胺基酸至反應容器之系統(0.2 M含於DMF中，1.25 mL，5 eq)暫停該系統，接著重新啟動自動化以對反應囊添加HATU(0.2 M含於DMF中，1.25 mL，5 eq)，及最後添加NMM(0.8 M含於DMF中，1.25 mL，10 eq)。週期性地攪拌該混合物15分鐘，接著通過玻璃濾片除去反應溶液。如下洗滌樹脂6次：通過容器底部添加DMF(2.5 mL)且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將Ac₂O/DIPEA/DMF(v/v/v 1:1:3 2.5 mL)添加至反應容器，週期性地攪拌該混合物10分鐘，接著通過玻璃濾片除去反應溶液。如下連續地洗滌樹脂六次：每次洗滌，通過容器底部添加DMF(2.5 mL)且週期性地攪拌所得混合物90秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將所得樹脂直接用於下一步驟。

最終封端程序：

如下洗滌樹脂三次：將DMF(2.5 mL)添加至反應容器，此後，藉由從反應容器底部N₂鼓泡週期性地攪拌該混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶劑。將哌啶:DMF(20:80 v/v, 2.5 mL)添加至反應容器。週期性地攪拌該混合物2.5分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。如下洗滌樹脂6次：每次洗滌，通過容器底部添加DMF(2.5 mL)且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將NMM(0.8 M含於DMF中，1.25 mL，10 eq)添加至反應容器，接著添加氯乙酸酐(0.4 M含於DMF中，1.25 mL，10 eq)。週期性地攪拌該混合物15分鐘，接著通過玻璃濾片除去反應溶液。以通過反應器底部添加的DMF(6.25 mL)洗滌樹脂且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過

玻璃濾片除去溶液。將NMM(0.8 M含於DMF中，1.25 mL，10 eq)添加至反應容器，接著添加氯乙酸酐(0.4 M含於DMF中，1.25 mL，10 eq)。週期性地攪拌該混合物15分鐘，接著通過玻璃濾片除去反應溶液。如下洗滌樹脂6次：通過容器底部添加DMF(2.5 mL)且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將Ac₂O/DIPEA/DMF(v/v/v 1:1:3 2.5 mL)添加至反應容器，週期性地攪拌該混合物10分鐘，接著通過玻璃濾片除去反應溶液。如下連續地洗滌樹脂六次：每次洗滌，通過容器底部添加DMF(2.5 mL)且週期性地攪拌所得混合物30秒。然後通過玻璃濾片除去溶液如下連續地洗滌樹脂四次：每次洗滌，通過容器底部添加DCM(2.5 mL)且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。接著用氮氣流乾燥所得樹脂10 min。

整體脫除保護基法A：

除非另外註明，否則手動進行所有操作。「整體脫除保護基法A」之程序係以0.100 mmol規格上進行的實驗，其中該規格係由結合至樹脂之Sieber連接子的量決定。該程序可藉由依規格倍數調整所述體積使規格為超過0.100 mmol規格。使用三氟乙酸:水:三異丙基矽烷:二硫蘇糖醇(92.5:2.5:2.5:2.5 v:v:v:w)製備「脫除保護基溶液」。自反應容器排出樹脂且轉移至25 mL配備玻璃濾片之針筒。將「脫除保護基溶液」(5.0 mL)添加至該針筒。在振盪器中混合該混合物85 min。過濾該溶液，濃縮且在乙醚(30 mL)中稀釋。離心沉澱固體3分鐘。倒出上清液且將固體再懸浮於乙醚(25 mL)中。離心懸浮液3分鐘。倒出上清液且將殘餘固體懸浮於乙醚(25 mL)中。離心懸浮液3分鐘。倒出上清液且在高真空下乾燥殘餘固體。獲得呈白色至灰白色固體之肽粗產物。

整體脫除保護基法B：

除非另外註明，否則手動進行所有操作。「整體脫除保護基法B」之程序係以0.04 mmol規格上進行的實驗，其中該規格係由結合至樹脂之Sieber連接子的量決定。該程序可藉由依規格倍數調整所述體積使規格為超過0.04 mmol規格。使用三氟乙酸:三異丙基矽烷(96:4; v:v)製備「脫除保護基溶液」。自反應容器排出樹脂且轉移至10 mL配備玻璃濾片之針筒。將「脫除保護基溶液」(2.0至3.0 mL)添加至針筒。在振盪器中混合該混合物1 h或1.5 h。過濾該溶液，用脫除保護基溶液(0.5 mL)洗滌，濃縮，然後在乙醚(30 mL)中稀釋。離心沉澱固體3分鐘。倒出上清液且將固體再懸浮於乙醚(25 mL)中。離心懸浮液3分鐘。倒出上清液且將殘餘固體懸浮於乙醚(25 mL)中。離心懸浮液3分鐘。倒出上清液且在高真空下乾燥殘餘固體。獲得呈白色至灰白色固體之肽粗產物。

整體脫除保護基法C：

除非另外註明，否則手動進行所有操作。「整體脫除保護基法C」之程序係以0.100 mmol規格上進行的實驗，其中該規格係由結合至樹脂之Sieber連接子的量決定。該程序可藉由依規格倍數調整所述體積使規格為超過0.100 mmol規格。使用三氟乙酸:三異丙基矽烷:二硫蘇糖醇(95:2.5:2.5 v:v:w)製備「脫除保護基溶液」。自反應容器排出樹脂且轉移至Bio-Rad管。將「脫除保護基溶液」(4.0 mL)添加至Bio-Rad管。在振盪器中混合該混合物60分鐘。過濾該溶液且在乙醚(30 mL)中稀釋。離心沉澱固體3分鐘。倒出上清液及將固體再懸浮於乙醚(25 mL)中。離心懸浮液3分鐘。倒出上清液且將殘餘固體懸浮於乙醚(25 mL)中。離心懸浮液3分鐘。倒出上清液且在高真空下乾燥殘餘固體。獲得呈白色至灰白色固體之肽粗產物。

整體脫除保護基法D：

除非另外註明，否則手動進行所有操作。「整體脫除保護基法

B」之程序係以0.100 mmol規格上進行的實驗，其中該規格係由結合至樹脂之Sieber連接子的量決定。該程序可藉由依規格倍數調整所述體積使規格為超過0.100 mmol規格。使用三氟乙酸:三異丙基矽烷:二硫蘇糖醇(94:3:3 v:v:w)製備「脫除保護基溶液」。自反應容器排出樹脂且轉移至25 mL配備玻璃濾片之針筒。將「脫除保護基溶液」(5.0 mL)添加至該針筒。在振盪器中混合該混合物5分鐘。過濾該溶液且在乙醚(30 mL)中稀釋。離心沉澱固體3分鐘。倒出上清液及將固體再懸浮於乙醚(25 mL)中。離心懸浮液3分鐘。倒出上清液且將殘餘固體懸浮於乙醚(25 mL)中。離心懸浮液3分鐘。倒出上清液且在高真空下乾燥殘餘固體。獲得呈白色至灰白色固體之肽粗產物。

整體脫除保護基法E：

除非另外註明，否則手動進行所有操作。「整體脫除保護基法E」之程序係以0.100 mmol規格上進行的實驗，其中該規格係由結合至樹脂之Fmoc Gly-ClTrt連接子的量決定。該程序可藉由依規格倍數調整所述體積使規格為超過0.100 mmol規格。使用三氟乙酸:三異丙基矽烷:二硫蘇糖醇(95:2.5:2.5 v:v:w)製備「脫除保護基溶液」。自反應容器排出樹脂且轉移至Bio-Rad管。將「脫除保護基溶液」(2.0 mL)添加至Bio-Rad管。在振盪器中混合該混合物3分鐘。過濾溶液，且收集於離心管中。將「脫除保護基溶液」(2.0 mL)添加至Bio-Rad管。在振盪器中混合該混合物3分鐘。過濾溶液，且收集於離心管中。將「脫除保護基溶液」(2.0 mL)添加至Bio-Rad管。在振盪器中混合該混合物3分鐘。過濾溶液，且收集於離心管中。允許離心管中的溶液靜置60分鐘。接著用乙醚(30 mL)稀釋所收集的溶液，及形成沉澱。離心沉澱固體3分鐘。倒出上清液及將固體再懸浮於乙醚(25 mL)中。離心懸浮液3分鐘。倒出上清液且將殘餘固體懸浮於乙醚(25 mL)中。離心懸浮液3分鐘。倒出上清液且在高真空下乾燥殘餘固體。獲得呈白

色至灰白色固體之肽粗產物。

整體脫除保護基法F：

除非另外註明，否則手動進行所有操作。「整體脫除保護基法F」之程序係以0.100 mmol規格上進行的實驗，其中該規格係由結合至樹脂之Rink連接子的量決定。該程序可藉由依規格倍數調整所述體積使規格為超過0.100 mmol規格。使用三氟乙酸:三異丙基矽烷:二硫蘇糖醇(95:2.5:2.5 v:v:w)製備「脫除保護基溶液」。自反應容器排出樹脂且轉移至6 ml Bio-Rad管。將「脫除保護基溶液」(4.0 mL)添加至Bio-Rad。在振盪器中混合該混合物90分鐘。過濾該溶液且在乙醚(30 mL)中稀釋。離心沉澱固體3分鐘。倒出上清液及將固體再懸浮於乙醚(25 mL)中。離心懸浮液3分鐘。倒出上清液且將殘餘固體懸浮於乙醚(25 mL)中。離心懸浮液3分鐘。倒出上清液且在高真空下乾燥殘餘固體。獲得呈白色至灰白色固體之肽粗產物。

環化法A

除非另外註明，否則手動進行所有操作。「環化法A」之程序係以0.100 mmol規格上進行的實驗，其中該規格係由用於產生肽之結合至樹脂之Sieber連接子的量決定。此規格並非基於直接測定程序中所使用肽的量基礎之上。該程序可藉由依規格倍數調整所述體積使規格為超過0.100 mmol規格。將肽粗產物固體溶於乙腈:8 M胍水溶液/50 mM TRIS(1:3)(pH 8.6)(7 mL:18 mL或類似比)之溶液中，且接著視需要使用NaOH水溶液(1.0M)將該溶液調整至pH=8.5至9.0。接著使用振盪器混合該溶液12至18小時。濃縮反應溶液且接著將殘餘物溶解於乙腈:水中。使該溶液進行逆相HPLC純化以提供所需環狀肽。

環化法C：

除非另外註明，否則手動進行所有操作。「環化法C」之程序係以0.100 mmol規格上進行的實驗，其中該規格係由用於產生肽之結合

至樹脂之Sieber連接子的量決定。此規格並非基於直接測定程序中所使用肽的量基礎之上。該程序可藉由依規格倍數調整所述體積使規格為超過0.100 mmol規格。將肽粗產物固體溶於乙腈:0.1 M碳酸氫銨緩衝水溶液(11 mL:24 mL或相似比)之溶液中，且接著使用NaOH水溶液(1.0 M)小心地將該溶液調整至pH=8.5至9.0。接著使用振盪器混合該溶液12至18小時。濃縮反應溶液且接著將殘餘物溶解於乙腈:水中。使該溶液進行逆相HPLC純化以提供所需環狀肽。

環化法D：

除非另外註明，否則手動進行所有操作。「環化法D」之程序係以0.100 mmol規格上進行的實驗，其中該規格係由用於產生肽之結合至樹脂之Sieber連接子的量決定。此規格並非基於直接測定程序中所使用肽的量基礎之上。該程序可藉由依規格倍數調整所述體積使規格為超過0.100 mmol規格。將肽粗產物固體溶於乙腈:0.1 M碳酸氫銨緩衝水溶液(11 mL:24 mL)之溶液中，且接著使用NaOH水溶液(1.0 M)小心地將該溶液調整至pH=8.5至9.0。接著藉由攪拌混合該溶液12至18小時。濃縮反應溶液且接著將殘餘物溶解於乙腈:水中。使該溶液進行逆相HPLC純化以提供所需環狀肽。

環化法E：

除非另外註明，否則手動進行所有操作。「環化法E」之程序係以0.100 mmol規格上進行的實驗，其中該規格係由用於產生肽之結合至樹脂之Sieber連接子的量決定。此規格並非基於直接測定程序中所使用肽的量基礎之上。該程序可藉由依規格倍數調整所述體積使規格為超過0.100 mmol規格。將肽粗產物固體溶於6 M胍HCl緩衝水溶液(15 mL)之溶液中，接著藉由攪拌混合該溶液12至18小時。濃縮反應溶液且將15 mL DMSO添加至殘餘物以提供漿液，過濾該漿液。使該經過濾之溶液進行逆相HPLC純化以提供所需環狀肽。

手動偶聯程序A：

將哌啶:DMF(20:80 v/v, 5.0 mL)添加至含有來自前一步驟之樹脂之Bio-Rad反應容器。週期性地振盪該混合物5分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。可如下連續地洗滌樹脂五次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(4.0 mL)且振盪所得混合物60秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將胺基酸(1.2至10當量)(典型為(0.2 M含於DMF中, 2.5 mL, 5 eq))添加至反應容器，接著添加HATU(1.210當量)(典型為(0.2 M含於DMF中, 2.5 mL, 5 eq))，且最後添加DIPEA(2.4至20當量)(典型為(0.8 M含於DMF中, 1.25 mL, 10 eq))。振盪該混合物60分鐘至18小時，接著通過玻璃濾片除去反應溶液。可如下連續地洗滌樹脂四次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(4.0 mL)且振盪所得混合物60秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。

樹脂上N-甲基化法A.(Turner, R. A.; Hauksson, N. E.; Gipe, J. H.; Lokey, R. S. *Org.Lett.*2013, 15(19), 5012-5015)：

除非另外註明，否則手動進行所有操作。「樹脂上N-甲基化法A」之程序係以0.100 mmol規格上進行的實驗，其中該規格係由用於產生肽之結合至樹脂之Sieber連接子的量決定。此規格並非基於直接測定程序中所使用肽的量基礎之上。該程序可藉由依規格倍數調整所述體積使規格為超過0.100 mmol規格。

將樹脂轉移至25 mL燒結針筒中。將哌啶:DMF(20:80 v/v, 5.0 mL)添加至樹脂。振盪該混合物3分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。用DMF(4.0 mL)洗滌樹脂3次。將哌啶:DMF(20:80 v/v, 4.0 mL)添加至反應容器。振盪該混合物3分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。用DMF(4.0 mL)連續地洗滌樹脂三次然後用DCM(4.0 mL)洗滌三次。將樹脂懸浮於DMF(2.0 mL)及三氟乙酸乙酯(0.119 mL, 1.00 mmol)、1,8-二氮雜雙環[5.4.0]十一-7-烯(0.181 mL, 1.20 mmol)中。將該混合

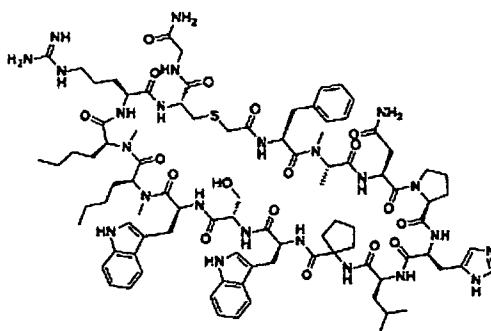
物置於振盪器上60 min。通過玻璃濾片除去溶液。用DMF(4.0 mL)連續地洗滌樹脂三次然後用DCM(4.0 mL)洗滌三次。

用無水THF(2.0 mL)洗滌樹脂三次以移除任何殘留水。在一經烘箱乾燥之4.0 mL小瓶中於乾燥4 Å分子篩(20 mg)上添加THF(1.0 mL)及三苯基膦(131 mg, 0.500 mmol)。將溶液轉移至樹脂且慢慢地添加偶氮二羧酸二異丙酯(0.097 mL, 0.5 mmol)。攪拌樹脂15 min。通過玻璃濾片除去溶液且用無水THF(2.0 mL)洗滌樹脂三次以移除任何殘留水。在一經烘箱乾燥之4.0 mL小瓶中於乾燥4 Å分子篩(20 mg)上添加THF(1.0 mL)、三苯基膦(131 mg, 0.500 mmol)。將溶液轉移至樹脂且慢慢地添加偶氮二羧酸二異丙酯(0.097 mL, 0.5 mmol)。攪拌樹脂15 min。通過玻璃濾片除去溶液。用DMF(4.0 mL)連續地洗滌樹脂三次然後用DCM(4.0 mL)洗滌三次。將樹脂懸浮於乙醇(1.0 mL)及THF(1.0 mL)中，且添加硼氫化鈉(37.8 mg, 1.000 mmol)。攪拌該混合物30 min並濾水。用DMF(4.0 mL)連續地洗滌樹脂三次然後用DCM(4.0 mL)洗滌三次。

微裂解A：

將2滴TIS及1 mL三氟乙酸添加至小的<10 mg樹脂樣品，在室溫下振盪。1 h後，移去一小等分試樣並用0.5 mL乙腈稀釋，過濾，及實現藉由LC-MS分析。

製備實例1001



於Rink樹脂上遵循一般合成程序製備實例1001：

遵循Fmoc-Gly-OH 「Symphony法B：樹脂膨脹程序」
 遵循Fmoc-Cys(Trt)-OH 「Symphony法B：標準偶聯程序」
 遵循Fmoc-Arg(Pbf)-OH 「Symphony法B：標準偶聯程序」
 遵循Fmoc-n甲基-Nle-OH 「Symphony法B：標準偶聯程序」
 遵循Fmoc-n甲基-Nle-OH 「Symphony法B：二級胺偶聯程序」
 遵循Fmoc-Trp(Boc)-OH 「Symphony法B：二級胺偶聯程序」
 遵循Fmoc-Ser(tBu)-OH 「Symphony法B：標準偶聯程序」
 遵循Fmoc-Trp(Boc)-OH 「Symphony法B：標準偶聯程序」
 遵循Fmoc-環戊基-Gly-OH 「手動偶聯程序A」
 遵循Fmoc-Leu-OH 「Symphony法B：二級胺偶聯程序」
 遵循Fmoc-His(Trt)-OH 「Symphony法B：標準偶聯程序」
 遵循Fmoc-Pro-OH 「Symphony法B：標準偶聯程序」
 遵循Fmoc-Asn(Trt)-OH 「Symphony法B：二級胺偶聯程序」
 遵循Fmoc-n甲基-Ala-OH 「Symphony法B：標準偶聯程序」
 遵循Fmoc-Phe-OH 「Symphony法B：二級胺偶聯程序」
 遵循「Symphony法B：最終封端程序」
 遵循「整體脫除保護基法F」
 遵循「環化法D」

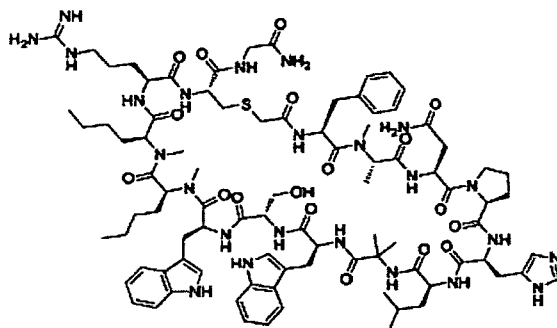
通過製備型LC/MS利用以下條件純化粗物質：管柱：Waters XBridge C18, 19×250 mm, 5- μ m粒子；流動相A：5:95乙腈:水(具有0.1%三氟乙酸)；流動相B：95:5 乙腈:水(具有0.1%三氟乙酸)；梯度：在25分鐘內從15% B變為65% B，接著，5分鐘維持在100% B；流速：20 mL/min。合併含有所需產物之溶離份並通過離心蒸發乾燥。產物的產量為6.4 mg，及其藉由LCMS分析估算得的純度為100%。

分析型LCMS條件D：滯留時間=1.67 min；ESI-MS(+) m/z 947.2

(M+2H)。

分析型 LCMS 條件 E：滯留時間=1.57 min；ESI-MS(+) m/z 946.7 (M+2H)。

製備實例1002



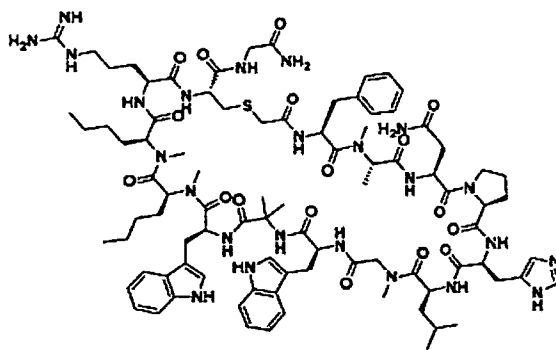
於Rink樹脂上遵循針對製備實例1001所述之一般合成順序製備實例1002，該一般合成順序係由以下一般程序組成：「Symphony法B：樹脂膨脹程序」、「Symphony法B：標準偶聯程序」、「Symphony法B：二級胺偶聯程序」、「手動偶聯程序A」、「Symphony法B：最終封端程序」、「整體脫除保護基法F」及「環化法D」。

通過製備型LC/MS利用以下條件純化粗物質：管柱：Waters XBridge C18, 19×200 mm, 5- μ m粒子；流動相A：5:95 乙腈:水(具有10-mM乙酸銨)；流動相B：95:5 乙腈:水(具有10-mM乙酸銨)；梯度：在25分鐘內從15%B變為65% B，接著，5分鐘維持在100% B；流速：20 mL/min。合併含有所需產物之溶離份並通過離心蒸發乾燥。產物的產量為6.0 mg，及其藉由LCMS分析估算得的純度為100%。

分析型 LCMS 條件 D：滯留時間=1.60 min；ESI-MS(+) m/z 934.0 (M+2H)。

分析型 LCMS 條件 E：滯留時間=1.52 min；ESI-MS(+) m/z 933.9 (M+2H)。

製備實例1003



於Rink樹脂上遵循針對製備實例1001所述之一般合成順序製備實例1003，該一般合成順序係由以下一般程序組成：「Symphony法B：樹脂膨脹程序」、「Symphony法B：標準偶聯程序」、「Symphony法B：二級胺偶聯程序」、「手動偶聯程序A」、「Symphony法B：最終封端程序」、「整體脫除保護基法F」及「環化法D」。

通過製備型LC/MS利用以下條件純化粗物質：管柱：Waters XBridge C18, 19×200 mm, 5- μ m粒子；流動相A：5:95 乙腈:水(具有10-mM乙酸銨)；流動相B：95:5 乙腈:水(具有10-mM乙酸銨)；梯度：在25分鐘內從15% B變為65% B，接著，5分鐘維持在100% B；流速：20 mL/min。合併含有所需產物之溶離份並通過離心蒸發乾燥。產物的產量為2.2 mg，及其藉由LCMS分析估算得的純度為100%。

分析型LCMS條件D：滯留時間=1.58 min；ESI-MS(+) m/z 926.7 (M+2H)。

分析型LCMS條件E：滯留時間=1.51 min；ESI-MS(+) m/z 926.2 (M+2H)。

化合物5001分析數據：

質譜法：「ESI-MS(+)」表示以正離子模式進行的電噴霧電離質譜法；「ESI-MS(-)」表示以負離子模式進行的電噴霧電離質譜法；「ESI-HRMS(+)」表示以正離子模式進行的高解析電噴霧電離質譜法；「ESI-HRMS(-)」表示以負離子模式進行的高解析電噴霧電離質譜法。

譜法。檢出的質量在「 m/z 」單位命名後面報告。準確質量大於1000之化合物經常呈二價或三價離子檢測到。

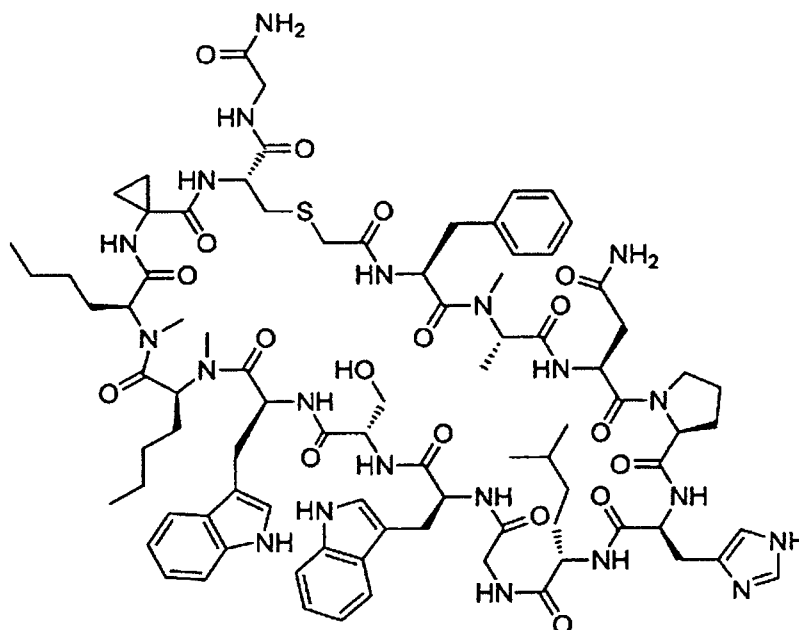
化合物5001分析條件A：

管柱：Waters BEH C18, 2.0×50 mm, 1.7- μ m 粒子；流動相 A：5:95 乙腈:水(具有 10 mM 乙酸銨)；流動相 B：95:5 乙腈:水(具有 10 mM 乙酸銨)；溫度：50℃；梯度：0%B，在 3 分鐘內從 0% B 變為 100% B，接著，0.5 分鐘維持在 100% B；流速：1 mL/min；檢測：在 220 nm 下之 UV。

化合物5001分析條件B：

管柱：Waters BEH C18, 2.0×50 mm, 1.7- μ m 粒子；流動相 A：5:95 甲醇:水(具有 10 mM 乙酸銨)；流動相 B：95:5 甲醇:水(具有 10 mM 乙酸銨)；溫度：50℃；梯度：0% B，在 3 分鐘內從 0% B 變為 100% B，接著，0.5 分鐘維持在 100% B；流速：0.5 mL/min；檢測：在 220 nm 下之 UV。

製備實例5001



如下製備實例5001。將Rink-Merrifield樹脂(178 mg, 0.100 mmol)添加至10 mL聚丙烯固相反應容器，及將該反應容器置於Prelude肽合

成儀上。遵循「Prelude法A：樹脂膨脹程序」。接著，在Prelude上若經樹脂結合之肽的N端為一級胺則遵循「Prelude法A：單偶聯程序」或若經樹脂結合之肽的N端為二級胺則遵循「Prelude法A：雙偶聯程序」連續地進行一系列胺基酸偶聯。遵循「Prelude法A：氯乙醯氯偶聯程序」；接著，遵循「整體脫除保護基法A」；然後，遵循「環化法A」。如所示，在合成中使用1-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)胺基)環丙烷羧酸(Fmoc-AcPc-OH)。通過製備型LC/MS利用以下條件純化粗物質：管柱：XBridge C18, 19×200 mm, 5- μ m粒子；流動相A：5:95 乙腈:水(具有10-mM乙酸銨)；流動相B：95:5 乙腈:水(具有10-mM乙酸銨)；梯度：在30分鐘內從10% B變為50% B，接著，5分鐘維持在100% B；流速：20 mL/min。合併含有所需產物之溶離份並通過離心蒸發乾燥。產物的產量為14.1 mg，及其藉由LCMS分析估算得的純度為95%。

分析條件A：滯留時間=2.10 min；ESI-MS(+) m/z 888.3 (M-2H)。

分析條件B：滯留時間=2.85 min；ESI-MS(+) m/z 890.5 (M+2H)。

下文列舉的所有實例係基於「一般合成順序A」進行製備

一般合成順序A：

「一般合成順序A」描述用於提供本文中所述之環狀態之程序之一般順序。出於該一般程序之目的，「Symphony法A」之程序可與「Prelude法A」之程序互換。將Rink-Merrifield樹脂(178 mg, 0.100 mmol)添加至10 mL聚丙稀固相反應容器，且將該反應容器置於Prelude肽合成儀上。遵循「Prelude法A：樹脂膨脹程序」。接著，在Prelude上若經樹脂結合之肽的N端為一級胺則遵循「Prelude法A：單偶聯程序」或若經樹脂結合之肽的N端為二級胺則遵循「Prelude法

A：雙偶聯程序」連續地進行一系列胺基酸偶聯。遵循「Prelude法A：氯乙醯氯偶聯程序」；接著，遵循「整體脫除保護基法A」；然後，遵循「環化法A」。

一般程序：

Prelude法A：

於自動化下在Prelude肽合成儀(Protein Technologies)上進行所有操作。除非註明否則在10 mL裝有底部玻璃濾片之聚丙烯管中進行所有程序；在反應之規格超過0.100 mmol之情況下，使用40 mL裝有底部玻璃濾片之聚丙烯管。該管通過該管的底部及頂部兩者連接至Prelude肽合成儀。可通過管的頂部添加DMF及DCM，此可均勻地向下沖洗管的側部。通過管的底部添加剩餘的試劑且向上通過玻璃濾片而與樹脂接觸。通過管的底部移去所有溶液。「週期性地攪拌」描述短暫脈衝N₂氣通過底部玻璃濾片；該脈衝持續約5秒且以每30秒進行。含在DMF中之氯乙醯氯溶液在製備24 h內使用。胺基酸溶液自製備超過三週後一般不使用。HATU溶液在製備5天內使用。DMF=二甲基甲醯胺；HATU=3-氧化六氟磷酸1-[雙(二甲基胺基)亞甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎘；DIPEA=二異丙基乙胺；Rink=(2,4-二甲氧基苯基)(4-烷氧基苯基)甲胺，其中「4-烷氧基」描述對聚苯乙烯樹脂連接的位置及種類。所使用的樹脂為具有Rink連接子(在氮經Fmoc保護)之Merrifield聚合物(聚苯乙烯)；100至200網目，1% DVB，0.56 mmol/g負載。下文列出所使用的常見胺基酸，圓括號內指示側鏈保護基。Fmoc-Ala-OH；Fmoc-Arg(Pbf)-OH；Fmoc-Asn(Trt)-OH；Fmoc-Asp(OtBu)-OH；Fmoc-Bzt-OH；Fmoc-Cys(Trt)-OH；Fmoc-Dab(Boc)-OH；Fmoc-Dap(Boc)-OH；Fmoc-Gln(Trt)-OH；Fmoc-Gly-OH；Fmoc-His(Trt)-OH；Fmoc-Hyp(tBu)-OH；Fmoc-Ile-OH；Fmoc-Leu-OH；Fmoc-Lys(Boc)-OH；Fmoc-Nle-OH；Fmoc-Met-OH；Fmoc-[N-^S

Me]Ala-OH ; Fmoc-[N-Me]Nle-OH ; Fmoc-Phe-OH ; Fmoc-Pro-OH ; Fmoc-Sar-OH ; Fmoc-Ser(tBu)-OH ; Fmoc-Thr(tBu)-OH ; Fmoc-Trp(Boc)-OH ; Fmoc-Tyr(tBu)-OH ; Fmoc-Val-OH 。

「Prelude法A」之程序描述依0.100 mmol規格進行的實驗，其中該規格係由結合至樹脂之Rink連接子的量決定。此規格相當於約178 mg的上述Rink-Merrifield樹脂。所有程序可藉由依規格倍數調整所述體積擴大規格超過0.100 mmol規格。在胺基酸偶聯之前，以樹脂膨脹程序(下文描述作「樹脂膨脹程序」)開始所有肽合成序列。胺基酸與一級胺N端之偶聯採用下文所述之「單偶聯程序」。胺基酸與二級胺N端之偶聯採用下文所述之「雙偶聯程序」。氯乙醯氯與肽的N端之偶聯由文詳述之「氯乙醯氯偶聯程序」描述。

樹脂膨脹程序：

將Merrifield:Rink樹脂(178 mg, 0.100 mmol)添加至10 mL聚丙烯固相反應容器。如下洗滌(膨脹)樹脂三次：將DMF(2.0 mL)添加至反應容器，此後，週期性地攪拌該混合物10分鐘，然後通過玻璃濾片除去溶劑。

單偶聯程序：

將哌啶:DMF(20:80 v/v, 2.0 mL)添加至含有來自前一步驟之樹脂之反應容器。週期性地攪拌該混合物3分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。將哌啶:DMF(20:80 v/v, 2.0 mL)添加至反應容器。週期性地攪拌該混合物3分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。可如下連續地洗滌樹脂六次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(2.0 mL)且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將胺基酸(0.2 M含於DMF中，1.0 mL, 2 eq)添加至反應容器，接著添加HATU(0.2 M含於DMF中，1.0 mL, 2 eq)，且最後添加DIPEA(0.8 M含於DMF中，0.5 mL, 4 eq)。週期性地攪拌該混合物15分鐘，接著通過玻璃濾片除去

反應溶液。可如下連續地洗滌樹脂四次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(2.0 mL)且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將乙酸酐(2.0 mL)添加至反應容器。週期性地攪拌該混合物10分鐘，接著通過玻璃濾片除去溶液。可如下連續地洗滌樹脂四次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(2.0 mL)且週期性地攪拌所得混合物90秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將所得樹脂直接用於下一步驟。

雙偶聯程序：

將哌啶:DMF(20:80 v/v, 2.0 mL)添加至含有來自前一步驟之樹脂之反應容器。週期性地攪拌該混合物3分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。將哌啶:DMF(20:80 v/v, 2.0 mL)添加至反應容器。週期性地攪拌該混合物3分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。可如下連續地洗滌樹脂六次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(2.0 mL)且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將胺基酸(0.2 M含於DMF中, 1.0 mL, 2 eq)添加至反應容器，接著添加HATU(0.2 M含於DMF中, 1.0 mL, 2 eq)，且最後添加DIPEA(0.8 M含於DMF中, 0.5 mL, 4 eq)。週期性地攪拌該混合物15分鐘，接著通過玻璃濾片除去反應溶液。如下洗滌樹脂兩次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(2.0 mL)且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將胺基酸(0.2 M含於DMF中, 1.0 mL, 2 eq)添加至反應容器，接著添加HATU(0.2 M含於DMF中, 1.0 mL, 2 eq)，且最後添加DIPEA(0.8 M含於DMF中, 0.5 mL, 4 eq)。週期性地攪拌該混合物15分鐘，接著通過玻璃濾片除去反應溶液。如下洗滌樹脂兩次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(2.0 mL)且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將乙酸酐(2.0 mL)添加至反應容器。週期性地攪拌該混合物10分鐘，接著通過玻璃濾片除去溶液。如5

下連續地洗滌樹脂四次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(2.0 mL)且週期性地攪拌所得混合物90秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將所得樹脂直接用於下一步驟。

氯乙醯氯偶聯程序：

將哌啶:DMF(20:80 v/v, 2.0 mL)添加至含有來自前一步驟之樹脂之反應容器。週期性地攪拌該混合物3分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。將哌啶:DMF(20:80 v/v, 2.0 mL)添加至反應容器。週期性地攪拌該混合物3分鐘且接著通過玻璃濾片除去溶液。如下連續地洗滌樹脂六次：每次洗滌，通過容器頂部添加DMF(2.0 mL)且週期性地攪拌所得混合物30秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將DIPEA(0.8 M含於DMF中, 3.0 mL, 24 eq)添加至反應容器，接著添加氯乙醯氯(0.8 M含於DMF中, 1.65 mL, 13.2 eq)。週期性地攪拌該混合物30分鐘，接著通過玻璃濾片除去溶液。如下連續地洗滌樹脂三次：每次洗滌，添加DMF(2.0 mL)於容器頂部且週期性地攪拌所得混合物90秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。如下連續地洗滌樹脂四次：每次洗滌，添加CH₂Cl₂(2.0 mL)於容器頂部且週期性地攪拌所得混合物90秒，然後通過玻璃濾片除去溶液。將所得樹脂置於N₂流下15分鐘。

*Symphony*法A：

除所提及之外，該程序集與「Prelude法A」者相同。對於所有程序，改用Symphony X肽合成儀(Protein Technologies)替代Prelude肽合成儀及通過反應容器頂部添加所有試劑。

樹脂膨脹程序：

該程序與「Prelude法A：樹脂膨脹程序」相同。

單偶聯程序：

該程序與「Prelude法A：單偶聯程序」相同，但DIPEA溶液之濃度為0.4 M及將1.0 mL的該溶液遞送至反應。

雙偶聯程序：

該程序與「Prelude法A：雙偶聯程序」相同，但DIPEA溶液之濃度為0.4 M及將1.0 mL的該溶液遞送至反應。

氯乙醯氯偶聯程序：

該程序與「Prelude法A：氯乙醯氯偶聯程序」相同。

整體脫除保護基法A：

除非另外註明，否則手動進行所有操作。「整體脫除保護基法A」之程序係以0.100 mmol規格上進行的實驗，其中該規格係由結合至樹脂之Rink連接子的量決定。該程序可藉由依規格倍數調整所述體積使規格為超過0.100 mmol規格。藉由在40 mL玻璃小瓶中將三氟乙酸(22 mL)、苯酚(1.325 g)、水(1.25 mL)及三異丙基矽烷(0.5 mL)組合以製備「脫除保護基溶液」。自反應容器排出樹脂且轉移至4 mL玻璃小瓶。將「脫除保護基溶液」(2.0 mL)添加至該小瓶。在振盪器中強力混合該混合物(在1000 RPM下混合1分鐘，接著在500 RPM下混合1至2 h)。通過0.2微米針筒過濾器過濾該混合物及用「脫除保護基溶液」(1.0 mL)或TFA(1.0 mL)萃取固體。將Et₂O(15 mL)添加至24 mL加有將已合併的濾液之試管。強力混合該混合物，此後，沉澱出大量白色固體。離心該混合物5分鐘，接著，自固體倒去溶液並丟棄。將固體懸浮於Et₂O(20 mL)中；接著，離心該混合物5分鐘；及自固體倒去溶液並丟棄。對於最後一次，將固體懸浮於Et₂O(20 mL)中；離心該混合物5分鐘；及自固體倒去溶液並丟棄以提供呈白色至灰白色固體之肽粗產物。

環化法A：

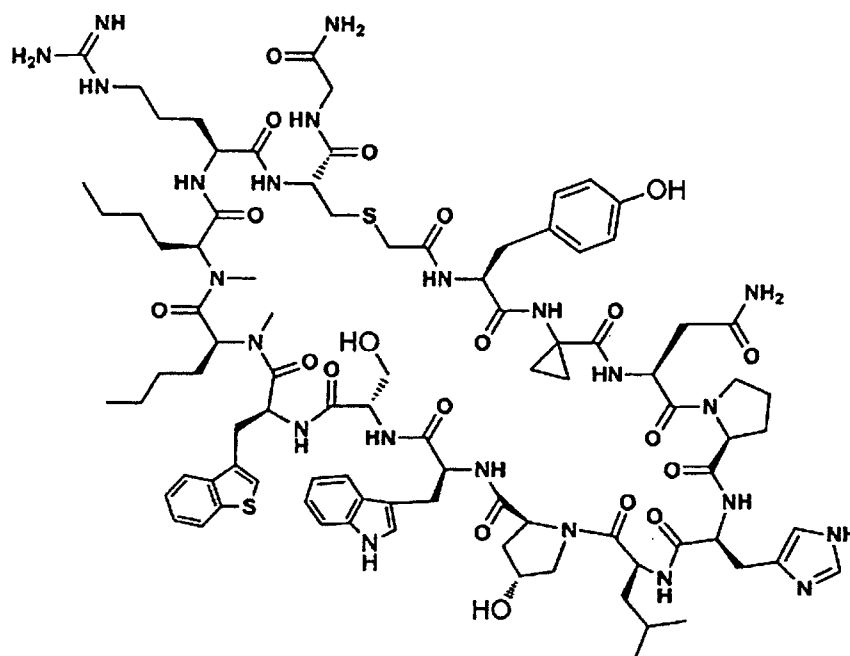
除非另外註明，否則手動進行所有操作。「環化法A」之程序係以0.100 mmol規格上進行的實驗，其中該規格係由用於產生肽之結合至樹脂之Rink連接子的量決定。此規格並非基於直接測定程序中所使

用肽的量基礎之上。該程序可藉由依規格倍數調整所述體積使規格為超過0.100 mmol規格。將肽粗產物固體溶於MeCN:0.1 M NH₄OAc水溶液(30 mL:30 mL)中，且接著使用NaOH水溶液(1.0 M)小心地將溶液調整至pH=8.5至9.0。接著允許該溶液在無攪拌下靜置12至18 h。濃縮反應溶液且接著將殘餘物溶解於DMSO:MeOH中。使該溶液進行逆相HPLC純化以提供所需環狀肽。

環化法B：

除非另外註明，否則手動進行所有操作。「環化法B」之程序係以0.100 mmol規格上進行的實驗，其中該規格係由用於產生肽之結合至樹脂之Rink連接子的量決定。此規格並非基於直接測定程序中所使用肽的量基礎之上。該程序可藉由依規格倍數調整所述體積使規格為超過0.100 mmol規格。將肽粗產物固體溶於MeCN:0.1 M NH₄OAc水溶液(1:1)中達到18至22 mL之總體積，且接著使用NaOH水溶液(1.0 M)小心地將溶液調整至pH=8.5至9.0。接著允許該溶液在無攪拌下靜置12至18 h。濃縮反應溶液且接著將殘餘物溶解於DMSO:MeOH中。使該溶液進行逆相HPLC純化以提供所需環狀肽。

製備實例9001



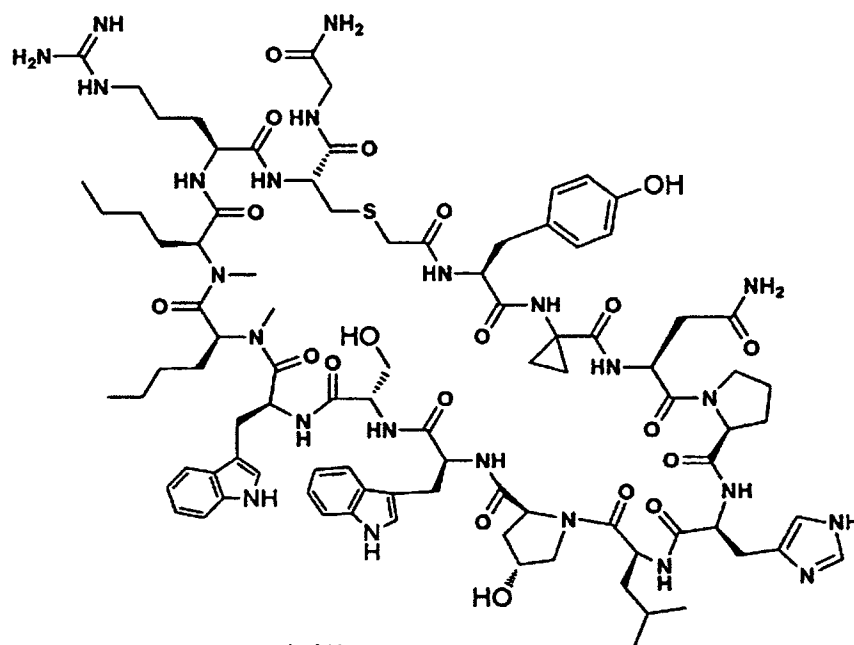
實例 9001

通過製備型LC/MS利用以下條件純化粗物質：管柱：XBridge C18, 19×200 mm, 5- μ m粒子；流動相A：5:95 乙腈:水(具有10-mM乙酸銨)；流動相B：95:5 乙腈:水(具有10-mM乙酸銨)；梯度：在30分鐘內從20% B變為60% B，接著，5分鐘維持在100% B；流速：20 mL/min。合併含有所需產物之溶離份並通過離心蒸發乾燥。產物的產量為19.4 mg，及其藉由LCMS分析估算得的純度為100%。

分析條件 A：滯留時間=1.62 min；ESI-MS(+) m/z 963.4 (M+2H)。

分析條件 B：滯留時間=2.84 min；ESI-MS(+) m/z 963.8 (M+2H)。

製備實例9002



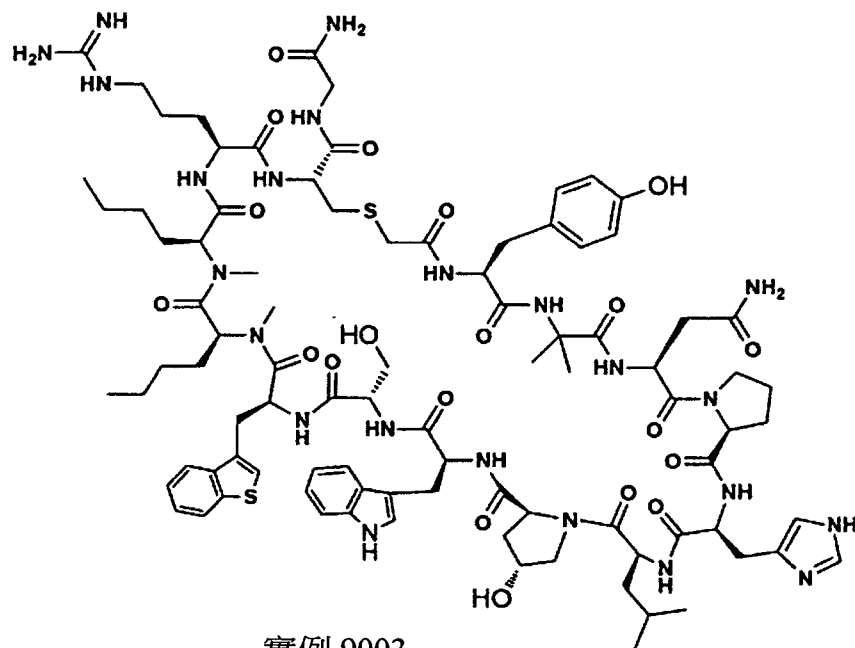
實例 9002

通過製備型LC/MS利用以下條件純化粗物質：管柱：XBridge C18, 19×200 mm, 5- μ m粒子；流動相A：5:95 甲醇:水(具有10-mM乙酸銨)；流動相B：95:5 甲醇:水(具有10-mM乙酸銨)；梯度：在30分鐘內從40% B變為80% B，接著，5分鐘維持在100% B；流速：20 mL/min。合併含有所需產物之溶離份並通過離心蒸發乾燥。產物的產量為24.0 mg，及其藉由LCMS分析估算得的純度為100%。

分析條件 A：滯留時間=1.63 min；ESI-MS(+) m/z 954.75 (M+2H)。

分析條件 B：滯留時間=3.11 min；ESI-MS(+) m/z 954.25 (M+2H)。

製備實例9003

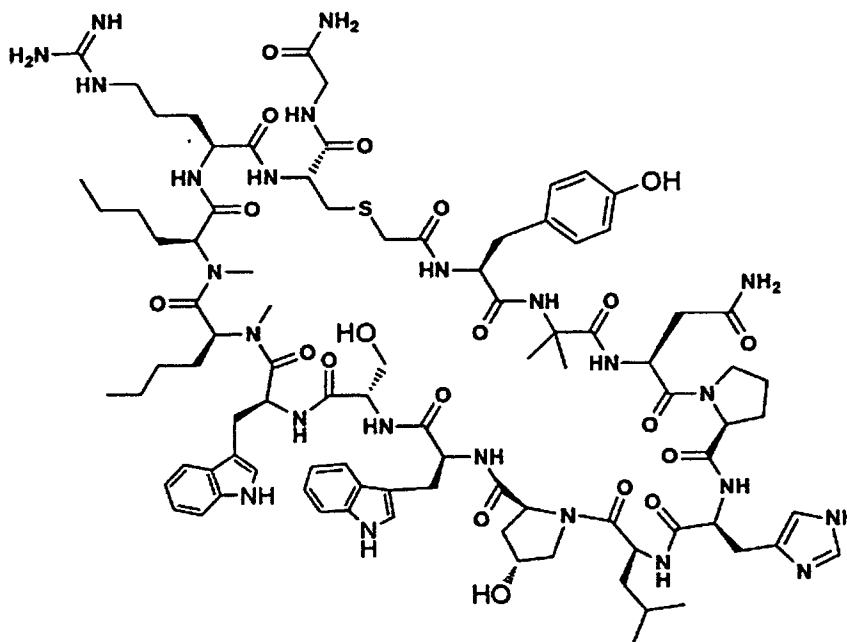


通過製備型LC/MS利用以下條件純化粗物質：管柱：XBridge C18, 19×200 mm, 5- μ m粒子；流動相A：5:95 乙腈:水(具有10-mM乙酸銨)；流動相B：95:5 乙腈:水(具有10-mM乙酸銨)；梯度：在30分鐘內從15% B變為55% B，接著，5分鐘維持在100% B；流速：20 mL/min。合併含有所需產物之溶離份並通過離心蒸發乾燥。產物的產量為35.5 mg，及其藉由LCMS分析估算得的純度為97%。

分析條件 A：滯留時間=1.61 min；ESI-MS(+) m/z 964.3 (M+2H)。

分析條件 B：滯留時間=2.84 min；ESI-MS(+) m/z 964.1 (M+2H)。

製備實例9004



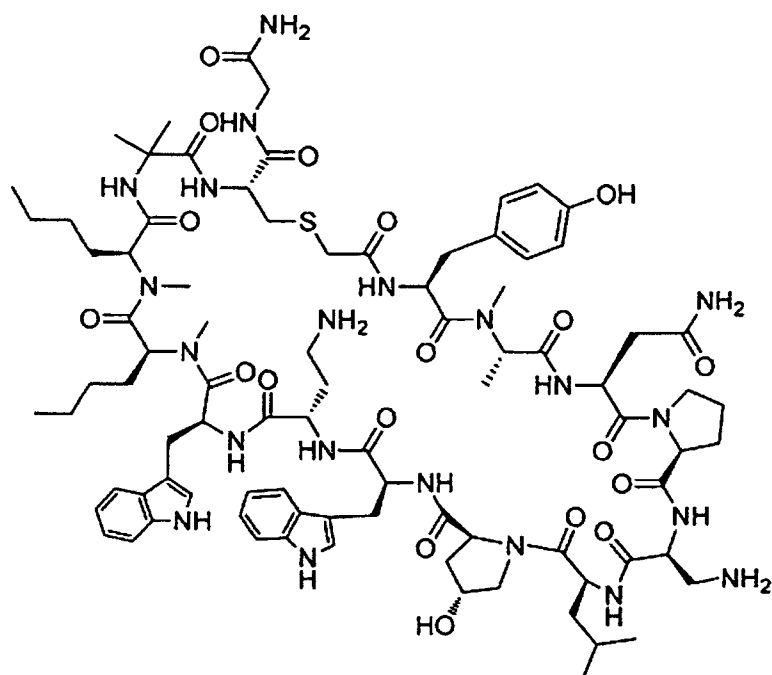
實例 9004

通過製備型 LC/MS 利用以下條件純化粗物質：管柱：XBridge C18, 19×200 mm, 5- μ m 粒子；流動相 A：5:95 甲醇:水(具有 10-mM 乙酸銨)；流動相 B：95:5 甲醇:水(具有 10-mM 乙酸銨)；梯度：在 30 分鐘內從 45% B 變為 85% B，接著，5 分鐘維持在 100% B；流速：20 mL/min。合併含有所需產物之溶離份並通過離心蒸發乾燥。產物的產量為 23.9 mg，及其藉由 LCMS 分析估算得的純度為 99%。

分析條件 A：滯留時間 = 1.48 min；ESI-MS(+) m/z 956.0 (M+2H)。

分析條件 B：滯留時間 = 2.67 min；ESI-MS(+) m/z 955.7 (M+2H)。

製備實例 9005

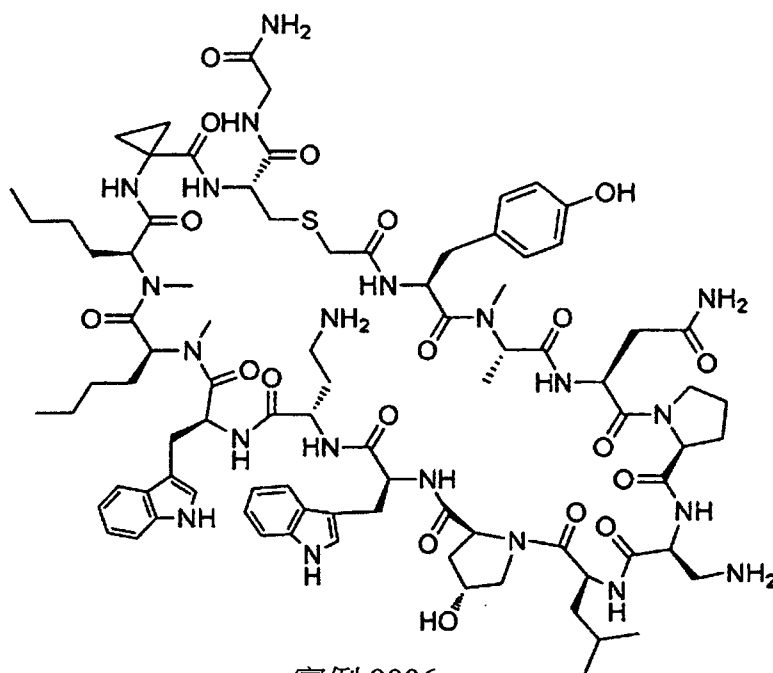


實例 9005

通過製備型 LC/MS 利用以下條件純化粗物質：管柱：XBridge C18, 19× mm, 5- μ m 粒子；流動相 A：5:95 甲醇:水(具有 10-mM 乙酸銨)；流動相 B：95:5 甲醇:水(具有 10-mM 乙酸銨)；梯度：在 30 分鐘內從 40% B 變為 80% B，接著，5 分鐘維持在 100% B；流速：20 mL/min。合併含有所需產物之溶離份並通過離心蒸發乾燥。產物的產量為 18.8 mg，及其藉由 LCMS 分析估算得的純度為 99%。

分析條件 A：滯留時間 = 1.64 min；ESI-MS(+) m/z 901.6 (M+2H)。

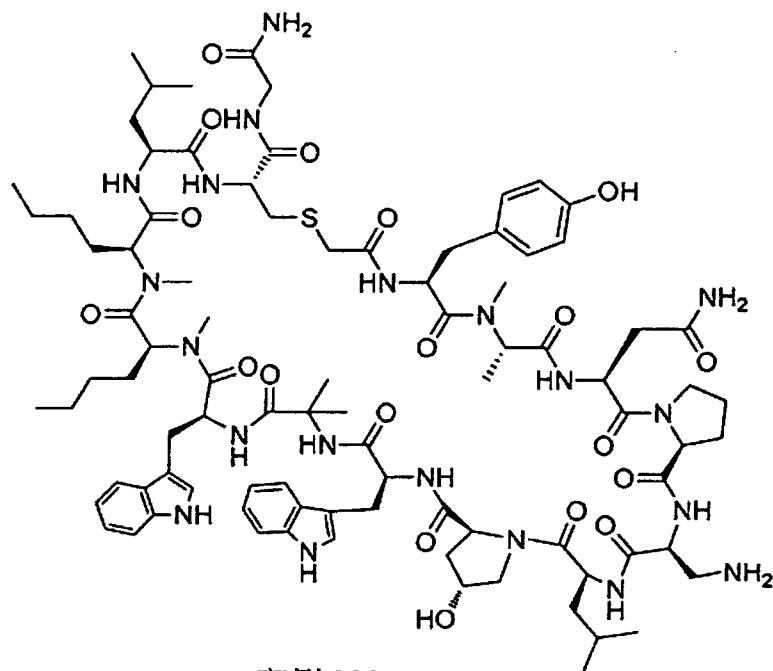
製備實例 9006



通過製備型LC/MS利用以下條件純化粗物質：管柱：XBridge C18, 19× mm, 5- μ m粒子；流動相A：5:95 甲醇:水(具有10-mM乙酸銨)；流動相B：95:5 甲醇:水(具有10-mM乙酸銨)；梯度：在30分鐘內從50% B變為90% B，接著，5分鐘維持在100% B；流速：20 mL/min。合併含有所需產物之溶離份並通過離心蒸發乾燥。產物的產量為40.5 mg，及其藉由LCMS分析估算得的純度為100%。

分析條件 A：滯留時間=1.59 min；ESI-MS(+) m/z 900.3 (M+2H)。

製備實例9007

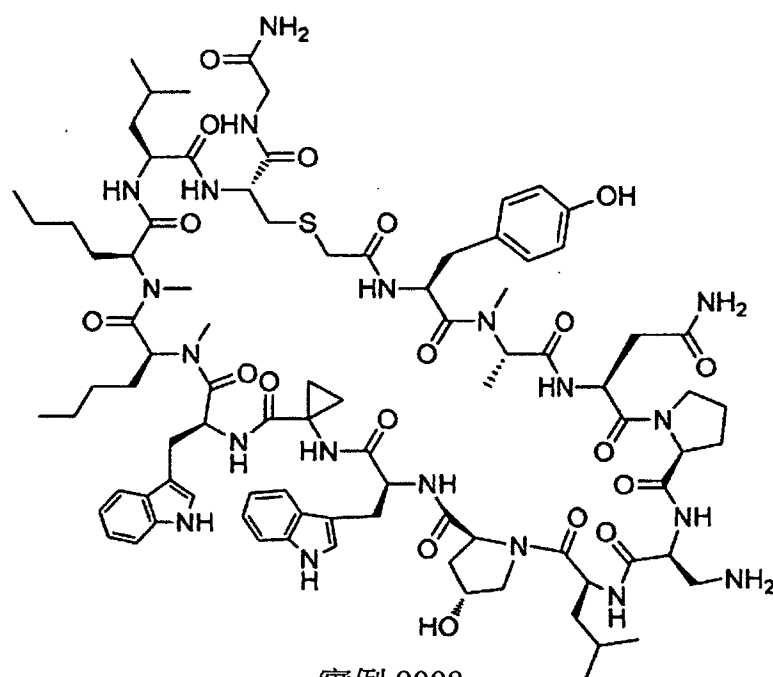


實例 9007

通過製備型LC/MS利用以下條件純化粗物質：管柱：XBridge C18, 19×200 mm, 5- μ m粒子；流動相A：5:95 甲醇:水(具有10-mM乙酸銨)；流動相B：95:5 甲醇:水(具有10-mM乙酸銨)；梯度：在30分鐘內從45% B變為90% B，接著，5分鐘維持在100% B；流速：20 mL/min。合併含有所需產物之溶離份並通過離心蒸發乾燥。通過製備型LC/MS利用以下條件進一步純化該物質：管柱：Waters CSH C18, 19×200 mm, 5- μ m粒子；流動相A：5:95 乙腈:水(具有10-mM乙酸銨)；流動相B：95:5 乙腈:水(具有10-mM乙酸銨)；梯度：在30分鐘內從5% B變為45% B，接著，5分鐘維持在100% B；流速：20 mL/min。合併含有所需產物之溶離份並通過離心蒸發乾燥。產物的產量為19.3 mg，及其藉由LCMS分析估算得的純度為100%。

分析條件 A：滯留時間=1.95 min；ESI-MS(+) m/z 907.8 (M+2H)。

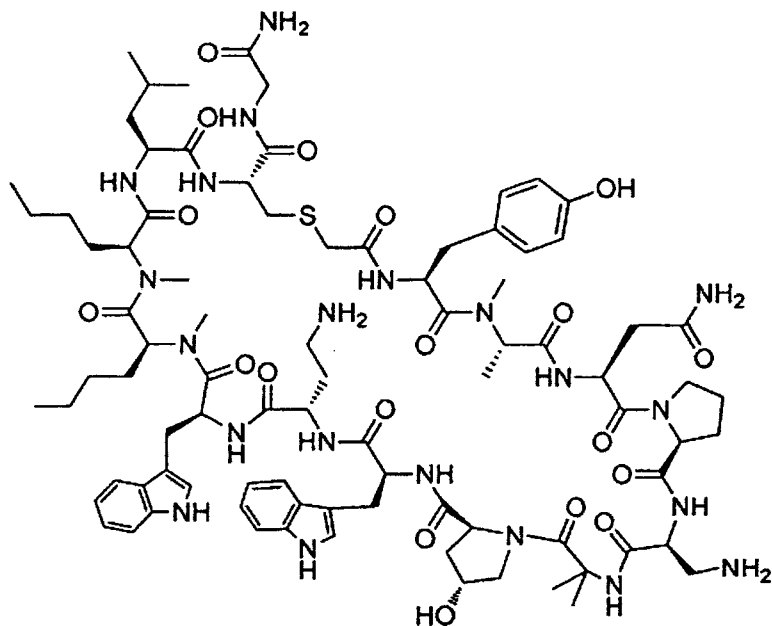
製備實例9008



通過製備型LC/MS利用以下條件純化粗物質：管柱：XBridge C18, 19×200 mm, 5- μ m粒子；流動相A：5:95 甲醇:水(具有10-mM乙酸銨)；流動相B：95:5 甲醇:水(具有10-mM乙酸銨)；梯度：在30分鐘內從45% B變為85% B，接著，5分鐘維持在100% B；流速：20 mL/min。合併含有所需產物之溶離份並通過離心蒸發乾燥。產物的產量為14.1 mg，及其藉由LCMS分析估算得的純度為98%。

分析條件 A：滯留時間=1.90 min；ESI-MS(+) m/z 906.6 (M+2H)。

製備實例9009

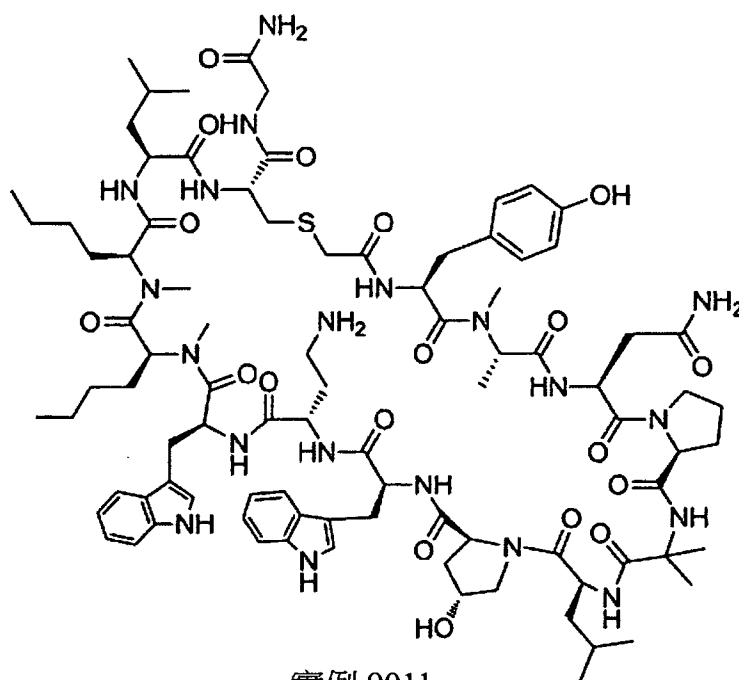


實例 9009

通過製備型LC/MS利用以下條件純化粗物質：管柱：XBridge C18, 19×200 mm, 5- μ m粒子；流動相A：5:95 甲醇:水(具有10-mM乙酸銨)；流動相B：95:5 甲醇:水(具有10-mM乙酸銨)；梯度：在30分鐘內從40% B變為80% B，接著，5分鐘維持在100% B；流速：20 mL/min。合併含有所需產物之溶離份並通過離心蒸發乾燥。通過製備型LC/MS利用以下條件進一步純化該物質：管柱：XBridge C18, 19×200 mm, 5- μ m粒子；流動相A：5:95 乙腈:水(具有10-mM乙酸銨)；流動相B：95:5 乙腈:水(具有10-mM乙酸銨)；梯度：在30分鐘內從5%B變為45% B，接著，5分鐘維持在100% B；流速：20 mL/min。合併含有所需產物之溶離份並通過離心蒸發乾燥。產物的產量為2.2 mg，及其藉由LCMS分析估算得的純度為91%。

分析條件 A：滯留時間=1.73 min；ESI-MS(+) m/z 901.4 (M+2H)。

製備實例9011

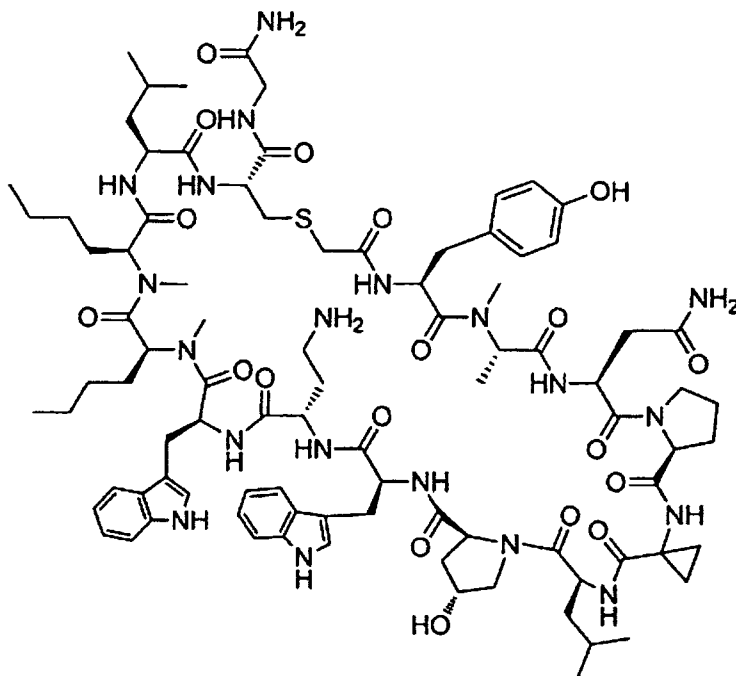


實例 9011

通過製備型LC/MS利用以下條件純化粗物質：管柱：XBridge C18, 19×200 mm, 5- μ m粒子；流動相A：5:95 甲醇:水(具有10-mM乙酸銨)；流動相B：95:5 甲醇:水(具有10-mM乙酸銨)；梯度：在30分鐘內從40% B變為85% B，接著，5分鐘維持在100% B；流速：20 mL/min。合併含有所需產物之溶離份並通過離心蒸發乾燥。產物的產量為29.2 mg，及其藉由LCMS分析估算得的純度為98%。

分析條件 A：滯留時間=1.81 min；ESI-MS(+) m/z 914.8 (M+2H)。

製備實例9012

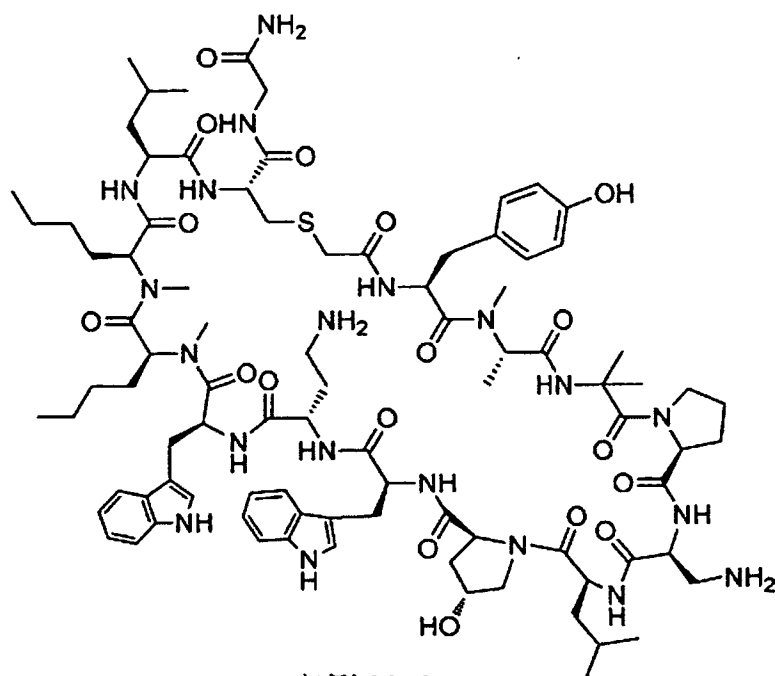


實例 9012

通過製備型LC/MS利用以下條件純化粗物質：管柱：XBridge C18, 19×200 mm, 5- μ m粒子；流動相A：5:95 甲醇:水(具有10-mM乙酸銨)；流動相B：95:5 甲醇:水(具有10-mM乙酸銨)；梯度：在30分鐘內從40% B變為85% B，接著，5分鐘維持在100% B；流速：20 mL/min。合併含有所需產物之溶離份並通過離心蒸發乾燥。通過製備型LC/MS利用以下條件進一步純化該物質：管柱：XBridge C18, 19×200 mm, 5- μ m粒子；流動相A：5:95 乙腈:水(具有10-mM乙酸銨)；流動相B：95:5 乙腈:水(具有10-mM乙酸銨)；梯度：在30分鐘內從15% B變為55% B，接著，5分鐘維持在100% B；流速：20 mL/min。合併含有所需產物之溶離份並通過離心蒸發乾燥。產物的產量為16.4 mg，及其藉由LCMS分析估算得的純度為96%。

分析條件 A：滯留時間=1.97 min；ESI-MS(+) m/z 914.3 (M+2H)。

製備實例9013

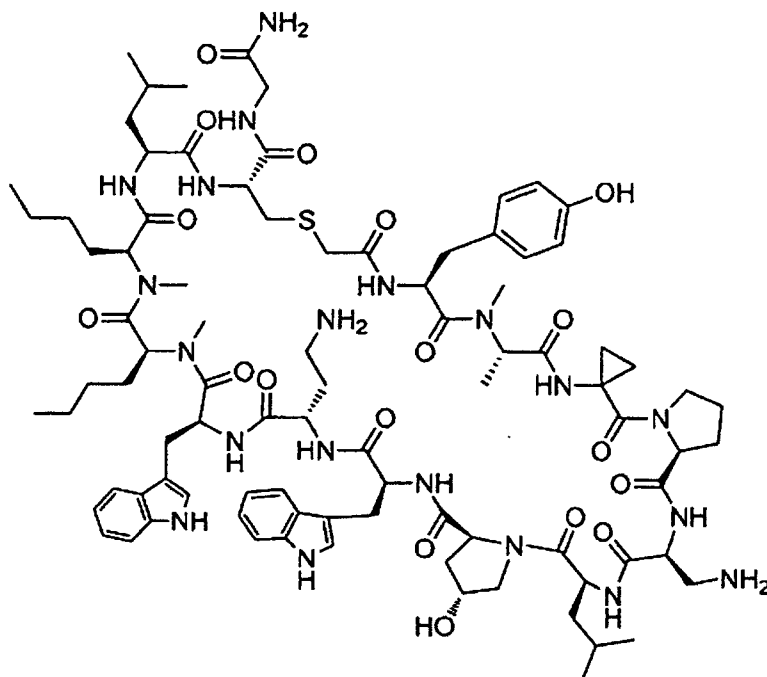


實例 9013

通過製備型LC/MS利用以下條件純化粗物質：管柱：XBridge C18, 19×200 mm, 5- μ m粒子；流動相A：5:95 甲醇:水(具有10-mM乙酸銨)；流動相B：95:5 甲醇:水(具有10-mM乙酸銨)；梯度：在30分鐘內從45% B變為85% B，接著，5分鐘維持在100% B；流速：20 mL/min。合併含有所需產物之溶離份並通過離心蒸發乾燥。產物的產量為21.9 mg，及其藉由LCMS分析估算得的純度為97%。

分析條件 A：滯留時間=1.78 min；ESI-MS(+) m/z 901.4 (M+2H)。

製備實例9014

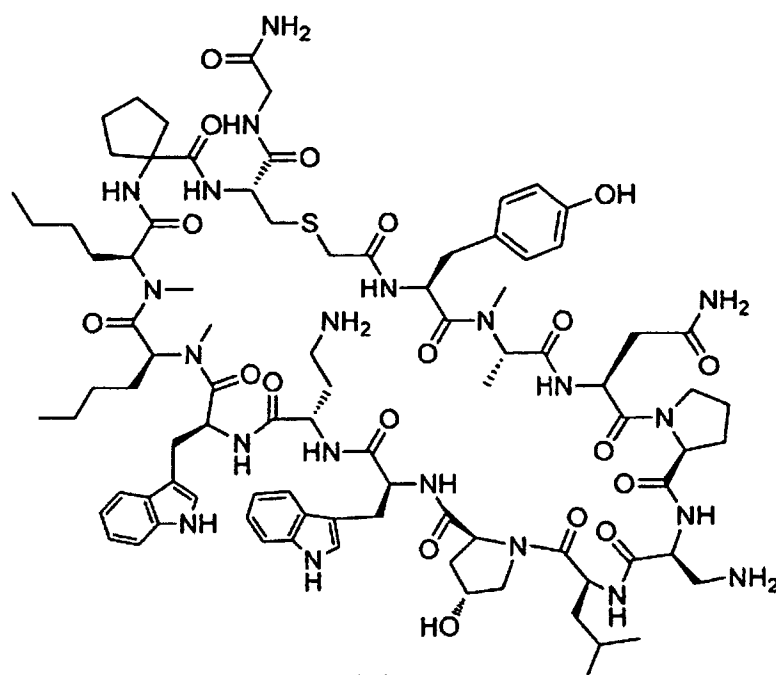


實例 9014

通過製備型LC/MS利用以下條件純化粗物質：管柱：XBridge C18, 19× mm, 5- μ m粒子；流動相A：5:95 甲醇:水(具有10-mM乙酸銨)；流動相B：95:5 甲醇:水(具有10-mM乙酸銨)；梯度：在30分鐘內從50% B變為90% B，接著，5分鐘維持在100% B；流速：20 mL/min。合併含有所需產物之溶離份並通過離心蒸發乾燥。產物的產量為35.3 mg，及其藉由LCMS分析估算得的純度為97%。

分析條件 A：滯留時間=1.76 min；ESI-MS(+) m/z 900.2 (M+2H)。

製備實例9015

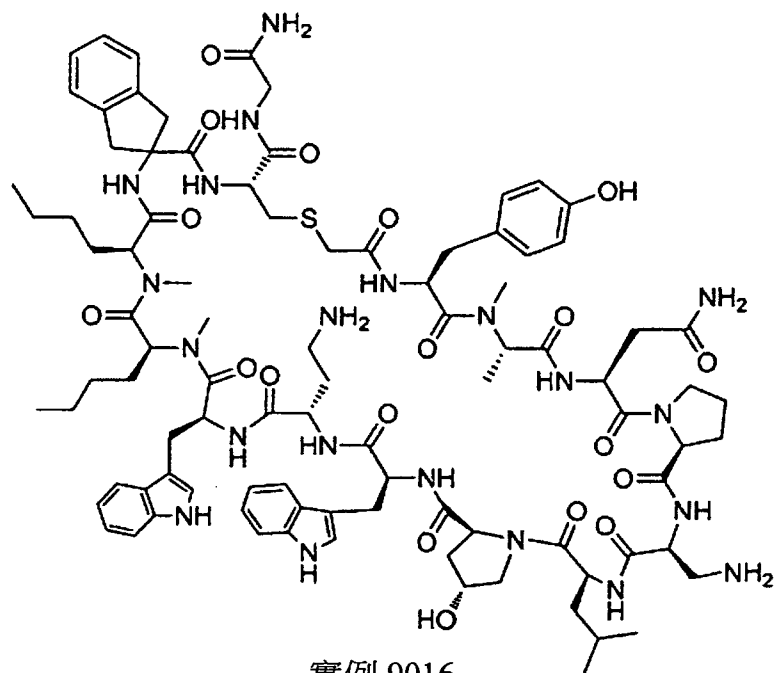


實例 9015

通過製備型LC/MS利用以下條件純化粗物質：管柱：XBridge C18, 19×200 mm, 5- μ m粒子；流動相A：5:95 乙腈:水(具有10-mM乙酸銨)；流動相B：95:5 乙腈:水(具有10-mM乙酸銨)；梯度：在30分鐘內從15% B變為55% B，接著，5分鐘維持在100% B；流速：20 mL/min。合併含有所需產物之溶離份並通過離心蒸發乾燥。產物的產量為15.8 mg，及其藉由LCMS分析估算得的純度為99%。

分析條件 A：滯留時間=1.56 min；ESI-MS(+) m/z 914.3 (M+2H)。

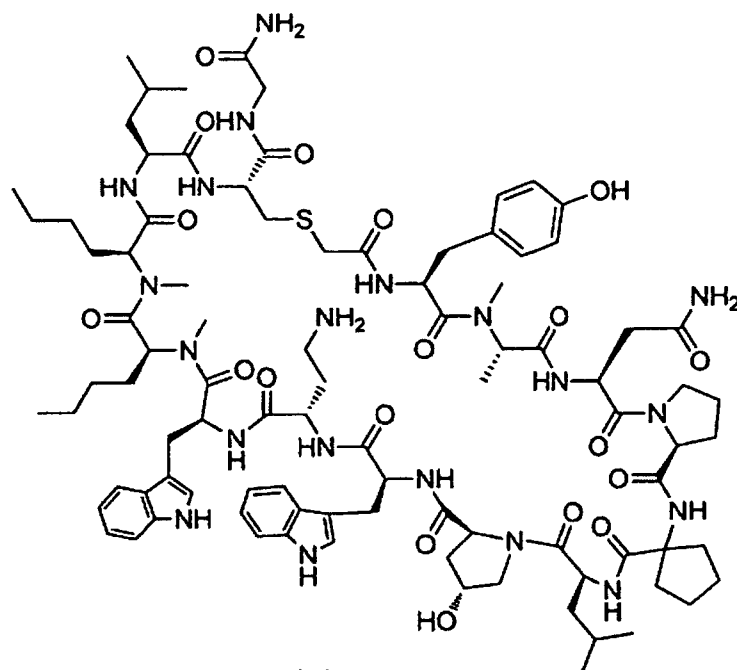
製備實例9016



通過製備型LC/MS利用以下條件純化粗物質：管柱：waters CSH c-18, 19×200 mm, 5- μ m粒子；流動相A：5:95 乙腈:水(具有0.1%三氟乙酸)；流動相B：95:5 乙腈:水(具有0.1%三氟乙酸)；梯度：在30分鐘內從15% B變為55% B，接著，5分鐘維持在100% B；流速：20 mL/min。合併含有所需產物之溶離份並通過離心蒸發乾燥。產物的產量為17.1 mg，及其藉由LCMS分析估算得的純度為94%。

分析條件 A：滯留時間=1.65 min；ESI-MS(+) m/z 938.1 (M+2H)。

製備實例9017

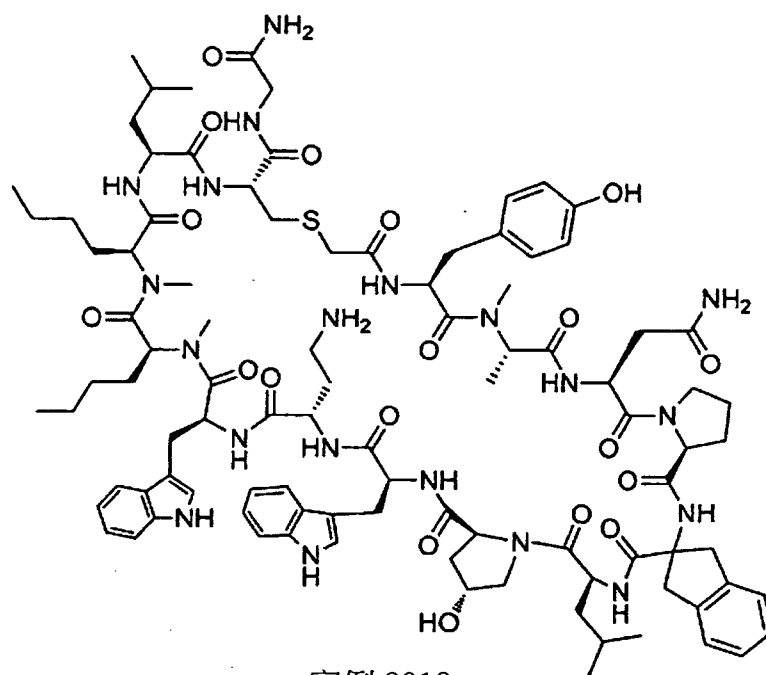


實例 9017

通過製備型LC/MS利用以下條件純化粗物質：管柱：XBridge C18, 19×200 mm, 5- μ m粒子；流動相A：5:95 乙腈:水(具有10-mM乙酸銨)；流動相B：95:5 乙腈:水(具有10-mM乙酸銨)；梯度：在30分鐘內從2% B變為60% B，接著，5分鐘維持在100% B；流速：20 mL/min。合併含有所需產物之溶離份並通過離心蒸發乾燥。通過製備型LC/MS利用以下條件進一步純化該物質：管柱：Waters CSH C18, 19×200 mm, 5- μ m粒子；流動相A：5:95 乙腈:水(具有10-mM乙酸銨)；流動相B：95:5 乙腈:水(具有10-mM乙酸銨)；梯度：在15分鐘內從25% B變為65% B，接著，5分鐘維持在100% B；流速：20 mL/min。合併含有所需產物之溶離份並通過離心蒸發乾燥。產物的產量為20.3 mg，及其藉由LCMS分析估算得的純度為97%。

分析條件 A：滯留時間=1.76 min；ESI-MS(+) m/z 927.9 (M+2H)。

製備實例9018

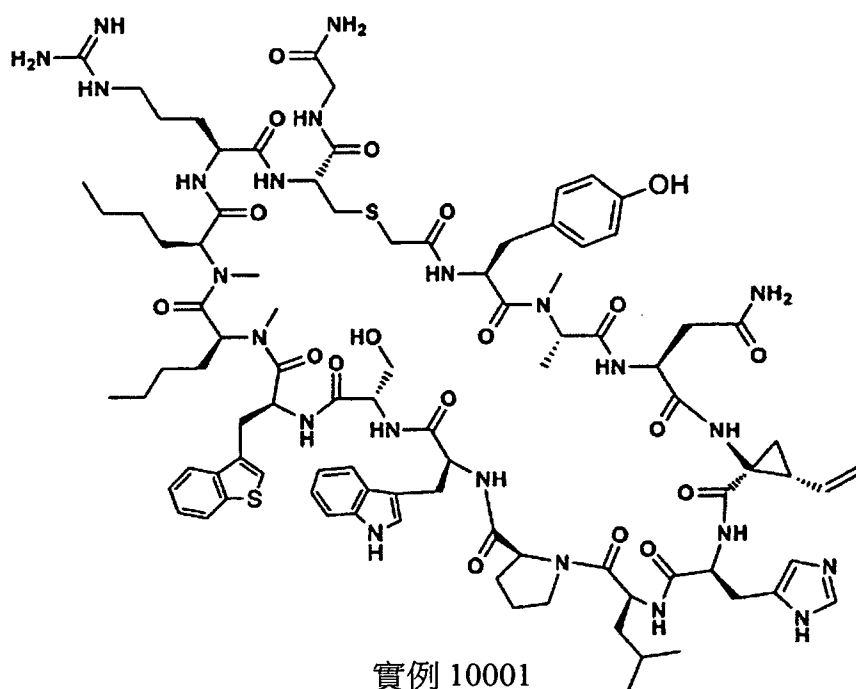


實例 9018

通過製備型LC/MS利用以下條件純化粗物質：管柱：waters CSH c-18, 19×200 mm, 5- μ m粒子；流動相A：5:95 乙腈:水(具有0.1%三氟乙酸)；流動相B：95:5 乙腈:水(具有0.1%三氟乙酸)；梯度：在30分鐘內從20% B變為60% B，接著，5分鐘維持在100% B；流速：20 mL/min。合併含有所需產物之溶離份並通過離心蒸發乾燥。產物的產量為4.8 mg，及其藉由LCMS分析估算得的純度為96%。

分析條件A：滯留時間=184 min；ESI-MS(+) m/z 951.9 (M+2H)。

製備實例10001

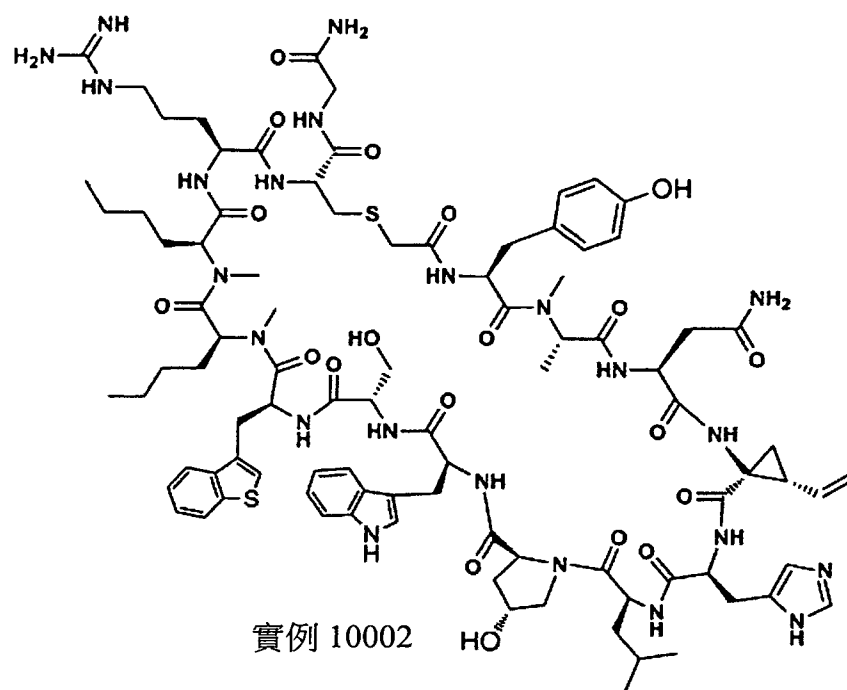


通過製備型LC/MS利用以下條件純化實例10001之粗物質：管柱：XBridge C18, 19×200 mm, 5- μ m粒子；流動相A：5:95 乙腈:水(具有10-mM乙酸銨)；流動相B：95:5 乙腈:水(具有10-mM乙酸銨)；梯度：在15分鐘內從20% B變為60% B，接著，5分鐘維持在100% B；流速：20 mL/min。合併含有所需產物之溶離份並通過離心蒸發乾燥。產物的產量為16.5 mg，及其藉由LCMS分析估算得的純度為95%。

分析條件 A：滯留時間=1.82 min；ESI-MS(+) m/z 962.8 (M+2H)。

分析條件 B：滯留時間=2.98 min；ESI-MS(+) m/z 962.8 (M+2H)。

製備實例10002

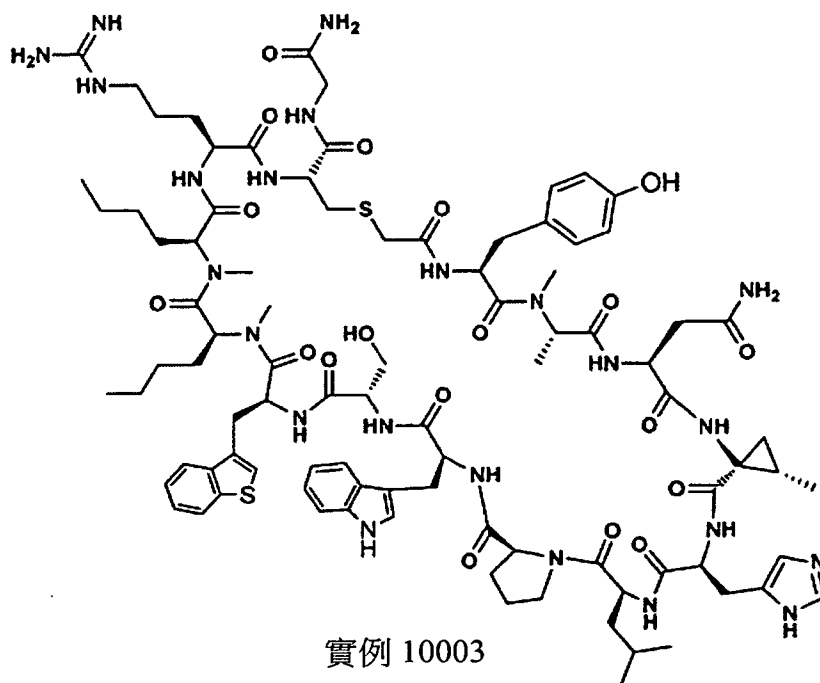


通過製備型LC/MS利用以下條件純化實例10002之粗物質：管柱：XBridge C18, 19×200 mm, 5- μ m粒子；流動相A：5:95 乙腈:水(具有10-mM乙酸銨)；流動相B：95:5 乙腈:水(具有10-mM乙酸銨)；梯度：在15分鐘內從20% B變為60% B，接著，5分鐘維持在100% B；流速：20 mL/min。合併含有所需產物之溶離份並通過離心蒸發乾燥。產物的產量為3.9 mg，及其藉由LCMS分析估算得的純度為100%。

分析條件 A：滯留時間=1.81 min；ESI-MS(+) m/z 970.9 (M+2H)。

分析條件 B：滯留時間=2.98 min；ESI-MS(+) m/z 970.8 (M+2H)。

製備實例10003



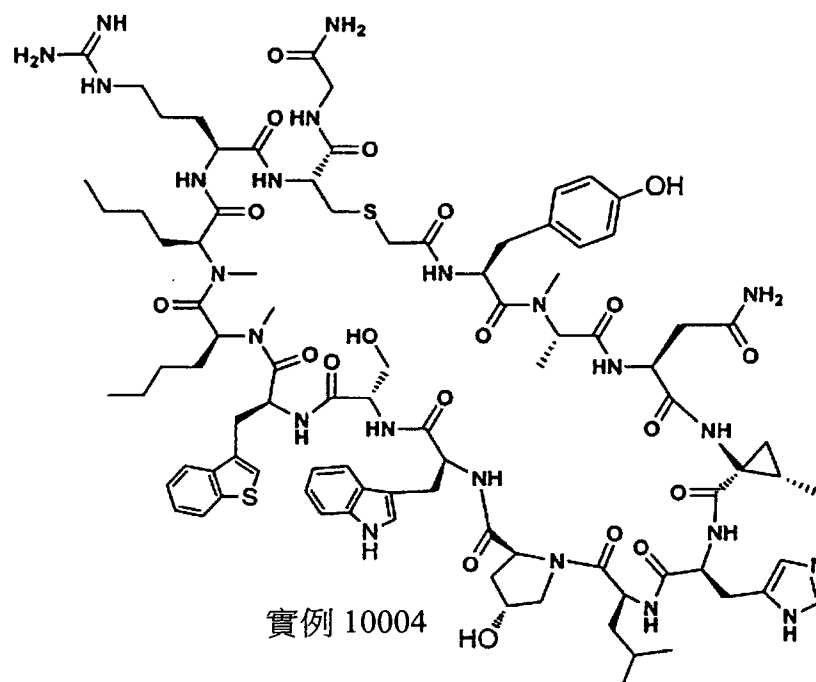
通過製備型LC/MS利用以下條件純化實例10003之粗物質：管柱：XBridge C18, 19×200 mm, 5- μ m粒子；流動相A：5:95 乙腈:水(具有10-mM乙酸銨)；流動相B：95:5 乙腈:水(具有10-mM乙酸銨)；梯度：在15分鐘內從20% B變為60% B，接著，5分鐘維持在100% B；流速：20 mL/min。合併含有所需產物之溶離份並通過離心蒸發乾燥。產物的產量為33.4 mg，及其藉由LCMS分析估算得的純度為97%。

分析條件 A：滯留時間=1.76 min；ESI-MS(+) m/z 957.0 (M+2H)。

分析條件 B：滯留時間=2.97 min；ESI-MS(+) m/z 956.8 (M+2H)。

ESI-HRMS(+) m/z ：計算值：955.9633 (M+2H)；實測值：955.9610 (M+2H)。

製備實例10004



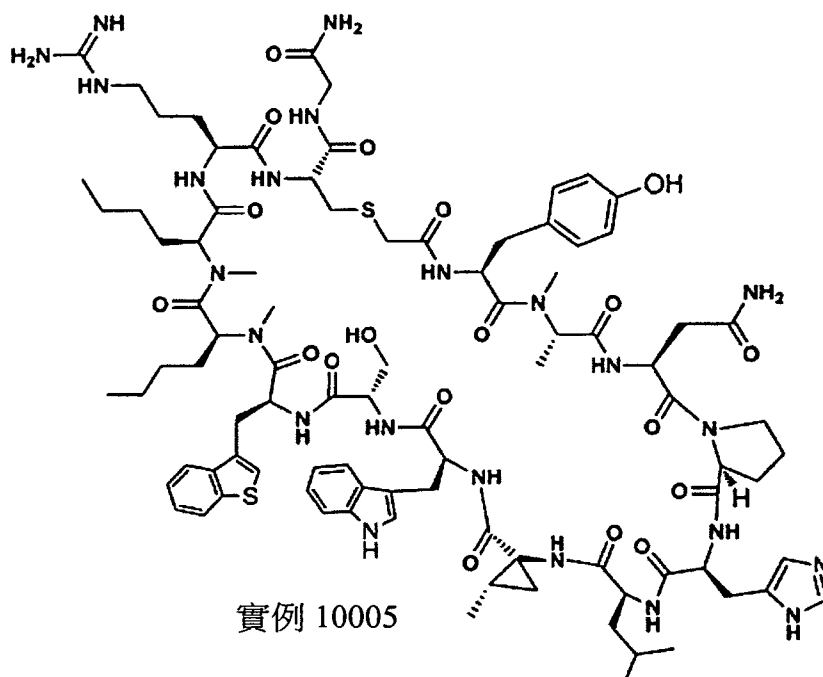
通過製備型LC/MS利用以下條件純化實例10004之粗物質：管柱：XBridge C18, 19×200 mm, 5- μ m粒子；流動相A：5:95 乙腈:水(具有10-mM乙酸銨)；流動相B：95:5 乙腈:水(具有10-mM乙酸銨)；梯度：在15分鐘內從20% B變為60% B，接著，5分鐘維持在100% B；流速：20 mL/min。合併含有所需產物之溶離份並通過離心蒸發乾燥。產物的產量為17.2 mg，及其藉由LCMS分析估算得的純度為100%。

分析條件 A：滯留時間=1.72 min；ESI-MS(+) m/z 964.8 (M+2H)。

分析條件 B：滯留時間=2.97 min；ESI-MS(+) m/z 964.7 (M+2H)。

ESI-HRMS(+) m/z ：計算值：963.9607 (M+2H)；實測值：963.9581 (M+2H)。

製備實例10005



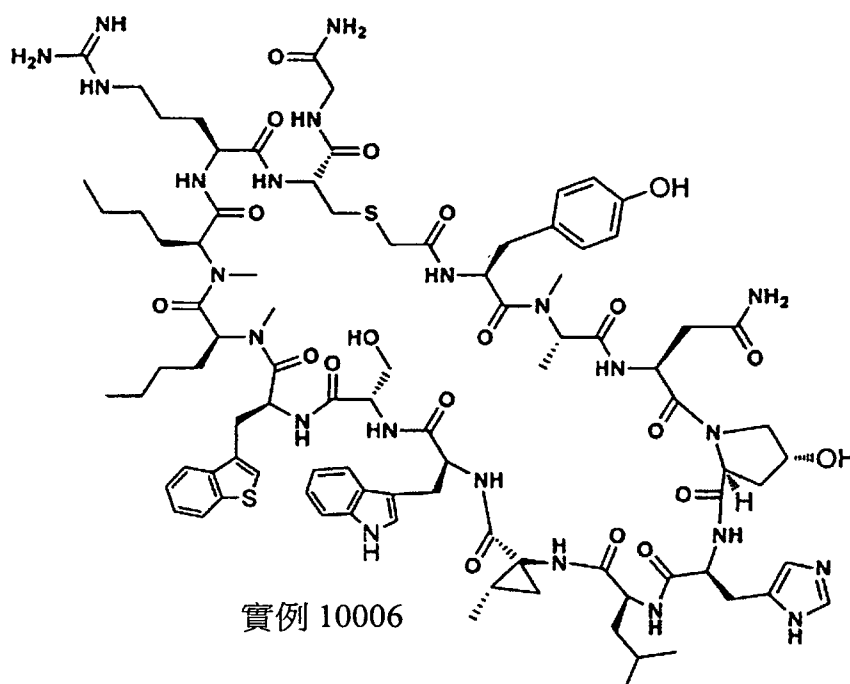
通過製備型LC/MS利用以下條件純化實例10005之粗物質：管柱：XBridge C18, 19×200 mm, 5- μ m粒子；流動相A：5:95 乙腈:水(具有10-mM乙酸銨)；流動相B：95:5 乙腈:水(具有10-mM乙酸銨)；梯度：在15分鐘內從20% B變為60% B，接著，5分鐘維持在100% B；流速：20 mL/min。合併含有所需產物之溶離份並通過離心蒸發乾燥。產物的產量為10.0 mg，及其藉由LCMS分析估算得的純度為100%。

分析條件 A：滯留時間=1.65 min；ESI-MS(+) m/z 956.6 (M+2H)。

分析條件 B：滯留時間=2.87 min；ESI-MS(+) m/z 956.7 (M+2H)。

ESI-HRMS(+) m/z ：計算值：955.9633 (M+2H)；實測值：955.9601 (M+2H)。

製備實例10006



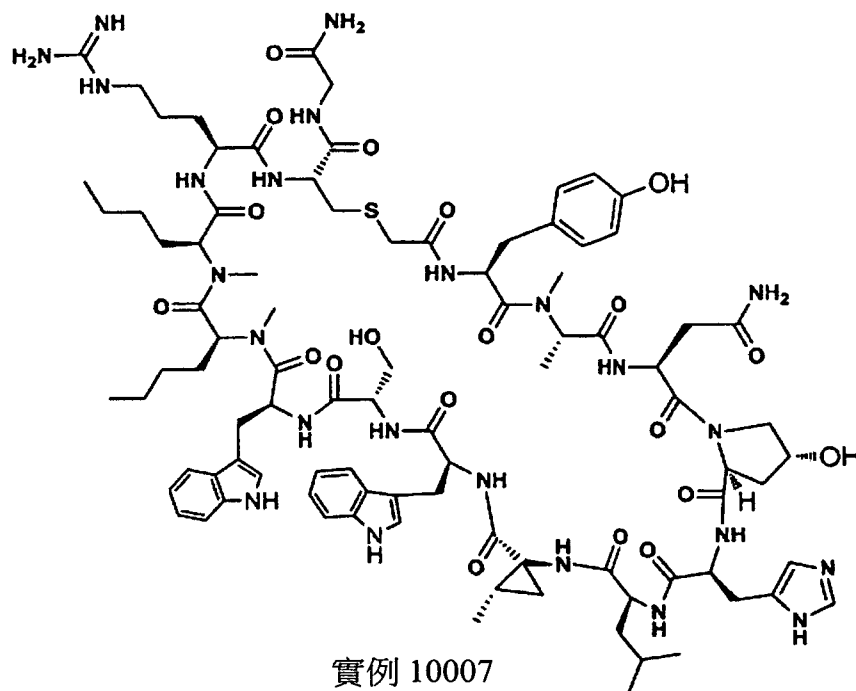
通過製備型LC/MS利用以下條件純化實例10006之粗物質：管柱：XBridge C18, 19×200 mm, 5- μ m粒子；流動相A：5:95 乙腈:水(具有10-mM乙酸銨)；流動相B：95:5 乙腈:水(具有10-mM乙酸銨)；梯度：在15分鐘內從20% B變為60% B，接著，5分鐘維持在100% B；流速：20 mL/min。合併含有所需產物之溶離份並通過離心蒸發乾燥。產物的產量為12.1 mg，及其藉由LCMS分析估算得的純度為100%。

分析條件 A：滯留時間=1.61 min；ESI-MS(+) m/z 965.1 (M+2H)。

分析條件 B：滯留時間=2.85 min；ESI-MS(+) m/z 965.0 (M+2H)。

ESI-HRMS(+) m/z ：計算值：963.9580 (M+2H)；實測值：963.9607 (M+2H)。

製備實例10007



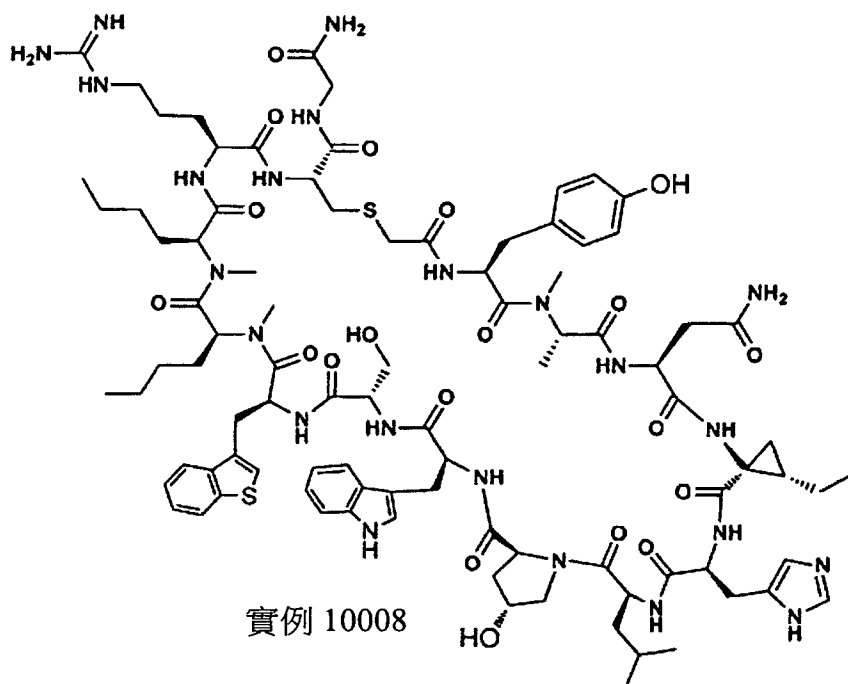
通過製備型LC/MS利用以下條件純化實例10007之粗物質：管柱：XBridge C18, 19×200 mm, 5- μ m粒子；流動相A：5:95 乙腈:水(具有10-mM乙酸銨)；流動相B：95:5 乙腈:水(具有10-mM乙酸銨)；梯度：在15分鐘內從20% B變為60% B，接著，5分鐘維持在100% B；流速：20 mL/min。合併含有所需產物之溶離份並通過離心蒸發乾燥。產物的產量為13.3 mg，及其藉由LCMS分析估算得的純度為100%。

分析條件 A：滯留時間=1.51 min；ESI-MS(+) m/z 956.7 (M+2H)。

分析條件 B：滯留時間=2.66 min；ESI-MS(+) m/z 956.3 (M+2H)。

ESI-HRMS(+) m/z ：計算值：955.4801 (M+2H)；實測值：955.4766 (M+2H)。

製備實例10008



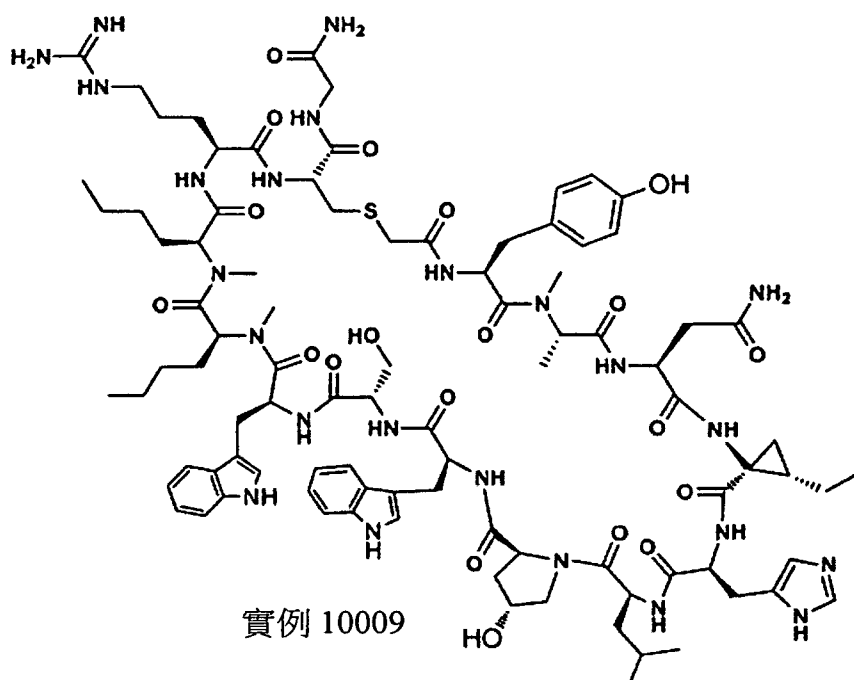
通過製備型LC/MS利用以下條件純化實例10008之粗物質：管柱：XBridge C18, 19×200 mm, 5- μ m粒子；流動相A：5:95 乙腈:水(具有10-mM乙酸銨)；流動相B：95:5 乙腈:水(具有10-mM乙酸銨)；梯度：在15分鐘內從20% B變為60% B，接著，5分鐘維持在100% B；流速：20 mL/min。合併含有所需產物之溶離份並通過離心蒸發乾燥。產物的產量為16.1 mg，及其藉由LCMS分析估算得的純度為100%。

分析條件 A：滯留時間=1.73 min；ESI-MS(+) m/z 971.8 (M+2H)。

分析條件 B：滯留時間=2.96 min；ESI-MS(+) m/z 971.7 (M+2H)。

ESI-HRMS(+) m/z ：計算值：970.9686 (M+2H)；實測值：970.9667 (M+2H)。

製備實例10009



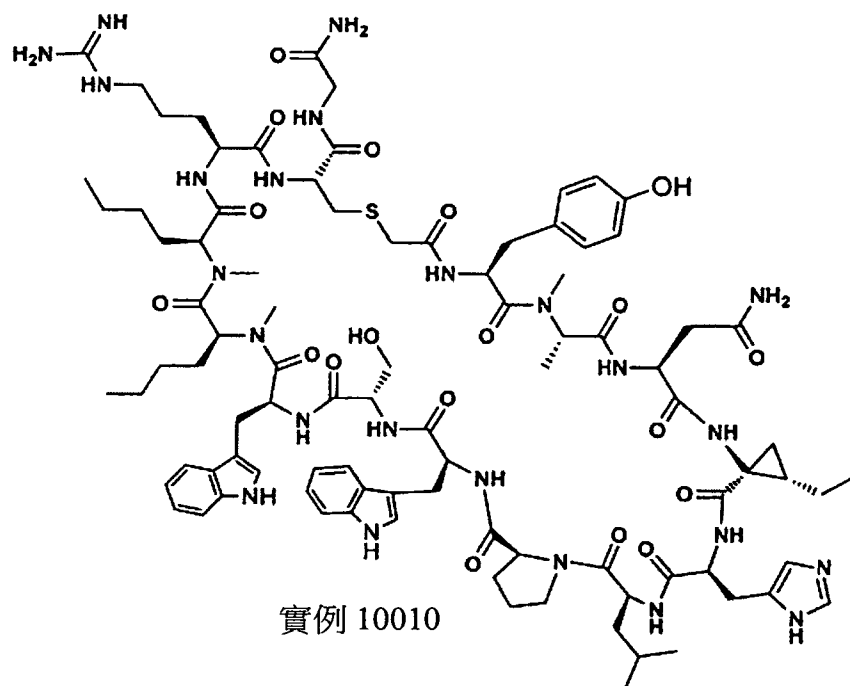
通過製備型LC/MS利用以下條件純化實例10009之粗物質：管柱：XBridge C18, 19×200 mm, 5- μ m粒子；流動相A：5:95 乙腈:水(具有10-mM乙酸銨)；流動相B：95:5 乙腈:水(具有10-mM乙酸銨)；梯度：在15分鐘內從20% B變為60% B，接著，5分鐘維持在100% B；流速：20 mL/min。合併含有所需產物之溶離份並通過離心蒸發乾燥。產物的產量為44.3 mg，及其藉由LCMS分析估算得的純度為97%。

分析條件 A：滯留時間=1.67 min；ESI-MS(+) m/z 963.2 (M+2H)。

分析條件 B：滯留時間=2.86 min；ESI-MS(+) m/z 963.3 (M+2H)。

ESI-HRMS(+) m/z ：計算值：962.4880 (M+2H)；實測值：962.4857 (M+2H)。

製備實例10010



通過製備型LC/MS利用以下條件純化實例10010之粗物質：管柱：XBridge C18, 19×200 mm, 5- μ m粒子；流動相A：5:95 乙腈:水(具有10-mM乙酸銨)；流動相B：95:5 乙腈:水(具有10-mM乙酸銨)；梯度：在15分鐘內從20% B變為60% B，接著，5分鐘維持在100% B；流速：20 mL/min。合併含有所需產物之溶離份並通過離心蒸發乾燥。產物的產量為31.1 mg，及其藉由LCMS分析估算得的純度為99%。

分析條件 A：滯留時間=1.71 min；ESI-MS(+) m/z 955.2 (M+2H)。

分析條件 B：滯留時間=2.89 min；ESI-MS(+) m/z 955.4 (M+2H)。

ESI-HRMS(+) m/z ：計算值：954.4905 (M+2H)；實測值：954.4881 (M+2H)。

採用均相時間解析熒光(HTRF)結合分析法測試大環肽競爭PD-1
與PD-L1結合之能力之方法

採用PD-1/PD-L1均相時間解析熒光(HTRF)結合分析法研究本發

明之大環肽結合至PD-L1之能力。

方法

可溶性PD-1與可溶性PD-L1之結合均相時間解析熒光(HTRF)分析法。可溶性PD-1及可溶性PD-L1係指經羧基端截短移去跨膜區且融合至異種序列，特定言之人類免疫球蛋白G序列(Ig)之Fc部分或六聚組胺酸抗原決定基標籤(His)之蛋白質。所有結合研究係在由補充0.1% (w/v)牛血清白蛋白及0.05% (v/v) Tween-20之dPBS組成之HTRF分析緩衝液中進行。對於PD-1-Ig/PD-L1-His結合分析，在4 μ l分析緩衝液中預培養抑制劑與PD-L1-His(最終濃度10 nM) 15 m，接著添加含在1 μ l分析緩衝液中之PD-1-Ig(最終濃度20 nM)且進一步培養15 m。使用來自人類、食蟹獼猴、小鼠或其他物種中任一者之PD-L1融合蛋白。使用經鉤穴狀物標記之抗-Ig單株抗體(最終濃度1 nM)及經別藻藍蛋白(APC)標記之抗-His單株抗體(最終濃度20 nM)來達成HTRF檢測。在HTRF檢測緩衝液中稀釋抗體且取5 μ l分配於結合反應之頂部。允許反應平衡30分鐘及使用EnVision熒光計獲得信號(665 nm/620 nm比)。在PD-1-Ig/PD-L2-His(分別為20 nM及5 nM)、CD80-His/PD-L1-Ig(分別為100 nM及10 nM)及CD80-His/CTLA4-Ig(分別為10 nM及5 nM)之間確立額外的結合分析。如下進行生物素化化合物第71號與人類PD-L1-His之間之結合/競爭研究。在4 μ l分析緩衝液中將大環肽抑制劑與PD-L1-His(最終濃度10 nM)預培養60分鐘，接著，添加含在1 μ l分析緩衝液中之生物素化化合物第71號(最終濃度0.5 nM)。允許結合平衡30分鐘，接著，添加含在5 μ l HTRF緩衝液中之經鉤穴狀物標記之鏈黴親和素(最終濃度2.5 pM)及經APC標記之抗His(最終濃度20 nM)。允許反應平衡30 m及使用EnVision熒光計獲得信號(665 nm/620 nm比)。

重組蛋白。在HEK293T細胞中表現具有C端人類Ig抗原決定基標

籤之羧基截短之人類PD-1(胺基酸25-167)[hPD-1(25-167)-3S-Ig]及具有C端His抗原決定基標籤之人類PD-L1(胺基酸18-239)[hPD-L1(19-239)-菸草脈斑駁病毒蛋白酶裂解位點(TVMV)-His]且連續地藉由重組蛋白A親和層析及尺寸排除層析純化。人類PD-L2-His(Sino Biologicals)、CD80-His(Sino Biologicals)、CTLA4-Ig(RnD Systems)均通過商業來源獲得。

重組人類PD-1-Ig之序列

hPD1(25-167)-3S-Ig

```
1      LDSPDRPWNP PTFSPALLVV TEGDNATFTC SFSNTSESFV LNWYRMSPSN
51     QTDKLAAPFE DRSQPGQDCR FRVTQLPNGR DFHMSVVRAR RNDSGTYLCG
101    AISLAPKAQI KESLRAELRV TERRAEVPTA HPSPSRPAG QFQGSPPGGG
151    GREPKSSDKT HTSPSPAPE LGGSSVFLF PPKPKDTLMI SRTFEVTCVV
201    VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW
251    LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV
301    SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGDS FFLYSKLTVD
351    KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK
```

(SEQ ID NO:1)

重組人類PD-L1-TVMV-His(PD-L1-His)之序列

hPDL1(19-239)-TVMV-His

```
1      FTVTVPKDLY VVEYGSNMTI ECKFPVEKQL DLAALIVYWE MEDKNIIQFV
51     HGEEDLKVQH SSYRQRARLL KDQLSLGNAA LQITDVKLQD AGVYRCMISY
101    GGADYKRITV KVNAPYNKIN QRILVDPVT SEHELTCQAE GYPKAEVIWT
151    SSDHQVLSGK TTTTNSKREE KLFNVTSTLR INTTTNEIFY CTFRRLDPEE
201    NHTAELVIPE LPLAHPNER TGSSETVRFQ GHHHHHHH
```

(SEQ ID NO:2)

結果顯示於表1中。如所顯示，本發明大環肽證實強效抑制PD-1-Ig與PD-L1-TVMV-His(PD-L1-His)之結合活性。範圍如下：A=0.10至10 μ M；B=0.01至0.099 μ M；C=0.004至0.0099 μ M。

表1

實例編號	HTRF IC50 (μ M)
實例9001	C
實例9002	4.13E-03
實例9003	B
實例9004	B
實例9013	A
實例9014	A

實例10001	A
實例10002	0.20
實例10003	A
實例10004	B
實例10008	B
實例10009	A
實例10010	A
實例9011	0.02
實例9012	B
實例9017	B
實例9018	B
實例9009	A
實例1001	A
實例1002	A
實例10005	1.00
實例10006	A
實例10007	A
實例1003	A
實例9007	A
實例9008	3.62
實例5001	A
實例9005	A
實例9006	0.04
實例9015	B
實例9016	B

熟習此項技術者將明白本發明不限於前述說明性實例，及其可在不脫離本發明之本質屬性下以其他特定形式體現。因此期望該等實例之所有態樣應視為說明性而非限制性，參考隨附申請專利範圍而非前述實例，及因此本文意欲涵蓋屬於申請專利範圍之等效物之含義及範圍內的所有改變。

【圖式簡單說明】

無

【符號說明】

無

【序列表】

<110> 美商必治妥美雅史谷比公司

<120> 免疫調節劑

<130> 12408-US-NP

<150> US 62/094,281

<151> 2014-12-19

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 384

<212> PRT

<213> 現代人

<400> 1

Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala
1 5 10 15

Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe
20 25 30

Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro
35 40 45

Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln
50 55 60

Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg
65 70 75 80

Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr
85 90 95

Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu
100 105 110

Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro
115 120 125

Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Gly
130 135 140

Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Arg Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr
145 150 155 160

His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser
165 170 175

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

180	185	190
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro		
195	200	205
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
210	215	220
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
225	230	235
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
245	250	255
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr		
260	265	270
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
275	280	285
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
290	295	300
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
305	310	315
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
325	330	335
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser		
340	345	350
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
355	360	365
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
370	375	380

<210> 2
 <211> 237
 <212> PRT
 <213> 現代人

<400> 2

Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser
1 5 10 15
Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp Leu
20 25 30
Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile Gln

-
- The chemical structure shows a macrocyclic compound with a complex ring system. It features multiple amide and carbonyl groups. The structure is substituted with various groups labeled R¹ through R²¹, and a linker A. The substituents are distributed across the macrocycle, with some appearing on multiple carbons. The linker A connects two nitrogen atoms in the ring. The overall structure is a large, cyclic molecule with a high degree of substitution.

$$\begin{array}{c}
 R^Z R^{14} R^{15} \\
 | \quad | \quad | \\
 \sim (CH_2)_z - C - S - (CH_2)_w \sim^* \\
 | \\
 R^Z
 \end{array}
 ; \quad
 \begin{array}{c}
 R^Z R^{14} R^{15} \\
 | \quad | \quad | \\
 \sim (CH_2)_z - C - S^+ - (CH_2)_w \sim^* \\
 | \quad | \\
 R^Z \quad O^-
 \end{array}
 ; \quad
 \begin{array}{c}
 R^Z R^{14} R^{15} \\
 | \quad | \quad | \\
 \sim (CH_2)_z - C - S(=O)_2 - (CH_2)_w \sim^* \\
 | \\
 R^Z
 \end{array}
 ;$$

$$\begin{array}{c}
 R^Z \\
 | \\
 \sim (CH_2)_n \sim^*
 \end{array}
 , \quad
 \begin{array}{c}
 R^Z \\
 | \\
 \sim (CH_2)_n - CH=CH \sim^*
 \end{array}
 , \quad
 \begin{array}{c}
 R^Z R^{14} R^{15} \\
 | \quad | \quad | \\
 \sim (CH_2)_n - C - O - (CH_2)_m \sim^* \\
 | \\
 R^Z
 \end{array}
 ;$$

$$\begin{array}{c}
 R^Z R^{14} R^{15} \\
 | \quad | \quad | \\
 \sim (CH_2)_n - C - NH - (CH_2)_m \sim^* \\
 | \\
 R^Z
 \end{array}
 ; \quad
 \begin{array}{c}
 R^Z R^{14} R^{15} \\
 | \quad | \quad | \\
 \sim (CH_2)_n - C - (CH_2)_{m'} - CH(R^x) \sim^* \\
 | \\
 R^Z
 \end{array}
 ; \text{ 及 }
 \begin{array}{c}
 R^v \\
 | \\
 \sim (CH_2)_p - C(=O) - NH - (CH_2)_m \sim^*
 \end{array}
 ;$$

w 為 1 或 2 ；

n 為0或1；

m 為1或2；

m' 為0或1；

p 為0、1或2；

R^x 係選自氫、胺基、羥基及甲基；

R^{14} 及 R^{15} 獨立地選自氫及甲基；及

R^z 係選自氫及 $-C(O)NHR^{16}$ ；其中 R^{16} 係選自氫、 $-CHR^{17}C(O)NH_2$ 、 $-CHR^{17}C(O)NHCHR^{18}C(O)NH_2$ 及 $-CHR^{17}C(O)NHCHR^{18}C(O)NHCH_2C(O)NH_2$ ；其中 R^{17} 係選自氫及 $-CH_2OH$ 及其中 R^{18} 係選自氫及甲基；

R^v 為氫或天然胺基酸側鏈；

R^c 、 R^f 、 R^h 、 R^i 及 R^m 為氫；

R^n 為氫或甲基或 R^v 與 R^n 形成吡咯啉環；

R^a 、 R^e 、 R^j 及 R^k 各自獨立地選自氫及甲基；

各 R^{20} 獨立地選自氫及 C_1 - C_6 烷基；

各 R^{21} 獨立地選自氫及 C_1 - C_6 烷基；

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 及 R^{13} 獨立地選自天然胺基酸側鏈及非天然胺基酸側鏈或可各自獨立地與對應之偕位 R^{20} 基團形成含有氧或氮原子之三員至六員碳環狀環或六員環，其中該環係視需要經一個、兩個或三個獨立選自 C_1 - C_3 烷氧基、 C_1 - C_3 烷基、 C_2 - C_4 烯基、鹵基、羥基及胺基之取代基取代且其中該五員及六員環係視需要與苯環稠合；或

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 及 R^{13} 可各自獨立地與如下文所述之對應鄰位 R 基團形成環；

R^e 及 R^k 可各自與對應鄰位 R 基團及其所連接的原子形成選自氮雜環丁烷、吡咯啉、嗎啉、哌啉、哌嗪及四氫噻唑之環；其中

各環係視需要經一至四個獨立選自胺基、氰基、甲基、鹵基及羥基之基團取代；

R^b 為甲基，或 R^b 及 R^2 與其所連接的原子共同形成選自氮雜環丁烷、吡咯啉、嗎啉、哌啉、哌嗪及四氫噻唑之環；其中各環係視需要經一至四個獨立選自胺基、氰基、甲基、鹵基及羥基之基團取代；或當 R^2 及偕位 R^{20} 均不為氫時，則 R^b 為氫；

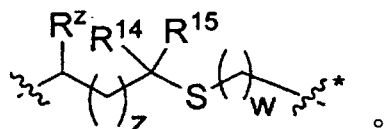
R^d 為氫或甲基，或 R^d 及 R^4 可與其所連接的原子共同形成選自氮雜環丁烷、吡咯啉、嗎啉、哌啉、哌嗪及四氫噻唑之環；其中各環係視需要經一至四個獨立選自胺基、氰基、甲基、鹵基、羥基及苯基之基團取代；

R^g 為氫或甲基或 R^g 及 R^7 可與其所連接的原子共同形成選自氮雜環丁烷、吡咯啉、嗎啉、哌啉、哌嗪及四氫噻唑之環；其中各環係視需要經一至四個獨立選自胺基、視需要經鹵基取代之苄基、苄氧基、氰基、環己基、甲基、鹵基、羥基、視需要經甲氧基取代之異噻啉基氧基、視需要經鹵基取代之噻啉基氧基、及四唑基之基團取代；且其中該吡咯啉及哌啉環係視需要與環己基、苯基或吡啶基稠合；及

R^1 為甲基，或 R^1 及 R^{12} 與其所連接的原子共同形成選自氮雜環丁烷及吡咯啉之環，其中各環係視需要經一至四個獨立選自胺基、氰基、甲基、鹵基及羥基之基團取代；

其限制條件為式(I)之化合物在具有四個不為氫之取代基且不為 α -甲基取代環之環之骨架上含有至少一個碳。

2. 如請求項1之化合物或其醫藥上可接受之鹽，其中A為



3. 如請求項2之化合物或其醫藥上可接受之鹽，其中

z 及 w 各為1；

R^{14} 及 R^{15} 為氫；及

R^2 為 $-C(O)NHR^{16}$ ；其中 R^{16} 為 $-CHR^{17}C(O)NH_2$ 。

4. 如請求項3之化合物，其中

R^1 為視需要經經基取代之苄基；

R^2 為甲基，或與偕位 R^{20} 共同形成環丙基環；

R^8 為 $-(CH_2)$ 吡啶基；

R^{10} 係選自各視需要經 $-CH_2CO_2H$ 取代之 $-(CH_2)$ 吡啶基及 $-(CH_2)$ 苯并噻吩基；

R^{11} 為丁基；

R^{12} 為丁基；

R^a 為氫；

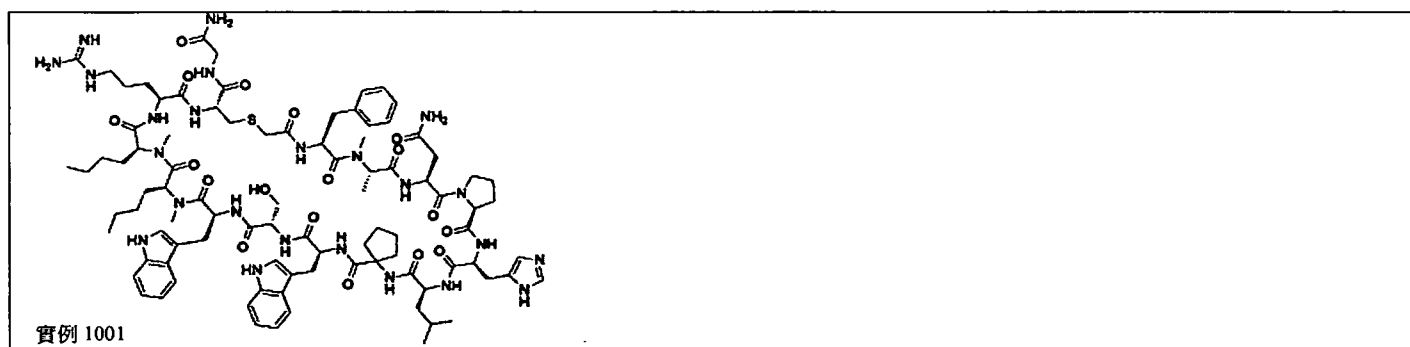
R^e 為氫；

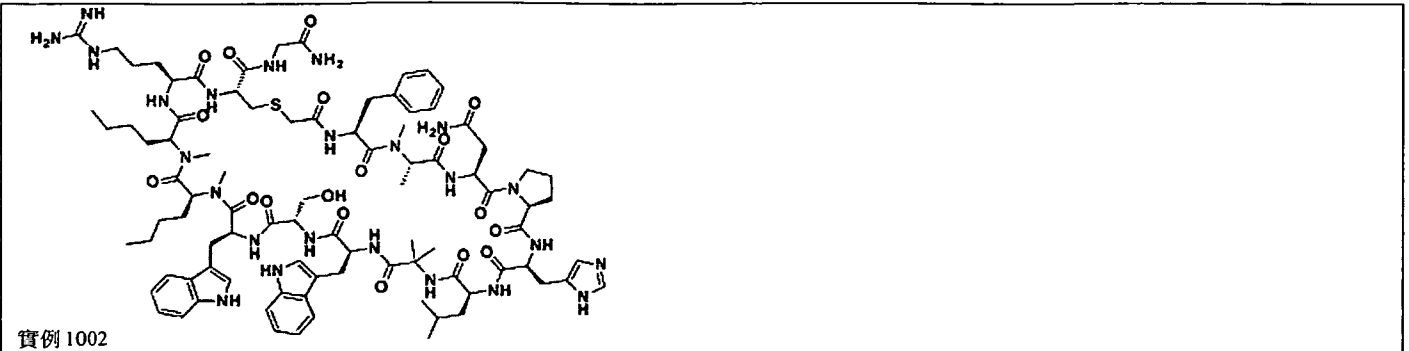
R^j 為甲基；

R^k 為甲基；及

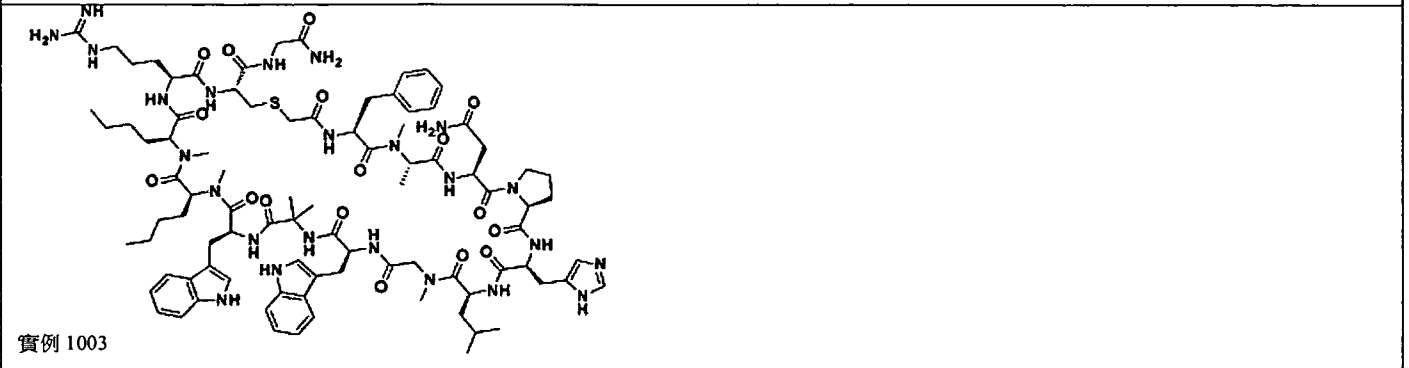
R^l 為氫。

5. 一種化合物，其係選自下列：

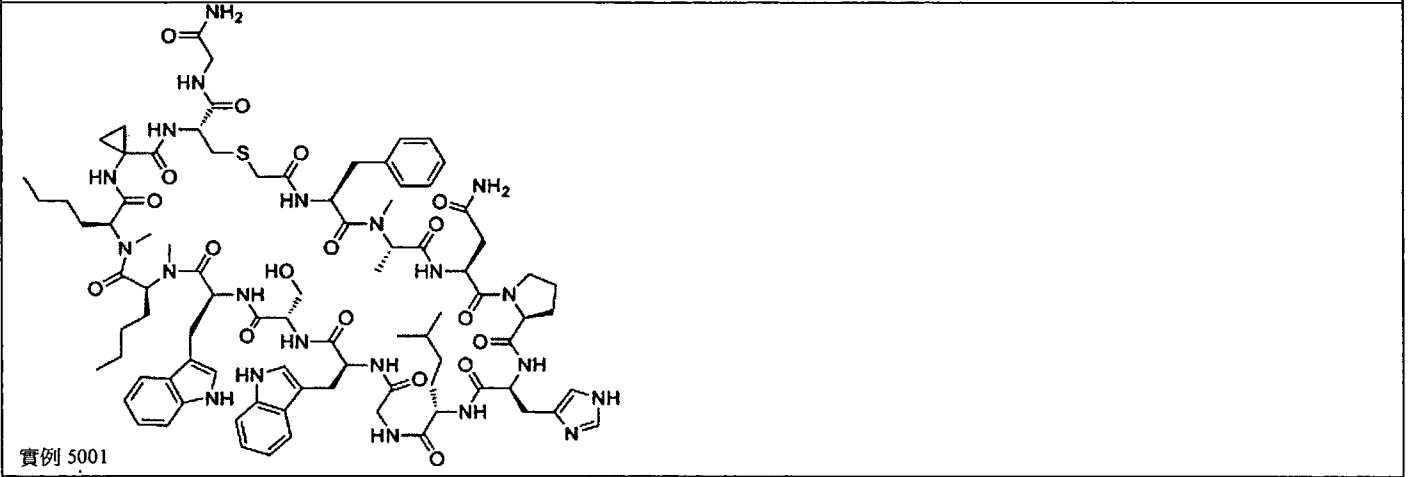




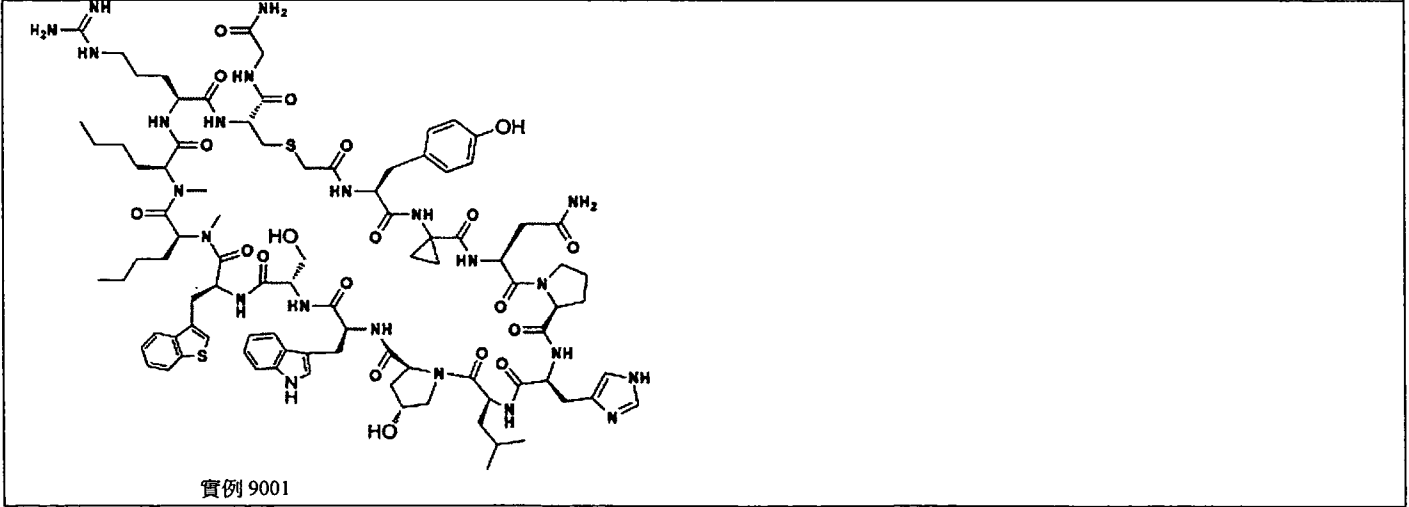
實例 1002



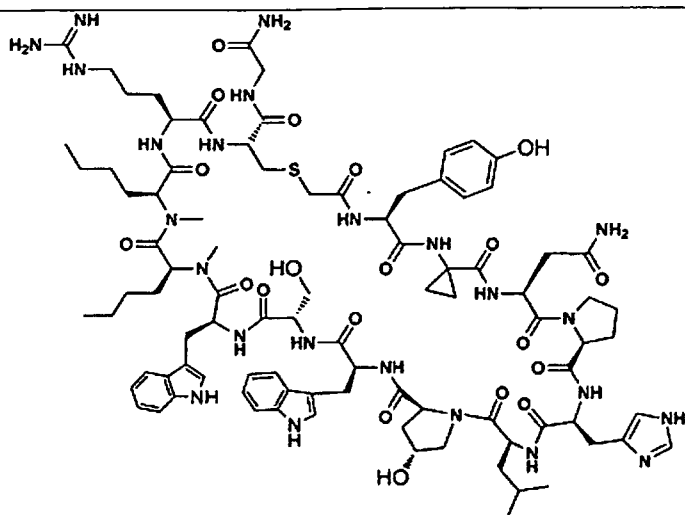
實例 1003



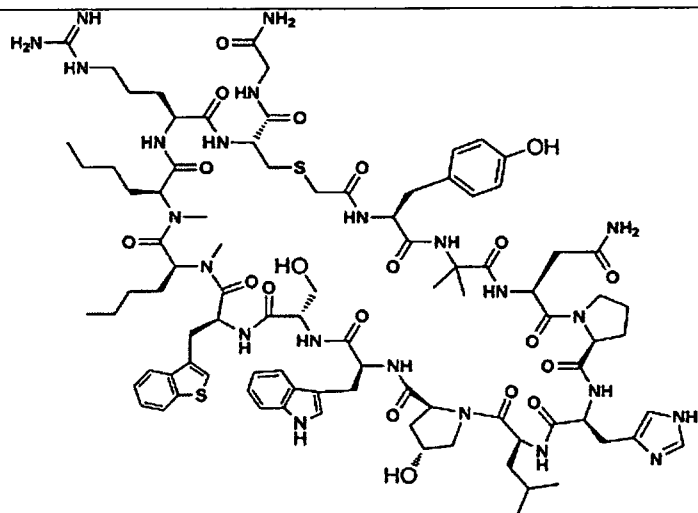
實例 5001



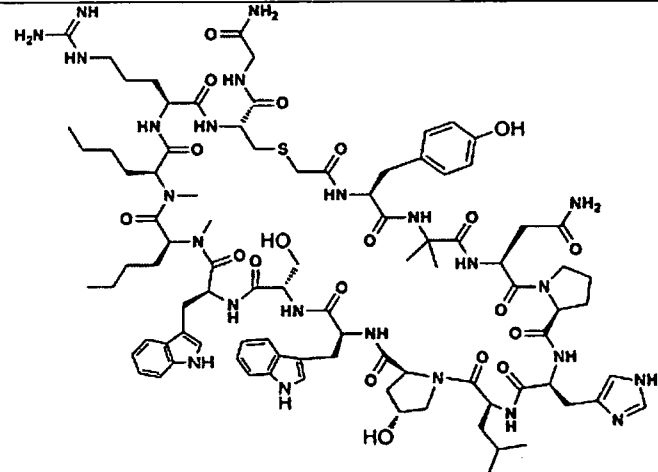
實例 9001



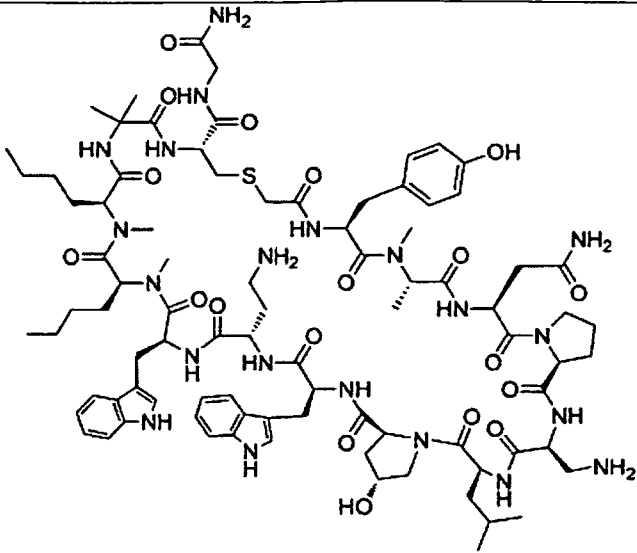
實例 9002



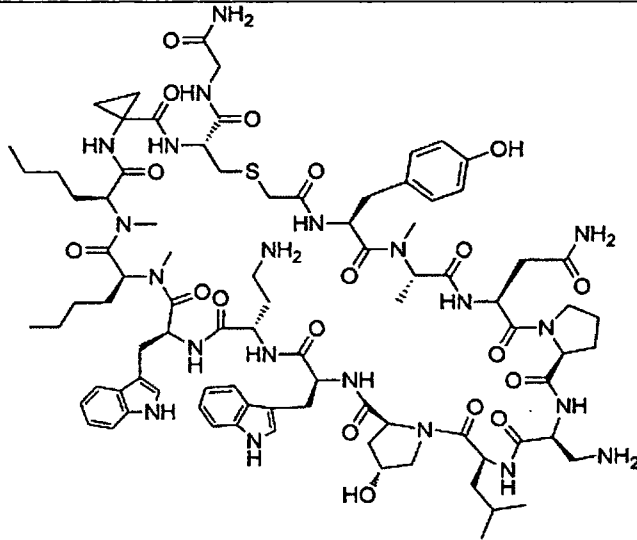
實例 9003



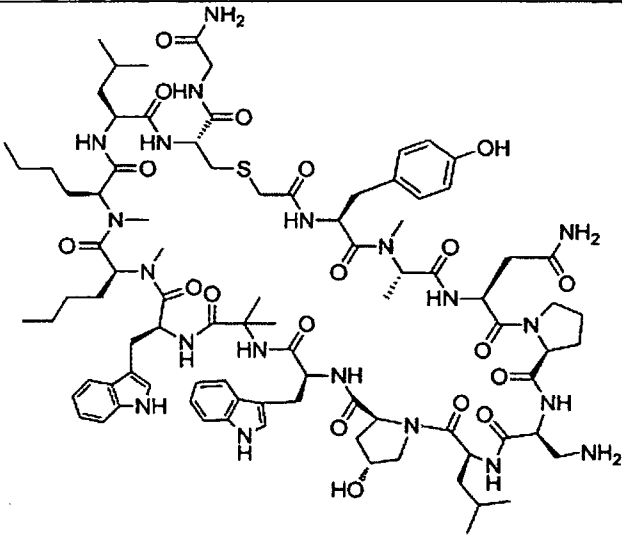
實例 9004



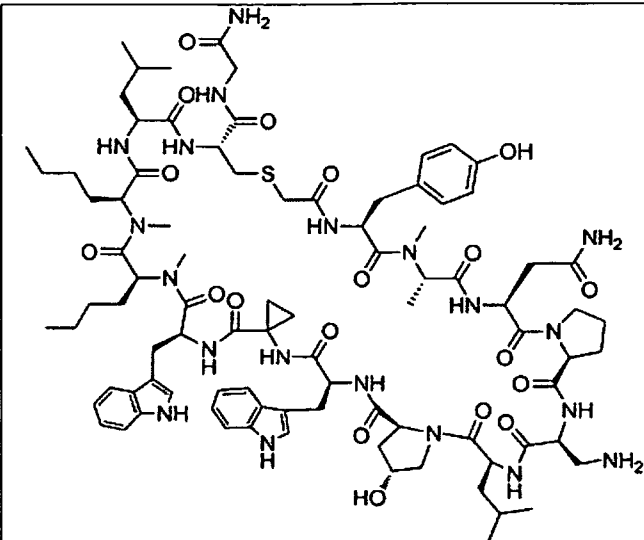
實例 9005



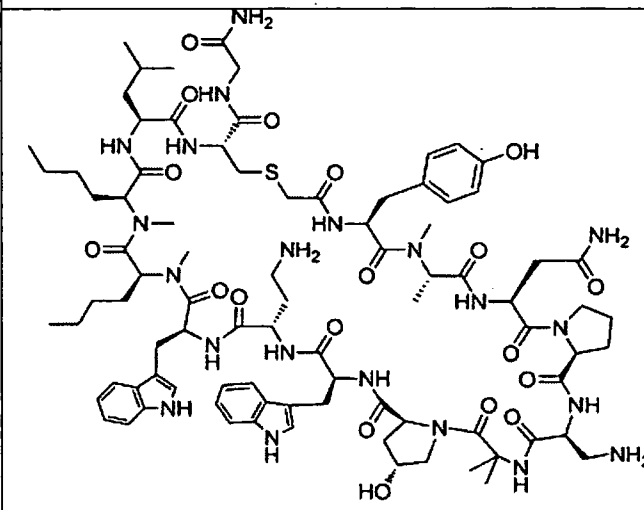
實例 9006



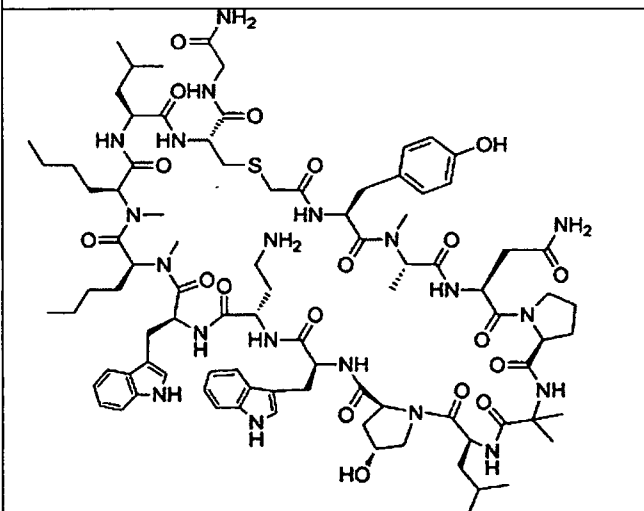
實例 9007



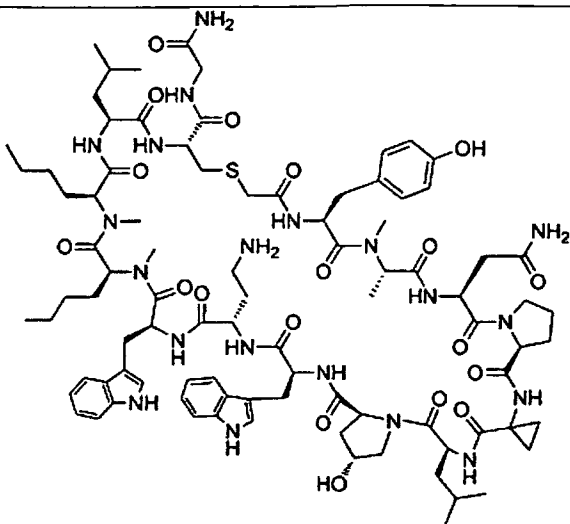
實例 9008



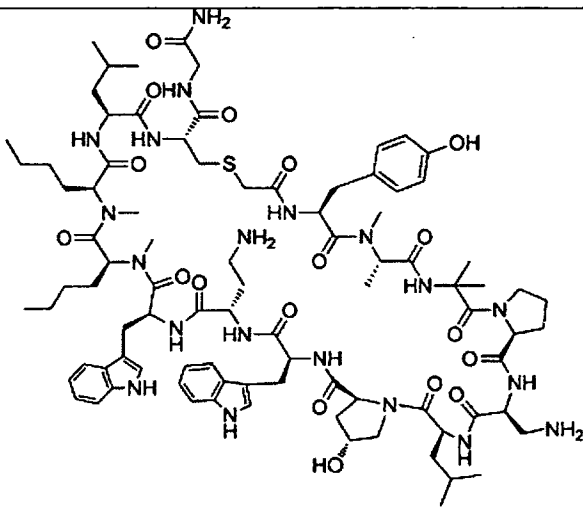
實例 9009



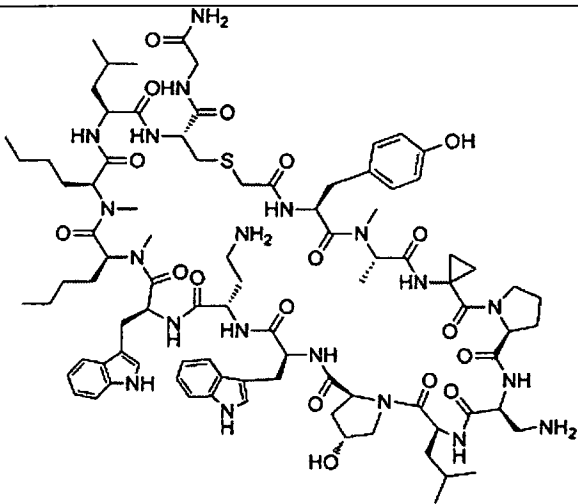
實例 9011



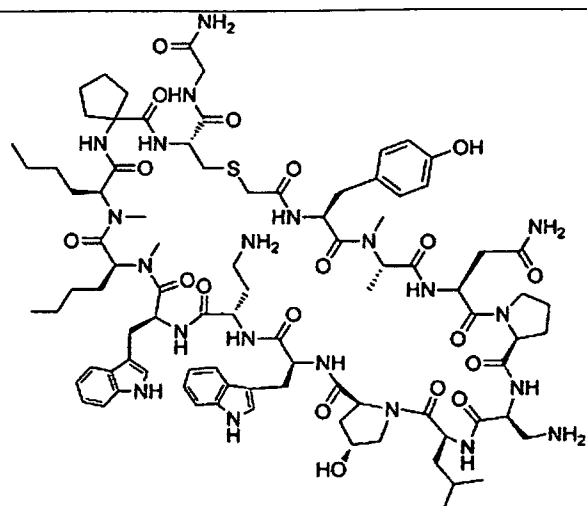
實例 9012



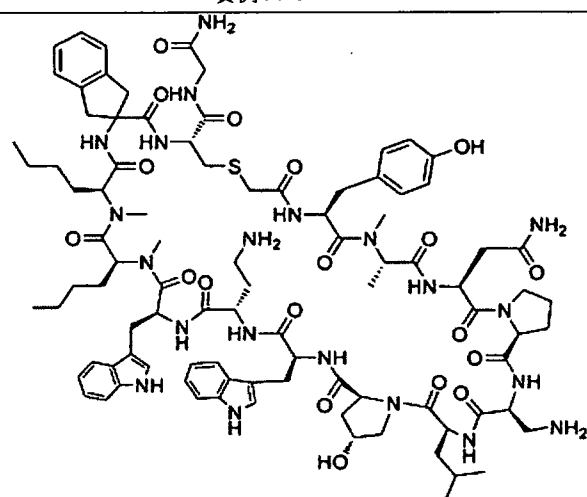
實例 9013



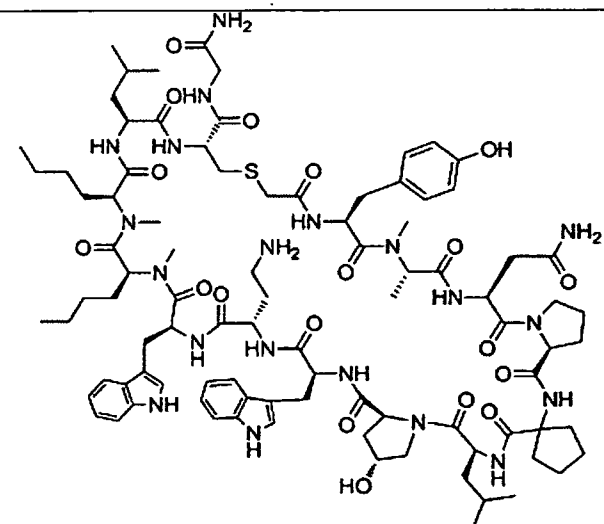
實例 9014



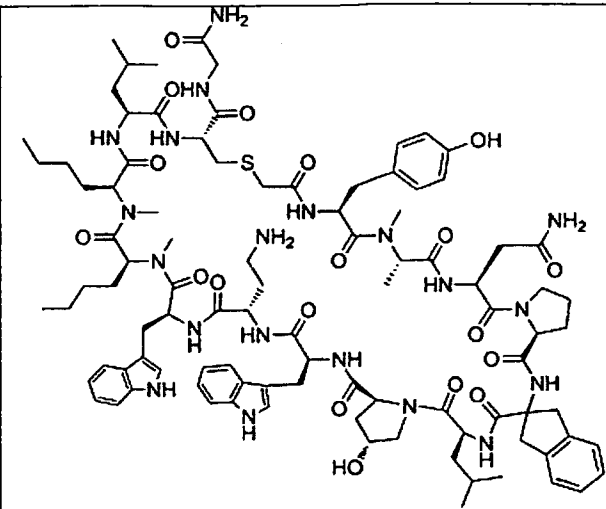
實例 9015



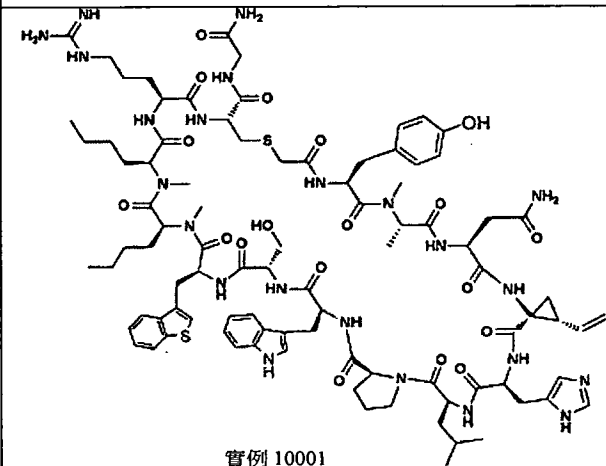
實例 9016



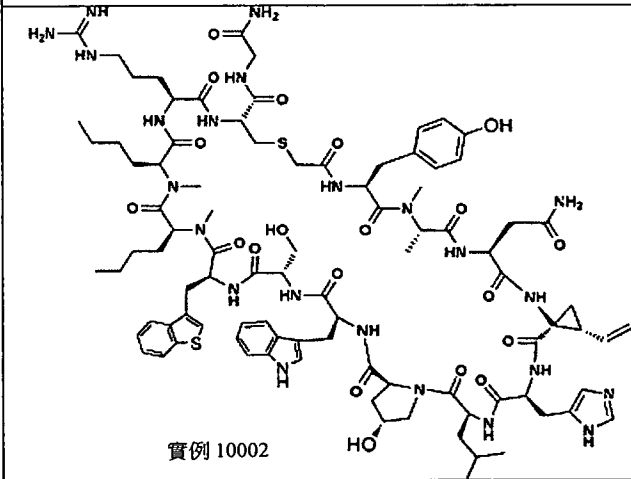
實例 9017



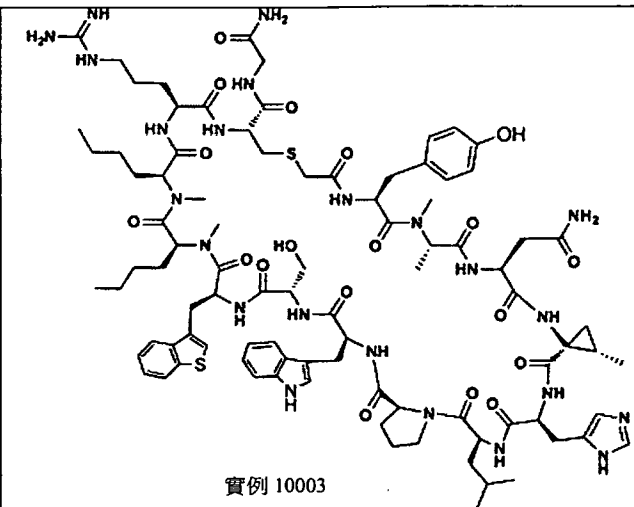
實例 9018



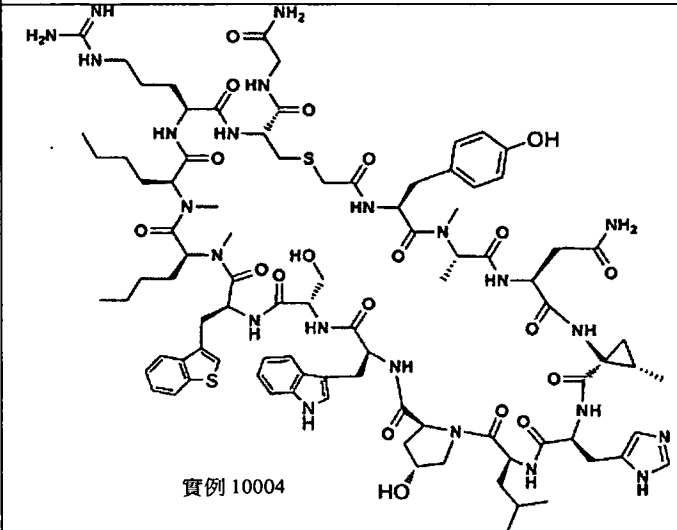
實例 10001



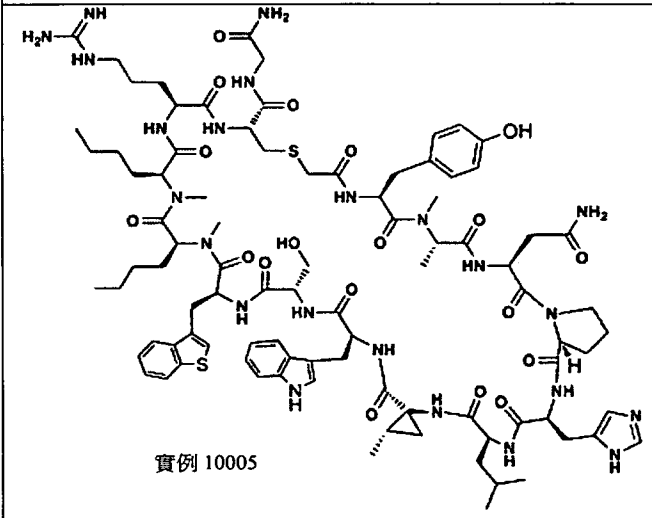
實例 10002



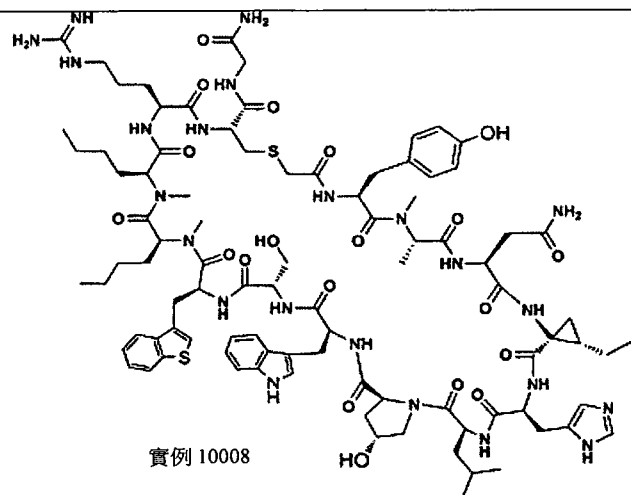
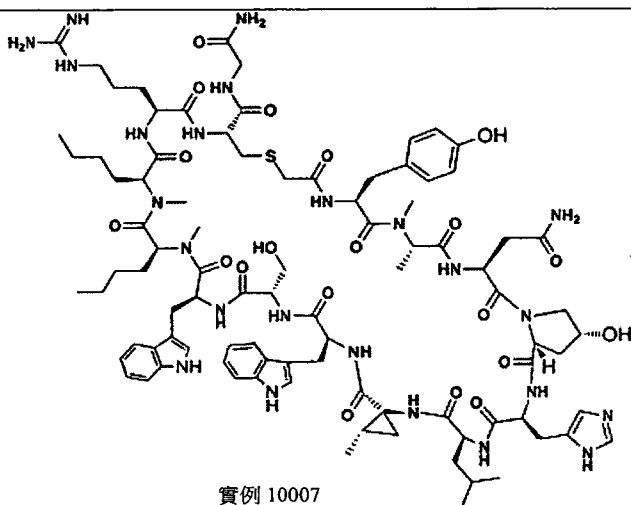
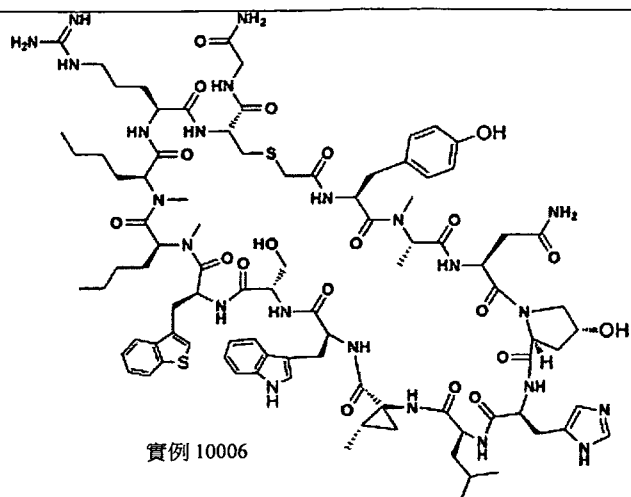
實例 10003

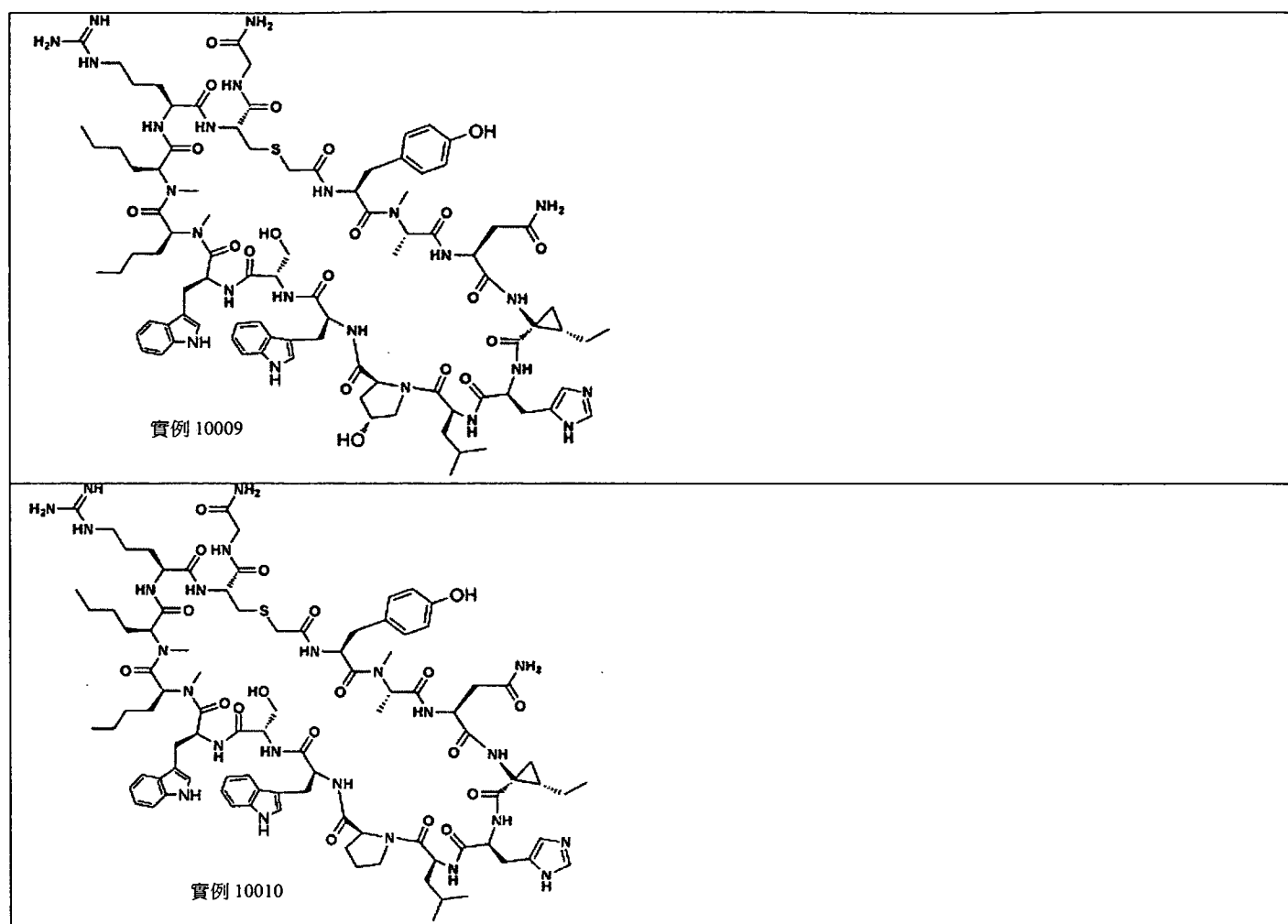


實例 10004



實例 10005





；或其醫藥上可接受之鹽。

6. 一種如請求項1之化合物或其治療上可接受之鹽之用途，其用於製造用於增強、刺激且/或增加有此需要的個體之免疫反應的藥物。
7. 如請求項6之用途，其中該藥物進一步包含另一藥劑，或該藥物用於在該另一藥劑之前、之後或同時投與。
8. 如請求項7之用途，其中該另一藥劑為抗微生物劑、抗病毒劑、細胞毒性劑及/或免疫反應調節劑。
9. 如請求項7之用途，其中該另一藥劑為HDAC抑制劑。
10. 如請求項7之用途，其中該另一藥劑為TLR7及/或TLR8促效劑。
11. 一種如請求項1之化合物或其治療上可接受之鹽之用途，其用於製造用於抑制有此需要的個體之癌細胞之生長、增殖或轉移的

藥物。

12. 如請求項11之用途，其中該癌症係選自黑色素瘤、腎細胞癌、鱗狀非小細胞肺癌(NSCLC)、非鱗狀NSCLC、結腸直腸癌、去勢抗性前列腺癌、卵巢癌、胃癌、肝細胞癌、胰臟癌、頭部及頸部鱗狀細胞癌、食道癌、胃腸道癌及乳癌及血液惡性疾病。
13. 一種如請求項1之化合物或其治療上可接受之鹽之用途，其用於製造用於治療有此需要的個體之傳染性疾病的藥物。
14. 如請求項13之用途，其中該傳染性疾病係由病毒引起。
15. 如請求項14之用途，其中該病毒係選自HIV、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、疱疹病毒及流感病毒。
16. 一種如請求項1之化合物或其治療上可接受之鹽之用途，其用於製造用於治療有此需要的個體之敗血性休克的藥物。
17. 一種如請求項1之化合物或其治療上可接受之鹽之用途，其用於製造用於阻斷個體之PD-L1與PD-1及/或CD80相互作用的藥物。