

化合物及用途

技术领域

[1] 本申请涉及生物医药化学领域。更具体地，本申请涉及一种能够靶向结合细胞并降解靶蛋白的偶联体化合物及其用途，和可用于制备偶联体化合物的连接子化合物。

背景技术

[2] 蛋白质水解靶向嵌合体（“PROTAC”，Proteolysis Targeting Chimeras）于 2001 年由 Raymond Deshaies 和 Craig Crews 提出并验证，是利用泛素-蛋白酶体系统对靶标蛋白（“POI”，Protein of Interest）进行降解的一种新成药技术。它是诱导蛋白降解技术的一种改进的、通用的平台技术，这个技术平台形成的嵌合体双功能小分子，一端是结合靶蛋白的靶蛋白配体，另一端是结合 E3 连接酶的 E3 连接酶配体，两个配体通过一段连接部分连接。在进入细胞后，嵌合体可以将靶蛋白和 E3 连接酶拉近并形成靶蛋白-PROTAC-E3 连接酶三元复合物，与此同时，泛素基于泛素结合酶 E2 与 E3 连接酶靠近，并进一步依赖 E3 连接酶而贴到靶蛋白上（靶蛋白的泛素化）。贴上泛素的靶蛋白将被蛋白酶体识别并降解，从而靶蛋白的水平被选择性地降低。前述过程中，PROTAC 中的靶蛋白配体无需长时间占据结合位点，只需三元复合物短暂的形成便可瞬时完成靶蛋白的泛素化，并且 PROTAC 在细胞内可多次循环发挥作用。理论上催化量的 PROTAC 药物就可以将任何过表达和突变的致病蛋白清除，从而治疗疾病。

[3] PROTAC 技术具有很多优势，包括 1) PROTAC 可克服肿瘤药物耐药性：化疗、激酶抑制剂、免疫疗法等癌症治疗方法展现的耐药性阻碍了临床应用，增加了药物开发的难度，而较低剂量的 PROTAC 就能降解整个靶标蛋白，并删除靶蛋白的全部功能，因此 PROTAC 技术有望解决当前面临的耐药性问题；2) PROTAC 有望降解不可成药的靶点：目前只有 20~25% 的蛋白质靶点正在进行药物发现的研究，大多数小分子药物或大分子抗体需要结合酶或受体的活性位点来发挥作用，然而，人类细胞中 80% 的蛋白缺乏这样的位点，对于 PROTAC，其不需要这样的位点而只需要提供结合活性，触发靶标蛋白与 E3 酶靠近，从而介导靶蛋白的泛素化并引发靶蛋白降解。

[4] 2013 年，Arvinas 在 2019 年将第一款 PROTAC 药物（ARV-110）推进至临床研究阶段。全球各药企争相利用 PROTAC 技术，开发靶向蛋白降解类药物。截止到 2021 年底，已经有 16 款 PROTAC 药物已经处于或即将进入临床研究阶段。然而，PROTAC 也有局限性。

例如 PROTAC 成药性差，PROTAC 分子量一般在 700~1200 之间，这种相对大的尺寸通常会使得它们的透膜能力、物理化学性质（例如，低水溶性）和药代动力学较差，这可能会使它们的体内应用复杂化。此外，PROTAC 的靶向性差，尽管 PROTAC 对多种靶点的高效性已被证实，但迄今为止报道的大多数降解物显示了其有限的组织选择性，并且对不同类型的细胞选择性较差。

[5] 本发明结合了配体药物偶联物和 PROTAC 技术的优势，通过将 PROTAC 偶联到具有靶向作用的配体上，在利用 PROTAC 药物自身克服肿瘤药物耐药性、靶向传统难以成药的靶点以及毒性小的同时，提高了 PROTAC 的靶向性和成药性。

发明内容

[6] 本申请的一个方面提供了一种偶联体化合物或其药学上可接受的盐，所述偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含至少两个特异性结合细胞表面蛋白的配体的靶向分子和与所述靶向分子连接的有效载荷，其中所述有效载荷为蛋白降解靶向嵌合体。

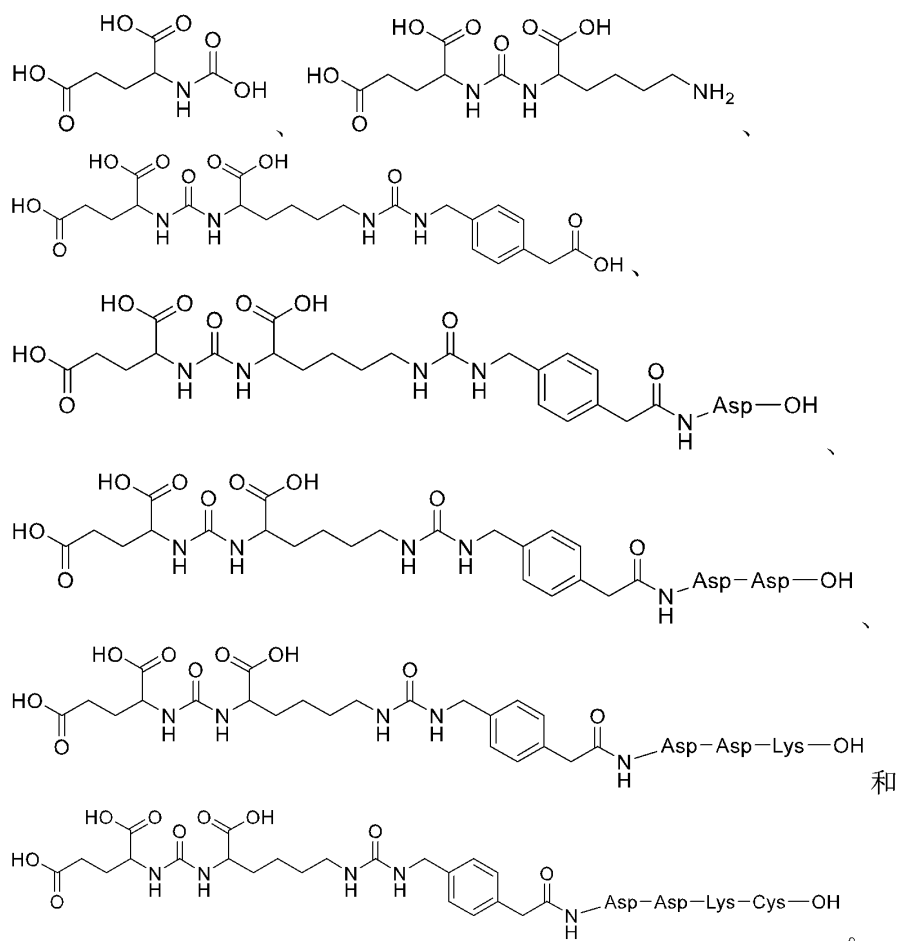
[7] 在一些实施方式中，靶向分子结合以下细胞表面蛋白：FOLR1、TRPV6、PSMA、LHRH、EGFR、Her2、Trop2、Her3、Claudin18.2、c-Met 或其任意组合。在一些实施方式中，靶向分子结合以下细胞表面蛋白：FOLR1、TRPV6、PSMA、c-Met 或其任意组合。

[8] 在一些实施方式中，靶向分子结合以下细胞表面蛋白组合：FOLR1 和 TRPV6；FOLR1 和 PSMA；TRPV6 和 PSMA；TRPV6 和 c-Met；FOLR1 和 c-Met；PSMA 和 c-Met；FOLR1、TRPV6 和 PSMA；FOLR1、TRPV6 和 c-Met；FOLR1、PSMA 和 c-Met；TRPV6、PSMA 和 c-Met；或 FOLR1、PSMA、TRPV6 和 c-Met。在一些实施方式中，靶向分子包含两种配体且分别结合 FOLR1 和 TRPV6、FOLR1 和 PSMA、TRPV6 和 PSMA、FOLR1 和 c-Met、PSMA 和 c-Met 或 TRPV6 和 c-Met。

[9] 在一些实施方式中，结合 FOLR1 的配体包括叶酸或其类似物和蝶酸，优选地，所述叶酸类似物选自 5-甲基四氢叶酸、5-甲酰基四氢叶酸、10-甲酰四氢叶酸、甲氨蝶呤、5,10-甲酰四氢叶酸、5,10-亚甲基四氢叶酸、氨基蝶呤和雷替曲塞。

[10] 在一些实施方式中，结合 TRPV6 的配体包括由 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列、由 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列、或与 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 2 具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列。

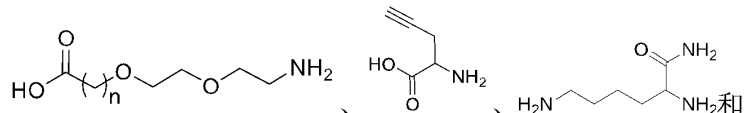
[11] 在一些实施方式中，结合 PSMA 的配体包括多肽、抗体或小分子。在一些实施方式中，结合 PSMA 的配体选自以下结构：



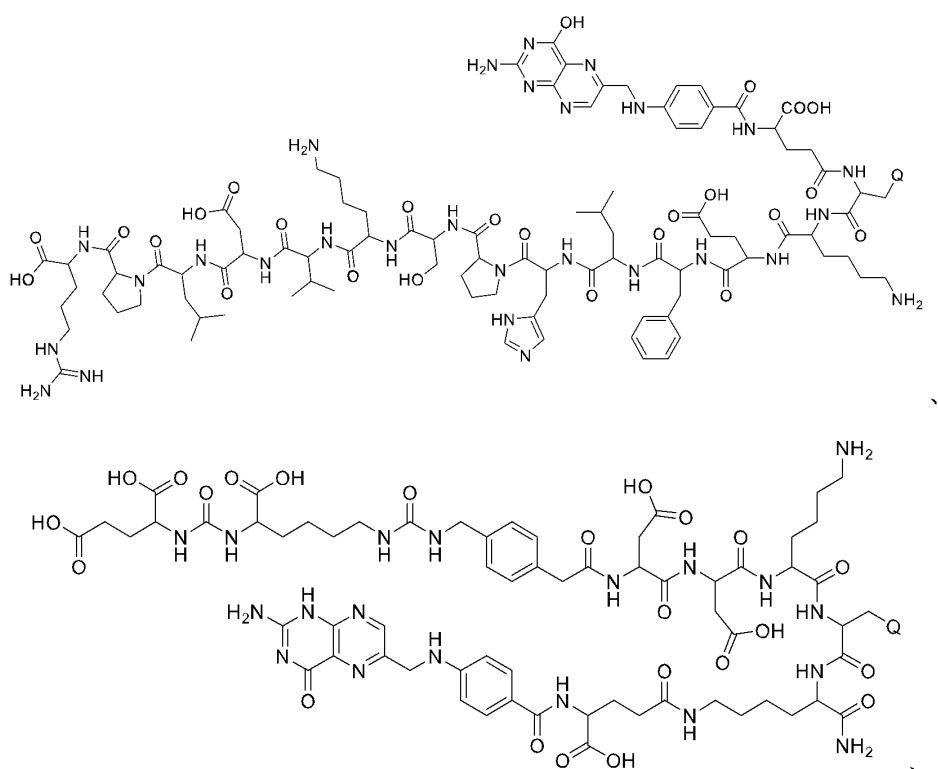
[112] 在一些实施方式中，结合 c-MET 的配体包括由 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列：Cys^a-X1-Cys^c-X2-Gly-Pro-Pro-X3-Phe-Glu-Cys^d-Trp-Cys^b-Tyr-X4-X5-X6；其中 X1 为 Asn、His 或 Tyr；X2 为 Gly、Ser、Thr 或 Asn；X3 为 Thr 或 Arg；X4 为 Ala、Asp、Glu、Gly 或 Ser；X5 为 Ser 或 Thr；X6 为 Asp 或 Glu；Cys^{a-d} 各自为半胱氨酸残基；优选地，残基 Cys^a 与 Cys^b 以及 Cys^c 与 Cys^d 分别环化形成两个独立的二硫键。在一些实施方式中，c-MET 配体的末端赖氨酸的羧基可以被酰胺化。在一些实施方式中，c-MET 配体的 N 末端可以被乙酰化。在一些实施方式中，结合 c-MET 的配体包括由 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列 Ala-Gly-Ser-Cys^a-Tyr-Cys^c-Ser-Gly-Pro-Pro-Arg-Phe-Glu-Cys^d-Trp-Cys^b-Tyr-Glu-Thr-Gly-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Lys，其中 Cys^{a-d} 各自为半胱氨酸残基，优选地，残基 Cys^a 与 Cys^b 以及 Cys^c 与 Cys^d 分别环化形成两个独立的二硫键，优选地，末端 Ala 的氨基被乙酰化。在一些实施

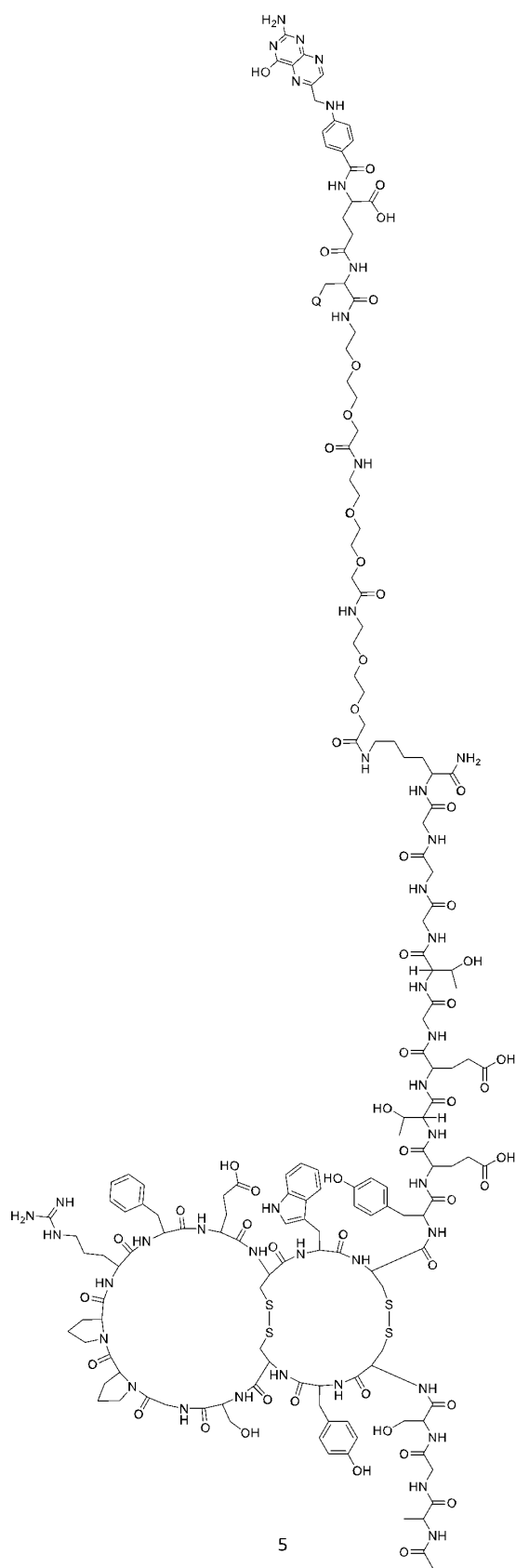
方式中, 结合 c-MET 的配体包括与 SEQ ID NO: 4 具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列, 并且其中 Cys^{a-d} 各自为半胱氨酸残基, 优选地, 残基 Cys^a 与 Cys^b 以及 Cys^c 与 Cys^d 分别环化形成两个独立的二硫键。

[13] 在一些实施方式中, 靶向分子中的配体直接连接或者通过间隔区相互连接, 优选的, 所述连接通过脱水缩合的方式进行。在一些实施方式中, 所述间隔区包含选自下组的氨基酸或氨基酸组合: Lys、Cys、Lys-Cys、Cys-Cys、Lys-Cys-Lys、Arg-Arg、Ala-Ser-Asn、Ala-Ala-Ala、Ser-Ser-Arg、Pro-Arg、Asp-Asp-Lys-Cys、和 Pro-Leu-Gly, 任选的, 所述氨基酸可以被酰胺化。在一些实施方式中, Lys 被酰胺化, 例如酰胺化成为 2,6-二氨基己酰胺。在一些实施方式中, 间隔区包含一个或多个相同或不同的选自下组的化合物通过脱水缩合形

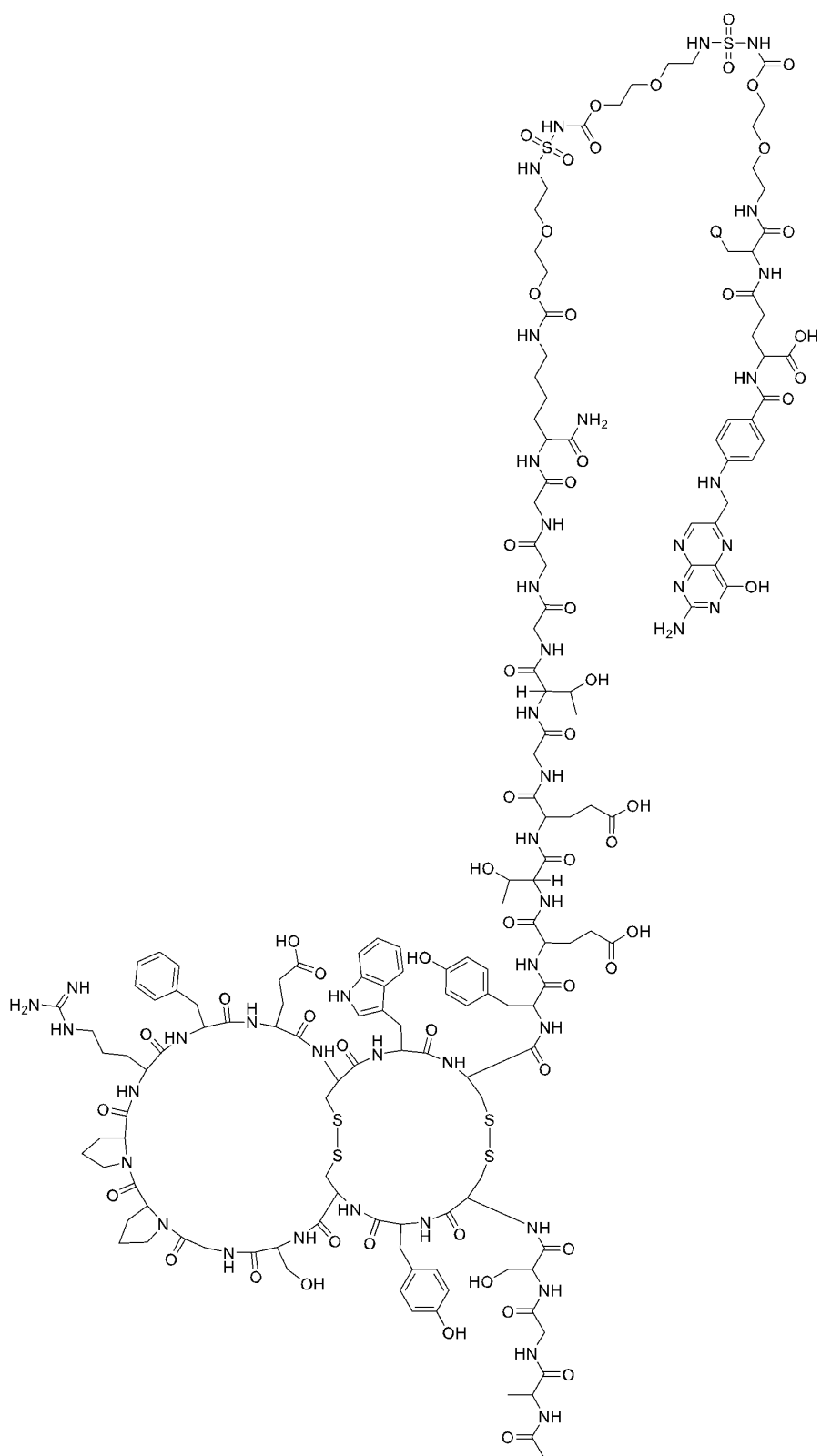
成: , 其中 n 为 0 或 1。

[14] 在一些实施例, 具有以下结构部分的靶向分子与有效载荷进行连接以形成偶联体化合物,



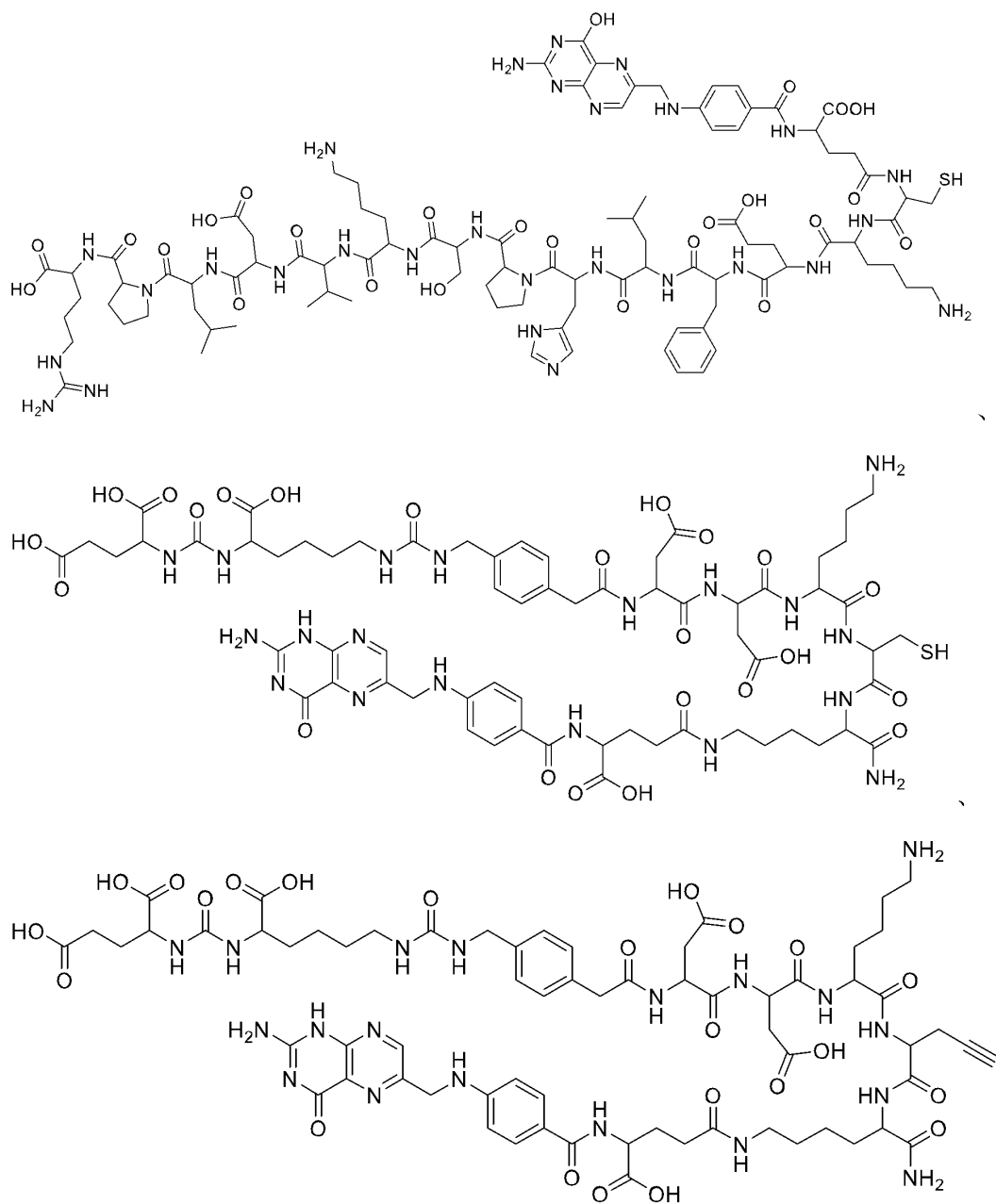


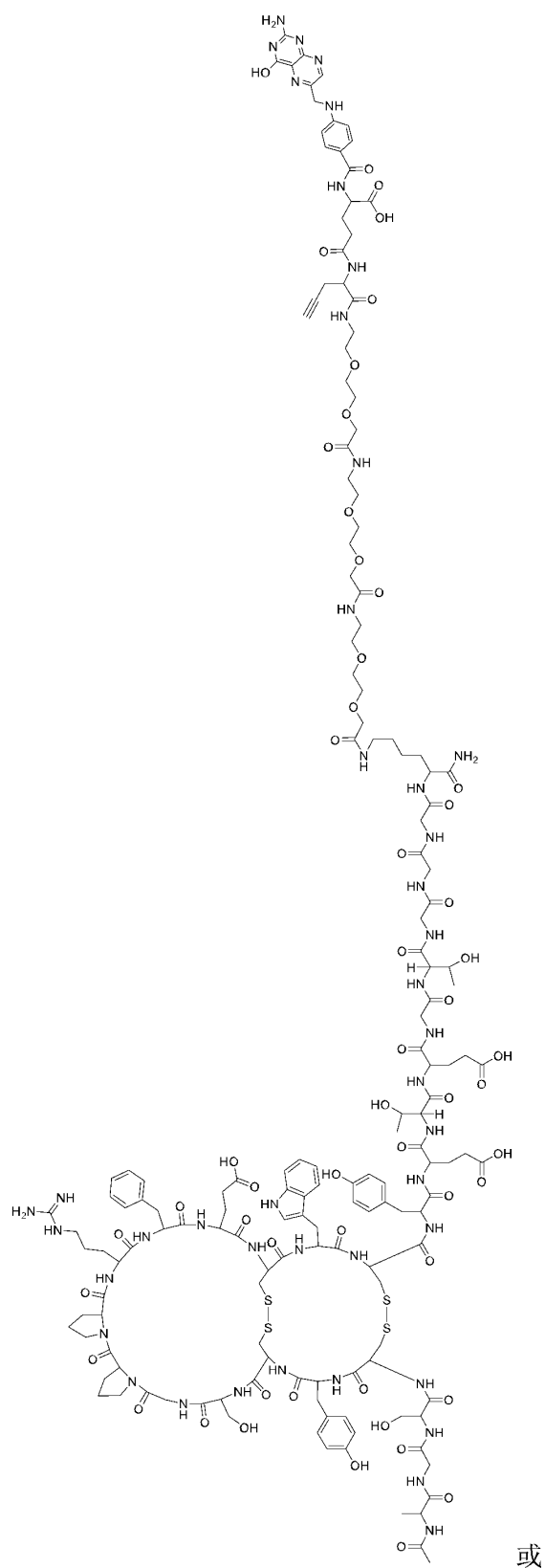
或

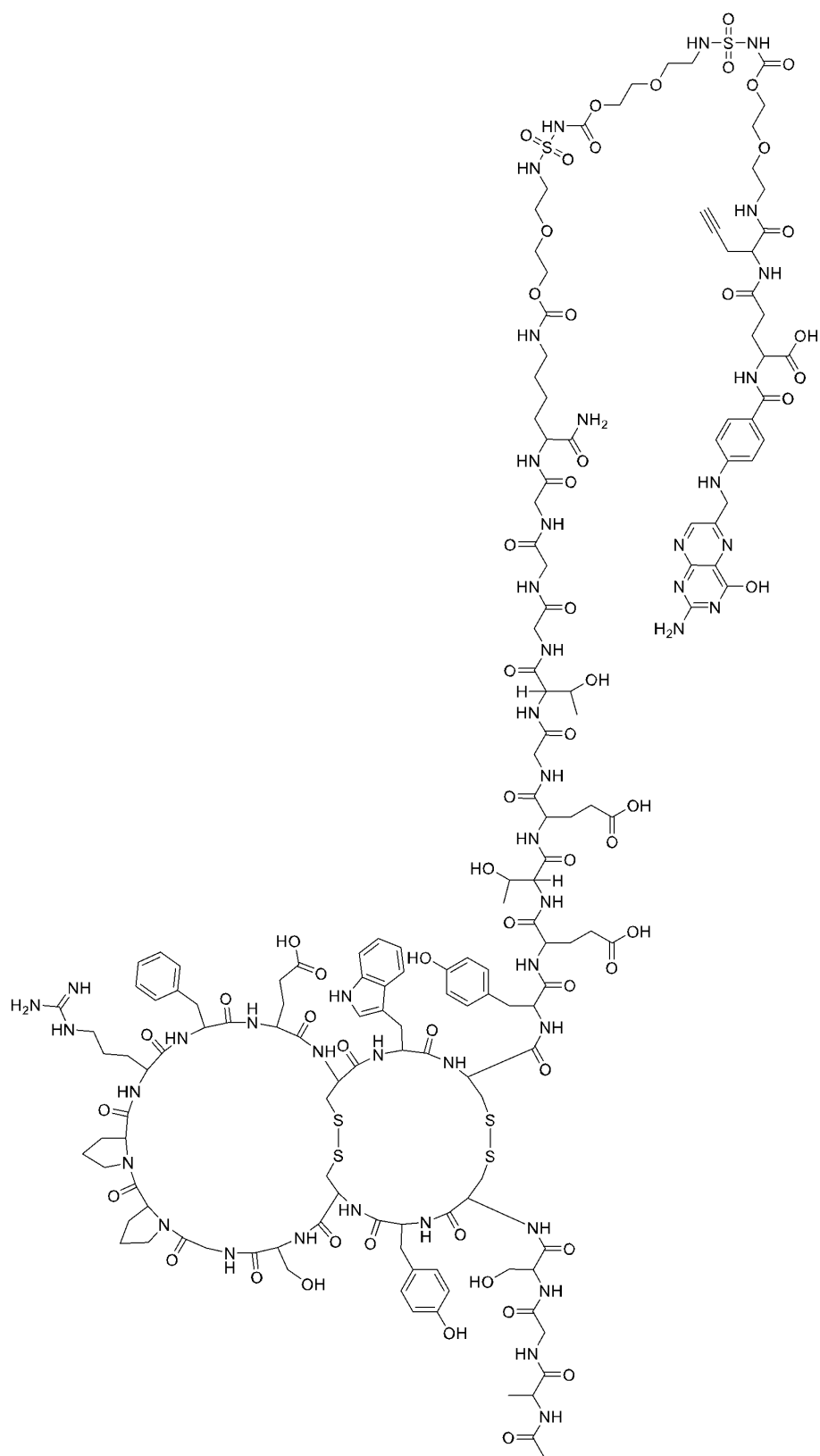


其中，Q为活性基团。在一些实施方式中，上述靶向分子通过活性基团Q与有效载荷进行连接，优选地，所述活性基团Q为炔基或巯基。

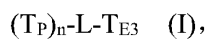
[15] 在一些实施方式中，具有以下结构的靶向分子与有效载荷进行连接以形成偶联体化合物：







[16] 在一些实施方式中，具有式 (I) 所示结构的蛋白降解靶向嵌合体与靶向分子进行连接以形成偶联体化合物：



其中，

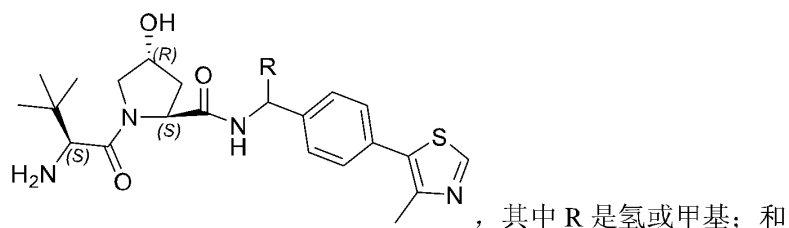
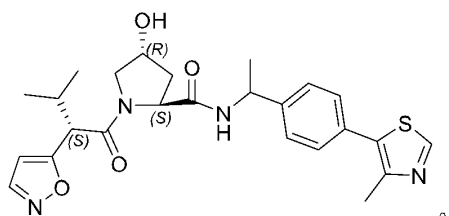
所述 T_P 为结合靶蛋白的靶蛋白配体部分，其中 n 为 1、2 或 3；

所述 L 为连接 T_P 和 T_{E3} 的连接部分；

所述 T_{E3} 为结合 E3 连接酶的 E3 连接酶配体部分。

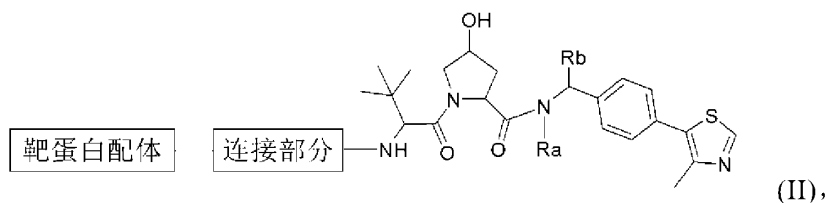
[17] 在一些实施方式中，所述 E3 连接酶配体结合 VHL (von Hippel-Lindau) 蛋白、CRBN (cereblon) 蛋白、MDM2 蛋白或 XIAP 蛋白；优选地，所述 E3 连接酶配体为 VHL 配体或 CRBN 配体。

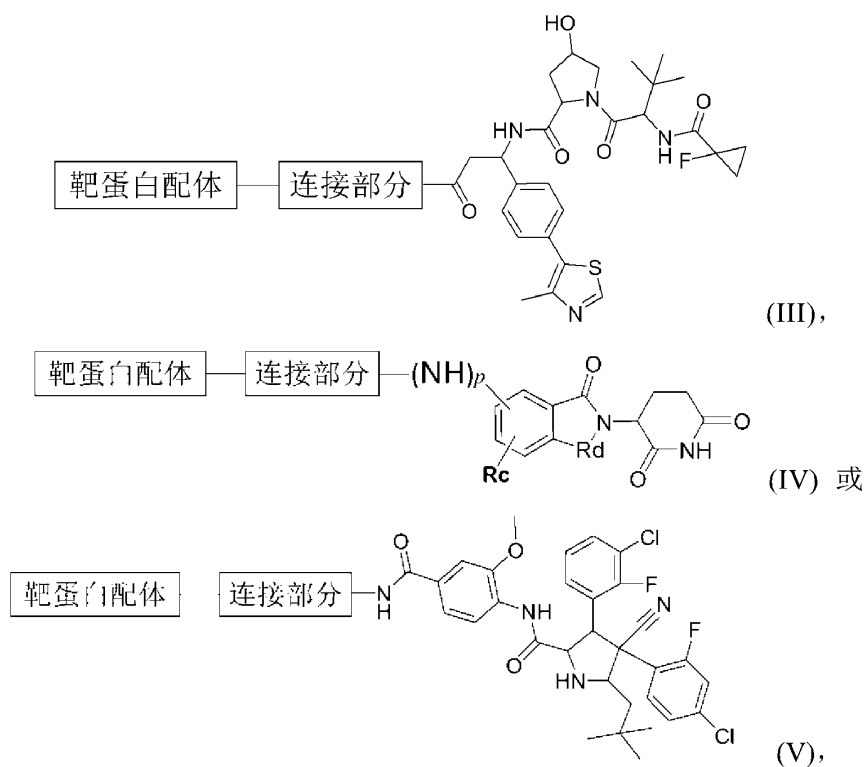
[18] 在一些实施方式中，VHL 配体为 VHL-L 或其类似物，其中 VHL-L 具有选自下组的结构：



[19] 在一些实施方式中，所述 CRBN 配体为来那度胺、泊马度胺、沙利度胺或其类似物。

[20] 在一些实施方式中，蛋白降解靶向嵌合体具有选自以下组的结构：





其中,

R_a、R_b 和 R_c 各自独立地为氢、烷基、NH₂、OH、或卤素, 优选地, 所述烷基为甲基, 所述卤素为氟;

R_d 为 CH₂、C=O 或 C=S;

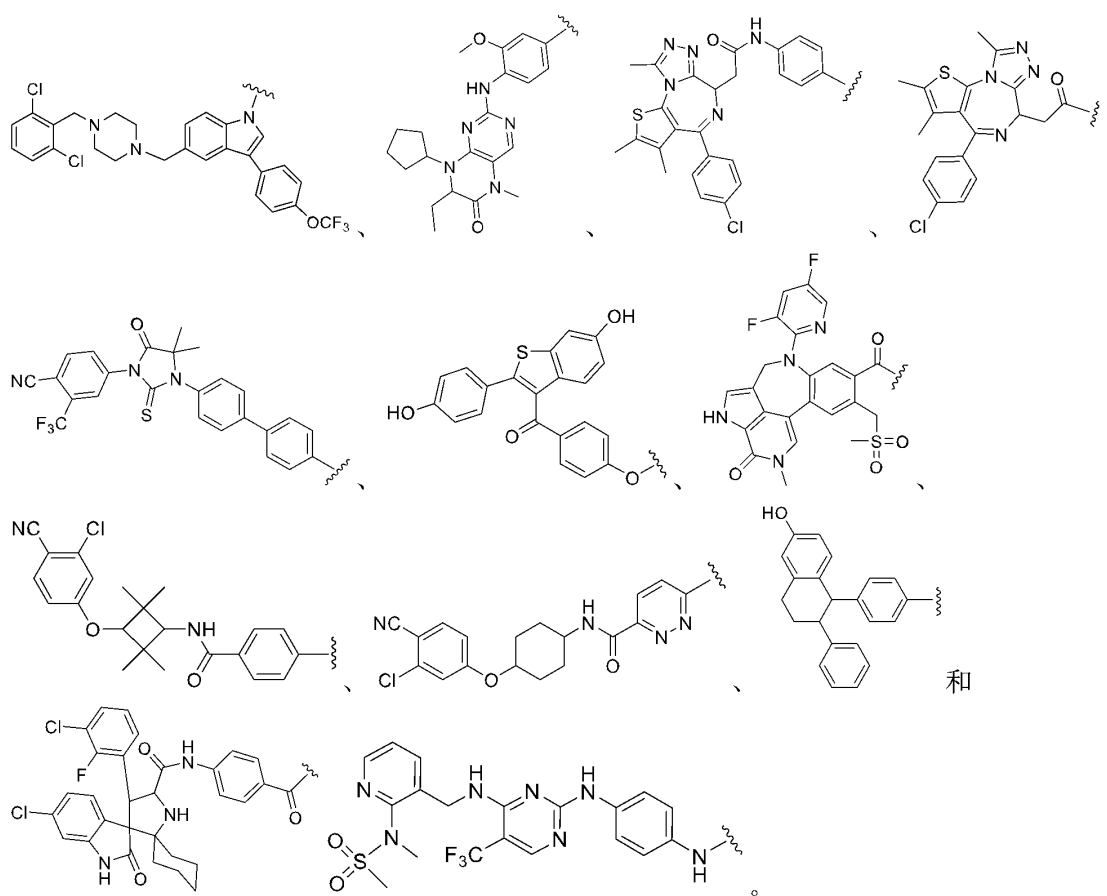
p 为 0 或 1;

所述靶蛋白配体能结合特定的靶蛋白;

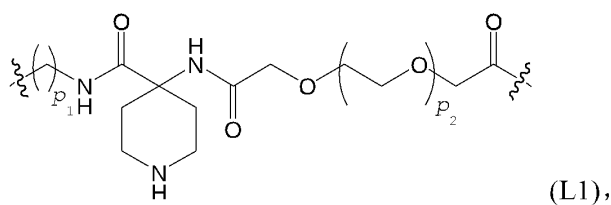
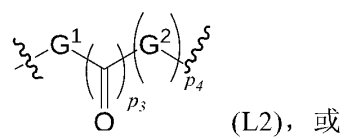
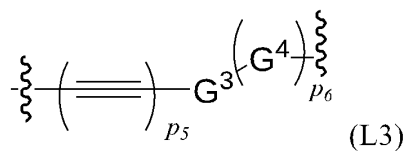
所述靶蛋白配体通过所述连接部分连接至 E3 连接酶基团。

[21] 在一些实施方式中, 靶蛋白为核受体 (例如, AR 和 ER)、激酶类蛋白 (例如, RIPK2、BCR-ABL、EGFR、HER2、c-Met、TBK1、CDK2/4/6/9、ALK、Akt、CK2、ERK1/2、FLT3、PI3K、BTK 和 FAK) AKT、PAN-BET 蛋白、BET 蛋白 (例如, BRD2、BRD3、BRD4 和 BRD6)、BLK、BRAF1、BCL-xl、ERR α 、FKBP12、FRS2 α 、JAK1、JAK3、IKZF1、IRAK4、MDM2、MetAP2、PLK1、PSK-J3、RAS、TACC3、Tau、TrkB、MDM2 或其任意组合物。在一些实施方式中, 所述靶蛋白为 AR 蛋白、ER 蛋白、RAS 蛋白、BRD4 蛋白、PLK1 蛋白、FAK 蛋白、MDM2 蛋白或其任意组合物。

[22] 在一些实施方式中, 所述靶蛋白配体部分具有选自以下的结构:



[23] 在一些实施方式中，蛋白降解靶向嵌合体中的连接部分具有选自下组的结构：



其中，

p_1 为 0-4 的整数；

p_2 为 0-6 的整数；

p_3 、 p_4 、 p_5 和 p_6 各自独立地为 0 或 1;

G¹为4-14元直链亚烷基，任选地，所述4-14元直链亚烷基中的2-5个碳原子可以被-O-、-NH-、-N(C₁₋₆烷基)-或-C≡C-取代；

G²为氨基酸残基, 其中优选地, 所述 G2 为 Lys 残基;

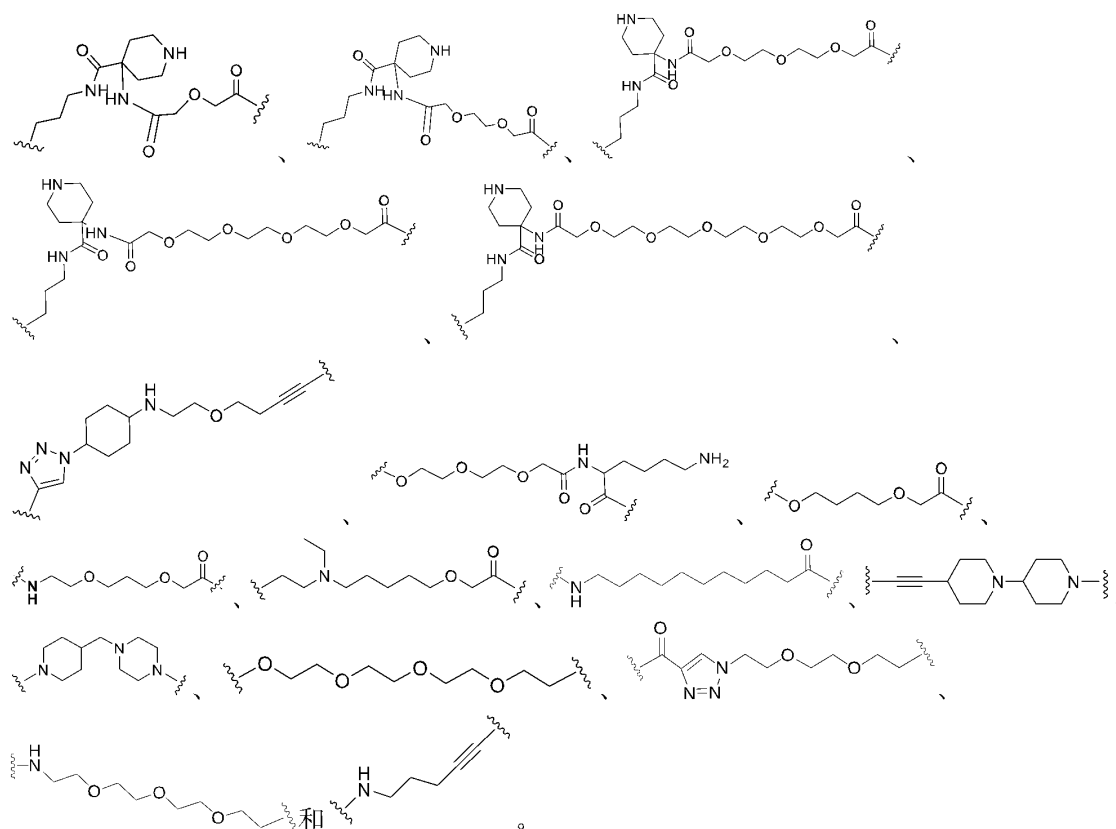
G^3 选自下组：

、、和

；

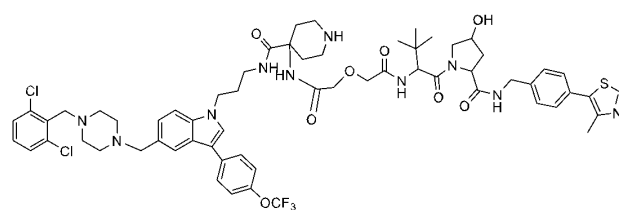
G⁴为5-9元直链亚烷基,任选地,所述5-9元直链亚烷基中的2-4个碳原子可以被-O-、-NH-、-N(C₁₋₆烷基)-或-C≡C-取代。

[24] 一些实施方式中，蛋白降解靶向嵌合体中的连接部分具有选自下组的结构

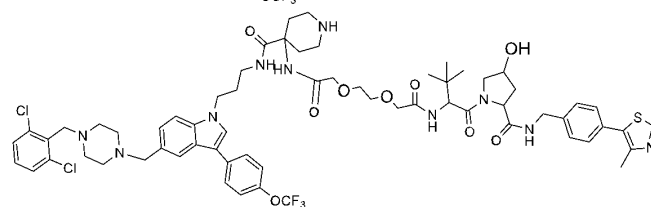


[25] 在一些实施方式中，蛋白降解靶向嵌合体具有如下所示的结构：

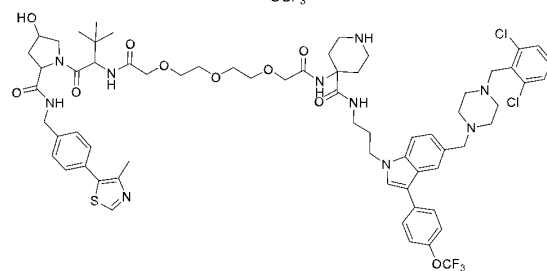
CR202CC



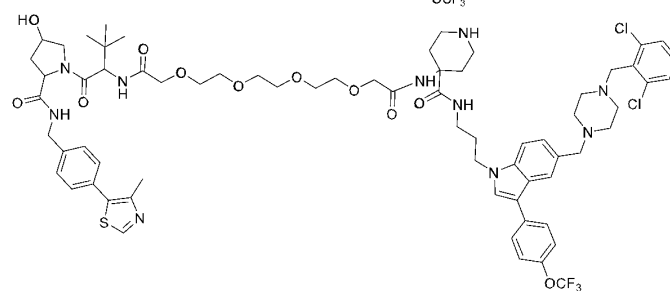
CR202CF



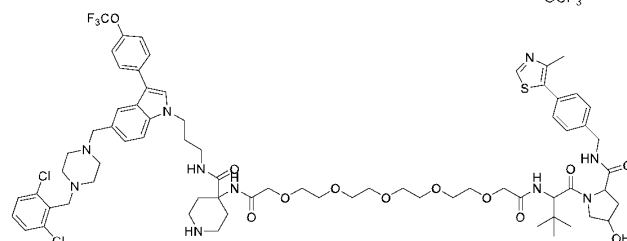
CR202CI



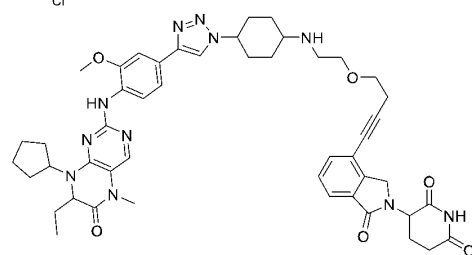
CR202CL



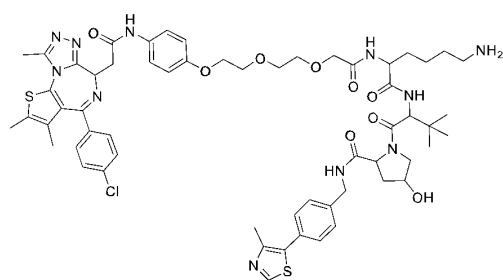
CR202CP



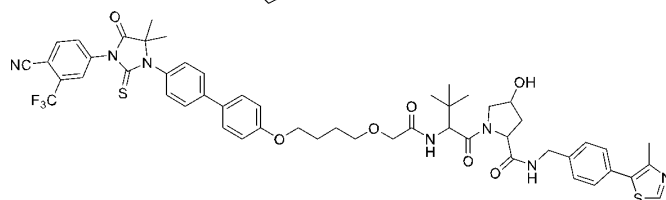
CR20274



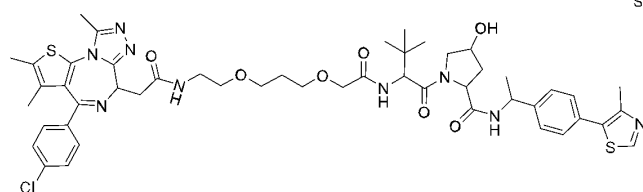
CR202EE



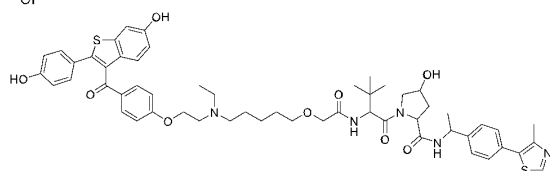
CR202Z5



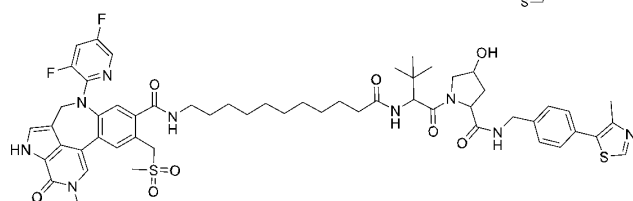
CR202ES



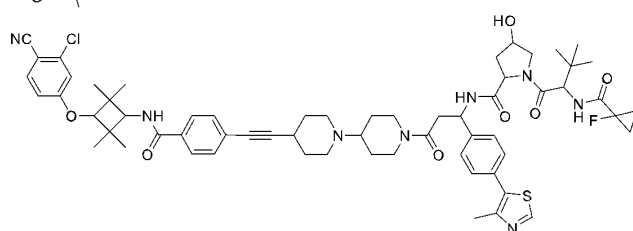
CR202Z7



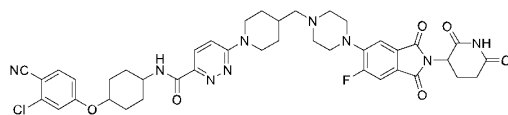
CR202Z8

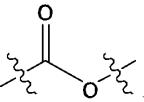
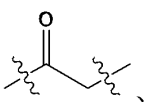
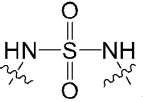
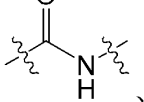
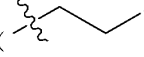
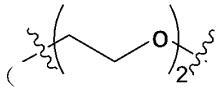
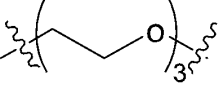


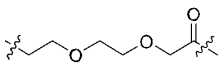
CR202Z9



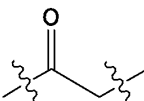
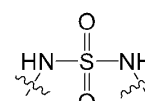
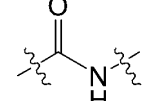
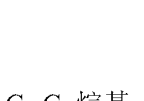
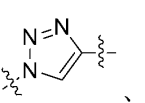
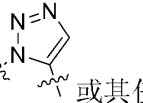
CR202Z1

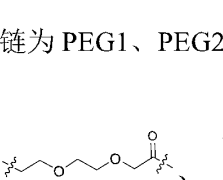
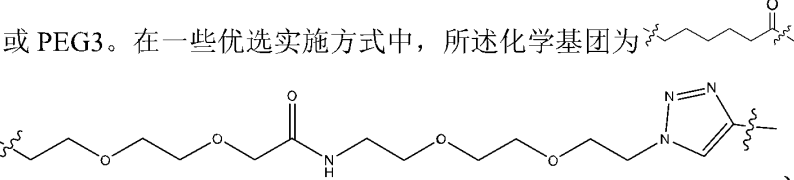
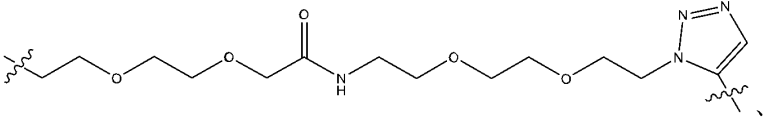
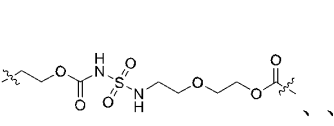
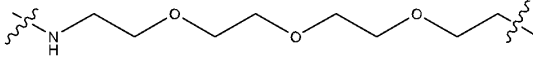
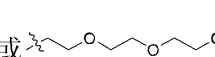


PEG 链、, , , , C₁-C₈ 烷基链、-NH-、-O-、-C(O)-或其任意组合。在一些优选的实施方式中, PEG 链为 PEG1 ()、PEG2 () 或 PEG3 ()。在一些优选的实施方式中, 所述连接

子包含连接模块 1 和与连接模块 1 结合的如下基团: 。本领域技术人员可以理解, 这些基团可以通过左侧连接点与连接模块 1 中的连接部分键合并且通过右侧连接点与有效载荷键合, 或者通过右侧连接点与连接模块 1 中的连接部分键合并且通过左侧连接点与有效载荷键合。

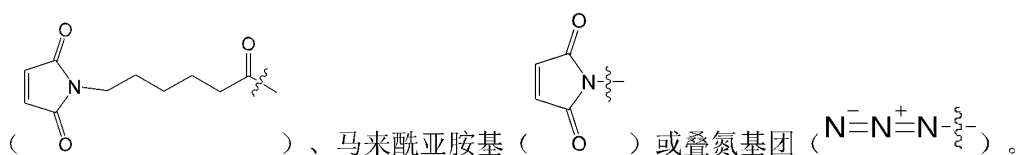
[30] 在一些实施方式中, 连接模块 1 与连接模块 2 通过键或者化学基团相连。在一些

实施方式中, 所述化学基团为 PEG 链、, , , , C₁-C₈ 烷基链、-NH-、-O-、-C(O)-、, 或其任意组合。在一些优选的实施方式中, PEG

链为 PEG1、PEG2 或 PEG3。在一些优选实施方式中, 所述化学基团为 , , , , 或 。本领域技术人员可以

理解, 这些化学基团可以通过左侧连接点与连接模块 1 键合以及通过右侧连接点与连接模块 2 键合, 或者通过右侧连接点与连接模块 1 键合以及通过左侧连接点与连接模块 2 键合。

[31] 在一些实施方式中, 所述连接模块 1 包括马来酰亚胺基己酰基



[32] 在一些实施方式中,所述连接模块2包括组织蛋白酶酶切基团、纤溶酶酶切基团、天冬酰胺内切酶酶切基团、 β -葡萄糖苷酸酶酶切基团、硫酸酯酶酶切基团、磷酸酯酶酶切基团、 β -半乳糖苷酶酶切基团、谷胱甘肽酶酶切基团或酸不稳定基团。

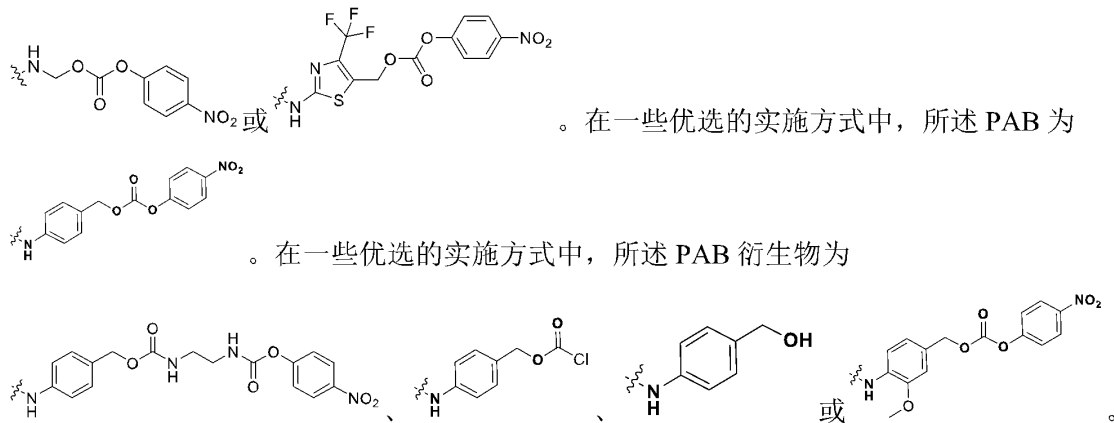
[33] 在一些实施方式中,所述组织蛋白酶酶切基团为CB酶酶切基团。

[34] 在一些优选的实施方式中,所述组织蛋白酶酶切基团包括氨基酸或氨基酸与自分解片段的组合。在一些优选的实施方式中,所述氨基酸为Val-Cit、Gly-Gly-Phe-Gly、CycloBut-Cit、Phe-Cit、Val-Ala、Glu-Val-Cit、Ala-Cit、Val-Cit-Pro或Val-Cit-Pro-Gly。

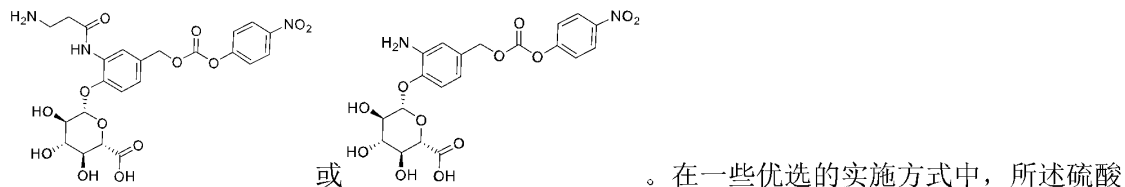
[35] 在一些优选的实施方式中,所述纤溶酶酶切基团包括氨基酸或氨基酸与自分解片段的组合。在一些优选的实施方式中,所述氨基酸为Val-Leu-Lys。

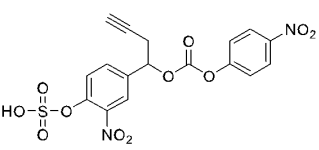
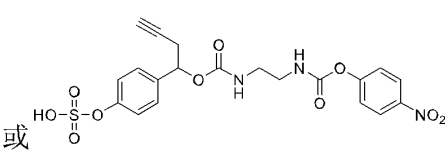
[36] 在一些优选的实施方式中,所述天冬酰胺内切酶基团包括氨基酸或氨基酸与自分解片段的组合。在一些优选的实施方式中,所述氨基酸选自Gly-Asn-Asn或Ala-Ala-Asn。

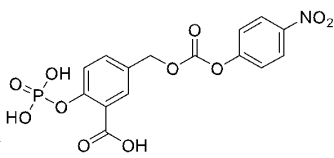
[37] 在一些优选的实施方式中,所述自分解片段为PAB及其衍生物、

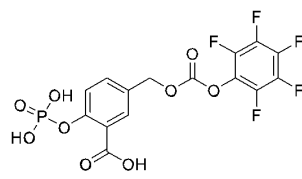


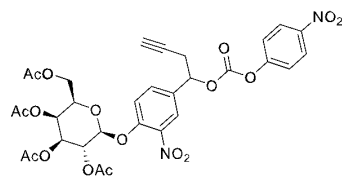
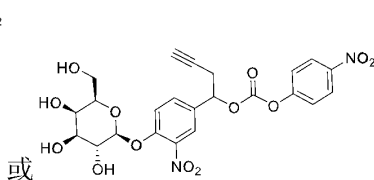
[38] 在一些优选的实施方式中,所述 β -葡萄糖醛酸酶酶切基团为

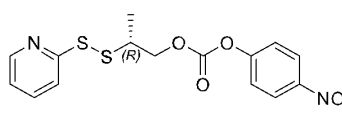


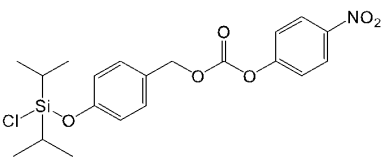
酯酶酶切基团为  或 。在一些优

选的实施方式中，所述磷酸酯酶酶切基团为  或

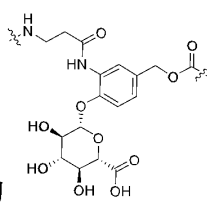
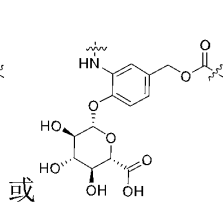
。在一些优选的实施方式中，所述 β -半乳糖苷酶酶切基团为

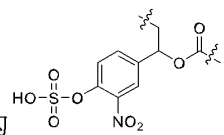
 或 。在一些优选的实施方式中，所

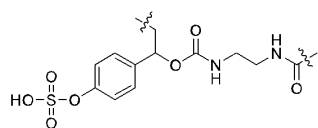
述谷胱甘肽酶酶切基团为 。在一些优选的实施方式中，所述酸

不稳定基团为 。

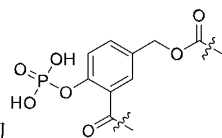
[39] 本领域技术人员可以理解，上述酶切基团的活性位点可任选地在合适的反应后与连接模块 1 连接、与化学基团连接、与靶向分子连接或与有效载荷连接。例如，在所述 β -葡萄糖醛酸酶酶切基团在与连接模块 1、化学基团、靶向分子或有效载荷进行有效连接后具

有以下结构  或 ；所述硫酸酯酶酶切基团在与连接模块 1、化

学基团、靶向分子或有效载荷进行有效连接后具有以下结构  或



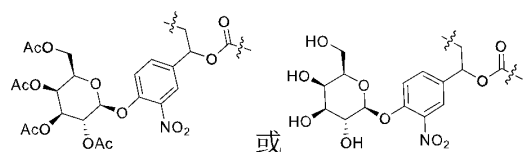
；所述磷酸酯酶酶切基团在与连接模块 1、化学基团、靶向分子或



有效载荷进行有效连接后具有以下结构

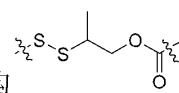
；所述 β -半乳糖苷酶酶切基团在与

连接模块 1、化学基团、靶向分子或有效载荷进行有效连接后具有以下结构



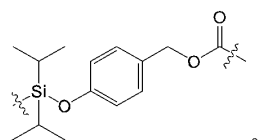
；所述谷胱甘肽酶酶切基团在与连接模块 1、化

学基团、靶向分子或有效载荷进行有效连接后具有以下结构

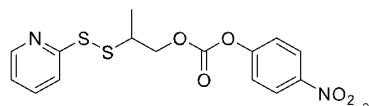


；所述酸不稳定

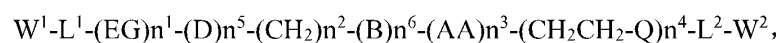
基团在与连接模块 1、化学基团、靶向分子或有效载荷进行有效连接后具有以下结构



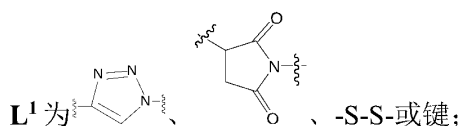
[40] 在一些优选的实施方式中，当所述连接子包括连接模块 2 时，所述连接模块 2 是谷胱甘肽酶酶切基团。在一些优选的实施方式中，所述谷胱甘肽酶酶切基团为



[41] 在一些实施方式中，偶联体化合物具有以下结构：



其中，

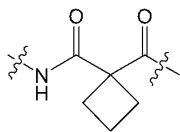


L^1 为 、、-S-S-或键；

EG 为 $-CH_2CH_2O-$ 或 $-OCH_2CH_2-$ ； n^1 是 0-6 的整数；

n^2 是 0-8 的整数；

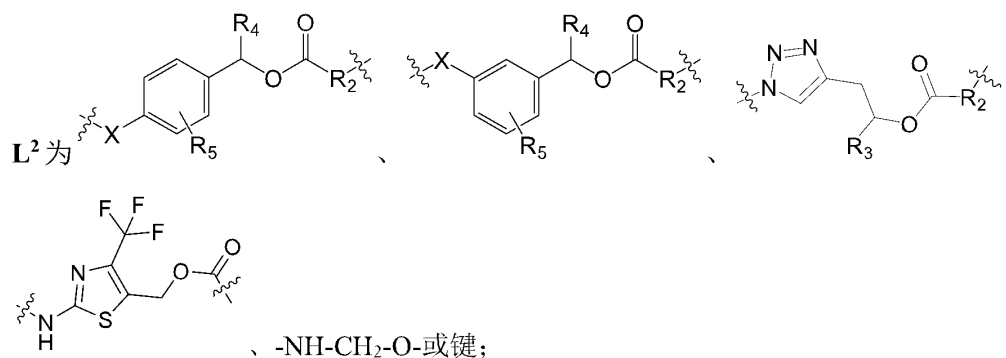
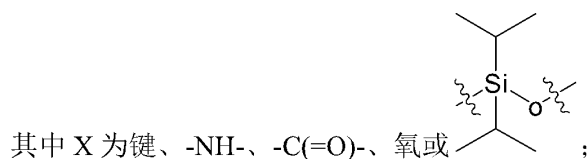
D 为 $-C(=O)-NH-S(=O)_2-NH-$; n^5 为 0 或 1;



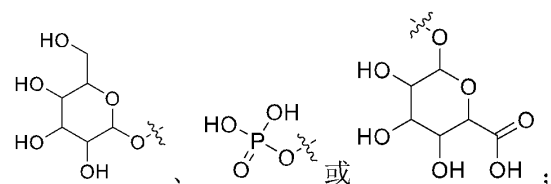
B 每次出现时独立地为 $-C(=O)-$ 、 $-NH-CH_2CH_2-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-NH-$ 、 $-CH(CH_3)-CH_2-O-$ 、 $-CH_2CH_2O-$ 、 $-NH-C(=O)-$ 或 $-NH-$; n^6 为 0-3 的整数;

AA 每次出现时独立地为氨基酸残基; n^3 是 0-5 的整数;

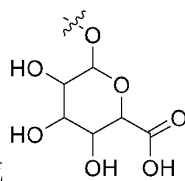
Q 每次出现时独立地为 $-C(=O)-$ 、 $-O-$ 或键, n^4 是 0-3 的整数;



R_2 为键、 $-OH-CH_2-$ 或 $-NH-CH_2CH_2-NH-C(=O)-$;



R_4 为氢或 C_{1-8} 烷基;



R₅为氢、氨基、硝基、磷酸基、-OR^a或 $\begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{OH} \\ | \quad | \end{array}$ ；其中，R^a为甲烷基、乙烷基、丙烷基或异丙烷基；

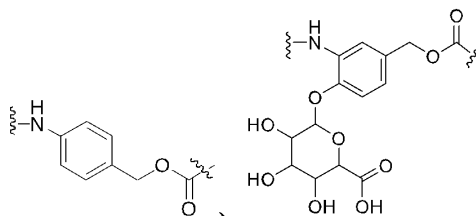
$\mathbf{w}^1$ 为可以结合细胞表面蛋白的靶向分子, 并且

W^2 为有效载荷。

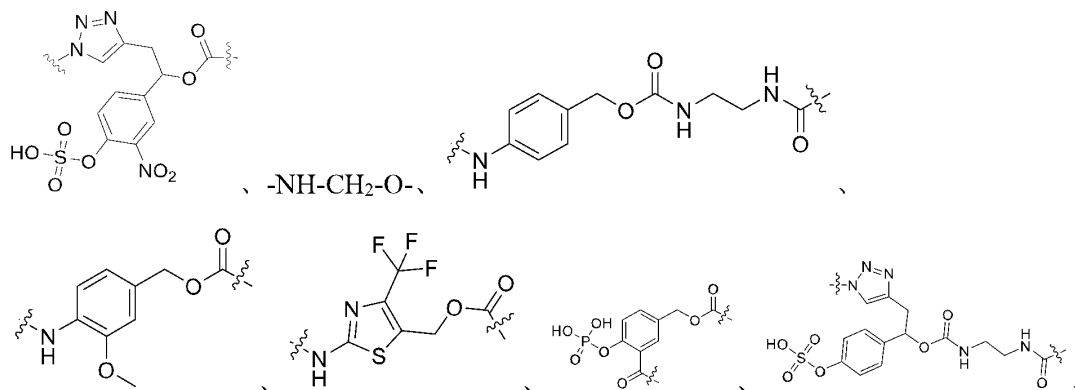
[42] 在一些实施方式中，EG 为 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 。在一些实施方式中， n^1 是 2。在一些实施方式中， n^1 是 0。在一些实施方式中， n^2 是 1。在一些实施方式中， n^2 是 4。在一些实施方式中， n^2 是 5。在一些实施方式中， n^5 是 0。在一些实施方式中， n^6 是 1。在一些实施方式中， n^6 是 3。在一些实施方式中， n^1 是 2、 n^2 是 1、 n^3 和 n^4 是 0 并且 L^2 是键。

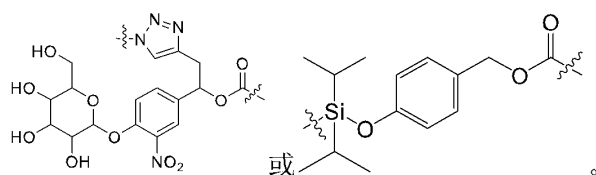
[43] 在一些实施方式中，AA 每次出现时独立地为 Val、Cit、Glu、Leu、Lys、Ala、Gly、Phe、Gln、Pro 或 Asn 形成的氨基酸残基。在一些实施方式中，-(AA)_n³-为选自下组的肽残基：-Val-Cit-、-Glu-Val-Cit-、-Ala-Cit-、-Phe-Cit-、-Val-Ala-、-Gly-Gly-Phe-Gly-、-Cit-、-Val-Leu-Lys-、-Val-Cit-Pro-Gly-、-Gly-Asn-Asn-和-Ala-Ala-Asn-。

[44] 在一些实施方式中, 当 n^4 为 1 时, Q 为 $-C(=O)-$; 当 n^4 为 2 时, Q 分别为 $-O-$ 和 $-C(=O)-$; 当 n^4 为 3 时, Q 分别为 $-O-$ 、 $-O-$ 和键。在一些实施方式中, n^4 为 0。

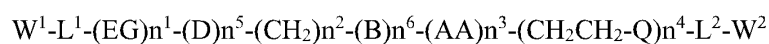


[45] 在一些实施方式中，L²为键、

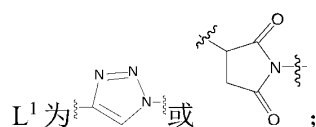




[46] 在一些实施方式中，偶联体化合物具有以下结构：



其中，



EG 为 $-CH_2CH_2O-$ ； n^1 是 0-4 的整数；

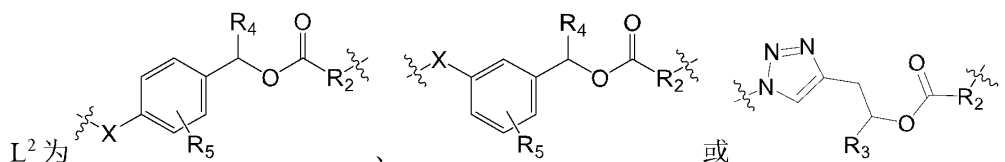
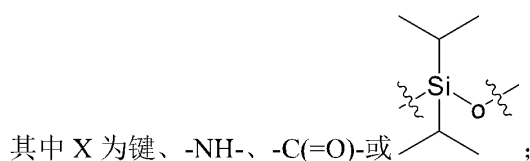
D 为 $-C(=O)-NH-S(=O)_2-NH-$ ； n^5 为 0 或 1；

n^2 是 0-5 的整数；

B 为 $-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-NH-$ 、 $-CH_2CH_2O-$ 、 $-NH-CH_2CH_2-C(=O)-$ 或 $-NH-$ ； n^6 为 0-3 的整数；

AA 每次出现时独立地为氨基酸残基； n^3 是 0-3 的整数；

Q 每次出现时独立地为 $-C(=O)-$ 、 $-O-$ 或键， n^4 是 0-3 的整数；

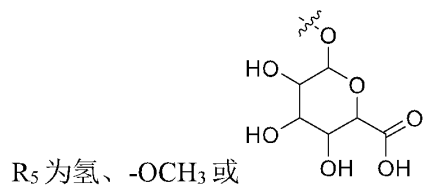


其中 X 为键、 $-NH-$ 、 $-C(=O)-$ 或

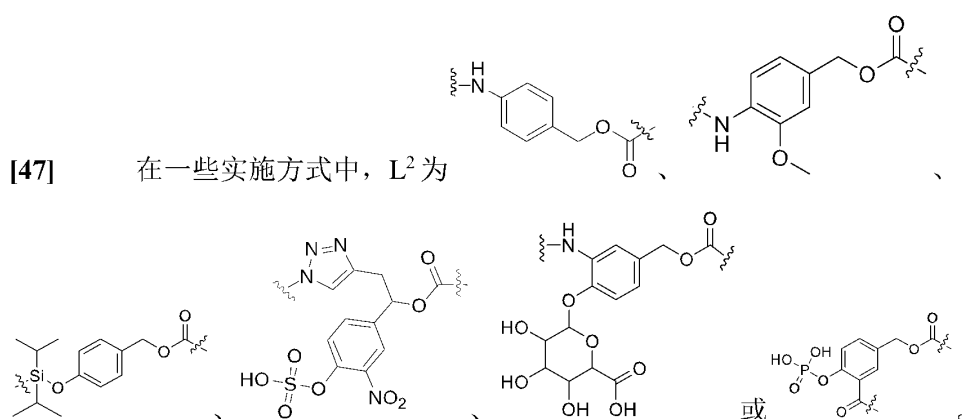
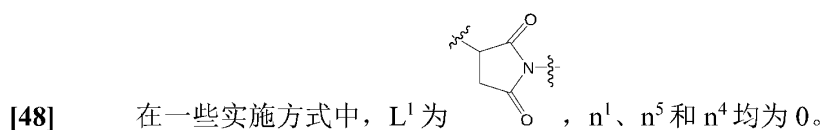
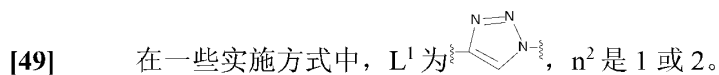
R_2 为键；



R₄ 为氢;



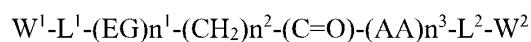
W¹ 为可以结合细胞表面蛋白的靶向分子, 并且 W² 为有效载荷。



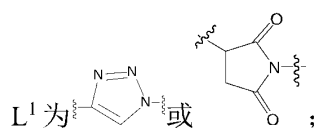
[50] 在一些实施方式中, n⁵ 为 1 时, n² 和 n⁴ 均为 0。

[51] 在一些实施方式中, AA 每次出现时独立地为 Val、Cit、Glu 或 Ala 形成的氨基酸残基。在一些实施方式中, -(AA)n³-为选自下组的肽残基: -Val-Cit-、-Glu-Val-Cit-、-Ala-Cit-和-Val-Ala-。

[52] 在一些实施方式中, 偶联体化合物具有以下结构:



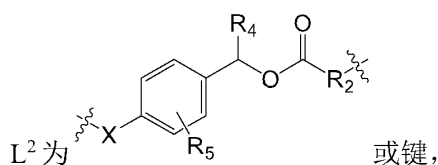
其中,



EG 为 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$; n^1 是 0-4 的整数;

n^2 是 0-5 的整数;

AA 每次出现时独立地为氨基酸残基; n^3 是 1-4 的整数;



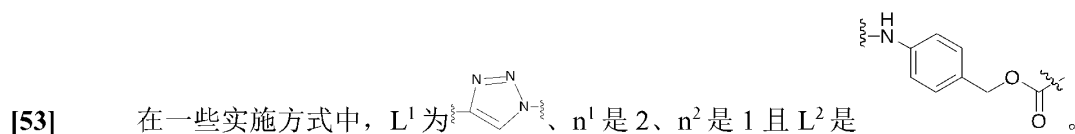
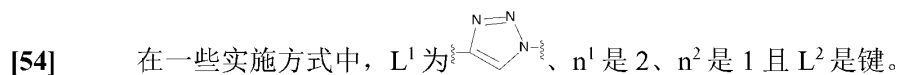
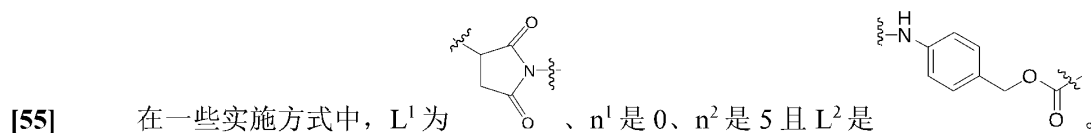
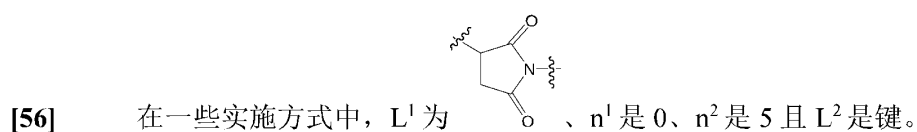
其中 X 为 $-\text{NH}-$;

R_2 为键;

R_4 为氢;

R_5 为氢或 $-\text{OCH}_3$;

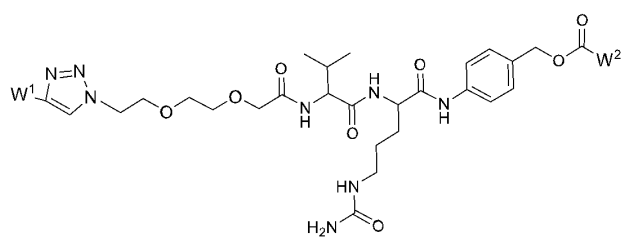
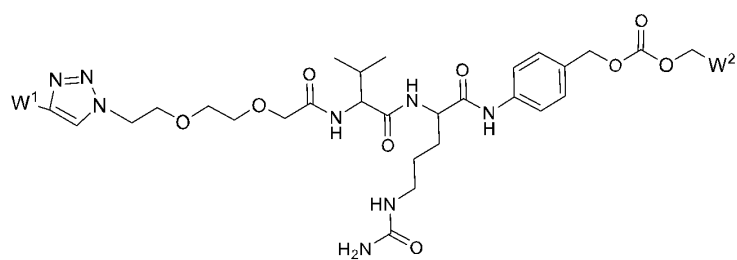
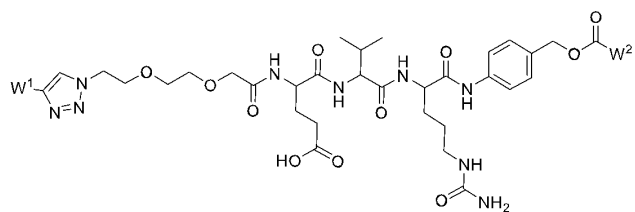
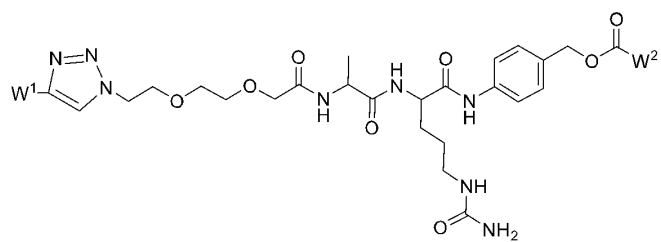
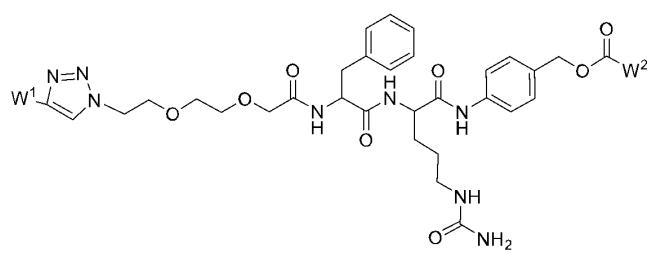
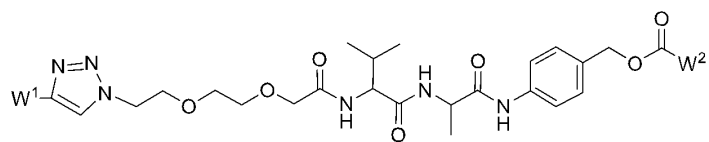
W^1 为可以结合细胞表面蛋白的靶向分子, 并且 W^2 为有效载荷。

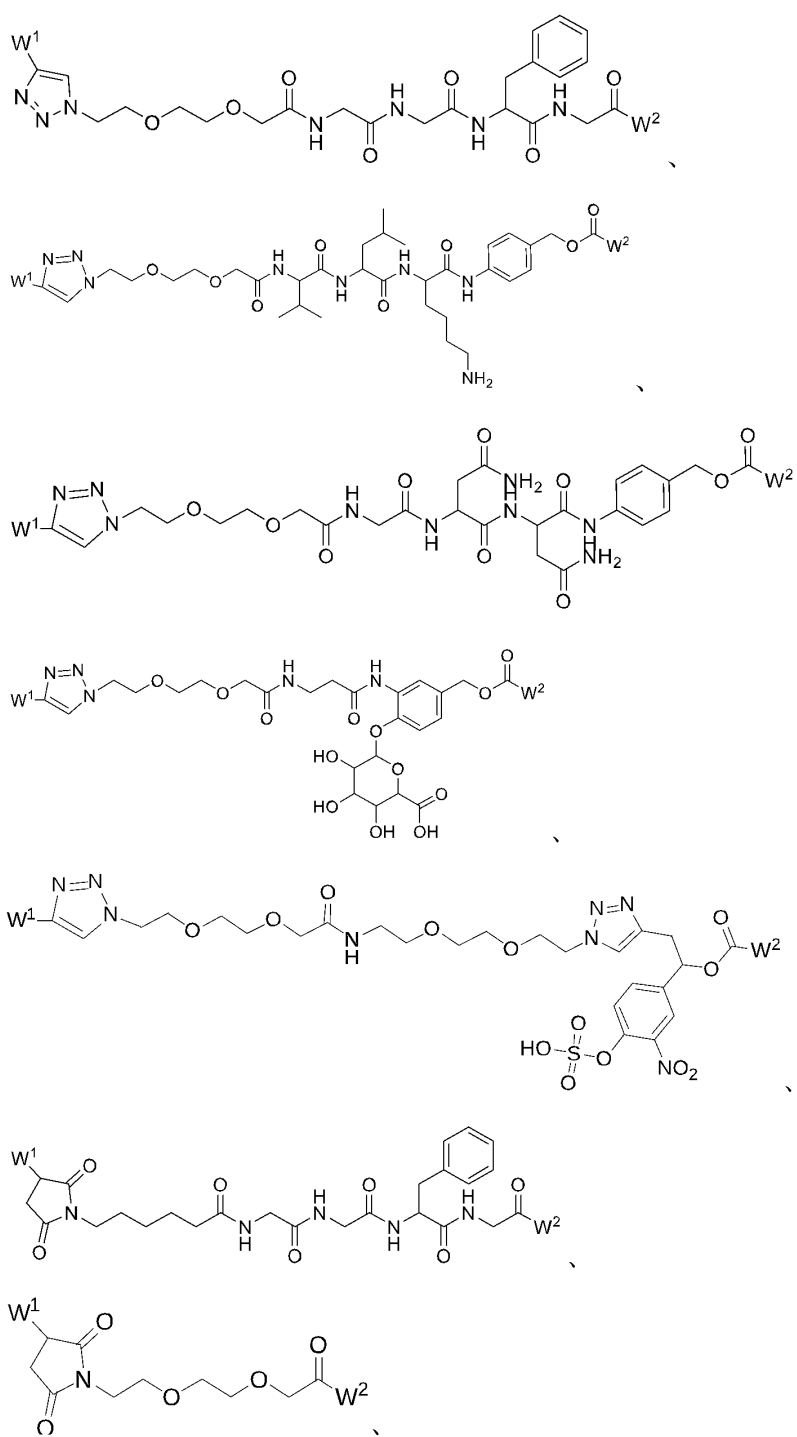


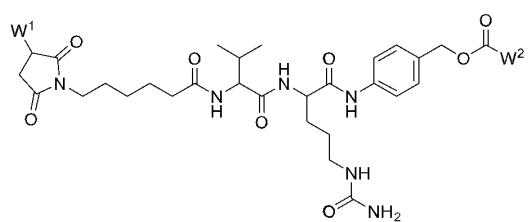
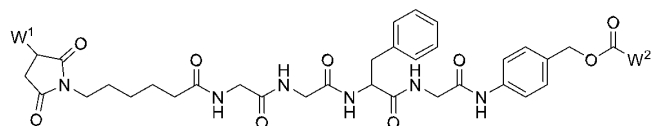
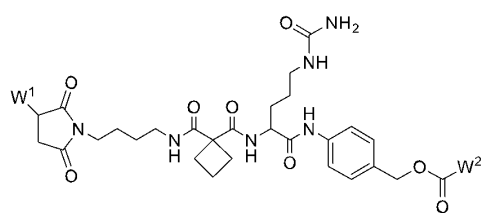
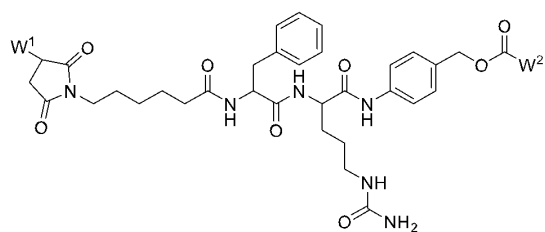
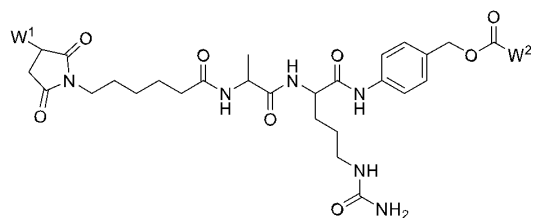
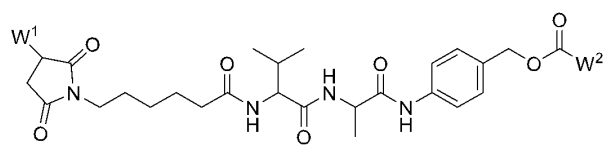
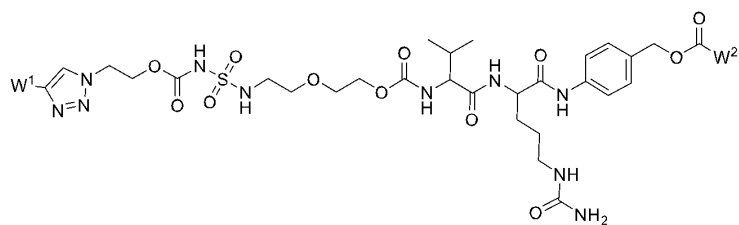
[57] 在一些实施方式中, AA 每次出现时独立地为 Val、Cit、Glu 或 Ala 氨基酸残基。

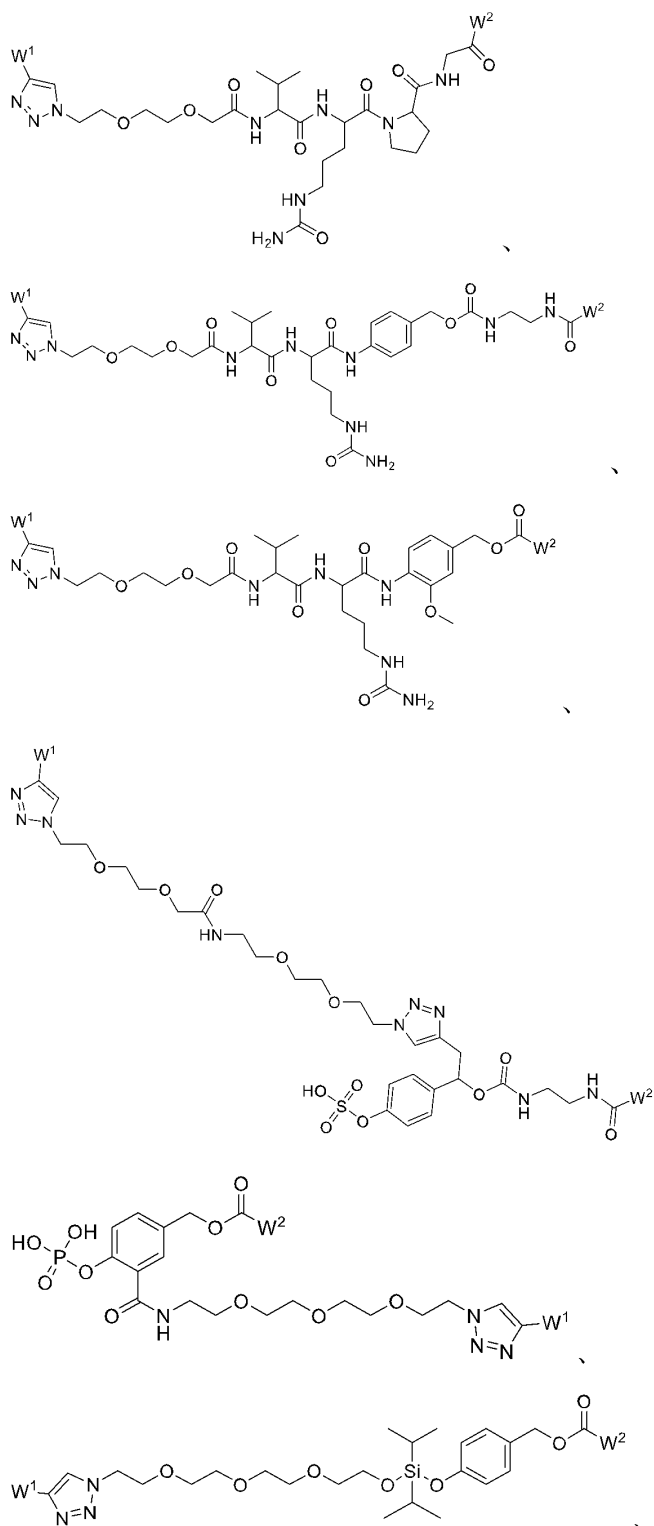
在一些实施方式中, $-(\text{AA})_{n^3}$ 为选自下组的肽残基: $-\text{Val-Cit-}$ 、 $-\text{Glu-Val-Cit-}$ 、 $-\text{Ala-Cit-}$ 、 $-\text{Phe-Cit-}$ 、 $-\text{Val-Ala-}$ 、 $-\text{Gly-Gly-Phe-Gly-}$ 、 $-\text{Val-Leu-Lys-}$ 和 $-\text{Gly-Asn-Asn-}$ 。

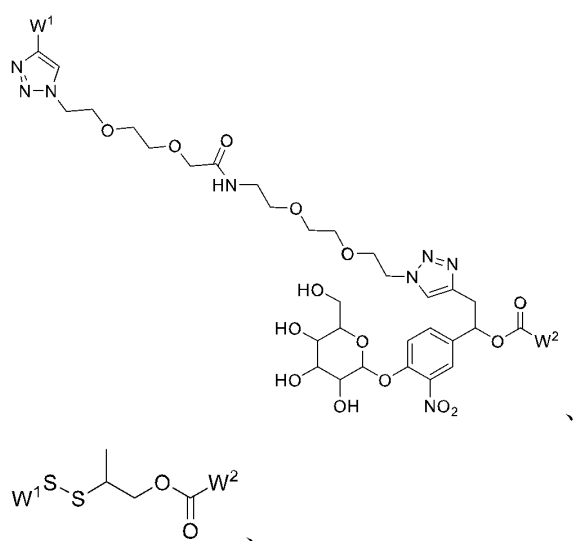
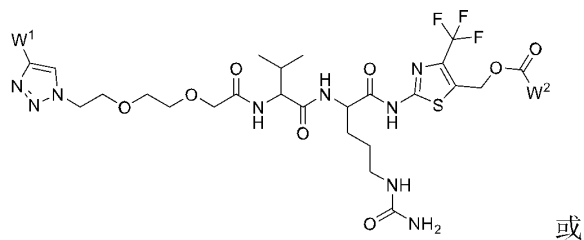
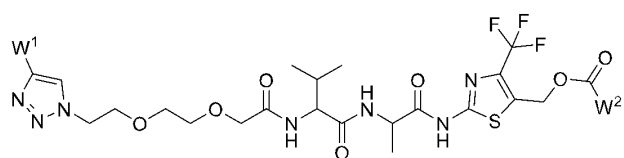
[58] 在一些实施方式中, 偶联体化合物具有如下结构:







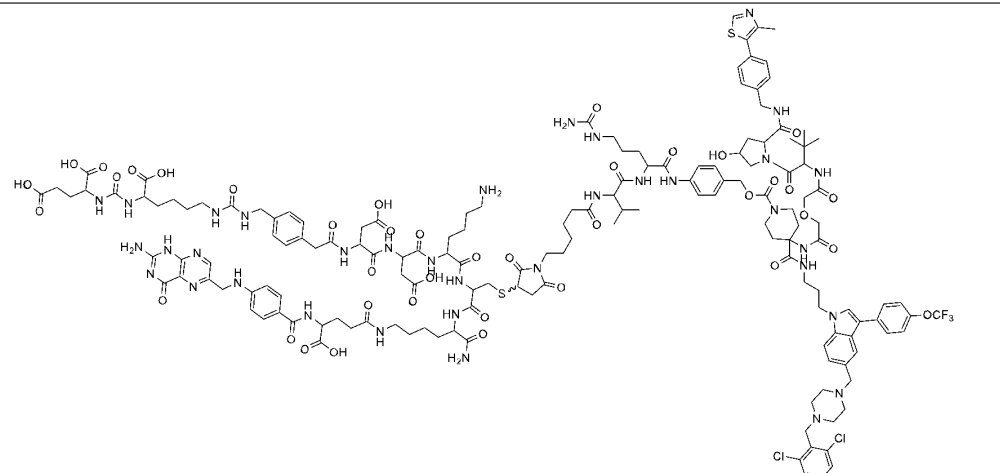
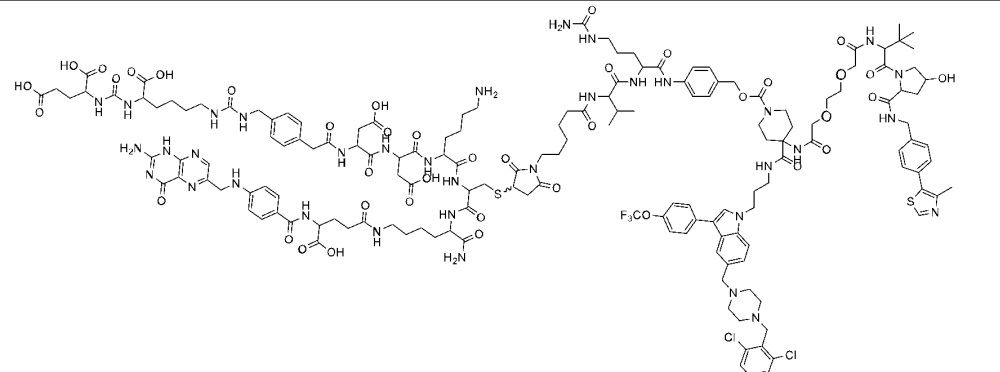
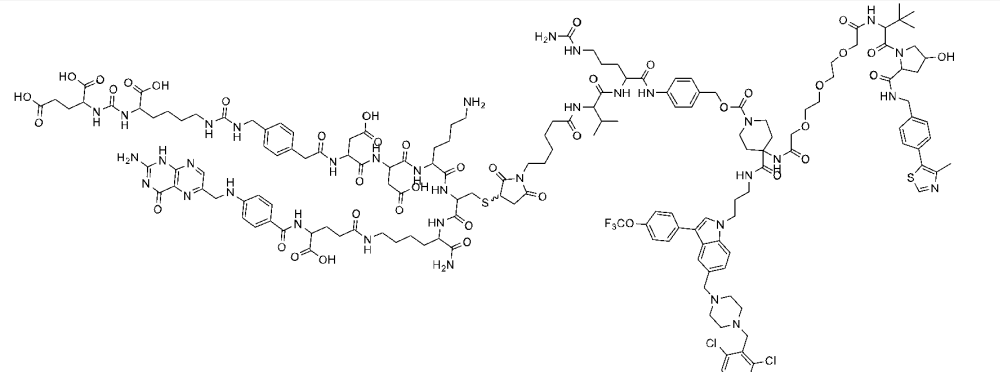


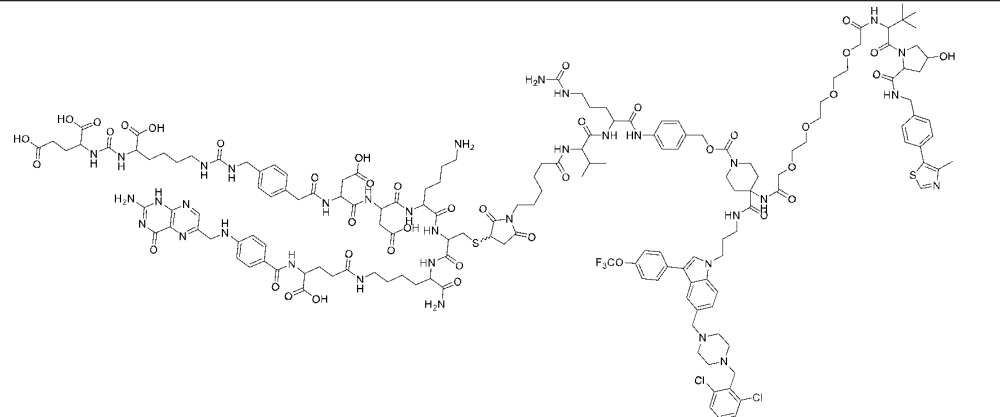
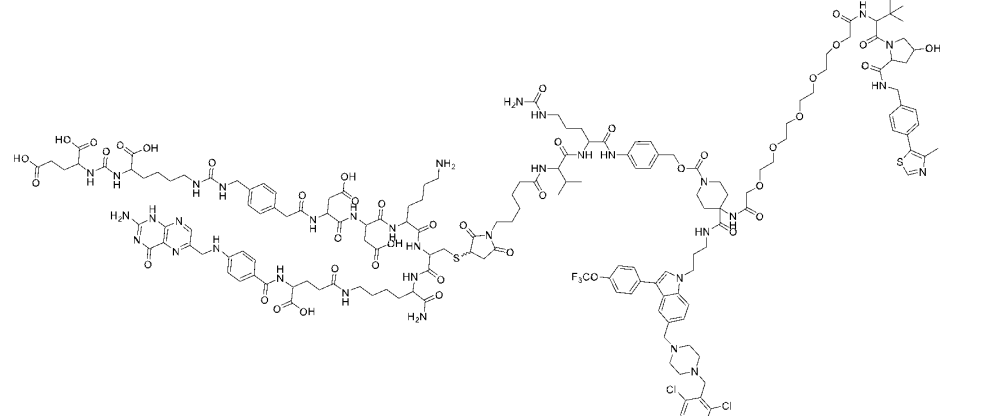
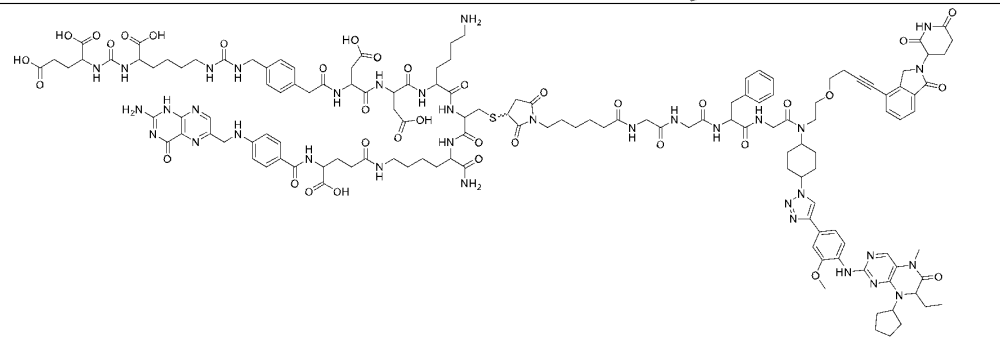
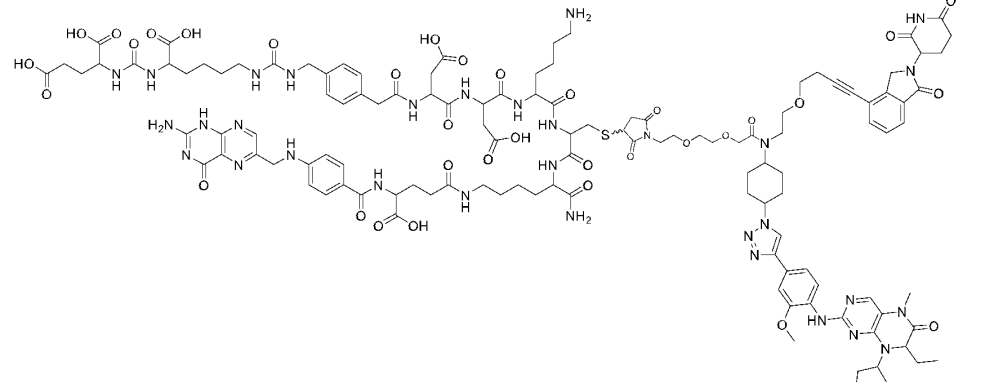


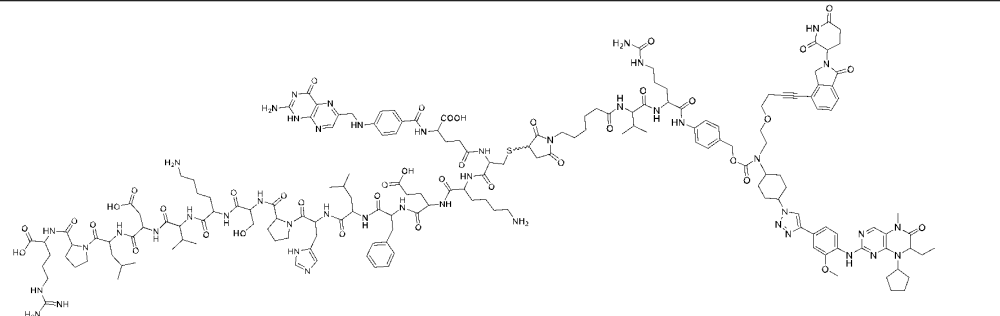
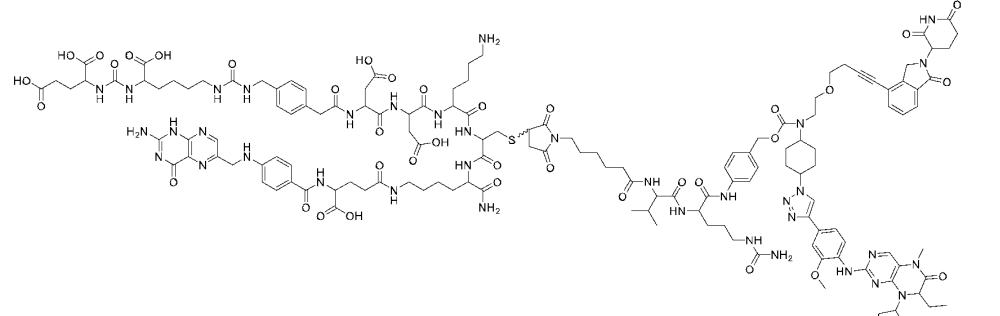
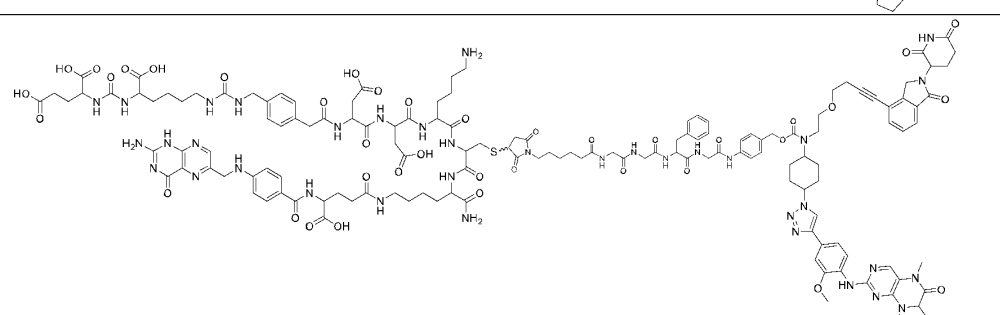
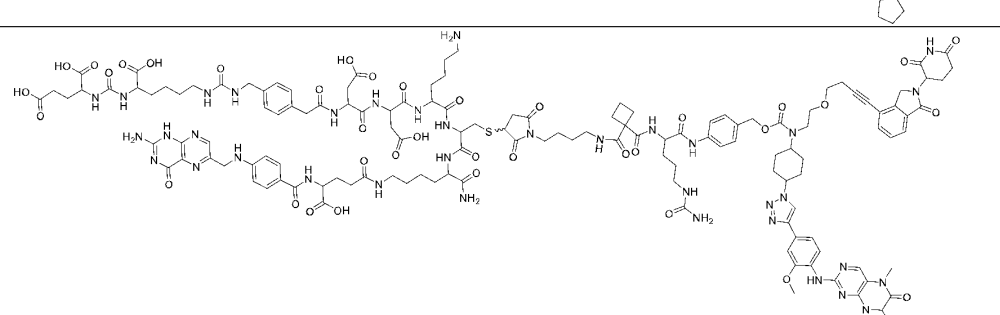
，其中 W^1 为可以结合细胞表面蛋白的靶

向分子，且 W^2 为有效载荷。

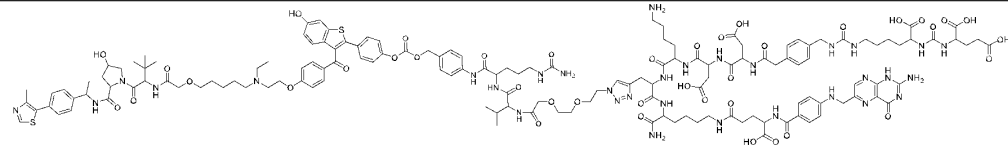
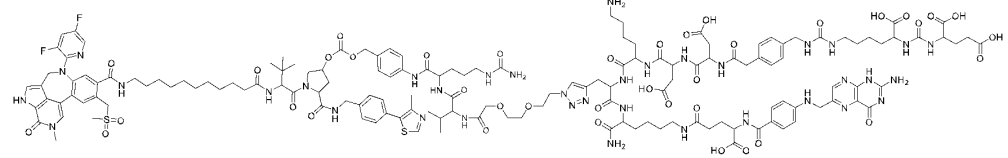
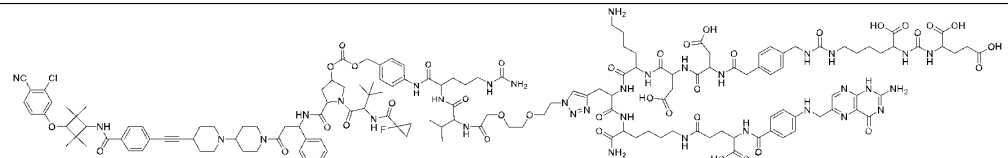
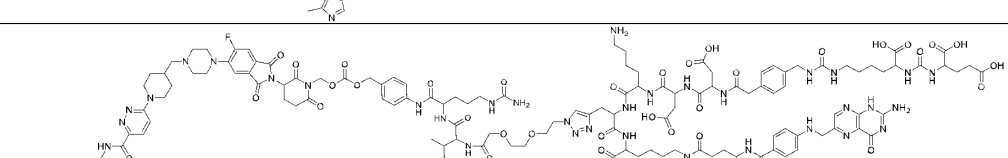
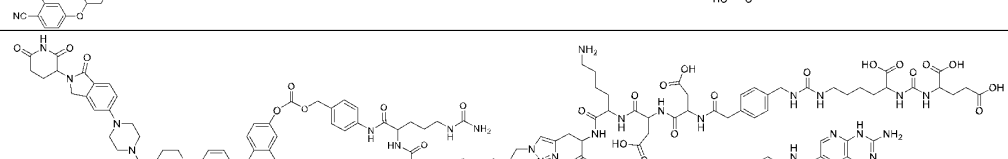
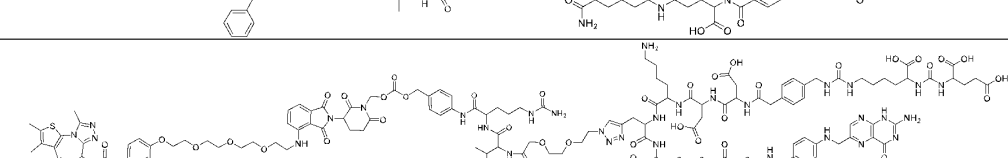
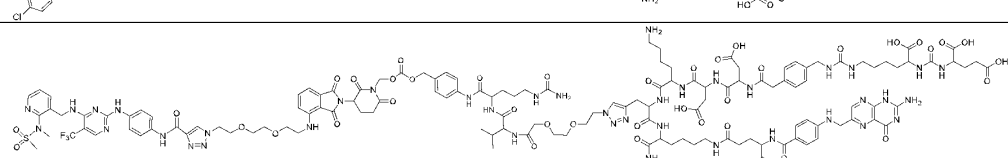
[59] 在一些实施方式中，偶联体化合物具有以下结构：

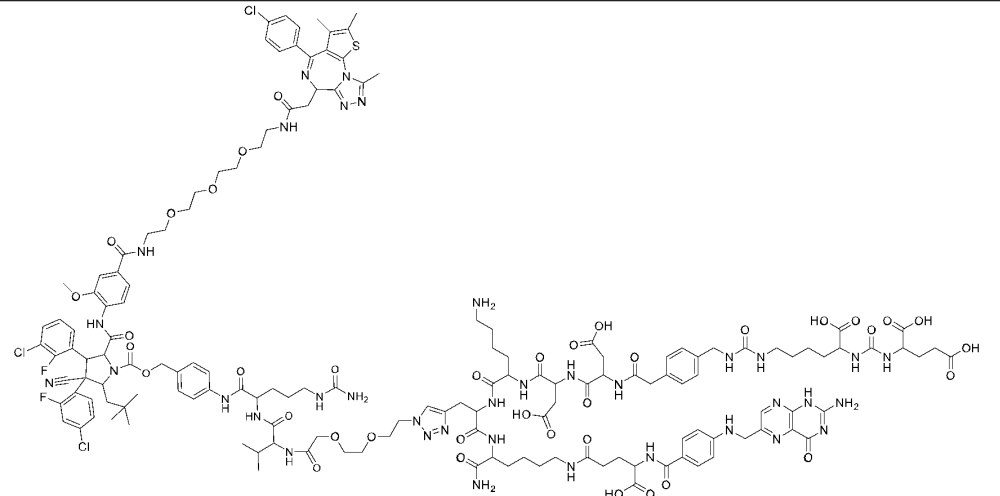
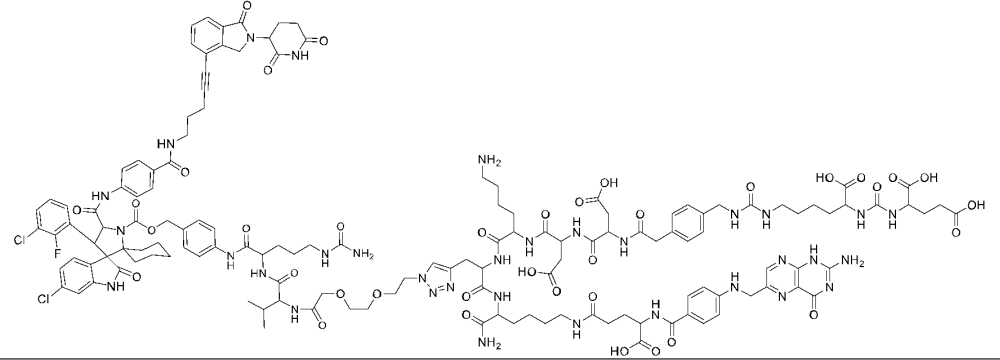
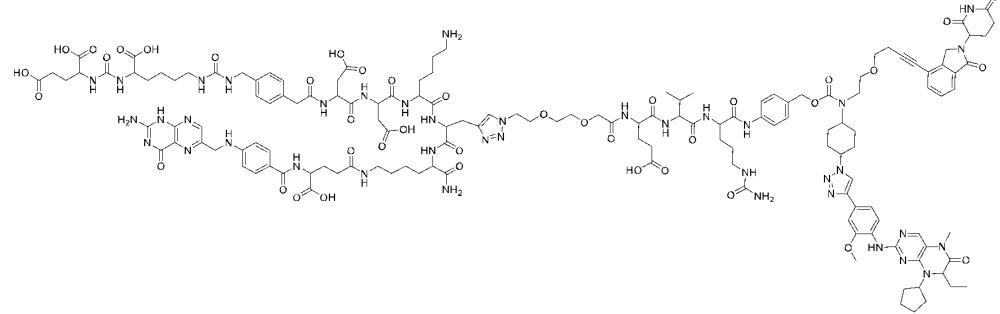
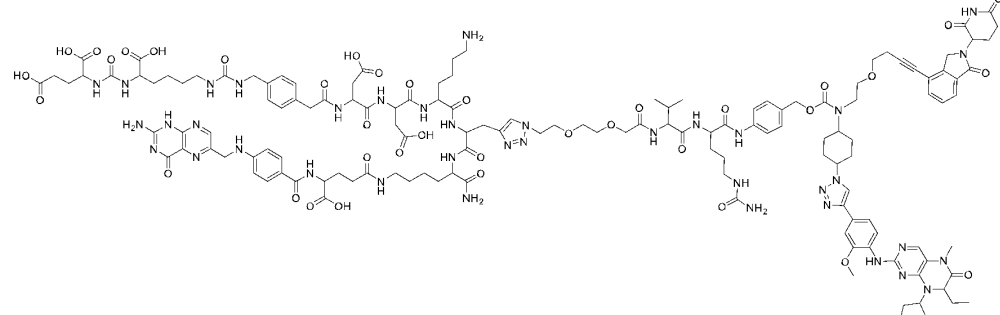
CR202CE	 <p>Chemical structure of CR202CE, a complex molecule featuring multiple amide, ester, and sulfonamide linkages, along with various functional groups including carboxylic acids, amines, and a thiazole ring.</p>
CR202CH	 <p>Chemical structure of CR202CH, a complex molecule featuring multiple amide, ester, and sulfonamide linkages, along with various functional groups including carboxylic acids, amines, and a thiazole ring.</p>
CR202CK	 <p>Chemical structure of CR202CK, a complex molecule featuring multiple amide, ester, and sulfonamide linkages, along with various functional groups including carboxylic acids, amines, and a thiazole ring.</p>

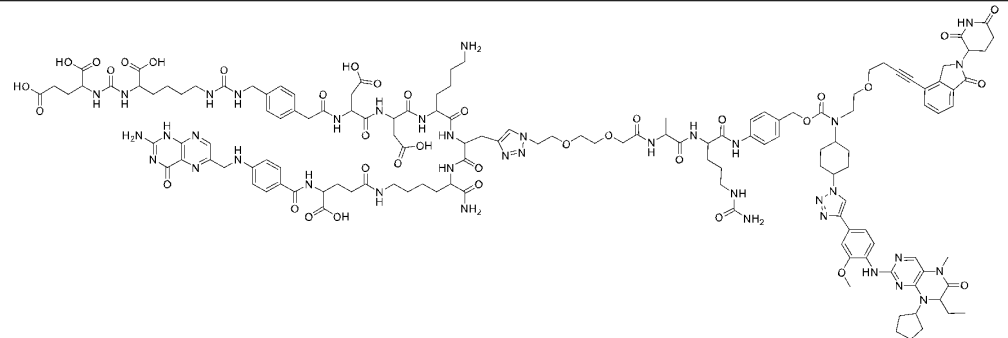
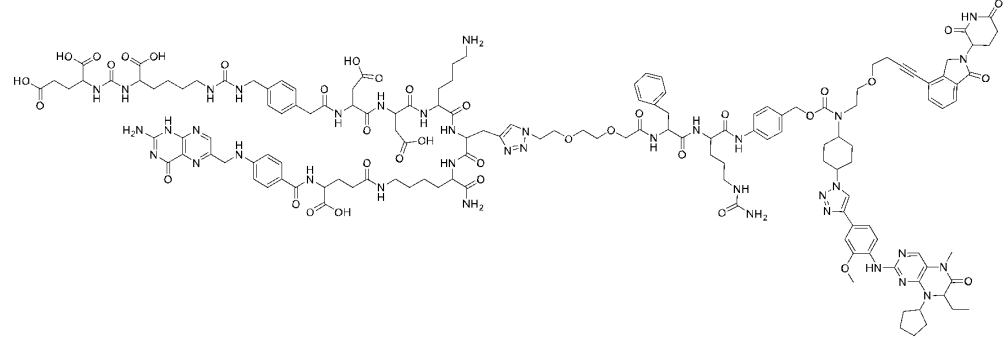
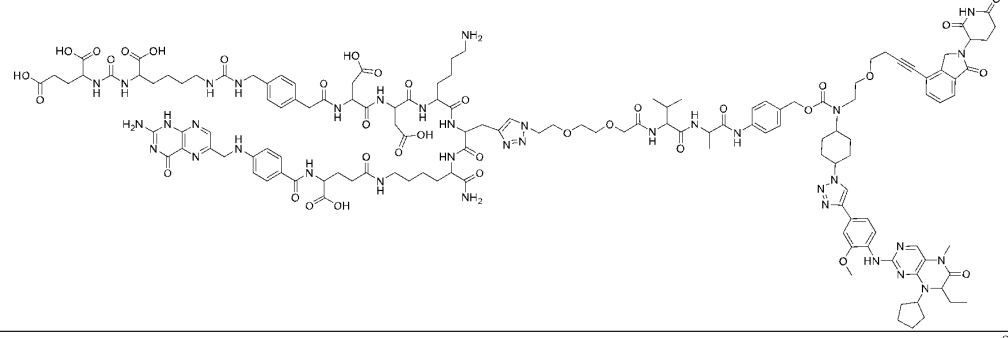
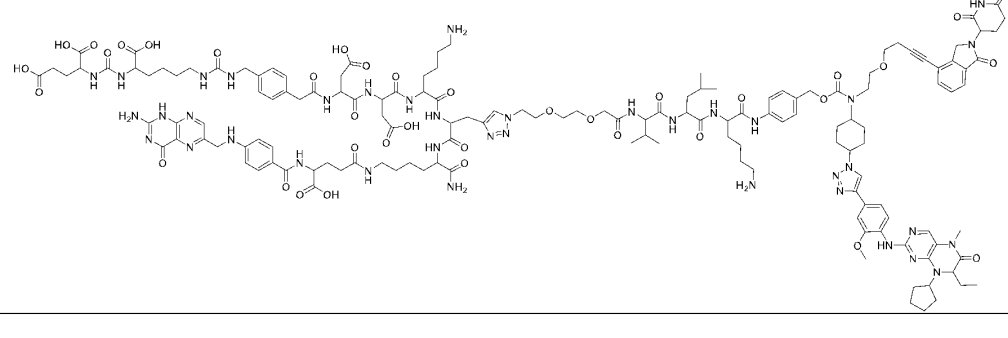
CR202CN	 <p>Chemical structure of CR202CN, a complex molecule featuring multiple amide, ester, and sulfonamide linkages, a pyridine ring, a fluorinated phenyl group, and a thiazole moiety.</p>
CR202CR	 <p>Chemical structure of CR202CR, a complex molecule featuring multiple amide, ester, and sulfonamide linkages, a pyridine ring, a fluorinated phenyl group, and a thiazole moiety.</p>
CR202F0	 <p>Chemical structure of CR202F0, a complex molecule featuring multiple amide, ester, and sulfonamide linkages, a pyridine ring, a fluorinated phenyl group, and a thiazole moiety.</p>
CR202F2	 <p>Chemical structure of CR202F2, a complex molecule featuring multiple amide, ester, and sulfonamide linkages, a pyridine ring, a fluorinated phenyl group, and a thiazole moiety.</p>

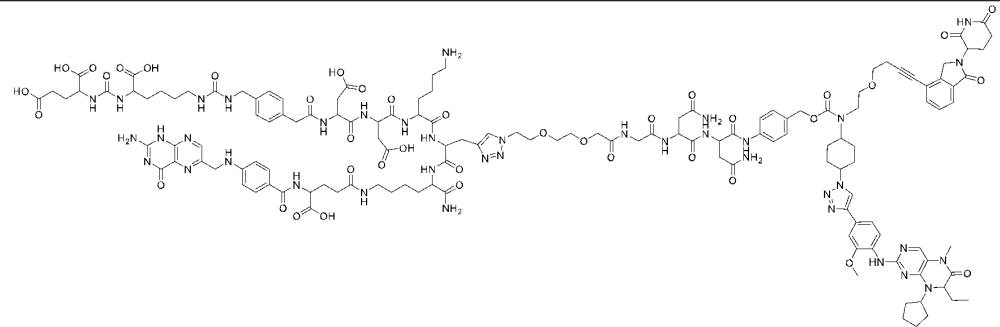
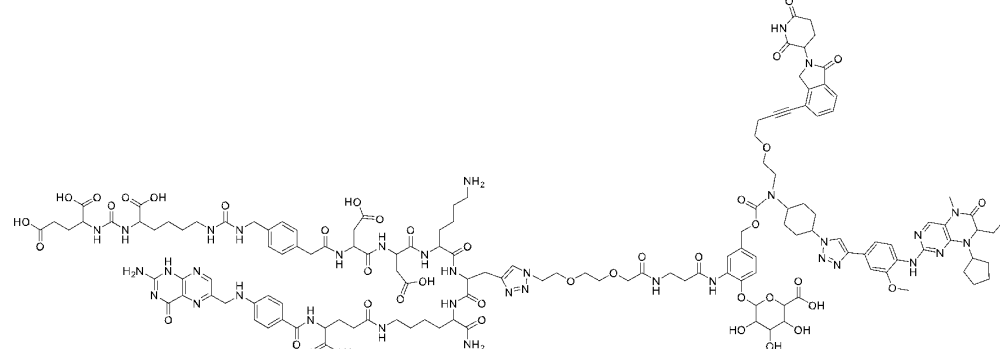
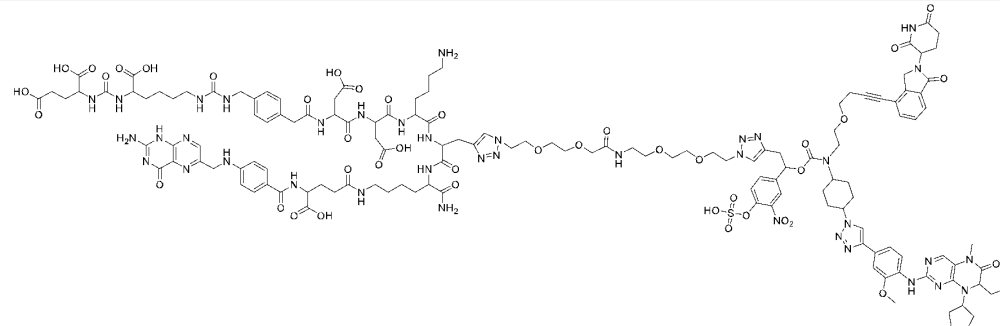
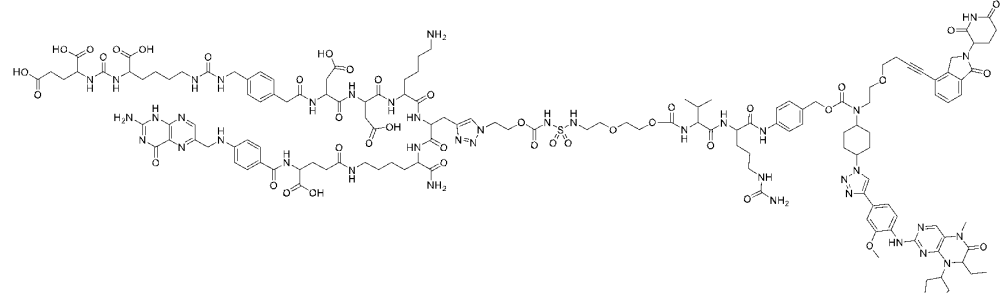
CR20214	
CR20282	
CR20285	
CR20287	

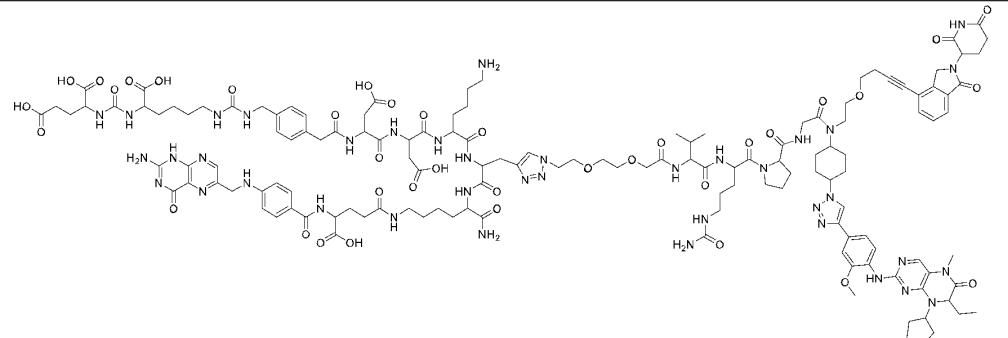
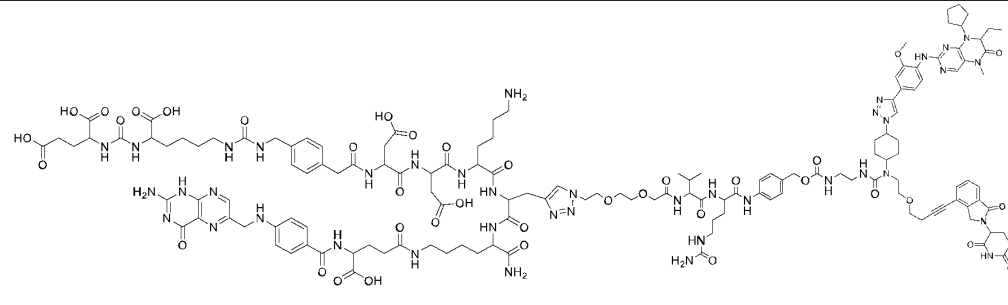
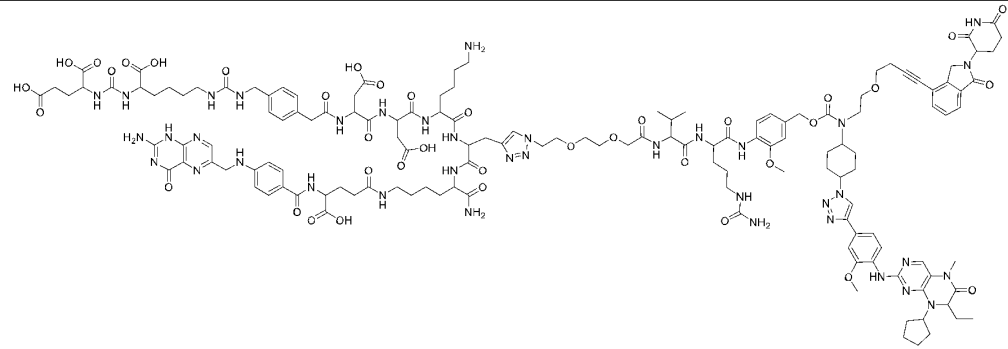
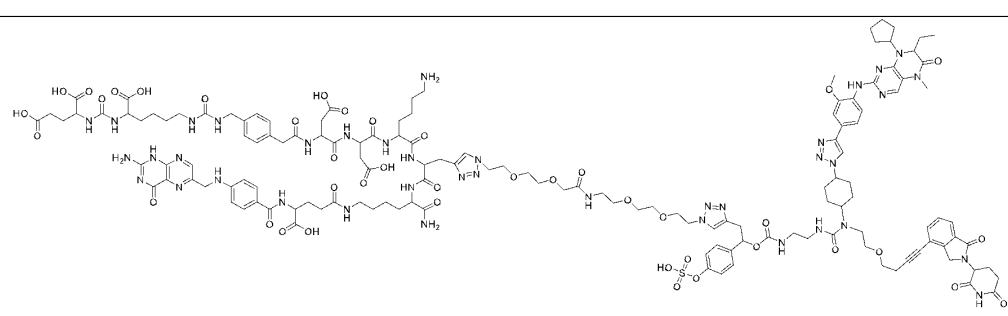
CR20293	
CR20295	
CR20297	
CR202EF	
CR202W5	
CR202W6	

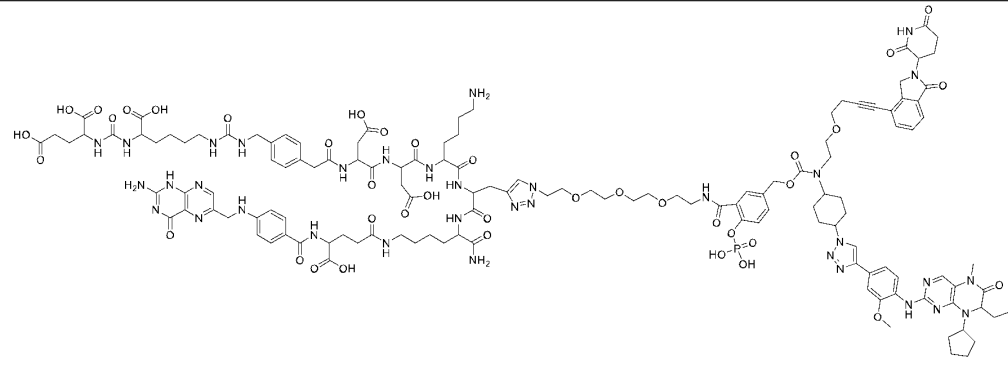
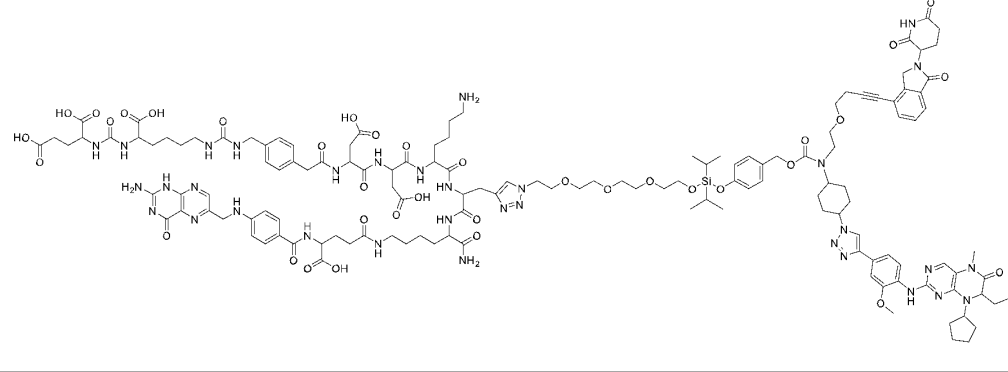
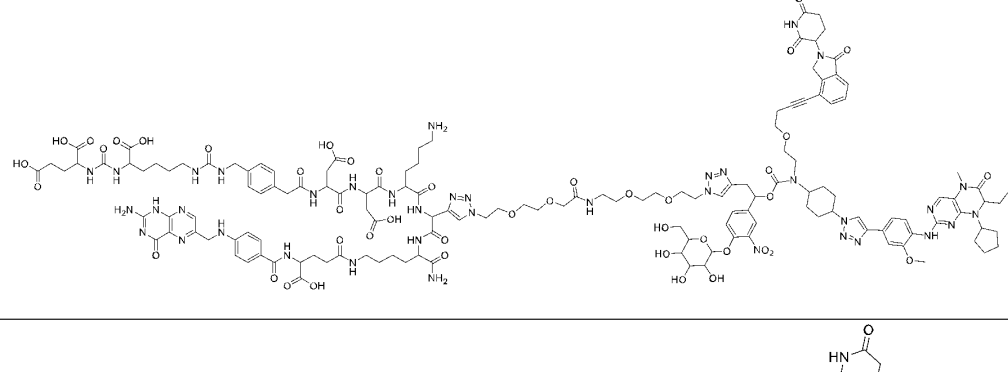
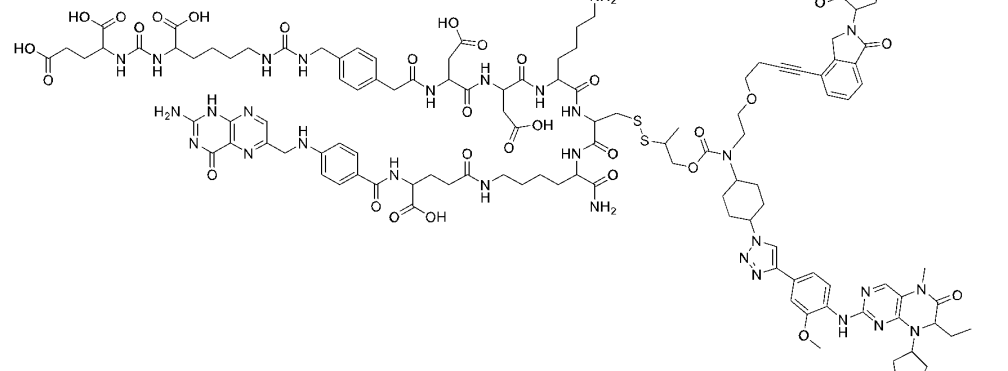
CR202W7	
CR202W8	
CR202W9	
CR202X0	
CR202X1	
CR202X2	
CR202X3	

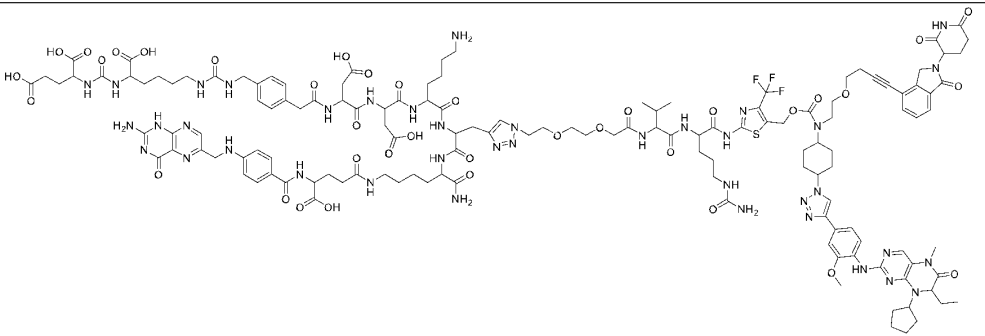
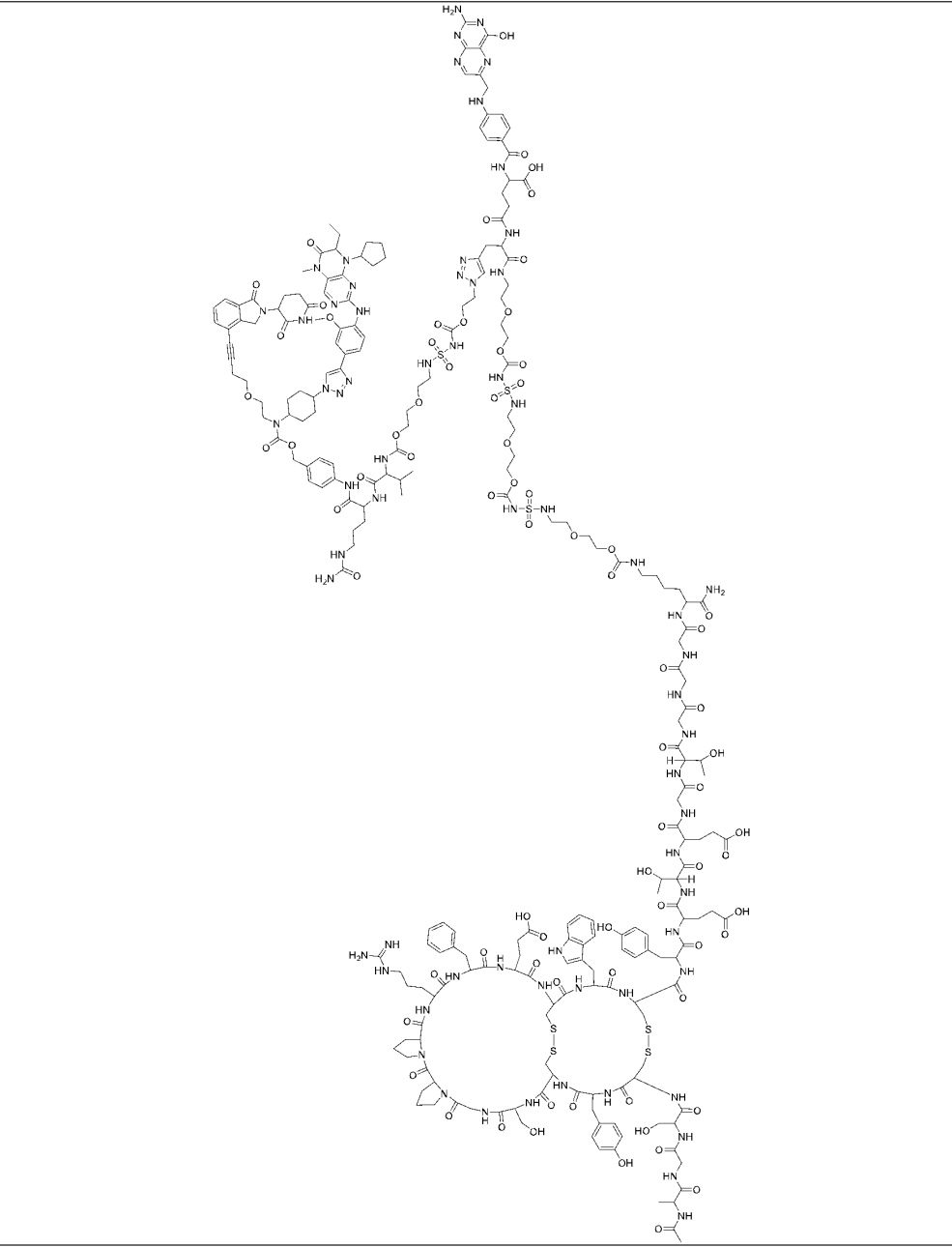
CR202Y3	
CR202Y5	
CR202V4	
CR202V5	

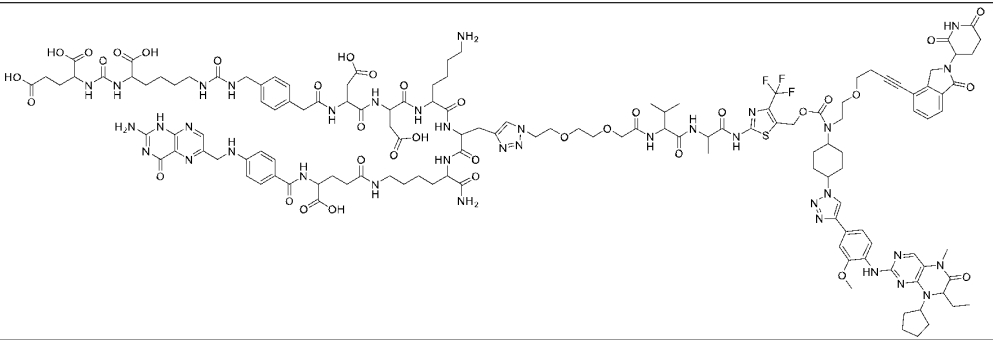
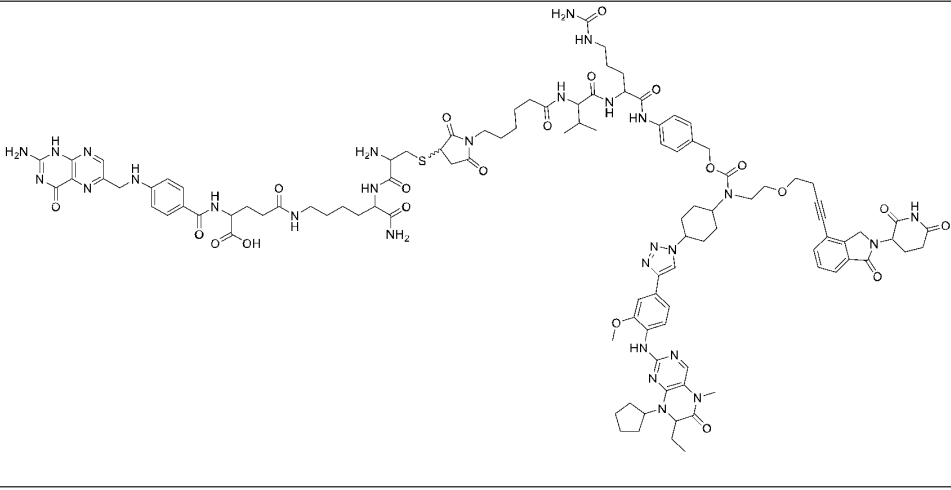
CR202V6	 <p>Chemical structure of CR202V6, a complex molecule featuring multiple amide, ester, and triazole linkages, along with various aromatic and heterocyclic rings.</p>
CR202V7	 <p>Chemical structure of CR202V7, a complex molecule featuring multiple amide, ester, and triazole linkages, along with various aromatic and heterocyclic rings.</p>
CR202Z6	 <p>Chemical structure of CR202Z6, a complex molecule featuring multiple amide, ester, and triazole linkages, along with various aromatic and heterocyclic rings.</p>
CR202V8	 <p>Chemical structure of CR202V8, a complex molecule featuring multiple amide, ester, and triazole linkages, along with various aromatic and heterocyclic rings.</p>

CR202V9	 <p>Chemical structure of CR202V9, a complex molecule featuring multiple amide bonds, a triazole ring, a pyridine ring, and a carboxylic acid group.</p>
CR202AL	 <p>Chemical structure of CR202AL, a complex molecule featuring multiple amide bonds, a triazole ring, a pyridine ring, and a carboxylic acid group.</p>
CR202W1	 <p>Chemical structure of CR202W1, a complex molecule featuring multiple amide bonds, a triazole ring, a pyridine ring, and a carboxylic acid group.</p>
CR202G M	 <p>Chemical structure of CR202G M, a complex molecule featuring multiple amide bonds, a triazole ring, a pyridine ring, and a carboxylic acid group.</p>

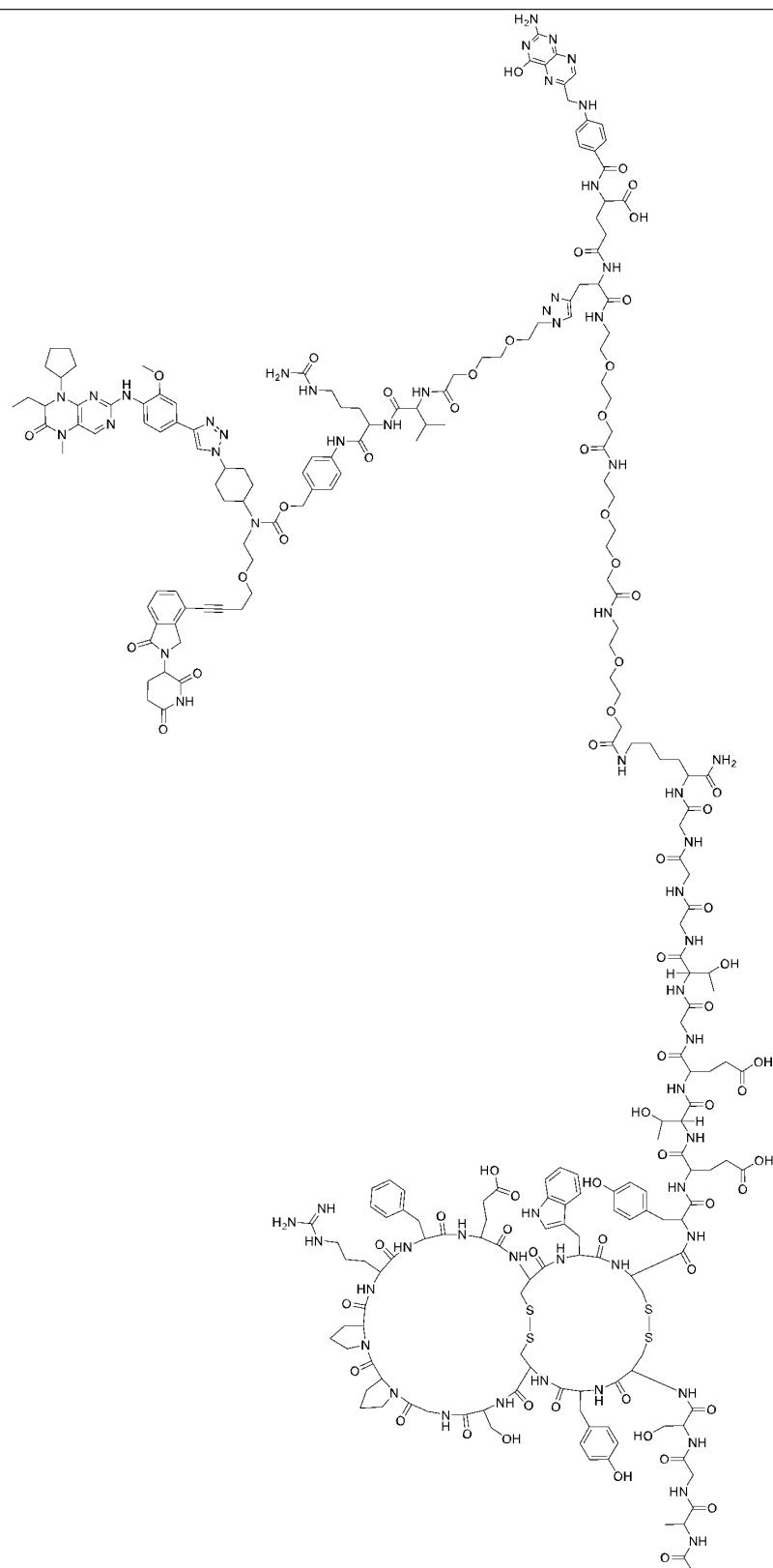
CR202GQ	 <p>Chemical structure of CR202GQ, a complex molecule featuring multiple amide bonds, a central triazole ring, and various side chains including a long alkyl chain, a carboxylic acid group, and a substituted benzene ring.</p>
CR202HJ	 <p>Chemical structure of CR202HJ, a complex molecule featuring multiple amide bonds, a central triazole ring, and various side chains including a long alkyl chain, a carboxylic acid group, and a substituted benzene ring.</p>
CR202FU	 <p>Chemical structure of CR202FU, a complex molecule featuring multiple amide bonds, a central triazole ring, and various side chains including a long alkyl chain, a carboxylic acid group, and a substituted benzene ring.</p>
CR202JG	 <p>Chemical structure of CR202JG, a complex molecule featuring multiple amide bonds, a central triazole ring, and various side chains including a long alkyl chain, a carboxylic acid group, and a substituted benzene ring.</p>

CR202LB	 <p>Chemical structure of CR202LB, a complex molecule featuring multiple amide, ester, and triazole linkages, including a phosphonic acid group and a terminal amine.</p>
CR202HT	 <p>Chemical structure of CR202HT, a complex molecule featuring multiple amide, ester, and triazole linkages, including a phosphonic acid group and a terminal amine.</p>
CR202HU	 <p>Chemical structure of CR202HU, a complex molecule featuring multiple amide, ester, and triazole linkages, including a phosphonic acid group and a terminal amine.</p>
CR202HV	 <p>Chemical structure of CR202HV, a complex molecule featuring multiple amide, ester, and triazole linkages, including a phosphonic acid group and a terminal amine.</p>

CR202FX	 <p>Chemical structure of CR202FX, a complex molecule featuring a central pyrazole ring system. It is substituted with various functional groups, including carboxylic acids, amides, and a long chain containing a terminal amine group. The structure also includes a thiazole ring and a fluorinated ether linkage.</p>
CR202HR	 <p>Chemical structure of CR202HR, a complex molecule featuring a central pyrazole ring system. It is substituted with various functional groups, including carboxylic acids, amides, and a long chain containing a terminal amine group. The structure also includes a thiazole ring and a fluorinated ether linkage.</p>

CR202GC	 <p>Chemical structure of CR202GC, a complex molecule featuring multiple amide, ester, and triazole linkages, along with various aromatic and heterocyclic moieties, including a pyridine ring and a fluorinated group.</p>
CR202MT	 <p>Chemical structure of CR202MT, a complex molecule featuring multiple amide, ester, and triazole linkages, along with various aromatic and heterocyclic moieties, including a pyridine ring and a fluorinated group.</p>

CR202EZ



[60] 本申请的另一个方面提供了一种药物组合物，所述药物组合物包含了本文所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，以及药学上可接受的载体。在一些实施方式中，药物组合物，用于静脉、皮下、口服、肌肉或心室内施用。

[61] 本申请的另一个方面提供了一种用于治疗对象中的疾病的方法，所述方法包括向所述对象施用治疗有效量的本文所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，或者本文所述的药物组合物。在一些实施方式中，所述疾病选自下组：癌症、免疫性疾病、心血管疾病、代谢疾病和神经疾病。在一些实施方式中，疾病的特征在于在所述对象中表达靶蛋白或异常表达靶蛋白。在一些实施方式中，所述方法还包括将一种或多种治疗剂与所述偶联体化合物或其药学上可接受的盐，或者所述药物组合物联合施用。

[62] 在一些实施方式中，癌症的特征在于癌细胞高表达 FOLR1、TRPV6、PSMA 或 c-MET。在一些实施方式中，癌症的特征在于癌细胞高表达 FOLR1 和 TRPV6、FOLR1 和 c-MET、c-MET 和 TRPV6、c-MET 和 PSMA、PSMA 和 TRPV6 或 FOLR1 和 PSMA。在一些实施方式中，癌症选自下组：人乳腺导管癌、人脑星形胶质母细胞瘤、膀胱移行细胞乳头瘤、前列腺癌、乳腺癌、肺癌、肾癌、白血病、卵巢癌、胃癌、宫颈癌、子宫癌、子宫内膜癌、肝癌、结肠癌、甲状腺癌、胰腺癌、结直肠癌、食道癌、睾丸癌、皮肤癌、淋巴瘤和多发性骨髓瘤。在一些实施方式中，肺癌是非小细胞肺癌或小细胞肺癌。

[63] 在一些实施方式中，免疫性疾病是自身免疫性疾病。在一些实施方式中，自身免疫性疾病选自下组：结缔组织病、系统性硬化症、类风湿性关节炎和系统性红斑狼疮。

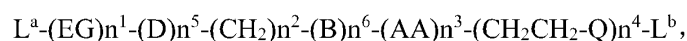
[64] 在一些实施方式中，心血管疾病选自下组：心绞痛、心肌梗死、中风、心脏病发作、高血压性心脏病、风湿性心脏病、心肌病、心脏心律失常和先天性心脏病。

[65] 在一些实施方式中，代谢疾病选自下组：糖尿病、痛风、肥胖症、低血糖症、高血糖症和血脂异常。

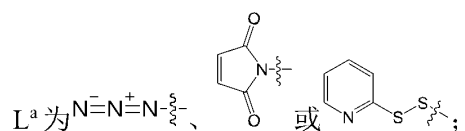
[66] 在一些实施方式中，神经疾病选自下组：阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿病、头部损伤、多发性硬化症、眩晕、昏迷和癫痫。

[67] 本申请的另一个方面提供了一种本文所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，或者本文所述的药物组合物在用于制备治疗对象中的疾病的药物中的用途。

[68] 本申请的另一个方面提供了一种化合物或其盐，所述化合物具有以下结构：



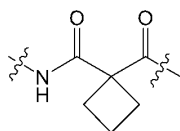
其中,



EG 为 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 或 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$; n^1 是 0-6 的整数;

n^2 是 0-8 的整数;

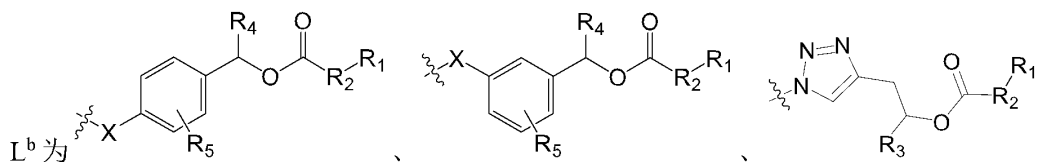
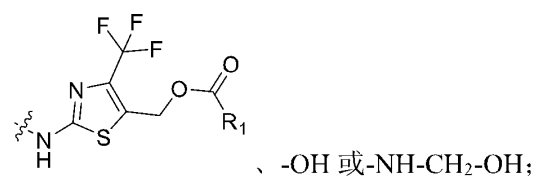
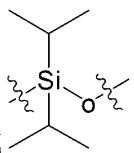
D 为 $-C(=O)-NH-S(=O)_2-NH-$; n^5 为 0 或 1;



B 为 $-C(=O)-$ 、、 $-NH-CH_2CH_2-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-NH-$ 、 $-CH(CH_3)-CH_2-O-$ 、 $-CH_2CH_2O-$ 、 $-NH-C(=O)-$ 或 $-NH-$ ； n^6 为 0-3 的整数；

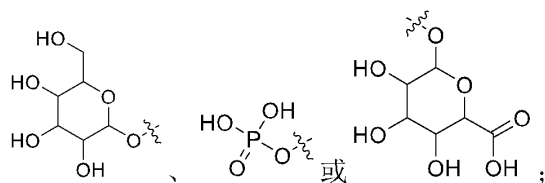
AA 每次出现时独立地为氨基酸残基; n^3 是 0-5 的整数;

Q 每次出现时独立地为-C(=O)-、-O-或键，n⁴ 是 0-3 的整数；

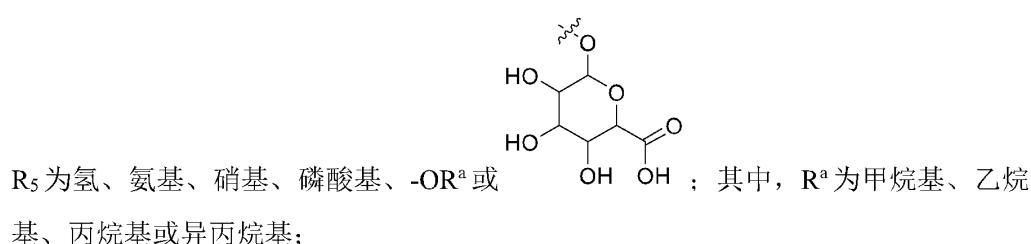
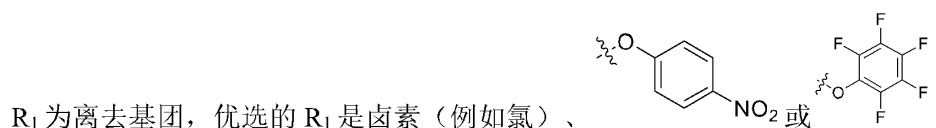


其中 X 为键、-NH-、-C(=O)-、氧或  ;

R₂ 为键、-O-CH₂-或-NH-CH₂CH₂-NH-C(=O)-;



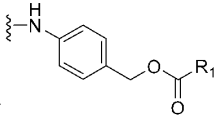
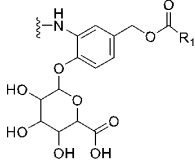
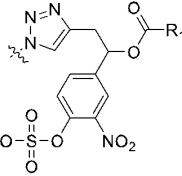
R_4 为氢或 C_{1-8} 烷基;

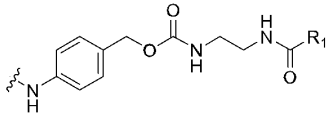
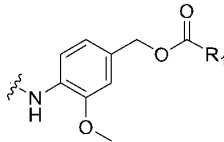


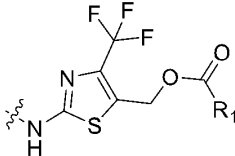
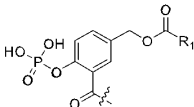
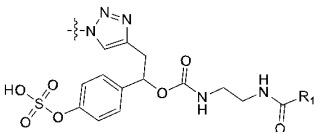
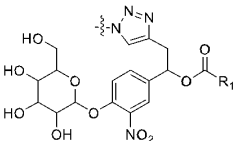
[69] 在一些实施方式中, EG 为 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 。在一些实施方式中, n^1 是 2。在一些实施方式中, n^1 是 0。在一些实施方式中, n^2 是 1。在一些实施方式中, n^2 是 4。在一些实施方式中, n^2 是 5。在一些实施方式中, n^5 是 0。在一些实施方式中, n^6 是 1。在一些实施方式中, n^6 是 3。在一些实施方式中, n^1 是 2、 n^2 是 1、 n^3-n^4 是 0 并且 L^b 是 $-\text{OH}$ 。

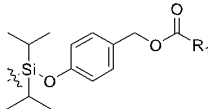
[70] 在一些实施方式中, AA 每次出现时独立地为 Val、Cit、Glu、Leu、Lys、Ala、Gly、Phe、Gln、Pro 或 Asn 形成的氨基酸残基。在一些实施方式中, $-(\text{AA})_{n^3}-$ 为选自下组的肽残基: $-\text{Val-Cit}-$ 、 $-\text{Glu-Val-Cit}-$ 、 $-\text{Ala-Cit}-$ 、 $-\text{Phe-Cit}-$ 、 $-\text{Val-Ala}-$ 、 $-\text{Gly-Gly-Phe-Gly}-$ 、 $-\text{Cit}-$ 、 $-\text{Val-Leu-Lys}-$ 、 $-\text{Val-Cit-Pro-Gly}-$ 、 $-\text{Gly-Asn-Asn}-$ 和 $-\text{Ala-Ala-Asn}-$ 。在一些实施方式中, 当 n^4 为 1 时, Q 为 $-\text{C}(=\text{O})-$; 当 n^4 为 2 时, Q 分别为 $-\text{O}-$ 和 $-\text{C}(=\text{O})-$; 当 n^4 为 3 时, Q 分别为 $-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-$ 和键。在一些实施方式中, n^4 为 0。

[71] 在一些实施方式中, L^b 为

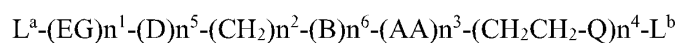
$-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{OH}$ 、
 、
 、
 、

、
、

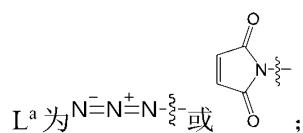
、
、
、

 或



[72] 在一些实施方式中，所述化合物具有以下结构：



其中,



EG 为 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$; n^1 是 2-4 的整数;

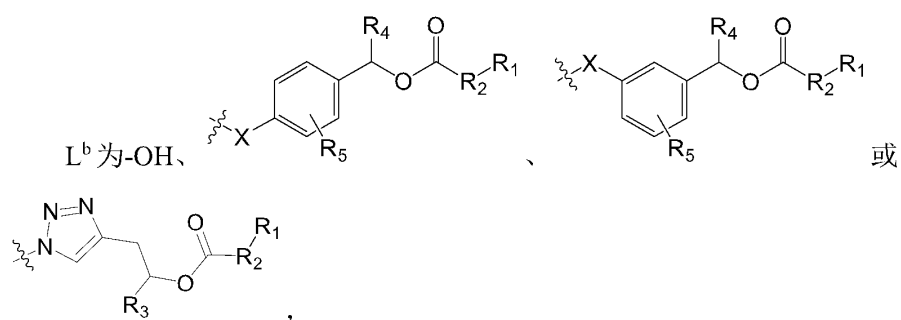
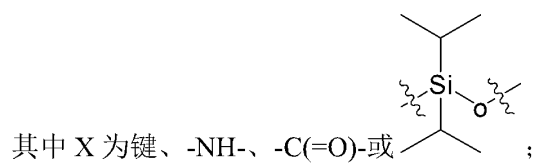
D 为 $-C(=O)-NH-S(=O)_2-NH-$; n^5 为 0 或 1;

n^2 是 0-5 的整数;

B 为 -C(=O)-、-C(=O)-NH-、-CH₂CH₂O-、-NH-CH₂CH₂-C(=O)-或-NH-; n⁶ 为 0-3 的整数;

AA 每次出现时独立地为氨基酸残基; n^3 是 0-3 的整数;

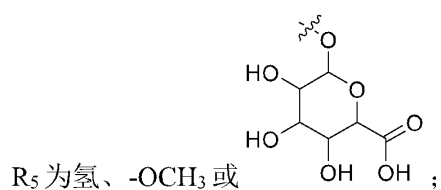
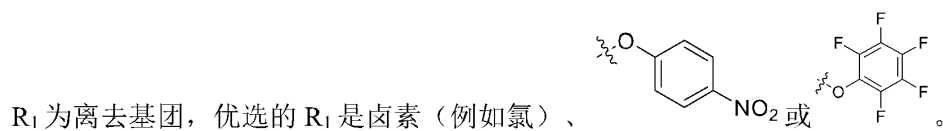
Q 每次出现时独立地为-C(=O)-、-O-或键, n^4 是 0-3 的整数;



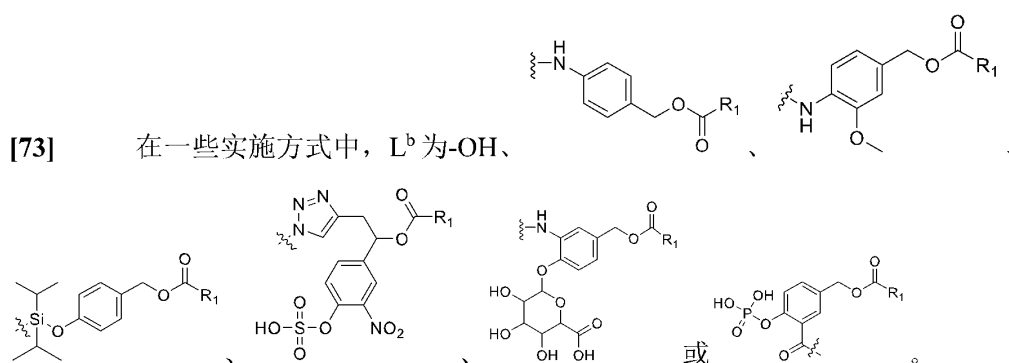
R_2 为键；



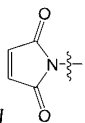
R_4 为氢；

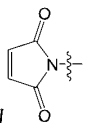


[73] 在一些实施方式中, L^b 为 -OH、



[74] 在一些实施方式中, n^5 为 1 时, n^2 和 n^4 均为 0。

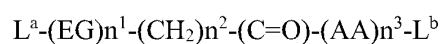


[75] 在一些实施方式中, L^a 为 , n^1 、 n^5 和 n^4 均为 0。

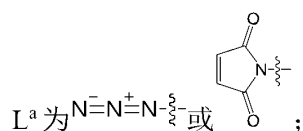
[76] 在一些实施方式中, L^a 为 $N^{\ominus}=N^{\oplus}=N-\frac{5}{2}-$, n^2 是 1 或 2。

[77] 在一些实施方式中, AA 每次出现时独立地为 Val、Cit、Glu 或 Ala 形成的氨基酸残基。在一些实施方式中, $-(AA)n^3-$ 为选自下组的肽残基: -Val-Cit-、-Glu-Val-Cit-、-Ala-Cit-和-Val-Ala-。

[78] 在一些实施方式中, 所述化合物具有以下结构:



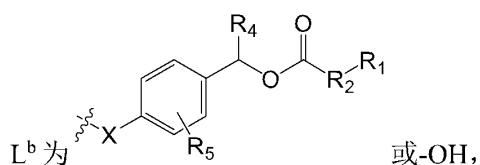
其中,



EG 为 $-CH_2CH_2O-$; n^1 是 0-4 的整数;

n^2 是 0-5 的整数;

AA 每次出现时独立地为氨基酸残基; n^3 是 0-3 的整数;



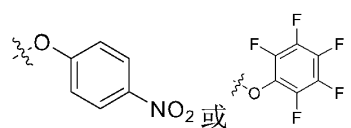
其中 X 为 $-NH-$;

R_2 为键;

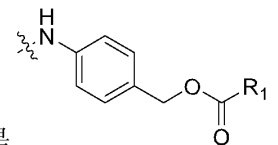
R_4 为氢;

R_5 为氢或 $-OCH_3$;

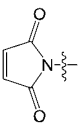
R₁为离去基团, 优选的 R₁ 是卤素 (例如氯)、

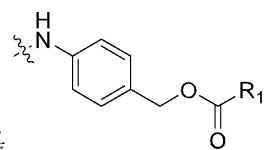


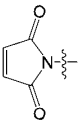
[79] 在一些实施方式中, L^a 为 $N=N^+=N-\text{wavy line}$ 、n¹ 是 2、n² 是 1 且 L^b 是



[80] 在一些实施方式中, L^a 为 $N=N^+=N-\text{wavy line}$ 、n¹ 是 2、n² 是 1 且 L^b 是 -OH。

[81] 在一些实施方式中, L^a 为 、n¹ 是 0、n² 是 5 且 L^b 是

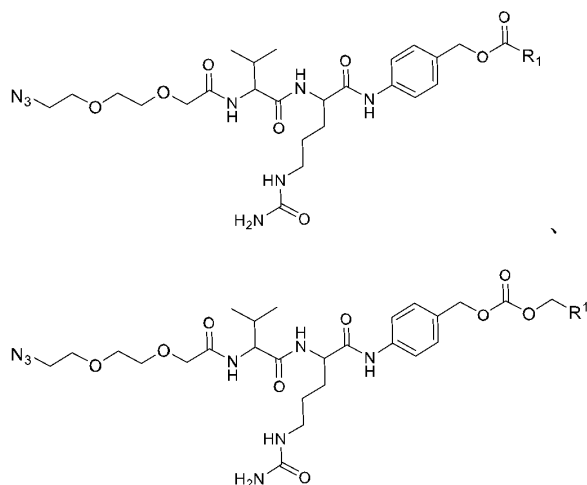


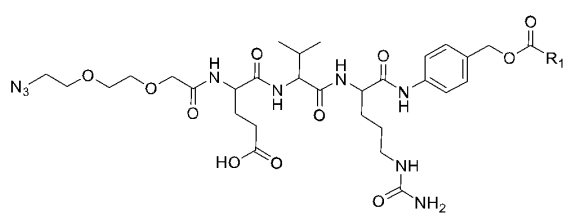
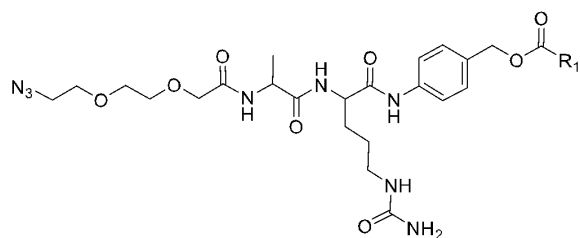
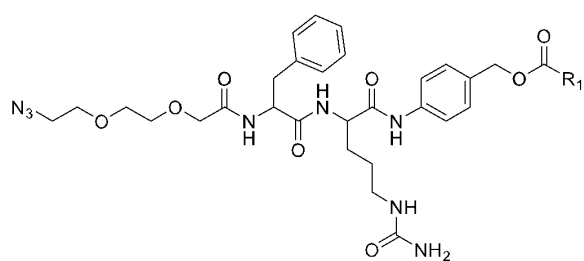
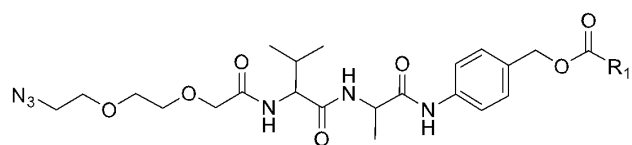
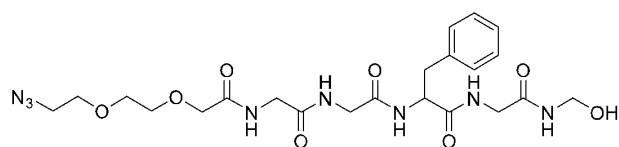
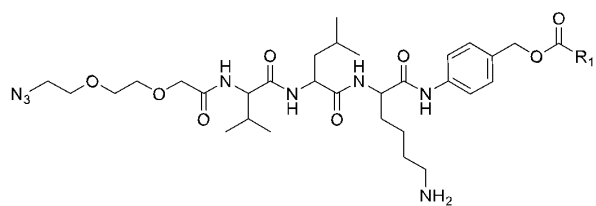
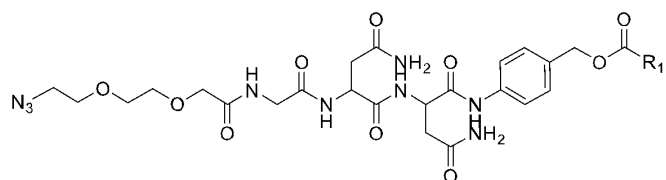
[82] 在一些实施方式中, L^a 为 、n¹ 是 0、n² 是 5 且 L^b 是 -OH。

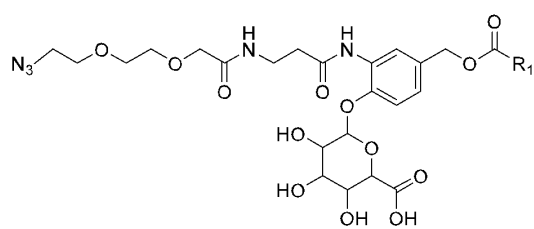
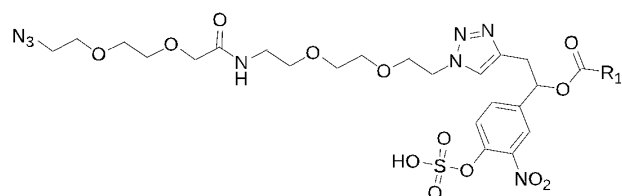
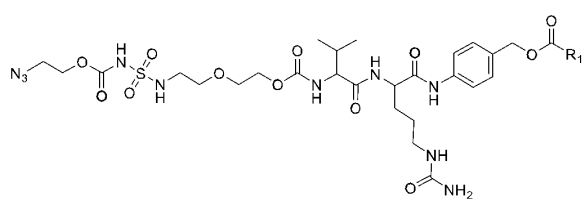
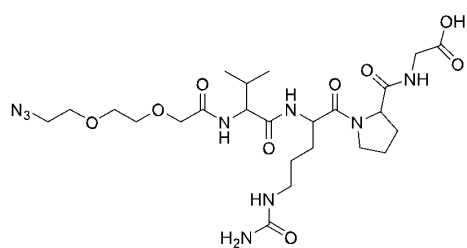
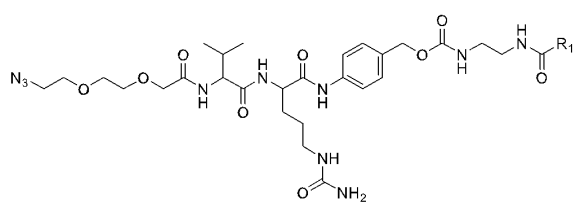
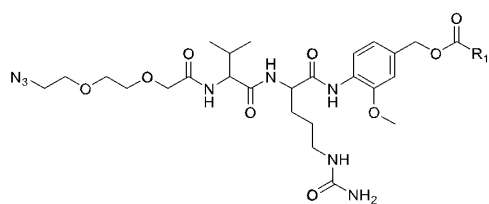
[83] 在一些实施方式中, AA 每次出现时独立地为 Val、Cit、Glu 或 Ala 氨基酸残基。

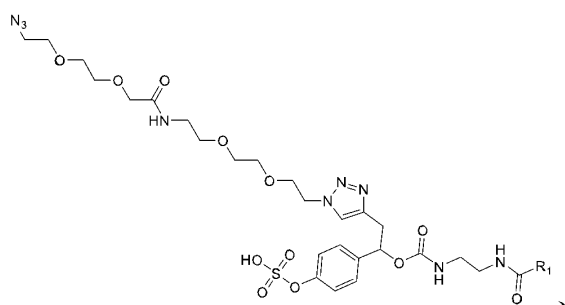
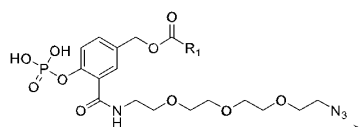
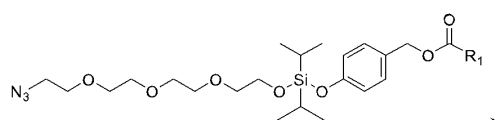
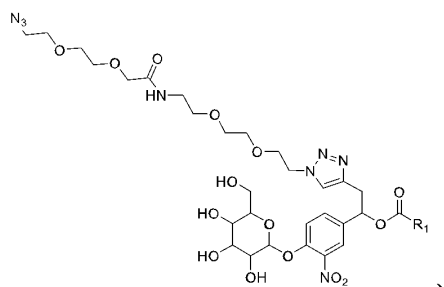
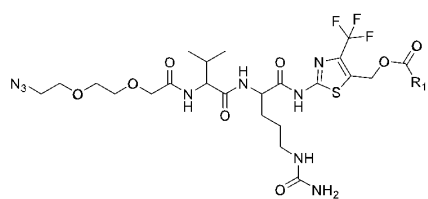
在一些实施方式中, -(AA)n³-为选自下组的肽残基: -Val-Cit-、-Glu-Val-Cit-、-Ala-Cit-、-Phe-Cit-、-Val-Ala-、-Gly-Gly-Phe-Gly-、-Val-Leu-Lys-和-Gly-Asn-Asn-。

[84] 在一些实施方式中, 化合物具有选自以下组的结构:

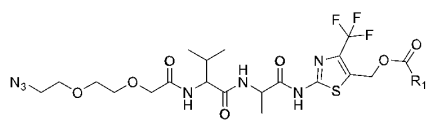
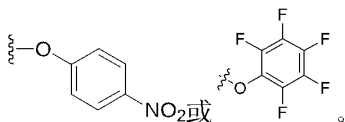
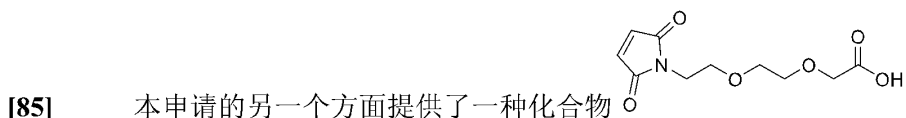








和

, 其中 R₁ 为离去基团, 优选的 R₁ 是卤素 (例如氯)、

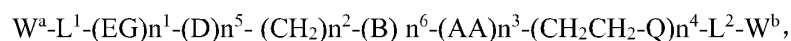
[85]

本申请的另一个方面提供了一种化合物 或其盐。

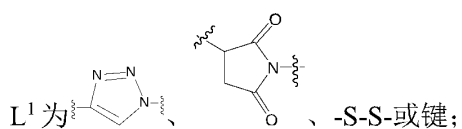
[86]

本申请的另一个方面提供了一种偶联体化合物或其药学上可接受的盐, 所述偶联

体化合物具有以下结构:



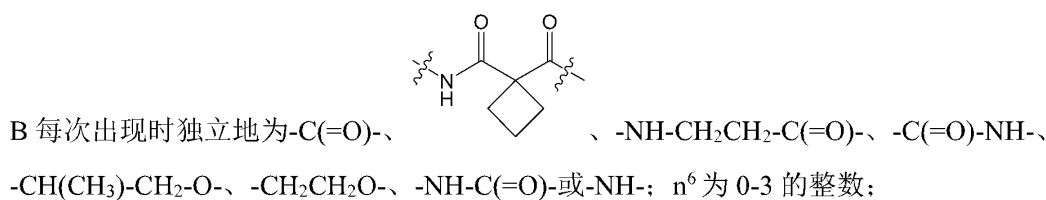
其中,



EG 为-CH₂CH₂O-或-OCH₂CH₂-; n^1 是 0-6 的整数;

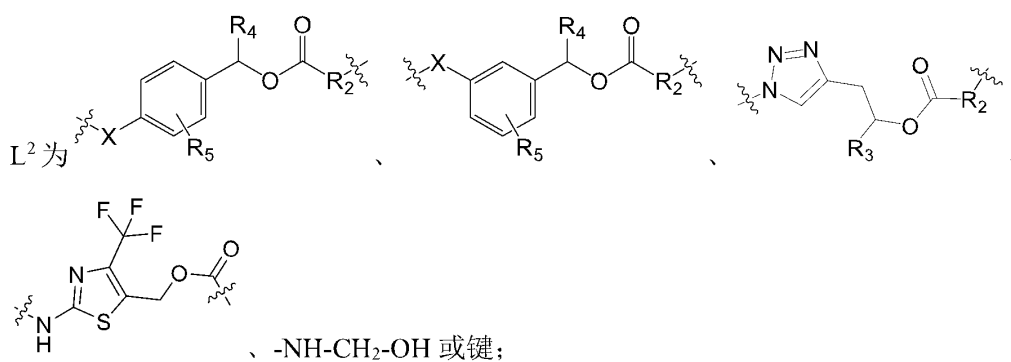
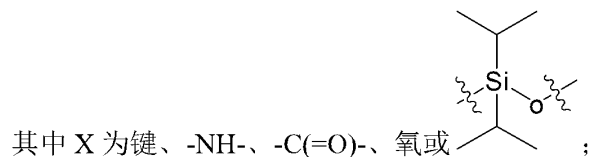
n^2 是 0-8 的整数;

D 为-C(=O)-NH-S(=O)₂-NH-; n^5 为 0 或 1;

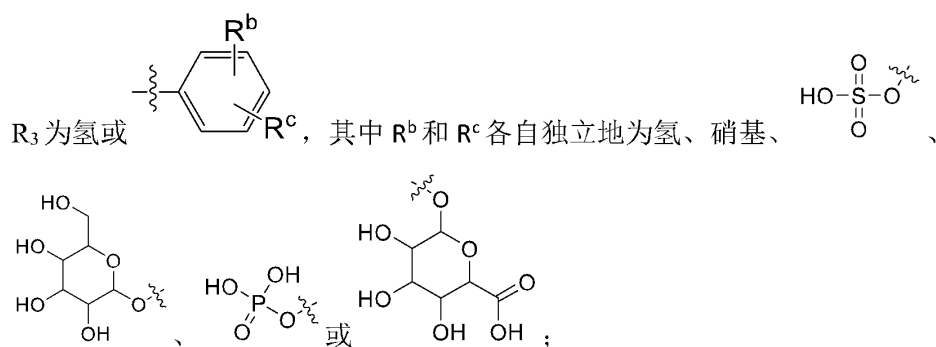


AA 每次出现时独立地为氨基酸残基; n^3 是 0-5 的整数;

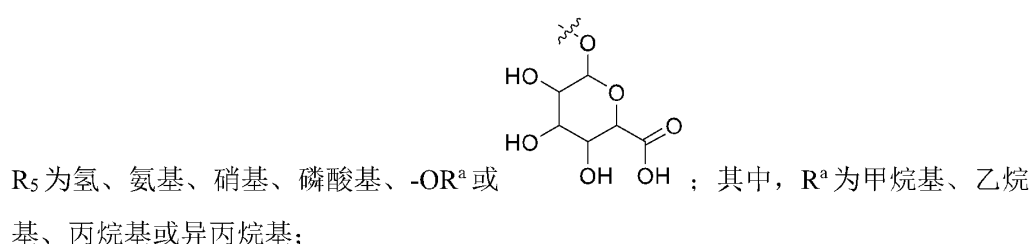
Q 每次出现时独立地为-C(=O)-、-O-或键, n^4 是 0-3 的整数;



R_2 为键、-O-CH₂-或-NH-CH₂CH₂-NH-C(=O)-;



R_4 为氢或 C_{1-8} 烷基;

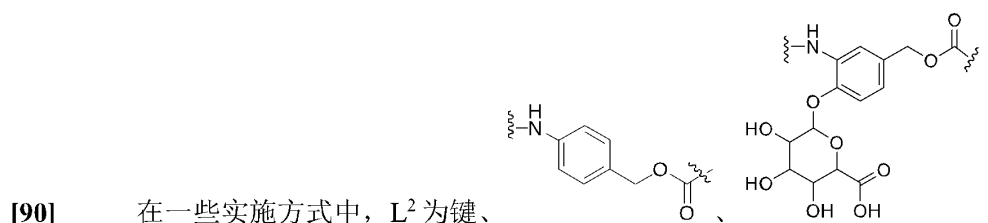


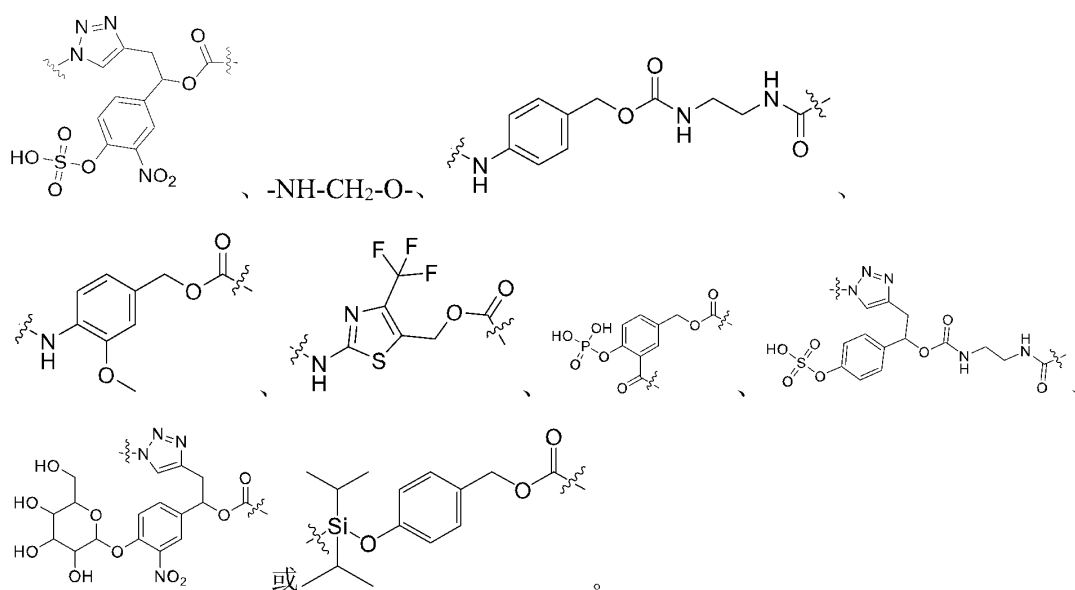
W^a 和 W^b 各自独立地为有效载荷或可以结合细胞表面蛋白的靶向分子。

[87] 在一些实施方式中, EG 为 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 。在一些实施方式中, n^1 是 2。在一些实施方式中, n^1 是 0。在一些实施方式中, n^2 是 1。在一些实施方式中, n^2 是 4。在一些实施方式中, n^2 是 5。在一些实施方式中, n^5 是 0。在一些实施方式中, n^6 是 1。在一些实施方式中, n^6 是 3。在一些实施方式中, n^1 是 2、 n^2 是 1、 n^3 和 n^4 是 0 并且 L^2 是键。

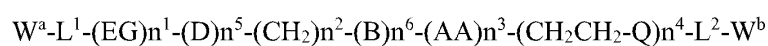
[88] 在一些实施方式中, AA 每次出现时独立地为 Val、Cit、Glu、Leu、Lys、Ala、Gly、Phe、Gln、Pro 或 Asn 形成的氨基酸残基。在一些实施方式中, $-(AA)n^3-$ 为选自下组的肽残基: $-\text{Val-Cit-}$ 、 $-\text{Glu-Val-Cit-}$ 、 $-\text{Ala-Cit-}$ 、 $-\text{Phe-Cit-}$ 、 $-\text{Val-Ala-}$ 、 $-\text{Gly-Gly-Phe-Gly-}$ 、 $-\text{Cit-}$ 、 $-\text{Val-Leu-Lys-}$ 、 $-\text{Val-Cit-Pro-Gly-}$ 、 $-\text{Gly-Asn-Asn-}$ 和 Ala-Ala-Asn- 。

[89] 在一些实施方式中, 当 n^4 为 1 时, Q 为 $-\text{C}(=\text{O})-$; 当 n^4 为 2 时, Q 分别为 $-\text{O-}$ 和 $-\text{C}(=\text{O})-$; 当 n^4 为 3 时, Q 分别为 $-\text{O-}$ 、 $-\text{O-}$ 和键。在一些实施方式中, n^4 为 0。

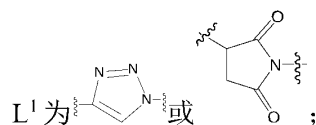




[91] 在一些实施方式中, 所述化合物具有以下结构:



其中,



EG 为 $-CH_2CH_2O-$; n^1 是 2-4 的整数;

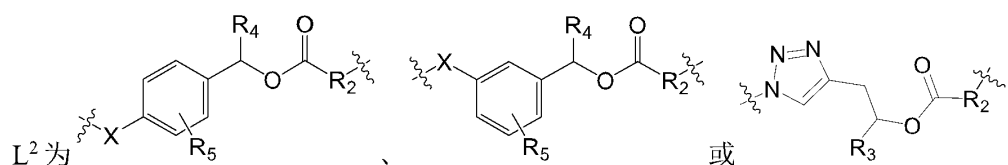
D 为 $-C(=O)-NH-S(=O)_2-NH-$; n^5 为 0 或 1;

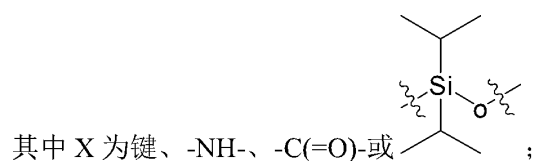
n^2 是 0-5 的整数;

B 为 $-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-NH-$ 、 $-CH_2CH_2O-$ 、 $-NH-CH_2CH_2-C(=O)-$ 或 $-NH-$; n^6 为 0-3 的整数;

AA 每次出现时独立地为氨基酸残基; n^3 是 0-3 的整数;

Q 每次出现时独立地为 $-C(=O)-$ 、 $-O-$ 或键; n^4 是 0-3 的整数;

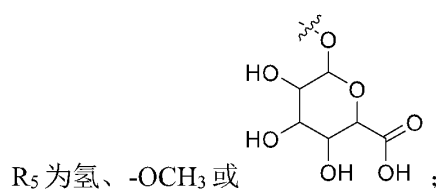




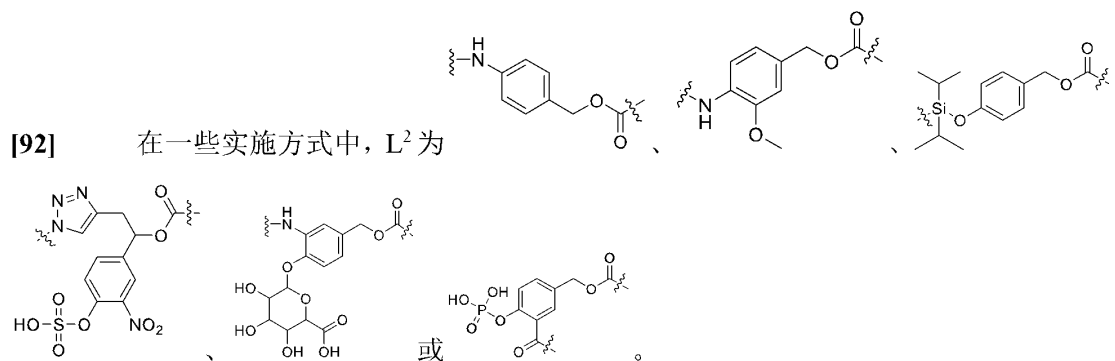
R₂ 为键;



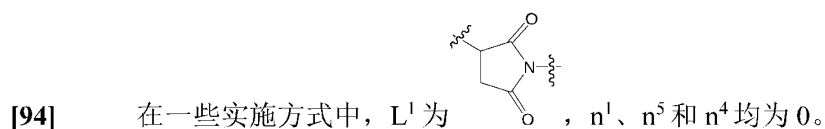
R₄ 为氢;

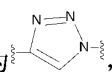


W^a 和 W^b 各自独立地为有效载荷或可以结合细胞表面蛋白的靶向分子。



[93] 在一些实施方式中, n⁵ 为 1 时, n² 和 n⁴ 均为 0。

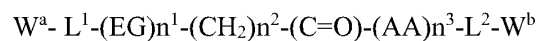


[95] 在一些实施方式中, L¹ 为  , n² 是 1 或 2。

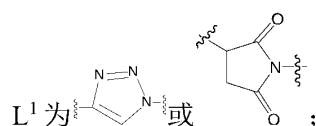
[96] 在一些实施方式中, AA 每次出现时独立地为 Val、Cit、Glu 或 Ala 形成的氨基酸残基。在一些实施方式中, -(AA)n³-为选自下组的肽残基: -Val-Cit-、-Glu-Val-Cit-、

-Ala-Cit-和-Val-Ala-。

[97] 在一些实施方式中, 所述化合物具有以下结构:



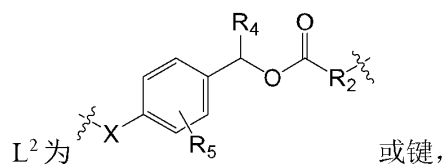
其中,



EG 为 $-CH_2CH_2O-$; n^1 是 0-4 的整数;

n^2 是 0-5 的整数;

AA 每次出现时独立地为氨基酸残基; n^3 是 1-4 的整数;



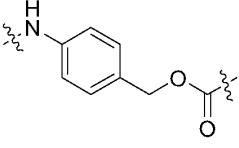
其中 X 为 $-NH-$;

R_2 为键;

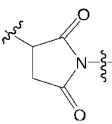
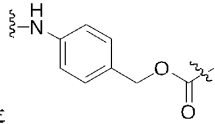
R_4 为氢;

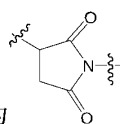
R_5 为氢或 $-OCH_3$;

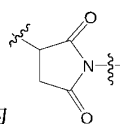
W^a 和 W^b 各自独立地为有效载荷或可以结合细胞表面蛋白的靶向分子。

[98] 在一些实施方式中, L^1 为 、 n^1 是 2、 n^2 是 1 且 L^2 是 。

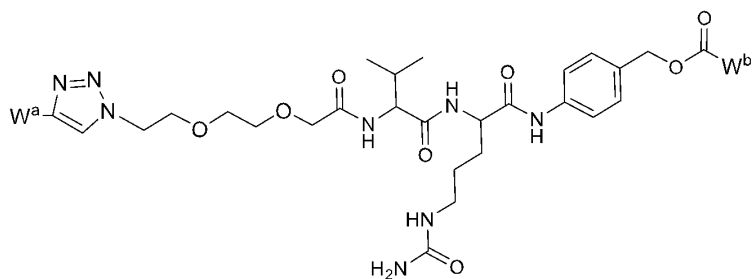
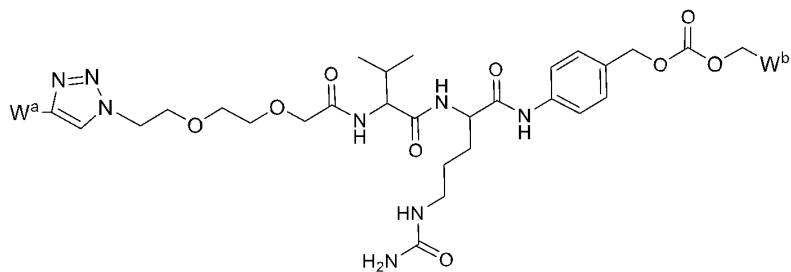
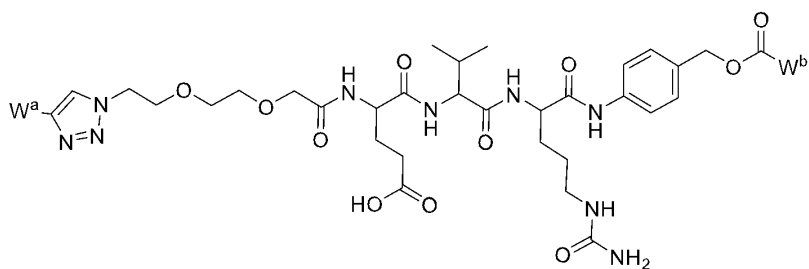
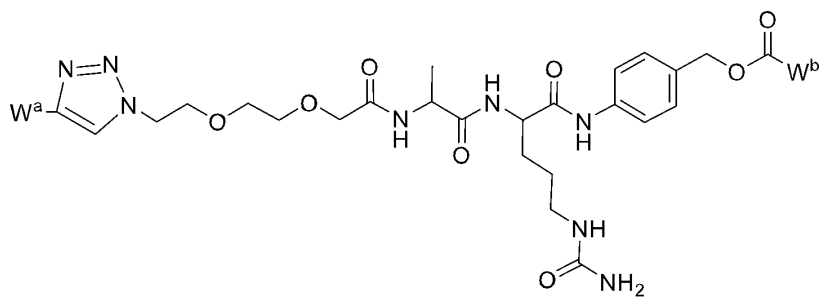
[99] 在一些实施方式中, L^1 为 、 n^1 是 2、 n^2 是 1 且 L^2 是键。

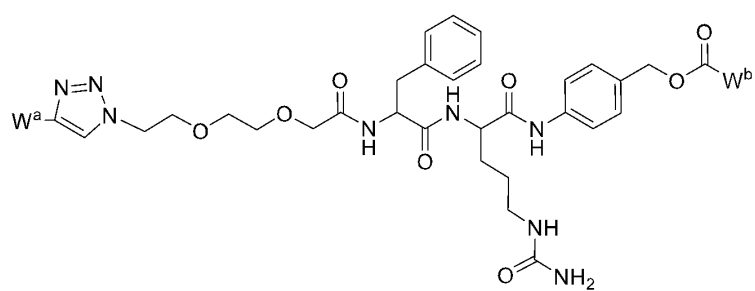
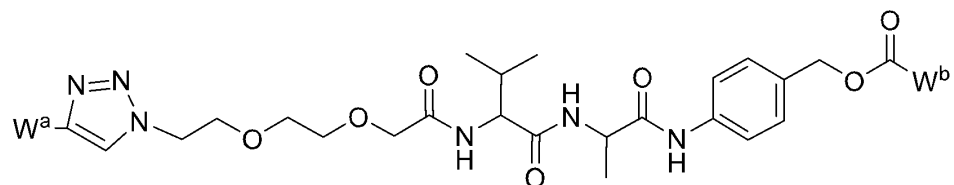
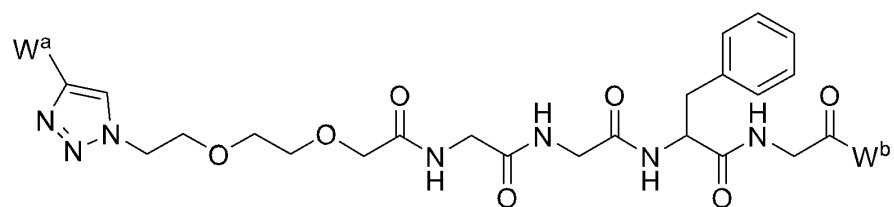
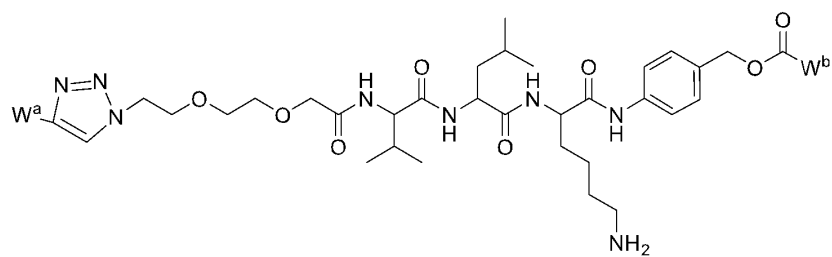
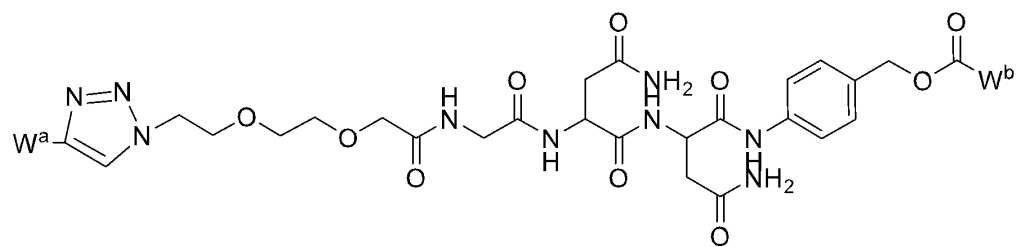
[100] 在一些实施方式中, L^1 为 、 n^1 是 0、 n^2 是 5 且 L^2 是 。

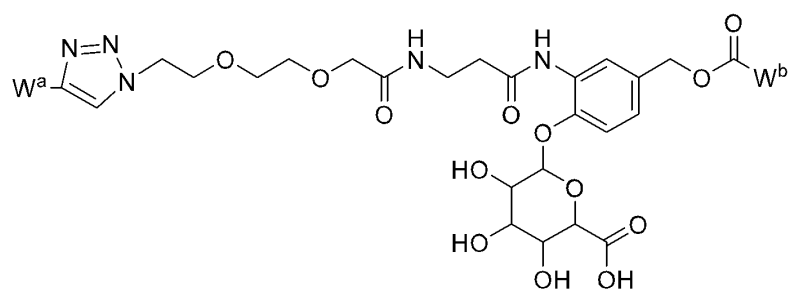
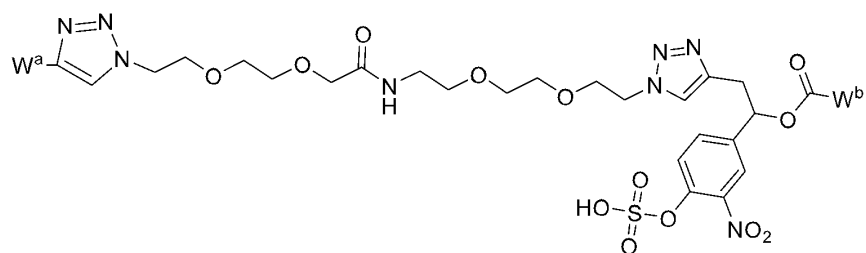
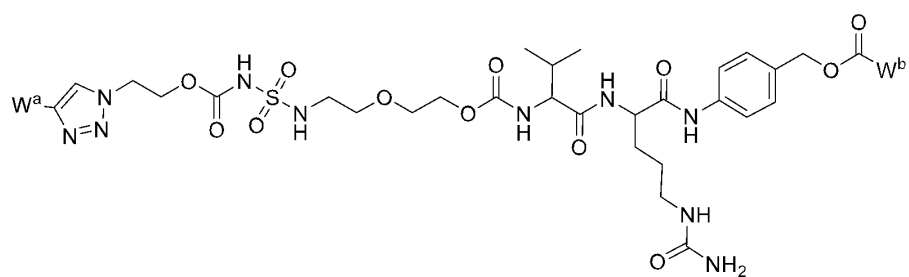
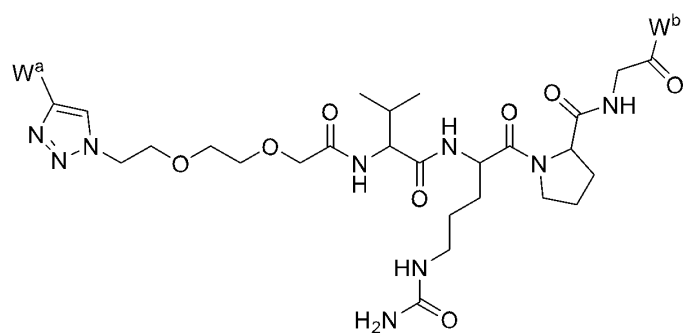
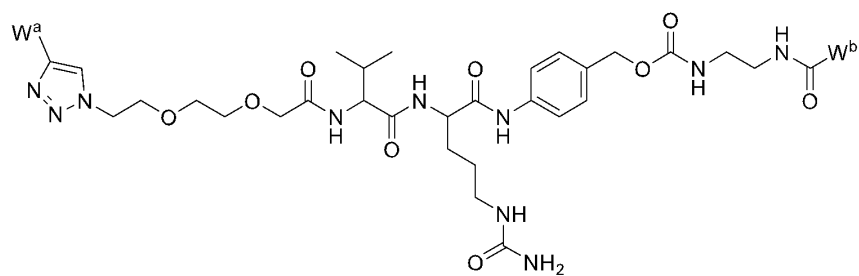


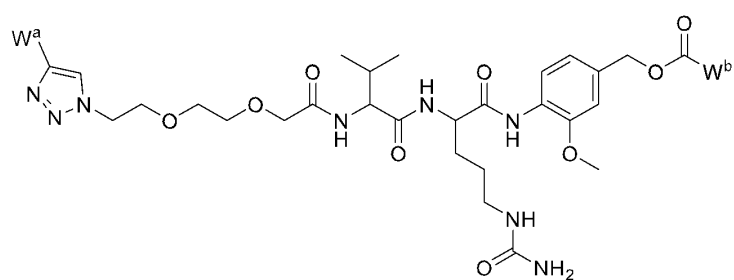
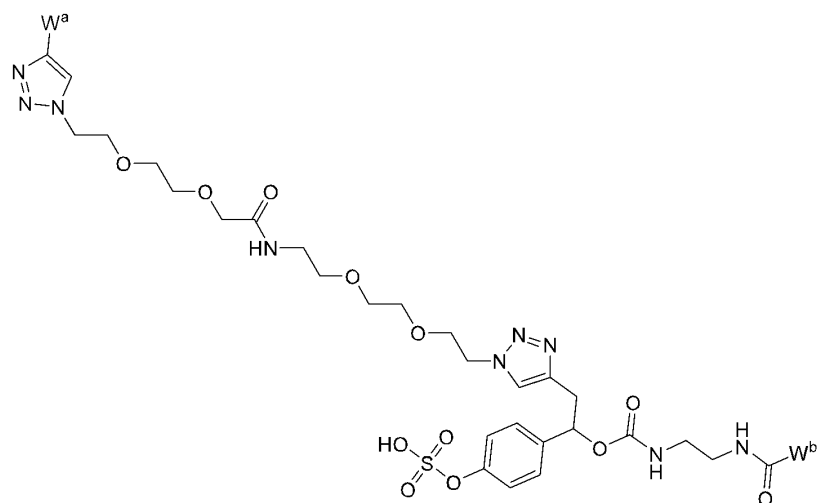
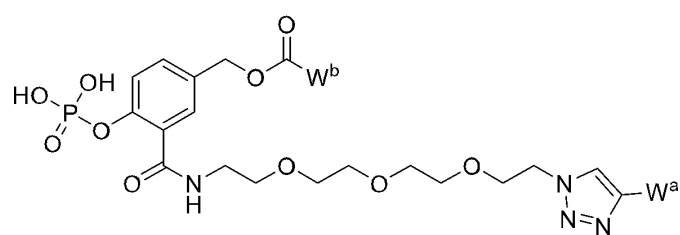
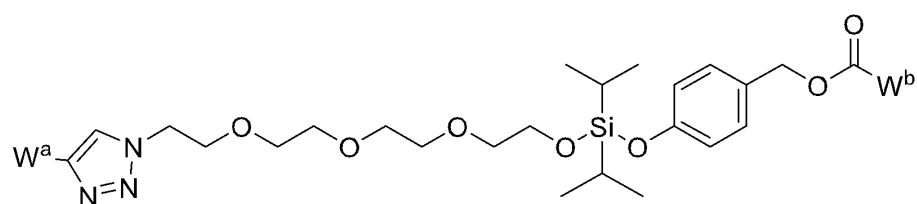
[101] 在一些实施方式中, L^1 为 、 n^1 是 0、 n^2 是 5 且 L^2 是键。

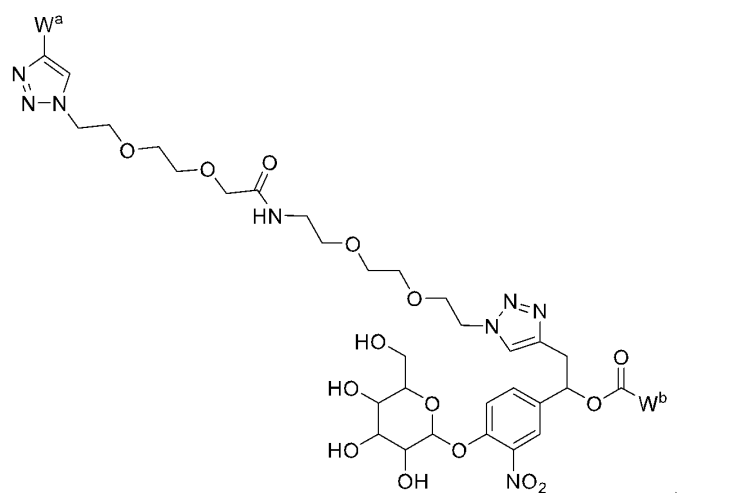
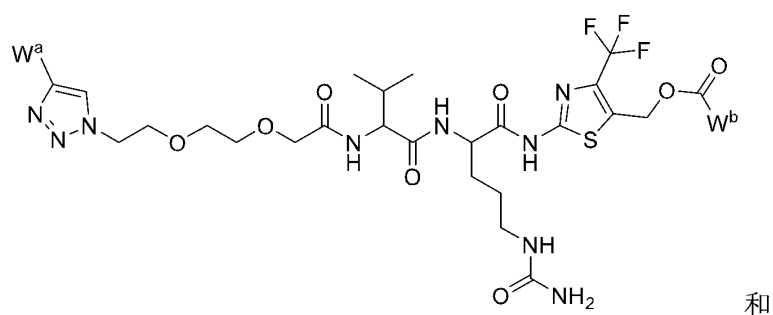
[102] 在一些实施方式中, 偶联体化合物具有选自以下组的结构:



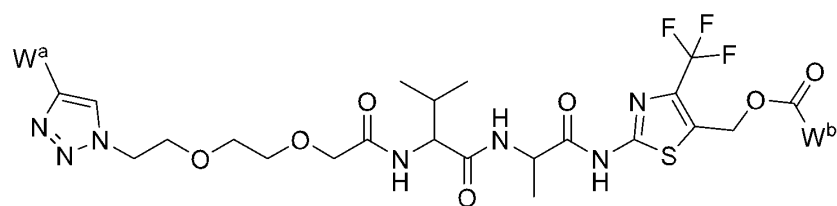






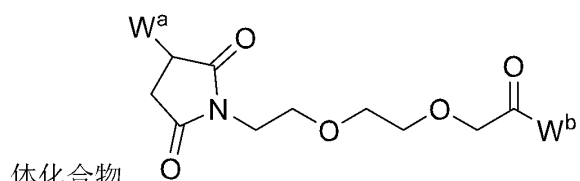


和

, 其中 W^a 和 W^b 各自独立

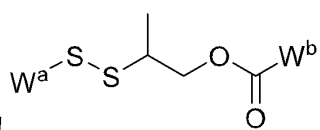
地为有效载荷或可以结合细胞表面蛋白的靶向分子。

[103] 本申请的另一个方面公开了一种偶联体化合物或其药学上可接受的盐, 所述偶联



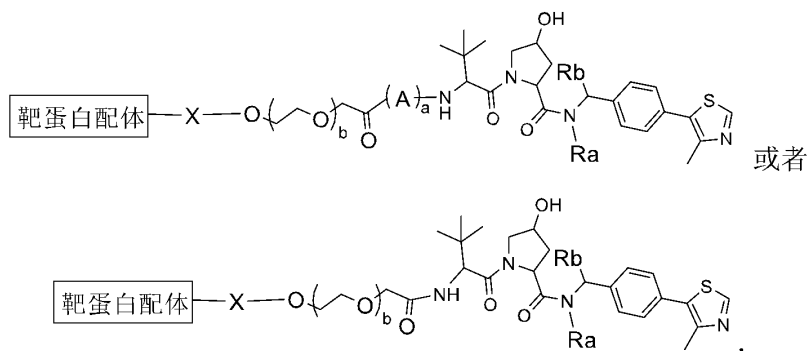
体化合物, 其中 W^a 和 W^b 各自独立地为有效载荷或可以结合细胞表面蛋白的靶向分子。

[104] 本申请的另一个方面公开了一种偶联体化合物或其药学上可接受的盐, 所述偶联



体化合物，其中 W^a 和 W^b 各自独立地为有效载荷或可以结合细胞表面蛋白的靶向分子。

[105] 本申请的另一个方面提供了一种蛋白降解靶向嵌合体或其药学上可接受的盐，所述蛋白降解靶向嵌合体化合物具有以下结构：



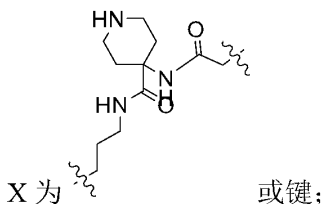
其中，

Ra 和 Rb 各自独立地为氢、烷基、 NH_2 、 OH 、或卤素；

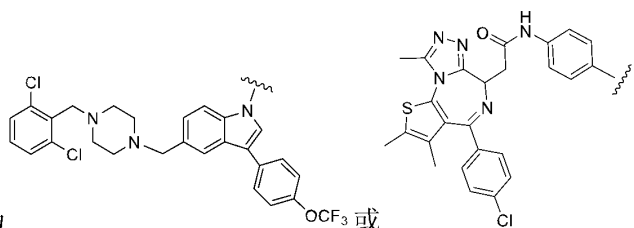
A 每次出现时独立地为氨基酸残基；

a 为 0 或 1；

b 为 0-5 的整数；



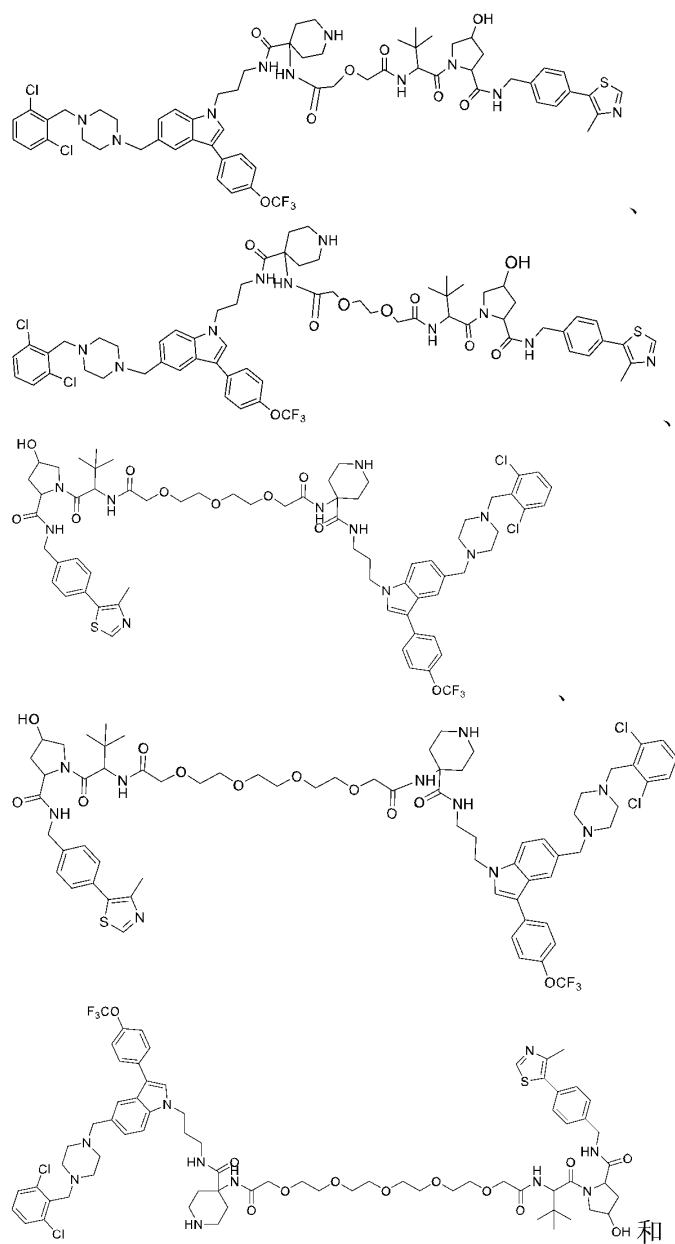
靶蛋白配体为

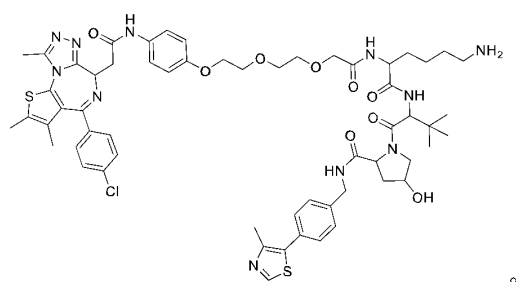


[106] 在一些实施方式中， Ra 为氢。在一些实施方式中， Rb 为氢。在一些实施方式中， A 为 Lys 形成的氨基酸残基。在一些实施方式中， a 为 1。在在实施方式中， a 为 0。在一些实施方式中， b 为 1。在一些实施方式中， b 为 2。在一些实施方式中， b 为 3。在一些

实施方式中，b 为 4。在一些实施方式中，b 为 5。

[107] 在一些实施方式中，蛋白降解靶向嵌合体具有选自以下组的结构：





附图说明

[108] 图 1 示出了示例性的本申请的偶联体化合物。

[109] 图 2 显示了化合物 CR20214 降解靶蛋白的 Western Blot 实验结果。

[110] 图 3 显示了化合物 CR20295 降解靶蛋白的 Western Blot 实验结果。

[111] 图 4 显示了化合物 CR202V6、CR202AL 降解靶蛋白的 Western Blot 实验结果。

[112] 图 5 显示了施用对照、CR20274 和本申请偶联体化合物后，人肝癌模型 HepG2 的荷瘤小鼠中肿瘤体积变化（图 5A）和人肝癌模型 HepG2 的荷瘤小鼠相较初始体重随给药时间的变化情况（图 5B）。

[113] 图 6 显示了施用对照、CR20274 和本申请偶联体化合物后，人乳腺癌模型 MDA-MB-231 的荷瘤小鼠中肿瘤体积变化（图 6A）和人乳腺癌模型 MDA-MB-231 的荷瘤小鼠相较初始体重随给药时间的变化（图 6B）。

[114] 图 7 显示了施用对照、CR20274 和本申请偶联体化合物后，人前列腺癌模型 22RV1 的荷瘤小鼠相较初始体重随给药时间的变化情况（图 7A）和人前列腺癌模型 22RV1 的荷瘤小鼠中肿瘤体积变化情况（图 7B）。

[115] 图 8 显示了施用对照、CR20274 和本申请偶联体化合物后，人前列腺癌模型 C4-2 荷瘤小鼠相较初始体重随给药时间的变化情况（图 8A）和人前列腺癌模型 C4-2 的荷瘤小鼠中肿瘤体积变化情况（图 8B）。

[116] 图 9 显示施用对照、CR20274 及本申请偶联体化合物后，人结肠癌模型 HT-29 荷瘤小鼠肿瘤体积变化情况（图 9A）和人结肠癌模型 HT-29 的荷瘤小鼠相较初始体重随给药时间的变化情况（图 9B）。

[117] 图 10 显示使用对照、CR20274 及本申请偶联体化合物后，人前列腺癌模型 22RV1

荷瘤小鼠中肿瘤体积变化情况（图 10A）和人前列腺癌模型 22RV1 相较初始体重随给药时间的变化情况（图 10B）。

具体实施方式

[118] 以下描述只为说明本申请的多种实施方式。因此，此处的具体实施方式不应理解为对申请范围的限制。本领域的技术人员基于本发明的宗旨和本文的描述，可很容易地得出多种等同方式和修改，应理解这样的等同实施方式包含在本发明范围内。在本申请中引用的所有文献，包含公开出版物、专利和专利申请都通过引用的方式全文并入本申请。

[119] 除非上下文另外明确指出，否则本文所使用的单数形式“一”、“一个”、“一种”和“该”或“所述”包括复数引用。

[120] 本文所使用的诸如“包括”、“包含”、“含有”、“含有”和“具有”等术语是包括性的或开放式的，并且不排除额外的、未叙述的要素或方法步骤。术语“由……组成”是封闭式的。

[121] 本文一方面公开了一种偶联体化合物或其药学上可接受的盐，所述偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含至少两个特异性结合细胞表面蛋白的配体的靶向分子和与所述靶向分子连接的有效载荷，其中所述有效载荷为蛋白降解靶向嵌合体。

[122] 在本申请中使用的术语“靶向分子”指的是能够靶向至靶部位、靶组织、靶器官、靶细胞或靶细胞内区域的任意分子或部分。在一些实施方式中，靶向分子使得，相比于非靶部位、非靶组织、非靶器官、非靶细胞或非靶细胞内区域，靶向分子使得连接于靶向分子的部分在靶部位、靶组织、靶器官、靶细胞或靶细胞内区域分配的更多，例如，多至少 10%、20%、50%、80%、100%、150%、200%、300%、400%、500%或更高。在一些实施方式中，靶向分子使得，相比于不带靶向分子，带有靶向分子的偶联体化合物或试剂在靶部位、靶组织、靶器官、靶细胞或靶细胞内区域分配的更多，例如，多至少 10%、20%、50%、80%、100%、150%、200%、300%、400%、500%或更高。在一些实施方式中，靶向分子能够触发或促进含有此类靶向分子的偶联体化合物与靶分子的特异性结合，触发或促进靶细胞对偶联体化合物的内吞作用，触发或促进偶联体化合物在靶细胞周围富集和/或进入靶细胞。

[123] 本申请使用的术语“配体”可以包括各种各样的化学分子或多肽，其对所选定的靶点具有特异性的结合亲和性，所选定的靶点可以是细胞表面蛋白（例如细胞表面受体或细胞表面抗原）、特定蛋白、细胞、组织、器官等。在一些实施方式中，配体可以与细胞表面受体特异性结合。在一些实施方式中，配体可以与细胞表面抗原特异性结合。在一些实施方式

中，配体可以与特定蛋白特异性结合，所述特定蛋白可以是导致疾病的。在一些实施方式中，该特定蛋白的过表达会导致疾病或者该特定蛋白是导致疾病的突变蛋白。在一些实施方式中，本申请的配体以 10^{-6} ~ 10^{-11} M (K_d 值) 的亲合性与靶点结合。在一些实施方式中，本申请的配体以至少 10^{-6} 、至少 10^{-7} 、至少 10^{-8} 或至少 10^{-9} M (K_d 值) 的亲合性与靶点结合。在一些实施方式中，本申请的配体以一定的亲合性与靶点结合，所述一定的亲合性是指与同非靶点（例如，其它细胞表面受体、细胞表面抗原或特定蛋白等）的亲合性相比，配体对靶点的亲合性高至少两倍、三倍、四倍、五倍、六倍、八倍、十倍、二十倍、五十倍、一百倍或更多倍。在一些实施方式中，本申请的细胞表面受体、细胞表面抗原、特定蛋白在靶细胞（例如，癌细胞或生理功能异常细胞）表面或靶细胞内的表达显著高于在正常细胞中的表达。在本申请中使用的术语“显著”指的是统计学上的显著差异，或者可以由本领域技术人员认识到的显著性差异。

[124] 在一些实施方式中，本申请的细胞表面受体、细胞表面抗原或特定蛋白在靶细胞（例如，癌细胞或生理功能异常细胞）表面或靶细胞内的表达水平是在正常细胞中的表达水平的 2 倍至 1,000,000 倍，例如在靶细胞（例如，癌细胞或生理功能异常细胞）中的表达水平比在正常细胞中的表达水平高 2 倍至 10 倍、2 倍至 100 倍、2 倍至 1,000 倍、2 倍至 10,000 倍、2 倍至 100,000 倍或 2 倍至 1,000,000 倍（可以等于上述数值范围内的任意值，包括该范围的端点）。在一些实施方式中，细胞表面受体在靶细胞（例如，癌细胞或生理功能异常细胞）中的表达水平比在正常细胞中的表达水平高至少 10 倍、至少 100 倍、至少 1,000 倍、至少 10,000 倍或者至少 100,000 倍。在一些实施方式中，当与靶细胞（例如，癌细胞或生理功能异常细胞）表达的细胞表面受体、细胞表面抗原或特定蛋白的水平比较时，正常细胞上的细胞表面受体、细胞表面抗原或特定蛋白的水平降低至少 50%、60%、70%、80%、90%、95% 或 99%。在一些实施方式中，本申请所述的细胞表面受体、细胞表面抗原或特定蛋白在正常细胞中是不能检测到的。

[125] 在一些实施方式中，细胞表面受体选自 FOLR1、TRPV6 或 c-Met。在一些实施方式中，细胞表面抗原选自 PSMA。

[126] 在一些实施方式中，特定蛋白选自核受体（例如，AR 和 ER）、激酶类蛋白（例如，RIPK2、BCR-ABL、EGFR、HER2、c-Met、TBK1、CDK2/4/6/9、ALK、Akt、CK2、ERK1/2、FLT3、PI3K、BTK 和 FAK）AKT、PAN-BET 蛋白、BET 蛋白（例如，BRD2、BRD3、BRD4 和 BRD6）、BLK、BRAF1、BCL-xl、ERR α 、FKBP12、FRS2 α 、JAK1、JAK3、

IKZF1、IRAK4、MDM2、MetAP2、PLK1、PSK-J3、RAS、TACC3、Tau、TrkB、MDM2 或其任意组合物。在一些实施方式中，特定蛋白选自 AR 蛋白、ER 蛋白、RAS 蛋白、BRD4 蛋白、PLK1 蛋白、FAK 蛋白、MDM2 蛋白或其任意组合物。在一些实施方式中，蛋白降解靶向嵌合体中的靶蛋白配体部分靶向该特定蛋白。

[127] 叶酸受体 1 (FOLR1) 是一种糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 锚定的糖蛋白，它以纳摩尔的亲和力结合叶酸，从而促进受体介导的内吞作用。快速生长的实体恶性肿瘤，包括卵巢癌和肺癌，都依赖于叶酸进行代谢和核酸合成。在一些实施方式中，本申请所述的靶向分子包括靶向 FOLR1 的配体。

[128] 特异性结合 FOLR1 的配体或“FOLR1 配体”是指能特异性识别并结合 FOLR1 的抗体、多肽、核酸适配体和小分子等。本申请的 FOLR1 配体包括目前已经存在的或者之后产生的 FOLR1 配体。在一些实施方式中，FOLR1 配体包括叶酸或其类似物和蝶呤。本文中所使用的术语“类似物”包括结构类似物与功能类似物。其中结构类似物是指具有相似化学结构的一类化合物，它们之间可以存在一个或多个不同的原子、或一个或多个不同的官能团。功能类似物是指具有相同或相似的化学作用、生物作用或药理学作用的一类化合物。在一些实施方式中，叶酸类似物选自下组：5-甲基四氢叶酸、5-甲酰基四氢叶酸、10-甲酰四氢叶酸甲氨蝶呤、5,10-甲酰四氢叶酸、5,10-亚甲基四氢叶酸、氨基蝶呤和雷替曲塞。

[129] 瞬时受体阳离子通道亚家族 V 成员 6 (transient receptor potential cation channel subfamily V member 6)，即 TRPV6，是一种高选择性钙离子跨膜转运通道，介导钙离子由细胞外向细胞内的主动转运。TRPV6 在人正常的肾脏、胃肠道、胰腺、乳腺、唾液腺等中有表达，但是主要表达于肠上皮细胞，其参与钙离子向细胞内的转运，因此当 TRPV6 通道的数量或功能发生改变时，可引起钙离子调节的变化，进一步导致与其相关组织器官的结构或功能异常。和正常组织相比，TRPV6 在乳腺癌、胆管癌、卵巢癌、肺鳞癌、前列腺癌等恶性肿瘤中表达明显升高，其异常表达可能与肿瘤的形成与进展有关。

[130] 特异性结合 TRPV6 的配体或“TRPV6 配体”是指能特异性识别并结合 TRPV6 的抗体、多肽、核酸适配体和小分子等。本申请的 TRPV6 配体包括目前已经存在的或者之后产生的 TRPV6 配体。在一些实施方式中，TRPV6 配体包括由 SEQ ID NO: 1

(KEFLHPSKVDLPR) 所示的氨基酸序列、由 SEQ ID NO: 2

(EGKLSSNDTEGGLCKEFLHPSKVDLPR) 所示的氨基酸序列、或与 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 2 具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 序列同一性的氨基酸

序列。

[131] 前列腺特异性膜抗原（PSMA），是指存在于前列腺上皮细胞膜的一种 II 型跨膜糖蛋白，由 750 个氨基酸组成，其具有 19 个胞内区氨基酸、24 个跨膜区氨基酸和 707 个胞外区氨基酸。前列腺特异性膜抗原在正常前列腺上皮细胞中表达，但其在前列腺癌细胞中的表达水平要高得多。相对于传统用于临床检测的前列腺特异抗原，前列腺特异性膜抗原是一种更加敏感和特异的前列腺癌肿瘤标记物，尤其是在激素难治性前列腺癌及前列腺癌转移灶中均为高表达，在区分前列腺癌和其他类型恶性肿瘤时具有高敏感度和特异性。同时，在多种非前列腺来源的实体瘤（如肺癌、膀胱癌、胃癌、胰腺癌、肾癌和结直肠癌等）中，前列腺特异性膜抗原也高度特异地表达于肿瘤血管内皮细胞上。

[132] 特异性结合前列腺特异性膜抗原的配体或“前列腺特异性膜抗原配体”是指能特异性识别并结合前列腺特异性膜抗原的抗体、多肽、核酸适配体和小分子等。本申请的前列腺特异性膜抗原配体包括目前已经存在的或者之后产生的前列腺特异性膜抗原配体，还包括前述配体的片段，只要这些片段还保留与前列腺特异性膜抗原结合的能力。抗体类配体是最常见的前列腺特异性膜抗原配体，其包括但不限于单克隆抗体 J591、J533、J415 和 E99（例如，参见 Liu H, Rajasekaran AK, Moy P 等人 *Constitutive and antibody-induced internalization of prostate-specific membrane antigen* [J]. *Cancer Res.*, 1998, 58 (18): 4055-4060）。核酸适配体是经过指数富集配体系统进行技术筛选得到的能与前列腺特异性膜抗原高亲和性、高特异性结合的单链 DNA 或 RNA，该类前列腺特异性膜抗原配体包括但不限于 xPSM-A10 核酸适配体及其衍生物和 xPSM-A9 核酸适配体及其衍生物（例如，参见 Lupoid SE 等人，*Identification and Characterization of nuclease-stabilized RNA molecules that bind human prostate cancer cells via the prostate-specific membrane antigen*, *Cancer Res.*, 2002, 62(14):4029-4033）。相比于抗体类和核酸适配体类配体，前列腺特异性膜抗原小分子配体具有分子量小、高渗透性、低免疫原性、易于合成等优势，其包括但不限于谷胺酰脲类小分子配体和氨基磷酸酯类小分子配体。

[133] 在本文中使用的在本申请中使用的术语“多肽”、“蛋白”和“肽”可以是单个氨基酸或者氨基酸的聚合物。如本申请所述的多肽、蛋白或肽可以含有天然存在的氨基酸，以及非天然存在的氨基酸，或者氨基酸的类似物和模拟物。可以通过本领域熟知的任何方法获得多肽、蛋白或肽，例如但不限于从天然物质中分离和纯化、重组表达、化学合成等。在一些实施方式中，多肽包括 2-50、2-40、2-30、2-25、2-22、2-20、2-18、2-15、2-12、2-10、2-8、4-50、5-50、5-40、5-30、5-25、5-22、5-20、5-18、5-15、5-12、5-10、6、7、8 或 9 个氨基

酸。

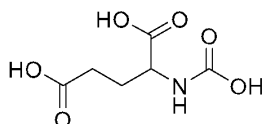
[134] 在本文中使用的“小分子配体”指的是具有小于或等于约 3kDa 分子量的化合物。在一些实施方式中，小分子化合物具有小于或等于约 2kDa 的分子量。在一些实施方式中，小分子化合物具有小于或等于约 1.5kDa 的分子量。在一些优选的实施方式中，小分子化合物具有小于或等于约 1kDa、800Da、700Da、600Da 或 500Da 的分子量。

[135] 在一些实施方式中，本申请的前列腺特异性膜抗原小分子配体可以选自由以下组成的组：2-[[甲基羟基氧膦基]甲基]戊二酸；2-[[乙基羟基氧膦基]甲基]戊二酸；2-[[丙基羟基氧膦基]甲基]戊二酸；2-[[丁基羟基氧膦基]甲基]戊二酸；2-[[环己基羟基氧膦基]甲基]戊二酸；2-[[苯基羟基氧膦基]甲基]戊二酸；2-[[2-(四氢呋喃基)羟基氧膦基]甲基]戊二酸；2-[[2-(四氢吡喃基)羟基氧膦基]甲基]戊二酸；2-[[[(4-吡啶基)甲基]羟基氧膦基]甲基]戊二酸；2-[[[(2-吡啶基)甲基]羟基氧膦基]甲基]戊二酸；2-[[[(2-苯基乙基)甲基]羟基氧膦基]甲基]戊二酸；2-[[[(3-苯基丙基)甲基]羟基氧膦基]甲基]戊二酸；2-[[[(3-苯基丁基)甲基]羟基氧膦基]甲基]戊二酸；2-[[[(2-苯基丁基)甲基]羟基氧膦基]甲基]戊二酸；2-[[[(4-苯基丁基)羟基氧膦基]甲基]戊二酸；和 2-[[[(氨基)羟基氧膦基]甲基]戊二酸；2-[[[甲基羟基氧膦基]氧]戊二酸；2-[[[乙基羟基氧膦基]氧]戊二酸；2-[[[丙基羟基氧膦基]氧]戊二酸；2-[[[丁基羟基氧膦基]氧]戊二酸；2-[[[苯基羟基氧膦基]氧]戊二酸；2-[[[(4-吡啶基)甲基]羟基氧膦基]氧]戊二酸；2-[[[(2-吡啶基)甲基]羟基氧膦基]氧]戊二酸；2-[[[(苯基甲基)羟基氧膦基]氧]戊二酸；和 2-[[[(2-苯基乙基)甲基]羟基氧膦基]氧]戊二酸；2-[[[(N-羟基)氨基甲酰]甲基]戊二酸；2-[[[(N-羟基-N-甲基)氨基甲酰]甲基]戊二酸；2-[[[(N-丁基-N-羟基)氨基甲酰]甲基]戊二酸；2-[[[(N-苄基-N-羟基)氨基甲酰]甲基]戊二酸；2-[[[(N-羟基-N-苯基)氨基甲酰]甲基]戊二酸；2-[[[(N-羟基-N-2-苯基乙基)氨基甲酰]甲基]戊二酸；2-[[[(N-乙基-N-羟基)氨基甲酰]甲基]戊二酸；2-[[[(N-羟基-N-丙基)氨基甲酰]甲基]戊二酸；2-[[[(N-羟基-N-3-苯基丙基)氨基甲酰]甲基]戊二酸；2-[[[(N-羟基-N-4-吡啶基)氨基甲酰]甲基]戊二酸；2-[[[(N-羟基)酰胺]甲基]戊二酸；2-[[[(N-羟基(甲基)酰胺]甲基]戊二酸；2-[[[(N-羟基(苄基)酰胺]甲基]戊二酸；2-[[[(N-羟基(苯基)酰胺]甲基]戊二酸；2-[[[(N-羟基(2-苯基乙基)酰胺]甲基]戊二酸；2-[[[(N-羟基(乙基)酰胺]甲基]戊二酸；2-[[[(N-羟基(丙基)酰胺]甲基]戊二酸；2-[[[(N-羟基(3-苯基丙基)酰胺]甲基]戊二酸；和 2-[[[(N-羟基(4-吡啶基)酰胺]甲基]戊二酸；2-[[[(亚硫酰基)甲基]戊二酸；2-[[[(甲基亚硫酰基)甲基]戊二酸；2-[[[(乙基亚硫酰基)甲基]戊二酸；2-[[[(丙基亚硫酰基)甲基]戊二酸；2-[[[(丁基亚硫酰基)甲基]戊二酸；2-[[[(苯基亚硫酰基)甲基]戊二酸；2-[[[(2-苯基乙基)亚硫酰基]甲基]戊二

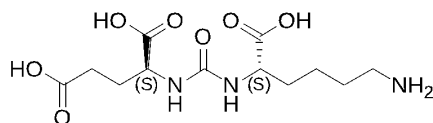
酸；2-[[[(3-苯基丙基)亚硫酸基]甲基]戊二酸；2-[[[(4-吡啶基)亚硫酸基]甲基]戊二酸；2-[(苄基亚硫酸基)甲基]戊二酸；2-[(磺酰基)甲基]戊二酸；2-[(甲磺酰基)甲基]戊二酸；2-[(乙磺酰基)甲基]戊二酸；2-[(丙磺酰基)甲基]戊二酸；2-[(丁磺酰基)甲基]戊二酸；2-[(苯基磺酰基)甲基]戊二酸；2-[[[(2-苯基乙基)磺酰基]甲基]戊二酸；2-[[[(3-苯基丙基)磺酰基]甲基]戊二酸；2-[[[(4-吡啶基)磺酰基]甲基]戊二酸；2-[(苄基磺酰基)甲基]戊二酸；2-[(亚砷亚胺基(sulfoximinyl))甲基]戊二酸；2-[(甲基亚砷亚胺基)甲基]戊二酸；2-[(乙基亚砷亚胺基)甲基]戊二酸；2-[(丙基亚砷亚胺基)甲基]戊二酸；2-[(丁基亚砷亚胺基)甲基]戊二酸；2-[(苯基亚砷亚胺基)甲基]戊二酸；2-[[[(2-苯基乙基)亚砷亚胺基]甲基]戊二酸；2-[[[(3-苯基丙基)亚砷亚胺基]甲基]戊二酸；2-[[[(4-吡啶基)亚砷亚胺基]甲基]戊二酸；和2-[(苄基亚砷亚胺基)甲基]戊二酸；N-[甲基羟基氧磷基]谷氨酸；N-[乙基羟基氧磷基]谷氨酸；N-[丙基羟基氧磷基]谷氨酸；N-[丁基羟基氧磷基]谷氨酸；N-[苯基羟基氧磷基]谷氨酸；N-[(苯基甲基)羟基氧磷基]谷氨酸；N-[[[(2-苯基乙基)甲基]羟基氧磷基]谷氨酸；和N-甲基-N-[苯基羟基氧磷基]谷氨酸。本申请的前列腺特异性膜抗原配体还包括PCT申请WO2010/108125和WO2006/093991中公开的所有前列腺特异性膜抗原小分子配体，上述两个专利申请以其全部内容并入本文。

[136] 在一些实施方式中，本申请的前列腺特异性膜抗原配体是戊二酸衍生物。在一些实施方式中，本申请的前列腺特异性膜抗原配体是戊二酸的氨基衍生物。

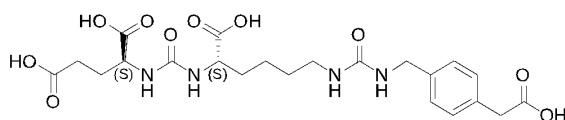
[137] 在一些实施方式中，本申请的前列腺特异性膜抗原配体包括如下结构：



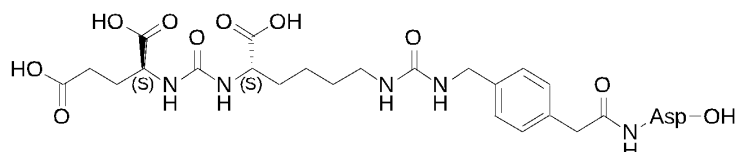
[138] 在一些实施方式中，偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含的前列腺特异性膜抗原配体包括如下结构：



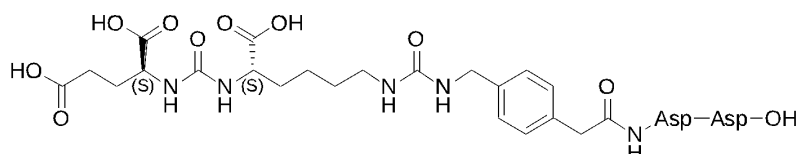
[139] 在一些实施方式中，偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含的前列腺特异性膜抗原配体包括如下结构：



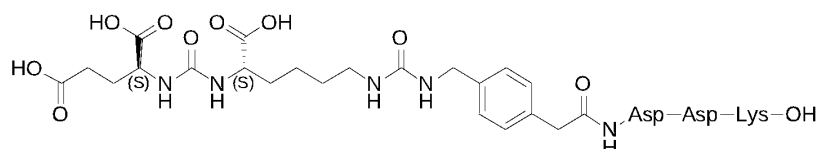
[140] 在一些实施方式中，偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含的前列腺特异性膜抗原配体包括如下结构：



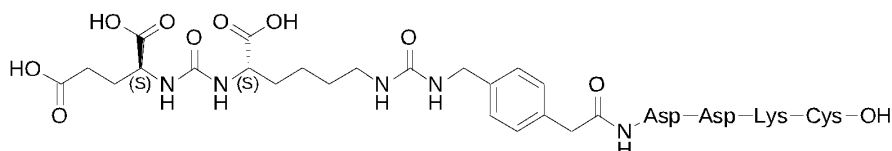
[141] 在一些实施方式中，偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含的前列腺特异性膜抗原配体包括如下结构：



[142] 在一些实施方式中，偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含的前列腺特异性膜抗原配体包括如下结构：



[143] 在一些实施方式中，偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含的前列腺特异性膜抗原配体包括如下结构：



[144] C-MET 是一种由 C-MET 原癌基因编码的蛋白产物，为肝细胞生长因子（HGF）的受体，具有酪氨酸激酶活性，与多种癌基因产物和调节蛋白相关，参与细胞信息传导、细胞骨架重排的调控，是细胞增殖、分化和运动的重要因素。C-MET 与多种癌的发生和转移密切相关。研究表明，许多肿瘤病人在其肿瘤的发生和转移过程中均有 C-MET 过度表达和基因扩增。由于 C-MET 在不同细胞、不同分化阶段作用的底物不同，使其在特定的条件下表现出多种功能，例如促进肝细胞、内皮细胞和黑色素细胞的分裂、引起上皮细胞的分散和诱导细胞形态变化。在一些实施方式中，本申请所述的靶向分子包括靶向 C-MET 的配体。

[145] 特异性结合 C-MET 的配体或“C-MET 配体”是指能特异性识别并结合 C-MET 的抗体、多肽、核酸适配体和小分子等。本申请的 C-MET 配体包括目前已经存在的或者之后产

生的 C-MET 配体。在一些实施方式中，C-MET 配体包括由 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列：Cys^a-X1-Cys^c-X2-Gly-Pro-Pro-X3-Phe-Glu-Cys^d-Trp-Cys^b-Tyr-X4-X5-X6；其中 X1 为 Asn、His 或 Tyr；X2 为 Gly、Ser、Thr 或 Asn；X3 为 Thr 或 Arg；X4 为 Ala、Asp、Glu、Gly 或 Ser；X5 为 Ser 或 Thr；X6 为 Asp 或 Glu；Cys^{a-d} 各自为半胱氨酸残基。在一些优选的实施方式中，残基 Cys^a 与 Cys^b 以及 Cys^c 与 Cys^d 分别环化形成两个独立的二硫键。在一些实施方式中，c-MET 的配体包括由 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列 Ala-Gly-Ser-Cys^a-Tyr-Cys^c-Ser-Gly-Pro-Pro-Arg-Phe-Glu-Cys^d-Trp-Cys^b-Tyr-Glu-Thr-Glu-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Lys，其中 Cys^{a-d} 各自为半胱氨酸残基。在一些优选的实施方式中，残基 Cys^a 与 Cys^b 以及 Cys^c 与 Cys^d 分别环化形成两个独立的二硫键。在一些优选的实施方式中，末端赖氨酸的羧基可以被酰胺化。本申请的 C-MET 配体还包括 PCT 申请 WO2008139207A3 中公开的所有 C-MET 配体，该文献公开的所有内容通过引用的方式并入本文。

[146] 文本使用的氨基酸的对应的中文名称和简写如下表所示。本申请中使用的术语“氨基酸”或具体的氨基酸中文名称或氨基酸简写旨在包括其所有的立体异构体，例如 L-构型和 D-构型。例如文申请使用的“Arg”可以是 L-Arg 或 D-Arg。例如，酰胺化的 Lys 可以是 L-2,6-二氨基己酰胺或 D-2,6-二氨基己酰胺。

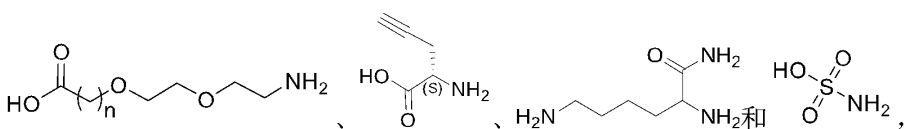
中文名称	符号与缩写
丙氨酸	A 或 Ala
精氨酸	R 或 Arg
天冬酰胺	N 或 Asn
天冬氨酸	D 或 Asp
半胱氨酸	C 或 Cys
谷氨酸	E 或 Glu
谷氨酰胺	Q 或 Gln
甘氨酸	G 或 Gly
组氨酸	H 或 His
亮氨酸	L 或 Leu
异亮氨酸	I 或 Ile
赖氨酸	K 或 Lys
甲硫氨酸	M 或 Met
苯丙氨酸	F 或 Phe
脯氨酸	P 或 Pro
丝氨酸	S 或 Ser
苏氨酸	T 或 Thr
色氨酸	W 或 Trp

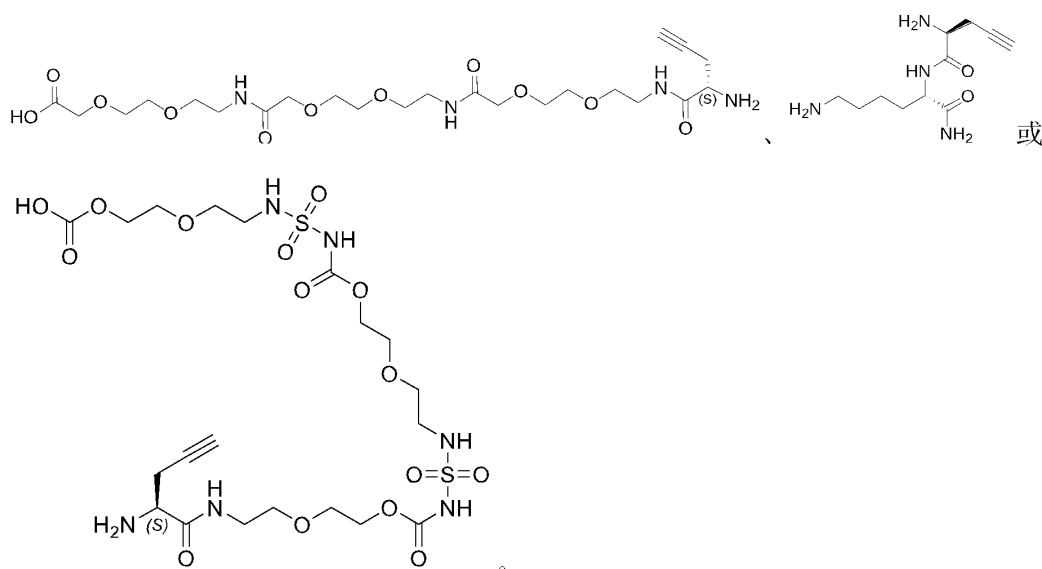
酪氨酸	Y 或 Tyr
缬氨酸	V 或 Val

[147] 在一些实施方式中，靶向分子中的配体直接连接或者通过间隔区相互连接。在一些优选的实施方式中，配体与配体之间或配体与间隔区之间的连接通过脱水缩合的方式进行。本文所使用的“脱水缩合”是指两个基团发生反应，脱去一个分子的水并形成新的化学键的过程。例如一个氨基酸中的氨基（-NH₂）和另一个氨基酸中的羧基（-COOH）发生反应，脱去一个分子的水并形成新的肽键。

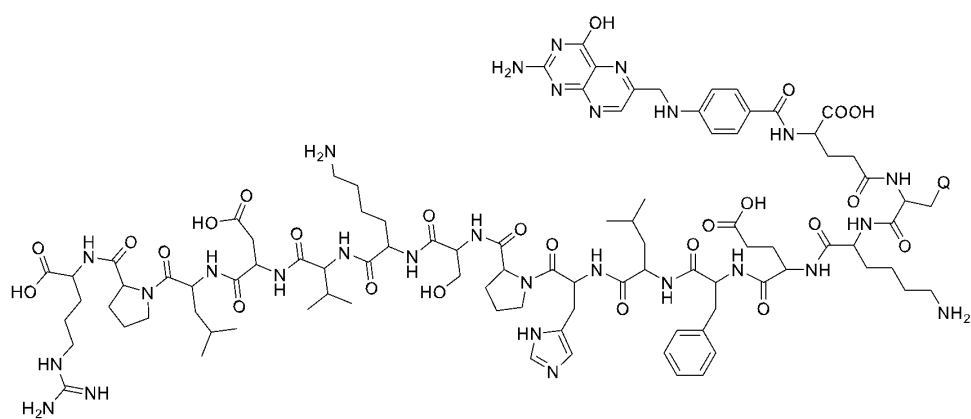
[148] 在一些实施方式中，间隔区包含选自下组的氨基酸或氨基酸组合：Lys、Cys、Lys-Cys、Cys-Cys、Lys-Cys-Lys、Arg-Arg、Ala-Ser-Asn、Ala-Ala-Ala、Ser-Ser-Arg、Pro-Arg、Asp-Asp-Lys-Cys 和 Pro-Leu-Gly。任选的，间隔区的氨基酸可以被酰胺化。在一些优选的实施方式中，赖氨酸（Lys）被酰胺化，例如，酰胺化成为 2,6-二氨基己酰胺。

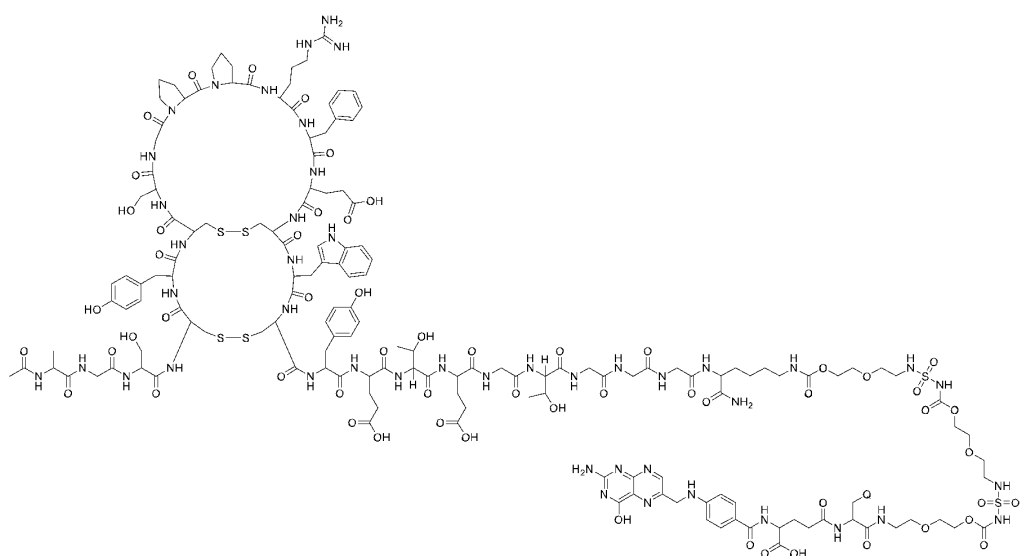
[149] 在一些实施方式中，间隔区包含一个或多个相同或不同的选自下组的化合物通过

脱水缩合形成：，其中 n 为 0 或 1。在一些实施方式中，间隔区可以是



[150] 在一些实施例中，具有以下结构部分的靶向分子与有效载荷进行连接以形成偶联体化合物，

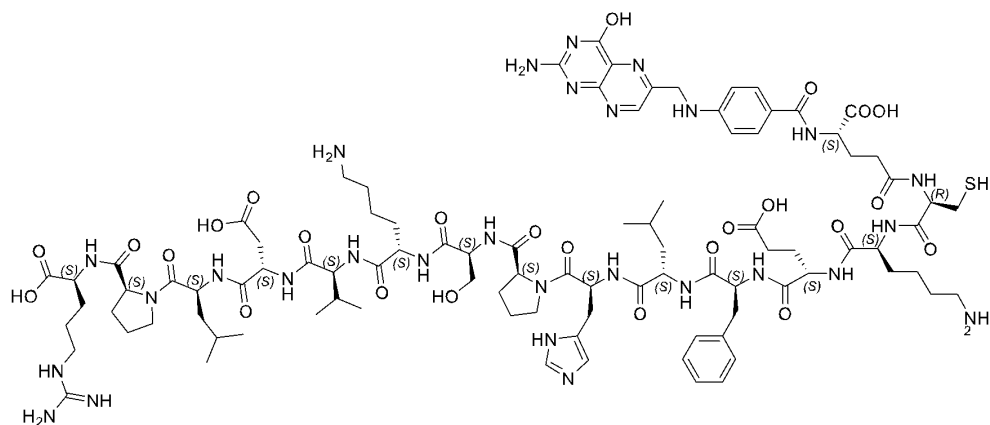


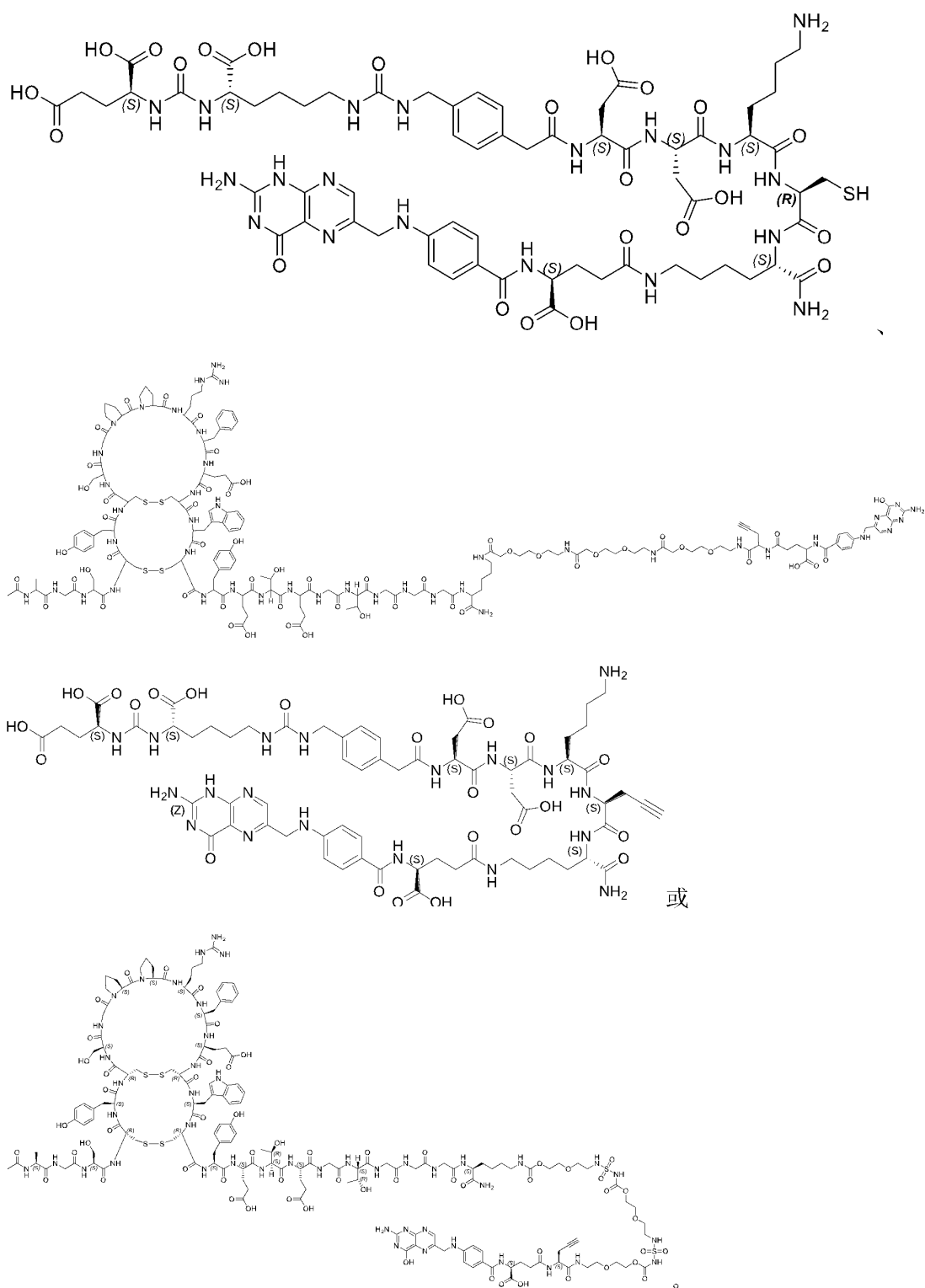


其中，Q 为活性基团；

在一些实施方式中，上述靶向分子通过活性基团 Q 与有效结构连接，其中活性基团 Q 为炔基或巯基。

[151] 在一些实施方式中，具有以下结构的靶向分子与有效载荷进行连接以形成偶联体化合物：



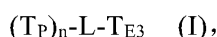


[152] 在本申请中使用的术语“有效载荷”指的是拟递送至靶细胞或组织的分子或物质。

在一些实施方式中，有效载荷可以是用于诊断、治疗或预防对象中的疾病的分子或物质。非限制性地，有效载荷可以是旨在用于诊断、治疗或预防对象中的疾病的蛋白降解靶向嵌合体。

[153] 在一些实施方式中，所述蛋白降解靶向嵌合体具有结合靶蛋白（特定蛋白）的靶蛋白配体部分，结合 E3 连接酶的 E3 连接酶配体部分，以及连接靶蛋白配体部分和 E3 连接酶配体部分的连接部分。本申请的蛋白降解靶向嵌合体包括目前已经存在的或者之后产生的蛋白降解靶向嵌合体。本申请的蛋白降解靶向嵌合体还包括 PCT 申请 WO2021205391A1；美国申请 US20190151457A1；和中国申请 CN113563414、CN104736569A 和 CN108366992A 中公开的所有蛋白降解靶向嵌合体，这些文献公开的所有内容通过引用的方式并入本文。

[154] 在一些实施方式中，具有式 (I) 所示结构的蛋白降解靶向嵌合体与靶向分子进行连接以形成偶联体化合物：



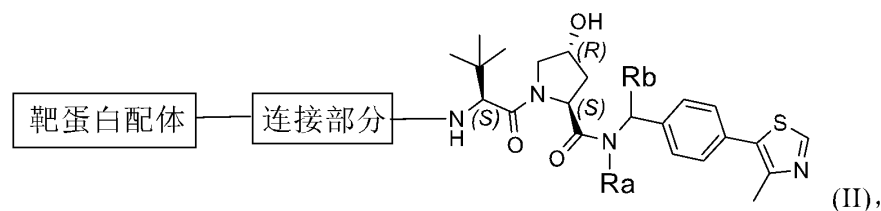
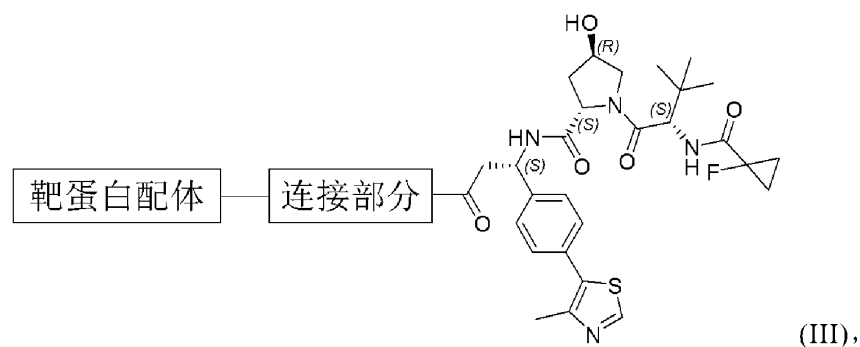
其中，

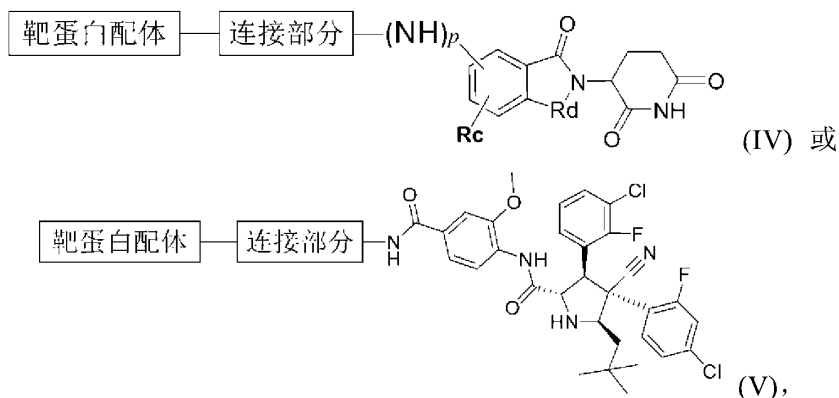
所述 T_P 为结合靶蛋白的靶蛋白配体部分，其中 n 为 1、2 或 3；

所述 L 为连接 T_P 和 T_{E3} 的连接部分；

所述 T_{E3} 为结合 E3 连接酶的 E3 连接酶配体部分。

[155] 在一些实施方式中，蛋白降解靶向嵌合体具有选自以下组的结构：





其中,

R_a 、 R_b 和 R_c 各自独立地为氢、烷基、 NH_2 、 OH 、或卤素, 优选地, 所述烷基为甲基, 所述卤素为氟;

R_d 为 CH_2 、 $C=O$ 或 $C=S$;

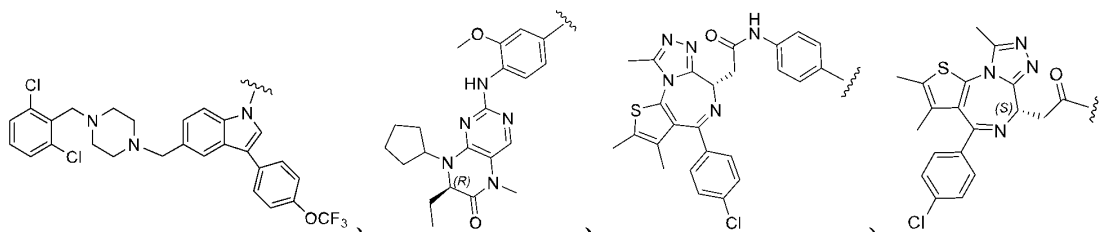
p 为 0 或 1;

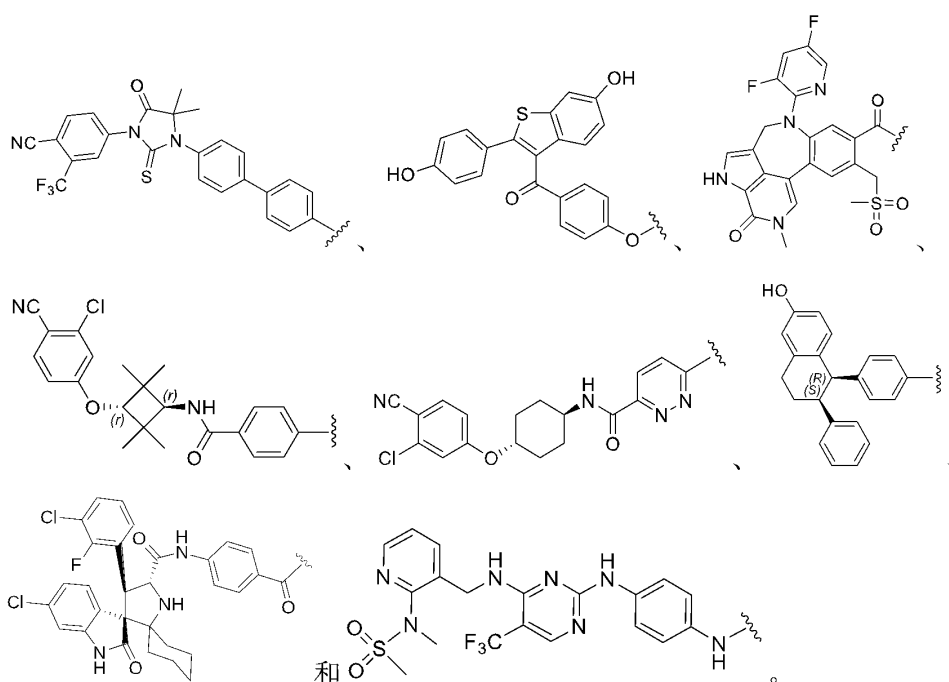
所述靶蛋白配体能结合特定的靶蛋白;

所述靶蛋白配体通过所述连接部分连接至 E3 连接酶基团。

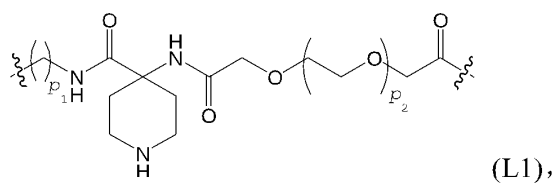
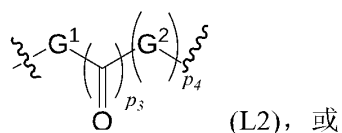
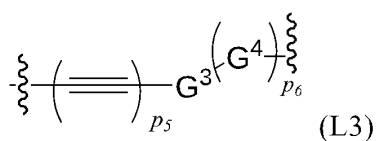
[156] 在一些实施方式中, 靶蛋白为本文所述的特定蛋白。在一些实施方式中, 靶蛋白选自核受体 (例如, AR 和 ER)、激酶类蛋白 (例如, RIPK2、BCR-ABL、EGFR、HER2、c-Met、TBK1、CDK2/4/6/9、ALK、Akt、CK2、ERK1/2、FLT3、PI3K、BTK 和 FAK) AKT、PAN-BET 蛋白、BET 蛋白 (例如, BRD2、BRD3、BRD4 和 BRD6)、BLK、BRAF1、BCL-xl、ERR α 、FKBP12、FRS2 α 、JAK1、JAK3、IKZF1、IRAK4、MDM2、MetAP2、PLK1、PSK-J3、RAS、TACC3、Tau、TrkB、MDM2 或其任意组合物。在一些优选的实施方式中, 靶蛋白选自 AR 蛋白、ER 蛋白、RAS 蛋白、BRD4 蛋白、PLK1 蛋白、FAK 蛋白、MDM2 蛋白或其任意组合物。在一些实施方式中, 特定蛋白的蛋白降解靶向嵌合体中的靶蛋白。

[157] 在一些实施方式中, 本文公开的靶蛋白配体部分具有选自以下的结构:





[158] 在一些实施方式中，蛋白降解靶向嵌合体中的连接部分具有选自下组的结构：



其中，

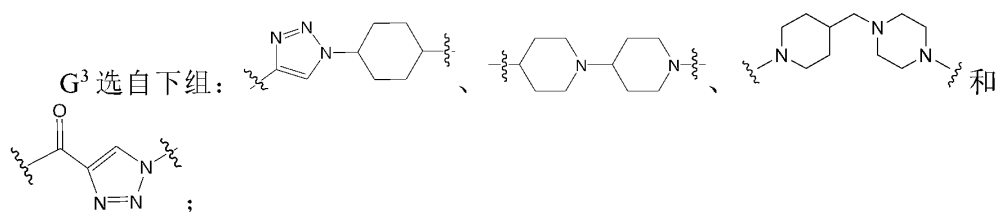
p_1 为 0-4 的整数；

p_2 为 0-6 的整数；

p_3 、 p_4 、 p_5 和 p_6 各自独立地为 0 或 1；

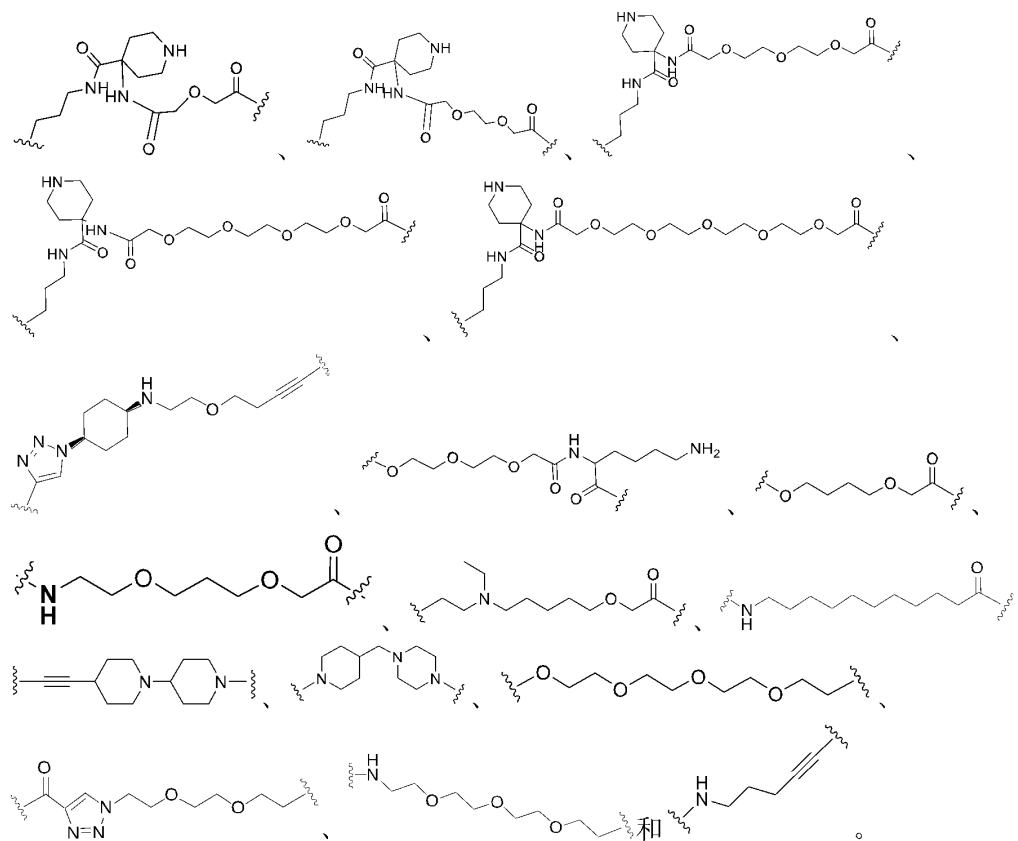
G^1 为 4-14 元直链亚烷基，任选地，所述 4-14 元直链亚烷基中的 2-5 个碳原子可以被 -O-、-NH-、-N(C₁₋₆ 烷基)-或 -C≡C- 取代；

G^2 为氨基酸残基，其中优选地，所述 G^2 为 Lys 残基；



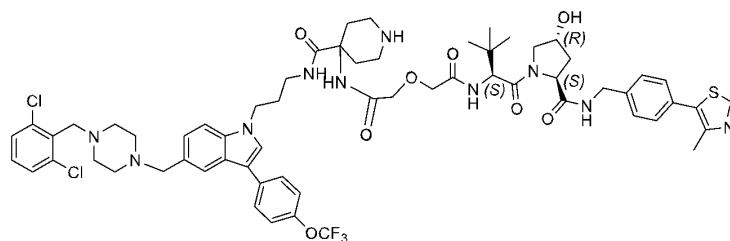
G^4 为 5-9 元直链亚烷基, 任选地, 所述 5-9 元直链亚烷基中的 2-4 个碳原子可以被 -O-、-NH-、-N(C₁₋₆ 烷基)-或 -C≡C- 取代。

[159] 一些实施方式中, 本文公开的蛋白降解靶向嵌合体中的连接部分具有选自下组的结构

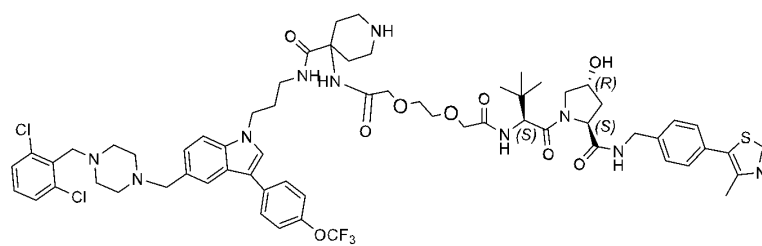


[160] 在一些实施方式中, 本文公开的蛋白降解靶向嵌合体具有如下所示的结构:

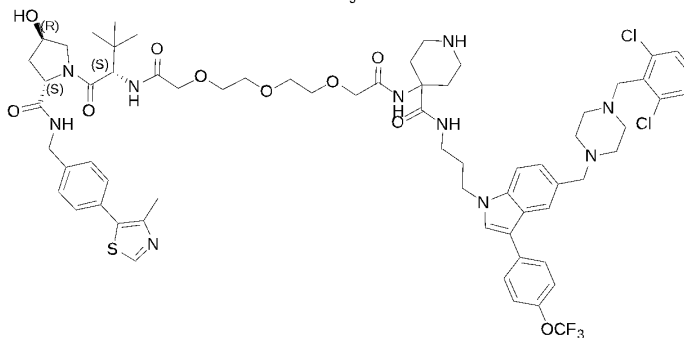
CR202CC



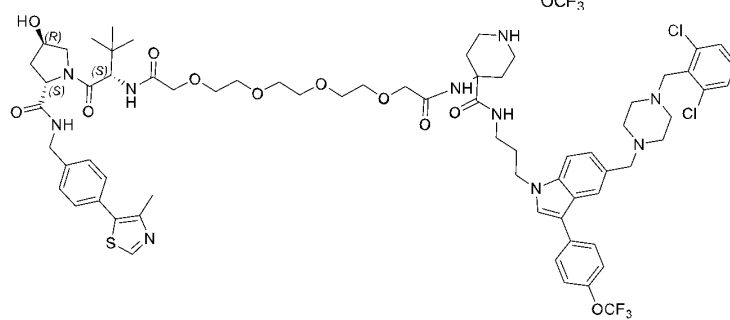
CR202CF



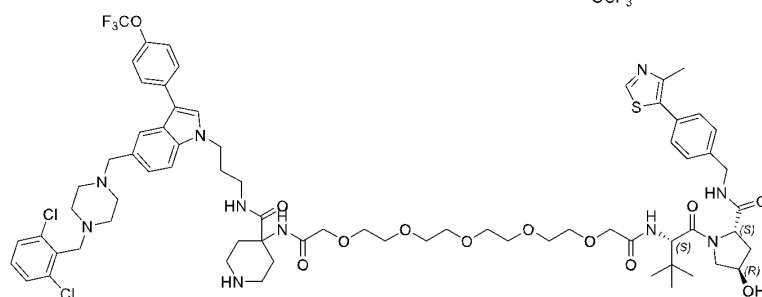
CR202CI



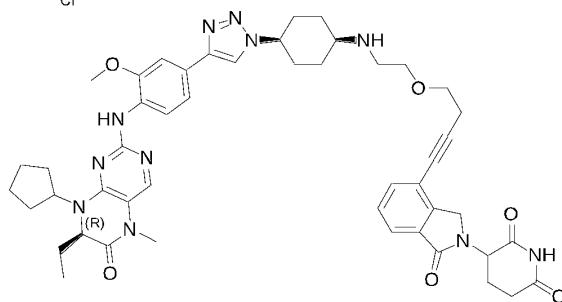
CR202CL



CR202CP



CR20274

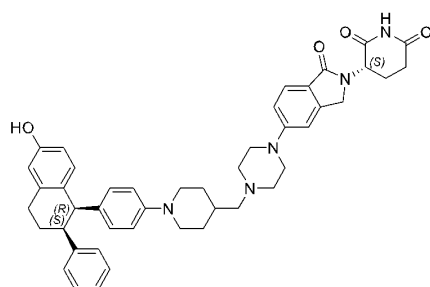


CC1=C(C)SC2=C1N3C(=N2)N(C)N=C3C(=O)Nc1ccc(OCCOCCOCC(=O)NC(=O)C[C@H](N)C[C@H](C(C)(C)C)C(=O)N[C@@H](Cc1ccc(cc1)-c2sc(C)n2)C(=O)O)cc1CN1C=NC2=C(C1)SC(=S)N2C3=CC=C(C=C3)C4=CC=C(C=C4)OCCCCCOCC(=O)N[C@@H](C(C)(C)C)C(=O)N[C@H]5C[C@H](O)[C@@H](C5)C(=O)NCC6=CC=C(C=C6)C7=NC(=N)SC7

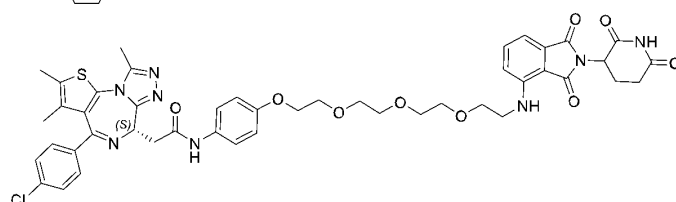
The chemical structure of compound 6 features a central thiazine ring system. It is substituted at position 2 with a 4-chlorophenyl group, at position 5 with a methylthio group, and at position 6 with a complex side chain. This side chain includes a carbonyl group linked to a chiral center (S), which is further connected to a tetrahydrofuran ring bearing a hydroxyl group (R) and another chiral center (S). The entire molecule is labeled as compound 6.

CC1(C)C[C@H](C(=O)N[C@@H](C)C2=CC=C(C=C2)c3ncsc3)[C@H](C(=O)N[C@@H](C)C4[C@H](O)CC[C@H]4C)[C@@H](C(=O)OCCN(CC)CCOCCOC(=O)N[C@@H](C(C)(C)C)C(=O)OCCc5ccc(cc5)C(=O)c6sc7cc(O)ccc7c6)C1CN1C=NC2=C1S=C(C2)C3=CC=C(C=C3)CN[C@@H](C(=O)NCCCCCCCCCCCC(=O)N[C@@H](C(C)(C)C)C(=O)N[C@H]4C[C@@H](O)[C@H](C4)CNC(=O)c5cc6c(cc5)ncn6C)C(=O)N[C@@H](C(=O)c7cc8c(cc7)ncn8C(F)F)C9=CC=C(C=C9)S(=O)(=O)CN#Cc1ccc(O[C@H]2CCCC[C@H]2NC(=O)c3ccc4nnc4c3C5CCN(CC5)CN6CCN(CC6)Cc7ccc8c(c7)c(=O)n9c(=O)[nH]c(=O)n9c8)c(F)c6

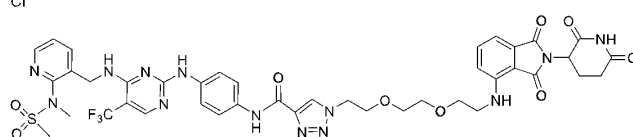
CR202Z2



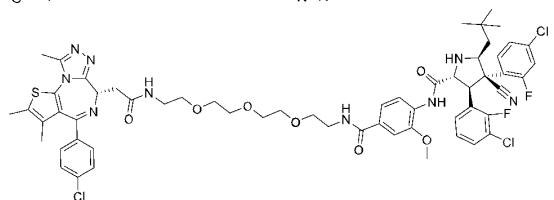
CR202Z3



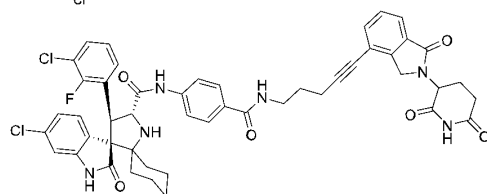
CR202Z4



CR202Y2



CR202Y4



[161] 在一些实施方式中，偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含一个、两个、三个、四个或更多个有效载荷。

[162] 在一些实施方式中，本申请的有效载荷在连接至本申请的靶向分子或连接子之前（即，形成偶联体化合物之前）具有游离的氨基或者羧基，有效载荷通过上述氨基或者羧基与偶联体化合物的相应部分（例如，连接子）的基团发生酰化反应从而偶联至偶联体化合物。

[163] 在一些实施方式中，有效载荷与所述靶向分子直接连接、或所述有效载荷通过连接子与所述靶向分子连接。在一些实施方式中，有效载荷与所述靶向分子之间、所述有效载荷与所述连接子之间、或所述连接子与所述靶向分子之间的连接是通过化学反应完成的。在一些优选的实施方式中，所述靶向分子与所述连接子之间的连接是通过 click 反应完成的。

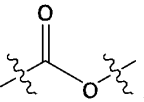
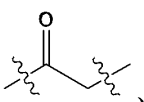
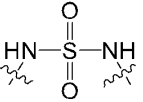
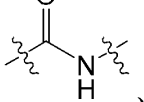
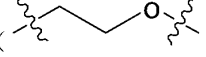
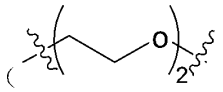
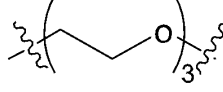
[164] 本申请所述的“click 反应”为一类具有高效性和高选择性的化学合成方法。click 反应通过形成高效连接单元把几个分子片段拼接起来，整个反应过程简单、快捷且副产物少。一些 click 反应的实例包括但不限于硫醇与烯烃的加成反应、叠氮化物与炔烃的环化反应。

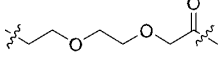
[165] 在本申请中使用的术语“连接子”指的是将有效载荷与靶向分子共价连接的分子或部分。连接子包括用于将有效载荷与至少一个靶向分子连接的官能团。在一些实施方式中，官能团可以含有两个反应性部分，一个用于与有效载荷连接，另一个用于与靶向分子连接。在一些实施方式中，官能团彼此之间是不同的。在一些实施方式中，官能团包含含有巯基反应性部分和胺反应性部分的基团。在一些实施方式中，官能团彼此之间是相同的。在一些实施方案中，连接子含有的氨基酸中的羧酸被酰胺化。在一些实施方案中，连接子含有短链的聚乙二醇（例如，包括 2-10、2-8、3-8、4-8、4-7、4-6 或 5 个重复单元）。在一些实施方案中，连接子含有叠氮基团。在一些实施方案中，连接子含有炔基基团。在一些实施方式中，连接子足够稳定以避免在血液循环过程中意外释放有效载荷，以增加有效载荷到靶细胞或组织的有效量并避免毒性。在一些实施方式中，连接子能够在靶细胞周围或内部释放有效载荷以有效杀死靶细胞或阻断靶细胞的功能。

[166] 在一些实施方式中，所述连接子包含连接模块 1 和连接模块 2。

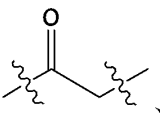
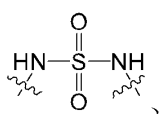
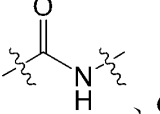
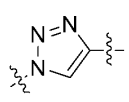
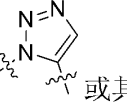
[167] 在一些实施方式中，所述连接子包含连接模块 2。

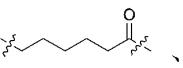
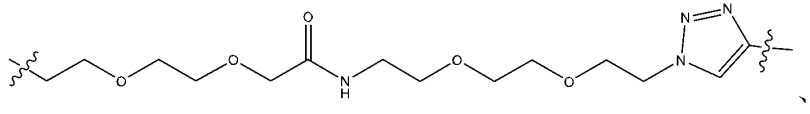
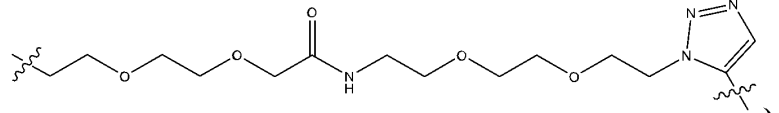
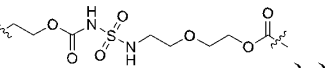
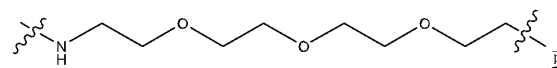
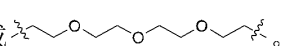
[168] 在一些实施方式中，所述连接子包含连接模块 1 和与连接模块 1 结合的如下基团：

PEG 链、, , , , C₁-C₈ 烷基链、-NH-、-O-、-C(O)-或其任意组合。在一些优选的实施方式中，PEG 链为 PEG1 ()、PEG2 () 或 PEG3 ()。在一些优选的实施方式中，所述连接

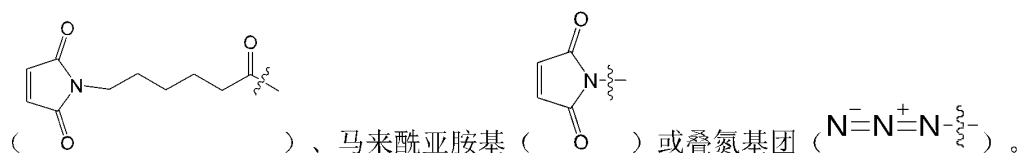
子包含连接模块 1 和与连接模块 1 结合的如下基团：。本领域技术人员可以理解，这些基团可以通过左侧连接点与连接模块 1 中的连接部分键合并且通过右侧连接点与有效载荷键合，或者通过右侧连接点与连接模块 1 中的连接部分键合并且通过左侧连接点与有效载荷键合。

[169] 在一些实施方式中，连接模块 1 与连接模块 2 通过键或者化学基团相连。在一些

实施方式中，所述化学基团为 PEG 链、、、、C₁-C₈ 烷基链、-NH-、-O-、-C(O)-、、 或其任意组合。在一些优选的实施方式中，PEG

链为 PEG1、PEG2 或 PEG3。在一些优选实施方式中，所述化学基团为 、、、、 或 。本领域技术人员可以理解，这些化学基团可以通过左侧连接点与连接模块 1 键合以及通过右侧连接点与连接模块 2 键合，或者通过右侧连接点与连接模块 1 键合以及通过左侧连接点与连接模块 2 键合。

[170] 在一些实施方式中，所述连接模块 1 包括马来酰亚胺基己酰基



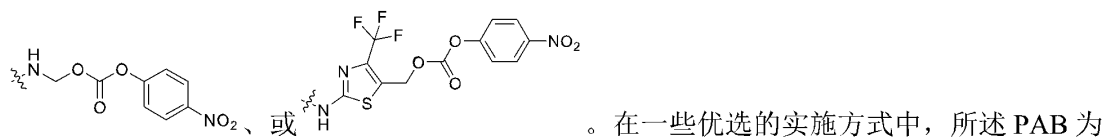
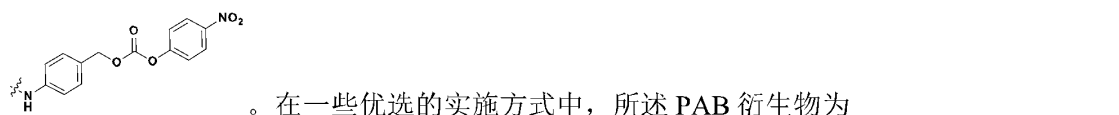
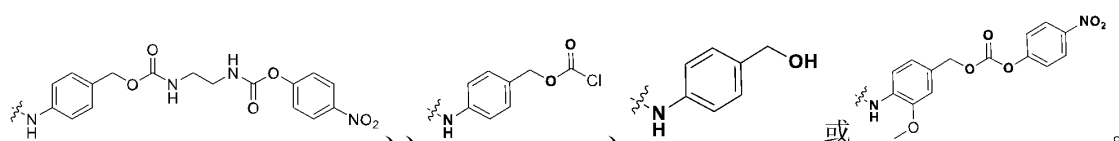
[171] 在一些实施方式中，所述连接模块 2 包括 CB 酶酶切基团、纤溶酶酶切基团、天冬酰胺内切酶酶切基团、β-葡萄糖苷酶酶切基团、硫酸酯酶酶切基团、磷酸酯酶酶切基团、β-半乳糖苷酶酶切基团、谷胱甘肽酶酶切基团或酸不稳定基团。

[172] 在一些优选的实施方式中，所述 CB 酶酶切基团包括氨基酸或氨基酸与自分解片段的组合。在一些优选的实施方式中，所述氨基酸为 Val-Cit、Gly-Gly-Phe-Gly、CycloBut-Cit、Phe-Cit、Val-Ala、Glu-Val-Cit、Ala-Cit、Val-Cit-Pro 或 Val-Cit-Pro-Gly。

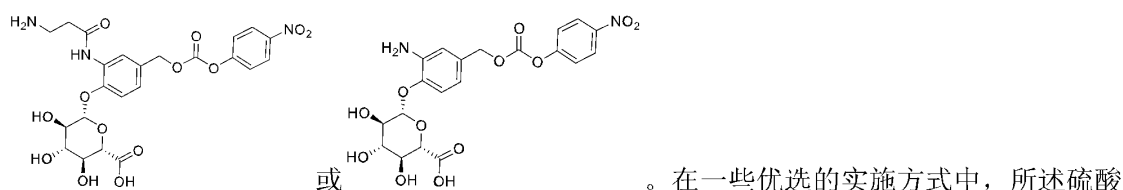
[173] 在一些优选的实施方式中，所述纤溶酶酶切基团包括氨基酸或氨基酸与自分解片段的组合。在一些优选的实施方式中，所述氨基酸为 Val-Leu-Lys。

[174] 在一些优选的实施方式中, 所述天冬酰胺内切酶基团包括氨基酸或氨基酸与自分解片段的组合。在一些优选的实施方式中, 所述氨基酸选自 Gly-Asn-Asn 或 Ala-Ala-Asn。

[175] 在一些优选的实施方式中, 所述自分解片段为 PAB 及其衍生物、



[176] 在一些优选的实施方式中, 所述 β -葡萄糖醛酸酶酶切基团为

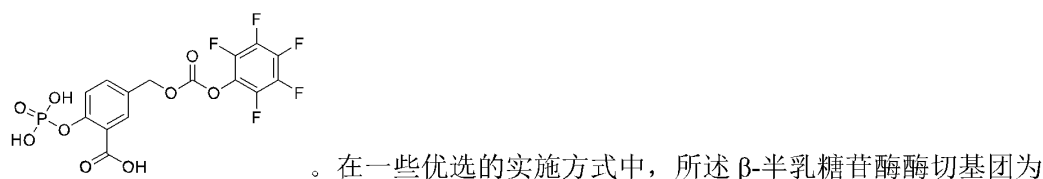
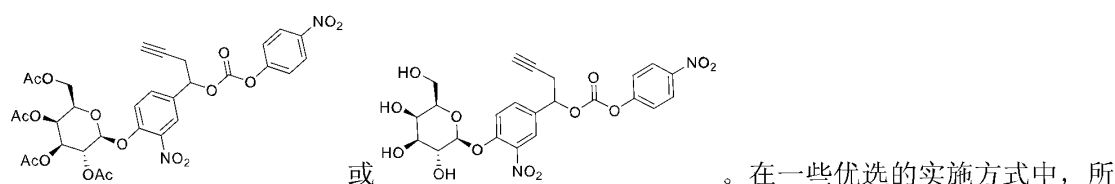


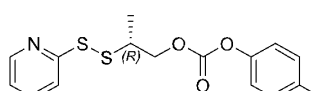
酯酶酶切基团为

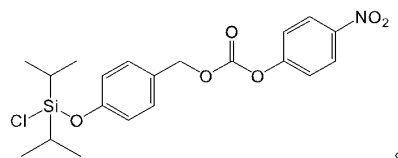
或

选的实施方式中, 所述磷酸酯酶酶切基团为

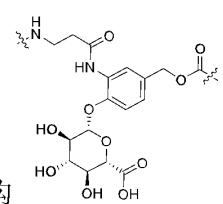
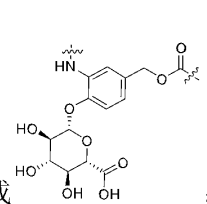
或

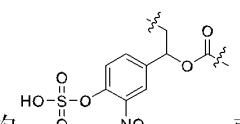


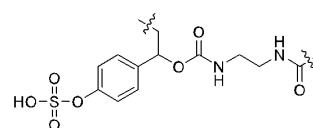
述谷胱甘肽酶酶切基团为 。在一些优选的实施方式中，所述酸

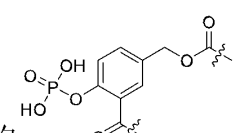
不稳定基团为 。

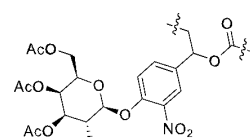
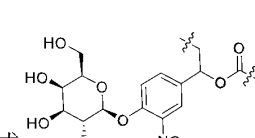
[177] 本领域技术人员可以理解，上述酶切基团的活性位点可任选地在合适的反应后与连接模块 1 连接、与化学基团连接、与靶向分子连接或与有效载荷连接。例如，在所述 β -葡萄糖醛酸酶酶切基团在与连接模块 1、化学基团、靶向分子或有效载荷进行有效连接后具

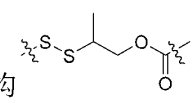
有以下结构  或 ；所述硫酸酯酶酶切基团在与连接模块 1、化

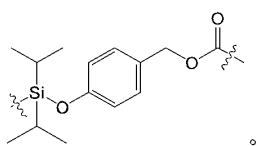
学基团、靶向分子或有效载荷进行有效连接后具有以下结构  或

；所述磷酸酯酶酶切基团在与连接模块 1、化学基团、靶向分子或

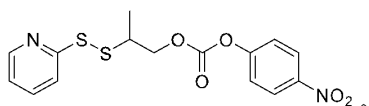
有效载荷进行有效连接后具有以下结构 ；所述 β -半乳糖苷酶酶切基团在与连接模块 1、化学基团、靶向分子或有效载荷进行有效连接后具有以下结构

 或 ；所述谷胱甘肽酶酶切基团在与连接模块 1、化

学基团、靶向分子或有效载荷进行有效连接后具有以下结构 ；所述酸不稳定基团在与连接模块 1、化学基团、靶向分子或有效载荷进行有效连接后具有以下结构

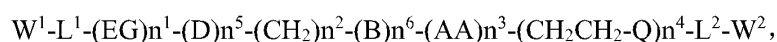


[178] 在一些优选的实施方式中，当所述连接子包括连接模块 2 时，所述连接模块 2 是谷胱甘肽酶酶切基团。在一些优选的实施方式中，所述谷胱甘肽酶酶切基团为

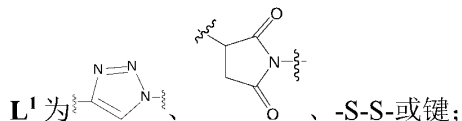


[179] CB 酶是指组织蛋白酶 B (Cathepsin B)，其是一种常见于溶酶体中的半胱氨酸蛋白酶。纤溶酶 (Plasmin) 是指一种常见于血浆中的丝氨酸蛋白酶。天冬酰胺内切酶 (Lagumain)，或称人豆蔻蛋白，是一种溶酶体中的肽酶，其可以靶向切割含有天冬酰胺残基 (-Asn-) 的肽段。

[180] 在一些实施方式中，偶联体化合物具有以下结构：



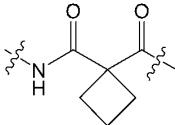
其中，



EG 为 $-CH_2CH_2O-$ 或 $-OCH_2CH_2-$ ； n^1 是 0-6 的整数；

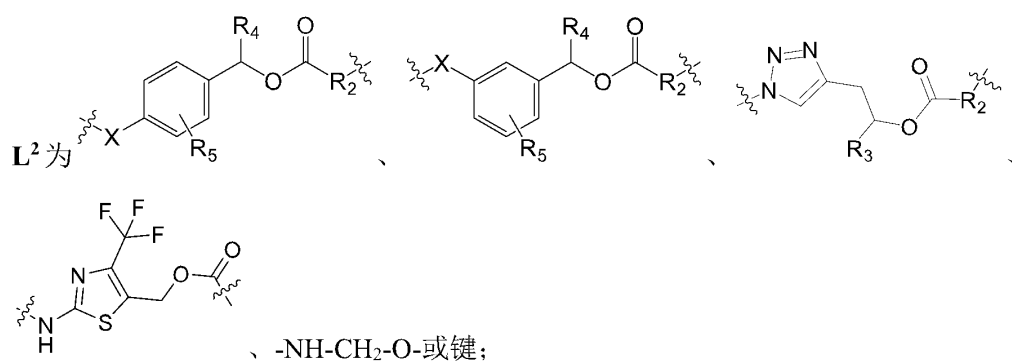
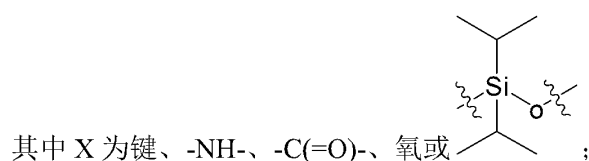
n^2 是 0-8 的整数；

D 为 $-C(=O)-NH-S(=O)_2-NH-$ ； n^5 为 0 或 1；

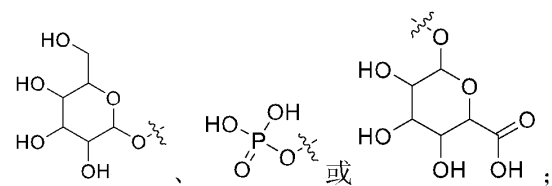
B 每次出现时独立地为 $-C(=O)-$ 、、 $-NH-CH_2CH_2-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-NH-$ 、 $-CH(CH_3)-CH_2-O-$ 、 $-CH_2CH_2O-$ 、 $-NH-C(=O)-$ 或 $-NH-$ ； n^6 为 0-3 的整数；

AA 每次出现时独立地为氨基酸残基； n^3 是 0-5 的整数；

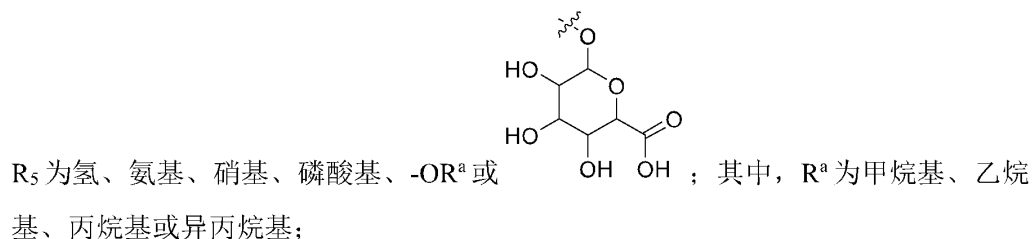
Q 每次出现时独立地为 $-C(=O)-$ 、 $-O-$ 或键， n^4 是 0-3 的整数；



R_2 为键、-O-CH2-或-NH-CH2CH2-NH-C(=O)-；



R_4 为氢或 C₁₋₈ 烷基；



W^1 为可以结合细胞表面蛋白的靶向分子，且

W^2 为有效载荷。

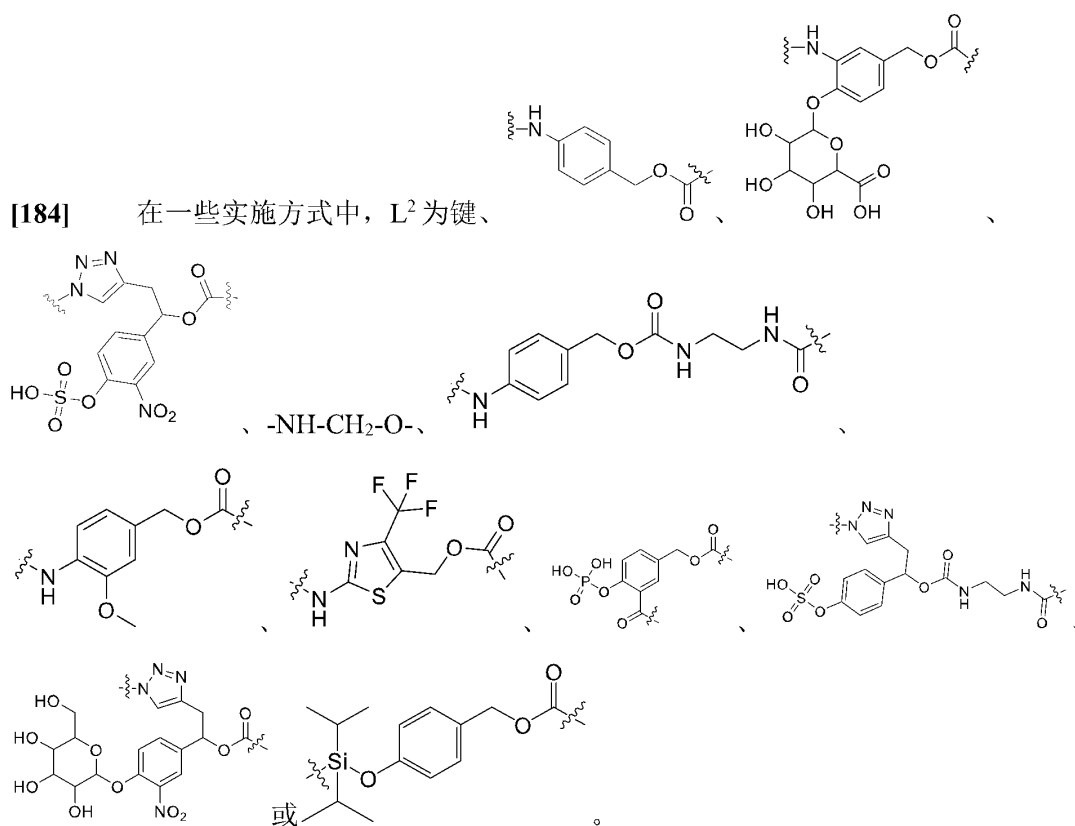
[181] 在一些实施方式中，EG 为-CH₂CH₂O-。在一些实施方式中， n^1 是 2。在一些实施方式中， n^1 是 0。在一些实施方式中， n^2 是 1。在一些实施方式中， n^2 是 4。在一些实施方式中，

式中， n^2 是 5。在一些实施方式中， n^5 是 0。在一些实施方式中， n^6 是 1。在一些实施方式中， n^6 是 3。在一些实施方式中， n^1 是 2、 n^2 是 1、 n^3 和 n^4 是 0 并且 L^2 是键。

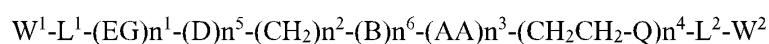
[182] 在一些实施方式中, AA 每次出现时独立地为 Val、Cit、Glu、Leu、Lys、Ala、Gly、Phe、Gln、Pro 或 Asn 形成的氨基酸残基。在一些实施方式中, -(AA)_n³-为选自下组的肽残基: -Val-Cit-、-Glu-Val-Cit-、-Ala-Cit-、-Phe-Cit-、-Val-Ala-、-Gly-Gly-Phe-Gly-、-Cit-、-Val-Leu-Lys-、-Val-Cit-Pro-Gly-、-Gly-Asn-Asn-和-Ala-Ala-Asn-。

[183] 在一些实施方式中, 当 n^4 为 1 时, Q 为 $-C(=O)-$; 当 n^4 为 2 时, Q 分别为 $-O-$ 和 $-C(=O)-$; 当 n^4 为 3 时, Q 分别为 $-O-$ 、 $-O-$ 和键。在一些实施方式中, n^4 为 0。

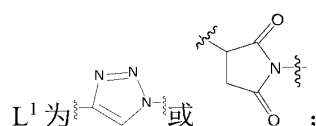
[184] 在一些实施方式中，L²为键、



[185] 在一些实施方式中，偶联体化合物具有以下结构：



其中,



EG 为 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$; n^1 是 0-4 的整数;

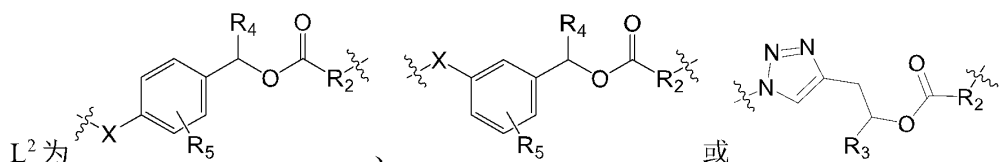
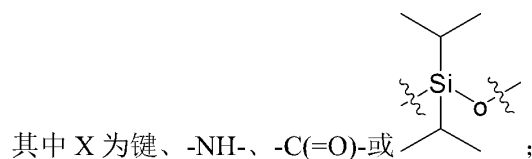
D 为 $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{S}(=\text{O})_2-\text{NH}-$; n^5 为 0 或 1;

n^2 是 0-5 的整数;

B 为 $-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 、 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 或 $-\text{NH}-$; n^6 为 0-3 的整数;

AA 每次出现时独立地为氨基酸残基; n^3 是 0-3 的整数;

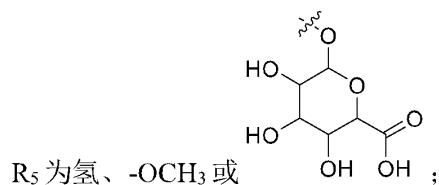
Q 每次出现时独立地为 $-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{O}-$ 或键, n^4 是 0-3 的整数;



R_2 为键;

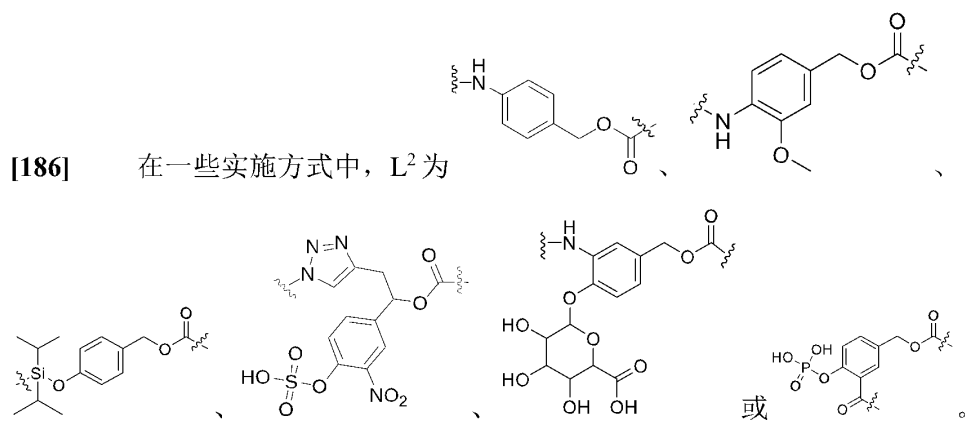
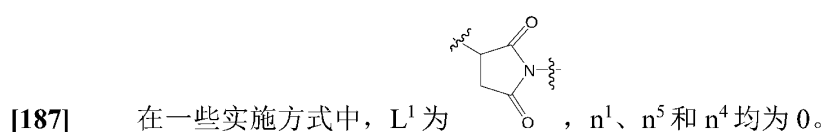
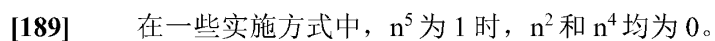
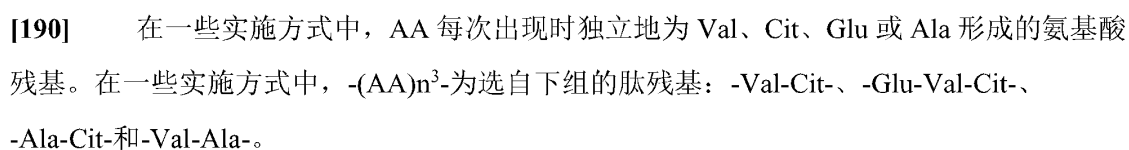
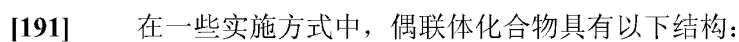
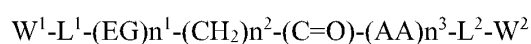


R_4 为氢;

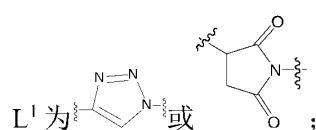


W^1 为可以结合细胞表面蛋白的靶向分子, 并且

W^2 为有效载荷。



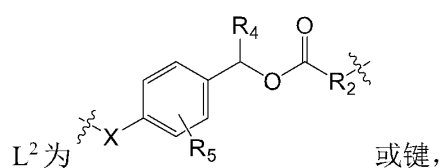
其中,



EG 为 $-CH_2CH_2O-$; n^1 是 0-4 的整数;

n^2 是 0-5 的整数;

AA 每次出现时独立地为氨基酸残基; n^3 是 1-4 的整数;



其中 X 为-NH-;

R₂ 为键;

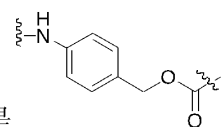
R₄ 为氢;

R₅ 为氢或-OCH₃;

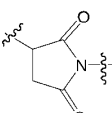
W¹ 为可以结合细胞表面蛋白的靶向分子, 并且

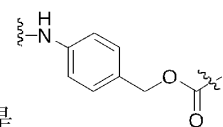
W² 为有效载荷。

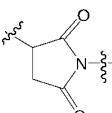
[192] 在一些实施方式中, L¹ 为 , n¹ 是 2、n² 是 1 且 L² 是



[193] 在一些实施方式中, L¹ 为 , n¹ 是 2、n² 是 1 且 L² 是键。

[194] 在一些实施方式中, L¹ 为 , n¹ 是 0、n² 是 5 且 L² 是

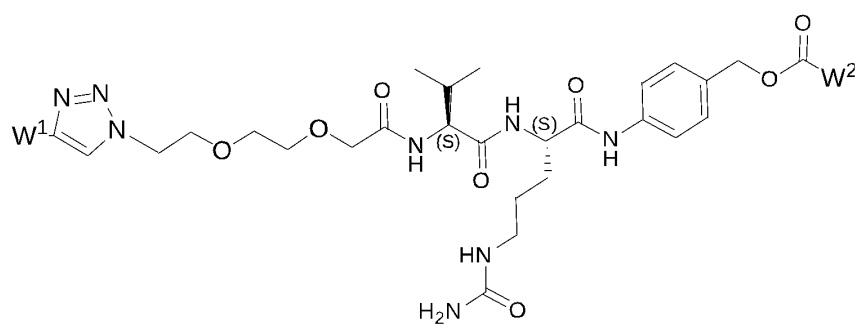
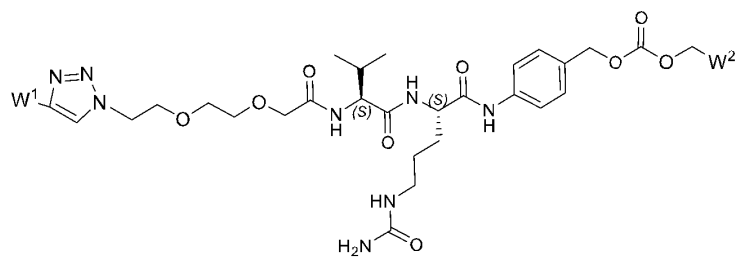
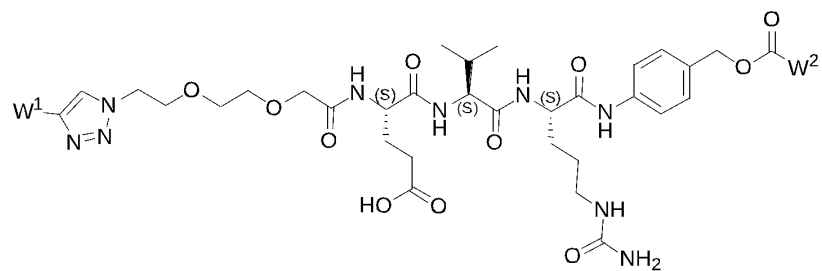
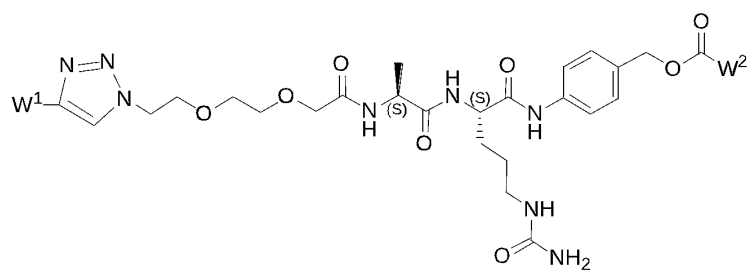
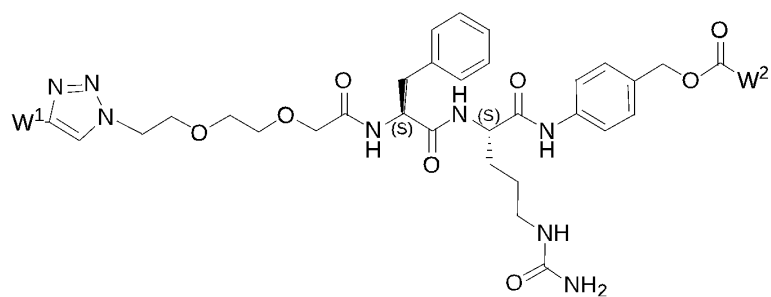


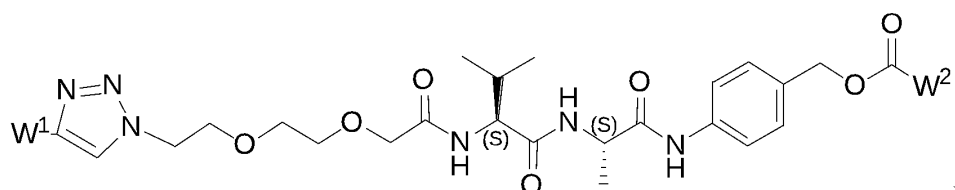
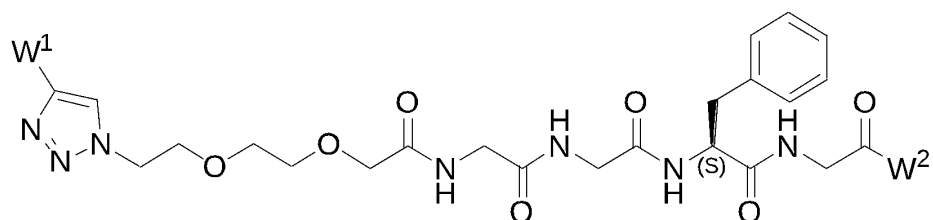
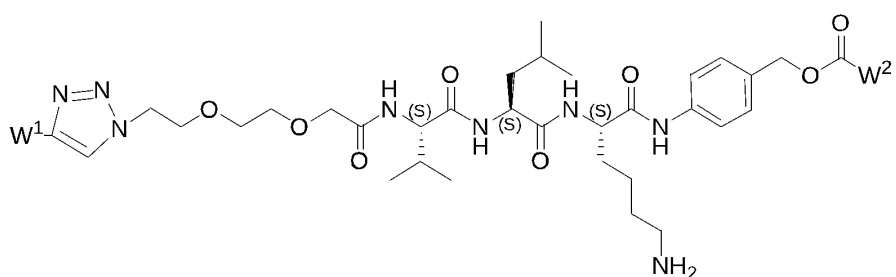
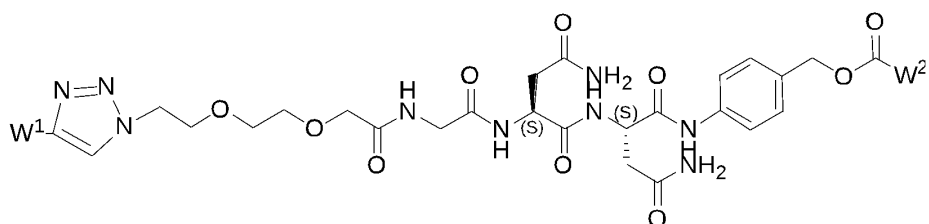
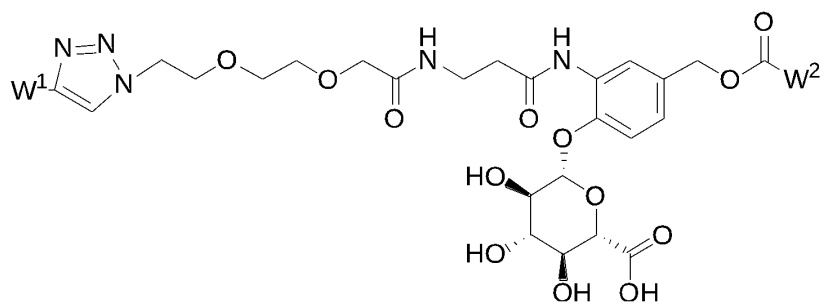
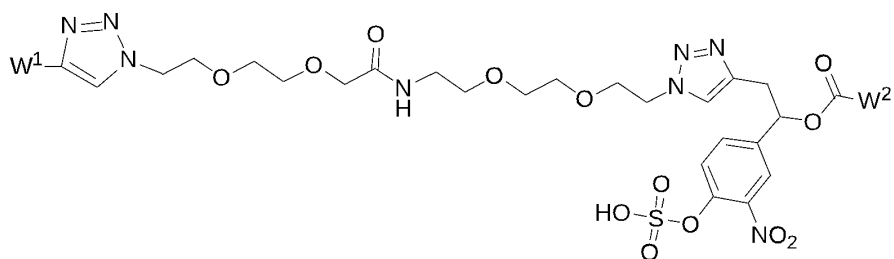
[195] 在一些实施方式中, L¹ 为 , n¹ 是 0、n² 是 5 且 L² 是键。

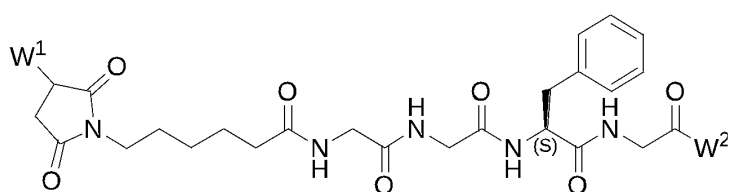
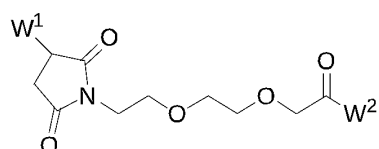
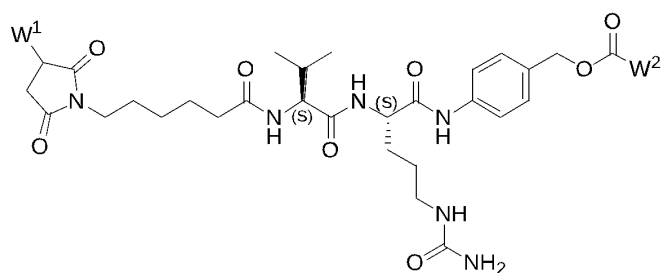
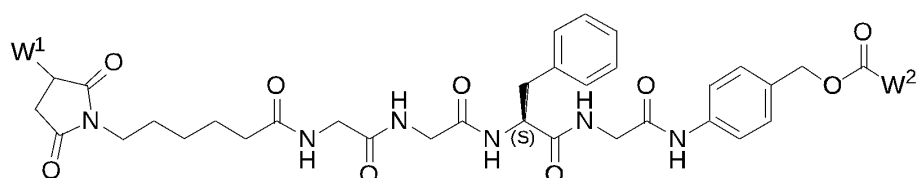
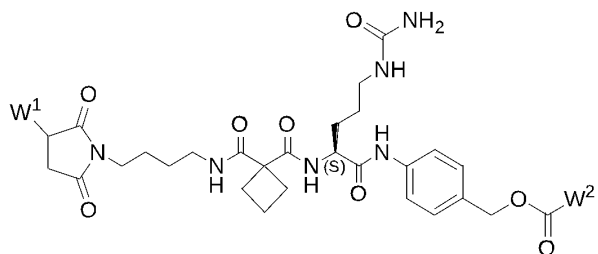
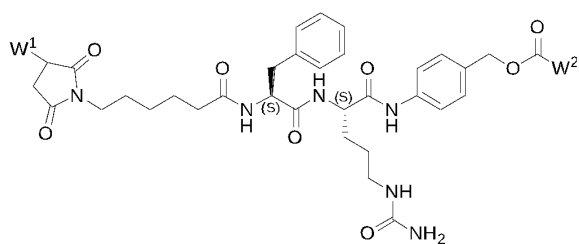
[196] 在一些实施方式中, AA 每次出现时独立地为 Val、Cit、Glu 或 Ala 氨基酸残基。

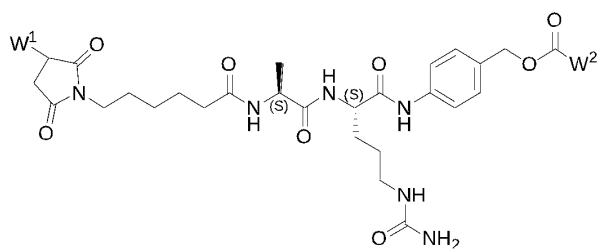
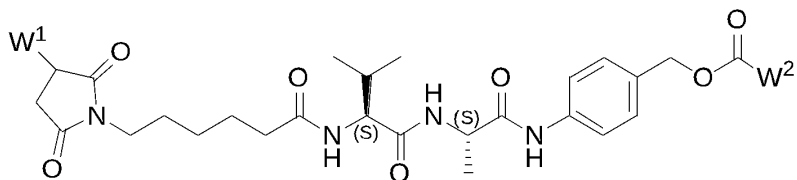
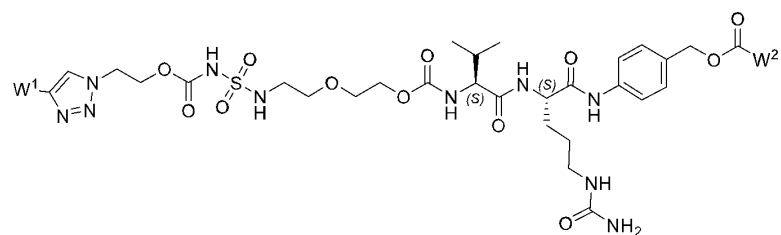
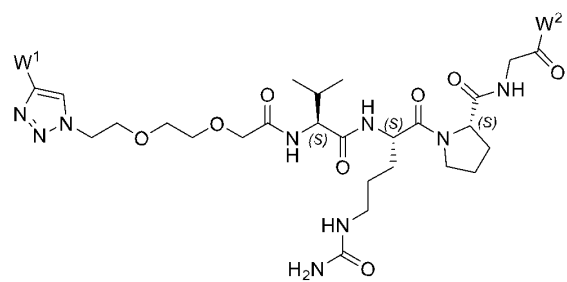
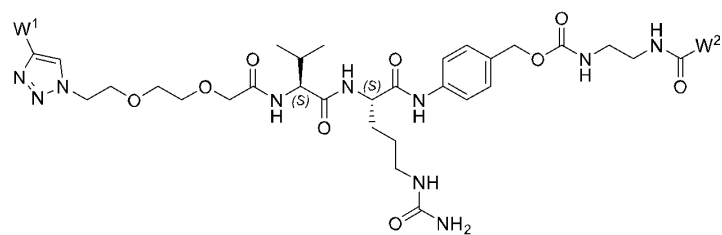
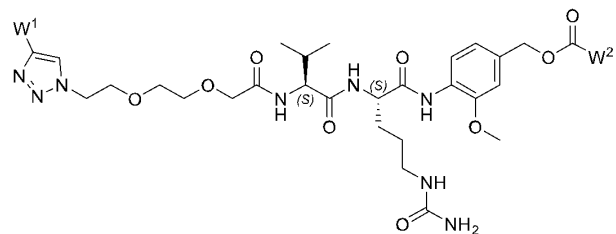
在一些实施方式中, -(AA)n³-为选自下组的肽残基: -Val-Cit-、-Glu-Val-Cit-、-Ala-Cit-、-Phe-Cit-、-Val-Ala-、-Gly-Gly-Phe-Gly-、-Val-Leu-Lys-和-Gly-Asn-Asn-。

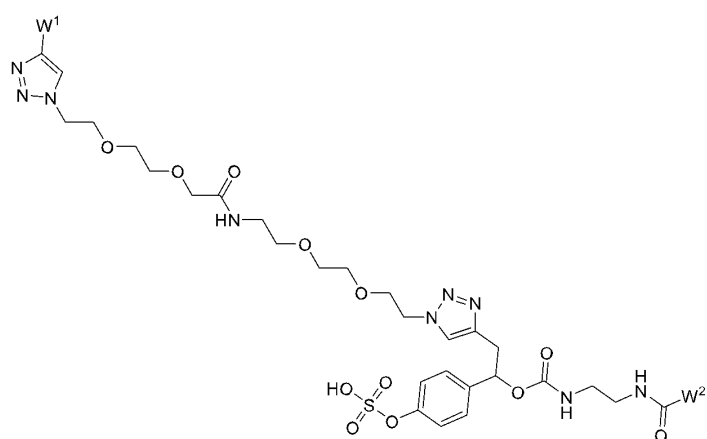
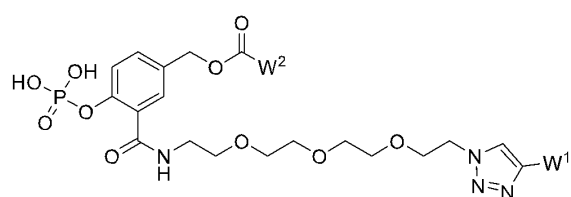
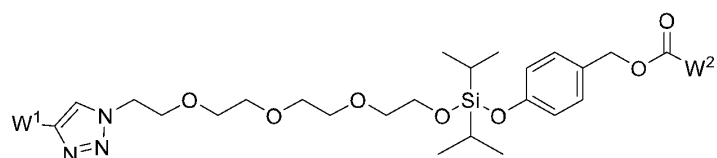
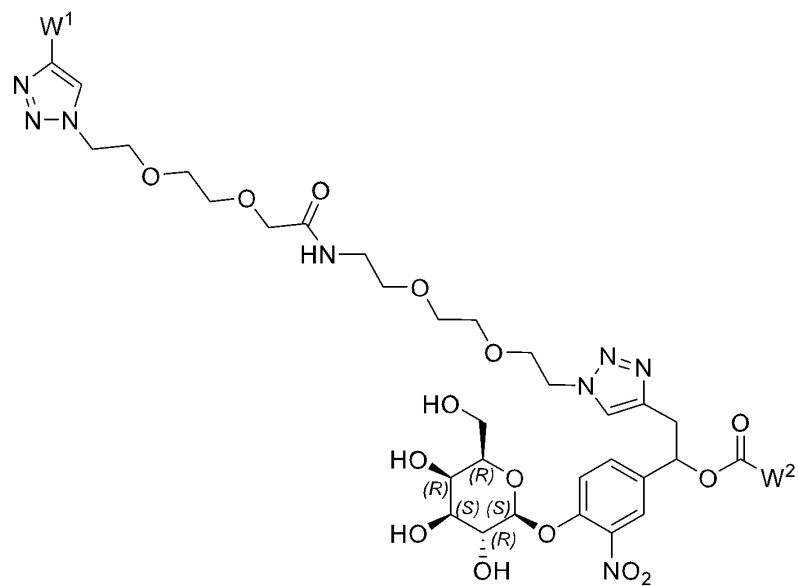
[197] 在一些实施方式中, 本文公开的偶联体化合物具有如下结构:

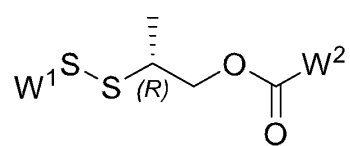
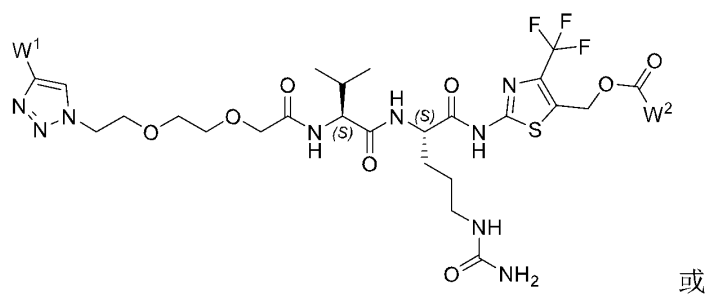
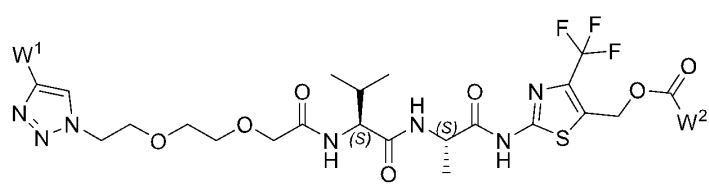






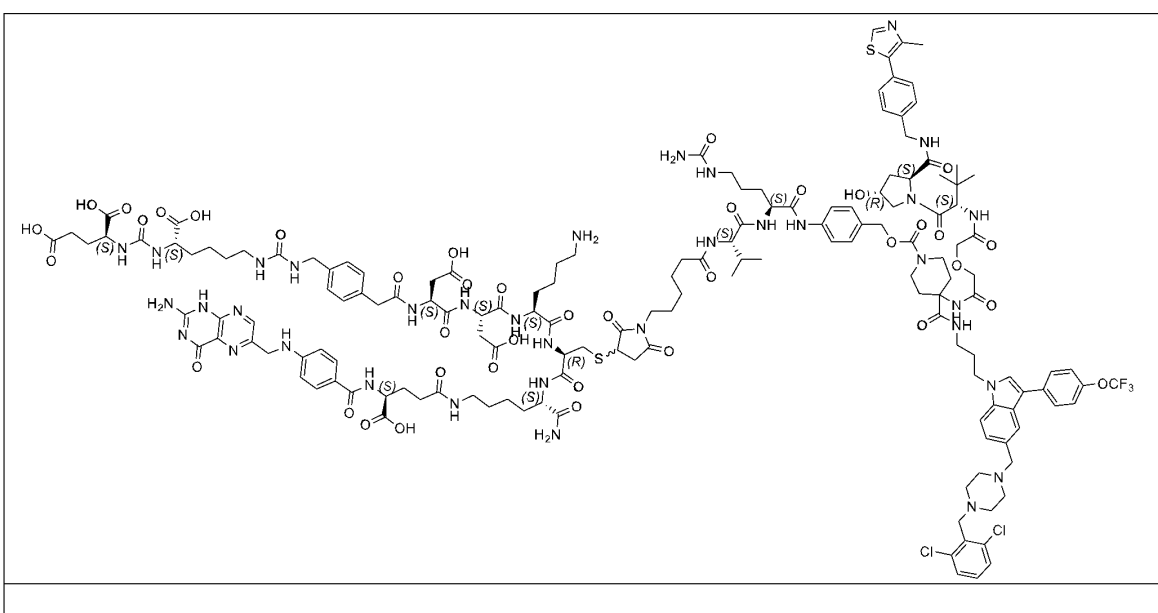


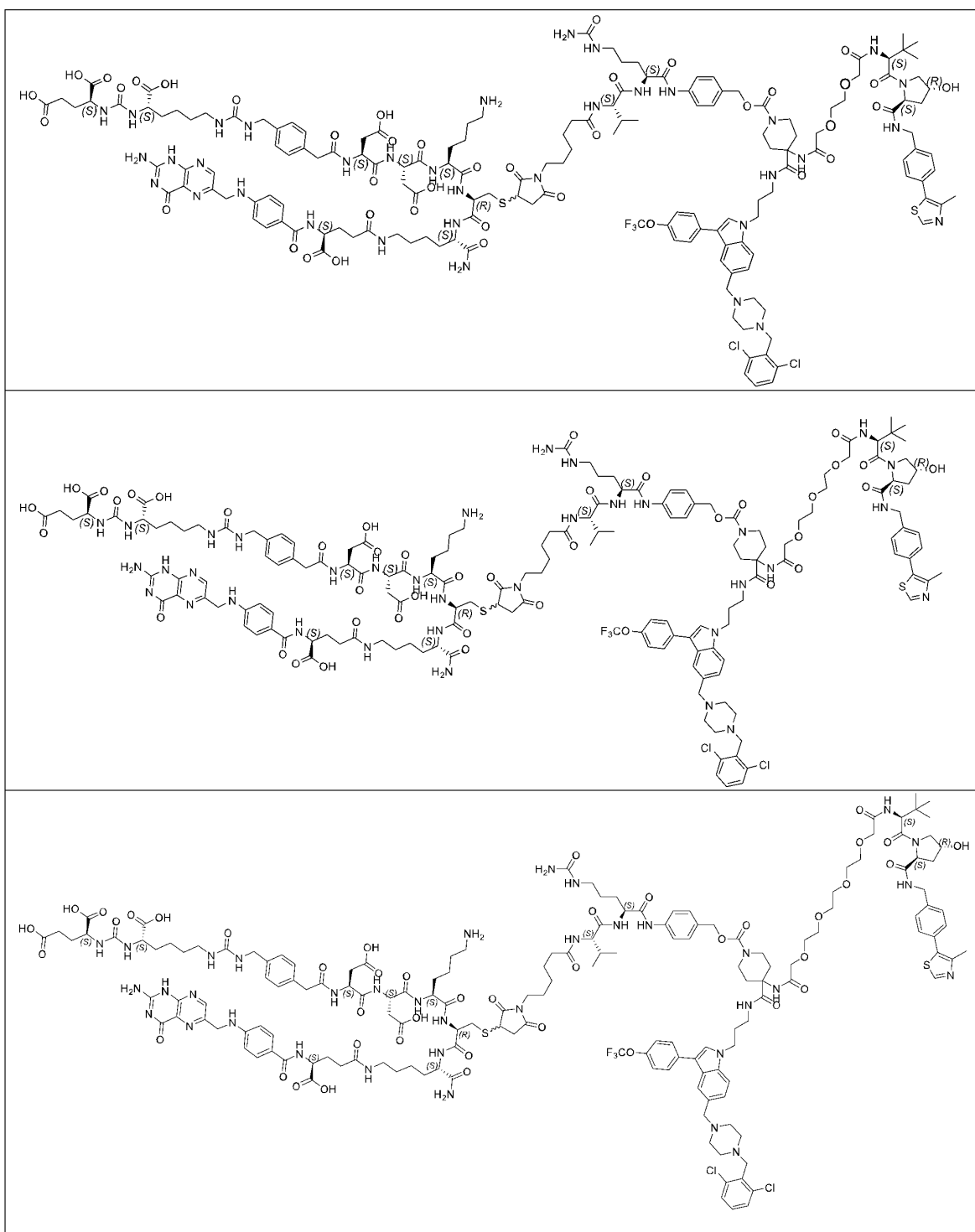


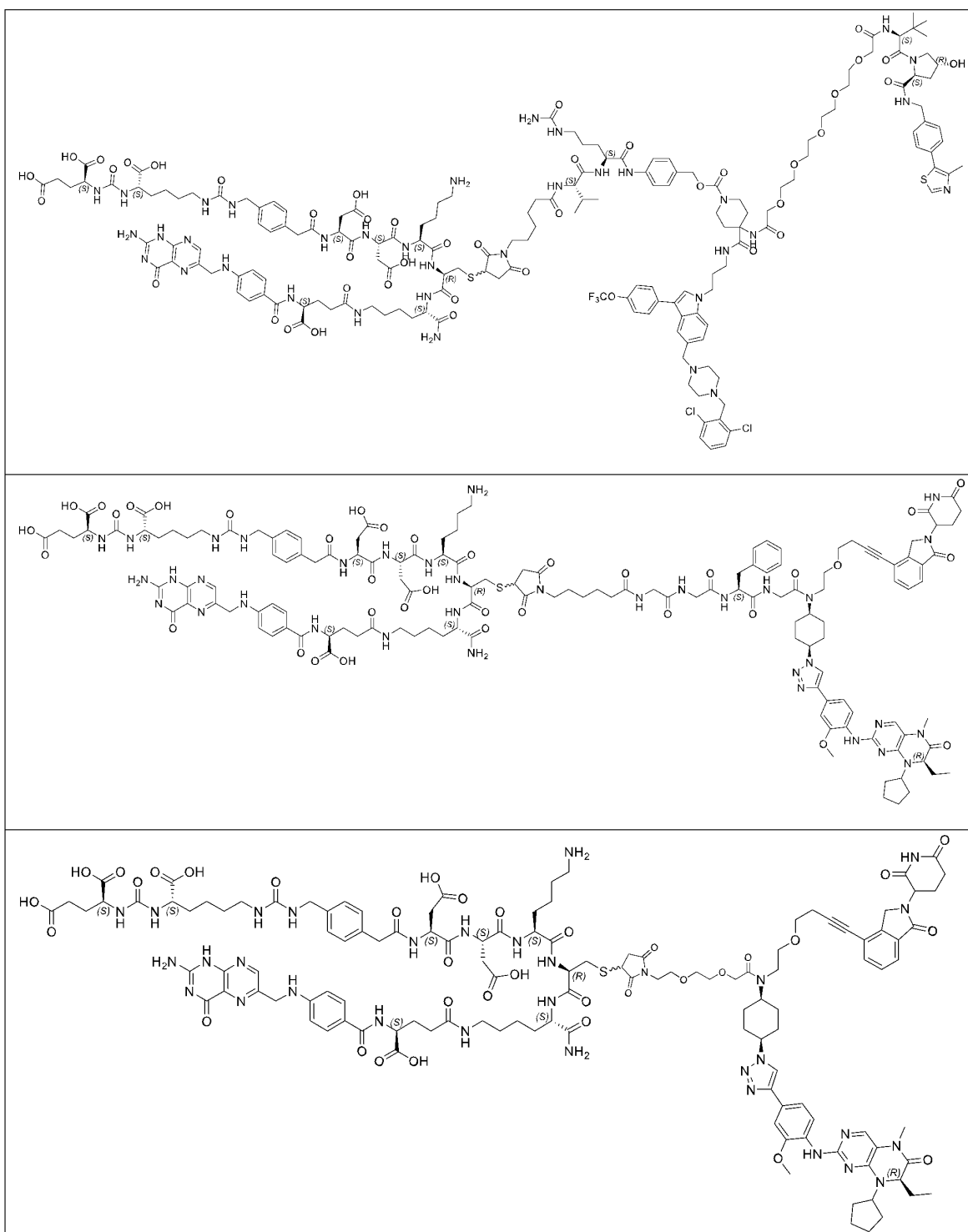


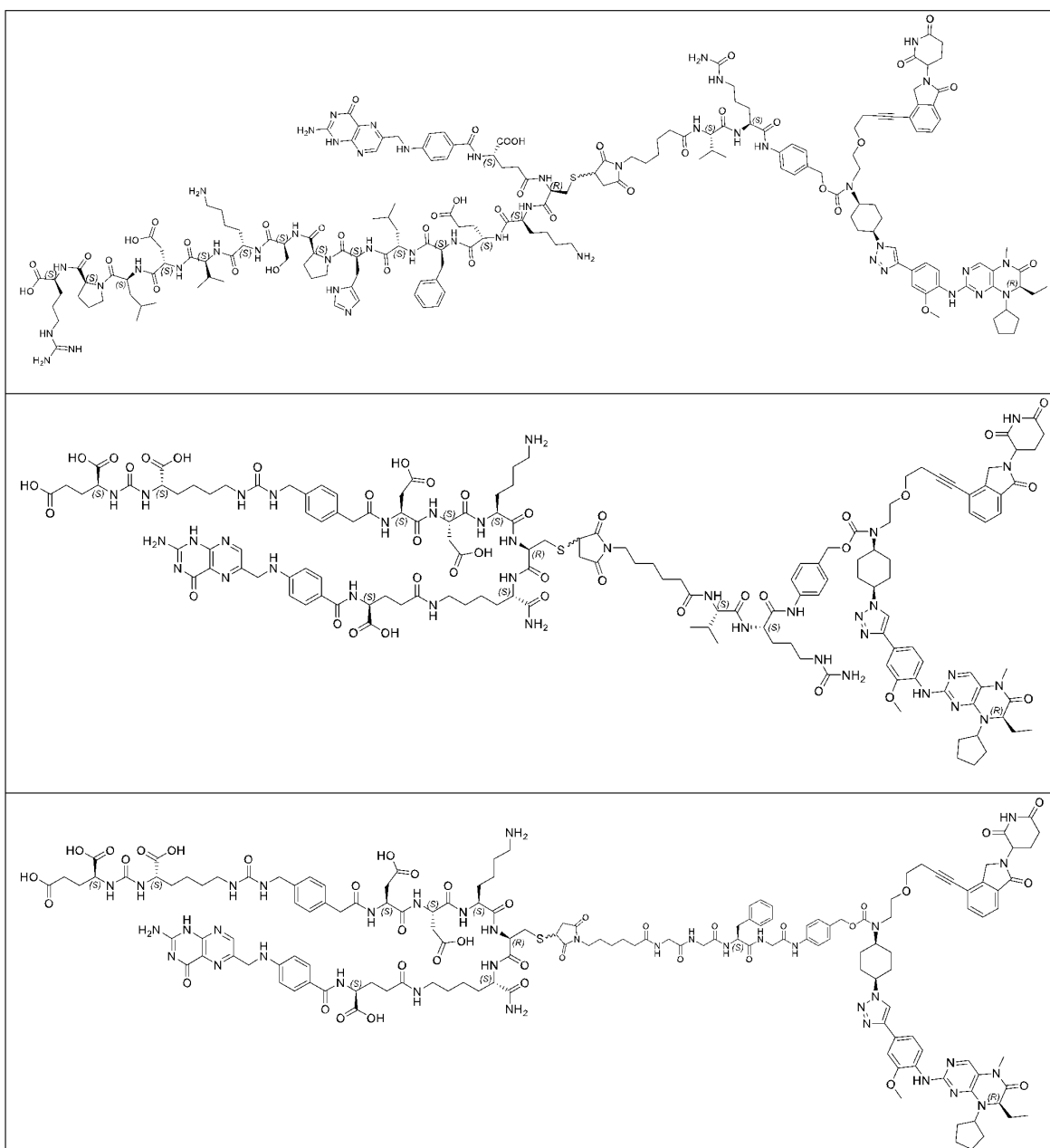
其中 W^1 为可以结合细胞表面蛋白的靶向分子，且 W^2 为有效载荷。

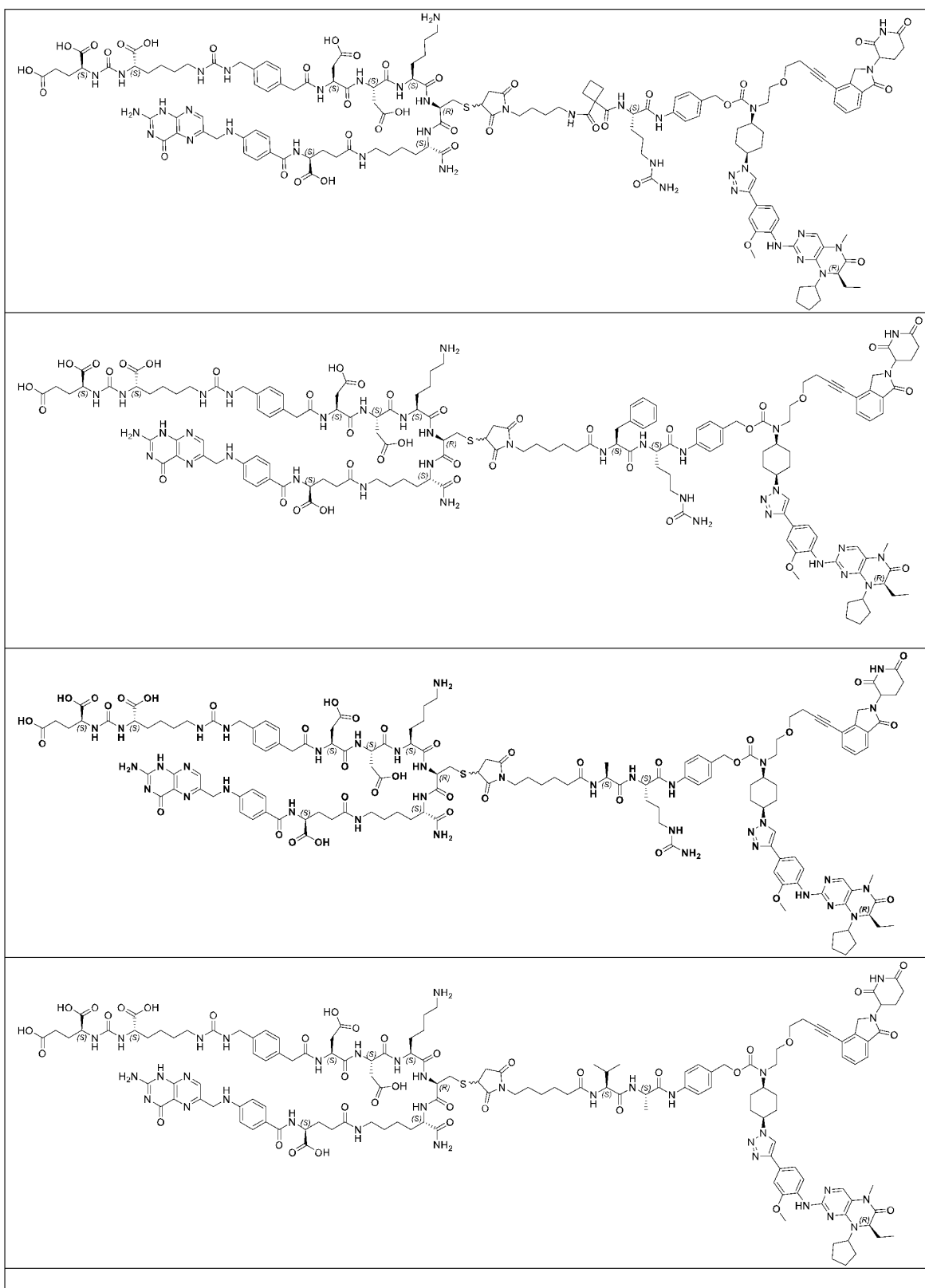
[198] 在一些实施方式中，本文公开了以下偶联体化合物：

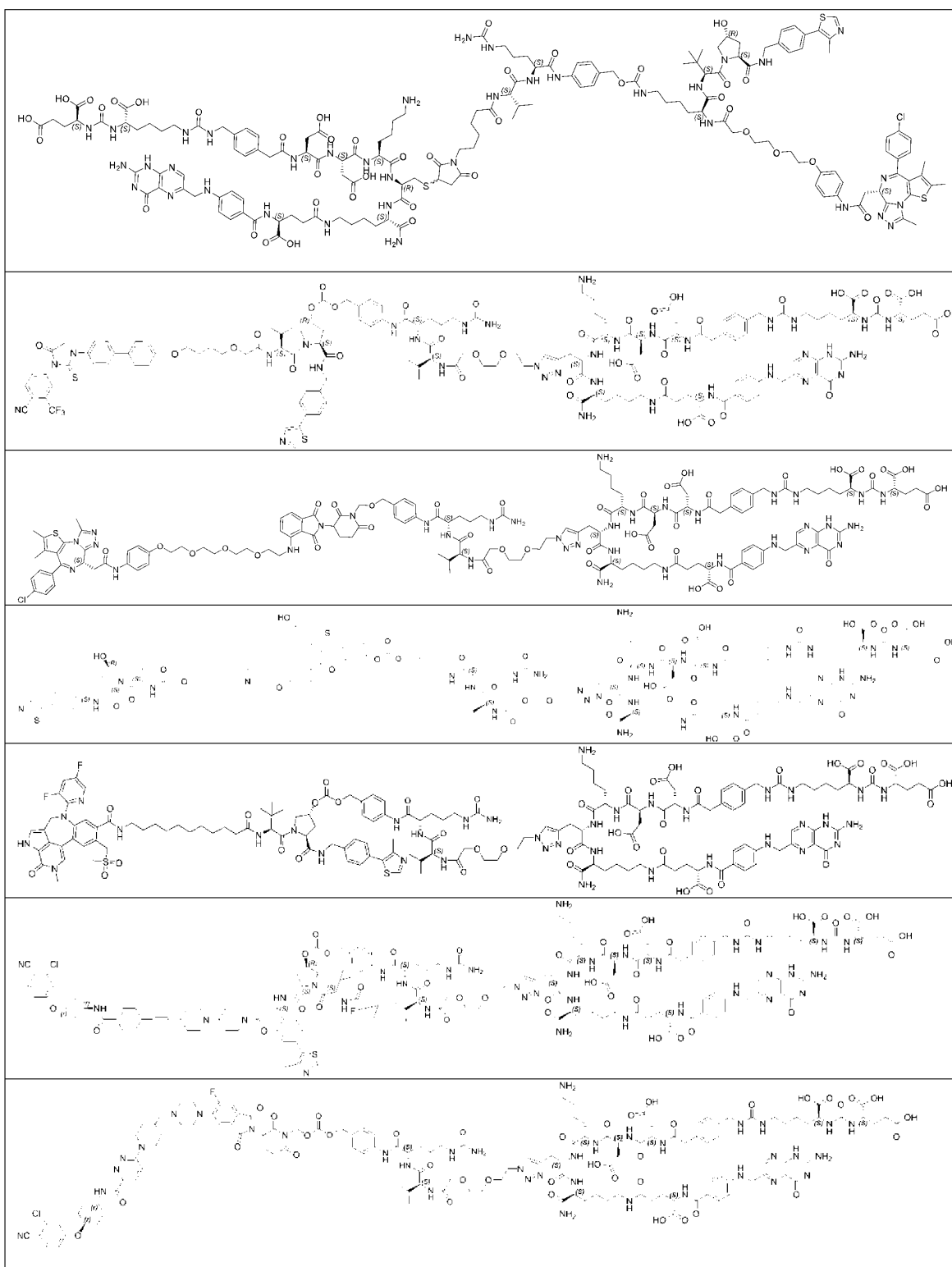


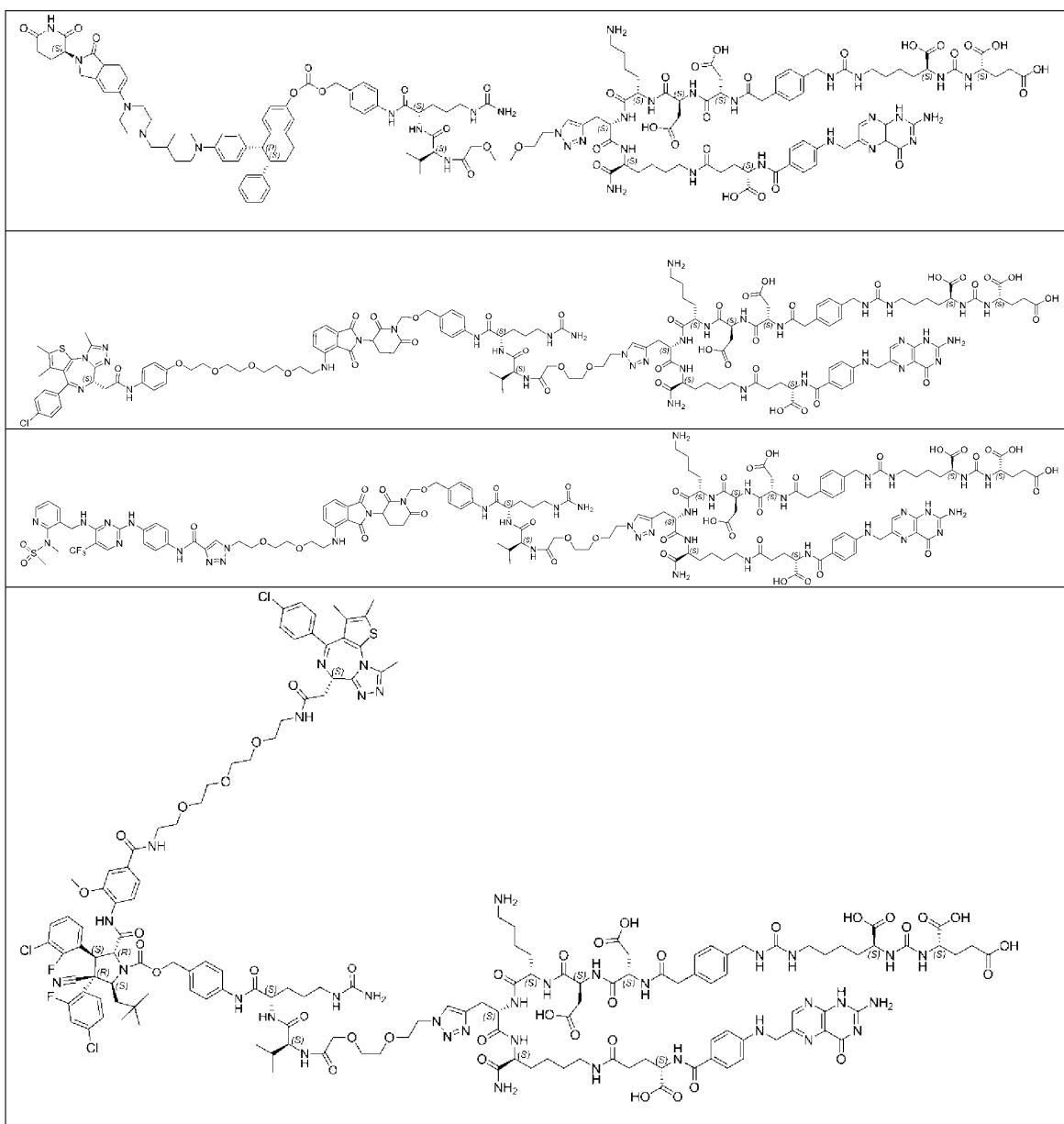


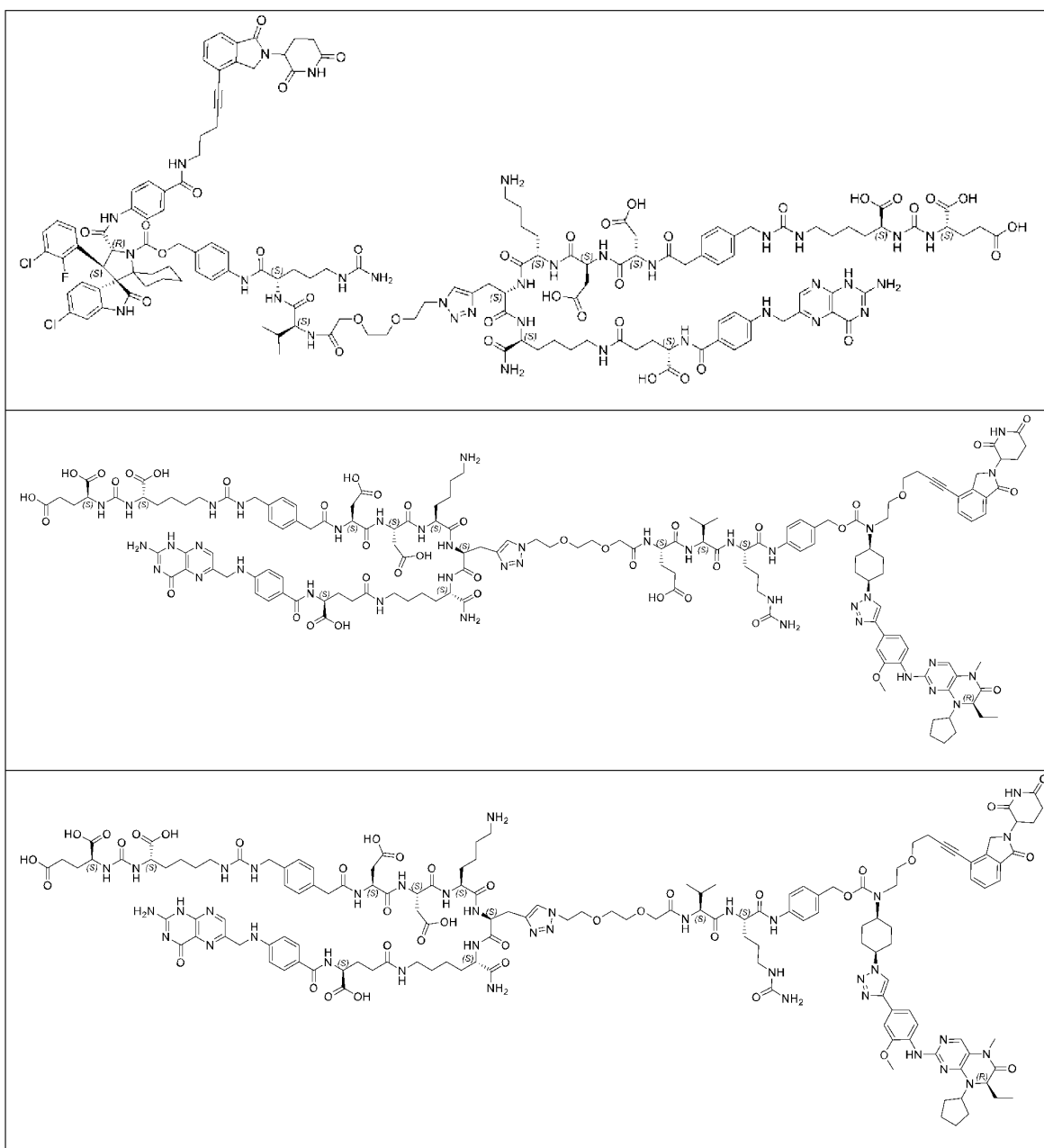


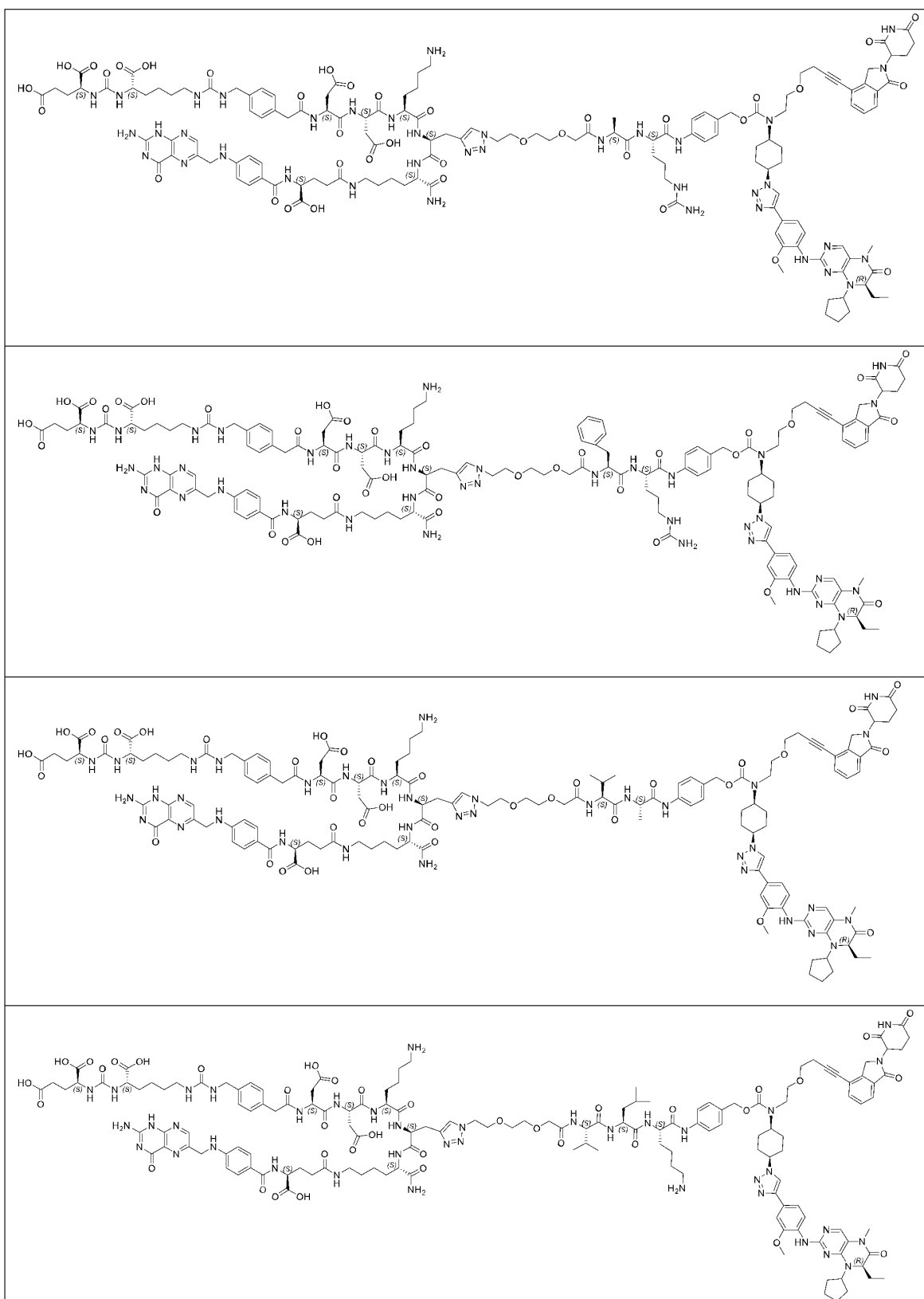


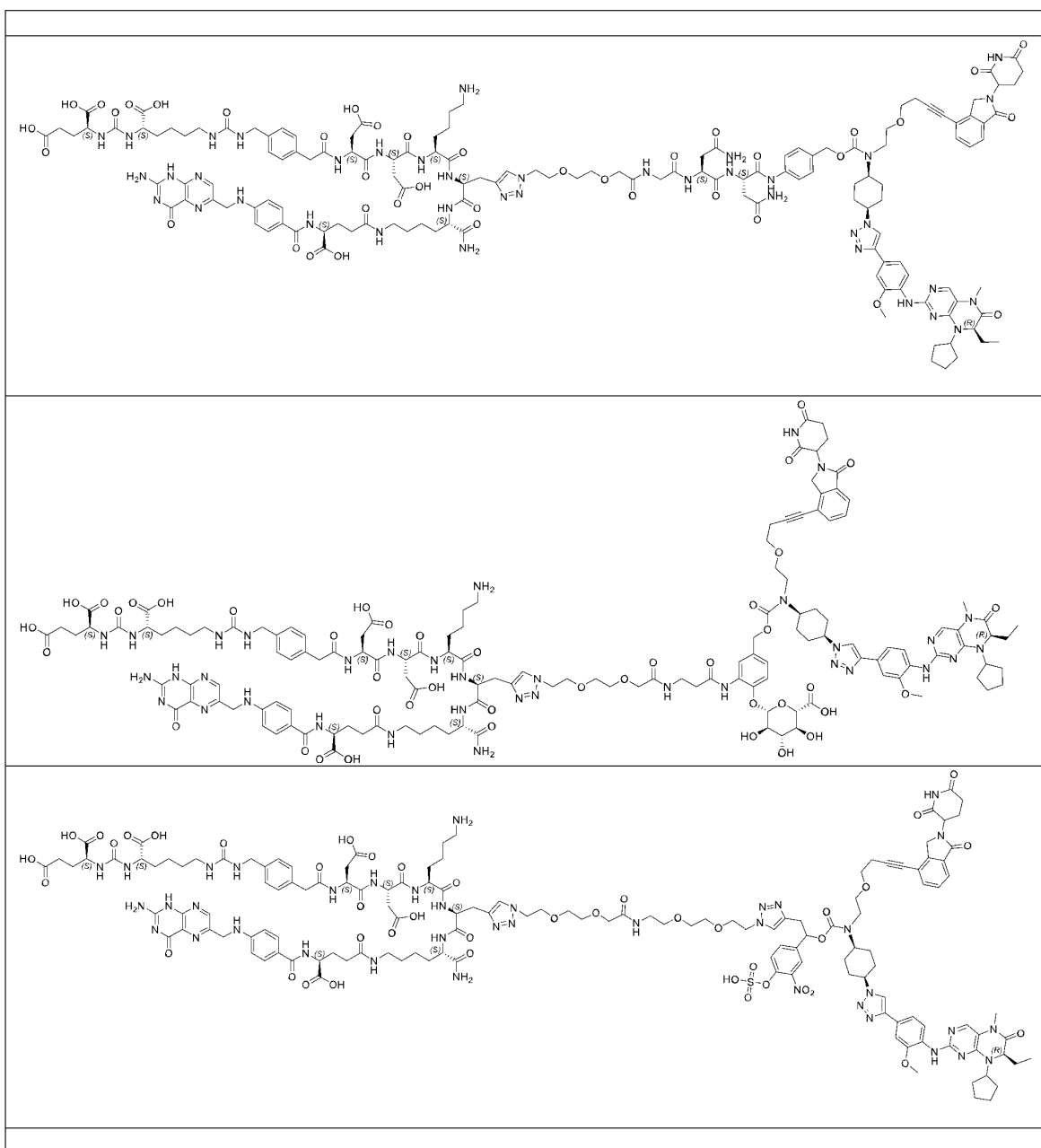


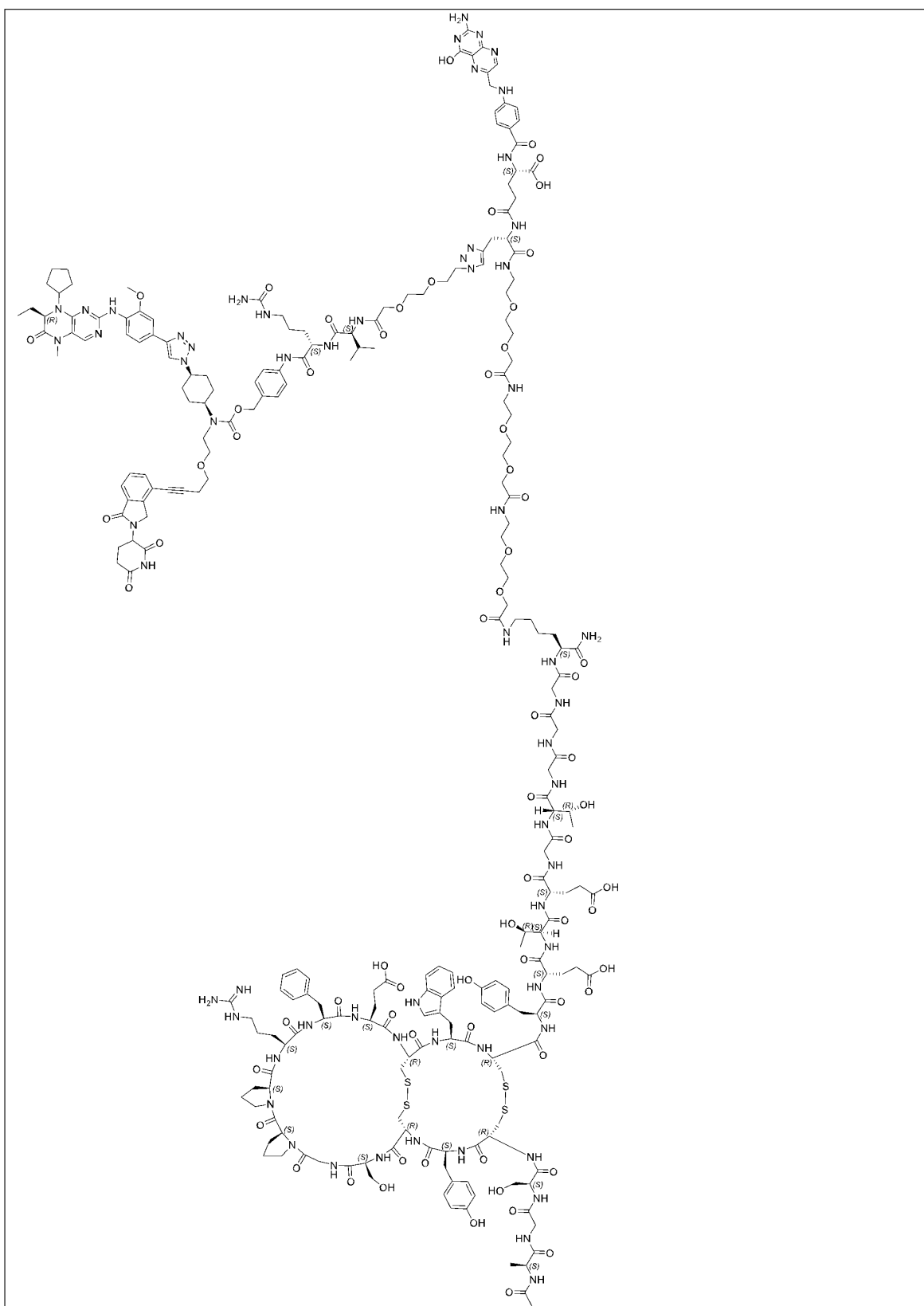


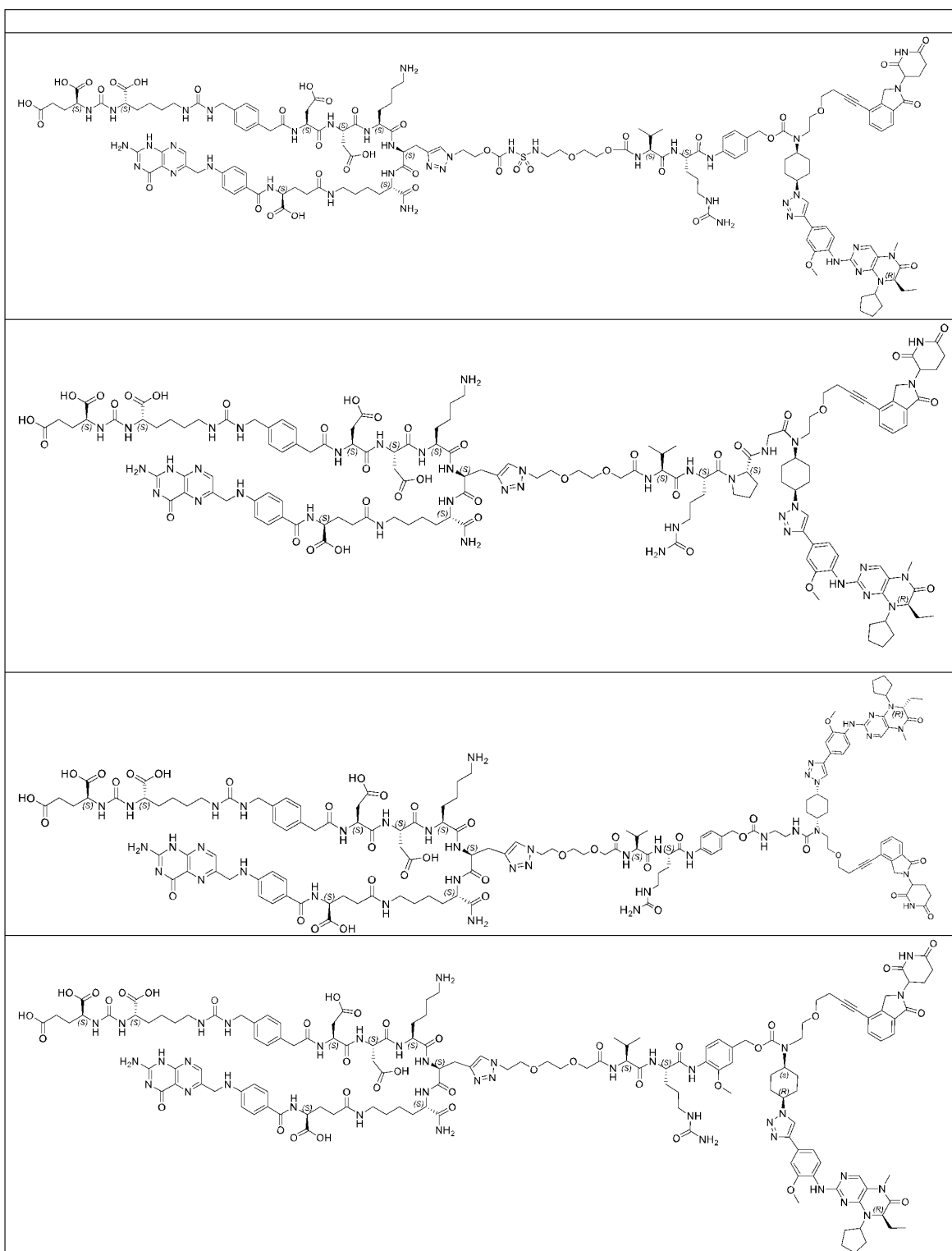


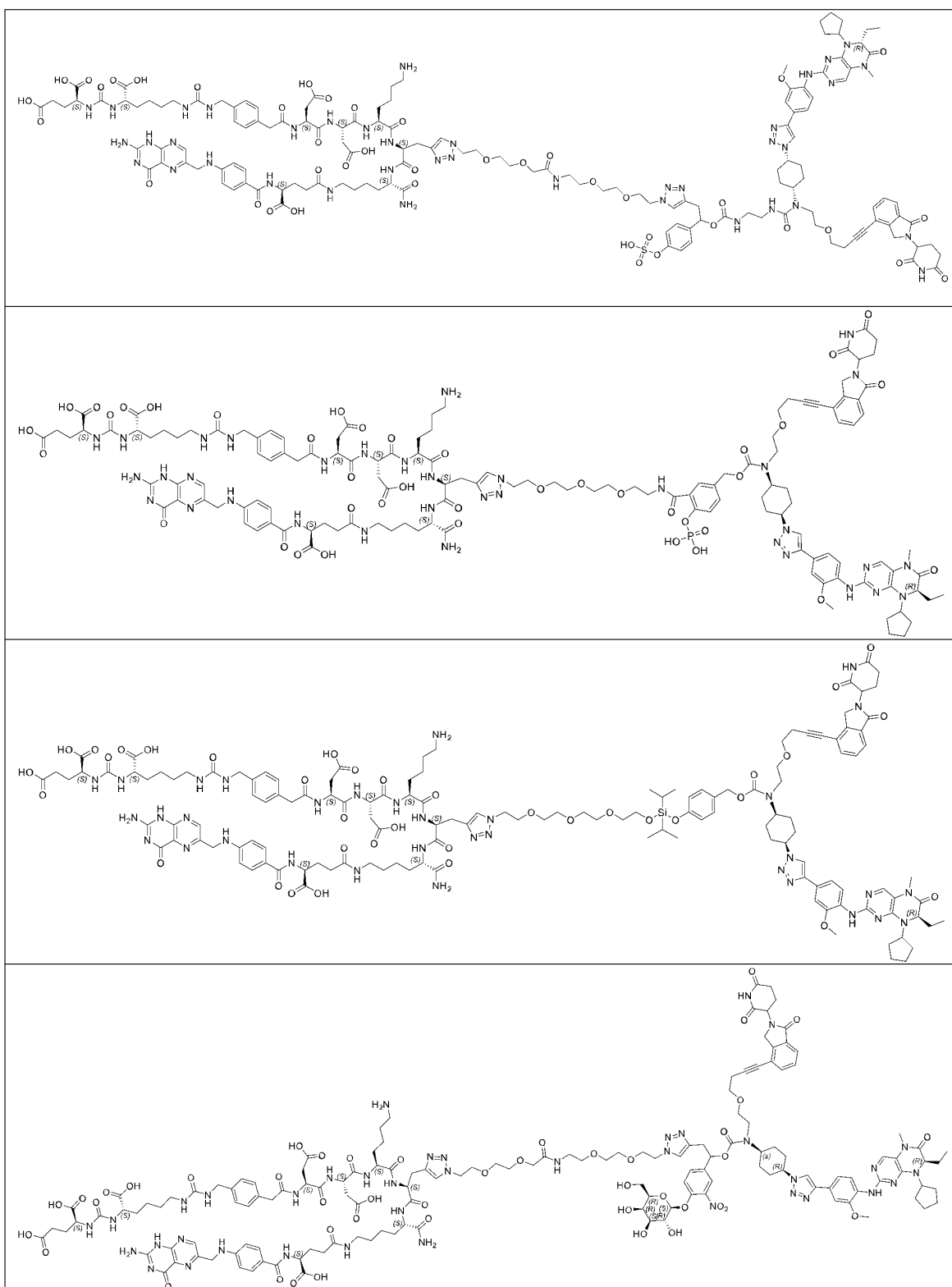


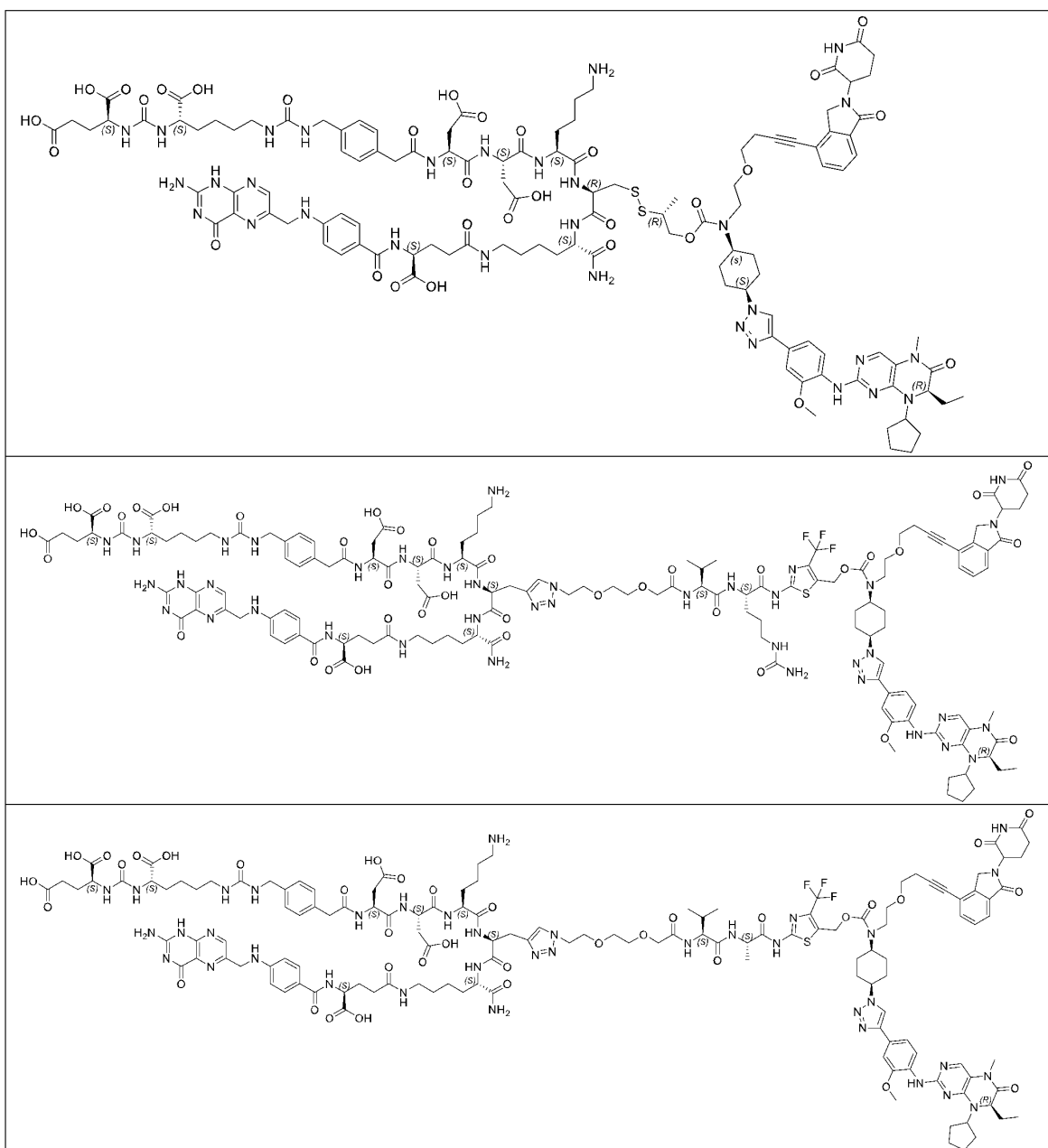


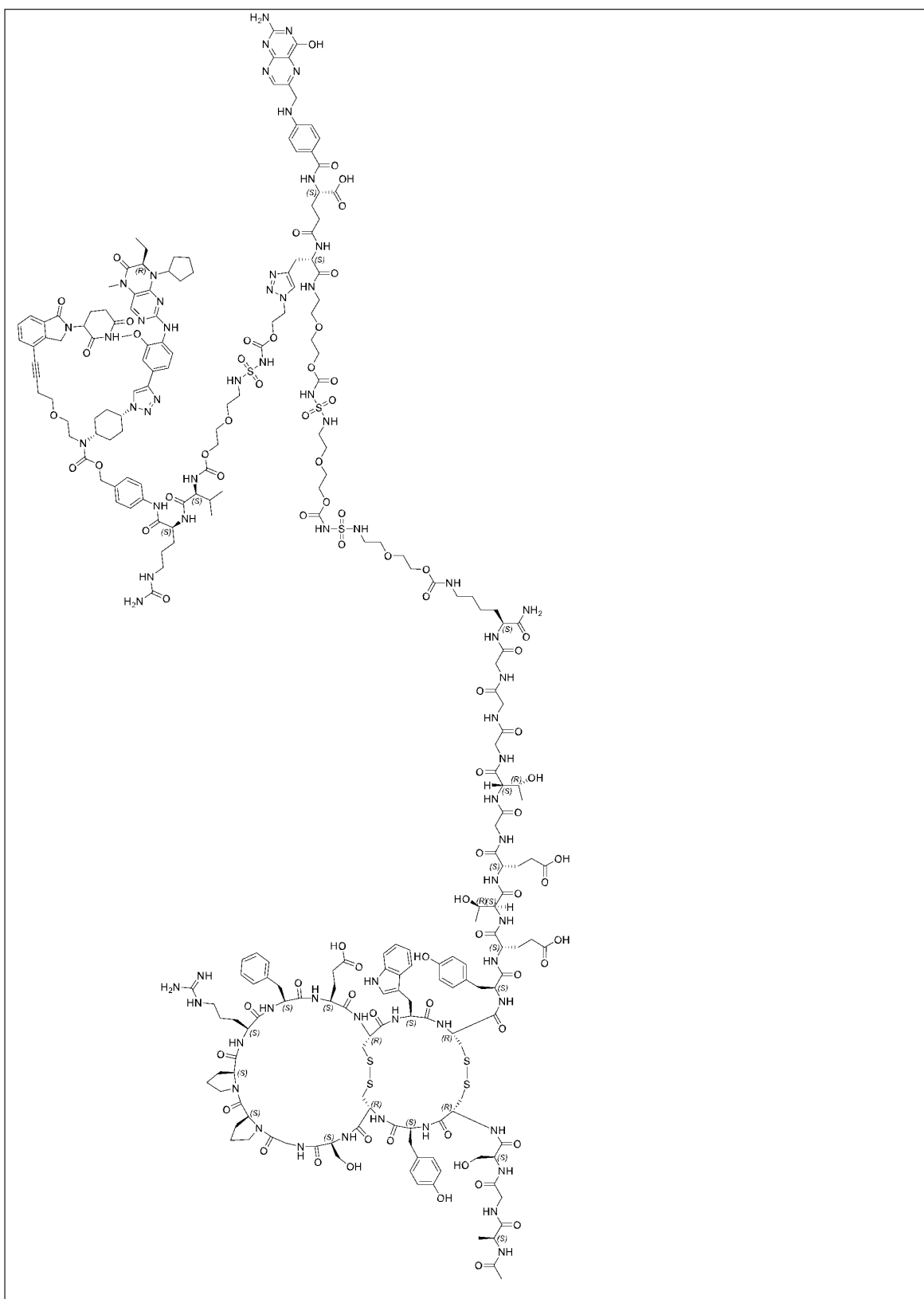


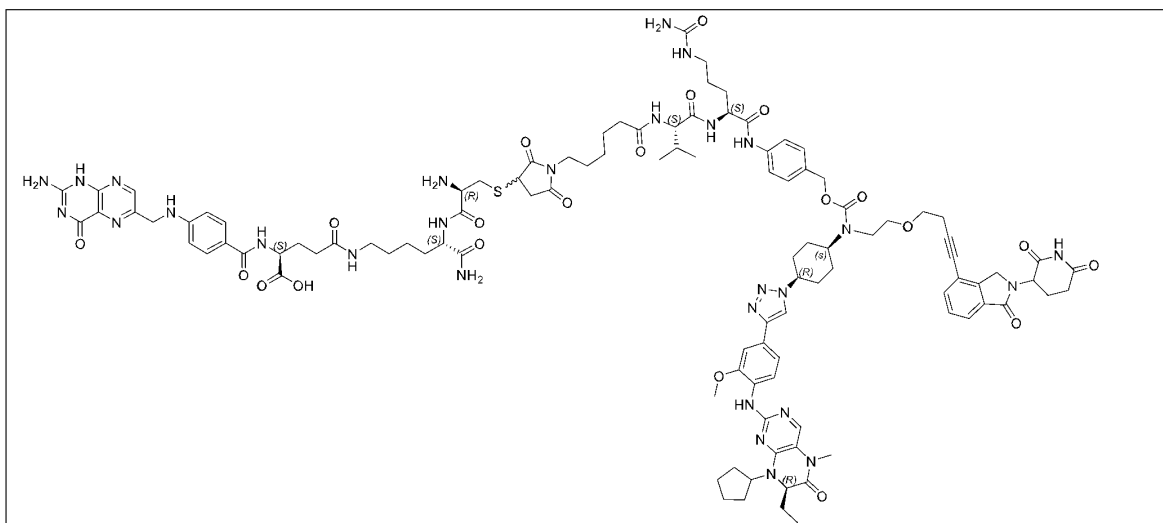












[199] 本申请中使用的术语“偶联体化合物”或“化合物”旨在包括所示结构的所有立体异构体（例如对映体和非对映体）、几何异构体、互变异构体和同位素。

[200] 本申请所述的偶联体化合物或化合物可以是不对称的（例如具有一个或多个立体中心）。除非另外指明，所有的立体异构体，例如对映体和非对映体，都旨在包含在内。可以以光学活化或外消旋的形式分离含有不对称取代的碳原子的本申请的偶联体化合物或化合物。如何从不具有光学活性的初始原料制备光学活化形式的方法是本领域公知的，如通过拆分外消旋混合物或通过立体选择性合成。在本申请所述的偶联体化合物或化合物中还可以存在烯烃、碳-碳双键等多种几何异构体，并且在本申请中已经考虑了所有的这些稳定异构体。本申请描述了偶联体化合物或化合物的顺式和反式几何异构体并且其可以以异构体的混合物或单独的异构体形式分离。

[201] 可以通过本领域公知的多种方法中的任一对化合物的外消旋混合物进行拆分。示例性的方法包括使用手性拆分酸的分级结晶，手性拆分酸是一种具有光学活性的成盐有机酸。用于分级重结晶方法的适宜的拆分试剂是例如具有光学活性的酸（如，酒石酸、二乙酰酒石酸、二苯甲酰酒石酸、扁桃酸、苹果酸、乳酸的 D 和 L 形式）或各种具有光学活性的樟脑磺酸。适于分级结晶方法的其他拆分试剂包括 N-甲基苄胺、2-苯甘氨酸、去甲麻黄碱、麻黄碱、N-甲基麻黄碱、环己基乙胺、1,2-二氨基环己烷等的立体异构纯形式。

[202] 还可以通过将光学活性拆分试剂（例如二硝基苯甲酰基苯基甘氨酸）的柱上通过洗脱进行外消旋混合物的拆分。可以由本领域技术人员确定适宜的洗脱溶剂组合物。

[203] 本申请的偶联体化合物或化合物还包括互变异构形式。互变异构形式是由同时伴有质子的迁移的单键与相邻双键的对换导致的。互变异构形式包括具有相同化学式和总电荷的异构质子化状态的质子的互变异构体。质子互变异构体的示例包括酮-烯醇对、酰胺-亚胺酸对、内酰胺-内酰亚胺对、烯胺-亚胺对和环状的形式，其中质子能够占据杂环系统的两个或多个位置，例如 1H-和 3H-咪唑、1H-，2H-和 4H-1,2,4-三唑、1H-和 2H-异𧄂唑以及 1H-和 2H-吡唑。互变异构形式通过适宜的取代能够平衡或空间锁定成一种形式。

[204] 本申请的偶联体化合物或化合物还可以包括中间体或最终化合物中出现原子的所有同位素。同位素包括具有相同原子序数但不同质量数的那些原子。例如，氢的同位素包括氕、氘和氚。

[205] 在某些实施方案中，本申请的偶联体化合物或化合物可以通过有机合成获得。可以使用任意公知的有机合成技术制备并且可以根据多种可能的合成途径合成本申请的偶联体化合物或化合物，包括其盐、酯、水合物或溶剂化物。

[206] 可以在适宜的溶剂中进行制备本申请的偶联体化合物或化合物的反应，有机合成领域的技术人员能够容易地对溶剂进行选择。适宜的溶剂能够在反应进行的温度下（例如可以是溶剂的冷冻温度至溶剂的沸腾温度的温度范围）基本上不与初始原料（反应物）、中间体或产物反应。可以在一种溶剂或一种以上溶剂的混合物中进行给定的反应。根据特定反应步骤，本领域技术人员能够针对特定反应步骤选择适宜的溶剂。

[207] 本申请偶联体化合物或化合物的制备可能涉及各种化学基团的保护和去保护。本领域技术人员能够容易地确定是否需要保护和去保护以及选择适宜的保护基团。保护基团化学可以参见例如 T. W. Greene and P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd Ed., Wiley & Sons, Inc., New York (1999)，其全部内容通过引用并入本申请。

[208] 可以根据本领域公知的任意适宜方法对反应进行监测。例如，可以利用光谱法，如核磁共振光谱（例如 ^1H 或 ^{13}C ）、红外光谱、分光光度法（例如 UV-可见）、质谱，或者利用色谱法，如高效液相色谱（HPLC）、液相色谱-质谱（LCMS）或薄层层析（TLC）对产物的形成进行监测。本领域技术人员可以利用多种方法对化合物进行纯化，包括高效液相色谱（HPLC）（例如参见“Preparative LC-MS Purification: Improved Compound Specific Method Optimization” Karl F. Blom, Brian Glass, Richard Sparks, Andrew P. Combs *J. Comb. Chem.* 2004, 6(6), 874-883，其全部内容通过引用并入本申请）和正相硅胶柱层析。

[209] 本申请的一个方面公开了一种药物组合物，所述药物组合物包含本申请所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，以及药学上可接受的载体。在一些实施方式中，本申请所述的药物组合物用于静脉、皮下、口服、肌肉或心室内施用。

[210] 在本申请中使用的术语“药学上可接受的”指的是在合理的医学判断范围内，其适用于与人和其他动物的细胞接触而没有不适当的毒性、刺激性、过敏反应等，并且与合理的效益/风险比是相称的。

[211] 在本申请中使用的术语“药学上可接受的盐”指的是本申请的偶联体化合物的相对无毒性的、无机和有机酸加成盐和碱加成盐。代表性的酸加成盐包括氢溴酸盐、盐酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、硝酸盐、乙酸盐、草酸盐、戊酸盐、油酸盐、棕榈酸盐、硬脂酸盐、月桂酸盐、硼酸盐、苯甲酸盐、乳酸盐、磷酸盐、甲苯磺酸盐、柠檬酸盐、马来酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、萘酸盐、甲磺酸盐、葡庚糖酸盐、乳糖酸盐、氨基磺酸盐、丙二酸盐、水杨酸盐、丙酸盐、亚甲基-双-*b*-羟基萘甲酸盐、龙胆酸盐、羟乙基磺酸盐、二对甲苯甲酰基酒石酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐、环己基氨基磺酸盐和奎尼酸月桂基磺酸盐等。碱加成盐包括药学上可接受的金属和胺盐。适宜的金属盐包括钠、钾、钙、钡、锌、镁和铝盐。在一些实施方式中，钠盐和钾盐是优选的。适宜的无机碱加成盐由金属碱制备，所述金属碱包括例如氯化钠、氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化钙、氢氧化铝、氢氧化锂、氢氧化镁和氢氧化锌。适宜的胺碱加成盐由具有足够碱性的胺制备，以形成稳定的盐，并且优选包括以下常用于药物化学的胺，因为其毒性较低并且是医疗用途可接受的：氨、乙二胺、*N*-甲基葡糖胺、赖氨酸、精氨酸、鸟氨酸、胆碱、*N,N'*-二苄基乙二胺、氯普鲁卡因、二乙醇胺、普鲁卡因、*N*-苄基苄胺、二乙胺、哌嗪、三羟甲基氨基甲烷、四甲基氢氧化铵、三乙胺、二苄胺、二苯羟甲胺、脱氢枞胺、*N*-乙基哌啶、苄胺、四甲基铵、四乙基铵、甲胺、二甲胺、三甲胺、乙胺、碱性氨基酸（例如，赖氨酸和精氨酸）以及二环己胺等。

[212] 在本申请中使用的术语“药学上可接受的载体”指的是用于向对象递送本申请提供的偶联体化合物的药学上可接受的溶剂、混悬剂或任何其他药学上惰性的载剂，其不干扰偶联体化合物的结构和性质。某些这样的载体能够将偶联体化合物配制成例如片剂、丸剂、胶囊剂、液体、凝胶剂、糖浆剂、浆剂、混悬剂和软锭剂，供对象口服摄入。某些这样的载体能够将偶联体化合物制成注射、输注或局部施用的制剂。

[213] 用于本申请提供的药物组合物中的药学上可接受的载体包括但不限于，例如药学

上可接受的液体、凝胶或固体载体、水性载剂（例如，氯化钠注射液、林格氏注射液、等渗右旋糖注射液、无菌水注射液或者右旋糖和乳酸林格氏注射液）、非水性载剂（例如，植物来源的固定油、棉籽油、玉米油、芝麻油或花生油）、抗微生物剂、等渗剂（例如，氯化钠或右旋糖）、缓冲剂（例如，磷酸或柠檬酸缓冲剂）、抗氧化剂（例如，硫酸氢钠）、麻醉剂（例如，盐酸普鲁卡因）、混悬剂/分散剂（例如，羧甲基纤维素钠、羟丙基甲基纤维素或聚乙烯吡咯烷酮）、螯合剂（例如，EDTA（乙二胺四乙酸）或EGTA（乙二醇四乙酸））、乳化剂（例如，聚山梨醇酯 80（吐温-80））、稀释剂、佐剂、赋形剂、或无毒性辅助物质、本领域公知的其他成分或其各种组合。适宜的成分可以包括例如填充剂、粘合剂、缓冲剂、防腐剂、润滑剂、调味剂、增稠剂、着色剂或乳化剂。

[214] 在一些实施方式中，药物组合物是注射制剂。注射制剂包括无菌水溶液或分散剂、混悬剂或乳剂。在所有情况下，注射制剂应该是无菌的并且应该是流体以便于注射。注射制剂应在生产和储存条件下保持稳定，并且必须防止细菌和真菌等微生物的污染。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇（例如，甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等）及其适宜的混合物和/或植物油的溶剂或分散介质。注射制剂应保持适当的流动性。例如，可以通过使用诸如卵磷脂的包衣、通过使用表面活性剂等保持适当的流动性。可以通过各种抗菌剂和抗真菌剂实现阻止微生物的作用，例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等。

[215] 在一些实施方式中，药物组合物是口服制剂。口服制剂包括但不限于胶囊、扁胶囊、丸剂、片剂、锭剂（使用调味基质，通常为蔗糖和阿拉伯胶或黄蓍胶）、粉剂、颗粒剂、或在水性或非水性液体中的溶液剂或混悬剂、或者作为水包油或油包水液体乳剂、或者作为酏剂或糖浆、或者作为软锭剂（使用惰性基质，如明胶和甘油，或者蔗糖和阿拉伯胶）和/或作为漱口剂等。

[216] 在用于口服施用的固体剂型（例如，胶囊、片剂、丸剂、糖衣丸、散剂、颗粒剂等）中，将偶联体化合物与一种或多种药学上可接受的载体混合，如柠檬酸钠或磷酸氢二钙，和/或下述中的任意一种：（1）填充剂或增量剂，例如，淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和/或硅酸；（2）粘合剂，例如，羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和/或阿拉伯胶；（3）保湿剂，例如，甘油；（4）崩解剂，例如，琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠；（5）溶液阻滞剂，例如，石蜡；（6）吸收促进剂，例如，季铵化合物；（7）润湿剂，例如，乙酰基醇和单硬脂酸甘油酯；（8）吸收剂，例如，高岭土和膨润土；（9）润滑剂，例如，滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、

月桂基硫酸钠及其混合物；以及(10)着色剂。

[217] 在用于口服施用的液体剂型中，将偶联体化合物与下述中的任意一种混合：药学上可接受的乳剂、微乳、溶液、混悬剂、糖浆剂和酏剂。除了偶联体化合物以外，液体剂型可以含有本领域常用的惰性稀释剂，例如，水或其他溶剂、增溶剂和乳化剂，例如，乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、异丙醇、1,3-丁二醇、油（特别是，棉籽油、花生油、玉米油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油）、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和脱水山梨醇脂肪酸酯及其混合物。除了惰性稀释剂以外，口服组合物还可以包含佐剂，例如，润湿剂、乳化剂和混悬剂、甜味剂、调味剂、着色剂、增香剂和防腐剂。

[218] 在一些实施方式中，药物组合物是口腔喷雾制剂或鼻喷雾制剂。喷雾制剂包括但不限于水性气雾剂、非水性混悬剂、脂质体制剂或固体颗粒制剂等。水性气雾剂通过将药剂的水溶液或混悬液与常规药学上可接受的载体和稳定剂混合制备。载体和稳定剂根据具体化合物的要求而改变，但是在通常情况下，其包括非离子表面活性剂（吐温或聚乙二醇）、油酸、卵磷脂、氨基酸，例如，甘氨酸、缓冲溶液、盐、糖或糖醇。气雾剂通常由等渗溶液制备，并且能够通过喷雾递送。

[219] 在一些实施方式中，药物组合物可以通过与一种或多种其他药物混合使用。在一些实施方式中，药物组合物包含至少一种其他药物。在一些实施方式中，其他药物是抗肿瘤药、心血管药、抗炎药、抗病毒药、消化系统药、神经系统药、呼吸系统药、免疫系统药、皮肤病药、代谢药等。

[220] 在一些实施方式中，可以通过适宜的途径向有需要的对象施用药物组合物，包括但不限于口服、注射（例如，静脉、肌内、皮下、皮内、心内、鞘内、胸膜内、腹膜内注射等）、粘膜（例如，鼻内、口内施用等）、舌下、直肠、经皮、眼内和肺部施用。在一些实施方式中，药物组合物可以静脉内、皮下、口服、肌内或心室内施用。

[221] 由于一些有效载荷的性质，例如高毒性、高亲水性，因而希望将有效载荷更特异性地和更有效地向有需要的对象递送。例如，在癌症治疗中，希望将化疗剂特异性地向癌细胞递送，而不对正常细胞产生毒性。因而，本申请的另一个方面公开了向有需要的对象递送有效载荷的方法，所述方法包括向对象施用治疗有效量的本申请提供的偶联体化合物，或其药学上可接受的盐，或者本申请提供的药物组合物。本申请所述的有效载荷可以是研究者、兽医、医生或其他医师正在寻找的在组织、系统、动物个体或人中引发生物学或医学应答以

预防、抑制、改善或治疗疾病的任何药剂。

[222] 本申请的一个方面公开了一种用于治疗对象中的疾病的方法，所述方法包括向所述对象施用治疗有效量的本申请所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，或者本申请所述的药物组合物。

[223] 在本申请中使用的术语“治疗有效量”指的是偶联体化合物或其药学上可接受的盐或药物组合物在一定程度上减轻对象中疾病或病症的一种或多种症状的量；使与疾病或病症相关或导致疾病或病症的一个或多个生理或生化参数部分或完全恢复正常的量；和/或降低疾病或病症发病的可能性的量。这种量通常根据多种因素而改变，本领域的普通技术人员根据本申请提供的说明书的范围能够对其进行确定和说明。这些包括但不限于：特定对象及其年龄、体重、身高、一般身体状况和病史、所使用的特定化合物，以及其制剂的载体和所选择的施用途径；以及所治疗病况的性质和严重程度。

[224] 在一些实施方式中，偶联体化合物或其药学上可接受的盐，或者药物组合物的量足以在对象中抑制疾病或病症，或者预防性地抑制或阻止疾病或病症的发病。尽管治疗有效量可以在不同对象中改变，但是其范围通常为从 0.01 至 100 mg/kg，例如 0.01 至 90 mg/kg、0.01 至 80 mg/kg、0.01 至 70 mg/kg、0.01 至 60 mg/kg、0.01 至 50 mg/kg、0.01 至 40 mg/kg、0.01 至 30 mg/kg、0.01 至 20 mg/kg、0.01 至 10 mg/kg、0.01 至 5 mg/kg、0.01 至 4 mg/kg、0.01 至 3 mg/kg、0.01 至 2 mg/kg、0.01 至 1 mg/kg、0.01 至 0.1 mg/kg。本申请所述的治疗有效量可以等于上述数值范围内的任意值，包括该范围的端点。

[225] 本申请的另一个方面公开了一种用于治疗对象中的疾病的方法，所述方法包括向所述对象施用治疗有效量的本申请所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，或者本申请所述的药物组合物。在一些实施方式中，所述方法还包括将一种或多种治疗剂与所述偶联体化合物或其药学上可接受的盐，或者所述药物组合物联合施用。

[226] 本申请的又一个方面公开了本申请所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，或者本申请所述的药物组合物在用于制备治疗对象中的疾病的药物中的用途。

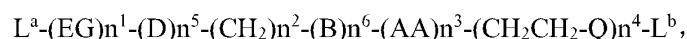
[227] 在本申请中使用的术语“对象”指的是人和非人动物。非人动物包括所有的脊椎动物，例如哺乳动物和非哺乳动物。对象也可以是家畜，例如，牛、猪、羊、家禽和马，或家养动物，例如，狗和猫。对象可以是雄性（例如，男性）或雌性（例如，女性），可以是老年，成年、青少年、儿童或婴儿。人可以是高加索人、非洲人、亚洲人、闪族人或其他种族

背景人士，或者是这些种族背景的混合。

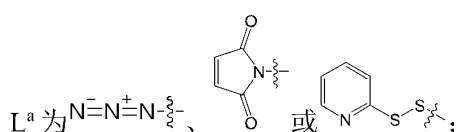
[228] 在一些实施方式中，本申请所述疾病选自下组：癌症、免疫性疾病、代谢疾病和神经疾病。在一些实施方式中，所述疾病的特征在于对象中的器官或组织中的细胞高表达或异常表达细胞表面受体、细胞表面抗原或特定蛋白。在一些实施方式中，细胞表面受体选自 FOLR1、TRPV6 和 c-Met。在一些实施方式中，细胞表面抗原选自 PSMA。在一些实施方式中，特定蛋白选自核受体（例如，AR 和 ER）、激酶类蛋白（例如，RIPK2、BCR-ABL、EGFR、HER2、c-Met、TBK1、CDK2/4/6/9、ALK、Akt、CK2、ERK1/2、FLT3、PI3K、BTK 和 FAK）、AKT、PAN-BET 蛋白、BET 蛋白（例如，BRD2、BRD3、BRD4 和 BRD6）、BLK、BRAF1、BCL-xl、ERR α 、FKBP12、FRS2 α 、JAK1、JAK3、IKZF1、IRAK4、MDM2、MetAP2、PLK1、PSK-J3、RAS、TACC3、Tau、TrkB、MDM2 或其任意组合物。

[229] 在一些实施方式中，癌细胞或其他生理功能异常的细胞具有本申请提及的细胞表面受体或抗原的表达。在一些实施方式中，癌细胞或其他生理功能异常具有本申请提及的细胞表面受体或抗原的高表达（例如，根据 Depmap 数据（参见 <https://depmap.org/portal/>），相应的基因表达至少为 0、0.01、0.05、0.1、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或 10 以上）。在一些实施方式中，癌细胞或其他生理功能异常细胞具有高表达，FOLR1、TRPV6、PSMA、c-Met 或其任意组合。

[230] 本申请的另一个方面公开了一种化合物或其盐，所述化合物具有以下结构：



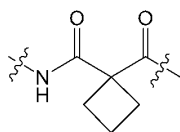
其中，

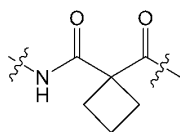


EG 为 $-CH_2CH_2O-$ 或 $-OCH_2CH_2-$; n^1 是 0-6 的整数;

n^2 是 0-8 的整数;

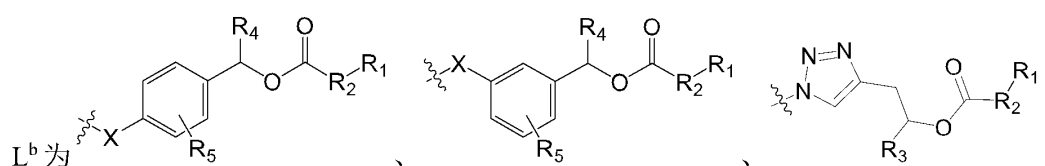
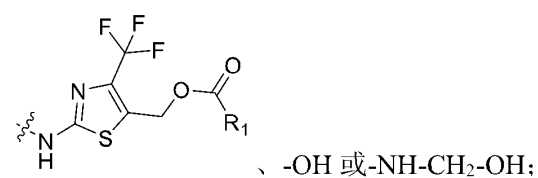
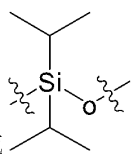
D 为 $-C(=O)-NH-S(=O)_2-NH-$; n^5 为 0 或 1;

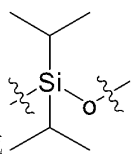


B 为 $-C(=O)-$ 、、 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=O)-$ 、 $-\text{C}(=O)-\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 、 $-\text{NH}-\text{C}(=O)-$ 或 $-\text{NH}-$ ； n^6 为 0-3 的整数；

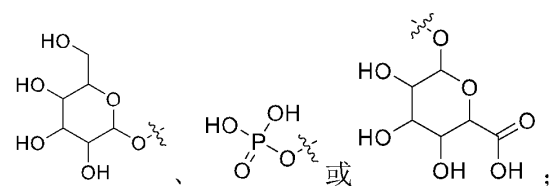
AA 每次出现时独立地为氨基酸残基； n^3 是 0-5 的整数；

Q 每次出现时独立地为 $-C(=O)-$ 、 $-\text{O}-$ 或键， n^4 是 0-3 的整数；

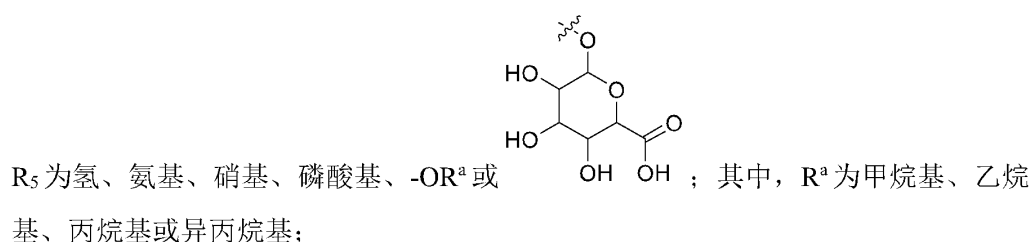
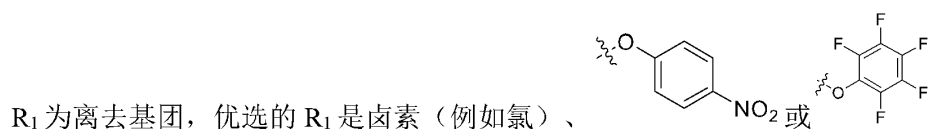


其中 X 为键、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{C}(=O)-$ 、氧或；

R_2 为键、 $-\text{O}-\text{CH}_2-$ 或 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=O)-$ ；

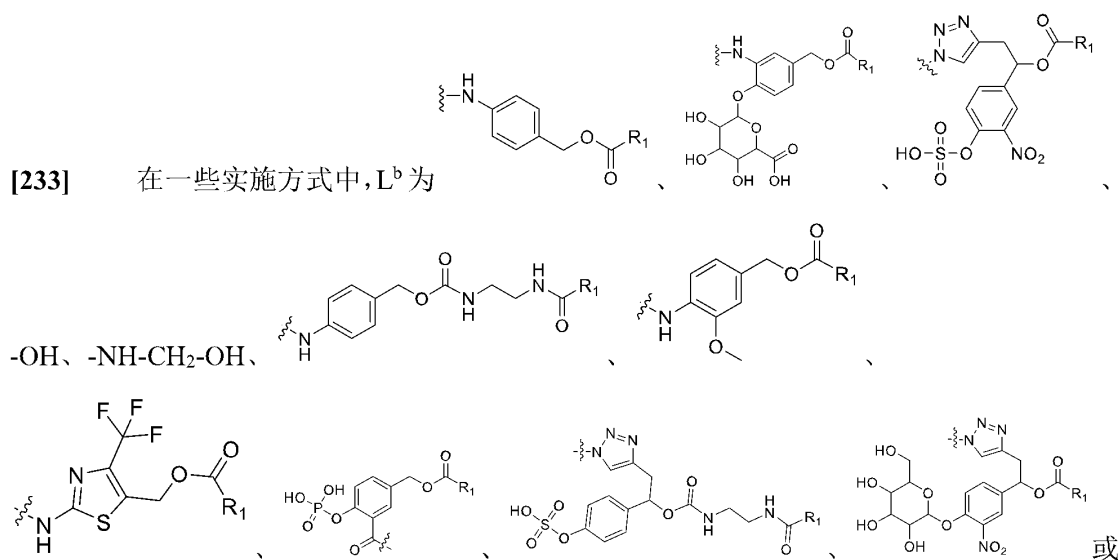


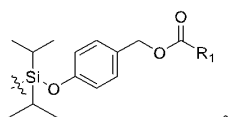
R_4 为氢或 C_{1-8} 烷基；



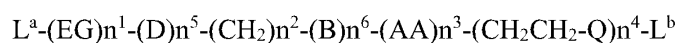
[231] 在一些实施方式中，EG 为 $-CH_2CH_2O-$ 。在一些实施方式中， n^1 是 2。在一些实施方式中， n^1 是 0。在一些实施方式中， n^2 是 1。在一些实施方式中， n^2 是 4。在一些实施方式中， n^2 是 5。在一些实施方式中， n^5 是 0。在一些实施方式中， n^6 是 1。在一些实施方式中， n^6 是 3。在一些实施方式中， n^1 是 2、 n^2 是 1、 n^3-n^4 是 0 并且 L^b 是 $-OH$ 。

[232] 在一些实施方式中，AA 每次出现时独立地为 Val、Cit、Glu、Leu、Lys、Ala、Gly、Phe、Gln、Pro 或 Asn 形成的氨基酸残基。在一些实施方式中， $-(AA)n^3-$ 为选自下组的肽残基： $-Val-Cit-$ 、 $-Glu-Val-Cit-$ 、 $-Ala-Cit-$ 、 $-Phe-Cit-$ 、 $-Val-Ala-$ 、 $-Gly-Gly-Phe-Gly-$ 、 $-Cit-$ 、 $-Val-Leu-Lys-$ 、 $-Val-Cit-Pro-Gly-$ 、 $-Gly-Asn-Asn-$ 和 $-Ala-Ala-Asn-$ 。在一些实施方式中，当 n^4 为 1 时，Q 为 $-C(=O)-$ ；当 n^4 为 2 时，Q 分别为 $-O-$ 和 $-C(=O)-$ ；当 n^4 为 3 时，Q 分别为 $-O-$ 、 $-O-$ 和键。在一些实施方式中， n^4 为 0。

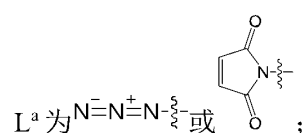




[234] 在一些实施方式中, 所述化合物具有以下结构:



其中,



EG 为 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$; n^1 是 2-4 的整数;

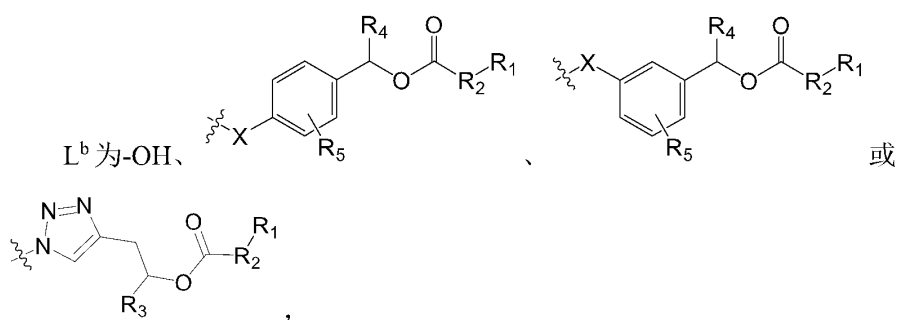
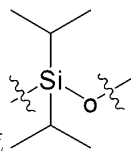
D 为 $-C(=O)-NH-S(=O)_2-NH-$; n^5 为 0 或 1;

n^2 是 0-5 的整数;

B 为 -C(=O)-、-C(=O)-NH-、-CH₂CH₂O-、-NH-CH₂CH₂-C(=O)-或-NH-; n⁶ 为 0-3 的整数;

AA 每次出现时独立地为氨基酸残基; n^3 是 0-3 的整数;

Q 每次出现时独立地为-C(=O)-、-O-或键，n⁴ 是 0-3 的整数；

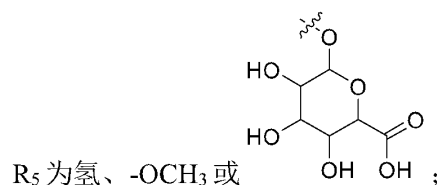
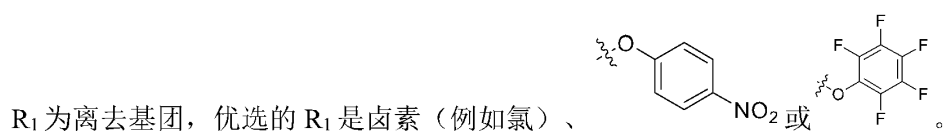


其中 X 为键、-NH-、-C(=O)-或  ;

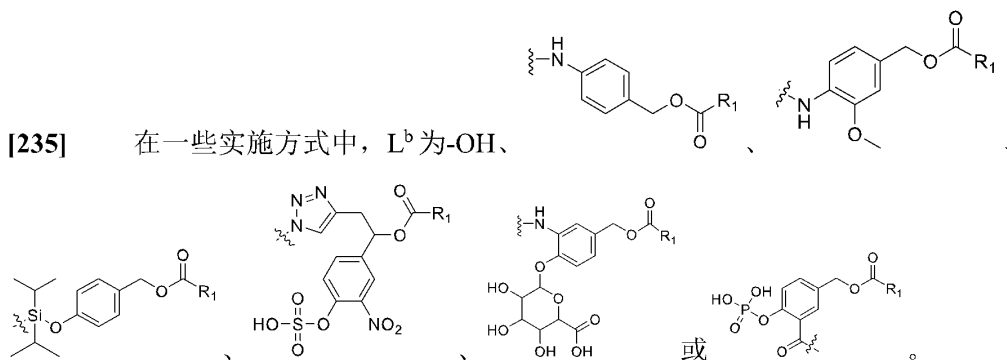
R₂ 为键；



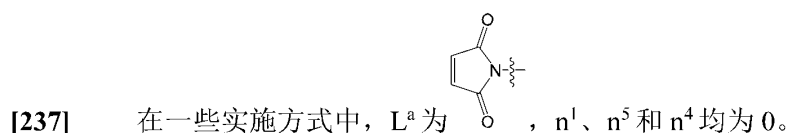
R_4 为氢;



[235] 在一些实施方式中, L^b 为 $-OH$ 、



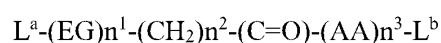
[236] 在一些实施方式中, n^5 为 1 时, n^2 和 n^4 均为 0。



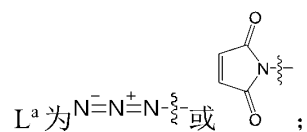
[238] 在一些实施方式中, L^a 为 $N=N^+=N^--$, n^2 是 1 或 2。

[239] 在一些实施方式中, AA 每次出现时独立地为 Val、Cit、Glu 或 Ala 形成的氨基酸残基。在一些实施方式中, $-(AA)n^3-$ 为选自下组的肽残基: $-\text{Val-Cit-}$ 、 $-\text{Glu-Val-Cit-}$ 、 $-\text{Ala-Cit-}$ 和 $-\text{Val-Ala-}$ 。

[240] 在一些实施方式中, 所述化合物具有以下结构:



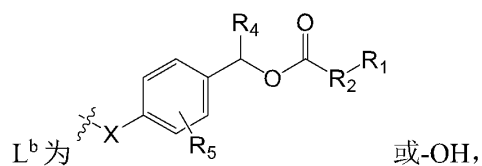
其中,



EG 为 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$; n^1 是 0-4 的整数;

n^2 是 0-5 的整数;

AA 每次出现时独立地为氨基酸残基; n^3 是 0-3 的整数;

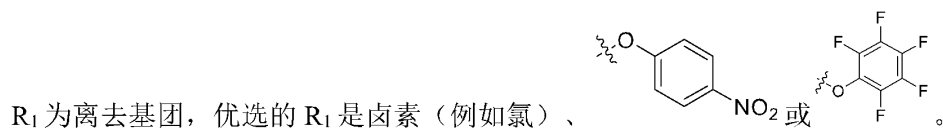


其中 X 为 $-\text{NH}-$;

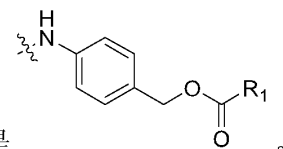
R_2 为键;

R_4 为氢;

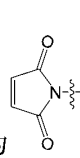
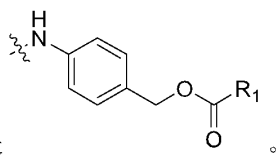
R_5 为氢或 $-\text{OCH}_3$;

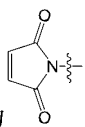


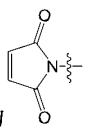
[241] 在一些实施方式中, L^a 为 $N=N=N-\text{[wavy line]}$ 、 n^1 是 2、 n^2 是 1 且 L^b 是



[242] 在一些实施方式中, L^a 为 $N=N=N-\text{[wavy line]}$ 、 n^1 是 2、 n^2 是 1 且 L^b 是 $-\text{OH}$ 。

[243] 在一些实施方式中, L^a 为 、 n^1 是 0、 n^2 是 5 且 L^b 是 .

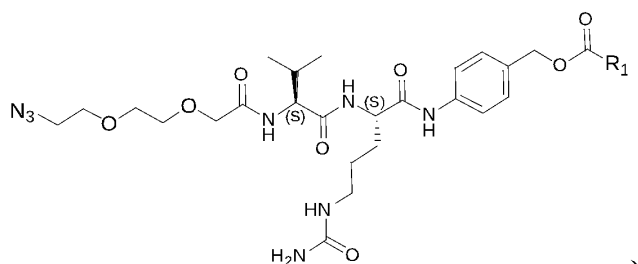
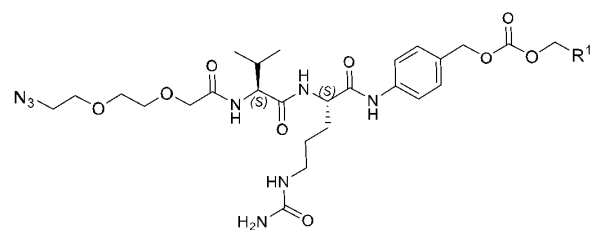
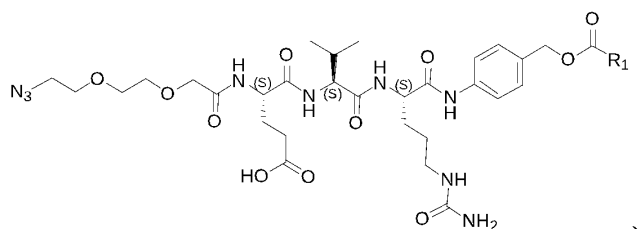
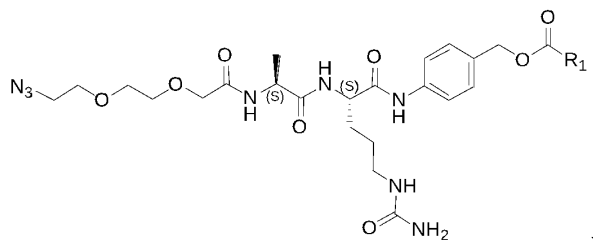


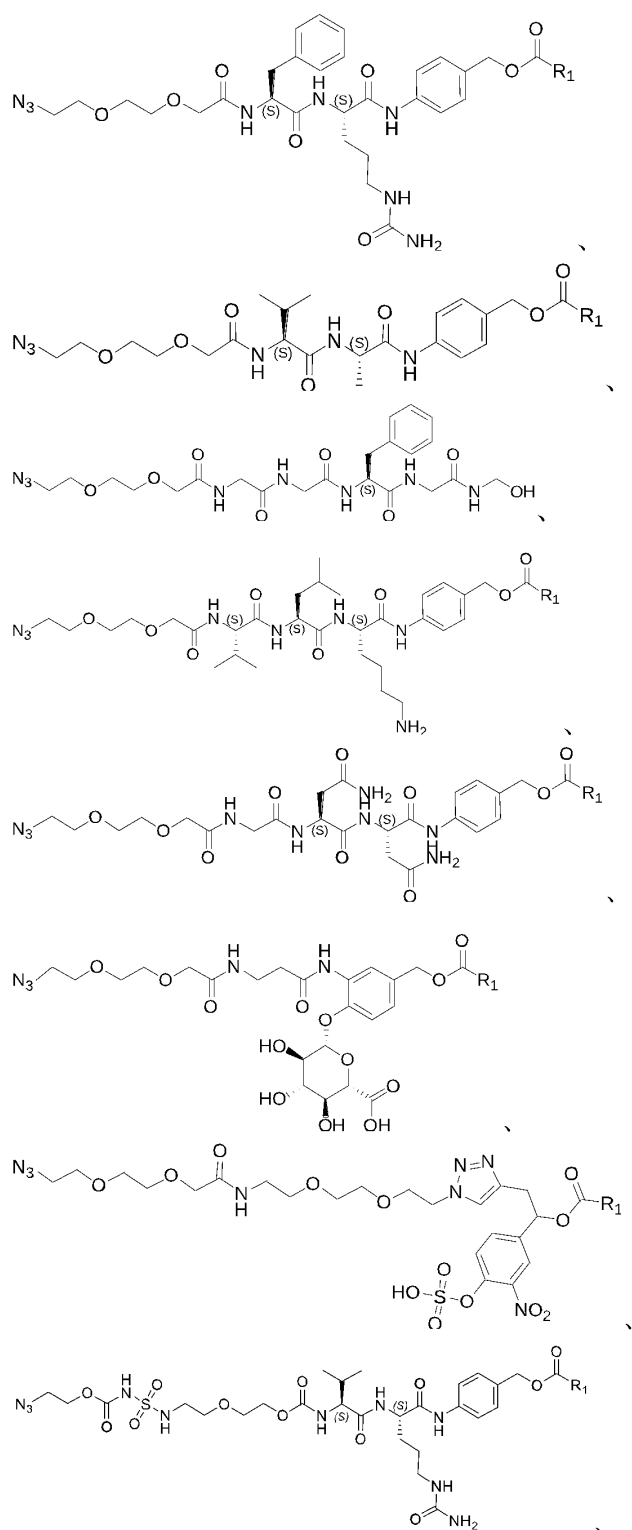
[244] 在一些实施方式中, L^a 为 、 n^1 是 0、 n^2 是 5 且 L^b 是 -OH。

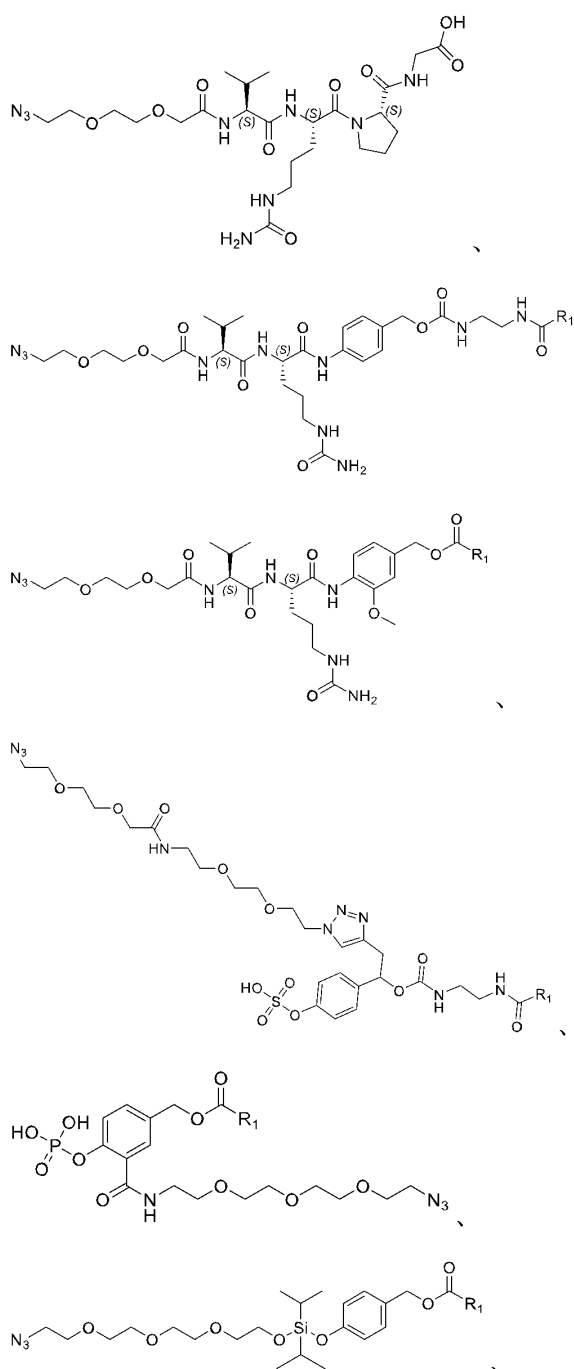
[245] 在一些实施方式中, AA 每次出现时独立地为 Val、Cit、Glu 或 Ala 氨基酸残基。

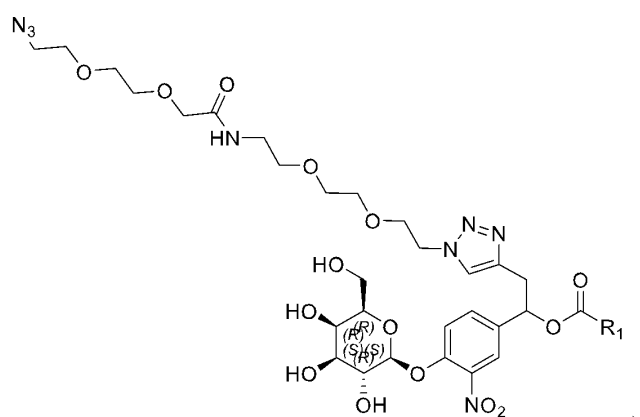
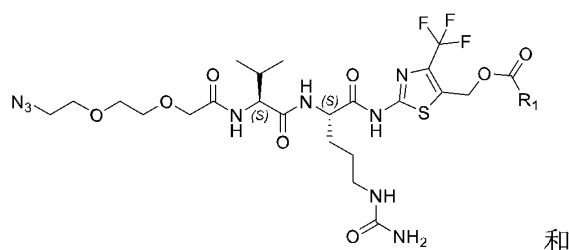
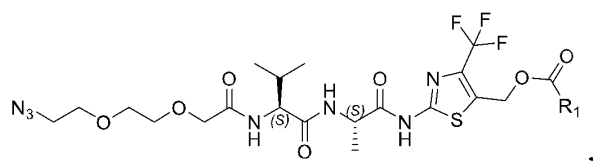
在一些实施方式中, $-(AA)n^3$ -为选自下组的肽残基: -Val-Cit-、-Glu-Val-Cit-、-Ala-Cit-、-Phe-Cit-、-Val-Ala-、-Gly-Gly-Phe-Gly-、-Val-Leu-Lys-和-Gly-Asn-Asn-。

[246] 在一些实施方式中, 本文公开的化合物具有选自以下组的结构:

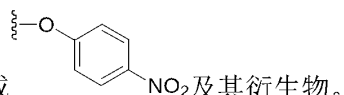


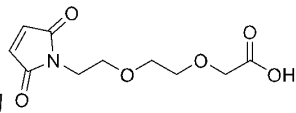






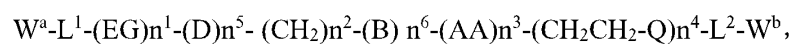
其中 R_1 为离去基团，优选的 R_1 是卤素（例如氯）或



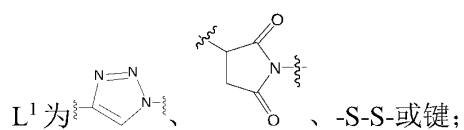
[247] 本申请的另一个方面公开了一种化合物  或其盐。

[248] 在一些实施方式中，离去基团是卤素，例如氟、氯、溴或碘。在一些优选的实施方式中，离去基团是氯。在一些优选的实施方式中，离去基团是对硝基苯酚。在一些优选的实施方式中，离去基团是五氟苯酚。

[249] 本申请的另一个方面公开了一种偶联体化合物或其药学上可接受的盐，所述偶联体化合物具有以下结构：



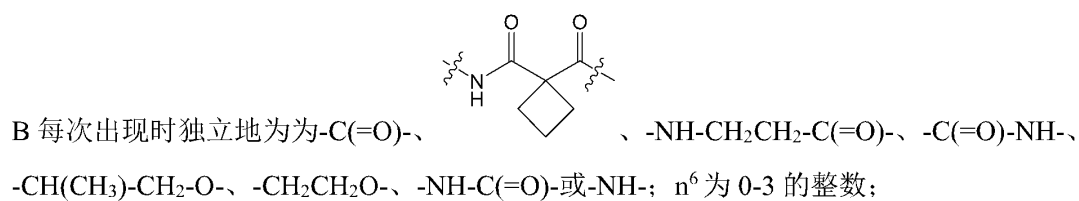
其中，



EG 为 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 或 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ ； n^1 是 0-6 的整数；

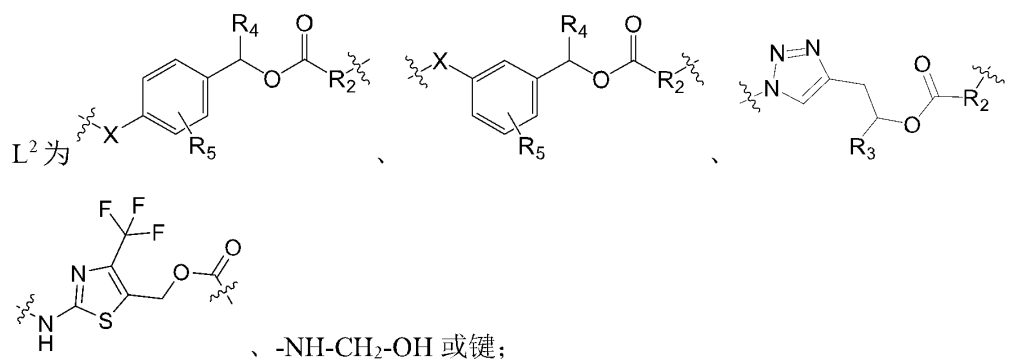
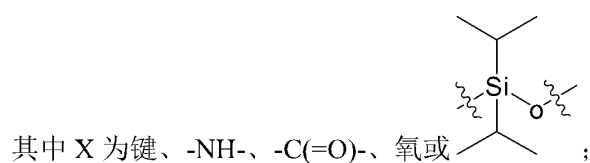
n^2 是 0-8 的整数；

D 为 $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{S}(=\text{O})_2-\text{NH}-$ ； n^5 为 0 或 1；

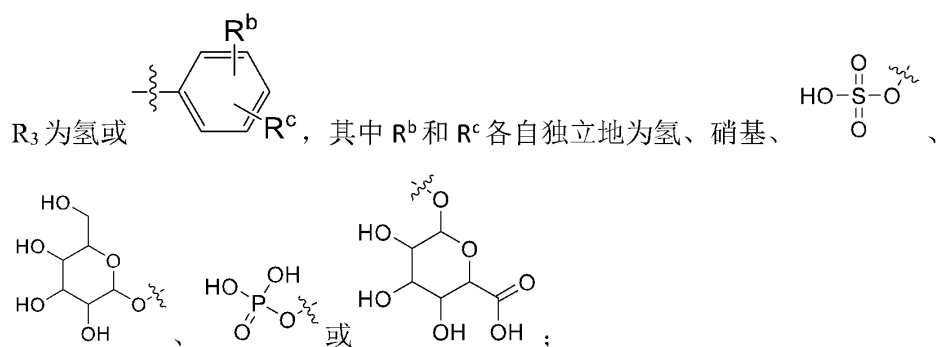


AA 每次出现时独立地为氨基酸残基； n^3 是 0-5 的整数；

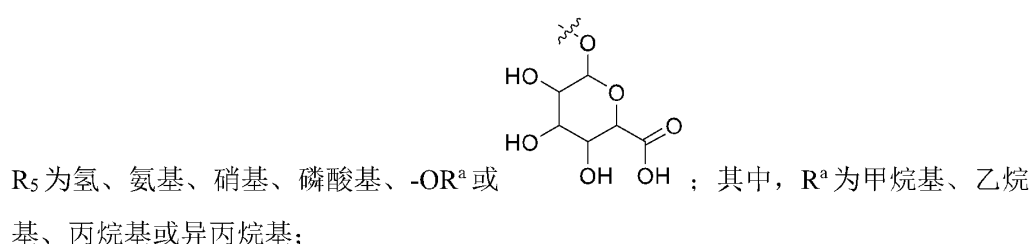
Q 每次出现时独立地为 $-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{O}-$ 或键， n^4 是 0-3 的整数；



R_2 为键、 $-\text{O}-\text{CH}_2-$ 或 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$ ；



R_4 为氢或 C_{1-8} 烷基;

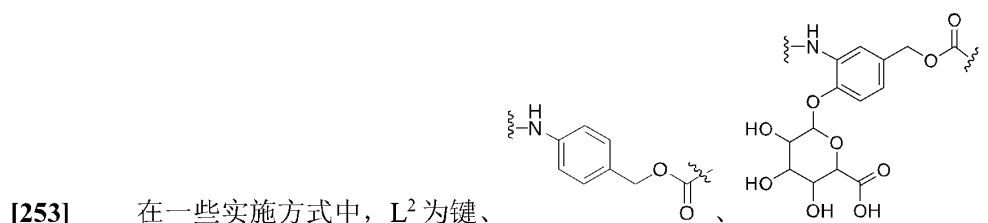


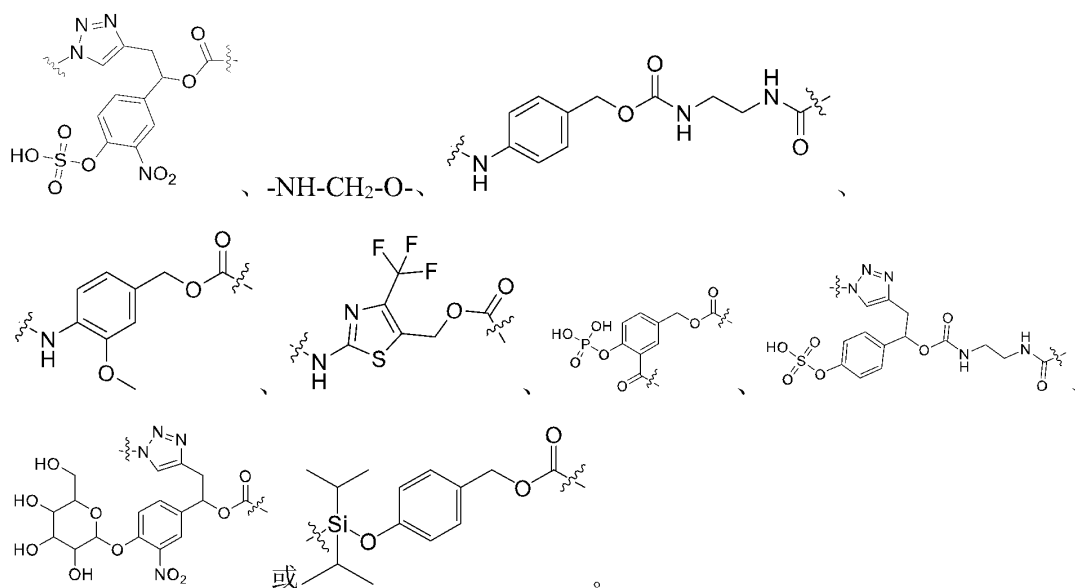
W^a 和 W^b 各自独立地为有效载荷或可以结合细胞表面蛋白的靶向分子。

[250] 在一些实施方式中, EG 为 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 。在一些实施方式中, n^1 是 2。在一些实施方式中, n^1 是 0。在一些实施方式中, n^2 是 1。在一些实施方式中, n^2 是 4。在一些实施方式中, n^2 是 5。在一些实施方式中, n^5 是 0。在一些实施方式中, n^6 是 1。在一些实施方式中, n^6 是 3。在一些实施方式中, n^1 是 2、 n^2 是 1、 n^3 和 n^4 是 0 并且 L^2 是键。

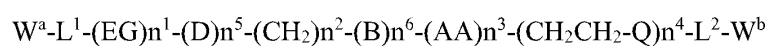
[251] 在一些实施方式中, AA 每次出现时独立地为 Val、Cit、Glu、Leu、Lys、Ala、Gly、Phe、Gln、Pro 或 Asn 形成的氨基酸残基。在一些实施方式中, $-(AA)n^3-$ 为选自下组的肽残基: $-\text{Val-Cit-}$ 、 $-\text{Glu-Val-Cit-}$ 、 $-\text{Ala-Cit-}$ 、 $-\text{Phe-Cit-}$ 、 $-\text{Val-Ala-}$ 、 $-\text{Gly-Gly-Phe-Gly-}$ 、 $-\text{Cit-}$ 、 $-\text{Val-Leu-Lys-}$ 、 $-\text{Val-Cit-Pro-Gly-}$ 、 $-\text{Gly-Asn-Asn-}$ 和 $-\text{Ala-Ala-Asn-}$ 。

[252] 在一些实施方式中, 当 n^4 为 1 时, Q 为 $-\text{C}(=\text{O})-$; 当 n^4 为 2 时, Q 分别为 $-\text{O-}$ 和 $-\text{C}(=\text{O})-$; 当 n^4 为 3 时, Q 分别为 $-\text{O-}$ 、 $-\text{O-}$ 和键。在一些实施方式中, n^4 为 0。

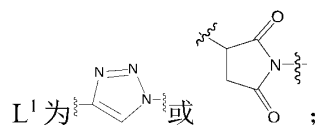




[254] 在一些实施方式中, 所述化合物具有以下结构:



其中,



EG 为 $-CH_2CH_2O-$; n^1 是 2-4 的整数;

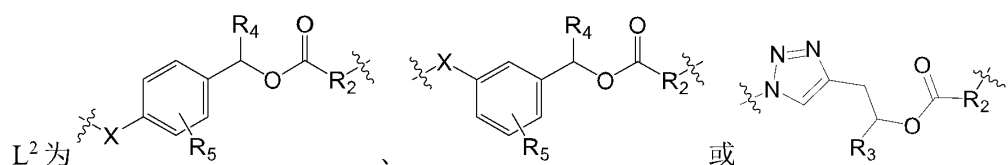
D 为 $-C(=O)-NH-S(=O)_2-NH-$; n^5 为 0 或 1;

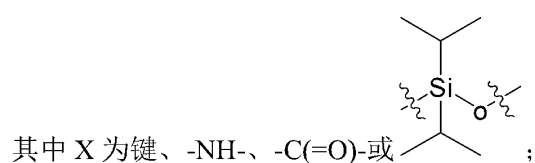
n^2 是 0-5 的整数;

B 为 $-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-NH-$ 、 $-CH_2CH_2O-$ 、 $-NH-CH_2CH_2-C(=O)-$ 或 $-NH-$; n^6 为 0-3 的整数;

AA 每次出现时独立地为氨基酸残基; n^3 是 0-3 的整数;

Q 每次出现时独立地为 $-C(=O)-$ 、 $-O-$ 或键; n^4 是 0-3 的整数;

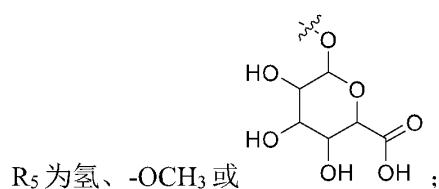




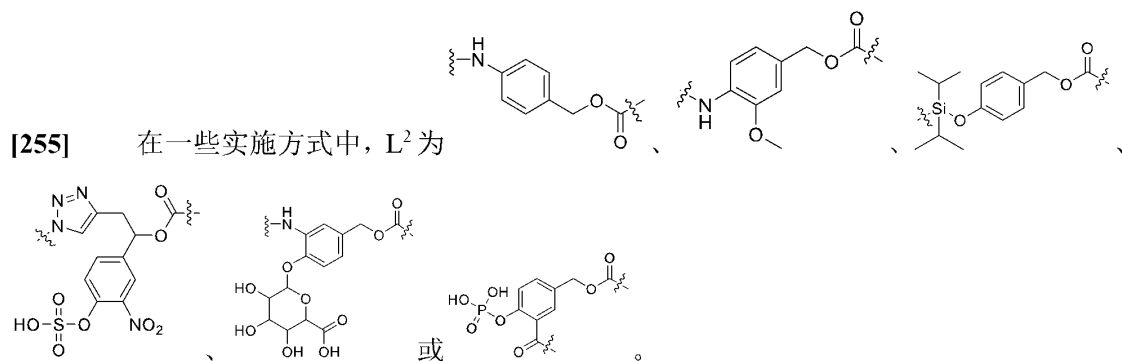
R₂ 为键;



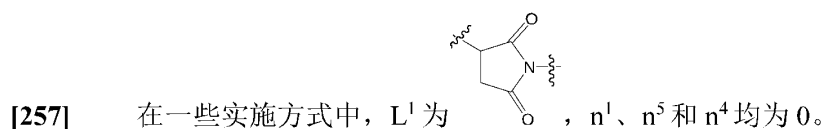
R₄ 为氢;

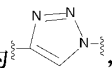


W^a 和 W^b 各自独立地为有效载荷或可以结合细胞表面蛋白的靶向分子。



[256] 在一些实施方式中, n⁵ 为 1 时, n² 和 n⁴ 均为 0。

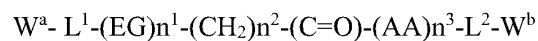


[258] 在一些实施方式中, L¹ 为  , n² 是 1 或 2。

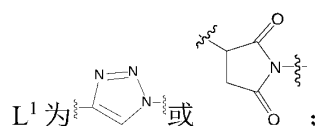
[259] 在一些实施方式中, AA 每次出现时独立地为 Val、Cit、Glu 或 Ala 形成的氨基酸残基。在一些实施方式中, -(AA)n³-为选自下组的肽残基: -Val-Cit-、-Glu-Val-Cit-、

-Ala-Cit-和-Val-Ala-。

[260] 在一些实施方式中, 所述化合物具有以下结构:



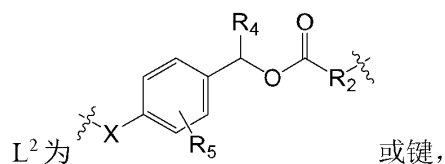
其中,



EG 为 $-CH_2CH_2O-$; n^1 是 0-4 的整数;

n^2 是 0-5 的整数;

AA 每次出现时独立地为氨基酸残基; n^3 是 1-4 的整数;



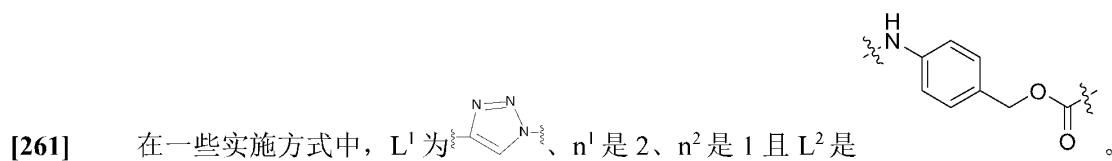
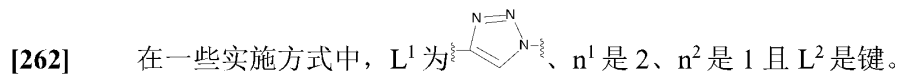
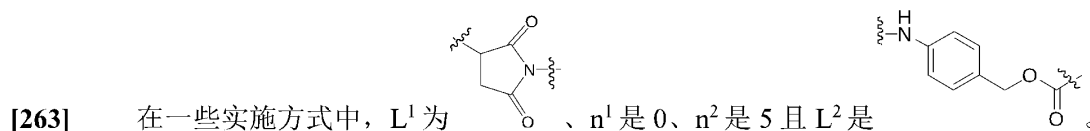
其中 X 为 $-NH-$;

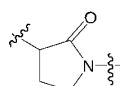
R_2 为键;

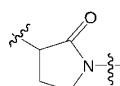
R_4 为氢;

R_5 为氢或 $-OCH_3$;

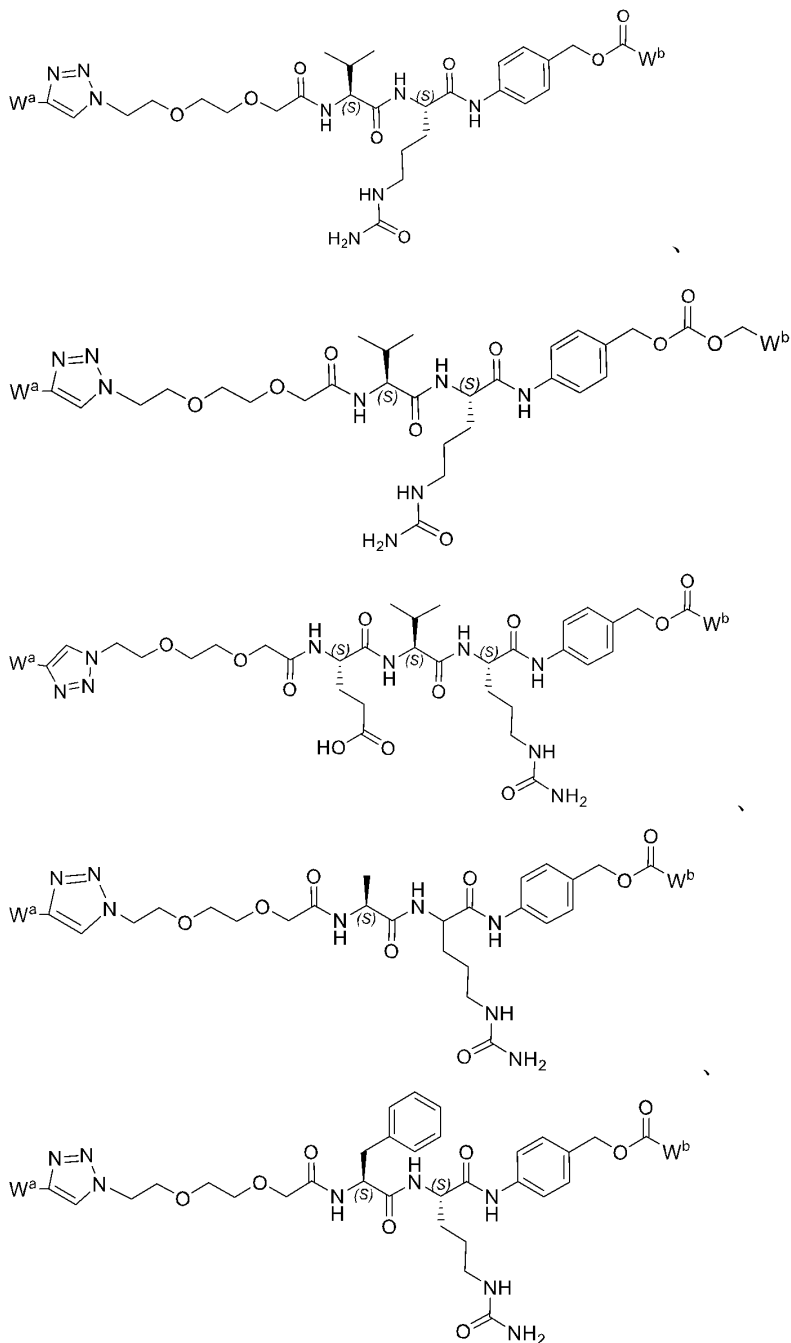
W^a 和 W^b 各自独立地为有效载荷或可以结合细胞表面蛋白的靶向分子。

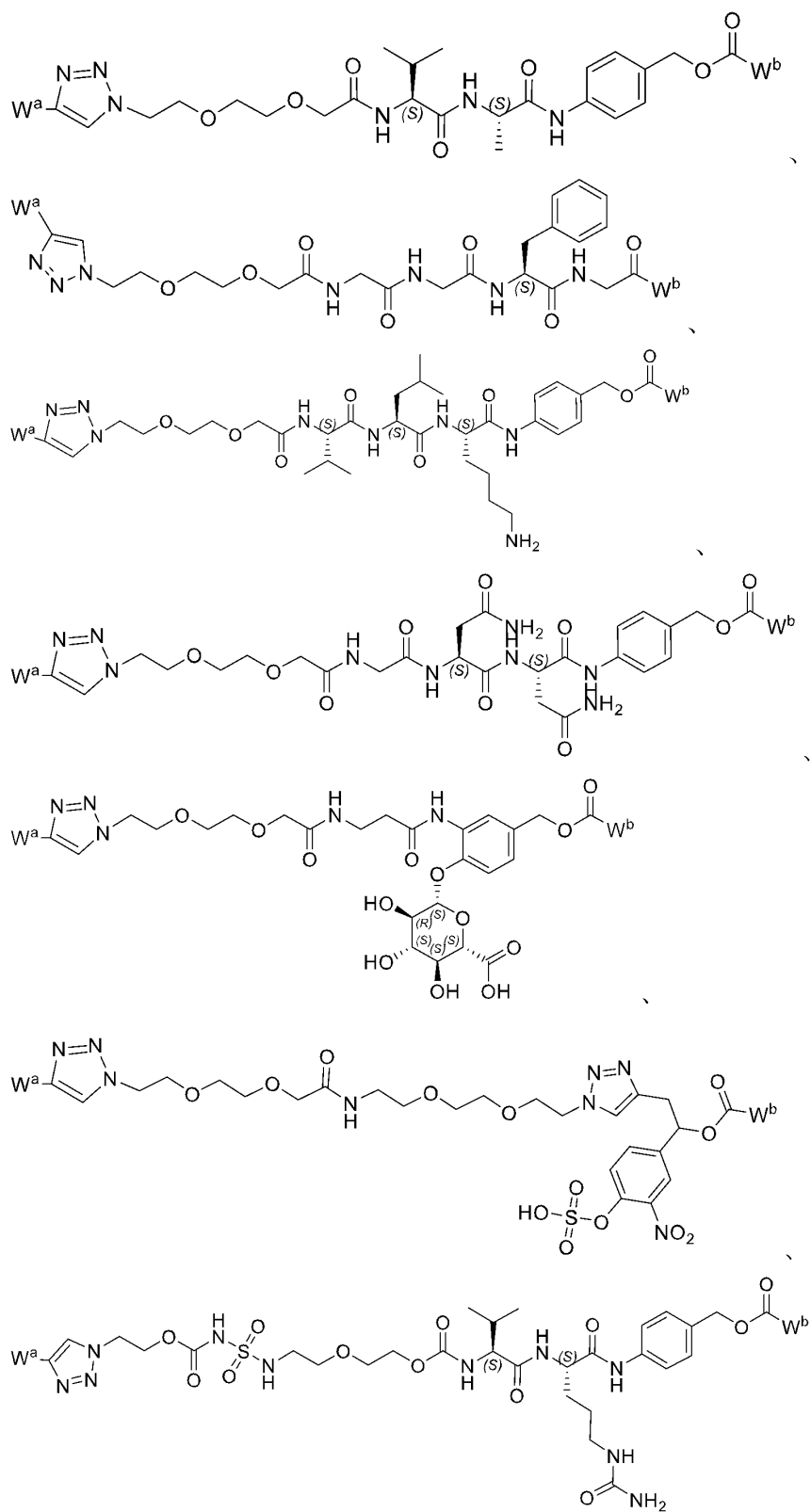


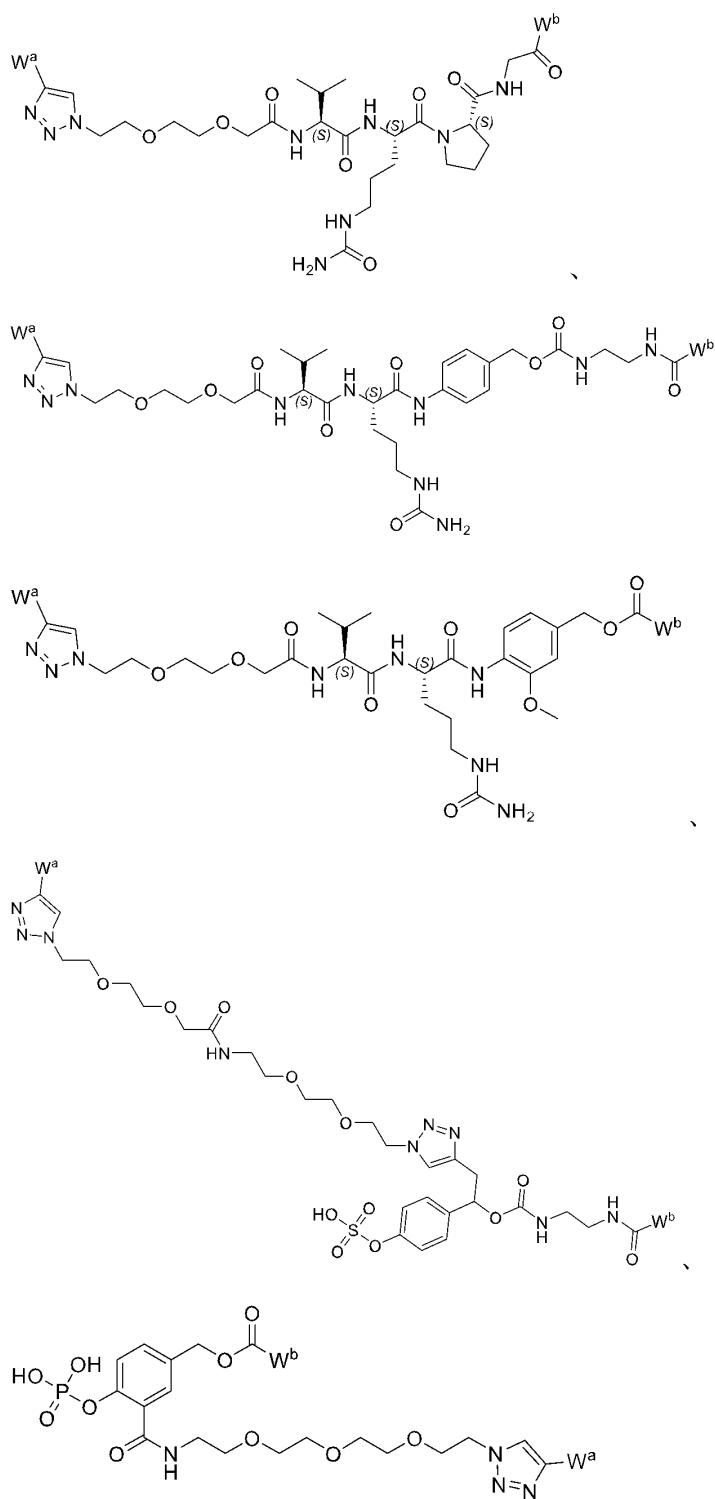


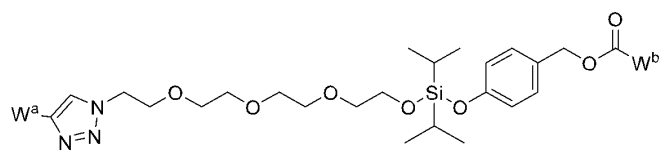
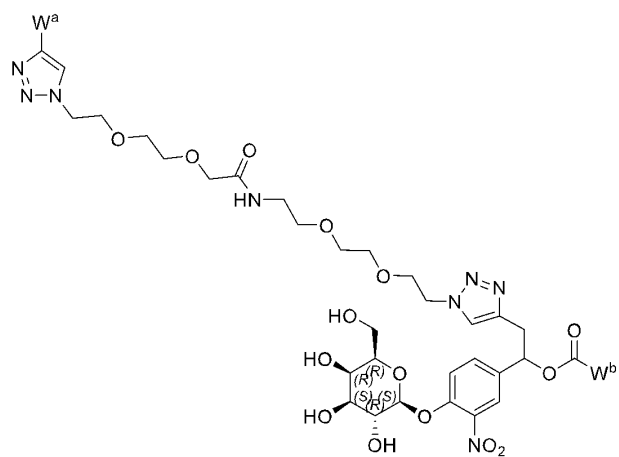
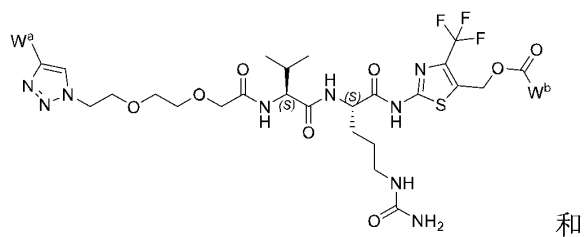
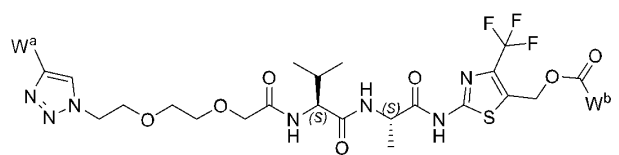
[264] 在一些实施方式中, L^1 为 、 n^1 是 0、 n^2 是 5 且 L^2 是键。

[265] 在一些实施方式中, 本文公开了具有选自以下组的结构的偶联体化合物:



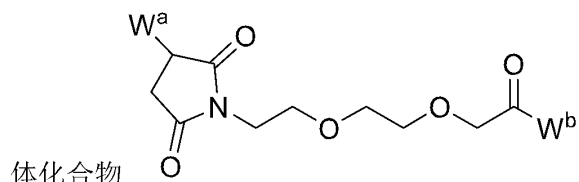






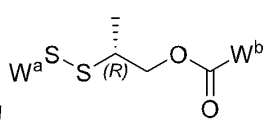
其中 W^a 和 W^b 各自独立地有效载荷或为可以结合细胞表面蛋白的靶向分子。

[266] 本申请的另一个方面提供了一种偶联体化合物或其药学上可接受的盐，所述偶联

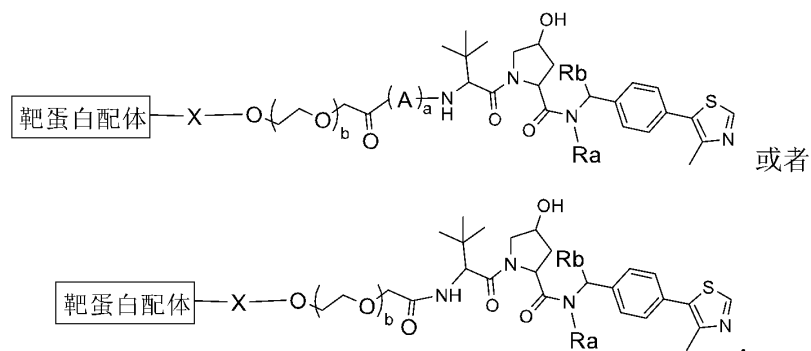


体化合物，其中 W^a 和 W^b 各自独立地为有效载荷或可以结合细胞表面蛋白的靶向分子。

[267] 本申请的另一个方面提供了一种偶联体化合物或其药学上可接受的盐，所述偶联

体化合物  , 其中 W^a 和 W^b 各自独立地为有效载荷或可以结合细胞表面蛋白的靶向分子。

[268] 本申请的另一个方面提供了一种蛋白降解靶向嵌合体或其药学上可接受的盐, 所述蛋白降解靶向嵌合体化合物具有以下结构:



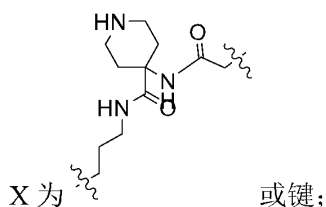
其中,

Ra 和 Rb 各自独立地为氢、烷基、NH₂、OH、或卤素;

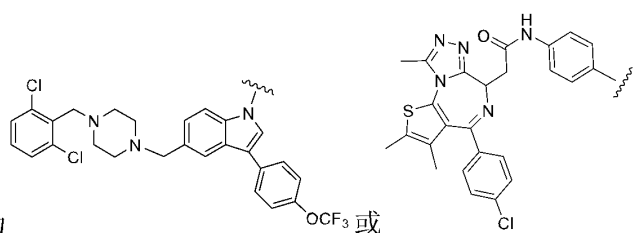
A 每次出现时独立地为氨基酸残基;

a 为 0 或 1;

b 为 0-5 的整数;



靶蛋白配体为



[269] 在一些实施方式中, Ra 为氢。在一些实施方式中, Rb 为氢。在一些实施方式中, A 为 Lys 形成的氨基酸残基。在一些实施方式中, a 为 1。在在在实施方式中, a 为 0。在在在实施方式中, b 为 1。在在在实施方式中, b 为 2。在在在实施方式中, b 为 3。在在在实施方式中, b 为 4。在在在实施方式中, b 为 5。

[272] 以下将通过具体实施例更详细地描述本申请。提供以下实施例仅用于说明目的，并且不旨在以任何方式限制本发明。本领域技术人员将容易地意识到可以对多种非关键参数进行改变或修改以产生基本上相同的结果。

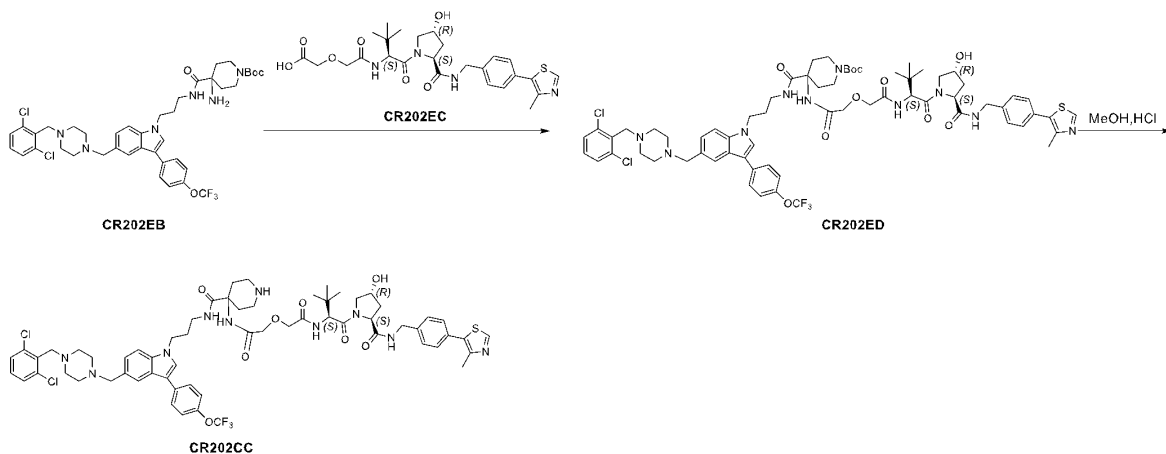
实施例

[273] 以下实施例旨在更好地说明本发明，且不应理解为限制本发明的范围。所有下述的特定组合物、材料和方法，其整体或部分，都在本发明的范围内。这些特定的组合物、材料和方法不是为了限制本发明，而只是为说明特定的实施方式在本发明的范围内。本领域技术人员可不添加创造性及不偏离本发明范围而开发出等同的组合物、材料和方法。应理解，在对本发明的方法作出的多种改动可以仍然包含在本发明范围内。发明人意在将这样的变动包含在本发明的范围内。

实施例 1 偶联体化合物的制备

[274] 1. 蛋白降解靶向嵌合体的制备

[275] 1.1 CR202CC、CR202CF、CR202CI、CR202CL 和 CR202CP 的制备

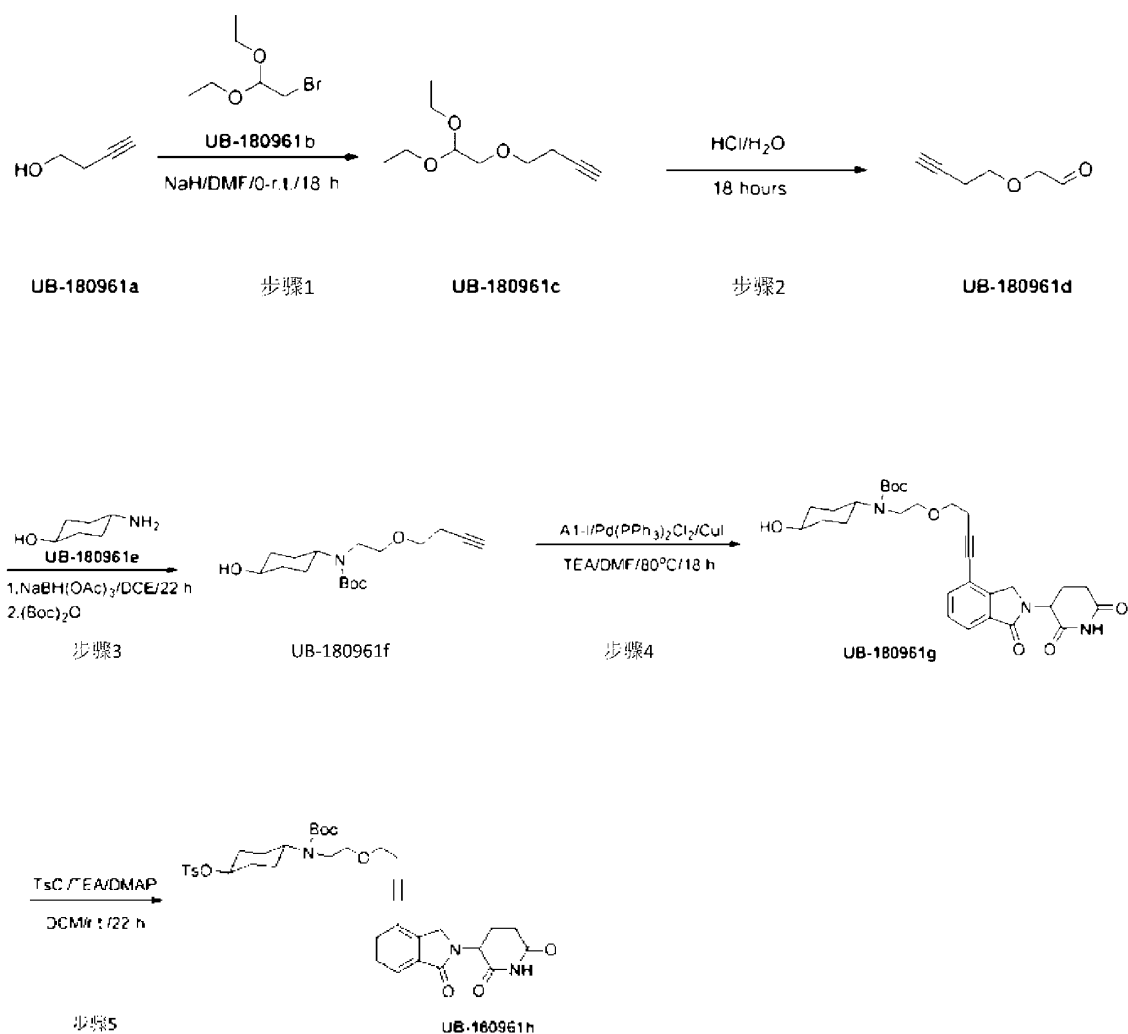


[276] 将 CR202EC (240.0 mg, 0.44 mmol, 合成路线可参考文献 J. Med. Chem. 2020, 63, 17, 9977-9989, 该文献公开的内容通过引用的方式并入本文) 加入 DMF (5 mL) 中, 0~5°C, 加入 HATU (175.0 mg, 0.46 mmol), DIPEA (166.0 μL, 0.50 mmol), 搅拌半小时后, 加入 CR202EB (342.0 mg, 0.42 mmol, 合成路线可参考专利 WO2015/184349A2 说明书第[0227]段, 该文献公开的内容通过引用的方式并入本文), 保温反应 2 小时, 反应完全, 反应液加

水 (25 mL)、乙酸乙酯 (25 mL) 萃取, 用无水硫酸钠干燥有机相, 柱层析纯化, 得淡黄色固体 **CR202ED** 14.0 mg。将 **CR202ED** (14.0 mg, 0.01 mmol) 加入甲醇 (200 μ L) 中, 0~5°C, 加入 3M HCl/甲醇溶液 (50 μ L), 20~25°C 下反应 1 小时, 反应完全, 干燥得到 **CR202CC** 13.0 mg。

[277] 通过与以上方法类似的步骤可获得蛋白降解靶向嵌合体 **CR202CF**、**CR202CI**、**CR202CL** 和 **CR202CP**。

[278] 1.2 **CR20274** 的制备



[279] **UB-180961h** 的合成

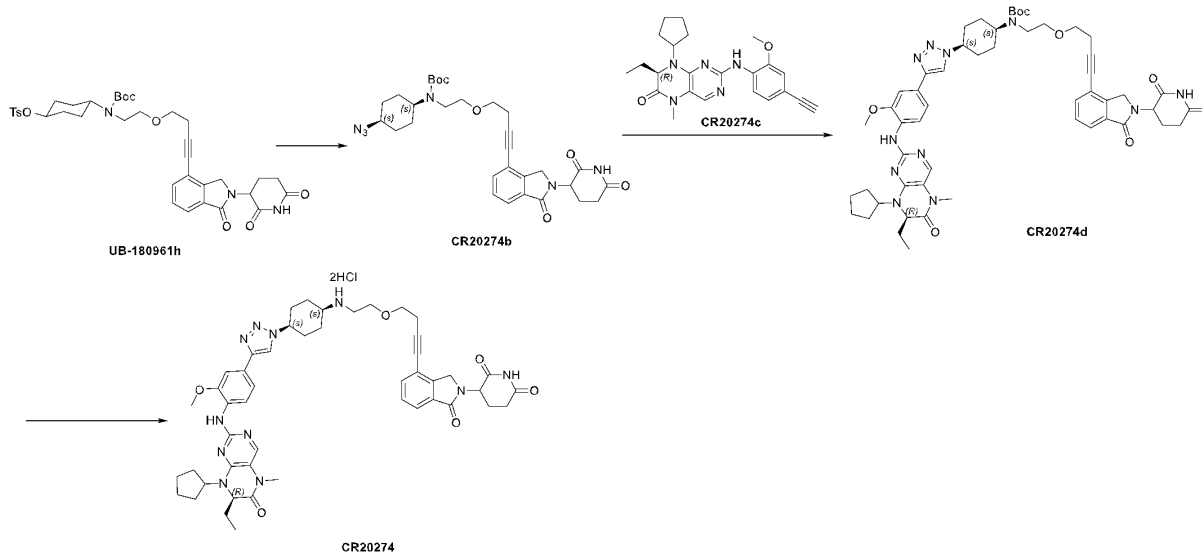
[280] 专利文献 WO2021205391A1 公开了化合物 UB-180961h 的制备方法, 该文献公开

的内容通过引用的方式并入本文。

[281] 将 **UB-180961a** (20 g, 71.1 mmol) 溶于干燥的 DMF (80 mL) 并冷却至 0°C, 再加入 NaH (16.8 g, 107 mmol) 至反应液中。半小时后, 将 **UB-180961b** (21.1 g, 107 mmol) 溶于干燥的 DMF (20 mL) 并滴加至反应液中, 室温反应过夜。向反应液中加入冰水 (100 mL) 并用 EtOAc (60 mL) 萃取三次, 有机相合并后通过柱层析 (PE/EtOAc = 0-100%) 分离得到无色油状的 **UB-180961c** (25g, 47% 收率)。将化合物 **UB-180961c** (15 g, 285.4 mmol) 溶于水 (40 mL) 后加入浓 HCl (10 mL) 并室温反应过夜。反应液用 DCM (50 mL) 萃取 3 次, 有机相用无水硫酸钠干燥后, 浓缩得到无色油状的 **UB-180961d** (7.6 g)。

[282] 将 **UB-180961d** (7.8 g, 68 mmol) 和 **UB-180961e** (7.6 g, 68 mmol) 溶于 DCE (100 mL) 后室温反应 1 小时, 再加入 NaBH(OAc)₃ (29.6 g, 136 mmol) 继续室温反应过夜, 向反应液中加入 TEA (5 mL, sat) 以及 Boc₂O (6 g, 23.8 mmol) 后室温反应 18 小时, 反应液用 EtOAc (15 mL) 萃取 2 次, 有机相用无水 Na₂SO₄ 干燥后通过柱层析分离 (PE/EtOAc = 0-100%) 得到黄色油状的 **UB-180961f** (4.6 g, 57% 收率)。将 **UB-180961f** (4.6 g, 15 mmol) 以及 A1-I (3.7 g, 10 mmol)、Pd(PPh₃)₂Cl₂ (701 mg, 1 mmol)、CuI (190 mg, 1 mmol)、TEA (4.2 mL, 30 mmol) 溶于干燥的 DMF (120 mL) 后, 在 80°C 条件下反应过夜。反应液用 EtOAc (15 mL) 萃取两次, 有机相用无水 Na₂SO₄ 干燥后通过柱层析分离 (PE/EtOAc = 0-100%) 得到黄色固状的 **UB-180961g** (3.6 g, 57% 收率)。

[283] 将 **UB-180961g** (3.6 g, 33.8 mmol)、TEA (10.3 g, 10.2 mmol) 以及 DMAP (12.4 g, 10.2 mmol) 溶于干燥的 DMF (140 mL) 后, 在 0°C 条件下加入 TsCl (14.6 g, 7.7 mmol)。反应液升至 30°C 后反应 15 小时。反应液用 DCM (50 mL) 萃取两次, 有机相浓缩后通过柱层析分离 (PE/EtOAc = 0-100%) 得到白色固状的 **UB-180961h** (3.6 g, 86% 收率)。



CR20274b 的合成

[284] 将 **UB-180961h** (48.4g, 1.0 eq) 溶解于 DMF (484 mL, 10V) 中, N₂ 置换, 加入 CsF (31.2g, 3 eq), 加入 TMSN₃ (叠氮三甲基硅烷, 23.7g, 3 eq), 内温升至 80°C, 搅拌 4.5 小时; 将反应液滴入饱和 NaHCO₃ 水溶液 (4.8 L) 中, 析出固体, 用 EA (乙酸乙酯, 968 mL) 将固体溶解, 再用饱和食盐水 (484 mL) 洗涤, 有机相干燥后浓缩得粗品, 柱层析纯化 (DCM:MeOH=45:1) 得白色固体 **CR20274b** (31.1g, 纯度: 95.6%, 收率: 78.7%), LCMS: [M+H]⁺ = 579.1。

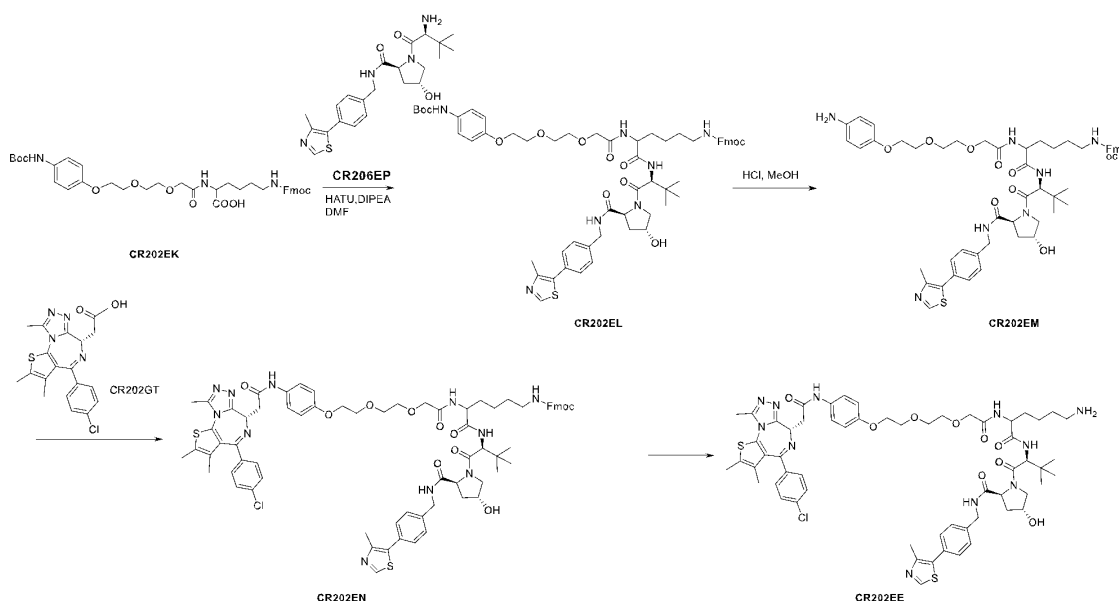
[285] CR20274d 的合成

[286] 将 **CR20274b** (30.8g, 1.0 eq)、**CR20274c** (21.7g, 1.0 eq) 溶于叔丁醇 (900 mL, 30v), 加入水 (450 mL, 15v)、CuSO₄ (8.49g, 1.0 eq)、抗坏血酸钠 (21.1g, 2.0 eq), 氮气置换三次, 控制 25-30°C, 保温反应 3.1 小时, 反应液中加入 DCM (900 mL) 和饱和食盐水 (300 mL), 分液, 再用 DCM (900 mL) 萃取一次, 收集有机相, 干燥, 浓缩; 柱层析纯化 (洗脱剂: DCM/MeOH=200/1-50/1), 减压浓缩得产物 **CR20274d** (41.5g, 收率: 78.8%)。

[287] CR20274 的合成

[288] 将 **CR20274d** 溶于 DCM (3 mL), 加入 0.5 mL HCl/dioxane (4 M), 室温反应 1 小时。反应液浓缩后用乙醚洗 (5 mL) 三次, 过滤得到白色固状的 **CR20274** (纯度 98.1%, MS:[M+H]⁺=884.6)

[289] 1.3 CR202EE 的制备



[290] CR202EM 的合成

[291] 将 **CR206EP** 加入 DMF (5 mL) 中, 0~5°C, 加入 HATU 和 DIPEA, 搅拌半小时后, 加入 **CR202EK**, 保温反应 2 小时, 反应完全, 反应液加水 (25 mL)、乙酸乙酯 (25 mL) 萃取, 用无水硫酸钠干燥有机相, 浓缩, 柱层析纯化, 得到 **CR202EL**。将 **CR202EL** 加入甲醇 (200 μ L) 中, 0~5°C, 加入 3M HCl/甲醇溶液 (50 μ L), 20~25°C 下反应 1 小时, 反应完全, 浓缩得到 **CR202EM**。

[292] CR202EN 合成

[293] 将 **CR206GT** 加入 DMF (5 mL) 中, 0~5°C, 加入 HATU 和 DIPEA, 搅拌半小时后, 加入 **CR202EM**, 保温反应 2 小时, 反应完全, 反应液加水 (25 mL)、乙酸乙酯 (25 mL) 萃取, 用无水硫酸钠干燥有机相, 浓缩, 柱层析纯化, 得到 **CR202EN**。

[294] CR202EE 合成

[295] 将 **CR205EN** (320.0 mg, 0.23 mmol) 加入 20%哌啶/DMF 溶液 (3.0mL), 室温反应 1 小时, 反应完全, 加水 (15 mL), 二氯甲烷 (15 mL) 萃取, 浓缩, 柱层析纯化, 得 **CR202EE** 181.0 mg。

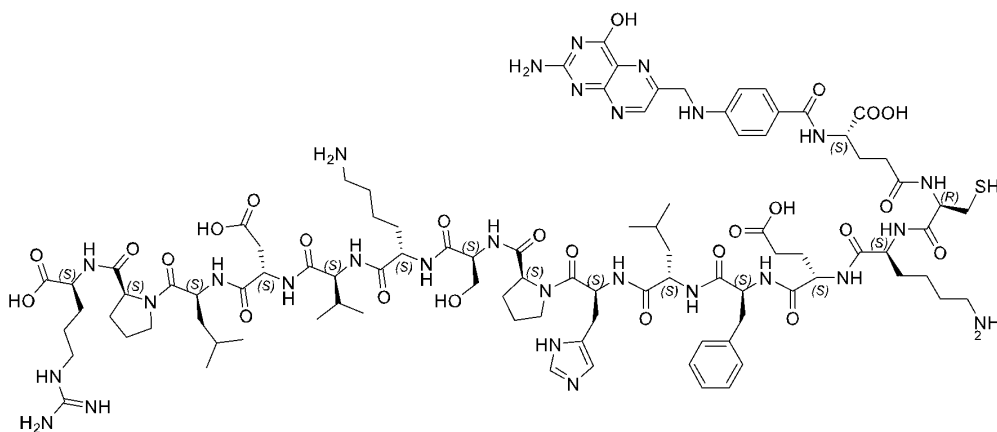
[296] 1.4 CR202Z5、CR202ES、CR202Z7、CR202Z8、CR202Z9、CR202Z1、CR202Z2、

CR202Z3、**CR202Z4**、**CR202Y2** 和 **CR202Y4** (来源: MCE, 目录号: HY-114312) 的合成

[297] **CR202Z5** 的合成路线可参考文献 (Communications Biology, (2018) 1:100) 中 ARCC-4 的合成。**CR202ES** 的合成路线可参考文献 (PNAS, 113 (26) 7124-7129) 中 ARV-771 的合成。**CR202Z7** 的合成路线可参考文献 (J. Med. Chem. 2019, 62, 3, 1420-1442) 中 ERD-308 的合成。**CR202Z8** 的合成路线可参考文献 (ChemMedChem, 2020, 15, 17-25) 中 GNE-987 的合成。**CR202Z9** 的合成路线可参考文献 (J. Med. Chem. 2019, 62, 2, 941-964) 中 ARD-69 的合成。**CR202Z1** 的合成路线可参考专利 (CN 111892577 A) 中 ARV-110 的合成。**CR202Z2** 的合成路线可参考专利 (US 2021/0139458 A1) 中 ARV-471 的合成。**CR202Z3** 的合成路线可参考文献 (Chemistry & Biology, 2015, 22, 755-763) 中 ARV-825 的合成。**CR202Z4** 的合成路线可参考文献 (ACS Med Chem Lett. 2019, 11, 1855-1862) 中 FC-11 的合成。**CR202Y2** 的合成路线可参考文献 (Cancer Res. 2019, 79, 251-262) 中 MD-224 的合成路线。**CR202Y4** 购买获得 (MCE, 目录号: HY-114312)。这些文献公开的全部内容通过引用的方式并入本文。

[298] 2. 靶向分子的制备

[299] 2.1 L-01、L-02 和 L-04 的合成

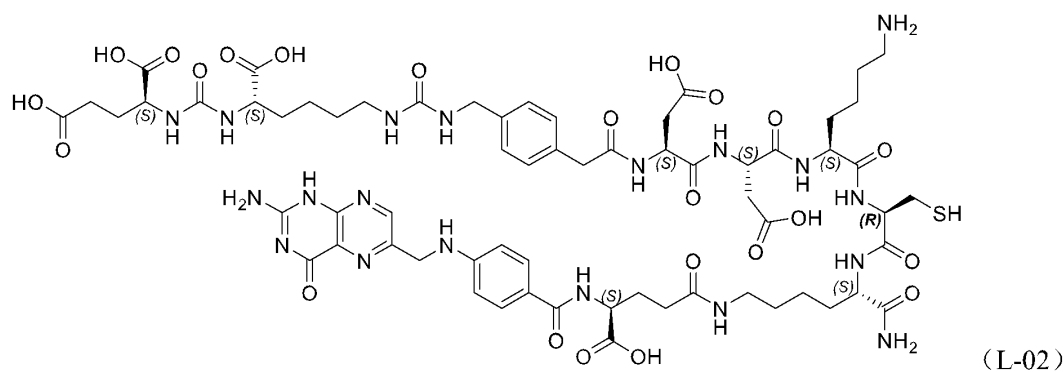
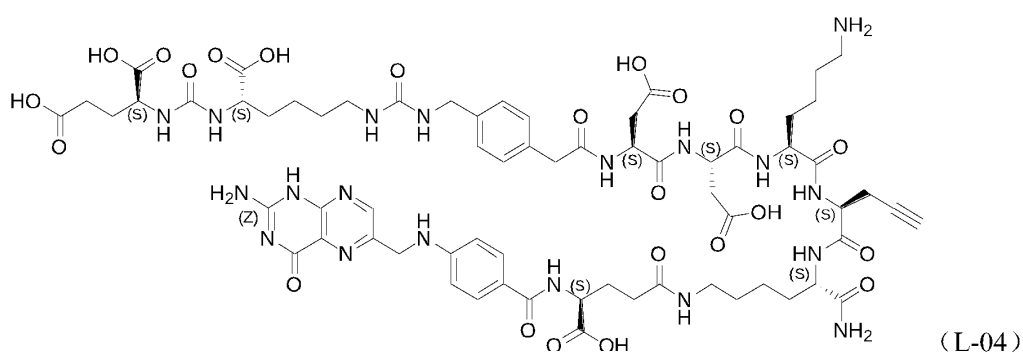


(L-01)

[300] 利用 Fmoc 化学氨基树脂固相合成靶向 TRPV6 和叶酸受体的靶向 L-01。将树脂装载于固相反应柱中, 加入 DMF, 氮气鼓泡至溶剂中, 使树脂溶胀 30 分钟。加入 Fmoc-Arg-OH、DCC (二环己基碳二亚胺) 和 DMAP, 在 25°C 下反应 3 小时, 后用醋酸酐和吡啶封端 1 小时, 再用 DMF 洗涤 3 次, 用 DBLK 脱除树脂上的 Fmoc 保护基团, 再用 DMF 洗涤 5 次。

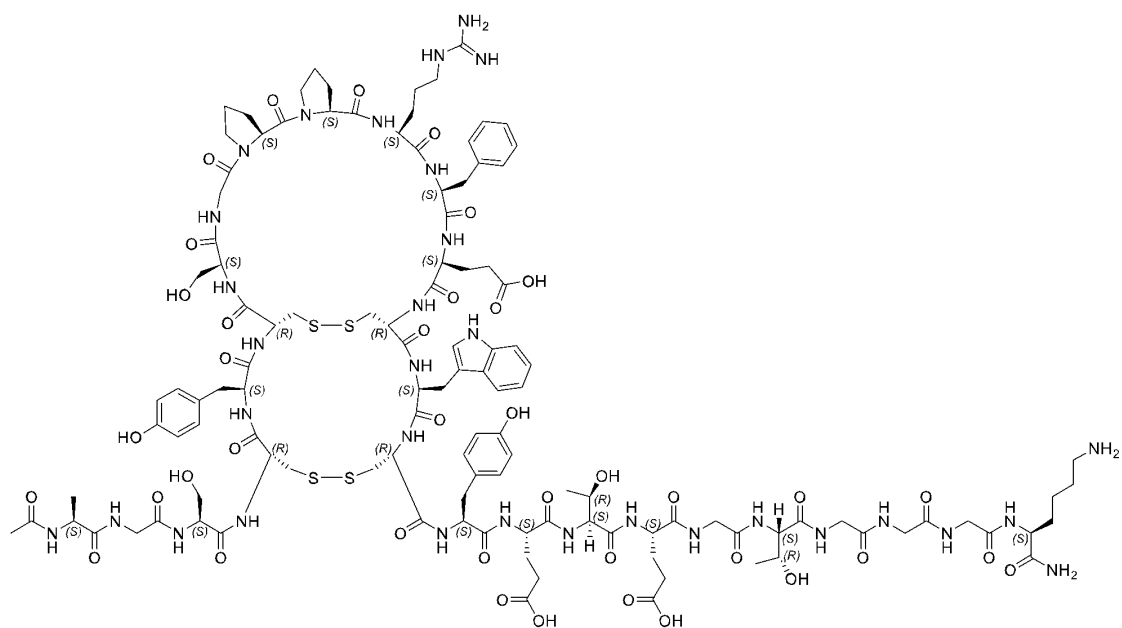
称取 Fmoc-Pro-OH 和 HOBt, 用 DMF 溶解, 0°C 冰水浴下向上述溶液中加入 DIC, 混合使其活化 5 分钟。将该溶液加入上述反应柱中, 反应 3 小时后, 抽干溶剂, 洗涤反应柱中的树脂 3 遍, 随后用 DBLK 脱除 Fmoc 保护基团。重复上述操作, 按照结构依次偶联 Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Lys(Boc)OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-His(Trt)-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Glu-OtBu 以及蝶酸, 以获得肽树脂。用裂解液裂解肽树脂后, 过滤, 收集裂解液倒入 MTBE 中, 析出固体, 用 MTBE 洗涤, 得到粗品, 粗品经 Pre-HPLC 制备得到 L-01。

[301] 通过与以上方法类似的步骤可获得到 L-02 和 L-04



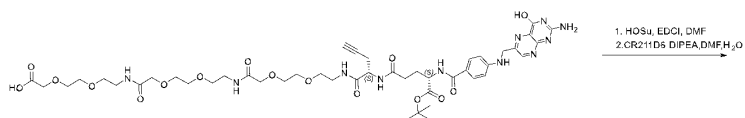
[302] 2.2 L-03 的合成

CR211D6 的结构:

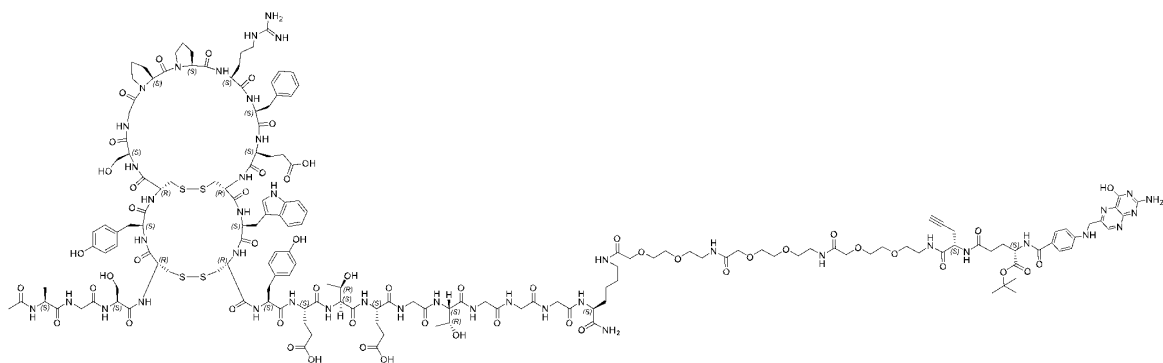


CR211D6

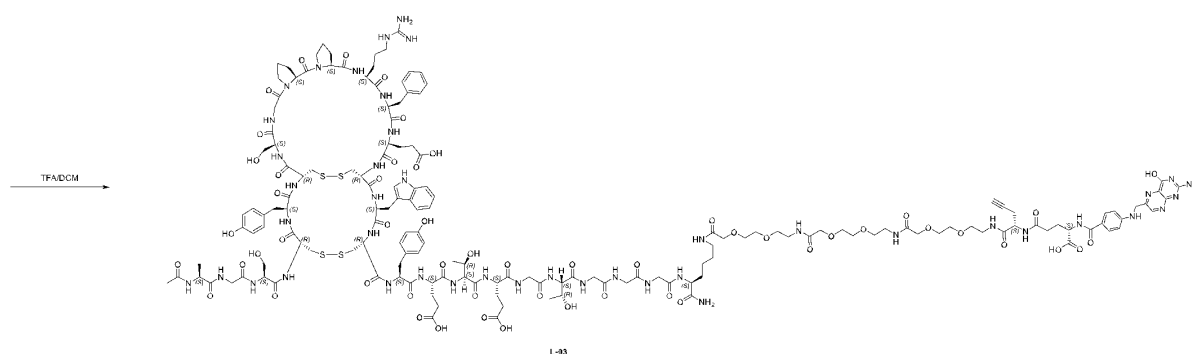
制备流程:



CR194PF



CR194PV



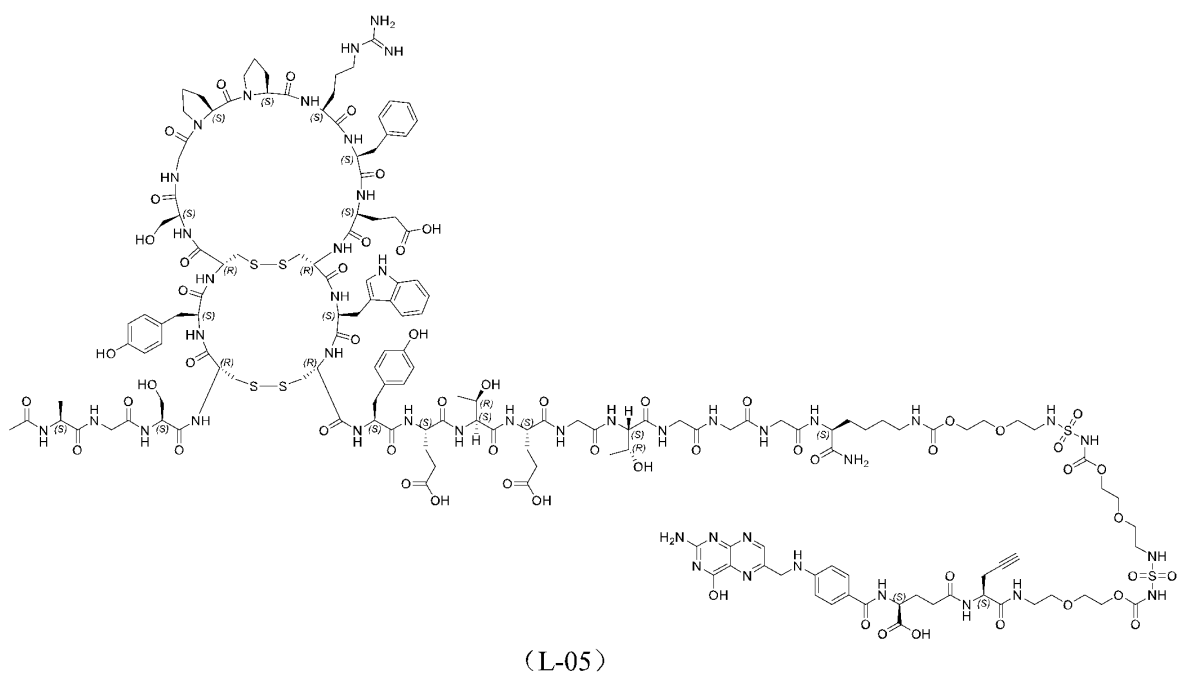
[303] **CR211D6** 合成参见 (Nature Medicine, 2015, 21, 955–961 ())。该文献公开的全部内容通过引用的方式并入本文。

[304] 将 **CR194PF** (150.0 mg, 145.9 μmol) 加入 DMF (3.0 mL) 中, 氮气保护, 避光, 溶解, 室温 (25.5°C) 下搅拌, 向反应液中依次加入 HOSu (25.2 mg, 219.0 μmol)、EDCI (42.0 mg, 219.0 μmol), 滴加 DIPEA 调节至 pH=8, 室温反应 1 小时, 补加 EDCI (42.0 mg, 219.0 μmol), 继续反应 1 小时, 将反应液滴加入 MTBE (30.0 mL) 中, 倒去清液, 残留物用 MTBE 洗涤 (5.0 mL $\times$ 2), 20°C, 真空干燥得黄色油状物, 加 DMF (1.0 mL) 溶解所得的黄色油状物 (即获得 **CR194PF** 活化酯溶液), 待用。

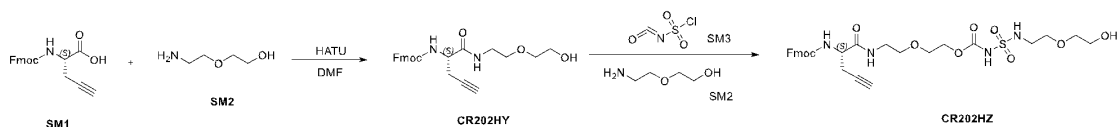
[305] 将 **CR211D6** (284.0 mg, 102.13 μmol) 加入 DMF/水 (2.0 mL/1.0 mL) 中溶解, 避光, 氮气保护, 室温 (25.9°C) 下搅拌, 滴加 DIPEA 调节至 pH=8, 滴加 **CR194PF** 活化酯溶液, 室温反应 1 小时, 反应液反向制备液相纯化, 冻干得 **CR194PV** (50.0 mg)。

[306] 将 **CR194PV** (56.2 mg, 14.8 μmmol) 加入 TFA/DCM (1.4 mL/1.4 mL) 中, 避光, 氮气保护, 室温 (22.7°C) 下搅拌 1 小时, 加入 MTBE (10.0 mL) 稀释, 氮气吹干, 残留物用 MTBE (5.0 mL) 洗涤, 氮气吹干得 **L-03**。

[307] 2.3 **L-05** 的合成



制备流程:

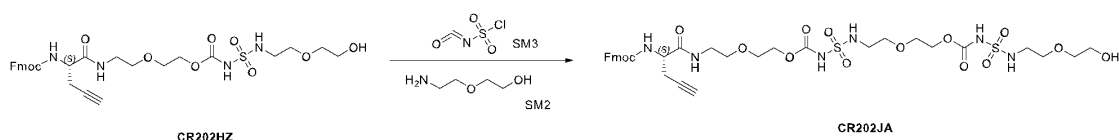


[308] 将 **SM1** (Fmoc-L-Pra-OH, 20.00 g, 60 mmol) 溶于 DMF (150 mL)。氮气置换三次, 反应液温度降至 -8°C, 加入 HATU (27.40 g, 72 mmol, 1.2 eq) 和 **SM2** (7.56 g, 72 mmol), 称取 DIEA (15.50 g, 120 mmol) 溶于 DMF (10 mL) 中, 滴加到体系中, 反应液在 0°C 搅拌 1 小时。HPLC 中控监测原料 **SM1** 基本反应完全。将反应液加入到乙酸乙酯 (250 mL) 和水 (800 mL) 中, 萃取分层, 水相再用适量 EA 萃取 2 次, 合并有机相, 用适量无水硫酸钠干燥 1 小时。过滤减压浓缩, 干燥后, 柱层析纯化 (DCM:MeOH=100:1), 得到白色固体 **CR202HY** (26.51 g, 纯度: 98.51%, 收率: 100%), $[M+H]^+ = 423.4$ 。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.81 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.64 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 7.45 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 7.36 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 6.94 (s, 1H), 5.76 (s, 1H), 4.49 (dd, J = 18.1, 11.0 Hz, 2H), 4.26 (t, J = 6.8 Hz, 1H), 3.86 – 3.69 (m, 2H), 3.66 – 3.44 (m, 6H), 2.66 (dd, J = 71.1, 60.5 Hz, 4H)。

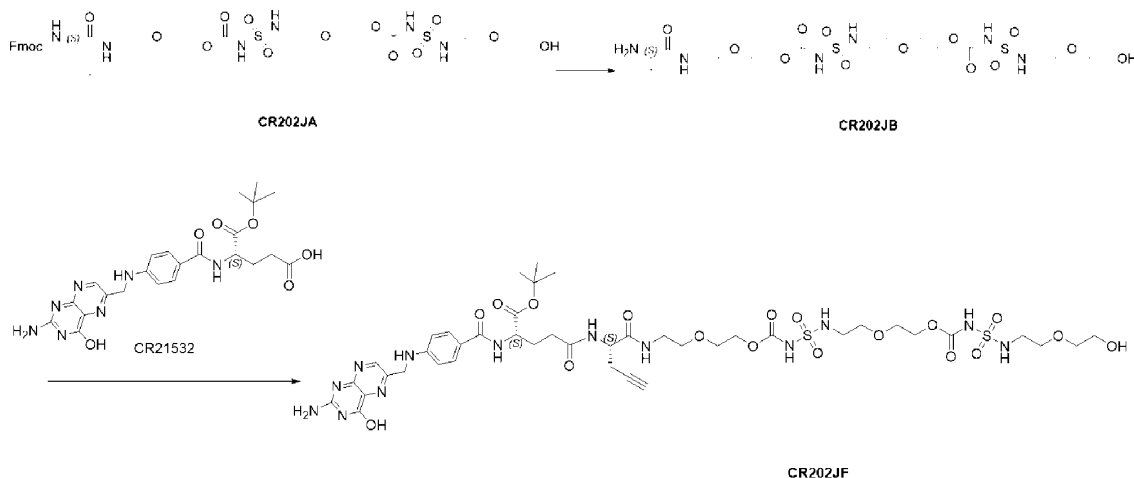
[309] 氮气保护下将 **SM3** (13.58 g, 96 mmol, 1.6 eq) 加入到无水 DCM (600 mL) 中,

反应液温度降至 0°C，缓慢滴加 **CR202HY** (25.80 g, 60 mmol) 的 DCM (200mL) 溶液，在 10°C 下反应 30 分钟，用氨水乙腈取样淬灭，HPLC 中控至完全反应完毕；加入三乙胺 (18.22 g, 180mmol)，测 pH=8，最后在 5°C 下滴加溶于 DCM (10 mL) 中的 **SM2** (9.47 g, 90 mmol) 溶液，滴加完毕后，反应在 10°C 搅拌 30 分钟，HPLC 中控监测基本反应完全。将反应液加入到二氯甲烷 (500 mL) 和水 (200 mL) 中，萃取分层，水相再用 150 mL 二氯甲烷萃取 2 次，合并有机相，用适量无水硫酸钠干燥 1 小时。过滤减压浓缩干后柱层析纯化

(DCM:EA=1:1，加 1% 甲醇和 0.5% 醋酸)，浓缩得到泡泡状固体 **CR202HZ** (24.00 g，纯度：95.82 %，收率：63.3%)， $[M+H]^+=633.14$ 。

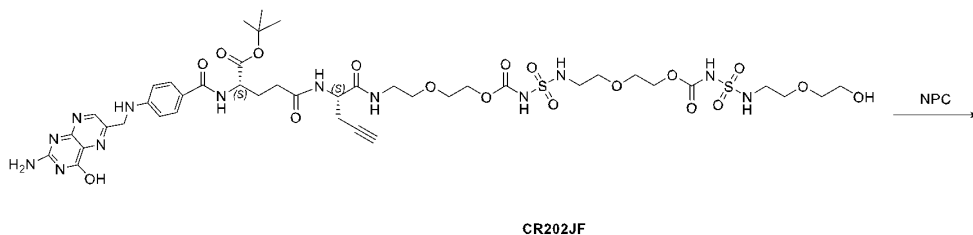
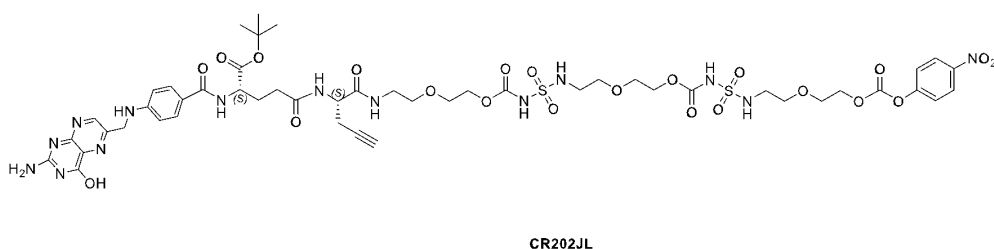


[310] 类似于由 **CR202HY** 制备 **CR202HZ** 的方法，制备获得得到 **CR202JA**。

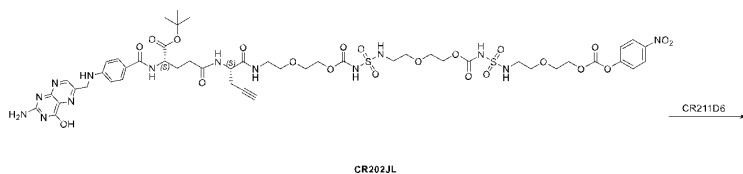
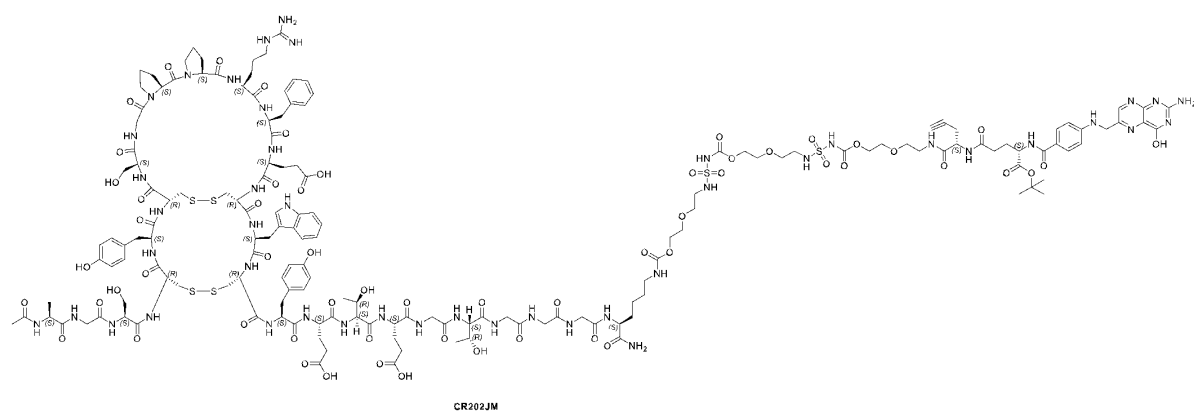


[311] 将 **CR202JA** (6.15 g, 7.29mmol) 溶于 DMF (100 mL) 中。氮气置换三次，反应液温度降至零下 5°C，滴加 DBU (2.10 g, 13.68 mmol)。滴加完毕后，反应液在 15°C 下搅拌 1~4 小时，HPLC 中控监测基本反应完全。加入 **CR21532** 的 DMSO 溶液 (3.63 g, 7.29 mmol，用 80ml DMSO 提前溶清)，再加入 HATU (4.99 g, 13.12 mmol)，15°C 反应 30 分钟，HPLC 中控监测至基本反应完全。停止反应，对所得粗产物进行纯化 (乙腈/0.1%TFA-H₂O)，冻

干得到黄棕色固体 **CR202JF** (2.55 g, 纯度: 83.16%, 收率: 31.87%), $[M+H]^+=1100.9$ 。

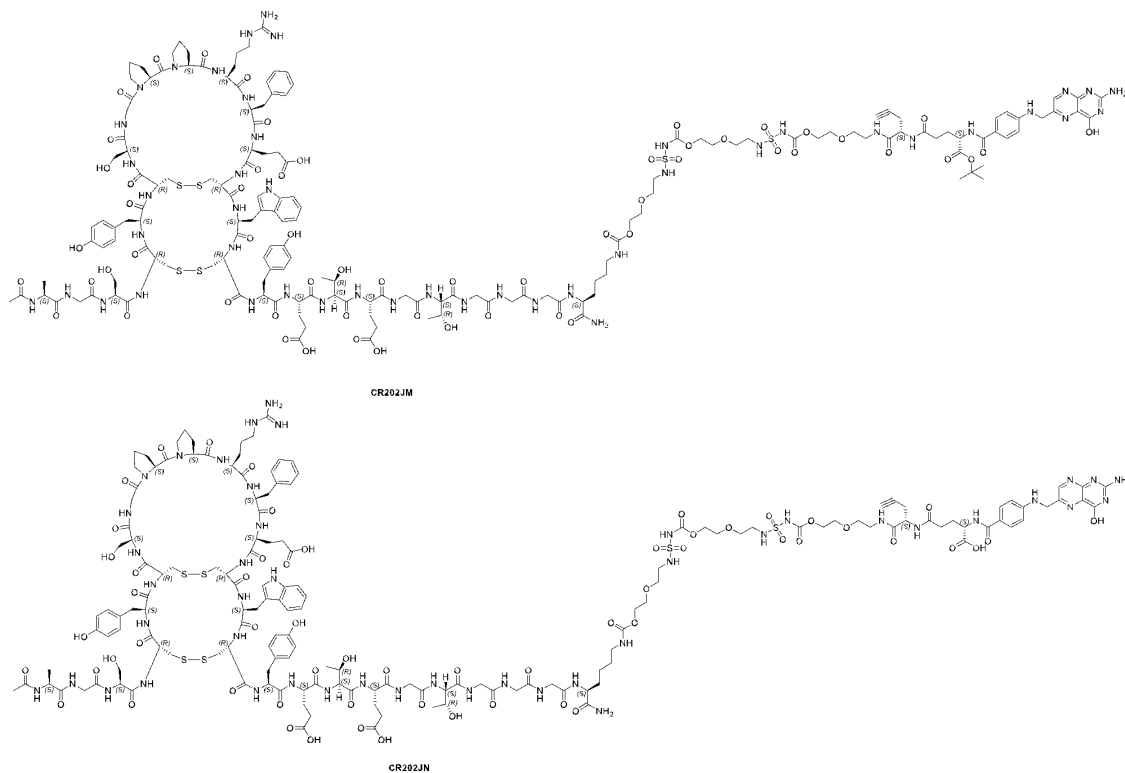


[312] 将 **CR202JF** (1.26 g, 1.14mmol) 溶于无水 DMF (15mL) 中, 加入球状分子筛, 干燥 30 分钟, 过滤, 将滤液转移至 250 mL 夹套瓶中, 加入无水 TEA (0.92 g, 9.12 mmol, pH=8~9), 氮气置换三次, 在 25°C 下, 加入二(对硝基苯)碳酸酯 (NPC, 0.6859 g, 2.3mmol), 磁力搅拌 8~10 小时, 停止反应。加入 200 mL MTBE 析出固体, 离心得黄色固体 **CR202JL** (1.28 g, 纯度: 60.86%, 收率: 87.50%), $[M+H]^+=1265.52$ 。



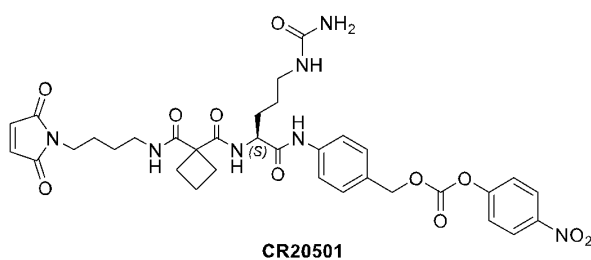
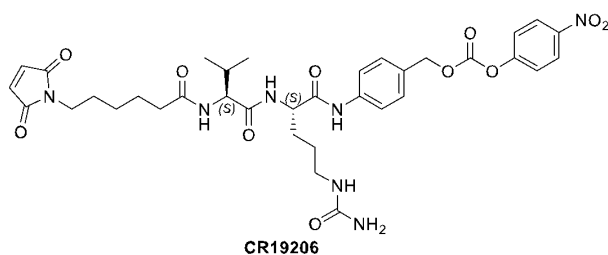
[313] 将 **CR202JL** (600.0 mg, 0.474 mmol) 溶于 DMF (40 mL), 加入 **CR211D6** (1039.5

mg, 0.474 mmol), HOBT (115.5 mg, 0.711 mmol), 氮气置换三次, 加入 DIEA (125.9 mg, 0.948 mmol), 控制反应液温度为 25°C, 磁力搅拌 3~5 小时, HPLC 中控监测反应完全。停止反应, 加入 300 mL MTBE 析出固体, 搅拌 10 分钟, 离心得黄色固体 **CR202JM** (1.26 g, 纯度: 60.41%, 收率: 68.11%), $[M+H]^+=978.09$ 。



[314] 在 100 mL 夹套瓶中, 加入 40% TFA/DCM (40 mL), 冷却至零下 10°C, 氮气保护下加入 **CR202JM** (1.26 g, 0.317 mmol), 缓慢升温至 18°C, 搅拌 2~3 小时, HPLC 中控监测反应完全。停止反应, 将反应液加入冷的 300 mL MTBE 中析出固体, 搅拌 10 分钟, 离心得粗品, 制备纯化, 冻干得到黄色固体 **CR202JN** (即 **L-05**, 160.9 mg, 纯度: 90.87%, 收率: 26.67%), $[M/3+H]^+=1285.5$ 。

[315] 3. 连接子的制备



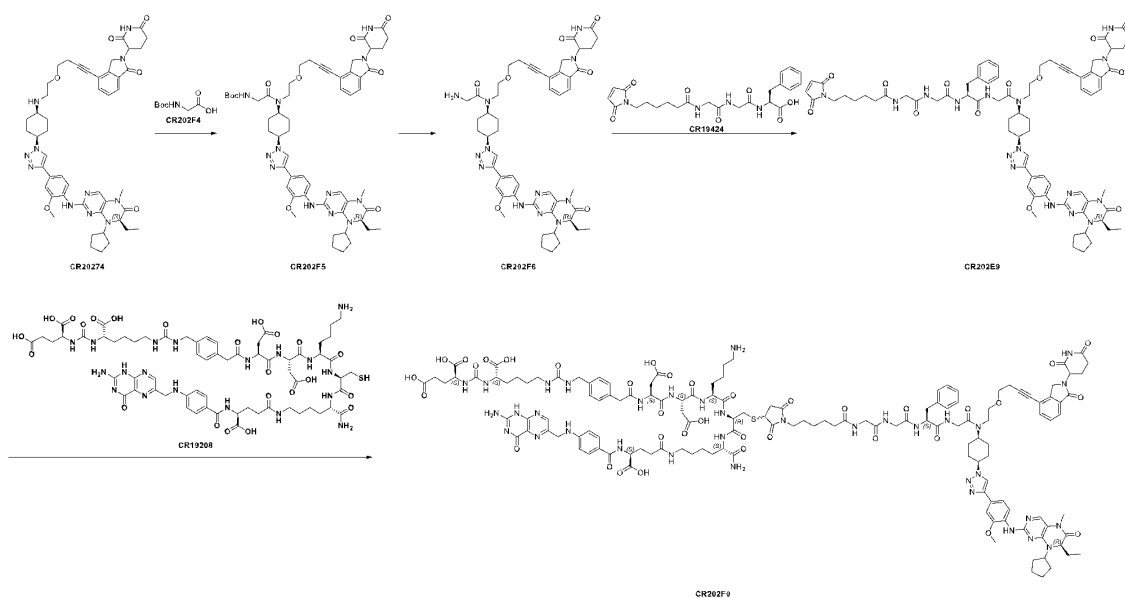
[316] 连接子 **CR20501** 的合成路线可参考文献 *J. Med. Chem.* 2018, 61, 989-1000。

CR19206 的合成路线可参考文献 *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 1860。这些文献公开的全部内容通过引用的方式并入本文。可以通过上述类似的方法合成本文中的其他连接子化合物。

[317] 本发明连接子中的多肽部分可参考靶向分子中的固相合成方法制备得到。

[318] 4. 偶联体化合物的制备

[319] 4.1 CR202F0 的制备



[320] 控温 0~10℃且在氮气保护的条件下，将 **CR202F4** (13.5 mg, 0.077 mmol)、

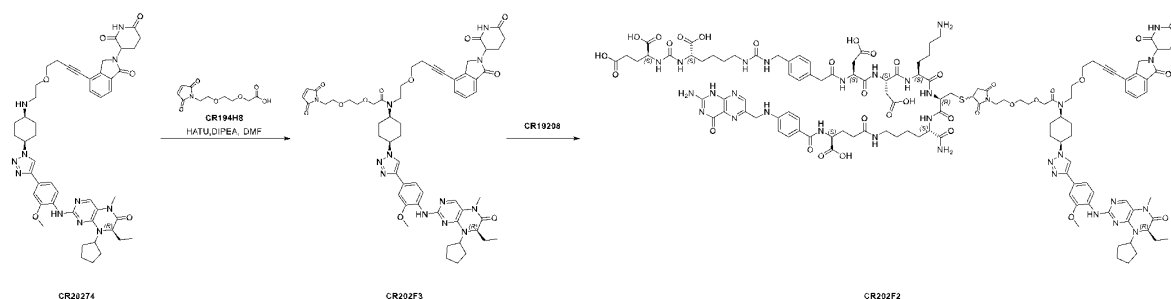
HATU (29.3 mg, 0.077 mmol) 和 DIPEA (10.0 mg, 0.077 mmol) 依次加入 DCM (1.0 mL) 中, 磁力搅拌 0.5 小时, 加入游离态 **CR20274** (45.5 mg, 0.05 mmol), 磁力搅拌溶解, 氮气保护, 20~25°C 反应 4 小时, HPLC 中控至反应完全。反应液加入冰水 (10.0 mL) 和 DCM (10.0 mL) 萃取分层, 有机相依次用饱和柠檬酸 (10.0 mL)、饱和碳酸氢钠 (10.0 mL) 和饱和食盐水 (10.0 mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥得到黄色固体 56.0 mg (含 **CR202F5**)。粗品直接用于下一步反应。

[321] 将含 **CR202F5** 的粗品 (56.0 mg, 0.0054 mmol) 加入 DCM (2.0 mL) 中, 磁力搅拌溶解, 氮气保护, 控温 0~10°C, 滴加 TFA (0.5 mL), 保温反应 1 小时, HPLC 中控至反应完全。反应液浓缩, 加入 DCM (10.0 mL) 和饱和碳酸氢钠 (2.0 mL), 萃取分层, 水相再用 DCM (5.0 mL×2) 萃取, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥得到土灰色固体 49.7 mg (含 **CR202F6**)。

[322] 控温 0~10°C 且在氮气保护的条件下, 将 **CR19424** (29.9 mg, 0.063 mmol)、HATU (24.1 mg, 0.063 mmol) 和 DIPEA (8.2 mg, 0.063 mmol) 依次加入 DMF (2.0 mL) 中, 磁力搅拌 0.5 小时, 加入游离态 **CR202F6** (39.7 mg, 0.042 mmol), 磁力搅拌溶解, 氮气保护, 20~25°C 下反应 1 小时, HPLC 中控至反应完全。反应液使用制备液相纯化。冻干得白色固体 21.1 mg (含 **CR202E9**)。

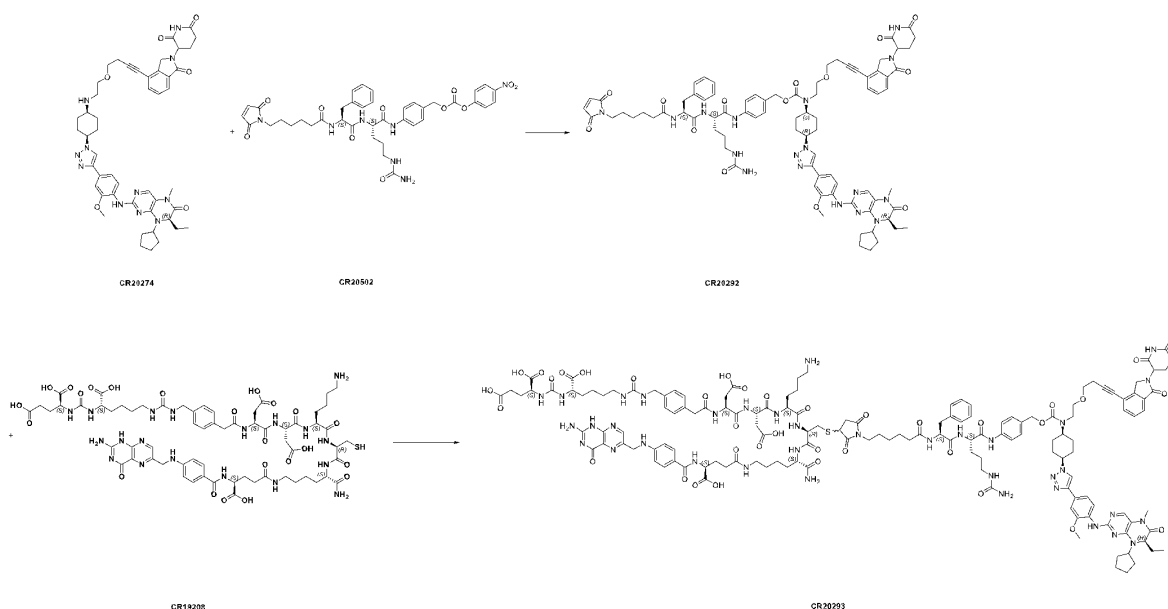
[323] 控温 20~25°C、避光且在氮气保护的情况下, 将 **CR202E9** (17.0 mg, 0.012 mmol) 和 **CR19208** (27.8 mg, 0.018 mmol) 加入 DMF (2.5 mL) 中, 磁力搅拌, 滴加 DIPEA 调节至 pH=8, 保温反应 1 小时, HPLC 中控至反应完全, 反应液使用制备液相纯化。冻干得白色固体 15.1 mg (**CR202F0**)。MS: $[M+4H]^{4+}=730.58$ 。

[324] 4.2 **CR202F2** 的制备



[325] 控温 0~10℃, 且在氮气保护的条件下, 将 **CR194H8** (167.9 mg, 0.068 mmol)、HATU (25.8 mg, 0.068 mmol) 和 DIPEA (13.2 mg, 0.10 mmol) 依次加入 DMF (0.6 mL) 中, 磁力搅拌 0.5 小时, 加入游离态 **CR20274** (30.0 mg, 0.034 mmol), 磁力搅拌溶解, 氮气保护, 25℃下反应 2 小时, HPLC 中控至反应完全。反应加入 DMF (2 mL), 避光, 15~25℃下加入 **CR19208** (155.2 mg, 0.10 mmol), 搅拌溶解, 滴加 DIPEA 至 pH=8, 反应 1.5 小时, HPLC 中控至反应完全。反应液使用制备液相纯化。冻干得 **CR202F2** (25.5 mg)。MS: $[M+4H]^{4+}/4=658.78$

[326] 4.3 **CR20293**、**CR202CE**、**CR202CH**、**CR202CK**、**CR202CN**、**CR202CR**、**CR20214**、**CR20282**、**CR20285**、**CR20287**、**CR20295** 和 **CR20297** 的制备



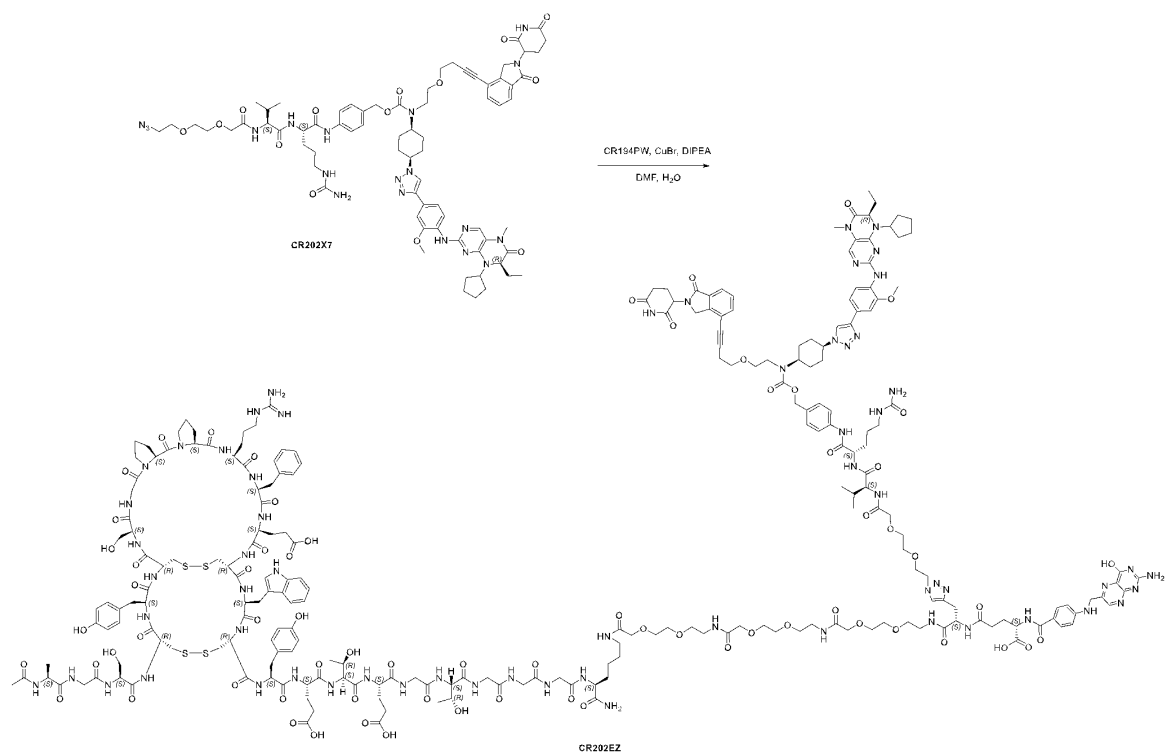
[327] 采用与 **CR19206** 的类似方法, 制备得到 **CR20502**。

[328] 将 **CR20274** (151.3 mg, 0.171 mmol)、**CR20502** (277.3 mg, 0.353 mmol) 和 HOBt (5.7 mg, 0.042 mmol) 依次加入 DMF (3.0 mL) 中, 磁力搅拌溶解, 氮气保护, 25℃下反应 24 小时, HPLC 中控至反应完全。反应加入 DMF (6 mL), 避光, 15~25℃下加入 **CR19208** (775.0 mg, 0.509 mmol), 搅拌溶解, 滴加 DIPEA 至 pH=8, 反应 2 小时, 取样 20 μ L 加乙腈/水 (400 μ L) 稀释, HPLC 中控至反应完全。反应液使用制备液相纯化。得到 **CR20293** (175.2 mg, 纯度: 95.85%, 收率: 33.7%)。

[329] 采用与制备 **CR20293** 类似的方法, 制备其它偶联体化合物 **CR202CE**、

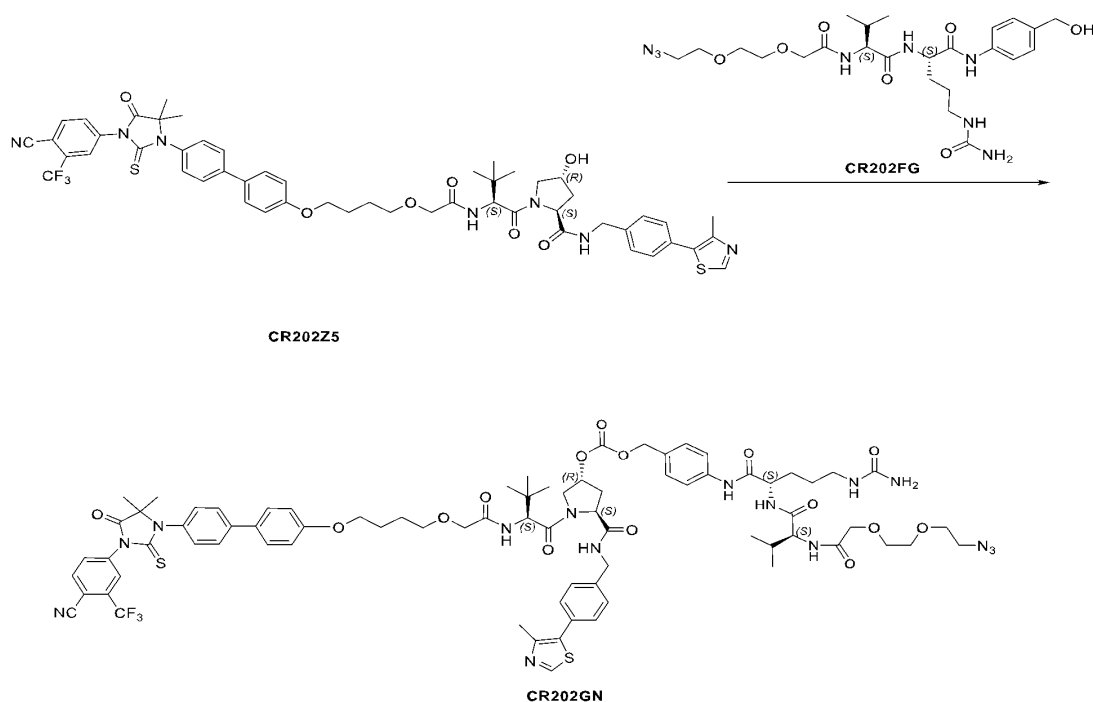
CR202CH、CR202CK、CR202CN、CR202CR、CR20214、CR20282、CR20285、
CR20287、CR20295 和 CR20297。

[330] 4.4 CR202EZ 的合成

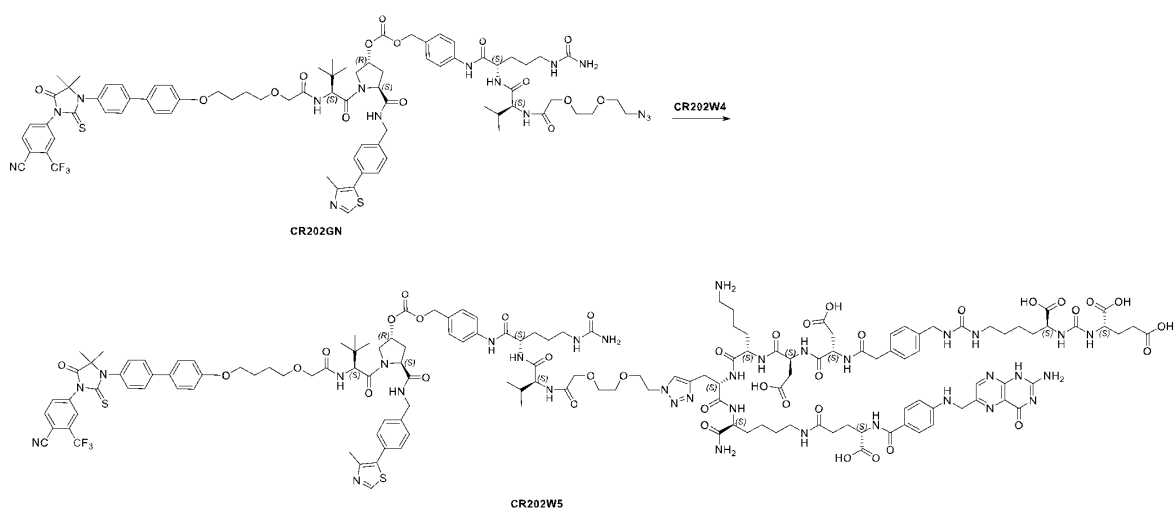


[331] 将 L-03 (CR194PW) 粗品溶解于 DMF/水 (2.0 mL/0.7 mL) 中, 再加入 CR202X7 (21.8 mg, 14.8 μ mol) 溶解, 避光, 氮气保护, 室温 (25.9°C) 下搅拌, 滴加 DIPEA 调节至 pH=8, 加入溴化亚铜 (2.1 mg, 14.8 μ mol), 室温反应 1 小时, 反应液反向制备液相纯化, 冻干得 CR202EZ (5.0 mg, 收率: 6.7%)。[M+5H]⁵⁺/5=1040.06。

[332] 4.5 CR202W5、CR202W6 和 CR202W9 的合成



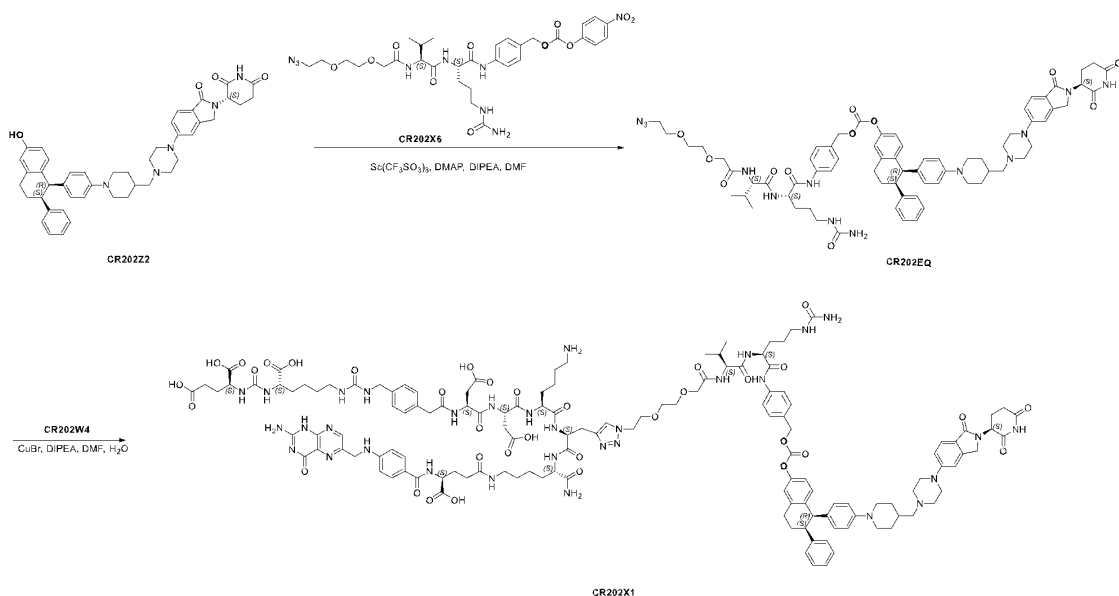
[333] 向 25 mL 单口夹套瓶 R1 中加入 **CR202Z5** (100.0 mg, 97.7 μmol)、DCM (2 mL) 和 4A 分子筛 (200.0 mg)，降温至 0 $^{\circ}\text{C}$ ，加入三乙胺 (34.5 mg, 342.0 μmol)，搅拌 2 小时。0 $^{\circ}\text{C}$ 下滴加三光气 (14.5 mg, 48.9 μmol) 的 DCM (0.1 mL) 溶液，保温反应 5 分钟。同时，向 25 mL 单口夹套瓶 R2 中加入 DMF (0.5 mL)、**CR202FG** (54 mg, 97.7 μmol)、DMAP (12 mg, 97.7 μmol) 和 TEA (10 mg, 97.7 μmol)，在 R2 中搅拌溶解，加入 4A 分子筛 (0.1 g)，降温至 0 $^{\circ}\text{C}$ 。氮气保护下，将 R1 中的混合物滴加至 R2 中，并保温搅拌反应 0.5 小时，至反应完全。向 R2 加入水 (1 mL) 淬灭反应，反应液反向液相制备纯化，得到 **CR202GN** (白色粉末，m=90mg，纯度：91.4%，收率：58.4%)，LCMS: $[\text{M}+2]^{2+}/2=800.9$ 。



[334] 将 **CR202GN** (75 mg, 46.9 μmol) 和 **L-04 (CR202W4)** (106.5 mg, 70.3 μmol) 用 DMF (4.5 mL) 和水 (1.5 mL) 在避光的条件下溶解, 维持氮气保护, 加入 DIPEA 调节体系 pH=8, 加入 CuBr (6.7 mg, 46.9 μmol), HPLC 中控至反应完全。反应液用反向液相制备纯化, 得到 **CR202W5** (白色粉末, 70.0 mg, 纯度: 100%, 收率: 47.9%), LCMS: $[M-3H]^3-/3=1037.0$ 。

[335] 同理, 采用类似的方法合成 **CR202W6** 和 **CR202W9**。

[336] 4.6 **CR202X1** 和 **CR202W7** 的合成

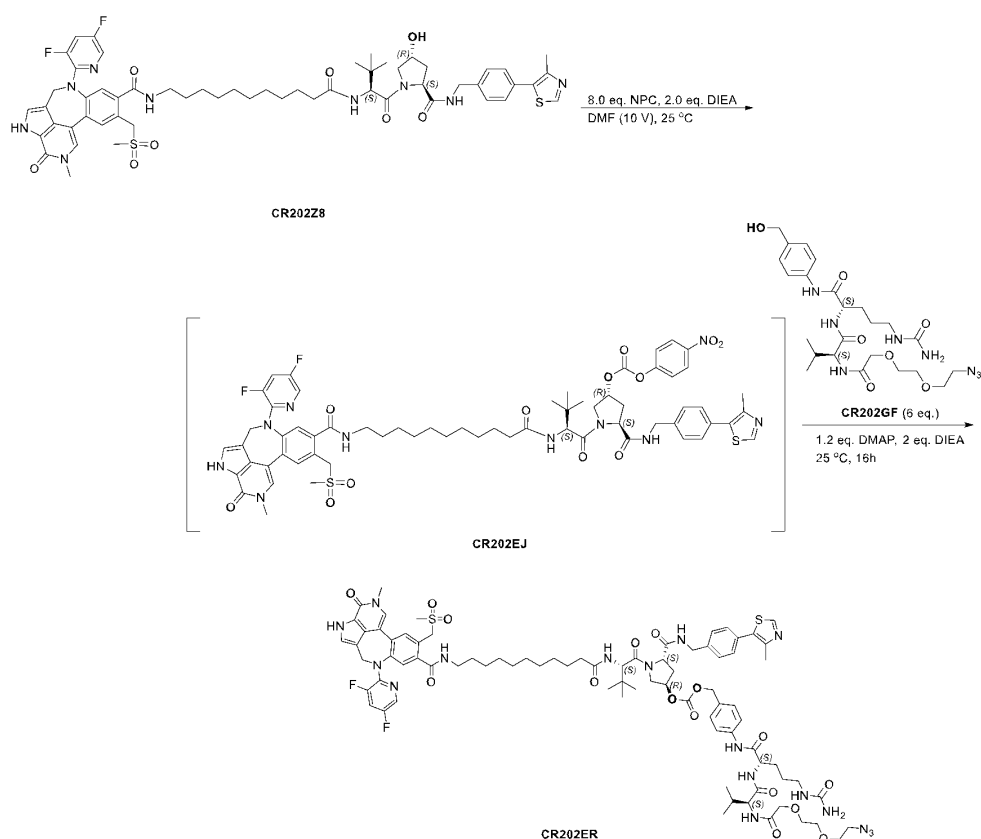


[337] 将 **CR202Z2** (100.0 mg, 138.0 μmol) 和 DMAP (20.0 mg, 166.0 μmol) 加入 DMF (3.6 mL) 中, 氮气保护, 零下 10°C 下搅拌, 依次加入三氟甲磺酸铈 (18.0 mg, 41.4 μmol)、DIPEA (18.0 mg, 138.0 μmol) 和 **CR202X6** (129.0 mg, 179.2 μmol), 用 DMF 溶液 (1.0 mL) 溶解, 保温反应 48 小时, 反应液用反向制备液相纯化, 得 **CR202EQ** (140.0 mg, 收率: 78.2%) 白色固体, $[\text{M}+\text{H}]^+=1300.5$ 。

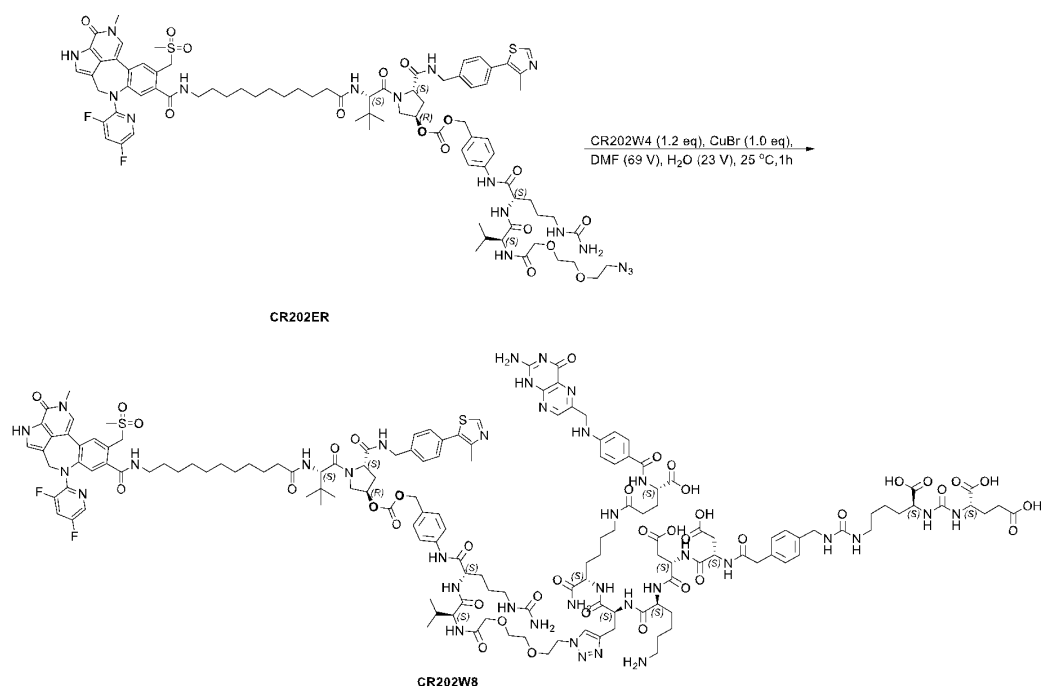
[338] **CR202X1** 合成参见 **CR202W5** 的合成。

[339] 同理, 采用类似的方法合成 **CR202W7**。

[340] 4.7 **CR202W8** 的合成

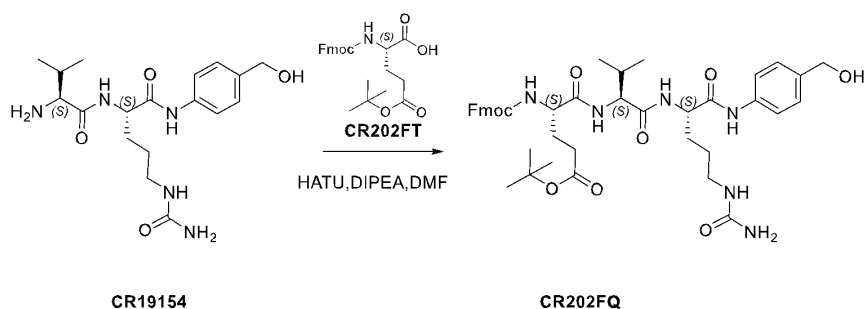


[341] 将 **CR202Z8** (30 mg, 27.4 μmol) 和 NPC (67 mg, 220 μmol) 用 DMF (0.3 mL) 溶解, 磁力搅拌, 保持氮气保护。加入 DIEA (7.1 mg, 54.9 μmol), 25 °C 下搅拌 15 小时。加入 **CR202GF** (45 mg, 81.7 μmol)、DMAP (4 mg, 32.7 μmol) 和 DIEA (7.1 mg, 54.9 μmol), 25 °C 下搅拌 16 小时, 取样中控至反应完全。制备纯化得到白色固体 **CR202ER** (29 mg, 纯度: 98.24%, 收率: 63%)。LCMS: $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}/2 = 837.5$



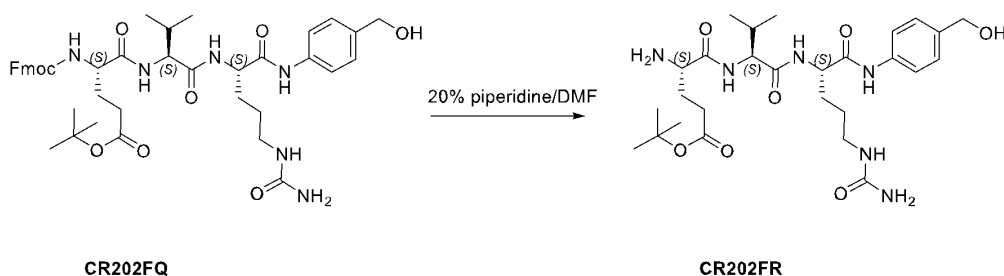
[342] 将 **CR202ER** (50 mg, 29.9 μmol) 和 **CR202W4** (54 mg, 35.6 μmol) 用 DMF (2.5 mL) 和水 (0.8 mL) 在避光条件下溶解, 磁力搅拌, 维持氮气保护。加入 DIEA (130 μL) 调节至 pH=8 后, 加入 CuBr (4.3 mg, 29.9 μmol), 25°C 下反应 1 小时, 取样中控至反应完全。反应液用制备液相纯化。得 **CR202W8** (33 mg, 收率: 41%)。LCMS: $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}/3 = 1063.1$ 。

[343] 4.8 CR202V4 的合成

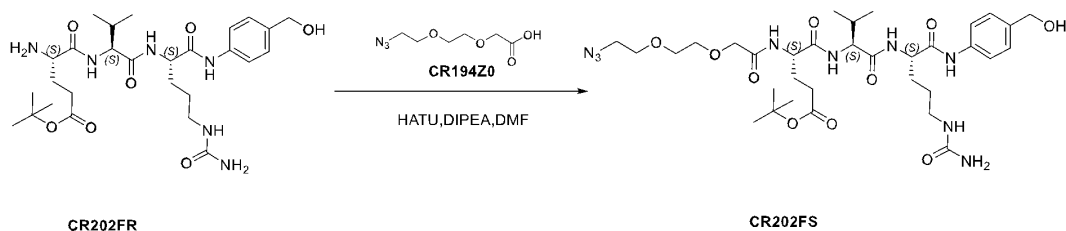


[344] 将 **CR202FT** (6.73 g, 15.81 mmol) 溶于 DMF (50 mL) 中, 磁力搅拌溶解。反应液温度降至 0°C, 加入 HATU (6.61 g, 17.39 mmol), 反应液在 0°C 下搅拌 10 分钟。加入 **CR19154** (6.00 g, 15.8 mmol), 称取 DIEA (2.25 g, 17.39 mmol) 溶于 DMF (10 mL) 中, 滴加到体系中, 反应液在 0°C 下搅拌 1 小时。监测原料反应完全。将反应液加入到乙酸

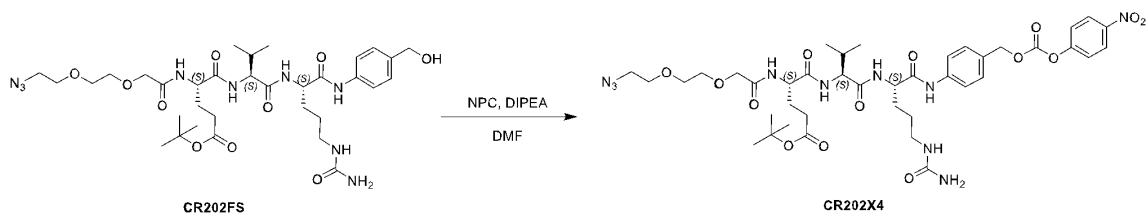
乙酯 (180 mL) 中, 搅拌 0.5 小时。离心, 用乙酸乙酯洗三次, 离心, 放至烘箱过夜 (35°C)。得到 **CR202FQ** (11.93 g, 纯度: 80%, 收率: 76.7%) 黄色固体。[M+H]⁺=787.47。



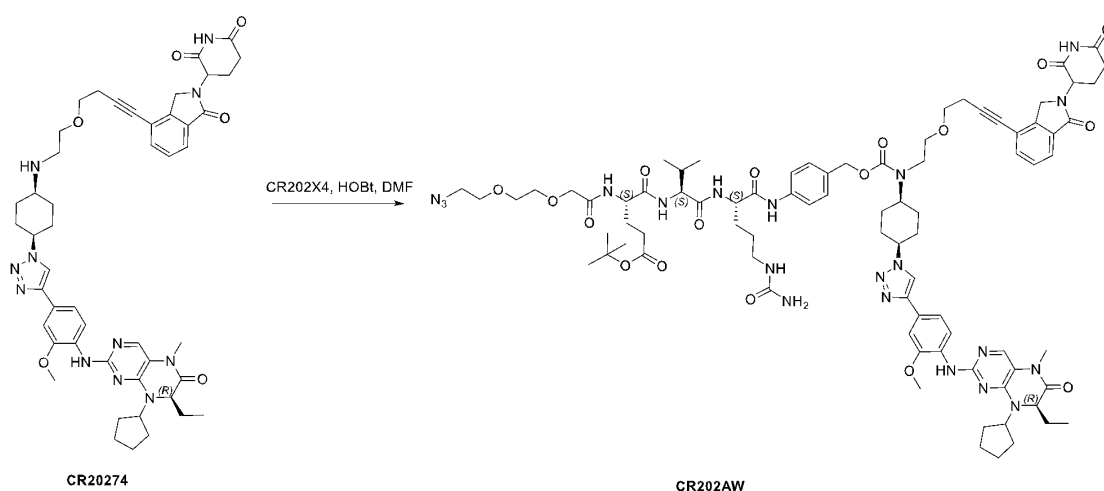
[345] 将 **CR202FQ** (6.5 g, 8.26 mmol) 溶于甲醇 (70 mL) 中, 磁力搅拌溶解。加入 20% 哌啶 DMF 溶液 (12.3 g, 28.91 mmol), 反应液在 50°C 下搅拌过夜。LCMS 监测原料反应完全。将甲醇旋干, 用乙酸乙酯带两次 (50 mL×2), 旋至剩约 15 mL, 加入甲基叔丁基醚 (200 mL), 有白色固体析出, 过滤, 滤饼甲基叔丁基醚淋洗 (20 mL×2), 真空干燥, 得到 **CR202FR** (4.09 g, 纯度: 91%, 收率: 79.8%) 乳白色固体。



[346] 将 **CR194Z0** (1.51 g, 7.97 mmol) 溶于 DMF (30 mL) 中, 磁力搅拌溶解。反应液温度降至 0°C, 加入 HATU (3.03 g, 7.97 mmol), 反应液在 0°C 下搅拌 10 分钟。加入 **CR202FR** (4.09 g, 7.24 mmol), 称取 DIEA (1.03 g, 7.97 mmol) 溶于 DMF (10 mL) 中, 滴加到体系中, 反应液在 0°C 下搅拌 1 小时。LCMS 监测原料反应完全。将反应液加入到乙酸乙酯 (150 mL) 中, 搅拌过夜。析出固体, 将固体离心, 用甲基叔丁基醚洗一次, 烘干得到 **CR202FS** (3.7 g, 纯度: 79.6%, 收率: 69.5%) 淡黄色固体, [M+H]⁺=736.51。

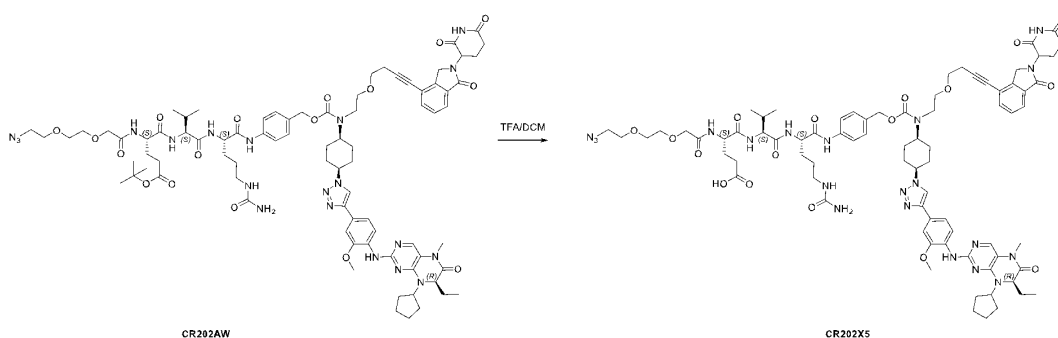


[347] 将 **CR202FS** (1.7 g, 2.3103 mmol) 溶于 DMF (20 mL) 中, 磁力搅拌溶解。加入 NPC (1.4 g, 4.6206 mmol) 和 DIEA (447.9 mg, 3.4655 mmol), 反应液在室温搅拌 1 小时。用反向制备液相纯化, 得到 **CR202X4** (1.77 g, 纯度: 99.28%, 收率: 85.04%) 白色固体。¹H-NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.16 (s, 1H), 8.38-8.30 (m, 2H), 8.25 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.96 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.75 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.68 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.64-7.55 (m, 2H), 7.44 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 6.06 (s, 0H), 5.27 (s, 2H), 4.51-4.37 (m, 3H), 4.24 (dd, $J = 8.4, 6.9$ Hz, 1H), 3.96 (s, 2H), 3.70-3.58 (m, 6H), 3.49-3.39 (m, 2H), 3.03 (ddd, $J = 38.8, 13.1, 6.5$ Hz, 2H), 2.29-2.19 (m, 2H), 1.98 (ddd, $J = 20.3, 12.7, 6.0$ Hz, 2H), 1.85-1.67 (m, 2H), 1.55 (ddd, $J = 21.1, 11.2, 5.0$ Hz, 2H), 1.41 (s, 10H), 0.87 (dd, $J = 14.8, 6.8$ Hz, 6H), $[M+H]^+ = 901.46$ 。

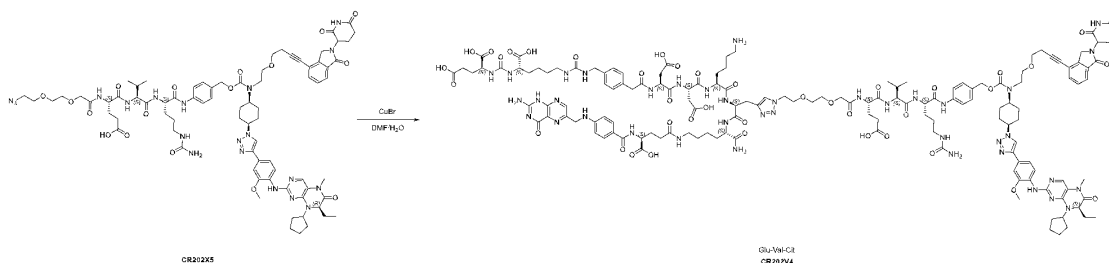


[348] 游离 **CR20274**: 将 **CR20274** 盐酸盐 (902.8 mg, 0.94 mmol) 加入 DCM (50.0 mL) 和甲醇 (10.0 mL) 中, 磁力搅拌至固体完全溶解。在 5~10°C 下, 滴加 10% 碳酸氢钠水溶液 (20 mL), 搅拌 30 分钟, 反应液中加入 DCM (50 mL)、甲醇 (5 mL) 和水 (20 mL), 萃取 (乳化层较厚), 水相加入 DCM/甲醇混合溶液萃取 2 遍, 每遍加入 DCM (50 mL) 和甲醇 (5 mL)。合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 30°C 真空浓缩干。得到游离态 **CR20274** (910.4 mg, 纯度: 92.04%, 收率: 100.0%) 固体, 直接用于后续步骤, 未纯化。

[349] 将游离态 **CR20274** (60.0 mg, 0.068 mmol)、**CR202X4** (150.1 mg, 0.170 mmol) 和 HOBt (1.8 mg, 0.014 mmol) 依次加入 DMF (1.5 mL) 中, 磁力搅拌溶解, 氮气保护, 25°C 下反应 24 小时, 补加 DIPEA (12 μ L, 0.068 mmol), 继续反应 20 小时, 用 HPLC 中控至反应完全, 反应液直接制备纯化, 得 **CR202AW** (64.9 mg, 纯度: 92.96%, 收率: 43.6%)。 $[M+2H]^+/2 = 823.8$ 。

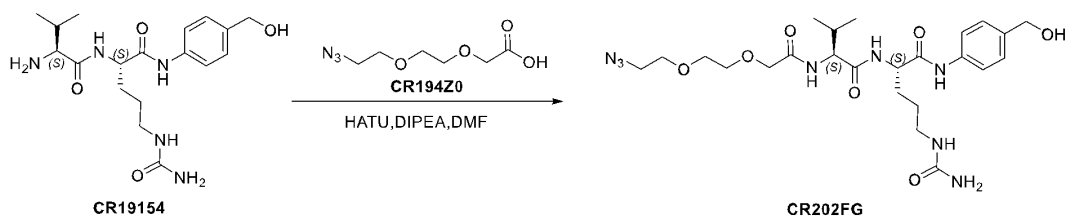


[350] 将 **CR202AW** (50.0 mg, 0.03mmol) 加入 DCM (2.0 mL) 中, 氮气保护, 控制外温 15°C, 滴加 TFA (0.2 mL), 保温反应 3 小时, 用 HPLC 中控至反应完全, 控制外温 10°C, 滴加饱和 NaHCO_3 调节至 pH=7~8, 浓缩除去 DCM, 有少量固体析出, 加入乙腈 (4 mL) 溶解, 反向制备液相纯化, 得 **CR202X5** (20.6 mg, 纯度: 84.20%, 收率: 42.9%)。



[351] 在 25 mL 夹套中, 将 **CR202X5** (16.0 mg, 10.1 μmol) 和 **CR202W4** (18.3 mg, 12.1 μmol) 用 DMF (1 mL) 和水 (0.3 mL) 在避光条件下溶解, 磁力搅拌, 氮气保护。加入 DIEA (250 μL) 调节 pH=8 后, 加入 CuBr (1.5 mg, 1.0 eq.), 25°C 下反应 2 小时。反应液用制备液相纯化。得 **CR202V4** (5.7 mg, 纯度: 92.26%, 收率: 13.9%), $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}/3=1035.98$ 。

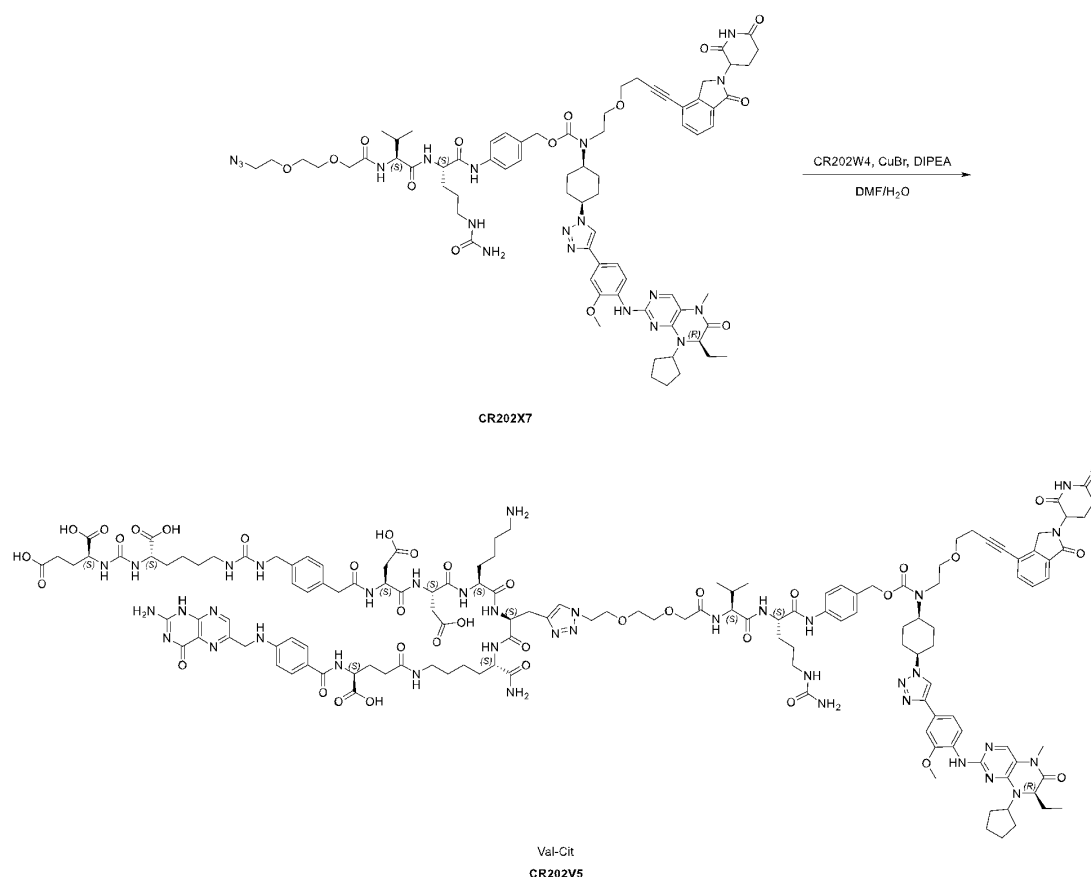
[352] 4.9 CR202V5、CR202V6、CR202Z6 和 CR202V7 的合成



[353] 将 **CR202Z0** (3.00 g, 15.81 mmol)、HATU (6.01 g, 15.81 mmol)、DIPEA (2.73 g, 21.08 mmol) 和 **CR19154** (4.00 g, 10.54 mmol) 依次加入 DMF (40 ml) 中, 氮气保护, 控制温度 25°C 下反应 2 小时, 用 HPLC 中控至反应完全, 反应液直接用反向制备液相纯

收率：100.0%，纯度：92.04%），直接用于后续步骤，未纯化。

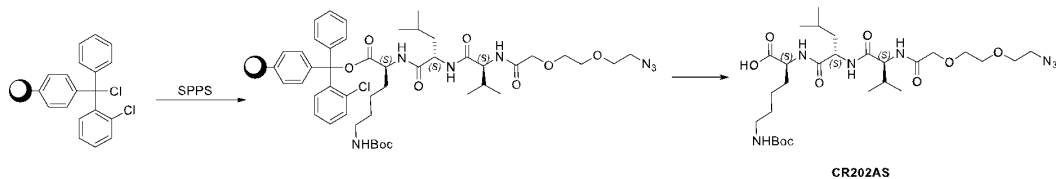
[356] 将游离态 **CR20274**（200.0 mg，0.23 mmol）、**CR202X6**（404.7 mg，0.57 mmol）和 HOBt（6.1mg，0.045mmol）依次加入 DMF（5.0 mL）中，磁力搅拌溶解，氮气保护，25℃下反应 24 小时，HPLC 中控至反应完全，反应液直接用反向制备液相纯化，得到 **CR202X7**（134.0 mg，纯度：98.32%，收率：40.6%）， $[M+2H]^{2+}=730.99$ 。



[357] 将 **CR202X7**（130.0 mg，0.089 mmol）和 **CR202W4**（161.8 mg，0.107 mmol）用 DMF（7.8 mL）和水（2.6 mL）在避光条件下溶解，磁力搅拌，氮气保护。加入 DIEA（250 μ L）调节 pH=8 后，加入 CuBr（12.7 mg，0.089 mmol），25℃下反应 2 小时中控至反应完全。反应液用反向制备液相纯化。得 **CR202V5**（76.6 mg，纯度：95.70%，收率：28.9%），MS： $[M+4H]^{4+}/4=745.02$ 。

[358] 同理，采用类似的方法合成 CR202V6、CR202Z6 和 CR202V7。

[359] 4.10 CR202V8 的合成



[360] CR202AS 的合成

树脂溶胀：称取 2-CTC 树脂（50.00 g，32.5 mmol），加入无水 DCM（500 mL），开启机械搅拌（120 转/分钟），氮气保护，25°C 下树脂溶胀 30 分钟。

氨基酸偶联：加入 Fmoc-Lys(boc)-OH（45.68 g，97.5 mmol）和 DIEA（21.00 g，162.5 mmol），继续反应 3 小时。

树脂封端：反应液转入固相合成反应釜中，抽干反应液，用 DMF 反复洗涤树脂三遍（500 mL×3），然后加入 DMF（500 mL），氮气鼓吹，最后加入甲醇（10.41 g，325 mmol）和 DIEA（12.60 g，97.5 mmol），25°C 下反应 1 小时。抽干反应液，DMF 洗涤树脂 5 遍（500 mL×5）。

脱保护：加入 20% 哌啶溶液（500 mL），氮气鼓吹，25°C 下反应 20 分钟，取出几粒树脂用乙醇洗涤三遍后加入茚三酮显色剂，110°C 下加热 2 分钟，树脂显紫色，反应结束。抽干反应液，DMF 洗涤树脂 5 遍（500 mL×5）。

氨基酸偶联：称取 Fmoc-Leu-OH（17.33 g，48.8 mmol）和 HOBt（6.59 g，48.8 mmol），加入 DMF（250 mL），磁力搅拌溶解后加入 DIC（6.15 g，48.98 mmol），搅拌 3 分钟后加入反应釜中，25°C 下反应 1 小时。取树脂检测，加热显色呈白色，反应结束。抽干反应液，DMF 洗涤树脂 3 遍（500 mL×3）。按照顺序再依次将 Fmoc-Val-OH 和 N₃-PEG₂-CH₂-COOH 与树脂进行偶联。

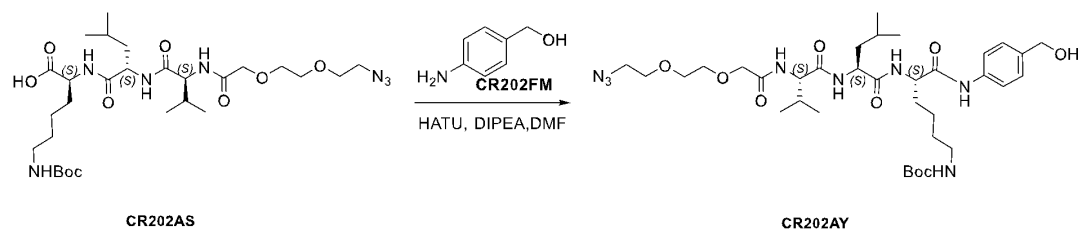
树脂收缩：DCM 洗涤树脂两遍（500 mL×2），MeOH 收缩树脂，干燥后称重得树脂 66.00 g。

裂解：将 22.00 g 树脂加入 240 mL 配置好的裂解液（72 mL 三氟乙醇用 DCM 稀释至 240 mL），开启机械搅拌，氮气保护，25°C 下反应 3 小时。

后处理：抽滤除去树脂，少量二氯甲烷洗涤树脂一遍，将滤液直接浓缩干，得到 8.08 g 油状液体 CR202AS，保存在零下 20°C 环境下产物固化，HPLC：91.08%，收率：118.0%，超重

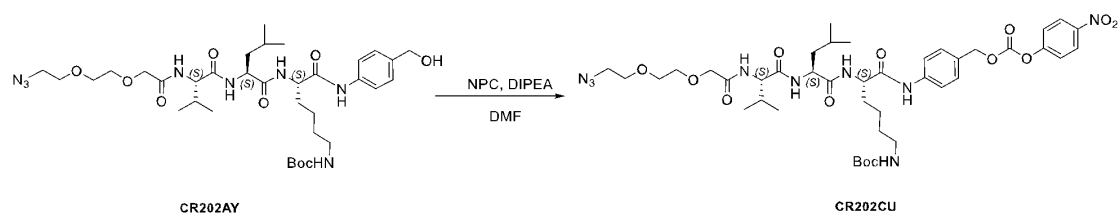
原因分析：产物中有三氟乙醇残留。

[361] CR202AY 的合成



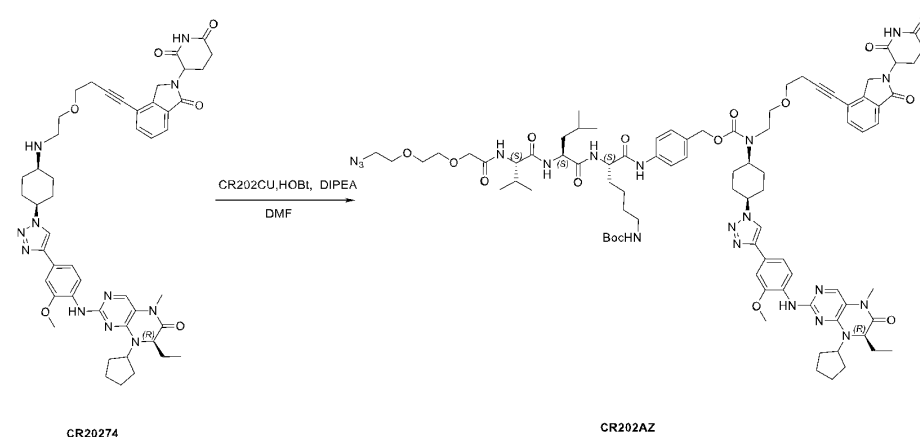
[362] 将 **CR202AS** (3.51 g, 5.6 mmol) 和 HATU (2.97 g, 7.8 mmol) 依次加入 DMF (33 mL)、EA (乙酸乙酯, 18 mL) 和水 (3.5 mL) 的混合溶剂中, 磁力搅拌, 氮气保护, 降温至 0°C, 依次滴加对氨基苄醇溶液 (1.03 g, 8.4 mmol, 用 EA (7 mL) 和 DMF (1.8 mL) 溶解) 和 DIEA 溶液 (1.3 mL, 7.8 mmol, 用 EA (7 mL) 溶解), 0°C 下反应 1 小时, HPLC 中控至反应完全, 反应液加入到纯化水 (200 mL) 中, EA 萃取 (100 mL×3), 合并有机相, 依次用纯化水 (100 mL) 和饱和食盐水 (100 mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 浓缩有机相, 得黄色油状液体 **CR202AY** (4.1466 g, HPLC: 86.48%, 收率: 96.5%)。

[363] CR202CU 合成



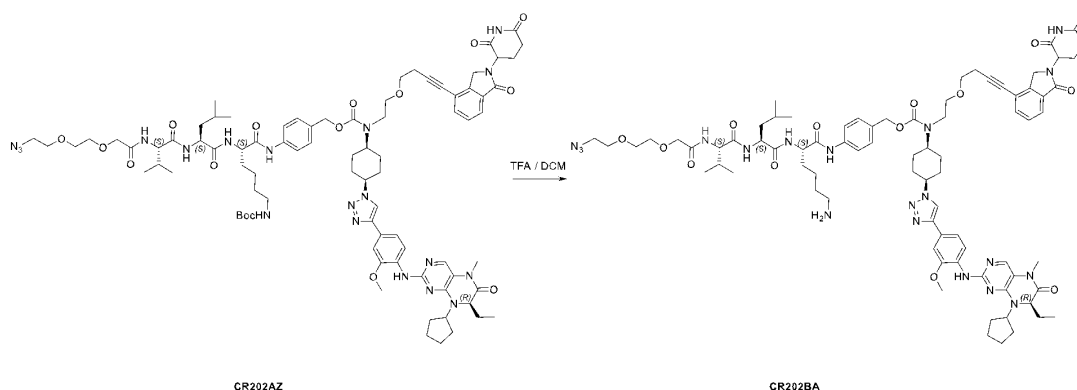
[364] 将 **CR202AY** (2.0783 g, 2.8 mmol) 和二对硝基苯碳酸酯 (1.5486 g, 5.1 mmol) 加入 DCM (30 mL) 中, 磁力搅拌至溶解, 加入 DIEA (0.93 mL, 5.7 mmol), 氮气保护, 25°C 下反应 3 小时。HPLC 中控至反应完全, 25°C 下浓缩, 反应液用制备液相纯化, 得 **CR202Z1** (1.3924 g, HPLC: 95.00%, 收率: 52.8%) 白色固体。

[365] CR202AZ 合成



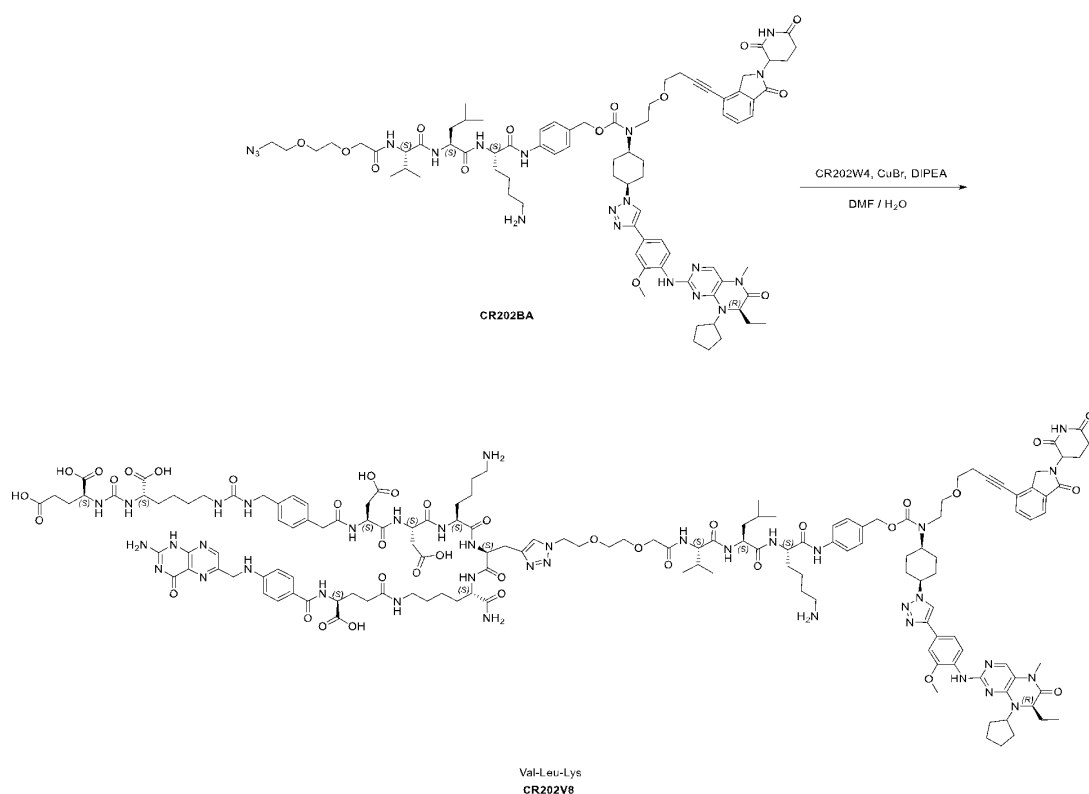
[366] 将 **CR20274** (150 mg, 0.17 mmol) 和 **CR202CU** (275.0 mg, 0.31 mmol) 加入 DMF (3.0 ml) 中, 磁力搅拌至溶解。加入 HOBT (4.6 mg, 0.034 mmol) 和 DIEA (40 mg, 0.26 mmol, 1.5eq), 氮气保护, 25°C 下反应 18 小时。HPLC 中控至反应完全, 反应液用制备液相纯化。得白色固体 **CR202AZ** (170.0 mg, HPLC: 98.89%, 收率: 60.9%), $[M+2H]^{2+}/2=823.46$ 。

[367] **CR202BA** 合成



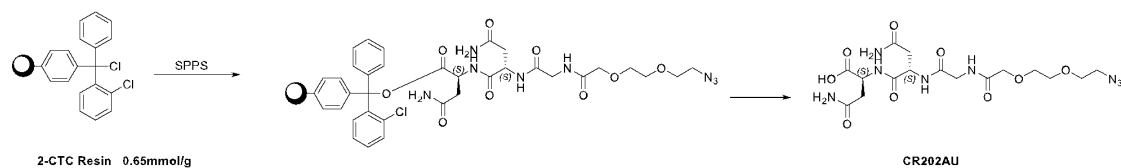
[368] 将 **CR202AZ** (170.0 mg, 0.10 mmol) 加入 DCM (4.0 mL) 中, 氮气保护, 控制外温 15°C, 滴加 TFA (0.4 mL), 保温反应 2.5 小时, HPLC 中控至反应完全。控制外温 0°C, 滴加饱和碳酸氢钠溶液调节至 pH=7~8。15°C 下浓缩除去 DCM, 残留物加乙腈 (10 mL) 溶解, 反应液用制备液相纯化。得 **CR202BA** (34.0 mg, HPLC: 89.36%, 收率: 21.4%) 白色固体, $[M+2H]^{2+}/2=773.3$ 。

[369] **CR202V8** 合成



[370] 将 **CR202BA** (55.0 mg, 0.036 mmol) 和 **CR202W4** (64.7 mg, 0.43 mmol) 用 DMF (4.0 mL) 和水 (1.3 mL) 在避光条件下溶解, 维持氮气保护, 磁力搅拌至溶解。加入 DIEA 调节至 pH=8, 加入 CuBr (5.1 mg, 0.036 mmol), 25°C 下反应 2 小时, 取样中控反应完全。反应液用制备液相纯化。除盐, 得 **CR202V8** (22.5 mg, 纯度: 95.03%, 收率: 20.8%), $[M+3H]^{3+}/3=1020.48$ 。

[371] 4.11 CR202V9 的合成



[372] CR202AU 合成

树脂溶胀: 称取 2-CTC 树脂 (50.00 g, 32.5 mmol), 加入无水 DCM (500 mL), 开启机械搅拌, 氮气保护, 25°C 树脂溶胀 30 分钟。

氨基酸偶联: 加入 Fmoc-Asn(trt)-OH (58.18 g, 97.5 mmol) 和 DIEA (21.00 g, 162.5 mmol),

继续反应 3 小时。

树脂封端：反应液转入固相合成反应釜中，抽干反应液，用 DMF 反复洗涤树脂三遍（500 mL×3），然后加入 DMF（500 mL），氮气鼓吹，最后加入甲醇（10.41 g，325 mmol），DIEA（12.60 g，97.5 mmol），25°C 下反应 1 小时。抽干反应液，DMF 洗涤树脂 5 遍（500 mL×5）。

脱保护：加入 20% 哌啶溶液（500 mL），氮气鼓吹，25°C 下反应 20 分钟，取出几粒树脂用乙醇洗涤三遍后加入茚三酮显色剂，110°C 下加热 2 分钟，树脂显紫色，反应结束。抽干反应液，DMF 洗涤树脂 5 遍（500 mL×5）。

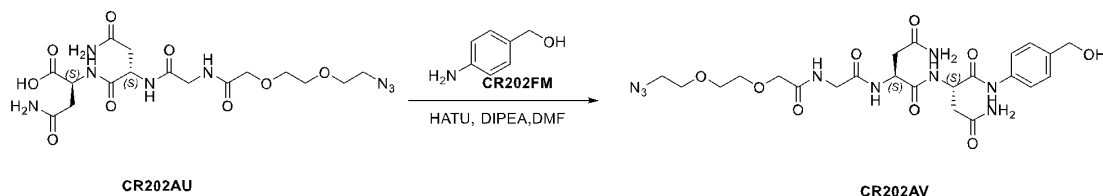
氨基酸偶联：称取 Fmoc-Asn(trt)-OH（17.33 g，48.8 mmol）和 HOBT（6.59 g，48.8 mmol），加入 DMF（250 mL），磁力搅拌溶解后加入 DIC（6.15 g，48.98 mmol），搅拌 3 分钟后加入反应釜中，25°C 下反应 1 小时。取树脂检测，加热显色呈白色，反应结束。抽干反应液，DMF 洗涤树脂 3 遍（500 mL×3）。按照顺序再依次将 Fmoc-Gly-OH 和 N₃-PEG₂-CH₂-COOH 与树脂进行偶联。

树脂收缩：DCM 洗涤树脂两遍（500 mL×2），MeOH 收缩树脂，干燥后称重得树脂 96.42 g。

裂解：32.14 g 树脂，在 5°C 下加入配置好的裂解液中（300 mL，DCM:TFA:Tis=4.9:4.9:0.2），开启机械搅拌，氮气保护，25°C 下反应 3 小时。

后处理：抽滤除去树脂，少量二氯甲烷洗涤树脂一遍，将滤液直接浓缩除去 DCM 后加入 600 mL 预冷的 MTBE 中，析出白色固体，搅拌 10 分钟，过滤，MTBE 洗涤固体 2 遍（100 mL×2），干燥得 5.21 g 白色固体 CR202AU（HPLC：92.71%，收率：101.6%），推测超重原因：产物中有 TFA 残留。

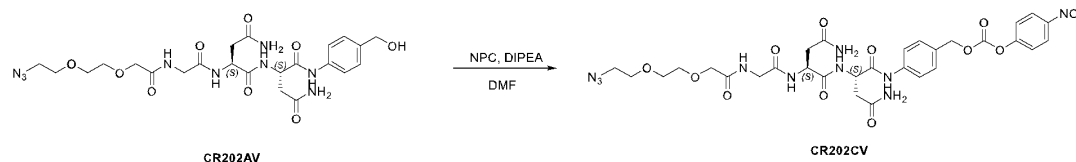
[373] CR202AV 合成



[374] 将 CR202AU（2.50 g，5.3 mmol）和对氨基苄醇（0.54 g，4.4 mmol）加入 DMF（12 mL）中，磁力搅拌至溶解澄清，加入 HATU（2.51 g，6.6 mmol）和 DIEA（2.20 mL，

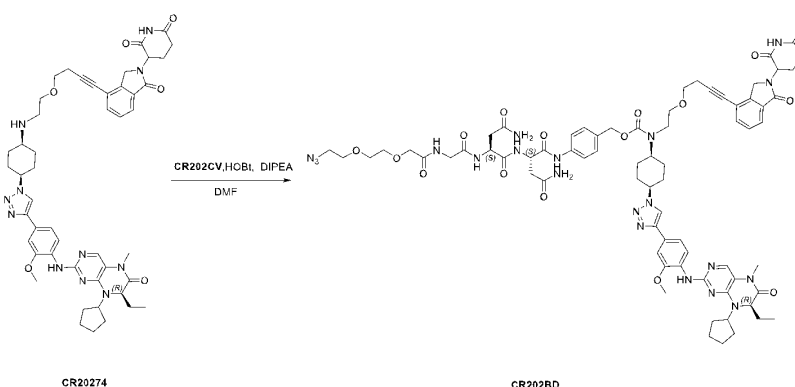
13.2 mmol), 25°C下反应 1.5 小时。HPLC 中控至反应完全, 将反应液加入到预冷的 MTBE (60 mL) 中, 析出白色固体, 磁力搅拌 10 分钟过滤, MTBE 洗涤固体 2 遍 (20 mL×2), 干燥得到 **CR202AV** (1.3194 g, 纯度: 87.79%, 收率: 51.9%) 白色固体。

[375] **CR202CV 合成**



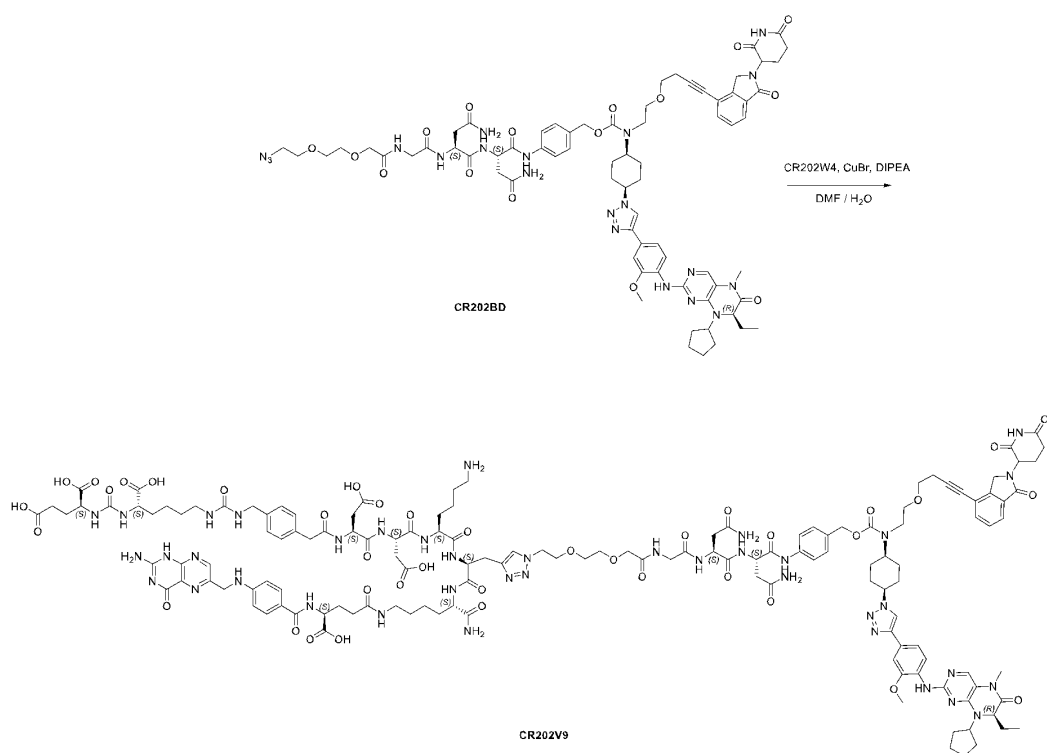
[376] 将 **CR202AV** (1.28 g, 2.2 mmol) 和二对硝基苯碳酸脂 (1.21 g, 4.0 mmol) 加入 DMF (10 mL) 中磁力搅拌溶解, 加入 DIEA (0.73 mL, 4.4 mmol), 氮气保护, 25 摄氏度下反应 2 小时。HPLC 中控至反应完全, 将反应液加入到 MTBE (60 mL) 中, 析出白色固体, 搅拌 10 分钟, 过滤, MTBE 洗涤固体 2 遍 (20 mL×2), 30°C 下真空干燥, 得到 **CR202CV** (1.19 g, HPLC: 87.40%, 收率: 84.8%) 白色固体。

[377] **CR202BD 合成**



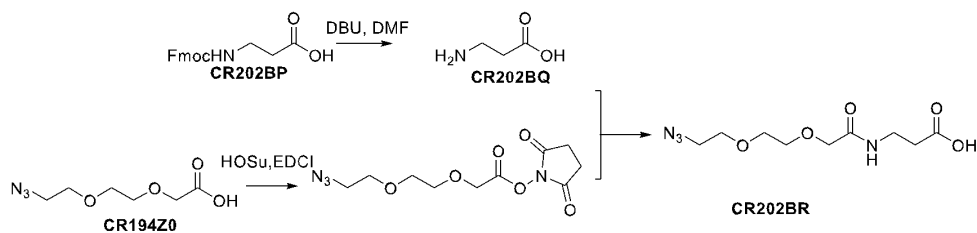
[378] 将 **CR20274** (51.2 mg, 56.6 μmol) 和 **CR202CV** (75.8 mg, 101.8 μmol) 加入 DMF (1 mL) 磁力搅拌溶解。加入 HOBT (1.5 mg, 11.3 μmol) 和 DIEA (15 μL, 84.8 μmol), N₂ 保护, 25°C 下反应 18 小时。HPLC 中控至反应完全, 反应液用制备液相纯化, 得 **CR202BD** (68.6 mg, 纯度: 91.5%, 收率: 81.7%) 白色固体。

[379] **CR202V9 合成**



[380] 将 **CR202BD** (58.0 mg, 39.0 μmol) 和 **CR202W4** (70.8 mg, 46.7 μmol) 用 DMF (3.6 mL) 和水 (1.2 mL) 在避光条件下溶解, 氮气保护, 磁力搅拌溶解。加入 DIEA 调节 pH=8 后, 加入 CuBr (5.6 mg, 39.0 μmol), 25°C 下反应 2 小时, 取样中控至反应完全。反应液制备液相纯化。得 **CR202V9** (37.4 mg, 纯度: 94.90%, 收率: 31.6%), $[\text{M}+4]^{4+}/4=751.89$ 。

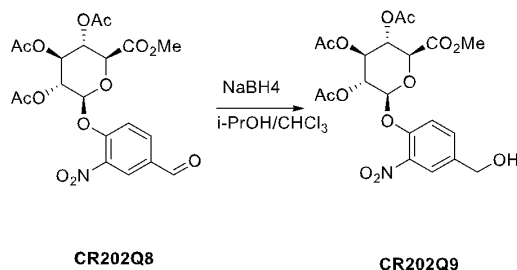
[381] 4.12 **CR202AL** 的合成



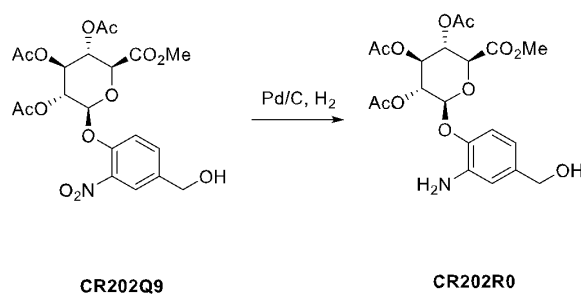
[382] **CR202Z0** 活化酯合成: 将 **CR202Z0** (3.00 g, 15.9 mmol) 加入 DCM (30 mL) 中, 氮气保护, 控制外温 0°C, 依次分批加入 EDCI (4.57 g, 23.8 mmol) 和 HOSu (2.74 g, 23.8 mmol), 添加完毕后, 自然升至室温, 在室温下反应 2 小时, 反应液倒入冰水 (100 mL) 中, 用 DCM 萃取 (50 mL $\times$ 2), 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 浓缩干得 4.6 g 黄色油状物。

[383] **CR202BQ** 合成: 将 **CR202BP** (5.90 g, 19.1 mmol) 加入 DMF (30 mL) 中, 磁

力搅拌溶解, 加入 DBU (2.40 g, 15.9 mmol), 室温下反应 3 小时, 加入 DIPEA (4.5 mL), 将 **CR202Z0** 活化酯 (4.6 g) 滴加入反应中, 室温下反应 2 小时, 反应液倒入冰水 (250 mL) 中, 用正庚烷萃取 (100 mL×2), 水相用 6N 盐酸调节至 pH=2, 再用 DCM 萃取 (100 mL×2), 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 得 **CR202BR** (2.30g, 收率: 56.1%) 黄色油状物。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.36 (s, 1H), 4.06 (s, 2H), 3.82-3.67 (m, 6H), 3.62 (dd, *J* = 12.1, 6.0 Hz, 2H), 3.52-3.41 (m, 2H), 2.67 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), MS: [M+H]⁺=261.4。

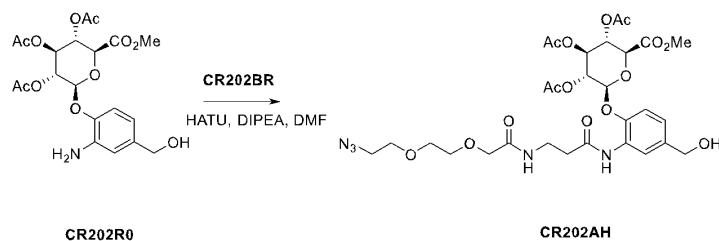


[384] 将 **CR202Q8** (3.30 g, 6.8 mmol) 加入异丙醇 (15 mL) 和氯仿 (55 mL) 中, 氮气保护, 控制外温 0°C, 分批加入硼氢化钠 (389.1 mg, 10.2 mmol), 保温反应 3.5 小时, TLC (正庚:EA=1:1, R_f=0.5) 验证反应完全。反应液倒入冰水 (150 mL) 中, 滴加 6N 盐酸 (2 mL), 用 DCM 萃取 (100 mL×2), 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 浓缩得 4.6 g 粗品, 加入 EA:正庚烷 (7.5 mL:7.5mL) 室温打浆过夜, 过滤, EA:正庚烷 (1 mL:1 mL) 淋洗, 真空干燥得 **CR202Q9** (3.60g, 收率: 83.7%) 类白色固体。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.86 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.58 (dd, *J* = 8.5, 2.1 Hz, 1H), 7.40 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 5.43-5.30 (m, 3H), 5.23 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 4.77 (s, 2H), 4.24 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 3.79 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 2.10 (d, *J* = 3.4 Hz, 6H), MS: [M+H]⁺=475.2。

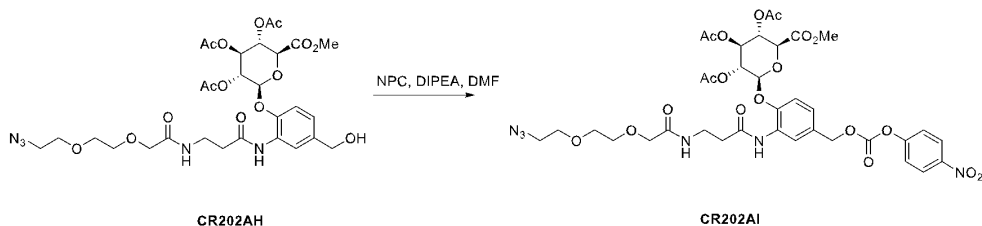


[385] 将 **CR202Q9** (2.85g, 5.9 mmol) 加入甲醇 (100 mL) 中, 加入 10% Pd/C (0.30 g, 含水量: 50%), 氢气置换 3 遍, 室温, 常压氢化 4 小时, TLC 验证反应完全, 过滤, 浓缩干, 加入 EA:正庚烷 (2mL:4mL) 在室温下打浆 16 小时, 过滤, 用 EA:正庚烷 (1:2, 2 mL×2)

淋洗，真空干燥得 **CR202R0** (2.60 g, 纯度: 91.63%, 收率: 87.8%) 类白色固体。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.94 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.77 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 6.70 (dd, *J* = 8.2, 1.7 Hz, 1H), 5.42-5.31 (m, 3H), 5.06 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 4.59 (s, 2H), 4.20 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 3.80 (s, 3H), 2.14-2.08 (m, 9H), MS: [M+H]⁺=456.3。

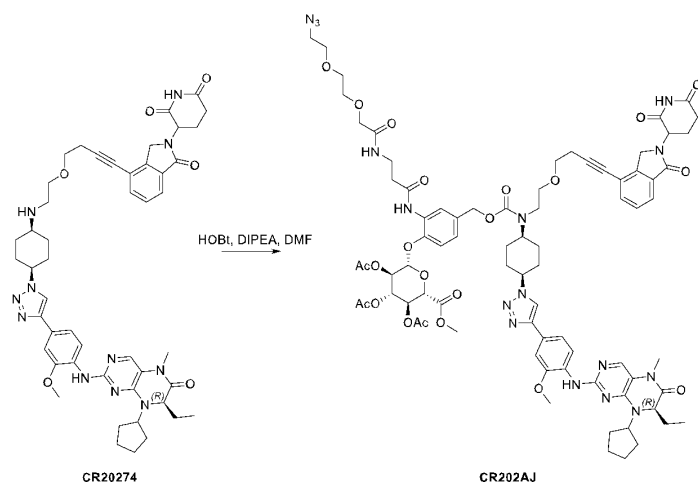


[386] 将 **CR202BR** (1.82g, 6.9 mmol) 加入 DMF (24 mL) 中，氮气保护，控制外温 0°C，依次加入 DIPEA (1.38 g, 10.6 mmol)、HATU (2.62g, 6.9 mmol) 和 **CR202R0** (2.40 g, 5.3 mmol)，添加完毕，自然升至室温 (16.0°C)，在室温下反应 2.5 小时，HPLC 中控至反应完全，反应倒入冰水 (200 mL) 中，用 EA 萃取 (100 mL×3)，合并有机相，饱和食盐水洗涤 (100 mL×2)，无水硫酸钠干燥，浓缩得 5.4 g 粗品，制备纯化，得泡沫状固体 **CR202AH** (2.18 g, 纯度: 97.52%, 收率: 54.8%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.43 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.10 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 6.97 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 5.45 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H), 5.35 (dt, *J* = 14.0, 7.7 Hz, 2H), 5.09 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 4.68 (s, 2H), 4.23 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H), 4.06 (s, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.71 (d, *J* = 5.1 Hz, 8H), 3.44 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H), 2.76 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 2.18-2.04 (m, 9H), MS: [M+H]⁺=698.3。



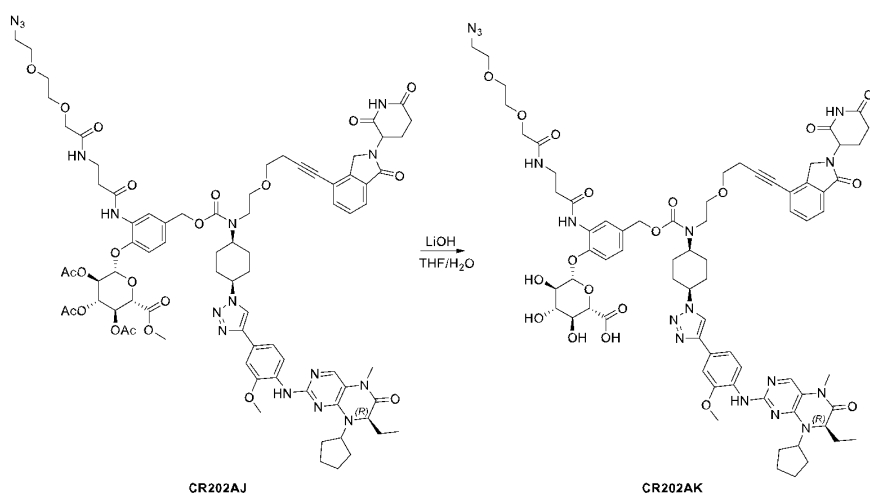
[387] 将 **CR202AH** (1.10 g, 1.58 mmol) 加入 DMF (10.0 mL) 溶解，氮气保护，依次加入二对硝基苯酚碳酸酯 (960.0 mg, 3.15 mmol) 和 DIPEA (306.0 mg, 2.37 mmol)，室温下反应 3 小时，HPLC 中控至反应完全。反应液制备纯化，得白色固体 **CR202AI** (1.10 g, 纯度: 99.85%, 收率: 80.9%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.56 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 8.35-8.28 (m, 2H), 8.13 (s, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.45-7.39 (m, 2H), 7.17 (dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, 1H), 7.01 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 5.47 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H), 5.39-5.31 (m, 2H), 5.27 (s, 2H), 5.13 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H),

4.25 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H), 4.10 (s, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.75-3.68 (m, 8H), 3.47-3.41 (m, 2H), 2.79 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 2.14-2.08 (m, 9H), MS: $[M+H]^+ = 863.3$ 。

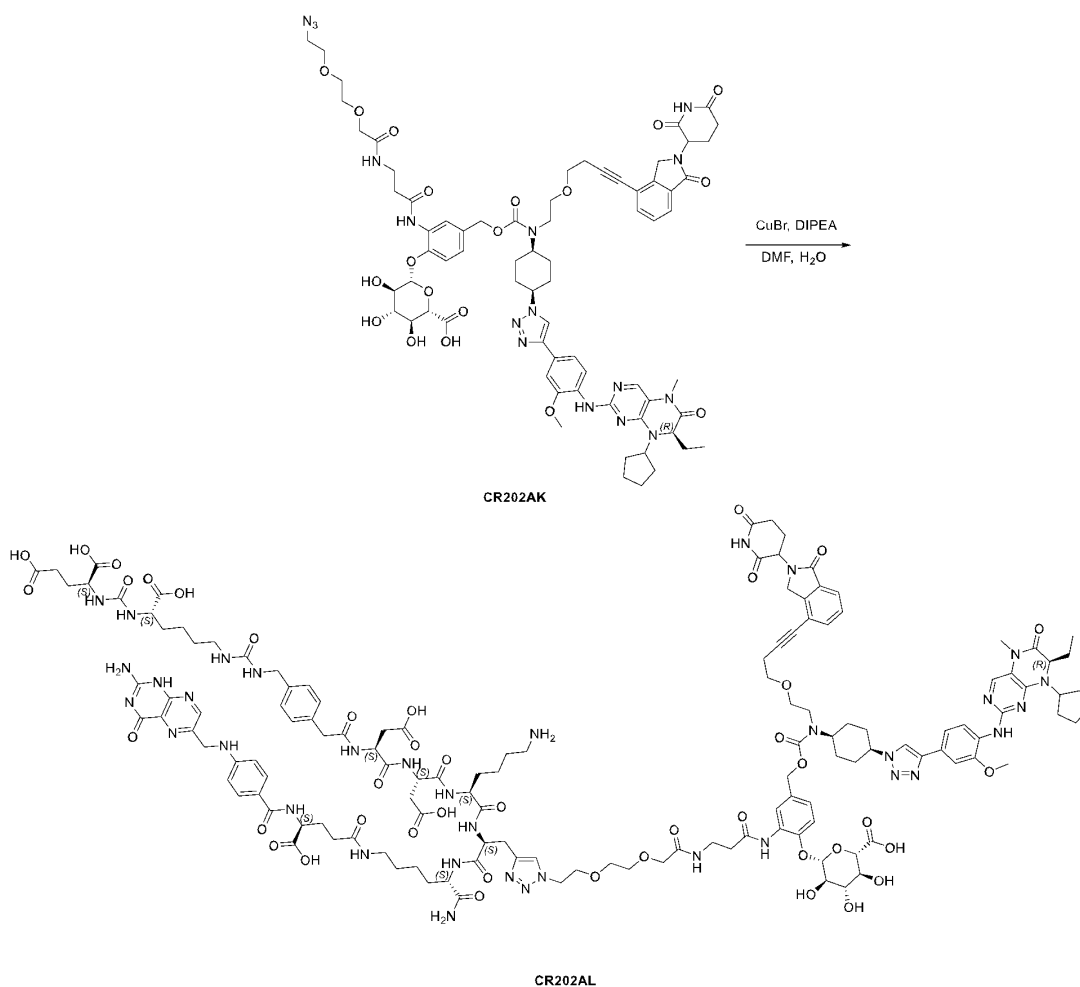


[388] **CR20274** 的游离：将 **CR20274** 盐酸盐 (2.8 g, 2.93 mmol, 1.0 eq.) 用 DCM (100.0 mL) 和甲醇 (20.0 mL) 溶解，冷却至 5~10°C。称取 NaHCO_3 (2.0 g, 23.8 mmol) 溶于水 (35 mL)，然后滴加到 **CR20274** 的 DCM/MeOH 溶液中。5~10°C 下搅拌 3 分钟，分层。水相用 DCM/MeOH (10/1, 50 mL $\times 2$) 萃取。合并有机相，无水硫酸钠干燥，过滤。滤液 30°C 真空浓缩干燥。得到游离态 **CR20274** (2.5 g, 纯度：98.02%，收率：97%) 淡黄色固体，直接用于后续步骤。

[389] 将游离态 **CR20274** (150.0 mg, 0.17 mmol)、**CR202AI** (292.8 mg, 0.34 mmol)、HOBt (4.6 mg, 0.034 mmol) 和 DIPEA (32.9 mg, 0.25 mmol) 依次加入 DMF (4.0 mL) 中，磁力搅拌溶解，氮气保护，25°C 下反应 20 小时，补加 DIPEA (8 μL , 0.045 mmol)，继续反应 24 小时，HPLC 中控至反应完全，反应液用制备液相纯化，得 **CR202AJ** (218.1 mg, 纯度：99.56%，收率：54.5%)。

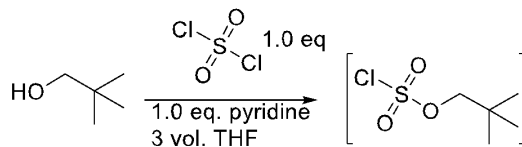


[390] 将 **CR202AJ** (210.0mg, 130.0 μmol) 加入 THF (21 mL) 中溶解, 控制外温 0~5°C, 滴加 0.1 M LiOH 水溶液 (7.2 mL, 718.0 μmol), 保温反应 1 小时, 反应液滴加 5% TFA 水溶液, 调节至 pH=6~7, 减压浓缩除去 THF, 残留液用制备液相纯化。得 **CR202AK** (35.0 mg, 纯度: 94.84%, 收率: 17.8%)。



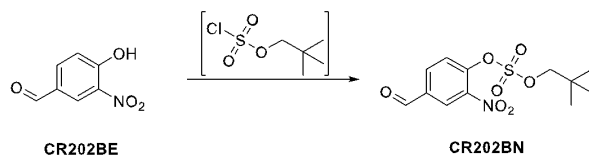
[391] 在 25 mL 夹套中, 将 **CR202AK**(85.0 mg, 57.8 μ mol, 1.0 eq.)和 **CR202W4**(104.9 mg, 69.4 μ mol, 1.2 eq.) 用 DMF (6.4 mL) 和水 (2.5 mL) 在避光条件下溶解, 磁力搅拌, 氮气保护。加入 DIEA 调节至 pH=8, 加入 CuBr (8.3 mg, 57.8 μ mol, 1.0 eq.), 25°C 下反应 2 小时, 取样中控至反应完全。反应液用制备液相纯化。纯水除盐, 得 **CR202AL** (23.7 mg, 纯度: 94.48%, 收率: 13.9%), $[M+4H]^{4+}/4=746.40$ 。

[392] 4.13 CR202W1 的合成

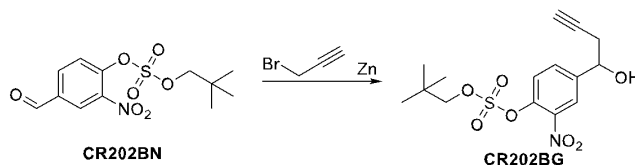


[393] 在 100 mL 三口瓶中, 将磺酰氯 (9.65 g, 71.5 mmol, 1.0 eq.) 用无水 THF (15 mL)

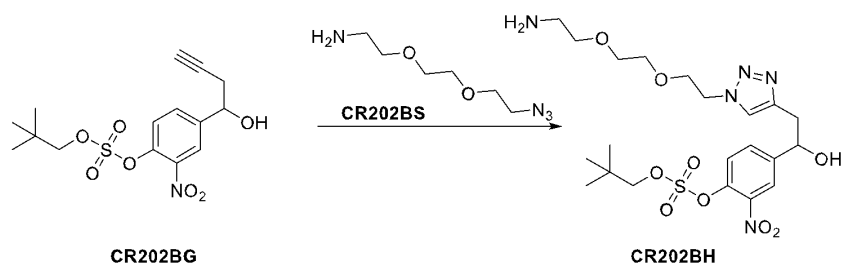
稀释，磁力搅拌，氮气保护，降温到零下 70°C。将新戊醇（6.3 g，71.5 mmol）和吡啶（5.66 g，71.5 mmol）溶于无水 THF（30 mL），1 小时缓慢滴加入三口瓶，滴加完毕自然升温至室温，搅拌 2 小时，过滤除去固体，得到**氯代亚硫酸新戊酯**（Neopentyl sulfurochloridate）。



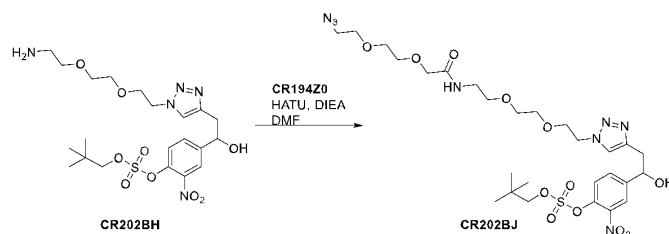
[394] 在 250 mL 三口瓶中，把 **CR202BE**（6 g，35.9 mmol）、TEA（7.27 g，71.8 mmol）和 DMAP（4.4 g，36.0 mmol）溶于 THF（120 mL），氮气保护，冷却至 0°C。滴加含 *Neopentyl sulfurochloridate* 的 THF 溶液（71.5 mmol）。0°C 下搅拌 1 小时，加入 1M HCl（150 mL）和乙酸乙酯（150 mL）淬灭。分层，有机相依次用饱和 NaHCO₃（100 mL）和 10% Na₂SO₄（100 mL）洗涤，用无水 Na₂SO₄ 干燥后过滤。滤液浓缩过硅胶柱（正庚烷/乙酸乙酯=10/1 ~ 5/1）得到 **CR202BN**（6.4 g，纯度：98.49%，收率：50%）淡黄色固体。H-NMR（400 MHz, DMSO-*d*₆） δ 10.09 (s, 1H), 8.76 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.39 (dd, *J* = 8.4 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.96 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.36 (s, 2H), 0.97 (s, 9H)。



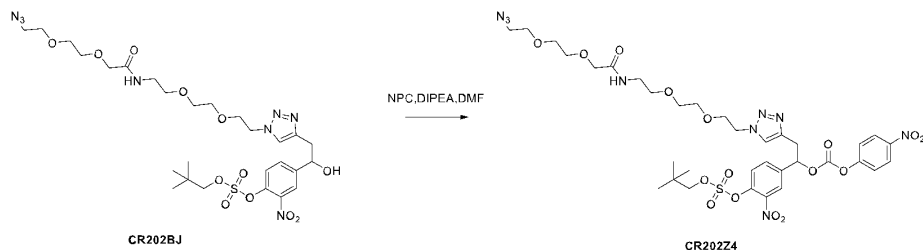
[395] 在 100 mL 夹套中，把 **CR202BN**（3 g，9.45 mmol）和溴丙炔（1.69 g，14.2 mmol）溶于 THF（40 mL），氮气保护。冷却至 -10°C，加入锌粉（927 mg，14.2 mmol）。关闭冷凝，自然升温至室温（10~20°C），搅拌过夜，取样中控至反应完全，加入饱和 NH₄Cl（200 mL）淬灭，乙酸乙酯萃取（150 mL×2）。合并有机相依次用水（150 mL）和 10% Na₂SO₄（150 mL）洗涤，无水 Na₂SO₄ 干燥后过滤。滤液浓缩，柱层析（正庚烷/乙酸乙酯 = 6/1 ~ 4/1）得到 **CR202BG**（5.0 g，纯度：94.86%，收率：64%）黄色的油。H-NMR（400 MHz, CDCl₃） δ 8.09 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.71 (dd, *J* = 8.4 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.61 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.97 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 4.22 (s, 2H), 2.73-2.60 (m, 2H), 2.13 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 1.02 (s, 9H)。



[396] **CR202BG** (5 g, 14.0 mmol) 和 **CR202BS** (2.44 g, 14.0 mmol) 溶于 DMF (50 mL) 和水 (15 mL) 中, 氮气保护。加入 DIEA (2.3 mL) 调 pH=8。加入 CuBr (2.0 g, 13.9 mmol), 25°C 搅拌 1 小时, 取样中控至反应完全。反应液制备液相纯化得无色的油 **CR202BH** (7.2 g, 纯度: 86.69%, 收率: 59%)。LCMS: $[M+H]^+ = 532.3$ 。

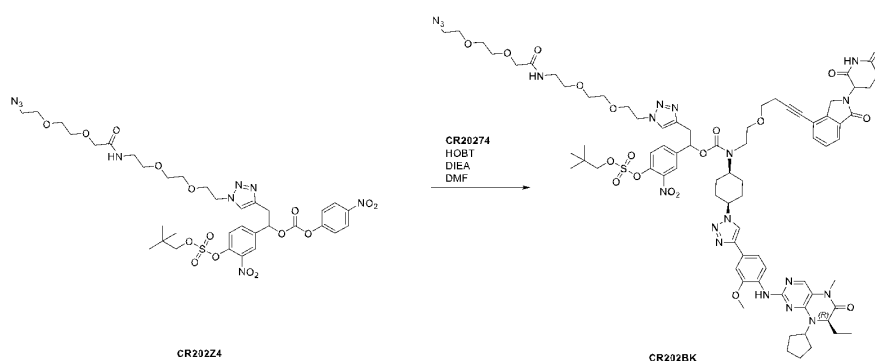


[397] 将 **CR202BH** (7.2 g, 9.48 mmol)、**CR194Z0** (1.8 g, 9.52 mmol) 和 DIEA (3.65 g, 28.2 mmol) 溶于 DMF (50 mL) 中, 氮气保护。加入 HATU (3.6 g, 9.47 mmol)。14°C 搅拌 2 小时, 取样中控至反应完全。加水 (150 mL) 和乙酸乙酯萃取 (100 mL×2)。合并有机相, 依次用水 (100 mL) 和 10% Na₂SO₄ (100 mL) 洗涤, 无水 Na₂SO₄ 干燥后过滤。滤液浓缩柱层析纯化 (DCM/MeOH = 30/1 ~ 20/1) 得到 **CR202BJ** (6.4 g, 纯度: 94.11%, 收率: 90%) 黄色的油。 $[M+H]^+ = 703.4$ (4.43 分钟)。H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.09 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.80 - 7.78 (m, 2H), 7.64 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.61 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 5.00 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 4.46 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 4.29 (s, 2H), 3.88 (s, 2H), 3.76 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H), 3.62 - 3.59 (m, 6H), 3.51 - 3.39 (m, 9H), 3.26 (q, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.02 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H), 0.96 (s, 9H)。

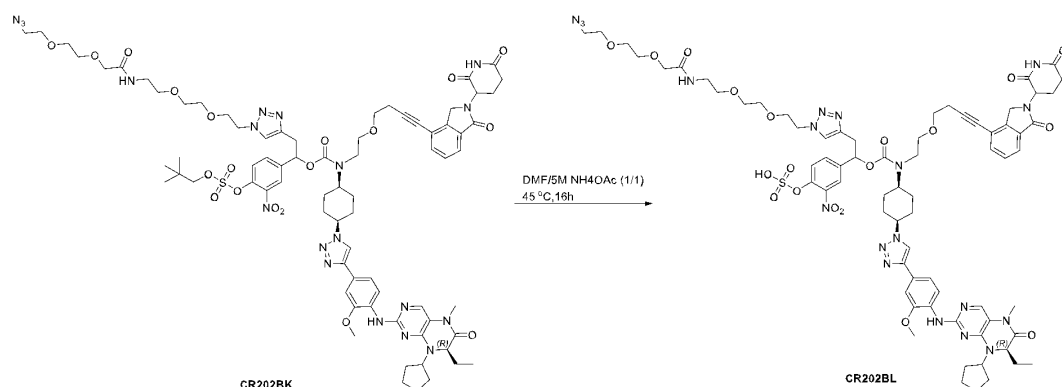


[398] 将 **CR202BJ** (6.4 g, 9.11 mmol)、NPC (5.5 g, 18.1 mmol) 和 DIEA (1.77 g,

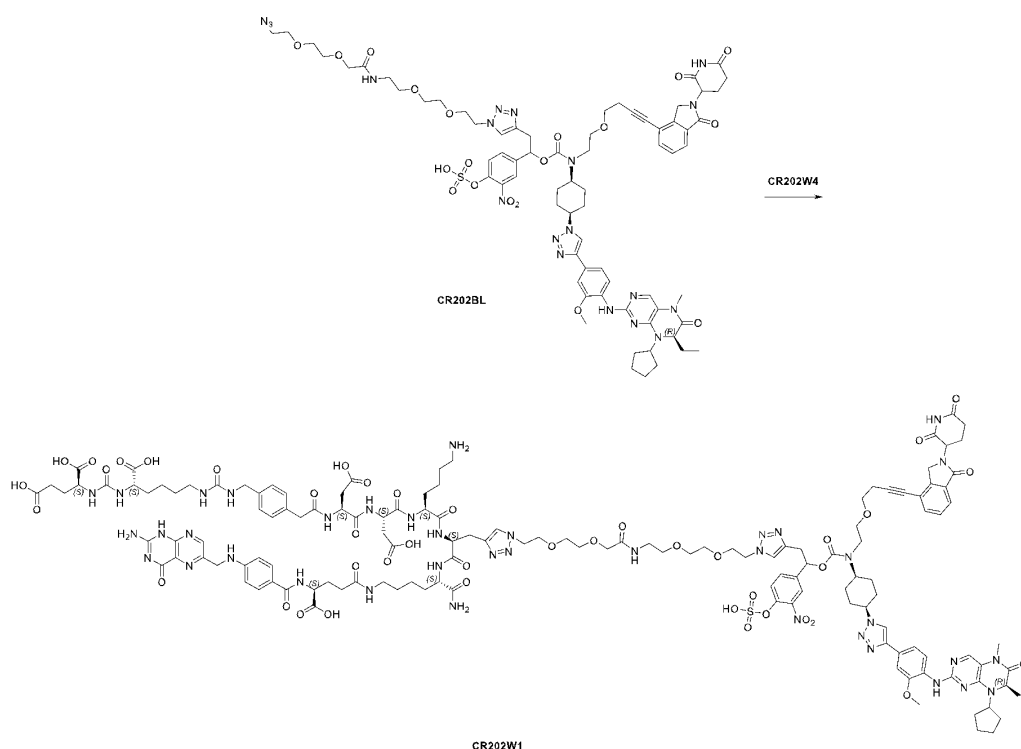
13.7 mmol) 溶于 DMF (30 mL) 中, 氮气保护。25°C 下搅拌 1.5 小时, 取样中控反应完全。反应液用制备液相纯化得 **CR202Z4** (6.0 g, 纯度: 97.24%, 收率: 72%) 无色胶状物。[M+H]⁺ = 868.3。H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.30 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 8.25 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.94 (dd, *J* = 8.4 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.74 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.60 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.52 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 6.17 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 4.48 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 4.31 (s, 2H), 3.87 (s, 2H), 3.76 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 3.61 - 3.58 (m, 6H), 3.46 - 3.36 (m, 10H), 3.24 (q, *J* = 6.0 Hz, 2H), 0.95 (s, 9H)。



[399] 将 **CR20274** (100 mg, 113 μ mol)、**CR202Z4** (196 mg, 226 μ mol)、HOBT (3 mg, 22.2 μ mol) 和 DIEA (29.2 mg, 226 μ mol) 溶于 DMF (1.5 mL) 中, 氮气保护。25°C 下搅拌 21 小时, 取样中控至反应完全。反应液用制备液相纯化得 **CR202BK** (82 mg, 纯度: 95.21%, 收率: 53%)。LCMS: [M/2+H]⁺ = 806.9 (RT=5.45 min)。

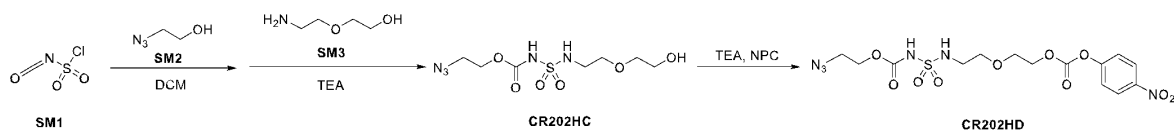


[400] 将 **CR202BK** (117 mg, 101 μ mol) 溶于 DMF (3 mL) 中, 加入 5 M NH₄OAc 水溶液 (3 mL), 氮气保护。45°C 下搅拌 17 小时, 取样中控至反应完全。反应液用制备液相纯化得 **CR202BL** (78 mg, 纯度: 99.54%, 收率: 70%)。LCMS: [M-H]⁻ = 1540.8。



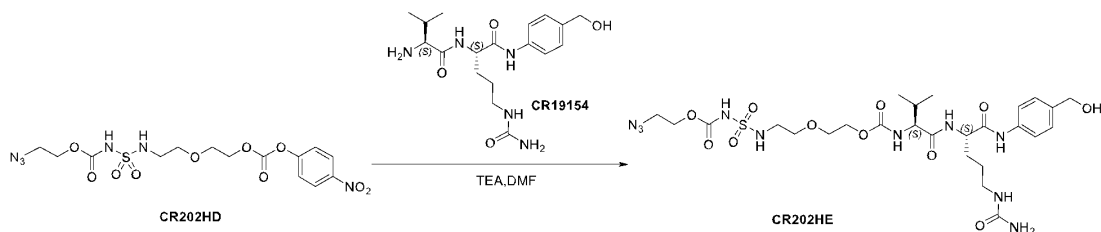
[401] 将 **CR202BL** (70 mg, 45.4 μmol) 和 **CR202W4** (83 mg, 54.8 μmol) 用 DMF (6 mL) 和水 (2 mL) 在避光条件下溶解, 磁力搅拌, 氮气保护。加入 DIEA (250 μL) 调 PH=8 后, 加入 CuBr (6.5 mg, 45.4 μmol), 25°C 下反应 1 小时, 补加 **CR202W4** (18 mg, 11.9 μmol)、DIEA (100 μL) 和 CuBr (3.2 mg, 22.7 μmol), 25°C 下反应 1 小时, 取样中控至反应完全。反应液用制备液相纯化。纯水除盐, 得 **CR202W1** (33 mg, 纯度: 94.46%, 收率: 19%), LCMS: $[M+4H]^{4+}/4 = 764.94$ 。

[402] 4.14 CR202GM 的合成

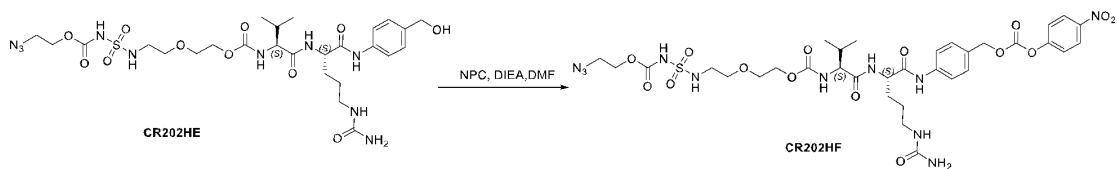


[403] 将 **SM1** (500 mg, 3.53 mmol, 1.0 eq.) 溶于 DCM (50.0 mL) 中, 氮气保护, 冷却至 0°C。加入 **SM2** (307 mg, 3.53 mmol, 1.0 eq.), 0°C 下搅拌 30 分钟。加入 TEA (714 mg, 7.06 mmol, 2.0 eq.) 和 **SM3** (371 mg, 3.53 mmol, 1.0 eq.), 5°C 下搅拌 1 小时。HPLC 中控至反应完全。加入 NPC (2.15 g, 7.07 mmol, 2.0 eq.) 和 TEA (358 mg, 3.54 mmol, 1.0 eq.), 25°C 下搅拌 3 小时。反应液浓缩过硅胶柱 (正庚烷/乙酸乙酯/乙酸=50/50/1), 得

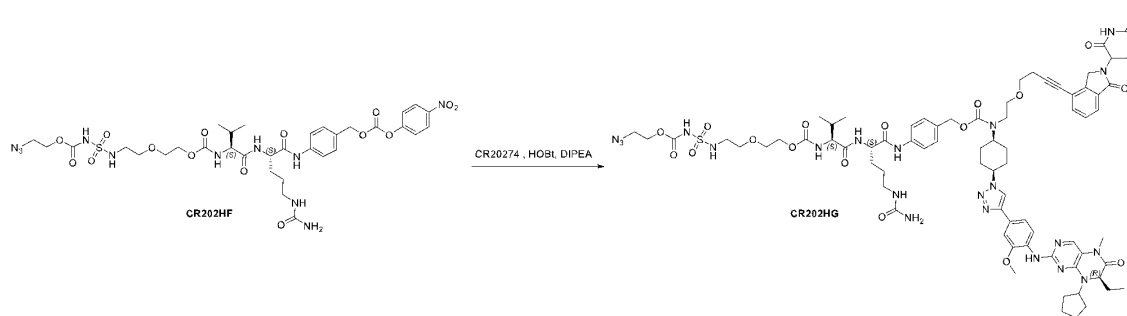
到无色粘稠的油 **CR202HD** (1.2 g, 纯度: 98.47%, 收率: 74%)。LCMS: $[M+H]^+ = 463.4$ 。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.30 - 8.26 (m, 2H), 8.02 (s, 1H), 7.43 - 7.40 (m, 2H), 5.72 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 4.46 - 4.44 (m, 2H), 4.33 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 3.79 - 3.77 (m, 2H), 3.67 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 3.53 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 3.35 (q, $J = 4.8$ Hz, 2H)。



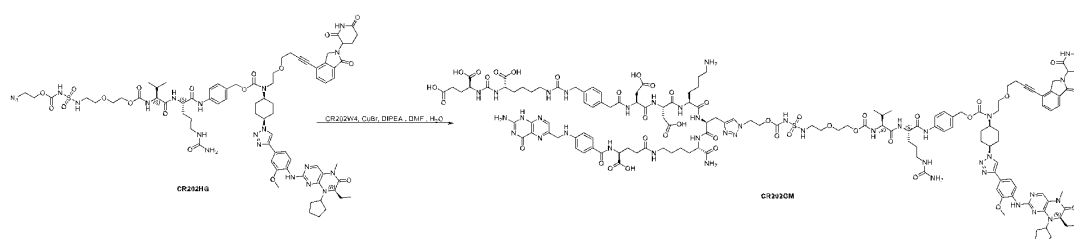
[404] 将 **CR202HD** (402 mg, 0.869 mmol, 1.1 eq.) 溶于 DMF (3 mL) 中, 加入 **CR19154** (300 mg, 0.791 mmol, 1.0 eq.) 和 TEA (240 mg, 2.37 mmol, 3.0 eq.), 25°C 下搅拌 17 小时。HPLC 中控至反应完全。反应液浓缩并用柱层析纯化 (DCM/MeOH/AcOH=100/10/1), 得到白色发泡固体 **CR202HE** (560 mg, 纯度: 100%, 90% 收率)。LCMS: $[M+H]^+ = 703.4$ 。¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 9.92 (s, 1H), 8.04 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.54 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.28 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.22 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 5.98 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 5.40 (s, 2H), 5.08 (s, 1H), 4.42 - 4.37 (m, 3H), 4.07 - 4.03 (m, 4H), 3.88 (dd, $J = 8.4$ Hz, 6.8 Hz, 1H), 3.56 - 3.54 (m, 2H), 3.48 - 3.46 (m, 4H), 3.01 - 2.93 (m, 4H), 2.01 - 1.92 (m, 1H), 1.74 - 1.30 (m, 4H), 0.87 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 0.83 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H)。



[405] 将 **CR202HE** (460 mg, 1.21 mmol, 1.0 eq.) 溶于 DMF (6 mL) 中, 加入 NPC (405 mg, 1.33 mmol, 1.1 eq.) 和 DIEA (235 mg, 1.82 mmol, 1.5 eq.), 25°C 搅拌 17 小时。HPLC 中控至反应完全。反应液直接用反向制备液相纯化, 得到白色固体 **CR202HF** (230 mg, 纯度: 98.59%, 收率: 37%)。LCMS: $[M+H]^+ = 868.3$ 。¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 11.37 (s, 1H), 10.14 (s, 1H), 8.36 - 8.32 (m, 2H), 8.13 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.84 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 7.68 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.61 - 7.58 (m, 2H), 7.44 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.24 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.03 (s, 1H), 5.27 (s, 2H), 4.47 - 4.42 (m, 1H), 4.25 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 4.14 - 4.05 (m, 2H), 3.95 - 3.91 (m, 1H), 3.61 - 3.59 (m, 4H), 3.52 - 3.51 (m, 2H), 3.13 - 2.96 (m, 4H), 2.04 - 1.96 (m, 1H), 1.78 - 1.58 (m, 2H), 1.54 - 1.34 (m, 2H), 0.90 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 0.86 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H)。

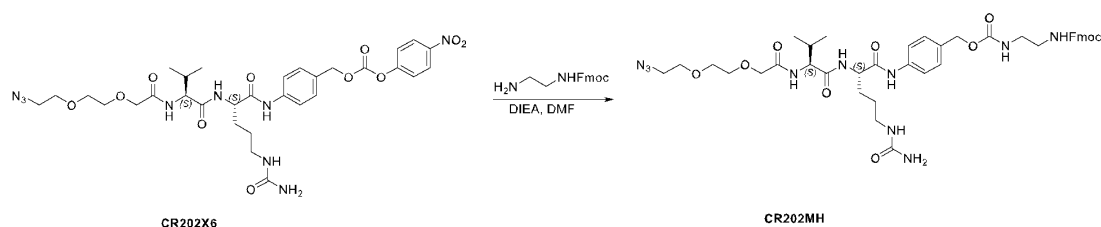


[406] 将 **CR202HF** (200.0 mg, 0.23 mmol)、**CR20274** (游离态, 220.0 mg, 0.23 mmol)、HOBT (6.4 mg, 0.05 mmol)、DIPEA (89.0 mg, 0.69 mmol) 依次加入 DMF (4.0 mL) 中, 氮气保护, 室温 (26.0°C) 下反应 16 小时, HPLC 中控至反应完全, 反应液用制备 HPLC 纯化(流动相: 为 0.1%TFA/H₂O 和 0.1% TFA/ACN), 冻干得 **CR202HG** (130.0 mg, 纯度: 97.81%, 收率: 35.0 %)。LCMS: [M+H]⁺=1612.93。



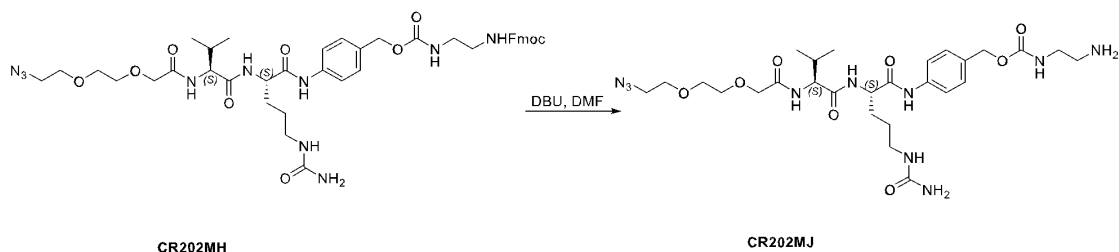
[407] 在氮气保护下将 **CR202HG** (120.0 mg, 0.074 mmol)、**CR202W4** (134.0 mg, 0.088 mmol), 加入 DMF (6 mL) 和水 (2 mL) 的混合溶剂中, 避光搅拌至溶解, 滴加 DIPEA 并调节至 pH=8, 加入 CuBr (13.0 mg, 0.074 mmol), 室温 (25.0 °C) 反应 2.5 小时, HPLC 中控至反应完全。反应液直接用制备 HPLC 纯化 (流动相为 0.1%TFA/H₂O 和 0.1% TFA/ACN), 用纯水将经制备 HPLC 纯化的产物脱盐, 冻干得到 **CR202GM** (52.1 mg, 纯度: 95.83%, 收率: 22.4 %), LCMS: [M+4H]⁴⁺=782.49。

[408] 4.15 **CR202HJ** 的合成

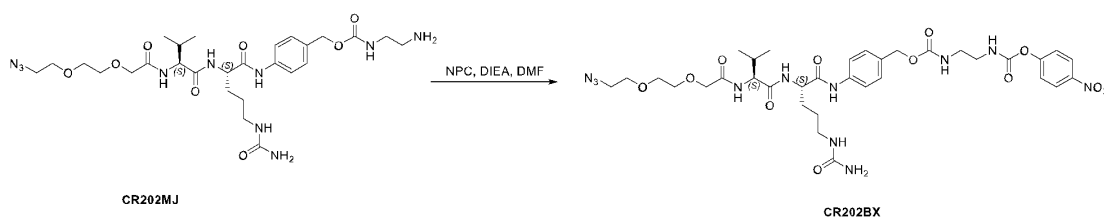


[409] 向 100 mL 单口瓶中依次加入 **CR202X6** (1.00 g, 1.39 mmol), Fmoc-乙二胺 (0.39

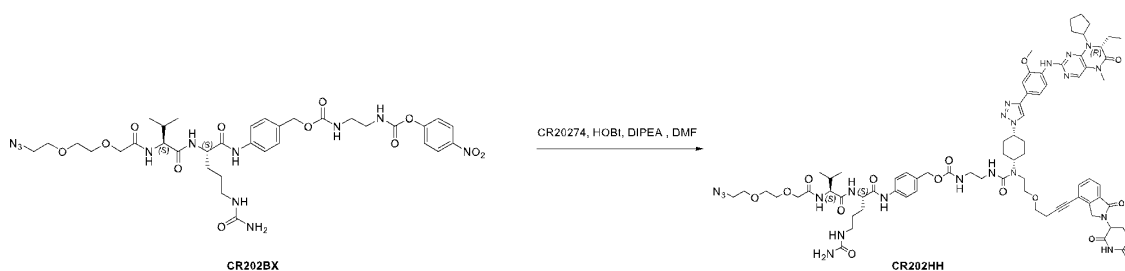
g, 1.39 mmol), DMF (10 mL) 搅拌至溶解。加入 DIEA (0.22 g, 1.67 mmol) 并在 20.7 °C 下反应 0.5 小时, 反应中取样并中控至反应完全。反应液倒入预冷 (0-10°C) 的 MTBE (80 mL) 中, 保温搅拌 5 分钟并离心, 析出的固体用冷 MTBE 洗涤 (8 mL×5), 得到白色固体 **CR202MH** (1.12 g, 纯度: 93.66%, 收率: 93.8%)。



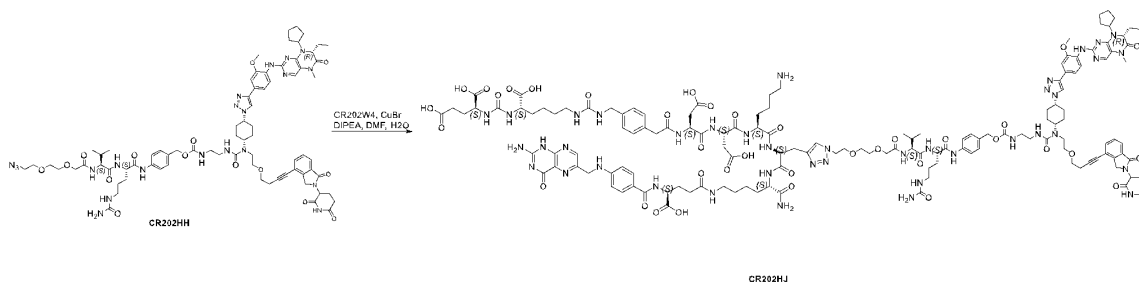
[410] 将 **CR202MH** (1.08 g, 1.26 mmol) 加入 DMF (7 mL) 中溶解, 滴加 DBU (0.19 g, 1.26 mmol) 的 DMF (3 mL) 溶液, 22.2°C 反应 0.5 小时, 反应中取样并中控至反应完全, 反应液用制备 HPLC 纯化 (流动相: 为 0.1% TFA/H₂O 和 0.1% TFA/ACN), 冻干得 **CR202MJ** (913.7mg, 纯度: 99.8%)。



[411] 将 **CR202MJ** (0.83 g, 1.30 mmol)、NPC (0.79 g, 2.60 mmol) 加入 DMF (8 mL) 中完全溶解, 加入 DIEA (0.25 g, 1.95 mmol) 后室温反应 0.5 小时, 反应中取样并中控至反应完全, 反应液用制备 HPLC 纯化, 冻干得 **CR202BX** (254.9 mg, 纯度: 96.46%, 收率: 24.5%)。LCMS: $[M+1H]^+=802.4$ 。¹H-NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.06 (s, 1H), 8.36 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 8.28 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 8.10 (s, 1H), 7.61 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.47 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.43 (d, J = 9.1 Hz, 2H), 7.32 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.01 (s, 1H), 5.43 (s, 1H), 4.99 (s, 2H), 4.42 (dd, J = 13.4, 7.8 Hz, 1H), 4.38-4.32 (m, 1H), 3.99 (s, 2H), 3.70-3.61 (m, 6H), 3.45-3.42 (m, 3H), 3.17 (s, 4H), 3.01 (dd, J = 22.5, 9.5 Hz, 2H), 2.07-1.97 (m, 1H), 1.77-1.56 (m, 2H), 1.53-1.32 (m, 2H), 0.90 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.85 (d, J = 6.8 Hz, 3H)。

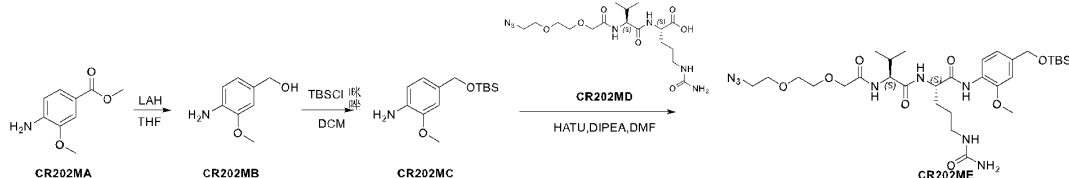


[412] 将 **CR202BX** (190.0 mg, 0.24 mmol)、**CR20274** (游离态, 251.4 mg, 0.28 mmol)、HOBt (6.4 mg, 0.05 mmol) 和 DIPEA (91.9 mg, 0.71 mmol) 依次加入 DMF (3.8 mL) 中, 氮气保护下室温反应 8 小时, 反应液用制备 HPLC 纯化 (流动相为 0.1% TFA/H₂O 和 0.1% TFA/ACN), 冻干得 **CR202HH** (230.0 mg, 纯度: 98.27%, 收率: 59.7%)。LCMS: $[M+H]^+=1546.63$ 。



[413] 氮气保护下将 **CR202HH** (210.0 mg, 0.14 mmol)、**CR202W4** (240.0 mg, 0.16 mmol) 加入 DMF (12 mL) 和水 (4 mL) 的混合溶剂中, 避光搅拌溶解, 滴加 DIPEA 调节至 pH=8, 加入 CuBr (18.9 mg, 0.14 mmol), 室温 (25.0 °C) 反应 5 小时, 反应中取样并中控至反应完全。反应液直接用制备 HPLC 纯化 (流动相为 0.1% TFA/H₂O 和 0.1% TFA/ACN), 用纯水将经制备 HPLC 纯化的产物脱盐, 冻干得 **CR202HJ** (215.7 mg, 纯度: 96.69%, 收率: 47.3%), LCMS: $[M+3H]^{3+}=1021.20$ 。

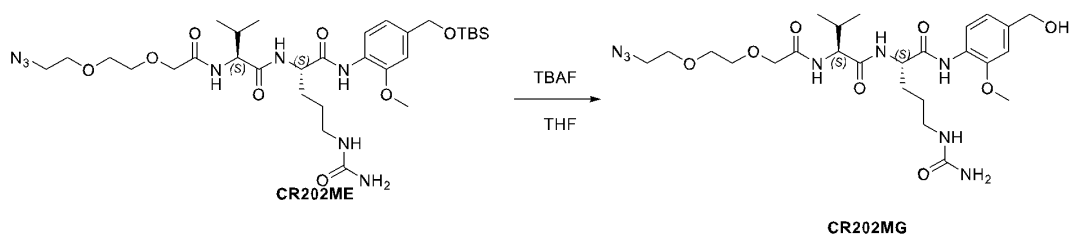
[414] 4.16 CR202FU 的合成



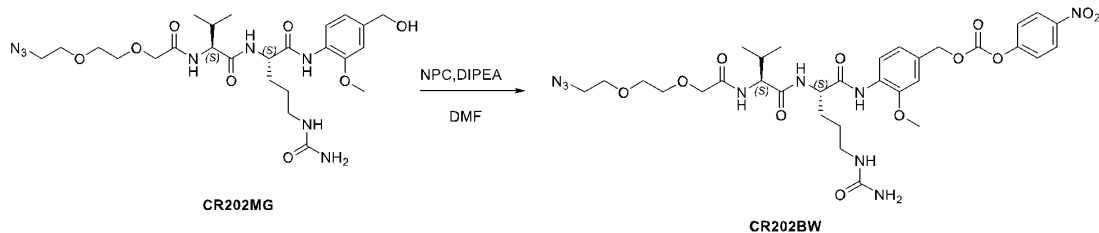
[415] 氮气保护下将四氢铝锂 (0.47g, 12.24 mmol) 加入到 THF (3 mL) 中并冷却到 0℃, 滴加 **CR202MA** (1.50g, 8.28 mmol) 的 THF (15 mL) 溶液, 0℃保温反应 2 小时, 反应中取样并用 TLC 监测至反应完全。反应液倒入冰水 (5 mL) 中, 滴加 15% 氢氧化钠溶液 (1 mL), 室温搅拌 15 分钟, 用乙酸乙酯萃取 (15 mL×3)。合并有机相并用无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩滤液至干燥, 粗产物用柱层析纯化 (PE/EA=1:1), 得 **CR202MB** (1.15g, 纯度: 95.03%, 收率: 86.15%), LCMS: $[M+H]^+=154.6$ 。

[416] 氮气保护下将 **CR202MB** (1.15 g, 7.50 mmol) 加入到 DCM (12 mL) 中, 依次加入咪唑 (1.53 g, 22.52 mmol) 和 TBSCl (1.69 g, 11.26 mmol), 室温反应 2 小时, 反应中取样并用 TLC 监测至反应完全。反应液倒入冰水 (5 mL) 中淬灭, 加入 DCM 萃取 (15 mL×3)。合并有机相并用无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩滤液至干燥, 粗产物用柱层析纯化 (DCM/MeOH=10:1), 得 **CR202MC** (1.50 g, 纯度: 99.15%, 收率: 74.07%)。¹H-NMR (400 MHz, DMSO) δ 6.73 (s, 1H), 6.62 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 6.57 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 4.60 (s, 2H), 4.54 (s, 2H), 3.74 (s, 3H), 0.88 (s, 9H), 0.05 (s, 6H)。

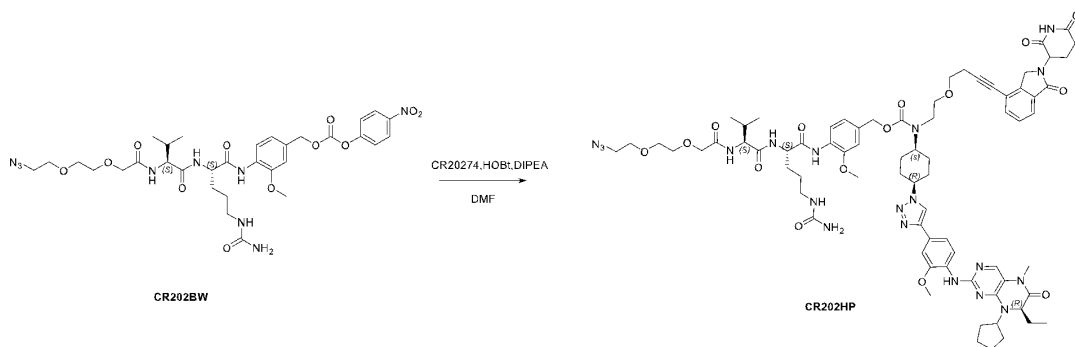
[417] 将 **CR202MD** (1.66 g, 3.73 mmol) 加入到 DMF (15 mL) 中, 控温 25°C, 加入 HATU (1.99 g, 5.22 mmol), 搅拌 15 分钟, 加入 **CR202MC** (1.50 g, 5.59 mmol) 和 DIEA (0.67 g, 5.22 mmol), 反应中取样监测至反应完全。反应液倒入冰水 (75 mL) 中, 加入 DCM 萃取 (30 mL×3)。合并有机相并用无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩滤液至干燥, 粗品 **CR202ME** 直接用于下一步反应。LCMS: $[M+H]^+ = 695.6$ 。



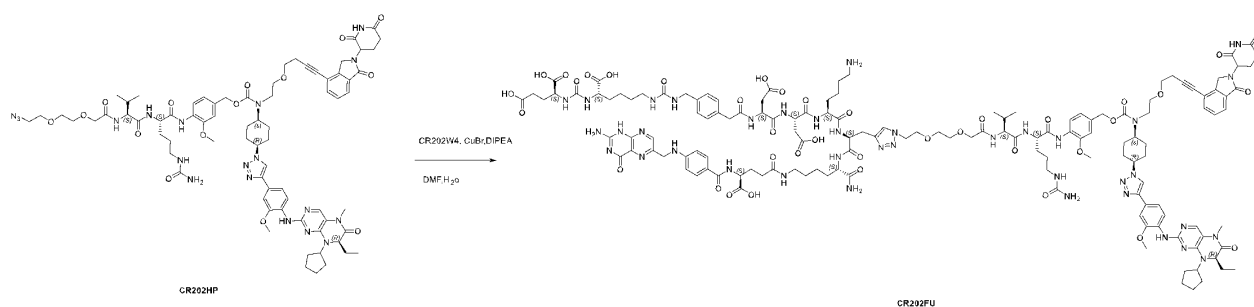
[418] 将 **CR202ME** (2.78g, 3.73 mmol) 加入到 THF (30 mL) 中, 加入 TBAF (2.09 g, 7.46 mmol), 25 ℃ 反应 1 小时, 反应中取样并用 TLC 监测至反应完全。浓缩反应液至干燥, 粗品 **CR202MG** 直接用于下一步反应。



[419] 将 **CR202MG** 粗品加入 DMF (30 mL) 中并完全溶解, 加入二(对硝基苯)碳酸酯(NPCl₂, 2.26g, 7.44 mmol), DIPEA (0.72 g, 5.58 mmol), 20~25℃ 反应 1 小时, 反应中取样监测至反应完全。反应液用制备 HPLC 纯化, 冻干得白色固体 **CR202BW** (1.35 g, 纯度: 98.5%, 收率: 48.7%)。LCMS: $[M+H]^+ = 746.6$; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.17 (s, 1H), 8.46-8.48 (d, 1H), 8.31-8.33 (d, 1H), 8.05-8.07 (d, 1H), 7.57-7.59 (d, 1H), 7.46-7.49 (d, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.02-7.07 (d, 1H), 6.00 (bs, 1H), 5.26 (s, 2H), 4.49-4.54 (m, 2H), 4.33-4.37 (dd, 2H), 3.97 (s, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.62-3.65 (m, 6H), 3.40-3.43 (t, 2H), 2.97-3.00 (t, 2H), 2.01-2.03 (m, 1H), 1.59-1.61 (m, 2H), 1.42-1.45 (m, 2H), 0.88-0.90 (d, 3H), 0.82-0.84 (d, 3H)。

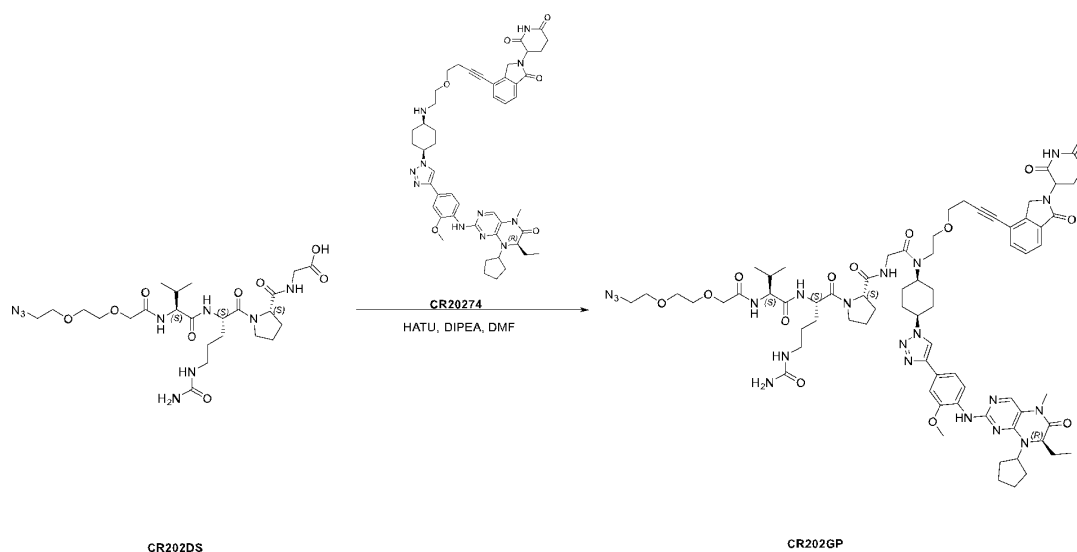


[420] 氮气保护下将 **CR202BW** (250.1 mg, 0.34 mmol)、**CR20274** (游离态, 326.0 mg, 0.37 mmol)、HOBT (9.0 mg, 0.07 mmol)、DIPEA (140.0 mg, 1.02 mmol) 依次加入 DMF (5.0 mL) 中, 室温反应 16 小时, 反应液用制备 HPLC 纯化 (流动相为 0.1% TFA/H₂O 和 0.1% TFA/ACN), 冻干得 **CR202HP** (236.2 mg, 纯度: 96.14%, 收率: 47.3%)。LCMS: $[M+H]^+ = 1490.96$ 。



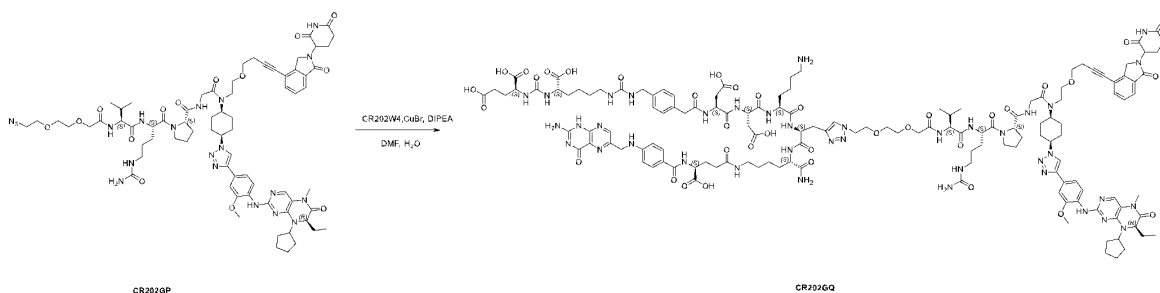
[421] 氮气保护下将 **CR202HP** (211.9 mg, 0.15 mmol) 和 **CR202W4** (268.0 mg, 0.148 mmol) 加入 DMF (12 mL) 和水 (4 mL) 的混合溶剂中, 避光搅拌至完全溶解, 滴加 DIPEA 调节至 pH=8, 加入 CuBr (6.4 mg, 0.05 mmol), 室温 (23.7 °C) 反应 5 小时。反应液直接用制备 HPLC 纯化 (流动相为 0.1% TFA/H₂O 和 0.1% TFA/ACN), 用纯水将经制备 HPLC 纯化的产物脱盐, 冻干得到 **CR202FU** (132.4 mg, 纯度: 98.67%, 收率: 28.5%), LCMS: $[M+4H]^{4+}=751.89$ 。

[422] 4.17 **CR202GQ** 的合成



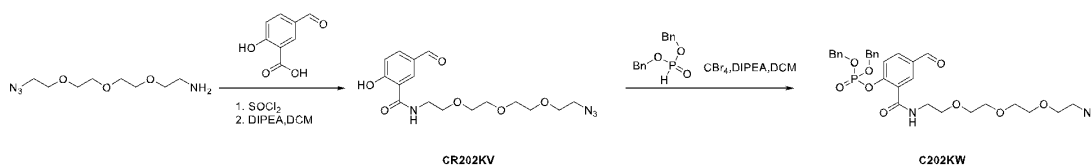
[423] **CR202DS** 合成参考 Ligand-01 的制备: LCMS: $[M+H]^+=600.4$, ¹H-NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.29 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 8.10 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 7.41 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 4.49-4.40 (m, 1H), 4.35-4.23 (m, 2H), 3.94 (s, 2H), 3.78 (dd, J = 17.5, 6.0 Hz, 1H), 3.73-3.54 (m, 9H), 3.45-3.37 (m, 2H), 2.95 (s, 2H), 2.08-1.78 (m, 5H), 1.73-1.63 (m, 1H), 1.56-1.32 (m, 3H), 0.81 (dd, J = 19.2, 6.7 Hz, 6H)

[424] 氮气保护下将 **CR202DS** (350.0 mg, 0.58 mmol) 加入 DMF (4.0 mL) 中搅拌至完全溶解并冷却至 5°C, 加入 HATU (220.5 mg, 0.58 mmol)、DIPEA (224.9 mg, 1.74 mmol), 保温反应 0.5 小时, 加入 **CR20274** (游离态, 541.8 mg, 0.61 mmol), 自然升至室温 (27.0 °C) 反应 16 小时, 反应液用制备 HPLC 纯化 (流动相为 0.1% TFA/H₂O 和 0.1% TFA/ACN), 冻干得 **CR202GP** (204.9 mg, 纯度: 91.88%, 收率: 23.8%)。LCMS: [M+H]⁺=1465.32。



[425] 氮气保护下将 **CR202GP** (200.0 mg, 0.14 mmol) 和 **CR202W4** (249.5 mg, 0.16 mmol) 加入 DMF (12 mL) 和水 (4 mL) 的混合溶剂中, 避光搅拌至完全溶解, 自然至室温 (23.0 °C), 滴加 DIPEA 调节至 pH=8, 加入 CuBr (20.0 mg, 0.14 mmol), 反应 1.5 小时。反应液直接用制备 HPLC 纯化 (流动相为 0.1% TFA/H₂O 和 0.1% TFA/ACN), 用纯水将经制备 HPLC 纯化的产物脱盐, 冻干得到 **CR202GQ** (156.7 mg, 纯度: 95.61%, 收率: 36.6%), LCMS: [M+4H]⁴⁺=745.93。

[426] 4.18 CR202LB 的合成

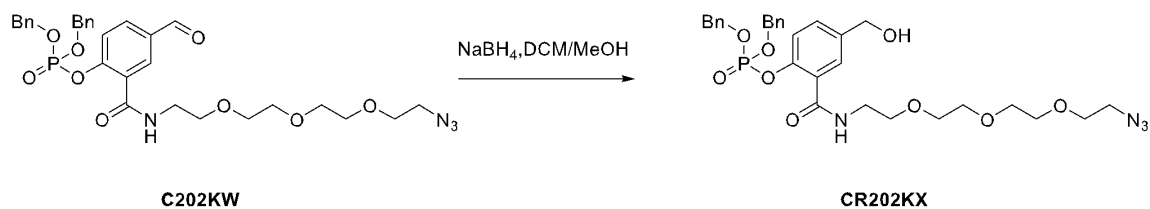


[427] 将 5-甲酰水杨酸 (5.03 g, 2.96 mmol) 加入到氯化亚砷 (75 mL) 中, 油浴 (82°C) 加热反应过夜。之后将反应液冷却至 50°C, 35°C 真空浓缩至干, 加入干燥的 THF (30 mL×3) 带蒸三遍除掉残余的氯化亚砷, 得到 5-甲酰水杨酰氯 (黄色固体)。

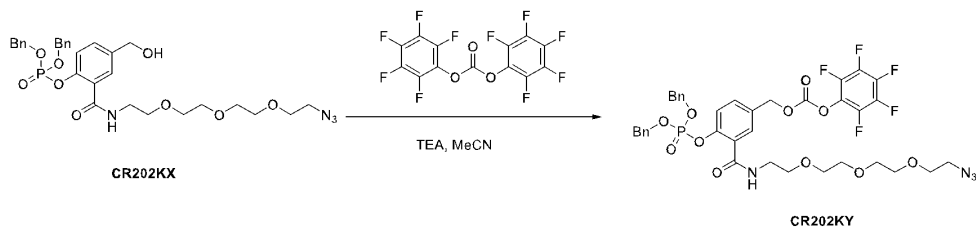
[428] 将叠氮-三聚乙二醇-胺 (4.30 g, 1.97 mmol) 加入到 THF (80 mL) 中, 降温至 2°C, 加入 DIPEA (10mL)。用干燥的 THF (20 mL) 溶解 5-甲酰水杨酸酰氯并控温降温至 2-10°C, 滴加入反应液中 (pH=5-6), 补加 1 mL DIPEA (pH=8), 升温至 20°C 搅拌过夜。向反应液加入水 (80 mL), 并用 DCM 萃取 (100 mL×3)。合并有机相并用无水硫酸钠干燥, 过

滤并浓缩滤液得到油状物粗品，粗品经硅胶柱层析纯化（DCM:EtOAc=10:1 至 2:1）得到 **CR202KV**（0.8 g，纯度：~90%（TLC），产率：15%）。LC-MS: $[M+H]^+$:367.06。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ 9.71 (s, 1H), 8.37 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 7.78 (dd, $J = 8.6, 2.2$ Hz, 1H), 6.89 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 3.60–3.48 (m, 10H), 3.46 (dd, $J = 7.3, 4.2$ Hz, 4H), 3.38–3.26 (m, 2H)。

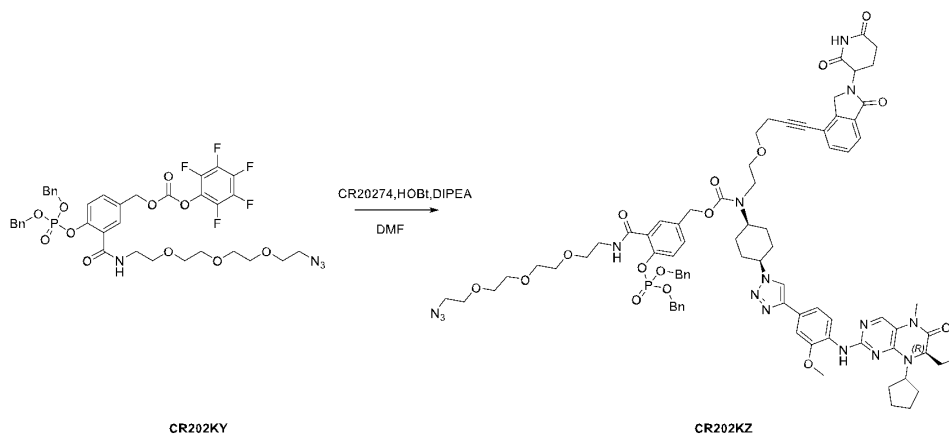
[429] 将 **CR194KV**（0.80 g，2.18 mmol）加入到 DCM（40 mL）中搅拌溶解，冰盐浴降温至 0°C，加入 DIPEA（1.0 mL，5.45 mmol）， CBr_4 （2.79 g，8.73 mmol）并搅拌至完全溶解。滴加亚磷酸二苄酯（1.14 g，4.36 mmol），滴加完毕移去冰盐浴，改用冰浴冷却反应液至内温 5°C，逐滴加入 5% NaH_2PO_4 水溶液（30 mL），并用 DCM（50mL $\times$ 3）萃取。合并有机相并用无水硫酸钠干燥，过滤后在 35°C 下真空浓缩滤液得到橙色油状物，经柱层析纯化（DCM:EtOAc=10:1-2:1）得到 **CR202KW**（1.3g，产率：60%）。 $[M+H]^+$:627.19， $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 9.96 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 7.85 (dd, $J = 8.5, 2.1$ Hz, 1H), 7.46 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.30 (dt, $J = 10.0, 5.1$ Hz, 10H), 7.20 (s, 1H), 5.12 (d, $J = 7.5$ Hz, 4H), 3.63–3.51 (m, 14H), 3.30 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H)。



[430] 将 **CR202KW**（1.30g，2.07 mmol）加入 DCM/MeOH 混合溶液（50 mL，V/V=1/1）中，溶清，冰盐浴冷却内温 0°C，分批加入 NaBH_4 （0.16g，4.14 mmol），0°C 搅拌 30 分钟，向反应液中加入水（50 mL）和 DCM（50 mL），分出有机相，水相再用 DCM 萃取（50mL $\times$ 2）。合并有机相并用无水硫酸钠干燥，过滤后在 35°C 下真空浓缩滤液得到 **CR202KX** 粗产品（1.29g，纯度:85.30%，收率：99.2%）。粗产品不经纯化直接进行下一步反应。LC-MS: $[M+H]^+$:629.14， $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.78 (s, 1H), 7.37–7.26 (m, 13H), 5.10 (d, $J = 8.5$ Hz, 4H), 4.66 (s, 2H), 3.57 (d, $J = 11.9$ Hz, 4H), 3.30 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H)。

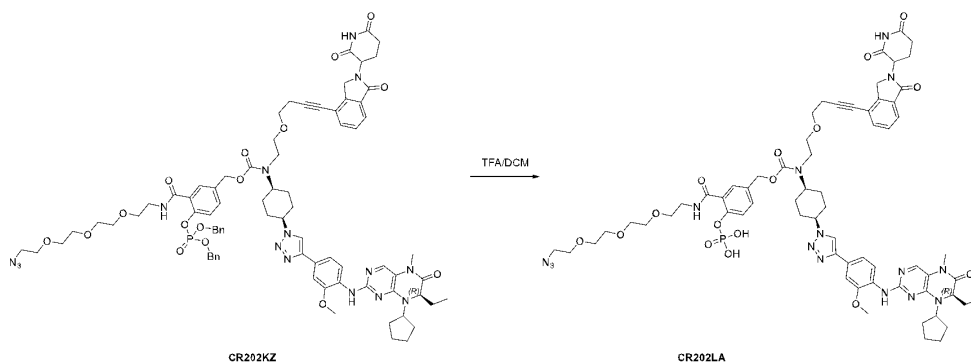


[431] 将 **CR202KX** (1.09 g, 1.73 mmol) 加入乙腈 (20 mL) 中溶清, 冰浴冷却, 加入 TEA (0.25 mL, 1.73 mmol), 之后将双(五氟苯基)碳酸酯 (1.06 g, 2.6 mmol) 的乙腈 (2.5 mL) 溶液逐滴加入反应液中, 移去冰浴搅拌 1.5 小时。反应完毕后用冰浴冷却反应液, 加入饱和碳酸氢钠水溶液 (30 mL) 和乙酸乙酯 (70 mL) 萃取, 收集有机相。有机相分别用水 (一次, 40mL) 和饱和氯化钠溶液 (30 mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤后在 30°C 下真空浓缩滤液得到油状物。油状物经柱层析纯化(正庚烷:乙酸乙酯=10:1 至 1:1)得到 **CR202KY** (1.02 g, 纯度: 96.53%, 收率: 70.3%)。LC-MS: $[M+H]^+$:839.12, H-NMR: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.91 (s, 1H), 7.43-7.26 (m, 12H), 5.28 (s, 2H), 5.11 (d, $J = 8.9$ Hz, 4H), 3.66-3.47 (m, 14H), 3.30 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H)。

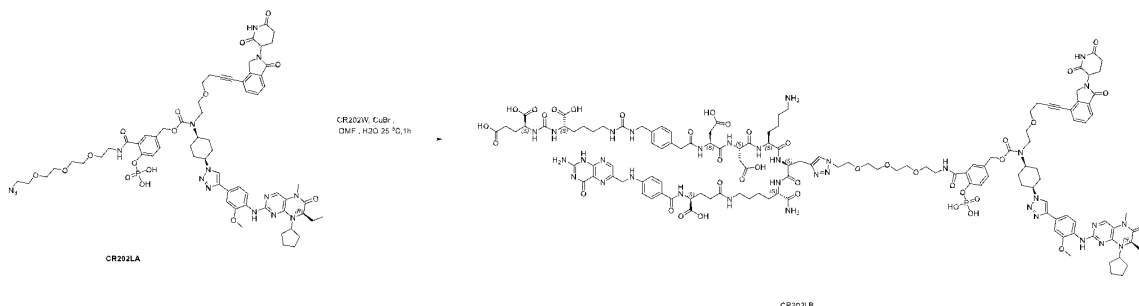


[432] 将 **CR20274** (0.57 g, 0.65 mmol) 加入 DMF (10 mL) 中溶清, 冰浴冷却。依次加入 HOBT (88.0mg, 0.65 mmol) 和 DIPEA (140 μL , 0.78 mmol)。将 **CR202KY** (0.66 g, 0.78 mmol) 溶于 DMF (2.5 mL), 滴加入反应液中, 滴加完毕, 移去冰浴搅拌 1 小时。反应液制备纯化冻干得到 **CR202KZ** (0.79g, 纯度: 93.01%, 收率: 80.0%)。

LC-MS: $[M+2H]^{2+}$:769.92。

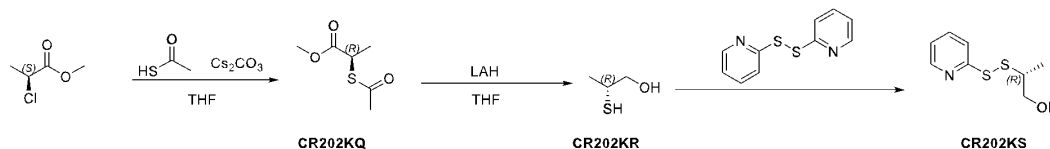


[433] 将 50% TFA 的二氯甲烷溶液 (14 mL, V/V=1/1) 降温至 0°C, 加入 **CR202KZ** (0.40 g, 0.26 mmol) 搅拌至完全溶解, 之后升温至 24°C 搅拌 2 小时。在 27°C 下真空浓缩反应液得到 **CR202LA** (0.36 g), 按理论产率直接进行下一步反应。LC-MS: [M+2]²⁺: 680.25。



[434] 将 **CR202LA** (0.36 g, 0.26 mmol) 加入到 DMF:H₂O (12 mL, V/V=1/1) 混合溶剂中并降温至 4°C, 逐滴加入 DIPEA (1.7 mL), 调至 pH=8, 依次加入 **CR202W4** (0.39 g, 0.26 mmol) 和 CuBr (37.1 mg, 10.26 mmol), 升温至内温 24.2°C 后搅拌 1.5 小时, 反应中取样用 HPLC 中控至反应完成。反应液用制备 HPLC 纯化, 冻干得到 **CR202LB** (0.29 g, 纯度: 98.34%, 两步收率: 38.8%)。

[435] 4.19 **CR202HV** 的合成

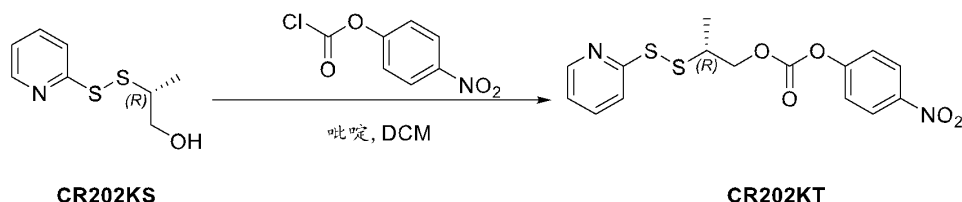


[436] 在氮气保护下将碳酸铯 (53.18 g, 179.48 mmol) 加入到 THF (290 mL) 中, 搅拌中加入硫代乙酸 (13.66 g, 179.48 mmol), 25°C 下反应 30 分钟后加入 (s)-(-)-2-氯丙酸甲酯 (20.00 g, 163.16 mmol), 继续反应 1 小时。将反应液过滤, 滤液加入水 (1.2 L) 中, MTBE 萃取两遍 (1 L×2)。合并有机相并用无水硫酸钠干燥, 合并有机相无水硫酸钠干燥, 过滤后浓缩滤液至干燥得到 **CR202KQ** (24.34 g, 纯度: 90.09%, 收率: 92.00%), [M+H]⁺=163.11。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.16 (q, J = 7.3 Hz, 1H), 3.66 (s, 4H), 2.28 (s, 3H), 1.43 (d, J = 7.3 Hz, 3H)。

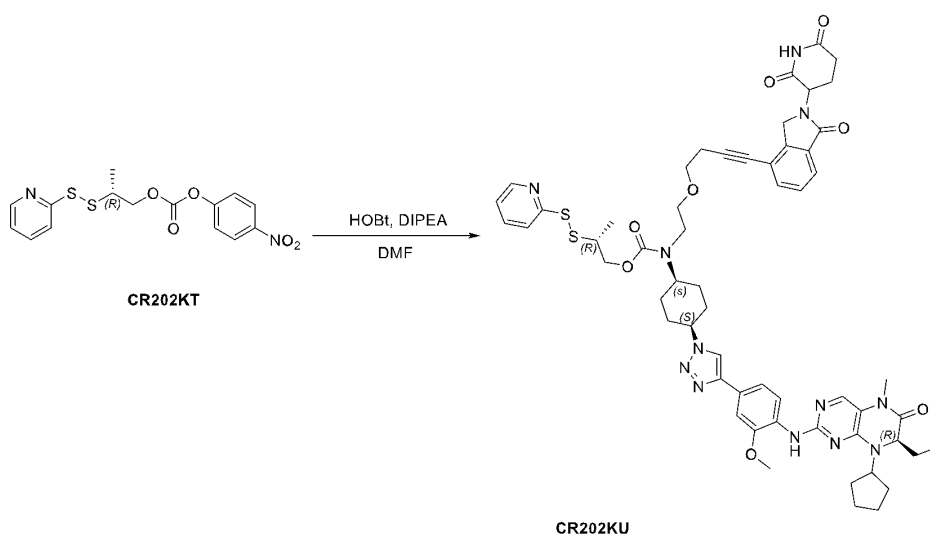
[437] 氮气保护下将 LiAlH₄ (9.36 g, 246.64 mmol) 加入 THF (150 mL) 中, 搅拌溶解并降温至 0°C。同时将 **CR202KQ** (10.00 g, 61.65 mmol) 溶解于 THF (50 mL) 中, 再将此溶液缓慢滴加至 LiAlH₄ 溶液中, 滴加结束将温度升至室温, 反应 1.5 小时, 用 HPLC 中控反

应至完全。之后降温至 0°C，缓慢滴加 2 M HCl 溶液至反应液不再新产生气泡，继续搅拌 15 分钟，过滤，滤饼用 THF (100 mL) 洗涤一遍，合并 (THF) 滤液后舍去。将滤饼用甲醇 (300 mL) 泡洗后过滤，此操作重复一遍，合并有机相，无水硫酸钠干燥，过滤后浓缩得到 **CR202KR** (9.0104 g, 纯度: 92.21%, 收率: 158.63%, 备注: 甲醇残留较多, 收率超 100%)。

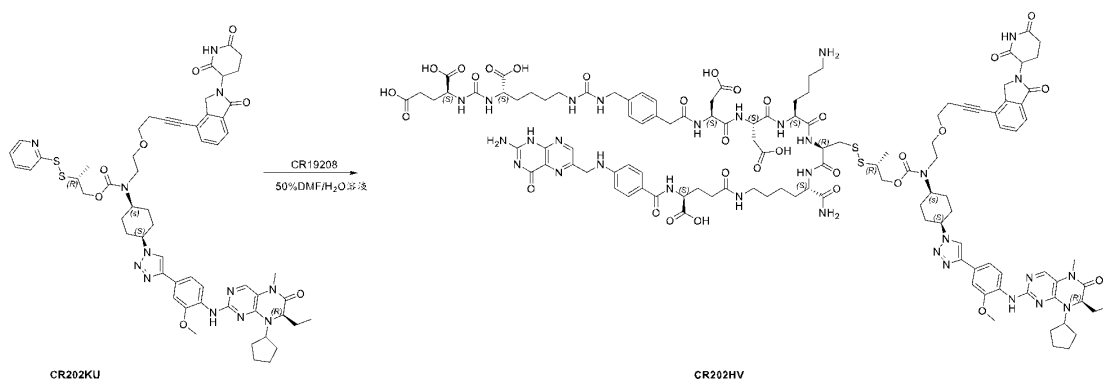
[438] 将 2,2'-二硫二吡啶 (10.37 g, 47.07 mmol) 加入甲醇 (40 mL) 中，加入 **CR202KR** (8.6763 g, 94.14 mmol)，25°C 反应 2 小时，用 HPLC 中控反应至完全。反应液浓缩得到粗产品并用柱层析纯化 (n-Heptane/EA=6/1) 得到 **CR202KS** (2.5298 g, 纯度: 94.35%, 收率: 26.7%)，LCMS: $[M+H]^+ = 201.97$ 。¹H-NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.43 (m, 1H), 7.81 (m, 2H), 7.22 (td, J = 5.3, 2.8 Hz, 1H), 5.08 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 3.46 (m, 2H), 3.05 (dd, J = 13.0, 6.5 Hz, 1H), 1.22 (t, J = 6.5 Hz, 3H)。



[439] 将 **CR202KS** (1.20 g, 5.96 mmol) 加入到 DCM (12 mL) 中，之后加入对硝基苯基氯甲酸酯 (1.44 g, 7.14 mmol)，吡啶 (0.49 g, 6.26 mmol)，25 °C 反应 1 小时，用 HPLC 中控反应至完全。反应液浓缩得到粗产品并用柱层析纯化 (n-Heptane/EA=10/1) 得到 **CR202KT** (2.01 g, 纯度: 87.42%, 收率: 92.2%)，LCMS: $[M+H]^+ = 366.98$ ，¹H-NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.44 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 8.31 (m, 2H), 7.81 (m, 2H), 7.55 (m, 2H), 7.24 (ddd, J = 6.5, 4.8, 1.5 Hz, 1H), 4.34 (qd, J = 11.2, 6.0 Hz, 2H), 3.46 (dt, J = 13.1, 6.5 Hz, 1H), 1.33 (d, J = 7.0 Hz, 3H)。

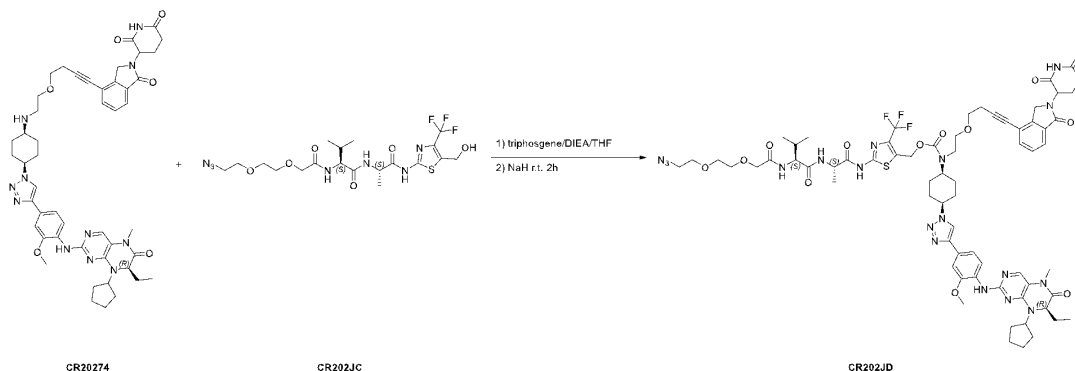


[440] 将 **CR202KT** (314.0 mg, 0.86 mmol) 加入到 DMF (5 mL) 中, 之后加入 **CR20274** (500.0 mg, 0.57 mmol)、HOBT (76.4 mg, 0.57 mmol) 和 DIPEA (146.0 mg, 1.13 mmol), 25 °C 反应 16 小时, 中控反应至完全。用制备 HPLC 纯化后冻干得到 **CR202KU** (0.4567 g, 纯度: 88.69%, 收率: 72.69%)。

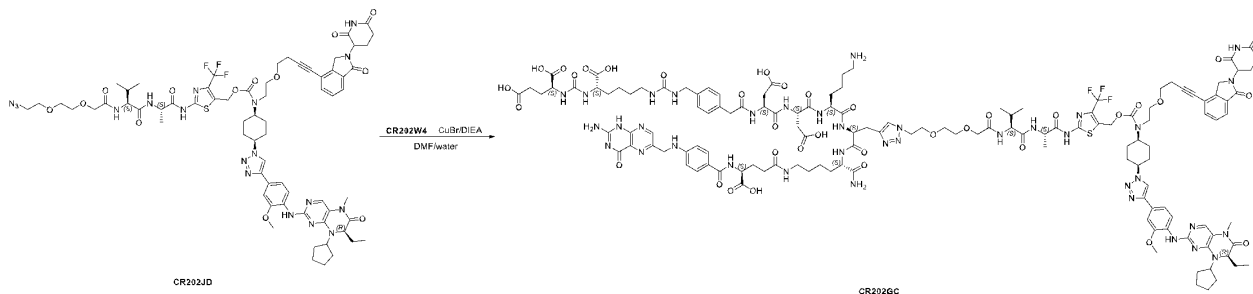


[441] 在氮气保护下将 **CR19208** (205.5 mg, 0.13 mmol) 加入到 50% DMF/H₂O 溶液 (8 mL, V/V=1/1) 中, 滴加 0.1 M NaHCO₃ 溶液至反应液 pH≈7。将 **CR202KU** (150.0 mg, 0.13 mmol) 溶解于 THF (3ml) 后滴加入反应液中 (可观察到反应液变浑浊)。补加 10 mL 50% DMF/H₂O 溶液, 10 mL DMF, 5 mL 0.1 M NaHCO₃ 溶液 (可观察到反应液变澄清), 之后在 25 °C 下反应 0.5 小时, 用 HPLC 中控反应至完全。反应液用制备 HPLC 纯化 (流动相为 0.1% TFA/H₂O 和 0.1% TFA/ACN), 冻干得到 **CR202HV** (99.5 mg, 纯度: 98.73 %, 收率: 29.26%)。LCMS: [M+3H]³⁺=841.76。

[442] 4.20 CR202GC 的合成

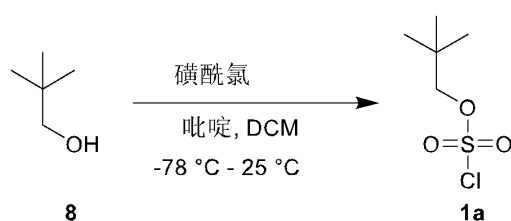


[443] 向 25 mL 单口瓶中加入 **CR20274** (313.9 mg, 0.3551 mmol)，之后在氮气保护下加入 THF (10.0 mL) 并降温至 0°C。加入三光气 (42.2 mg, 0.1420 mmol)，此时出现白色固体，滴加 DIEA 至固体完全溶解，保温 0°C 下反应 40 分钟。另取一 25 mL 单口瓶，加入 **CR202JC** (191.6 mg, 0.3551 mmol) 和 THF (2.0 mL)，降温至 0°C 后加入 NaH (85.2 mg, 2.1306 mmol)，搅拌至不再有气泡冒出。将 **CR20274** 的反应液加入到 **CR202JC** 的反应液。加入完毕后缓慢恢复到室温反应 30 分钟，用 HPLC 中控反应至完成。反应液用制备 HPLC 纯化得到 44.2mg 白色固体 **CR202JD** (纯度：80.42%，收率：8.6%)。

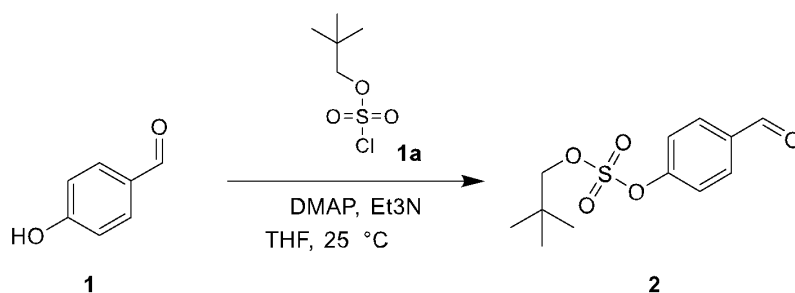


[444] 称取 **CR202JD** (40.0 mg, 0.0276 mmol, 1.0 eq.)，**CR202W4** (41.8 mg, 0.0276 mmol, 1.0 eq.)，加入到 50 mL 夹套瓶中，并加入 DMF/H₂O 溶液 (2.0 mL, V/V=3/1)，避光条件下控温至 25°C。滴加 DIEA 到反应液中至 pH=8，加入 CuBr (4.5 mg, 0.0276 mmol, 1.0 eq.)。保温 25°C，搅拌 10 分钟。取反应液 20 μL，加 ACN/MeOH/H₂O 稀释至 300 μL，HPLC 中控至反应完成。反应液在 2-8°C 下冷藏 2 小时，用制备 HPLC 纯化得到 **CR202GC** 白色固体 (22.0 mg, 纯度：98.53%)。

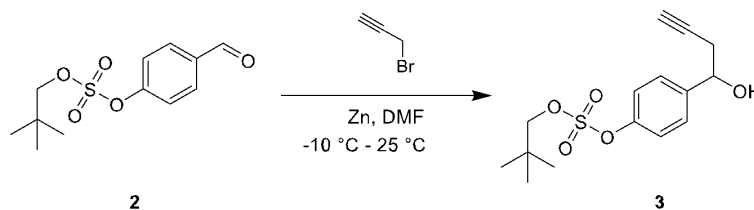
[445] 4.21 CR202JG 的合成



[446] 将化合物 **8** (20.0 g, 226 mmol, 24.4 mL, 1.40 eq.) 和吡啶 (12.8 g, 162 mmol, 13.1 mL, 1.00 eq.) 溶于 DCM (200 mL) 中, 控温零下 78°C 到零下 60°C 之间, 将其缓慢滴加至磺酰氯 (21.8 g, 162 mmol, 16.2 mL, 1.00 eq.) 的 DCM (200 mL) 溶液中, 室温反应 10 小时。反应液浓缩得到黄色油状物, 蒸馏得到无色油状的化合物 **1a** (10.5 g, 粗品)。¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ: 4.18 (s, 2H), 1.06 (s, 9H)。

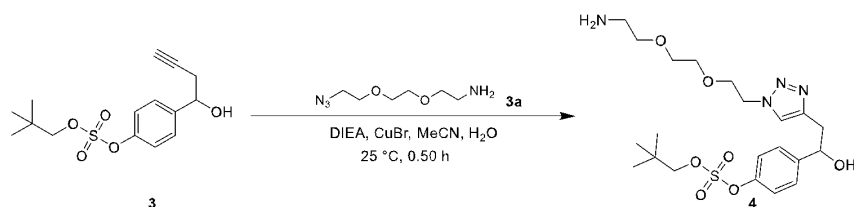


[447] 将化合物 **1a** (5.00 g, 40.9 mmol, 1.00 eq.)、DMAP (5.00 g, 40.9 mmol, 1.00 eq.) 和 Et₃N (8.29 g, 81.8 mmol, 11.4 mL, 2.00 eq.) 溶于 THF (70.0 mL) 中, 向上述溶液中滴加化合物 **1** (9.55 g, 51.1 mmol, 1.25 eq.) 的 THF (35.0 mL) 溶液, 室温反应 12 小时。加入 10% 柠檬酸 (500 mL) 淬灭反应, 用乙酸乙酯萃取 (200 mL * 2), 合并有机相并用饱和食盐水 (200 mL) 洗涤, 然后用无水硫酸钠干燥, 过滤。浓缩滤液得到黄色油状物, 柱层析纯化 (石油醚/乙酸乙酯=10/1-5/1) 得到无色油状化合物 **2** (9.00 g, 32.7 mmol, 纯度: 99.0%, 收率: 79.9%)。¹H NMR: (CDCl₃, 400 MHz) δ 9.94 (s, 1H), 7.91 - 7.87 (m, 2H), 7.41 (dd, J = 10.8 Hz, 2.40 Hz, 2H), 4.04 (s, 2H), 0.90 (s, 9H)。

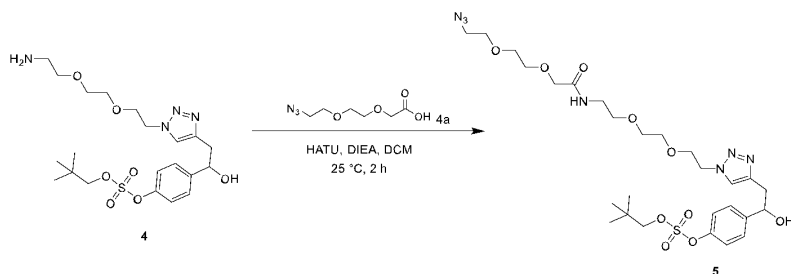


[448] 将化合物 **2** (9.00 g, 32.7 mmol, 1.00 eq.) 和 3-溴丙炔 (7.30 g, 49.0 mmol, 5.29 mL, 纯度: 80%, 1.50 eq.) 溶于 DMF (135 mL) 中, 零下 10°C 的条件下加入 Zn (3.44 g,

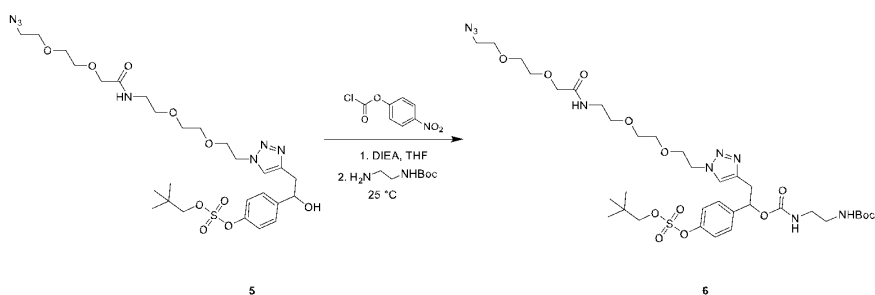
52.6 mmol, 1.61 eq.)，升至室温反应 12 小时。加入氯化铵水溶液（400 mL）淬灭反应，用乙酸乙酯萃取（250 mL *3），合并有机相并用无水硫酸镁干燥，过滤并浓缩滤液至干燥，粗产物用柱层析纯化（PE/EA=6/1）得到黄色油状化合物 **3**（10.0 g，粗品）。LCMS: $[M+H]^+ = 313.1$; ^1H NMR: (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.46 (d, J = 8.80 Hz, 2H), 7.32 - 7.28 (m, 2H), 4.90 (t, J = 6.40 Hz, 1H), 4.09 (s, 2H), 2.65 - 2.62 (m, 2H), 2.09 (t, J = 2.80 Hz, 1H), 1.01 (s, 9H)。



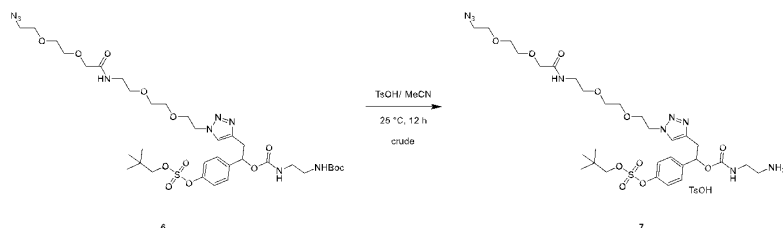
[449] 将化合物 **3**（6.87 g, 19.5 mmol, 1.00 eq.）和化合物 **3a**（3.41 g, 19.5 mmol, 1.00 eq.）溶于乙腈（60 mL）和水（18.0 mL），室温下加入 DIEA（2.03 g, 15.6 mmol, 2.73 mL, 0.80 eq.）和 CuBr（2.81 g, 19.6 mmol, 596 μ L, 1.00 eq.），室温反应 0.5 小时。反应液中加入醋酸酸化得到蓝色溶液，用制备 HPLC 纯化（0.05% TFA 体系）的得到化合物 **4**（10.7 g, 17.5 mmol, 纯度：98.6%，收率：89.6%，TFA salt）。LCMS: $[M+H]^+ = 487.2$; ^1H NMR: (CDCl₃, 400 MHz) δ 8.01 (br s, 3H), 7.46 (br s, 2H), 7.25 (s, 2H), 4.49 - 4.46 (m, 2H), 4.10 (s, 2H), 3.85 - 3.55 (m, 10H), 3.11 (s, 3H), 1.01 (s, 9H)。



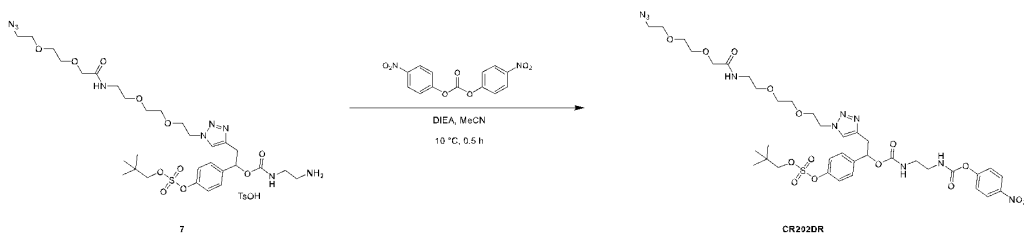
[450] 将化合物 **4**（6.30 g, 10.3 mmol, 1.00 eq., TFA salt）、化合物 **4a**（1.62 g, 8.58 mmol, 0.83 eq.）和 DIPEA（4.01 g, 31.0 mmol, 5.40 mL, 3.00 eq.）溶于 DMF（30.0 mL）中，室温下加入 HATU（3.93 g, 10.3 mmol, 1.00 eq.），室温反应 2 小时。反应液用制备 HPLC 纯化（0.01% TFA 体系）得到化合物 **5**（3.30 g, 4.95 mmol, 纯度：98.6%，收率：47.8%）。LCMS: $[M+H]^+ = 658.4$; ^1H NMR: (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.51 (s, 1H), 7.39 (d, J = 8.40 Hz, 2H), 7.21 - 7.20 (m, 2H), 7.04 (s, 1H), 5.00 (dd, J = 8.80 Hz, 3.20 Hz, 1H), 4.46 - 4.43 (m, 2H), 4.01 (s, 2H), 3.89 (s, 2H), 3.78 - 3.59 (m, 2H), 3.58 - 3.32 (m, 16H), 3.04 - 2.99 (m, 2H), 0.94 (s, 9H)。



[451] 将化合物 **5** (3.50 g, 5.32 mmol, 1.00 eq.) 和 DIPEA (2.75 g, 21.3 mmol, 3.71 mL, 4.00 eq.) 溶于 THF (35.0 mL), 室温下加入对硝基苯基氯甲酸酯 (2.25 g, 11.2 mmol, 2.10 eq.), 室温反应 1 小时后, 加入 N-叔丁氧羰基-1,2-乙二胺 (1.71 g, 10.6 mmol, 1.67 mL, 2.00 eq.), 室温反应 2 小时。反应液用制备 HPLC 纯化 (0.01% TFA 体系) 得到化合物 **6** (3.50 g, 4.00 mmol, 纯度: 96.4%, 收率 75.1%)。LCMS: $[M+H]^+ = 844.4$; ^1H NMR: ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 7.43 (s, 1H), 7.35 (d, $J = 8.80$ Hz, 2H), 7.24 - 7.22 (m, 2H), 7.09 (s, 1H), 5.92 - 5.89 (m, 1H), 5.77 (s, 1H), 5.18 (s, 1H), 4.48 - 4.46 (m, 2H), 4.06 (s, 2H), 3.98 (s, 2H), 3.80 - 3.66 (m, 2H), 3.65 - 3.55 (m, 14H), 3.53 (d, $J = 8.40$ Hz, 2H), 3.37 - 3.19 (m, 6H), 1.40 (s, 9H), 0.98 (s, 9H)。

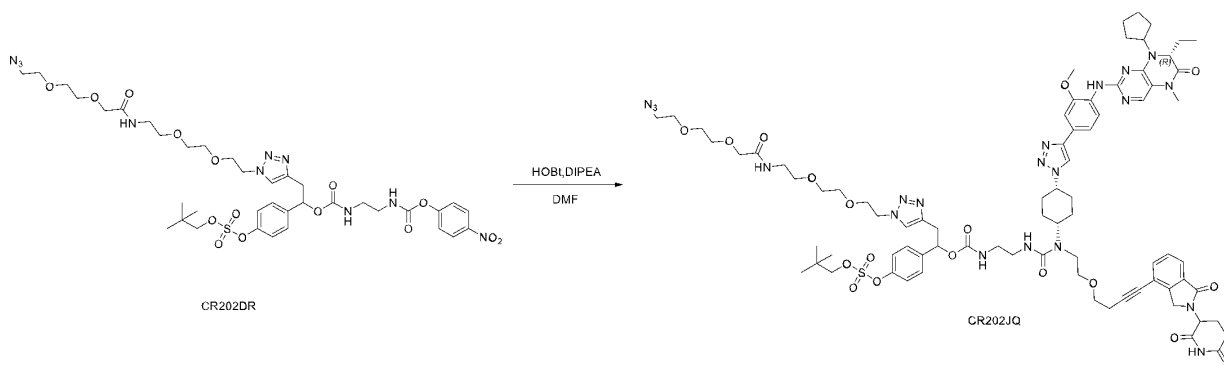


[452] 将化合物 **6** (3.50 g, 4.00 mmol, 1.00 eq.) 溶于乙腈 (44.0 mL) 中, 室温下加入 TsOH (2.41 g, 13.9 mmol, 3.50 eq.), 室温反应 12 小时。反应液浓缩得到黄色油状化合物 **7** (4.00 g, 粗品), 粗品直接用于下一步反应。

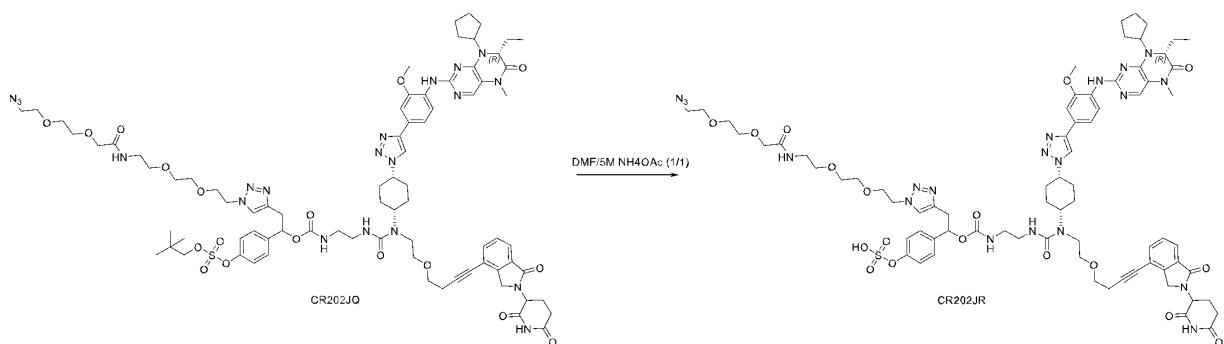


[453] 将化合物 **7** (2.00 g, 2.18 mmol, 1.00 eq., 粗品) 和 DIEA (1.13 g, 8.73 mmol, 1.52 mL, 4.00 eq.) 溶于乙腈 (20 mL) 中, 10°C 下加入二(对硝基苯)碳酸酯 (531 mg, 1.75 mmol, 0.80 eq.), 反应液在 10°C 下反应 0.5 小时。反应液用制备 HPLC 纯化 (0.01% TFA 体

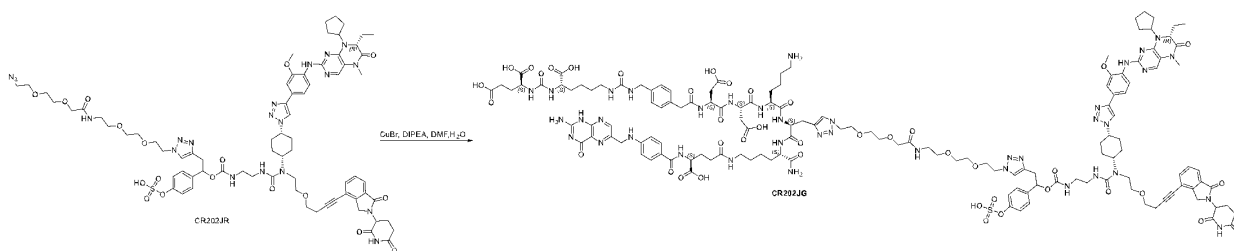
系)得到无色油状 **CR202DR** (1.05 g, 1.14 mmol, 收率: 52.2%, 纯度: 98.7%)。LCMS: $[M+H]^+ = 909.3$; ^1H NMR: ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 8.23 (d, $J = 8.80$ Hz, 2H), 7.48(s, 1H), 7.38 (d, $J = 8.40$ Hz, 2H), 7.31 - 7.25 (m, 4H), 7.16 (s, 1H), 6.46 (s, 1H), 5.97 (s, 2H), 4.48 (t, $J = 4.80$ Hz, 2H), 4.10 (s, 2H), 4.01 (s, 2H), 3.82 - 3.67 (m, 2H), 3.58 - 3.26 (m, 22H), 1.01(s, 9H)。



[454] 将 **CR202DR** (350 mg, 385 μ mol) 溶于 DMF (7 mL) 中并用冰浴降温, 之后在氮气保护下加入 **CR20274** (340 mg, 385 μ mol)、HOBT (10 mg, 77 μ mol) 和 DIEA (100 mg, 770 μ mol), 并在 25°C 下搅拌反应 6 小时。反应液倒入 70 mL 的 MTBE 中, 瓶底析出油状物, 弃去上层清液。继续向油状物中加入 50 mL 的 MTBE 并搅拌, 油状物部分固化, 得到的半固体粗品 **CR202JQ** 直接用于下步反应 (纯度: 78.22%)。LCMS: $[M+H]^+ = 1654.2$ 。

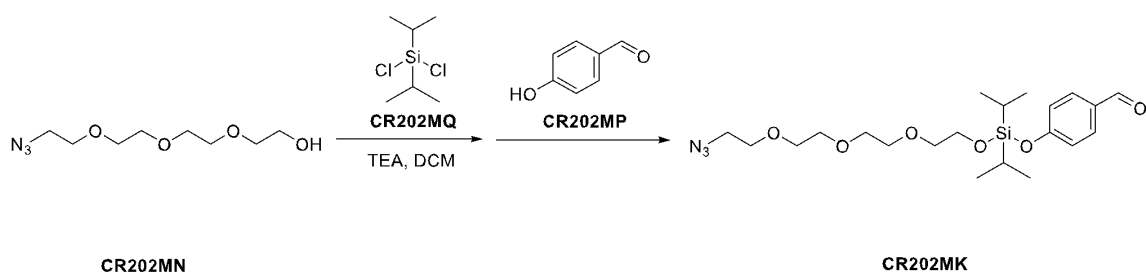


[455] 在氮气保护下, 向 100 mL 茄型烧瓶中加入上步所得的 **CR202JQ** 并溶于 DMF (7.5 mL) 中, 之后加入 5 M NH_4OAc 水溶液 (7.5 mL), 55°C 下搅拌 16 小时, 反应过程中取样中控反应至完全。反应液用制备 HPLC 纯化得到 **CR202JR** (219.3 mg, 纯度: 85.83%, 收率: 55.2%)。 $[M+H]^+ = 1504.07$ 。



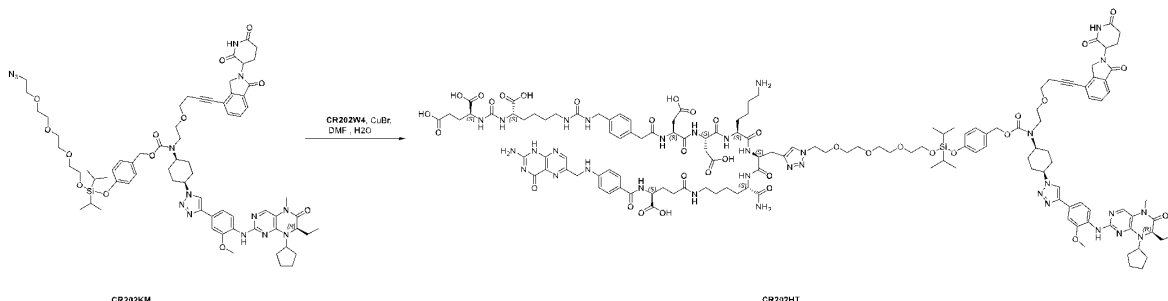
[456] 在氮气保护下，向 25 mL 茄型烧瓶中加入 **CR202JR** (151.0 mg, 94.7 μmol) 和 **CR202W4** (170.2 mg, 94.7 μmol)，并加入 DMF (7.5 mL) 和水 (7.5 mL) 在避光条件下搅拌至完全溶解。加入 DIEA 调节 pH=8，之后加入 CuBr (13.6 mg, 94.7 μmol)，在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 2.5 小时，反应过程中取样中控反应至完全。反应液用制备 HPLC 纯化得到 **CR202JG** (62.3 mg, 纯度: 96.78%, 收率: 21.2%)。LCMS: $[\text{M}-2\text{H}]^{2-} = 1547.85$ 。

[457] 4.22 **CR202HT** 的合成



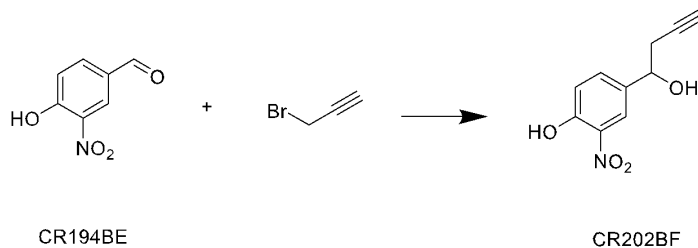
[458] 在氮气保护下将 TEA (2.54 g, 25.08 mmol) 加入 DCM (20 mL) 中，冷却至 0 $^{\circ}\text{C}$ ，滴加 **CR202MQ** (1.95 g, 10.53 mmol)，后用 DCM (4 mL) 淋洗注射器，保温反应 0.5 小时，用注射泵滴加 **CR202MN**/DCM (2.20 g/8 mL, 10.03 mmol)，1 小时滴加完毕，保温反应 1 小时，滴加 **CR202MP**/DCM (1.35 g/5 mL, 11.24 mmol)，10 分钟滴加完毕，0 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 小时。浓缩除去 DCM，加入 EA/正庚烷 (V/V=1/4, 60 mL) 稀释，纯化水洗涤 3 遍 (60 mL $\times$ 3)，有机相用无水硫酸钠干燥，过滤后在 35 $^{\circ}\text{C}$ 下真空浓缩滤液，经柱层析纯化 (正庚烷/EA=100/0~8/1)，得淡黄色油状物 **CR202MK** (1.59 g, 纯度: ~80%, 收率: 54.9%)。
 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 9.93 (s, 1H), 7.84 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.15 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 4.02 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H), 3.70 (m, 12H), 3.42 (m, 2H), 1.23 (m, 2H), 1.13 (dd, $J = 7.1, 3.4$ Hz, 12H)。

室温反应 (24.9 °C) 7 小时, 取样中控反应完全, 反应液用制备 HPLC 纯化 (流动相为乙腈和水)。冻干得 **CR202KM** (107.7 mg 纯度: 95.0%, 收率: 22.4%)。



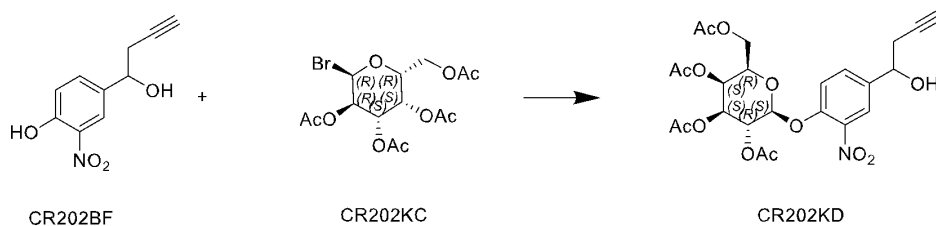
[462] 将 **CR202KM** (107.0 mg, 0.078mmol) 溶于 DMF (6.5 mL) 中, 加入纯化水 (3.5 mL), 反应液浑浊, 在避光的条件下加入 **CR202W4** (142.5 mg, 0.095 mmol), 氮气置换 3 遍, 外温 25°C 下搅拌至溶清, 滴加 DIPEA (100 μ L) 调节至 pH=8, 加入溴化亚铜 (11.2 mg, 0.078 mmol), 保温反应 2 小时, 取样中控反应完毕, 反应液用制备 HPLC 纯化 (流动相为 15 mM 醋酸钠/水-乙腈体系, 乙腈-水体系脱盐), 冻干得 **CR202HT** (26.1 mg, 纯度: 88.29%, 16.0 mg, 纯度: 73.74%)。LCMS: $[M+3H]^{3+}=960.92$ 。

[463] 4.23 **CR202HU** 的合成

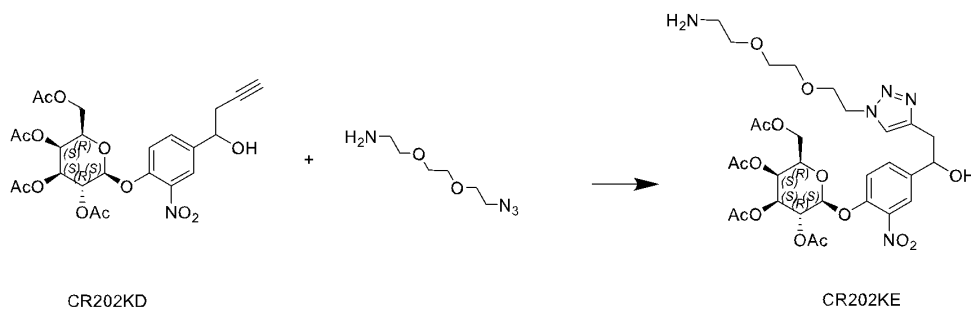


[464] 将锌粉 (9.03g, 0.138 mol) 加入到 500mL 单口瓶中, 然后加入干燥 THF (150mL), 滴加炔丙基溴 (16.41g, 0.138 mol)。搅拌 30 分钟。将 **CR202BE** (9.98g, 0.060 mol) 溶于干燥 THF (150 mL) 中, 在 -10°C--5°C 下滴加入反应中, 滴加完毕后, 移去冰浴反应 15 分钟, 反应液成胶状, 取样 HPLC 中控。将反应液冷至 0°C, 滴加入 100mL 饱和氯化铵, 然后补加 100mL 水, 将反应液转移至分液漏斗中, 加入乙酸乙酯 300mL 萃取两次, 合并有机相, 经无水硫酸钠干燥, 过滤后在 35°C 下真空浓缩滤液得到棕色油状物, 经柱层析纯化 (正庚烷: 乙酸乙酯=20:1-2:1) 得到 **CR202BF** (12.00g, 纯度: 91.14%, 产率: 97.6%)。
 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 10.53 (s, 1H), 8.13 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.62 (dd, $J = 8.7, 2.0$ Hz,

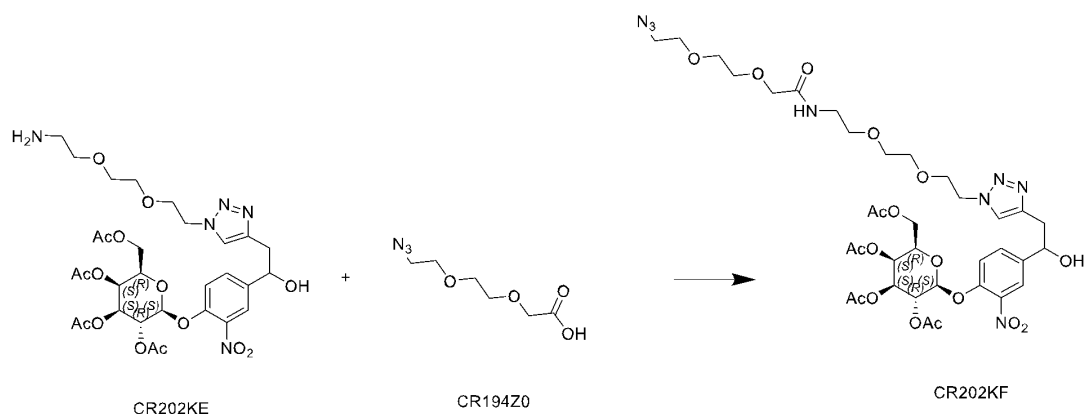
1H), 7.14 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 4.86 (dd, J = 9.5, 6.2 Hz, 1H), 2.71 – 2.55 (m, 2H), 2.48 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 2.11 – 2.04 (m, 1H).



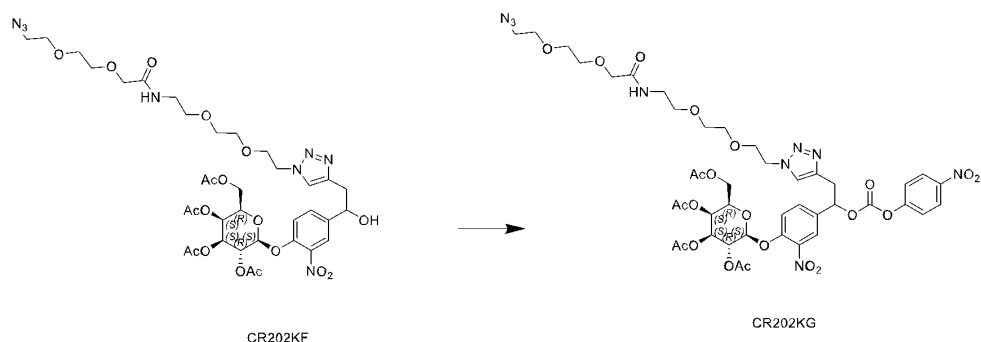
[465] 将碳酸银 (13.24 g, 48.03 mmol) 加入到 250 mL 单口瓶中, 再加入乙腈 (130 mL), 保持冰盐浴冷却, 加入 HMTTA (2.09 g, 9.09 mmol), 搅拌 7 分钟, 加入 **CR202BF** (2.70 g, 12.98 mmol) 和 **CR202KC** (6.94g, 16.88 mmol), 移去冰盐浴, 反应 1 小时, 取样 HPLC 中控, 反应液过滤, 除去碳酸银, 滤液加入乙酸乙酯 (150 mL) 和水 (100 mL), 分出有机相, 水相再用乙酸乙酯 (100mL) 萃取, 合并有机相, 用饱和氯化钠 (100mL) 洗涤, 用无水硫酸钠干燥, 过滤 (硅藻土+硅胶+硅藻土三层过滤) 后在 28°C 下真空浓缩滤液, 经柱层析纯化 (正庚烷: 乙酸乙酯=4:1-1:2) 得到 **CR202KD** (10.00g, 产率: 120.9% (产物含有乙酸乙酯))。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.83 (dd, J = 9.1, 2.1 Hz, 1H), 7.54 (td, J = 9.3, 2.2 Hz, 1H), 7.32 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 5.51 (dd, J = 10.5, 7.9 Hz, 1H), 5.44 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 5.06 (ddd, J = 9.2, 8.5, 1.9 Hz, 2H), 4.88 (t, J = 6.2 Hz, 1H), 4.30 – 4.19 (m, 1H), 4.18 – 3.98 (m, 2H), 2.71 – 2.54 (m, 2H), 2.16 (s, 3H), 2.13 – 2.07 (m, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.01 (s, 3H).



[466] 将 **CR202KD** (9.50 g, 0.018 mol) 溶于乙腈/H₂O (280 mL, 乙腈:H₂O=3:1) 中, 冰盐浴冷却至 3°C, 加入 N₃-(PEG)₂-NH₂ (3.08 g, 0.018 mol), 随后加入 CuBr (2.54 g, 0.018 mol), 3°C 下反应 20 分钟, 取样 HPLC 中控。向反应液中滴加 5% TFA (60 mL), 调节至 pH=5, 制备纯化冻干, 得到 **CR202KE** (11.02g, 纯度: 93.38%, 产率 115.7% (产物含反应试剂))。LC-MS: [M+H]⁺: 712.17。

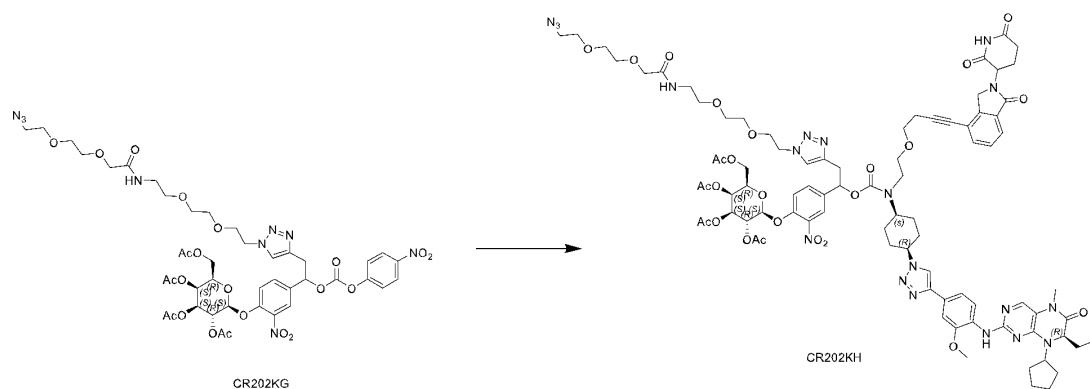


[467] 将 **CR202KE** (10.00 g, 0.014 mol) 加入到 500 mL 单口瓶中, 加入干燥的 DMAc (100 mL), 冰浴冷却至内温 4°C, 加入 **CR202Z0** (2.66g, 0.014 mol) 和 HATU (5.34g, 0.014 mol), 滴加入 DIPEA (11 mL, 0.063mol), 冰浴反应 25 分钟, 取样中控, 反应结束, 向反应液中滴加 300 mL 水, 控温 <20°C, 用乙酸乙酯萃取 (200 mL×2), 合并有机相, 用饱和食盐水洗 (50 mL×4), 用无水硫酸钠干燥, 过滤后在 25°C 下真空浓缩滤液得到粗品, 经柱层析纯化 (正庚烷:乙酸乙酯=4:1; DCM:MeOH=100:1-30:1) 得到 **CR202KF** (6.20g, 纯度: 90.02%, 产率: 61.4%)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.81 (s, 1H), 7.73 (d, J = 4.3 Hz, 1H), 7.56 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.31 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.13 (s, 1H), 5.51 (dd, J = 10.3, 8.1 Hz, 1H), 5.44 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 5.14 – 5.00 (m, 3H), 4.61 – 4.50 (m, 2H), 4.22 (dd, J = 11.2, 7.0 Hz, 1H), 4.15 (dd, J = 11.6, 6.6 Hz, 1H), 3.94 (s, 2H), 3.84 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 3.70 – 3.61 (m, 6H), 3.58 (s, 4H), 3.51 (t, J = 5.3 Hz, 2H), 3.48 – 3.41 (m, 2H), 3.41 – 3.35 (m, 2H), 3.16 (dd, J = 15.1, 3.2 Hz, 1H), 3.03 (dd, J = 15.0, 8.8 Hz, 3H), 2.16 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 1.99 (s, 3H).

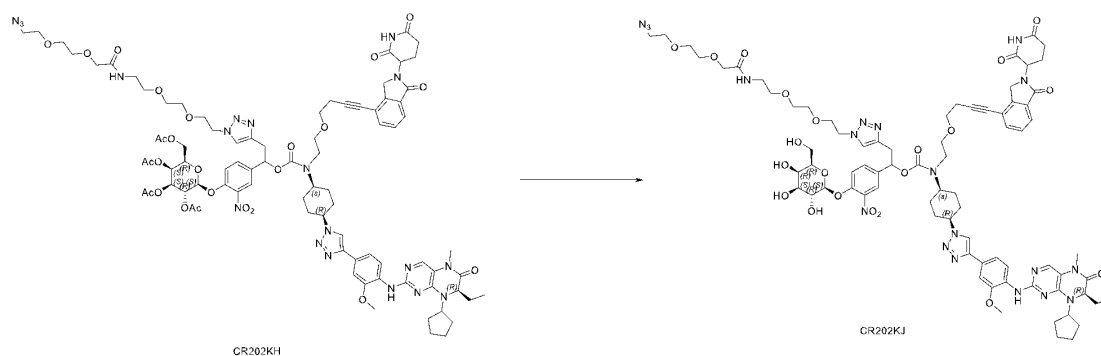


[468] 将 **CR202KF** (2.00g, 2.27mmol) 溶解于干燥的 DMAc (60mL) 中, 加入 NPC (1.38g, 4.53 mmol), 随后滴加入 DIPEA (1.2 mL, 6.81 mmol), 搅拌 17 小时, 滴加 300mL 的乙腈

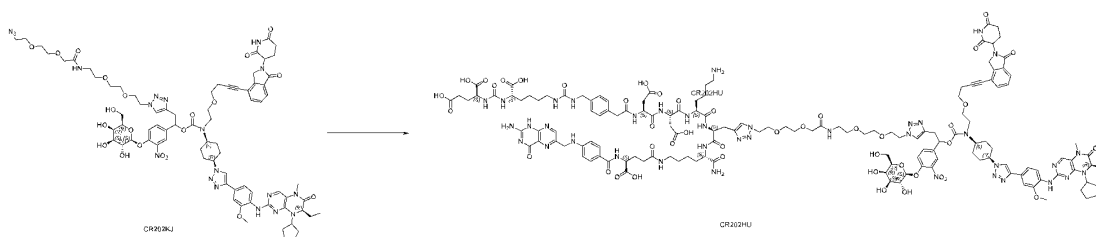
/0.1%TFA 水=1/1 试剂, 控温<20℃, 制备纯化冻干得到 **CR202KG** (1.65g, 纯度: 98.3%, 产率 67.5%)。LC-MS:[M+H]⁺:1048.29。



[469] 将 **CR202KG** (0.82 g, 0.76 mmol) 溶解于干燥的 DMAc (13 mL) 中, 冰浴冷却至
内温 10℃, 加入 **CR20274** (0.74 g, 0.84 mmol) 和 HOBT (0.1032 g, 0.76 mmol), 随后加入
DIPEA (0.16mL), 移去冰浴搅拌 3.5 小时。反应液制备纯化冻干得到 **CR202KH** (1.0781
g, 纯度: 98.23%, 产率: 78.7%)。LC-MS: $[M+2]^+$:897.21。

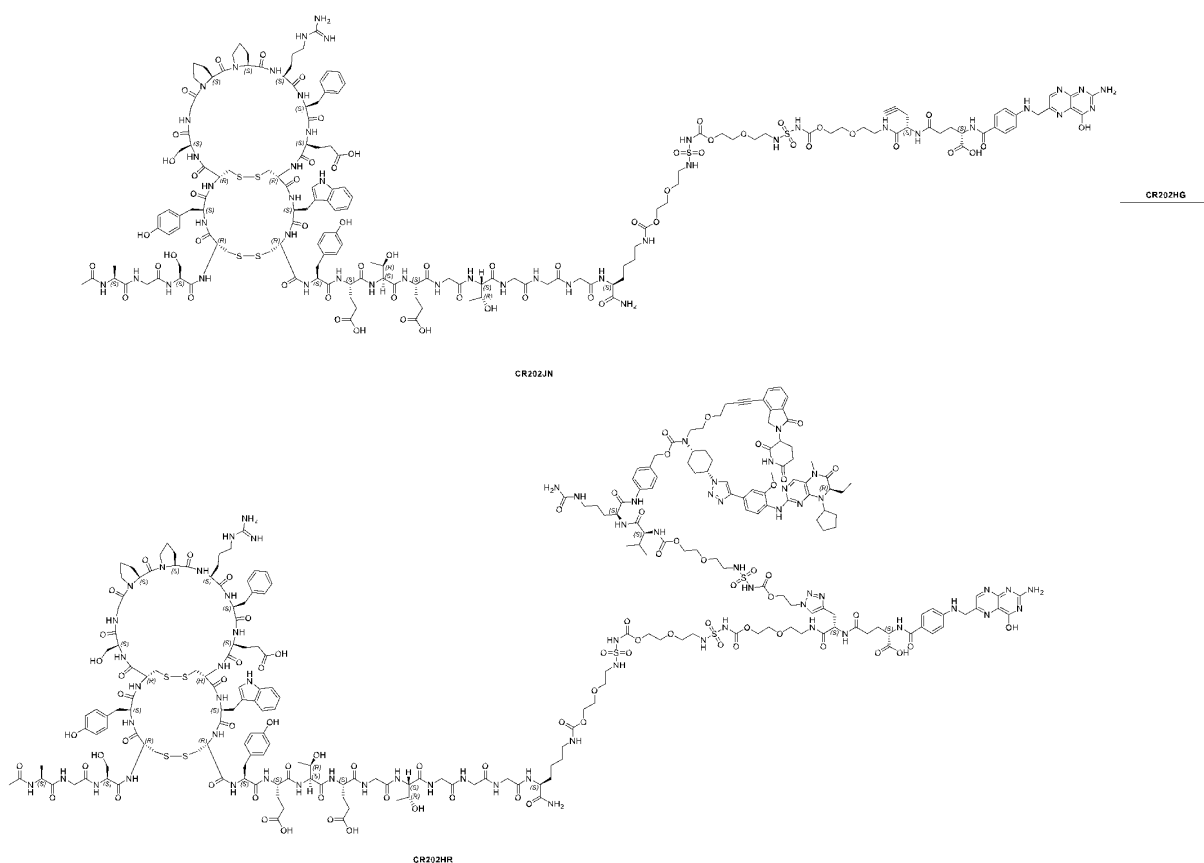


[470] 将 **CR202KH** (0.50 g, 0.28 mmol) 溶解于甲醇 (50mL) 中, 降温至 10℃, 滴加 0.1 M LiOH (25 mL), 控温在 10-15℃, 反应 25 分钟, 取样中控反应结束, 滴加入 5%AcOH 调 pH=5, 纯化冻干得到 **CR202KJ** (0.24g, 纯度: 98.84%, 产率: 45.3%)。LC-MS:[M+2]²⁺: 813.18。



[471] 将 **CR202KJ** (0.22 g, 0.135 mmol) 和 **CR202W4** (0.25 g, 0.162 mmol) 溶解于 DMF:H₂O=1:1 (6.6 mL) 中, 控温 20°C, 滴加 DIPEA 调 pH=8.0。加入 CuBr (20.1 mg, 0.135 mmol), 搅拌 1.5 小时, 取样 HPLC 中控至反应完全, 将反应液温度降至 0°C, 滴加 2% TFA 调 pH=3, 制备纯化得到 **CR202HU** (0.11 g, 纯度: 95.3%, 产率: 26.2%)。

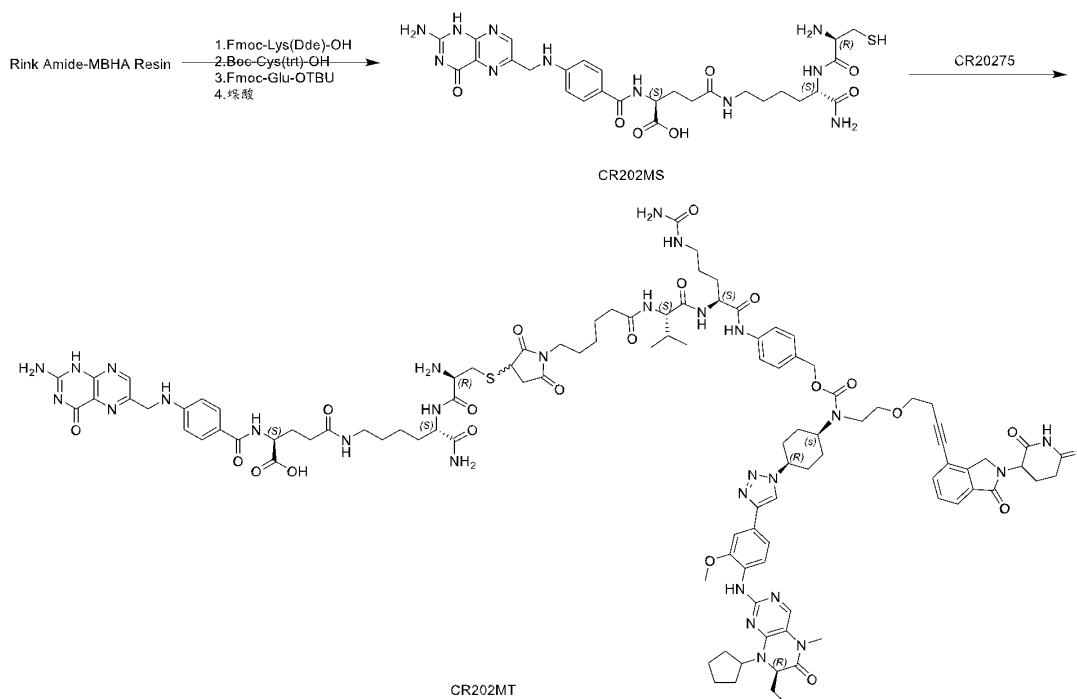
[472] 4.24 **CR202HR** 的合成



[473] 将 **CR202JN** (520.0mg, 0.135mmol) 溶于 DMF/水 (9/1, 40 mL) 中, 加入 **CR202HG** (250.0mg, 0.155mmol) 和 CuBr (48.4mg, 0.337mmol), 氮气置换三次, pH=7, 控制反应液温度为 25°C, 磁力搅拌 3~5 小时, HPLC 中控监测反应完全, 停止反应, 反应液制备纯

化, 冻干得到黄色固粉末 **CR202HR** (358.6 mg, 纯度 97.78%, 收率:40.75%),
 $[M/4+H]^+=1367.50$ 。

[474] 4.25 **CR202MT** 的合成



[475] 采用与 L-01 的类似方法, 制备得到黄色固体 **CR202MS**。

[476] 采用与 **CR20282** 的类似方法, 制备得到 **CR20275**。

[477] 将 **CR20275** (150.1 mg, 0.10 mmol) 和 **CR202MS** (81.2 mg, 0.12 mmol) 加入到 50% ACN/H₂O (15 mL) 中, 再加入 10 mmol/L Na₂HPO₄ 调节反应液 pH 至 4-6, 25 °C 反应 1 小时, HPLC 中控至反应完全。反应液直接制备纯化, 得 **CR202MT** (90.0 mg, 纯度: 93.46%, 收率: 41.3%)。

实施例 2 溶解性实验研究

[478] 溶解度实验通用操作: 向偶联体化合物 (1.0 mg) 和单独的蛋白降解嵌合体分批加入 PBS (pH=7.2~7.4), 每次 0.05 mL, 涡旋 2 分钟, 直至固体溶解, 溶解度计算公式: $C=m/V$, C: 浓度, m: 样品重量, V: PBS 总体积。

表 1. 溶解度

化合物	CR202V5	CR202V6	CR202V7	CR202W4	CR20282	CR20293	CR20295	CR20297
浓度 mg/mL	2.8	1.9	1.5	2.8	13.4	20.6	26.4	10.6
化合物	CR202Z6	CR202V4	CR202V8	CR202V9	CR202AL	CR202W1	CR20274	
浓度 mg/mL	2.7	8.0	7.5	15.8	5.7	8.1	<0.9	

实验结论：从上表可以看出，偶联体化合物的溶解度显著高于单独的蛋白降解嵌合体（即 CR20274）。

实施例 3 酶切实验研究

- [479] 1. CR20282、CR20293、CR20295、CR20297 的组织蛋白酶 B 酶切实验研究
- [480] 样品信息（酶切实验）：CR20282、CR20293、CR20295、CR20297、组织蛋白酶 B-human liver（来源：Sigma）、半胱氨酸（来源：Sigma）、醋酸钠和 EDTA（上海凌峰）。
- [481] 实验方案：将各偶联体化合物用乙腈-水（1:1 含 0.1%TFA）溶解配制成 1 mg/mL 母液；取 30 μ L 1 mg/mL 各化合物母液加至 570 μ L 的 50 mM NaOAc（含 1 mM EDTA 和 10 mM 半胱氨酸）溶液中，混匀；再加入 7 μ L 组织蛋白酶 B（浓度为 0.05U/ μ l），轻柔混匀，将整个反应样品置于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中孵育 0、1、2、4 和 8 小时；各时间点取样进 HPLC 分析。
- [482] 实验结果与分析：由表 2 和 3 可知，组织蛋白酶 B 的酶切作用下，各药物均具有较好的载药释放速率。

表 2 酶切各偶联体化合物的主成分剩余率

时间	CR20282	CR20293	CR20295	CR20297
0 小时	87%	100%	100%	100%
1 小时	17%	76%	46%	55%
2 小时	8%	46%	22%	27%
4 小时	2%	27%	8%	10%

8 小时	0%	7%	0%	0%
------	----	----	----	----

表 3 酶切各偶联体化合物的 CR20274 生成率

时间点	CR20282	CR20293	CR20295	CR20297
0 小时	9%	0%	0%	0%
1 小时	79 %	17%	15%	21%
2 小时	86%	38%	16%	40%
4 小时	89%	59%	18%	55%
8 小时	86%	64%	24%	61%

[483] 2. CR202V4、CR202V5、CR202V6、CR202V7 和 CR202Z6 的组织蛋白酶 B 酶切速率研究

[484] 样品信息（酶切实验）：CR202V4、CR202V5、CR202V6、CR202V7、CR202Z6、组织蛋白酶 B-human liver（来源：Sigma）、半胱氨酸（来源：Sigma）、醋酸钠和 EDTA（来源：上海凌峰）。

[485] 实验步骤：

- 1) 用 0.1%TFA-乙腈水（1:1）将各偶联体化合物配置成 500 μg/mL 母液；
- 2) 取 60 μL 的 500 μg/mL 化合物母液加入至 536 μL 的 50 mM NaOAc(含 1 mM EDTA+10 mM Cys) ， 再加入 4 μL 组织蛋白酶 B（CB 酶），轻微振荡混匀；
- 3) 将上述 2)中酶切反应物置于 37°C恒温培养箱中孵育 0 小时、1 小时、2 小时、4 小时和 24 小时，到点进样，各时间点取样进 LC-MS 分析。

[486] 实验结果与分析：由表 4 和 5 可知，在 CB 酶的作用下，各药物均具有较好的载药释放速率。

表 4. 各化合物酶切主成分剩余率

时间	CR202V4	CR202V5	CR202V6	CR202V7	CR202Z6
0 小时	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
1 小时	0.00%	2.37%	11.20%	30.64%	6.89%
2 小时	0.00%	0%	2.66%	13.69%	0.58%
4 小时	0.00%	0%	0%	3.70%	0.41%
24 小时	0.00%	0%	0%	0%	0%

表 5. 各化合物酶切 CR20274 生成率

时间	CR202V4	CR202V5	CR202V6	CR202V7	CR202Z6
0 小时	0%	0%	0%	0%	0%
1 小时	100%	100%	6%	57%	100%
2 小时	100%	100%	88%	89%	100%
4 小时	100%	100%	100%	100%	100%
24 小时	100%	100%	100%	100%	100%

[487] 3. CR202V8 和 CR202W1 酶切速率研究

[488] 通过纤溶酶和硫酸酯酶的酶切作用观察偶联体化合物 CR202V8（含纤溶酶酶切基团）和 CR202W1（含硫酸酯酶酶切基团）的化合物结构稳定性。

[489] 实验步骤：

- 1) 用 PBS（pH=7.4）将各化合物配置成 500 μg/mL 母液；
- 2) 取 60 μL 的 500 μg/mL 化合物母液加入至 420 μL PBS(pH=7.4)中,再加入 60 μL 0.2U/mL 纤溶酶（或 60 μL 0.5U/mL 硫酸酯酶），轻微振荡混匀；
- 3) 将上述 2)中酶切反应物置于 37℃恒温培养箱中孵育 0 小时、1 小时、2 小时、4 小时和 24 小时，到点进样，各时间点取样进 LC-MS 分析。

[490] 实验结果与分析：由表 6 和 7 可知，CR202V8 和 CR202W1 均具有较快的载药释放速率。其中，相比于 CR202W1，CR202V8 的载药释放速率更快。

表 6. 各化合物酶切主成分剩余率

时间	CR202V8	CR202W1
0 小时	8%	97%
1 小时	1%	89%

2 小时	1%	80%
4 小时	0%	69%
24 小时	0%	37%

表 7. 各化合物酶切 CR20274 生成率

时 间	CR202V8	CR202W1
0 小时	22%	0%
1 小时	100%	9%
2 小时	100%	15%
4 小时	100%	27%
24 小时	100%	56%

[491] 4、 研究 CR202AL 的 β -葡萄糖苷酶酶切速率

[492] 通过 β -葡萄糖苷酶的酶切作用观察偶联体化合物 CR202AL 的化合物结构稳定性，并观察是否有其他酶切片段，确定酶切位点。

[493] 实验步骤：

- 1) 用 PBS (pH=6.8) 将 CR202AL 配置成 500 $\mu\text{g/mL}$ 母液；
- 2) 取 100 μL 的 500 $\mu\text{g/mL}$ 化合物母液加入至 775 μL PBS (pH=6.8) 中，再加入 125 μL 100U/mL β -葡萄糖苷酶，轻微振荡混匀；
- 3) 将上述 2) 中酶切反应物置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中孵育 0 小时、1 小时、2 小时、4 小时、24 小时，到点进样，各时间点取样进 LC-MS 分析。

[494] 实验结果与分析：由表 8 和 9 可知， β -葡萄糖苷酶酶切作用下，CR202AL 具有较好的载药释放速率。

表 8. CR202AL 酶切主成分剩余率

时 间	CR202AL
0 小时	100.00%
1 小时	26.70%
2 小时	9.75%
4 小时	4.87%
24 小时	0.00%

表 9. CR202AL 酶切 CR20274 生成率

时 间	CR202AL
0 小时	5.16%
1 小时	107.33%
2 小时	146.03%
4 小时	146.54%
24 小时	100.80%

实施例 4 血浆稳定性研究

[495] 1. CR20282、CR20285、CR20293、CR20295 和 CR20297 的血浆稳定性研究实

[496] 样品信息：CR20282、CR20285、CR20293、CR20295、CR20297、甲醇和小鼠血浆。

[497] 实验方案：将各偶联体化合物用乙腈-水（1:1）或乙腈-水（1:1 含 0.1%TFA）溶解配制成 1 mg/mL 母液；取 10 μL 1 mg/mL 母液加至 90 μL 血浆中，轻柔混匀，将血浆药物样置于 37°C 恒温箱中孵育 0、0.5、1、2、4、6 和 24 小时；到反应时间点后取出样品，加 300 μL 甲醇溶液（含 10 ng/mL 特菲那定）进行蛋白沉淀；离心（12 min、4°C、12000 rpm），取上清，保存于零下 80°C 的冰箱中，收集完所有时间点样品，进行 LC-MS 分析。

[498] 实验结果与分析：由表 10 和 11 可知，各偶联体化合物在血浆中较稳定，在血浆中释放的有效载荷较少且速度较慢。

表 10. 各化合物血浆稳定性主成分剩余率

时间	CR20282	CR20285	CR20293	CR20295	CR20297
0 小时	86.91%	80.03%	83.13%	92.38%	85.14%
0.5 小时	78.98%	73.49%	75.57%	85.39%	87.68%
1 小时	80.58%	70.41%	75.83%	72.91%	77.46%
2 小时	67.29%	68.31%	67.76%	71.15%	74.50%
4 小时	54.93%	63.85%	69.79%	64.95%	79.71%
6 小时	55.92%	60.08%	70.46%	41.82%	43.25%
24 小时	15.25%	26.68%	45.43%	20.02%	22.96%

表 11. 各化合物血浆稳定性 CR20274 生成率

时间	CR20282	CR20285	CR20293	CR20295	CR20297
0 小时	0.01%	0.20%	0.00%	0.02%	0.05%

0.5 小时	0.27%	0.56%	0.17%	0.09%	0.13%
1 小时	0.36%	0.52%	0.32%	0.10%	0.15%
2 小时	0.41%	0.80%	0.52%	0.19%	0.38%
4 小时	0.50%	1.39%	0.67%	0.31%	0.47%
6 小时	0.65%	1.51%	0.95%	0.19%	0.38%
24 小时	0.84%	3.09%	3.38%	0.71%	1.34%

[499] 2. CR202V4、CR202V5、CR202V6、CR202V7、CR202V8、CR202V9、CR202Z6、CR202W1、CR202AL 和 CR20282 的血浆稳定性研究

[500] 样品信息：CR202V4、CR202V5、CR202V6、CR202V7、CR202V8、CR202V9、CR202Z6、CR202W1、CR202AL、CR20282、甲醇和小鼠血浆。

[501] 实验步骤：

- 1) 用 0.1%TFA-乙腈水（1:1）将各偶联体化合物配置成 1 mg/mL 母液；
- 2) 取 10 μ L 1mg/mL 化合物母液加入至 90 μ L 新鲜血浆，轻微振荡混匀，置于 37°C 恒温培养箱中孵育 0 小时、0.5 小时、1 小时、2 小时、4 小时、6 小时和 24 小时；
- 3) 到反应时间点后取出样品，加 300 μ L 甲醇溶液（含 10 ng/mL 特菲那定）进行蛋白沉淀；
- 4) 离心（13 分钟、4°C、12000 rpm），取上清，保存于零下 80°C 的冰箱中，收集完所有时间点样品，进行 LC-MS 分析。

[502] 实验结果与分析：由表 12 和 13 可知，各偶联体化合物在血浆中较稳定，在血浆中释放的有效载荷较少且速度较慢。

表 12. 各化合物血浆稳定性主成分剩余率

时 间	主 成 分 (CR202 V4) 剩 余 率	主 成 分 (CR202V5) 剩 余 率	主 成 分 (CR202 V6) 剩 余 率	主 成 分 (CR202V7)剩 余 率	主 成 分 (CR202V8) 剩 余 率	主 成 分 (CR202V9) 剩 余 率	主 成 分 (CR202Z6) 剩 余 率	主 成 分 (CR202 W1)剩 余 率	主 成 分 (CR202AL)剩 余 率	主 成 分 (CR20282) 剩 余 率
0h	84.13%	94.75%	91.24%	88.59%	78.37%	99.22%	105.34%	105.30%	76.04%	109.94%
0.5h	75.91%	100.98%	87.89%	80.93%	50.90%	99.85%	113.62%	89.44%	69.77%	95.98%
1h	74.31%	94.88%	87.91%	86.63%	59.93%	98.41%	111.67%	102.61%	78.07%	82.50%
2h	78.19%	94.66%	87.59%	75.50%	49.50%	89.57%	80.38%	105.09%	75.61%	83.10%
4h	61.27%	90.56%	82.48%	63.89%	41.21%	67.13%	88.43%	107.80%	74.87%	74.33%
6h	70.38%	80.42%	80.40%	66.20%	32.46%	66.29%	98.63%	84.83%	57.09%	66.72%
24h	1.36%	-1.03%	0.00%	-2.63%	-2.40%	0.62%	4.82%	-2.67%	1.20%	-2.82%

表 13. 各化合物 CR20274 释放率

时间	CR202V4 中 CR20274 释 放 率 (实际释 放 / 理 论 释放)	CR202V5 中 CR20274 释 放 率(实 际释放/理 论释放)	CR202V6 中 CR20274 释 放 率(实 际释放/理 论释放)	CR202V7 中 CR20274 释 放 率 (实际释 放 / 理 论 释放)	CR202V8 中 CR20274 释 放 率 (实际释 放 / 理 论 释放)	CR202V9 中 CR20274 释 放 率 (实际释 放 / 理 论 释放)	CR202Z6 中 CR20274 释 放 率(实 际释放/理 论释放)	CR202W1 中 CR20274 释 放 率(实 际释放/理 论释放)	CR202AL 中 CR20274 释 放 率(实 际释放/理 论释放)	CR20282 中 CR20274 释 放 率(实 际释放/理 论释放)
0h	-0.12%	0.02%	0.03%	-0.02%	0.06%	0.11%	0.05%	0.68%	0.01%	0.00%
0.5h	0.04%	0.17%	0.07%	0.15%	1.94%	0.17%	0.22%	0.63%	0.47%	0.34%
1h	0.11%	0.25%	0.15%	0.24%	5.56%	0.22%	0.34%	0.83%	0.86%	0.48%
2h	0.17%	0.37%	0.26%	0.28%	7.07%	0.21%	0.25%	0.80%	0.96%	0.84%
4h	0.30%	0.94%	0.47%	0.37%	14.20%	0.25%	0.37%	0.96%	2.60%	1.17%
6h	0.42%	0.97%	0.52%	0.49%	14.58%	0.30%	0.48%	0.88%	3.69%	1.60%
24h	2.62%	3.92%	2.47%	3.25%	105.58%	1.46%	1.95%	2.82%	28.17%	8.18%

实施例 5 偶联体化合物 CR20214 对不同肿瘤细胞的扩增抑制实验

[503] 细胞株信息

表 14

细胞名称	中文名称
A549	人非小细胞肺癌细胞
HCC1954	人乳腺导管癌细胞
HCT-116	人结肠癌细胞
SK-BR-3	人乳腺腺癌细胞
U87MG	人脑星形胶质母细胞 瘤细胞
NCI-H460	人大细胞肺癌细胞
RT4	人膀胱移行细胞乳头 瘤细胞
KB	人口腔表皮样癌细胞
SCLC-21H	人小细胞肺癌细胞
LNCaP	人前列腺癌细胞
Hela	人宫颈癌细胞
293T	人胚肾细胞
293T-FOLR1	人胚肾细胞高表达 FOLR1
293T-FOLR1/PSMA	人胚肾细胞高表达

	FOLR1 和 PSMA
--	--------------

[504] 主要试剂：1640 无叶酸培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素溶液、L-谷氨酰胺和 CCK8。

[505] 实验步骤

1) 细胞铺板

提前准备好细胞，胰蛋白酶（Trypsin）消化、收集计数，使用完全细胞培养基将细胞稀释成 2×10^4 个细胞/mL，铺 96 孔板，每个孔加入 100 μ L 稀释的细胞悬液，每块板设置阴性及空白对照孔。将加好细胞的 96 孔板置于 37°C，5%CO₂ 培养箱培养过夜。

2) 稀释加样

将样品用培养基进行梯度稀释（初始浓度 10 μ M，5 倍梯度稀释），共设置 9 个浓度梯度，将孔板中的培养基吸弃，按照每孔 100 μ L 的药物溶液加入到 96 孔板中，3 个复孔，并设立阴性对照和空白对照，置于 37°C，5%CO₂ 培养箱培养 72 小时。

3) 显色读板

取 CCK-8 显色液，每孔加入 10 μ L（孔内液体体积的 10%），37°C 孵育适宜时间（尽量使 OD 值在 1.0-2.5 范围内），96 孔板去掉培养板盖，置于酶标仪（Molecular Devices SpectraMax iD5），450 nm 读数数值。

4) 数据处理

使用 GraphPad Prism 8.0.2 进行四参数拟合曲线，得到 IC₅₀ 值。

5) 实验结果与分析

实验结果：见表 15，由表 15 可知，CR20214 对各种类型的肿瘤细胞有杀伤作用。

表 15. 化合物 IC₅₀ (nM)

细胞名称	CR20214
A549	1603
HCC1954	3968
HCT-116	1117

SK-BR-3	1489
U87MG	907.3
NCI-H460	1595
RT4	275.5
KB	422.2
SCLC-21H	1795
LNCaP	52.23
Hela	950.2
293T	2023
293T-FOLR1	692.7
293T-FOLR1/PSMA	845.2

实施例 6 偶联体化合物 CR20282、CR20285、CR20287、CR20293、CR20295、CR20297 和 CR202F0 对不同肿瘤细胞的扩增抑制实验

[506] 细胞株信息

表 16

细胞名称	中文名称	FOLR1/PSMA 表达情况
LNCaP	人前列腺癌细胞	PSMA 高表达
22RV1	人前列腺癌细胞	PSMA 高表达
C4-2	人前列腺癌细胞	PSMA 高表达
MDA-MB-231-FOLR1	人乳腺癌细胞稳转 FOLR1	FOLR1 高表达
MDA-MB-231-PSMA	人乳腺癌细胞稳转 PSMA	PSMA 高表达
293T-PSMA	人胚肾细胞	PSMA 高表达

[507] 主要试剂：1640 无叶酸培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素溶液、L-谷氨酰胺和 CCK8。

[508] 实验步骤

1) 细胞铺板

提前准备好细胞，胰蛋白酶（Trypsin）消化、收集计数，使用完全细胞培养基将细胞稀释成 2×10^4 个细胞/ml，铺 96 孔板，每个孔加入 100 μ L 稀释的细胞悬液，每块板设置阴性及空白对照孔。将加好细胞的 96 孔板置于 37°C，5%CO₂ 培养箱培养过夜。

2) 稀释加样

将样品用培养基进行梯度稀释（初始浓度 10 μM，5 倍梯度稀释），共设置 9 个浓度梯度，将孔板中的培养基吸弃，按照每孔 100 μL 的药物溶液加入到 96 孔板中，3 个复孔，并设立阴性对照和空白对照，置于 37°C，5%CO₂ 培养箱培养 72 小时。

3) 显色读板

取 CCK-8 显色液，每孔加入 10 μL（孔内液体体积的 10%），37°C 孵育适宜时间（尽量使 OD 值在 1.0-2.5 范围内），96 孔板去掉培养板盖，置于酶标仪（Molecular Devices SpectraMax iD5），450nm 读数数值。

4) 数据处理

使用 GraphPad Prism 8.0.2 进行四参数拟合曲线，得到 IC₅₀ 值。

5) 实验结果与分析

实验结果：见表 17，由表 17 可知，CR20282、CR20285、CR20293、CR20295 和 CR20297 对表达 FOLR1 和 PSMA 的各种瘤细胞具有很强的杀伤作用。

表 17. 化合物 IC₅₀ (nM)

IC ₅₀ (nM)	LNCap	22RV1	C4-2	MDA-MB-231-FOLR1	MDA-MB-231-PSMA	293T-PSMA
CR20282	73.95	98.49	212.4	206.9	374.3	85.64
CR20295	10.58	3.239	5.074	13.89	8.695	85.64
CR20293	37.91	16.43	77.98	94.15	70.63	3267
CR20297	178	71.89	128.8	258.2	313.9	5827
CR20285	44.59	17.53	40.67	49.2	85.81	6047
CR202F0	1483	367.7	1121	10808	5951	12661
CR20287	1259	449	882.5	1630	2040	3314

实施例 7 化合物 CR20274 和偶联体化合物 CR20282 对不同肿瘤细胞的扩增抑制实验

[509] 细胞株信息

表 18

细胞名称	中文名称	FOLR1/PSMA 表达情况
HepG2	人肝癌细胞	FOLR1 和 PSMA 无可见表达
PC-3	人前列腺癌细胞	FOLR1 和 PSMA 无可见表达
A549	人非小细胞肺癌细胞	FOLR1 和 PSMA 无可见表达
NCI-H460	人大细胞肺癌细胞	FOLR1 和 PSMA 无可见表达

[510] 主要试剂：1640 无叶酸培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素溶液、L-谷氨酰胺和 CCK8。

[511] 实验步骤

1) 细胞铺板

提前准备好细胞，胰蛋白酶（Trypsin）消化、收集计数，使用完全细胞培养基将细胞稀释成 2×10^4 个细胞/ml，铺 96 孔板，每个孔加入 100 μ L 稀释的细胞悬液，每块板设置阴性及空白对照孔。将加好细胞的 96 孔板置于 37°C，5%CO₂ 培养箱培养过夜。

2) 稀释加样

将样品用培养基进行梯度稀释（初始浓度 10 μ M，5 倍梯度稀释），共设置 9 个浓度梯度，将孔板中的培养基吸弃，按照每孔 100 μ L 的药物溶液加入到 96 孔板中，3 个复孔，并设立阴性对照和空白对照，置于 37°C，5%CO₂ 培养箱培养 72 小时。

3) 显色读板

取 CCK-8 显色液，每孔加入 10 μ L（孔内液体体积的 10%），37°C 孵育适宜时间（尽量使 OD 值在 1.0-2.5 范围内），96 孔板去掉培养板盖，置于酶标仪（Molecular Devices SpectraMax iD5），450nm 读数数值。

4) 数据处理

使用 GraphPad Prism 8.0.2 进行四参数拟合曲线，得到 IC₅₀ 值。

5) 实验结果与分析

实验结果：见表 19，由表 19 可知，CR20274 对不表达 PSMA 和 FOLR1 的细胞株依然有较强的杀伤作用，而 CR20282 对不表达 PSMA 和 FOLR1 的细胞几乎无杀伤作用，这表明

细胞膜表面缺乏 FOLR1 和 PSMA, 双配体 PROTAC 靶向递送受到阻碍, 表明双配体 PROTAC 相比 PROTAC 裸药具有更好的靶向性。

表 19. 化合物 IC₅₀ (nM)

IC ₅₀ (nM)	HepG2	PC-3	A549	NCI-H460
CR20274	106.8	103.2	124.2	314.2
CR20282	/	/	/	/

实施例 8 偶联体化合物 CR202V4、CR202V5、CR202V6、CR202V7、CR202V9、CR202W1、CR202Z6、CR202AL、CR202GM、CR202GQ、CR202FU、CR202HJ、CR202JG、CR202HU、CR202HV 和 CR202V8 对不同肿瘤细胞的增殖抑制实验

[512] 细胞株信息: 22RV1 (人前列腺癌细胞)、C4-2 (人前列腺癌细胞) 和 MDA-MB-231 (人乳腺癌细胞)

[513] 主要试剂: 1640 无叶酸培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素溶液、L-谷氨酰胺、CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay 试剂

[514] 实验步骤:

1) 细胞铺板

提前准备好细胞, Trypsin 消化、收集计数, 使用完全细胞培养基将细胞稀释成 1.5×10^4 个细胞/mL, 铺 96 孔板, 每个孔加入 100 μ L 稀释的细胞悬液, 每块板设置阴性及空白对照孔。将加好细胞的 96 孔板置于 37°C, 5%CO₂ 培养箱培养过夜。

2) 稀释加样

将样品用培养基进行梯度稀释 (初始浓度 10 μ M, 3 倍梯度稀释), 共设置 9 个浓度梯度, 将孔板中的培养基吸弃, 按照每孔 100 μ L 的药物溶液加入到 96 孔板中, 3 个复孔, 并设立阴性对照和空白对照, 置于 37°C, 5%CO₂ 培养箱培养 72 小时。

3) CellTiter-Glo 发光法检测细胞活性

将 CellTiter-Glo 缓冲液融化并放置至室温, 将 CellTiter-Glo 底物放置至室温, 在一瓶 CellTiter-Glo 底物中加入 CellTiter-Glo 缓冲液以溶解底物, 从而配制 CellTiter-Glo 工作液, 缓慢涡旋震荡使充分溶解。取出细胞培养板放置 30 分钟使其平衡至室温, 在每孔中加入 50 μ L

(等于每孔中细胞培养液一半体积)的 CellTiter-Glo 工作液。用铝箔纸包裹细胞板以避光。将培养板在轨道摇床上振摇 2 分钟以诱导细胞裂解。培养板在室温放置 10 分钟以稳定发光信号。置于酶标仪 (Molecular Devices SpectraMax iD5) 检测发光信号。

4) 数据处理

使用 GraphPad Prism 8.0.2 进行四参数拟合曲线, 得到 IC₅₀ 值。

5) 实验结果与分析

实验结果: 见表 20, 由表 20 可知, 偶联体化合物 CR202V4、CR202V5、CR202V6、CR202V7、CR202V9、CR202W1、CR202Z6、CR202AL、CR202GM、CR202GQ、CR202FU、CR202HJ、CR202JG、CR202HU、CR202HV 和 CR202V8 对不同肿瘤细胞均有较好的肿瘤抑制作用。

表 20: 化合物 IC₅₀(nM)

化合物名称	细胞株名称		
	22RV1	C4-2	MDA-MB-231
CR202V4	221.8	84.7	233.7
CR202V5	779.3	143.8	412.2
CR202V6	3.0	4.6	2.7
CR202V7	103.3	37.1	128.1
CR202V9	118.0	44.0	324.5
CR202W1	111.5	43.2	120.2
CR202Z6	370.4	272.5	344.4
CR202AL	6.3	0.5	2.5
CR202GM	286.7	/	512.1
CR202GQ	3162	/	4475
CR202FU	468.7	/	791.9
CR202HJ	1215	/	3653
CR202JG	1098	/	3779
CR202HU	1.52	/	5.5
CR202HV	154.6	/	14.19
CR202V8	20.47	/	24.07

备注: “/”表示没有检测。

实施例 9 偶联体化合物 CR202W5、CR202W8、CR202W9 和 CR202W6 以及单独的蛋白降解嵌合体 CR202Z5、CR202Z8、CR202Z9 和 CR202ES 对不同肿瘤细胞的扩增抑

制实验

[515] 细胞株信息：LNCaP（人前列腺癌细胞）、VCaP（人前列腺癌细胞）

[516] 主要试剂：1640 无叶酸培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素溶液、L-谷氨酰胺、CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay 试剂

[517] 实验步骤：

6) 细胞铺板

提前准备好细胞，Trypsin 消化、收集计数，使用完全细胞培养基将细胞稀释成 1.5×10^4 个细胞/mL，铺 96 孔板，每个孔加入 100 μ L 稀释的细胞悬液，每块板设置阴性及空白对照孔。将加好细胞的 96 孔板置于 37°C，5%CO₂ 培养箱培养过夜。

7) 稀释加样

将样品用培养基进行梯度稀释（初始浓度 10 μ M，3 倍梯度稀释），共设置 9 个浓度梯度，将孔板中的培养基吸弃，按照每孔 100 μ L 的药物溶液加入到 96 孔板中，3 个复孔，并设立阴性对照和空白对照，置于 37°C，5%CO₂ 培养箱培养 72 小时。

8) CellTiter-Glo 发光法检测细胞活性

将 CellTiter-Glo 缓冲液融化并放置至室温，将 CellTiter-Glo 底物放置至室温，在一瓶 CellTiter-Glo 底物中加入 CellTiter-Glo 缓冲液以溶解底物，从而配制 CellTiter-Glo 工作液，缓慢涡旋震荡使充分溶解。取出细胞培养板放置 30 分钟使其平衡至室温，在每孔中加入 50 μ L（等于每孔中细胞培养液一半体积）的 CellTiter-Glo 工作液。用铝箔纸包裹细胞板以避光。将培养板在轨道摇床上振摇 2 分钟以诱导细胞裂解。培养板在室温放置 10 分钟以稳定发光信号。置于酶标仪（Molecular Devices SpectraMax iD5）检测发光信号。

9) 数据处理

使用 GraphPad Prism 8.0.2 进行四参数拟合曲线，得到 IC₅₀ 值。

10) 实验结果与分析

实验结果：见表 21，由表 21 可知，和单独的蛋白降解嵌合体 CR202Z5、CR202Z8、CR202Z9 和 CR202ES 相比，偶联体化合物 CR202W5、CR202W8、CR202W9 和 CR202W6 对不同肿瘤细胞具有相当甚至更优的杀伤效果。

表 21：化合物 IC50(nM)

化合物名称	细胞株名称	
	LNCaP	VCaP
CR202Z5	373.1	182.9
CR202W5	442.9	75.3
CR202Z8	1.5	1.5
CR202W8	5.3	2.7
CR202Z9	417.7	12.4
CR202W9	72	180
CR202ES	8.7	10.9
CR202W6	12.2	4.7

实施例 10 化合物 CR202CC、CR202CF 和 CR202CI 对肿瘤细胞的扩增抑制实验

[518] 细胞株信息

表 22

细胞名称	中文名称	FOLR1/PSMA 表达情况
LNCaP	人前列腺癌细胞	PSMA 高表达
SK-OV-3	人卵巢癌细胞	FOLR1 高表达

[519] 主要试剂：1640 无叶酸培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素溶液、L-谷氨酰胺和 CCK8。

[520] 实验步骤

1) 细胞铺板

提前准备好细胞，胰蛋白酶（Trypsin）消化、收集计数，使用完全细胞培养基将细胞稀释成 2×10^4 个细胞/ml，铺 96 孔板，每个孔加入 100 μ L 稀释的细胞悬液，每块板设置阴性及空白对照孔。将加好细胞的 96 孔板置于 37°C，5%CO₂ 培养箱培养过夜。

2) 稀释加样

将样品用培养基进行梯度稀释（初始浓度 10 μ M，5 倍梯度稀释），共设置 9 个浓度梯度，将孔板中的培养基吸弃，按照每孔 100 μ L 的药物溶液加入到 96 孔板中，3 个复孔，并设立阴性对照和空白对照，置于 37°C，5%CO₂ 培养箱培养 72 小时。

3) 显色读板

取 CCK-8 显色液，每孔加入 10 μ L（孔内液体体积的 10%），37°C 孵育适宜时间（尽量使 OD 值在 1.0-2.5 范围内），96 孔板去掉培养板盖，置于酶标仪（Molecular Devices SpectraMax iD5），450nm 读数数值。

4) 数据处理

使用 GraphPad Prism 8.0.2 进行四参数拟合曲线，得到 IC₅₀ 值。

5) 实验结果与分析

实验结果：见表 23。由表 23 可知，CR202CC、CR202CF 和 CR202CI 对表达 FOLR1 和 PSMA 的各种瘤细胞具有很强的杀伤作用。

表 23. 化合物 IC₅₀ (nM)

IC ₅₀ (nM)	LNCap	SK-OV-3
CR202CC	0.3	/
CR202CF	/	31.5
CR202CI	/	0.3

实施例 11 CR20214、CR20295、CR202V6、CR202AL 的靶蛋白降解活性实验

[521] 细胞株信息：MDA-MB-231（人乳腺癌细胞）、22RV1（人前列腺癌细胞）

[522] 主要试剂耗材：

名称	厂家	货号
PBS(1×)	gibco	C100105OObt
RIPA Lysis and Extraction Buffer	Thermo	89901
Protease Inhibitor Cocktail	bimake	B14001
4×Laemmli sample buffer	BIO-RAD	161-0747
Precision Plus Protein™	BIO-RAD	161-0377
Tris-Glycine Transfer Buffer (pH8.3, 10×)	康为世纪	CW0044S
TBS (pH8.0, 10×)	康为世纪	CW0042
Nonfat Dry Milk	CST	#9999

GAPDH(D4C6R)Mouse mAb	CST	#97166
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	CST	#7076
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	CST	#7074
ExpressPlus™ PAGE Gels, 10×8, 4-20%, 15 wells	金斯瑞	M42015C
MOPS Running Buffer Liquid(20×)	金斯瑞	M00680-500
Clc-PARPity Max™ Western ECL Substrate	BIO-RAD	1705062
BCA 蛋白质定量试剂盒	TIANGEN	PA115

[523] 实验步骤:

[524] 蛋白样品的提取:

- 1) 取适量的 RIPA 裂解液, 在使用前数分钟加入 Protease Inhibitor Cocktail (1:100)。
- 2) 对细胞去除培养基, 用细胞刮刮下, 离心细胞, 预冷 PBS 洗两遍。按照每大皿 300 μ L 裂解液的比例加入裂解液。将离心管置于冰上, 用枪头吹打 5 分钟, 使裂解液和细胞充分接触。
- 3) 裂解 30 分钟后, 收集裂解液并转移到离心管中, 离心样品 15 分钟, 12000 $\times$ g 使细胞碎片成小球。
- 4) 将上清液转移到新的离心管中, 即可进行后续的 Western 操作。

[525] BCA 法浓度测定:

- 1) 4 $\times$ Laemmli sample buffer 中每 900 μ L 加入 100 μ L 巯基乙醇, 现配现用。
- 2) 稀释样品: 按 20 μ g~40 μ g 蛋白量每孔, 15~20 μ L 上样量每孔, 计算出所加裂解液体积、PBS 体积和 4 $\times$ loading buffer 体积, 三者充分混匀。
- 3) 变性样品: 90~95 $^{\circ}$ C 加热 5 分钟。

[526] ExpressPlus™ PAGE 电泳:

每孔加入适量蛋白质样品溶液, 挑选孔中加入预染标记 (marker) 蛋白质溶液做为电泳标记, 上样后在恒压 140V 条件下电泳直至溴酚兰跑胶底部为止。

[527] 转膜:

- 1) 先把硝酸纤维素膜用甲醇处理 5~10 秒，再用纯水处理 1~2 分钟，然后用转膜缓冲液 30 分钟平衡硝酸纤维素膜和厚滤纸各 30 分钟；
- 2) 将胶和硝酸纤维素膜夹于两层厚滤纸之间逐层铺平，做成“三明治”，并将其转移到湿转膜仪上，恒流 300 mA 2 小时；
- 3) 转膜结束后，用镊子将膜取出，按自己便于记忆的位置做好标记。

[528] 封闭：

将经 1×TBST 洗涤的硝酸纤维素膜浸没于用 1×TBST 缓冲液配制的 5% Nonfat Dry Milk 封闭液中，20~25 度孵育 2 小时；1×TBST 溶液洗膜 2 次，1×TBS 溶液洗膜 1 次，每次 5 分钟。

[529] 孵育一抗：

封闭完成后将配好一抗溶液和硝酸纤维素膜加入杂交袋中 4℃过夜；1×TBST 溶液洗膜 2 次，1×TBS 溶液洗膜 1 次，每次 5 分钟。

[530] 孵育二抗：

用稀释后的二抗孵育硝酸纤维素膜 1.5 小时后弃去多余的抗体溶液，1×TBST 溶液洗膜 2 次，1×TBS 溶液洗膜 1 次，每次 5 分钟。

[531] 显色曝光：

采用 HRP 标记的抗体耦联增强化学发光试剂进行显色，然后通过 X 射线胶片曝光，经过显影、水洗和定影后确定抗原-抗体（一抗）-抗体（二抗）在硝酸纤维素膜上的位置。用凝胶成像系统扫描 X 射线胶片上出现的条带，以 GAPDH 作为参照。

[532] 结果分析：由 Western Blot 实验结果可知（参见图 2-4），CR20214、CR20295、CR202V6 和 CR202AL 能快速降解靶蛋白。其中，CR20214 在 100 nM 浓度下，6 小时几乎能完全降解 BRD4 和 PLK1（图 2）。CR20295 在 100 nM 浓度下，6 小时几乎能够完全降解 BRD4 靶蛋白（图 3A）；当 CR20295 在 10 nM 浓度下，24 小时几乎能完全降解 BRD4（图 3B）。CR202V6 和 CR202AL 在 3 nM 浓度下，6 小时几乎能完全降解 BRD4 靶蛋白（图 4A），显示出优异的靶蛋白降解活性，24 小时仍然有较强的降解活性（图 4B）。

实施例 12 化合物对人肝癌 HepG2 细胞皮下移植肿瘤在 BALB/c 裸小鼠模型的药效学评价

[533] 实验目的：临床前评价 CR202 系列化合物对无 FOLR1 和 PSMA 受体表达的皮下 HepG2 肝细胞癌移植肿瘤模型在 BALB/c 裸小鼠体内的药效。

[534] 实验方案：将 0.1 mL (10×10^6 个) HepG2 细胞皮下接种于每只小鼠的右背侧，肿瘤平均体积达到 100-150 mm³ 时随机分组，设置模型对照组和给药组，在分组第一天开始给药。在给药开始前，称量所有动物的体重，并用游标卡尺测量肿瘤体积。肿瘤细胞接种后，常规监测包括了肿瘤生长及治疗对动物正常行为的影响，具体内容有实验动物的活动性，摄食和饮水情况，体重增加或降低情况，眼睛、被毛及其它异常情况。开始给药后，定期测量小鼠的体重和肿瘤的大小。肿瘤体积计算公式：肿瘤体积 (mm³) $V = 1/2 \times (a \times b^2)$ (其中 a 表示长径，b 表示短径)。肿瘤生长抑制率，TGI(%), 计算公式为： $TGI\% = (1 - T/C) \times 100\%$ (T 和 C 分别为治疗组和对照组在某一特定时间点的平均肿瘤体积) 实验分组与设计如下表 24 所示：

表 24. HepG2 动物模型实验分组和给药方案

组别	动物数	测试物	剂量 (mg/kg)	给药方式	给药体积 (ml/kg)	计划给药周期
1	6	对照	--	--	--	--
2	6	CR20274	4	iv	10	biw×3w
3	6	CR20282	12.5	iv	10	biw×3w
4	6	CR20282	12.5	iv	10	qw×3w

注：biw×3w 是指每周施药两次，持续 3 周（下同）；qw×3w 是指每周施药 1 次，持续 3 周（下同）。

[535] 实验结果分析：阴性对照组在分组后第 36 天平均瘤体积达到 1726.90 mm³。测试物 CR20274 在 4 mg/kg, biw×3 给药方案下未表现出一定的肿瘤生长抑制作用，在分组后第 36 天平均瘤体积达到 1329.84 mm³，TGI 值为 22.99%，与阴性对照组相比无显著性差异 (P=0.382)。测试物 CR20282 在 12.5 mg/kg, biw×3 和 12.5mg/kg, qw×3 的两种给药方案下未表现出一定的肿瘤生长抑制作用，与阴性对照组相比无显著性差异 (P=0.701)。具体可参见图 5A-图 5B。

[536] 测试物 CR20274 和 CR20282 在设定给药频率方案下对人肝癌模型 HepG2 荷瘤小鼠的肿瘤生长均未产生良好的抗肿瘤效果。而小鼠人肝癌模型 HepG2 为不表达 FOLR1 和 PSMA 的模型，由此可得出双配体 PROTAC 化合物在无相应靶点蛋白表达的动物模型中，无明显的抗肿瘤效果。

实施例 13 化合物对皮下异体移植人乳腺癌 MDA-MB-231 肿瘤模型的药效学评价

[537] 实验目的：临床前评价测试物 CR20274、CR20282 和 CR20285 在皮下人乳腺癌模型 MDA-MB-231 在 BALB/c 裸小鼠体内的药效学研究。

[538] 实验方案：将 MDA-MB-231 瘤块皮下接种于每只小鼠的右侧腋下，肿瘤平均体积达到 200 mm³ 时开始分组给药。在给药后，每天监测动物的健康状况及死亡情况，例行检查包括观察肿瘤生长和药物治疗对动物日常行为表现的影响行为活动，摄食摄水量，体重变化，外观体征或其它不正常情况。考察肿瘤生长是否被抑制、延缓或治愈。定期检测肿瘤体积。肿瘤体积的计算公式为： $V=1/2 \times (a \times b^2)$ ，a 和 b 分别表示肿瘤的长径和短径。肿瘤生长抑制率，TGI(%)，计算公式为： $TGI\% = (1-T/C) \times 100\%$ （T 和 C 分别为治疗组和对照组在某一特定时间点的平均肿瘤体积）。实验分组和给药方案见下表 25 所示：

表 25. MDA-MB-231 动物模型实验分组和给药方案

组别	动物数	测试物	剂量 (mg/kg)	给药方式	计划给药周期
1	6	对照	N/A	N/A	N/A
2	6	CR20274	4	iv	biw×3
3	6	CR20282	12.5	iv	qw×3
4	6	CR20282	12.5	iv	biw×3
5	6	CR20282	6	iv	biw×3
6	6	CR20285	12.5	iv	qw×3
7	6	CR20285	6	iv	biw×3

[539] 实验结果分析：人乳腺癌模型 MDA-MB-231 在荷瘤小鼠肿瘤体积变化请参见图 6A，人乳腺癌模型 MDA-MB-231 荷瘤小鼠相较初始体重随给药时间的变化参见图 6B。可见，CR20282 12.5 mg/kg biw×3 对小鼠异体移植结人乳腺癌模型 MDA-MB-231 的肿瘤生长产生了显著的抗肿瘤效果，且安全性较高。CR20282 12.5 mg/kg qw×3、CR20285 12.5 mg/kg qw×3、CR20285 6mg/kg biw×3、CR20282 3mg/kg biw×3 和 CR20285 3mg/kg biw×3 对小鼠异体移植结人乳腺癌模型 MDA-MB-231 的肿瘤也有一定的抗肿瘤效果。CR20274 4 mg/kg biw×3 对小鼠异体移植结人乳腺癌模型 MDA-MB-231 的肿瘤则没有抗肿瘤效果。该结果表明，相比于蛋白降解靶向嵌合体，连接有靶向分子的偶联体化合物能显著提高的抗肿瘤作用。

实施例 14 化合物对人前列腺癌 22RV1 细胞皮下移植肿瘤在 BALB/c 裸小鼠模型的药效学评价

[540] 实验目的：临床前评价化合物对治疗皮下 22RV1 细胞移植肿瘤模型（高表达

PSMA) 在 BALB/c 裸小鼠体内的药效学研究。

[541] 实验方案: 将 22RV1 瘤块皮下接种于每只小鼠的右背侧下, 肿瘤平均体积达到 150 mm³ 时开始分组给药。在给药后, 每天监测动物的健康状况及死亡情况, 例行检查包括观察肿瘤生长和药物治疗对动物日常行为表现的影响行为活动, 摄食摄水量, 体重变化, 外观体征或其它不正常情况。考察肿瘤生长是否被抑制、延缓或治愈。定期检测肿瘤体积。肿瘤体积的计算公式为: $V = 1/2 \times (a \times b^2)$, a 和 b 分别表示肿瘤的长径和短径。实验分组和给药方案见下表 26 所示:

表 26. 22RV1 动物模型中的给药途径、剂量及方案

组别	动物数	测试物	剂量 (mg/kg)	给药方式	给药体积 (ml/kg)	计划给药周期
1	6	对照	--	--	--	--
2	6	CR20274	4	iv	10	biw×3
3	6	CR20282	12.5	iv	10	biw×3
4	6	CR20293	12.5	iv	10	biw×3
5	6	CR20295	12.5	iv	10	biw×3
6	6	CR20297	12.5	iv	10	biw×3

[542] 实验结果分析: 人前列腺癌模型 22RV1 荷瘤小鼠相较初始体重随给药时间的变化情况请参见图 7A。本实验中, BALB/c 荷瘤裸小鼠对不同剂量的测试物耐受良好, 体重呈增长趋势, 实验期间无小鼠死亡。

[543] 人前列腺癌模型 22RV1 荷瘤小鼠肿瘤体积变化情况请参见图 7B。阴性对照组在分组后第 31 天平均瘤体积达到 1861.79 mm³。测试物 **CR20274** 在 4 mg/kg, biw×3 给药方案下未表现出一定的肿瘤生长抑制作用, 在分组后第 31 天平均瘤体积达到 1274.47 mm³, TGI 值为 31.55%, 与阴性对照组相比无显著性差异 (P>0.05)。测试物 **CR20282** 在 12.5 mg/kg, biw×3 给药方案下表现出极显著的肿瘤生长抑制作用, 在分组后第 31 天平均瘤体积达到 21.22 mm³, TGI 值为 98.86%, 与阴性对照组相比呈显著性差异 (P<0.001)。测试物 **CR20293** 在 12.5 mg/kg, biw×3 给药方案下表现出极显著的肿瘤生长抑制作用, 在分组后第 31 天平均瘤体积达到 46.32 mm³, TGI 值为 97.51%, 与阴性对照组相比呈显著性差异 (P<0.001)。测试物 **CR20295** 在 12.5 mg/kg, biw×3 给药方案下表现出极显著的肿瘤生长抑制作用。在分组后第 31 天平均瘤体积达到 86.32 mm³, TGI 值为 95.36%, 与阴性对照组相比呈显著性差异 (P<0.001)。测试物 **CR20297** 在 12.5 mg/kg, biw×3 给药方案下表现出极显著的肿瘤生长抑

制作用，在分组后第 31 天肿瘤完全消退，TGI 值为 100.00%，与阴性对照组相比呈显著性差异（ $P<0.001$ ）。

[544] 可见，相比对照组和 CR20274，测试物 CR20282、CR20293、CR20295 和 CR20297 对人前列腺癌模型 22RV1 荷瘤小鼠的肿瘤生长均产生显著的抗肿瘤效果；且 BALB/c 荷瘤裸小鼠对上述测试物耐受良好，体重呈增长趋势，实验期间无小鼠死亡。

实施例 15 化合物对人前列腺癌 C4-2 细胞皮下移植肿瘤在 NCG 小鼠模型的药效学评价

[545] 实验目的：临床前评价化合物对治疗皮下 C4-2 细胞移植肿瘤模型（高表达 PSMA）在 NCG 小鼠体内的药效影响。

[546] 实验方案：将 C4-2 细胞皮下接种于每只小鼠的右背侧，肿瘤平均体积达到 100-150 mm³ 时分组给药，给药后，常规监测包括肿瘤生长及治疗对动物正常行为的影响，具体内容有实验动物的活动性，摄食和饮水情况，体重增加或降低情况，眼睛、被毛及其它异常情况。试验过程中观察到的临床症状均记录在原始数据中。开始给药后，定期测量小鼠的体重和肿瘤的大小。肿瘤体积的计算公式为： $V = 1/2 \times (a \times b^2)$ ，a 和 b 分别表示肿瘤的长径和短径。实验分组和给药方案见下表 27 所示：

表 27. C4-2 动物模型中的给药途径、剂量及方案

组别	动物数	测试物	剂量 (mg/kg)	给药方式	给药体积 (ml/kg)	计划给药周期
1	5	对照	--	--	--	--
2	5	CR20274	4	i.v	10	biw×3w
3	5	CR20282	12.5	i.v	10	biw×3w
4	5	CR20285	12.5	i.v	10	biw×3w
5	5	CR20293	12.5	i.v	10	biw×3w
6	5	CR20295	12.5	i.v	10	biw×3w
7	5	CR20297	12.5	i.v	10	biw×3w

[547] 实验结果分析：小鼠人前列腺癌模型 C4-2 荷瘤小鼠相较初始体重随给药时间的变化情况请参见图 8A。本实验中，BALB/c 荷瘤裸小鼠对不同剂量的测试物耐受良好，体重呈增长趋势，实验期间基本无小鼠死亡。

[548] 小鼠人前列腺癌模型 C4-2 荷瘤小鼠相较初始体重随给药时间的变化情况请参见图 8B。阴性对照组在分组后第 23 天平均瘤体积达到 1748.61 mm³。测试物 CR20274 在 4

mg/kg, biw×3 给药方案下未表现出一定的肿瘤生长抑制作用, 在分组后第 23 天平均瘤体积达到 2198.07 mm³, TGI 值为-25.70%, 与阴性对照组相比无显著性差异 (P>0.05)。测试物 **CR20282** 在 12.5mg/kg, biw×3 给药方案下表现出一定的肿瘤生长抑制作用, 在分组后第 23 天平均瘤体积达到 557.12 mm³, TGI 值为 68.14%, 与阴性对照组相比呈显著性差异 (P<0.01)。测试物 **CR20293** 在 12.5 mg/kg, biw×3 给药方案下表现出一定的肿瘤生长抑制作用, 在分组后第 23 天平均瘤体积达到 778.70 mm³, TGI 值为 55.47%, 与阴性对照组相比呈显著性差异 (P<0.05)。测试物 **CR20295** 在 12.5 mg/kg, BIW×3 给药方案下表现出一定的肿瘤生长抑制作用。在分组后第 23 天平均瘤体积达到 415.38 mm³, TGI 值为 76.25%, 与阴性对照组相比呈显著性差异 (P<0.001)。测试物 **CR20297** 在 12.5 mg/kg, biw×3 给药方案下表现出优异的肿瘤生长抑制作用, 在分组后第 23 天平均瘤体积达到 300.72 mm³, TGI 值为 82.80%, 与阴性对照组相比呈显著性差异 (P<0.001)。

[549] 综上所述, 相比对照组和 CR20274, 测试物 CR20282、CR20293、CR20295 和 CR20297 对小鼠人前列腺癌模型 C4-2 的肿瘤生长均表现出比较好的抗肿瘤效果和安全性。

实施例 16: 化合物对 HT-29 细胞皮下移植肿瘤在 BALB/c 裸小鼠模型的药效学评价

[550] 实验目的: 临床前评价 CR202 系列化合物对治疗皮下 HT-29 细胞移植肿瘤模型在 BALB/c nude 小鼠体内的药效影响。

[551] 实验方案: 将: HT-29 细胞皮下接种于每只小鼠的右背侧, 肿瘤平均体积达到 100-150 mm³ 时分组给药, 给药后, 常规监测包括肿瘤生长及治疗对动物正常行为的影响, 具体内容有实验动物的活动性, 摄食和饮水情况, 体重增加或降低情况, 眼睛、被毛及其它异常情况。试验过程中观察到的临床症状均记录在原始数据中。开始给药后, 定期测量小鼠的体重和肿瘤的大小。肿瘤体积的计算公式为: $V = 1/2 \times (a \times b^2)$, a 和 b 分别表示肿瘤的长径和短径。实验分组和给药方案见下表 28 所示:

表 28. HT-29 动物模型中的给药途径、剂量及方案

组别	动物数	测试物	剂量 (mg/kg)	给药方式	计划给药周期
1	6	对照	--	--	--
2	6	CR20274	2	i.v	biw×3w
3	6	CR20274	4	i.v	biw×3w
4	6	CR20282	6	i.v	biw×3w
5	6	CR20282	12.5	i.v	biw×3w

6	6	CR202EZ	10.4	<i>i.v</i>	biw×3w
7	6	CR202EZ	21.6	<i>i.v</i>	biw×3w
8	6	CR202HR	10.9	<i>i.v</i>	biw×3w
9	6	CR202HR	22.7	<i>i.v</i>	biw×3w

[552] 实验结果与分析：本实验中，CR20282，CR202EZ，CR202HR 与等摩尔剂量的 CR20274 相比，在低剂量和高剂量下均表现良好的抑瘤率和安全性（参见图 9A-9B）。给药组小鼠耐受性良好，体重呈增长趋势，实验期间无小鼠异常死亡。阴性对照组在分组后第 25 天平均瘤体积达到 2079.64 mm³，实施安乐死。

[553] 测试物 CR20274 在 2 mg/kg, BIW×3 给药方案下表现出一定的肿瘤生长抑制作用。在分组后第 25 天平均瘤体积达到 1575.84 mm³，TGI 值为 24.23%，与阴性对照组相比差异不显著（P>0.05）。

[554] 测试物 CR20274 在 4 mg/kg, BIW×3 给药方案下表现出一定的肿瘤生长抑制作用。在分组后第 25 天平均瘤体积达到 1316.64 mm³，TGI 值为 36.69%，与阴性对照组相比差异不显著（P>0.01）。

[555] 测试物 CR20282 在 6 mg/kg, BIW×3 给药方案下表现出一定的肿瘤生长抑制作用。在分组后第 25 天平均瘤体积达到 971.53 mm³，TGI 值为 53.28%，与阴性对照组相比呈显著性差异（P<0.001）。

[556] 测试物 CR20282 在 12.5 mg/kg, BIW×3 给药方案下表现出一定的肿瘤生长抑制作用。在分组后第 25 天平均瘤体积达到 670.36 mm³，TGI 值为 67.77%，与阴性对照组相比呈显著性差异（P<0.001）。

[557] 测试物 CR202EZ 在 10.4 mg/kg, BIW×3 给药方案下未表现出一定的肿瘤生长抑制作用。在分组后第 25 天平均瘤体积达到 1082.77 mm³，TGI 值为 47.93%，与阴性对照组相比呈显著性差异（P<0.001）。

[558] 测试物 CR202EZ 在 21.6 mg/kg, BIW×3 给药方案下表现出一定的肿瘤生长抑制作用。在分组后第 25 天平均瘤体积达到 691.438mm³，TGI 值为 66.75%，与阴性对照组相比呈显著性差异（P<0.001）。

[559] 测试物 CR202HR 在 10.9 mg/kg, BIW×3 给药方案下表现出优异的肿瘤生长抑制作用。在分组后第 25 天平均瘤体积达到 946.05 mm³，TGI 值为 54.51%，与阴性对照组相比

呈显著性差异（ $P<0.001$ ）。

[560] 测试物 CR202HR 在 22.7 mg/kg，BIW×3 给药方案下表现出优异的肿瘤生长抑制作用。在分组后第 25 天平均瘤体积达到 614.73 mm³，TGI 值为 70.44%，与阴性对照组相比呈显著性差异（ $P<0.001$ ）。

[561] 综上所述，测试物 CR20282、CR202EZ、CR202HR 对小鼠皮下移植人结直肠癌模型 HT-29 的肿瘤生长均表现较好的抗肿瘤效果且呈明显的剂量相关。

实施例 17：化合物在人前列腺癌 22Rv-1 细胞株皮下异种移植 BALB/c Nude 雄性小鼠模型中的药效学评价

[562] 实验目的：临床前评价 CR202 系列化合物在人源前列腺癌 22Rv-1 细胞株皮下异种移植 BALB/c Nude 雄性小鼠模型中的抗肿瘤作用。

[563] 实验方案：22Rv-1（CL-00458）细胞培养在含 10%胎牛血清的 PRMI1640 培养液中。收集指数生长期的 22Rv-1 细胞，PBS 重悬至适合浓度用于裸鼠皮下肿瘤接种。实验小鼠于右侧背部皮下接种 1×10^7 22Rv-1 细胞，细胞重悬在 1:1 的 PBS 与基质胶中（0.1 mL/只）定期观察肿瘤生长情况，待肿瘤生长至平均体积 100-150 mm³ 时根据肿瘤大小随机分组给药。给药后，常规监测包括肿瘤生长及治疗对动物正常行为的影响，具体内容有实验动物的活动性，摄食和饮水情况，体重增加或降低情况，眼睛、被毛及其它异常情况。试验过程中观察到的临床症状均记录在原始数据中。开始给药后，定期测量小鼠的体重和肿瘤的大小。肿瘤体积的计算公式为： $V = 1/2 \times (a \times b^2)$ ，a 和 b 分别表示肿瘤的长径和短径。实验分组和给药方案见下表 29 所示：

表 29. 22Rv-1 动物模型中的给药途径、剂量及方案

组别	动物数	测试物	剂量 (mg/kg)	给药方式	计划给药周期
1	6	对照	--	--	--
2	6	CR202LB	2.87	i.v	biw×3w
3	6	CR202HT	2.88	i.v	biw×3w

[564] 实验结果与分析：本实验中人源前列腺癌 22Rv-1 在荷瘤小鼠肿瘤体积变化请参见图 10A，人源前列腺癌 22Rv-1 荷瘤小鼠相较初始体重随给药时间的变化参见图 10B。由此可见，CR202LB 和 CR202HT 均表现良好的抑瘤率和安全性。给药组小鼠耐受性良好，体重

呈增长趋势,实验期间无小鼠异常死亡。阴性对照组在分组后第 29 天平均瘤体积达到 1651.17 mm³, 实施安乐死。

[565] 测试物 CR202LB 在 2.87 mg/kg, BIW×3 给药方案下表现出一定的肿瘤生长抑制作用。在分组后第 29 天平均瘤体积达到 969.46 mm³, TGI 值为 41.29%, 与阴性对照组相比呈显著性差异 (P<0.001)。

[566] 测试物 CR202HT 在 2.88 mg/kg, BIW×3 给药方案下表现出一定的肿瘤生长抑制作用。在分组后第 29 天平均瘤体积达到 690.37 mm³, TGI 值为 58.19%, 与阴性对照组相比呈显著性差异 (P<0.001)。

[567] 综上所述, CR202LB 和 CR202HT 化合物对小鼠皮下移植人源前列腺癌 22Rv-1 的肿瘤生长均表现较好的安全性和一定的抗肿瘤效果。

[568] 与上述实验方法类似, 检测本申请其他偶联化合物的抑瘤作用。实验结果显示, 本申请其他偶联化合物均具有一定的抑瘤作用, 且偶联化合物的抑瘤效果优于裸药。

[569] 实施例 18: 化合物在人结直肠癌 HT-29 细胞株皮下异种移植 BALB/c Nude 雄性小鼠模型中的单次 PK 评价

[570] 实验目的: 化合物 CR20214 和 CR20274 在人结直肠癌 HT-29 细胞株皮下异种移植 BALB/c Nude 雄性小鼠模型中的单次 PK 评价。

[571] 实验方案: 将 HT-29 细胞系接种于每只小鼠 (购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司, 体重 20-25g, 雄性, 年龄 45-60 天) 的右背侧皮下, 肿瘤平均体积达到约 300 mm³ 时分组。HT-29 荷瘤小鼠以尾静脉注射的方式, 分别单次给予 6.25 mg/kg 的 CR20214 和 2 mg/kg 的 CR20274。给药后分别于 0.833、0.25、0.5、1、2、4、8、24、48 和 72 小时取肿瘤, 并将肿瘤研磨后取匀浆液进行液液萃取, 取离心后上清液注入三重四级杆串联质谱仪, 定量测定 CR20274 在肿瘤中的含量, 见表 30 所示。

表 30. CR20214 和 CR20274 在肿瘤组织中的浓度 (nmol/g)

时间 (h)	CR20214 在肿瘤中释放 CR20274 的浓度 (C1)	CR20274 在肿瘤中的浓度(C2)	C1/C2
0.0833	0.044	0.227	0.19
0.25	0.060	0.206	0.29
0.5	0.164	0.222	0.74
1	0.108	0.191	0.57

WO 2023/202654		PCT/CN2023/089422	
2	0.191	0.180	1.06
4	0.265	0.164	1.62
8	0.353	0.154	2.29
24	0.271	0.104	2.61
48	0.166	0.064	2.59
72	0.133	0.044	3.02

[572] 实验结果与分析：在等摩尔剂量给药条件下，在肿瘤组织中，CR20214 比 CR20274 具有更高的浓度，显示了 CR20214 具有更好的靶向能力。

权 利 要 求 书

1. 一种偶联体化合物或其药学上可接受的盐，所述偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含至少两个特异性结合细胞表面蛋白的配体的靶向分子和与所述靶向分子连接的有效载荷，其中所述有效载荷为蛋白降解靶向嵌合体。
2. 根据权利要求1所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，所述靶向分子结合以下细胞表面蛋白：FOLR1、TRPV6、PSMA、LHRH、EGFR、Her2、Trop2、Her3、Claudin18.2、c-Met 或其任意组合。
3. 根据权利要求1或2所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，所述靶向分子结合以下细胞表面蛋白：FOLR1、TRPV6、PSMA、c-Met 或其任意组合。
4. 根据权利要求1-3中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，所述靶向分子结合以下细胞表面蛋白组合：FOLR1 和 TRPV6；FOLR1 和 PSMA；TRPV6 和 PSMA；TRPV6 和 c-Met；FOLR1 和 c-Met；PSMA 和 c-Met；FOLR1、TRPV6 和 PSMA；FOLR1、TRPV6 和 c-Met；FOLR1、PSMA 和 c-Met；TRPV6、PSMA 和 c-Met；或 FOLR1、PSMA、TRPV6 和 c-Met。
5. 根据权利要求1-4中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，所述靶向分子包含两种配体且分别结合 FOLR1 和 TRPV6、FOLR1 和 PSMA、TRPV6 和 PSMA、FOLR1 和 c-Met、PSMA 和 c-Met 或 TRPV6 和 c-Met。
6. 根据权利要求2-5中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述结合 FOLR1 的配体包括叶酸或其类似物和蝶酸，优选地，所述叶酸类似物选自 5-甲基四氢叶酸、5-甲酰基四氢叶酸、10-甲酰四氢叶酸甲氨蝶呤、5,10-甲酰四氢叶酸、5,10-亚甲基四氢叶酸、氨基蝶呤和雷替曲塞。
7. 根据权利要求2-6中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述结合 TRPV6 的配体包括由 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列、由 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列、或与 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 2 具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列。

氨酸残基；优选地，残基 Cys^a 与 Cys^b 以及 Cys^c 与 Cys^d 分别环化形成两个独立的二硫键。

11. 根据权利要求 2-10 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述结合 c-MET 的配体包括由 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列

Ala-Gly-Ser-Cys^a-Tyr-Cys^c-Ser-Gly-Pro-Pro-Arg-Phe-Glu-Cys^d-Trp-Cys^b-Tyr-Glu-Thr-Glu-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Lys，其中 Cys^{a-d} 各自为半胱氨酸残基，优选地，残基 Cys^a 与 Cys^b 以及 Cys^c 与 Cys^d 分别环化形成两个独立的二硫键，可选的，末端赖氨酸的羧基可以被酰胺化；可选的，N 末端的丙氨酸可以被乙酰化。

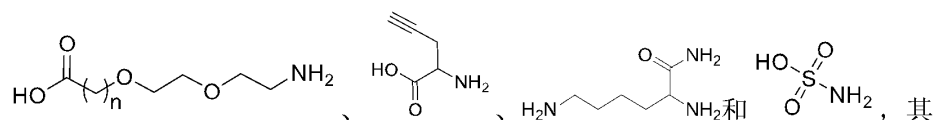
12. 根据权利要求 2-11 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述结合 c-MET 的配体包括与 SEQ ID NO: 4 具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 序列同一性的氨基酸序列，并且其中 Cys^{a-d} 各自为半胱氨酸残基，优选地，残基 Cys^a 与 Cys^b 以及 Cys^c 与 Cys^d 分别环化形成两个独立的二硫键。

13. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述配体直接连接或者通过间隔区相互连接，优选的，所述连接通过脱水缩合的方式进行。

14. 根据权利要求 13 所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述间隔区包含选自下组的氨基酸或氨基酸组合：Lys、Cys、Lys-Cys、Cys-Cys、Lys-Cys-Lys、Arg-Arg、Ala-Ser-Asn、Ala-Ala-Ala、Ser-Ser-Arg、Pro-Arg、Asp-Asp-Lys-Cys、和 Pro-Leu-Gly，任选的，所述氨基酸可以被酰胺化。

15. 根据权利要求 14 所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中 Lys 被酰胺化，例如酰胺化成为 2,6-二氨基己酰胺。

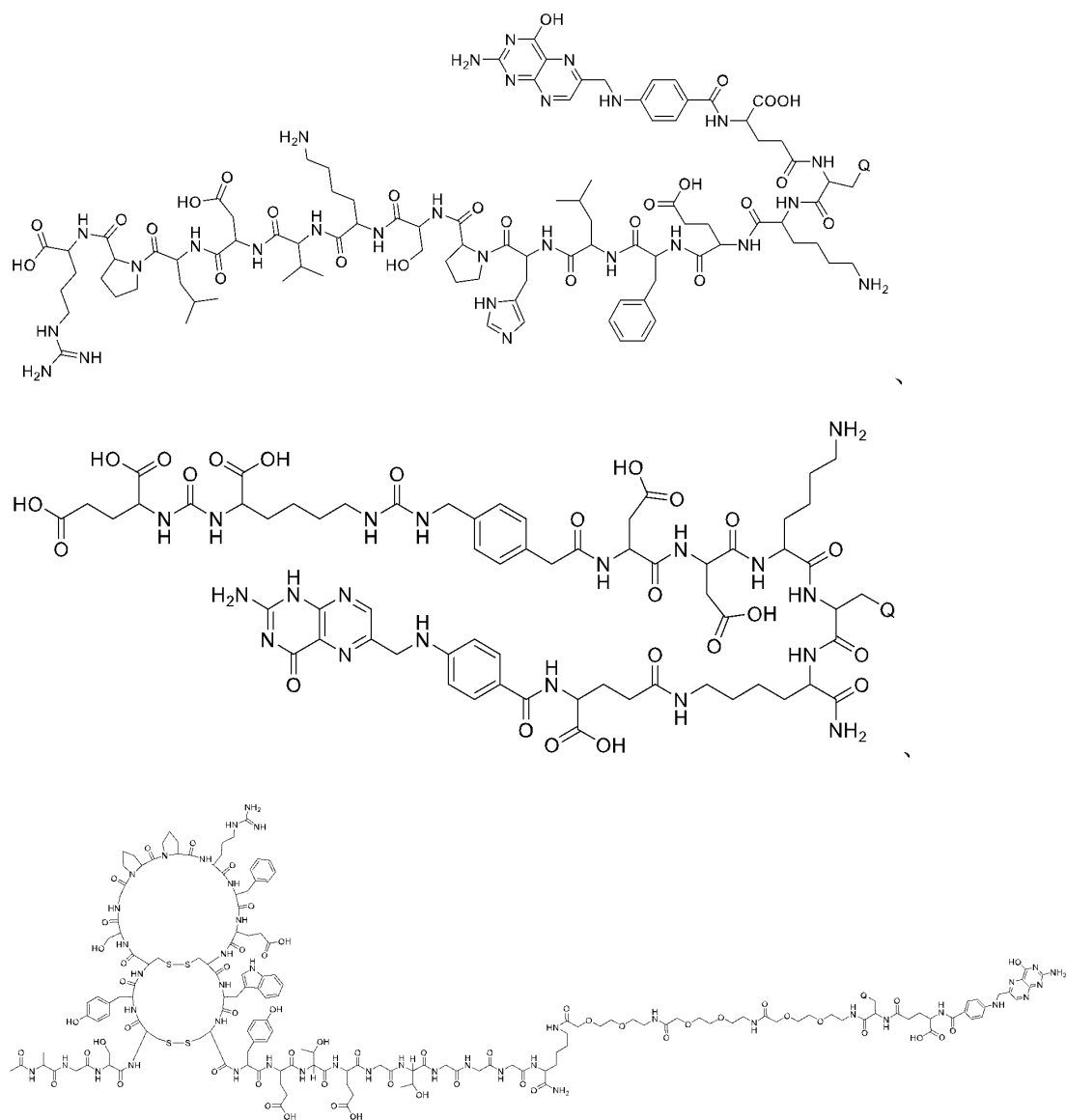
16. 根据权利要求 13 所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述间隔区包含一个或多个相同或不同的选自下组的化合物通过脱水缩合形成：



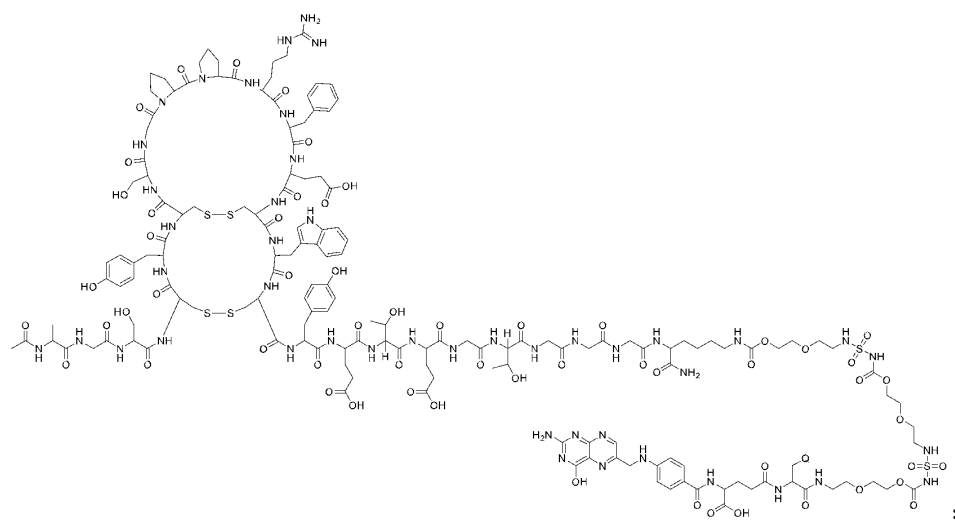
中 n 为 0 或 1。

17. 根据权利要求 1-16 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，

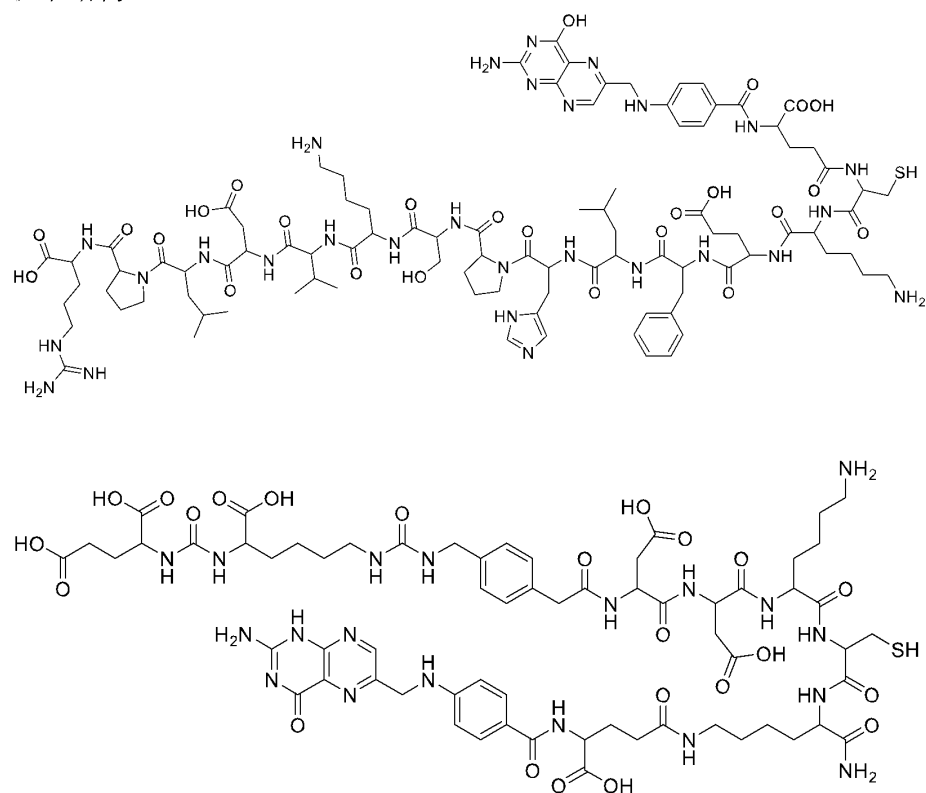
其中具有以下结构的靶向分子与有效载荷进行连接以形成偶联体化合物：

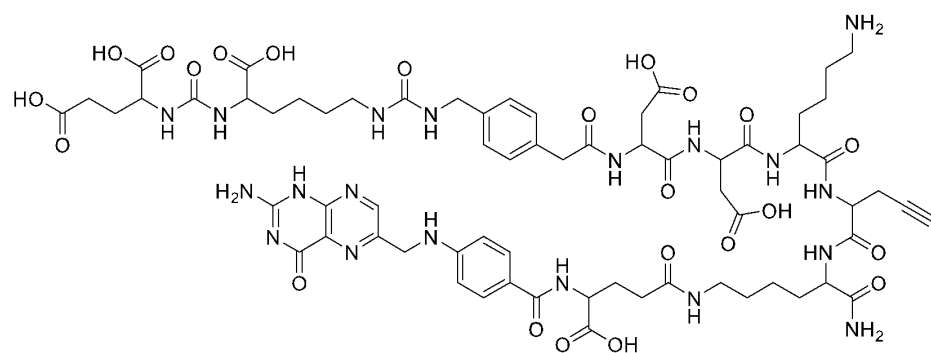


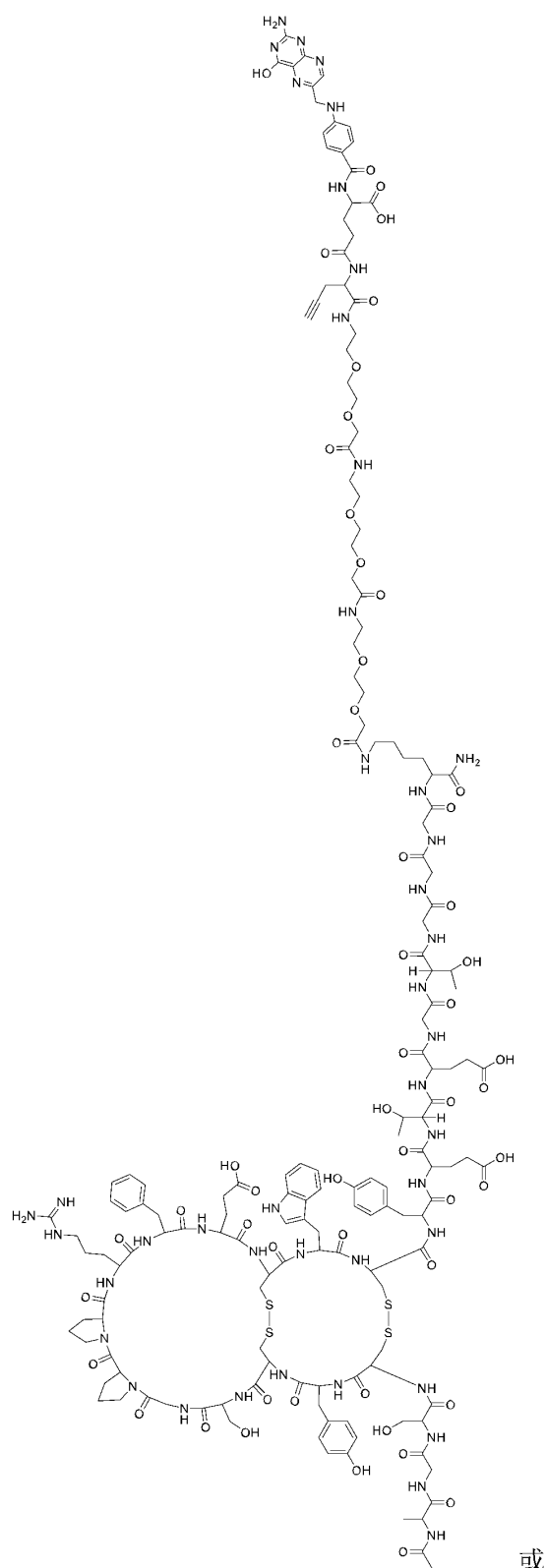
或



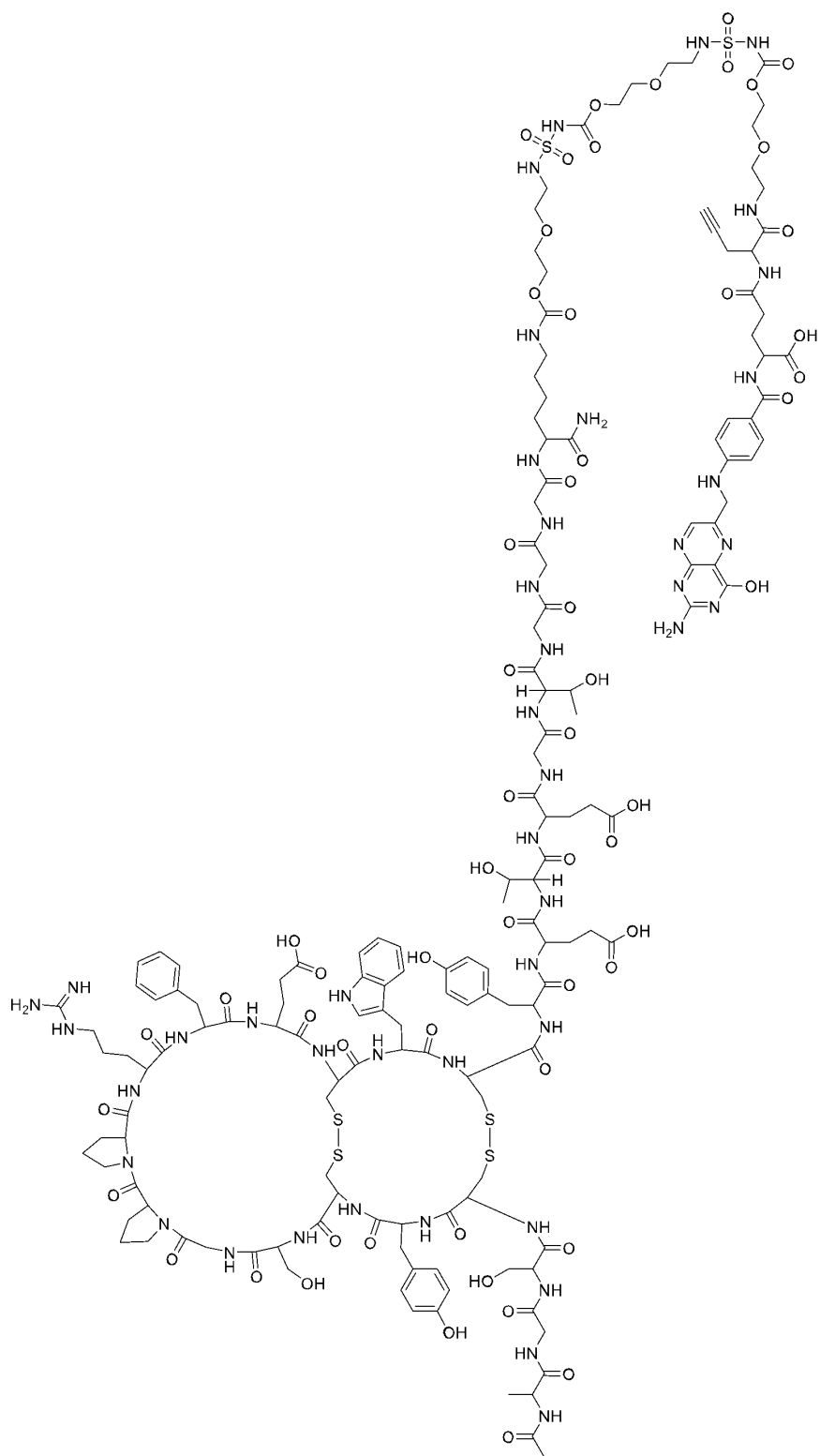
其中，Q 为活性基团，所述靶向分子通过其活性基团 Q 与有效载荷进行连接；优选地，所述活性基团 Q 为炔基或巯基；优选地，所述靶向分子具有以下结构：



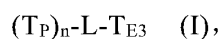




或



18. 根据权利要求 1-17 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中具有式 (I) 所示结构的蛋白降解靶向嵌合体与靶向分子进行连接以形成偶联体化合物：



其中，

所述 T_P 为结合靶蛋白的靶蛋白配体部分，其中 n 为 1、2 或 3；

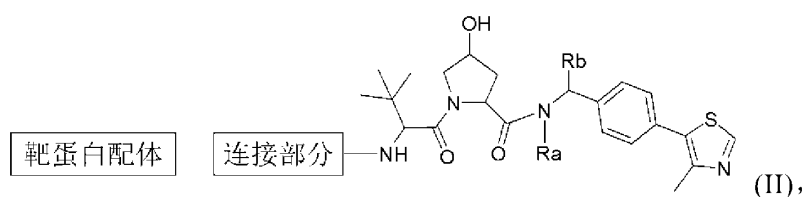
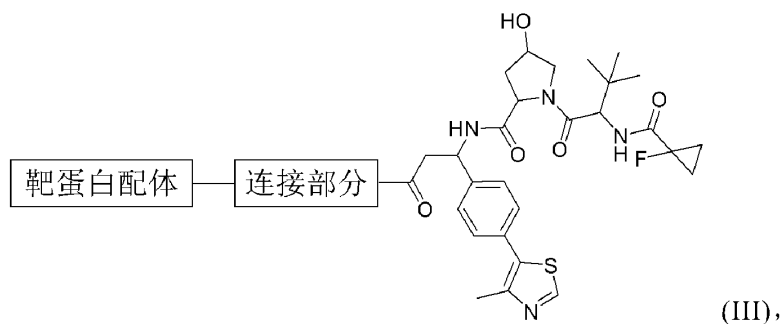
所述 L 为连接 T_P 和 T_{E3} 的连接部分；

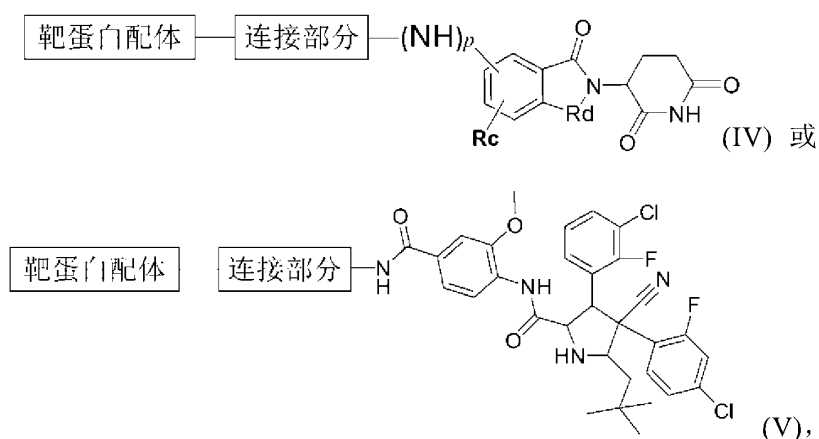
所述 T_{E3} 为结合 E3 连接酶的 E3 连接酶配体部分。

19. 根据权利要求 18 所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述 E3 连接酶配体结合 VHL (von Hippel-Lindau) 蛋白、CRBN (cereblon) 蛋白、MDM2 蛋白或 XIAP 蛋白；优选地，所述 E3 连接酶配体为 VHL 配体或 CRBN 配体。

20. 根据权利要求 19 所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述 VHL 配体为 VHL-L 或其类似物，所述 CRBN 配体为来那度胺、泊马度胺、沙利度胺或其类似物。

21. 根据权利要求 18-20 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述蛋白降解靶向嵌合体具有选自以下组的结构：





其中,

Ra、Rb 和 Rc 各自独立地为氢、烷基、NH₂、OH、或卤素, 优选地, 所述烷基为甲基, 所述卤素为氟;

Rd 为 CH₂、C=O 或 C=S;

p 为 0 或 1;

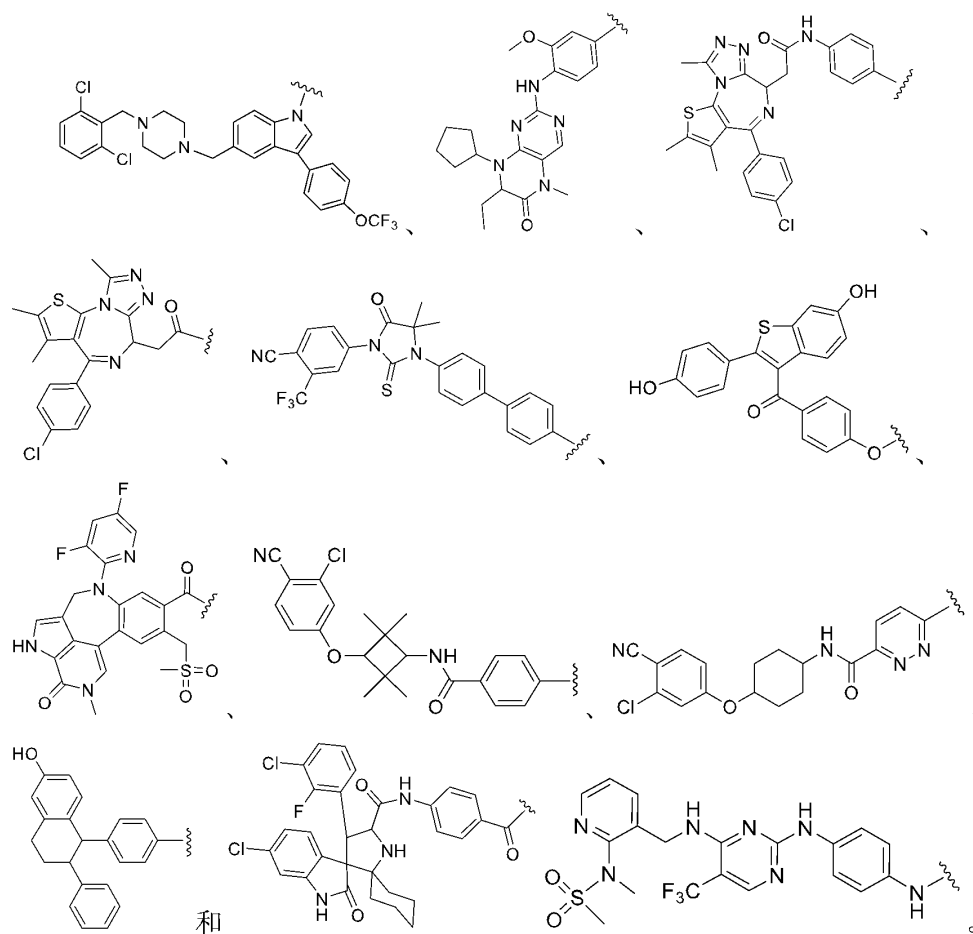
所述靶蛋白配体能结合特定的靶蛋白;

所述靶蛋白配体通过所述连接部分连接至 E3 连接酶基团。

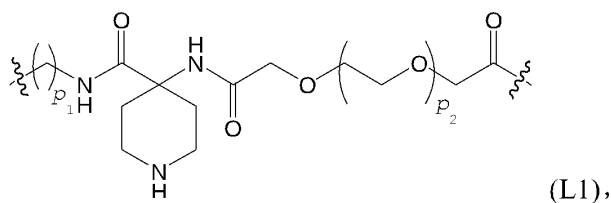
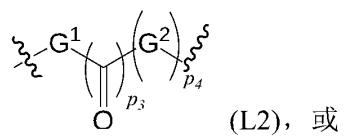
22. 根据权利要求 18-21 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐, 其中所述靶蛋白为核受体 (例如, AR 和 ER)、激酶类蛋白 (例如, RIPK2、BCR-ABL、EGFR、HER2、c-Met、TBK1、CDK2/4/6/9、ALK、Akt、CK2、ERK1/2、FLT3、PI3K、BTK 和 FAK) AKT、PAN-BET 蛋白、BET 蛋白 (例如, BRD2、BRD3、BRD4 和 BRD6)、BLK、BRAF1、BCL-xl、ERR α 、FKBP12、FRS2 α 、JAK1、JAK3、IKZF1、IRAK4、MDM2、MetAP2、PLK1、PSK-J3、RAS、TACC3、Tau、TrkB、MDM2 或其任意组合物。

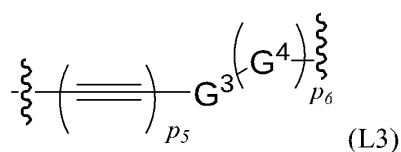
23. 根据权利要求 18-22 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐, 其中所述靶蛋白为 AR 蛋白、ER 蛋白、RAS 蛋白、BRD4 蛋白、PLK1 蛋白、FAK 蛋白、MDM2 蛋白或其任意组合物。

24. 根据权利要求 18-23 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐, 其中所述靶蛋白配体部分具有选自以下的结构:



25. 根据权利要求18-24中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述连接部分具有选自下组的结构：





其中,

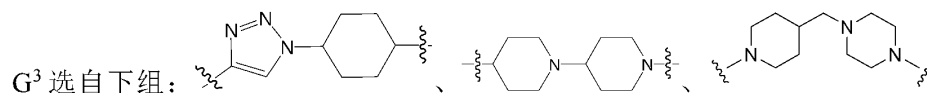
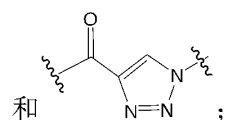
p_1 为 0-4 的整数;

p_2 为 0-6 的整数;

p_3 、 p_4 、 p_5 和 p_6 各自独立地为 0 或 1;

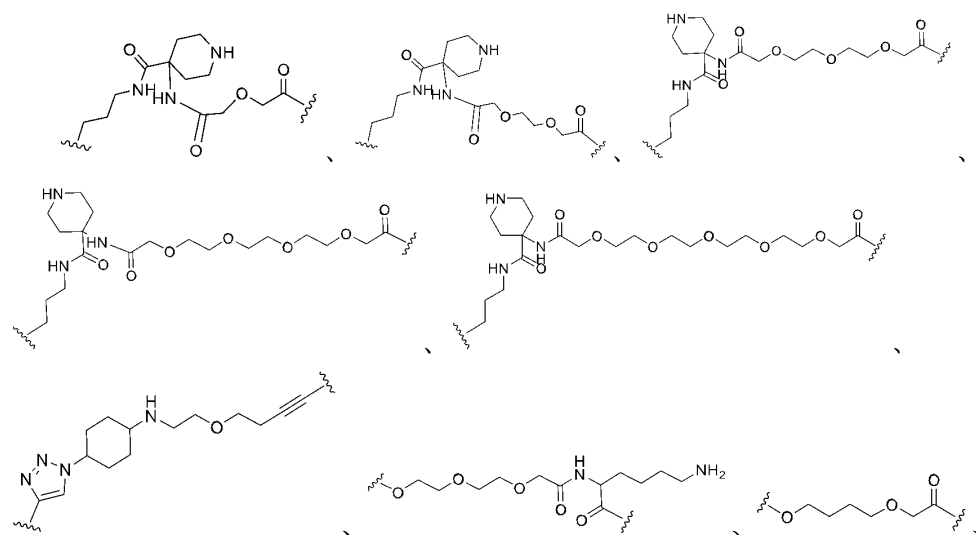
G^1 为 4-14 元直链亚烷基, 任选地, 所述 4-14 元直链亚烷基中的 2-5 个碳原子可以被 -O-、-NH-、-N(C₁₋₆ 烷基)-或 -C≡C- 取代;

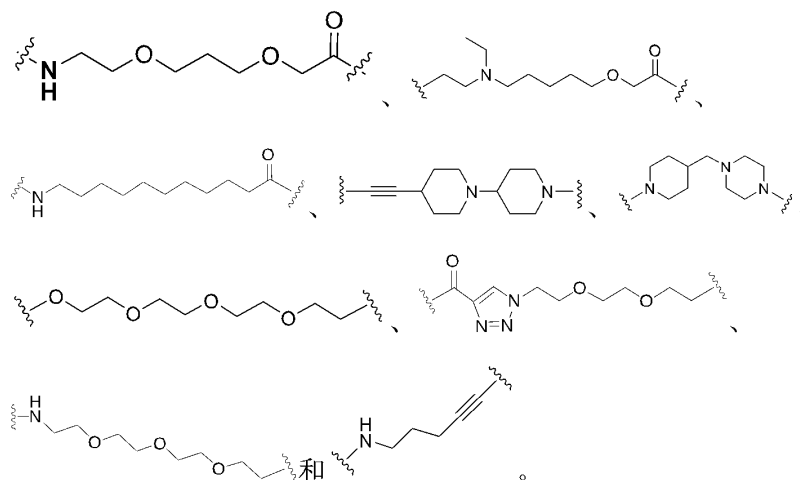
G^2 为氨基酸残基, 其中优选地, 所述 G^2 为 Lys 残基;



G^4 为 5-9 元直链亚烷基, 任选地, 所述 5-9 元直链亚烷基中的 2-4 个碳原子可以被 -O-、-NH-、-N(C₁₋₆ 烷基)-或 -C≡C- 取代。

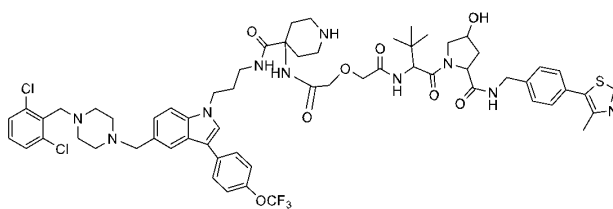
26. 根据权利要求 18-25 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐, 其中所述连接部分具有选自下组的结构:



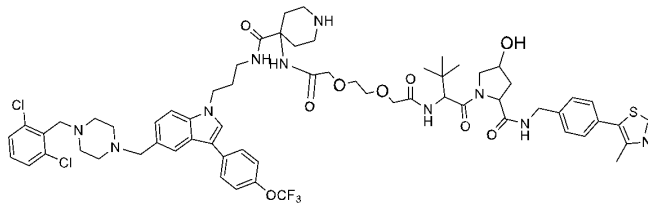


27. 根据权利要求 18-26 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中蛋白降解靶向嵌合体具有如下所示的结构：

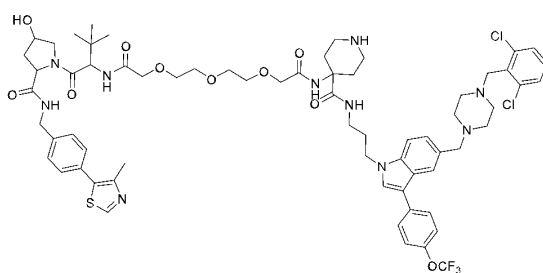
CR202CC



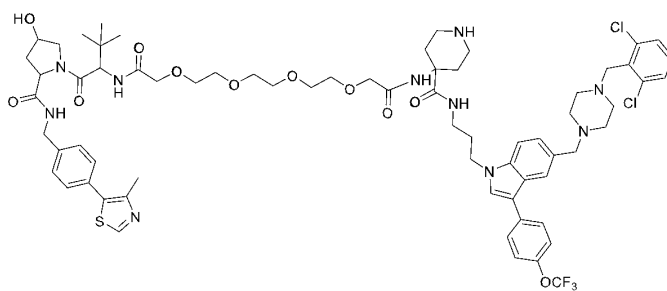
CR202CF



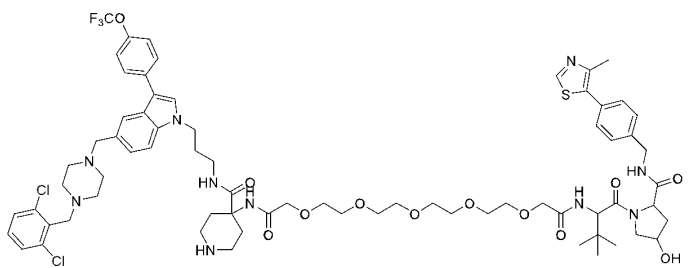
CR202CI



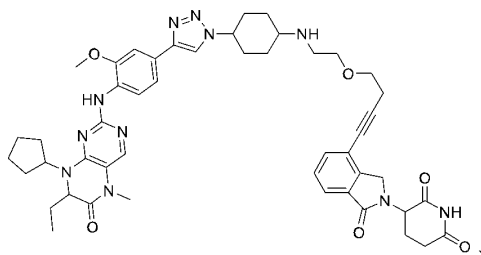
CR202CL



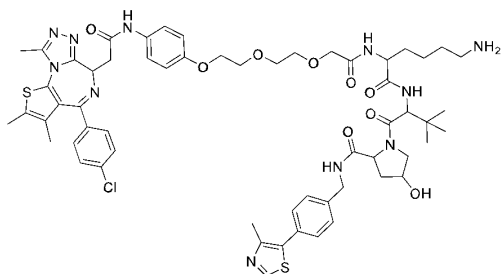
CR202CP



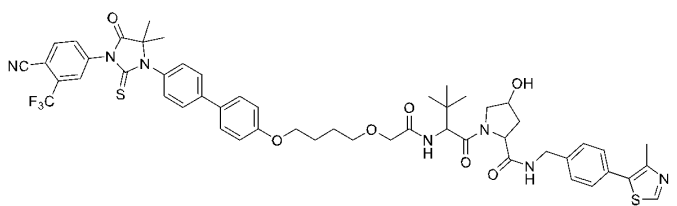
CR20274



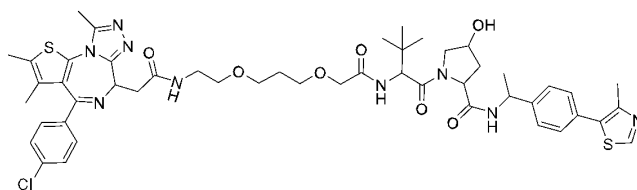
CR202EE



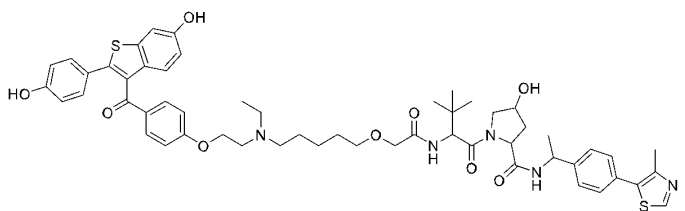
CR202Z5



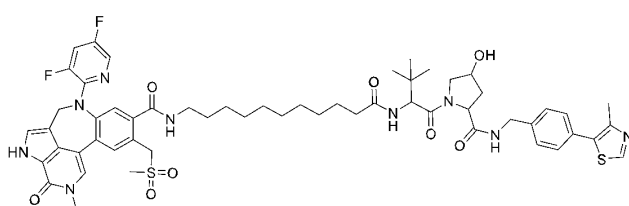
CR202ES



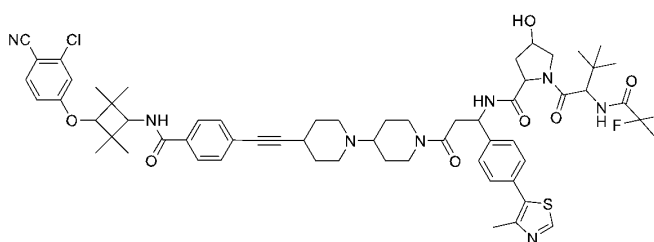
CR202Z7



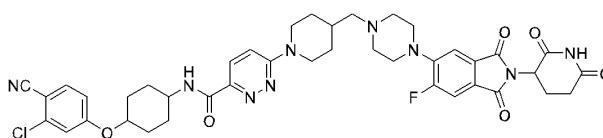
CR202Z8



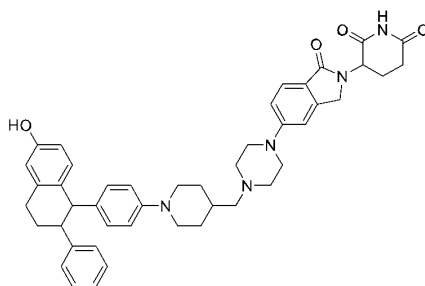
CR202Z9



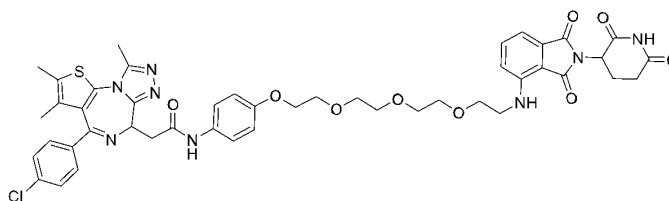
CR202Z1



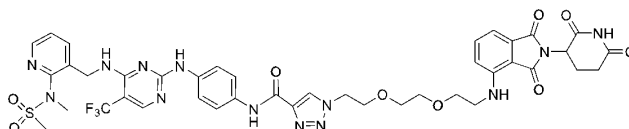
CR202Z2



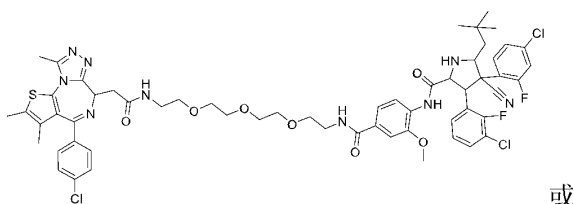
CR202Z3



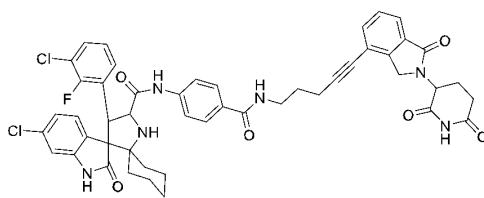
CR202Z4



CR202Y2



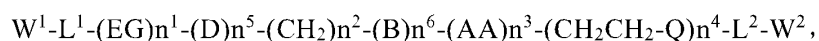
CR202Y4



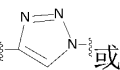
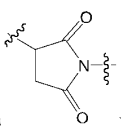
28. 根据权利要求 1-27 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述有效载荷与所述靶向分子直接连接、或所述有效载荷通过连接子与所述靶向分子连接。

29. 根据权利要求 1-28 所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述有效载荷与所述靶向分子之间、所述有效载荷与所述连接子之间、或所述连接子与所述靶向分子之间的连接是通过化学反应完成的；优选地，所述靶向分子与所述连接子之间的连接是通过 click 反应完成的。

30. 根据权利要求 1-29 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述偶联体化合物具有以下结构



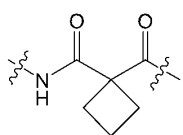
其中，

L^1 为  或 、-S-S-或键；

EG 为 -CH₂CH₂O-或-OCH₂CH₂-； n^1 是 0-6 的整数；

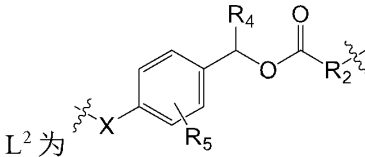
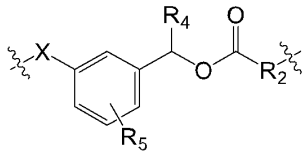
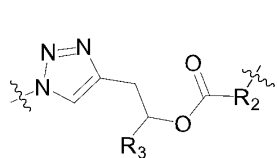
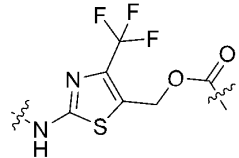
n^2 是 0-8 的整数；

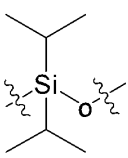
D 为 -C(=O)-NH-S(=O)₂-NH-； n^5 为 0 或 1；

B 每次出现时独立地为 -C(=O)-、、-NH-CH₂CH₂-C(=O)-、-C(=O)-NH-；-CH(CH₃)-CH₂-O-、-CH₂CH₂O-、-NH-C(=O)-或-NH-； n^6 为 0-3 的整数；

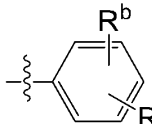
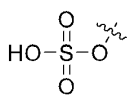
AA 每次出现时独立地为氨基酸残基； n^3 是 0-5 的整数；

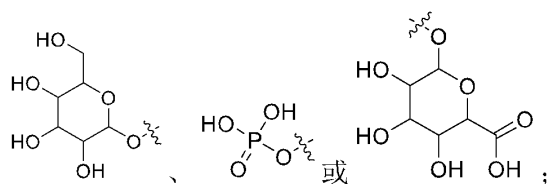
Q 每次出现时独立地为 -C(=O)-、-O-或键， n^4 是 0-3 的整数；

L^2 为 、、
、、-NH-CH₂-O-或键；

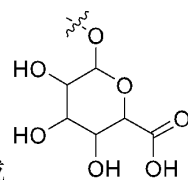
其中 X 为键、-NH-、-C(=O)-、氧或 ；

R_2 为键、-O-CH₂-或-NH-CH₂CH₂-NH-C(=O)-；

R_3 为氢或  R^c ，其中 R^b 和 R^c 各自独立地为氢、硝基、、



R_4 为氢或 C_{1-8} 烷基;

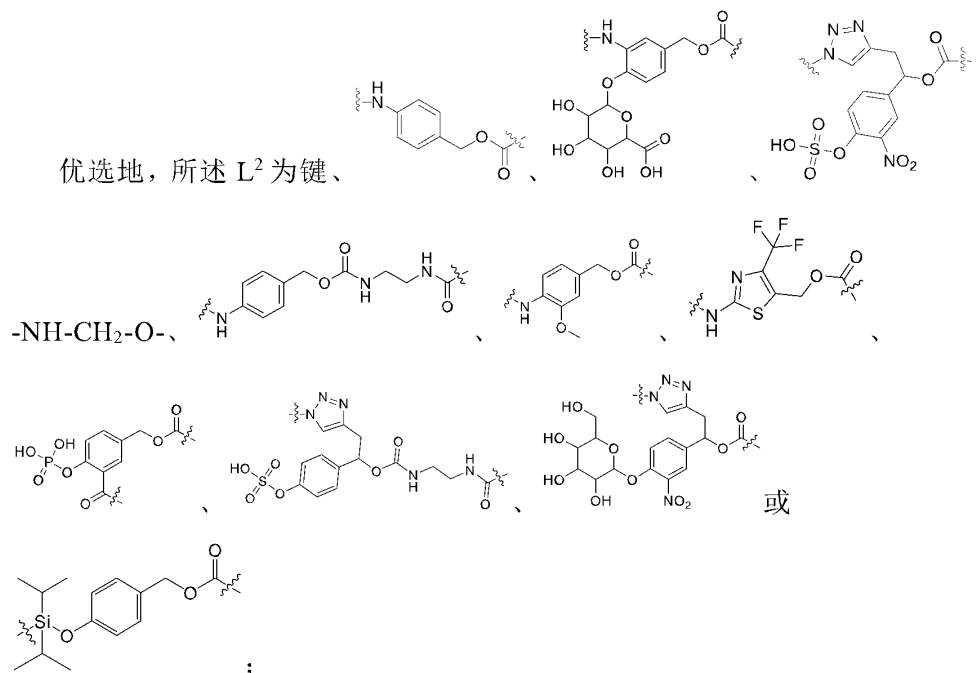


R_5 为氢、氨基、硝基、磷酸基、 $-OR^a$ 或

基、乙烷基、丙烷基或异丙烷基;

W^1 为可以结合细胞表面蛋白的靶向分子, 并且 W^2 为有效载荷;

优选地, 所述 L^2 为键、



优选地, EG 为 $-CH_2CH_2O-$;

优选地, n^1 是 2 或 0;

优选地, n^2 是 1、4 或 5;

优选地, n^5 是 0;

优选地, n^6 是 1 或 3;

优选地, n^1 是 2、 n^2 是 1、 n^3 和 n^4 是 0 并且 L^2 是键;

优选地, AA 每次出现时独立地为 Val、Cit、Glu、Leu、Lys、Ala、Gly、Phe、Gln、Pro 或 Asn 形成的氨基酸残基;

优选地, $-(AA)n^3$ -为选自下组的肽残基: -Val-Cit-、-Glu-Val-Cit-、-Ala-Cit-、-Phe-Cit-、-Val-Ala-、-Gly-Gly-Phe-Gly-、-Cit-、-Val-Leu-Lys-、Val-Cit-Pro-Gly-、-Gly-Asn-Asn-和 Ala-Ala-Asn-;

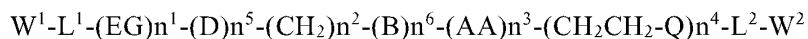
优选地, 当 n^4 为 1 时, Q 为 $-C(=O)-$;

优选地, 当 n^4 为 2 时, Q 分别为 $-O-$ 和 $-C(=O)-$;

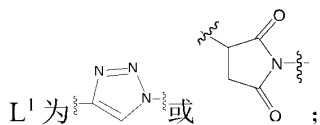
优选地, 当 n^4 为 3 时, Q 分别为 $-O-$ 、 $-O-$ 和键; 或

优选地, n^4 为 0。

31. 根据权利要求 1-30 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐, 其中所述偶联体化合物具有以下结构



其中,



EG 为 $-CH_2CH_2O-$; n^1 是 0-4 的整数;

D 为 $-C(=O)-NH-S(=O)_2-NH-$; n^5 为 0 或 1;

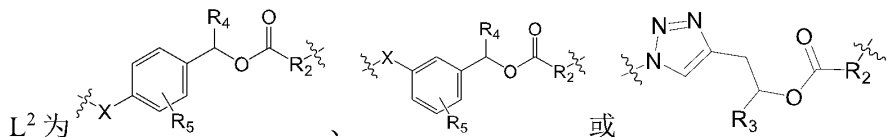
n^2 是 0-5 的整数;

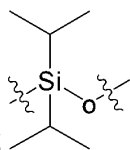
B 为 $-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-NH-$ 、 $-CH_2CH_2O-$ 、 $-NH-CH_2CH_2-C(=O)-$ 或 $-NH-$;

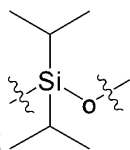
n^6 为 0-3 的整数;

AA 每次出现时独立地为氨基酸残基; n^3 是 0-3 的整数;

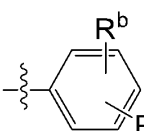
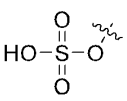
Q 每次出现时独立地为 $-C(=O)-$ 、 $-O-$ 或键, n^4 是 0-3 的整数;



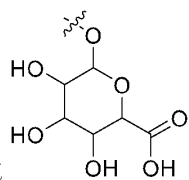


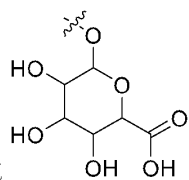
其中 X 为键、-NH-、-C(=O)-或  ；

R₂ 为键；

R₃ 为 ，其中 R^b 和 R^c 各自独立地为氢、硝基或  ；

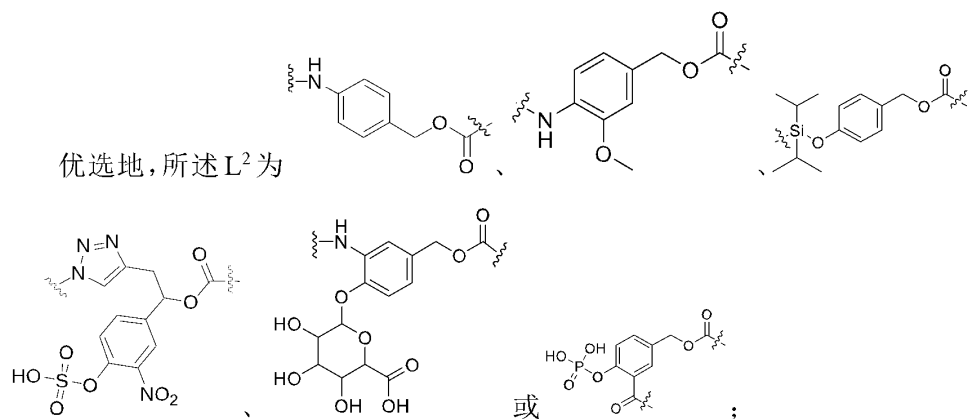
R₄ 为氢；

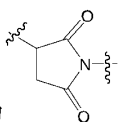


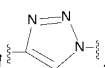
R₅ 为氢、-OCH₃ 或  ；

W¹ 为可以结合细胞表面蛋白的靶向分子，并且 W² 为有效载荷；

优选地，所述 L² 为



优选地，L¹ 为 ，n¹、n⁵ 和 n⁴ 均为 0；

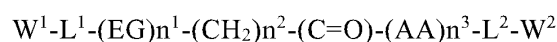
优选地，L¹ 为 ，n² 是 1 或 2；

优选地，n⁵ 为 1 时，n² 和 n⁴ 均为 0；

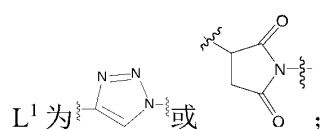
优选地，AA 每次出现时独立地为 Val、Cit、Glu 或 Ala 形成的氨基酸残基；或

优选地, $-(AA)n^3$ -为选自下组的肽残基: -Val-Cit-、-Glu-Val-Cit-、-Ala-Cit-和-Val-Ala-。

32. 根据权利要求 1-31 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐, 其中所述偶联体化合物具有以下结构



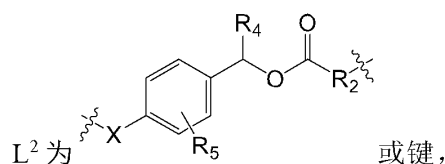
其中,



EG 为 $-CH_2CH_2O-$; n^1 是 0-4 的整数;

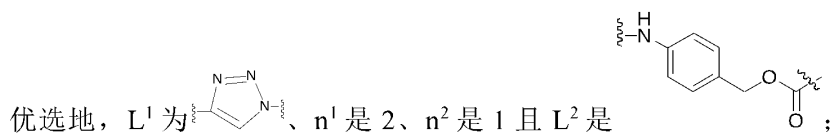
n^2 是 0-5 的整数;

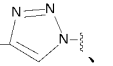
AA 每次出现时独立地为氨基酸残基; n^3 是 1-4 的整数;

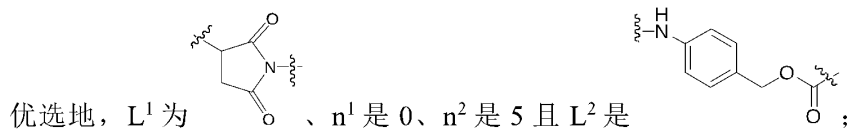
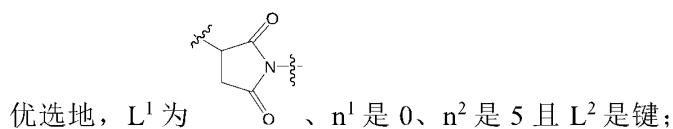


其中 X 为 $-NH-$; R_2 为键; R_4 为氢; R_5 为氢或 $-OCH_3$;

W^1 为可以结合细胞表面蛋白的靶向分子, 并且 W^2 为有效载荷;



优选地, L^1 为 、 n^1 是 2、 n^2 是 1 且 L^2 是键;



优选地, AA 每次出现时独立地为 Val、Cit、Glu 或 Ala 氨基酸残基; 或

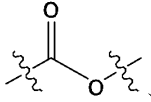
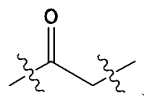
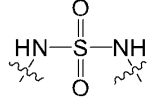
优选地, $-(AA)n^3$ -为选自下组的肽残基: -Val-Cit-、-Glu-Val-Cit-、-Ala-Cit-、

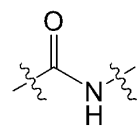
-Phe-Cit-、-Val-Ala-、-Gly-Gly-Phe-Gly-、-Val-Leu-Lys-和-Gly-Asn-Asn-。

33. 根据权利要求28-32中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述连接子包含连接模块1和连接模块2，可选地，所述连接模块1与连接模块2通过键相连；可选地，所述连接模块1与连接模块2通过化学基团相连。

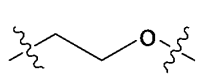
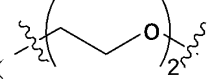
34. 根据权利要求28-32中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述连接子包含连接模块2；优选的，所述连接模块2可被酶切或在酸中不稳定。

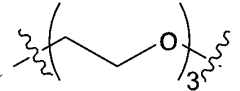
35. 根据权利要求28-32中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述连接子包含连接模块1以及与所述连接模块1结合的基团；可选的，所

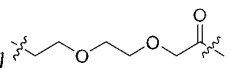
述与连接模块1结合的基团为PEG链、、、、



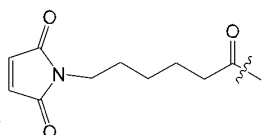
、C₁-C₈烷基链、-NH-、-O-、-C(O)-或其任意组合；

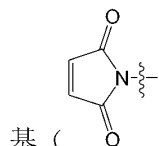
优选地，所述PEG链为PEG1 ()、PEG2 ()

或PEG3 ()；

可选的，所述与连接模块1结合的基团为.

36. 根据权利要求33-35中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，

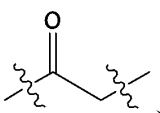
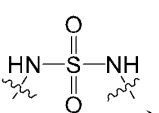
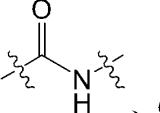
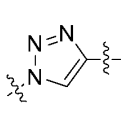
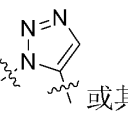
所述连接模块1为马来酰亚胺基己酰基 ()、马来酰亚胺



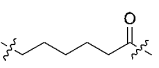
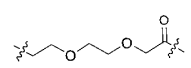
基 () 或叠氮基团 ($\text{N}^-\text{N}^+=\text{N}-$ )。

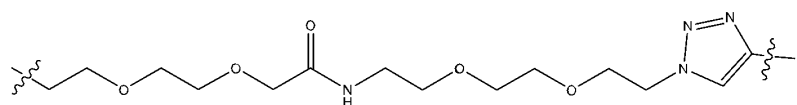
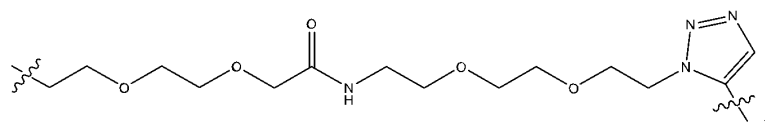
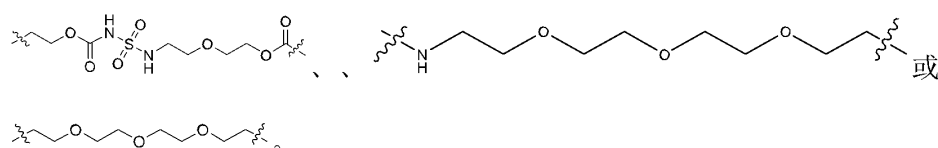
37. 根据权利要求 33-36 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，所述连接模块 2 在与靶向分子、连接模块 1、化学基团或有效载荷连接前，具有包含以下基团的结构：CB 酶酶切基团、纤溶酶酶切基团、天冬酰胺内切酶酶切基团、 β -葡萄糖苷酸酶酶切基团、硫酸酯酶酶切基团、磷酸酯酶酶切基团、 β -半乳糖苷酶酶切基团、谷胱甘肽酶酶切基团或酸不稳定基团。

38. 根据权利要求 33 所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，所述化学

基团为 PEG 链、、、、 C_1 - C_8 烷基链、
-NH-、、 或其任意组合；

优选地，所述 PEG 链为 PEG1、PEG2 或 PEG3；

优选地，所述化学基团为 、、



39. 根据权利要求 37 所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中：

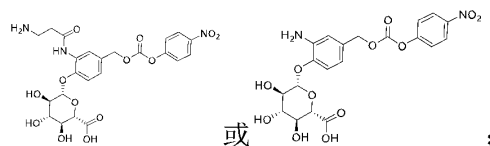
所述 CB 酶酶切基团包括氨基酸或氨基酸与自分解片段的组合，所述氨基酸为 Val-Cit、Gly-Gly-Phe-Gly、CycloBut-Cit、Phe-Cit、Val-Ala、Glu-Val-Cit、Ala-Cit、Val-Cit-Pro 或 Val-Cit-Pro-Gly；

所述纤溶酶酶切基团包括氨基酸或氨基酸与自分解片段的组合，所述氨

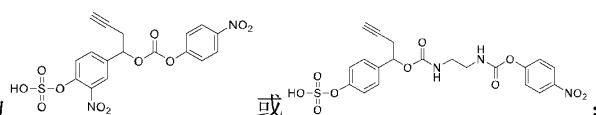
基酸为 Val-Leu-Lys;

所述天冬酰胺内切酶基团包括氨基酸或氨基酸与自分解片段的组合, 所述氨基酸选自 Gly-Asn-Asn 或 Ala-Ala-Asn;

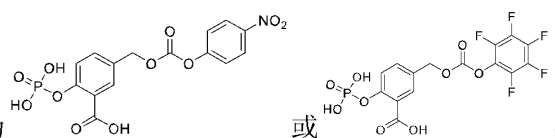
所述 β -葡萄糖醛酸酶酶切基团为



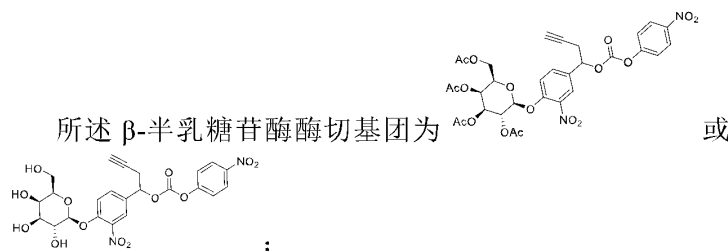
所述硫酸酯酶酶切基团为



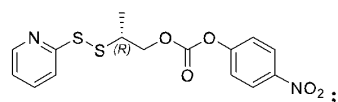
所述磷酸酯酶酶切基团为



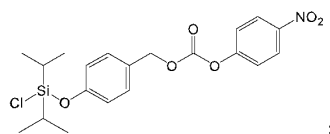
所述 β -半乳糖苷酶酶切基团为



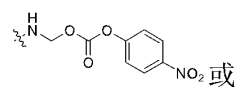
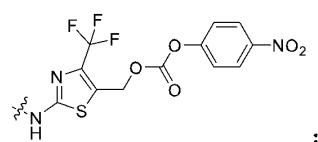
所述谷胱甘肽酶酶切基团为



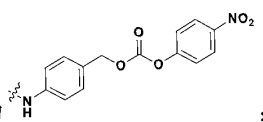
所述酸不稳定基团为

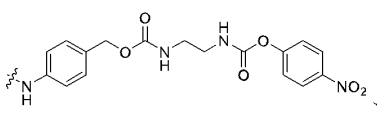
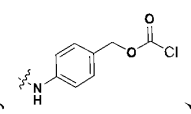


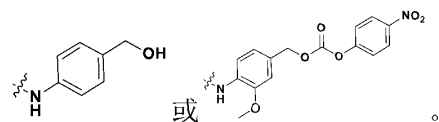
可选的, 所述自分解片段为 PAB 及其衍生物、



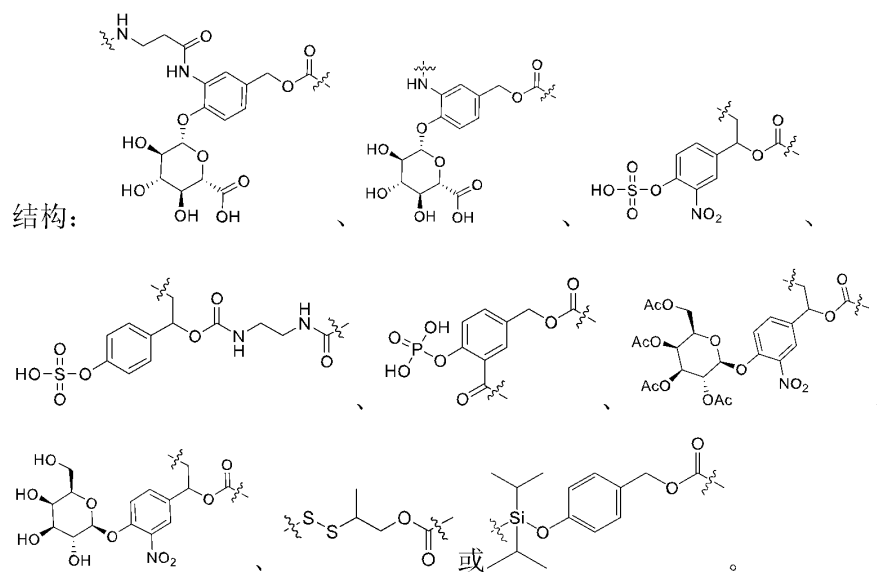
优选地, 所述 PAB 为



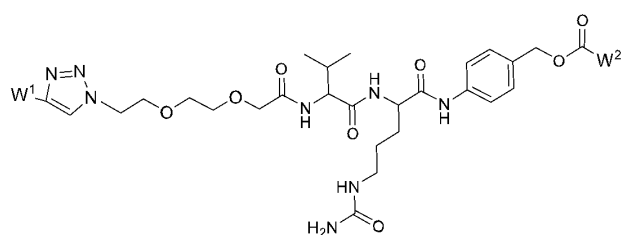
优选地, 所述 PAB 衍生物为 、、

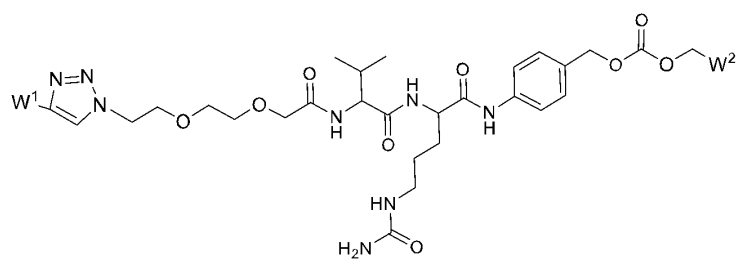
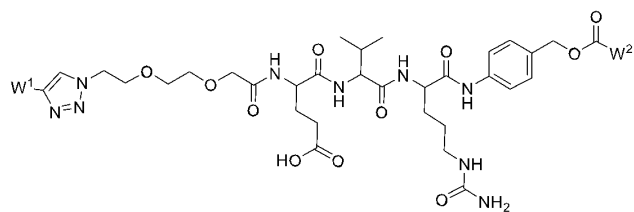
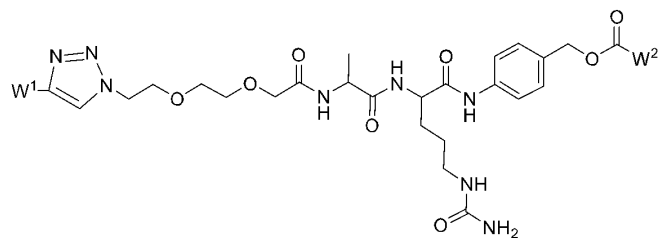
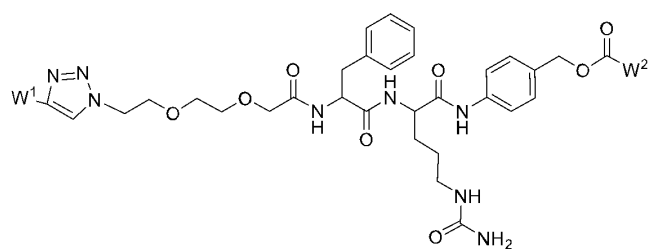
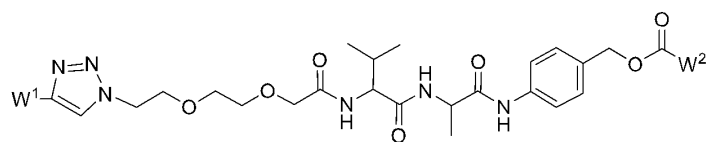
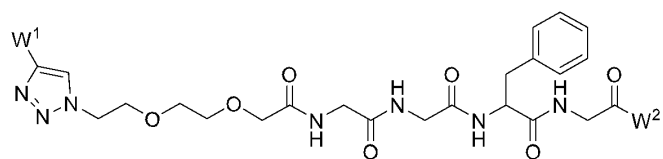


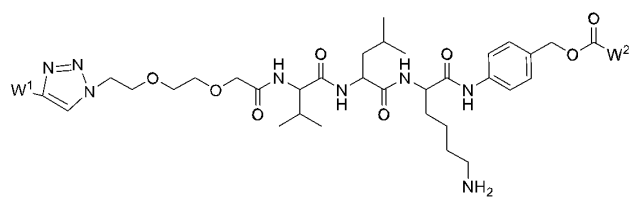
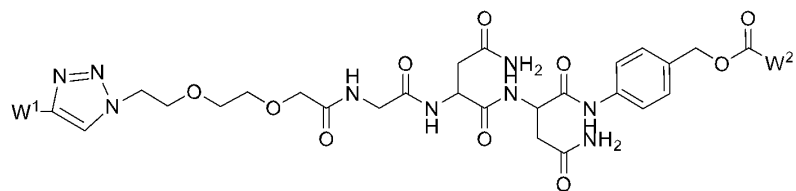
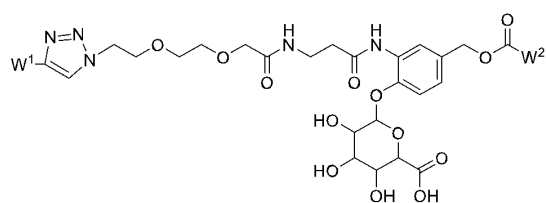
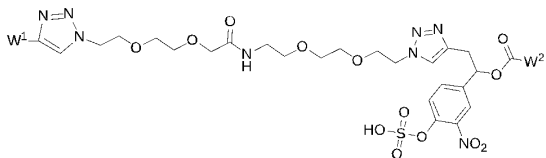
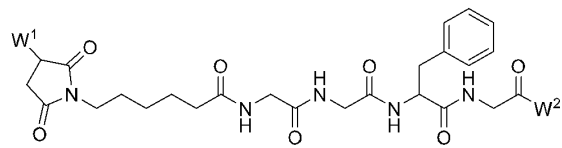
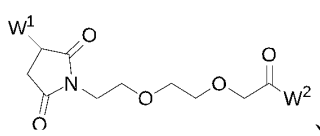
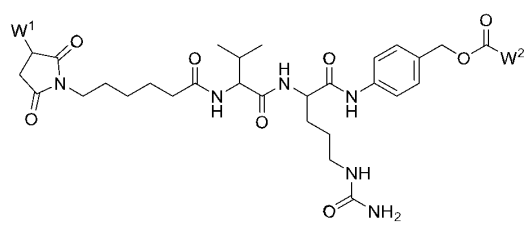
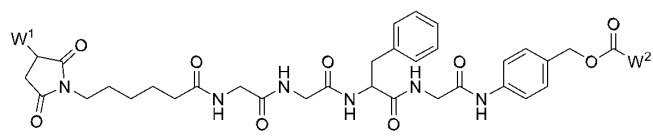
40. 根据权利要求 39 所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐, 在与连接模块 1、化学基团、靶向分子或有效载荷进行有效连接后连接模块 2 部分具有如下

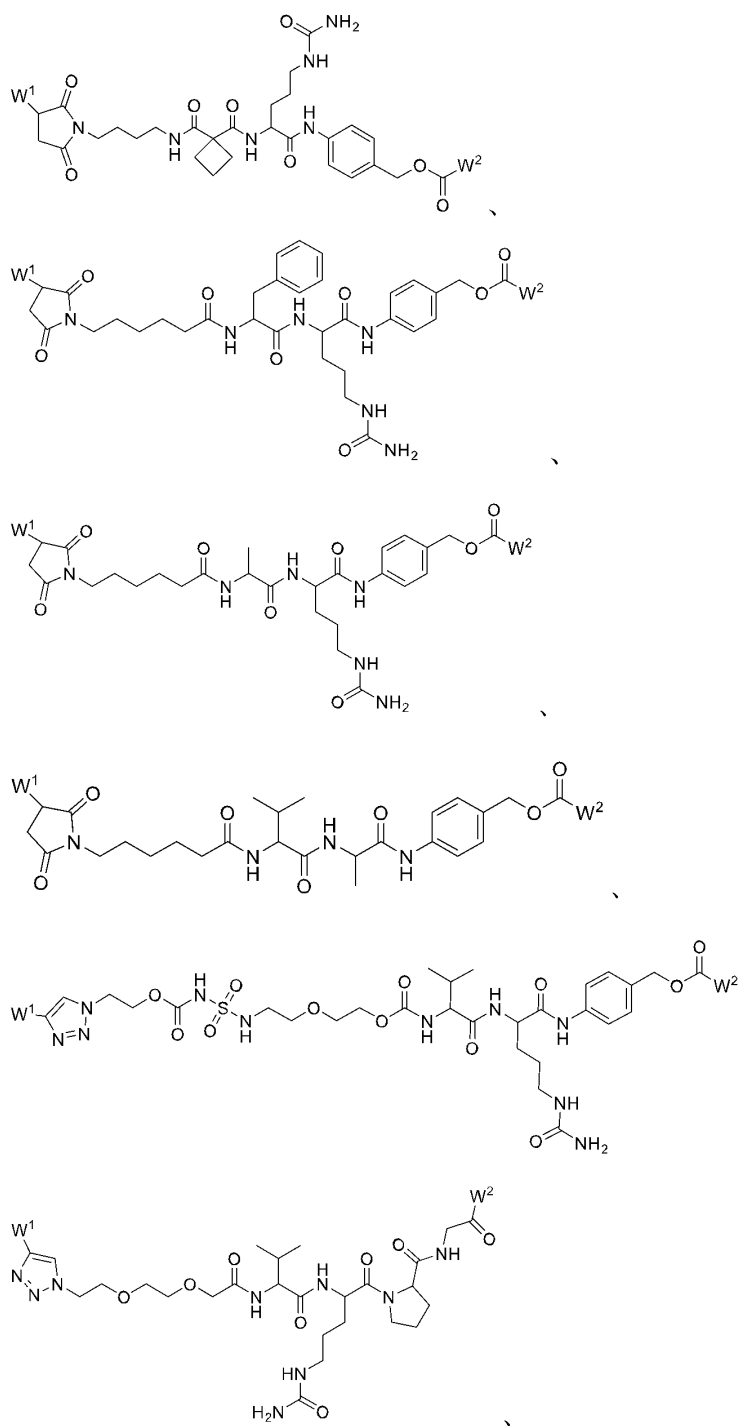


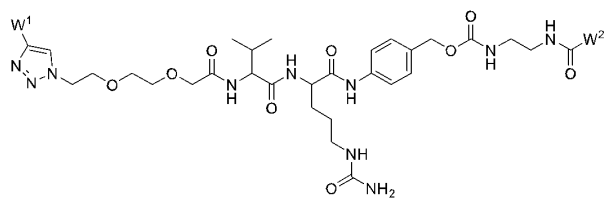
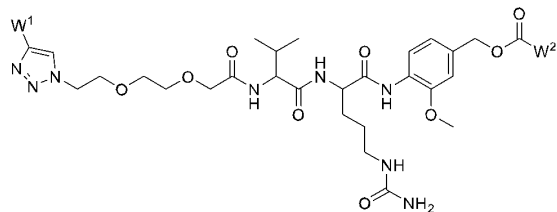
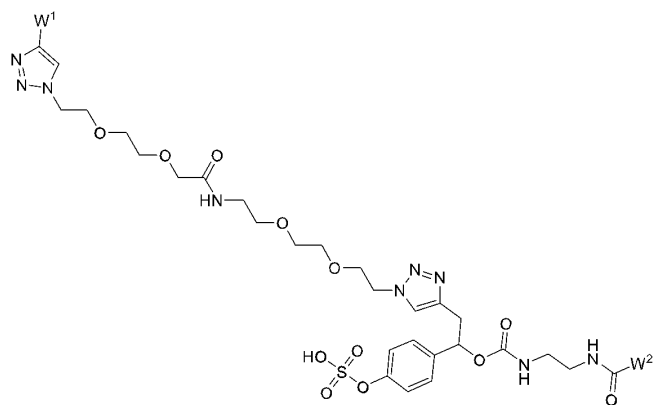
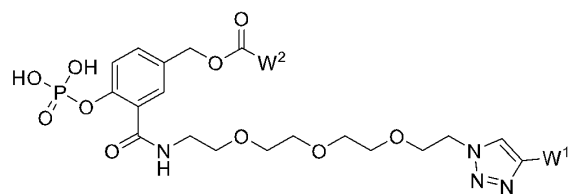
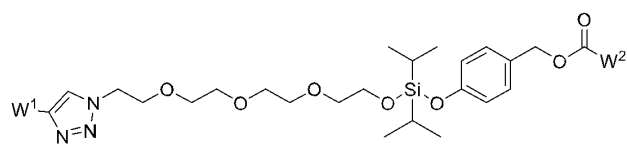
41. 根据权利要求 1-40 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐, 其中所述偶联体化合物具有如下结构:

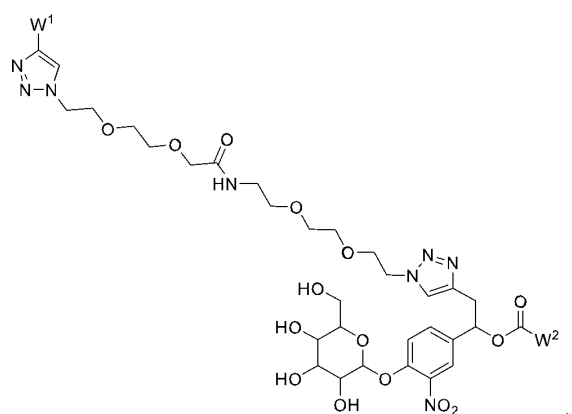
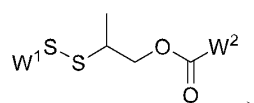
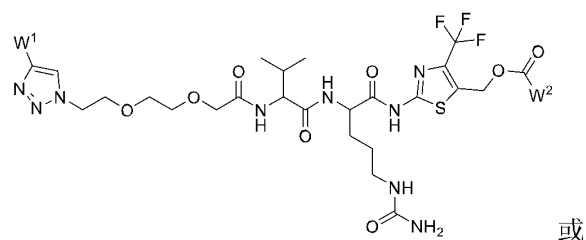




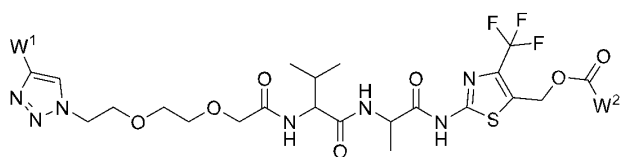






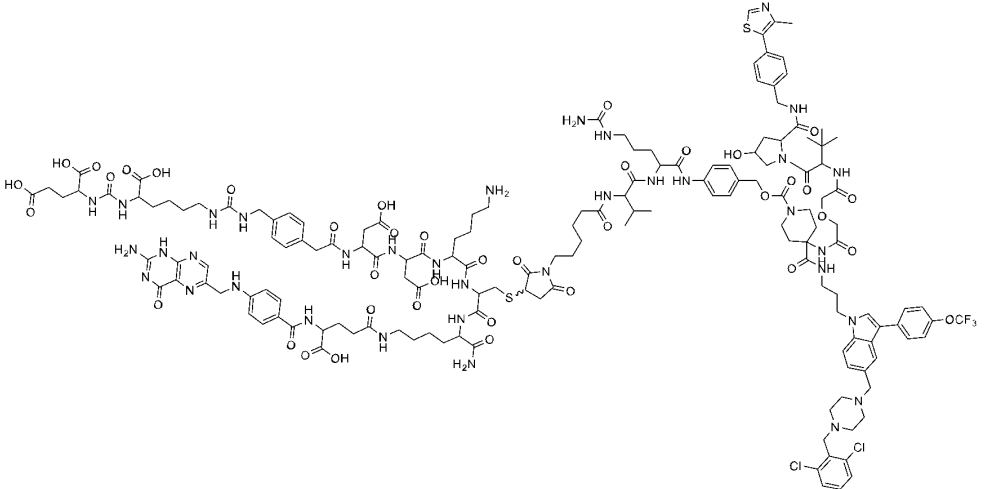
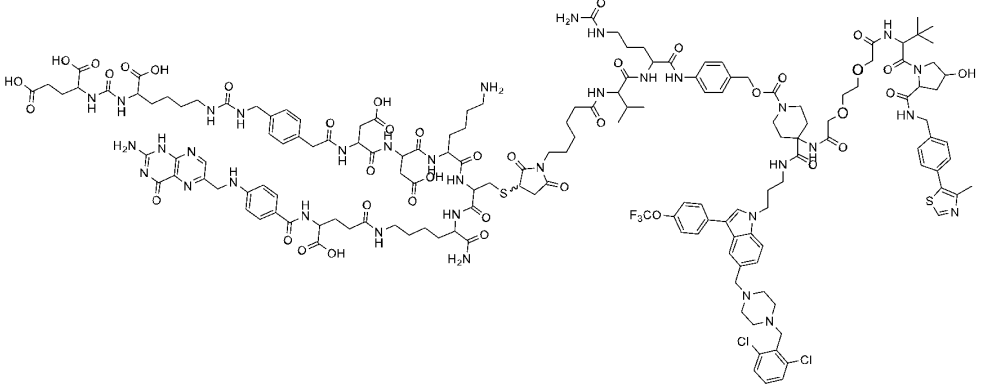
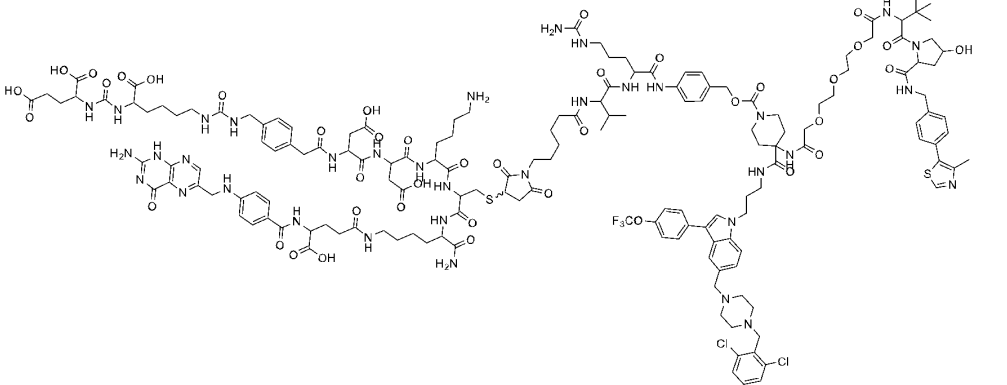


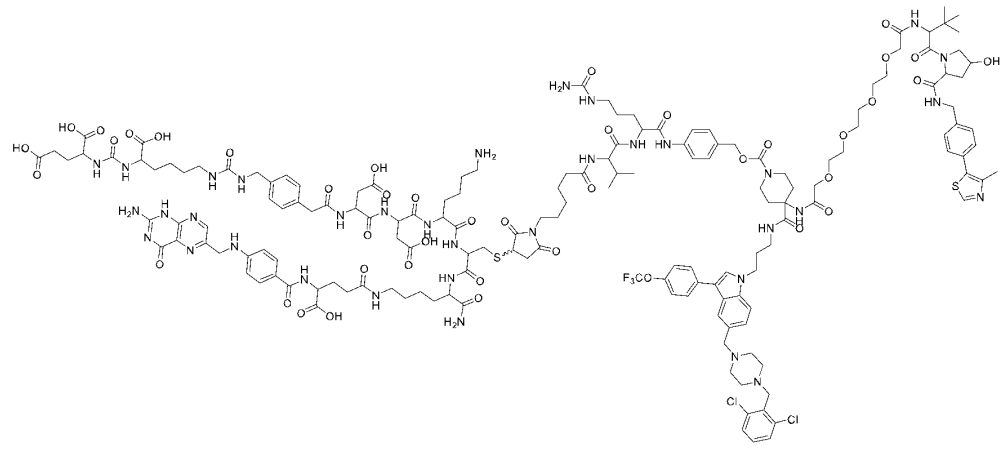
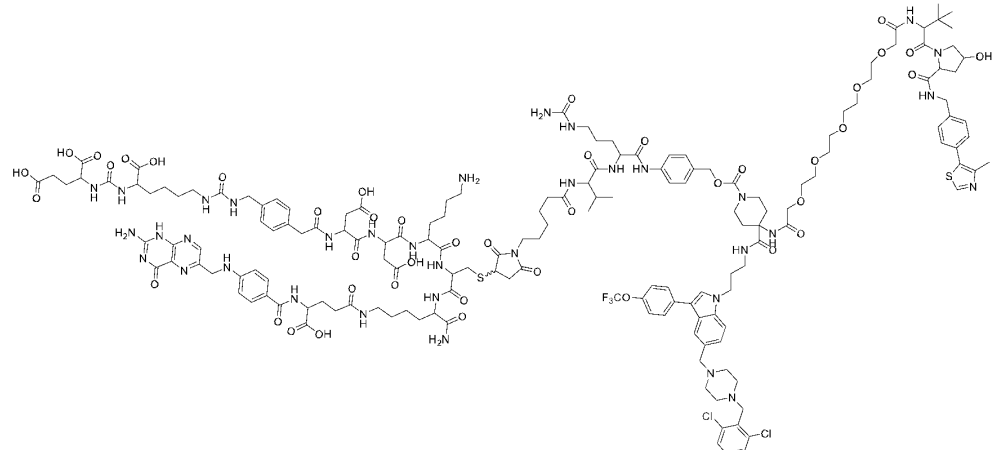
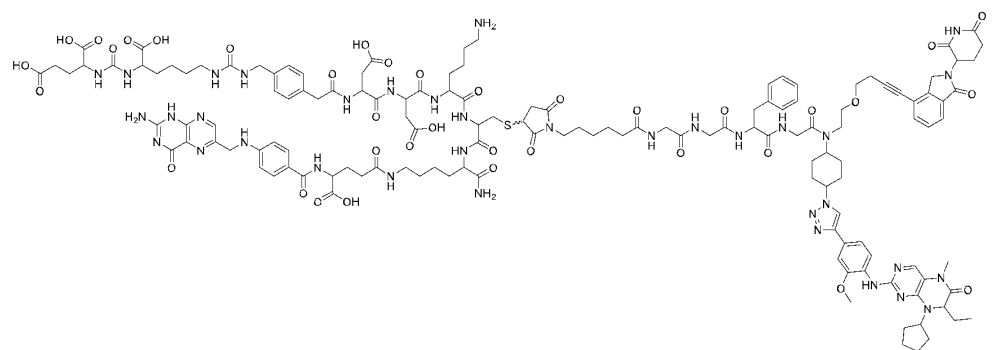
或



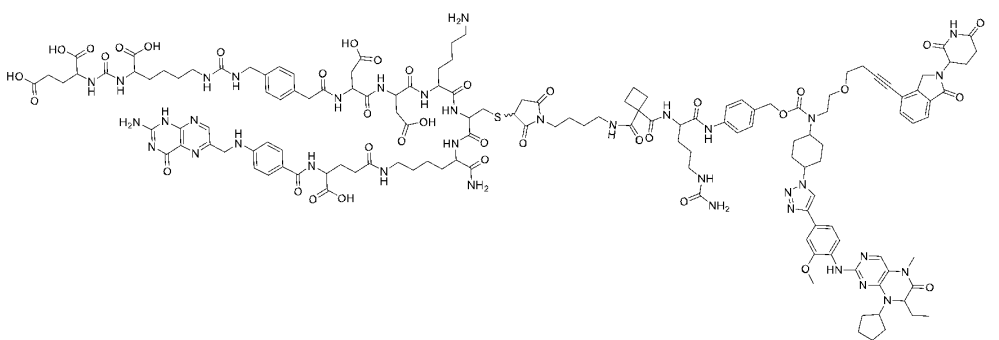
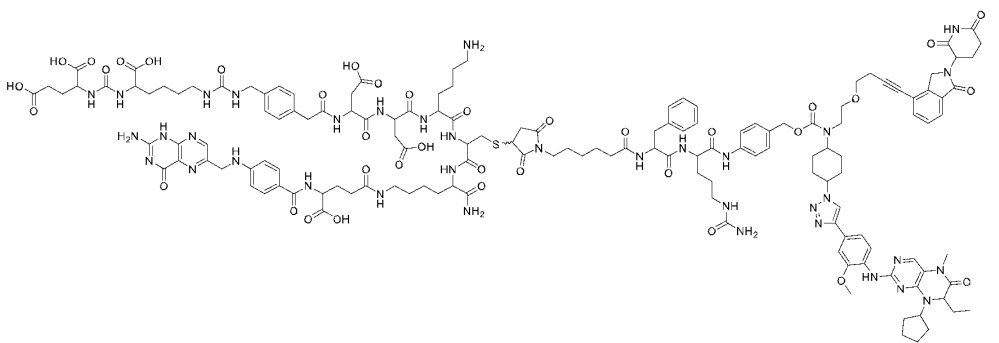
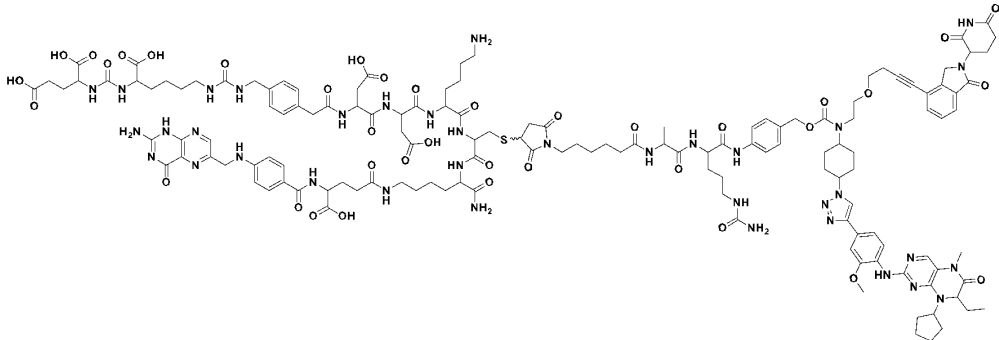
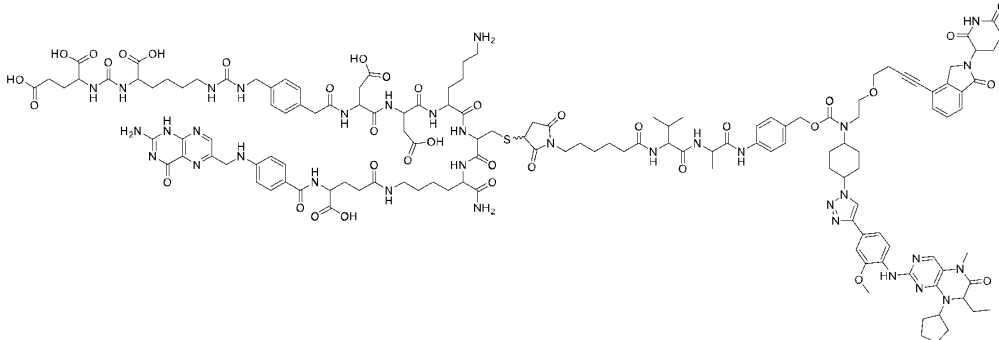
其中 W^1 为可以结合细胞表面蛋白的靶向分子，并且 W^2 为有效载荷。

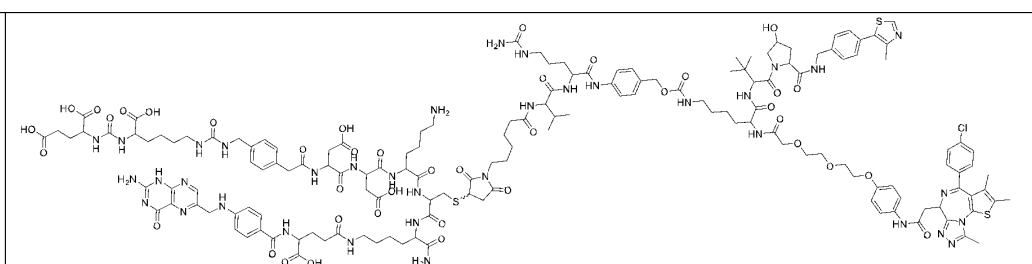
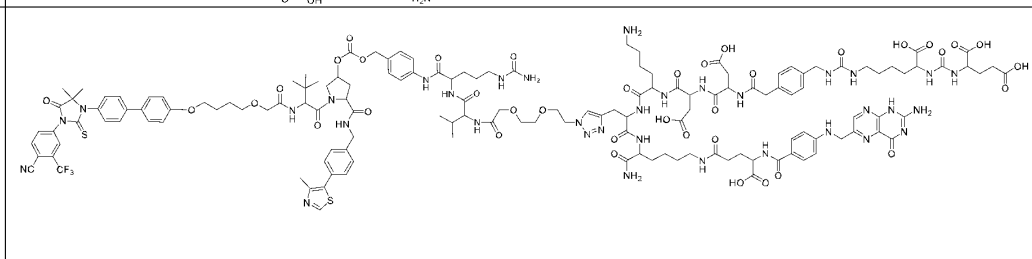
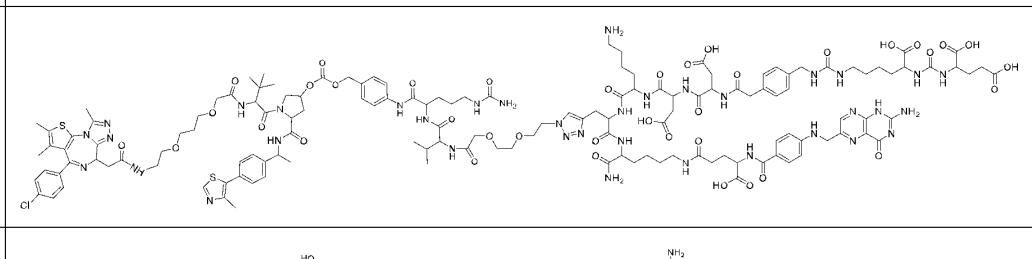
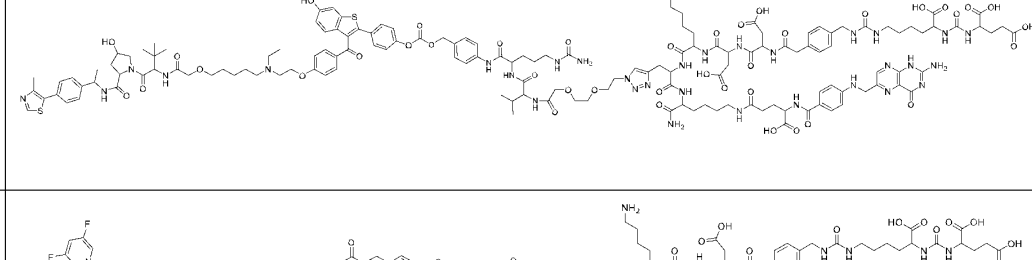
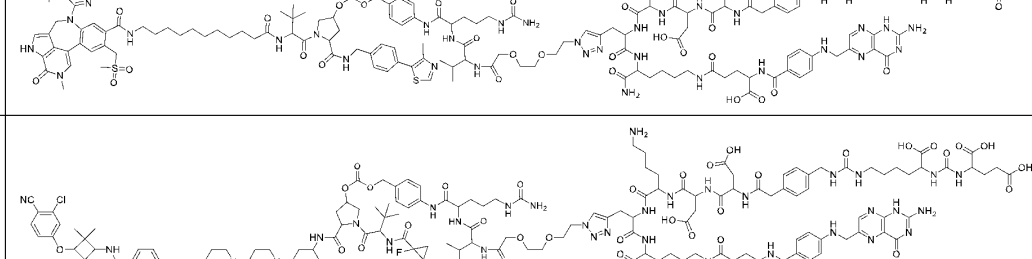
42. 根据权利要求 1-41 所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述偶联体化合物具有以下结构：

CR202CE	 <p>Chemical structure of CR202CE, a complex molecule featuring multiple fused and linked rings, including a pyrimidine, a benzimidazole, and a benzothiazine. It contains several amide, ester, and sulfonamide groups, as well as a trifluoromethyl group (OCF₃) and a chlorine atom.</p>
CR202CH	 <p>Chemical structure of CR202CH, a complex molecule featuring multiple fused and linked rings, including a pyrimidine, a benzimidazole, and a benzothiazine. It contains several amide, ester, and sulfonamide groups, as well as a trifluoromethyl group (OCF₃) and a chlorine atom.</p>
CR202CK	 <p>Chemical structure of CR202CK, a complex molecule featuring multiple fused and linked rings, including a pyrimidine, a benzimidazole, and a benzothiazine. It contains several amide, ester, and sulfonamide groups, as well as a trifluoromethyl group (OCF₃) and a chlorine atom.</p>

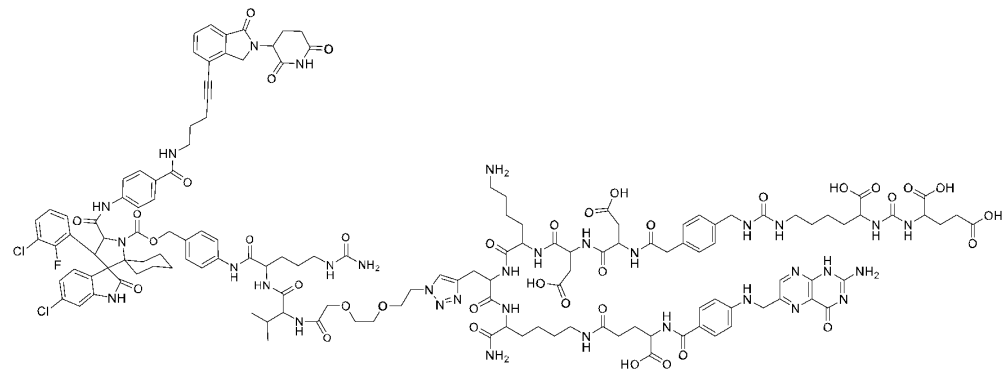
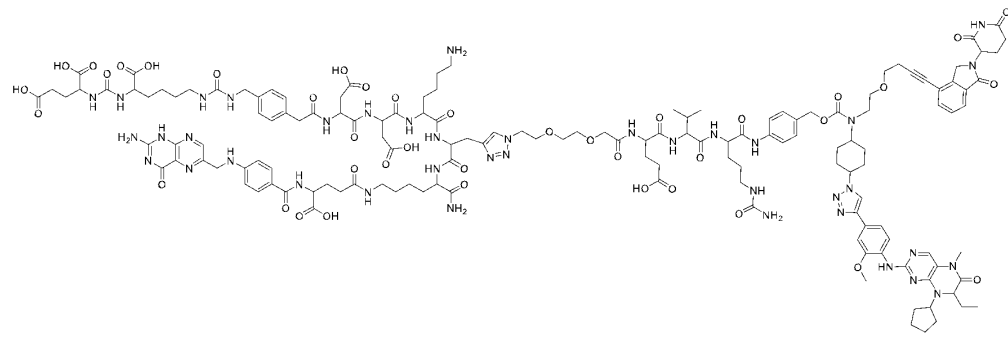
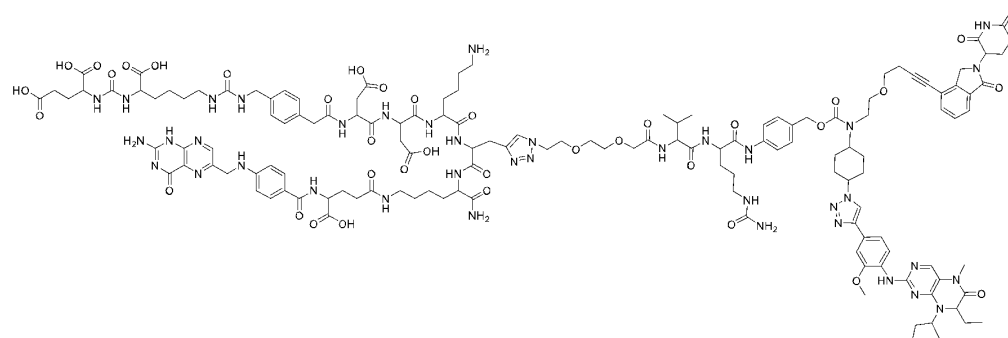
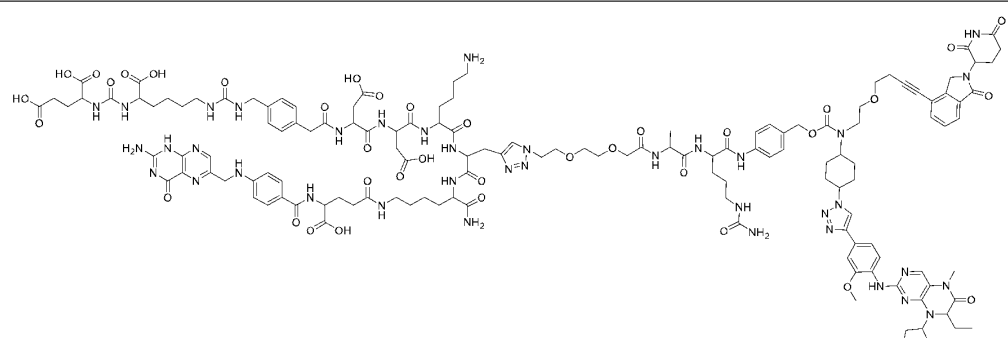
CR202CN	 <p>Chemical structure of CR202CN, a complex molecule featuring a central pyrimidine core. It is substituted with a carboxylic acid group, a hydroxyl group, and a long chain containing an amide, a sulfonamide, and a fluorinated benzene ring. The structure also includes a thiazole ring and a complex side chain with multiple amide and ester linkages.</p>
CR202CR	 <p>Chemical structure of CR202CR, which is identical to CR202CN. It features a central pyrimidine core with various functional groups including a carboxylic acid, a hydroxyl group, an amide, a sulfonamide, a fluorinated benzene ring, a thiazole ring, and a complex side chain with multiple amide and ester linkages.</p>
CR202F0	 <p>Chemical structure of CR202F0, a complex molecule featuring a central pyrimidine core. It is substituted with a carboxylic acid group, a hydroxyl group, and a long chain containing an amide, a sulfonamide, and a fluorinated benzene ring. The structure also includes a thiazole ring and a complex side chain with multiple amide and ester linkages.</p>

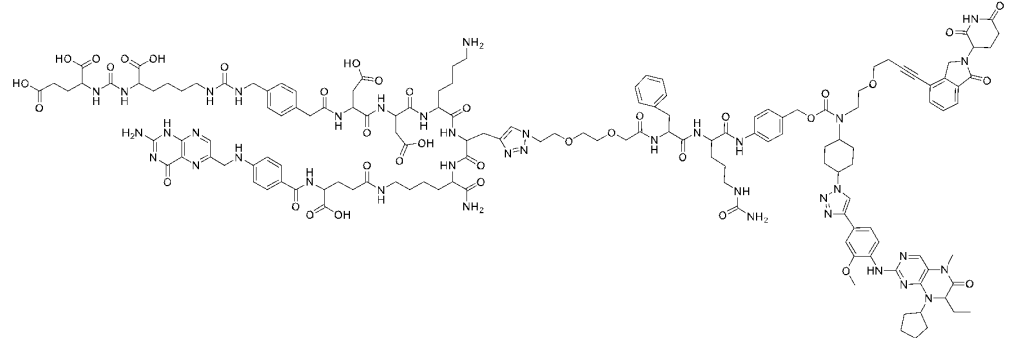
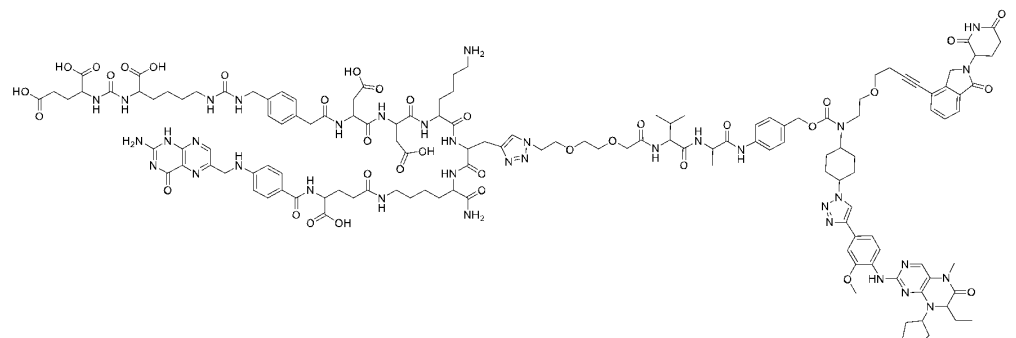
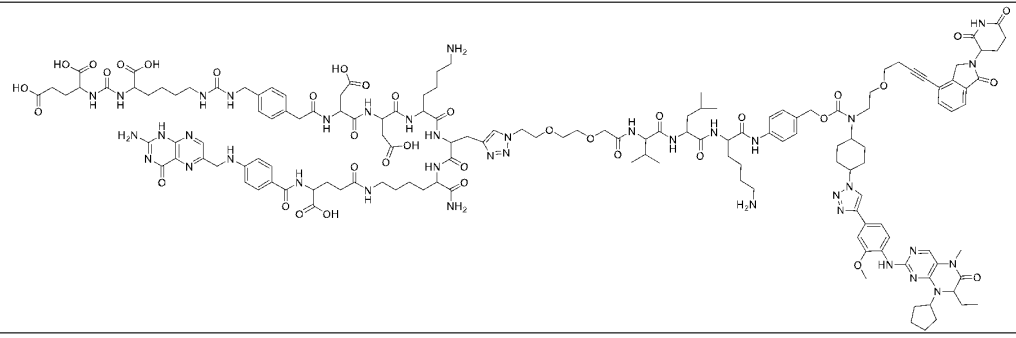
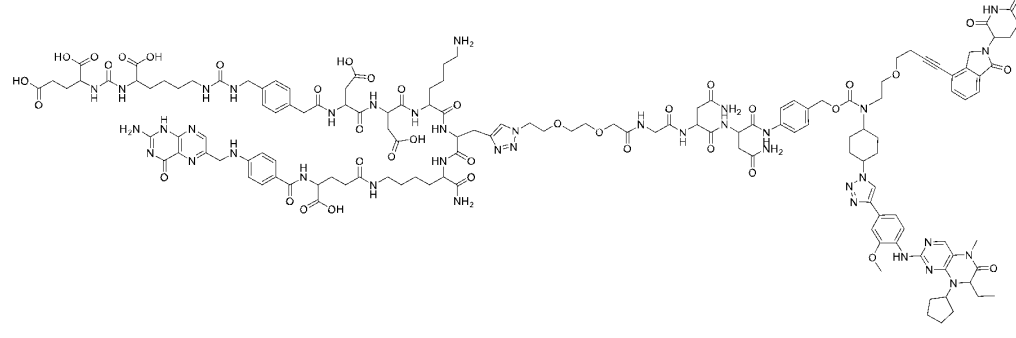
CR202F2	
CR20214	
CR20282	
CR20285	

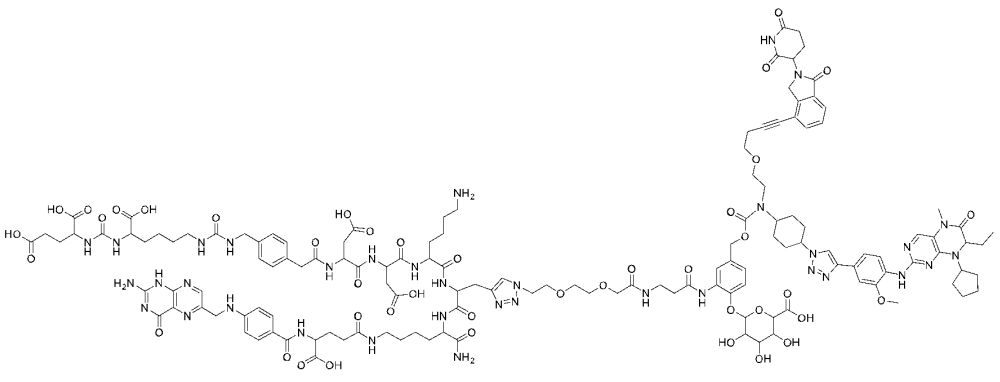
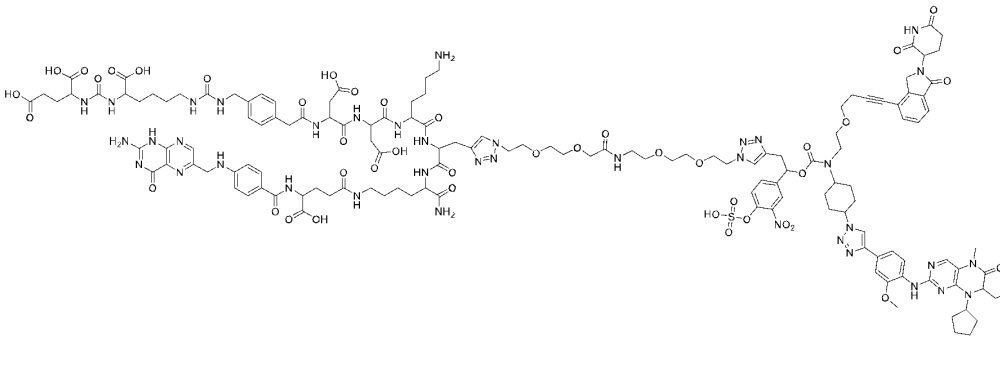
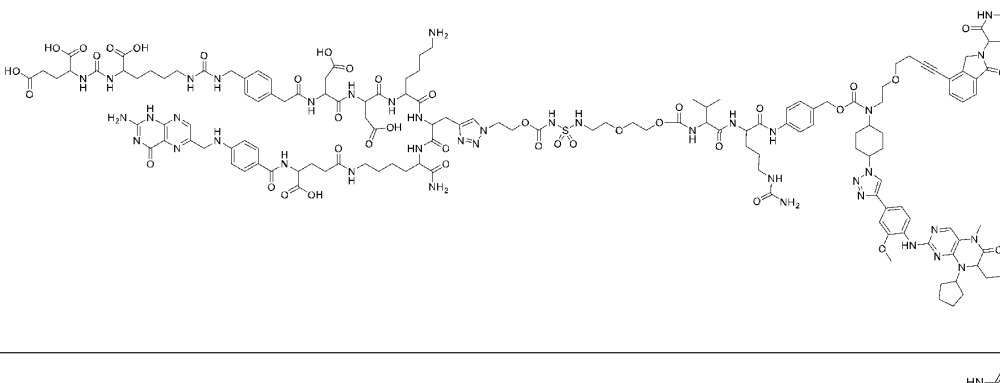
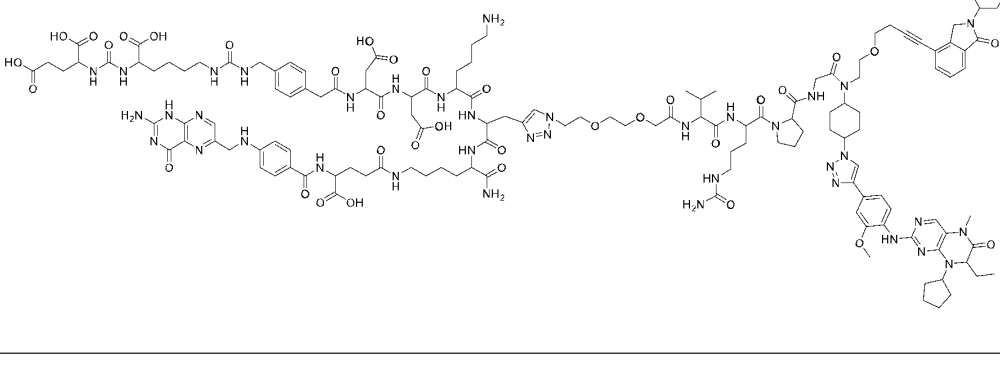
CR20287	 <p>Chemical structure of CR20287, a complex molecule featuring multiple amide, ester, and heterocyclic functional groups, including a quinazoline core and a cyclohexane ring.</p>
CR20293	 <p>Chemical structure of CR20293, a complex molecule featuring multiple amide, ester, and heterocyclic functional groups, including a quinazoline core and a cyclohexane ring.</p>
CR20295	 <p>Chemical structure of CR20295, a complex molecule featuring multiple amide, ester, and heterocyclic functional groups, including a quinazoline core and a cyclohexane ring.</p>
CR20297	 <p>Chemical structure of CR20297, a complex molecule featuring multiple amide, ester, and heterocyclic functional groups, including a quinazoline core and a cyclohexane ring.</p>

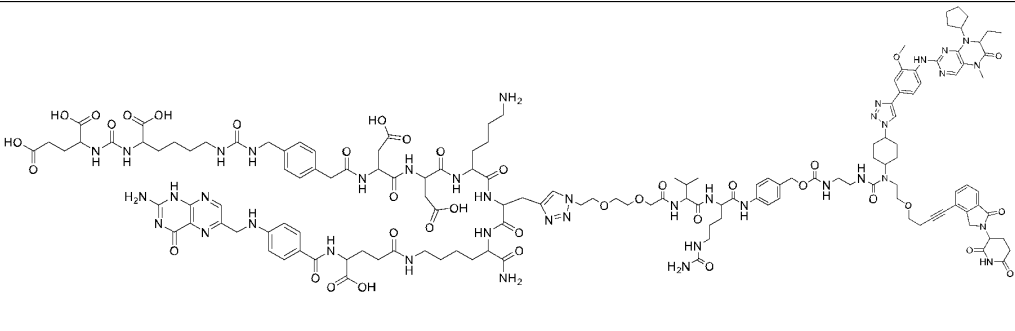
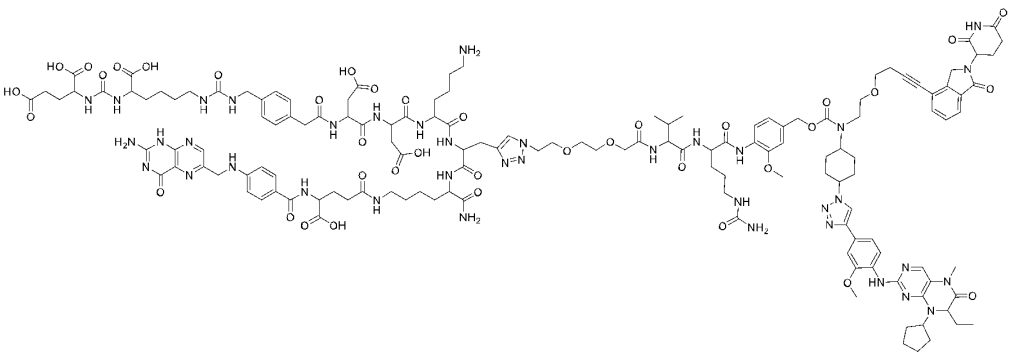
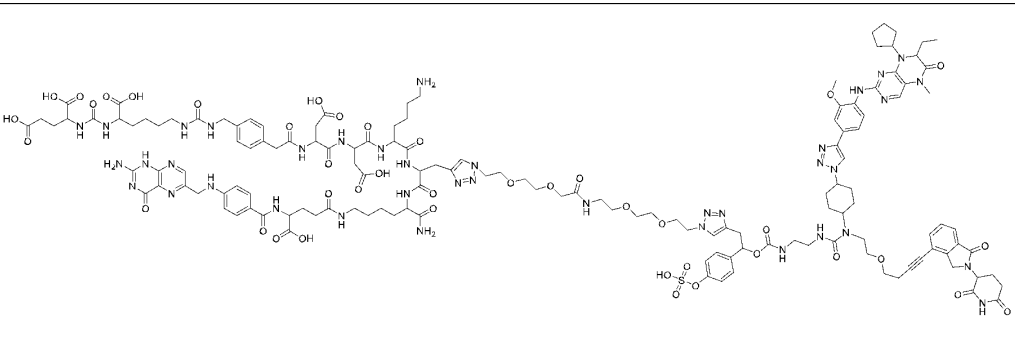
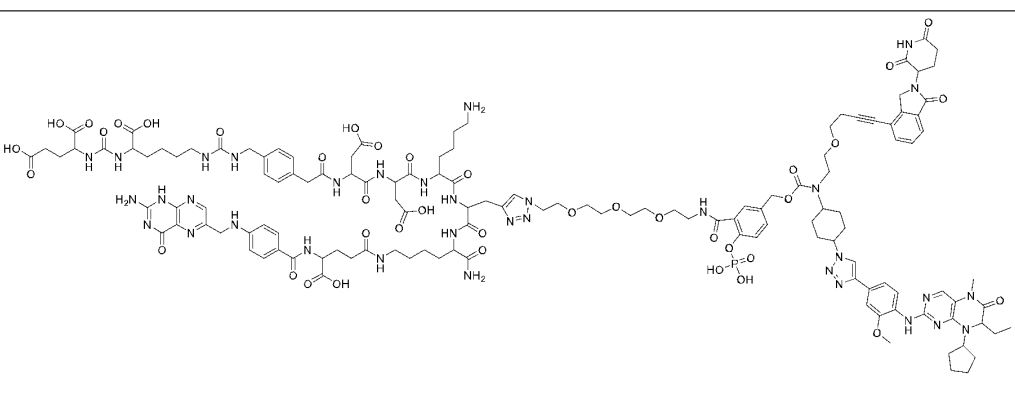
CR202EF	
CR202W5	
CR202W6	
CR202W7	
CR202W8	
CR202W9	

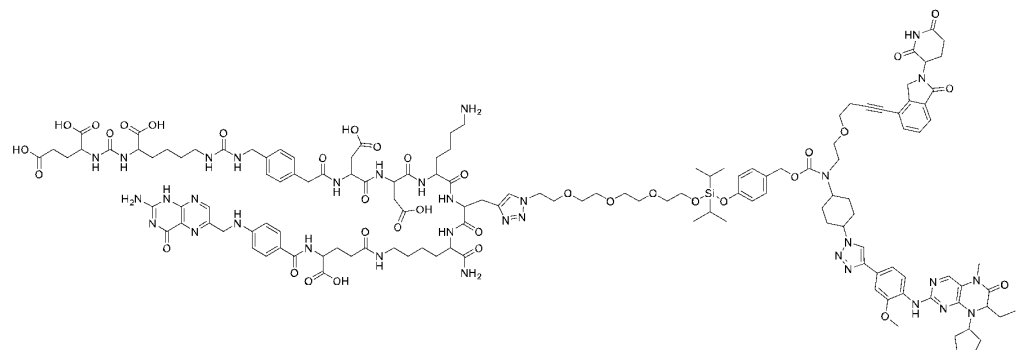
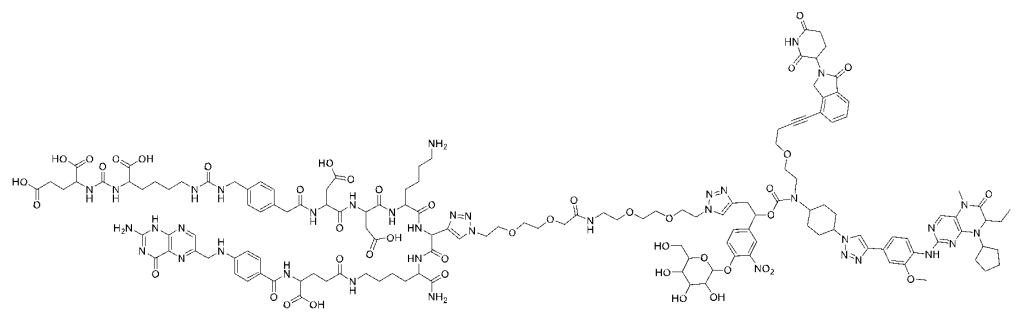
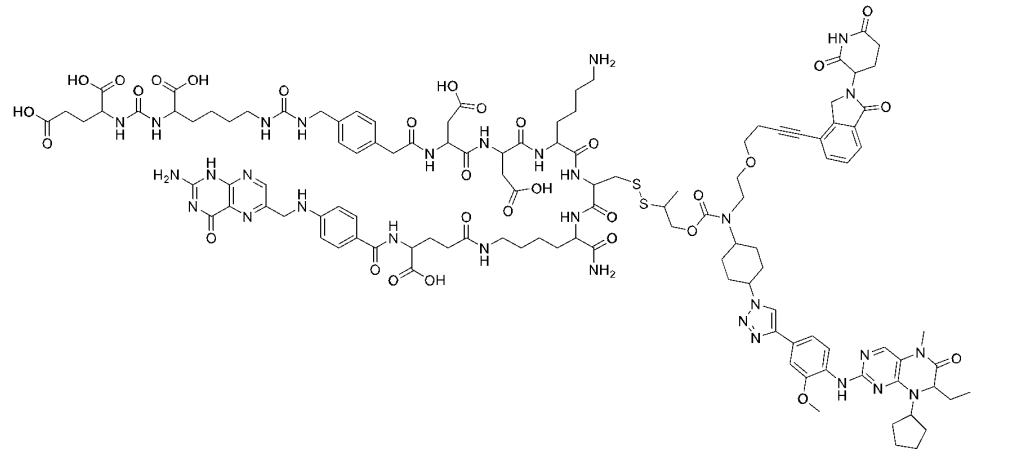
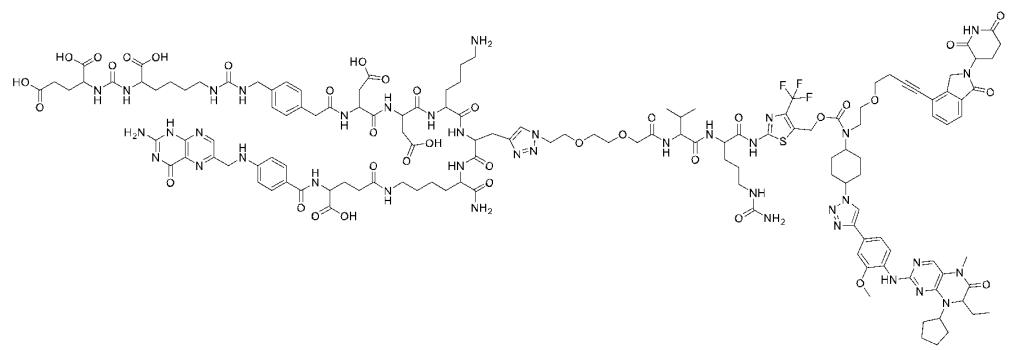
CR202X0	
CR202X1	
CR202X2	
CR202X3	
CR202Y3	

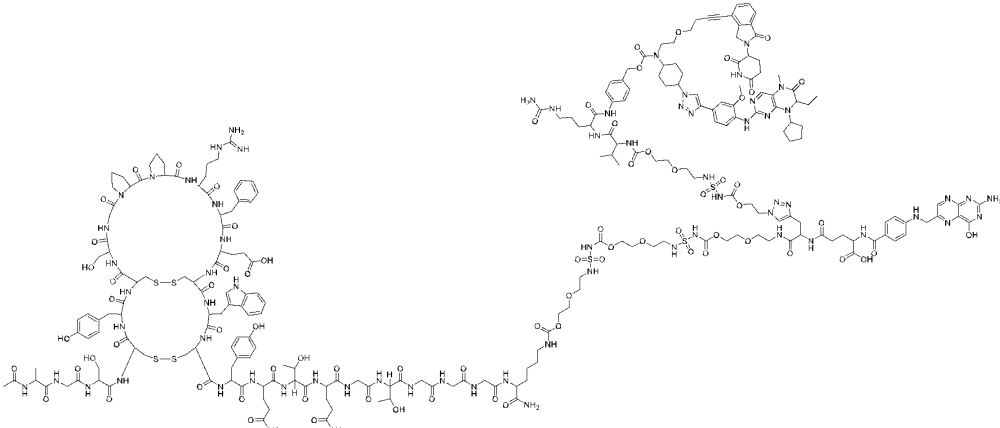
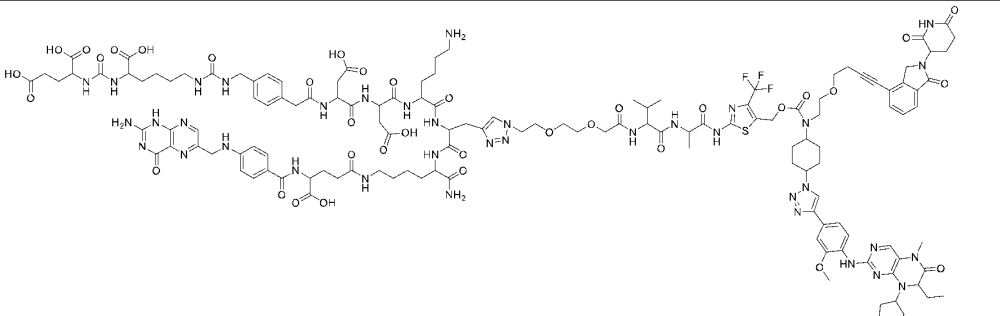
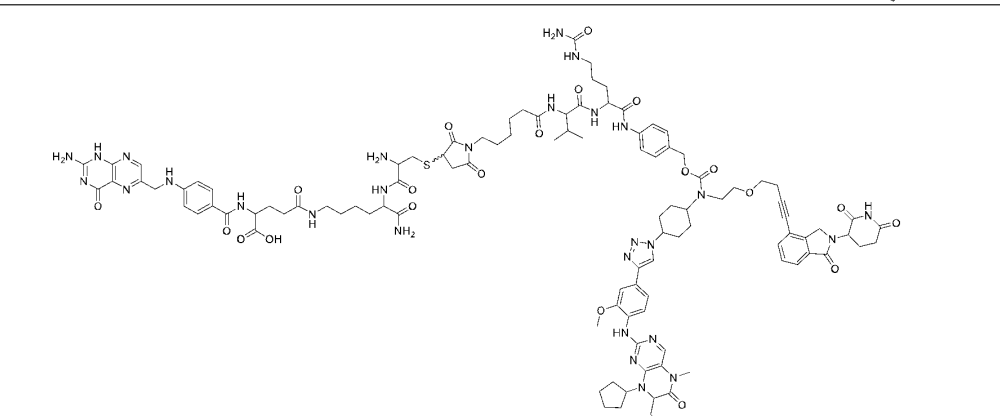
CR202Y5	 <p>Chemical structure of CR202Y5, a complex molecule featuring a central core with multiple amide, ester, and carboxylic acid groups, and a terminal indole ring system.</p>
CR202V4	 <p>Chemical structure of CR202V4, a complex molecule featuring a central core with multiple amide, ester, and carboxylic acid groups, and a terminal indole ring system.</p>
CR202V5	 <p>Chemical structure of CR202V5, a complex molecule featuring a central core with multiple amide, ester, and carboxylic acid groups, and a terminal indole ring system.</p>
CR202V6	 <p>Chemical structure of CR202V6, a complex molecule featuring a central core with multiple amide, ester, and carboxylic acid groups, and a terminal indole ring system.</p>

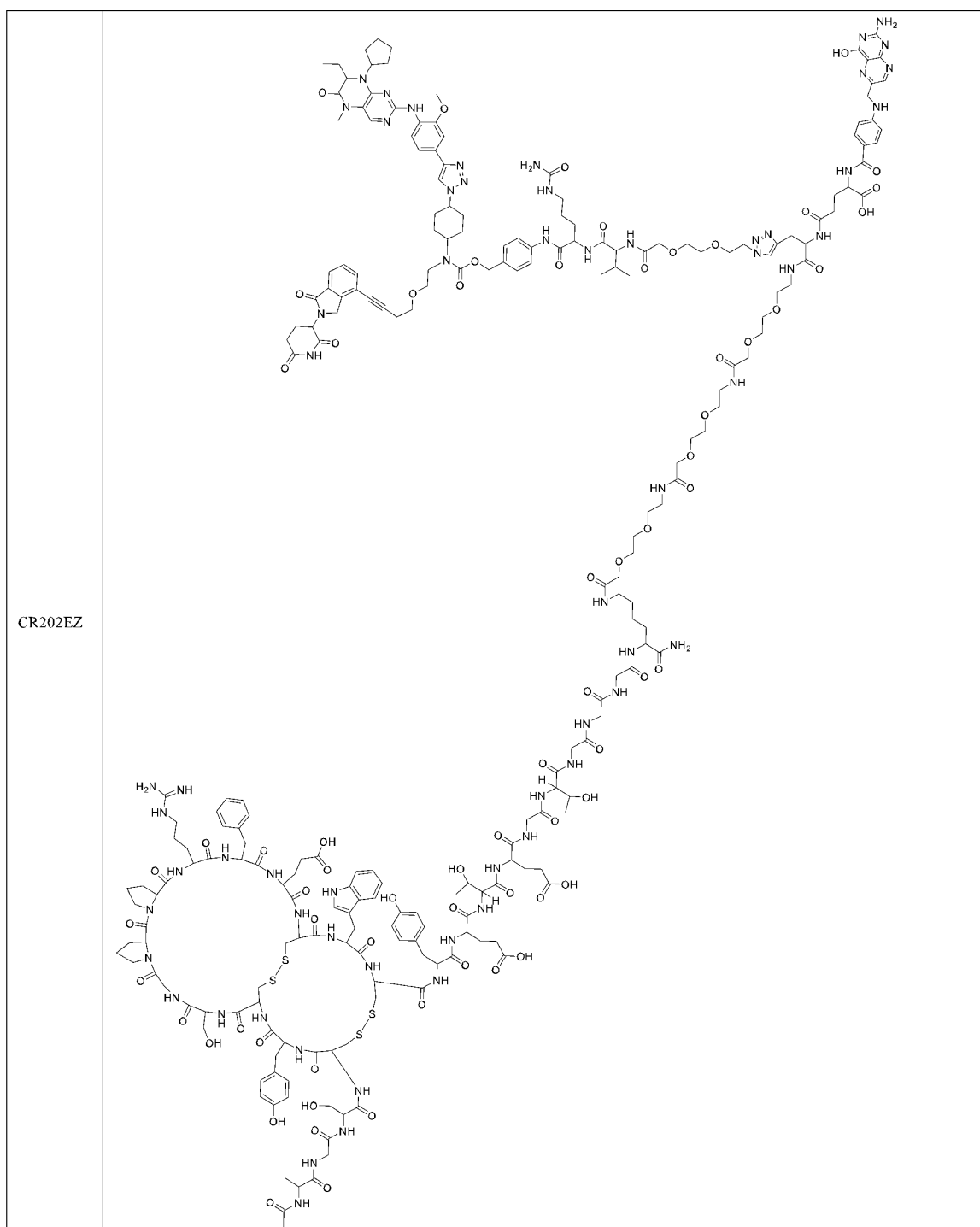
CR202V7	 <p>Chemical structure of CR202V7, a complex molecule featuring multiple amide, ester, and triazole linkages, along with various aromatic and heterocyclic rings, including a pyridine ring and a substituted benzene ring.</p>
CR202Z6	 <p>Chemical structure of CR202Z6, a complex molecule featuring multiple amide, ester, and triazole linkages, along with various aromatic and heterocyclic rings, including a pyridine ring and a substituted benzene ring.</p>
CR202V8	 <p>Chemical structure of CR202V8, a complex molecule featuring multiple amide, ester, and triazole linkages, along with various aromatic and heterocyclic rings, including a pyridine ring and a substituted benzene ring.</p>
CR202V9	 <p>Chemical structure of CR202V9, a complex molecule featuring multiple amide, ester, and triazole linkages, along with various aromatic and heterocyclic rings, including a pyridine ring and a substituted benzene ring.</p>

CR202AL	 <p>Chemical structure of CR202AL, a complex molecule featuring multiple amide, ester, and triazole linkages, along with various functional groups including carboxylic acids, alcohols, and a terminal amine.</p>
CR202W1	 <p>Chemical structure of CR202W1, a complex molecule featuring multiple amide, ester, and triazole linkages, along with various functional groups including carboxylic acids, alcohols, and a terminal amine.</p>
CR202GM	 <p>Chemical structure of CR202GM, a complex molecule featuring multiple amide, ester, and triazole linkages, along with various functional groups including carboxylic acids, alcohols, and a terminal amine.</p>
CR202GQ	 <p>Chemical structure of CR202GQ, a complex molecule featuring multiple amide, ester, and triazole linkages, along with various functional groups including carboxylic acids, alcohols, and a terminal amine.</p>

CR202HJ	 <p>Chemical structure of CR202HJ, a complex molecule featuring multiple amide, ester, and triazole linkages, with various functional groups including carboxylic acids, amines, and a terminal triazole ring.</p>
CR202FU	 <p>Chemical structure of CR202FU, a complex molecule featuring multiple amide, ester, and triazole linkages, with various functional groups including carboxylic acids, amines, and a terminal triazole ring.</p>
CR202JG	 <p>Chemical structure of CR202JG, a complex molecule featuring multiple amide, ester, and triazole linkages, with various functional groups including carboxylic acids, amines, and a terminal triazole ring.</p>
CR202LB	 <p>Chemical structure of CR202LB, a complex molecule featuring multiple amide, ester, and triazole linkages, with various functional groups including carboxylic acids, amines, and a terminal triazole ring.</p>

CR202HT	 <p>Chemical structure of CR202HT, a complex molecule featuring multiple amide bonds, a central triazole ring, and various side chains including a long alkyl chain, a carboxylic acid group, and a complex heterocyclic system with a cyclopentyl ring and a carbonyl group.</p>
CR202HU	 <p>Chemical structure of CR202HU, a complex molecule featuring multiple amide bonds, a central triazole ring, and various side chains including a long alkyl chain, a carboxylic acid group, and a complex heterocyclic system with a cyclopentyl ring and a carbonyl group.</p>
CR202HV	 <p>Chemical structure of CR202HV, a complex molecule featuring multiple amide bonds, a central triazole ring, and various side chains including a long alkyl chain, a carboxylic acid group, and a complex heterocyclic system with a cyclopentyl ring and a carbonyl group.</p>
CR202FX	 <p>Chemical structure of CR202FX, a complex molecule featuring multiple amide bonds, a central triazole ring, and various side chains including a long alkyl chain, a carboxylic acid group, and a complex heterocyclic system with a cyclopentyl ring and a carbonyl group.</p>

CR202HR	 <p>Chemical structure of CR202HR, a complex molecule featuring a large macrocyclic ring system with multiple amide and hydroxyl groups. It is linked to a long, branched side chain containing various functional groups, including a sulfonamide, a triazole, and a pyridine ring.</p>
CR202GC	 <p>Chemical structure of CR202GC, a complex molecule featuring a long, branched side chain with multiple amide and hydroxyl groups. It is linked to a large, complex ring system containing a triazole, a pyridine, and a sulfonamide group.</p>
CR202MT	 <p>Chemical structure of CR202MT, a complex molecule featuring a long, branched side chain with multiple amide and hydroxyl groups. It is linked to a large, complex ring system containing a triazole, a pyridine, and a sulfonamide group.</p>



43. 一种药物组合物, 所述药物组合物包含根据权利要求 1-42 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐, 以及药学上可接受的载体。

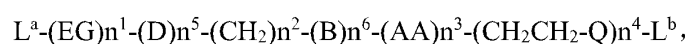
44. 根据权利要求 43 所述的药物组合物, 其中, 所述组合物用于静脉、皮下、口服、肌内或心室内施用。
45. 一种用于治疗对象中的疾病的方法, 所述方法包括向所述对象施用治疗有效量的根据权利要求 1-42 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐, 或者根据权利要求 43 或 44 所述的药物组合物。
46. 根据权利要求 45 所述的方法, 其中所述疾病选自下组: 癌症、免疫性疾病、心血管疾病、代谢疾病和神经疾病。
47. 根据权利要求 46 所述的方法, 其中所述癌症的特征在于癌细胞高表达 FOLR1、TRPV6、PSMA 或 c-MET。
48. 根据权利要求 47 所述的方法, 其中所述癌症的特征在于癌细胞高表达 FOLR1 和 TRPV6、FOLR1 和 c-MET、c-MET 和 TRPV6、c-MET 和 PSMA、PSMA 和 TRPV6 或 FOLR1 和 PSMA。
49. 根据权利要求 45-48 中任一项所述的方法, 其中所述疾病的特征在于在所述对象中表达所述靶蛋白或异常表达所述靶蛋白。
50. 根据权利要求 46 所述的方法, 其中所述癌症选自下组: 人乳腺导管癌、人脑星形胶质母细胞瘤、膀胱移行细胞乳头瘤、前列腺癌、乳腺癌、肺癌、肾癌、白血病、卵巢癌、胃癌、宫颈癌、子宫癌、子宫内膜癌、肝癌、结肠癌、甲状腺癌、胰腺癌、结直肠癌、食道癌、睾丸癌、皮肤癌、淋巴瘤和多发性骨髓瘤。
51. 根据权利要求 46 所述的方法, 其中所述免疫性疾病是自身免疫性疾病可选的, 所述自身免疫性疾病选自下组: 结缔组织病、系统性硬化症、类风湿性关节炎和系统性红斑狼疮。
52. 根据权利要求 46 所述的方法, 其中所述心血管疾病选自下组: 心绞痛、心肌梗死、中风、心脏病发作、高血压性心脏病、风湿性心脏病、心肌病、心脏心律失常和先天性心脏病。
53. 根据权利要求 46 所述的方法, 其中所述代谢疾病选自下组: 糖尿病、痛风、肥胖症、低血糖症、高血糖症和血脂异常。

54. 根据权利要求 46 所述的方法, 其中所述神经疾病选自下组: 阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿病、头部损伤、多发性硬化症、眩晕、昏迷和癫痫。

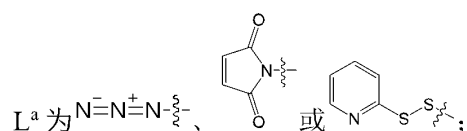
55. 根据权利要求 45-54 中任一项所述的方法, 其中所述方法还包括将一种或多种治疗剂与所述偶联体化合物或其药学上可接受的盐, 或者所述药物组合物联合施用。

56. 根据权利要求 1-42 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐, 或者根据权利要求 43 或 44 所述的药物组合物在用于制备治疗对象中的疾病的药物中的用途。

57. 一种化合物或其盐, 所述化合物具有以下结构:



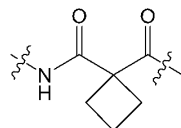
其中,



EG 为 $-CH_2CH_2O-$ 或 $-OCH_2CH_2-$; n^1 是 0-6 的整数;

n^2 是 0-8 的整数;

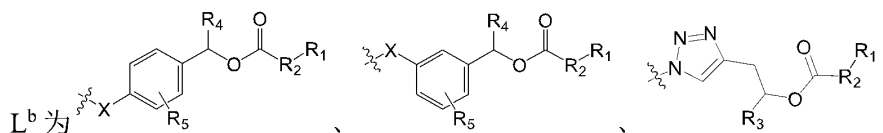
D 为 $-C(=O)-NH-S(=O)_2-NH-$; n^5 为 0 或 1;

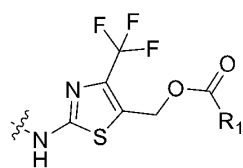


B 为 $-C(=O)-$ 、、 $-NH-CH_2CH_2-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-NH-$ 、 $-CH(CH_3)-CH_2O-$ 、 $-CH_2CH_2O-$ 、 $-NH-C(=O)-$ 或 $-NH-$; n^6 为 0-3 的整数;

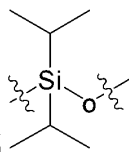
AA 每次出现时独立地为氨基酸残基; n^3 是 0-5 的整数;

Q 每次出现时独立地为 $-C(=O)-$ 、 $-O-$ 或键, n^4 是 0-3 的整数;





、-OH 或 -NH-CH₂-OH;

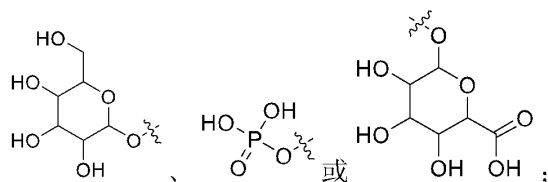


其中 X 为键、-NH-、-C(=O)-、氧或

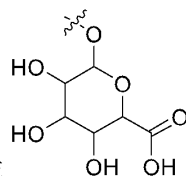
R₂ 为键、-O-CH₂-或 -NH-CH₂CH₂-NH-C(=O)-;



R₃ 为氢或

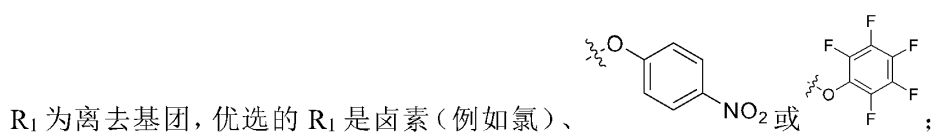


R₄ 为氢或 C₁₋₈ 烷基;

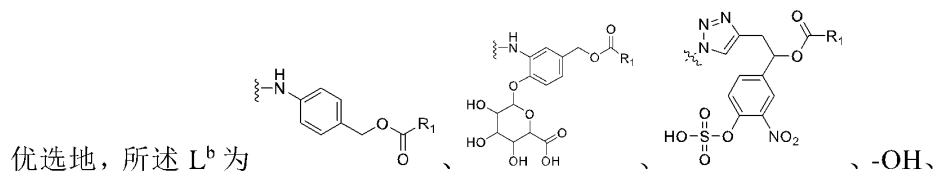


R₅ 为氢、氨基、硝基、磷酸基、-OR^a 或

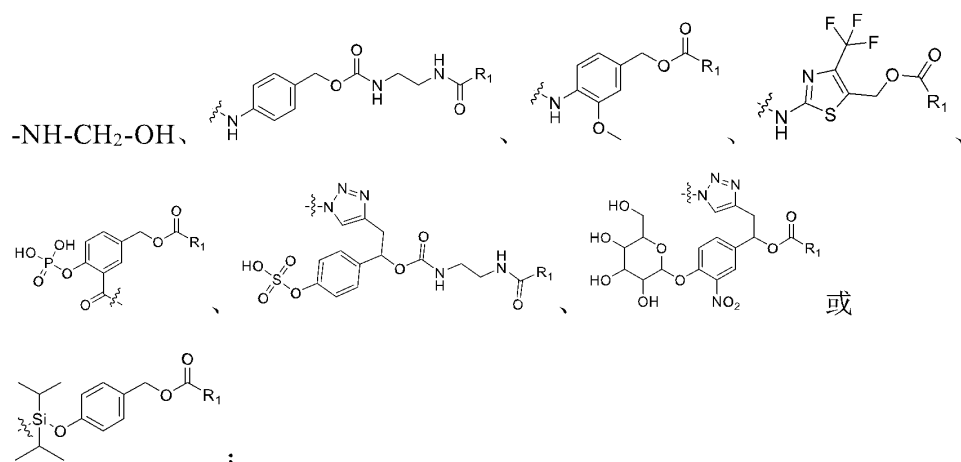
基、乙烷基、丙烷基或异丙烷基;



R₁ 为离去基团, 优选的 R₁ 是卤素 (例如氯)、



优选地, 所述 L^b 为



优选地, EG 为 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$;

优选地, n^1 是 0 或 2;

优选地, n^2 是 1、4 或 5;

优选地, n^5 是 0;

优选地, n^6 是 1 或 3;

优选地, n^1 是 2、 n^2 是 1、 n^3 和 n^4 是 0 并且 L^b 是 $-\text{OH}$;

优选地, AA 每次出现时独立地为 Val、Cit、Glu、Leu、Lys、Ala、Gly、Phe、Gln、Pro 或 Asn 形成的氨基酸残基;

优选地, $-(\text{AA})n^3$ -为选自下组的肽残基: $-\text{Val-Cit-}$ 、 $-\text{Glu-Val-Cit-}$ 、 $-\text{Ala-Cit-}$ 、 $-\text{Phe-Cit-}$ 、 $-\text{Val-Ala-}$ 、 $-\text{Gly-Gly-Phe-Gly-}$ 、 $-\text{Cit-}$ 、 $-\text{Val-Leu-Lys-}$ 、 $-\text{Val-Cit-Pro-Gly-}$ 、 $-\text{Gly-Asn-Asn-}$ 和 $-\text{Ala-Ala-Asn-}$;

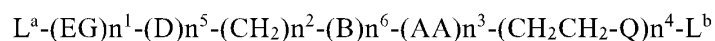
优选地, 当 n^4 为 1 时, Q 为 $-\text{C}(=\text{O})-$;

优选地, 当 n^4 为 2 时, Q 分别为 $-\text{O-}$ 和 $-\text{C}(=\text{O})-$;

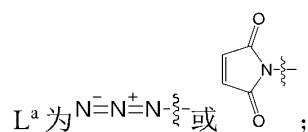
优选地, 当 n^4 为 3 时, Q 分别为 $-\text{O-}$ 、 $-\text{O-}$ 和键; 或

优选地, n^4 为 0。

58. 根据权利要求 57 所述的化合物或其盐, 其中所述化合物具有以下结构:



其中,



EG 为 $-CH_2CH_2O-$; n^1 是 2-4 的整数;

D 为 $-C(=O)-NH-S(=O)_2-NH-$; n^5 为 0 或 1;

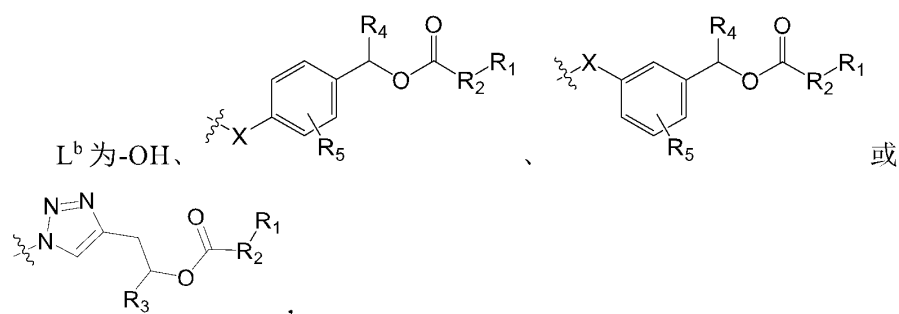
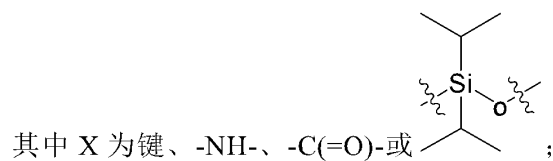
n^2 是 0-5 的整数;

B 为 $-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-NH-$ 、 $-CH_2CH_2O-$ 、 $-NH-CH_2CH_2-C(=O)-$ 或 $-NH-$;

n^6 为 0-3 的整数;

AA 每次出现时独立地为氨基酸残基; n^3 是 0-3 的整数;

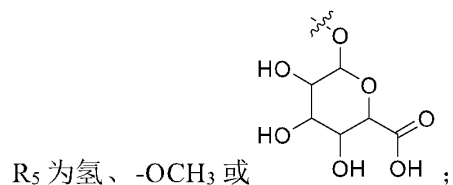
Q 每次出现时独立地为 $-C(=O)-$ 、 $-O-$ 或键, n^4 是 0-3 的整数;



R_2 为键;



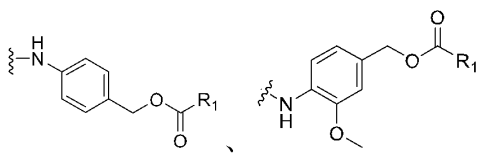
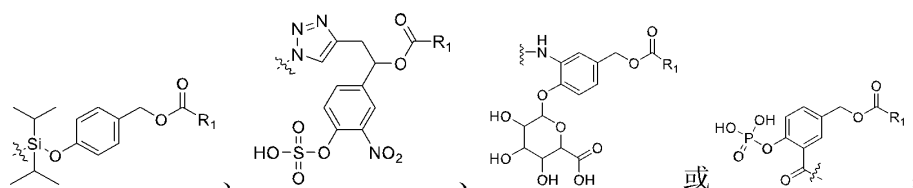
R_4 为氢;



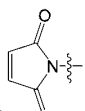
R_1 为离去基团, 优选的 R_1 是卤素 (例如氯)、



优选地, L^b 为 -OH、



优选地, n^5 为 1 时, n^2 和 n^4 均为 0;



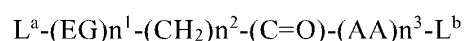
优选地, L^a 为

优选地, L^a 为 $N=N^+=N-\frac{5}{2}-$, n^2 是 1 或 2;

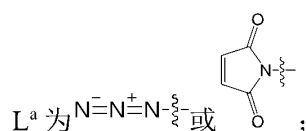
优选地, AA 每次出现时独立地为 Val、Cit、Glu 或 Ala 形成的氨基酸残基; 或

优选地, $-(AA)n^3-$ 为选自下组的肽残基: -Val-Cit-、-Glu-Val-Cit-、-Ala-Cit- 和 -Val-Ala-。

59. 根据权利要求 57 或 58 所述的化合物或其盐, 其中所述化合物具有以下结构:



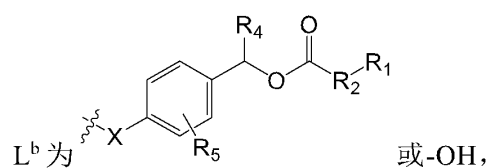
其中,



EG 为 $-CH_2CH_2O-$; n^1 是 0-4 的整数;

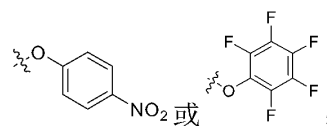
n^2 是 0-5 的整数;

AA 每次出现时独立地为氨基酸残基; n^3 是 0-3 的整数;

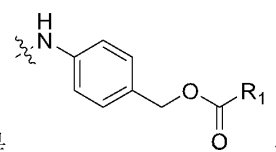


其中 X 为-NH-; R₂ 为键; R₄ 为氢; R₅ 为氢或-OCH₃;

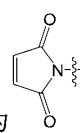
R₁ 为离去基团, 优选的 R₁ 是卤素 (例如氯)、

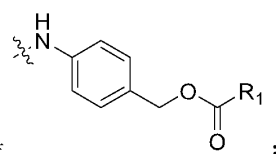


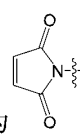
优选地, L^a 为 $\text{N}^{\ominus}=\text{N}^{\oplus}=\text{N}-\text{S}_2^{\ominus}$ 、n¹ 是 2、n² 是 1 且 L^b 是



优选地, L^a 为 $\text{N}^{\ominus}=\text{N}^{\oplus}=\text{N}-\text{S}_2^{\ominus}$ 、n¹ 是 2、n² 是 1 且 L^b 是-OH;

优选地, L^a 为 、n¹ 是 0、n² 是 5 且 L^b 是



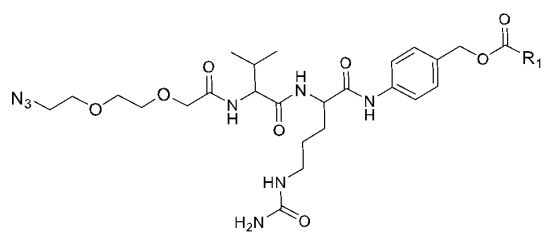
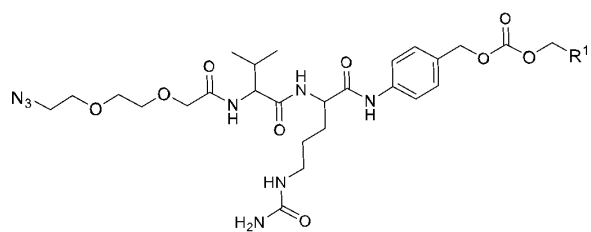
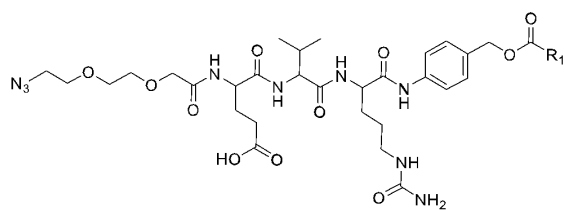
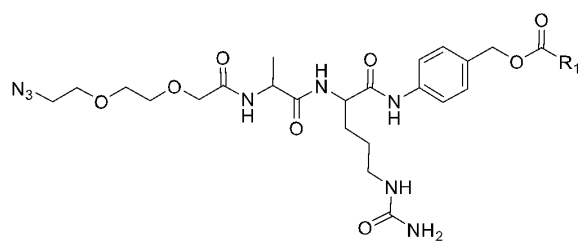
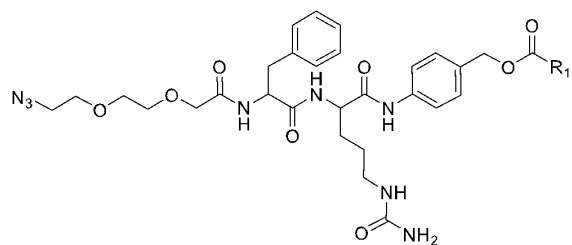
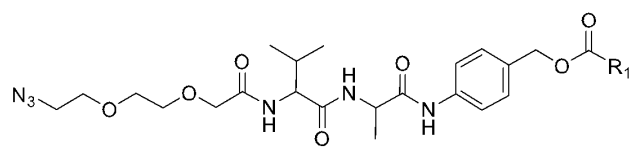
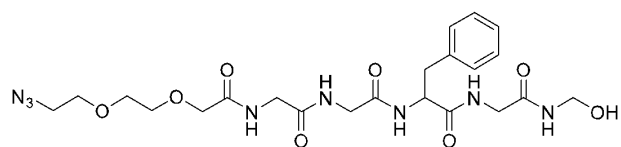
优选地, L^a 为 、n¹ 是 0、n² 是 5 且 L^b 是-OH;

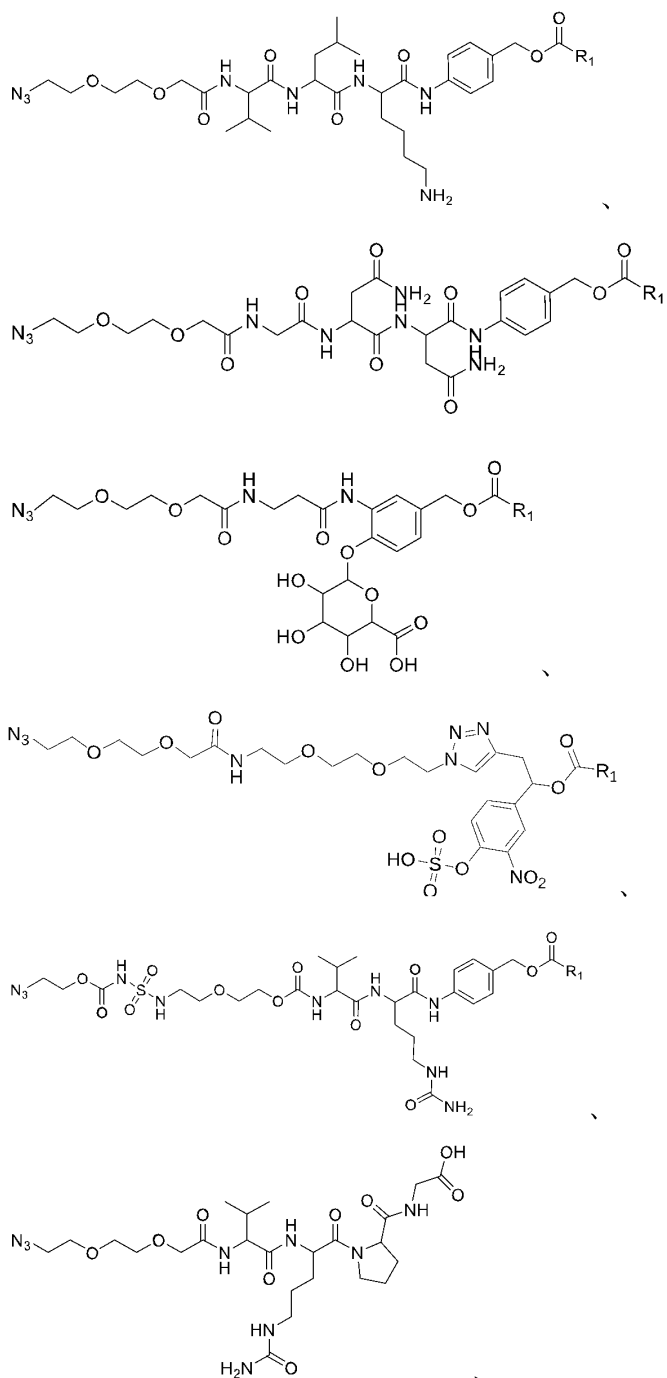
优选地, 所述 AA 每次出现时独立地为 Val、Cit、Glu 或 Ala 氨基酸残基;

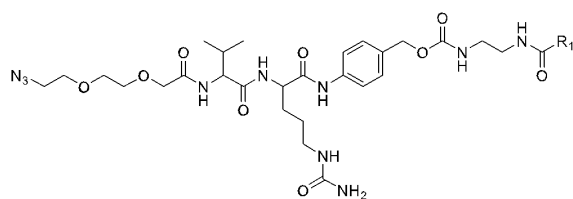
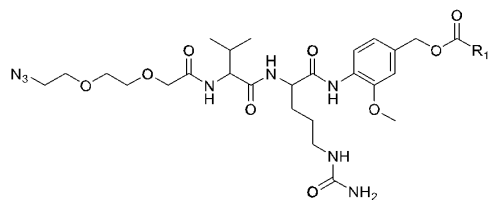
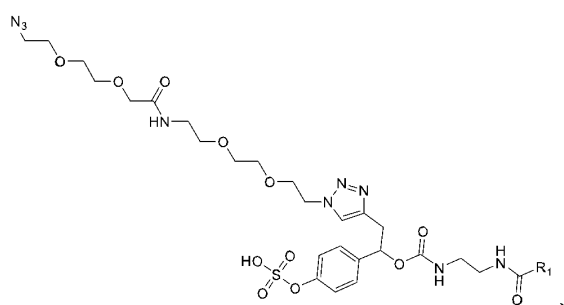
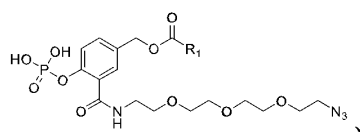
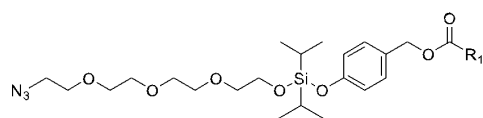
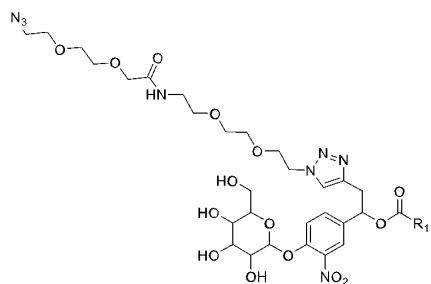
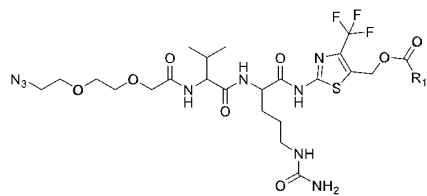
或

优选地, 所述-(AA)_n³-为选自下组的肽残基: -Val-Cit-、-Glu-Val-Cit-、-Ala-Cit-、-Phe-Cit-、-Val-Ala-、-Gly-Gly-Phe-Gly-、-Val-Leu-Lys-和 -Gly-Asn-Asn-。

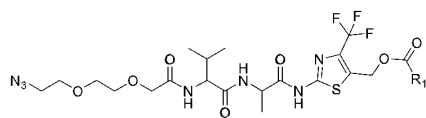
60. 根据权利要求 57-59 中任一项所述的化合物或其盐, 所述化合物具有选自以下组的结构:



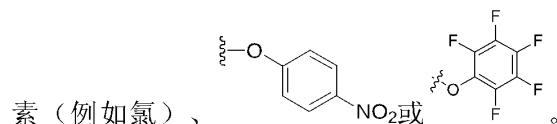




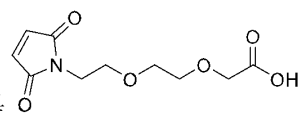
和



，其中 R_1 为离去基团，优选的 R_1 是卤

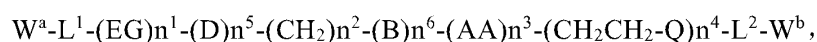


素（例如氯）、

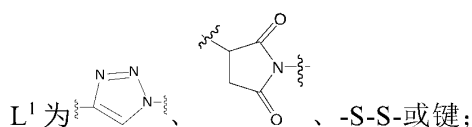


61. 一种化合物或其盐，所述化合物是

62. 一种偶联体化合物或其药学上可接受的盐，所述偶联体化合物具有以下结构：



其中，

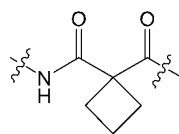


L^1 为

EG 为 $-CH_2CH_2O-$ 或 $-OCH_2CH_2-$ ； n^1 是 0-6 的整数；

n^2 是 0-8 的整数；

D 为 $-C(=O)-NH-S(=O)_2-NH-$ ； n^5 为 0 或 1；

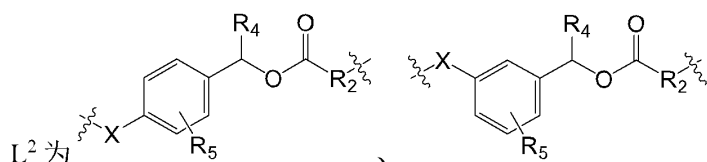


B 每次出现时独立地为 $-C(=O)-$ 、

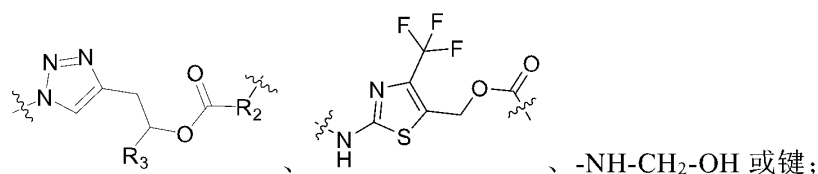
$-NH-CH_2CH_2-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-NH-$ 、 $-CH(CH_3)-CH_2-O-$ 、 $-CH_2CH_2O-$ 、 $-NH-C(=O)-$ 或 $-NH-$ ； n^6 为 0-3 的整数；

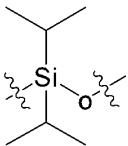
AA 每次出现时独立地为氨基酸残基； n^3 是 0-5 的整数；

Q 每次出现时独立地为 $-C(=O)-$ 、 $-O-$ 或键， n^4 是 0-3 的整数；

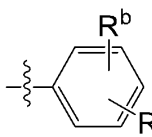
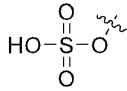


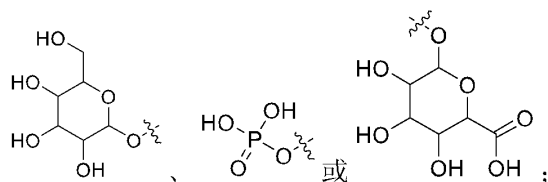
L^2 为



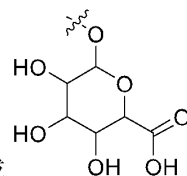
其中 X 为键、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-$ 、氧或  ；

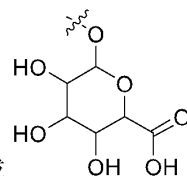
R_2 为键、 $-\text{O}-\text{CH}_2-$ 或 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$ ；

R_3 为氢或 ，其中 R^b 和 R^c 各自独立地为氢、硝基、、



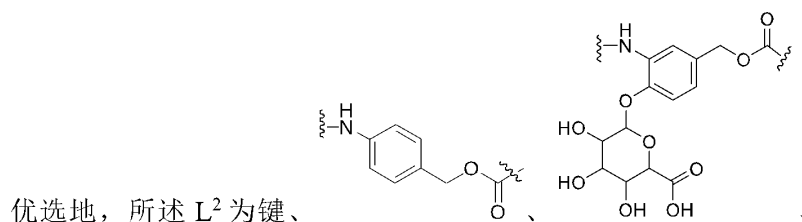
R_4 为氢或 C_{1-8} 烷基；



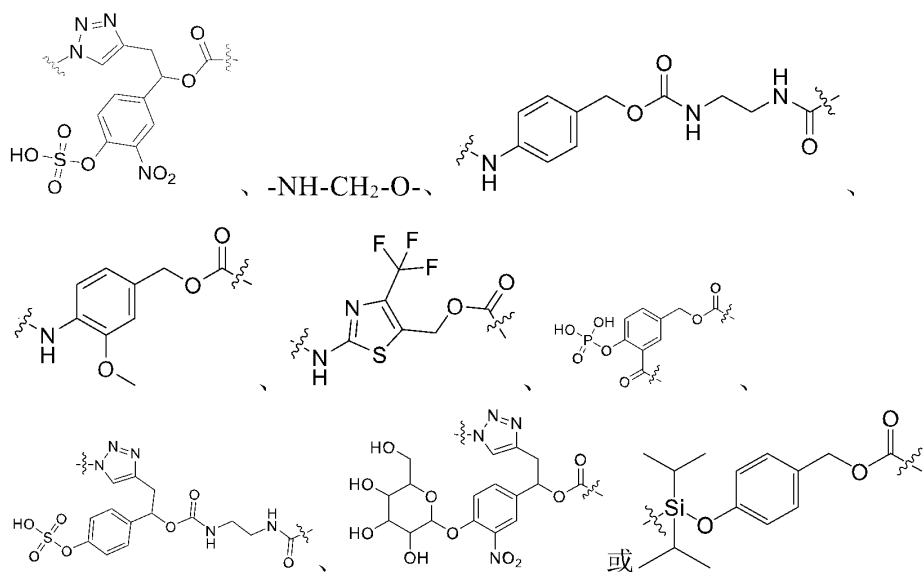
R_5 为氢、氨基、硝基、磷酸基、 $-\text{OR}^a$ 或 ；其中， R^a 为甲烷

基、乙烷基、丙烷基或异丙烷基；

W^a 和 W^b 各自独立地为有效载荷或可以结合细胞表面蛋白的靶向分子；



优选地，所述 L^2 为键、



优选地, EG 为 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$;

优选地, n^1 是 0 或 2;

优选地, n^2 是 1、4 或 5;

优选地, n^5 是 0;

优选地, n^6 是 1 或 3;

优选地, n^1 是 2、 n^2 是 1、 n^3 和 n^4 是 0 并且 L^2 是键;

优选地, AA 每次出现时独立地为 Val、Cit、Glu、Leu、Lys、Ala、Gly、Phe、Gln、Pro 或 Asn 形成的氨基酸残基;

优选地，-(AA)_n-为选自下组的肽残基：-Val-Cit-、-Glu-Val-Cit-、-Ala-Cit-、-Phe-Cit-、-Val-Ala-、-Gly-Gly-Phe-Gly-、-Cit-、-Val-Leu-Lys-、-Val-Cit-Pro-Gly-、-Gly-Asn-Asn-和-Ala-Ala-Asn-；

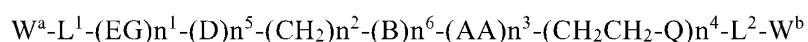
优选地, 当 n^4 为 1 时, Q 为 $-C(=O)-$;

优选地, 当 n^4 为 2 时, Q 分别为 -O- 和 -C(=O)-;

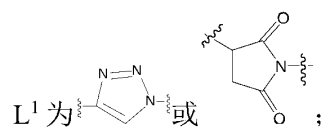
优选地，当 n^4 为 3 时，Q 分别为 -O-、-O- 和键；或

优选地, n^4 为 0。

63. 根据权利要求 62 所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐, 其中所述偶联体化合物具有以下结构:



其中,



EG 为 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$; n^1 是 2-4 的整数;

D 为 $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{S}(=\text{O})_2-\text{NH}-$; n^5 为 0 或 1;

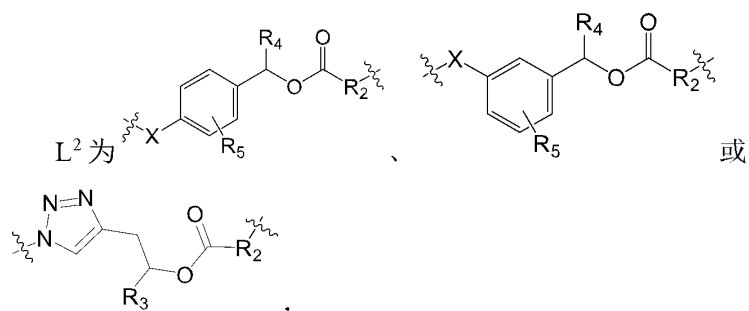
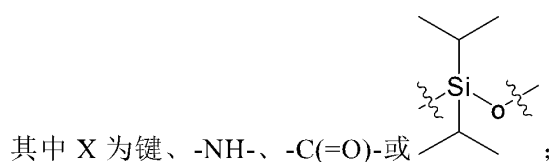
n^2 是 0-5 的整数;

B 为 $-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 、 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 或 $-\text{NH}-$;

n^6 为 0-3 的整数;

AA 每次出现时独立地为氨基酸残基; n^3 是 0-3 的整数;

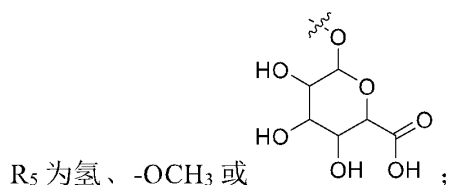
Q 每次出现时独立地为 $-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{O}-$ 或键, n^4 是 0-3 的整数;



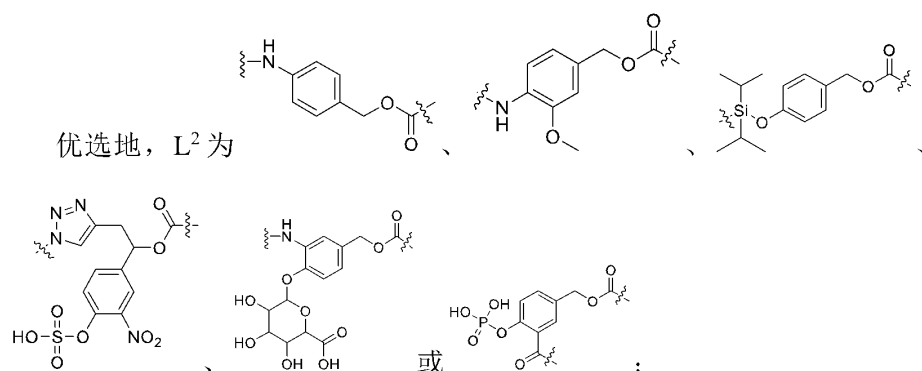
R_2 为键;



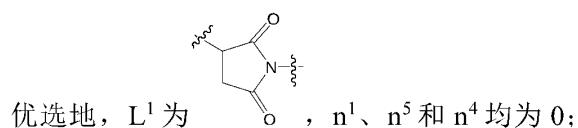
R_4 为氢;



W^a 和 W^b 各自独立地为有效载荷或可以结合细胞表面蛋白的靶向分子；



优选地，n⁵ 为 1 时，n² 和 n⁴ 均为 0；

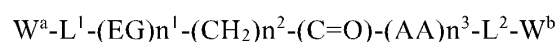


优选地，L¹ 为 ， n² 是 1 或 2；

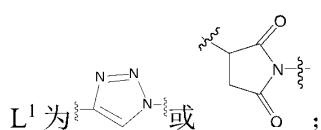
优选地，AA 每次出现时独立地为 Val、Cit、Glu 或 Ala 形成的氨基酸残基；或

优选地，-(AA)n³-为选自下组的肽残基：-Val-Cit-、-Glu-Val-Cit-、-Ala-Cit-和-Val-Ala-。

64. 根据权利要求 61 或 62 所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述偶联体化合物具有以下结构：



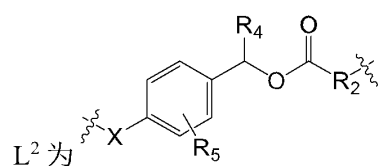
其中，



EG 为 -CH₂CH₂O-；n¹ 是 0-4 的整数；优选地

n² 是 1-5 的整数；

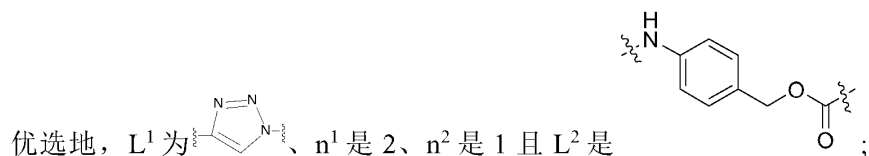
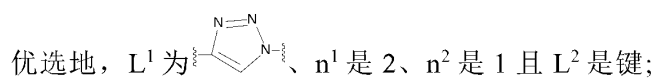
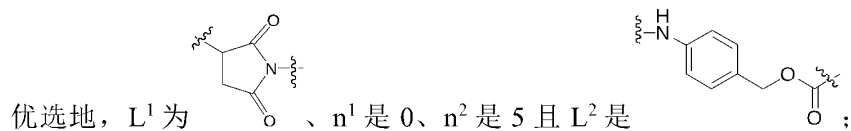
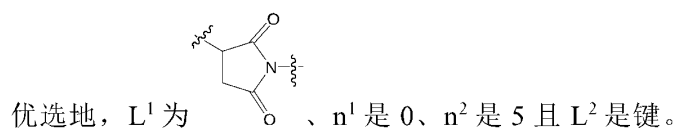
AA 每次出现时独立地为氨基酸残基；n³ 是 1-4 的整数；



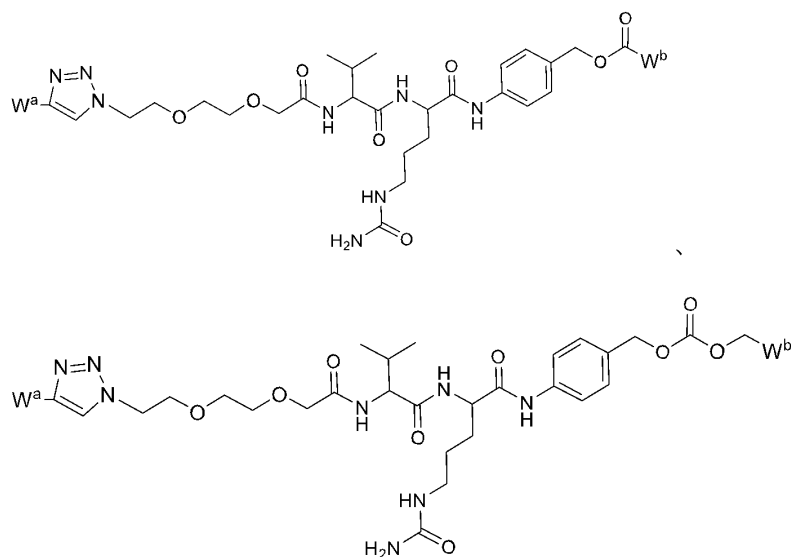
或键，

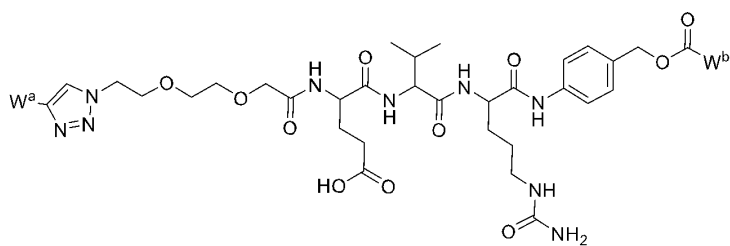
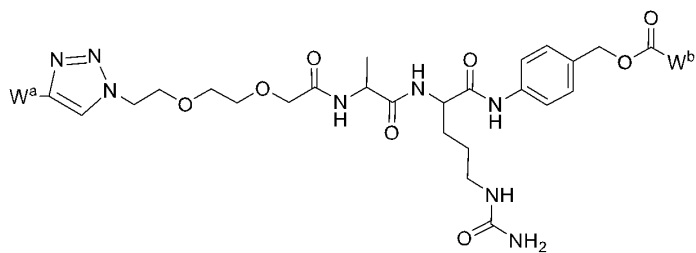
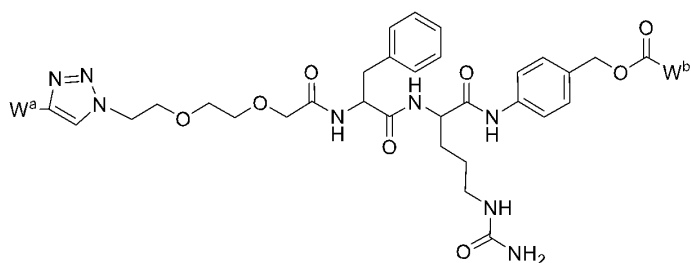
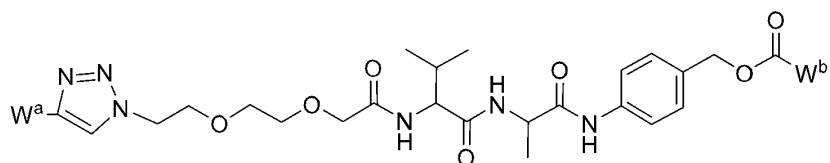
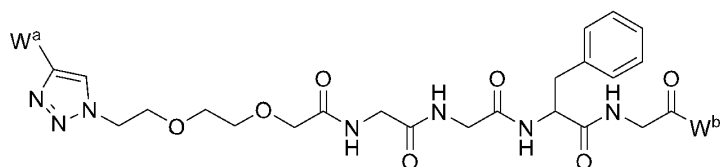
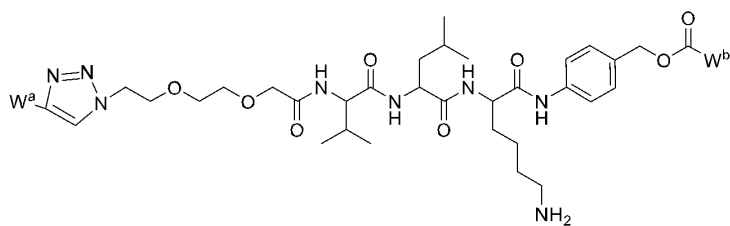
其中 X 为-NH-；R₂ 为键；R₄ 为氢；R₅ 为氢或-OCH₃；

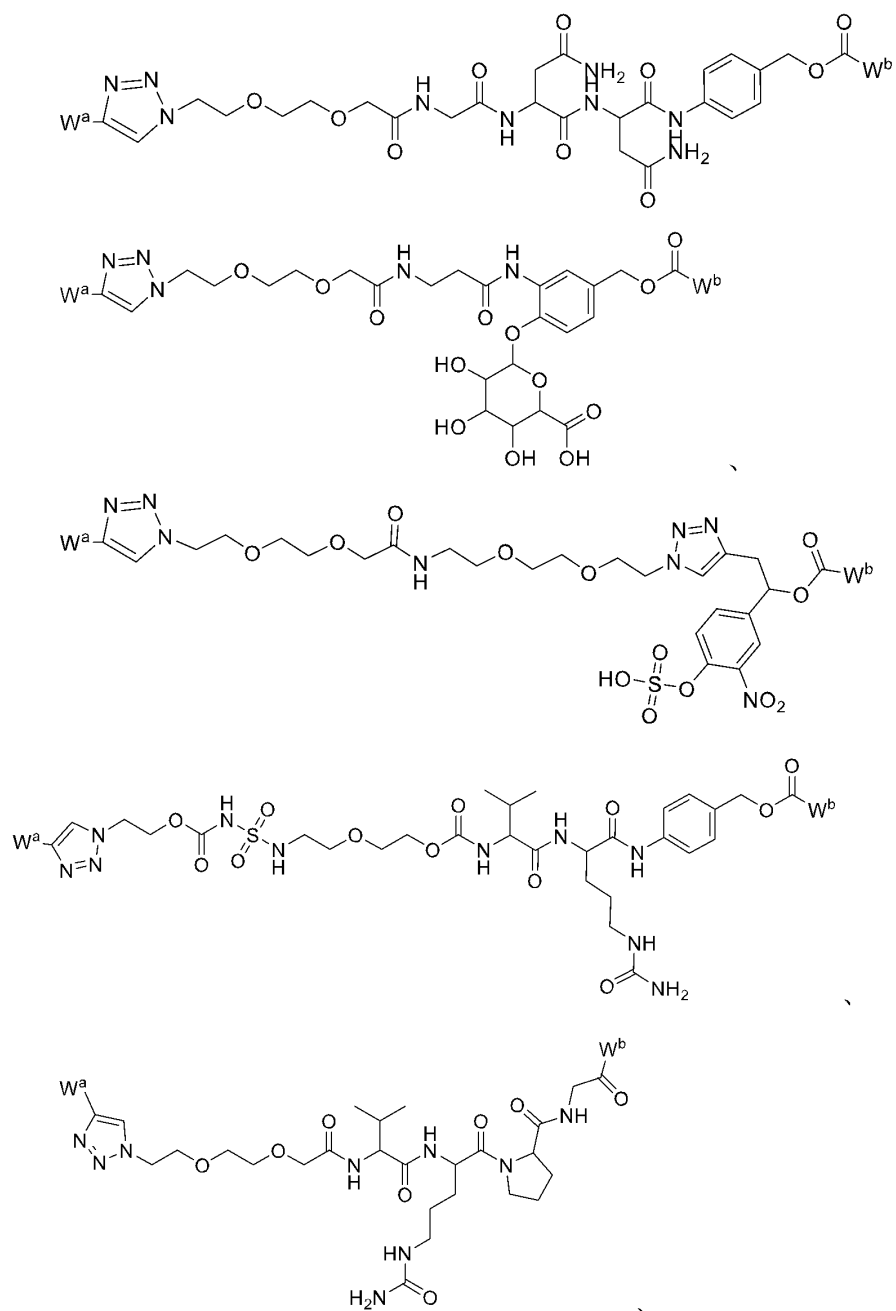
W^a 和 W^b 各自独立地为有效载荷或可以结合细胞表面蛋白的靶向分子；

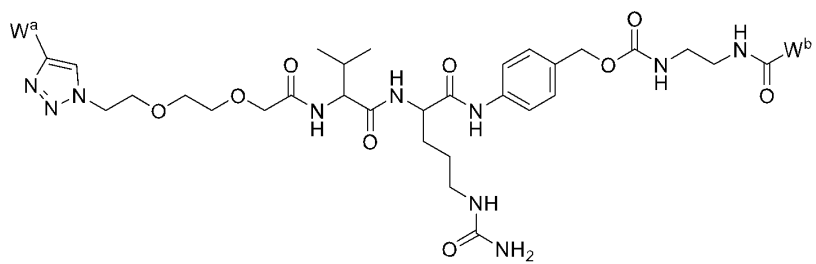
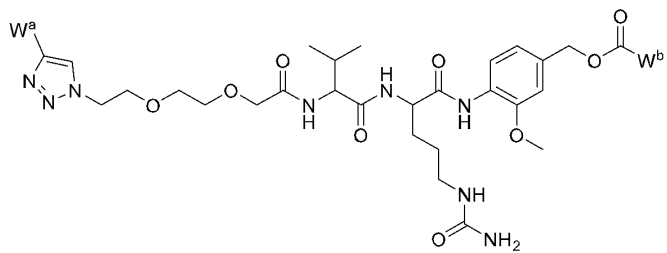
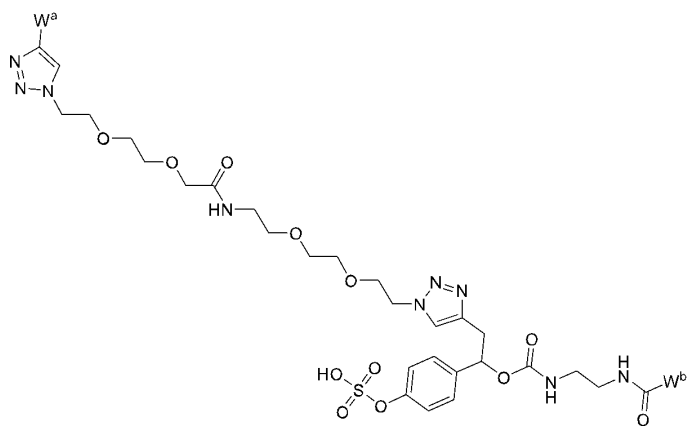
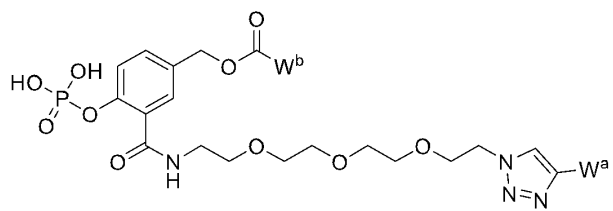
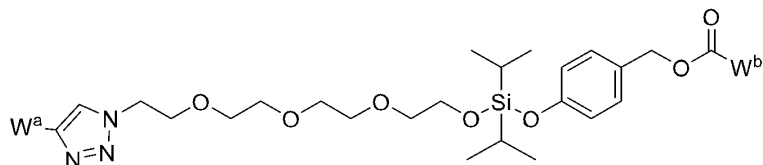


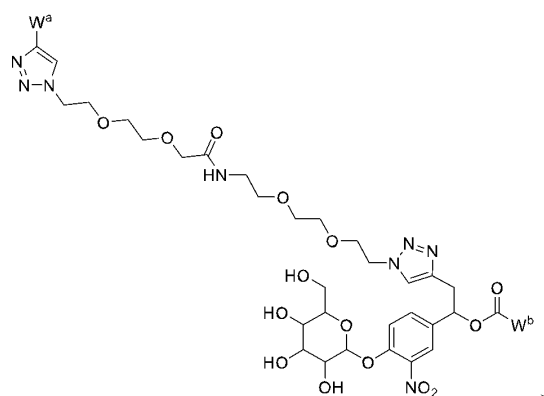
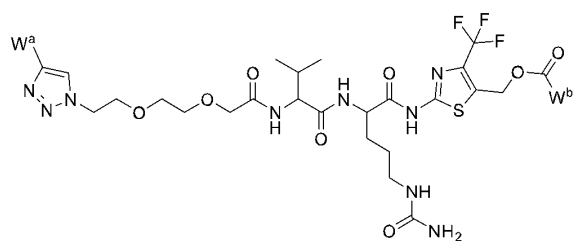
65. 根据权利要求 52-64 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，所述化合物具有选自以下组的结构：



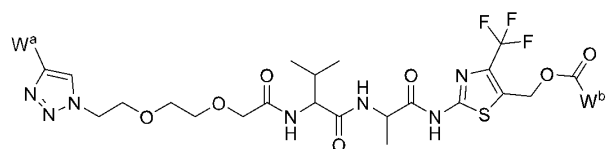






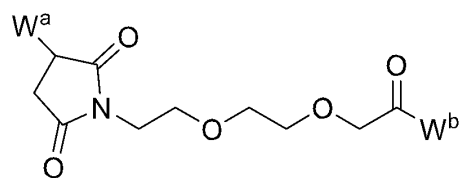


和

, 其中 W^a 和 W^b 各自独立

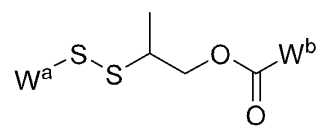
地为有效载荷或可以结合细胞表面蛋白的靶向分子。

66. 一种偶联体化合物或其药学上可接受的盐, 所述偶联体化合物是

, 其中 W^a 和 W^b 各自独立地为有效载荷或

可以结合细胞表面蛋白的靶向分子。

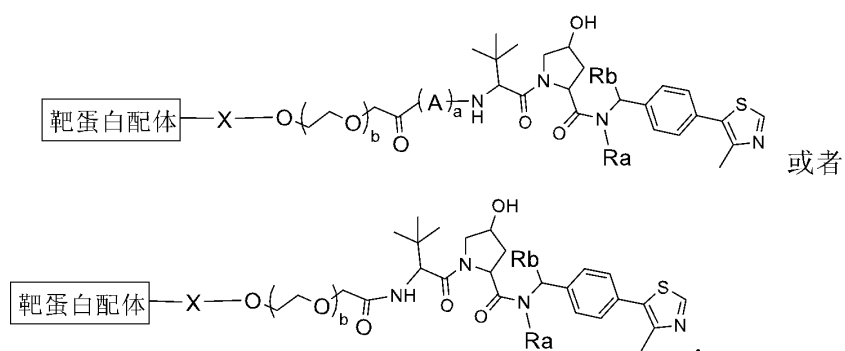
67. 一种偶联体化合物或其药学上可接受的盐, 所述偶联体化合物是

, 其中 W^a 和 W^b 各自独立地为有效载荷或可以结合

细胞表面蛋白的靶向分子。

68. 一种蛋白降解靶向嵌合体或其药学上可接受的盐, 所述蛋白降解靶向嵌

合体化合物具有以下结构：

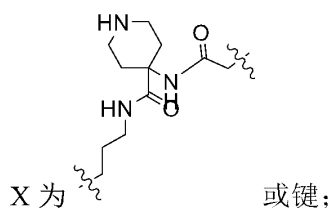
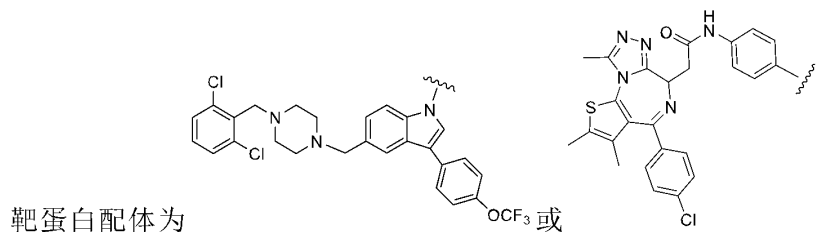


其中，

Ra 和 Rb 各自独立地为氢、C₁₋₄ 烷基、NH₂、OH、或卤素；

A 为氨基酸残基；a 为 0 或 1；

b 为 0-5 的整数；



69. 根据权利要求 68 所述的蛋白降解靶向嵌合体或其药学上可接受的盐，其中 Ra 为氢。

70. 根据权利要求 68 所述的蛋白降解靶向嵌合体或其药学上可接受的盐，其中 Rb 为氢。

71. 根据权利要求 68 所述的蛋白降解靶向嵌合体或其药学上可接受的盐，其中 A 为 Lys 形成的氨基酸残基。

72. 根据权利要求 68 所述的蛋白降解靶向嵌合体或其药学上可接受的盐，所

述蛋白降解靶向嵌合体化合物具有选自以下组的结构：

