

一种包含 SN38 的抗体药物偶联物中间体及其制备方法

技术领域

[01] 本发明涉及抗体药物偶联物领域,具体涉及一种抗体药物偶联物中间体及其制备方法。

背景技术

[02] 抗体偶联药物 (Antibody-Drug Conjugate, ADC) 作为一种新型的生物靶向药物,实现了单抗靶向作用和小分子药物细胞毒性的强强联合,现已成为肿瘤靶向治疗发展最快的领域之一。ADC 的三个组成单元 (抗体、细胞毒素和连接子) 共同组成靶向药物递送系统,其中抗体实现靶向性,连接子保证 ADC 在血液转运过程中的稳定性,而到达作用靶点后,毒素发挥对癌细胞的杀伤作用。目前有 60 多种 ADC 药物正在推进抗肿瘤治疗临床试验,其中绝大多数毒素为微管蛋白抑制剂,少部分为 DNA 抑制剂。DNA 抑制剂相比较微管蛋白抑制剂有两个优势: 1) DNA 抑制剂 (picomolar IC₅₀ values) 比微管蛋白抑制剂 (sub-nanomolar IC₅₀ values) 有更高活性,在治疗较少抗原的肿瘤中起到更好的作用; 2) 能够杀死不在分裂期的癌症细胞,在进行实体瘤治疗方面具有优势。

[03] 喜树碱类化合物是临床中应用的拓扑异构酶 1 (TOP1) 抑制剂,对临床上生长缓慢的实体瘤有良好的效果。但是喜树碱的特殊结构导致其水溶性及脂溶性都很差,必须进行水溶性改造。以喜树碱为弹头的 ADC 药物为解决上述缺陷提供了新的方案。

[04] 目前已有 2 款以喜树碱衍生物为弹头的 ADC 药物获批上市,为 Enhertu (trastuzumab deruxtecan) 和 Trodelvy (Sacituzumab govitecan), 它们在治疗肿瘤尤其是恶性肿瘤方面满足了极大的临床需求。阿斯利康/第一三共研发的 Enhertu 以组织蛋白酶 B 活化的 GGFG 四肽作为 linker, 并引入一小段自裂解结构,释放出来的是 Exatecan 的衍生物 Dxd。在 HER2 阳性转移性乳腺癌中, 99 例患者使用 Enhertu 的客观缓解率为 54.5%, 疾病控制率为 93.9%。Sacituzumab govitecan 的连接子为 Mcc-triazole spacer-PEG7-x-lysine-PABC, 在细胞中溶酶体 (pH 在 5 左右) 中分解释放喜树碱 (SN38)。Sacituzumab govitecan 的三阴乳腺癌临床二期结果显示,其有效率高达 30%, 69.5% 的患者肿瘤都出现了缩小,而三阴乳腺癌临床几乎是“无药可治”。此外,针对多线治疗失败的小细胞

肺癌, Sacituzumab govitecan 可以使 60% 的患者肿瘤缩小; 针对化疗、靶向和 PD-1 治疗都失败的非小细胞肺癌, Sacituzumab govitecan 的控制率高达 43%。但临床试验中, 尽管治疗效果显著, 但同时也存在较为严重的 ADC 毒性引发的安全性问题, 如血液系统毒性、神经毒性、肺毒性、皮肤毒性、肝毒性、眼毒性、代谢异常、心脏毒性等, 因此改善 ADC 药物的安全性是目前药物开发中需要高度关注和解决的问题。

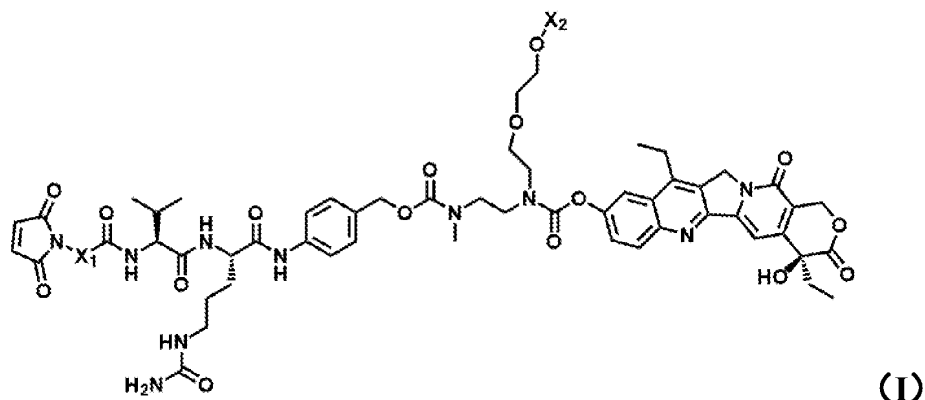
[05] 此外, 部分 ADC 的连接子及载荷的合成中也存在金属离子反应产物不便于去除问题, 如 Sacituzumab govitecan 所用到的 CL2A-SN38 在合成过程中涉及到点击化学反应 (Click 反应) (参见中国专利申请公开号 CN102448494A, 说明书第 50 页第[0273]段), 因此会导致该反应产物中含有 Cu^{2+} , 且不易去除。

[06] 连接子(Linker)在 ADC 结构中起着至关重要的作用, 其会影响 ADC 的药代动力学参数、治疗指数和药效。Linker 可维持 ADC 复合物在血流中的稳定性, 连接子的设计首先要考虑到稳定性, 因为 ADC 药物的半衰期比较长, 所以需要连接子的性质稳定, 这样才能防止连接子在血液中被分解提前释放毒素。如果连接子在血液中不够稳定, 就会导致 ADC 在进入肿瘤细胞之前就被分解, 药物对肿瘤的打击作用就会降低, 甚至会误杀其他细胞。而且, 在肿瘤细胞内化 ADC 的过程中, Linker 应能够快速释放细胞毒性药物。由此, 连接子对于开发的 ADC 药品的安全性、有效性具有显著的决定作用。并且根据连接子结构的不同, 也极大的影响 ADC 的制备过程的难度系数、生产成本以及环境友好性, 并且极大的影响 ADC 药品的质量, 如 ADC 的稳定性等, 进而会影响 ADC 药物的安全性。

发明内容

[07] 本发明提供了一种包含 SN38 的抗体药物偶联物中间体及其制备方法, 该制备方法步骤简单, 节约成本, 在反应中不会引入重金属离子, 具有更高的环境友好性, 并且采用该制备方法合成的抗体药物偶联物中间体具有良好的稳定性, 从而显著提升 ADC 药物的安全性。

[08] 本发明涉及一种如式 (I) 所示的抗体药物偶联物中间体:



其中：

X₁ 为烷烃链或 PEG 链.

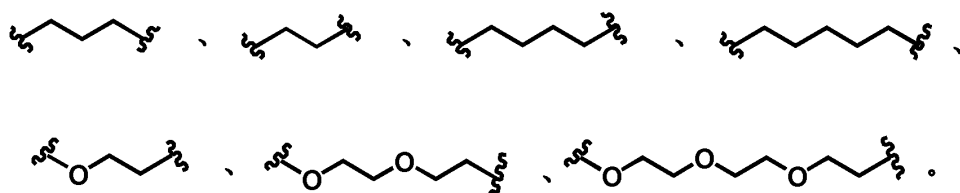
X_2 为 H 或 $-C(O)NR^1R^2$, 且,

5 **R¹选自氢、卤素、羟基、取代或非取代的 C₁₋₆烷基、取代或非取代的 C₁₋₆羟烷基、取代或非取代的 C₁₋₆氨基烷基、取代或非取代的 C₁₋₆烷氧基、取代或非取代的 C₁₋₆烷酰基和取代或非取代的 C₁₋₆烷醛基；**

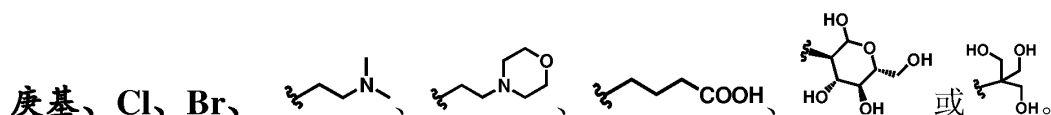
10 R²选自氢和取代或非取代的 C₁₋₆烷基；其中各取代的 C₁₋₆烷基任选被 1-5 个独立地选自以下的取代基取代：卤素、羟基、氨基、羰基、羧基、5-10 元杂环基和 C₁₋₆ 卤代烷基，其中所述 5-10 元杂环基具有 1-3 个选自氧、氮和硫的杂原子。

[09]优选的, 所述的 X_1 选自: $-(CH_2)_m-$ 或 $-(CH_2CH_2O)_p-$, 其中所述的 m 选自 1、2、3、4、5、6, 优选的, m 为 5; 其中所述的 p 选自 1、2、3、4、5、6, 优选的, p 为 2。

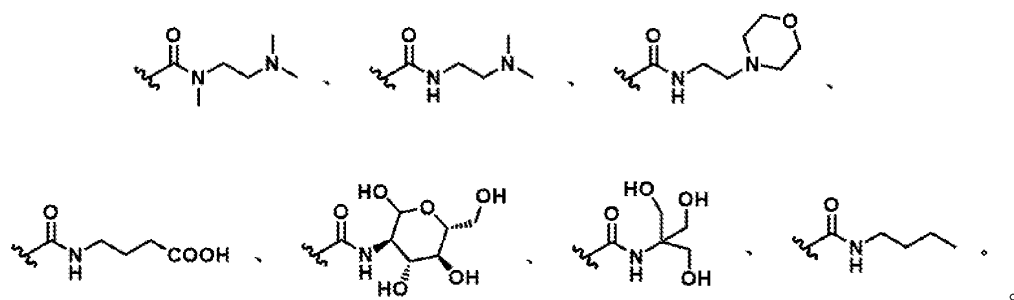
15 [10]优选的, 所述 X_1 选自:



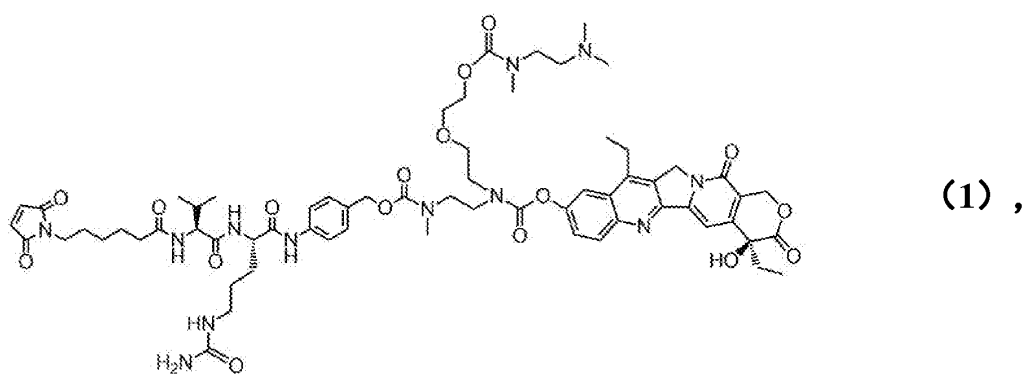
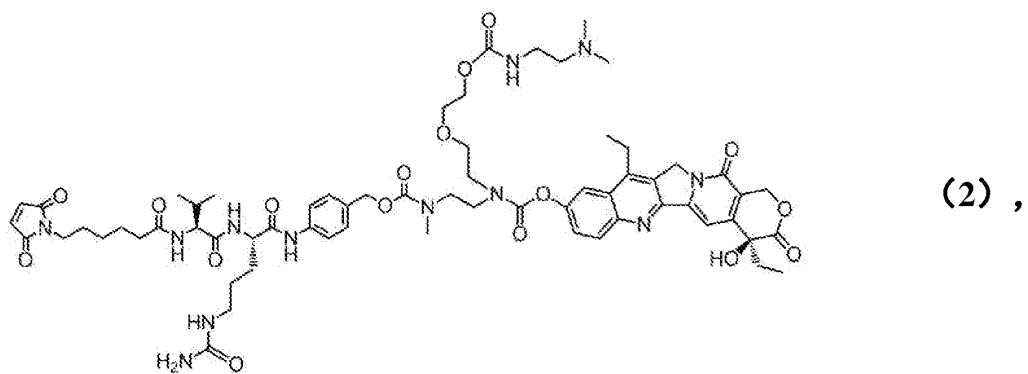
[11] 优选的, 所述的 R^1 或 R^2 选自: H、甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、

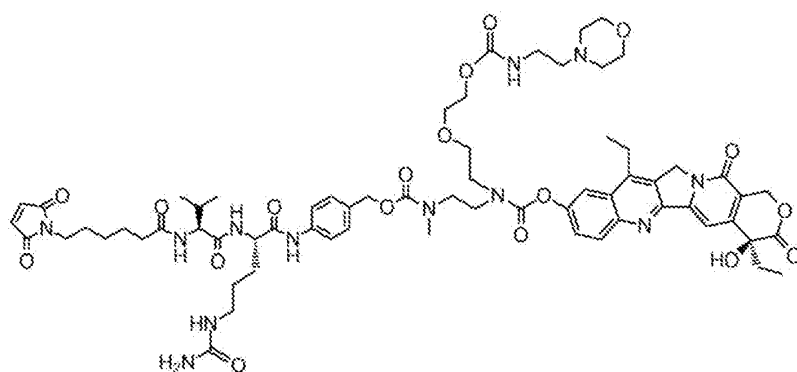
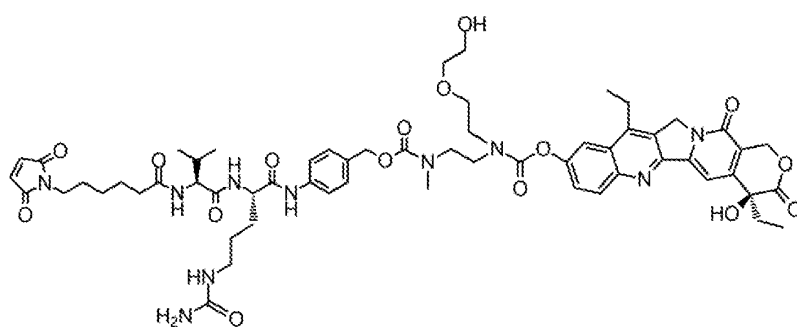
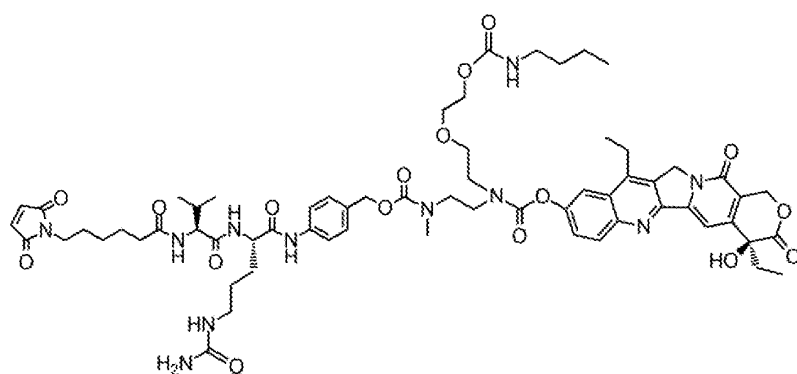
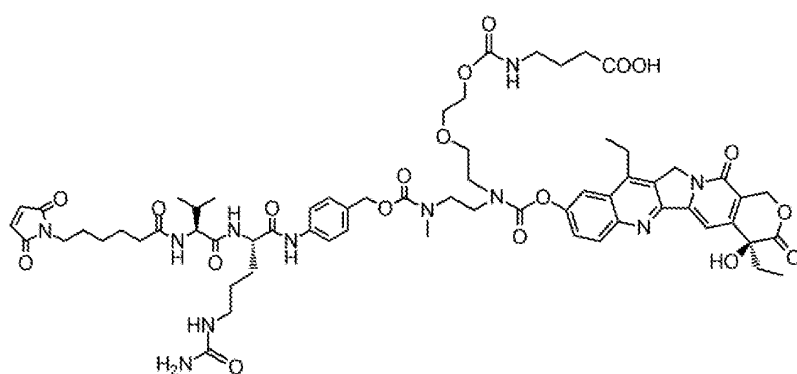


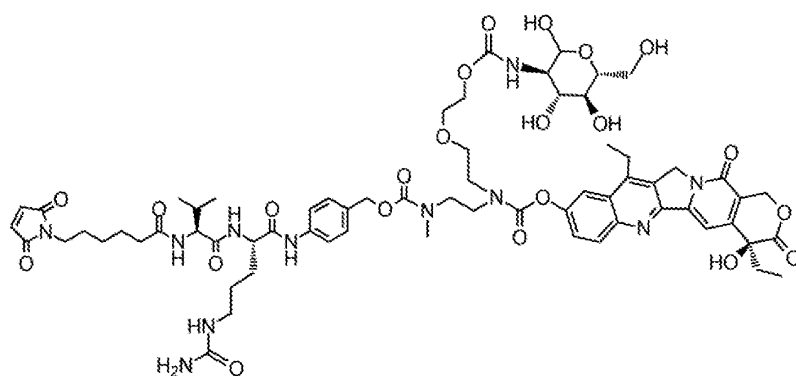
[12]优选的,所述的 X_2 为:



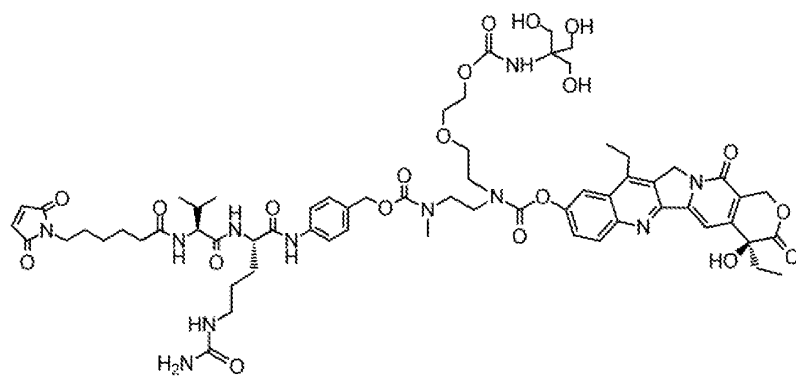
[13]优选的，所述的抗体药物偶联物中间体的结构如式（1） - （16）所示：



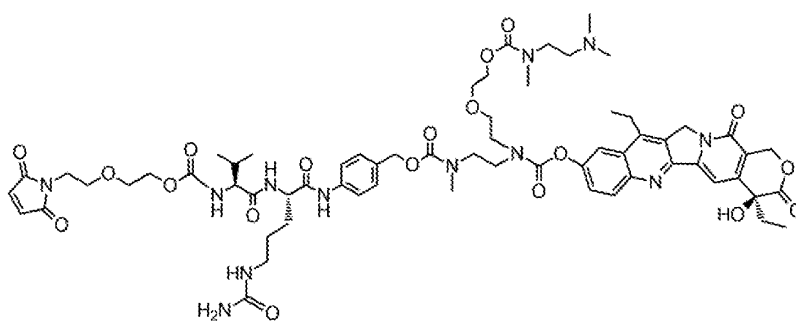




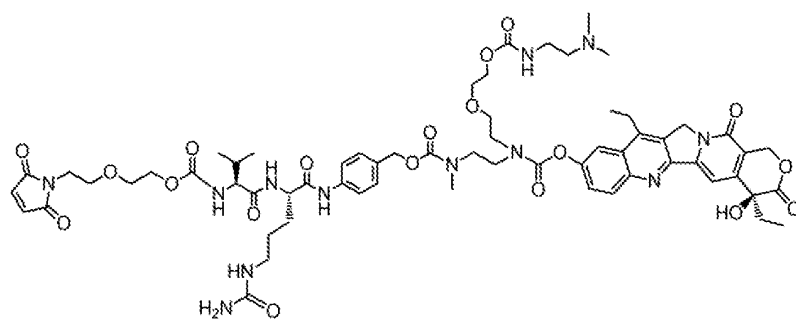
(7) ,



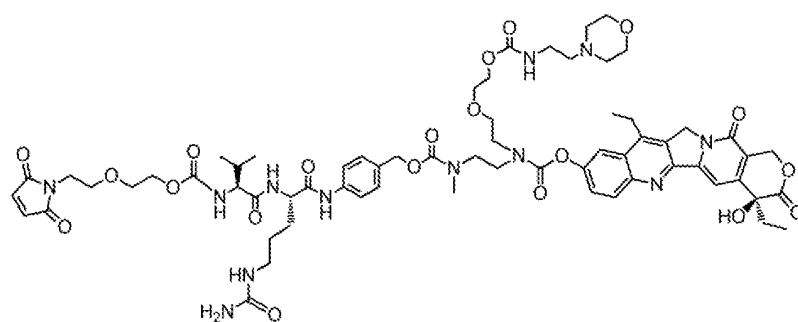
(8) ,



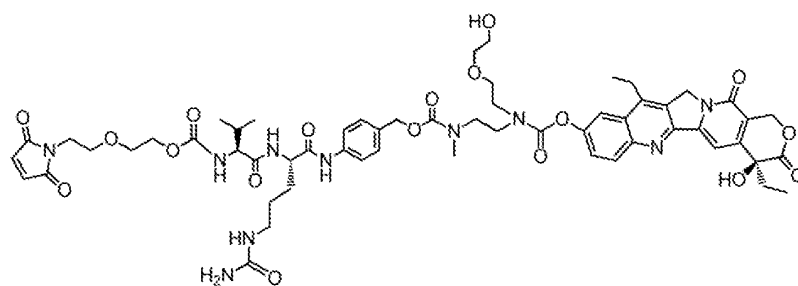
(9) ,



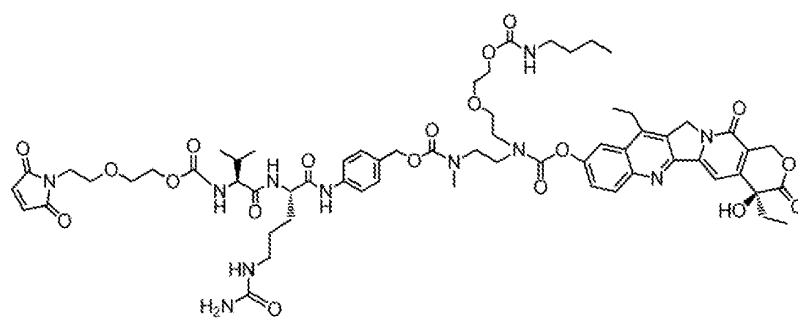
(10) ,



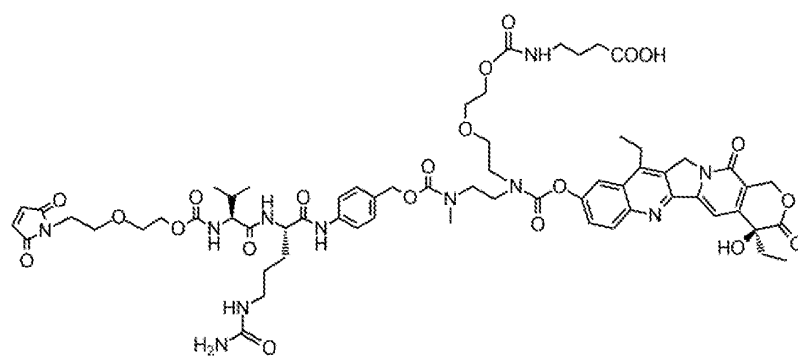
(11) ,



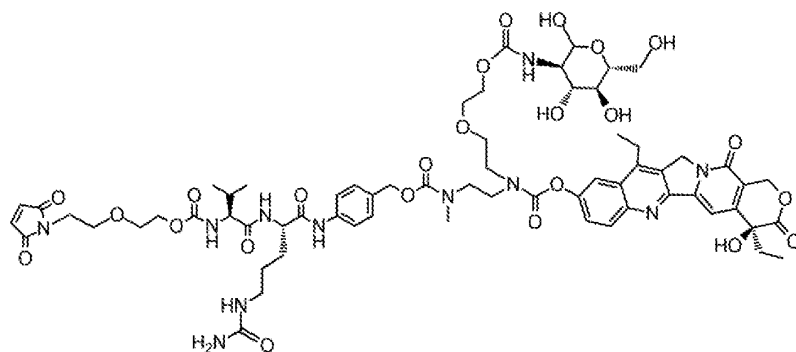
(12) ,



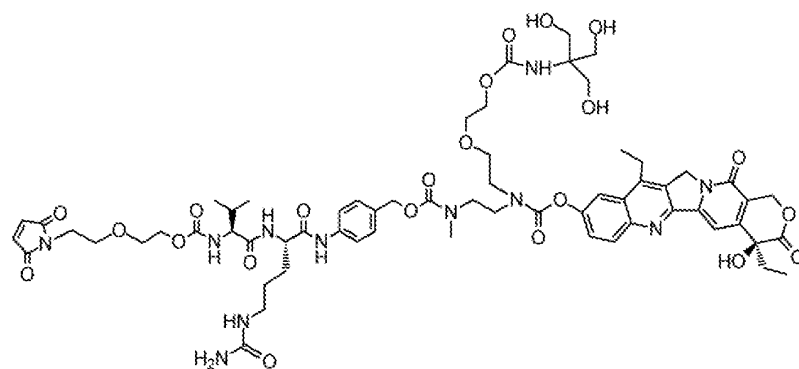
(13) ,



(14) ,



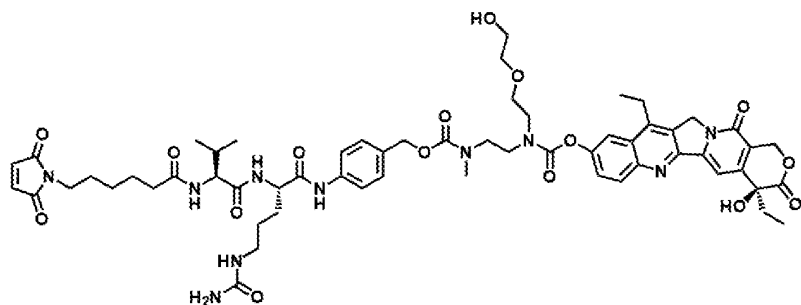
(15) ,



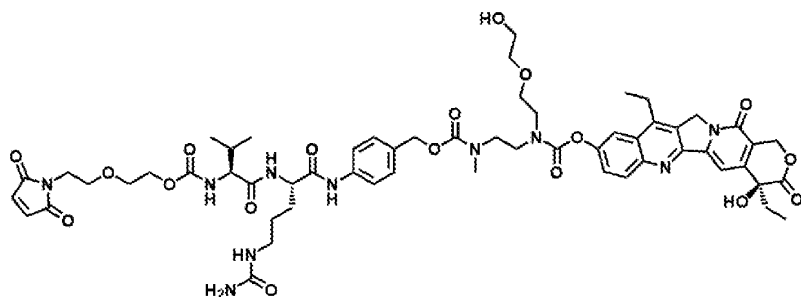
(16) .

[14]本发明还提供了一种抗体药物偶联物中间体的制备方法。

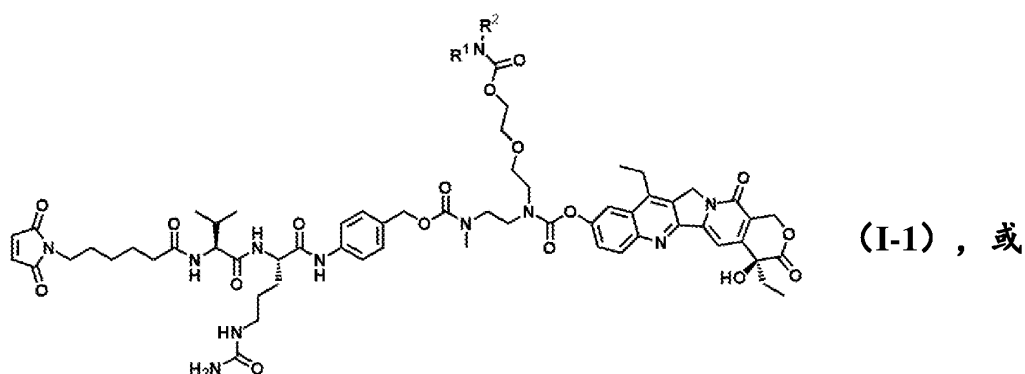
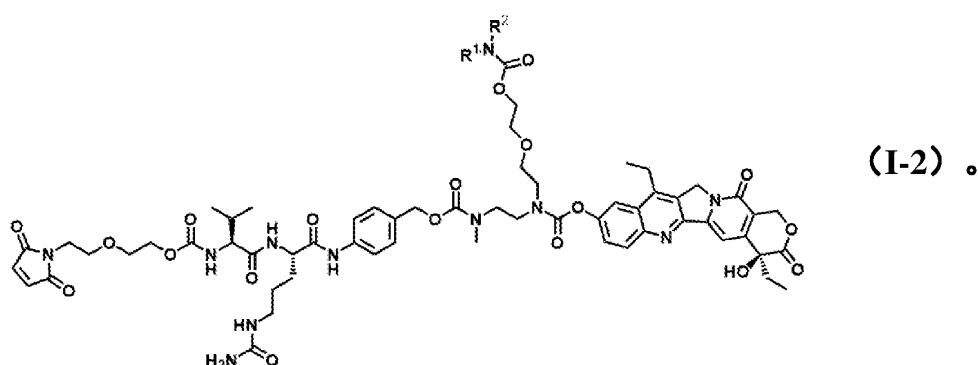
[15]进一步的，所述的抗体药物偶联物中间体的结构为：



(4) , 或



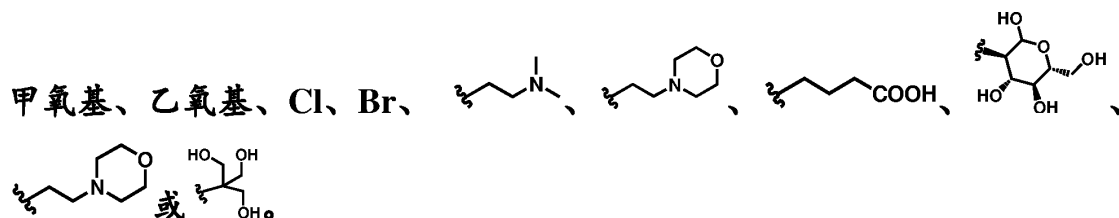
(12) , 或



[16]所述的 R^1 选自氢、取代或非取代的 C_{1-6} 烷基、取代或非取代的 C_{1-6} 羟基烷基、取代或非取代的 C_{1-6} 氨基烷基、取代或非取代的 C_{1-6} 烷氧基、取代或非取代的 C_{1-6} 烷酰基和取代或非取代的 C_{1-6} 烷醛基；

[17]所述的 R^2 选自氢和取代或非取代的 C_{1-6} 烷基；其中各取代的 C_{1-6} 烷基
 5 任选被 1-5 个独立地选自以下的取代基取代：卤素、羟基、氨基、羰基、羧基、5-10 元杂环基和 C_{1-6} 卤代烷基，其中所述 5-10 元杂环基具有 1-3 个选自氧、氮和硫的杂原子。

[18]优选的， R^1 或 R^2 选自：H、甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、庚基、



[19]进一步的，所述的式 (4) 化合物的制备方法为：

反应 A：将化合物 a 和化合物 b 溶于溶剂中，室温搅拌适当时间后置于低

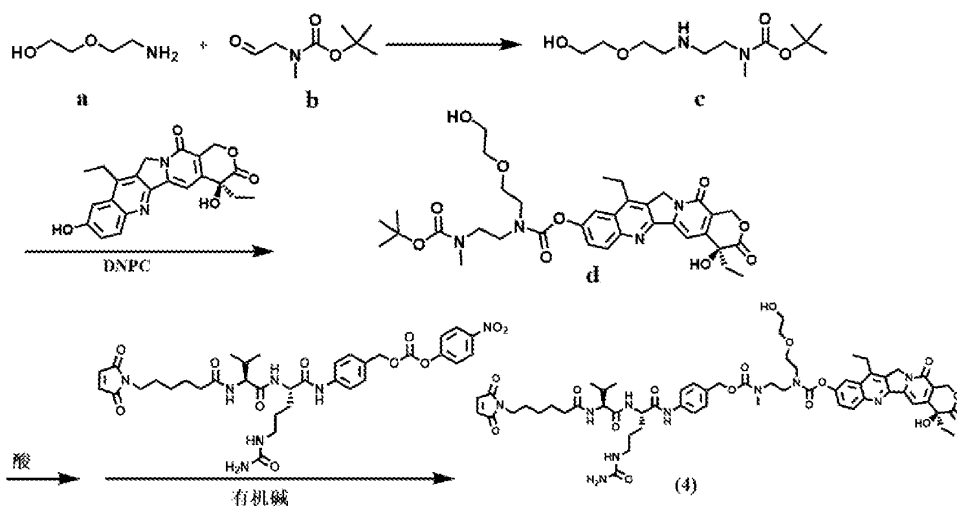
温条件下加入还原剂，再搅拌适当时间后，再置于室温搅拌过夜，反应结束后旋干溶剂并进行萃取、干燥和纯化；

反应 B：将 SN38 和 DNPC 溶于溶剂中，加入有机碱，室温搅拌适当时间，反应结束后旋干溶剂并进行打浆和过滤；

5 反应 C：将反应 B 的产物溶于溶剂中，加入反应 A 的产物及有机碱，室温搅拌适当时间，反应结束后旋干溶剂并进行纯化；

反应 D：将反应 C 的产物溶于溶剂中，加入酸，低温条件下搅拌适当时间，反应结束后旋干溶剂后与 Mc-VC-PAB-PNP 一起溶于溶剂中，低温条件下再搅拌适当时间，加入有机碱，反应结束后旋干溶剂并进行纯化。

10 [20]反应进程 1:



[21]进一步的，所述的式 (12) 化合物的制备方法为：

15 反应 A：将化合物 a 和化合物 b 溶于溶剂中，室温搅拌适当时间后置于低温条件下加入还原剂后搅拌适当时间，再置于室温搅拌过夜，反应结束后旋干溶剂并进行萃取、干燥和纯化；

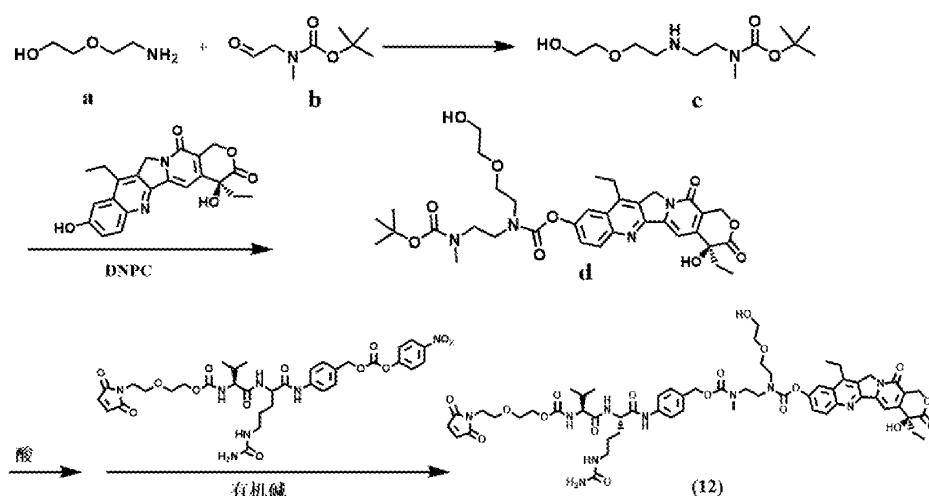
反应 B：将 SN38 和 DNPC 溶于溶剂中，加入有机碱，室温搅拌适当时间，反应结束后旋干溶剂并进行打浆和过滤；

反应 C：将反应 B 的产物溶于溶剂中，加入反应 A 的产物及有机碱，室温搅拌适当时间，反应结束后旋干溶剂并进行纯化；

20 反应 D：将反应 C 的产物溶于溶剂中，加入酸，低温条件下搅拌适当时间，反应结束后旋干溶剂后与 MP2-VC-PAB-PNP 一起溶于溶剂中，低温条件下搅拌适当时间，加入有机碱，反应结束后旋干溶剂并进行

纯化。

[22]反应进程 2:



[23]进一步的, 所述的化合物 (I-1) 的制备方法为:

5 反应 A: 将化合物 a 和化合物 b 溶于溶剂中, 室温搅拌适当时间后置于低温条件下中加入还原剂后搅拌适当时间, 再置于室温搅拌过夜, 反应结束后旋干溶剂并进行萃取、干燥和纯化;

反应 B: 将 SN38 和 DNPC 溶于溶剂中, 加入有机碱, 室温搅拌适当时间, 反应结束后旋干溶剂并进行打浆和过滤;

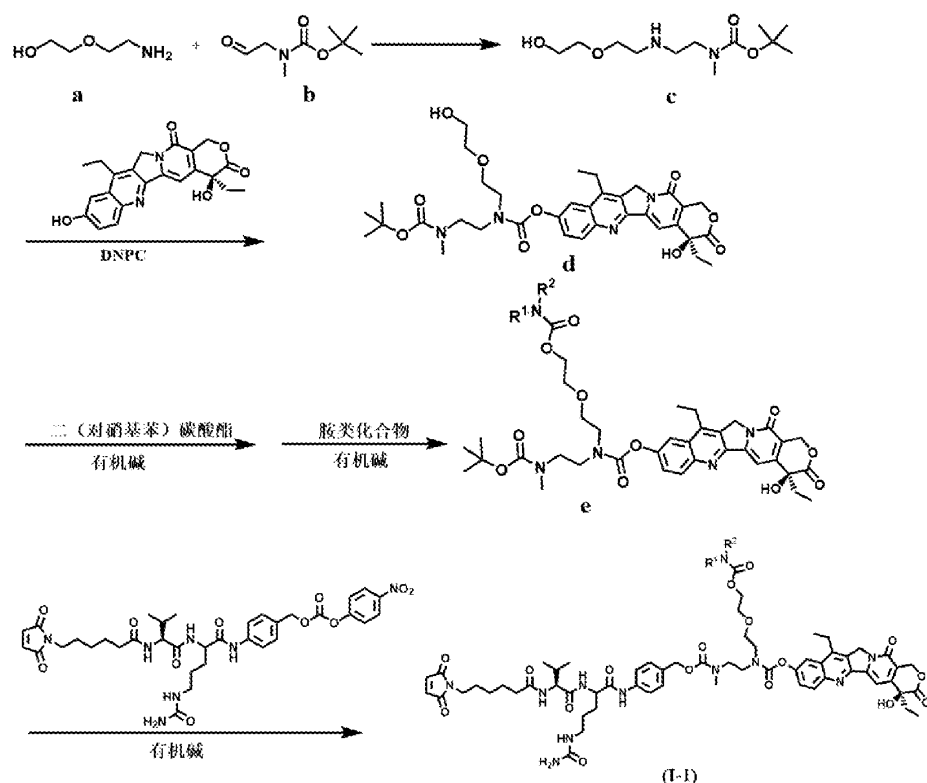
10 反应 C: 将反应 B 的产物溶于溶剂中, 加入反应 A 的产物及有机碱, 室温搅拌适当时间, 反应结束后旋干溶剂并进行纯化;

反应 D: 将反应 C 的产物溶于溶剂中, 加入二(对硝基苯)碳酸酯和有机碱, 恒温搅拌适当时间, 反应结束后旋干溶剂并进行纯化;

15 反应 E: 将反应 D 的产物和胺类化合物溶于溶剂中, 加入有机碱, 低温条件下搅拌适当时间, 反应结束后旋干溶剂并进行纯化;

反应 F: 将反应 E 的产物溶于溶剂中, 加入酸, 低温条件下搅拌适当时间, 反应结束后旋干溶剂后与 Mc-VC-PAB-PNP 一起溶于溶剂中, 低温条件下搅拌适当时间, 加入有机碱, 反应结束后旋干溶剂并进行纯化。

20 [24]反应进程 3:



[25]进一步的, 所述的化合物 (I-2) 的制备方法为:

反应 A: 将化合物 a 和化合物 b 溶于溶剂中, 室温搅拌适当时间后置于低温条件下中加入还原剂后搅拌适当时间, 再置于室温搅拌过夜, 反应结束后旋干溶剂并进行萃取、干燥和纯化;

反应 B: 将 SN38 和 DNPC 溶于溶剂中, 加入有机碱, 室温搅拌适当时间, 反应结束后旋干溶剂并进行打浆和过滤;

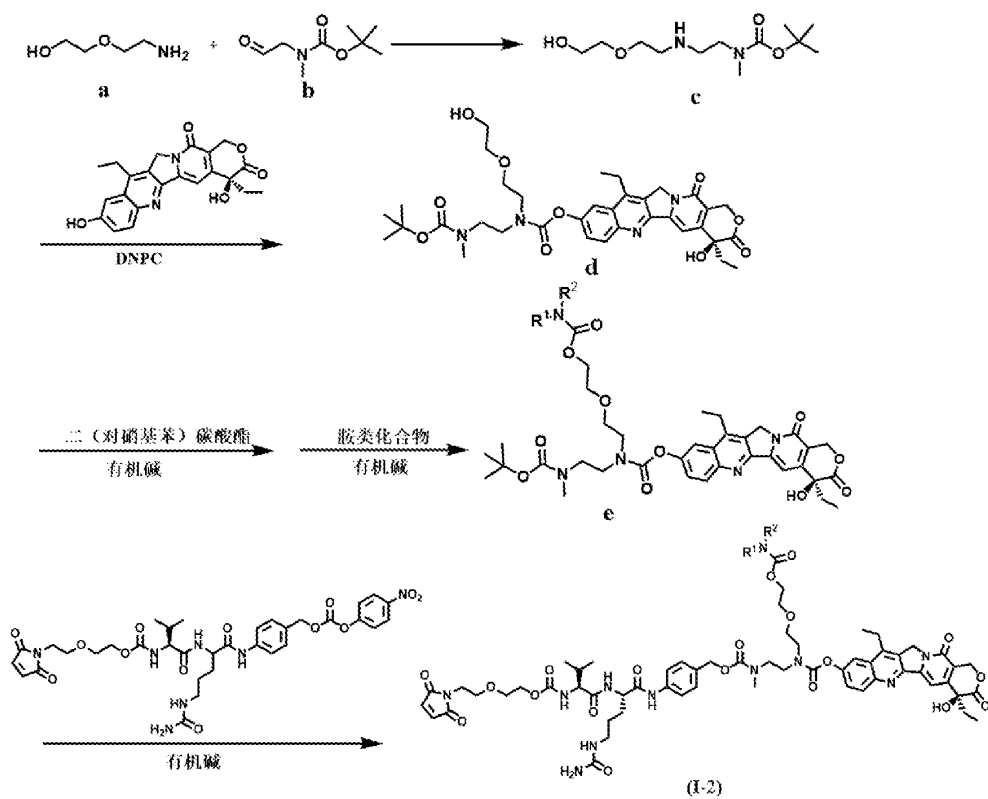
反应 C: 将反应 B 的产物溶于溶剂中, 加入反应 A 的产物及有机碱, 室温搅拌适当时间, 反应结束后旋干溶剂并进行纯化;

反应 D: 将反应 C 的产物溶于溶剂中, 加入二(对硝基苯)碳酸酯和有机碱, 恒温搅拌适当时间, 反应结束后旋干溶剂并进行纯化;

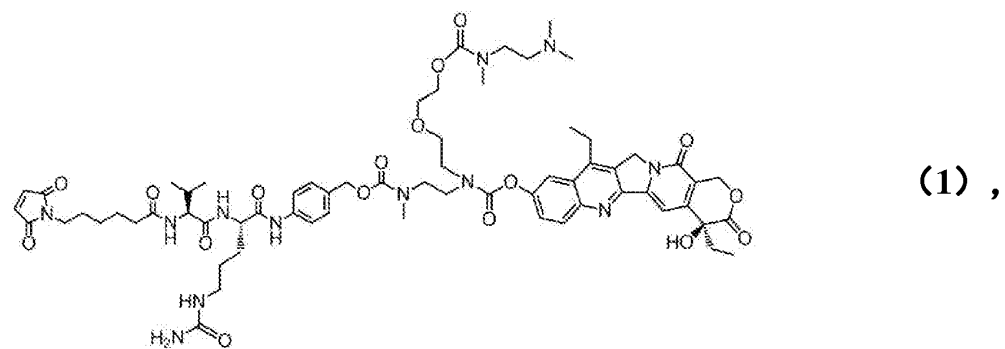
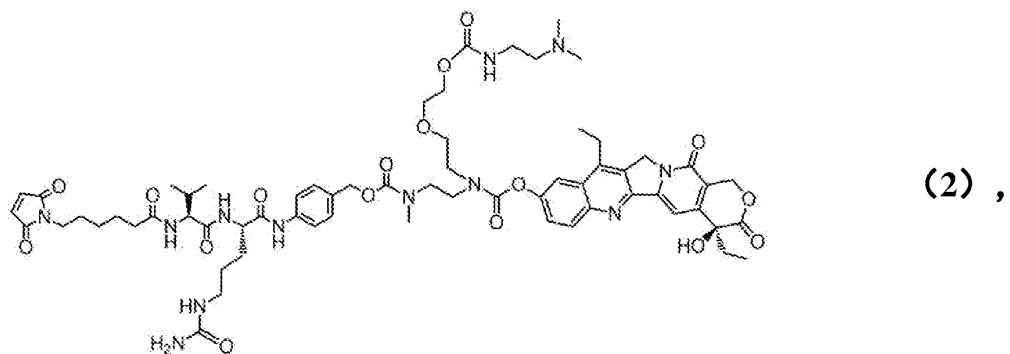
反应 E: 将反应 D 的产物和胺类化合物溶于溶剂中, 加入有机碱, 低温条件下搅拌适当时间, 反应结束后旋干溶剂并进行纯化;

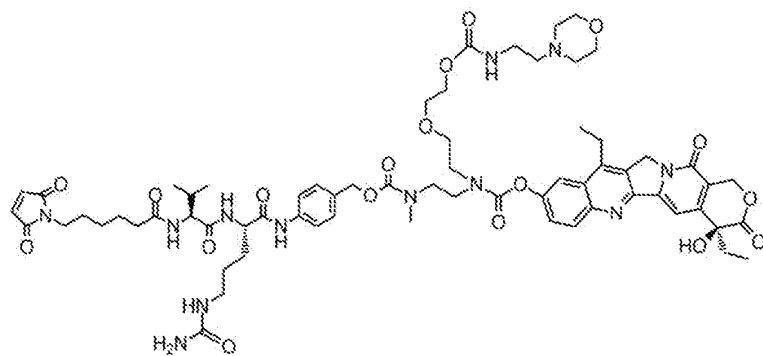
反应 F: 将反应 E 的产物溶于溶剂中, 加入酸, 低温条件下搅拌适当时间, 反应结束后旋干溶剂后与 MP2-VC-PAB-PNP 一起溶于溶剂中, 低温条件下搅拌适当时间, 加入有机碱, 反应结束后旋干溶剂并进行纯化。

[26]反应进程 4:

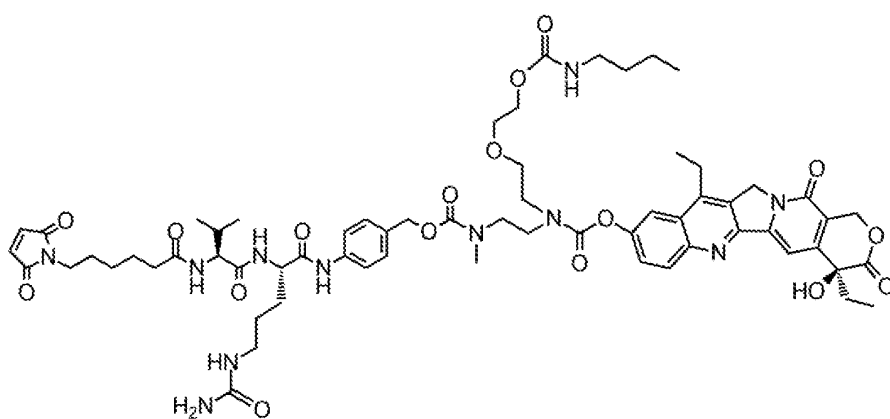


[27] 进一步的, 所述的化合物 (I-1) 选自:

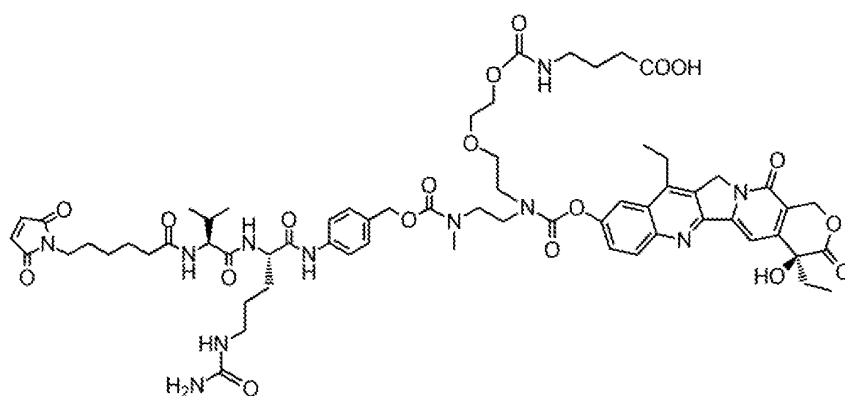




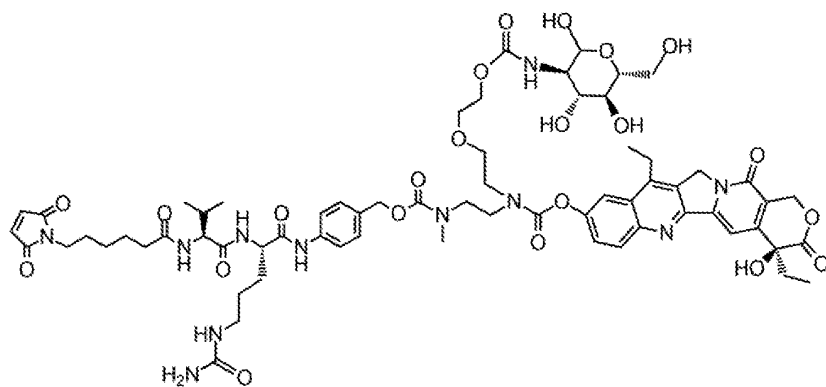
(3) ,



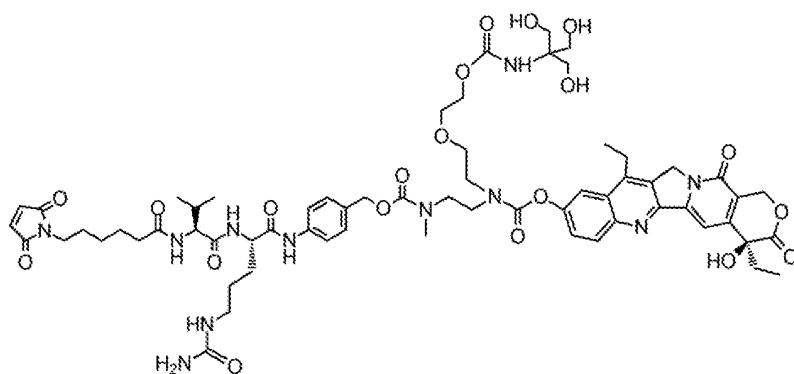
(5) ,



(6) ,

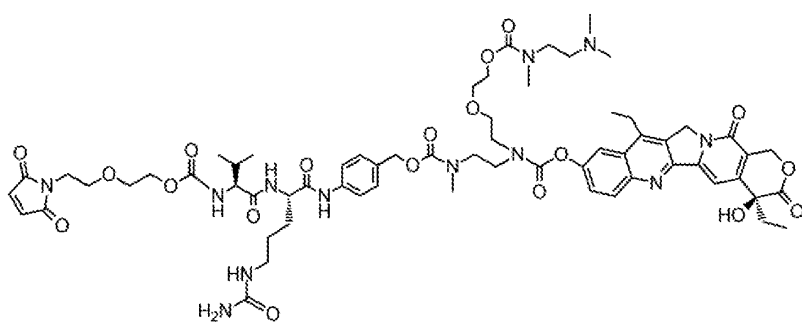


(7) ,

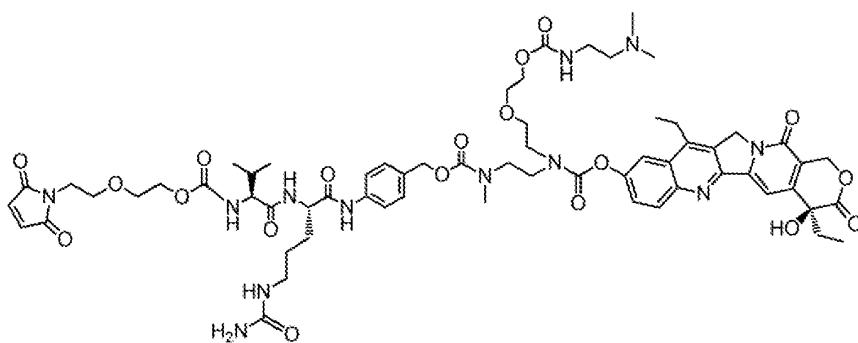


(8) ,

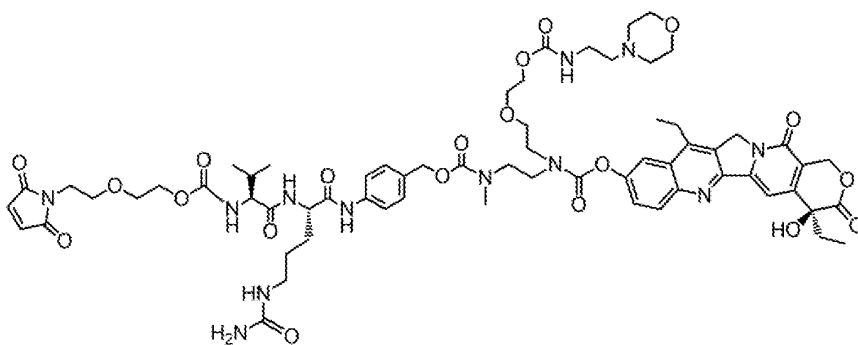
所述的化合物 (I-2) 选自:



(9) ,

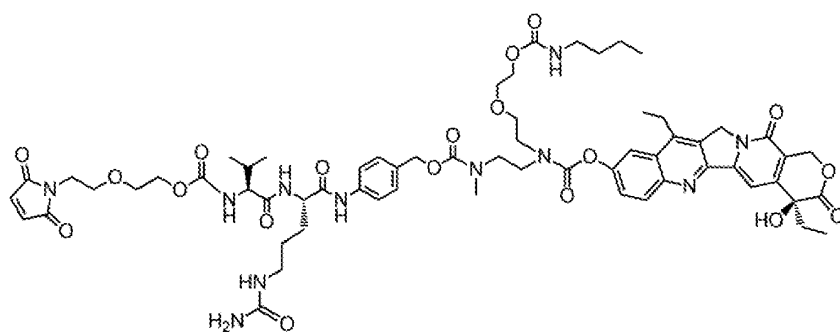


(10) ,

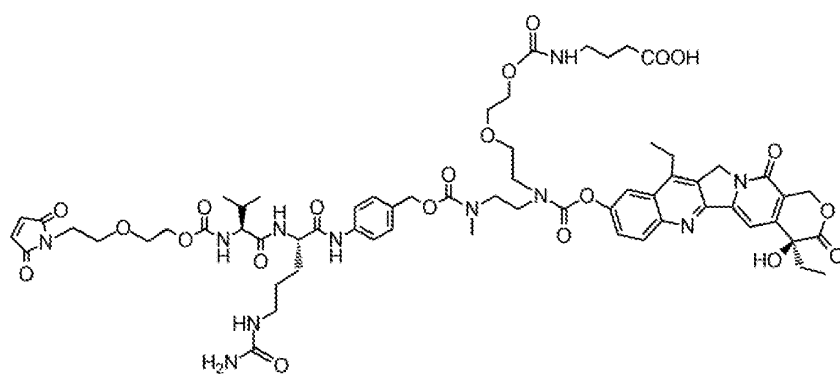


(11) ,

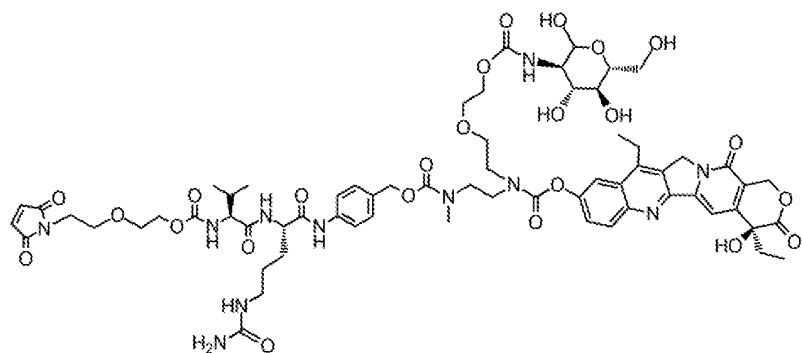
(13) ,



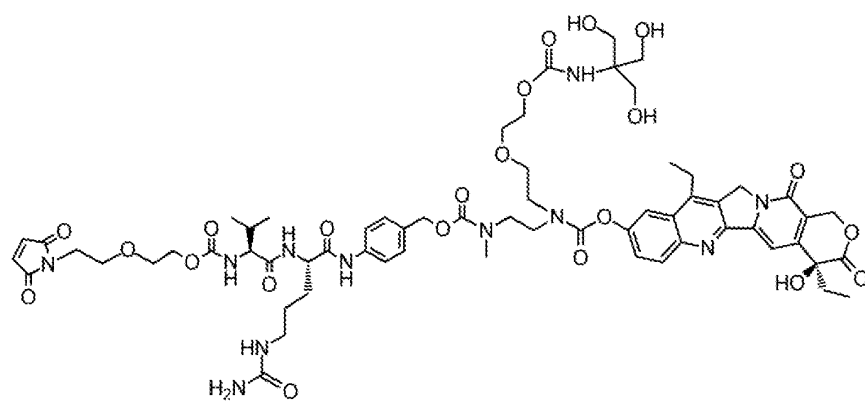
(14) ,



(15) ,



(16) .



- [28]进一步的，上述任一反应进程中所述的“低温条件下”为冰水浴下。
- [29]进一步的，上述任一反应进程中所述的溶剂可独立地为极性溶剂和/或非极性溶剂，所述的极性溶剂为 THF、DMF、DMA、NMP 的一种或几种；所述的非极性溶剂为二氯甲烷、四氯化碳的一种或几种。
- 5 [30]进一步的，上述任一反应进程中所述的有机碱可独立地为 N，N-二异丙基乙胺、三乙胺、吡啶的一种或几种，优选为 N，N-二异丙基乙胺以及吡啶中的一种或两种。
- [31]进一步的，所述的酸为盐酸、三氟乙酸、柠檬酸中的一种或两种。
- [32]进一步的，所述的胺类化合物为伯胺或仲胺。
- 10 [33]进一步的，所述的反应 A 中使用乙酸乙酯进行萃取，所述的纯化采用柱层析法，洗脱剂为二氯甲烷和甲醇。
- [34]进一步的，所述的反应 B 中使用乙酸乙酯、正己烷、二氯甲烷中的一种或多种组合进行打浆。
- [35]进一步的，所述的反应 C 中采用柱层析法进行纯化，洗脱剂为二氯甲烷和甲醇。
- 15 [36]进一步的，所述的反应 D 中采用柱层析法进行纯化，洗脱剂为二氯甲烷和甲醇。
- [37]进一步的，所述的反应 E 中采用柱层析法进行纯化，洗脱剂为二氯甲烷和甲醇。
- 20 [38]进一步的，所述的反应 F 中采用制备液相法进行纯化，流动相 A 为 MeCN，0.1% HCOOH，流动相 B 为 H₂O，0.1% HCOOH。
- [39]进一步的，所述反应均在氮气保护下进行。
- [40] 本发明提供的制备抗体药物偶联物中间体（具体为连接基团-SN38 共价偶联物）的方法，除制备方法步骤简单，降低了由于重金属残留导致的安全性问题，且使用该抗体药物偶联物中间体制备的抗体药物偶联物在体内将具有更高的稳定性。
- 25 [41] 同时，发明人惊奇的发现，本发明中的连接子与 SN38 组合，所制备的抗体药物偶联物能够产生显著的肿瘤抑制效果。

附图说明

- 30 [42]图 1 为小鼠体重变化情况；

[43] 图 2 为肿瘤体积变化情况；

[44] 图 3 相对肿瘤体积情况。

具体实施方式

[缩写]

- 5 [45] 除非另有说明，本发明使用的所有缩写具有本领域普通技术人员所理解的相同含义。如本发明所用，常用的缩写及其定义如下所示：

缩写	定义
DCC	N,N'-二环己基碳二亚胺
EDCI	1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐
DIC	N,N'-二异丙基碳二亚胺
HATU	2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯
HBTU	苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐
HBPIPU	(苯并三氮唑-1-基氧基)二吡啶碳六氟磷酸盐
HBPYU	O-(苯并三氮唑-1-基)-N,N,N',N'-二吡咯基脲六氟磷酸盐
HCTU	6-氯苯并三氮唑-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸酯
HDMA	1-[(二甲氨基)(吗啡啉)甲基]-3-氧代-1H-[1,2,3]三氮唑[4,5-b]并吡啶 3-六氟磷酸盐
TATU	2-(7-氯杂苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸盐
TBTU	O-苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸盐
TCTU	O-(6-氯-1H-苯并三氮唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸盐
TCFH	N,N,N',N'-四甲基氧甲脲六氟磷酸盐
TDBTU	N,N,N',N'-四甲基-O-(4-巯基-3,4-二氢-1,2,3-苯并三嗪-3-基)脲四氟硼酸盐
TFFH	氟代-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐
BTFFH	N,N,N',N'-双(四亚甲基)氟代甲脲六氟磷酸盐
TSTU	2-琥珀酰亚胺基-1,1,3,3-四甲基脲四氟硼酸酯
PyBOP	1H-苯并三氮唑-1-基氧三吡咯烷基六氟磷酸盐
PyCIOP	氯代三吡咯烷基六氟磷酸盐

PyAOP	(3H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶-3-氧基)三-1-吡咯烷基六氟磷酸盐
PyCIU	1-(氯-1-吡咯烷基亚甲基)吡咯烷六氟磷酸盐
DEPBT	3-(二乙氧基邻酰氧基)-1,2,3-苯并三嗪-4-酮
EEDQ	2-乙氧基-1-乙氧碳酸基-1,2-二氢喹啉
Mc	马来酰亚胺基乙酰基
SN38	Camptothecin
DMF	N,N-二甲基甲酰胺
DMA	二甲基乙酰胺
DNPC	二(对硝基苯)碳酸酯
DMSO	二甲基亚砷
THF	四氢呋喃
DCM	二氯甲烷
DIPEA	N,N-二异丙基乙胺
TFA	三氟乙酸

[定义]

[46] 与说明书的各方面相关的各种术语在说明书和权利要求书中通篇使用。除非另外指明，否则此类术语被赋予本领域的普通含义。其它具体定义的术语应按照与本文所提供的定义相符的方式理解。

5 [47] 如本文所用，术语“一个”和“一种”和“所述”是按照标准惯例使用的并且意指一个或多个，除非上下文另有指示。因此例如，对“一种抗体药物偶联物”的提及包括两个或更多个抗体药物偶联物的组合等等。

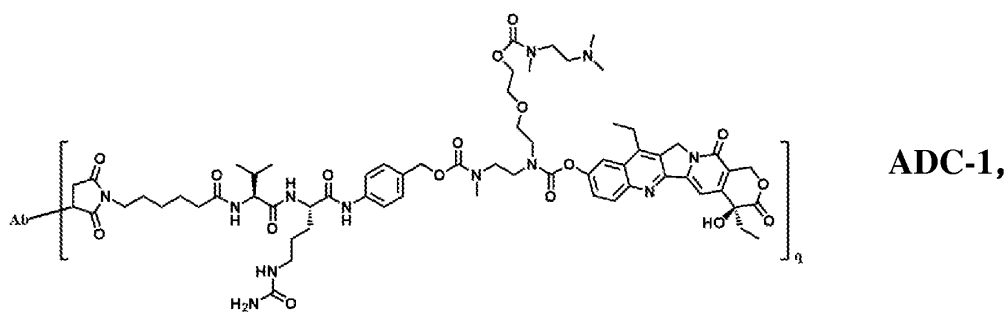
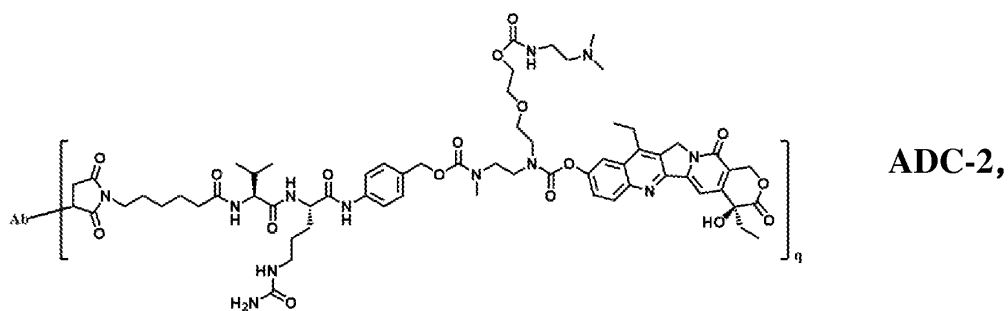
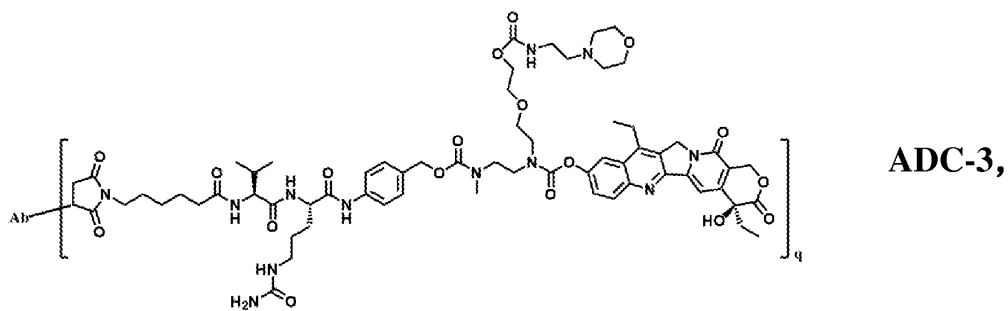
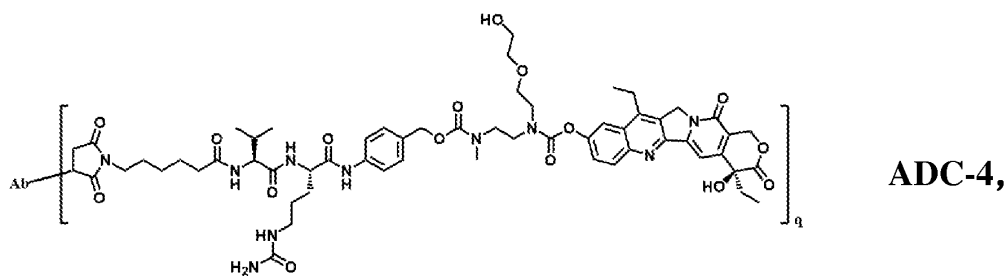
[48]应当理解，无论何处在本文中用语言“包含”描述方面，除此之外还提供了以“由组成”和/或“基本上由组成”描述的类似方面。

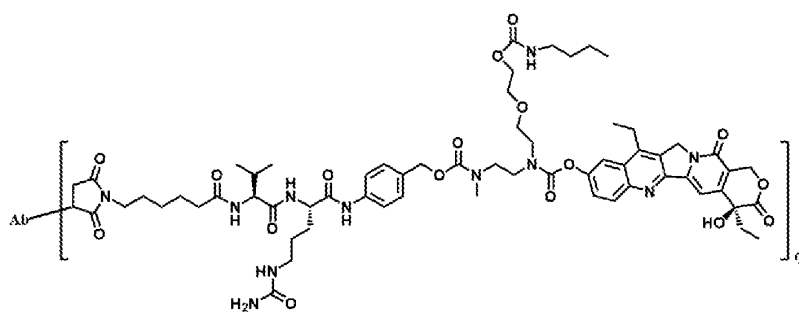
10 [49] 本发明所使用的术语“抗体药物偶联物”表示抗体/抗体功能性片段、连接子、药物部分经过化学反应连接在一起的化合物，其结构通常由三部分组成：抗体或抗体类配体、药物部分、以及将抗体或抗体类配体及药物偶联起来的连接子(linker)。目前抗体药物偶联物的制备通常分为两步：第一步是将连接子与药物部分通过化学反应形成“连接子-药物”偶联物，
15 第二步是将“连接子-药物”偶联物中的连接子部分与抗体/抗体功能性片

段通过巯基或者氨基共价偶合在一起。本发明所使用的术语“抗体药物偶联物中间体”是指上述所述的“连接子-药物”偶联物，进一步的，本发明涉及的“抗体药物偶联物中间体”泛指“连接基团”和 SN38 共价偶联物。

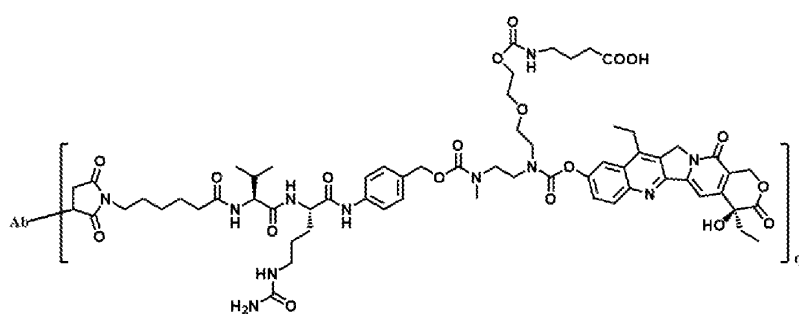
5 [50] 本发明所用的“抗体药物偶联物”采用本领域通用制备方法制备，示例性的，本发明所用的抗体药物偶联物的制备方法为：用 pH=7.4 的 PBS 缓冲液，把抗体配制为 10mg/mL 的溶液，加入适量当量的 TCEP，振荡混匀 1 小时，再加入 5.0 摩尔当量的连接子-毒素(即式 1-式 16 所示的化合物)，振荡混匀，反应 1h，反应结束后，超滤除去残留的小分子，加载至
10 疏水色谱(HIC-HPLC)进行 DAR、药物分布、裸抗比例检测。

[51] 可以理解的是，本发明旨在提供一种新的药物偶联物中间体，并示例性的以 Heceptin 制备多例 ADC 对技术效果进行验证，抗体的选择不对本专利造成限制，示例性地给出具体 ADC 的结构，其中，ADC-1 中的连接子和毒素对应于所用的式(1)化合物与 Heceptin 利用上述本领域制备“抗体药物偶联物”的通用制备方法制备而成(下同，ADC-2 中的连接子和毒素对应于式(2)化合物；ADC-3 中的连接子和毒素对应于式(3)化合物；ADC-4 中的连接子和毒素对应于式(4)化合物；ADC-5 中的连接子和毒素对应于式(5)化合物；ADC-6 中的连接子和毒素对应于式(6)化合物；ADC-7 中的连接子和毒素对应于式(7)化合物；ADC-8 中的连接子和毒素对应于式(8)；化合物 ADC-9 中的连接子和毒素对应于式(9)；化合物 ADC-10 中的连接子和毒素对应于式(10)化合物；ADC-11 中的连接子和毒素对应于式(11)化合物；ADC-12 中的连接子和毒素对应于式(12)化合物；ADC-13 中的连接子和毒素对应于式(13)化合物；ADC-14 中的连接子和毒素对应于式(14)化合物；ADC-15 中的连接子和毒素对应于式(15)化合物；ADC-16 中的连接子和毒素对应于式(16)化合物；ADC-17 中的连接子和毒素对应于 CL2A-SN38) 与：其中，q 可选自 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10。

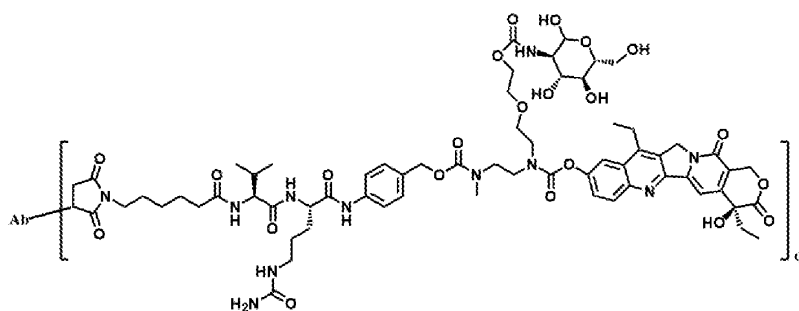




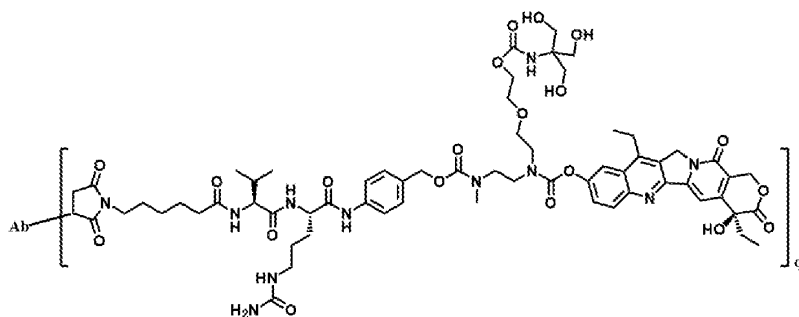
ADC-5,



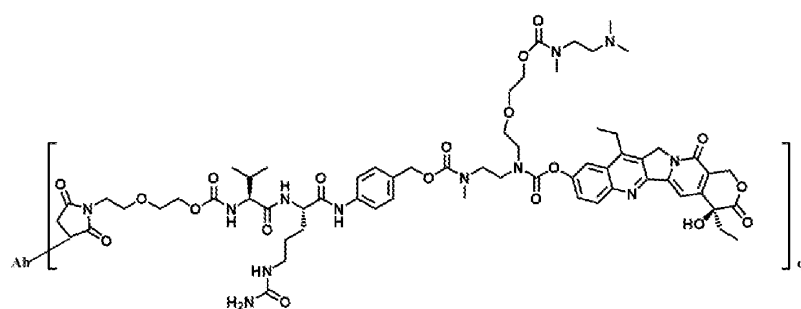
ADC-6,



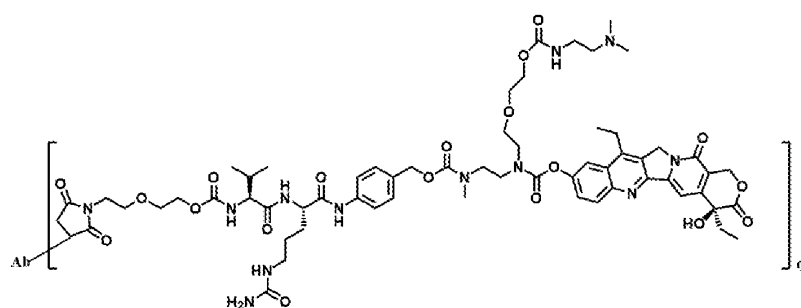
ADC-7,



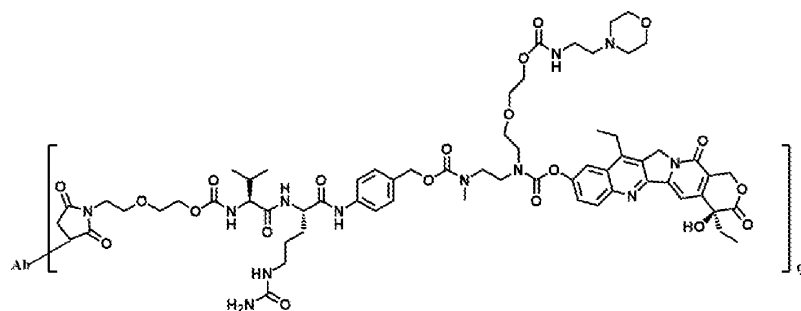
ADC-8,



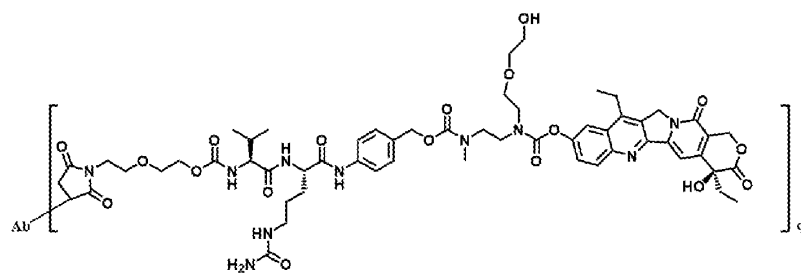
ADC-9,



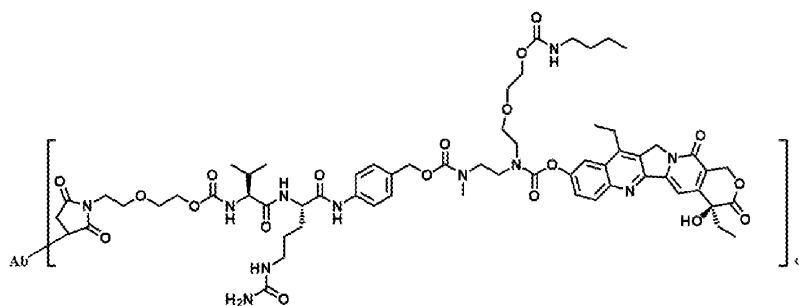
ADC-10,



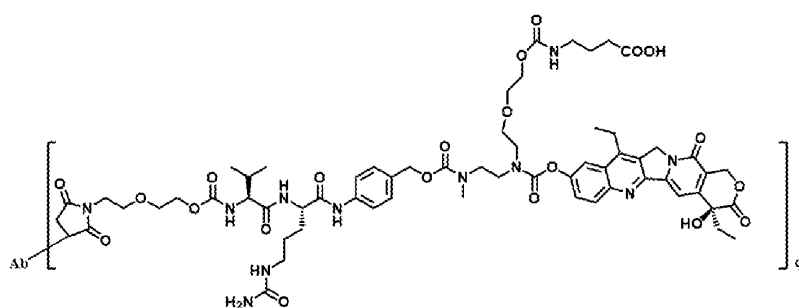
ADC-11,



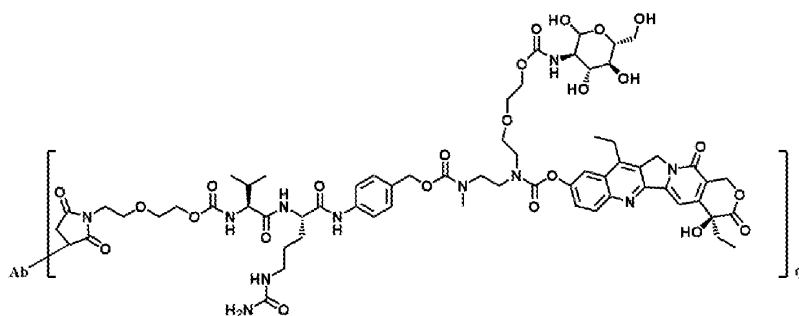
ADC-12,



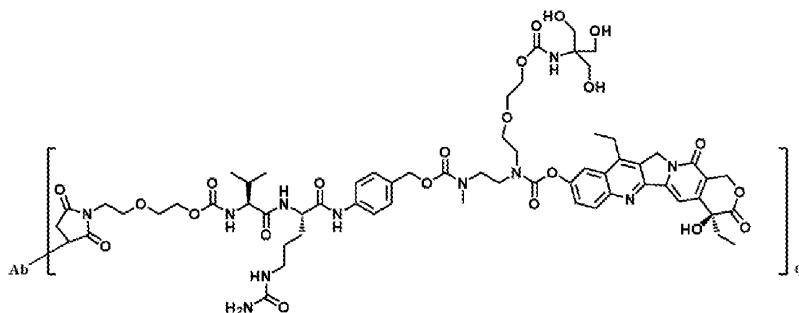
ADC-13,



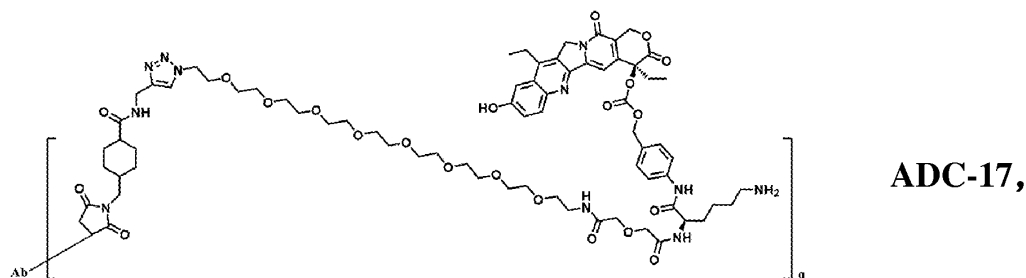
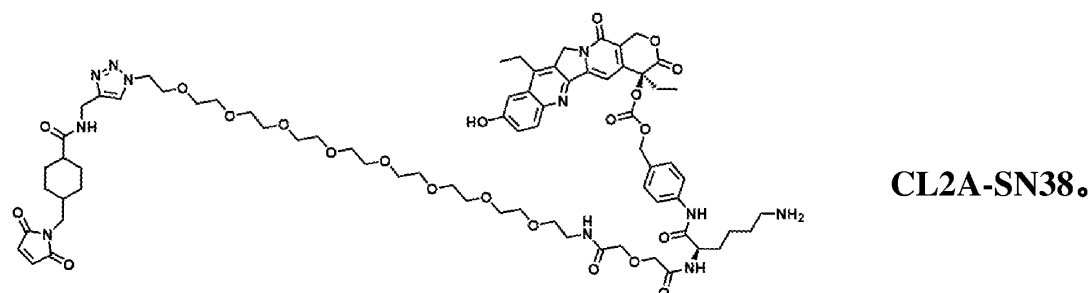
ADC-14,



ADC-15,



ADC-16,



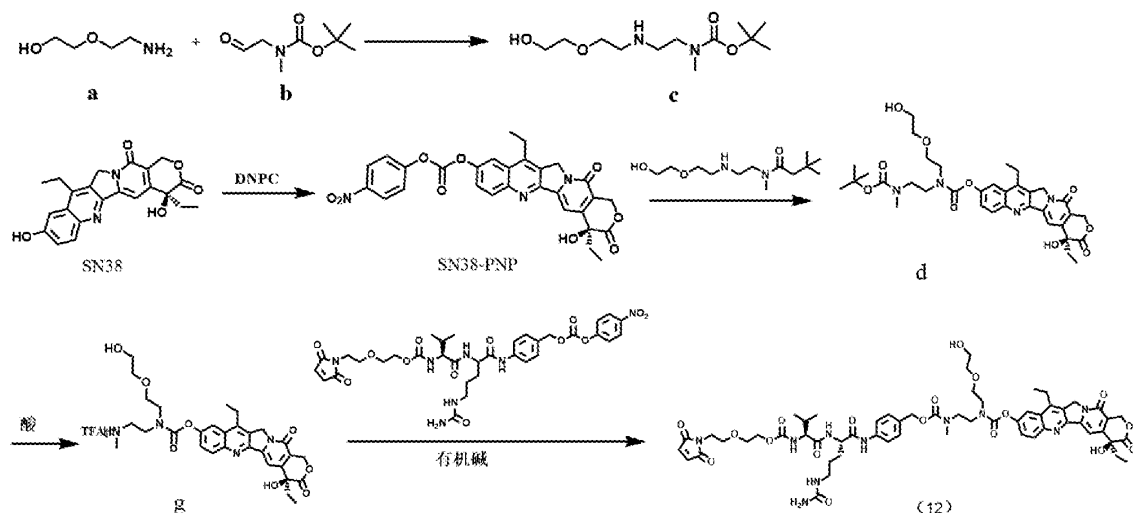
[52] 本发明中的术语“连接基团”是指一种具有双官能团或多官能团的分子，可分别与蛋白/抗体分子和 SN38 反应，因此作为一种“桥梁”将蛋白/抗体与 SN38 连接起来。本发明涉及的连接基团特指那些结构中含有酰基结构的基团。

5 [具体实施例]

[53] 下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件或按照制造厂商建议的条件进行，未注明具体来源的试剂，为市场购买的常规试剂。除非另外说明，否则所有的百分数、比率、比例、或份数按重量计。

[54] 除非另行定义，文中所使用的所有专业与科学用于与本领域熟悉人员所熟悉的意义相同。此外，任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明办法中。文中所述的较佳实施方式与材料仅作示范之用。

[55] 实施例 1 式 (12) 化合物的制备方法



[56] 1) 化合物 c (2-Boc-N-甲基乙基乙二醇) 的合成方法

[57] 将化合物 a (氨基乙二醇) 0.6g 和化合物 b (N-Boc-乙醛) 1.0 g 溶于 20 mL 甲醇中, 室温搅拌 6h。将反应置于冰水浴, 加入三乙酰氧基硼氢化钠, 冰水浴搅拌 1h, 恢复至室温搅拌过夜。通过 LC-MS 法检测, 产物没有紫外吸收。将溶剂旋干, 用乙酸乙酯萃取 2 次, 无水 Na₂SO₄, 干燥旋干, 柱层析法纯化, 洗脱剂为二氯甲烷: 甲醇=20: 1, 冲洗, 得产物 1.0g, 产率 66%。LC-MS: (M+H)⁺ 262.6。

[58] 2) SN38-PNP(10-对硝基苯基碳酸酯-喜树碱)的合成方法

[59] 将 SN38(喜树碱) 1.0g 和 DNPC(二(对硝基苯)碳酸酯) 1.6 g 溶于 100 mL 四氢呋喃中, 加三乙胺 2 mL, 室温搅拌 1.5 h。通过 LC-MS 法检测, 反应结束。反应完成后, 将溶剂旋干, 用乙酸乙酯: 正己烷=20mL: 100mL 打浆, 过滤得固体, 用二氯甲烷 20 mL 打浆, 过滤, LC-MS 监测收集产品得 SN38-PNP 固体 700 mg, 产率 49.3%。LC-MS: (M+H)⁺ 557.4。

[60] 3) 化合物 d (Boc-N-甲基乙基乙二醇-喜树碱)的合成方法

[61] 将 SN38-PNP 250 mg 溶于 30 mL N,N-二甲基甲酰胺中, 加入 235 mg Boc-DMEDA-PEG 和 233 uL N,N-二异丙基乙胺, 室温搅拌 16 h。通过 LC-MS 法检测, 反应结束。反应完成后, 将溶剂旋干, 柱层析法纯化, 洗脱剂为二氯甲烷: 甲醇=20: 1, 冲洗。LC-MS 监测收集产品得 Boc-DMEDA-PEG-SN38 固体 213 mg。收率 70 %。LC-MS: (M+H)⁺ 680.5。

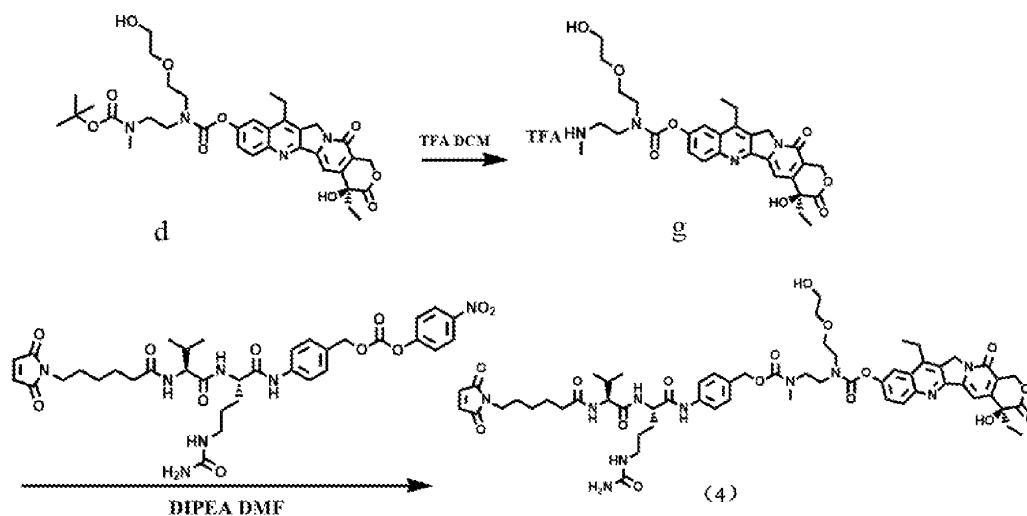
[62] 4) 化合物 g (10-(2-N-甲基乙基乙二醇)-喜树碱三氟乙酸盐)的合成方法

[63] 将化合物 d 73.0 mg 溶于 3 mL 二氯甲烷和 3 mL 三氟乙酸中, 置于冰水浴中, 恒温搅拌 1 h。通过 LC-MS 法检测, 反应结束。反应完成后, 将溶剂旋干, 再加入甲苯 2 mL 和二氯甲烷 2 mL, 旋干, 带两次。LC-MS 监测收集产品得 SN38-DMEDA · TFA, 直接投入下一步反应。LC-MS: (M+H)⁺ 580.6。

[64] 5) 式 (12) 化合物 (马来酰亚胺二乙氧基- L-缬氨酰基-L-瓜氨酸-对氨基苄基-(2-N-甲基乙基乙二醇)-喜树碱)的合成方法

[65] 将 MP2-VC-PAB-PNP 50 mg 溶于 4 mL N,N-二甲基甲酰胺中, 放入冰水浴恒温, 加氮气保护。加入化合物 g 38 mg, 再加入三乙胺 42 u L, 恒温搅拌 0.5 h 后, 恢复至室温反应 0.5h。LC-MS 法检测, 反应完成。反应结束后, 将溶剂低温旋出, 制备液相法纯化, 制备柱: Sun Fire® Prep C18 OBD TM 5um, 19*250mm Column; 流动相 A: MeCN, 流动相 B: H₂O。LC-MS 监测收集纯品得式 (12) 化合物固体 18 mg。收率 22 %。LC-MS: (M+H)⁺1197.2。

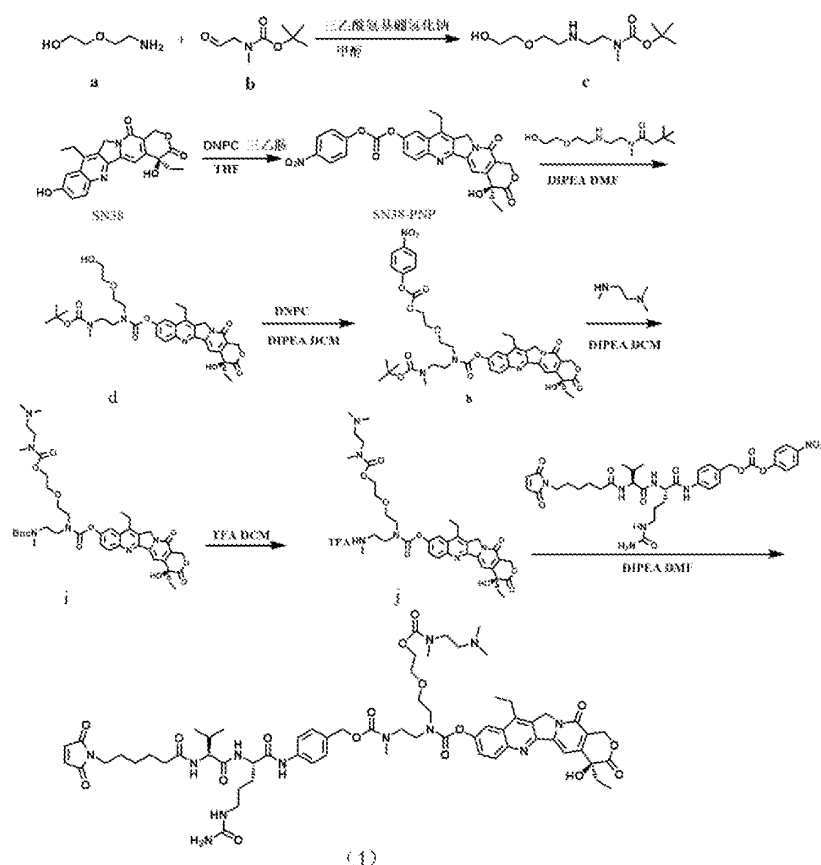
[66] 实施例 2 式 (4) 化合物的制备方法



[67] 按照实施例 1 的合成路线制备化合物 g (10-(2-N-甲基乙基乙二醇)-喜树碱三氟乙酸盐): 将化合物 d (73.0 mg) 溶于 3 mL 二氯甲烷和 3 mL 三氟乙酸中, 置于冰水浴中, 恒温搅拌 1 h。通过 LC-MS 法检测, 反应结束。反应完成后, 将溶剂旋干, 再加入二氯甲烷 2 mL, 旋干, 带两次。LC-MS 监测收集产品得化合物 g (70 mg), 直接投入下一步反应。LC-MS: (M+H)⁺ 580.6。

[68]按照实施例 1 的合成路线制备式 (4) 化合物 (马来酰亚胺己酸-L-缬氨酰基-L-瓜氨酸-对氨基苄基-(2-N-甲基乙基乙二醇)-喜树碱): 将 Mc-VC-PAB-PNP(马来酰亚胺己酸-L-缬氨酰基-L-瓜氨酸-对氨基苄基-对硝基苄基碳酸酯)(58 mg), 化合物 g (42 mg) 溶于 2.5 mL N,N-二甲基甲酰胺中后, 冰水浴搅拌 30 mins, 滴加 DIPEA (42 mg), 冰水浴搅拌 1h。通过 LC-MS 法检测, 反应未完成。继续加入三乙胺 (10 mg), 室温搅拌 1h, 反应溶液变黄, 通过 LC-MS 法检测, 反应完成。反应完成后, 将溶剂低温旋干, 制备液相法纯化, 制备柱: Sun Fire® Prep C18 OBD TM 5um, 19*250mm Column; 流动相 A: MeCN, 0.1% HCOOH, 流动相 B: H₂O, 0.1% HCOOH。LC-MS 监测收集纯品得式 (4) 化合物固体 34 mg, 收率为 40.5%。LC-MS: (M+H)⁺1179.2。

[69] 实施例 3 式 (1) 化合物的制备方法



[70] 1) 化合物 c (2-Boc-N-甲基乙基乙二醇)的合成方法

[71] 将化合物 a (氨基乙二醇)0.6g 和化合物 b (N-Boc-(甲胺基)乙醛) 1.0 g 溶于 20 mL 甲醇中, 室温搅拌 6 h。将反应体系置于冰水浴, 加入三乙酞氧基硼氢化钠, 冰水浴搅拌 1h, 恢复至室温搅拌过夜。通过 LC-MS 法检测, 产物没有紫外吸收。将溶剂旋干, 用乙酸乙酯萃取 2 次, 加入无水 Na₂SO₄ 沉淀, 倒出有机相, 干燥旋干, 柱层析法纯化, 洗脱剂为二氯甲烷: 甲醇=20: 1, 冲洗, 得产物 1.0g, 产率 66%。LC-MS: (M+H)⁺ 262.6。

[72] 2) SN38-PNP(10-对硝基苯基碳酸酯-喜树碱)的合成方法

[73] 将 SN38 1.0g 和 DNPC(二(对硝基苯)碳酸酯)1.6 g 溶于 100 mL 四氢呋喃中, 加三乙胺 2 mL, 室温搅拌 1.5 h。通过 LC-MS 法检测, 反应结束。反应完成后, 将溶剂旋干, 用乙酸乙酯: 正己烷=20mL: 100mL 打浆, 过滤得固体, 用二氯甲烷 20 mL 打浆, 过滤, LC-MS 监测收集产品得 SN38-PNP 固体 700 mg, 产率 49.3%。LC-MS: (M+H)⁺ 557.4。

[74] 3) 化合物 d (Boc-N-甲基乙基乙二醇-喜树碱)的合成方法

[75] 将 500 mg SN38-PNP 溶于 30 mL N,N-二甲基甲酰胺中, 加入 370 mg 化合物 c 和 233 μ L N,N-二异丙基乙胺, 室温搅拌 3 h。通过 LC-MS 法检测, 反应结束。反应完成后, 将溶剂旋干, 柱层析法纯化, 洗脱剂为二氯甲烷: 甲醇=20: 1, 冲洗。LC-MS 监测收集产品得化合物 d 固体 250 mg。收率 45 %。LC-MS: (M+H)⁺ 680.5。

[76] 4) 化合物 h (Boc-N-甲基乙基二乙氧基对硝基活性酯-喜树碱)的合成方法

[77] 将化合物 d 220.0 mg 溶于 5 mL 二氯甲烷中, 加入二(对硝基苯)碳酸酯 150 mg、DIPEA 86 mg, 恒温搅拌 16 h。通过 LC-MS 法检测, 反应结束。反应完成后, 将溶剂旋干, 柱层析法纯化, 洗脱剂为二氯甲烷: 甲醇=50: 1。收集产品得化合物 h 固体 220 mg, 收率 68.5 %直接投入下一步反应。LC-MS: (M+H)⁺ 845.6。

[78] 5) 化合物 i (Boc-N-甲基乙基二乙氧基-N,N,N-三甲基乙二胺-喜树碱)的合成方法

[79] 将化合物 h (Boc-N-甲基乙基二乙氧基对硝基活性酯-喜树碱)220 mg, N,N,N-三甲基乙二胺 50 mg 溶于 5 mL N,N-二甲基甲酰胺中后, 滴加 DIPEA (65 mg), 冰水浴搅拌 1 h。通过 LC-MS 法检测, 反应完成后, 将溶剂旋干, 柱层析法纯化, 洗脱剂为二氯甲烷: 甲醇=20: 1。收集产品得化合物 i 固体 157 mg, 收率 75 %直接投入下一步反应。LC-MS: (M+H)⁺

808.6.

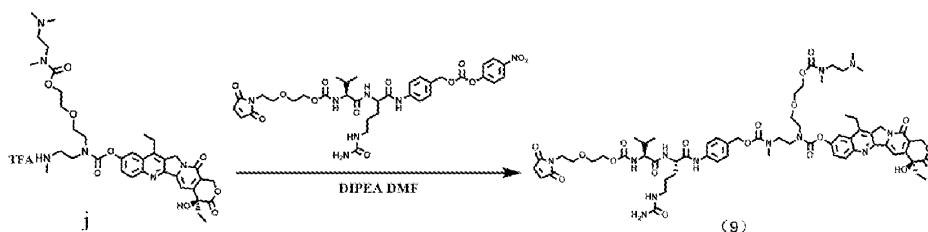
[80] 6) 化合物j(N-甲基乙基二乙氧基-N,N,N-三甲基乙二胺-喜树碱-三氟乙酸盐)的合成方法

[81] 将化合物 i (Boc-N-甲基乙基二乙氧基-N,N,N-三甲基乙二胺-喜树碱) 157.0 mg 溶于 3 mL 二氯甲烷和 1.3 mL 三氟乙酸中, 置于冰水浴中, 恒温搅拌 1 h。通过 LC-MS 法检测, 反应结束。反应完成后, 将溶剂旋干, 再加入二氯甲烷 2 mL, 旋干, 带两次。得化合物 j 120 mg, 直接投入下一步反应。LC-MS: (M+H)⁺708.3。

[82] 7) 式 (1) 化合物 (马来酰亚胺己酸-L-缬氨酰基-L-瓜氨酸-对氨基苄基-(N-甲基乙基二乙氧基-N,N,N-三甲基乙二胺)-喜树碱)的合成方法

[83] 将 Mc-VC-PAB-PNP(马来酰亚胺己酸- L-缬氨酰基-L-瓜氨酸-对氨基苄基-对硝基苯基碳酸酯)52 mg, 化合物 j 35 mg 溶于 2.5 mL N,N-二甲基甲酰胺中后, 冰水浴搅拌 30 mins, 滴加 DIPEA 129mg, 冰水浴搅拌 0.5 h。通过 LC-MS 法检测, 反应未完成。继续加入加 DIPEA 129mg, 室温搅拌 0.5h, 反应溶液变黄, 通过 LC-MS 法检测, 反应完成。反应完成后, 将溶剂低温旋干, 制备液相法纯化, 制备柱: Sun Fire® Prep C18 OBD TM 5um, 19*250mm Column; 流动相 A: MeCN, 0.1% HCOOH, 流动相 B: H₂O, 0.1% HCOOH。LC-MS 监测收集纯品得式 (1) 化合物固体 20 mg, 收率为 20.5%。LC-MS: (M+H)⁺ 1307.6。

20 [84] 实施例 4 式 (9) 化合物的制备方法



[85] 按照实施例 3 的合成路线制备式 (9) 化合物(马来酰亚胺二乙氧基-L-缬氨酰基-L-瓜氨酸-对氨基苄基-(N-甲基乙基二乙氧基-N,N,N-三甲基乙二胺)-喜树碱): 将 MP2-VC-PAB-PNP(马来酰亚胺二乙氧基-L-缬氨酰基-L-瓜氨酸-对氨基苄基-对硝基苄基碳酸酯)(52mg), 化合物 j (34 mg) 溶于 2.5 mL N,N-二甲基甲酰胺中后, 冰水浴搅拌 30 mins, 滴加 DIPEA(36 mg), 冰水浴搅拌 0.5 h。通过 LC-MS 法检测, 反应未完成。继续加入加 DIPEA(8mg), 室温搅拌 1.5h, 反应溶液变黄, 通过 LC-MS 法检测, 反应完成。反应完成后, 将溶剂低温旋干, 制备液相法纯化, 制备柱: S

un Fire® Prep C18 OBD TM 5um, 19*250mm Column; 流动相 A: MeCN, 0.1%HCOOH, 流动相 B: H₂O, 0.1%HCOOH。LC-MS 监测收集纯品得式 (9) 化合物固体 23 mg, 收率为 35.2%。LC-MS: (M+H)⁺1325.4。

[86] 实施例 5 ADC-1 对 NCI-N87 细胞的抑制作用

[87] 将式 (1) 化合物和 CL2A-SN38 中间体分别通过本领域常规方法与 Heceptin 进行巯基偶联(例如参见中国专利申请公开号 CN102448494A 中的实施例 12), 制备得到平均 DAR 值为 8 的 ADC-1 和 HER2-CL2A-SN38 (ADC-17) 抗体药物偶联物。将 NCI-N87 细胞胰酶消化后调整细胞密度为 50000 个/ml, 100 μL/孔加入细胞培养板中, 37°C, 5% CO₂ 培养箱中孵育 14 -20 h。用基础培养基对分别对样品组和对照组(供试品成分见表 1)进行梯度稀释, 以 100 μL/孔转入铺有细胞的细胞培养板中; 在 37°C 条件下, 5% CO₂ 培养箱中孵育 70-74 h。用培养基将 CCK-8 稀释 10 倍, 将 96 孔板中的旧培养基吸出, 每孔加入 100 μL 稀释的 CCK-8 溶液, 5% CO₂ 条件下显色 2-4 h, 离心去气泡后在酶标仪上选择测定波长 450 nm/655 nm 进行读数, 其结果见表 2。

[88] 表 1 供试品成分

序号	供试品	平均 DAR
样品 1	ADC-1	8
对照组 1	ADC-17	8
对照组 2	HER2 裸抗体	/

[89] 表 2 对 NCI-N87 细胞的抑制作用

序号	供试品	IC50 (ng/ml)
样品 1	ADC-1	251
对照组 1	ADC-17	210
对照组 2	HER2 裸抗体	NA

[90] 实验结果表明, ADC-1 组与 ADC-17 组对 NCI-N87 细胞的抑制效果相当。

[91] 实施例 6 稳定性实验研究

[92] 1) 精密称取化合物式 (1) 化合物 (2.1mg)、 CL2A-SN38 (2.1mg)

分别溶于 DMSO 700 μ L;

[93] 2) 分别配制 pH 为 6、7、8 的 PB(0.2M)缓冲液;

[94]3) 取 50 μ L 式 (1) 化合物的 DMSO 溶液于离心管, 加入 pH=6 的 PB(0.2M)缓冲液 950 μ L, 化合物浓度为 60 μ g/mL。放置于 37 $^{\circ}$ C 恒温体系中; 取 50 μ L CL2A-SN38 的 DMSO 溶液于离心管, 加入 pH=6 的 PB(0.2M)缓冲液 950 μ L, 化合物浓度为 60 μ g/mL。放置于 37 $^{\circ}$ C 恒温体系中;

[95] 4) 分别在时间为 0h、2h、4h、6h、24h、48h 取样 40 μ L, 加入乙腈 120 μ L, 离心, 取上清液送 LC-MS 定量检测。

[96] 5) 结果处理:

[97] 以 T=0h 的 LC-MS 浓度为基准, 数据=T/T₀*100 %, 结果分别如表 3 和表 4 所示。

[98] 表 3 式 (1) 化合物

时间	pH=6	pH=7	pH=8
0	1	1	1
2	0.988606	0.878866	0.56405
4	0.97612	0.801849	0.284131
6	0.92084	0.821934	0.123407
24	0.86821	0.256709	0.009607
48	0.78862	0.122173	0.012562

[99] 在 pH 为 6 时, 式 (1) 化合物 48 小时后分解了 21.2%;

[100] 在 pH 为 7 时, 式 (1) 化合物 48 小时后分解了 87.8%;

[101] 在 pH 为 8 时, 式 (1) 化合物 48 小时后分解了 98.7%。

[102] 表 4 CL2A-SN38

时间	pH=6	pH=7	pH=8
0	1	1	1
2	0.747874	0.703812	0.628692
4	0.647065	0.585106	0.434695

6	0.412955	0.571543	0.38435
24	0.035931	0.022606	0.025316
48	0.020243	0.01906	0.019275

[103] 在 pH 为 6 时, CL2A-SN38 48 小时后分解了 98.0%;

[104] 在 pH 为 7 时, CL2A-SN38 48 小时后分解了 98.1%;

[105] 在 pH 为 8 时, CL2A-SN38 48 小时后分解了 98.1%。

[106] 由表 3-表 4 中的结果, 可以看出:

5 [107] 1) 式 (1) 化合物在弱酸性条件下比 CL2A-SN38 更稳定。

[108] 2) 式 (1) 化合物在中性条件下, 6h 分解了 18%, 24h 分解了 75%, CL2A-SN38 在中性条件下, 6h 分解了 43%, 24h 分解了 98%。

[109] 3) 式 (1) 化合物在碱性条件下, 24h 分解了 97%, CL2A-SN38 24h 分解了 98%。

10 [110] 因此, 采用本发明制备的式 (1) 化合物与 CL2A-SN38 相比, 在体内弱酸性或中性条件下具有更高的稳定性, 预计将显著提高 ADC 药物安全性。

[111] 实施例 7 评估抗 Her2-药物偶联物对原位乳腺癌发展的抑制作用

[112] 1. 实验方法

15 [113] BT474 细胞株复苏后传 1-2 代, 待细胞生长状态稳定后扩大培养, 制备肿瘤细胞悬液, 裸鼠乳脂垫接种 0.2×10^7 个 BT474 细胞, 共接种 60 只雌性 BALB/c 裸鼠。平均肿瘤体积达到约 70mm^3 时, 选取 42 只, 按照肿瘤体积随机分成 6 组: 阴性对照组为对照组 1 (生理盐水组)、对照组 2 (ADC-17)、实验组 1 (ADC-4)、实验组 2 (ADC-12)、实验组 3 (ADC-1)、实验组 4 组 (ADC-9), 每组 7 只。模型建立成功后。按上述分组, 对照组 1 给予生理盐水静脉注射给药, 其余组别给予静脉注射药物, 给药剂量为对照组 2 5mg/kg、实验组 1 5mg/kg、实验组 2 5mg/kg、实验组 3 5mg/kg、实验组 4 5mg/kg, 每周 1 次, 持续 21 周。每周 3 次称重并测量肿瘤体积, 于第 21 天称量和测量肿瘤体积。

25 [114] 2. 试验结果及分析

[115] 1) 小鼠体重变化情况:

[116] 表 5 小鼠的体重情况

组别		数量 (只)		体重 (g)	
		D1	D21	D1	D21
对照组 1	生理盐水	7	7	18.40±1.41	19.94±1.22
对照组 2	ADC-17	7	7	18.73±0.78	20.36±0.90
实验组 1	ADC-4	7	7	18.43±0.95	20.42±0.86
实验组 2	ADC-12	7	7	18.43±0.95	19.94±0.72
实验组 3	ADC-1	7	7	17.88±1.01	18.64±1.31
实验组 4	ADC-9	7	7	18.13±1.14	18.61±1.04

[117] 实验过程无小鼠死亡，实验结束时，各组与对照组 1 相比，对照组 2 (ADC-17 组)、实验组 1 (ADC-4)、实验组 2 (ADC-12)、实验组 3 (ADC-1)、实验组 4 (ADC-9) 体重未出现明显差异，具体见表 5 和图 1。

5 [118] 2) 小鼠肿瘤体积情况：

[119] 表 6 小鼠肿瘤体积情况

组别		肿瘤体积 (mm ³)		RTV	T/C (%)
		D1	D21		
对照组 1	生理盐水	75.60±24.66	107.07±19.30 ^{##}	1.52±0.39 ^{##}	-
对照组 2	ADC-17	67.95±15.73	49.17±13.29 ^{**}	0.75±0.19 ^{**}	49.30
实验组 1	ADC-4	68.24±13.13	57.12±20.28 ^{**}	0.83±0.27 ^{**}	55.00
实验组 2	ADC-12	70.73±16.36	66.26±21.37 ^{**}	0.95±0.26 [*]	62.58
实验组 3	ADC-1	66.47±14.09	61.32±12.82 ^{**}	0.95±0.23 ^{**}	62.48
实验组 4	ADC-9	70.73±17.99	75.76±46.18 [*]	1.02±0.35 [*]	67.19

注：各组与对照组 1 生理盐水组相比，“*”表示 P<0.05；“**”表示 P<0.01；

各组与对照组 2 相比，“#”表示 P<0.05，“##”表示 P<0.01

10 [120] 在给药后 21 天对照组 1 的肿瘤体积达到 107±19.30 mm³，对照组 2、实验组 1、实验组 2、实验组 3、实验组 4 五组的肿瘤体积分别为 49.17±13.29、57.12±20.28、66.26±21.37、61.32±12.82、75.76±46.18、75.19±25.99 mm³（见表 6），其中对照组 2、实验组 1、实验组 2、实验组 3

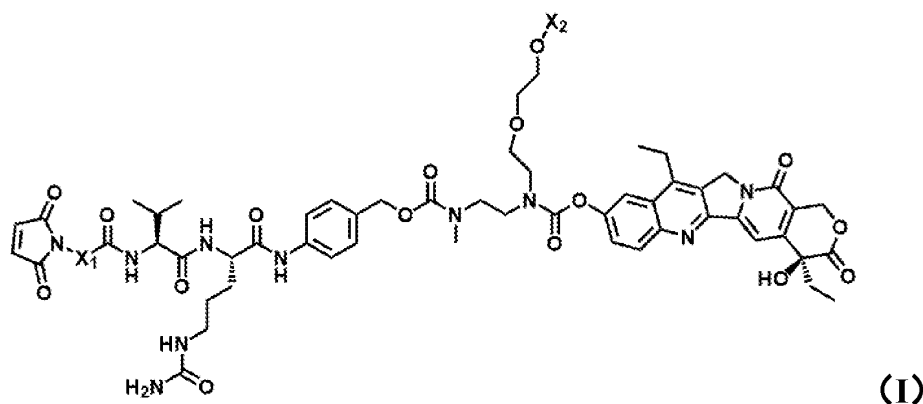
四组与对照组 1（生理盐水组）在统计学上的差异非常显著（ $P < 0.01$ ），实验组 4 与对照组 1 在统计学上的差异显著（ $P < 0.05$ ）。实验组 1、实验组 2、实验组 3 四组与对照组 2 的肿瘤体积在统计学上无显著性差异（ $P > 0.05$ ），且其相对肿瘤体积也均无显著性差异（ $P > 0.05$ ），即效果相当。其中对照组 2、实验组 1、实验组 2、实验组 3、实验组 4 五组的相对肿瘤增殖率（T/C）分别为 49.30%、55.00%、62.58%、62.48%、67.19% 和 63.20%。由以上数据可知本实验测试的对照组 2、实验组 1、实验组 2、实验组 3 组对应的四个抗体药物偶联物均能极为显著地抑制 BT474 肿瘤生长且效果相当，而实验组 4 也可起到抑制 BT474 肿瘤生长地作用。在试验过程中各组肿瘤体积变化情况与相对肿瘤体积变化情况分别如图 2 和图 3 所示。

[121] 综上所述，利用本发明中药物偶联物中间体构建的 ADC 对乳腺癌 BT474 细胞模型显示出显著的抗肿瘤活性，优选的 ADC-1、ADC-4、ADC-12 具有明显优势，预计在体内条件下会显著提高安全性的情况下，还能起到与 ADC-17 组效果相当的肿瘤抑制效果。

[122] 本发明已通过各个具体实施例作了举例说明。但是，本领域普通技术人员能够理解，本发明并不限于各个具体实施方式，普通技术人员在本发明的范围内可以作出各种改动或变型，并且在本说明书中各处提及的各个技术特征可以相互组合，而仍不背离本发明的精神和范围。这样的改动和变型均在本发明的范围之内。

权利要求书

1. 一种如式 (I) 所示的抗体药物偶联物中间体:



其中：

X₁ 为烷烃链或 PEG 链,

5 X_2 为 H 或 $-C(O)NR^1R^2$, 且,

R¹选自氢、卤素、羟基、取代或非取代的 C₁₋₆烷基、取代或非取代的 C₁₋₆羟烷基、取代或非取代的 C₁₋₆氨基烷基、取代或非取代的 C₁₋₆烷氧基、取代或非取代的 C₁₋₆烷酰基和取代或非取代的 C₁₋₆烷醛基；

10 R²选自氢和取代或非取代的 C₁₋₆烷基；其中各取代的 C₁₋₆烷基任选被 1-5 个独立地选自以下的取代基取代：卤素、羟基、氨基、羰基、羧基、5-10 元杂环基和 C₁₋₆卤代烷基，其中所述 5-10 元杂环基具有 1-3 个选自氧、氮和硫的杂原子。

2. 根据权利要求 1 所述的抗体药物偶联物中间体, 其特征在于, 所述的 X_1 选自:

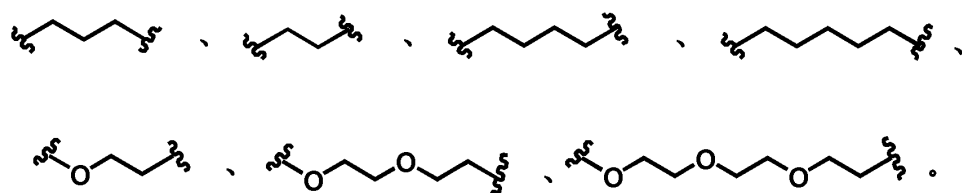
15 $-(\text{CH}_2)_m-$, 或
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_p-$.

其中：

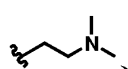
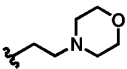
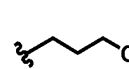
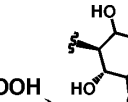
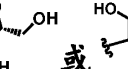
所述的 m 为 1、2、3、4、5、6，优选的，m 为 5；

所述的 p 为 1、2、3、4、5、6，优选的，p 为 2；

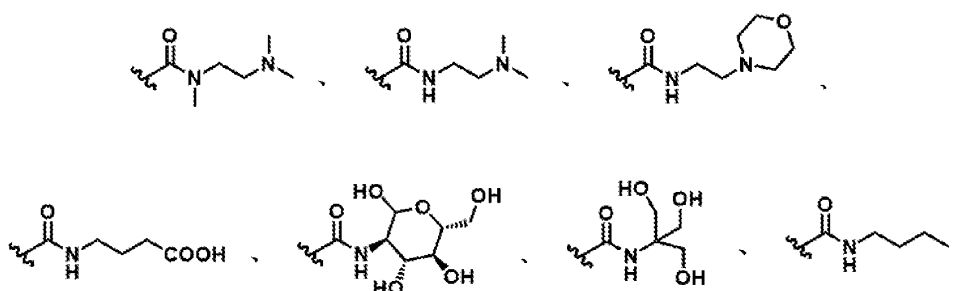
20 优选的, X_1 选自:



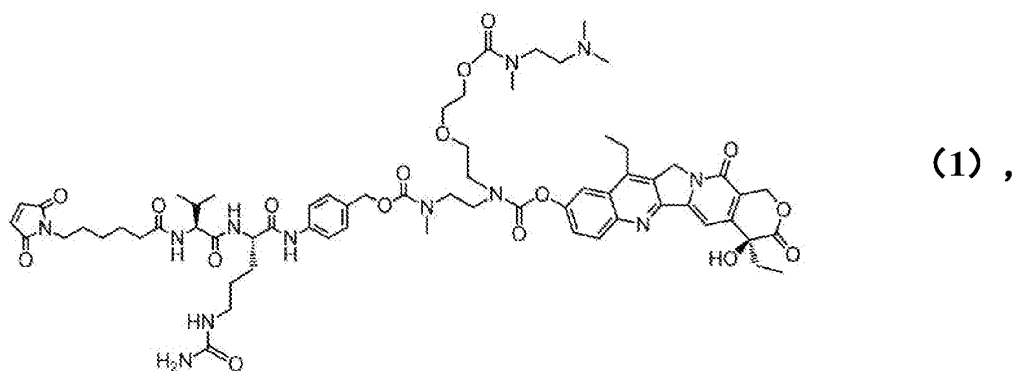
3. 根据权利要求 1 所述的抗体药物偶联物中间体, 其特征在于, 所述的 R^1 或 R^2 独立地选自: H、甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、庚基、甲

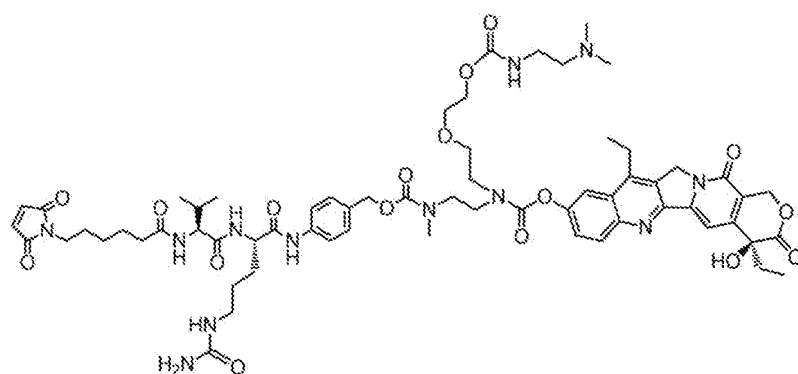
氧基、乙氧基、Cl、Br、、、、 或 ;

5 4. 根据权利要求 1-3 任一所述的抗体药物偶联物中间体, 其特征在于, 所述的 X_2 选自:

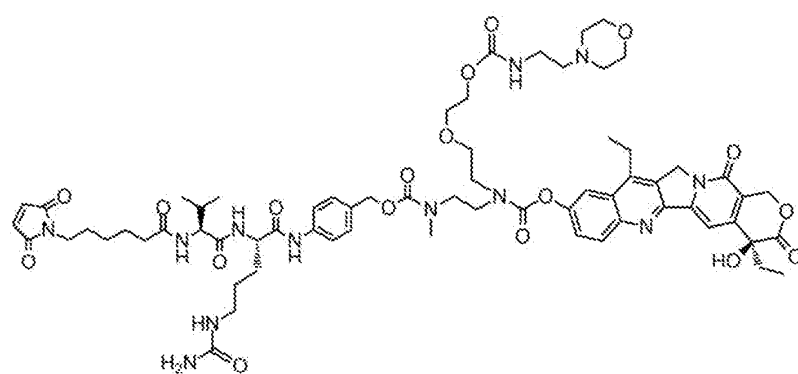


5. 权利要求 1 所述的抗体药物偶联物中间体, 其特征在于: 所述的抗体药物偶联物中间体的结构如式 (1) - (16) 所示:

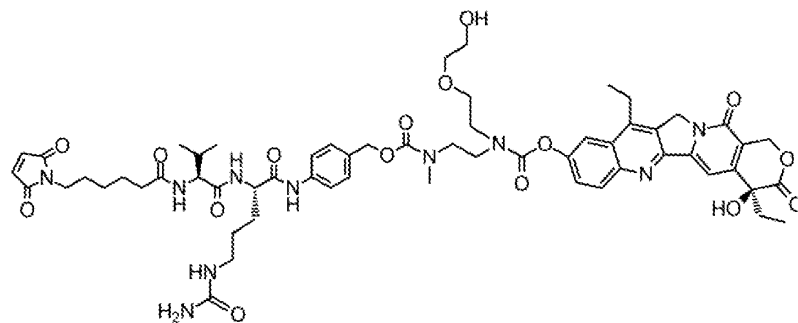




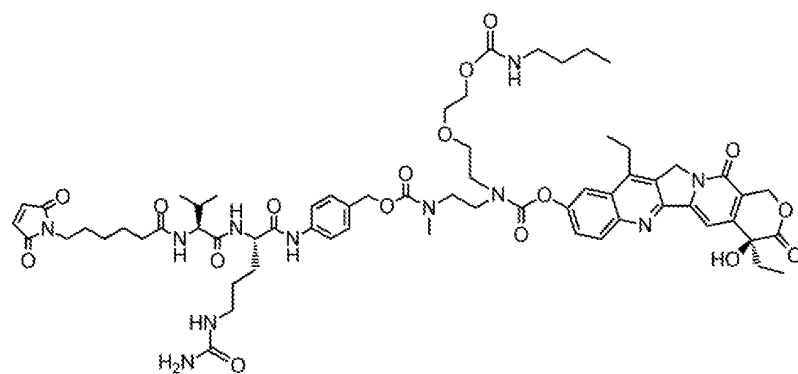
(2) ,



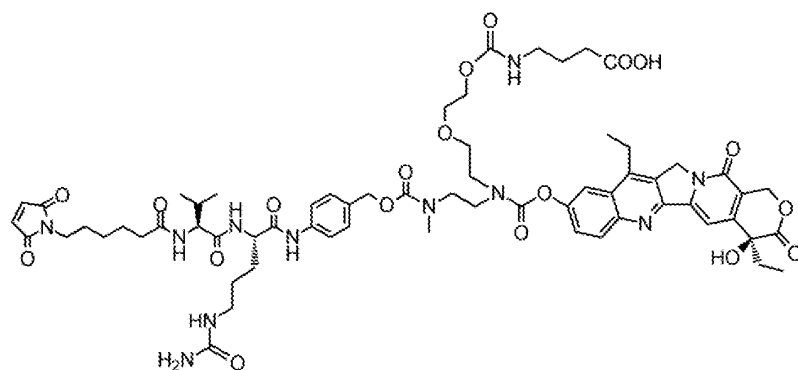
(3) ,



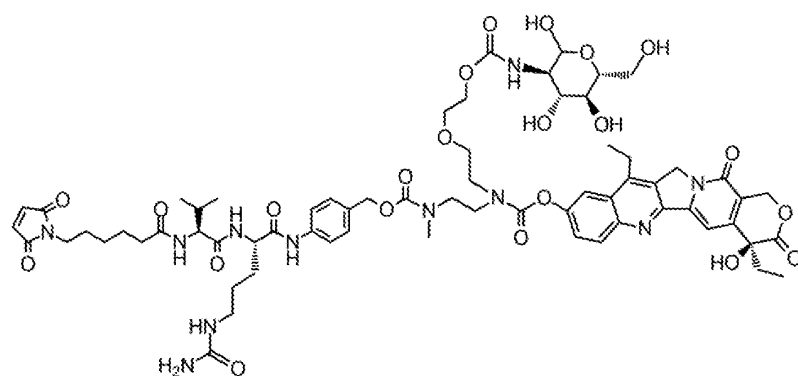
(4) ,



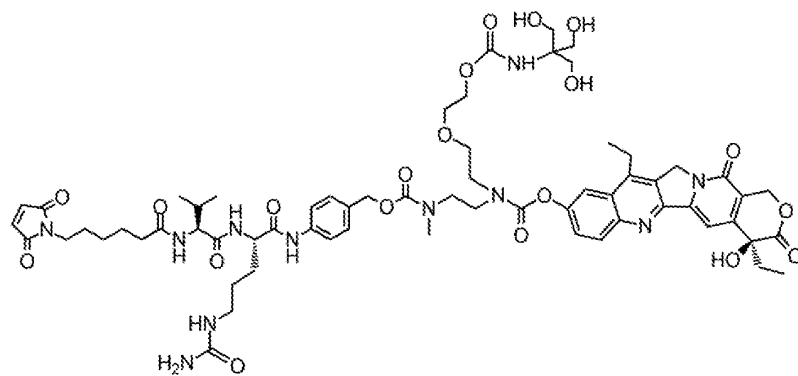
(5) ,



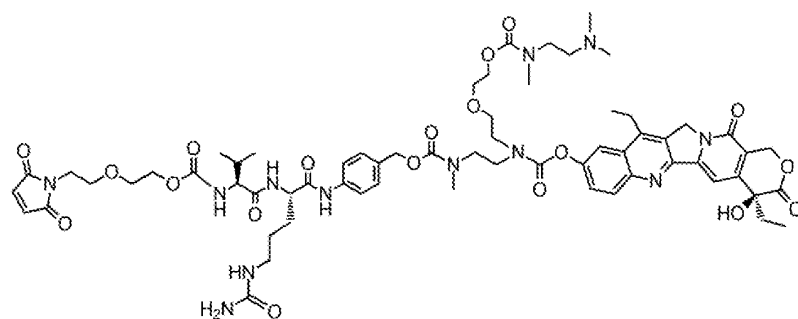
(6) ,



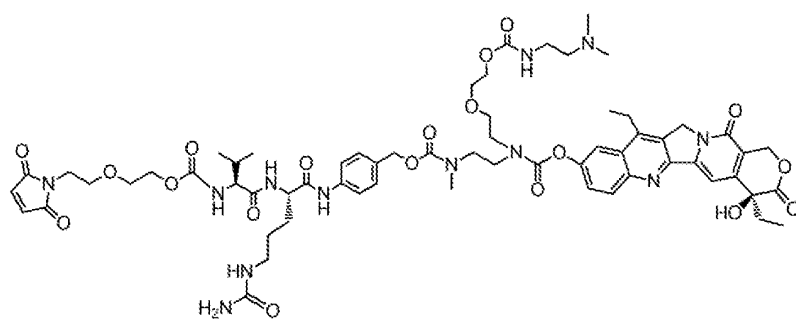
(7) ,



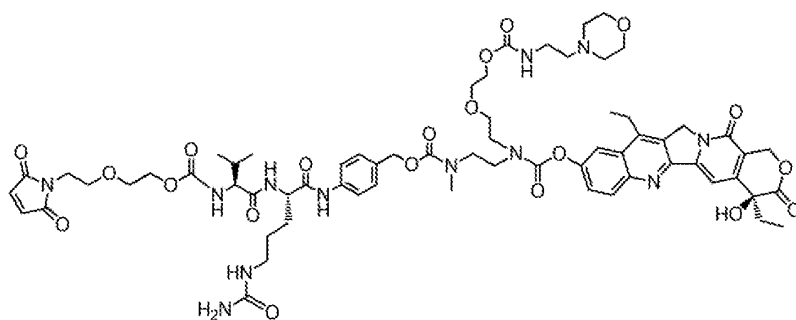
(8) ,



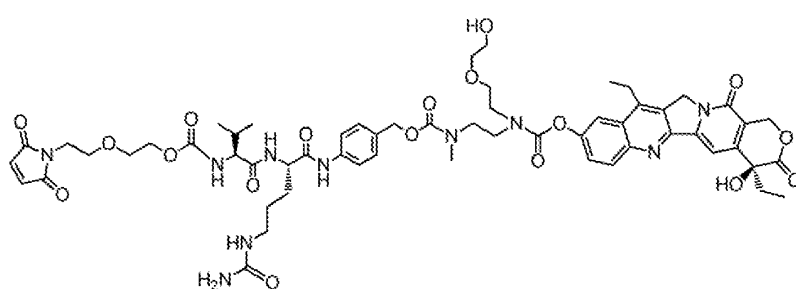
(9) ,



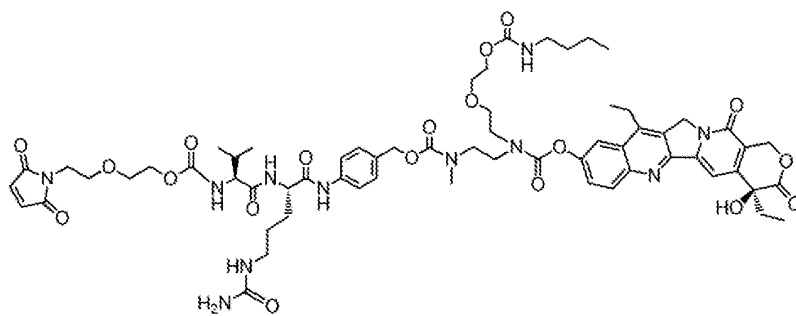
(10) ,



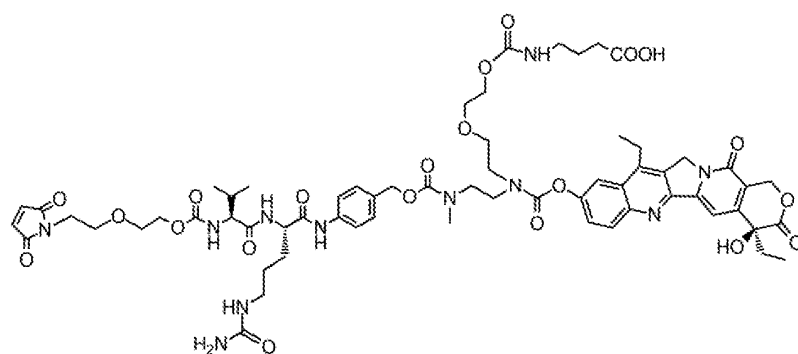
(11) ,



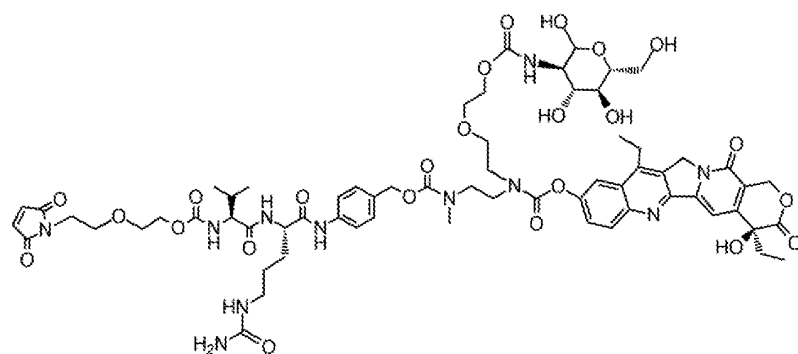
(12) ,



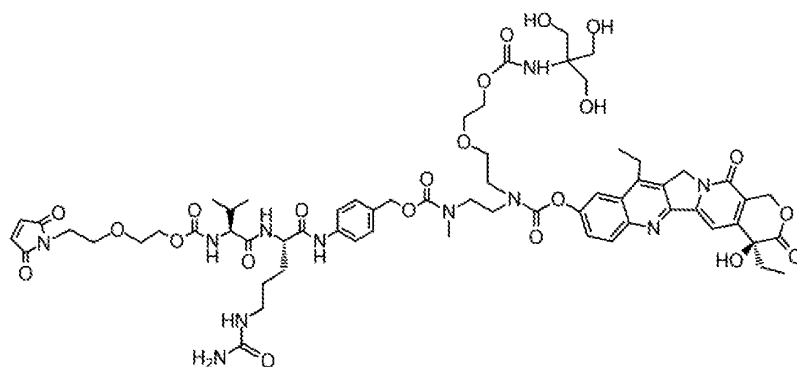
(13) ,



(14) ,

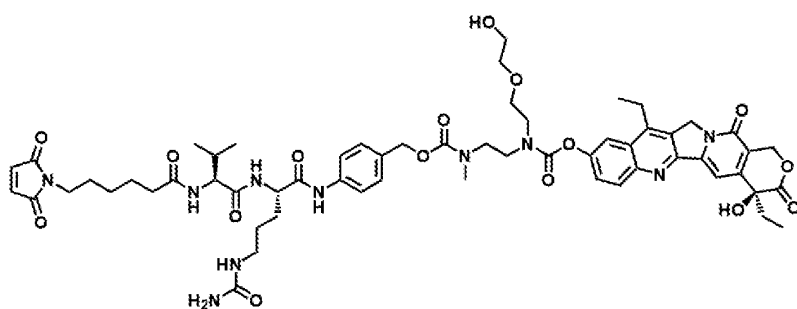


(15) ,

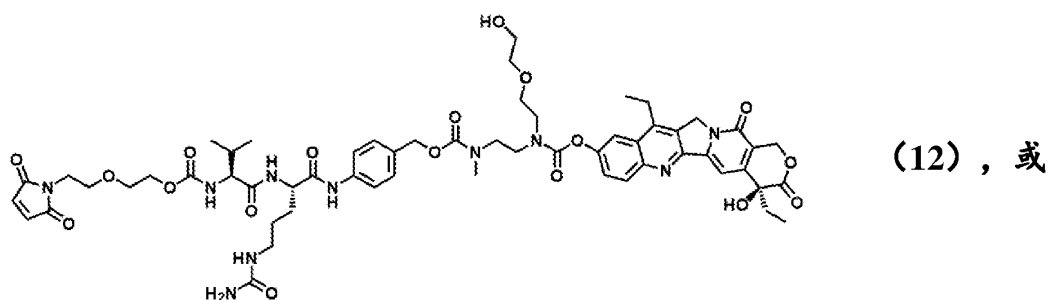
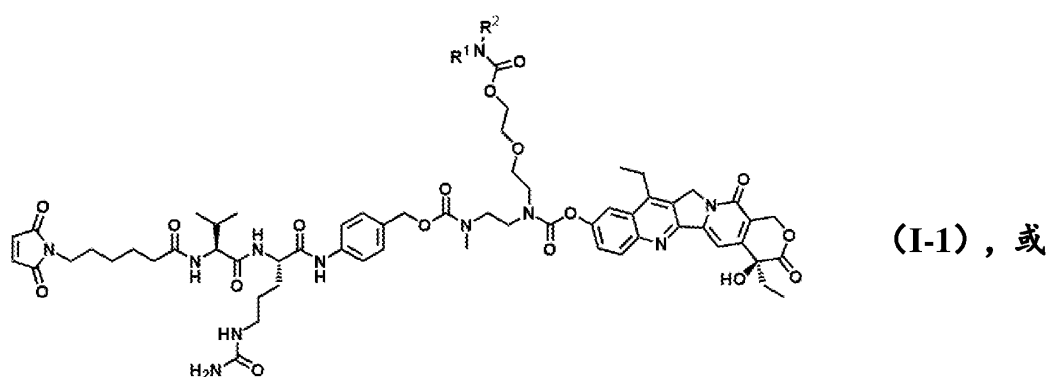
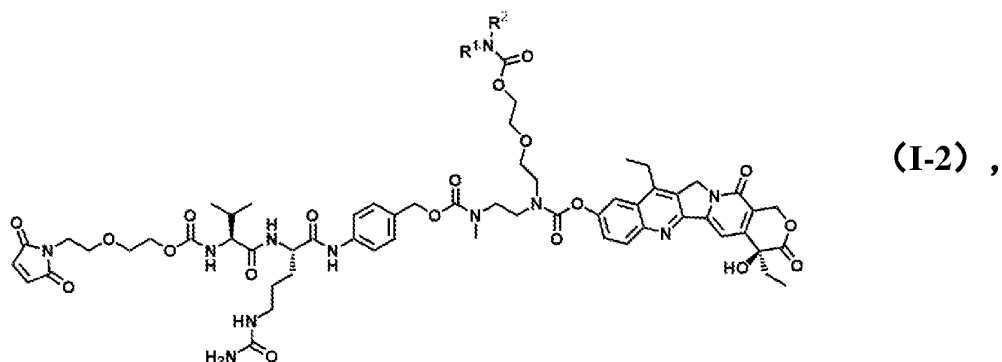


(16) .

6. 一种抗体药物偶联物中间体的制备方法, 所述的抗体药物偶联物中间
 间为:



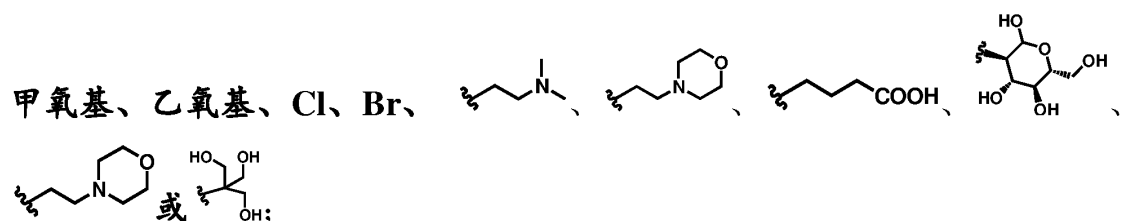
(4) , 或



所述的 R^1 选自氢、取代或非取代的 C_{1-6} 烷基、取代或非取代的 C_{1-6} 羟烷基、取代或非取代的 C_{1-6} 氨基烷基、取代或非取代的 C_{1-6} 烷氧基、取代或非取代的 C_{1-6} 烷酰基和取代或非取代的 C_{1-6} 烷醛基；

所述的 R^2 选自氢和取代或非取代的 C_{1-6} 烷基；其中各取代的 C_{1-6} 烷基任选被 1-5 个独立地选自以下的取代基取代：卤素、羟基、氨基、羰基、羧基、5-10 元杂环基和 C_{1-6} 卤代烷基，其中所述 5-10 元杂环基具有 1-3 个选自氧、氮和硫的杂原子；

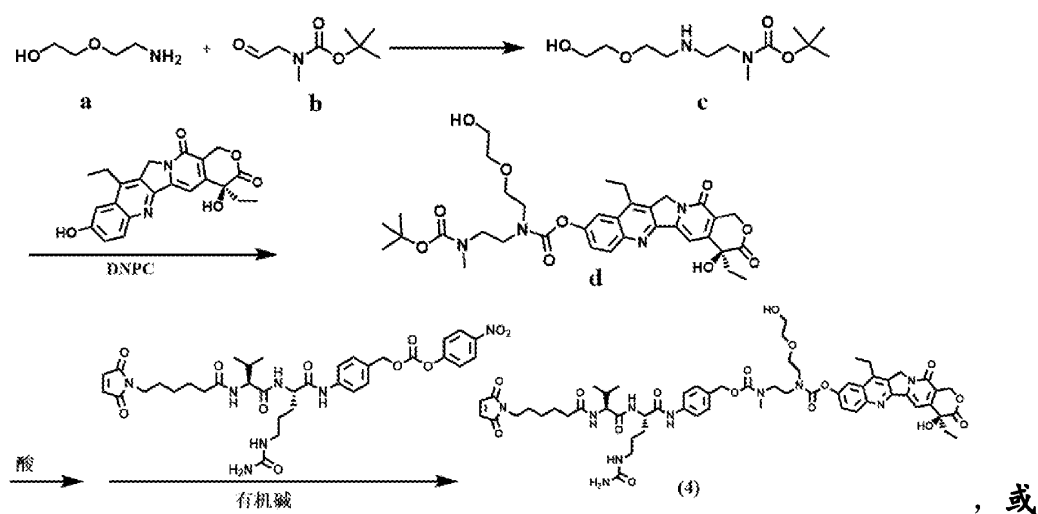
优选的, R^1 或 R^2 选自: H、甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、庚基、



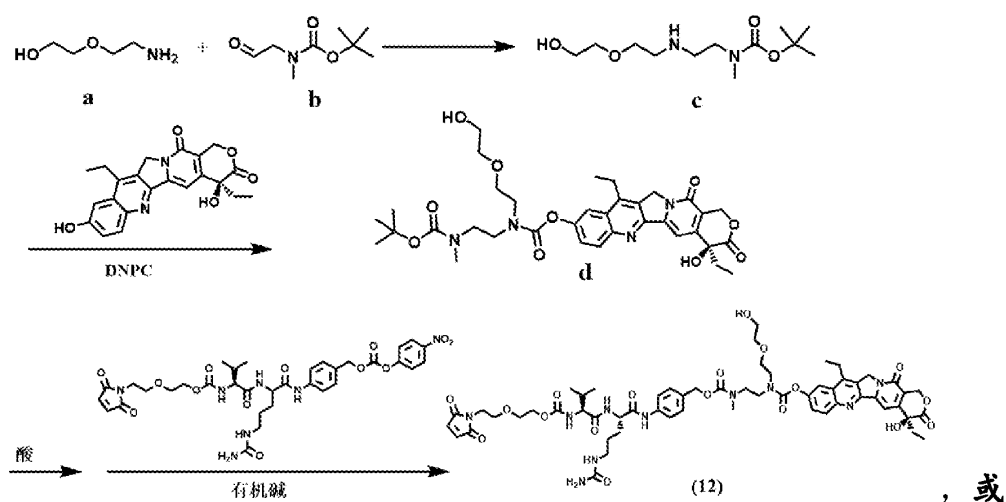
所述制备方法选自以下反应过程:

5

反应过程 1:

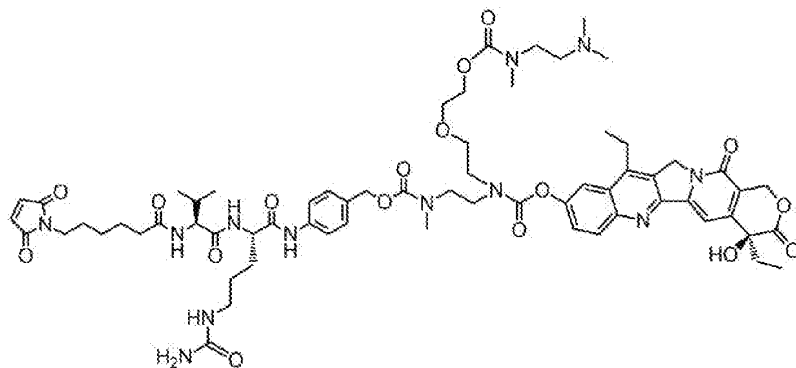


反应过程 2:

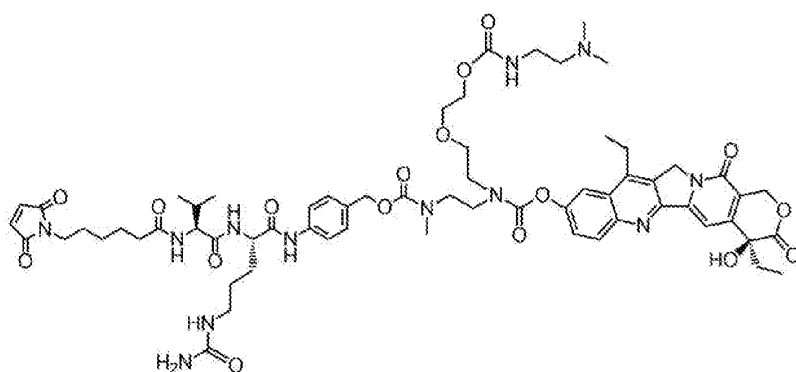


反应过程 3:

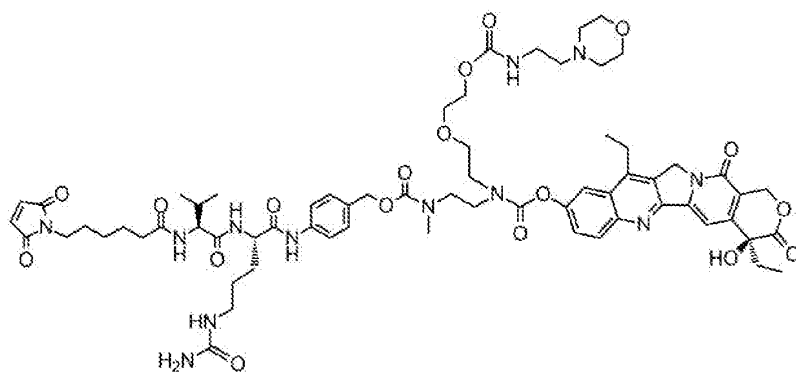
7. 根据权利要求 6 所述的制备方法, 其特征在于, 所述的化合物 (I-1) 选自:



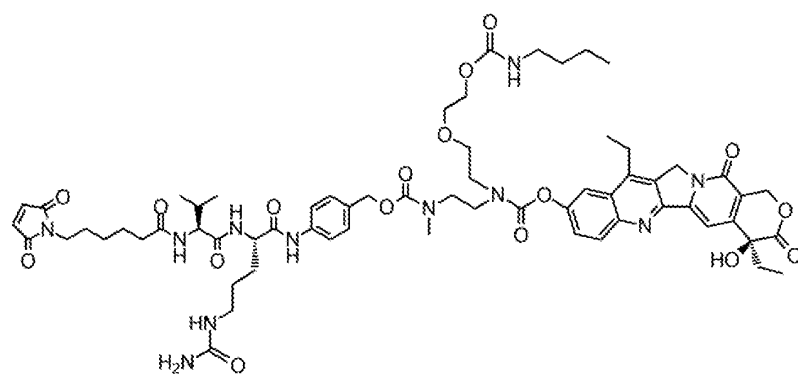
(1) ,



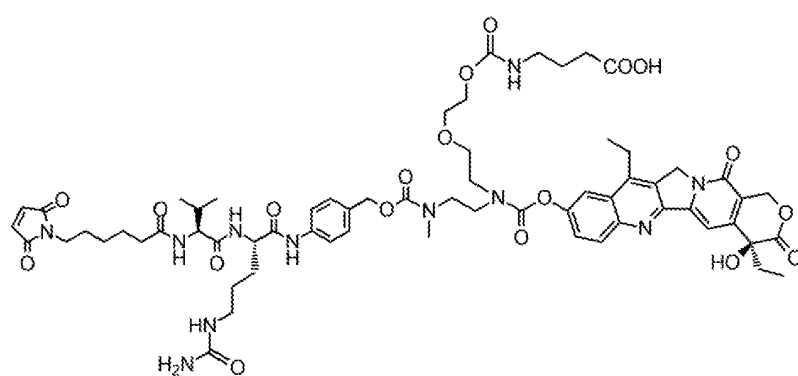
(2) ,



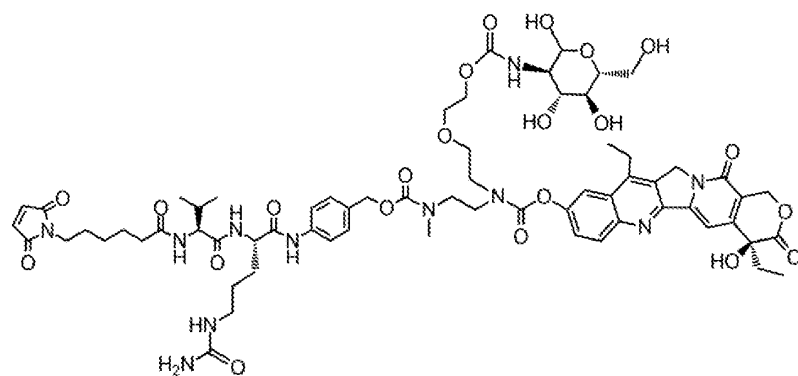
(3) ,



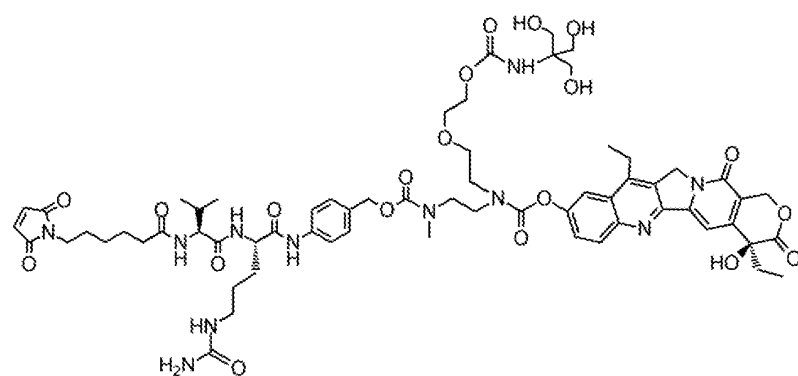
(5) ,



(6) ,

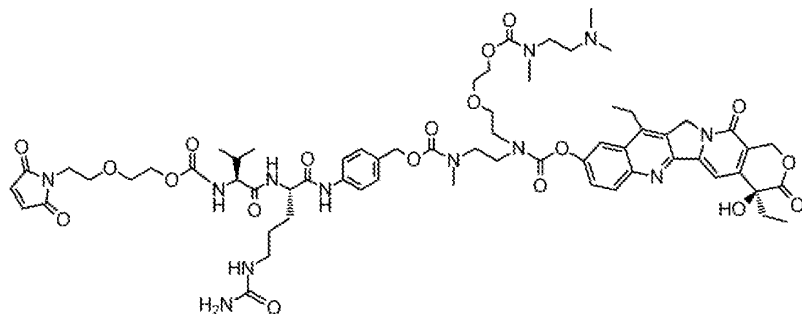


(7) ,

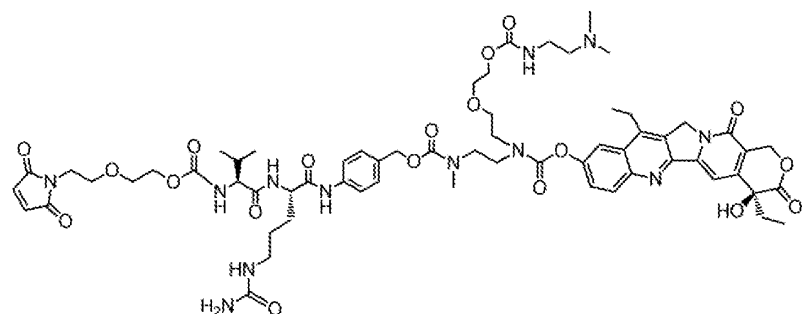


(8) ;

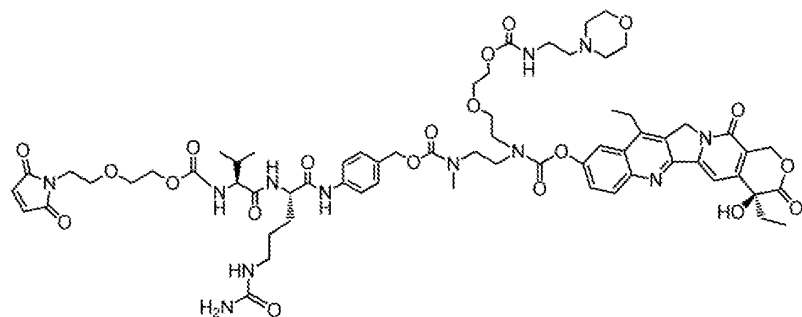
或, 所述的化合物 (I-2) 选自:



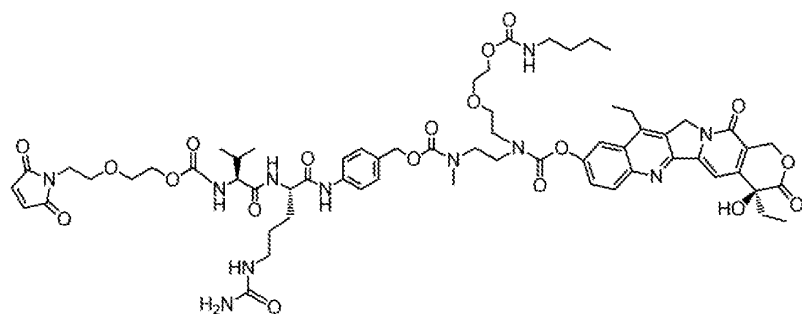
(9) ,



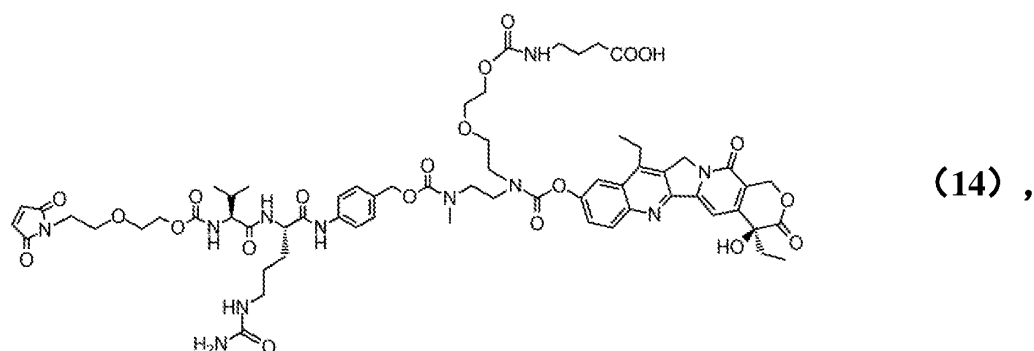
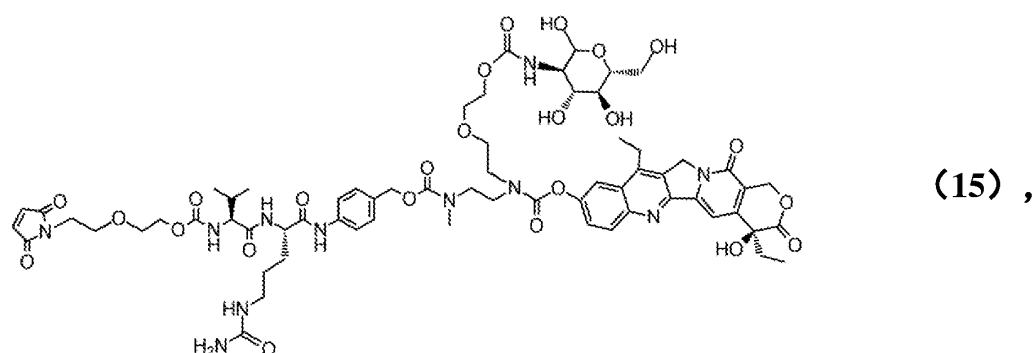
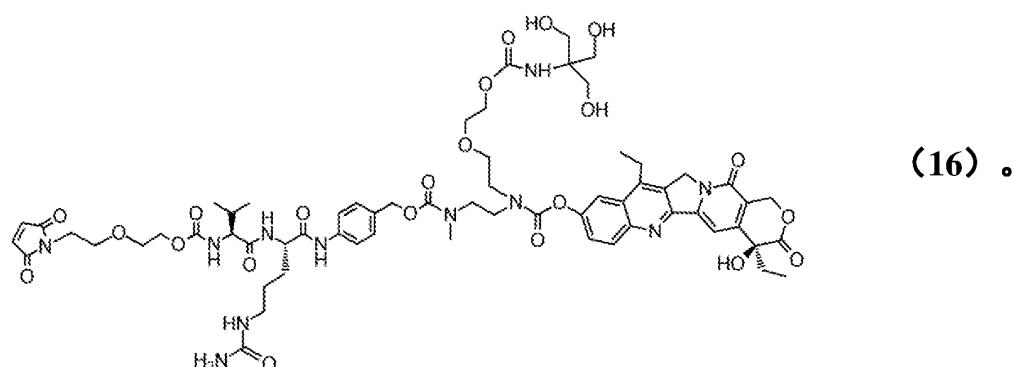
(10) ,



(11) ,



(13) ,



8. 根据权利要求 6 所述的制备方法, 其特征在于, 所述反应过程 1 包括以下条件:

反应 A: 将化合物 a 和化合物 b 溶于溶剂中, 室温搅拌适当时间后置于低温条件下加入还原剂, 再搅拌适当时间后, 再置于室温搅拌过夜, 反应结束后旋干溶剂并进行萃取、干燥和纯化;

反应 B: 将 SN38 和 DNPC 溶于溶剂中, 加入有机碱, 室温搅拌适当时间, 反应结束后旋干溶剂并进行打浆和过滤;

反应 C: 将反应 B 的产物溶于溶剂中, 加入反应 A 的产物及有机碱, 室温搅拌适当时间, 反应结束后旋干溶剂并进行纯化;

反应 D: 将反应 C 的产物溶于溶剂中, 加入酸, 低温条件下搅拌适当时间, 反应结束后旋干溶剂后与 Mc-VC-PAB-PNP 一起溶于溶剂中, 低温条件下再搅拌适当时间, 加入有机碱, 反应结束后旋干溶剂并进行纯化。

- 5 9. 根据权利要求 6 所述的制备方法, 其特征在于, 所述反应过程 2 包括以下条件:

反应 A: 将化合物 a 和化合物 b 溶于溶剂中, 室温搅拌适当时间后置于低温条件下加入还原剂后搅拌适当时间, 再置于室温搅拌过夜, 反应结束后旋干溶剂并进行萃取、干燥和纯化;

- 10 反应 B: 将 SN38 和 DNPC 溶于溶剂中, 加入有机碱, 室温搅拌适当时间, 反应结束后旋干溶剂并进行打浆和过滤;

反应 C: 将反应 B 的产物溶于溶剂中, 加入反应 A 的产物及有机碱, 室温搅拌适当时间, 反应结束后旋干溶剂并进行纯化;

- 15 反应 D: 将反应 C 的产物溶于溶剂中, 加入酸, 低温条件下搅拌适当时间, 反应结束后旋干溶剂后与 MP2-VC-PAB-PNP 一起溶于溶剂中, 低温条件下搅拌适当时间, 加入有机碱, 反应结束后旋干溶剂并进行纯化。

10. 根据权利要求 6 所述的制备方法, 其特征在于, 所述反应过程 3 包括以下操作条件:

- 20 反应 A: 将化合物 a 和化合物 b 溶于溶剂中, 室温搅拌适当时间后置于低温条件下中加入还原剂后搅拌适当时间, 再置于室温搅拌过夜, 反应结束后旋干溶剂并进行萃取、干燥和纯化;

反应 B: 将 SN38 和 DNPC 溶于溶剂中, 加入有机碱, 室温搅拌适当时间, 反应结束后旋干溶剂并进行打浆和过滤;

- 25 反应 C: 将反应 B 的产物溶于溶剂中, 加入反应 A 的产物及有机碱, 室温搅拌适当时间, 反应结束后旋干溶剂并进行纯化;

反应 D: 将反应 C 的产物溶于溶剂中, 加入二(对硝基苯)碳酸酯和有机碱, 恒温搅拌适当时间, 反应结束后旋干溶剂并进行纯化;

反应 E: 将反应 D 的产物和胺类化合物溶于溶剂中, 加入有机碱, 低温条件下搅拌适当时间, 反应结束后旋干溶剂并进行纯化;

反应 F: 将反应 E 的产物溶于溶剂中, 加入酸, 低温条件下搅拌适当时间, 反应结束后旋干溶剂后与 Mc-VC-PAB-PNP 一起溶于溶剂中, 低温条件下搅拌适当时间, 加入有机碱, 反应结束后旋干溶剂并进行纯化。

5 11. 根据权利要求 6 所述的制备方法, 其特征在于, 所述反应过程 4 包括以下操作条件:

反应 A: 将化合物 a 和化合物 b 溶于溶剂中, 室温搅拌适当时间后置于低温条件下中加入还原剂后搅拌适当时间, 再置于室温搅拌过夜, 反应结束后旋干溶剂并进行萃取、干燥和纯化;

10 反应 B: 将 SN38 和 DNPC 溶于溶剂中, 加入有机碱, 室温搅拌适当时间, 反应结束后旋干溶剂并进行打浆和过滤;

反应 C: 将反应 B 的产物溶于溶剂中, 加入反应 A 的产物及有机碱, 室温搅拌适当时间, 反应结束后旋干溶剂并进行纯化;

反应 D: 将反应 C 的产物溶于溶剂中, 加入二(对硝基苯)碳酸酯和有机碱, 恒温搅拌适当时间, 反应结束后旋干溶剂并进行纯化;

15 反应 E: 将反应 D 的产物和胺类化合物溶于溶剂中, 加入有机碱, 低温条件下搅拌适当时间, 反应结束后旋干溶剂并进行纯化;

反应 F: 将反应 E 的产物溶于溶剂中, 加入酸, 低温条件下搅拌适当时间, 反应结束后旋干溶剂后与 MP2-VC-PAB-PNP 一起溶于溶剂中, 低温条件下搅拌适当时间, 加入有机碱, 反应结束后旋干溶剂并进行纯化。

20 12. 根据权利要求 6—11 中任一项所述的方法, 其中所述的“低温条件下”为冰水浴下。

13. 根据权利要求 6—11 中任一项所述的制备方法, 其特征在于所述的溶剂为极性溶剂和/或非极性溶剂, 所述的极性溶剂为 THF、DMF、DMA、NMP 的一种或几种; 所述的非极性溶剂为二氯甲烷、四氯化碳的一种或几种。

25 14. 根据权利要求 6—11 中任一项所述的制备方法, 其特征在于所述的有机碱为 N, N -二异丙基乙胺、三乙胺、吡啶的一种或几种, 优选为 N, N-二异丙基乙胺以及吡啶中的一种或两种。

15. 根据权利要求 6—11 中任一项所述的制备方法，其特征在于所述的酸为盐酸、三氟乙酸、柠檬酸中的一种或两种。

16. 根据权利要求 6—11 中任一项所述的制备方法，其特征在于所述的胺类化合物为伯胺或仲胺。

5 17. 根据权利要求 6—11 中任一项所述的制备方法，其特征在于所述的反应 A 中使用乙酸乙酯进行萃取，所述的纯化采用柱层析法，洗脱剂为二氯甲烷和甲醇。

10 18. 根据权利要求 6—11 中任一项所述的制备方法，其特征在于所述的反应 B 中使用乙酸乙酯、正己烷、二氯甲烷中的一种或多种组合进行打浆。

19. 根据权利要求 6—11 中任一项所述的制备方法，其特征在于所述的反应 C 中采用柱层析法进行纯化，洗脱剂为二氯甲烷和甲醇。

20. 根据权利要求 6—11 中任一项所述的制备方法，其特征在于所述的反应 D 中采用柱层析法进行纯化，洗脱剂为二氯甲烷和甲醇。

15 21. 根据权利要求 6—11 中任一项所述的制备方法，其特征在于所述的反应 E 中采用柱层析法进行纯化，洗脱剂为二氯甲烷和甲醇。

22. 根据权利要求 6—11 中任一项所述的制备方法，其特征在于所述的反应 F 中采用制备液相法进行纯化，流动相 A 为 MeCN, 0.1% HCOOH, 流动相 B 为 H₂O, 0.1% HCOOH。

20 23. 根据权利要求 6—11 中任一项所述的制备方法，其特征在于，所述反应均在氮气保护下进行。