

说明书

发明名称: 双毒素抗体药物偶联物及其用途

- [0001] 相关申请的交叉引用
- [0002] 本申请要求第202311543915.2号和第202410631122.4号中国专利申请的优先权和权益, 所述专利申请的全部内容通过援引并入本文。

技术领域

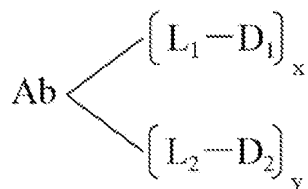
- [0003] 本公开涉及化学医药领域, 具体涉及一种双毒素抗体药物偶联物及其用途。

背景技术

- [0004] 作为新型的靶向治疗药物, 抗体药物偶联物(Antibody Drug Conjugate, ADC)利用了抗体对正常细胞和肿瘤细胞表面抗原结合的特异性和细胞毒素的高效性, 能够有效地将细胞毒素靶向输送到疾患部位发挥药效, 同时又降低了传统药物形式中细胞毒素副作用过大的缺陷, 逐渐在肿瘤等领域的治疗中发挥着越来越重要的作用。
- [0005] ADC药物由单克隆抗体、连接子(linker)及细胞毒性药物(细胞毒素)三部分组成。目前报道的大多数ADC药物为包含一种毒素的抗体药物偶联物, 对于包含双毒素的抗体药物偶联物报道相对较少。

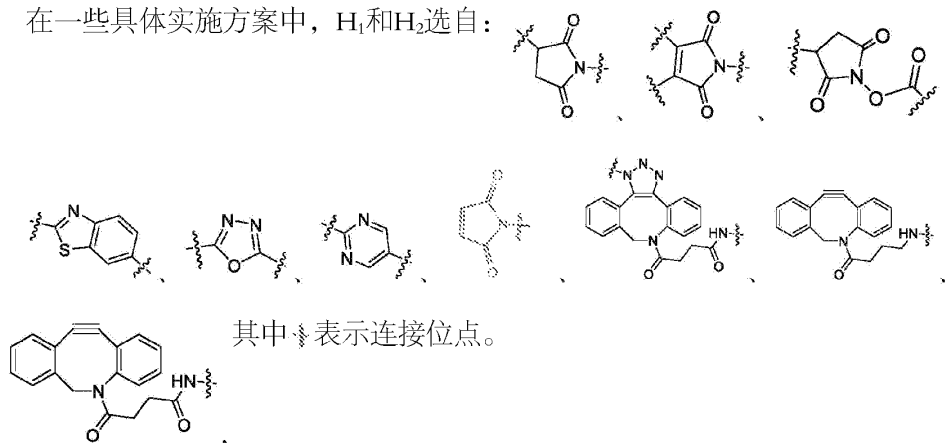
发明内容

- [0006] 本公开的第一方面提供了雷公藤甲素和喜树碱类药物的组合在制备用于治疗肿瘤疾病的药物中的应用。
- [0007] 在一些具体实施方案中, 雷公藤甲素和喜树碱类药物共同作为抗体药物偶联物中的毒素。
- [0008] 本公开的第二方面提供了一种包含双毒素的抗体药物偶联物, 其具有式:

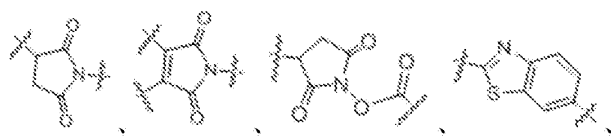


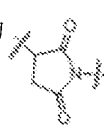
- [0009] 其中，Ab是抗体或其抗原结合片段；
- [0010] D_1 和 D_2 选自雷公藤甲素或喜树碱类药物，并且 D_1 、 D_2 不相同；
- [0011] L_1 和 L_2 为连接单元；
- [0012] x, y 为0-8。
- [0013] 在一些具体实施方案中， L_1 与Ab通过巯基或酰胺基团相连。在另一些具体实施方案中， L_2 与Ab通过糖基相连。
- [0014] 在一些具体实施方案中， L_1 具有 $[H_1-L_{1a}-L_{1b}-L_{1c}-D_1]_x$ 所示结构。在另一些具体实施方案中， L_2 具有 $[H_2-L_{2a}-L_{2b}-L_{2c}-D_2]_y$ 所示结构。在一些具体实施方案中， H_1 和 H_2 是与Ab的接头部位或者能够与Ab进行反应的基团。在另一些具体实施方案中， L_{1a} 是连接 H_1 和 L_{1b} 之间的连接单元， L_{2a} 是连接 H_2 和 L_{2b} 之间的连接单元。在有一些具体实施方案中， L_{1b} 是连接 L_{1a} 和 L_{1c} 之间的连接子， L_{2b} 是连接 L_{2a} 和 L_{2c} 之间的连接子。在一些具体实施方案中， L_{1c} 是 L_{1b} 和 D_1 之间的间隔子， L_{2c} 是 L_{2b} 和 D_2 之间的间隔子。

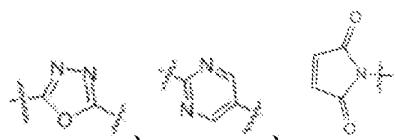
- [0015] 在一些具体实施方案中， H_1 和 H_2 选自：



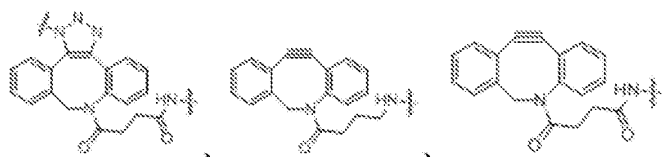
- [0016] 在另一些具体实施方案中， H_1 选自：



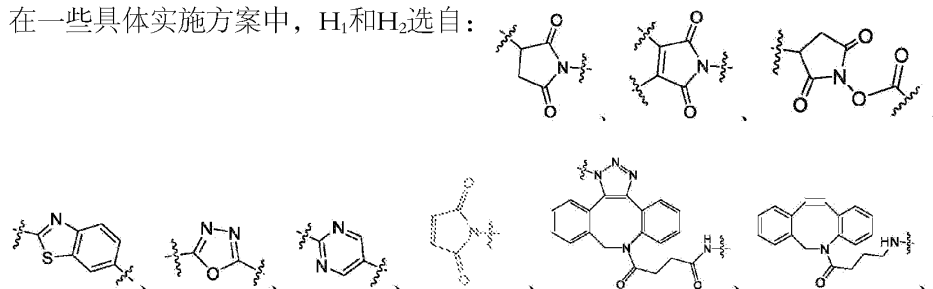
在优选的实施方案中，H₁为  在一些



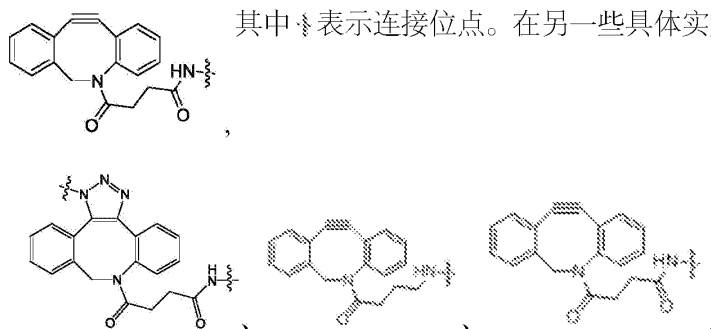
具体实施方案中，H₂选自：



[0017] 在一些具体实施方案中，H₁和H₂选自：



其中  表示连接位点。在另一些具体实施方案中，H₂选自：

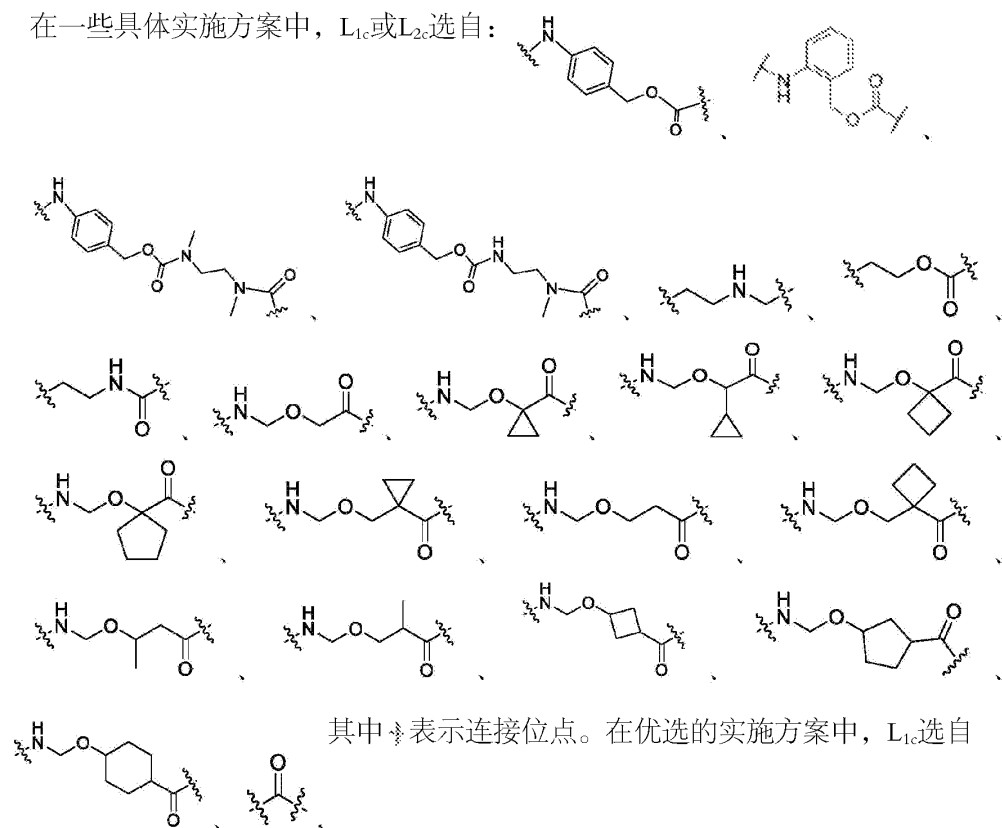


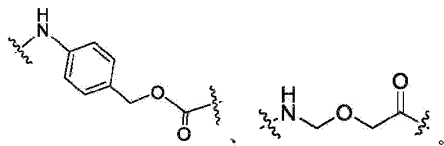
[0018] 在一些具体实施方案中，L_{1a}或L_{2a}包含-L_d-C(O)-，其中L_d选自任选取代的亚烷基、任选取代的聚乙二醇基、任选取代的亚烯基、任选取代的亚炔基、任选取代的亚脂肪环基、任选取代的亚脂肪杂环基、任选取代的亚芳基、任选取代的亚杂芳基或它们的组合。在另一些具体实施方案中，L_d选自任选取代的C₁₋₃₀亚烷基、任选取代的聚乙二醇基、任选取代的C₂₋₃₀亚烯基、任选取代的C₂₋₃₀亚炔基、任选取代的C₃₋₃₀亚脂肪环基、任选取代的C₁₋₃₀亚脂肪杂环基、任选取代的C₆₋₃₀

亚芳基、任选取代的C₅₋₃₀亚杂芳基或它们的组合。在一些具体实施方案中，L_d选自-(CH₂)_m-、-(PEG)_n-或-(CH₂)_m-(PEG)_n-(CH₂)_z，其中m，n，z为0-10的整数，优选地，m，n，z为0-8的整数。

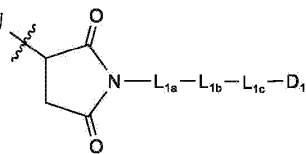
[0019] 在一些具体实施方案中，L_{1b}或L_{2b}为可裂解的连接子或不可裂解的连接子。在一些具体实施方案中，L_{1b}或L_{2b}为可裂解的2-10个氨基酸组成的肽链。在优选的实施方案中，L_{1b}或L_{2b}选自Gly-Gly-Phe-Gly、Val-Cit、Val-Ala、Val-Lys、Val-Arg、AcLys-Val-Cit、AcLys-Val-Ala、Phe-Cit、Phe-Ala、Phe-Lys、Phe-Arg、Glu-Val-Ala、Glu-Val-Cit、Ala-Lys、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp-Cit、Ala-Ala-Asn、Ala-Ala-Ala、Ala-Asn、Lys。在还优选的实施方案中，L_{1b}或L_{2b}选自Gly-Gly-Phe-Gly、Val-Cit、Val-Ala、Val-Lys、Phe-Cit、Phe-Ala、Phe-Lys、Ala-Ala-Asn。

[0020] 在一些具体实施方案中，L_{1c}或L_{2c}选自：

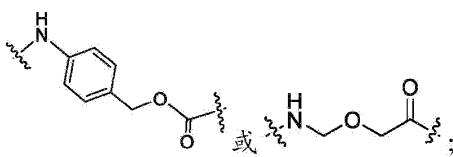




[0021] 在一些具体实施方案中, L_1-D_1 为 $\text{---}\text{O}\text{---}$ 其中 L_{1a} 为 $-(CH_2)_{m1}$

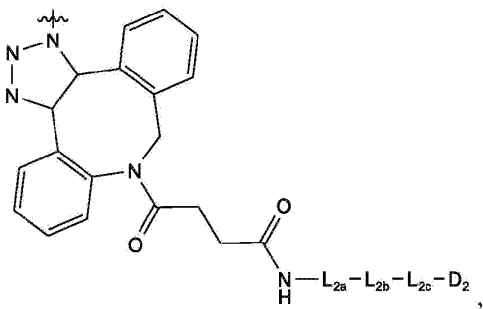


-C(O)-或-(PEG)_{n1}-(CH₂)_{z1}-C(O)-, 其中m₁、n₁、z₁为2-8的整数; L_{1b}为Gly-Gly、Phe-Gly、Val-Cit或Val-Ala; L_{1c}为 $\begin{matrix} \text{H} \\ | \\ \text{N} \end{matrix}$ D₁为



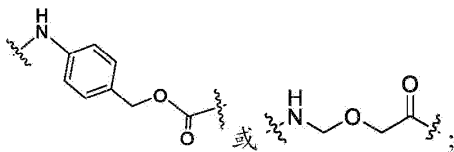
雷公藤甲素或喜树碱类药物。

[0022] 在一些具体实施方案中, L₂-D₂为

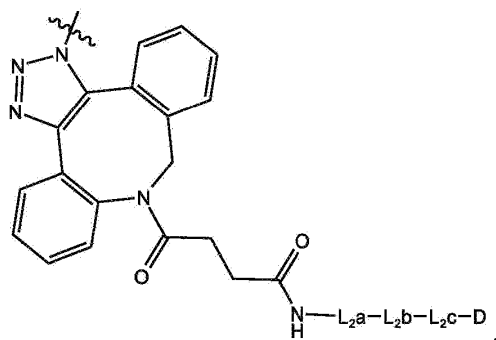


其中： L_{2a} 为 $-(\text{PEG})_{n2}-(\text{CH}_2)_{z2}-\text{C}(\text{O})-$

, 其中 n_2 、 z_2 为2-8的整数; L_{2b} 为Gly-Gly-Phe-Gly、Val-Cit或Val-Ala; L_{2c} 为



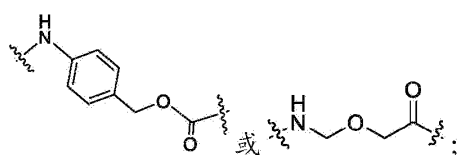
[0023] 在一些具体实施方案中, L_2-D_2 为



其中： L_{2a} 为 $-(\text{PEG})_{n_2}-(\text{CH}_2)_{z_2}-\text{C}(\text{O})-$

，其中 n_2 、 z_2 为2-8的整数； L_{2b} 为Gly-Gly-Phe-Gly、Val-Cit或Val-Ala； L_{2c} 为

D_2 为雷公藤甲素或喜树碱类药物。



[0024] 在一些具体实施方案中， L_{1a} 为 $-(\text{CH}_2)_{m_1}-\text{C}(\text{O})-$ ，其中 m_1 为2-6的整数，优选为5。在另一些具体实施方案中， L_{1a} 为 $-(\text{PEG})_{n_1}-(\text{CH}_2)_{z_1}-\text{C}(\text{O})-$ ，其中 n_1 、 z_1 为2-6的整数，优选 n_1 、 z_1 为2。

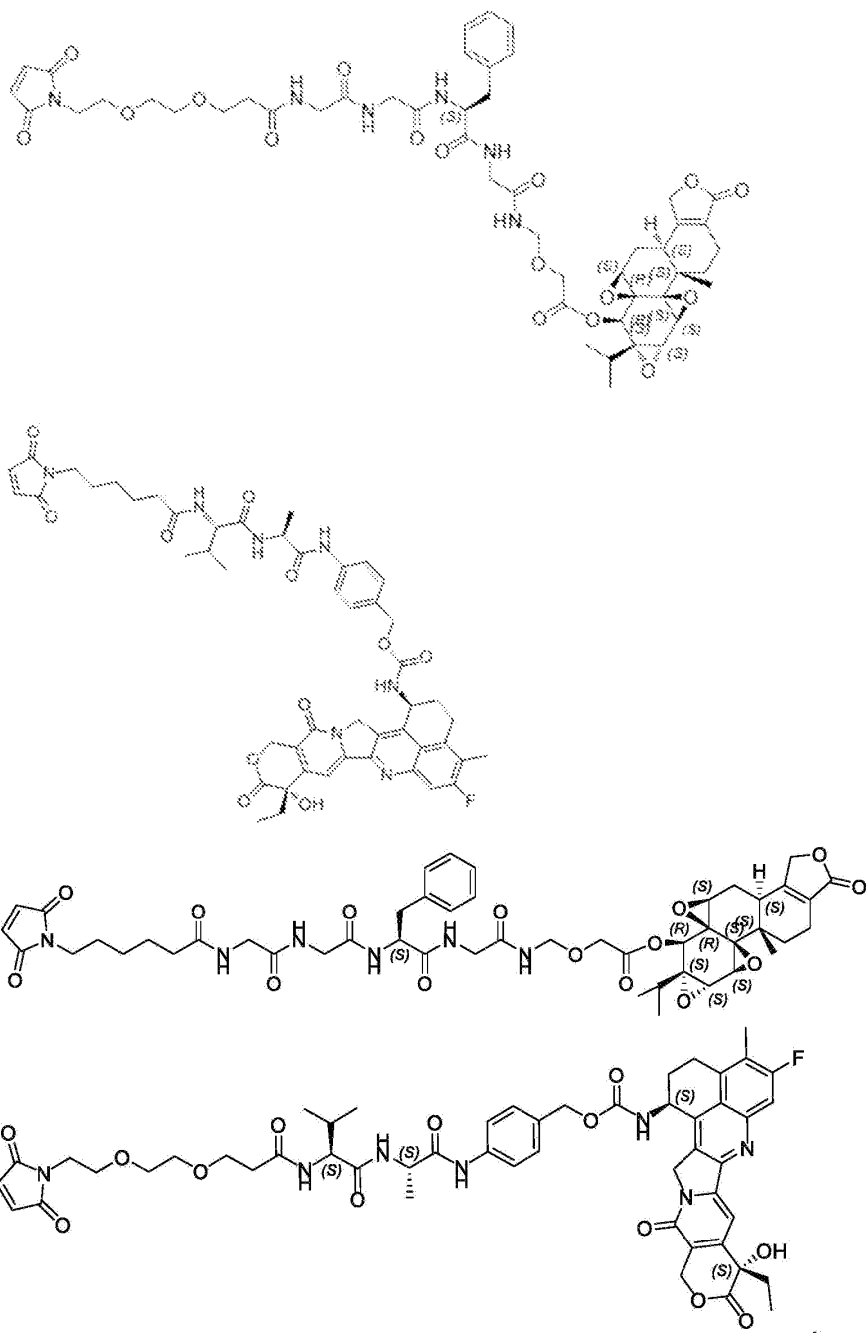
[0025] 在一些具体实施方案中， L_{2a} 为 $-(\text{PEG})_{n_2}-(\text{CH}_2)_{z_2}-\text{C}(\text{O})-$ ，其中 n_2 、 z_2 为2-6的整数。在另一些具体实施方案中， L_{1a} 为 $-(\text{PEG})_{n_1}-(\text{CH}_2)_{z_1}-\text{C}(\text{O})-$ ，其中 n_1 、 z_1 为2-6的整数；优选 n_2 为4-6的整数， z_2 为2。

[0026] 在一些具体实施方案中， D_1 为雷公藤甲素， D_2 为喜树碱类药物。在另一些具体实施方案中， D_1 为喜树碱类药物， D_2 为雷公藤甲素。在一些具体实施方案中，喜树碱类药物为喜树碱、依喜替康、拓扑替康、SN38或其衍生物。在另一些具体实施方案中，喜树碱类药物为依喜替康。

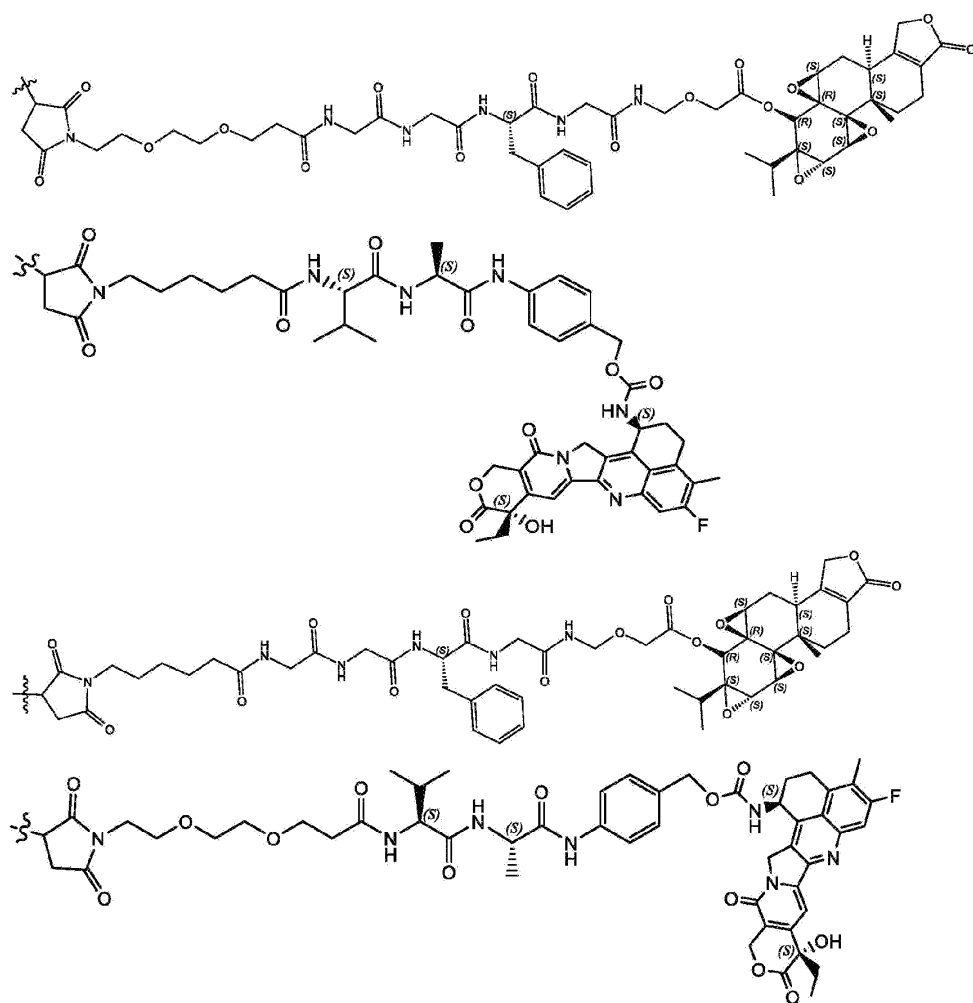
[0027] 在一些具体实施方案中， x 选自2-8，优选3-5； y 选自3-4。

[0028] 在一些具体实施方案中， $x+y \geq 4$ ，优选 $4 \leq x+y \leq 9$ ，更优选 $7 \leq x+y \leq 8$ 。

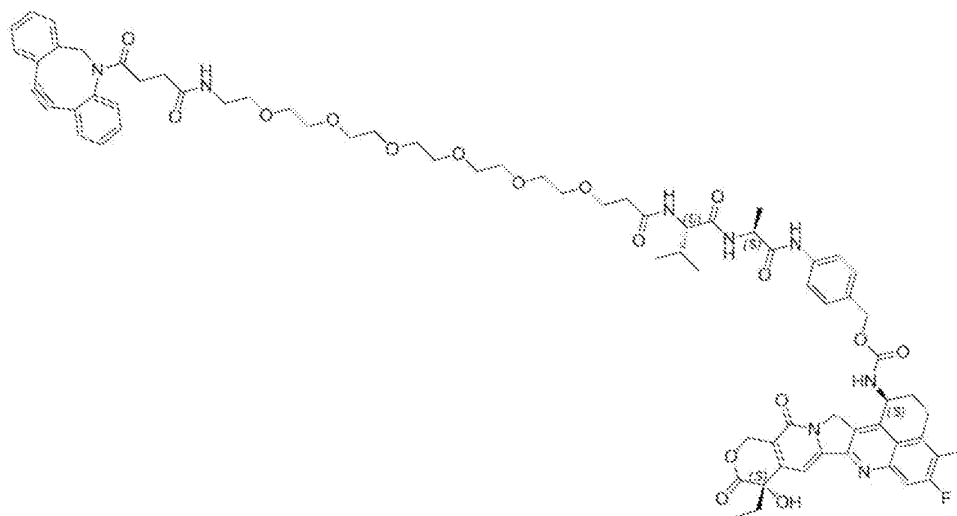
[0029] 在一些具体实施方案中， L_1-D_1 选自：

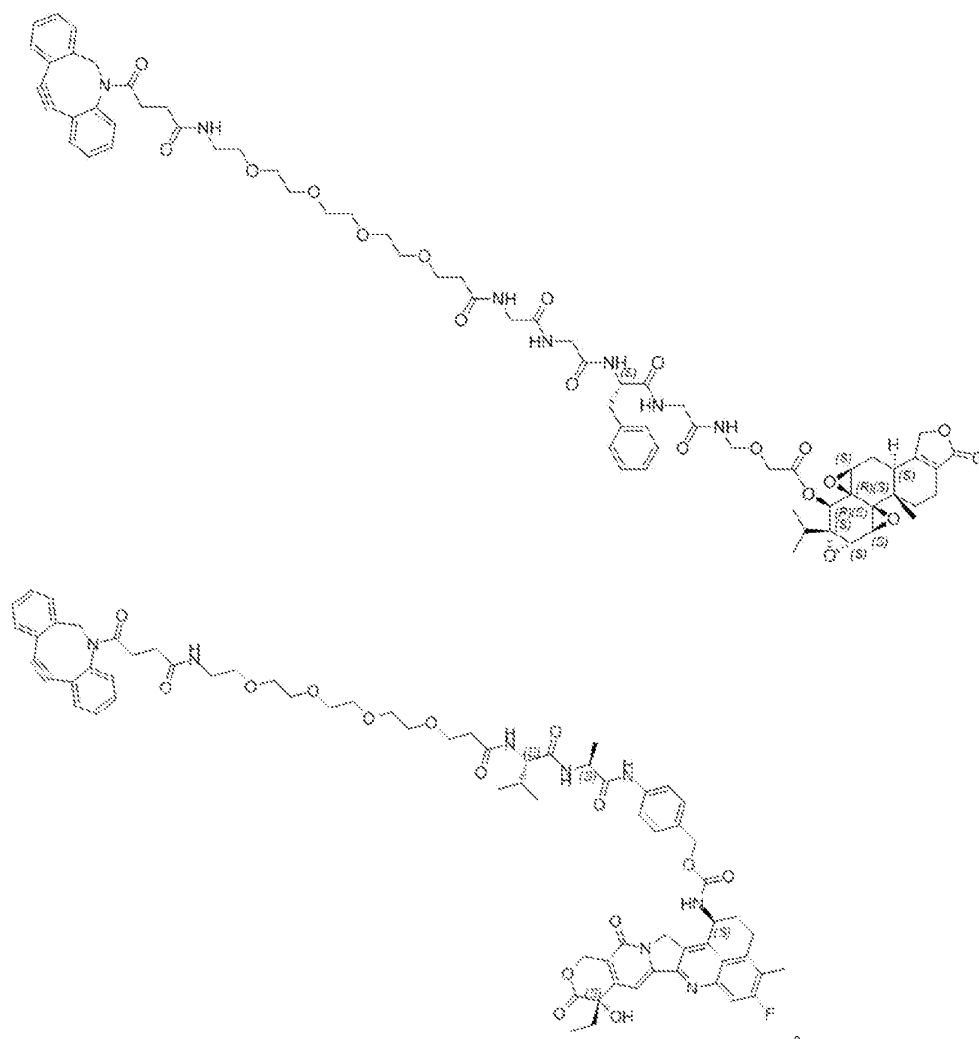


[0030] 在一些更具体实施方案中，L₁-D₁选自：

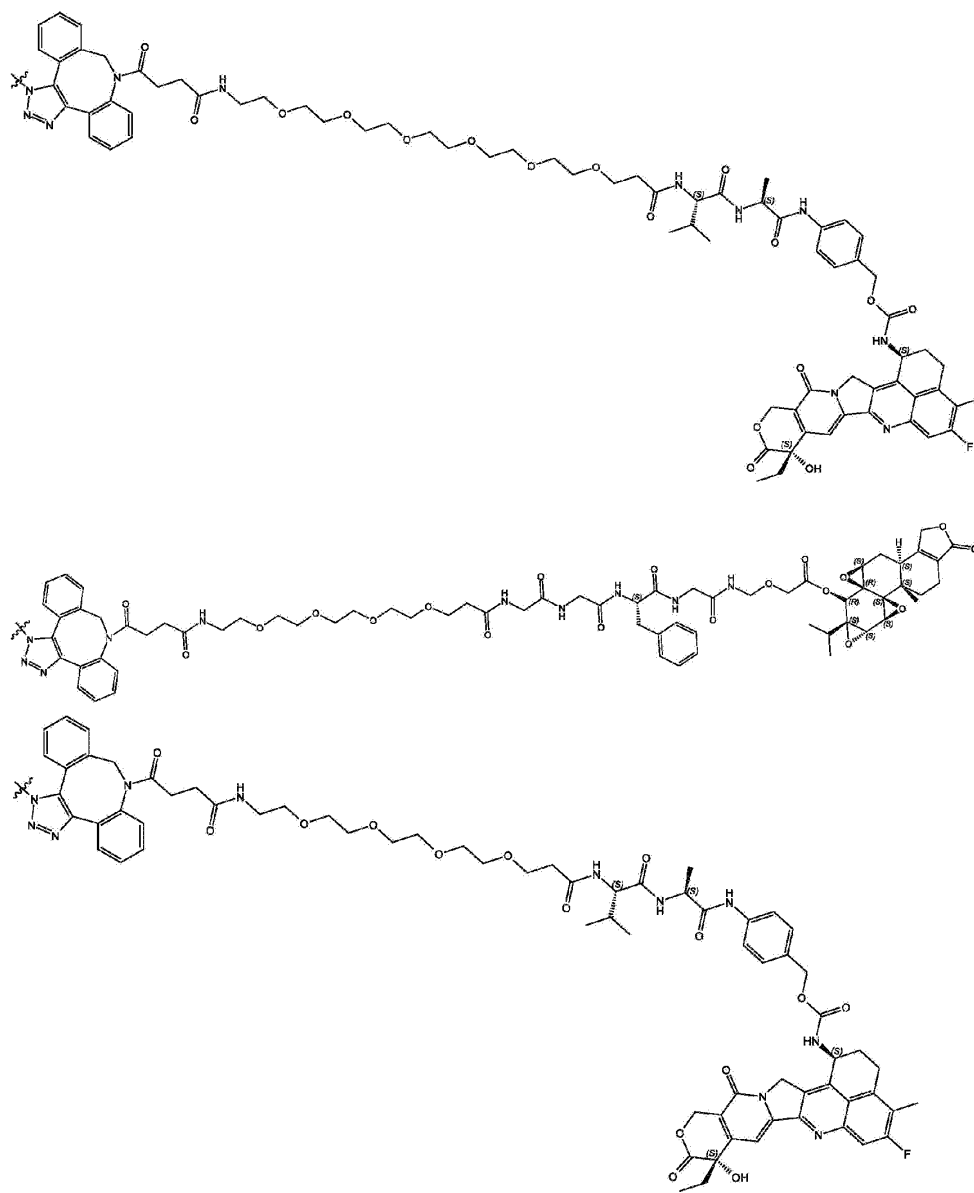


[0031] 在一些具体实施方案中，L₂-D₂选自：

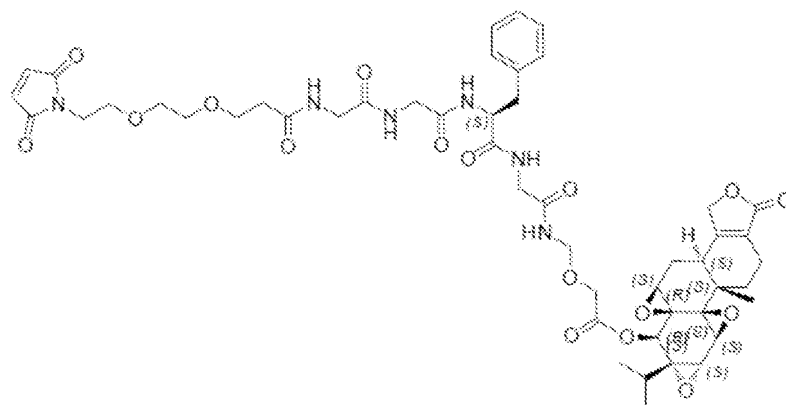




[0032] 在一些更具体实施方案中，L₂-D₂选自：



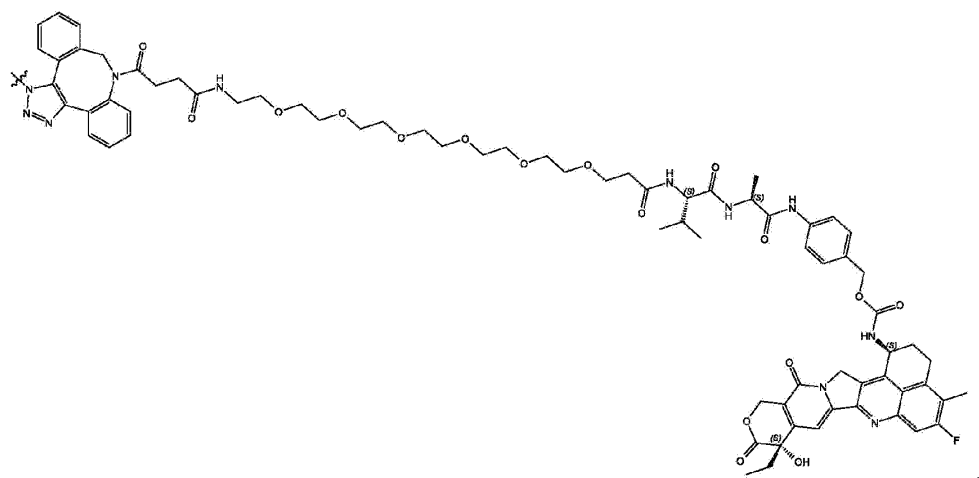
[0033] 在一些具体实施方案中， L_1-D_1 为：



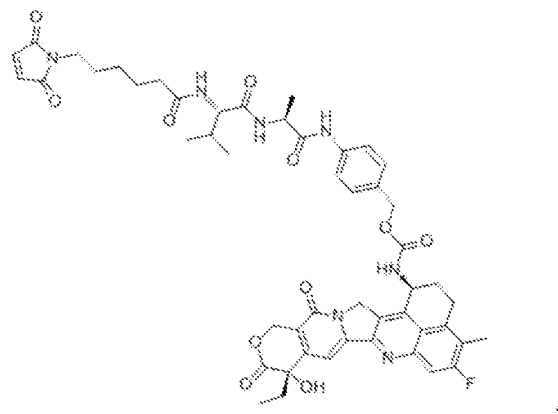
The chemical structure of compound 10 is a long-chain molecule. It begins with a quinoxaline moiety (a benzene ring fused to a pyrazine ring) connected via an amide bond to a poly(ethylene glycol) (PEG) spacer. The PEG spacer is a linear chain of repeating ethylene oxide units. The PEG chain is terminated by an amide bond to a complex fluorinated heterocyclic system. This system includes a pyrazole ring, a pyridine ring, and a fluorinated benzene ring, all interconnected by various functional groups including amides, esters, and a hydroxyl group.

The chemical structure shows a polymer chain with a repeating unit of poly(amide-ether). The chain is terminated on one end by a polycyclic aromatic ether moiety, which includes a benzofuran-like structure fused to a cyclohexane ring, with various stereocenters indicated by (R), (S), and (M) labels. The other end of the chain is terminated by a carbonyl group.

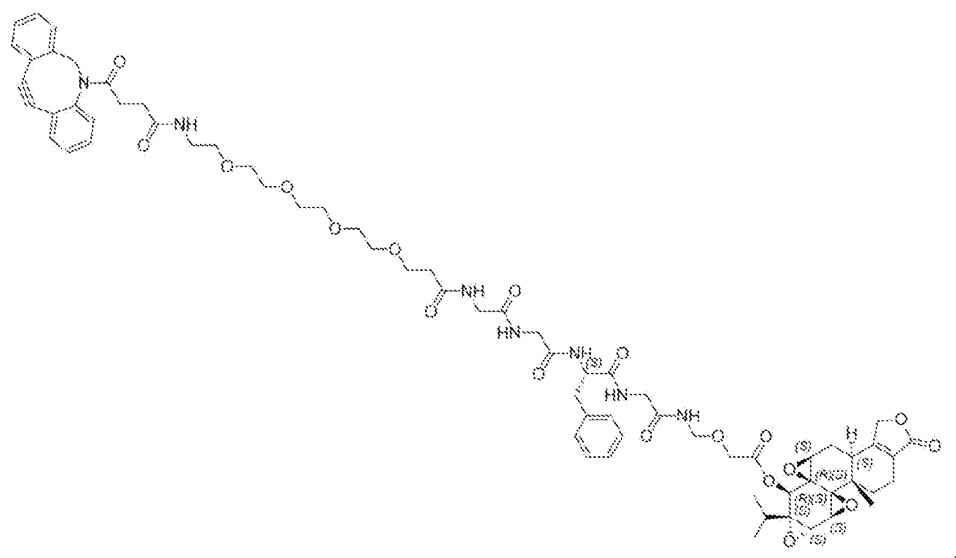
[0036] L₂-D₂为:



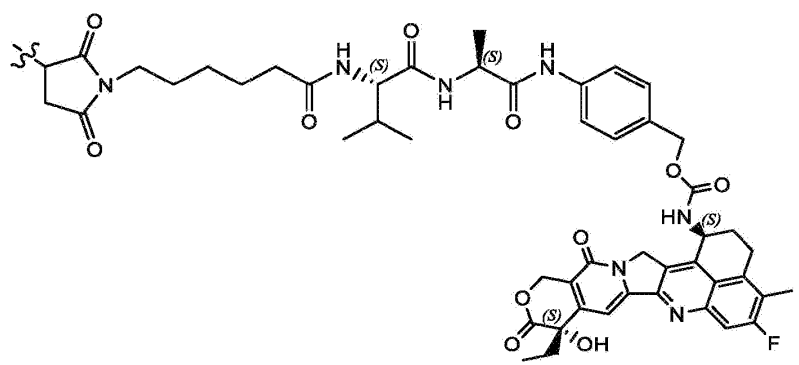
[0037] 在一些具体实施方案中， L_1-D_1 为：



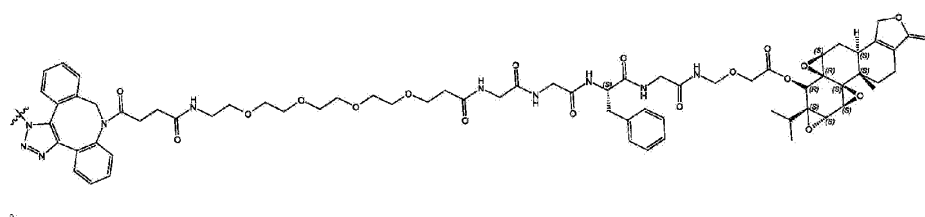
[0038] L_2-D_2 为：



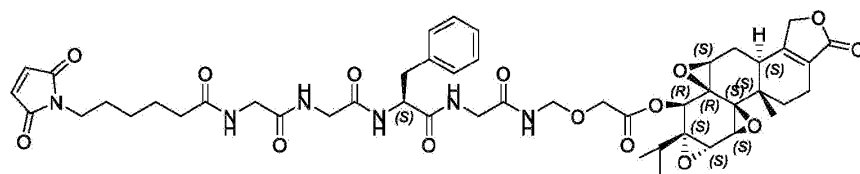
[0039] 在一些具体实施方案中， L_1-D_1 为：



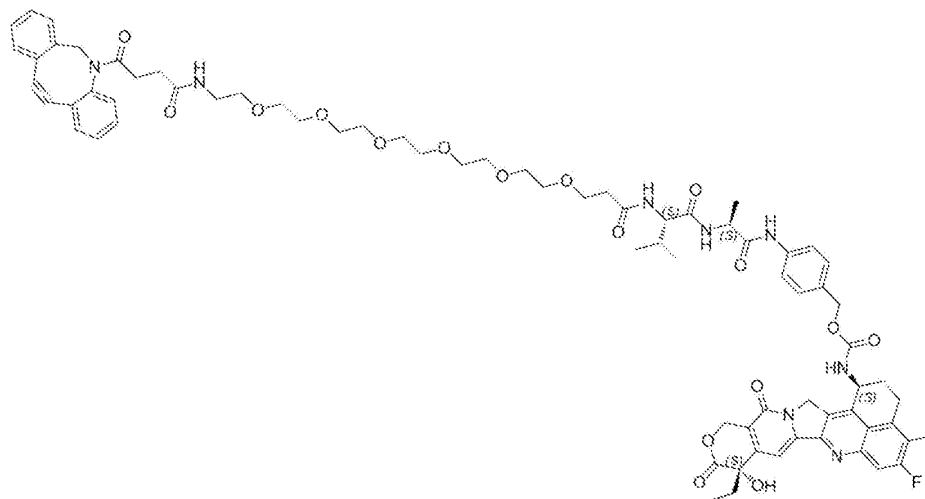
[0040] L_2-D_2 为：



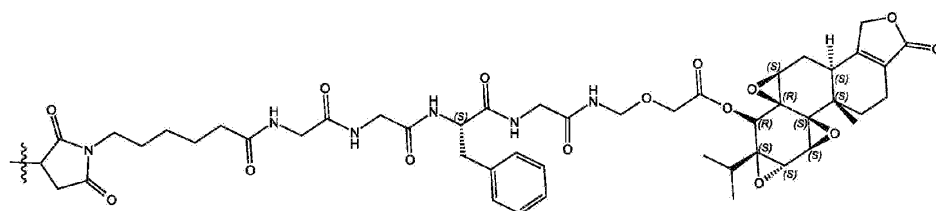
[0041] 在一些具体实施方案中， L_1-D_1 为：



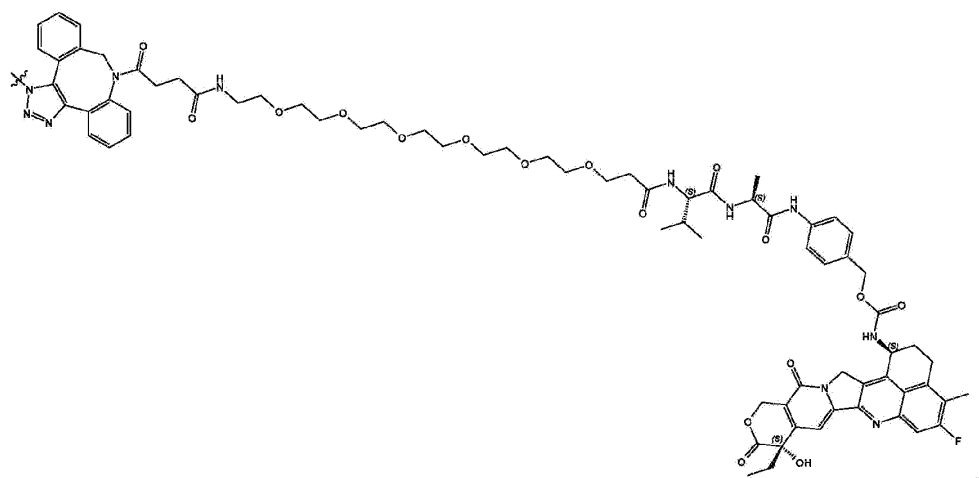
[0042] L₂-D₂为:



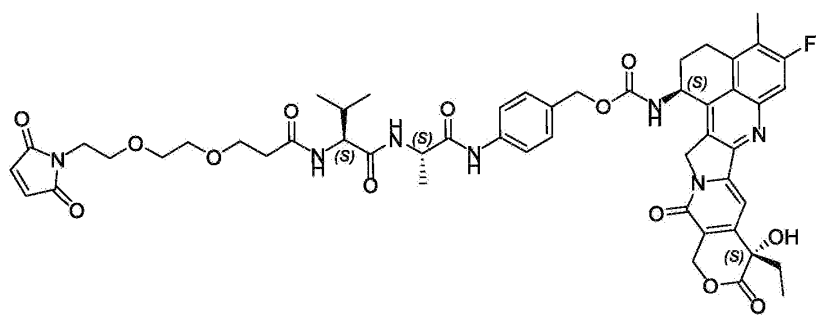
[0043] 在一些具体实施方案中, L₁-D₁为:



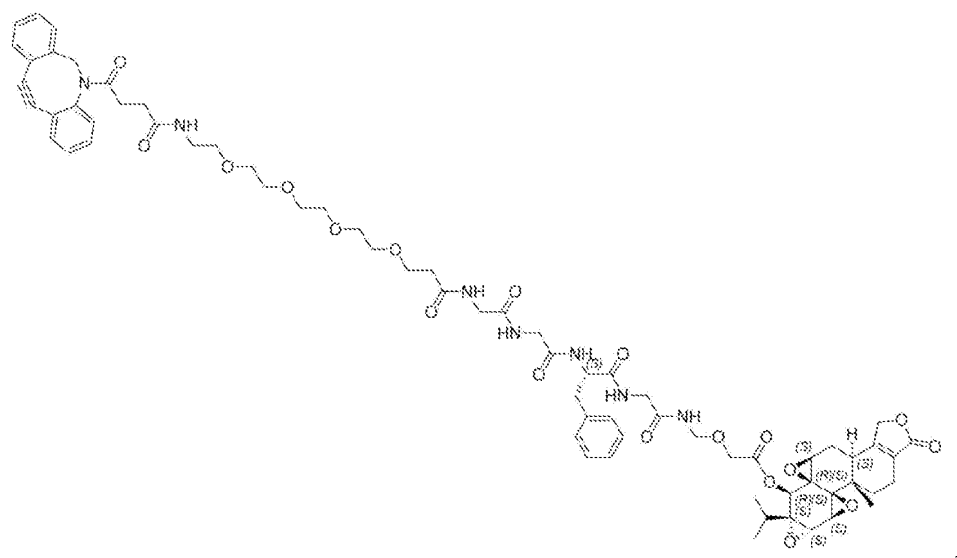
[0044] L₂-D₂为:



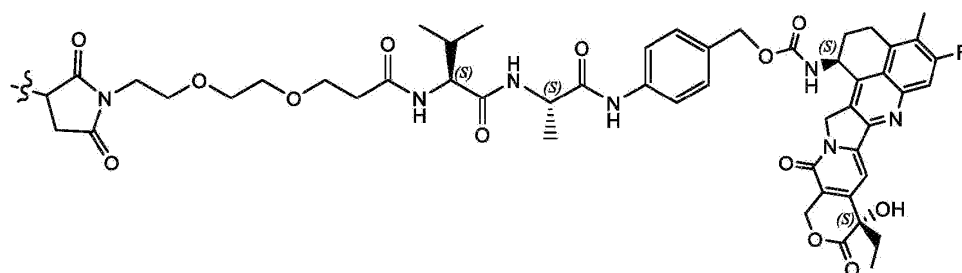
[0045] 在一些具体实施方案中， L_1-D_1 为：



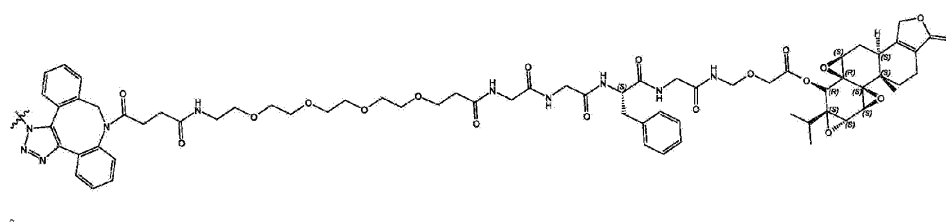
[0046] L_2-D_2 为：



[0047] 在一些具体实施方案中， L_1-D_1 为：



[0048] L_2-D_2 为：



[0049] 在一些实施方案中，所述 L_2 与抗体通过寡糖相连接，所述寡糖位于抗体的Fc片段，具体连接于Fc片段的天冬酰胺残基上。在一些实施方案中，可以偶联的糖型包括G0-GN，G0F-GN、G0、G0F、G1、G1F等。在一些优选的实施方案中，所述寡糖的糖型为G0、G0F和/或G1F。在一些实施方案中，所述抗体上的寡糖通过叠氮化修饰。在一些优选的实施方案中，所述叠氮化修饰包括：将抗体与UDP-GalNAz和GalT1接触反应。在另一些实施方案中，将所述叠氮化修饰的抗体与 L_2 上的DBCO通过偶联反应而连接。在另一些优选的实施方案中，所述偶联反应包括：将叠氮化修饰的抗体与 L_2 上的DBCO通过点击化学反应，完成 L_2 与抗体的糖基偶联。

[0050] 在一些具体实施方案中，抗体或抗原结合片段结合选自以下的一种或多种：碳酸酐酶IX、 α -胎蛋白、 α -辅肌动蛋白、A3、A33、ART 4、B7、B7H3、B7H4、BAGE、BrE3抗原、CA125、CAMEL、CAPTM、CASP-8/m、CCL19、CCL21、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11A、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD52、CD54、CD55、CD59、CD64、CD66a-e、CD67、CD70、CD70L、CD

74、CD79a、CD80、CD83、CD95、CD126、CD132、CD133、CD138、CD147、CD154、CDC27、CDK-4、CDKN2A、HIF- $I\alpha$ 、结肠特异性抗原p(CSAp)、CEA、CEACAM5、CEACAM6、oMet、DAM、EGFR、EGFRvIII、cMet、EGP-1(Trop-2)、EGP-2、ELF2-M、Ep-CAM、Her2、Her3、Claudin 18.2、ROR1、ROR2、dll3、marcl7、纤维母细胞生长因子(FGF)、Flt-1、Flt-3、叶酸受体、G250抗原、GAGE、gp100、GRO- β 、HLA-DR.HML24、HMGB-1、HSP70-2M、IGF-1R、IGR1R、MAGE、MAGE-3、MART-1、MART-2、NY-ESO-1、TRAG3、mCRP、MCP-1、MIP-1A、MIP-1B、MIF、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5ac、MUC13、MUC16、MUM-1/2、MUM-3、NCA66、NCA95、NCA90、胰腺癌黏蛋白、PD-1受体、PD-L1受体、胎盘生长因子、PLAGL2、前列腺酸性磷酸酶、PSA、PRAME、PSMA、P1GF、ILGF、ILGF-1R、RS5、RANTES、T101、SAGE、S100、存活素、存活素-2B、TAG、TAG-72、腱生蛋白、TRAIL受体、Tn抗原、ED-B、WT-1、17-1A抗原。在另一些具体实施方案中，抗体或抗原结合片段选自以下的一种或多种：Her2、Her3、B7H3、Claudin 18.2、DLL-3、EGP-1(Trop-2)。

[0051] 在一些具体实施方案中，抗体或抗原结合片段选自epratuzumab、veltuzumab、sacituzumab、patritumab、trastuzumab、pertuzumab、abciximab、alemtuzumab、cetuximab、gemtuzumab、ibritumomab、panitumumab、rituximab、tositumomab、abagovomab、atlizumab、benralizumab、obinutuzumab、basiliximab、dadizumab、efalizumab、muromomab、natlizumab、omalizumab、gaiitenemab、solanezumab、tisotumab、brentuximab、inotuzumab、moxetumomab、polatuzumab、enfortumab、belantamab、cetuximab、loncastuximab、daratumumab、nimotuzumab、zolbetuximab、omburtamab、rovalpituzumab。在另一些具体实施方案中，抗体或抗原结合片段选自sacituzumab、daratumumab、zolbetuximab、omburtamab、patritumab、rovalpituzumab。

[0052] 在一些具体实施方案中，抗体或抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，其中重链可变区包括三个互补决定区HCDR1-3，分别包含SEQ ID NO: 1-3所述的氨基酸序列；其中轻链可变区包括三个互补决定区LCDR1-3，分别包含S

EQ ID NO: 4-6所述的氨基酸序列；优选地，所述抗体或其抗原结合片段重链可变区包含SEQ ID NO: 7所述的氨基酸序列，轻链可变区包含SEQ ID NO: 8所述的氨基酸序列。在另一些具体实施方案中，抗体或其抗原结合片段重链包含SEQ ID NO: 9所述的氨基酸序列，轻链包含SEQ ID NO: 10所述的氨基酸序列。

[0053] 在一些具体实施方案中，抗体或抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包括三个互补决定区HCDR1-3，分别包含SEQ ID NO: 11-13所述的氨基酸序列；其中轻链可变区包括三个互补决定区LCDR1-3，分别包含SEQ ID NO: 14-16所述的氨基酸序列。在另一些具体实施方案中，抗体或其抗原结合片段重链可变区包含SEQ ID NO: 17所述的氨基酸序列，轻链可变区包含SEQ ID NO: 18所述的氨基酸序列；更优选地，所述抗体或其抗原结合片段重链包含SEQ ID NO: 19所述的氨基酸序列，轻链包含SEQ ID NO: 20所述的氨基酸序列。

[0054] 本公开的第三方面提供了一种药物组合物，包含本文所述的抗体药物偶联物。在一些实施方案中，药物组合物还包含药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。

[0055] 本公开的第四方面提供了本文所述的抗体药物偶联物在制备用于治疗 and/或预防肿瘤的药物中的用途。

[0056] 在一些具体实施方案中，肿瘤选自与以下分子中的一种或多种表达相关的肿瘤：Trop-2、Her2、Her3、B7H3、Claudin 18.2、CD30、CD38、CD33、CD70和EGFR。在另一些具体实施方案中，肿瘤包含实体肿瘤或血液肿瘤。在一些具体实施方案中，肿瘤选自：肺癌、肾癌、尿道癌、结肠直肠癌、前列腺癌、多形性成胶质细胞瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、黑色素瘤、肝癌、膀胱癌、胃癌、白血病、恶性淋巴瘤、宫颈癌、鳞状细胞癌、阴茎癌、食道癌、唾液腺癌。

[0057] 本公开的第五方面提供了用于治疗肿瘤疾病的本文所述的抗体药物偶联物。

[0058] 在一些具体实施方案中，雷公藤甲素和喜树碱类药物共同作为所述抗体药物偶联物中的毒素。

- [0059] 在一些具体实施方案中，肿瘤选自与以下分子中的一种或多种表达相关的肿瘤：Trop-2、Her2、Her3、B7H3、Claudin 18.2、CD30、CD38、CD33、CD70和EGFR。在另一些具体实施方案中，肿瘤包含实体肿瘤或血液肿瘤。在一些具体实施方案中，肿瘤选自：肺癌、肾癌、尿道癌、结肠直肠癌、前列腺癌、多形性成胶质细胞瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、黑色素瘤、肝癌、膀胱癌、胃癌、白血病、恶性淋巴瘤、宫颈癌、鳞状细胞癌、阴茎癌、食道癌、唾液腺癌。
- [0060] 本公开的第六方面提供了用于治疗 and/或预防肿瘤的方法，所述方法包括向有需要的个体施用治疗有效量的本文所述的抗体药物偶联物。
- [0061] 在一些具体实施方案中，雷公藤甲素和喜树碱类药物共同作为所述抗体药物偶联物中的毒素。
- [0062] 在一些具体实施方案中，肿瘤选自与以下分子中的一种或多种表达相关的肿瘤：Trop-2、Her2、Her3、B7H3、Claudin 18.2、CD30、CD38、CD33、CD70和EGFR。在另一些具体实施方案中，肿瘤包含实体肿瘤或血液肿瘤。在一些具体实施方案中，肿瘤选自：肺癌、肾癌、尿道癌、结肠直肠癌、前列腺癌、多形性成胶质细胞瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、黑色素瘤、肝癌、膀胱癌、胃癌、白血病、恶性淋巴瘤、宫颈癌、鳞状细胞癌、阴茎癌、食道癌、唾液腺癌。
- [0063] 本公开的第七方面提供了本文所述的抗体药物偶联物在治疗和/或预防肿瘤中的用途。
- [0064] 在一些具体实施方案中，肿瘤选自与以下分子中的一种或多种表达相关的肿瘤：Trop-2、Her2、Her3、B7H3、Claudin 18.2、CD30、CD38、CD33、CD70和EGFR。在另一些具体实施方案中，肿瘤包含实体肿瘤或血液肿瘤。在一些具体实施方案中，肿瘤选自：肺癌、肾癌、尿道癌、结肠直肠癌、前列腺癌、多形性成胶质细胞瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、黑色素瘤、肝癌、膀胱癌、胃癌、白血病、恶性淋巴瘤、宫颈癌、鳞状细胞癌、阴茎癌、食道癌、唾液腺癌。

附图说明

- [0065] 图1示出包含双毒素的ADC结构示意图。
- [0066] 图2A示出实施例12所用的HCT-15(人结直肠癌)细胞中HSP70的表达。
- [0067] 图2B示出实施例12所用的HCT-15(人结直肠癌)细胞中外排泵基因ABAC1的表达。
- [0068] 图3A示出实施例13所用的人结直肠癌小鼠模型(COLO205细胞)中小鼠肿瘤体积变化。
- [0069] 图3B示出实施例13所用的人结直肠癌小鼠模型(COLO205细胞)中小鼠肿瘤重量变化。
- [0070] 图4示出实施例14所用的人胰腺癌小鼠模型(Bxpc-3细胞)中小鼠肿瘤体积变化。
- [0071] 图5示出实施例15所用的人结直肠癌耐药小鼠模型中(HCT-15-TROP2细胞)中小鼠肿瘤体积变化。
- [0072] 图6A示出实施例16所用的小分子毒素对于MX-1细胞(人乳腺癌细胞)汇合度的影响。
- [0073] 图6B示出实施例16所用的小分子毒素对于WiDr细胞(人结直肠癌细胞)汇合度的影响。
- [0074] 图6C示出实施例16所用的小分子毒素对于HeLa细胞(人宫颈癌细胞)汇合度的影响。
- [0075] 图6D示出实施例16所用的小分子毒素对于MFE-280细胞(人子宫内膜癌细胞)汇合度的影响。
- [0076] 图7A示出实施例16所用的小分子毒素对于HuH-7细胞(人肝癌细胞)存活率的影响。
- [0077] 图7B示出实施例16所用的小分子毒素对于NUGC-4细胞(人胃癌细胞)存活率的影响。
- [0078] 图7C示出实施例16所用的小分子毒素对于Calu-6细胞(人退行性癌细胞)存活率的影响。
- [0079] 图8A示出实施例17所用的人结直肠癌耐药模型中(HCT-15-TROP2细胞)小鼠肿瘤体积变化。

- [0080] 图8B示出实施例17所使用的人结直肠癌耐药模型中(HCT-15-TROP2细胞)小鼠肿瘤重量变化。
- [0081] 图9A示出实施例18所用的人肺癌模型(NCI-H2170细胞)中小鼠肿瘤体积变化。
- [0082] 图9B示出实施例18所用的人肺癌模型(NCI-H2170细胞)中小鼠肿瘤重量变化。
- [0083] 图10示出实施例22所用的人NCI-H292 CDX模型中小鼠肿瘤体积变化。
- [0084] 图11示出实施例27所用的人胃癌(NUGC-4细胞)皮下荷瘤模型中小鼠肿瘤体积变化。
- [0085] 图12A示出实施例28所用的人结肠癌(COLO205细胞)皮下荷瘤模型中小鼠肿瘤体积变化。
- [0086] 图12B示出实施例28所用的人结肠癌(COLO205细胞)皮下荷瘤模型中小鼠肿瘤体积变化。
- [0087] 图13A示出实施例29所用的人肺鳞癌(NCI-H2170细胞)皮下荷瘤模型中小鼠肿瘤体积变化。
- [0088] 图13B示出实施例29所用的人结肠癌(NCI-H2170细胞)皮下荷瘤模型中小鼠肿瘤体积变化。

具体实施方式

- [0089] 在以下的说明中，包括某些具体的细节以对各个公开的实施方案提供全面的理解。然而，相关领域的技术人员会认识到，不采用一个或多个这些具体的细节，而采用其他方法、部件、材料等的情况下可实现实施方案。
- [0090] 除非本公开内容中另外要求，在整个说明书和权利要求书中，词语“包括”和“包含”应解释为开放式的、含括式的意义，即“包括但不限于”。
- [0091] 在整个本说明书中提及的“一实施方案”或“另一实施方案”或“实施方案”或“某些实施方案”意指在至少一实施方案中包括与该实施方案所述的相关的具体参考要素、结构或特征。因此，在整个说明书中不同位置出现的短语“一实施方案”或“实施方案”或“另一实施方案”不必全部指同一实施方案。此外，具体要素、结构或特征可以任何适当的方式在一个或多个实施方案中结合。

- [0092] 应当理解, 在本公开的说明书和权利要求书中用到的单数形式的冠词“一”(对应于英文“a”、“an”和“the”)包括复数的对象, 除非文中另外明确地规定。
- [0093] 术语定义
- [0094] 除非另有相反的说明, 否则说明书及权利要求中所用的下列术语具有以下的意义:
- [0095] 本公开中命名的某些化学基团前面所置的简写符号表示在所指示的化学基团存在的碳原子总数。例如, C_1-C_{30} 烷基描述如下文所定义的具有总共1至30个碳原子的烷基, 而 C_3-C_{30} 环烷基描述如下文所定义的具有总共3至30个碳原子的环烷基。简写符号中的碳总数不包含可能存在于所述基团的取代基中的碳。
- [0096] 本公开中, 取代基之前的碳数范围旨在包含该范围内的所有子范围以及单独的数值。举例而言, “ C_{1-30} ”被认为包含“ C_{1-20} ”、“ C_{1-10} ”、“ C_{2-30} ”、“ C_{2-20} ”、“ C_{2-10} ”、“ C_{3-30} ”、“ C_{3-20} ”、“ C_{3-10} ”等。举例而言, “ C_{6-30} ”被认为包含“ C_{6-24} ”、“ C_{6-18} ”、“ C_{6-15} ”、“ C_{6-12} ”等。此外, “ C_{2-30} ”和“ C_{5-30} ”也做出相应的解释。
- [0097] 在本公开中, 术语“卤素”系指氟、氯、溴或碘。
- [0098] 在本公开中, 术语“羟基”系指-OH基团。
- [0099] 在本公开中, 术语“氨基”系指-NH₂基团。
- [0100] 在本公开中, 术语“羧基”系指-COOH基团。
- [0101] 在本公开中, 术语“氰基”系指-CN基团。
- [0102] 在本公开中, 术语“硝基”系指-NO₂基团。
- [0103] 在本公开中, 术语“烃基”系指脂肪族烃基团。烃基部分可以是“饱和的烃基”基团, 即, 烷基基团, 其不包含任何烯或炔部分。烃基部分还可以是“不饱和的烃基”部分, 即, 烯基基团或炔基基团, 其包含至少一个烯或炔部分。
- “烷基”是指由规定数量的碳原子组成的饱和烃基团。“烯基”是指由规定数量的碳原子和至少一个碳-碳双键组成的基团, 并且由单键与分子的其余部分连接的直链或支链烃链基团, 例如乙烯基、丙-1-烯基、丁-1-烯基、戊-1-烯基、戊-1,4-二烯基等。“炔基”是指由规定数量的碳原子和至少一个碳-碳三

键组成的基团，并且由单键与分子的其余部分连接的直链或支链烃链基团。烃基部分，无论饱和的或不饱和的，可以是支链的或直链的。在本公开中，术语“亚烃基”，例如“亚烷基”、“亚烯基”和“亚炔基”，是指二价的相对应的烃基团。

- [0104] 在本公开中，术语“烃基氧基”系指通式-O-烃基，其中烃基如本公开内容中所定义。烃基氧基的示例性实例包括但不限于甲氧基、乙氧基、正丙氧基、1-甲基乙氧基(异丙氧基)、正丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基、戊氧基和叔戊氧基。
- [0105] 在本公开中，术语“芳基”是指具有完全离域的Pi电子体系的碳环(全碳)或两个或多个稠合环(共享两个相邻碳原子的环)。芳基基团包括但不限于苄基、苯基、联苯基及萘基。在本公开中，术语“亚芳基”是指二价的上述芳基基团。
- [0106] 在本公开中，术语“杂芳基”系指是指由规定数量的碳原子(例如3至30个碳原子)和1至5个选自氮、氧及硫的杂原子组成的芳族环基。杂芳基可为单环、双环、三环或四环环系统，其可包含经稠合或桥接的环系统。杂芳基的示例性实例包括但不限于氮杂卓基、吡啶基、苯并咪唑基、苯并噻唑基、苯并吡唑基、苯并二氧杂环戊烯基、苯并呋喃基、苯并噁唑基、苯并噻唑基、苯并噻二唑基、苯并[b][1,4]二氧杂环庚基、1,4-苯并二噁烷基、苯并萘呋喃基、苯并噁唑基、苯并二氧杂环戊烯基、苯并二氧杂环己烯基、苯并吡喃基、苯并吡喃酮基、苯并呋喃基、苯并呋喃酮基、苯并噻吩基、苯并三唑基、苯并[4,6]咪唑并[1,2-a]吡啶基、呋唑基、噌啉基、二苯并呋喃基、二苯并噻吩基、呋喃基、呋喃酮基、异噻唑基、咪唑基、吡唑基、吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、哒嗪基、吡咯基、喹唑啉基、喹噁啉基、喹啉基、奎宁环基、异喹啉基、四氢喹啉基、噻唑基、噻二唑基、三唑基、四唑基、三嗪基和噻吩基。术语“亚杂芳基”是指二价的上述杂芳基基团。

- [0107] 在本公开中，术语“脂肪环基”系指仅由碳和氢原子组成的，饱和或不饱和的，并且通过单键与分子的其余部分相连的稳定的非芳香族单环烃基团，例如环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环癸基等。术语“亚脂肪杂环基”是指二价的上述脂肪杂环基基团。
- [0108] 在本公开中，“取代的”是指被选自以下的一个或多个取代基取代：氘、卤素、氨基基团、氰基基团、硝基基团、 C_1 - C_{10} 烷基基团、 C_1 - C_{10} 烷氧基基团、 C_1 - C_{10} 烷基氨基基团、 C_2 - C_{10} 烯基基团、 C_2 - C_{10} 炔基基团、 C_3 - C_{10} 环烷基基团、 C_6 - C_{20} 芳基基团和 C_2 - C_{20} 杂芳基基团。
- [0109] 在本公开中，术语“个体”和“患者”可以互换使用，系指动物(例如，人)、伴侣动物(例如，狗、猫或马)和家畜(例如，牛、猪和羊)。在某些实施方案中，个体是包括雄性和雌性的哺乳动物。在某些实施方案中，个体为人类。
- [0110] 在本公开中，术语“哺乳动物”是指包括例如狗、猫、牛、羊、马和人类等的动物。在某些实施方案中，哺乳动物包括人类。
- [0111] 在本公开中，术语“药学上可接受的”系指必须与制剂的其它成分相容并且不会对其接受者有害的载体、载剂、稀释剂、赋形剂和/或盐。
- [0112] 在本公开中，术语“任选的”或“任选地”意为随后描述的事件或状况可以发生也可以不发生，且说明书包括该事件或状况发生的情况及未发生的情况。
- [0113] 在本公开中，术语“药学上可接受的赋形剂”包括但不限于已经被美国食品与药品管理局认可的而可用于人类或动物的对组成药物组合物无副作用的各种形式的任何辅助物质，例如载体、助流剂、甜味剂、稀释剂、防腐剂、染料/着色剂、香味增强剂、表面活性剂、润湿剂、分散剂、助悬剂、稳定剂、等渗压剂、溶剂或乳化剂等。
- [0114] 在本公开中，术语“载体”定义为有利于将化合物引入细胞或组织的化合物。例如二甲亚砜(DMSO)通常用作载体，这是因为它易于将某些有机化合物引入生物体的细胞或组织中。
- [0115] 在本公开中，术语“稀释剂”定义为在药物制剂中用于稀释主药成分的物质，其主要作用是使微量主药成分与其他成分混合均匀，从而提高药物在制剂中的含量均匀度，或改善制剂的成形性以满足制备工艺的需要。

- [0116] 在本公开中，术语“药学上可接受的盐”包括“可以接受的酸加合盐”和“可以接受的碱加合盐”。
- [0117] 在本公开中，术语“可以接受的酸加合盐”系指保持游离碱的生物学有效性和性质的那些盐，所述酸加合盐是在生物学或其它方面合适的并且是使用无机酸或有机酸来形成的，所述无机酸例如但不限于盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等，所述有机酸例如但不限于乙酸、2,2-二氯乙酸、己二酸、褐藻酸、抗坏血酸、天冬氨酸、苯磺酸、苯羧酸、4-乙酰胺基苯羧酸、樟脑酸、樟脑-10-磺酸、癸酸、己酸、辛酸、碳酸、肉桂酸、柠檬酸、环己烷基氨基磺酸、十二烷基硫酸、乙烷-1,2-二磺酸、乙烷磺酸、2-羟基乙烷磺酸、甲酸、富马酸、粘酸、龙胆酸、葡庚糖酸、葡萄糖酸、葡萄糖醛酸、谷氨酸、戊二酸、2-氧代-戊二酸、甘油磷酸、乙醇酸、马尿酸、异丁酸、乳酸、乳糖醛酸、月桂酸、马来酸、苹果酸、丙二酸、扁桃酸、甲烷磺酸、黏酸、萘-1,5-二磺酸、萘-2-磺酸、1-羟基-2-萘甲酸、烟酸、油酸、乳清酸、草酸、棕榈酸、双羟萘酸、丙酸、焦谷氨酸、丙酮酸、水杨酸、4-氨基水杨酸、癸二酸、硬脂酸、丁二酸、酒石酸、硫氰酸、对甲苯磺酸、三氟乙酸、十一碳烯酸等。
- [0118] 在本公开中，术语“可以接受的碱加合盐”系指保持游离酸的生物学有效性和性质的那些盐，所述碱加合盐是在生物学或其它方面合适的。向游离酸中加入无机碱或有机碱来制备这些盐。由无机碱衍生的盐包括但不限于钠、钾、锂、铵、钙、镁、铁、锌、铜、锰、铝盐等。在某些实施方案中，无机盐为铵、钠、钾、钙及镁盐。由有机碱衍生的盐包括但不限于伯、仲和叔胺的盐、包括天然存在的取代的胺在内的取代的胺、环胺和碱性离子交换树脂的盐，例如氨、异丙胺、三甲胺、二乙胺、三乙胺、三丙胺、二乙醇胺、乙醇胺、2-二甲氨基乙醇、2-二乙氨基乙醇、二环己胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、咖啡因、普鲁卡因、海巴明、胆碱、甜菜碱、苄胺、苯乙二胺、乙二胺、葡萄糖胺、甲基葡萄糖胺、可可碱、三乙醇胺、氨基丁三醇、嘌呤、腺嘌呤、腺嘌呤、N-乙基腺嘌呤、聚胺树脂等。在某些实施方案中，有机碱是异丙胺、二乙胺、乙醇胺、三甲胺、二环己胺、胆碱和咖啡因。

- [0119] 在本公开中，术语“溶剂或溶剂混合物”系指任何和所有溶剂。在某些实施方案中，溶剂或溶剂混合物为有机溶剂和水，其包括但不限于甲醇、乙醇、2-丙醇、正丁醇、异丁醇、丙酮、甲基乙基酮、乙酸乙酯、1,4-二噁烷、乙醚、甲基叔丁基醚、四氢呋喃、乙腈、二氯甲烷、氯仿、N,N-二甲基甲酰胺、环己烷、环戊烷、正己烷、正庚烷、正戊烷、甲苯、邻二甲苯、对二甲苯、二甲基亚砜(DMSO)、吡啶、乙酸、苯甲醚、乙酸丁酯、异丙基苯、甲酸乙酯、甲酸、乙酸异丁酯、乙酸异丙酯、乙酸甲酯、3-甲基-1-丁醇、甲基异丁基酮、2-甲基-1-丙醇、1-戊醇、乙酸丙酯、乙二醇和1-甲基-2-吡咯烷酮，以及任何和所有两种或更多种这类溶剂的混合物。在某些实施方案中，溶剂或溶剂混合物为单一溶剂和二元混合物。在某些实施方案中，溶剂或溶剂混合物为水和有机溶剂的单一溶剂以及水和有机溶剂的二元混合物。
- [0120] 在本公开中，术语“药物组合物”系指本公开中所述的化合物与通常被本领域所接受的将生物活化化合物输送至诸如人类等哺乳动物的介质所形成的制剂。这样的介质包括所有药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。
- [0121] 在本公开中，术语“治疗有效量”和“有效量”可以互换使用，系指改善、减弱或消除特定疾病或病况和特定疾病或病况的症状、或者避免或延迟特定疾病或病况或者特定疾病或病况的症状的发病的化合物或化合物组合的量。根据化合物、疾病状态及其严重性、以及待治疗哺乳动物的年龄、体重等，构成“治疗有效量”的本公开中所述的化合物的量将会不同，但是本领域的技术人员根据其自身的知识以及本公开可以依惯例确定本公开中所述的化合物的量。
- [0122] 本公开所用的“治疗”涵盖患有相关疾病或病症的哺乳动物例如人类中治疗相关的疾病或疾病状态，并且包括：
- [0123] (i) 预防疾病或疾病状态在哺乳动物中发生，尤其是当该哺乳动物易感于所述疾病状态，但尚未被诊断出患有这种疾病状态时；
- [0124] (ii) 抑制疾病或疾病状态，即阻止其发生；或者
- [0125] (iii) 缓解疾病或疾病状态，即使疾病或疾病状态消退或不进展。
- [0126] 正如本公开所用的那样，术语“疾病”、“病症”和“疾病状态”可以相互交换使用，或者可以是不同的，因为特殊的疾病或疾病状态可能并没有已知的致

病因因子(因此不能用病因学解释), 因此其不被公认为是疾病, 而是被认为是不期望的疾病状态或病症, 其中临床医生已经鉴定出或多或少的特定系列的症状。

[0127] 在本公开中, 术语“生理可接受的”系指不消除化合物的生物活性和性质的载体或稀释剂。

[0128] 示例性实施方案

[0129] 本公开意外发现, 雷公藤甲素联合喜树碱类药物具有协同作用, 能够显著提高对于肿瘤细胞的杀伤作用, 有望为肿瘤疾病提供一种新的治疗策略。

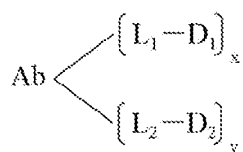
[0130] 因此, 本公开提供了雷公藤甲素联合喜树碱类药物在制备用于治疗肿瘤疾病的药物中的应用。

[0131] 在一些具体的实施方案中, 本公开发现雷公藤甲素和喜树碱类药物能够共同作为抗体药物偶联物中的毒素, 用于制备治疗肿瘤疾病的药物。

[0132] 在一些具体的实施方案中, 所述喜树碱类药物示例性地为喜树碱(CPT)、依沙替康、依喜替康、拓扑替康、SN38或其衍生物。在一些优选的实施方案中, 所述喜树碱类药物为依喜替康。

[0133] 在一些具体的实施方案中, 所述雷公藤甲素和喜树碱类药物的摩尔比为0.1~10:1。在另一些优选的实施方案中, 所述雷公藤甲素和喜树碱类药物的摩尔比为1:0.5~1:2。在另一些优选的实施方案中, 所述雷公藤甲素和喜树碱类药物的摩尔比约为1:1。

[0134] 在一些更具体的实施方案中, 本公开提供一种包含双毒素的抗体药物偶联物, 其具有式:



[0135] 其中, Ab是抗体或其抗原结合片段;

[0136] D₁和D₂为具有抗肿瘤活性的毒素, 并且D₁、D₂选自雷公藤甲素或喜树碱类药物, D₁、D₂不相同;

[0137] L₁和L₂为连接毒素和抗体的连接单元;

[0138] x, y为0-8, x, y为整数或者非整数。

- [0139] 在一些更具体的实施方案中，x，y可以为0、1、2、3、4、5、6、7或8，以及这些数值之间的其它数值。在一些更具体的实施方案中，x与y之和大于等于4。
- [0140] 在一些更具体的实施方案中，本公开于提供一种包含双毒素的抗体药物偶联物，其具有式：
- [0141]
$$\text{Ab}-[\text{L}_1-\text{D}_1-\text{L}_2-\text{D}_2]_x$$
- [0142] 其中，Ab是抗体或其抗原结合片段；
- [0143] D_1 和 D_2 为具有抗肿瘤活性的毒素，并且 D_1 、 D_2 选自雷公藤甲素或喜树碱类药物， D_1 、 D_2 不相同；
- [0144] L_1 和 L_2 为连接毒素和抗体的连接单元；
- [0145] x为2-8，x，y为整数或者非整数。
- [0146] 在一些更具体的实施方案中，x，y可以为2、3、4、5、6、7或8，以及这些数值之间的其它数值。
- [0147] 在一些实施方案中，所述 L_1 与Ab通过巯基或酰胺基团相连。在一些优选的实施方案中，所述 L_1 连接于Ab的Fab片段。抗体与毒素最常见的偶联方法之一是利用抗体的赖氨酸残基，氨基酸亲核 NH_2 基团与利用有效载荷上亲电的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)基团发生反应。此外还可以通过二硫化物重桥接策略，利用IgG抗体包含的四个链间二硫键进行还原，产生八个巯基，与马来酰亚胺的连接子反应。此外还可以利用二乙烯基嘧啶重桥接技术、二溴吡啶二酮桥接技术、双砷重桥接偶联技术、工程化非天然氨基酸生物偶联等进行毒素与抗体的偶联。
- [0148] 在一些实施方案中，所述 L_2 与Ab通过糖基相连。在一些优选的实施方案中，所述 L_2 连接于Ab的Fc片段。由于IgG是一种糖蛋白，它在Fc片段每个重链的 CH_2 结构域天冬酰胺残基位置包含N-聚糖，这种糖基化可以作为连接有效载荷的附着点。在一些实施方案中，所述 L_2 与抗体通过寡糖与抗体相连接，所述寡糖位于抗体的Fc片段，具体连接于Fc片段的天冬酰胺残基上。在一些实施方案中，可以偶联的糖型包括G0-GN，G0F-GN、G0、G0F、G1、G1F等。在一些优选的实施方案中，所述寡糖的糖型为G0、G0F和/或G1F。在一些优选实施方案中，所述抗体上的寡糖通过叠氮化修饰。在一些优选的实施方案中，所述叠氮化修饰包括：将抗体与UDP-GalNAz和GalT1接触反应。在另一些实施方案中，将所述叠

氮化修饰的抗体与L₂上的DBCO通过偶联反应而连接。所述L₂通过寡糖与抗体上的天冬酰胺(Asn残基)连接,更优选的,所述L₂通过寡糖上的GlcNac与抗体上的天冬酰胺连接。在一些具体的实施方案中,所述寡糖与所述抗体的Fc片段连接。在一些具体的实施方案中,所述寡糖与所述Fc片段的CH₂结构域连接。在一些更具体的实施方案中,所述寡糖与所述Fc片段的Asn连接。在另一些优选的实施方案中,所述偶联反应包括:将叠氮化修饰的抗体与L₂上的DBCO通过点击化学反应,完成L₂与抗体的糖基偶联。糖基偶联方式可参见参考文献Chemoenzymatic Conjugation of Toxic Payloads to the Globally Conserved N Glycan of Native mAbs Provides Homogeneous and Highly Efficacious Antibody-Drug Conjugate, RV Geel et al., Bioconjug Chem. 2015 Nov 18; 26(11):2233-42.

[0149] 在一些实施方案中:

[0150] 所述L₁具有[H₁-L_{1a}-L_{1b}-L_{1c}-D₁]_x所示结构;

[0151] 所述L₂具有[H₂-L_{2a}-L_{2b}-L_{2c}-D₂]_y所示结构;

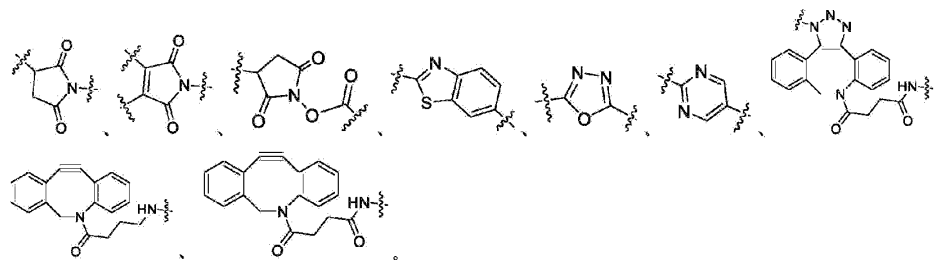
[0152] H₁和H₂是和所述抗体或其抗原结合片段的接头部位或者能够与Ab进行反应的基团;

[0153] L_{1a}是连接所述接头部位H₁和L_{1b}之间的连接单元, L_{2a}是连接所述接头部位H₂和L_{2b}之间的连接单元;

[0154] L_{1b}是连接L_{1a}和L_{1c}之间的连接子, L_{2b}是连接L_{2a}和L_{2c}之间的连接子;

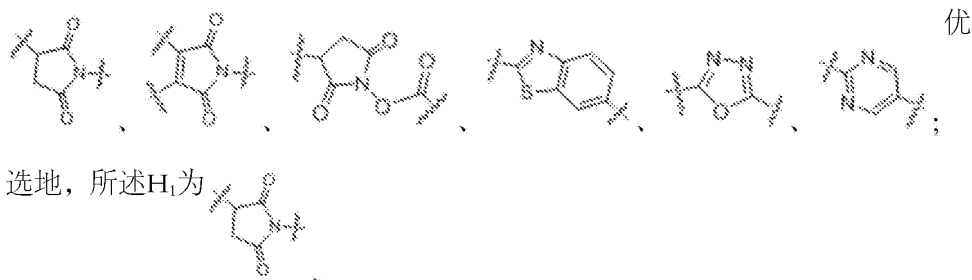
[0155] L_{1c}是L_{1b}和D₁之间的间隔子, L_{2c}是L_{2b}和D₂之间的间隔子。

[0156] 在一些实施方案中,所述H₁和H₂选自:

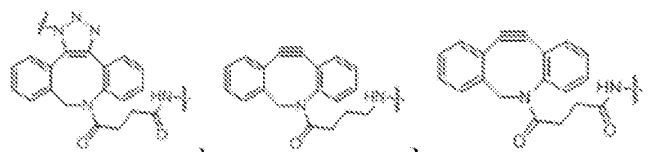


[0157] 在一些实施方案中,所述H₁选自:

[0158]



[0159] 在一些实施方案中, 所述H₂选自:



[0160] 在一些实施方案中, 所述L_{1a}或L_{2a}包含-L_d-C(O)-, 其中L_d选自任选取代的亚烷基、任选取代的聚乙二醇基、任选取代的亚烯基、任选取代的亚炔基、任选取代的亚脂肪环基、任选取代的亚脂肪杂环基、任选取代的亚芳基、任选取代的亚杂芳基或它们的组合。

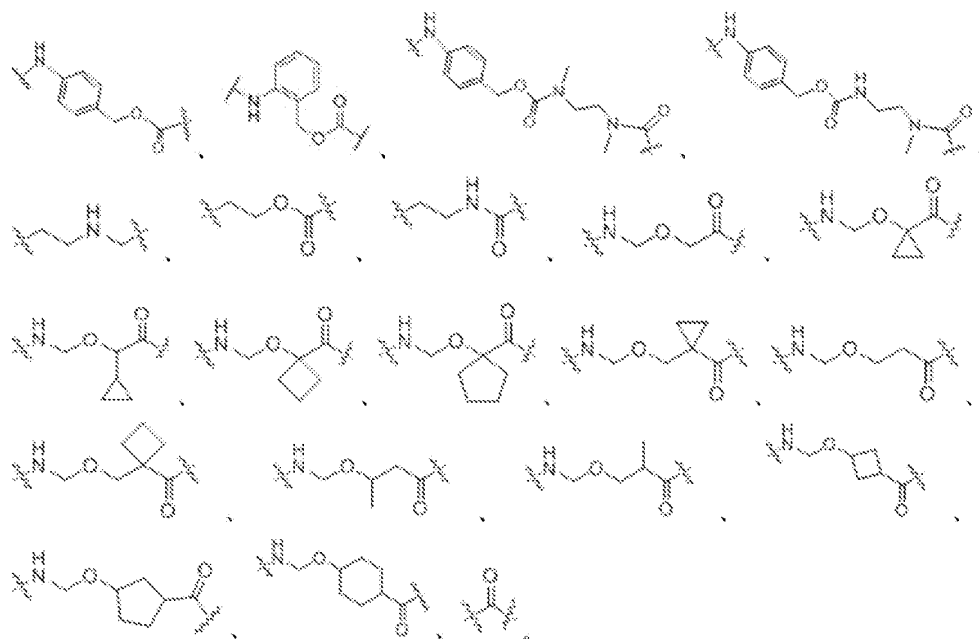
[0161] 在一些实施方案中, 所述L_d选自-(CH₂)_m-、-(PEG)_n-或-(CH₂)_m-(PEG)_n-(CH₂)_z-, 其中m, n, z为0-10的整数, 优选的, m, n, z为0-8的整数。例如, m, n, z为0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10, 或者由这些数值中的任两个组成的范围。

[0162] 在一些实施方案中, 所述L_{1b}或L_{2b}为可裂解的连接子或不可裂解的连接子。基于不可切割的连接子的ADC必须被内化, 抗体部分需要被溶酶体蛋白酶降解以释放活性分子。代表性的不可切割连接子为N-琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸盐(SMCC)。可切割连接子可以分为酶依赖性和非酶(化学)依赖性连接子。典型的化学依赖性连接子为含有二硫键的连接子, 其在受到硫醇的亲核攻击以释放活性载体。酶连接子是目前应用最有潜力的连接子类型, 其能够被组织蛋白酶、磷酸酶、焦磷酸酶、β-葡萄糖醛酸酶、β-半乳糖苷酶、硫酸酯酶等酶解。

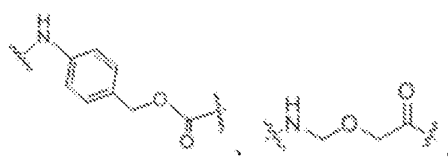
[0163] 在一些实施方案中, 所述L_{1b}或L_{2b}为可裂解的2-10个氨基酸组成的肽链; 优选地, 所述L₂或L₅选自Gly-Gly-Phe-Gly(简称GGFG)、Val-Cit(简称VC)、Val-Ala

(简称VA), Val-Lys、Val-Arg、AcLys-Val-Cit, AcLys-Val-Ala, Phe-Cit、Phe-Ala、Phe-Lys、Phe-Arg、Glu-Val-Ala、Glu-Val-Cit、Ala-Lys、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp-Cit、Ala-Ala-Asn、Ala-Ala-Ala、Ala-Asn、Lys; 优选地, 所述 L_{1b} 或 L_{2b} 选自Gly-Gly-Phe-Gly、Val-Cit、Val-Ala、Val-Lys、Phe-Cit、Phe-Ala、Phe-Lys、Ala-Ala-Asn。

[0164] 在一些实施方案中, 所述 L_{1c} 或 L_{2c} 选自:

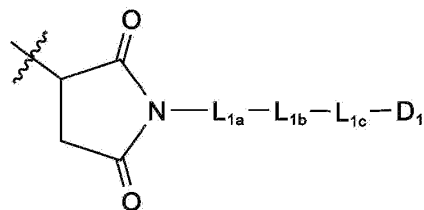


[0165] 在一些优选的实施方案中, 所述 L_{1c} 选自



[0166] 在一些具体的实施方案中, 所述 L_1-D_1 为:

[0167] 其中:



[0168] L_{1a} 为 $-(CH_2)_{m1}-C(O)-$ 或 $-(PEG)_{n1}-(CH_2)_{z1}-C(O)-$, 其中 m_1 、 n_1 、 z_1 为2-8的整数;

[0169] L_{1b} 为Gly-Gly-Phe-Gly、Val-Cit或Val-Ala;

[0170] L_{1c} 为

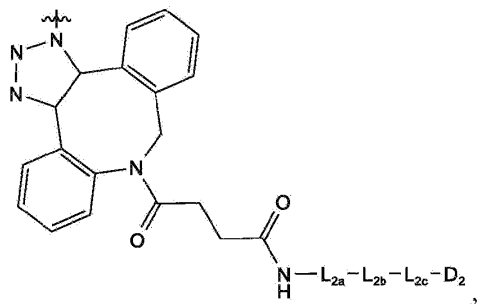
[0171] D_1 为雷公藤甲素或喜树碱类药物。

[0172] 在一个更具体的实施方案中, m_1 、 n_1 、 z_1 为2、3、4、5、6、7、8, 或者由这些数值中的任两个组成的范围。

[0173] 在一些优选的实施方案中, 所述 L_{1a} 为 $-(CH_2)_{m1}-C(O)-$, 其中 m_1 为2-6的整数, 优选为5; 或者 L_{1a} 为 $-(PEG)_{n1}-(CH_2)_{z1}-C(O)-$, 其中 n_1 、 z_1 为2-6的整数, 优选 n_1 、 z_1 为2。

[0174] 在一些具体的实施方案中, 所述 L_2-D_2 为:

[0175] 其中:



[0176] L_{2a} 为 $-(PEG)_{n2}-(CH_2)_{z2}-C(O)-$, 其中 n_2 、 z_2 为2-8的整数;

[0177] L_{2b} 为Gly-Gly-Phe-Gly、Val-Cit或Val-Ala;

[0178] L_{2c} 为

[0179] D_2 为雷公藤甲素或喜树碱类药物。

[0180] 在一个更具体的实施方案中, n_2 、 z_2 为2、3、4、5、6、7、8, 或者由这些数值中的任两个组成的范围。

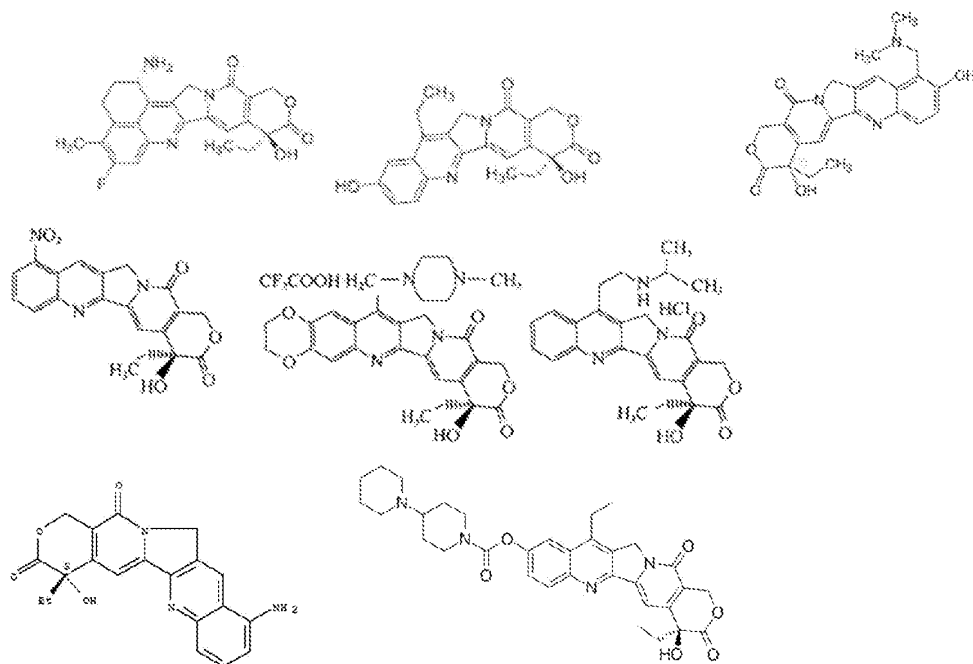
[0181] 在一些优选的实施方案中, 所述 L_{2a} 为 $-(\text{PEG})_{n_2}-(\text{CH}_2)_{z_2}-\text{C}(\text{O})-$, 其中 n_2 、 z_2 为2-6的整数; 或者 L_{1a} 为 $-(\text{PEG})_{n_1}-(\text{CH}_2)_{z_1}-\text{C}(\text{O})-$, 其中 n_1 、 z_1 为2-6的整数, 优选 n_2 为4-6的整数, z_2 为2。

[0182] 在一些实施方案中, 所述 D_1 为雷公藤甲素, D_2 为喜树碱类药物。

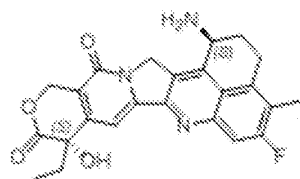
[0183] 在一些优选的实施方案中, 所述 D_1 为喜树碱类药物, D_2 为雷公藤甲素。

[0184] 在一些实施方案中, 所述喜树碱类药物为喜树碱(CPT)、依喜替康、拓扑替康、SN38或其衍生物; 优选地, 所述喜树碱类药物为依喜替康。

[0185] 示例性的, 喜树碱类药物或衍生物具有如下的结构:

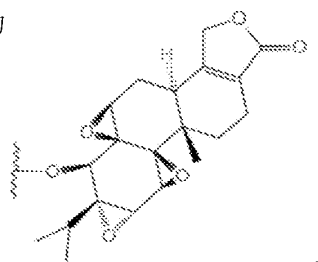


[0186] 在一些优选的实施方案中, 所述喜树碱类药物为依喜替康。

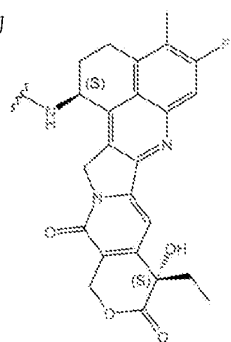


[0187] 在一些实施方案中, 所述 x 选自2-8, 优选3-5; y 选自3-4。

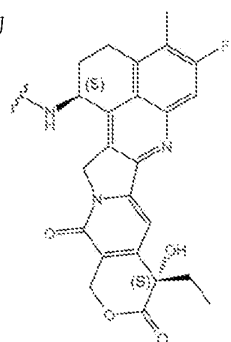
[0188] 在一些实施方案中，所述D₁为



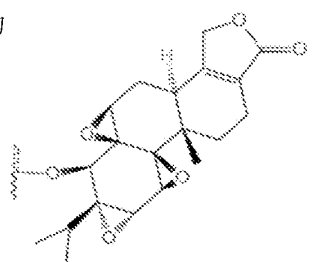
[0189] 在一些实施方案中，所述D₂为



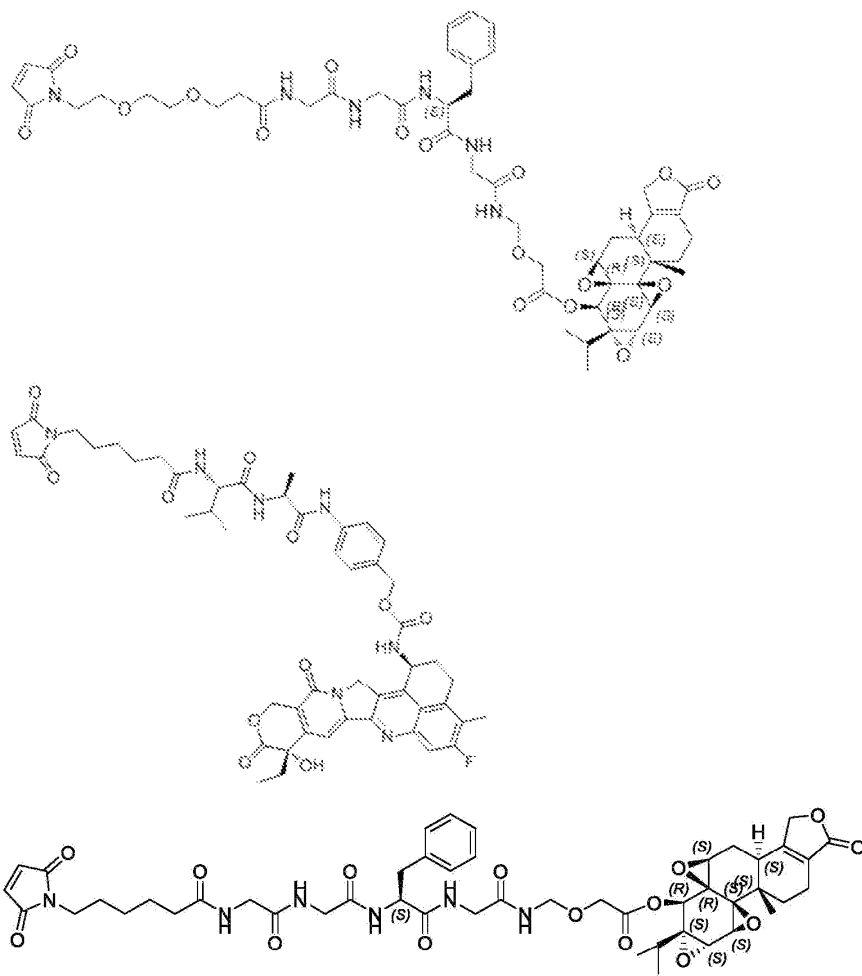
[0190] 在一些实施方案中，所述D₁为



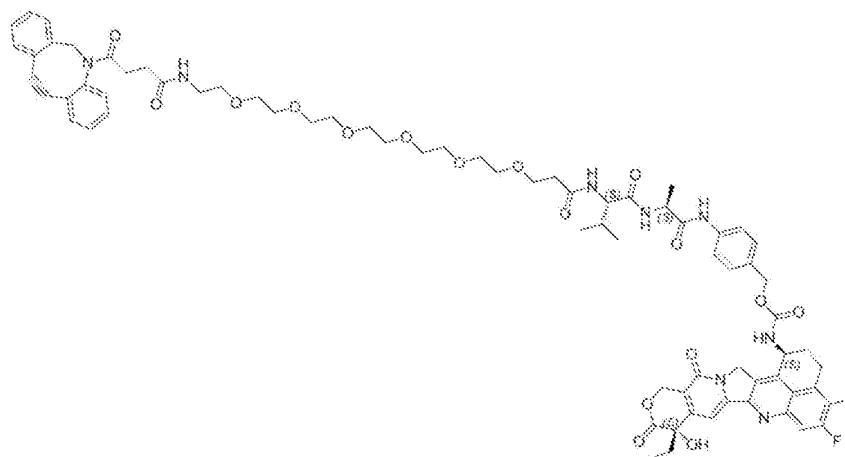
[0191] 在一些实施方案中，所述D₂为

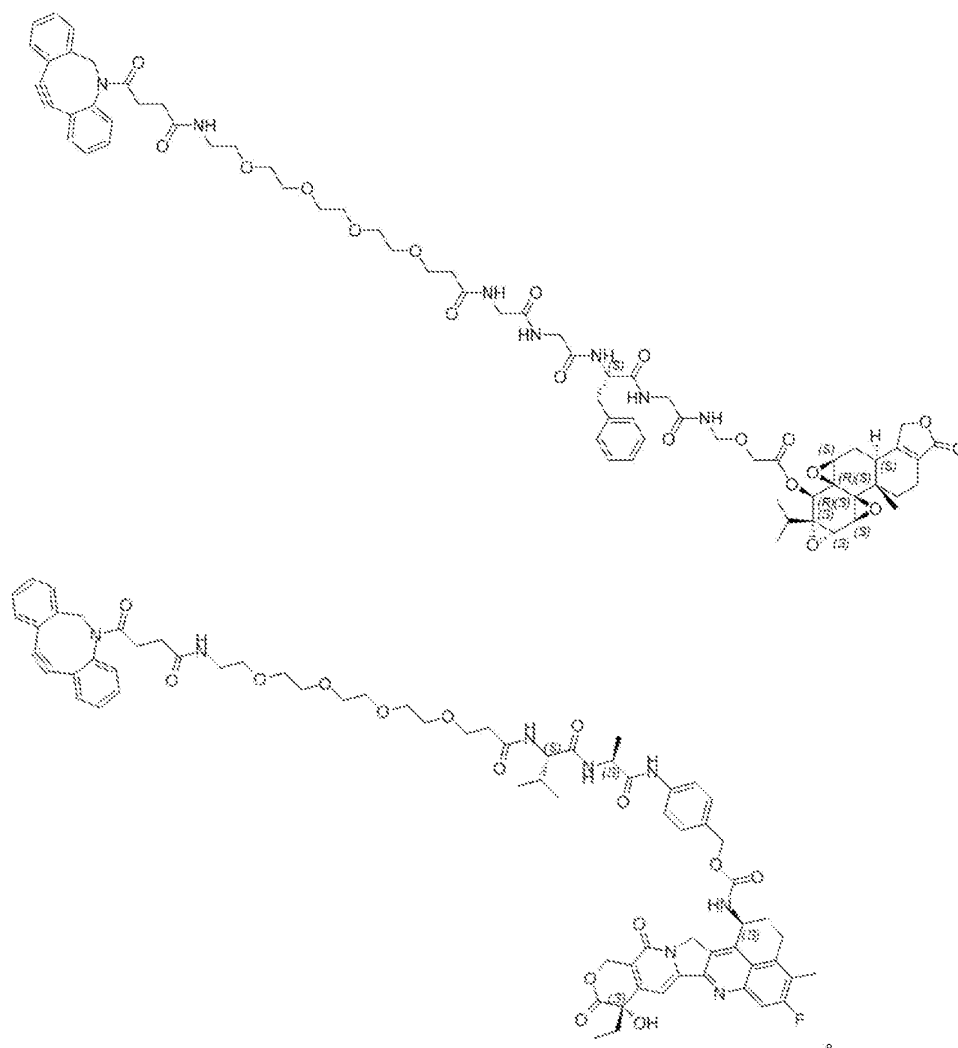


[0192] 在一些实施方案中，所述L₁-D₁结构选自：

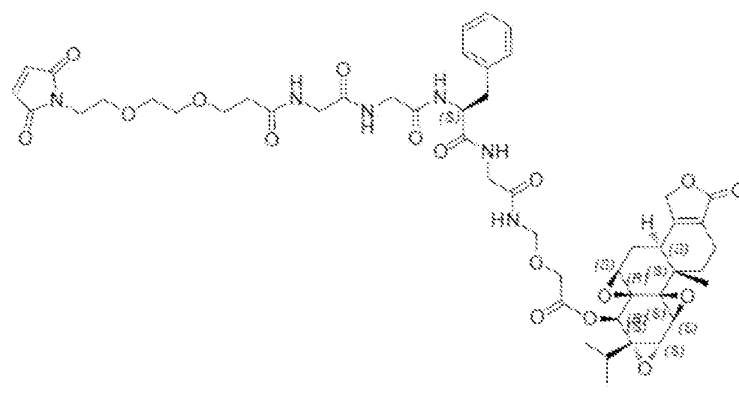


[0193] 在一些实施方案中，所述L₂-D₂结构选自：

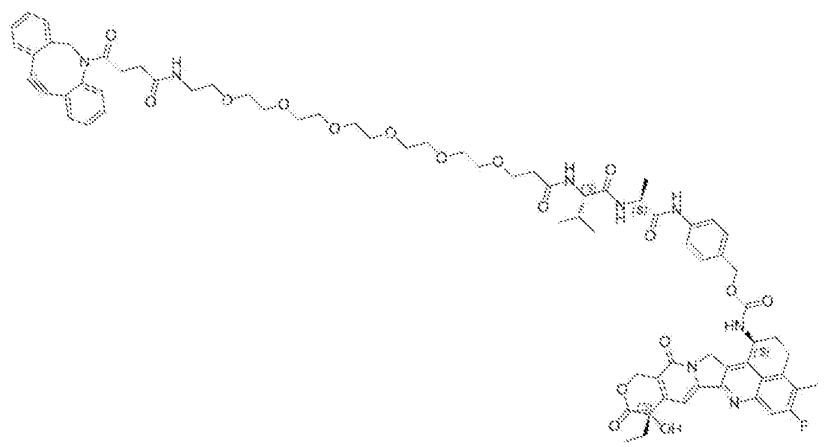




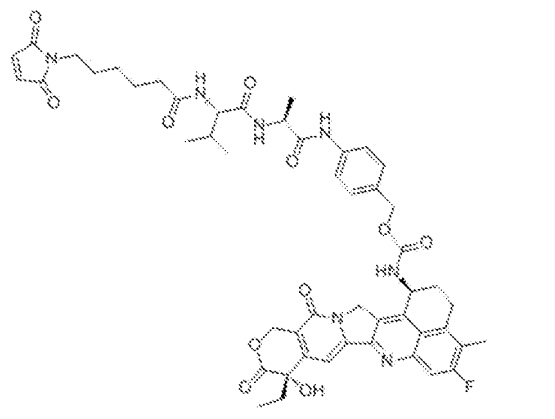
[0194] 在一些具体的实施方案中，所述L₁-D₁结构为：



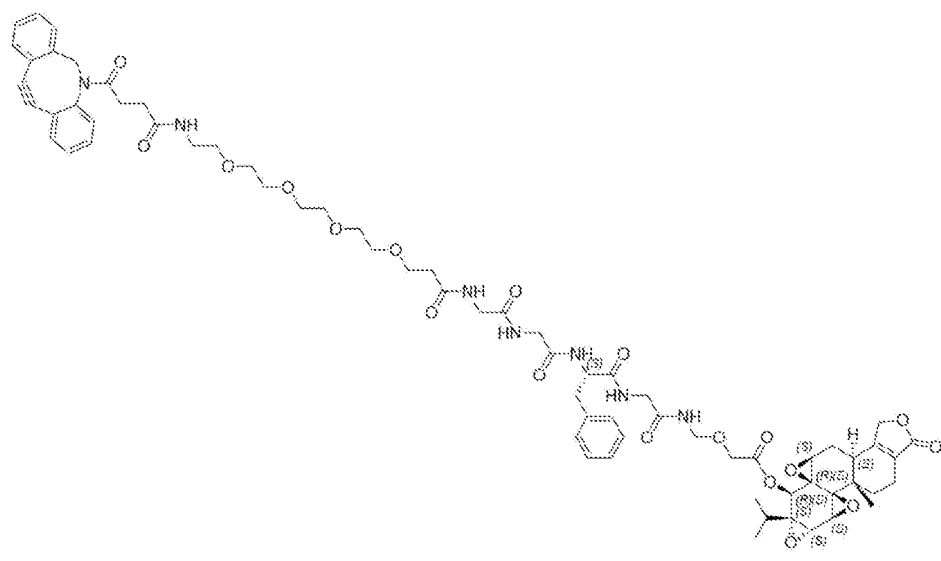
[0195] L₂-D₂结构为:



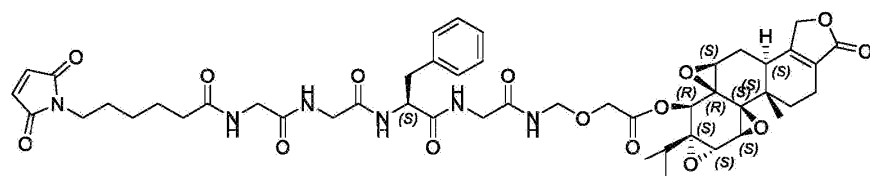
[0196] 在另一些具体的实施方案中, 所述L₁-D₁结构为:



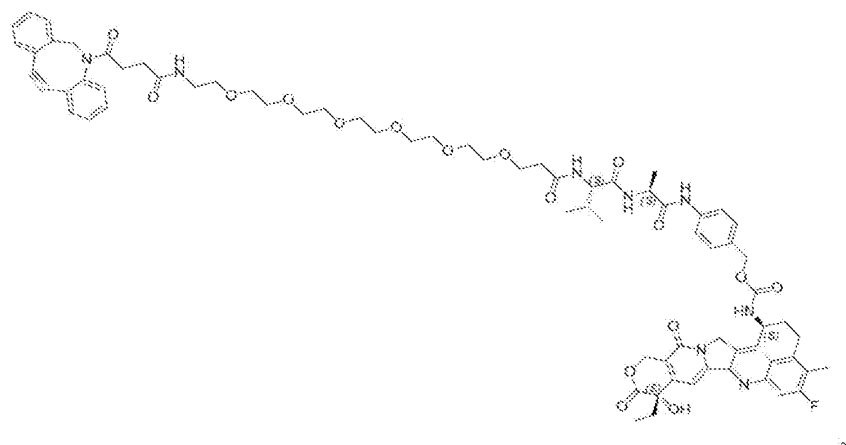
[0197] L₂-D₂结构为:



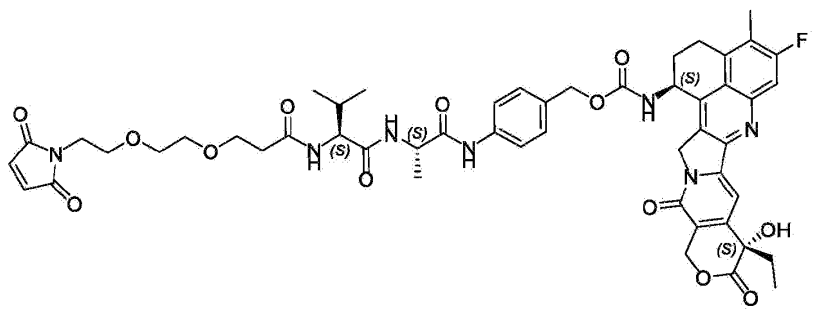
[0198] 在另一些具体的实施方案中，所述L₁-D₁结构为：



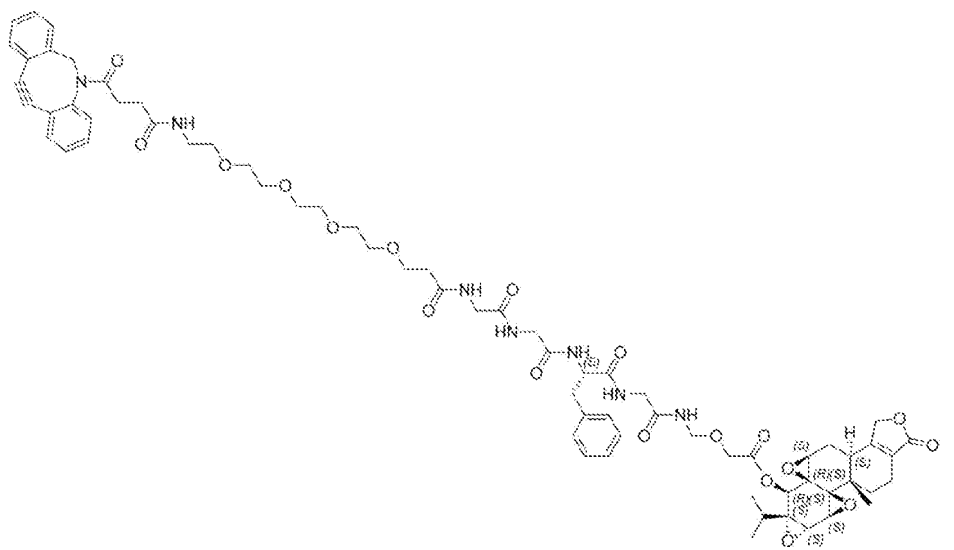
[0199] L₂-D₂结构为：



[0200] 在另一些具体的实施方案中，所述L₁-D₁结构为：



[0201] L₂-D₂结构为：



[0202] 在一些实施方案中，所述L₂与抗体通过寡糖相连接，所述寡糖位于抗体的Fc片段，具体连接于Fc片段的天冬酰胺残基上。在一些实施方案中，可以偶联的糖型包括G0-GN，G0F-GN、G0、G0F、G1、G1F等。在一些优选的实施方案中，所述寡糖的糖型为G0、G0F和/或G1F。在一些实施方案中，所述抗体上的寡糖通过叠氮化修饰。在一些优选的实施方案中，所述叠氮化修饰包括：将抗体与UDP-GalNAz和GalT1接触反应。在另一些实施方案中，将所述叠氮化修饰的抗体与L₂上的DBCO通过偶联反应而连接。在另一些优选的实施方案中，所述偶联反应包括：将叠氮化修饰的抗体与L₂上的DBCO通过点击化学反应，完成L₂与抗体的糖基偶联。

[0203] 在一些实施方案中，所述抗体或抗原结合片段结合选自以下的一种或多种：碳酸酐酶IX、 α -胎蛋白、 α -辅肌动蛋白、A3、A33、ART 4、B7、B7H3、B7H4、BAGE、BrE3抗原、CA125、CAMEL、CAP^h、CASP-8/m、CCL19、CCL21、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11a、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD52、CD54、CD55、CD59、CD64、CD66a-e、CD67、CD70、CD70L、CD74、CD79a、CD80、CD83、CD95、CD126、CD132、CD133、CD138、CD147、CD154、CDC27、CDK-4、CDKN2A、HIF- $\text{I } \alpha$ 、结肠特异性抗原_p(CSA_p)、CEA、CEACAM5、CEACAM6、oMet、DAM、EGFR、EGFRvIII、cMet、EGP-1(Trop-2)、EGP-2.ELF2-M、Ep-CAM、Her2、Her3、Claudin 18.2、ROR1、ROR2、dll3、marcl7、纤维母细胞生长因子(FGF)、Flt-1、Flt-3、叶酸受体、G250抗原、GAGE、gp100、GRO- β 、HLA-DR.HML24、HMGB-1、HSP70-2M₁、IGF-1R、IGR1R、MAGE、MAGE-3、MART-1.MART-2.NY-ESO-1、TRAG3、mCRP、MCP-1、MIP-1A、MIP-1B、MIF、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5ac、MUC13、MUC16、MUM-1/2、MUM-3、NCA66、NCA95、NCA90、胰腺癌黏蛋白、PD-1受体、PD-L1受体、胎盘生长因子、PLAGL2、前列腺酸性磷酸酶、PSA、PRAME、PSMA、P1GF、ILGF、ILGF-1R、RS5、RANTES、T101、SAGE、S100、存活素、存活素-2B、TAG、TAG-72、腱生蛋白、TRAIL受体、Tn抗原、ED-B、WT-1、17-1A抗原。在优选的实施方案中，所述抗体或抗原结合片段结合选自Her2、Her3、B7H3、Claudin 18.2、DLL-3或EGP-1(Trop-2)中的一种或多种。

[0204] 在一些具体的实施方案中，所述抗体或抗原结合片段选自epratuzumab、veltuzumab、sacituzumab、patritumab、trastuzumab、pertuzumab、abciximab、alemtuzumab、cetuximab、gemtuzumab、ibritumomab、panitumumab、rituximab、tositumomab、abagovomab、atlizumab、benralizumab、obinutuzumab、basiliximab、dadizumab、efalizumab、muromomab、natlizumab、omalizumab、gaiitenemab、solanezumab、tisotumab、brentuximab、inotuzumab、moxetumomab、polatuzumab、enfortu

mab、belantamab、cetuximab、loncastuximab、daratumumab、nimotuzumab、zolbetuximab、omburtamab、rovalpituzumab。

[0205] 在一些优选的实施方案中，所述抗体或抗原结合片段选自sacituzumab、daratumumab、zolbetuximab、omburtamab、patritumab、rovalpituzumab。

[0206] 在一些实施方案中，所述抗体或抗原结合片段选自Sacituzumab抗体或其抗原结合片段，Sacituzumab抗体或抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，其中重链可变区包括三个互补决定区HCDR1-3，分别包含SEQ ID NO：1-3所述的氨基酸序列；其中轻链可变区包括三个互补决定区LCDR1-3，分别包含SEQ ID NO：4-6所述的氨基酸序列。

[0207] 在一些具体的实施方案中，所述抗体或抗原结合片段的HCDR1-3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO：1-3所示。在另一些具体的实施方案中，所述抗体或抗原结合片段的LCDR1-3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO：4-6所示。

[0208] 在一些更具体的实施方案中，所述Sacituzumab抗体或其抗原结合片段重链可变区包含SEQ ID NO：7所述的氨基酸序列，轻链可变区包含SEQ ID NO：8所述的氨基酸序列。例如，在一些实施方案中，所述抗体或抗原结合片段重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO：7所示。在另一些实施方案中，所述抗体或抗原结合片段轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO：8所示。

[0209] 在一些更具体的实施方案中，所述Sacituzumab抗体或其抗原结合片段重链包含SEQ ID NO：9所述的氨基酸序列，轻链包含SEQ ID NO：10所述的氨基酸序列。例如，在一些实施方案中，所述抗体或抗原结合片段重链的氨基酸序列如SEQ ID NO：9所示。在另一些实施方案中，所述抗体或抗原结合片段轻链的氨基酸序列如SEQ ID NO：10所示。

[0210] 在一些实施方案中，所述抗体或抗原结合片段选自Patritumab抗体或其抗原结合片段，patritumab抗体或抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，其中重链可变区包括三个互补决定区HCDR1-3，分别包含SEQ ID NO：11-13所述的氨基酸序列；其中轻链可变区包括三个互补决定区LCDR1-3，分别包含SEQ ID NO：14-16所述的氨基酸序列。

- [0211] 在一些具体的实施方案中，所述抗体或抗原结合片段的HCDR1-3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO: 11-13所示。在另一些具体的实施方案中，所述抗体或抗原结合片段的LCDR1-3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO: 14-16所示。
- [0212] 在一些更具体的实施方案中，所述Patritumab抗体或其抗原结合片段重链可变区包含SEQ ID NO: 17所述的氨基酸序列，轻链可变区包含SEQ ID NO: 18所述的氨基酸序列。例如，在一些实施方案中，所述抗体或抗原结合片段重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 17所示。在另一些实施方案中，所述抗体或抗原结合片段轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 18所示。
- [0213] 在一些更具体的实施方案中，所述Patritumab抗体或其抗原结合片段重链包含SEQ ID NO: 19所述的氨基酸序列，轻链包含SEQ ID NO: 20所述的氨基酸序列。例如，在一些实施方案中，所述抗体或抗原结合片段重链的氨基酸序列如SEQ ID NO: 19所示。在另一些实施方案中，所述抗体或抗原结合片段轻链的氨基酸序列如SEQ ID NO: 20所示。
- [0214] 在一些实施方案中，本公开所述的双毒素的抗体药物偶联物的制备方法包括：首先对抗体进行叠氮化反应后，使得毒素D₂(或如前述的[H₂-L_{2a}-L_{2b}-L_{2c}-D₂]_y结构单元)与抗体进行糖偶联；然后再将毒素D₁(或如前述的[H₁-L_{1a}-L_{1b}-L_{1c}-D₁]_x结构单元)与抗体通过巯基进行偶联，制备得到包含双毒素的抗体药物偶联物，其结构示意图如图1所示。图1中，毒素1通过连接单元巯基偶联于抗体，抗体包含的四个链间二硫键进行还原，产生八个巯基，因此可通过连接单元负载2-8个毒素1。毒素2通过连接单元糖基偶联于抗体，可通过连接单元负载2-4个毒素2。
- [0215] 本公开另一方面在于提供一种药物组合物，所述药物组合物包含本公开所述的抗体药物偶联物，和药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。
- [0216] 本公开另一方面在于提供一种本公开所述的抗体药物偶联物在制备用于治疗 and /或预防肿瘤的药物中的用途。
- [0217] 在一些优选的实施方案中，所述肿瘤选自与以下分子中的一种或多种表达相关的肿瘤：Trop-2、Her2、Her3、B7H3、Claudin 18.2、CD30、CD38、CD33、CD70和EGFR。
- [0218] 在一些具体的实施方案中，所述肿瘤包含实体肿瘤或血液肿瘤。

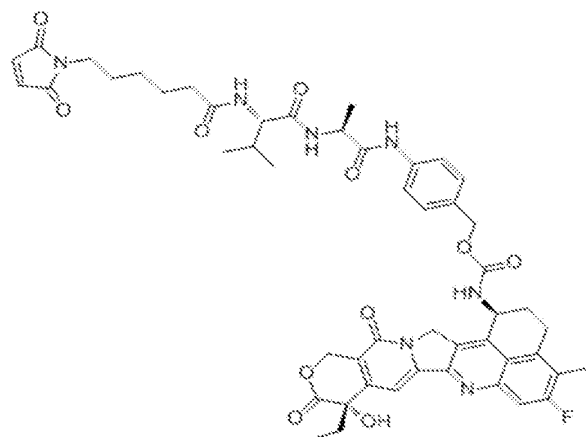
- [0219] 在一些更具体的实施方案中，所述肿瘤选自：肺癌、肾癌、尿道癌、结肠直肠癌、前列腺癌、多形性成胶质细胞瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、黑色素瘤、肝癌、膀胱癌、胃癌、白血病、恶性淋巴瘤、宫颈癌、鳞状细胞癌、阴茎癌、食道癌、唾液腺癌。
- [0220] 实施例
- [0221] 下面结合具体实施例，进一步阐述本公开。应理解，这些实施例仅用于说明本公开而不适用于限制本公开的范围，并且以下实施例也不代表以下实验为本公开所有的实验或仅有的实验。
- [0222] 本公开采用的示例性抗体为Sacituzumab(又名赛妥珠单抗/戈沙妥珠单抗/hRS 7)，其在WO2014057687A中具有详细描述。具体地，Sacituzumab抗体重链可变区包括三个互补决定区HCDR1-3，分别包含SEQ ID NO：1-3所述的氨基酸序列；轻链可变区包括三个互补决定区LCDR1-3，分别包含SEQ ID NO：4-6所述的氨基酸序列。更具体地，Sacituzumab抗体重链可变区包含SEQ ID NO：7所述的氨基酸序列，轻链可变区包含SEQ ID NO：8所述的氨基酸序列；更具体地，Sacituzumab抗体重链包含SEQ ID NO：9所述的氨基酸序列，轻链包含SEQ ID NO：10所述的氨基酸序列。抗体的构建可通过本领域的常规的生物学方法进行构建或者商购。
- [0223] 本公开采用的另一示例性抗体为Patritumab(又名帕曲妥单抗)，其在WO20070 77028A2中具有详细描述。具体地，Patritumab抗体重链可变区包括三个互补决定区HCDR1-3，分别包含SEQ ID NO：11-13所述的氨基酸序列；轻链可变区包括三个互补决定区LCDR1-3，分别包含SEQ ID NO：14-16所述的氨基酸序列。更具体的，Patritumab抗体重链可变区包含SEQ ID NO：17所述的氨基酸序列，轻链可变区包含SEQ ID NO：18所述的氨基酸序列；更具体地，Patritumab抗体重链包含SEQ ID NO：19所述的氨基酸序列，轻链包含SEQ ID NO：20所述的氨基酸序列。抗体的构建可通过本领域的常规的生物学方法进行构建或者商购。
- [0224] 参照药物(阳性对照药物)Dato-Dxd(datopotamab deruxtecan, DS-1062a)，其为基于第一三共株式会社的Dxd-ADC平台开发的一款针对Trop-2抗体(datopotama

b)和拓扑异构酶抑制剂(Dxd)的抗体药物偶联物，其结构和制备方法在WO2014057687A中有详细描述，可通过该专利方法进行制备或商购。

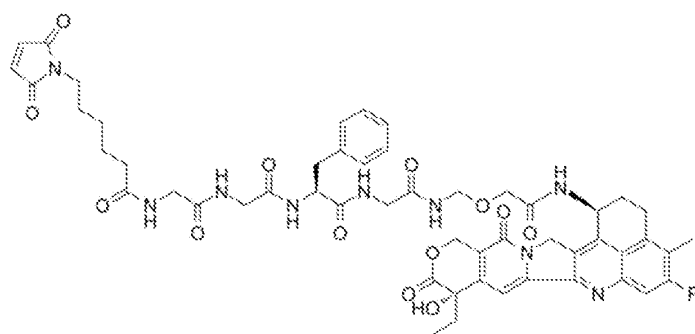
[0225] 参照药物(阳性对照药物)Trodelvy，其为吉利德开发的一款针对trop-2抗体(Sacituzumab)和SN38的抗体药物偶联物，通过商购获得该对照药物类似物。

[0226] 本公开的其他原料为市售，或者通过本领域已知的方法制备。例如本公开采用的毒素为雷公藤甲素(Triptolide)购自中国食品药品检定研究院，CAT#111567-201404，ID：DP03-BYVB，M.wt：360.4。本公开的依喜替康(Exatecan)为商购，CAS号：171335-80-1。甲磺酸依喜替康为商购，CAS号：169869-90-3。

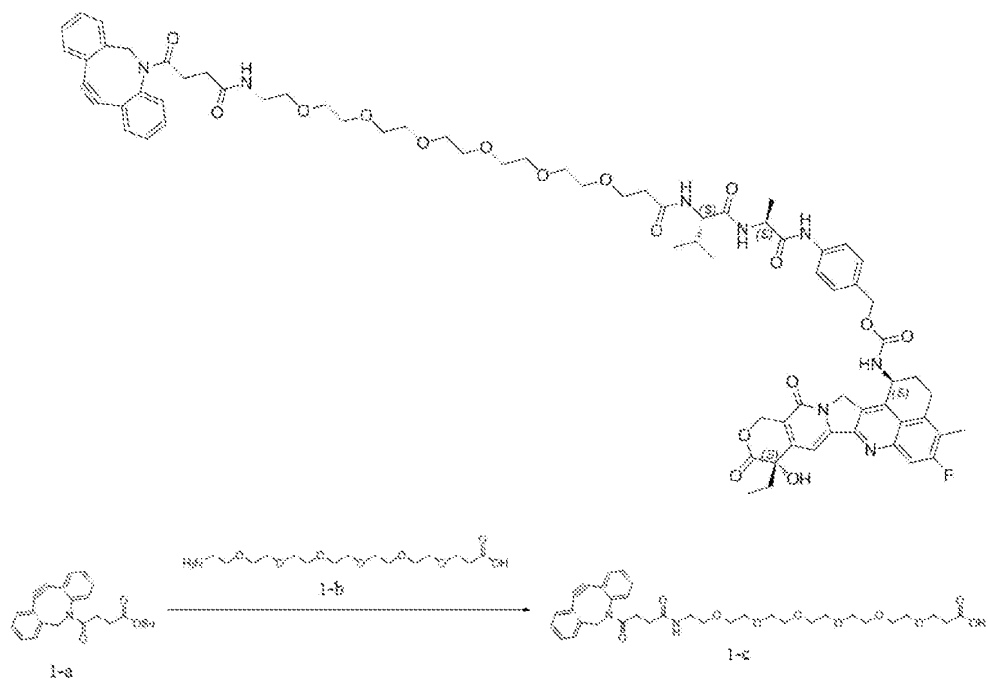
[0227] 化合物7(147270-MC-VA-PAB-Exatecan)为商购，其CAS号为：2680543-57-9，结构如下：



[0228] 化合物8(HY-13631E)为商购，其CAS号为：1599440-13-7，结构如下：

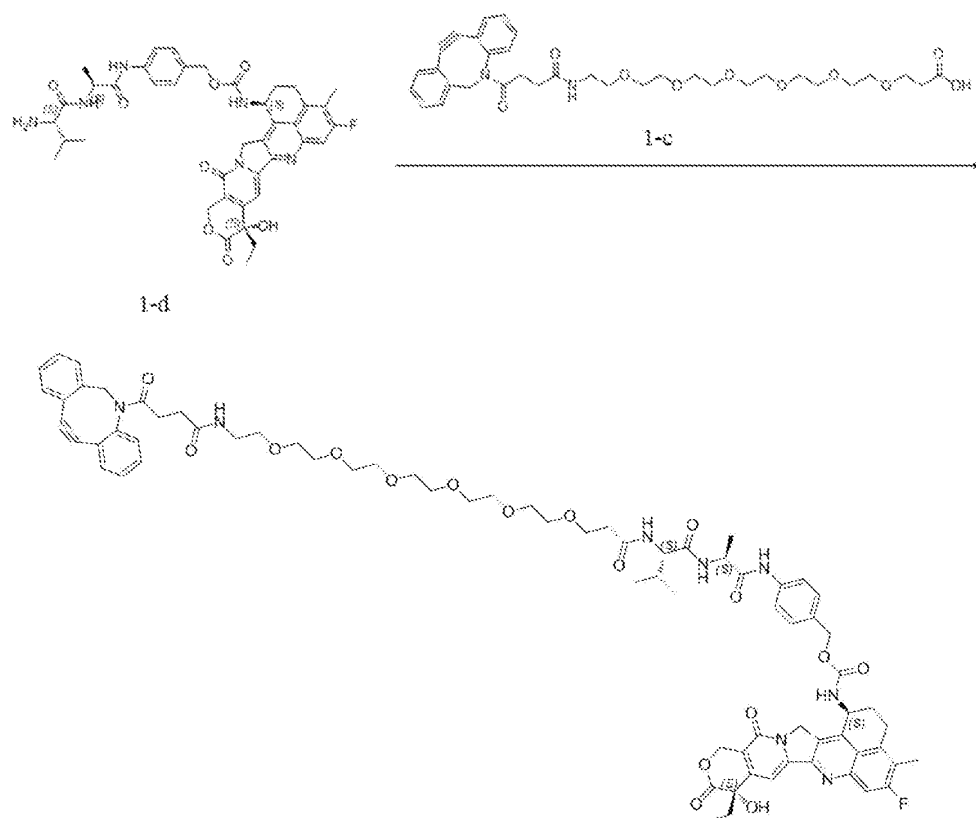


[0229] 实施例1制备化合物1(DBCO-PEG6-VA-PAB-Exatecan)



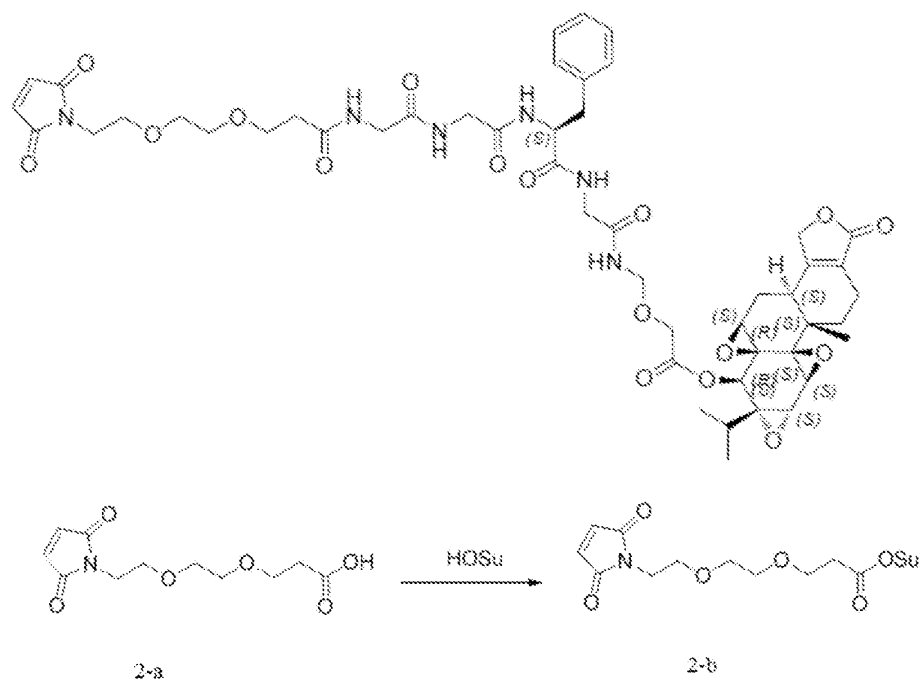
[0230] 将化合物1-a(150mg,0.37mmol), 化合物1-b(132mg,0.37mmol)溶于1.5mL DMF, 再将TEA(75mg, 0.74mmol)缓慢滴入, 加毕室温反应2h。后处理: 将反应液直接用反相柱纯化, $H_2O:ACN=60\%:40\%$, 冻干后得到300mg黄色油状物(化合物1-c), 收率: 94%。

[0231] 将化合物1-c(135mg,0.21mmol), HATU(96mg,0.25mmol)溶于4mL DMF中, 再将DIEA(40mg,0.31mol)加入, 室温搅拌15分钟, 将化合物1-d(162mg,0.21mmol)加入, 室温搅拌1h。后处理: 将反应液直接送至反相HPLC制备, 冻干得到130mg近白色固体, 收率: 43%。

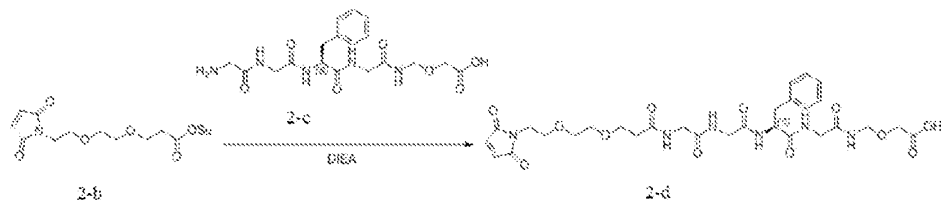


[0232] 核磁：¹H NMR(400MHz,DMSO) δ 9.92(s,1H),8.17(dJ=6.7Hz,1H),8.06(dJ=7.9 Hz,1H),7.87(dJ=8.6Hz,1H),7.79 - 7.72(m,2H),7.67(dJ=6.7Hz,1H),7.60(dJ=8.5Hz, 3H),7.47(ddJ=15.6,7.0Hz,3H),7.36(dJ=7.8Hz,3H),7.33 - 7.26(m,3H),6.51(s,1H),5.4 4(s,2H),5.28(s,3H),5.09 - 4.99(m,3H),4.38(tJ=7.1Hz,1H),4.23 - 4.17(m,1H),3.61 - 3. 55(m,3H),3.49 - 3.43(m,22H),3.28(dJ=5.8Hz,2H),3.10 - 3.04(m,2H),2.61 - 2.54(m,1 H),2.44(dJ=6.7Hz,1H),2.37(s,3H),2.27 - 1.70(m,9H),1.30(dJ=7.1Hz,3H),0.88(tJ= 6.2Hz,6H),0.83(dJ=6.7Hz,3H)。

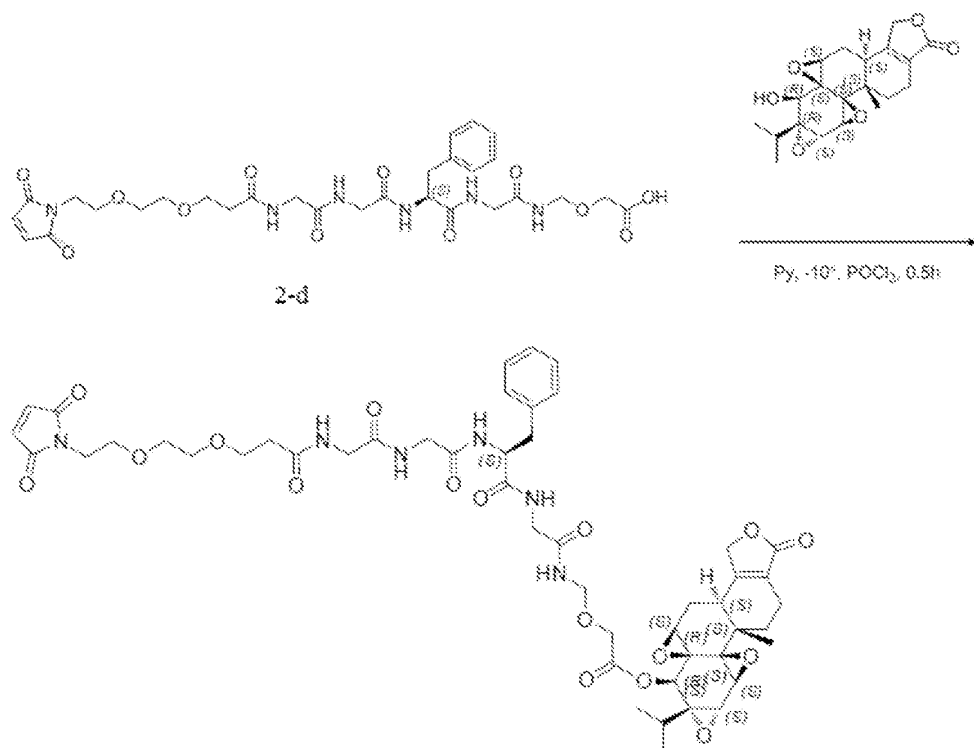
[0233] 实施例2制备化合物2(MC-PEG2-GGFG-Triptolide)



[0234] 将化合物2-a(10g,38.9mmol), HOSU(5.37g,46.7mmol)用100mL DCM溶解, 加入EDCI(11.2g, 58.5mmol), 室温搅拌1h。LCMS监测反应无原料剩余, 反应液浓缩拌样经柱层析(DCM:EA=10:1)得产品, 浓缩得12g淡黄色油状物(化合物2-b), 收率: 87%。



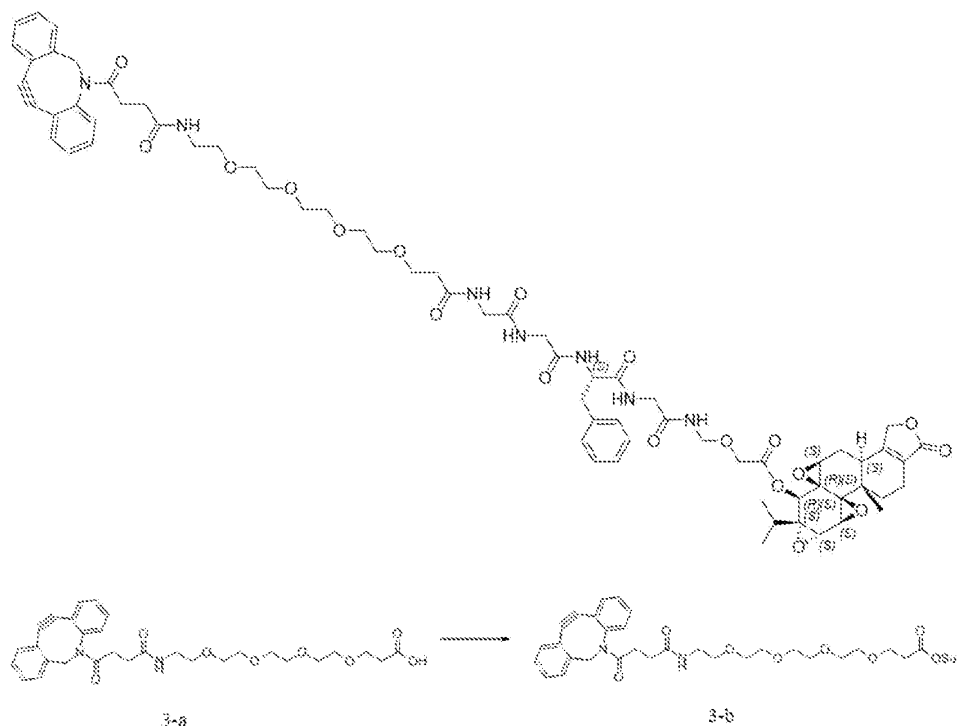
[0235] 将化合物2-b(8g,22.6mmol)和化合物2-c(9.56g,22.6mmol)置于三口瓶中, 用90mL(水: 乙腈=2:1)溶解, 氮气保护, 0-10℃下加入DIEA(2.33g, 18mmol), 加完升至室温反应16h。LCMS监测反应结束, 反应液用EA萃取一遍, 水相用0.5mol/LHCl调PH为2, 用(DCM:IPA=4:1)萃取四次, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥后浓缩, 用EA打浆, 得10.5g白色固体, 收率: 70%。



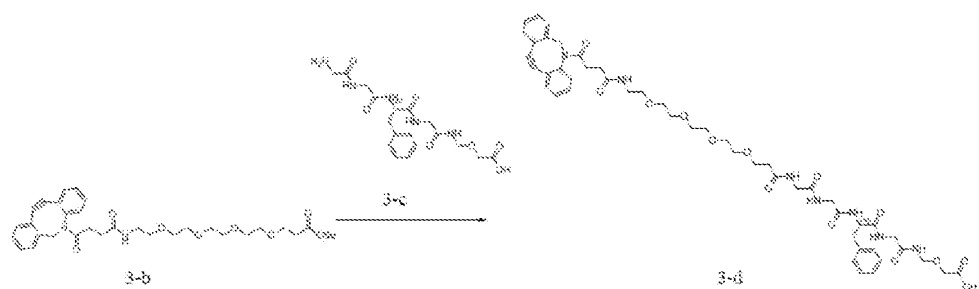
[0236] 将化合物2-d(1.62g,2.44mmol)、雷公藤甲素(800mg,2.22mmol)置于三口瓶中，用20mL Py(吡啶)溶解，氮气保护，-10-5℃下加入POCl₃(3.4g,22.2mmol)，保持该温度反应5min。LCMS监测反应结束，反应液滴到400ml冰的1mol/L HCl中，用(DCM:IPA=4:1)200*3萃取，合并有机相，无水硫酸钠干燥后浓缩送制备。制备液冻干得1.1g黄色固体，收率：44%。

[0237] 核磁：¹H NMR(400MHz,DMSO) δ 8.61(t,J=6.7Hz,1H),8.30(t,J=5.7Hz,1H),8.18-8.05(m,2H),7.99(t,J=5.7Hz,1H),7.29-7.22(m,4H),7.22-7.15(m,1H),7.01(s,2H),5.03(s,1H),4.90-4.73(m,2H),4.70-4.58(m,2H),4.54-4.45(m,1H),4.17(s,2H),3.95(d,J=3.0 Hz,1H),3.80-3.66(m,6H),3.63-3.48(m,8H),3.47-3.43(m,2H),3.43-3.39(m,2H),3.06(dd,J=13.8,4.4Hz,1H),2.80(dd,J=13.9,9.9Hz,1H),2.68-2.58(m,1H),2.36(t,J=6.5Hz,2H),2.28-2.18(m,1H),2.16-2.06(m,1H),2.00-1.90(m,1H),1.90-1.75(m,2H),1.34-1.23(m,2H),0.92-0.84(m,6H),0.74(d,J=6.8Hz,3H)。

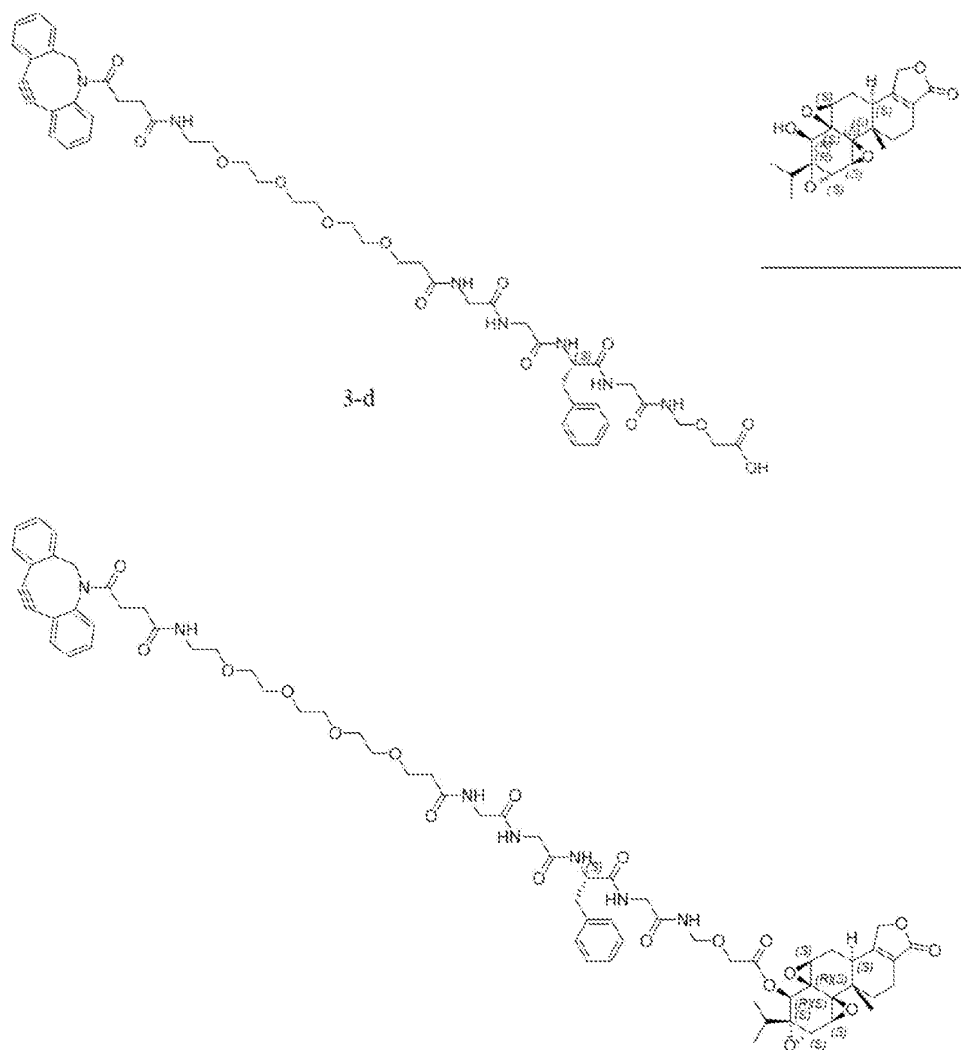
[0238] 实施例3制备化合物3(DBCO-PEG4-GGFG-Triptolide)



[0239] 将化合物3-a(2g,3.62mmol), NHS(624mg,5.42mmol), 2,6-二甲基吡啶溶于80mL二甲基乙酰胺, 再将EDCI(1.04g,5.43mmol)室温下加入, 加毕室温反应过夜。后处理: 将反应液倒入水中, EA萃取, 有机相用饱和食盐水洗涤, 再用无水硫酸钠干燥, 旋干得到2.4g黄色油状物(化合物3-b)。



[0240] 将化合物3-b(2.0g, 3.07mmol), 化合物3-d(1.3g, 3.07mmol)溶于10mL DMF中, 再将TEA(620mg, 6.14mmol)加入, 室温搅拌1h。后处理: 将反应液直接用反相柱纯化, $\text{H}_2\text{O}:\text{CAN}=60\%:40\%$, 冻干得到1.2微黄色易吸潮固体(化合物3-d), 两步收率50%。

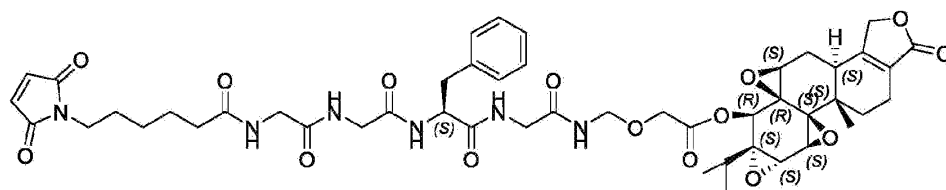


[0241] 将化合物3-d(1.2g,1.23mmol)，雷公藤甲素(446mg,1.23mmol)溶于18mL吡啶中，氮气保护，降温至 -30°C 将 POCl_3 (569mg,3.71mmol)缓慢滴加，滴毕保持温度在 $-10 \sim -30^{\circ}\text{C}$ 反应0.5h。后处理：将反应液降至 -30°C 后迅速上样反相柱纯化， $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}=50\%:50\%$ ，冻干后得到1.5g白色固体需送去反相制备，最终得到1.1g白色固体，收率：68%。

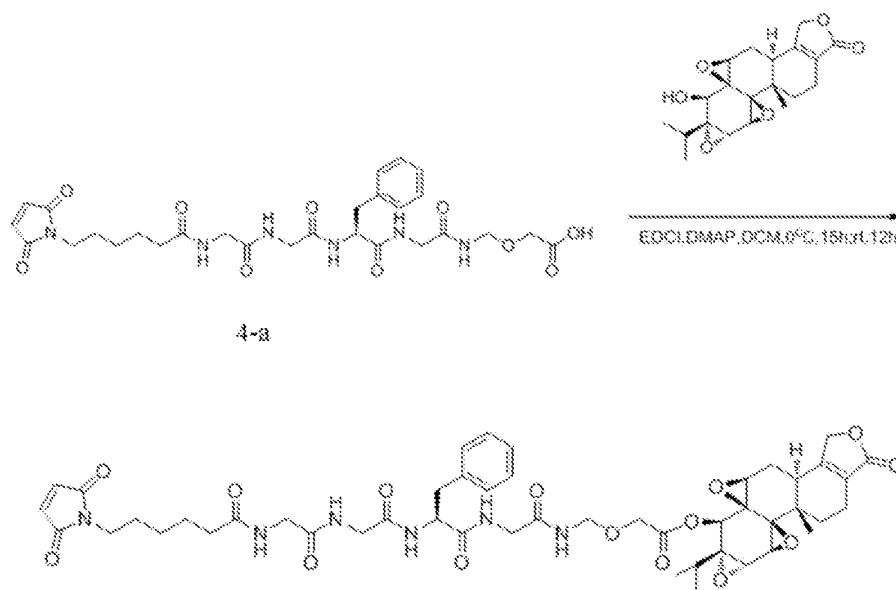
[0242] 核磁： ^1H NMR(400MHz,DMSO) δ 8.61(tJ=6.8Hz,1H),8.30(tJ=5.8Hz,1H),8.18 - 8.08(m,2H),7.99(tJ=5.7Hz,1H),7.75(tJ=5.5Hz,1H),7.70 - 7.65(m,1H),7.62(d,J=7.0Hz,1H),7.52 - 7.42(m,3H),7.40 - 7.28(m,3H),7.27 - 7.22(m,4H),7.18(tdJ=5.9,2.5 Hz,1H),5.03(tJ=7.0Hz,2H),4.89 - 4.72(m,2H),4.69 - 4.58(m,2H),4.50(tdJ=9.1,4.3H

z, 1H), 4.17(s, 2H), 3.95(d, J=3.1Hz, 1H), 3.76(dt, J=17.3, 5.7Hz, 3H), 3.71 - 3.67(m, 3H), 3.60(dd, J=12.7, 6.2Hz, 5H), 3.48 - 3.43(m, 12H), 3.30(s, 2H), 3.13 - 3.02(m, 3H), 2.80(dd, J=13.8, 9.7Hz, 1H), 2.58(dd, J=16.1, 7.9Hz, 2H), 2.38(t, J=6.5Hz, 2H), 2.23(ddd, J=15.4, 10.2, 5.5Hz, 2H), 2.16 - 2.06(m, 1H), 2.03 - 1.92(m, 2H), 1.89 - 1.72(m, 3H), 1.29(d, J=5.2Hz, 2H), 0.91 - 0.85(m, 6H), 0.74(d, J=6.8Hz, 3H).

[0243] 实施例4制备化合物4(MC-GGFG-Triptolide)



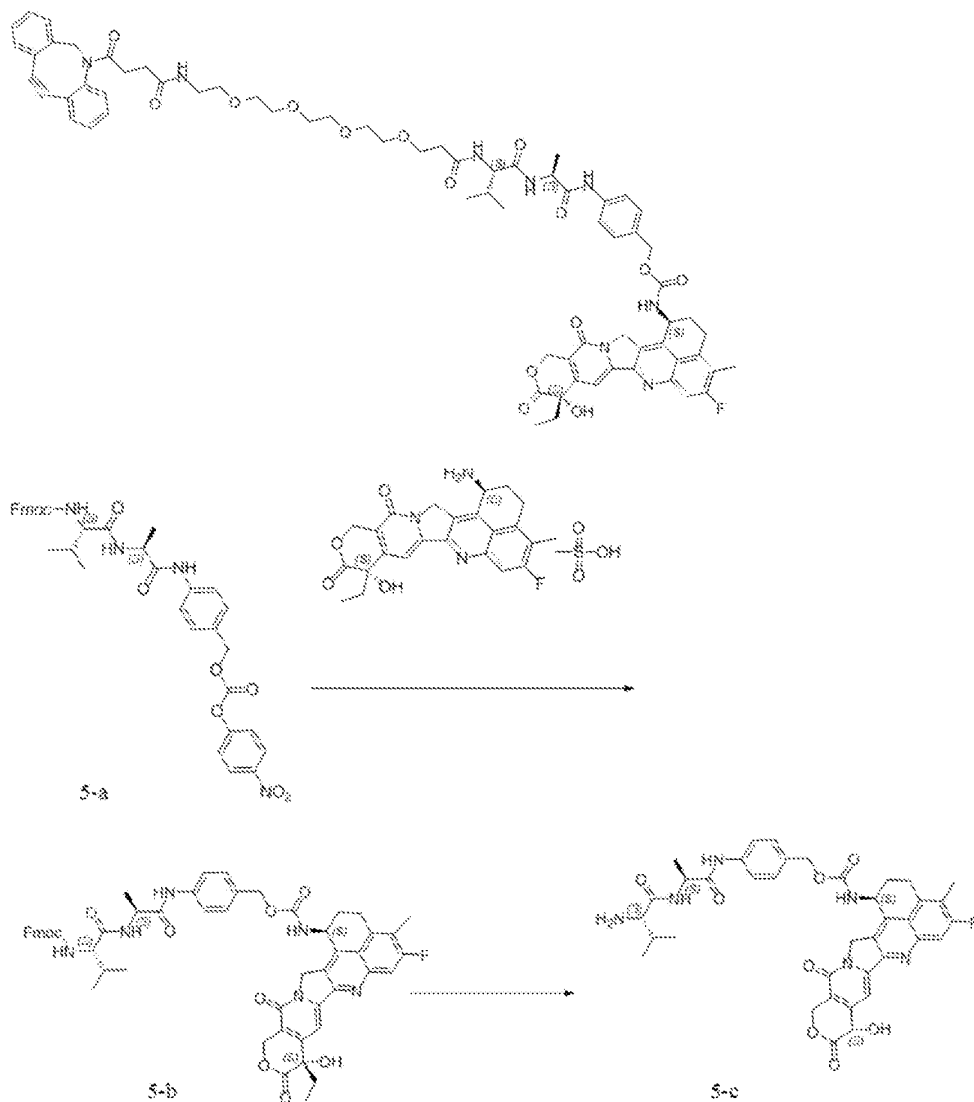
[0244] 将雷公藤甲素(36mg, 0.1mmol), 化合物4-a(62mg, 0.1mmol)加入吡啶(1.5mL干燥)中, 氮气保护下 -10°C 搅拌, 然后加入 POCl_3 (46mg, 0.3mmol), 然后将混合物在 -10°C , N_2 气氛条件下搅拌0.5h, 混合物HPLC纯化后获得白色固体(20mg, 收率21%)。



[0245] 核磁: ^1H NMR(400MHz, DMSO) δ 8.62(d, J=6.8Hz, 1H), 8.32(t, J=5.7Hz, 1H), 8.18 - 8.05(m, 2H), 8.01(t, J=5.6Hz, 1H), 7.35-7.15(m, 5H), 7.02(s, 2H), 5.06(s, 1H), 4.92 - 4.77(m, 2H), 4.72 - 4.58(m, 2H), 4.52(td, J=9.2, 4.6Hz, 1H), 4.19(s, 2H), 3.97(d, J=3.2Hz, 1H),

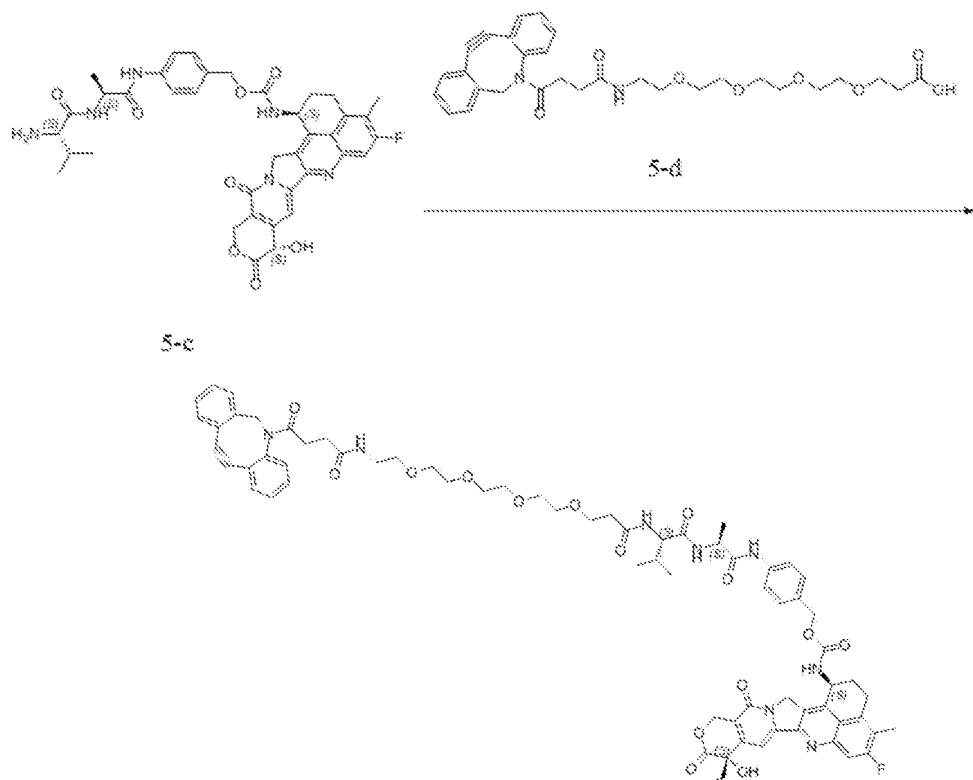
3.83 - 3.53(m,8H),3.40(d,J=7.0Hz,2H),3.08(dd,J=13.8,4.5Hz,1H),2.82(dd,J=13.7,9.8Hz,1H),2.62(s,1H),2.31 - 2.20(m,1H),2.18 - 2.06(m,3H),1.88(ddd,J=33.7,27.6,17.1Hz,3H),1.50(dq,J=14.6,7.3Hz,4H),1.39 - 1.28(m,2H),1.21(dt,J=15.1,7.6Hz,2H),0.94 - 0.85(m,6H),0.77(t,J=5.9Hz,3H).

[0246] 实施例5制备化合物5(DBCO-PEG4-VA-PAB-Exatecan)



[0247] 将化合物5-a(1.8g,2.64mmol),依喜替康甲磺酸盐(1.54g,2.91mmol)溶于18mL DMSO,再将DIEA(1g,7.92mmol)缓慢加入,加毕室温反应4h,反应监测原料消耗完,再将TEA(1.8mL)加入,室温搅拌3h。后处理:将反应液直接用反相柱纯

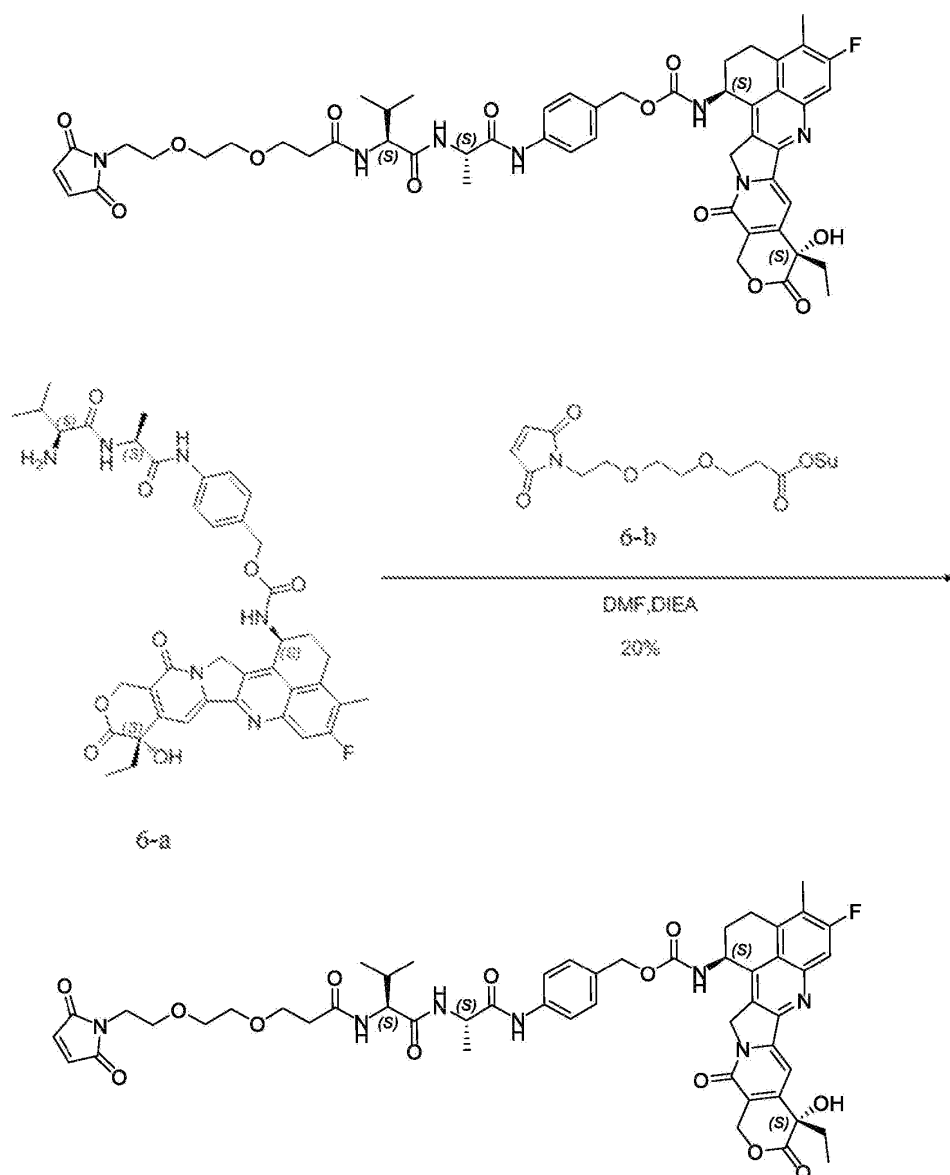
化, $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}=65\%:35\%$, 冻干后得到1.98g黄绿色粉末(化合物5-c), 收率: 99%。



[0248] 将化合物5-c(409mg,0.21mmol), HATU(247mg,0.43mmol)溶于3mL DMF中, 再将DIEA(105mg,0.54mol)加入, 室温搅拌15分钟, 将化合物5-d(300mg,0.36mmol)加入, 室温搅拌2h。后处理: 将反应液直接送至反相HPLC制备, 冻干得到120mg近白色固体, 收率: 17%。

[0249] 核磁: ^1H NMR(400MHz,DMSO) δ 9.93(s,1H),8.17(dJ=6.9Hz,1H),8.06(dJ=8.4Hz,1H),7.87(dJ=8.6Hz,1H),7.76(tJ=9.9Hz,2H),7.66(dJ=6.3Hz,1H),7.60(dJ=8.4Hz,3H),7.50 - 7.43(m,3H),7.36(dJ=8.7Hz,3H),7.33 - 7.26(m,3H),6.51(s,1H),5.44(s,2H),5.28(dJ=4.3Hz,3H),5.10 - 4.98(m,3H),4.38(tJ=7.1Hz,1H),4.24 - 4.17(m,1H),3.61 - 3.55(m,3H),3.52 - 3.39(m,14H),3.28(dJ=5.9Hz,2H),3.08(ddJ=10.0,5.3Hz,2H),2.58(ddJ=16.1,7.9Hz,1H),2.44(tJ=6.7Hz,1H),2.37(s,3H),2.27 - 1.71(m,9H),1.30(dJ=7.1Hz,3H),0.88(tJ=6.2Hz,6H),0.83(dJ=6.8Hz,3H)。

[0250] 实施例6制备化合物6(MC-PEG2-VA-PAB-Exatecan)



[0251] 室温下向一个100毫升三口瓶中加入化合物6-a(480mg,0.64mmol)，加入DMF(20 mL)溶解后，加入化合物6-b(237.2mg,0.67mmol)。反应降温至0℃，缓慢滴加DIEA(237.2mg, 1.28mmol)，反应在0℃搅拌2h，LC-MS显示反应完全。反应液加入醋酸(0.5mL)后先经反相(TFA/MeCN)分离，冻干。再经制备分离，冻干得黄色固体127mg(化合物6)，收率20%。

[0252] 核磁：¹H NMR(400MHz,DMSO) δ 9.95(s,1H),8.19(dJ=6.8Hz,1H),8.08(dJ=8.8 Hz,1H),7.88(dJ=8.8Hz,1H),7.79(dJ=10.8Hz,1H),7.62(dJ=8.4Hz,2H),7.39(dJ=8.

4Hz,2H),7.33(s,1H),7.04(s,2H),5.47(s,2H),5.30(dJ=4.4Hz,3H),5.10(s,2H),4.44-4.36(m,1H),4.25-4.19(m,1H),3.58(dd,J=11.2,5.6Hz,5H),3.52(dJ=5.2Hz,3H),3.36-3.07(m,3H),2.49-2.36(m,5H),2.20(dJ=13.2Hz,2H),2.04-1.85(m,3H),1.32(dJ=7.2Hz,3H),0.92-0.84(m,9H)。

[0253] 实施例7雷公藤甲素(化合物2)/依喜替康(化合物1)双毒素ADC(ADC-1)的制备

[0254] 按以下反应体系加入样品使抗体(Sacituzumab)终浓度10mg/ml, MnCl_2 终浓度10mmol/L, pH7.5 Tris-HCl终浓度10mmol/L, UDP-GalNAz终浓度5mmol/L, GalT1按5mgGalT1/1gmAb ~ 50mgGalT1/1gmAb比例加入, 30℃恒温摇床振荡 ≥ 12 h完成抗体的叠氮化反应。通过层析去除叠氮化反应引入的UDP-GalNAz、GalT1、 Mn^{2+} 等物质。按以下反应体系加入化合物1使叠氮化抗体的终浓度10mg/ml, DMSO终浓度10%, 化合物1与抗体的摩尔比5-15, 30℃恒温摇床振荡 ≥ 12 h, 完成抗体与毒素的糖偶联。在以上反应液中直接加入TCEP还原抗体, TCEP与抗体摩尔比5, 30℃恒温摇床振荡2h还原抗体。加入化合物2完成巯基偶联, 化合物2与抗体摩尔比5, 2~8℃搅拌2h, 完成巯基偶联。通过浓缩换液去除工艺过程引入的TCEP、DMSO、化合物1、化合物2等物质, 将样品置换到4.29g/LpH6.5的MES缓冲液中, 补加海藻糖和聚山梨酯80(II), 使海藻糖的终浓度为8.56g/L, 聚山梨酯80(II)终浓度为0.1g/L, 完成样品的制备。取样品100 μ g, 加入2 μ l 1mol/LDTT, 补加超纯水至终体积100 μ l, 室温还原30min, 然后直接LC-MS检测。根据质谱信号强度归一化后计算样品的平均DAR值, 雷公藤甲素为3.7, 依喜替康为3.6。

[0255] 实施例8依喜替康(化合物7)/雷公藤甲素(化合物3)双毒素ADC(ADC-2)的制备

[0256] 按以下反应体系加入样品使抗体(Sacituzumab)终浓度10mg/ml, MnCl_2 终浓度10mmol/L, pH7.5 Tris-HCl终浓度10mmol/L, UDP-GalNAz终浓度5mmol/L, GalT1按5mgGalT1/1gmAb ~ 50mgGalT1/1gmAb比例加入, 30℃恒温摇床振荡 ≥ 12 h完成抗体的叠氮化反应。通过层析去除叠氮化反应引入的UDP-GalNAz、GalT1、 Mn^{2+} 等物质。按以下反应体系加入化合物3使叠氮化抗体的终浓度10mg/ml, DMSO终浓度10%, 化合物3与抗体的摩尔比5-15, 30℃恒温摇床振荡 ≥ 12 h, 完成抗体与毒素的糖偶联。在以上反应液中直接加入TCEP还原抗体, TCEP

与抗体摩尔比4.5，30℃恒温摇床振荡2h还原抗体。加入化合物7完成巯基偶联，化合物7与抗体摩尔比5，2~8℃搅拌2h，完成巯基偶联。通过浓缩换液去除工艺过程引入的TCEP、DMSO、化合物3、化合物7等物质，将样品置换到4.29g/L pH6.5的MES缓冲液中，调整蛋白浓度为20mg/ml，补加海藻糖和聚山梨酯80(I)，使海藻糖的终浓度为8.56g/L，聚山梨酯80(II)终浓度为0.1g/L，完成样品的制备。取样品100 μ g，加入2 μ l 1mol/L DTT，补加超纯水至终体积100 μ l，室温还原30min，然后直接LC-MS检测。根据质谱信号强度归一化后计算样品的平均DAR值，依喜替康为4.2，雷公藤甲素为3.7。

[0257] 实施例9雷公藤甲素(化合物4)/依喜替康(化合物1)双毒素ADC(ADC-3)的制备

[0258] 按以下反应体系加入样品使抗体(Sacituzumab)终浓度10mg/ml，MnCl₂终浓度10mmol/L，pH7.5 Tris-HCl终浓度10mmol/L，UDP-GalNAz终浓度5mmol/L，GalT1按5mgGalT1/1gmAb~50mgGalT1/1gmAb比例加入，30℃恒温摇床振荡 $\geq$ 12h完成抗体的叠氮化反应。通过层析去除叠氮化反应引入的UDP-GalNAz、GalT1、Mn²⁺等物质。按以下反应体系加入化合物1使叠氮化抗体的终浓度10mg/ml，DMSO终浓度10%，化合物1与抗体的摩尔比5-15，30℃恒温摇床振荡 $\geq$ 12h，完成抗体与毒素的糖偶联。在以上反应液中直接加入TCEP还原抗体，TCEP与抗体摩尔比5，30℃恒温摇床振荡2h还原抗体。化合物4完成巯基偶联，化合物4与抗体摩尔比5，2~8℃搅拌2h，完成巯基偶联。通过浓缩换液去除工艺过程引入的TCEP、DMSO、化合物1、化合物4等物质，将样品置换到4.29g/L pH6.5的MES缓冲液中，补加海藻糖和聚山梨酯80(II)，使海藻糖的终浓度为8.56g/L，聚山梨酯80(II)终浓度为0.1g/L，完成样品的制备。取样品100 μ g，加入2 μ l 1mol/L DTT，补加超纯水至终体积100 μ l，室温还原30min，然后直接LC-MS检测。根据质谱信号强度归一化后计算样品的平均DAR值，雷公藤甲素为4.5，依喜替康为3.8。

[0259] 实施例10依喜替康(化合物6)/雷公藤甲素(化合物3)双毒素ADC(ADC-4)的制备

[0260] 按以下反应体系加入样品使抗体(Sacituzumab)终浓度10mg/ml，MnCl₂终浓度10mmol/L，pH7.5 Tris-HCl终浓度10mmol/L，UDP-GalNAz终浓度5mmol/L，GalT1按5mgGalT1/1gmAb~50mgGalT1/1gmAb比例加入，30℃恒温摇床振荡 $\geq$

12h完成抗体的叠氮化反应。通过层析去除叠氮化反应引入的UDP-GalNAz、GalT1、Mn²⁺等物质。按以下反应体系加入化合物3使叠氮化抗体的终浓度10mg/ml，DMSO终浓度10%，化合物3与抗体的摩尔比5-15，30℃恒温摇床振荡≥12h，完成抗体与毒素的糖偶联。在以上反应液中直接加入TCEP还原抗体，TCEP与抗体摩尔比4.5，30℃恒温摇床振荡2h还原抗体。加入化合物6完成巯基偶联，化合物6与抗体摩尔比5，2~8℃搅拌2h，完成巯基偶联。通过浓缩换液去除工艺过程引入的TCEP、DMSO、化合物3、化合物6等物质，将样品置换到4.29g/L pH6.5的MES缓冲液中，调整蛋白浓度为20mg/ml，补加海藻糖和聚山梨酯80(I)，使海藻糖的终浓度为8.56g/L，聚山梨酯80(II)终浓度为0.1g/L，完成样品的制备。取样品100μg，加入2μl 1mol/L DTT，补加超纯水至终体积100μl，室温还原30min，然后直接LC-MS检测。根据质谱信号强度归一化后计算样品的平均DAR值，依喜替康为3.7，雷公藤甲素为3.6。

[0261] 实施例11依喜替康(化合物1)ADC(ADC-5)的制备

[0262] 按以下反应体系加入样品使抗体(Sacituzumab)终浓度10mg/ml，MnCl₂终浓度10mmol/L，pH7.5 Tris-HCl终浓度10mmol/L，UDP-GalNAz终浓度5mmol/L，GalT1按5mgGalT1/1gmAb~50mgGalT1/1gmAb比例加入，30℃恒温摇床振荡≥12h完成抗体的叠氮化反应。通过层析去除叠氮化反应引入的UDP-GalNAz、GalT1、Mn²⁺等物质。按以下反应体系加入化合物1使叠氮化抗体的终浓度10mg/ml，DMSO终浓度10%，化合物1与抗体的摩尔比5-15，30℃恒温摇床振荡≥12h，完成抗体与毒素的糖偶联。通过浓缩换液去除工艺过程引入的DMSO、化合物1等物质，将样品置换到4.29g/L pH6.5的MES缓冲液中，调整蛋白浓度为20mg/ml，补加海藻糖和聚山梨酯80(II)，使海藻糖的终浓度为8.56g/L，聚山梨酯80(II)终浓度为0.1g/L，完成样品的制备。取样品100μg，补加超纯水至终体积100μl，然后直接LC-MS检测。根据质谱信号强度归一化后计算样品的平均DAR值，依喜替康为3.7。

[0263] 实施例12

[0264] HSP70在许多肿瘤中表达上调，可造成肿瘤恶化与化疗抵抗。采用HSP70的相对表达水平来研究雷公藤甲素对mRNA转录水平的抑制功能。

- [0265] 实验方法：HCT-15(人结直肠癌)细胞在T75中生长至90%融合度后，胰酶消化传代至6孔板中，37℃过夜培养后分别加入Dxd(100nM)、Exatecan(100nM)、Triptolide(100nM)、Triptolide+Dxd(100nM+100nM)、Triptolide+Exatecan(100nM+100nM)，不加药组为CTRL。24h后弃培养基，加入500ul/孔Trizol提取RNA，反转录后以18S为内参进行实时定量PCR检测HSP70、ABAC1的表达，引物序列如下：ABAC1F:ATGGCTACATGAGAGCGGAG(SEQ ID NO: 21); ABAC1 R: CGTTGCACCTCTCTGGTCC(SEQ ID NO: 22); HSP70 F: ACCAAGCAGACG CAGATCTTC(SEQ ID NO: 23); HSP70R: CGCCCTCGTA CACCTGGAT(SEQ ID NO: 24); 18S F: CTCGCTCCTCTCCCACTTG(SEQ ID NO: 25); 18S R: TGACCGGGTTGGTTTTGATC(SEQ ID NO: 26)。
- [0266] 结果如图2A、2B所示，图2A中，纵坐标为HSP70。HCT-15细胞在受到100nM Dxd或Exatecan刺激下HSP70表达显著上调，而相同物质量浓度的Triptolide处理下，HSP70mRNA显著减少，Triptolide能抑制mRNA的合成。
- [0267] 图2B中，纵坐标为外排泵基因ABAC1表达水平。从图中可以看出，Triptolide显著降低HCT-15外排泵基因ABAC1的表达，引起细胞对Dxd或Exatecan敏感性增强。
- [0268] Triptolide和Exatecan联用，HSP70和ABAC1表达显著上调，证明了Triptolide和Exatecan联用在抵抗细胞凋亡保护和耐药的协同性。
- [0269] 实施例13人结直肠癌模型(COLO205细胞)中的药效实验
- [0270] 实验动物
- [0271] NCG小鼠购自成都药康生物科技有限公司。
- [0272] 动物造模
- [0273] COLO205细胞重悬在1640培养基或DMEM培养基中(总体积0.1mL/只鼠)，实验用NCG小鼠于接种前剔除背部右前侧毛发，然后皮下接种 6×10^6 个- 1×10^7 个细胞。
- [0274] 给药方案
- [0275] 在接瘤后7天，通过静脉注射给予小鼠供试样品(阴性对照：PBS溶液；供试药物：ADC-1、ADC-2；阳性对照：Dato-Dxd、Trodelyv)，每组6只动物，给药

剂量为5mg/kg。开始给药后，每周测量两次小鼠的体重和肿瘤的大小。肿瘤体积计算公式：肿瘤体积(mm³)=1/2×(L×W²)(其中L表示长径，W表示短径)。肿瘤体积变化结果如图3A所示。在实验结束后，处死小鼠，解剖肿瘤称重，结果如图3B(*表示P<0.05，**表示P<0.01，***表示P<0.001，****表示P<0.0001)。

[0276] 实施例14人胰腺癌模型(Bxpc-3细胞)中抑瘤作用

[0277] 实验动物

[0278] NCG小鼠购自成都药康生物科技有限公司

[0279] 动物造模

[0280] Bxpc-3细胞重悬在1640培养基或DMEM培养基中(总体积0.1mL/只鼠)，实验用NCG小鼠于接种前剔除背部右前侧毛发，然后皮下接种 6×10^6 个- 1×10^7 个细胞。

[0281] 给药方案

[0282] 在接瘤后17天，通过静脉注射给予小鼠供试样品(阴性对照：PBS溶液；供试药物：ADC-3；阳性对照：Dato-Dxd)，每组6只动物，给药剂量为5mg/kg。接种后第28天，即首次给药后第11天进行二次给药，剂量为10mg/kg。开始给药后，每周测量两次小鼠的体重和肿瘤的大小。肿瘤体积计算公式：肿瘤体积(mm³)=1/2×(L×W²)(其中L表示长径，W表示短径)。肿瘤体积变化结果如图4所示。

[0283] 实施例15人结直肠癌耐药模型中(HCT-15-TROP2细胞)中抑瘤作用

[0284] 实验动物

[0285] NCG小鼠购自成都药康生物科技有限公司。

[0286] 动物造模

[0287] HCT-15-TROP2细胞重悬在1640培养基或DMEM培养基中(总体积0.1mL/只鼠)，实验用NCG小鼠于接种前剔除背部右前侧毛发，然后皮下接种 6×10^6 个- 1×10^7 个细胞。

[0288] 给药方案

[0289] 在接瘤后10天，通过静脉注射给予小鼠供试样品(阴性对照：PBS溶液；供试药物：ADC-2；阳性对照：Dato-Dxd)，每组6只动物，给药剂量为5mg/kg。开始给药后，每周测量两次小鼠的体重和肿瘤的大小。肿瘤体积计算公式：肿瘤体

积(mm^3) = $1/2 \times (L \times W^2)$ (其中L表示长径, W表示短径)。肿瘤体积变化结果如图5所示。

[0290] 实施例16

[0291] 本实施例用于考察Triptolide与Exatecan单药或者双药1:1结合使用对肿瘤细胞是否有显著杀伤。

[0292] 细胞准备

[0293] 取对数生长期的MX-1细胞(人乳腺癌细胞)、WiDr细胞(人结直肠癌细胞)、MFE-280细胞(人子宫内膜癌细胞)、HeLa细胞(人宫颈癌细胞)、HuH-7细胞(人肝癌细胞)、NUGC-4细胞(人胃癌细胞)、Calu-6细胞(人退行性癌细胞), 经0.25% Trypsin-EDTA消化, 以含10% FBS的1640培养基重悬细胞, 台盼蓝染色计数, 调整细胞密度至 1×10^6 个/ml, 接种于96孔细胞培养板中, 每孔100 μ l, 37°C、5% CO₂培养箱中贴壁4h。

[0294] 药物准备:

[0295] 药物组1: 小分子毒素Dxd稀释: 用含10% FBS的1640培养基将Dxd以100nM为起始浓度, 2倍梯度稀释4个梯度, 共5个浓度梯度, 6为空白, 浓度分别为: 100nM、50nM、25nM、12.5nM、6.25nM。

[0296] 药物组2: 小分子毒素Exatecan(简称EXA)稀释: 用含10% FBS的1640培养基将Exatecan以100nM为起始浓度, 2倍梯度稀释4个梯度, 共5个浓度梯度, 6为空白, 浓度分别为: 100nM、50nM、25nM、12.5nM、6.25nM。

[0297] 药物组3: 小分子毒素Triptolide(简称TRP)稀释: 用含10% FBS的1640培养基将Triptolide以100nM为起始浓度, 2倍梯度稀释4个梯度, 共5个浓度梯度, 6为空白, 浓度分别为: 100nM、50nM、25nM、12.5nM、6.25nM。

[0298] 药物组4: 小分子毒素Dxd+Triptolide(简称DXD+TRP)稀释: 用含10% FBS的1640培养基将100nM Dxd+100nM Triptolide等比混合溶液(即: 2ml 100nM Dxd+2ml 100nM Triptolide混合溶液)以50nM为起始浓度, 2倍梯度稀释4个梯度, 共5个浓度梯度, 6为空白, 浓度分别为: 50nM、25nM、12.5nM、6.25nM、3.125nM。

[0299] 药物组5: 小分子毒素Exatecan+Triptolide(简称EXA+TRP)稀释: 用含10% FBS的1640培养基将100nM Exatecan+100nM Triptolide等比混合溶液(即: 2ml 100nM

Exatecan+2ml 100nM Triptolide混合溶液)以50nM为起始浓度，2倍梯度稀释4个梯度，共5个浓度梯度，6为空白，浓度分别为：50nM、25nM、12.5nM、6.25nM、3.125nM。

[0300] 加样：

[0301] 将稀释好的Dxd、Exatecan、Triptolide、Dxd+Triptolide、Exatecan+Triptolide不同浓度梯度样品分别取100 μ l转移至已接种MX-1、WiDr、MFE-280、HeLa、HuH-7、NUGC-4、Calu-6细胞的培养板内中，2复孔，共5组样品，即：单独的Dxd组、单独的Exatecan组、单独的Triptolide组、Dxd+Triptolide组和Exatecan+Triptolide组。其中单独的Dxd组终浓度为50nM、25nM、12.5nM、6.25nM、3.125nM；单独的Exatecan组终浓度为50nM、25nM、12.5nM、6.25nM、3.125nM；单独的Triptolide组终浓度为50nM、25nM、12.5nM、6.25nM、3.125nM；Dxd+Triptolide组和Exatecan+Triptolide组终浓度为25nM、12.5nM、6.25nM、3.125nM、1.562nM。

[0302] 数据采集

[0303] 加样完成后，将细胞板置于Incucyte连续拍照，2h/次，连续拍照收集数据，分析细胞融合度体现药物对细胞的杀伤能力。

[0304] 实验结果

[0305] MX-1细胞、WIDR细胞、HeLa细胞、MFE-280细胞的汇合度(或融合度)分别如图6A-6D。HuH-7细胞、NUGC-4细胞、Calu-6细胞的存活率如图7A-7C所示。从结果可以看出Dxd或Exatecan与Triptolide的联用组相比于Dxd、Exatecan或Triptolide单药组能够更显著实现细胞杀伤。

[0306] 实施例17人结直肠癌耐药模型中(HCT-15-TROP2细胞)抑瘤作用

[0307] 实验动物

[0308] NCG小鼠购自成都药康生物科技有限公司。

[0309] 动物造模

[0310] HCT-15-Trop2细胞重悬在1640培养基或DMEM培养基中(总体积0.1mL/只鼠)，实验用NCG小鼠于接种前剔除背部右前侧毛发，然后皮下接种 1×10^7 个细胞。

- [0311] 给药方案
- [0312] 两周一次对动物(每组7只动物)进行尾静脉注射供试样品(阴性对照: PBS溶液; 供试药物: ADC-2、ADC-4、ADC-5; 阳性对照: Dato-Dxd), 给药当天记为D0, 共给药三次(Day0、Day14和Day29), 给药剂量为5mg/kg。开始给药后, 每周测量两次小鼠的体重和肿瘤的大小。肿瘤体积计算公式: $\text{肿瘤体积}(\text{mm}^3) = 1/2 \times (L \times W^2)$ (其中L表示长径, W表示短径)。肿瘤体积变化结果如图8A所示。在实验结束后, 处死小鼠, 解剖肿瘤称重, 结果如图8B所示(*表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$, ***表示 $P < 0.001$, ****表示 $P < 0.0001$)。
- [0313] 实施例18人肺癌NCI-H2170细胞模型中抑瘤作用
- [0314] 实验动物
- [0315] NCG小鼠购自成都药康生物科技有限公司。
- [0316] 动物造模
- [0317] NCI-H2170细胞重悬在1640培养基或DMEM培养基中(总体积0.1mL/只鼠), 实验用NCG小鼠于接种前剔除背部右前侧毛发, 然后皮下接种 1×10^7 个细胞。
- [0318] 给药方案
- [0319] 对动物(每组6只动物)进行尾静脉注射供试样品(阴性对照: PBS溶液; 供试药物: ADC-2、ADC-4、ADC-5; 阳性对照: Dato-Dxd), 给药当天记为D0, 共给药一次(Day0), 给药剂量为5mg/kg。开始给药后, 每周测量两次小鼠的体重和肿瘤的大小。肿瘤体积计算公式: $\text{肿瘤体积}(\text{mm}^3) = 1/2 \times (L \times W^2)$ (其中L表示长径, W表示短径)。肿瘤体积变化结果如图9A。在实验结束后, 处死小鼠, 解剖肿瘤称重, 结果如图9B所示(*表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$, ***表示 $P < 0.001$, ****表示 $P < 0.0001$)。
- [0320] 实施例19依喜替康(化合物6)ADC(ADC-6)的制备
- [0321] 蛋白液中直接加入TCEP还原抗体(Sacituzumab), TCEP与抗体摩尔比为4:1, 30°C恒温摇床振荡2h还原抗体。加入化合物6完成巯基偶联, 化合物6与抗体摩尔比为5:1, 2~8°C搅拌2h, 完成巯基毒素偶联。通过浓缩换液去除工艺过程引入的DMSO、化合物6等物质, 将样品置换到4.29g/L pH6.5的MES缓冲液中, 调整蛋白浓度为20mg/ml, 补加海藻糖和聚山梨酯80(II), 使海藻糖的终浓度为8.56g/

L, 聚山梨酯80(II)终浓度为0.1g/L, 完成样品的制备。取样品100 μ g, 补加超纯水至终体积100 μ l, 然后直接LC-MS检测。根据质谱信号强度归一化后计算样品的平均DAR值, 依喜替康为3.9。

[0322] 实施例20依喜替康(化合物6)ADC(ADC-7)的制备

[0323] 蛋白液中直接加入TCEP还原抗体(Sacituzumab), TCEP与抗体摩尔比为8:1, 30 $^{\circ}$ C恒温摇床振荡2h还原抗体。加入化合物6完成巯基偶联, 化合物6与抗体摩尔比为10:1, 2~8 $^{\circ}$ C搅拌2h, 完成巯基毒素偶联。通过浓缩换液去除工艺过程引入的DMSO、化合物6等物质, 将样品置换到4.29g/L pH6.5的MES缓冲液中, 调整蛋白浓度为20mg/ml, 补加海藻糖和聚山梨酯80(II), 使海藻糖的终浓度为8.56g/L, 聚山梨酯80(II)终浓度为0.1g/L, 完成样品的制备。取样品100 μ g, 补加超纯水至终体积100 μ l, 然后直接LC-MS检测。根据质谱信号强度归一化后计算样品的平均DAR值, 依喜替康为7.9。

[0324] 实施例21雷公藤甲素(化合物3)ADC(ADC-8)的制备

[0325] 按以下反应体系加入样品使抗体(Sacituzumab)终浓度10mg/ml, $MnCl_2$ 终浓度10mmol/L, pH7.5 Tris-HCl终浓度10mmol/L, UDP-GalNAz终浓度5mmol/L, GalT1按5mgGalT1/1gmAb~50mgGalT1/1gmAb比例加入, 30 $^{\circ}$ C恒温摇床振荡 $\geq$ 12h完成抗体的叠氮化反应。通过层析去除叠氮化反应引入的UDP-GalNAz、GalT1、 Mn^{2+} 等物质。按以下反应体系加入化合物3使叠氮化抗体的终浓度10mg/ml, DMSO终浓度10%, 化合物3与抗体的摩尔比5-15, 30 $^{\circ}$ C恒温摇床振荡 $\geq$ 12h, 完成抗体与毒素的糖偶联。通过浓缩换液去除工艺过程引入的DMSO、化合物3等物质, 将样品置换到4.29g/L pH6.5的MES缓冲液中, 调整蛋白浓度为20mg/ml, 补加海藻糖和聚山梨酯80(II), 使海藻糖的终浓度为8.56g/L, 聚山梨酯80(II)终浓度为0.1g/L, 完成样品的制备。取样品100 μ g, 补加超纯水至终体积100 μ l, 然后直接LC-MS检测。根据质谱信号强度归一化后计算样品的平均DAR值, 雷公藤甲素为3.7。

[0326] 实施例22NCI-H292 CDX模型动物药效实验

[0327] 实验动物

[0328] NKG小鼠购自赛业生物科技有限公司。

- [0329] 动物造模
- [0330] NCI-H292细胞重悬在1640培养基或DMEM培养基中，密度为 1×10^8 cells/mL细胞。实验小鼠于接种前剔除背部右前侧毛发，然后皮下接种0.1mL细胞悬液/只鼠，接种密度为 1×10^7 个NCI-H292细胞/只鼠，每组8只动物。
- [0331] 给药方案
- [0332] 对动物进行尾静脉注射供试样品(阴性对照：PBS溶液；供试药物：ADC8组、ADC-7组、ADC8+ADC6组、ADC-4组)，给药当天记为D0，共给药三次(Day 0，Day14，Day28)。给药剂量为：ADC8组(5mg/kg)、ADC-7组(5mg/kg)、ADC8+ADC6组(2.5mg/kg+2.5mg/kg)、ADC-4组(5mg/kg)；开始给药后，每周测量两次小鼠的体重和肿瘤的大小。肿瘤体积计算公式：肿瘤体积(mm³)= $1/2 \times (L \times W^2)$ (其中L表示长径，W表示短径)。肿瘤体积变化结果如图10所示。在D43停止观察并终止实验，统计小鼠死亡情况，结果表明，ADC-4组存活小鼠5只，死亡3只；而ADC-7组小鼠死亡7只，PBS对照组小鼠死亡7只，结果如下表所示。
- [0333] 从结果可以看出，ADC8+ADC6(雷公藤-ADC和依喜替康-ADC)联合用药组的药效与ADC-7、ADC-4组在前两次用药后的药效相近，第三次给药后，ADC-4组的药效最优，并且从小鼠死亡时间和数量统计来看，其安全性最好。

[0334] 表1

组别	小鼠死亡数（存活数）/只				
	0 天	10 天	20 天	30 天	42 天
阴性对照组	0（8）	0（8）	0（8）	1（7）	7（1）
ADC-7 组	0（8）	0（8）	1（7）	2（6）	7（1）
ADC-4 组	0（8）	0（8）	0（8）	1（7）	3（5）

- [0335] 实施例23Dxd-ADC(ADC-9)的制备
- [0336] 本制备工艺包含抗体还原→巯基偶联→浓缩换液。抗体(Patritumab)用TCEP进行还原，将TCEP按照TCEP与抗体的摩尔比为4:1的比例加入，还原反应在22℃恒温摇床振荡条件下进行，反应时间2h。抗体的还原反应完成后，再加入带有马来酰胺接头的小分子毒素(化合物8)对抗体进行巯基偶联，将小分子载荷(Dxd)按照小分子与抗体的摩尔比为6:1的比例加入，巯基偶联反应在22℃恒温摇床振

荡条件下进行，反应时间2h。然后通过浓缩换液去除DMSO、TCEP、小分子载荷等工艺引入的杂质。根据质谱信号强度归一化后计算样品的平均DAR值，D_xd为5.63。

[0337] 实施例24D_xd-ADC(ADC-10)的制备

[0338] 本制备工艺包含抗体还原→巯基偶联→浓缩换液。抗体(Patritumab)用TCEP进行还原，将TCEP按照TCEP与抗体的摩尔比为20:1的比例加入，还原反应在22℃恒温摇床振荡条件下进行，反应时间2h。抗体的还原反应完成后，再加入带有马来酰胺接头的小分子毒素化合物8)对抗体进行巯基偶联，将小分子载荷(D_xd)按照小分子与抗体的摩尔比为20:1的比例加入，巯基偶联反应在22℃恒温摇床振荡条件下进行，反应时间2h。然后通过浓缩换液去除DMSO、TCEP、小分子载荷等工艺引入的杂质。根据质谱信号强度归一化后计算样品的平均DAR值，D_xd为7.93。

[0339] 实施例25依喜替康(化合物6)/雷公藤甲素(化合物3)双毒素ADC(ADC-11)的制备

[0340] 本制备工艺包含抗体叠氮化→protein A亲和层析→糖偶联→抗体还原→巯基偶联→浓缩换液。按以下反应体系加入样品使抗体(Patritumab)终浓度10mg/ml，pH7.5 Tris-HCl终浓度10mmol/L，UDP-GalNAz终浓度5mmol/L，GalT1按GalT1按照GalT1与抗体(Patritumab)的质量比为40:1的比例加入。抗体的叠氮化反应在22℃恒温摇床振荡条件下进行，反应时间14~16h。然后通过protein A亲和层析去除叠氮化反应中加入的GalT1、UDP-GalNAz、Mn²⁺等杂质。然后将带有叠氮化基团的抗体与带有DBCO接头的小分子载荷(化合物3)按照小分子载荷(化合物3)与抗体的摩尔比为7.5:1的比例加入进行点击化学反应，抗体的糖偶联反应在22℃恒温摇床振荡条件下进行，反应时间14~16h，完成抗体与小分子载荷(化合物3)的糖偶联。糖偶联的抗体用TCEP进行还原，将TCEP按照TCEP与抗体的摩尔比为3.7:1的比例加入，还原反应在22℃恒温摇床振荡条件下进行，反应时间2h。抗体的还原反应完成后，再加入带有马来酰胺接头的小分子(化合物6)对抗体进行巯基偶联，将小分子载荷(化合物6)按照小分子与抗体的摩尔比为6:1的比例加入，巯基偶联反应在22℃恒温摇床振荡条件下进行，反应时间2h。最后通过

浓缩换液去除DMSO、TCEP、小分子载荷等工艺引入的杂质。根据质谱信号强度归一化后计算样品的平均DAR值，依喜替康为3.89，雷公藤甲素为3.78。

[0341] 实施例26雷公藤甲素ADC(ADC-12)的制备

[0342] 本制备工艺包含抗体叠氮化→protein A亲和层析→糖偶联→浓缩换液。按以下反应体系加入样品使抗体(Patritumab)终浓度10mg/ml，pH7.5 Tris-HCl终浓度10 mmol/L，UDP-GalNAz终浓度5mmol/L，GalT1按将GalT1按照GalT1与抗体(Patritumab)的质量比为40:1的比例加入。抗体的叠氮化反应在22℃恒温摇床振荡条件下进行，反应时间14~16h。然后通过protein A亲和层析去除叠氮化反应中加入的GalT1、UDP-GalNAz、Mn²⁺等杂质。然后将带有叠氮化基团的抗体与带有DBCO接头的小分子载荷(化合物3)按照小分子载荷(化合物3)与抗体的摩尔比为5:1的比例加入进行点击化学反应，抗体的糖偶联反应在22℃恒温摇床振荡条件下进行，反应时间14~16h，完成抗体与小分子载荷(化合物3)的糖偶联。最后通过浓缩换液去除DMSO、TCEP、小分子载荷等工艺引入的杂质。根据质谱信号强度归一化后计算样品的平均DAR值，雷公藤甲素为3.9。

[0343] 实施例27NCG小鼠上NUGC-4人胃癌细胞皮下荷瘤模型中的药效

[0344] 实验动物

[0345] NCG小鼠购自成都药康生物科技有限公司。

[0346] 动物造模

[0347] NUGC-4细胞培养在含1640+10%FBS+1%P/S培养液中。收集指数生长期的NUGC-4细胞，用1640空培养基重悬调节细胞密度至 1×10^8 个/ml，将细胞1ml/支分装入1.5ml EP管中，于冰上备用。细胞重悬在1640空培养基中(总体积0.1mL/只鼠)，实验小鼠于接种前剔除背部右前侧毛发，然后皮下接种 1×10^7 个NUGC-4细胞。每组8只动物。

[0348] 给药方案

[0349] 对动物进行尾静脉注射供试样品(阴性对照：PBS溶液；供试药物：ADC-9组或ADC-10)、ADC-11组)，给药当天记为Day 0，共给药三次(ADC-9/ADC-10组Day 0给药ADC-9，Day21、Day28给药ADC-10)。给药剂量为：Day 0天给药5mg/kg，Day 21、Day 28天分别给药10mg/kg；开始给药后，每周测量两次小鼠

的肿瘤大小。肿瘤体积计算公式： $\text{肿瘤体积}(\text{mm}^3) = 1/2 \times (L \times W^2)$ (其中L表示长径，W表示短径)。肿瘤体积变化结果如图11所示。

[0350] 实施例28结肠癌COLO205细胞皮下荷瘤模型中的药效

[0351] 实验动物

[0352] C-NKG小鼠购自赛业生物科技有限公司。

[0353] 动物造模

[0354] COLO205细胞培养在含1640+10%FBS培养液中。收集指数生长期的COLO205细胞，用1640空培养基重悬，调节细胞密度至 1×10^8 个/ml，将细胞1ml/支分装入1.5ml EP管中，于冰上备用。实验小鼠于接种前剔除背部右前侧毛发，然后皮下接种0.1ml细胞悬液/只鼠，接种密度为 1×10^7 个NCI-H2170细胞/只鼠。每组8只动物。

[0355] 给药方案

[0356] 对动物进行尾静脉注射供试样品(阴性对照：PBS溶液；供试药物：ADC9组、ADC11组)，给药当天记为D0，共给药四次(Day 0, Day 7, Day 14, Day 21)。给药剂量为：Day 0天给药10mg/kg、Day 7、Day 14天分别给药5mg/kg，Day 21天给药10mg/kg；开始给药后，每周测量两次小鼠的肿瘤大小。肿瘤体积计算公式： $\text{肿瘤体积}(\text{mm}^3) = 1/2 \times (L \times W^2)$ (其中L表示长径，W表示短径)。肿瘤体积变化结果如图12A所示。

[0357] 给药后31天，将ADC 9组动物平均分为两组，分别给与ADC-10与ADC-11，剂量为10mg/kg。其肿瘤体积变化如图12B所示。从图中可以看出，肿瘤对ADC-9已产生耐药能力，分组给药后ADC-11组能压制肿瘤生长，产生明显的肿瘤生长抑制效果，ADC-10组仍然无法压制肿瘤生长。

[0358] 实施例29肺鳞癌NCI-H2170细胞皮下荷瘤模型中的药效

[0359] 实验动物

[0360] C-NKG小鼠购自赛业生物科技有限公司。

[0361] 动物造模

[0362] NCI-H2170细胞培养在含1640+20%FBS培养液中。收集指数生长期的NCI-H2170细胞，用1640空培养基重悬，调节细胞密度至 1×10^8 个/ml，将细胞1ml/支

分装入1.5ml EP管中，于冰上备用。实验小鼠于接种前剔除背部右前侧毛发，然后皮下接种0.1mL细胞悬液/只鼠，接种密度为 1×10^7 个NCI-H2170细胞/只鼠。每组8只动物。

[0363] 给药方案

[0364] 对动物进行尾静脉注射供试样品(阴性对照：PBS溶液；供试药物：ADC-9组、ADC-11组、ADC-12)，给药当天记为D0，共给药2次(Day 0, Day 10)。给药剂量为：5mg/kg；开始给药后，每周测量两次小鼠的肿瘤大小。肿瘤体积计算公式：肿瘤体积(mm^3) = $1/2 \times (L \times W^2)$ (其中L表示长径，W表示短径)。肿瘤体积变化结果如图13A所示。

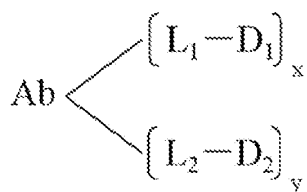
[0365] 首次给药后21天将原ADC-9组16只小鼠按肿瘤体积平均分为两组，分别给与ADC-10与ADC-11，每周一次频率给药10mg/kg，PBS组和原ADC-11组也继续给药，每周一次频率给药10mg/kg。其肿瘤体积变化如图13B所示。从图中可以看出，每周一次频率给药条件下，ADC-10对肿瘤生长无显著抑制作用，ADC-11组能够显著减小肿瘤。

权利要求书

[权利要求 1] 雷公藤甲素和喜树碱类药物的组合在制备用于治疗肿瘤疾病的药物中的应用。

[权利要求 2] 根据权利要求1所述的应用，其特征在于，雷公藤甲素和喜树碱类药物共同作为抗体药物偶联物中的毒素。

[权利要求 3] 一种包含双毒素的抗体药物偶联物，其具有式：



其中，Ab是抗体或其抗原结合片段；

D₁和D₂选自雷公藤甲素或喜树碱类药物，并且D₁、D₂不相同；

L₁和L₂为连接单元；

x, y为0-8。

[权利要求 4] 根据权利要求3所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述L₁与Ab通过巯基或酰胺基团相连。

[权利要求 5] 根据权利要求3或4所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述L₂与Ab通过糖基相连。

[权利要求 6] 根据权利要求3至5中任一项所述的抗体药物偶联物，其特征在于：

所述L₁具有[H₁-L_{1a}-L_{1b}-L_{1c}-D₁]_x所示结构；

所述L₂具有[H₂-L_{2a}-L_{2b}-L_{2c}-D₂]_y所示结构；

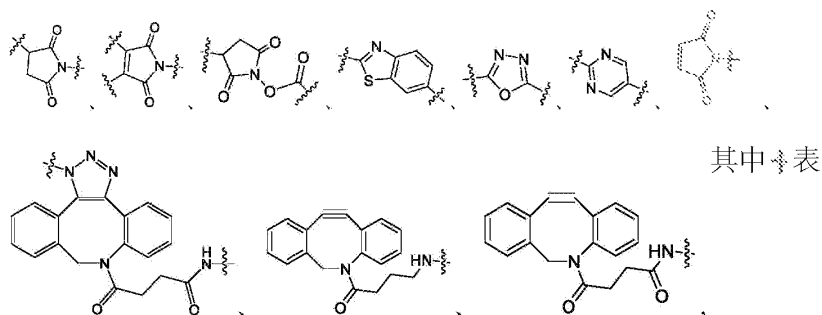
H₁和H₂是与Ab的接头部位或者能够与Ab进行反应的基团；

L_{1a}是连接H₁和L_{1b}之间的连接单元，L_{2a}是连接H₂和L_{2b}之间的连接单元；

L_{1b}是连接L_{1a}和L_{1c}之间的连接子，L_{2b}是连接L_{2a}和L_{2c}之间的连接子；

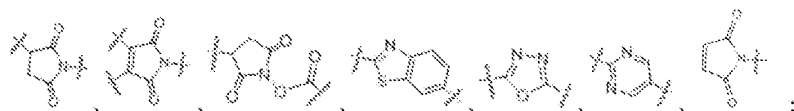
L_{1c}是L_{1b}和D₁之间的间隔子，L_{2c}是L_{2b}和D₂之间的间隔子。

[权利要求 7] 根据权利要求6所述的体药物偶联物，其特征在于，所述H₁和H₂选自：

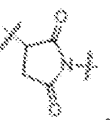


示连接位点。

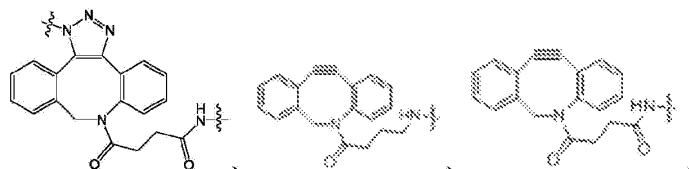
[权利要求 8] 根据权利要求7所述的体药物偶联物，其特征在于，所述H₁选自：



优选地，所述H₁为



[权利要求 9] 根据权利要求7所述的体药物偶联物，其特征在于，所述H₂选自：



[权利要求 10] 根据权利要求6至9中任一项所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述L_{1a}或L_{2a}包含-L_d-C(O)-，其中L_d选自任选取代的亚烷基、任选取代的聚乙二醇基、任选取代的亚烯基、任选取代的亚炔基、任选取代的亚脂肪环基、任选取代的亚脂肪杂环基、任选取代的亚芳基、任选取代的亚杂芳基或它们的组合，优选地，L_d选自任选取代的C₁₋₃₀亚烷基、任选取代的聚乙二醇基、任选取代的C₂₋₃₀亚烯基、任选取代的C₂₋₃₀亚炔基、任选取代的C₃₋₃₀亚脂肪环基、任选取代的

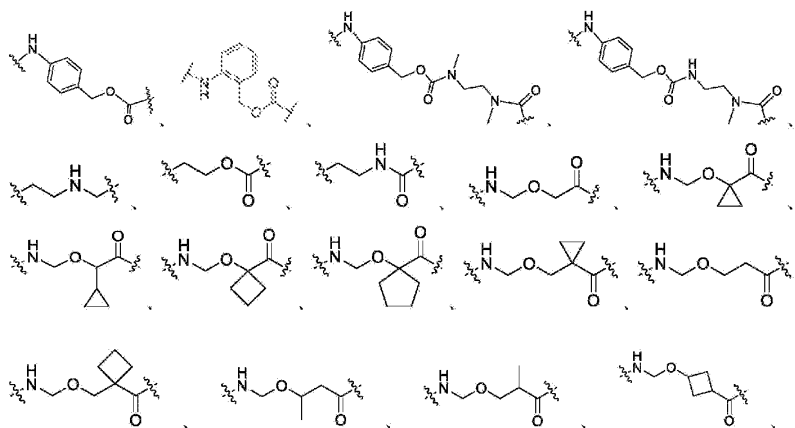
C₁₋₃₀亚脂肪杂环基、任选取代的C₆₋₃₀亚芳基、任选取代的C₅₋₃₀亚杂芳基或它们的组合。

[权利要求 11] 根据权利要求10所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述L_d选自-(CH₂)_m-、-(PEG)_n-或-(CH₂)_m-(PEG)_n-(CH₂)_z，其中m，n，z为0-10的整数，优选地，m，n，z为0-8的整数。

[权利要求 12] 根据权利要求6至11中任一项所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述L_{1b}或L_{2b}为可裂解的连接子或不可裂解的连接子。

[权利要求 13] 根据权利要求12所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述L_{1b}或L_{2b}为可裂解的2-10个氨基酸组成的肽链；优选地，所述L_{1b}或L_{2b}选自Gly-Gly-Phe-Gly、Val-Cit、Val-Ala、Val-Lys、Val-Arg、AcLys-Val-Cit、AcLys-Val-Ala、Phe-Cit、Phe-Ala、Phe-Lys、Phe-Arg、Glu-Val-Ala、Glu-Val-Cit、Ala-Lys、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp-Cit、Ala-Ala-Asn、Ala-Ala-Ala、Ala-Asn、Lys；优选地，所述L_{1b}或L_{2b}选自Gly-Gly-Phe-Gly、Val-Cit、Val-Ala、Val-Lys、Phe-Cit、Phe-Ala、Phe-Lys、Ala-Ala-Asn。

[权利要求 14] 根据权利要求6至13中任一项所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述L_{1c}或L_{2c}选自：



优选地, 所述L_{1c}选自

其中 $\ast$ 表示连接位点。

于, 所述L₁-D₁为

其中

L_{1b}为Gly-Gly-Phe-Gly、Val-Cit或Val-Ala；

 L_{1c} 为

或

D₁为雷公藤甲素或喜树碱类药物。

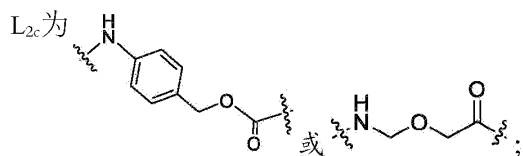
于, 所述L₂-D₂为

其中：

THE

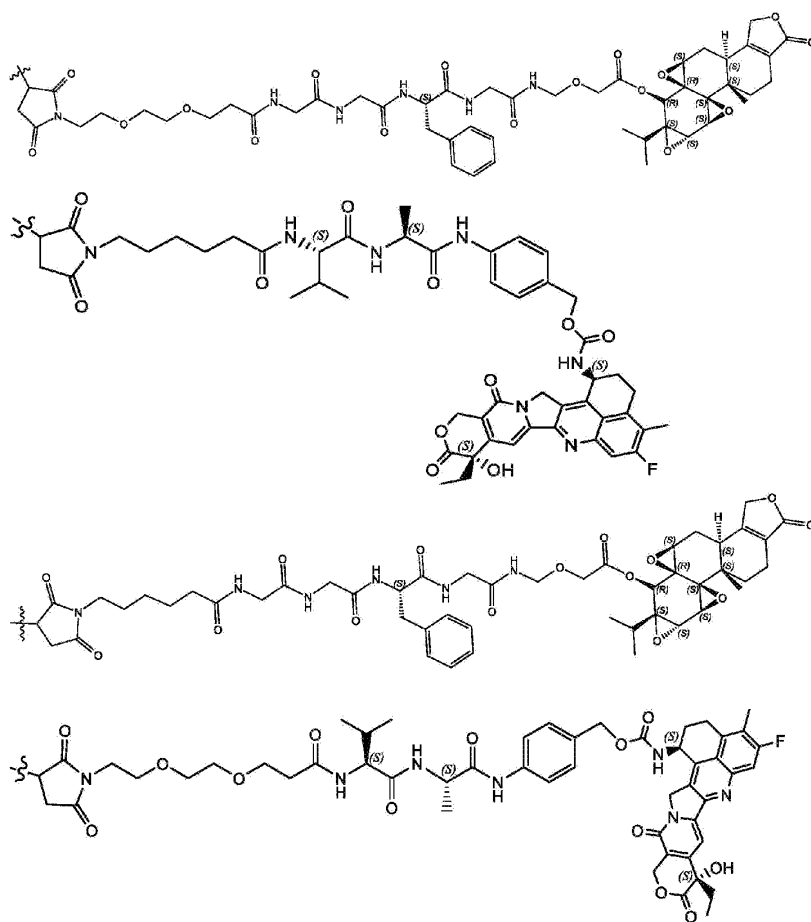
L_{2a} 为 $-(\text{PEG})_{n_2}-(\text{CH}_2)_{z_2}-\text{C}(\text{O})-$, 其中 n_2 、 z_2 为2-8的整数;

L_{2b}为Gly-Gly-Phe-Gly、Val-Cit或Val-Ala;



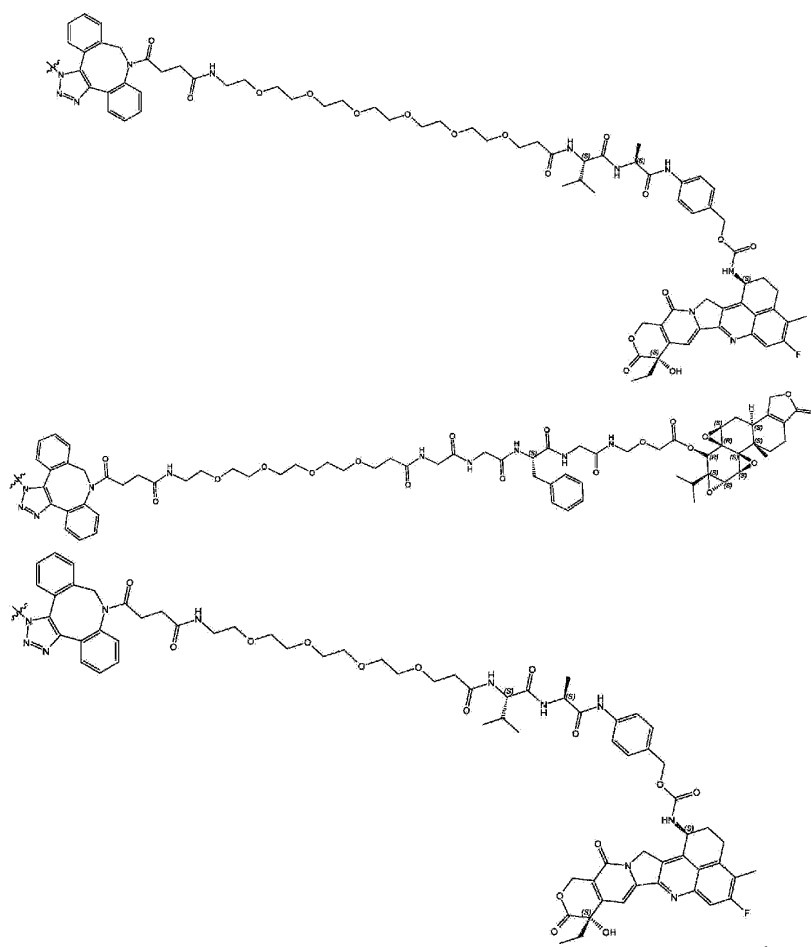
D_2 为雷公藤甲素或喜树碱类药物。

- [权利要求 17] 根据权利要求15所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述 L_{1a} 为 $-(CH_2)_{m1}-C(O)-$ ，其中 m_1 为2-6的整数，优选为5；或者 L_{1a} 为 $-(PEG)_{n1}-(CH_2)_{z1}-C(O)-$ ，其中 n_1 、 z_1 为2-6的整数，优选 n_1 、 z_1 为2。
- [权利要求 18] 根据权利要求16所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述 L_{2a} 为 $-(PEG)_{n2}-(CH_2)_{z2}-C(O)-$ ，其中 n_2 、 z_2 为2-6的整数；或者 L_{1a} 为 $-(PEG)_{n1}-(CH_2)_{z1}-C(O)-$ ，其中 n_1 、 z_1 为2-6的整数，优选 n_2 为4-6的整数， z_2 为2。
- [权利要求 19] 根据权利要求3所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述 D_1 为雷公藤甲素， D_2 为喜树碱类药物。
- [权利要求 20] 根据权利要求3所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述 D_1 为喜树碱类药物， D_2 为雷公藤甲素。
- [权利要求 21] 根据权利要求3至20中任一项所述的抗体药物偶联物，其特征在于，喜树碱类药物为喜树碱、依喜替康、拓扑替康、SN38或其衍生物；优选地，所述喜树碱类药物为依喜替康。
- [权利要求 22] 根据权利要求3所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述 x 选自2-8，优选3-5； y 选自3-4。
- [权利要求 23] 根据权利要求3至14中任一项所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述 L_1-D_1 选自：



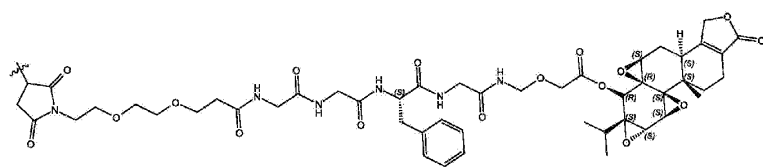
[权利要求 24]

根据权利要求3至14中任一项所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述L₂-D₂选自：

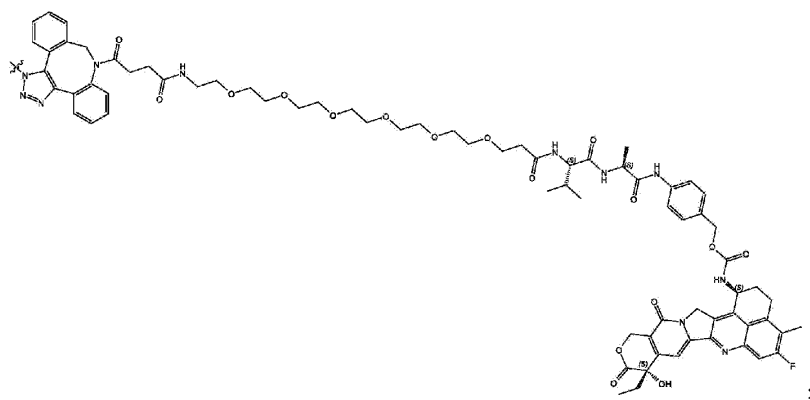


[权利要求 25]

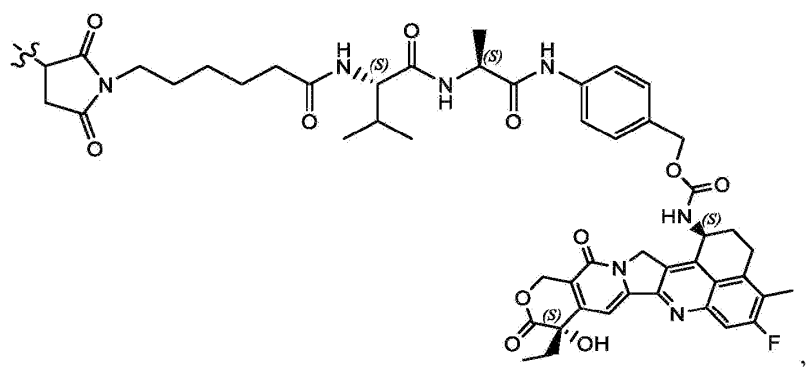
根据权利要求3至14中任一项所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述 L_1-D_1 为：



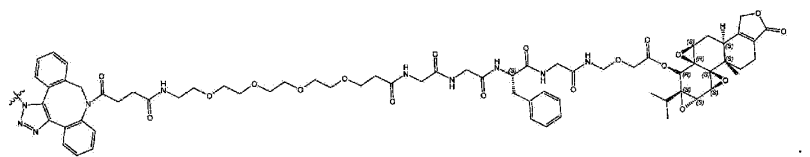
L_2-D_2 为：



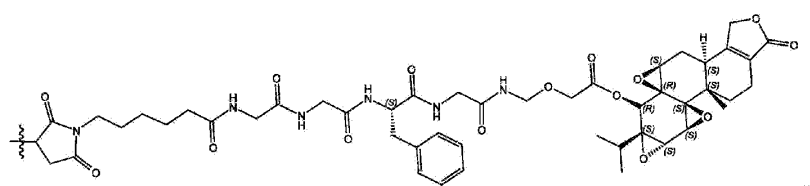
或者所述 L_1-D_1 为:



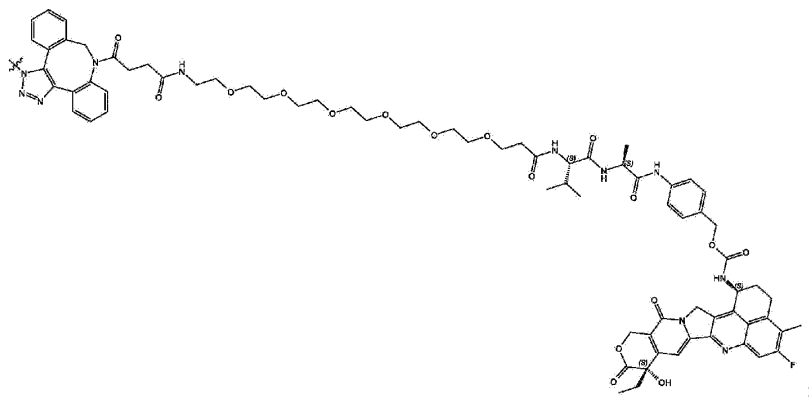
L_2-D_2 为:



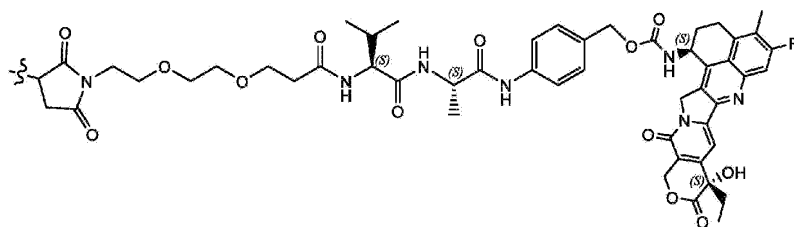
或者所述 L_1-D_1 为:



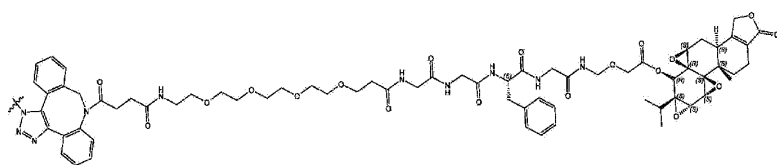
L_2-D_2 为:



或者所述L₁-D₁为:



L₂-D₂为:



[权利要求 26]

根据权利要求3至25中任一项所述的抗体药物偶联物, 其特征在于, 所述L₂通过寡糖与抗体相连接。

[权利要求 27]

根据权利要求3至26中任一项所述的抗体药物偶联物, 其特征在于, 所述抗体或抗原结合片段结合选自以下的一种或多种: 碳酸酐酶IX、 α -胎蛋白、 α -辅肌动蛋白、A3、A33、ART 4、B7、B7 H3、B7H4、BAGE、BrE3抗原、CA125、CAMEL、CAP"、CASP -8/m、CCL19、CCL21、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11A、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD5

2、CD54、CD55、CD59、CD64、CD66a-e、CD67、CD70、CD70L、CD74、CD79a、CD80、CD83、CD95、CD126、CD132、CD133、CD138、CD147、CD154、CDC27、CDK-4、CDKN2A、HIF- $I\alpha$ 、结肠特异性抗原p(CSAp)、CEA、CEACAM5、CEACAM6、oMet、DAM、EGFR、EGFRvIII、cMet、EGP-1(Trop-2)、EGP-2、ELF2-M、Ep-CAM、Her2、Her3、Claudin 18.2、ROR1、ROR2、dll3、marcl7、纤维母细胞生长因子(FGF)、Flt-1、Flt-3、叶酸受体、G250抗原、GAGE、gp100、GRO- β 、HLA-DR.HML24、HMGB-1、HSP70-2M、IGF-1R、IGR1R、MAGE、MAGE-3、MART-1、MART-2、NY-ESO-1、TRAG3、mCRP、MCP-1、MIP-1A、MIP-1B、MIF、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5ac、MUC13、MUC16、MUM-1/2、MUM-3、NCA66、NCA95、NCA90、胰腺癌黏蛋白、PD-1受体、PD-L1受体、胎盘生长因子、PLAGL2、前列腺酸性磷酸酶、PSA、PRAME、PSMA、P1GF、ILGF、ILGF-1R、RS5、RANTES、T101、SAGE、S100、存活素、存活素-2B、TAG、TAG-72、腱生蛋白、TRAIL受体、Tn抗原、ED-B、WT-1、17-1A抗原；优选地，所述抗体或抗原结合片段结合选自Her2、Her3、B7H3、Claudin 18.2、DLL-3或EGP-1(Trop-2)中的一种或多种；以及

优选地，所述抗体或抗原结合片段选自epratuzumab、veltuzumab、sacituzumab、patritumab、trastuzumab、pertuzumab、abciximab、alemtuzumab、cetuximab、gemtuzumab、ibritumomab、panitumumab、rituximab、tositumomab、abagovomab、atlizumab、benralizumab、obinituzumab、basiliximab、dadizumab、efalizumab、muromomab、natlizumab、omalizumab、gaiitenemmab、solanezumab、tisotumab、brentuximab、inotuzumab、moxetumomab、polatuzumab、enfortumab、belantamab、cetuximab、loncastuximab、daratumumab、nimotuzumab、zolbetuximab、omburtamab、rovalpituzumab；更优选地，所述抗

体或抗原结合片段选自sacituzumab、daratumumab、zolbetuximab、omburtamab、patritumab、rovalpituzumab。

[权利要求 28]

根据权利要求3至27中任一项所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述抗体或抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，其中重链可变区包括三个互补决定区HCDR1-3，分别包含SEQ ID NO：1-3所述的氨基酸序列；其中轻链可变区包括三个互补决定区LCDR1-3，分别包含SEQ ID NO：4-6所述的氨基酸序列；优选地，所述抗体或其抗原结合片段重链可变区包含SEQ ID NO：7所述的氨基酸序列，轻链可变区包含SEQ ID NO：8所述的氨基酸序列；更优选地，所述抗体或其抗原结合片段重链包含SEQ ID NO：9所述的氨基酸序列，轻链包含SEQ ID NO：10所述的氨基酸序列。

[权利要求 29]

根据权利要求3至27中任一项所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述抗体或抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包括三个互补决定区HCDR1-3，分别包含SEQ ID NO：11-13所述的氨基酸序列；其中轻链可变区包括三个互补决定区LCDR1-3，分别包含SEQ ID NO：14-16所述的氨基酸序列；优选地，所述抗体或其抗原结合片段重链可变区包含SEQ ID NO：17所述的氨基酸序列，轻链可变区包含SEQ ID NO：18所述的氨基酸序列；更优选地，所述抗体或其抗原结合片段重链包含SEQ ID NO：19所述的氨基酸序列，轻链包含SEQ ID NO：20所述的氨基酸序列。

[权利要求 30]

根据权利要求3至29中任一项所述的抗体药物偶联物，其特征在于， $x+y \geq 4$ ，优选 $4 \leq x+y \leq 9$ ，更优选地， $7 \leq x+y \leq 8$ 。

[权利要求 31]

一种药物组合物，其特征在于，所述药物组合物包含权利要求3至30中任一项所述的抗体药物偶联物，和药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。

- [权利要求 32] 权利要求3至30中任一项所述的抗体药物偶联物在制备用于治疗 and/或预防肿瘤的药物中的用途；优选地，所述肿瘤选自与以下分子中的一种或多种表达相关的肿瘤：Trop-2、Her2、Her3、B7H3、Claudin 18.2、CD30、CD38、CD33、CD70和EGFR；优选地，所述肿瘤包含实体肿瘤或血液肿瘤；更优选地，所述肿瘤选自：肺癌、肾癌、尿道癌、结肠直肠癌、前列腺癌、多形性成胶质细胞瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、黑色素瘤、肝癌、膀胱癌、胃癌、白血病、恶性淋巴瘤、宫颈癌、鳞状细胞癌、阴茎癌、食道癌、唾液腺癌。
- [权利要求 33] 用于治疗肿瘤疾病的权利要求3至30中任一项所述的抗体药物偶联物。
- [权利要求 34] 根据权利要求33所述的抗体药物偶联物，其中雷公藤甲素和喜树碱类药物共同作为所述抗体药物偶联物中的毒素。
- [权利要求 35] 治疗个体中肿瘤疾病的方法，其包括给予所述个体权利要求3至30中任一项所述的抗体药物偶联物或权利要求31所述的药物组合物，优选地，所述肿瘤选自与以下分子中的一种或多种表达相关的肿瘤：Trop-2、Her2、Her3、B7H3、Claudin 18.2、CD30、CD38、CD33、CD70和EGFR；优选地，所述肿瘤包含实体肿瘤或血液肿瘤；更优选地，所述肿瘤选自：肺癌、肾癌、尿道癌、结肠直肠癌、前列腺癌、多形性成胶质细胞瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、黑色素瘤、肝癌、膀胱癌、胃癌、白血病、恶性淋巴瘤、宫颈癌、鳞状细胞癌、阴茎癌、食道癌、唾液腺癌。