

## 抗体偶联药物、其制备方法及应用

本申请要求申请日为 2023 年 8 月 21 日的中国专利申请 2023110584395 的优先权，本申请引用上述中国专利申请的全文。

5

## 技术领域

本发明涉及生物医药技术领域，具体涉及一种抗体偶联药物、其制备方法及应用。

## 技术背景

10 抗体偶联药物 (Antibody drug conjugate or ADC) 是一种新型、有效的靶向药物，由抗体、连接子和毒素三部分组成。其中，毒素 (payload)，是发挥药效的关键成分，抗体是发挥靶向作用的关键部分，而连接子不仅仅将两者连接在一起，也影响 ADC 的稳定性，药物的释放机制，和抗体的偶联方式等。理想的 payload 既能杀死靶向肿瘤细胞，又能杀死肿瘤非靶向 (没有靶向抗原) 的肿瘤细胞，即旁杀效应，而对正常细胞组织 (没有靶抗原) 不产生毒性。理想的 linker 需要在循环系统中稳定，到达肿瘤微环境或肿瘤细胞 (内吞) 即释放 payload 从而对肿瘤细胞

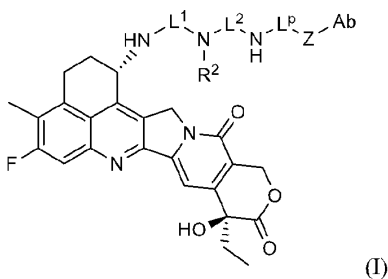
15

或肿瘤微环境的细胞进行杀伤。  
依喜替康及其衍生物是一类有效的 DNA 拓扑异构酶 I 抑制剂，其作为 payload 已经在 HER2 阳性的肿瘤治疗领域获得了很好的效果。开发更多以依喜替康为 payload 的具有抗肿瘤活性的药物偶联物具有重要意义。

## 发明内容

20 本发明提供一种由稳定的连接子和 TOP1 异构酶抑制剂连接而成的低毒抗体偶联药物，其对实体瘤的生长具有较好的抑制效果。

本发明的一方面，提供一种式(I)所示的抗体-药物偶联物：



(I)

式中，

25  $R^2$  选自氢、氟、 $C_1$ - $C_6$  烷基、 $C_1$ - $C_6$  烷氧基、酰基、磺酰基；

$L^1$  选自  $-L^{11}-L^{12}-L^{13}-$ ；其中， $L^{11}$ 、 $L^{12}$ 、 $L^{13}$  各自独立地选自不存在、 $-C(=O)-$ 、 $C_1$ - $C_2$  亚烷基或  $C_1$ - $C_2$  亚烷基- $O-$ ，条件是，当  $L^{11}$  为  $-C(=O)-$  时， $R^2$  不为氢；

$L^2$  选自  $C_1$ - $C_6$  亚烷基或  $C_1$ - $C_6$  酰基，所述  $C_1$ - $C_6$  亚烷基或  $C_1$ - $C_6$  酰基任选地被一个或多个  $R^3$  取代；

$R^3$  选自苯基取代或未取代的  $C_1$ - $C_6$  烷基、 $C_1$ - $C_6$  烷氧基；

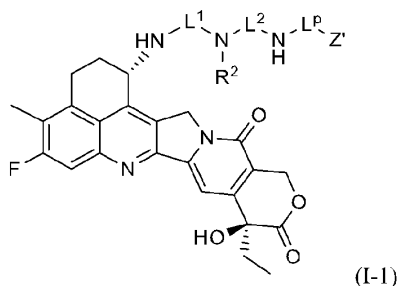
30  $L^3$  为由 1-7 个氨基酸，例如 2-7 个氨基酸构成的肽残基；

$Z$  选自  $-L^4-L^5-$ ，其中， $L^4$  选自不存在、 $-C(=O)-C_1$ - $C_8$  亚烷基、 $-C(=O)-(CH_2CH_2O)_{2-6}-CH_2CH_2NH-$  或  $-C(=O)-(CH_2)_{0-6}-NR^1(CH_2)_{0-6}-$ ； $L^5$  为可偶联抗体的接头；

$R^1$  选自  $-C_1$ - $C_6$  烷基-羧基或  $-C_1$ - $C_6$  烷基-氨基；

Ab 为抗体。

在一实施方案中，所述抗体是将式(I-1)化合物 (payload-linker) 与抗体偶联得到：



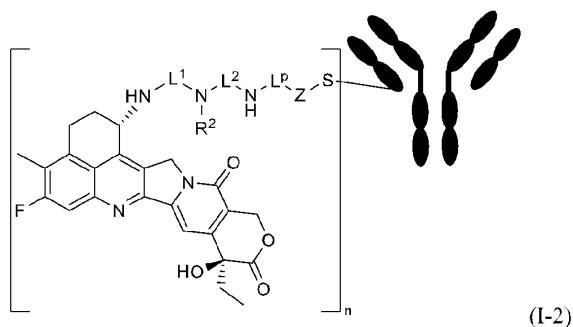
式中， $L^1$ 、 $L^2$ 、 $R^2$ 、 $L^P$  各自定义同式(I)化合物。

5  $Z'$  为与 Z 相适应的可偶联抗体的接头基团。

在一实施方案中， $Z'$  选自 (马来酰亚胺基)、、 和 ；其中， $R^j$  选自卤素，优选为溴或碘。

在一实施方案中， $Z'$  选自马来酰亚胺、溴乙酰基或碘乙酰基。

在一实施方案中，如式(I-2)所示，抗体和 payload-linker 的连接位点为抗体链间的二硫键被还原、打开后的半胱氨酸的巯基。



其中， 表示抗体。

在一实施方案中，Payload-linker 和抗体半胱氨酸的连接方式为通过溴乙酰接头基团中的溴原子被抗体链间的巯基取代或通过马来酰亚胺结构的接头基团进行 Michael 加成偶联。

15 在一实施方案中， $R^2$  选自氢、氘、 $C_1$ - $C_3$  烷基、 $C_1$ - $C_3$  烷氧基、 $-C(=O)C_1$ - $C_3$  烷基或  $-S(=O)_2C_1$ - $C_3$  烷基；

优选地， $R^2$  选自氢、氘、甲基、乙基、甲氧基、乙氧基、甲酰基、乙酰基、甲磺酰基或乙磺酰基；

优选地， $R^2$  选自氢、甲基、甲氧基、甲酰基或甲磺酰基。

在一实施方案中， $L^{11}$ 、 $L^{12}$ 、 $L^{13}$  各自独立地选自不存在、 $-C=O-$ 、 $-CH_2-$ 、 $-CH_2O-$  或  $-OCH_2-$ ；

优选地， $L^1$  选自  $-C(=O)CH_2OCH_2-$ 、 $-C(=O)CH_2O-$ 、 $-C(=O)CH_2$  或  $-CH_2-$ ；

20 优选地， $L^2$  选自  $C_1$ - $C_3$  亚烷基；

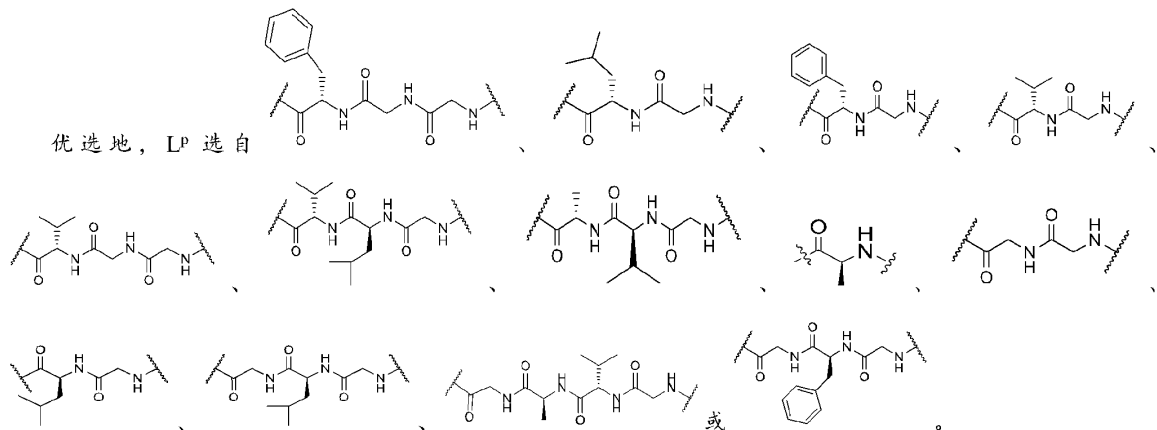
优选地， $L^2$  选自亚甲基、亚乙基。

在一实施方案中，当  $L^1$  为  $-C(=O)CH_2O-$  时， $R^2$  选自  $C_1$ - $C_6$  烷基，优选为  $-C_1$ - $C_3$  烷基，更优选为甲基。

在一实施方案中, 当  $L^1$  为  $-C(=O)CH_2-$  时,  $R^2$  选自  $C_1$ - $C_6$  烷氧基, 优选为  $-C_1$ - $C_3$  烷氧基, 更优选为甲氧基。

在一实施方案中,  $L^p$  选自由 1、2、3 或 4 个选自苯丙氨酸 (Phe)、甘氨酸 (Gly)、缬氨酸 (Val)、丙氨酸 (Ala) 或亮氨酸 (Leu) 的氨基酸构成的肽残基;

5 优选地,  $L^p$  选自 -Val-Cit-、-Gly-Lys-、-Gly-Leu-、-Val-Ala-、-Gly-Phe-、-GLy-Gly-Lys-、-Gly-Gly-Phe-、-Gly-Val-Ala-、-Gly-Ala-、-Gly-Gly-Val-、-Gly-Leu-Val-、-Gly-Phe-Gly-或 -Gly-Gly-Leu-;



在一实施方案中,  $L^1$  选自

; “~” 所示位置表示与抗

10 体相连, “~” 所示位置表示与  $L^2$  基团相连:

优选地,  $L^2$  选自  $-C(=O)-C_1-C_8$  亚烷基、 $-C(=O)-(CH_2CH_2O)_{2-6}-CH_2CH_2NH-$  或  $-C(=O)-(CH_2)_{1-4}-NR^1(CH_2)_2-$ ;

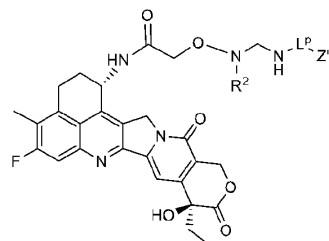
优选地,  $L^2$  选自  $-C(=O)-(CH_2CH_2O)_{2-6}-CH_2CH_2NH-$  或  $-C(=O)-(CH_2)_{1-4}-NR^1(CH_2)_2-$ ;

优选地,  $R^1$  选自  $-C_1$ - $C_3$  烷基-羧基;

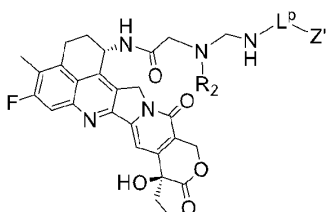
优选地,  $L^2$  选自  $-C(=O)-(CH_2CH_2O)_2-CH_2CH_2NH-$  或

15 优选地,  $Z$  选自

在一实施方案中, 所述抗体-药物偶联物是将式(II)或式(III)化合物与抗体偶联得到:



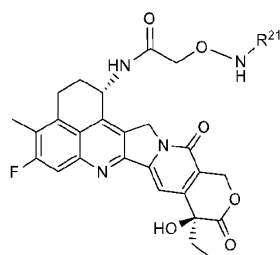
(II)



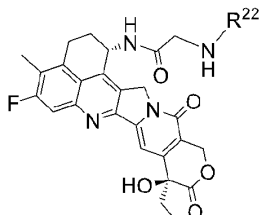
(III)

其中,  $R^2$ 、 $L^p$  各自定义同式(I)化合物,  $Z'$  为与  $Z$  相适应的可偶联抗体的接头基团, 优选为马来酰亚胺、溴乙酰基或碘乙酰基;

20 优选地, 所述抗体-药物偶联物在生理环境下释放以下抗肿瘤化合物:



(II-1)



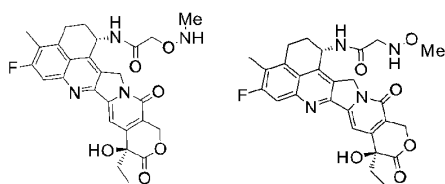
(III-1)

其中,  $R^{21}$  选自  $C_1$ - $C_6$  烷基, 优选为  $-C_1$ - $C_3$  烷基, 更优选为甲基。

$R^{22}$  选自  $C_1$ - $C_6$  烷氧基, 优选为  $-C_1$ - $C_3$  烷氧基, 更优选为甲氧基。

在一实施方案中, 所述生理环境为蛋白酶作用下。

5 优选释放以下抗肿瘤化合物:



在一实施方案中, 所述抗体为肿瘤相关抗原抗体;

优选地, 所述肿瘤相关抗原选自 Her2、Nectin-4、Trop2、5T4、B7H3、ROR1 或 Claudin18.2 中的一种或多种的抗体; 所述抗体可以为单特异性或多特异性抗体。

10 优选地, 所述肿瘤选自乳腺癌、肺癌、结直肠癌、食管癌、胃癌、肺癌、肾癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、头颈癌、胰腺癌或肝癌;

优选地, 所述抗体为 HS627 抗体、IP140B 抗体或 Nectin-4 抗体。

优选地, 所述抗体包含氨基酸序列 SEQ ID NO : 1 或其任何变体的重链, 和氨基酸序列 SEQ ID NO : 2 或其任何变体的轻链;

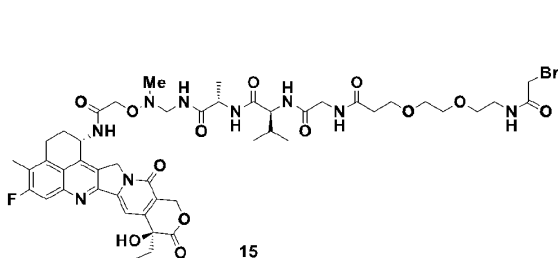
15 优选地, 所述抗体包含氨基酸序列 SEQ ID NO : 3 或其任何变体的重链, 和氨基酸序列 SEQ ID NO : 4 或其任何变体的轻链;

优选地, 所述抗体包含氨基酸序列 SEQ ID NO : 5 或其任何变体的重链, 和氨基酸序列 SEQ ID NO : 6 或其任何变体的轻链。

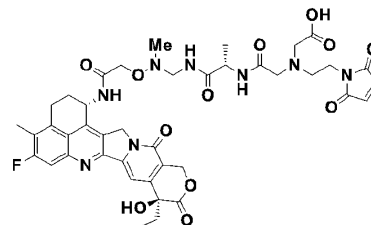
在一实施方案中, 所述抗体-药物偶联物的药物抗体比为 2-8, 进一步优选为 3.5-4.5 或 7.5-8。

20 在一实施方式中, 所述抗体可以是 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4, 优选为 IgG1。

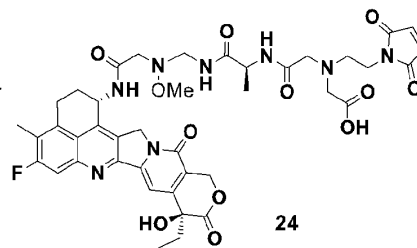
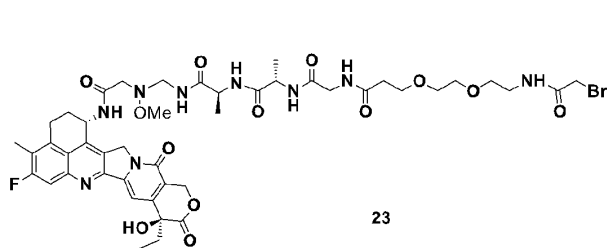
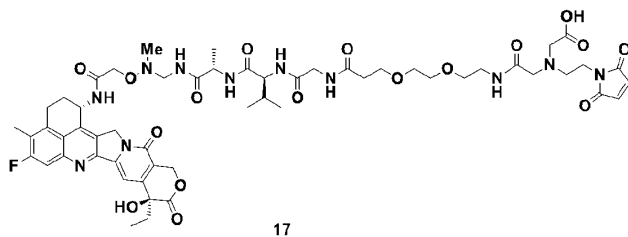
在一实施方案中, 所述抗体-药物偶联物是将以下化合物与抗体偶联得到:



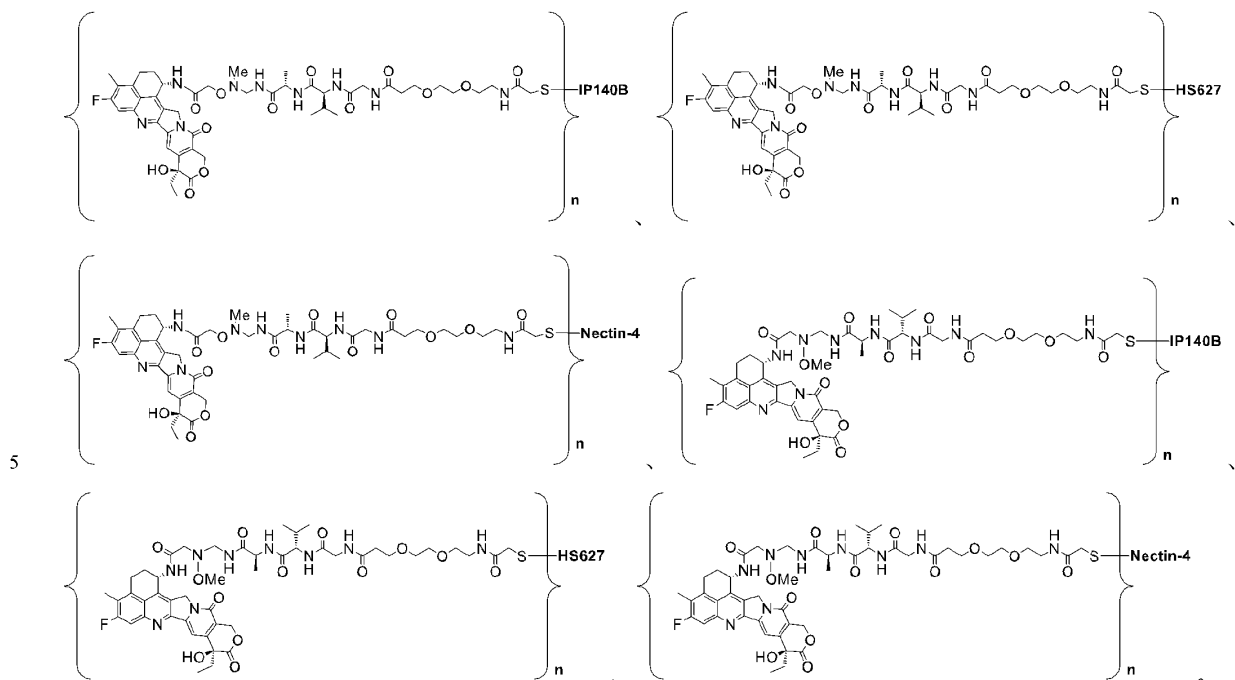
15



16



本发明提供以下抗体-药物偶联物：



其中，n 为所述抗体-药物偶联物的药物抗体比，优选为  $8 \pm 0.5$ 。

本发明的另一方面，提供一种药物组合物，其包括所述的抗体-药物偶联物与药学上可接受的载体。

本发明的另一方面，提供所述的抗体-药物偶联物或所述药物组合物在制备抗肿瘤药物中的用途。

10 本发明的另一方面，提供一种治疗肿瘤疾病的方法，其包括向有需要的患者施用治疗有效量的所述抗体-药物偶联物或所述药物组合物的步骤。

优选地，所述肿瘤为实体瘤。

优选地，所述肿瘤选自乳腺癌、肺癌、结直肠癌、食管癌、胃癌、肝癌、肾癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、头颈癌、胰腺癌或肝癌。

15

#### 附图说明

图 1 示出了实施例 9 中 ADC1 的 DAR 测试结果。

图 2 示出了实施例 9 中 ADC2 的 DAR 测试结果。

图 3 示出了实施例 10 中 ADC3 的 DAR 测试结果。

5 图 4 示出了实施例 11 中 ADC4 的 DAR 测试结果。

图 5 示出了实施例 12 中 ADC5 的 DAR 测试结果。

图 6 示出了实施例 13 中 ADC6 的 DAR 测试结果。

图 7 示出了实施例 14 中 ADC7 的 DAR 测试结果。

图 8 示出了测试例 1 中 BXPC-3 模型肿瘤生长曲线图。

10 图 9 示出了测试例 1 中 BXPC-3 模型解剖后肿瘤照片。

图 10 示出了测试例 1 中 NCI-H1975 模型肿瘤生长曲线图。

图 11 示出了测试例 1 中 NCI-H1975 模型解剖后肿瘤照片。

图 12 示出了测试例 1 中 MDA-MB-231 模型肿瘤生长曲线图。

图 13 示出了测试例 1 中 MDA-MB-231 模型解剖后肿瘤照片。

15 图 14 示出了测试例 1 中 KYSE-150 模型肿瘤生长曲线图。

图 15 示出了测试例 1 中 KYSE-150 模型解剖后肿瘤照片。

图 16 示出了测试例 2 中食蟹猴第 1、3、4 次 (Day 1、38、52) 静脉注射 22、35 mg/kg 的 ADC5 后, 食蟹猴血清中 ADC5-TAB 个体药时曲线图。

20 图 17 示出了测试例 2 中食蟹猴第 3 次 (Day 38, 左边) 和第 4 次 (Day 52, 右边) 静脉注射 ADC5 @35 mg/kg 血浆中毒素分子个体药时曲线图。

图 18 示出了测试例 2 中食蟹猴静脉注射 ADC5 后, 血清中 ADC5 (ADC 药物) 和 ADC5-TAB (总抗) 药物-时间曲线图。

图 19 示出了测试例 2 中食蟹猴静脉注射 ADC5 后, 血清中 payload (游离毒素分子) 的药物-时间曲线图。

#### 25 具体实施方式

##### I. 定义

在本发明中, 除非另有说明, 否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且, 本文中所用的相关术语和实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的术语和常规步骤。同时, 为了更好地理解本发明, 下面提供相关术语的定义和解释。

30 如本文使用的和除非另作说明, 术语“约”或“大约”是指在给定值或范围的加或减 10% 之内。在需要整数的情况下, 该术语是指在给定值或范围的加或减 10% 之内、向上或向下舍入到最接近的整数。

在本文的描述中, 涉及到“一些实施例”、“一些实施方式”或“一些实施方案”, 其描述了所有可能实施例的子集, 但是可以理解, “一些实施例”可以是所有可能实施例的相同子集或不同子集, 并且可以在不冲突的情况下相互结合。

35 如本文使用的和除非另作说明, 术语“包含”, “包括”, “具有”, “含有”, 包括其语法上的等同形式, 通常应当理解为开放式且非限制性的, 例如, 不排除其他未列举的要素或步骤。

如本文所用, 术语“烷基”指直链或支链饱和脂肪族烃基基团, 其包含 1 到 20 个碳原子。术语“C<sub>1-6</sub> 烷基”指具有 1 到 6 个碳原子的直链或支链烷基, 更优选是 C<sub>1-4</sub> 烷基, 最优选是 C<sub>1-3</sub> 烷基。烷基具体实例包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、仲丁基、正戊基、1,1-二甲基丙基、1,2-二甲基丙基、2,2-二甲基丙基、1-乙基丙基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、正己基、1-乙基-2-甲基丙基、1,1,2-三甲基丙基、1,1-二甲基丁基、1,2-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、1,3-二甲基丁基、2-乙基丁基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、4-甲基戊基、2,3-二甲基丁基, 及其各种支链异构体等。

术语“烷氧基”指-O-(烷基)和-O-(非取代的环烷基)，其中烷基的定义如上所述。烷氧基的非限制性实例包括：甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基、环丙氧基、环丁氧基、环戊氧基、环己氧基。烷氧基可以是任选取代的或非取代的，当被取代时，取代基优选为一个或多个以下基团，其独立地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、氨基、硝基、氯基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基、羧基或羧酸酯基。

“”是指化学键连接处。需要说明的是，本发明所记载的结构片段（例如-L<sup>11</sup>-L<sup>12</sup>-L<sup>13</sup>-或-L<sup>2</sup>-L<sup>1</sup>-），在无特别说明的时候，代表由左到右的顺序连接相应基团，例如当-L<sup>12</sup>-为C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>亚烷基-O-时，其表示C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>亚烷基-O-的左侧连接-L<sup>11</sup>-，右端连接-L<sup>13</sup>-。

可以理解地，本申请的抗体-药物偶联物中，例如式(I)中，药物-连接子片段与抗体之间的“-”意欲表示抗体与该片段的连接关系，不欲限定为一个抗体连接一个药物-连接子片段。本领域公知，一个抗体上由于存在多个连二硫键，因此一个抗体可以连接一个或多个药物。

如本文所用，术语“取代的”是指特定原子上的任意一个或多个氢原子被取代基取代，可以包括重氢和氢的变体，只要特定原子的价态是正常的并且取代后的化合物是稳定的。当取代基为氧代基(即=O)时，意味着两个氢原子被取代。氧代基取代不会发生在芳香基上。术语“任选取代”或“任选被取代的”是指可以被取代，也可以不被取代，除非另有规定，取代基的种类和数目在化学上可以实现的基础上可以是任意的。

虽然未出现“任选被取代的”的术语，但若环(例如脂肪环或芳香环)上出现任意位置的取代，那么应当理解的是取代其的位置和数目是任意的，只要在化学上可以实现。

如本文所用，术语“抗体”被用于最宽泛的含义，具体涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、携带一个或多个CDR或源自CDR序列的抗体片段或合成多肽，只要这些多肽表现出所需的生物活性。抗体(Abs)和免疫球蛋白(Igs)是具有相同结构特征的糖蛋白。“抗体”也可指免疫球蛋白和免疫球蛋白片段，无论天然的或者部分或全部合成(例如重组)产生的，包括其至少包含免疫球蛋白分子的部分可变区的保留全长免疫球蛋白的结合特异性能力的任何片段。因此，抗体包括具有与免疫球蛋白抗原结合结构域(抗体结合位点)同源或基本上同源的结合结构域的任何蛋白。抗体包括抗体片段，例如抗肿瘤干细胞抗体片段。如本文所用，因此术语抗体包括合成抗体、重组产生的抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、人抗体、非人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、胞内抗体以及抗体片段，例如但不限于Fab片段、Fab'片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、Fv片段、二硫键连接的Fv(dsFv)、Fd片段、Fd'片段、单链Fv(scFv)、单链Fab(scFab)、双抗体、抗独特型(抗Id)抗体、或者上述任何抗体的抗原结合片段。本文所提供的抗体包括任何免疫球蛋白类型(例如，IgG、IgM、IgD、IgE、IgA和IgY)、任何类别(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类(例如，IgG2a和IgG2b)的成员(“类型”和“种类”、以及“亚型”和“亚类”在本文中可互换使用)。天然或野生型(即得自未人工操纵的群体成员)抗体和免疫球蛋白通常为约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白，其由两个相同的轻链(L)和两个相同的重链(H)组成。每条重链的一端具有可变结构域(VH)，随后是多个恒定结构域。每条轻链的一端具有可变结构域(VL)，另一端具有恒定结构域。所谓“未人工操纵”意指未经旨在使其含有或表达外来抗原结合分子的处理。野生型可指一个群体中发现的最普遍的等位基因或种类或指得自未操纵动物的抗体，相比较于等位基因或多态型，或得自以某种形式的操纵例如诱变、使用重组方法等改变该抗原结合分子的氨基酸的变体或衍生物。

如本文所用，术语“药物抗体比(DAR)”是指附着在单个单抗上的有效载荷分子(抗肿瘤化合物或药物)的平均数量。

如本文所用，术语“药学可接受的辅料”是指无毒、惰性、固态、半固态的物质或液体灌装剂、稀释剂、封装材料或辅助制剂或任何类型辅料，其与患者相兼容，最好为哺乳动物，更优选为人，其适合将活性试剂输送到目标靶点而不终止试剂的活性。本发明的药物载体和辅料，能够更好地与活性成分配适，制得药物制剂具有符合标准的溶出度、贮藏稳定性和杂质含量等。

通常，本发明的抗体偶联药物可以与一种或多种药用载体形成适合的剂型施用。这些剂型适用于口服、直肠给药、局部给药、口内给药以及其他非胃肠道施用(例如，皮下、肌肉、静脉等)。例如，适合其他非胃肠道给药的剂型包括注射剂等。上述剂型可由本发明的活性成分与一种或多种载体或辅料经由通用的药剂学方法制成。上述的载体需要与本发明的活性成分或其他辅料兼容。

- 5 在本发明的实施方案中，所述药物组合物可以包含以下任意施用方式：口服，喷雾吸入，直肠用药，鼻腔用药，颊部用药，局部用药，非肠道用药，如皮下，静脉，肌内，腹膜内，鞘内，心室内，胸骨内和颅内注射或输入，或借助一种外植储器用药。当口服用药时，本发明的化合物可制成任意口服可接受的制剂形式，包括但不限于片剂、胶囊、水溶液或水悬浮液。片剂使用的载体一般包括乳糖和玉米淀粉，另外也可加入润滑剂如硬脂酸镁。胶囊制剂使用的稀释剂一般包括乳糖和干燥玉米淀粉。水悬浮液制剂则通常是将活性成分与适宜的乳化剂和悬浮剂混合使用。
- 10 如果需要，以上口服制剂形式中还可加入甜味剂、芳香剂或着色剂。本发明的化合物还可以无菌注射制剂形式用药，包括无菌注射水或油悬浮液或无菌注射溶液。可使用的载体和溶剂包括水、林格氏溶液和等渗氯化钠溶液。此外灭菌的非挥发油也可用作溶剂或悬浮介质，如单甘油酯或二甘油酯。

本发明的药物组合物以符合医学实践规范的方式配制、定量和给药。给予本发明的活性成分的“治疗有效量”由要治疗的具体病症、治疗的个体、病症的起因、药物的靶点以及给药方式等因素决定。

- 15 如本文所用，“治疗有效量”是指可对患者(例如人和/或动物)产生功能或活性的且可被人和/或动物所接受的量。
- 如本文所用，“患者”是指一种动物，最好为哺乳动物，更好的人。
- 如本文所用，“治疗”是指减轻、延缓进展、衰减、预防或维持现有疾病或病症(例如癌症)。“治疗”还包括将疾病或病症的一个或多个症状治愈、预防其发展或减轻到某种程度。

## 20 II. 实施例

为了使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚，下面将对本发明作进一步地详细描述，所描述的实施例不应视为对本发明的限制，本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其它实施例，都属于本发明保护的范围。

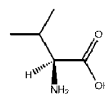
- 对本发明实施例进行进一步详细说明之前，对本发明实施例中涉及的名词和术语进行说明，本发明实施例中涉及的名词和术语适用于如下的解释。

本公开具体实施方式中使用的原料、设备均为已知产品，通过购买市售产品获得。

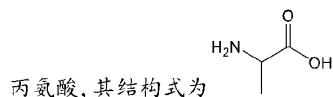
缩写：

- Fmoc: 9-芴基甲氧基羰基；DCM: 二氯甲烷；DMF: N,N-二甲基甲酰胺；THF: 四氢呋喃；HOBT: 1-羟基苯并三唑；EDCI: 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐；DIPEA: 二异丙基乙胺；TFA: 三氟乙酸；HATU: 2-(7-氯杂苯并三唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐；DIC: N,N'-二异丙基碳二亚胺；NHS: N-羟基丁二酰亚胺；

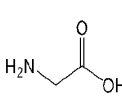
DBU: 1,8-二偶氮杂双螺环[5.4.0]十一-7-烯；DMA: N,N-二甲基苯胺。Val: 缬氨酸，其结构式为



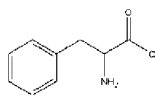
；Ala:



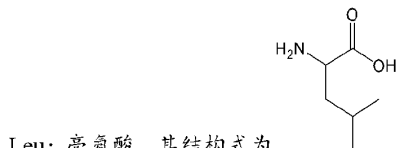
；Gly: 甘氨酸，其结构式为



；Phe: 苯丙氨酸，其结构式为



；



。所述肽残基 L<sup>p</sup> 可通过本领域公知的氨基酸缩合方法得到，本发明对此不做特

别限定。

本发明中，抗体和用于连接抗体的接头 Lj 可以通过本领域公知的方法连接得到。例如，当 Lj 结构为  (或 ) 时，其可以通过  (或 ) 与抗体上的巯基等可反应基团反应连接得到，本发明对此不做特别限定。

5 测试例 1 中 IgG1 单克隆抗体 (Human IgG1, kappa isotype Control) 购自 Sino-Biological, 货号: HG1K。

本实施例中制备 ADC 使用但不限于 HS627、IP140B 抗体和 Nectin-4 抗体，HS627 抗体重链氨基酸序列如下 (SEQ ID NO: 1)：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTEMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQM  
NSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT  
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK  
10 KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA  
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD  
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

轻链氨基酸序列如下 (SEQ ID NO: 2)：

15 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDF  
ATYYCQQYYIYPYTFGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ  
DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

IP140B 抗体的重链氨基酸序列如下 (SEQ ID NO: 3)：

QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYEMNWVRQAPGKGLEWVSYSISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQM  
20 NSLRAEDTAVYYCAREMQFGWELLGAFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS  
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF  
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK  
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK  
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

25 轻链氨基酸序列如下 (SEQ ID NO: 4)：

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPED  
FAVYYCQQYGSFSGGQTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS  
KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Nectin-4 抗体重链氨基酸序列如下 (SEQ ID NO: 5)：

30 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYNMNWVRQAPGKGLEWVSYSISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLSLQM  
NSLRDEDTAVYYCARAYYYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG  
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD  
TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI  
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS  
35 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

轻链氨基酸序列如下 (SEQ ID NO: 6)：

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISGWLAWYQQKPGKAPKFLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDF

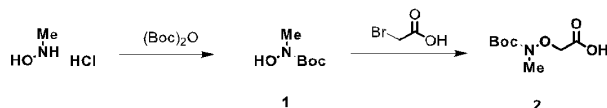
ATYYCQQANSFPPTFGGGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ  
DSKDSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

DAR 值测试与计算：基于 RP-HPLC-MS 测试结果，使用 Waters Acquity UPLC I-Class/Xevo G2-XS QTOF 仪器分析 ADC 的 DAR 值。

- 5 RP-HPLC 参数设置：色谱柱 PLRP-S 1000A 5 $\mu$ m，柱温为 70 $^{\circ}$ C。流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液，流动相 B 为 0.1% 甲酸乙腈溶液，流速为 0.2 mL/min。流动相梯度为 20-50% B，18 分钟；50-95% B，5 分钟；95-20% B，0.1 分钟；20-20% B，6.9 分钟。

- MS 参数参设设置：毛细管电压 2.50 kV，锥孔电压 100 V，质量分析范围 m/z：200 至 4000，MSE 碰撞能量 20 至 45 eV，离子源温度 120 $^{\circ}$ C，雾化温度 500 $^{\circ}$ C，雾化流速 1000 L/Hr，内标为亮氨酸脑啡肽。供试品用样品缓冲液  
10 稀释到 1 mg/mL，加入终浓度为 50 mmol/L 的 TCEP，37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min，进样 5  $\mu$ L。识别轻链峰并计算峰面积百分比，峰面积总和为 100。同样识别重链峰并计算峰面积百分比，峰面积总和为 100。通过峰面积百分比与相应的药物负荷相乘分别计算重链和轻链的加权峰面积。DAR 值计算公式为：DAR=2\* ( $\Sigma$  轻链加权峰面积+ $\Sigma$  重链加权峰面积)/100。

#### 实施例 1：2-(((叔丁氧羰基)(甲基)氨基)氧基)乙酸 (2) 的合成

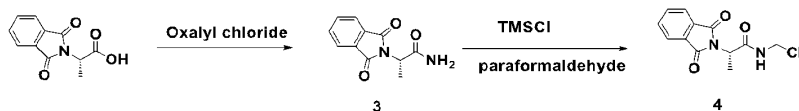


15

- 步骤一：在 300 mL 三口瓶中，依次加入 N-甲基胍盐酸盐 (20 g, 239.5 mmol)，水 (60 mL) 和 THF (60 mL)，冰浴下冷却至 0 $^{\circ}$ C，加入碳酸氢钠 (20.1 g, 239.3 mmol)，缓慢滴入二碳酸二叔丁酯 (47.0 g, 215.3 mmol)，在 0 $^{\circ}$ C 下搅拌 1 h，室温下反应 3 h，用乙酸乙酯萃取 (2 x 50 mL)，合并有机相，用饱和食盐水 (50 mL) 洗涤，用 0.5 N 稀盐酸 (30 mL) 洗涤，再用饱和食盐水 (50 mL) 洗涤，无水硫酸镁干燥，过滤、浓缩得到淡黄色油状液体化合物 1 (33 g，  
20 产率 93.7%，HPLC 纯度 98%)； $^1$ H NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.25 (s, 1H), 3.00 (s, 3H), 1.40 (s, 9H)。

- 步骤二：冰浴冷却下，向 300 mL 的三口瓶中加入 1.5 N 的 NaOH 水溶液 (100 mL)，化合物 1 (10 g, 67.9 mmol)，搅拌下加入溴乙酸 (9.4 g, 67.7 mmol) 水溶液 (50 mL)，在 0 $^{\circ}$ C 搅拌 0.5 h，乙酸乙酯 (2 x 50 mL)，水相用 1 N 的 HCl 调节 pH=2，二氯甲烷萃取 (3 x 50 mL)，饱和食盐水洗涤，无水 MgSO<sub>4</sub> 干燥，过滤、浓缩得到淡黄色油状液体化合物 2 (12 g，产率 86.1%，HPLC 纯度 95%)； $^1$ H NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12.42 (s, 1H), 4.37 (s, 2H), 3.09  
25 (s, 3H), 1.43 (d,  $J$  = 5.8 Hz, 9H)；LCMS: [M-1]<sup>+</sup> 204.12 (理论值：205.10)。

#### 实施例 2：(S)-N-(氯甲基)-2-(1,3-二氧代异吲哚啉-2-基)丙酰胺 (4) 的合成

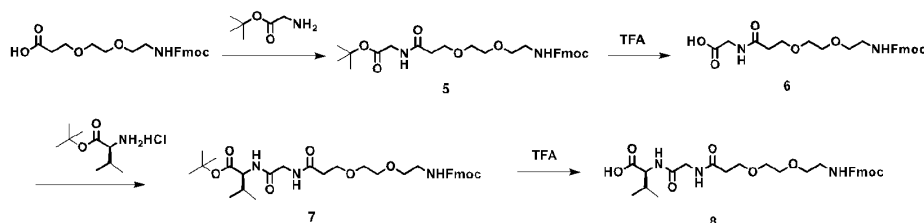


- 步骤一：在 500 mL 单口瓶中，加入邻苯二甲酰丙氨酸 (5 g, 22.8 mmol)，DCM (175 mL)，DMF (100  $\mu$ L)，冰  
30 浴冷却至 0 $^{\circ}$ C，氩气保护下滴加草酰氯 (5.79 g, 45.6 mmol)，在 0 $^{\circ}$ C 下搅拌 1.5 h，浓缩，粗品溶于 DCM (90 mL)，冷却至 0 $^{\circ}$ C，滴加 7 M 的氯甲醇溶液 (9.78 mL, 69.1 mmol) 室温搅拌反应 2 h，加入正己烷，过滤，干燥，得到化合物 3 (4.5 g，产率 92%，HPLC 97%)； $^1$ H NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7.84 (d,  $J$  = 4.9 Hz, 3H), 7.63 (s, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.19 (d,  $J$  = 10.6 Hz, 1H), 4.69 (q,  $J$  = 7.2 Hz, 1H), 1.56 (d,  $J$  = 7.3 Hz, 3H)；LCMS: [M+1]<sup>+</sup> 219.05 (理论值：218.07)。

- 步骤二：将化合物 3 (1 g, 4.5 mmol) 溶解在 DCM (10 mL) 中，加入 TMS-Cl (10 mL) 和多聚甲醛 (550.4 mg，  
35 18 mmol)，封管，升温至 40 $^{\circ}$ C 反应 1.5 h，冷却后过滤，浓缩得到化合物 4 (1.22 g，产率 100%，HPLC 纯度 96%)；

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.85 (dd,  $J=5.4, 3.1$  Hz, 2H), 7.78-7.72 (m, 2H), 7.19 (s, 1H), 5.23-5.13 (m, 2H), 5.03-4.74 (m, 2H), 1.69 (d,  $J=7.3$  Hz, 3H); LCMS:  $[\text{M}+1]^+$  266.98 (理论值: 266.05)。

### 实施例 3: Fmoc-PEG<sub>2</sub>-Gly-Val (8) 的合成



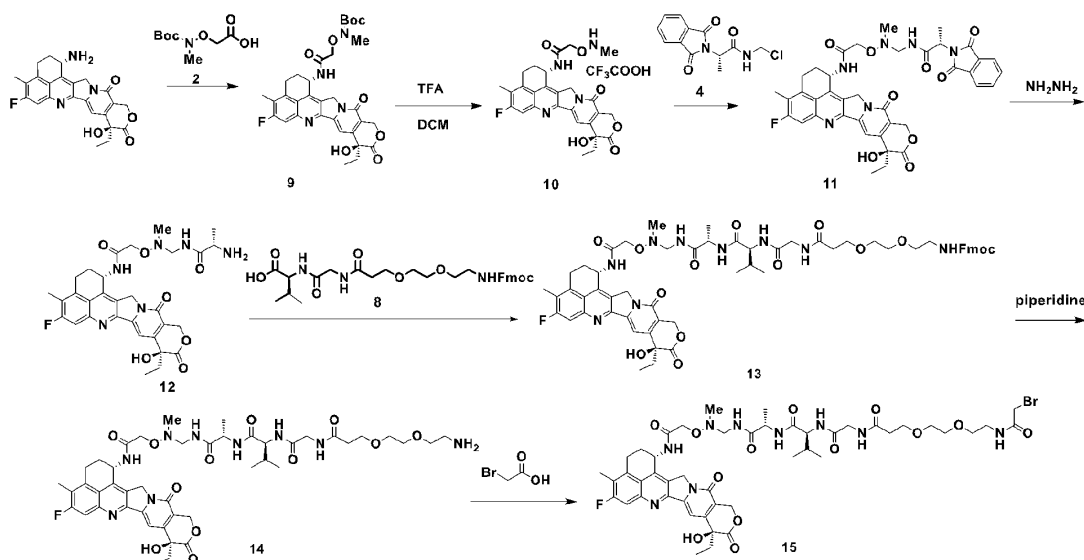
步骤一: 在 1000mL 的单口瓶中, 加入二氯甲烷 (500 mL), 搅拌下, 依次加入 Fmoc-NH-PEG<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-COOH (30 g, 75 mmol), HOBT (12.15 g, 90 mmol), EDCI (17.25 g, 90 mmol), 甘氨酸叔丁酯 (10.32 g, 78.75 mmol), DIPEA (10.16 g, 90 mmol), 室温搅拌反应 2h, 用饱和食盐水, 饱和碳酸氢钠水溶液和 0.5M 盐酸洗涤, 无水硫酸镁干燥, 过滤、浓缩得到化合物 **5** (36.2 g, 产率 94%, HPLC 98%);  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.78-7.67 (m, 2H), 7.60 (d,  $J=7.3$  Hz, 2H), 7.41-7.34 (m, 2H), 7.34-7.24 (m, 2H), 6.78 (s, 1H), 5.60 (s, 1H), 4.45-4.15 (m, 2H), 3.90-4.00 (m, 2H), 3.80-3.33 (m, 10H), 2.90-2.42 (m, 3H), 1.44 (s, 9H); LCMS:  $[\text{M}+1]^+$  513.14 (理论值: 512.25)。

步骤二: 在 1000mL 的单口瓶中, 加入二氯甲烷 (400 mL), 化合物 **5** (36.2 g, 70 mmol), 搅拌均匀后, 滴加三氟乙酸 (100 mL), 室温搅拌反应过夜, 浓缩、得到化合物 **6** (32.2 g, 产率 100%, HPLC 97%);  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.88 (s, 1H), 7.72 (d,  $J=7.4$  Hz, 2H), 7.60-7.50 (m, 2H), 7.40-7.33 (m, 2H), 7.30-7.20 (m, 2H), 7.19 (s, 1H), 5.68 (s, 1H), 7.45-7.33 (m, 2H), 4.45-4.35 (m, 2H), 4.25-4.15 (m, 2H), 4.00 (d,  $J=4.8$  Hz, 1H), 3.69 (t,  $J=5.7$  Hz, 2H), 3.60-3.20 (m, 8H), 2.50 (m, 2H); LCMS:  $[\text{M}+1]^+$  457.08 (理论值: 456.19)。

步骤三: 在 1000mL 的单口瓶中, 加入二氯甲烷 (300 mL), 搅拌情况下, 依次加入化合物 **6** (5 g, 10.87 mmol), HOBT (1.76 g, 13.04 mmol), EDCI (2.5 g, 13.04 mmol), L-缬氨酸叔丁酯盐酸盐 (1.91 g, 11 mmol) 和 DIPEA (2.84 g, 22 mmol), 室温搅拌 2h, 用饱和食盐水, 饱和碳酸氢钠水溶液, 0.5M 盐酸洗涤, 无水硫酸镁干燥, 过滤、浓缩得到化合物 **7** (5.5 g, 产率 82%, HPLC 97%);  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.80-7.70 (m, 2H), 7.61 (d,  $J=7.4$  Hz, 2H), 7.41-7.33 (m, 2H), 7.31-7.25 (m, 2H), 6.97 (d,  $J=8.6$  Hz, 1H), 5.98 (t,  $J=5.4$  Hz, 1H), 4.50-4.36 (m, 3H), 4.21 (t,  $J=7.0$  Hz, 1H), 4.05-3.95 (m, 2H), 3.75-3.65 (m, 1H), 3.64-3.50 (m, 6H), 3.45-3.30 (m, 2H), 2.51 (s, 1H), 2.20-2.10 (m, 1H), 1.43 (s, 9H), 0.90 (m, 6H); LCMS:  $[\text{M}+1]^+$  612.05 (理论值: 611.32)。

步骤四: 在 1000mL 的单口瓶中, 加入二氯甲烷 (50 mL), **7** (5.5 g, 9 mmol), 搅拌下滴加三氟乙酸 (10 mL), 继续搅拌过夜, 浓缩得到化合物 **8** (4.99 g, 产率 100%, HPLC 96%);  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.41 (s, 1H), 7.72 (d,  $J=7.4$  Hz, 2H), 7.64-7.53 (m, 3H), 7.36 (q,  $J=7.7$  Hz, 2H), 7.28 (q,  $J=7.4$  Hz, 2H), 5.90-5.84 (s, 1H), 5.27 (s, 0H), 4.52-4.33 (m, 3H), 4.25-4.13 (m, 1H), 4.14-4.09 (m, 1H), 4.07-4.01 (m, 1H), 3.97 (m, 1H), 3.70 (s, 2H), 3.57 (m, 3H), 3.52 (t,  $J=5.3$  Hz, 2H), 3.41-3.23 (m, 2H), 3.22 (s, 1H), 2.51 (q,  $J=10.5, 5.5$  Hz, 2H), 2.17 (dt,  $J=13.4, 6.6$  Hz, 1H), 0.91 (dd,  $J=18.1, 6.8$  Hz, 5H); LCMS:  $[\text{M}+1]^+$  556.14 (理论值: 555.26)。

### 实施例 4: N-(溴乙酰)-PEG<sub>2</sub>-Gly-Val-Ala-ha-N(Me)-氨基乙酰)依喜替康 (15) 的合成



步骤一：氩气保护下，向 100mL 的三口瓶中依次加入化合物 **2** (5.8 g, 28.3 mmol)，DMF (50 mL)，HATU (10.7 g, 28.2 mmol)，依喜替康甲磺酸盐 (10 g, 18.8 mmol)，DIPEA (6.1 g, 47.2 mmol)，搅拌使溶液溶清，升温至室温反应 6h，倒入 500mL 的冰水中，过滤，滤饼用水冲洗 3 次，滤饼在鼓风干燥箱干燥 (50°C，24h)，得到化合物 **9** (10.5 g，产率 90%，HPLC 89%)；<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.81 (d, *J*=8.6 Hz, 1H), 7.72 (d, *J*=10.7 Hz, 1H), 7.28-7.23 (m, 1H), 6.51 (d, *J*=1.9 Hz, 1H), 5.65-5.59 (m, 1H), 5.40 (d, *J*=3.8 Hz, 2H), 5.23-5.14 (m, 1H), 5.11 (d, *J*=19.0 Hz, 1H), 4.44-4.35 (m, 2H), 3.16 (d, *J*=6.6 Hz, 2H), 3.07 (s, 3H), 2.36-2.31 (m, 3H), 2.23 (dq, *J*=14.6, 5.0 Hz, 2H), 2.19 (s, 2H), 1.85 (m, *J*=21.4, 7.3 Hz, 2H), 1.20 (s, 9H), 0.86 (t, *J*=7.3 Hz, 3H); LCMS: [M+1]<sup>+</sup> 623.45 (理论值: 622.24)。

步骤二：在 250mL 三口瓶中加入 DCM (100 mL)，化合物 **9** (10.5 g, 16.9 mmol)，搅拌、降温至 0°C，滴加 TFA (25 mL)，室温下搅拌反应 3h，浓缩，加入乙酸乙酯/石油醚 (1:1)，过滤、干燥得到化合物 **10** (10 g，产率 93%，HPLC 87%)；<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.87 (d, *J*=8.6 Hz, 1H), 7.78 (d, *J*=10.8 Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 6.42 (s, 0H), 5.75 (s, 1H), 5.60 (dt, *J*=8.7, 4.4 Hz, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.28 (s, 2H), 4.68-4.58 (m, 2H), 3.18 (p, *J*=6.3, 5.4 Hz, 2H), 2.84 (s, 3H), 2.39 (d, *J*=1.8 Hz, 3H), 2.24 (m, *J*=14.0, 4.8 Hz, 1H), 2.15 (m, *J*=10.4, 7.4, 4.4 Hz, 1H), 1.85 (m, *J*=21.4, 7.3 Hz, 2H), 0.86 (t, *J*=7.3 Hz, 3H); LCMS: [M+1]<sup>+</sup> 523.38 (理论值: 522.19)。

步骤三：在 100mL 三口瓶中加入化合物 **10** (6 g, 9.4 mmol)，DMF (30 mL) 和化合物 **4** (3 g, 11.2 mmol)，在 0-5°C 下搅拌，滴加 DIPEA (3.7 g, 28.6 mmol)，室温搅拌反应 1.5h，加入甲基叔丁基醚 (300 mL)，去除上清液，用 50mL DCM 溶解黑色固体，加入 15g 硅胶拌样，硅胶柱层析纯化得到化合物 **11** (6.2 g，产率 87.4%，HPLC 92%)；<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.72-8.66 (m, 1H), 8.49 (d, *J*=8.8 Hz, 1H), 7.79-7.71 (m, 1H), 7.70 (s, 3H), 7.28 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 5.39 (d, *J*=17.2 Hz, 3H), 5.23-5.19 (s, 1H), 5.00 (s, 1H), 4.68 (q, *J*=7.3 Hz, 1H), 4.18 (s, 3H), 4.12-4.01 (m, 1H), 3.18 (d, *J*=17.1 Hz, 1H), 3.07 (d, *J*=17.6 Hz, 1H), 2.37 (s, 3H), 2.00-1.92 (m, 2H), 1.87-1.80 (m, 2H), 1.29 (m, *J*=7.2 Hz, 3H), 1.25-1.05 (m, 1H), 0.84 (q, *J*=13.5, 7.5 Hz, 3H); LCMS: [M+1]<sup>+</sup> 753.12 (理论值: 752.26)。

步骤四：将化合物 **11** (0.1 g, 0.13 mmol) 溶解在 MeOH (5 mL) 中，加入水合肼 (39.9 mg, 0.79 mmol)，封管，升温至 60°C 反应 2h，降温，反应液倒入饱和食盐水 (100 mL) 中，乙酸乙酯萃取，浓缩得到化合物 **12** (0.07 g，产率 77%，HPLC 95%)；<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.91 (t, *J*=6.0 Hz, 1H), 8.58 (d, *J*=8.9 Hz, 1H), 8.17 (s, 3H), 7.66 (d, *J*=10.8 Hz, 1H), 7.27 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 5.58 (td, *J*=8.3, 7.9, 4.8 Hz, 1H), 5.39 (s, 2H), 5.19 (d, *J*=19.0 Hz, 1H), 5.01 (d, *J*=18.9 Hz, 1H), 4.35 (dd, *J*=13.2, 6.3 Hz, 1H), 4.25 (dd, *J*=12.1, 4.7 Hz, 1H), 4.20 (d, *J*=2.3 Hz, 2H), 3.97-3.88 (m,

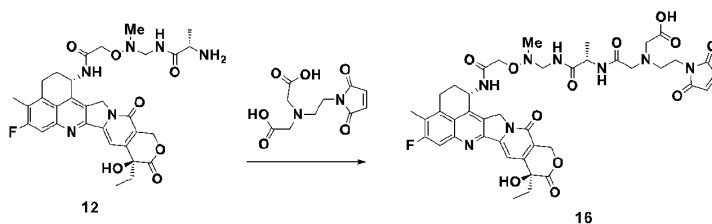
1H), 3.18 (dt,  $J=17.1, 5.9$  Hz, 1H), 3.13-3.03 (m, 1H), 2.53 (s, 3H), 2.31 (d,  $J=1.9$  Hz, 3H), 2.26-2.09 (m, 2H), 1.93-1.77 (m,  $J=7.2$  Hz, 2H), 1.37 (d,  $J=6.9$  Hz, 3H), 0.86 (t,  $J=7.3$  Hz, 3H). LCMS:  $[M+1]^+$  623.15 (理论值: 622.26)。

步骤五: 称取化合物 **12** (70 mg, 0.112 mmol) 溶于 DMF (2 mL) 中, 加入 DIPEA (29 mg, 0.224 mmol) 搅拌溶解, 依次加入化合物 **8** (62.16 mg, 0.112 mmol), HATU (42.56 mg, 0.112 mmol), 室温搅拌反应 1h, 浓缩, 硅胶柱层析纯化得到化合物 **13** (81 mg, 产率 62%, HPLC 96%);  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.50 (d,  $J=8.9$  Hz, 1H), 8.24 (t,  $J=6.3$  Hz, 1H), 8.11 (t,  $J=5.7$  Hz, 1H), 7.99 (d,  $J=7.2$  Hz, 1H), 7.86 (d,  $J=7.5$  Hz, 2H), 7.74 (dd,  $J=9.8, 7.4$  Hz, 2H), 7.67 (d,  $J=7.5$  Hz, 2H), 7.39 (t,  $J=7.4$  Hz, 2H), 7.35-7.26 (m, 4H), 6.52 (s, 1H), 5.75 (s, 2H), 5.59 (dt,  $J=9.2, 6.1$  Hz, 1H), 5.41 (d,  $J=2.0$  Hz, 2H), 5.25 (d,  $J=18.9$  Hz, 1H), 5.09 (d,  $J=18.8$  Hz, 1H), 4.33-3.99 (m, 8H), 3.70 (qd,  $J=16.6, 5.7$  Hz, 2H), 3.57 (t,  $J=6.5$  Hz, 2H), 3.46 (s, 4H), 3.39 (d,  $J=6.0$  Hz, 2H), 3.26-3.06 (q,  $J=6.1$  Hz, 5H), 2.48 (d,  $J=2.4$  Hz, 3H), 2.41-2.29 (m, 5H), 2.17 (q,  $J=6.5$  Hz, 2H), 1.93-1.77 (m, 3H), 1.14 (d,  $J=7.1$  Hz, 3H), 0.86 (t,  $J=7.3$  Hz, 3H), 0.82-0.66 (m, 6H); LCMS:  $[M+1]^+$  1160.24 (理论值: 1159.50)。

步骤六: 在 10mL 的单口瓶中, 加入化合物 **13** (81 mg, 0.069 mmol), 用 DMF (1 mL) 溶解, 加入哌啶 (100  $\mu\text{L}$ ), 室温下反应 1h, 加入甲基叔丁基醚 (20 mL), 离心, 去除上清液, 干燥后得到化合物 **14** (32 mg, 产率 49%, HPLC 94%);  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.53 (d,  $J=8.9$  Hz, 1H), 8.28 (t,  $J=6.3$  Hz, 1H), 8.13 (t,  $J=5.7$  Hz, 1H), 8.01 (d,  $J=7.2$  Hz, 1H), 7.77 (t,  $J=10.2$  Hz, 5H), 7.30 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.60 (dt,  $J=8.9, 6.0$  Hz, 1H), 5.41 (s, 2H), 5.27 (d,  $J=18.9$  Hz, 1H), 5.13 (d,  $J=19.0$  Hz, 1H), 4.28 (dd,  $J=13.2, 6.7$  Hz, 1H), 4.24-4.12 (m, 3H), 4.12-4.03 (m, 2H), 3.79-3.64 (m, 2H), 3.63-3.48 (m, 8H), 3.27-3.08 (m, 2H), 2.97 (h,  $J=5.7$  Hz, 2H), 2.47 (s, 3H), 2.37 (dd,  $J=7.8, 4.3$  Hz, 5H), 2.18 (q,  $J=6.4$  Hz, 2H), 1.85 (qq,  $J=14.0, 7.2$  Hz, 3H), 1.15 (d,  $J=7.1$  Hz, 3H), 0.86 (t,  $J=7.3$  Hz, 3H), 0.71 (dd,  $J=13.3, 6.8$  Hz, 6H); LCMS:  $[M+1]^+$  938.02 (理论值: 937.43)。

步骤七: 在 10mL 的单口瓶中, 依次加入 DCM (3mL), 化合物 **14** (32 mg, 0.034mmol), 溴乙酸 (9.5 mg, 0.068 mmol) 和 DIC (8.6 mg, 0.068 mmol), 室温搅拌反应 90min, 浓缩, 硅胶柱层析纯化得到黄色固体状化合物 **15** (22 mg, 产率 61%, HPLC 97%);  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.49 (d,  $J=8.9$  Hz, 1H), 8.33 (t,  $J=5.7$  Hz, 1H), 8.24 (t,  $J=6.2$  Hz, 1H), 8.11 (t,  $J=5.8$  Hz, 1H), 7.98 (d,  $J=7.1$  Hz, 1H), 7.75 (d,  $J=8.5$  Hz, 1H), 7.70 (d,  $J=10.8$  Hz, 1H), 7.28 (s, 1H), 5.64-5.54 (m, 1H), 5.40 (s, 2H), 5.23 (d,  $J=18.9$  Hz, 1H), 5.04 (d,  $J=18.9$  Hz, 1H), 4.33-3.97 (m, 6H), 3.85 (s, 2H), 3.70 (qd,  $J=16.5, 5.7$  Hz, 3H), 3.57 (t,  $J=6.5$  Hz, 4H), 3.52-3.37 (m, 4H), 3.26-3.17 (m, 4H), 3.14-3.06 (m, 1H), 2.47 (s, 3H), 2.41-2.28 (m, 5H), 2.24-2.11 (m,  $J=6.9, 6.0$  Hz, 2H), 1.84 (dh,  $J=20.8, 7.0$  Hz, 3H), 1.14 (d,  $J=7.1$  Hz, 3H), 0.85 (t,  $J=7.3$  Hz, 3H), 0.70 (dd,  $J=11.4, 6.8$  Hz, 6H); LCMS:  $[M+1]^+$  1058.24 (理论值: 1057.36)。

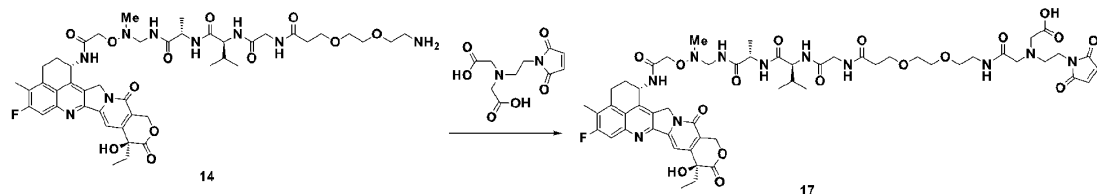
#### 实施例 5: N-(马来酰亚胺乙基胺)-Gly-Ala-ha-N(Me)-氧氧基乙酰依喜替康 (16)



步骤一: 向盛有 5 mL 无水 DMF 的单口烧瓶中, 加入化合物 **12** (200 mg, 0.32 mmol), 搅拌使其充分溶解; 另取一干净烧瓶, 称取马来酰亚胺乙基胺-N,N-二乙酸 (226.1 mg, 0.64 mmol), DIC (81.0 mg, 0.64 mmol), 振荡使其溶于二氯甲烷 (2 mL) 与 DMF (0.5 mL) 的混合溶剂中, 将化合物 **12** 的 DMF 溶液置于冰浴中, 加入 DIC 与马来酰亚胺乙基胺-N,N-二乙酸的混合溶液。使体系自然升至室温, 搅拌过夜, 减压除去二氯甲烷, 反向柱层析湿法上样纯化产品 (ACN%=25~40) 得到白色固体状化合物 **16** (100 mg, 产率 36%);  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12.39 (s, 1H), 8.53 (d,  $J=8.9$  Hz, 1H), 8.38 (t,  $J=6.2$  Hz, 1H), 7.76 (dd,  $J=13.8, 8.9$  Hz, 2H), 7.31 (s, 1H), 6.95 (s, 2H), 6.52

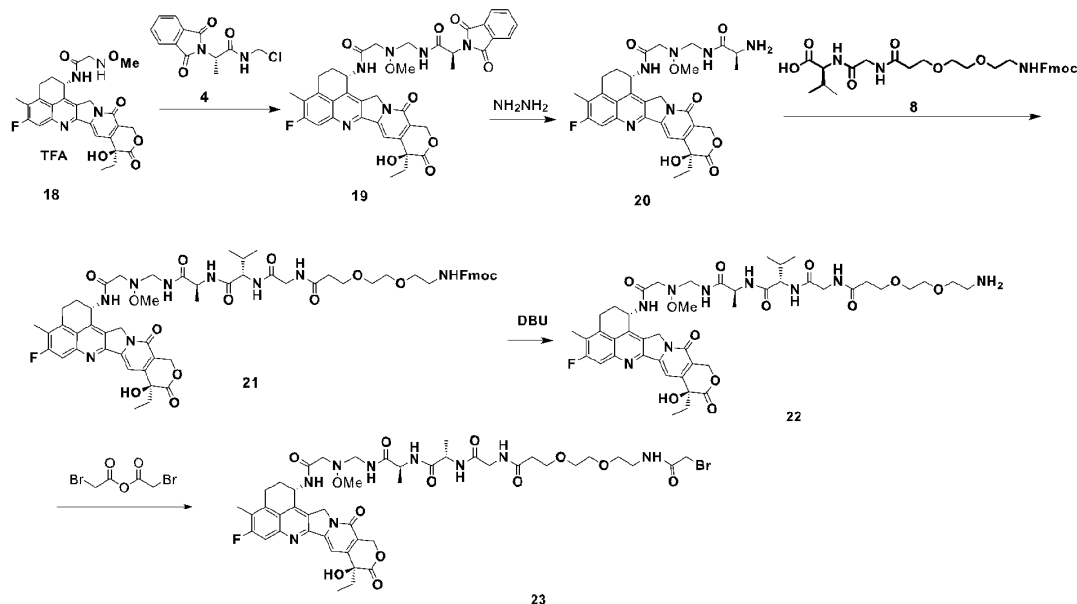
(s, 1H), 5.65–5.57 (m, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.27 (d,  $J=19.0$  Hz, 1H), 5.17 (d,  $J=18.8$  Hz, 1H), 4.27–4.08 (m, 6H), 3.42 (t,  $J=6.3$  Hz, 3H), 3.19–3.11 (m, 3H), 2.68 (t,  $J=6.5$  Hz, 2H), 2.48 (s, 4H), 2.39 (d,  $J=1.8$  Hz, 4H), 2.19 (q,  $J=6.3$  Hz, 2H), 1.86 (dp,  $J=21.4, 7.2$  Hz, 3H), 1.13 (d,  $J=7.1$  Hz, 3H), 0.87 (t,  $J=7.3$  Hz, 4H); LC/MS:  $[M+1]^+$  862.22 (理论值: 860.35)。

#### 5 实施例 6: N-(马来酰亚胺乙基胺(N-羧乙基)-Gly-PEG<sub>2</sub>-Gly-Val-Ala-ha-N(Me)-氨基乙酰)依喜替康 (17)



步骤一: 向盛有 5 mL 无水 DMF 的单口烧瓶中, 加入化合物 **14** (200 mg, 0.213 mmol), 搅拌使其充分溶解; 另取一干净烧瓶, 称取马来酰亚胺乙基胺-N,N-二乙酸 (151.89 mg, 0.43 mmol), DIC (54.44 mg, 0.43 mmol), 振荡使其溶于二氯甲烷 (2 mL) 与 DMF (0.5 mL) 的混合溶剂中, 将化合物 **14** 的 DMF 溶液置于冰浴中, 加入 DIC 与马来酰亚胺乙基胺-N,N-二乙酸的混合溶液。使体系自然升至室温, 搅拌过夜, 减压除去二氯甲烷, 反向柱层析法上样纯化 (ACN%=25~35), 得到白色固体状化合物 **1** (84 mg, 产率 33.5%);  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.55 (d,  $J=9.0$  Hz, 1H), 8.33–8.16 (m, 2H), 8.08 (s, 1H), 7.80 (dd,  $J=22.2, 10.7$  Hz, 2H), 7.31 (s, 1H), 6.99 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 5.61 (dd,  $J=9.2, 5.5$  Hz, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.29 (d,  $J=19.0$  Hz, 1H), 5.18 (d,  $J=18.7$  Hz, 1H), 4.28 (dd,  $J=13.1, 6.7$  Hz, 1H), 4.22–4.16 (m, 2H), 4.14 (dd,  $J=12.2, 5.2$  Hz, 1H), 4.10–4.06 (m, 1H), 4.05–3.99 (m, 1H), 3.73 (dd,  $J=16.5, 5.7$  Hz, 1H), 3.66 (dd,  $J=16.6, 5.8$  Hz, 1H), 3.57 (t,  $J=6.5$  Hz, 2H), 3.45 (d,  $J=3.0$  Hz, 6H), 3.38 (t,  $J=6.2$  Hz, 5H), 3.25–3.12 (m, 8H), 2.70 (t,  $J=6.5$  Hz, 1H), 2.47 (s, 4H), 2.39 (d,  $J=5.0$  Hz, 3H), 2.35 (t,  $J=6.5$  Hz, 2H), 2.19 (p,  $J=6.9, 5.8$  Hz, 2H), 1.90–1.80 (m, 3H), 1.13 (d,  $J=7.1$  Hz, 3H), 0.87 (t,  $J=7.3$  Hz, 3H), 0.81 (t,  $J=6.5$  Hz, 1H), 0.71 (dd,  $J=13.7, 6.7$  Hz, 5H); LCMS:  $[M+1]^+$  1176.45 (理论值: 1175.49)。

#### 20 实施例 7: N-(溴乙酰-PEG<sub>2</sub>-Gly-Val-Ala-ha-N(OMe)-氨基乙酰)依喜替康 (23) 的合成



步骤一: 在 1 mL 的 DMF 中, 加入依喜替康甲磺酸盐 (100 mg, 0.19 mmol), TEA (25 mg, 0.24 mmol), 搅

拌溶清, 加入溴乙酸 (40 mg, 0.28 mmol), HATU (85 mg, 0.22 mmol), 室温下搅拌反应 1h, 减压去除 DMF, 硅胶柱层析分离纯化得到中间体依喜替康-N-溴乙酰胺 (90 mg, 产率 86%); LCMS:  $[M+1]^+$  557.1 (理论值: 556.39)。

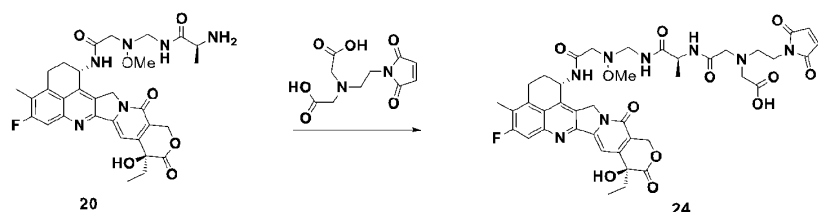
步骤二: 将依喜替康-N-溴乙酰胺溶解于 DMF (1 mL), 加入甲氧基胺盐酸盐 (126 mg, 1.5 mmol), TEA (182 mg, 1.8 mmol), 室温搅拌反应 1h, 减压去除 DMF, 硅胶柱层析分离纯化得到化合物 **18** (80 mg, 产率 86%);  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  8.50-8.46 (m, 1H), 7.80 (d,  $J=10.8$  Hz, 1H), 7.30 (d,  $J=1.9$  Hz, 1H), 6.83 (td,  $J=6.2, 1.8$  Hz, 1H), 6.52 (d,  $J=1.9$  Hz, 1H), 5.61-5.55 (m, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.22 (s, 2H), 4.01-3.87 (m, 1H), 3.42 (d,  $J=6.1$  Hz, 3H), 3.17 (t,  $J=6.4$  Hz, 2H), 2.40 (s, 3H), 2.22-2.11 (m, 2H), 1.86 (dp,  $J=21.1, 7.1$  Hz, 2H), 0.90-0.83 (m, 3H); LCMS:  $[M+1]^+$  523.20 (理论值: 522.19)。

步骤三: 将 DMF (12 mL) 加入到 50mL 三口烧瓶中, 在 0-5°C 下依次加入化合物 **18** (1.68 g, 2.2 mmol), DIPEA (1.17 g, 9.1 mmol), 化合物 **4** (1.75 g, 6.6 mmol), 在 5-10°C 搅拌反应 2h, 加入甲基叔丁基醚 (60 mL), 倒去上清液, 得到化合物 **19** (LCMS  $[M+H]^+$ : 753.27; 理论值: 752.26), 溶解于 DCM (25 mL), 搅拌下滴加 80% 水合肼 (0.94 g, 15 mmol), 室温下搅拌过夜, 浓缩, 用 DMF 和水溶解后进行液相制备, 冻干后得到化合物 **20** (1.08 g, 两步合并产率 50%);  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  8.91 (t,  $J=6.0$  Hz, 1H), 8.51 (d,  $J=8.7$  Hz, 1H), 8.11 (s, 3H), 7.78 (d,  $J=10.9$  Hz, 1H), 7.31 (s, 1H), 6.54 (s, 1H), 5.63-5.54 (m, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.19 (s, 2H), 4.35-4.39 (m, 1H), 4.25-4.30 (m, 1H), 3.88 (s, 1H), 3.50 (s, 3H), 3.25-3.06 (m, 2H), 2.39 (s, 3H), 2.29-2.11 (m, 2H), 1.81-1.93 (m, 2H), 1.37 (d,  $J=7.0$  Hz, 3H), 0.87 (t,  $J=7.3$  Hz, 3H); LCMS (ESI)  $[M+H]^+$ : 623.20 (理论值: 622.26)。

步骤四: 向 25mL 单口瓶中加入化合物 **8** (0.68 g, 1.22 mmol), DCM (9 mL), 冷却至 0°C, 依次加入 EDCI (0.25 g, 1.30 mmol) 和 NHS (0.15 g, 1.52 mmol), 室温下搅拌反应 2h, 在 0°C 和氩气保护下向反应液中滴加 DIPEA (0.19 g, 1.47 mmol), 将化合物 **20** (0.9 g, 1.25 mmol) 的 DMF 溶液 (用 5 mL DMF 稀释) 缓慢滴加到反应体系中, 室温反应过夜, 真空下去除 DMF, 硅胶柱层析纯化得到化合物 **21** (500 mg, 产率 32%);  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  8.50 (d,  $J=8.7$  Hz, 1H), 8.39 (t,  $J=6.1$  Hz, 1H), 8.13 (t,  $J=5.7$  Hz, 1H), 8.09 (d,  $J=7.2$  Hz, 1H), 7.91 (d,  $J=7.5$  Hz, 2H), 7.80 (t,  $J=10.4$  Hz, 2H), 7.72 (d,  $J=7.4$  Hz, 2H), 7.44 (t,  $J=7.4$  Hz, 2H), 7.38-7.26 (m, 4H), 6.56 (s, 1H), 5.67-5.56 (m, 1H), 5.45 (s, 2H), 5.23 (s, 2H), 4.35-4.12 (m, 5H), 3.82-3.69 (m, 2H), 3.62 (t,  $J=6.4$  Hz, 2H), 3.55-3.45 (m, 6H), 3.43 (t,  $J=5.8$  Hz, 2H), 3.22-3.12 (m, 4H), 2.45-2.35 (m, 5H), 2.32-2.12 (m, 2H), 1.95-1.83 (m, 3H), 1.34-1.19 (m, 8H), 0.90 (t,  $J=7.3$  Hz, 3H), 0.74-0.80 (m, 6H); LCMS (ESI)  $[M+H]^+$ : 1160.26 (理论值: 1159.50)。

步骤五: 将化合物 **21** (422 mg, 0.36 mmol) 加入到 DMF (2 mL) 中, 搅拌溶解, 在 0°C 下滴加 DBU (28 mg, 1.84 mmol), 室温下搅拌 2h, 加入甲基叔丁基醚 (21 mL), 去上清液, 得到化合物 **22** (LCMS  $[M+H]^+$ : 938.23; 理论值: 937.43), 溶解于 DMF (1.1 mL), 搅拌, 0°C 下滴加溴乙酸酐 (0.95 g, 3.66 mmol) 的 DMF (1.9 mL) 溶液, 室温下搅拌 2h, 加入甲基叔丁基醚 (20 mL), 去除上清液, 粘稠物用 DMF 溶解, 液相纯化, 冻干、得到化合物 **23** (100 mg, 两步合并产率 26%);  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO}$ )  $\delta$  8.47 (d,  $J=8.0$  Hz, 1H), 8.39-8.24 (m, 2H), 8.16-8.01 (m, 2H), 7.77 (d,  $J=10.0$  Hz, 2H), 7.30 (s, 1H), 5.59 (s, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.19 (s, 2H), 4.38-4.08 (m, 4H), 3.90-3.58 (m, 14H), 3.50-3.14 (m, 10H), 2.43-2.33 (m, 4H), 2.19 (s, 2H), 1.92-1.82 (m, 3H), 1.20 (d,  $J=6.6$  Hz, 3H), 0.87 (t,  $J=6.7$  Hz, 3H), 0.73 (dd,  $J=13.8, 6.3$  Hz, 5H);  $^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  173.65, 172.90, 170.98, 170.88, 169.32, 168.70, 166.55, 163.10, 161.12, 157.16, 152.84, 150.43, 145.69, 140.84, 136.81, 126.10, 124.23, 124.08, 122.11, 119.59, 110.25, 97.14, 72.81, 69.97, 69.89, 69.19, 67.16, 65.71, 60.62, 59.30, 58.35, 57.74, 50.07, 48.67, 44.92, 42.42, 36.33, 31.07, 30.77, 29.92, 28.19, 19.45, 18.54, 18.34, 11.47, 11.43, 8.21; LCMS (ESI)  $[M+H]^+$ : 1058.26 (理论值: 1057.36)。

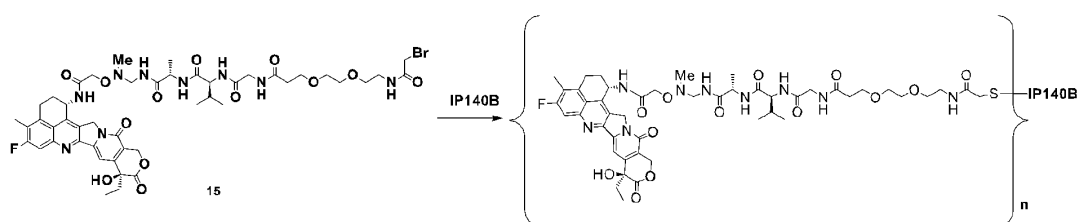
#### 实施例 8: N-(*m*-乙基胺(*N*-羧乙基)-Gly-Ala-ha-N(OMe)-氨基乙酰)依喜替康 (**24**)



步骤一：在一 50 mL 圆底烧瓶中加入化合物 **20** (80 mg, 0.129 mmol) 和 DMF (5 mL)，搅拌使其充分溶解 (溶液 1)。另取一 10 mL 反应瓶，加入马来酰亚胺乙基胺-N,N-二乙酸 (91 mg, 0.258 mmol)，DIC (32.51 mg, 0.258 mmol)，二氯甲烷 (4 mL) 和 DMF (2 mL)，充分振荡使其溶解 (溶液 2)。将化合物 **20** 的 DMF 溶液 (溶液 1) 置于冰浴中，搅拌下向溶液 1 中滴加溶液 2，撤去冰浴，使反应体系自然升至室温，搅拌过夜。减压除去二氯甲烷，反相色谱柱纯化 (ACN%=35%) 得到黄色粉末状化合物 **24** (32 mg, 产率 28.8%)；<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.48 (d, *J*=8.9 Hz, 1H), 8.43 (t, *J*=6.3 Hz, 1H), 7.78 (d, *J*=10.8 Hz, 2H), 7.30 (s, 1H), 6.96 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 5.61-5.56 (m, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.25-5.17 (m, 2H), 4.28-4.21 (m, 2H), 4.19-4.13 (m, 1H), 3.49-3.42 (m, 6H), 3.18 (t, *J*=5.5 Hz, 5H), 2.70 (t, *J*=6.8 Hz, 2H), 2.39 (s, 3H), 2.22-2.13 (m, 2H), 1.85 (dq, *J*=21.6, 6.9 Hz, 2H), 1.21 (dd, *J*=32.6, 6.2 Hz, 5H), 0.87 (t, *J*=7.4 Hz, 4H)；LCMS (ESI) [M+H]<sup>+</sup> 862.05 (理论值 860.31)。

### 实施例 9：IP140B 抗体-偶联药物 ADC1 和 ADC2 的制备

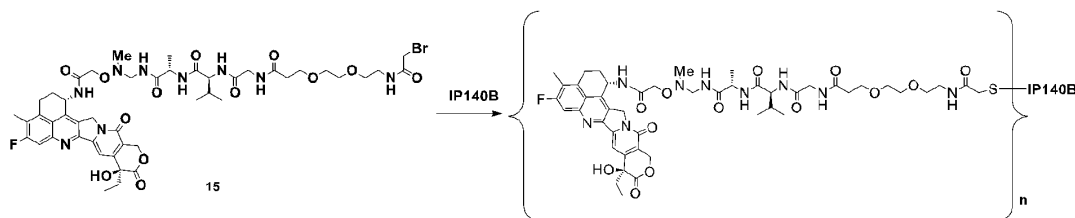
#### (1) ADC1 (DAR 8) 的制备



取 IP140B 抗体 (10.0mg/mL, 10mg, 0.066mmol)，用 1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶液调 pH 至 7.2，然后再加入 0.1M 乙二胺四乙酸二钠的溶液 (25 μL)，加入配置好的 TCEP·HCl (三(2-羧乙基)膦盐酸盐) 溶液 (10mM, 0.04mL)，室温 25°C 旋转转盘反应 4h。

将化合物 **15** (0.99mg, 0.93mmol) 溶于 0.1mL 的 DMA 中，加入到上述溶液体系中，混匀，室温旋转转盘反应 16h，反应完后用 NAP-5 凝胶柱 (Cytiva) 去除小分子并将缓冲液置换为 20mM 组氨酸-盐酸组氨酸溶液，pH=6.2，得到抗体偶联药物 ADC1 (3.2mg/mL, 2mL)。其 RP-HPLC-MS 测试结果见图 1，其中 A 和 B 为 HPLC 结果、C 和 D 为 MS 结果。RP-MS 计算平均值：n=7.9；MS 结果显示抗体轻链 (L) 连接了一个 linker-payload，重链 (H) 连接了 3 个 linker-payload。

#### (2) ADC2 (DAR 4) 的制备

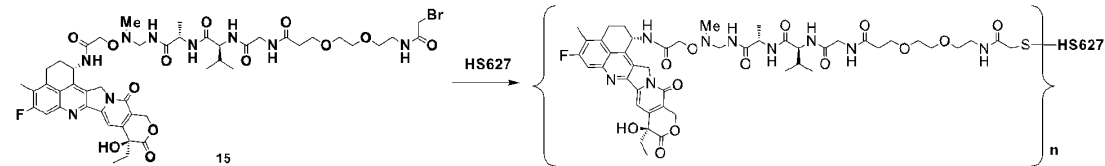


取 IP140B 抗体 (10.0mg/mL, 10mg, 0.066mmol)，用 1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶液调 pH 至 7.2，加入配置好的 TCEP·HCl 溶液 (10mM, 0.02mL)，10°C 旋转转盘反应 2h。

将化合物 15 (0.59mg, 0.56mmol) 溶于 0.1mL 的 DMA 中, 加入到上述溶液体系中, 混匀, 室温旋转转盘反应 16h, 反应完后用 NAP-5 凝胶柱 (Cytiva) 去除小分子并将缓冲液置换为 20mM 组氨酸-盐酸组氨酸溶液, pH=6.2, 得到抗体偶联药物 ADC2 (3.0mg/ml, 2mL)。其 RP-HPLC-MS 测试结果见图 2, 其中 A 和 B 为 HPLC 结果、C 为 MS 结果。RP-MS 计算平均值:  $n=3.9$ ; MS 结果显示抗体轻重链 (HL) 连接 2 个 linker-payload。

5

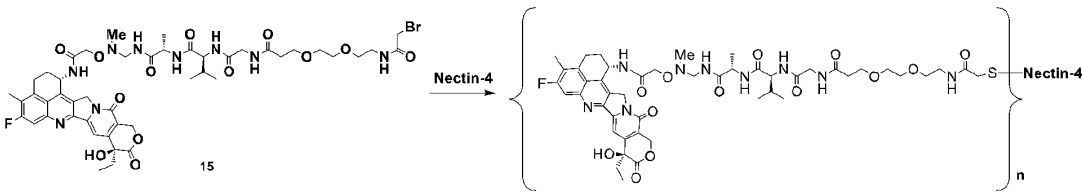
实施例 10: HS627 抗体-偶联药物 ADC3 的制备



取 HS627 抗体 (10.0mg/mL, 10mg, 0.066mmol), 用 1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶液调 pH 至 7.2, 然后再加入 0.1M 乙二胺四乙酸二钠的溶液 (25  $\mu$ L), 加入配置好的 TCEP·HCl (三(2-羧乙基)膦盐酸盐) 溶液 (10mM, 0.04mL), 室温 25°C 旋转转盘反应 4h。

将化合物 15 (0.99mg, 0.93mmol) 溶于 0.1mL 的 DMA 中, 加入到上述溶液体系中, 混匀, 室温旋转转盘反应 16h, 反应完后用 NAP-5 凝胶柱 (Cytiva) 去除小分子并将缓冲液置换为 20mM 组氨酸-盐酸组氨酸溶液, pH=6.2, 得到抗体偶联药物 ADC3 (3.0mg/ml, 2mL)。其 RP-HPLC-MS 测试结果见图 3, 其中 A 和 B 为 HPLC 结果、C 和 D 为 MS 结果。RP-MS 计算平均值:  $n=7.8$ ; MS 结果显示轻链 (L) 连接了一个 linker-payload, 重链 (H) 连接了 3 个 linker-payload。

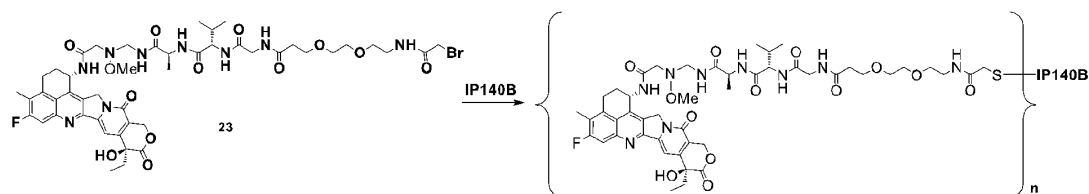
实施例 11: Nectin-4 抗体-偶联药物 ADC4 的制备



取 Nectin-4 抗体 (10.0mg/mL, 10mg, 0.066mmol), 用 1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶液调 pH 至 6.2, 然后再加入 0.1M 乙二胺四乙酸二钠的溶液 (25  $\mu$ L), 加入配置好的 TCEP·HCl (三(2-羧乙基)膦盐酸盐) 溶液 (10mM, 0.04mL), 室温 25°C 旋转转盘反应 4h。

将化合物 15 (0.99mg, 0.93mmol) 溶于 0.1mL 的 DMA 中, 加入到上述溶液体系中, 混匀, 室温旋转转盘反应 16h, 反应完后用 NAP-5 凝胶柱 (Cytiva) 去除小分子并将缓冲液置换为 20mM 组氨酸-盐酸组氨酸溶液, pH=6.2, 得到抗体偶联药物 ADC4 (3.0mg/mL, 2mL)。其 RP-HPLC-MS 测试结果见图 4, 其中 A 和 B 为 HPLC 结果、C 和 D 为 MS 结果。RP-MS 计算平均值:  $n=7.9$ ; MS 结果显示轻链 (L) 连接了一个 linker-payload, 重链 (H) 连接了 3 个 linker-payload。

实施例 12: IP140B 抗体-偶联药物 ADC5 的制备

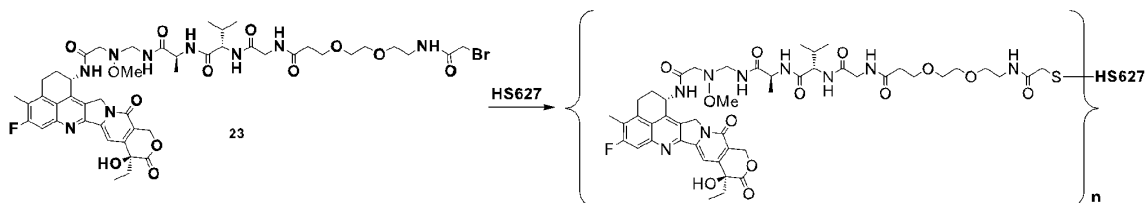


取 IP140B 抗体 (10.0mg/mL, 10mg, 0.066mmol), 用 1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶液调 pH 至 7.2, 然后再加入 0.1M 乙二胺四乙酸二钠的溶液 (25  $\mu$ L), 加入配置好的 TCEP·HCl (三(2-羧乙基)膦盐酸盐) 溶液 (10mM, 0.04mL), 室温 25°C 旋转转盘反应 4h。

- 5 将化合物 23 (0.99mg, 0.93mmol) 溶于 0.1mL 的 DMA 中, 加入到上述溶液体系中, 混匀, 室温旋转转盘反应 16h, 反应完后用 NAP-5 凝胶柱 (Cytiva) 去除小分子并将缓冲液置换为 20mM 组氨酸-盐酸组氨酸溶液, pH=6.2, 得到抗体偶联药物 ADC5 (3.2mg/mL, 2mL)。其 RP-HPLC-MS 测试结果见图 5, 其中 A 和 B 为 HPLC 结果、C 和 D 为 MS 结果。RP-MS 计算平均值:  $n=7.8$ ; MS 结果显示轻链 (L) 连接了一个 linker-payload, 重链 (H) 连接了 3 个 linker-payload。

10

### 实施例 13: HS627 抗体-偶联药物 ADC6 的制备



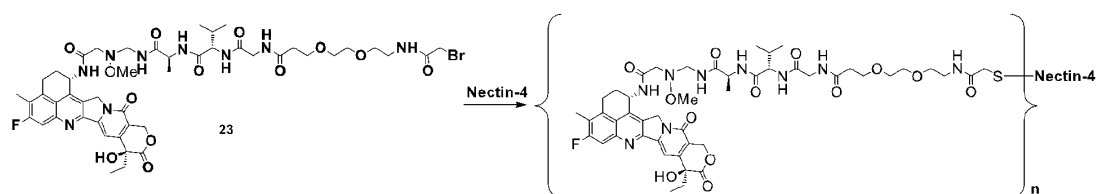
取 HS627 抗体 (10.0mg/mL, 10mg, 0.066mmol), 用 1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶液调 pH 至 7.2, 然后再加入 0.1M 乙二胺四乙酸二钠的溶液 (25  $\mu$ L), 加入配置好的 TCEP·HCl (三(2-羧乙基)膦盐酸盐) 溶液 (10mM, 0.04mL), 室温 25°C 旋转转盘反应 4h。

15

将化合物 23 (0.99mg, 0.93mmol) 溶于 0.1mL 的 DMA 中, 加入到上述溶液体系中, 混匀, 室温旋转转盘反应 16h, 反应完后用 NAP-5 凝胶柱 (Cytiva) 去除小分子并将缓冲液置换为 20mM 组氨酸-盐酸组氨酸溶液, pH=6.2, 得到抗体偶联药物 ADC6 (3.0mg/mL, 2mL)。其 RP-HPLC-MS 测试结果见图 6, 其中 A 和 B 为 HPLC 结果、C 和 D 为 MS 结果。RP-MS 计算平均值:  $n=7.8$ ; MS 显示轻链 (L) 连接了一个 linker-payload, 重链 (H) 连接了 3 个 linker-payload。

20

### 实施例 14: Nectin-4 抗体-偶联药物 ADC7 的制备



取 Nectin-4 抗体 (10.0mg/mL, 10mg, 0.066mmol), 用 1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶液调 pH 至 6.2, 然后再加入 0.1M 乙二胺四乙酸二钠的溶液 (25  $\mu$ L), 加入配置好的 TCEP·HCl (三(2-羧乙基)膦盐酸盐) 溶液 (10mM, 0.04mL), 室温 25°C 旋转转盘反应 4h。

25

将化合物 23 (0.99mg, 0.93mmol) 溶于 0.1mL 的 DMA 中, 加入到上述溶液体系中, 混匀, 室温旋转转盘反应 16h, 反应完后用 NAP-5 凝胶柱 (Cytiva) 去除小分子并将缓冲液置换为 20mM 组氨酸-盐酸组氨酸溶液, pH=6.2, 得到抗体偶联药物 ADC7 (3.0mg/mL, 2mL)。其 RP-HPLC-MS 测试结果见图 7, 其中 A 和 B 为 HPLC

结果、C 和 D 为 MS 结果。RP-MS 计算平均值: n=7.9; MS 结果显示轻链 (L) 连接了一个 linker-payload, 重链 (H) 连接了 3 个 linker-payload。

测试例 1: ADC 体内抑制肿瘤生长活性

ADC 裸鼠移植瘤模型(cell derived xenograft, CDX)抑制肿瘤活性测试方法: 胰腺癌细胞 BXPc-3、肺腺癌细胞 NCI-H1975、三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231、食管鳞癌细胞 KYSE-150 于体外单层培养, 细胞饱和度为 80%-90% 时, 用胰酶-EDTA 消化, 离心弃上清, PBS 重悬细胞, 将细胞悬液调整至合适浓度, 将 BXPc-3、NCI-H1975、MDA-MB-231、KYSE-150 细胞 (2-10×10<sup>6</sup> cells/0.1mL) 分别皮下接种于 BALB/c 裸小鼠, 定期观察动物及移植瘤生长情况, 待瘤体积长到 100-200 mm<sup>3</sup> 左右, 根据瘤体积和体重进行随机分组, 每组 6 只动物。定期静脉注射给药。每周 2 次用游标卡尺测量肿瘤长径 a (mm)、短径 b (mm) 和小鼠体重, 根据以下公式计算肿瘤体积 (tumor volume, V):  $V = 1/2 \times a \times b^2$  (mm<sup>3</sup>), 其中 a 和 b 分别表示肿瘤长和宽, 并绘制生长曲线, 最后剥取肿瘤并称重。统计分析基于试验结束时肿瘤体积和荷瘤鼠体重的数据运用 GraphPad Prism 软件进行分析得到抑瘤结果。

主要评价指标:

肿瘤生长抑制率(tumor growth inhibition, TGI):

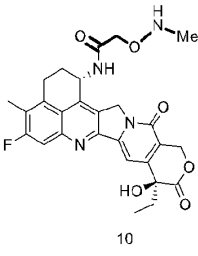
$TGI(\%) = [1 - (avT_{i-0}/avC_{i-0})] \times 100\%$ ; 其中 avT<sub>i-0</sub> 是给药组在特定天的平均肿瘤体积, 减去该给药组在开始给药当天的平均肿瘤体积; 其中 avC<sub>i-0</sub> 是溶媒对照组在特定天的平均肿瘤体积, 减去溶媒对照组在开始给药当天的平均肿瘤体积。

1、BXPc-3 CDX 模型

|     | 给药药物                  | 给药剂量             | 给药频率          | D33 天<br>肿瘤抑制率 |
|-----|-----------------------|------------------|---------------|----------------|
| 对照组 | 生理盐水                  | 5 μL/g           | BIW x 3 weeks | -              |
|     | 吉西他滨<br>(Gemcitabine) | 90 mg/kg         | BIW x 3 weeks | 41.52%         |
|     | IgG1-化合物 15           | 5 mg/kg          | BIW x 3 weeks | 24.67%         |
|     | IP140B                | 5 mg/kg          | BIW x 3 weeks | 30.66%         |
|     | 化合物 10                | 0.12 mg/kg       | BIW x 3 weeks | 16.75%         |
|     | IP140B+ 化合物 10        | 5mg/kg+0.12mg/kg | BIW x 3 weeks | 17.89%         |
| 实验组 | ADC1                  | 0.8 mg/kg        | BIW x 3 weeks | 66.37%         |
|     |                       | 2 mg/kg          | BIW x 3 weeks | 93.04%         |
|     |                       | 5 mg/kg          | BIW x 3 weeks | 96.87%         |

BIW 为每周给药两次, day 0, 3, 7, 10, 14, 17 给药, 观察到第 33 天。

其中, IgG1 为没有靶点选择性的单克隆抗体工具序列, 其对人体细胞没有亲和力。



化合物 10 为化合物 15 的毒素 (抗肿瘤化合物) 部分, 其结构式为

实验结果：ADC1 三个剂量 0.8mg/kg、2mg/kg 和 5mg/kg 均呈现了比阳参吉西他滨（Gemcitabine）、单独抗体、单独毒素、抗体和毒素的简单混合物、没有靶向作用的 ADC 更强的抑制肿瘤生长的活性且具有剂量依赖性的抑制活性。

5 2、NCI-H1975 模型

|     | 给药药物               | 给药剂量             | 给药频率          | D21 天肿瘤抑制率 |
|-----|--------------------|------------------|---------------|------------|
| 对照  | 生理盐水               | 5 μL/g           | BIW x 2 weeks | -          |
|     | 紫杉醇<br>(Paditaxel) | 10 mg/kg         | BIW x 2 weeks | 94.5%      |
|     | IgG1-化合物 15        | 6 mg/kg          | BIW x 2 weeks | 94.3%      |
|     | IP140B+ 化合物 10     | 6mg/kg+0.17mg/kg | BIW x 2 weeks | 11.2%      |
| 实验组 | ADC1               | 1 mg/kg          | BIW x 2 weeks | 96.9%      |
|     |                    | 3 mg/kg          | BIW x 2 weeks | 99.4%      |
|     |                    | 6 mg/kg          | BIW x 2 weeks | 99.7%      |

BIW 为每周给药两次，day 0, 4, 7, 11 给药，观察到第 21 天。

实验结果：实验组三个剂量 1mg/kg、3mg/kg 和 6mg/kg 均呈现了比抗体和毒素的简单混合物、没有靶向作用的 ADC 更强的抑制肿瘤生长的活性，1mg/kg ADC1 组的肿瘤抑制效果甚至优于 10 mg/kg 的紫杉醇。3mg/kg 和 6mg/kg 两个剂量组几乎完全抑制了肿瘤的生长，6mg/kg 剂量组有 50%的荷瘤小鼠肿瘤完全消失。

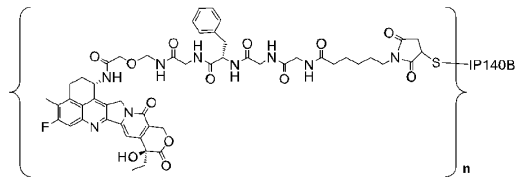
10

3、MDA-MB-231 CDX 模型

|     | 给药药物               | 给药剂量             | 给药频率        | D25 天肿瘤抑制率 |
|-----|--------------------|------------------|-------------|------------|
| 对照  | 生理盐水               | 5 μL/g           | BIW×3 doses | -          |
|     | 紫杉醇<br>(Paditaxel) | 10 mg/kg         | BIW×3 doses | 79.96%     |
|     | IgG1-化合物 15        | 6 mg/kg          | BIW×3 doses | 95.93%     |
|     | IP140B+化合物 10      | 5mg/kg+0.12mg/kg | BIW×3 doses | 31.13%     |
|     | IP140B-Dxd         | 3 mg/kg          | BIW×3 doses | 93.05%     |
| 实验组 | ADC1               | 1 mg/kg          | BIW×3 doses | 72.95%     |
|     |                    | 3 mg/kg          | BIW×3 doses | 93.47%     |
|     |                    | 6 mg/kg          | BIW×3 doses | 95.78%     |
|     | ADC2               | 6 mg/kg          | BIW×3 doses | 96.50%     |
|     |                    | 12 mg/kg         | BIW×3 doses | 96.83%     |
|     | ADC5               | 3 mg/kg          | BIW×3 doses | 94.17%     |

BIW 为每周给药两次，day 0, 3, 7 给药，观察到第 25 天。

IP140B-Dxd 的结构式为（其中 n = 7.89）：



实验结果：ADC1 两个剂量 3mg/kg 和 6mg/kg，ADC5 的 3mg/kg 以及 ADC2 的两个剂量 6mg/kg 和 12mg/kg 均呈现了比阳参紫杉醇（Paditaxel）、抗体和毒素的简单混合物、没有靶向作用的 ADC 更强的抑制肿瘤生长的活性。

5 4、KYSE-150 CDX 模型

|     | 给药药物                | 给药剂量     | 给药频率          | D21 天肿瘤抑制率 |
|-----|---------------------|----------|---------------|------------|
| 对照  | 生理盐水                | 10 μL/g  | BIW x 2 weeks | -          |
|     | 紫杉醇<br>(Paclitaxel) | 10 mg/kg | BIW x 2 weeks | 78.00%     |
|     | IgG1-化合物 15         | 6 mg/kg  | BIW x 2 weeks | 83.87%     |
| 实验组 | ADC1                | 1 mg/kg  | BIW x 2 weeks | 98.98%     |
|     |                     | 3 mg/kg  | BIW x 2 weeks | 107.52%    |
|     |                     | 6 mg/kg  | BIW x 2 weeks | 108.18%    |
|     | ADC2                | 6 mg/kg  | BIW x 2 weeks | 96.92%     |
|     |                     | 12 mg/kg | BIW x 2 weeks | 98.37%     |

BIW 为每周给药两次，day 0, 3, 7, 10 给药，观察到第 21 天。

实验结果：ADC1 的三个剂量 1mg/kg、3mg/kg 和 6mg/kg，ADC2 的两个剂量 6mg/kg 和 12mg/kg 均呈现了比阳参紫杉醇（Paclitaxel）及没有靶向作用的 ADC 更强的抑制肿瘤生长的活性。

测试例 2：ADC 食蟹猴毒理研究

10 1. 单次给药 ADC 考察剂量耐受性，药代动力学和毒性

食蟹猴单次静脉滴注 ADC 后，考察药物在猴体内的药动学性质，同时观察动物的毒性表现。

试验方法：

本试验设 2 个组，分别为 22/35 mg/kg、60 mg/kg 组，每组 2 只猴，雌雄各半（低剂量组第 1、2 次给药剂量为 22 mg/kg，第 3、4 次给药剂量为 35 mg/kg）。各组食蟹猴均按 5 mL/kg 的给药体积静脉注射相应浓度的 ADC 制剂。

15 每 2 周 1 次、连续给药 2 次，洗脱恢复 22 天后进行第 3 次给药，2 周后进行第 4 次给药。以 22/35 mg/kg 组首次给药当天定义为试验第 1 天，60 mg/kg 组首次给药当天为试验第 5 天。给药间每天观察食蟹猴一般状况，每周测定 1 次体重、摄食量；首次给药后 3 天各组食蟹猴及试验第 19、42、56、66 天 22/35 mg/kg 组食蟹猴经静脉采血进行血液学、血生化检查；末试验第 66 天，22/35 mg/kg 组食蟹猴麻醉施以安乐死后进行大体解剖观察、脏器重量测定、骨髓涂片，对各组食蟹猴的心脏、肝脏、脾脏、肺、肾脏、卵巢、子宫颈、附睾、腹股沟淋巴结、给药部位（含血管）进行组织病理学检查。

药代动力学：食蟹猴单次静脉滴注不同剂量的 ADC 药物后，连续多个时间点采集血样。22/35 mg/kg 组食蟹猴于第 1、3 次给药前、第 2 次给药结束后 0.0167 小时及第 1、3、4 次给药结束后 0.167、4、24、48、72、96、168、336 小时经上肢静脉采集血样，以 ELISA 法检测血清中 ADC-TAB 的浓度，以 LC-MS/MS 法检测血浆中小分子毒素的浓度，并计算 AUClast 等毒代参数。

25 毒性研究：食蟹猴单次静脉滴注不同剂量的 ADC 药物后，通过临床观察、体重和摄食量、血液学、血生化、尿

液、大体解剖等多个方面考察动物的耐受性，以及药物相关的毒性表现。

试验结果：

试验期间，食蟹猴一般状况良好，自主活动正常，未见明显毒性反应。给药期间，22/35 mg/kg组雄、雌食蟹猴摄食量未见明显异常改变，22 mg/kg连续两次给药后食蟹猴体重未见异常，剂量升至35 mg/kg连续两次给药后食蟹猴体重未见明显变化；首次给药后3~4天，60 mg/kg组食蟹猴摄食量和体重略有降低。

试验期间各检测时间点，各组雌、雄食蟹猴血生化指标均未见明显异常改变。

药代动力学：食蟹猴单次静脉滴注 ADC 后，ADC 在食蟹猴血液中稳定（参见图 16），游离毒素浓度很低（参见图 17），表明 ADC 在食蟹猴中缓慢释放，偶联方式稳定。

毒性表现：食蟹猴单次静脉滴注 ADC 后，动物耐受性良好，未表现出严重或不可耐受的药物相关毒性，表明 ADC 的安全性可控，可支持其进一步的临床研究。

2. 重复给药考察可能致毒器官及药代参数

食蟹猴每3周1次、连续6周（共3次）静脉注射的毒性试验，观察该供试品可能引起毒性反应的性质、程度、量效和时效关系及可逆性，判断毒性靶器官或靶组织，同时研究其毒代动力学特征，并伴随考察对心血管系统、中枢神经系统、呼吸功能及给药部位的影响，为临床使用的安全性提供参考。

试验方法：

本试验设4个组，分别为对照组（ADC5 制剂缓冲液）及 ADC5 @9、18、36 mg/kg 组，每组10只食蟹猴，雌雄各半。各组食蟹猴按 5 mL/kg 的体积静脉注射对照品（ADC5 制剂缓冲液）或相应浓度的 ADC5。每3周给药1次、连续6周、共3次，停药恢复观察6周。首次给药当天为给药期第1天，末次给药后1天为恢复期第1天。

各组食蟹猴分别于首、末给药前及给药结束后即刻（给药结束 0~2 分钟）、给药后 4、8、24、48、72、96、168、240、336、504 小时；末次给药结束后 672 小时采集血样，以 ELISA 法检测各时间点猴血清中 ADC-TAB（总抗）和 ADC（抗体偶联药物）的浓度，以 LC-MS/MS 检测各时间点食蟹猴血浆中游离毒素的浓度，计算 AUC 等毒代参数。

试验结果：

给药期间，18、36 mg/kg 组部分雌、雄食蟹猴可见摄食量降低。除此之外，给药期及恢复期间，9 mg/kg 组雌、雄食蟹猴摄食量及 ADC5 各组雌、雄食蟹猴体重未见明显异常改变。

首次给药后 4~5、24、72、168、336、504 小时，末次给药后 4 小时及恢复期结束，ADC5 各组雌、雄食蟹猴 II 导联心电图未见心律失常，心率、P 波时间、PR 间期、QRS 波时间、QT 间期、RR 间期、校正 QT 间期等 II 导联心电图指标以及血压、呼吸检测相关指标未见明显异常。各种血生化指标、尿液指标、淋巴细胞、细胞因子、骨髓涂片、脏器检测相关指标未见明显异常。

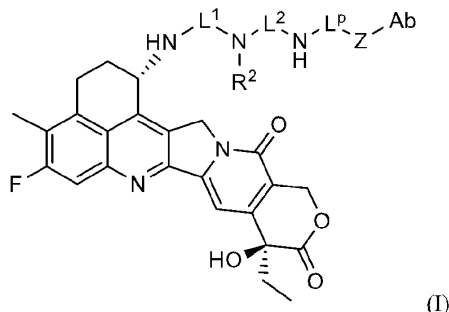
药代动力学：

在本试验条件下，食蟹猴每3周1次、连续6周（共3次）静脉注射 9、18、36 mg/kg 的 ADC5，停药恢复6周。ADC5 在食蟹猴血液中稳定，（参见图 18），游离毒素浓度很低（参见图 19），表明 ADC 在食蟹猴中缓慢释放，偶联方式稳定，支持临床 Q3W 给药方案。

毒性表现：食蟹猴重复静脉滴注 ADC 后，动物耐受性良好，轻微的表现如食物间或减少均能恢复，未表现出严重或不可耐受的药物相关毒性，表明 ADC 的安全性可控，可支持其进一步的临床研究。

## 权 利 要 求 书

1. 式(I)所示的抗体-药物偶联物:



式中,

$R^2$  选自氢、氘、 $C_1$ - $C_6$ 烷基、 $C_1$ - $C_6$ 烷氧基、酰基、磺酰基;

$L^1$  选自  $-L^{11}-L^{12}-L^{13}-$ ; 其中,  $L^{11}$ 、 $L^{12}$ 、 $L^{13}$  各自独立地选自不存在、 $-C(=O)-$ 、 $C_1$ - $C_2$ 亚烷基或  $C_1$ - $C_2$ 亚烷基- $O-$ , 条件是, 当  $L^{11}$  为  $-C(=O)-$  时,  $R^2$  不为氢;

$L^2$  选自  $C_1$ - $C_6$ 亚烷基或  $C_1$ - $C_6$ 酰基, 所述  $C_1$ - $C_6$ 亚烷基或  $C_1$ - $C_6$ 酰基任选地被一个或多个  $R^3$  取代;

$R^3$  选自苯基取代或未取代的  $C_1$ - $C_6$ 烷基、 $C_1$ - $C_6$ 烷氧基;

$L^p$  为由 1-7 个氨基酸构成的肽残基;

$Z$  选自  $-L^z-L^j-$ , 其中,  $L^z$  选自不存在、 $-C(=O)-C_1-C_8$ 亚烷基、 $-C(=O)-(CH_2CH_2O)_{2-6}-CH_2CH_2NH-$  或  $-C(=O)-(CH_2)_{0-6}-NR^1(CH_2)_{0-6}-$ ;  $L^j$  为可偶联抗体的接头;

$R^1$  选自  $-C_1$ - $C_6$ 烷基-羧基或  $-C_1$ - $C_6$ 烷基-氨基;

Ab 为抗体。

2. 根据权利要求 1 所述的抗体-药物偶联物, 其中,  $R^2$  选自氢、氘、 $C_1$ - $C_3$ 烷基、 $C_1$ - $C_3$ 烷氧基、 $-C(=O)C_1-C_3$ 烷基或  $-S(=O)_2C_1-C_3$ 烷基;

优选地,  $R^2$  选自氢、氘、甲基、乙基、甲氧基、乙氧基、甲酰基、乙酰基、甲磺酰基或乙磺酰基;

优选地,  $R^2$  选自氢、甲基、甲氧基、甲酰基或甲磺酰基。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的抗体-药物偶联物, 其中,  $L^{11}$ 、 $L^{12}$ 、 $L^{13}$  各自独立地选自不存在、 $-C(=O)-$ 、 $-CH_2-$ 、 $-CH_2O-$  或  $-OCH_2-$ ;

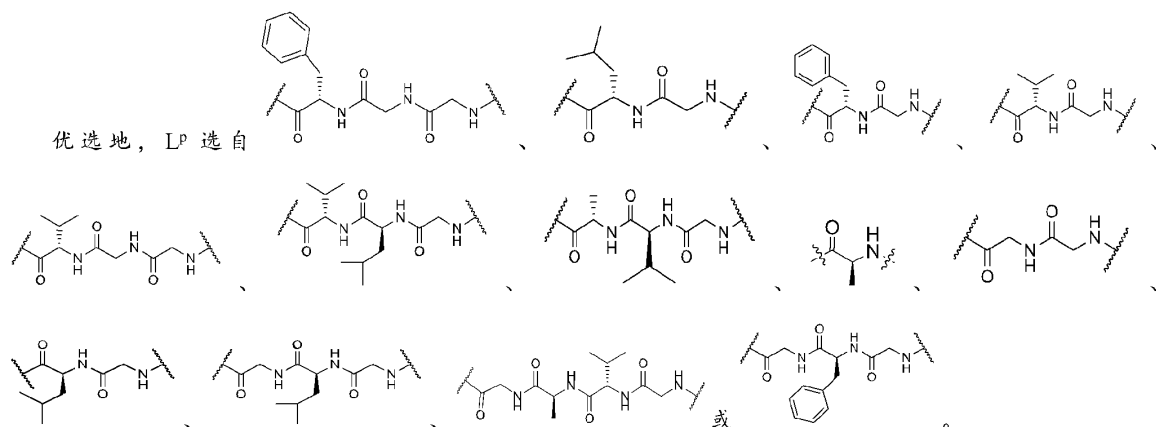
优选地,  $L^1$  选自  $-C(=O)CH_2OCH_2-$ 、 $-C(=O)CH_2O-$ 、 $-C(=O)CH_2$  或  $-CH_2-$ ;

优选地,  $L^2$  选自  $C_1$ - $C_3$ 亚烷基;

优选地,  $L^2$  选自亚甲基、亚乙基。

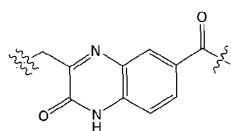
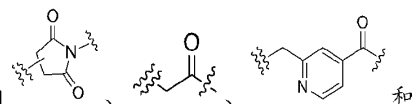
4. 根据权利要求 1-3 任一项所述的抗体-药物偶联物, 其中,  $L^p$  选自由 1、2、3 或 4 个选自苯丙氨酸 (Phe)、甘氨酸 (Gly)、缬氨酸 (Val)、丙氨酸 (Ala) 或亮氨酸 (Leu) 的氨基酸构成的肽残基;

优选地,  $L^p$  选自  $-Val-Cit-$ 、 $-Gly-Lys-$ 、 $-Gly-Leu-$ 、 $-Val-Ala-$ 、 $-Gly-Phe-$ 、 $-GLy-Gly-Lys-$ 、 $-Gly-Gly-Phe-$ 、 $-Gly-Val-Ala-$ 、 $-Gly-Ala-$ 、 $-Gly-Gly-Val-$ 、 $-Gly-Leu-Val-$ 、 $-Gly-Phe-Gly-$  或  $-Gly-Gly-Leu-$ ;



5

5. 根据权利要求 1-4 任一项所述的抗体-药物偶联物, 其中,  $L_j$  选自



; “ $\sim$ ”所示位置表示与抗体相连, “ $\sim$ ”所示位置表示与  $L^z$  基团相连;

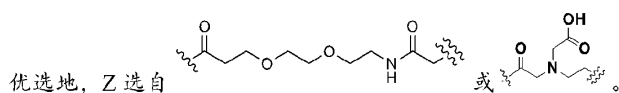
优选地,  $L^z$  选自  $-C(=O)-C_1-C_8$  亚烷基、 $-C(=O)-(CH_2CH_2O)_{2-6}-CH_2CH_2NH-$  或  $-C(=O)-(CH_2)_{1-4}-NR^1(CH_2)_{2-}$ ;

优选地,  $L^z$  选自  $-C(=O)-(CH_2CH_2O)_{2-6}-CH_2CH_2NH-$  或  $-C(=O)-(CH_2)_{1-4}-NR^1(CH_2)_{2-}$ ;

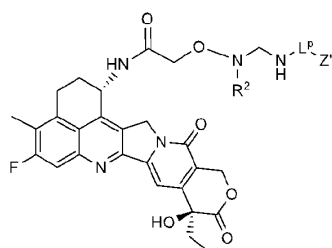
优选地,  $R^1$  选自  $-C_1-C_3$  烷基-羧基;

10

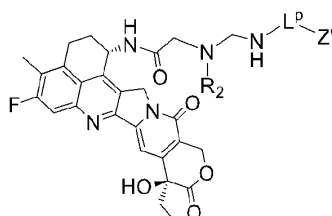
优选地,  $L^z$  选自  $-C(=O)-(CH_2CH_2O)_2-CH_2CH_2NH-$  或  $\sim$ ;



6. 根据权利要求 1-5 任一项所述的抗体-药物偶联物, 其中, 所述抗体-药物偶联物是将式(II)或式(III)化合物与抗体偶联得到:



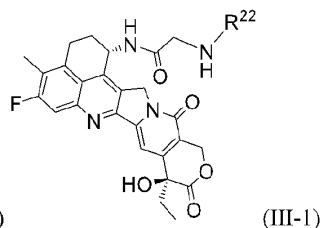
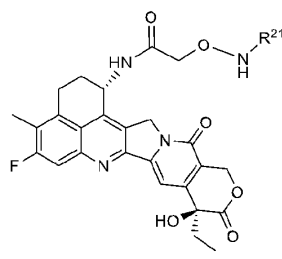
(II)



(III)

其中,  $R^2$ 、 $L^p$  各自定义同式(I)化合物,  $Z'$  为与  $Z$  相适应的可偶联抗体的接头基团, 优选为马来酰亚胺基、溴乙酰基或碘乙酰基;

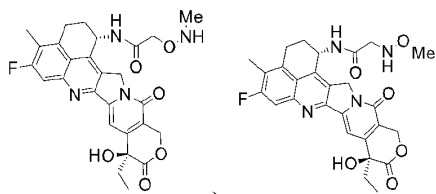
优选地, 所述抗体-药物偶联物在生理环境下释放以下抗肿瘤化合物:



其中,  $R^{21}$  选自  $C_1$ - $C_6$  烷基, 优选为  $-C_1$ - $C_3$  烷基, 更优选为甲基;

$R^{22}$  选自  $C_1$ - $C_6$  烷氧基, 优选为  $-C_1$ - $C_3$  烷氧基, 更优选为甲氧基;

优选释放以下抗肿瘤化合物:



5

7. 根据权利要求 1-6 任一项所述的抗体-药物偶联物, 其中, 所述抗体为肿瘤相关抗原抗体;

优选地, 所述肿瘤相关抗原选自 Her2、Nectin-4、Trop2、5T4、B7H3、ROR1 或 Claudin18.2 中的一种或多种的抗体;

10 优选地, 所述肿瘤选自乳腺癌、肺癌、结直肠癌、食管癌、胃癌、肺癌、肾癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、头颈癌、胰腺癌或肝癌;

优选地, 所述抗体包含氨基酸序列 SEQ ID NO : 1 或其任何变体的重链, 和氨基酸序列 SEQ ID NO : 2 或其任何变体的轻链;

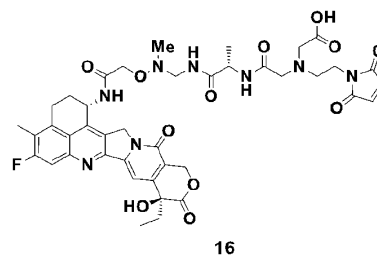
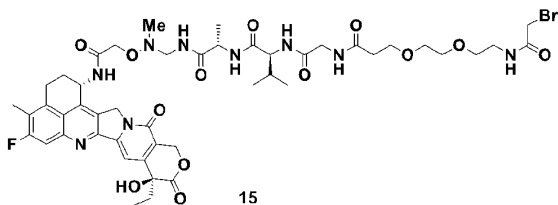
15 优选地, 所述抗体包含氨基酸序列 SEQ ID NO : 3 或其任何变体的重链, 和氨基酸序列 SEQ ID NO : 4 或其任何变体的轻链;

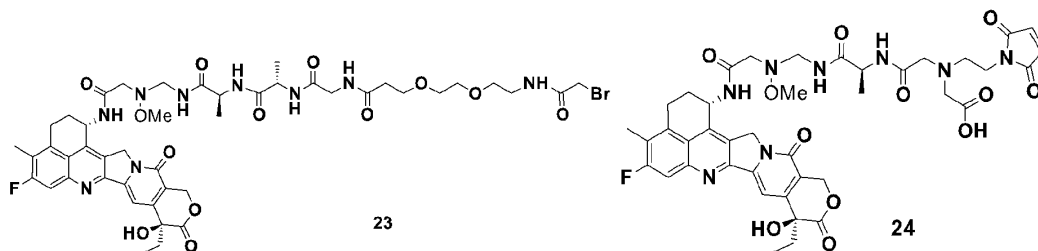
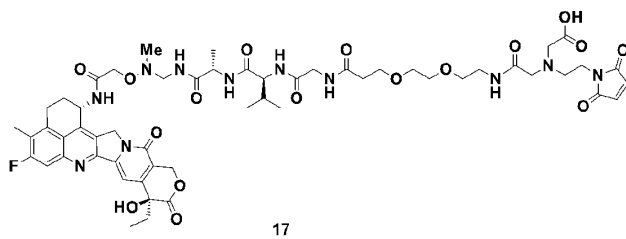
优选地, 所述抗体包含氨基酸序列 SEQ ID NO : 5 或其任何变体的重链, 和氨基酸序列 SEQ ID NO : 6 或其任何变体的轻链;

优选地, 所述抗体-药物偶联物的药物抗体比为 2-8, 进一步优选为 3.5-4.5 或 7.5-8。

20

8. 根据权利要求 1-7 任一项所述的抗体-药物偶联物, 其中, 所述抗体-药物偶联物是将以下化合物与抗体偶联得到:





9. 药物组合物，其包括权利要求 1-8 任一项所述的抗体-药物偶联物与药学上可接受的载体。

5

10. 权利要求 1-8 任一项所述的抗体-药物偶联物或权利要求 9 所述的药物组合物在制备抗肿瘤药物中的用途；

优选地，所述肿瘤选自乳腺癌、肺癌、结直肠癌、食管癌、胃癌、肺癌、肾癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、头颈癌、胰腺癌或肝癌。

10 11. 一种治疗肿瘤疾病的方法，其包括向有需要的患者施用治疗有效量的权利要求 1-8 任一项所述的抗体-药物偶联物或权利要求 9 所述的药物组合物的步骤；

优选地，所述肿瘤为实体瘤；

优选地，所述肿瘤选自乳腺癌、肺癌、结直肠癌、食管癌、胃癌、肺癌、肾癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、头颈癌、胰腺癌或肝癌。

15