

艾日布林衍生物的药物偶联物

技术领域

本公开涉及艾日布林衍生物的药物偶联物。

背景技术

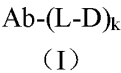
抗体药物偶联物 (antibody drug conjugate, ADC) 把单克隆抗体或者抗体片段通过稳定的化学接头化合物与具有生物活性的药物相连, 充分利用了抗体对正常细胞和肿瘤细胞表面抗原结合的特异性和药物的高效性, 同时又避免了前者疗效偏低和后者毒副作用过大等缺陷。这也就意味着, 与以往传统的化疗药物相比, 抗体药物偶联物能精准地结合肿瘤细胞并降低将对正常细胞的影响。

至 2000 年第一个抗体药物偶联物 Mylotarg (吉妥珠单抗奥唑米星 (gemtuzumab ozogamicin), 惠氏制药有限公司) 被美国 FDA 批准上市用于治疗急性髓细胞白血病开始, 进入临床阶段的 ADC 药物共有 164 项, 大多数 (n=100) 处于临床一期, 46 项进入临床二期, 7 项进入临床三期, BLA 申请药物有 3 项。三代上市的代表药物分别是基因泰克和 Genetics 公司合作开发的 Polatuzumab vedotin (商品名, Polivy, 2019 年 6 月获批上市), Agensys (安斯泰来的子公司) 和 Seattle Genetics 合作开发的 Enfortumab vedotin (商品名, Padcev, 2019 年 12 月) 以及第一三共开发的 Fam-trastuzumab deruxtecan (商品名, Enhertu)。

微管为与包括细胞内迁移和转运、细胞信号传导和维持细胞形状的多种细胞功能相关的有力的细丝状细胞骨架蛋白。微管也在有丝分裂细胞分裂中通过形成染色体分成两个子细胞所需的有丝分裂纺锤体而起到关键作用。所有细胞中微管的生物功能大部分由其聚合动力学调节, 这通过 α 和 β 微管蛋白二聚物可逆、非共价地加在微管两端进行。这种动力学行为和所产生的对微管长度的控制为有丝分裂纺锤体的适当功能所不可缺少的。甚至微管动力学的微小改变也会牵涉轴检查点, 抑制有丝分裂时细胞周期进展, 且随后引起细胞死亡。由于癌细胞的细胞分裂快速, 所以与正常细胞相比, 其一般对结合于微管蛋白且破坏其正常功能的化合物更加敏感。因此, 微管蛋白抑制剂和其它靶向微管剂有望成为一类治疗癌症的药物。

发明内容

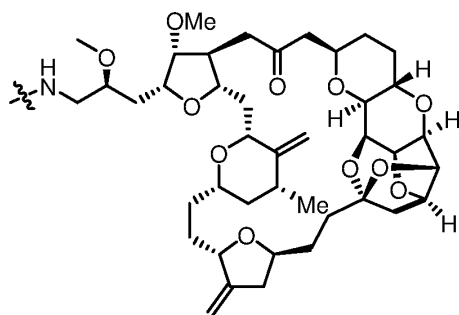
本公开提供了一种抗体-药物偶联物 (ADC), 其具有式 (I) 所示结构或其药学上可接受的盐或溶剂化物:



其中, Ab 为与 HER2 的结构域 II 结合的 HER2 抗体或其抗原结合片段,

L 为将 Ab 共价连接于 D 的连接子, 且 k 为 1 至 20 (包括 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 或任意两数值之间任意数值),

-D 如式所示:



5

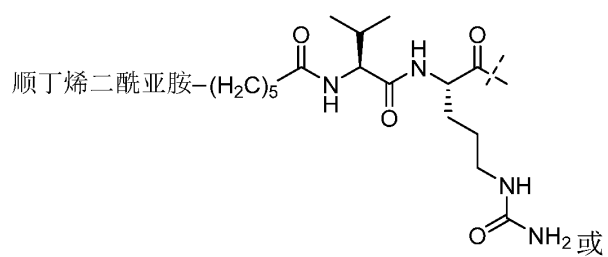
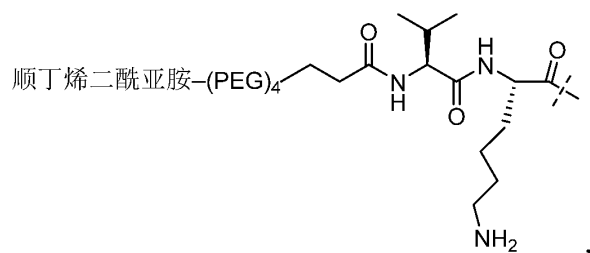
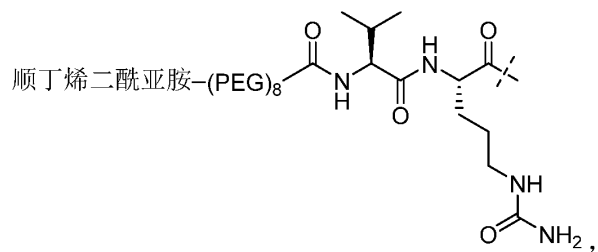
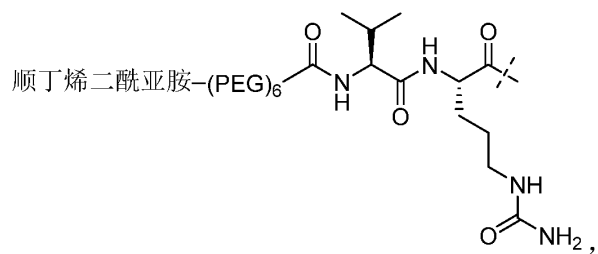
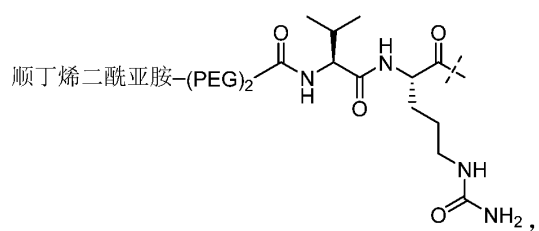
在一些实施方案中, 抗体-药物偶联物 $\text{Ab}-(\text{L-D})_k$ 中 k 选自 1 至 10, 可以为整数, 也可以为小数。

在一些实施方案中, 连接子在细胞外是稳定的, 使得 ADC 在存在于细胞外环境中时保持完整, 但在例如癌细胞的细胞中内化时能够裂解。在一些实施方案中, 当 ADC 进入表达对 ADC 的抗体部分具有特异性的抗原的细胞时, 艾日布林衍生物药物部分从抗体部分裂解, 且裂解释放艾日布林衍生物的未修饰形式。

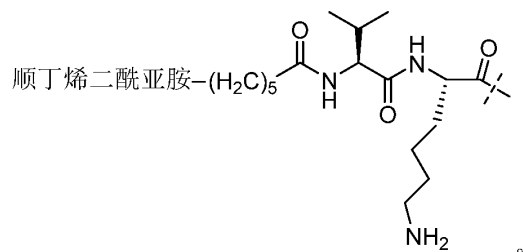
在一些实施方案中, 连接子中的可裂解部分为可裂解肽部分。在一些实施方案中, 相对于包含其他可裂解部分的 ADC, 包含可裂解肽部分的 ADC 显示较低的聚集水平, 改善的抗体: 药物比率, 增加的癌细胞的靶向杀死, 减少的非癌细胞的脱靶杀死, 和/或较高的药物负载。在一些实施方案中, 相对于不可裂解的连接子, 添加可裂解部分增加细胞毒性和/或效力。在一些实施方案中, 可裂解肽部分能够由酶裂解, 且连接子为酶能够裂解的连接子。在一些实施方案中, 酶为组织蛋白酶, 且连接子为组织蛋白酶能够裂解的连接子。在某些实施方案中, 与其他分裂机制相比, 酶能够裂解的连接子(例如组织蛋白酶能够裂解的连接子)显示上述改善特性中的一种或多种。

在一些实施方案中, 连接子包含氨基酸单元, 所述氨基酸单元优选包含由 2 至 7 个选自苯丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、赖氨酸、瓜氨酸、丝氨酸、谷氨酸、天冬氨酸的氨基酸构成的肽残基, 更优选缬氨酸-瓜氨酸(Val-Cit)、丙氨酸-丙氨酸-天冬酰胺(Ala-Ala-Asn)、甘氨酸-甘氨酸-赖氨酸(Gly-Gly-lys)、缬氨酸-赖氨酸(Val-lys)、缬氨酸-丙氨酸(Val-Ala)、缬氨酸-苯丙氨酸(Val-Phe)或甘氨酸-甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸(Gly-Gly-Phe-Gly)。

在一些实施方案中, 本公开包括氨基酸单元的连接子选自:



5



在一些实施方案中，氨基酸单元包含缬氨酸-瓜氨酸(Val-Cit)。在一些实施方案中，相对于包含其它氨基酸单元或其它可裂解部分的 ADC，包含 Val-Cit 的 ADC

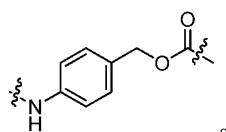
显示增加的稳定性, 减少的脱靶细胞杀死, 增加的靶向细胞杀死, 较低的聚集水平, 和/或较高的药物负载。

另一方面, 一些实施方案提供的连接子包含可裂解磺酰胺部分, 所述连接子在还原条件下能够裂解。

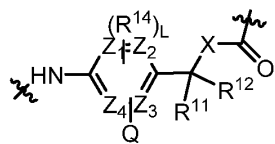
5 在一些实施方案中, 所述连接子包含可裂解二硫化物部分, 所述连接子在还原条件下能够裂解。

另一方面, 本公开抗体偶联物中连接子包含至少一种将艾日布林衍生物 D 连接于可裂解部分的间隔单元。在一些实施方案中, 所述连接子包含连接于 D 的间隔单元。

10 在一些实施方案中, 所述间隔单元包含对氨基苯甲氧基羰基 (pAB),

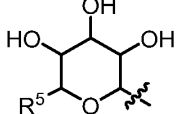


在一些实施方案中, 所述间隔单元包含:

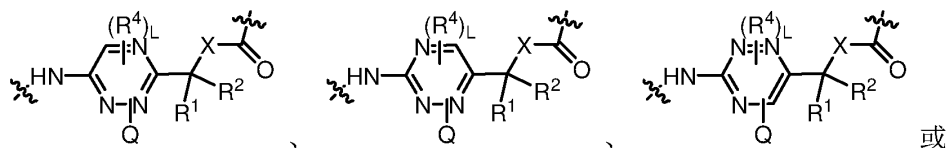


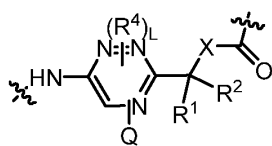
15 其中, Z_1 至 Z_4 各自独立地选自碳原子或氮原子; R^4 选自烷基、环烷基、芳基和杂芳基, 所述的烷基、环烷基、芳基和杂芳基各自独立地任选被选自烷基、烷氧基、卤素、氨基、氰基、硝基、羟基、羟烷基、环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基中的一个或多个取代基所取代; R^1 和 R^2 各自独立选自氢、 C_{1-6} 烷基、卤代烷基或 C_{3-6} 环烷基, 优选氢; 或者, R^1 与 R^2 与其相连接的碳原子一起形成 C_{3-6} 环烷基; X 选自 -O- 或 -NH-; L 选自 1-4 之间整数;

20 Q 为 V-E, V-E 提供了可被位于胞内的糖苷酶切割的糖苷键, E 选自 -O-、-S-

或 $-NR^3$, R^3 选自氢或甲基, 进一步地, V 选自 , 其中 R^5 选自 -COOH 或 CH_2OH 。在一些实施方案中, V 选自 -COOH。

在一些实施方案中, 所述间隔单元包含:





另一方面，本公开抗体偶联物（ADC）中 L-D 是由下式表示的化学部分：

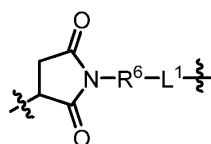
-Str- (Pep)-Sp-D

Str 是与 Ab 共价连接的伸展基单元，

Sp 为间隔单元，

Pep 选自氨基酸单元。

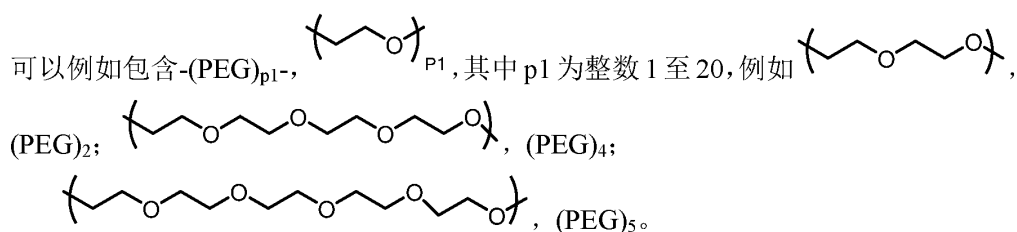
另一方面，ADC 中 Str 选自下式表示的化学部分：



，其中 R^6 选自 $-W-C(O)-$ 、 $-C(O)-W-C(O)-$ 、 $(CH_2CH_2O)_{p1}C(O)-$ 、 $(CH_2CH_2O)_{p1}CH_2C(O)-$ 、 $(CH_2CH_2O)_{p1}CH_2CH_2C(O)-$ ，其中 W 选自 C_{1-8} 亚烷基、 C_{1-8} 亚烷基-环烷基或 1 至 8 个原子的直链杂亚烷基，所述杂亚烷基包含 1 至 3 个选自 N、O 或 S 的杂原子，其中所述的 C_{1-8} 亚烷基、 C_{1-8} 亚烷基-环烷基和直链杂亚烷基各自独立地任选进一步被选自卤素、羟基、氰基、氨基、烷基、氯代烷基、烷氧基和环烷基的一个或多个取代基所取代；

L^1 选自 $-NR^7(CH_2CH_2O)_{p1}CH_2CH_2C(O)-$ 、 $-NR^7(CH_2CH_2O)_{p1}CH_2C(O)-$ 、 $-S(CH_2)_{p1}C(O)-$ 、 $-(CH_2)_{p1}C(O)-$ 或化学键，优选化学键；其中， $p1$ 为 1 至 20 的整数， R^7 选自氢原子、烷基、卤代烷基和羟烷基。

在一些实施方案中，连接子可以包含至少一种聚乙二醇(PEG)部分。PEG 部分



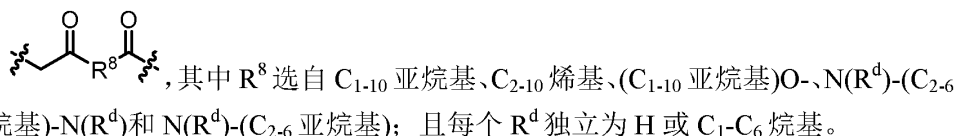
在一些实施方案中，连接子中的间隔子单元包含 $(PEG)_2$ 。在一些实施方案中，尽管连接子长度较短，但相对于包含较长间隔子单元(例如 $(PEG)_8$)的 ADC，包含较短间隔子单元(例如 $(PEG)_2$)的 ADC 显示较低的聚集水平和/或较高的药物负载。

在一些实施方案中，所述抗体-药物偶联物中 R^7 选自 C_{1-6} 亚烷基 $C(O)-$ 、 $-(CH_2-CH_2O)_2C(O)-$ 、 $-(CH_2-CH_2O)_2CH_2C(O)-$ 、 $-(CH_2-CH_2O)_2CH_2CH_2C(O)-$ 、 $-(CH_2-CH_2O)_3C(O)-$ 和 $-(CH_2-CH_2O)_4C(O)-$ 。

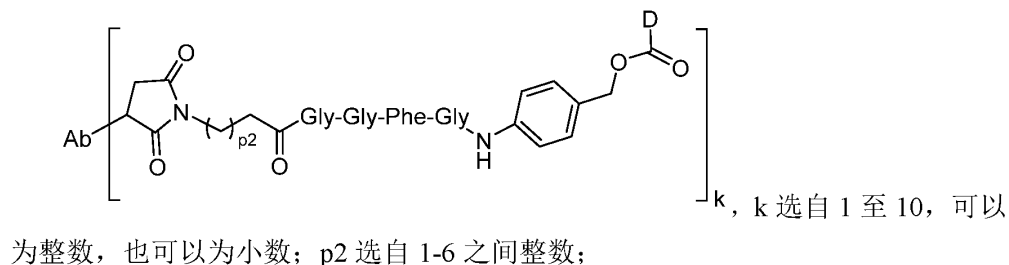
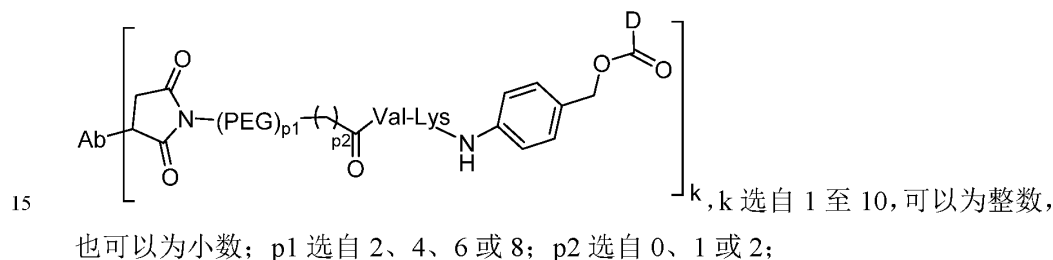
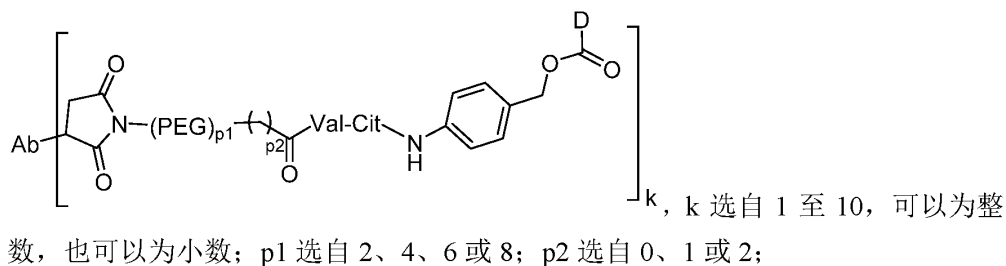
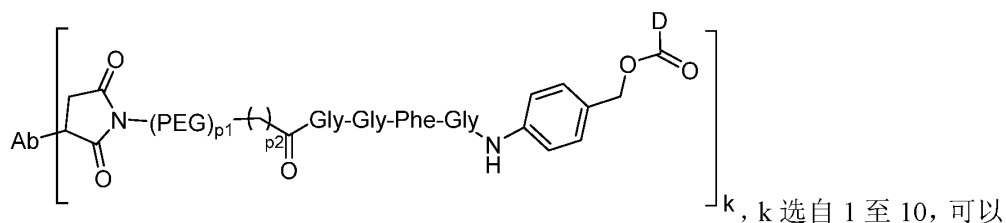
在一些实施方案中，所述抗体-药物偶联物中连接子 L 包含：顺丁烯二酰亚胺- $(PEG)_2$ -Val-Cit、顺丁烯二酰亚胺- $(PEG)_6$ -Val-Cit、顺丁烯二酰亚胺- $(PEG)_8$ -Val-Cit、顺丁烯二酰亚胺- $(PEG)_4$ - $CH_2CH_2C(O)$ -Val-lys、顺丁烯二酰亚胺- $(CH_2)_5$ -Val-Cit、顺

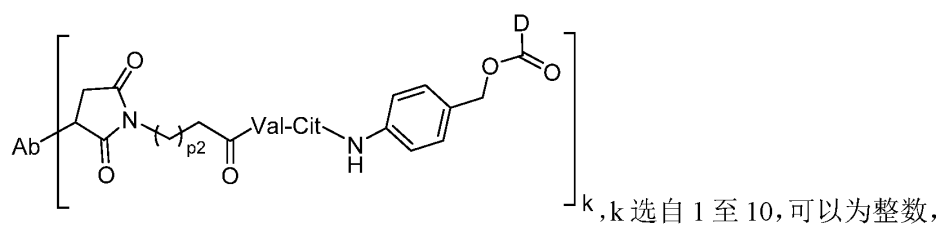
丁烯二酰亚胺-(CH₂)₅-Val-lys、顺丁烯二酰亚胺-(CH₂)₅- Gly-Gly-Phe-Gly、顺丁烯二酰亚胺-(PEG)₂-Ala-Ala-Asn、顺丁烯二酰亚胺-(PEG)₆-Ala-Ala-Asn、顺丁烯二酰亚胺-(PEG)₈-Ala-Ala-Asn、顺丁烯二酰亚胺-(PEG)₄-三唑-(PEG)₃-磺酰胺、顺丁烯二酰亚胺-(PEG)₂-CH₂CH₂C(O)-Val-lys、顺丁烯二酰亚胺-(PEG)₄-三唑-(PEG)₃-磺酰胺或
 5 Mal-(PEG)₄-三唑-(PEG)₃-二硫化物。

另一方面，一些实施方案提供所述抗体-药物偶联物中 Str 选自下式表示的化学部分：

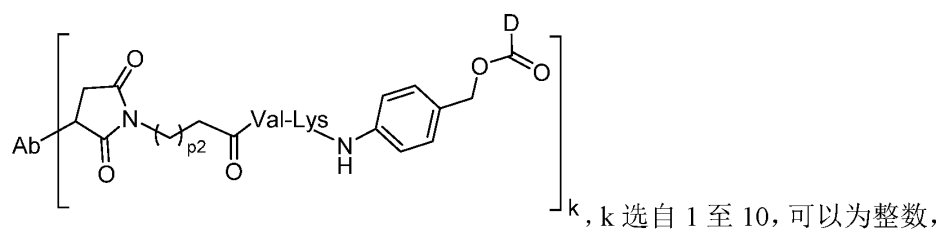


10 在一些实施方案中，所述抗体-药物偶联物，其由下式表示：



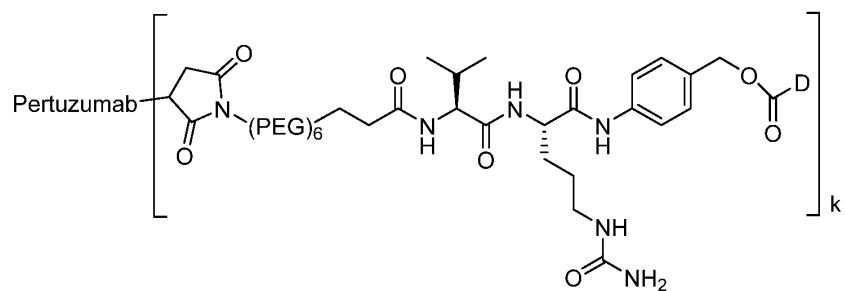
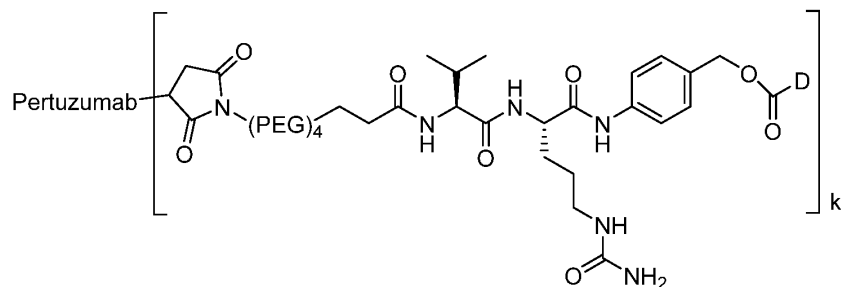
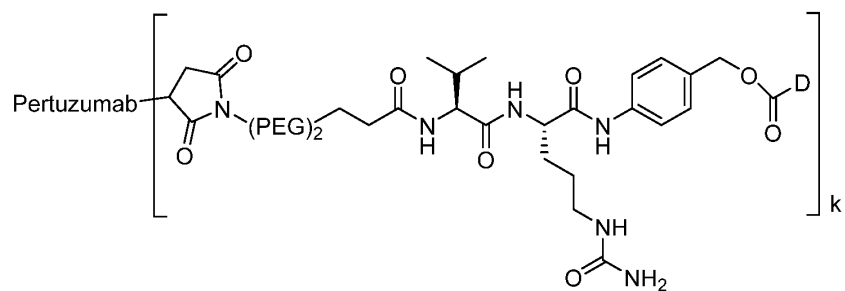


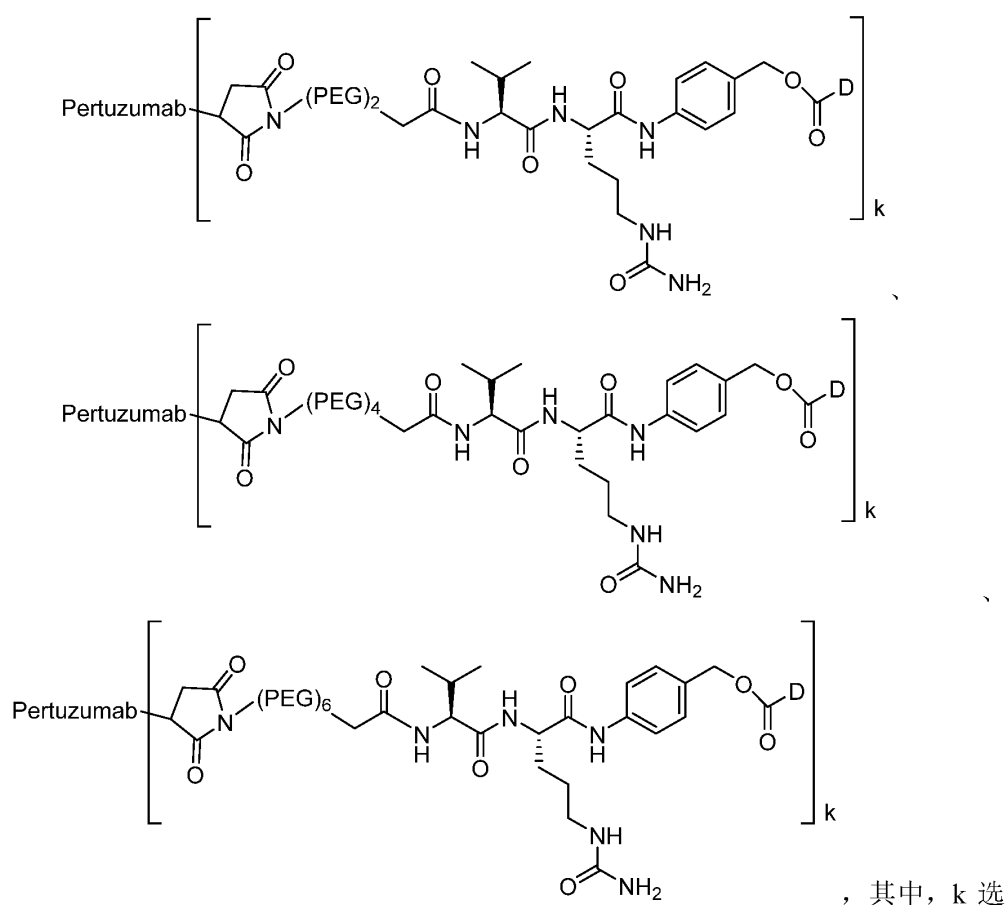
也可以为小数; p_2 选自 1-6 之间整数;



也可以为小数; p_2 选自 1-6 之间整数。

5 进一步地, 本公开所述抗体-药物偶联物 (ADC) 选自:





自 1 至 10, 可以为整数, 也可以为小数。

5 前述 HER2 的结构域 II 结合的 HER2 抗体或其抗原结合片段重、轻链的可变区序列如下所示:

轻链可变区

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRY
TGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYYIYPYTFGQGTKVEIK

10

SEQ ID NO: 1

重链可变区

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMWDWRQAPGKGLEWVADV
PNSGGSINQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYF
15 DYWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 2。

以下为 Pertuzumab 的序列:

轻链

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRY
20 TGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVA

APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO. 3

重链

5 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMMDWVRQAPGKGLEWVADV
PNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGP
DYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
10 EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO. 4。

15 以下为 Trastuzumab 的序列：

轻链

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIY
SGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGT
15 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO. 5

重链

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV
NGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGD
25 DYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN
KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
30 SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO. 6。

在一些实施方案中，本公开抗体偶联物中 k 选自 2.0 至 2.5，包括 2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5 或任意两数之间值。

35 在另一些实施方案中，本公开抗体偶联物中 k 选自 2.5 至 3.5，包括 2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0 或任意两数之间值。

在另一些实施方案中，本公开抗体偶联物中 k 选自 3.5 至 5.0，包括 3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0 或任意两数

之间值。

另一方面，本公开还提供前述抗体-偶联物的同位素取代物。在一些实施方案中，所述同位素取代物为氘原子取代的。

另一方面，本公开还提供一种药物组合物，其含有治疗有效量的前述抗体-药物偶联物，或其同位素取代物，以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

在一些实施方案中，所述的药物组合物的单位剂量为 0.001mg-1000mg。

在某些实施方案中，基于组合物的总重量，所述的药物组合物含有 0.01-99.99% 的前述抗体-药物偶联物，或其同位素取代物。在某些实施方案中，所述的药物组合物含有 0.1-99.9% 的前述抗体-药物偶联物，或其同位素取代物。在某些实施方案中，所述的药物组合物含有 0.5%-99.5% 的前述抗体-药物偶联物，或其同位素取代物。在某些实施方案中，所述的药物组合物含有 1%-99% 的前述抗体-药物偶联物，或其同位素取代物。在某些实施方案中，所述的药物组合物含有 2%-98% 的前述抗体-药物偶联物，或其同位素取代物。

在某些实施方案中，基于组合物的总重量，所述的药物组合物含有 0.01%-99.99% 的药学上可接受的赋形剂。在某些实施方案中，所述的药物组合物含有 0.1%-99.9% 的药学上可接受的赋形剂。在某些实施方案中，所述的药物组合物含有 0.5%-99.5% 的药学上可接受的赋形剂。在某些实施方案中，所述的药物组合物含有 1%-99% 的药学上可接受的赋形剂。在某些实施方案中，所述的药物组合物含有 2%-98% 的药学上可接受的赋形剂。

本公开还提供一种前述抗体-药物偶联物或前述药物组合物在制备用于治疗或预防肿瘤的药物中的用途。在一些实施方案中，所述的肿瘤为与 HER2 的结构域 II 表达相关的癌症。

本公开还提供一种前述抗体-药物偶联物或前述药物组合物在制备治疗和/或预防癌症的药物中的用途。在一些实施方案中，所述癌症选自乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫癌、前列腺癌、肾癌、尿道癌、膀胱癌、肝癌、胃癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、食道癌、黑色素瘤、神经胶质瘤、神经母细胞瘤、肉瘤、肺癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、白血病、骨癌、皮肤癌、甲状腺癌、胰腺癌和淋巴瘤。

本公开还提供一种治疗或预防与 HER2 的结构域 II 表达相关的癌症患者的方法，其通过向所述患者施用治疗有效量的如前述抗体-药物偶联物，或其同位素取代物，或前述药物组合物。

本公开还提供了用于治疗或预防与 HER2 的结构域 II 表达相关的癌症的前述抗体-药物偶联物，或其同位素取代物，或前述药物组合物。

可将活性化合物制成适合于通过任何适当途径给药的形式，活性化合物优选是以单位剂量的方式，或者是以患者可以以单剂自我给药的方式。本发明化合物或组合物的单位剂量的表达方式可以是片剂、胶囊、扁囊剂、瓶装药水、药粉、颗粒剂、锭剂、栓剂、再生药粉或液体制剂。

发明的详细说明

除非另有限定，本公开所用的所有技术和科学术语均与本公开所属领域普通技术人员的通常理解一致。虽然也可采用与本公开所述相似或等同的任何方法和材料实施或测试本公开，但本公开描述了优选的方法和材料。描述和要求保护本公开时，依据以下定义使用下列术语。

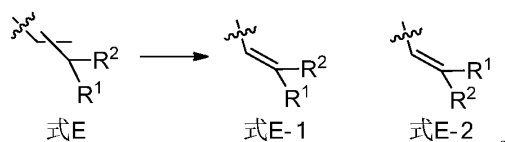
当本公开中使用商品名时，申请人旨在包括该商品名产品的制剂、该商品名产品的非专利药和活性药物部分。

除非有相反陈述，在说明书和权利要求书中使用的术语具有下述含义。

本公开化合物可以存在特定的几何或立体异构体形式。本公开设想所有的这类化合物，包括顺式和反式异构体、(-)-和(+)-对映体、(R)-和(S)-对映体、非对映异构体、(D)-异构体、(L)-异构体，及其外消旋混合物和其他混合物，例如对映异构体或非对映体富集的混合物，所有这些混合物都属于本公开的范围之内。烷基等取代基中可存在另外的不对称碳原子。所有这些异构体以及它们的混合物，均包括在本公开的范围之内。本公开的含有不对称碳原子的化合物可以以光学活性纯的形式或外消旋形式被分离出来。光学活性纯的形式可以从外消旋混合物拆分，或通过使用手性原料或手性试剂合成。

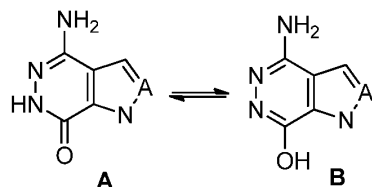
可以通过的手性合成或手性试剂或者其他常规技术制备光学活性的(R)-和(S)-异构体以及 D 和 L 异构体。如果想得到本公开某化合物的一种对映体，可以通过不对称合成或者具有手性助剂的衍生作用来制备，其中将所得非对映体混合物分离，并且辅助基团裂开以提供纯的所需对映异构体。或者，当分子中含有碱性官能团(如氨基)或酸性官能团(如羧基)时，与适当的光学活性的酸或碱形成非对映异构体的盐，然后通过本领域所公知的常规方法进行非对映异构体拆分，然后回收得到纯的对映体。此外，对映异构体和非对映异构体的分离通常是通过使用色谱法完成的，所述色谱法采用手性固定相，并任选地与化学衍生法相结合(例如由胺生成氨基甲酸盐)。

本公开所述化合物的化学结构中，键“/”表示未指定构型，即如果化学结构中存在手性异构体，键“/”可以为“”或“”，或者同时包含“”和“”两种构型。键“”表示未指定构型，包括顺式(E)或反式(Z)构型。或者本公开所描述的“”是指双键，以该键键合的结构可为“顺式异构体”或“反式异构体”或者“顺式异构体和反式异构体以任何比例形成的混合物”，例如式 E 代表 E-1、式 E-2 或两者以任何比例形成的混合物：



本公开所述化合物的化学结构中，键“”并未指定构型，即可以为 Z 构型或 E 构型，或者同时包含两种构型。

本公开的化合物和中间体还可以以不同的互变异构体形式存在，并且所有这样的形式包含于本公开的范围内。术语“互变异构体”或“互变异构体形式”是指可由低能垒互变的不同能量的结构异构体。例如，质子互变异构体(也称为质子转移互变异构体)包括经由质子迁移的互变，如酮-烯醇及亚胺-烯胺、内酰胺-内酰亚胺异构化。内酰胺-内酰亚胺平衡实例是在如下所示的 A 和 B 之间。



本公开中的所有化合物可以被画成 A 型或 B 型。所有的互变异构形式在本公开的范围内。化合物的命名不排除任何互变异构体。

本公开还包括一些与本文中记载的那些相同的，但一个或多个原子被原子量或质量数不同于自然中通常发现的原子量或质量数的原子置换的同位素标记的本公开化合物。可结合到本公开化合物的同位素的实例包括氢、碳、氮、氧、磷、硫、氟、碘和氯的同位素，诸如分别为 ^2H 、 ^3H 、 ^{11}C 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{13}N 、 ^{15}N 、 ^{15}O 、 ^{17}O 、 ^{18}O 、 ^{31}P 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{18}F 、 ^{123}I 、 ^{125}I 和 ^{36}Cl 等。

除另有说明，当一个位置被特别地指定为氘(D)时，该位置应理解为具有大于氘的天然丰度(其为 0.015%)至少 1000 倍的丰度的氘(即，至少 10%的氘掺入)。示例中化合物的具有大于氘的天然丰度可以是至少 1000 倍的丰度的氘、至少 2000 倍的丰度的氘、至少 3000 倍的丰度的氘、至少 4000 倍的丰度的氘、至少 5000 倍的丰度的氘、至少 6000 倍的丰度的氘或更高丰度的氘。本公开还包括各种氘化形式的式(I)化合物。与碳原子连接的各个可用的氢原子可独立地被氘原子替换。本领域技术人员能够参考相关文献合成氘化形式的式(I)化合物。在制备氘代形式的式(I)化合物时可使用市售的氘代起始物质，或它们可使用常规技术采用氘代试剂合成，氘代试剂包括但不限于氘代硼烷、三氘代硼烷四氢呋喃溶液、氘代氢化锂铝、氘代碘乙烷和氘代碘甲烷等。

“任选地”或“任选”是指意味着随后所描述的事件或环境可以但不必发生，该说明包括该事件或环境发生或不发生的场合。例如“任选的被卤素或者氰基取代的 C_{1-6} 烷基”是指卤素或者氰基可以但不必须存在，该说明包括烷基被卤素或者氰基取代的情形和烷基不被卤素和氰基取代的情形。

“药物组合物”表示含有一种或多种本文所述化合物或其生理学上可药用盐或前体药物与其他化学组分的混合物，以及其他组分例如生理学可药用的载体和赋形剂。药物组合物的目的是促进对生物体的给药，利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。

“可药用赋形剂”包括但不限于任何已经被美国食品和药物管理局批准对于人类或家畜动物使用可接受的任何助剂、载体、赋形剂、助流剂、甜味剂、稀释

剂、防腐剂、染料/着色剂、增香剂、表面活性剂、润湿剂、分散剂、助悬剂、稳定剂、等渗剂、溶剂或乳化剂。

本公开中所述“有效量”或“有效治疗量”包含足以改善或预防医学病症的症状或病症的量。有效量还意指足以允许或促进诊断的量。用于特定患者或兽医学受试者的有效量可依据以下因素而变化：如待治疗的病症、患者的总体健康情况、给药的方法途径和剂量以及副作用严重性。有效量可以是避免显著副作用或毒性作用的最大剂量或给药方案。

术语“药物”是指细胞毒性药物或免疫调节剂。细胞毒性药物能在肿瘤细胞内具有较强破坏其正常生长的化学分子。细胞毒性药物原则上在足够高的浓度下都可以杀死肿瘤细胞，但是由于缺乏特异性，在杀伤肿瘤细胞的同时，也会导致正常细胞的凋亡，导致严重的副作用。该术语包括毒素，如细菌、真菌、植物或动物来源的小分子毒素或酶活性毒素，放射性同位素(例如 At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³² 和 Lu 的放射性同位素)，毒性药物，化疗药物，抗生素和核溶酶。免疫调节剂是免疫关卡分子的抑制剂。

术语“连接子”、“连接单元”、“接头单元”、“接头”或“连接片段”是指一端与配体连接而另一端与药物相连的化学结构片段或键，也可以连接其他接头后再与药物相连。

接头可以包含一种或多种接头构件。例示性的接头构件包括 6-马来酰亚氨基己酰基(MC)、马来酰亚氨基丙酰基(MP)、缬氨酸-瓜氨酸(Val-Cit 或 vc)、丙氨酸-苯丙氨酸(ala-phe)、对氨基苄氧羰基(PAB)，及那些源自与接头试剂的偶联的：N-琥珀酰亚氨基 4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯(SPP)、N-琥珀酰亚氨基 4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1 羧酸酯(SMCC，在本文中也可称作 MCC)和 N-琥珀酰亚氨基(4-碘-乙酰基)氨基苯甲酸酯(SIAB)。接头可以包括拉伸单元、间隔单元、氨基酸单元和延伸单元。可以通过本领域已知方法合成，诸如 US2005-0238649A1 中所记载的。接头可以是便于在细胞中释放药物的“可切割接头”。例如，可使用酸不稳定接头(例如脲)、蛋白酶敏感(例如肽酶敏感)接头、光不稳定接头、二甲基接头、或含二硫化物接头(Chari 等, *Cancer Research* 52: 127-131(1992); 美国专利 No.5,208,020)。

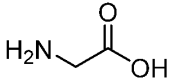
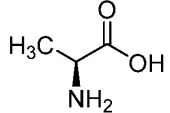
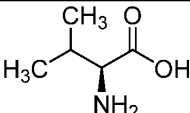
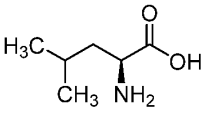
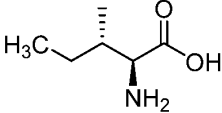
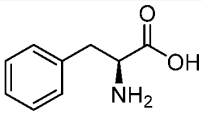
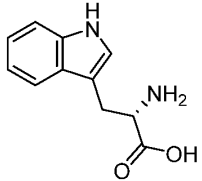
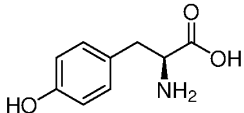
术语“拉伸单元”指一端通过碳原子与抗体共价连接而另一端与氨基酸单元、二硫化物部分、磺酰胺部分或非肽化学部分相连的化学结构片段。

术语“间隔单元”是一种双功能化合结构片段，可用于偶联氨基酸单元和细胞毒性药物最终形成抗体-药物偶联物，这种偶联方式可以将细胞毒性药物选择性的连接到氨基酸单元上。

术语“氨基酸”是指分子结构中含有氨基和羧基，并且氨基和羧基都直接连接在-CH-结构上的有机化合物。通式是 H₂NCH(R)COOH，R 为 H、取代或未取代烷基等。根据氨基连结在羧酸中碳原子的位置，可分为 α、β、γ、δ、ε……-氨基酸。

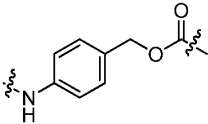
在生物界中，构成天然蛋白质的氨基酸具有其特定的结构特点，即其氨基直接连接在 α -碳原子上，即 α -氨基酸，包括甘氨酸（Glycine）、丙氨酸（Alanine）、缬氨酸（Valine）、亮氨酸（Leucine）、异亮氨酸（Isoleucine）、苯丙氨酸（Phenylalanine）、色氨酸（Tryptophan）、酪氨酸（Tyrosine）、天冬氨酸（Aspartic acid）、组氨酸（Histidine）、天冬酰胺（Asparagine）、谷氨酸（Glutamic acid）、赖氨酸（Lysine）、谷氨酰胺（Glutamine）、甲硫氨酸（Methionine）、精氨酸（Arginine）、丝氨酸（Serine）、苏氨酸（Threonine）、半胱氨酸（Cysteine）、脯氨酸（Proline）等。非天然氨基酸如瓜氨酸。如本领域技术人员所公知的，非天然氨基酸并不构成天然蛋白质，因此也不参与本公开中抗体的合成。本公开所用氨基酸三字母代码和单字母代码如

10 *J.biol.chem.*, 243, p3558(1968)中所述。

简称	缩写	名称	结构
G	Gly	甘氨酸 Glycine	
A	Ala	丙氨酸 Alanine	
V	Val	缬氨酸 Valine	
L	Leu	亮氨酸 Leucine	
I	Ile	异亮氨酸 Isoleucine	
F	Phe	苯丙氨酸 Phenylalanine	
W	Trp	色氨酸 Tryptophan	
Y	Tyr	酪氨酸 Tyrosine	

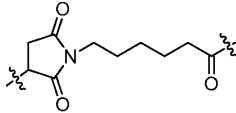
D	Asp	天冬氨酸 Aspartic acid	
H	His	组氨酸 Histidine	
N	Asn	天冬酰胺 Asparagine	
E	Glu	谷氨酸 Glutamic acid	
K	Lys	赖氨酸 Lysine	
Q	Gln	谷氨酰胺 Glutamine	
C	Cit	瓜氨酸 Citrulline	

本公开中间隔单元为 PAB，结构如 对氨基苯甲氧羰基 片段，其结构如式(VI)所示，连接在 D 上，



(VI)

接头组件包括但不限于：
MC=6-马来酰亚氨基己酰基，结构如下：



Val-Cit 或“vc”=缬氨酸-瓜氨酸(蛋白酶可切割接头中的例示二肽)

瓜氨酸=2-氨基-5-脲基戊酸

Me-Val-Cit=N-甲基-缬氨酸-瓜氨酸(其中接头肽键已经修饰以防止其受到组织蛋白酶 B 的切割)

MC(PEG)₆-OH=马来酰亚氨基己酰基-聚乙二醇(可附着于抗体半胱氨酸)

SPP=N-琥珀酰亚氨基 4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯

SPDP=N-琥珀酰亚氨基 3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯

SMCC=琥珀酰亚氨基-4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1-羧酸酯

IT=亚氨基硫烷

PBS=磷酸缓冲盐溶液。

5 术语“抗体-药物偶联物”，指配体通过稳定的连接单元与具有生物活性的药物相连。在本公开中“抗体-药物偶联物”(antibody drug conjugate, ADC)，指把单克隆抗体或者抗体片段通过稳定的连接单元与具有生物活性的毒性药物相连。

术语“载药量”可以表示为药物量和抗体量的比值，即 ADC 中每个抗体所偶联的药物的平均数量。载药量的范围可以是每个抗体(Ab)连接 1-20 个，优选 1-10
10 个细胞毒性药物(D)。在本公开的实施方式中，载药量表示为 k，示例性的可以为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 或任意两数值之间数值的均值。优选 1-10，更优选 1-8，或 2-8，或 2-7，或 3-8，或 3-7，或 3-6，或 4-7，或 4-6，或 4-5 的均值。可用常规方法如 UV/可见光光谱法、质谱、ELISA 试验、单抗分子大小变异体测定法(CE-SDS)和 HPLC 特征鉴定
15 偶联反应后每个 ADC 分子的药物平均数量。

本公开单抗分子大小变异体测定法(CE-SDS)可采用十二烷基硫酸钠毛细管电泳(CE-SDS)紫外检测方法，在还原和非还原条件下，依据分子量大小，按毛细电泳法(2015 年版《中国药典》0542)，定量测定重组单克隆抗体产品的纯度。

可以用以下非限制性方法控制抗体-药物偶联物的载量，包括：

- 20 (1) 控制连接试剂和单抗的摩尔比，
(2) 控制反应时间和温度，
(3) 选择不同的反应试剂。

术语“抗体”指免疫球蛋白，是由两条相同的重链和两条相同的轻链通过链间二硫键连接而成的四肽链结构。免疫球蛋白重链恒定区的氨基酸组成和排列顺序不同，故其抗原性也不同。据此，可将免疫球蛋白分为五类，或称为免疫蛋白的同种型，即 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE，其相应的重链分别为 μ 链、 δ 链、 γ 链、 α 链、和 ϵ 链。同一类 Ig 根据其铰链区氨基酸组成和重链二硫键的数目和位置的差别，又可分为不同的亚类，如 IgG 可分为 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。轻链通过恒定区的不同分为 κ 链或 λ 链。五类 Ig 中每类 Ig 都可以有 κ 链或 λ 链。抗体
30 重链和轻链靠近 N 端的约 110 个氨基酸的序列变化很大，为可变区(Fv 区)；靠近 C 端的其余氨基酸序列相对稳定，为恒定区。可变区包括 3 个高变区(HVR)和 4 个序列相对保守的骨架区(FR)。3 个高变区决定抗体的特异性，又称为互补性决定区(CDR)。每条轻链可变区(LCVR)和重链可变区(HCVR)由 3 个 CDR 区 4 个 FR 区组成，从氨基端到羧基端依次排列的顺序为：FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4。轻链的 3 个 CDR 区指 LCDR1、LCDR2、和 LCDR3；重链的
35 3 个 CDR 区指 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。

本公开的抗体包括鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体和全人源抗体，优选人源化抗体和全人源抗体。

术语“鼠源抗体”在本公开中为根据本领域知识和技能用鼠制备抗体。制备时用特定抗原注射试验对象，然后分离表达具有所需序列或功能特性的抗体的杂交瘤。

术语“嵌合抗体（chimeric antibody）”，是将鼠源性抗体的可变区与人抗体的恒定区融合而成的抗体，可以减轻鼠源性抗体诱发的免疫应答反应。建立嵌合抗体，要先建立分泌鼠源性特异性单抗的杂交瘤，然后从鼠杂交瘤细胞中克隆可变区基因，再根据需要克隆人抗体的恒定区基因，将鼠可变区基因与人恒定区基因连接成嵌合基因后插入表达载体中，最后在真核系统或原核系统中表达嵌合抗体分子。

术语“人源化抗体（humanized antibody）”，也称为 CDR 移植抗体（CDR-grafted antibody），是指将鼠的 CDR 序列移植到人的抗体可变区框架，即不同类型的人种系抗体框架序列中产生的抗体。可以克服嵌合抗体由于携带大量鼠蛋白成分，从而诱导的异源性反应。此类构架序列可以从包括种系抗体基因序列的公共 DNA 数据库或公开的参考文献获得。如人重链和轻链可变区基因的种系 DNA 序列可以在“VBase”人种系序列数据库（在因特网 www.mrccpe.com.ac.uk/vbase 可获得），以及在 Kabat, E.A. 等人，1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版中找到。为避免免疫原性下降的同时，引起的活性下降，可对所述的人抗体可变区框架序列进行最少反向突变或回复突变，以保持活性。本公开的人源化抗体也包括进一步由噬菌体展示对 CDR 进行亲和力和成熟后的人源化抗体。进一步描述参与人源化可使用小鼠抗体的方法的文献包括，例如 Queen 等，Proc., Natl.Acad.Sci.USA, 88, 2869, 1991 和 Winter 及其同事的方法 [Jones 等，Nature, 321, 522(1986), Riechmann, 等，Nature, 332, 323-327(1988), Verhoeyen, 等，Science, 239, 1534(1988)]。

术语“全人源抗体”、“全人抗体”或“完全人源抗体”，也称“全人源单克隆抗体”，其抗体的可变区和恒定区都是人源的，去除免疫原性和毒副作用。单克隆抗体的发展经历了四个阶段，分别为：鼠源性单克隆抗体、嵌合性单克隆抗体、人源化单克隆抗体和全人源单克隆抗体。本公开为全人源单克隆抗体。全人抗体制备的相关技术主要有：人杂交瘤技术、EBV 转化 B 淋巴细胞技术、噬菌体显示技术（phage display）、转基因小鼠抗体制备技术（transgenic mouse）和单个 B 细胞抗体制备技术等。

术语“抗原结合片段”是指抗体的保持特异性结合抗原的能力的一个或多个片段。已显示可利用全长抗体的片段来进行抗体的抗原结合功能。“抗原结合片段”中包含的结合片段的实例包括(i)Fab 片段，由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的单价片段；(ii)F(ab')₂ 片段，包含通过铰链区上的二硫桥连接的两个 Fab

片段的二价片段；(iii) 由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段；(iv) 由抗体的单臂的 VH 和 VL 结构域组成的 Fv 片段；(v) 单结构域或 dAb 片段(Ward 等人,(1989)Nature341 : 544-546), 其由 VH 结构域组成；和(vi) 分离的互补决定区(CDR) 或(vii) 可任选地通过合成的接头连接的两个或更多个分离的 CDR 的组合。

5 此外, 虽然 Fv 片段的两个结构域 VL 和 VH 由分开的基因编码, 但可使用重组方法, 通过合成的接头连接它们, 从而使得其能够产生为其中 VL 和 VH 区配对形成单价分子的单个蛋白质链(称为单链 Fv(scFv) ; 参见, 例如, Bird 等人(1988)Science242 :423-426 ; 和 Huston 等人 (1988)Proc.Natl.Acad.Sci USA85:5879-5883)。此类单链抗体也意欲包括在术语抗体的“抗原结合片段”中。

10 使用本领域技术人员已知的常规技术获得此类抗体片段, 并且以与对于完整抗体的方式相同的方式就功用性筛选片段。可通过重组 DNA 技术或通过酶促或化学断裂完整免疫球蛋白来产生抗原结合部分。抗体可以是不同同种型的抗体, 例如, IgG(例如, IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 亚型)、IgA1、IgA2、IgD、IgE 或 IgM 抗体。

15 Fab是通过用蛋白酶木瓜蛋白酶(切割H链的224位的氨基酸残基)处理IgG抗体分子所获得的片段中的具有约50,000的分子量并具有抗原结合活性的抗体片段, 其中H链N端侧的约一半和整个L链通过二硫键结合在一起。

F(ab')₂是通过用酶胃蛋白酶消化IgG铰链区中两个二硫键的下方部分而获得的分子量为约100,000并具有抗原结合活性并包含在铰链位置相连的两个Fab区的抗体片段。

20

Fab'是通过切割上述F(ab')₂的铰链区的二硫键而获得的分子量为约50,000并具有抗原结合活性的抗体片段。

此外, 可以通过将编码抗体的Fab'片段的DNA插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中并将载体导入到原核生物或真核生物中以表达Fab'来生产所述Fab'。

25 术语“单链抗体”、“单链 Fv”或“scFv”意指包含通过接头连接的抗体重链可变结构域(或区域; VH)和抗体轻链可变结构域(或区域; VL)的分子。此类 scFv 分子可具有一般结构: NH₂-VL-接头-VH-COOH 或 NH₂-VH-接头-VL-COOH。合适的现有技术接头由重复的 GGGGS 氨基酸序列或其变体组成, 例如使用 1-4 个重复的变体 (Holliger 等人(1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA90: 6444-6448)。可用于本公开的其他接头由 Alfthan 等人(1995), Protein Eng.8:725-731, Choi 等人(2001), Eur.J.Immuno 1.31:94-106, Hu 等人(1996), Cancer Res.56:3055-3061, Kipriyanov 等人(1999), J.Mol.Biol.293:41-56 和 Roovers 等人(2001), Cancer Immunol.描述。

30

术语“CDR”是指抗体的可变结构域内主要促成抗原结合的 6 个高变区之一。

35 所述 6 个 CDR 的最常用的定义之一由 Kabat E.A. 等人, (1991)Sequences of proteins of immunological interest.NIH Publication91-3242)提供。如本文中使用的,

CDR 的 Kabat 定义只应用于轻链可变结构域的 CDR1、CDR2 和 CDR3(CDR L1、CDR L2、CDR L3 或 L1、L2、L3)，以及重链可变结构域的 CDR2 和 CDR3(CDR H2、CDR H3 或 H2、H3)。通常，每个重链可变区中存在三个 CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3)，每个轻链可变区中存在三个 CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3)。可以使用各种公知方案中的任何一种来确定 CDR 的氨基酸序列边界，包括“Kabat”编号规则（参见 Kabat 等(1991)，*“Sequences of Proteins of Immunological Interest”*，第 5 版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD）、“Chothia”编号规则（参见 Al-Lazikani 等人，(1997)JMB 273: 927-948)和 ImMunoGenTics(IMG T)编号规则(参见 Lefranc M.P., Immunologist, 7, 132-136(1999); Lefranc, M.P.等, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77(2003))等。例如，对于经典格式，遵循 Kabat 规则，所述重链可变域(VH)中的 CDR 氨基酸残基编号为 31-35(HCDR1)、50-65(HCDR2)和 95-102(HCDR3)；轻链可变域(VL)中的 CDR 氨基酸残基编号为 24-34(LCDR1)、50-56(LCDR2)和 89-97(LCDR3)。遵循 Chothia 规则，VH 中的 CDR 氨基酸编号为 26-32(HCDR1)、52-56(HCDR2)和 95-102(HCDR3)；并且 VL 中的氨基酸残基编号为 26-32(LCDR1)、50-52(LCDR2)和 91-96(LCDR3)。通过组合 Kabat 和 Chothia 两者的 CDR 定义，CDR 由人 VH 中的氨基酸残基 26-35(HCDR1)、50-65(HCDR2)和 95-102(HCDR3)和人 VL 中的氨基酸残基 24-34(LCDR1)、50-56(LCDR2)和 89-97(LCDR3)构成。遵循 IMG T 规则，VH 中的 CDR 氨基酸残基编号大致为 26-35(CDR1)、51-57(CDR2)和 93-102(CDR3)，VL 中的 CDR 氨基酸残基编号大致为 27-32(CDR1)、50-52(CDR2)和 89-97(CDR3)。遵循 IMG T 规则，抗体的 CDR 区可以使用程序 IMG T/DomainGap Align 确定。

术语“抗体框架”，是指可变结构域 VL 或 VH 的一部分，其用作该可变结构域的抗原结合环(CDR)的支架。从本质上讲，其是不具有 CDR 的可变结构域。

术语“表位”或“抗原决定簇”是指抗原上免疫球蛋白或抗体特异性结合的部位。表位通常以独特的空间构象包括至少 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 个连续或非连续的氨基酸（参见，例如，*Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*，第 66 卷，G.E.Morris, Ed.(1996)）。

术语“特异性结合”、“选择性结合”、“选择性地结合”和“特异性地结合”是指抗体对预先确定的抗原上的表位的结合。通常，抗体以大约小于 10^{-7}M ，例如：大约小于 10^{-8}M 、 10^{-9}M 或 10^{-10}M 或更小的亲和力(KD)结合。

术语“核酸分子”是指 DNA 分子和 RNA 分子。核酸分子可以是单链或双链的，但优选是双链 DNA。当将核酸与另一个核酸序列置于功能关系中时，核酸是“有效连接的”。例如，如果启动子或增强子影响编码序列的转录，那么启动子或增强子有效地连接至所述编码序列。

术语“载体”是指能够运输已与其连接的另一个核酸的核酸分子。在一个实

实施方案中，载体是“质粒”，其是指可将另外的DNA区段连接至其中的环状双链DNA环。在另一个实施方案中，载体是病毒载体，其中可将另外的DNA区段连接至病毒基因组中。本文中公开的载体能够在已引入它们的宿主细胞中自主复制(例如，具有细菌的复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)或可在引入宿主细胞后整合入宿主细胞的基因组，从而随宿主基因组一起复制(例如，非附加型哺乳动物载体)。

现有技术中熟知生产和纯化抗体和抗原结合片段的方法，如冷泉港的抗体实验技术指南，5-8章和15章。抗原结合片段同样可以用常规方法制备。发明所述的抗体或抗原结合片段用基因工程方法在非人源的CDR区加上一个或多个来源FR区。人FR种系序列可以通过比对IMGT人类抗体可变区种系基因数据库和MOE软件，从ImMunoGeneTics(IMGT)的网站<http://imgt.cines.fr>得到，或者从免疫球蛋白杂志，2001ISBN012441351上获得。

术语“宿主细胞”是指已向其中引入了表达载体的细胞。宿主细胞可包括细菌、微生物、植物或动物细胞。易于转化的细菌包括肠杆菌科(enterobacteriaceae)的成员，例如大肠杆菌(*Escherichia coli*)或沙门氏菌(*Salmonella*)的菌株；芽孢杆菌科(Bacillaceae)例如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)；肺炎球菌(*Pneumococcus*)；链球菌(*Streptococcus*)和流感嗜血菌(*Haemophilus influenzae*)。适当的微生物包括酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和毕赤酵母(*Pichia pastoris*)。适当的动物宿主细胞系包括CHO(中国仓鼠卵巢细胞系)和NS0细胞。

本公开工程化的抗体或抗原结合片段可用常规方法制备和纯化。比如，编码重链和轻链的cDNA序列，可以克隆并重组至GS表达载体。重组的免疫球蛋白表达载体可以稳定地转染CHO细胞。作为一种更推荐的现有技术，哺乳动物类表达系统会导致抗体的糖基化，特别是在Fc区的高度保守N端位点。阳性的克隆在生物反应器的无血清培养基中扩大培养以生产抗体。分泌了抗体的培养液可以用常规技术纯化。比如，用含调整过的缓冲液的A或G Sepharose FF柱进行纯化。洗去非特异性结合的组分。再用PH梯度法洗脱结合的抗体，用SDS-PAGE检测抗体片段，收集。抗体可用常规方法进行过滤浓缩。可溶的混合物和多聚体，也可以用常规方法去除，比如分子筛、离子交换。得到的产物需立即冷冻，如-70℃，或者冻干。

氨基酸序列“同一性”指在比对氨基酸序列及必要时引入间隙，以达成最大序列同一性百分比，且不将任何保守性取代视为序列同一性的一部分，第一序列中与第二序列中的氨基酸残基同一的氨基酸残基的百分比。为测定氨基酸序列同一性百分比的目的，比对可以通过属于本领域技术的范围内的多种方式来实现，例如使用公开可得到的计算机软件，诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可确定适用于测量比对的参数，包括在所比较的序列全长上达成最大比对所需的任何算法。

术语“肽”是指介于氨基酸和蛋白质之间的化合物片段，由 2 个或 2 个以上氨基酸分子通过肽键相互连接而成，是蛋白质的结构与功能片段，如激素、酶类等本质上都是肽。

术语“糖”是指由 C、H、O 三种元素组成的生物大分子，可分为单糖、二糖和多糖等。

术语“荧光探针”是指在紫外-可见-近红外区有特征荧光，并且其荧光性质（激发和发射波长、强度、寿命和偏振等）可随所处环境的性质，如极性、折射率、粘度等改变而灵敏地改变的一类荧光性分子，其与核酸(DNA 或 RNA)、蛋白质或其他大分子结构非共价相互作用而使一种或几种荧光性质发生改变，可用于研究大分子物质的性质和行为。

术语“烷基”指饱和脂肪族烃基团，其为包含 1 至 20 个碳原子的直链或支链基团，优选含有 1 至 12 个碳原子的烷基，更优选含有 1 至 10 个碳原子的烷基，最优选含有 1 至 6 个碳原子的烷基。非限制性实例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、正己基、1-乙基-2-甲基丙基，及其各种支链异构体等。更优选的是含有 1 至 6 个碳原子的低级烷基，非限制性实施例包括甲基、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-甲基丁基等。烷基可以是取代的或非取代的，当被取代时，取代基可以在任何可使用的连接点上被取代，所述取代基优选为一个或多个以下基团，其独立地选自烷基、烷氧基、卤素、氨基、氰基、硝基、羟基、羟烷基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基。

术语“杂烷基”指含有一个或多个选自 N、O 或 S 的杂原子的烷基，其中烷基如上所定义。

“一价基团”是指一个化合物从“形式上”消除一个单价的原子或基团。“亚基”则是指化合物从“形式上”消除两个单价或一个双价形成的原子或原子团。示例“烷基”是指由烷烃分子中去除 1 个氢原子后余下的部分，包括 1 至 20 个碳原子的直链和支链一价基团。含有 1 至 6 个碳原子的烷基，非限制性实施例包括甲基、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、2,2-二甲基丙基及其各种支链异构体等。

术语“亚烷基”指饱和的直链或支链脂肪族烃基，其具有 2 个从母体烷的相同碳原子或两个不同的碳原子上除去两个氢原子所衍生的残基，其为包含 1 至 20 个碳原子的直链或支链基团，优选含有 1 至 12 个碳原子，更优选含有 1 至 6 个碳原子的亚烷基。亚烷基的非限制性实例包括但不限于亚甲基(-CH₂-)、1,1-亚乙基(-CH(CH₃)-)、1,2-亚乙基(-CH₂CH₂-)、1,1-亚丙基(-CH(CH₂CH₃)-)、1,2-亚丙基(-CH₂CH(CH₃)-)、1,3-亚丙基(-CH₂CH₂CH₂-)、1,4-亚丁基(-CH₂CH₂CH₂CH₂-)和 1,5-亚丁基(-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-)等。亚烷基可以是取代的或非取代的，当被取代时，取代基可以在任何可使用的连接点上被取代，所述取代基优选独立地任选自卤

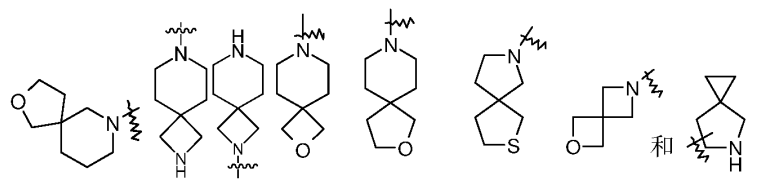
素、羟基、氰基、氨基、烷基、氯代烷基、烷氧基和环烷基中的一个或多个。同理,“亚烯基”如前所定义。

术语“烷氧基”指-O-(烷基)和-O-(非取代的环烷基),其中烷基或环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、
5 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、羟基、硝基、氰基、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。

术语“环烷基”指饱和或部分不饱和单环或多环环状烃取代基,环烷基环包含 3 至 20 个碳原子,优选包含 3 至 12 个碳原子,更优选包含 3 至 10 个碳原子,
10 最优选包含 3 至 8 个碳原子。单环环烷基的非限制性实例包括环丙基、环丁基、环戊基、环戊烯基、环己基、环己烯基、环己二烯基、环庚基、环庚三烯基、环辛基等;多环环烷基包括螺环、稠环和桥环的环烷基。

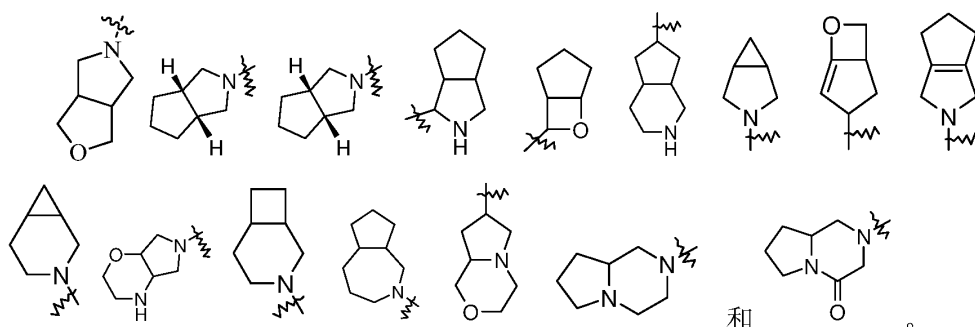
术语“杂环烷基”指饱和或部分不饱和单环或多环环状烃取代基,其包含 3
15 至 20 个环原子,其中一个或多个环原子为选自氮、氧或 $S(O)_m$ (其中 m 是整数 0 至 2) 的杂原子,但不包括-O-O-、-O-S-或-S-S-的环部分,其余环原子为碳。优选包含 3 至 12 个环原子,其中 1 至 4 个是杂原子;更优选环烷基环包含 3 至 10 个环原子。单环杂环烷基的非限制性实例包括吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、吗啉基、硫代吗啉基、高哌嗪基等。多环杂环烷基包括螺环、稠环和桥环的杂环烷基。

术语“螺杂环烷基”指 5 至 20 元的单环之间共用一个原子(称螺原子)的多环
20 杂环烷基团,其中一个或多个环原子为选自氮、氧或 $S(O)_m$ (其中 m 是整数 0 至 2) 的杂原子,其余环原子为碳。其可以含有一个或多个双键,但没有一个环具有完全共轭的 π 电子系统。优选为 6 至 14 元,更优选为 7 至 10 元。根据环与环之间共用螺原子的数目将螺杂环烷基分为单螺杂环烷基、双螺杂环烷基或多螺杂环烷基,优选为单螺杂环烷基和双螺杂环烷基。更优选为 4 元/4 元、4 元/5 元、4 元/6
25 元、5 元/5 元或 5 元/6 元单螺杂环烷基。螺杂环烷基的非限制性实例包括:

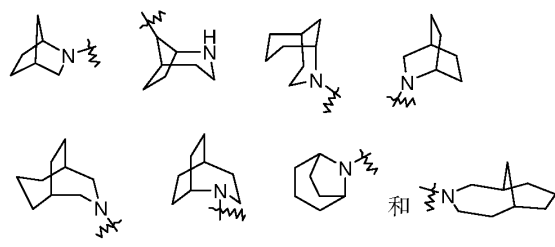


术语“稠杂环烷基”指 5 至 20 元,系统中的每个环与体系中的其他环共享毗
邻的一对原子的多环杂环烷基团,一个或多个环可以含有一个或多个双键,但没
30 有一个环具有完全共轭的 π 电子系统,其中一个或多个环原子为选自氮、氧或 $S(O)_m$ (其中 m 是整数 0 至 2) 的杂原子,其余环原子为碳。优选为 6 至 14 元,更优选为 7 至 10 元。根据组成环的数目可以分为双环、三环、四环或多环稠杂环烷基,

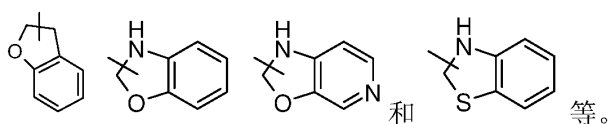
优选为双环或三环，更优选为 5 元/5 元或 5 元/6 元双环稠杂环烷基。稠杂环烷基的非限制性实例包括：



术语“桥杂环烷基”指 5 至 14 元，任意两个环共用两个不直接连接的原子的多环杂环烷基团，其可以含有一个或多个双键，但没有一个环具有完全共轭的 π 电子系统，其中一个或多个环原子为选自氮、氧或 $S(O)_m$ (其中 m 是整数 0 至 2) 的杂原子，其余环原子为碳。优选为 6 至 14 元，更优选为 7 至 10 元。根据组成环的数目可以分为双环、三环、四环或多环桥杂环烷基，优选为双环、三环或四环，更优选为双环或三环。桥杂环烷基的非限制性实例包括：

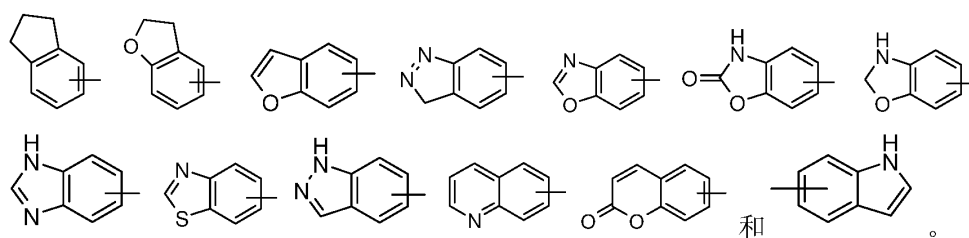


所述杂环烷基环可以稠合于芳基、杂芳基或环烷基环上，其中与母体结构连接在一起的环为杂环烷基，其非限制性实例包括：



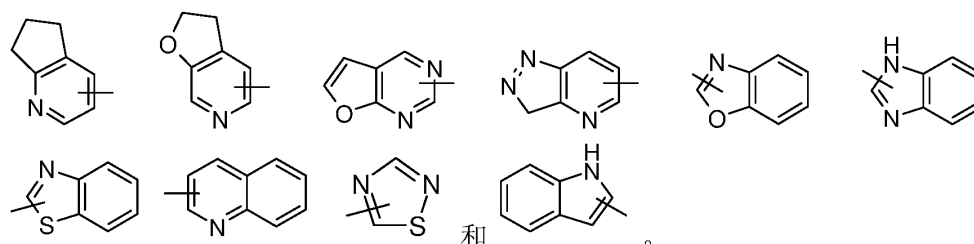
15 杂环烷基可以是任选取代的或非取代的，当被取代时，取代基优选为一个或多个以下基团，其独立地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基、氧代基。

术语“芳基”指具有共轭的 π 电子体系的6至14元全碳单环或稠合多环（也就是共享毗邻碳原子对的环）基团，优选为6至10元，例如苯基和萘基，优选苯基。所述芳基环可以稠合于杂芳基、杂环烷基或环烷基环上，其中与母体结构连接在一起的环为芳基环，其非限制性实例包括：



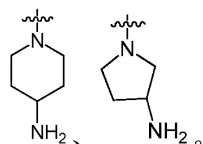
芳基可以是取代的或非取代的，当被取代时，取代基优选为一个或多个以下基团，其独立地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基。

术语“杂芳基”指包含 1 至 4 个杂原子、5 至 14 个环原子的杂芳族体系，其中杂原子选自氧、硫和氮。杂芳基优选为 5 至 10 元，更优选为 5 元或 6 元，例如呋喃基、噻吩基、吡啶基、吡咯基、N-烷基吡咯基、嘧啶基、吡嗪基、咪唑基、四唑基等。所述杂芳基环可以稠合于芳基、杂环烷基或环烷基环上，其中与母体结构连接在一起的环为杂芳基环，其非限制性实例包括：

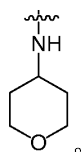


杂芳基可以是任选取代的或非取代的，当被取代时，取代基优选为一个或多个以下基团，其独立地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基。

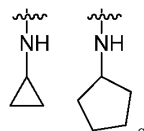
术语“氨基杂环烷基”指杂环烷基被一个或多个氨基取代，优选被一个氨基取代，其中杂环烷基如上所定义，其中“氨基”指-NH₂。本公开的代表性实施例如下：



术语“杂环烷基氨基”指氨基被一个或多个杂环烷基取代，优选被一个杂环烷基取代，其中氨基如上所定义，其中杂环烷基如上所定义。本公开的代表性实施例如下：



术语“环烷基氨基”指氨基被一个或多个环烷基取代，优选被一个环烷基取代，其中氨基如上所定义，其中环烷基如上所定义。本公开的代表性实施例如下：



- 5 术语“环烷基烷基”指烷基被一个或多个环烷基取代，优选被一个环烷基取代，其中烷基如上所定义，其中环烷基如上所定义。

术语“卤代烷基”指烷基被一个或多个卤素取代，其中烷基如上所定义。

术语“氘代烷基”指烷基被一个或多个氘原子取代，其中烷基如上所定义。

术语“羟基”指-OH基团。

- 10 术语“卤素”指氟、氯、溴或碘。

术语“氨基”指-NH₂。

术语“硝基”指-NO₂。

化学式中简称“Me”为甲基。

- “任选”或“任选地”意味着随后所描述的事件或环境可以但不必发生，该说明包括该事件或环境发生或不发生地场合。例如，“任选被烷基取代的杂环烷基团”意味着烷基可以但不必须存在，该说明包括杂环烷基团被烷基取代的情形和杂环烷基团不被烷基取代的情形。

- “取代的”指基团中的一个或多个氢原子，优选为最多5个，更优选为1至3个氢原子彼此独立地被相应数目的取代基取代。不言而喻，取代基仅处在它们的可能的化学位置，本领域技术人员能够在不付出过多努力的情况下确定（通过实验或理论）可能或不可能的取代。例如，具有游离氢的氨基或羟基与具有不饱和（如烯属）键的碳原子结合时可能是不稳定的。

- 术语“药学上可接受的盐”或“可药用盐”是指本公开抗体-药物偶联物的盐，或本公开中所述的化合物的盐，这类盐用于哺乳动物体内时具有安全性和有效性，且具有应有的生物活性。本公开抗体-药物偶联物至少含有一个氨基，因此可以与酸形成盐，可药用盐的非限制性实例包括：盐酸盐。

术语“溶剂合物”指本公开的配体-药物偶联化合物与一种或多种溶剂分子形成可药用的溶剂合物，溶剂分子的非限制性实例包括水、乙醇、乙腈、异丙醇、DMSO、乙酸乙酯。

- 30 术语“药物载体”用于本公开的药物，是指能改变药物进入人体的方式和在体内的分布、控制药物的释放速度并将药物输送到靶向器官的体系。药物载体释

放和靶向系统能够减少药物降解及损失，降低副作用，提高生物利用度。如可作为载体的高分子表面活性剂由于其独特的两亲性结构，可以进行自组装，形成各种形式的聚集体，优选的实例如胶束、微乳液、凝胶、液晶、囊泡等。这些聚集体具有包载药物分子的能力，同时又对膜有良好的渗透性，可以作为优良的药物载体。

术语“赋形剂”是在药物制剂中除主药以外的附加物，也可称为辅料。如片剂中的粘合剂、填充剂、崩解剂、润滑剂；半固体制剂软膏剂、霜剂中的基质部分；液体制剂中的防腐剂、抗氧剂、矫味剂、芳香剂、助溶剂、乳化剂、增溶剂、渗透压调节剂、着色剂等均可称为赋形剂。

术语“稀释剂”又称填充剂，其主要用途是增加片剂的重量和体积。稀释剂的加入不仅保证一定的体积大小，而且减少主要成分的剂量偏差，改善药物的压缩成型性等。当片剂的药物含有油性组分时，需加入吸收剂吸收油性物，使保持“干燥”状态，以利于制成片剂。

“结合 HER2 的异二聚体结合位点的” HER2 抗体结合结构域 II 中的残基(且任选还结合 HER2 的胞外域以外的其它结构域，诸如结构域 I 和 III 中的残基)，且至少在在一定程度上能在空间上阻碍 HER2-EGFR、HER2-HER3 或 HER2-HER4 异二聚体的形成。Franklin et al., Cancer Cell 5: 317-328(2004)表征了存放在 RCSB 蛋白质数据库(ID Code IS78)的 HER2-Pertuzumab 晶体结构,举例说明了结合 HER2 的异二聚体结合位点的示例性抗体。

“结合 HER2 结构域 II 的” 抗体结合结构域 II 中的残基和任选 HER2 的其它结构域，诸如结构域 I 和 III 中的残基。优选的是，结合结构域 II 的抗体结合 HER2 结构域 I、II 和 III 之间的连接处。

在本文中，“Pertuzumab”指包含分别在 SEQ ID No.1 和 2 中的轻链和重链可变区氨基酸序列的抗体。若 Pertuzumab 是完整抗体，则它优选包含分别在 SEQ ID No.3 和 4 中的轻链和重链氨基酸序列。“Pertuzumab”指包含分别在 SEQ ID No.1 和 2 中的轻链和重链可变区氨基酸序列的抗体。本公开“Trastuzumab”是包含分别在 SEQ ID No.5 和 6 中的轻链和重链氨基酸序列。制备方法参见 WO2006033700 并将相关内容引入本文以示说明。

附图说明

图 1 为 N87/16-8 皮下移植瘤模型小鼠肿瘤体积变化图。

图 2 为 N87/16-8 皮下移植瘤模型小鼠体重变化图。

图 3 为 JIMIT-1 皮下移植瘤模型小鼠肿瘤体积变化图。

图 4 为 JIMIT-1 皮下移植瘤模型小鼠体重变化图。

具体实施方式

以下结合实施例进一步描述本公开，但这些实施例并非限制本公开的范围。

本公开实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。未注明具体来源的试剂，为市场购买的常规试剂。

5 化合物的结构是通过核磁共振(NMR)或/和质谱(MS)来确定的。NMR 位移(δ)以 10^{-6} (ppm)的单位给出。NMR 的测定是用 Bruker AVANCE-400 核磁仪，测定溶剂为氘代二甲基亚砷(DMSO- d_6)、氘代氯仿(CDCl₃)、氘代甲醇(CD₃OD)，内标为四甲基硅烷(TMS)。

MS 的测定用 Agilent 1200 /1290 DAD- 6110/6120 Quadrupole MS 液质联用仪
10 (生产商：Agilent，MS 型号：6110/6120 Quadrupole MS)。

waters ACQuity UPLC-QD/SQD(生产商：waters，MS 型号：waters ACQuity Qda Detector/waters SQ Detector)THERMO Ultimate 3000- Q Exactive (生产商：THERMO，MS 型号：THERMO Q Exactive)

高效液相色谱法 (HPLC) 分析使用 Agilent HPLC 1200DAD、Agilent HPLC
15 1200VWD 和 Waters HPLC e2695-2489 高压液相色谱仪。

手性 HPLC 分析测定使用 Agilent 1260 DAD 高效液相色谱仪。

高效液相制备使用 Waters 2545-2767、Waters 2767-SQ Detecor2、Shimadzu LC-20AP 和 Gilson GX-281 制备型色谱仪。

手性制备使用 Shimadzu LC-20AP 制备型色谱仪。

20 CombiFlash 快速制备仪使用 Combiflash Rf200 (TELEDYNE ISCO)。

薄层层析硅胶板使用烟台黄海 HSGF254 或青岛 GF254 硅胶板，薄层色谱法 (TLC)使用的硅胶板采用的规格是 0.15 mm 至 0.2 mm，薄层层析分离纯化产品采用的规格是 0.4 mm 至 0.5 mm。

硅胶柱色谱法一般使用烟台黄海硅胶 200 至 300 目硅胶为载体。

25 本发明的已知的起始原料可以采用或按照本领域已知的方法来合成，或可购买自 ABCR GmbH & Co. KG, Acros Organics, Aldrich Chemical Company, 韶远化学科技(Accela ChemBio Inc) 、达瑞化学品等公司。

实施例中无特殊说明，反应能够均在氩气氛或氮气氛下进行。

氩气氛或氮气氛是指反应瓶连接一个约 1L 容积的氩气或氮气气球。

30 氢气气氛是指反应瓶连接一个约 1L 容积的氢气气球。

加压氢化反应使用 Parr 3916EKX 型氢化仪和清蓝 QL-500 型氢气发生器或 HC2-SS 型氢化仪。

氢化反应通常抽真空，充入氢气，反复操作 3 次。

微波反应使用 CEM Discover-S 908860 型微波反应器。

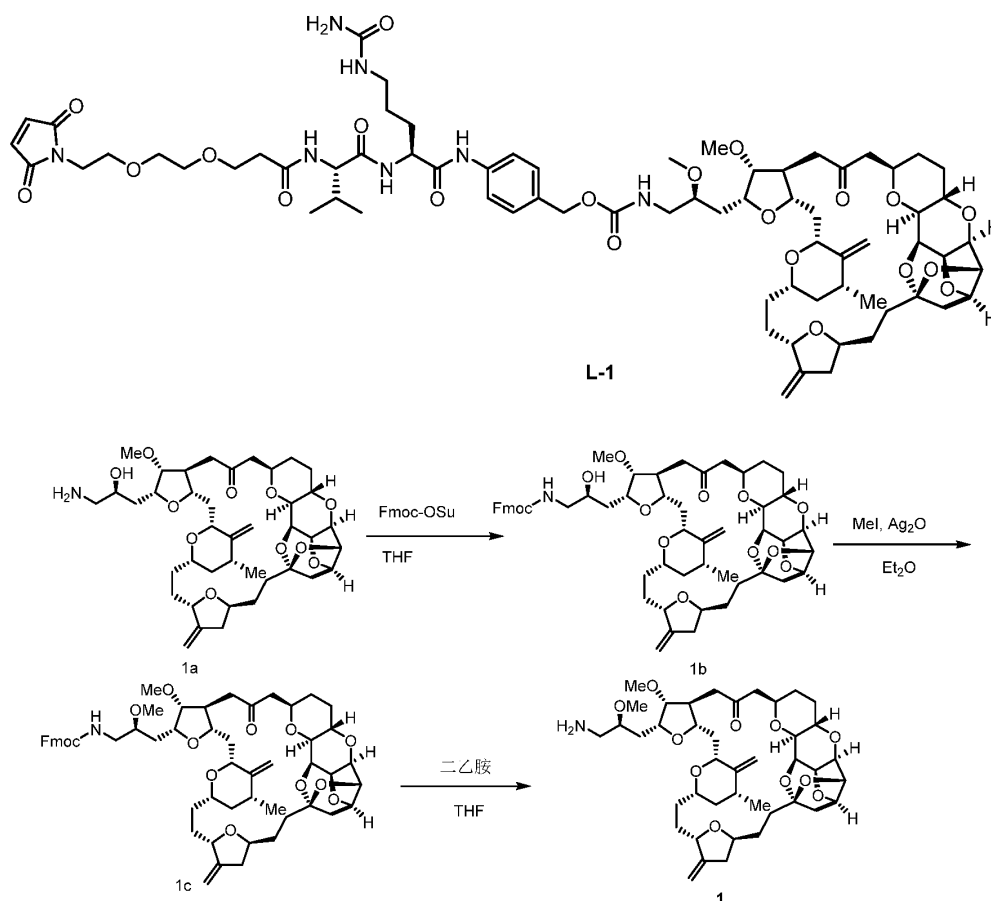
35 实施例中无特殊说明，溶液是指水溶液。

实施例中无特殊说明，反应的温度为室温，为 20℃至 30℃。

纯化化合物采用的柱层析的洗脱剂的体系和薄层色谱法的展开剂的体系包括：

- A：二氯甲烷和异丙醇体系，B：二氯甲烷和甲醇体系，C：石油醚和乙酸乙酯体系，溶剂的体积比根据化合物的极性不同而进行调节，也可以加入少量的三乙胺和酸性或碱性试剂等进行调节。

实施例 1



步骤 1：化合物 **1b** 的制备

冰水浴下，将化合物 **1a**（艾日布林，参照 ZL201010236637.2 方法制备获得）(72.91 mg, 0.1 mmol)溶于 10 mL 的四氢呋喃中，加入 Fmoc-OSu(茆甲氧羰酰琥珀酰亚胺，41 mg, 0.12 mmol)，然后在室温搅拌至反应完全。减压浓缩得粗品，直接用于下一步反应。

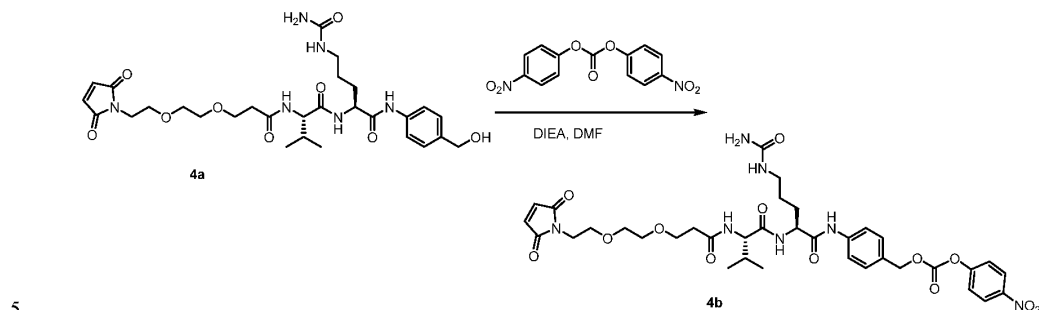
步骤 2：化合物 **1c** 的制备

将上步所得化合物 **1b** 的粗品溶于 10 mL 无水乙醚中，加入氧化银(34.8 mg, 0.15 mmol)，接着加入碘甲烷(28.4 mg, 0.2 mmol)，然后于室温搅拌至反应完全，过滤，然后减压浓缩得粗品，直接进行下一步反应。

步骤 3：化合物 **1** 的制备

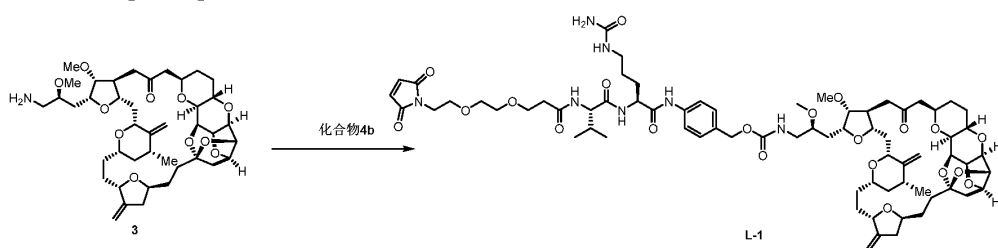
将上步所得化合物 **1c** 粗品溶于 10 mL 的四氢呋喃中, 加入 2mL 的二乙胺, 然后在室温搅拌至反应完全, 减压浓缩得粗品, 经硅胶柱层析色谱法 (洗脱剂: 二氯甲烷/乙酸乙酯/石油醚) 纯化, 得 3mg 目标产物化合物 **1**。

LC/MS (ESI): m/z 744.2 $[M+H]^+$ 。



冰水浴下, 将 **4a** (50 mg, 0.08 mmol, 参照 WO2017151979 中方法制备) 溶解到 1.5 mL 的 N,N-二甲基甲酰胺中, 然后加入 DIPEA (N,N-二异丙基乙胺, 18 mg, 0.14 mmol), 接着加入二(对硝基苯)碳酸酯 (49 mg, 0.16 mmol), 然后在室温下搅拌 10 加入 20 mL 甲基叔丁基醚, 搅拌 20 分钟, 过滤, 干燥得到固体 36 mg, LC/MS (ESI): m/z 784.1 $[M+H]^+$ 。

10



将化合物 **1** (13.5 mg, 0.018 mmol) 溶于 1.5 mL 的 DMF 中, 加入 DIPEA (7 mg, 0.054 mmol), 然后分批加入化合物 **4b** (18 mg, 1.3 mmol), 搅拌至反应基本完全, 浓缩得粗品, 经 HPLC 制备分离得 6.5 mg 化合物 L-1, 纯度 96.95%, LC/MS (ESI): m/z 1388.3 $[M+H]^+$ 。

15

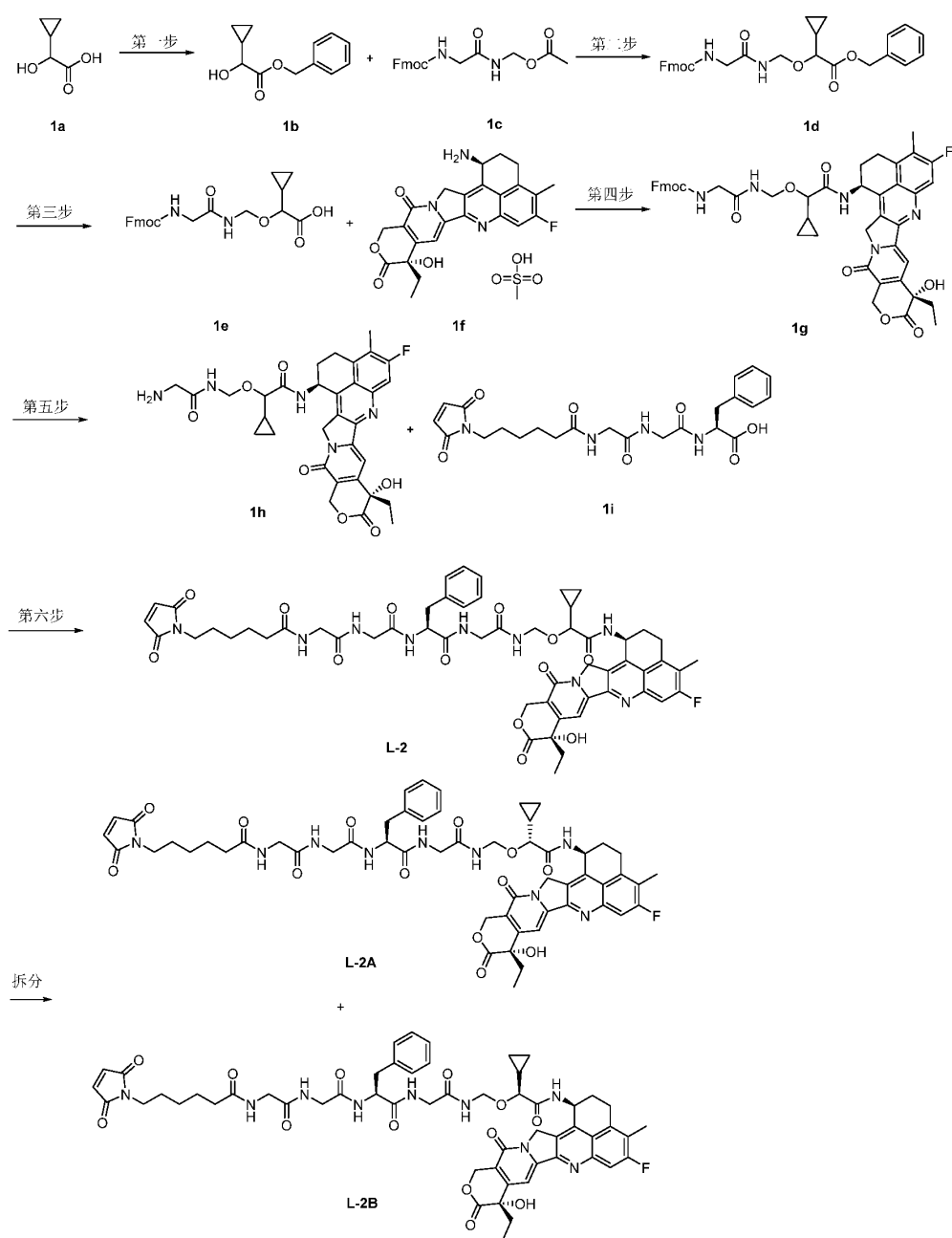
实施例 2 ADC-001

N-((2*R*,10*S*)-10-苄基-2-环丙基-1-(((1*S*,9*S*)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1*H*,12*H*-苯并[*de*]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-*b*]喹啉-1-基)氨基)-1,6,9,12,15-五氧代-3-氧杂-5,8,11,14-四氮杂十六-16-基)-6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)己酰胺 **L-2A**

20

N-((2*S*,10*S*)-10-苄基-2-环丙基-1-(((1*S*,9*S*)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1*H*,12*H*-苯并[*de*]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-*b*]喹啉-1-基)氨基)-1,6,9,12,15-五氧代-3-氧杂-5,8,11,14-四氮杂十六-16-基)-6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)己酰胺 **L-2B**

25



第一步

2-环丙基-2-羟基乙酸苄酯 **1b**

将 **1a** (1.3 g, 11.2 mmol; 采用专利申请“WO2013/106717”公开的方法制备而得)
 溶于 50 mL 乙腈中, 依次加入碳酸钾(6.18 g, 44.8 mmol), 溴化苄(1.33 mL, 11.2 mmol)
 和四丁基碘化铵(413 mg, 1.1 mmol)。将反应液室温搅拌 48 小时, 通过硅藻土过
 滤, 滤饼用乙酸乙酯 (10 ml) 淋洗, 合并滤液减压浓缩, 用硅胶柱色谱法以展开
 剂体系 C 纯化所得残余物, 得到标题产物 **1b** (2 g, 产率: 86.9%)。

第二步

10-环丙基-1-(9*H*-芴-9-基)-3,6-二氧代-2,9-二氧杂-4,7-二氮杂十一-11-酸苄酯 **1d**

将 **1b**(120.9 mg, 0.586 mmol)和 **1c**(180 mg, 0.489 mmol)加入反应瓶, 加入 4 mL 四氢呋喃, 氩气置换三次, 冰水浴降温至 0-5℃, 加入叔丁醇钾(109 mg, 0.98 mmol), 撤去冰浴, 升至室温搅拌 40 分钟, 加入 10 mL 冰水, 用乙酸乙酯(20 mL×2)和氯仿(10 mL×5)萃取, 合并有机相并浓缩。所得残余物溶于 4 mL 二氧六环中, 加入 2 mL 水, 加入碳酸氢钠(49.2 mg, 0.586 mmol)和氯甲酸-9-芴甲酯(126 mg, 0.49 mmol), 室温搅拌 2 小时。加入 20 mL 水, 用乙酸乙酯(10 mL×3)萃取, 有机相用饱和氯化钠溶液(20 mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩。用硅胶柱色谱法以展开剂体系 C 纯化所得残余物, 得到标题产物 **1d** (48 mg, 产率: 19%)。

10 MS m/z (ESI): 515.0 [M+1]。

第三步

10-环丙基-1-(9*H*-芴-9-基)-3,6-二氧代-2,9-二氧杂-4,7-二氮杂十一-11-酸 **1e**

将 **1d** (20 mg, 0.038 mmol)溶于 4.5 mL 四氢呋喃和乙酸乙酯(V:V=2:1)混合溶剂中, 加入钨碳(12 mg, 含量 10%, 干型), 氢气置换三次, 室温搅拌反应 1 小时。反应液用硅藻土过滤, 滤饼用乙酸乙酯淋洗, 滤液浓缩, 得到粗品标题产物 **1e** (13 mg), 产品不经纯化直接进行下一步反应。

MS m/z (ESI): 424.9 [M+1]。

第四步

(9*H*-芴-9-基)甲基 2-(((1-环丙基-2-(((1*S*,9*S*)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1*H*,12*H*-苯并[*de*]吡喃并[3',4':6,7]咪唑啶并[1,2-*b*]喹啉-1-基)氨基)-2-氧代乙氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)氨基甲酸酯 **1g**

将 **1f**(10 mg, 18.8 μmol)加入反应瓶, 加入 1 mL *N,N*-二甲基甲酰胺, 氩气置换三次, 冰水浴降温至 0-5℃, 滴加一滴三乙胺, 加入粗品 **9c** (13 mg, 30.6 μmol), 加入 4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基氯化吗啉盐(16.9 mg, 61.2 μmol), 冰浴搅拌反应 40 分钟。加入 10 mL 水, 用乙酸乙酯(10 mL×3)萃取, 合并有机相。有机相用饱和氯化钠溶液(10 mL×2)洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩。用薄层层析以展开剂体系 B 纯化所得残余物, 得到标题产物 **1g** (19 mg, 产率: 73.6%)。

MS m/z (ESI): 842.1[M+1]。

30

第五步

2-((2-氨基乙酰氨基)甲氧基)-2-环丙基-*N*-(((1*S*,9*S*)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1*H*,12*H*-苯并[*de*]吡喃并[3',4':6,7]咪唑啶并[1,2-*b*]喹啉-1-基)乙酰胺 **1h**

将 **1g** (19 mg, 22.6 μmol) 溶于 2 mL 二氯甲烷中, 加入 1 mL 二乙胺, 室温搅拌 2 小时。反应液减压浓缩, 加入 1 mL 甲苯并减压浓缩, 重复两次。往残余物中加入 3 mL 正己烷打浆, 静置后倾出上层清液, 保留固体。将固体残余物减压浓

缩，油泵拉干得到粗品标题产物 **1h** (17 mg)，产品不经纯化直接用于下一步反应。

MS m/z (ESI): 638.0[M+18]。

第六步

N-((2*R*,10*S*)-10-苄基-2-环丙基-1-(((1*S*,9*S*)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1*H*,12*H*-苯并[*de*]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-*b*]喹啉-1-基)氨基)-1,6,9,12,15-五氧代-3-氧杂-5,8,11,14-四氮杂十六-16-基)-6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)己酰胺 **9-A**

N-((2*S*,10*S*)-10-苄基-2-环丙基-1-(((1*S*,9*S*)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1*H*,12*H*-苯并[*de*]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-*b*]喹啉-1-基)氨基)-1,6,9,12,15-五氧代-3-氧杂-5,8,11,14-四氮杂十六-16-基)-6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)己酰胺 **9-B**

将粗品 **1h** (13.9 mg, 22.4 μ mol)溶于 0.6 mL *N,N*-二甲基甲酰胺，氩气置换三次，冰水浴降温至 0-5℃，加入 **1l** (21.2 mg, 44.8 μ mol)的 0.3 mL *N,N*-二甲基甲酰胺溶液，加入 4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基氯化吗啉盐(18.5 mg, 67.3 μ mol)，冰浴搅拌反应 10 分钟，撤去冰浴，升至室温搅拌 1 小时，反应生成化合物 **L-2**。反应液进行高效液相色谱法纯化(分离条件：色谱柱：XBridge Prep C18 OBD 5 μ m 19*250mm；流动相：A-水(10mmol NH₄OAc)：B-乙腈，梯度洗脱，流速：18 mL/min)，收集其相应组分，减压浓缩，得到标题产物 **L-2A**：2.4 mg, **L-2B**：1.7 mg)。

MS m/z (ESI): 1074.4 [M+1]。

化合物 **L-2A** 和 **L-2B** 中保留时间较短者：

UPLC 分析：保留时间 1.14 分钟，纯度：85% (色谱柱：ACQUITY UPLC BEHC18 1.7 μ m 2.1*50 mm，流动相：A-水(5 mmol NH₄OAc)，B-乙腈)。

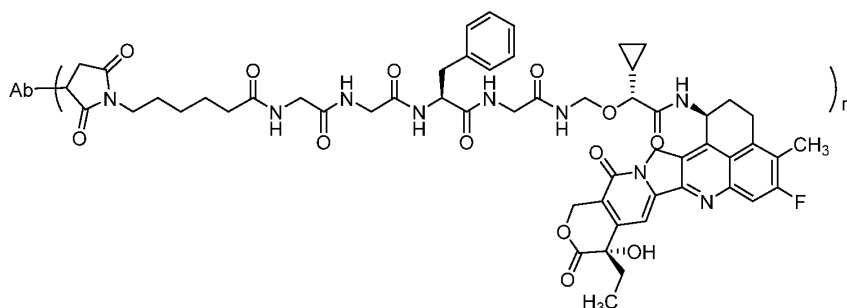
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.60 (t, 1H), 8.51-8.49 (d, 1H), 8.32-8.24 (m, 1H), 8.13-8.02 (m, 2H), 8.02-7.96 (m, 1H), 7.82-7.75 (m, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.26-7.15 (m, 4H), 6.99 (s, 1H), 6.55-6.48 (m, 1H), 5.65-5.54 (m, 1H), 5.41 (s, 2H), 5.35-5.15 (m, 3H), 4.74-4.62 (m, 1H), 4.54-4.40 (m, 2H), 3.76-3.64 (m, 4H), 3.62-3.48 (m, 2H), 3.20-3.07 (m, 2H), 3.04-2.94 (m, 1H), 2.80-2.62 (m, 1H), 2.45-2.30 (m, 3H), 2.25-2.15 (m, 2H), 2.15-2.04 (m, 2H), 1.93-1.78 (m, 2H), 1.52-1.39 (m, 3H), 1.34-1.12 (m, 5H), 0.87 (t, 3H), 0.64-0.38 (m, 4H)。

化合物 **L-2A** 和 **L-2B** 中保留时间较长者：

UPLC 分析：保留时间 1.16 分钟，纯度：89% (色谱柱：ACQUITY UPLC BEHC18 1.7 μ m 2.1*50 mm，流动相：A-水(5 mmol NH₄OAc)，B-乙腈)。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.68-8.60 (m, 1H), 8.58-8.50 (m, 1H), 8.32-8.24 (m, 1H), 8.13-8.02 (m, 2H), 8.02-7.94 (m, 1H), 7.82-7.75 (m, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.26-7.13 (m, 3H), 6.99 (s, 1H), 6.55-6.48 (m, 1H), 5.60-5.50 (m, 1H), 5.41 (s, 2H), 5.35-5.15 (m, 2H), 4.78-4.68 (m, 1H), 4.60-4.40 (m, 2H), 3.76-3.58 (m, 4H), 3.58-3.48 (m, 1H), 3.20-3.10 (m, 2H), 3.08-2.97 (m, 2H), 2.80-2.72 (m, 2H), 2.45-2.30 (m, 3H),

2.25-2.13 (m, 2H), 2.13-2.04 (m, 2H), 2.03-1.94 (m, 2H), 1.91-1.78 (m, 2H), 1.52-1.39 (m, 3H), 1.34-1.12 (m, 4H), 0.91-0.79 (m, 3H), 0.53-0.34 (m, 4H)。



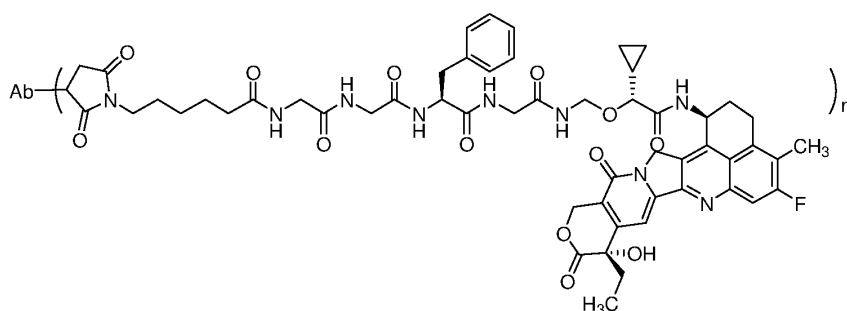
5

在 37 °C 条件下, 向抗体 Pertuzumab 的 PBS 缓冲水溶液 (pH=6.5 的 0.05 M 的 PBS 缓冲水溶液; 10.0 mg/mL, 1.50 mL, 101 nmol) 加入配置好的三(2-羧乙基) 膦酸盐(TCEP-HCl)的水溶液(10 mM, 16.2 uL, 162 nmol), 置于水浴振荡器, 于 37 °C 下振荡反应 3 小时, 停止反应。将反应液用水浴降温至 25 °C。

10 将化合物 L-2A 和 L-2B 中保留时间短者(0.87 mg, 810 nmol)溶解于 66 uL 二甲亚砜中, 加入到上述反应液中, 置于水浴振荡器, 于 25 °C 下振荡反应 3 小时, 停止反应。将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相: pH=6.5 的 0.05 M 的 PBS 缓冲水溶液, 含 0.001M 的 EDTA), 得到标题产物的 PBS 缓冲液(1.16 mg/mL, 12.0 mL), 于 4 °C 冷藏储存。

15 RP-HPLC 计算平均值: n=2.67。

实施例 3. ADC-002



20 在 37 °C 条件下, 向抗体 Pertuzumab 的 PBS 缓冲水溶液 (pH=6.5 的 0.05 M 的 PBS 缓冲水溶液; 10.0 mg/mL, 1.50 mL, 101 nmol) 加入配置好的三(2-羧乙基) 膦酸盐(TCEP-HCl)的水溶液(10 mM, 28.4 uL, 284 nmol), 置于水浴振荡器, 于 37 °C 下振荡反应 3 小时, 停止反应。将反应液用水浴降温至 25 °C。

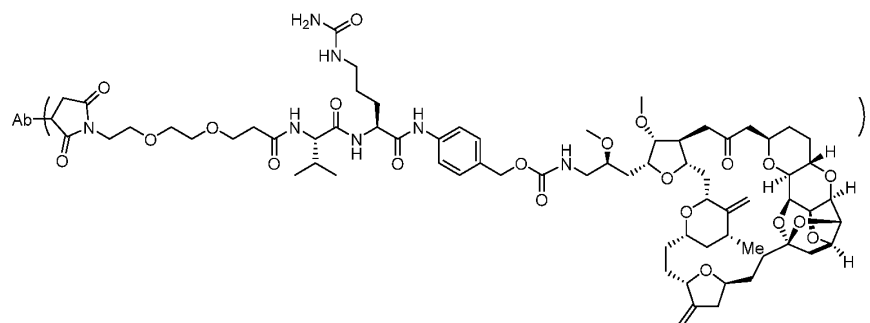
将化合物 L-2A 和 L-2B 中保留时间短者(1.09 mg, 1015 nmol)溶解于 84 uL 二甲亚砜中, 加入到上述反应液中, 置于水浴振荡器, 于 25 °C 下振荡反应 3 小时,

停止反应。将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相: pH=6.5 的 0.05 M 的 PBS 缓冲水溶液, 含 0.001M 的 EDTA), 得到标题产物的 PBS 缓冲液(1.06 mg/mL, 12.0 mL), 于 4 °C 冷藏储存。

RP-HPLC 计算平均值: $n=4.51$ 。

5

实施例 4 ADC-003

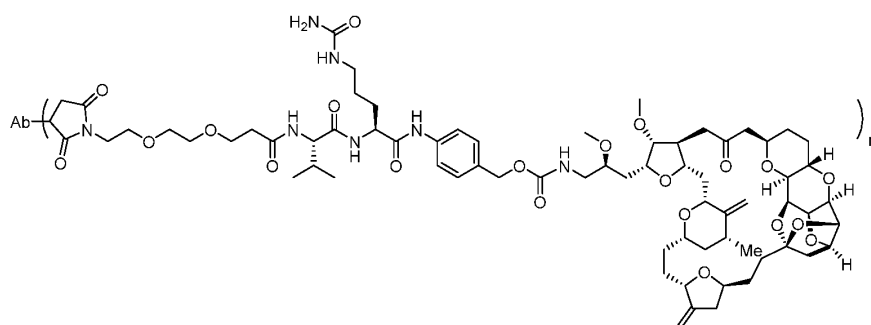


在 37 °C 条件下, 向抗体 Pertuzumab 的 PBS 缓冲水溶液 (pH=6.5 的 0.05 M 的 PBS 缓冲水溶液; 10.0 mg/mL, 1.43 mL, 97 nmol) 加入配置好的三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP-HCl)的水溶液(10 mM, 15.5 uL, 155 nmol), 置于水浴振荡器, 于 37 °C 下振荡反应 3 小时, 停止反应。将反应液用水浴降温至 25 °C。

将化合物 L-1 (1.07 mg, 771 nmol) 溶解于 50 uL 二甲亚砜中, 加入到上述反应液中, 置于水浴振荡器, 于 25 °C 下振荡反应 3 小时, 停止反应。将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相: pH=6.5 的 0.05 M 的 PBS 缓冲水溶液, 含 0.001M 的 EDTA), 得到标题产物的 PBS 缓冲液(1.21 mg/mL, 10.8 mL), 于 4 °C 冷藏储存。

CE-SDS 计算平均值: $n=2.04$ 。

实施例 5 ADC-004

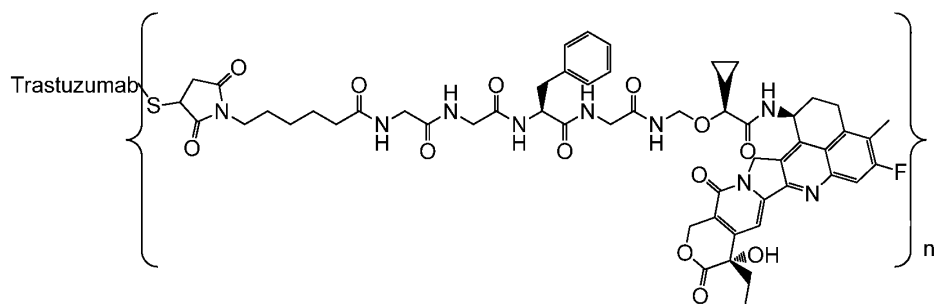


在 37 °C 条件下, 向抗体 Pertuzumab 的 PBS 缓冲水溶液 (pH=6.5 的 0.05 M 的 PBS 缓冲水溶液; 10.0 mg/mL, 1.43 mL, 97 nmol) 加入配置好的三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP-HCl)的水溶液(10 mM, 24.2 uL, 242 nmol), 置于水浴振荡器, 于 37 °C 下振荡反应 3 小时, 停止反应。将反应液用水浴降温至 25 °C。

将化合物 **L-1** (1.34 mg, 965 nmol)溶解于 60 uL 二甲亚砜中, 加入到上述反应液中,置于水浴振荡器,于 25 °C下振荡反应3 小时,停止反应。将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相: pH=6.5 的 0.05 M 的 PBS 缓冲水溶液, 含 0.001M 的 EDTA), 得到标题产物的 PBS 缓冲液(1.24 mg/mL, 9.8 mL), 于 4 °C 冷藏储存。

5 CE-SDS 计算平均值: n=3.17。

实施例 6 ADC-005



参照实施例 3 方法, 利用化合物 **L-2A** 和 **L-2B** 中保留时间长者与曲妥珠单抗 (参照 WO2006033700 方法制备获得) 为起始物料, 制得目标产物的 PBS 缓冲液 (1.24 mg/mL, 9.8 mL), 于 4 °C 冷藏储存。

10 CE-SDS 计算平均值: n= 6。

测试例 1: 对体外培养人乳腺癌 **BT-474** 和人胃癌 **NCI-N87**, **NCI-N87/16-8**, **NCI-N87/8-2** 细胞增殖的抑制作用

15

1.1 药物信息

序列	药品代号	浓度%	纯度%
1	ADC-001	1.16	96.06
2	ADC002	1.06	95.13
3	ADC-003	1.21	98.18
4	ADC-004	1.24	97.57
5	ADC-005	5	/
6	kadcyla	10	/

注: 以上样品由上海恒瑞有限公司提供。其中帕妥珠单抗按照 WO2006033700 中类似方法制备获得; kadcyla: 曲妥珠单抗-美坦新偶联物。

1.2 受试细胞

20 NCI-N87 和 BT-474 细胞购自 American Type Culture Collection(ATCC)。T-DM1 长期作用 NCI-N87 诱导出的 T-DM1 耐药的 NCI-N87/16-8 和 NCI-N87/8-2 细胞由本实验室构建。细胞用含 10 % 胎牛血清 (FBS) 的 RPMI 1640/DMEM (1: 1) 培养液培养。

1.3 仪器及试剂

RPMI 1640 和 DMEM 购自 Gibco BRL 公司；FBS 购自 Gibco 公司；磺酰罗丹明 B(SRB)购自 Sigma 公司。

酶标仪 Synergy H4 购自 BioTek 公司。

1.4 实验步骤

- 5
- 接种一定数量的对数生长期细胞于 96 孔培养板。贴壁生长 24 小时后，加入不同浓度（10000, 3000, 1000, 300, 100, 30, 10, 3, 1 ng/mL）的药物。药物处理 120 小时后，用三氯乙酸固定细胞。然后 SRB 溶液染色；最后加入 Tris 溶液溶解 SRB，酶标仪 510nm 波长下测定 OD 值，以下列公式计算细胞生长抑制率：
抑制率= (OD 值对照孔－OD 值给药孔)/ OD 值对照孔×100%

- 10
- 根据各浓度抑制率，用 GraphPad Prism 7 软件计算半数抑制浓度 IC₅₀。

表 1.对 HER2 阳性肿瘤细胞增殖抑制作用 IC₅₀ (ng/mL)

	NCI-N87	NCI-N87/16-8	NCI-N87/8-2	BT-474
ADC-001	≈10000	≈10000	≈10000	>10000
ADC-001	1186	832.4	1257	>10000
ADC-003	13.0	104.5	55.4	8.7
ADC-004	8.1	33.6	13.0	5.6
ADC-005	391.3	235.7	96.5	>10000
ADC-005	26.3	≈10000	≈10000	77.3

测试例 2：化合物 1 的体外细胞毒活性筛选

1.1. 实验原理及方法

- 15
- 本实验利用 CTG 检测 ATP 含量，反映肿瘤细胞的存活情况。首先通过种植不同密度的细胞并培养 3 天和 5 天，根据 IC₅₀ 和最大抑制率确定最终培养条件。然后按照此条件检测毒素分子的杀伤作用。

1.2. 细胞株的选择

- 20
- 根据实验目的，选择乳腺癌、NSCLC 两种疾病模型，选出 SKBR3 肿瘤细胞（HER2+，ATCC，货号 HTB-30）、MDA-MB-468（HER2-，ATCC，货号 HTB-132）和 A549（人非小细胞肺癌细胞，ATCC，货号 CCL-185）三株细胞用于筛选实验。

1.3. 细胞培养条件的确定

- 25
- 1)细胞培养: A549、SK-BR-3 和 MDA-MB-468 细胞分别用含 10% FBS(Gibco, 10099-141)的 Ham's F-12K(Kaighn's)培养基(Gibco, 21127030)和 McCoy's 5A 培养基(ThermoFisher, 货号 16600108)培养及 Leibovitz's L-15 培养基(ThermoFisher, 货号 11415-114) 进行培养。
2)细胞铺板: 将 A549 用胰酶消化后, 用上述培养基终止, 计数后分别取 4.3×10⁵、

7.2×10⁵、11.5×10⁵ 个细胞加培养液使终体积均为 26ml。在 96 孔板（康宁，货号 3903）第 2 列到第 11 列每孔加 180ul 细胞悬液，使得细胞密度分别为每孔 3K、5K、8K。第 12 列为 200ul 培养液，剩余孔用 PBS 填充。SKBR3 和 MDA-MB-468 细胞重复上述操作。平行两份。

2）药物配制：在圆底 96 孔板（康宁，货号 3788）中，用 DMSO 配制阳性对照艾日布林和本公开化合物储备液。在配药板 1 的第 1 列配制 2mM（用 DMSO 将储备液稀释 10 倍），此后到第 10 列梯度 10 倍稀释于 DMSO 中，第 11 列为 DMSO。配药板 2 第 2 列至第 11 列每孔加入相应培养液 95ul，从配药板 1 的第 2 列至第 11 列吸取 5ul 溶液至配药板 2，混匀后，吸取 20ul 加入铺好的细胞中，继续培养 3 天和 5 天。

3）CTG 检测（Cell Titer-Glo™，发光细胞生存能力检测，Promega 公司）：分别在第 3 天和第 5 天取出细胞板，平衡至室温。每孔加入 90ul CTG，避光室温反应 10min，酶标仪读取发光值并计算 IC₅₀。

1.4. 数据结果

表 2

	SKBR3		MDA-MB-468		A549	
化合物	IC ₅₀ (nM)	最大抑制率%	IC ₅₀ (nM)	最大抑制率%	IC ₅₀ (nM)	最大抑制率%
艾日布林	0.7147	94.90	0.4819	87.47	0.6609	81.50
化合物 1	0.2052	96.87	0.1827	88.01	0.5151	81.34

测试例 3：化合物 1 药代动力学测试

1、概述

以 Non-naïve 的比格犬为受试动物，应用LC/MS/MS法测定了比格犬静脉注射给予化合物D-1和艾日布林后不同时刻血浆中的药物浓度。研究本公开化合物在犬体内的药代动力学行为，评价其药动学特征。

2、试验方案

2.1 试验药品

化合物 D-1 和艾日布林

2.2 试验动物

比格犬6只，雄性，平均分为2组，由美迪西普亚医药科技（上海）有限公司采购并进行动物给药实验。

2.3 药物配制

称取化合物D-1，加5%体积的DMSO，20%PG和20% PEG400使其溶解，然后加入55%生理盐水配制成0.25mg/ml无色澄明溶液。

称取艾日布林，加5%体积的DMSO，20%PG和20% PEG400使其溶解，然后加入55%生理盐水配制成0.25mg/ml无色澄明溶液。

2.4 给药

一组犬静脉注射给药化合物D-1，给药剂量均为0.5mg/kg，给药体积均为2ml/kg。

5 另一组犬静脉注射给药艾日布林，给药剂量均为0.5mg/kg，给药体积均为2ml/kg。

3、操作

犬注射给药化合物 D-1，于给药前及给药后 5 分钟、0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、12.0、24.0 小时采血 1ml，将收集的血液样本置于 EDTA-K2 抗凝型采血管中，
10 将收集到的全血放在冰上，1 小时内离心分离血浆（离心力 2200g，离心 10 min，2-8℃）。血浆样本在检测前存放于-80℃冰箱内。

犬注射给药艾日布林化合物，于给药前及给药后 5 分钟、0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、12.0、24.0 小时采血 1ml，将收集的血液样本置于 EDTA-K2 抗凝型采血管中，将收集到的全血放在冰上，1 小时内离心分离血浆（离心力 2200g，离心 10
15 min，2-8℃）。血浆样本在检测前存放于-80℃冰箱内。

测定药物注射给药后犬血浆中的待测化合物含量：取给药后各时刻的犬血浆 25 μl，加入内标溶液喜树碱（中国生物制品检定所）50 μl（100 ng/mL）和乙腈 200 μl，涡旋混合 5 分钟，离心 10 分钟（3700 转/分钟），血浆样品取上清液 3-4μl 进行 LC/MS/MS（API4000 三重四极杆串联质谱仪（No.2），美国 Applied Biosystems
20 公司；Shimadzu LC-30AD 超高效液相色谱系统，日本 Shimadzu 公司）分析。

4、药代动力学参数结果

本公开化合物的药代动力学参数如下表 3 所示。

表 3

编 号	犬药代实验					
	血药浓度	曲线面积	半衰期	滞留时间	清除率	表观分布容积
	C5min (ng /mL)	AUC0-t (ng /mL*h)	T1/2 (h)	MRT (h)	CL (ml/min/kg)	Vz (ml/kg)
化合物 1	82.1	433	29.3	41.1	8.9	22039
艾日布林	217	106	3.5	3.7	78	15556

25 测试例 4：ADC-004 对人胃癌 NCI-N87/16-8 裸小鼠皮下移植瘤的疗效

1、实验目的

评价 ADC-004对人胃癌NCI-N87/16-8裸小鼠皮下移植瘤的疗效。

2、试验药品

ADC-004, 用生理盐水稀释至所需浓度。

3、细胞

人胃癌NCI-N87细胞购自American Type Culture Collection。NCI-N87经T-DM1长期诱导培养对T-DM1耐药, 命名为NCI-N87/16-8。细胞用10-cm培养皿培养, 培养条件为RPMI 1640培养基(Gibco)中加10%胎牛血清以及青、链霉素, 于37℃、含5% CO₂空气的培养箱中培养。一周2-3次传代, 当细胞呈指数生长期时, 胰酶消化, 收集细胞, 计数, 接种。

4、试验动物

BALB/cJGpt-Foxn1tm/Gpt小鼠, 4周, 雌性, 购自江苏集萃药康生物科技有限公司。生产许可证号: SCXK(苏)2019-0009; 动物合格证号202004958。饲养环境: SPF级。

5、试验步骤

每只裸小鼠皮下接种 1×10^7 NCI-N87/16-8 细胞, 待肿瘤生长至 100-150mm³ 后, 根据肿瘤体积和体重将动物分组(D0)。小鼠静脉注射给予 0.3 和 0.6 mg/ml 的 ADC-004, 给药体积 10 mL/kg。每周测 2 次肿瘤体积, 称小鼠体重, 记录数据。

6、试验指标

实验指标为考察药物对肿瘤生长的影响, 具体指标为 T/C%或肿瘤生长抑制率 TGI(%)。

每周二次用游标卡尺测量肿瘤直径, 肿瘤体积 (V) 计算公式为:

$V = 1/2 \times a \times b^2$ 其中 a、b 分别表示长、宽。

$T/C(\%) = (T - T_0)/(C - C_0) \times 100$ 其中 T、C 为实验结束时的肿瘤体积; T₀、C₀ 为实验开始时的肿瘤体积。

生长抑制率 $TGI(\%) = 100 - T/C(\%)$ 。

当肿瘤出现消退时, 生长抑制率 $TGI(\%) = 100 - (T - T_0)/T_0 \times 100$

如果肿瘤比起始体积缩小, 即 $T < T_0$ 或 $C < C_0$ 时, 即定义为肿瘤部分消退(PR); 如果肿瘤完全消失, 即定义为肿瘤完全消退(CR)。

实验结束、达到实验终点、或溶剂组平均肿瘤体积达到 1500mm³, CO₂ 麻醉处死动物, 随后解剖取瘤并拍照。

7、统计学分析

除非特别说明, 二组肿瘤体积之间比较采用双尾 Student's t 检验, $P < 0.05$ 定义为有统计学显著性差异。

8、结果

单次给药后第 22 天, 3 mg/k 和 6 mg/kg, ADC-004 可以抑制 NCI-N87/16-8 细胞在裸小鼠皮下移植瘤模型中的生长, 抑瘤率分别为 46.77%和 90.18% ($P < 0.01$ vs PBS control)。荷瘤小鼠对能 ADC-004 很好耐受, 没有体重减轻等症状发生。

9、结论

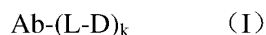
ADC-004能够有效抑制人胃癌NCI-N87/16-8细胞在裸小鼠皮下移植瘤模型中的生长，荷瘤小鼠对ADC-004能很好耐受。

测试例 5: ADC-004 对 JIMIT-1 细胞在裸小鼠皮下移植瘤的疗效

- 5
- 1、试验药品
- ADC-004，用PBS稀释至所需浓度。
- 2、细胞
- 人乳腺癌JIMIT-1细胞。
- 4、试验动物
- 10 雌性Balb/c nude 小鼠
- 5、试验步骤
- BALB/c nude 小鼠右侧背部皮下接种 JIMIT1 细胞 5×10^5 JIMIT1 细胞，待肿瘤体
- 积达 $80-100\text{mm}^3$ 时，根据肿瘤体积和小鼠体重随机分组，每组 6 只，分组当天开
- 始给药。HRA00092-C063-004 采用 PBS 稀释至 0.6 mg/ml 静脉注射给药，给药体
- 15 积为 10 ml/kg ，对照组静脉注射给予相同体积的 PBS。
- 每周二次用游标卡尺测量肿瘤长径和短径，并测量小鼠体重。
- 肿瘤体积（V）计算公式为：
- $$V = 1/2 \times a \times b^2$$
 其中 a、b 分别表示长、宽。
- $$T/C(\%) = (T - T_0) / (C - C_0) \times 100$$
 其中 T、C 为实验结束时的肿瘤体积； T_0 、 C_0 为
- 20 实验开始时的肿瘤体积。
- 生长抑制率 $TGI(\%) = 100 - T/C(\%)$ 。
- 除非特别说明，二组肿瘤体积之间比较采用双尾 Student's T 检验， $P < 0.05$ 定
- 义为有统计学显著性差异。
- 6、结果
- 25 单次给药后第24天，ADC-004可以显著抑制JIMIT-1细胞在裸小鼠皮下移植瘤
- 模型中的生长，抑瘤率为121.3%，其中5只小鼠中的肿瘤都出现了消退($< 50\text{ mm}^3$)。
- 荷瘤小鼠对能ADC-004很好耐受，没有体重减轻等症状发生。

权利要求书

1. 一种抗体-药物偶联物，其具有式 (I) 所示的结构：

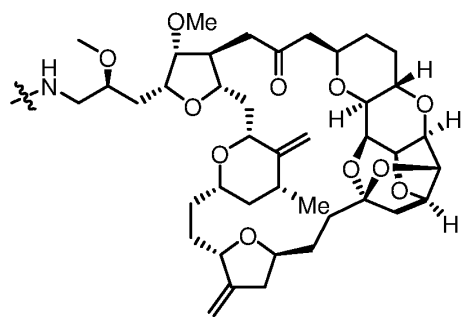


5 或其药学上可接受的盐或溶剂化物；

其中，Ab 为与 HER2 的结构域 II 结合的 HER2 抗体或其抗原结合片段，

L 为将 Ab 共价连接于 D 的连接子，且 k 为 1 至 20，

-D 如式所示：



10

2. 根据权利要求 1 所述的抗体-药物偶联物，其中 k 选自 1 至 10，可以为整数，也可以为小数。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的抗体-药物偶联物，其中所述连接子包含可裂解肽部分。

4. 根据权利要求 3 所述的抗体-药物偶联物，其中所述可裂解肽部分能够由酶裂解，优选能够由组织蛋白酶裂解，进一步的所述组织蛋白酶优选组织蛋白酶 B。

5. 根据权利要求 3 或 4 所述的抗体-药物偶联物，其中所述连接子包含氨基酸单元，所述氨基酸单元优选包含由 2 至 7 个选自苯丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、赖氨酸、瓜氨酸、丝氨酸、谷氨酸、天冬氨酸的氨基酸构成的肽残基，更优选缬氨酸-瓜氨酸(Val-Cit)、丙氨酸-丙氨酸-天冬酰胺(Ala-Ala-Asn)、甘氨酸-甘氨酸-赖氨酸(Gly-Gly-lys)、缬氨酸-赖氨酸(Val-lys)、缬氨酸-丙氨酸(Val-Ala)、缬氨酸-苯丙氨酸(Val-Phe)或甘氨酸-甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸(Gly-Gly-Phe-Gly)(SEQ ID NO. 7)。

6. 根据权利要求 1 或 2 所述的抗体-药物偶联物，其中所述连接子包含可裂解磺酰胺部分。

7. 根据权利要求 1-3 任一项所述的抗体-药物偶联物，其中所述连接子包含可裂解二硫化物部分。

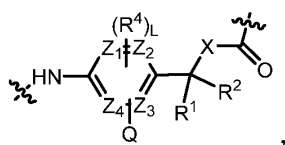
8. 根据权利要求 6 或 7 所述的抗体-药物偶联物，其中所述连接子在还原条件下能够裂解。

9. 根据权利要求 1-8 任一项所述的抗体-药物偶联物，其中所述连接子包含连接于 D 的间隔单元。

10. 根据权利要求 9 所述的抗体-药物偶联物，其中所述间隔单元包含对氨基苯甲氧基羰基 (pAB)。

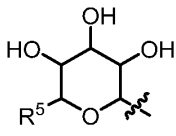
10

11. 根据权利要求 9 所述的抗体-药物偶联物，其中所述间隔单元包含



其中，Z₁ 至 Z₄ 任选自碳原子或氮原子；R⁴ 选自烷基、环烷基、芳基和杂芳基，所述的烷基、环烷基、芳基和杂芳基各自独立地任选自被选自烷基、烷氧基、卤素、氨基、氰基、硝基、羟基、羟烷基、环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基中的一个或多个取代基所取代；R¹ 和 R² 各自独立选自氢、C₁₋₆ 烷基、卤代烷基或 C₃₋₆ 环烷基，优选氢；或者，R¹ 与 R² 与其相连接的碳原子一起形成 C₃₋₆ 环烷基；X 选自 -O- 或 -NH-；L 选自 1-4 之间整数；

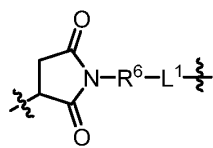
Q 为 V-E，V-E 提供了可被位于胞内的糖苷酶切割的糖苷键，E 选自 -O-、-S-

或 -NR³，R³ 选自氢或甲基；进一步地，V 选自 ，其中 R⁵ 选自 -COOH 或 CH₂OH。

12. 根据权利要求 1-11 任一项所述的抗体-药物偶联物，其中 L-D 是由下式表示的化学部分：

-Str- (Pep)-Sp-D，Str 是与 Ab 共价连接的伸展基单元，
Sp 为间隔单元，
Pep 选自氨基酸单元。

13. 根据权利要求 12 所述的抗体-药物偶联物，其中 Str 选自下式表示的化学部分：



5 其中 R^6 选自 $-W-C(O)-$ 、 $-C(O)-W-C(O)-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_{p1}C(O)-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_{p1}CH_2C(O)-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_{p1}CH_2CH_2C(O)-$ ，其中 W 选自 C_{1-8} 亚烷基、 C_{1-8} 亚烷基-环烷基或 1 至 8 个原子的直链杂亚烷基，所述杂亚烷基包含 1 至 3 个选自 N 、 O 或 S 的杂原子，其中所述的 C_{1-8} 亚烷基、 C_{1-8} 亚烷基-环烷基和直链杂亚烷基各自独立地任选进一步被选自卤素、羟基、氰基、氨基、烷基、氯代烷基、烷氧基和环烷基的一个或多个取代基所取代；

L^1 选自 $-NR^7(CH_2CH_2O)_{p1}CH_2CH_2C(O)-$ 、 $-NR^7(CH_2CH_2O)_{p1}CH_2C(O)-$ 、 $-S(CH_2)_{p1}C(O)-$ 、 $-(CH_2)_{p1}C(O)-$ 或化学键，其中 $p1$ 为 1 至 20 的整数，优选化学键； $p1$ 为 1 至 20 的整数， R^7 选自氢原子、烷基、卤代烷基和羟烷基。

10

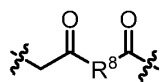
14. 根据权利要求 13 所述的抗体-药物偶联物，其中 R^6 选自 C_{1-6} 亚烷基 $C(O)-$ 、 $-(CH_2-CH_2O)_2C(O)-$ 、 $-(CH_2-CH_2O)_2CH_2C(O)-$ 、 $-(CH_2-CH_2O)_2CH_2CH_2C(O)-$ 、 $-(CH_2-CH_2O)_3C(O)-$ 和 $-(CH_2-CH_2O)_4C(O)-$ 。

15

15. 根据权利要求 13 或 14 所述的抗体-药物偶联物，其中连接子 L 包含：顺丁烯二酰亚胺- $(PEG)_2$ -Val-Cit、顺丁烯二酰亚胺- $(PEG)_6$ -Val-Cit、顺丁烯二酰亚胺- $(PEG)_8$ -Val-Cit、顺丁烯二酰亚胺- $(PEG)_4$ - $CH_2CH_2C(O)$ -Val-lys、顺丁烯二酰亚胺- $(CH_2)_5$ -Val-Cit、顺丁烯二酰亚胺- $(CH_2)_5$ -Val-lys、顺丁烯二酰亚胺- $(CH_2)_5$ -Gly-Gly-Phe-Gly、顺丁烯二酰亚胺- $(PEG)_2$ -Ala-Ala-Asn、顺丁烯二酰亚胺- $(PEG)_6$ -Ala-Ala-Asn、顺丁烯二酰亚胺- $(PEG)_8$ -Ala-Ala-Asn、顺丁烯二酰亚胺- $(PEG)_4$ -三唑- $(PEG)_3$ -磺酰胺、顺丁烯二酰亚胺- $(PEG)_2$ - $CH_2CH_2C(O)$ -Val-lys、顺丁烯二酰亚胺- $(PEG)_4$ -三唑- $(PEG)_3$ -磺酰胺或 Mal- $(PEG)_4$ -三唑- $(PEG)_3$ -二硫化物。

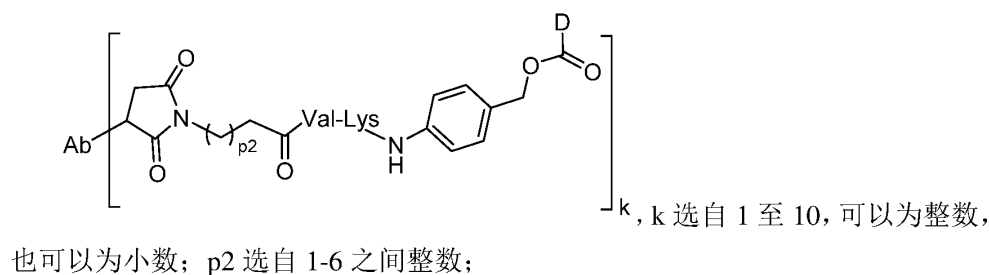
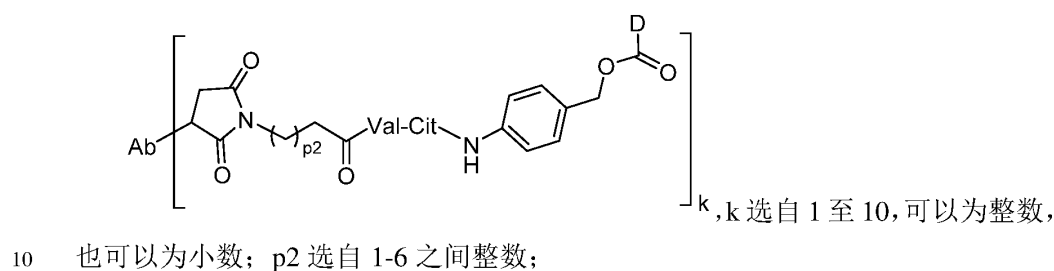
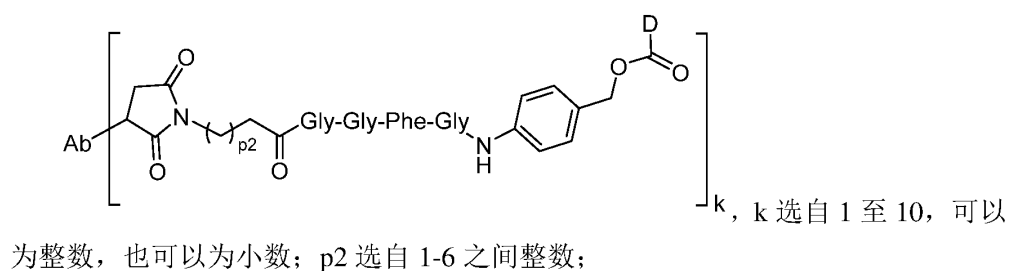
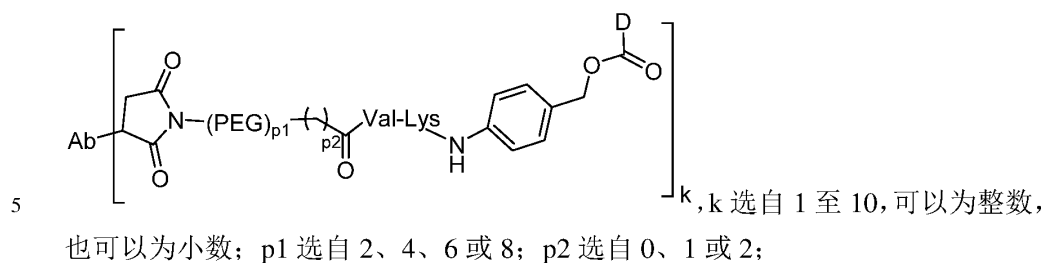
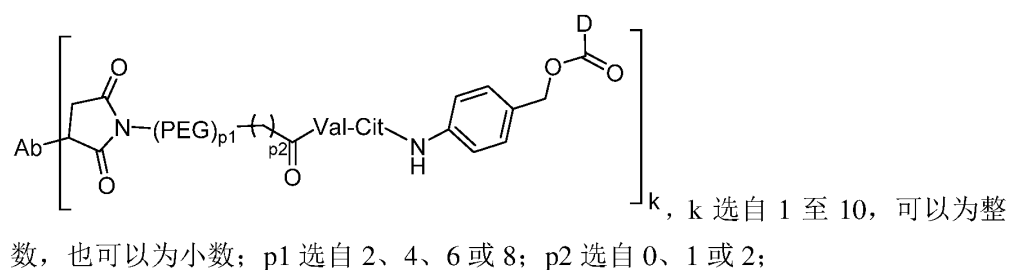
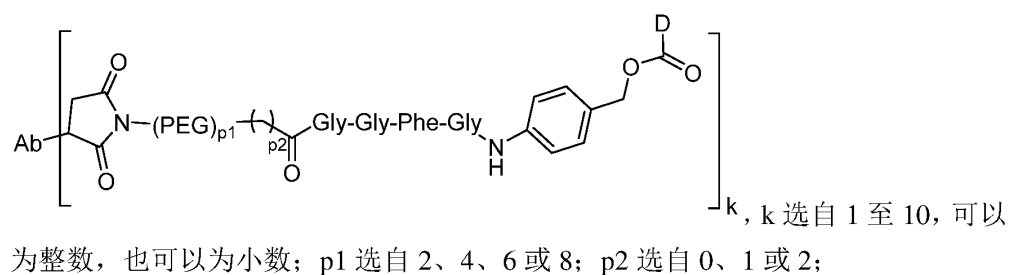
25

16. 根据权利要求 12 所述的抗体-药物偶联物，其中 Str 选自下式表示的化学部分：



其中 R^8 选自 C_{1-10} 亚烷基、 C_{2-10} 亚烯基、 $(C_{1-10}$ 亚烷基) $O-$ 、 $N(R^d)-(C_{2-6}$ 亚烷基)- $N(R^d)$ 和 $N(R^d)-(C_{2-6}$ 亚烷基)；且每个 R^d 独立为 H 或 C_1-C_6 烷基。

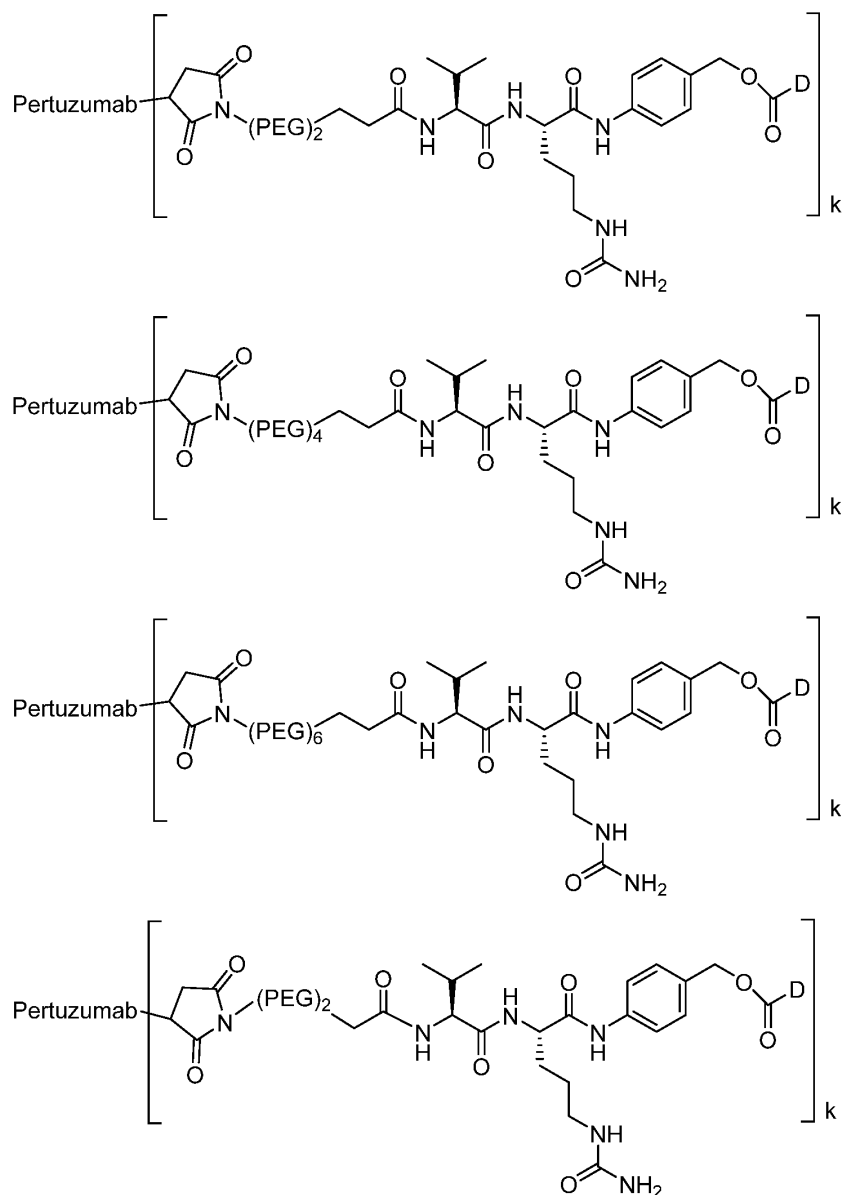
17. 根据权利要求 1-15 任一项所述的抗体-药物偶联物，其由下式表示：



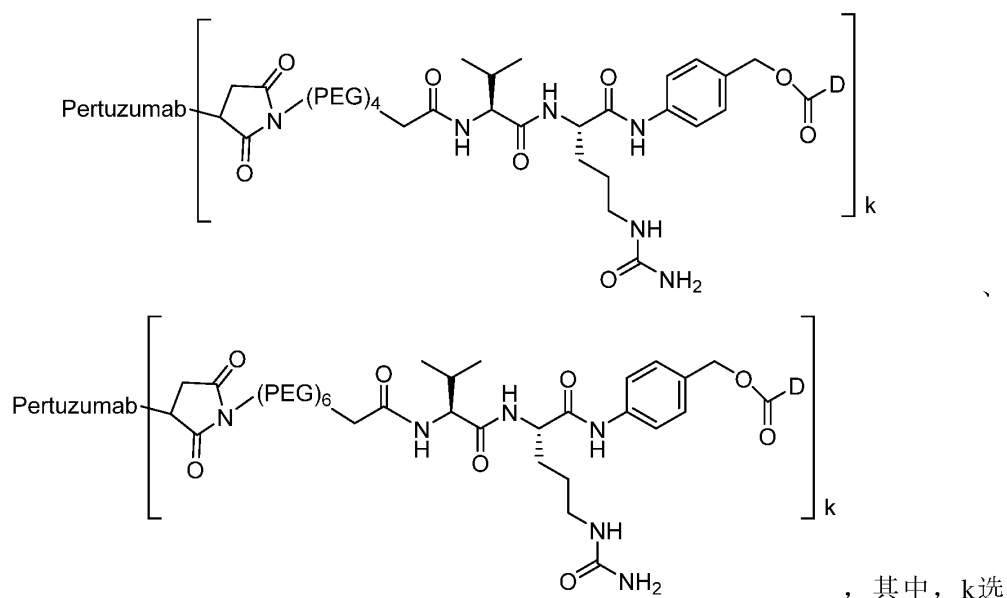
Ab、D 如权利要求 1 中所定义。

18. 根据权利要求 1-17 任一项所述的抗体-药物偶联物，其中所述 HER2 抗体包含分别在 SEQ ID No.1 和 2 中的轻链和重链可变区氨基酸序列，优选地，所述
5 HER2 抗体包含分别如 SEQ ID No.3 和 4 所示的轻链和重链氨基酸序列。

19. 根据权利要求 1-18 任一项所述的抗体-药物偶联物，其由下式表示：



10



自1至10，可以为整数，也可以为小数。

5

20. 根据权利要求1至19中任一项所述的抗体-药物偶联物，其中k选自2.0至2.5、2.5至3.5或3.5至5.0。

21. 一种权利要求1至20中任一项所述抗体-药物偶联物的同位素取代物，优选地，所述的同位素取代为氘原子取代。

22. 一种药物组合物，其含有：

治疗有效量的权利要求1至20任一项所述的抗体-药物偶联物，或者权利要求21所述的同位素取代物，以及
药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

23. 权利要求1至20任一项所述的抗体-药物偶联物、或权利要求21所述的同位素取代物或权利要求22所述的药物组合物在制备用于治疗或预防肿瘤的药物中的用途。

20

24. 根据权利要求23所述的用途，其中所述的肿瘤为与HER2的结构域II表达相关的癌症，所述癌症优选乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫癌、前列腺癌、肾癌、尿道癌、膀胱癌、肝癌、胃癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、食道癌、黑色素瘤、神经胶质瘤、神经母细胞瘤、肉瘤、肺癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、白血病、骨癌、皮肤癌、甲状腺癌、胰腺癌和淋巴瘤。

25