说明书

发明名称: 一种抗体药物偶联物

[0001] 优先权

[0002] 本申请要求于2024年6月6日提交中国国家知识产权局、申请号为CN202410732731.9、发明名称为“一种氘代的喜树碱衍生物及配体药物偶联物”的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用结合在本申请中。

技术领域

[0003] 本发明涉及生物医药技术领域，具体涉及抗体及其抗原结合片段、喜树碱类化合物、连接子及其抗体药物偶联物。

背景技术

[0004] 抗体药物偶联物(Antibody-Drug Conjugates，ADCs)是一类由单克隆抗体和具有强效细胞毒性载荷通过生物活性连接子偶联而成的新型生物药物，其药物作用机理为抗体药物偶联物利用单克隆抗体实现与靶向抗原之间的特异性结合后内化进入靶标癌细胞，细胞毒性载荷在抗体药物偶联物内化进入癌细胞后发挥细胞毒性杀死癌细胞(Fu Z,Li S,Han S,et al.Antibody drug conjugate:the"biological missile"for targeted cancer therapy[J].Signal Transduction and Targeted Therapy,(2022)7:93.)。抗体药物偶联物通过特异性靶向在肿瘤和健康细胞之间高度差异化表达的细胞表面标志物，可以实现选择性地将高效细胞剂输送到目标癌细胞，因此在抗肿瘤治疗领域被誉为“生物导弹”。自2000年，首款ADC药物Mylotarg(gemtuzumab ozogamicin)获批上市以来，截止至2025年1月，全球仅有16种ADC(基本信息见表1)获得批准上市，且由于ADC应用对患者靶点阳性要求以及ADC使用后期存在的耐药性原因，目前临床中仍存在大量未满足的治疗需求。此外，ADC药物还存在开发难度大，技术壁垒高的特点。

表1.全球获批上市ADC药物基本信息

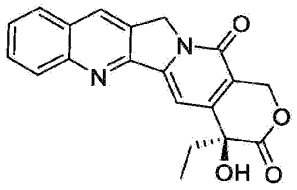
序号	商品名	药物名称	研发机构	毒素	靶点
1	Mylotarg	奥加吉妥珠单抗	Pfizer	Calicheamicin	CD33
2	Adcetris	维布妥昔单抗	Seagen/Takeda Pharmaceuticals	MMAE	CD30
3	Kadcyla	恩美曲妥珠单抗	Roche/ ImmunoGen	DM1	HER2
4	Besponsa	奥加伊妥珠单抗	Pfizer/Celltech	Calicheamicin	CD22
5	Lumoxiti	帕西妥欧单抗	AstraZeneca	PE38	CD22
6	Polivy	维泊妥珠单抗	Roche	MMAE	CD79B
7	Padcev	维恩妥尤单抗	Seagen/Astellas Pharma	MMAE	HER2
8	Enhertu	德曲妥珠单抗	Daiichi Sankyo/AstraZeneca	DXD	NECTIN-4
9	Trodelvy	戈沙妥珠单抗	Gilead Sciences	SN38	TOROP2
10	Blenrep	玛贝兰妥单抗	GSK	MMAF	BCMA
11	Zynlonta	替朗妥昔单抗	ADC Therapeutics	PBD	CD19
12	爱地希	维迪西妥单抗	荣昌生物	MMAE	HER2
13	Tivdak	维替索妥尤单抗	Genmab/ Seagen	MMAE	TF
14	Elahere	索米妥昔单抗	Immunogen/华东医药	DM4	FRA
15	Akalux	Cetuximab Sarotalocan Sodium	乐天医疗	IRDye700DX	EGFR
16	佳泰莱	芦康沙妥珠单抗	科伦博泰	KL610023	Trop2

[0005] CDCP1(CUB domain−containing protein 1)是一种跨膜糖蛋白，广泛表达于多种肿瘤细胞中，包括结直肠癌、肺癌、乳腺癌等。研究表明，CDCP1在肿瘤的发生、侵袭以及转移过程中扮演着重要角色，因此成为了潜在的肿瘤治疗靶点之一(Kaur,H.,et al.(2016)."CDCP1:A Novel Target for Cancer Immunotherapy."Journal of Cancer Research and Therapeutics,12(3),821 - 832.DOI:10.4103/0973−1482.188207.Siegel,R.L.,et al.(2021)."Cancer Statistics,2021."CA:A Cancer Journal for Clinicians,71(1),7−33.DOI:10.3322/caac.21654.)。随着CDCP1在肿瘤中的重要性逐步被认识，基于CDCP1的抗体药物偶联物的开发正在成为肿瘤治疗领域的研究热点。应用新型的CDCP1抗体研发的抗体药物偶联物能够实现精准的靶向治疗，使抗癌药物能够专一地作用于CDCP1阳性的肿瘤细胞，最大程度地提高治疗效果。目前已存在靶向CDCP1的抗体药物偶联物处于临床前阶段研究，尚未有进入临床阶段的探索分子，CDCP1抗体药物偶联物的开发仍面临着许多挑战，包括抗体的特异性、药物载荷的设计、偶联方式的优化、药物在体内的稳定性及释放

机制等，如何克服这些技术难题，提升CDCP1抗体药物偶联物的临床疗效，成为当前研究的核心问题。

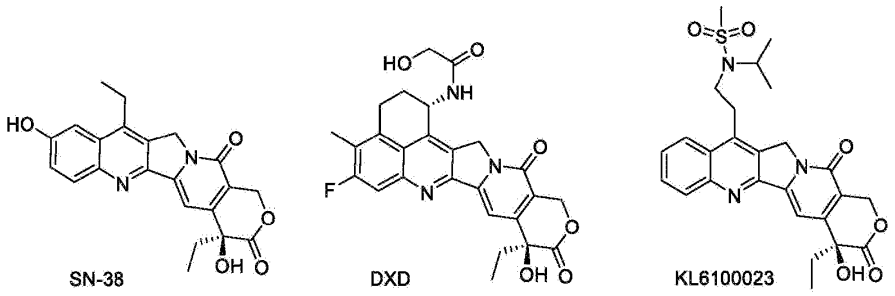
[0006] 从药物载荷设计而言，目前可用于构建有效ADC的毒素种类非常有限，16款上市ADC涉及的毒素种类仅有卡奇霉素(Calicheamicin)、PE38(一种铜绿假单胞菌外毒素a片段)、PBD(吡咯并苯并二氮杂)以及奥瑞他汀类化合物(MMAE、MMAF)、美登素类化合物(如DM1、DM4)、喜树碱类化合物(如DXD、SN38、KL610023)等10种毒素选择。

[0007] 其中，喜树碱类化合物是对喜树碱(CPT)的一个或多个位点进行基团改构而得的一类化合物的总称。喜树碱(CPT)是一种拓扑异构酶Ⅰ抑制剂，可从喜树的树皮中分离获得(用于治疗癌症的传统中医药材)，其具体分子结构于1966年被Wall等人首次公开(Wall M.Plant antitumor agents I.The isolation and structure of camptothecin−A novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from Camptotheca acuminata[J].J Am Chem Soc,1966,88.)，如下所示,

分子结构	名称
	喜树碱（camptothecin）

[0008] 喜树碱(CPT)可通过氢键与拓扑异构酶和DNA结合，阻止DNA重组进而破坏DNA导致细胞凋亡，然而由于水溶性差、靶向性低、对正常组织产生高毒性以及在血浆中不稳定等缺点，喜树碱在应用时受到诸多限制(Dancey J,Eisenhauer E A.Current perspectives on camptothecins in cancer treatment[J].Br J Cancer,1996；Proulx M E,Desormeaux A,Marquis J F,et al.Treatment of visceral leishmaniasis with sterically stabilized liposomes containing camptothecin[J].Antimicrobial Agent and Chemotherapy,2019.)，自首次公开喜树碱的结构50余年以来，虽然后期有大量的喜树碱类化合物被公开，同时也有部分喜树碱类化合物作为毒素被应用到构建抗体药物偶联物的研究中，但是截止目前包含喜树碱类化合物且具备显著成药性能的抗体药物偶联物数量屈指可数，从表1可以看出，目前上市的16款抗体药物偶联物中

仅有三款采用了喜树碱类化合物分别为德曲妥珠单抗(trastuzumab deruxtecan)中的DXD与戈沙妥珠单抗(Sacituzumab Govitecan)中的SN38和芦康沙妥珠单抗(Sacituzumab Tirumotecan)中的KL6100023(结构如下所示)，尽管基于这三种载荷开发的抗体药物偶联物都取得了显著的效果，但由于每一种载荷对于不同类型的肿瘤疾病均存在不同的杀伤效果及安全性特征，具有较高的差异性，同时还涉及与不同连接子之间的组合都会带来治疗效果的差异，因此对于新型喜树碱类载荷的开发，仍存在巨大的需求及改进需要。



[0009] 从药物组成和技术特点来看，ADC在发展过程中经历了四次迭代分别为：第一代ADC药物、第二代ADC药物、第三代ADC药物及第四代ADC药物，其中①第一代ADC药物(Mylotarg、Besponsa)主要由常规化疗药物通过不可裂解连接子与鼠源抗体连接而成，此类ADC药物的功效并不优于游离的细胞毒性药物，甚至经常出现免疫原性、毒性载荷的不可控释放、抗体聚合、代谢不稳定、安全窗窄、成药挑战较高等问题；②第二代ADC药物(Adcetris、Kadcyla)对单克隆抗体、细胞毒性载荷及连接子进行了优化，采用IgG1同种型单克隆抗体，与IgG4相比，该类抗体更适合与小分子载荷进行生物偶联同时具备较高的癌细胞靶向能力，另一突破则是采用更有效的细胞毒性药物，提高了其水溶性与偶联水平，除此以外第二代ADC对连接子进行了改进以实现更优的血浆稳定性及药物均一性。通过对抗体、连接子、毒素三组分的改进，第二代ADC虽然具有较好的临床效果及安全性，但仍然存在由于脱靶毒性导致的治疗窗口不足、高DAR值ADC的聚集或快速清除等缺点；③第三代ADC药物(如：Polivy、Padcev)引入定点特异性偶联技术，产生了具有良好表征DAR值(2或4)及预期细胞毒性的均一性ADC，此类ADC表现出较低的脱靶毒性、较低的免疫原性、较高的药代动力

学效率，但仍然存在有效载荷释放不足、高耐药性等问题；④第四代ADC药物(Enhertu、Trodelvy)采取高DAR值(4-8)、中低活性细胞毒性载荷策略，载荷具有较高的旁观者效应，对肿瘤表面抗原低表达和高表达抗原肿瘤都具有良好的疗效。目前已上市的两款第四代ADC药物：Enhertu、Trodelvy均采用了喜树碱类化合物作为细胞毒性载荷，而Enhertu的连接子-毒素会在体循环中脱落导致细胞毒性，Tropelvy采用的payload活性较弱，同时在体循环中稳定性较差。

[0010] 氘为氢在自然界中的一种稳定形态的非放射性同位素，于1932年被首次发现并命名，氘与氢具有非常相似的物理化学性质，由于具有比氢更大的原子质量，与C-H键相比，C-D键的振动频率降低，基态能量降低，进而解离活化能增加，裂解速度较慢，使得C-D键比C-H键更加稳定(6-9倍)。将药物分子中的氢用氘取代后，可能封闭代谢位点、减少有毒代谢物的生成。此外，氘代药物在多种代谢酶下可以保持稳定，减缓系统清除速率从而延长药物在体内的半衰期。因此，氘代药物治疗可以通过降低单次给药剂量，同时在不影响药物的药理活性情况下实现降低药物的毒副作用的目标。在2017年，美国FDA批准了历史上第一款氘代药物上市——Teva的Austedo，并于2020年5月在中国获准上市。Austedo是氘代版的丁苯那嗪，其原型药丁苯那嗪此前一直是治疗亨廷顿舞蹈症的主流药物，但存在半衰期短、患者依存性低等缺陷。氘代丁苯那嗪通过将丁苯那嗪苯环上的两个甲氧基中的氢原子用氘原子置换，显著降低了药物代谢的速度，提高药物半衰期，从而减少药物的给药量，同时还抑制了由于药物血液浓度下降产生的戒断反应。虽然氘代在药物发现中有诸多优势，但是仍存在氘代效应的不可预测性，在不同位点的氘代产生的效果差异大，以及在控制氘富集的位置和程度方面也存在合成挑战，目前暂无氘代抗体偶联药物上市。

[0011] 综上所述，经过几十年的发展，目前获批上市的药物和靶点仍然有限，至今只有16个ADC药物获得批准，针对13个靶点。考虑到癌症的复杂性和多样性，现有药物远不能满足所有患者的需求，虽然包含喜树碱类化合物的抗体药物偶联物在治疗效果方面有了显著提高，但是仍然存在药效差异、安全性及耐药性问题，因此，进一步开发筛选肿瘤特异性高表达靶点的高亲和力抗体以及适合的载荷及连接子结构都至关重要，决定了抗体药物偶联物的有效性及安全性。

[0012] 因此，针对以上诸多问题和挑战，本领域仍然存在对载荷、抗体、连接子进行改进的需求以开发获得安全性及疗效进一步提高或赋予差异性治疗效果的抗体药物偶联物。

发明内容

[0013] 本发明提供一种靶向CDCP1的抗体或抗原结合片段、新型连接子、载荷及其在抗体药物偶联物中的应用。

[0014] 本发明还提供包含上述抗体的抗体药物偶联物(ADC)、编码上述CDCP1抗体的核苷酸、多核苷酸组合、表达载体及宿主细胞、包含上述CDCP1的抗体、抗体药物偶联物的药物组合物以及它们在制备治疗或预防癌症药物中的应用。

[0015] 一方面，涉及一种靶向CDCP1的抗体药物偶联物，所述抗体药物偶联物中包含靶向CDCP1的靶向部分，所述靶向部分包括重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，其中：

[0016] (1)所述重链可变区(VH)包含如下3个CDRs：SEQ ID NO:19所示序列的CDR-H1，SEQ ID NO:20所示序列的CDR-H2和SEQ ID NO:21所示序列的CDR-H3；和，

[0017] 所述轻链可变区(VL)包含如下3个CDRs：SEQ ID NO:22所示序列的CDR-L1，SEQ ID NO:23所示序列的CDR-L2和SEQ ID NO:24所示序列的CDR-L3；

[0018] 或

[0019] (2)所述重链可变区(VH)包含如下3个CDRs：SEQ ID NO:29所示序列的CDR-H1，SEQ ID NO:30所示序列的CDR-H2和SEQ ID NO:31所示序列的CDR-H3；和，

[0020] 所述轻链可变区(VL)包含如下3个CDRs：SEQ ID NO:32所示序列的CDR-L1，SEQ ID NO:33所示序列的CDR-L2和SEQ ID NO:34所示序列的CDR-L3；

[0021] 所述CDRs按IMGT编号系统定义。

[0022] 在一些实施方案中的抗体药物偶联物，其中，

[0023] 所述重链可变区(VH)包含如SEQ ID NO:25所示的序列或与SEQ ID NO:25相比同一性大于80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列，所述轻

链可变区(VL)包含如SEQ ID NO:26所示的序列或与SEQ ID NO:26相比同一性大于80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列；或

[0024] 所述重链可变区(VH)包含如SEQ ID NO:35所示的序列或与SEQ ID NO:35相比同一性大于80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列，所述轻链可变区(VL)包含如SEQ ID NO:36所示的序列或与SEQ ID NO:36相比同一性大于80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列。

[0025] 在一些实施方案中，抗体药物偶联物的靶向部分选自抗体或抗原结合片段。

[0026] 在一些实施方案中的抗体药物偶联物，所述抗体或抗原结合片段选自单克隆抗体、双特异性抗体、多特异性抗体或Fab片段、F(ab')片段、$F(ab')_2$片段、Fv片段、dAb、Fd、单链抗体(scFv)。

[0027] 在一些实施方案中，抗体药物偶联物的靶向部分还包含免疫球蛋白的恒定区，进一步优选的，其中所述的免疫球蛋白选自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

[0028] 在一些实施方案中，抗体药物偶联物的抗体部分包括重链和轻链，其中，

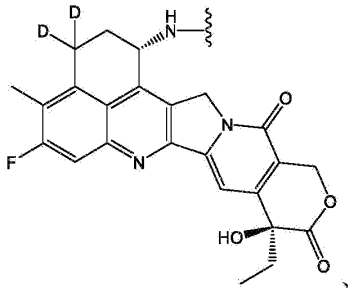
[0029] 所述重链包含如SEQ ID NO:27所示的序列或与SEQ ID NO:27相比同一性大于80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列，所述轻链包含如SEQ ID NO:28所示的序列或与SEQ ID NO:28相比同一性大于80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列；或

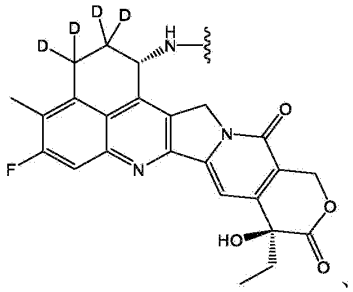
[0030] 所述重链包含如SEQ ID NO:37所示的序列或与SEQ ID NO:37相比同一性大于80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列，所述轻链包含如SEQ ID NO:38所示的序列或与SEQ ID NO:38相比同一性大于80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列。

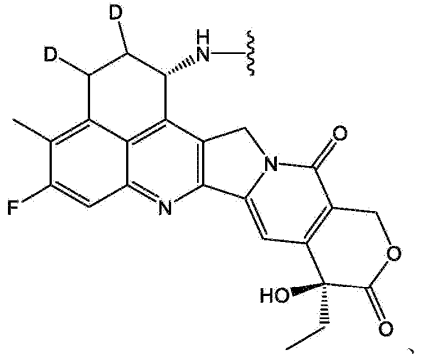
[0031] 在一些实施方案中，抗体药物偶联物的结构通式为$Ab-U_n$，所述Ab表示靶向部分，所述U表示连接子和载荷部分；所述n为选自1、2、3、4、5、6、7或8中的整数，分别代表连接在所述Ab上的U的数量为1、2、3、4、5、6、7或8；所述Ab通过连接子与所述载荷共价相连。

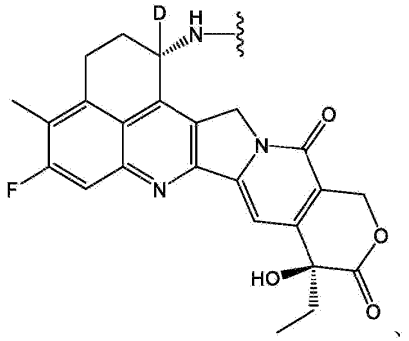
[0032] 在一些实施方案中，抗体药物偶联物的Ab上通过一个或多个所述连接子连接1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个或16个所述的载荷。

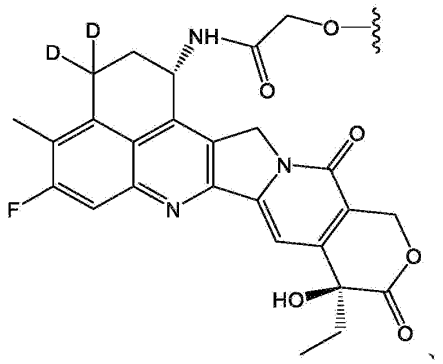
[0033] 在一些实施方案中的抗体药物偶联物，所述载荷选自

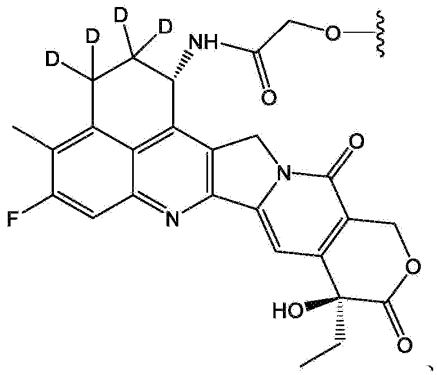
、

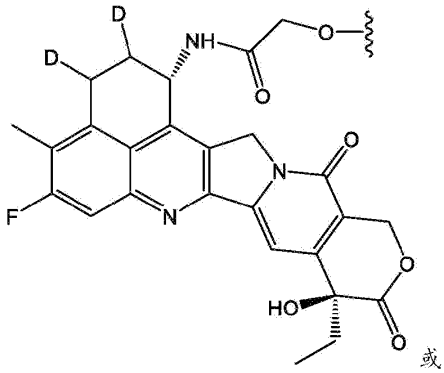
、

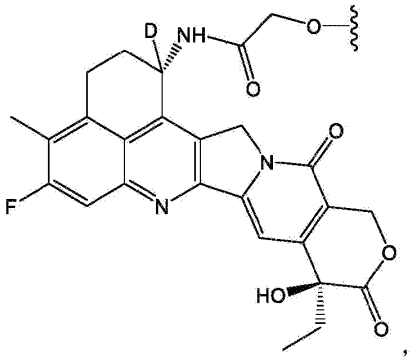
、

、

、

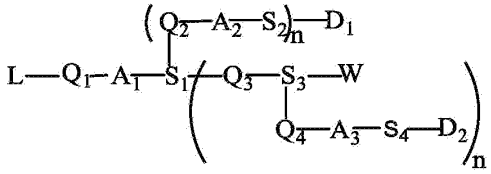
、

或

，

[0034] “〰”是所述载荷和连接子连接的位点。

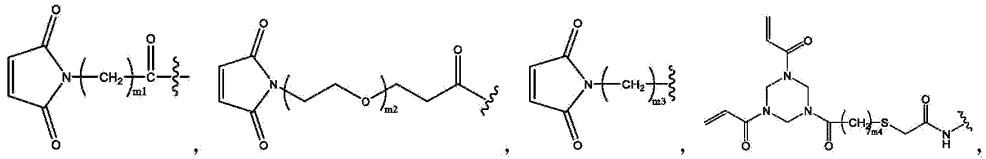
[0035] 在一些实施方案中的抗体药物偶联物，所述连接子和载荷部分由下式(I)表示：



(I)

[0036] 其中，

[0037] L是附着抗体的接头，选自以下结构：



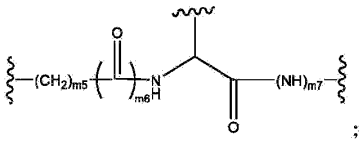
[0038] Q_1、Q_2、Q_3、Q_4各自独立地是单键或选自以下结构$-(CH_2CH_2O)p-$、$-NH-(CH_2OCH_2)p-C(O)-$、$-(NHCH_2C(O))-O-$、$-NH(CH_2CH_2O)p-CH_2CH_2C(O)-$、$-(CH_2CH_2O)p-CH_2CH_2C(O)-$、$-CH_2-Y-(CH_2CH_2O)p-CH_2CH_2C(O)-$、$-NHCH_2-Y-(CH_2CH_2O)p-CH_2CH_2C(O)-$、$-(CH_2)-Y-$、$-NHCH_2C(O)CH_2C(O)-$；所述Y选自C3-8环烷基或C3-8环状杂烷基或C1-8环状不饱和杂烷基，所述杂烷基包含选自N、O或者S的1-3个原子，p选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10；

[0039] A_1是单键或由1、2、3、4个氨基酸残基组成的肽；

[0040] A_2是单键或由1、2、3、4个氨基酸残基组成的肽；

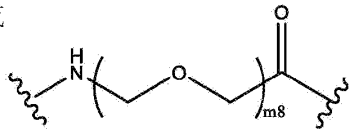
[0041] A_3是单键或由1、2、3、4个氨基酸残基组成的肽；

[0042] S_1、S_3独立地选自



；

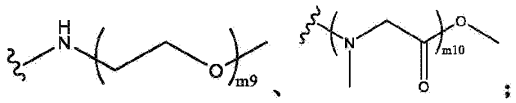
[0043] S_2、S_4独立地选自$-NH-CH_2-$或



；

[0044] D_1是第一药物单元，D_2是第二药物单元；

[0045] W选自



[0046] m1选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10；

[0047] m2选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10；

[0048] m3选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10；

[0049] m4选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10；

[0050] m5选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10；

[0051] m6选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10；

[0052] m7选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10；

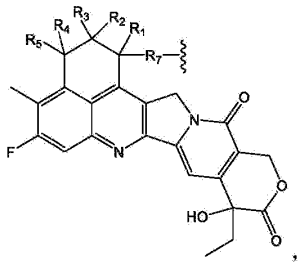
[0053] m8选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10；

[0054] m9选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15；

[0055] m10选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15；

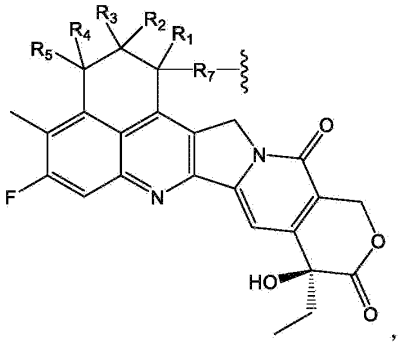
[0056] 下标n为0或1。

[0057] 在一些实施方案中，所述载荷独立地选自以下结构：



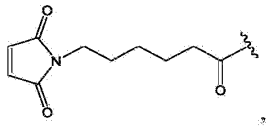
[0058] “〰”是所述载荷和连接子连接的位点，其中：R_1、R_2、R_3、R_4、R_5独立地选自H、D、T，R_1、R_2、R_3、R_4、R_5至少有一个为D，R_7独立地选自-NH-或-NH-C(O)-CH_2-O-，所述药物单元通过存在的羟基或胺基团中的任一个与连接子结构连接。

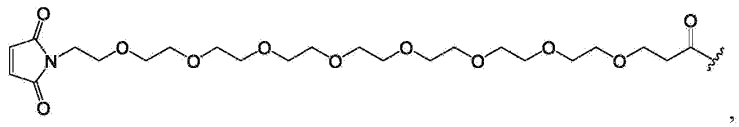
[0059] 在一些实施方案中，所述载荷独立地选自以下结构：

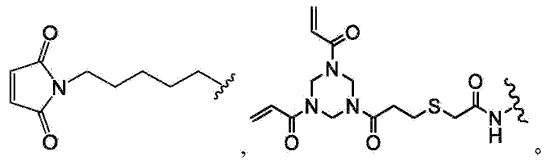
[0060] 

[0061] “〰”是所述载荷和连接子连接的位点，其中：R_1、R_2、R_3、R_4、R_5独立地选自氢(H)、氘(D)或氚(T)，R_1、R_2、R_3、R_4、R_5至少有一个、两个、三个或四个为D，R_7独立地选自-NH-或-NH-C(O)-CH_2-O-。

[0062] 在一些实施方案中，所述L选自以下结构：







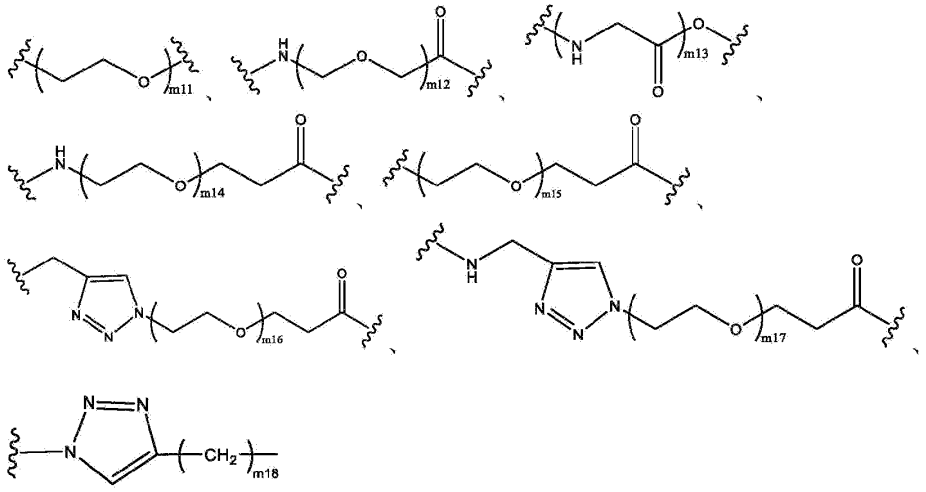
[0063] 在一些实施方案中，所述A_1、A_2、A_3独立地选自单键或包括由选自苯丙氨酸(Phe)、甘氨酸(Gly)、缬氨酸(Val)、赖氨酸(Lys)、精氨酸(Arg)、丝氨酸(Ser)、谷氨酸(Glu)、天冬氨酸(Asp)、丙氨酸(Ala)、半胱氨酸(Cys)、瓜氨酸(Cit)中的氨基酸组成的肽。

[0064] 优选的，所述A_1、A_2、A_3独立地选自单键或包括由选自苯丙氨酸(Phe)、甘氨酸(Gly)、缬氨酸(Val)、赖氨酸(Lys)、精氨酸(Arg)、丝氨酸(Ser)、谷氨酸(Glu)、天冬氨酸(Asp)、丙氨酸(Ala)、半胱氨酸(Cys)、瓜氨酸(Cit)中的2-4个氨基酸残基组成的肽；优选的，包括由选自苯丙氨酸(Phe)、甘氨酸(Gly)、丙氨酸(Ala)、缬氨酸(Val)的2-4个氨基酸残基组成的肽。

[0065] 优选的，所述A_1、A_2、A_3独立地选自单键或包括以下结构：

[0066] −Gly−Ala−、−Ala−Gly−、−Val−Gly−、−Gly−Val−、−Val−Cit−、−Val−Ala−、−Gly−Phe−、−Phe−Gly−、−Gly−Gly−Ala−Gly−、−Gly−Gly−Val−Gly−、−Gly−Gly−Phe−Gly−、−Gly−Ala−Gly−Gly−、−Gly−Val−Gly−Gly−、−Gly−Phe−Gly−Gly−、−Gly−Gly−Lys−Gly−、−Gly−Gly−Ser−Gly−、−Gly−Gly−Glu−Gly−、−Gly−Lys−Gly−Gly−、−Gly−Ser−Gly−Gly−、−Gly−Glu−Gly−Gly−、−Gly−Gly−Val−Ala−、−Gly−Gly−Cit−Gly−、−Gly−Cit−Gly−Gly−或−Ala−Ala−Ala−；优选的，−Gly−Gly−Phe−Gly−、−Val−Ala−、−Val−Gly−、−Phe−Gly−、−Gly−Gly−Val−Gly−、−Gly−Gly−Val−Ala−、−Ala−Ala−Ala−；更优选的，所述连接子包括以下结构：−Val−Ala−。

[0067] 在一些实施方案中，所述Q_1、Q_2、Q_3、Q_4连接基团独立地选自单键或以下结构：



[0068] 其中，

[0069] m11选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10；

[0070] m12选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10；

[0071] m13选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10；

[0072] m14选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10；

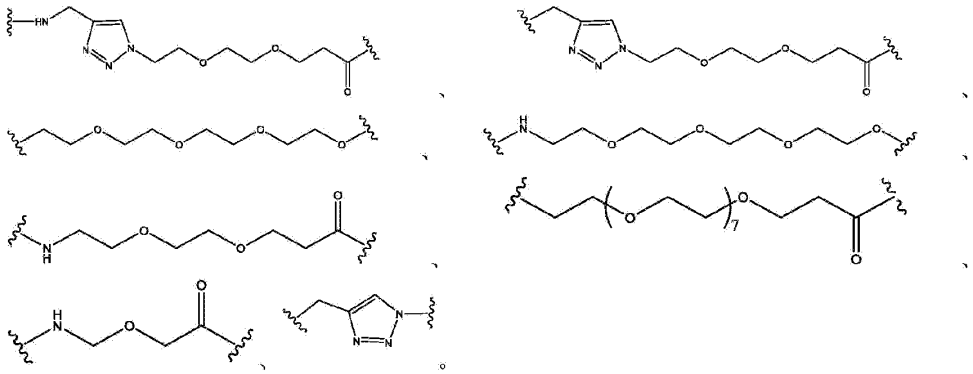
[0073] m15选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10；

[0074] m16选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10；

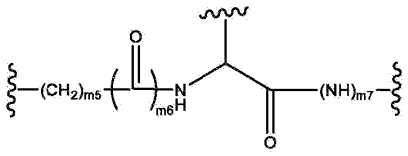
[0075] m17选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10；

[0076] m18选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10。

[0077] 优选的，所述Q_1、Q_2、Q_3、Q_4连接基团独立地选自单键或以下结构：

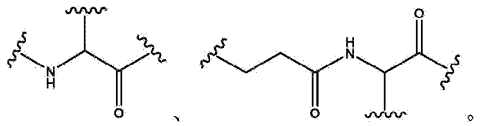


[0078] 在一些实施方案中，所述S_1、S_3独立地选自以下结构：

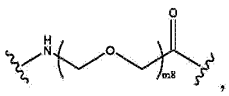


，其中，m5选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10；m6选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10；m7选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10。

[0079] 优选的，所述S_1、S_3独立地选自以下结构：

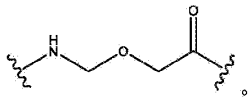


[0080] 在一些实施方案中，所述S_2、S_4选自−NH−CH_2−或以下结构：

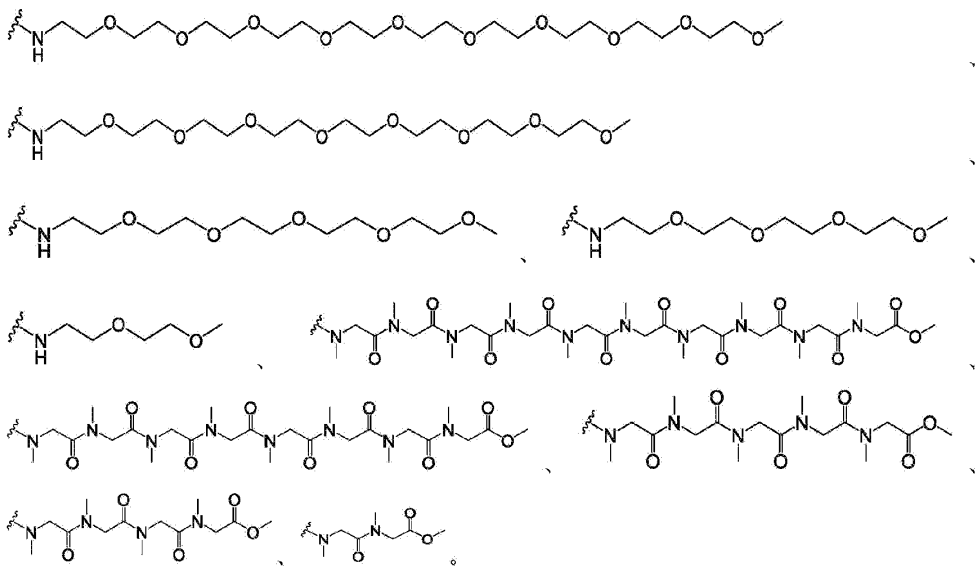


，其中，m8选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10。

[0081] 优选的，所述S_2、S_4选自−NH−CH_2−或以下结构：

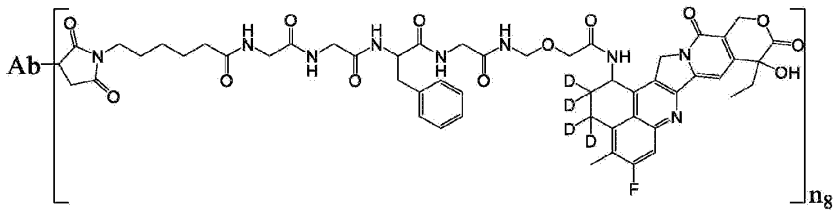


[0082] 在一些实施方案中，所述W选自以下结构：

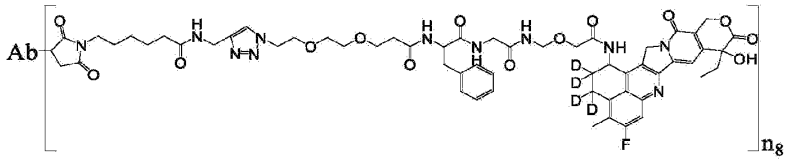


[0083] 在一些实施方案中，所述抗体药物偶联物选自以下结构：

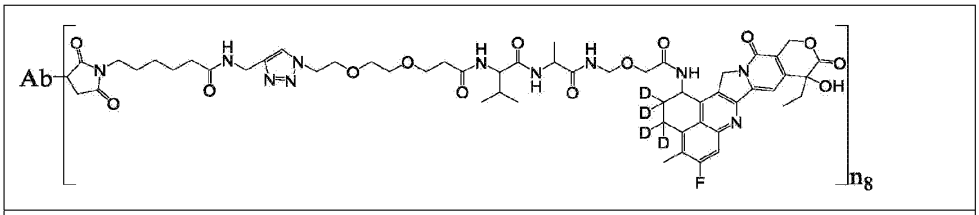
ADC-1



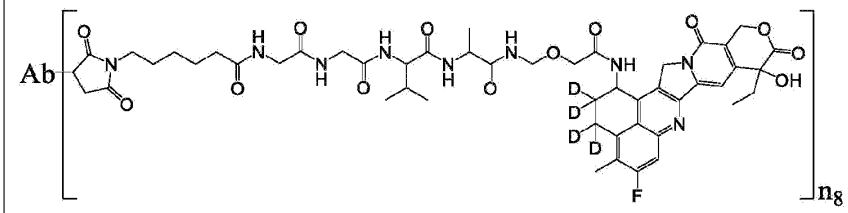
ADC-2



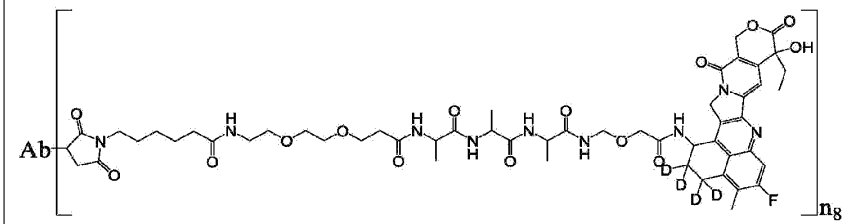
ADC-6



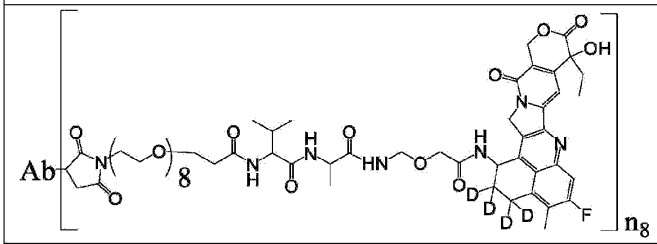
ADC-5



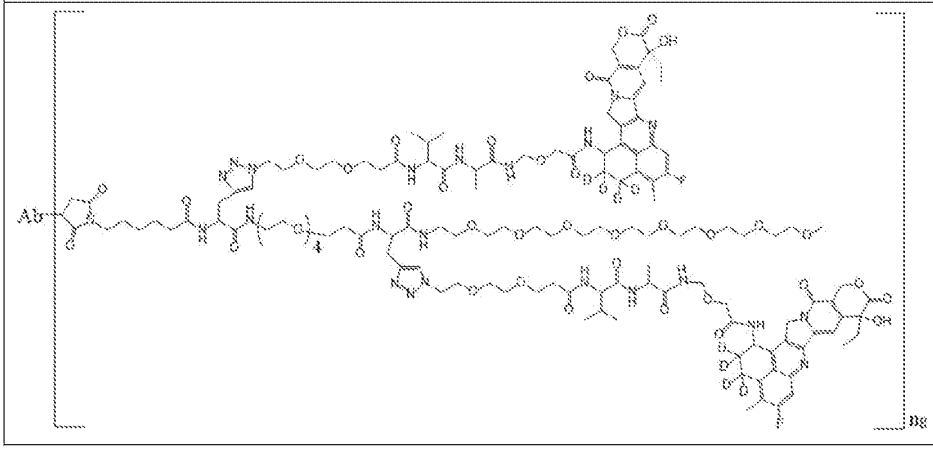
ADC-7



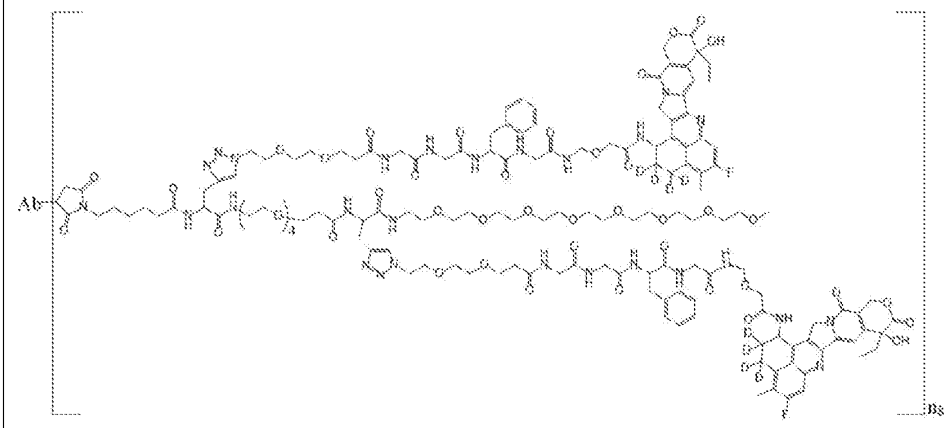
ADC-14



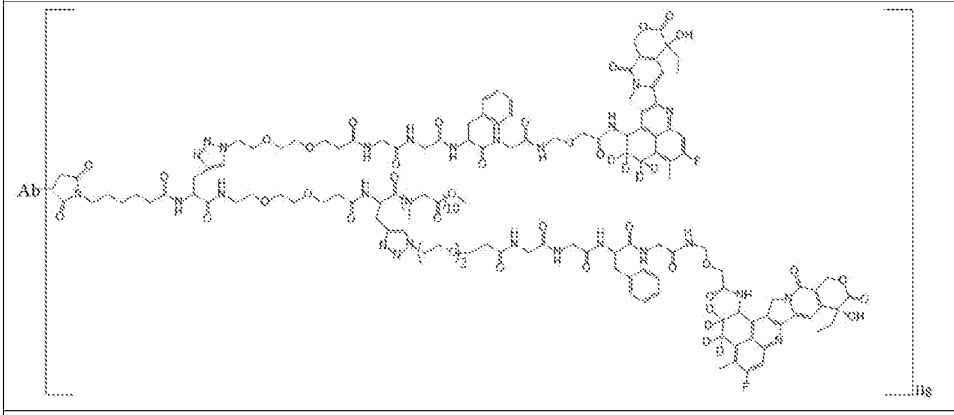
ADC-4



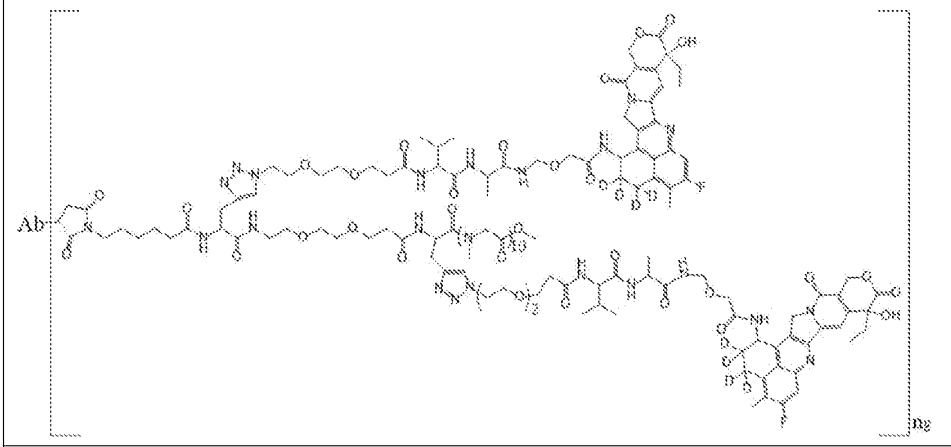
ADC-3



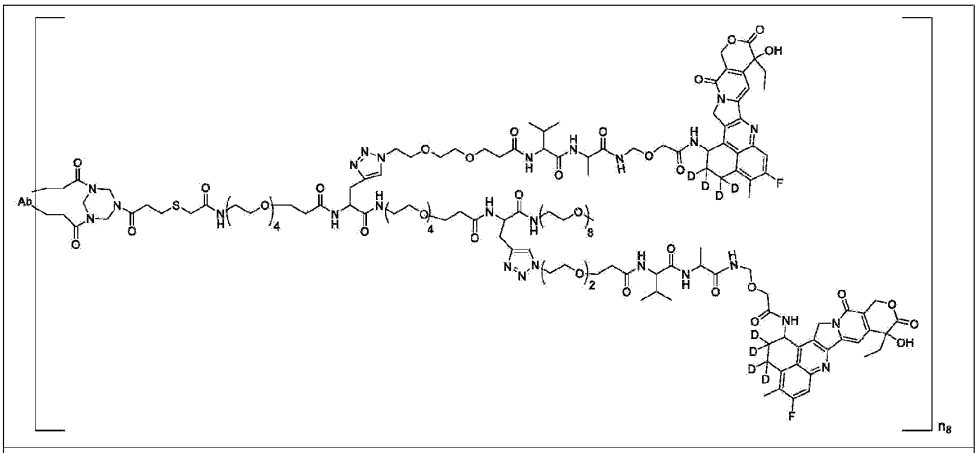
ADC-8



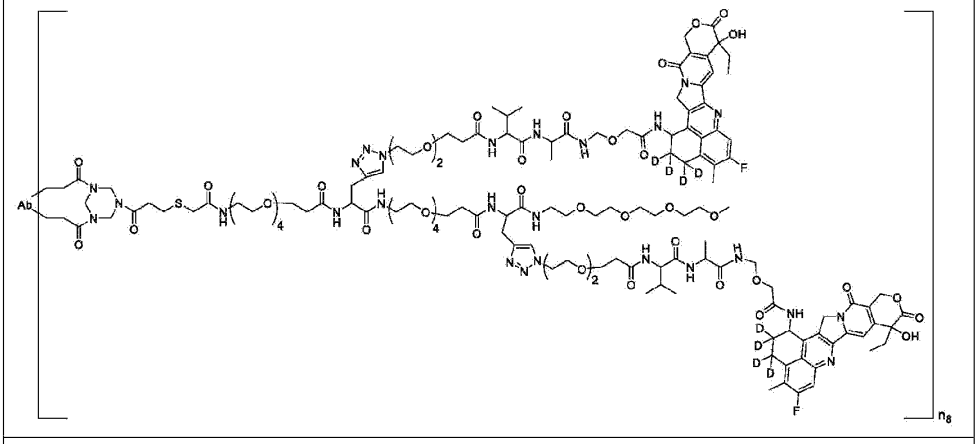
ADC-9



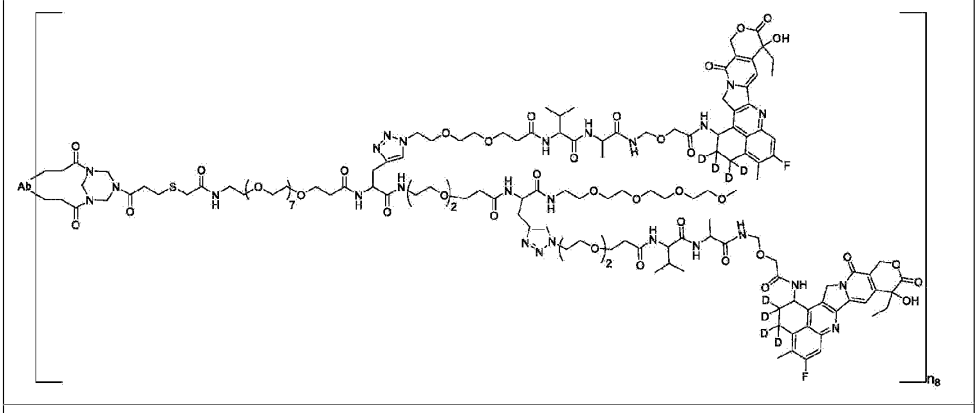
ADC-10



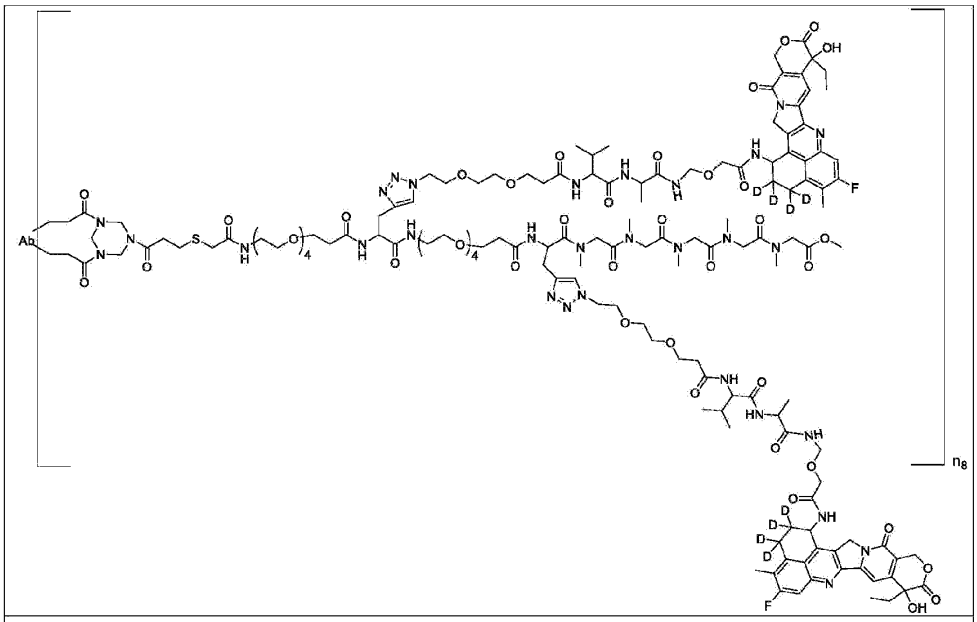
ADC-11



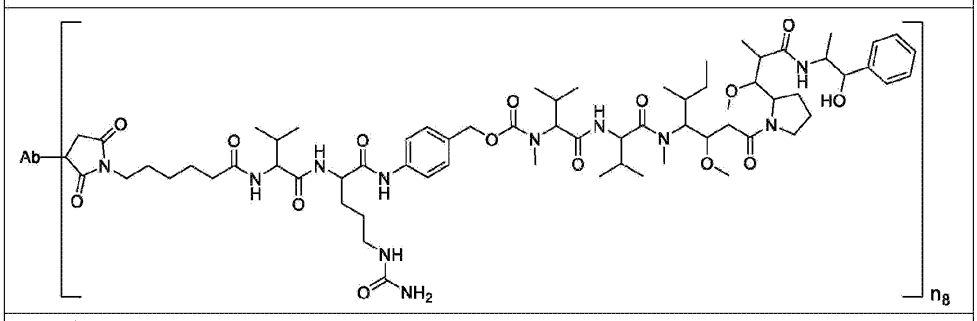
ADC-12



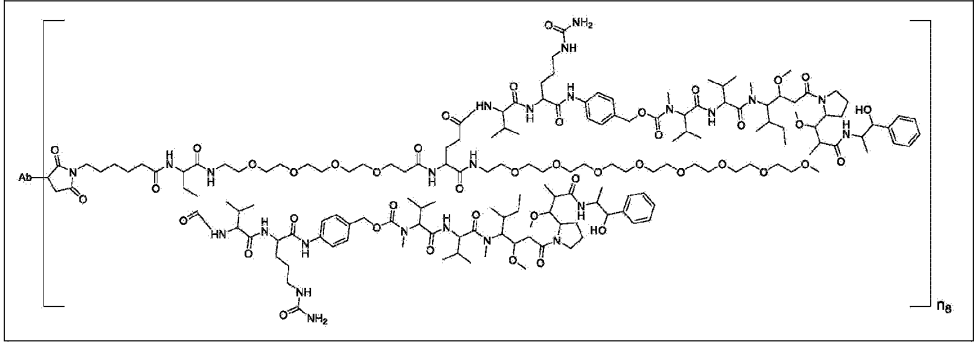
ADC-13



ADC-15



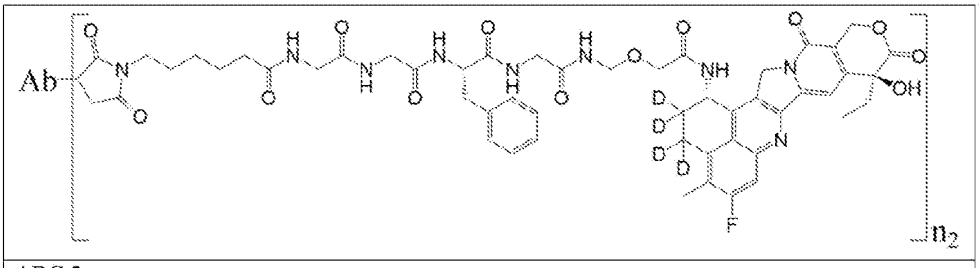
ADC-16



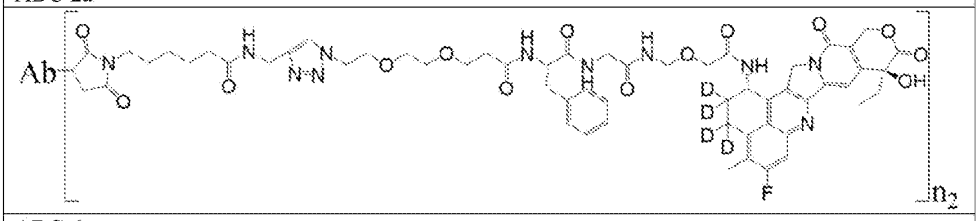
[0084] 所述n_8选自1、2、3、4、5、6、7或8,代表所述Ab上连接的连接子-载荷部分的数量为1、2、3、4、5、6、7或8个；所述抗体通过抗体中的半胱氨酸上的二硫键连接连接子-载荷部分。

[0085] 在一些实施方案中，所述抗体药物偶联物选自以下结构：

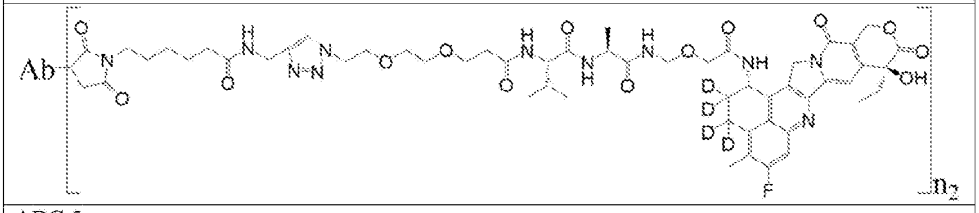
ADC-1a



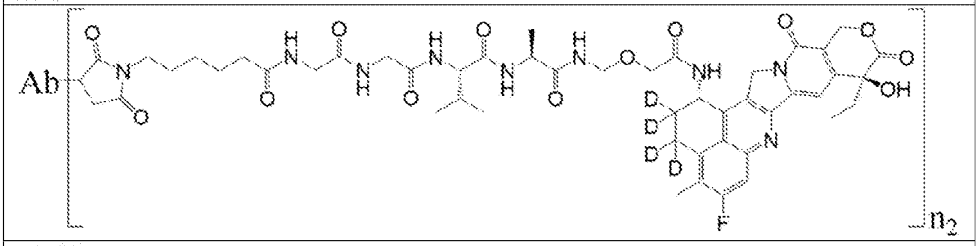
ADC-2a



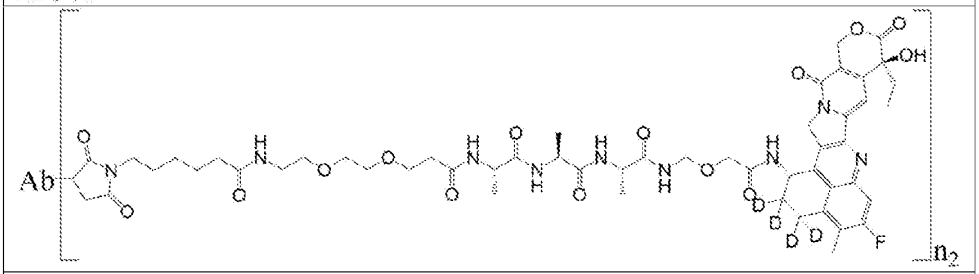
ADC-6a



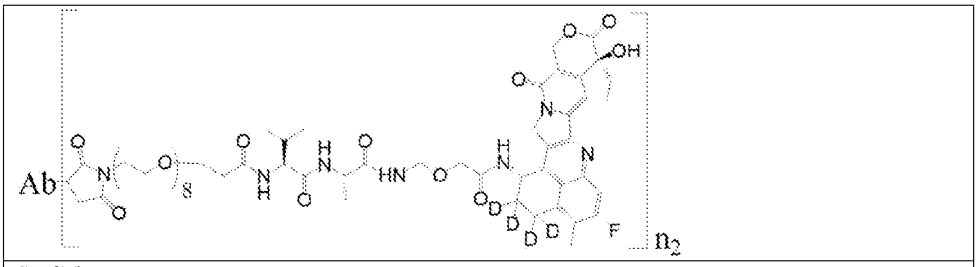
ADC-5a



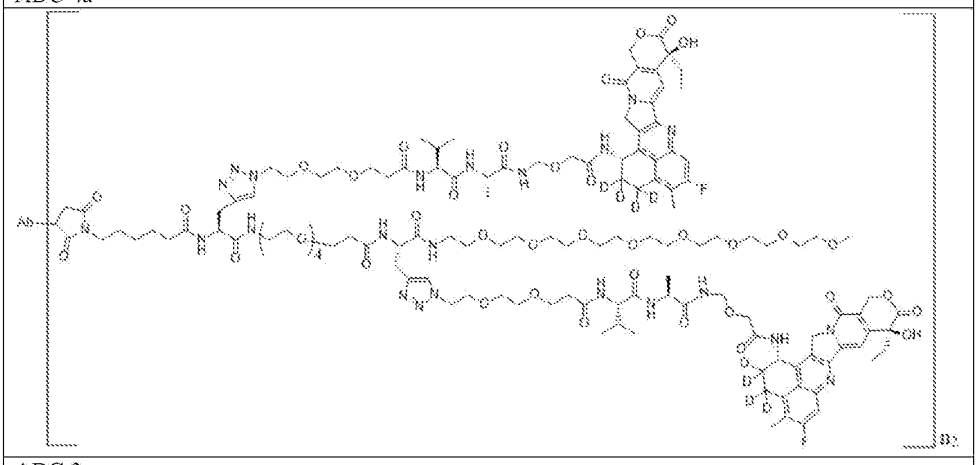
ADC-7a



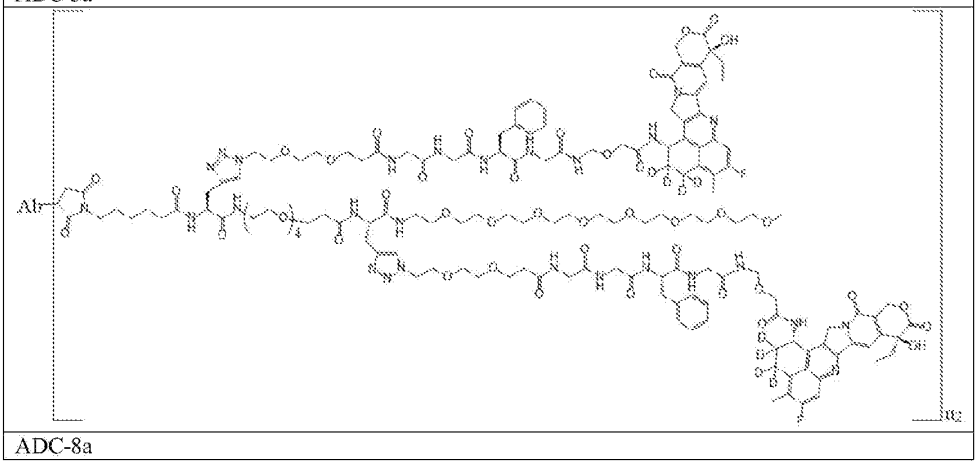
ADC-14a



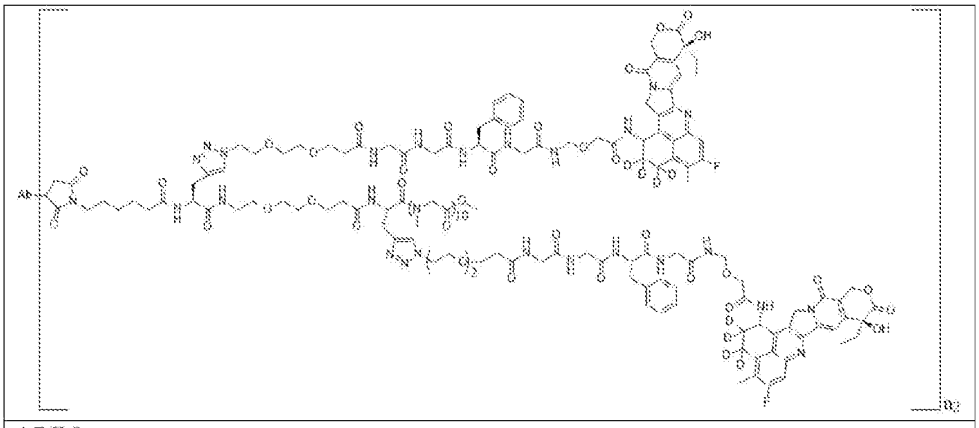
ADC-4a



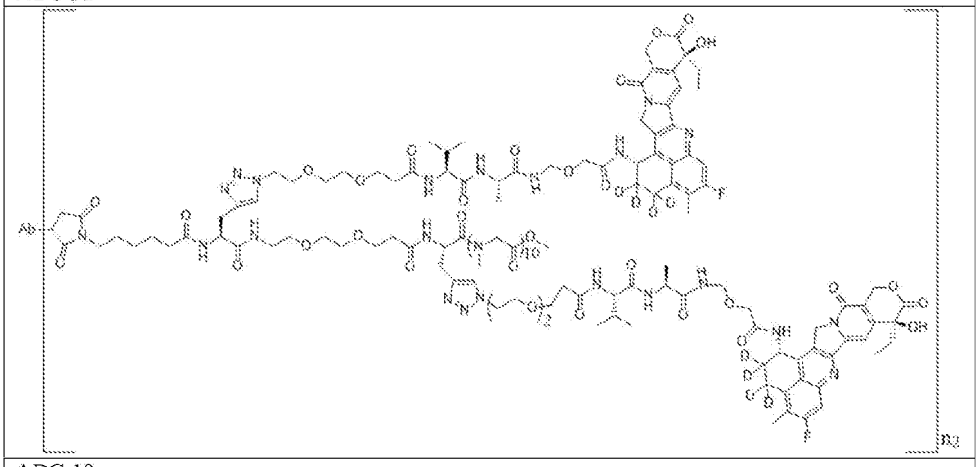
ADC-3a



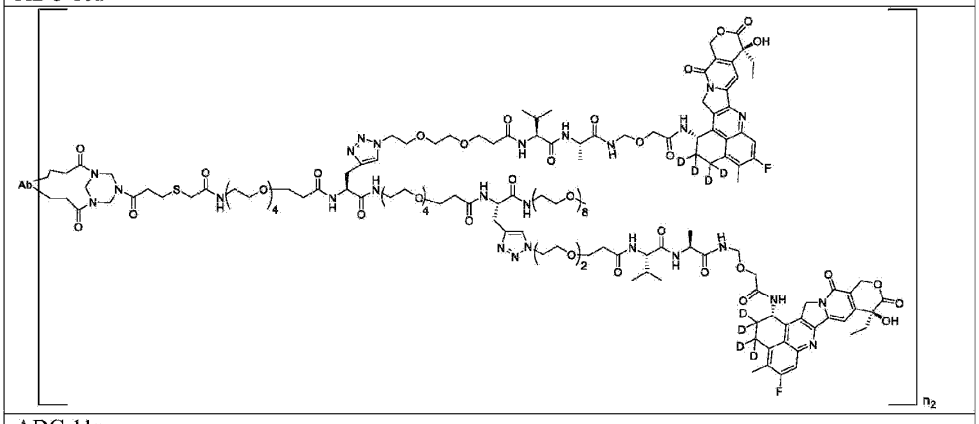
ADC-8a



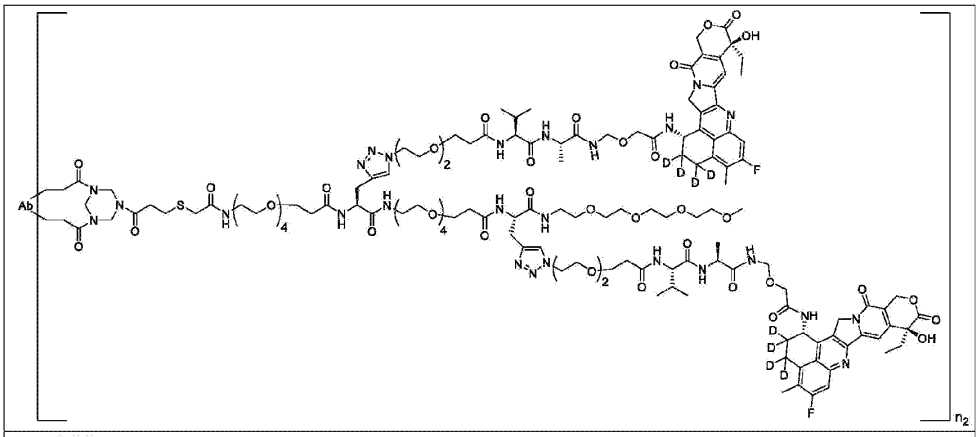
ADC-9a



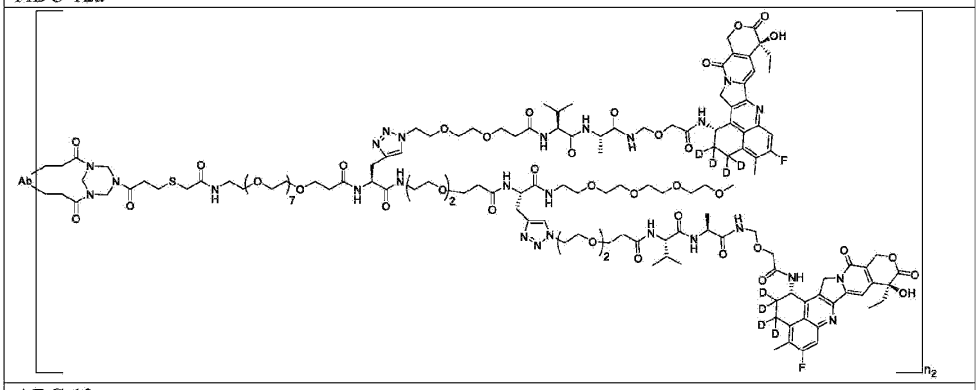
ADC-10a



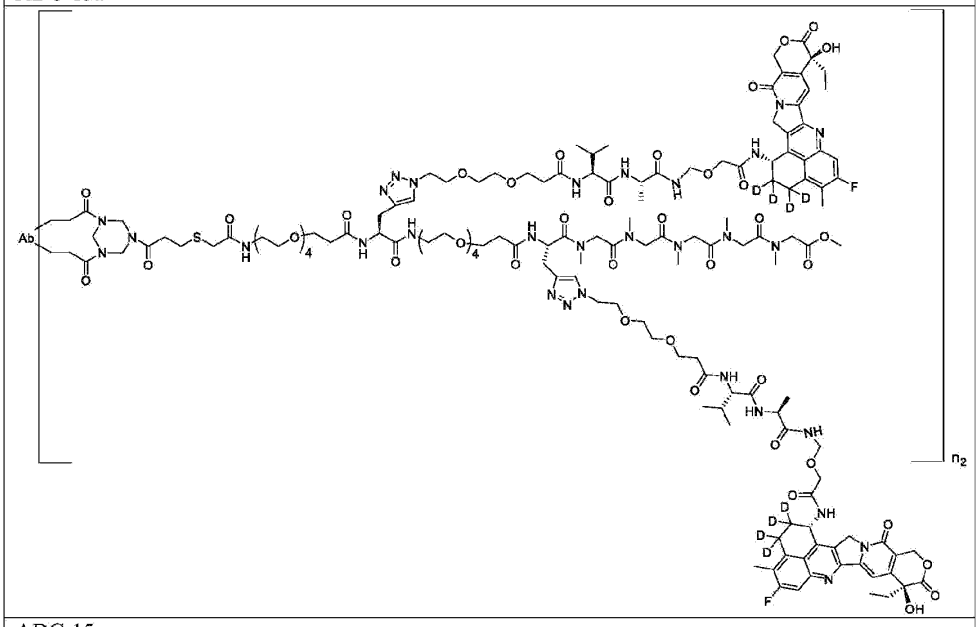
ADC-11a



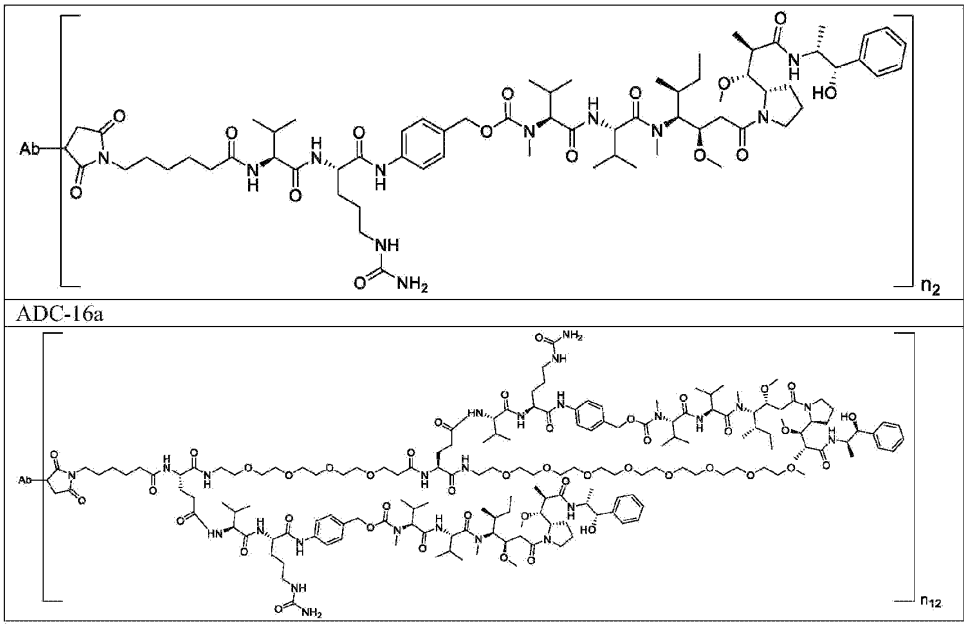
ADC-12a



ADC-13a



ADC-15a



[0086] 所述n_2选自1、2、3、4、5、6、7或8,代表所述Ab上连接的连接子-载荷部分的数量为1、2、3、4、5、6、7或8个；所述抗体通过抗体中的半胱氨酸上的二硫键连接连接子-载荷部分。

[0087] 一方面，涉及肿瘤的治疗方法，所述治疗方法包括给予患者施用有效量的上述任一项所述的抗体药物偶联物。

[0088] 在一些实施方案中，肿瘤是CDCP-1阳性。

[0089] 在一些实施方案中，肿瘤是肺癌或胰腺癌；进一步优选的，所述肿瘤是肺癌鳞癌，肺腺癌，非小细胞肺癌或胰腺腺癌。

[0090] 一方面，涉及一种靶向CDCP1的抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段包含下述重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，其中：

[0091] (1)包含如下3个CDRs的VH：包含SEQ ID NO:19所示序列的CDR-H1，包含SEQ ID NO:20所示序列的CDR-H2，包含SEQ ID NO:21所示序列的CDR-H3；和，

包含如下3个CDRs的VL：包含SEQ ID NO:22所示序列的CDR-L1，包含SEQ ID NO:23所示

序列的CDR-L2，包含SEQ ID NO:24所示序列的CDR-L3；或

[0092] (2)包含如下3个CDRs的VH：包含SEQ ID NO:29所示序列的CDR-H1，包含SEQ ID NO:30所示序列的CDR-H2，包含SEQ ID NO:31所示序列的CDR-H3；和，

[0093] 包含如下3个CDRs的VL：包含SEQ ID NO:32所示序列的CDR-L1，包含SEQ ID NO:33所示序列的CDR-L2，包含SEQ ID NO:34所示序列的CDR-L3；

[0094] 所述CDRs按IMGT编号系统定义。

[0095] 在一些实施方案中，所述的抗体或其抗原结合片段选自单克隆抗体、双特异性抗体、多特异性抗体、包含所述抗原结合片段的重组蛋白或Fab片段、F(ab')片段、$F(ab')_2$片段、Fv片段、dAb、Fd、单链抗体(scFv)。

[0096] 在一些实施方案中，所述的抗体或抗原结合片段还包含免疫球蛋白的恒定区，其中所述的免疫球蛋白选自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

[0097] 在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含选自如下任一组的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)：

[0098] (1)重链可变区的序列如SEQ ID NO:25所示，或与SEQ ID NO:25具有相同的CDR 1-3且与SEQ ID NO:25相比同一性大于80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列；和轻链可变区的序列如SEQ ID NO:26所示，或与SEQ ID NO:26具有相同的CDR 1-3且与SEQ ID NO:26相比同一性大于80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列；或

[0099] (2)重链可变区的序列如SEQ ID NO:35所示，或与SEQ ID NO:35具有相同的CDR 1-3且与SEQ ID NO:35相比同一性大于80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列；和轻链可变区的序列如SEQ ID NO:36所示，或与SEQ ID NO:36具有相同的CDR 1-3且与SEQ ID NO:36相比同一性大于80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列。

[0100] 在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含选自如下任一组的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)：

[0101] (1)重链可变区的序列如SEQ ID NO:25所示；和轻链可变区的序列如SEQ ID NO:26所示；

[0102] 或

[0103] (2)重链可变区的序列如SEQ ID NO:35所示；和

[0104] 轻链可变区的序列如SEQ ID NO:36所示。

[0105] 在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含选自如下任一组的重链和轻链：

[0106] (1)所述重链包含如SEQ ID NO:27所示的序列或与SEQ ID NO:27相比同一性大于80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列；和

[0107] 所述轻链包含如SEQ ID NO:28所示的序列或与SEQ ID NO:28相比同一性大于80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列；

[0108] 或

[0109] (2)所述重链包含如SEQ ID NO:37所示的序列或与SEQ ID NO:37相比同一性大于80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列；和

[0110] 所述轻链包含如SEQ ID NO:38所示的序列或与SEQ ID NO:38相比同一性大于80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列。

[0111] 在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含选自如下任一组的重链和轻链：

[0112] (1)重链的氨基酸序列如SEQ ID NO:27所示；和轻链的氨基酸序列如SEQ ID NO:28所示；或

[0113] (2)重链的氨基酸序列如SEQ ID NO:37所示；和轻链的氨基酸序列如SEQ ID NO:38所示。

[0114] 一方面，涉及融合蛋白，所述融合蛋白包含上述任一抗体或其抗原结合片段。

[0115] 一方面，涉及分离的多核苷酸，所述多核苷酸编码上述任一抗体或其抗原结合片段或融合蛋白。

[0116] 一方面，涉及一种核酸构建体，所述核酸构建体包含上述多核苷酸。

[0117] 在一些实施方案中，所述核酸构建体为表达载体，其中所述的多核苷酸与允许其所编码的多肽在宿主细胞或无细胞表达系统中表达的调节序列有效连接。

[0118] 一方面，涉及一种宿主细胞，所述的宿主细胞包含上述的多核苷酸或者上述的核酸构建体；其优选自原核细胞、真核细胞、酵母细胞、哺乳动物细胞、大肠

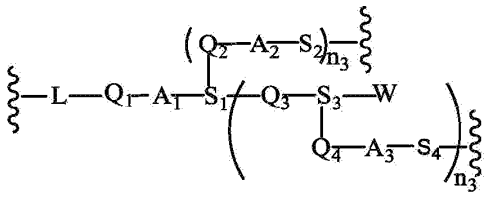
杆菌细胞；更优选的，所述的宿主细胞选自CHO细胞、NS0细胞、Sp2/0细胞或BHK细胞。

[0119] 一方面，涉及上述抗体或其抗原结合片段或融合蛋白的生产方法，所述方法包括在允许上述的核酸构建体表达的条件下培养上述的宿主细胞，并从培养物中回收产生的表达蛋白。

[0120] 一方面，涉及上述的抗体或其抗原结合片段或融合蛋白或多核苷酸在制备药物中的用途。

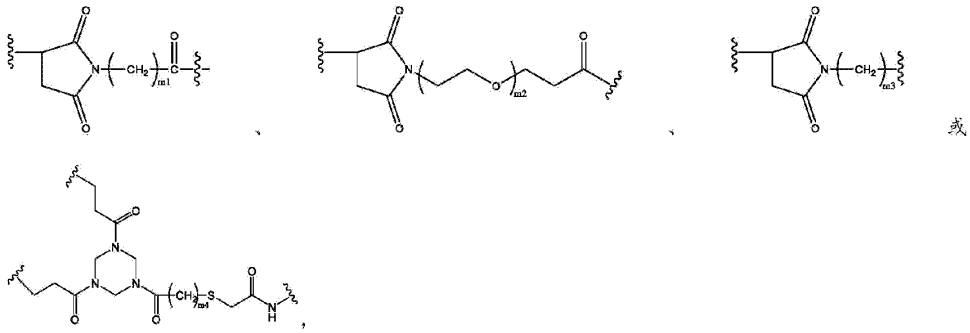
[0121] 优选的，所述药物包括单特异性抗体、双特异性抗体、多特异性抗体、抗体药物偶联物或者抗体核素偶联物。

[0122] 一方面，涉及如式(II)所示的连接子，



(II)

[0123] 其中，L是附着抗体的接头，选自以下结构：



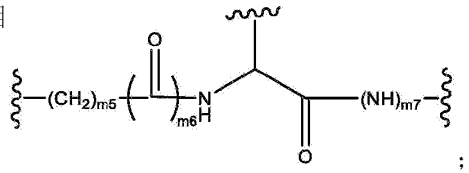
[0124] 其中，Q_1、Q_2、Q_3、Q_4各自独立地是单键或选自以下结构$-(CH_2CH_2O)p-$、$-NH-(CH_2OCH_2)p-C(O)-$、$-(NHCH_2C(O))p-O-$、$-NH(CH_2CH_2O)p-CH_2CH_2C(O)-$、$-(CH_2CH_2O)p-CH_2CH_2C(O)-$、$-CH_2-Y-(CH_2CH_2O)p-CH_2CH_2C(O)-$、$-NHCH_2-Y-(CH_2CH_2O)p-CH_2CH_2C(O)-$、$-(CH_2)-Y-$、$-NHCH_2C(O)CH_2C(O)-$；所述Y选自C3-8环烷基或C3-8环状杂烷基或C3-8环状不饱和

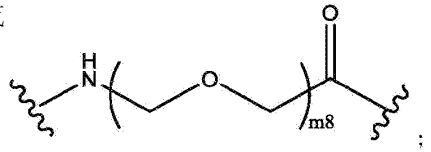
杂烷基，所述杂烷基包含选自N、O或者S的1-3个原子，p选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10；

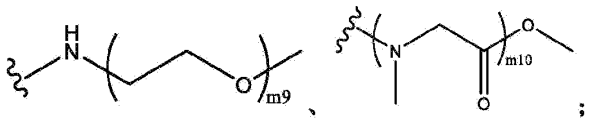
[0125] A_1是单键或由1、2、3、4个氨基酸残基组成的肽；

[0126] A_2是单键或由1、2、3、4个氨基酸残基组成的肽；

[0127] A_3是单键或由1、2、3、4个氨基酸残基组成的肽；

[0128] S_1、S_3独立地选自 ；

[0129] S_2、S_4独立地选自-NH-CH_2-或 ；

[0130] W选自 ；

[0131] m1选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10；

[0132] m2选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10；

[0133] m3选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10；

[0134] m4选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10；

[0135] m5选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10；

[0136] m6选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10；

[0137] m7选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10；

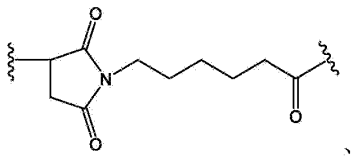
[0138] m8选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10；

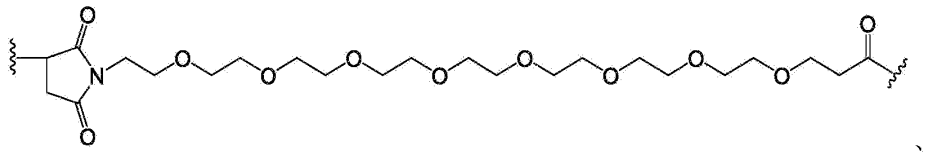
[0139] m9选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15；

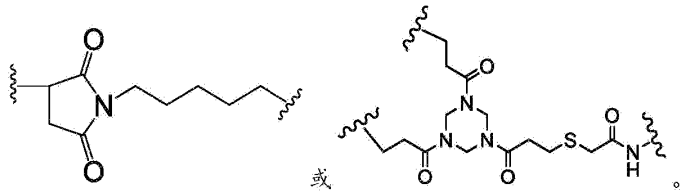
[0140] m10选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15；

[0141] 下标n_3为0或1。

[0142] 在一些实施方案中，所述L选自以下结构：


、


、


或

。

[0143] 在一些实施方案中，所述A_1、A_2、A_3独立地选自单键或包括由选自苯丙氨酸(Phe)、甘氨酸(Gly)、缬氨酸(Val)、赖氨酸(Lys)、精氨酸(Arg)、丝氨酸(Ser)、谷氨酸(Glu)、天冬氨酸(Asp)、丙氨酸(Ala)、半胱氨酸(Cys)、瓜氨酸(Cit)中的氨基酸组成的肽。

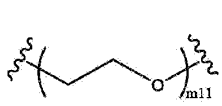
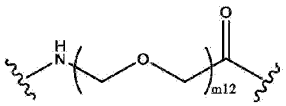
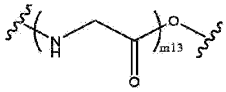
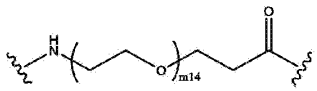
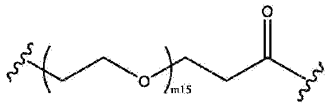
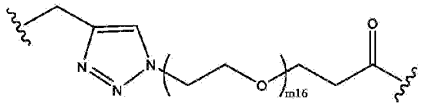
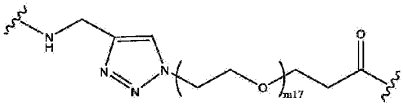
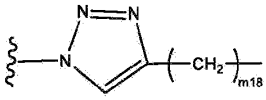
[0144] 在一些实施方案中，所述A_1、A_2、A_3独立地选自单键或包括由选自苯丙氨酸(Phe)、甘氨酸(Gly)、缬氨酸(Val)、赖氨酸(Lys)、精氨酸(Arg)、丝氨酸(Ser)、谷氨酸(Glu)、天冬氨酸(Asp)、丙氨酸(Ala)、半胱氨酸(Cys)、瓜氨酸(Cit)中的2-4个氨基酸残基组成的肽；优选的，包括由选自苯丙氨酸(Phe)、甘氨酸(Gly)、丙氨酸(Ala)、缬氨酸(Val)的2-4个氨基酸残基组成的肽。

[0145] 在一些实施方案中，所述A_1、A_2、A_3独立地选自单键或包括以下结构：

[0146] -Gly-Ala-、-Ala-Gly-、-Val-Gly-、-Gly-Val-、-Val-Cit-、-Val-Ala-、-Gly-Phe-、-Phe-Gly-、-Gly-Gly-Ala-Gly-、-Gly-Gly-Val-Gly-、-Gly-Gly-Phe-Gly-、-Gly-Ala-Gly-Gly-、-Gly-Val-Gly-Gly-、-Gly-Phe-Gly-Gly-、-Gly-Gly-Lys-Gly-、-Gly-Gly-Ser-Gly-、-Gly-Gly-Glu-Gly-、-Gly-Lys-Gly-Gly-、-Gly-Ser-Gly-Gly-、-Gly-Glu-Gly-Gly-、-Gly-Gly-Val-Ala-、-Gly-Gly-Cit-Gly-、-Gly-Cit-Gly-Gly-或-Ala-Ala-Ala-；优选的，-Gly-Gly-Phe-Gly-、-Val-Ala-、-Val-Gly-、-Phe-Gly-、-Gly-Gly-

Val−Gly−、−Gly−Gly−Val−Ala−、−Ala−Ala−Ala−；更优选的，所述连接子包括以下结构：−Val−Ala−。

[0147] 在一些实施方案中，所述Q_1、Q_2、Q_3、Q_4连接基团独立地选自单键或以下结构：


、

、

、

、

、

、

或

其中，

，

[0148] m11选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10；

[0149] m12选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10；

[0150] m13选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10；

[0151] m14选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10；

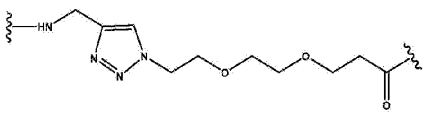
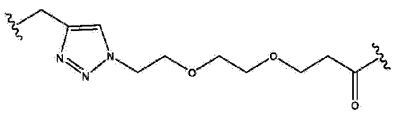
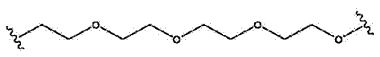
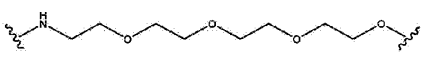
[0152] m15选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10；

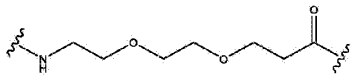
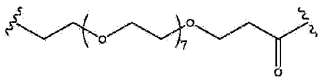
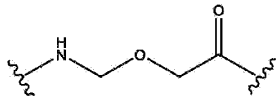
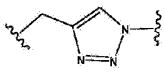
[0153] m16选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10；

[0154] m17选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10；

[0155] m18选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10。

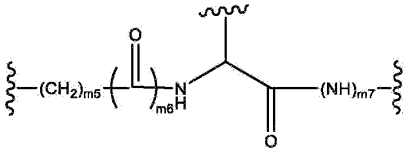
[0156] 在一些实施方案中，所述Q_1、Q_2、Q_3、Q_4连接基团独立地选自单键或以下结构：


、

、

、

、


、

、

或

。

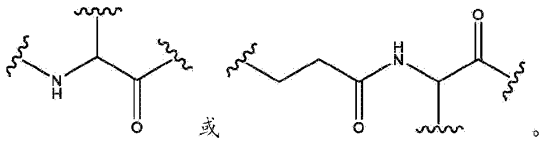
[0157] 在一些实施方案中，所述S_1、S_3独立地选自以下结构：

其中，


，

[0158] m5选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；m6选0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；m7选0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

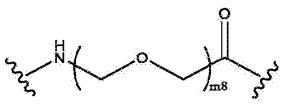
[0159] 在一些实施方案中，所述S_1、S_3独立地选自以下结构：


或

。

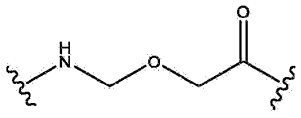
[0160] 在一些实施方案中，所述S_2、S_4选自-NH-CH_2-或以下结构：

其中，

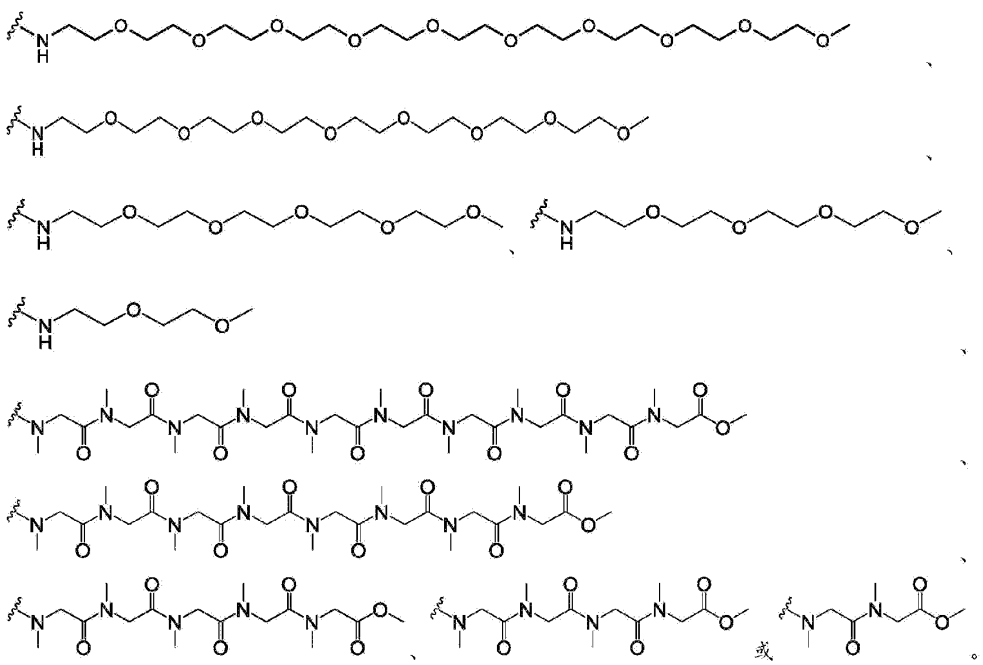

，

[0161] m8选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

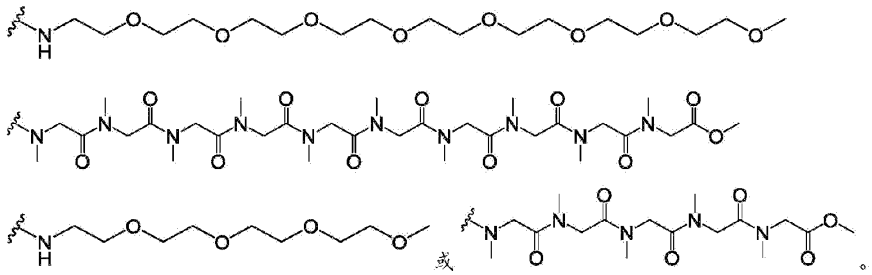
[0162] 在一些实施方案中，所述S_2、S_4选自-NH-CH_2-或以下结构：


。

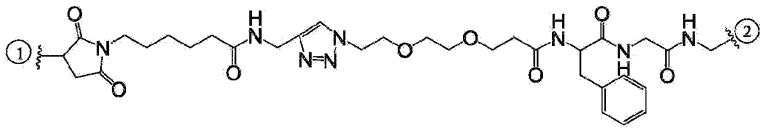
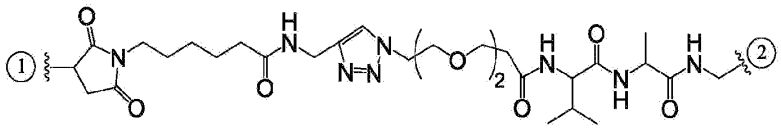
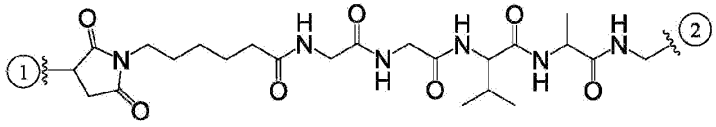
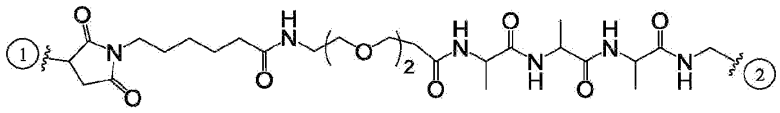
[0163] 在一些实施方案中，所述W选自以下结构：



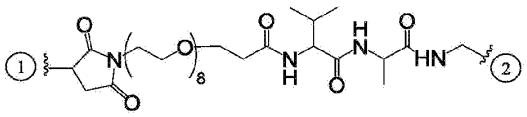
[0164] 在一些实施方案中，所述W选自以下结构：



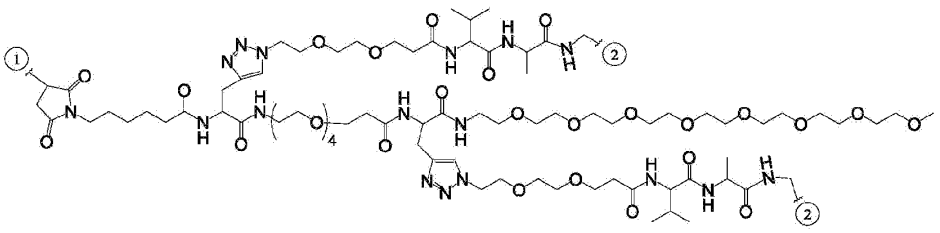
[0165] 在一些实施方案中，所述连接子选自以下结构：

DL-02

DL-06

DL-05

DL-07


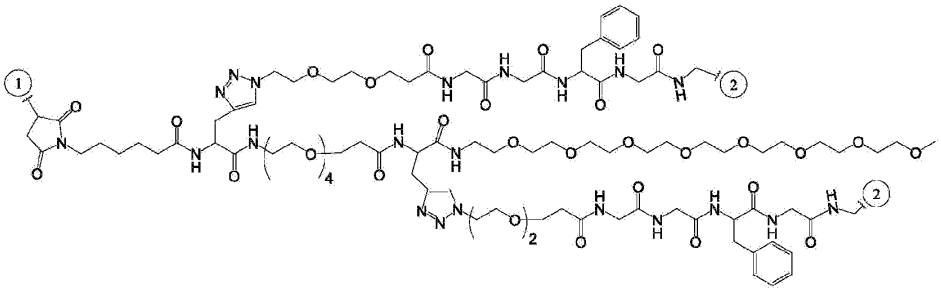
DL-14



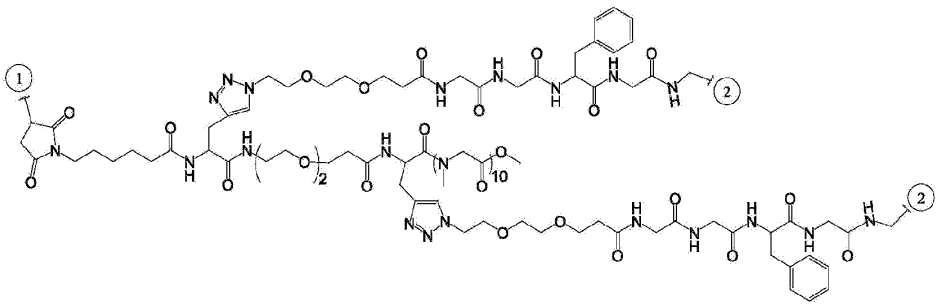
DL-04



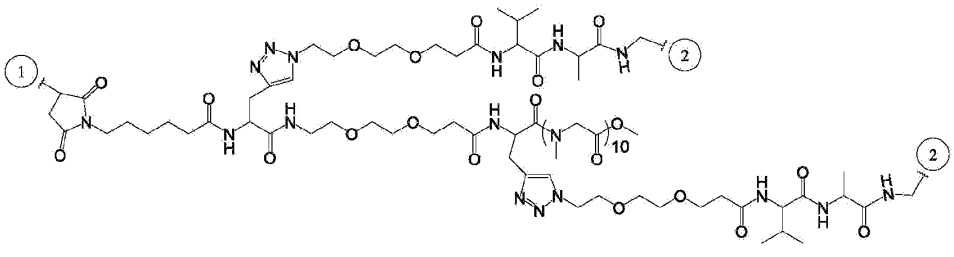
DL-03



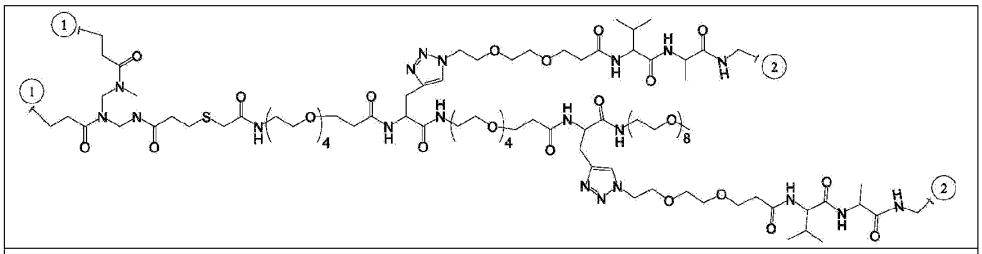
DL-08



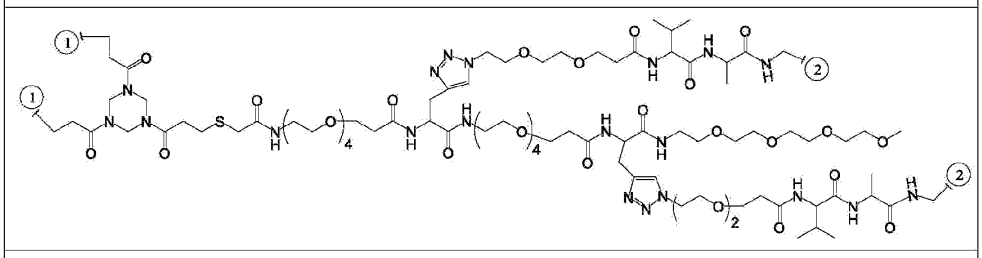
DL-09



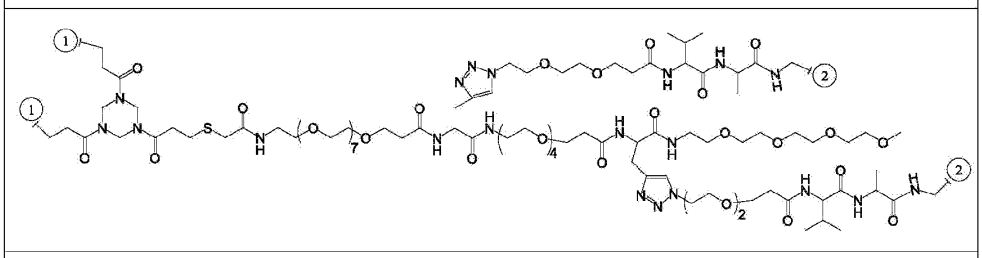
DL-10



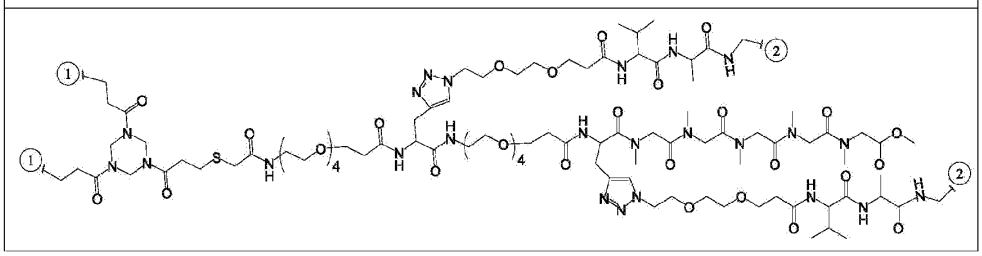
DL-11



DL-12

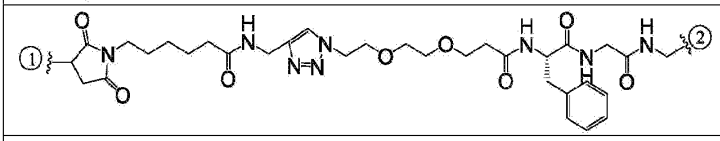
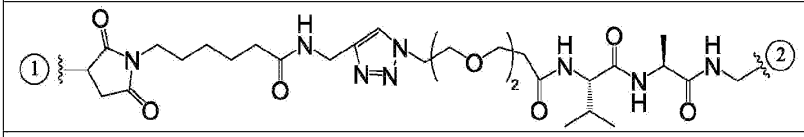


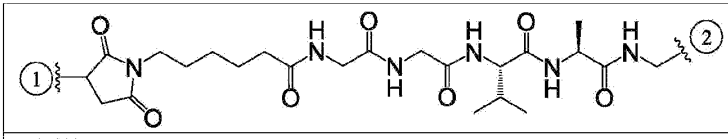
DL-13



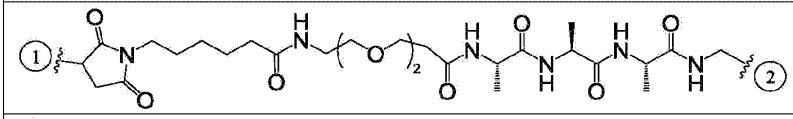
[0166] 其中，所述“①”与抗体相连；所述“②”与药物单元相连。

[0167] 在一些实施方案中，所述连接子选自以下结构：

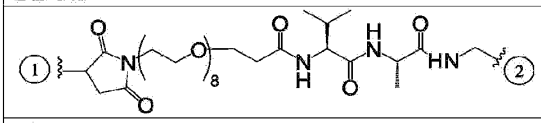
DL-02a

DL-06a

DL-05a



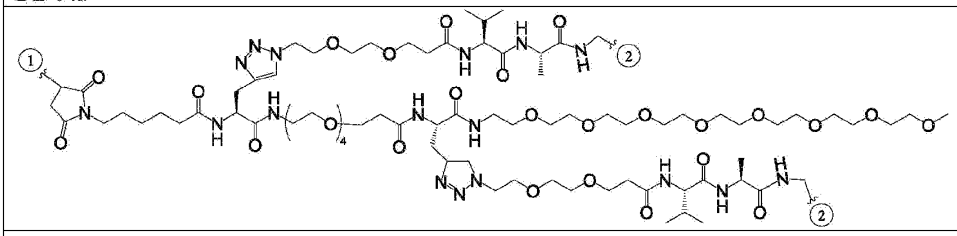
DL-07a



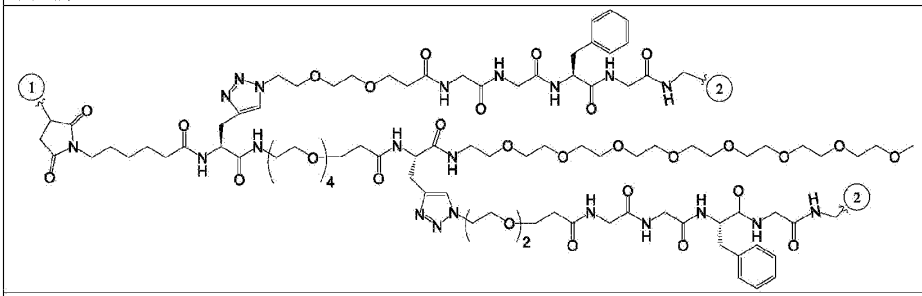
DL-14a



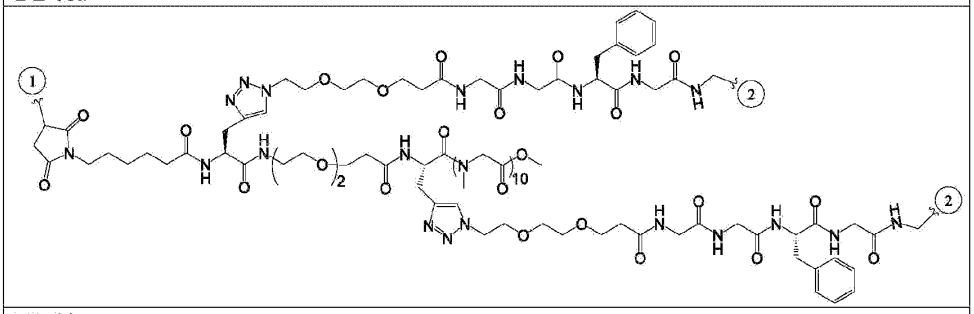
DL-04a



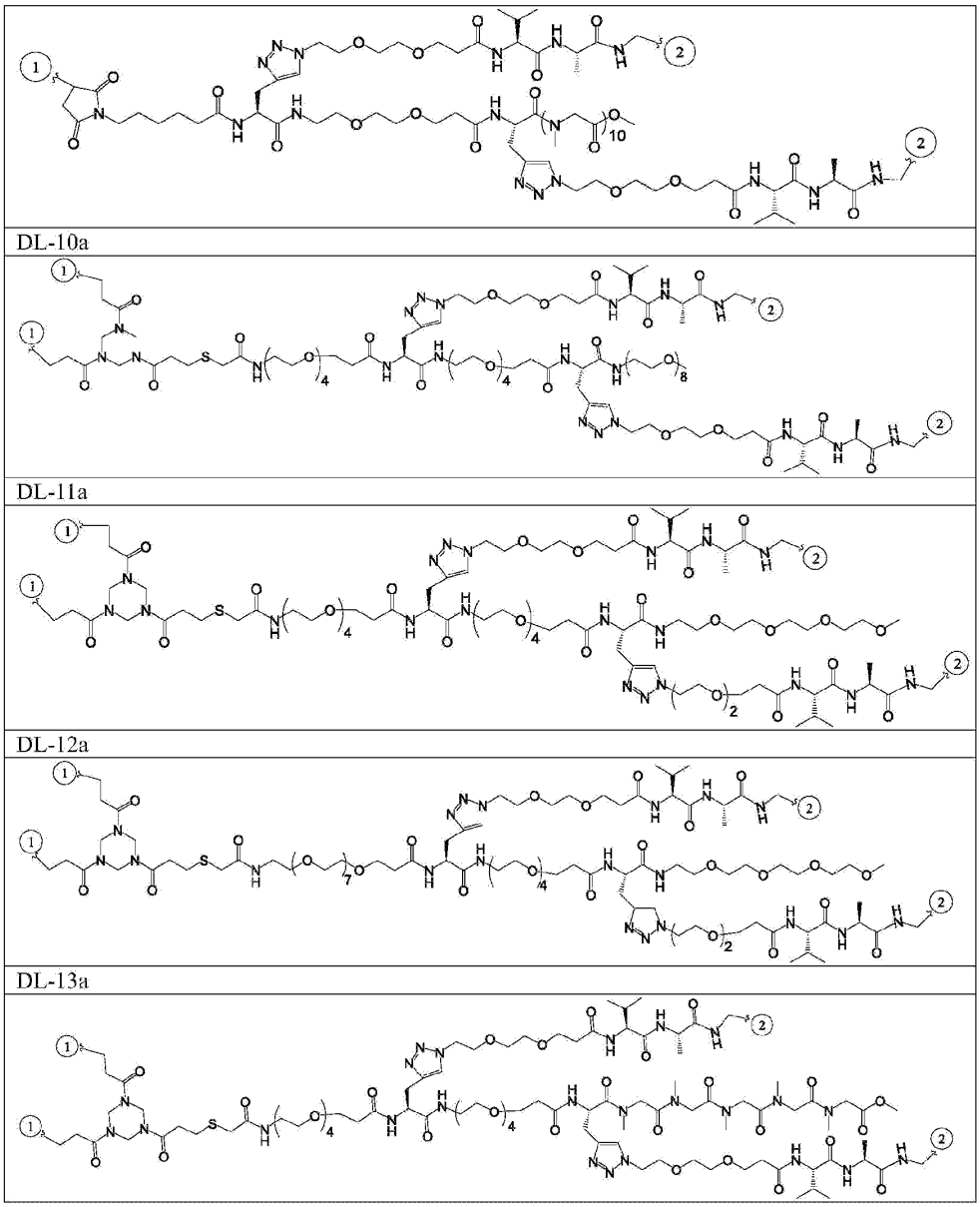
DL-03a



DL-08a



DL-09a



DL-10a

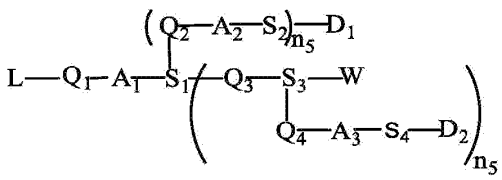
DL-11a

DL-12a

DL-13a

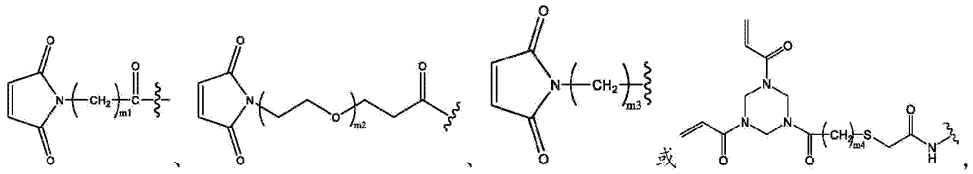
[0168] 其中，所述 “①” 与抗体相连；所述 “②” 与载荷化合物相连。

[0169] 一方面，涉及一种如式(III)所示的连接子-载荷化合物：



(III)

[0170] 其中，L是附着抗体的接头，选自以下结构：

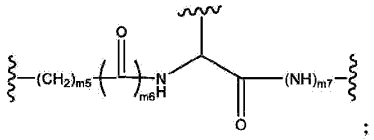


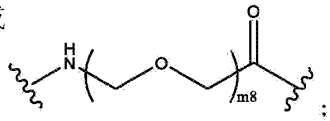
[0171] 其中，Q_1、Q_2、Q_3、Q_4各自独立地是单键或选自以下结构$-(CH_2CH_2O)p-$、$-NH-(CH_2OCH_2)p-C(O)-$、$-(NHCH_2C(O))p-O-$、$-NH(CH_2CH_2O)p-CH_2CH_2C(O)-$、$-(CH_2CH_2O)p-CH_2CH_2C(O)-$、$-CH_2-Y-(CH_2CH_2O)p-CH_2CH_2C(O)-$、$-NHCH_2-Y-(CH_2CH_2O)p-CH_2CH_2C(O)-$、$-(CH_2)-Y-$、$-NHCH_2C(O)CH_2C(O)-$；所述Y选自C3-8环烷基或C3-8环状杂烷基或C3-8环状不饱和杂烷基，所述杂烷基包含选自N、O或者S的1-3个原子，p选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

[0172] A_1是单键或由1、2、3、4个氨基酸残基组成的肽；

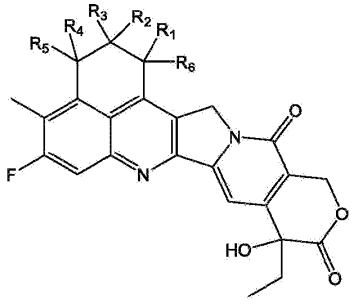
[0173] A_2是单键或由1、2、3、4个氨基酸残基组成的肽；

[0174] A_3是单键或由1、2、3、4个氨基酸残基组成的肽；

[0175] S_1、S_3独立地选自 ；

[0176] S_2、S_4独立地选自$-NH-CH_2-$或 ；

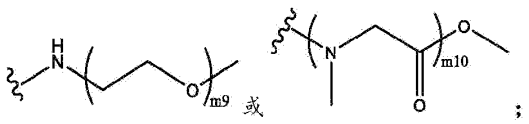
[0177] D_1是第一载荷化合物，D_2是第二载荷化合物，D_1、D_2独立地选自如式(IV)所示化合物：



(IV)

[0178] 其中，R_1、R_2、R_3、R_4、R_5独立地选自氢(H)、氘(D)，R_1、R_2、R_3、R_4、R_5至少有一个、两个、三个或四个为D；R_6选自$-NH_2$或$-NH-C(O)-CH_2-OH$；所述D_1、D_2通过存在的羟基或胺基团中的任一个与S_1、S_2或S_4连接；

[0179] W选自



；

[0180] m1选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

[0181] m2选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

[0182] m3选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

[0183] m4选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

[0184] m5选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

[0185] m6选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

[0186] m7选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

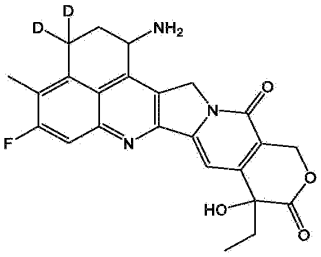
[0187] m8选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

[0188] m9选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15；

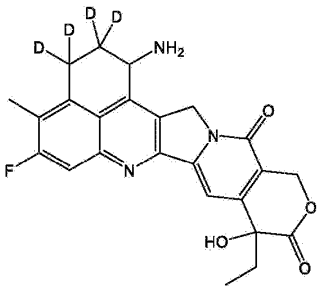
[0189] m10选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15；

[0190] 下标n_5为0或1。

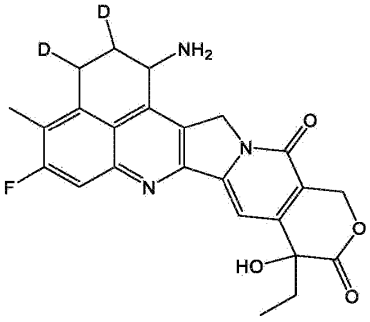
[0191] 在一些实施方案中的连接子-载荷化合物，所述D_1、D_2独立地选自以下结构：



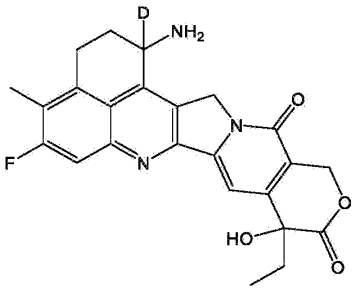
（I-1）、



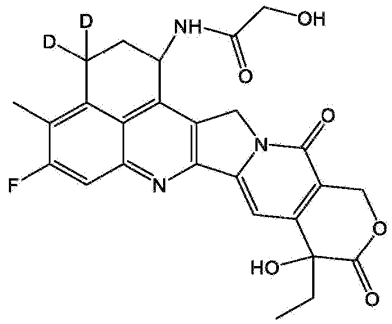
（I-2）、



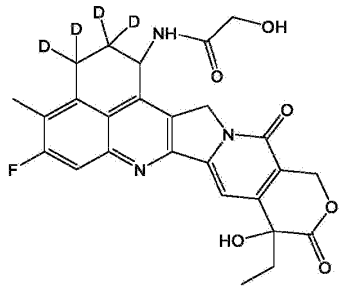
（I-3）、



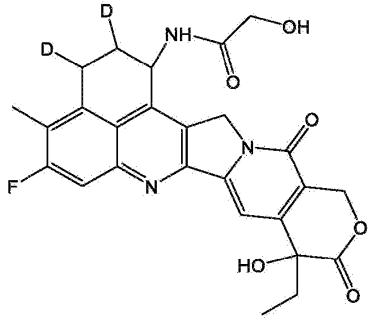
（I-4）、



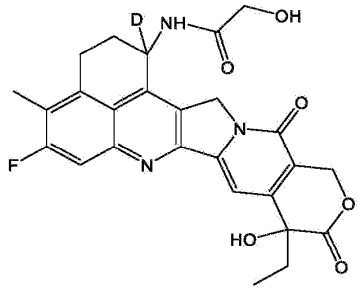
（I-5）、



（I-6）、

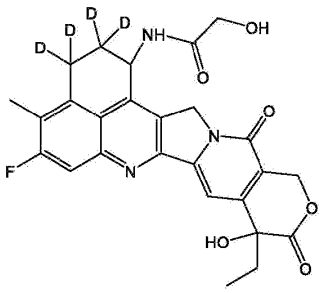
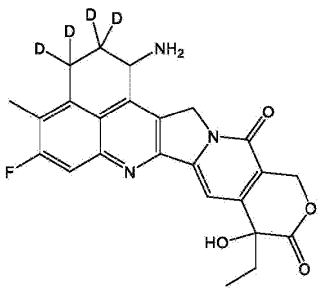


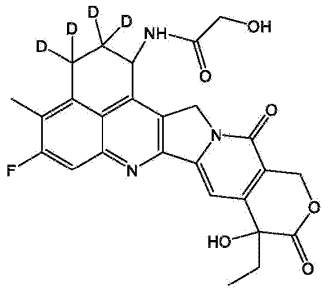
（I-7）或

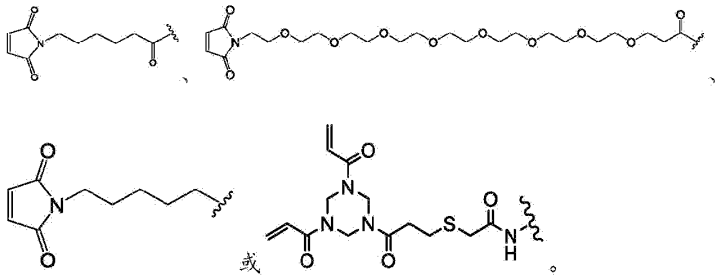


（I-8）；

[0192] 在一些优选的实施方案中，所述D_1、D_2独立地选自以下结构：

[0193]  （I-6）或  （I-2）。

[0194] 在一些更优选的实施方案中，D_1、D_2的结构为： （I-6）。

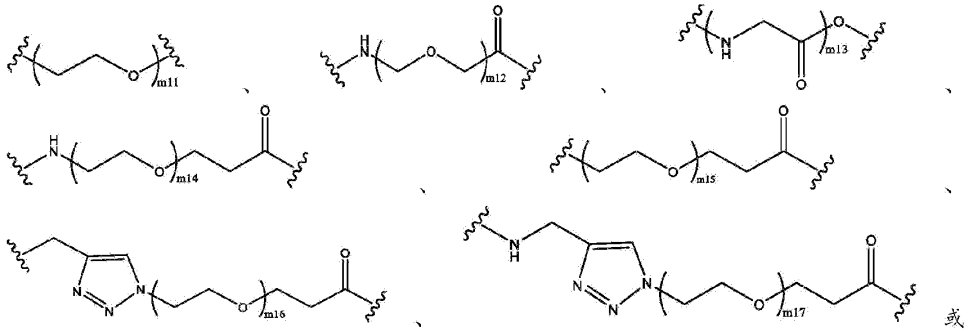
[0195] 在一些实施方案中的连接子-载荷化合物，所述-L选自以下结构：

[0196] 在一些实施方案中，所述A_1、A_2、A_3独立地选自单键或包括由选自苯丙氨酸(Phe)、甘氨酸(Gly)、缬氨酸(Val)、赖氨酸(Lys)、精氨酸(Arg)、丝氨酸(Ser)、谷氨酸(Glu)、天冬氨酸(Asp)、丙氨酸(Ala)、半胱氨酸(Cys)、瓜氨酸(Cit)中的氨基酸组成的肽。

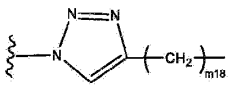
[0197] 在一些实施方案中，所述A_1、A_2、A_3独立地选自单键或包括由选自苯丙氨酸(Phe)、甘氨酸(Gly)、缬氨酸(Val)、赖氨酸(Lys)、精氨酸(Arg)、丝氨酸(Ser)、谷氨酸(Glu)、天冬氨酸(Asp)、丙氨酸(Ala)、半胱氨酸(Cys)、瓜氨酸(Cit)中的2-4个氨基酸残基组成的肽；优选的，包括由选自苯丙氨酸(Phe)、甘氨酸(Gly)、丙氨酸(Ala)、缬氨酸(Val)的2-4个氨基酸残基组成的肽。

[0198] 在一些实施方案中，所述A_1、A_2、A_3独立地选自单键或包括以下结构：-Gly-Ala-、-Ala-Gly-、-Val-Gly-、-Gly-Val-、-Val-Cit-、-Val-Ala-、-Gly-Phe-、-Phe-Gly-、-Gly-Gly-Ala-Gly-、-Gly-Gly-Val-Gly-、-Gly-Gly-Phe-Gly-、-Gly-Ala-Gly-Gly-、-Gly-Val-Gly-Gly-、-Gly-Phe-Gly-Gly-、-Gly-Gly-Lys-Gly-、-Gly-Gly-Ser-Gly-、-Gly-Gly-Glu-Gly-、-Gly-Lys-Gly-Gly-、-Gly-Ser-Gly-Gly-、-Gly-Glu-Gly-Gly-、-Gly-Gly-Val-Ala-、-Gly-Gly-Cit-Gly-、-Gly-Cit-Gly-Gly-或-Ala-Ala-Ala-；优选的，-Gly-Gly-Phe-Gly-、-Val-Ala-、-Val-Gly-、-Phe-Gly-、-Gly-Gly-Val-Gly-、-Gly-Gly-Val-Ala-、-Ala-Ala-Ala-；更优选的，所述连接子包括以下结构：-Val-Ala-。

[0199] 在一些实施方案中，所述连接子-载荷化合物的Q_1、Q_2、Q_3、Q_4连接基团独立地选自单键或以下结构：



或



其中，

[0200] m11选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

[0201] m12选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

[0202] m13选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

[0203] m14选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

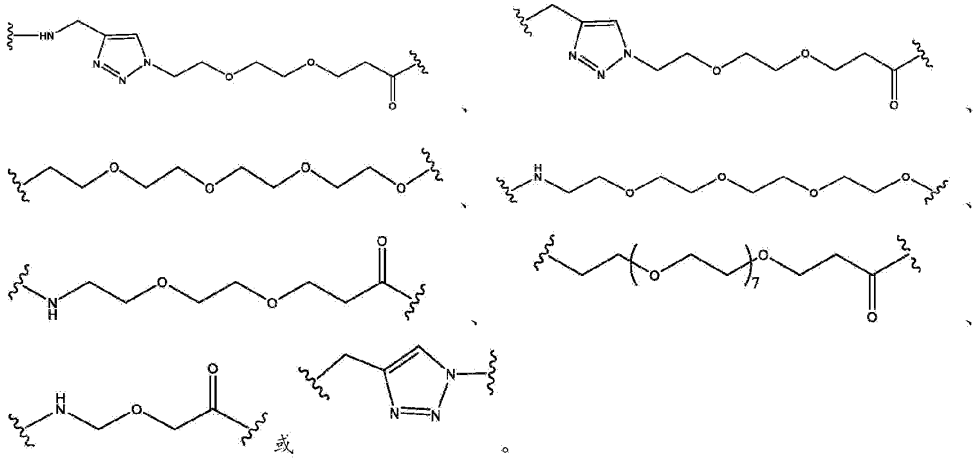
[0204] m15选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

[0205] m16选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

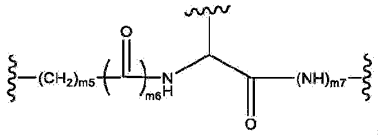
[0206] m17选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

[0207] m18选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[0208] 在一些实施方案中，所述连接子-载荷化合物的Q_1、Q_2、Q_3、Q_4连接基团独立地选自单键或以下结构：

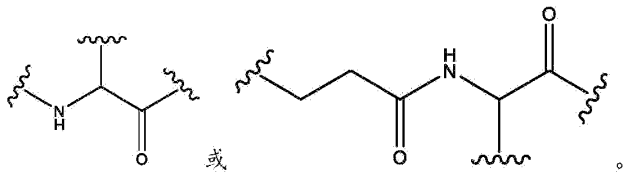


[0209] 在一些实施方案中，所述连接子-载荷化合物的S_1、S_3独立地选自以下结构：

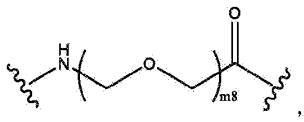


[0210] 其中，m5选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；m6选0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；m7选0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[0211] 在一些实施方案中，所述连接子-载荷化合物的S_1、S_3独立地选自以下结构：

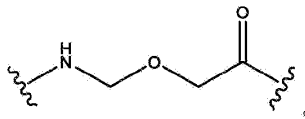


[0212] 在一些实施方案中，所述连接子-载荷化合物的S_2、S_4选自-NH-CH_2-或以下结构：



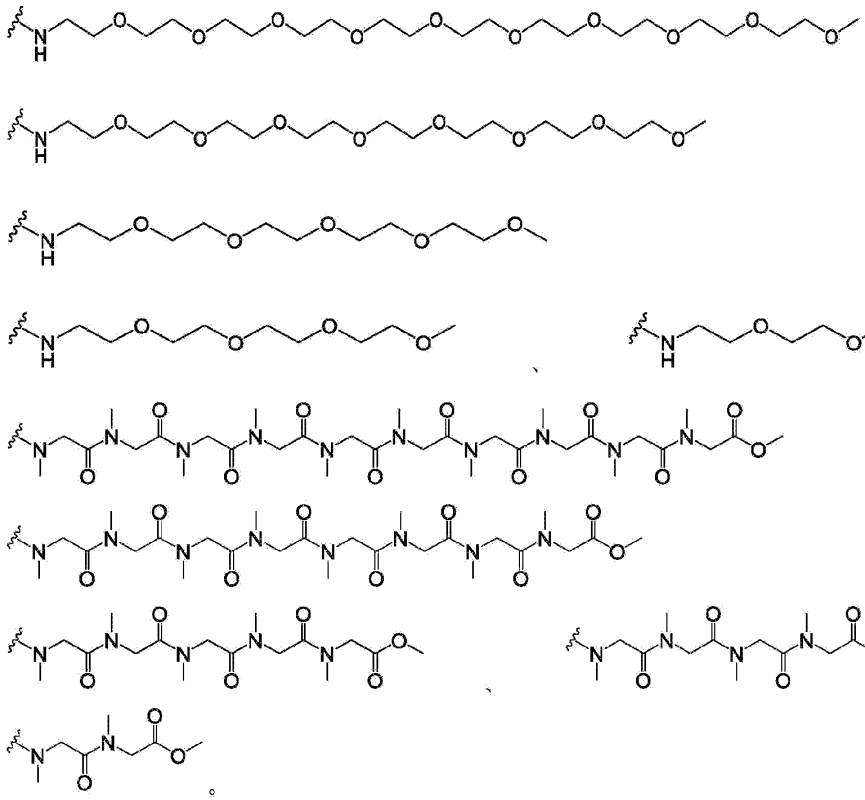
[0213] 其中，m8选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[0214] 在一些实施方案中，所述连接子-载荷化合物的S_2、S_4选自-NH-CH_2-或以下结构：



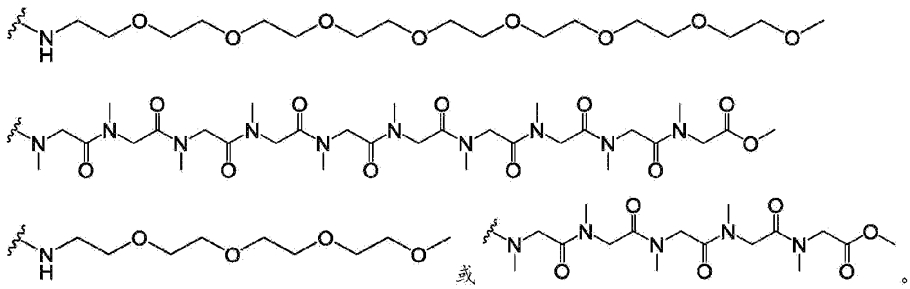
。

[0215] 在一些实施方案中，所述连接子-载荷化合物的W选自以下结构：



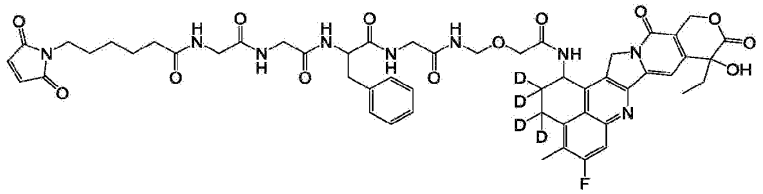
。

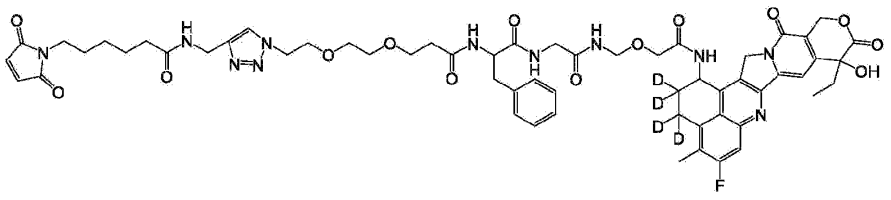
[0216] 在一些实施方案中，所述连接子-载荷化合物的W选自以下结构：



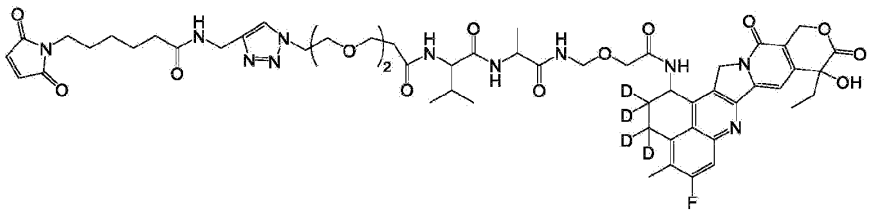
。

[0217] 在一些实施方案中，所述连接子-载荷化合物选自以下结构：

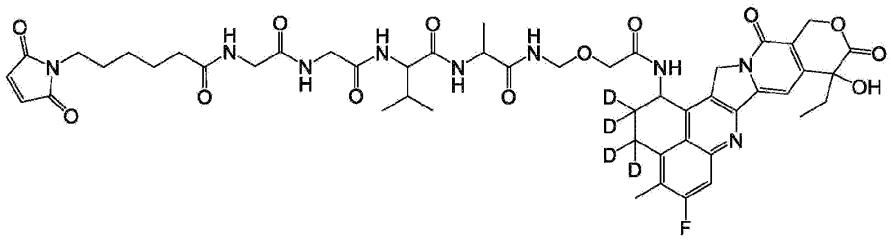
DL01-dDxd

DL02-dDxd



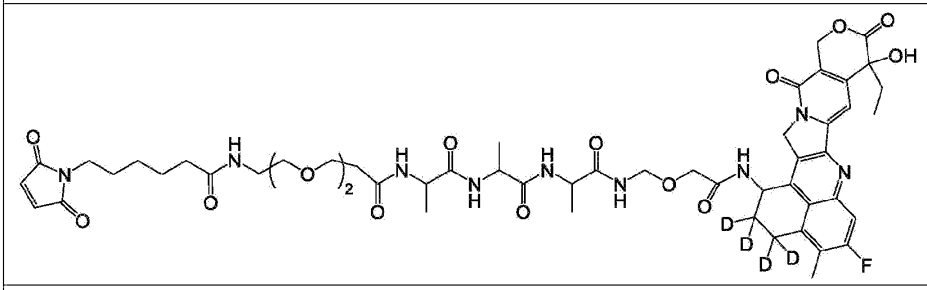
DL06-dDxd



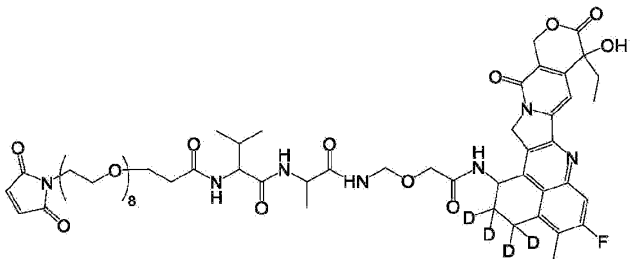
DL05-dDxd



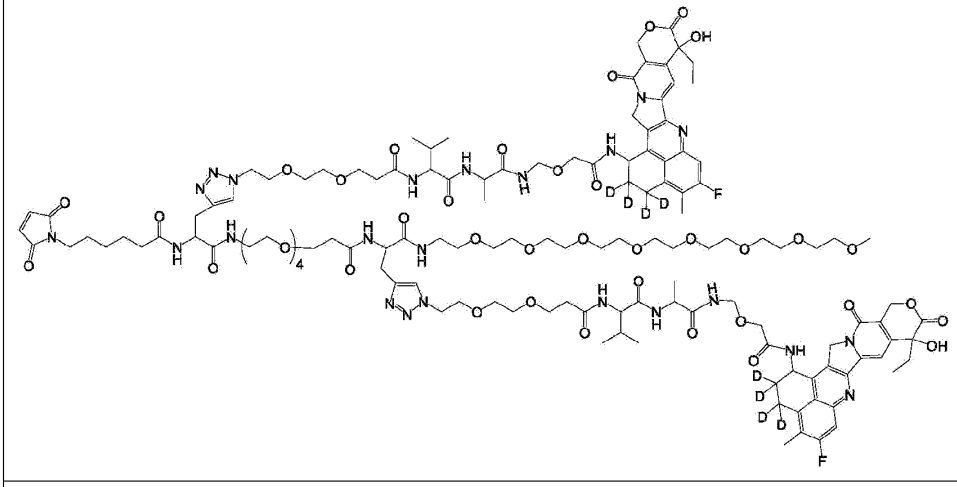
DL07-dDxd



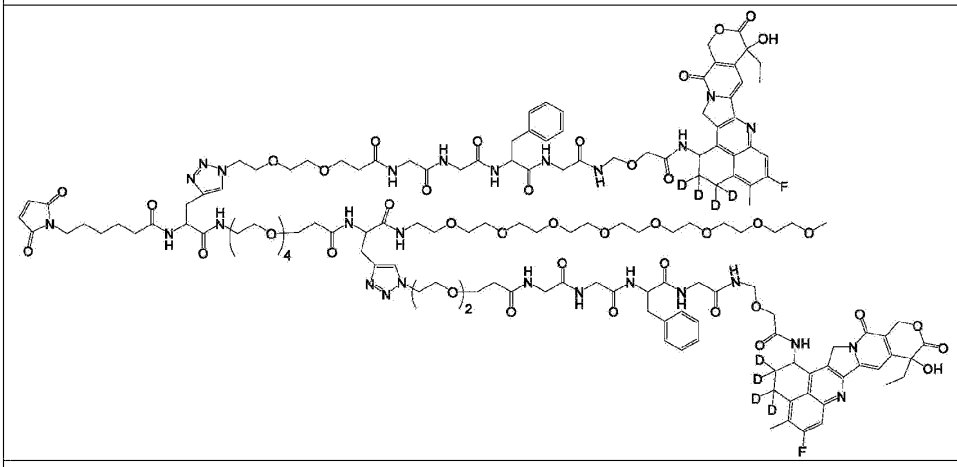
DL14-dDxd



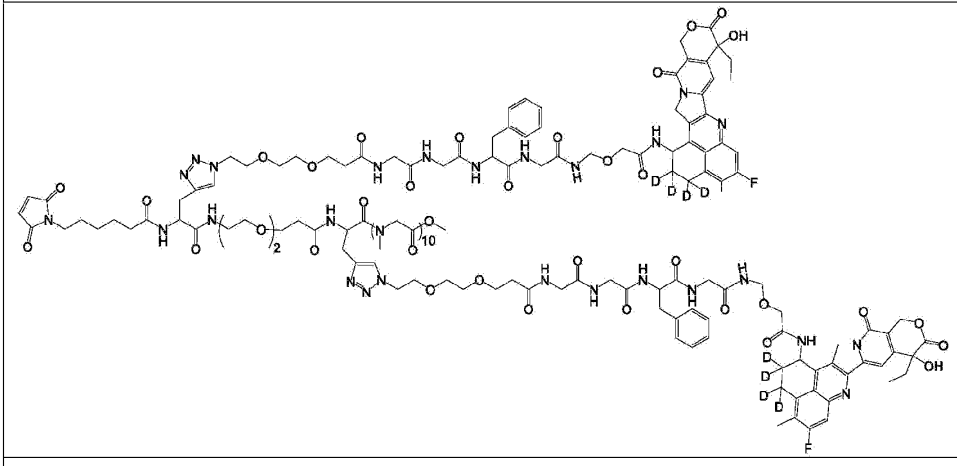
DL04-dDxd



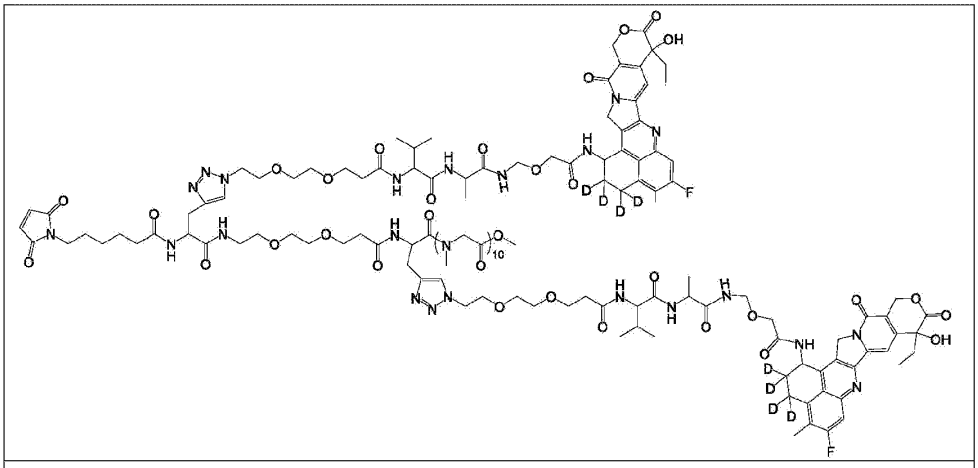
DL03-dDxd



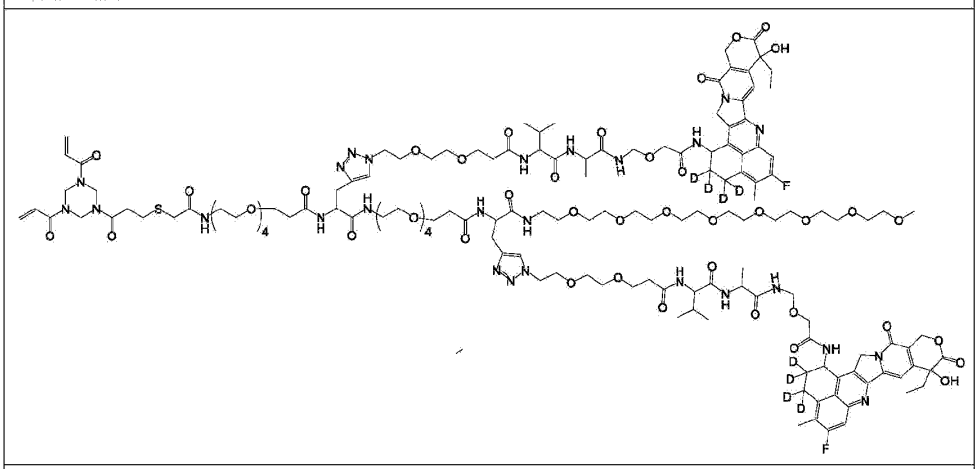
DL08-dDxd



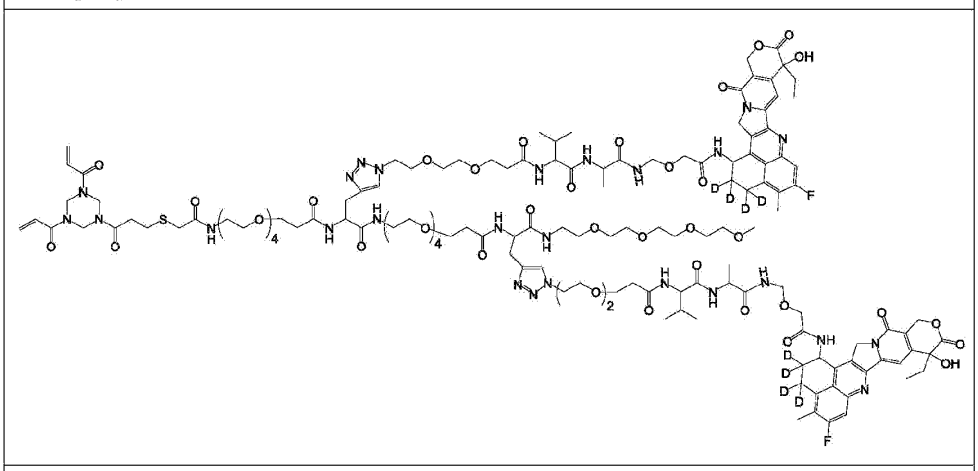
DL09-dDxd



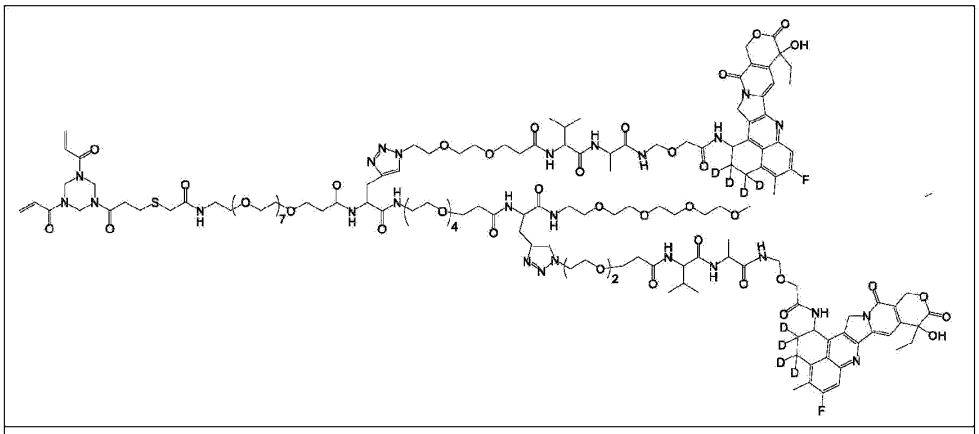
DL10-dDxd



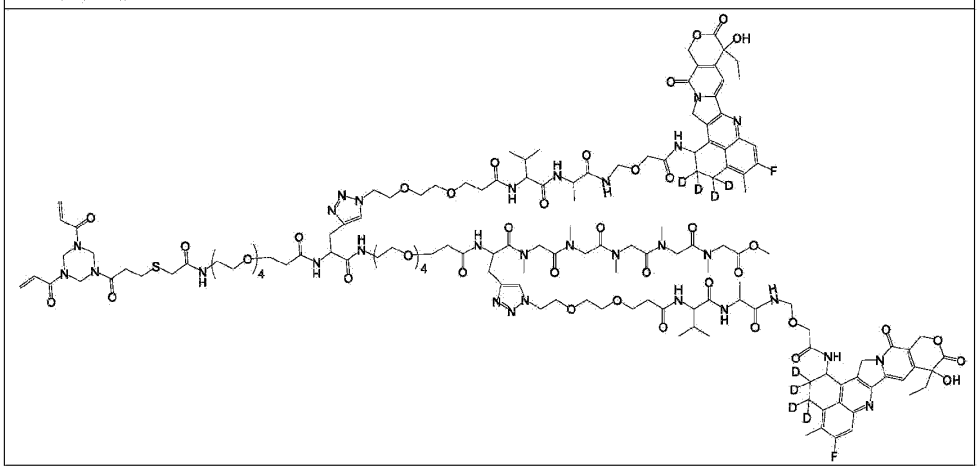
DL11-dDxd



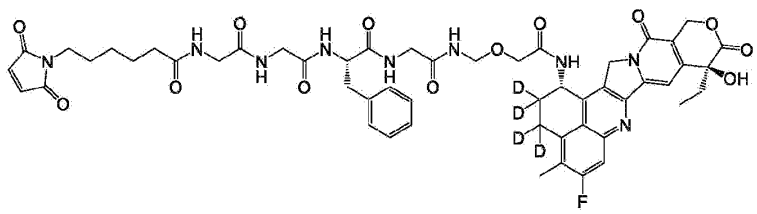
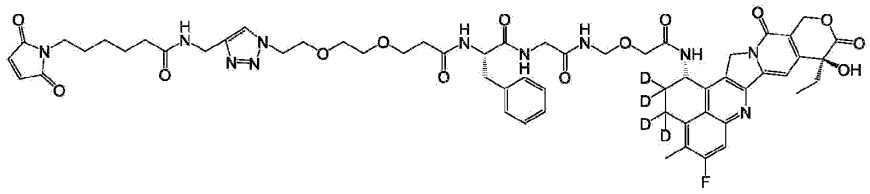
DL12-dDxd

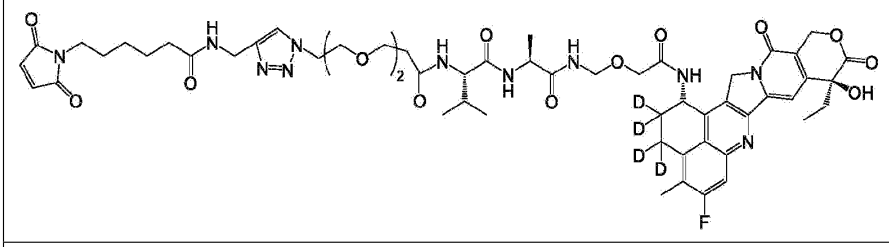


DL13-dDxd

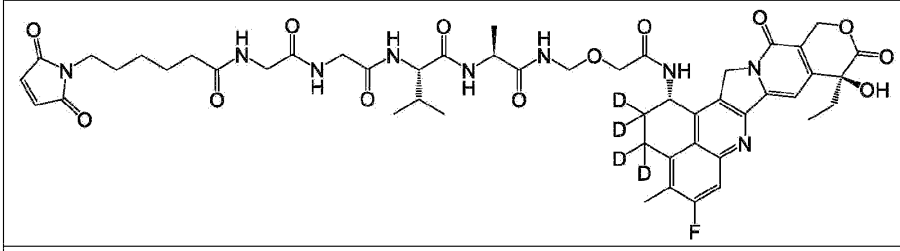


[0218] 在一些优选的实施方案中，所述的连接子-载荷化合物选自以下结构：

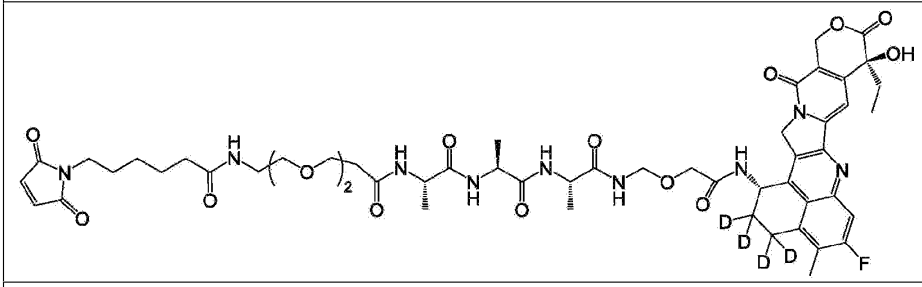
DL01-dDxd-1

DL02-dDxd-1

DL06-dDxd-1



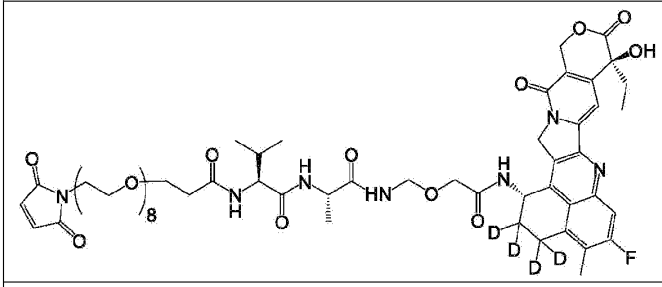
DL05-dDxd-1



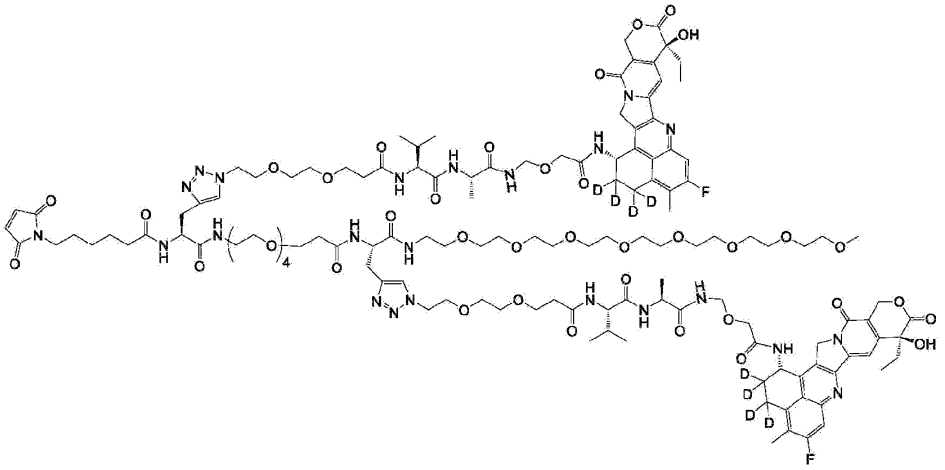
DL07-dDxd-1



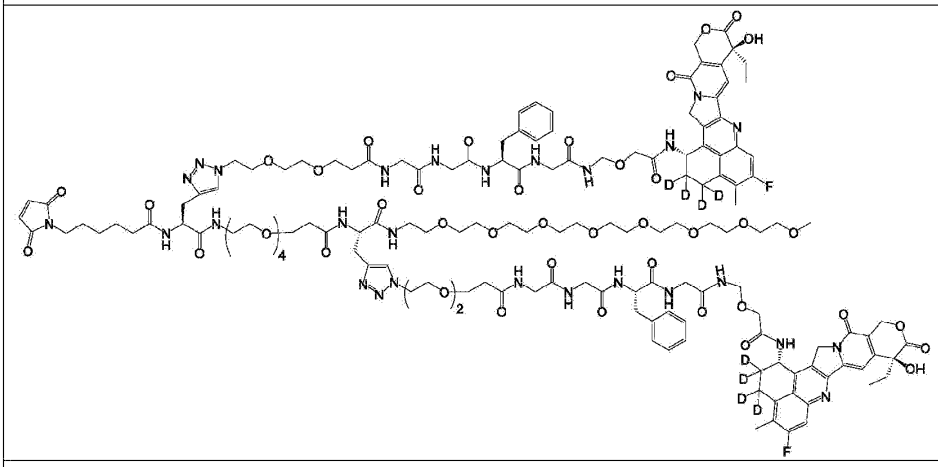
DL14-dDxd-1



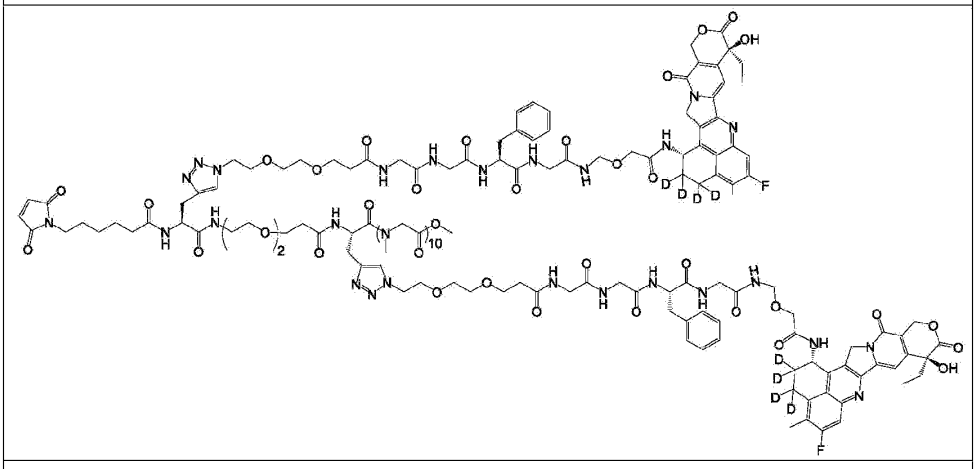
DL04-dDxd-1



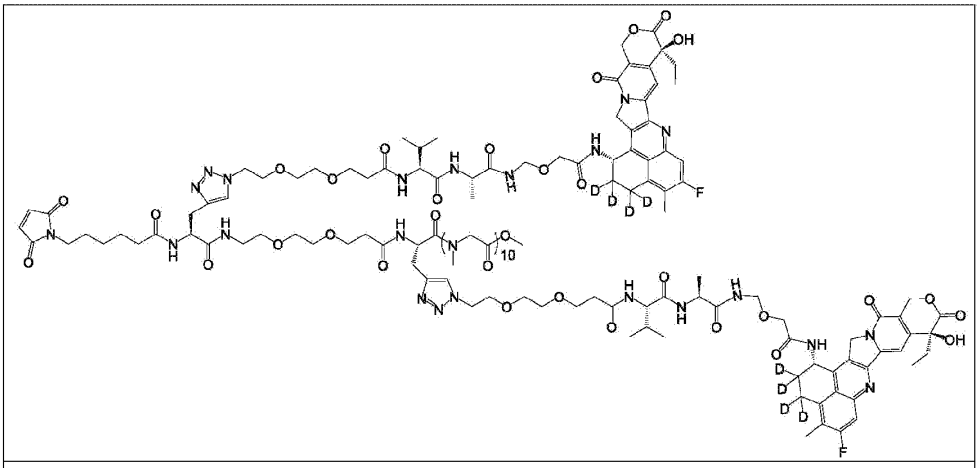
DL03-dDxd-1



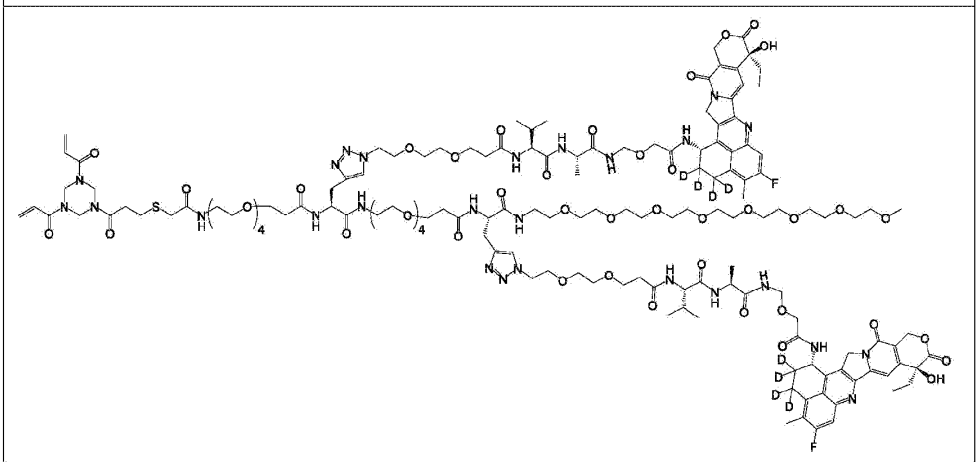
DL08-dDxd-1



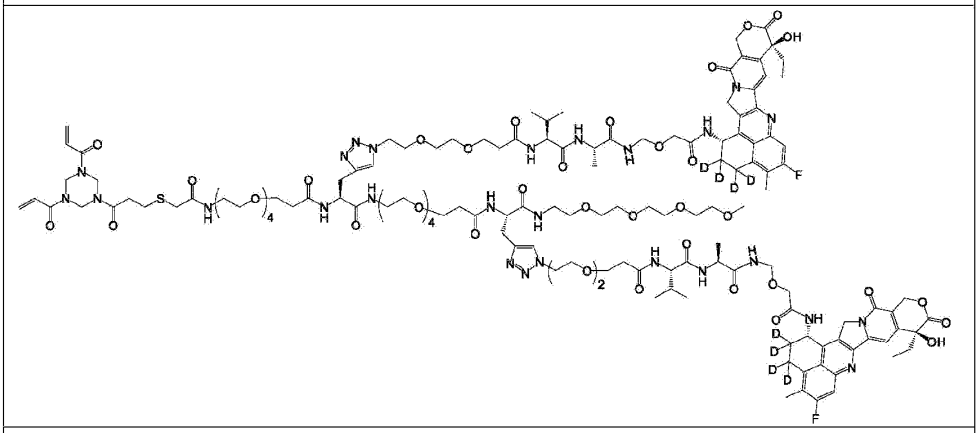
DL09-dDxd-1



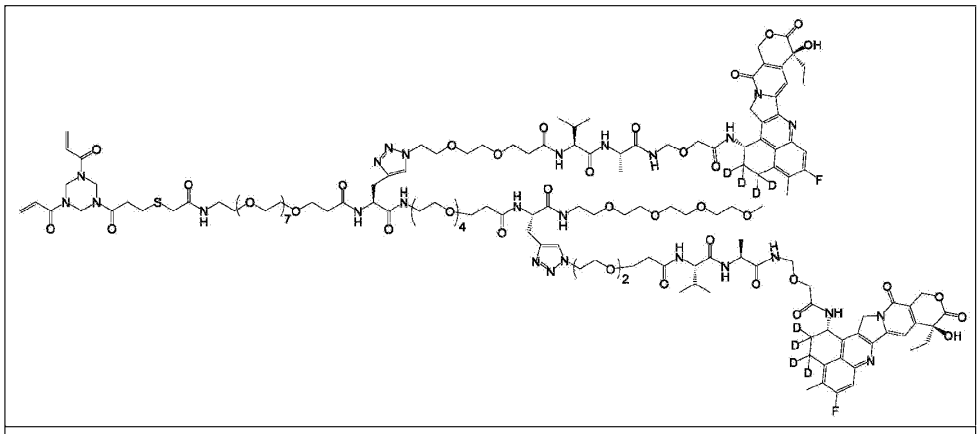
DL10-dDxd-1



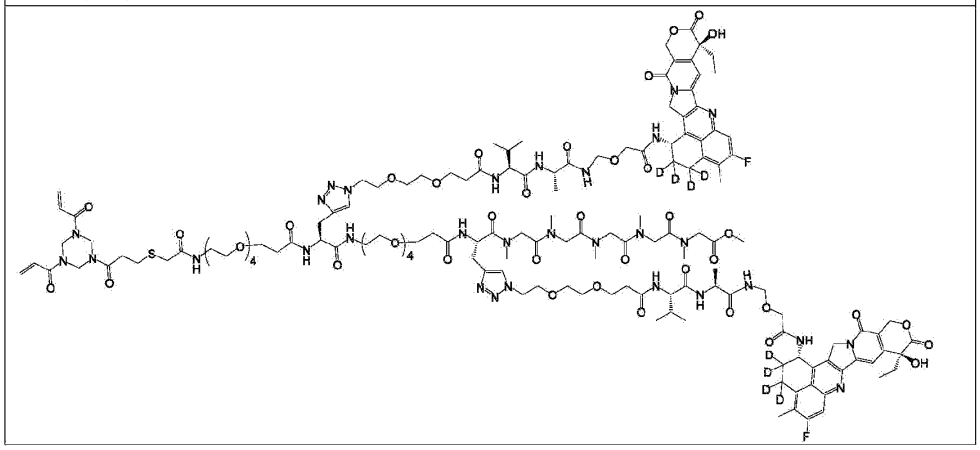
DL11-dDxd-1



DL12-dDxd-1

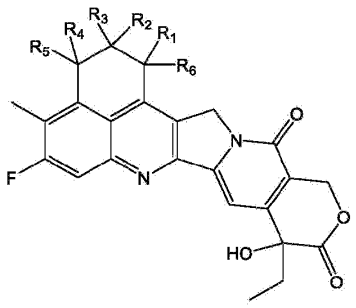


DL13-dDxd-1



[0219] 一方面，涉及一种连接子−载荷化合物，所述化合物为上述连接子−载荷的立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物。

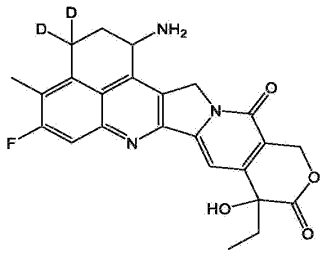
[0220] 一方面，涉及一种式(V)所示的氘代喜树碱类化合物：



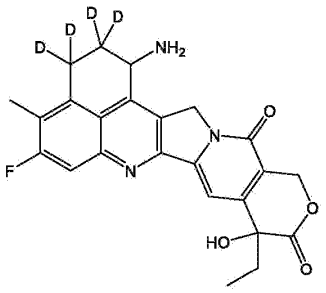
(V)

[0221] 其中：R_1、R_2、R_3、R_4、R_5独立地选自氢(H)、氘(D)，R_1、R_2、R_3、R_4、R_5至少有一个、两个、三个或四个为D；R_6选自$-NH_2$或$-NH-C(O)-CH_2-OH$。

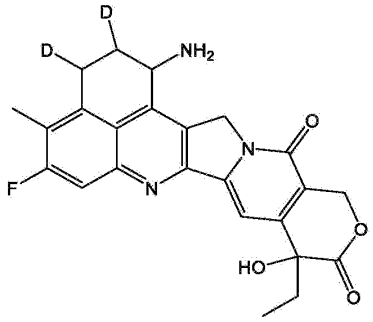
[0222] 在一些实施方案中，式(V)所示的结构选自如下化合物组成的组：



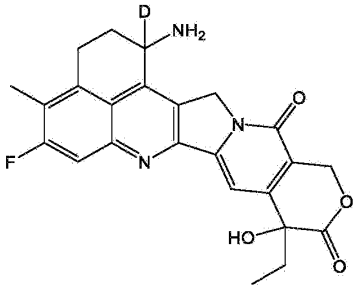
(I-1)、



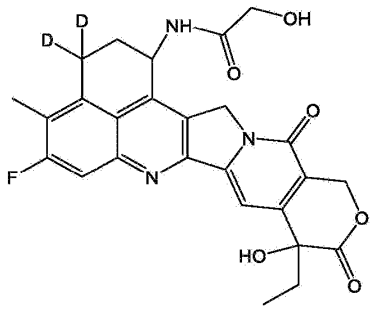
(I-2)、



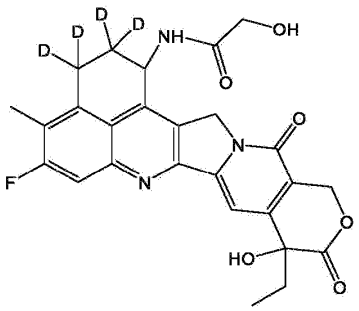
(I-3)、



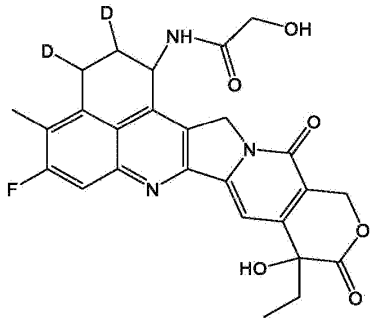
(I-4)、



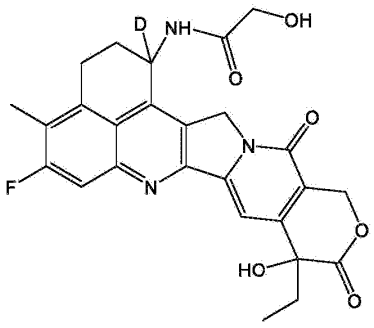
(I-5)、



(I-6)、

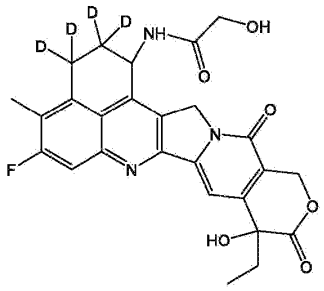


(I-7)或

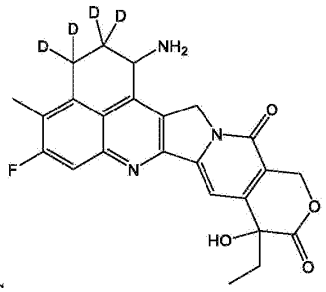


(I-8)；

[0223] 在一些优选的实施方案中，式(V)所示的结构为：

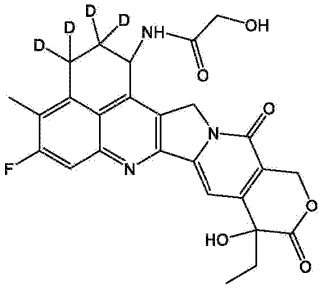


（I-6）或



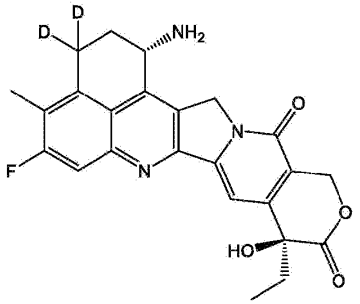
（I-2）；

在一些更优选的实施方案中，所述化合物的结构为：

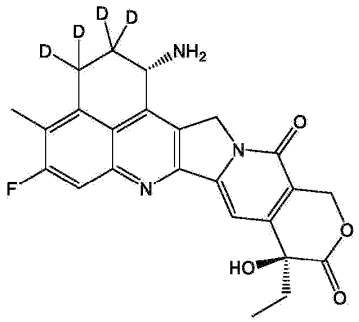


（I-6）。

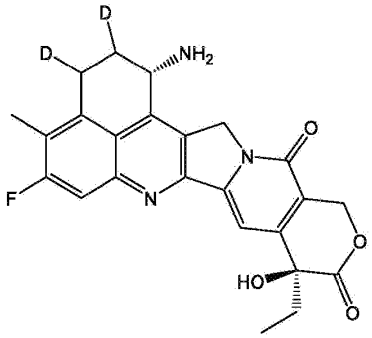
[0224] 在一些实施方案中，式(V)所示的氘代喜树碱类化合物结构选自如下化合物组成的组：



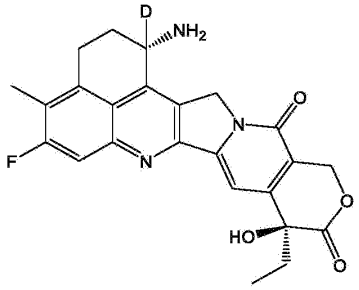
（I-1a）、



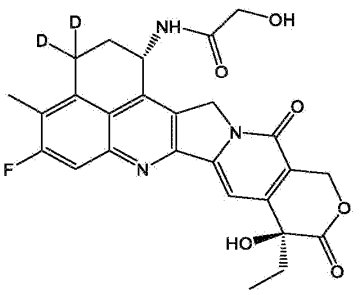
（I-2a）、



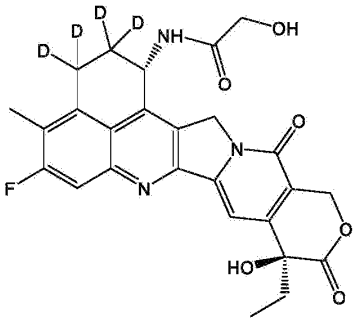
（I-3a）、



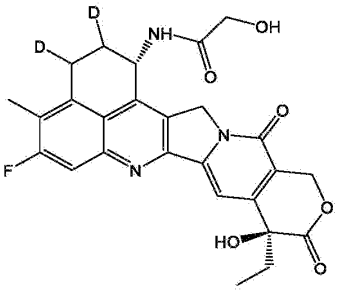
（I-4a）、



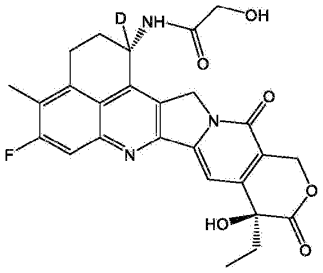
（I-5a）、



（I-6a）、



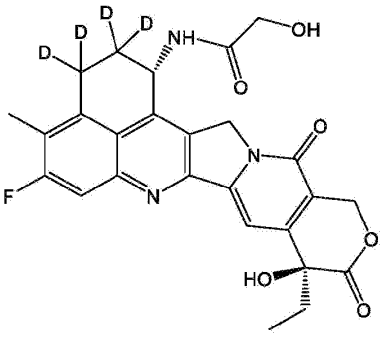
（I-7a）或



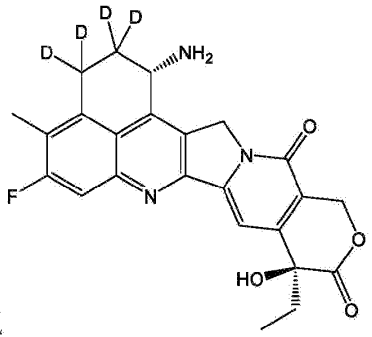
（I-8a）。

[0225] 在一些优选的实施方案中，式(V)所示的结构为：

[0226]

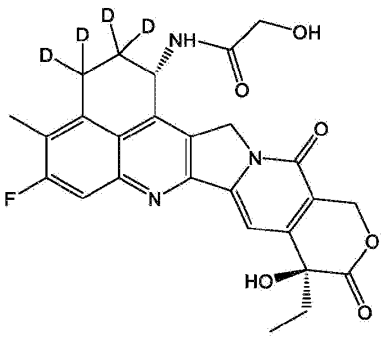


（I-6a）或



（I-2a）；

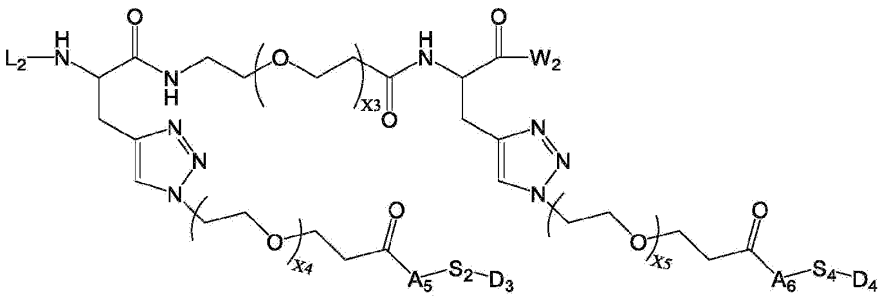
在一些更优选的实施方案中，所述化合物的结构为：



（I-6a）。

[0227] 一方面，涉及一种化合物，所述化合物为I-1～I-8、I-1a～I-8a化合物的立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物。

[0228] 一方面，涉及一种式(IIIa)所示的化合物:

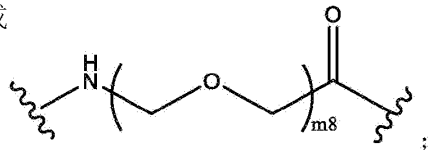
[0229] 
(IIIa)

[0230] L_2为附着连接抗体的接头；

[0231] W_2是任选的基团；

[0232] A_5是由1、2、3或4个氨基酸残基组成的肽；

[0233] A_6是由1、2、3或4个氨基酸残基组成的肽；

[0234] S_2、S_4独立地选自-NH-CH_2-或 
；

[0235] D_3是第一载荷化合物；

[0236] D_4是第二载荷化合物；

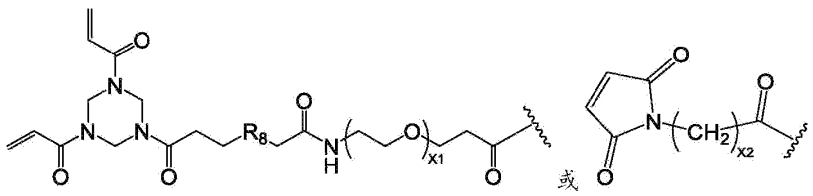
[0237] m8选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

[0238] X_3选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

[0239] X_4选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

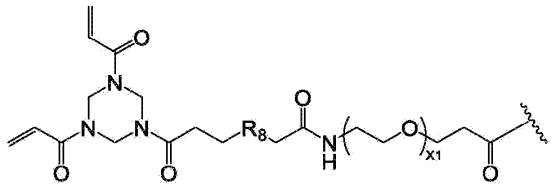
[0240] X_5选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[0241] 在一些实施方案中，所述L_2包括以下结构：

[0242] 

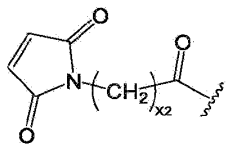
其中，R_8选自N、O或者S；X_1选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；X_2选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[0243] 在一些优选的实施方案中，所述L_2包括以下结构：

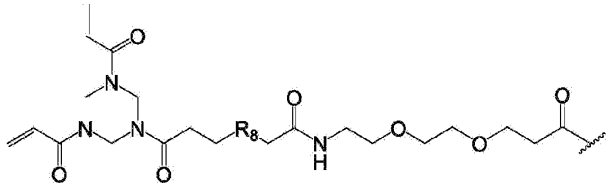
[0244] ，

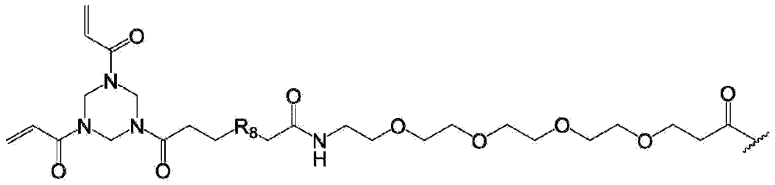
其中，R_8选自N、O或者S；X_1选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

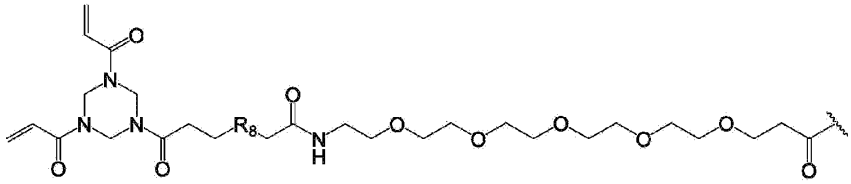
[0245] 在一些优选的实施方案中，所述L_2包括以下结构：

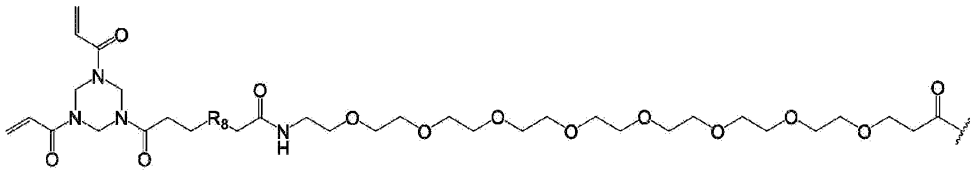
[0246] ，其中，X_2选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[0247] 在一些优选的实施方案中，所述L_2包括以下结构：

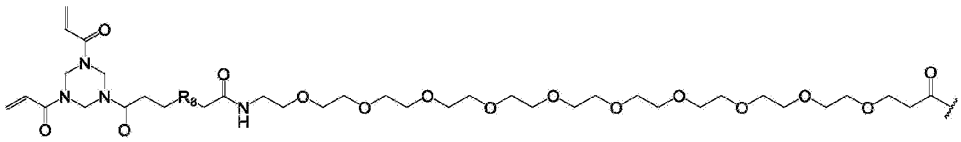
[0248] 、


、


、



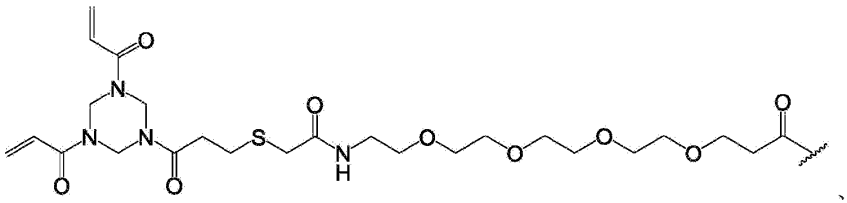
或

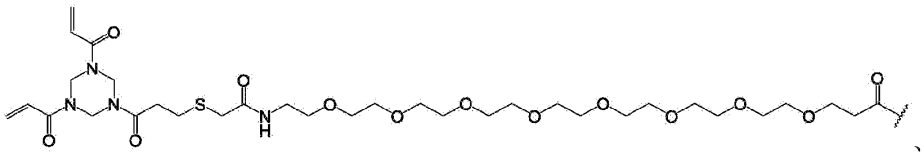


，其中，R_8选自N、O或者S。

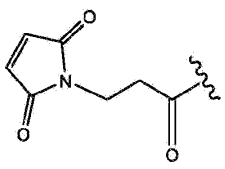
[0249] 在一些优选的实施方案中，所述L_2包括以下结构：

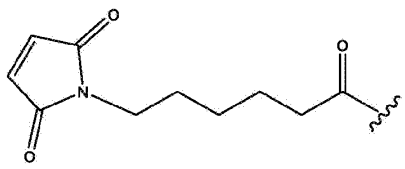
[0250]

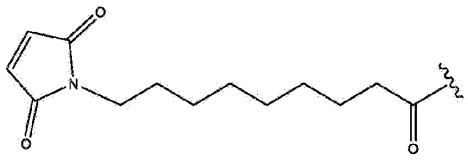

、


、

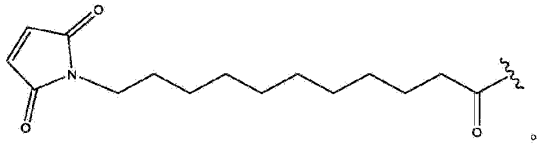
[0251]


、


、

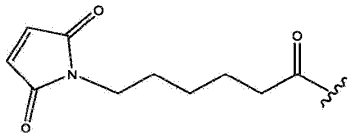


或



。

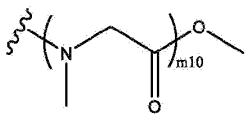
[0252] 在一些优选的实施方案中，所述L_2结构如下所示：

[0253] 

。

[0254] 在一些实施方案中，所述W包括以下结构：

或



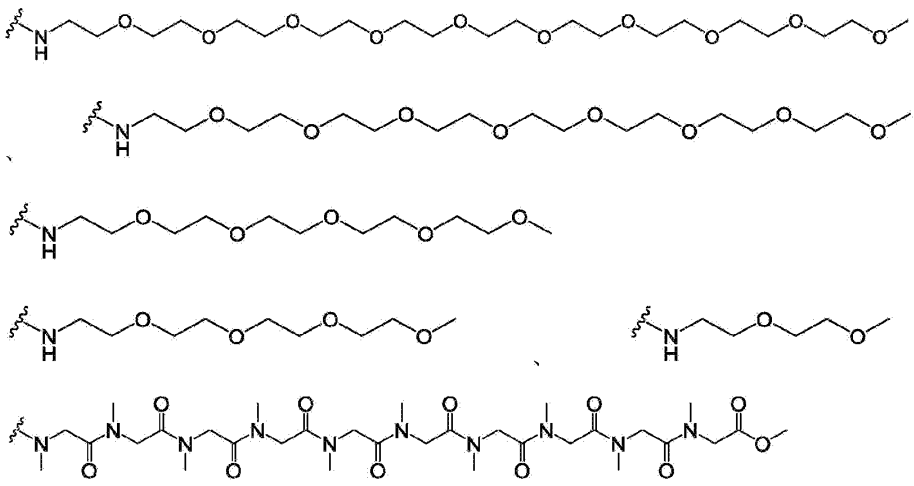
其中，

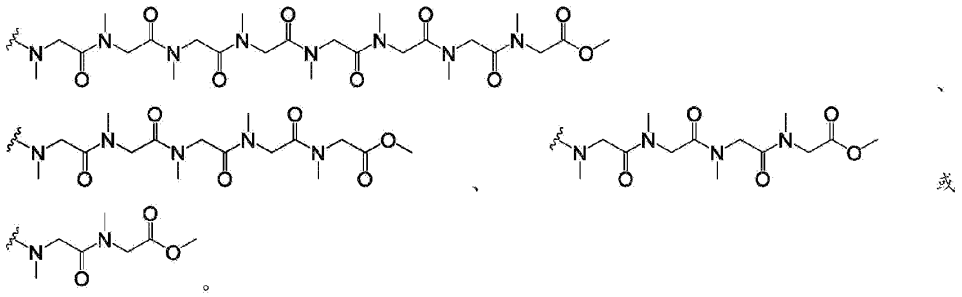
，

M9选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

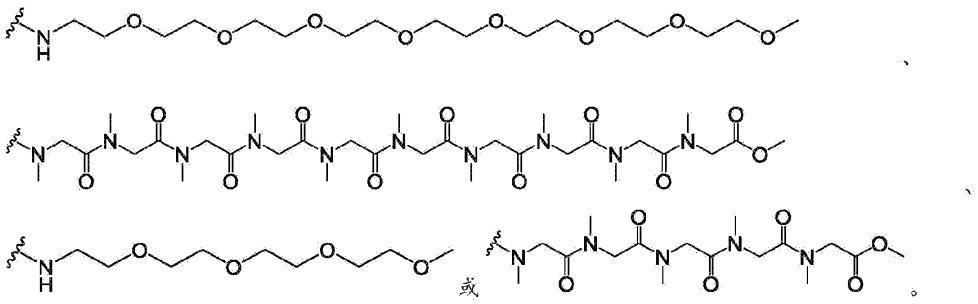
M10选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[0255] 在一些优选的实施方案中，所述W选自以下结构：

[0256] 



[0257] 在一些优选的实施方案中，所述W选自以下结构：

[0258] 

[0259] 在一些实施方案中，所述A_1、A_2、A_3独立地选自单键或包括由选自苯丙氨酸(Phe)、甘氨酸(Gly)、缬氨酸(Val)、赖氨酸(Lys)、精氨酸(Arg)、丝氨酸(Ser)、谷氨酸(Glu)、天冬氨酸(Asp)、丙氨酸(Ala)、半胱氨酸(Cys)或瓜氨酸(Cit)中的氨基酸组成的肽。

[0260] 在一些实施方案中，所述A_1、A_2、A_3独立地选自单键或包括由选自苯丙氨酸(Phe)、甘氨酸(Gly)、缬氨酸(Val)、赖氨酸(Lys)、精氨酸(Arg)、丝氨酸(Ser)、谷氨酸(Glu)、天冬氨酸(Asp)、丙氨酸(Ala)、半胱氨酸(Cys)或瓜氨酸(Cit)中的2-4个氨基酸残基组成的肽；优选的，包括由选自苯丙氨酸(Phe)、甘氨酸(Gly)、丙氨酸(Ala)或缬氨酸(Val)的2-4个氨基酸残基组成的肽。

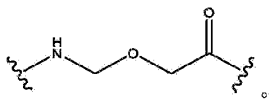
[0261] 在一些实施方案中，所述A_1、A_2、A_3独立地选自单键或包括以下结构：

[0262] -Gly-Ala-、-Ala-Gly-、-Val-Gly-、-Gly-Val-、-Val-Cit-、-Val-Ala-、-Gly-Phe-、-Phe-Gly-、-Gly-Gly-Ala-Gly-、-Gly-Gly-Val-Gly-、-Gly-Gly-Phe-Gly-、-Gly-Ala-Gly-Gly-、-Gly-Val-Gly-Gly-、-Gly-Phe-Gly-Gly-、-Gly-Gly-Lys-Gly-、-Gly-Gly-Ser-Gly-、-Gly-Gly-Glu-Gly-、-Gly-Lys-Gly-Gly-、-Gly-Ser-Gly-Gly-、-Gly-Glu-Gly-Gly-、-Gly-Gly-

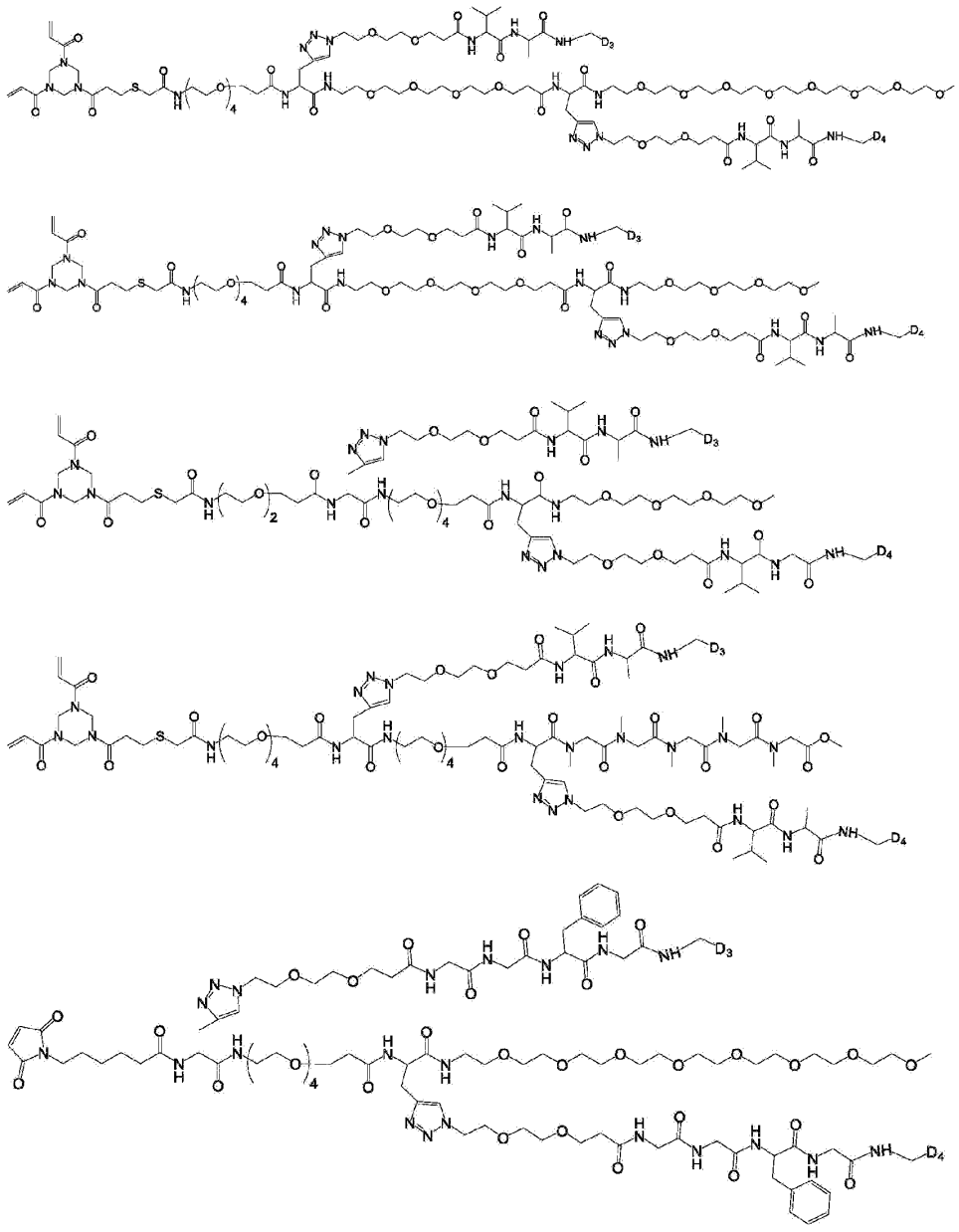
Val−Ala−、−Gly−Gly−Cit−Gly−、−Gly−Cit−Gly−Gly−或−Ala−Ala−Ala−；优选的，−Gly−Gly−Phe−Gly−、−Val−Ala−、−Val−Gly−、−Phe−Gly−、−Gly−Gly−Val−Gly−、−Gly−Gly−Val−Ala−或−Ala−Ala−Ala−；更优选的，所述连接子包括以下结构：−Val−Ala−。

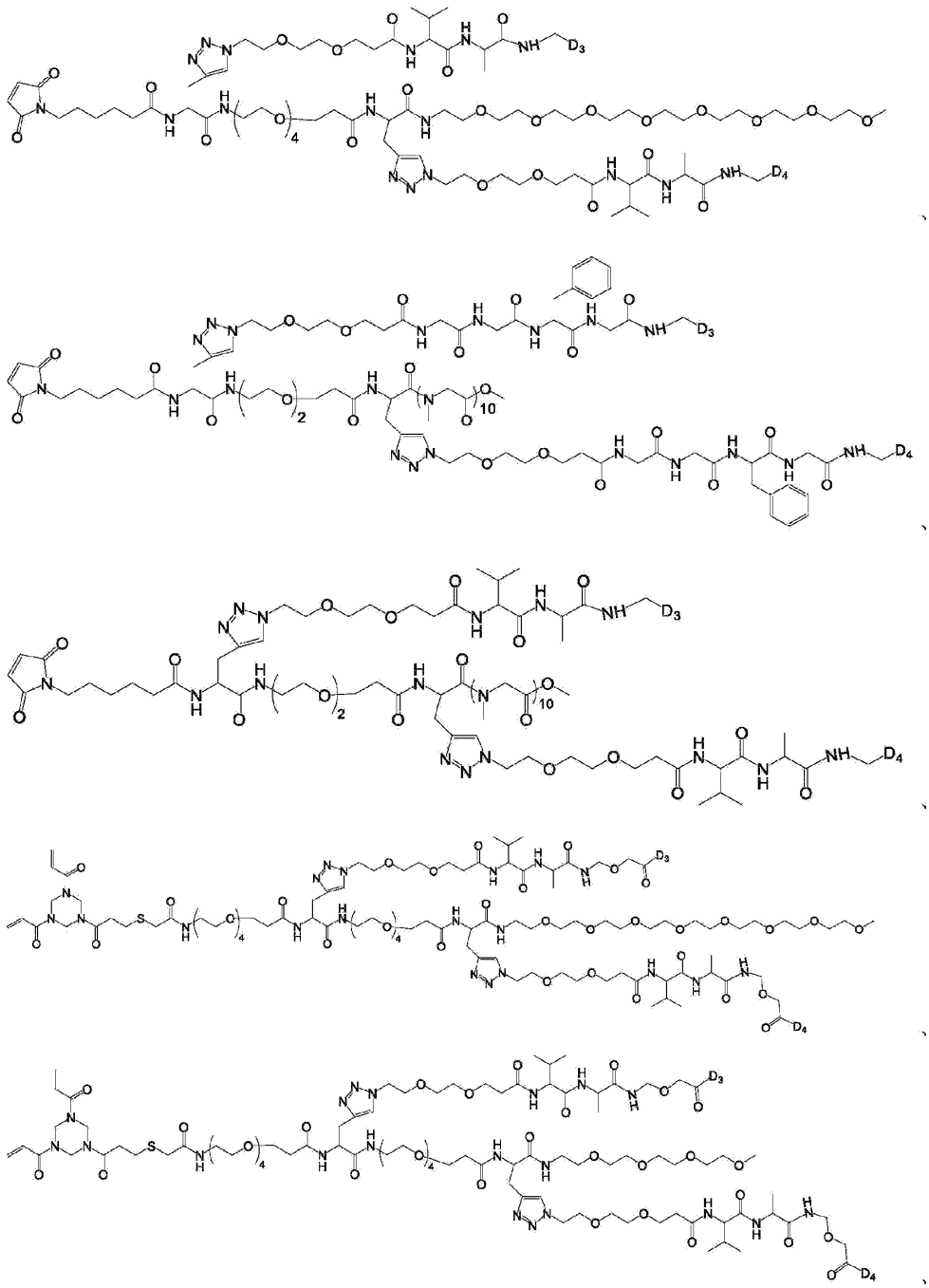
[0263] 在一些实施方案中，所述第一载荷化合物和所述第二载荷化合物独立地选自细胞毒性分子、免疫增强剂和放射性同位素，所述细胞毒性分子包括但不限于微管蛋白抑制剂或DNA损伤剂；进一步优选的，所述微管蛋白抑制剂包括但不限于海兔毒素(dolastatin)及奥瑞他汀(auristatin)类细胞毒分子，美登素(maytansine)类细胞毒分子；所述DNA损伤剂包括但不限于卡奇霉素(calicheamicin)类、倍癌霉素(duocarmycin)类、安曲霉素类衍生物PBD、喜树碱(camptothecins)及喜树碱类衍生物、SN−38、Dxd；进一步优选的，所述奥瑞他汀(auristatin)类细胞素分子包括但不限于MMAE或MMAF或它们的衍生物，所述美登素类细胞毒素分子包括但不限于DM1、DM4或它们的衍生物；进一步优选的，所述喜树碱类衍生物选自权利要求65或66所述的化合物，所述化合物通过存在的羟基或胺基团中的任一个失去一个氢后与S_2或S_4附连。

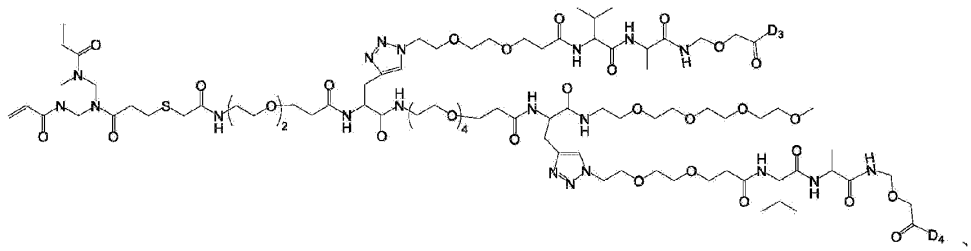
[0264] 在一些实施方案中，所述S_2、S_4选自−NH−CH_2−或以下结构：

[0265] 。

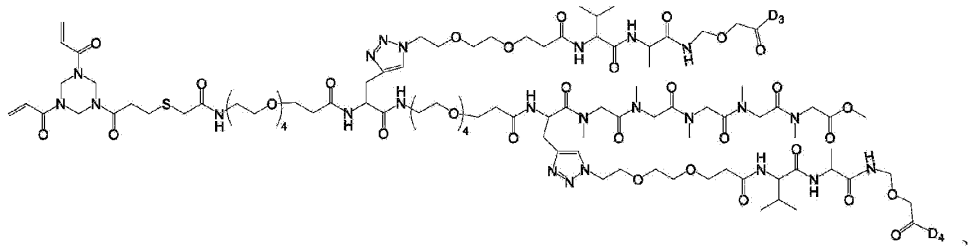
[0266] 在一些实施方案中，所述化合物选自：



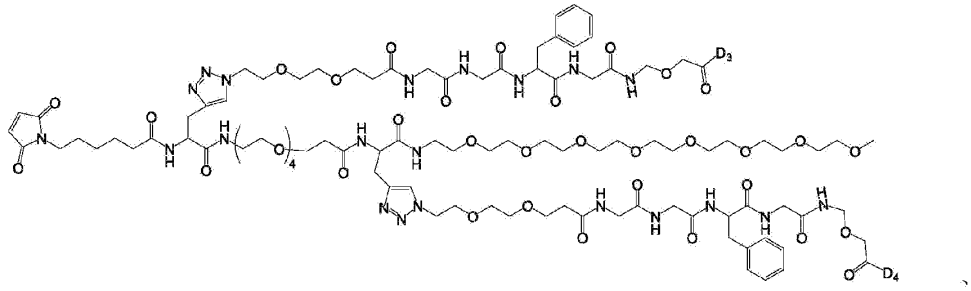




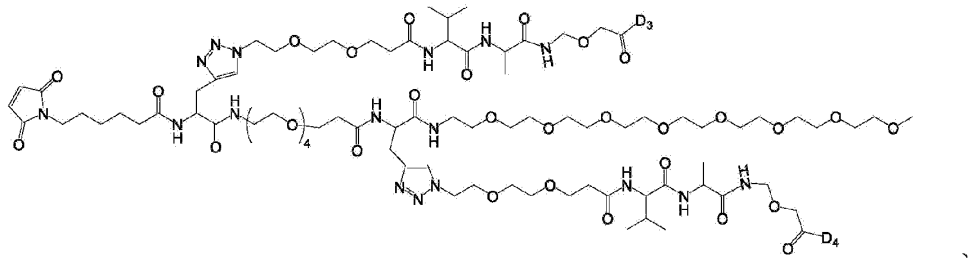
、



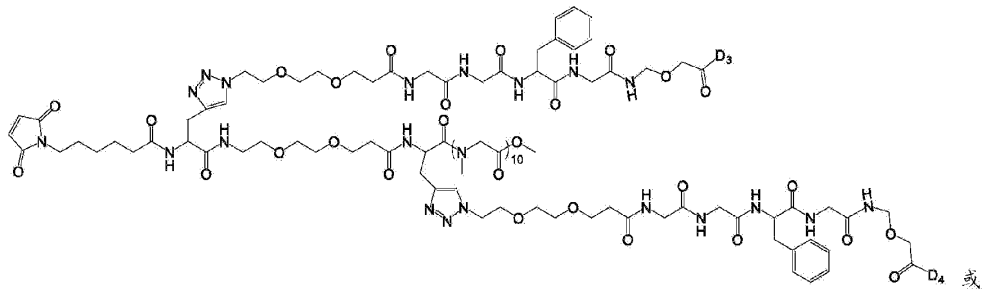
、



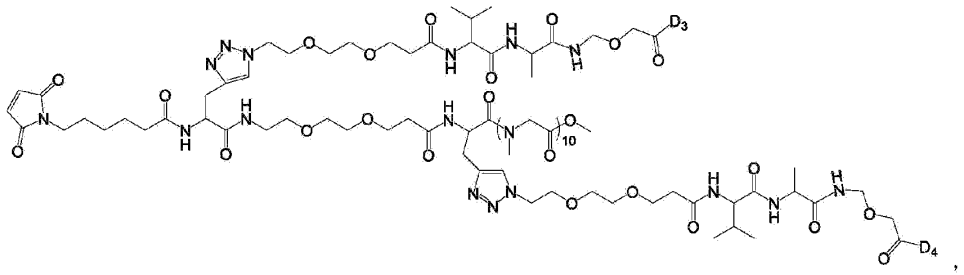
、



、

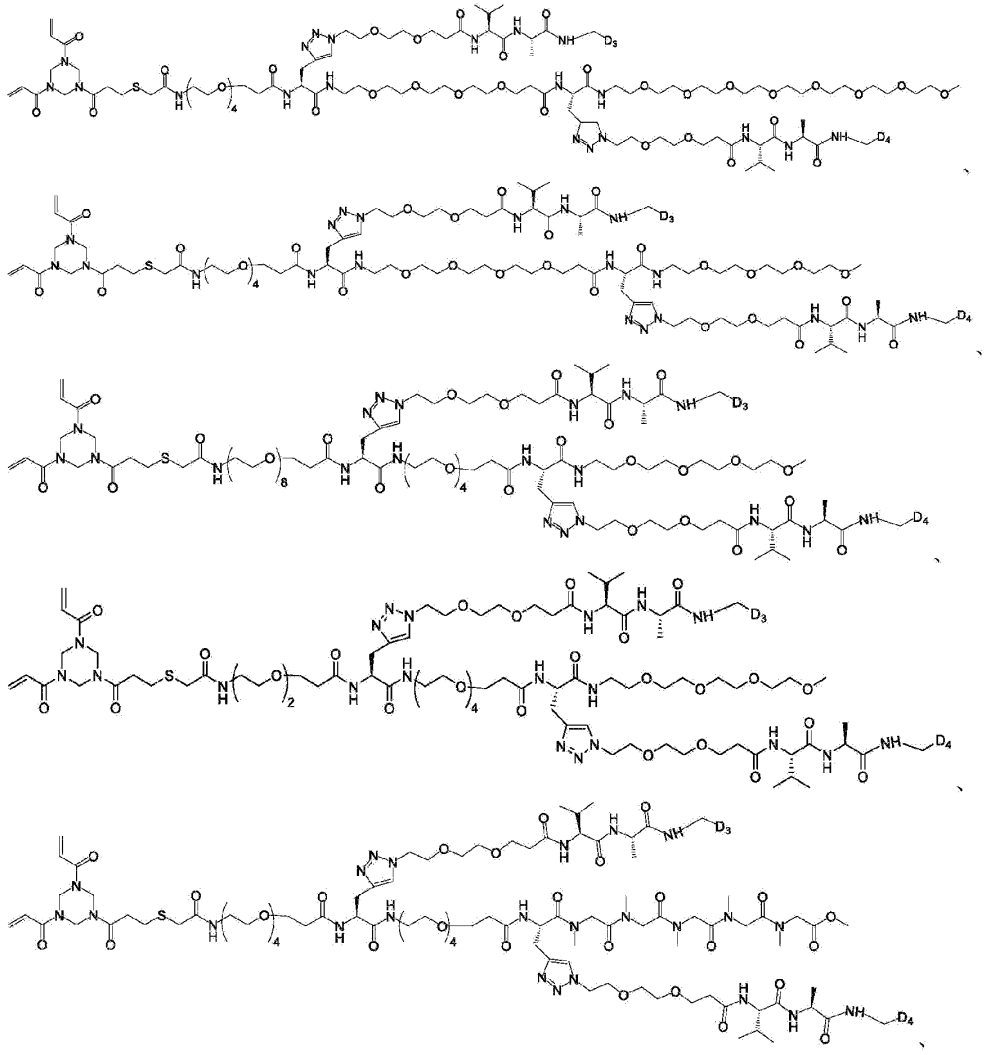


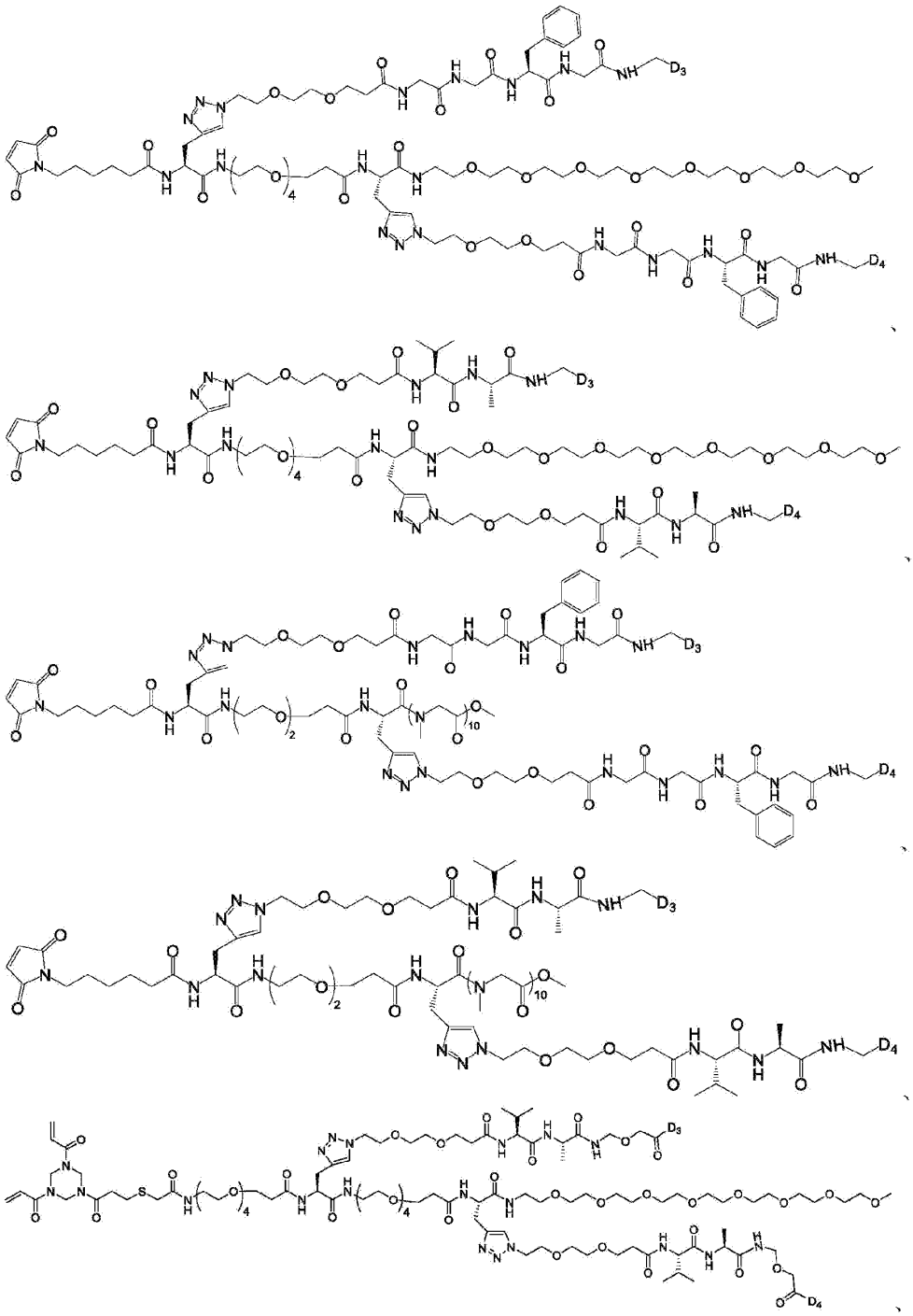
或

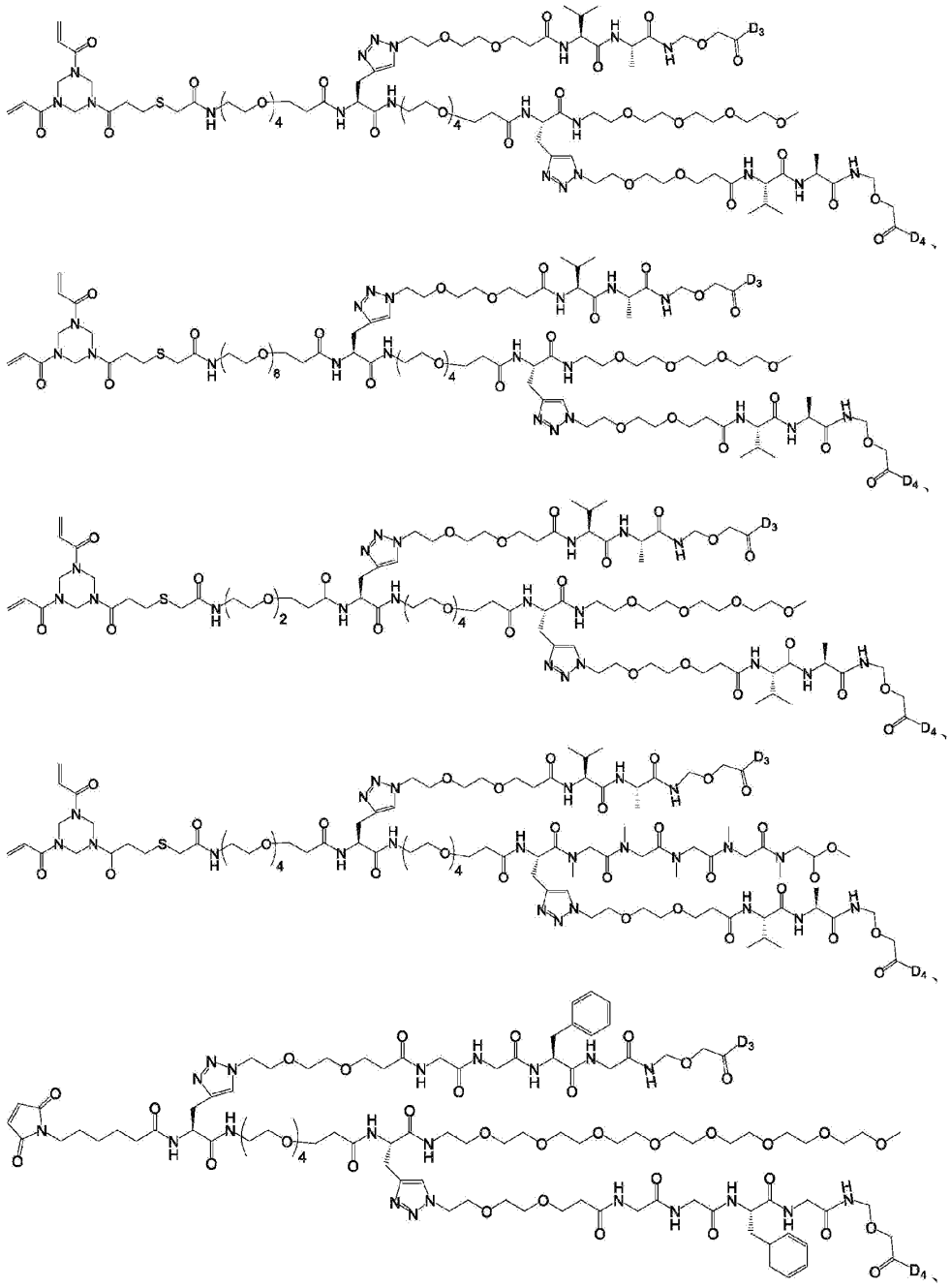


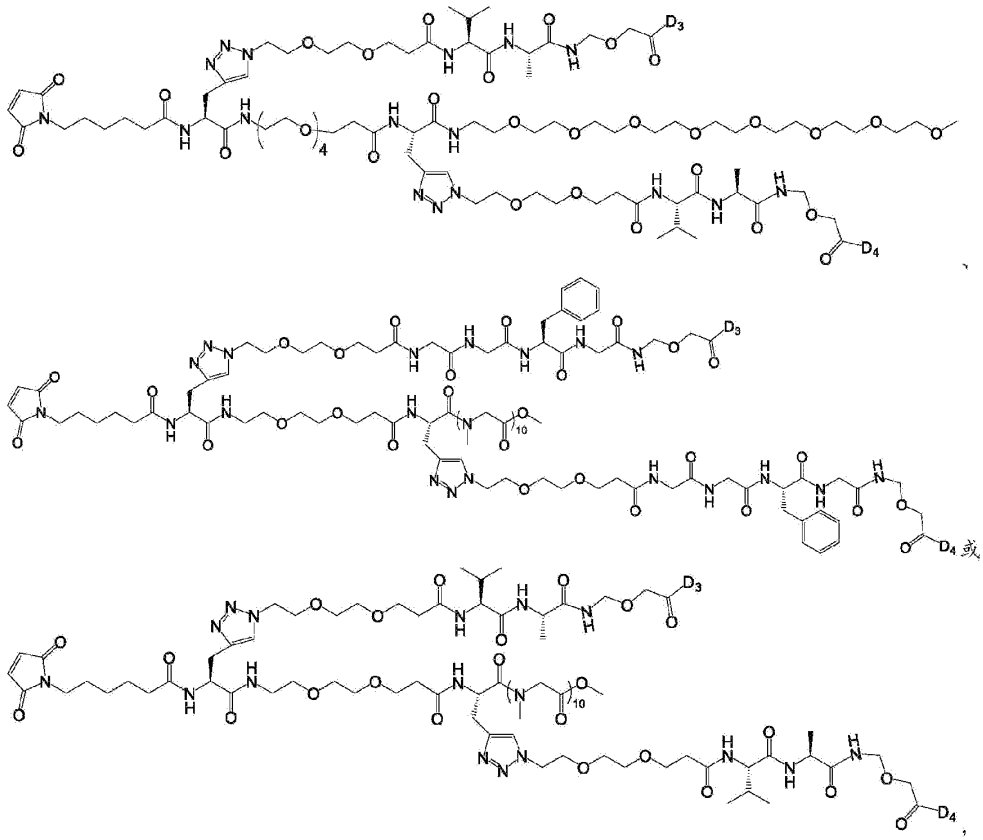
其中，D_3是第一载荷化合物；D_4是第二载荷化合物。

[0267] 在一些优选的实施方案中，所述化合物选自：









其中，D_3是第一载荷化合物；D_4是第二载荷化合物。

[0268] 一方面，涉及一种化合物，所述化合物为上述化合物的立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物。

[0269] 一方面，涉及上述连接子在制备抗体药物偶联物中的应用。

[0270] 一方面，涉及上述连接子-载荷化合物在制备抗体药物偶联物中的应用。

[0271] 一方面，涉及上述化合物在制备抗体药物偶联物中的应用。

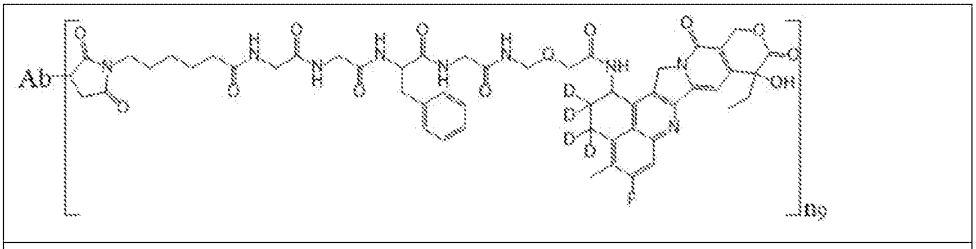
[0272] 一方面，涉及一种包括靶向单元、连接子、载荷的抗体药物偶联物，所述抗体药物偶联物使用的连接子上述任一连接子结构，和/或所述抗体药物偶联物使用的载荷选自上述任一化合物。

[0273] 在一些实施方案中，所述抗体药物偶联物的靶向单元选自上述任一抗体或其抗原结合片段。

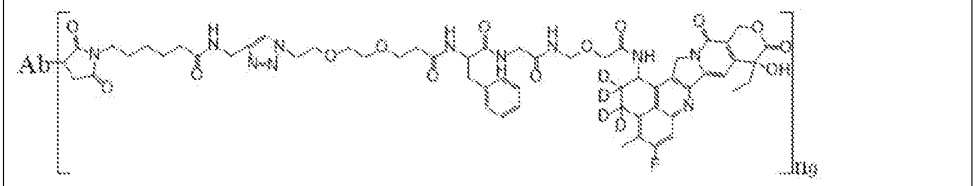
[0274] 在一些实施方案中，所述抗体药物偶联物的连接子-载荷选自上述任一化合物。

[0275] 在一些实施方案中，所述抗体药物偶联物选自以下结构：

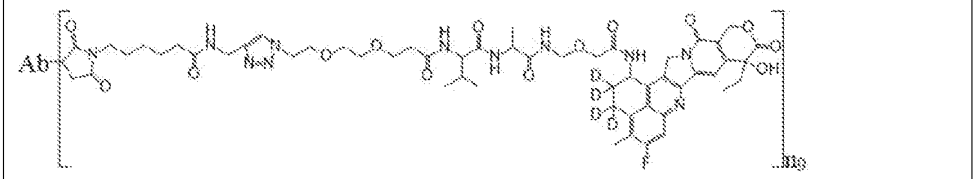
ADC-100



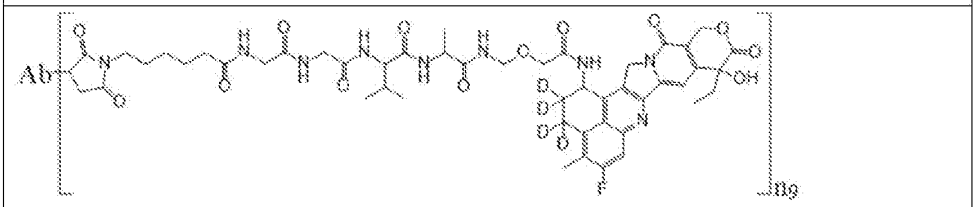
ADC-200



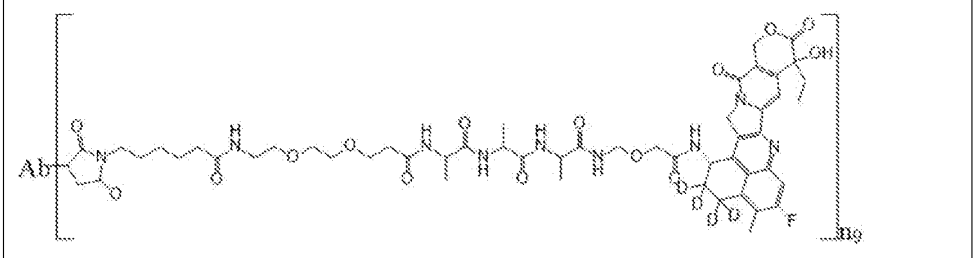
ADC-600



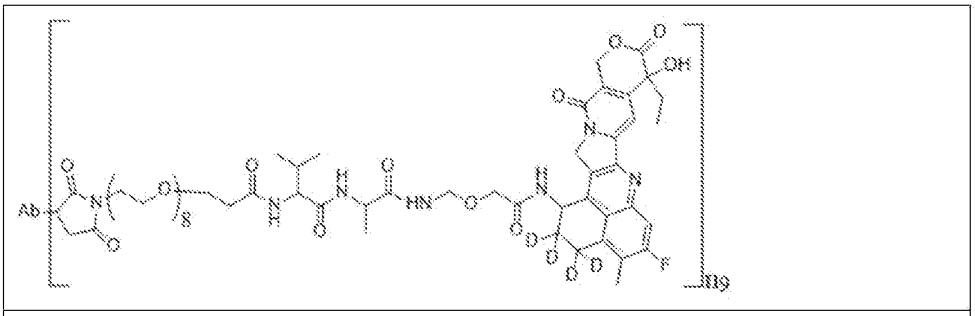
ADC-500



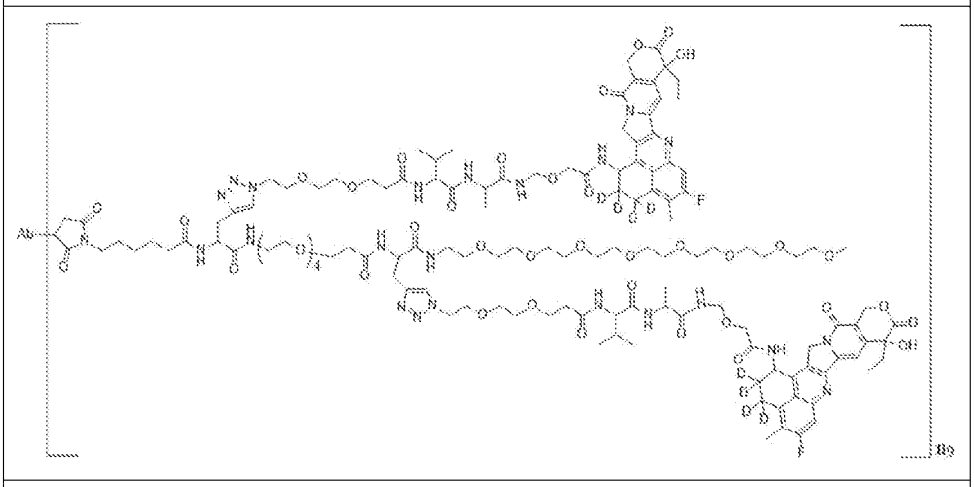
ADC-700



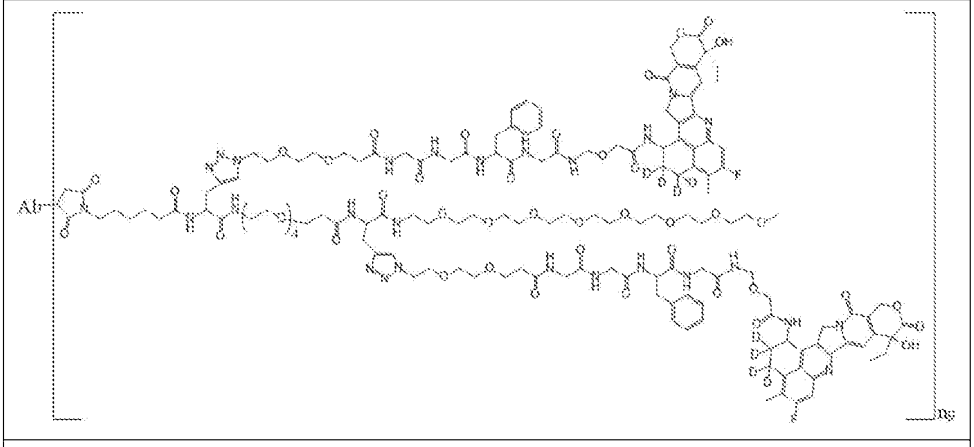
ADC-1400



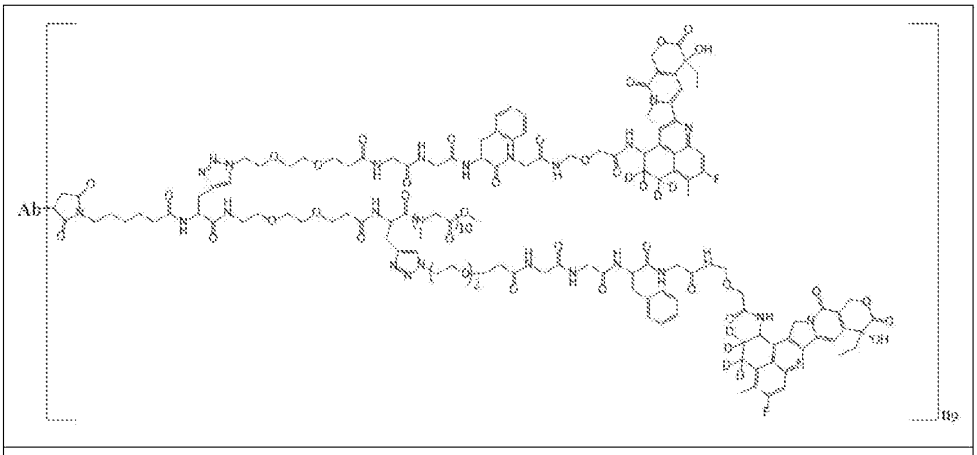
ADC-400



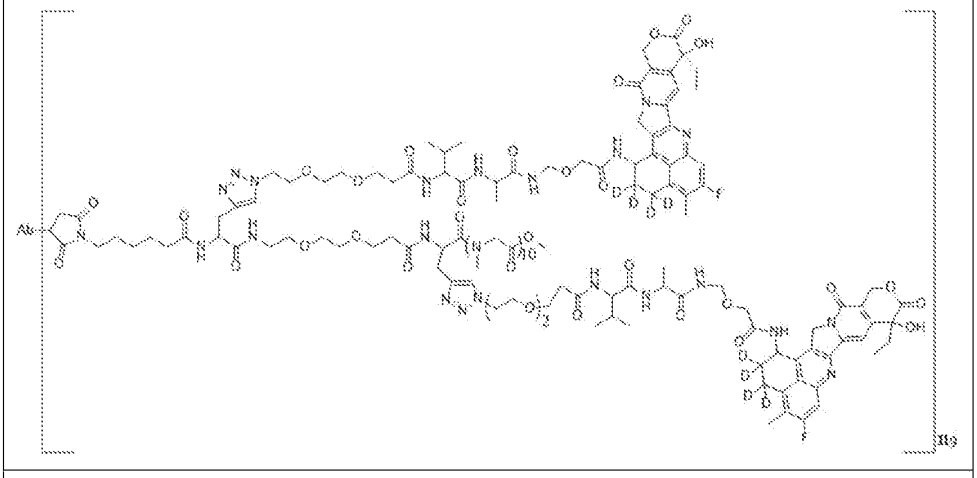
ADC-300



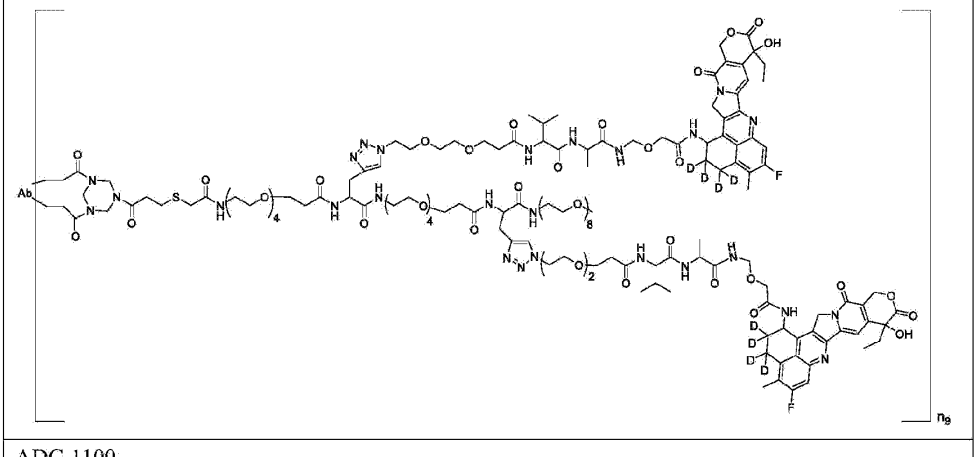
ADC-800



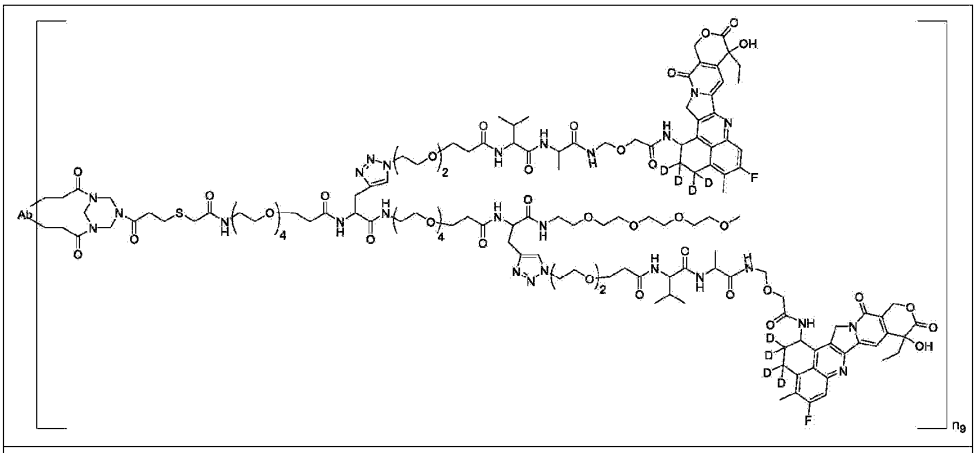
ADC-900



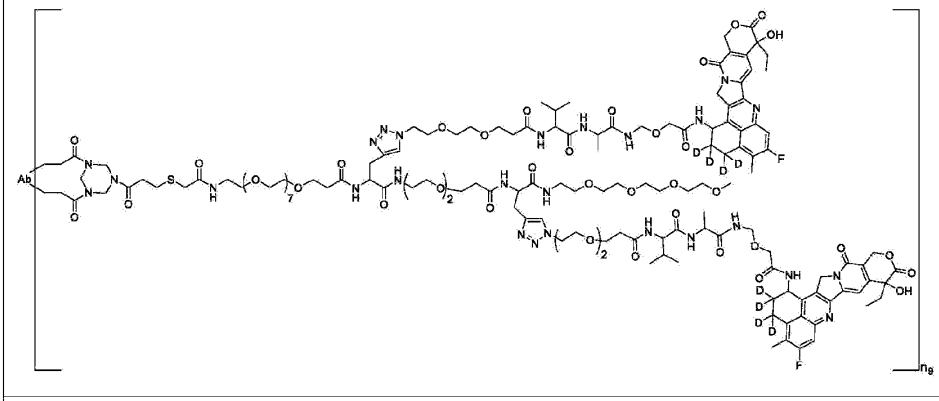
ADC-1000



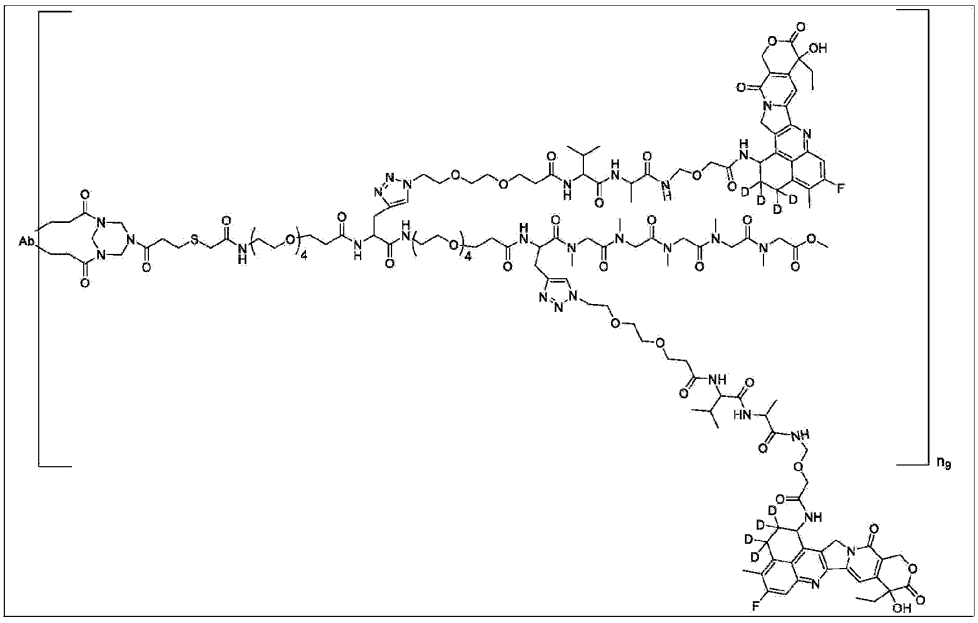
ADC-1100



ADC-1200



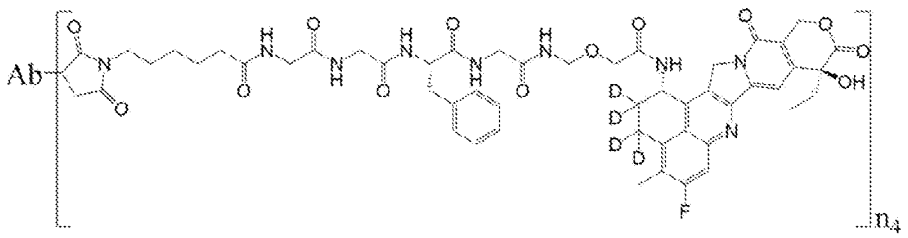
ADC-1300



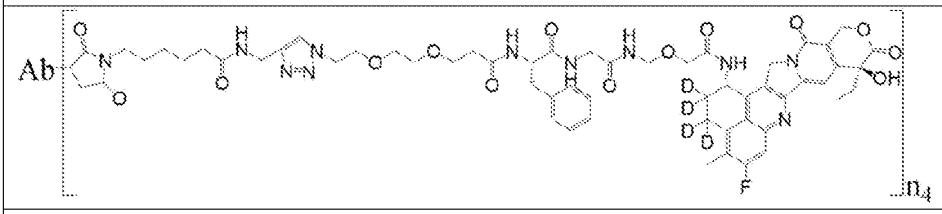
[0276] 其中，Ab为靶向单元，所述n_9选自1、2、3、4、5、6、7或8。

[0277] 在一些实施方案中，所述抗体药物偶联物选自以下结构：

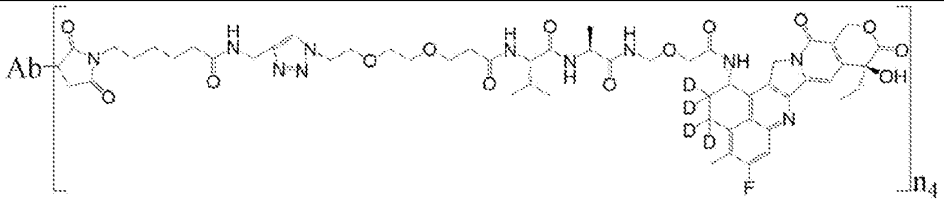
ADC-100a



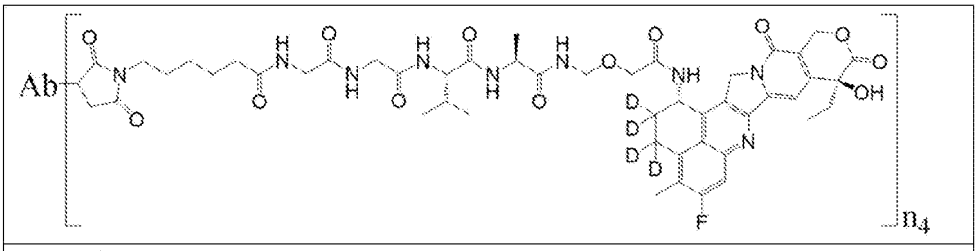
ADC-200a



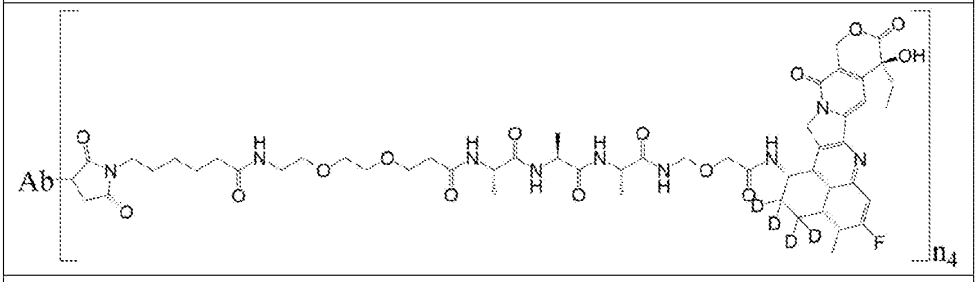
ADC-600a



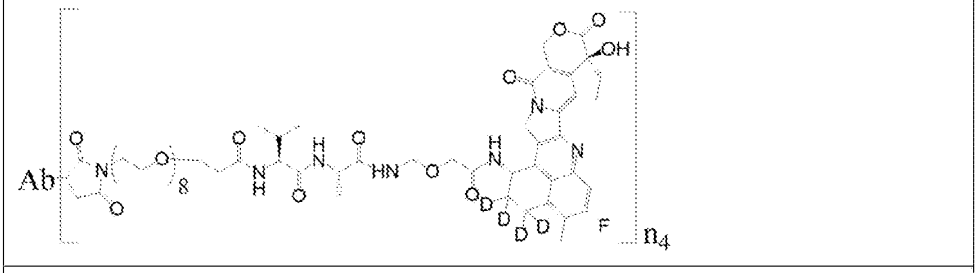
ADC-500a



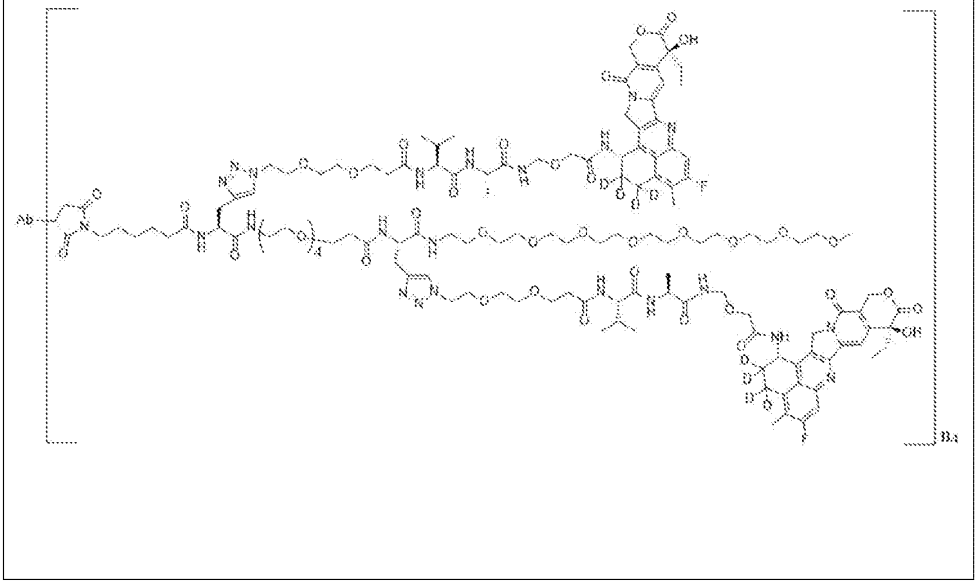
ADC-700a



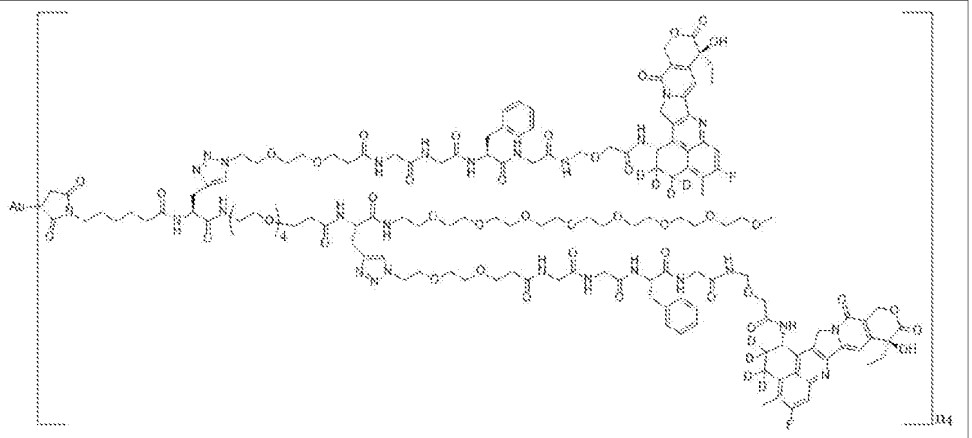
ADC-1400a



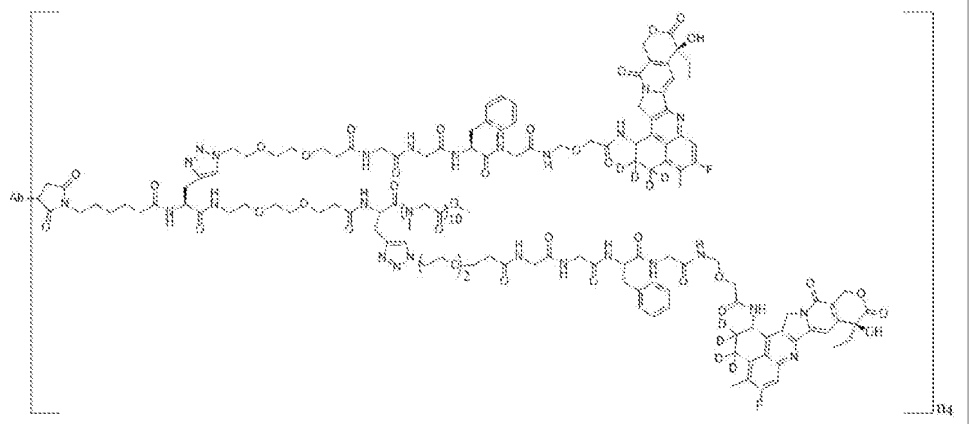
ADC-400a



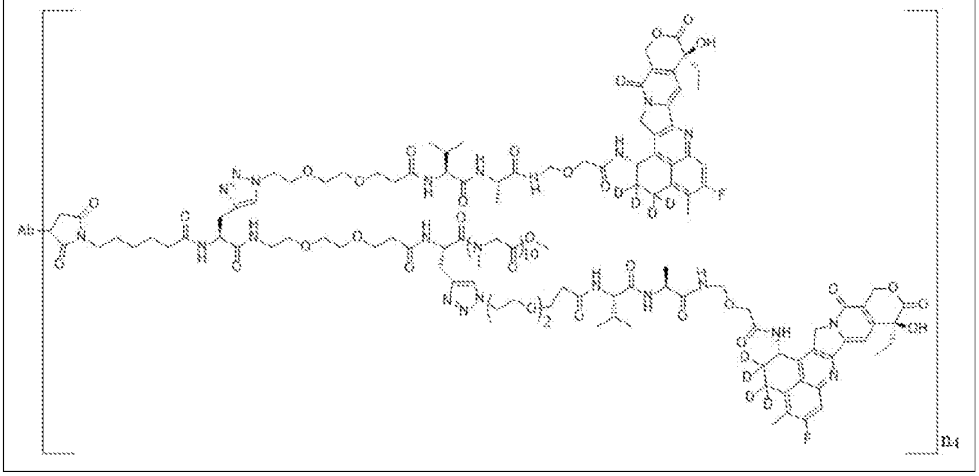
ADC-300a



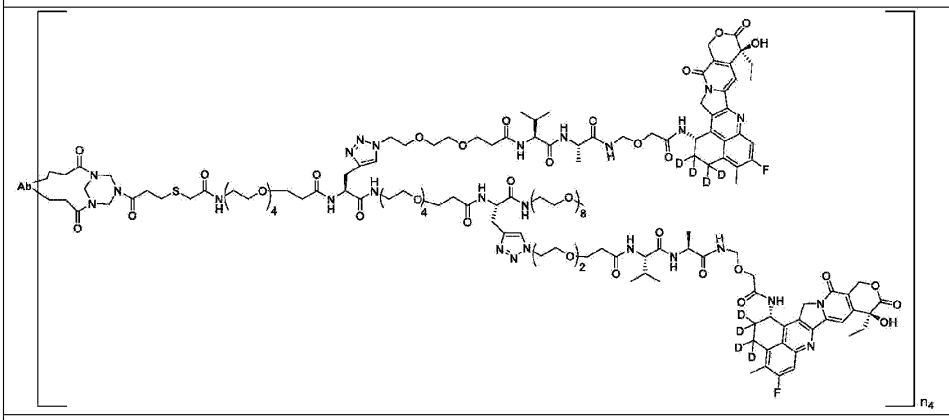
ADC-800a



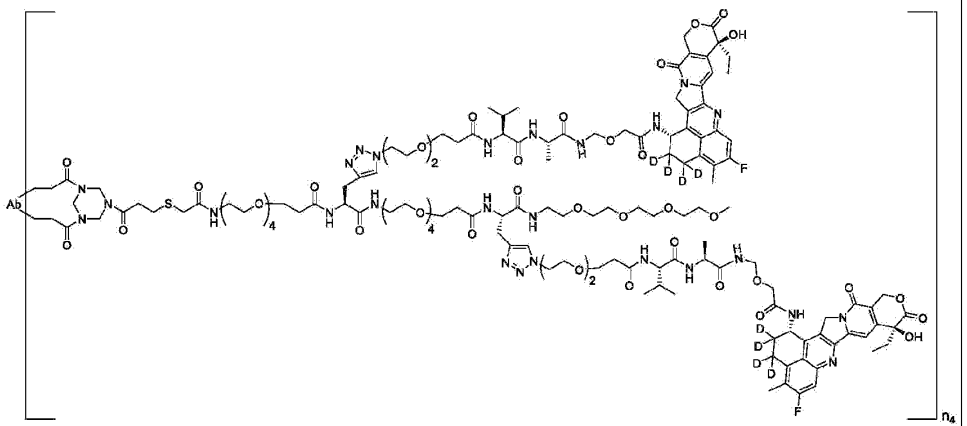
ADC-900a



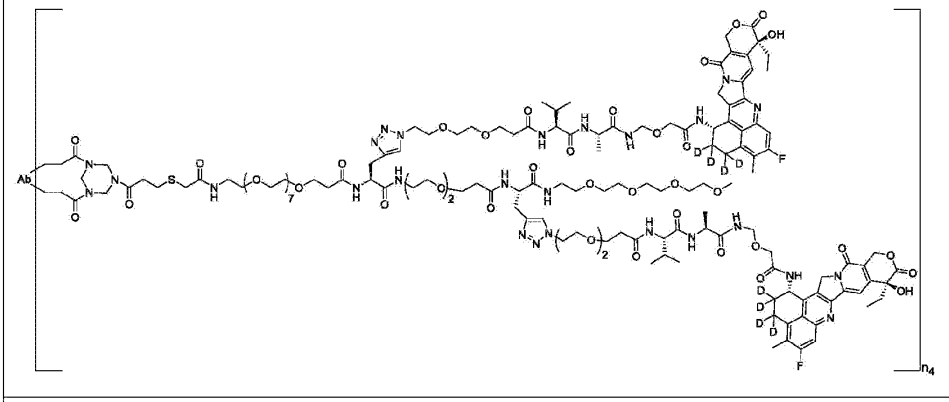
ADC-1000a



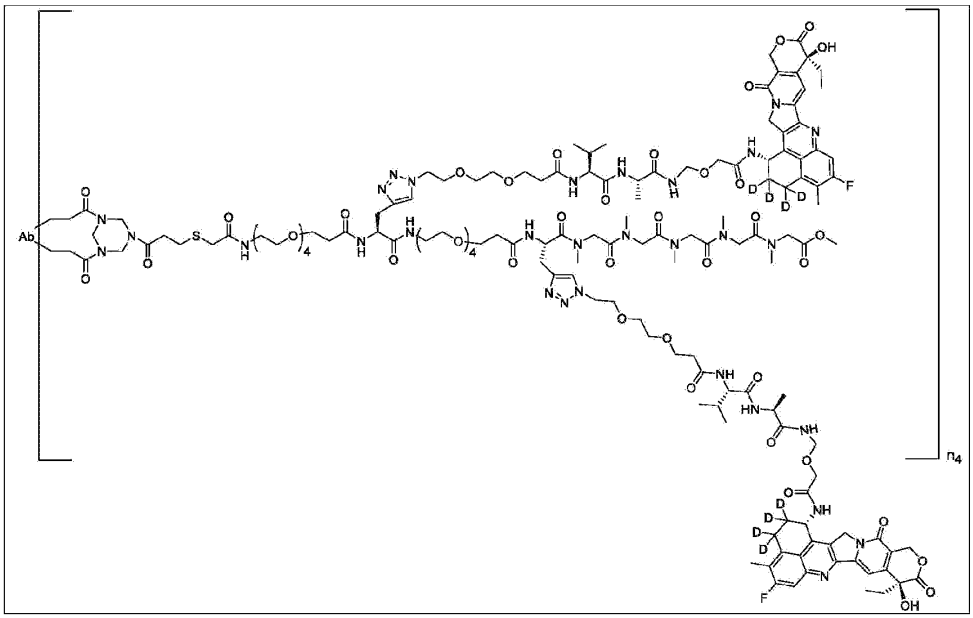
ADC-1100a



ADC-1200a



ADC-1300a



[0278] 其中，Ab为靶向单元；所述n_4选自1、2、3、4、5、6、7或8，代表所述Ab上连接的连接子-载荷部分的数量为1、2、3、4、5、6、7或8个。

[0279] 在一些优选的实施方案中，所述抗体药物偶联物的结构为ADC-1300；所述靶向单元Ab为靶向CDCP1的抗体或其抗原结合片段；在一些更优选的实施方案中，所述靶向单元Ab是上述任意一项所述的抗体或其抗原结合片段。

[0280] 一方面，涉及一种药物组合物，其包含上述任一抗体药物偶联物和/或上述任一抗体或其抗原结合片段，以及可药用载体。

[0281] 一方面，涉及上述任一抗体或其抗原结合片段或融合蛋白、上述任一多核苷酸、上述任一核酸构建体、上述任一抗体药物偶联物或上述任一药物组合物在制备用于治疗或预防癌症的药物中的用途。

[0282] 在一些实施方案中，所述癌症为CDCP1阳性癌症。

[0283] 在一些实施方案中，所述CDCP1阳性癌症为肺癌、或胰腺癌；在一些优选的实施方案中，所述CDCP1阳性癌症是肺癌鳞癌，肺腺癌，非小细胞肺癌或胰腺腺癌。

[0284] 一方面，涉及一种重组蛋白，所述重组蛋白包含上述任一抗体或抗原结合片段。

[0285] 在一些实施方案中，所述重组蛋白为双特异性抗体或多特异性抗体。

[0286] 一方面，涉及上述任一抗体或抗原结合片段在制备重组蛋白中的应用。

[0287] 本文引用的所有参考文献，包括专利、专利申请以及各类出版物，均通过引用而整体并入，其程度如同单独地且特别地指出每篇参考文献均通过引用而并入，并且在本文中以其整体进行了阐述。

[0288] 本文中对专利文件的引用和并入仅仅是为了方便起见，而并非反映对此类专利文件的有效性、可专利性和/或可实施性的任何观点。

[0289] 本文中使用的所有标题和小标题仅仅是为了方便起见，而不应解释为以任何方式限制本发明。

[0290] 本文提供的任何和所有示例或示例性措辞(例如，诸如)的使用仅旨在更好地阐明本发明，而不对本发明的范围构成限制，除非另有声明。说明书中的任何用语均不应被解释为表示任何未请求保护的要素对本发明的实践是必不可少的。

[0291] 本发明包括在适用法律允许的情况下对所附权利要求书中记载的主题的所有修改和等同方案。

附图说明

[0292] 图1是载荷为Dxd、dDxd的ADC(抗体均为Ab1，连接子均为DL01)在EBC-1细胞(人肺腺癌细胞)中的内化效率对比图；

[0293] 图2是载荷为Dxd、dDxd的ADC(抗体均为Ab2，连接子均为DL01)在BXPC-3细胞(人原位胰腺癌细胞)中的内化效率对比图；

[0294] 图3是抗CDCP1抗体药物偶联物(MMAE载荷)对EBC-1细胞(人肺腺癌细胞)异种移植瘤生长抑制数据图；

[0295] 图4是抗CDCP1抗体药物偶联物(MMAE载荷)对BxPC3细胞(人原位胰腺癌细胞)异种移植瘤生长抑制数据图；

[0296] 图5是抗CDCP1抗体药物偶联物(喜树碱类载荷)对EBC-1细胞(人肺腺癌细胞)异种移植瘤生长抑制实验(5mg/kg剂量)数据图；

[0297] 图6是抗CDCP1抗体药物偶联物(喜树碱类载荷)对EBC-1细胞(人肺腺癌细胞)异种移植瘤生长抑制实验(2.5mg/kg剂量)数据图；

[0298] 图7是抗CDCP1抗体药物偶联物(载荷分别为dDxd、Dxd)毒性耐受试验数据图；

具体实施方式

[] 定义

[0299] 除非相反地特别说明，否则本发明的实践将采用本领域技术范围内的病毒学、免疫学、微生物学、分子生物学和重组DNA技术的常规方法或与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同。其中许多出于说明性目的在下文进行描述，此类技术在文献中作出了充分地说明。

[0300] 除非另有指出，否则本发明中的术语“烷基”本身或作为另一术语的一部分是指具有指定碳原子数的被取代或未被取代的直链或支链、饱和或不饱和烃(例如C1-8烷基是指具有1至8个碳原子的烷基基团)，代表性的直链“C1-8烷基”基团包括但不限于-甲基、-乙基、-正丙基、-正丁基、-正戊基、-正己基、-正庚基和-正辛基；而支链-C_3-C_8烷基包括但不限于-异丙基、-仲丁基、-异丁基、-叔丁基、-异戊基、-和2甲基丁基；不饱和的-C_2-C_8烷基包括但不限于-乙烯基、-烯丙基、-1-丁烯基、-2-丁烯基、-异丁烯基、-1-异戊烯基、-2-戊烯基、-3-甲基-1-丁烯基、-2-甲基-2-丁烯基、-2,3-二甲基-2-丁烯基、-1-己烯基、-2-己烯基、-3-己烯基、-乙炔基、-丙炔基、-1-丁炔基、-2-丁炔基、-1-戊炔基、-2-戊炔基和-3-甲基-1-丁炔基，以上烷基基团可未被取代，或可被一个或多个基团取代。

[0301] 除非另有指出，否则本发明中的术语“C1-8杂烷基”本身或作为另一术语的一部分是指完全饱和或含1至3个不饱和度，由述及的碳原子数和1至8个、优选1至3个选自O、N和S的杂原子组成的稳定的直链或支链烃或其组合，并且氮和硫原子可任选被氧化，并且氮杂原子可任选被季铵盐化。杂原子O、N、S可位于杂烷基基团的任何内部位置处或位于烷基基团与分子的其与部分附连的位置处，典型的杂烷基包括但不限于：-O-CH_3、-CH_2-O-CH_3、-CH_2-CH_2-O-CH_3、-NH-CH_3、-CH_2-NH-CH_3、-CH_2-N(CH_3)-CH_3、-S-CH_3、-CH_2-S-CH_3、-CH_2-CH_2-S-CH_3。通常，C1至C4杂烷基具有1至4个碳原子和1或2个杂原子。

[0302] 除非另有指出，否则本发明中的术语“C3-8环烷基”本身或作为另一术语的一部分为通过从母体环系的环原子去除一个氢原子而得到的3-、4-、5-、6-、7-或8-元一价、被取代或未被取代、饱和或不饱和的非芳香族单环状或双环状碳环环状，代表性的C_3-C_8环烷基包括但不限于环丙基、环丁基、环戊基、环戊二烯基、环己基、环己烯基、1,3-环己二烯基、1,3,5-环庚三烯基、环辛基和环辛二烯基。

[0303] 除非另有指出，否则本发明中的术语“C3-8杂环烷基”本身或作为另一术语的一部分是指具有3至8个碳原子(也称为环成员)和一至四个独立选自N、O、P或S的杂原子环成员并通过从母体环系的环原子去除一个氢原子而得到的一价的被取代或未被取代的芳香族或非芳香族单环状或双环状环系。其中所有环原子都涉及在芳香化合物结构中的杂环称为杂芳基，否则被称为杂碳环。

[0304] 除非另有指出，否则本发明中的术语“任意官能团取代的基团”中的“任意官能团”包括但不限于以下基团：-卤素、-C_1-C_8烷基、-C_2-C_8烯基、-C_2-C_8炔基、-O-(C_1-C_8烷基)、-O-(C_2-C_8烯基)、-O-(C_2-C_8炔基)、-芳基、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH_2、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')$_2$、-NHC(O)R'、-SR'、-SO_3R'、-$S(O)_2$R'、-S(O)R'、-OH、-NO_2、-N_3、-NH_2、-NH(R')、-N(R')$_2$和-CN，其中R'各自独立地选自-H、-C_1-C_8烷基、-C_2-C_8烯基、-C_2-C_8炔基或-芳基，其中所述-C_1-C_8烷基、-C_2-C_8烯基、-C_2-C_8炔基、O-(C_1-C_8烷基)、-O-(C_2-C_8烯基)、-O-(C_2-C_8炔基)、和-芳基可以进一步被一个或多个基团任选取代，这些基团包括但不限于：-C_1-C_8烷基、-C_2-C_8烯基、-C_2-C_8炔基、-卤素、-O-(C_1-C_8烷基)、-O-(C_2-C_8烯基)、-O-(C_2-C_8炔基)、-芳基、-C(O)R"、-OC(O)R"、-C(O)OR"、-C(O)NH_2、-C(O)NHR"、-C(O)N(R")$_2$、-NHC(O)R"、-SR"、-SO_3R"、-$S(O)_2$R"、-S(O)R"、-OH、-N_3、-NH_2、-NH(R")、-N(R")$_2$和-CN，其中R"各自独立地选自-H、-C_1-C_8烷基、-C_2-C_8烯基、-C_2-C_8炔基或-芳基。

[0305] 本发明中的术语“氨基酸”包括天然氨基酸、含有能够形成酰胺键的N和羧酸的分子、通式NH_2-CHR-COOH的分子或带有母体氨基酸的肽内的残基，其

中“R”是许多不同的侧链之一。“R”可以是天然氨基酸中发现的取代基。“R”也可以指不是天然氨基酸的取代基。

[0306] 本发明中的术语“氨基酸残基”指与另一个氨基酸相连时，失去水分子后保留的氨基酸部分。

[0307] 本发明中的术语“立体异构体”是指具有相同的化学组成和连结性但其原子在空间中的不同定位不能通过在单键周围旋转而互相转化的化合物。

[0308] 本发明中的术语“药学上可接受的盐”是指化合物(连接子–药物或其配体药物偶联物)的药学上可接受的有机或无机盐。示例性的盐包括但不限于硫酸盐、三氟乙酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐、草酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、酸式磷酸盐、异烟酸酯、乳酸盐、水杨酸盐、酒石酸盐、油酸盐、酒石酸氢盐、抗坏血酸盐、琥珀酸盐、马来酸盐、龙胆酸盐、富马酸盐、葡萄糖酸盐、葡糖醛酸盐，蔗糖盐、甲酸盐、苯甲酸盐、谷氨酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐和扑酸盐。药学上可接受的盐可能涉及另一个分子如乙酸根离子、琥珀酸根离子或其他抗衡离子的引入，抗衡离子可以是任何将稳定母体化合物上的电荷的有机或无机部分。此外，药学上可接受的盐可在其结构中具有不止一个带电荷的原子。其中多个带电荷的原子是药学上可接受的盐的一部分的情况可具有多个抗衡离子，因此药学上可接受的盐可具有一个或多个带电荷的原子和/或一个或多个抗衡离子。

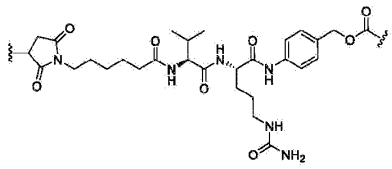
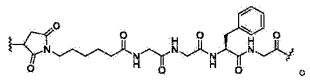
[0309] 本发明中的术语“抗体药物偶联物”是指生物活性分子(药物分子)与靶向单元连接得到的物质，在本发明的部分实施方案中，生物活性分子与靶向单元通过连接体相连，所述连接体在特定环境(例如肿瘤内的水解酶和、/或pH值环境)中和特定作用(例如溶酶体蛋白酶的作用)下能够断裂，从而使生物活性分子与靶向单元分离。在本发明的部分实施方案中，所述连接体包含可切割或不可切割的单元，例如肽或二硫键。在本发明的部分实施方案中，生物活性分子与靶向单元直接通过共价键相连，所述共价键在特定环境或作用下能够断裂，从而使生物活性与靶向单元分离。

[0310] 本发明中的术语“靶向单元”是指与生物部分或其片段结合或关联的结构，包含但不限于抗体片段或功能性片段、替代物、变体、蛋白质配体、蛋白质支架、RNA、DNA、RNA或DNA片段、小分子配体或抗原结合片段。

[0311] 本发明中的术语“单克隆抗体”包括但不限于人单克隆抗体、人源化单克隆抗体或嵌合人-小鼠(或其他物种)单克隆抗体。抗体包括全长抗体及其抗原结合片段。人单克隆抗体可通过本领域已知的多种技术中的任何一种来制备(例如，Teng等,1983,Proc.Natl.Acad.Sci.USA.80:7308-7312；Kozbor等,1983,ImmunologyToday 4:72-79；和Olsson等,1982,Meth.Enzymol.92:3-16)。

[0312] 本发明中的术语“抗体”可以是将与靶细胞(例如，癌细胞抗原、病毒抗原或微生物抗原)免疫特异性结合的抗体的功能活性片段、衍生物或类似物，或者是与肿瘤细胞或基质结合的其他抗体，其“功能活性”指的是所述片段、衍生物或类似物能够与靶细胞免疫特异性结合。其他可用的抗体包括但不限于抗体的片段，如不限于F(ab’)$_2$片段、Fab片段、Fvs、单链抗体、双链抗体、三链抗体、四链抗体、scFv、scFv-FV、双特异性抗体、多特异性抗体或与抗体具有相同的特异性的任何其他分子；抗体包括经修饰的类似物和衍生物，即通过任何类型分子的共价附连修饰的类似物和衍生物，只要这样的共价附连允许抗体保持其抗原结合免疫特异性即可。例如但不限于，抗体的衍生物和类似物包括已经进一步修饰的那些，例如，通过糖基化、乙酰化、PEG化、磷酸化、酰胺化、由已知的保护/封闭基团衍生化、蛋白水解裂解、与细胞抗体单元或其他蛋白质的连接等修饰。众多化学修饰中的任何一种均可通过已知的技术进行，包括但不限于特异性化学裂解、乙酰化、甲酰化、在衣霉素存在下的代谢合成等。对癌细胞抗原具有免疫特异性的抗体可商购获得或通过本领域技术人员已知的任何方法如重组表达技术生产。编码对癌细胞抗原具有免疫特异性的抗体的核苷酸序列可例如自GenBank数据库或类似数据库、文献出版物或通过常规克隆和测序获得。

[0313] 本发明中的术语“抗原结合片段”主要指的是抗体中的能够特异结合抗原的功能片段如scFv(单链抗体)、Fv、Fab、F(ab’)$_2$、Fab’、scFv-Fc、单域抗体、类抗体、双特异性抗体、多特异抗体，或者通过化学修饰的任何抗体片段。

[0314] 本发明中的术语“连接子”具有两个反应性末端，一端用于结合或缔合生物部分或其片段，例如靶向单元，另一端用于偶联例如药物。除非另有指出，本发明中的-MC-VC-PAB-连接子结构如下所示：；除非另有指出，本发明中的-MC-GGFG-连接子结构如下所示：。

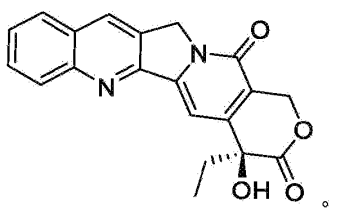
[0315] 本发明中的“癌症”，是指或描述哺乳动物中通常以细胞生长失控为特征的生理状况或病症，“肿瘤”包含一个或多个癌细胞。

[0316] 本发明中的“治疗剂”，是指细胞毒性剂、免疫增强剂、放射性同位素、细胞生长抑制剂、微管蛋白抑制剂或DNA损伤剂，具体包括但不限于海兔毒素(dolastatin)及奥瑞他汀(auristatin)类细胞毒分子，美登素(maytansine)类细胞毒分子、卡奇霉素(calicheamicin)类、倍癌霉素(duocarmycin)类、安曲霉素类衍生物PBD、喜树碱(camptothecins)及喜树碱类衍生物、SN-38、Dxd等。

[0317] 本发明中也包括用各种放射性或非放射性同位素原子的化合物。构成本发明的化合物的原子中也可以含有非天然比例的原子同位素或使用原子同位素替换。作为原子同位素，可举出例如氘(^{2}H)、氚(^{3}H)、或碳—14(^{14}C)等。

[0318] 除非另有指出，否则本发明中所使用的“〰”表示结构片段与分子其他部分相连接的部位。

[0319] 除非另有指出，否则本发明中的术语“可被……取代”、“可含有”、“含有”及其在本文中的其它变体形式为包含性的inclusive或开放式的，且不排除其它未列举的元素或方法步骤。

[0320] 除另有定义外，本发明中的喜树碱衍生物指包含喜树碱母体结构的被任意官能团取代的化合物，其中喜树碱母体结构如下所示：。

[0321] 除非另有指出，否则本发明中的术语“独立地选自"一组，则各取代基独立于另一者被选择。因此，各取代基可与另一(其他)取代基相同或不同。

[0322] 除非另有指出，否则本发明中的术语“连接子”具有两个反应性末端，一端用于结合或缔合生物部分或其片段，例如靶向单元，另一端用于偶联例如载荷。

[0323] 除非另有指出，否则本发明中的“治疗”是指减轻或消除所针对的疾病或病症。如果受试者接受了治疗量的本发明的化合物或其药学上可接受的形式或者本发明的药物组合物，该受试者的至少一种指标和症状表现出可观察到的和/或可检测出的缓解和/或改善，则表明该受试者已被成功地“治疗”。可以理解的是，治疗不仅包括完全地治疗，还包括未达到完全地治疗，但实现了一些生物学或医学相关的结果。

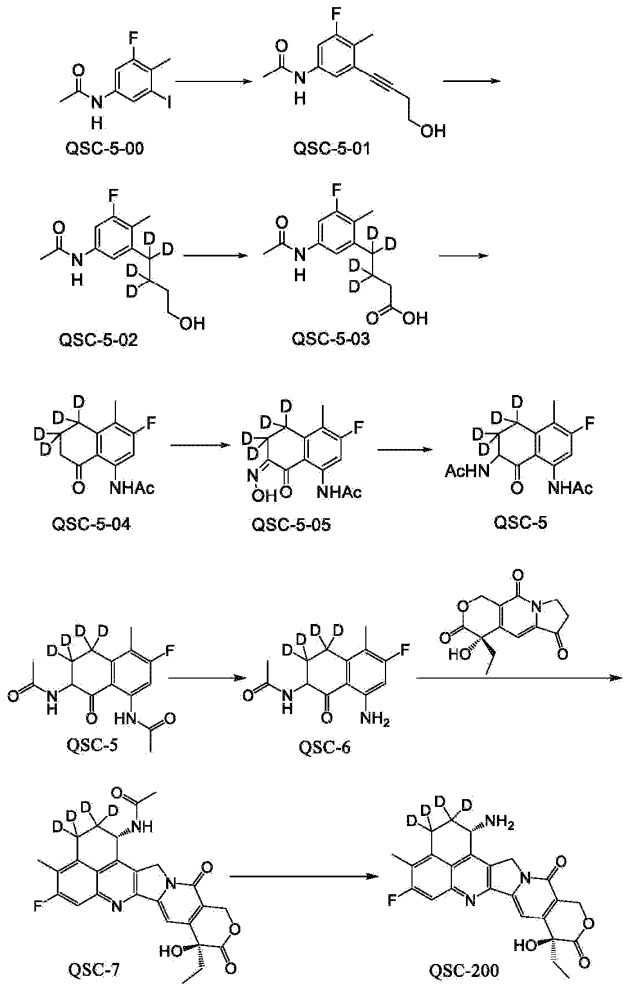
[0324] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述，但是本领域技术人员将会理解，下面实施

例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。

实施例

[0325] 1.氘代喜树碱化合物的制备

[0326] 实施例1化合物QSC-200的合成



[0327] QSC−5−01的合成：称取N−(3−氟−5−碘−4−甲基苯基)乙酰胺(60.0g，0.20mol)，3−丁炔−1−醇(28.7g，0.41mol)加入300mL DMF(N,N−Dimethylformamide)搅拌溶解，加入TEA(Triethylamine)(82.7g，0.82mol)，搅拌10min后，加入$PdCl_2(PPh_3)_2$(3.6g，0.005mol)，CuI(3.9g，0.02mol)，搅拌反应4h。将反应液滴加至3L水中，滴毕，继续搅拌1h，过滤，将滤饼转移至2L单口瓶中，加入1L EA溶解后，加入12g硅胶搅拌30min，过快速硅胶柱去除颜色，滤液旋蒸浓缩至约500mL时，加入1L Heptane打浆16h，过滤，滤饼干燥得33.8g QSC−5−01，收率70.3%。LC−MS(ESI+)235.10$[M+H]^+$。

[0328] QSC−5−02的合成：称取QSC−5−01(30.0g，0.13mol)、PtO_2(3.0g，10%w/w)，加入1200mL THF(tetrahydrofuran)，300mL D_2O溶解，在氘气氛围下，室温反应

16h。体系中加入2L EA(Ethyl acrylate)，1L H_2O，5.0g活性炭搅拌0.5h，硅藻土助滤，将滤液分液，有机相浓缩，得白色固体，将白色固体使用MTBE(Methyl tert-Butyl Ether):Heptane＝1:1 500mL打浆2h，过滤，滤饼干燥得29.3g QSC-5-02，收率94.5%。LC-MS(ESI+)243.16$[M+H]^+$。

[0329] QSC-5-03的合成：称取QSC-5-02(28.9g，0.12mol)，加入600mL丙酮，搅拌分散，0℃下缓慢滴加58mL CrO_3·H_2SO_4，滴毕，继续反应10-30min。反应体系中加入50mL异丙醇，搅拌20min后，过滤，滤饼用200mL EA淋洗，；将滤液旋蒸除去丙酮后，加入1L EA，500mL H_2O搅拌，分液，有机相再用纯化水洗2次，每次500mL，保留有机相。将NaOH溶液(配置NaOH溶液：7.2g NaOH加入300mL纯化水搅拌溶解)加至有机相中，搅拌5min，分液，保留水相，水相再用EA洗2次，每次300mL；水相用6N盐酸调节pH至2-3，有大量固体析出，使用EA萃取水相3次，每次300mL，合并有机相，浓缩，所得固体使用Heptane搅拌2h，过滤干燥，得18.0g QSC-5-03，收率58.9%。LC-MS(ESI+)257.14$[M+H]^+$。

[0330] QSC-5-04的合成：称取QSC-5-03(18.0g，0.07mol)，加入33mL TFA(Trifluoroacetic acid)，搅拌，降温至0℃，滴加29mL TFAA(Trifluoroacetic anhydride)，反应30min。将反应液滴加至500mL H_2O中，滴毕，继续搅拌30min，过滤，滤饼用纯化水淋洗。将滤饼转移至2L瓶中，加入500mL EA溶解，加入250mL纯化水，搅拌10min，分液，有机相用250mL饱和Na_2CO_3洗涤，无水硫酸钠干燥，旋蒸得固体，将固体用250mL Heptane打浆2h，过滤干燥，得14.2g QSC-5-04，收率85.0%。LC-MS(ESI+)239.13$[M+H]^+$。

[0331] QSC-5-05的合成：500mL瓶中加入400mL THF，140mL叔丁醇，降温至0℃。加入19.7g叔丁醇钾(19.7g，0.17mol)，搅拌10min。将QSC-5-04(14.0g，0.06mol)用130mL THF溶解后，缓慢滴加至反应体系，滴毕，继续搅拌10min，将亚硝酸丁酯(9.6g，0.09mol)用30mL THF溶解后，缓慢滴加至反应体系。滴毕，继续反应30min。反应体系中加入200mL饱和NH_4Cl，搅拌10min，分液；有机相加入1L EA，400mL纯化水，搅拌10min，分液；有机相再用400mL H_2O洗一次，旋蒸得固体。将所得固体加入200mL Heptane打浆2h，过滤，干燥，得13.7g QSC-5-05，收率87%。LC-MS(ESI+)268.12$[M+H]^+$。

[0332] QSC-5的合成：称取QSC-5-05(13.5g，0.05mol)，加入810mL THF，Pt/C(1.4 g，10%w/w)，乙酸酐(13.5g，0.10mol)，氢气氛围下反应16h。将体系过滤，使用硅藻土助滤，有机相旋蒸浓缩，得固体。固体加入200mL EA打浆2h，过滤。滤饼加入400mL DCM(Dichloromethane)溶解，加入5g活性炭，搅拌1h，硅藻土助滤，过滤保留有机相，有机相旋蒸得固体。固体中加入200mL Heptane打浆1 h，过滤干燥，得9.0g QSC-5，收率60.4%。LC-MS(ESI+)296.15$[M+H]^+$。

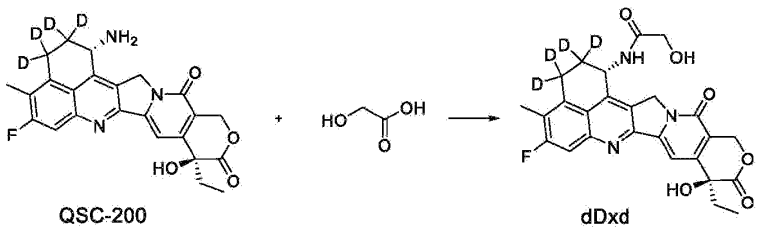
[0333] QSC-6的合成：将QSC-5(8.01g，27.0mmol)，2N盐酸(320mL)溶解，35℃反应2.0h。反应完成后，用0.5N $NaCO_3$溶液调PH至7～8，加入二氯甲烷萃取三次，将有机相脱水后旋干，并真空干燥，得到QSC-6 6.76g，收率98.5%。LC-MS(E SI+)：255.1$[M+H]^+$。

[0334] QSC-7的合成：将QSC-6(6.76g，26.6mmol)，(S)-4-乙基-4-羟基-7,8-二氢-1H-吡喃O[3,4-F]吲哚嗪-3,6,10(4H)-酮(8.57g，32.6mmol)和对甲苯磺酸一水合物(2.53g，13.3mmol)溶于272mL甲苯和27mL DMF的溶剂中，130℃回流分水反应10h。反应完成后，恢复室温，加MTBE和正庚烷，过滤得到粗品，并真空干燥，得到QSC-7 15.36g，收率120.4%。LC-MS(ESI^+)：482.2$[M+H]^+$。

[0335] QSC-200的合成：称取QSC-7粗品(15.36g)置于反应瓶中，加入150mL纯化水和75mL甲磺酸溶解，110℃搅拌反应5h。反应完成后，趁热过滤得母液，向母液中加入750mL无水乙醇，过滤并真空干燥得到粗品5.4g；将粗品中加入81mL纯化水和81mL甲磺酸溶解，缓慢滴加324mL无水乙醇析晶，过滤并真空干燥得到QS C-200 4.46g，产率30.9%。LC-MS(ESI+)：439.2$[M+H]^+$。

[0336] 实施例2化合物dDxd、d1Dxd的合成

[0337] 1.化合物dDxd的合成

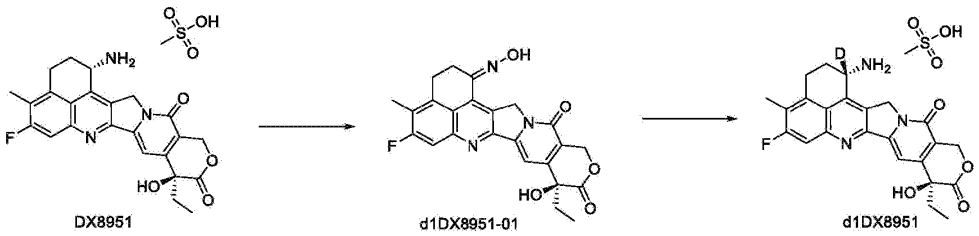
[0338] 

QSC-200 dDxd

[0339] 将QSC-200(43.9mg，0.1mmol)、羟乙酸(15.1mg，0.2mmol)、HATU(76.1mg，0.2mmol)溶于2ml DMF中，加入DIPEA(49.7μL，0.3mmol)，室温搅拌3h，制备液相分离纯化，冻干，得dDxd 25.9mg，收率52.1%。LC-MS(ESI+)：498.5[M+H]$^+$。

[0340] 2.化合物d1Dxd的合成

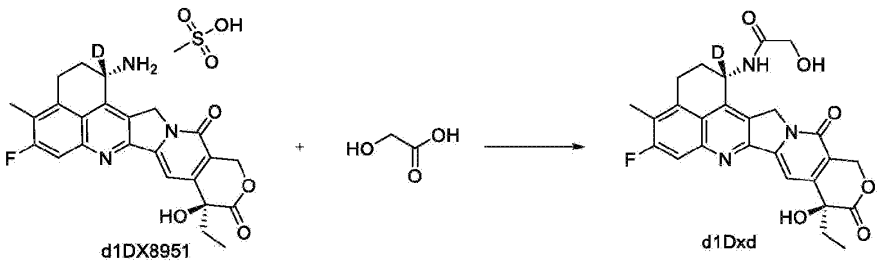
[0341] 1)化合物d1DX8951的合成

[0342] 

[0343] 化合物DX8951(5g，9.4mmol)中加入乙醇50mL和水40mL搅拌，依次加入三乙胺(1.9g，18.8mmol)、二水合钨酸钠(3.4g，10.3mmol)，滴加25mL过氧化氢，50℃搅拌8h。体系加入100mL纯化水，搅拌1h后过滤，滤饼用250mL N,N-二甲基甲酰胺打浆4h，过滤得到目标化合物d1DX8951-01 3.1g，收率73%。LC-MS(ESI+)450.15[M+H]$^+$。

[0344] 化合物d1DX8951-01(2.0g，4.4mmol)、甲磺酸(856mg，8.8mmol)、100mg 5%钯碳(1mg，0.005mmol)用60mL四氢呋喃和30mL氧化氘搅拌分散，通用氘气，反应4h。旋蒸除去四氢呋喃，加入30mL甲磺酸溶解残留物，加入300mL乙醇析晶，过滤得到目标化合物d1DX8951 1.1g，收率46%。LC-MS(ESI+)437.18[M+H]$^+$。

[0345] 2)化合物d1Dxd的合成

[0346] 

[0347] 将d1DX8951(53.2mg，0.1mmol)、羟乙酸(15.0mg，0.2mmol)、HATU(76.0mg，0.2mmol)溶于2mL DMF中，加入DIPEA(N,N−Diisopropylethylamine)(50.1μL，0.3mmol)，室温搅拌3h，制备液相分离纯化，冻干，得目标化合物d1Dxd 27.3mg，收率57.2%。LC−MS(ESI+)495.5$[M+H]^+$。

[0348] 实施例3消除半衰期及AUC分析

[0349] 1.体外肝微粒体半衰期评价

[0350] 不同种属孵育混合液:PBS(pH＝7.4)，不同种属肝微粒体蛋白(终浓度为0.5mg/mL)，化合物(终浓度为0.5μg/mL)。分别取180μL的孵育液，在37℃恒温水浴箱中预孵育5min，然后加入20μL NADPH(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)(终浓度1mM)启动反应，分别在反应0、5、10、20、30、60min后加入0.8mL冰冷乙腈终止反应。孵育体系中有机溶剂的含量要控制在1%以内。

[0351] 实验选用食蟹猴、人的肝微粒体对Dxd和dDxd进行体外温孵，采用高效液相色谱法对Dxd和dDxd的剩余量进行测定，将受试物在0min浓度作为100%，各时间点的受试物浓度与0min浓度相比得到剩余百分数。各时间点的受试物剩余百分数的自然对数与孵育时间经线性回归，求得斜率(k)，由公式求得各种属肝微粒体中的消除半衰期$T_{1/2}$。

表2.Dxd与dDxd在体外肝微粒体半衰期数据

化合物	物种	$T_{1/2}$(h)
Dxd	食蟹猴	2.51
	人	7.70
dDxd	食蟹猴	1.89
	人	7.22

[0352] dDxd与Dxd在肝微粒体中的代谢稳定性评估的数据如表2所示，在食蟹猴、人体外肝微粒体蛋白中，dDxd的半衰期均短于Dxd，说明dDxd在肝脏中代谢更快，具有更好的安全性。

[0353] 2.体内消除半衰期及AUC(Area Under Curve)分析

[0354] 取检疫合格SD大鼠，每组6只，雌雄各半。实施例中化合物给药当天配制，溶媒为5%二甲基亚砜(DMSO)+10%聚氧乙烯蓖麻油(solutol)+85%生理盐水(salin

e)。给药前称重，根据体重，计算给药量，给药剂量为1mg/kg，给药体积5mL/kg，通过静脉注射给药。大鼠给药前，给药后0.083、0.25、0.5、1、2、4、6、8、12和24小时，经颈静脉采血，每个样品采集约0.2mL，肝素钠抗凝，采集后放置冰上，并于1小时之内离心分离血浆(离心条件：6800g，6分钟，2-8℃)。血浆样品40μL加入160μL乙腈沉淀，混合后3500×g离心5～20分钟，取处理后上清溶液100μL进行LC/MS/MS分析待测化合物的浓度。通过不同时间点的血药浓度数据，运用Phoenix WinNonlin7.0计算药代动力学参数，提供AUC_{0-t}、和$T_{1/2}$及其平均值和标准差。

[0355] dDxd与Dxd在大鼠体内的药代动力学试验数据如表3所示，dDxd与Dxd相比具有更短的半衰期；Dxd的AUC_{0-24h}为174.99±87.65h*ng/mL，dDxd的AUC_{0-24h}为90.84±12.23h*ng/mL，dDxd有更低的体内暴露量，具有更好的安全性。

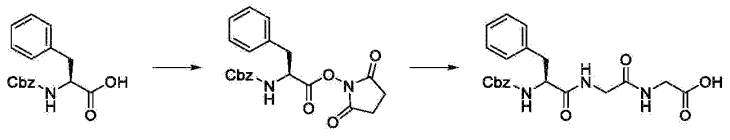
表3.Dxd与dDxd在大鼠体内消除半衰期及AUC数据

化合物	$T_{1/2}$(h)	AUC_{0-24h}(h*ng/mL)
Dxd	0.46±0.03	174.99±87.65
dDxd	0.39±0.06	90.84±12.23

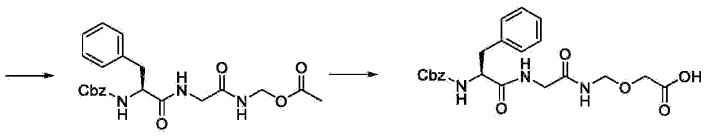
[0356] 通过对d1Dxd化合物的性能检测，试验结果显示，d1Dxd化合物具有令人惊讶的高代谢稳定性、良好的药代动力学特性，高细胞毒性和良好的安全性。

[0357] 连接子-载荷化合物的制备

[0358] 实施例4化合物INT-1的合成



INT-1-1 INT-1-2



INT-1-3 INT-1

[0359] 称N-苄氧羰基-L-苯丙氨酸(150g，0.50mol)、N-羟基丁二酰亚胺(69.21g，0.60mol)，用750mL四氢呋喃溶解，反应液降温至0℃，称取DCC(N,N’-Dicyclo

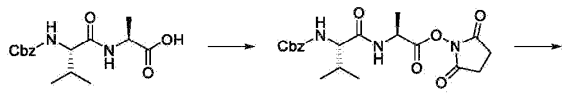
hexylcarbodiimide)(124.08g，0.60mol)，用310mL四氢呋喃超声溶清，控温0～5℃滴加DCC的THF溶液。室温反应4h。体系降温至5℃，过滤，滤饼用少量四氢呋喃淋洗，滤液用EtOH置换两次，打浆过夜，过滤得185.42g INT-1-1，收率93%。LC-MS(ESI+)397.27$[M+H]^+$。

[0360] 化合物INT-1-1(185.42g，0.47mol)用1390mL四氢呋喃溶解，称取双甘肽(92.70g，0.70mol)，碳酸氢钠(47.16g，0.56mol)，用705mL水超声溶清，室温滴加双甘肽的碳酸氢钠水溶液。室温下反应2h。反应液调酸至PH≤2，用DCM萃取三次，1N HCl洗涤一次，干燥。过滤，用DCM淋洗，滤液旋干至发泡固体，加入EA:Hep.(1-pyridin-2-yl-ethanol)＝2:1的体系打浆过夜。过滤，用EA，Hep.分别淋洗三次，滤饼烘干，得到目标化合物INT-1-2 162.02g,收率93.78%。LC-MS(ESI+)414.34$[M+H]^+$。

[0361] 化合物INT-1-2(20.00g，48.38mmol)用240mL四氢呋喃溶解，室温加入四乙酸铅(27.05g，128.68mmol)。室温下反应过夜。过滤，滤饼用少量四氢呋喃淋洗，母液旋干，过柱，得到目标化合物INT-1-3 14.55g,收率70.36%。LC-MS(ESI+)450.34$[M+Na]^+$。

[0362] 化合物INT-1-3(14.00g，32.7mmol)用280mL DCM溶解，室温加入对甲苯磺酸吡啶盐(PPTS)(1.62g，0.033mmol)，羟基乙酸(3.73g，49mmol)回流下反应过夜。过滤，滤饼用少量二氯甲烷淋洗，过柱，得到目标化合物INT-1 8.75g，收率60.25%。LC-MS(ESI+)444.34$[M+H]^+$。

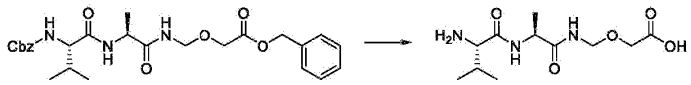
[0363] 实施例5化合物INT-2的合成



INT-2-1



INT-2-2 INT-2-3



INT-2-4 INT-2

[0364] 称苄氧羰基-L-缬氨酰-L-丙氨酸(160g，500mmol)、N-羟基丁二酰亚胺(85.71g，750mol)用2000mL二氯甲烷溶解，降温至0℃，控温0-10℃，加入2,4,6-Collidine(180.64g，1490mmol)，保温搅拌1h。控温0-10℃，加入TFAA(156.54g，750mmol)的300mL二氯甲烷溶液，保温搅拌3h。过滤，得INT-2-1 199g，收率95.0%。LC-MS(ESI+)420.4[M+H]$^+$。

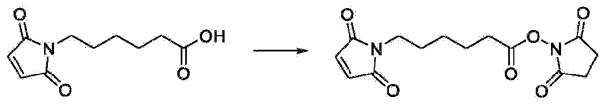
[0365] 化合物INT-2-1(199g，470mmol)溶解于四氢呋喃1600mL，加入甘氨酸(42.74g，570mmol)的5%碳酸氢钠(1000mL)水溶液，加入DME(1,2-Dimethoxyethane)400mL。40℃反应5h，反应液加入2N盐酸350mL，加入二氯甲烷2L萃取，收集有机相旋干得到目标化合物INT-2-2 150.0g，收率84.0%。LC-MS(ESI+)380.3[M+H]$^+$。

[0366] 化合物INT-2-2(20.0g，52.71mmol)，用800mL四氢呋喃溶解，加入5mL冰乙酸，快速搅拌下加入四乙酸铅(35.0g，118.13mmol)，室温下搅拌3h。反应液离心，将上清液浓缩后，加入600mL二氯甲烷，用1N盐酸洗涤2次，每次100mL。饱和食盐水100mL洗涤1次。无水硫酸钠干燥1h，过滤，滤液浓缩，得白色固体化合物INT-2-3 14.3g，收率68.9%。LC-MS(ESI+)395.3[M+H]$^+$。

[0367] 化合物INT-2-3(7.0g，17.8mmol)，用200mL二氯甲烷溶解，加入乙醇酸苄酯(29.57g，178mmol)、PPTS(0.45g，0.18mmol)，回流下搅拌过夜。反应液浓缩，得淡黄色油状物INT-2-4 7.1g，收率80.2%。LC-MS(ESI+)500.3[M+H]$^+$。

[0368] 化合物INT-2-4(7.1g，14.2mmol)，用150mL甲醇溶解，加入10%钯碳(2.5g，0.35w)，氢气球。室温下搅拌3h。反应液加水70mL，过滤，滤液浓缩，得白色固体化合物INT-2 3.7g，收率95.3%。LC-MS(ESI+)276.1[M+H]$^+$。

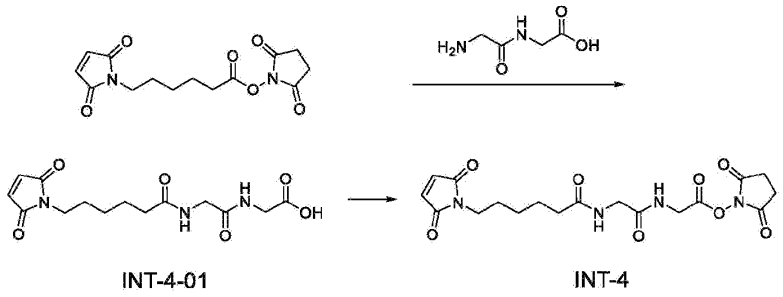
[0369] 实施例6化合物INT-3的合成



INT-3

[0370] 马来酰亚胺已酸(2112.1mg，10mmol)、N-羟基丁二酰亚胺(1.38g，12mmol)，用50mL四氢呋喃溶解，反应液降温至0℃，称取DCC(2.48g，12mmol)，用40mL四氢呋喃超声溶清，控温0～5℃滴加DCC的THF溶液。室温反应4h。体系降温至5℃，过滤，滤饼用少量四氢呋喃淋洗，滤液用EtOH置换两次，打浆过夜，过滤得2.86g INT-3，收率93%。LC-MS(ESI+)331.3[M+Na]$^+$。

[0371] 实施例7化合物INT-4的合成

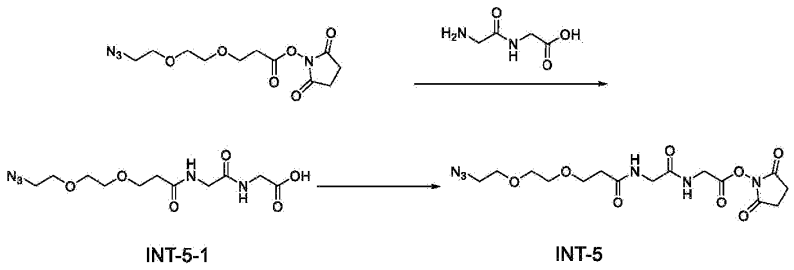


INT-4-01 INT-4

[0372] 称INT-3(616.3mg，2.00mmol)、双甘肽(264.2mg，2.00mmol)，用10mL二氯甲烷溶解，加入TEA(415.9μl，3.00mmol)，室温搅拌3h。反应液减压浓缩，固体粗品制备液相纯化得572.2mg INT-4-01，收率88%。LC-MS(ESI+)326.1[M+H]$^+$。

[0373] 化合物INT-4-01(572.2mg，1.75mmol)用10mL四氢呋喃溶解，室温加入N-羟基丁二酰亚胺(402.2mg，3.50mmol)和DCC(722.1mg，3.50mmol)。室温下反应过夜。体系降温至5℃，过滤，滤饼用少量四氢呋喃淋洗，母液旋干，乙醇打浆，得到目标化合物INT-4粗品。LC-MS(ESI+)423.2[M+H]$^+$。

[0374] 实施例8化合物INT-5的合成

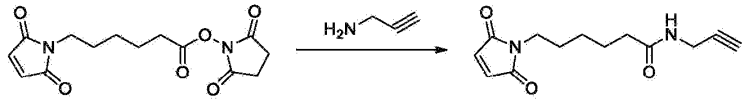


INT-5-1 INT-5

[0375] N3−PEG2−NHS(10g，33mmol)溶解于四氢呋喃100mL，加入甘氨酰甘氨酸(5.28g，40mmol)的5％碳酸氢钠(100mL)水溶液，加入DME 40mL。40℃反应5h，反应液加入2N盐酸35mL，加入二氯甲烷200mL萃取，收集有机相旋干得到目标化合物INT−5−1 9.3g，收率88.0％。LC−MS(ESI+)318.3[M+H]$^+$。

[0376] INT−5−1(9g，28.4mmol)、N−羟基丁二酰亚胺(3.59g，31.2mmol)，用80mL四氢呋喃溶解，反应液降温至0℃，称取DCC(6.43g，31.2mmol)，用20mL四氢呋喃超声溶清，控温0～5℃滴加DCC的THF溶液。室温反应4h。体系降温至5℃，过滤，滤饼用少量四氢呋喃淋洗，滤液用EtOH置换两次，打浆过夜，过滤得10.58g INT−5，收率90％。LC−MS(ESI+)415.2[M+H]$^+$。

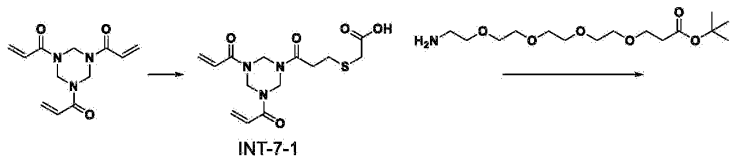
[0377] 实施例9化合物INT−6的合成



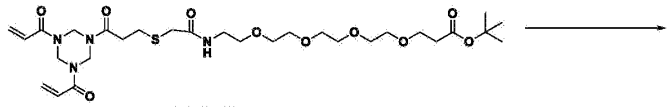
INT-3 INT-6

[0378] INT−3(380.3mg，1.0mmol)用5mL二氯甲烷溶解，室温加入炔丙胺(55.1mg，1.0mmol)和N,N−二异丙基乙胺(66.1mg，1.2mmol)。室温搅拌过夜。体系减压旋干，经制备液相纯化，得到目标化合物INT−6 181.8mg粗品。收率73.2％。LC−MS(ESI+)249.3[M+H]$^+$。

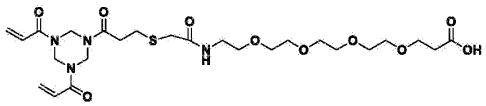
[0379] 实施例10化合物INT−7的合成



INT-7-1



INT-7-2



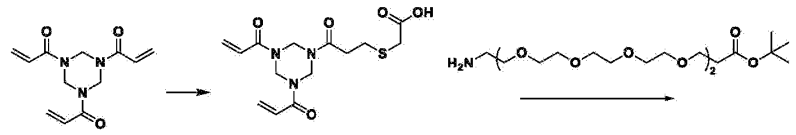
INT-7

[0380] 称1,3,5-三丙烯酰基六氢-1,3,5-三嗪(25g，100mmol)溶解于500mL二氯甲烷中，加入TEA(4159μl，30mmol)，巯基乙酸(2.8g，30mmol)室温搅拌3h。反应液减压浓缩，固体粗品过快速制备纯化得3.1g INT-7-1，收率30%。LC-MS(ESI+)342.1[M+H]$^+$。

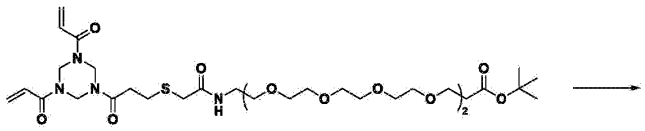
[0381] 化合物INT-7-1(1000mg，2.86mmol)用10mL DMF溶解，室温加为2-(7-氮杂苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯(HATU)(1100mg，2.89mmol)，氨基-PEG4叔丁酯(919mg，2.86mmol)，室温搅拌下滴加N,N-二异丙基乙胺(DIPEA)(370mg，2.86mmol)。室温反应2h。反应液旋干，柱层析，洗脱剂DCM/MeOH＝30:1，得到目标化合物INT-7-2 1.04g，收率56.6%。LC-MS(ESI+)645[M+H]$^+$。

[0382] 称取化合物INT-7-2(1000mg，1.55mmol)加入DCM 20mL，搅拌下加入三氟乙酸4mL。室温搅拌过夜，反应液旋干，再加入20mL DCM溶解。用水洗涤三次，每次5mL。再用饱和食盐水5mL洗涤一次。有机相旋干得淡黄色油状物目标化合物0.91g INT-7，收率100%，LC-MS(ESI+)589[M+H]$^+$。

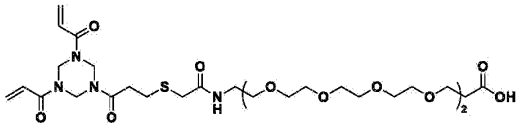
[0383] 实施例11化合物INT-8的合成



INT-8-1



INT-8-2



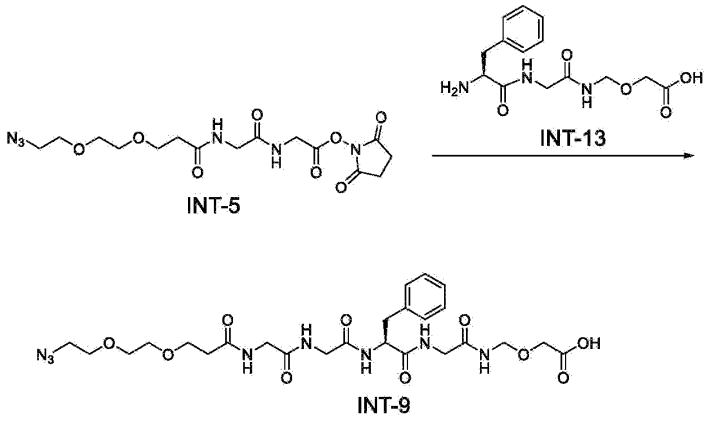
INT-8

[0384] 称1,3,5-三丙烯酰基六氢-1,3,5-三嗪(16g，64mmol)溶解于320mL二氯甲烷中，加入TEA(2662μl，19mmol)，巯基乙酸(1.8g，19mmol)室温搅拌3h。反应液减压浓缩，固体粗品过快速制备纯化得2.1g INT-8-1，收率30%。LC-MS(ESI+)342.1[M+H]$^+$。

[0385] 化合物INT-8-1(2g，5.86mmol)用40mL DCM溶解，室温加为2-(7-氮杂苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯(HATU)(2.67g，7.03mmol)，氨基-PEG4叔丁酯(3.21g，6.44mmol)，室温搅拌下滴加DIPEA(N,N-Diisopropylethylamine)(908.6mg，7.03mmol)。室温反应2h。反应液旋干，柱层析，洗脱剂DCM/MeOH＝80:1，得到目标化合物INT-7-2 900mg，收率49.5%。LC-MS(ESI+)822[M+H]$^+$。

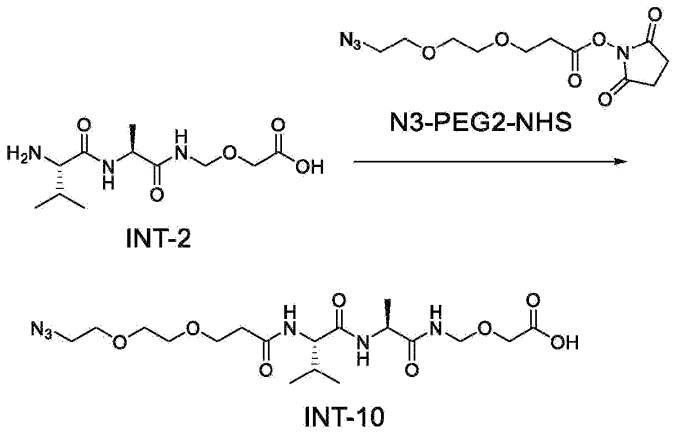
[0386] 称取化合物INT-8-2(900mg，1.10mmol)加入DCM 8mL，搅拌下加入三氟乙酸2mL。室温搅拌过夜，反应液旋干，再加入20mL DCM溶解。用水洗涤三次，每次5mL。再用饱和食盐水5mL洗涤一次。有机相旋干得淡黄色油状物目标化合物750mg INT-7，收率100%，LC-MS(ESI+)764[M+H]$^+$。

[0387] 实施例12化合物INT-9的合成



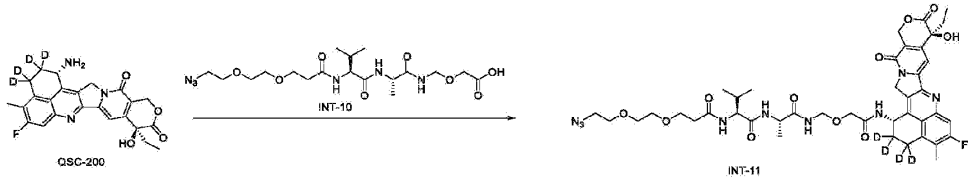
[0388] INT-5(7.7g，18.6mmol)溶解于DMF 70mL，加入INT-13(6.9g，22.3mmol)，加入DIPEA(4.8g，37.2mmol)。室温反应5h，使用flash快速色谱法进行浓缩纯化，冻干得INT-9 9.3g，收率84.5%。LC-MS(ESI+)609.6[M+H]$^+$。

[0389] 实施例13化合物INT-10的合成



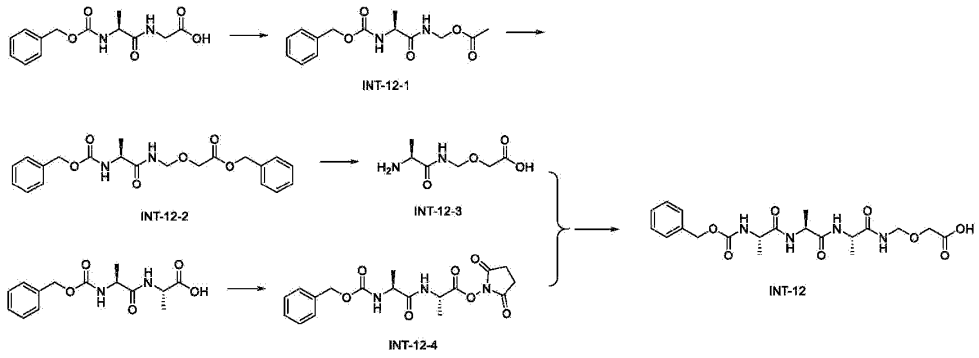
[0390] INT-2(1g，3.6mmol)、N3-PEG2-NHS(1.2g，4.0mmol)，用10mL DMF，加入DIPEA(0.56g，4.4mmol)室温反应24h。浓缩flash纯化，冻干得INT-10 1.28g，收率80%。LC-MS(ESI+)461.2[M+H]$^+$。

[0391] 实施例14化合物INT-11的合成



[0392] 称取INT-10(594mg，1.29mmol)，QSC-200(515mg，1.17mmol)和HATU(535 mg，1.41mmol)置于反应瓶中，室温下加入DMF，搅拌均匀，滴加DIPEA(454m g，3.51mmol)。反应2h，停止反应，反相制备纯化。得INT-11，收率73%。LC -MS(ESI+)：882.3$[M+H]^+$。

[0393] 实施例15化合物INT-12的合成



[0394] 称苄氧羰基-L-丙氨酸(30g，110mmol)，用900mL四氢呋喃溶解，加入9mL冰乙酸，快速搅拌下加入四乙酸铅(104.0g，240mmol)，40℃下搅拌4h。过滤，滤液浓缩，得类白色固体化合物INT-12-1 27.72g，收率88.1%。LC-MS(ESI+)29 5.3$[M+H]^+$。

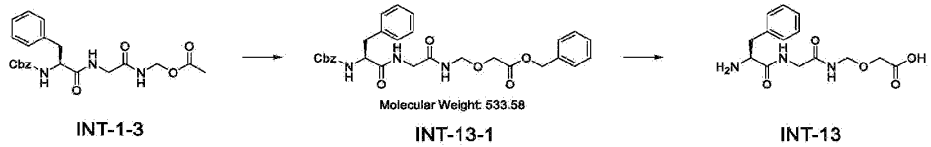
[0395] 化合物INT-12-1(12g，40.8mmol)，用120mL二氯甲烷溶解，加入乙醇酸卞脂(67.7g，408mmol)、PPTS(Pyridinium p-Toluenesulfonate)(1.02g，4.08mmol)，回流下搅拌过夜。反应液浓缩，得淡黄色油状物INT-12-2 13.8g，收率85.2%。L C-MS(ESI+)401.5$[M+H]^+$。

[0396] 化合物INT-12-2(10g，25mmol)，用300mL甲醇溶解，加入10%钯碳(3.5g，0.3 5w)，氢气。室温下搅拌3h。反应液加水100mL，过滤，滤液浓缩，得白色固体化合物INT-12-3 3.5g，收率80.1%。LC-MS(ESI+)177.2$[M+H]^+$。

[0397] 称苄氧羰基-L-丙氨酰丙氨酸(10g，34.0mmol)、N-羟基丁二酰亚胺(4.3g，37.3 mmol)用60mL四氢呋喃溶解，降温至0℃，控温0-10℃，加入DCC(7.71g，37.4m mol)的四氢呋喃溶液20mL，室温搅拌3h。过滤，滤液浓缩后乙醇打浆，过滤得I NT-12-4 12.1g，收率91.0%。LC-MS(ESI+)392.4$[M+H]^+$。

[0398] 化合物INT-12-4(4.00g，10.2mmol)和化合物INT-12-3(1.98g，11.2mmol)、用40mL DMF溶解，加入DIPEA(1.32g，10.23mmol)室温反应24h。浓缩flash纯化，冻干得INT-12 2.8g，收率61%。LC-MS(ESI+)453.2[M+H]$^+$。

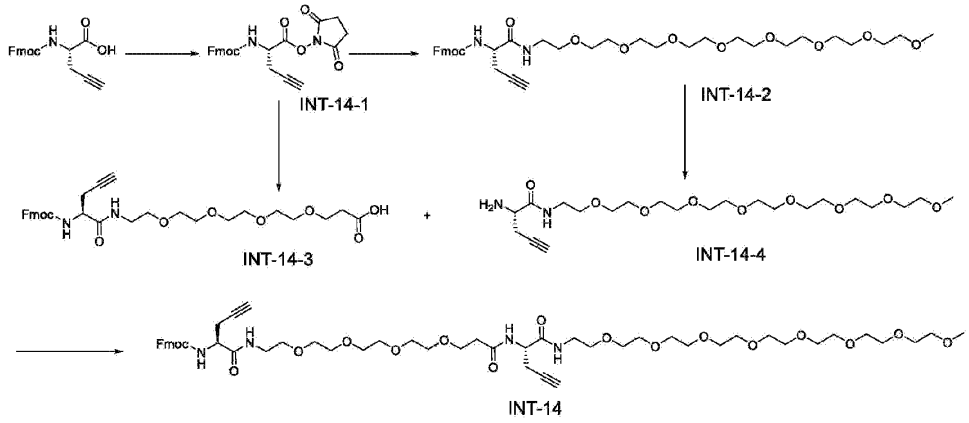
[0399] 实施例16化合物INT-13的合成



[0400] 化合物INT-1-3(14.00g，32.7mmol)用280mL DCM溶解，室温加入PPTS(1.62g，0.033mmol)，乙醇酸苯甲酯(5.69g，49mmol)回流下反应过夜。过滤，滤饼用少量二氯甲烷淋洗，过柱，得到目标化合物INT-13-1 13.65g，收率78.31%。LC-MS(ESI+)534.22[M+H]$^+$。

[0401] 将INT-13-1(13.00，24.4mmol)，钯/碳(2.60g，20%)，用130mL四氢呋喃溶解，氢气条件下室温搅拌2.0h。反应完成后，过滤除去钯/碳，用甲醇淋洗滤饼，滤液旋干得到目标化合物INT-13 6.19g,收率82.15%。LC-MS(ESI+)332.32[M+Na]$^+$。

[0402] 实施例17化合物INT-14的合成



[0403] Fmoc-L-炔丙基甘氨酸(503mg，1.5mmol)用10mL四氢呋喃溶解，室温加入NHS(N-Hydroxy succinimide)(190mg，1.65mmol)和DCC(340mg，1.65mmol)，室温搅拌过夜。体系过滤，滤饼用1mL四氢呋喃洗三次，母液减压旋干，得到目标化合物INT-14-1 940mg粗品。LC-MS(ESI+)455.5[M+Na]$^+$。

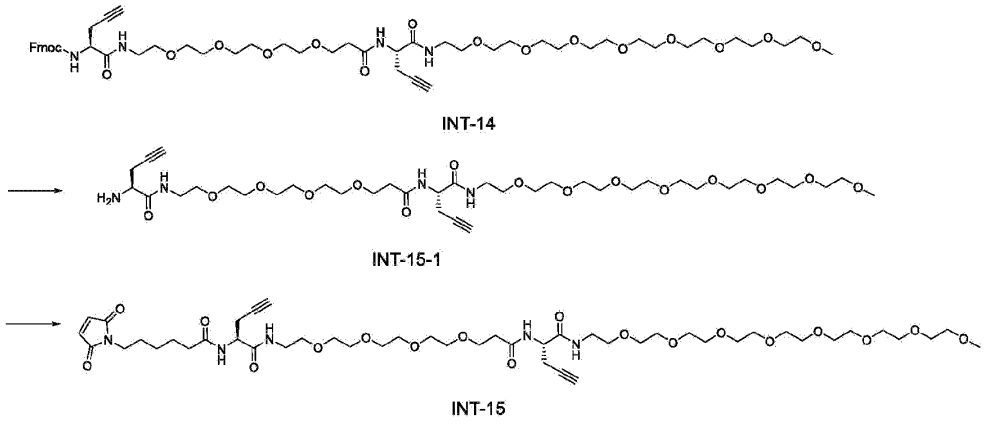
[0404] 化合物INT-14-1粗品(470mg，0.75mmol)用8mL二氯甲烷溶解，室温加入mPEG$_8$-NH$_2$(288mg，0.75mmol)和N,N-二异丙基乙胺(96mg，0.75mmol)。室温搅拌过夜。体系减压旋干，经制备液相纯化，得到目标化合物INT-14-2 368mg粗品。收率70%。LC-MS(ESI+)702.1[M+H]$^+$。

[0405] 化合物INT-14-1粗品(470mg，0.75mmol)用8mL二氯甲烷溶解，室温加入NH$_2$-PEG$_4$-COOH(200mg，0.75mmol)和N,N-二异丙基乙胺(96mg，0.75mmol)。室温搅拌过夜。体系减压旋干，经制备液相纯化，得到目标化合物INT-14-3 247mg粗品。收率56%。LC-MS(ESI+)584.3[M+H]$^+$。

[0406] 化合物INT-14-2(200mg，0.29mmol)用5mL二氯甲烷溶解，室温加入二乙胺(1mL)。室温搅拌过夜。体系减压旋干，再次加入5mL二氯甲烷溶解，再次减压旋干，重复五次。得到目标化合物INT-14-4粗品。LC-MS(ESI+)479.9[M+H]$^+$。

[0407] 化合物INT-14-4粗品用5mL二氯甲烷溶解，室温加入化合物INT-14-3(183mg，0.31mmol)、HOBT(1-Hydroxybenzotriazole)(58mg，0.43mmol)和EDCI(1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride)(82mg，0.43mmol)。室温搅拌过夜。体系减压旋干，经制备液相纯化，得到目标化合物INT-14 167mg。收率56%。LC-MS(ESI+)1044.5[M+H]$^+$。

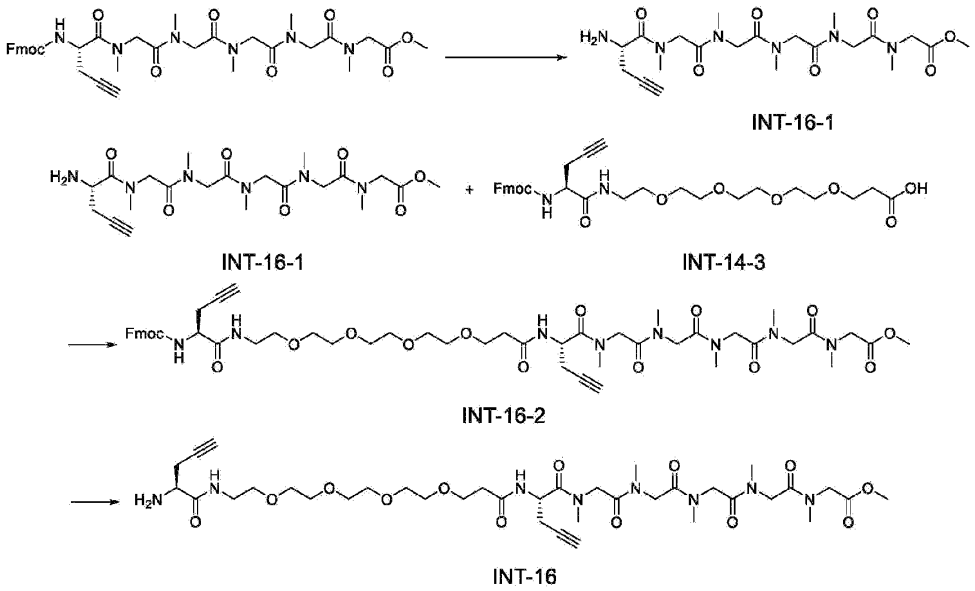
[0408] 实施例18化合物INT-15的合成



[0409] 化合物INT-14(146mg，0.14mmol)用4mL二氯甲烷溶解，室温加入二乙胺(0.4mL)。室温搅拌2h。体系减压旋干。再次加入5mL二氯甲烷溶解，再次减压旋干，重复五次。得到目标化合物INT-15-1粗品。LC-MS(ESI+)820.5[M+H]$^+$。

[0410] 化合物INT-15-1粗品用2mL N,N-二甲基甲酰胺溶解，室温加入6-(马来酰亚胺基)己酸琥珀酰亚胺酯(65mg，0.21mmol)和N,N-二异丙基乙胺(36mg，0.28mmol)。室温搅拌过夜。体系经制备液相纯化，得到目标化合物INT-15mg。两步收率62%。LC-MS(ESI+)1014.5$[M+H]^+$。

[0411] 实施例19化合物INT-16的合成

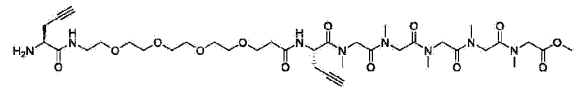


[0412] Fmoc-Pra-5Sar-OMe(705m g，1mmol)用10mL二氯甲烷溶解，室温加入二乙胺(2mL)室温搅拌3h。反应体系旋干溶剂，得到目标化合物INT-16-1粗品，未纯化直接用于下一步。LC-MS(ESI+)483.26$[M+H]^+$。

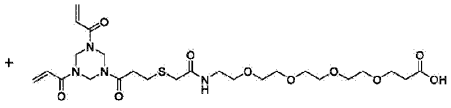
[0413] 化合物INT-14-3(583mg，1mmol)用15mL N,N-二甲基甲酰胺溶解，室温加入N,N-二异丙基乙胺(194mg，1.5mmol)和HATU(456mg，1.2mmol)，室温下搅拌1h。室温加入化合物INT-16-1粗品，室温搅拌过夜。体系经制备液相纯化，得到目标化合物INT-16-2 456mg，收率44%。LC-MS(ESI+)1048.41$[M+H]^+$。

[0414] 化合物INT-16-2(456mg，0.44mmol)用6mL二氯甲烷溶解，室温加入二乙胺(1.2mL)，室温搅拌3h。反应体系旋干溶剂，得到目标化合物INT-16粗品，未纯化直接用于下一步。LC-MS(ESI+)825.64$[M+H]^+$。

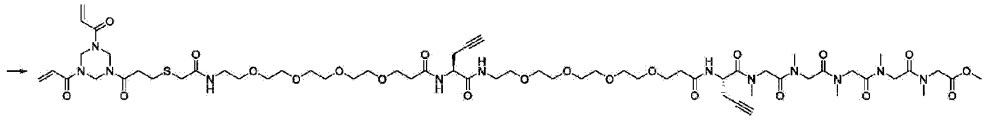
[0415] 实施例20化合物INT-17的合成



INT-16



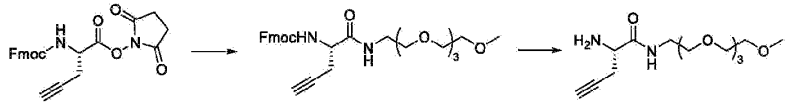
INT-7



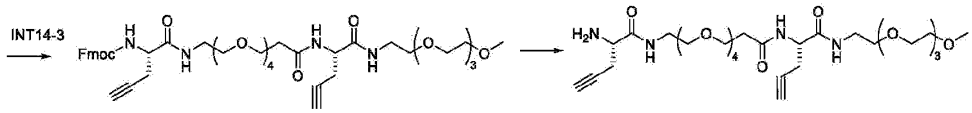
INT-17

[0416] 化合物INT-7(306mg，0.52mmol)用10mL N,N-二甲基甲酰胺溶解，室温加入N,N-二异丙基乙胺(84mg，0.65mmol)和HATU(456mg，0.52mmol)，室温下搅拌1h。室温加入化合物INT-16粗品，室温搅拌过夜。体系经制备液相纯化，得到目标化合物INT-17 200mg，收率33%。LC-MS(ESI+)1048.41[M+H]$^+$。

[0417] 实施例21化合物INT-18的合成



INT-14-1 INT-18-1 INT-18-2



INT-18-3 INT-18

[0418] 称取INT-14-1(300mg，694μmol)置于50mL规格的单口瓶中，加入10mL的二氯甲烷溶解，室温搅拌。称取NH_2-PEG_4-OMe(143.79mg，694μmol)加入到体系中。量取DIPEA 145μL滴加至反应体系中，室温反应过夜。LC-MS监测反应完成后，旋蒸除去溶剂，反向Flash制备系统纯化。得到目标产物INT-18-1 267mg，纯度99.79，产率71.71%。ESI-MS(m/z)：526.24[M+H]$^+$。

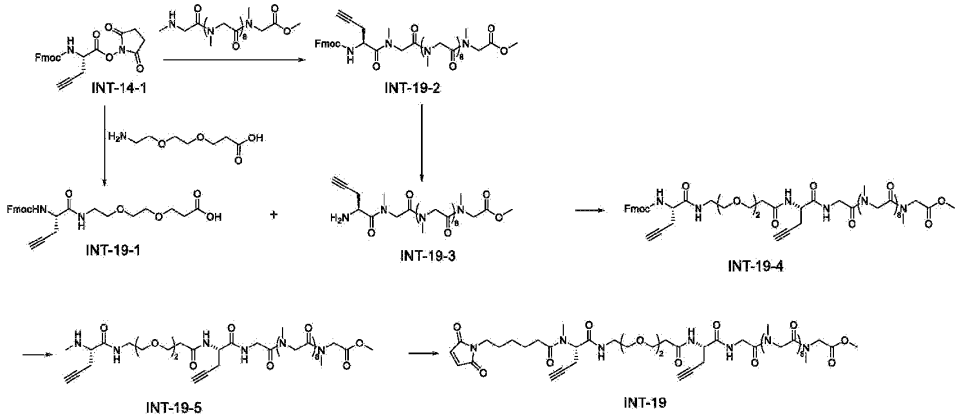
[0419] 称取INT-18-1(267mg，509μmol)置于10mL规格的单口瓶中，加入3mL的二氯甲烷溶解，室温搅拌。量取600μL的二乙胺滴加至体系中，室温反应过夜。LC-

MS监测反应完成后，将反应液旋干，再使用5mL的二氯甲烷溶解，旋干，重复3次。将得到的INT-18-2粗品直接投入下一步。

[0420] 称取INT-14-3(294.82mg，506μmol)置于25mL规格的单口瓶中，加入6mL的二氯甲烷溶解，室温搅拌。称取HATU(288.60mg，759μmol)加入反应体系中。量取DIPEA 177μL滴加至反应体系中，室温搅拌30min。称取INT-18-2(153mg，506μmol)加入反应体系中，室温反应过夜。LC-MS监测反应完成后，旋蒸除去溶剂，反向Flash制备系统纯化。得到目标产物INT-18-3 263.0mg，纯度99%，产率59.95%。LC-MS(ESI+)：868.67$[M+H]^+$。

[0421] 称取INT-18-3(511mg，589.38μmol)置于50mL规格的单口瓶中，加入20mL的二氯甲烷溶解，室温搅拌。量取3mL的二乙胺滴加至体系中，室温反应过夜。LC-MS监测反应完成后，将反应液旋干。再使用20mL的二氯甲烷溶解，旋干，正己烷洗，重复3次，得到的INT-18粗品158mg。LC-MS(ESI+)588.7$[M+H]^+$。

[0422] 实施例22化合物INT-19的合成



[0423] 称取INT-14-1(432.4mg，1.0mmol)、NH_2PEG_2-COOH(177.3mg，1.0mmol)置于25mL规格的单口瓶中，加入10mL的二氯甲烷溶解，滴加DIPEA 50μL室温搅拌过夜。LC-MS监测反应完成后，旋蒸除去溶剂，反向Flash制备系统纯化。得到目标产物INT-19-1 441.5mg，收率89.3%。LC-MS(ESI+)：495.5$[M+H]^+$。

[0424] 称取INT-14-1(432.4mg，1.0mmol)、10-Sar-COOHMe(742.8mg，1.0mmol)置于50mL规格的单口瓶中，加入15mL的二氯甲烷溶解，滴加DIPEA 145μL室温搅

拌过夜。LC-MS监测反应完成后，旋蒸除去溶剂，反向Flash制备系统纯化。得到目标产物INT-19-2 983.7mg，收率92.7%。LC-MS(ESI+)：1061.2$[M+H]^+$。

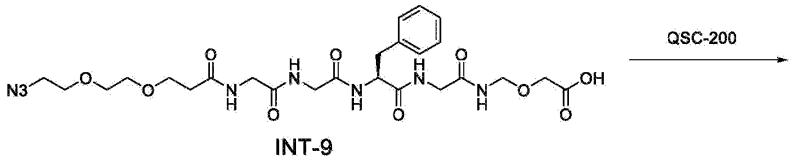
[0425] 称取INT-19-2(503.2mg，0.5mmol)置于25mL规格的单口瓶中，加入5mL的二氯甲烷溶解，室温搅拌。量取1mL的二乙胺滴加至体系中，室温反应过夜。LC-MS监测反应完成后，将反应液旋干。再使用5mL的二氯甲烷溶解，旋干，正己烷洗，重复3次，得INT-19-3粗品707.1mg，收率89.6%。LC-MS(ESI+)852.9$[M+H]^+$。

[0426] 称INT-19-1(247.2mg，0.5mmol)、INT-19-3(425.7mg，0.5mmol)、HATU(288.60mg，759μmol)置于25mL规格的单口瓶中，加入6mL的DMF，177μL DIPEA溶解，室温搅拌。LC-MS监测反应完成后，反向Flash制备纯化。得到目标产物INT-19-4 497.9mg，产率76.6%。LC-MS(ESI+)：1301.4$[M+Na]^+$。

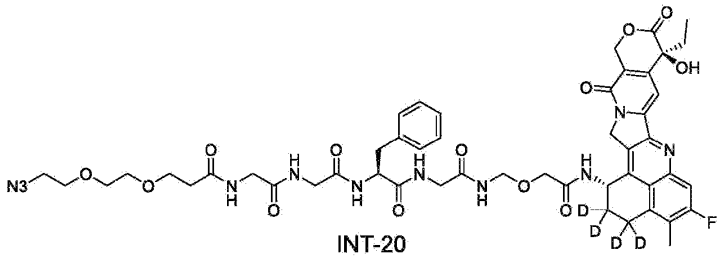
[0427] 称取INT-19-4(497.9mg，0.38mmol)置于25mL规格的单口瓶中，加入8mL的二氯甲烷溶解，室温搅拌。量取1.5mL的二乙胺滴加至体系中，室温反应3h。LC-MS监测反应完成后，将反应液旋干。再使用5mL的二氯甲烷溶解，旋干，正己烷洗，重复3次。得INT-19-5粗品378.9mg，收率91.3%。LC-MS(ESI+)1093.2$[M+H]^+$。

[0428] 称INT-3(95.1mg，0.25mmol)、INT-19-5(189.3mg，0.175mmol)于25mL单口瓶中，加入10mL二氯甲烷，室温搅拌过夜。LC-MS监测反应完成后，反向Flash制备纯化。得到目标产物INT-19165.2mg，产率82.3%。LC-MS(ESI+)1286.4$[M+H]^+$。

[0429] 实施例23化合物INT-20的合成



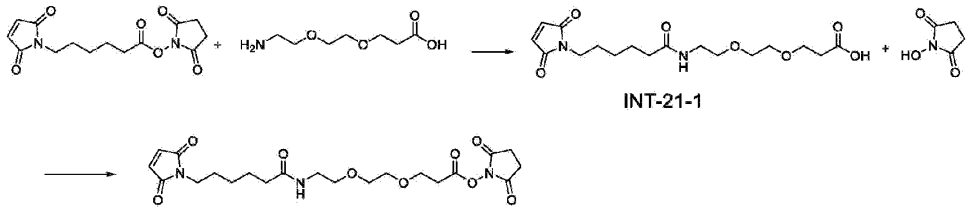
INT-9



INT-20

[0430] 称INT-9(304mg，0.5mmol)、QSC-200(219.2mg，0.5mmol)、HATU(184.9mg，0.6mmol)于25mL单口瓶中，加入10mL DMF、125μL DIPEA，室温搅拌过夜。LC-MS监测反应完成后，制备液相纯化。得到目标产物INT-20 427.9mg，产率83.1%。LC-MS(ESI+)1031.1$[M+H]^+$。

[0431] 实施例24化合物INT-21的合成



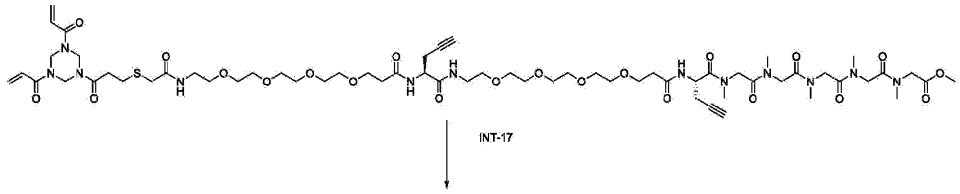
INT-21-1

INT-21

[0432] 化合物INT-3(2.0g，6.49mmol)、3-[2-(2-氨基乙氧基)乙氧基]-丙酸(1.1g，6.49mmol)，溶解于40mL N,N-二甲基甲酰胺中，加入N,N-二异丙基乙胺(1.3g，9.7mmol)，室温搅拌2.0h。反应完成后，经制备液相纯化，得到目标化合物INT-21-1 2.1g，收率88%。LC-MS(ESI+)371.2$[M+H]^+$。

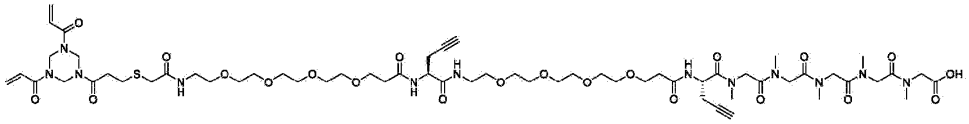
[0433] 将INT-21-1(400mg，1.08mmol)，N-羟基丁二酰亚胺(150mg，1.32mmol)，DCC(268mg，1.3mmol)溶解于10mL四氢呋喃中，室温搅拌4.0h。反应完成后，经滤除不溶性固体，得到目标化合物INT-21 452mg，收率90%。LC-MS(ESI+)468.2$[M+H]^+$。

[0434] 实施例25化合物INT-22的合成



INT-17

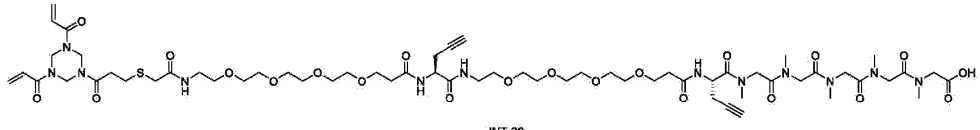
[0435]



INT-22

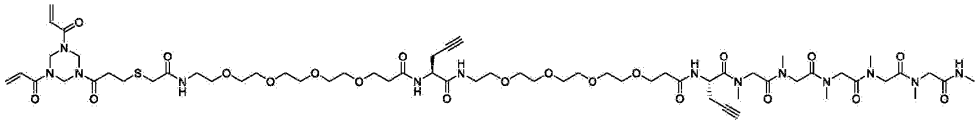
[0436] 称INT-17(500.00mg，0.36mmol)，用10mL乙腈和10mL纯化水搅拌溶清，加入DIPEA，调节PH＝10左右，室温搅拌2h。LC-MS监测反应完成后，反应液减压浓缩，得到目标化合物INT-22481.36mg，收率96.93%。LC-MS(ESI+)1379.6[M-H]$^-$。

[0437] 实施例26化合物INT-23的合成



INT-22

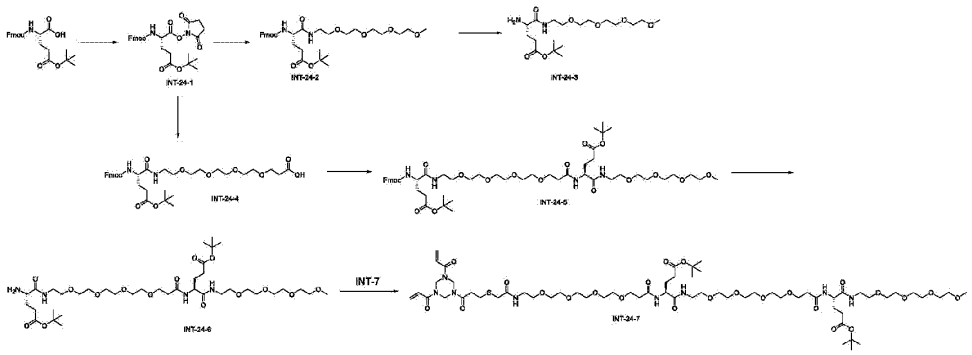
[0438]

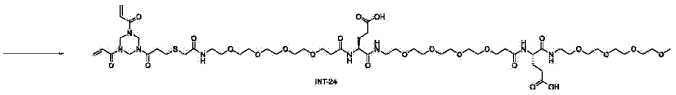


INT-23

[0439] 将INT-22(481.36mg，0.35mmol)，甲氨盐酸盐(28.23mg，0.42mmol)和HATU(198.72mg，0.52mmol)置于反应瓶中，室温下加入5mL DMF，搅拌均匀，滴加DIPEA(112.58mg，0.87mmol)。反应1h，停止反应，反相制备纯化。得INT-23 276.37mg，收率56.88%。LC-MS(ESI+)1394.7[M+H]$^+$。

[0440] 实施例27化合物INT-24的合成



[0441] 

[0442] Fmoc-O-叔丁基-L-谷氨酸(2g，4.7mmol)用40mL四氢呋喃溶解，室温加入N-羟基丁二酰亚胺(594mg，4.17mmol)和DCC(1067mg，5.17mmol)。室温下反应过夜。体系过滤，滤饼用少量四氢呋喃淋洗，母液旋干得到目标化合物INT-24-1粗品，未纯化直接下一步。LC-MS(ESI+)523.2[M+H]$^+$。

[0443] 化合物INT-24-1(110mg，0.21mmol)用3mL二氯甲烷溶解，室温加入TEA(21mg，0.21mmol)和mPEG$_4$-NH$_2$(40mg，0.21mmol)。室温下搅拌过夜。体系旋干溶剂，经制备液相纯化，得到目标化合物INT-24-2 132mg，收率80%。LC-MS(ESI+)615.4[M+H]$^+$。

[0444] 化合物INT-24-2(110mg，0.139mmol)用1mL二氯甲烷溶解，室温加入二乙胺(200μL)，室温搅拌3h。反应体系旋干溶剂，得到目标化合物INT-24-03粗品，未纯化直接用于下一步。LC-MS(ESI+)393.4[M+H]$^+$。

[0445] 化合物INT-24-1(220mg，0.42mmol)用5mL二氯甲烷溶解，室温加入TEA(42mg，0.42mmol)和NH$_2$-PEG$_4$-COOH(111mg，0.42mmol)。室温下搅拌过夜。体系旋干溶剂，经制备液相纯化，得到目标化合物INT-24-4 221mg，收率78%。LC-MS(ESI+)673.4[M+H]$^+$。

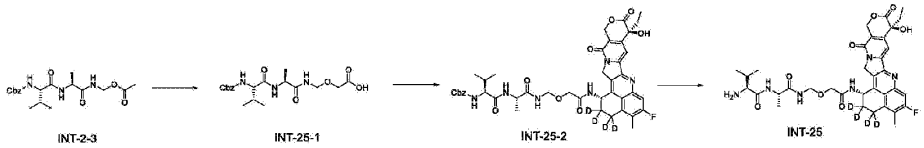
[0446] 化合物INT-24-4(85mg，0.13mmol)用1.5mL DMF溶解，室温加入DIPEA(25mg，0.19mmol)和TSTU(46mg，0.15mmol)。室温下搅拌1h。室温加入化合物INT-24-03粗品，室温搅拌过夜。体系经制备液相纯化，得到目标化合物INT-24-5 72mg，收率53%。LC-MS(ESI+)1047.7[M+H]$^+$。

[0447] 化合物INT-24-5(72mg，0.06mmol)用4mL二氯甲烷溶解，室温加入二乙胺(800μL)。室温下搅拌1h。体系减压旋干，得到目标化合物INT-24-6粗品。LC-MS(ESI+)825.7[M+H]$^+$。

[0448] 化合物INT-24-6粗品用4mL二氯甲烷溶解，室温加入TEA(18mg，0.18mmol)和INT-7(28mg，0.09mmol)、HATU(68.35mg，0.18mmol)。室温下搅拌过夜。体系减压旋干，体系经制备液相纯化，得到目标化合物INT-24-7 27mg，两步收率38%。LC-MS(ESI+)1394.8[M+H]$^+$。

[0449] 化合物INT-24-7(10mg，0.08mmol)用1mL二氯甲烷溶解，室温加入TFA(200μL)。室温搅拌2h。体系减压旋干，得到目标化合物INT-24粗品10mg。LC-MS(ESI+)1283.6[M+H]$^+$。

[0450] 实施例28化合物INT-25的合成

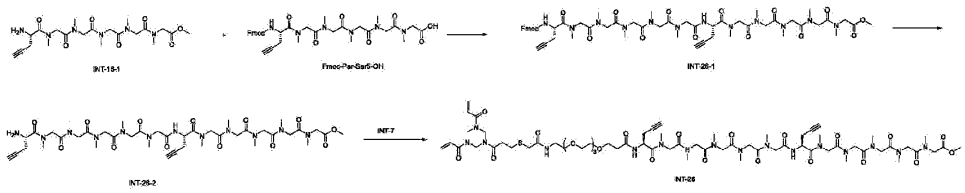


[0451] 化合物INT-2-3(14.00g，32.7mmol)用280mL DCM溶解，室温加入PPTS(1.62g，0.033mmol)，乙醇酸(3.73g，49mmol)回流下反应过夜。过滤，滤饼用少量二氯甲烷淋洗，过柱，得到目标化合物INT-25-1 10.53g，收率78.31%。LC-MS(ESI+)410.2[M+H]$^+$。

[0452] 称INT-25-1(410.3mg，1mmol)、QSC-200(440.5mg，1mmol)、HATU(571.3mg，1.5mmol)于25mL单口瓶中，加入5mL DMF、125μL DIPEA，室温搅拌过夜。LC-MS监测反应完成后，制备液相纯化。得到目标产物INT-25-2 665.3mg，产率80.1%。LC-MS(ESI+)831.4[M+H]$^+$。

[0453] 将INT-25-2(415.0，0.5mmol)，钯/碳(83.2mg，20%)，用10mL四氢呋喃溶解，氢气条件下室温搅拌2.0h。反应完成后，过滤除去钯/碳，用甲醇淋洗滤饼，滤液旋干得到目标化合物INT-25 335mg,收率95%。LC-MS(ESI+)697.3[M+H]$^+$。

[0454] 实施例29化合物INT-26的合成

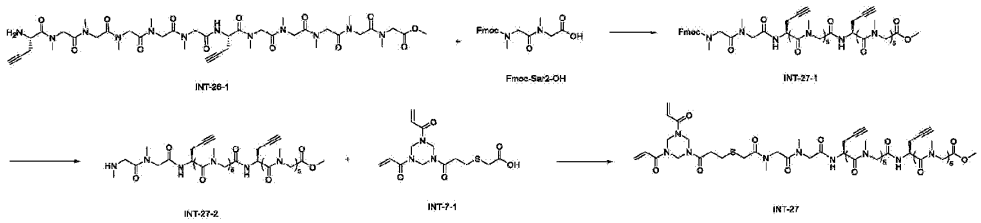


[0455] 称化合物INT-16-1(337mg，0.7mmol)，Fmoc-Pra-Sar5-COOH(483mg，0.7mmol)和HATU(418mg，1.1mmol)，用15mL N,N-二甲基甲酰胺溶解，加入N,N-二异丙基乙胺(108mg，0.84mmol)室温搅拌3h。体系经制备液相纯化，得到目标化合物INT-26-1 380mg，收率58.2%。LC-MS(ESI+)1155.57$[M+H]^+$。

[0456] 化合物INT-26-1(462mg，0.4mmol)用6mL二氯甲烷溶解，室温加入二乙胺(1.2mL)，室温搅拌3h。反应体系旋干溶剂，冻干得到目标化合物INT-26-2粗品370mg，未纯化直接用于下一步。LC-MS(ESI+)933.47$[M+H]^+$。

[0457] 化合物INT-26-2(205mg，0.22mmol)，INT-7(118mg，0.2mmol)和HATU(114mg，0.3mmol)，用5mL N,N-二甲基甲酰胺溶解，加入N,N-二异丙基乙胺(31mg，0.24mmol)室温搅拌3h。体系经制备液相纯化，得到目标化合物INT-26 83mg，收率70.5%。LC-MS(ESI+)1503.7$[M+H]^+$。

[0458] 实施例30化合物INT-27的合成

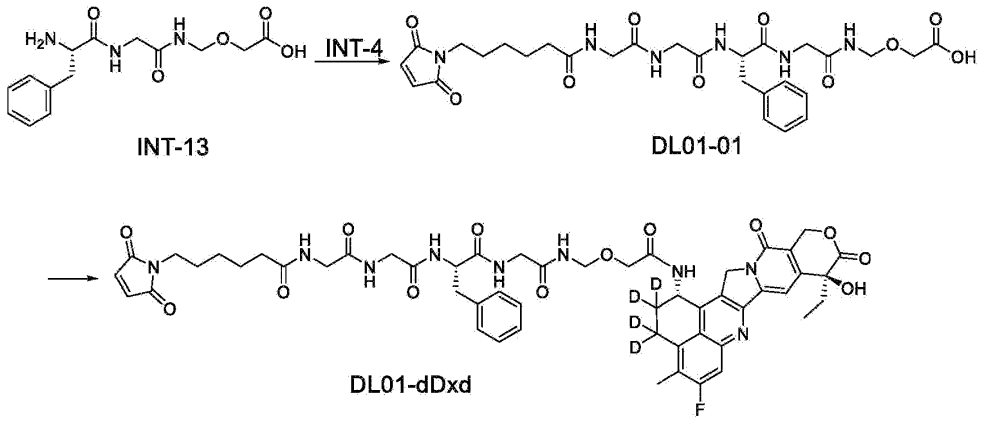


[0459] 称取化合物INT-26-1(160mg，0.17mmol)，Fmoc-Sar2-COOH(61mg，0.16mmol)和HATU(73mg，0.19mmol)加入25mL圆底反应瓶，用6mL N,N-二甲基甲酰胺溶解，加入N,N-二异丙基乙胺(62mg，0.48mmol)室温搅拌3h。体系经制备液相纯化，得到目标化合物INT-27-1 157mg，收率71.2%。LC-MS(ESI+)1298.61$[M+H]^+$。

[0460] 化合物INT-27-1(156mg，0.12mmol)用6mL二氯甲烷溶解，室温加入二乙胺(1.2mL)，室温搅拌3h。反应体系旋干溶剂，冻干得到目标化合物INT-27-2粗品129mg，未纯化直接用于下一步。LC-MS(ESI+)1075.55$[M+H]^+$。

[0461] 称取化合物INT-27-2(117mg，0.11mmol)，INT-7-1(53mg，0.11mmol)和HATU(49mg，0.13mmol)加入25mL圆底反应瓶，用6mL N,N-二甲基甲酰胺溶解，加入N,N-二异丙基乙胺(22mg，0.17mmol)室温搅拌3h。体系经制备液相纯化，得到目标化合物INT-27 65mg，收率40.9%。LC-MS(ESI+)1398.64$[M+H]^+$。

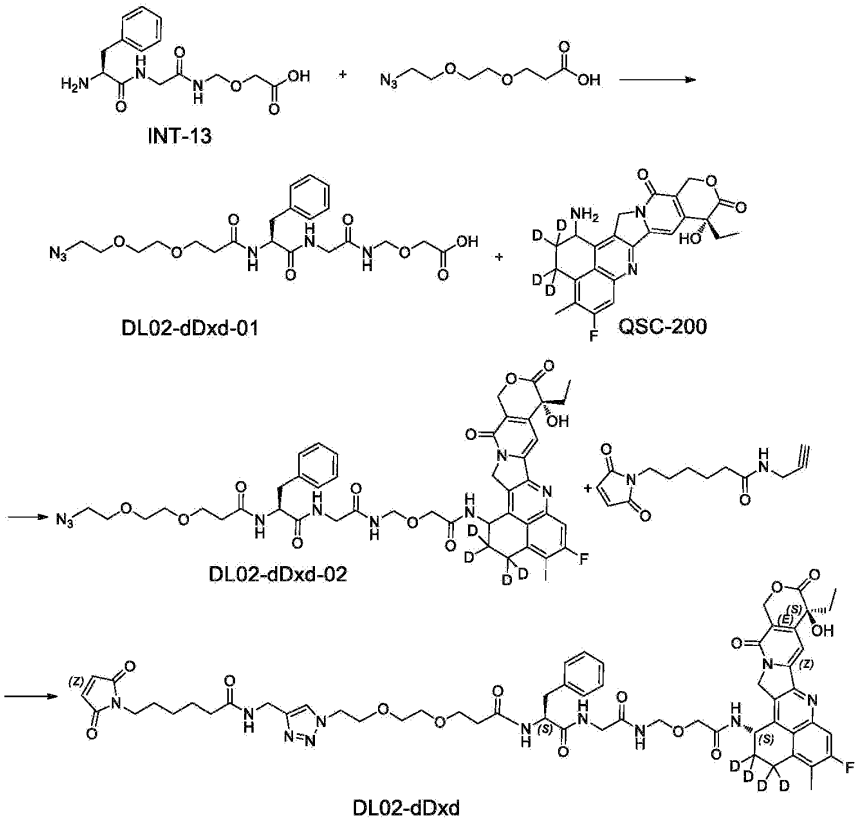
[0462] 实施例31化合物DL01-dDxd的合成



[0463] 中间体INT-13(105mg，0.34mmol)和INT-4(215mg，0.51mmol)用6.5mL N,N-二甲基甲酰胺溶解，室温搅拌2h。体系经制备液相纯化，得到目标化合物DL01-01 186.4mg，收率89.3%。LC-MS(ESI+)615.34$[M+H]^+$。

[0464] 化合物DL01-01(52mg，0.085mmol)用5mL N,N-二甲基甲酰胺溶解，室温加入QSC-200(25mg，0.057mmol)、EDCI(32mg，0.17mmol)和HOBT(23mg，0.17mmol)。室温搅拌2h。体系经制备液相纯化，得到目标化合物DL01-dDxd 19.4mg，收率22%。LC-MS(ESI+)1038.58$[M+H]^+$。

[0465] 实施例32化合物DL02-dDxd的合成



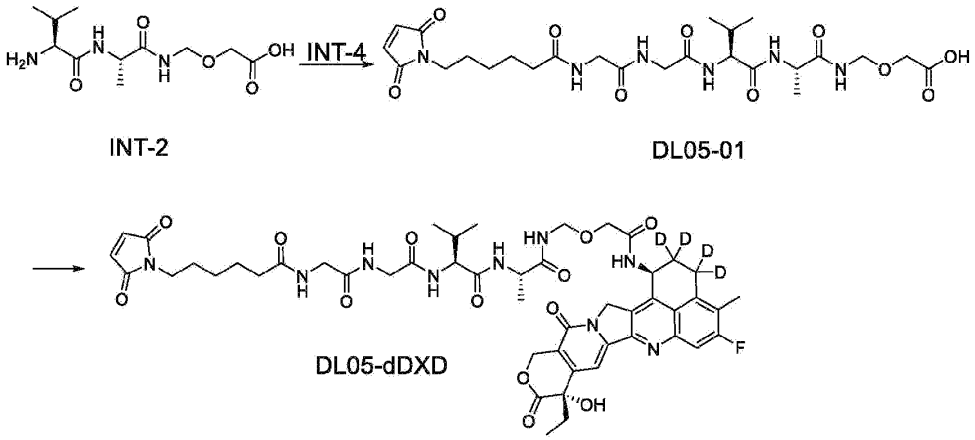
[0466] 将叠氮-乙二醇-乙酸(238mg，1.17mmol),HATU(326mg，0.86mmol)溶解于15 mL N,N-二甲基甲酰胺中，加入N,N-二异丙基乙胺(201mg，1.56mmol)，室温预搅1.0h。再加入INT-13(240mg，0.78mmol)至反应液中，反应2.0h。反应完成后，经制备液相纯化，得到目标化合物DL02-dDxd-0193.9mg，收率24%。LC-MS(ESI+)495.4$[M+H]^+$。

[0467] 将DL02-dDxd-01(25mg，0.051mmol),HATU(19mg，0.051mmol)，QSC-200(15 mg，0.034mmol)溶解于15mL N,N-二甲基甲酰胺中，加入N,N-二异丙基乙胺(8.8mg，0.068mmol)，室温搅拌2.0h。反应完成后，经制备液相纯化，得到目标化合物DL02-dDxd-02 6.3mg，收率14%。LC-MS(ESI+)916.8$[M+H]^+$。

[0468] 化合物DL02-dDxd-02(6.3mg，0.0069mmol)用1mL丙酮溶解，室温加入INT-6(2.5mg,0.01mmol)，五水硫酸铜(2.5mg，0.01mmol)，氮气保护下转至低温槽10℃搅拌，称取维生素C钠(2.0mg，0.01mmol)溶解在1mL水中，逐滴加入至上述反应

液中，10℃下搅拌1h。用1mL乙腈淬灭反应。经制备液相纯化，得到目标化合物DL02-dDxd 5.2mg,收率为65%。LC-MS(ESI+)1164.8[M+H]$^+$。

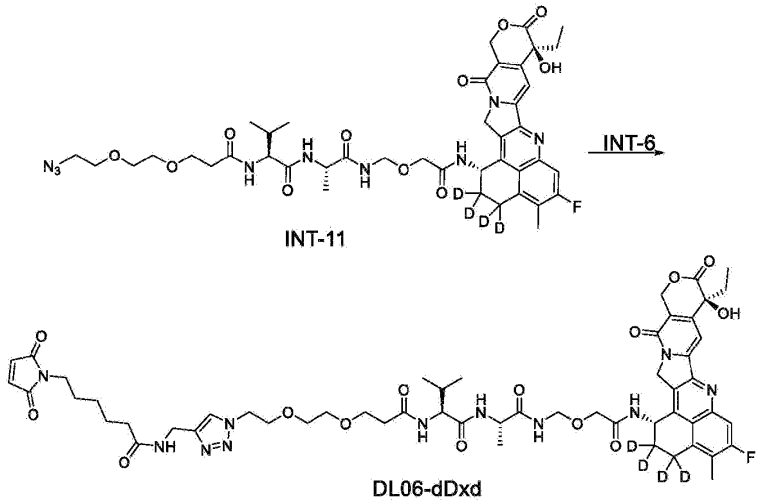
[0469] 实施例33化合物DL05-dDxd的合成



[0470] 中间体INT-2(60mg，0.218mmol)和INT-4(138mg，0.327mmol)用5mL N,N-二甲基甲酰胺溶解，室温搅拌2h。体系经制备液相纯化，得到目标化合物DL05-01 104mg，收率81.9%。LC-MS(ESI+)583.29[M+H]$^+$。

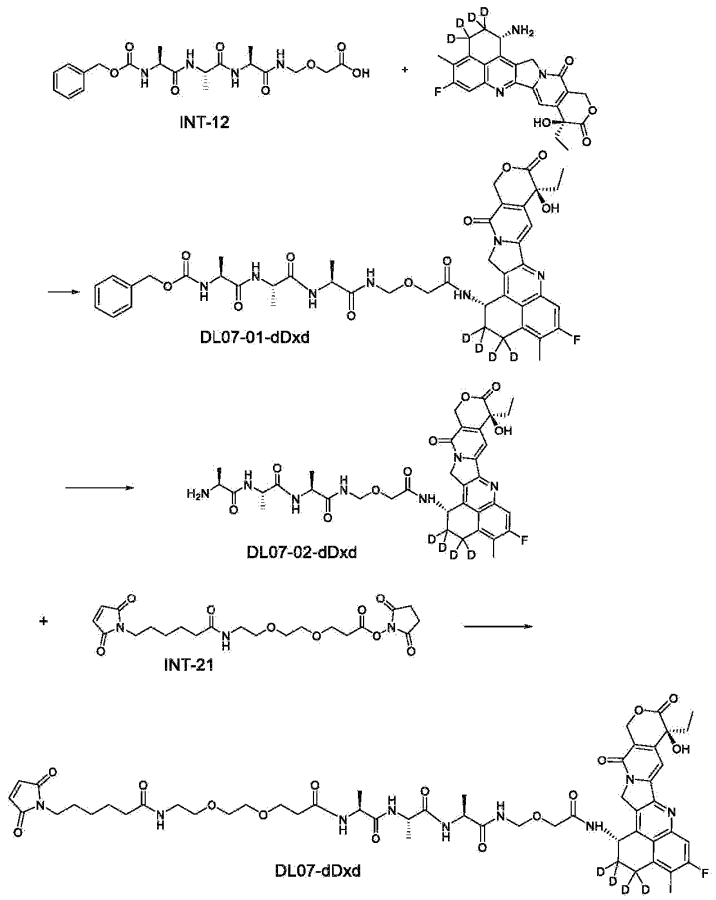
[0471] 化合物DL05-01(50mg，0.086mmol)用5mL N,N-二甲基甲酰胺溶解，室温加入QSC-200(38mg，0.072mmol)、EDCI(41mg，0.21mmol)和HOBT(29mg，0.21mmol)。室温搅拌2h。体系经制备液相纯化，得到目标化合物DL05-dDxd 64.6mg，收率74.9%。LC-MS(ESI+)1004.28[M+H]$^+$。

[0472] 实施例34化合物DL06-dDxd的合成



[0473] 化合物INT−11(100mg，0.113mmol)用4mL丙酮溶解，室温加入INT−6(28mg,0.113mmol)，五水硫酸铜(42.5mg，0.17mmol)，转至低温槽10℃下搅拌，称取维生素C钠(33.7mg，0.17mmol)溶解在2mL水中，逐滴加入上述反应液中，10℃下搅拌1h。用乙腈(2mL)淬灭反应。经制备液相纯化，得到目标化合物DL06−dDxd 76.8mg，收率为60.2%。LC−MS(ESI+)1130.93$[M+H]^+$。

[0474] 实施例35化合物DL07−dDxd的合成

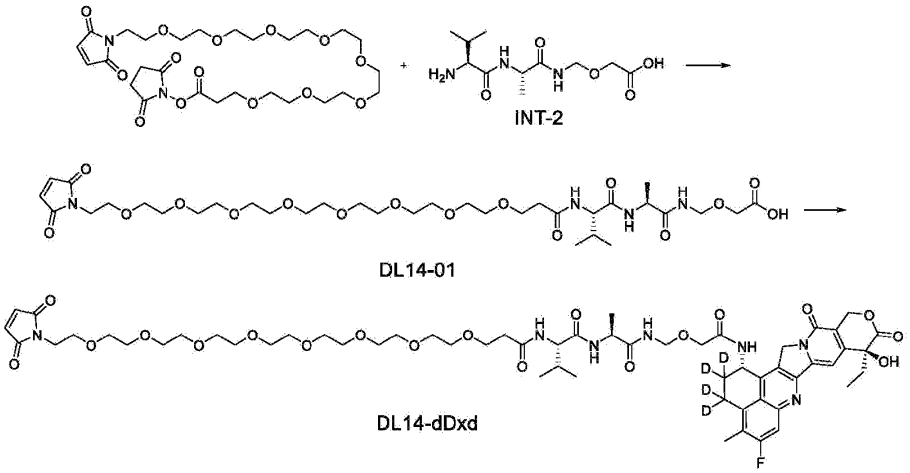


[0475] 将INT-12(500mg，1.1mmol),HATU(501mg，1.32mmol)，QSC-200(531mg，1.21mmol)溶解于30mL N,N-二甲基甲酰胺中，加入N,N-二异丙基乙胺(213mg，1.65mmol)，室温搅拌2.0h。反应完成后，经制备液相纯化，得到目标化合物DL07-01-dDxd 672mg，收率70%。LC-MS(ESI+)874.5[M+H]$^+$。

[0476] 化合物DL07-01-dDxd(672mg，0.77mmol)用20mL甲醇溶解。室温加入钯/碳(200mg，30%)。氢气置换三次室温搅拌2h。体系过滤，钯/碳用5mL甲醇洗三次，旋干滤液得到粗品DL07-02-dDxd直接用于下一步。LC-MS(ESI+)740.3[M+H]$^+$。

[0477] 化合物DL07-02-dDxd(150mg，0.20mmol)、INT-21(112mg，0.24mmol)，溶解于10mL N,N-二甲基甲酰胺中，加入N,N-二异丙基乙胺(39mg，0.3mmol)，室温搅拌2.0h。反应完成后，经制备液相纯化，得到目标化合物DL07-dDxd 75mg，收率34%。LC-MS(ESI+)1092.8[M+H]$^+$。

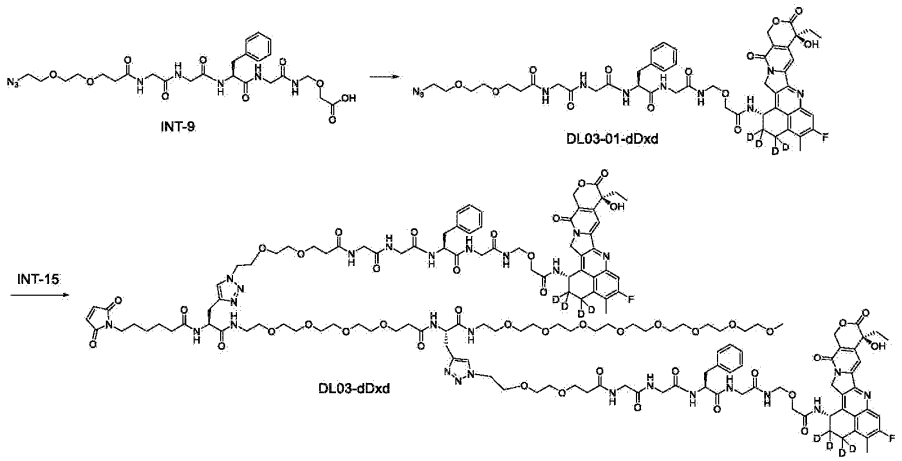
[0478] 实施例36化合物DL14-dDxd的合成



[0479] 称马来酰亚胺-八聚乙二醇-丙烯酸琥珀酰亚胺酯(200mg，0.32mmol)、INT-2(89mg，0.32mmol)于25mL单口瓶中，加入5mL DMF，60μL TEA，室温搅拌过夜，制备液相纯化，得DL14-01 127.8mg，收率50.9%。LC-MS(ESI+)779.4[M+H]$^+$。

[0480] 将DL14-01(127.2mg，0.16mmol)、EDCI(34.6mg，0.18mol)、HOBT(11.1mg，0.082mmol)、QSC-200(96.4mg，0.18mmol)，加入5mL DMF、41μL DIPEA，室温搅拌6h，制备液相纯化，得DL14-dDxd 95.5mg，收率48.5%。LC-MS(ESI+)1201.3[M+H]$^+$。

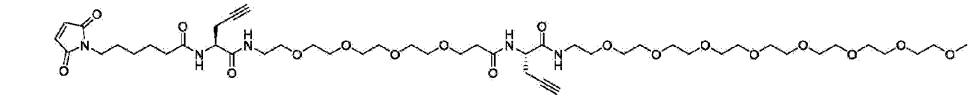
[0481] 实施例37化合物DL03-dDxd的合成



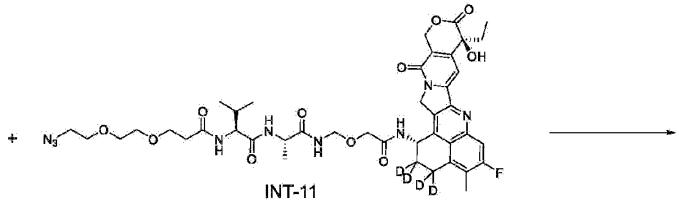
[0482] INT-9(218mg，0.36mmol)用5mL N,N-二甲基甲酰胺溶解，室温加入QSC-200(192mg，0.36mmol)，HATU(150mg，0.39mmol)和N,N-二异丙基乙胺(95mg，0.72mmol)。室温搅拌1h。体系经Flash纯化，得到目标化合物DL03-01-dDxd 274mg。收率74%。LC-MS(ESI+)1029.9$[M+H]^+$。

[0483] 化合物INT-15(178mg，173μmol)用8mL丙酮和4mL水溶解，室温加入化合物DL03-01-dDxd(360mg，344μmol)和五水硫酸铜(134mg，536μmol)。体系放置10℃低温浴中搅拌。将含有维生素C钠(106.7mg，536μmol)的水溶液(4mL)缓慢滴加至反应中。10℃搅拌1h。体系用乙腈(2mL)淬灭。体系经制备液相纯化，得目标化合物DL03-dDxd 361mg，收率68%。LC-MS(ESI+)1537.1$[M/2+H]^+$。

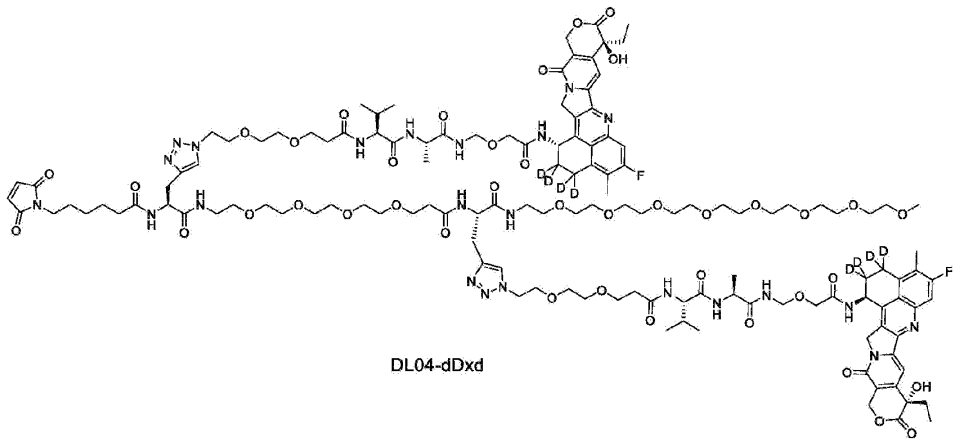
[0484] 实施例38化合物DL04-dDxd的合成



INT-15



INT-11

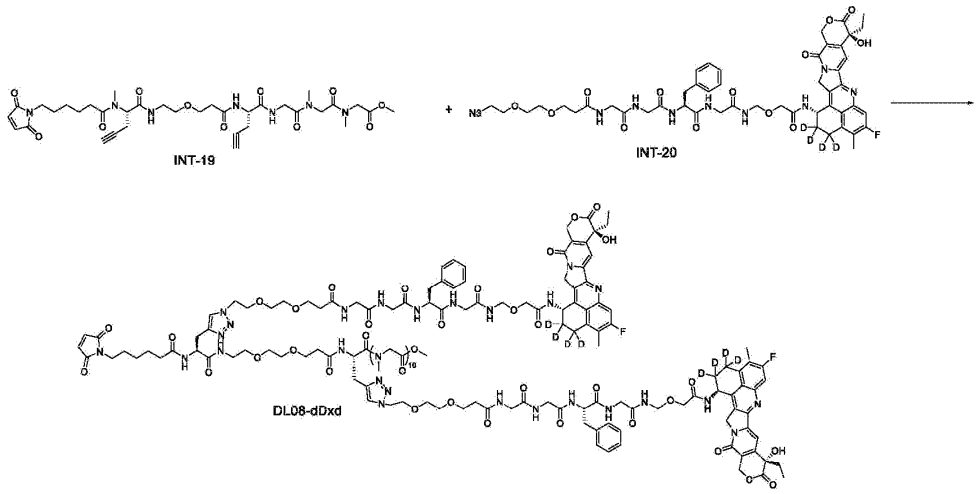


DL04-dDxd

[0485] 将INT-15(404.5mg，0.40mmol)，INT-11(723.0mg，0.82mmol)，五水合硫酸铜(237.5mg，0.95mmol)溶于6mL丙酮中，加入1mL冰乙酸，在氩气条件下10℃搅拌。加入L-抗坏血酸钠(239.3mg，1.20mmol)，并用2mL水溶解，滴加到反应液

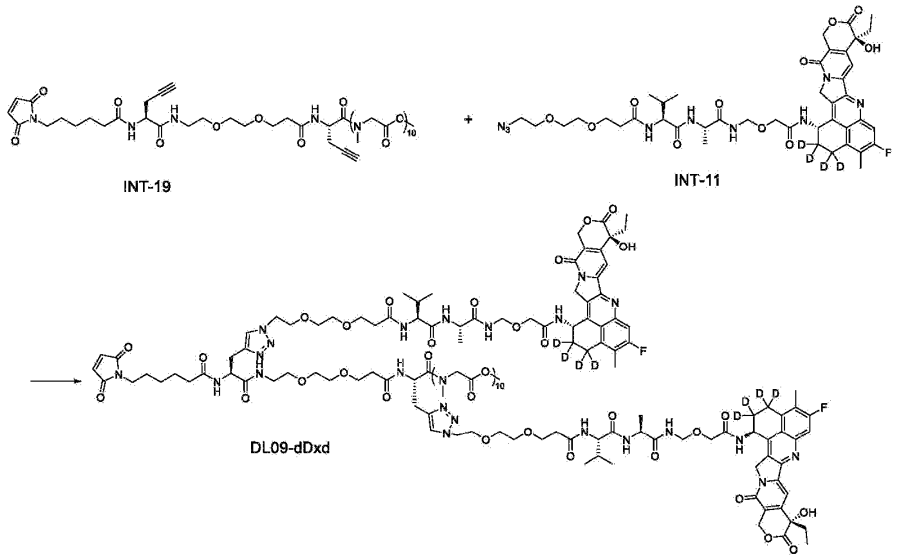
中，10℃搅拌1.0h。反应结束后，加入2mL乙腈淬灭，经制备液相纯化，得到DL04-dDxd 242.5mg，收率22%。LC-MS(ESI$^+$)2778.8[M+H]$^+$。

[0486] 实施例39化合物DL08-dDxd的合成



[0487] 称取INT-19(40mg，31.12μmol)置于25mL规格的三口瓶中，加入2mL的丙酮和2mL的纯化水使其完全溶解，0℃搅拌，依次称取INT-20(70.52mg，68.46μmol)加入到反应体系中，硫酸铜(14.9mg，93.35μmol)溶于1mL的水中，缓慢滴加至反应体系中，维生素C钠(19.73mg，99.58μmol)溶于1mL的水中，缓慢滴加至反应体系中，0℃搅拌30min。LC-MS监测反应完成后，向反应体系中滴加100μL的ACN(Acetonitrile)进行淬灭反应，反向制备液相纯化。得到目标产物DL08-dDxd 51mg，纯度97.41%，产率48.99%。ESI-MS(m/z)：1672.78[M/2+H]$^+$。

[0488] 实施例40化合物DL09-dDxd的合成

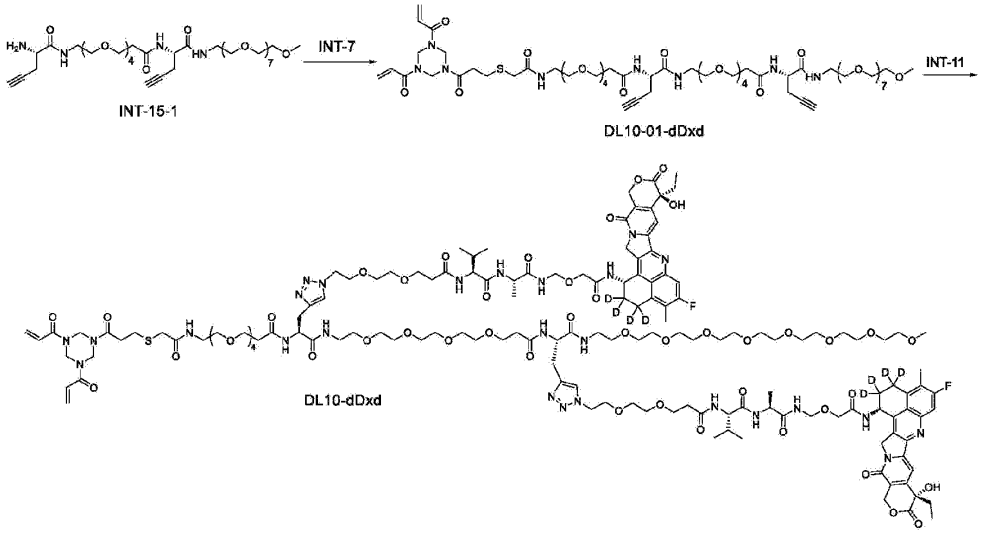


[0489] 称取INT-19(40mg，31.12μmol)置于25mL规格的三口瓶中，加入2mL的丙酮和2mL的纯化水使其完全溶解，0℃搅拌，依次称取INT-11(60.38mg，68.46μmol)加入到反应体系中，五水硫酸铜(23.31mg，93.35μmol)溶于1mL的水中，缓慢滴加至反应体系中，维生素C钠(19.73mg，99.58μmol)溶于1mL的水中，缓慢滴加至反应体系中，0℃搅拌30min。LC-MS监测反应完成后，向反应体系中滴加100μL ACN进行淬灭反应，反向制备液相纯化。得到目标产物DL09-dDxd 49mg，纯度98.11%，产率51.64%。ESI-MS(m/z)：1524.56$[M/2+H]^+$。

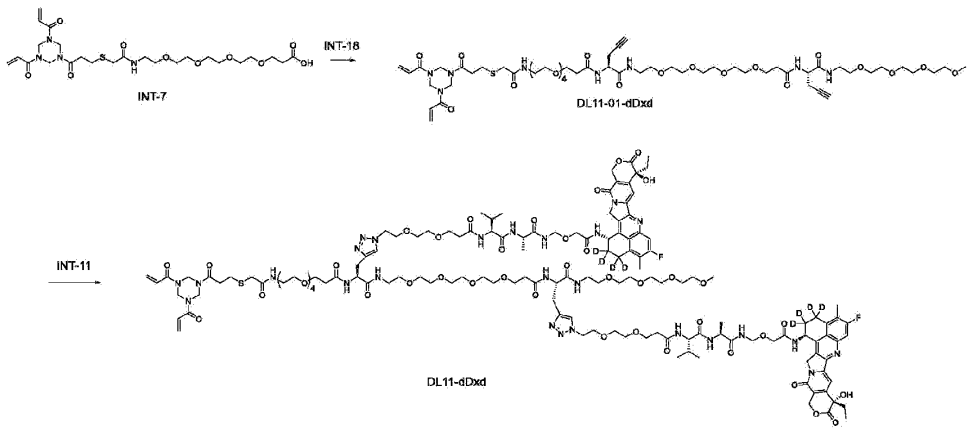
[0490] 实施例41化合物DL10-dDxd的合成

[0491] 称化合物INT-15-1(830mg，1mmol)，INT-7(590mg，1mmol)，溶于10mL DMF中，加入HATU(380mg，10mmol)。室温搅拌下加入DIPEA(130mg，10mmol)。室温搅拌反应2h，反应液用乙腈水稀释，过0.45μm滤膜后使用高压制备液相纯化，得DL10-01-dDxd 97mg，收率69.8%，LC-MS(ESI+)1392$[M+H]^+$

[0492] 称化合物DL10-01-dDxd(97mg，0.07mmol)、INT-11(129.3mg，015mmol)、硫酸铜(18.5mg，0.21mmol)溶解于5mL丙酮溶液中。10℃搅拌10min。称量维生素C钠(13.8mg，0.21mmol)溶解于5mL水中，向反应液中加入维生素C钠水溶液。保持10℃继续搅拌1h。反应液旋蒸除去丙酮，加入乙腈水稀释后高压制备液相纯化得65mg DL10-dDxd，收率30%，LC-MS(ESI+)1758.3$[M/2]^+$。



[0493] 实施例42化合物DL11-dDxd的合成

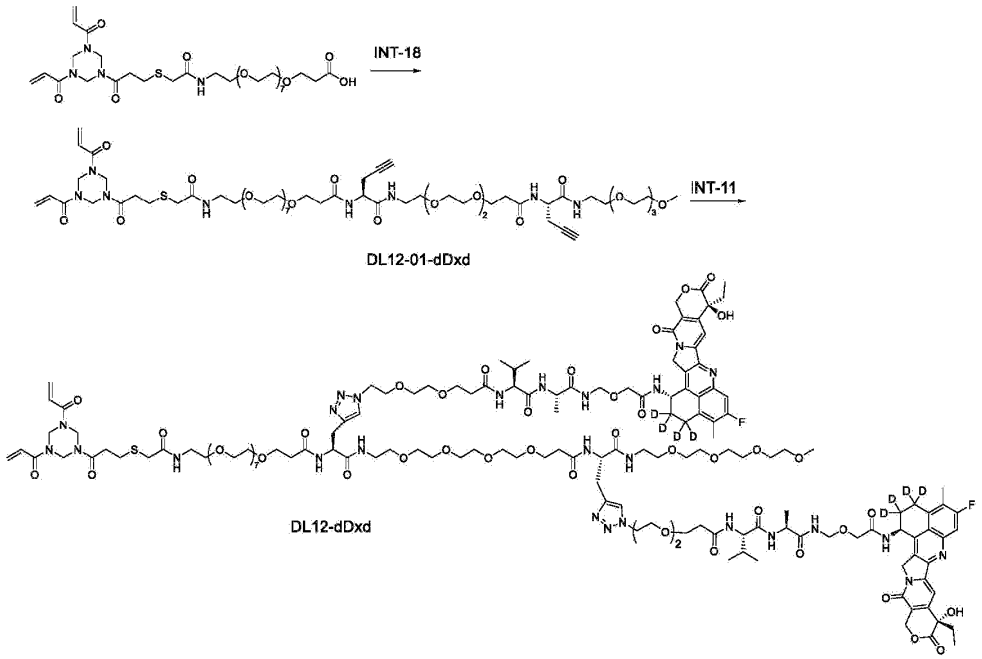


[0494] 将INT-7(403.3mg，0.68mmol),HATU(195.2mg，0.51mmol)溶解于10mLN,N-二甲基甲酰胺中，加入N,N-二异丙基乙胺90.3μL，室温预搅1.0h。再加入INT-18(221.4mg，0.34mmol)至反应液中，反应2.0h。反应完成后，经制备液相纯化，得到目标化合物DL11-01-dDxd 147.6mg，收率36%。LC-MS(ESI$^+$)1216.3[M+H]$^+$。

[0495] 将DL11-01-dDxd(147.6mg，0.12mmol)，INT-11(236.8mg，0.27mmol)，五水合硫酸铜(99.8mg，0.40mmol)溶于6mL丙酮中，在氩气条件下10℃搅拌。加入L-抗坏血酸钠(84.7mg，0.43mmol)，并用2mL水溶解，滴加到反应液中，10℃搅拌

1.0h。反应结束后，加入2mL乙腈淬灭，经制备液相纯化，得到DL11-dDxd 57.3 mg，收率16%。LC-MS(ESI$^+$)2978.8[M+H]$^+$。

[0496] 实施例43化合物DL12-dDxd的合成

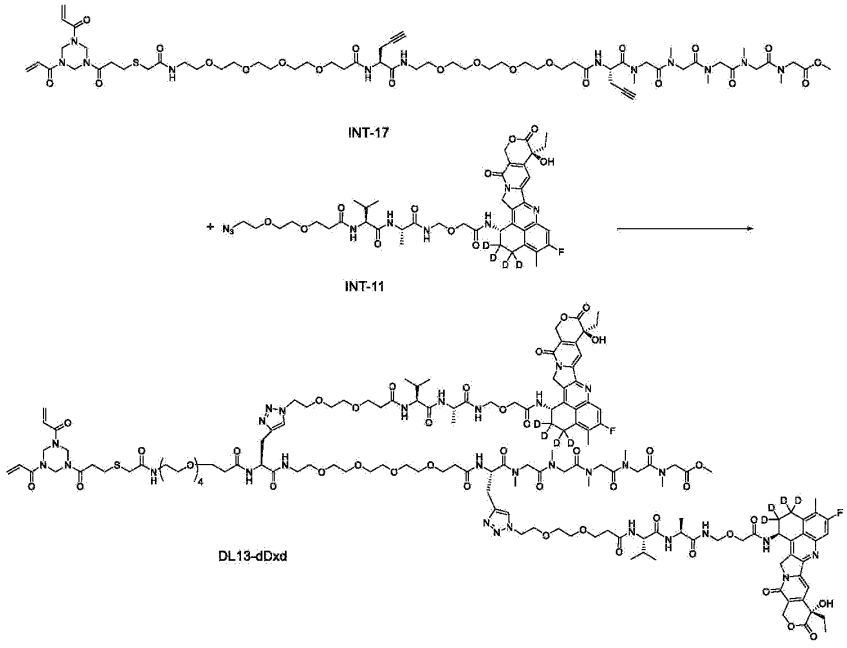


[0497] 称取INT-9(188mg，245.79μmol)置于50mL规格的单口瓶中，加入10mL的DMF溶解，室温搅拌。称取HATU(102.8mg，270μmol)加入反应体系中。量取52μL DIPEA滴加至反应体系中，室温搅拌50min。称取INT-18(158mg，245.8μmol)加入反应体系中，室温反应过夜。LC-MS监测反应完成后，高压反向制备系统纯化。得到目标产物DL12-01-dDxd 185mg，纯度98%，产率59.95%。LC-MS(ESI$^+$)：1392.59[M+H]$^+$。

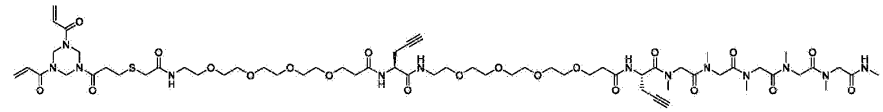
[0498] 称取DL12-01-dDxd(121mg，86.95μmol)置于50mL规格的三口瓶中，加入5mL的丙酮和1mL的纯化水使其完全溶解，0℃搅拌，依次称取INT-11(153.37mg，173.9μmol)加入到反应体系中，五水硫酸铜(54.27mg，217.37μmol)溶于2mL的水中，缓慢滴加至反应体系中，维生素C钠(51.67mg，260.85μmol)溶于2mL的水中，缓慢滴加至反应体系中，0℃搅拌30min。LC-MS监测反应完成后，向反应体系中滴加100μL ACN进行淬灭反应，反向制备液相纯化。得到目标产物DL12-dDxd 89mg，产率32.44%。ESI-MS(m/z)：1578.76[M+2H]$^{2+}$。

[0499] 实施例44化合物DL13-dDxd的合成

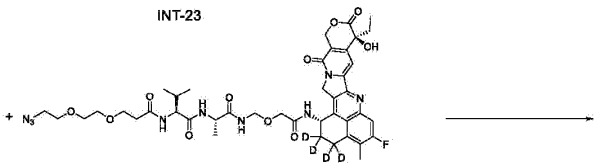
[0500] 化合物INT-17(200mg，0.14mmol)用10mL丙酮溶解，室温加入INT-11(256mg，0.29mmol)，五水硫酸铜(105mg，0.42mmol)和维生素C钠(83mg，0.42μmol),室温搅拌1h。用乙腈(5.0mL)进行淬灭反应。体系经制备液相纯化，得到目标化合物DL13-dDxd 181mg,收率为41%。LC-MS(ESI+)1579.76[M/2+H]$^+$。



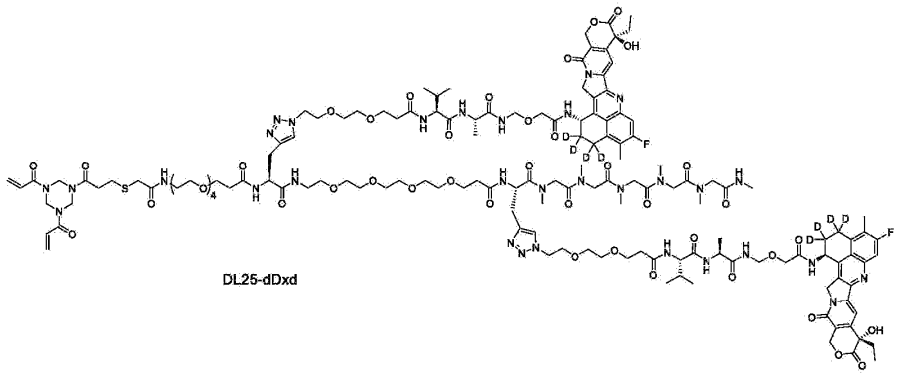
[0501] 实施例45化合物DL25-dDxd的合成



INT-23



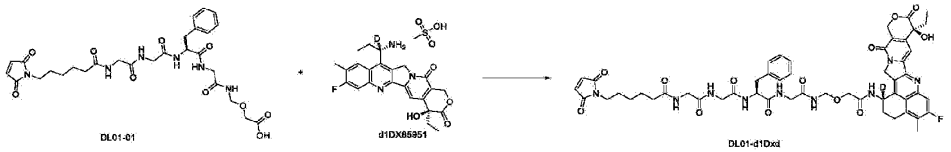
INT-11



DL25-dDxd

[0502] 称取INT-23(51.00mg，0.04mmol)，INT-11(63.11mg，0.07mmol)加入丙酮(1.5mL)、纯化水(0.5mL)搅拌溶解并氮气置换3次；称取五水硫酸铜(8.87mg，0.04mmol)、抗坏血酸钠(7.05mg，0.04mmol)分别加入纯化水(0.2mL)溶解备用，依次加入五水硫酸铜的溶液和抗坏血酸钠的溶液，于室温搅拌反应0.5h，LC-MS监测反应完成后，制备液相纯化，得DL25-dDxd 60.13mg收率54.02%。LC-MS(ESI+)3157.5$[M+H]^+$。

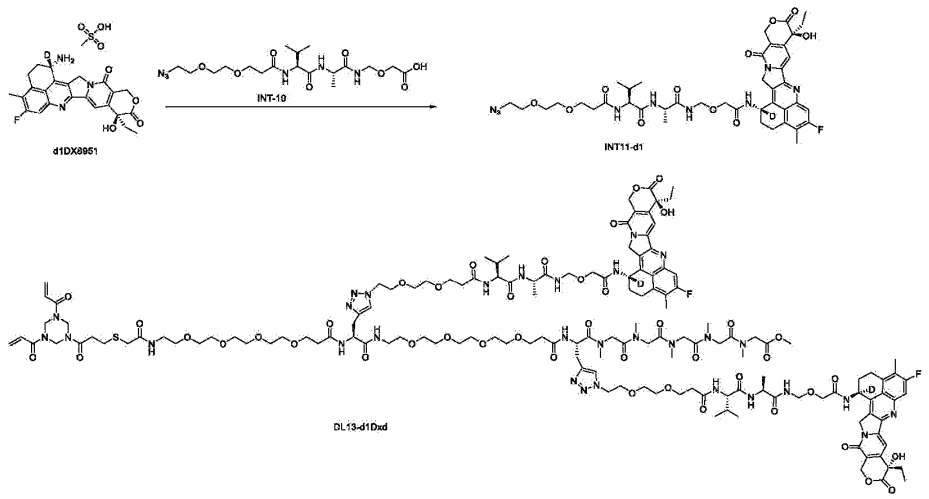
[0503] 实施例46化合物DL01-d1Dxd的合成



DL01-01 d1DX85951 DL01-d1Dxd

[0504] 化合物DL01-01(850mg，1.4mmol)、d1DX85951(620mg，1.2mmol)用20mL N,N-二甲基甲酰胺溶解，加入HATU(684mg，1.8mmol)、N,N-二异丙基乙胺(387mg，3mmol),室温搅拌2h。体系经制备液相纯化，得到目标化合物DL-d1Dxd 868mg，收率72%。LC-MS(ESI+)1035.40$[M+H]^+$。

[0505] 实施例47化合物DL13-d1Dxd的合成

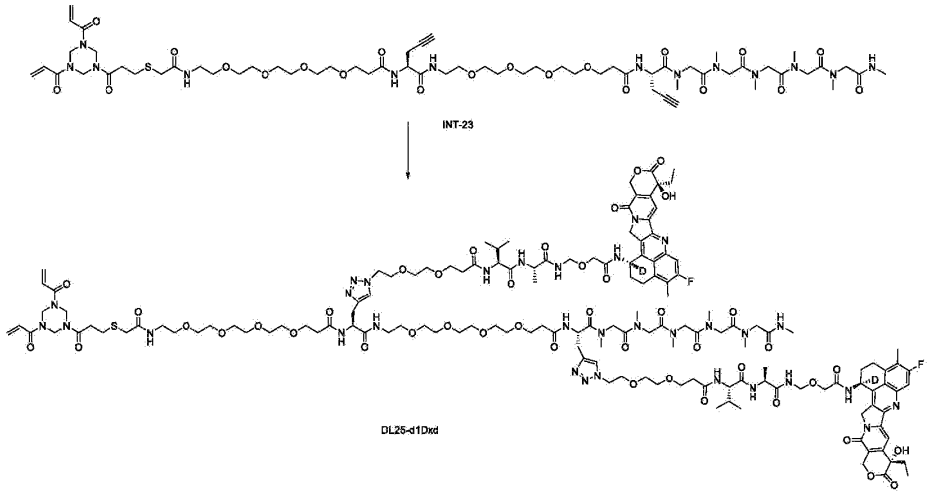


[0506] 称取INT-10(594.0mg，1.29mmol)，d1DX8951(507.24mg，1.16mmol)和HATU(535mg，1.41mmol)置于反应瓶中，室温下加入10mL DMF，搅拌均匀，滴加DIPEA(454mg，3.51mmol)。反应2h，停止反应，反相制备纯化。得INT-11-d1 649.25mg，收率57.27%。LC-MS(ESI+)879.3$[M+H]^+$。

[0507] 称取INT-17(50.00mg，0.04mmol)，INT-11-d1(63.02mg，0.07mmol)加入丙酮(1.5mL)、纯化水(0.5mL)搅拌溶解并氮气置换3次；称取五水硫酸铜(8.96mg，0.04mmol)、抗坏血酸钠(7.10mg，0.04mmol)分别加入纯化水(0.2mL)溶解备用，依次加入五水硫酸铜的溶液和抗坏血酸钠的溶液，于室温搅拌反应0.5h，LC-MS监测反应完成后，制备液相纯化，得DL13-d1Dxd 50.86mg收率45.01%。LC-MS(ESI+)3152.4$[M+H]^+$。

[0508] 实施例48化合物DL25-d1Dxd的合成

[0509] 称取INT-23(50.00mg，0.04mmol)，INT-11-d1(63.02mg，0.07mmol)加入丙酮(1.5mL)、纯化水(0.5mL)搅拌溶解并氮气置换3次；称取五水硫酸铜(8.96mg，0.04mmol)、抗坏血酸钠(7.10mg，0.04mmol)分别加入纯化水(0.2mL)溶解备用，依次加入五水硫酸铜的溶液和抗坏血酸钠的溶液，于室温搅拌反应0.5h，LC-MS监测反应完成后，制备液相纯化，得DL25-d1Dxd 53.79mg收率47.59%。LC-MS(ESI+)3151.4$[M+H]^+$。



[0510] 抗体药物偶联物的制备

[0511] 实施例49采用通用偶联方法制备抗体药物偶联物

[0512] 抗体药物偶联物的制备采用通用的偶联方法：用纯化水分别配制还原剂和保护剂如下：1～20mM TCEP(Tris-2-carboxyethyl-phosphine)、1～20mM DTPA(Diethylene triamine pentacetate acid)母液，还原剂用量根据所需偶联率不同可在一定浓度范围内添加，与一定浓度单克隆抗体(如：5～30mg/mL)混合，TCEP与抗体的终浓度摩尔比8～14:1，于25℃搅拌反应1h。TCEP还原后的抗体可直接进行偶联。

[0513] 配制一定浓度(5mM)连接子-活性药物单元化合物溶于DMSO(dimethyl sulfoxide，二甲亚砜)中，按照药物与巯基的摩尔比1.2～1.5:1缓慢加药，于25℃搅拌反应1-4h。反应结束后，用HIS缓冲液离心超滤，纯化去除残余未反应药物以及DMSO等游离小分子，并且利用液质联用(LC-MS)法检测偶联情况，用体积排阻色谱法(SEC)检测偶联后样品纯度。

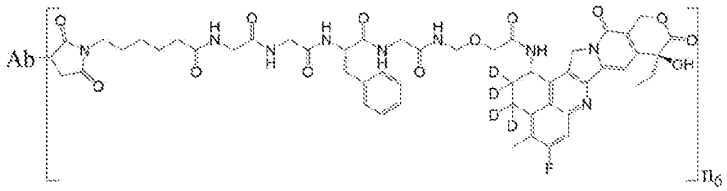
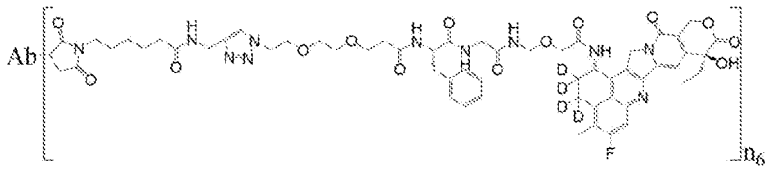
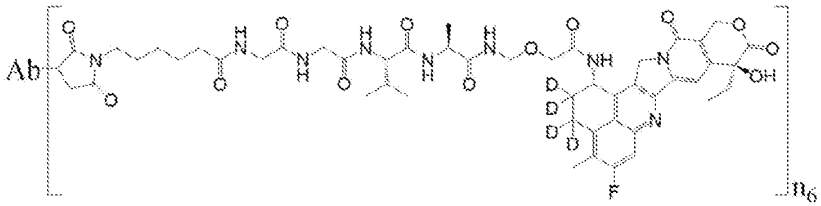
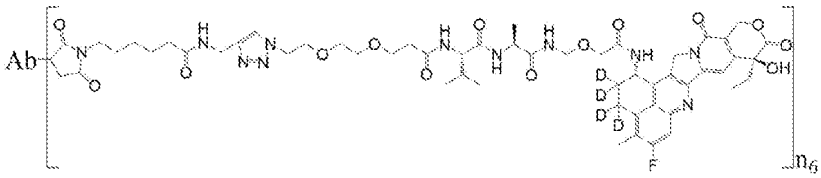
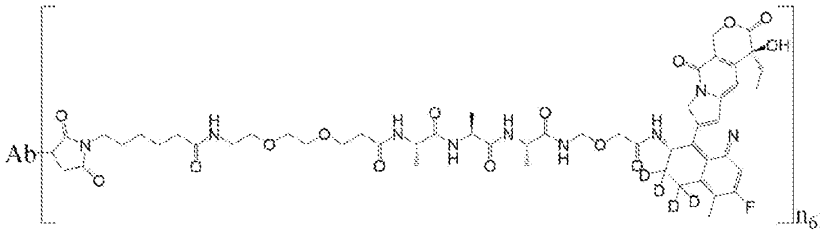
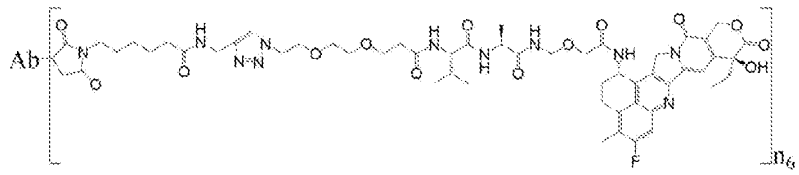
[0514] 实施例50采用工程化半胱氨酸偶联方法制备抗体药物偶联物

[0515] 抗体药物偶联物的制备采用工程化半胱氨酸的偶联方法：用纯化水配制还原剂如下：1～100mM TCEP(Tris-2-carboxyethyl-phosphine)；用DMSO(dimethyl sulfoxide，二甲亚砜)配制氧化剂如下：1～100mM DHAA(Dehydroacetic acid)母液，与一定浓度单克隆抗体(如：1～20mg/mL)混合，TCEP与抗体的终浓度摩尔比10～100:1，于25℃搅拌反应2-18h。还原后用Tris-HCl缓冲液超滤离心去除多余的

TCEP，向体系中加入DHAA，DHAA与抗体的终浓度摩尔比10～100:1，于25℃搅拌反应1-4h，反应结束后用Tris-HCl缓冲液超滤离心去除多余的DHAA，配制一定浓度(5mM)连接子-活性药物单元化合物溶于DMSO(dimethyl sulfoxide，二甲亚砜)中，按照药物与巯基的摩尔比1.2～2:1缓慢加药，于25℃搅拌反应1-4h。反应结束后，用Tris-HCl缓冲液离心超滤去除残余未反应药物以及DMSO等游离小分子，并且利用液质联用(LC-MS)法检测偶联情况，用体积排阻色谱法(SEC)检测偶联后样品纯度。

[0516] 实施例51：通过制备靶向Trop2抗体药物偶联物(随机偶联)进行质量验证将偶联用连接子-毒素化合物DL01-dDxd、DL02-dDxd、DL05-dDxd、DL06-dDxd、DL07-dDxd、DL05-Dxd、DL06-Dxd、DL07-Dxd采用本实施例49的通用偶联方法，与抗体分子Ab偶联(Ab：RD219A1抗体，一种自行表达生产的靶向Trop2抗体)。偶联产物经液质联用(LC-MS)法检测其平均药物/抗体比值(DAR值)，偶联产物经体积排阻色谱法(SEC)检测其纯度。

表4.采用通用偶联方法制备的抗体药物偶联物的结构

ADC 编号	ADC 结构
RD219A1-DL01-dDxd	
RD219A1-DL02-dDxd	
RD219A1-DL05-dDxd	
RD219A1-DL06-dDxd	
RD219A1-DL07-dDxd	
RD219A1-DL05-Dxd	

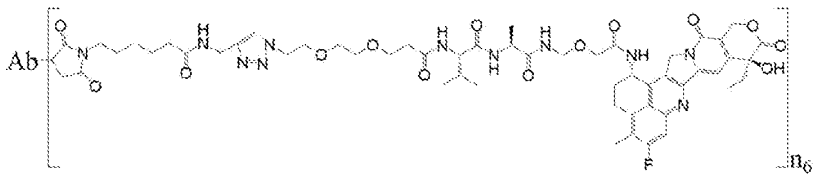
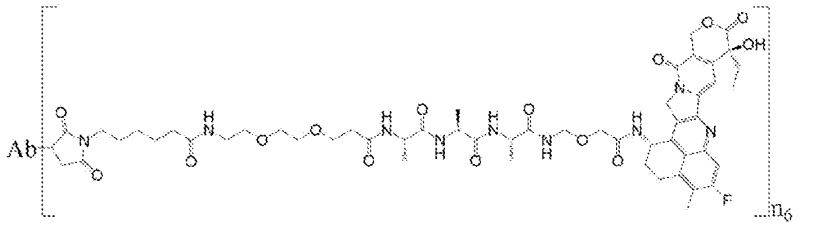
RD219A1-DL06-Dxd	
RD219A1-DL07-Dxd	

表5.采用通用偶联方法制备的抗体药物偶联物的测试结果

ADC 编号	DAR	SEC%
RD219A1-DL01-dDxd	8.14	96.5
RD219A1-DL02-dDxd	7.86	96.9
RD219A1-DL05-dDxd	8.40	96.0
RD219A1-DL06-dDxd	8.30	97.6
RD219A1-DL07-dDxd	8.05	96.6
RD219A1-DL05-Dxd	7.92	96.8
RD219A1-DL06-Dxd	7.96	96.2
RD219A1-DL07-Dxd	7.97	96.4

ADC编号含义：以两个破折号“-”连接三个部分，依次为所使用的靶向部分，连接子及载荷部分，

以RD219A1-DL01-dDxd为例，靶向部分为RD219A1抗体，连接子为DL01，载荷为dDxd化合物。

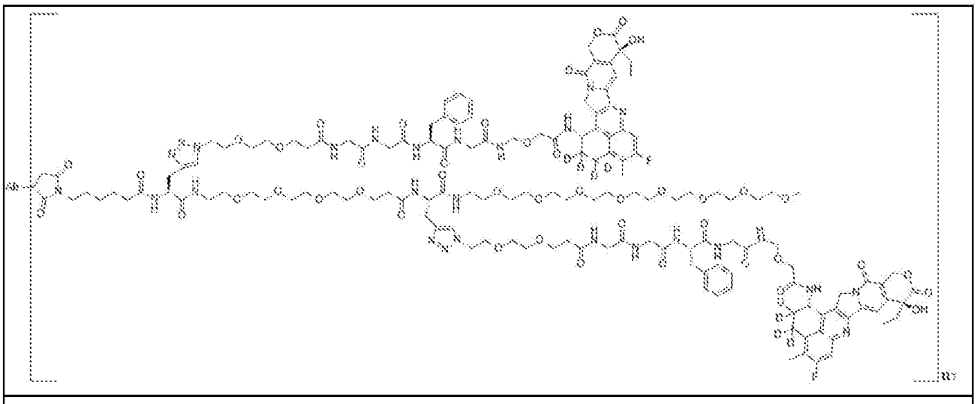
[0517] 通过使用已验证的ADC靶点(Trop2)抗体，进行抗体药物偶联物的制备及质量检测，结果(表5)表明，使用本发明的连接子或连接子-载荷结构，可制备获得高DAR值，高纯度的抗体偶联药物。

[0518] 实施例52：通过制备靶向Trop2抗体药物偶联物(定点偶联)进行质量验证

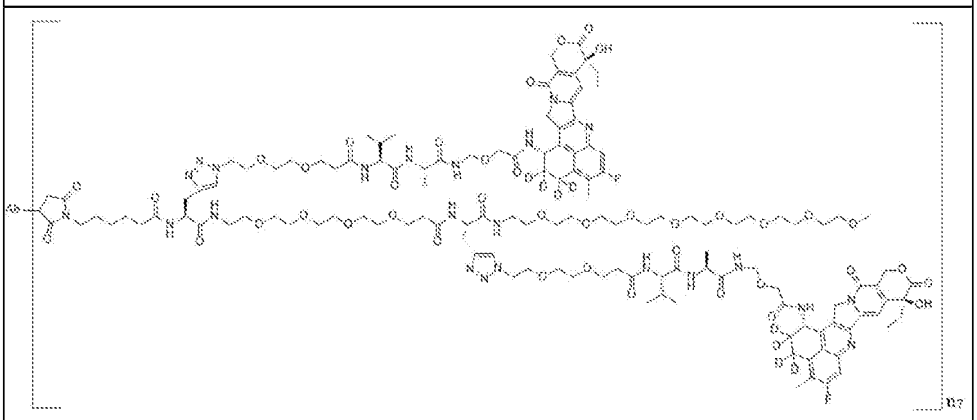
[0519] 将偶联用连接子-毒素化合物DL03-dDxd、DL04-dDxd、DL08-dDxd、DL09-dDxd、DL03-Dxd、DL04-Dxd采用本实施例50的工程化半胱氨酸偶联方法，与一种工程化抗体分子Ab偶联(RD219B1抗体，一种经特定位点半胱氨酸突变后的Trop2靶向抗体)。偶联产物经液质联用(LC-MS)法检测其平均药物/抗体比值(DAR值)，偶联产物经体积排阻色谱法(SEC)检测其纯度。

表6.采用工程化半胱氨酸偶联方法制备的抗体药物偶联物结构

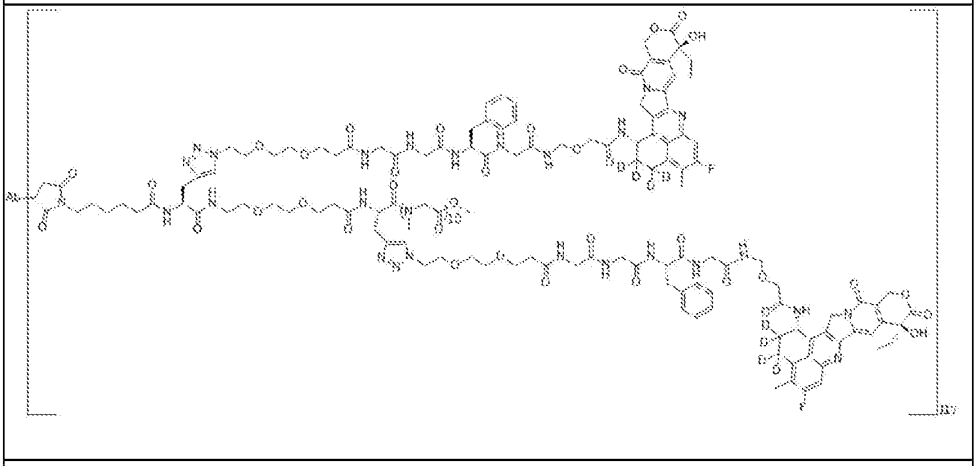
RD219B1-DL03-dDxd



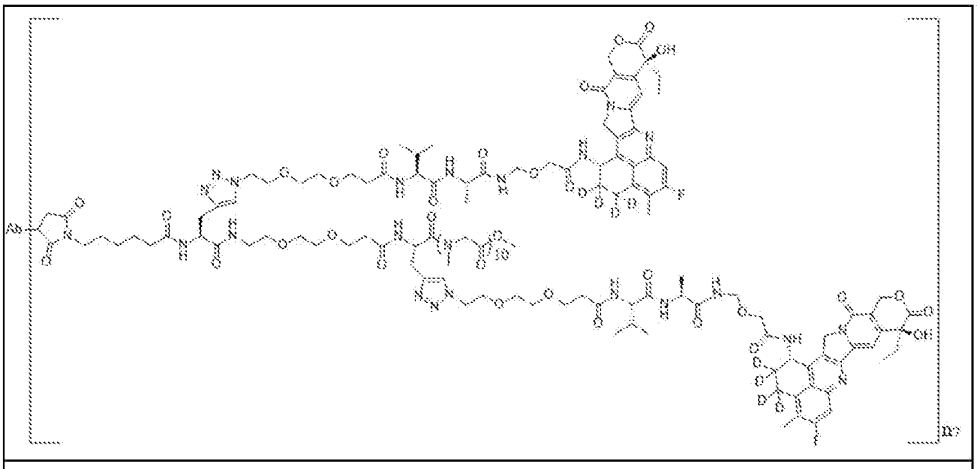
RD219B1-DL04-dDxd



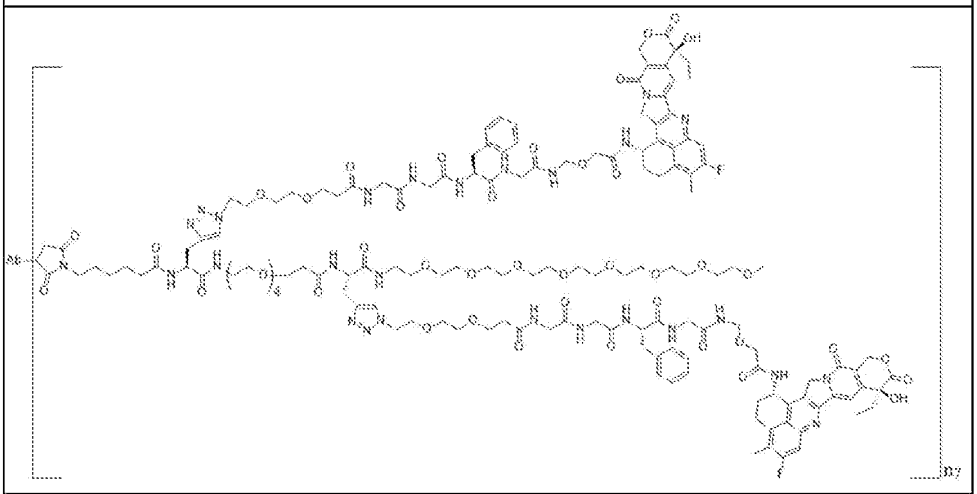
RD219B1-DL08-dDxd



RD219B1-DL09-dDxd



RD219B1-DL03-Dxd



RD219B1-DL04-Dxd

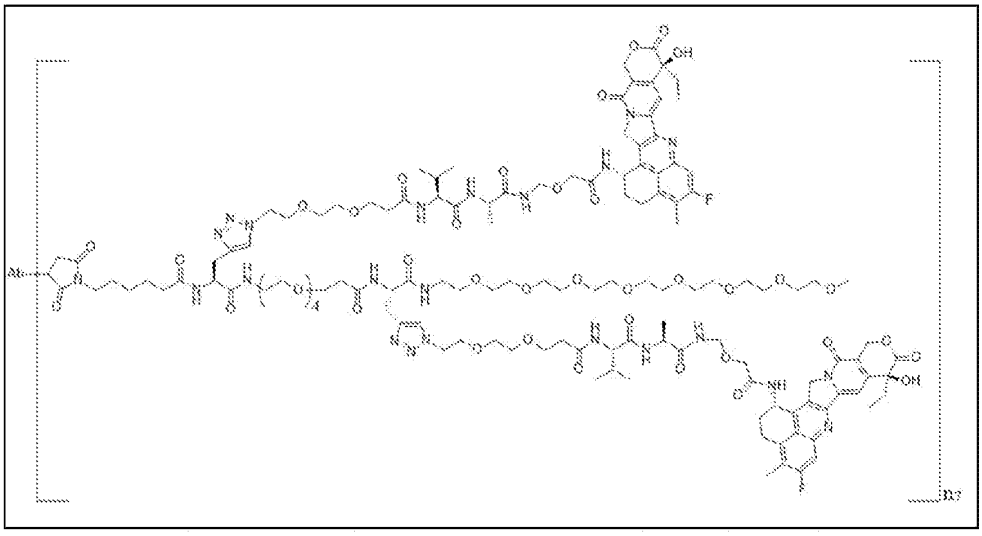


表7.采用工程化半胱氨酸偶联方法制备的抗体药物偶联物的测试结果

ADC 编号	DAR	SEC%
RD219B1-DL03-dDxd	7.71	94.8
RD219B1-DL04-dDxd	7.63	94.9
RD219B1-DL08-dDxd	7.69	94.6
RD219B1-DL09-dDxd	7.52	94.9
RD219B1-DL03-Dxd	7.68	94.7
RD219B1-DL04-Dxd	7.68	95.1

ADC编号含义：以两个破折号“-”连接三个部分，依次为所使用的靶向部分，连接子及载荷部

分，以RD219B1-DL03-dDxd为例，靶向部分为RD219B1抗体，连接子为DL03，载荷为dDxd化合物。

[0520] 通过使用已验证的ADC靶点(Trop2)半胱氨酸定点突变抗体，进行定点偶联抗体药物偶联物的制备及质量检测，实验结果(表7)表明，使用本发明的连接子或连接子-载荷结构，可制备获得高DAR值，高纯度的半胱氨酸定点偶连抗体偶联药物。

[0521] 抗体药物偶联物体外毒性试验

[0522] 实施例53：抗体药物偶联物的细胞毒活性

[0523] 将指数倍增期的细胞BXPC-3(人原位胰腺癌细胞)以5E4-1E5/mL(科学记数法(下同)，代表$5\times10^4-1\times10^5$/mL)的密度，以100μL每孔分别接种于96孔板。37℃、5% CO_2培养箱孵育过夜。将抗体偶联药物用完全培养基梯度配制为浓度0～333nM，100μL加入孔中，每个浓度设立3个复孔，同时设置空白对照组。药物作用168±2h后，加CCK-8试剂，37℃、5% CO_2培养箱孵育1～4h，于酶标仪450nm处检测各孔的OD值。计算抑制率IR%＝(OD空白-OD药物)×100/OD空白。将抑制率和药物浓度进行四参数拟合，计算IC_{50}。

表8.抗体药物偶联物在BXPC-3(人原位胰腺腺癌细胞)的细胞毒活性

ADC	IC_{50} (nM)	MIR(%)
RD219A1-DL01-dDxd	0.068	93.27
RD219A1-DL02-dDxd	0.057	95.35
RD219B1-DL03-dDxd	0.055	97.25
RD219B1-DL04-dDxd	0.054	96.67
RD219A1-DL05-dDxd	0.082	94.64
RD219A1-DL06-dDxd	0.078	94.00
RD219A1-DL07-dDxd	0.059	96.97
RD219B1-DL08-dDxd	0.046	96.77
RD219B1-DL09-dDxd	0.053	96.31
RD219B1-DL03-DXD	0.056 /	96.62
RD219B1-DL04-DXD	0.055	96.4
RD219A1-DL05-DXD	0.052	96.32
RD219A1-DL06-DXD	0.060	95.97
RD219A1-DL07-DXD	0.056	96.39
RD219A1-MC-GGFG-DXD	0.065	96.73

ADC编号含义：除“RD219A1-MC-GGFG-DXD”外，其他编号均以两个破折号“-”连接三个部分，

依次为所使用的靶向部分，连接子及载荷部分，以RD219A1-DL01-dDxd为例，靶向部分为RD219A1抗体，连接子为DL01，载荷为dDxd化合物。“RD219A1-MC-GGFG-DXD”意为，抗体为“RD219A1”，连接子为“MC-GGFG”，载荷为DXD。

[0524] 结果分析：通过表8可以看出，采用本发明中的连接子-毒素结构制备的ADC对BXPC-3(人原位胰腺癌细胞)肿瘤细胞系表现出了高毒性，相较于MC-GGFG-DXD目前在ADC领域经临床效果验证的连接子-毒素结构，DL01-dDxd、DL02-dDxd、DL03-dDxd、DL04-dDxd、DL05-dDxd、DL06-dDxd、DL07-dDxd、DL08-dDxd、DL09-dDxd显示出更优或相当的细胞毒活性，本实施例中的细胞毒活性试验结果说明本发明中的连接子-毒素结构具有广阔的应用前景。

[0525] 实施例54抗CDCP1抗体的筛选开发

[0526] 1.抗CDCP-1鼠源抗体的制备

[0527] (1)动物免疫方案

[0528] 动物免疫采用蛋白免疫Balb/C与CD1小鼠的方式进行，选用ACRO的胞外全长CDCP-1蛋白作为免疫原，购自ACRO(Phe30-Thr667，货号CD1-H52H6)。结合弗氏完全或非完全佐剂，每隔一周将40μg蛋白注射入小鼠的皮下，共免疫四次。末次免疫后7天眼眶采血，分离血清后，采用流式细胞术(FACS)检测血清特异抗体效价。血清效价达到常规杂交瘤抗体制备要求之后，进行40μg蛋白的冲击免疫，3天后开展细胞融合。

[0529] (2)杂交瘤制备及筛选

[0530] 对达到融合条件，并完成冲击免疫的小鼠，摘取该小鼠的脾细胞，PEG作用下与小鼠骨髓瘤细胞进行融合，制备杂交瘤细胞。具体方法,即在50％的PEG1500作用下，将摘除的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0以2:1的比例融合，悬至于含有HAT(次黄嘌呤(hypoxanthine，H)，氨基蝶呤(aminopterin，A)，胸腺嘧啶核苷(thymidine，T))的培养基中，后将细胞以2～3E6个/孔接种于96孔细胞板中，并置于37℃，5％ CO_2培养箱中培养。培养5天后换成HT培养基继续培养5d后采用FACS检测方式，检测杂交瘤细胞上清分泌的抗体同hCDCP1胞外全长蛋白的结合活性，FACS选用细胞为MDA-MB-231(人乳腺癌细胞)。具体方法，即将100μL杂

交瘤上清加入分装有5E5个细胞的E-tube管中，常温反应1h,3000rpm离心3min，PBS洗涤2次，每个样品加入1:2000倍稀释的Anti-Mouse IgG-APC抗体100μL，常温反应1h,PBS洗涤2次，重悬，上机检测(机器：Invitrogen Attune NxT流式细胞仪)。FACS检测结果显示，所列杂交瘤上清均与CDCP1具有较好的亲和力。

[0531] 选取具有较好结合的阳性杂交瘤进行亚克隆，以获得可以产生特异性鼠源抗体的单克隆杂交瘤细胞。为确定产生的抗体的特异性，进一步检测杂交瘤上清与阴性细胞系的结合活性，选用的阴性细胞为Caki-1细胞。上清检测筛选中结果为MDA-MB-231阳性、Caki-1阴性的细胞即为产生特异性鼠源抗体的单克隆细胞。FACS检测结果显示，杂交瘤上清均具有较好的特异性结合活性。

[0532] 2.抗CDCP-1嵌合抗体的制备

[0533] (1)嵌合抗体制备

[0534] 将上述获得的特异性较好的杂交瘤进行序列钓取以获得鼠源抗体的完整的可变区序列。目前获取鼠源抗体可变区序列的方法为Race技术，选取单克隆杂交瘤细胞株扩大培养，提取基因组RNA，使用SMARTer RACE 5'/3'Kit(Clontech 634913)试剂盒反转录，获得cDNA序列，后选用通用引物扩增鼠源抗体轻重链的可变区序列。

[0535] 按照SMARTer RACE 5'/3'Kit(clontech 634913)试剂盒说明书，成功调取了136株杂交瘤的可变区序列。将重链可变区序列和轻链可变区序列通过同源重组的方法分别构建在含有人IgG1重链恒定区和人κ轻链恒定区的pcDNA3.1表达载体上，据此获得嵌合抗体轻重链表达质粒，并在293T细胞小体系表达后，进行FACS结合筛选验证。最终经表达和验证，并完成大体系制备的19个嵌合抗体：#2、#5、#6、#13、#31、#32、#33、#38、#66、#89、#92、#94、#96、#108、#110、#111、#118、#119、#120，其中嵌合抗体#6、#31信息如下所示：

[0536] SEQ ID NO:1：(#6重链可变区序列)

[0537] EVQLQQSGAEVVRPGASAKLSCKASGYTFTDYEMHWVKQTPVHGLEWIGAIDPETGGIADNQ

KFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCIKGWNYAMDYWGQGTSVTVSS

[0538] SEQ ID NO:2：(#6轻链可变区序列)

[0539] DIVMTQSLKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTGVAWYQQKPGQSPKLFIYWASTRHTGVPDRFTG

SGSGTDFTLTISSVQAEDLALYYCQQHYSTPWTFGGGTKLEIK

[0540] SEQ ID NO:3：(#31重链可变区序列)

[0541] EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYGMSWVRQTPDKRLDWVATISSGGRYTYYADS

VKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARHYDYDGVYFDVWGAGTTVTVSS

[0542] SEQ ID NO:4：(#31轻链可变区序列)

[0543] DVVMTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSFVHWYQQKSVTSPKRWIYDTSKLASGVPTRFSGS

GSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWNNNKPPTFGVGTKLEIK

[0544] 3.嵌合抗体性质分析

[0545] (1)嵌合抗体亲和力检测

[0546] (1.1)亲和动力学检测-OCTET

[0547] 使用Octet RED96e(购自赛多利斯)进行亲和动力学检测。具体操作和方法根据仪器说明书和厂家提供的详细方法。具体为：用ProA生物传感器(购自赛多利斯)进行亲和力测定。将CDCP1的嵌合抗体用含0.02%(v/v)Tween，PH7.4的PBS溶液稀释至终浓度为：400nM,200nM,100nM，然后与ProA生物传感器反应1min，再和用含0.02%(v/v)Tween，PH7.4的PBS溶液稀释到10μg/L的抗原进行反应1.5min，抗原即人的胞外全长CDCP1蛋白(CD1-H52H6，ACRO，Phe30-Thr667)，人的胞外远膜端CDCP1蛋白(13262-H08H，义翘神州，Met1-Glu343)，鼠的胞外全长CDCP1蛋白(51110-M08H，义翘神州，Met1-Leu666)，猴的胞外全长CDCP1蛋白(90296-C08H，义翘神州，Met1-Thr667)；通过Octet仪器检测干涉波长的变化来检测抗体与各种抗原的结合与解离，然后用Octet User Software软件拟合得到结合常数与解离常数，亲和力常数为解离常数与结合常数的比值，结果显示#6、#31具有较好的结合能力。

[0548] (1.2)嵌合抗体亲和力FACS检测

[0549] 将CDCP1嵌合抗体稀释至终浓度为：20μg/mL，10μg/mL，5μg/mL，1μg/mL，0.2μg/mL，0.04μg/mL，0.004μg/mL，0.0004μg/mL分别与5E5个MDA-MB-231(人乳腺癌细胞)、HCT116(人结肠癌细胞)、PC-3细胞常温下共孵育1h后，3000rpm离心3min，PBS洗涤2次，每个样品加入1:2000倍稀释的Anti-Mouse

IgG-APC抗体100μL，常温反应1h，PBS洗涤2次，重悬，上机检测(机器：Invitrogen Attune NxT流式细胞仪)，FACS检测结果显示#6、#31具有较好的亲和力。

[0550] 实施例55抗CDCP1抗体的人源化及优化

[0551] 1.抗CDCP1人源化抗体的制备

[0552] (1)#6嵌合抗体人源化改造

[0553] 根据嵌合抗体的亲和力评价结果，选择#6嵌合抗体进行抗体的人源化改造。经人源化抗体改造，#6嵌合抗体获得6条重链(6-H1，6-H2，6-H3，6-H4，6-H5，6-H6)，6条轻链(6-L1，6-L2，6-L3，6-L4，6-L5，6-L6)的可变区氨基酸序列，序列如下所示：

[0554] SEQ ID NO:5：(#6人源化重链可变区序列H1)

[0555] EVQLVQSGAE VKKPGATVKI SCKVSGYTFT DYEMHWVQQA PGKGLEWMGA IDPETGGIAY AQKFQGRVTI TADTSTDTAY MELSSLRSED TAVYYCIKGWNYAMDYWGQG TLVTVSS

[0556] SEQ ID NO:6：(#6人源化重链可变区序列H2)

[0557] EVQLVQSGAE VKKPGATVKI SCKVSGYTFT DYEMHWVQQA PGKGLEWMGA IDPETGGIAY AQKFQGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCIKGWNYAMDYWGQG TLVTVSS

[0558] SEQ ID NO:7：(#6人源化重链可变区序列H3)

[0559] EVQLVQSGAE VKKPGATVKI SCKVSGYTFT DYEMHWVQQA PGKGLEWMGA IDPETGGIAD NQKFQGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCIKGWNYAMDYWGQG TLVTVSS

[0560] SEQ ID NO:8：(#6人源化重链可变区序列H4)

[0561] QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT DYEMHWVRQA PGQGLEWMGA IDPETGGIAY AQKFQGRVTM TRDTSTSTVY MELSSLRSED TAVYYCIKGWNYAMDYWGQG TLVTVSS

[0562] SEQ ID NO:9：(#6人源化重链可变区序列H5)

[0563] QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT DYEMHWVRQA PGQGLEWMGA IDPETGGIAY AQKFKGRVTM TADKSTSTVY MELSSLRSED TAVYYCIKGWNYAMDYWGQG TLVTVSS

[0564] SEQ ID NO:10：(#6人源化重链可变区序列H6)

[0565] EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT DYEMHWVRQA PGQGLEWMGA IDPETGGIAD NQKFKGRVTM TADKSTSTVY MELSSLRSED TAVYYCIKGWNYAMDYWGQG TLVTVSS

[0566] SEQ ID NO:11：(#6人源化轻链可变区序列L1)

[0567] DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS TGLAWYQQKP GKAPKLLIYW ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYSTPWTFGGGTKVEIK

[0568] SEQ ID NO:12：(#6人源化轻链可变区序列L2)

[0569] DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS TGLAWYQQKP GKAPKLLIYW ASTRHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYSTPWTFGGGTKVEIK

[0570] SEQ ID NO:13：(#6人源化轻链可变区序列L3)

[0571] DIVMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS TGVAWYQQKP GKAPKLLIYW ASTRHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYSTPWTFGGGTKVEIK

[0572] SEQ ID NO:14：(#6人源化轻链可变区序列L4)

[0573] DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQDVS TGLAWYQQKP GQPPKLLIYW ASTRESGVPD RFSGSGSGTD FTLTISSLQA EDVAVYYCQQ HYSTPWTFGGGTKVEIK

[0574] SEQ ID NO:15：(#6人源化轻链可变区序列L5)

[0575] DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQDVS TGLAWYQQKP GQPPKLLIYW ASTRHSGVPD RFSGSGSGTD FTLTISSLQA EDVAVYYCQQ HYSTPWTFGGGTKVEIK

[0576] SEQ ID NO:16：(#6人源化轻链可变区序列L6)

[0577] DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKASQDVS TGVAWYQQKP GQPPKLLIYW ASTRHSGVPD RFSGSGSGTD FTLTISSLQA EDVAVYYCQQ HYSTPWTFGGGTKVEIK

[0578] 将获得的重链和轻链的可变区氨基酸序列进行密码子优化，添加酶切位点、信号肽、及抗体轻重链的恒定区后进行合成，并搭建pCDNA3.1载体。将获得的完整的轻重链基因进行质粒大提，将大提后的质粒按照轻重链交叉组合的方式转染Expi293细胞，100mL体系表达纯化并进行性质分析。

[0579] 2.#6人源化抗体筛选

[0580] (1)#6人源化抗体的亲和动力学检测

[0581] 使用Octet RED96e(购自赛多利斯)进行亲和动力学检测。具体操作和方法根据仪器说明书和厂家提供的详细方法。具体为：用ProA生物传感器(购自赛多利斯)进行亲和力测定。将CDCP1的#6嵌合抗体、36个人源化抗体用含0.02%(v/v)Tween，PH7.4的PBS溶液稀释至终浓度为：400nM,200nM,100nM，然后与ProA生物传感器反应1min，再和用含0.02%(v/v)Tween，PH7.4的PBS溶液稀释到10μg/m

L的抗原进行反应1.5min，即人的胞外全长CDCP1蛋白(CD1-H52H6，ACRO，Phe30-Thr667)，人的胞外远膜端CDCP1蛋白(13262-H08H，义翘神州，Met1-Glu343)，猴的胞外全长CDCP1蛋白(90296-C08H，义翘神州，Met1-Thr667)；通过Octet仪器检测干涉波长的变化来检测抗体与各种抗原的结合与解离，然后用Octet User Software软件拟合得到结合常数与解离常数，亲和力常数为解离常数与结合常数的比值。实验结果显示#6的36个人源化抗体均与三种抗原具有较好的结合亲和力。

[0582] (2)#6人源化抗体的亲和力FACS检测

[0583] 将CDCP1的36个人源化抗体稀释至终浓度为：20μg/mL，10μg/mL，5μg/mL，1μg/mL，0.2μg/mL，0.04μg/mL，0.004μg/mL，0.0004μg/mL分别与5E5个MDA-MB-231(人乳腺癌细胞)、PC-3细胞常温下共孵育1h后，3000rpm离心3min,PBS洗涤2次，每个样品加入1:2000倍稀释的Anti-Mouse IgG-APC抗体100μl,常温反应1h,PBS洗涤2次，重悬，上机检测(机器：Invitrogen Attune NxT流式细胞仪)。FACS检测结果如表9所示，实验结果可以看出下列多个人源化抗体具有优异的亲和力。

表9.PC-3细胞中#6人源化抗体的亲和力FACS检测结果

PC-3					
H*L	EC_{50}（μg/mL）	H*L	EC_{50}（μg/mL）	H*L	EC_{50}（μg/mL）
H1+L1	0.1219	H3+L1	0.02621	H5+L1	~234.1
H1+L2	0.03939	H3+L2	0.02899	H5+L2	0.3341
H1+L3	0.03477	H3+L3	0.02927	H5+L3	0.4954
H1+L4	158.3	H3+L4	~0.02259	H5+L4	nd
H1+L5	0.02669	H3+L5	0.02642	H5+L5	0.6013
H1+L6	0.03202	H3+L6	0.0209	H5+L6	0.2605
H2+L1	8.181	H4+L1	4.298	H6+L1	0.02684
H2+L2	0.04465	H4+L2	0.2444	H6+L2	0.02382
H2+L3	0.02989	H4+L3	0.4751	H6+L3	0.02986
H2+L4	nd	H4+L4	2.855	H6+L4	0.03683
H2+L5	0.01297	H4+L5	0.1603	H6+L5	0.01071
H2+L6	0.03172	H4+L6	0.08725	H6+L6	~0.01874
嵌合#6	~0.02248	h14A043	0.4953	--	--

[0584] 注：“nd”表示未检出(not detected)。

[0585] (3)#6嵌合抗体来源的人源化抗体的内吞速率检测

[0586] 按照promega PHAb抗体染料标记试剂盒说明书标记挑选出的18个人源化抗体，抗体标记前浓度为2mg/mL。将标记好的抗体与PC-3(人前列腺癌细胞)、HCT116(人结肠癌细胞)于37℃孵育。时间梯度设置为：0h，3h，6h，8h，16h，24h，浓度设定为100nM。每个采样点结束后采用细胞流式仪检测荧光强度。从实验结果可以看出H1+L6(人源化抗体Ab1)、H5+L2、H6+L2内吞速率较快。

[0587] 3.#31嵌合抗体人源化改造

[0588] (1)#31嵌合抗体人源化筛选

[0589] 根据嵌合抗体的亲和力评价结果，选择#31嵌合抗体进行抗体的人源化改造。经人源化抗体改造，与性能筛选，最终选择人源化抗体hAb2序列如下所示：

[0590] 人源化抗体hAb2的可变区序列如下所示：

[0591] SEQ ID NO:17：(#31人源化重链可变区序列H1)

[0592] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGRYTYYADS

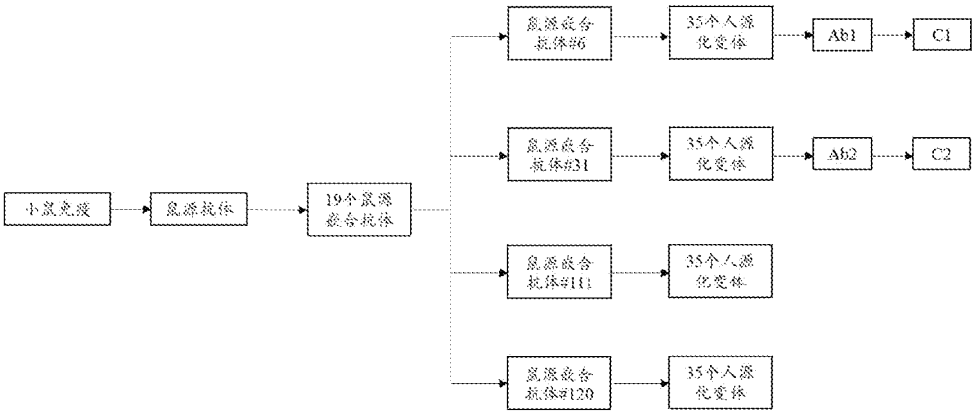
VKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHYDYDGVYFDVWGQGTMVTVSS

[0593] SEQ ID NO:18：(#31人源化轻链可变区序列L1)

[0594] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSFVHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLQSGVPSRFSGSG

SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWNNNKPPTFGQGTKLEIK

[0595] 如下概述了本申请的CDCP1抗体的筛选流程，在Ab1、Ab2分别进行重链A114C突变(Kabat编号)得到C1、C2。



[0596] 4.优化后的人源化抗体性能表征

[0597] (1)抗CDCP1抗体Ab1与Ab2的收率

[0598] 抗体在Expi293细胞中表达，并通过Protein A柱从培养基中纯化，随后使用尺寸排阻柱进一步纯化。利用Gator BLI系统上的定量协议确定了抗体的表达滴度。数据表明，Ab1收率400mg/L，Ab2收率400mg/L，Ab1与Ab2均具有较高的收率。

[0599] (2)抗CDCP1抗体Ab1与Ab2的熔化温度

[0600] 抗体的熔点通过差示扫描荧光法(DSF)在Bio-Rad CFX Opus 96实时PCR系统上进行测量。将抗体与SYPRO Orange染料混合，并在20℃至95℃的温度梯度下孵育。在570nm处实时监测荧光发射，熔点通过Bio-Rad CFX Maestro软件计算得出。数据表明，Ab1、Ab2的熔化温度Tm均为67.5℃，具有较好的热稳定性。

[0601] (3)抗CDCP1抗体Ab1与Ab2的纯度

[0602] 抗体的纯度通过安捷伦1290系统上的ACQUITY UPLC Protein BEH SEC柱(200Å,1.7μm，4.6mm×300mm)进行评估。流动相为205mM NaCl、4mM KCl、15mM NaH_2PO_4、2.7mM K_2HPO_4，pH 7.4。数据分析使用安捷伦Chemstation软件完成。数据表明，Ab1、Ab2具有优异的SEC纯度，均为100%。

[0603] (4)抗CDCP1抗体Ab1与Ab2的蛋白结合活性

[0604] 蛋白结合实验在Biacore T200系统上进行。抗体固定在使用抗人Fc捕获试剂盒准备的CM5芯片上。将一系列稀释的全长CDCP-1注入多循环动力学实验中。结合速率常数(Ka)、解离速率常数(Kd)和平衡解离常数(KD)通过Biacore评估软件计算得出。如表10所示，数据表明，Ab1和Ab2具较好的蛋白结合活性。

表10.抗CDCP1抗体Ab1与Ab2的蛋白结合活性

编号	Ab1	Ab2
结合速率 ka (1/Ms)	6.42E05	2.75E05
解离速率 kd (1/s)	1.10E-02	5.38E-03
平衡解离常数 KD (nM)	17.07	19.6

[0605] (5)抗CDCP1抗体Ab1与Ab2的内吞作用

[0606] 细胞以每孔20,000个细胞的密度接种于96孔黑色透明底板中，并孵育过夜。使用IncuCyte® FabFluor-pH Red抗体标记试剂盒对单个抗体进行标记。将荧光标记的抗体加入细胞板中，并通过IncuCyte®SX5测量荧光信号。如表11所示，数据表明，Ab1、Ab2具有较好的内吞效应。

表11.抗CDCP1抗体Ab1与Ab2的内吞作用

编号	Ab1	Ab2
内吞作用	++++ （高内化效率）	++++ （高内化效率）

[0607] 实施例56抗CDCP1抗体的制备及其氨基酸序列的确定

[0608] 根据实施例55的筛选结果，优选的抗CDCP1抗体为Ab1(#6人源化H1+L6)、Ab2(#31人源化H1+L1)。

[0609] Ab1重链可变区和轻链可变区CDR1-3氨基酸序列

[0610] 表12.抗CDCP1抗体Ab1的CDR氨基酸序列

类型	氨基酸序列	编号
HCDR1	GYTFTDYE	SEQ ID NO: 19
HCDR2	IDPETGGI	SEQ ID NO: 20
HCDR3	IKGWNYAMDY	SEQ ID NO: 21
LCDR1	QDVSTG	SEQ ID NO: 22
LCDR2	WAS	SEQ ID NO: 23
LCDR3	QQHYSTPWT	SEQ ID NO: 24

注：所述CDR是基于IMGT定义方案获得的

[0611] Ab1重链可变区氨基酸序列SEQ ID NO:25:

EVQLVQSGAE VKKPGATVKI SCKVSGYTFT DYEMHWVQQA PGKGLEWMGA 50

IDPETGGIAY AQKFQGRVTI TADTSTDTAY MELSSLRSED TAVYYCIKGW 100

NYAMDYWGQG TLVTVSS 117

[0612] Ab1轻链可变区氨基酸序列SEQ ID NO:26

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKASQDVS TGVAWYQQKP GQPPKLLIYW 50

ASTRHSGVPD RFSGSGSGTD FTLTISSLQA EDVAVYYCQQ HYSTPWTFGG 100

GTKVEIK 107

[0613] Ab1重链氨基酸序列SEQ ID NO:27

EVQLVQSGAE VKKPGATVKI SCKVSGYTFT DYEMHWVQQA PGKGLEWMGA 50

IDPETGGIAY AQKFQGRVTI TADTSTDTAY MELSSLRSED TAVYYCIKGW 100

NYAMDYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF 150

PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS SSLGTQTYIC 200

NVNHKPSNTK VDKKVEPKSC DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT 250

LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY 300

RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT 350

LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS 400

DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK 447

[0614] Ab1轻链氨基酸序列SEQ ID NO:28

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKASQDVS TGVAWYQQKP GQPPKLLIYW 50

ASTRHSGVPD RFSGSGSGTD FTLTISSLQA EDVAVYYCQQ HYSTPWTFGG 100

GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV 150

DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG 200

LSSPVTKSFN RGEC 214

[0615] Ab2重链可变区和轻链可变区CDR1-3

表13.抗CDCP1抗体Ab2的CDR氨基酸序列

类型	氨基酸序列	编号
HCDR1	GFTFSSYG	SEQ ID NO: 29
HCDR2	ISSGGRYT	SEQ ID NO: 30
HCDR3	ARHYDYDGVYFDV	SEQ ID NO: 31
LCDR1	SSVSF	SEQ ID NO: 32
LCDR2	DTS	SEQ ID NO: 33
LCDR3	QQWNNNKPPT	SEQ ID NO: 34

注：所述CDR是基于IMGT定义方案获得的

[0616] Ab2重链可变区氨基酸序列SEQ ID NO:35

EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT 50

ISSGGRYTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY 100

DYDGVYFDVW GQGTMVTVSS 120

[0617] Ab2轻链可变区氨基酸序列SEQ ID NO:36

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASSSVS FVHWYQQKPG KAPKLLIYDT 50

SKLQSGVPSR FSGSGSGTDF TLTISSLQPE DFATYYCQQW NNNKPPTFGQ 100

GTXLEIK 107

[0618] Ab2重链氨基酸序列SEQ ID NO:37

EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT 50

ISSGGRYTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY 100

DYDGVYFDVW GQGTMVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK 150

DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT 200

YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP 250

KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN 300

STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ 350

VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV 400

LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 450

[0619] Ab2轻链氨基酸序列SEQ ID NO:38

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASSSVS FVHWYQQKPG KAPKLLIYDT 50

SKLQSGVPSR FSGSGSGTDF TLTISSLQPE DFATYYCQQW NNNKPPTFGQ 100

GTKLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV 150

DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG 200

LSSPVTKSFN RGEC 214

[0620] 实施例57抗CDCP1抗体药物偶联物(MMAE载荷)的制备

[0621] 抗体药物偶联物的制备采用通用的偶联方法：用纯化水分别配制还原剂和保护剂如下：1～20mM TCEP(Tris-2-carboxyethyl-phosphine)、1～20mM DTPA(Diethylene triamine pentacetate acid)母液，还原剂用量根据所需偶联率不同可在一定浓度范围内添加，与一定浓度单克隆抗体(如：5～30mg/mL)混合，TCEP与抗体

的终浓度摩尔比2～2.5:1，于25℃搅拌反应1h-2h。TCEP还原后的抗体可直接进行偶联。

[0622] 抗CDCP1抗体C1的序列信息如下：

[0623] C1重链氨基酸序列SEQ ID NO:39

EVQLVQSGAE VKKPGATVKI SCKVSGYTFT DYEMHWVQQA PGKGLEWMGA 50
IDPETGGIAY AQKFQGRVTI TADTSTDTAY MELSSLRSED TAVYYCIKGW 100
NYAMDYWGQG TLVTVSSCST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF 150
PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS SSLGTQTYIC 200
NVNHKPSNTK VDKKVEPKSC DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT 250

LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY 300
RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT 350
LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS 400
DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK 447

[0624] C1轻链氨基酸序列SEQ ID NO:40

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKASQDVS TGVAWYQQKP GQPPKLLIYW 50
ASTRHSGVPD RFSGSGSGTD FTLTISSLQA EDVAVYYCQQ HYSTPWTFGG 100
GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD 150
NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL 200
SSPVTKSFNR GEC 213

[0625] 抗CDCP1抗体C2的序列信息如下；

[0626] C2重链氨基酸序列SEQ ID NO:41

EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT 50
ISSGGRYTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY 100
DYDGVYFDVW GQGTMVTVSS CSTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK 150
DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT 200
YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP 250
KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN 300
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ 350
VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV 400
LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 450

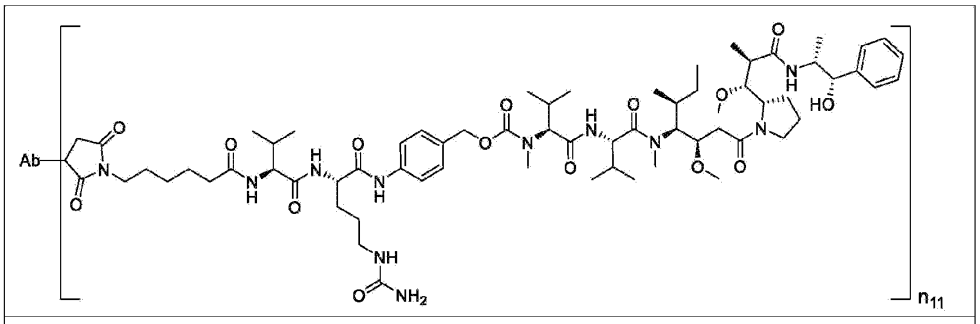
[0627] C2轻链氨基酸序列SEQ ID NO:42

```
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASSSVS FVHWYQQKPG KAPKLLIYDT 50
SKLQSGVPSR FSGSGSGTDF TLTISSLQPE DFATYYCQQW NNNKPPTFGQ 100
GTKLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV 150
DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG 200
LSSPVTKSFN RGEC                                        214
```

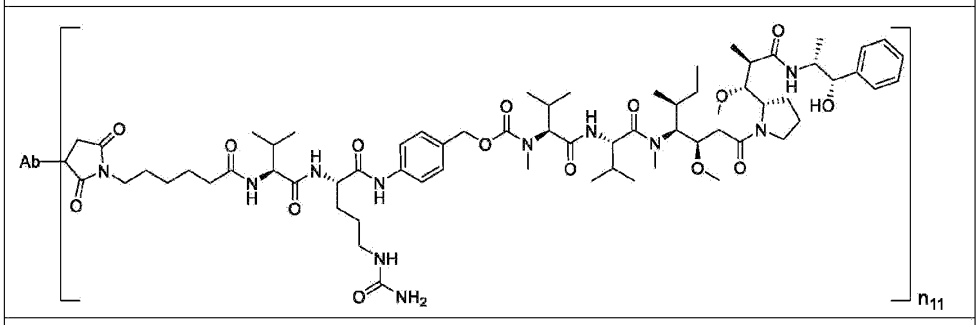
[0628] 配制一定浓度(5mM)连接子-活性药物单元化合物溶于DMSO(dimethyl sulfoxide，二甲亚砜)中，按照药物与巯基的摩尔比1.2～1.5:1缓慢加药，于25℃搅拌反应1-2h。反应结束后，用HIS缓冲液离心超滤，纯化去除残余未反应药物以及DMSO等游离小分子，并且利用疏水高效液相(HIC-HPLC)法及液质联用(LC-MS)法检测偶联情况，用体积排阻色谱法(SEC)检测偶联后样品纯度。

表14.制备的抗CDCP1抗体药物偶联物(MMAE载荷)的结构

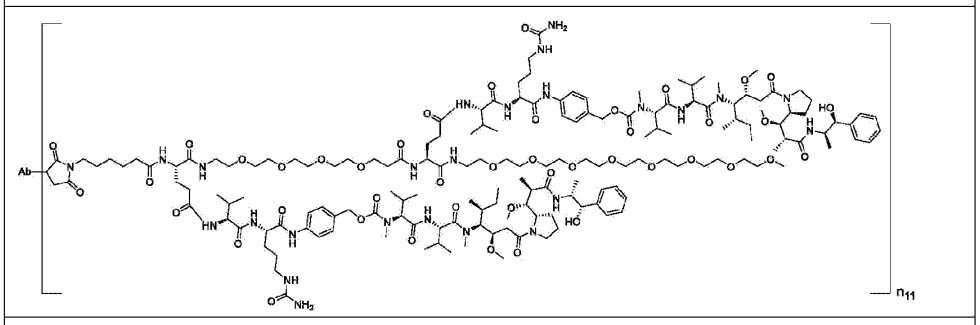
Ab1-MC-VA-PAB-MMAE



Ab2-MC-VA-PAB-MMAE



C1-DL02-MMAE



C2-DL02-MMAE

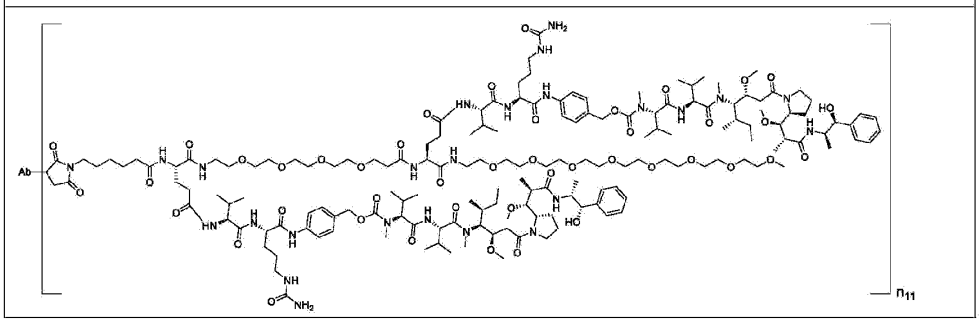


表15.抗体药物偶联物的测试结果

ADC 编号	DAR	SEC%
Ab1-MC-VC-PAB-MMAE	3.95	94.42

Ab2-MC-VC-PAB-MMAE	4.07	97.25
C1-DL02-MMAE	4.12	94.62
C2-DL02-MMAE	3.92	96.28

[0629] ADC编号含义：除“Ab1-MC-VC-PAB-MMAE、Ab2-MC-VC-PAB-MMAE”外，其他编号均以两个破折号“-”连接三个部分，依次为所使用的靶向部分，连接子及载荷部分，以C1-DL02-MMAE为例，靶向部分为C1抗体，连接子为DL02，载荷为MMAE化合物。“Ab1-MC-VC-PAB-MMAE”意为，抗体为“Ab1”，连接子为“MC-VC-PAB”，载荷为MMAE，“Ab2-MC-VC-PAB-MMAE”意为，抗体为“Ab2”，连接子为“MC-VC-PAB”，载荷为MMAE，。

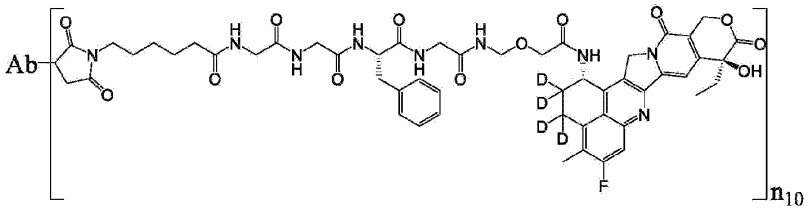
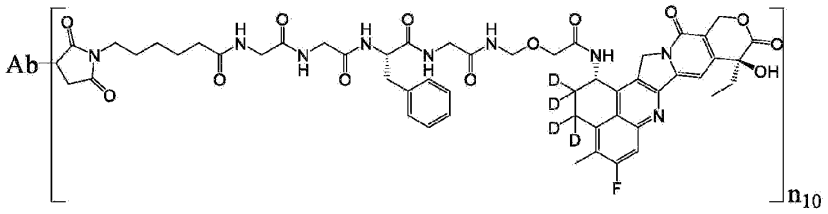
[0630] 实施例58抗CDCP1抗体药物偶联物(喜树碱类载荷)的制备

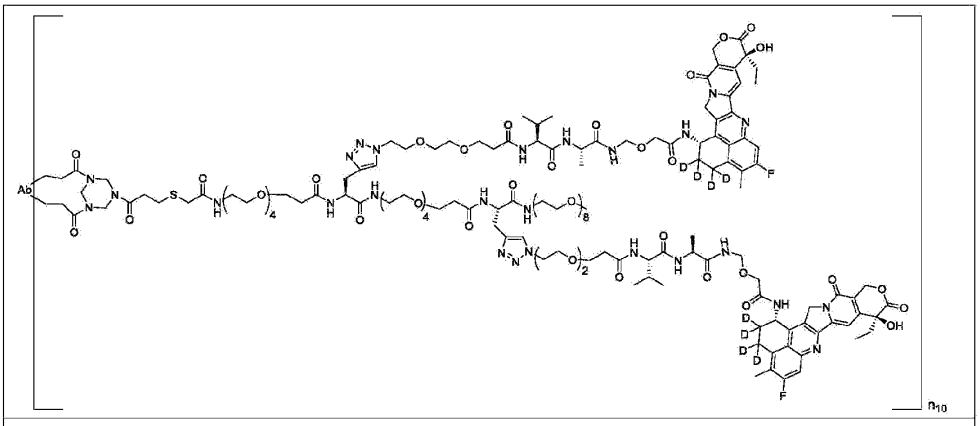
[0631] (1)通用偶联方法

[0632] 抗体药物偶联物的制备采用通用的偶联方法(DAR4和DAR8)：用纯化水分别配制还原剂和金属螯合剂如下：1～20mM TCEP(Tris-2-carboxyethyl-phosphine)、1～20mM DTPA(Diethylene triamine pentacetate acid)母液，还原剂用量根据所需偶联率不同可在一定浓度范围内添加，与一定浓度单克隆抗体(如：5～30mg/mL)混合，根据DAR值的不同，如DAR4和DAR8，TCEP与抗体的终浓度摩尔比5～14:1，于25℃搅拌反应1h。TCEP还原后的抗体可直接进行偶联。

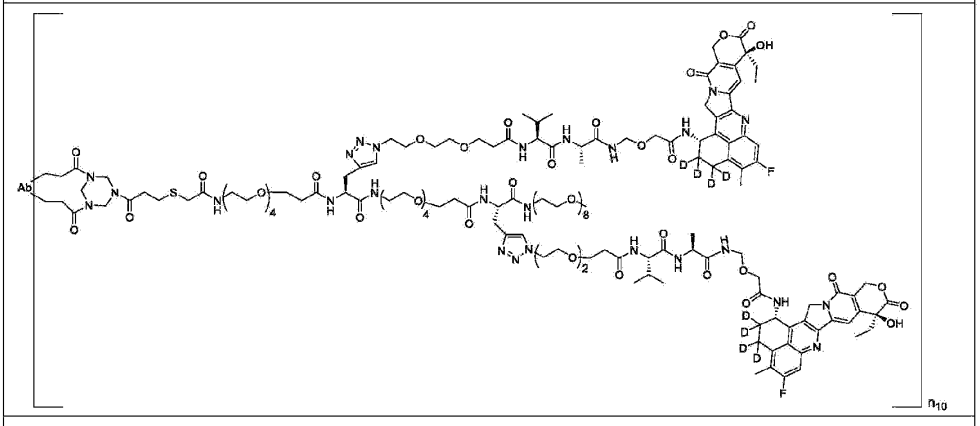
[0633] 配制一定浓度(5mM)连接子-活性药物单元化合物溶于DMSO(dimethyl sulfoxide，二甲亚砜)中，根据DAR值的不同，如DAR4和DAR8，按照药物与巯基的摩尔比1.5～5:1缓慢加药，于25℃搅拌反应1-4h。反应结束后，用ADC缓冲液(20mM盐酸组氨酸，36.5g/L甘露糖，ph6.0)离心超滤，纯化去除残余未反应药物以及DMSO等游离小分子，并且利用疏水高效液相(HIC-HPLC)法及液质联用(LC-MS)法检测偶联情况，用体积排阻色谱法(SEC)检测偶联后样品纯度。

表16.采用通用偶联方法制备的抗体药物偶联物的结构

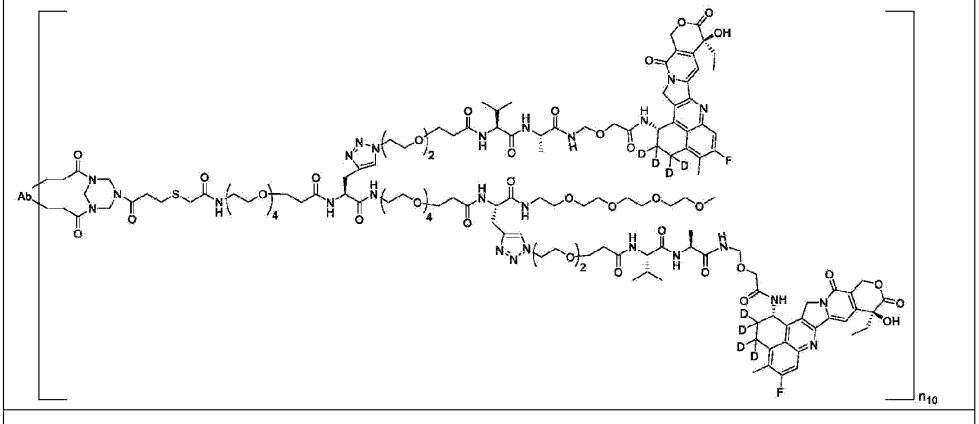
Ab1-DL01-dDxd

Ab2-DL01-dDxd

Ab1-DL10-dDxd



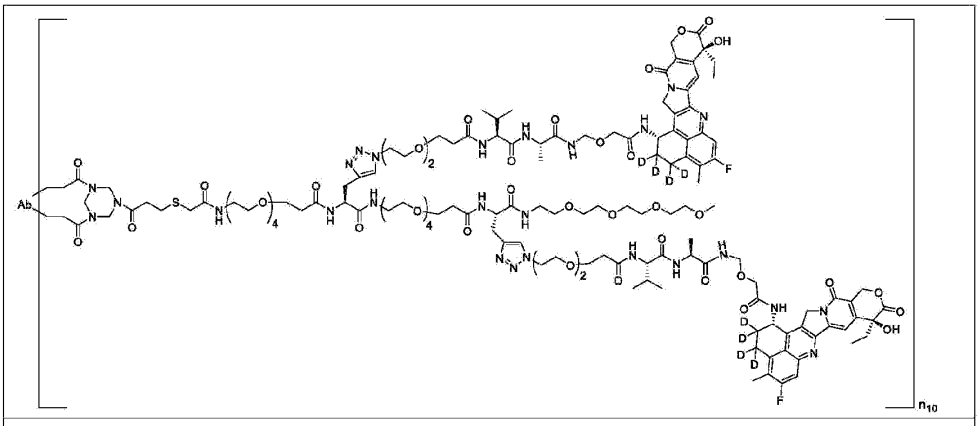
Ab2-DL10-dDxd



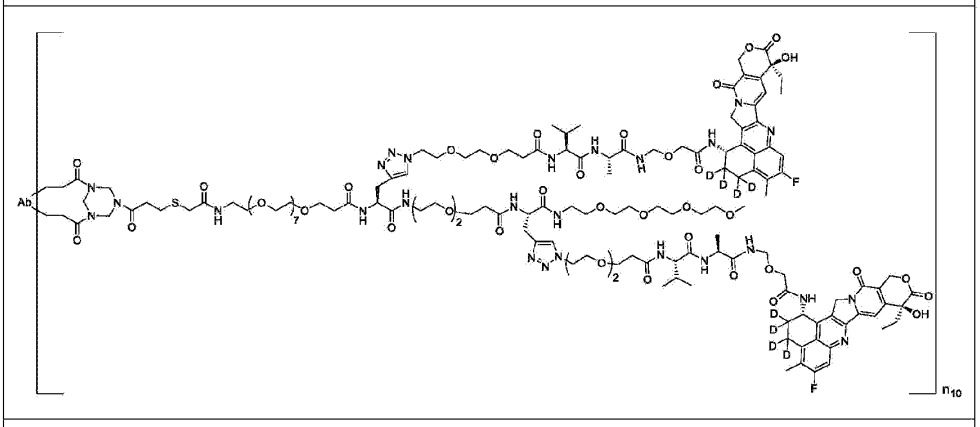
Ab1-DL11-dDxd



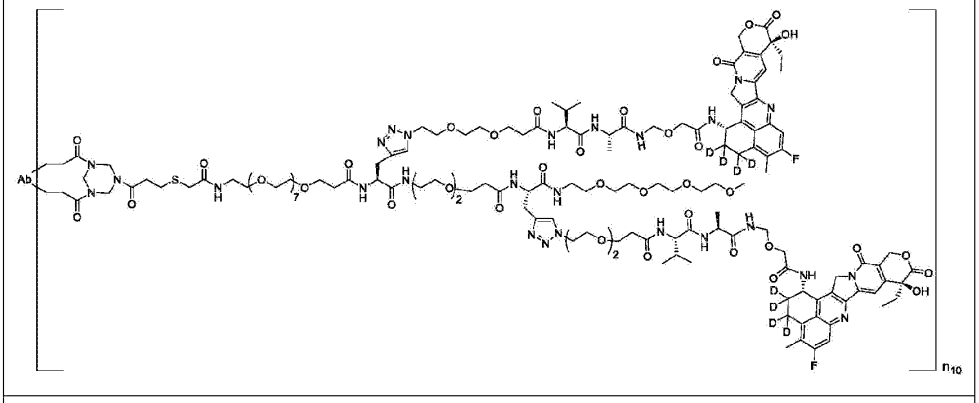
Ab2-DL11-dDxd



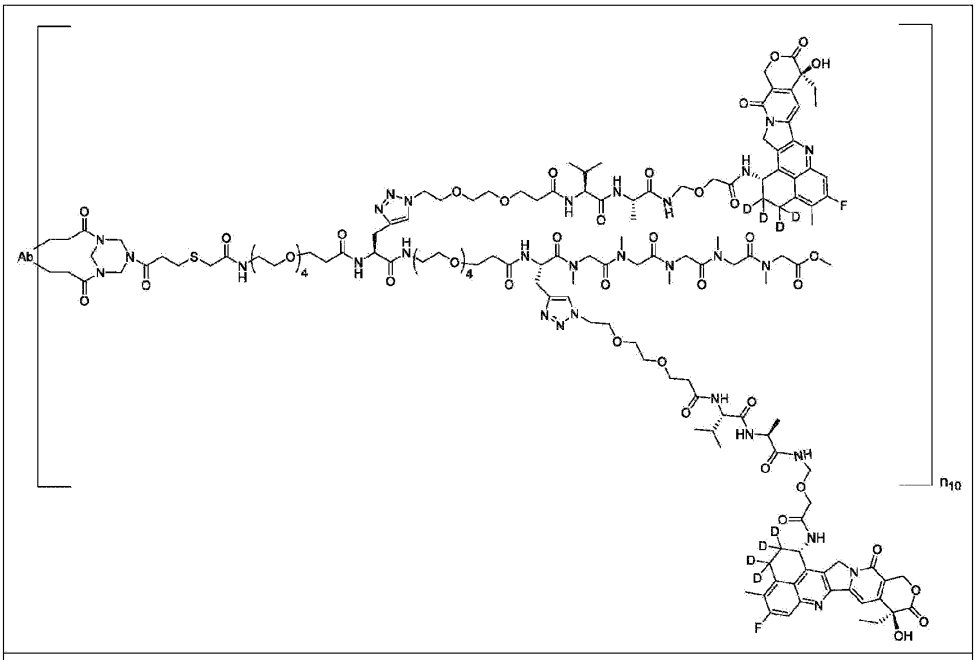
Ab1-DL12-dDxd



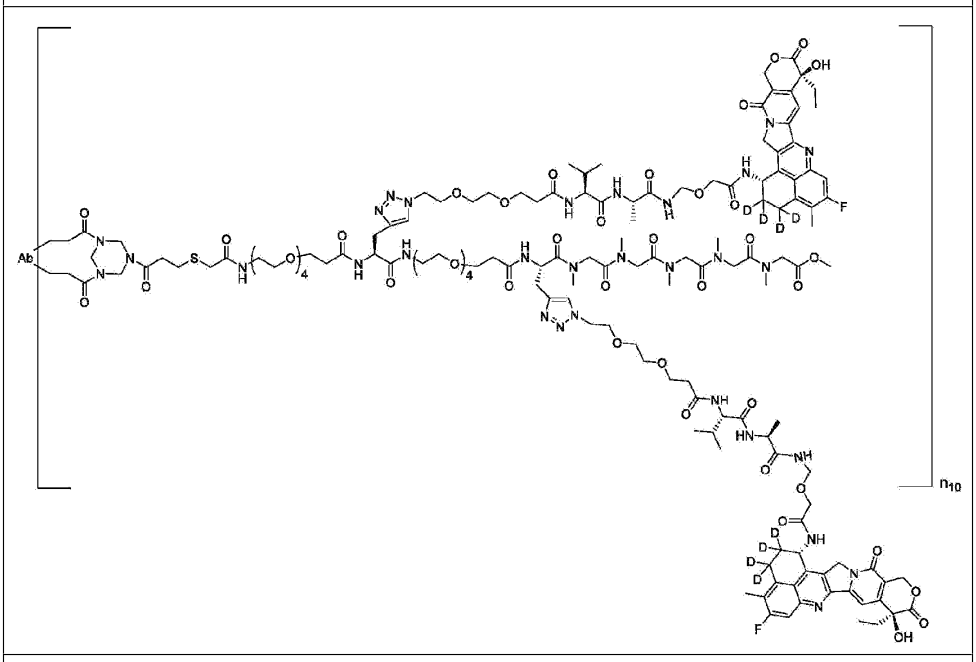
Ab2-DL12-dDxd



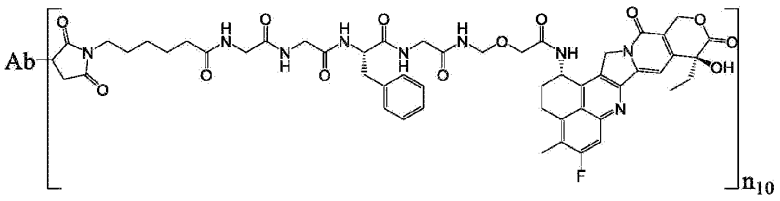
Ab1-DL13-dDxd



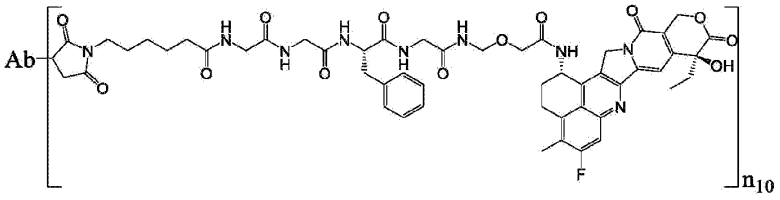
Ab2-DL13-dDxd



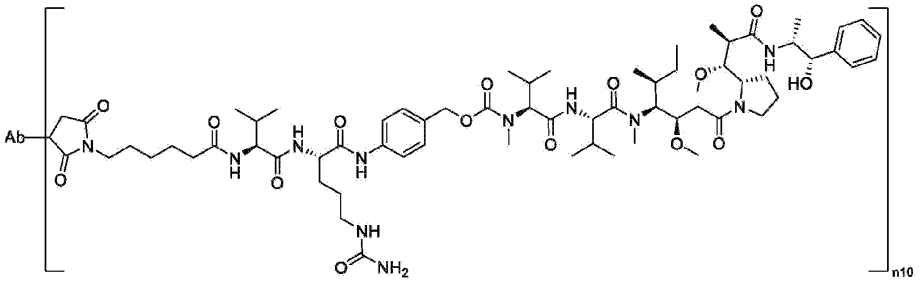
Ab1-DL01-Dxd



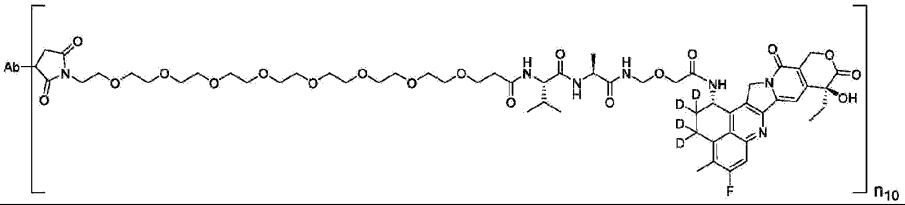
Ab2-DL01-Dxd



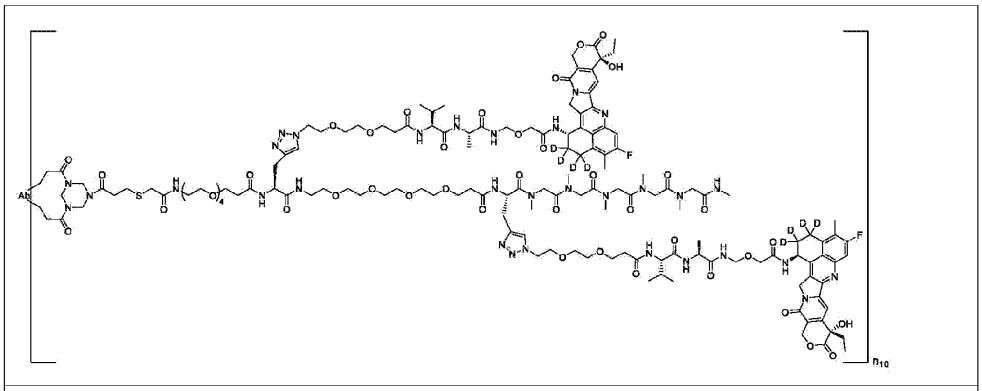
Ab1-MC-VC-PAB-MMAE



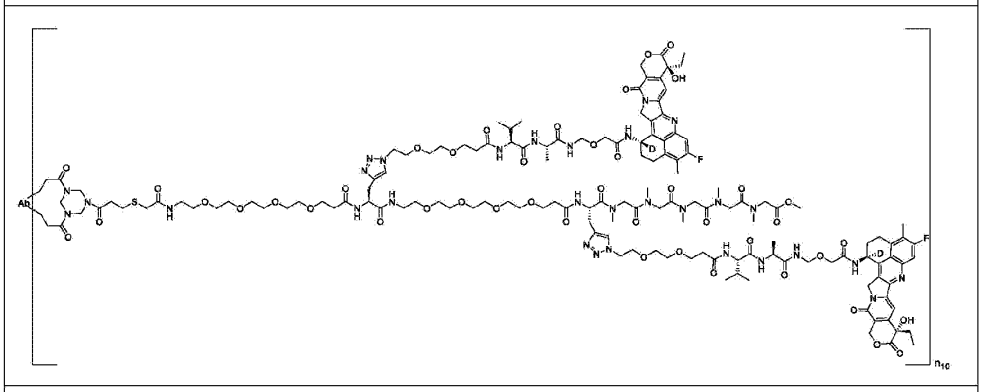
Ab1-DL14-dDxd



Ab1-DL25- dDxd



Ab1-DL13-d1Dxd



Ab1-DL25-d1Dxd

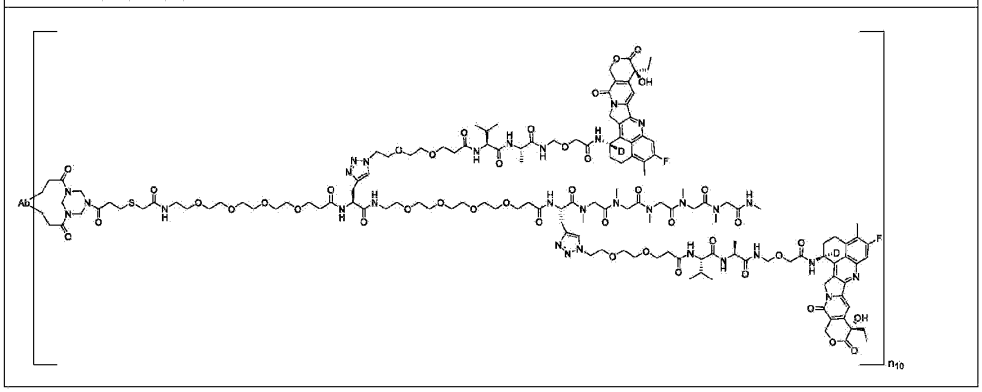


表17.采用通用偶联方法制备的抗体药物偶联物的测试结果

ADC 编号	DAR	SEC%
Ab1-DL01-dDxd	7.95	98.98
Ab2-DL01-dDxd	7.95	97.37
Ab1-DL10-dDxd	8.10	97.37
Ab2-DL10- dDxd	8.16	95.35

Ab1-DL11- dDxd	8.24	95.26
Ab2-DL11-dDxd	8.64	89.17
Ab1-DL12-dDxd	8.52	95.21
Ab2-DL12-dDxd	8.58	98.24
Ab1-DL13-dDxd	8.54	95.08
Ab2-DL13-dDxd	8.56	98.42
Ab1-DL01-Dxd	7.9	99.15
Ab2-DL01-Dxd	7.95	99.24
Ab1-DL13-Dxd	7.86	98.19
Ab1-MC-VC-PAB-MMAE	3.95	94.42
Ab1-DL14-dDxd	7.99	98.93
Ab1-DL25- dDxd	7.92	97.67
Ab1-DL13-d1Dxd	8.12	99.15
Ab1-DL25-d1Dxd	7.68	99.15

ADC编号含义：除“Ab1−MC−VC−PAB−MMAE”外，其他编号均以两个破折号“−”连接三个部分，

依次为所使用的靶向部分，连接子及载荷部分，以Ab1−DL01−dDxd为例，靶向部分为Ab1抗体，连接子为DL01，载荷为dDxd化合物。“Ab1−MC−VC−PAB−MMAE”意为，抗体为“Ab1”，连接子为“MC−VC−PAB”，载荷为MMAE。

[0634] 实施例59抗CDCP1抗体药物偶联物在肿瘤细胞的内化效率

[0635] 实验前一天将指数倍增期的细胞EBC−1(人肺腺癌细胞)均匀铺于6孔板中。每孔铺入约5E5个细胞，2mL。抗体透析至10mM碳酸氢钠缓冲液(pH值8.5)中，加入pHAb Amine Reactive Dye染料，反应1h后超滤透析。将计算好浓度的Antibody−dye用细胞培养基稀释至10μg/mL，取100μL，加入2mL的细胞孔中，37℃下孵育细胞，时间梯度为0h，1h，3h，5h，7h，24h。内吞时间结束后流式细胞仪检测荧光强度。

[0636] 使用抗体均为Ab1，连接子均为DL01，对比载荷分别为Dxd和dDxd构建的两种ADC(Ab1−DL01−Dxd、Ab1−DL01−dDxd)在人肺腺癌细胞EBC−1中的内化效率

试验结果如图1所示，结果显示在人肺腺癌细胞EBC-1中，载荷为dDxd的ADC的内化效率高于载荷为Dxd的ADC。

[0637] 使用抗体均为Ab2，连接子均为DL01，对比载荷分别为Dxd和dDxd构建的两种ADC(Ab2-DL01-Dxd、Ab2-DL01-dDxd)在胰腺导管癌细胞系XPC-3的内化效率试验结果如图2所示，结果显示在胰腺导管癌细胞BXPC-3中，载荷为dDxd的ADC的内化效率高于载荷为Dxd的ADC。

[0638] 结果惊奇的发现，根据所选用的抗体不同，采用本发明的dDxd作为载荷所制备的抗体药物偶联物的内化性能在特定的肿瘤细胞类型中优于以Dxd为载荷的同种抗体所制备的抗体药物偶联物。

[0639] 实施例60抗CDCP1抗体药物偶联物对肿瘤细胞的抑制作用

[0640] 将指数倍增期的人肺腺癌细胞EBC-1、人非小细胞肺癌细胞HCC827以5000-10000/mL的密度，以100μL每孔分别接种于96孔板。37℃、5% CO_2培养箱孵育过夜。将ADC用完全培养基梯度配制为浓度0～3333.3nM，9个浓度点，100μL加入孔中，每个浓度设立3个复孔，同时设置空白对照组。药物作用72～144h后，加CCK-8试剂，37℃、5% CO_2培养箱孵育1～4h，于酶标仪450nm处检测各孔的OD值。计算抑制率IR%＝(OD空白-OD药物)×100/OD空白。将抑制率和药物浓度进行四参数拟合，使用GraphPad Prism，计算IC_{50}。

表18.抗CDCP1抗体药物偶联物对人肺腺癌细胞EBC-1的抑制作用

ADC	EBC-1	
	IC50 (nM)	MIR (%)
Ab1-DL01-dDxd	13.20	99.04
Ab2-DL01-dDxd	10.95	99.45
Ab1-DL10-dDxd	12.52	99.51
Ab2-DL10-dDxd	13.72	99.38
Ab1-DL11-dDxd	18.08	99.37
Ab2-DL11-dDxd	16.58	99.5
Ab1-DL12-dDxd	16.88	99.21
Ab2-DL12-dDxd	18.63	99.03
Ab1-DL13-dDxd	16.51	98.74
Ab2-DL13-dDxd	19.08	98.83
Ab1-DL01-Dxd	18.19	99.24

表19.抗CDCP1抗体药物偶联物对人非小细胞肺癌细胞HCC827的抑制作用

ADC	HCC827	
	IC50 (nM)	MIR (%)
Ab1-DL01-dDxd	1.02	98.70
Ab2-DL01-dDxd	1.25	98.28
Ab1-DL10-dDxd	1.37	99.55
Ab2-DL10-dDxd	1.55	99.24
Ab1-DL11-dDxd	1.75	99.37
Ab2-DL11-dDxd	1.70	99.16
Ab1-DL12-dDxd	1.34	99.26
Ab2-DL12-dDxd	1.74	98.93

Ab1-DL13-dDxd	1.36	99.33
Ab2-DL13-dDxd	2.09	99.15

[0641] 试验结果表明，本发明中的多个连接子-载荷L-D结构制备的抗体药物偶联物对肿瘤细胞都具有明显的增殖抑制效果。

[0642] 实施例61不同载荷抗体药物偶联物细胞抑制效果比较

[0643] 1)将指数倍增期的人肺腺癌细胞EBC-1以5000-10000/mL的密度，以100μL每孔分别接种于96孔板。37℃、5% CO_2培养箱孵育过夜。

[0644] 2)将ADC用完全培养基梯度配制为浓度0～3333.3nM，9个浓度点，100μL加入孔中，每个浓度设立3个复孔，同时设置空白对照组。

[0645] 3)药物作用72～144h后，加CCK-8试剂，37℃、5% CO_2培养箱孵育1～4h，于酶标仪450nm处检测各孔的OD值。计算抑制率IR%＝(OD空白-OD药物)*100/OD空白。将抑制率和药物浓度进行四参数拟合，使用GraphPad Prism，计算IC_{50}。

[0646] 试验结果表明，本实施例的抗体药物偶联物对肿瘤细胞具有明显的增殖抑制效果，如表20所示，在抗体和连接子相同，载荷为dDxd的ADC的抑制活性优于载荷为Dxd的ADC；两种ADC的抑制率相当。

表20.EBC-1细胞抑制效果比较

ADC	Cell	IC50 (nM)	MIR(%)
Ab1-DL01-dDxd	EBC-1 (人肺腺癌细胞)	18.19	99.24
Ab1-DL01-Dxd		56.10	100.0

[0647] 实施例62抗CDCP1抗体药物偶联物(MMAE载荷)对EBC-1细胞(人肺腺癌细胞)异种移植瘤生长抑制实验

[0648] 1)EBC-1人肺腺癌细胞培养于含10% FBS(Fetal Bovine Serum)的MEM培养基(Minimum Essential Medium)，维持在含5% CO_2的37℃饱和湿度培养箱中。

[0649] 2)收集对数生长期EBC-1细胞，重悬于含50% Matrigel的MEM基础培养基中，调整细胞密度至1E8/mL。

[0650] 3)在无菌条件下，接种0.1mL细胞悬液至小鼠右侧腋窝皮下，接种密度为1E7个细胞/0.1mL/鼠。

[0651] 4)动物接种后7天，剔除掉过大过小以及不规则的肿瘤，选择规则的肿瘤体积为120.61mm^3−207.69mm^{3}的动物进行分组，每组6只，分组后每组动物肿瘤体积平均值为146.34mm^{3}左右时，分组当日记为Day 0，并按照动物体重进行给药。

[0652] 5)每周2次测定动物体重和肿瘤体积，每日观察记录动物临床症状。

[0653] 在EBC−1(人肺腺癌细胞)肿瘤模型中，如图3所示，1mg/kg的剂量下，Ab1−MC−VC−PAB−MMAE(抗体为Ab1,连接子为MC−VC−PAB，载荷为MMAE)和C1−DL02−MMAE对肿瘤有抑制作用，Ab1−MC−VC−PAB−MMAE的药效明显优于C1−DL02−MMAE，C1−DL02−MMAE随给药剂量提升，也展现出良好的药效，具有明显剂量相关性。

[0654] 实施例63抗CDCP1抗体药物偶联物(MMAE载荷)对BxPC3细胞(人原位胰腺癌细胞)异种移植瘤生长抑制实验

[0655] 1)BxPC−3细胞(人原位胰腺癌细胞)培养于含10％ FBS的RPMI−1640培养基，维持在含5％CO_2的37℃饱和湿度培养箱中。

[0656] 2)收集对数生长期BxPC−3细胞(人原位胰腺癌细胞)，重悬于含50％ Matrigel的MEM基础培养基中，调整细胞密度至1E8/mL。

[0657] 3)在无菌条件下，接种0.1mL细胞悬液至小鼠右侧腋窝皮下，接种密度为1E7个细胞/0.1mL/鼠。

[0658] 4)动物接种后27天，剔除掉过大过小以及不规则的肿瘤，选择规则的肿瘤体积为100.5mm^3−207.86mm^{3}的动物进行分组，每组6只，分组后每组动物肿瘤体积平均值为145.33mm^{3}左右时，分组当日记为Day 0，并按照动物体重进行给药。

[0659] 5)两次给药分别在0天和11天，每周2次测定动物体重和肿瘤体积，每日观察记录动物临床症状。

[0660] 试验结果显示(图4)，在BxPC−3(人原位胰腺癌细胞)肿瘤模型中，2mg/kg的低剂量给药，Ab1−MC−VC−PAB−MMAE和C1−DL02−MMAE具有相近的药效，都表现出非常好肿瘤抑制效果。并且C1−DL02−MMAE具有明显的剂量相关性，在6mg/kg的给药剂量下，观察到肿瘤消退。

[0661] 实施例64抗CDCP1抗体药物偶联物(喜树碱类载荷)对EBC-1细胞(人肺腺癌细胞)异种移植瘤生长抑制实验(5mg/kg剂量)

[0662] 1)EBC-1细胞培养于含10% FBS的MEM培养基，维持在含5% CO_2的37℃饱和湿度培养箱中。

[0663] 2)收集对数生长期EBC-1细胞，重悬于含50% Matrigel的MEM基础培养基中，调整细胞密度至1E8/mL。

[0664] 3)在无菌条件下，接种0.1mL细胞悬液至小鼠右侧背部皮下，接种密度为1E7个细胞/0.1mL/鼠。

[0665] 4)动物接种后7天，剔除掉过大过小以及不规则的肿瘤，选择规则的肿瘤体积为100.72mm^3-193.56mm^3的动物进行分组，每组7只，分组后每组动物肿瘤体积平均值为134.79mm^3左右时，分组当日记为Day 0，并按照动物体重进行给药，分别在0天和24天给药。

[0666] 5)试验期间每周2次测定动物体重和肿瘤体积，每日观察记录动物临床症状。

[0667] 试验结果显示(图5)，在5mg/kg的剂量下，Ab1-DL13-dDxd对肿瘤的抑制作用显著优于Ab1-DL13-Dxd，Ab1-DL13-dDxd显示出更好的体内药效。

[0668] 实施例65抗CDCP1抗体药物偶联物(喜树碱类载荷)对EBC-1细胞(人肺腺癌细胞)异种移植瘤生长抑制实验(2.5mg/kg剂量)

[0669] 1)EBC-1细胞培养于含10% FBS的MEM培养基，维持在含5% CO_2的37℃饱和湿度培养箱中。

[0670] 2)收集对数生长期EBC-1细胞，重悬于含50% Matrigel的MEM基础培养基中，调整细胞密度至1E8/mL。

[0671] 3)在无菌条件下，接种0.1mL细胞悬液至小鼠右侧背部皮下，接种密度为1E7个细胞/0.1mL/鼠。

[0672] 动物接种后7天，剔除掉过大过小以及不规则的肿瘤，选择规则的肿瘤体积为123.27mm^3-213.02mm^3的动物进行分组，每组7只，分组后每组动物肿瘤体积平均值为149.65mm^3左右时，分组当日记为Day 0，并按照动物体重进行给药。

[0673] 试验期间每周2次测定动物体重和肿瘤体积，每日观察记录动物临床症状。

[0674] 试验结果表明(图6)，在2.5mg/kg的剂量下，Ab1-DL13-dDXd对肿瘤的抑制作用优于Ab1-DL01-Dxd。

[0675] 实施例66毒性耐受试验

[0676] 1)取检疫合格ICR小鼠，在分组前称量，雌性动物体重范围约为26～31克。

[0677] 2)按体重随机分为以下剂量组：Ab1-DL01-dDxd 600mg/kg、Ab1-DL01-Dxd 600mg/kg,每组4只小鼠，静脉注射相应药液。

[0678] 3)另取同批次小鼠作为对照组，按照同体积尾静脉给予0.9％氯化钠注射液。给药后分别在4、7、11、14、17天检测体重。

[0679] 试验结果表明(图7)：在本次实验条件下，600mg/kg剂量下Ab1-DL01-dDxd死亡1只小鼠，Ab1-DL01-Dxd小鼠全部死亡。数据表明Ab1-DL01-dDxd比Ab1-DL01-Dxd在小鼠模型上具有更高的毒性耐受量，体现dDxd相较于Dxd作为ADC载荷具有更优的体内安全性特征。

[0680] 上述实施例的试验结果表明，本发明中的抗CDCP1抗体具有较高的收率、良好的热稳定性和蛋白结合稳定性、优异的纯度和细胞结合活性以及较好的内吞效应，在提升肿瘤治疗的精确性与有效性方面展现出广阔的应用前景。本发明中的抗CDCP1抗体药物偶联物具有较高的载荷递送效率、内化效率高，对肿瘤细胞具有优异的抑制活性、体内药效及安全性良好，本发明的氘代载荷也大大降低抗体药物偶联物的体内毒性，显著提高了制备的抗体药物偶联物的安全性，为肿瘤治疗药物的优化提供了创新性解决方案。

[0681] 以上所揭示的仅是本发明的部分实施例，并非是对本发明作任何形式的限制，本领域普通技术人员能够理解，本发明并不限于以上各个具体实施方式。对本领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，可以对本发明进行若干改进和修饰，这些改进和修饰也落入本发明权利要求的保护范围内。

权利要求书

[权利要求 1] 一种靶向CDCP1的抗体药物偶联物，其特征在于，所述抗体药物偶联物中包含靶向CDCP1的靶向部分，所述靶向部分包括重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，其中：

(1)所述重链可变区(VH)包含如下3个CDRs：SEQ ID NO:19所示序列的CDR-H1，SEQ ID NO:20所示序列的CDR-H2和SEQ ID NO:21所示序列的CDR-H3；和，

所述轻链可变区(VL)包含如下3个CDRs：SEQ ID NO:22所示序列的CDR-L1，SEQ ID NO:23所示序列的CDR-L2和SEQ ID NO:24所示序列的CDR-L3；

或

(2)所述重链可变区(VH)包含如下3个CDRs：SEQ ID NO:29所示序列的CDR-H1，SEQ ID NO:30所示序列的CDR-H2和SEQ ID NO:31所示序列的CDR-H3；和，

所述轻链可变区(VL)包含如下3个CDRs：SEQ ID NO:32所示序列的CDR-L1，SEQ ID NO:33所示序列的CDR-L2和SEQ ID NO:34所示序列的CDR-L3；

所述CDRs按IMGT编号系统定义。

[权利要求 2] 根据权利要求1所述的抗体药物偶联物，其特征在于，

(1)所述重链可变区(VH)包含如SEQ ID NO:25所示的序列或与SEQ ID NO:25相比同一性大于80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列，所述轻链可变区(VL)包含如SEQ ID NO:26所示的序列或与SEQ ID NO:26相比同一性大于80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列；或

(2)所述重链可变区(VH)包含如SEQ ID NO:35所示的序列或与SEQ ID NO:35相比同一性大于80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列，所述轻链可变区(VL)包含如SEQ ID NO:

36所示的序列或与SEQ ID NO:36相比同一性大于80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列。

[权利要求 3] 根据权利要求1或2所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述靶向部分选自抗体或抗原结合片段。

[权利要求 4] 根据权利要求1-3中任一项所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述抗体或抗原结合片段选自单克隆抗体、双特异性抗体、多特异性抗体或Fab片段、F(ab')片段、$F(ab')_2$片段、Fv片段、dAb、Fd、单链抗体(scFv)。

[权利要求 5] 根据权利要求4所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述靶向部分还包含免疫球蛋白的恒定区，进一步优选的，其中所述的免疫球蛋白选自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

[权利要求 6] 根据权利要求1-5中任一项所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述抗体部分包括重链和轻链，其中，

(1)所述重链包含如SEQ ID NO:27所示的序列或与SEQ ID NO:27相比同一性大于80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列，所述轻链包含如SEQ ID NO:28所示的序列或与SEQ ID NO:28相比同一性大于80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列；或

(2)所述重链包含如SEQ ID NO:37所示的序列或与SEQ ID NO:37相比同一性大于80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列，所述轻链包含如SEQ ID NO:38所示的序列或与SEQ ID NO:38相比同一性大于80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列。

[权利要求 7] 根据权利要求1-6中任一项所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述抗体药物偶联物的结构通式为$Ab-U_n$，其中：

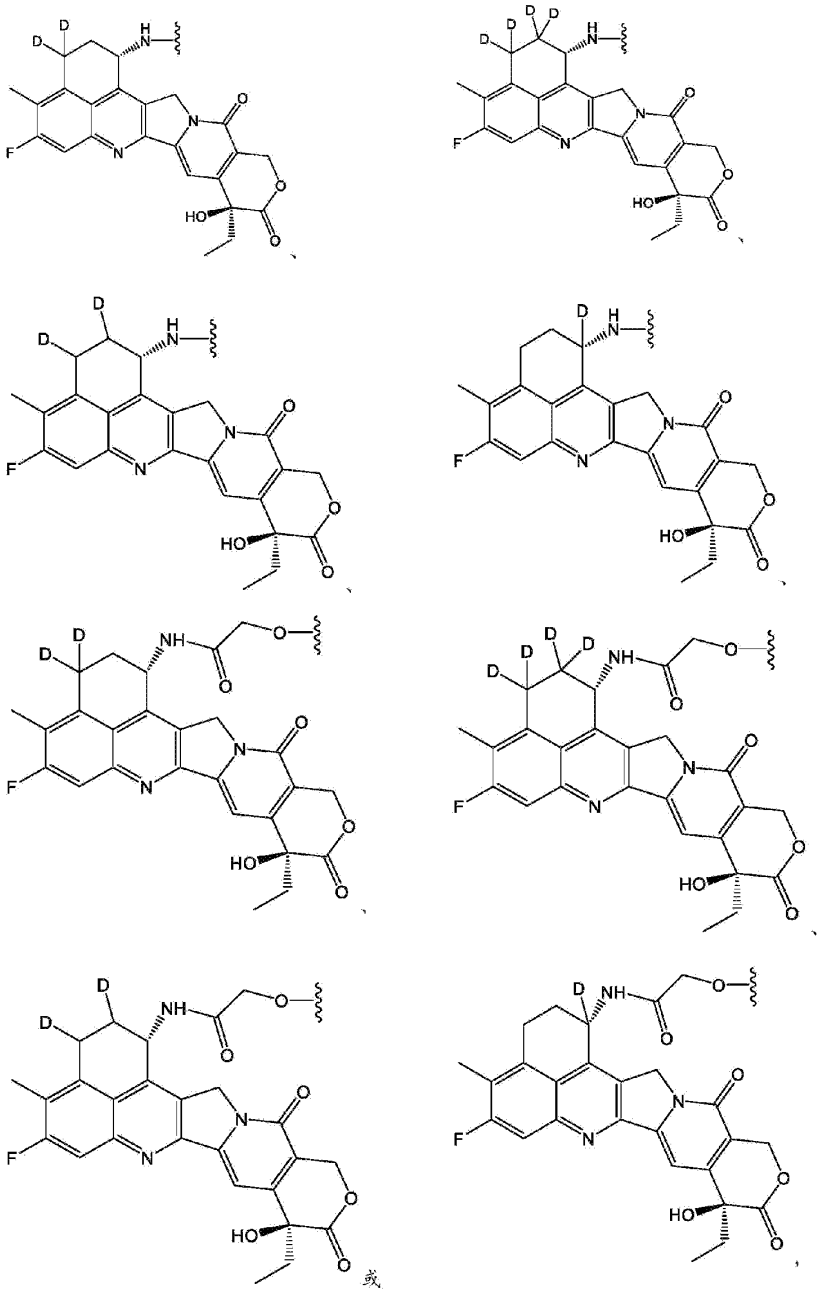
所述Ab表示靶向部分，所述U表示连接子和载荷部分；

所述n为选自1、2、3、4、5、6、7或8中的整数，分别代表连接在所述Ab上的U的数量为1、2、3、4、5、6、7或8；

所述Ab通过连接子与所述载荷共价相连。

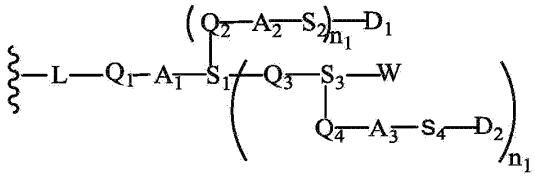
[权利要求 8] 根据权利要求7所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述Ab上通过一个或多个所述连接子连接1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个或16个所述的载荷。

[权利要求 9] 根据权利要求8所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述载荷选自



“ ”是所述载荷和连接子连接的位点。

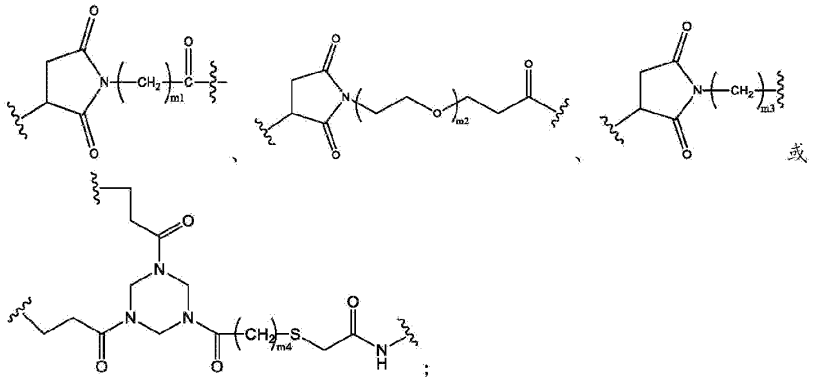
[权利要求 10] 根据权利要求7-9任一项所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述连接子-载荷部分由下式(I)表示：



(I)

其中，

L是附着抗体的接头，选自以下结构：



；

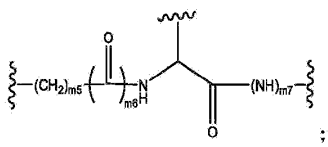
Q_1、Q_2、Q_3、Q_4各自独立地是单键或选自以下结构$-(CH_2CH_2O)p-$、$-NH-(CH_2OCH_2)p-C(O)-$、$-(NHCH_2C(O))-O-$、$-NH(CH_2CH_2O)p-CH_2CH_2C(O)-$、$-(CH_2CH_2O)p-CH_2CH_2C(O)-$、$-CH_2-Y-(CH_2CH_2O)p-CH_2CH_2C(O)-$、$-NHCH_2-Y-(CH_2CH_2O)p-CH_2CH_2C(O)-$、$-(CH_2)-Y-$、$-NHCH_2C(O)CH_2C(O)-$；所述Y选自C3-8环烷基或C3-8环状杂烷基或C3-8环状不饱和杂烃基，所述杂烷基包含选自N、O或者S的1-3个原子，p独立地选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

A_1是单键或由1、2、3或4个氨基酸残基组成的肽；

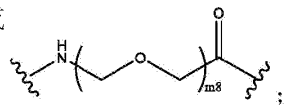
A_2是单键或由1、2、3或4个氨基酸残基组成的肽；

A_3是单键或由1、2、3或4个氨基酸残基组成的肽；

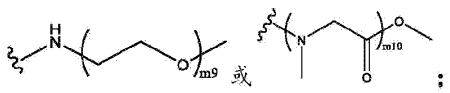
S_1、S_3独立地选自



；

S_2、S_4独立地选自-NH-CH_2-或 ;

D_1是第一载荷化合物，D_2是第二载荷化合物；

W选自 ;

m1选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

m2选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

m3选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

m4选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

m5选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

m6选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

m7选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

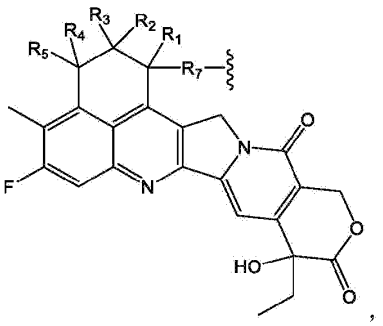
m8选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

m9选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15；

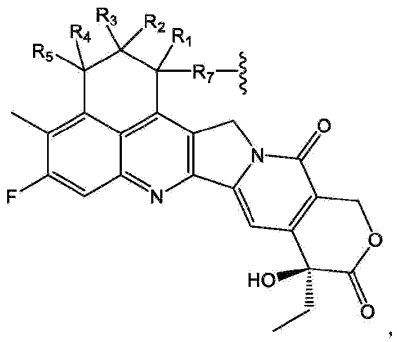
m10选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15；

下标n_1为0或1。

[权利要求 11] 根据权利要求7-10任一项所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述载荷独立地选自以下结构：

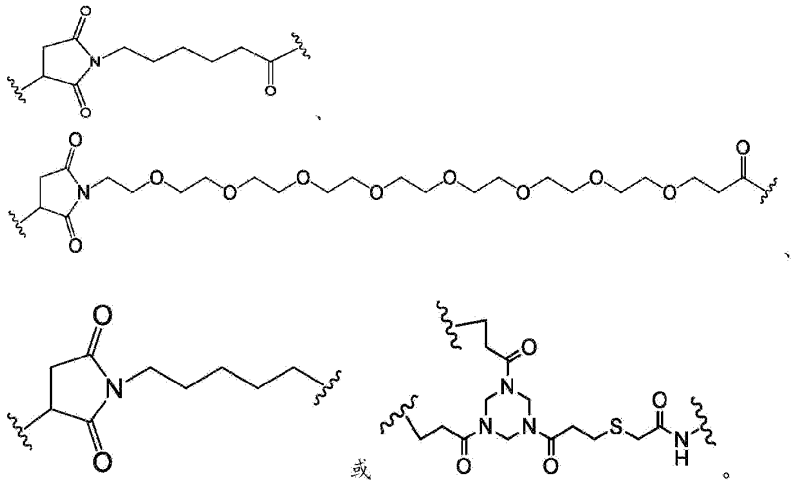
，“ ”是所述载荷和连接子连接的位点，其中：R_1、R_2、R_3、R_4、R_5独立地选自氢(H)、氘(D)或氚(T)，R_1、R_2、R_3、R_4、R_5至少有一个、两个、三个或四个为D，R_7独立地选自-NH-或-NH-C(O)-CH_2-O-。

[权利要求 12] 根据权利要求11所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述载荷独立地选自以下结构：



“〰”是所述载荷和连接子连接的位点，其中：R_1、R_2、R_3、R_4、R_5独立地选自氢(H)、氘(D)或氚(T)，R_1、R_2、R_3、R_4、R_5至少有一个、两个、三个或四个为D，R_7独立地选自−NH−或−NH−C(O)−CH_2−O−。

[权利要求 13] 根据权利要求7−12中任一项所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述−L−选自以下结构：



或

[权利要求 14] 根据权利要求7−12中任一项所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述A_1、A_2、A_3独立地选自单键或包括由选自苯丙氨酸(Phe)、甘氨酸(Gly)、缬氨酸(Val)、赖氨酸(Lys)、精氨酸(Arg)、丝氨酸(Se

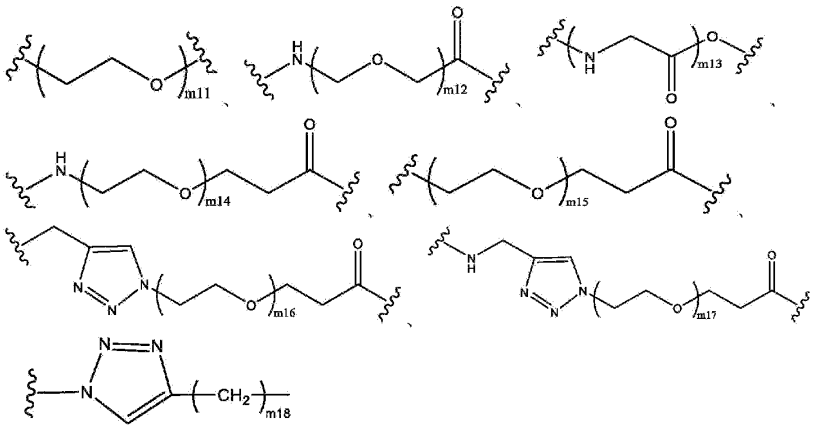
r)、谷氨酸(Glu)、天冬氨酸(Asp)、丙氨酸(Ala)、半胱氨酸(Cys)、瓜氨酸(Cit)中的氨基酸组成的肽。

[权利要求 15] 根据权利要求14所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述A_1、A_2、A_3独立地选自单键或包括由选自苯丙氨酸(Phe)、甘氨酸(Gly)、缬氨酸(Val)、赖氨酸(Lys)、精氨酸(Arg)、丝氨酸(Ser)、谷氨酸(Glu)、天冬氨酸(Asp)、丙氨酸(Ala)、半胱氨酸(Cys)、瓜氨酸(Cit)中的2-4个氨基酸残基组成的肽；优选的，包括由选自苯丙氨酸(Phe)、甘氨酸(Gly)、丙氨酸(Ala)、缬氨酸(Val)的2-4个氨基酸残基组成的肽。

[权利要求 16] 根据权利要求15所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述A_1、A_2、A_3独立地选自单键或包括以下结构：

-Gly-Ala-、-Ala-Gly-、-Val-Gly-、-Gly-Val-、-Val-Cit-、-Val-Ala-、-Gly-Phe-、-Phe-Gly-、-Gly-Gly-Ala-Gly-、-Gly-Gly-Val-Gly-、-Gly-Gly-Phe-Gly-、-Gly-Ala-Gly-Gly-、-Gly-Val-Gly-Gly-、-Gly-Phe-Gly-Gly-、-Gly-Gly-Lys-Gly-、-Gly-Gly-Ser-Gly-、-Gly-Gly-Glu-Gly-、-Gly-Lys-Gly-Gly-、-Gly-Ser-Gly-Gly-、-Gly-Glu-Gly-Gly-、-Gly-Gly-Val-Ala-、-Gly-Gly-Cit-Gly-、-Gly-Cit-Gly-Gly-或-Ala-Ala-Ala-；优选的，-Gly-Gly-Phe-Gly-、-Val-Ala-、-Val-Gly-、-Phe-Gly-、-Gly-Gly-Val-Gly-、-Gly-Gly-Val-Ala-或-Ala-Ala-Ala-；优选的，所述连接子包括以下结构：-Val-Ala-。

[权利要求 17] 根据权利要求7-16中任一项所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述Q_1、Q_2、Q_3、Q_4连接基团独立地选自单键或以下结构：



或 ，

其中，

m11选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

m12选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

m13选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

m14选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

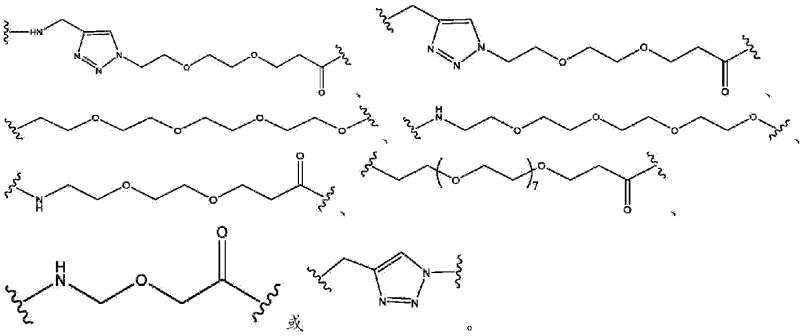
m15选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

m16选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

m17选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

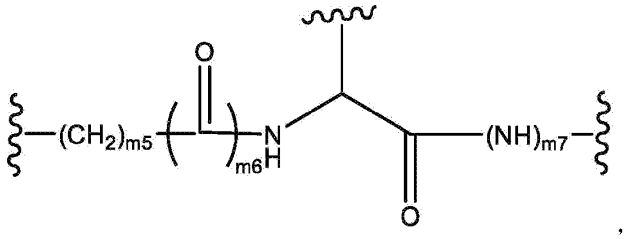
m18选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[权利要求 18] 根据权利要求17所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述Q_1、Q_2、Q_3、Q_4连接基团独立地选自单键或以下结构：



或 。

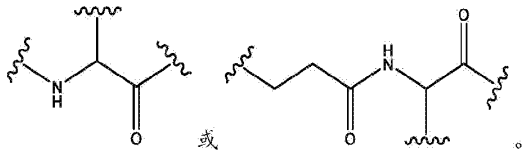
[权利要求 19] 根据权利要求7-18中任一项所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述S_1、S_3独立地选自以下结构：



，

其中，m5选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；m6选0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；m7选0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

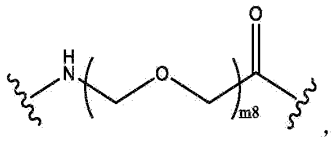
[权利要求 20] 根据权利要求19所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述S_1、S_3独立地选自以下结构：



或

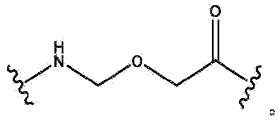
。

[权利要求 21] 根据权利要求7-20中任一项所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述S_2、S_4选自-NH-CH_2-或以下结构：



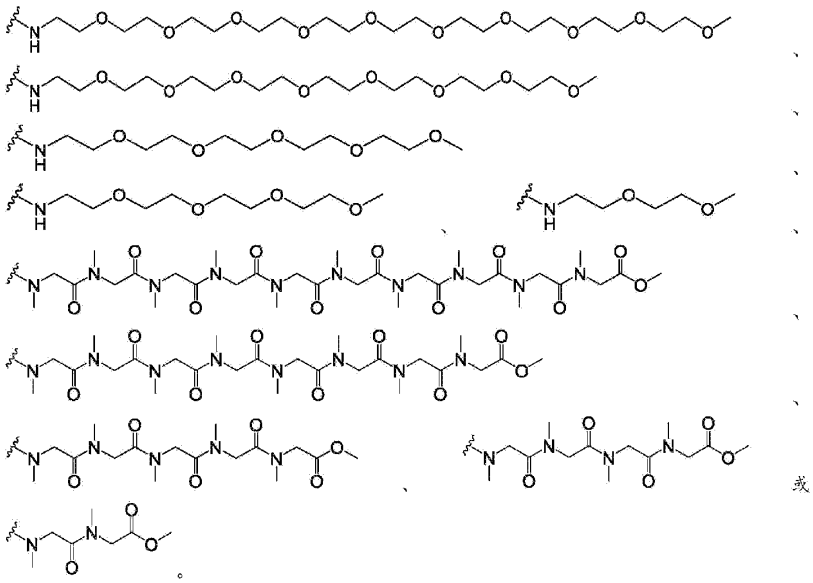
，其中，m8选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[权利要求 22] 根据权利要求21所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述S_2、S_4选自-NH-CH_2-或以下结构：



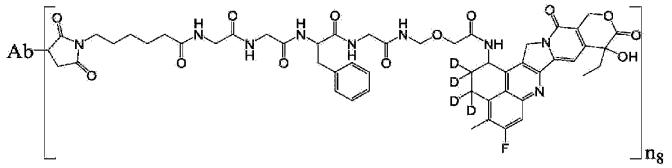
。

[权利要求 23] 根据权利要求7-22中任一项所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述W选自以下结构：

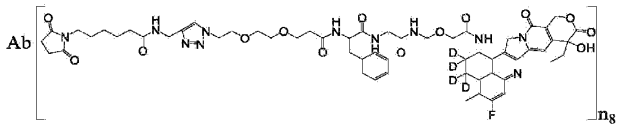


[权利要求 24] 根据权利要求7所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述抗体药物偶联物选自以下结构：

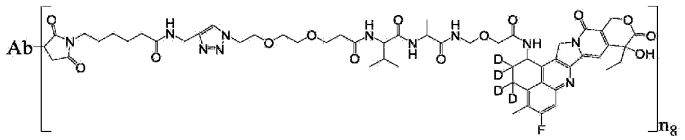
ADC-1



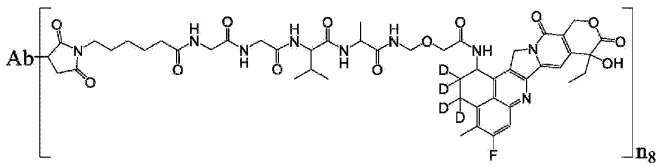
ADC-2



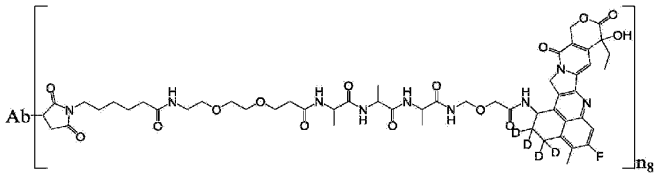
ADC-6



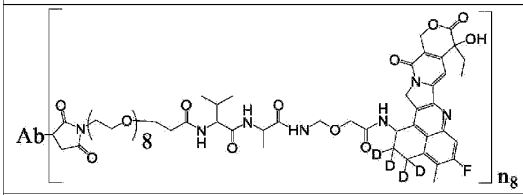
ADC-5



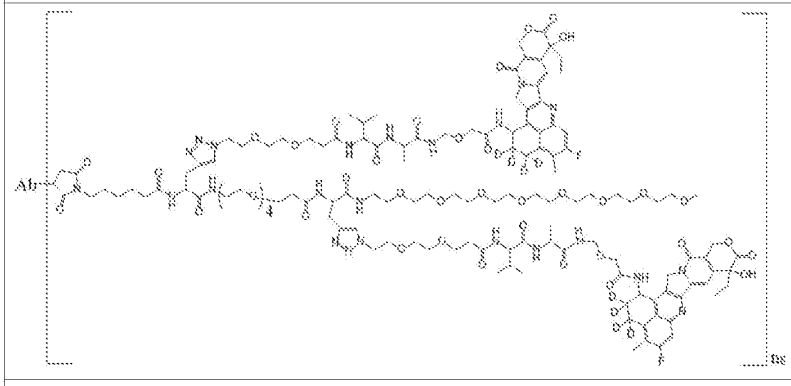
ADC-7



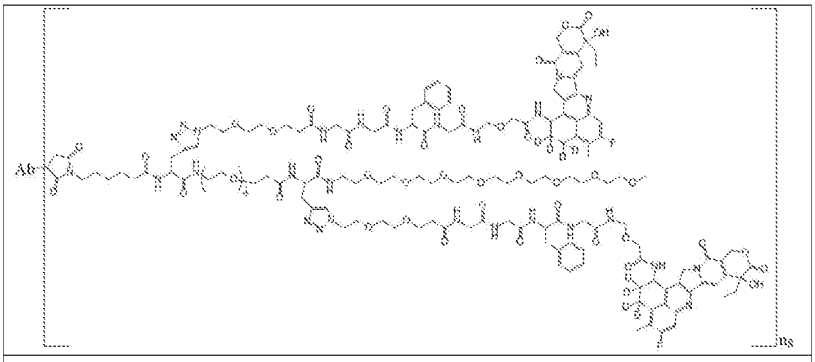
ADC-14



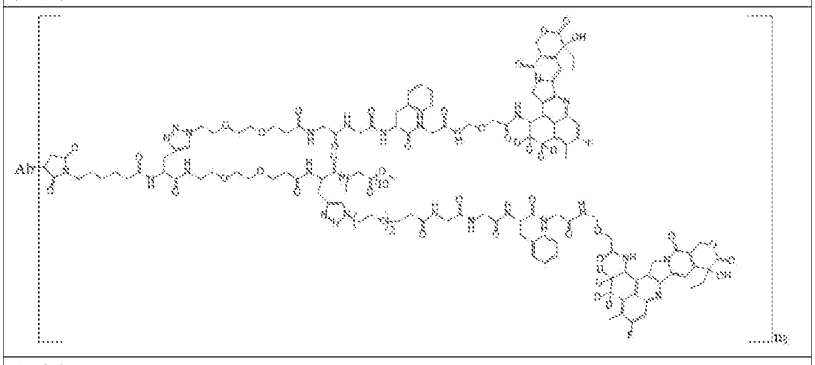
ADC-4



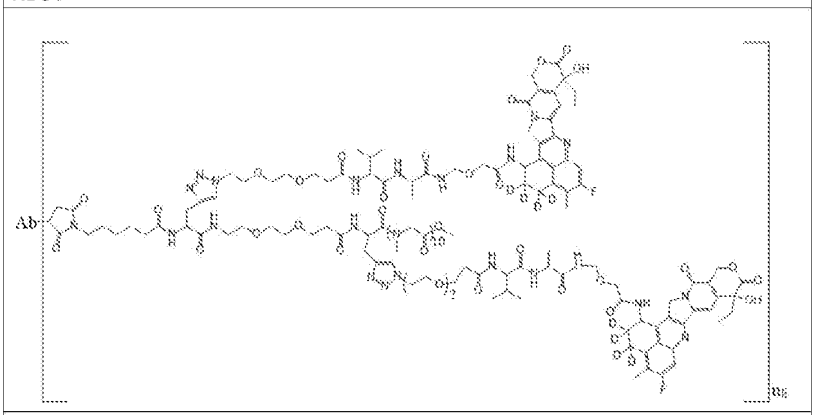
ADC-3



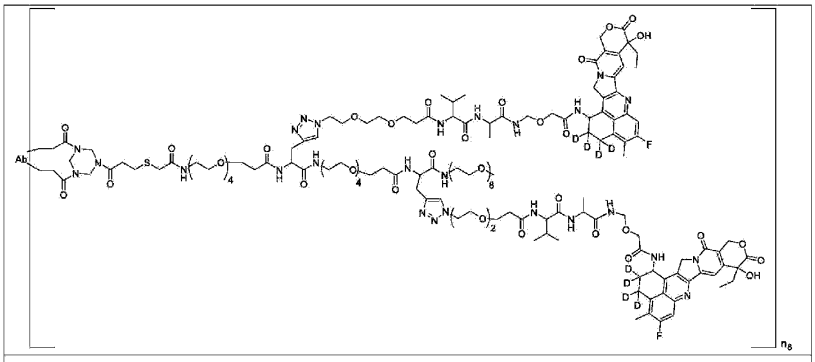
ADC-8



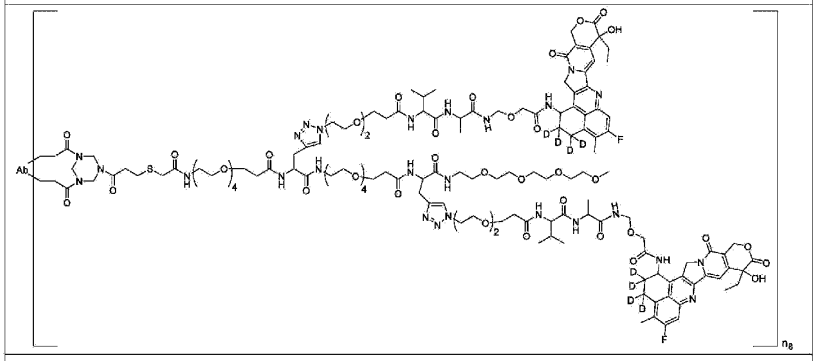
ADC-9



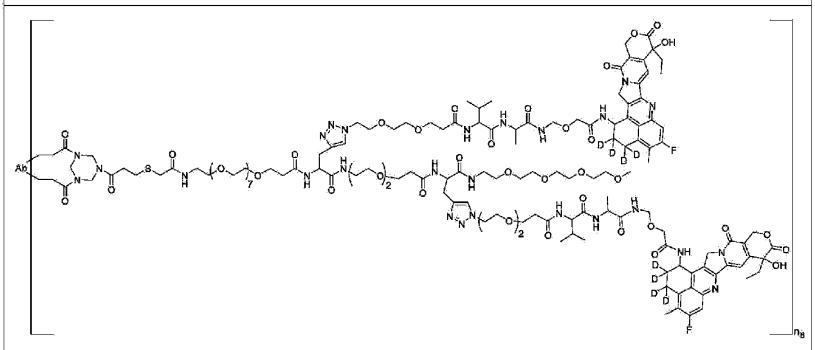
ADC-10



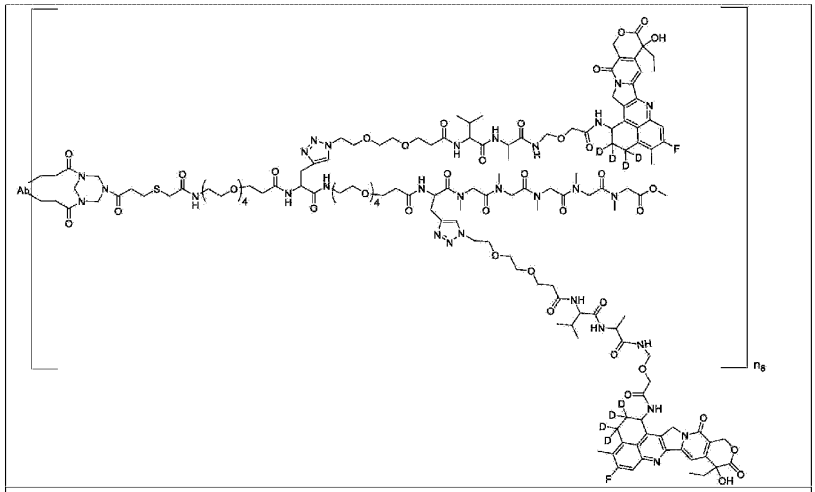
ADC-11



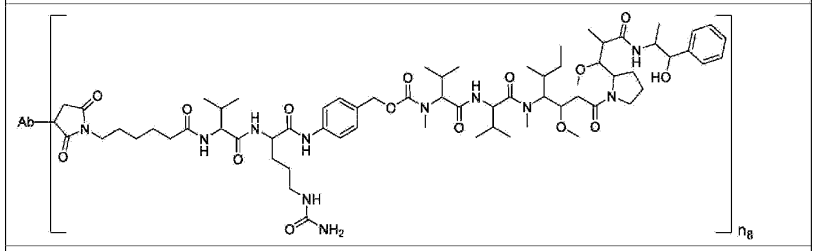
ADC-12



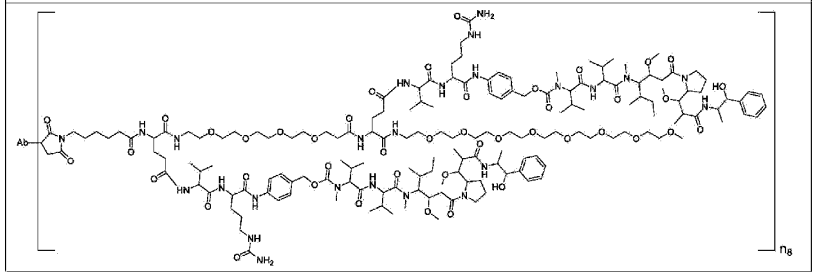
ADC-13



ADC-15



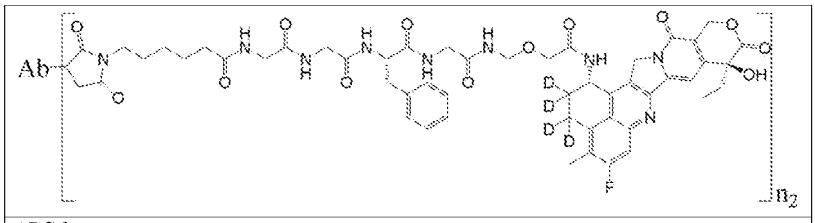
ADC-16



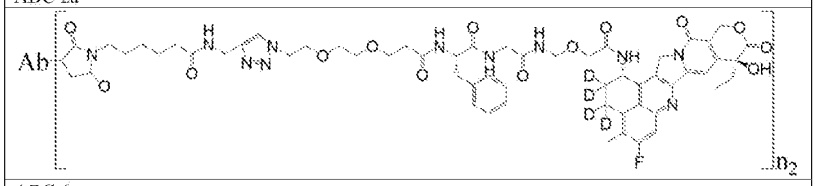
所述n_8选自1、2、3、4、5、6、7或8，代表所述Ab上连接的连接子-载荷部分的数量为1、2、3、4、5、6、7或8个；所述抗体通过抗体中的半胱氨酸上的二硫键连接连接子-载荷部分。

[权利要求 25] 根据权利要求7所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述抗体药物偶联物选自以下结构：

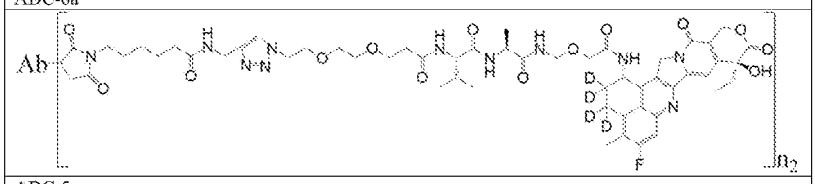
ADC-1a



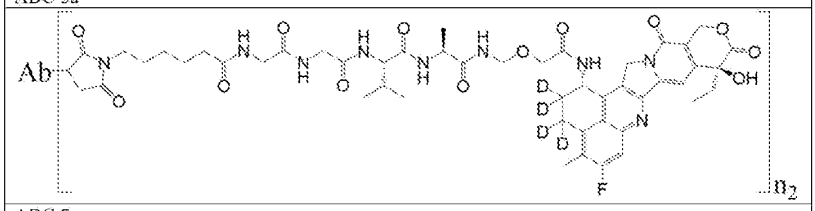
ADC-2a



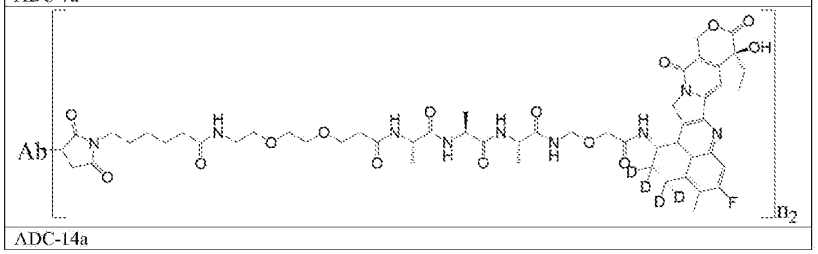
ADC-6a



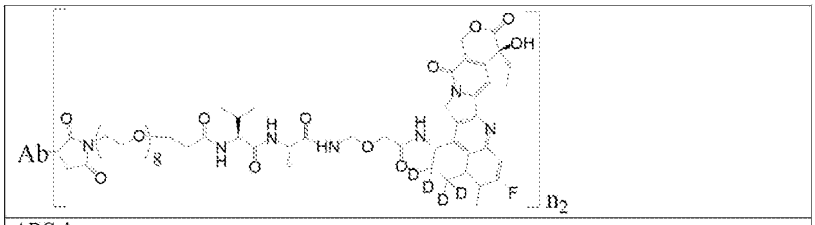
ADC-5a



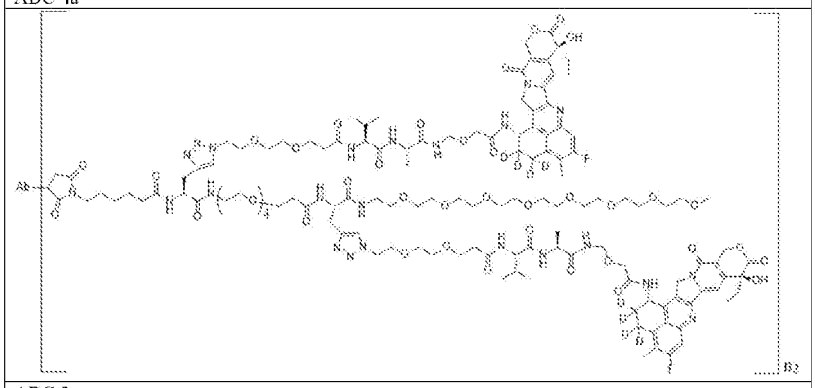
ADC-7a



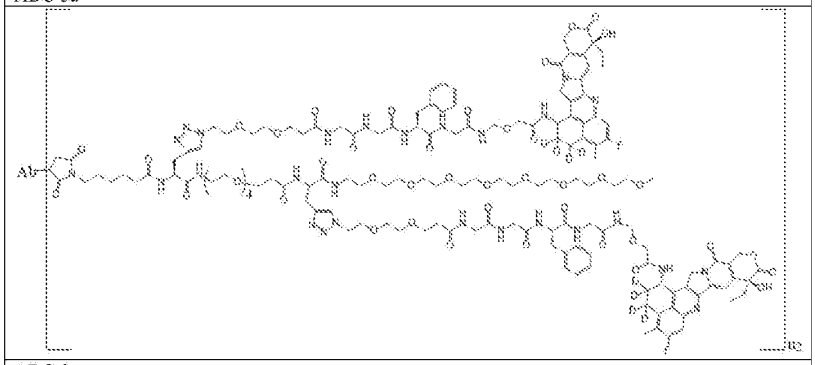
ADC-14a



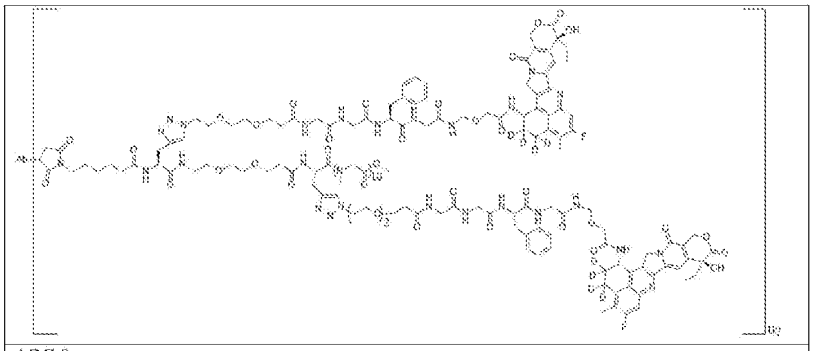
ADC-4a



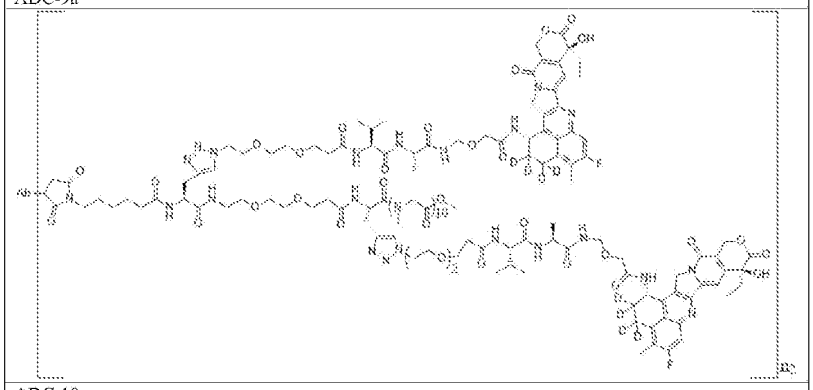
ADC-3a



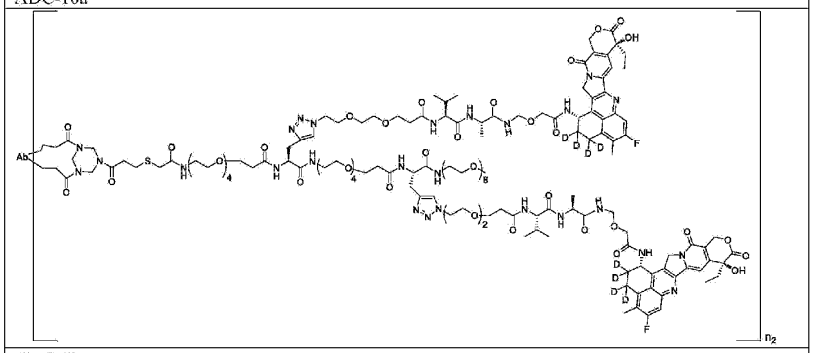
ADC-8a



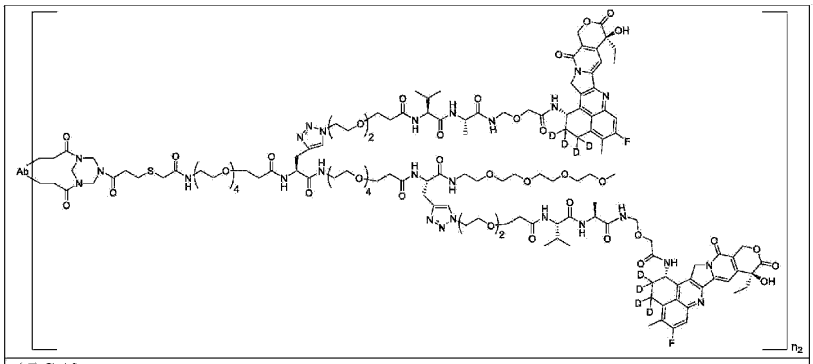
ADC-9a



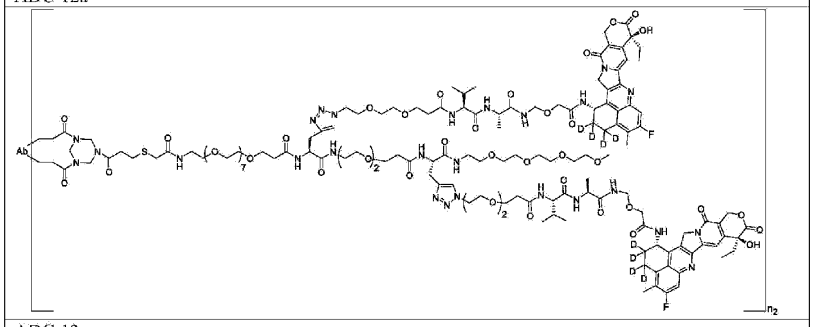
ADC-10a



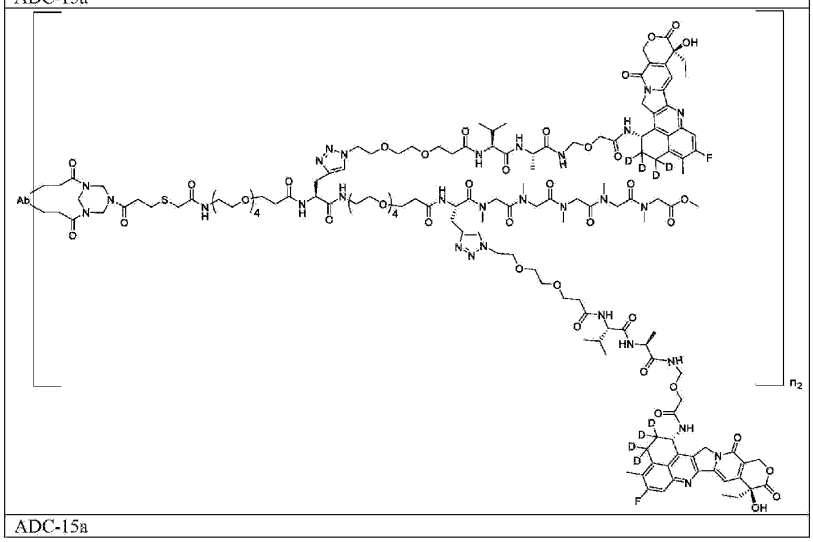
ADC-11a



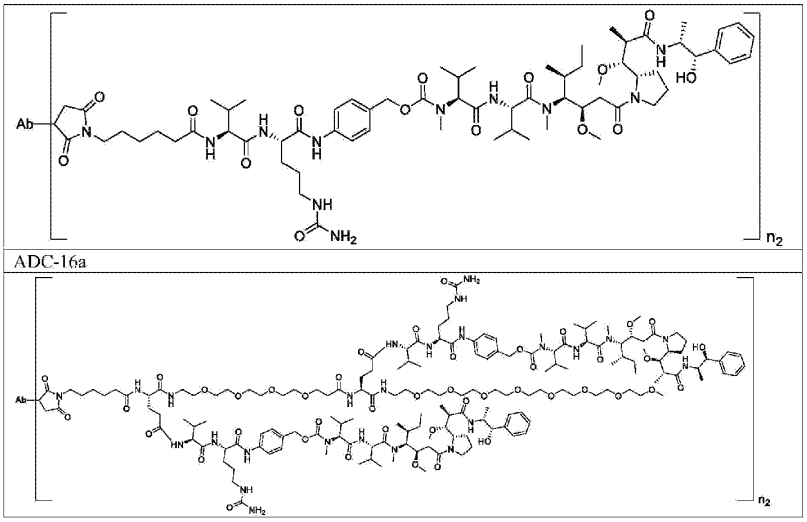
ADC-12a



ADC-13a



ADC-15a



所述n_2选自1、2、3、4、5、6、7或8,代表所述Ab上连接的连接子-载荷部分的数量为1、2、3、4、5、6、7或8个；所述抗体通过抗体中的半胱氨酸上的二硫键连接连接子-载荷部分。

[权利要求 26] 一种肿瘤的治疗方法，其特征在于，所述治疗方法包括给予患者施用有效量的权利要求1～25中任一项所述的抗体药物偶联物。

[权利要求 27] 根据权利要求26所述的治疗方法，其特征在于，所述肿瘤为CDCP-1阳性。

[权利要求 28] 根据权利要求27所述的治疗方法，其特征在于，所述肿瘤是肺癌或胰腺癌；进一步优选的，所述肿瘤是肺癌鳞癌，肺腺癌，非小细胞肺癌或胰腺腺癌。

[权利要求 29] 一种靶向CDCP1的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，其中，

(1)所述重链可变区(VH)包含如下3个CDRs：SEQ ID NO:19所示序列的CDR-H1，SEQ ID NO:20所示序列的CDR-H2和SEQ ID NO:21所示序列的CDR-H3；和，

所述轻链可变区(VL)包含如下3个CDRs：SEQ ID NO:22所示序列的CDR-L1，SEQ ID NO:23所示序列的CDR-L2和SEQ ID NO:24所示序列的CDR-L3；

或

(2)所述重链可变区(VH)包含如下3个CDRs：SEQ ID NO:29所示序列的CDR-H1，包含SEQID NO:30所示序列的CDR-H2和SEQ ID NO:31所示序列的CDR-H3；和，

所述轻链可变区(VL)包含如下3个CDRs：SEQ ID NO:32所示序列的CDR-L1，SEQ ID NO:33所示序列的CDR-L2和SEQ ID NO:34所示序列的CDR-L3；

所述CDRs按IMGT编号系统定义。

[权利要求 30] 根据权利要求29所述的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述的抗体或其抗原结合片段选自单克隆抗体、双特异性抗体、多特异性抗体或Fab片段、F(ab')片段、$F(ab')_2$片段、Fv片段、dAb、Fd、单链抗体(scFv)。

[权利要求 31] 根据权利要求29或30所述的抗体或其抗原结合片段，所述的抗体或抗原结合片段还包含免疫球蛋白的恒定区，其中所述的免疫球蛋白选自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

[权利要求 32] 根据权利要求29-31中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中，

所述抗体或其抗原结合片段包含选自如下任一组的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)：

(1)重链可变区包含如SEQ ID NO:25所示的序列，或与SEQ ID NO:25具有相同的CDR 1-3且与SEQ ID NO:25相比同一性大于80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列；和

轻链可变区包含如SEQ ID NO:26所示的序列，或与SEQ ID NO:26具有相同的CDR 1-3且与SEQID NO:26相比同一性大于80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列；

或

(2)重链可变区包含如SEQ ID NO:35所示的序列，或与SEQ ID NO:35具有相同的CDR 1-3且与SEQ ID NO:35相比同一性大于80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列；和

轻链可变区包含如SEQ ID NO:36所示的序列，或与SEQ ID NO:36具有相同的CDR 1-3且与SEQ ID NO:36相比同一性大于80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列。

[权利要求 33] 根据权利要求32所述的抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段包含重链和轻链，其中，

(1)所述重链包含如SEQ ID NO:27所示的序列或与SEQ ID NO:27相比同一性大于80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列；和

所述轻链包含如SEQ ID NO:28所示的序列或与SEQ ID NO:28相比同一性大于80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列；

或

(2)所述重链包含如SEQ ID NO:37所示的序列或与SEQ ID NO:37相比同一性大于80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列；和

所述轻链包含如SEQ ID NO:38所示的序列或与SEQ ID NO:38相比同一性大于80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列。

[权利要求 34] 一种融合蛋白，其特征在于，所述融合蛋白包含权利要求29-33中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

[权利要求 35] 分离的多核苷酸，所述多核苷酸编码权利要求29-33中任意一项所述的抗体或其抗原结合片段或者权利要求34所述的融合蛋白。

[权利要求 36] 一种核酸构建体，所述核酸构建体包含权利要求35所述的多核苷酸。

[权利要求 37] 根据权利要求36所述的核酸构建体，其特征在于，所述核酸构建体为表达载体，其中所述的多核苷酸与允许其所编码的多肽在宿主细胞或无细胞表达系统中表达的调节序列有效连接。

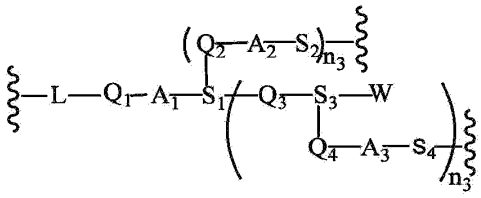
[权利要求 38] 一种宿主细胞，其特征在于，所述的宿主细胞包含权利要求35所述的多核苷酸或者权利要求36，37所述的核酸构建体；其优选自原核细胞、真核细胞、酵母细胞、哺乳动物细胞、大肠杆菌细胞；更优选的，所述的宿主细胞选自CHO细胞、NS0细胞、Sp2/0细胞或BHK细胞。

[权利要求 39] 权利要求29至33中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或者权利要求34所述的融合蛋白的生产方法，其特征在于，所述方法包括在允许权利要求36所述的核酸构建体表达的条件下培养权利要求38所述的宿主细胞，并从培养物中回收产生的表达蛋白。

[权利要求 40] 权利要求29至33中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或者权利要求34所述的融合蛋白或权利要求35所述的多核苷酸在制备药物中的用途。

[权利要求 41] 根据权利要求40所述的用途，所述药物包括单特异性抗体、双特异性抗体、多特异性抗体或者抗体药物偶联物、抗体核素偶联物。

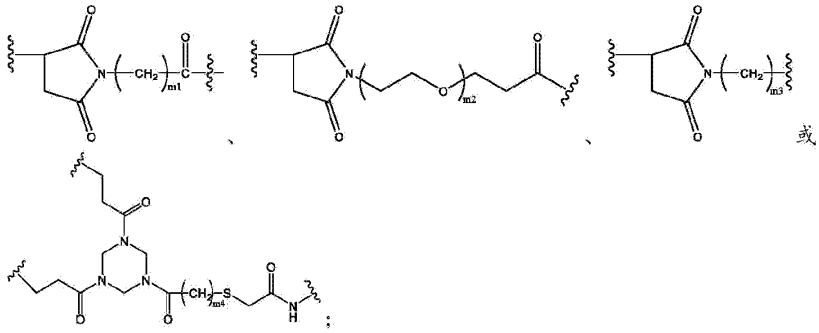
[权利要求 42] 一种连接子，如式(II)所示，



(II)

其中，

L是附着抗体的接头，选自以下结构：



其中，Q_1、Q_2、Q_3、Q_4各自独立地是单键或选自以下结构$-(CH_2CH_2O)p-$、$-NH-(CH_2OCH_2)p-C(O)-$、$-(NHCH_2C(O))p-O-$、$-NH(CH_2CH_2O)p-CH_2CH_2C(O)-$、$-(CH_2CH_2O)p-CH_2CH_2C(O)-$、$-CH_2-Y-(CH_2CH_2O)p-CH_2CH_2C(O)-$、$-NHCH_2-Y-(CH_2CH_2O)p-CH_2CH_2C(O)-$、$-(CH_2)-Y-$或$-NHCH_2C(O)CH_2C(O)-$；

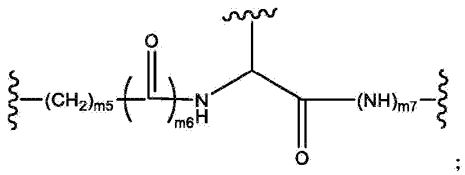
所述Y选自C3-8环烷基或C3-8环状杂烷基或C3-8环状不饱和杂烷基，所述杂烷基包含选自N、O或者S的1-3个原子，p选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

A_1是单键或由1、2、3或4个氨基酸残基组成的肽；

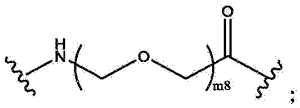
A_2是单键或由1、2、3或4个氨基酸残基组成的肽；

A_3是单键或由1、2、3或4个氨基酸残基组成的肽；

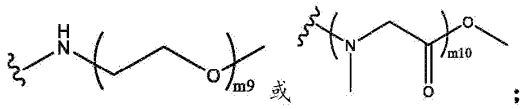
S_1、S_3独立地选自



S_2、S_4独立地选自$-NH-CH_2-$或



W选自



m1选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

m2选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

m3选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

m4选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

m5选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

m6选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

m7选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

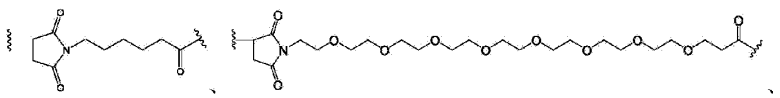
m8选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

m9选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15；

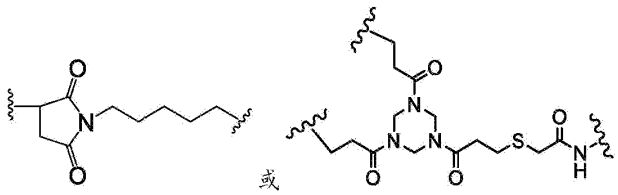
m10选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15；

下标n_3为0或1。

[权利要求 43] 根据权利要求42所述的连接子，所述L选自以下结构：


、

、


或

。

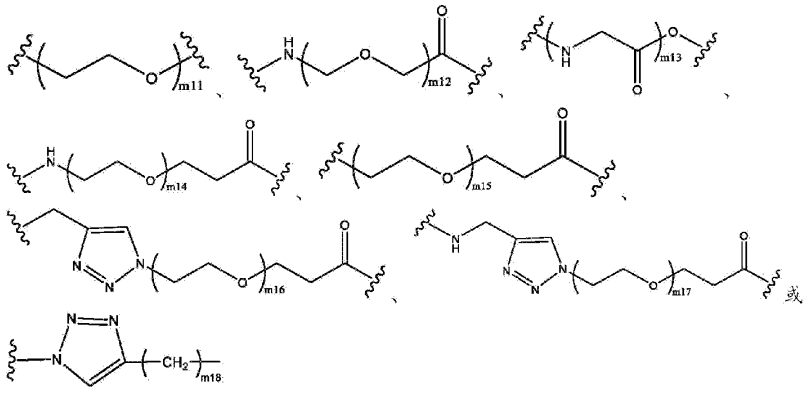
[权利要求 44] 根据权利要求43所述的连接子，所述A_1、A_2、A_3独立地选自单键或包括由选自苯丙氨酸(Phe)、甘氨酸(Gly)、缬氨酸(Val)、赖氨酸(Lys)、精氨酸(Arg)、丝氨酸(Ser)、谷氨酸(Glu)、天冬氨酸(Asp)、丙氨酸(Ala)、半胱氨酸(Cys)或瓜氨酸(Cit)中的氨基酸组成的肽。

[权利要求 45] 根据权利要求44所述的连接子，所述A_1、A_2、A_3独立地选自单键或包括由选自苯丙氨酸(Phe)、甘氨酸(Gly)、缬氨酸(Val)、赖氨酸(Lys)、精氨酸(Arg)、丝氨酸(Ser)、谷氨酸(Glu)、天冬氨酸(Asp)、丙氨酸(Ala)、半胱氨酸(Cys)或瓜氨酸(Cit)中的2−4个氨基酸残基组成的肽；优选的，包括由选自苯丙氨酸(Phe)、甘氨酸(Gly)、丙氨酸(Ala)或缬氨酸(Val)的2−4个氨基酸残基组成的肽。

[权利要求 46] 根据权利要求45所述的连接子，所述A_1、A_2、A_3独立地选自单键或包括以下结构：

−Gly−Ala−、−Ala−Gly−、−Val−Gly−、−Gly−Val−、−Val−Cit−、−Val−Ala−、−Gly−Phe−、−Phe−Gly−、−Gly−Gly−Ala−Gly−、−Gly−Gly−Val−Gly−、−Gly−Gly−Phe−Gly−、−Gly−Ala−Gly−Gly−、−Gly−Val−Gly−Gly−、−Gly−Phe−Gly−Gly−、−Gly−Gly−Lys−Gly−、−Gly−Gly−Ser−Gly−、−Gly−Gly−Glu−Gly−、−Gly−Lys−Gly−Gly−、−Gly−Ser−Gly−Gly−、−Gly−Glu−Gly−Gly−、−Gly−Gly−Val−Ala−、−Gly−Gly−Cit−Gly−、−Gly−Cit−Gly−Gly−或−Ala−Ala−Ala−；优选的，−Gly−Gly−Phe−Gly−、−Val−Ala−、−Val−Gly−、−Phe−Gly−、−Gly−Gly−Val−Gly−、−Gly−Gly−Val−Ala−或−Ala−Ala−Ala−；更优选的，所述连接子包括以下结构：−Val−Ala−。

[权利要求 47] 根据权利要求42−46中任一项所述的连接子，所述Q1、Q2、Q3、Q4连接基团独立地选自单键或以下结构：



其中，

m11选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

m12选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

m13选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

m14选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

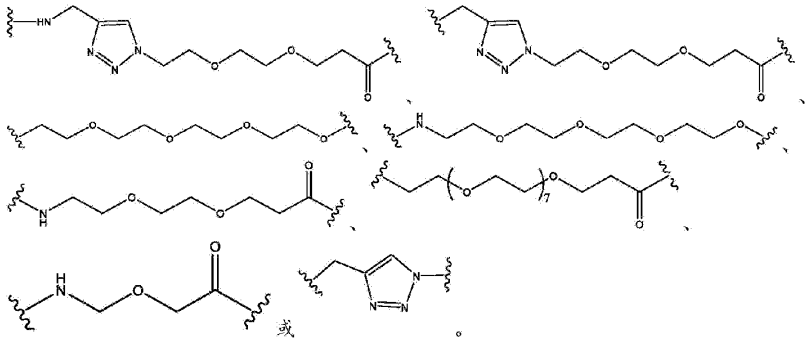
m15选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

m16选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

m17选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

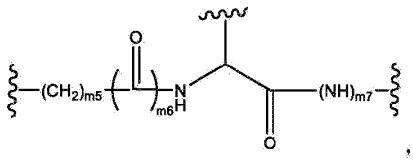
m18选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[权利要求 48] 根据权利要求47所述的连接子，所述Q_1、Q_2、Q_3、Q_4连接基团独立地选自单键或以下结构：



或 。

[权利要求 49] 根据权利要求42-48中任一项所述的连接子，所述S_1、S_3独立地选自以下结构：

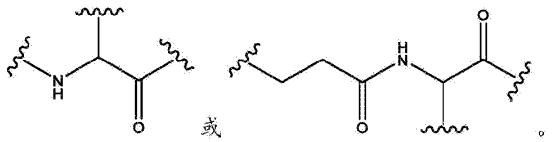


，

其中，m5选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

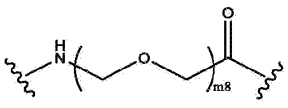
m6选0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；m7选0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[权利要求 50] 根据权利要求49所述的连接子，所述S1、S3独立地选自以下结构：

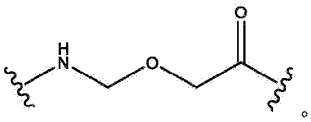


或 。

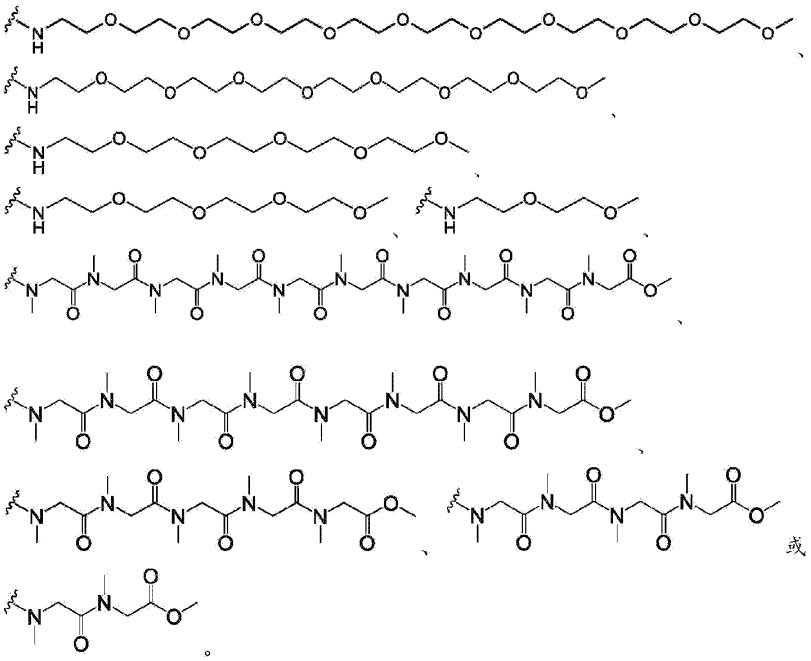
[权利要求 51] 根据权利要求42-50中任一项所述的连接子，所述S_2、S_4选自-NH-CH2-或以下结构：


其中，m8选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

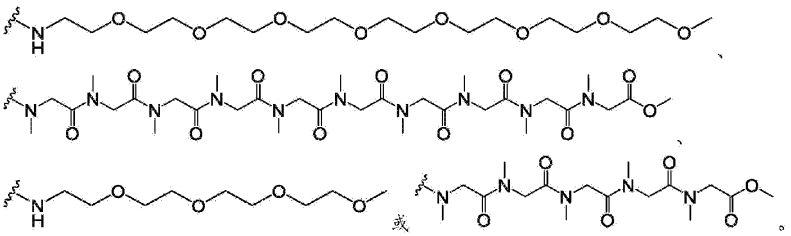
[权利要求 52] 根据权利要求51所述的连接子，所述S_2、S_4选自−NH−CH_2−或以下结构：



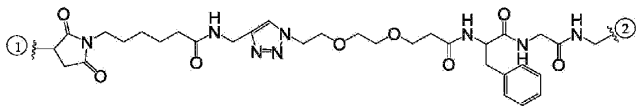
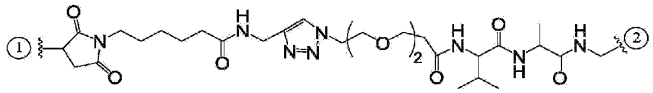
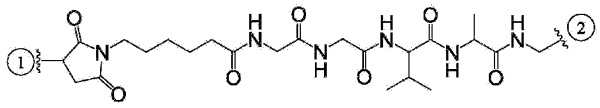
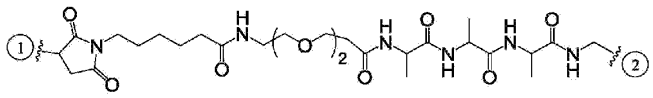
[权利要求 53] 根据权利要求42−52任一项所述的连接子，所述W选自以下结构：

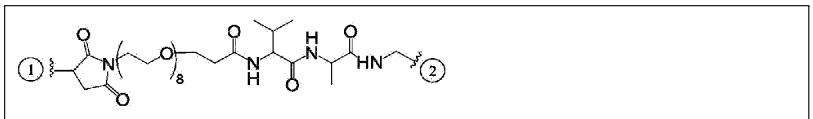


[权利要求 54] 根据权利要求53所述的连接子，所述W选自以下结构：

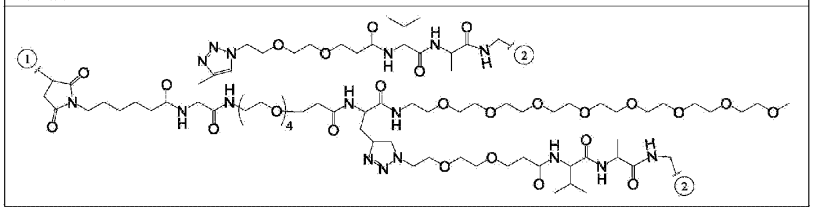


[权利要求 55] 根据权利要求42−54任一项所述的连接子，所述连接子选自以下结构：

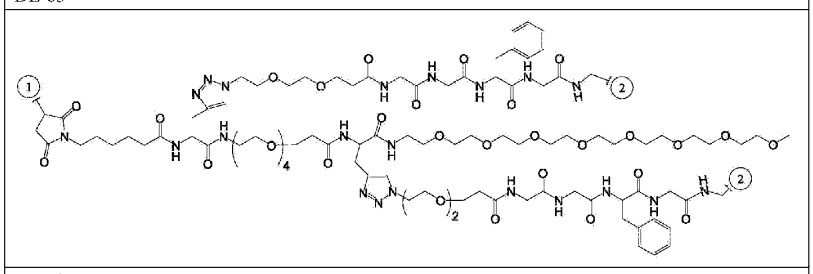
DL-02

DL-06

DL-05

DL-07

DL-14



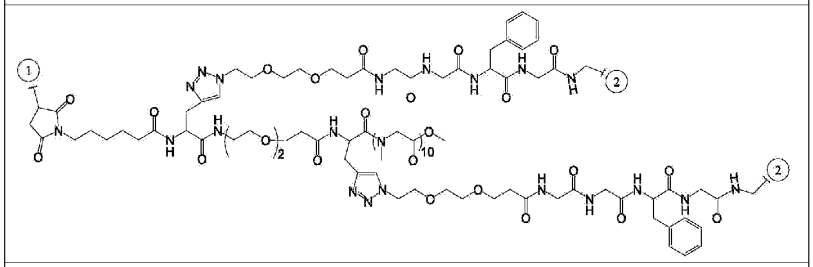
DL-04



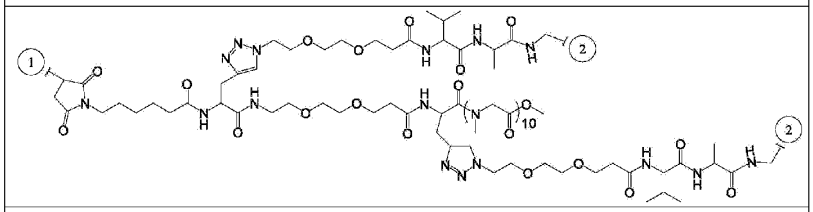
DL-03



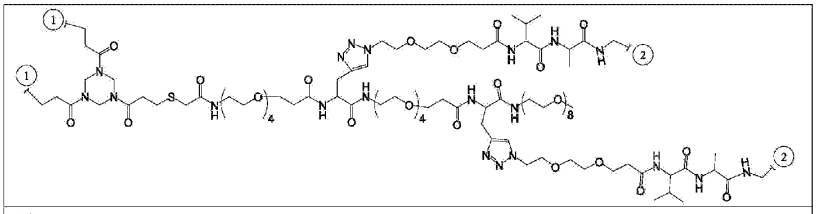
DL-08



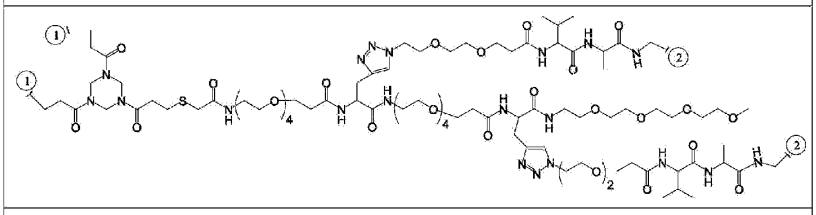
DL-09



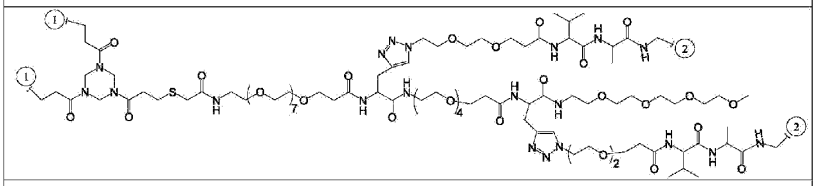
DL-10



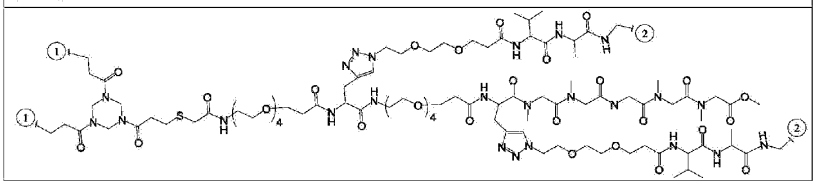
DL-11



DL-12



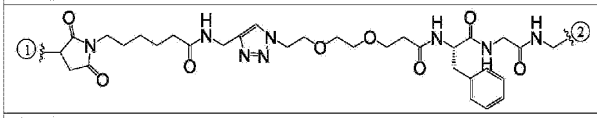
DL-13



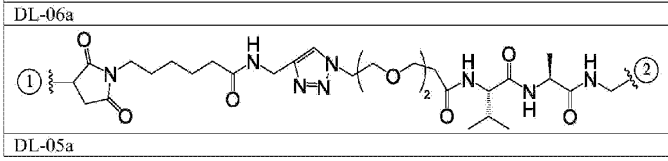
其中，所述“①”与抗体相连；所述“②”与药物单元相连。

[权利要求 56] 根据权利要求55所述的连接子，所述连接子选自以下结构：

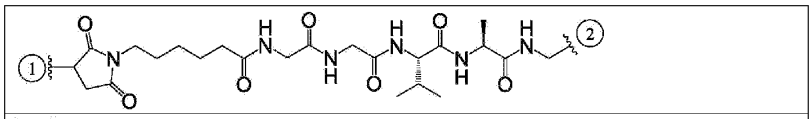
DL-02a



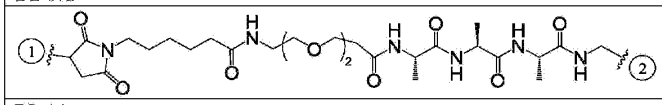
DL-06a



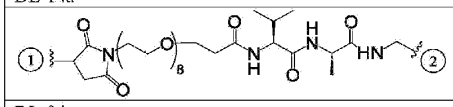
DL-05a



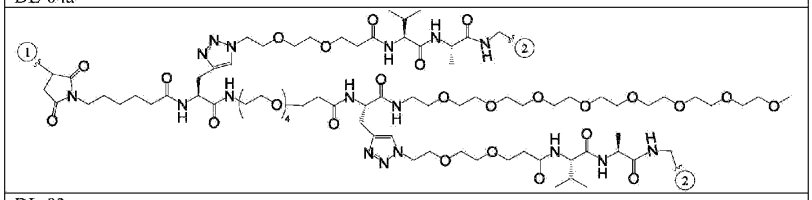
DL-07a



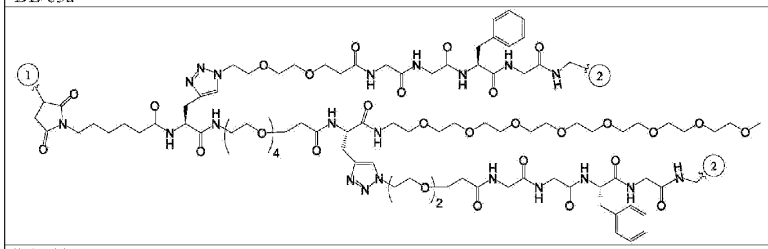
DL-14a



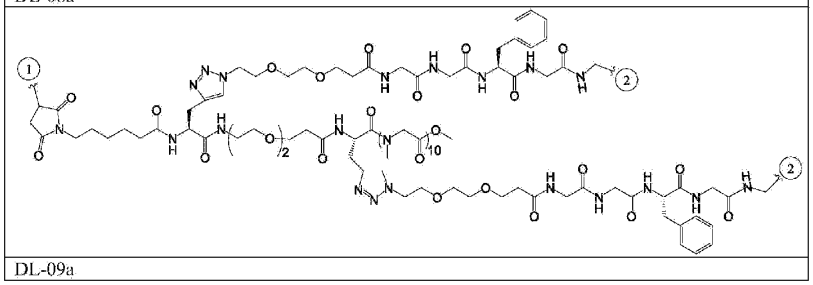
DL-04a



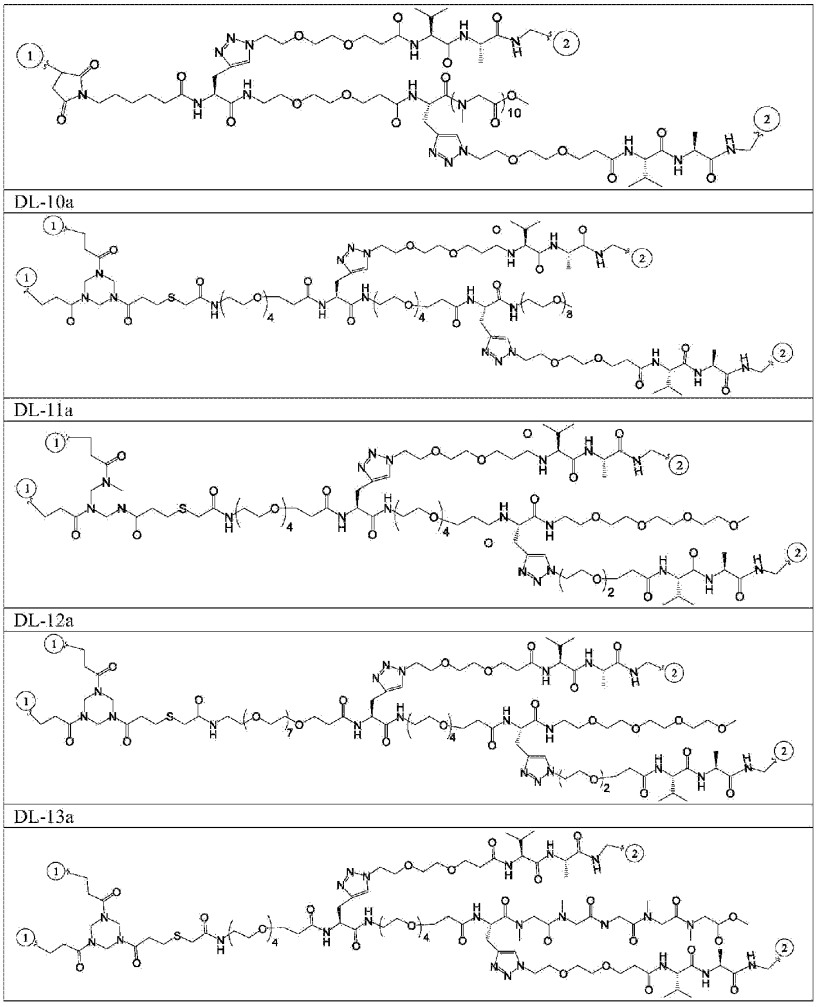
DL-03a



DL-08a

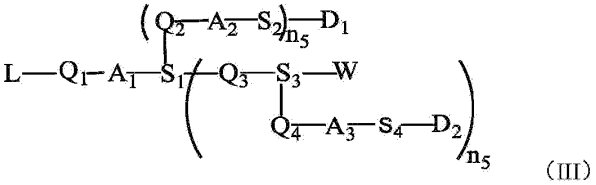


DL-09a



其中，所述“①”与抗体相连；所述“②”与载荷化合物相连。

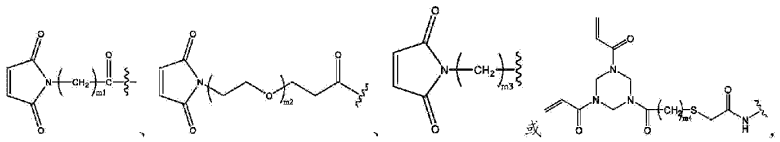
[权利要求 57] 一种连接子-载荷，如式(III)所示结构：



(III)

其中，

L是附着抗体的接头，选自以下结构：



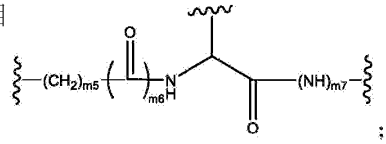
其中，Q_1、Q_2、Q_3、Q_4各自独立地是单键或选自以下结构$-(CH_2CH_2O)p-$、$-NH-(CH_2OCH_2)p-C(O)-$、$-(NHCH_2C(O))p-O-$、$-NH(CH_2CH_2O)p-CH_2CH_2C(O)-$、$-(CH_2CH_2O)p-CH_2CH_2C(O)-$、$-CH_2-Y-(CH_2CH_2O)p-CH_2CH_2C(O)-$、$-NHCH_2-Y-(CH_2CH_2O)p-CH_2CH_2C(O)-$、$-(CH_2)-Y-$或$-NHCH_2C(O)CH_2C(O)-$；所述Y选自C3-8环烷基或C3-8环状杂烷基或C3-8环状不饱和杂烷基，所述杂烷基包含选自N、O或者S的1-3个原子，p独立地选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

A_1是单键或由1、2、3或4个氨基酸残基组成的肽；

A_2是单键或由1、2、3或4个氨基酸残基组成的肽；

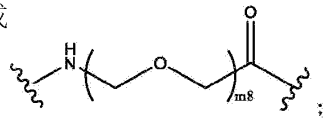
A_3是单键或由1、2、3或4个氨基酸残基组成的肽；

S_1、S_3独立地选自



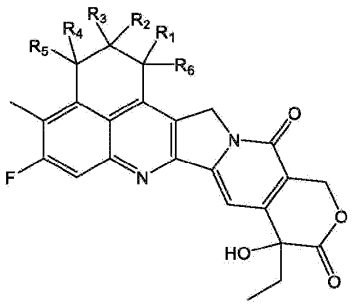
；

S_2、S_4独立地选自$-NH-CH_2-$或



；

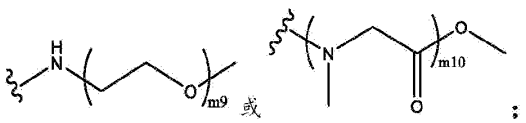
D_1是第一载荷化合物，D_2是第二载荷化合物，D_1、D_2独立地选自如式(IV)所示化合物、或式(IV)所示化合物的立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物：



(IV)

其中，R_1、R_2、R_3、R_4、R_5独立地选自氢(H)、氘(D)或氚(T)，R_1、R_2、R_3、R_4、R_5至少有一个、两个、三个或四个为D；R_6选自$-NH_2$或$-NH-C(O)-CH_2-OH$；所述D_1、D_2通过存在的羟基或胺基团中的任一个与S_1、S_2或S_4连接；

W选自



；

m1选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

m2选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

m3选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

m4选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

m5选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

m6选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

m7选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

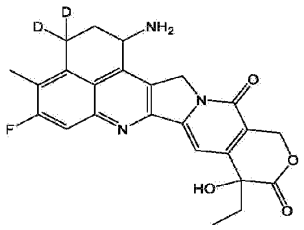
m8选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

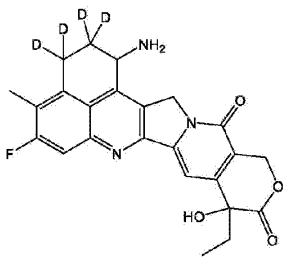
m9选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15；

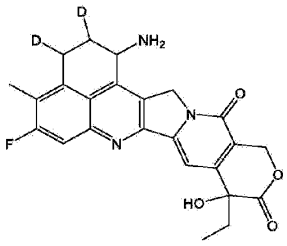
m10选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15；

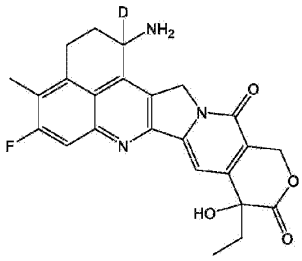
下标n_5为0或1。

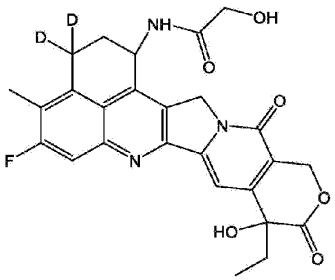
[权利要求 58] 根据权利要求57所述的连接子-载荷，所述D_1、D_2独立地选自以下结构：

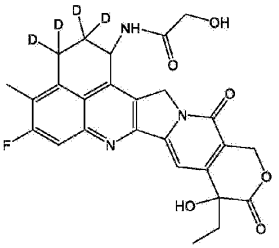

(I-1)、

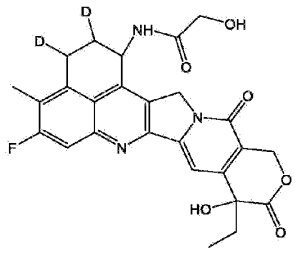

(I-2)、

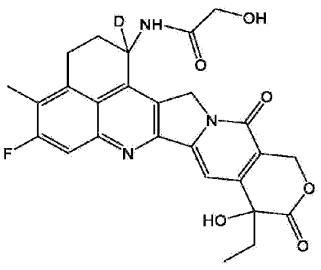

(I-3)、


(I-4)、

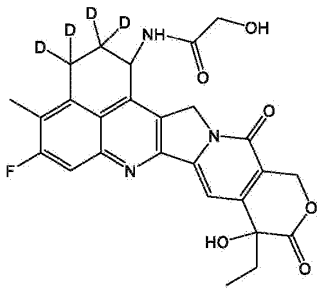

(I-5)、

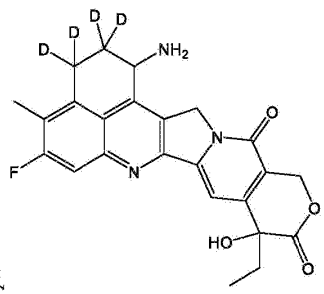

(I-6)、


(I-7) 或

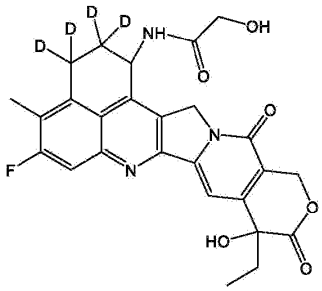

(I-8)；

优选的，独立地选自：

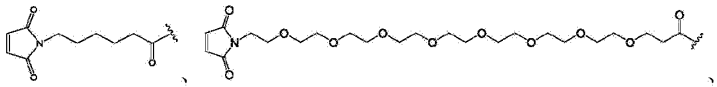

（I-6）或


（I-2）；

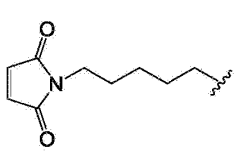
更优选的，D_1、D_2的结构为：

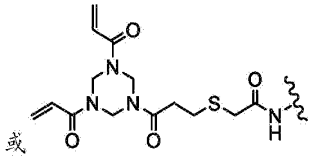

（I-6）。

[权利要求 59] 根据权利要求57或58所述的连接子-载荷，所述-L选自以下结构：


、

、




或

。

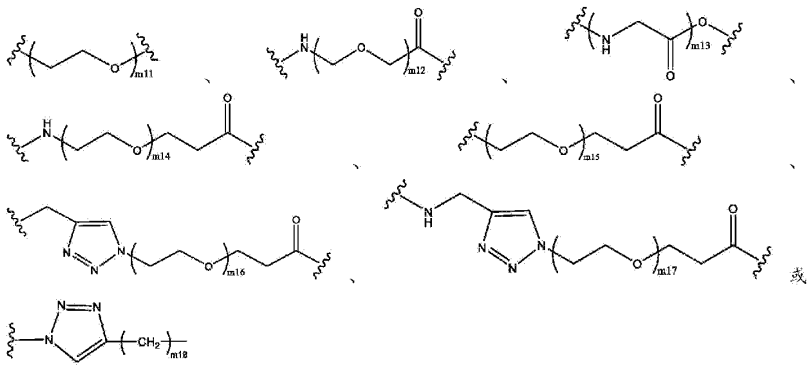
[权利要求 60] 根据权利要求59所述的连接子-载荷，所述A_1、A_2、A_3独立地选自单键或包括由选自苯丙氨酸(Phe)、甘氨酸(Gly)、缬氨酸(Val)、赖氨酸(Lys)、精氨酸(Arg)、丝氨酸(Ser)、谷氨酸(Glu)、天冬氨酸(Asp)、丙氨酸(Ala)、半胱氨酸(Cys)或瓜氨酸(Cit)中的氨基酸组成的肽。

[权利要求 61] 根据权利要求60所述的连接子-载荷，所述A_1、A_2、A_3独立地选自单键或包括由选自苯丙氨酸(Phe)、甘氨酸(Gly)、缬氨酸(Val)、赖氨酸(Lys)、精氨酸(Arg)、丝氨酸(Ser)、谷氨酸(Glu)、天冬氨酸(Asp)、丙氨酸(Ala)、半胱氨酸(Cys)或瓜氨酸(Cit)中的2-4个氨基酸残

基组成的肽；优选的，包括由选自苯丙氨酸(Phe)、甘氨酸(Gly)、丙氨酸(Ala)或缬氨酸(Val)的2-4个氨基酸残基组成的肽。

[权利要求 62] 根据权利要求61所述的连接子-载荷，所述A_1、A_2、A_3独立地选自单键或包括以下结构：-Gly-Ala-、-Ala-Gly-、-Val-Gly-、-Gly-Val-、-Val-Cit-、-Val-Ala-、-Gly-Phe-、-Phe-Gly-、-Gly-Gly-Ala-Gly-、-Gly-Gly-Val-Gly-、-Gly-Gly-Phe-Gly-、-Gly-Ala-Gly-Gly-、-Gly-Val-Gly-Gly-、-Gly-Phe-Gly-Gly-、-Gly-Gly-Lys-Gly-、-Gly-Gly-Ser-Gly-、-Gly-Gly-Glu-Gly-、-Gly-Lys-Gly-Gly-、-Gly-Ser-Gly-Gly-、-Gly-Glu-Gly-Gly-、-Gly-Gly-Val-Ala-、-Gly-Gly-Cit-Gly-、-Gly-Cit-Gly-Gly-或-Ala-Ala-Ala-；优选的，-Gly-Gly-Phe-Gly-、-Val-Ala-、-Val-Gly-、-Phe-Gly-、-Gly-Gly-Val-Gly-、-Gly-Gly-Val-Ala-或-Ala-Ala-Ala-；更优选的，所述A_1为单键，和所述A_2和A_3独立地为-Val-Ala-。

[权利要求 63] 根据权利要求57-62任一项所述的连接子-载荷，所述Q_1、Q_2、Q_3、Q_4连接基团独立地选自单键或以下结构：



其中，

m11选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

m12选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

m13选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

m14选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

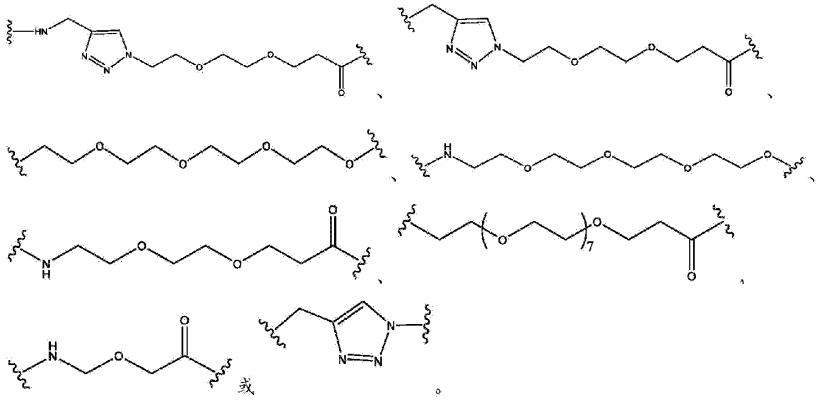
m15选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

m16选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

m17选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

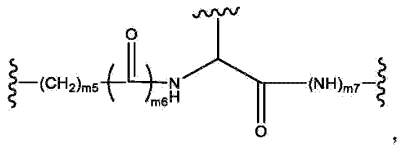
m18选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[权利要求 64] 根据权利要求63所述的连接子-载荷，所述Q_1、Q_2、Q_3、Q_4连接基团独立地选自单键或以下结构：



或。

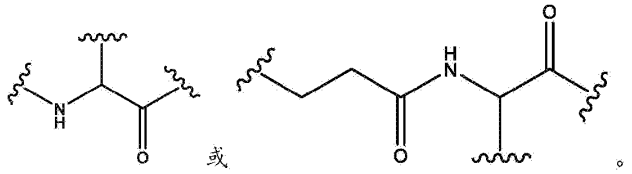
[权利要求 65] 根据权利要求57-64中任一项所述的连接子-载荷，其特征在于，所述S_1、S_3独立地选自以下结构：



，其中，m5选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

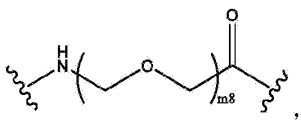
m6选0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；m7选0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[权利要求 66] 根据权利要求65所述的连接子-载荷，所述S_1、S_3独立地选自以下结构：



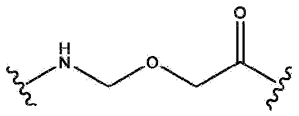
或。

[权利要求 67] 根据权利要求57-66中任一项所述的连接子-载荷，其特征在于，所述S_2、S_4选自-NH-CH_2-或以下结构：



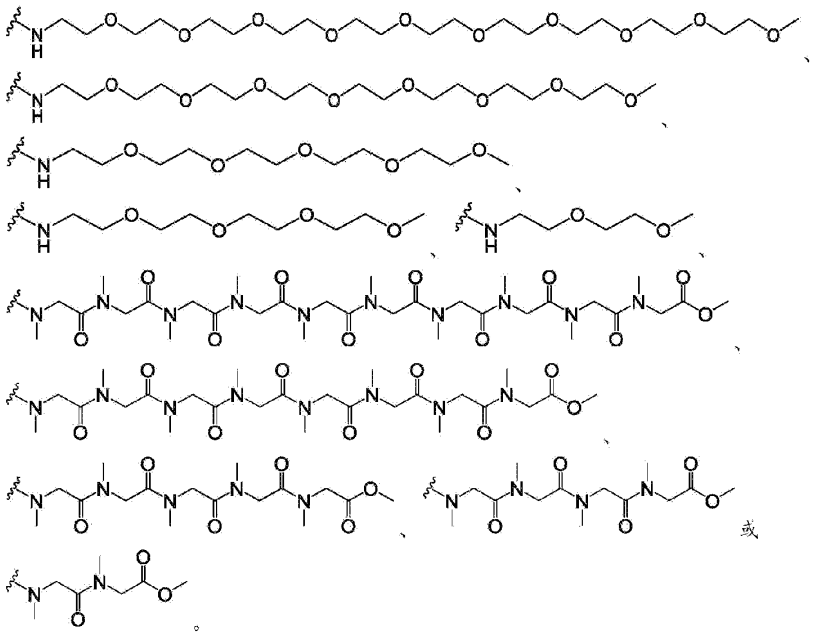
其中，m8选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[权利要求 68] 根据权利要求67所述的连接子-载荷，所述S_2、S_4选自-NH-CH_2-或以下结构：



。

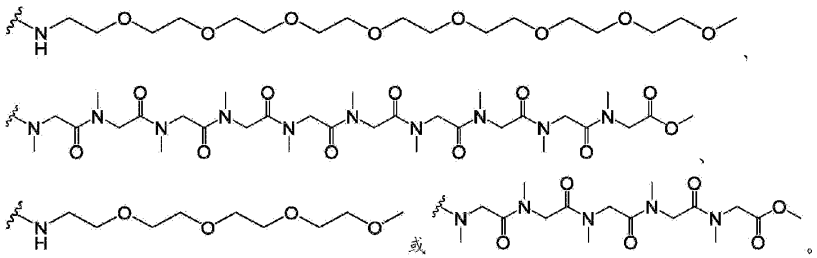
[权利要求 69] 根据权利要求57-68中任一项所述的连接子-载荷，所述W选自以下结构：



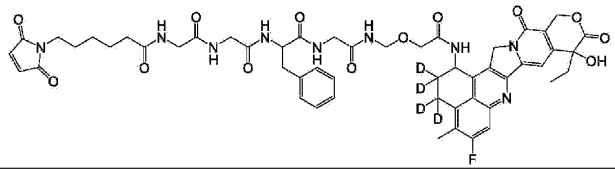
或

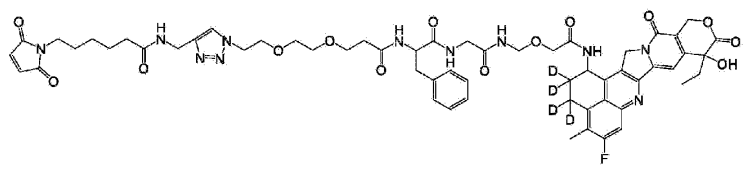
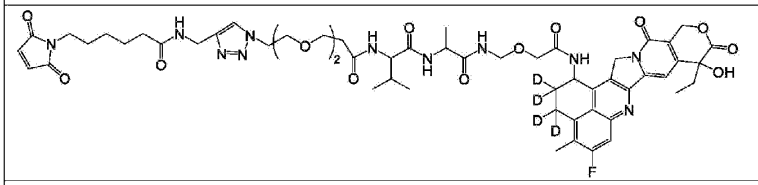
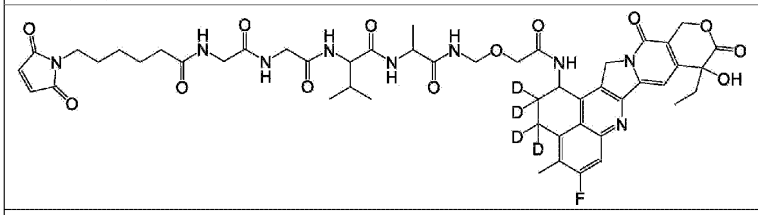
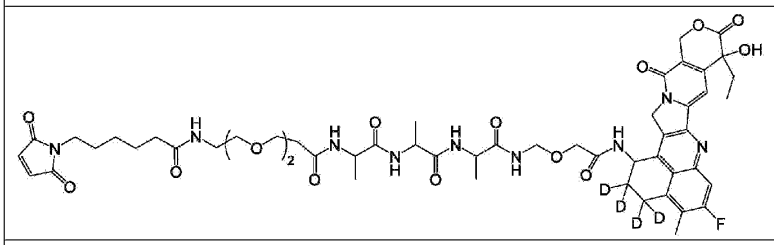
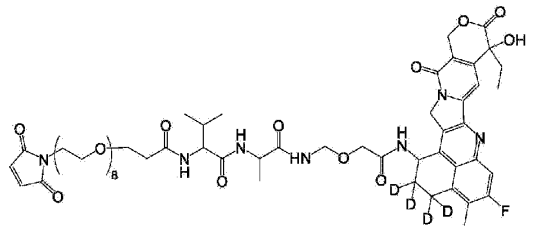
。

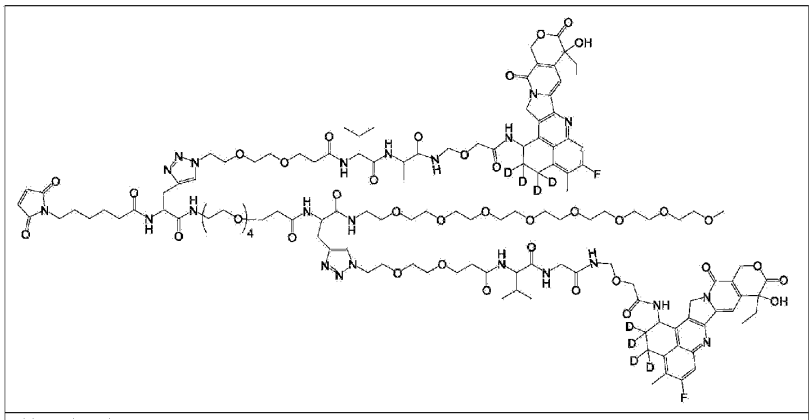
[权利要求 70] 根据权利要求69所述的连接子-载荷，所述W选自以下结构：



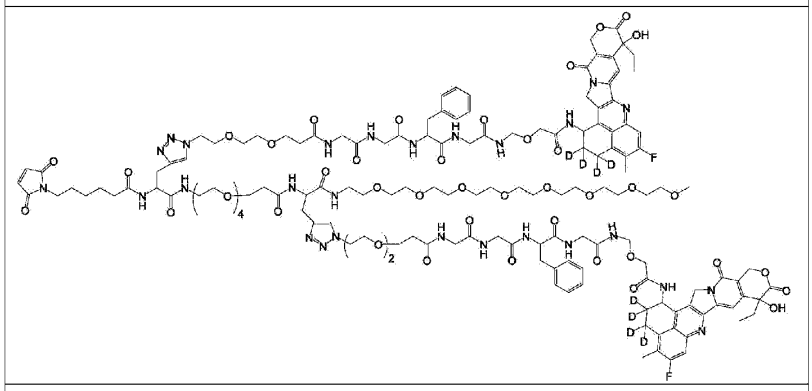
[权利要求 71] 根据权利要求57–70中任一项所述的连接子–载荷，其特征在于，所述连接子–载荷化合物选自以下结构：

DL01-dDxd

DL02-dDxd

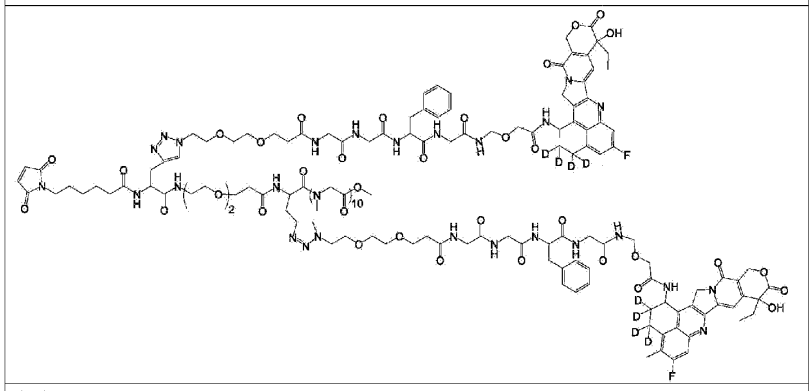

DL06-dDxd

DL05-dDxd

DL07-dDxd

DL14-dDxd

DL04-dDxd



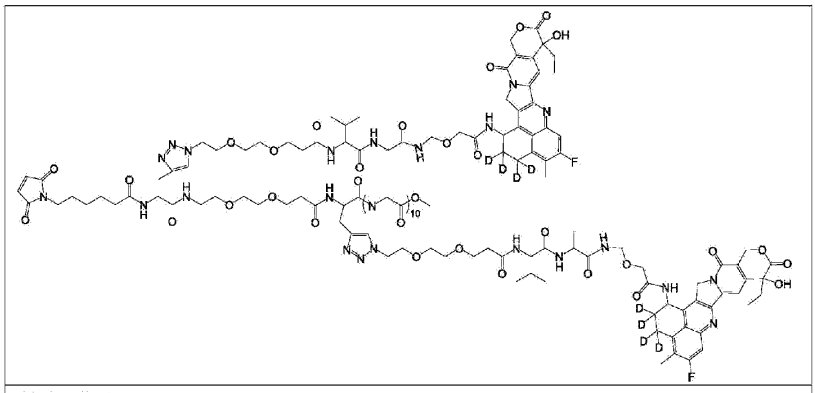
DL03-dDxd



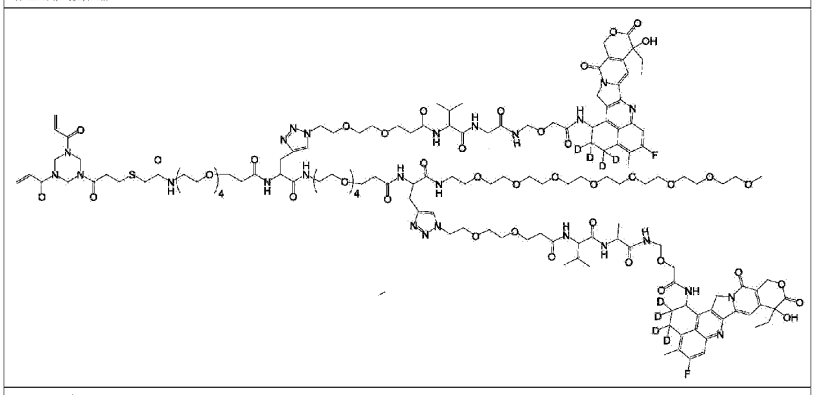
DL08-dDxd



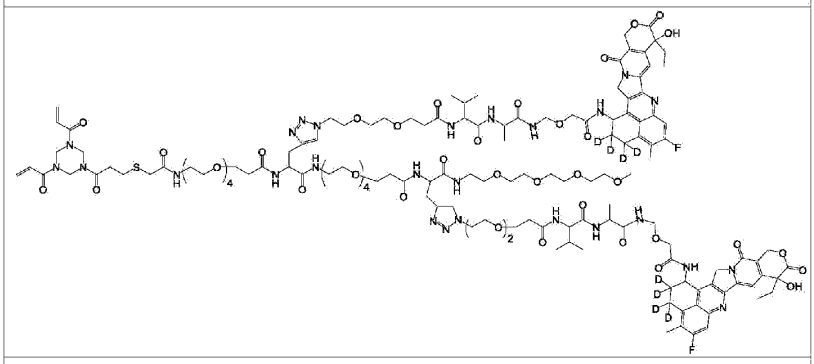
DL09-dDxd



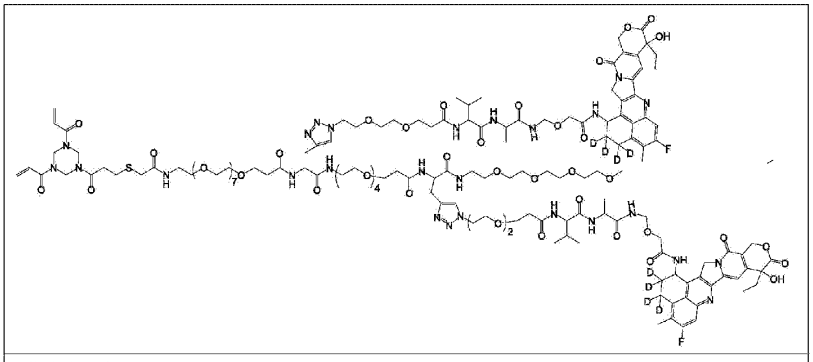
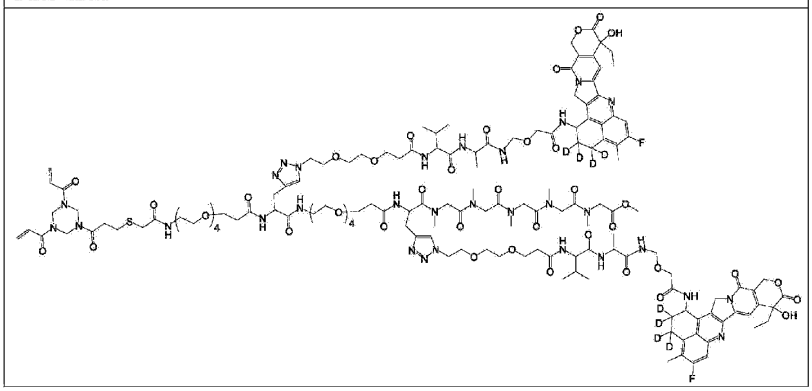
DL10-dDxd



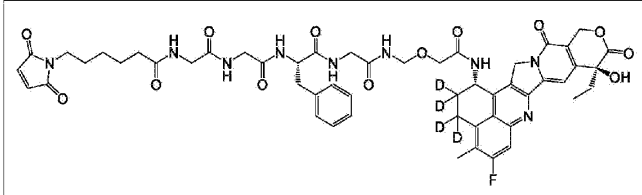
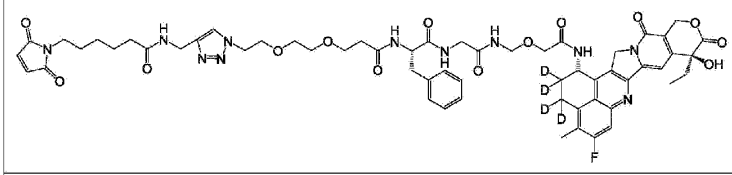
DL11-dDxd

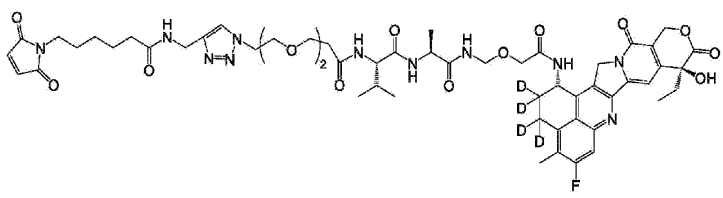


DL12-dDxd

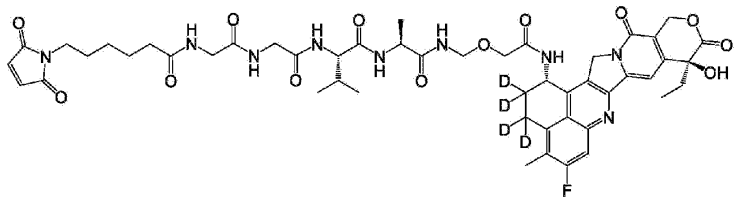

DL13-dDxd


[权利要求 72] 根据权利要求71所述的连接子−载荷，其特征在于，所述连接子−载荷化合物选自以下结构：

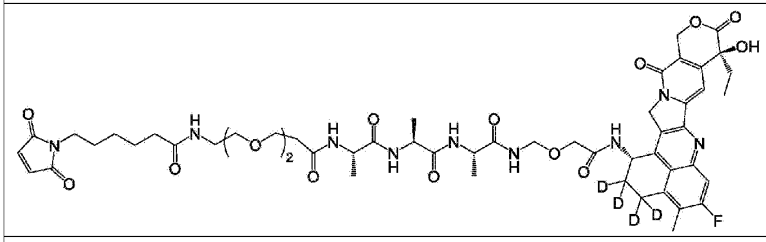
DL01-dDxd-1

DL02-dDxd-1

DL06-dDxd-1



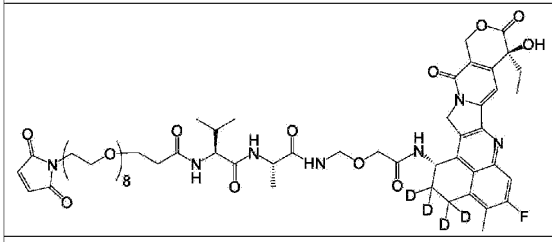
DL05-dDxd-1



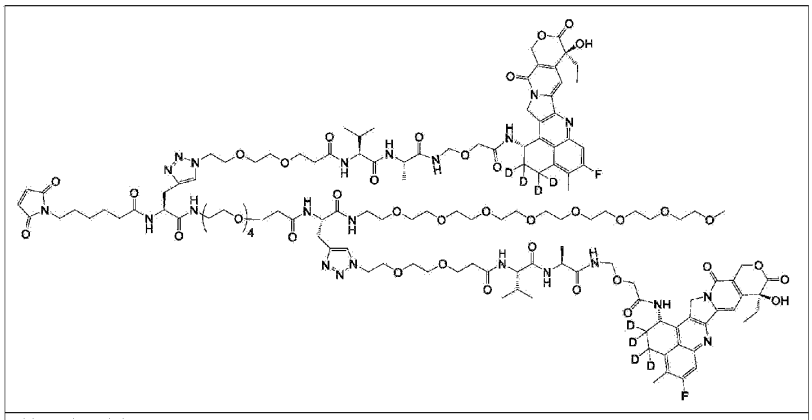
DL07-dDxd-1



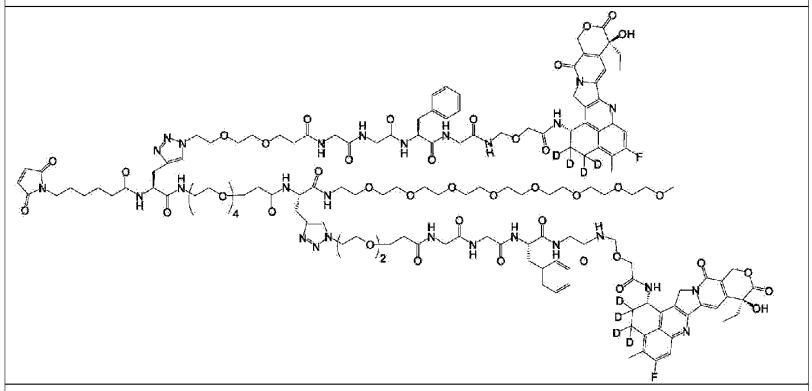
DL14-dDxd-1



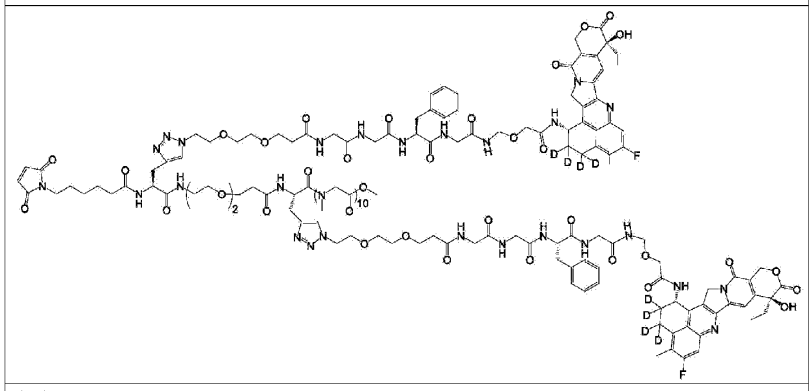
DL04-dDxd-1



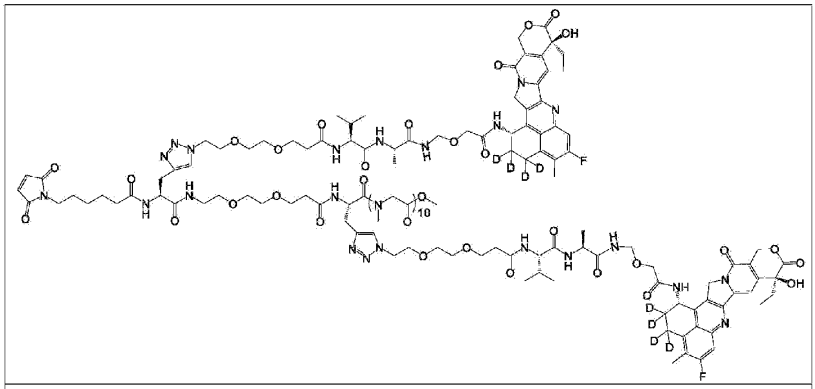
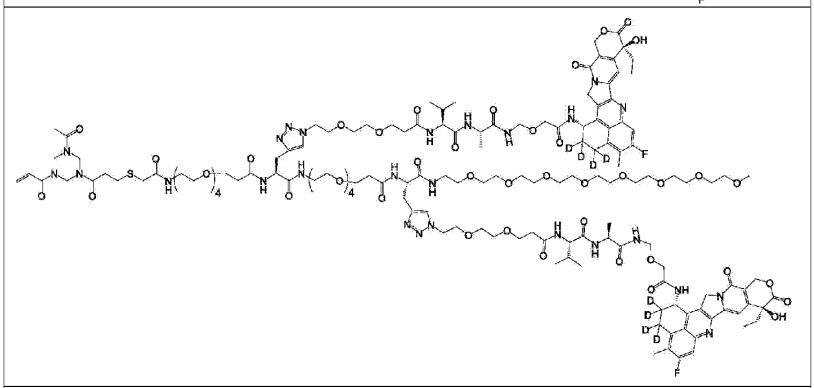
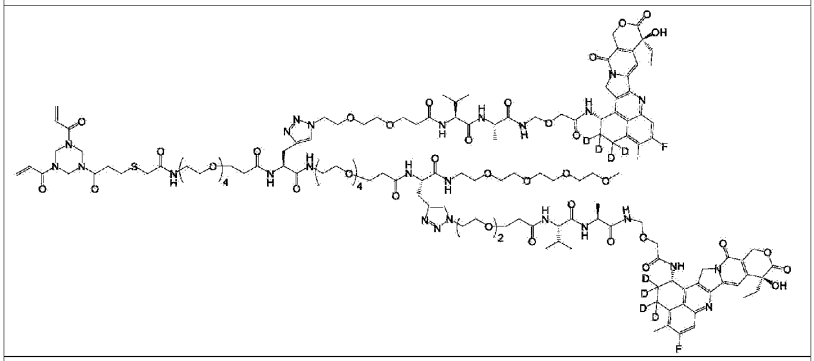
DL03-dDxd-1



DL08-dDxd-1



DL09-dDxd-1

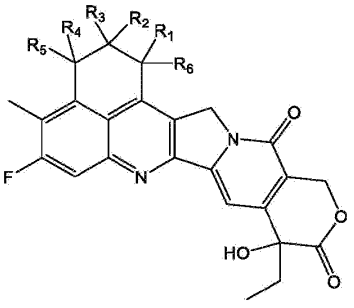


DL11-dDxd-1

DL12-dDxd-1



DL13-dDxd-1

[权利要求 73] 一种连接子−载荷，所述连接子−载荷为权利要求57−72中任一项所述化合物的立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物。

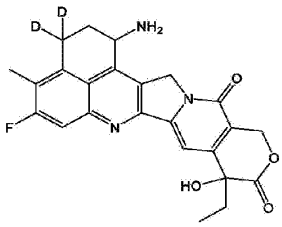
[权利要求 74] 一种式(V)所示的氘代喜树碱类化合物：

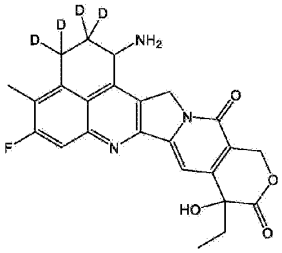


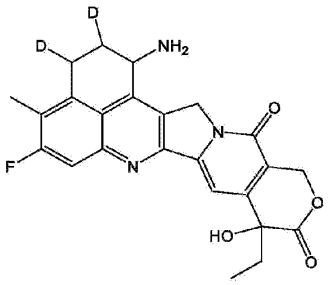
(V)

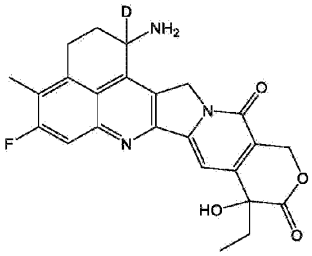
其中：R_1、R_2、R_3、R_4、R_5独立地选自氢(H)、氘(D)或氚(T)，R_1、R_2、R_3、R_4、R_5至少有一个、两个、三个或四个为D；R_6选自$-NH_2$或$-NH-C(O)-CH_2-OH$。

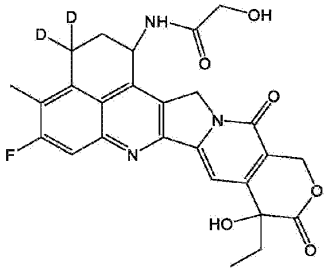
[权利要求 75] 根据权利要求74所述的氘代喜树碱类化合物，式(V)所示的结构选自如下化合物组成的组：

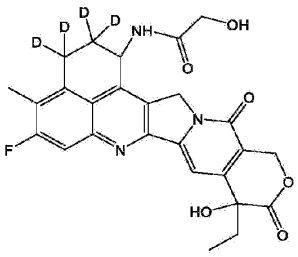

(I-1)、

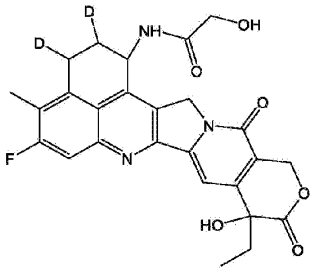

(I-2)、

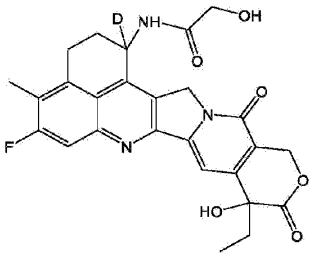

(I-3)、


(I-4)、

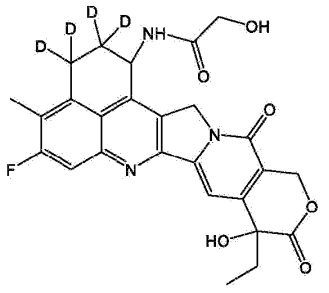

(I-5)、

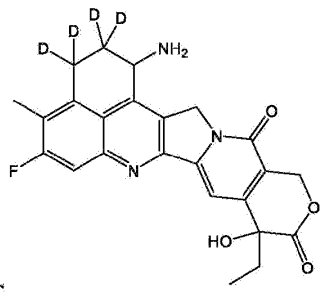

(I-6)、


(I-7) 或


(I-8)；

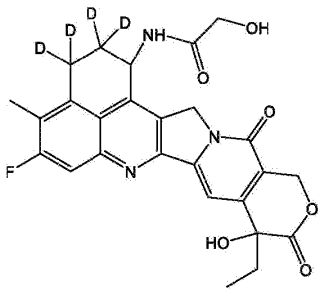
优选的，式(V)所示的结构选自如下化合物组成的组：


(I-6) 或


(I-2)；

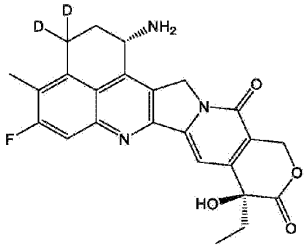
更优选的，式(V)

所示的结构为：

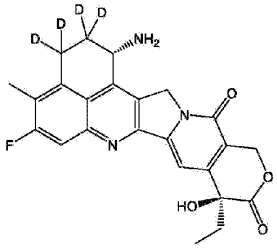


(I-6)。

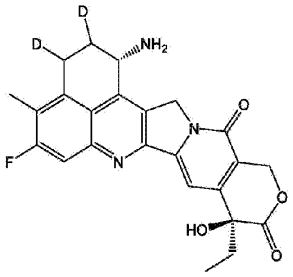
[权利要求 76] 根据权利要求75所述的氘代喜树碱类化合物，式(V)所示的结构选自如下化合物组成的组：



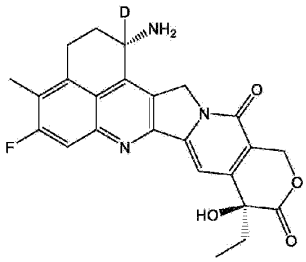
(I-1a)、



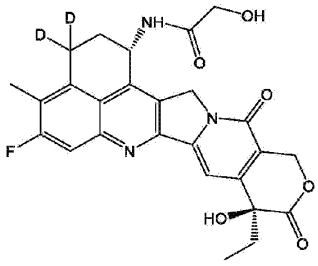
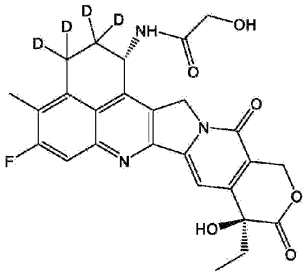
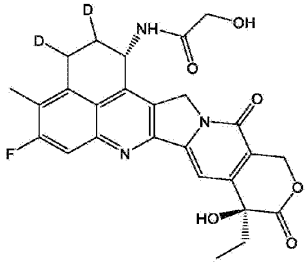
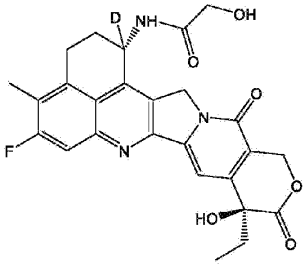
(I-2a)、



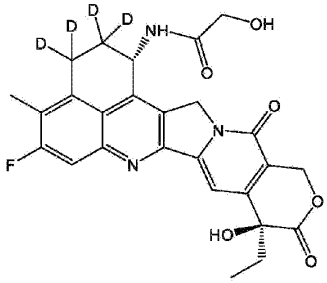
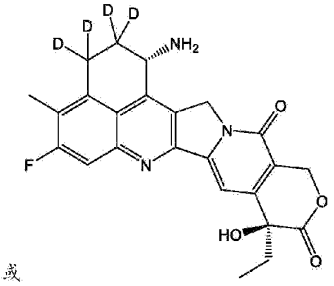
(I-3a)、



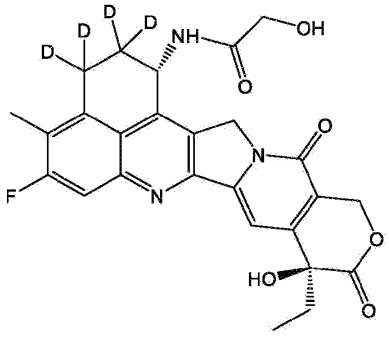
(I-4a)、


(I-5a)、

(I-6a)、

(I-7a) 或

(I-8a)；

优选的，式(V)所示的结构为：

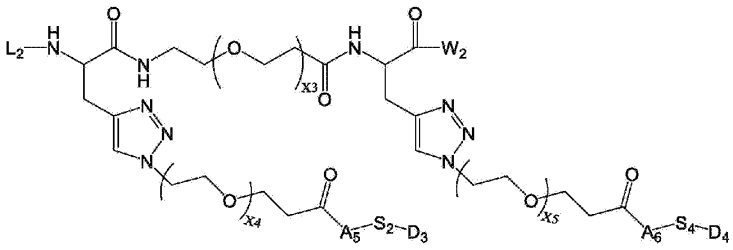

(I-6a) 或

(I-2a)；

更优选的，所述化合物的结构为：


(I-6a)。

[权利要求 77] 一种化合物，所述化合物为权利要求74−76中任一项所述化合物的立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物。

[权利要求 78] 一种式(IIIa)所示的化合物：



(IIIa)

L_2为附着连接抗体的接头；

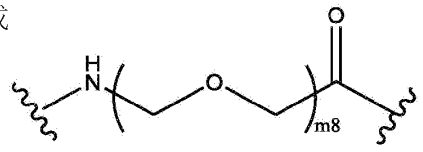
W_2是任选的基团；

A_5是由1、2、3或4个氨基酸残基组成的肽；

A_6是由1、2、3或4个氨基酸残基组成的肽；

S_2、S_4独立地选自−NH−CH_2−

或



；

D_3是第一载荷化合物；

D_4是第二载荷化合物；

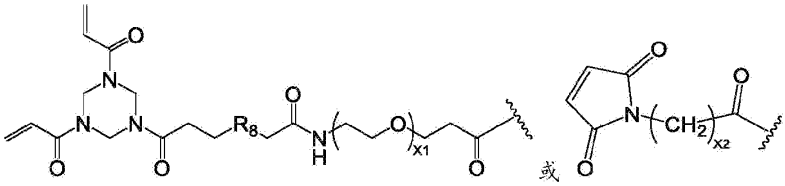
m8选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

X_3选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

X_4选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

X_5选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

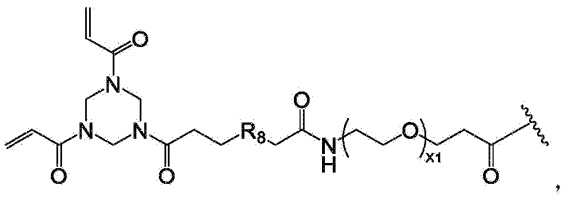
[权利要求 79] 如权利要求78所述的化合物，其特征在于，所述L_2包括以下结构：



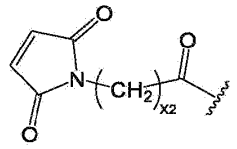
其中，R_8选自N、O

或者S；X_1选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；X_2选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

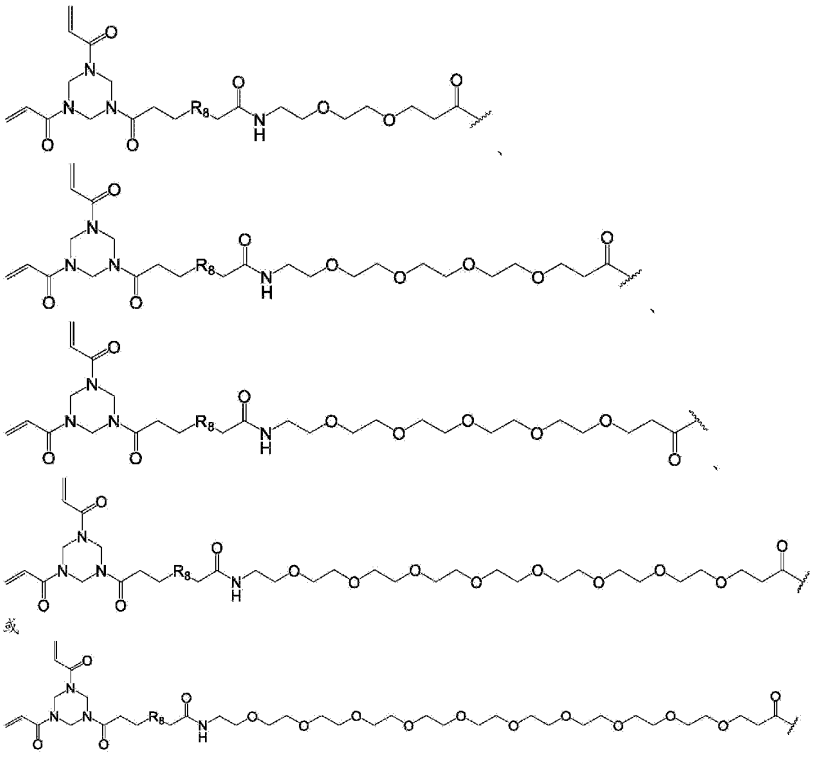
[权利要求 80] 如权利要求79所述的化合物，其特征在于，所述L_2包括以下结构：



其中，R_8选自N、O或者S；X_1选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

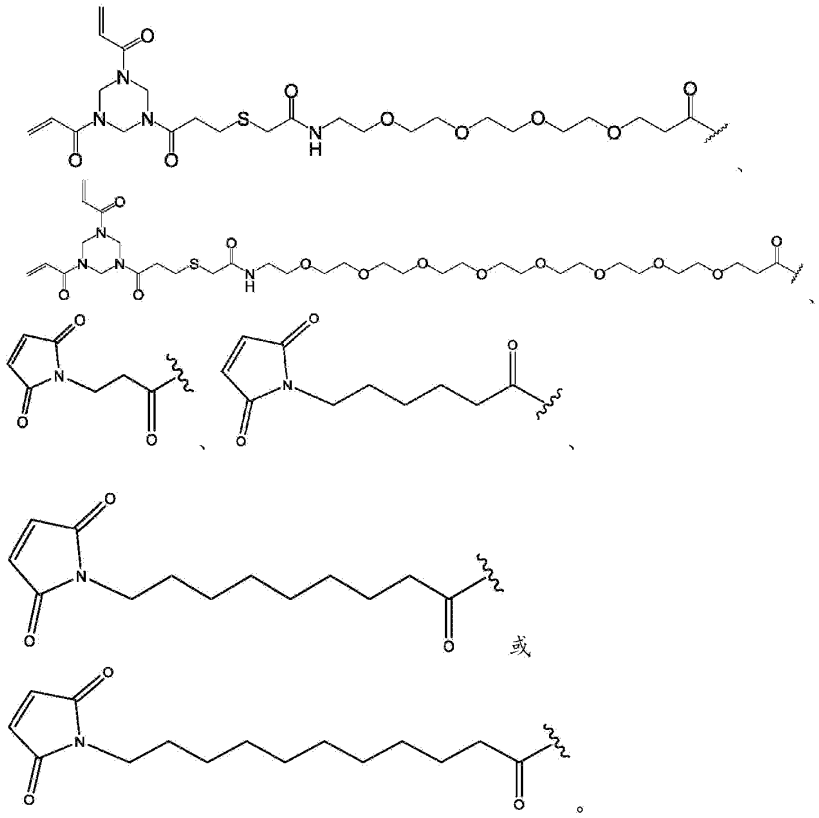
[权利要求 81] 如权利要求80所述的化合物，其特征在于，所述L_2包括以下结构：，其中，X_2选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[权利要求 82] 如权利要求78-81中任一项所述的化合物，其特征在于，所述L_2包括以下结构：



，其中，R_8选自N、O或者S。

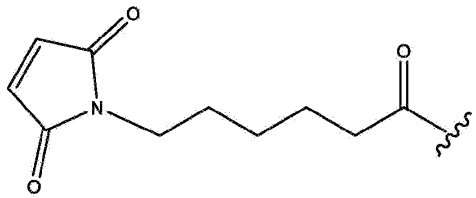
[权利要求 83] 如权利要求78-82中任一项所述的化合物，其特征在于，所述L_2包括以下结构：



或

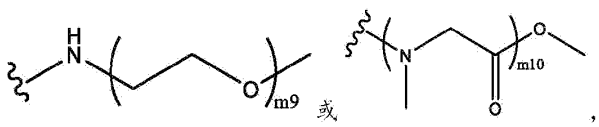
。

[权利要求 84] 如权利要求78-83中任一项所述的化合物，其特征在于，所述L_2结构如下所示：



。

[权利要求 85] 如权利要求78-84中任一项中任一项所述的化合物，其特征在于，所述W包括以下结构：

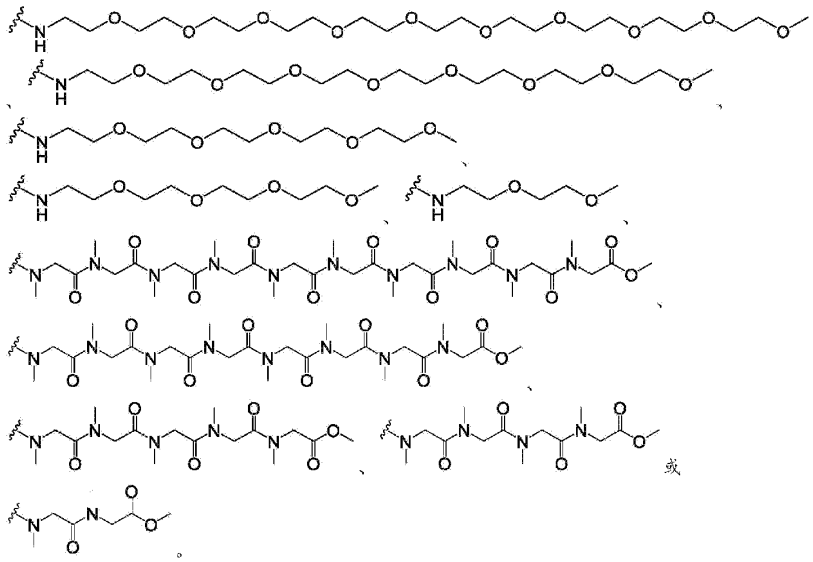


其中，

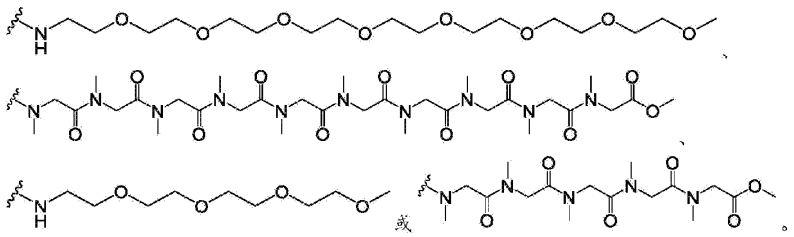
M9选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

M10选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[权利要求 86] 如权利要求78-85中任一项所述的化合物，其特征在于，所述W选自以下结构：



[权利要求 87] 如权利要求78-86中任一项所述的化合物，其特征在于，所述W选自以下结构：



[权利要求 88] 根据权利要求78-87中任一项所述的化合物，其特征在于，所述A_1、A_2、A_3独立地选自单键或包括由选自苯丙氨酸(Phe)、甘氨酸(Gly)、缬氨酸(Val)、赖氨酸(Lys)、精氨酸(Arg)、丝氨酸(Ser)、谷氨酸

(Glu)、天冬氨酸(Asp)、丙氨酸(Ala)、半胱氨酸(Cys)或瓜氨酸(Cit)中的氨基酸组成的肽。

[权利要求 89] 根据权利要求88所述的化合物，其特征在于，所述A_1、A_2、A_3独立地选自单键或包括由选自苯丙氨酸(Phe)、甘氨酸(Gly)、缬氨酸(Val)、赖氨酸(Lys)、精氨酸(Arg)、丝氨酸(Ser)、谷氨酸(Glu)、天冬氨酸(Asp)、丙氨酸(Ala)、半胱氨酸(Cys)或瓜氨酸(Cit)中的2-4个氨基酸残基组成的肽；优选的，包括由选自苯丙氨酸(Phe)、甘氨酸(Gly)、丙氨酸(Ala)或缬氨酸(Val)的2-4个氨基酸残基组成的肽。

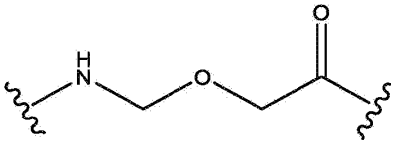
[权利要求 90] 根据权利要求89所述的化合物，其特征在于，所述A_1、A_2、A_3独立地选自单键或包括以下结构：

-Gly-Ala-、-Ala-Gly-、-Val-Gly-、-Gly-Val-、-Val-Cit-、-Val-Ala-、-Gly-Phe-、-Phe-Gly-、-Gly-Gly-Ala-Gly-、-Gly-Gly-Val-Gly-、-Gly-Gly-Phe-Gly-、-Gly-Ala-Gly-Gly-、-Gly-Val-Gly-Gly-、-Gly-Phe-Gly-Gly-、-Gly-Gly-Lys-Gly-、-Gly-Gly-Ser-Gly-、-Gly-Gly-Glu-Gly-、-Gly-Lys-Gly-Gly-、-Gly-Ser-Gly-Gly-、-Gly-Glu-Gly-Gly-、-Gly-Gly-Val-Ala-、-Gly-Gly-Cit-Gly-、-Gly-Cit-Gly-Gly-或-Ala-Ala-Ala-；优选的，-Gly-Gly-Phe-Gly-、-Val-Ala-、-Val-Gly-、-Phe-Gly-、-Gly-Gly-Val-Gly-、-Gly-Gly-Val-Ala-或-Ala-Ala-Ala-；更优选的，所述连接子包括以下结构：-Val-Ala-。

[权利要求 91] 如权利要求78-90中所述的化合物，其特征在于，所述第一载荷化合物和所述第二载荷化合物独立地选自细胞毒性分子、免疫增强剂和放射性同位素，所述细胞毒性分子包括但不限于微管蛋白抑制剂或DNA损伤剂；进一步优选的，所述微管蛋白抑制剂包括但不限于海兔毒素(dolastatin)及奥瑞他汀(auristatin)类细胞毒分子，美登素(maytansine)类细胞毒分子；所述DNA损伤剂包括但不限于卡奇霉素(calicheamicin)类、倍癌霉素(duocarmycin)类、安曲霉素类衍生物

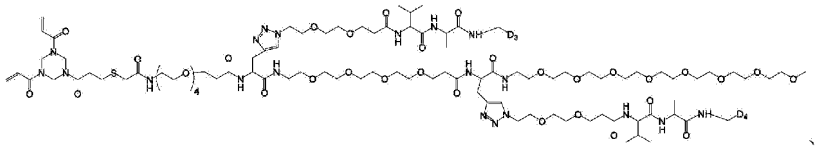
PBD、喜树碱(camptothecins)及喜树碱类衍生物、SN-38、Dxd；进一步优选的，所述奥瑞他汀(auristatin)类细胞素分子包括但不限于MMAE或MMAF或它们的衍生物，所述美登素类细胞毒素分子包括但不限于DM1、DM4或它们的衍生物；进一步优选的，所述喜树碱类衍生物选自权利要求65或66所述的化合物，所述化合物通过存在的羟基或胺基团中的任一个失去一个氢后与S_2或S_4附连。

[权利要求 92] 根据权利要求78-91中任一项所述的化合物，其特征在于，所述S_2、S_4选自-NH-CH_2-或以下结构：

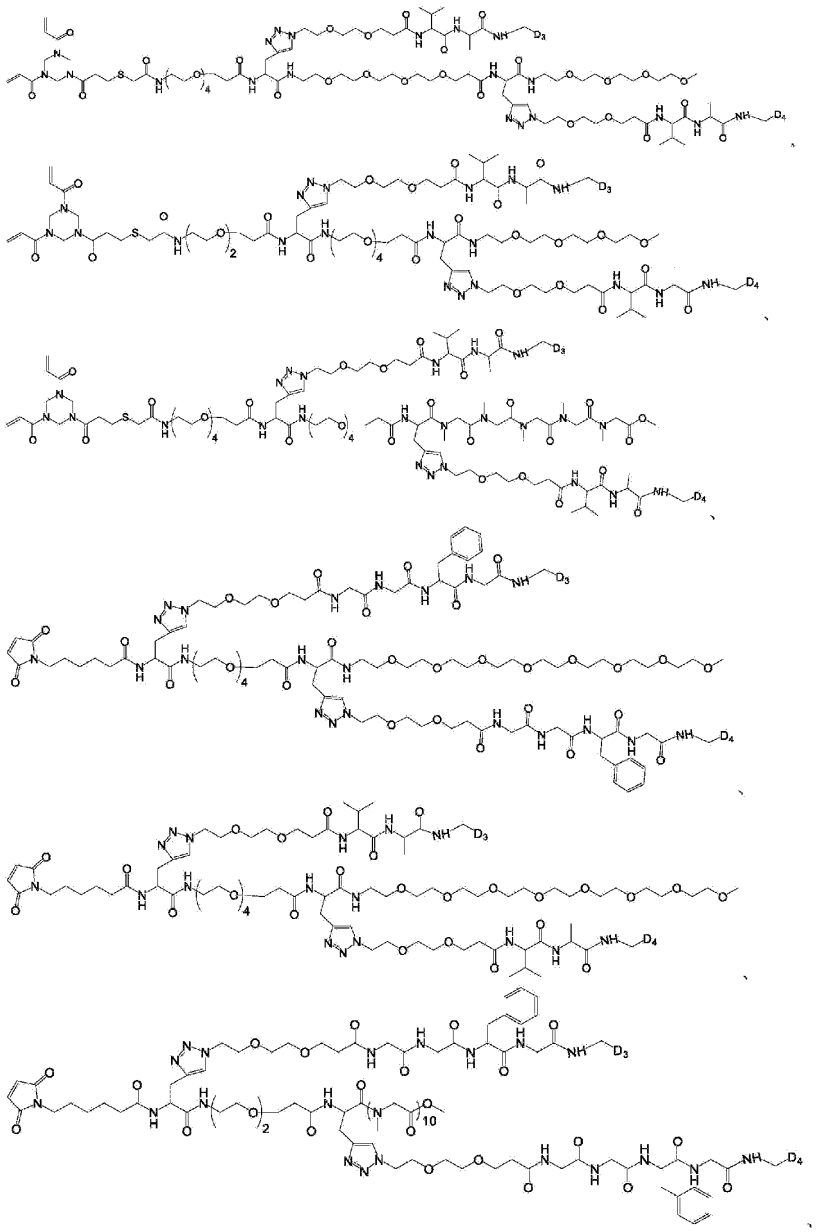


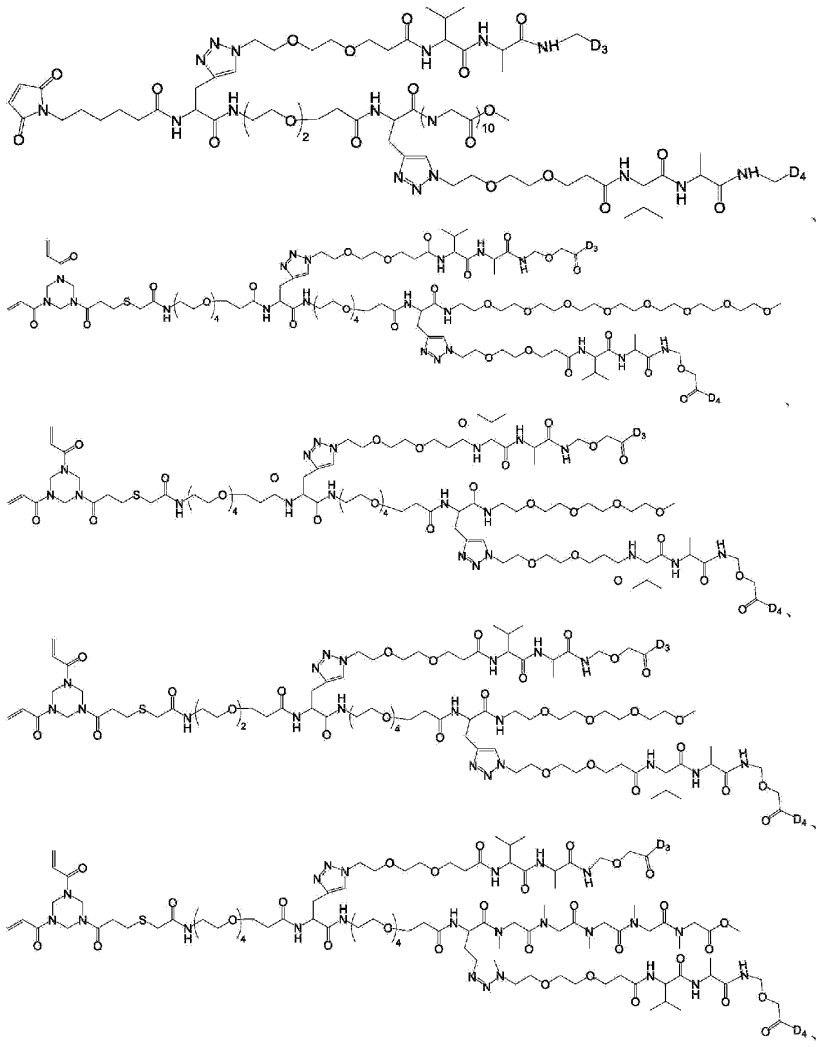
。

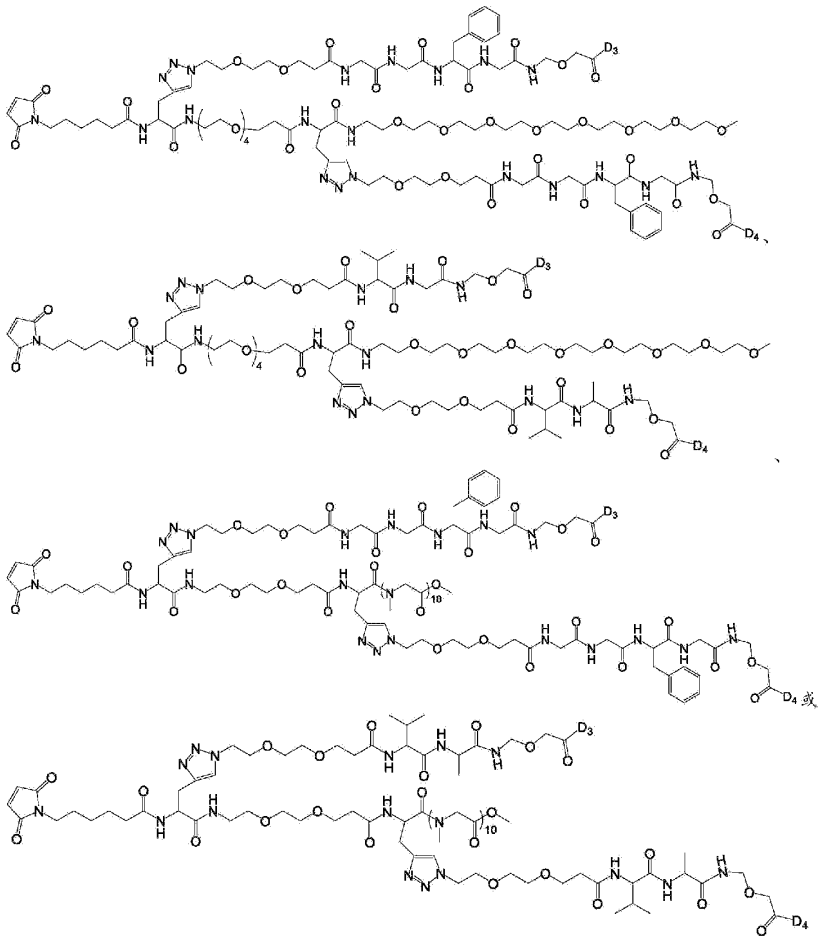
[权利要求 93] 如权利要求78-92中所述的化合物，其特征在于所述化合物选自：



、

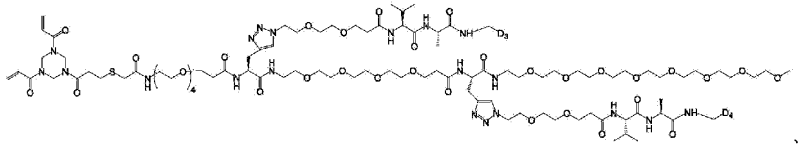


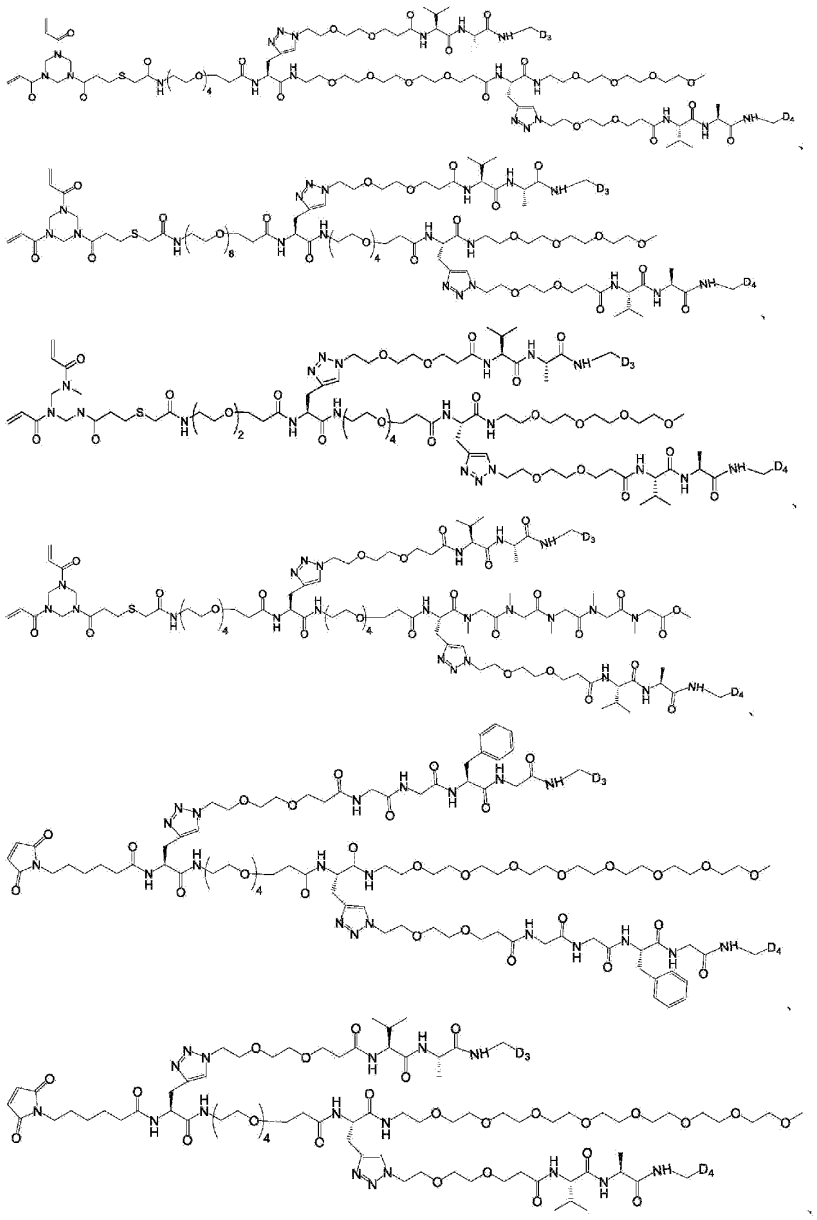


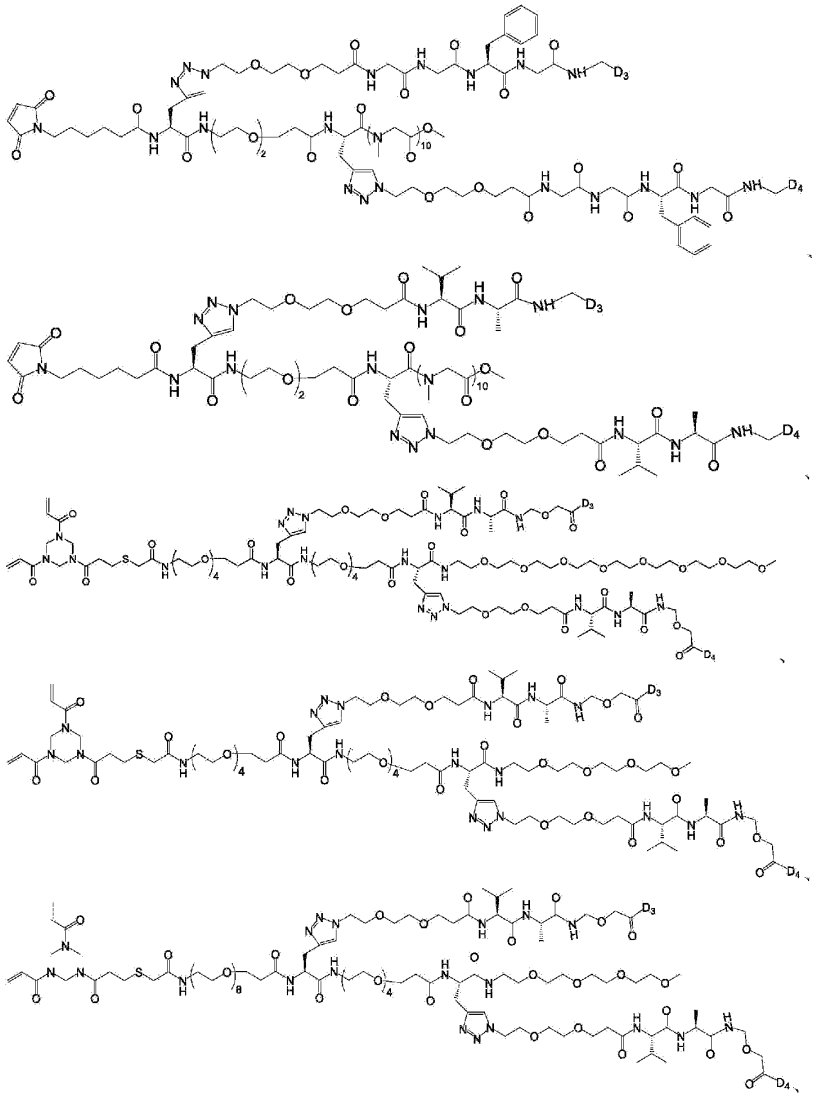


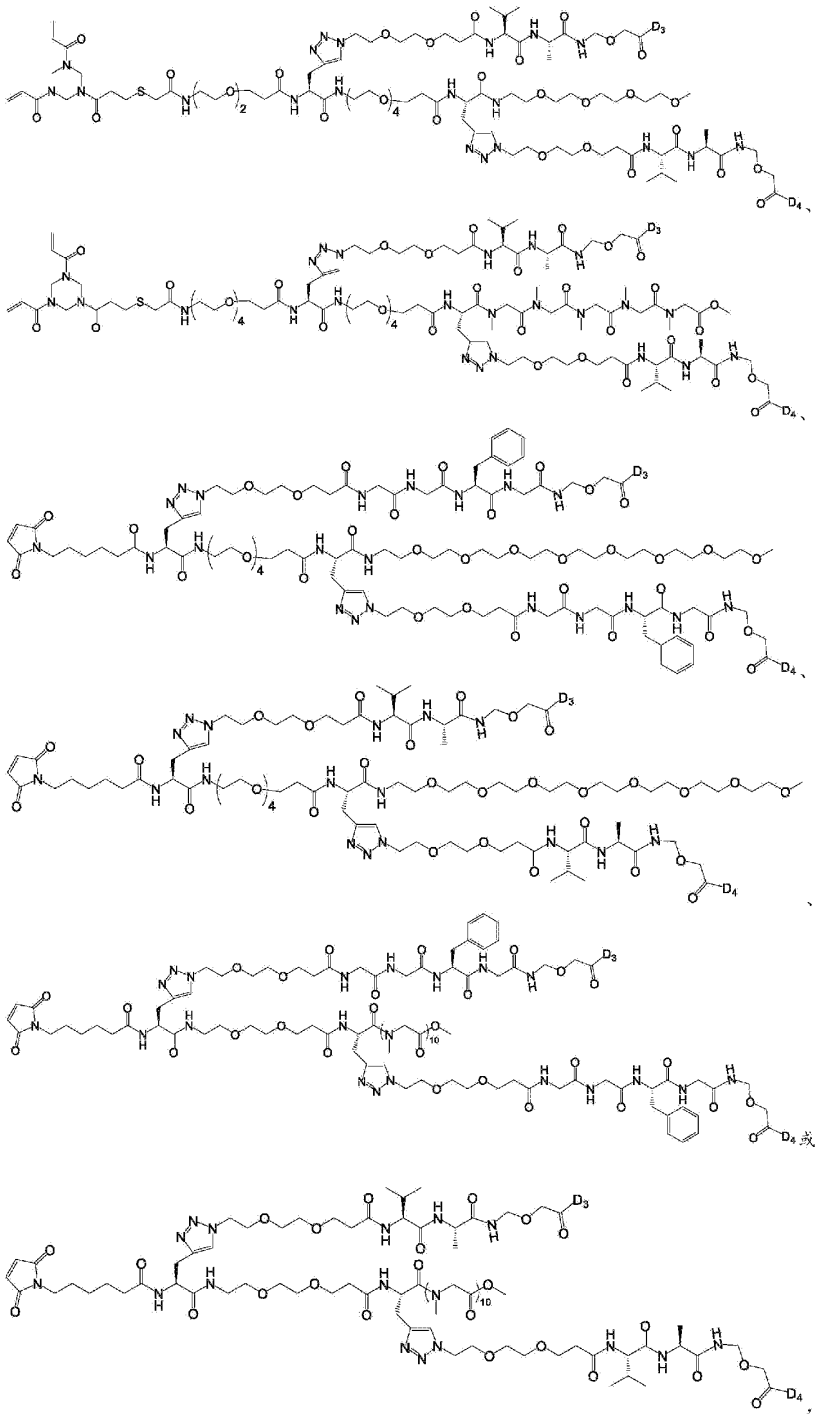
，其中，D_3是第一载荷化合物；D_4是第二载荷化合物。

[权利要求 94] 如权利要求93所述的化合物，其特征在于所述化合物选自：









其中，D_3是第一载荷化合物；D_4是第二载荷化合物。

[权利要求 95] 一种化合物，其特征在于，所述化合物为权利要求74−94中任一项所述化合物的立体异构体、药学上可接受的盐或溶剂化物。

[权利要求 96] 权利要求42−56任一项所述连接子在制备抗体药物偶联物中的应用。

[权利要求 97] 权利要求57−73或78−95任一项所述连接子−载荷在制备抗体药物偶联物中的应用。

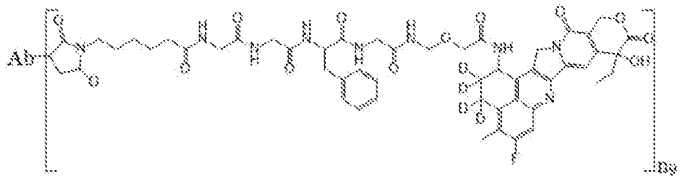
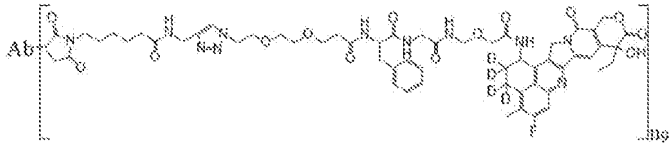
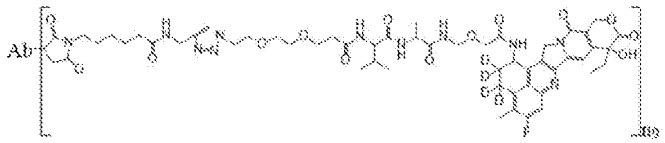
[权利要求 98] 权利要求74−77任一项所述化合物在制备抗体药物偶联物中的应用。

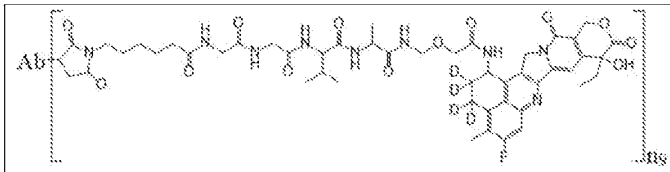
[权利要求 99] 一种包括靶向单元、连接子、载荷的抗体−药物偶联物，所述抗体−药物偶联物使用的连接子选自权利要求42−56任一项所述的连接子结构，和/或所述抗体−药物偶联物使用的载荷选自权利要求74−77任一项所述的化合物。

[权利要求 100] 根据权利要求99所述的抗体−药物偶联物，所述靶向单元选自权利要求29−33中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

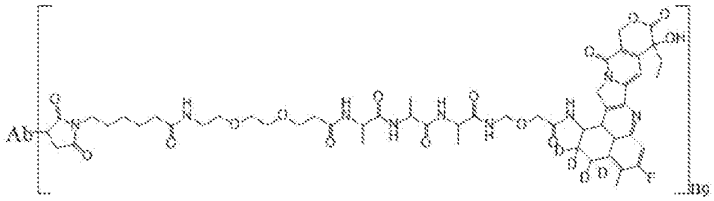
[权利要求 101] 根据权利要求99所述的抗体−药物偶联物，所述连接子−载荷选自权利要求57−73或78−95任一项所述的化合物。

[权利要求 102] 根据权利要求99−101任一项所述的抗体−药物偶联物，所述抗体−药物偶联物选自以下结构：

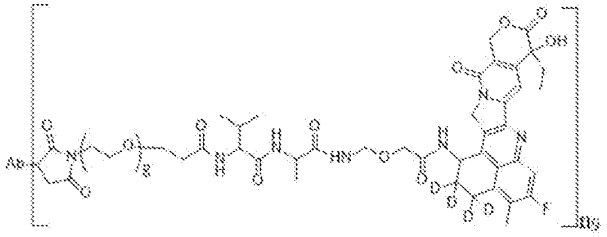
ADC-100

ADC-200

ADC-600

ADC-500



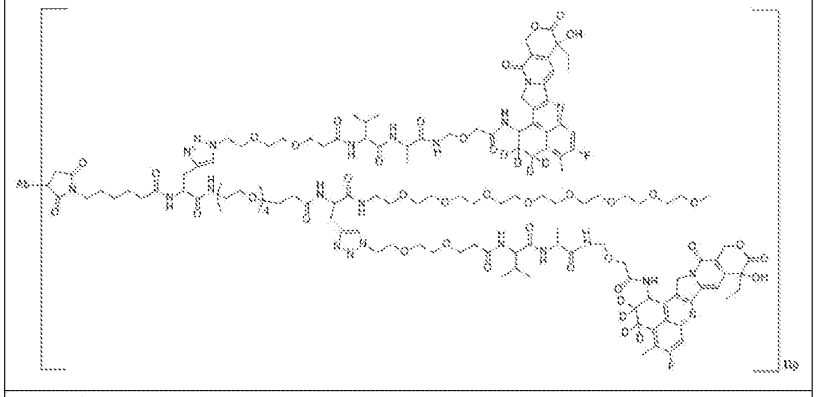
ADC-700



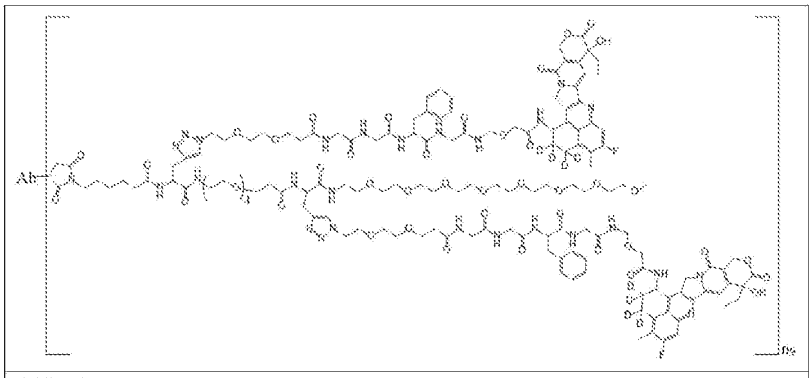
ADC-1400



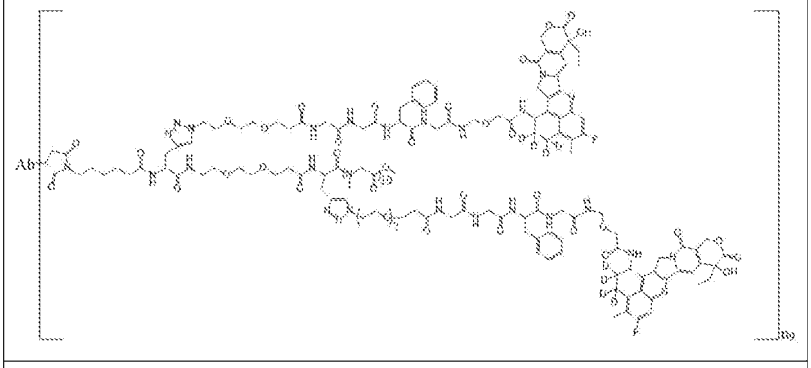
ADC-400



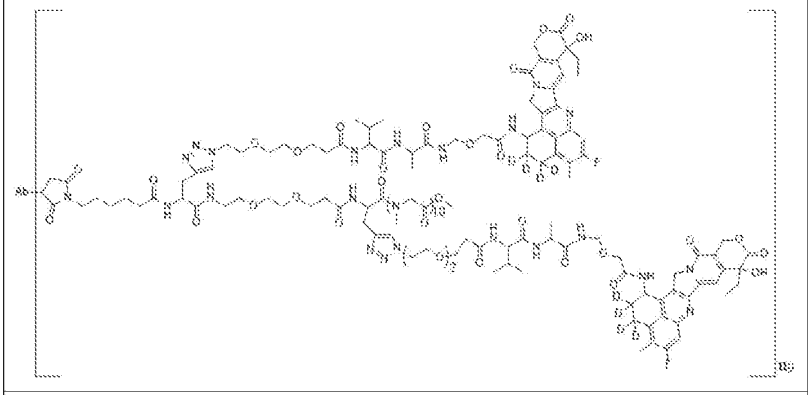
ADC-300



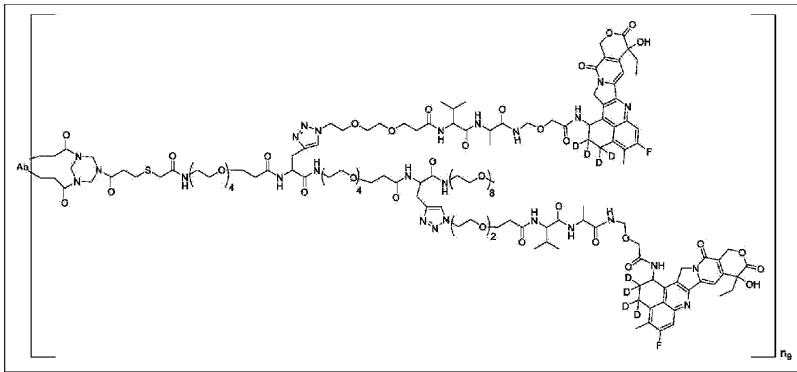
ADC-800



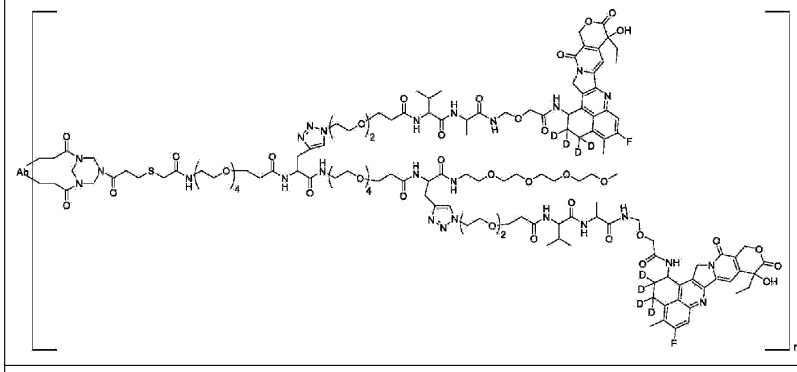
ADC-900



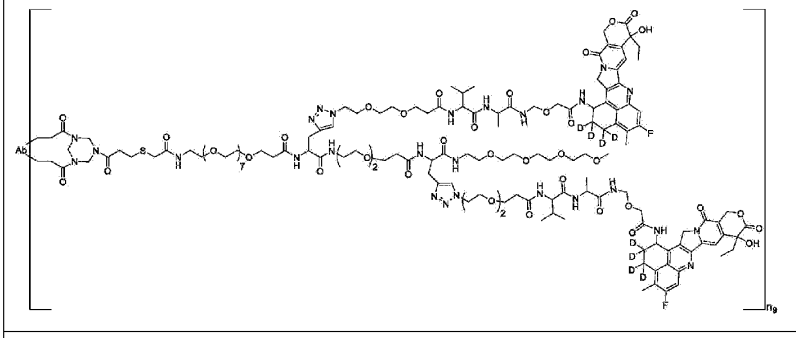
ADC-1000



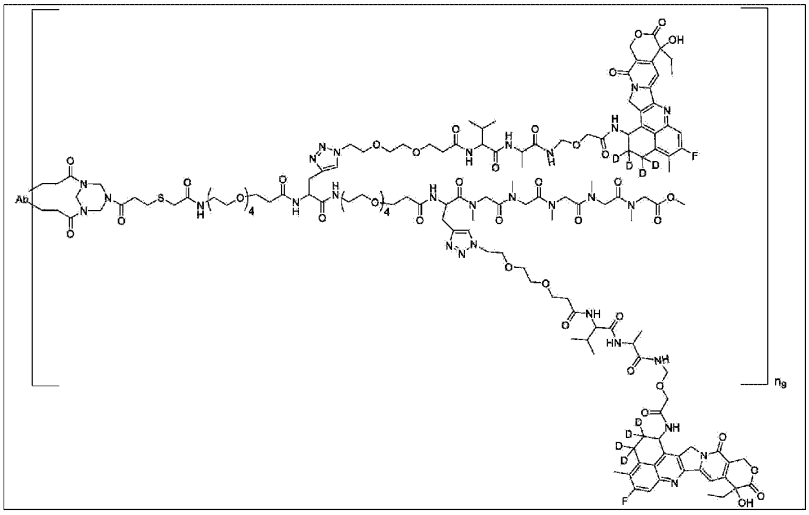
ADC-1100



ADC-1200



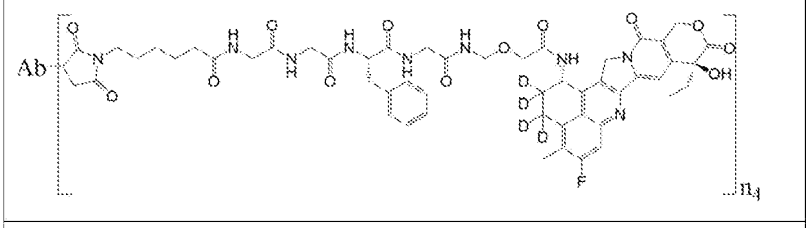
ADC-1300



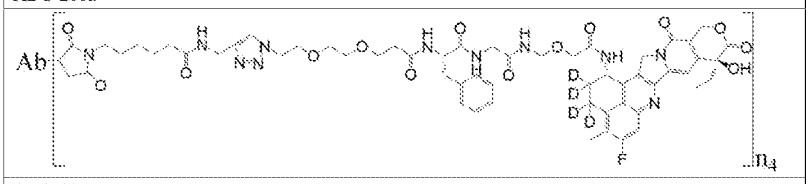
其中，Ab为靶向单元，所述n_9选自1、2、3、4、5、6、7或8。

[权利要求 103] 根据权利要求96所述的抗体药物偶联物，所述抗体药物偶联物选自以下结构：

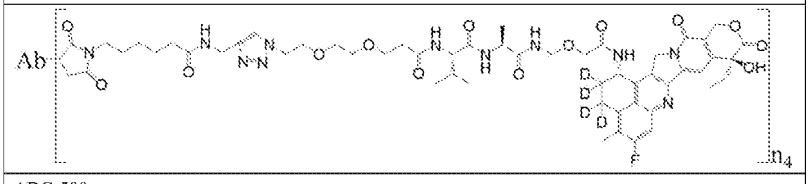
ADC-100a



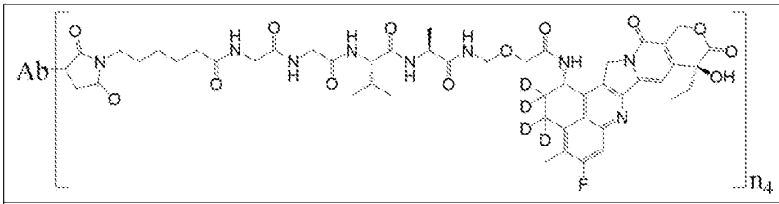
ADC-200a



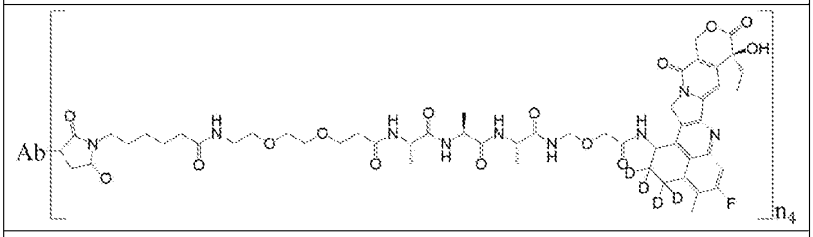
ADC-600a



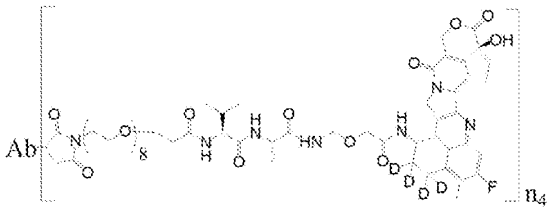
ADC-500a



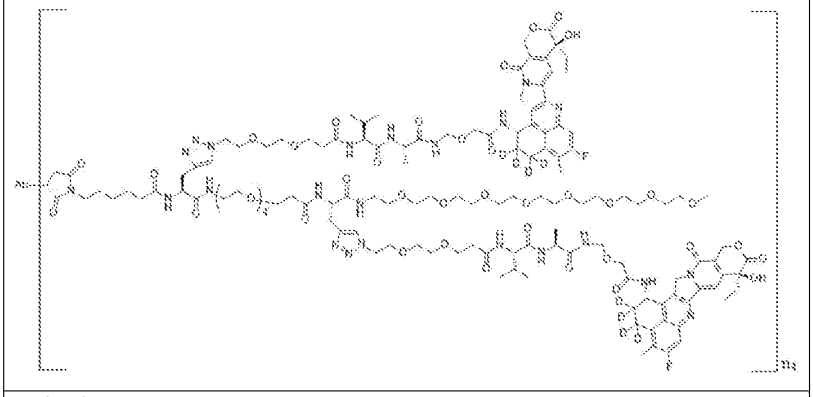
ADC-700a



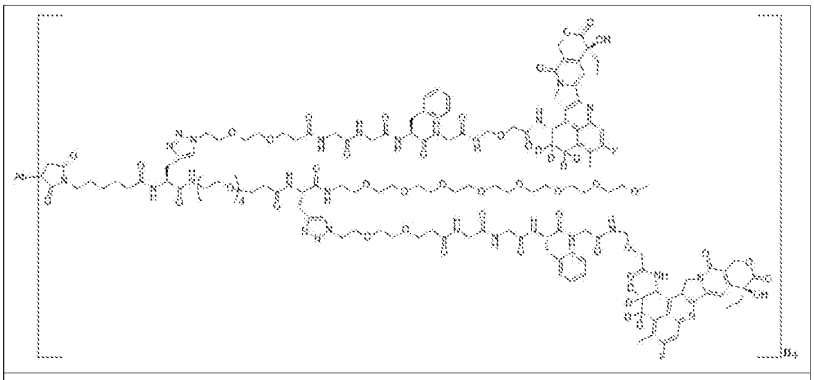
ADC-1400a



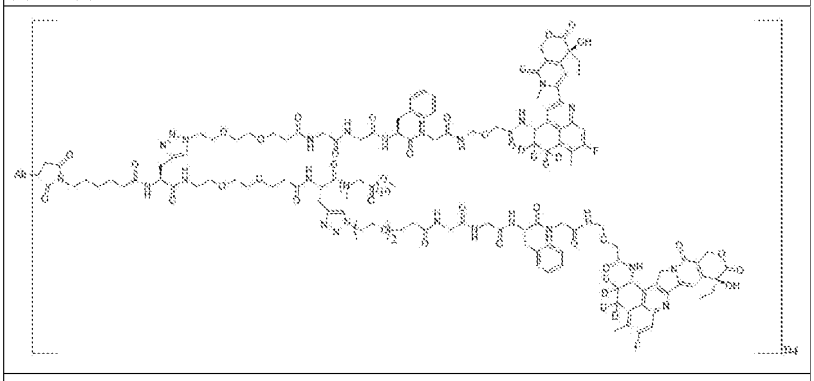
ADC-400a



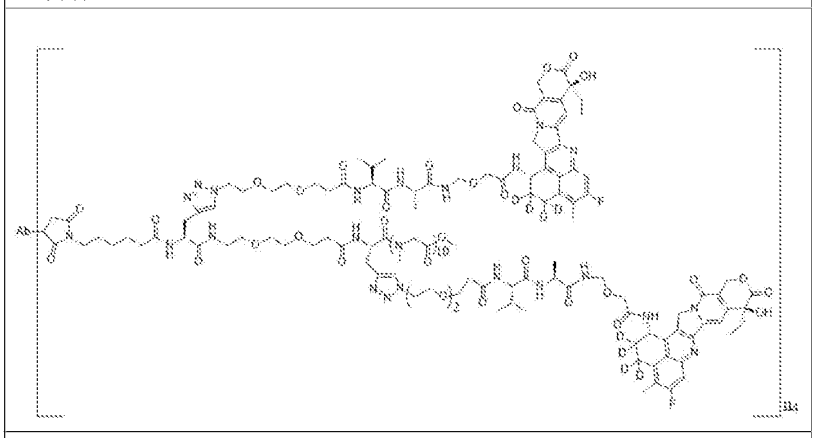
ADC-300a



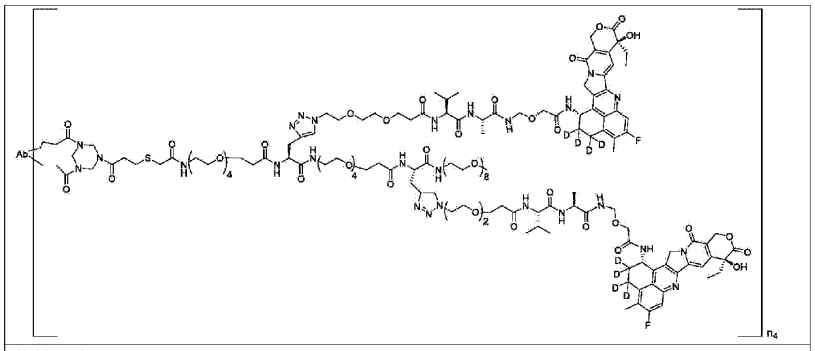
ADC-800a



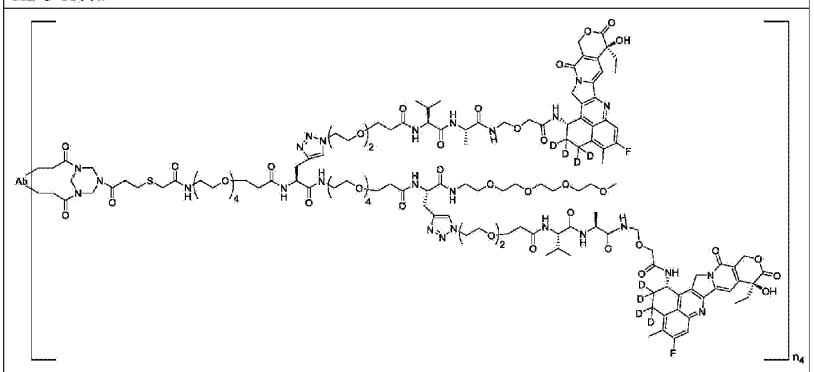
ADC-900a



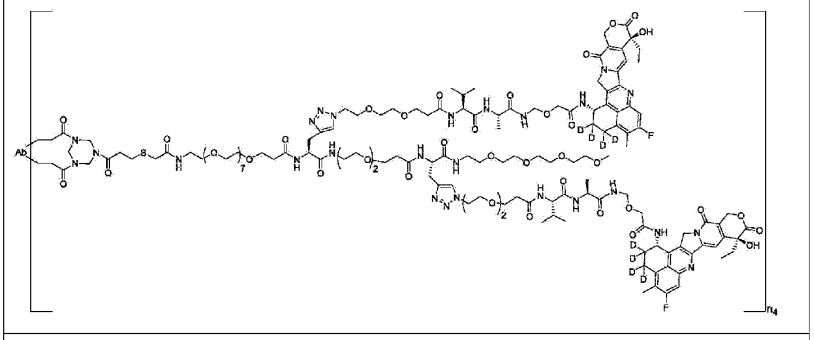
ADC-1000a



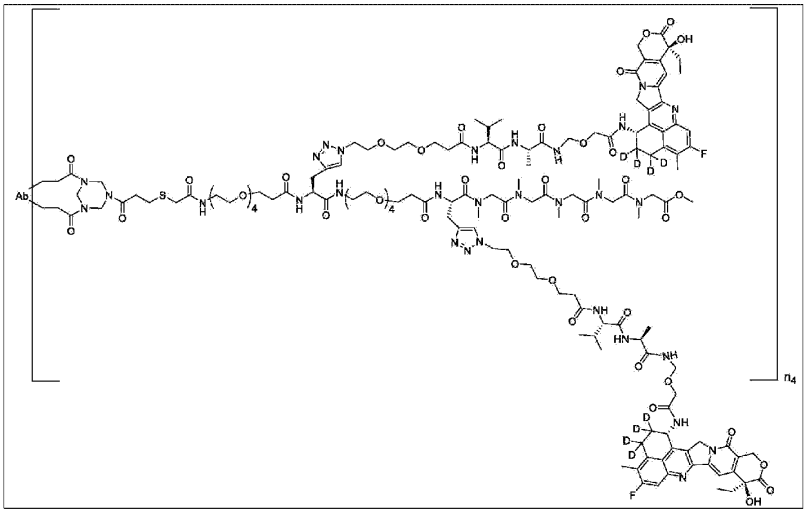
ADC-1100a



ADC-1200a



ADC-1300a



其中，Ab为靶向单元；所述n_4选自1、2、3、4、5、6、7或8，代表所述Ab上连接的连接子-载荷部分的数量为1、2、3、4、5、6、7或8个。

[权利要求 104] 根据权利要求99所述的抗体药物偶联物，所述抗体药物偶联物的结构为ADC-1300a；优选的，所述靶向单元Ab为靶向CDCP1的抗体或其抗原结合片段；更优选的，所述靶向单元Ab是权利要求29-34任意一项所述的抗体或其抗原结合片段。

[权利要求 105] 一种药物组合物，其包含权利要求1-25或99-103中任一项的抗体药物偶联物和/或权利要求29-34中任一项的抗体或其抗原结合片段，以及可药用载体。

[权利要求 106] 权利要求29-34中任一项的抗体或其抗原结合片段、权利要求34中所述的融合蛋白、权利要求35所述的多核苷酸、权利要求36或37所述的核酸构建体、权利要求1-25或99-103任一项的抗体药物偶联物或权利要求105所述的药物组合物在制备用于治疗或预防癌症的药物中的用途。

[权利要求 107] 根据权利要求106所述的用途，所述癌症为CDCP1阳性癌症。

[权利要求 108] 根据权利要求107所述的用途，所述CDCP1阳性癌症为肺癌、或胰腺癌；进一步优选的，所述CDCP1阳性癌症是肺癌鳞癌，肺腺癌，非小细胞肺癌或胰腺腺癌。

[权利要求 109] 一种重组蛋白，所述重组蛋白包含权利要求29-34中任一项的抗体或抗原结合片段。

[权利要求 110] 根据权利要求109所述的重组蛋白，其中所述重组蛋白为双特异性抗体或多特异性抗体。

[权利要求 111] 权利要求29-34中任一项的抗体或抗原结合片段在制备重组蛋白中的应用。