生物活性物偶联物及其制备方法和用途

本申请要求申请日为2021/2/9的中国专利申请2021101781361的优先权；要求申请日为2021/3/30的中国专利申请2021103408065的优先权；要求申请日为2021/7/21的中国专利申请202110825932X的优先权；要求申请日为2021/7/21的中国专利申请2021108259226的优先权，序列表txt的文件也于2021/7/21与中国专利申请2021108259226同时提交；要求申请日为2021/7/21的中国专利申请2021108259067的优先权，序列表txt的文件也于2021/7/21与中国专利申请2021108259067同时提交。本申请引用上述中国专利申请的全文。本申请包含的序列列表是说明书的一部分，并且本文通过引用整体并入本文。

技术领域

本公开属于医药技术领域，涉及生物活性物偶联物（配体药物偶联物）、化合物、药物连接体偶联物及其制备方法，以及其在预防和/或治疗与细胞活动异常相关的疾病，包括但不限于在预防和/或治疗肿瘤疾病中的用途。

背景技术

利用细胞毒的化疗一度是癌症的标准疗法，但高杀伤力的细胞毒素分子会杀伤正常细胞，引起严重的毒副作用。靶向抗肿瘤药物由于同时具有靶向性和抗肿瘤活性，已成为当今肿瘤研究领域的热点，但经常由于靶向药物的靶点选择性问题产生比较大的毒副作用，从而限制了靶向药物的治疗效果。生物大分子药物，如抗体或抗体片段，虽然靶向性强，但对实体瘤的治疗效果有限，或者根本不具有治疗效果。ADC是抗体和小分子药物的偶联体，融合了抗体的靶向作用和生物活性分子的活性，成为一种生物导弹，具有非常可期待的疗效和安全性优势。抗体引导ADC结合到靶细胞，随后被细胞内化，小分子药物在细胞内通过特定酶作用下发生的酶解释放，治疗疾病。

ADC药物近几年发展非常迅速，已经上市的ADC有14种：(1)Mylotarg（Gemtuzumab Ozogamicin，吉妥珠单抗（CD33）-卡齐霉素），CD33阳性急性髓性白血病（AML），2000年FDA批准上市，2010年撤市，2017年重新上市；（2）Adcetris（Brentuximab Vedotin，CD30单抗-MMAE），经典霍奇金淋巴瘤和间变性大细胞淋巴瘤，2011年FDA批准上市；（3）Kadcyla（Trastuzumab Emtansine，曲妥珠单抗(Her2)-美登素生物碱TM1），HER2阳性乳腺癌，2013年FDA批准上市；(4)Besponsa(Inotuzumab ozogamicin，CD22单抗-卡奇霉素），成人复发或难治性B细胞淋巴细胞白血病，2017年批准上市；（5）Lumoxiti（Moxetumomab pasudotox-tdfk, CD22-假单胞菌外毒素），复发性或难治性毛细胞白血病（HCL），2018年上市；（6）Polivy（Polatuzumab vedotin-piiq, CD79b-MMAE），复发性或难治性弥漫

性大B细胞淋巴瘤(R/R DLBCL)，2019年上市；(7)Padcev(Enfortumab vedotin-ejfv, Nectin 4-MMAE)，局部晚期或转移性尿路上皮癌(UC)，2019年上市；(8)Enhertu(Famtrastuzumab deruxtecan-nxki, Her2-拓扑异构酶I抑制剂)，乳腺癌，2019年上市；(9) Trodelvy (Trop2-拓扑异构酶I抑制剂 ADC)，三阴乳腺癌，2020年4月FDA批准上市；(10) BCMA ADC Belantamab mafodotin (GSK2857916)；(11) CD19 ADC Zynlonta (loncastuximab tesirine); (12) EGFR ADC Akalux; (13) Her2 ADC 维迪西妥单抗RC48；(14) Tissue Factor ADC Tivadak (tisotumab vedotin)。

ADC药物由抗体、生物活性分子（药物分子）及连接体（Linker）三部分组成。生物活性分子通过连接体共价偶联到抗体上。除了靶向性和生物活性，生物活性分子与抗体的偶联方式也是ADC药物的核心之一，其决定了药品的均一性和稳定性，极大地影响ADC的药代动力学性质和毒性等。生物活性分子与抗体连接部分的稳定性的提高，会增加ADC体循环稳定性，减少药物在非靶向组织的脱落，从而相对增加了带入靶细胞内和靶细胞附近周围的药物，增加生物活性分子在靶细胞内及附近的释放量，可以进一步的增效减毒。因此，增加生物活性分子与抗体连接稳定性是ADC药物研究中极为重要的技术领域之一。

目前上市的10种ADC抗体和连接体的偶联方式主要有两种：(1) 赖氨酸是抗体中最常见的连接位点，其ε-氨基可以与连接体的活化羧基反应，形成酰胺键。目前已有可以实现定点偶联的技术，即以活化基团活化链接子的羧基，再与抗体中特定的赖氨酸ε-氨基形成酰胺键，完成偶联。一方面，通过此类酰胺键实现定点定量偶联还不具有广谱实用性，只能在某些特定情况下使用；另一方面，在体内酶的作用下，易发生水解，导致生物活性分子与抗体在未达到靶细胞时即发生脱落，增加了毒性。(2) 抗体半胱氨酸的巯基（SH），都是以二硫键的形式存在。打开抗体中的二硫键，可以提供多个自由的巯基作为偶联位点。与抗体巯基进行偶联，一种方法是抗体上自由的巯基与马来酰亚胺发生Michael加成反应，也可以是特定的底物与抗体上自由的巯基通过两次Michael加成反应，形成一个结构独特的硫桥键。但有较多文献报道，通过巯基Michael加成方法得到的ADC，会有30%或更多的ADC在体循环中发生逆Michael加成，产生毒素提前脱落而发生毒性反应。

抗体偶联药物根据发展历程可以分为四代：

第一代抗体偶联药物是基于鼠源抗体，这类抗体由于可以产生复杂的免疫原性，从而具有很强的毒副作用；

第二代抗体偶联药物是在第一代的基础上使用人源化或全人源抗体，第二代抗体偶联药物的成药性质得到了巨大改善。第一代和第二代抗体偶联药物在抗体和药物的连接上是相对随意的，因而最终抗体偶联药物产品为一个多组份混合物，这类药物不但毒性大，其质量也难以控制；

第三代抗体偶联药物在使用人源化或全人源抗体的基础上，同时实现毒素-连接子（linker）和抗体的定点-定量偶联，从而生成均一性的单分子抗体偶联药物，这类抗体偶联药物的毒性和质量控制

比第二代抗体偶联药物有很大改进；

第四代抗体偶联药物是在第三代的基础上，对毒素-连接子（linker）进行了革新。第四代抗体偶联药物一改过去以高毒性毒素为基础的抗体偶联药物策略，选用相对低毒性的喜树碱类分子作为生物活性成分，同时采用高毒素-抗体比（DAR），如 DAR 值 8，这类 ADC 对肿瘤表面抗原低表达的肿瘤也能产生很好的治疗效果。第四代抗体偶联药物尽管起步晚，但由于其显著的疗效，异军突起，很快获得了临床认可，其代表性药物 Enhertu 和 Trodelvy 已被 FDA 批准上市。但目前第四代 ADC 依然存在稳定性差或溶解度低的问题，已有技术缺乏普适性，仍然需要进一步开发新的毒素-linker 来解决这些问题。

已有的抗体偶联药物一般是通过 ADC 中的抗体和肿瘤细胞表面抗原结合，然后发生细胞内吞进入核内体（endosome），再从核内体向溶酶体转化，然后在溶酶体中水解酶的作用下将生物活性分子（毒素或 payload）从 ADC 解离下来，解离下来的生物活性分子从溶酶体进入胞浆后杀伤肿瘤细胞，从杀伤肿瘤细胞后逃逸的生物活性分子可以进一步杀伤其周围抗原不表达或低表达的肿瘤细胞（即所谓的旁观者效应，by-stander effect）。在这整个过程中，任何一个环节的变化都可以使 ADC 产生耐药性而失去治疗效果，如治疗过程中抗原表达发生变化，内吞减弱甚至失去内吞，核内体或溶酶体功能发生变化等等。因此寻找一种能在体内血液循环体系中稳定的 ADC、同时这种 ADC 又能在肿瘤微环境中不需要细胞内吞而产生胞外裂解将毒素解离脱落来杀伤肿瘤，这种 ADC 将能克服传统 ADC 存在的多种耐药机制，因而在临床治疗上将具有非常重大的意义。

尽管有证据表明 Immunomedics 和 Gilead 的 Trodelvy 可以不需要内吞而在肿瘤细胞外裂解，但由于 Trodelvy 在血浆和水溶液中非常不稳定，其血浆半衰期小于 24 小时，因而这类 ADC 只能用于生物活性低的毒素组成的 ADC 去避免 ADC 毒素提前脱落产生的非靶向毒副作用。

此外传统 ADC 的连接子的功能是完成细胞内的酶切或利用其调节水溶性等，如何能让连接子在满足酶切要求的同时，利用连接子实现 ADC 在肿瘤组织中的富集，对降低 ADC 在正常组织中的毒副作用也具有重要意义。

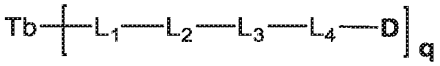
另外，B7H3 为 B7 家族的 I 型跨膜蛋白，在人体中具有两种同种型 2Ig-B7H3 和 4Ig-B7H3。B7H3 在正常组织中广泛的表达，仅组成型表达于非免疫静息期纤维细胞、内皮细胞、成骨细胞和羊水干细胞，诱导性表达于活化的 T、NK、DC 和巨噬细胞上，未在淋巴器官检测到阳性表达（Chapoval, A.I., et al., B7H3: A costimulatory molecule for T cell activation and IFN production. Nature Immunology, 2001. 2(3): p. 269-274）。研究表明，约 76.5%的早期肝癌患者血清中的 B7H3 较正常人高 3 倍左右（60.79 ± 19.45 Vs 20.52 ± 8.46ng/mL），但与疾病进程的相关性尚不清（Zhao, L., et al., Early Detection of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Hepatocirrhosis by Soluble B7H3. Journal of Gastrointestinal Surgery. 21(5): p. 807-812）。

目前，临床前研究中有针对 B7H3 靶点的治疗策略。例如，针对小鼠 B7H3 的抗体将增强肿瘤中浸润的 CD8 阳性 T 细胞并抑制肿瘤生长（Mod Pathol . 2010 Aug;23(8):1104-12.）。此外，WO2008/066691 显示识别 B7H3 变体 B7H3a 的抗体在体内对腺癌具有抗肿瘤作用。在临床研究中，小鼠 B7H3 抗体和放射性碘 131 的结合药物可以显著抑制患者神经母细胞瘤的生长[Jneufoocol 97（3）：409-18（2010）]。

发明内容

为了改进抗体药物偶联物（ADC）或其它配体药物偶联物（PDC）的治疗效果，降低药物毒副作用，提高治疗窗口，本公开提供一种式（XV）所示的配体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其含有生物活性分子（药物分子）、连接体和靶向部分，所述靶向部分通过活性基团（例如巯基）与所述连接体连接形成配体药物偶联物。本公开还开发了包含结合 B7H3 分子的可变轻链结构域和/或可变重链(VH)结构域，所述可变轻链结构域和/或可变重链(VH)结构域抗体已经来自人源抗体。

为此，在本公开的第一方面，本公开提供了式 XV 所示的配体药物偶联物，



式 XV

或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，

其中：

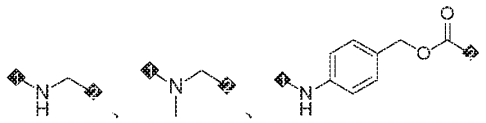
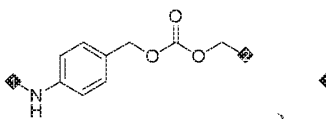
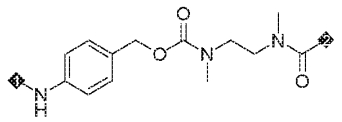
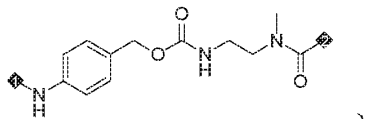
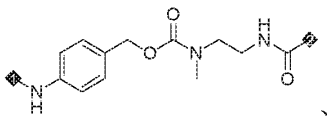
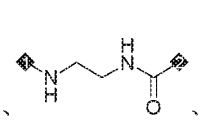
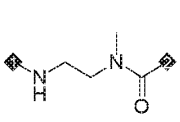
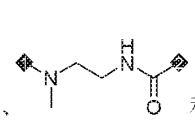
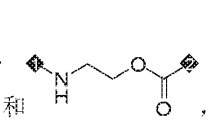
Tb 为和靶点结合的配体或靶向部分；

q 为药物配体偶联比；

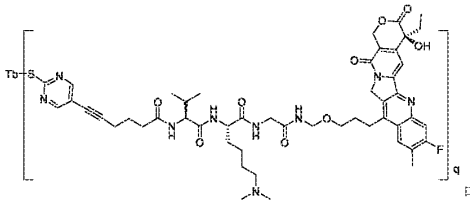
D 为生物活性分子片段；

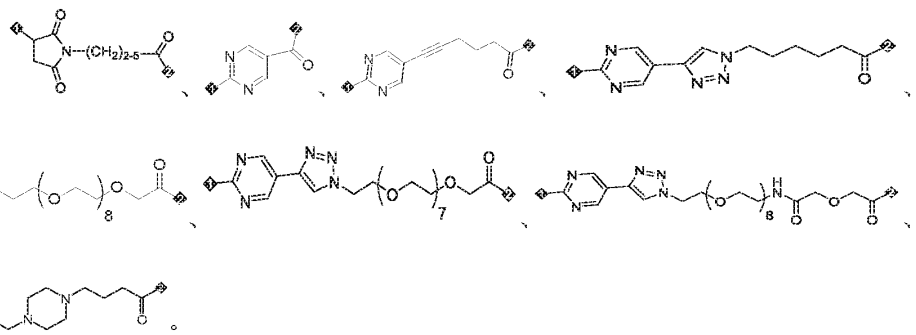
L_1 为延伸单元；

L_2 不存在或为连接单元；L_3 选自氨基酸残基或由 2-10 个氨基酸残基组成的短肽；

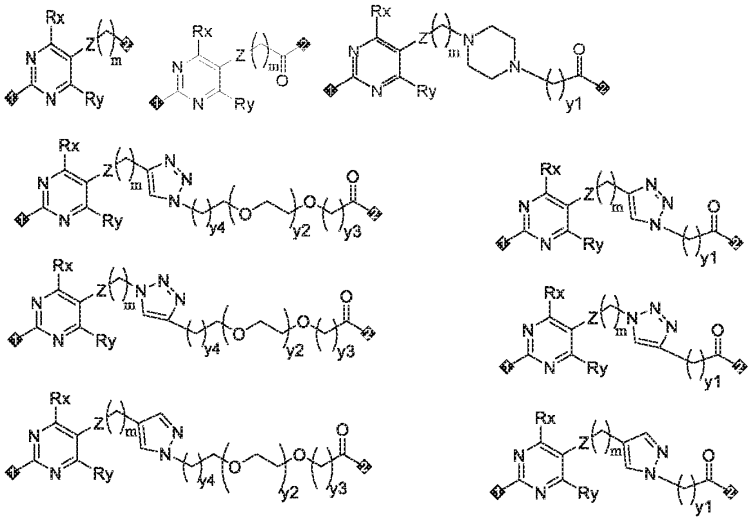
L_4 不存在或存在，L_4 存在时，L_4 选自  、  、  、  、  、  、  、  和  ，

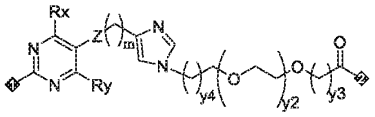
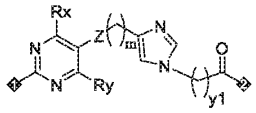
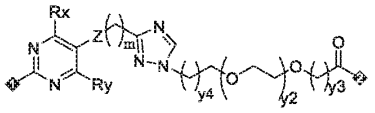
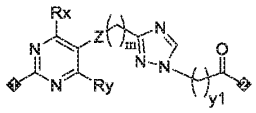
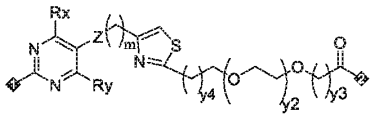
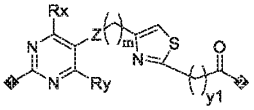
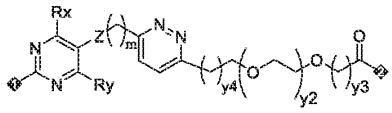
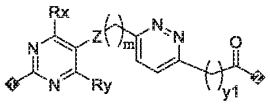
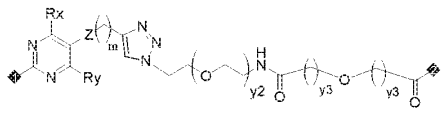
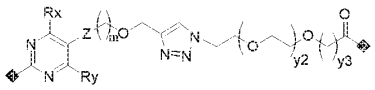
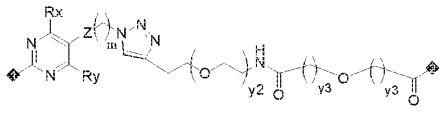
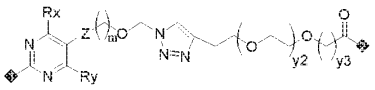
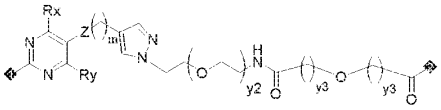
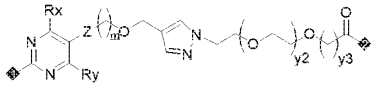
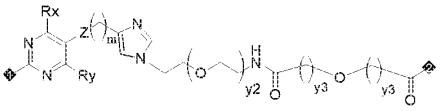
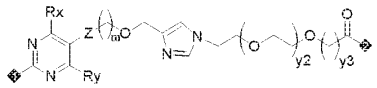
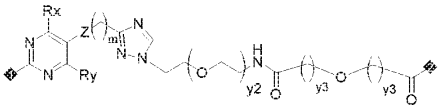
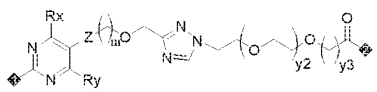
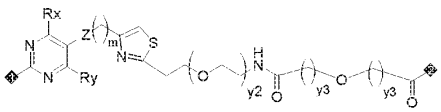
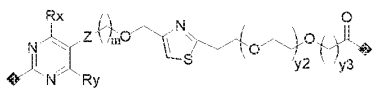
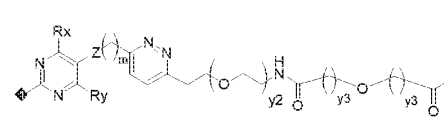
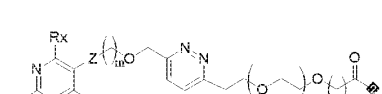
1 位与 L_3 相连，2 位与 D 相连。

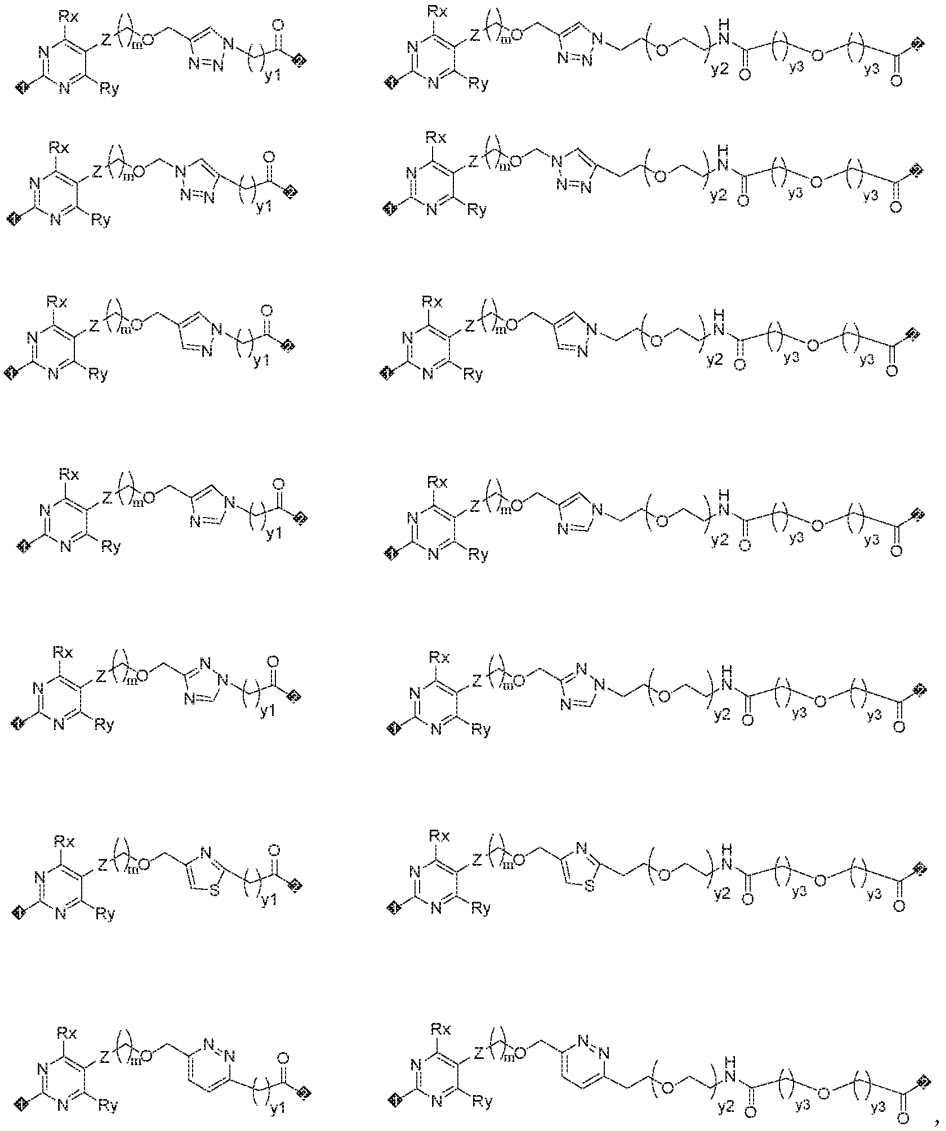
另外，还需要说明的是，对于"L_1的1位通过S原子与Tb相连"，本领域技术人员可以理解的是，L_1的1位是与打开二硫键（例如，通过还原剂TCEP还原二硫键可以打开二硫键，生成巯基-SH）后的Tb（如抗体）自身所含有巯基进行连接，也就是说，L_1与Tb之间的-S-并非另外再外接的硫原子。例如，  中，-S-并非另外外接的硫原子，而是打开双硫键后的Tb自身所含有巯基与L_1例如  的1位进行连接后形成的-S-。

延伸单元为配体药物偶联物或药物连接体偶联物或连接子的组分，其作用是将和靶点结合的配体或靶向部分与配体药物偶联物的其余部分或连接子的其余部分相连。延伸单元能够将Tb单元连接于L_2（如果存在）或L_3，具体实例包括但不限于(其中1位与靶点结合的配体或靶向部分相连、2位与L_2或L_3相连)：  。

在一些实施方案中，L_1选自：



各 Z 独立地选自直接键、碳碳三键、碳碳双键、C6-10 芳基、5-10 元杂芳基、酰胺基、磺酰胺基、亚胺基和 CF_2；

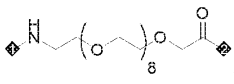
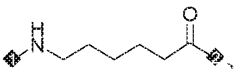
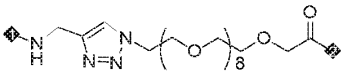
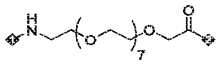
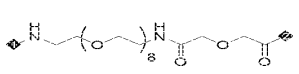
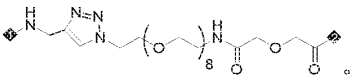
Rx 和 Ry 独立地选自 H 和 C1-4 烷基；

各 m 独立地选自 0、1、2、3、4、5 和 6；

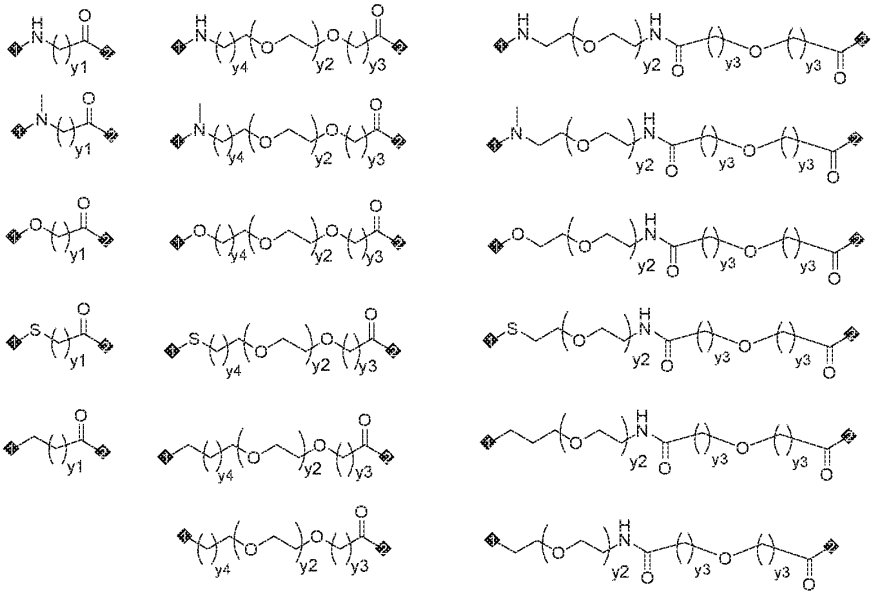
y1、y2、y3 和 y4 独立地选自 0-20 之间的任意整数；

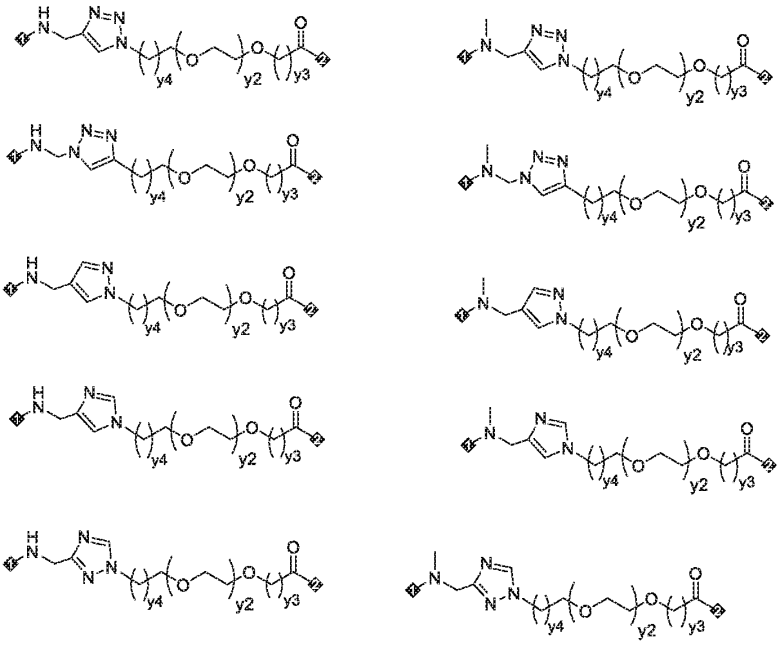
1 位通过 S 原子与 Tb 相连，2 位与 L_2 或 L_3 相连。

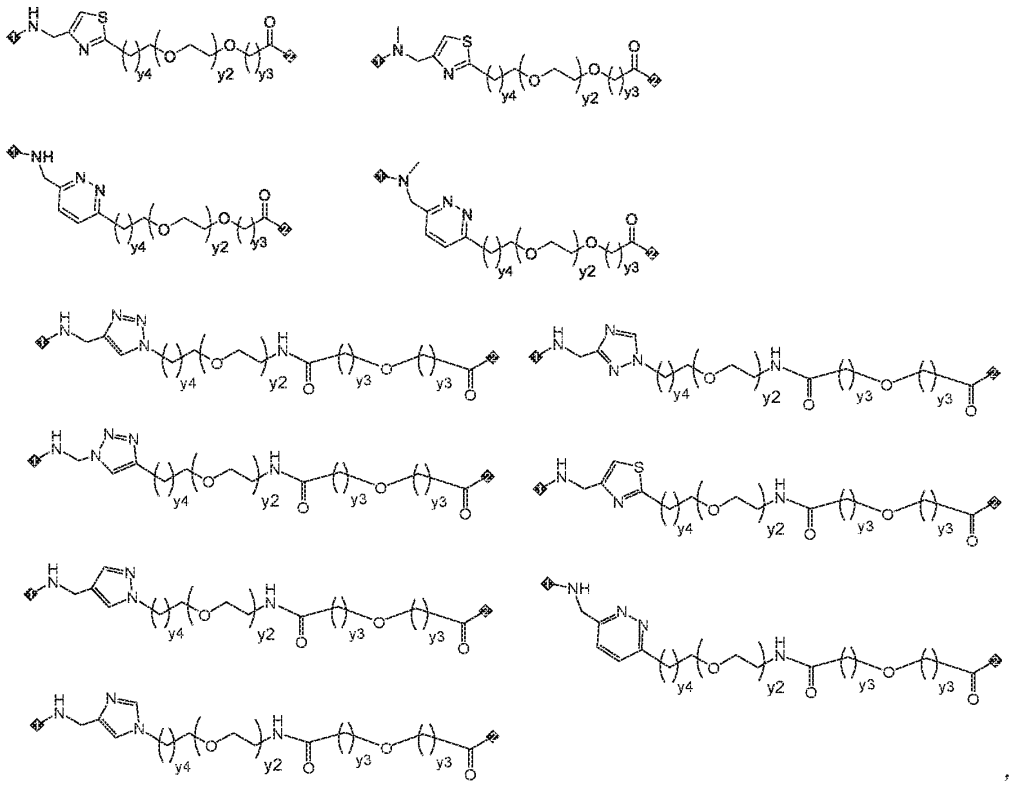
连接单元为配体药物偶联物或药物连接体偶联物或连接子的组分，其作用是用来结合延伸单元与氨基酸残基或由 2-10 个氨基酸残基组成的短肽。连接单元存在时能够将 L_1 连接于 L_3。具体实例包括

但不限于(其中 1 位与延伸单元相连、2 位与 L_3 相连)：  、  、  、  、  和  。

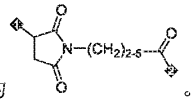
在一些实施方案中，L_2 不存在或存在，L_2 存在时，L_2 选自：

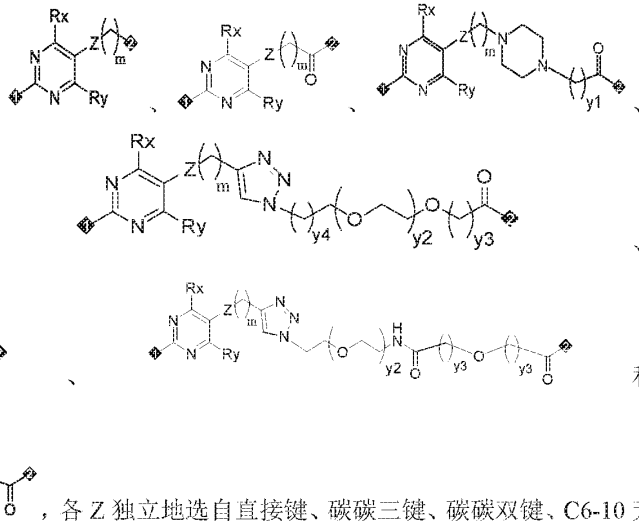




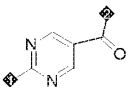
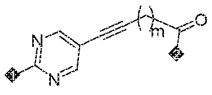
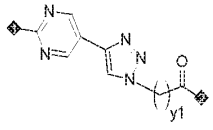
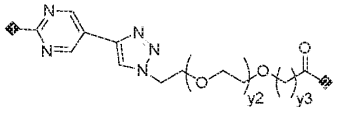
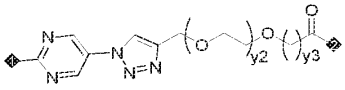
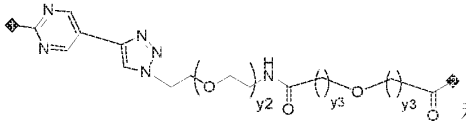
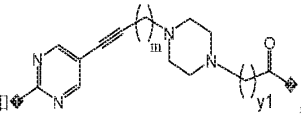


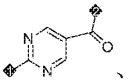
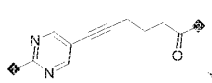
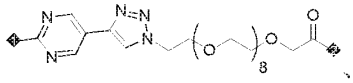
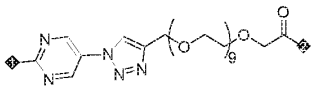
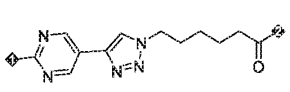
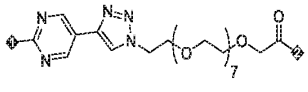
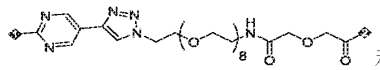
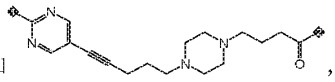
y1、y2、y3 和 y4 独立地选自 0-20 之间的任意整数，1 位与 L_1 相连，2 位与 L_3 相连。

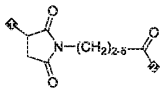
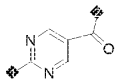
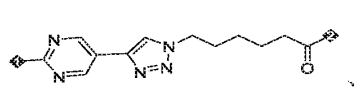
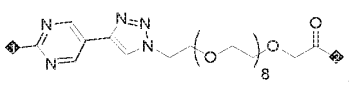
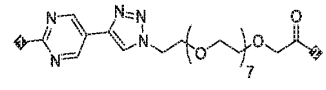
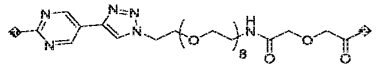
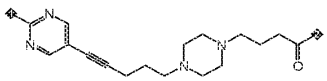
在一些实施方案中，L_1 为  。

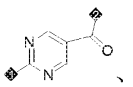
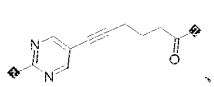
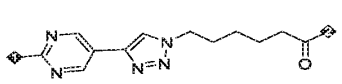
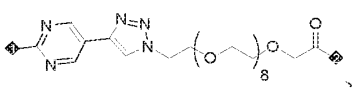
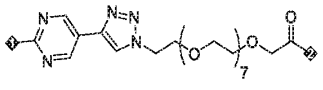
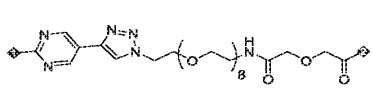
在一些实施方案中，L_1 选自  ，各 Z 独立地选自直接键、碳碳三键、碳碳双键、C6-10 芳基、5-10 元杂芳基和酰胺基（优选选自直接键、碳碳三键、碳碳双键）；Rx、Ry 独立地选自 H 和 C1-4 烷基；各 m 独立地选自 0、1、2、3、4、5 和 6；y1 选自 1-6 之间任意整数（如 4、5、6）；各 y2 独

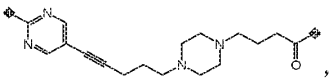
立地选自 0-15（如 6-15）之间任意整数；各 y3 独立地选自 1、2 和 3；各 y4 独立地选自 0 和 1；1 位通过 S 原子与 Tb 相连，2 位与 L_2 或 L_3 相连。

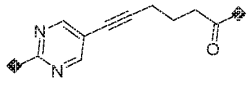
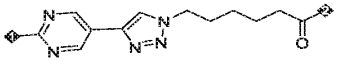
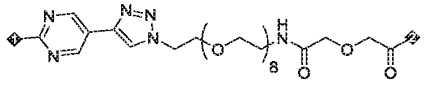
在一些实施方案中，L_1 选自  、  、  、  、  、  和  ，m 选自 2、3、4，y1 选自 1-6 之间任意整数（如 4、5、6），各 y2 独立地选自 0-10（如 6-10）之间任意整数，各 y3 独立地选自 1 或 2，1 位通过 S 原子与 Tb 相连，2 位与 L_2 或 L_3 相连。

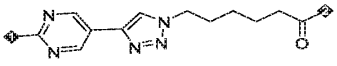
在一些实施方案中，L_1 选自  、  、  、  、  、  、  和  ，1 位通过 S 原子与 Tb 相连，2 位与 L_2 或 L_3 相连。

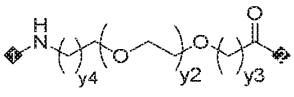
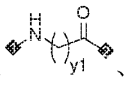
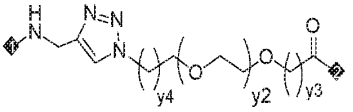
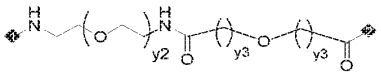
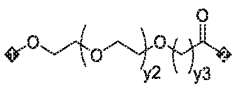
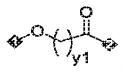
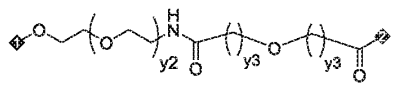
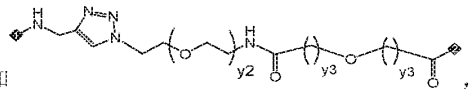
在一些实施方案中，L_1 选自  、  、  、  、  、  、  、  。

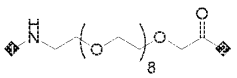
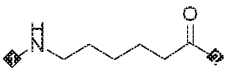
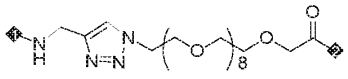
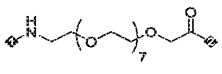
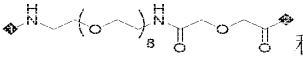
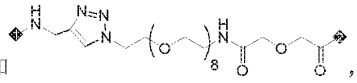
在一些实施方案中，L_1 选自  、  、  、  、  、  和

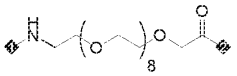
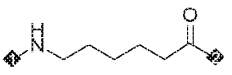
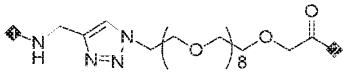
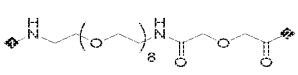
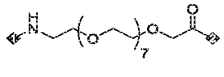
 ，1 位通过 S 原子与 Tb 相连，2 位与 L_2 或 L_3 相连。

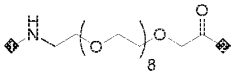
在一些实施方案中，L_1 选自  、  和  ，1 位通过 S 原子与 Tb 相连，2 位与 L_2 或 L_3 相连。

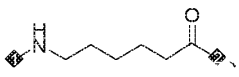
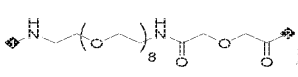
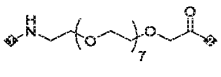
在一些实施方案中，L_1 选自  和  ，1 位通过 S 原子与 Tb 相连，2 位与 L_2 或 L_3 相连。

在一些实施方案中，L_2 不存在或存在，L_2 存在时，L_2 选自  、  、  、  、  、  、  和  ，y1 选自 1-6 之间任意整数（如 4、5、6），各 y2 独立地选自 0-10（如 6-10）之间任意整数，各 y3 独立地选自 1 或 2，各 y4 独立地选自 0 或 1，1 位与 L_1 相连，2 位与 L_3 相连。

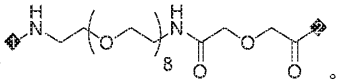
在一些实施方案中，L_2 不存在或存在，L_2 存在时，L_2 选自  、  、  、  、  和  ，1 位与 L_1 相连，2 位与 L_3 相连。

在一些实施方案中，L_2 不存在或存在，L_2 存在时，L_2 选自  、  、  、  和  ，1 位与 L_1 相连，2 位与 L_3 相连。

在一些实施方案中，L_2 不存在或存在，L_2 存在时，L_2 选自  、

 、  和  ，1 位与 L_1 相连，2 位与 L_3 相连。

在一些实施方案中，L_2 不存在。

在一些实施方案中，L_2 选自  。

在一些实施方案中，L_3 选自氨基酸残基或由 2-10 个氨基酸残基组成的短肽；所述的氨基酸残基选自天然氨基酸残基、非天然氨基酸残基、或选自 AA_1 所示氨基酸残基或其立体异构体。

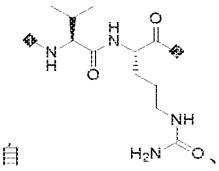
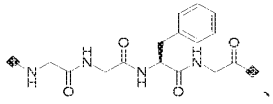
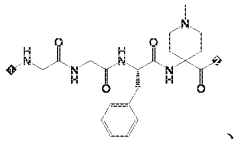
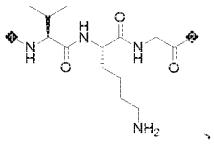
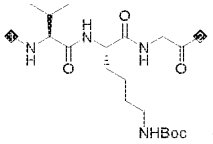
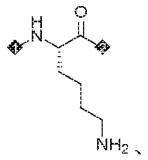
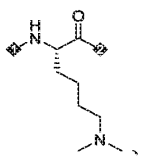
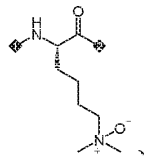
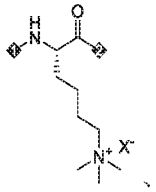
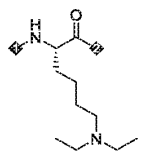
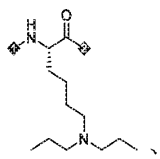
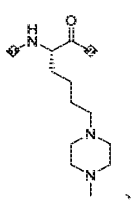
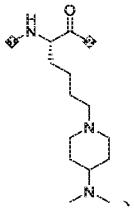
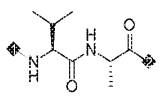
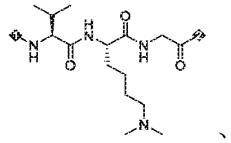
在一些实施方案中，L_3 选自氨基酸残基 Val、D-Val、Cit、Phe、Lys、Lys(Ac)、Leu、Gly、Ala、Asn、Asp、Arg、AA^1 或由 2-10 个选自 Val、Cit、Phe、Lys、D-Val、Leu、Gly、Ala、Asn、Asp、AA^1 的氨基酸残基组成的短肽。

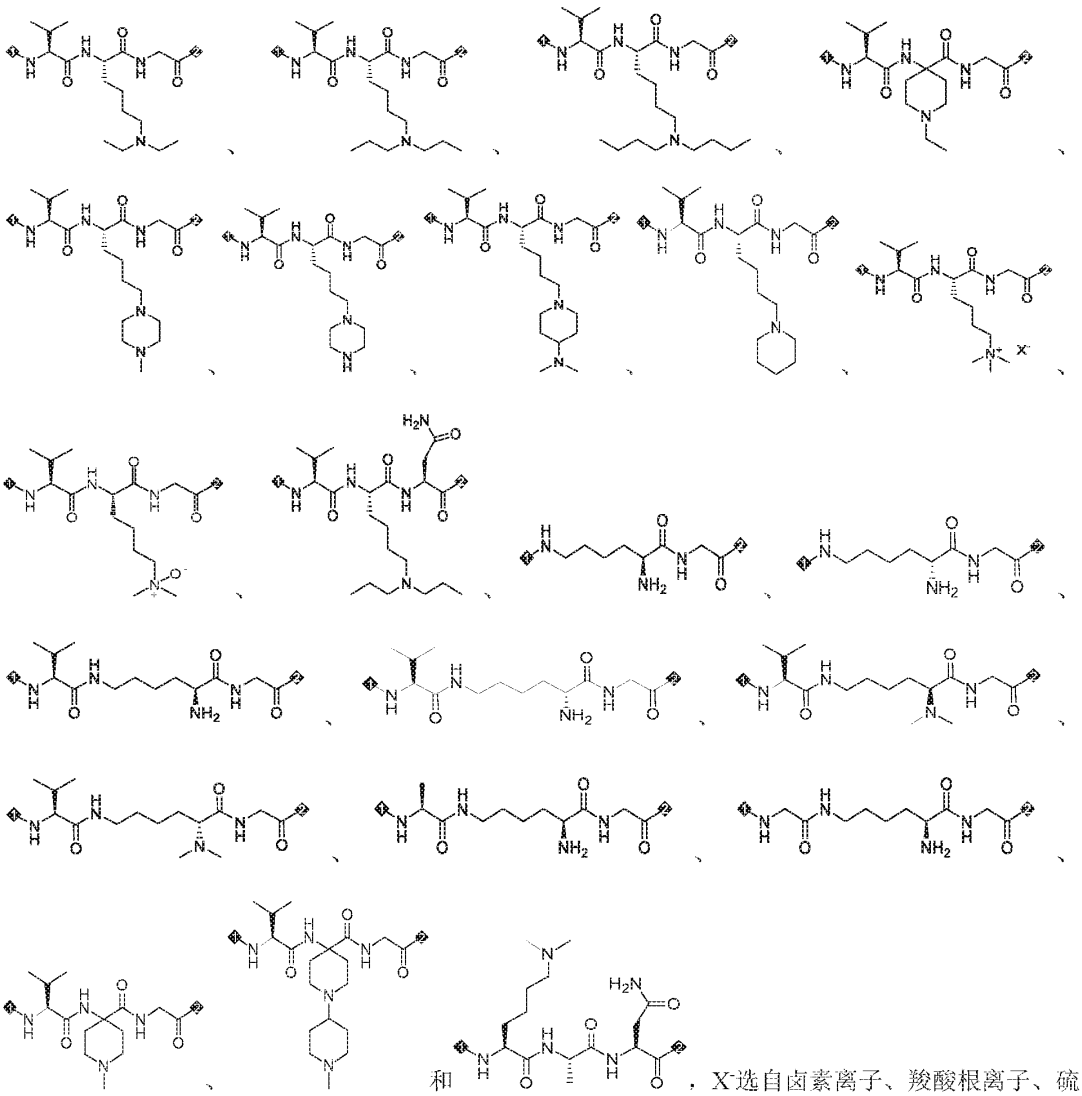
在一些实施方案中，L_3 选自 Val、Cit、Phe、Lys、D-Val、Leu、Gly、Ala、Asn、AA^1、Val-Cit、Cit-Val、Cit-Ala、Val-Ala、Lys-Val、Val-Lys(Ac)、Phe-Lys、Phe-Lys(Ac)、Ala-Ala、Val-AA^1、Ala-AA^1、Gly-AA^1、AA^1-Gly、Ala-Ala-Ala、Ala-Ala-Asn、Ala-Ala-Asp、Val-AA^1-Gly、Ala-AA^1-Gly、Gly-AA^1-Gly、Lys-Ala-Ala-Asn、Lys-Ala-Ala-Asp、Gly-Phe-Gly、Gly-Gly-Phe-Gly、D-Val-Leu-Lys、Gly-Gly-Arg、Ala-Ala-Asn、Gly-Gly-Phe、Val-Lys-Gly、Val-Lys-Gly-Gly、Val-Lys 和 Lys-Ala-Asn。

在一些实施方案中，L_3 选自 AA^1、AA^1-Gly、Val-Cit、Val-AA^1-Gly、AA^1-Ala-Asn 和 Gly-Gly-Phe-Gly。

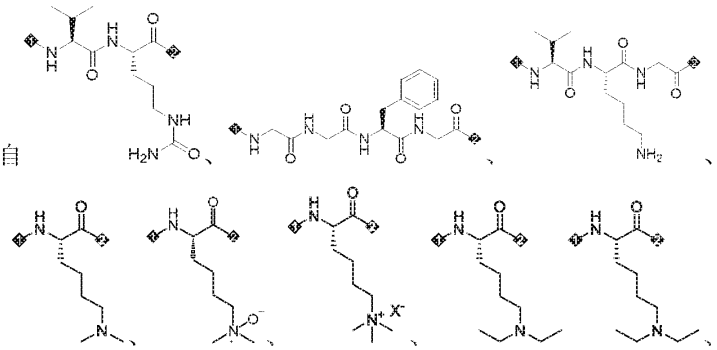
在一些实施方案中，L_3 选自 AA^1 和 Val-AA^1-Gly。

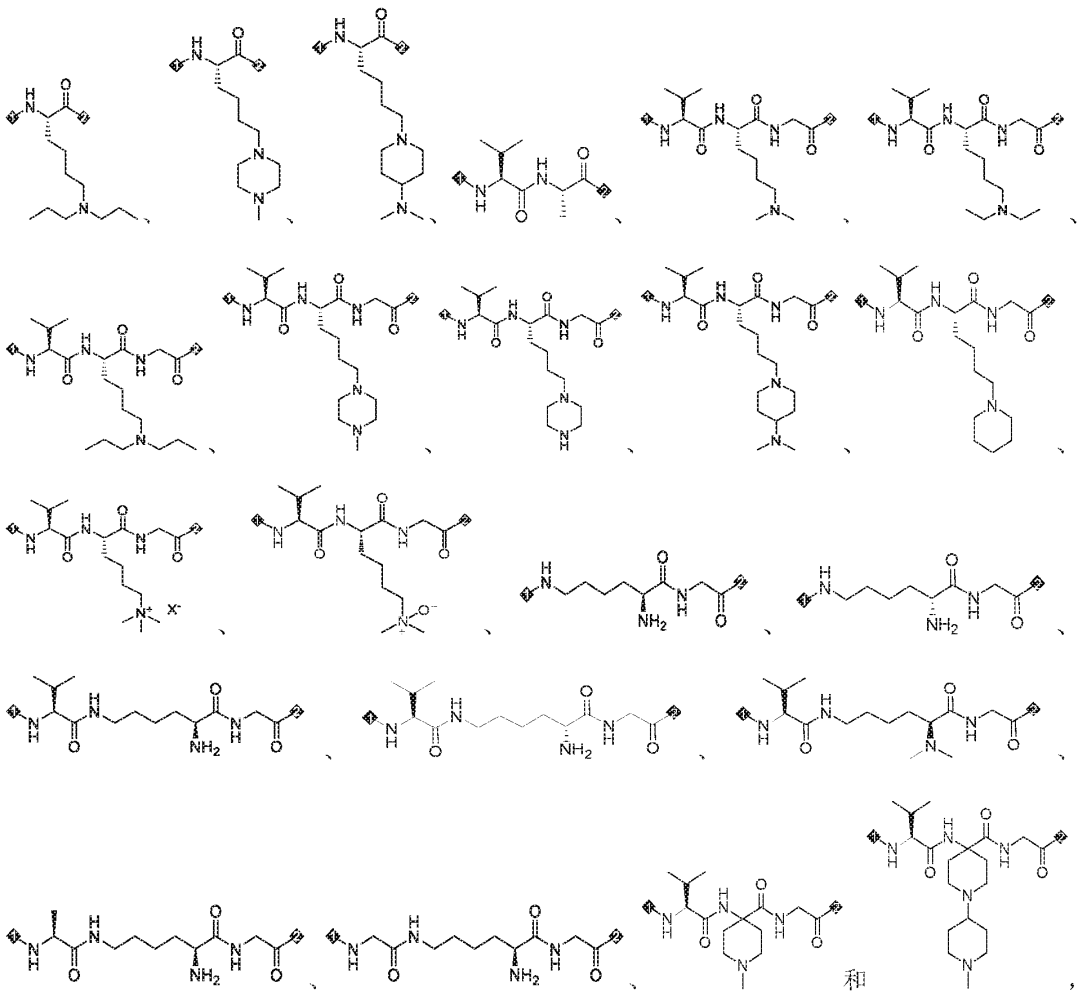
在一些实施方案中，L_3 选自 Val-AA^1-Gly。

在一些实施方案中，L_3 选自  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  。



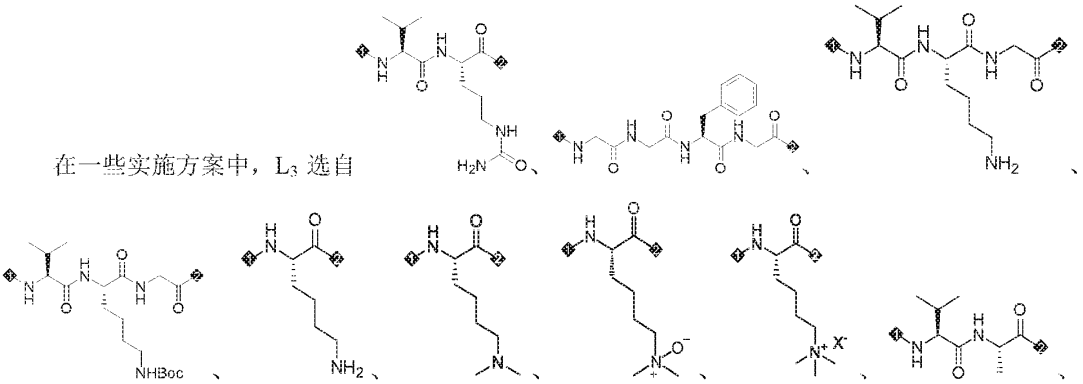
和 ，X^-选自卤素离子、羧酸根离子、硫酸根离子、硫酸氢根离子和 OH^-，1 位与 L_1 或 L_2 相连，2 位与 L_4 或 D 相连。

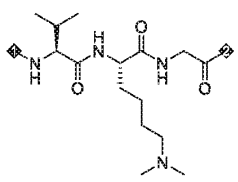
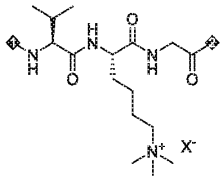
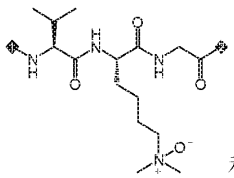
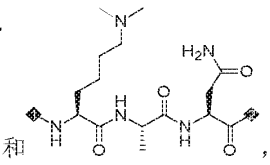
在一些实施方案中，L_3 选自 

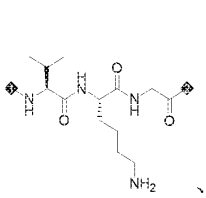
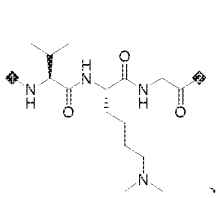
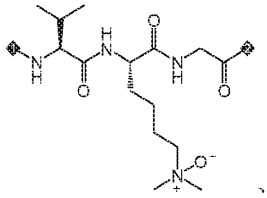
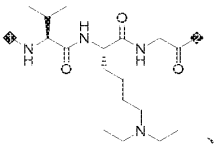
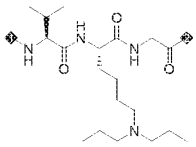
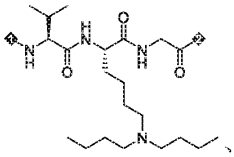
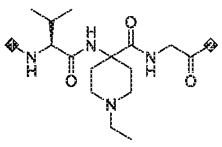
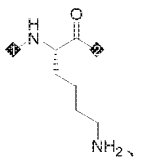
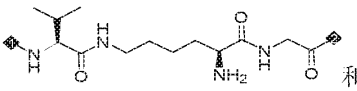
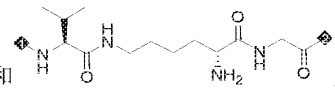


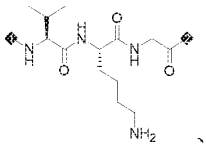
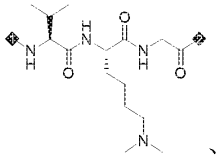
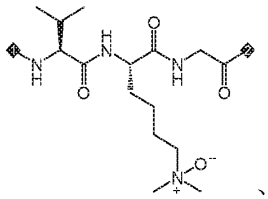
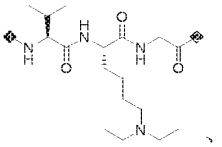
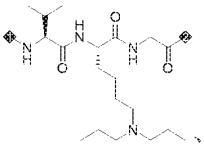
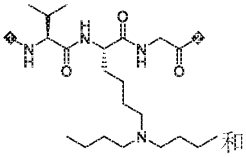
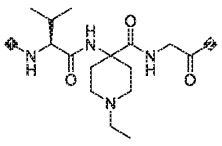
X^-选自卤素离子、羧酸根离子、硫酸根离子、硫酸氢根离子和 OH^-，1 位与 L_1 或 L_2 相连，2 位与 L_4 或 D 相连。

在一些实施方案中，L_3 选自

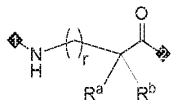


 、  、  和  ，X⁻选自卤素离子、羧酸根离子、硫酸根离子、硫酸氢根离子和 OH^-，1 位与 L_1 或 L_2 相连，2 位与 L_4 或 D 相连。

在一些实施方案中，L_3 选自  、  、  、  、  、  、  、  、  和  ，1 位与 L_1 或 L_2 相连，2 位与 L_4 或 D 相连。

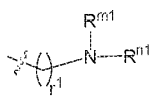
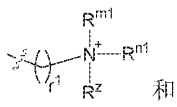
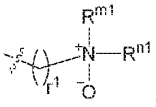
在一些实施方案中，L_3 选自  、  、  、  、  、  和  ，1 位与 L_1 或 L_2 相连，2 位与 L_4 或 D 相连。

在一些实施方案中，AA^1 所示氨基酸残基的结构如下所示，



AA^1

其中：

R^a、R^b 各自独立地选自 H、  、  和  ，且 R^a、R^b 不同时为 H；

或者，R^a 与 R^b 和与它们共同相连的碳原子一起，形成 4-10 元杂环，所述 4-10 元杂环任选地被一个或多个 R^0 所取代；

r、r^1 各自独立地选自 0 到 20 的任意整数；

R^{m1}、R^{n1} 各自独立地选自 H、C1-6 烷基、C3-6 环烷基和-$COOR^{x1}$；

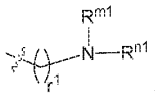
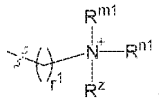
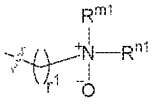
R^{x1} 选自 C1-6 烷基；

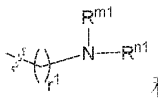
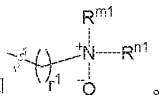
或者，R^{m1} 与 R^{n1} 和与它们共同相连的氮原子一起，形成 4-10 元杂环，所述 4-10 元杂环任选地被一个或多个 $R^{0'}$ 所取代；

R^z 选自 C1-6 烷基；

R^0、$R^{0'}$ 各自独立地选自 C1-6 烷基、C3-6 环烷基、-$NR^{m2}R^{n2}$ 和任选被 C1-6 烷基取代的 4-10 元杂环基；

R^{m2}、R^{n2} 各自独立地选自 H 和 C1-6 烷基。

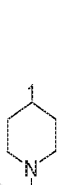
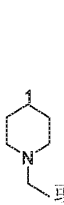
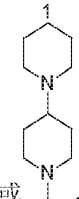
在一些实施方案中，R^a、R^b 中，任一个为 H，另一个选自  、  和  。

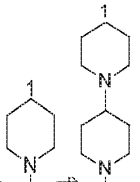
在一些实施方案中，R^a、R^b 中，任一个为 H，另一个选自  和  。

在一些实施方案中，R^a 与 R^b 和与它们共同相连的碳原子一起，形成被 R^0 取代的 5-6 元杂环。

在一些实施方案中，R^a 与 R^b 和与它们共同相连的碳原子一起，形成被 R^0 取代的哌啶环或哌嗪环。

在一些实施方案中，R^a 与 R^b 和与它们共同相连的碳原子一起，形成被 R^0 取代的哌啶环。

在一些实施方案中，R^a 与 R^b 和与它们共同相连的碳原子一起，形成  、  或  ，1 号碳原子为与 R^a 和 R^b 共同相连的碳原子。

在一些实施方案中，R^a 与 R^b 和与它们共同相连的碳原子一起，形成  或 ，1 号碳原子为与 R^a 和 R^b 共同相连的碳原子。

在一些实施方案中，r、r^1 各自独立地选自 0、1、2、3、4 和 5。

在一些实施方案中，r、r^1 各自独立地选自 0 和 4。

在一些实施方案中，r、r^1 中，任一个为 0，另一个为 4。

在一些实施方案中，R^{m1}、R^{n1} 各自独立地选自 H、甲基、乙基、正丙基、正丁基、-COOCH3、-COOCH2CH3、-COOCH2CH2CH3、-COOCH(CH3)2、-COOC(CH3)3 和-COOCH2CH2CH2CH3。

在一些实施方案中，R^{m1}、R^{n1} 各自独立地选自 H、C1-6 烷基、C3-6 环烷基和叔丁氧羰基。

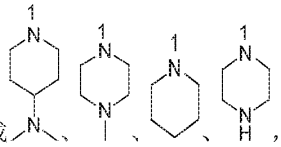
在一些实施方案中，R^{m1}、R^{n1} 各自独立地选自 H 和 C1-6 烷基。

在一些实施方案中，R^{m1}、R^{n1} 各自独立地选自 H、甲基、乙基和正丙基。

在一些实施方案中，r、r^1 中，r 为 4，r^1 为 0 时，R^{m1}、R^{n1} 各自独立地选自 H、C1-6 烷基（如 H、甲基）；r 为 0，r^1 为 4 时，R^{m1}、R^{n1} 各自独立地选自 C1-6 烷基（如甲基、乙基、正丙基），优选选自 C2-6 烷基（如乙基、正丙基）。

在一些实施方案中，R^{m1} 与 R^{n1} 和与它们共同相连的氮原子一起，形成任选被 $R^{0'}$ 取代的 5-6 元杂环。

在一些实施方案中，R^{m1} 与 R^{n1} 和与它们共同相连的氮原子一起，形成任选被 $R^{0'}$ 取代的哌啶环或哌嗪环。

在一些实施方案中，R^{m1} 与 R^{n1} 和与它们共同相连的氮原子一起，形成  ，1 号氮原子为与 R^{m1} 和 R^{n1} 共同相连的氮原子。

在一些实施方案中，R^z 为甲基。

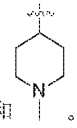
在一些实施方案中，R^0、$R^{0'}$ 各自独立地选自 C1-6 烷基、$-NR^{m2}R^{n2}$ 和任选被 C1-6 烷基取代的 5-6 元杂环基。

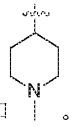
在一些实施方案中，R^0 选自 C1-6 烷基和被 C1-6 烷基取代的 5-6 元杂环基，所述 5-6 元杂环基选自哌啶基和哌嗪基。

在一些实施方案中，R^0 选自甲基、乙基和被甲基取代的 5-6 元杂环基，所述 5-6 元杂环基为哌啶

基。

在一些实施方案中，R^0选自甲基和被甲基取代的5-6元杂环基，所述5-6元杂环基为哌啶基。

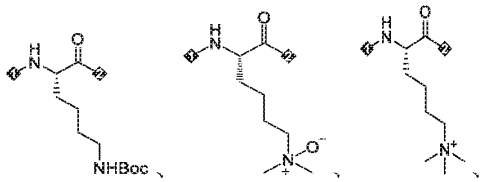
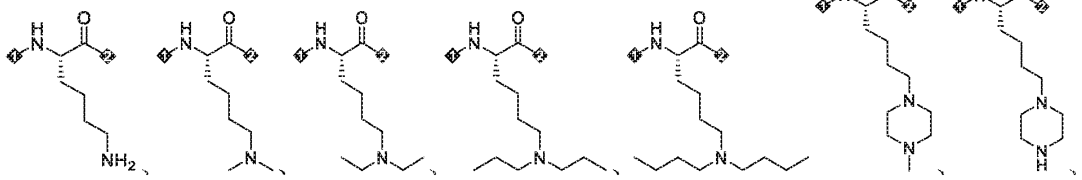
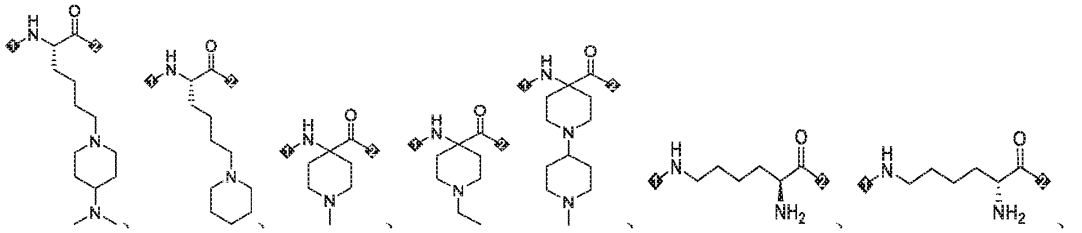
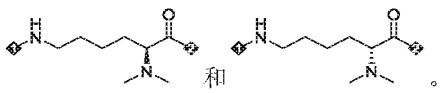
在一些实施方案中，R^0选自甲基、乙基和  。

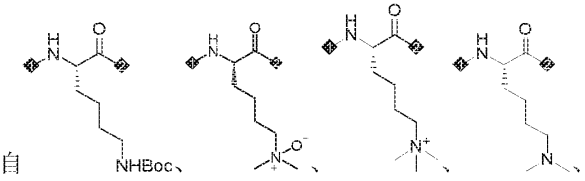
在一些实施方案中，R^0选自甲基和  。

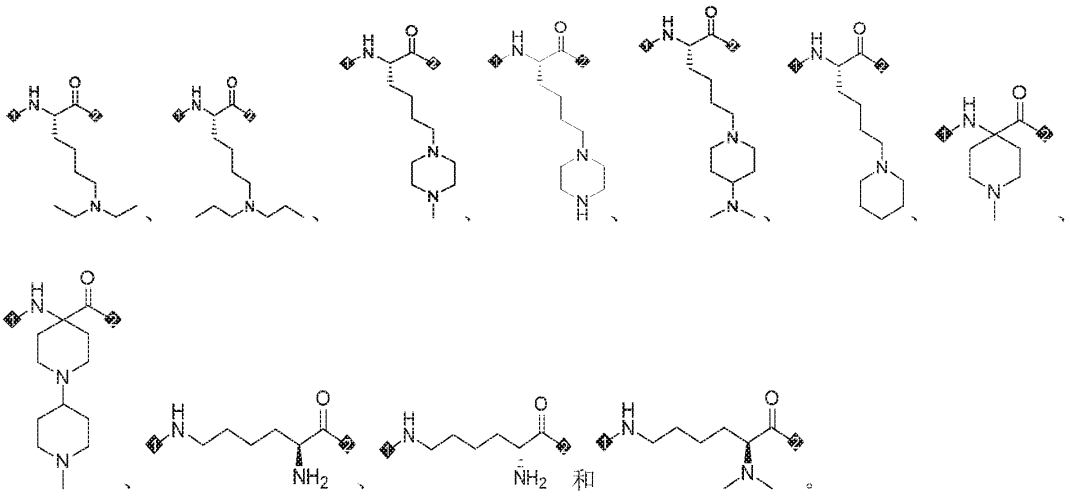
在一些实施方案中，$R^{0'}$选自C1-6烷基和-$NR^{m2}R^{n2}$。

在一些实施方案中，$R^{0'}$选自甲基和-$NR^{m2}R^{n2}$。

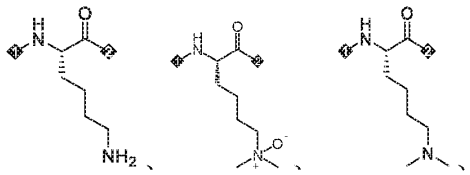
在一些实施方案中，R^{m2}、R^{n2}为甲基。

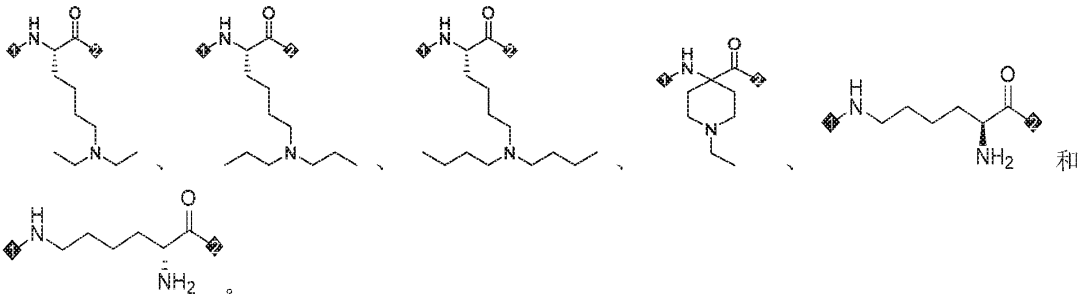
在一些实施方案中，AA^1所示氨基酸残基选自  、  、  和  。

在一些实施方案中，AA^1所示氨基酸残基选自  。

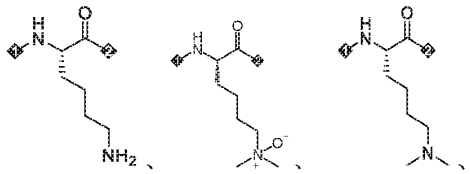


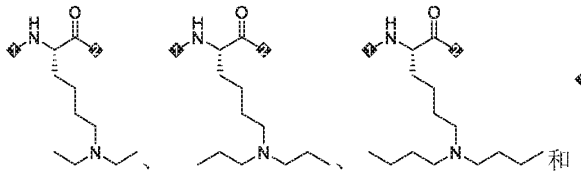
在一些实施方案中，AA^1 所示氨基酸残基选自



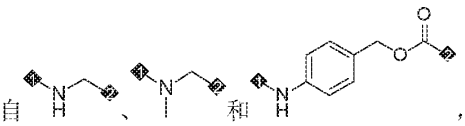


在一些实施方案中，AA^1 所示氨基酸残基选自

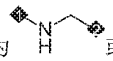
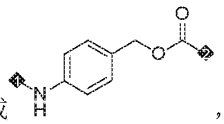




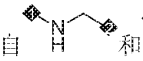
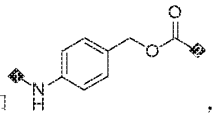
在一些实施方案中，L_4 不存在或存在，L_4 存在时，L_4 选自

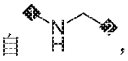


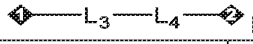
，1 位与 L_3 相连，2 位与 D 相连。

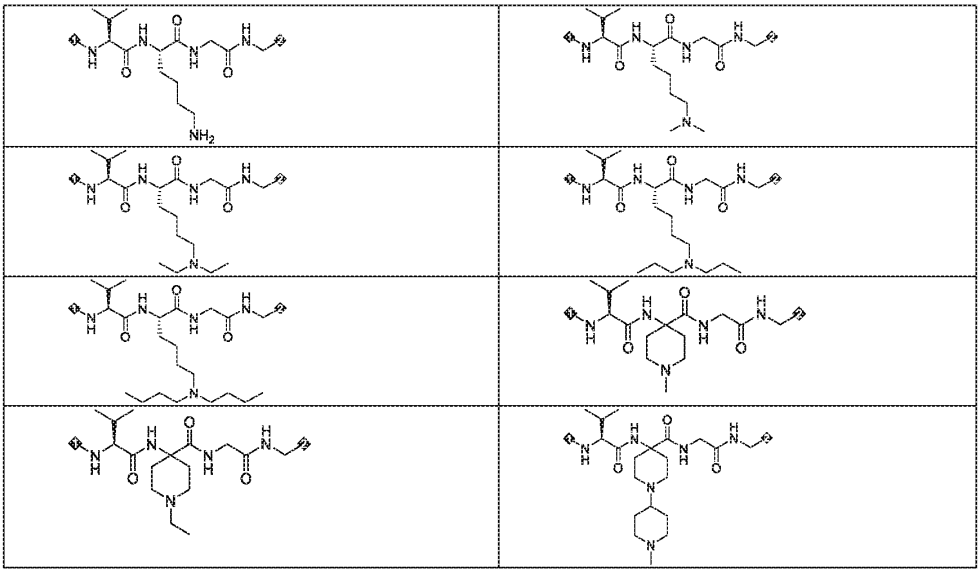
在一些实施方案中，L_4 不存在或存在，L_4 存在时，L_4 为  或  ，1 位与 L_3 相连，2 位与 D 相连。

在一些实施方案中，L_4 不存在。

在一些实施方案中，L_4 选自  和  ，1 位与 L_3 相连，2 位与 D 相连。

在一些实施方案中，L_4 选自  ，1 位与 L_3 相连，2 位与 D 相连。

在一些实施方案中，  的结构选自以下结构片段：



。

在一些实施方案中，Tb 为抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段以及单克隆抗体或其抗原结合片段包括：Fab、Fab'、F(ab')2、Fd、Fv（例如，scFv)、dAb、互补决定区片段、非人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、全人抗体、前抗（Probody)、单克隆抗体、双特异性抗体或多特异性抗体。

在一些实施方案中，Tb 为具有内吞或不内吞活性的抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，Tb 为具有内吞活性的抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，Tb 为具有结合肿瘤组织中游离抗原和/或肿瘤细胞表面抗原肿瘤细胞表面抗原活性的抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，Tb 为具有被肿瘤细胞内吞的活性，且有肿瘤组织中游离抗原或者肿瘤细胞

表面抗原结合活性的抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，Tb 为具有被肿瘤细胞内吞的活性，且有肿瘤组织中游离抗原以及肿瘤细胞表面抗原结合活性的抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，Tb 为具有被肿瘤细胞内吞的活性，且没有肿瘤组织中游离抗原结合活性的抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，Tb 为具有被肿瘤细胞内吞的活性，且没有肿瘤细胞表面抗原结合活性的抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，Tb 为没有内吞活性的、或内吞活性弱的抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，Tb 为不具有结合肿瘤组织中游离抗原和/或肿瘤细胞表面抗原肿瘤细胞表面抗原活性的抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，Tb 为没有被肿瘤细胞内吞活性的、或内吞活性弱的，且有肿瘤组织中游离抗原或者肿瘤细胞表面抗原结合活性的抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，Tb 为没有被肿瘤细胞内吞活性的、或内吞活性弱的，且有肿瘤组织中游离抗原以及肿瘤细胞表面抗原结合活性的抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，Tb 为没有被肿瘤细胞内吞活性的、或内吞活性弱的，且没有肿瘤细胞表面抗原结合活性的抗体其抗原结合片段。在一些实施方案中，Tb 为没有被肿瘤细胞内吞活性的、或内吞活性弱的，且没有肿瘤组织中游离抗原结合活性的抗体其抗原结合片段。

在一些实施方案中，Tb 为没有被肿瘤细胞内吞活性的，且人体内没有对应抗原的抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，Tb 为没有肿瘤细胞相关抗原结合的抗体。

在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段，选自 IgG 同型抗体。

在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段，选自同型 IgG1，同型 IgG2，同型 IgG3 或同型 IgG4。

在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段，为抗鸡溶菌酶人 IgG1 同型抗体。

在一些实施方案中，Tb 为具有结合肿瘤细胞表面非内吞（例如 ALCAM/CD166）抗原活性的抗体其抗原结合片段。

在一些实施方案中，Tb 为具有肿瘤细胞相关抗原结合的抗体。

在一些实施方案中，Tb 为具有肿瘤组织中游离抗原或者肿瘤细胞表面抗原结合活性的抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，Tb 为具有肿瘤组织中游离抗原以及肿瘤细胞表面抗原结合活性的抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，Tb 为具有 B7H3-2Ig 和/或 B7H-4Ig 的抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，Tb 为具有 B7H3-4Ig 结合活性高于 B7H3-2Ig 结合活性抗体或其抗原结合片段。

在本公开的部分实施方案中，Tb 为和靶点结合的配体或靶向部分。

在一些实施方案中，所述 Tb 的靶点选自肿瘤细胞表达高于正常细胞的靶点。

在一些实施方案中，所述 Tb 的靶点选自肿瘤细胞高表达，而正常细胞低表达的靶点。

在一些实施方案中，所述 Tb 的靶点选自：B7H3、CD20、CD19、CD30、GPNMB、Her2、Trop-2、EGFR、Her3、GD-2，CD79b 和 BCMA 等。

在一些实施方案中，所述 Tb 为抗体或其抗原结合的片段。

在一些实施方案中，Tb 为非人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、全人抗体。

在一些实施方案中，Tb 为单克隆抗体，双特异性抗体或多特异性抗体。

在一些实施方案中，Tb 为单克隆抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，Tb 为抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段、抗 Trop-2 抗体或其抗原结合片段、抗 Her 2 抗体或其抗原结合片段、抗 Her3 抗体或其抗原结合片段或抗 EGFR 抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，Tb 为抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段，例如 1D1、1D1-01、2E3，2E3-02 抗体、enoblituzumab，mirzotamab，omburtamab 或其抗原结合片段。

所述 1D1 的序列如 SEQ ID NO:1 所示。所述 1D1-01 的 VH 序列如 SEQ ID NO:3 所示，VL 序列如 SEQ ID NO:13 所示。所述 1D1-01 的重链序列如 SEQ ID NO:45 所示，轻链序列如 SEQ ID NO:46 所示。所述 2E3 的序列如 SEQ ID NO:2 所示。所述 2E3-02 的 VH 序列如 SEQ ID NO:23 所示，VL 序列如 SEQ ID NO:33 所示。所述 2E3-02 的重链序列如 SEQ ID NO:47 所示，轻链序列如 SEQ ID NO:48 所示。

在一些实施方案中，Tb 为抗 B7H3 单克隆抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，Tb 为抗 Trop-2 抗体或其抗原结合片段，例如 datopotamab，sacituzumab 或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，Tb 为抗 Trop-2 单克隆抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，Tb 为抗 Her 2 抗体或其抗原结合片段，例如 anbenitamab，coprelotamab，disitamab，gancotamab，margetuximab，pertuzumab，timigutuzumab，zanidatamab，Trastuzumab，Pertuzumab 或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，Tb 为抗 Her 2 单克隆抗体或其抗原结合片段，例如曲妥珠单抗、帕妥珠单抗或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，Tb 为抗 Her3 抗体或其抗原结合片段，例如 barecetamab，duligotuzumab，

elgemtumab，istiratumab，lumretuzumab，patritumab，seribantumab，zenocutuzumab，202-2-1 抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，Tb 为抗 Her3 单克隆抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，Tb 为抗 EGFR 抗体或其抗原结合片段，例如 demupitamab，depatuxizumab，futuximab，imgatuzumab，laprituximab，losatuxizumab，matuzumab，modotuximab，necitumumab，nimotuzumab，panitumumab，pimurutamab，serclutamab，tomuzotuximab，zalutumumab，Cetuximab 或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，Tb 为抗 EGFR 单克隆抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，所述抗体具有结合抗原但不具有内吞活性的抗体。在一些实施方案中，所述抗体具有结合 B7H3、CD20、CD19、CD30、GPNMB、Her2、Trop-2、EGFR、Her3、GD-2、CD79b 和 BCMA 等抗原但不具有内吞活性的抗体。

在一些实施方案中，所述抗体具有结合 B7H3 抗原但不具有内吞活性的抗体。比如 WO2021168379A1 的 INV721 和 I7-01。更具体的，Anti-B7H3 的抗体具有 WO2021168379A1 所述的 SEQ ID NO:2 的 VH 和 SEQ ID NO:1 的 VL。

在一些实施方案中，所述抗体具有结合 GD2 抗原但不具有内吞活性的抗体。比如 WO2021168379A1 的 INV721 和 GD2-5。更具体的，Anti- GD2 的抗体具有 WO2021168379A1 所述的 SEQ ID NO:4 的 VH 和 SEQ ID NO:3 的 VL。

在一些实施方案中，所述抗体具有结合 HER3 抗原但不具有内吞活性的抗体，比如 US10808032B2 的 SEQ ID NO: 22 所示的 ANTI-HER3 的 21F06 抗体。

在一些实施方案中，所述抗体具有结合 CD20 抗原但不具有内吞活性的抗体。 尽管已显示所谓的“II 型”CD20 特异性抗体很难被 CD20 阳性靶细胞内化，但已发现其他所谓的“I 型”CD20 特异性抗体某种程度上被内化并降解,这取决于与其相互作用的靶细胞上激活和抑制 Fc γR 的表达水平。在一些实施方案中，所述抗体具有结合 CD20 抗原但不具有内吞活性的抗体为 II 型”CD20 特异性抗体，例如 obinutuzumab。

在一些实施方案中，所述抗体具有结合非内吞（例如 ALCAM/CD166）抗原活性的抗体。在一些实施方案中，所述抗体为包含 EP3911682A1 中 SEQ ID No:73 的 VH 和 SEQ ID No:74 的 VL, SEQ ID No:75 的 VH 和 SEQ ID No:76 的 VL, SEQ ID No:77 的 VH 和 SEQ ID No:78 的 VL，或，SEQ ID No:79 的 VH 和 SEQ ID No:88 的 VL 所示的抗体。

在一些实施方案中，所述 Tb 为靶向部分，例如配体、蛋白质、多肽、非蛋白质试剂(例如糖、RNA 或 DNA)，抗体类似物等。

在一些实施方案中，q 选自 0.1-16.0 之间的任意数值；在优选地实施方案中，q 选自 0.1-16.0 之间

的任意整数。

在一些实施方案中，q 选自 0.1-8.0 之间的任意数值，在优选地实施方案中，q 选自 0.1-8.0 之间的任意整数。

在一些实施方案中，q 选自 2-8 之间的任意数值。

在一些实施方案中，q 选自 3-8 之间的任意数值。

在一些实施方案中，q 选自 4-8 之间的任意数值。

在一些实施方案中，q 选自 6-8 之间的任意数值。

在一些实施方案中，q 选自 2-8 之间的任意整数。

在一些实施方案中，q 选自 3-8 之间的任意整数。

在一些实施方案中，q 选自 4-8 之间的任意整数。

在一些实施方案中，q 选自 6-8 之间的任意整数。

在一些实施方案中，q 选自 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 和 12。

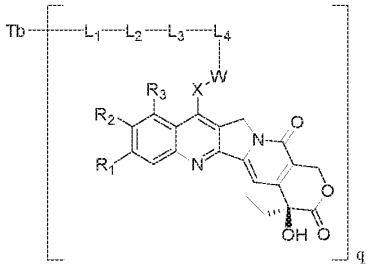
在一些实施方案中，q 选自 2、4、6 和 8。

本公开中，所述的生物活性分子片段是指本领域中均知的，抗体-药物偶联物（或称抗体偶联药物（antibody-drug conjugate, ADC））中，在肿瘤组织间或肿瘤细胞内连接子裂解/降解/酶切后，能够形成具有生物活性的药物（例如小分子细胞毒药物，所述药物包括其失去一个原子或原子团后的基团）或其衍生物（例如其前体）的部分（片段或基团）。为了避免歧义，“药物”并非仅指已获得医药监管部门审批的“药品”，还包括临床中，或者研发和学术研究中任何有潜在治疗生物活性的分子。

在一些实施方案中，D 为具有抗肿瘤生物活性分子片段。

在一些实施方案中，D 为具有抗肿瘤生物活性分子片段，其中所述的生物活性分子选自细胞毒性剂或其衍生物，例如 DNA 拓扑异构酶抑制剂（例如喜树碱类生物活性分子，例如喜树碱、DXD、取代基被修饰的喜树碱或取代基被修饰的 DXD）或微管蛋白抑制剂(例如 MMAF 类微管蛋白抑制剂，MMAE 类微管蛋白抑制剂)。

在一些实施方案中，配体药物偶联物具有式 I 所式结构：



其中，

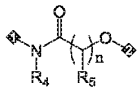
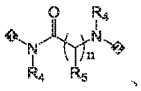
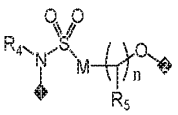
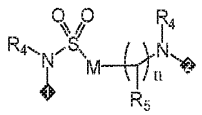
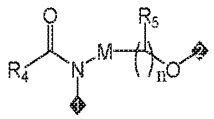
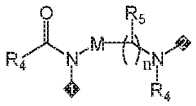
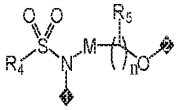
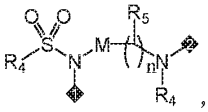
R_1、R_2 各自独立地选自 H、卤素、-OH、任选取代的 C1-6 烷基和任选取代的 C1-6 烷氧基，或者，

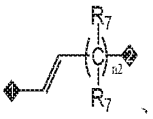
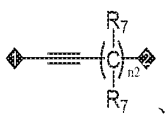
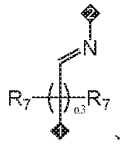
R_1 和 R_2 和与其相连的碳原子一起形成 5-7 元碳环或 5-7 元杂环，所述杂环含有 1 个或多个 O，S，N，羰基，亚砜基或砜基或其任意组合；

R_3 选自 H、卤素、-OH、$-NH_2$、任选取代的 C1-6 烷基和任选取代的 C1-6 烷氧基，或者，

R_3 和 X 和与其相连的碳原子一起形成 5-7 元碳环或 5-7 元杂环，所述杂环含有 1 个或多个 O，S，N，羰基，亚砜基或砜基或其任意组合，或者，

R_3 和 R_2 和与其相连的碳原子一起形成 5-7 元碳环或 5-7 元杂环，所述杂环含有 1 个或多个 O，S，N，羰基，亚砜基或砜基或其任意组合；

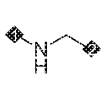
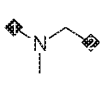
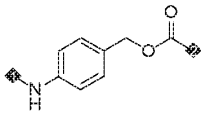
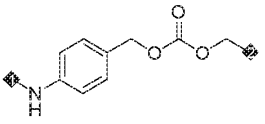
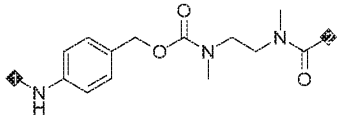
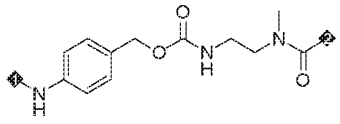
W 不存在或存在，W 存在时，W 选自-O-、-S-、$-NR_4-$、  、  、  、  、  、  、  、  和  ，1 位与 X 相连，2 位与 L_4 或 L_3 相连；

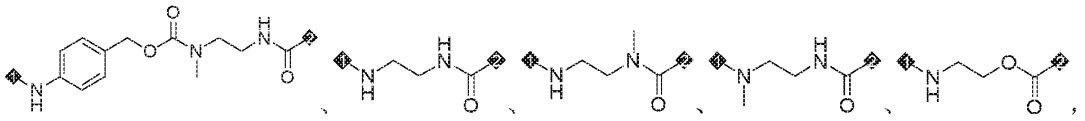
X 选自直接键，任选取代的$-O-(CH_2)_{n3}-$、$-N(R_4)-(CH_2)_{n3}-$、$-S-(CH_2)_{n3}-$、羰基$-(CH_2)_{n3}$、$-SO_2-(CH_2)_{n3}-$、  、  、  、$-(CH_2)_{n1}-$、C3-6 环烷基、C6-10 芳基、5-10 元杂芳基和 4-10 元杂环基，1 位和母环相连，2 位和 W 或 L_4 相连；所述取代基选自一个或多个 C1-4 烷基、C3-6 环烷基，或者多个 C1-4 烷基和与它们同时相连的碳原子一起形成 C3-6 环烷基；

各 M 独立地选自直接键和$-CR^{5a}R^{5b}-$；

R_4、R_5、R^{5a}、R^{5b}、R_6、R_7 各自独立地选自 H、任选取代的 C1-4 烷基、任选取代的 C1-4 烷氧基和任选取代的 C3-6 环烷基；

n、n'、n1、n2、n3 各自独立地选自 0 到 6 之间的任意整数；

L_4 不存在或存在，L_4 存在时，L_4 选自  、  、  、  、  、  、



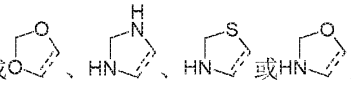
1 位与 L_3 相连，2 位与 W 或 X 相连。

Tb、L_1、L_2、L_3 和 q 具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义。

在一些实施方案中，R_1、R_2 各自独立地选自 H、卤素和 C1-4 烷基。

在一些实施方案中，R_1 和 R_2 和与其相连的碳原子一起形成 5-6 元杂环，所述杂环含有 1 个、2 个或 3 个 O，S 或 N 或其任意组合。

在一些实施方案中，R_1 选自 H 和卤素，R_2 选自 H 和 C1-4 烷基。

在一些实施方案中，R_1 和 R_2 和与其相连的碳原子形成  ，虚线表示所述杂环与苯环稠合的位置。

在一些实施方案中，R_1 为 H 或 F，R_2 为 H 或甲基。

在一些实施方案中，R_1 为 F，R_2 为甲基或 R_1 和 R_2 和与其相连的碳原子一起形成  。

在一些实施方案中，R_1 为 F，R_2 为甲基。

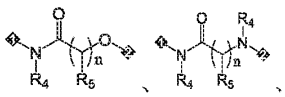
在一些实施方案中，R_1 和 R_2 和与其相连的碳原子一起形成  。

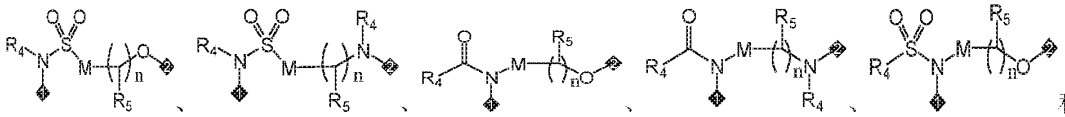
在一些实施方案中，R_3 选自 H 和 C1-4 烷基。

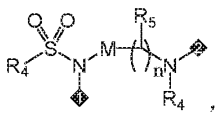
在一些实施方案中，R_3 和 X 和与其相连的碳原子一起形成 5-6 元碳环。

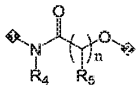
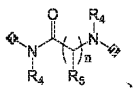
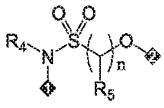
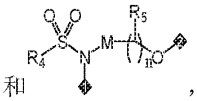
在一些实施方案中，R_3 为 H 或 R_3 和 X 和与其相连的碳原子一起形成  ，虚线表示所述碳环与苯环和吡啶环稠合的位置。

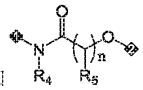
在一些实施方案中，R_3 为 H。

在一些实施方案中，W 不存在或存在，W 存在时，W 选自-O-、-S-、-NR_4-、  、

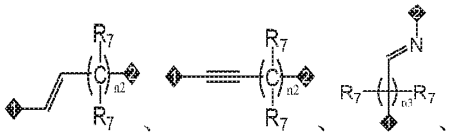
 和

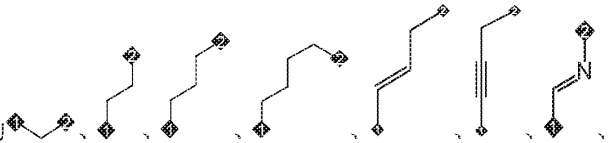
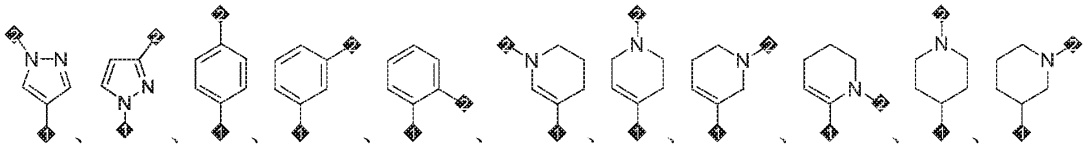
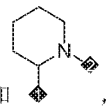
 ，1 位与 X 相连，2 位与 L_4 或 L_3 相连。

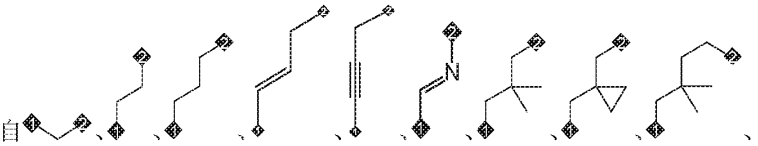
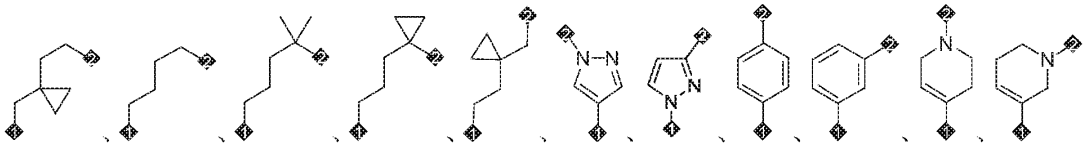
在一些实施方案中，W 不存在或存在，W 存在时，W 选自-O-、-S-、-NR_4-、  、  、  和  ，1 位与 X 相连，2 位与 L_4 或 L_3 相连。

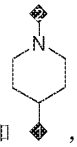
在一些实施方案中，W 选自-O-、-NR_4-和  ，1 位 X 相连，2 位与 L_4 或 L_3 相连。

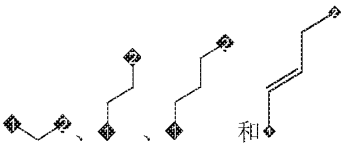
在一些实施方案中，W 选自-O-和-NR_4-，1 位 X 相连，2 位与 L_4 或 L_3 相连。

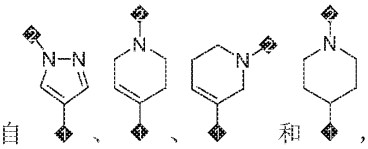
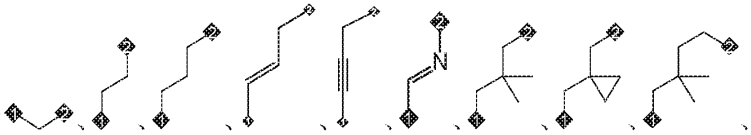
在一些实施方案中，X 选自任选取代的-$(CH_2)_{n1}$-、  、C6-10 芳基、5-10 元杂芳基和 4-10 元杂环基，1 位和母环相连，2 位和 W 或 L_4 相连；所述取代基选自 1 个或 2 个 C1-4 烷基，或者 2 个 C1-4 烷基和与它们同时相连的碳原子一起形成 C3-6 环烷基。

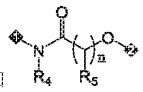
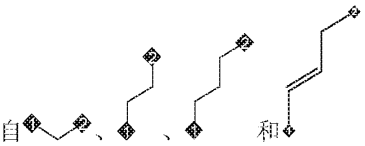
在一些实施方案中，X 选自任选取代的  、  和  ，1 位和母环相连，2 位和 W 或 L_4 相连；所述取代基选自 1 个或 2 个 C1-4 烷基（如甲基），或者 2 个 C1-4 烷基（如甲基）和与它们同时相连的碳原子一起形成 C3-6 环烷基（如环丙基）。

在一些实施方案中，X 选自  、 


和 ，1 位和母环相连，2 位和 W 或 L_4 相连。

在一些实施方案中，X 选自  、、和，1 位和母环相连，2 位和 W 相连。

在一些实施方案中，W 不存在时，X 选自  、、和，1 位和母环相连，2 位和 L_4 相连；W 存在时，X 选自  、、、、、、、、、、、、、、、和，1 位和母环相连，2 位和 W 相连。

在一些实施方案中，W 选自-O-、-NR_4-和  ，1 位 X 相连，2 位与 L_4 或 L_3 相连；X 选自  、、和，1 位和母环相连，2 位和 W 相连。

在一些实施方案中，R_4、R_5 各自独立地选自 H、C1-4 烷基和 C3-6 环烷基。

在一些实施方案中，各 R_4 独立地选自 H、C1-4 烷基和 C3-6 环烷基，R_5 为 H。

在一些实施方案中，各 R_4 独立地选自 H、甲基、乙基、正丙基、异丙基、叔丁基和环丙基，R_5 为 H。

在一些实施方案中，R^{5a}、R^{5b} 各自独立地选自 H 和 C1-4 烷基。

在一些实施方案中，R^{5a}、R^{5b} 各自独立地选自 H 和甲基。

在一些实施方案中，各 R_7 独立地选自 H 和 C1-4 烷基。

在一些实施方案中，R_7 为 H。

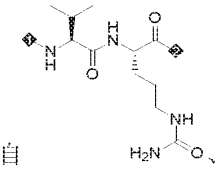
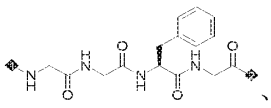
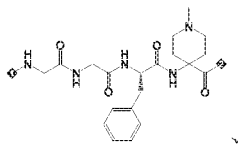
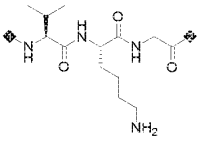
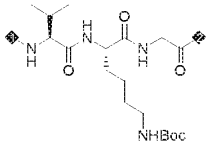
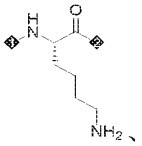
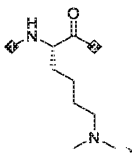
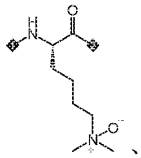
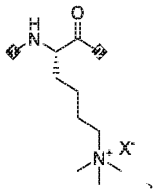
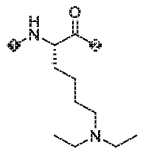
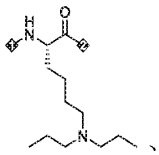
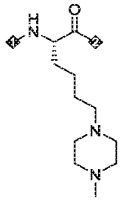
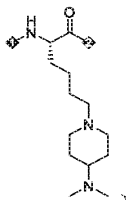
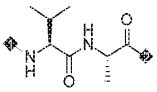
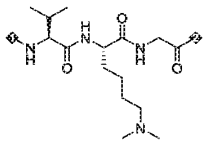
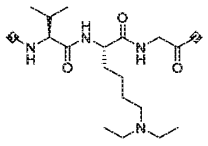
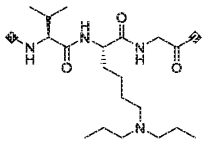
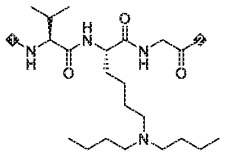
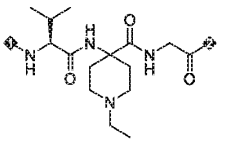
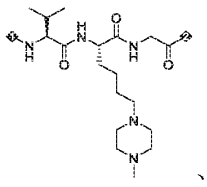
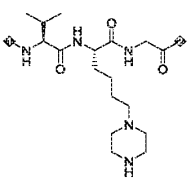
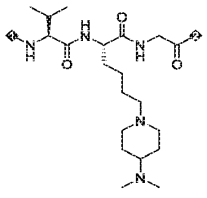
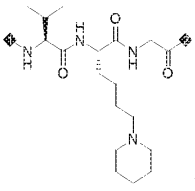
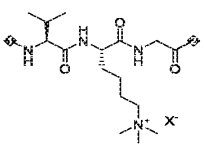
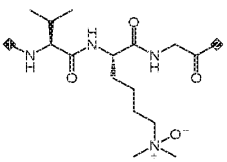
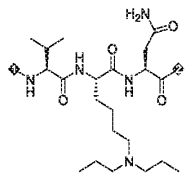
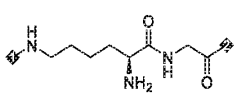
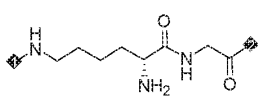
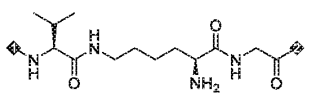
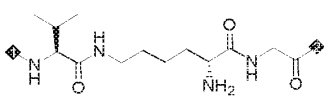
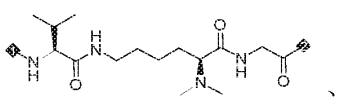
在一些实施方案中，n 选自 1、2 和 3。

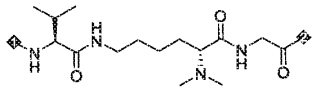
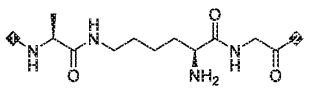
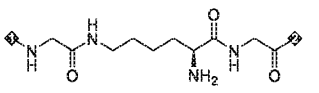
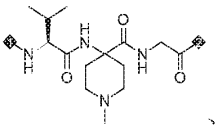
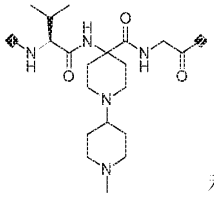
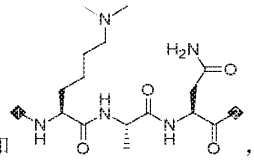
在一些实施方案中，n 为 1。

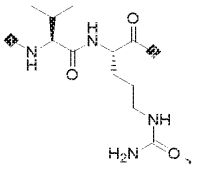
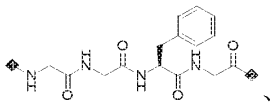
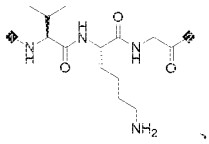
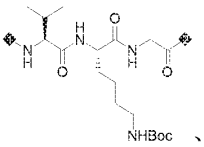
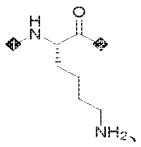
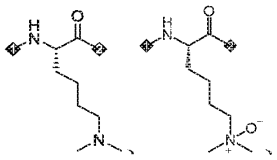
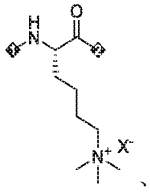
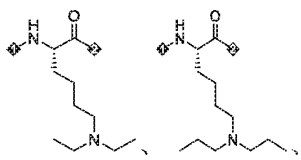
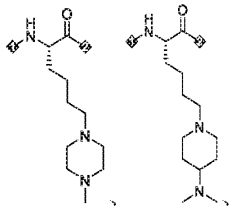
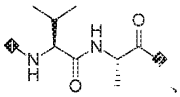
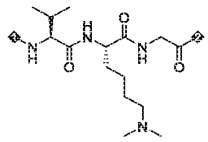
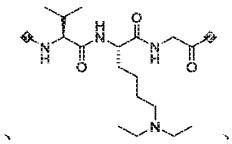
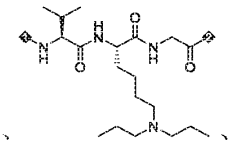
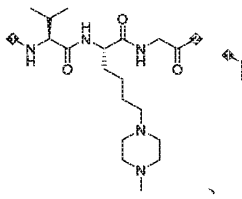
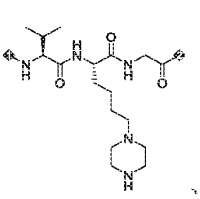
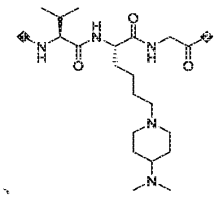
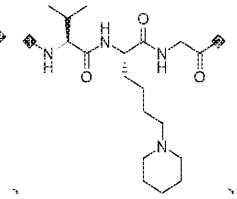
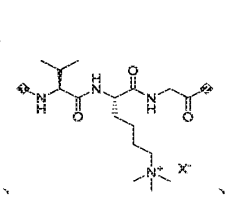
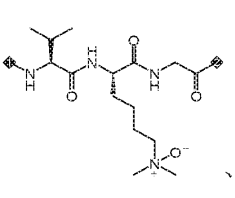
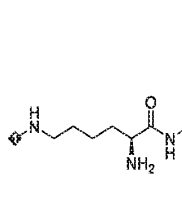
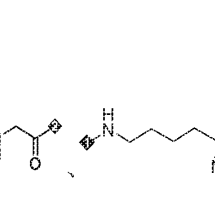
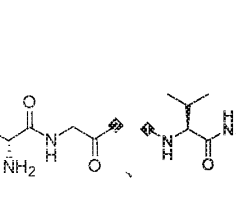
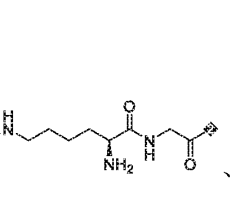
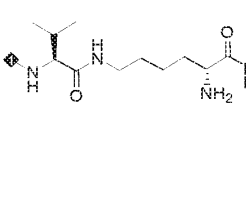
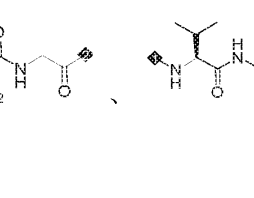
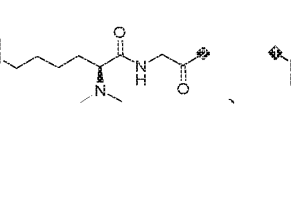
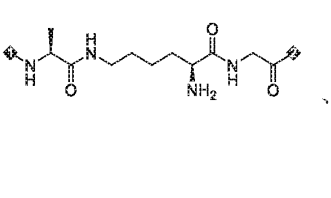
在一些实施方案中，n1 选自 1、2、3 和 4。

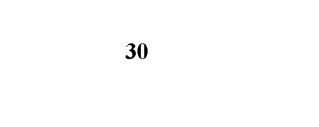
在一些实施方案中，n2 为 1。

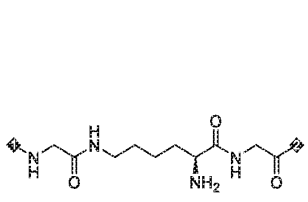
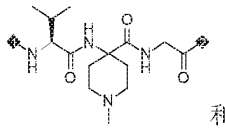
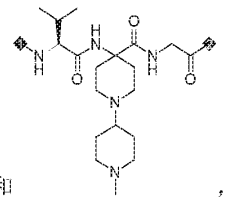
在一些实施方案中，n3 为 0。

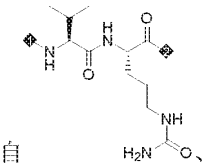
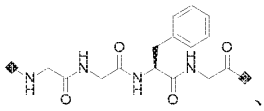
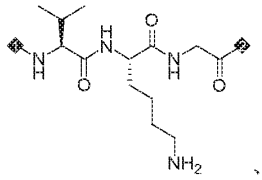
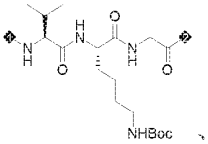
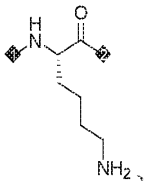
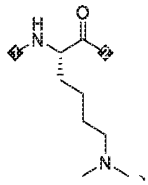
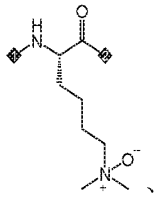
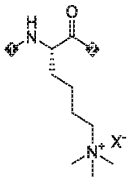
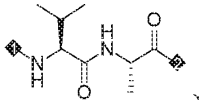
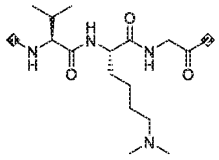
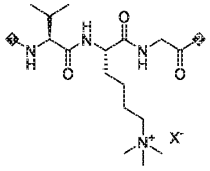
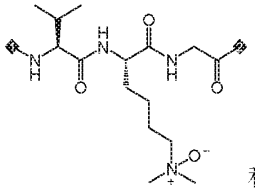
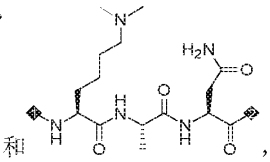
在一些实施方案中，L_3 选自  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  。

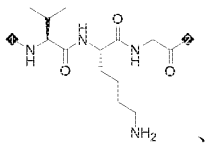
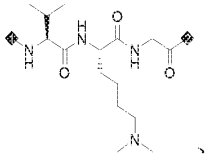
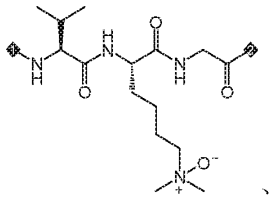
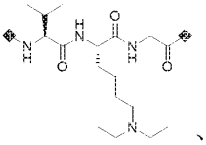
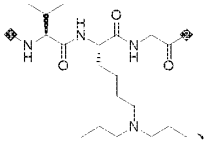
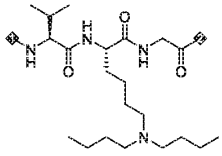
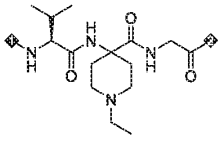
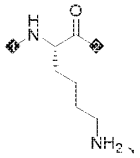
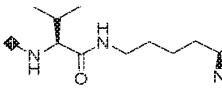
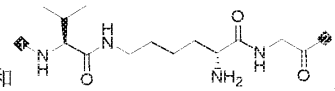

、

、

、

、


和
，X⁻选自卤素离子、羧酸根离子、硫酸根离子、硫酸氢根离子和 OH⁻，1 位与 L_1 或 L_2 相连，2 位与 L_4 或 W 相连。

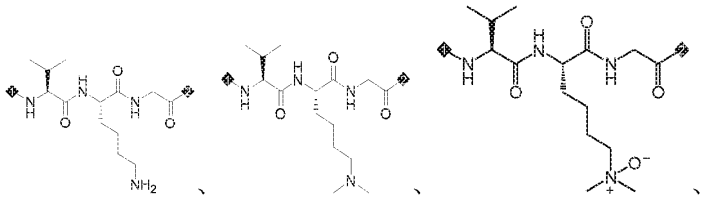
在一些实施方案中，L_3 选自

、

、

、

、
























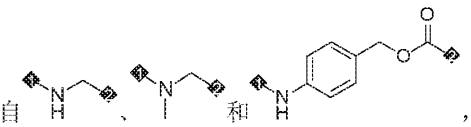


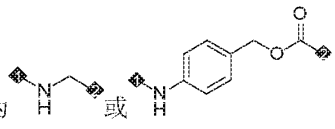
 、  和  ，X^-选自卤素离子、羧酸根离子、硫酸根离子、硫酸氢根离子和OH^-，1 位与 L_1 或 L_2 相连，2 位与 L_4 或 W 相连。

在一些实施方案中，L_3 选自  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  和  ，X^-选自卤素离子、羧酸根离子、硫酸根离子和硫酸氢根离子、OH^-，1 位与 L_1 或 L_2 相连，2 位与 L_4 或 W 相连。

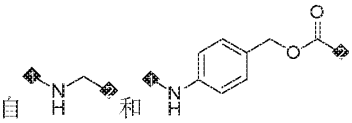
在一些实施方案中，L_3 选自  、  、  、  、  、  、  、  、  和  ，1 位与 L_1 或 L_2 相连，2 位与 L_4 或 W 相连。

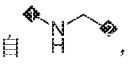
在一些实施方案中，L_3 选自  ，1 位与 L_1 或 L_2 相连，2 位与 L_4 或 W 相连。

在一些实施方案中，L_4 不存在或存在，L_4 存在时，L_4 选自  ，1 位与 L_3 相连，2 位与 W 或 X 相连。

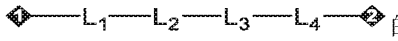
在一些实施方案中，L_4 不存在或存在，L_4 存在时，L_4 为  ，1 位与 L_3 相连，2 位与 W 或 X 相连。

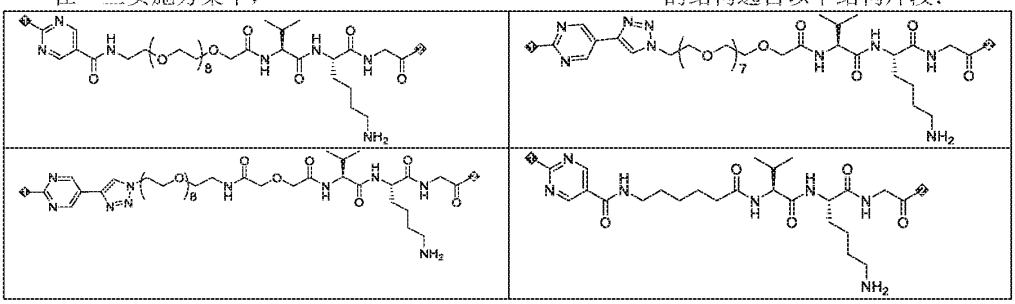
在一些实施方案中，L_4 不存在。

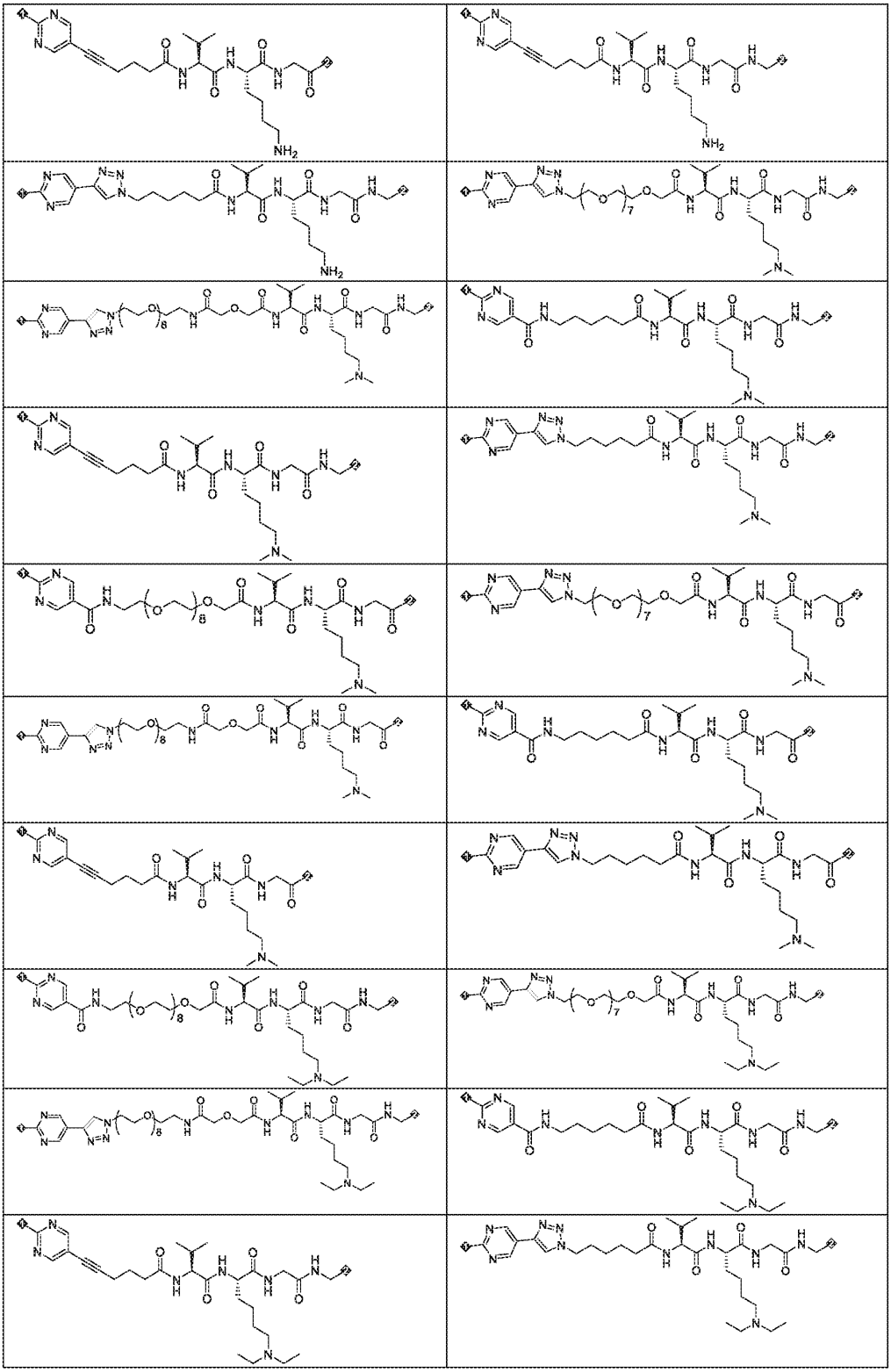
在一些实施方案中，L_4 选自  ，1 位与 L_3 相连，2 位与 W 或 X 相连。

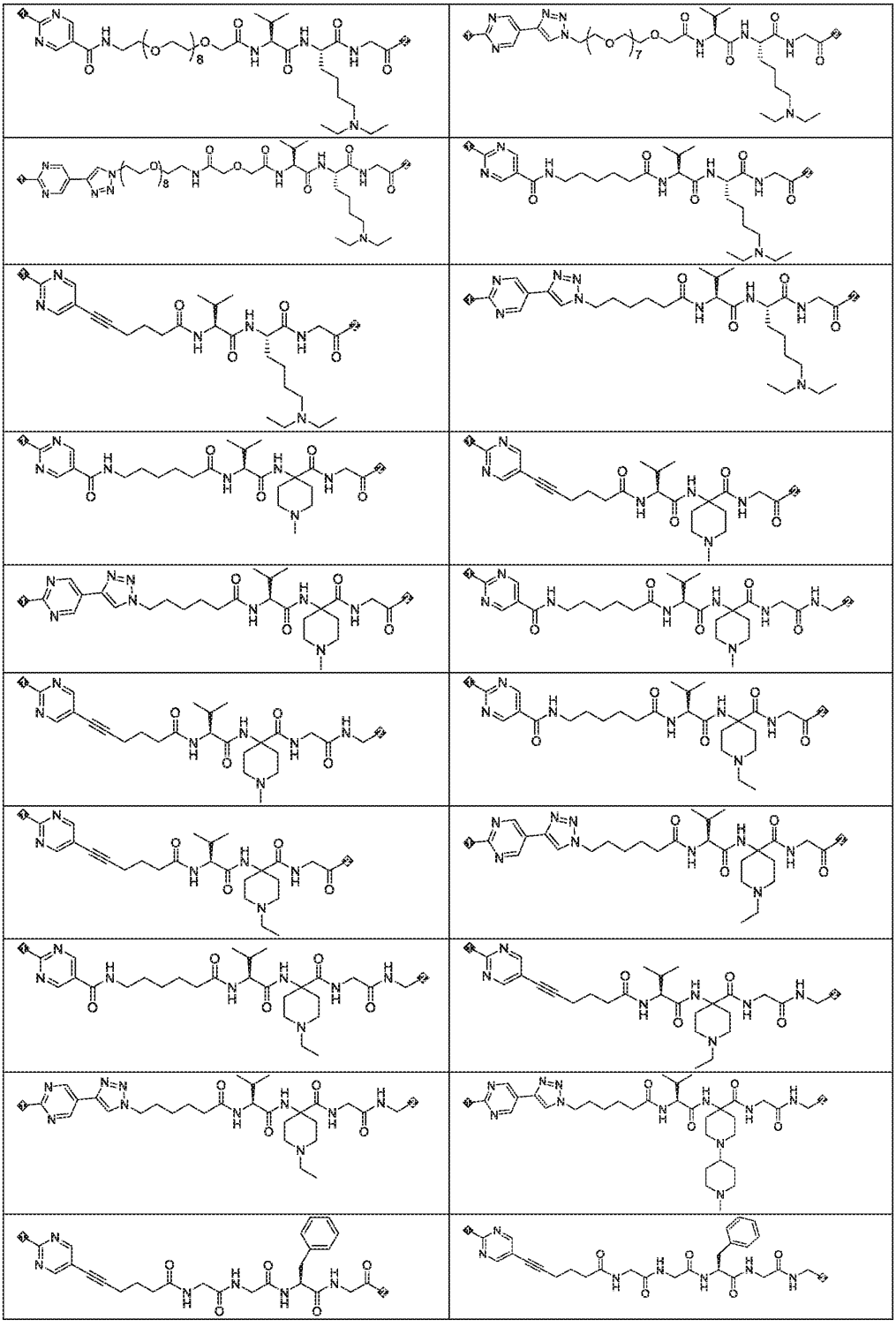
在一些实施方案中，L_4 选自  ，1 位与 L_3 相连，2 位与 W 或 X 相连。

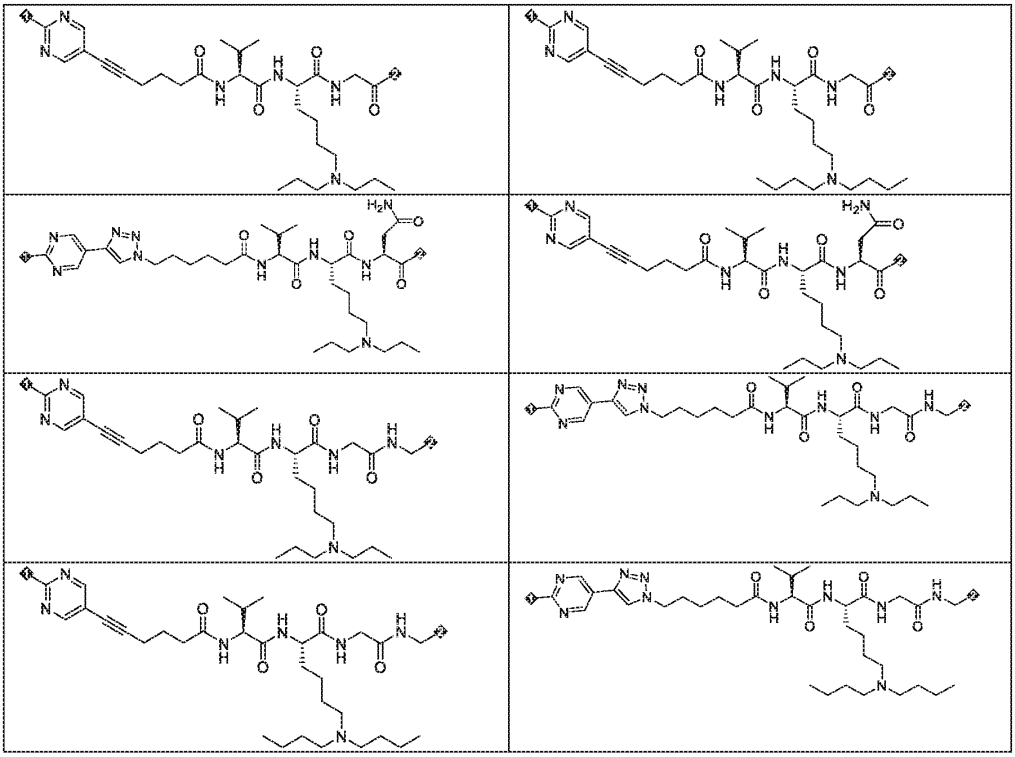
需要说明的是，如前所述，W 不存在或存在，由此，W 不存在时，L_4 的 1 位与 L_3 相连，2 位与 X 相连；W 存在时，L_4 的 1 位与 L_3 相连，2 位与 W 相连。以下关于 L_4 的连接关系可参照前述内容进行理解。

在一些实施方案中，  的结构选自以下结构片段：

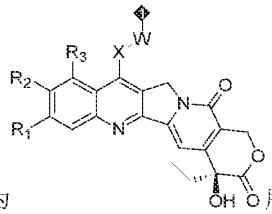




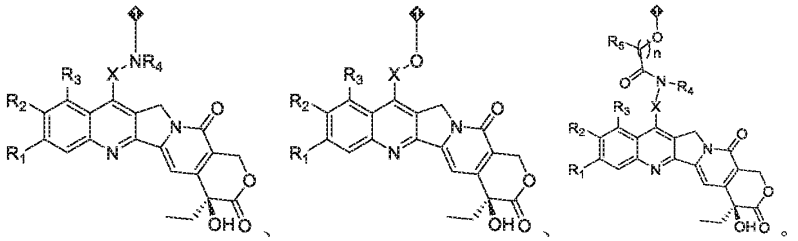


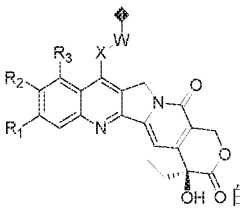


其中，1 位与 Tb 相连，2 位与 W 相连。

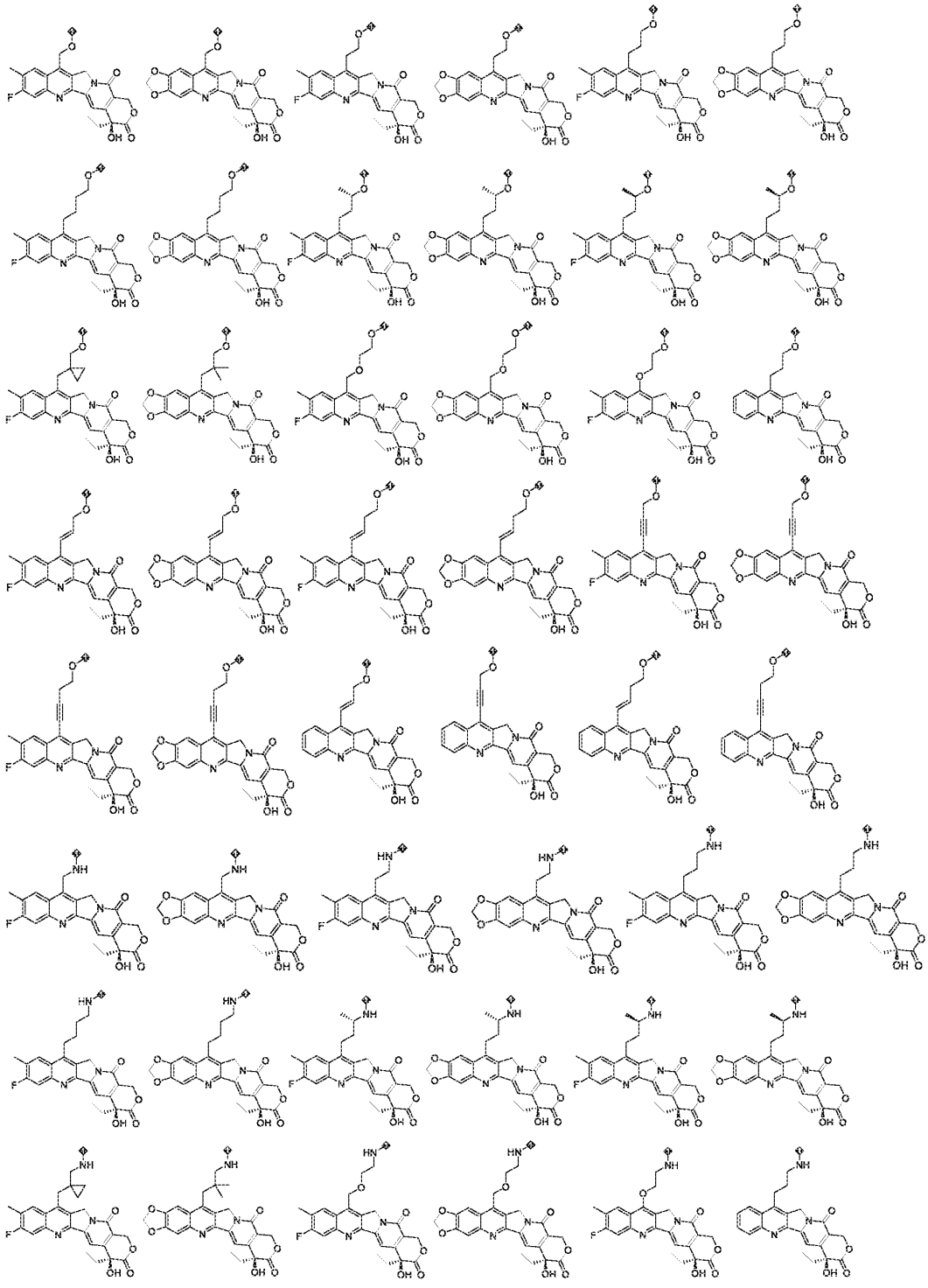


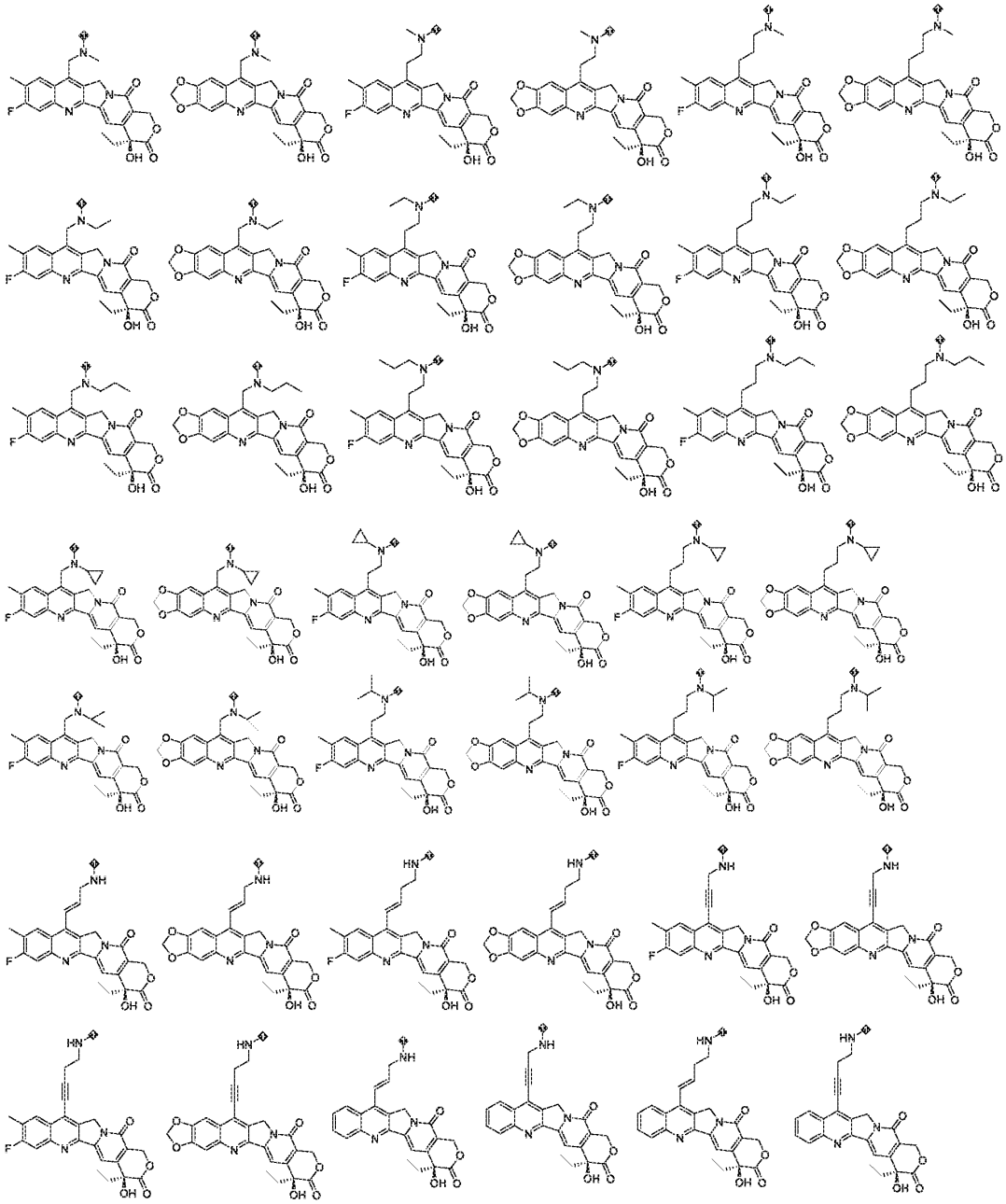
在一些实施方案中，D 为 所示的结构片段；1 位与 L_3 或 L_4 连接；例如

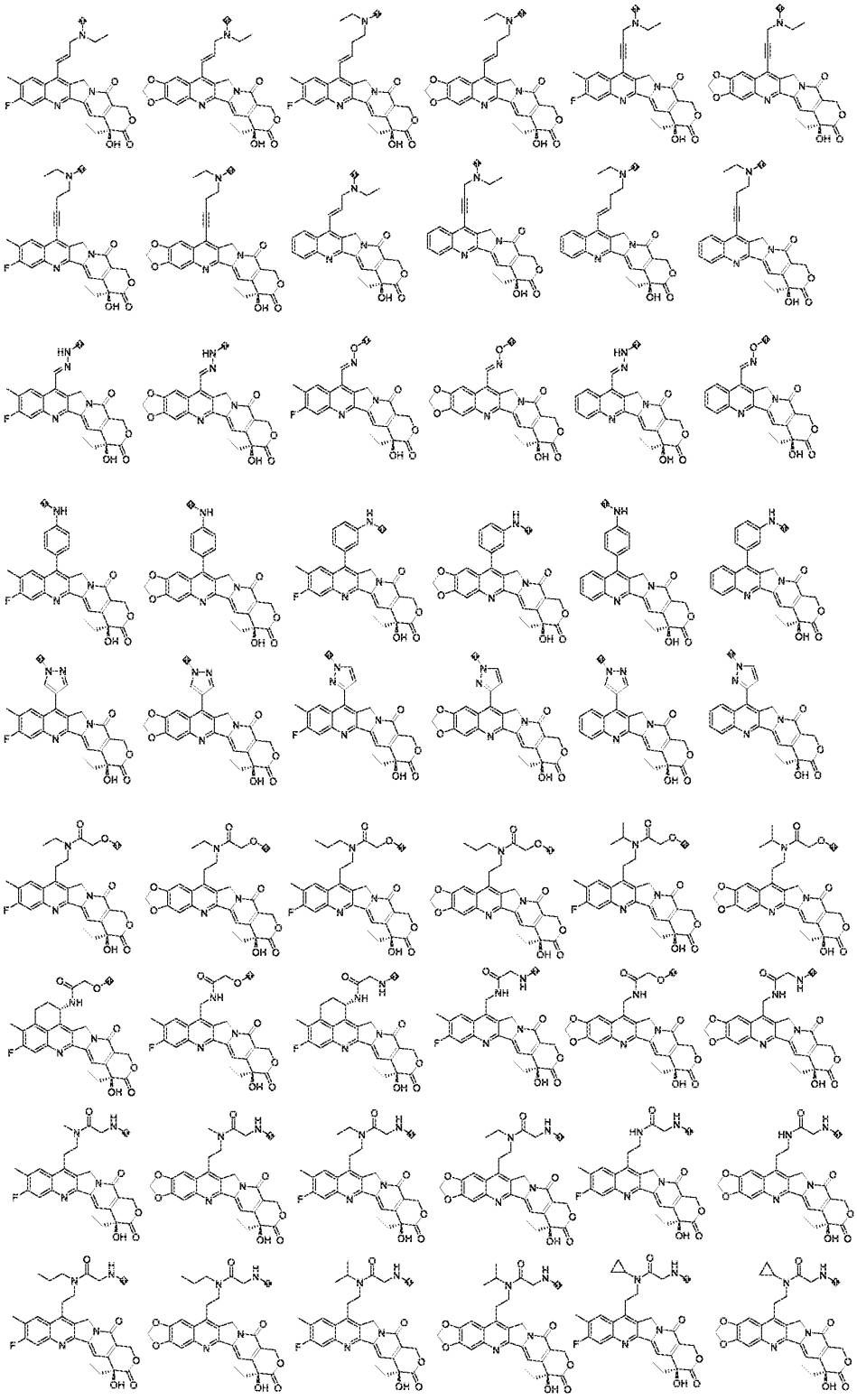




在一些实施方案中， 的结构选自以下结构片段：

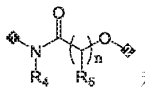
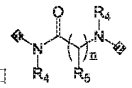
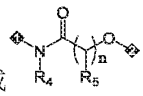


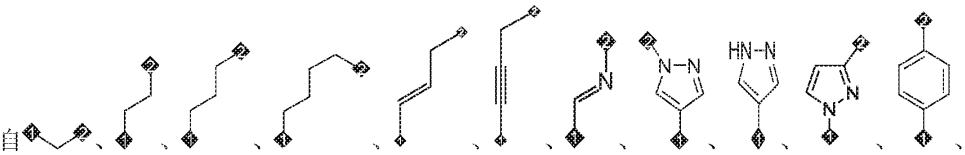
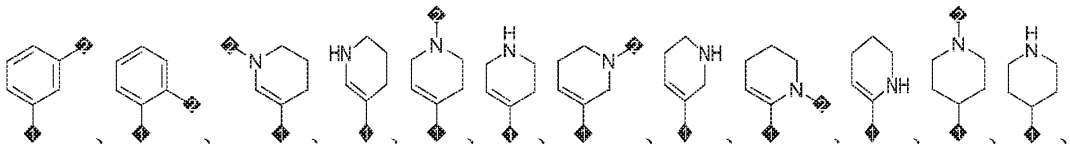


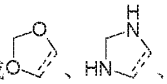
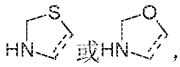


其中，1 位与 L_4 相连；当 L_4 不存在时，1 位与 L_3 相连。

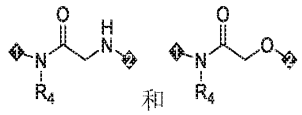
在一些实施方案中，

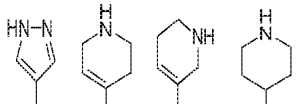
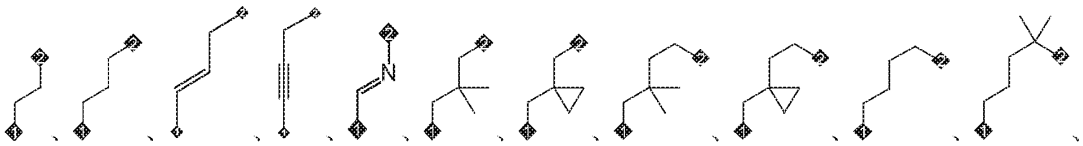
W 不存在或存在，W 存在时，W 选自-O-、-S-、-NR_4-、  和  ；例如不存在、-O-、-NR_4-或  ；R_4 和 R_5 各自独立地选自 H 和 C1-4 烷基；n 独立地选自 0、1、2、3 和 4；

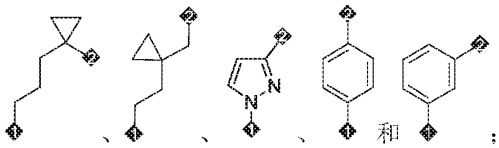
X 选自  、  、  和；

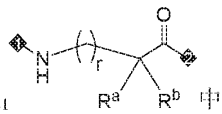
R_1 选自 H、卤素，R_2 选自 H、C1-4 烷基，或，R_1 和 R_2 和与其相连的碳原子形成  、  或，虚线表示所述杂环与苯环稠合的位置；

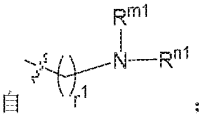
R_3 选自 H 和 C1-4 烷基，或，R_3 和 X 和与其相连的碳原子一起形成 5-6 元碳环；

优选地，W 不存在或存在，W 存在时，W 选自-O-、-NR_4-（例如-NH-、-$N(CH_3)$-、-$N(C_2H_5)$-）、  和；R_4 独立地选自 H、甲基、乙基、异丙基、正丙基、叔丁基和环丙基；

W 不存在时，X 选自  、、和，1 位和母环相连；W 存在时，X 选自  、  、、



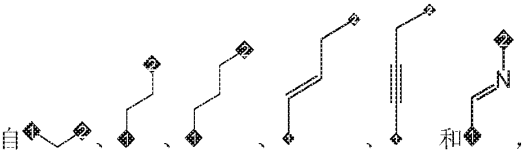
AA_1  中，r 选自 0、1、2、3、4 和 5；

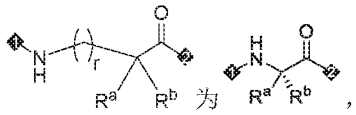
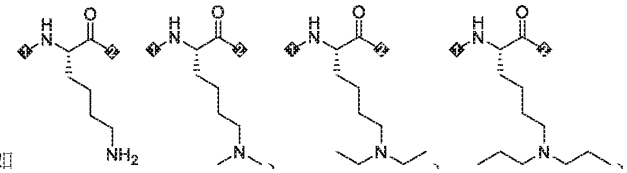
R^a、R^b 中，任一个为 H，另一个选自  ；或者，R^a 与 R^b 和与它们共同相连的碳原子一起，形成被 R^0 取代的 5-6 元杂环；

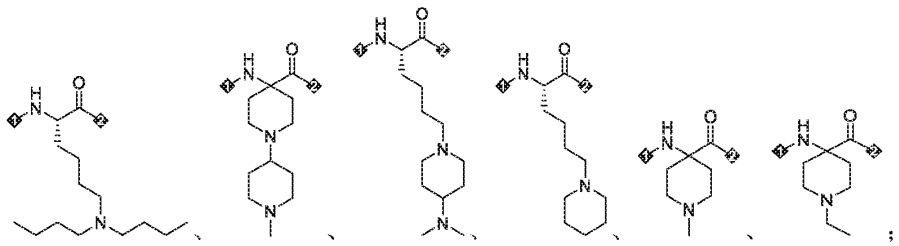
R_1 选自 H、卤素，R_2 选自 H、C1-4 烷基，或，R_1 和 R_2 和与其相连的碳原子形成  ；

R_3 选自 H 和 C1-4 烷基，或，R_3 和 X 和与其相连的碳原子一起形成 R_3 和 X 和与其相连的碳原子一起形成  ；

更优选地，W 选自-O-和-NR_4-，1 位 X 相连，2 位与 L_4 或 L_3 相连；

X 选自  ，1 位和母环相连，2 位和 W 相连；

 为 ，例如 

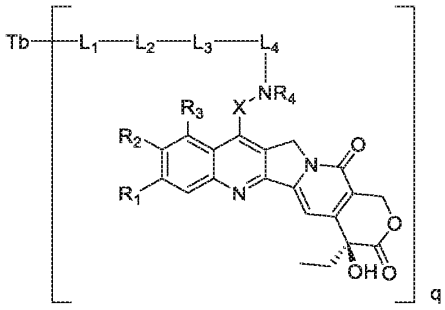
 ；

R_1 为 F，

R_2 为甲基或 R_1 和 R_2 和与其相连的碳原子一起形成  ；

R_3 为 H。

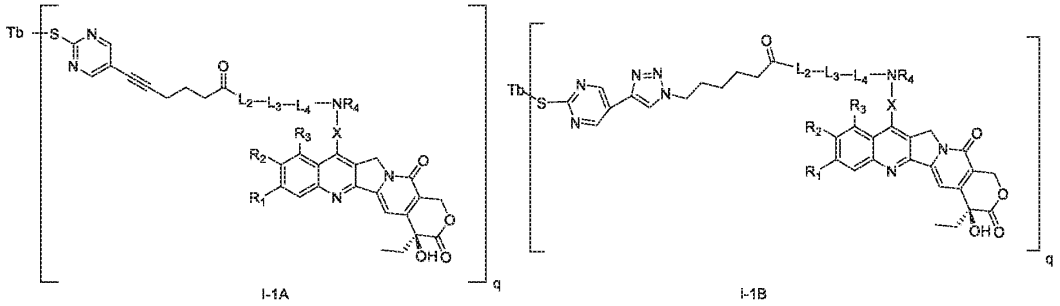
在一些实施方案中，配体药物偶联物具有式 I-1 所式结构：



I-1 ，

其中，Tb、L_1、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4 和 q 具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义。

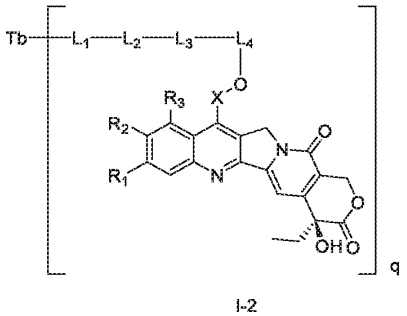
在一些实施方案中，配体药物偶联物具有式 I-1A 或 I-1B 所式结构：



I-1A I-1B

其中，Tb、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4 和 q 具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义。

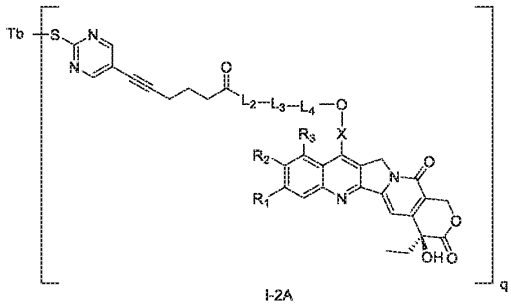
在一些实施方案中，配体药物偶联物具有式 I-2 所式结构：



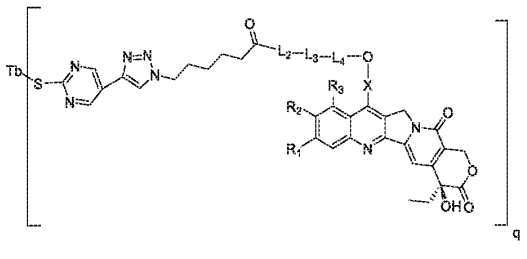
I-2

其中，Tb、L_1、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3 和 q 具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义。

在一些实施方案中，配体药物偶联物具有式 I-2A 或 I-2B 所式结构：



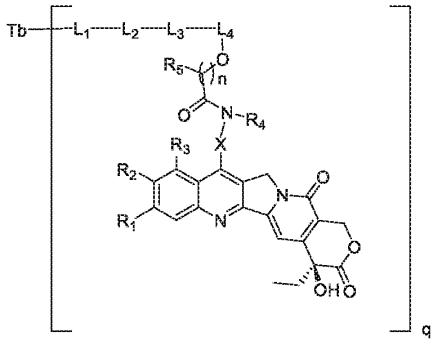
I-2A



I-2B

其中，Tb、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3 和 q 具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义。

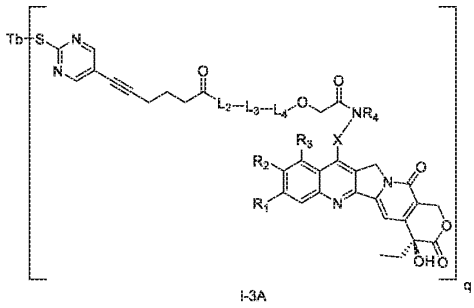
在一些实施方案中，配体药物偶联物具有式 I-3 所式结构：



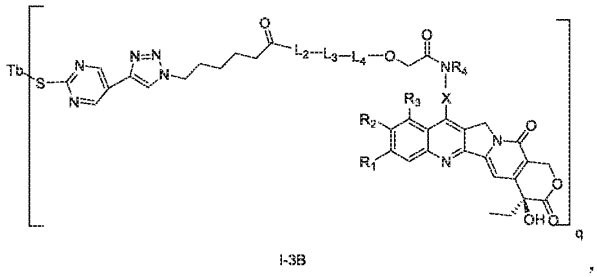
I-3

其中，Tb、L_1、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、n 和 q 具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义。

在一些实施方案中，配体药物偶联物具有式 I-3A 或 I-3B 所式结构：



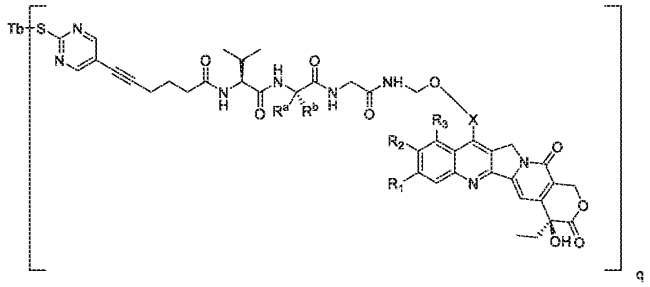
I-3A



I-3B

其中，Tb、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4 和 q 具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义。

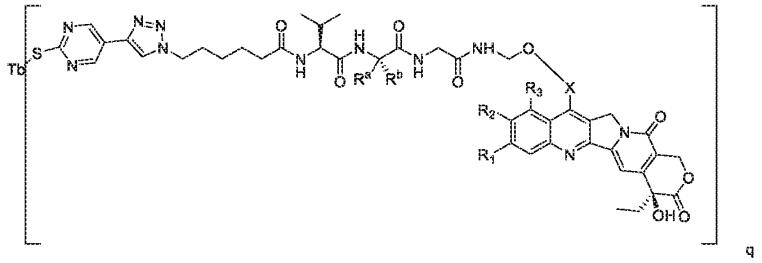
在一些实施方案中，配体药物偶联物具有式 I-A 所式结构：



I-A ，

其中，Tb、X、R_1、R_2、R_3、R^a、R^b 和 q 具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义。

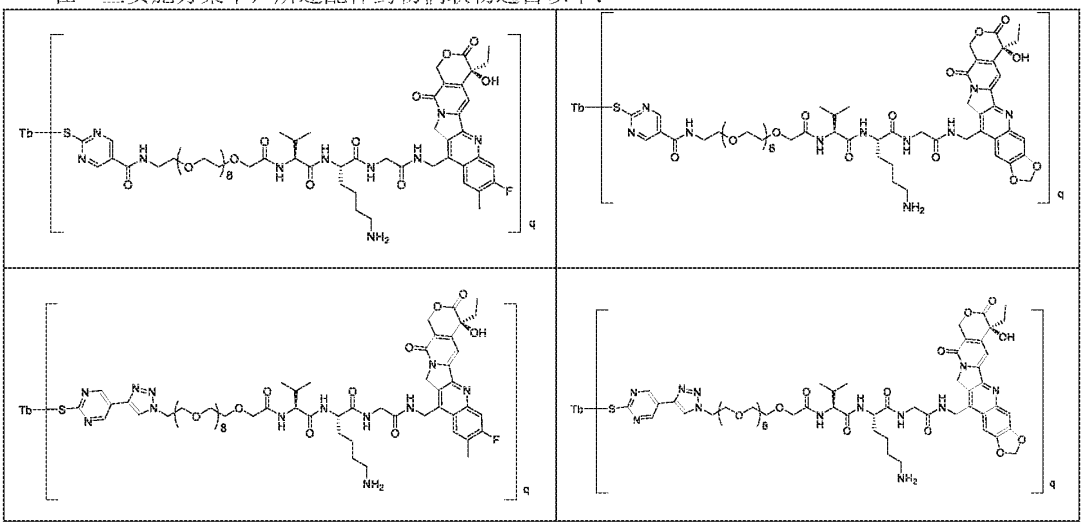
在一些实施方案中，配体药物偶联物具有式 I-B 所式结构：

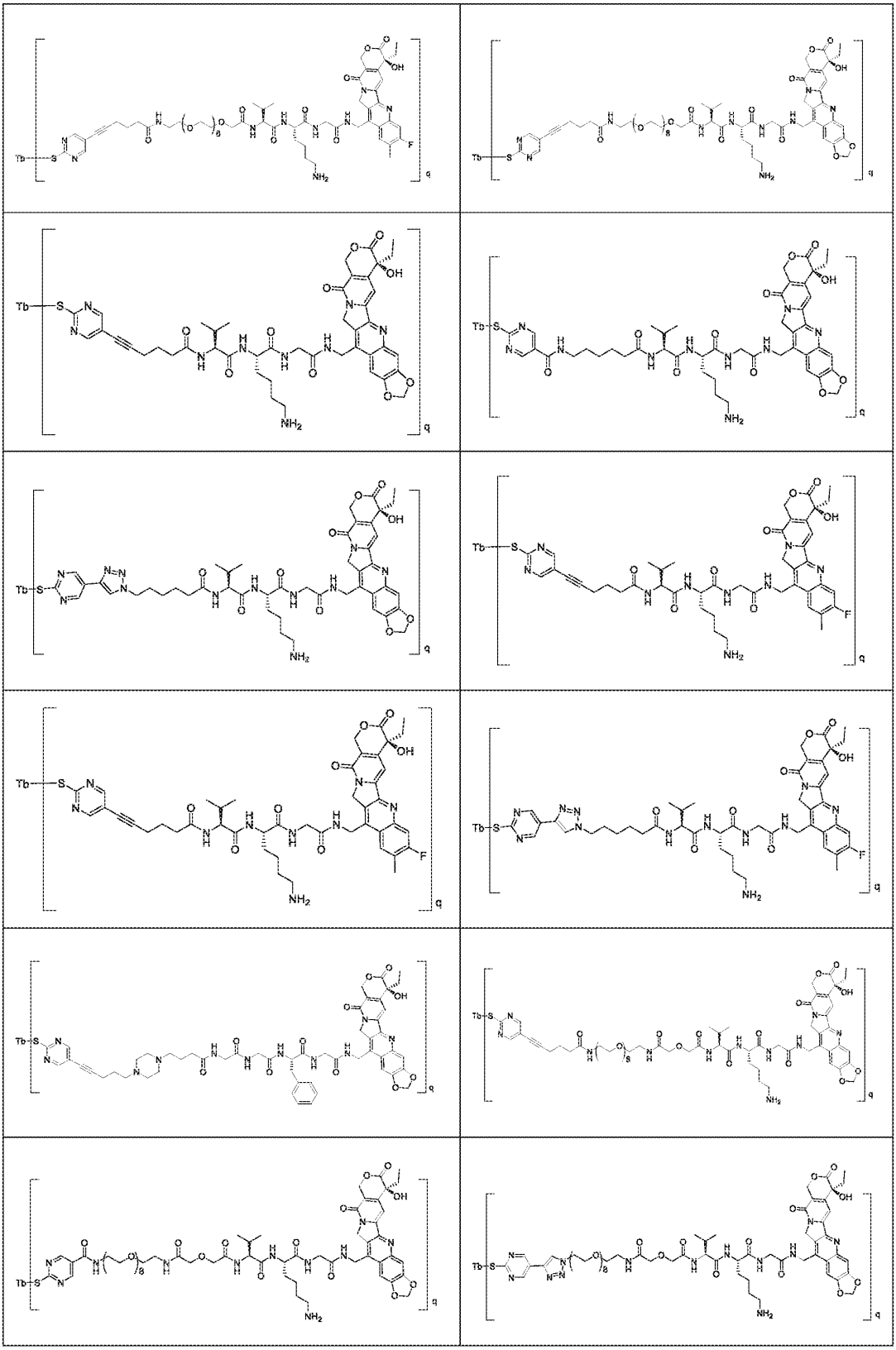


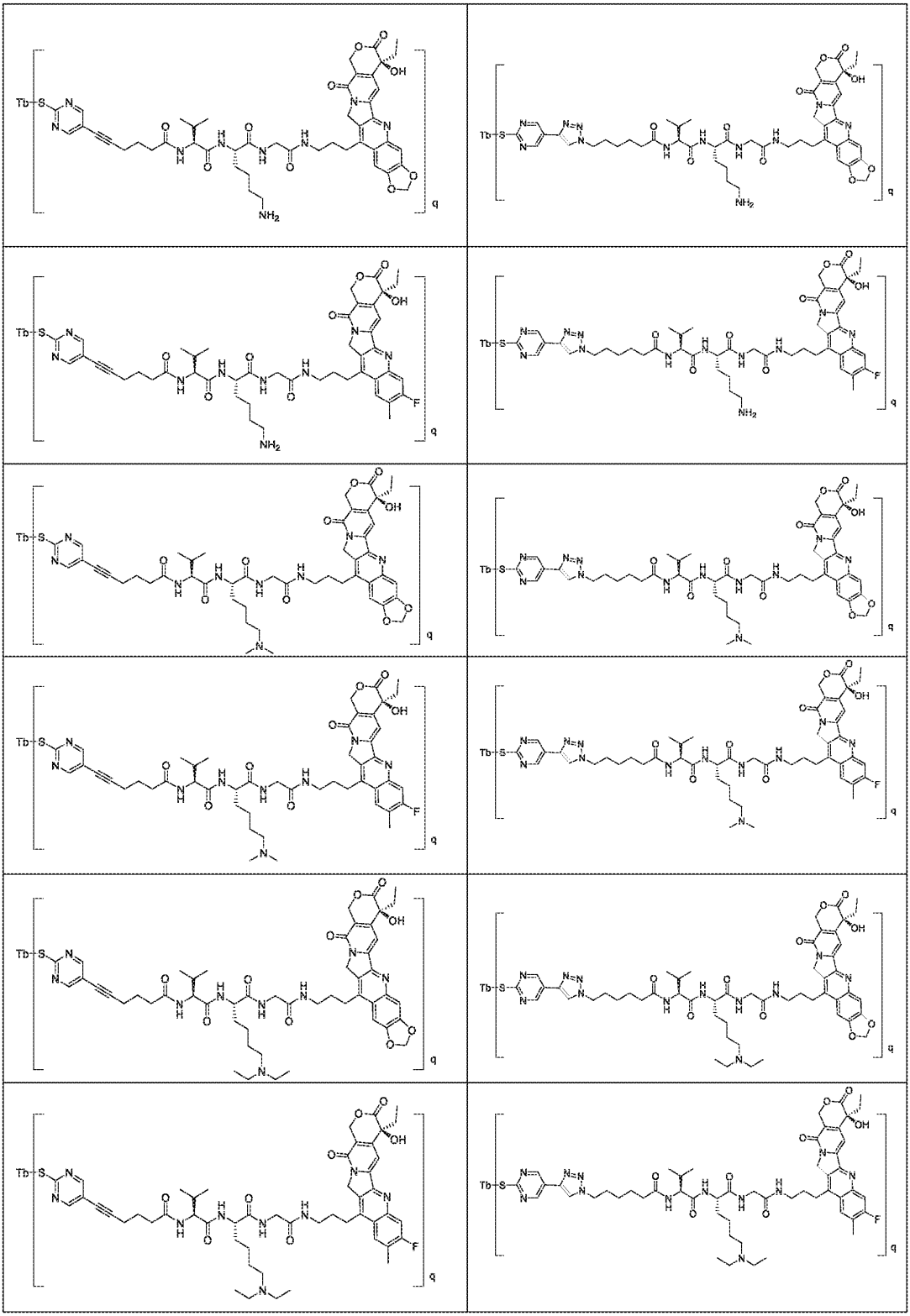
I-B ，

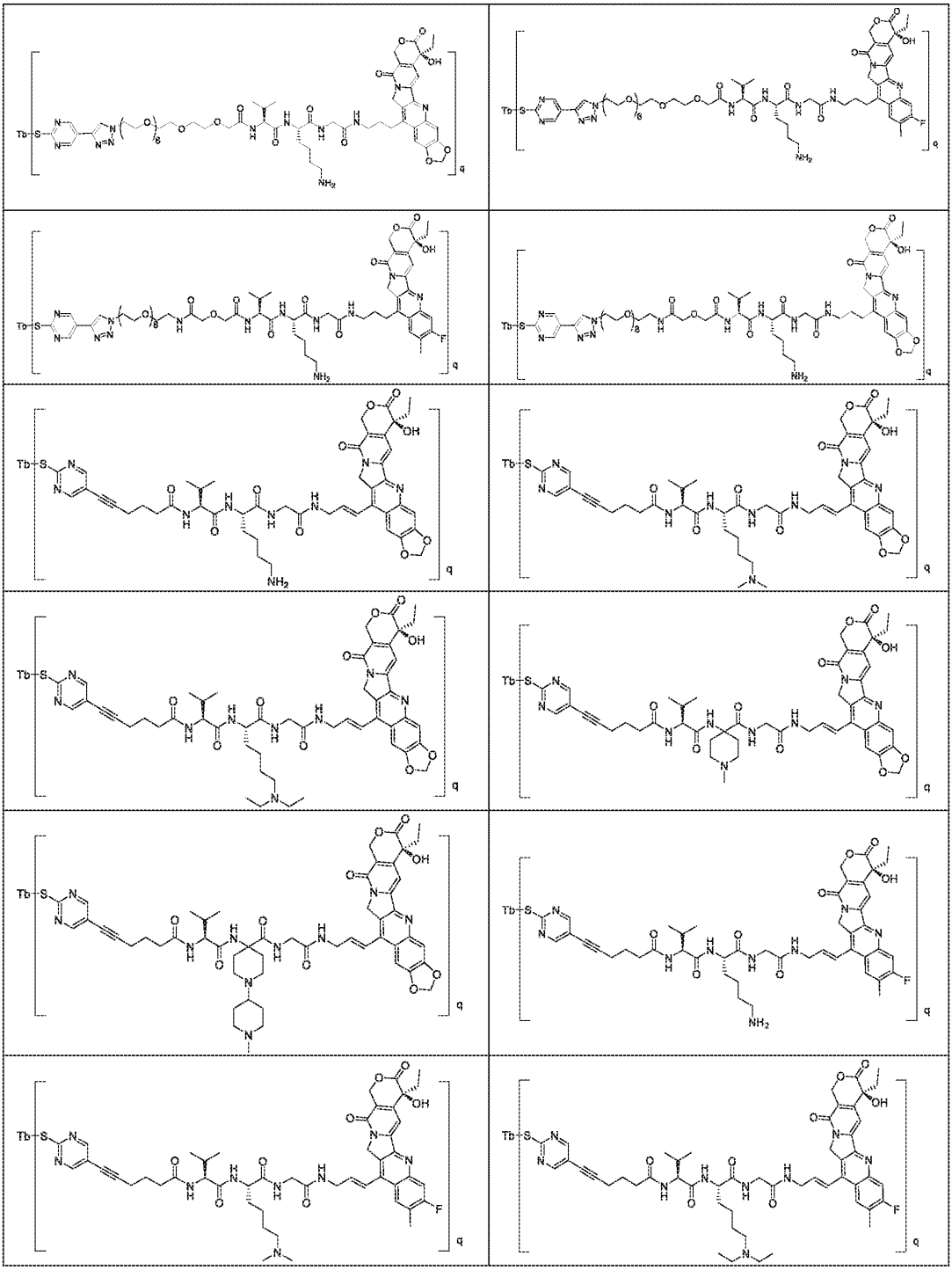
其中，Tb、X、R_1、R_2、R_3、R^a、R^b 和 q 具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义。

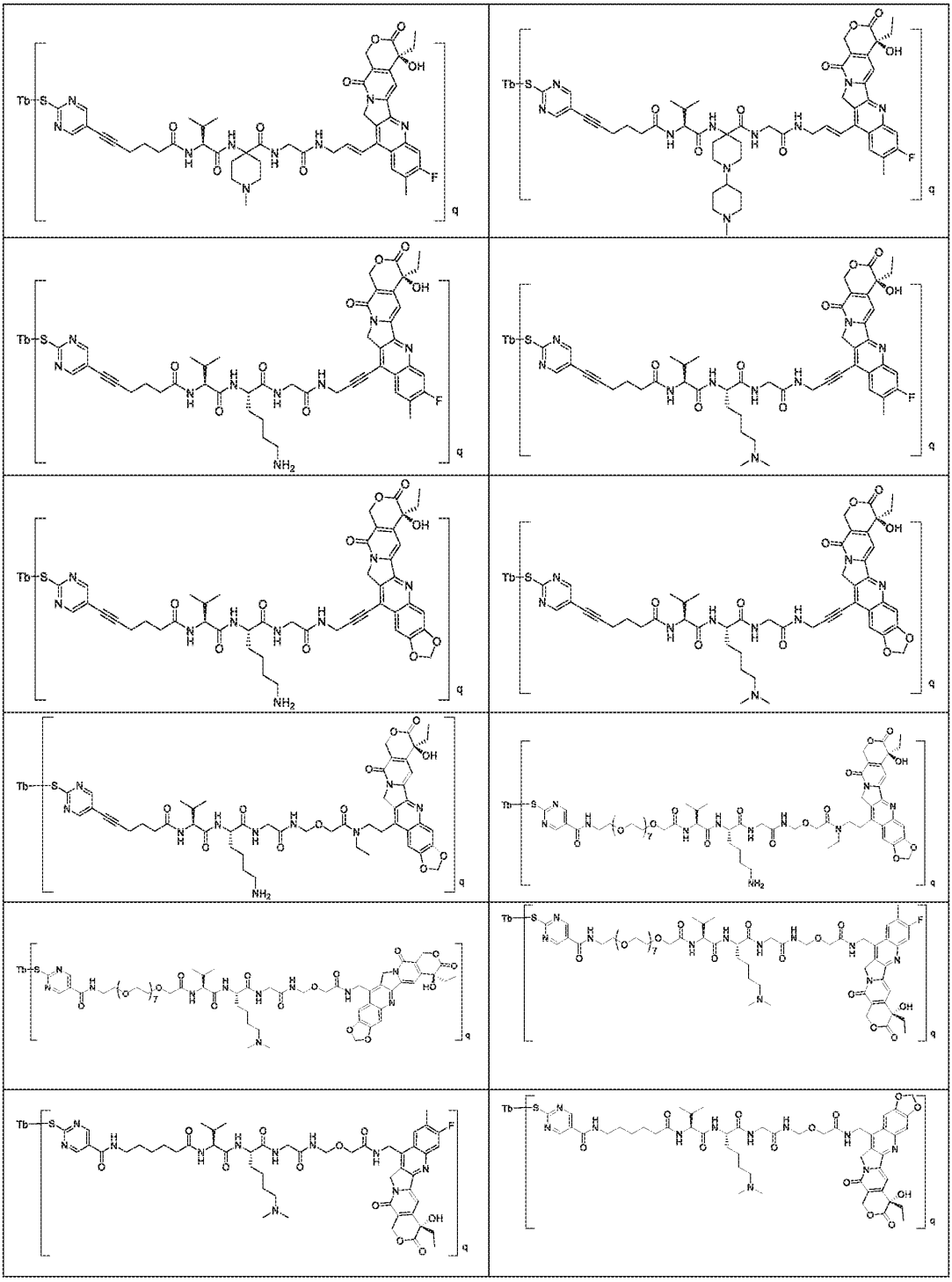
在一些实施方案中，所述配体药物偶联物选自以下：

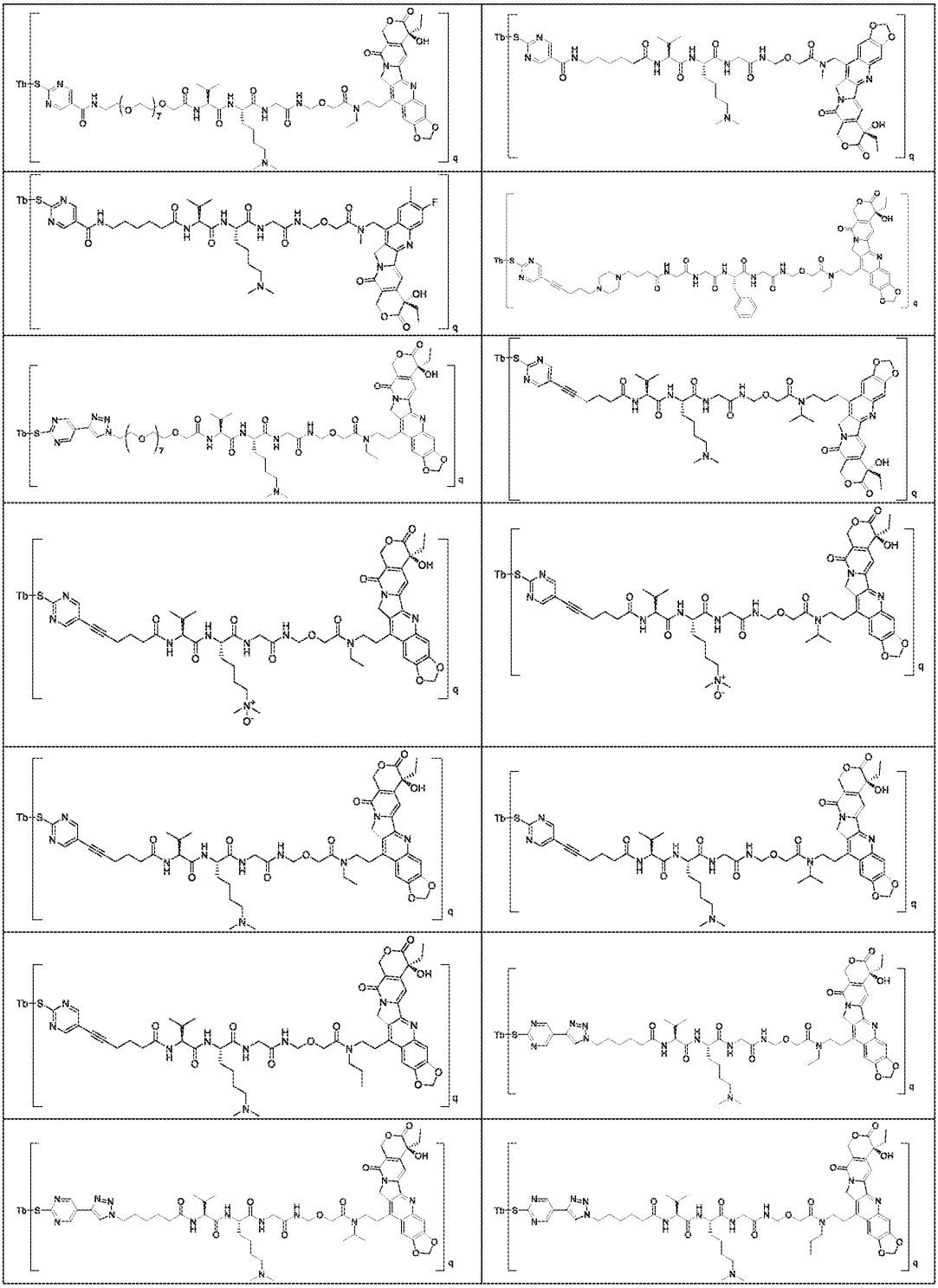


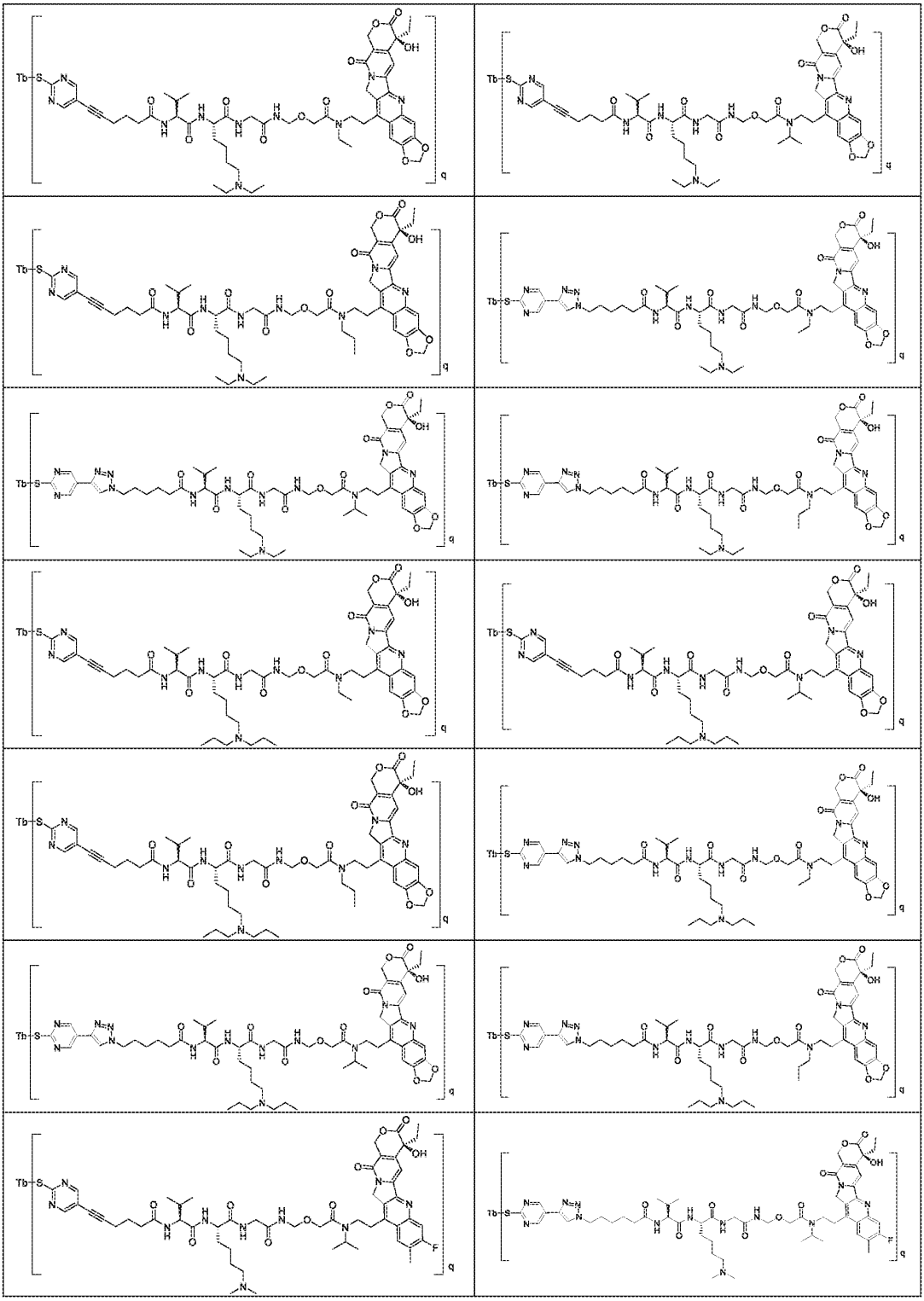


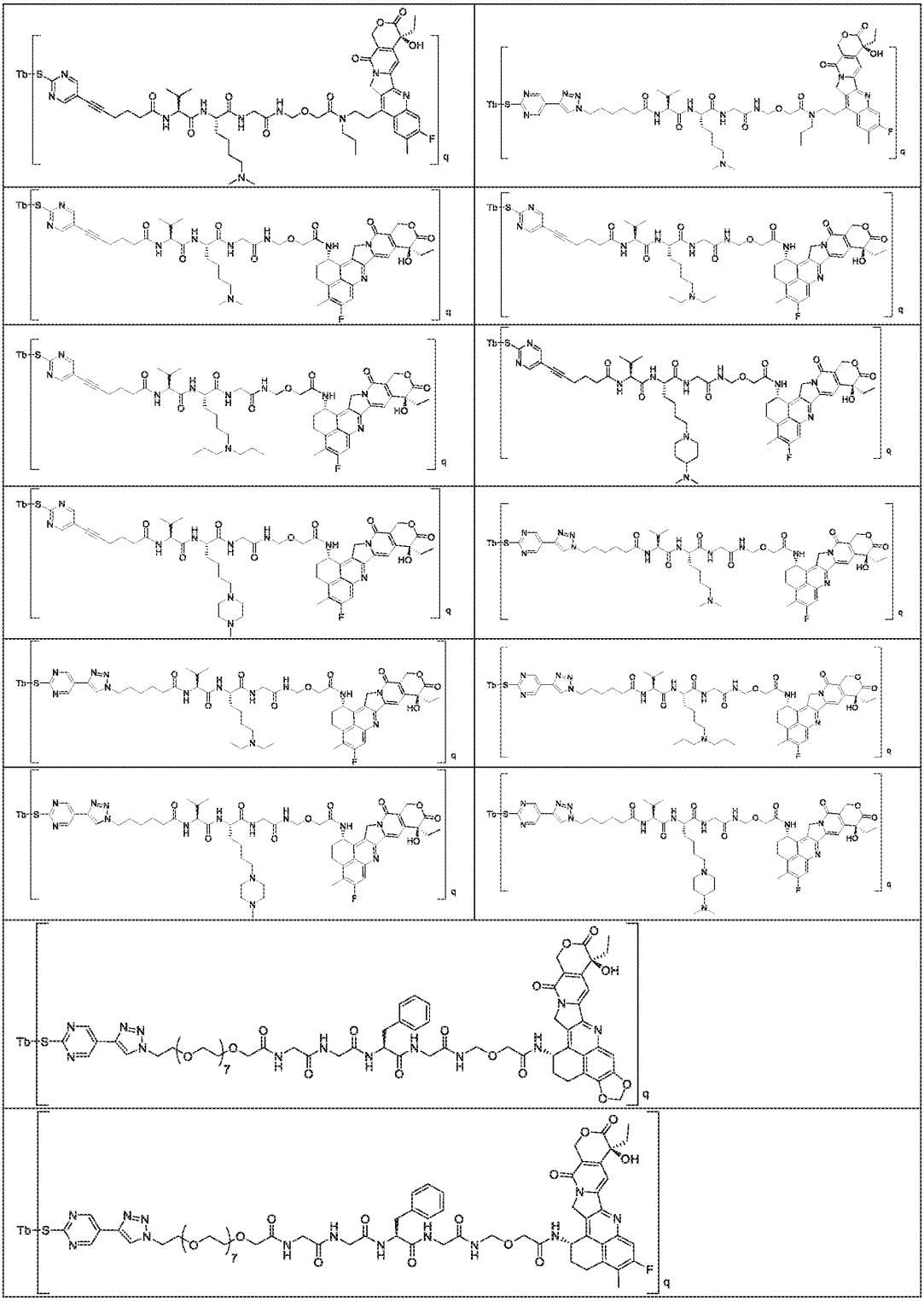


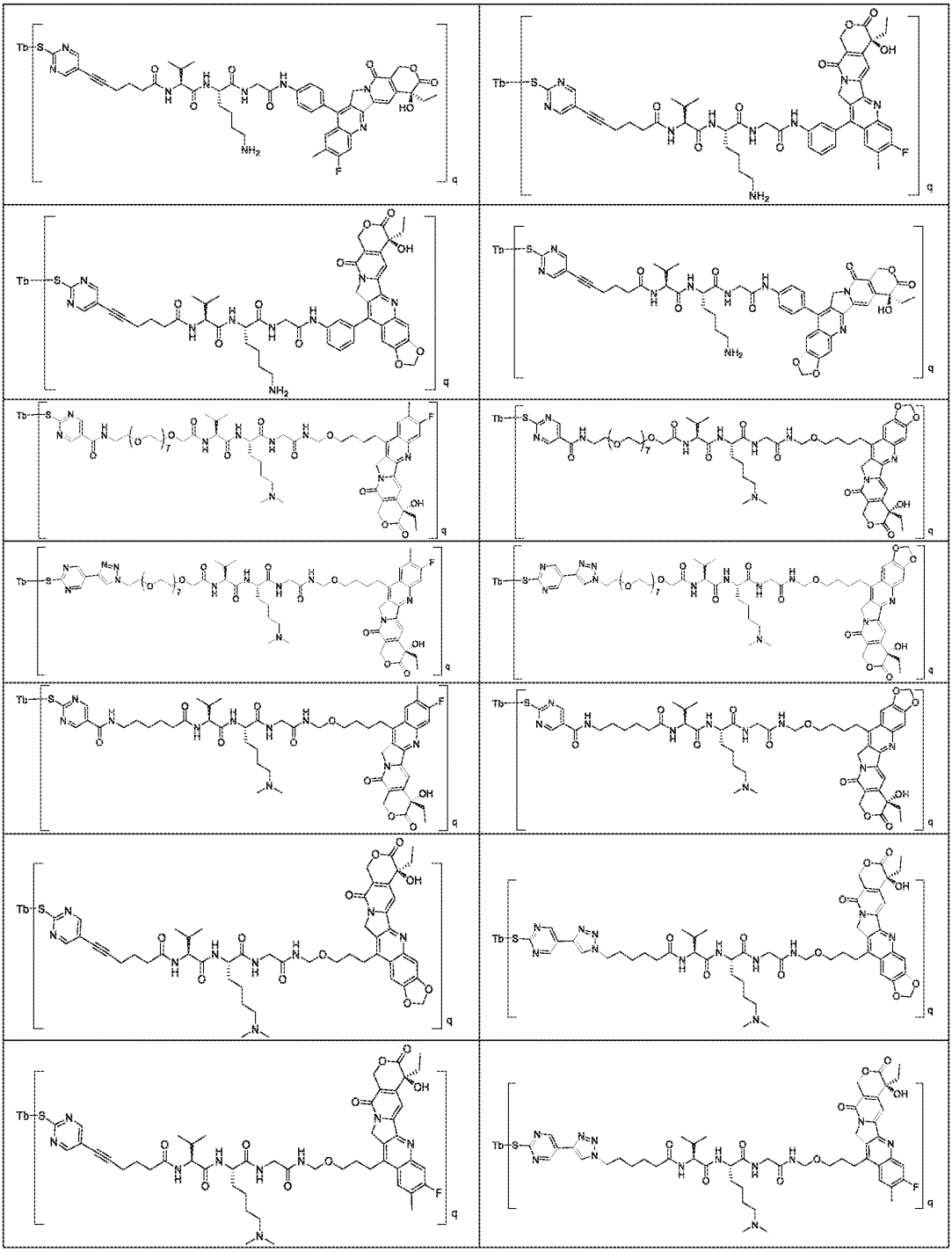


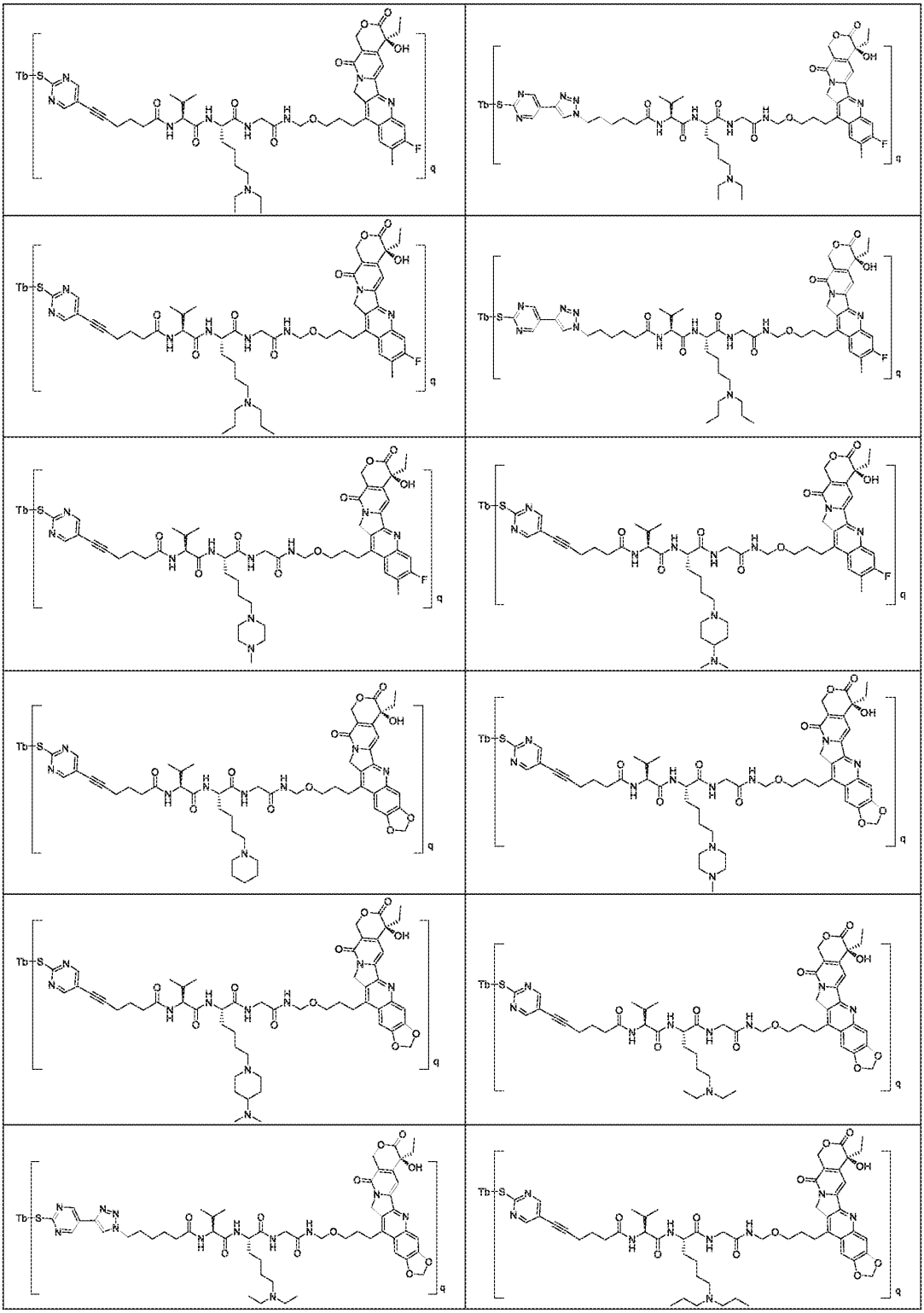


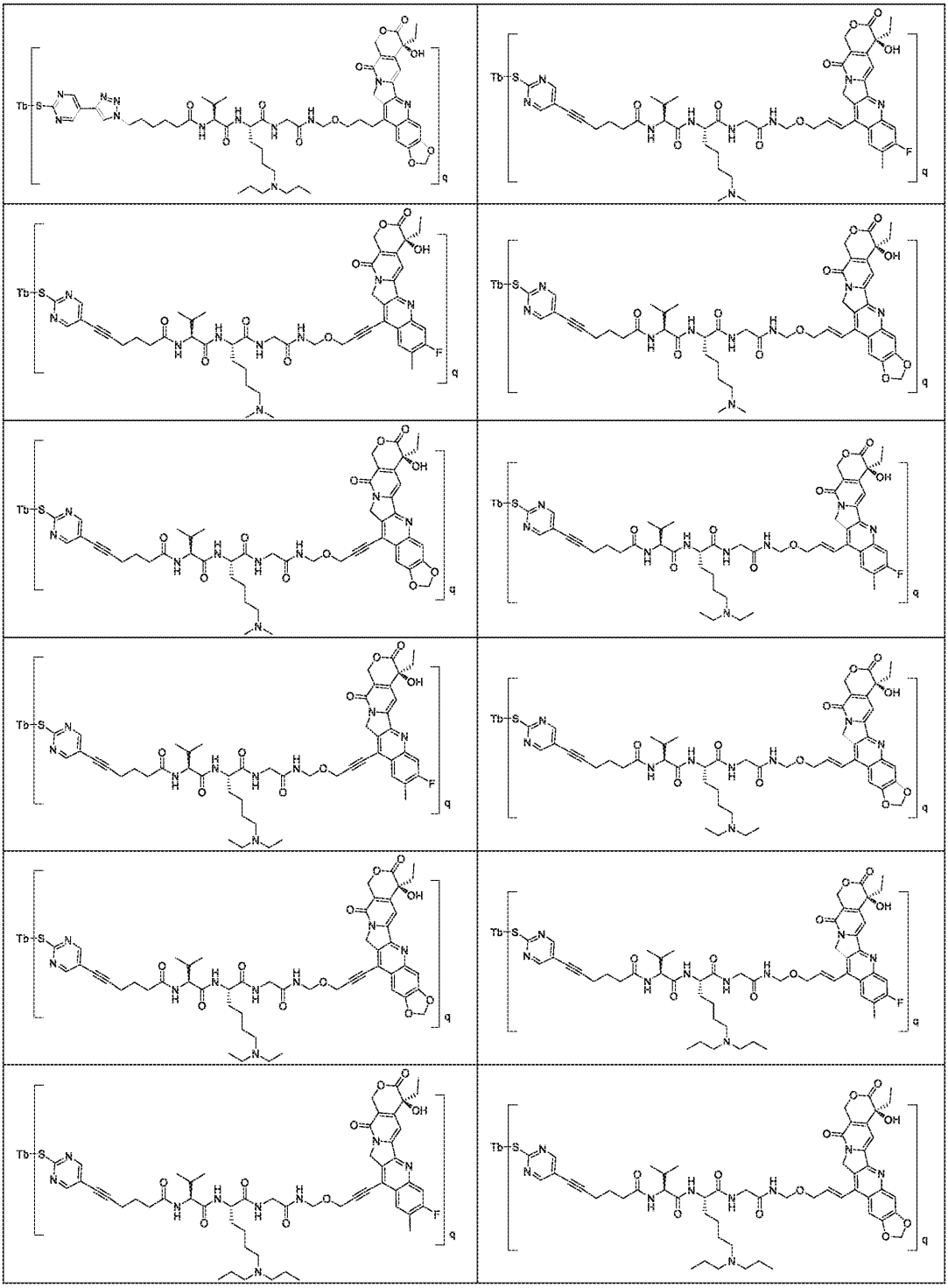


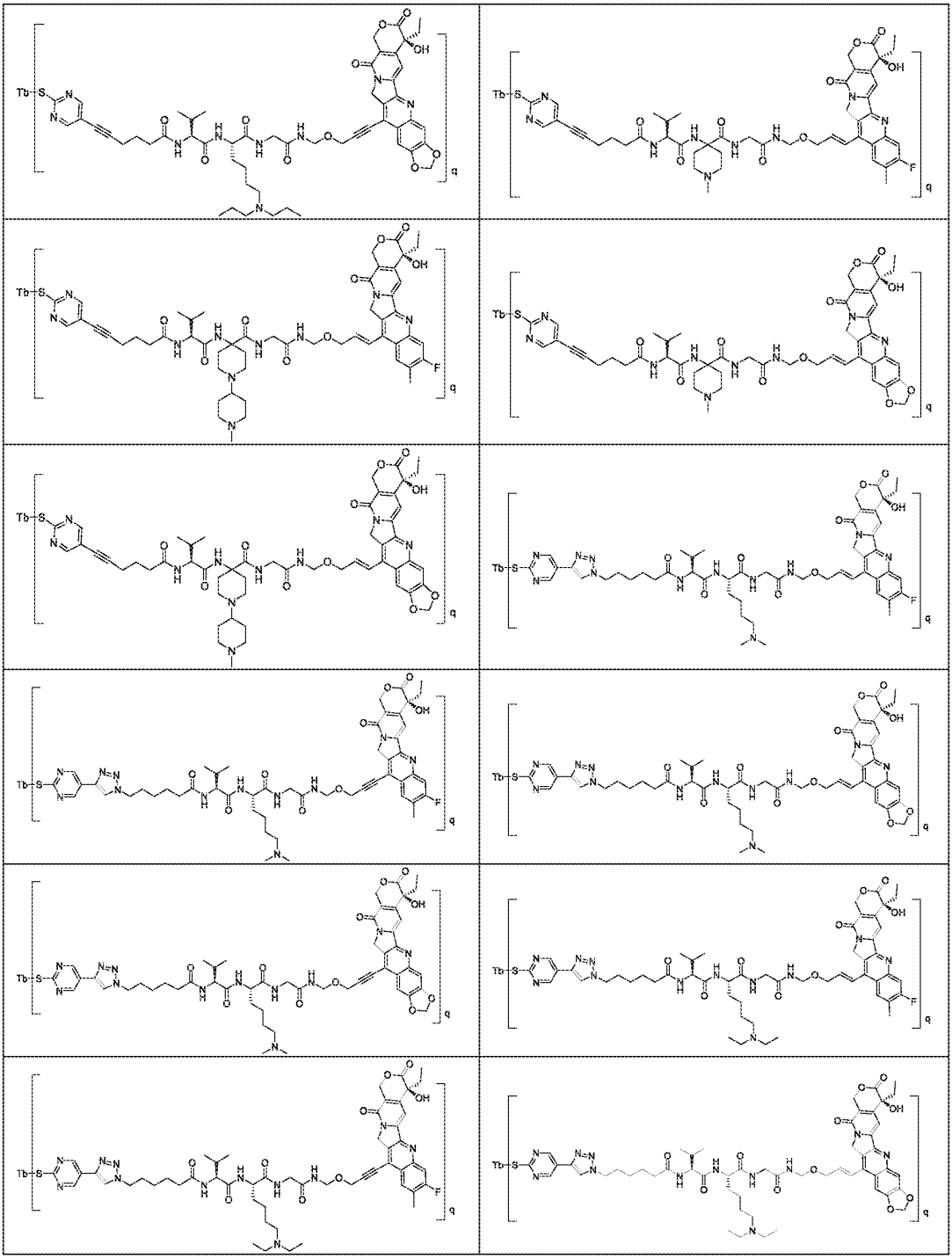


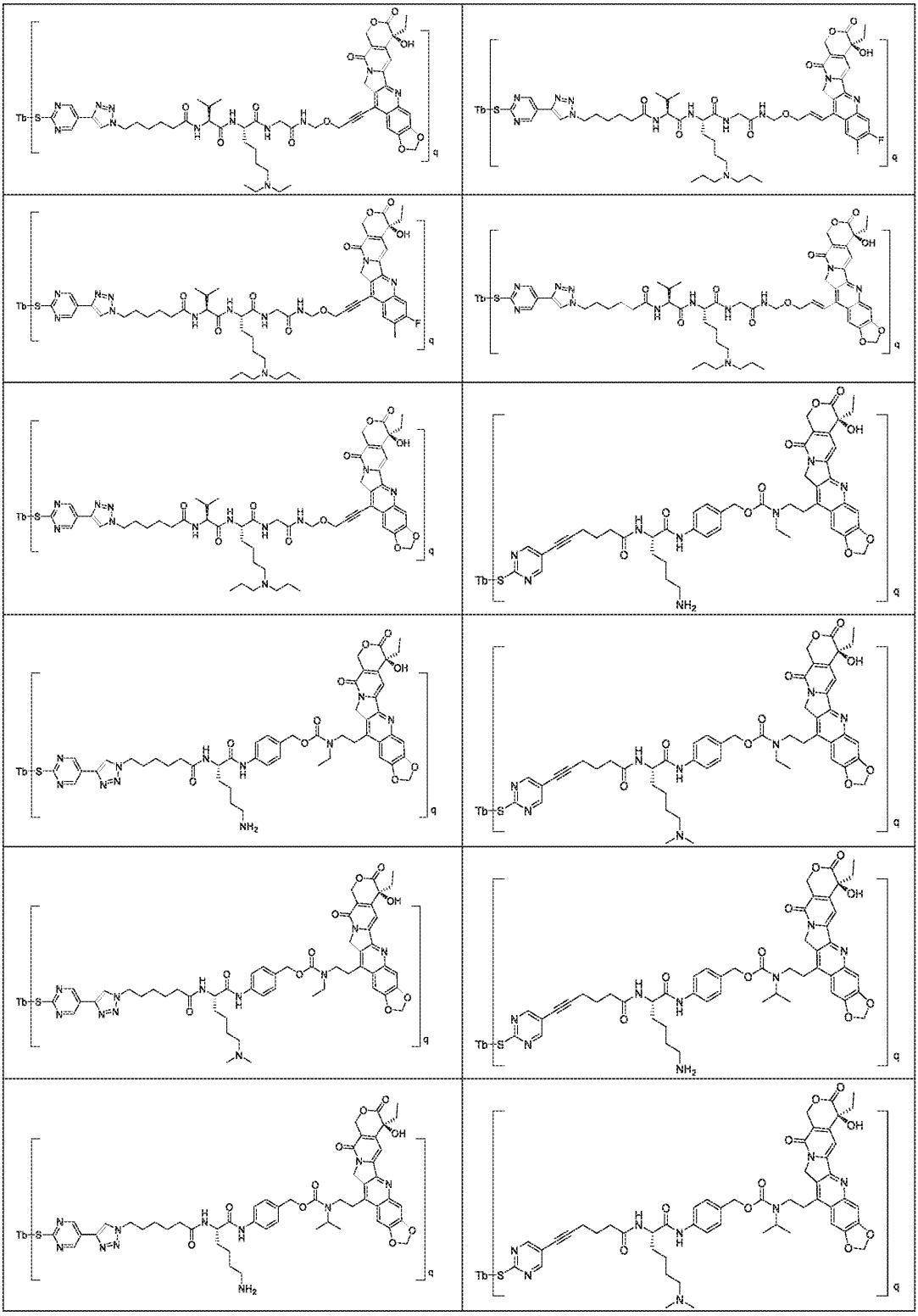


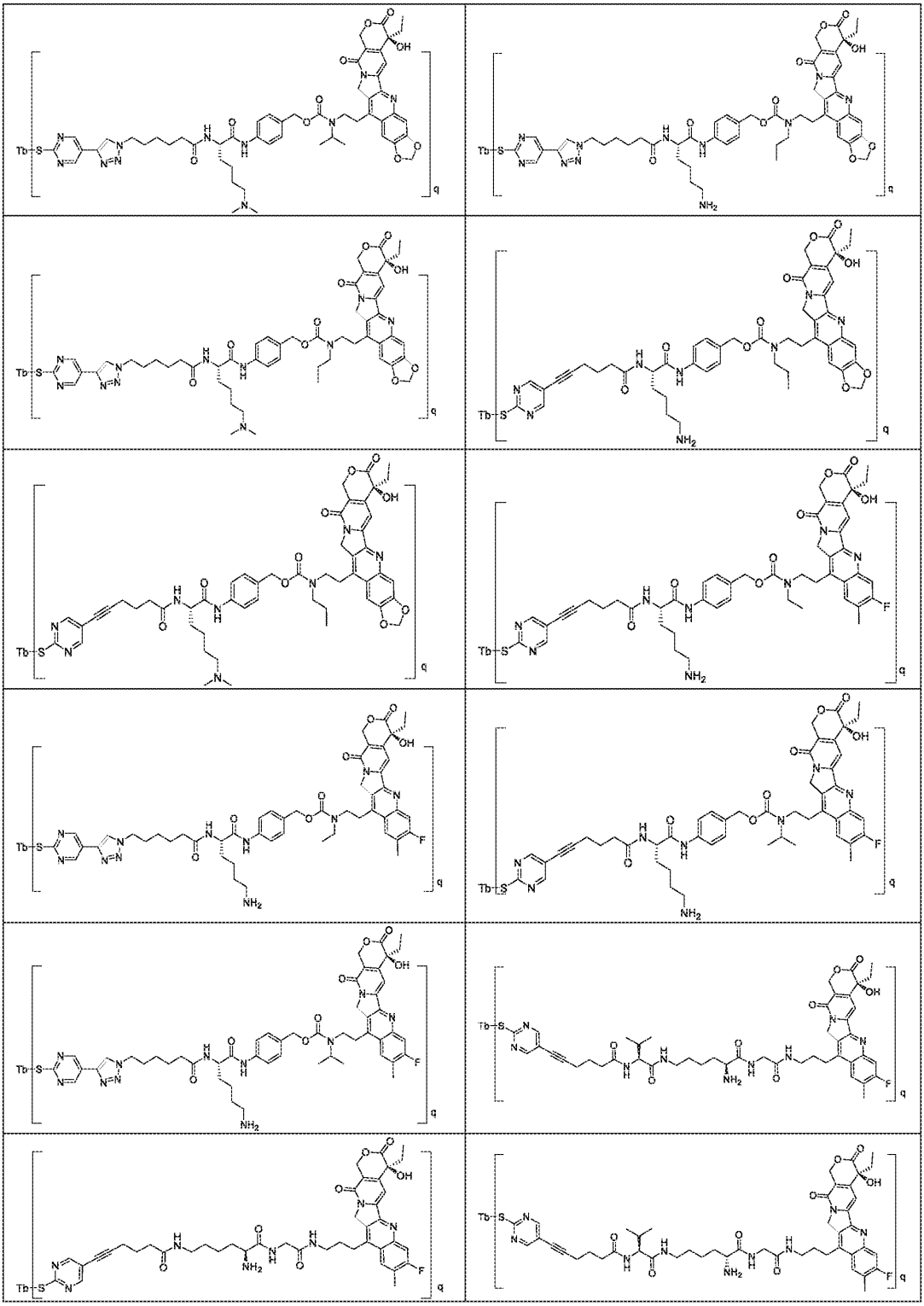


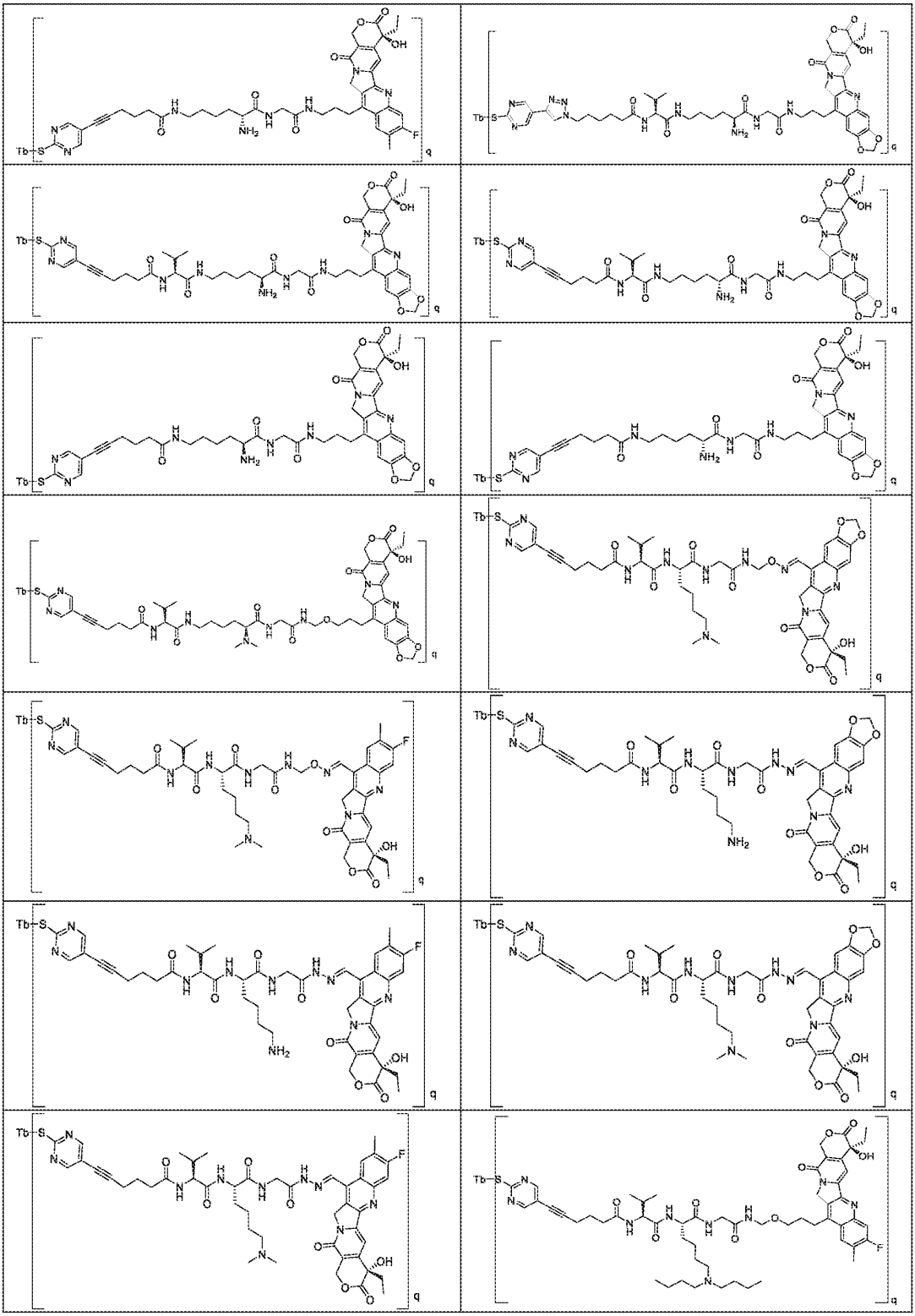


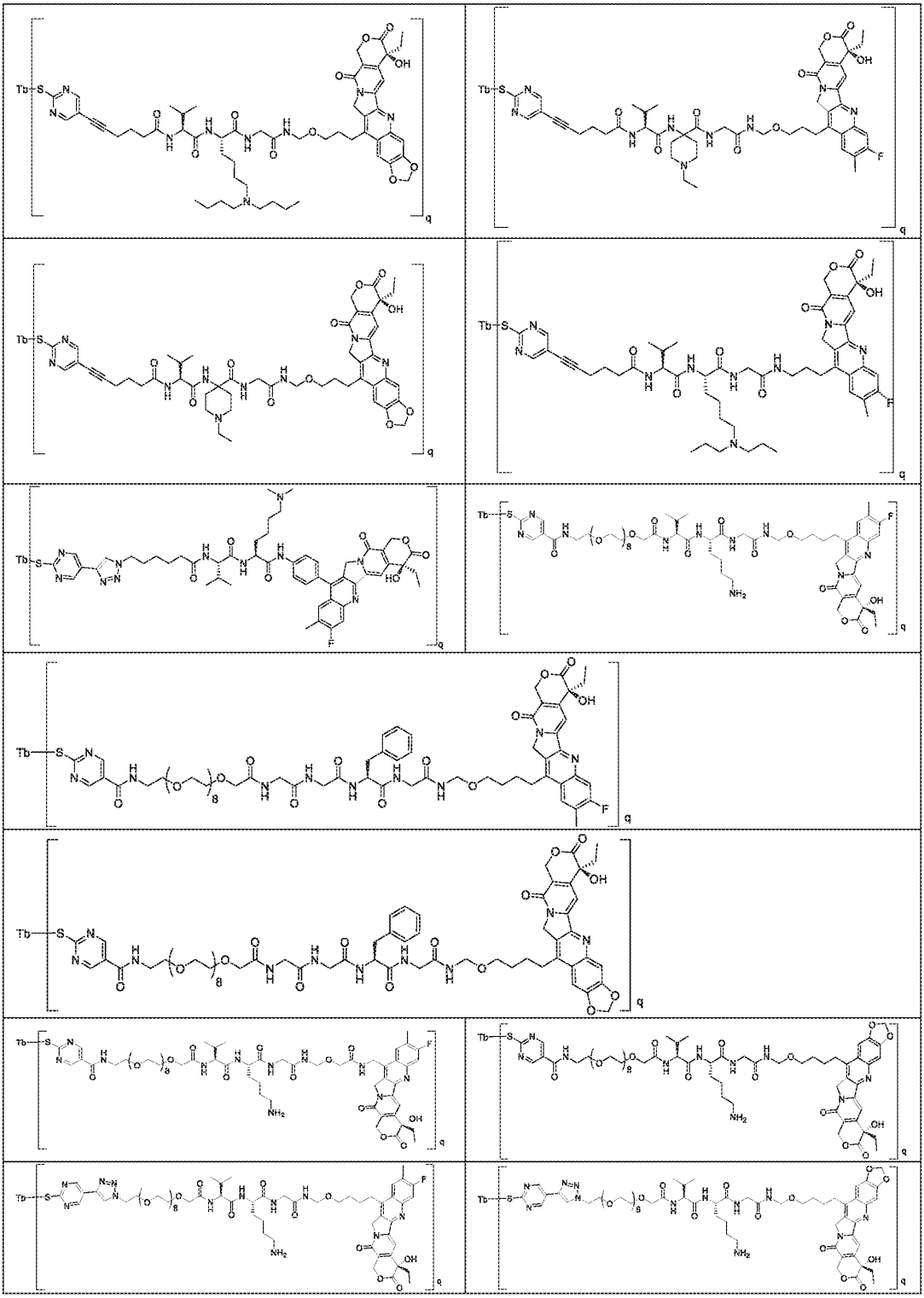


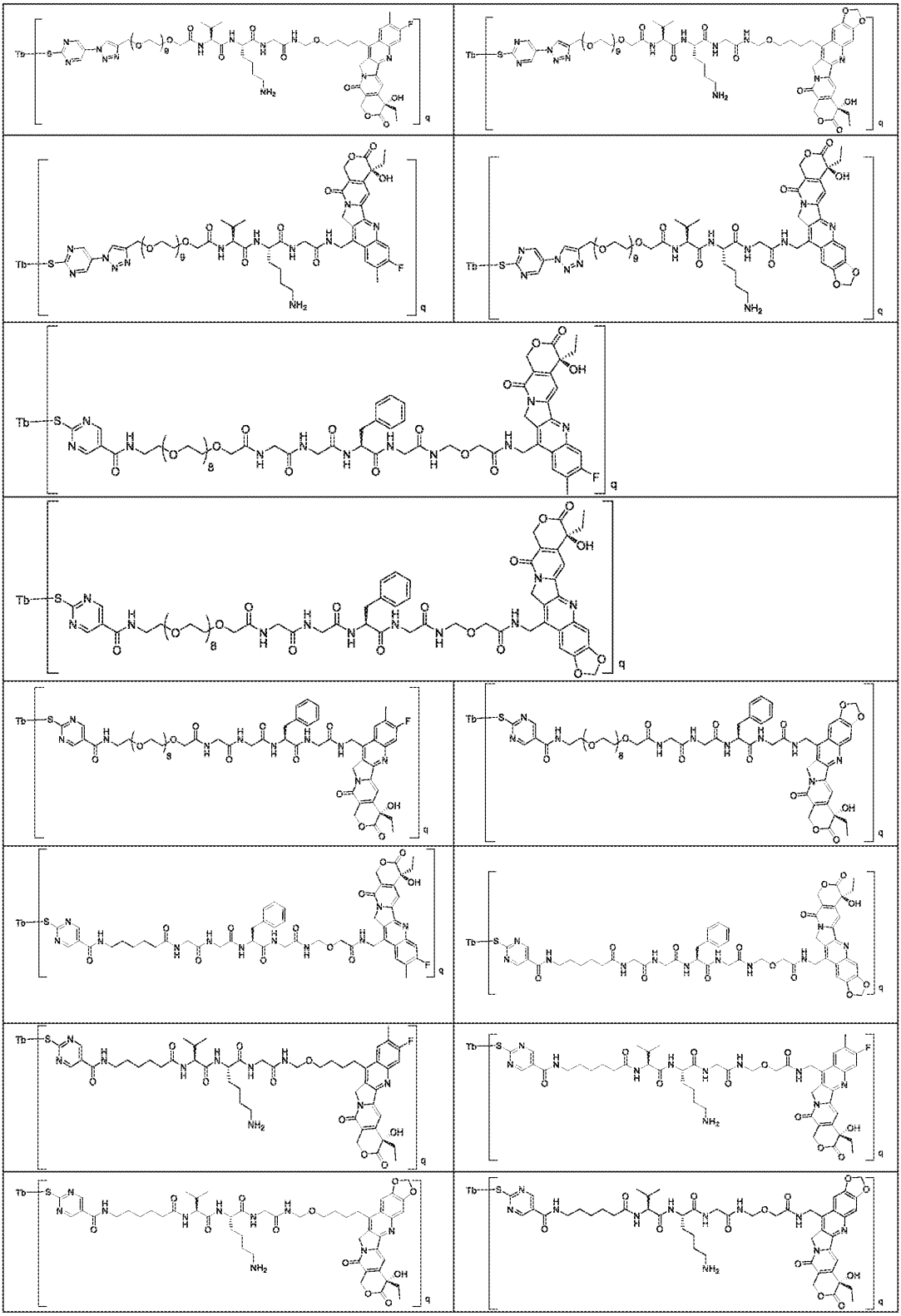


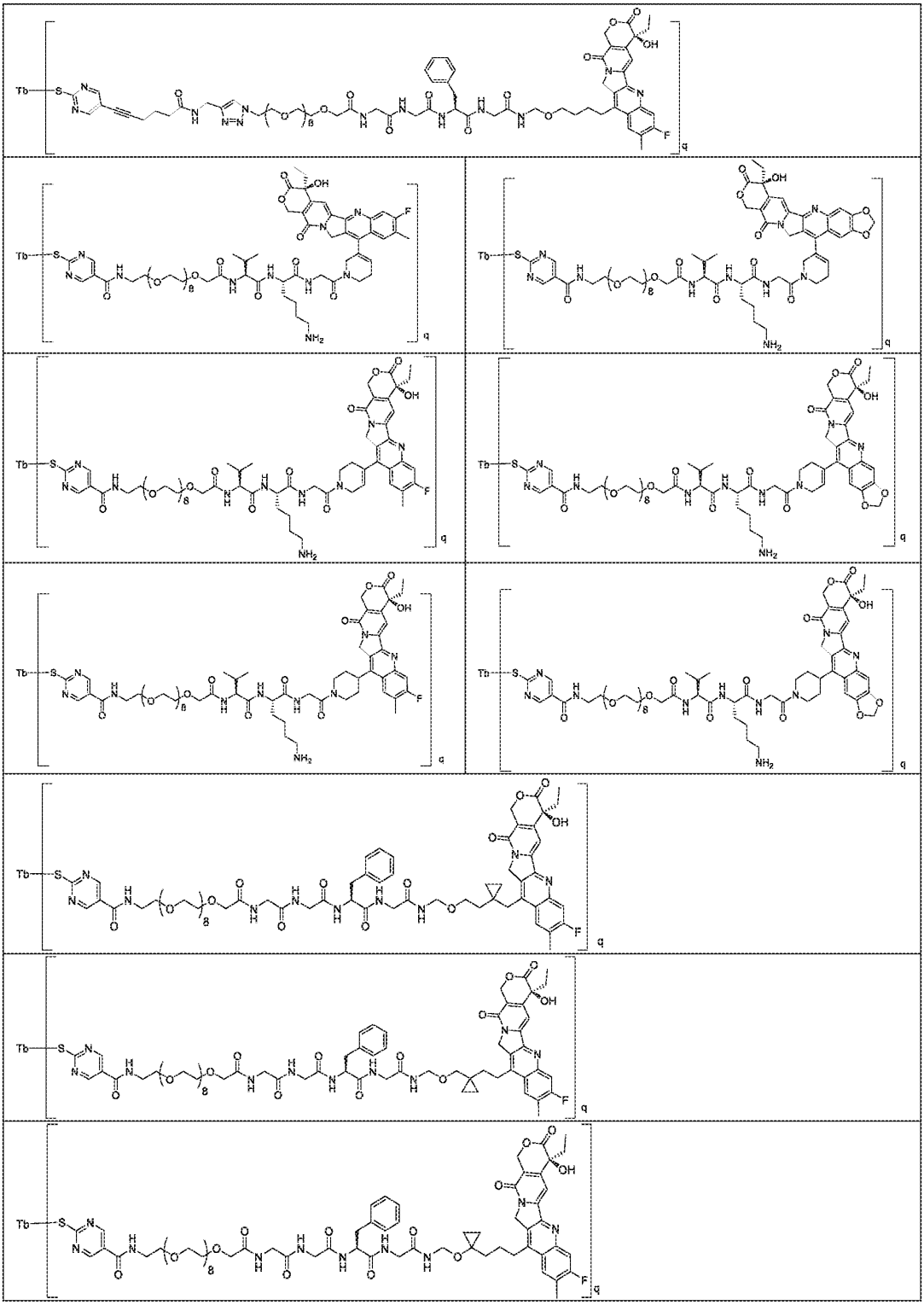


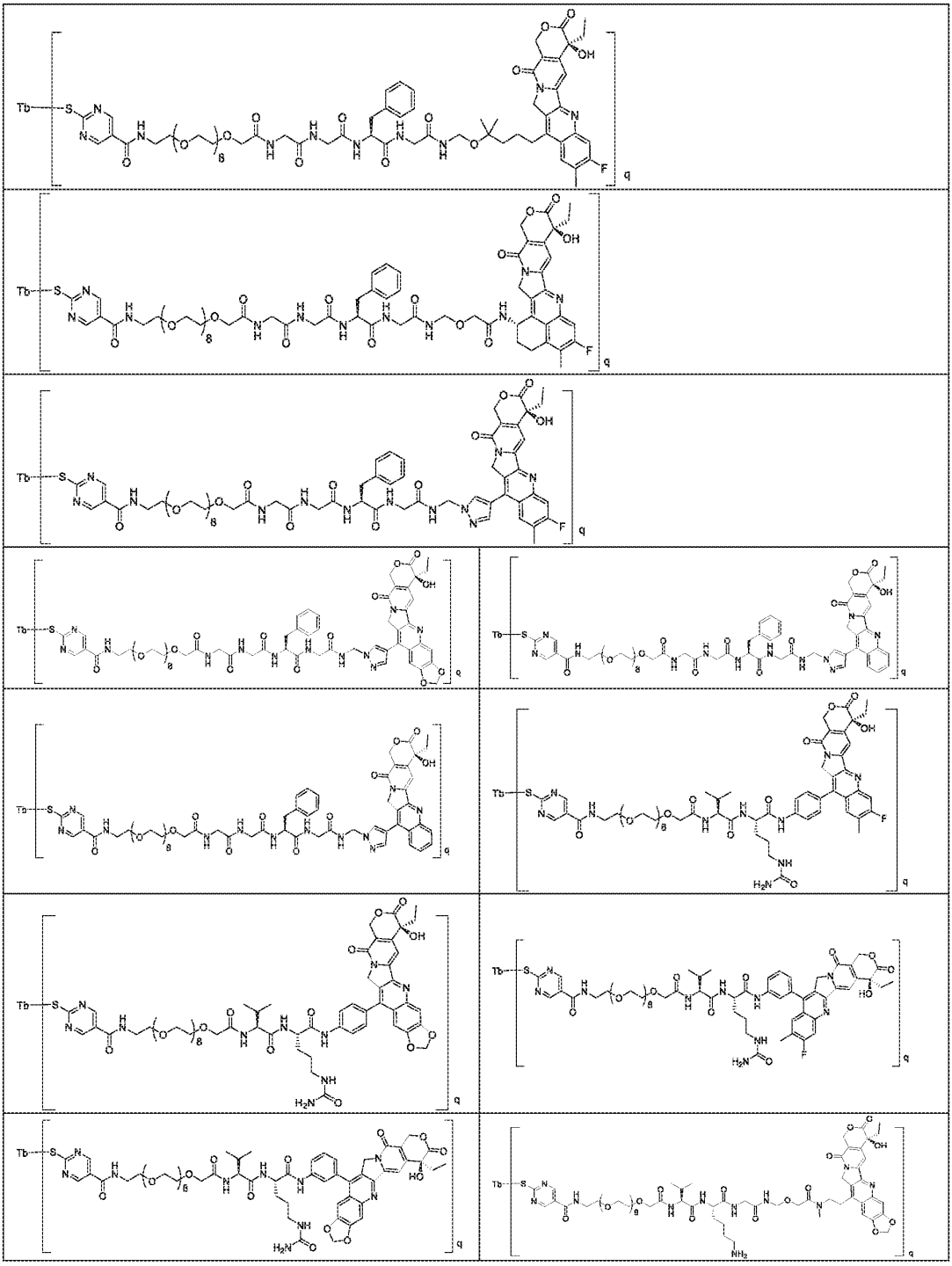


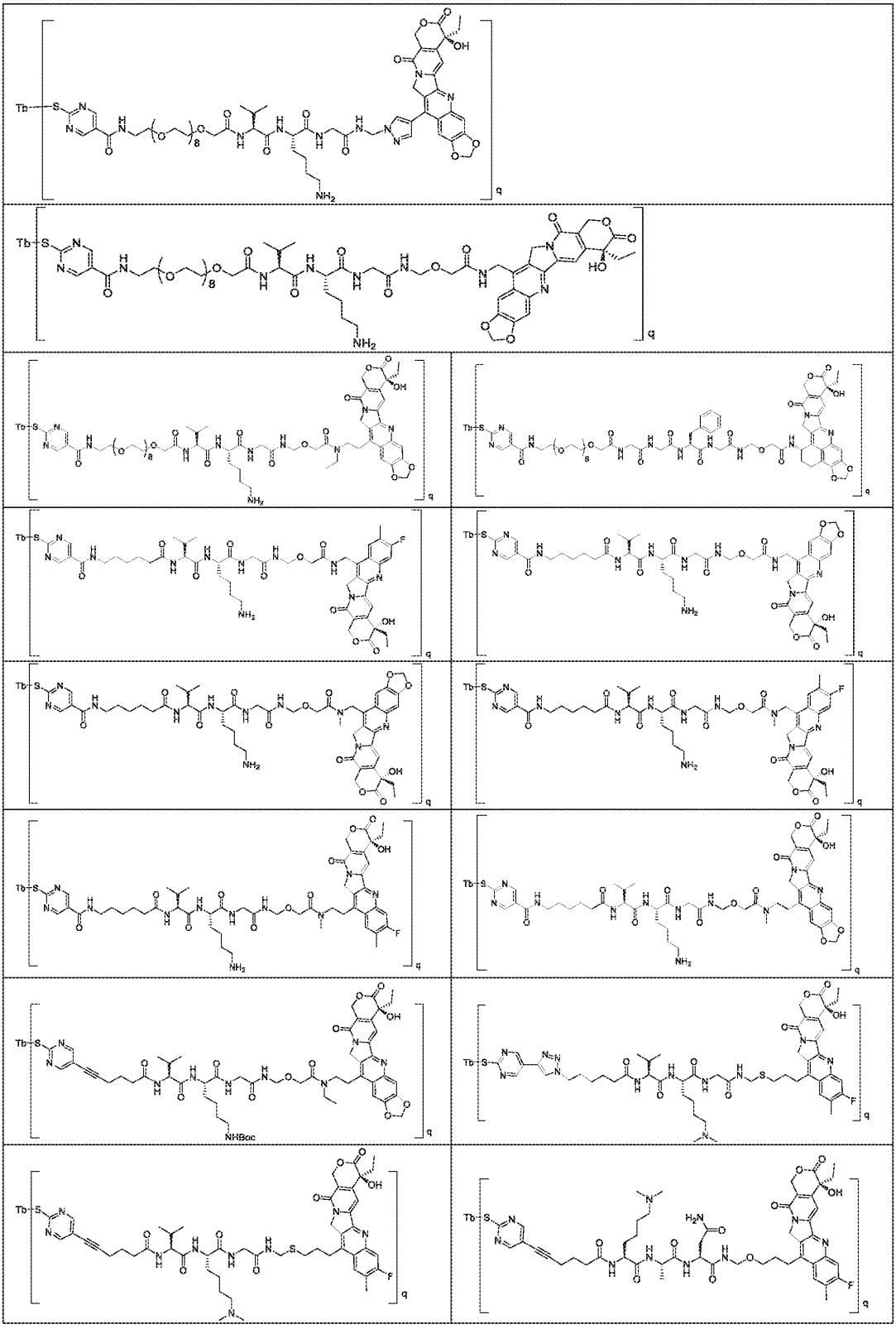












。

所述 Tb 的抗体或其抗原结合的片段可以本领域已知的各种方法来制备，例如通过基因工程重组技术来获得。例如，通过化学合成或 PCR 扩增获得编码本公开抗体的重链和轻链基因的 DNA 分子。将所得 DNA 分子插入表达载体内，然后转染宿主细胞。然后，在特定条件下培养转染后的宿主细胞，并表达本公开的抗体。

在本公开的部分实施方案中，靶向部分为抗 B7H3 抗体或其抗原结合的片段。在一些实施方案中，所述抗 B7H3 抗体包括所有现有技术中的抗 B7H3 抗体，例如 enoblituzumab，mirzotamab，omburtamab，以及参见 CN112521512，WO2021027674，WO2021021543，WO2021006619，CN111662384，CN111454357，WO2020151384，WO2020140094，WO2020103100，WO2020102779，WO2020063673，WO2020047257，WO2020041626，CN110684790，CN110642948，WO2019225787，WO2019226017，US20190338030，CN110305213，WO2018209346，WO2018177393，US9150656，WO2016106004，WO2016044383，WO2016033225，WO2015181267，US20120294796，WO2011109400，CN101104639，WO2004093894，WO2002010187，WO2001018021 中的抗 B7H3 抗体。在一些实施方案中，所述抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段选自：CN 103687945 B 中编号 M30-H1-L4 抗体和 CN 109069633 A 中编号 mAb-C-DUBA 的抗体。

在一些实施方案中，所述抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段包含如下的互补决定区（CDR）的抗体或其抗原结合片段，其中 CDR 按 IMGT 编号系统定义：

(a)序列为 SEQ ID NO:10 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:11 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:12 的 HCDR3；和/或，

序列为 SEQ ID NO:20 的 LCDR1，序列为 GTF 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:22 的 LCDR3；

(b)序列为 SEQ ID NO:10 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:11 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:12 的 HCDR3；和/或，

序列为 SEQ ID NO:40 的 LCDR1，序列为 GAS 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:42 的 LCDR3；

(c)序列为 SEQ ID NO:30 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:31 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:32 的 HCDR3；和/或，

序列为 SEQ ID NO:40 的 LCDR1，序列为 GAS 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:42 的 LCDR3；

或

(d)序列为 SEQ ID NO:30 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:31 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:32 的 HCDR3；和/或，

序列为 SEQ ID NO:20 的 LCDR1，序列为 GTF 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:22 的 LCDR3。

在一些实施方案中，所述抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段，按 IMGT 编号系统定义，包含：

含有（a）中重链 HCDR1，HCDR2，HCDR3 的 VH 和含有（a）轻链 LCDR1，LCDR2，LCDR3 的 VL；

含有（b）中重链 HCDR1，HCDR2，HCDR3 的 VH 和含有（b）轻链 LCDR1，LCDR2，LCDR3 的 VL；

含有（c）中重链 HCDR1，HCDR2，HCDR3 的 VH 和含有（c）轻链 LCDR1，LCDR2，LCDR3 的 VL；或

含有（d）中重链 HCDR1，HCDR2，HCDR3 的 VH 和含有（d）轻链 LCDR1，LCDR2，LCDR3 的 VL。

在一些实施方案中，所述抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段包含如下的互补决定区（CDR），其中 CDR 按 Chothia 编号系统定义：

(a)序列为 SEQ ID NO:4 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:5 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:6 的 HCDR3；和/或，

序列为 SEQ ID NO:14 的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO:15 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:16 的 LCDR3；

(b)序列为 SEQ ID NO:24 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:25 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:26 的 HCDR3；和/或，

序列为 SEQ ID NO:34 的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO:35 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:36 的 LCDR3；

(c)序列为 SEQ ID NO:4 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:5 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:6 的 HCDR3；和/或，

序列为 SEQ ID NO:34 的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO:35 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:36 的 LCDR3；

或

(d)序列为 SEQ ID NO:24 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:25 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:26 的 HCDR3；和/或，

序列为 SEQ ID NO:14 的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO:15 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:16 的 LCDR3。

在一些实施方案中，所述抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段，按 Chothia 编号系统定义，包含：

含有（a）中重链 HCDR1，HCDR2，HCDR3 的 VH 和含有（a）轻链 LCDR1，LCDR2，LCDR3 的 VL；

含有（b）中重链 HCDR1，HCDR2，HCDR3 的 VH 和含有（b）轻链 LCDR1，LCDR2，LCDR3

的 VL；

含有（c）中重链 HCDR1，HCDR2，HCDR3 的 VH 和含有（c）轻链 LCDR1，LCDR2，LCDR3 的 VL；或

含有（d）中重链 HCDR1，HCDR2，HCDR3 的 VH 和含有（d）轻链 LCDR1，LCDR2，LCDR3 的 VL。

在一些实施方案中，所述抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段包含如下的互补决定区（CDR），其中 CDR 按 kabat 编号系统定义：

(a)序列为 SEQ ID NO:7 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:8 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:9 的 HCDR3；和/或，

序列为 SEQ ID NO:17 的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO:18 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:19 的 LCDR3；

(b)序列为 SEQ ID NO:27 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:28 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:29 的 HCDR3；和/或，

序列为 SEQ ID NO:37 的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO:38 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:39 的 LCDR3；

(c)序列为 SEQ ID NO:7 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:8 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:9 的 HCDR3；和/或，

序列为 SEQ ID NO:37 的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO:38 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:39 的 LCDR3；

或

(d)序列为 SEQ ID NO:27 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:28 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:29 的 HCDR3；和/或，

序列为 SEQ ID NO:17 的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO:18 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:19 的 LCDR3。

在一些实施方案中，所述抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段，按 kabat 编号系统定义，包含：

含有（a）中重链 HCDR1，HCDR2，HCDR3 的 VH 和含有（a）轻链 LCDR1，LCDR2，LCDR3 的 VL；

含有（b）中重链 HCDR1，HCDR2，HCDR3 的 VH 和含有（b）轻链 LCDR1，LCDR2，LCDR3 的 VL；

含有（c）中重链 HCDR1，HCDR2，HCDR3 的 VH 和含有（c）轻链 LCDR1，LCDR2，LCDR3 的 VL；或

含有（d）中重链 HCDR1，HCDR2，HCDR3 的 VH 和含有（d）轻链 LCDR1，LCDR2，LCDR3 的 VL。

在一些实施方案中，所述抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段包含：

(a) 重链可变区（VH），其包含选自下列的氨基酸序列：

(i) SEQ ID NO:3 或 23 所示的序列；

(ii) 与 SEQ ID NO:3 或 23 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合（例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合）的序列；或

(iii) 与 SEQ ID NO:3 或 23 所示的序列相比具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；

和/或

(b) 轻链可变区（VL），其包含选自下列的氨基酸序列：

(iv) SEQ ID NO:13 或 33 所示的序列；

(v) 与 SEQ ID NO:13 或 33 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合（例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合）的序列；或

(vi) 与 SEQ ID NO:13 或 33 所示的序列相比具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列。

在一些实施方案中，所述抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO:3 所示的 VH，和/或，SEQ ID NO:13 所示的 VL。

在一些实施方案中，所述抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO:23 所示的 VH，和/或，SEQ ID NO:33 所示的 VL。

在一些实施方案中，所述抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO:3 所示的 VH，和/或，SEQ ID NO:33 所示的 VL。

在一些实施方案中，所述抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO:23 所示的 VH，和/或，SEQ ID NO:13 所示的 VL。

在一些实施方案中，所述抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段包含：

(a) SEQ ID NO:3 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:13 所示序列的 VL；

(b) SEQ ID NO:23 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:33 所示序列的 VL；

(c) SEQ ID NO:3 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:13 所示序列的 VL；

(d) SEQ ID NO:23 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:13 所示序列的 VL；

(e) 重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），其中所述重链可变区（VH）和轻链可变区（VL）独立地与(a)至(f)任一组中所述的 VH 和 VL 相比分别具有至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性；或

(f) 重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），其中所述重链可变区（VH）和轻链可变区（VL）与(a)至(d)任一组中所述的 VH 和 VL 分别相比，独立地具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合（例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合）。优选地，所述的置换是保守置换。

在一些实施方案中，所述抗 B7H3 抗体的重链包含人免疫球蛋白的重链恒定区（CH）或其变体，所述变体与其所源自的野生型序列相比具有至多 50 个氨基酸的保守置换（例如至多 45 个、至多 40 个、至多 35 个、至多 30 个、至多 25 个、至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个或至多 5 个氨基酸的保守置换；例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的保守置换）。在某些实施方案中，所述抗 B7H3 抗体轻链包含人免疫球蛋白的轻链恒定区（CL）或其变体，所述变体与其所源自的野生型序列相比具有至多 50 个氨基酸的保守置换（例如至多 45 个、至多 40 个、至多 35 个、至多 30 个、至多 25 个、至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个或至多 5 个氨基酸的保守置换；例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的保守置换）。

在一些实施方案中，恒定区被改变，例如被突变，以修饰抗 B7H3 抗体分子的性质（例如改变下列中的一个或多个特性：Fc 受体结合、抗体糖基化、半胱氨酸残基的数目、效应细胞功能或补体功能）。可以通过将抗体恒定区中的至少一个氨基酸残基替换为不同残基，产生功能改变，例如，改变抗体对效应子配体（如 FcR 或补体 C1q）的亲和力，从而改变效应子功能（例如降低）。抗体的 Fc 区介导几种重要的效应子功能，例如 ADCC、吞噬作用(ADCP)、CDC 等。

在一些实施方案中，所述抗B7H3抗体或其抗原结合片段具有重链恒定区(CH)，其选自例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD 和 IgE 的重链恒定区；特别地选自例如 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 的重链恒定区，更特别地选自 IgG1（例如是人 IgG1）的重链恒定区。在一些实施方案中，人 IgG1 重链恒定区如 SEQ ID NO:43 所示。在一些实施方案中，本公开的抗体或其抗原结合片段具有轻链恒定区，其选自例如 κ 或 λ 轻链恒定区，优选 κ 轻链恒定区（例如人 κ 轻链恒定区）。在一些实施方案中，轻链恒定区具有如 SEQ ID NO:44 所示的序列。

在一些实施方案中，所述抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO:43 所示的 CH 或其变体，所述变体与 SEQ ID NO:43 相比具有至多 20 个氨基酸的保守置换（例如至多 20 个、至多 15 个、

至多 10 个或至多 5 个氨基酸的保守置换；例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的保守置换），或者与 SEQ ID NO:43 相比具有至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性。

在一些实施方案中，所述抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段包含轻链恒定区或其变体。在一些实施方案中，所述轻链恒定区包含 κ 轻链恒定区。在一些实施方案中，所述轻链恒定区包含 SEQ ID NO:44 所示的轻链恒定区（CL）或其变体，所述变体与 SEQ ID NO:44 相比具有至多 20 个氨基酸的保守置换（例如至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个或至多 5 个氨基酸的保守置换；例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的保守置换），或者与 SEQ ID NO:44 相比具有至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性。

在一些实施方案中，所述抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO:43 所示的重链恒定区（CH）和 SEQ ID NO:44 所示的轻链恒定区（CL）。

在一些实施方案中，所述抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段包含：

(a) 重链，其包含选自下列的氨基酸序列：

(i) 包含 SEQ ID NO:3 所示的 VH 序列和 SEQ ID NO:43 所示的 CH 序列的序列；

(ii) 与(i)所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合（例如至多 50 个、至多 45 个、至多 40 个、至多 35 个、至多 30 个、至多 25 个、至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个或至多 5 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合；例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合）的序列；或

(iii)与(i)所示的序列相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；以及

(b) 轻链，其包含选自下列的氨基酸序列：

(iv) 包含 SEQ ID NO:13 所示的 VL 序列和 SEQ ID NO:44 所示的 CL 序列的序列；

(v) 与(iv)所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合（例如至多 50 个、至多 45 个、至多 40 个、至多 35 个、至多 30 个、至多 25 个、至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个或至多 5 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合；例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合）的序列；或

(vi) 与(iv)所示的序列相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列。

在一些实施方案中，(ii)或(v)中所述的置换是保守置换。

在一些实施方案中，所述抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段包含：

(a) 重链，其包含选自下列的氨基酸序列：

(i) 包含 SEQ ID NO:23 所示的 VH 序列和 SEQ ID NO:43 所示的 CH 序列的序列；

(ii) 与(i)所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合（例如至多 50 个、至多 45 个、至多 40 个、至多 35 个、至多 30 个、至多 25 个、至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个或至多 5 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合；例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合）的序列；或

(iii)与(i)所示的序列相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；以及

(b) 轻链，其包含选自下列的氨基酸序列：

(iv) 包含 SEQ ID NO:33 所示的 VL 序列和 SEQ ID NO:44 所示的 CL 序列的序列；

(v) 与(iv)所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合（例如至多 50 个、至多 45 个、至多 40 个、至多 35 个、至多 30 个、至多 25 个、至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个或至多 5 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合；例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合）的序列；或

(vi) 与(iv)所示的序列相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列。

在一些实施方案中，(ii)或(v)中所述的置换是保守置换。

在一些实施方案中，所述抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段包含重链和轻链，

所述重链包含：

(i) SEQ ID NO:45 所示的序列；

(ii) 与(i)所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合（例如至多 50 个、至多 45 个、至多 40 个、至多 35 个、至多 30 个、至多 25 个、至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个或至多 5 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合；例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合）的序列；或

(iii) 与(i)所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；和

所述轻链包含：

(iv) SEQ ID NO:46 所示的序列；

(v) 与(iv)所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合（例如至多 50 个、至多 45 个、至多 40 个、至多 35 个、至多 30 个、至多 25 个、至多 20 个、至多 15 个、至多 10

个或至多 5 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合；例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合）的序列；或

(vi) 与(iv)所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列;

优选地，(ii)或(v)中所述的置换是保守置换。

在一些实施方案中，所述抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段包含重链和轻链，

所述重链包含：

(i) SEQ ID NO:47 所示的序列；

(ii) 与(i)所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合（例如至多 50 个、至多 45 个、至多 40 个、至多 35 个、至多 30 个、至多 25 个、至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个或至多 5 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合；例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合）的序列；或

(iii) 与(i)所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；和

所述轻链包含：

(iv) SEQ ID NO:48 所示的序列；

(v) 与(iv)所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合（例如至多 50 个、至多 45 个、至多 40 个、至多 35 个、至多 30 个、至多 25 个、至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个或至多 5 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合；例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合）的序列；或

(vi) 与(iv)所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；

优选地，(ii)或(v)中所述的置换是保守置换。

在一些实施方案中，所述抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段是嵌合抗体，人源化抗体或全人源抗体。

在一些实施方案中，所述抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段选自 scFv、Fab、Fab'、(Fab')2、Fv 片段、二硫键连接的 Fv(dsFv)、双抗体(diabody)。

在一些实施方案中，所述抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段是 scFv。在某些实施方案中，本公开的 scFv 包含：

(a) SEQ ID NO:3 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:13 所示序列的 VL；

(b) SEQ ID NO:23 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:33 所示序列的 VL；

(c) SEQ ID NO:3 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:33 所示序列的 VL；

(d) SEQ ID NO:23 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:13 所示序列的 VL；

(e) 重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），其中所述重链可变区（VH）和轻链可变区（VL）独立地与(a)至(d)任一组中所述的 VH 和 VL 相比分别具有至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性；或

(f) 重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），其中所述重链可变区（VH）和轻链可变区（VL）与(a)至(d)任一组中所述的 VH 和 VL 分别相比，独立地具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合（例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合）。优选地，所述的置换是保守置换。

在一些实施方案中，本公开的抗体是 scFv。在某些实施方案中，本公开的 scFv 包含：

(i) SEQ ID NO:1 或 2 所示的序列；

(ii) 与(i)所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合（例如至多 50 个、至多 45 个、至多 40 个、至多 35 个、至多 30 个、至多 25 个、至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个或至多 5 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合；例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合）的序列；或

(iii) 与(i)所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；

优选地，(ii)中所述的置换是保守置换。

在一些实施方案中，所述抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段是 scFv。在某些实施方案中，本公开的 scFv 包含 SEQ ID NO:1 或 2 所示的序列。

在一些实施方案中，所述抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段选自：1D1 抗体、1D1-01 抗体、2E3 抗体和 2E3-02 抗体。

在本公开的部分实施方案中，靶向部分为曲妥珠单抗或帕妥珠单抗（Pertuzumab）。曲妥珠单抗是抗 Her 2 的单克隆抗体，其氨基酸序列是本领域技术人员已知的，其示意性序列可参见，例如 CN103319599，末位 Lys 是容易缺失的但不影响生物活性，参见 Dick, L. W.等人，Biotechnol. Bioeng.，100: 1132-1143。

曲妥珠单抗的示例性的重链序列和轻链序列可参见例如 IMGT /mAb-DB ID 97 。帕妥珠单抗的示例性的重链序列和轻链序列可参见 US7560111 的 SEQ ID No. 16 和 SEQ ID No. 15，也可参见 IMGT /mAb-DB ID 80。

在本公开的部分实施方案中，靶向部分为抗 Her3 抗体或其抗原结合的片段。在一些实施方案中，所述抗 Her3 抗体包括所有现有技术中的抗 Her3 抗体，例如，参见抗体 barecetamab，duligotuzumab，

elgemtumab，istiratumab，lumretuzumab，patritumab，seribantumab，zenocutuzumab，202-2-1 抗体、抗体 CN 103189392 B 中重链 SEQ ID NO:10 和轻链 SEQ ID NO:14 所示的抗体和 IMGT/mAb-DB SEQ ID NO:546 所示的抗体。

在一些实施方案中，靶向部分为抗 Her3 抗体，所述抗 Her3 抗体或其抗原结合片段包含如下的互补决定区（CDR）的抗体或其抗原结合片段，其中 CDR 按 IMGT 编号系统定义：

序列为 SEQ ID NO:56 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:57 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:58 的 HCDR3；和/或，

序列为 SEQ ID NO:41 的 LCDR1，序列为 AAS 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:21 的 LCDR3。

在一些实施方案中，所述抗 Her3 抗体或其抗原结合片段，按 IMGT 编号系统定义，包含：上述含有上述重链 HCDR1，HCDR2，HCDR3 的 VH 和含有上述轻链 LCDR1，LCDR2，LCDR3 的 VL。

在一些实施方案中，所述抗 Her3 抗体或其抗原结合片段包含如下的互补决定区（CDR）的抗体或其抗原结合片段，其中 CDR 按 kabat 编号系统定义：

序列为 SEQ ID NO:53 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:54 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:55 的 HCDR3；和/或，

序列为 SEQ ID NO:59 的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO:60 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:21 的 LCDR3。

在一些实施方案中，所述抗 Her3 抗体或其抗原结合片段，按 kabat 编号系统定义，包含：上述含有上述重链 HCDR1，HCDR2，HCDR3 的 VH 和含有上述轻链 LCDR1，LCDR2，LCDR3 的 VL。

在一些实施方案中，所述抗 Her3 抗体或其抗原结合片段包含：

(a) 重链可变区（VH），其包含选自下列的氨基酸序列：

(i) SEQ ID NO:49 所示的序列；

(ii) 与 SEQ ID NO:49 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合（例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合）的序列；或

(iii) 与 SEQ ID NO:49 所示的序列相比具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；

和/或

(b) 轻链可变区（VL），其包含选自下列的氨基酸序列：

(iv) SEQ ID NO:50 所示的序列；

(v) 与 SEQ ID NO:50 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合

（例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合）的序列；或

(vi) 与 SEQ ID NO:50 所示的序列相比具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列。

在一些实施方案中，所述抗 Her3 抗体或其抗原结合片段包含：

(a) SEQ ID NO:49 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:50 所示序列的 VL；

(b) 重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），其中所述重链可变区（VH）和轻链可变区（VL）独立地与(a)组中所述的 VH 和 VL 相比分别具有至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性；或

(c) 重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），其中所述重链可变区（VH）和轻链可变区（VL）与(a)组中所述的 VH 和 VL 分别相比，独立地具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合（例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合）。优选地，所述的置换是保守置换。

在一些实施方案中，所述抗 Her3 抗体的重链包含人免疫球蛋白的重链恒定区（CH）或其变体，所述变体与其所源自的野生型序列相比具有至多 50 个氨基酸的保守置换（例如至多 45 个、至多 40 个、至多 35 个、至多 30 个、至多 25 个、至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个或至多 5 个氨基酸的保守置换；例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的保守置换）。在某些实施方案中，所述抗 B7H3 抗体轻链包含人免疫球蛋白的轻链恒定区（CL）或其变体，所述变体与其所源自的野生型序列相比具有至多 50 个氨基酸的保守置换（例如至多 45 个、至多 40 个、至多 35 个、至多 30 个、至多 25 个、至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个或至多 5 个氨基酸的保守置换；例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的保守置换）。

在一些实施方案中，恒定区被改变，例如被突变，以修饰抗 Her3 抗体分子的性质（例如改变下列中的一个或多个特性：Fc 受体结合、抗体糖基化、半胱氨酸残基的数目、效应细胞功能或补体功能）。可以通过将抗体恒定区中的至少一个氨基酸残基替换为不同残基，产生功能改变，例如，改变抗体对效应子配体（如 FcR 或补体 C1q）的亲和力，从而改变效应子功能（例如降低）。抗体的 Fc 区介导几种重要的效应子功能，例如 ADCC、吞噬作用(ADCP)、CDC 等。

在一些实施方案中，所述抗 Her3 抗体或其抗原结合片段具有重链恒定区（CH），其选自例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD 和 IgE 的重链恒定区；特别地选自例如 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 的重链恒定区，更特别地选自 IgG1（例如是人 IgG1）的重链恒定区。在一些实施方案中，本

公开的抗体或其抗原结合片段具有轻链恒定区，其选自例如 κ 或 λ 轻链恒定区，优选 κ 轻链恒定区（例如人 κ 轻链恒定区）。

在一些实施方案中，所述抗 Her3 抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO:43 所示的重链恒定区（CH）和 SEQ ID NO:44 所示的轻链恒定区（CL）。

在一些实施方案中，所述抗 Her3 抗体或其抗原结合片段包含重链和轻链，

所述重链包含：

(i) SEQ ID NO:51 所示的序列；

(ii) 与(i)所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合（例如至多 50 个、至多 45 个、至多 40 个、至多 35 个、至多 30 个、至多 25 个、至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个或至多 5 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合；例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合）的序列；或

(iii) 与(i)所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；和

所述轻链包含：

(iv) SEQ ID NO:52 所示的序列；

(v) 与(iv)所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合（例如至多 50 个、至多 45 个、至多 40 个、至多 35 个、至多 30 个、至多 25 个、至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个或至多 5 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合；例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合）的序列；或

(vi) 与(iv)所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；

优选地，(ii)或(v)中所述的置换是保守置换。

在一些实施方案中，所述抗 Her3 抗体或其抗原结合片段是嵌合抗体，人源化抗体或全人源抗体。

在一些实施方案中，所述抗 Her3 抗体或其抗原结合片段选自 scFv、Fab、Fab'、(Fab')2、Fv 片段、二硫键连接的 Fv(dsFv)、双抗体(diabody)。

在一些实施方案中，所述抗 Her3 抗体或其抗原结合片段是 scFv。在某些实施方案中，本公开的 scFv 包含：

(a) SEQ ID NO:49 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:50 所示序列的 VL；

(b) 重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），其中所述重链可变区（VH）和轻链可变区（VL）独立地与(a)组中所述的 VH 和 VL 相比分别具有至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的

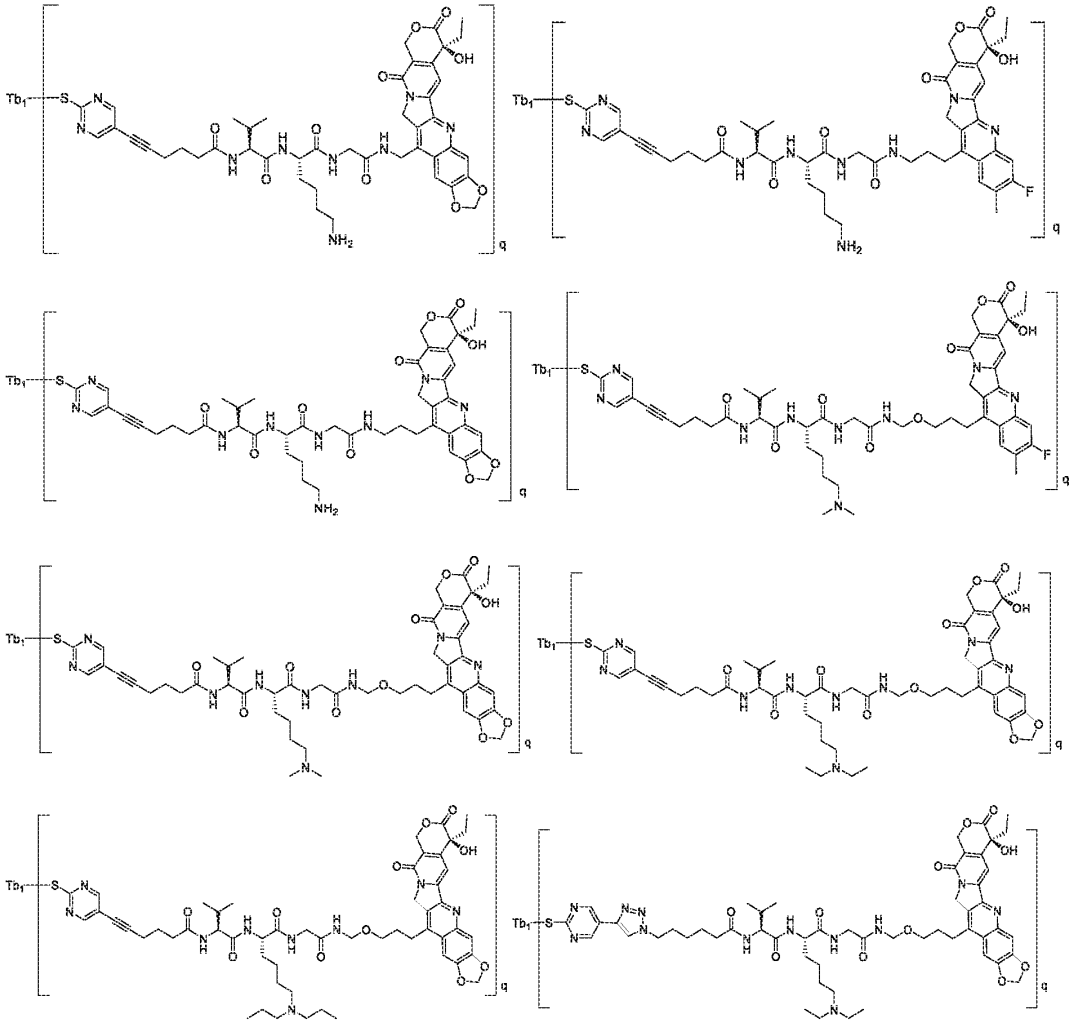
序列同一性；或

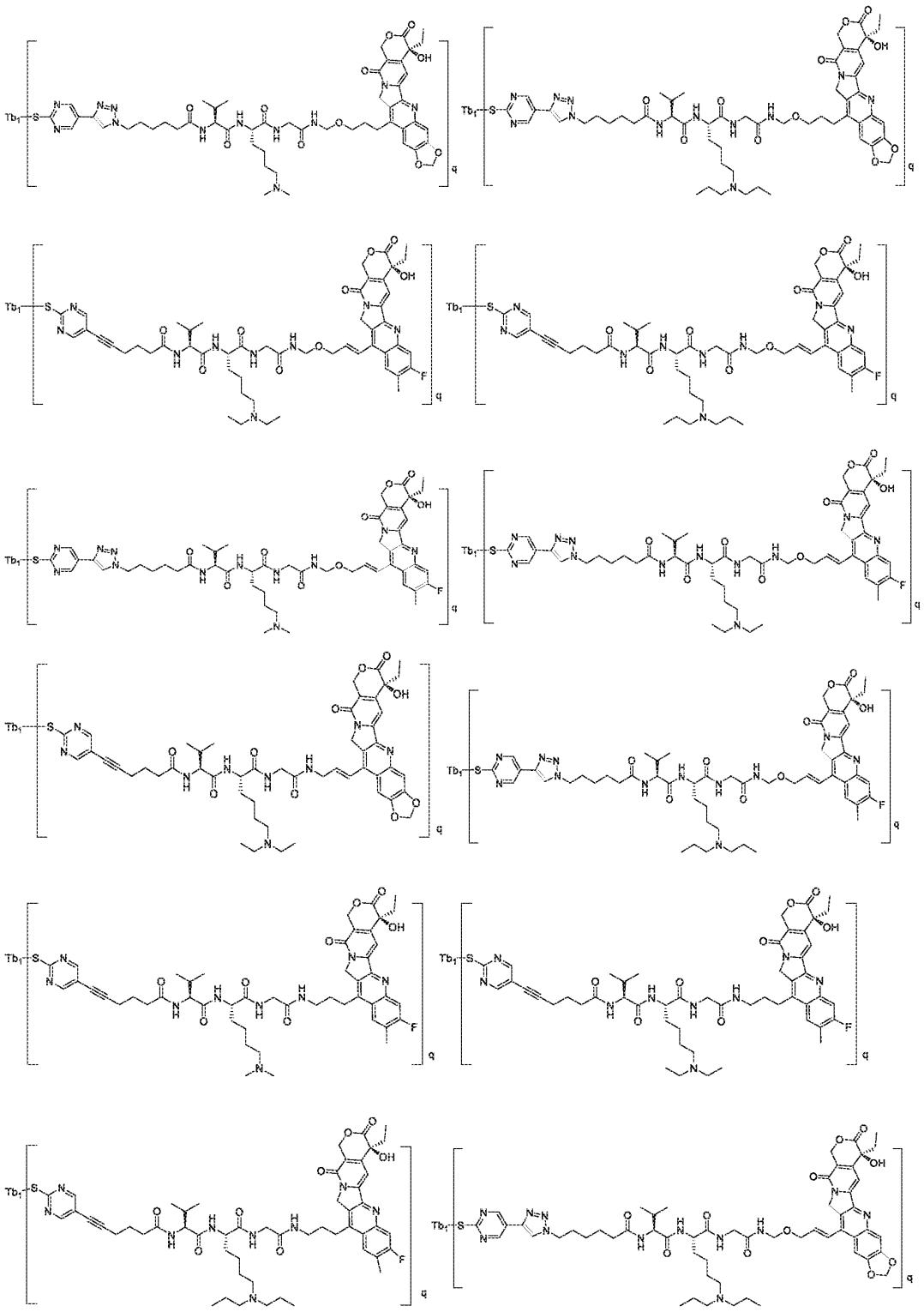
(c) 重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），其中所述重链可变区（VH）和轻链可变区（VL）与(a)组中所述的 VH 和 VL 分别相比，独立地具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合（例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合）。优选地，所述的置换是保守置换。

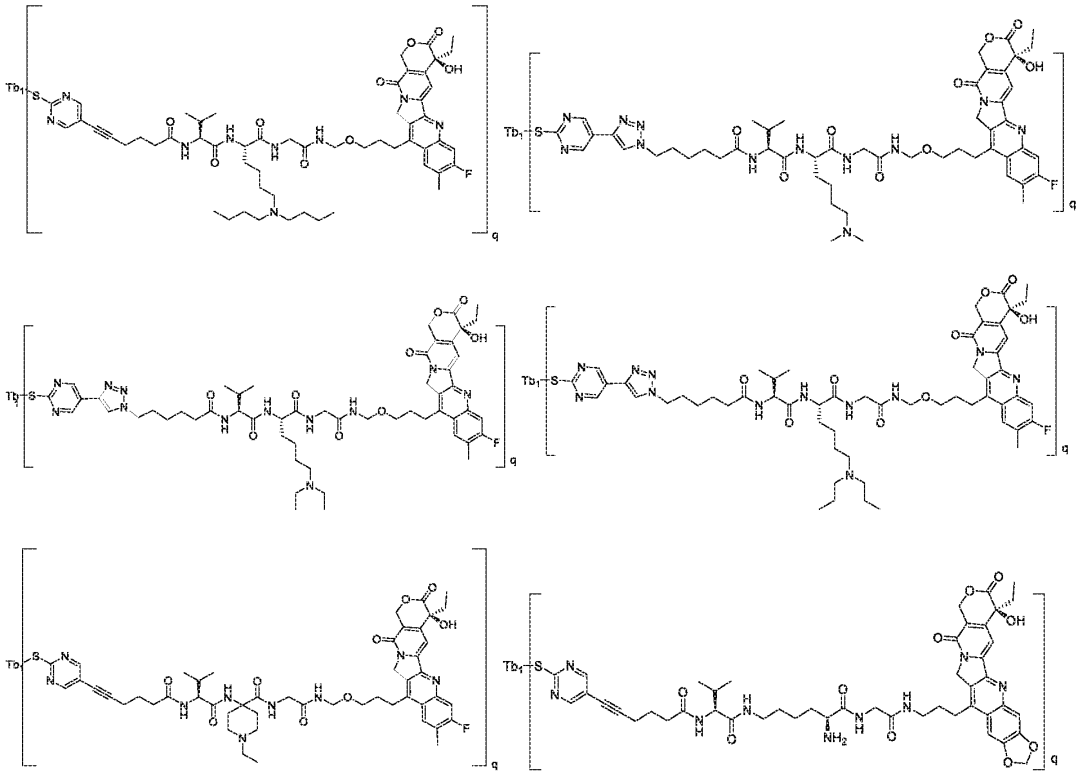
在一些实施方案中，所述抗 Her3 抗体或其抗原结合片段选自：202-2-1 抗体。

在本公开的部分实施方案中，靶向部分为西妥昔单抗（Cetuximab）。西妥昔单抗是抗 EGFR 的单克隆抗体，其氨基酸序列是本领域技术人员已知的，其示意性序列可参见，IMGT/mAb-DB ID 151 所示的抗体。

在一些实施方案中，所述配体药物偶联物选自：

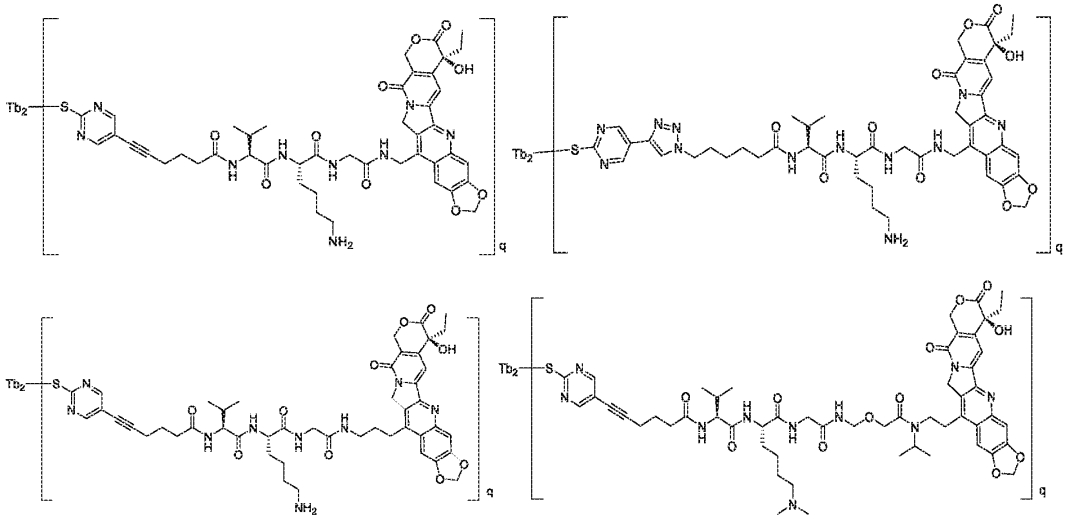


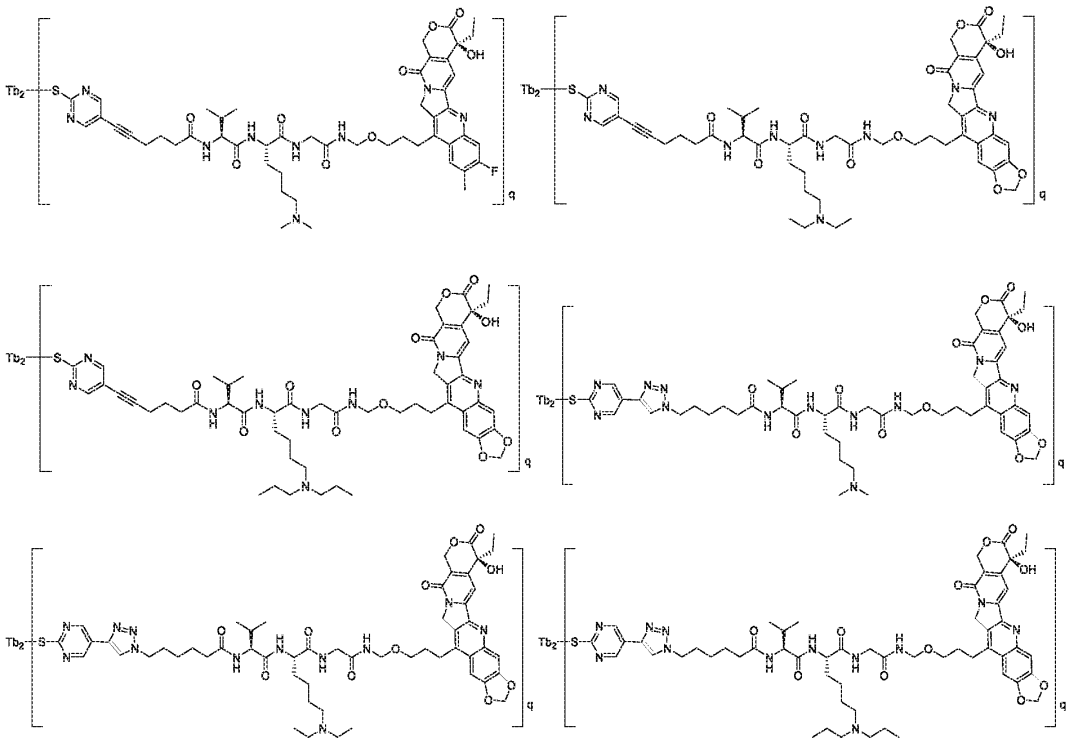




其中，Tb_1 为抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段，例如 enoblituzumab，mirzotamab， omburtamab，1D1-01，2E3-02 抗体，优选 1D1-01 或 2E3-02 抗体；q 选自 0.1-16.0 之间的任意数值，优选 2-8 之间的任意数值。在一些实施方案中，q 为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。在一些优选地实施方案中，q 为 2、4、6 或 8。

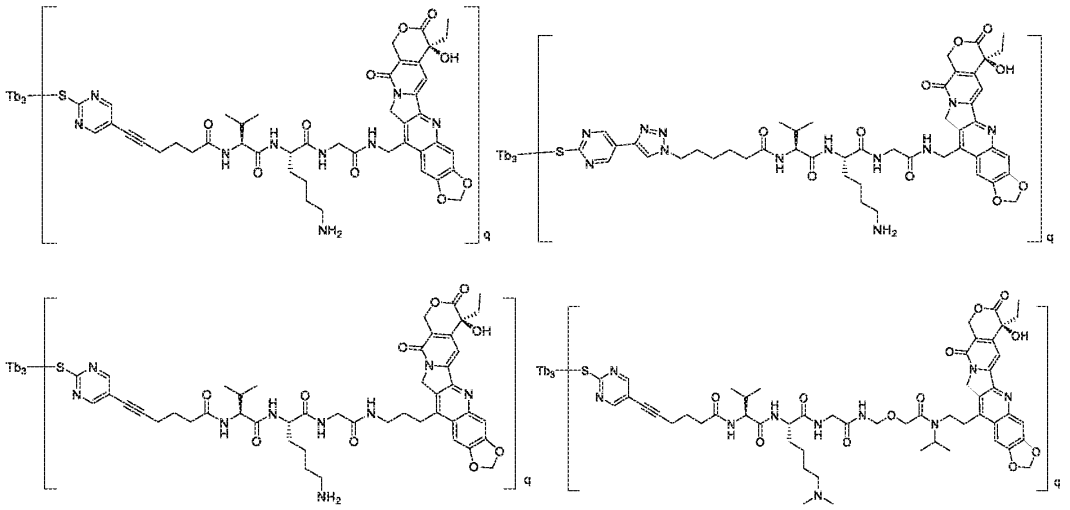
在一些实施方案中，所述配体药物偶联物选自：

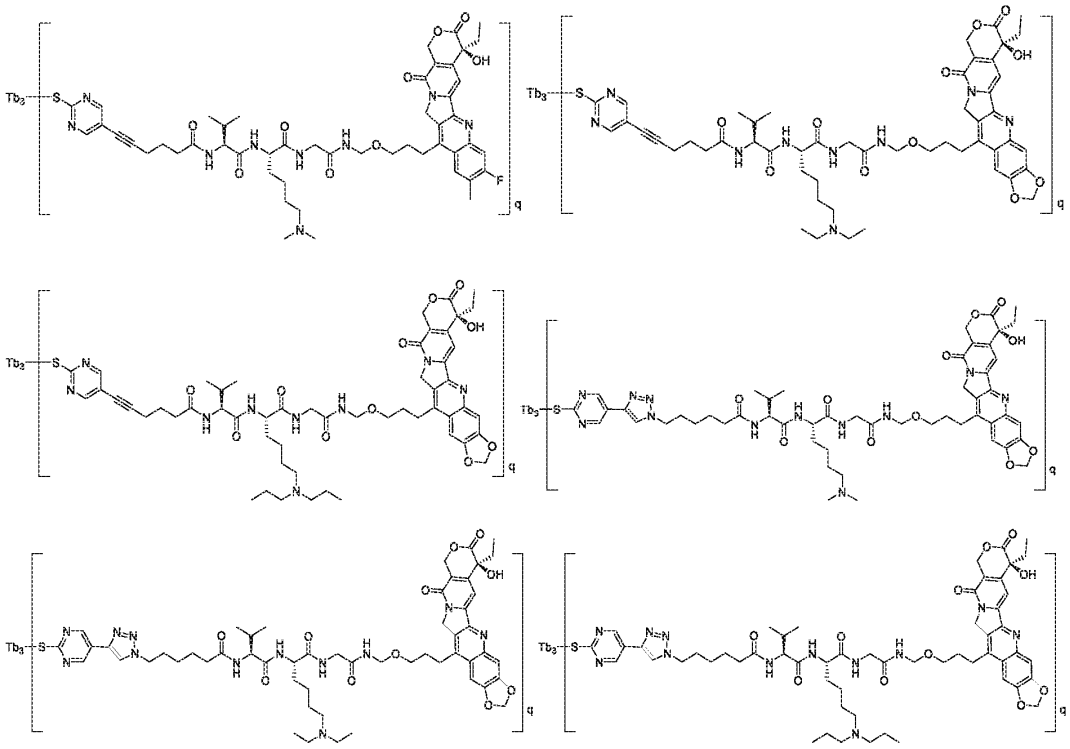




其中，Tb_2 为抗 Trop-2 抗体或其抗原结合片段，例如 datopotamab，sacituzumab，优选 sacituzumab；q 选自 0.1-16.0 之间的任意数值，优选 2-8 之间的任意数值。在一些实施方案中，q 为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。在一些优选地实施方案中，q 为 2、4、6 或 8。

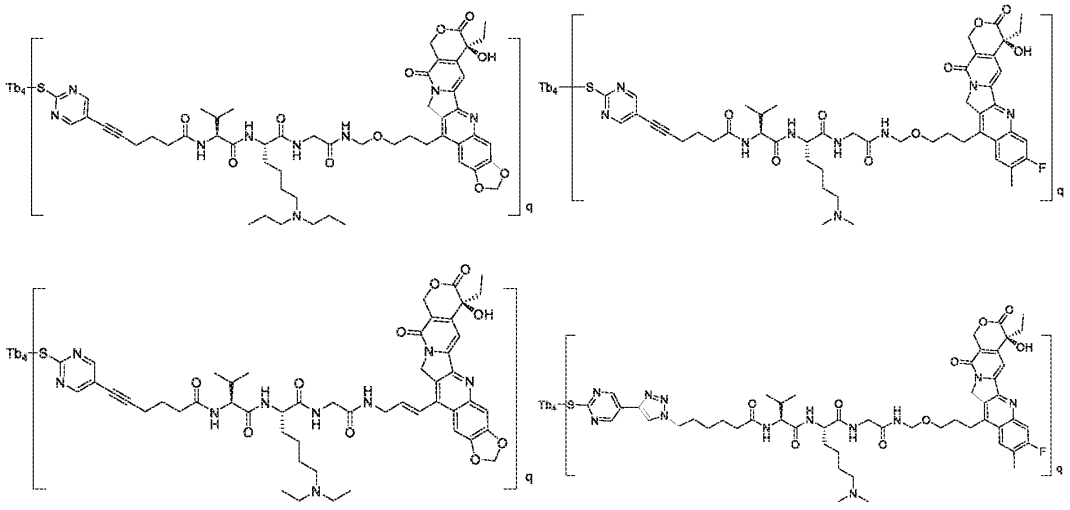
在一些实施方案中，所述配体药物偶联物选自：





其中，Tb_3为抗 Her2 抗体或其抗原结合片段，例如 anbenitamab，coprelotamab，disitamab，gancotamab，margetuximab，pertuzumab，timigutuzumab，zanidatamab，Trastuzumab，Pertuzumab，优选 Trastuzumab 或 Pertuzumab；q 选自 0.1-16.0 之间的任意数值，优选 2-8 之间的任意数值。在一些实施方案中，q 为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。在一些优选地实施方案中，q 为 2、4、6 或 8。

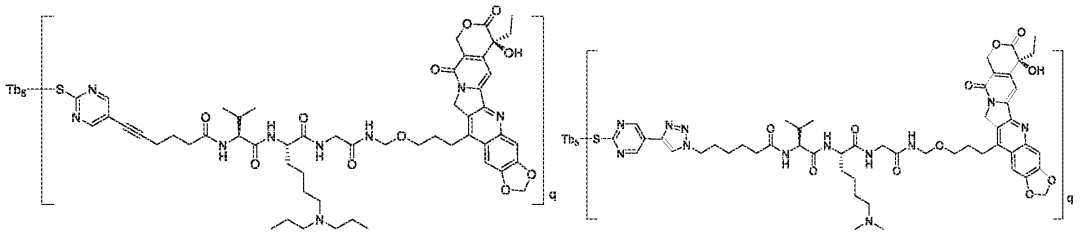
在一些实施方案中，所述配体药物偶联物选自：



其中，Tb_4为抗 Her3 抗体或其抗原结合片段，例如，抗体 barecetamab，duligotuzumab，elgemtumab，

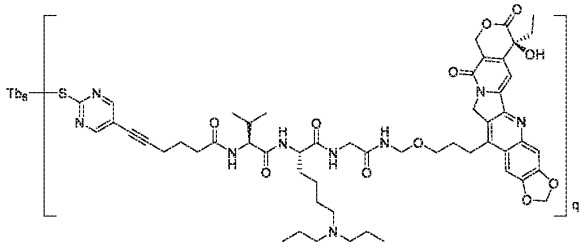
istiratumab，lumretuzumab，patritumab，seribantumab，zenocutuzumab, 202-2-1 抗体，CN 103189392 B 中重链 SEQ：10 和轻链 SEQ：14 所示的抗体，IMGT/mAb-DB ID：564 所示的抗体，202-2-1 抗体；优选 202-2-1 抗体；q 选自 0.1-16.0 之间的任意数值，优选 2-8 之间的任意数值。在一些实施方案中，q 为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。在一些优选地实施方案中，q 为 2、4、6 或 8。

在一些实施方案中，所述配体药物偶联物选自：



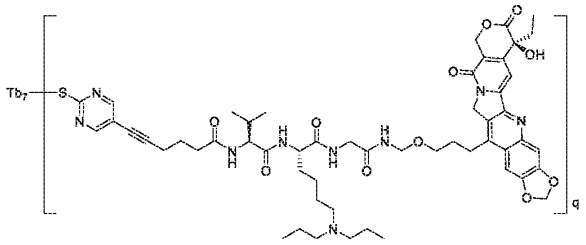
其中，Tb_5 为抗 EGFR 抗体或其抗原结合片段，例如 demupitamab，depatuxizumab，futuximab，imgatuzumab，laprituximab，losatuxizumab，matuzumab，modotuximab，necitumumab，nimotuzumab，panitumumab，pimurutamab，serclutamab，tomuzotuximab，zalutumumab，Cetuximab；优选 Cetuximab；q 选自 0.1-16.0 之间的任意数值，优选 2-8 之间的任意数值。在一些实施方案中，q 为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。在一些优选地实施方案中，q 为 2、4、6 或 8。

在一些实施方案中，所述配体药物偶联物选自：



其中，Tb_6 为无肿瘤细胞内吞活性的抗体或者结合非内吞（例如 ALCAM/CD166）抗原活性的抗体，例如：人体内没有相应细胞表面抗原的 IgG 同型抗体，抗 CD166 的抗体，优选地，为抗鸡溶菌酶人 IgG1 同型抗体；q 选自 0.1-16.0 之间的任意数值，优选 2-8 之间的任意数值。在一些实施方案中，q 为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。在一些优选地实施方案中，q 为 2、4、6 或 8。

在一些实施方案中，所述配体药物偶联物选自：



其中，Tb_7 为肿瘤细胞内吞活性较弱或无，但有肿瘤细胞表面抗原结合活性的抗体；q 选自 0.1-16.0 之间的任意数值，优选 2-8 之间的任意数值。在一些实施方案中，q 为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。在一些优选地实施方案中，q 为 2、4、6 或 8。

在一些实施方案中，所述抗体具有结合 B7H3 抗原但不具有内吞活性的抗体。比如 WO2021168379A1 的 INV721 和 I7-01。更具体的，Anti-B7H3 的抗体具有 WO2021168379A1 所述的 SEQ ID NO:2 的 VH 和 SEQ ID NO:1 的 VL。

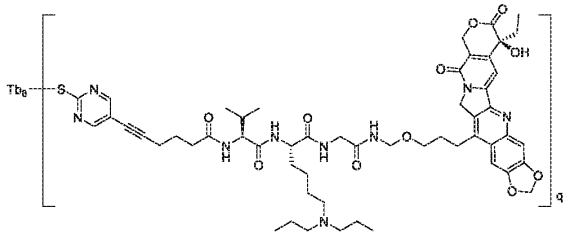
在一些实施方案中，所述抗体具有结合 GD-2 抗原但不具有内吞活性的抗体。比如 WO2021168379A1 的 INV721 和 GD2-5。更具体的，Anti- GD-2 的抗体具有 WO2021168379A1 所述的 SEQ ID NO:4 的 VH 和 SEQ ID NO:3 的 VL。

在一些实施方案中，所述抗体具有结合 HER3 抗原但不具有内吞活性的抗体，比如 US10808032B2 的 SEQ ID NO: 22 所示的 ANTI-HER3 的 21F06 抗体。

在一些实施方案中，所述抗体具有结合 CD20 抗原但不具有内吞活性的抗体。 尽管已显示所谓的"II 型"CD20 特异性抗体很难被 CD20 阳性靶细胞内化，但已发现其他所谓的"I 型"CD20 特异性抗体某种程度上被内化并降解,这取决于与其相互作用的靶细胞上激活和抑制 Fc γR 的表达水平。在一些实施方案中，所述抗体具有结合 CD20 抗原但不具有内吞活性的抗体为 II 型"CD20 特异性抗体，例如 obinutuzumab。

在一些实施方案中，所述抗体具有结合非内吞（例如 ALCAM/CD166）抗原活性的抗体。在一些实施方案中，所述抗体为包含 EP3911682A1 中 SEQ ID No:73 的 VH 和 SEQ ID No:74 的 VL, SEQ ID No:75 的 VH 和 SEQ ID No:76 的 VL, SEQ ID No:77 的 VH 和 SEQ ID No:78 的 VL, 或， SEQ ID No:79 的 VH 和 SEQ ID No:88 的 VL 所示的抗体。

在一些实施方案中，所述配体药物偶联物选自：

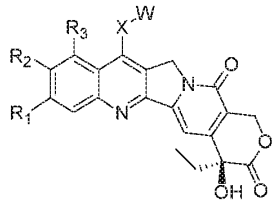


其中，Tb_8 为具有肿瘤细胞内吞活性的且有肿瘤细胞表面抗原结合活性的抗体，例如 1D1-01，2E3-02 抗体，sacituzumab，pertuzumab，Trastuzumab 或 Cetuximab 抗体；q 选自 0.1-16.0 之间的任意数值，优选 2-8 之间的任意数值。在一些实施方案中，q 为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。在一些优选地实施方案中，q 为 2、4、6 或 8。

另外，还需要说明的是，本领域技术人员可以理解的是，L 是与打开二硫键（例如，通过还原剂

TCEP 还原二硫键可以打开二硫键，生成巯基-SH）后 Tb（如抗体）自身所含有巯基进行连接，也就是说，L 与 Tb 之间的-S-并非另外再外接的硫原子。例如，其中，-S-并非另外外接的硫原子，而是打开双硫键后的 Tb 自身所含有巯基与 L 进行连接后形成的-S-。

在本公开的第二方面，本公开提供了式 II 所示化合物：



式 II

或所述化合物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐、其药学上可接受的溶剂合物或其配体药物偶联物，

其中：

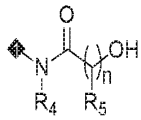
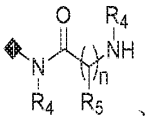
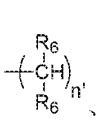
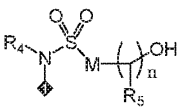
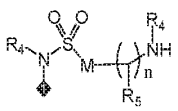
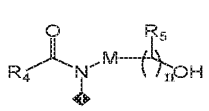
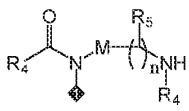
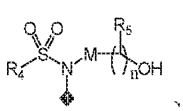
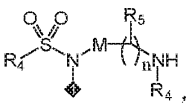
R_1、R_2 各自独立地选自 H、卤素、-OH、任选取代的 C1-6 烷基、任选取代的 C1-6 烷氧基，或者，

R_1 和 R_2 和与其相连的碳原子一起形成 5-7 元碳环或 5-7 元杂环，所述杂环含有 1 个或多个 O，S，N，羰基，亚砜基或砜基或其任意组合；

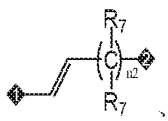
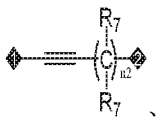
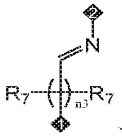
R_3 选自 H、卤素、-OH、$-NH_2$、任选取代的 C1-6 烷基、任选取代的 C1-6 烷氧基，或者，

R_3 和 X 和与其相连的碳原子一起形成 5-7 元碳环或 5-7 元杂环，所述杂环含有 1 个或多个 O，S，N，羰基，亚砜基或砜基或其任意组合；

R_3 和 R_2 和与其相连的碳原子一起形成 5-7 元碳环或 5-7 元杂环，所述杂环含有 1 个或多个 O，S，N，羰基，亚砜基或砜基或其任意组合；

W 不存在或存在，W 存在时，W 选自-OH、-SH、$-NHR_4$、  、  、  、  、  、  、  、  、  ，1 位与 X 相连；

X 选自直接键，任选取代的-O-$(CH_2)_{n3}$-、-N(R_4)-$(CH_2)_{n3}$-、-S-$(CH_2)_{n3}$-、羰基-$(CH_2)_{n3}$-、-SO_2-$(CH_2)_{n3}$-、

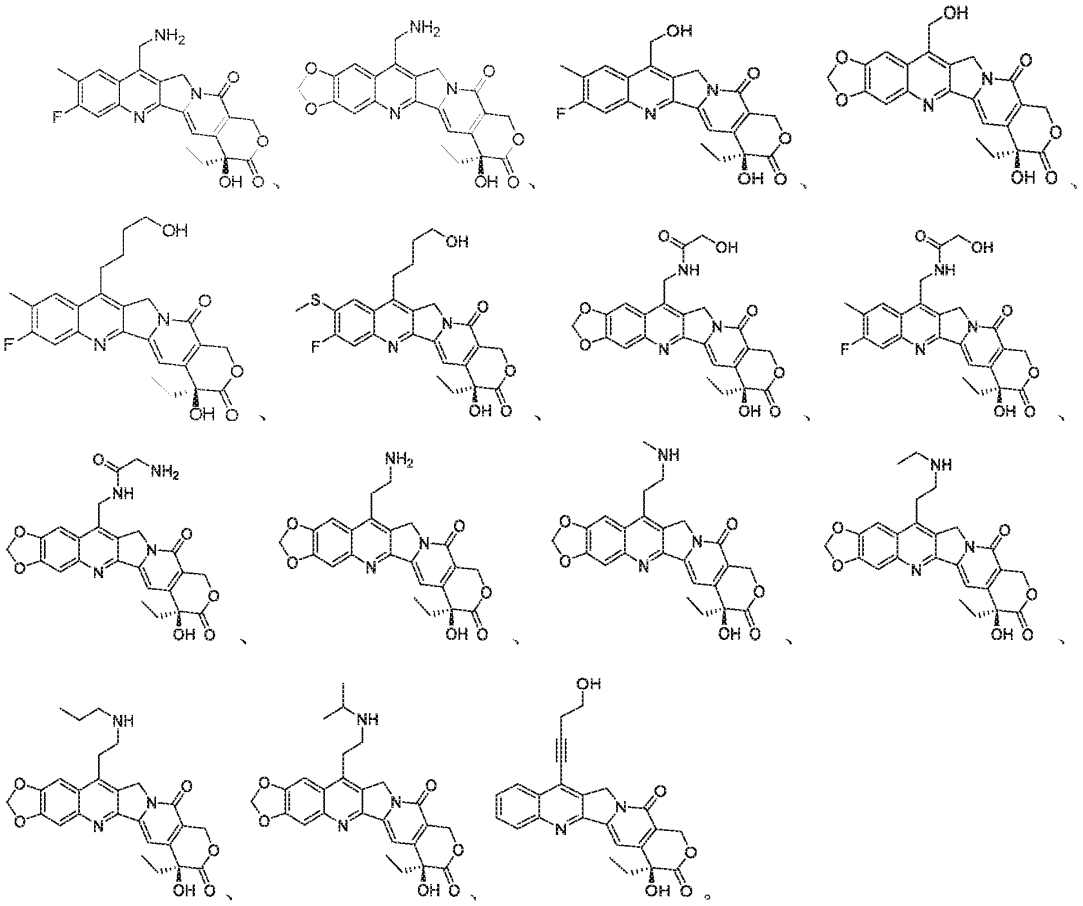
-$(CH_2)_{n1}$-、  、  、  、C3-6 环烷基、C6-10 芳基、5-10 元杂芳基和 4-10 元杂环基，1 位和母环相连，2 位和 W 相连；所述取代基选自一个或多个 C1-4 烷基、C3-6 环烷基，或者多个 C1-4 烷基和与它们同时相连的碳原子一起形成 C3-6 环烷基；

各 M 独立地选自直接键、-$CR^{5a}R^{5b}$-；

R_4、R_5、R^{5a}、R^{5b}、R_6、R^7 各自独立地选自 H、任选取代的 C1-4 烷基、任选取代的 C1-4 烷氧基、任选取代的 C3-6 环烷基；

n、n'、n1、n2、n3 各自独立地选自 0 到 6 之间的任意整数；

其中，当 R_1、R_2 同时为 H，且 X 为-$(CH_2)_{n1}$-时，n1 为 1、2、3、4 时，W 不为-OH 或-NHR_4；且式 II 所示化合物不包含

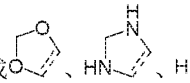


在一些实施方案中，R_1 和 R_2 各自独立地选自 H、卤素或 C1-4 烷基。

在一些实施方案中，R_1 和 R_2 和与其相连的碳原子一起形成 5-6 元杂环，所述杂环含有 1 个、2 个

或3个O，S或N或其任意组合。

在一些实施方案中，R_1选自H和卤素，R_2选自H和C1-4烷基。

在一些实施方案中，R_1和R_2和与其相连的碳原子形成  ，虚线表示所述杂环与苯环稠合的位置。

在一些实施方案中，R_1为H或F，R_2为H或甲基。

在一些实施方案中，R_1和R_2和与其相连的碳原子一起形成  。

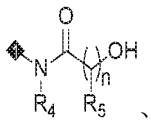
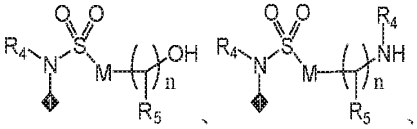
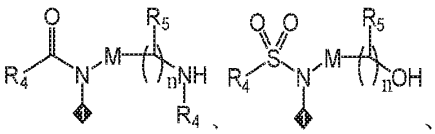
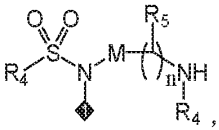
在一些实施方案中，R_1为F，R_2为甲基；或R_1和R_2和与其相连的碳原子一起形成  。

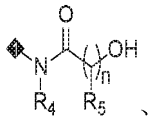
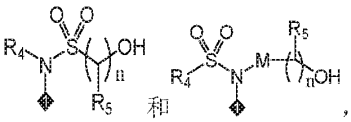
在一些实施方案中，R_1为F，R_2为甲基。

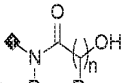
在一些实施方案中，R_1和R_2和与其相连的碳原子一起形成  。

在一些实施方案中，R_3选自H和C1-4烷基。

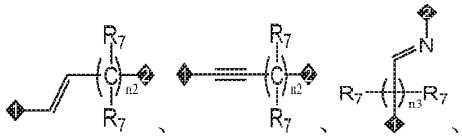
在一些实施方案中，R_3为H。

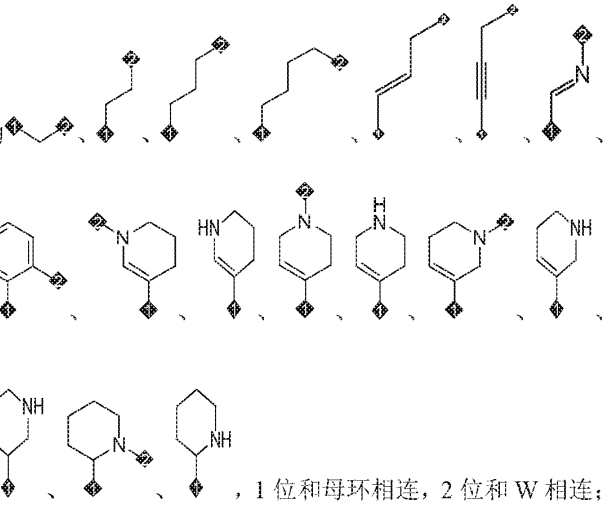
在一些实施方案中，W不存在或存在，W存在时，W选自-OH、-SH、-NHR$_4$、  、  、  、  ，1位与X相连。

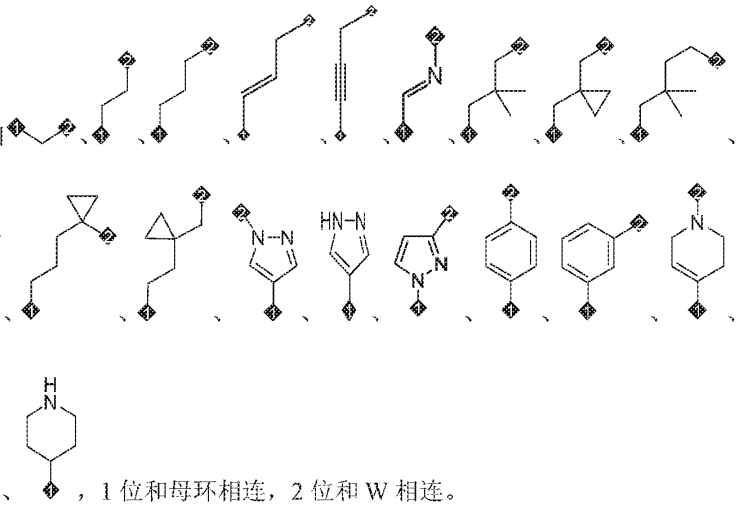
在一些实施方案中，W不存在或存在，W存在时，W选自-OH、-SH、-NHR$_4$、  、  ，1位与X相连。

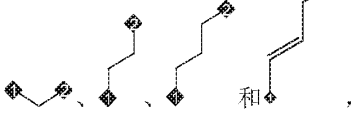
在一些实施方案中，W选自-OH、-NHR$_4$和  ，1位与X相连。

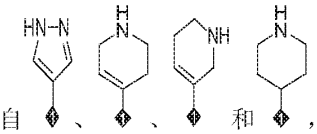
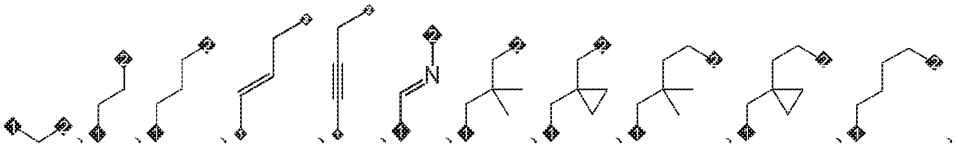
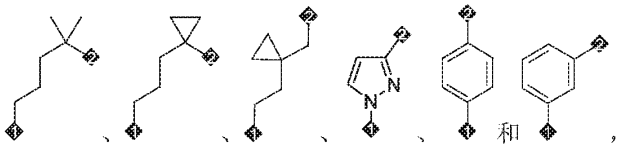
在一些实施方案中，W选自-OH和-NHR$_4$，1位与X相连。

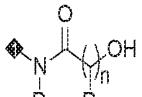
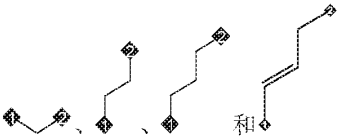
在一些实施方案中，X 选自任选取代的-$(CH_2)_{n1}$-、  、C6-10 芳基、5-10 元杂芳基和 4-10 元杂环基，1 位和母环相连，2 位和 W 相连；所述取代基选自 1 个或 2 个 C1-4 烷基，或者 2 个 C1-4 烷基和与它们同时相连的碳原子一起形成 C3-6 环烷基。

在一些实施方案中，X 选自任选取代的  ，1 位和母环相连，2 位和 W 相连；所述取代基选自 1 个或 2 个 C1-4 烷基（如甲基），或者 2 个 C1-4 烷基（如甲基）和与它们同时相连的碳原子一起形成 C3-6 环烷基（如环丙基）。

在一些实施方案中，X 选自  ，1 位和母环相连，2 位和 W 相连。

在一些实施方案中，X 选自  ，1 位和母环相连，2 位和 W 相连。

在一些实施方案中，W 不存在时，X 选自  、、和，1 位和母环相连；W 存在时，X 选自  、  和，1 位和母环相连，2 位和 W 相连。

在一些实施方案中，W 选自-OH、-NHR$_4$和  ，1 位 X 相连，2 位与 L$_4$或 L$_3$相连；X 选自  和，1 位和母环相连，2 位和 W 相连。在一些实施方案中，R$_4$和 R$_5$各自独立地选自 H、C1-4 烷基和 C3-6 环烷基。

在一些实施方案中，各 R$_4$独立地选自 H、C1-4 烷基和 C3-6 环烷基，R$_5$为 H。

在一些实施方案中，各 R$_4$独立地选自 H、甲基、乙基、异丙基、正丙基、叔丁基和环丙基，R$_5$为 H。

在一些实施方案中，R^{5a}和 R^{5b}各自独立地选自 H 和 C1-4 烷基；

在一些实施方案中，R^{5a}和 R^{5b}各自独立地选自 H 和甲基；

在一些实施方案中，各 R^{7}独立地选自 H 和 C1-4 烷基；

在一些实施方案中，R^{7}为 H。

在一些实施方案中，n 为 1、2 或 3。

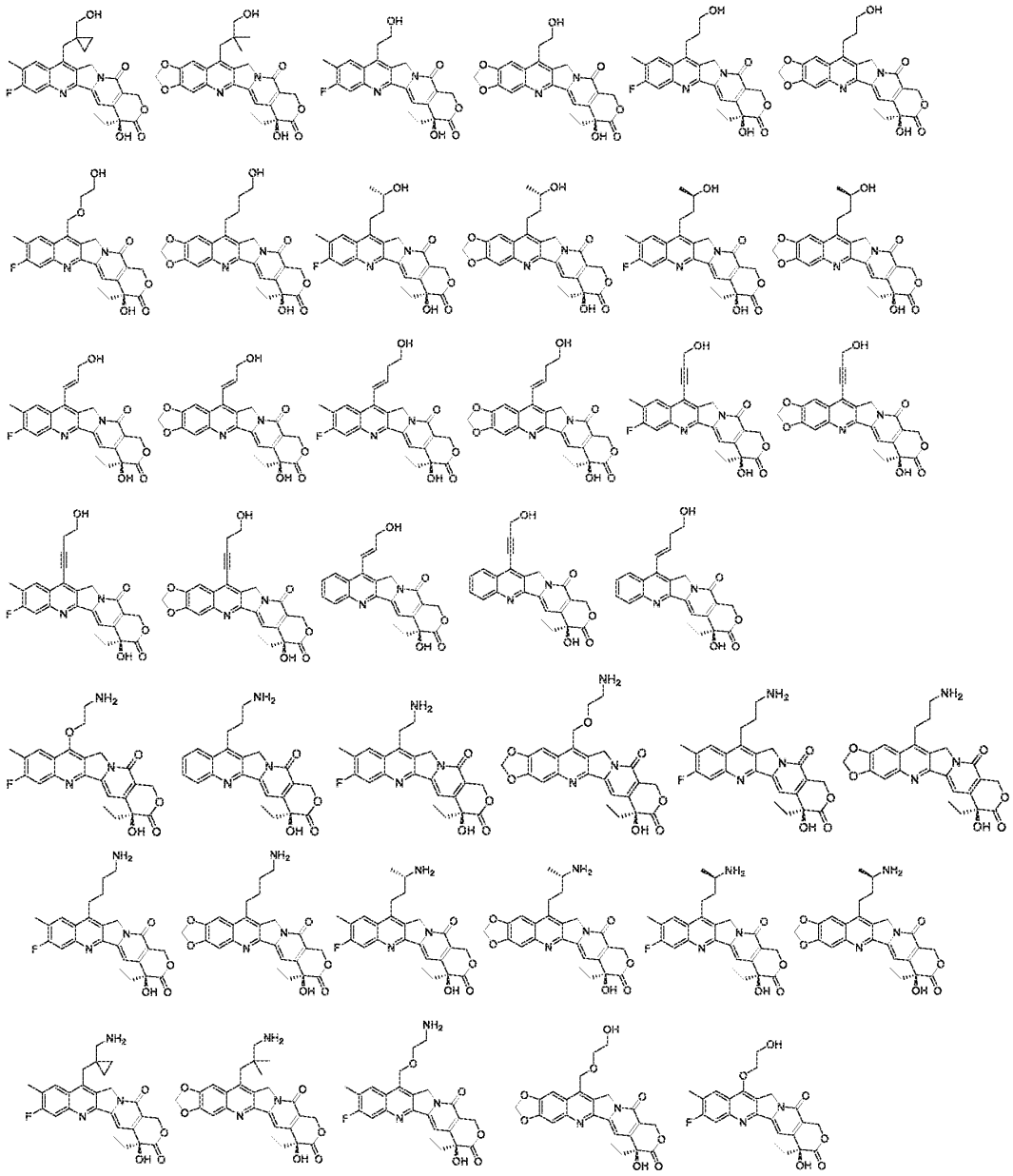
在一些实施方案中，n 为 1。

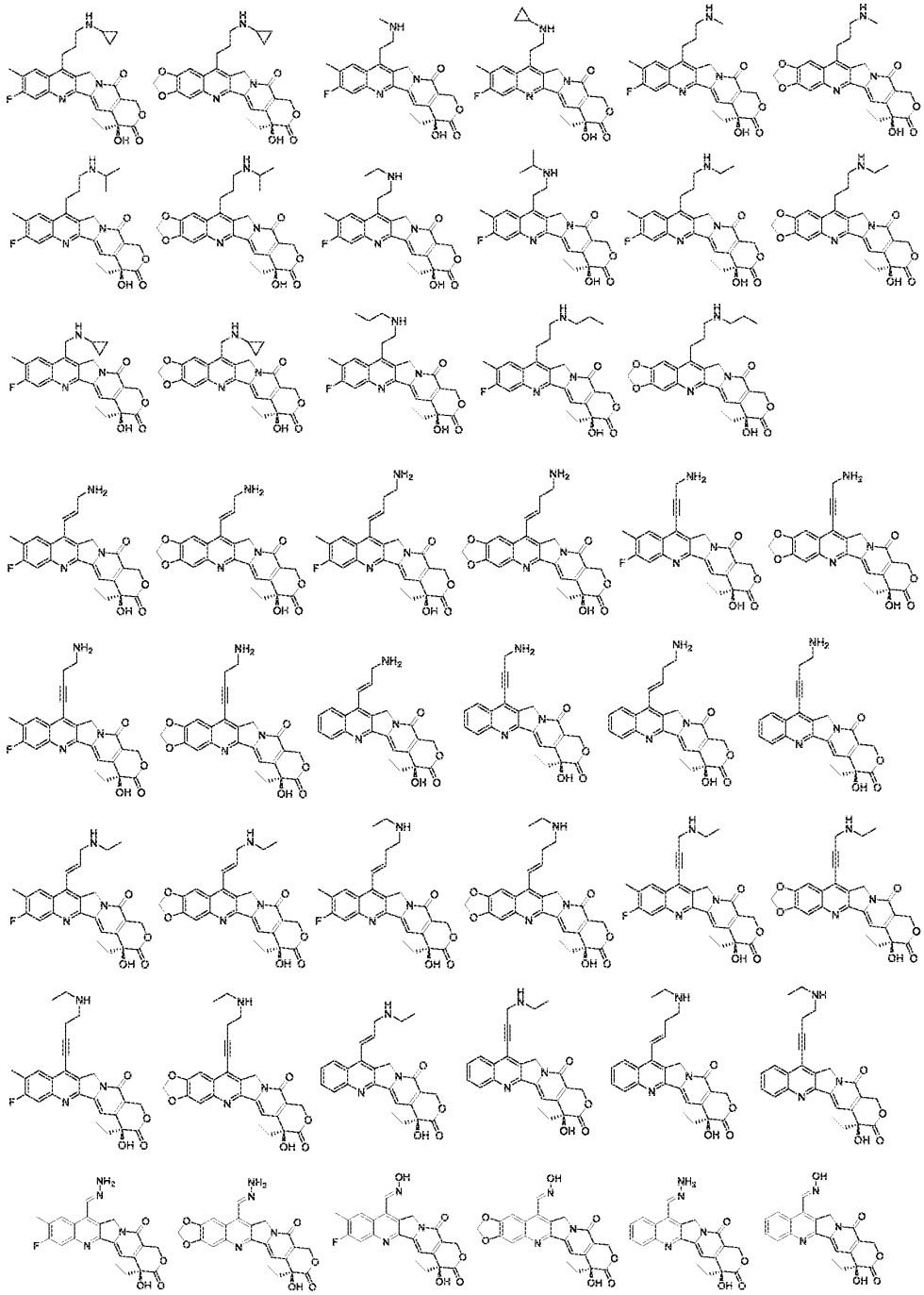
在一些实施方案中，n1 为 1、2、3 或 4。

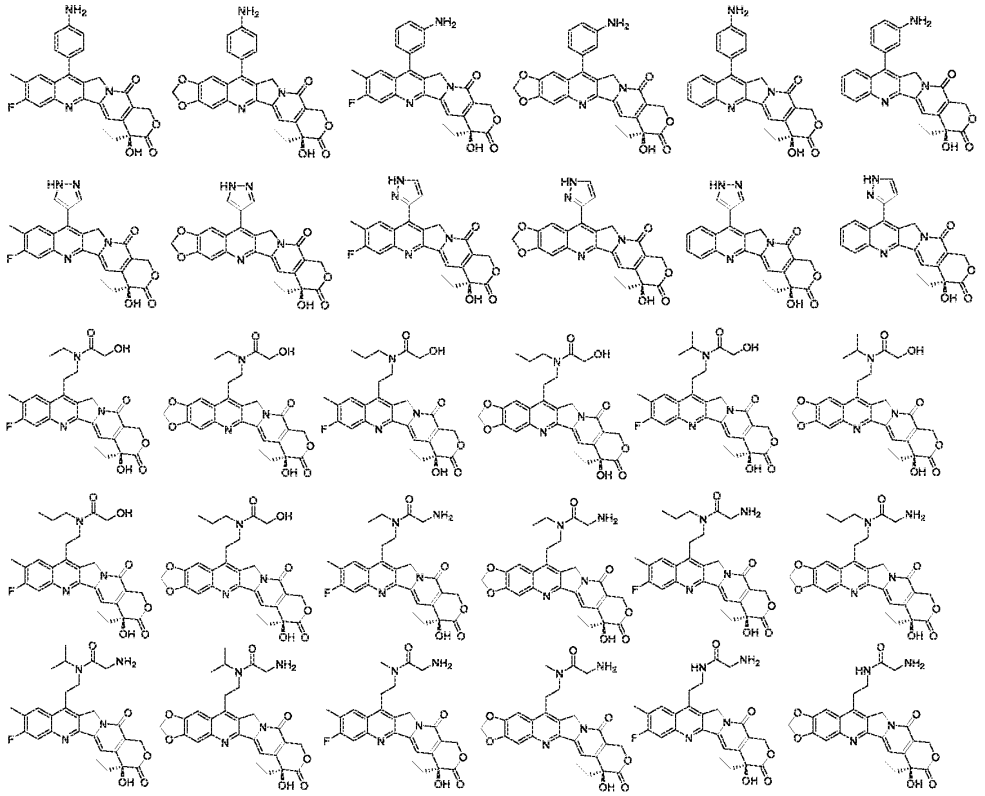
在一些实施方案中，n2 为 1；

在一些实施方案中，n3 为 0。

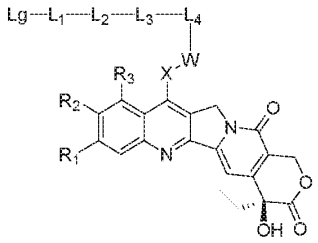
在一些实施方案中，式 II 所示化合物选自以下任一化合物：







在本公开的第三方面，本公开提供了式 III 所示的药物连接体偶联物，



式 III

或所述药物连接体偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，

其中：

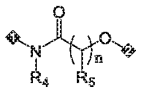
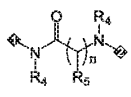
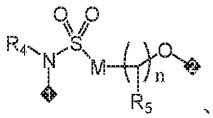
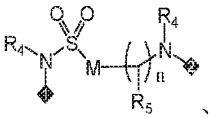
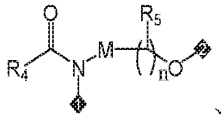
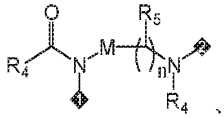
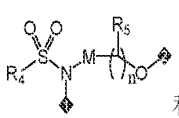
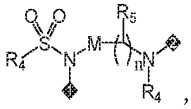
R_1 和 R_2 各自独立地选自 H、卤素、-OH、任选取代的 C1-6 烷基或任选取代的 C1-6 烷氧基，或者，

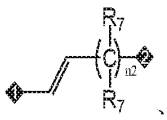
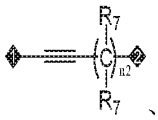
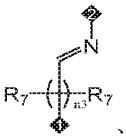
R_1 和 R_2 和与其相连的碳原子一起形成 5-7 元碳环或 5-7 元杂环，所述杂环含有 1 个或多个 O，S，N，羰基，亚砜基或砜基或其任意组合；

R_3 选自 H、卤素、-OH、$-NH_2$、任选取代的 C1-6 烷基和任选取代的 C1-6 烷氧基，或者，

R_3 和 X 和与其相连的碳原子一起形成 5-7 元碳环或 5-7 元杂环，所述杂环含有 1 个或多个 O，S，N，羰基，亚砜基或砜基或其任意组合，或者，

R_3 和 R_2 和与其相连的碳原子一起形成 5-7 元碳环或 5-7 元杂环，所述杂环含有 1 个或多个 O，S，N，羰基，亚砜基或砜基或其任意组合；

W 不存在或存在，W 存在时，W 选自-O-、-S-、-NR_4-、  、  、  、  、  、  、  、  和  ，1 位与 X 相连，2 位与 L_4 或 L_3 相连；

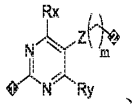
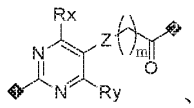
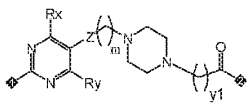
X 选自直接键，任选取代的-O-$(CH_2)_{n3}$-、-N(R_4)-$(CH_2)_{n3}$-、-S-$(CH_2)_{n3}$-、羰基-$(CH_2)_{n3}$、-SO_2-$(CH_2)_{n3}$-、  、  、  、-$(CH_2)_{n1}$-、C3-6 环烷基、C6-10 芳基、5-10 元杂芳基和 4-10 元杂环基，1 位和母环相连，2 位和 W 或 L_4 相连；所述取代基选自一个或多个 C1-4 烷基、C3-6 环烷基，或者多个 C1-4 烷基和与它们同时相连的碳原子一起形成 C3-6 环烷基；

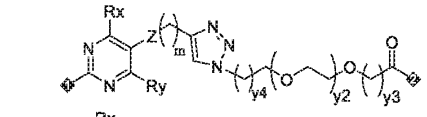
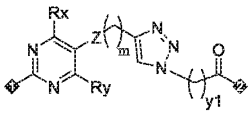
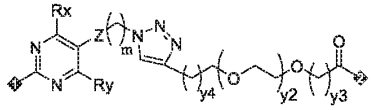
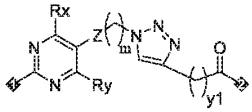
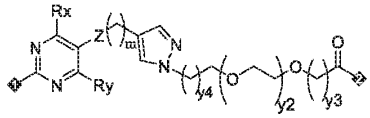
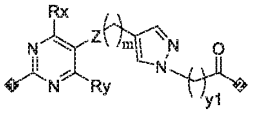
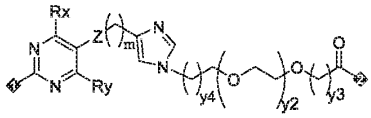
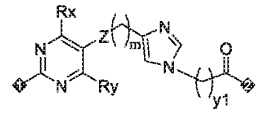
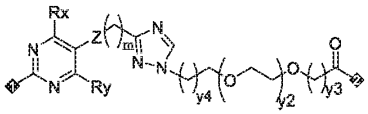
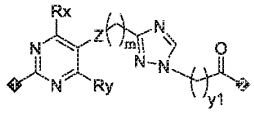
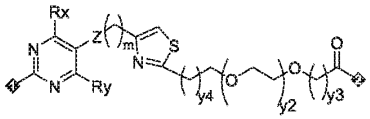
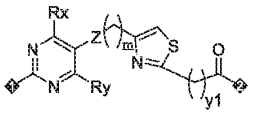
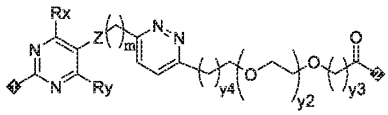
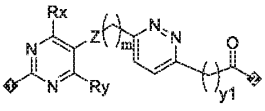
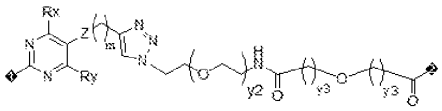
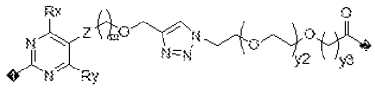
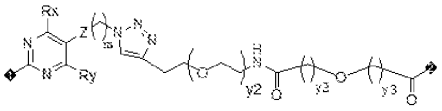
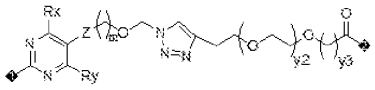
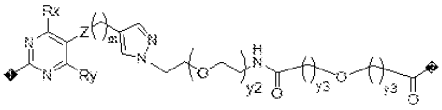
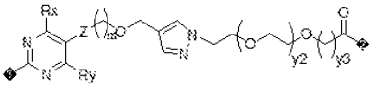
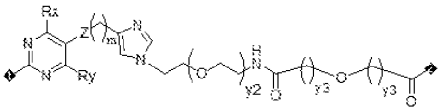
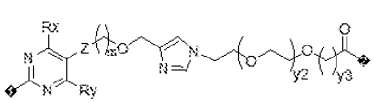
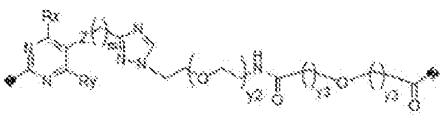
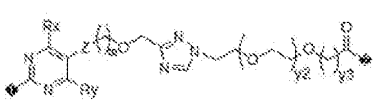
各 M 独立地选自直接键、-$CR^{5a}R^{5b}$-；

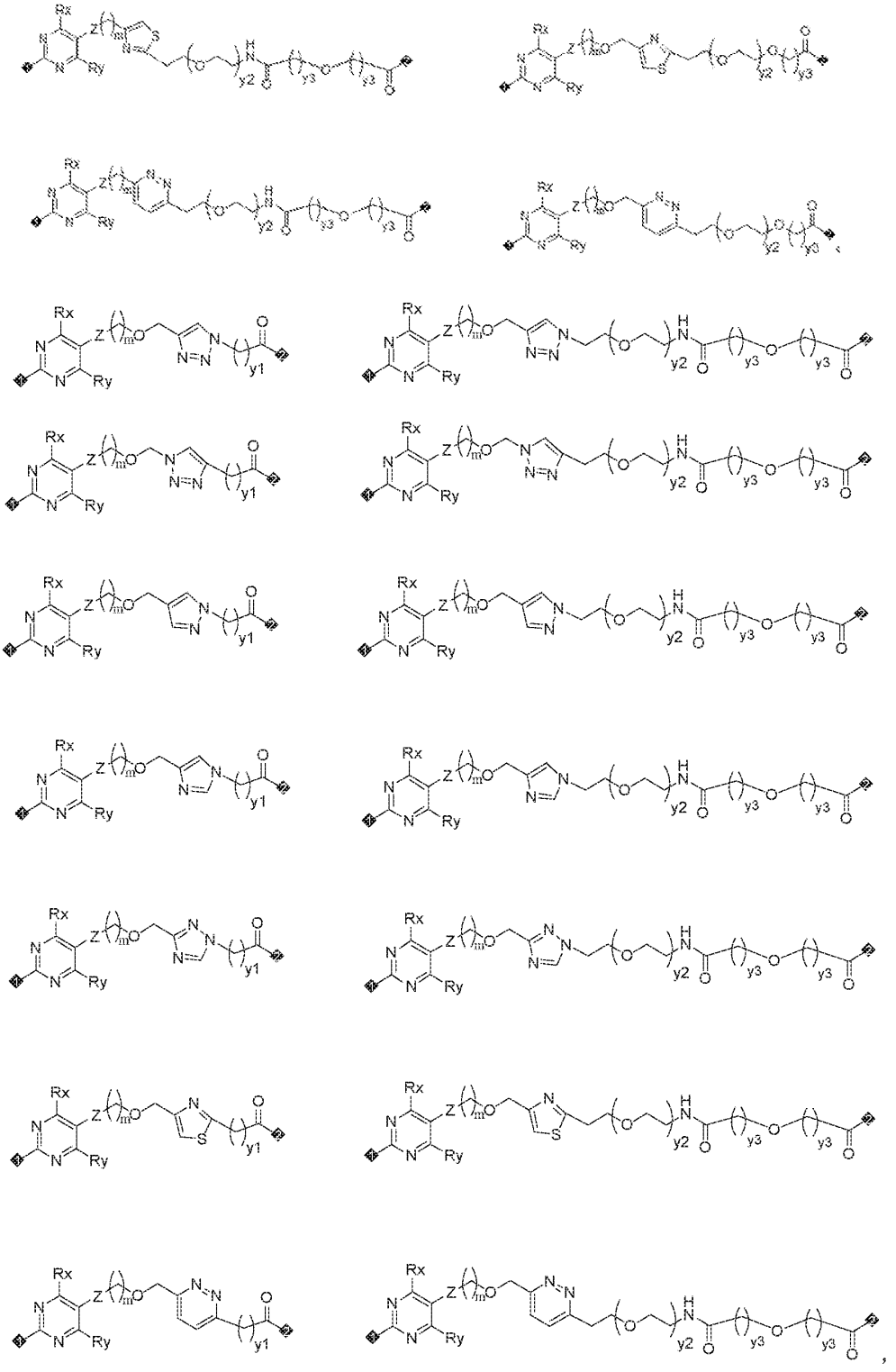
R_4、R_5、R^{5a}、R^{5b}、R_6 和 R_7 各自独立地选自 H、任选取代的 C1-4 烷基、任选取代的 C1-4 烷氧基和任选取代的 C3-6 环烷基；

n、n'、n1、n2、n3 各自独立地选自 0 到 6 之间的任意整数；

L_1 选自：

 、  、  、

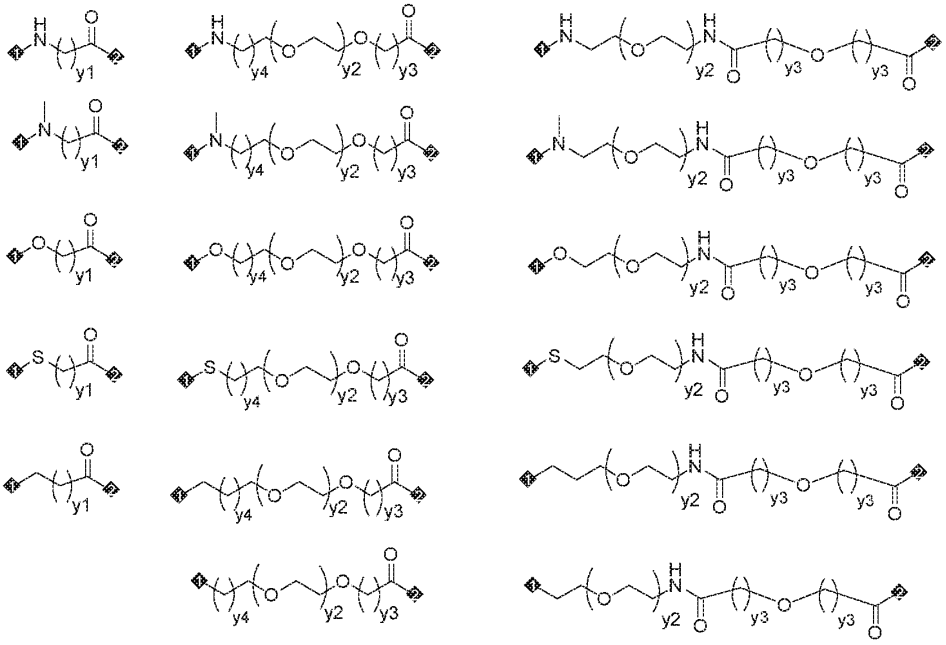

























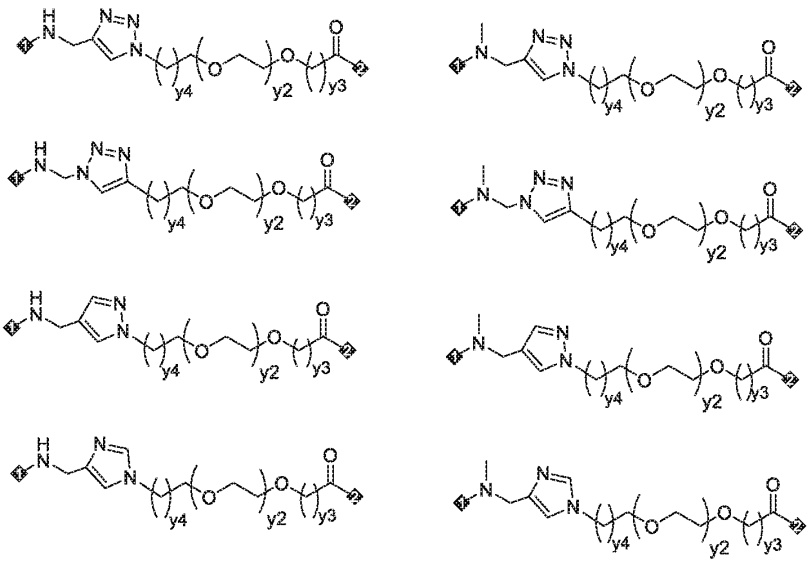


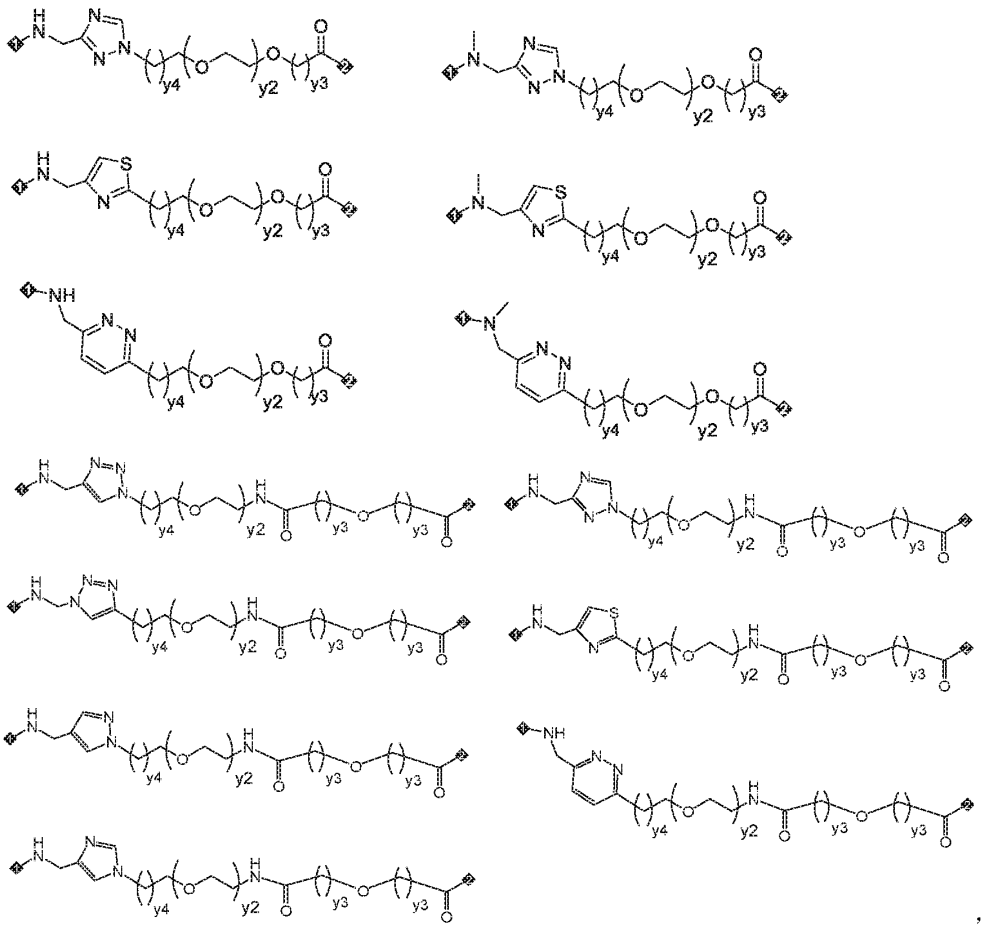
各 Z 独立地选自直接键、碳碳三键、碳碳双键、C6-10 芳基、5-10 元杂芳基、酰胺基、磺酰胺基、

亚胺基、CF_2，Rx、Ry 各自独立地选自 H、C1-4 烷基，各 m 独立地选自 0、1、2、3、4、5、6，y1、y2、y3、y4 各自独立地选自 0-20 之间的任意整数，1 位与 Lg 相连，2 位与 L_2 或 L_3 相连；

L_2 不存在或存在，L_2 存在时，L_2 选自：

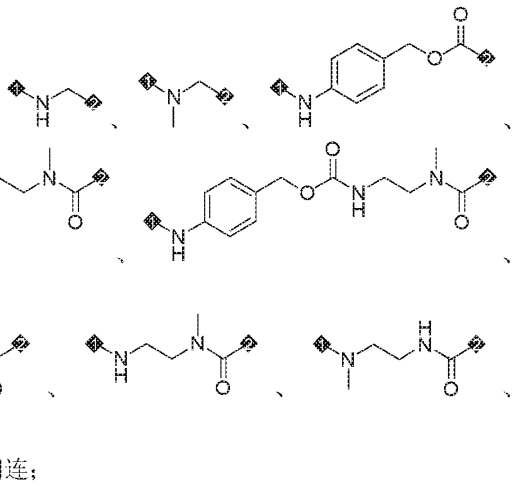






y1、y2、y3、y4 各自独立地选自 0-20 之间的任意整数，1 位与 L_1 相连，2 位与 L_3 相连；

L_3 选自氨基酸残基或由 2-10 个氨基酸残基组成的短肽；

L_4 不存在或存在，L_4 存在时，L_4 选自  ，1 位与 L_3 相连，2 位与 W 或 X 相连；

Lg 为离去基团，Lg 选自卤素、砜基、三级胺盐基（Me_3N^+、Et_3N^+）、重氮盐基、-OMs、$MeSO_2$-、

CF_3SO_3-。

在一些实施方案中，R_1、R_2各自独立地选自 H、卤素、C1-4 烷基。

在一些实施方案中，R_1和 R_2和与其相连的碳原子一起形成 5-6 元杂环，所述杂环含有 1 个、2 个或 3 个 O，S 或 N 或其任意组合。

在一些实施方案中，R_1选自 H、卤素，R_2选自 H、C1-4 烷基。

在一些实施方案中，R_1和 R_2和与其相连的碳原子形成  、  、  或，虚线表示所述杂环与苯环稠合的位置。

在一些实施方案中，R_1为 H 或 F，R_2为 H 或甲基。

在一些实施方案中，R_1为 F，R_2为甲基或 R_1和 R_2和与其相连的碳原子一起形成  。

在一些实施方案中，R_1为 F，R_2为甲基。

在一些实施方案中，R_1和 R_2和与其相连的碳原子一起形成  。

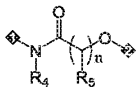
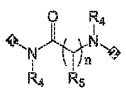
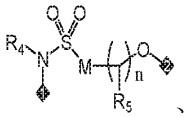
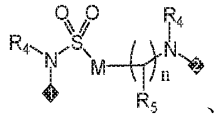
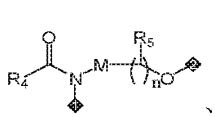
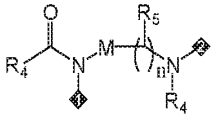
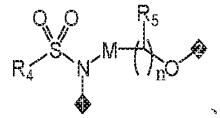
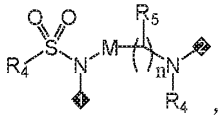
在一些实施方案中，R_3选自 H、C1-4 烷基。

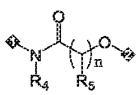
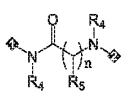
在一些实施方案中，R_3和 X 和与其相连的碳原子一起形成 5-6 元碳环。

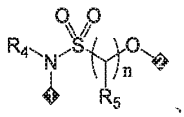
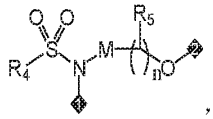
在一些实施方案中，R_3为 H 或 R_3和 X 和与其相连的碳原子一起形成  ，虚线表示所述碳环与苯环和吡啶环稠合的位置。

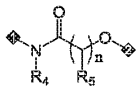
在一些实施方案中，R_3为 H。

在一些实施方案中，R_3和 X 和与其相连的碳原子一起形成  ，虚线表示所述碳环与苯环和吡啶环稠合的位置。

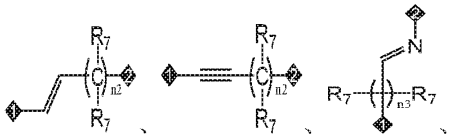
在一些实施方案中，W 不存在或存在，W 存在时，W 选自-O-、-S-、-NR_4-、  、  、  、  、  、  、  、  ，1 位与 X 相连，2 位与 L_4或 L_3相连。

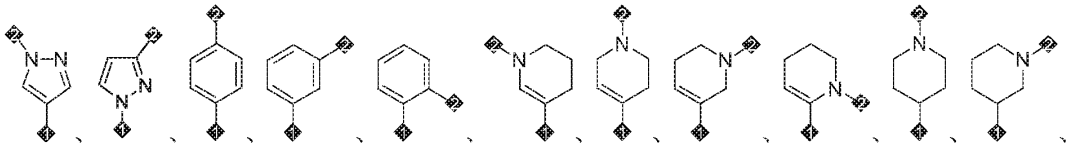
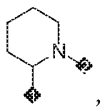
在一些实施方案中，W 不存在或存在，W 存在时，W 选自-O-、-S-、-NR_4-、  、  、

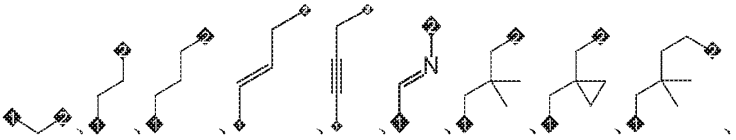
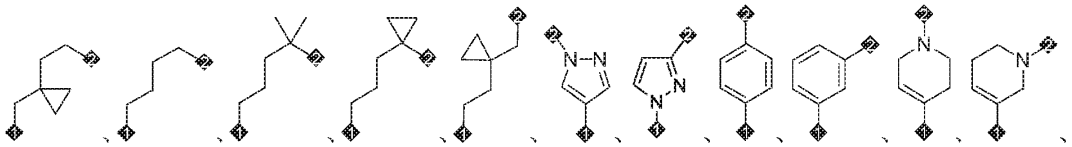

、  ，1 位与 X 相连，2 位与 L_4 或 L_3 相连。

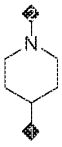
在一些实施方案中，W 选自-O-、-NR_4-、  ，1 位 X 相连，2 位与 L_4 或 L_3 相连。

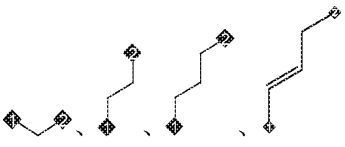
在一些实施方案中，W 选自-O-、-NR_4-，1 位 X 相连，2 位与 L_4 或 L_3 相连。

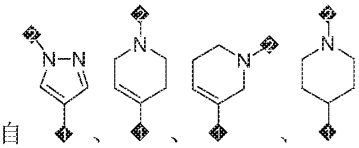
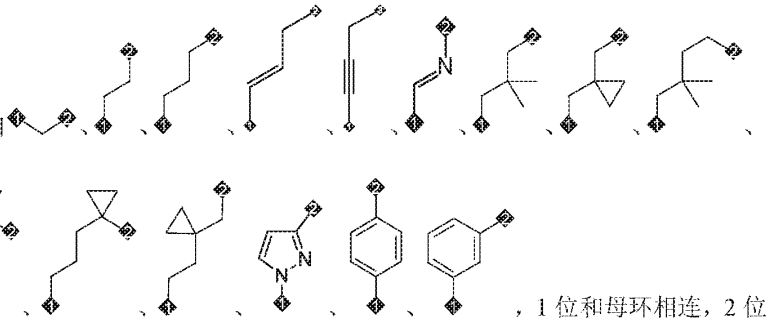
在一些实施方案中，X 选自任选取代的-$(CH_2)_{m1}$-、  、C6-10 芳基、5-10 元杂芳基和 4-10 元杂环基，1 位和母环相连，2 位和 W 或 L_4 相连；所述取代基选自 1 个或 2 个 C1-4 烷基，或者 2 个 C1-4 烷基和与它们同时相连的碳原子一起形成 C3-6 环烷基。

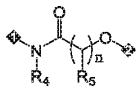
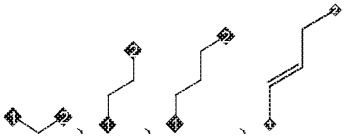
在一些实施方案中，X 选自任选取代的 

 ，1 位和母环相连，2 位和 W 或 L_4 相连；所述取代基选自 1 个或 2 个 C1-4 烷基（如甲基），或者 2 个 C1-4 烷基（如甲基）和与它们同时相连的碳原子一起形成 C3-6 环烷基（如环丙基）。

在一些实施方案中，X 选自 


 ，1 位和母环相连，2 位和 W 或 L_4 相连。

在一些实施方案中，X 选自  ，1 位和母环相连，2 位和 W 相连。

在一些实施方案中，W 不存在时，X 选自  ，1 位和母环相连，2 位和 L_4 相连；W 存在时，X 选自  ，1 位和母环相连，2 位和 W 相连。

在一些实施方案中，W 选自-O-、-NR_4-、  ，1 位 X 相连，2 位与 L_4 或 L_3 相连；X 选自  ，1 位和母环相连，2 位和 W 相连。

在一些实施方案中，R_4、R_5 各自独立地选自 H、C1-4 烷基、C3-6 环烷基。

在一些实施方案中，各 R_4 独立地选自 H、C1-4 烷基、C3-6 环烷基，R_5 为 H。

在一些实施方案中，各 R_4 独立地选自 H、甲基、乙基、正丙基、异丙基、叔丁基、环丙基，R_5 为 H。

在一些实施方案中，R^{5a}、R^{5b} 各自独立地选自 H、C1-4 烷基。

在一些实施方案中，R^{5a}、R^{5b} 各自独立地选自 H、甲基。

在一些实施方案中，各 R^7 独立地选自 H、C1-4 烷基。

在一些实施方案中，R^7为H。

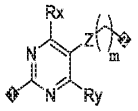
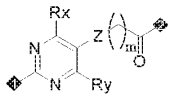
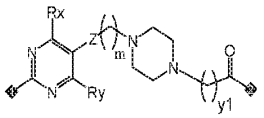
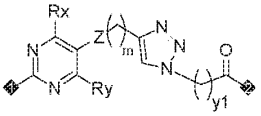
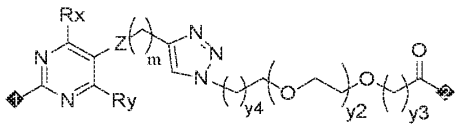
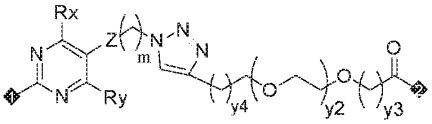
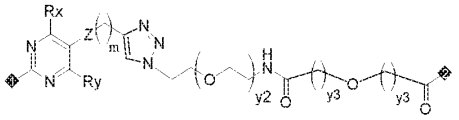
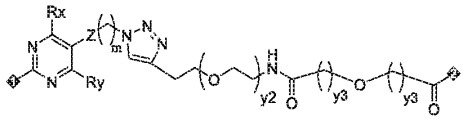
在一些实施方案中，n选自1、2或3。

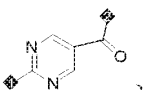
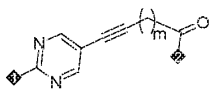
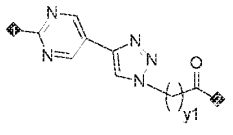
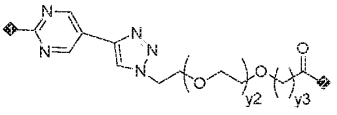
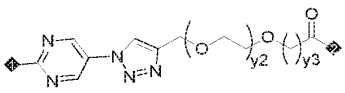
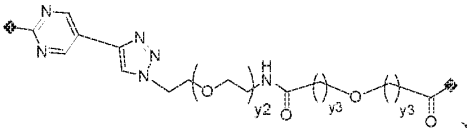
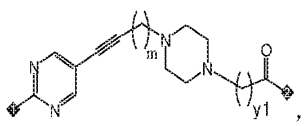
在一些实施方案中，n为1。

在一些实施方案中，n1选自1、2、3或4。

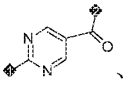
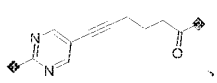
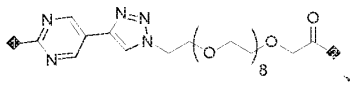
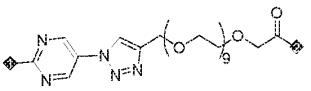
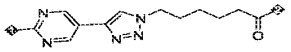
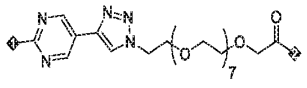
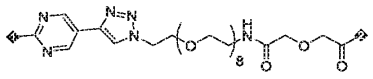
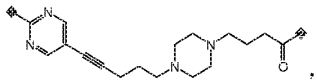
在一些实施方案中，n2为1。

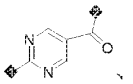
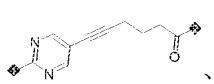
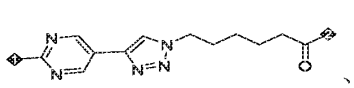
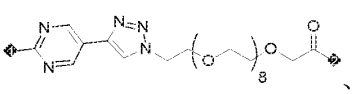
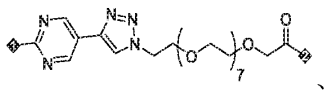
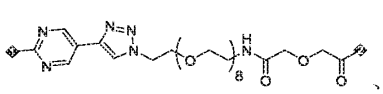
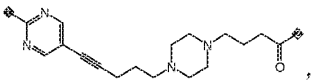
在一些实施方案中，n3为0。

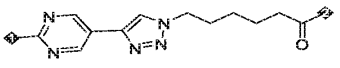
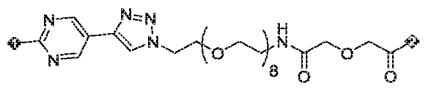
在一些实施方案中，L_1选自  、  、  、  、  、  、  、  ，各Z独立地选自直接键、碳碳三键、碳碳双键、C6-10芳基、5-10元杂芳基、酰胺基（优选选自直接键、碳碳三键、碳碳双键），Rx、Ry各自独立地选自H、C1-4烷基，各m独立地选自0、1、2、3、4、5、6，y1选自1-6之间任意整数（如4、5、6），各y2独立地选自0-15（如6-15）之间任意整数，各y3独立地选自1、2或3，各y4独立地选自0或1，1位与lg相连，2位与L_2或L_3相连；例如各Z独立地选自直接键、碳碳三键、碳碳双键，Rx、Ry各自独立地选自H、C1-4烷基，各m独立地选自0、1、2、3、4、5、6，y1选自1-6之间任意整数（如4、5、6），各y2独立地选自0-15（如6-15）之间任意整数，各y3独立地选自1、2或3，各y4独立地选自0或1，1位通过S原子与Lg相连，2位与L_2或L_3相连。

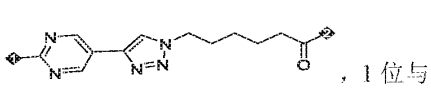
在一些实施方案中，L_1选自  、  、  、  、  、  、  ，m选自2、3、4，y1选自1-

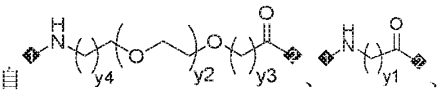
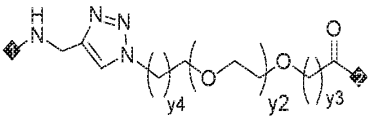
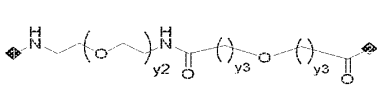
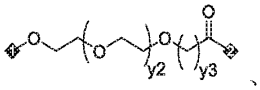
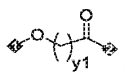
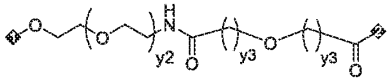
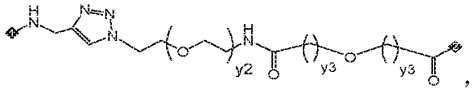
6 之间任意整数（如 4、5、6），各 y2 独立地选自 0-10（如 6-10）之间任意整数，各 y3 独立地选自 1 或 2，1 位与 Lg 相连，2 位与 L_2 或 L_3 相连。

在一些实施方案中，L_1 选自  、  、  、  、  、  、  、  ，1 位与 Lg 相连，2 位与 L_2 或 L_3 相连。

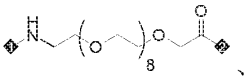
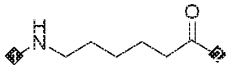
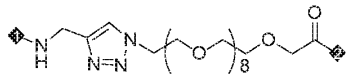
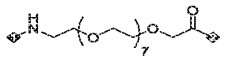
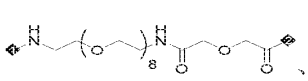
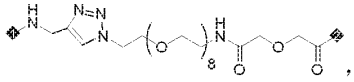
在一些实施方案中，L_1 选自  、  、  、  、  、  、  ，1 位与 Lg 相连，2 位与 L_2 或 L_3 相连。

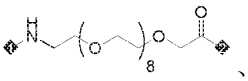
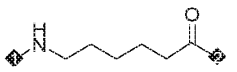
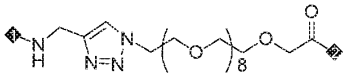
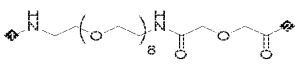
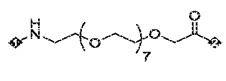
在一些实施方案中，L_1 选自  、  、  ，1 位与 Lg 相连，2 位与 L_2 或 L_3 相连。

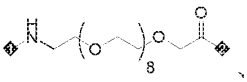
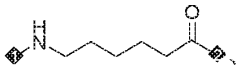
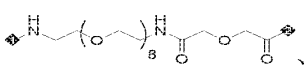
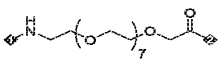
在一些实施方案中，L_1 选自  、  ，1 位与 Lg 相连，2 位与 L_2 或 L_3 相连。

在一些实施方案中，L_2 不存在或存在，L_2 存在时，L_2 选自  、  、  、  、  、  、  ，y1 选自 1-6 之间任意整数（如 4、5、6），各 y2 独立地选自 0-10（如 6-10）之间任意整数，各 y3 独立地选

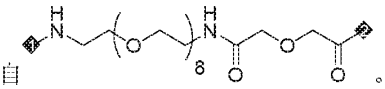
自 1 或 2，各 y4 独立地选自 0 或 1，1 位与 L_1 相连，2 位与 L_3 相连。

在一些实施方案中，L_2 不存在或存在，L_2 存在时，L_2 选自  、  、  、  、  、  ，1 位与 L_1 相连，2 位与 L_3 相连。

在一些实施方案中，L_2 不存在或存在，L_2 存在时，L_2 选自  、  、  、  、  ，1 位与 L_1 相连，2 位与 L_3 相连。

在一些实施方案中，L_2 不存在或存在，L_2 存在时，L_2 选自  、  、  、  ，1 位与 L_1 相连，2 位与 L_3 相连。

在一些实施方案中，L_2 不存在。

在一些实施方案中，L_2 选自  。

在一些实施方案中，L_3 选自氨基酸残基或由 2-10 个氨基酸残基组成的短肽；所述的氨基酸残基选自天然氨基酸残基、非天然氨基酸残基、AA^1 所示氨基酸残基或其立体异构体。

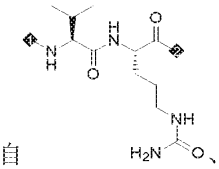
在一些实施方案中，L_3 选自氨基酸残基 Val、D-Val、Cit、Phe、Lys、Lys(Ac)、Leu、Gly、Ala、Asn、Asp、Arg、AA^1 或由 2-10 个选自 Val、Cit、Phe、Lys、D-Val、Leu、Gly、Ala、Asn、Asp、AA^1 的氨基酸残基组成的短肽。

在一些实施方案中，L_3 选自 Val、Cit、Phe、Lys、D-Val、Leu、Gly、Ala、Asn、AA^1、Val-Cit、Cit-Val、Cit-Ala、Val-Ala、Lys-Val、Val-Lys(Ac)、Phe-Lys、Phe-Lys(Ac)、Ala-Ala、Val-AA^1、Ala-AA^1、Gly-AA^1、AA^1-Gly、Ala-Ala-Ala、Ala-Ala-Asn、Ala-Ala-Asp、Val-AA^1-Gly、Ala-AA^1-Gly、Gly-AA^1-Gly、Lys-Ala-Ala-Asn、Lys-Ala-Ala-Asp、Gly-Phe-Gly、Gly-Gly-Phe-Gly、D-Val-Leu-Lys、Gly-Gly-Arg、Ala-Ala-Asn、Gly-Gly-Phe、Val-Lys-Gly、Val-Lys-Gly-Gly、Val-Lys、Lys-Ala-Asn。

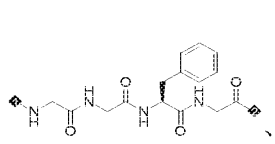
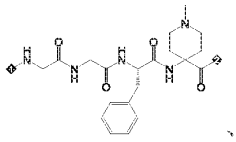
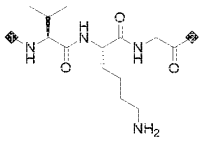
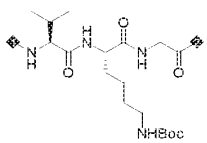
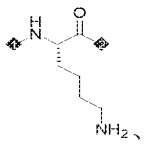
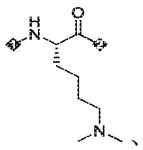
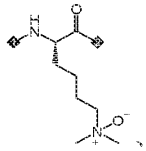
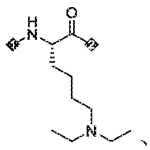
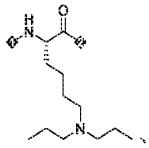
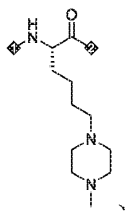
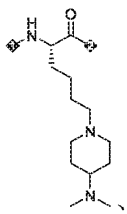
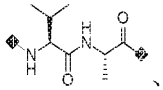
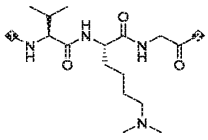
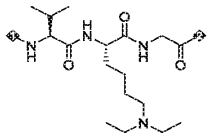
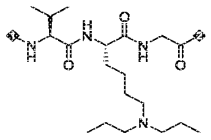
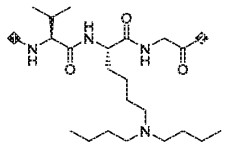
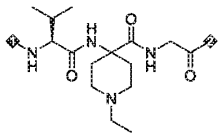
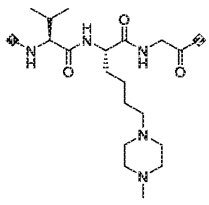
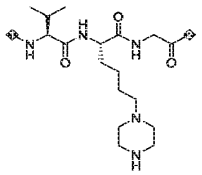
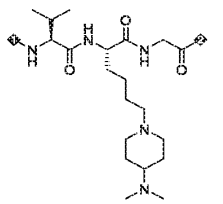
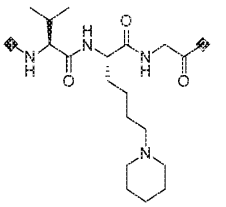
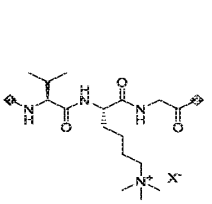
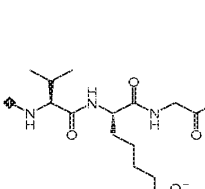
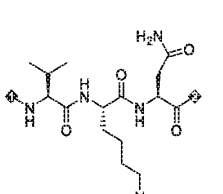
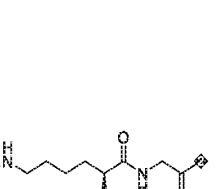
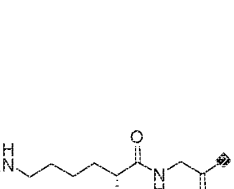
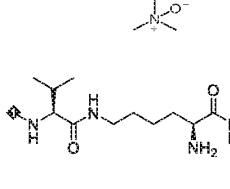
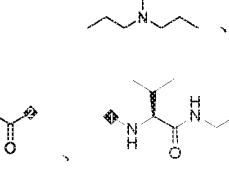
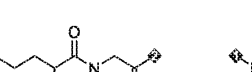
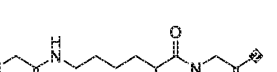
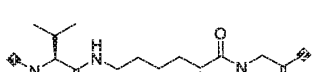
在一些实施方案中，L_3 选自 AA^1、AA^1-Gly、Val-Cit、Val-AA^1-Gly、AA^1-Ala-Asn、Gly-Gly-Phe-Gly。

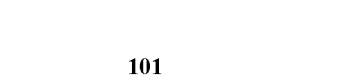
在一些实施方案中，L_3 选自 AA^1、Val-AA^1-Gly。

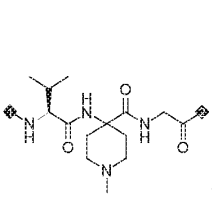
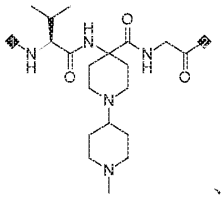
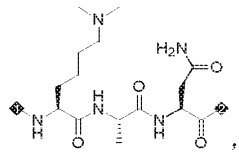
在一些实施方案中，L_3 选自 Val-AA^1-Gly。

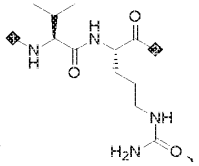
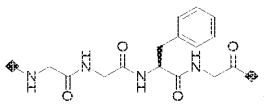
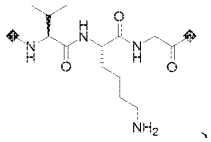


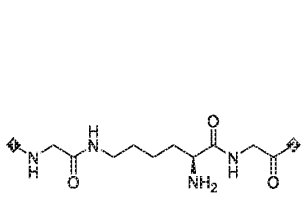
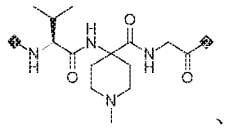
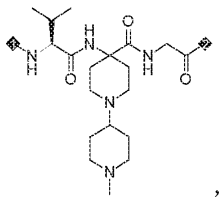
在一些实施方案中，L_3 选自

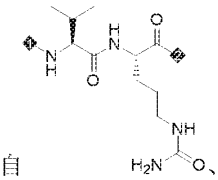
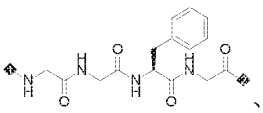
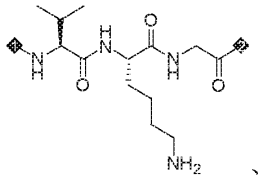
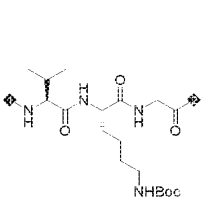
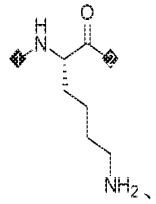
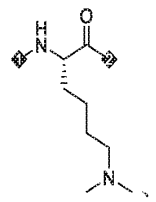
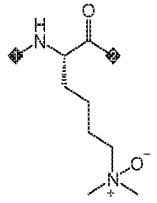
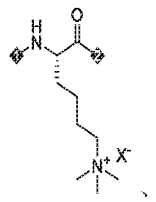
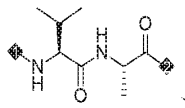
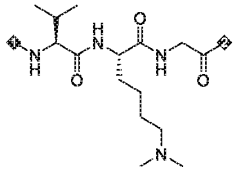
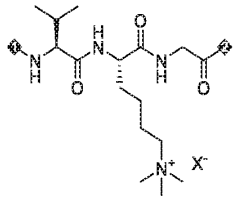
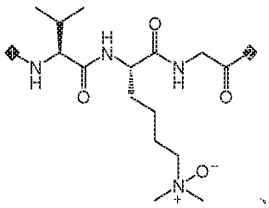
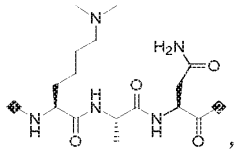
































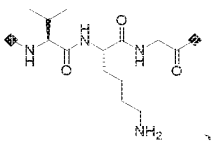
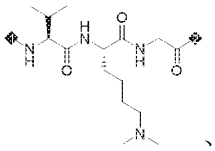
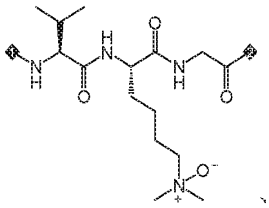
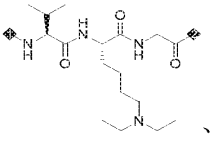
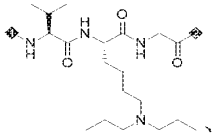
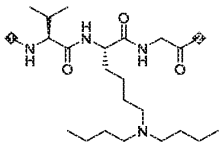
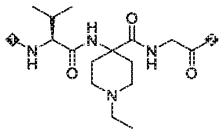
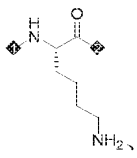
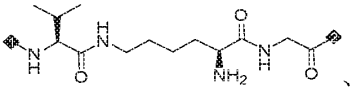
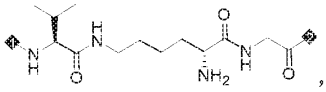


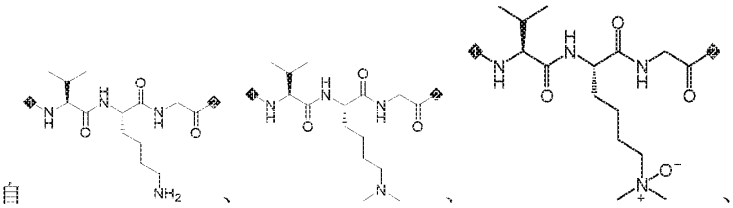
 、  、  ，X^-选自卤素离子、羧酸根离子、硫酸根离子、硫酸氢根离子、OH^-，1 位与 L_1 或 L_2 相连，2 位与 L_4 或 W 相连。

在一些实施方案中，L_3 选自  、  、  、

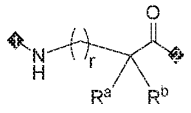

、 
、 
，X^-选自卤素离子、羧酸根离子、硫酸根离子、硫酸氢根离子、OH^-，1 位与 L_1 或 L_2 相连，2 位与 L_4 或 W 相连。

在一些实施方案中，L_3 选自  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  ，X^-选自卤素离子、羧酸根离子、硫酸根离子、硫酸氢根离子、OH^-，1 位与 L_1 或 L_2 相连，2 位与 L_4 或 W 相连。

在一些实施方案中，L_3 选自  、  、  、  、  、  、  、  、  、  ，1 位与 L_1 或 L_2 相连，2 位与 L_4 或 W 相连。

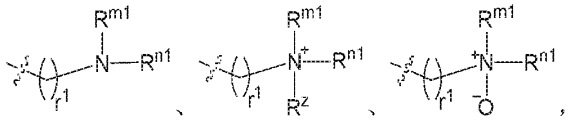
在一些实施方案中，L_3 选自  ，1 位与 L_1 或 L_2 相连，2 位与 L_4 或 W 相连。

在一些实施方案中，AA^1 所示氨基酸残基的结构如下所示，



AA^1

其中：

R^a、R^b 各自独立地选自 H、  ，且 R^a、R^b 不同时为 H；

或者，R^a 与 R^b 和与它们共同相连的碳原子一起，形成 4-10 元杂环，所述 4-10 元杂环任选地被一个或多个 R^0 所取代；

r、r^1 各自独立地选自 0 到 20 的任意整数；

R^{m1}、R^{n1} 各自独立地选自 H、C1-6 烷基、C3-6 环烷基、$-COOR^{x1}$；

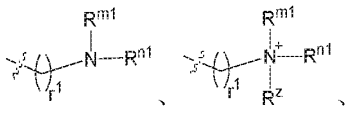
R^{x1} 选自 C1-6 烷基；

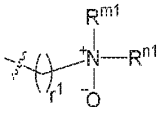
或者，R^{m1} 与 R^{n1} 和与它们共同相连的氮原子一起，形成 4-10 元杂环，所述 4-10 元杂环任选地被一个或多个 $R^{0'}$ 所取代；

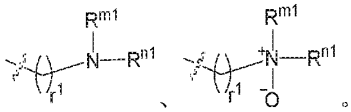
R^z 选自 C1-6 烷基；

R^0、$R^{0'}$ 各自独立地选自 C1-6 烷基、C3-6 环烷基、$-NR^{m2}R^{n2}$、任选被 C1-6 烷基取代的 4-10 元杂环基；

R^{m2}、R^{n2} 各自独立地选自 H、C1-6 烷基。

在一些实施方案中，R^a、R^b 中，任一个为 H，另一个选自  、

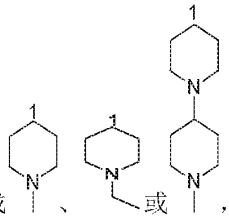

。

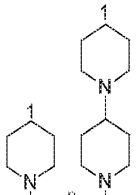
在一些实施方案中，R^a、R^b 中，任一个为 H，另一个选自  。

在一些实施方案中，R^a 与 R^b 和与它们共同相连的碳原子一起，形成被 R^0 取代的 5-6 元杂环。

在一些实施方案中，R^a 与 R^b 和与它们共同相连的碳原子一起，形成被 R^0 取代的哌啶环或哌嗪环。

在一些实施方案中，R^a 与 R^b 和与它们共同相连的碳原子一起，形成被 R^0 取代的哌啶环。

在一些实施方案中，R^a 与 R^b 和与它们共同相连的碳原子一起，形成  ，1 号碳原子为与 R^a 和 R^b 共同相连的碳原子。

在一些实施方案中，R^a 与 R^b 和与它们共同相连的碳原子一起，形成  ，1 号碳原子为与 R^a 和 R^b 共同相连的碳原子。

在一些实施方案中，r、r^1 各自独立地选自 0、1、2、3、4、5。

在一些实施方案中，r、r^1 各自独立地选自 0、4。

在一些实施方案中，r、r^1 中，任一个为 0，另一个为 4。

在一些实施方案中，R^{m1}、R^{n1} 各自独立地选自 H、甲基、乙基、正丙基、正丁基、-COOCH3、-COOCH2CH3、-COOCH2CH2CH3、-COOCH(CH3)2、-COOC(CH3)3、-COOCH2CH2CH2CH3。

在一些实施方案中，R^{m1}、R^{n1} 各自独立地选自 H、C1-6 烷基、C3-6 环烷基、叔丁氧羰基。

在一些实施方案中，R^{m1}、R^{n1} 各自独立地选自 H、C1-6 烷基。

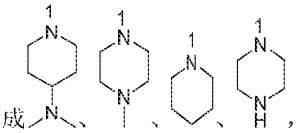
在一些实施方案中，R^{m1}、R^{n1} 各自独立地选自 H、甲基、乙基、正丙基。

在一些实施方案中，r、r^1 中，r 为 4，r^1 为 0 时，R^{m1}、R^{n1} 各自独立地选自 H、C1-6 烷基（如 H、甲基）；r 为 0，r^1 为 4 时，R^{m1}、R^{n1} 各自独立地选自 C1-6 烷基（如甲基、乙基、正丙基），优选选自 C2-6 烷基（如乙基、正丙基）。

在一些实施方案中，R^{m1} 与 R^{n1} 和与它们共同相连的氮原子一起，形成任选被 R^0 取代的 5-6 元杂

环。

在一些实施方案中，R^{m1} 与 R^{n1} 和与它们共同相连的氮原子一起，形成任选被 $R^{0'}$ 取代的哌啶环或哌嗪环。

在一些实施方案中，R^{m1} 与 R^{n1} 和与它们共同相连的氮原子一起，形成  ，1 号氮原子为与 R^{m1} 和 R^{n1} 共同相连的氮原子。

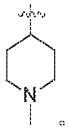
在一些实施方案中，R^z 为甲基。

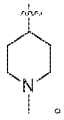
在一些实施方案中，R^0、$R^{0'}$ 各自独立地选自 C1-6 烷基、$-NR^{m2}R^{n2}$、任选被 C1-6 烷基取代的 5-6 元杂环基。

在一些实施方案中，R^0 选自 C1-6 烷基、被 C1-6 烷基取代的 5-6 元杂环基，所述 5-6 元杂环基选自哌啶基、哌嗪基。

在一些实施方案中，R^0 选自甲基、乙基、被甲基取代的 5-6 元杂环基，所述 5-6 元杂环基为哌啶基。

在一些实施方案中，R^0 选自甲基、被甲基取代的 5-6 元杂环基，所述 5-6 元杂环基为哌啶基。

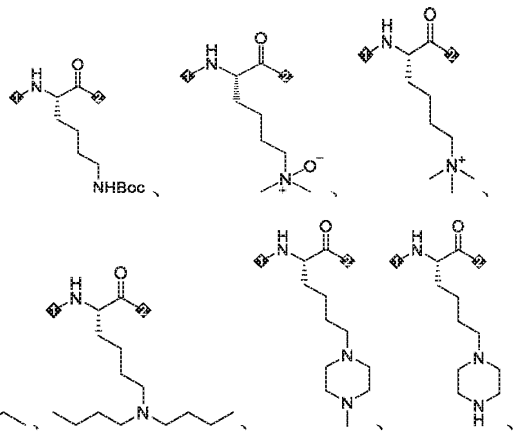
在一些实施方案中，R^0 选自甲基、乙基、  。

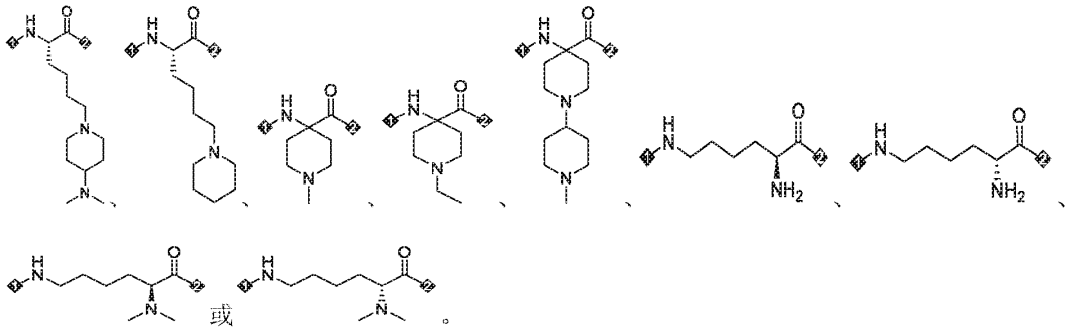
在一些实施方案中，R^0 选自甲基、  。

在一些实施方案中，$R^{0'}$ 选自 C1-6 烷基、$-NR^{m2}R^{n2}$。

在一些实施方案中，$R^{0'}$ 选自甲基、$-NR^{m2}R^{n2}$。

在一些实施方案中，R^{m2}、R^{n2} 为甲基。

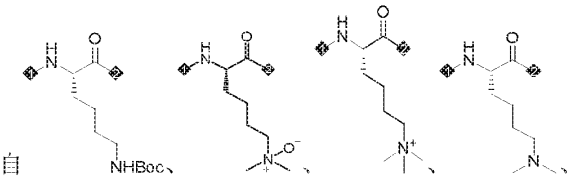
在一些实施方案中，AA^1 所示氨基酸残基选自  。

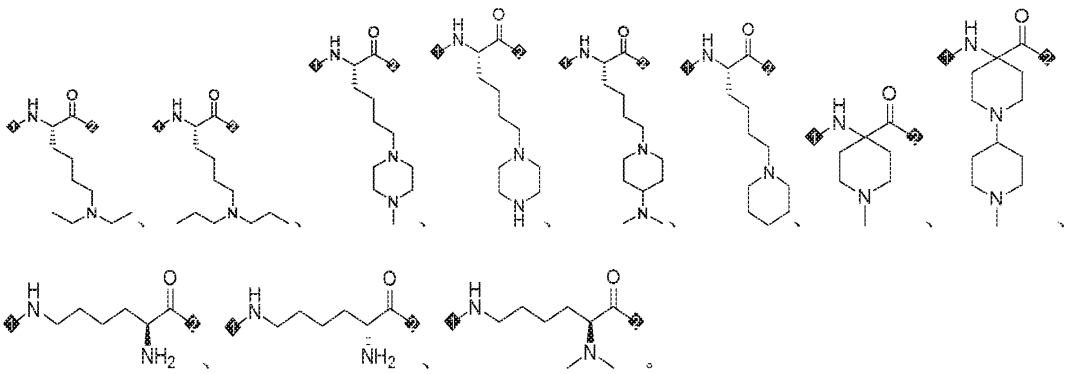


或

。

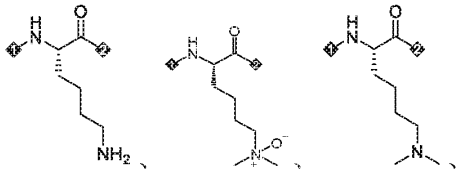
在一些实施方案中，AA^1 所示氨基酸残基选自

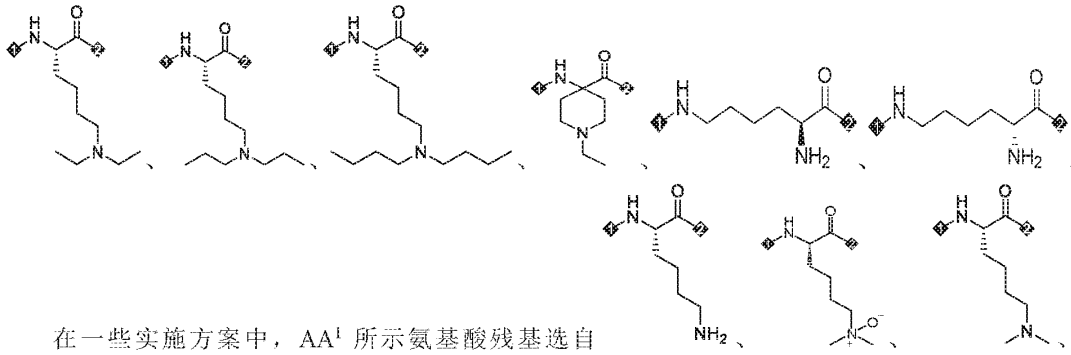




。

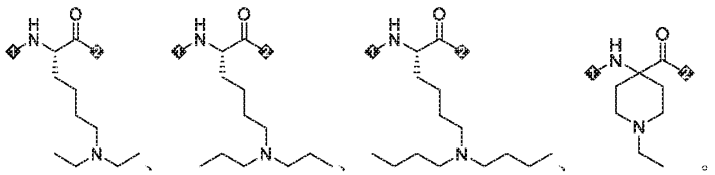
在一些实施方案中，AA^1 所示氨基酸残基选自

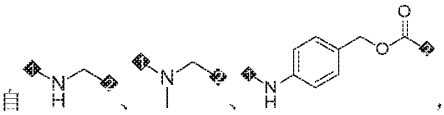


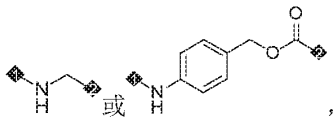


。

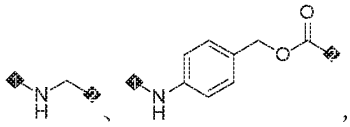
在一些实施方案中，AA^1 所示氨基酸残基选自

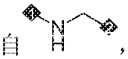


在一些实施方案中，L_4 不存在或存在，L_4 存在时，L_4 选自  ，1 位与 L_3 相连，2 位与 W 或 X 相连。

在一些实施方案中，L_4 不存在或存在，L_4 存在时，L_4 为  ，1 位与 L_3 相连，2 位与 W 或 X 相连。

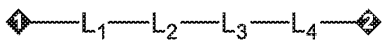
在一些实施方案中，L_4 不存在。

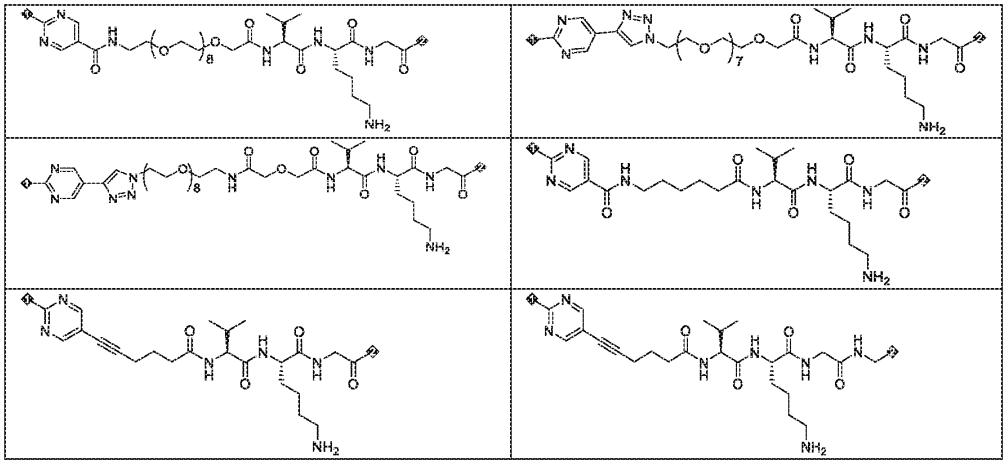
在一些实施方案中，L_4 选自  ，1 位与 L_3 相连，2 位与 W 或 X 相连。

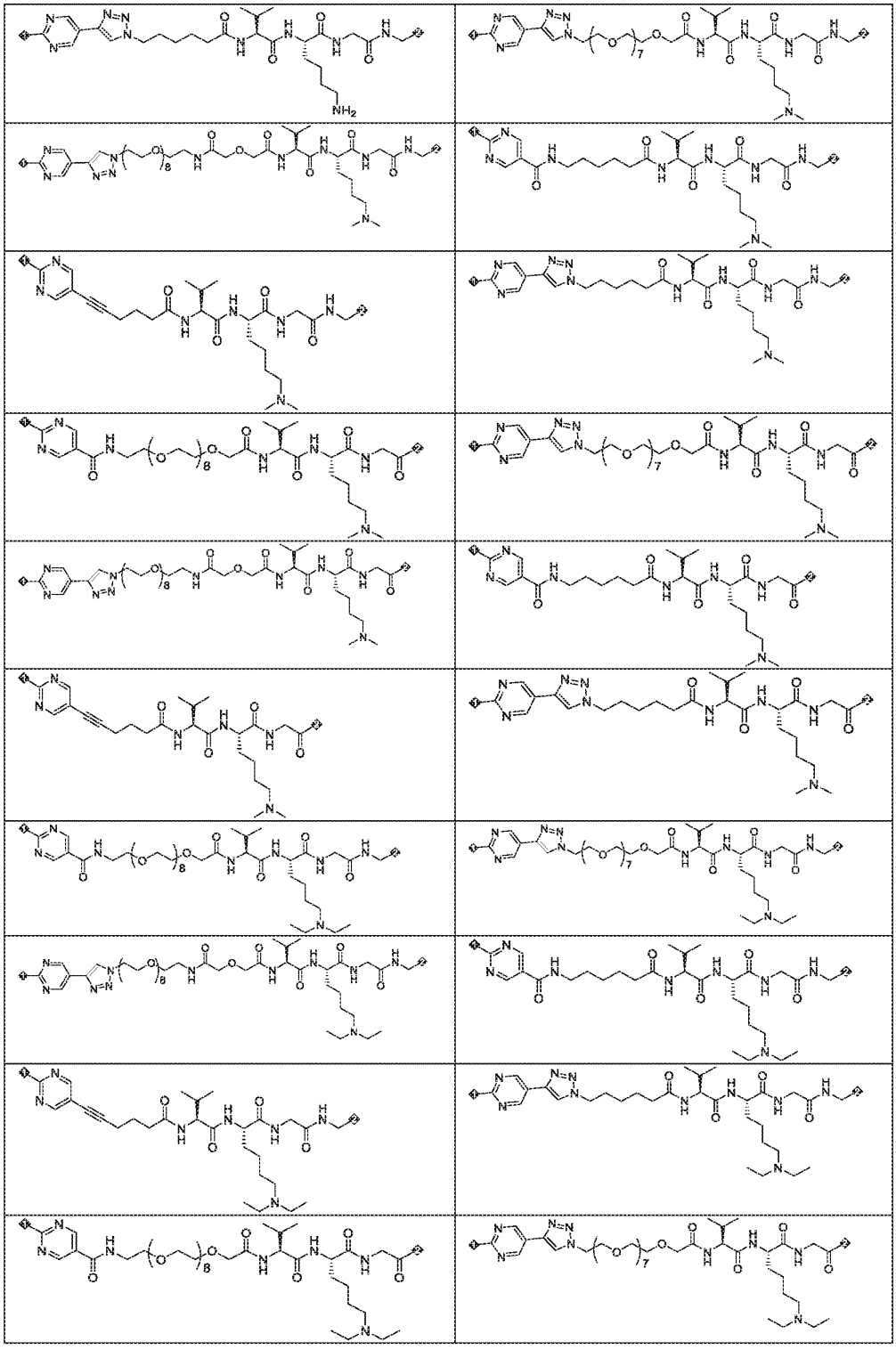
在一些实施方案中，L_4 选自  ，1 位与 L_3 相连，2 位与 W 或 X 相连。

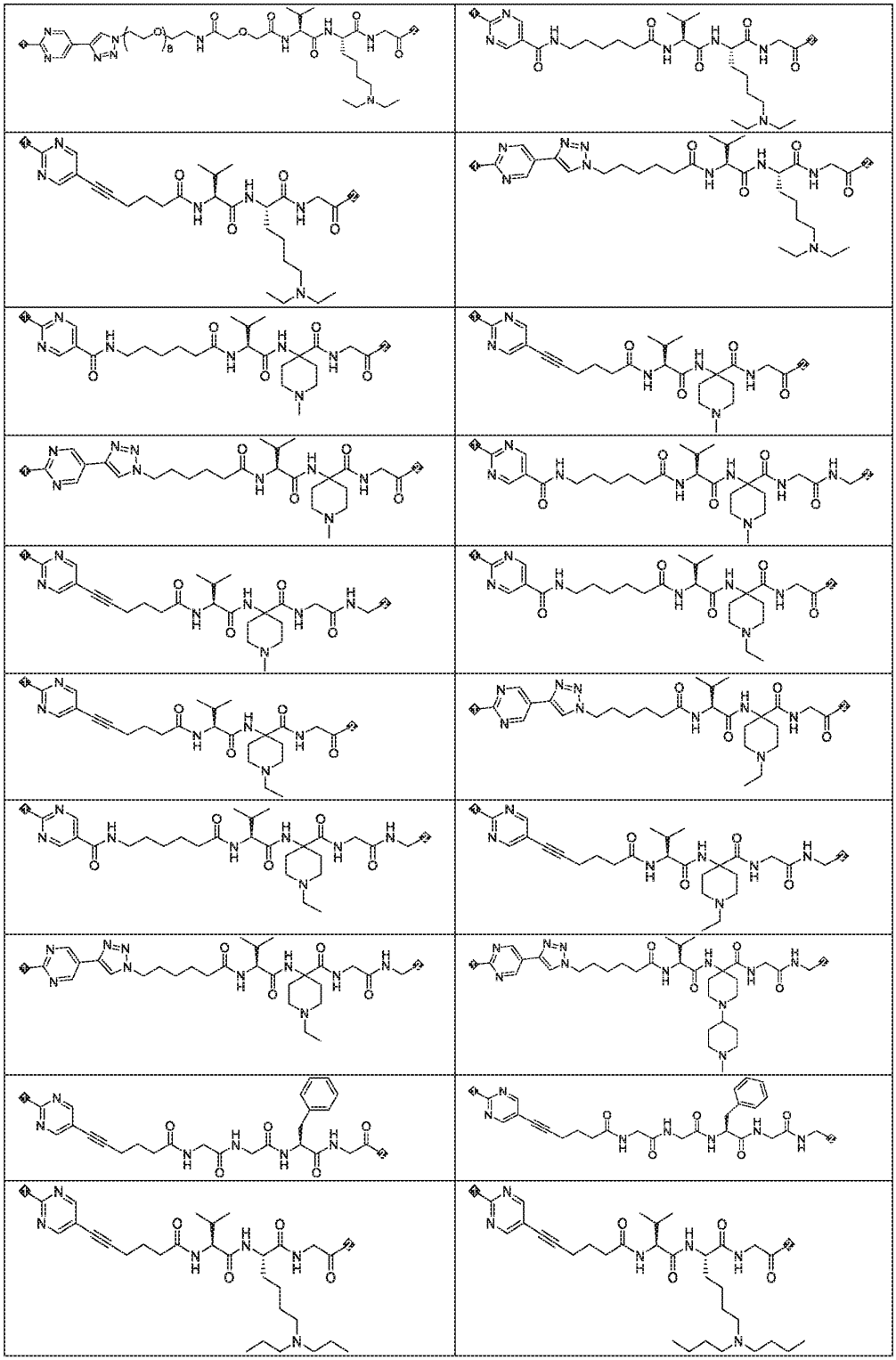
在一些实施方案中，Lg 选自 F、Cl、$MeSO_2$-。

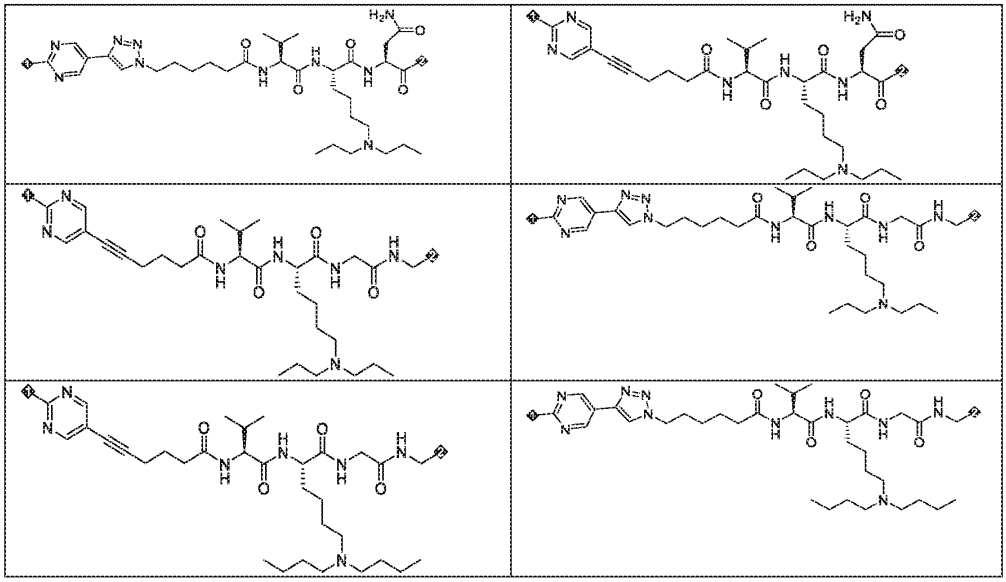
在一些实施方案中，Lg 选自 F、$MeSO_2$-。

在一些实施方案中，  的结构选自以下：

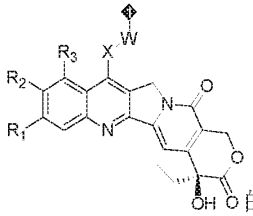




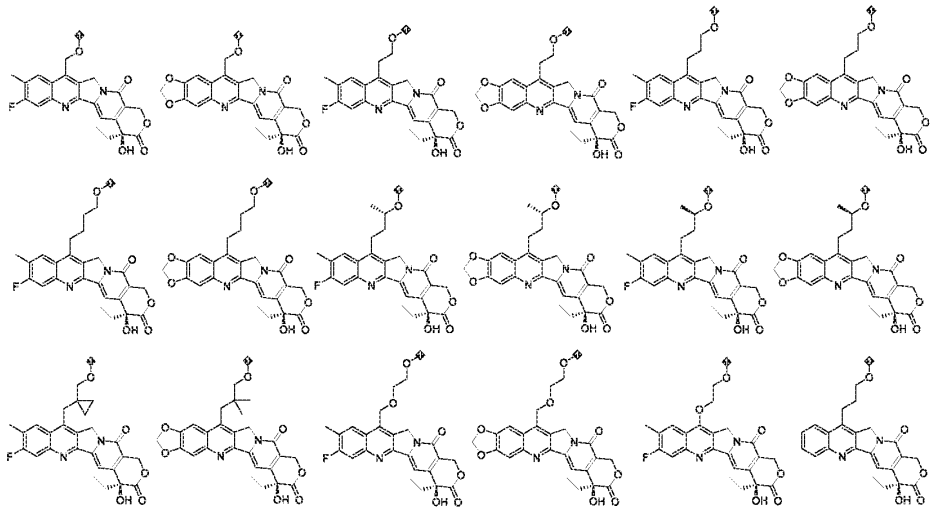


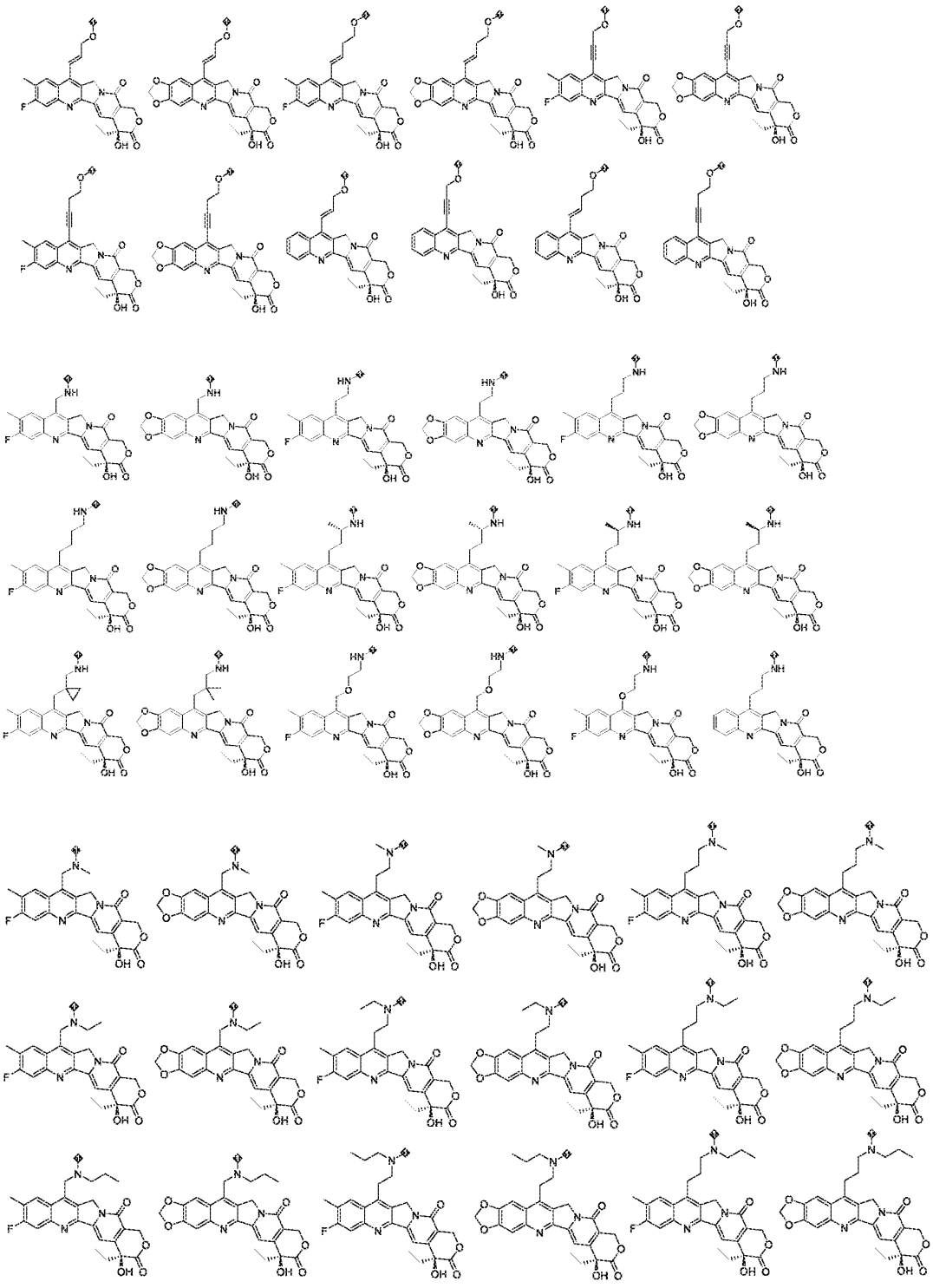


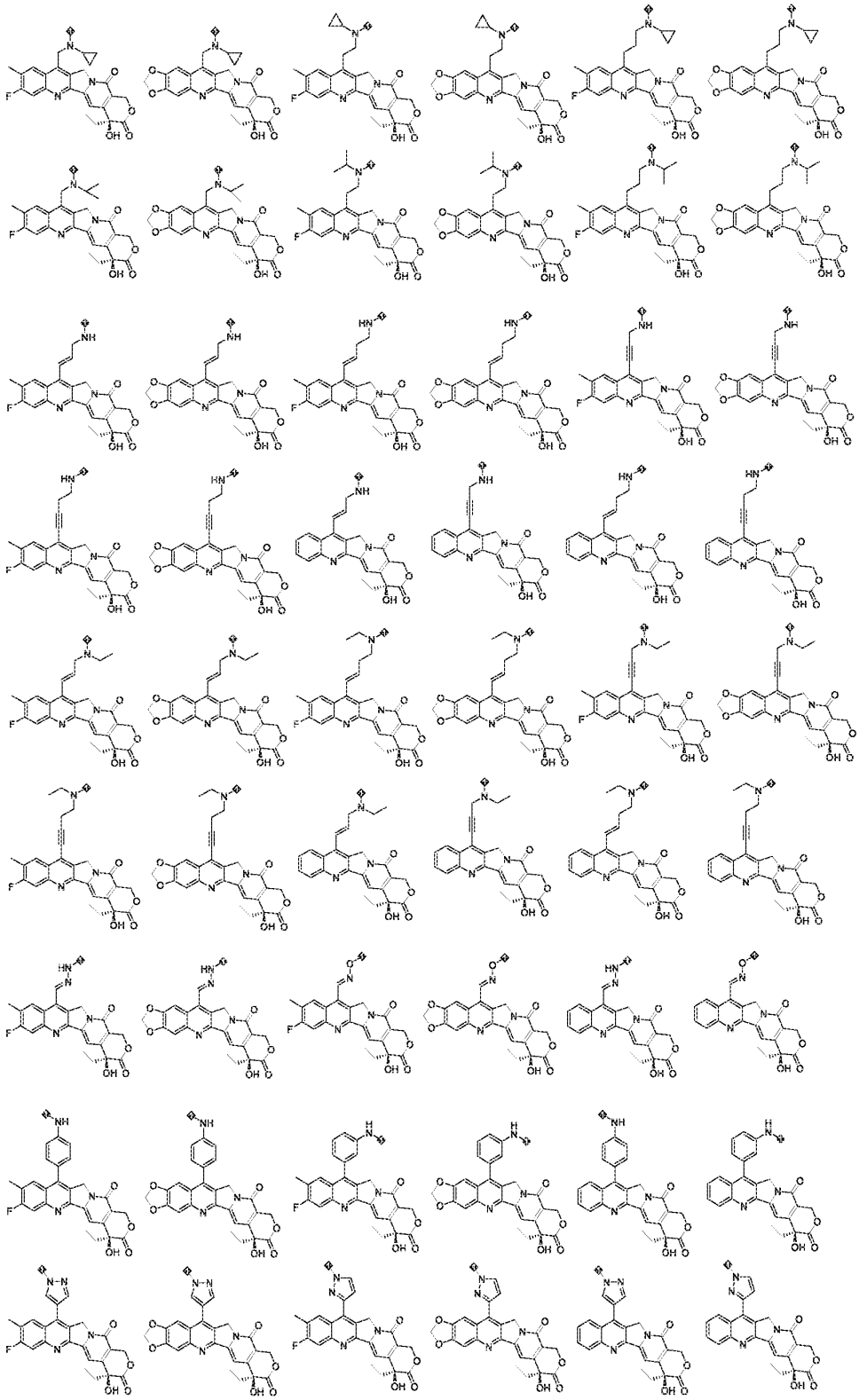
其中，1 位与 Lg 相连，2 位与 W 相连。

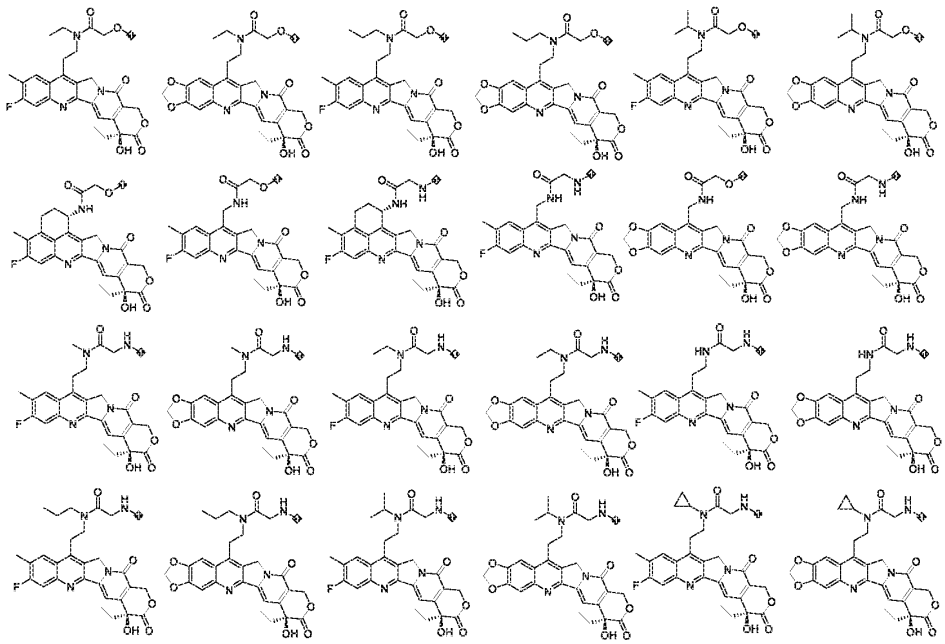


在一些实施方案中， 的结构选自以下：



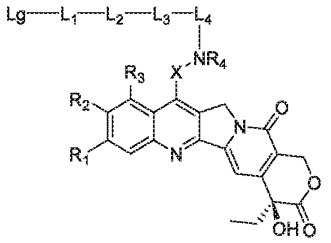






其中，1 位与 L_4 相连；当 L_4 不存在时，1 位与 L_3 相连。

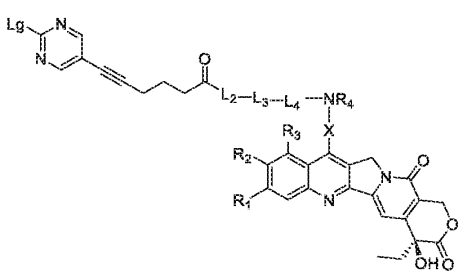
在一些实施方案中，药物连接体偶联物具有式 III-(1)所式结构：



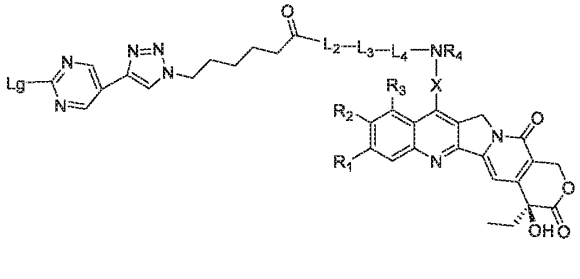
III-(1)

其中，L_1、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4 和 Lg 具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义。

在一些实施方案中，药物连接体偶联物具有式 III-(1A)或 III-(1B)所式结构：



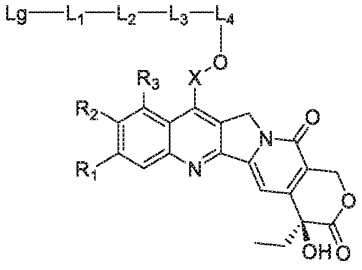
III-(1A)、



III-(1B)，

其中，L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4和 Lg 具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义。

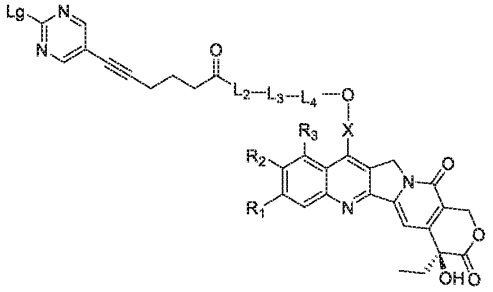
在一些实施方案中，药物连接体偶联物具有式 III-(2)所式结构：



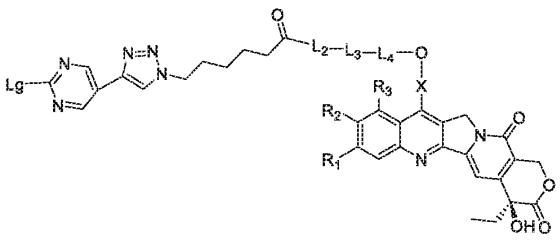
III-(2)，

其中，L_1、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3和 Lg 具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义。

在一些实施方案中，药物连接体偶联物具有式 III-(2A)或 III-(2B)所式结构：



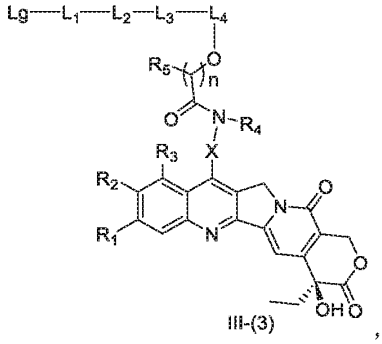
III-(2A)、



III-(2B)，

其中，L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3和 Lg 具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义。

在一些实施方案中，药物连接体偶联物具有式 III-(3)所式结构：

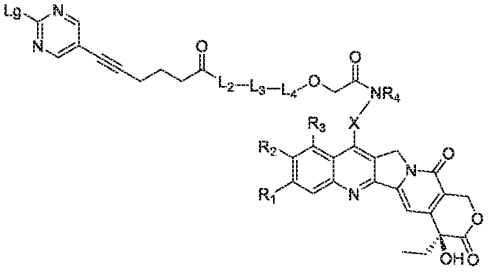


III-(3)，

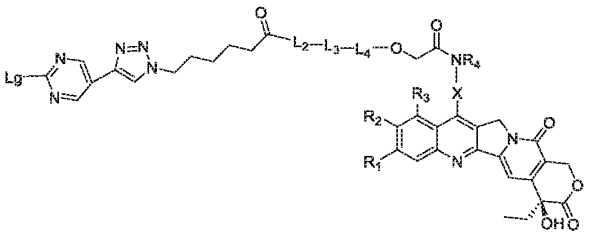
其中，L_1、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、n 和 Lg 具有上文以及本文具体叙述的任何实

施方案中所提供的含义。

在一些实施方案中，药物连接体偶联物具有式 III-(3A)或 III-(3B)所式结构：



III-(3A)

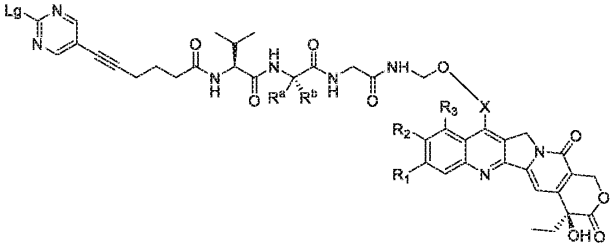


III-(3B)

，

其中，Lg、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4 和 Lg 具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义。

在一些实施方案中，药物连接体偶联物具有式 III-A 所式结构：

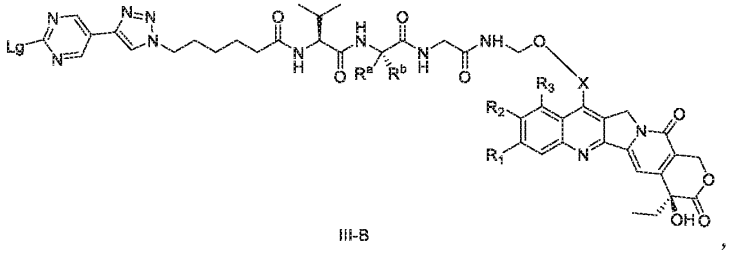


III-A

，

其中，Lg、X、R_1、R_2、R_3、R^a、R^b 和 q 具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义。

在一些实施方案中，药物连接体偶联物具有式 III-B 所式结构：

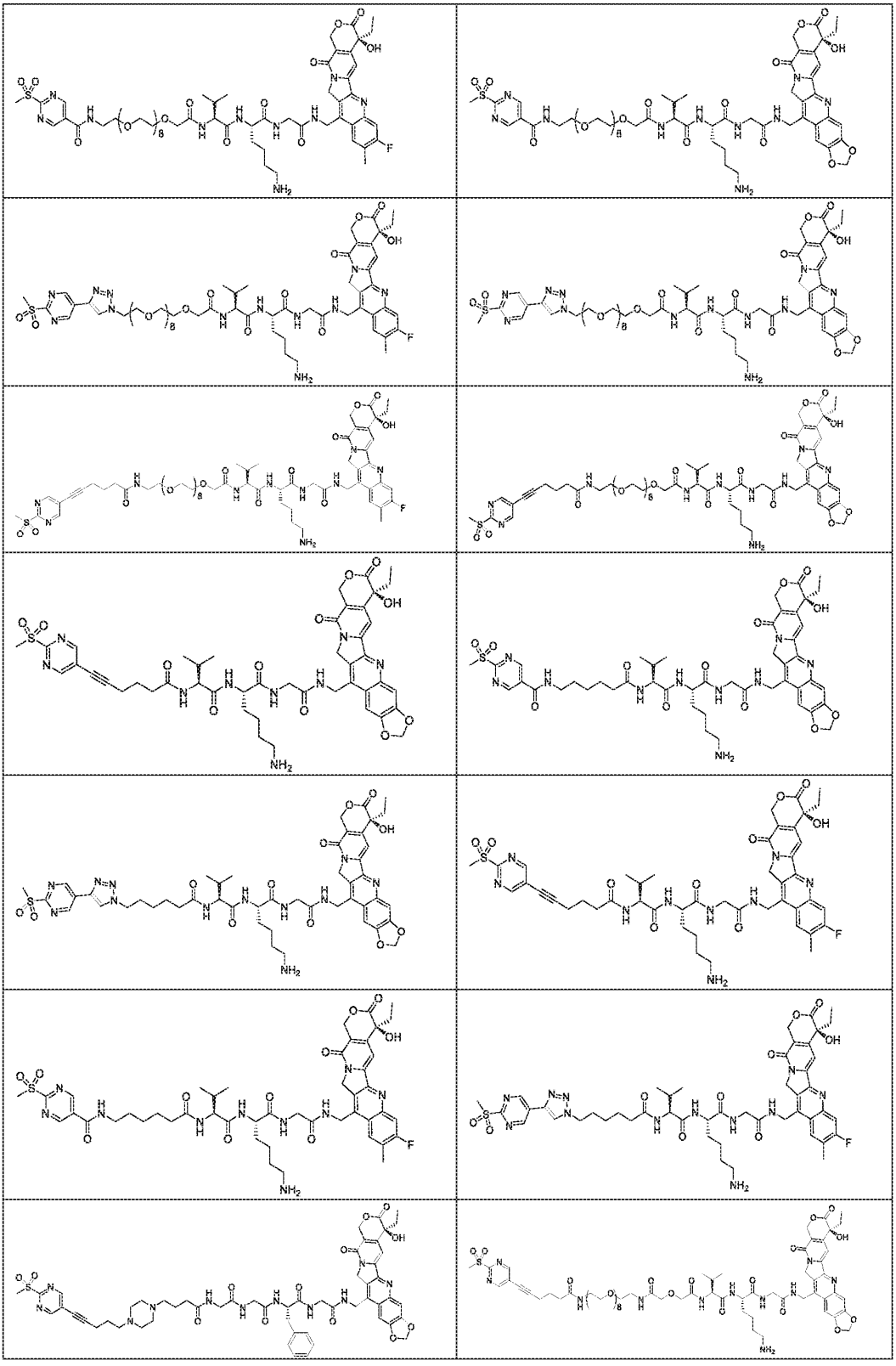


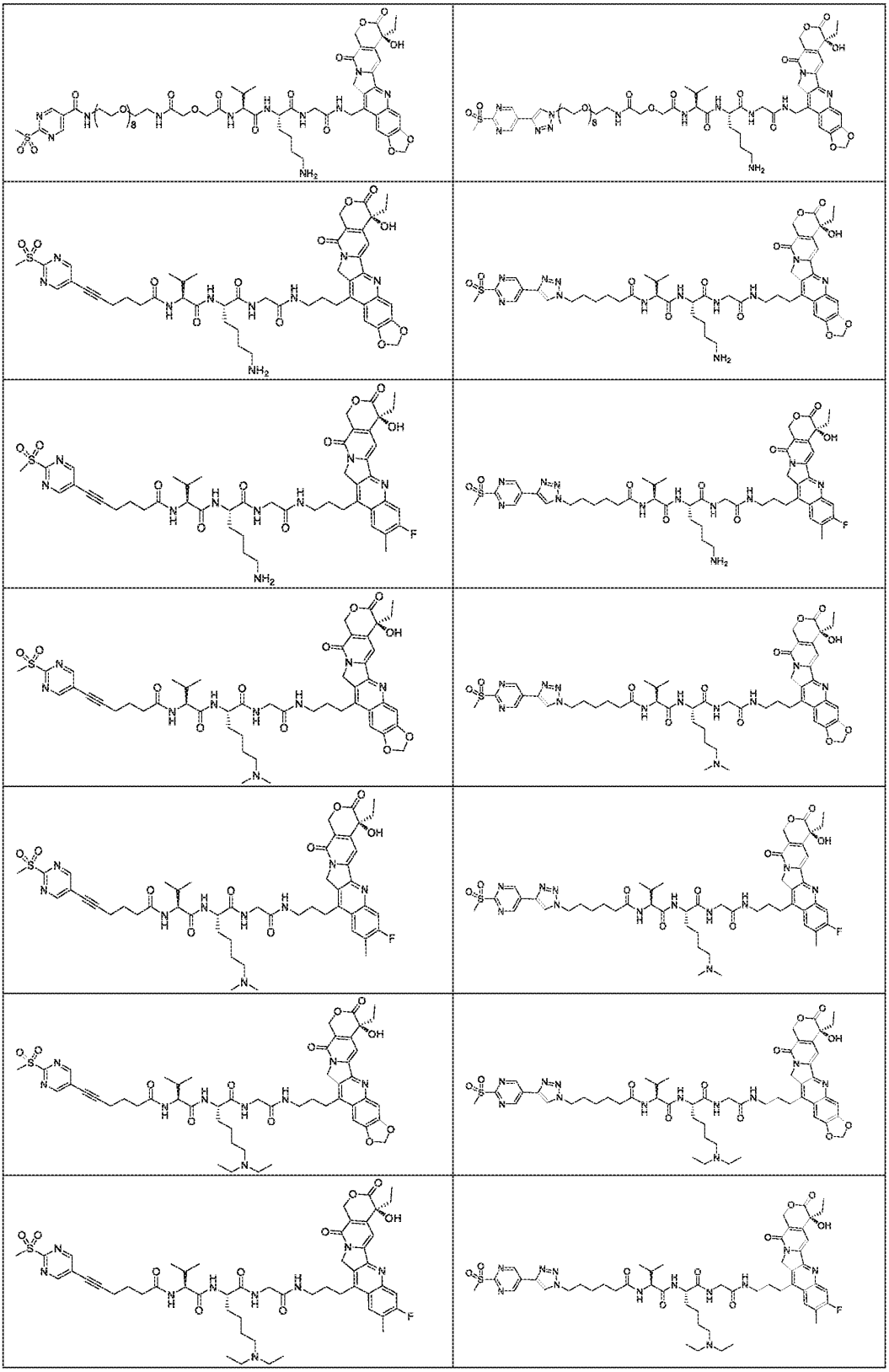
III-B

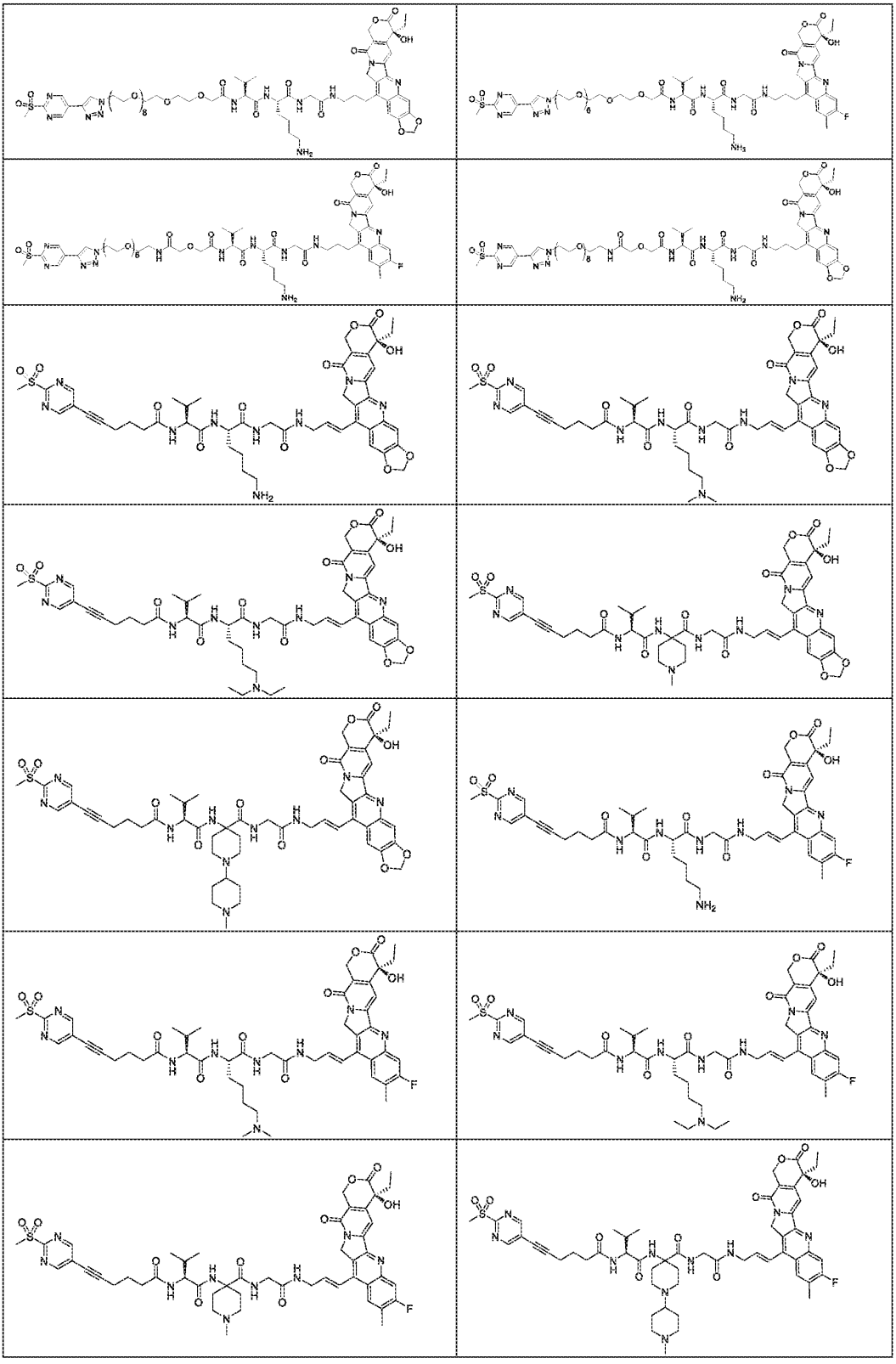
，

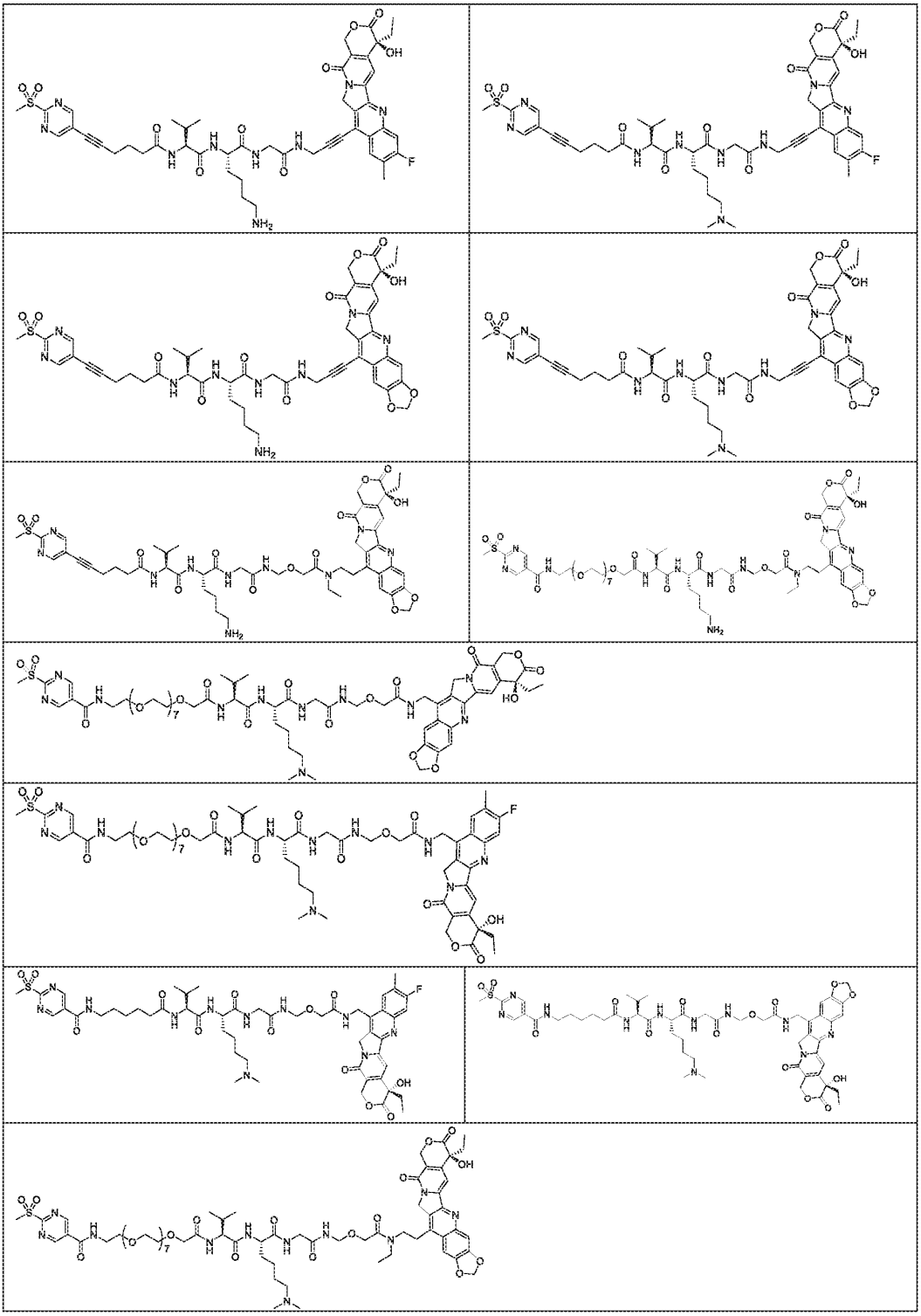
其中，Lg、X、R_1、R_2、R_3、R^a、R^b 和 q 具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义。

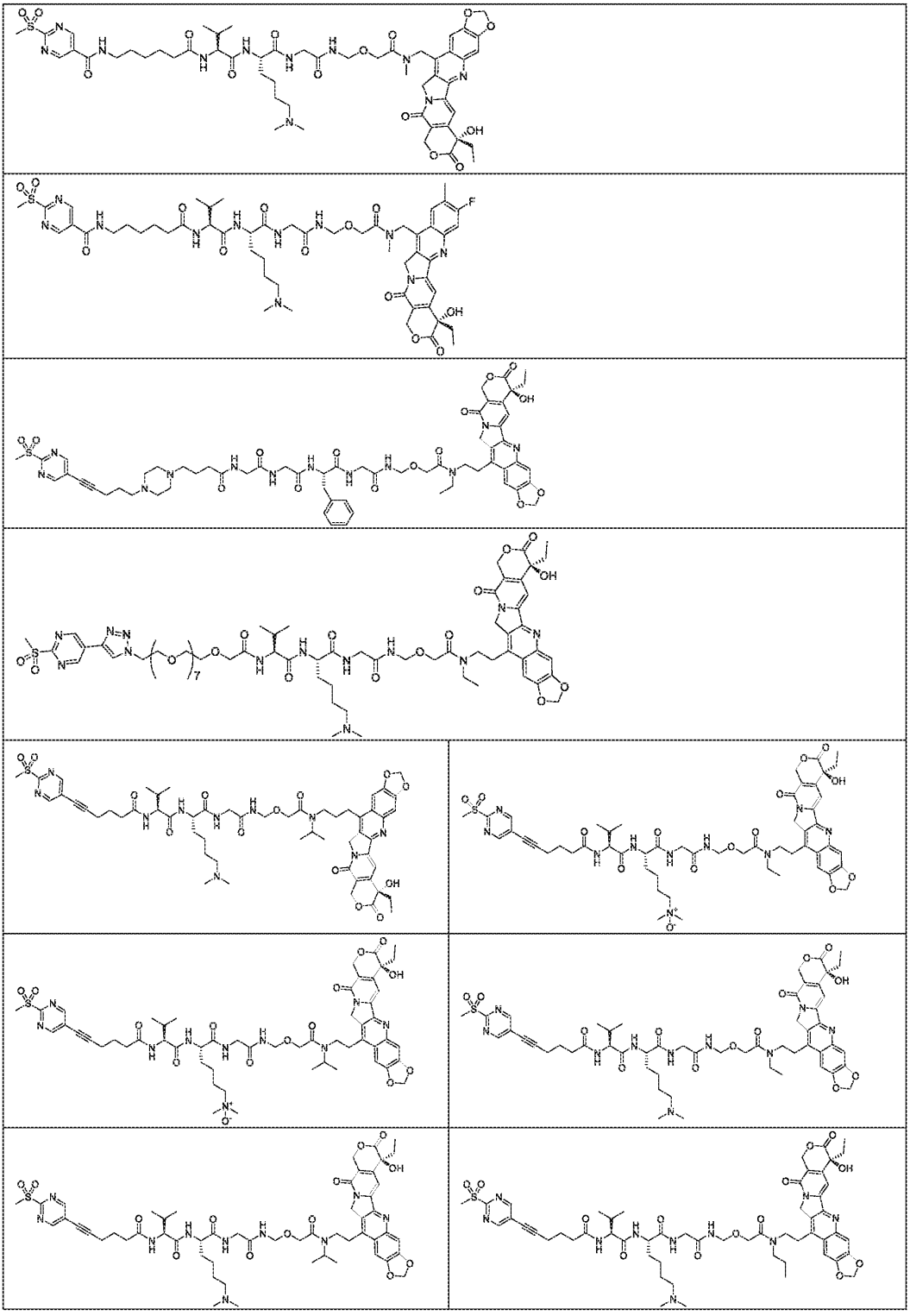
在一些实施方案中，式 III 所示的药物连接体偶联物选自以下结构：

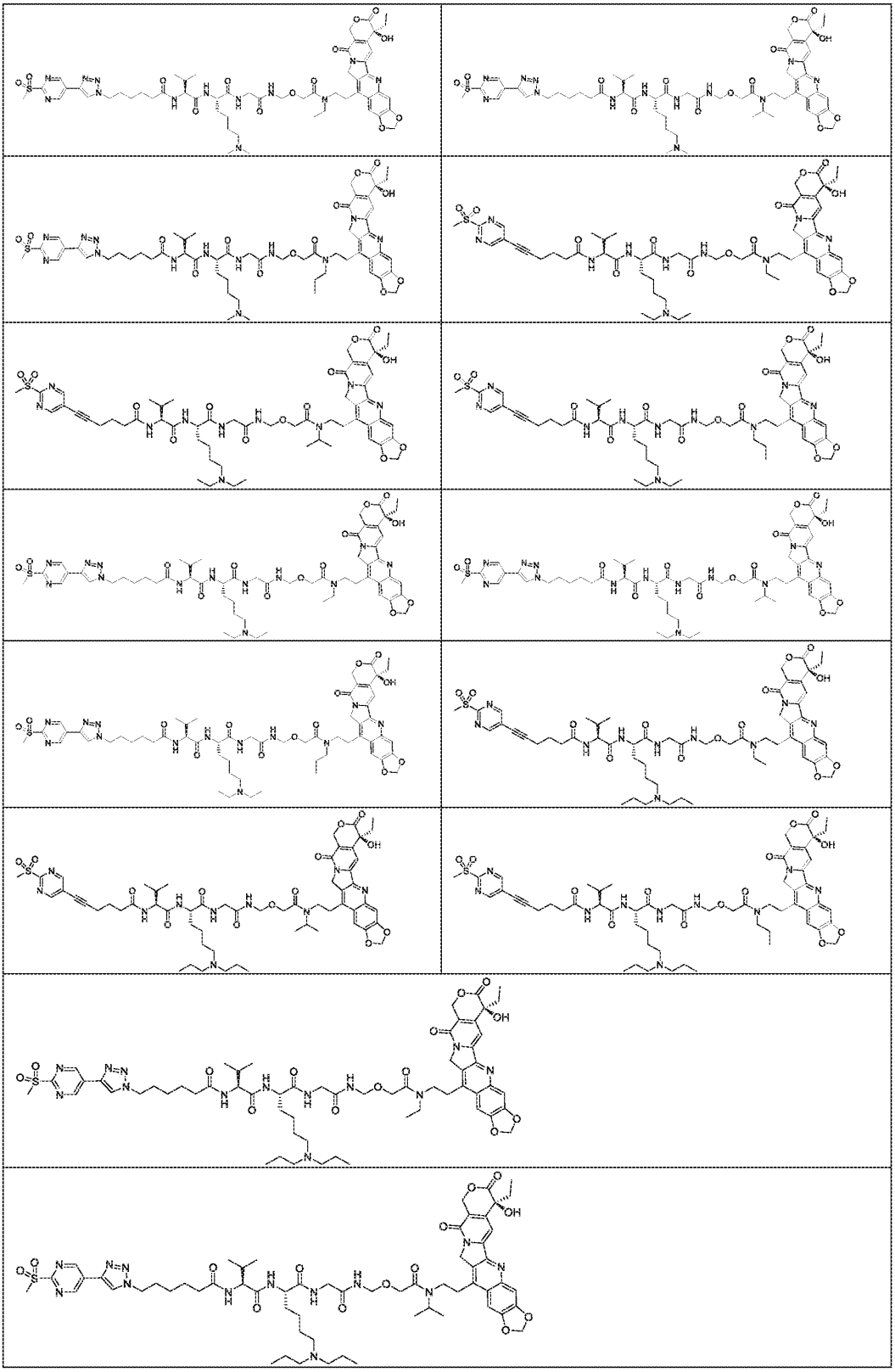


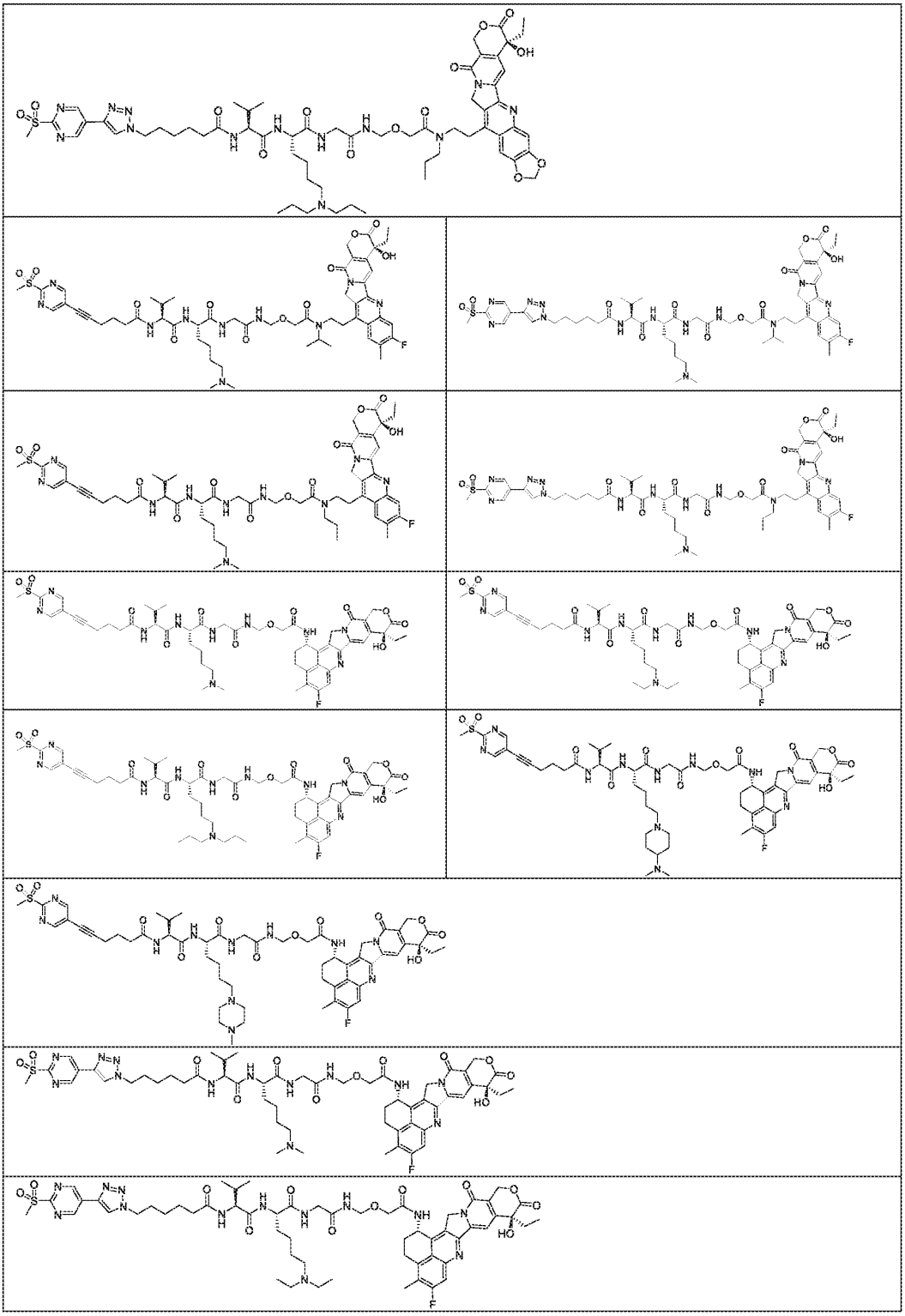


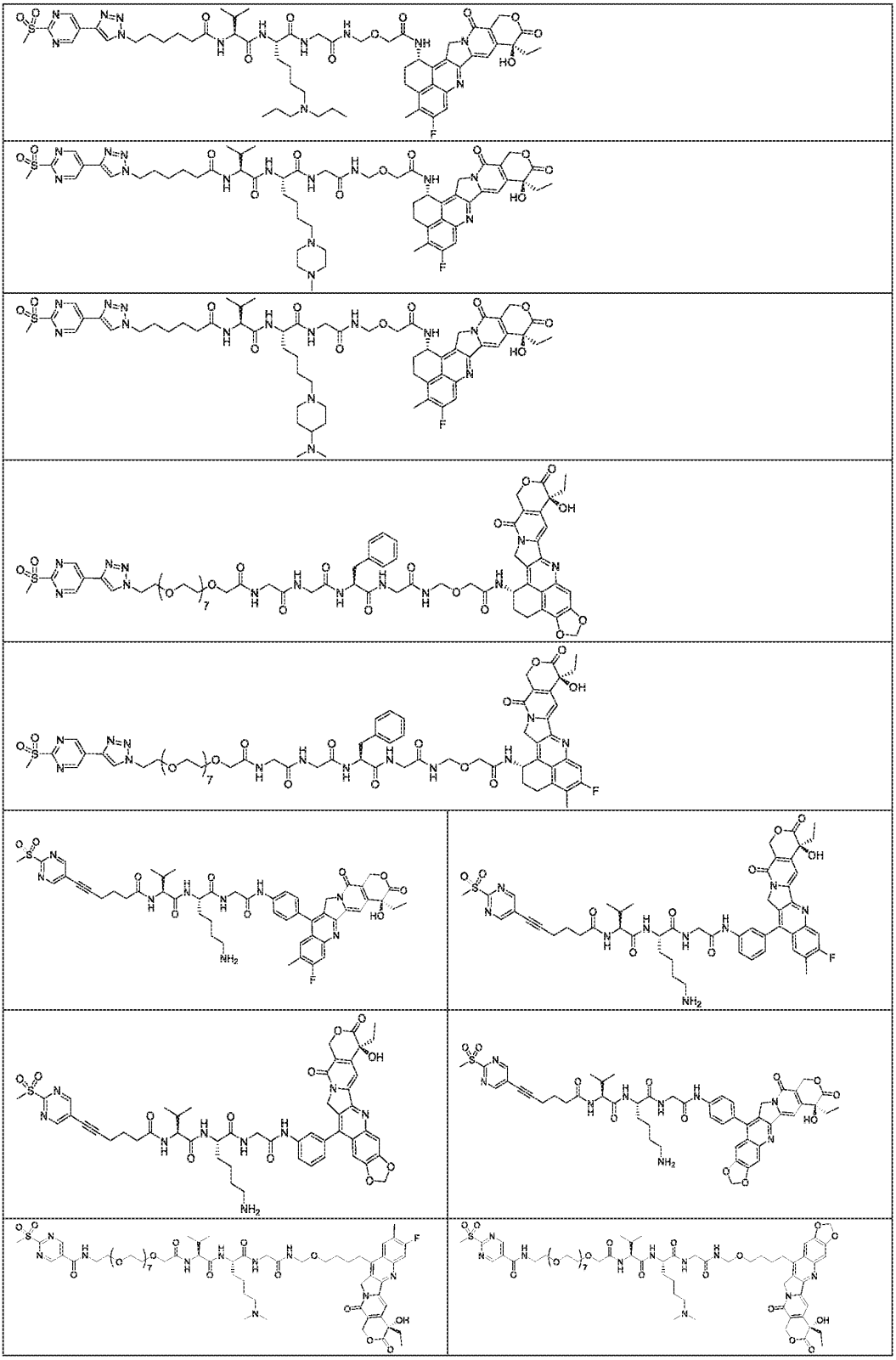


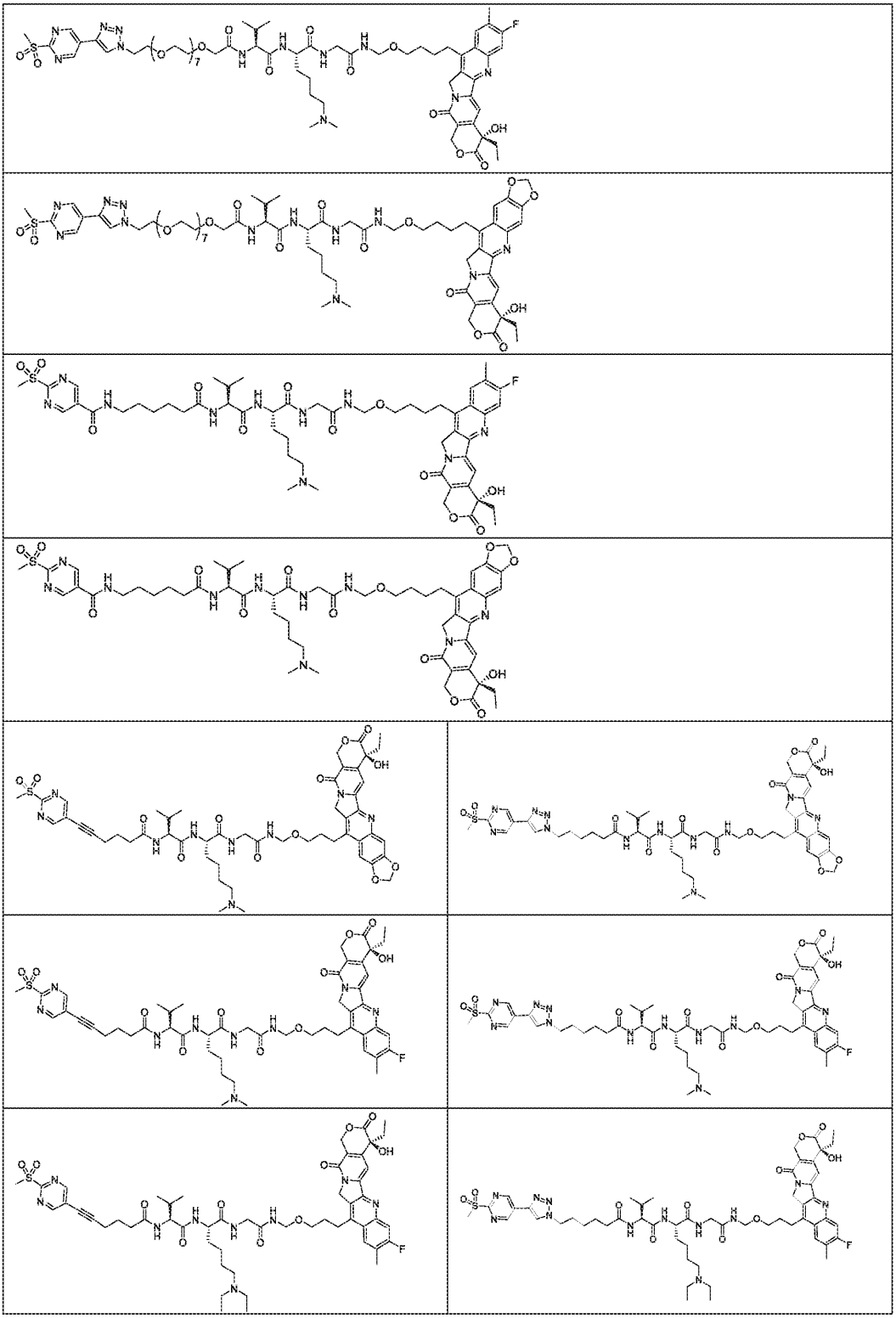


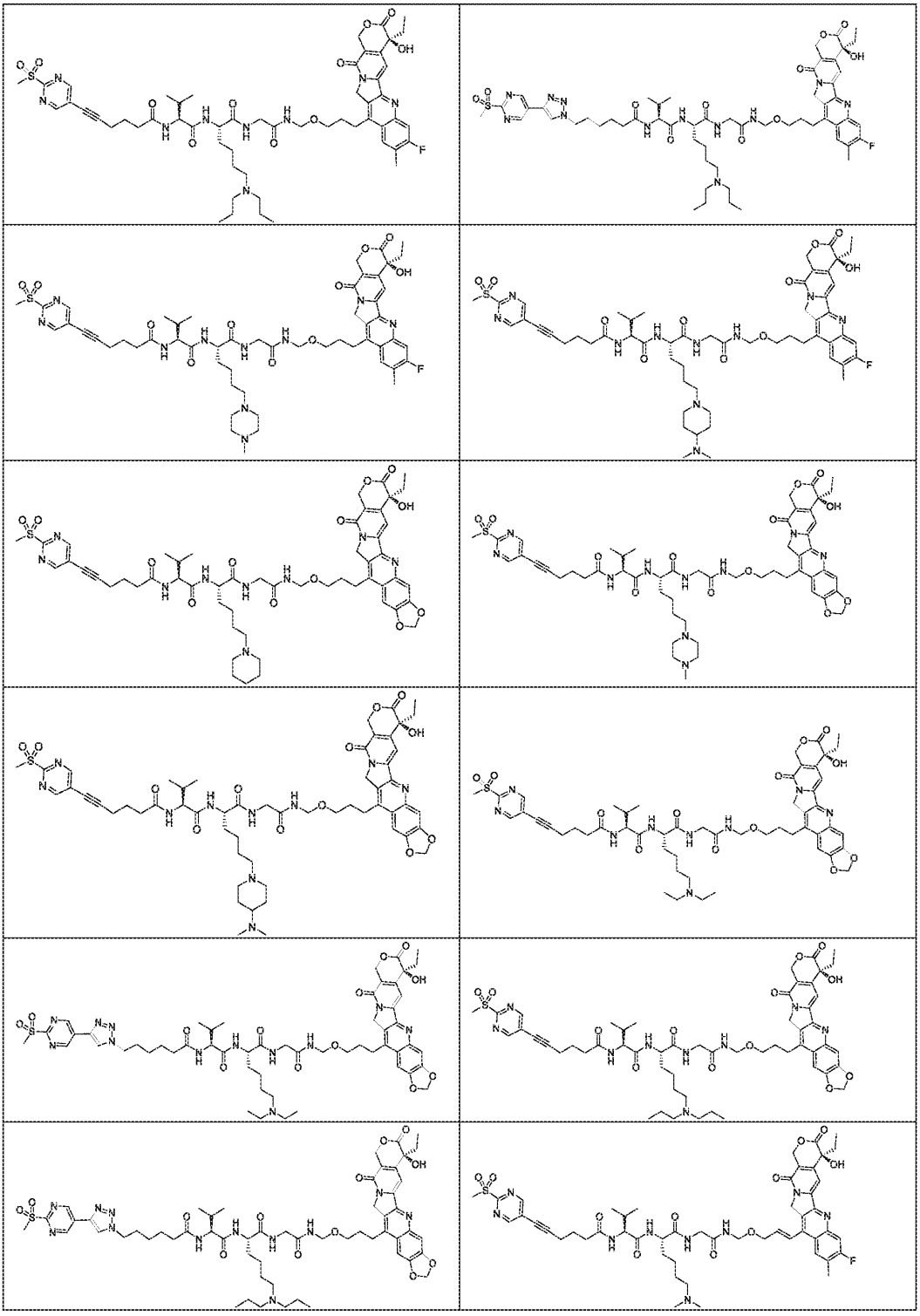


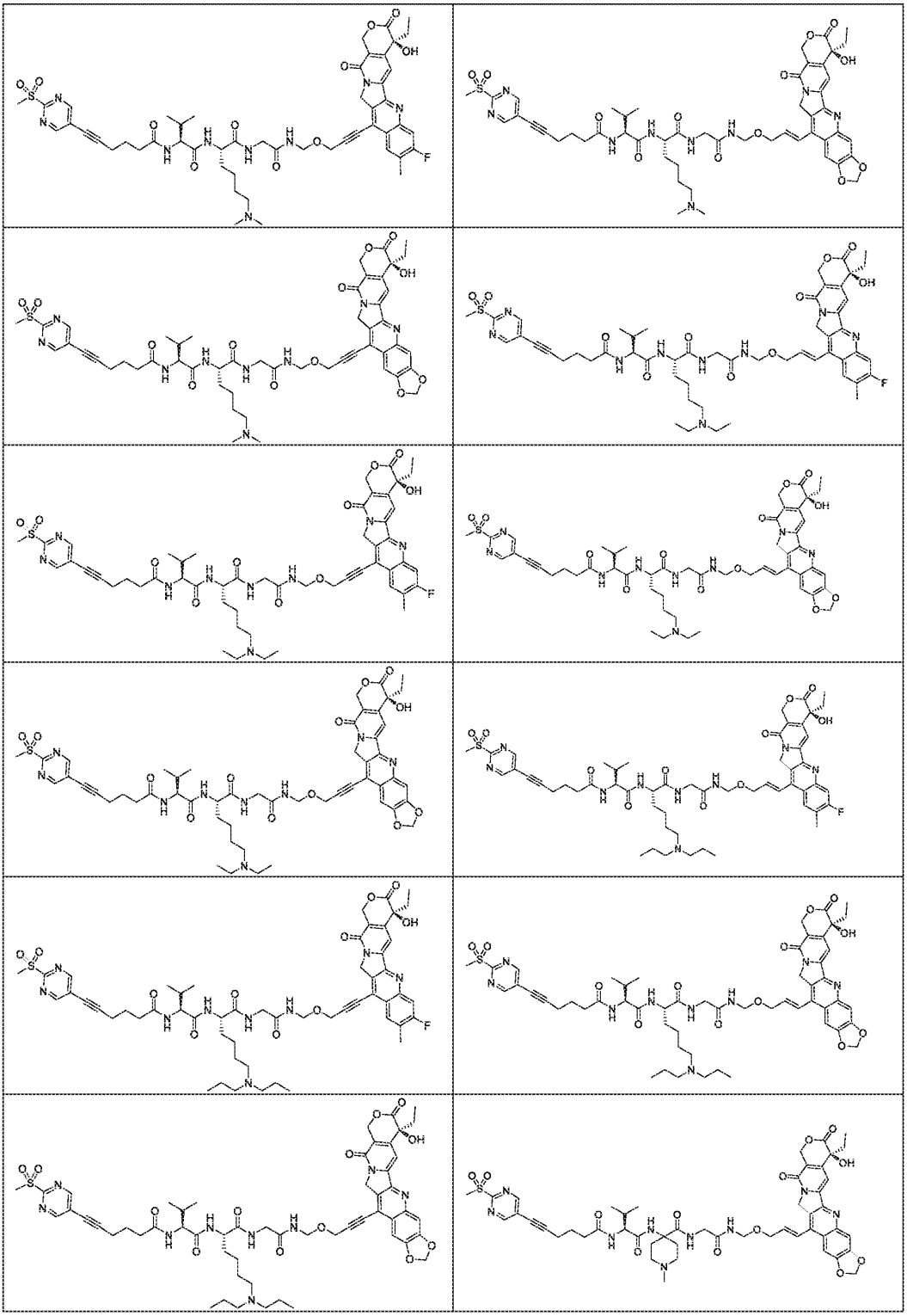


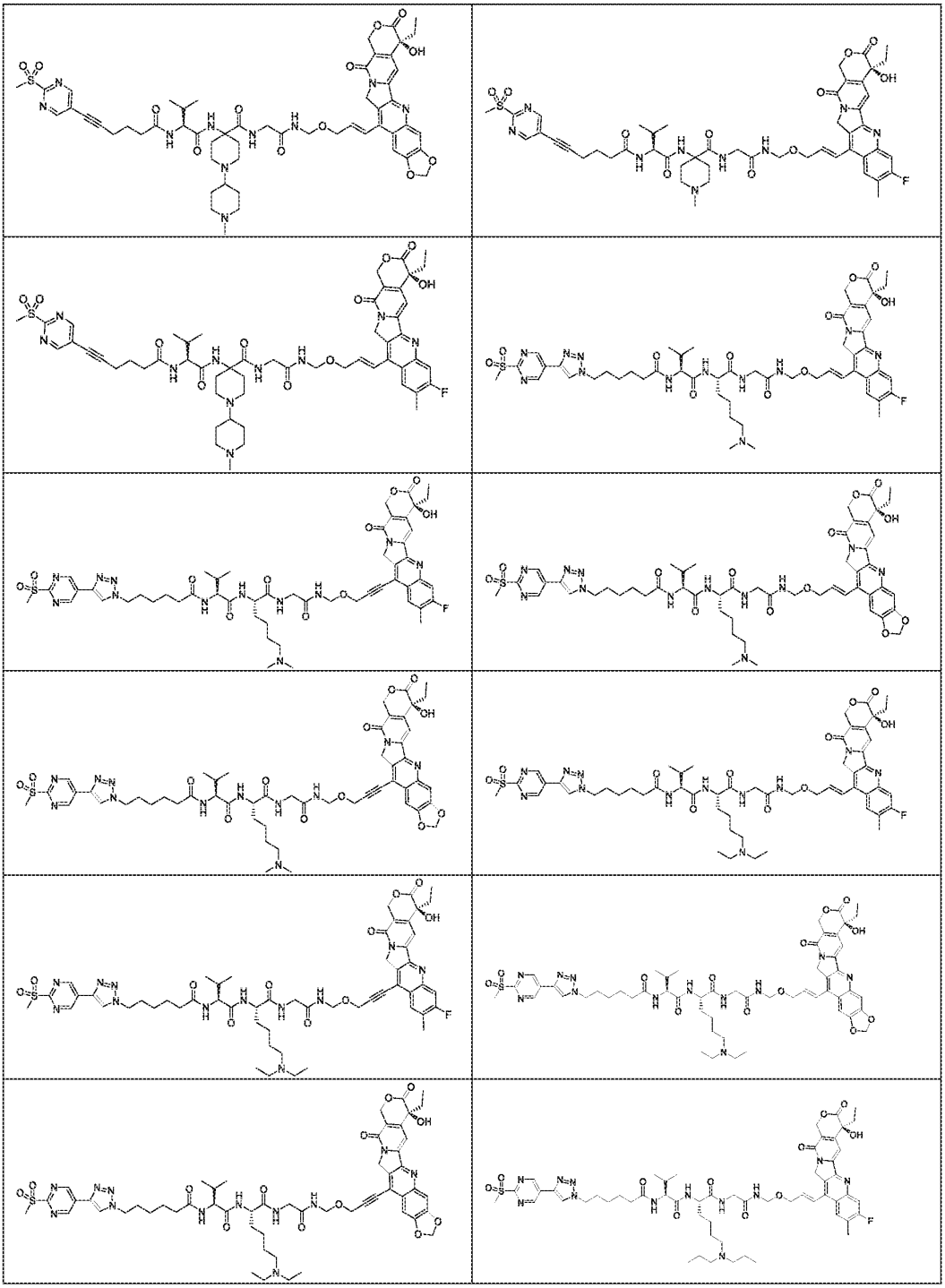


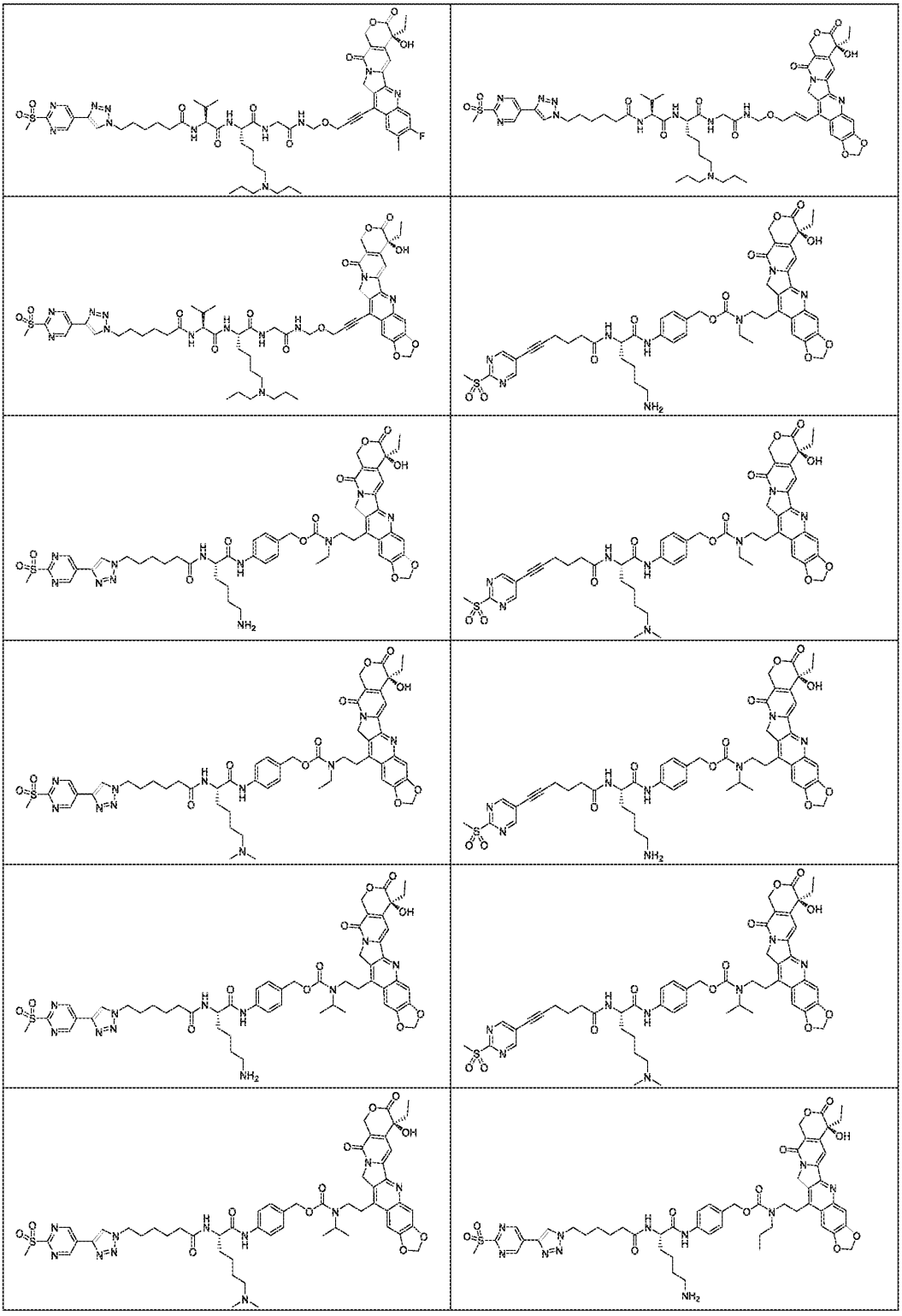


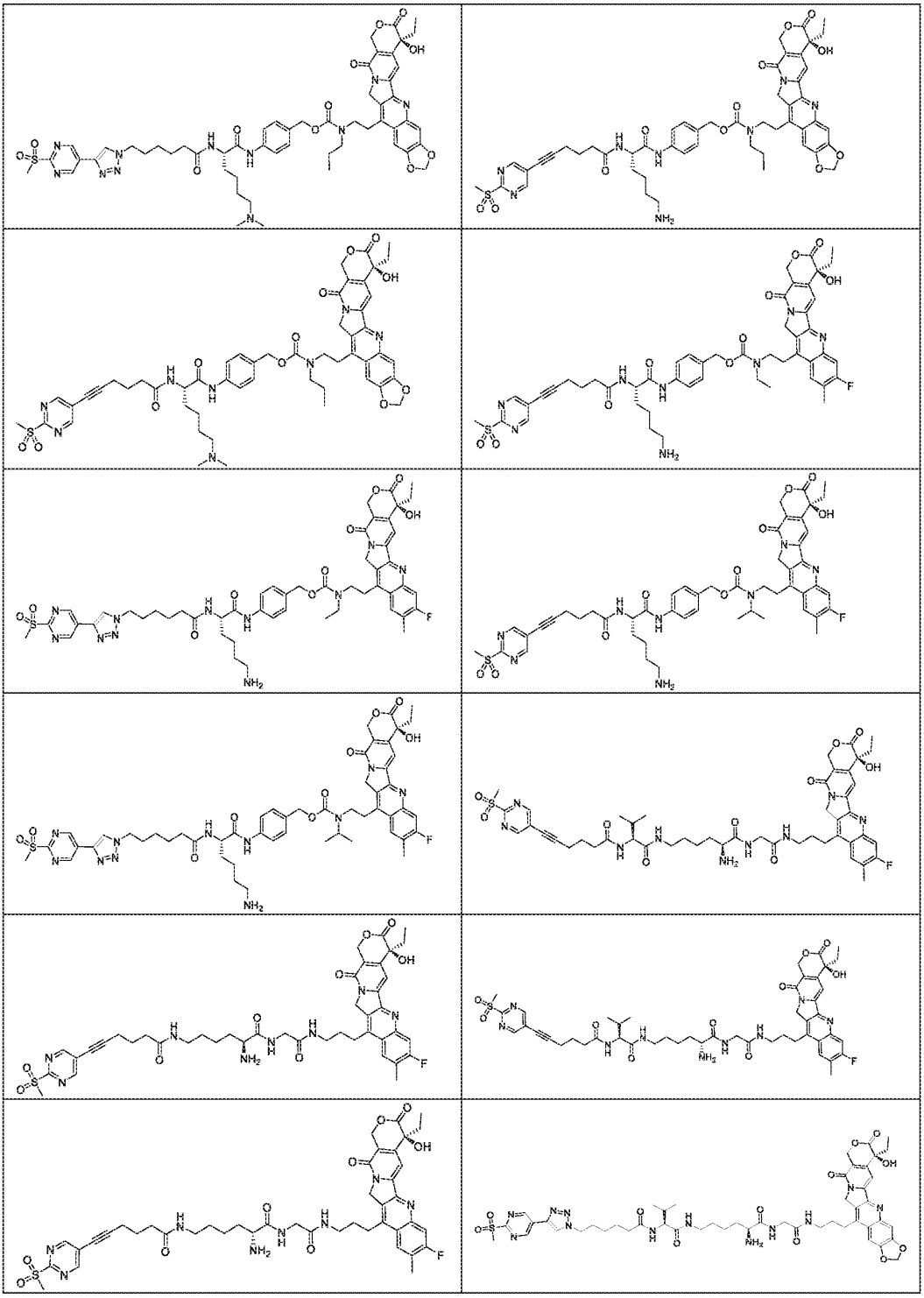


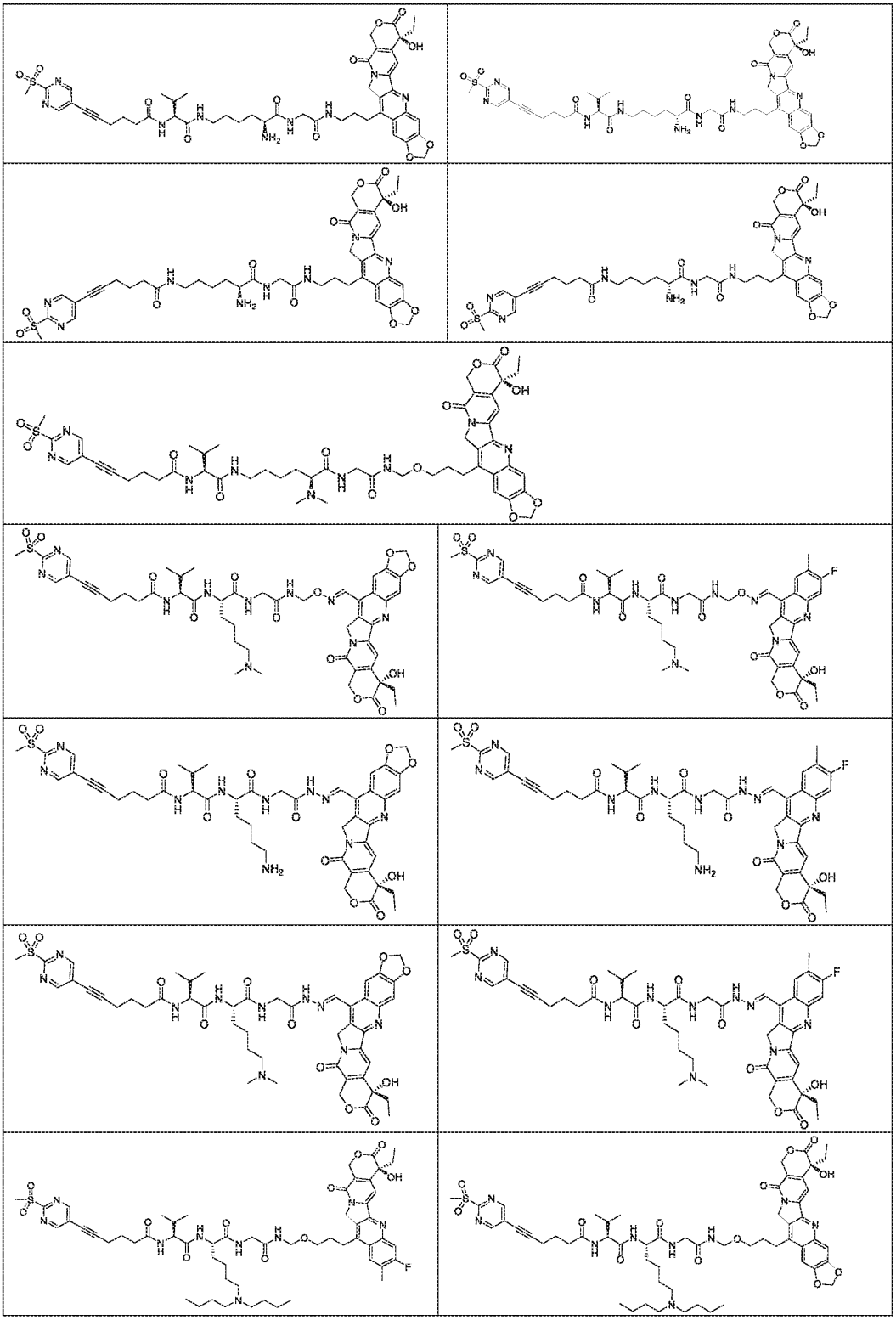


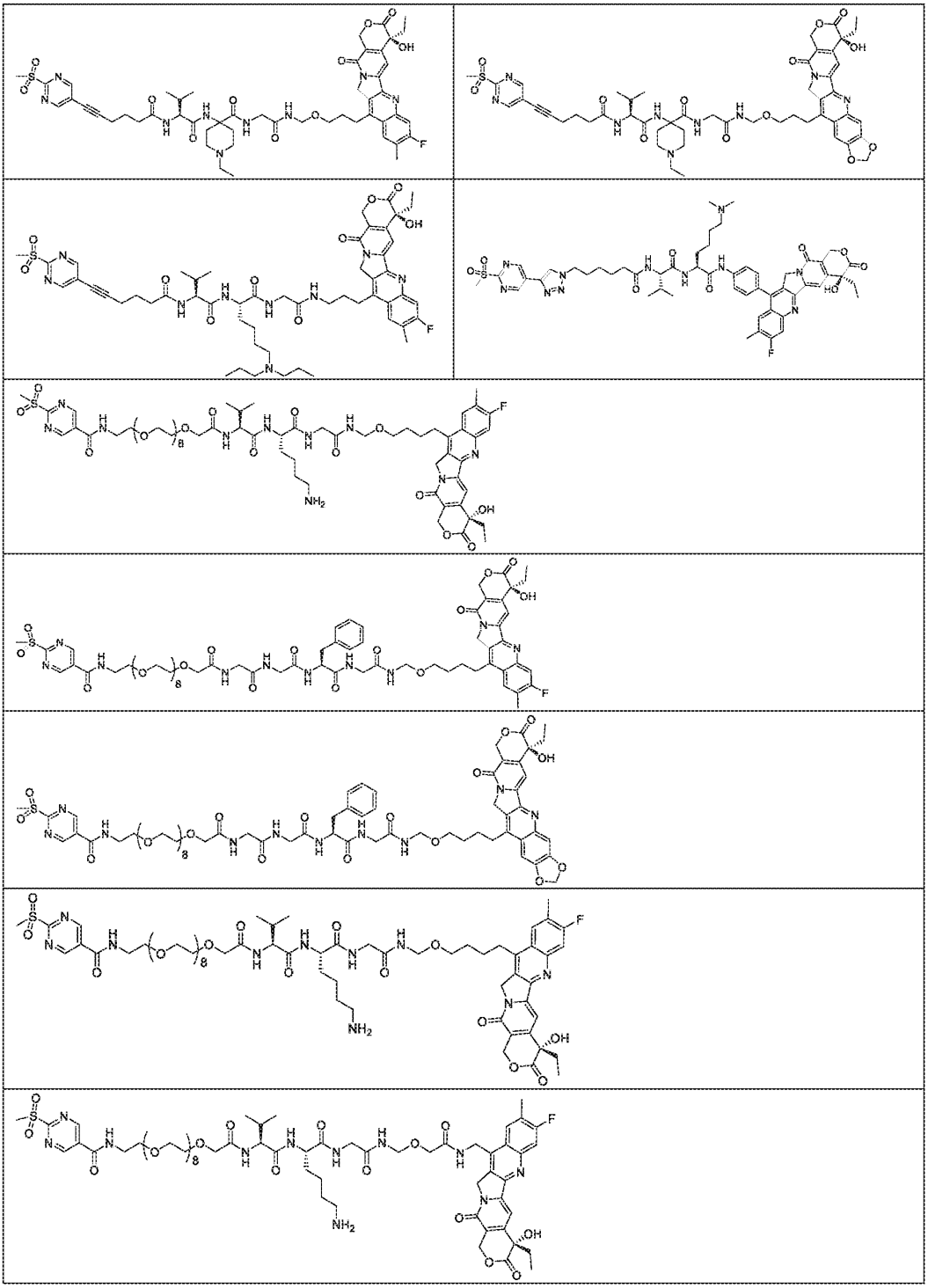


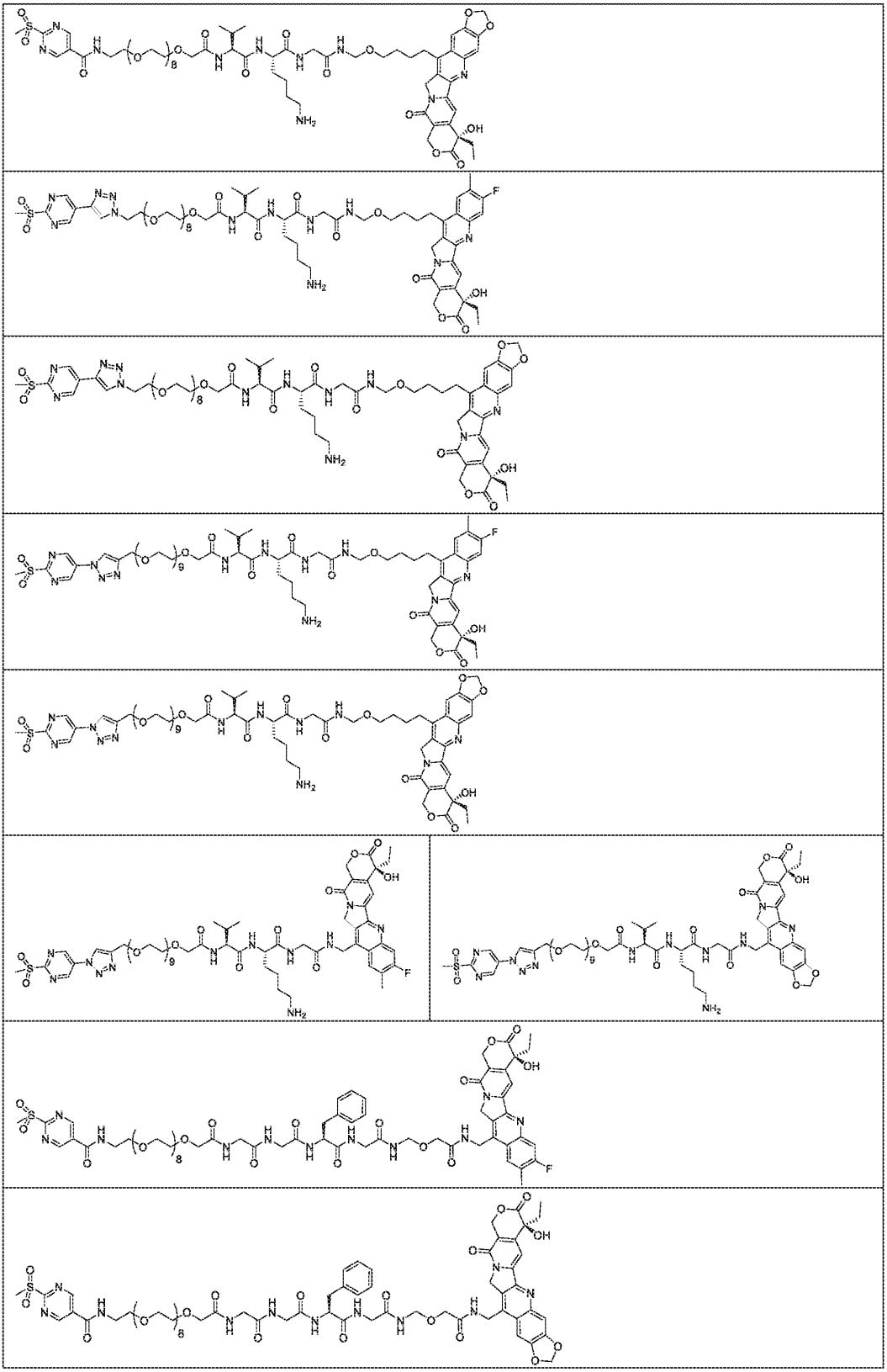


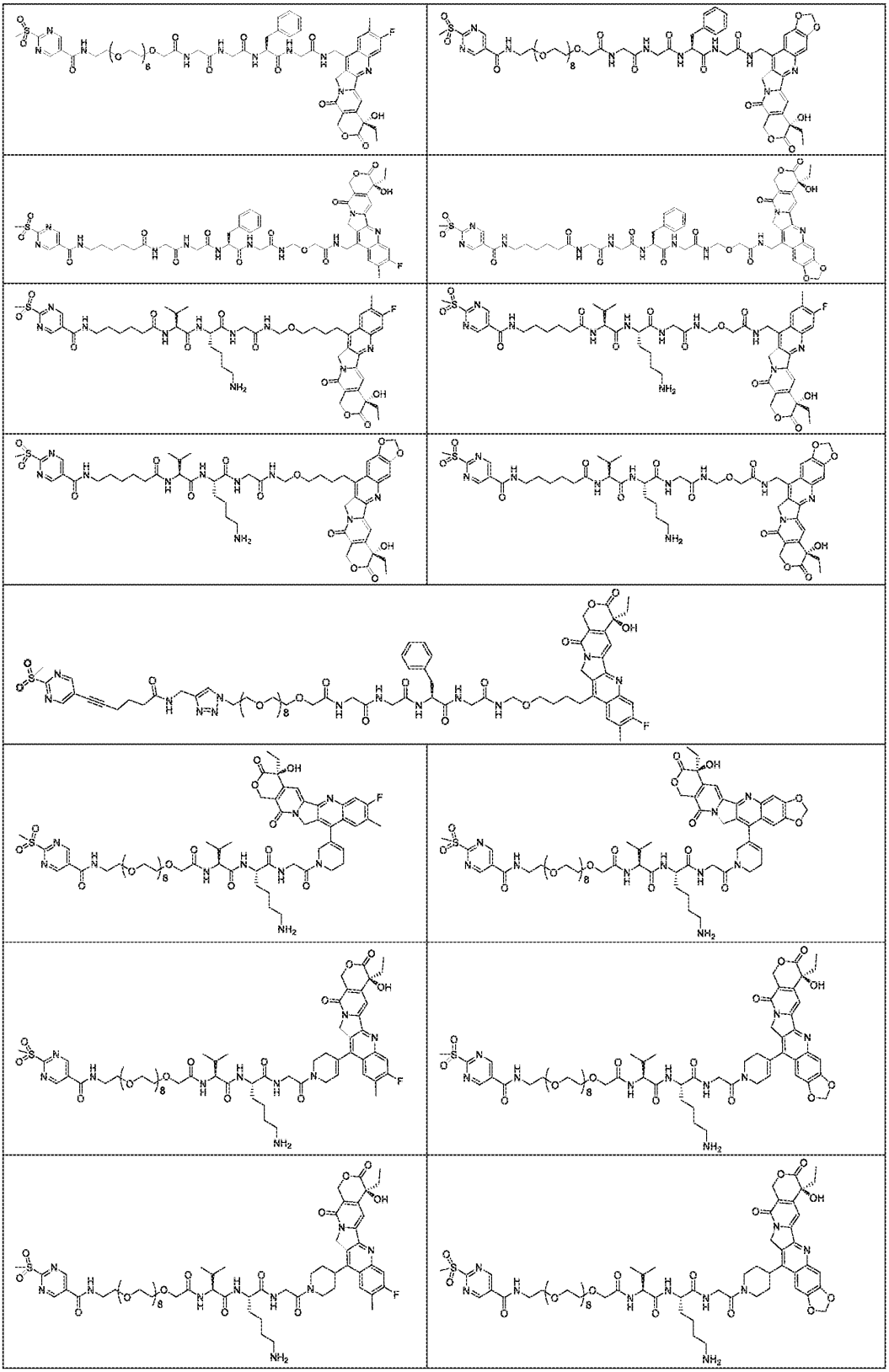


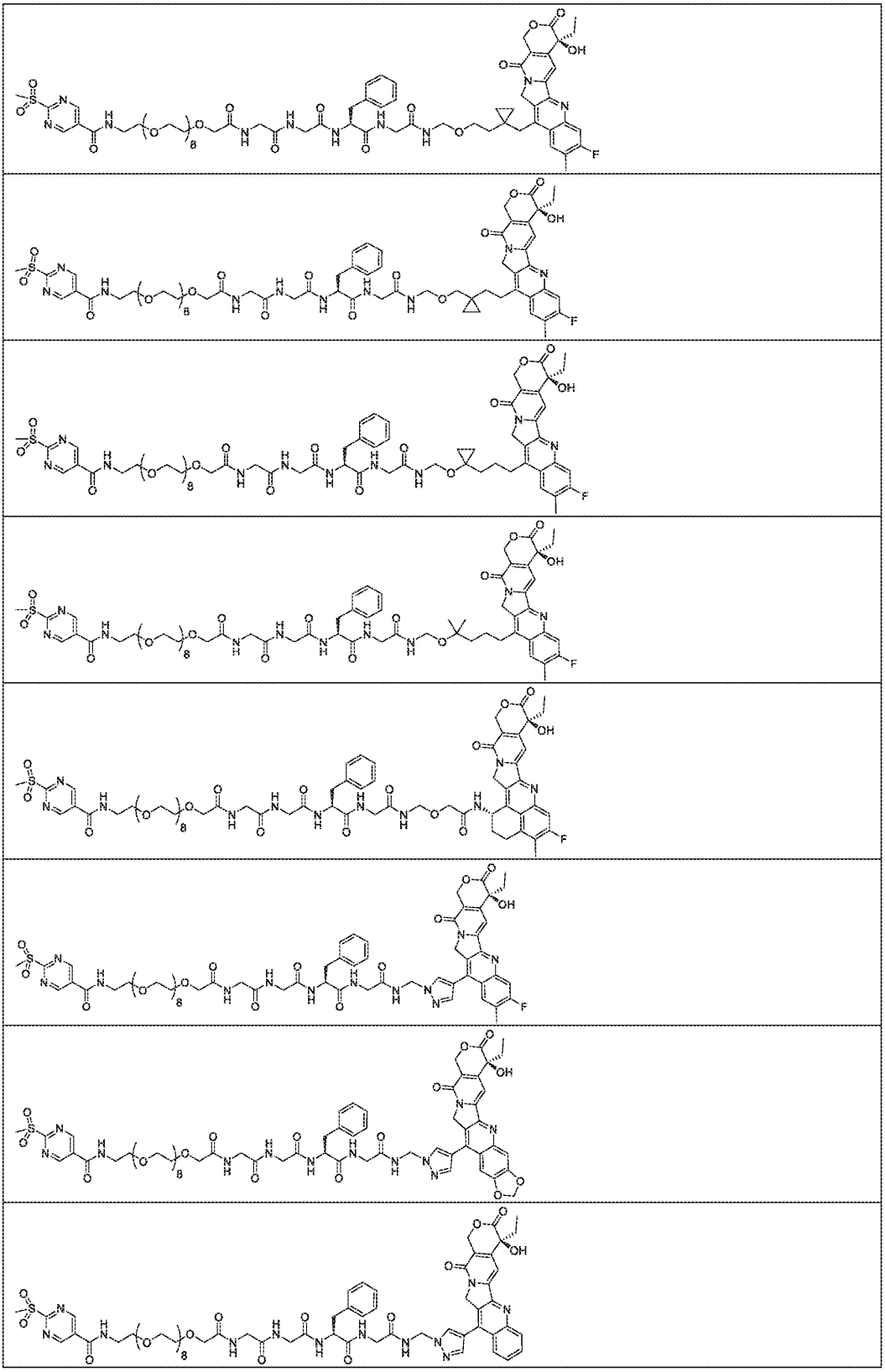


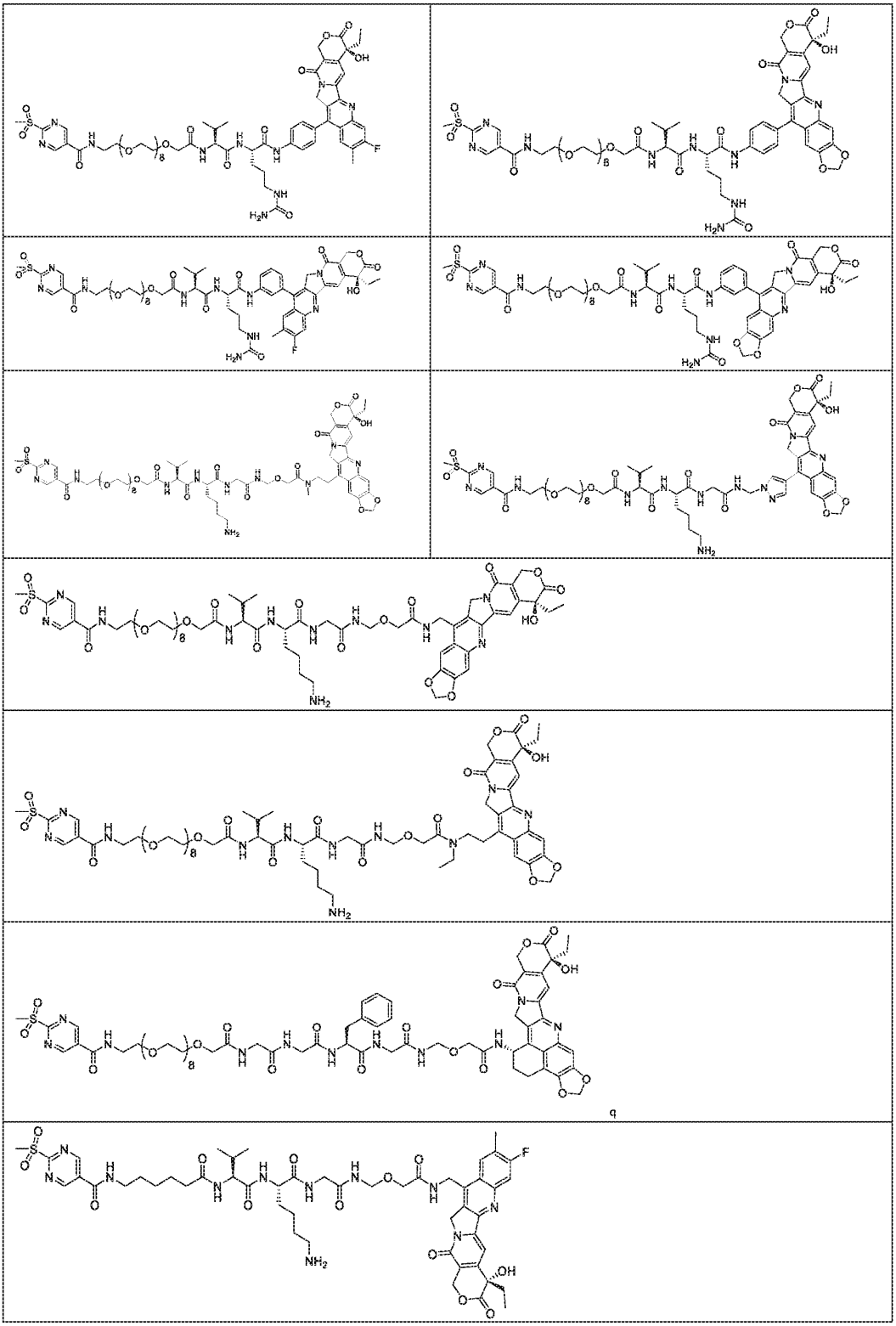




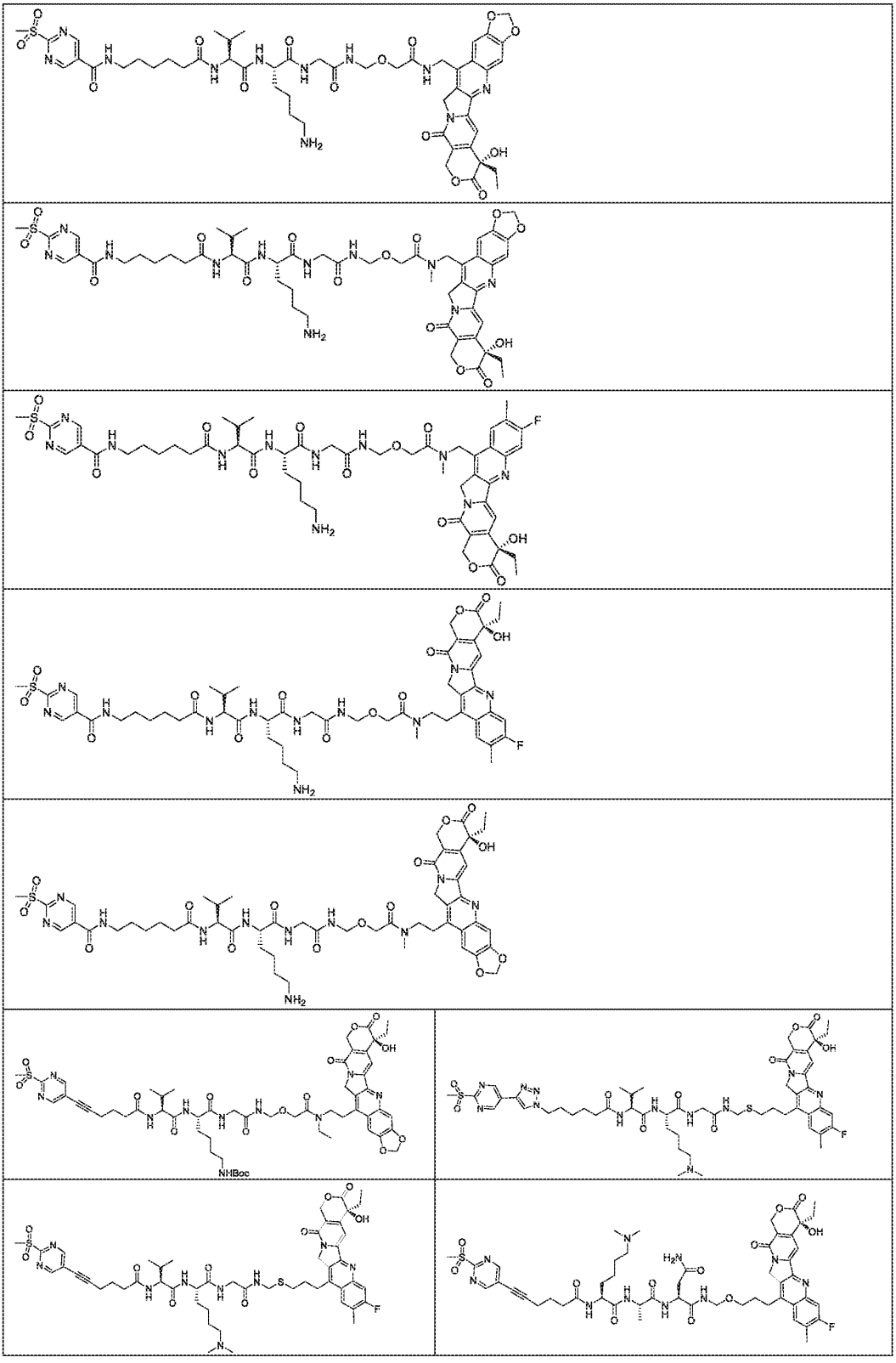








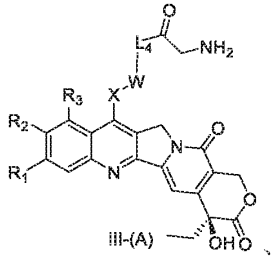
q



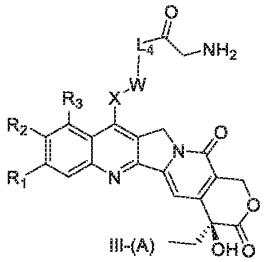
。

在一些实施方案中提供了化合物，其中式 III 所示的药物连接体偶联物中的 L1-L2-L3 单元已被部分裂解，从而留下与之键合的氨基酸残基的药物部分。

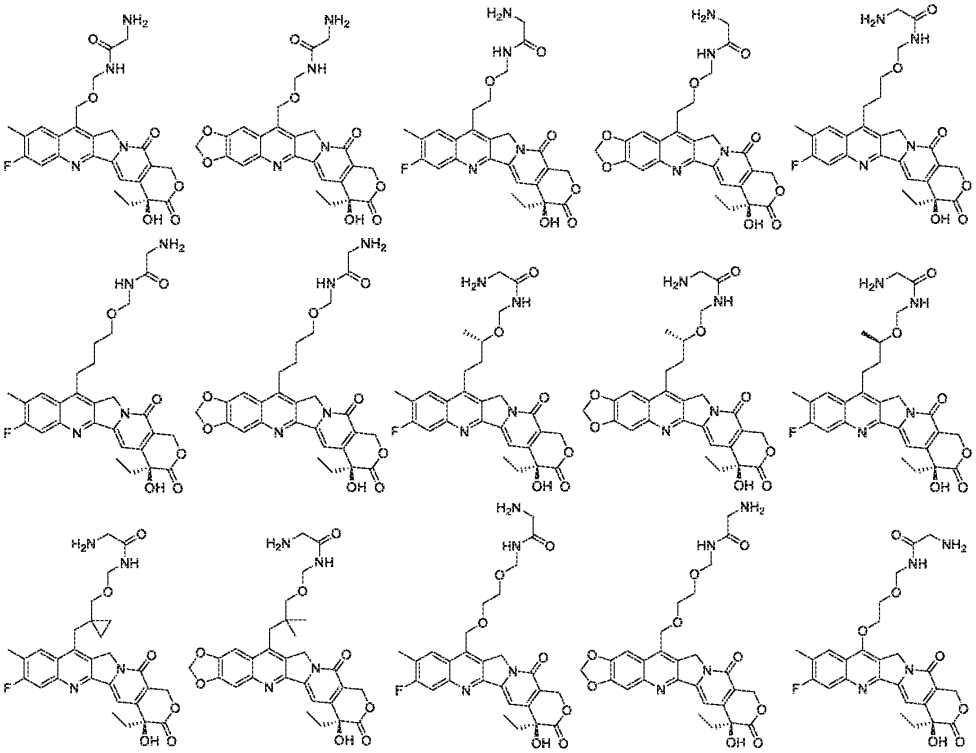
在一些实施方案中，部分释放的游离药物为式 III-(A)的化合物：

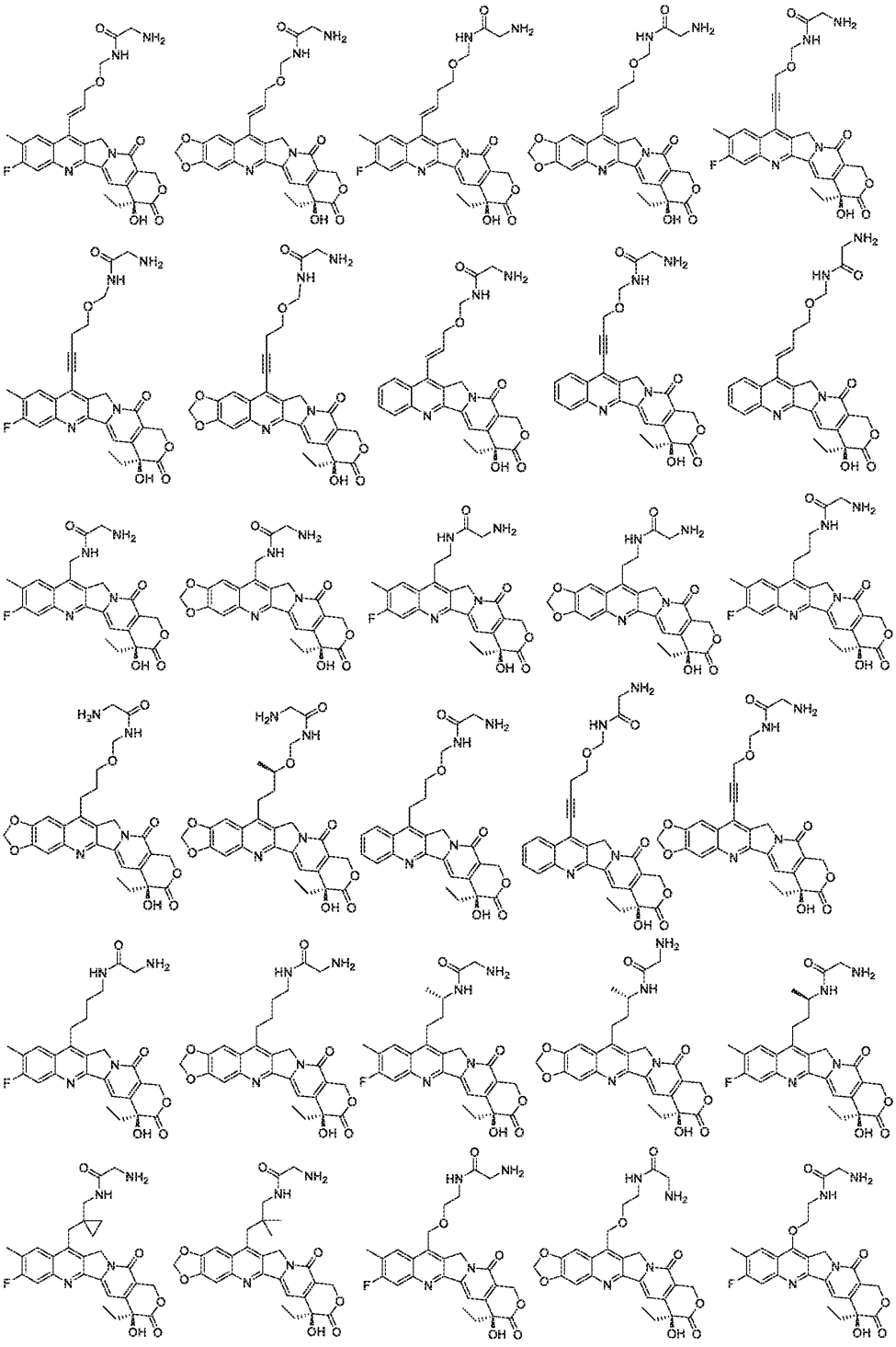


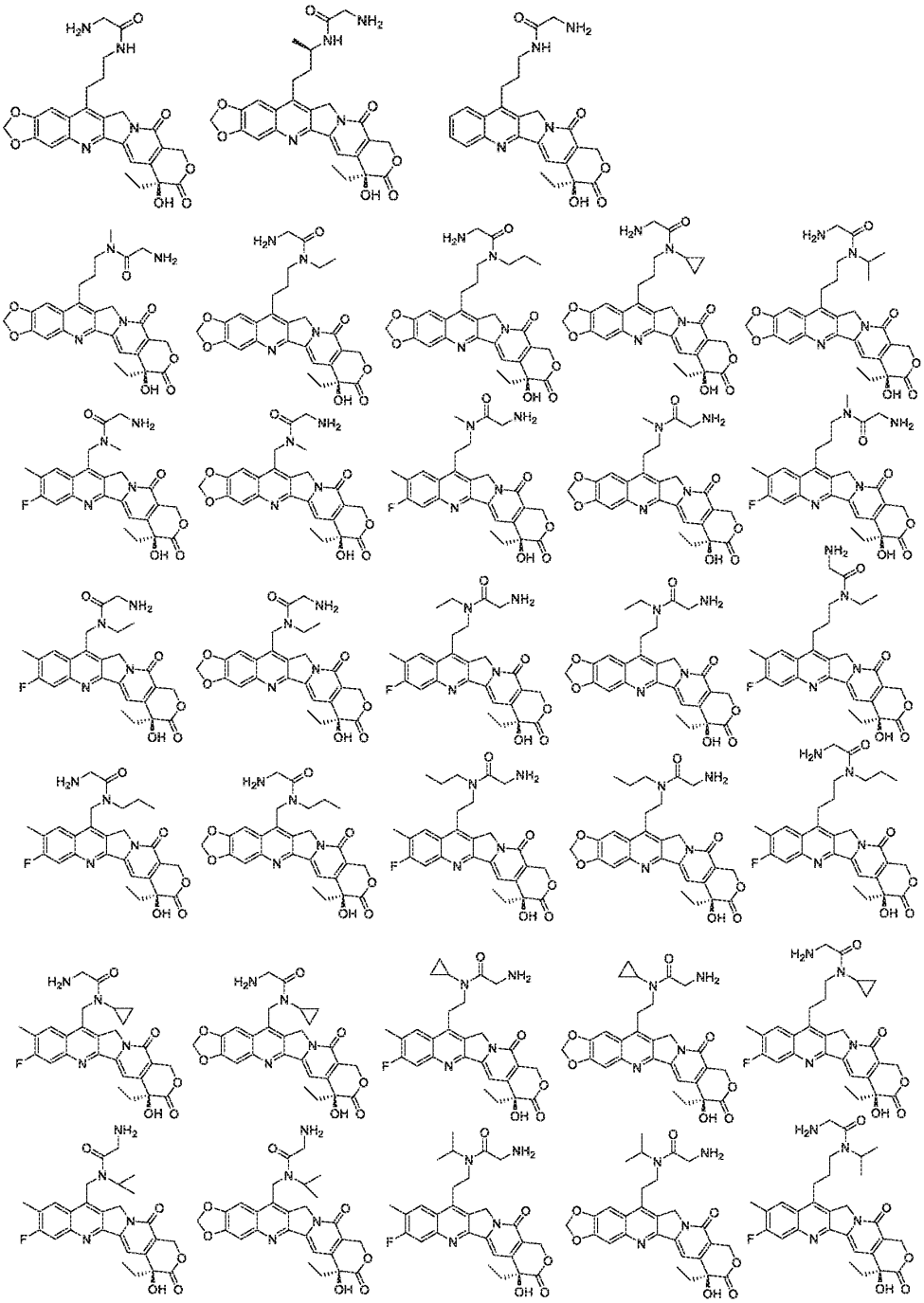
或其立体异构体或立体异构体的混合物，或其药学上可接受的盐，其中 L_4、X、W、R_1、R_2 和 R_3 具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义。

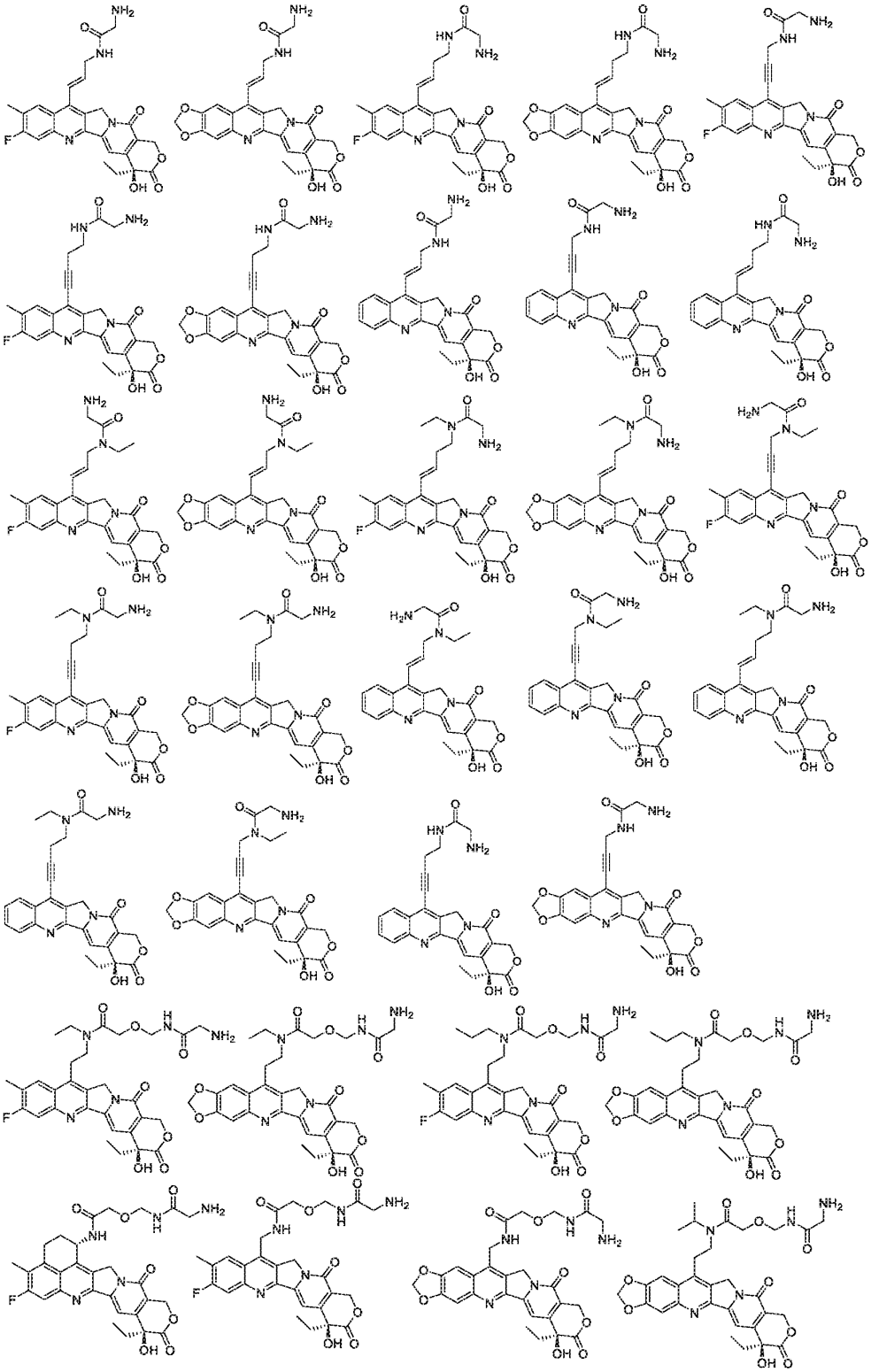


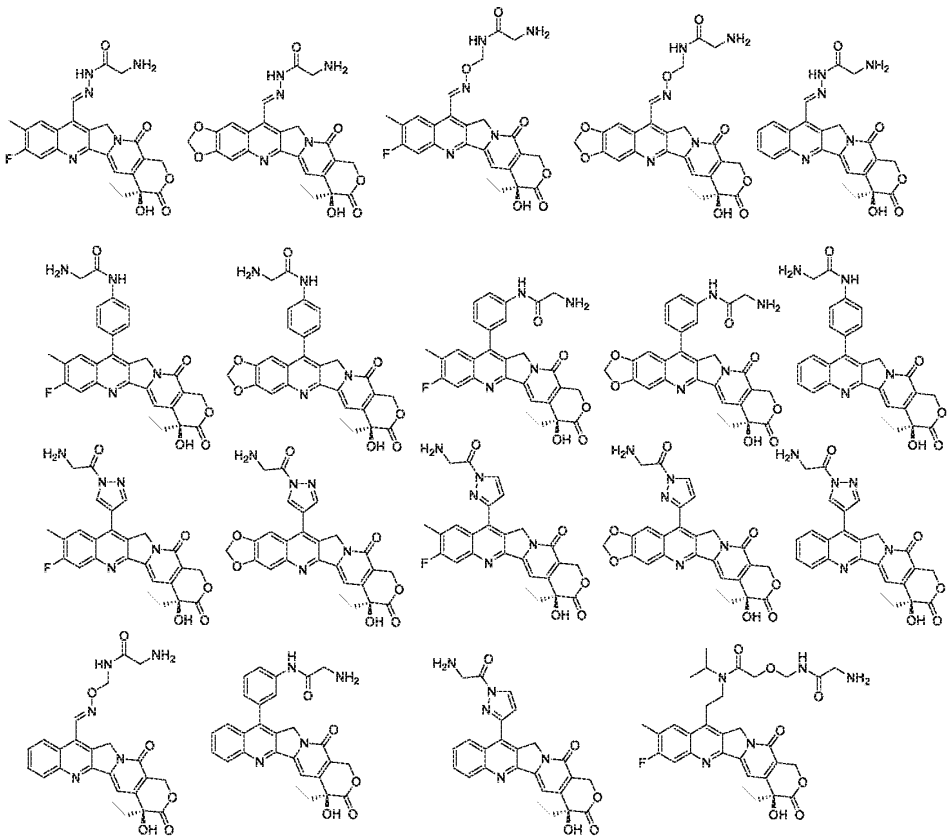
在一些实施方案中，III-(A)的结构选自以下：



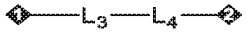








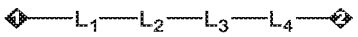
本公开还提供了一种配体药物偶联物中的连接体，其结构含如下所示片段：



其中，2 位与生物活性分子片段相连；(1 位与配体端相连，例如，当其与连接单元(例如 L_2)相连，再通过延伸单元(例如 L_1)与配体或靶向部分(Tb)相连；或者，当连接单元不存在时，直接与延伸单元相连，再进一步与配体相连)；

L_3、L_4 的定义如本公开中任一方案所述。

在一些实施方案中，所述的配体药物偶联物中的连接体，其结构如下所示：



其中，1 位与和靶点结合的配体或靶向部分相连，2 位与生物活性分子片段相连；

L_1、L_2、L_3、L_4 的定义如本公开中任一方案所述；

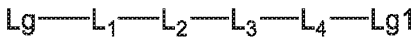
较佳地，所述的靶点结合的配体或靶向部分和所述的生物活性分子片段的定义分别如本公开中任一方案中的 Tb 和 D 所述。

在一些实施方案中，所述连接体 1 位与和抗体或其抗原结合片段相连，2 位与生物活性分子片段相连。

在一些实施方案中，所述连接体 1 位与和抗体或其抗原结合片段上的半胱氨酸或赖氨酸相连，2 位与生物活性分子片段相连；

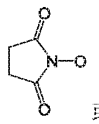
较佳地，所述的抗体或其抗原结合片段如本公开中任一方案所述。

在本公开的第四方面，本公开还提供了式 III-1 所示的连接体：

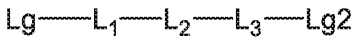


III-1

Lg、L_1、L_2、L_3和 L_4具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义；Lg1 为和药物分子反应时的离去基团。

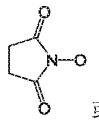
在一些实施方案中，Lg1 优选为-OH、  或卤素。

在本公开的第五方面，本公开还提供了式 III-2 所示的连接体：



III-2

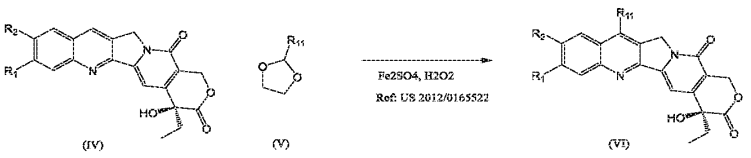
Lg、L_1、L_2和 L_3具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义；Lg2 为和 L4 或含有药物分子的片段反应时的离去基团。

在一些实施方案中，Lg2 优选为-OH、  或卤素。

在本公开的第六方面，本公开提供了式 II 所示化合物（药物分子、生物活性分子）、式 III 所示药物连接体偶联物的制备方法。

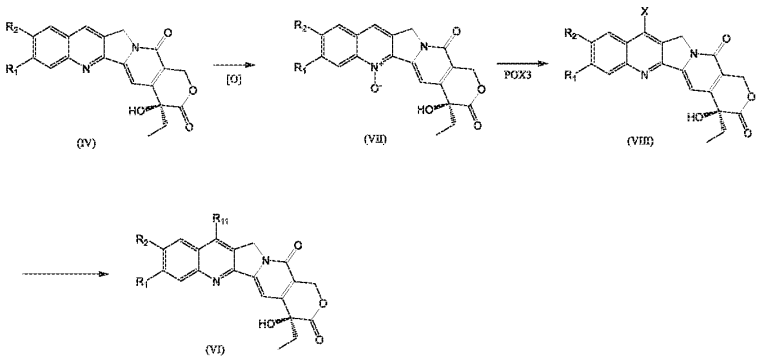
一方面，本公开提供了式 II 所示化合物（药物分子、生物活性分子）的制备方法。具体地：

通式所示化合物（IV）通过和化合物（V）在铁化合物催化下的烷基化反应或其它相关的 Minisci 反应可以获得化合物（VI）。



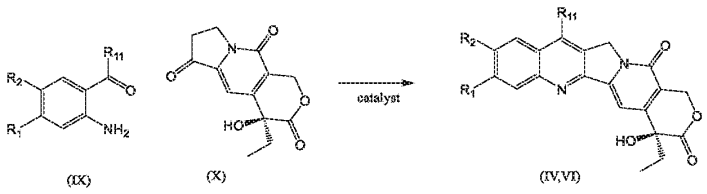
(IV) (V) (VI)

或者，化合物（IV）通过氮氧化反应生成化合物（VII），化合物（VII）通过三卤氧磷处理后生成化合物（IV）的卤代产物化合物（VIII）。化合物（VIII）可以通过多种形式的反应，如 Heck 反应，Suzuki 反应，Buchwald 反应，Nigishi 反应，Stille 反应等获得化合物（VI）。

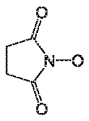


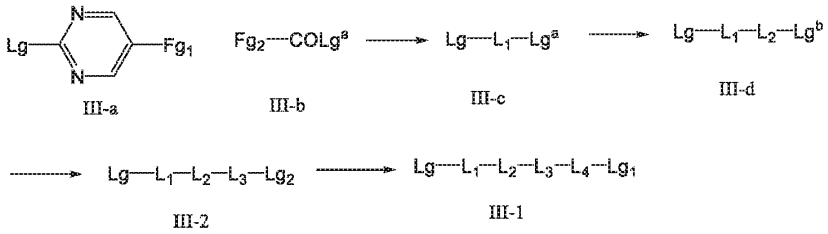
化合物（VI）中 R_{11} 可以通过多种化学转化，如氧化，还原，取代等多种教科书中常见的方法合成不同的或更加复杂的分子。

或者，化合物（VI）和化合物（IV）也可以通过如下所示的化合物（IX）和化合物（X）通过关环反应获得。



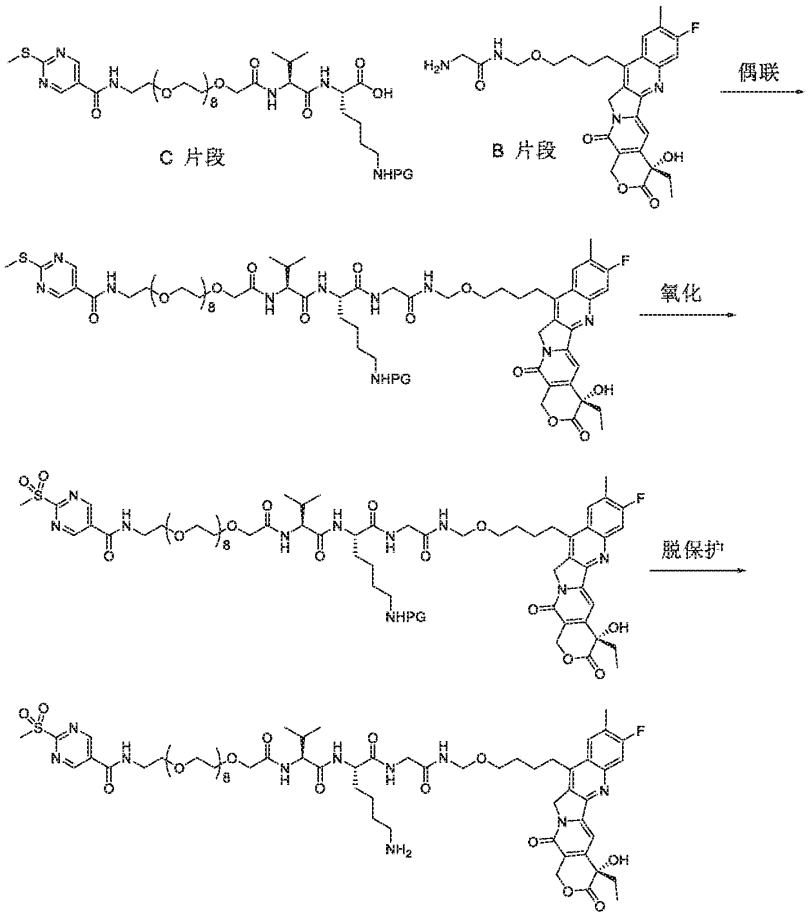
另一方面，本公开提供了式 III-1 和式 III-2 所示片段的制备方法。具体地：

化合物 III-a 通过其功能机团 Fg_1 和化合物 III-b 的功能机团 Fg_2 反应可以得到化合物 III-c， 化合物 III-c 通过其功能机团 Fg^a 可以获得化合物 III-d，类似转化可以获得通式化合物 III-2 和 III-1。Lg^a，Lg^b，Lg_1，Lg_2 为可反应的离去机团，如-OH、  或卤素等。

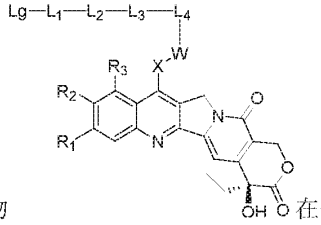


再另一方面，本公开提供了式 III 所示药物连接体偶联物的制备方法。具体地：

目标产物可以通过如下反应式所示的 B 片段和 C 片段的偶联得到，偶联产物经过一些常用的化学修饰，如氧化，脱保护等，即可得到通式 III 所示的药物连接体偶联物。



在本公开的第七方面，本公开提供了制备前述配体药物偶联物的方法，其包括：



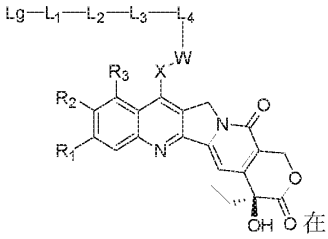
将 Tb 与式 III 所示的药物连接体偶联物 在合适的溶剂和条件下进行偶联反应：

其中：

Tb 具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义；

R_1、R_2、R_3、X、W、L_1、L_2、L_3、L_4、Lg 具有上文以及本文具体叙述的任何实施方案中所提供的含义。

在一些实施方案中，所述方法包括将 Tb 与式 III 所示的药物连接体偶联物



在合适的溶剂和条件下进行偶联反应形成 C-S 键的步骤。

在一些实施方案中，所述 Tb 与所述药物连接体偶联物的物质的量的比为 1:（1-20），如 1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:12、1:14、1:16、1:18、1:（10-20）、1:（12-20）、1:（14-20）、1:（16-20）或 1:（18-20）。

在一些实施方案中，所述偶联反应在水和/或有机溶剂中进行。

在一些实施方案中，所述有机溶剂选自 N,N-二甲基甲酰胺、二甲基亚砜、N-甲基吡咯烷酮、腈类(例如乙腈)、醇类(例如甲醇、乙醇)或其任意组合。

在一些实施方案中，所述方法进一步包括将偶联产物进行纯化的步骤。

在一些实施方案中，通过层析方法对所述偶联产物进行纯化。

在一些实施方案中，所述层析方法包括离子交换层析、疏水层析、反相层析或亲和层析中的一种或多种。

在本公开的第八方面，本公开提供了一种结合 B7H3 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如下的互补决定区（CDR）：

SEQ ID NO:3 或 23 所示的重链可变区（VH）中含有的 HCDR1 或其序列的变体、HCDR2 或其序列的变体以及 HCDR3 或其序列的变体；和/或

SEQ ID NO: 13 或 33 所示的轻链可变区（VL）中含有的 LCDR1 或其序列的变体、LCDR2 或其序列的变体以及 LCDR3 或其序列的变体。

在某些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 3 所示的 VH 中含有的 HCDR1 或其序列的变体、HCDR2 或其序列的变体以及 HCDR3 或其序列的变体; 和/或 SEQ ID NO: 13 所示的 VL 中含有的 LCDR1 或其序列的变体、LCDR2 或其序列的变体以及 LCDR3 或其序列的变体。

在某些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 3 所示的 VH 中含有的 HCDR1 或其序列的变体、HCDR2 或其序列的变体以及 HCDR3 或其序列的变体; 和/或 SEQ ID NO: 33 所示的 VL 中含有的 LCDR1 或其序列的变体、LCDR2 或其序列的变体以及 LCDR3 或其序列的变体。

在某些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 23 所示的 VH 中含有的 HCDR1 或其序列的变体、HCDR2 或其序列的变体以及 HCDR3 或其序列的变体; 和/或 SEQ ID NO: 33 所示的 VL 中含有的 LCDR1 或其序列的变体、LCDR2 或其序列的变体以及 LCDR3 或其序列的变体。

在某些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 23 所示的 VH 中含有的 HCDR1

或其序列的变体、HCDR2 或其序列的变体以及 HCDR3 或其序列的变体; 和/或 SEQ ID NO: 13 所示的 VL 中含有的 LCDR1 或其序列的变体、LCDR2 或其序列的变体以及 LCDR3 或其序列的变体。

在某些优选实施方案中，所述序列的变体为与其来源 CDR 相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的 CDR。

在某些优选实施方案中，所述的置换为保守置换。

优选地，所述 CDR 根据 AbM、Chothia、Kabat 或 IMGT 编号系统定义。

在某些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段的 VH 和/或 VL 中包括来自人的免疫球蛋白的构架区(FR)。

在某些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段结合人 B7H3 和/或猴 B7H3。在某些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段结合人 2Ig B7H3。在某些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段结合人 4Ig B7H3。在某些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段结合猴 4Ig B7H3。在某些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段结合人 2Ig B7H3 和人 4Ig B7H3，并且更优先结合人 4Ig B7H3。在某些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段结合人 4Ig B7H3，而不结合人 2Ig B7H3。

在一个方面，本公开提供了一种能够结合 B7H3 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：重链可变区（VH）和/或轻链可变区（VL）。

在某些实施方案中，本公开的抗体或其抗原结合片段包含下述重链可变区（VH）和/或轻链可变区（VL），其中 CDR 按 IMGT 编号系统定义：

(a) 包含如下 3 个 CDR 的重链可变区（VH）：序列为 SEQ ID NO:10 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:11 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:12 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区（VL）：序列为 SEQ ID NO:20 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 LCDR1，序列为 GTF 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:22 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 LCDR3；

(b) 包含如下 3 个 CDR 的重链可变区（VH）：序列为 SEQ ID NO:30 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:31 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3

个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:32 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区（VL）：序列为 SEQ ID NO:40 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 LCDR1，序列为 GAS 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:42 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 LCDR3；

(c) 包含如下 3 个 CDR 的重链可变区（VH）：序列为 SEQ ID NO:10 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:11 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:12 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区（VL）：序列为 SEQ ID NO:40 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 LCDR1，序列为 GAS 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:42 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 LCDR3；

或

(d) 包含如下 3 个 CDR 的重链可变区（VH）：序列为 SEQ ID NO:30 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:31 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:32 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区（VL）：序列为 SEQ ID NO:20 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 LCDR1，序列为 GTF 的 LCDR2 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列，序列为 SEQ ID NO:22 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 LCDR3。

在某些实施方案中，本公开的抗体或其抗原结合片段包含下述重链可变区（VH）和/或轻链可变区（VL），其中 CDR 按 IMGT 编号系统定义：

(a) 包含如下 3 个 CDR 的重链可变区（VH）：序列为 SEQ ID NO:10 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:11 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:12 的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区（VL）：序列为 SEQ ID NO:20 的 LCDR1，序列为 GTF 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:22 的 LCDR3；

(b) 包含如下 3 个 CDR 的重链可变区（VH）：序列为 SEQ ID NO:10 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:11 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:12 的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区（VL）：序列为 SEQ ID NO:40 的 LCDR1，序列为 GAS 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:42 的 LCDR3；

(c) 包含如下 3 个 CDR 的重链可变区（VH）：序列为 SEQ ID NO:30 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:31 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:32 的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区（VL）：序列为 SEQ ID NO:40 的 LCDR1，序列为 GAS 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:42 的 LCDR3；

或

(d) 包含如下 3 个 CDR 的重链可变区（VH）：序列为 SEQ ID NO:30 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:31 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:32 的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区（VL）：序列为 SEQ ID NO:20 的 LCDR1，序列为 GTF 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:22 的 LCDR3。

在某些实施方案中，本公开的抗体或其抗原结合片段包含下述重链可变区（VH）和/或轻链可变区（VL），其中 CDR 按 Chothia 编号系统定义：

(a) 包含如下 3 个 CDR 的重链可变区（VH）：序列为 SEQ ID NO:4 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:5 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:6 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区（VL）：序列为 SEQ ID NO:14 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO:15 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:16 或与其相比具有一个或几个氨基

酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 LCDR3；

(b) 包含如下 3 个 CDR 的重链可变区（VH）：序列为 SEQ ID NO:4 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:5 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:6 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区（VL）：序列为 SEQ ID NO:34 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO:35 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:36 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 LCDR3；

(c) 包含如下 3 个 CDR 的重链可变区（VH）：序列为 SEQ ID NO:24 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:25 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:26 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区（VL）：序列为 SEQ ID NO:34 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO:35 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:36 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 LCDR3；

或

(d) 包含如下 3 个 CDR 的重链可变区（VH）：序列为 SEQ ID NO:24 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:25 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:26 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区（VL）：序列为 SEQ ID NO:14 或与其相比具有一个或几个氨基

酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO:15 的 LCDR2 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列，序列为 SEQ ID NO:16 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 LCDR3。

在某些实施方案中，本公开的抗体或其抗原结合片段包含下述重链可变区（VH）和/或轻链可变区（VL），其中 CDR 按 chothia 编号系统定义：

(a) 包含如下 3 个 CDR 的重链可变区（VH）：序列为 SEQ ID NO:4 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:5 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:6 的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区（VL）：序列为 SEQ ID NO:14 的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO:15 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:16 的 LCDR3；

(b) 包含如下 3 个 CDR 的重链可变区（VH）：序列为 SEQ ID NO:24 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:25 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:26 的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区（VL）：序列为 SEQ ID NO:34 的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO:35 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:36 的 LCDR3；

(c) 包含如下 3 个 CDR 的重链可变区（VH）：序列为 SEQ ID NO:4 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:5 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:6 的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区（VL）：序列为 SEQ ID NO:34 的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO:35 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:36 的 LCDR3；

或

(d) 包含如下 3 个 CDR 的重链可变区（VH）：序列为 SEQ ID NO:24 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:25 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:26 的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区（VL）：序列为 SEQ ID NO:14 的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO:15 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:16 的 LCDR3。

在某些实施方案中，本公开的抗体或其抗原结合片段包含下述重链可变区（VH）和/或轻链可变区（VL），其中 CDR 按 kabat 编号系统定义：

(a) 包含如下 3 个 CDR 的重链可变区（VH）：序列为 SEQ ID NO:7 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:8 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:9 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区（VL）：序列为 SEQ ID NO:17 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO:18 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:19 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 LCDR3；

(b) 包含如下 3 个 CDR 的重链可变区（VH）：序列为 SEQ ID NO:27 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:28 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:29 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区（VL）：序列为 SEQ ID NO:37 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO:38 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:39 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 LCDR3；

(c) 包含如下 3 个 CDR 的重链可变区（VH）：序列为 SEQ ID NO:7 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:8 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:9 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区（VL）：序列为 SEQ ID NO:37 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO:38 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:39 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 LCDR3；

或

(d) 包含如下 3 个 CDR 的重链可变区（VH）：序列为 SEQ ID NO:27 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:28 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3

个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:29 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区（VL）：序列为 SEQ ID NO:17 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO:18 的 LCDR2 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列，序列为 SEQ ID NO:19 或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列的 LCDR3。

在某些实施方案中，本公开的抗体或其抗原结合片段包含下述重链可变区（VH）和/或轻链可变区（VL），其中 CDR 按 kabat 编号系统定义：

(a) 包含如下 3 个 CDR 的重链可变区（VH）：序列为 SEQ ID NO:7 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:8 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:9 的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区（VL）：序列为 SEQ ID NO:17 的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO:18 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:19 的 LCDR3；

(b) 包含如下 3 个 CDR 的重链可变区（VH）：序列为 SEQ ID NO:27 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:28 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:29 的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区（VL）：序列为 SEQ ID NO:37 的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO:38 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:39 的 LCDR3；

(c) 包含如下 3 个 CDR 的重链可变区（VH）：序列为 SEQ ID NO:7 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:8 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:9 的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区（VL）：序列为 SEQ ID NO:37 的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO:38 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:39 的 LCDR3；

或

(d) 包含如下 3 个 CDR 的重链可变区（VH）：序列为 SEQ ID NO:27 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:28 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:29 的 HCDR3；和/或，

包含如下 3 个 CDR 的轻链可变区（VL）：序列为 SEQ ID NO:17 的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO:18 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:19 的 LCDR3。

在某些实施方案中，本公开的抗体或其抗原结合片段包含下述重链可变区（VH）和/或轻链可变区（VL），其中，与前述 IMGT、chothia 或 kabat 定义的 CDR 相比，所述重链可变区（VH）和/或轻链可变区（VL）中至少一个 CDR 含有突变，所述突变为一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合）。

优选地，本公开所述的置换为保守置换。

在某些实施方案中，本公开的抗体或其抗原结合片段的 VH 包含来源于人免疫球蛋白的重链可变区（VH）的构架区（FR），和/或所述抗体或其抗原结合片段的 VL 包含来源于人免疫球蛋白的轻链可变区（VL）的构架区（FR）。因此，在某些实施方案中，本公开的抗体或其抗原结合片段是人源化的。在某些实施方案中，本公开的抗体或其抗原结合片段是全人源的。

在某些实施方案中，本公开的抗体或其抗原结合片段的 VH 包含来源于人免疫球蛋白的重链可变区（VH）的构架区（FR），和/或所述抗体或其抗原结合片段的 VL 包含来源于人免疫球蛋白的轻链可变区（VL）的构架区（FR）。因此，在某些实施方案中，本公开的抗体或其抗原结合片段是人源化的。在某些实施方案中，本公开的抗体或其抗原结合片段是全人源的。

在某些实施方案中，本公开的抗体或其抗原结合片段包含：

(a) 人免疫球蛋白的重链构架区或其变体，所述变体与其所源自的胚系抗体基因编码的氨基酸序列相比具有至多 20 个氨基酸的保守置换（例如至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个或至多 5 个氨基酸的保守置换；例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的保守置换）；和/或

(b) 人免疫球蛋白的轻链构架区或其变体，所述变体与其所源自的胚系抗体基因编码的氨基酸序列相比具有至多 20 个氨基酸的保守置换（例如至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个或至多 5 个氨基酸的保守置换；例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的保守置换）。

在某些实施方案中，本公开的抗体或其抗原结合片段的人源化程度为至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%。

在某些实施方案中，本公开的抗体或其抗原结合片段包含：

(a) 重链可变区（VH），其包含选自下列的氨基酸序列：

(i) SEQ ID NO:3 或 23 所示的序列；

(ii) 与 SEQ ID NO:3 或 23 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合（例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合）的序列；或

(iii) 与 SEQ ID NO:3 或 23 所示的序列相比具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；

和/或

(b) 轻链可变区（VL），其包含选自下列的氨基酸序列：

(iv) SEQ ID NO:13 或 33 所示的序列；

(v) 与 SEQ ID NO:13 或 33 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合（例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合）的序列；或

(vi) 与 SEQ ID NO:13 或 33 所示的序列相比具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列。

在某些实施方案中，本公开的抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO:3 所示的 VH，和/或, SEQ ID NO:13 所示的 VL。

在某些实施方案中，本公开的抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO:23 所示的 VH，和/或, SEQ ID NO:33 所示的 VL。

在某些实施方案中，本公开的抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO:3 所示的 VH，和/或, SEQ ID NO:33 所示的 VL。

在某些实施方案中，本公开的抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO:23 所示的 VH，和/或, SEQ ID NO:13 所示的 VL。

在某些实施方案中，本公开的抗体或其抗原结合片段包含：

(a) SEQ ID NO:3 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:13 所示序列的 VL；

(b) SEQ ID NO:23 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:33 所示序列的 VL；

(c) SEQ ID NO:3 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:33 所示序列的 VL；

(d) SEQ ID NO:23 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:13 所示序列的 VL.

(e) 重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），其中所述重链可变区（VH）和轻链可变区（VL）独立地与(a)至(f)任一组中所述的 VH 和 VL 相比分别具有至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性；或

(f) 重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），其中所述重链可变区（VH）和轻链可变区（VL）与(a)至(d)任一组中所述的 VH 和 VL 分别相比，独立地具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合（例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合）。优选地，所述的置换是保守置换。

在某些实施方案中，本公开的抗体或其抗原结合片段的重链包含人免疫球蛋白的重链恒定区（CH）或其变体，所述变体与其所源自的野生型序列相比具有至多 50 个氨基酸的保守置换（例如至多 45 个、至多 40 个、至多 35 个、至多 30 个、至多 25 个、至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个或至多 5 个氨

基酸的保守置换；例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的保守置换）。在某些实施方案中，本公开的抗体或其抗原结合片段的轻链包含人免疫球蛋白的轻链恒定区（CL）或其变体，所述变体与其所源自的野生型序列相比具有至多 50 个氨基酸的保守置换（例如至多 45 个、至多 40 个、至多 35 个、至多 30 个、至多 25 个、至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个或至多 5 个氨基酸的保守置换；例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的保守置换）。

在一些实施方案中，恒定区被改变，例如被突变，以修饰抗 B7H3 抗体分子的性质（例如改变下列中的一个或多个特性：Fc 受体结合、抗体糖基化、半胱氨酸残基的数目、效应细胞功能或补体功能）。可以通过将抗体恒定区中的至少一个氨基酸残基替换为不同残基，产生功能改变，例如，改变抗体对效应子配体（如 FcR 或补体 C1q）的亲和力，从而改变效应子功能（例如降低）。抗体的 Fc 区介导几种重要的效应子功能，例如 ADCC、吞噬作用(ADCP)、CDC 等。

在某些实施方案中，本公开的抗体或其抗原结合片段具有重链恒定区（CH），其选自例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD 和 IgE 的重链恒定区；特别地选自例如 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 的重链恒定区，更特别地选自 IgG1（例如是人 IgG1）的重链恒定区。在一些实施方案中，人 IgG1 重链恒定区如 SEQ ID NO:43 所示。在一些实施方案中，本公开的抗体或其抗原结合片段具有轻链恒定区，其选自例如 κ 或 λ 轻链恒定区，优选 κ 轻链恒定区（例如人 κ 轻链恒定区）。在一些实施方案中，轻链恒定区具有如 SEQ ID NO:44 所示的序列。

在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO:43 所示的 CH 或其变体，所述变体与 SEQ ID NO:43 相比具有至多 20 个氨基酸的保守置换（例如至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个或至多 5 个氨基酸的保守置换；例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的保守置换），或者与 SEQ ID NO:43 相比具有至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性。

在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含轻链恒定区或其变体。在一些实施方案中，所述轻链恒定区包含 κ 轻链恒定区。在一些实施方案中，所述轻链恒定区包含 SEQ ID NO:44 所示的轻链恒定区（CL）或其变体，所述变体与 SEQ ID NO:44 相比具有至多 20 个氨基酸的保守置换（例如至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个或至多 5 个氨基酸的保守置换；例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的保守置换），或者与 SEQ ID NO:16 相比具有至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性;

在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO:43 所示的重链恒定区（CH）和

SEQ ID NO:44 所示的轻链恒定区（CL）。

在某些实施方案中，本公开的抗体或其抗原结合片段包含：

(a) 重链，其包含选自下列的氨基酸序列：

(i) 包含 SEQ ID NO:3 所示的 VH 序列和 SEQ ID NO:43 所示的 CH 序列的序列；

(ii) 与(i)所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合（例如至多 50 个、至多 45 个、至多 40 个、至多 35 个、至多 30 个、至多 25 个、至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个或至多 5 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合；例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合）的序列；或

(iii)与(i)所示的序列相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；以及

(b) 轻链，其包含选自下列的氨基酸序列：

(iv) 包含 SEQ ID NO:13 所示的 VL 序列和 SEQ ID NO:44 所示的 CL 序列的序列；

(v) 与(iv)所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合（例如至多 50 个、至多 45 个、至多 40 个、至多 35 个、至多 30 个、至多 25 个、至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个或至多 5 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合；例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合）的序列；或

(vi) 与(iv)所示的序列相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列。

在某些实施方案中，(ii)或(v)中所述的置换是保守置换。

在某些实施方案中，本公开的抗体或其抗原结合片段包含：

(a) 重链，其包含选自下列的氨基酸序列：

(i) 包含 SEQ ID NO:23 所示的 VH 序列和 SEQ ID NO:43 所示的 CH 序列的序列；

(ii) 与(i)所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合（例如至多 50 个、至多 45 个、至多 40 个、至多 35 个、至多 30 个、至多 25 个、至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个或至多 5 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合；例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合）的序列；或

(iii)与(i)所示的序列相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；以及

(b) 轻链，其包含选自下列的氨基酸序列：

(iv) 包含 SEQ ID NO:33 所示的 VL 序列和 SEQ ID NO:44 所示的 CL 序列的序列；

(v) 与(iv)所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合（例如至多

50 个、至多 45 个、至多 40 个、至多 35 个、至多 30 个、至多 25 个、至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个或至多 5 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合；例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合）的序列；或

(vi) 与(iv)所示的序列相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列。

在某些实施方案中，(ii)或(v)中所述的置换是保守置换。

在某些实施方案中，本公开的抗体或其抗原结合片段包含重链和轻链，

所述重链包含：

(i) SEQ ID NO:45 所示的序列；

(ii) 与(i)所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合（例如至多 50 个、至多 45 个、至多 40 个、至多 35 个、至多 30 个、至多 25 个、至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个或至多 5 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合；例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合）的序列；或

(iii) 与(i)所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；和

所述轻链包含：

(iv) SEQ ID NO:46 所示的序列；

(v) 与(iv)所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合（例如至多 50 个、至多 45 个、至多 40 个、至多 35 个、至多 30 个、至多 25 个、至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个或至多 5 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合；例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合）的序列；或

(vi) 与(iv)所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列;

优选地，(ii)或(v)中所述的置换是保守置换。

在某些实施方案中，本公开的抗体或其抗原结合片段包含重链和轻链，

所述重链包含：

(i) SEQ ID NO:47 所示的序列；

(ii) 与(i)所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合（例如至多 50 个、至多 45 个、至多 40 个、至多 35 个、至多 30 个、至多 25 个、至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个或至多 5 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合；例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合）的序列；或

(iii) 与(i)所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；和

所述轻链包含：

(iv) SEQ ID NO:48 所示的序列；

(v) 与(iv)所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合（例如至多 50 个、至多 45 个、至多 40 个、至多 35 个、至多 30 个、至多 25 个、至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个或至多 5 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合；例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合）的序列；或

(vi) 与(iv)所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列;

优选地，(ii)或(v)中所述的置换是保守置换。

在某些实施方案中，本公开的抗体是嵌合抗体，人源化抗体或全人源抗体。在某些实施方案中，本公开的抗体或其抗原结合片段选自 scFv、Fab、Fab'、$(Fab')_2$、Fv 片段、二硫键连接的 Fv(dsFv)、双抗体(diabody).

在某些实施方案中，本公开的抗体是 scFv。在某些实施方案中，本公开的 scFv 包含：

(a) SEQ ID NO:3 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:13 所示序列的 VL；

(b) SEQ ID NO:23 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:33 所示序列的 VL；

(c) SEQ ID NO:3 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:33 所示序列的 VL；

(d) SEQ ID NO:23 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:13 所示序列的 VL.

(e) 重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），其中所述重链可变区（VH）和轻链可变区（VL）独立地与(a)至(d)任一组中所述的 VH 和 VL 相比分别具有至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性；或

(f) 重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），其中所述重链可变区（VH）和轻链可变区（VL）与(a)至(d)任一组中所述的 VH 和 VL 分别相比，独立地具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合（例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合）。优选地，所述的置换是保守置换。

在某些实施方案中，本公开的抗体是 scFv。在某些实施方案中，本公开的 scFv 包含：

(i) SEQ ID NO:1 或 2 所示的序列；

(ii) 与(i)所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合（例如至多 50 个、至多 45 个、至多 40 个、至多 35 个、至多 30 个、至多 25 个、至多 20 个、至多 15 个、至多 10

个或至多 5 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合；例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合）的序列；或

(iii) 与(i)所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；

优选地，(ii)中所述的置换是保守置换。

在某些实施方案中，本公开的抗体是 scFv。

在某些实施方案中，本公开的 scFv 包含 SEQ ID NO:1 或 2 所示的序列。

抗体衍生物

本公开的抗体或其抗原结合片段可进行衍生化，例如被连接至另一个分子（例如另一个多肽或蛋白）。通常，抗体或其抗原结合片段的衍生化（例如，标记）不会对其与 B7H3（特别是人 B7H3）的结合产生不利影响。因此，本公开的抗体或其抗原结合片段还意欲包括此类衍生化的形式。例如，可以将本公开的抗体或其抗原结合片段连接（通过化学偶合、基因融合、非共价连接或其它方式）于一个或多个其它分子基团，例如另一个抗体（例如，形成双特异性抗体），检测试剂，药用试剂，和/或能够介导抗体或其抗原结合片段与另一个分子结合的蛋白或多肽（例如，抗生物素蛋白或多组氨酸标签）。

一种类型的衍生化抗体（例如，双特异性抗体）是通过交叉连接 2 个或更多个抗体（属于同一类型或不同类型）而产生的。获得双特异性抗体的方法是本领域公知的，其实例包括但不限于，化学交联法、细胞工程法（杂交瘤法）或基因工程法。

另一种类型的衍生化抗体是标记的抗体。例如，可以将本公开的抗体或其抗原结合片段连接至可检测的标记。本公开所述的可检测的标记可以是可通过荧光、光谱、光化学、生物化学、免疫学、电学、光学或化学手段检测的任何物质。这类标记是本领域熟知的，其实例包括但不限于，酶（例如，辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、脲酶、葡萄糖氧化酶，等）、放射性核素（例如，3H、125I、35S、14C 或 32P）、荧光染料（例如，异硫氰酸荧光素（FITC）、荧光素、异硫氰酸四甲基罗丹明（TRITC）、藻红蛋白（PE）、德克萨斯红、罗丹明、量子点或花菁染料衍生物（例如 Cy7、Alexa 750））、吖啶酯类化合物、磁珠（例如，Dynabeads®）、测热标记物例如胶体金或有色玻璃或塑料（例如，聚苯乙烯、聚丙烯、乳胶，等）珠、以及用于结合上述标记物修饰的亲和素（例如，链霉亲和素）的生物素。教导该标记物的使用的专利包括，但不限于，美国专利 3,817,837；3,850,752；3,939,350；3,996,345；4,277,437；4,275,149；及 4,366,241（全部通过引用并入本文）。如上所述的可检测的标记可通过本领域已知的方法检测。例如，放射性标记可使用摄影胶片或闪烁计算器检测，荧光标记物可使用光检测器检测，以检测发射的光。酶标记物一般通过给酶提供底物及检测通过酶对底物的作用产生的反应产物来检测，及测热标记物通过简单可视化着色标记物来检测。在某些实施方案中，此类标

记能够适用于免疫学检测（例如，酶联免疫测定法、放射免疫测定法、荧光免疫测定法、化学发光免疫测定法等）。在某些实施方案中，可通过不同长度的接头（linker）将如上所述的可检测的标记连接至本公开的抗体或其抗原结合片段，以降低潜在的位阻。

此外，本公开的抗体或其抗原结合片段还可以用化学基团进行衍生，例如聚乙二醇（PEG），甲基或乙基，或者糖基。这些基团可用于改善抗体的生物学特性，例如增加血清半衰期。

本公开的抗原结合片段可以通过水解完整的抗体分子获得（参见 Morimoto et al., J. Biochem. Biophys. Methods 24:107-117 (1992) and Brennan et al., Science 229:81 (1985)）。另外，这些抗原结合片段也可以直接由重组宿主细胞产生（reviewed in Hudson, Curr. Opin. Immunol. 11: 548-557 (1999); Little et al., Immunol. Today, 21: 364-370 (2000)）。比如，Fab'片段可以直接从宿主细胞中获得；可以将 Fab' 片段化学偶联形成 $F(ab')_2$ 片段(Carter et al., Bio/Technology, 10: 163-167 (1992))。另外，Fv、Fab 或 $F(ab')_2$ 片段也可以直接从重组宿主细胞培养液中直接分离得到。本领域的普通技术人员完全知晓制备这些抗原结合片段的其它技术。

本公开的 IgG 同型对照抗体是本领域的普通技术人员完全知晓并可以购买或制备获得的。例如人抗鸡蛋溶酶体抗体(human anti-Hen Egg Lysozyme IgG，anti-HEL，如 human IgG1，简称 hIgG1)，其序列来自于 Acierno 等人发表的 Affinity maturation increases the stability and plasticity of the Fv domain of anti-protein antibodies 研究中 Fab F10.6.6 序列的可变区序列(Acierno 等人.J Mol Biol.2007；374(1):130-46.)。制备方法如下：委托南京金斯瑞生物对 human IgG 抗体的重轻链(全序列或可变区)基因进行氨基酸的密码子优化和基因合成，参照《分子克隆实验指南(第三版)》介绍的标准技术，采用 PCR、酶切、DNA 胶回收、连接转化、菌落 PCR 或酶切鉴定等标准的分子克隆技术将重轻链基因分别亚克隆到哺乳动物表达系统的抗体重链表达载体和抗体轻链表达载体，并进一步对重组表达载体的重轻链基因进行测序分析。测序验证正确后，大量制备去内毒素级别的表达质粒并将重轻链表达质粒瞬时共转染 HEK293 细胞进行重组抗体的表达。培养 7 天后收集细胞培养液，进行 rProtein A 柱(GE)亲和纯化，收获的抗体样 品用 SDS-PAGE 和 SEC-HPLC 标准分析技术对其进行质量鉴定。

在第九方面，本公开提供了一种多特异性抗体，其包含本公开第八方面任一项所述的抗体或其抗原结合片段，和另外的抗体或其片段或抗体类似物。

在某些实施方案中，所述多特异性抗体是双特异性抗体或三特异性抗体或四特异性抗体。

因此，在第十方面，本公开提供了一种分离的核酸分子，包含编码本公开的抗体或其抗原结合片段、或其重链可变区和/或轻链可变区、或其一个或多个 CDR 的核苷酸序列。根据本领域已知的密码子简并性，在某些实施方案中，所述核苷酸序列是可以根据密码子简并性进行替换的。在某些实施方案中，所述核苷酸序列是密码子最优化的。

在某些实施方案中，本公开所述分离的核酸分子包含：(i) 分别编码本公开的抗体或其抗原结合

片段的重链可变区和轻链可变区的第一核酸和第二核酸，或（ii）分别编码本公开的抗体或其抗原结合片段的重链可变区和重链恒定区的第一核酸，和轻链可变区和轻链恒定区的第二核酸，或（iii）分别编码本公开的抗体或其抗原结合片段的重链和轻链的第一核酸和第二核酸。在某些实施方案中，所述第一核酸和第二核酸包含与上述（i）-（iii）中任一第一核酸和第二核酸的简并序列或基本上相同序列的核酸。在某些实施方案中，所述简并序列或基本上相同序列指与（i）-（iii）中所述核酸分子相比具有至少大约 85%、90%、95%、99%或更高序列同一性的序列或具有一个或更多个核苷酸取代的序列，或相差不超过 3、6、15、30 或 45 个核苷酸的序列。

在第十一方面，提供了一种载体（例如克隆载体或表达载体），其包含本公开的分离的核酸分子。在某些实施方案中，本公开的载体是例如质粒，粘粒，噬菌体，慢病毒等。在某些实施方案中，所述载体能够在受试者（例如哺乳动物，例如人）体内表达本公开的抗体或其抗原结合片段。

第十二方面，提供了一种宿主细胞，其包含本公开的分离的核酸分子或本公开的载体。宿主细胞可以是真核细胞（例如哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母细胞）或原核细胞（例如大肠杆菌）。合适的真核细胞包括但不限于 NS0 细胞、Vero 细胞、Hela 细胞、COS 细胞、CHO 细胞、HEK293 细胞、BHK 细胞、和 MDCKII 细胞。适宜的昆虫细胞包括但不限于 Sf9 细胞。在某些实施方案中，本公开的宿主细胞是哺乳动物细胞，例如 CHO（例如 CHO-K1、CHO-S、CHO DXB11、CHO DG44）。

第十三方面，提供了制备本公开的抗体或其抗原结合片段、或多特异性抗体的方法，其包括，在允许所述抗体或其抗原结合片段、或多特异性抗体表达的条件下，培养本公开的宿主细胞，和从培养的宿主细胞培养物中回收所述抗体或其抗原结合片段。

第十四方面，提供一种抗体-药物偶联物，其中抗体为上述抗 B7H3 的抗体，其通过接头与偶联部分连接。所述偶联部分选自：可检测的标记、放射性同位素、荧光物质、发光物质、有色物质、酶、聚乙二醇（PEG）、核素、核酸、小分子毒素、具有结合活性多肽、蛋白、受体、配体，以及其它抑制肿瘤细胞生长、促进肿瘤细胞凋亡或坏死的活性物质。

在一些实施例中，抗体-药物偶联物包含下式的抗 B7H3 抗体药物缀合物(B7H3-ADC)：

$$Ab\text{-}(L\text{-}D)n,$$

其中：

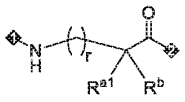
Ab 是在第八方面抗体或其抗原结合片段，并且；

D 是小分子毒素药物部分；

L 是键或连接分子，其共价连接 Ab 和 D；

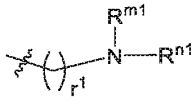
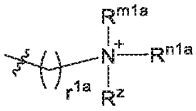
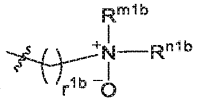
n 是 1-16 之间的整数，且表示共价连接至 Ab 的 L-D 的数目。

在一些实施例中，抗体-药物偶联物的 L 包含选自氨基酸残基或由 2-10 个氨基酸残基组成的短肽；所述的氨基酸残基选自天然氨基酸残基、非天然氨基酸残基、AA^1 所示氨基酸残基或其立体异构体；



AA^1

AA^1 所示的氨基酸残基中：

R^{a1} 和 R^b 各自独立地选自 H、  、  和  ；

或者，R^{a1} 与 R^b 和与它们共同相连的碳原子一起形成 4-10 元杂环，所述的 4-10 元杂环中，杂原子选自 O、N 和 S 中的 1 个、2 个、3 个或 4 个；所述的 4-10 元杂环任选地被一个或多个 R^0 所取代；

r、r^1、r^{1a} 和 r^{1b} 各自独立地为 0 到 20 的任意整数；

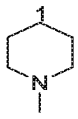
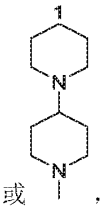
R^{m1}、R^{n1}、R^{m1a}、R^{n1a}、R^{m1b} 和 R^{n1b} 各自独立地为 H、C_{1-6} 烷基、C_{3-6} 环烷基或-$COOR^{x1}$，其中，R^{x1} 为 C_{1-6} 烷基；

或者，R^{m1} 和 R^{n1}、R^{m1a} 和 R^{n1a}、以及 R^{m1b} 和 R^{n1b} 和与它们共同相连的氮原子一起，形成 4-10 元杂环，所述的 4-10 元杂环中，杂原子选自 O、N 和 S 中的 1 个、2 个、3 个或 4 个；所述的 4-10 元杂环任选地被一个或多个 $R^{0'}$ 所取代；

R^z 选自 C_{1-6} 烷基；

R^0、$R^{0'}$ 各自独立地选自 C_{1-6} 烷基、C_{3-6} 环烷基、-$NR^{m2}R^{n2}$ 和任选被 C_{1-6} 烷基取代的 4-10 元杂环基；所述的 4-10 元杂环中，杂原子选自 O、N 和 S 中的 1 个、2 个、3 个或 4 个；

R^{m2} 和 R^{n2} 各自独立地选自 H 和 C_{1-6} 烷基。

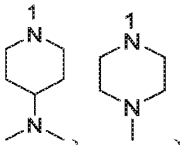
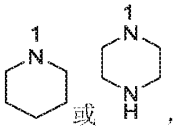
在一些实施方案中，AA^1 所示氨基酸残基中，R^{a1} 与 R^b 和与它们共同相连的碳原子一起形成 5-6 元杂环，所述的 5-6 元杂环中，杂原子为 N，杂原子数为 1 个或 2 个；所述的 5-6 元杂环任选地被一个或多个 R^0 所取代。所述的 5-6 元杂环优选为哌啶环或哌嗪环，进一步优选为哌啶环，例如  或  ，1 号碳原子为与 R^{a1} 和 R^b 共同相连的碳原子。

在一些实施方案中，r、r^1、r^{1a} 和 r^{1b} 各自独立地为 0、1、2、3、4 或 5；优选为地，r、r^1、r^{1a} 和 r^{1b} 各自独立地为 0 或 4；进一步优选为地，r 为 0，r^1、r^{1a} 和 r^{1b} 为 4；或者 r 为 4，r^1、r^{1a} 和 r^{1b} 为 0。

在一些实施方案中，r、r^1、r^{1a} 和 r^{1b} 不同时为 0。

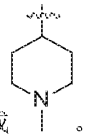
在一些实施方案中，R^{m1}、R^{n1}、R^{m1a}、R^{n1a}、R^{m1b} 和 R^{n1b} 各自独立地为 H、C_{1-6} 烷基或-$COOR^{x1}$，

其中，R^{x1} 为 C_{1-6} 烷基；优选为各自独立地为 H、甲基、乙基、正丙基、-$COOCH_3$、-$COOCH_2CH_3$、-$COOCH_2CH_2CH_3$、-$COOCH(CH_3)_2$、-$COOC(CH_3)_3$ 或-$COOCH_2CH_2CH_2CH_3$。

在一些实施方案中，R^{m1} 和 R^{n1}、R^{m1a} 和 R^{n1a}、以及 R^{m1b} 和 R^{n1b} 和与它们共同相连的氮原子一起形成 5-6 元杂环，所述的 5-6 元杂环中，杂原子选自 1 个或 2 个 N 原子；所述的 5-6 元杂环任选地被一个或多个 $R^{0'}$ 所取代；所述的 5-6 元杂环优选为哌啶环或哌嗪环；进一步优选为  、  或 ，1 号氮原子为与 R^{m1} 和 R^{n1} 共同相连的氮原子。

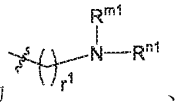
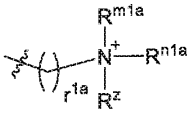
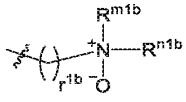
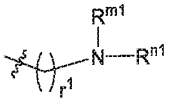
在一些实施方案中，R^z 优选为 C_{1-6} 烷基；更优选为甲基。

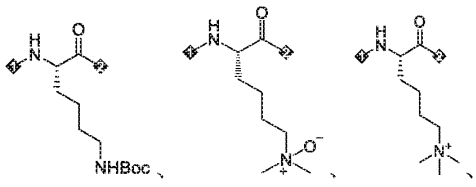
在一些实施方案中，R^0 和 $R^{0'}$ 各自独立地为 C_{1-6} 烷基、-$NR^{m2}R^{n2}$ 或任选被 C_{1-6} 烷基取代的 5-6 元杂环基；所述的 5-6 元杂环中，杂原子选自 1 个或 2 个 N 原子。

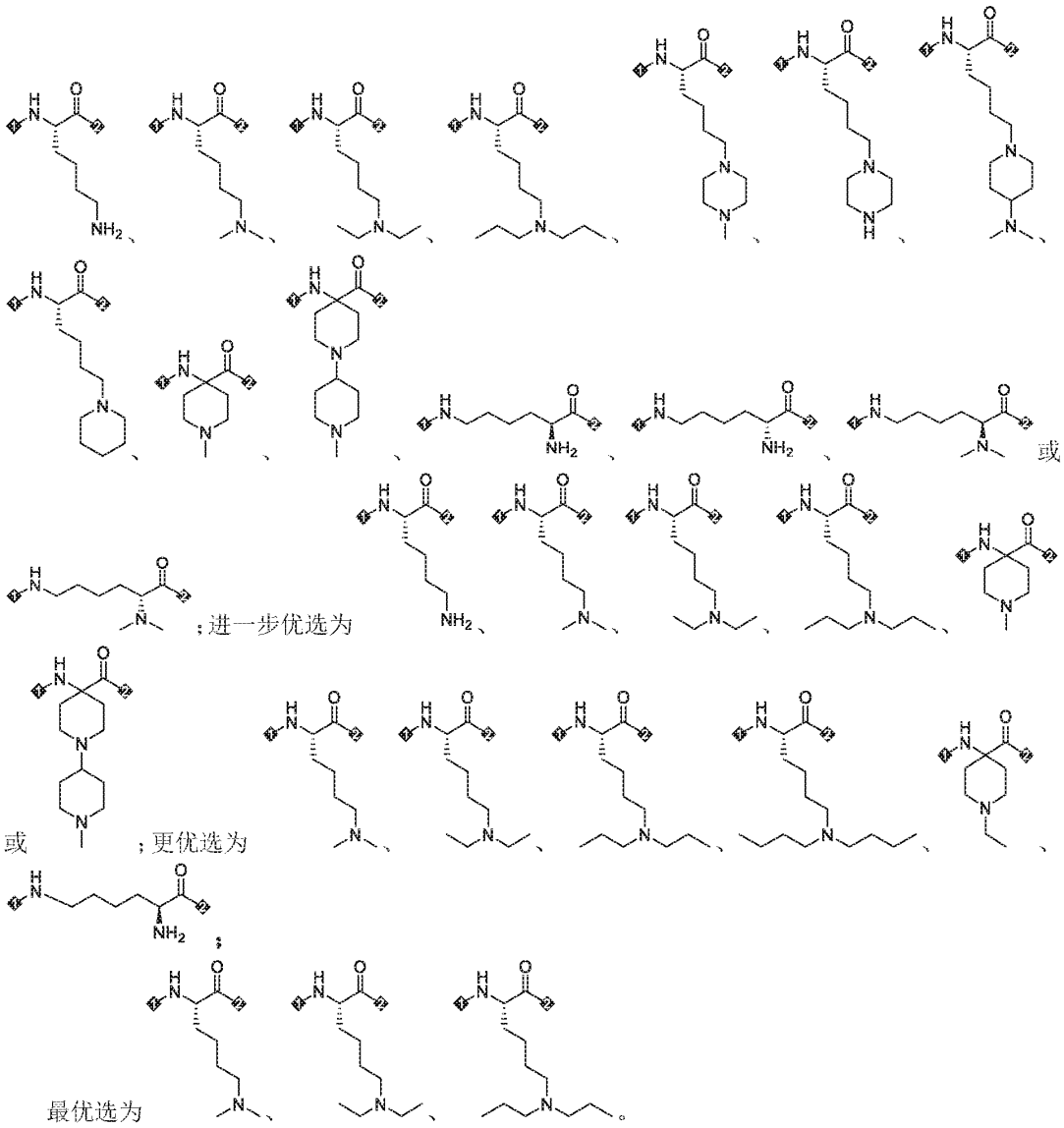
在一些实施方案中，R^0 优选为 C_{1-6} 烷基或被 C_{1-6} 烷基取代的 5-6 元杂环基，所述的 5-6 元杂环基为哌啶基或哌嗪基；进一步优选为甲基或被甲基取代的哌啶基；例如甲基或  。

在一些实施方案中，$R^{01'}$ 各自独立地优选为 C_{1-6} 烷基、-$NR^{m2}R^{n2}$ 或任选被 C_{1-6} 烷基取代的 5-6 元杂环基；所述的 5-6 元杂环中，杂原子为 1 个或 2 个 N；进一步优选为 C_{1-6} 烷基或-$NR^{m2}R^{n2}$；更优选为甲基或-$NR^{m2}R^{n2}$，其中，R^{m2} 和 R^{n2} 各自独立地优选为 H 或 C_{1-6} 烷基，更优选为甲基。

在一些实施方案中，$R^{0'}$ 优选为 C_{1-6} 烷基或-$NR^{m2}R^{n2}$；R^{m2} 和 R^{n2} 各自独立地优选为 H 或 C_{1-6} 烷基（例如甲基）。

在一些实施方案中，AA^1 所示氨基酸残基中，R^{a1} 和 R^b 中任一个为 H，另一个为  、  和  ；优选为地，R^{a1} 和 R^b 中的任一个为 H，另一个选自  。

在一些实施方案中，AA^1 所示氨基酸残基优选为  、、、



；进一步优选为

或 ；更优选为

；

最优选为

。

在一些实施方案中，抗体-药物偶联物由抗体-连接子-药物组成，其中所述药物选自：微管阻断药物，DNA 损伤药物，Bcl-xL 抑制剂等。

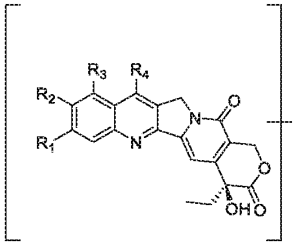
在一些实施方案中，抗体-药物偶联物由抗体-连接子-药物组成，其中所述药物选自：金盏花素 Auristatins（例如 MMAF，MMAE），美登素衍生物（例如 DM1，DM4），微管溶素，隐粘菌素，抗有丝分裂抑制剂，吡咯苯并氮卓类和吲哚氯苯并氮卓类，杜卡霉素，喜树碱，卡奇霉素等。

在一些实施方案中，抗体-药物偶联物由抗体-连接子-药物组成，其中所述药物选自喜树碱（CPT）及其衍生物。

在一些实施方案中，抗体-药物偶联物由抗体-连接子-药物组成，其中所述药物选自拓扑异构酶 I 抑制剂。

在一些实施方案中，抗体-药物偶联物由抗体-连接子-药物组成，其中所述药物选自: SN-38, DXd。

在一些实施方案中，所述抗体-药物偶联物的，D 为具有式 II 所示的药物单元：



II

其中，

R_1 为 H 或 F，

R_2 为 H 或甲基；

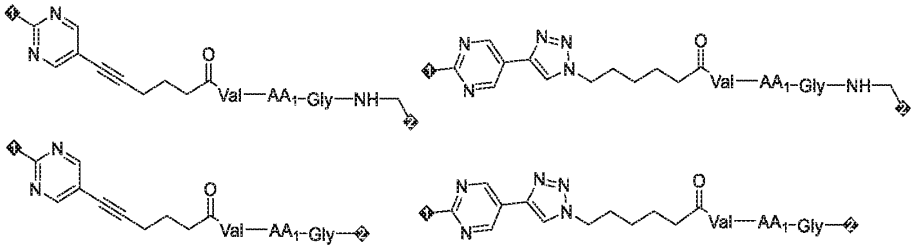
或者 R_1 和 R_2 和与其相连的碳原子一起形成  ；

R_3 为 H；

R_4 选自 H、-(C1-C4 烷基)-OH，-(C1-C4 烯基)-OH，-(C1-C4 烷基)-NH_2，或-(C1-C4 烯基)-NH_2；

其中 L 通过 D 上存在的羟基或胺基链接。

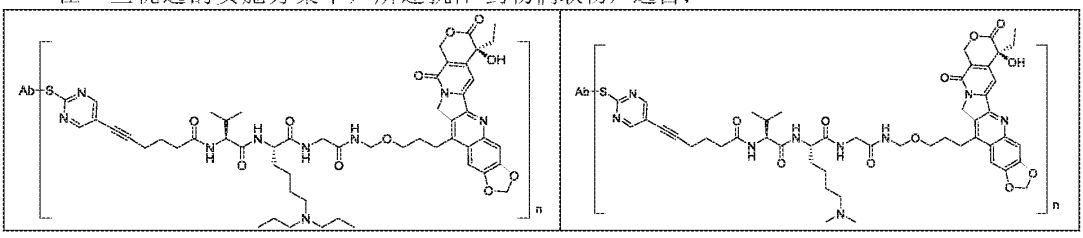
在一些实施方案中，所述抗体-药物偶联物的 L 选自；

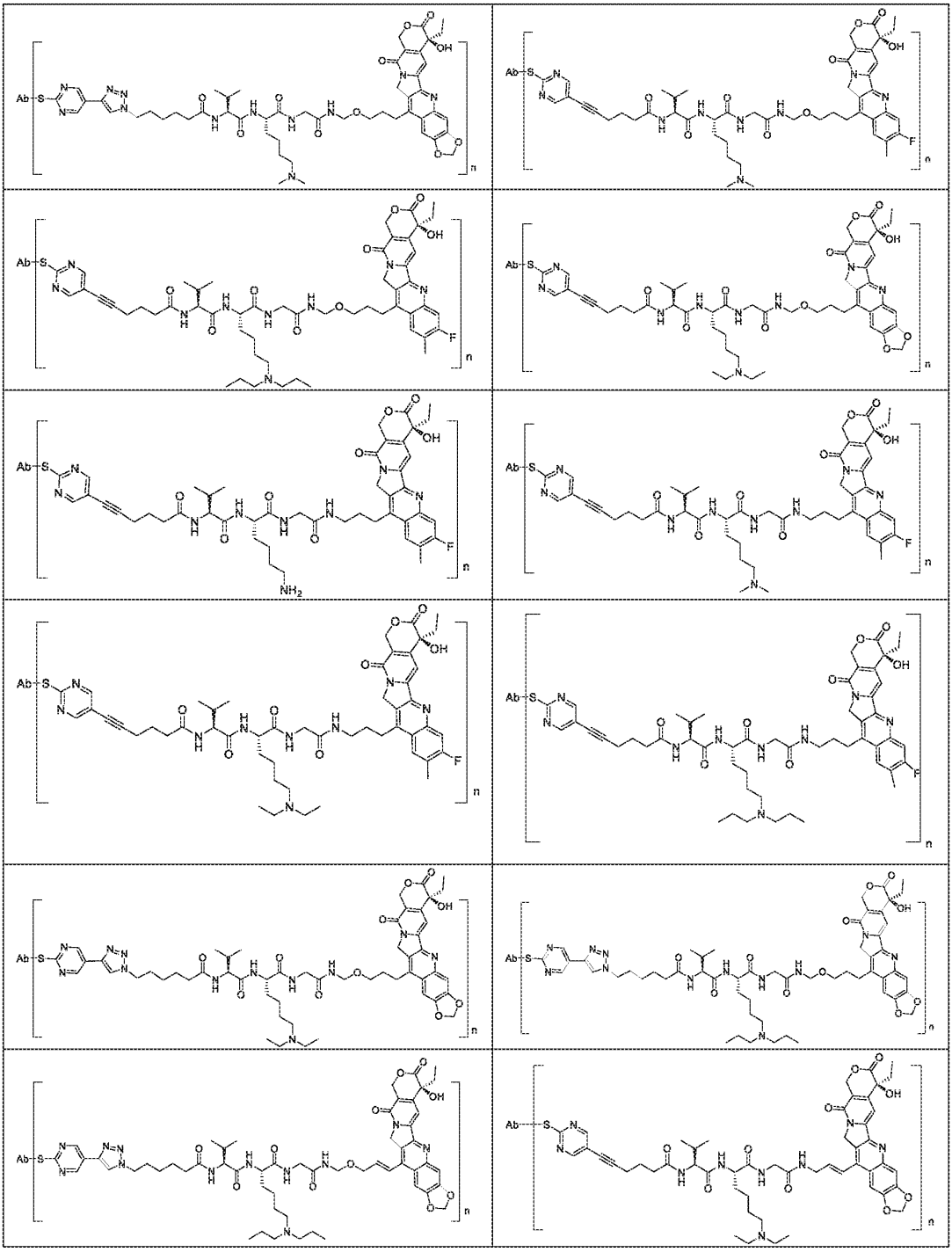


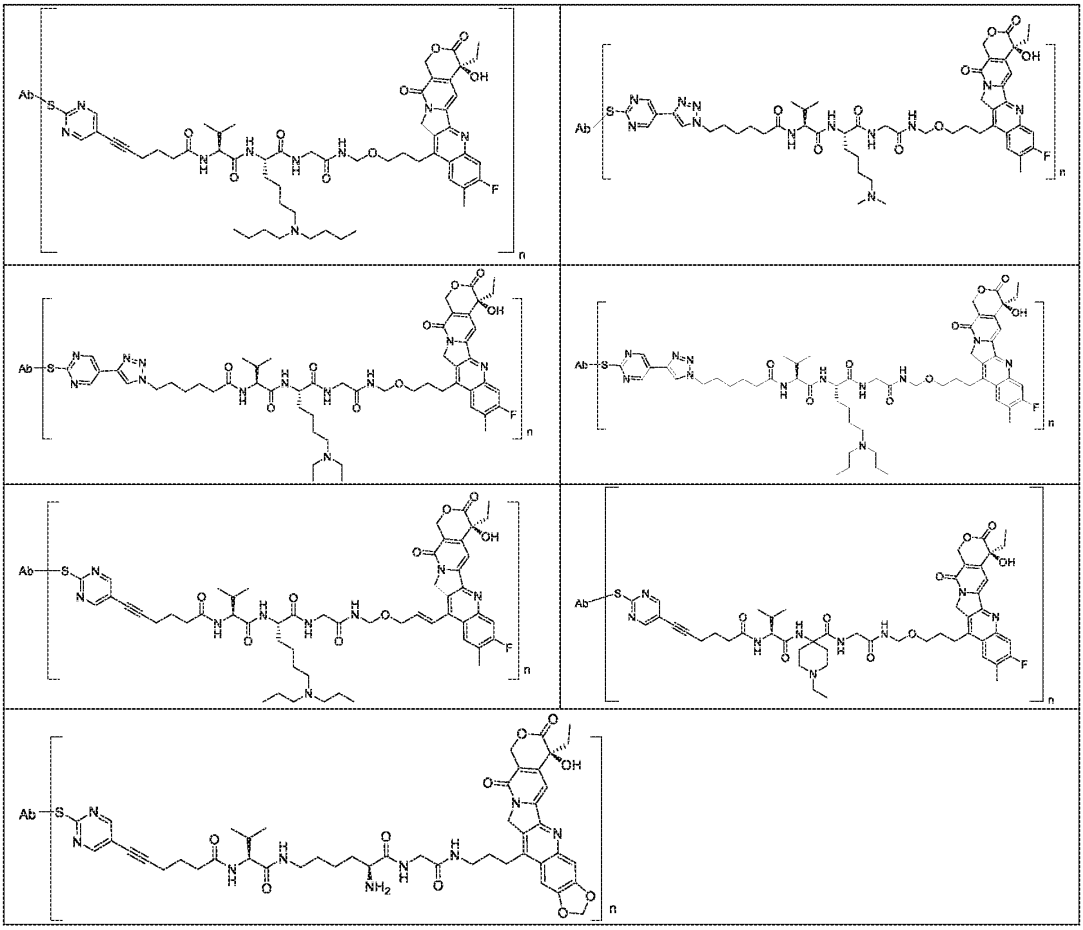
其中，1 位与 Ab 相连，2 位与 D 相连；AA1 如上文所定义。

另外，还需要说明的是，本领域技术人员可以理解的是，L 是与打开二硫键（例如，通过还原剂 TCEP 还原二硫键可以打开二硫键，生成巯基-SH）后 Ab（如抗体）自身所含有巯基进行连接，也就是说，L 与 Ab 之间的-S-并非另外再外接的硫原子。例如， 中，-S-并非另外外接的硫原子，而是打开双硫键后的 Tb 自身所含有巯基与 L 进行连接后形成的-S-。

在一些优选的实施方案中，所述抗体-药物偶联物，选自：







其中 Ab 为 B7H3 抗体 1D1-01 或 2E3-02，n 为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16，q 优选 1、2、3、4、5、6、7、8。

在本公开的第十五方面，本公开提供了一种配体药物偶联物，其包含本公开上前述的配体药物偶联物或前述的抗体-药物偶联物，所述的配体药物偶联物具有两种或多种 q 值，所述的抗体-药物偶联物具有两种或多种 n 值。所述配体药物偶联物是指包含异质 DAR 分布的配体药物偶联物或抗体-药物偶联物(ADC)。

在一些实施方案中，当所述的配体药物偶联物中的一种 q 值或 n 值的配体药物偶联物占大部分时，q 值或 n 值和 DAR 接近。

在一些实施方案中，所述的配体药物偶联物中的药物与抗体的比例（DAR）选自 1-10 中的整数或小数。

在一些实施方案中，所述的配体药物偶联物中的药物与抗体的比例（DAR）选自 2、2.5、3、3.5、4、4.5,5、5.5、6、6.5、7、7.2、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.7、8.9 和 9。

在一些实施方案中，所述的配体药物偶联物 ADC 含有具有 1 至 8 的 DAR 的分布的 ADC，例如，1.5、2、4、6、和 8(即，1.5、2、4、6、 和 8 的载药种类)。值得注意的是，可以产生降解产物，使得所述的配体药物偶联物中也可以包含 1、3、5 和 7 的 DAR。此外，所述的配体药物偶联物中的 ADC 也可具有大于 8 的 DAR。所述的配体药物偶联物由链间二硫化物还原然后偶联 产生。在一些实施方案中，所述的配体药物偶联物包含如下两者：DAR 为 4 或更低(即，载药种类为 4 或更低) 的所述的配体药物偶联物以及 DAR 为 6 或更高(即，载药种类为 6 或更高)的所述的配体药物偶联物。

在另一个方面，提供了本公开的抗体或其抗原结合片段在制备试剂盒中的用途，所述试剂盒用于检测 B7H3 在样品中的存在或其水平。在另一个方面，本公开提供了诊断性或治疗性试剂盒，其包括一个或多个以下物质：本公开所述的抗体或其抗原结合片段、核酸、载体、宿主细胞、多特异性抗体、缀合物或者药物组合物。可选地，所述诊断性或治疗性试剂盒还包括使用说明书。

在本公开的第十六方面，本公开提供了药物组合物，其包含物质 A，以及任选的一种或多种药用辅料；所述的物质 A 为前述的配体药物偶联物、或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物、或前述的抗体或其抗原结合片段、核酸分子、载体、宿主细胞、多特异性抗体、和/或配体药物偶联物、缀合物，或前述的抗体-药物偶联物，或者前述的化合物、或所述化合物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物。所述的物质 A 可为治疗有效量的。

在某些实施方案中，本公开的药物组合物包含本公开的抗体或其抗原结合片段，以及药学上可接受的载体和/或赋形剂。

在某些实施方案中，本公开的药物组合物包含本公开的宿主细胞，以及药学上可接受的载体和/或赋形剂，其中所述宿主细胞包含如前所述的分离的核酸分子或载体。

在某些实施方案中，本公开的药物组合物包含本公开的多特异性抗体，以及药学上可接受的载体和/或赋形剂。

在某些实施方案中，本公开的药物组合物包含本公开的缀合物以及药学上可接受的载体和/或赋形剂。

在本公开的第十七方面，本公开提供了前述的物质 A 或者前述的药物组合物在制备治疗和/或预防与细胞活动异常相关的疾病（例如癌症疾病）的药物中的用途。所述的物质 A 或者前述的药物组合物可为治疗有效量的。

在一些实施例中，提供本公开的抗体或其抗原结合片段、核酸、载体、宿主细胞、抗体药物偶联物，或者多特异性抗体在制备药物中的用途，所述药物用于调整（抑制或阻断）B7H3 的活性。

在一些实施例中，提供本公开的抗体或其抗原结合片段、核酸、载体、宿主细胞、抗体药物偶联物，或者多特异性抗体在制备药物中的用途，所述药物用于治疗或预防与 B7H3 的活性有关的疾病。

在一些实施例中，提供本公开的抗体或其抗原结合片段、核酸、载体、宿主细胞、抗体药物偶联物，或者多特异性抗体在制备药物中的用途，所述药物用于治疗或预防与 B7H3 的活性有关的肿瘤。

在一些实施方案中，所述癌症疾病选自食管癌（例如食管腺癌和食管鳞状细胞癌）、脑瘤、肺癌（例如小细胞性肺癌，非小细胞性肺癌或肺腺癌）、鳞状上皮细胞癌、膀胱癌、胃癌、卵巢癌、腹膜癌、胰腺癌、乳腺癌、头颈癌、子宫颈癌、子宫内膜癌、结肠癌（例如人结肠腺癌）、直肠癌、结直肠癌、肝癌、肾癌、尿路上皮癌、表皮癌、非霍奇金淋巴瘤、中枢神经系统肿瘤（例如神经胶质瘤、多形性胶质母细胞瘤、胶质瘤或肉瘤）、前列腺癌或甲状腺癌。

在一些实施方案中，所述癌症疾病为与 Trop-2、Her 2、B7H3、Her 3、EGFR 相关的癌症疾病。在一些实施方案中，所述癌症疾病为与 Trop-2 或 Her 2 相关的癌症疾病。

在一些实施方案中，所述癌症疾病为与 Trop-2 相关的癌症疾病。

在一些实施方案中，所述癌症疾病为与 Her 3 相关的癌症疾病。

在一些实施方案中，所述癌症疾病为与 EGFR 相关的癌症疾病。

在一些实施方案中，所述癌症疾病为与 B7H3 相关的癌症疾病。

在一些实施方案中，所述癌症疾病为实体肿瘤。

在一些实施方案中，所述癌症疾病为乳腺癌或肺癌（优选非小细胞肺癌）。

在本公开的第十七方面，本公开提供了前述的物质 A 或者前述的药物组合物，其用于治疗和/或预防与细胞活动异常相关的疾病（例如癌症疾病）。

在一些实施方案中，所述癌症疾病选自食管癌（例如食管腺癌和食管鳞状细胞癌）、脑瘤、肺癌（例如小细胞性肺癌、非小细胞性肺癌或肺腺癌）、鳞状上皮细胞癌、膀胱癌、胃癌、卵巢癌、腹膜癌、胰腺癌、乳腺癌、头颈癌、子宫颈癌、子宫内膜癌、结肠癌（例如人结肠腺癌）、直肠癌、结直肠癌、肝癌、肾癌、尿路上皮癌、表皮癌、非霍奇金淋巴瘤、中枢神经系统肿瘤（例如神经胶质瘤、多形性胶质母细胞瘤、胶质瘤或肉瘤）、前列腺癌或甲状腺癌。

在一些实施方案中，所述癌症疾病为与 Trop-2、Her 2、B7H3、Her 3 、EGFR 相关的癌症疾病。在一些实施方案中，所述癌症疾病为与 Trop-2 或 Her 2 相关的癌症疾病。

在一些实施方案中，所述癌症疾病为与 Trop-2 相关的癌症疾病。

在一些实施方案中，所述癌症疾病为与 Her 3 相关的癌症疾病。

在一些实施方案中，所述癌症疾病为与 EGFR 相关的癌症疾病。

在一些实施方案中，所述癌症疾病为与 B7H3 相关的癌症疾病。

在一些实施方案中，所述癌症疾病为实体肿瘤。在一些实施方案中，所述癌症疾病为乳腺癌或肺癌（优选非小细胞肺癌）。

在本公开的第十八方面，本公开提供了预防和/或治疗与细胞活动异常相关的疾病（例如癌症疾

病）的方法，其包括：给予有需要的个体预防和/或治疗有效量的前述的物质 A，或者前述的药物组合物。

在一些实施方案中，所述癌症疾病选自食管癌（例如食管腺癌和食管鳞状细胞癌）、脑瘤、肺癌（例如小细胞性肺癌、非小细胞性肺癌或肺腺癌）、鳞状上皮细胞癌、膀胱癌、胃癌、卵巢癌、腹膜癌、胰腺癌、乳腺癌、头颈癌、子宫颈癌、子宫内膜癌、结肠癌（例如人结肠腺癌）、直肠癌、结直肠癌、肝癌、肾癌、尿路上皮癌、表皮癌、非霍奇金淋巴瘤、中枢神经系统肿瘤（例如神经胶质瘤、多形性胶质母细胞瘤、胶质瘤或肉瘤）、前列腺癌或甲状腺癌。

在一些实施方案中，所述癌症疾病为与 Trop-2、Her 2、B7H3、Her 3、EGFR 相关的癌症疾病。

在一些实施方案中，所述癌症疾病为与 Trop-2 或 Her 2 相关的癌症疾病。

在一些实施方案中，所述癌症疾病为与 Trop-2 相关的癌症疾病。

在一些实施方案中，所述癌症疾病为与 Her 3 相关的癌症疾病。

在一些实施方案中，所述癌症疾病为与 EGFR 相关的癌症疾病。

在一些实施方案中，所述癌症疾病为与 B7H3 相关的癌症疾病。

在一些实施方案中，所述癌症疾病为实体肿瘤。

在一些实施方案中，所述癌症疾病为乳腺癌或肺癌（优选非小细胞肺癌）。

在本公开中，除非另有说明，否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且，本文中所用的细胞培养、分子遗传学、核酸化学、免疫学实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的常规步骤。同时，为了更好地理解本公开，下面提供相关术语的定义和解释。

如本文所使用，术语“药学上可接受的盐”的例子是由形成药学上可以接受的阴离子的有机酸形成的有机酸加合盐，包括但不限于甲酸盐、乙酸盐、丙酸盐、苯甲酸盐、马来酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、柠檬酸盐、抗坏血酸盐、α-酮戊二酸盐、α-甘油磷酸盐、烷基磺酸盐或芳基磺酸盐；优选地，所述烷基磺酸盐为甲基磺酸盐或乙基磺酸盐；所述芳基磺酸盐为苯磺酸盐或对甲苯磺酸盐。也可形成合适的无机盐，包括但不限于盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硝酸盐、碳酸氢盐和碳酸盐、硫酸盐或磷酸盐等。

如本文所使用的，术语“药学上可接受的载体和/或赋形剂”是指在药理学和/或生理学上与受试者和活性成分相容的载体和/或赋形剂，其是本领域公知的(参见例如 Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995)，并且包括但不限于：pH 调节剂，表面活性剂，佐剂，离子强度增强剂，稀释剂，维持渗透压的试剂，延迟吸收的试剂，防腐剂。

药学上可接受的盐可使用本领域熟知的标准程序获得，例如，通过将足量的碱性化合物和提供药学上可以接受的阴离子的合适的酸反应。

本公开中，所述药用辅料是指生产药品和调配处方时，使用的赋形剂和附加剂，是指除活性成分外，在安全性方面已进行了合理的评估，并且包含在药物制剂中的物质。药用辅料除了赋型、充当载体、提高稳定性外，还具有增溶、助溶、缓控释等重要功能，是可能会影响到药品的质量、安全性和有效性的重要成分。根据其来源可分为天然物、半合成物和全合成物。根据其作用与用途可分为：溶剂、抛射剂、增溶剂、助溶剂、乳化剂、着色剂、黏合剂、崩解剂、填充剂、润滑剂、湿润剂、渗透压调节剂、稳定剂、助流剂、矫味剂、防腐剂、助悬剂、包衣材料、芳香剂、抗黏着剂、抗氧剂、螯合剂、渗透促进剂、pH 调节剂、缓冲剂、增塑剂、表面活性剂、发泡剂、消泡剂、增稠剂、包合剂、保湿剂、吸收剂、稀释剂、絮凝剂与反絮凝剂、助滤剂、释放阻滞剂等；根据其给药途径可分为口服、注射、黏膜、经皮或局部给药、经鼻或口腔吸入给药和眼部给药等。同一药用辅料可用于不同给药途径的药物制剂，且有不同的作用和用途。

所述药物组合物可根据给药途径制成各种适宜的剂型。例如片剂、胶囊剂、颗粒剂、口服溶液剂、口服混悬剂、口服乳剂、散剂、酊剂、糖浆剂、注射剂、栓剂、软膏剂、乳膏剂、糊剂、眼用制剂、丸剂、植入剂、气雾剂、粉雾剂、喷雾剂等。其中，所述的药物组合物或适宜的剂型可以含有 0.01mg 至 1000mg 的本公开的化合物或其药学上可接受的盐或偶联物，适宜含有 0.1mg 至 800mg，优选含有 0.5-500mg，优选含有 0.5 至 350mg，特别优选 1-250mg。

所述药物组合物可以注射剂形式用药，包括注射液、注射用无菌粉末与注射用浓溶液。其中，可使用的载体和溶剂包括水、林格氏溶液和等渗氯化钠溶液。另外，灭菌的非挥发油也可用作溶剂或悬浮介质，如单甘油酯或二甘油酯。

本文使用的术语“治疗”一般是指获得需要的药理和/或生理效应。该效应根据完全或部分地预防疾病或其症状，可以是预防性的；和/或根据部分或完全稳定或治愈疾病和/或由于疾病产生的副作用，可以是治疗性的。本文使用的“治疗”涵盖了对患者疾病的任何治疗，包括：(a)预防易感染疾病或症状但还没诊断出患病的患者所发生的疾病或症状；(b)抑制疾病的症状，即阻止其发展；或(c)缓解疾病的症状，即，导致疾病或症状退化。

在本公开中，术语“个体”包括人或非人动物。示例性人个体包括患有疾病(例如本文所述的疾病)的人个体(称为患者)或正常个体。本公开中术语“非人动物”包括所有脊椎动物，例如非哺乳动物(例如鸟类、两栖动物、爬行动物)和哺乳动物，例如非人灵长类、家畜和/或驯化动物(例如绵羊、犬、猫、奶牛、猪等)。

本公开中，术语“有效剂量”指被给药后会在一定程度上缓解所治疗病症的一种或多种症状的化合物的量。

本公开中，术语“配体药物偶联物”是指生物活性分子（药物分子）与靶向部分连接得到的物质。在本公开的部分实施方案中，生物活性分子与靶向部分通过连接体相连。所述连接体在特定环境（例

如肿瘤内的水解酶和/或低 pH 值环境）中或特定作用（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部分分离。在本公开的部分实施方案中，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。在本公开的部分实施方案中，生物活性分子与靶向部分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，从而使生物活性分子与靶向部分分离。在本公开的部分实施方案中，所述配体药物偶联物包含靶向部分、连接体以及本公开的式 II 化合物片段。

本公开中，术语“生物活性物”、“生物活性分子”或“药物分子”指抑制或防止细胞的功能和/或引起细胞死亡或破坏的物质，在本公开的部分实施方案中，偶联物中的生物活性物、生物活性分子或药物分子为具有抗肿瘤生物活性的分子。例如：放射性同位素，例如 At^{211}、I^{131}、I^{125}、Y^{90}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Bi^{212}、P^{32}、Pb^{212} 和 Lu 的放射性同位素；金属配合物，例如金属铂配合物、金属金配合物，奥沙利铂等；糖肽类抗生素，例如博来霉素、平阳霉素；DNA 拓扑异构酶抑制剂，例如拓扑异构酶 I 抑制剂，喜树碱、羟基喜树碱、9-氨基喜树碱、SN-38、伊立替康、拓扑替康、贝洛替康、卢比替康，拓扑异构酶 II 抑制剂，放线菌素 D、阿霉素、多柔比星、多卡米星，柔红霉素、米托蒽醌、鬼臼毒素、依托泊苷等；干扰 DNA 合成药物，例如甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶、阿糖胞苷、吉西他滨、巯嘌呤、喷司他丁、氟达拉滨、克拉屈滨、奈拉滨等；作用于结构蛋白的药物，例如微管蛋白抑制剂，长春花生物碱类、长春新碱、长春碱、紫杉醇、多西他赛、卡巴他赛等；肿瘤信号通路抑制剂，例如丝氨酸/苏氨酸激酶抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、天冬氨酸激酶抑制剂或组氨酸激酶抑制剂等；还包括蛋白酶体抑制剂、组蛋白去乙酰化酶抑制剂、肿瘤新生血管生成抑制剂、细胞周期蛋白抑制剂、美登素衍生物、卡里奇霉素衍生物、奥瑞他汀衍生物、Pyrrolobenzodiazepines（PBD）衍生物、美法仑、丝裂霉素 C、苯丁酸氮芥、或其它抑制肿瘤细胞生长、促进肿瘤细胞凋亡和坏死的活性物质；酶及其片段，诸如核溶酶；抗生素；毒素，诸如小分子毒素或者细菌、真菌、植物或动物起源的酶活性毒素，包括其片段和/或变体；生长抑制剂；药物模块。术语“毒素”指能够对细胞的生长或增殖产生有害效果的物质。

本公开中，术语“小分子”是指具有生物活性的小分子药物。术语小分子毒素具有细胞损伤活性，即以某种形式造成细胞的病理学变化的状 态，并且细胞损伤不限于直接损伤，包括对细胞的结构和功能的所有种类的损伤，诸如 DNA 裂解、碱基-二聚体形成、染色体裂解、对细胞分裂机制的损伤和不同酶促活性的下降。

本公开中，术语“连接体”是指将生物活性分子（药物分子）与靶向部分连接起来的片段。

本公开中，术语“靶向部分”是指偶联物中能够与细胞表面的靶标（或靶标的部分）特异性结合的部分。通过靶向部分与靶标的相互作用，偶联物可以被递送至特定的细胞群。

本公开中，当偶联物中的靶向部分为抗体时，偶联物可被称为“药物-抗体偶联物”。

本公开中，抗体或其抗原结合片段包括衍生化的抗体或其抗原结合片段，例如具有巯基的抗体或其抗原结合片段，其中所述衍生化使得抗体具有与药物连接体偶联物反应的基团或能力。所述巯基-

SH 可以打开二硫键（例如，通过还原剂 TCEP 还原）衍生获得。

本文中使用的术语“癌症”和“肿瘤”以相同的含义使用。

本文中使用的术语“基因”不仅包括 DNA，而且包括其 mRNA、其 cDNA 和其 cRNA。

本文中使用的术语“多核苷酸”以与核酸相同的含义使用，并且还包括 DNA、RNA、探 针、寡核苷酸和引物。

本文中使用的术语“Tb”为“target binding”的缩写，包括抗体或与靶标结合的任意分子，术语“Ab”为“antibody”的缩写，与“抗体”无区别地使用。

本文中使用的术语“多肽”和“蛋白”无区别地使用。

本文中使用的术语“细胞”也包括动物个体内的细胞和培养的细胞。

本公开中所述的抗 B7H3 抗体中涉及的 B7H3 可为本领域常规的 B7H3，例如可溶性 B7H3、膜形式 B7H3 等，并且还表示 B7H3 变 体 1 和/或 B7H3 变体 2。

KD 指获得自 Kd(具体结合分子-靶蛋白相互作用的解离速率)与 Ka(具体结合分子-靶蛋白相互作用的结合速率)之比(或 Kd/Ka，以摩尔浓度(M)表示)的解离常数。可使用本领域充分建立的方法测定 KD 值。测定结合分子的 KD 的优选方法是通过使用表面等离子共振，例如生物传感器系统，如 Biacore TM(GE Healthcare Life Sciences)系统。

术语“B7H3 变体”是指一种多肽，其与 B7H3 多肽，B7H3 片段，抗 B7H3 抗体或其抗体片段具有相似或相同的功能，但非必需包含相似或相同的 B7H3 多肽，B7H3 片段，抗 B7H3 抗体或其片段的氨基酸序列，或具有相似或相同的 B7H3 多肽，B7H3 片段，抗 B7H3 抗体或其片段的结构。

术语“Her3 变体变体”是指一种多肽，其与 Her3 多肽，Her3 片段，抗 Her3 抗体或其抗体片段具有相似或相同的功能，但非必需包含相似或相同的 Her3 多肽，Her3 片段，抗 Her3 抗体或其片段的氨基酸序列，或具有相似或相同的 Her3 多肽，Her3 片段，抗 Her3 抗体或其片段的结构。

如本文所用，两个氨基酸序列之间的百分比同源性等于两个序列之间的百分比同一性(identity)。两个序列之间的序列百分比同一性是序列共享的相同位置的数目的函数(即，%同源性＝相同位置的数目/位置总数目 X100)，其中考虑缺口(gap)的数目和每一缺口的长度，需要将其引入用于两个序列的最优对比。可用本领域通常所知的方法进行序列比较和确定序列间的百分比同一性，可用数学算法实现这种序列比较和百分比同一性的确定。例如，可用 Meyers 和 Miller，1988Comput.Appl.Biosci.4：11-17 的算法(已整合入 ALIGN 程序(版本 2.0))来确定氨基酸序列之间和/或核苷酸序列之间的百分比同一性。此外，可用从 Accelrys 在线获得的 GCG 软件包中的 GAP 程序(使用其缺省参数)来确定氨基酸序列之间或核苷酸序列之间的百分比同一性。在一个实施方案中，所述两个序列是等长的。

术语“表位”是指在动物体优选哺乳动物体内具有抗原性或免疫原性活性的 B7H3 多肽或蛋白的一部分。B7H3 本公开的抗体或其抗原结合片段的表位可以通过现有技术测定，例如合成肽法，免疫

信息学预测，多肽活性的测定，表位肽扫描法，噬菌体展示技术，X 射线衍射和核磁共振分析，抗体同源建模蛋白对接预测法。本文中使用的短语“结合相同表位的抗体”表示，结合共同表位的不同抗体。如果 第二抗体结合第一抗体所结合的部分肽或部分三级结构，那么可以确定，所述第一抗体和 所述第二抗体结合相同表位。

本公开中，术语“抗体”取其最广义的解释，包括完整的单克隆抗体、多克隆抗体以及由至少两个完整抗体形成的多特异性抗体(例如双特异性抗体)，只要它们具有所需的生物学活性。在本公开中，“抗体”和“免疫球蛋白”可以互换使用。如本文所述的“抗体分子”或“抗体”指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分，即含有免疫特异性结合抗原的抗原结合位点的分子。因此，术语抗体广义上不仅涵盖完整抗体分子，还包括所述抗体的片段以及所述抗体和抗体片段的变体(包括衍生物)。当“抗体分子”或“抗体”与抗原结合片段在同一语境下使用时，“抗体分子”或“抗体”指完整抗体分子或全长抗体。在本说明书中所述术语抗体分子例如包括但非限于单链 Fv(scFv)，Fab 片段，Fab'片段，F(ab')2，二硫键连接的 Fv(sdFv)，Fv，及完整抗体或全长抗体。术语“单链 Fv”或“scFv”是指一种多肽，其包含与抗体 VH 结构域连接的抗体的 VL 结构域。例如免疫特异性结合 B7H3 的抗体可以与其它抗原发生交叉反应。优选地，免疫特异性结合 B7H3 的抗体与其它抗原不发生交叉反应。免疫特异性结合 B7H3 的抗体可以例如通过免疫测定或其它本领域技术人员已知的方法鉴别。“完整”抗体或“全长”抗体指包含两条重链(H)和两条轻链(L)的蛋白，所述重链和轻链通过二硫键相互连接，所述蛋白包含：(1)就重链而言，包含可变区(本文缩写为“VH”)和含有三个结构域 CH1、CH2、CH3 的重链恒定区；和(2)就轻链而言，包含轻链可变区(本文缩写为"VL")和含有一个结构域 CL 的轻链恒定区。本公开的抗体包括但非限于单克隆，多特异性，人或嵌合抗体，单链抗体，Fab 片段，F(ab')片段，抗独特型(抗-Id)抗体(包括例如本公开抗体的抗-Id 抗体)，和上述任何抗体的表位结合片段。本公开的免疫球蛋白分子可以是免疫球蛋白的任何类型(例如 IgG，IgE，IgM，IgD，IgA 和 IgY)，类别(例如 IgG1，IgG2，IgG3，IgG4，IgA1 和 IgA2)或亚类。优选地，本公开的抗体包含或由具有序列及其具体信息表所述任一氨基酸序列或其片段或变体的 VH 结构域，VH CDR（本文中多用 HCDR 表示），VL 结构域，或 VL CDR（本文中多用 LCDR 表示）组成。

在本公开中，术语“单克隆抗体”指抗体来自一群基本均一的抗体，即构成该集群的各抗体完全相同，除了可能存在的少量天然突变。单克隆抗体具有针对抗原的一个决定簇(表位)的高特异性，而与其相对的多克隆抗体则包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体。除了特异性之外，单克隆抗体的优点还在于合成时可以不受其他抗体的污染。此处修饰语“单克隆”表示该抗体的特征在于来自一个基本均一的抗体群，而不应理解成需由特殊方法制得。

在本公开的部分实施方案中，单克隆抗体还特别包括嵌合抗体，即重链和/或轻链的一部分与某种、某类或某亚类抗体相同或同源，其余部分则与另一种、另一类或另一亚类抗体相同或同源，只要

它们具有所需的生物学活性(参见例如US 4,816,567；和 Morrison 等人，1984，PNAS，81: 6851-6855)。可用于本公开的嵌合抗体包括灵长类化(primatized)抗体，其包含来自非人灵长类(例如古猴、猩猩等)的可变区抗原结合序列和人恒定区序列。

术语“抗原结合片段”是指抗体的一部分，优选是抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包括 Fab、Fab′、$F(ab')_2$、Fd、Fv、dAb 和互补决定区片段，二抗体(diabody)，线性抗体和单链抗体分子。本文中使用的术语“抗原结合片段”表示抗体的具有抗原结合活性的部分片段，其 中所述片段具有抗体的完全或部分功能，包括非限于单链 Fv(scFv)，Fab，Fab`，F(ab`)2，二硫键连接的 Fv(sdFv)，Fv，di-scFv 等。该术语也包括 Fab`，其 为在还原条件下处理 F(ab`)2 得到的抗体的可变区的单价片段。但是，该术语不限于这些分 子，只要所述片段具有与抗原的结合亲和力即可。此外，这些功能片段不仅包括用适当的酶 处理抗体蛋白的全长分子得到的片段，而且包括使用遗传修饰的抗体基因在适当宿主细胞 中生产的蛋白。

本文中使用的术语“Fab`”表示如上所述在还原条件下处理 F(ab`)2 得到的抗体的 可变区的单价片段。但是，本公开的 Fab`也包括使用遗传修饰的抗体基因生产的 Fab`。

如本文中所使用的，术语“scFv”是指，包含 VL 和 VH 结构域的单个多肽链，其中所述 VL 和 VH 通过接头（linker）或直接相连（参见，例如, Bird 等人, Science 242:423-426 (1988)；Huston 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988)；和 Pluckthun，The Pharmacology of Monoclonal Antibodies，第 113 卷， Roseburg 和 Moore 编，Springer-Verlag，纽约，第 269-315 页(1994))。此类 scFv 分子可具有一般结构：NH2-VL-接头-VH-COOH 或 NH2-VH-接头-VL-COOH。合适的现有技术接头由重复的 GGGGS 氨基酸序列或其变体组成。例如，可使用具有氨基酸序列(GGGGS)4 的接头，但也可使用其变体（Holliger 等人(1993)，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448)。可用于本公开的其他接头由 Alfthan 等人(1995)，Protein Eng. 8:725-731，Choi 等人(2001)，Eur. J. Immunol. 31: 94-106，Hu 等人(1996)，Cancer Res. 56:3055-3061，Kipriyanov 等人(1999)，J. Mol. Biol. 293: 41-56 和 Roovers 等人(2001)，Cancer Immunol.描述。在一些情况下，scFv 的 VH 与 VL 之间还可以存在二硫键。如本文中所使用的，术语“di-scFv”是指，由两个 scFv 连接形成的抗体片段。

如本文所用，在所述抗体或其抗原结合片段中的即使含有变体、氨基酸的置换、缺失或添加，也仍然具有结合所述抗原的活性。

术语“双特异性抗体”亦称为“双功能抗体偶联物”，是指由第一抗体(片段)和第二抗体(片段)通过偶联臂所形成的偶联物，该偶联物保留了各自抗体的活性，故具有双功能和双特异性。

术语“多特异性抗体”包括例如三特异性抗体和四特异性抗体，前者是具有三种不同抗原结合特异性的抗体，而后者是具有四种不同抗原结合特异性的抗体。

术语“完整抗体”或“全长抗体”指包含抗原结合可变区和轻链恒定区(CL)、重链恒定区(CH1、CH2

和 CH3)的抗体。恒定区可以是天然序列(例如人天然恒定区序列)或其氨基酸序列变体。完整抗体优选是具有一种或多种效应功能的完整抗体。

术语"前抗(Probody)"是一种修饰的抗体，包括一种抗体或一种抗体片段，能专门与其靶点结合，能够与掩蔽基团耦合，其中掩蔽基团指对抗体或抗体片段与其靶点的结合能力的裂解常数比没有耦合掩蔽基团的抗体或抗体片段与其靶点的结合能力的裂解常数至少大 100 倍或 1000 倍、或者 10000 倍。

在本公开中，非人(例如鼠)抗体的"人源化"形式指包含最少量非人免疫球蛋白序列的嵌合抗体。大多数人源化抗体是人接受者免疫球蛋白的超变区残基被置换成具有所需特异性、亲和力和功能的非人(例如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类)超变区残基(供者抗体)。在一些实施方案中，人免疫球蛋白的框架区(FR)残基也被置换成非人残基。而且，人源化抗体还可以包含受者抗体或供者抗体中没有的残基。这些修饰是为了进一步优化抗体的性能。人源化抗体一般包含至少一个，通常是两个可变区，其中所有或几乎所有超变环(hypervanable loops)与非人免疫球蛋白的相对应，而 FR 则完全或几乎完全是人免疫球蛋白的序列。人源化抗体还可以包含免疫球蛋白恒定区(Fc，通常是人免疫球蛋白 Fc)的至少一部分。有关细节参见例如 Jones 等人，1986，Nature，321: 522-525；Riechmann 等人，1988，Nature，332: 323-329；和 Presta，1992，Curr Op Struct Bwl 2: 593-596。

完整抗体可根据重链恒定区的氨基酸序列分为不同的"类"。主要的五类是 IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM，其中几类还可以分为不同的"亚类"(同种型)，例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2。抗体不同类的重链恒定区分别称为 α、β、ε、γ 和 μ。免疫球蛋白不同类的亚基结构和三维构型是本领域中公知的。

在本文中，本公开的抗体或其抗原结合片段含有的 CDR 可根据本领域已知的各种编号系统确定。在某些实施方案中，本公开的抗体或其抗原结合片段含有的 CDR 优选地通过 Kabat、Chothia 或，AbM 或 IMGT 编号系统确定。其中根据 IMGT 编号系统，其 CDR 和 FR 对应的编号如下：

	FR1-IMGT	CDR1-IMGT	FR2-IMGT	CDR2-IMGT	FR3-IMGT	For germline V-GENE (*) CDR3-IMGT	For rearranged V-J-GENEs and V-D-J-GENEs	
						Germline CDR3-IMGT	Rearranged CDR3-IMGT	FR4-IMGT
氨基酸编号	1 --> 26 (C 23)	27 --> 38	39 --> 55 (W 41)	56 --> 65	66 --> 104 (C 104)	105 --> 116	105 --> 117 (112.1, 111.1, 112.2, 111.2, etc.)	118 --> 129
氨基	25-26	5-12 aa	16-17	0-10 aa	36-39	2-12 aa	2-13 aa	10-12

酸个数	aa		aa		aa		(more than 13 aa)	aa

如本文中所使用的，术语“构架残基区”或“FR 残基”是指，抗体可变区中除了如上定义的 CDR 残基以外的那些氨基酸残基。

如本文中所使用的，术语“胚系抗体基因”是非淋巴细胞表达的免疫球蛋白的编码基因，它没有经历导致表达特异免疫球蛋白的遗传学重排及成熟的成熟过程。本公开的各种实施方案所提供的一个优点来源于一种认识，那就是胚系抗体基因编码的氨基酸序列比成熟抗体基因编码的氨基酸序列更多地保留了动物物种个体的特征性的重要氨基酸序列结构。因此当被治疗性应用于该物种时，更少地被该物种识别为外源物质。

作为氨基酸取代，在本说明书中，保守的氨基酸取代是优选的。保守的氨基酸取代 表示，在与氨基酸侧链有关的氨基酸集合内发生的取代。优选的氨基酸集合如下：酸性集合 (天冬氨酸和谷氨酸)；碱性集合(赖氨酸、精氨酸和组氨酸)；非极性集合(丙氨酸、缬氨酸、 亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸和色氨酸)；和不带电荷的极性家族(甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸)。更优选的氨基酸集合如下：脂族 羟基(丝氨酸和苏氨酸)；含有酰胺的集合(天冬酰胺和谷氨酰胺)；脂族集合(丙氨酸、缬氨 酸、亮氨酸和异亮氨酸)；和芳族集合(苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸)。这样的氨基酸取代优选 地在不会损害具有原始氨基酸序列的物质的性能的集合内进行。

此外，已知的是，缺失在培养的哺乳动物细胞中生产的抗体的重链的羧基端的赖 氨酸残基(Journal of Chromatography A, 705: 129-134 (1995))，还已知的是，缺失在 培养的哺乳动物细胞中生产的抗体的重链的羧基端的 2 个氨基酸残基(甘氨酸和赖氨酸)，并且新位于羧基端处的脯氨酸残基被酰胺化(Analytical Biochemistry, 360: 75-83 (2007))。但是，重链序列的这样的缺失和修饰不会影响抗体的抗原结合亲和力和效应子功 能(补体的活化、抗体依赖性的细胞的细胞毒性等)。

本文涉及的二十个常规氨基酸的编写遵循常规用法。参见例如，Immunology-A Synthesis (2nd Edition, E. S. Golub and D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates , Sunderland, Mass. (1991))，其以引用的方式并入本文中。在本文中，术语“多肽”和“蛋白质”具有相同的含义且可互换使用。并且在本公开中，氨基酸通常用本领域公知的单字母和三字母缩写来表示。例如，丙氨酸可用 A 或 Ala 表示；精氨酸可用 R 或 Arg 表示；甘氨酸可用 G 或 Gly 表示；谷氨酰胺可用 Q 或 Gln 表示。

如本文中所使用的，术语“预防”是指，为了阻止或延迟疾病或病症或症状（例如，肿瘤和传染病）在受试者体内的发生而实施的方法。如本文中所使用的，术语“治疗”是指，为了获得有益或所需临床结果而实施的方法。为了本公开的目的，有益或所需的临床结果包括但不限于，减轻症状、缩小疾病的范围、稳定（即，不再恶化）疾病的状态，延迟或减缓疾病的发展、改善或减轻疾病的状态、和缓解症状（无论部分或全部），无论是可检测或是不可检测的。此外，“治疗”还可以指，与期望的存活期

相比（如果未接受治疗），延长存活期。

如本文中使用的，术语“受试者”是指哺乳动物，例如灵长类哺乳动物，例如非人灵长类哺乳动物或人。在某些实施方式中，所述受试者（例如人）肿瘤和传染病，或者，具有患有上述疾病的风险。

如本文中所使用的，术语“有效量”是指足以获得或至少部分获得期望的效果的量。例如，预防疾病（例如，肿瘤和传染病）有效量是指，足以预防，阻止，或延迟疾病（例如，肿瘤和传染病）的发生的量；治疗疾病有效量是指，足以治愈或至少部分阻止已患有疾病的患者的疾病和其并发症的量。测定这样的有效量完全在本领域技术人员的能力范围之内。例如，对于治疗用途有效的量将取决于待治疗的疾病的严重度、患者自己的免疫系统的总体状态、患者的一般情况例如年龄，体重和性别，药物的施用方式，以及同时施用的其他治疗等等。

如本文中所使用的，术语“效应子功能（effector function）”是指，那些可归因于抗体 Fc 区（天然序列 Fc 区或氨基酸序列变体 Fc 区）的生物学活性，且其随抗体同种型而变化。

术语“药学上可接受的”指当分子本体、分子片段或组合物适当地给予动物或人时，它们不会产生不利的、过敏的或其他不良反应。可作为药学上可接受的载体或其组分的一些物质的具体示例包括糖类（如乳糖）、淀粉、纤维素及其衍生物、植物油、明胶、多元醇（如丙二醇）、海藻酸等。

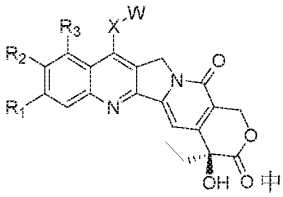
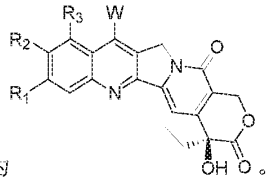
使用实验动物可以确定抗体和抗体-药物偶联物对癌症的体内治疗效果，例如，将抗体施用给植入了表达 B7H3 的肿瘤细胞系的裸鼠，并测量癌细胞的任何变化。

在本公开中，尽管大多数情况下抗体中的氨基酸取代是被 L-氨基酸取代，但也不限于此。在一些实施方案中，抗体肽链中可以包括一个或多个 D-氨基酸。包含 D-氨基酸的肽在口腔、肠道或血浆中比仅包含 L-氨基酸的肽更加稳定而不易降解。

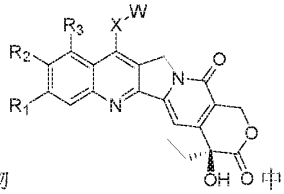
本公开所用的单克隆抗体可以由许多方法生产。例如，用于本公开的单克隆抗体可以通过杂交瘤方法，使用许多物种(包括小鼠、仓鼠、大鼠和人的细胞)获得(参见例如 Kohler 等人，1975，Nature，256: 495)，或者通过重组 DNA 技术制得(参见例如 US 4,816,567)，或者从噬菌体抗体库中分离得到(参见例如 Clackson 等人，1991，Nature，352: 624-628；和 Marks 等人，1991，Journal of Molecular Biology，222: 581-597)。

本文中，除非以其他方式明确指出，在本文中通篇采用的描述方式“各...独立地选自”和“...各自独立地选自”可以互换，均应做广义理解，其既可以是指在不同基团中，相同或不同的符号之间所表达的具体选项之间互相不影响，也可以表示在相同的基团中，相同或不同的符号之间所表达的具体选项之间互相不影响。

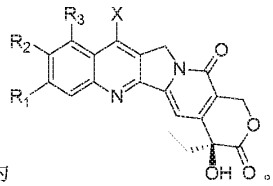
本文中，术语“直接键”表示其两侧的基团直接相连，例如，式 II 所示的化合物

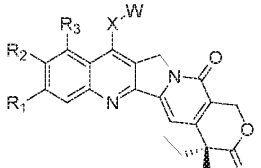
中，若 X 为直接键，则其结构式为 。其余直接键可参照前述内容进行理解。

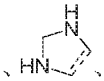
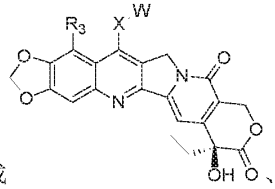
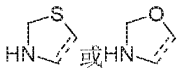
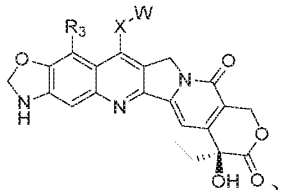
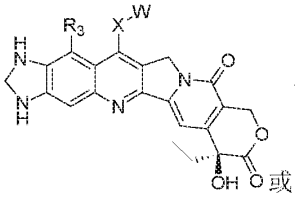
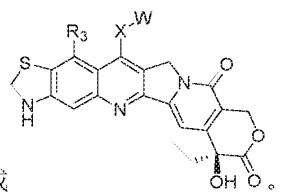


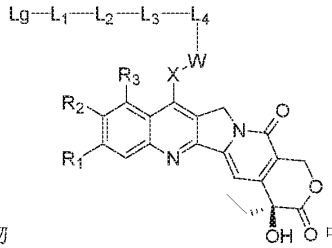
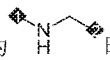
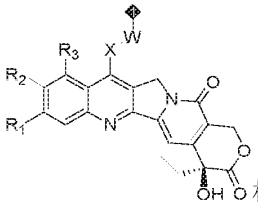
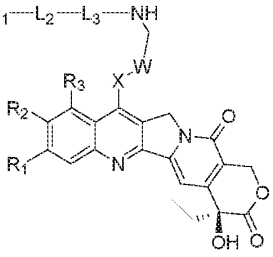
本文中，术语“不存在”表示该基团不存在，例如，式 II 所示的化合物 中，

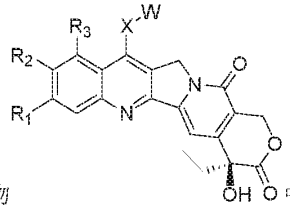
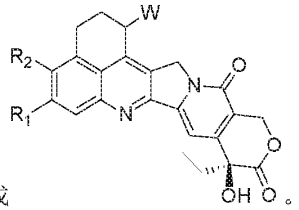


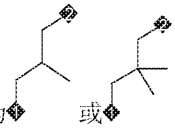
若 W 不存在，则其结构式为 。

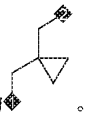


式 II 所示的化合物 中，R_1 和 R_2 和与其相连的碳原子形成  、  、  、  或，“虚线”键表示所述杂环与苯环稠合的位置，例如，形成  、  或  。

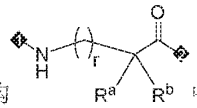
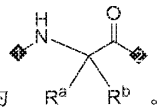
本文中，式 III 所示的药物连接体偶联物  中，L_4 为  时，其中的标号 1、2 表示 L_4 与其余基团的连接位置，具体地，1 位与 L_3 相连，2 位与药物分子即  相连时，形成  。其余标号 1、2 可参照前述内容进行理解。

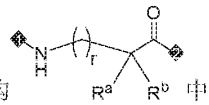
本文中，式 II 所示的化合物  中，R_3 和 X 和与其相连的碳原子一起形成  ，虚线表示所述碳环与苯环和吡啶环稠合的位置，形成  。

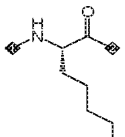
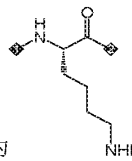
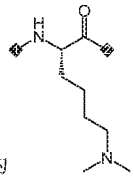
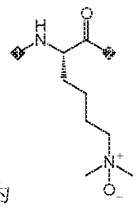
本文中，X 的定义例如为，“X 选自任选取代的  ，所述取代基选自 1 个或 2 个 C1-4 烷基（如甲基）”，则 X 例如可以为  。X 其余类似的定义可参照前述内容进行理解。

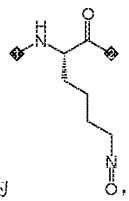
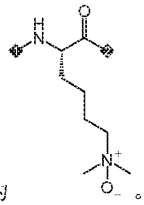
本文中，X 的定义例如为，“X 选自任选取代的  ，所述取代基选自 2 个 C1-4 烷基（如甲基）和与它们同时相连的碳原子一起形成 C3-6 环烷基（如环丙基）”，则 X 例如可以为  。X 其余类

似的定义可参照前述内容进行理解。

AA^1所示氨基酸残基的结构  中，若 r 为 0，则本领域技术人员可以理解的是，AA^1所示氨基酸残基的结构将变为  。

AA^1所示氨基酸残基的结构  中，若 R^a 与 R^b 和与它们共同相连的碳原子一起，形成 4-10 元杂环，所述 4-10 元杂环任选地被一个或多个 R^0 所取代，其中，术语“所述 4-10 元杂环任选地被一个或多个 R^0 所取代”的含义为，所述 4-10 元杂环可以不被取代，也可以被一个或多个 R^0 所取代，且所述多个 R^0 中，各 R^0 的定义可以相同，也可以不同。其余类似的定义可以参照前述内容进行理解。

本文中，例如，L_3 选自 Lys、Val-Cit、Ala-Ala-Asn、Ala-Ala-Asp、Gly-Gly-Phe-Gly、Val-Lys-Gly、Val-Ala、Lys-Ala-Asn 时，“所述赖氨酸（Lys）的远端氨基任选地被 1 个、2 个或 3 个选自叔丁氧羰基、C1-6 烷基（优选甲基）、O 的取代基所取代”的含义为，所述 L_3 各选项中的 Lys 的远端氨基任选地被 1 个、2 个或 3 个选自叔丁氧羰基、C1-6 烷基（优选甲基）、O 的取代基所取代。其中，“Lys 的远端氨基”指的是赖氨酸残基  中裸露的氨基-NH_2。“所述赖氨酸（Lys）的远端氨基任选地被 1 个、2 个或 3 个选自叔丁氧羰基、C1-6 烷基（优选甲基）、O 的取代基所取代”表示所述赖氨酸（Lys）的远端氨基可以不被取代，也可以被 1 个、2 个或 3 个选自叔丁氧羰基、C1-6 烷基（优选甲基）、O 的取代基所取代，例如，可以被 1 个叔丁氧羰基取代，即变为  ，或者，可以被 2 个甲基取代，即变为  ，或者被 2 个甲基和 1 个 O 同时取代，即变为  。需要说明的是，“所述赖氨酸（Lys）的远端氨基被 O 取代”指的是所述赖氨酸（Lys）的远端氨基被氧代，即


变为  ，若该远端氨基进一步被两个甲基所取代，则其变为 。

在本说明书的各部分，本公开化合物的取代基按照基团种类或范围公开。特别指出，本公开包括这些基团种类和范围的各个成员的每一个独立的次级组合。例如，术语"C1-6 烷基"特别指独立公开的甲基、乙基、C3 烷基、C4 烷基、C5 烷基和 C6 烷基。

在本文中，术语"C1-6 烷基"表示直链或支链的含有 1-6 个碳原子的烷基，包括例如 "C1-3 烷基" 或 "C1-4 烷基"，甲基，乙基等，具体实例包括但不限于：甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、己基。

在本文中，术语"C_{1-4} 烷基"表示直链或支链的含有 1-4 个碳原子的烷基，包括例如 "C_{1-3} 烷基"，甲基，乙基等，具体实例包括但不限于：甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基。

在本文中，术语"C_{2-6} 烯基"是指含有至少一个双键且碳原子数为 2-6 的直链、支链或环状的烯基，包括例如"C_{2-4} 烯基"等。其实例包括但不限于：乙烯基、1-丙烯基、2-丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、1,3-丁二烯基、1-戊烯基、2-戊烯基、3-戊烯基、1,3-戊二烯基、1,4-戊二烯基、1-己烯基、2-己烯基、3-己烯基、1,4-己二烯基、环戊烯基、1,3-环戊二烯基、环己烯基、1,4-环己二烯基等。

在本文中，术语"C_{2-6} 炔基"是指含有至少一个三键且碳原子数为 2-6 的直链或支链的炔基，包括例如"C_{2-4} 炔基"等。其实例包括但不限于：乙炔基、丙炔基、2-丁炔基、2-戊炔基、3-戊炔基、4-甲基-2-戊炔基、2-己炔基、3-己炔基、5-甲基-2-己炔基等。

在本文中，术语"卤素"包括氟、氯、溴、碘。

在本文中，术语"3-6 元环烷基"或"C_{3-6} 环烷基"是指含有 3-6 个碳原子的饱和环状烷基，包括环丙烷基（即环丙基）、环丁烷基（即环丁基）、环戊烷基（即环戊基）、环己基。

在本文中，术语"3-7 元碳环烷基"或"C_{3-7} 环烷基"是指含有 3-7 个碳原子的饱和环状烷基，包括环丙烷基、环丁烷基、环戊烷基、环己基、环庚基。

在本文中，术语"C1-6 烷氧基"是指通过氧原子连接至母体分子部分的如上文所定义的烷基。具体实例包括但不限于甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、异丁氧基、叔丁氧基、戊氧基、己氧基等。

在本文中，术语"C_{1-4} 烷氧基"是指通过氧原子连接至母体分子部分的如上文所定义的烷基。具体实例包括但不限于甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、异丁氧基、叔丁氧基等。

在本文中，术语“4-10 元杂环基”是指含有 4-10 个环原子(其中至少一个环原子为杂原子，例如氮原子、氧原子或硫原子)的环状基团。术语“4-6 元杂环基”是指含有 4-6 个环原子(其中至少一个环原子为杂原子，例如氮原子、氧原子或硫原子)的环状基团。任选地，环状结构中的环原子（例如碳原子、氮原子或硫原子）可以被氧代。“4-8 元杂环基”包括例如“4-8 元含氮杂环基”、“4-8 元含氧杂环基”、“4-7 元杂环基”、“4-7 元含氧杂环基”、“4-7 元杂环基”、“4-6 元杂环基”、“5-7 元杂环基”、“5-6 元杂环基”、“5-6 元含氮杂环基”，包括但不限于氧代环丁烷基、吡咯烷基、四氢呋喃基、哌啶基、哌嗪基、四氢吡喃基、高哌嗪基等。

在本文中，术语“4-10 元杂环”是指含有 4-10 个环原子(其中至少一个环原子为杂原子，例如氮原子、氧原子或硫原子)的环。术语“5-6 元杂环”是指含有 5-6 个环原子(其中至少一个环原子为杂原子，例如氮原子、氧原子或硫原子)的环，包括但不限于吡咯烷、四氢呋喃、哌啶、哌嗪、四氢吡喃等环。

在本文中，术语“芳基”是指具有芳香性的单环或多环烃基，例如 6-10 元芳基、5-8 元芳基等。具体的实例包括但不限于苯基、萘基、蒽基、菲基等。所述“6-10 元芳基”是指含有 6-10 个环原子的芳基。所述“C6-10 芳基” 是指含有 6-10 个碳原子的芳基。

在本文中，术语“杂芳基”是指具有芳香性的环状基团，其中至少一个环原子为杂原子，例如氮原子、氧原子或硫原子。任选地，环状结构中的环原子（例如碳原子、氮原子或硫原子）可以被氧代。具体实例包括但不限于 5-10 元杂芳基、5-6 元杂芳基、5-10 元含氮杂芳基、6-10 元含氧杂芳基、6-8 元含氮杂芳基、5-8 元含氧杂芳基等，例如呋喃基、噻吩基、吡咯基、噻唑基、异噻唑基、噻二唑基、噁唑基、异噁唑基、噁二唑基、咪唑基、吡唑基、1,2,3-三唑基、1,2,4-三唑基、1,2,3-噁二唑基、1,2,4-噁二唑基、1,2,5-噁二唑基、1,3,4-噁二唑基、吡啶基、2-吡啶酮基、4-吡啶酮基、嘧啶基、1,4-二氧杂环己二烯基、2*H*-1,2-噁嗪基、4*H*-1,2-噁嗪基、6*H*-1,2-噁嗪基、4*H*-1,3-噁嗪基、6*H*-1,3-噁嗪基、4*H*-1,4-噁嗪基、哒嗪基、吡嗪基、1,2,3-三嗪基、1,3,5-三嗪基、1,2,4,5-四嗪基、氮杂环庚三烯基、1,3-二氮杂环庚三烯基、氮杂环辛四烯基等。

本文用波浪线“~”表示的结构式中的键意在表示，该结构表示顺式或反式异构体，或任意比例的顺式和反式异构体的混合物。

术语“药物与抗体比”或“DAR”是指药物的数量，例如，与 ADC 的抗体附接的小分子毒素。ADC 的 DAR 可以在 1 到 16 的范围内，但是取决于抗体上的连接位点的数量，更高的负 载(例如 20)也是可能的。提及负载到单个抗体上的药物的数量时，或可替代地，提及一组 ADC 的平均或均值 DAR 时，可以使用术语 DAR。

发明的有益效果

本公开通过大量研究获得高活性和高细胞渗透性的生物活性药物（生物活性分子或 payload）、高体内循环稳定性和高化学稳定性的连接子、通过调节连接子的理化性质（如碱性和亲油性）实现抗体

偶联药物（ADC）对肿瘤微环境的富集、连接子特有的体内酶切特性以及与靶向部分的偶联方式、结合大量体内体外药效的筛选验证，获得一类新颖的抗体生物活性分子偶联物。利用上述方式获得的偶联物，能够实现多种下述的惊奇的技术效果：

根据上述方式得到的偶联物具有更好的溶解度和优异的化学稳定性，如不发生传统 ADC 中马来酰亚胺连接方式引起的可逆 Michael 加成反应，因此可以获得高药物-抗体比，在一些实施方案中，所述偶联物的 DAR 值能够达到 6-8；

具有极高的偶联效率，在一些实施方案中，所述偶联效率能够达到或超过 90%；

通过大量研究发现了一类具有高血浆稳定性，但同时又能在肿瘤微环境中（肿瘤细包内和肿瘤细胞外均可）裂解的链接子，因此可以在抗原低表达或者抗原不表达肿瘤中产生好的抗肿瘤效果；

根据上述方式得到的偶联物（ADC）通过对连接子和整体 ADC 分子的理化性质的调整，提高了整个 ADC 分子在相对酸性肿瘤环境中的暴露量，因而 ADC 具有更好的肿瘤组织靶向性，即在肿瘤微环境中的富集能力，增加了生物活性分子在瘤内和血液浓度比，降低了 ADC 分子的机理相关的毒性（ADC 结合非肿瘤组织中细胞表面抗原并内吞后产生的毒性，或者又叫“on-target 毒性”），因此具有更高的治疗指数；

根据上述方式得到的偶联物具有很高的在体内循环中的稳定性，减少了药物分子在非靶组织中的脱落，减少了非靶组织中毒素脱落引起的“off-target”毒性；

所述偶联物的生物活性分子具有更高的抗肿瘤细胞活性，因此具有优异的旁观者效应（by-stander effect），ADC 能够更有效地杀死抗原高表达肿瘤细胞以及肿瘤组织中抗原低表达或抗原不表达的肿瘤细胞；

本公开的毒素-连接子，利用其连接子在肿瘤微环境中的胞外裂解能力，可以和没有细胞内吞能力的抗体组成抗体偶联药物，这类抗体偶联药物依然具有高抗肿瘤活性；

本公开的毒素-连接子，利用其连接子在肿瘤微环境中的胞外裂解能力以及其在肿瘤微环境中的富集能力，可以和没有细胞内吞能力的抗体以及没有肿瘤细胞外抗原结合能力的抗体组成抗体偶联药物，这类抗体偶联药物依然具有高抗肿瘤活性；

本公开提供的抗体具有极高的人源化程度或者全人源抗体，从而可安全地施用给人受试者，而不引发免疫原性反应。具有能够很高的结合人和非人 B7H3 的能力，尤其涉及与非人灵长类动物(例如食蟹猴)的 B7H3 具有交叉反应性的抗体的分子；

综上，本发明的连接子、抗体和 ADC 具有重大的临床价值。

附图说明

图 1A 抗 B7H3 抗体 1D1-01 与人 B7H3-4IgG-His 蛋白 ELISA 结合检测

图 1B 抗 B7H3 抗体 2E3-02 与人 B7H3-4IgG-His 蛋白 ELISA 结合检测

图 2A 抗 B7H3 抗体 1D1-01 与猴 B7H3-4IgG-His 蛋白 ELISA 结合检测

图 2B 抗 B7H3 抗体 2E3-02 与猴 B7H3-4IgG-His 蛋白 ELISA 结合检测

图 3A 抗 B7H3 抗体 1D1-01 与 MCF-7 肿瘤细胞流式结合检测

图 3B 抗 B7H3 抗体 2E3-02 与 MCF-7 肿瘤细胞流式结合检测

图 4A 抗 B7H3 抗体 1D1-01 与 A549 肿瘤细胞流式结合检测

图 4B 抗 B7H3 抗体 2E3-02 与 A549 肿瘤细胞流式结合检测

图 5 抗 B7H3 抗体 2E3-02 与 PC-3 肿瘤细胞流式结合检测

图 6A 抗 B7H3 抗体 1D1-01 与 B7H3 蛋白特异性结合检测

图 6B 抗 B7H3 抗体 2E3-02 与 B7H3 蛋白特异性结合检测

图 7A 肿瘤细胞 A549 对候选抗体 1D1-01 内吞检测

图 7B 肿瘤细胞 A549 对候选抗体 2E3-02 内吞检测

图 7C 肿瘤细胞 A549 对候选抗体 202-2-1 内吞检测

图 8 偶联前后的 SEC 图谱

图 9 抗 B7H3-ADC 在 NCI-HT29 移植瘤模型抑制肿瘤生长的测试之一

图 10 抗 B7H3-ADC 在 NCI-HT29 移植瘤模型抑制肿瘤生长的测试之二

图 11 抗 B7H3-ADC 在 NCI-H358 移植瘤模型抑制肿瘤生长的测试

图 12 抗 B7H3-ADC 在 食管鳞癌 PDX 模型中抑制肿瘤生长的测试

图 13 抗 B7H3-ADC 在 前列腺 PDX 模型中抑制肿瘤生长的测试

图 14 抗 Her3-ADC 在 NCI-H358 移植瘤模型抑制肿瘤生长的测试

图 15 抗 Her3-ADC 在 SW480 移植瘤模型抑制肿瘤生长的测试之一

图 16 抗 Her3-ADC 在 SW480 移植瘤模型抑制肿瘤生长的测试之二

图 17 HT29 模型中 A1.9 在血浆和肿瘤中的分布比

图 18 HT29 模型中 ADC 在血浆和肿瘤中的分布比。

图 19A 抗体-药物偶联物在肿瘤匀浆中孵育并检测结果

图 19B 抗体-药物偶联物在肌肉组织匀浆中孵育结果

具体实施方式

以下通过具体实施方式的描述对本公开作进一步说明，但这并非是对本公开的限制。本领域技术人员根据本公开的教导，可以做出各种修改或改进，而不脱离本公开的基本思想和范围。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品。

本公开中的缩写具有以下含义：

OMs	甲磺酸酯基	FA	甲酸
OTs	对甲苯磺酸酯基	ACN	乙腈
OTf	三氟甲磺酸酯基	CCK8 试剂	2-(2-甲氧基-4-硝苯基)-3-(4-硝苯基)-5-(2,4-二磺基苯)-2H-四唑单钠盐
TBS	叔丁基二甲基硅基	FBS	胎牛血清
MMT	对甲氧基苯基二苯甲基	DMSO	二甲基亚砜
PB/PBS	磷酸盐缓液	HBTU	O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐
HOBT	1-羟基苯并三唑	HATU	2-(7-氮杂苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐
NBS	N-溴代琥珀酰亚胺	TFA	三氟乙酸
PPTS	吡啶对甲苯磺酸盐	DCM	二氯甲烷
THF	四氢呋喃	DMF	N,N-二甲基甲酰胺
EDC	1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐	IgG	免疫球蛋白 G
CDR	免疫球蛋白可变区中的互补决定区	HRP	辣根过氧化物酶
FR	抗体构架区：抗体可变区中除 CDR 残基以外的氨基酸残基	hFc	人 IgG 抗体 Fc 段
VH	抗体重链可变区	KD	平衡解离常数
VL	抗体轻链可变区	HCDR1	免疫球蛋白重链可变区中的互补决定区 1
AbM	AbM CDR 定义方式来源于 Martin 的相关研究（Martin ACR, Cheetham JC, Rees AR (1989) Modelling antibody hypervariable loops: A combined algorithm. Proc Natl Acad Sci USA 86:9268–9272），此定义方法整合了 Kabat	HCDR2	免疫球蛋白重链可变区中的互补决定区 2

	及 Chothia 两者的部分定义。		
Kabat	由 Elvin A. Kabat 提出的免疫球蛋白比对及编号系统 (参见，例如 Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991)。	HCDR3	免疫球蛋白重链可变区中的互补决定区 3
Chothia	由 Chothia 等人提出的免疫球蛋白编号系统，其是基于结构环区的位置鉴定 CDR 区边界的经典规则(参见，例如 Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia 等人 (1989) Nature 342:878-883)。	LCDR1	免疫球蛋白轻链可变区中的互补决定区 1
IMGT	基于由 Lefranc 等人发起的国际免疫遗传学信息系统 (The international ImMunoGeneTics information system ® (IMGT))的编号系统，可参阅 Lefranc et al., Dev. Comparat. Immunol. 27:55-77, 2003。	LCDR2	免疫球蛋白轻链可变区中的互补决定区 2
mAb	单克隆抗体	LCDR3	免疫球蛋白轻链可变区中的互补决定区 3
EC50	产生 50%功效或结合的浓度	SEC-HPLC	分子排阻高效液相色谱
ELISA	酶联免疫吸附测定	HC	疫球蛋白重链
PCR	聚合酶链式反应	LC	疫球蛋白轻链

序列及其具体信息：

SEQ ID NO	序列名称	氨基酸序列

1	scFv 1D1	EGQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISSYWMNWVRQAPGKGLEWVA NIKQDGSEKYYVDSVQGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR RMYSSGWYWGAFDMWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSP GTLSLSPGERATLSCRASQSVSSIYLAWNQQKPGQAPRLLIYGTFKRATGIP DRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQYDTSSITFGQGTRLEIK
2	scFv 2E3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVS GISGSGGSTYYADSVQGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKA RSGYDYFFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSLS PGERATLSCRASQRISSSFLAWYQQKPGQAPSLLIYGASSRATGIPDRFSGS GSGTDFTLTISSLEPEDFAVFYCQQYSNSPLTFGGGTKVEIK
3	1D1-01 VH	EGQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISSYWMNWVRQAPGKGLEWVA NIKQDGSEKYYVDSVQGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR RMYSSGWYWGAFDMWGQGTMVTVSS
4	1D1-01 chothia HCDR1	GFTISSY
5	1D1-01 chothia HCDR2	KQDGSE
6	1D1-01 chothia HCDR3	RMYSSGWYWGAFDM
7	1D1-01 kabat HCDR1	SYWMN
8	1D1-01 kabat HCDR2	NIKQDGSEKYYVDSVQG
9	1D1-01 kabat HCDR3	RMYSSGWYWGAFDM

10	1D1-01 IMGT HCDR1	GFTISSYW
11	1D1-01 IMGT HCDR2	IKQDGSEK
12	1D1-01 IMGT HCDR3	ARRMYSSGWYWGAFDM
13	1D1-01 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSIYLAWNQQKPGQAPRLLIYGT FKRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQYDTSSITFGQGTRL EIK
14	1D1-01 chothia LCDR1	RASQSVSSIYLA
15	1D1-01 chothia LCDR2	GTFKRAT
16	1D1-01 chothia LCDR3	QQYDTSSIT
17	1D1-01 kabat LCDR1	RASQSVSSIYLA
18	1D1-01 kabat LCDR2	GTFKRAT
19	1D1-01 kabat LCDR3	QQYDTSSIT

20	1D1-01 IMGT LCDR1	QSVSSIY
\	1D1-01 IMGT LCDR2	GTF
21	202-2-1 kabat/IMGT LCDR3	QQLNSYPLT
22	1D1-01 IMGT LCDR3	QQYDTSSIT
23	2E3-02 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSGISGSGGSTYYADSVQGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKARSGYDYFFDYWGQGTLVTVSS
24	2E3-02 chothia HCDR1	GFTFSSY
25	2E3-02 chothia HCDR2	SGSGGS
26	2E3-02 chothia HCDR3	ARSGYDYFFDY
27	2E3-02 kabat HCDR1	SYAMN
28	2E3-02 kabat HCDR2	GISGSGGSTYYADSVQG

29	2E3-02 kabat HCDR3	ARSGYDYFFDY
30	2E3-02 IMGT HCDR1	GFTFSSYA
31	2E3-02 IMGT HCDR2	ISGSGGST
32	2E3-02 IMGT HCDR3	AKARSGYDYFFDY
33	2E3-02 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRISSSFLAWYQQKPGQAPSLLIYGA SSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVFYCQQYSNSPLTFGGGTK VEIK
34	2E3-02 chothia LCDR1	RASQRISSSFLA
35	2E3-02 chothia LCDR2	GASSRAT
36	2E3-02 chothia LCDR3	QQYSNSPLT
37	2E3-02 kabat LCDR1	RASQRISSSFLA
38	2E3-02 kabat LCDR2	GASSRAT

39	2E3-02 kabat LCDR3	QQYSNSPLT
40	2E3-02 IMGT LCDR1	QRISSSF
\	2E3-02 IMGT LCDR2	GAS
41	202-2-1 IMGT LCDR1	QGISSY
42	2E3-02 IMGT LCDR3	QQYSNSPLT
43	IgG1 CH，即 IgG1 恒定区	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
44	Kappa CL，即 kappa 恒定区	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC

45	1D1-01 HC，即 1D1-01 重链	EGQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISSYWMNWVRQAPGKGLEWVA NIKQDGSEKYYVDSVQGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR RMYSSGWYWGAFDMWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
46	1D1-01 LC，即 1D1-01 轻链	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSIYLAWNQQKPGQAPRLLIYGT FKRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQYDTSSITFGQGTRL EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
47	2E3-02 HC，即 2E3-02 重链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVS GISGSGGSTYYADSVQGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKA RSGYDYFFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
48	2E3-02 LC，即 2E3-02 轻链	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRISSSFLAWYQQKPGQAPSLLIYGA SSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVFYCQQYSNSPLTFGGGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC

49	202-2-1 VH	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWV AVIWYDVSHKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLSLQMNSLRAEDTAVYYCA RDWGDPDAFDIWGQGTMVTVSS
50	202-2-1 VL	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGTKV EIK
51	202-2-1 HC，即 202-2-1 重链	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWV AVIWYDVSHKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLSLQMNSLRAEDTAVYYCA RDWGDPDAFDIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
52	202-2-1 LC，即 202-2-1 轻链	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGTKV EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
53	202-2-1 kabat HCDR1	TYGMH
54	202-2-1 kabat HCDR2	VIWYDVSHKYYADSVKG
55	202-2-1 kabat HCDR3	DWGDPDAFDI

56	202-2-1 IMGT HCDR1	GFTFSTYG
57	202-2-1 IMGT HCDR2	IWYDVSHK
58	202-2-1 IMGT HCDR3	ARDWGDPDAFDI
59	202-2-1 kabat LCDR1	RASQGISSYLA
60	202-2-1 kabat LCDR2	AASTLQS
\	202-2-1 IMGT LCDR2	AAS

现参照下列意在举例说明本公开(而非限定本公开)的实施例来描述本公开。

除非特别指明，本公开中所使用的分子生物学实验方法和免疫检测法，基本上参照 J. Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册，第 2 版，冷泉港实验室出版社，1989，以及 F. M. Ausubel 等人，精编分子生物学实验指南，第 3 版，John Wiley & Sons, Inc.，1995 中所述的方法进行。本领域技术人员知晓，实施例以举例方式描述本公开，且不意欲限制本公开所要求保护的范围。

制备方案

以下的实施例中记载的化合物的结构通过核磁共振(^{1}H NMR)或质谱(MS)来确定。

核磁共振(^{1}H NMR)的测定仪器使用 Bruker 400 MHz 核磁共振仪；测定溶剂为氘代甲醇(CD_3OD)、氘代氯仿($CDCl_3$)或六氘代二甲基亚砜(DMSO-d_6)；内标物质为四甲基硅烷(TMS)。

实施例中使用的核磁共振(NMR)图谱中的缩写示于以下。

s：单峰(singlet)、d：二重峰(doublet)、t：三重峰(triplet)、q：四重峰(quartet)、dd：双二重峰(double doublet)、qd：四二重峰(quartet doublet)、ddd：双双二重峰(double double doublet)、ddt：

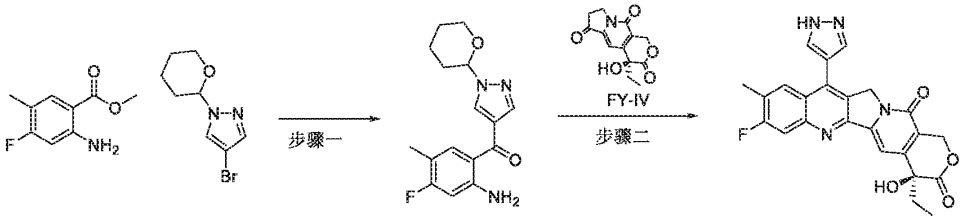
双双三重峰(double double triplet)、dddd：双双双二重峰(double double double doublet)、m：多重峰(multiplet)、br：宽峰(broad)、J：偶合常数、Hz：赫兹、DMSO-d_6：氘化二甲基亚砜。δ值用ppm值表示。

质谱(MS)的测定仪器使用Agilent (ESI)质谱仪，型号为Agilent 6120B。

一、生物活性分子和合成"药物-连接体化合物"过程使用的中间体的合成

A、生物活性分子的合成

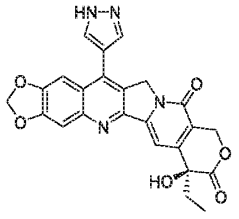
实施例 A1.1： (S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-11-(1H-吡唑-4-基)-1,12-二氢-14H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮（A1.1）的合成



步骤一： 4-溴-1-(四氢-2H-吡喃-2-基)-1H-吡唑（4.6g）溶于无水四氢呋喃中（50ml），上述溶液在氮气保护下干冰-丙酮冷却到-78°C，然后滴加正丁基锂（12ml, 2M），反应液在-78°C 搅拌 20 分钟，然后加入 2-氨基-4-氟-5-甲基苯甲酸甲酯（1.83g），加完后，反应自然升至室温，并连续搅拌反应 5 小时。反应甲甲醇（3ml）猝灭后加入乙酸乙酯（200ml），溶液用水洗（100ml x 3），有机相干燥后除去有机溶剂，用硅胶柱色谱分离得到目标产物 (2-氨基-4-氟-5-甲基苯基)(1-(四氢-2H-吡喃-2-基)-1H-吡唑-4-基)甲酮，ESI-MS (m/z): 304 $[M+H]^+$。

步骤二： (S)-4-乙基-4-羟基-7,8-二氢-1H-吡喃[3,4-f]中氮䓬并-3,6,10(4H)-三酮（2.63g）， (2-氨基-4-氟-5-甲基苯基)(1-(四氢-2H-吡喃-2-基)-1H-吡唑-4-基)甲酮 (3.03g), 对甲苯磺酸（1.74g）溶于二氯甲烷（50ml）中，然后除去溶剂，混合物在氮气保护下加热至120°C反应4小时。混合物溶于乙酸乙酯（300ml），有机相水洗（100ml x 2），干燥后除去有机溶剂，残留物用硅胶柱层析分离得到目标产物 (S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-11-(1H-吡唑-4-基)-1,12-二氢-14H-吡喃并[3',4':6,7] 吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮（A1.1）。 ESI-MS (m/z): 447 $[M+H]^+$。

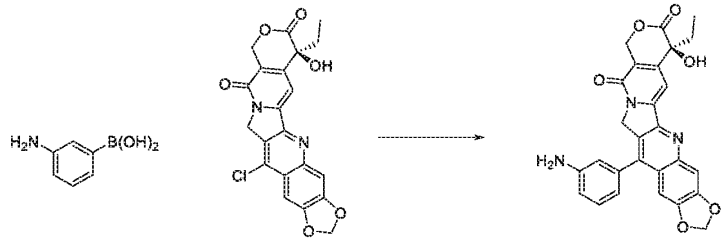
实施例 A1.2： (S)-7-乙基-7-羟基-14-(1H-吡唑-4-基)-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7] 吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮（A1.2）的合成



用实施例 A1.1 相同的方法和反应条件，用 6-氨基苯并[d][1,3]二氧环戊烷-5-羧酸甲酯代替 2-氨基

-4-氟-5-甲基苯甲酸甲酯，得到目标产物 (S)-7-乙基-7-羟基-14-(1H-吡唑-4-基)-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮（A1.2）。ESI-MS (m/z): 459 $[M+H]^+$。

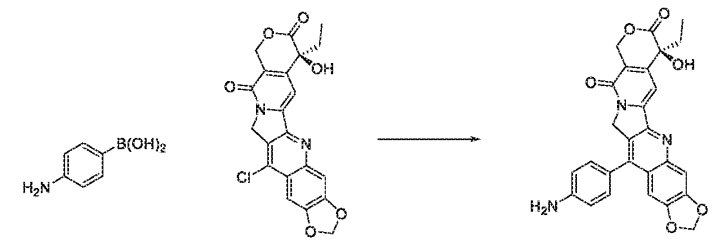
实施例 A1.3：(S)-14-(3-氨基苯基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮（A1.3）的合成



A1.3-A A1.3-B A1.3

化合物（A1.3-A）(1.4g)，化合物（A1.3-B）(2.2g)，$Pd_2(DBA)_3$ (300 mg)，三环己基磷（300 mg），醋酸钾（1.1g）依次加入二氧六环（30ml）和水（5ml）的混合溶剂中，混合物在氮气保护下 100°C 加热搅拌反应 12 小时。冷却后加入乙酸乙酯（200ml），水洗（100ml），干燥后，硅胶柱层析分离得到目标产物 (S)-14-(3-氨基苯基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3] 二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮（A1.3）。ESI-MS (m/z): 484 $[M+H]^+$。

实施例 A1.4：(S)-14-(4-氨基苯基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3] 二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮（A1.4）的合成



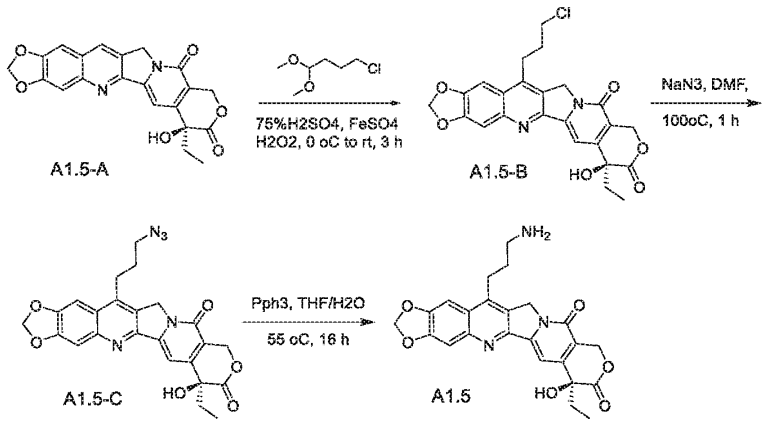
A1.4-A A1.4-B A1.4

化合物（A1.4-A）(1.4g)，化合物（A1.4-B）(2.2g)，$Pd_2(DBA)_3$(300mg)，三环己基磷（300mg），醋酸钾（1.1g）依次加入二氧六环（30ml）和水（5ml）的混合溶剂中，混合物在氮气保护下 100°C 加热搅拌反应 12 小时。冷却后加入乙酸乙酯（200ml），水洗（100ml），干燥后，硅胶柱层析分离得到目标产物 (S)-14-(4-氨基苯基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3] 二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮（A1.4）。

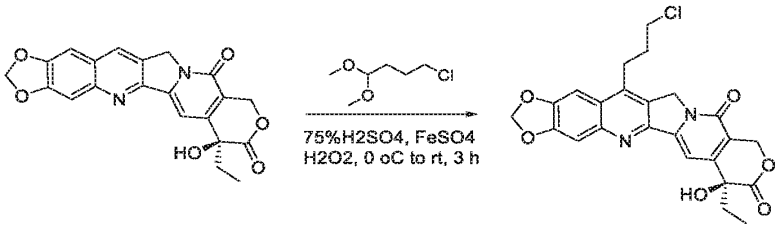
ESI-MS (m/z): 484 $[M+H]^+$;

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.56 (s, 1H), 7.34 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.27 (s, 1H), 7.14 (s, 1H), 6.89 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 6.26 (s, 2H), 5.40 (s, 2H), 5.05 (s, 2H), 1.96 – 1.78 (m, 2H), 0.88 (t, J = 7.2 Hz, 3H)。

实施例 A1.5：(S)-14-(3-氨基丙基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮 （A1.5）的合成



步骤一：(S)-14-(3-氯丙基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮的合成

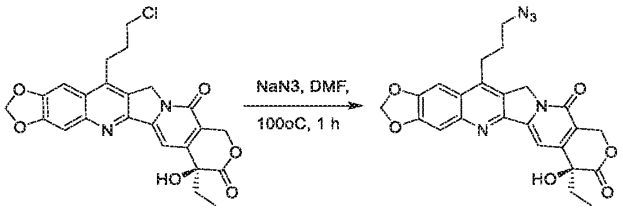


冰浴条件下，向化合物（*S*） 7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环[4,5-g]吡喃并[3'，4'：6,7]茚并[1,2-b]喹啉-8,11（7H）-二酮（A1.5-A，500 mg）的 75%硫酸溶液（5 mL）中加入七水合硫酸亚铁（570 mg 七水合硫酸亚铁溶于 1mL 水中），和 4,4-二甲氧基氯丁烷（3.89 g），反应液搅拌三分钟后滴加双氧水（29%，2.5 mL）。反应液在 0 ºC 下搅拌反应 5 分钟后升至室温，并搅拌反应 3 小时。反应液加入水（50 mL）稀释，乙酸乙酯（80 mL×2）萃取，有机相用饱和食盐水洗涤，无水硫酸钠干燥，浓缩得到粗产品，粗产品用 C18 柱（乙腈/0.05%甲酸的水溶液：5%-60%）进一步纯化得到目标化合物（黄色固体，400 mg，收率：67%）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：468.9；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.65 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.30 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.26 (s, 2H), 3.81 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 3.22 (s, 2H), 1.98 (d, *J* = 6.7 Hz, 4H), 0.88 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H)。

步骤二：(S)-14-(3-叠氮基丙基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮的合成

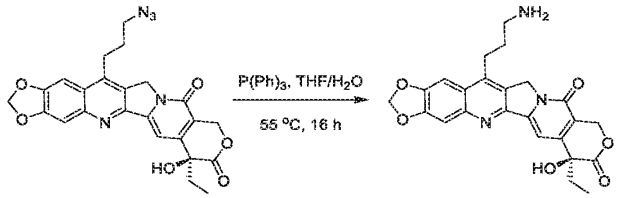


向化合物(S)-14-(3-氯丙基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮（200 mg）的 N, N-二甲基甲酰胺溶液（3 mL）中，加入叠氮化钠（284 mg），反应液在 100 ℃下搅拌反应 1 小时。向反应液中加入水（30 mL），乙酸乙酯（60 mL×2）萃取，有机相用经饱和食盐水洗涤，无水硫酸钠干燥，浓缩得到目标化合物(S)-14-(3-叠氮基丙基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮（黄色固体，180 mg ，收率：88%）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：476；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.65 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.25 (s, 2H), 3.53 – 3.49 (m, 2H), 3.16 – 3.12 (m, 2H), 1.93 – 1.80 (m, 4H), 0.88 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H)。

步骤三：(S)-14-(3-氨基丙基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮的合成



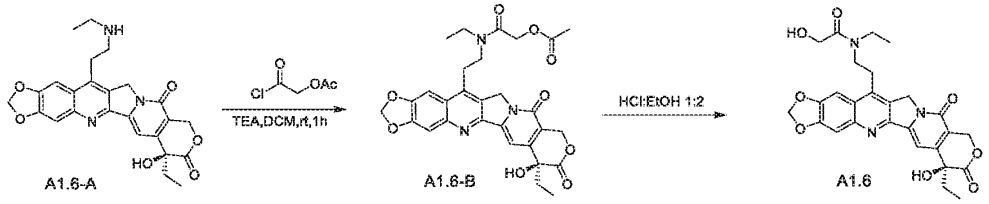
向化合物(S)-14-(3-叠氮基丙基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮的合成（130 mg，0.274 mmol）的四氢呋喃（3 mL）和水（1 mL）混合溶液中加入三苯基膦（108 mg，0.411 mmol），在 55 ℃下反应 16 小时。LCMS 显示反应完全。向反应液中加入水（5 mL），用 2N 盐酸（3 mL）调至酸性，用乙酸乙酯（10 mL）萃取。水相经高效液相制备纯化（乙腈/ 0.05%甲酸的水溶液）得到目标化合物(S)-14-(3-氨基丙基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮的合成 (A1.5，黄色固体，15 mg, 收率：12%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：449.9；

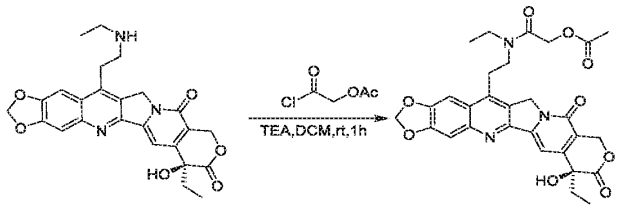
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.72 (s, 3H), 7.53 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.30 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 5.24 (s, 2H), 3.15 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.03 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.96 – 1.81 (m, 4H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H)。

实施例 A1.6：(S)-N-乙基-N-(2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷

并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)-2-羟基乙酰胺（A1.6）的合成



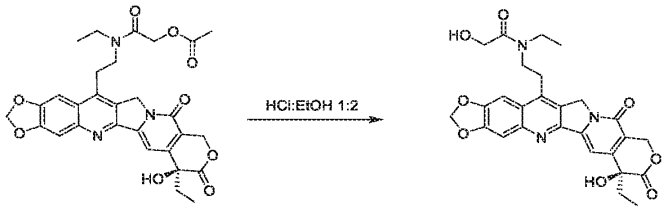
步骤一：（S） -2-（乙基（2-（7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧醇[4,5-g]吡喃并[3'，4'：6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基）乙基）氨基）-2-氧乙基乙酸酯（A1.6-B）的制备：



将化合物（S） -7-乙基-14-（2-（乙胺基）乙基）-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环[4,5-g]吡喃并[3'，4'：6,7]吲哚嗪[1,2-b]喹啉-8,11（7H）-二酮（A1.6-A，50 mg），乙酰氧基乙酰氯，（73 mg），三乙胺（50 mg）依次加入二氯甲烷（5 mL）中，室温搅拌反应 1 小时。反应液旋蒸除去溶剂，得到粗品油状化合物 75mg。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：564.2。

步骤二：(S)-N-乙基-N-(2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)-2-羟基乙酰胺（A1.6）的合成



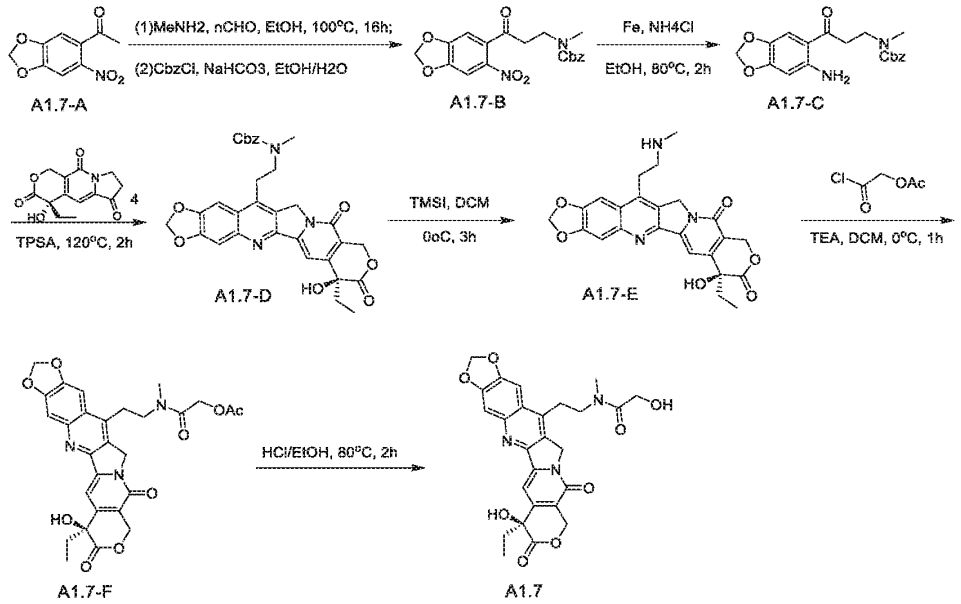
将粗品化合物（S）-2-（乙基（2-（7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧醇[4,5-g]吡喃并[3'，4'：6,7]吲哚嗪[1,2-b]喹啉-14-基）乙基）氨基）-2-氧乙基乙酸酯 （75mg，0.13 mmol）溶在浓盐酸和无水乙醇混合溶液（体积比为 1/2，3 mL）中，然后反应液 85 ℃回流反应 1 小时。LCMS 显示反应完成。反应液浓缩，粗产品经制备色谱(0.01% 三氟乙酸的水溶液，乙腈)纯化得到目标化合物(S)-N-乙基-N-(2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)-2-羟基乙酰胺（A1.6）（15 mg，收率：26%）为白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：522.0；

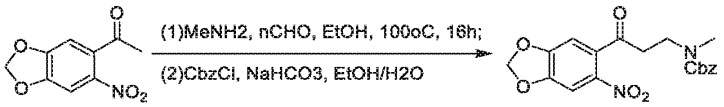
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.92 (s, 1H), 7.53 (m, 1H), 7.25 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.31 (s, 2H), 5.43

(s, 2H), 5.34 (m, 2H), 4.65 (m, 1H), 4.07 (m, 2H), 3.52 (m, 2H), 3.41 (m, 2H), 2.00 (m, 2H), 1.88 (m, 2H), 1.16 – 1.04 (m, 3H), 0.89 – 0.83 (m, 3H)。

实施例 A1.7：(S)-N-甲基-N-(2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)-2-羟基乙酰胺（A1.7）的合成



步骤一：化合物甲基苄基（3-（6-硝基苯并[d][1,3]二氧杂环-5-基）-3-氧丙基）氨基甲酸酯的制备

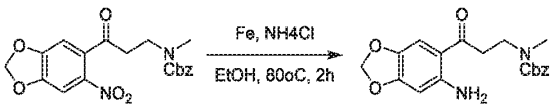


将化合物 1-（6-硝基苯并[*d*][1,3]二恶英-5-基）乙烷-1-酮（A1.7-A，500 mg），甲胺盐酸盐（1.6 g）和多聚甲醛（714 mg）溶在乙醇（8 mL）中，100°C 下闷罐反应 16 小时。反应液降至室温并减压浓缩，所得残渣用二氯甲烷（80 mL）溶解，有机相经水（50 mL × 3）萃取。所得水相用碳酸氢钠调至 PH=9，然后加入氯甲酸苄酯（513 mg, 3.0 mmol），在室温下反应 16 小时。反应液用乙酸乙酯（30 mL × 3）萃取，有机相经饱和食盐水洗涤，无水硫酸钠干燥，抽滤，浓缩得到粗品，粗产品经 C18 分离纯化 (乙腈/水含 0.05%甲酸=5~95%)得到目标化合物（A1.7-B，180 mg，收率 23%）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：387.1.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.56 (s, 1H), 7.35 (m, 5H), 7.32 (m, 1H), 6.17 (s, 2H), 5.13 (s, 2H), 3.71 (m, 2H), 3.03 (m, 3H), 2.99 – 2.86 (m, 2H)。

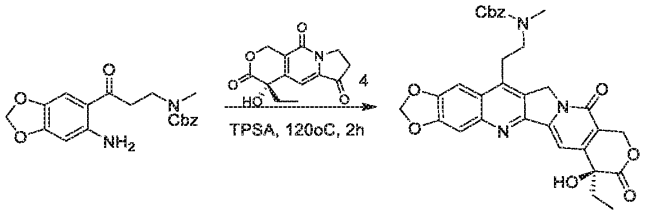
步骤二：化合物苄基（3-（6-氨基苯并[d][1,3]二恶英-5-基）-3-氧丙基）（甲基）氨基甲酸酯（A1.7-C）的制备



将化合物 A1.7-B 甲基苄基（3-（6-硝基苯并[d][1,3]二氧杂环-5-基）-3-氧丙基）氨基甲酸酯（180 mg, 0.47 mmol）溶于饱和氯化铵水溶液（8 mL）和乙醇（8 mL）混合溶液中，然后向反应液中加入铁粉（130 mg），反应在 80°C 下搅拌 2 小时。将反应液过滤，滤液减压浓缩成固体，粗产品经 TLC 分离纯化 (石油醚：乙酸乙酯=2/1)得到目标化合物 A1.7-C（76 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：357.0。

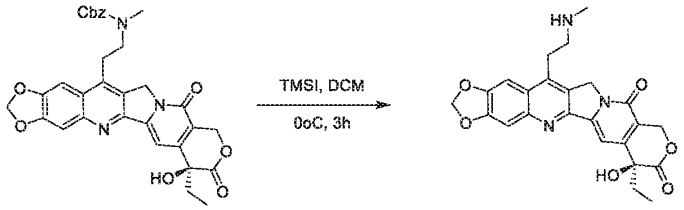
步骤三：苄基（S）-（2-（7-乙基-7-羟基-8,11-二氧基-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环[4,5-g]吡喃并[3'，4'：6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基）乙基）（甲基）氨基甲酸酯（A1.7-D）的制备



室温下，将化合物 A1.7-C 苄基（3-（6-氨基苯并[d][1,3]二恶英-5-基）-3-氧丙基）（甲基）氨基甲酸酯（38 mg），化合物（S） -4-乙基-4-羟基-7,8-二氢-1H-吡喃并[3,4-f]吲哚嗪-3,6,10（4H）-三酮（29 mg） 和对甲苯磺酸（23 mg）溶于二氯甲烷（5 mL）溶液中，溶液澄清混匀后减压浓缩，用油泵抽至真空，反应在 120°C 真空下反应 2 小时。将反应液降至室温，加入水（30 mL）并用二氯甲烷（30 mL × 3）萃取。合并有机相依次经无水硫酸钠干燥、过滤，滤液减压浓缩得到目标化合物 A1.7-D（50 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 584.0。

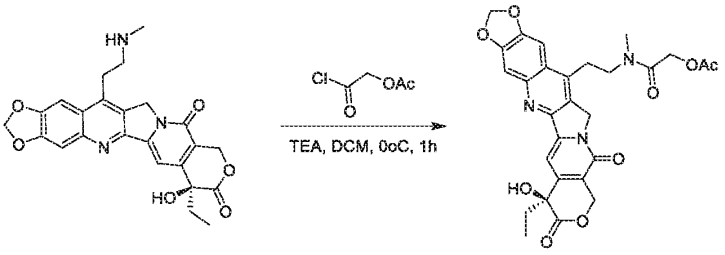
步骤四：（S） 7-乙基-7-羟基-14-（2-（甲胺基）乙基）-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环[4,5-g]吡喃并[3'，4'：6,7]吲哚嗪[1,2-b]喹啉-8,11（7H）-二酮（A1.7-E）的制备



室温下，将化合物 A1.7-D 苄基（S）-（2-（7-乙基-7-羟基-8,11-二氧基-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环[4,5-g]吡喃并[3'，4'：6,7]吲哚嗪[1,2-b]喹啉-14-基）乙基）（甲基）氨基甲酸酯（50 mg）溶于二氯甲烷（5 mL）溶液中，于 0°C 下加入三甲基碘硅烷（51 mg，0.26 mmol），反应 3 小时。将反应液浓缩除去溶剂，经高效液相制备纯化（乙腈/水含 0.05%甲酸）得到褐色固体化合物 A1.7-E（15 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：450.0。

步骤五：化合物（S） -2-（(2-（7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧醇[4,5-g]吡喃并[3'，4'：6,7]吲哚嗪[1,2-b]喹啉-14-基）乙基）（甲基）氨基）-2-氧乙基乙酸酯（A1.7-F）的制备



将化合物 A1.7-E（S） 7-乙基-7-羟基-14-（2-（甲胺基）乙基）-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环[4,5-g]吡喃并[3'，4'：6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11（7H）-二酮（15 mg）和三乙胺（15 mg）溶于二氯甲烷（5 mL）溶液中，于 0°C 下加入乙酰氧基乙酰氯（20 mg）反应 1 小时。将反应液浓缩除去溶剂得到粗品，所得固体直接用于下一步，未做进一步纯化。

LCMS (ESI) $[M5+H]^+$ = 550.1。

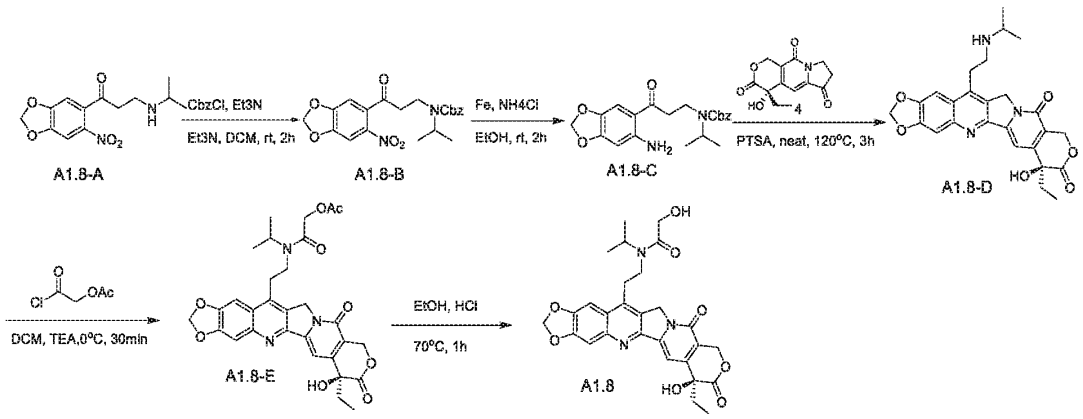
步骤六：化合物（S） -N-（2-（7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环[4,5-g]吡喃并[3'，4'：6,7]吲哚嗪[1,2-b]喹啉-14-基）乙基）-2-羟基-N-甲基乙酰胺（A1.7）的制备



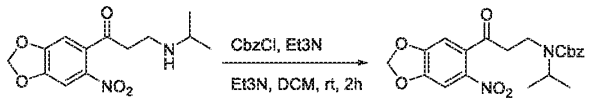
将化合物 A1.7-F（S） -2-（(2-（7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧醇[4,5-g]吡喃并[3'，4'：6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基）乙基）（甲基）氨基）-2-氧乙基乙酸酯（15 mg）溶于乙醇（5 mL）溶液中，加入浓盐酸（1.5 mL），于 80°C 下反应 2 小时。将反应液浓缩除去溶剂，经高效液相制备纯化（乙腈/水含 0.05%甲酸）得到白色固体化合物 A1.7（1.6 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：508.2。

实施例 A1.8：(S)-N-异丙基-N-(2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)-2-羟基乙酰胺（A1.8）的合



步骤一：化合物异丙基苄基（3-（6-硝基苯并[d][1,3]二恶英-5-基）-3-氧丙基）氨基甲酸酯（A1.8-B）的制备

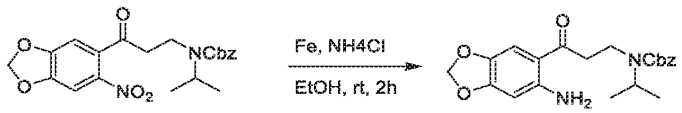


向化合物（A1.8-A）3-（异丙胺基）-1-（6-硝基苯并[d][1,3]二恶英-5-基）丙-1-酮（900 mg）的二氯甲烷溶液（10 mL）中，依次加入三乙胺（1.8 g）和苄氧基碳酰氯（734 mg，4.3 mmol），在室温下反应 2 小时。反应液加水（50 mL）稀释，用二氯甲烷（50 mL×3）萃取，有机相经饱和食盐水洗涤，无水硫酸钠干燥，浓缩得到粗品，粗产品经柱层析分离纯化 (石油醚：乙酸乙酯=3/1)得到目标化合物（A1.8-B）（600 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：414.9；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.72 (s, 1H), 7.34 (br s, 6H), 6.31 (s, 2H), 5.08 (s, 2H), 4.14 – 4.10 (m, 1H), 3.48 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 3.03 (s, 2H), 1.13 - 1.11 (m, 6H)。

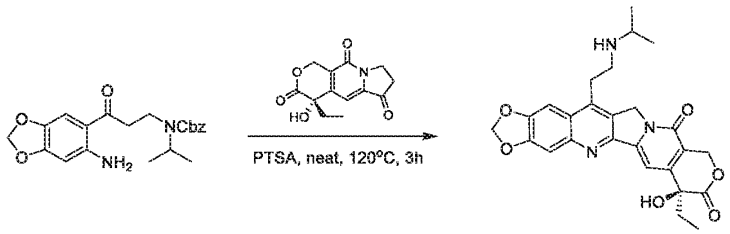
步骤二：化合物苄基（3-（6-氨基苯并[d][1,3]二恶英-5-基）-3-氧丙基）（异丙基）氨基甲酸酯（A1.8-C）的制备



将化合物（A1.8-B）异丙基苄基（3-（6-硝基苯并[d][1,3]二恶英-5-基）-3-氧丙基）氨基甲酸酯（200 mg, 0.48 mmol）溶于饱和氯化铵（3 mL）和乙醇（3 mL）混合溶液中，然后向反应液中加入铁粉（135 mg），反应在室温下搅拌 2 小时。将反应液过滤，滤液减压浓缩成固体，粗产品经柱层析分离纯化 (石油醚：乙酸乙酯=3/1)得到目标化合物（A1.8-C）（65 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：395.2。

步骤三：（S） 7-乙基-7-羟基-14-（2-（异丙胺基）乙基）-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环[4,5-g]吡喃并[3'，4'：6,7]吲哚嗪[1,2-b]喹啉-8,11（7H）-二酮（A1.8-D）的制备

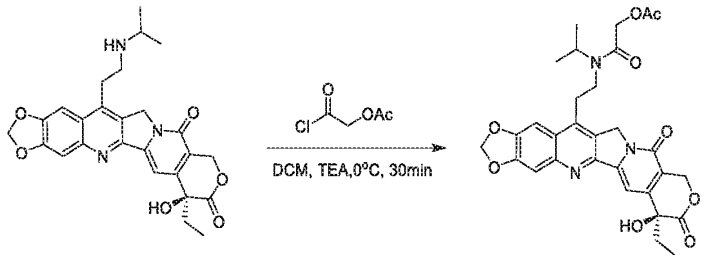


室温下，将化合物（A1.8-C）苄基（3-（6-氨基苯并[d][1,3]二恶英-5-基）-3-氧丙基）（异丙基）氨基甲酸酯（65 mg），化合物（S） -4-乙基-4-羟基-7,8-二氢-1H-吡喃并[3,4-f]吲哚嗪-3,6,10（4H）-三酮（45 mg）和对甲苯磺酸（33 mg，0.17 mmol）溶于二氯甲烷（10 mL）溶液中，溶液澄清混匀后减压浓缩，用油泵抽至真空，反应在 120°C 真空下反应 2 小时。将反应液降至室温，加入水（50 mL），用二氯甲烷（30 mL×3）萃取，合并有机相依次并无水硫酸钠干燥、过滤，滤液减压浓缩，粗产品经柱层析分离纯化 (二氯甲烷/甲醇=10/1)得到目标化合物（A1.8-D）（40 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：478.0；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.46 (s, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.27 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 6.33 (s, 2H), 5.44 (s, 2H), 5.35 (s, 2H), 3.41 (br s, 2H), 3.23 (br s, 3H), 1.94 – 1.78 (m, 2H), 1.25 (d, J = 6.4 Hz, 6H), 0.88 (t, J = 7.3 Hz, 3H)。

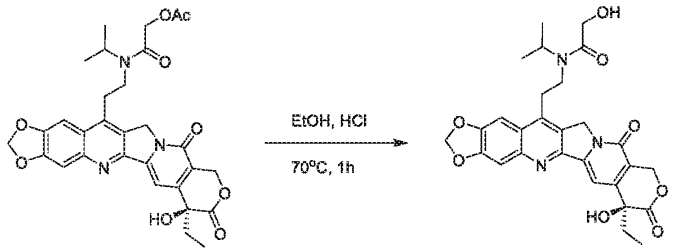
步骤四：化合物（（S） -2-（（2-（7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂[4,5-g]吡喃并[3'，4'：6,7]吲哚嗪[1,2-b]喹啉-14-基）乙基）（异丙基）氨基）-2-氧代乙酸乙酯（A1.8-E）的制备



冰浴下，向化合物（S） -7-乙基-7-羟基-14-（2-（异丙胺基）乙基）-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环[4,5-g]吡喃并[3'，4'：6,7]吲哚嗪[1,2-b]喹啉-8,11（7H）-二酮（A1.8-D）（40 mg）的二氯甲烷溶液（2 mL）中加入三乙胺（35 mg），2-氯-2-氧乙基乙酸酯（57 mg），在零度下反应 30 分钟。将反应液减压浓缩得到化合物 A1.8-E，直接应用于下一步。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：578.0。

步骤五：化合物（S） -N-（2-（7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧并[4,5-g]吡喃并[3'，4'：6,7]吲哚嗪[1,2-b]喹啉-14-基）乙基）-2-羟基-N-异丙基乙酰胺（A1.8）的制备

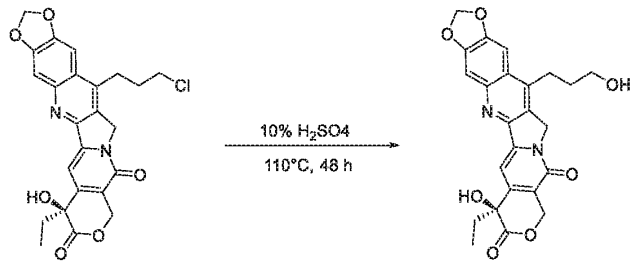


向化合物（S） -2-（(2-（7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂[4,5-g]吡喃并[3'，4'：6,7]吲哚嗪[1,2-b]喹啉-14-基）乙基）（异丙基）氨基）-2-氧代乙酸乙酯（A1.8-E，50 mg）的乙醇溶液（3 mL）中，加入浓盐酸（0.5 mL），在 70°C 下反应 1 小时。将反应液浓缩得到粗产品。再经高效液相制备纯化（乙腈/ 0.05%甲酸的水溶液）得到目标化合物（A1.8，3 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：464.0；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.99 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.31 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 5.36 (s, 2H), 4.22 (s, 2H), 3.99 – 3.94 (m, 1H), 3.44 (dd, *J* = 16.7, 7.8 Hz, 2H), 3.33 – 3.21 (m, 2H), 1.95 – 1.79 (m, 2H), 1.19 (dd, *J* = 16.4, 5.8 Hz, 6H), 0.88 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H)。

实施例 A1.9：(S)-7-乙基-7-羟基-14-(3-羟基丙基)-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮 （A1.9）的合成



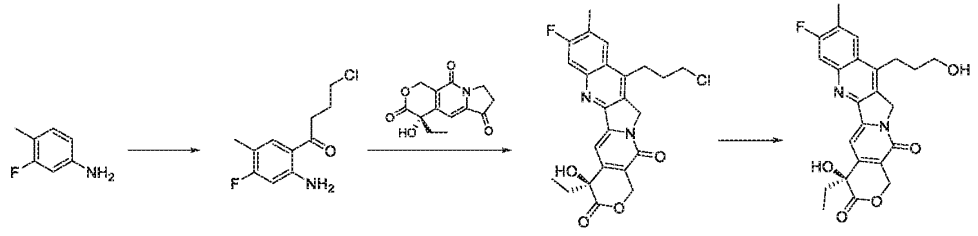
将化合物(S)-7-乙基-7-羟基-14-(3-氯丙基)-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮（100 mg，0.213 mmol）溶于 10%硫酸（5 mL）溶液中，反应在 110°C 下反应 48 小时。向反应液中加入饱和碳酸氢钠（30 mL）溶液，用二氯甲烷（10 mL X 5）萃取，无水硫酸钠干燥，抽滤，减压浓缩得到粗产品。经高效液相制备纯化（乙腈/水含 0.05%甲酸）得到(S)-7-乙基-7-羟基-14-(3-羟基丙基)-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮（A1.9，1.78 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：451.0；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 7.63 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.28 (s, 2H), 5.47 – 5.37 (m, 2H), 5.32 – 5.19 (m, 2H), 3.51 – 3.46 (m, 2H), 3.17 – 3.13 (m, 2H), 1.92 – 1.76 (m, 4H), 0.90 –

0.84 (m, 3H)。

实施例 A1.10：(S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-11-(3-羟基丙基)-9-甲基-1,12-二氢-14H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮（A1.10）的合成



A1.10-A A1.10-B A1.10-C A1.10

步骤一：

0℃ 下，向化合物 A1.10-A（10 g ）的 1,2-二氯乙烷（200 mL）溶液，滴加 1mol/L 三氯化硼（96 mL），4-氯丁腈（9.9 g）。80 ℃下搅拌反应 2 小时。反应液降至室温，加入 2 mol/L 盐酸 (90 mL)并在 80 ℃下回流搅拌 0.5 小时。反应液降至室温，加入少量水稀释，用二氯甲烷（200 mL X 3）萃取，有机相用无水硫酸钠干燥，抽滤，浓缩得到粗品，粗产品经柱层析分离纯化 (石油醚：乙酸乙酯=10/1)得到目标化合物 A1.10-B（4 g）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：230.0。

步骤二：

向化合物 A1.10-B（50 mg）中加入（S） -4-乙基-4-羟基-7,8-二氢-1H-吡喃并[3,4-f]吲哚嗪-3,6,10（4H）-三酮（35 mg），一水合对甲苯磺酸（41.4 mg），溶于二氯甲烷（30 mL）溶液中，溶液澄清混匀后减压浓缩，用油泵抽至真空，反应在 120°C 真空下反应 3 小时。LCMS 显示反应完全。将反应液降至室温，加入水（20 mL），用二氯甲烷（20 mL X 3）萃取。合并有机相依次并无水硫酸钠干燥、过滤，滤液减压浓缩得到粗产品。粗产品经柱层析分离纯化 (二氯甲烷比甲醇=20 比 1)得到目标化合物 A1.10-C（80 mg）为白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：457.0。

步骤三：

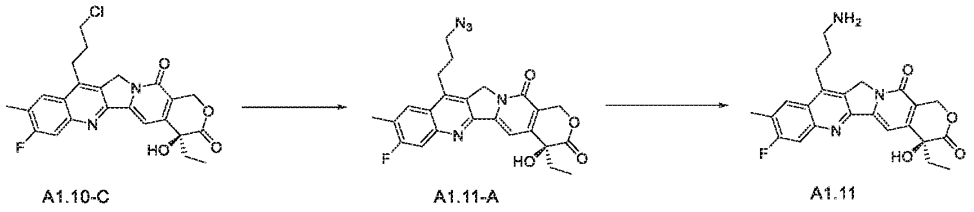
将化合物 A1.10-C（75 mg）溶于六甲基磷酰三胺，加入纯水（0.8 mL）反应液在 100 ℃ 下搅拌 72 小时。LCMS 检测反应完成。经制备色谱(0.01% TFA in water，MeCN)纯化得到目标化合物（10 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：439.2；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.22 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.87 (d, J = 10.9 Hz, 1H), 7.31 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.30 (s, 2H), 4.67 (t, J = 4.9 Hz, 1H), 3.55 – 3.47 (m, 2H), 3.28 – 3.20 (m, 2H), 2.51 (s, 3H), 1.93 – 1.81 (m, 4H), 0.88 (t, J = 7.3 Hz, 3H)。

实施例 A1.11：(S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-11-(3-氨基丙基)-9-甲基-1,12-二氢-14H-吡喃并[3',4':6,7]吲

喹嗪并[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮（A1.11）的合成



步骤一：

向 A1.10-C（395 mg）的 N'N-二甲基甲酰胺（10 mL）溶液中加入叠氮化钠 (432 mg)，反应液 80 ºC 反应 16 小时，然后冷却至室温，加入水（50 mL）稀释，用乙酸乙酯（80 mL*3）萃取，合并有机相，无水硫酸钠干燥，抽滤浓缩得到目标产物 A1.11-A（290 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：464.0。

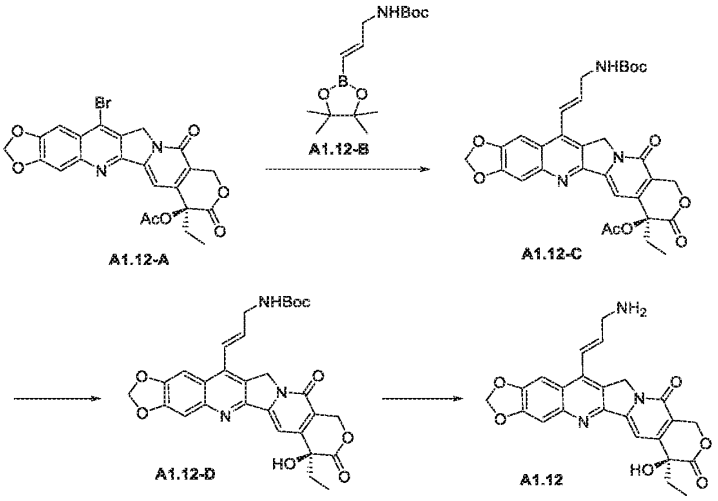
步骤二：

将化合物 A1.11-A（93 mg）溶于四氢呋喃（5 mL）中，加入三苯基膦（78 mg），室温反应 4 小时。然后向反应液中加入盐酸（4M，1mL），反应液升至 55 ºC 反应 16 小时，LCMS 监测反应完全。反应液直接浓缩，粗品经过反相柱（流动相 A 为 0.05%甲酸水溶液，B 为乙腈）提纯得到目标产物 A1.11（28 mg，收率：36%）为白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：438.4；

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.52 (s, 1H), 8.16 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.76 (d, J = 10.7 Hz, 1H), 7.63 (s, 1H), 5.49 (ABq, J = 78.9, 16.3 Hz, 2H), 5.31 (br s, 2H), 3.35 – 3.32 (m, 2H), 3.22 – 3.10 (m, 2H), 2.55 (s, 3H), 2.13 – 2.11 (m, 2H), 1.96 – 1.94 (m, 2H), 1.01 (t, J = 7.4 Hz, 3H)。

实施例 A1.12：(S,E)-14-(3-氨基-1-丙烯-1-基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮 （A1.12）的合成



步骤一：

将化合物 A1.12-A（200 mg，0.39 mmol），化合物 A1.12-B（112 mg，0.39 mmol），氟化铯（152 mg，0.975 mmol）和四三苯基膦钯（45 mg，0.039 mmol）加入 1,4-二氧六环溶液（8 mL）。在氮气气氛下 120°C 微波反应 0.5 小时。LCMS 显示反应完全。向反应液加入二氯甲烷（20 mL）和甲醇（10 mL）混合溶液稀释，过滤。滤液浓缩，粗品通过制备 TLC 纯化（二氯甲烷：甲醇=30:1）得到目标化合物 (S,E)-14-(3-((叔丁氧羰基)氨基)-1-丙烯-1-基)-7-乙基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3] 二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-7-基 乙酸酯（A1.12-C，60 mg，收率：26%）为棕色固体。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 590.3；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.63 (s, 1H), 7.49 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.09 (d, *J* = 16.7 Hz, 1H), 6.93 (s, 1H), 6.45 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H), 6.30 (s, 2H), 5.47 (s, 2H), 5.34 – 5.24 (m, 2H), 3.94 (s, 2H), 2.21 (br s, 3H), 2.03 – 1.96 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 0.91 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H).

步骤二：

向化合物(S,E)-14-(3-((叔丁氧羰基)氨基)-1-丙烯-1-基)-7-乙基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3] 二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-7-基 乙酸酯（A1.12-C ，50 mg，0.085 mmol）的甲醇溶液（15 mL）和加入甲醇钠（9.2 mg，0.17 mmol），在 50°C下搅拌反应 2 小时。LCMS 显示反应完全。将反应液浓缩得到目标化合物(S,E)-14-(3-((叔丁氧羰基)氨基)-1-丙烯-1-基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮（A1.12-D，50 mg）粗品为棕色固体。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 548；

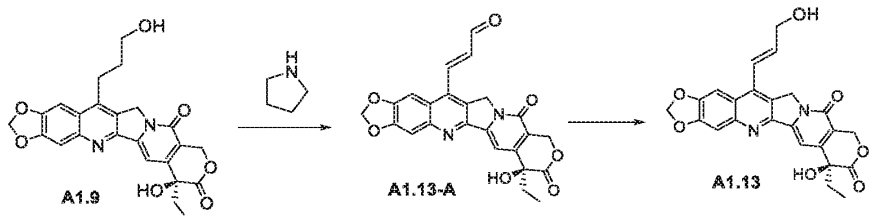
步骤三：

向化合物(S,E)-14-(3-((叔丁氧羰基)氨基)-1-丙烯-1-基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮（A1.12-D，50 mg，0.091 mmol）的二氯甲烷溶液（2 mL）中，加入三氟乙酸（1 mL），在室温下搅拌反应 30 分钟。LCMS 显示反应完全。将反应液浓缩，粗品经高效液相制备纯化（乙腈/0.05%甲酸的水溶液）得到目标化合物(S,E)-14-(3-氨基-1-丙烯-1-基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮 （A1.12）（8.1 mg，收率 21%）为棕色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 448.3；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.20 (s, 2H), 7.72 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.40 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H), 7.27 (s, 1H), 6.52 – 6.46 (m, 2H), 6.31 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.27 (s, 2H), 3.86 (br s, 2H), 1.90 – 1.83 (m, 2H), 0.88 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

实施例 A1.13：(S,E)-14-(3-羟基-1-丙烯-1-基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮 （A1.13）的合成



步骤一：

将化合物 A1.9 (200 mg, 0.444 mmol) 溶在二甲亚砜 (2 mL) 中，加入 IBX (311 mg, 1.11 mmol)，室温下搅拌 2 小时，然后补加入 IBX (186 mg, 0.666mmol) 于反应液中，再向反应液中加入四氢吡咯（6.3 mg, 0.089 mmol）和乙腈（3 mL）,反应液在室温下搅拌过夜。LCMS 检测反应完成，用乙酸乙酯萃取 (20 mL x 3)，有机相经饱和食盐水洗涤，无水硫酸钠干燥，抽滤，旋干，得到粗产品，粗产品通过硅胶柱纯化(DCM : MeOH = 50 : 1 to 10 : 1) 得到目标化合物(S,E)-14-(3-氧代-1-丙烯-1-基)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮 (A1.13-A，100 mg，纯度 50.0 %，收率 25.0%) 为黄色固体。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 447.1。

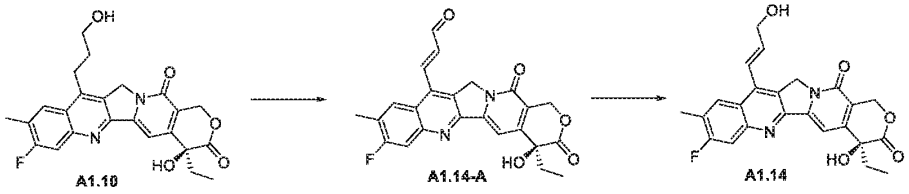
步骤二：

将化合物 A1.13-A (40 mg, 0.09 mmol) 溶在四氢呋喃 (1 mL) 中,然后向反应液中加入氰基硼氢化钠(28 mg, 0.448mmol)，在室温下搅拌过夜。LCMS 显示反应完成。将反应液浓缩得粗产品，粗产品纯化通过 prep-HPLC (HCl in water/MeCN) 得目标化合物 (3.56 mg，纯度 93.6 %，收率 9.0 %) 为淡黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 449.2；

1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.61 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 7.20 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H), 6.69 – 6.59 (m, 1H), 6.49 (s, 1H), 6.30 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.26 (s, 2H), 5.16 (br s, 1H), 4.34 (br s, 2H), 1.93 – 1.81 (m, 2H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

实施例 A1.14：(S,E)-4-乙基-8-氟-4-羟基-11-(3-羟基-1-丙烯-1-基)-9-甲基-1,12-二氢-14H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉--3,14(4H)-二酮（A1.14）的合成



步骤一：

向 25 mL 的单口瓶中加入化合物（S）-4-乙基-8-氟-4-羟基-11-（3-羟丙基）-9-甲基-1,12-二氢-14H-吡喃并[3'，4'：6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-3,14（4H）-二酮（A1.10，100 mg, 0.228 mmol)，DMSO(0.5 mL)和乙腈(0.75 mL)，依次加入 IBX(160 mg, 0.571 mmol)和(*R*)-二苯基(吡咯烷-2-基)甲醇 (12 mg, 0.047

mmol），室温下继续搅拌反应 16 小时，然后向反应液中加入甲醇和二氯甲烷混合溶剂 (200 mL)（DCM:MeOH=10:1），饱和食盐水(300 mL)萃取，合并有机相，水洗、干燥、过滤，滤液减压蒸干溶剂得粗品，粗品用快速 Flash 纯化（DCM:MeOH=10:1）得到目标化合物（S）-4-乙基-8-氟-4-羟基-11-（3-氧代丙基）-9-甲基-1,12-二氢-14H-吡喃并[3'，4'：6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-3,14（4H）-二酮 (A1.14-A, 40 mg，收率 40%)。

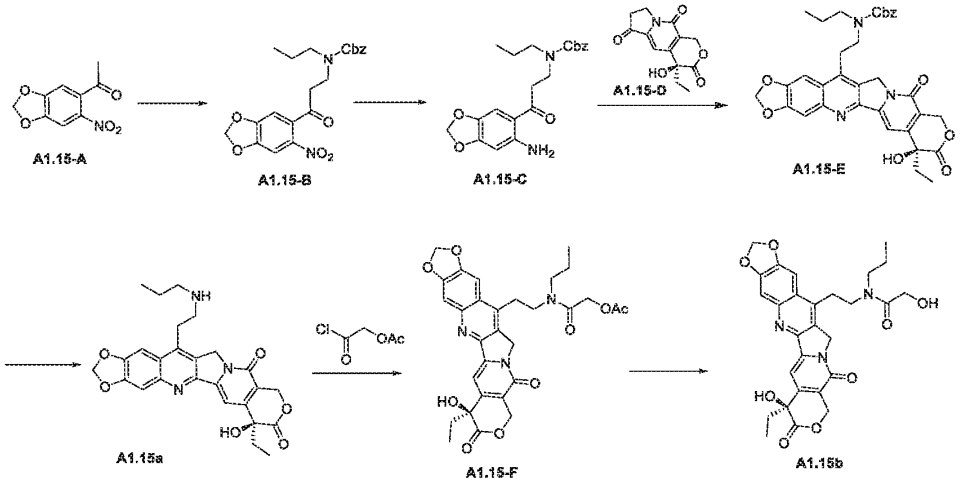
LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 435.1.

步骤二：

向 50 mL 的三口瓶中加入化合物（S）-4-乙基-8-氟-4-羟基-11-（3-氧代丙基）-9-甲基-1,12-二氢-14H-吡喃并[3'，4'：6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-3,14（4H）-二酮 (A1.14-A, 40 mg, 0.228 mmol)，无水 THF(5 mL)，N_2 保护下降温至-78°C，缓慢滴加三仲丁基硼氢化锂的 THF 溶液(0.11 mL，1N)，保持-78°C继续搅拌 1 小时。反应完成后加入饱和氯化铵水溶液淬灭反应，升至室温，用饱和食盐水稀释(50 mL)，用乙酸乙酯萃取(20 mL X 3)，合并有机相水洗、干燥、过滤，减压蒸干溶剂得到(S,E)-4-乙基-8-氟-4-羟基-11-(3-羟基-1-丙烯-1-基)-9-甲基-1,12-二氢-14H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉--3,14(4H)-二酮（A1.14，28 mg）为类白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 437.1。

实施例 A1.15：(S)-7-乙基-7-羟基-14-(2-(正丙基氨基)乙基)-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮 （A1.15a）和(S)-N-(2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)-2-羟基-N-正丙基乙酰胺（A1.15b）的合成



步骤一：

将化合物 A1.15-A（5.0 g，23.9 mmol），丙基胺盐酸盐（22.8 g，239 mmol）和多聚甲醛（7.18 g，239 mmol）溶在乙醇（100 mL）中，110 °C 下闷罐反应 12 小时。LCMS 检测反应完全。反应液降至

室温并减压浓缩，向反应固体中加入二氯甲烷（100 mL），用水（80 mL X 3）洗涤，水相用碳酸氢钠调至 pH = 9。向水溶液中加入苄氧基碳酰氯（3.7 g，21.8 mmol），在室温下反应 2 小时。LCMS 检测反应完全。用二氯甲烷（100 mL X 3）萃取，有机相经饱和食盐水洗涤，无水硫酸钠干燥，抽滤，浓缩得到粗品，粗产品经柱层析分离纯化 (石油醚：乙酸乙酯=10/1)得到目标化合物 A1.15-B（1.5 g，收率 20.1%）为黄色油状液体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 415.1；

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.56 (s, 1H), 7.35 (m, 6H), 6.18 (s, 2H), 5.17 – 5.12 (m, 2H), 3.69 – 3.67 (m, 2H), 3.32 – 3.30 (m, 2H), 3.09 – 2.90 (m, 2H), 1.59 (m, 2H), 0.90 (m, 3H)。

步骤二：

将化合物 A1.15-B（1.5 g, 3.63 mmol）溶在饱和氯化铵（20 mL）和乙醇（20 mL）混合溶液中，然后向反应液中加入铁粉（1.02 g，18.1 mmol），反应在 80°C 下搅拌 1 小时。LCMS 显示反应完成。将反应液过滤，滤液减压浓缩成固体，粗产品用 C18 柱反相分离纯化(乙腈/0.05%FA 的水溶液: 5%到 55%)得到目标化合物 A1.15-C (600 mg, 收率 43.0%)为黄色固体

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 385.2, t_R = 1.329 min.

步骤三：

室温下，将化合物 A1.15-C（350 mg，0.91 mmol），化合物（S） -4-乙基-4-羟基-7,8-二氢-1H-吡喃并[3,4-f]吲哚嗪-3,6,10（4H）-三酮（A1.15-D，218 mg，0.83 mmol）和对甲苯磺酸（170 mg，0.87 mmol）溶于二氯甲烷（5 mL）溶液中，溶液澄清混匀后减压浓缩，用油泵抽至真空，反应在 120°C 真空下反应 2 小时。LCMS 显示反应完全。将反应液降至室温，加入水（50 mL），用二氯甲烷（30 mL X 3）萃取，合并有机相依次并无水硫酸钠干燥、过滤，滤液减压浓缩得到化合物 A1.15-E（390 mg，收率 76%）为褐色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 612.0。

步骤四：

室温下，将化合物 A1.15-E（390 mg，0.638 mmol）溶于二氯甲烷（5 mL）溶液中，0°C 氮气保护下滴加三甲基碘硅烷（510 mg，2.55 mmol），反应体系室温搅拌 2 小时。向反应液中加入乙醚（2 mL）和浓盐酸（4 mL），搅拌 30 分钟，用饱和碳酸氢钠将反应体系调至 H = 9，用二氯甲烷（50 mL X 5）萃取，合并有机相经无水硫酸钠干燥、过滤，滤液减压浓缩得到粗产品。经高效液相制备纯化（乙腈/水含 0.05%甲酸）得到化合物 A1.15a（200 mg，收率 66.1%）为米白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 478.2；

1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.30 (s, 1H, HCO_2H), 7.67 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.23 (s, 1H), 6.62 – 6.41 (m, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.28 (s, 2H), 3.27 – 3.25 (m, 2H), 2.91 – 2.79 (m, 2H), 2.58 – 2.56

(m, 2H), 1.91 – 1.79 (m, 2H), 1.44 – 1.42 (m, 2H), 0.90 – 0.84 (m, 6H)。

步骤五：

室温下，将化合物 A1.15a（120 mg，0.251 mmol）溶于二氯甲烷（5 mL）中，0°C 下滴加化合物乙酰氧基乙酰氯（167 mg，1.25 mmol）和三乙胺（133 mg，1.25 mmol），反应在 0°C 下搅拌反应 30 分钟。LCMS 检测反应完全。将反应液减压浓缩得到粗品化合物 A1.15-F（120 mg，收率 82.8%）为黄色固体。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 578.3。

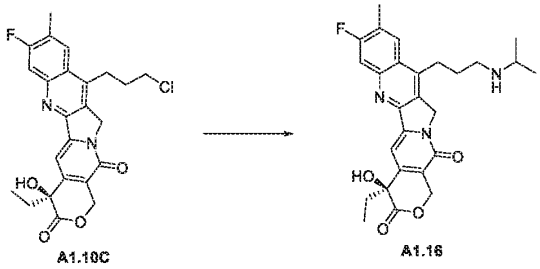
步骤六：

室温下，将化合物 A1.15-F（120 mg，0.207 mmol）溶于乙醇（4 mL）中，然后向反应液中加入浓盐酸（2 mL），反应在 70°C 下搅拌反应 1 小时。LCMS 检测反应完全。向反应液加入水（20 mL），用二氯甲烷（30 mL X 5）萃取，合并有机相依次并无水硫酸钠干燥、过滤，滤液减压浓缩得到粗产品。经高效液相制备纯化（乙腈/水含 0.05%甲酸）得到化合物 A1.15b（20 mg，收率 18.1%）为米白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 536.2；

1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.93 (s, 0.7H), 7.69 (s, 0.3H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.49 (s, 1H), 6.30 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.35 (s, 1.5H), 5.29 (s, 0.5H), 4.65 – 4.62 (m, 1H), 4.13 - 3.97 (m, 2H), 3.51 – 3.49 (m, 2H), 3.33 – 3.30 (m, 2H), 3.24 – 3.20 (m, 2H), 1.86 – 1.84 (m, 2H), 1.60 – 1.52 (m, 2H), 0.89 – 0.86 (m, 6H)。

实施例 A1.16：(S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-11-(3-异丙基氨基丙基)-9-甲基-1,12-二氢-14H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮（A1.16）的合成

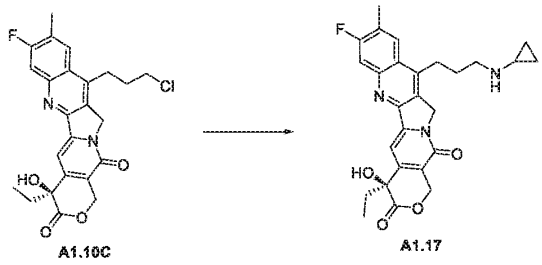


向 A1.10-C（200 mg，0.439 mmol）和异丙基胺（50 mg，0.877 mmol）的 DMF 溶液（10 mL）中加入二异丙基乙胺（170 mg，1.32 mmol）和碘化钠（99 mg，0.659 mmol），反应在 50°C 封管下反应 2 小时。向反应液中加入乙酸乙酯，有机相经饱和食盐水洗涤，无水硫酸钠干燥，抽滤，减压浓缩得到粗品。粗品经 pre-TLC 分离纯化（二氯甲烷:甲醇=10:1)后得到黄色固体，化合物继续经高效液相制备纯化（乙腈/水含 0.05%甲酸）得到目标化合物(S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-11-(3-异丙基氨基丙基)-9-甲基-1,12-二氢-14H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮（A1.16，2.03 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 480.2；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.28 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.27 (s, 1H, HCO2H) 7.92 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 7.33 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.45 (s, 2H), 5.30 (s, 2H), 33.30 – 3.22 (m, 3H), 3.18 – 3.10 (m, 2H), 2.54 (s, 3H), 2.06 – 1.94 (m, 2H), 1.93 – 1.80 (m, 2H), 1.26 – 1.20 (m, 6H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H)。

实施例 A1.17：(S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-11-(3-环丙基氨基丙基)-9-甲基-1,12-二氢-14H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮（A1.17）的合成

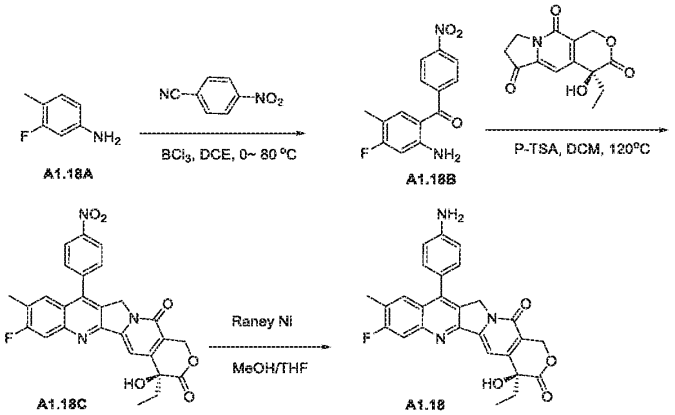


向 A1.10C（200 mg，0.439 mmol）和环丙基胺（52 mg，0.881 mmol）的 DMF 溶液（10 mL）中加入二异丙基乙胺（165 mg，1.28 mmol）和碘化钠（96 mg，0.640 mmol），反应在 50°C 封管下反应 2 小时。 LCMS 监测反应完全。向反应液中加入乙酸乙酯，有机相经饱和食盐水洗涤，无水硫酸钠干燥，抽滤，减压浓缩得到粗品。粗品经 TLC 分离纯化 (二氯甲烷:甲醇=10:1)后继续经高效液相制备纯化（乙腈/水含 0.05%甲酸）得到目标化合物(S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-11-(3-环丙基氨基丙基)-9-甲基-1,12-二氢-14H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮（A1.17，5.12 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 478.2；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.22 (br s, 2H, one is HCO2H), 7.86 (br s, 1H), 7.30 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.28 (s, 2H), 3.24 – 3.19 (m, 2H), 2.75 – 2.68 (m, 2H), 2.49 (s, 3H), 2.16 – 2.09 (m, 1H), 1.95 – 1.76 (m, 4H), 0.91 – 0.83(t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.43 – 0.33 (m, 2H), 0.31 – 0.21 (m, 2H)。

实施例 A1.18：(S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-11-(4-氨基苯基)-9-甲基-1,12-二氢-14H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮（A1.18）的合成



步骤一：

氮气保护下，将3-氟-4-甲基苯胺（A1.18A，2.0 g，16.3 mmol）溶在1,2-二氯乙烷（40 mL）中，在0 ℃下向其中滴加三氯化硼（19.2 mL, 19.2 mmol）后，再缓慢加入对硝基苯腈（2.8 g, 19.2 mmol），加入完毕将反应液升至80 ℃搅拌过夜。将反应液冷却至室温向其中加入盐酸（40 mL, 2M），后升温至80 ℃继续搅拌30分钟，经LCMS检测反应完全后，向反应液中加入水（80 mL），用二氯甲烷萃取（100 mL x 3），合并有机相经无水硫酸钠干燥，过滤，旋干，粗产品经硅胶柱色谱(PE:EA=10:1）纯化得目标化合物（A1.18B，2.0 g，收率46.5%）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 275.1；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.34 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.77 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.39 (s, 2H), 7.11 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.63 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 2.00 (s, 3H)。

步骤二：

将化合物A1.18B (620 mg，2.28 mmol)，(S)-4-乙基-4-羟基-7,8-二氢-1H-吡喃并[3,4-f]中氮茚-3,6,10(4H)-三酮（600 mg, 2.28 mmol)，对甲苯磺酸(560 mg, 2.96 mmol）加入到反应瓶中，用二氯甲烷将其溶解均匀，将二氯甲烷旋干，抽真空，在真空状态下将其加热到120 ℃，在此温度下保持六个小时，经LCMS检测反应完成后，向体系中加入甲醇（10 mL），再加入水（80 mL）有大量沉淀析出，沉淀过滤后干燥得到目标化合物（A1.18C，800 mg，收率80.0%）为黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 502.2；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.52 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 8.13 – 7.89 (m, 3H), 7.64 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.37 (d, J = 13.4 Hz, 1H), 6.54 (s, 1H), 5.41 (s, 2H), 5.06 (m, 2H), 2.40 (s, 3H), 1.94 – 1.84 (m, 2H), 0.87 (m, 3H)。

步骤三：

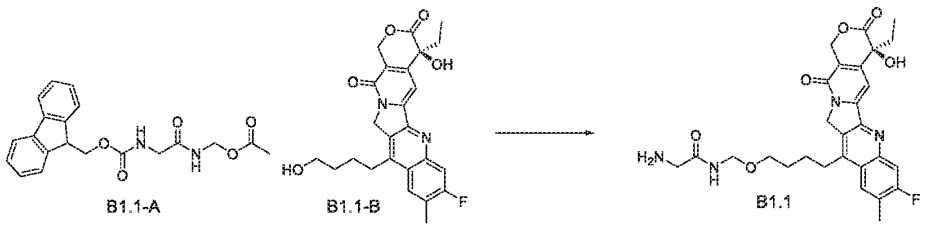
将雷尼镍（609 mg, 10.5 mmol）加入到化合物A1.18C (1.0 g，2.1 mmol）的甲醇（25 mL）和四氢呋喃（50 mL）混合溶液中，反应液在室温氢气氛围下搅拌5小时。LCMS检测反应完全，将反应液过滤，滤液旋干得到目标化合物（S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-11-(4-氨基苯基)-9-甲基-1,12-二氢-14H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮（A1.18，650 mg，收率67%）为黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 472.3；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.93 – 7.81 (m, 2H), 7.40 – 7.25 (m, 3H), 6.81 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 6.51 (s, 1H), 5.62 (s, 2H), 5.41 (s, 2H), 5.10 (s, 2H), 2.41 (s, 3H), 1.93 – 1.80 (m, 2H), 0.88 (t, J = 7.2 Hz, 3H)。

B、含生物活性分子片段中间体的合成

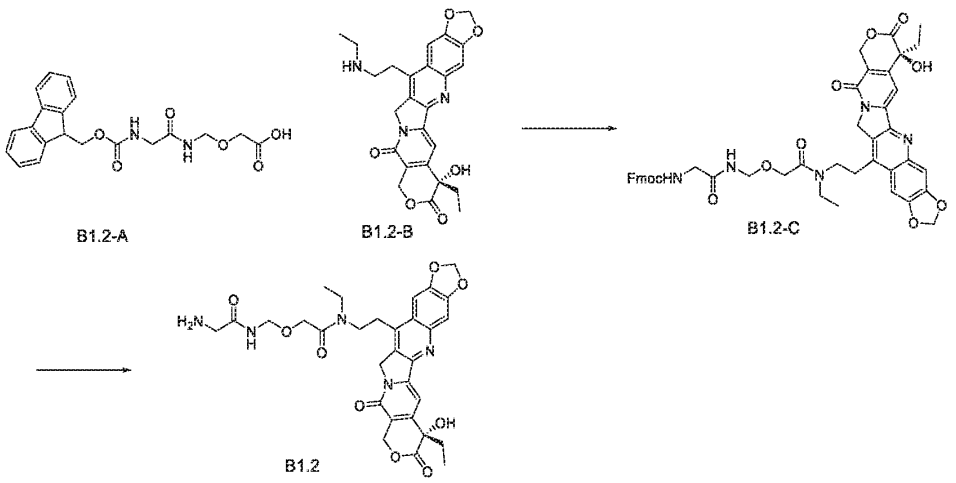
实施例B1.1：(S)-2-氨基-N-((4-(4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丁氧基)甲基)乙酰胺（B1.1）的合成



化合物（B1.1-A）（368mg），化合物（B1.1-B）（452mg）和对甲苯磺酸吡啶盐（PPTS）（25mg）在二氯甲烷（20ml）中回流 20 小时，然后用碳酸氢钠水溶液和盐酸水溶液分别洗涤，减压除去有机溶剂，残留物溶于 DMF（5ml），加入哌啶（1ml），化合物搅拌 20 分钟，溶于减压除去大部分低沸点组分，残留物制备 HPLC 分离得到目标产物 (S)-2-氨基-N-((4-(4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丁氧基)甲基)乙酰胺（B1.1）。

ESI-MS (m/z): 539 $[M+H]^+$。

实施例 B1.2：(S)-2-((2-氨基乙酰胺基)甲氧基)-N-乙基-N-(2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)乙酰胺（B1.2）的合成



步骤一：

依次将化合物 B1.2-A（274 mg），二异丙基乙胺（334 mg）和 HBTU（369 mg）加入 N,N-二甲基甲酰胺（10 mL）中，随后加入化合物 B1.2-B（300 mg）。反应液在室温下搅拌 2 小时。向反应液中加入乙酸乙酯（50 mL），用饱和食盐水（30 mL X 3）洗涤，无水硫酸钠干燥，抽滤，滤液减压浓缩成固体，粗产品经柱层析分离纯化 (二氯甲烷：甲醇=10/1)得到目标化合物 B1.2-C（300 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：830.2；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.74 (s, 1H), 7.91 – 7.84 (m, 2H), 7.80 – 7.67 (m, 2H), 7.65 – 7.54 (m, 2H), 7.53 – 7.46 (m, 1H), 7.45 – 7.37 (m, 2H), 7.36 – 7.27 (m, 2H), 7.25 – 7.23 (m, 1H), 6.57 – 6.44 (m, 1H),

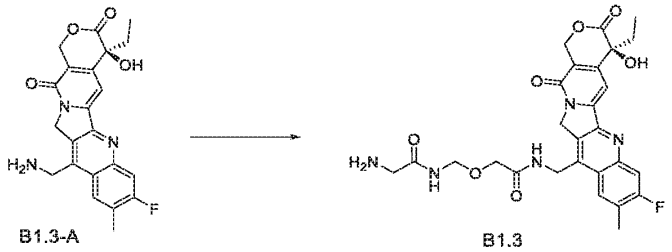
6.29 (s, 2H), 5.50 – 5.19 (m, 4H), 4.71 – 4.57 (m, 2H), 4.32 – 3.97 (m, 7H), 3.80 – 3.53 (m, 4H), 3.20 – 3.14 (m, 2H), 1.92 – 1.80 (m, 2H), 1.28 – 1.22 (m, 3H), 0.87 – 0.82 (m, 3H).

步骤二：

向化合物 B1.2-C（300 mg）的 N,N-二甲基甲酰胺（4 mL）溶液加入哌啶（1 mL），反应液在室温下搅拌 20 分钟。反应液除去低沸点组分后得到目标产物，直接用于下步合成。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 608.0。

实施例 B1.3：(S)-2-氨基-N-((2-(((4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)甲基)氨基)-2-氧代乙氧基)甲基)乙酰胺（B1.3）的合成

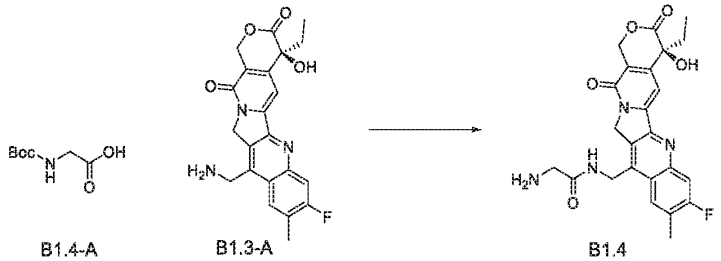


B1.3-A B1.3

用实施例 B1.1 相同的方法和反应条件，用化合物（B1.3-A）代替（B1.2-B），得到目标产物 (S)-2-氨基-N-((2-(((4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)甲基)氨基)-2-氧代乙氧基)甲基)乙酰胺（B1.3）。

ESI-MS (m/z): 554 $[M+H]^+$。

实施例 B1.4： (S)-2-氨基-N-((4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)甲基)乙酰胺（B1.4）的合成



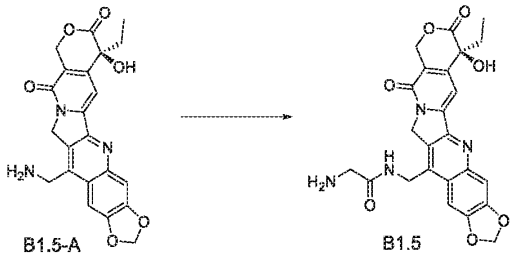
B1.4-A B1.3-A B1.4

向化合物（B1.4-A）(175mg)，化合物（B1.3-A）(409mg)的 DMF (5ml) 溶液中加入 DIPEA（200ul），HBTU（420mg）。化合物室温小搅拌反应 20 小时，混合物加入乙酸乙酯（100ml），水洗（100ml x 3），减压除去有机溶剂，然后向残留物中加入 1:1 DCM/TFA（10ml），室温放置 20 分钟。减压除去低沸点组分，残留物用制备 HPLC 分离得到目标产物 (S)-2-氨基-N-((4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)甲基)乙酰胺（B1.4）。

ESI-MS (m/z): 467 $[M+H]^+$。

实施例 B1.5：(S)-2-氨基-N-((7-乙基-7-羟基-8,11-二氧-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧环戊烷并[4,5-

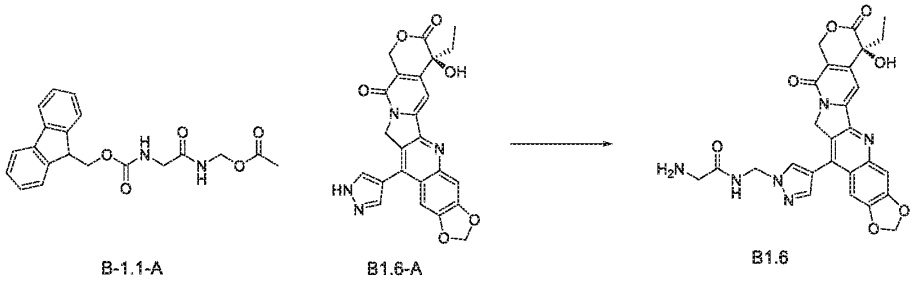
g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)乙酰胺（B1.4）的合成



将 B1.5-A (200 mg)溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (5 mL)中，依次加入 N,N-二异丙基乙胺 (154.80 mg)，2, 5-二氧吡咯烷-1-基（叔丁氧羰基）甘氨酸(157mg)于反应液中，反应液在 25 ℃下搅拌 60 分钟。向反应液中加入水（30 mL），抽滤，干燥滤饼得到白色固体产物（ESI-MS (m/z): 579.4 $[M+H]^+$）。将上述白色固体产物溶于三氟乙酸和二氯甲烷混合溶液(体积比为 1：3；4 mL)中， 反应液室温下搅拌 1 小时。 然后将反应液浓缩得粗产品，粗产品用 C18 柱反相分离纯化(乙腈/0.05%甲酸水溶液: 5%到 50%)得到目标产物 (S)-2-氨基-N-((7-乙基-7-羟基-8,11-二氧-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)乙酰胺（B1.5，110mg）。

ESI-MS (m/z): 479.3 $[M+H]^+$。

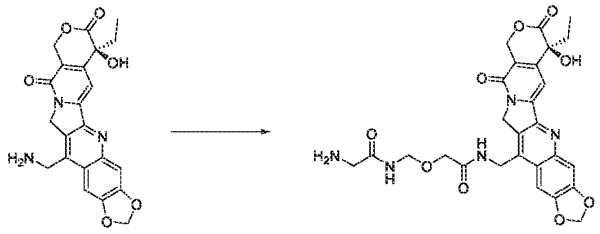
实施例 B1.6：(S)-2-氨基-N-((4-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)-1H-吡唑-1-基)甲基)乙酰胺（B1.6）的合成



用实施例 B1.1 相同的方法和反应条件，用化合物（B1.6-A）代替化合物（B1.1-B），得到目标产物(S)-2-氨基-N-((4-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)-1H-吡唑-1-基)甲基)乙酰胺（B1.6）。

ESI-MS (m/z): 545 $[M+H]^+$。

实施例 B1.7：(S)-2-氨基-N-((2-(((7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3] 二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)氨基)-2-氧代乙氧基)甲基)乙酰胺（B1.7）的合成

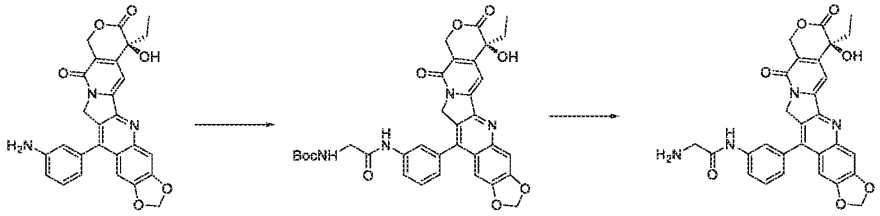


B1.5-A B1.7

用实施例 B1.2 相同的方法和反应条件，用化合物（B1.5-A）代替化合物（B1.2-B），得到含目标产物 (S)-2-氨基-N-((2-(((7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)氨基)-2-氧代乙氧基)甲基)乙酰胺（B1.7）的混合物，上述混合物直接用于下面合成反应。

ESI-MS (m/z): 566 $[M+H]^+$。

实施例 B1.8：(S)-2-氨基-N-(3-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3] 二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)苯基)乙酰胺（B1.8）的合成

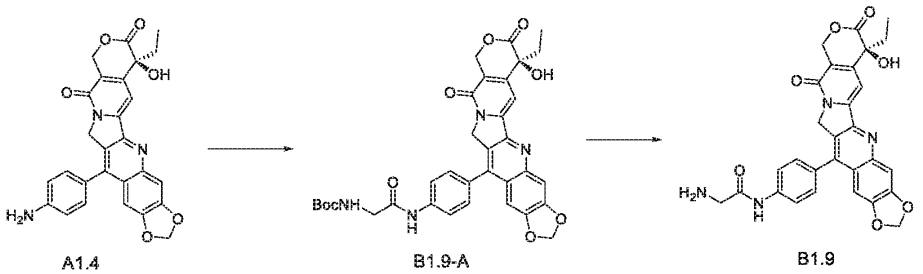


A1.3 B1.8-A B1.8

用实施例 B1.4 相同的方法和反应条件，用化合物（A1.3）代替化合物（B1.3-A），得到目标产物 (S)-2-氨基-N-(3-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]-二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)苯基)乙酰胺（B1.8）。

ESI-MS (m/z): 541 $[M+H]^+$。

实施例 B1.9：(S)-2-氨基-N-(4-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)苯基)乙酰胺（B1.9）的合成



A1.4 B1.9-A B1.9

用实施例 B1.4 相同的方法和反应条件，用化合物（A1.4）代替化合物（B1.3-A），得到目标产物

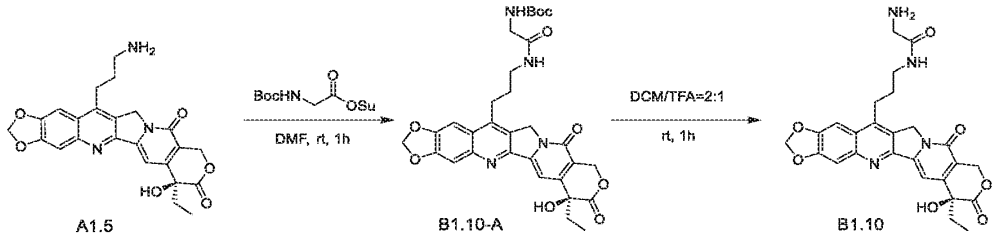
(S)-2-氨基-N-(4-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]-二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)苯基)乙酰胺（B1.9）。或者采用下列反应条件得到目标产物。

将化合物 A1.4 (60 mg，0.12 mmol) 溶在 N,N-二甲基甲酰胺（3 mL），依次加入（叔丁氧羰基）甘氨酸 (26 mg，0.15 mmol)、HATU (56 mg, 0.15 mmol)，N,N-二异丙基乙胺 (48 mg, 0.37 mmol)，室温下搅拌 1 小时，TLC 检测反应完成。然后直接向上述反应液中加入 TFA(1.0 mL)。在室温下继续搅拌 1 小时，LCMS 检测反应完成，将反应液浓缩除去三氟乙酸得粗产物，粗产物经制备色谱 (0.01% 三氟乙酸水溶液, 乙腈) 纯化得到目标产物(S)-2-氨基-N-(4-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]-二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)苯基)乙酰胺（B1.9）（26.3 mg, 收率 38%）为黄色固体。

ESI-MS (m/z): 541 $[M+H]^+$;

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.71 (s, 1H), 8.16 (s, 2H), 7.86 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.67-7.58 (m, 3H), 7.29 (s, 1H), 7.04 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.28 (s, 2H), 5.40 (s, 2H), 5.05 (s, 2H), 3.87 (s, 2H), 1.93-1.81 (m, 2H), 0.88 (t, J = 7.3 Hz, 3H)。

实施例 B1.10：(S)-2-氨基-N-(3-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]-二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)丙基)乙酰胺（B1.10）的合成



步骤一：

室温下，向化合物 A1.5（200 mg）的 N,N-二甲基甲酰胺溶液（5 mL）中加入三乙胺（67 mg）和 2,5-二氧吡咯烷-1-基（叔丁氧羰基）甘氨酸（182 mg），在室温下反应 1 小时。反应液加入水（30 mL）稀释，乙酸乙酯（30 mL×2）萃取，有机相用饱和食盐水洗涤，无水硫酸钠干燥，浓缩得到粗产品，粗产品用 C18 柱（乙腈/0.05%甲酸的水溶液：5%-60%）进一步纯化得到目标化合物（B1.10-A，100 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：607。

步骤二：

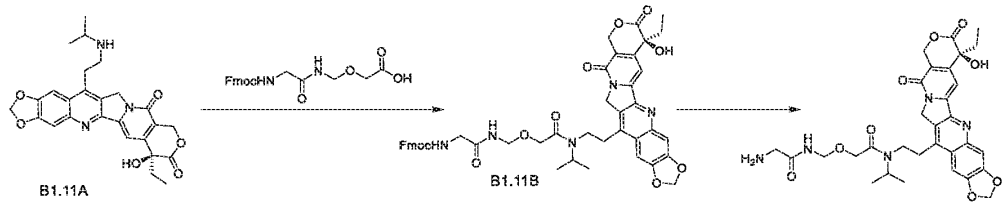
向化合物 B1.10-A（100 mg）的二氯甲烷溶液（4 mL）中，加入三氟乙酸（2 mL），在室温下搅拌反应 1 小时。将反应液浓缩，粗品加入 N,N-二甲基甲酰胺溶液（3mL），用 C18 柱（乙腈/0.05%甲酸的水溶液：5%-60%）进一步纯化得到目标化合物(S)-2-氨基-N-(3-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-

7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]-二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)丙基)乙酰胺（B1.10，80 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：507；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.26 (s, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.23 (s, 2H), 3.31 (s, 2H), 3.30 – 3.27 (m, 2H), 3.13 – 3.07 (m, 2H), 2.04 – 1.76 (m, 4H), 0.87 (t, J = 7.3 Hz, 3H)。

实施例 B1.11：(S)-2-((2-氨基乙酰胺基)甲氧基)-N-异丙基-N-(2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)乙酰胺（B1.11）的合成



步骤一：

将化合物 1-（9H-芴-9-基）-3,6-二氧-2,9-二氧-4,7-二氮杂环-11-甲酸 （242 mg），二异丙基乙胺（330 mg）和 N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯（359 mg）溶于 N,N-二甲基甲酰胺（10 mL）溶液中。随后加入化合物（S）-7-乙基-7-羟基-14-（2-（异丙胺基）乙基）-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环[4,5-g]吡喃并[3'，4'：6,7]吲哚嗪[1,2-b]喹啉-8,11（7H）-二酮（300 mg），反应在室温下反应 2 小时。向反应液中加入乙酸乙酯（50 mL），用饱和食盐水（30 mL X 3）洗涤，无水硫酸钠干燥，抽滤，滤液减压浓缩成固体，粗产品经柱层析分离纯化 (二氯甲烷：甲醇=10/1)得到目标化合物化合物 B1.11B（220 mg）。

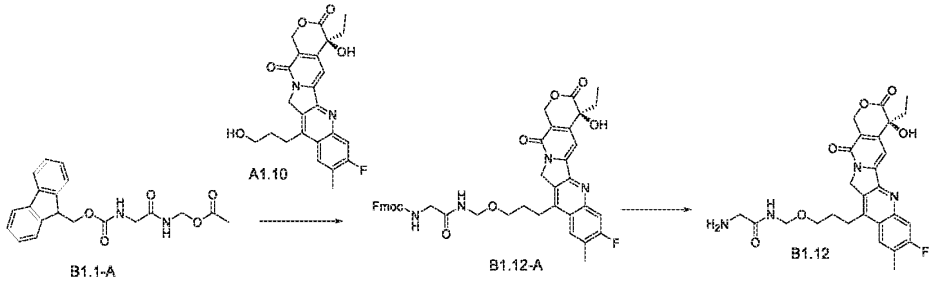
LCMS (ESI) $[M+H]^+$：844.0。

步骤二：(S)-2-((2-氨基乙酰胺基)甲氧基)-N-异丙基-N-(2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)乙酰胺的制备

向化合物 B1.11B（220 mg，0.261 mmol）的 N,N-二甲基甲酰胺（4 mL）溶液中加入哌啶（1 mL），反应在室温下搅拌 20 分钟。LCMS 检测反应反应完全。反应液减压浓缩得到目标化合物（220 mg）为褐色固体，上述产物未经纯化直接用于下步合成。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：622.1。

实施例 B1.12：(S)-2-氨基-N-((4-(4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丙氧基)甲基)乙酰胺（B1.12）的合成



步骤一：

将化合物 A1.10 (160 mg, 0.365 mmol) 溶在 N,N-二甲基甲酰胺 (3 mL) 中，加入(2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)乙酰氨基)甲基乙酸酯 （（B1.1-A，672 mg, 1.83 mmol)，然后加入盐酸乙酸乙酯 (0.073mL, 3M) 于反应液中，反应液在室温下搅拌过夜。LCMS 检测反应完成。该反应液直接经反相色谱 (乙腈/0.05%FA 的水溶液: 5%到 50%) 纯化后得目标化合物(80 mg, 收率 29.0%)为白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 747.4；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.74 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 8.28 – 8.17 (m, 1H), 7.99 – 7.88 (m, 3H), 7.73 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.63 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.44 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.35 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 6.58 (s, 1H), 5.48 (s, 2H), 5.29 (s, 2H), 4.66 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 4.32 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 4.26 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H), 3.71 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.57 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.29 – 3.20 (m, 2H), 2.55 (s, 3H), 2.00 – 1.86 (m, 4H), 0.93 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H).

步骤二：B1.12-A （240mg）溶于 DMF（5ml），加入哌啶（1ml），化合物搅拌 20 分钟，溶于减压除去低沸点组分，残留物直接用于下步合成。

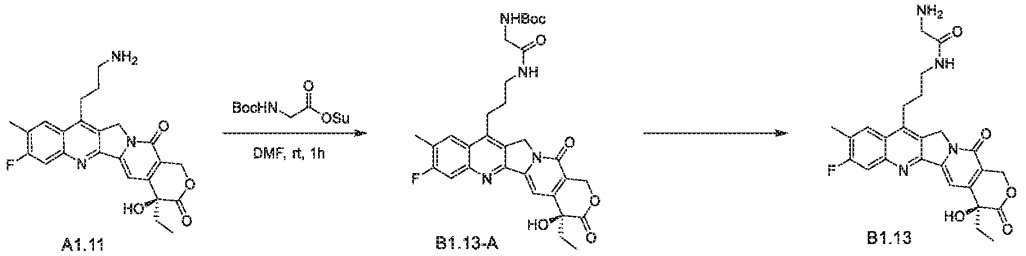
ESI-MS (m/z): 525.2 $[M+H]^+$。

少量粗产物经反相色谱 (乙腈/0.05%FA 的水溶液: 5%到 50%) 纯化后得目标化合物。

ESI-MS (m/z): 525.1 $[M+H]^+$;

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.13 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H), 8.21 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.02 (brs, 2H), 7.89 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 6.54 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.28 (s, 2H), 4.66 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.64 (s, 2H), 3.53 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 3.25-3.18 (m, 2H), 2.52 (s, 3H), 1.98-1.84 (m, 4H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H)。

实施例 B1.13：(S)-2-氨基-N-(3-(4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)乙酰胺（B1.13）的合成



步骤一：

室温下，向化合物 A1.11（200 mg）的 N,N-二甲基甲酰胺溶液（5 mL）中加入三乙胺（67 mg）

和 2,5-二氧吡咯烷-1-基（叔丁氧羰基）甘氨酸（182 mg），在室温下反应 1 小时。反应液加入水（30 mL）稀释，乙酸乙酯（30 mL×2）萃取，有机相用饱和食盐水洗涤，无水硫酸钠干燥，浓缩得到粗产品，粗产品用 C18 柱（乙腈/0.05%甲酸的水溶液：5%-60%）进一步纯化得到目标化合物（B1.13-A，104 mg）。

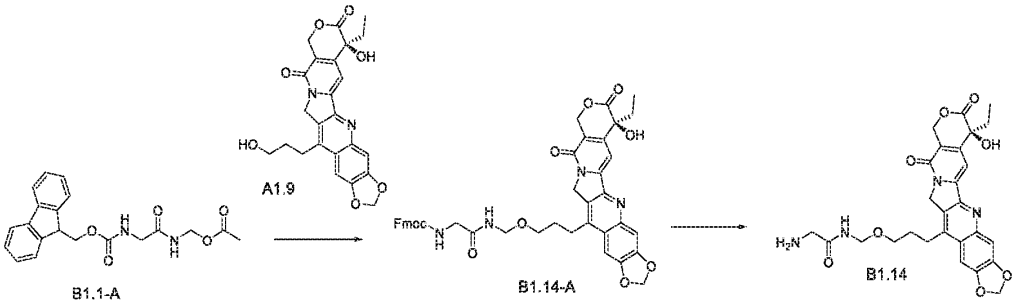
LCMS (ESI) $[M+H]^+$：595。

步骤二：

向化合物 B1.13-A（100 mg）的二氯甲烷溶液（4 mL）中，加入三氟乙酸（2 mL），在室温下搅拌反应 1 小时。将反应液浓缩，粗品加入 N,N-二甲基甲酰胺溶液（3mL），用 C18 柱（乙腈/0.05%甲酸的水溶液：5%-60%）进一步纯化得到目标化合物(S)-2-氨基-N-(3-(4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)乙酰胺（B1.13，88 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：495。

实施例 B1.14： (S)-2-氨基-N-((3-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)丙氧基)甲基)乙酰胺（B1.14）的合成



步骤一：化合物（B1.1-A）（368mg），化合物（A1.9）（440mg）和对甲苯磺酸吡啶盐（PPTS）（25mg）在二氯甲烷（20ml）中回流 20 小时，然后用碳酸氢钠水溶液和盐酸水溶液分别洗涤，减压除去有机溶剂，得到粗产物，粗产品经柱层析分离纯化（二氯甲烷：甲醇=10/1)得到目标化合物化合物 B1.14A（240 mg）。

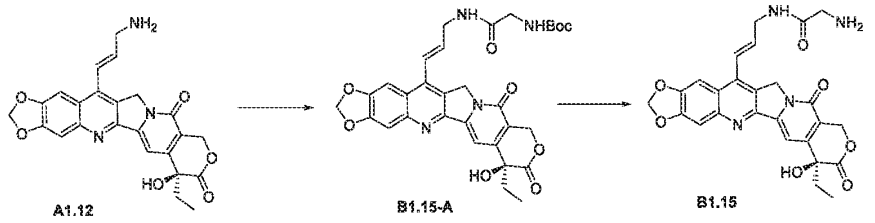
LCMS (ESI) $[M+H]^+$：747。

步骤二：B1.14-A （240mg）溶于 DMF（5ml），加入哌啶（1ml），化合物搅拌 20 分钟，溶于减压除去低沸点组分，残留物直接用于下步合成。少量粗产物经反相色谱 (乙腈/0.05%FA 的水溶液: 5%到 50%) 纯化后得目标化合物。

ESI-MS (m/z): 525 $[M+H]^+$；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.13 (t, 1H)，8.04 (br, 2H), 7.58（s，1H），7.51（s，1H），7.25（s，1H），6.29（s，2H），5.43（S，2H），5.21（s, 2H），4.65（d，2H），3.63（m，2H），3.53（m，2H），3.11（m，2H），1.87（m，4H），0.88（t，3H）。

实施例 B1.15：(S,E)-2-氨基-N-(3-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)烯丙基)乙酰胺



步骤一：

室温下，向化合物 A1.12（200 mg，0.447 mmol）的 N,N-二甲基甲酰胺溶液（5 mL）中加入三乙胺（135 mg，1.341 mmol）和 N-羟基-2,5-二氧吡咯烷 叔丁氧羰基甘氨酸酯（183 mg，0.671 mmol），在室温下反应 1 小时。LCMS 显示反应完全。向反应液中加入水（20 mL），用乙酸乙酯（20 mL×3）萃取，有机相用饱和食盐水洗涤，无水硫酸钠干燥，浓缩得到目标化合物 B1.15A（130 mg ，收率：48%）为棕色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ =605.6。

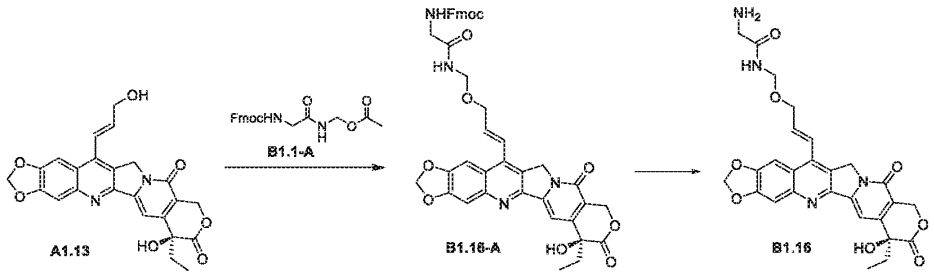
步骤二：

室温下，将化合物 B1.15-A（130 mg，0.215mmol）用盐酸 1，4-二氧六环溶液（5 mL）溶解，在室温下反应 30 分钟。LCMS 显示反应完全。反应液通过反向纯化得到目标化合物（60 mg，收率：52%）为棕色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ =505.2；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.85 (s, 1H), 8.15 (s, 2H), 7.70 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.21 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 6.51 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 6.31 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.28 (s, 2H), 4.19 (s, 2H), 1.86 – 1.82 (m, 4H), 0.87 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

实施例 B1.16：(S,E)-2-氨基-N-(((3-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)烯丙基)氧基)甲基)乙酰胺



步骤一：

在氮气保护下，将原料 A1.13 (150 mg, 0.335 mmol) 溶在甲苯 (3 mL) 中，加入(2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)乙酰氨基)甲基乙酸酯 (B1.1-A，308 mg, 0.84 mmol)，然后将醋酸锌 (123 mg, 0.67 mmol) 加入到反应液中，反应液在 100°C 下搅拌过夜。LCMS 检测反应完成。该反应液直接经反相色谱 (乙腈/0.05%甲酸的水溶液: 5%到 50%) 纯化后得目标化合物（9H-芴-9-基）甲基（S，E）-（2-（((3-（7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环[4,5-g]吡喃[3'，4'：6,7]吲哚嗪[1,2-b]喹啉-14-基）烯丙基）氧基）甲基）氨基）-2-氧代乙基）氨基甲酸酯 (B1.16-A，80 mg, 收率 31%)为白色固体。

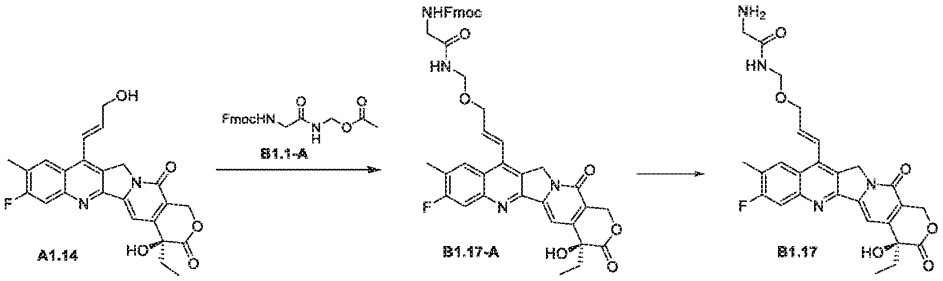
LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 757.4。

步骤二：

将化合物 B1.16-A (80 mg, 0.11 mmol) 溶在 N,N-二甲基甲酰胺 (2 mL) 中,然后向反应液中加入哌啶(0.05 mL)，在室温下搅拌 1 小时。LCMS 显示反应完成。将反应液浓缩得粗产品，粗产品用 C18 柱反相分离纯化(乙腈/0.05%氨水的水溶液: 5%到 50%)得到目标化合物(35 mg, 收率 62%)为棕色固体。

LCMS (ESI) [M+H]+ = 535.2, tR = 1.070 min.

实施例 B1.17：(S,E)-2-氨基-N-(((3-(4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)烯丙基)氧基)甲基)乙酰胺



步骤一：

将化合物 A1.14 (80 mg, 0.183 mmol)和化合物(2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)乙酰氨基)甲基乙酸酯 (B1.1-A，135 mg, 0.367 mmol)溶于甲苯 (4 mL)，加入醋酸锌 (190 mg, 1.03 mmol)，反应液在 100 摄氏度下搅拌 48 小时。冷却至室温，向其中加入水 (10 mL)，用乙酸乙酯 (10 mL×3) 萃取。合并有机相经无水硫酸钠干燥，过滤，浓缩得到粗产物，粗产物经反相色谱 (0.05% FA 的水溶液/乙腈: 5%到 100%) 纯化后得到目标化合物(S,E)-2-（Fmoc 氨基）-N-(((3-(4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)烯丙基)氧基)甲基)乙酰胺 (B1.17-A，30mg)为白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 745.2；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.82 (m 1H), 8.21 (m, 1H), 7.89 (m, 2H), 7.84 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.68

(m, 1H), 7.61 (m, 1H), 7.42 (m, 1H), 7.37 (m, 1H), 7.33 – 7.28 (m, 4H), 6.72 – 6.55 (m, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.28 (s, 2H), 4.75 (m, 2H), 4.34 (m, 2H), 4.28 – 4.24 (m, 2H), 4.20 (m, 1H), 3.70 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.47 (s, 3H), 1.90 – 1.82 (m, 2H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H)。

步骤二：

将化合物 4 (25 mg, 0.034 mmol)， 溶于 N, N-二甲基甲酰胺 (2 mL)中，然后加入二乙胺(0.2 mL)，加毕，反应液室温搅拌 1 小时， LCMS 检测反应完成后，将反应液直接减压蒸干溶剂得到粗产品目标化合物(S,E)-2-氨基-N-(((3-(4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)烯丙基)氧基)甲基)乙酰胺为黄色粘稠状产品。

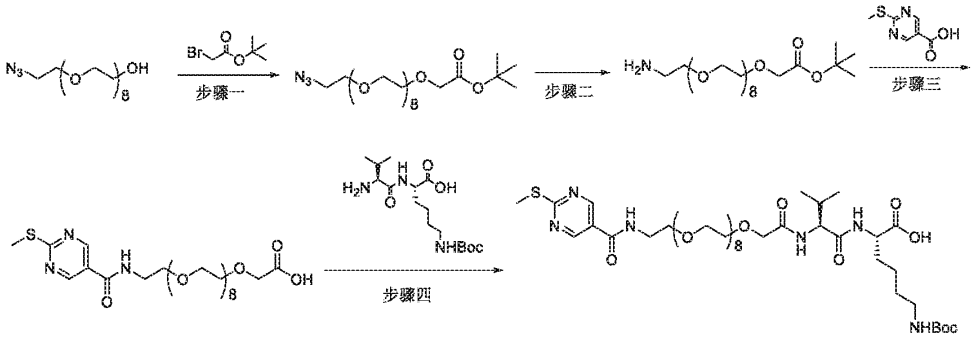
LCMS (ESI) [M+H]+ = 523.2；

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 523.1, t_R = 0.446 min, 1.311 min.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.26 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 8.23 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.06 (s, 2H), 7.91 (m, 1H), 7.40 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H), 7.34 (s, 1H), 6.70 – 6.60 (m, 1H), 6.54 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.35 (s, 2H), 4.80 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 4.38 (d, *J* = 3.9 Hz, 2H), 3.68 (d, 2H), 2.52 (s, 3H), 1.90 – 1.84 (m, 2H), 0.88 (m, 3H)。

C、含偶联连接段分子片段中间体的合成

实施例 C1.1：N^6-(叔丁氧基羰基)-N^2-((1-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1-氧代-5,8,11,14,17,20,23,26,29-九氧杂-2-氮杂-31-烷酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸 （化合物 C1.1）



步骤一： 29-叠氮基-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂-29-烷酸叔丁酯

向 26-叠氮基-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧杂-26-烷-1-醇（4.39g）的 DMF（40ml）溶液中加入 NaH（0.6g，60%）。上述混合物搅拌 30 分钟后，加入溴乙酸叔丁酯（2.4g）。混合物在干燥条件下搅拌 20 小时。然后向混合物中加入乙酸乙酯（200ml）和水（200ml，开始时慢慢加入），有机相水洗（100ml x 3），无水硫酸钠干燥，减压除去溶剂，残留物经过硅胶柱色谱分离得到目标产物，29-叠氮基-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂-29-烷酸叔丁酯。

ESI-MS (*m/z*): 554 $[M + H]^+$。

步骤二：29-氨基-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂-29-烷酸叔丁酯

向 29-叠氮基-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂-29-烷酸叔丁酯（1.16g） 的乙酸乙酯（20ml）溶液中加入钯碳催化剂（Pd/C，10%，100mg）。上述溶液在氢气气氛下搅拌 5 小时，然后滤去钯碳后，减压除去溶剂得到目标产物。

ESI-MS (*m/z*): 528 $[M + H]^+$。

步骤三：1-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1-氧代-5,8,11,14,17,20,23,26,29-九氧杂-2-氮杂-31-烷酸

29-氨基-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂-29-烷酸叔丁酯(527mg)和 2-甲硫基-嘧啶-5-羧酸(170mg)加入干燥 DMF (10ml), 然后在冰浴冷却下向上述溶液中依次加入 DIPEA（0.2ml），HBTU（420mg）。上述混合物室温小搅拌 20 小时。然后用乙酸乙酯（100ml）稀释，水洗（100ml x 4）,有机相无水硫酸钠干燥后，减压除去有机溶剂，残留物溶于 DCM（10ml），然后加入 TFA（10ml）,混合物室温下搅拌 1 小时，然后减压除去低沸点组分，残留物经过制备 HPLC 分离得到 1-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1-氧代-5,8,11,14,17,20,23,26,29-九氧杂-2-氮杂-31-烷酸。

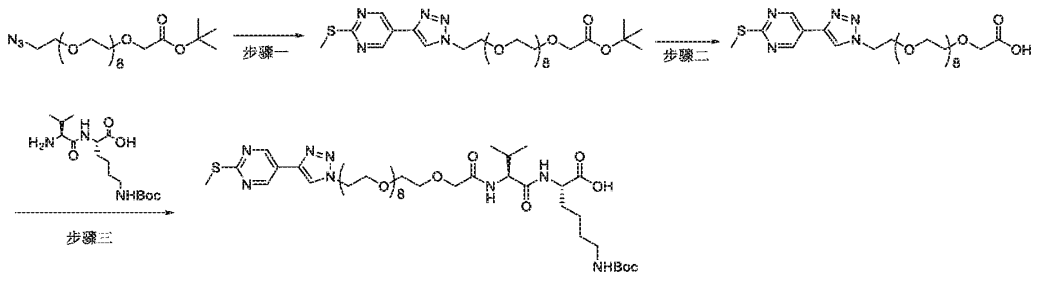
ESI-MS (*m/z*): 624 $[M + H]^+$。

步骤四：N^6-(叔丁氧基羰基)-N^2-((1-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1-氧代-5,8,11,14,17,20,23,26,29-九氧杂-2-氮杂-31-烷酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸

1-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1-氧代-5,8,11,14,17,20,23,26,29-九氧杂-2-氮杂-31-烷酸（623mg）溶于 DMF（10ml），0°C 下加入 DIPEA（300ul），HBTU （420mg）。混合物搅拌 30 分钟，然后加入缬氨酸-（Boc）赖氨酸二肽化合物（345mg）。反应搅拌 20 小时，然后加入乙酸乙酯（100ml），稀盐酸（20ml x 3）洗，有机相干燥后减压除去有机溶剂，粗产物通过制备 HPLC 分离得到目标化合物 N^6-(叔丁氧基羰基)-N^2-((1-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1-氧代-5,8,11,14,17,20,23,26,29-九氧杂-2-氮杂-31-烷酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸（化合物 C1.1）。

ESI-MS (*m/z*): 951 $[M + H]^+$。

实施例 C1.2：N^6-(叔丁氧基羰基)-N^2-((29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂-29-烷酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸（化合物 C1.2）



步骤一：29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂-29-烷酸叔丁酯

29-叠氮基-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂-29-烷酸叔丁酯（1.7g），2-甲硫基-5-乙炔基嘧啶（450mg）溶于 DMSO-水（20ml，4:1）中，向混合物中加入溴化亚铜（50mg）。反应液室温下搅拌 2 小时，然后加入乙酸乙酯（100ml），水洗（100ml x 3），干燥后减压除去有机溶剂，粗产物用硅胶柱层析分离得到目标产物 29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂-29-烷酸叔丁酯。

MS (*m/z*): 704 $[M + H]^+$。

步骤二：29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂-29-烷酸

29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂-29-烷酸叔丁酯（1g）溶于二氯甲烷（10ml），然后加入 TFA（5ml）。混合物室温静置 1 小时，然后减压除去低沸点组分得到目标产物 29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂-29-烷酸。

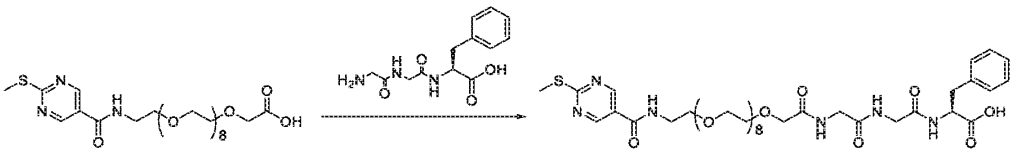
MS (*m/z*): 648 $[M + H]^+$。

步骤三：N^6-(叔丁氧基羰基)-N^2-((29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂-29-烷酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸

29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂-29-烷酸（647mg）溶于 DMF（10ml），0°C 下加入 DIPEA（300ul），HBTU （420mg）。混合物搅拌 30 分钟，然后加入缬氨酸-赖氨酸二肽化合物（345mg）。反应搅拌 20 小时，然后加入乙酸乙酯（100ml），稀盐酸（20ml x 3）洗，有机相干燥后减压除去有机溶剂，粗产物通过制备 HPLC 分离得到目标化合物 N^6-(叔丁氧基羰基)-N^2-((29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂-29-烷酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸（化合物 C1.2）。

ESI-MS (*m/z*): 975 $[M + H]^+$。

实施例 C1.3：(1-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1-氧代-5,8,11,14,17,20,23,26,29-九氧杂-2-氮杂-31-烷酰基)-甘胺酸-甘氨酸-L-苯丙氨酸（化合物 C1.3）

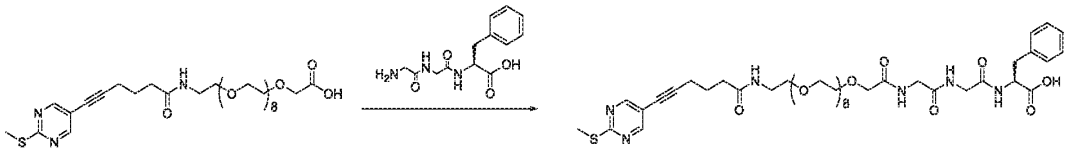


用实施例 C1.1 步骤四相同的方法和反应条件，用相应的原料，得到目标产物 (1-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1-氧代-5,8,11,14,17,20,23,26,29-九氧杂-2-氮杂-31-烷酰基)-甘胺酸-甘氨酸-L-苯丙氨酸（化合物 C1.3）。

ESI-MS (m/z): 885 $[M+H]^+$。

实施例 C1.4：(36-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-31-氧代-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂-30-氮杂-三十六-

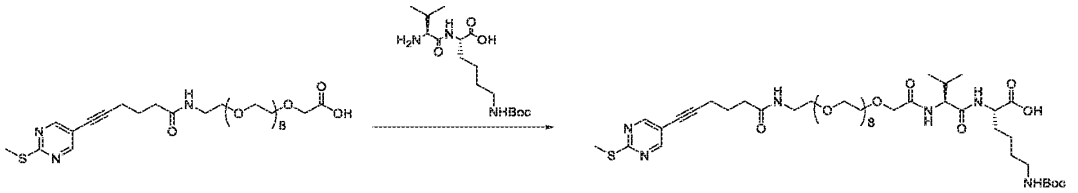
(35-炔)-酰基)甘氨酸甘氨酸苯丙氨酸（化合物 C1.4）



用实施例 C1.1 步骤四相同的方法和反应条件，用反应式所示的原料，得到目标产物(36-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-31-氧代-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂-30-氮杂-三十六-(35-炔)-酰基)甘氨酸甘氨酸苯丙氨酸（化合物 C1.4）。

ESI-MS (m/z): 951 $[M+H]^+$。

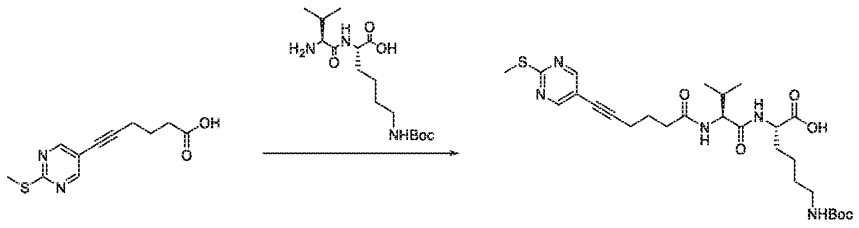
实施例 C1.5：N^6-(叔丁氧基羰基)-N^2-((36-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-31-氧代-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂-30-氮杂-三十六-(35-炔)-酰基)- L-缬氨酸)-L-赖氨酸（C1.5）



用实施例 C1.1 步骤四相同的方法和反应条件，用反应式所示的化合物作为原料，得到目标产物 N^6-(叔丁氧基羰基)-N^2-((36-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-31-氧代-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂-30-氮杂-三十六-(35-炔)-酰基)- L-缬氨酸)-L-赖氨酸（化合物 C1.5）。

ESI-MS (m/z): 1017 $[M+H]^+$。

实施例 C1.6：N^6-(叔丁氧基羰基)-N^2-((6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-己-5-炔酰基)- L-缬氨酸)-L-赖氨酸（化合物 C1.6）



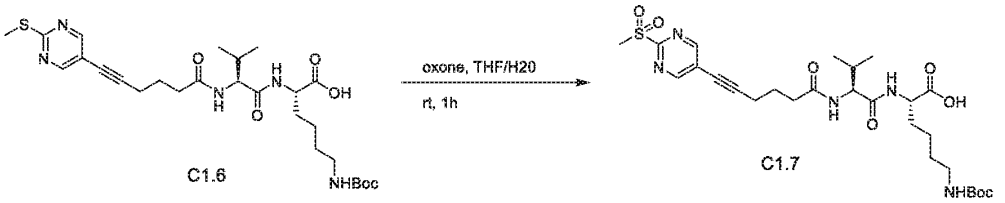
将 6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸 （920mg）和 N-羟基丁二酰亚胺（537 mg）溶于二氯甲烷（50mL）中，然后加入二环己基碳二亚胺（963 mg）。反应液室温搅拌 1 小时，然后减压除去二氯甲烷，残留物溶于 N,N-二甲基甲酰胺（50mL），然后加入 N^2-L-缬氨酸-N^6-(Boc)-L-赖氨酸 (1.5g)，反应液室温下搅拌反应 16 小时，将反应液倒入 200mL 水中，用饱和碳酸氢钠溶液调节 pH 至 11，上述水溶液用乙酸乙酯萃取两次，弃掉有机相，将水相用柠檬酸调节 pH 到 4-5，用乙酸乙酯（100 mL x 3）萃取三次，有机相用饱和食盐水（100 mL）洗涤，无水硫酸钠干燥，抽滤，旋蒸，得到粗产品 2.8g，

粗产品用快速色谱法分离纯化(DCM：MeOH = 30：1)得到目标化合物 N^6-(叔丁氧基羰基)-N^2-((6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-己-5-炔酰基)- L-缬氨酸)-L-赖氨酸 (1.0g) （化合物 C1.6）。

ESI-MS (m/z): 564.3 $[M+H]^+$。

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 12.45 (s, 1H), 8.68 (s, 2H), 8.12 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 6.76 (s, 1H), 4.27 – 4.19 (m, 1H), 4.11 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 2.88 (d, *J* = 7.9 Hz, 3H), 2.73 (s, 1H), 2.59 (s, 1H), 2.52 (s, 4H), 2.40 – 2.24 (m, 3H), 2.03 – 1.88 (m, 2H), 1.77 (d, *J* = 3.2 Hz, 2H), 1.68 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 1.60 – 1.49 (m, 1H), 1.36 (s, 15H), 0.85 (dd, *J* = 14.8, 6.7 Hz, 7H)。

实施例 C1.7：N^6-(叔丁氧基羰基)-N^2-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-己-5-炔酰基)- L-缬氨酸)-L-赖氨酸（化合物 C1.7）

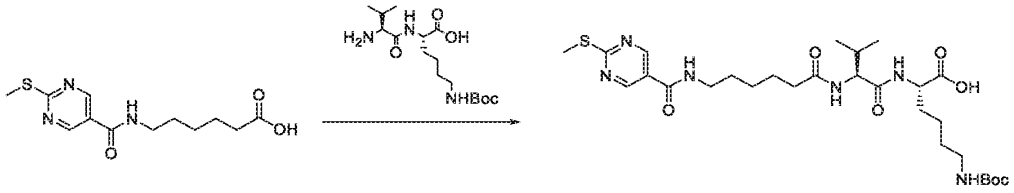


向化合物 C1.6（260 mg）的四氢呋喃（3 mL）和水（3 mL）混合溶液中加入过氧单磺酸钾（1.414 g），在室温下搅拌反应 1 小时。将反应液过滤，滤液用 C18 柱（乙腈/0.05%甲酸的水溶液：5%-60%）纯化得到目标化合物 N^6-(叔丁氧基羰基)-N^2-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-己-5-炔酰基)- L-缬氨酸)-L-赖氨酸（化合物 C1.7）（120 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$: 596;

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 12.48 (s, 1H), 9.13 (s, 2H), 8.14 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.90 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 6.77 (s, 1H), 4.24 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 4.12 (br s, 1H), 3.41 (s, 3H), 2.89 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.43 – 2.29 (m, 2H), 2.03 – 1.93 (m, 2H), 1.82 (br s, 2H), 1.63 – 1.60 (m, 4H), 1.37 (s, 12H), 0.88 – 0.83 (m, 6H)。

实施例 C1.8：N^6-(叔丁氧基羰基)-N^2-((6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-甲酰胺基)己酰基)- L-缬氨酸)-L-赖氨酸（化合物 C1.8）

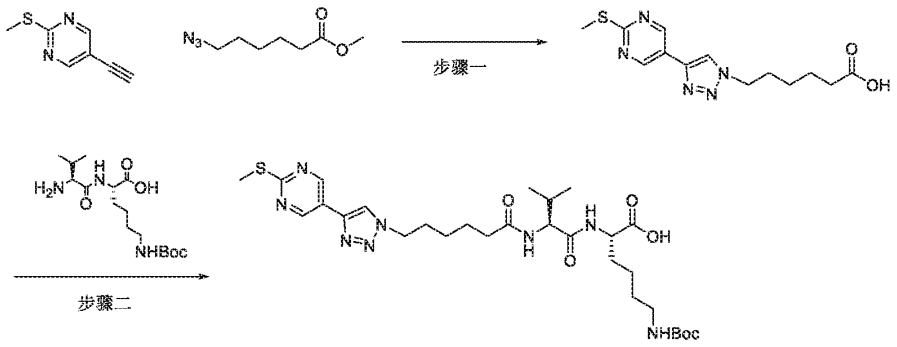


用实施例 C1.6 相同的方法和反应条件，用反应式所示的已知化合物作为原料，得到目标产物 N^6-(叔丁氧基羰基)-N^2-((6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-甲酰胺基)己酰基)- L-缬氨酸)-L-赖氨酸（化合物 C1.8）。

ESI-MS (m/z): 611 $[M+H]^+$。

实施例 C1.9：N^6-(叔丁氧基羰基)-N^2-((6-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰基)- L-

缬氨酸)-L-赖氨酸（化合物 C1.9）



步骤一：6-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酸

室温下，将 2-甲硫基-5-乙炔基嘧啶（1.5g）、6-叠氮基己酸甲酯（1.71g）溶于叔丁醇与水的混合溶剂（20 mL/25 mL）中，加入维生素 C 钠 (5.7 g), 溴化亚铜（2.9g）搅拌反应 10 h。反应加入乙酸乙酯（200ml），水洗（100ml x 5），干燥后除去有机溶剂，硅胶柱层析得到 6-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酸甲酯 （2.8g），ESI-MS (m/z): 321.9$[M+H]^+$。上述产物溶于四氢呋喃（100ml），加入氢氧化锂（1M，20ml），混合物搅拌 3 小时，然后加入盐酸至反应液 pH 2，然后加入乙酸乙酯（200ml），水洗（100ml x 3），干燥，除去有机溶剂得到目标产物 6-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酸。ESI-MS (m/z): 308.4 $[M+H]^+$。

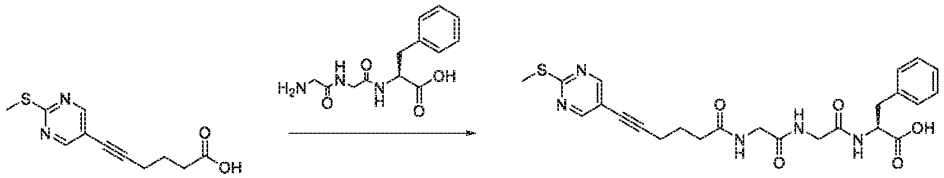
步骤二：N^6-(叔丁氧基羰基)-N^2-((6-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰)- L-缬氨酸)-L-赖氨酸

将化合物 6-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酸 (370 mg,)和 N-羟基丁二酰亚胺 (152 mg) 溶在二氯甲烷（5 mL）中搅拌，再加入二环乙基碳二亚胺（273 mg），然后反应液在室温下搅拌 1 小时。向反应液中加入 10 mL 水，用乙酸乙酯萃取（20 mL x 2），有机相用饱和食盐水洗，用无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩得到粗品。将此粗品溶解在 N,N-二甲基甲酰胺(10 mL)搅拌，加入化合物 N^2-L-缬氨酸-N^6-(Boc)-L-赖氨酸，反应液在室温下反应 16 小时，向反应液中缓慢加入柠檬酸将 PH 调至 5 左右，加入水，再用乙酸乙酯萃取(3 x 10 mL)，有机相用饱和食盐水洗涤，无水硫酸钠干燥，浓缩除去乙酸乙酯得到目标产物 N^6-(叔丁氧基羰基)-N^2-((6-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰基)- L-缬氨酸)-L-赖氨酸（化合物 C1.9，400 mg）。

ESI-MS (m/z): 635.3 $[M+H]^+$；

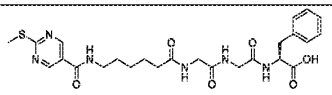
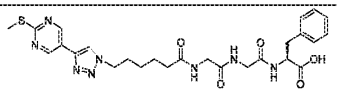
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 12.46 (s, 1H), 9.06 (s, 2H), 9.06 (s, 1H), 8.70 (s, 1H), 8.07 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.77 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 6.76 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.41 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 4.19 (dd, J = 8.9, 7.0 Hz, 1H), 4.14 – 4.05 (m, 1H), 2.92 – 2.85 (m, 2H), 2.56 (s, 3H), 2.24 – 2.10 (m, 2H), 1.97 – 1.81 (m, 3H), 1.71 – 1.64 (m, 1H), 1.61 – 1.50 (m, 3H), 1.36 (s, 9H), 1.28 – 1.22 (m, 6H), 0.88 – 0.76 (m, 6H)。

实施例 C1.10：(6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)己-(5-炔)-酰基)甘氨酸甘氨酸-L-苯丙氨酸（化合物 C1.10）

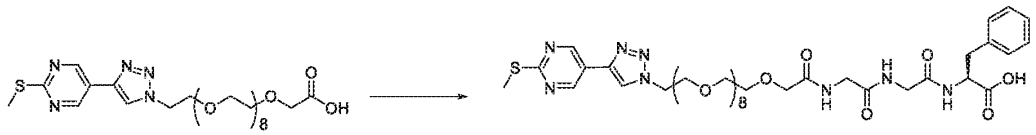


用实施例 C1.6 相同的方法和反应条件，上述反应式所示的已知原料，得到目标产物 (6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)甘氨酸甘氨酸-L-苯丙氨酸（化合物 C1.10）。ESI-MS (m/z): 498 $[M+H]^+$。

用实施例 C1.6 相同的方法和反应条件，利用不同的反应原料，得到下表中目标产物。

化合物	化学结构	化学名称	ESI-MS (*m/z*): $[M+H]^+$
C1.11		(6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-甲酰胺基)己酰基) 甘氨酸甘氨酸-L-苯丙氨酸	545
C1.12		(6-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰基) 甘氨酸甘氨酸-L-苯丙氨酸	569

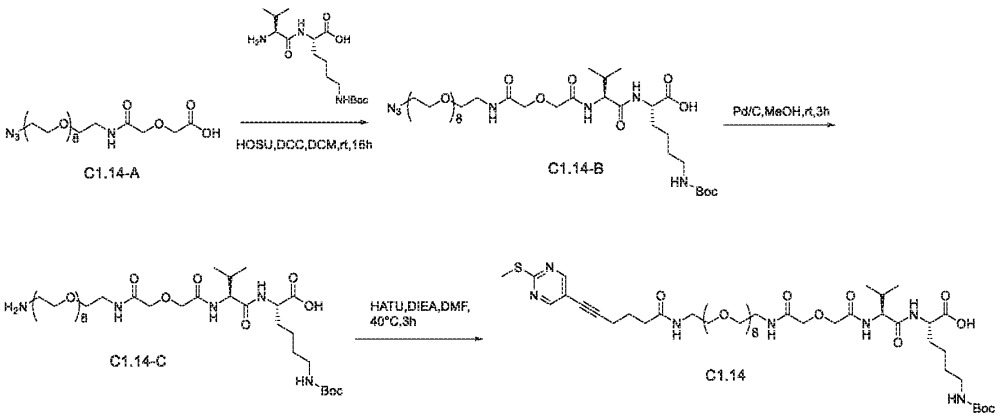
实施例 C1.13：(29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂 29 烷酰基) 甘氨酸甘氨酸-L-苯丙氨酸（化合物 C1.13）



用实施例 C1.1 步骤四相同的方法和反应条件，利用已知原料，得到目标产物 (29-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂 29 烷酰基)甘氨酸甘氨酸-L-苯丙氨酸（化合物 C1.13）。

ESI-MS (m/z): 909 $[M+H]^+$。

实施例 C1.14：N^6-(叔丁氧基羰基)-N^2-((39-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-5,34-二氧代-3,9,12,15,18,21,24,27,30-九氧杂-6,33-二氮杂三十九烷-38-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸（C1.14）



步骤一：

将化合物 C1.14-A（336mg）溶于二氯甲烷（5 mL）中，加入 N-羟基丁二酰亚胺（98 mg，0.85 mmol），二环己基碳二亚胺（175 mg，0.85 mmol）室温搅拌反应 1 小时， 然后将化合物 N^2-L-缬氨酸-N^6-(Boc)-L-赖氨酸（230 mg）加入反应液，室温搅拌反应过夜。浓缩除去溶剂得到粗产品，粗产品用 C18 柱反相分离纯化（乙腈/0.01%FA 的水溶液： 5%-50%）得到无色油状目标化合物（C1.14B，290 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 882.3。

步骤二：

将化合物 C1.14-B（300 mg）溶于无水甲醇（5 mL）中，加入 Pd/C（10%, 60 mg），氢气置换三次，室温搅拌反应过夜，抽滤，浓缩得到目标化合物 C1.14-C（293 mg）为无色油状物。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：856.1。

步骤三：

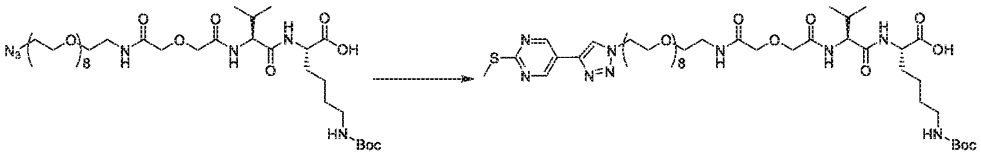
将 6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸（84 mg）溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (3 mL)中，然后依次加入 N,N-二异丙基乙胺 （61 mg），HATU （108 mg）。反应液室温搅拌 20 分钟，然后加入化合物 C1.14-C（196 mg），40°C 搅拌反应 3 小时，粗产品用 C18 柱反相分离纯化（乙腈/0.01%FA 的水溶液： 5%-65%）得到目标化合物 N^6-(叔丁氧基羰基)-N^2-((39-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-5,34-二氧代-3,9,12,15,18,21,24,27,30-九氧杂-6,33-二氮杂三十九烷-38-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸（C1.14）（170 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1074.0；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.68 (s, 2H), 8.23 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 8.13 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.99 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.43 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 6.69 (s, 1H), 4.09 (dd, *J* = 8.8, 6.5 Hz, 1H), 4.02 (s, 2H), 3.98 (d, *J* = 2.9 Hz, 2H), 3.74 – 3.70 (m, 1H), 3.50 (s, 30H), 3.45 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 3.39 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.26 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 3.20 (q, *J* = 5.9 Hz, 2H), 2.81 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.52 (s, 3H), 2.24 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.12

– 2.06 (m, 1H), 1.79 – 1.74 (m, 2H), 1.67 – 1.59 (m, 1H), 1.50 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 1.36 (s, 9H), 1.24 (s, 2H), 1.20 – 1.09 (m, 2H), 0.85 (t, *J* = 6.3 Hz, 6H)。

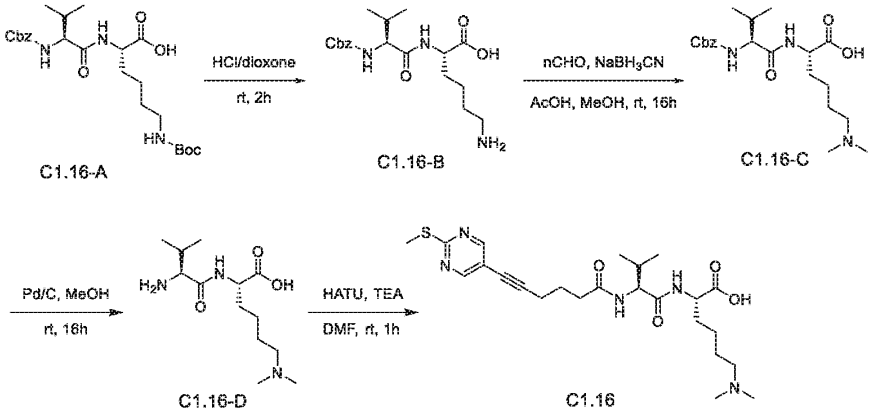
实施例 C1.15：N^6-(叔丁氧基羰基)-N^2-((32-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-5-氧代-3,9,12,15,18,21,24,27,30-九氧杂-6-氮杂三十二烷酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸（C1.15）



将化合物 C1.14-B（130 mg），5-乙炔基-2-甲硫基嘧啶（44 mg），维生素 C 钠（3 mg）和硫酸铜（5 mg）加入到叔丁醇（2 mL）和水（2 mL）的混合溶液中，反应在室温氮气下反应 3 小时。向反应液中加入水（10 mL），用二氯甲烷（30 mL×3）萃取，有机相经饱和食盐水洗涤，无水硫酸钠干燥，抽滤，浓缩得到粗品，粗产品 TLC 分离纯化（二氯甲烷：甲醇=10 比 1)得到目标化合物 N^6-(叔丁氧基羰基)-N^2-((32-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-5-氧代-3,9,12,15,18,21,24,27,30-九氧杂-6-氮杂三十二烷酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸（C1.15）（90 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ =1032.3。

实施例 C1.16：N^6,N^6-二甲基-N^2-((6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)- L-缬氨酸)-L-赖氨酸



步骤一：

向化合物 C1.16-A（10.0 g）加入氯化氢-二氧六环（100 mL）溶液，在室温下反应 2 小时。反应液减压浓缩得到白色固体目标化合物 C1.16-B（8.0 g）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：380.1。

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.18 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.40 – 7.30 (m, 5H), 7.26 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 5.08 – 4.99 (m, 2H), 4.23 – 4.11 (m, 1H), 3.94 – 3.88 (m, 1H), 2.78 – 2.73 (m, 2H), 2.03 – 1.94 (m, 1H), 1.77 – 1.51 (m, 4H), 1.44 – 1.31 (m, 2H), 0.87 (dd, *J* = 17.3, 6.6 Hz, 6H)。

步骤二：

将化合物 C1.16-B（3.0 g）和醋酸钠（1.90 g）溶在甲醇（100 mL）溶液中，室温下反应 10 分钟，向反应液中加入多聚甲醛（2.8 g），室温下搅拌反应 30 分钟，再向反应液中加入氰基硼氢化钠（1.0 g），反应在室温下搅拌反应 16 小时。反应液过滤后滤液用 C18 柱反向分离纯化(乙腈比 0.05%的甲酸水溶液: 5%到 55%)得到目标化合物 C1.16-C (1.70 g)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：408.1；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.86 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 7.40 – 7.26 (m, 6H), 5.03 (s, 2H), 4.08 – 4.06 (m, 1H), 3.90 – 3.85 (m, 1H), 2.50 – 2.45 (m, 2H), 2.35 (s, 6H), 2.05 – 1.93 (m, 1H), 1.73 – 1.55 (m, 2H), 1.51 – 1.40 (m, 2H), 1.33 – 1.22 (m, 2H), 0.85 (dd, J = 16.5, 6.8 Hz, 6H)。

步骤三：

室温下，将化合物 C1.16-C（1.6 g）溶于甲醇（80 mL）中，然后向反应液中加入 Pd/C（10%，0.16 g），氢气下室温下搅拌反应 12 小时。将反应液过滤，滤液减压浓缩得到目标化合物 C1.16-D（680 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：274.2。

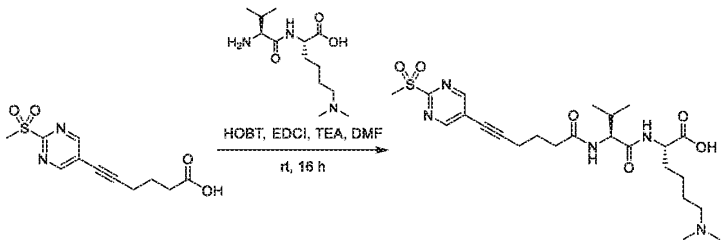
步骤四：

将 6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸（944 mg）溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (30 mL)中，然后依次加入 N,N-二异丙基乙胺（1.3 g），2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯（HBTU，1.8 g）。反应液室温搅拌 20 分钟，然后加入化合物 C1.16-D（1.1 g），40 ℃ 搅拌反应 3 小时，粗产品用 C18 柱反相分离纯化（乙腈/0.01%甲酸的水溶液； 5%-65%）得到白色固体目标化合物 N^6,N^6-二甲基-N^2-((6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)- L-缬氨酸)-L-赖氨酸 C1.16（1.2 g）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：492.1；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.68 (s, 2H), 8.00 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.91 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 4.20 (t, 1H), 4.08 (dd, J = 12.7, 7.7 Hz, 1H), 2.47 – 2.40 (m, 4H), 2.37 – 2.31 (m, 2H), 2.30 (s, 6H), 2.01 – 1.92 (m, 1H), 1.82 – 1.73 (m, 2H), 1.71 – 1.56 (m, 2H), 1.49 – 1.37 (m, 2H), 1.33 – 1.23 (m, 2H), 0.88 – 0.82 (m, 6H).

实施例 C1.17：N^6,N^6-二甲基-N^2-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)- L-缬氨酸)-L-赖氨酸 C1.17



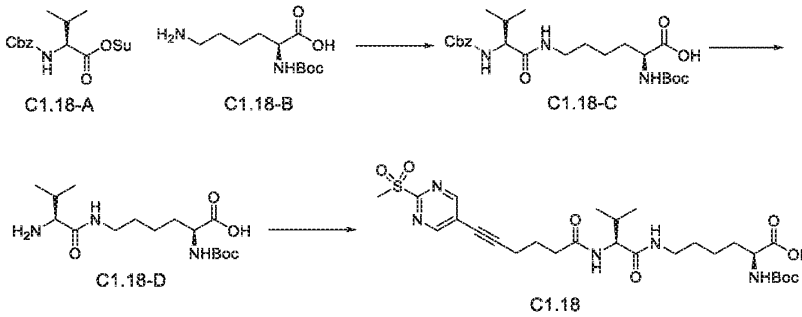
将 6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸 (268 mg), 化合物 C1.16-D (328 mg), 三乙胺 (322 mg) 溶于 N, N-二甲基甲酰胺 (5 mL)。然后再加入 1-羟基苯并三唑(HOBT，162 mg)和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDCI，229 mg),

反应液室温搅拌 16 小时，反应液直接经过 C18 柱反相（乙腈和 0.05%的甲酸水溶液体系）提纯得到目标化合物 N^6,N^6-二甲基-N^2-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)- L-缬氨酸)-L-赖氨酸（C1.17 ，白色固体，327 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：524.4。

^{1}H NMR (400 MHz,) δ 9.13 (s, 2H), 7.95 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H), 4.21 (dd, *J* = 8.8, 6.9 Hz, 1H), 4.08 – 4.03 (m, 1H), 3.41 (s, 3H), 2.55 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.42 – 2.32 (m, 4H), 2.27 (s, 6H), 1.98 (dd, *J* = 13.6, 6.8 Hz, 1H), 1.86 – 1.77 (m, 2H), 1.74 – 1.55 (m, 2H), 1.47 – 1.37 (m, 2H), 1.31 – 1.23 (m, 2H), 0.85 (dd, *J* = 12.8, 6.8 Hz, 6H)。

实施例 C1.18：N^2-(叔丁氧基羰基)-N^6-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)- L-缬氨酸)-L-赖氨酸



步骤一：

化合物 C1.18-B (3 g) 溶于二氯甲烷 (30 ml)，加入 DIPEA (4 ml)，然后加入化合物 C1.18-A (3.48 g)，混合物室温下搅拌反应 20 小时。向反应液中加入乙酸乙酯 (200 ml)，混合物依次用盐酸 (0.1M, 30 ml x 3)、水 (30ml x 3) 洗涤，无水硫酸钠干燥，减压浓缩后得到目标混合物 C1.18-C (4.7 g)。

步骤二：

室温下，将化合物 C1.18-C (4.7 g) 溶于甲醇 (80 mL) 中，然后向反应液中加入 Pd/C (10%, 0.6 g)，在氢气下室温下搅拌反应 12 小时。将反应液过滤，滤液减压浓缩得到目标化合物 C1.18-D (3.4 g)。LCMS (ESI) $[M+H]^+$：346.2。

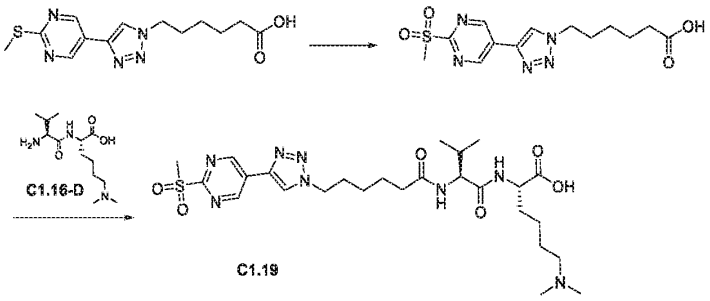
步骤三：

将 6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸 (2.68 g), 溶于 N, N-二甲基甲酰胺 (50 mL), 然后再加入三乙胺 (3 ml), HBTU (3.8 g), 混合物室温下搅拌 10 分钟，然后加入乙酸乙酯 (200 ml)，混合物用饱

和碳酸氢钠（20 ml x 2），盐酸（0.1M，50 ml x 2），水（50 ml x 2）洗，无水硫酸钠干燥，减压浓缩得到粗产物中间体，上述粗产物溶于 DMF （30 ml），加入 DIPEA（1.6 ml），然后加入 C1.18-D (3.4 g)， 反应液室温搅拌 3 小时，然后加入乙酸乙酯（200 ml），用盐酸（0.1M，50 ml x 2），水（50 ml x 2）洗，无水硫酸钠干燥，减压浓缩得到粗产物，经硅胶柱色谱分离提纯得到目标化合物 N^2-(叔丁氧基羰基)-N^6-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)- L-缬氨酸)-L-赖氨酸（C1.18 ，白色固体，3.8 g)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：596.4。

实施例 C1.19：N^6,N^6-二甲基-N^2-((6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸



步骤一：

将化合物 6-(4-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酸（1.0 g， 3.3mmol）溶在四氢呋喃和水（40mL，3:1）混合溶液中，加入过氧单磺酸钾（10.0 g，16.3mmol）。室温搅拌反应 3 小时，LCMS 检测反应完成。反应液过滤，滤饼用 DMSO 洗涤，合并滤液。经反相纯化（C18，乙腈：0.1%甲酸=5%-55%）纯化，得到 6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酸（750mg，收率 67.9%）白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 340.1$；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.48 (s, 2H), 8.95 (s, 1H), 4.49 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 3.45 (s, 3H), 2.22 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.95 – 1.84 (m, 2H), 1.61 – 1.50 (m, 2H), 1.36 – 1.26 (m, 2H)。

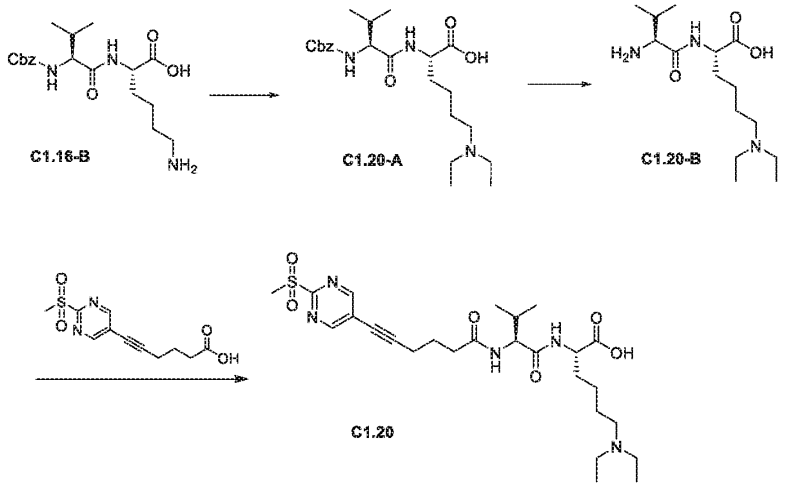
步骤二：

将化合物 6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酸（300 mg，0.88mmol）溶于 N,N-二甲基甲酰胺（6mL），加入 HATU（337 mg，0.88mmol），DIPEA（286 mg，2.21mmol），室温搅拌反应 30 分钟，然后加入二肽 C1.16-D（243 mg，0.88 mmol），室温搅拌反应 2 小时。LCMS 检测反应完成，反应液通过 C18 柱分离纯化（乙腈/0.01%FA 的水溶液：5%-50%）得到目标化合物 N^6,N^6-二甲基-N^2-((6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸（300 mg，收率 57%）白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 595.5$, $t_R = 2.024$ min。

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.49 (s, 2H), 9.01 (s, 1H), 7.85 (br s, 1H), 7.84 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 4.48 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 4.17 – 4.15 (m, 1H), 4.02 (br s, 1H), 3.44 (s, 3H), 2.42 (br s, 2H), 2.30 (s, 6H), 2.18 – 2.14 (m, 2H), 1.99 – 1.96 (m, 1H), 1.88 (dd, *J* = 14.6, 7.1 Hz, 2H), 1.67 (br s, 1H), 1.59 – 1.53 (m, 2H), 1.43 (br s, 2H), 1.28 – 1.26 (m, 5H), 0.83 – 0.89 (m, 6H).

实施例 C1.20：N^6,N^6-二乙基-N^2-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)- L-缬氨酸)-L-赖氨酸



步骤一：

将化合物 C1.16-B（5.0 g, 12.05 mmol）溶在二氯甲烷（100 mL）中，向反应液中加入乙醛（3.2 g, 72.3 mmol），室温下搅拌反应 10 分钟，再向反应液中加入三乙酰氧基硼氢化钠（12.8 g, 60.25 mmol），反应在室温下搅拌反应 1 小时。LCMS 显示反应完全。向反应液中加入氯化铵饱和水溶液搅拌一个小时，旋干，过滤后滤液用 C18 柱反向分离纯化(乙腈比 0.05%的甲酸水溶液: 5%到 55%)得到目标化合物 C1.20-A (4.57 g, 收率 82.0%)为白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 436.4;

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.70 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.41 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.38 – 7.26 (m, 5H), 5.08 – 4.99 (m, 2H), 4.00 (dd, *J* = 12.6, 6.5 Hz, 1H), 3.86 (dd, *J* = 8.6, 6.8 Hz, 1H), 2.74 (dd, *J* = 14.0, 6.9 Hz, 4H), 2.64 – 2.54 (m, 2H), 2.05 – 1.94 (m, 1H), 1.72 – 1.52 (m, 2H), 1.52 – 1.38 (m, 2H), 1.38 – 1.18 (m, 2H), 1.04 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H), 0.87 – 0.81 (m, 6H)。

步骤二：

室温下，将化合物 C1.20-A（1.6 g，3.68 mmol）溶于甲醇（80 mL）中，然后向反应液中加入 Pd/C（0.16 g），氢气下室温下搅拌反应 12 小时。LCMS 显示反应完成。将反应液过滤，滤液减压浓缩得到目标化合物 C1.20-B（900 mg, 收率 82%)为米白色固体。

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.04 (br s, 1H), 4.02 – 3.99 (m, 1H), 3.10 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 2.65 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 2.55 – 2.51 (m, 2H), 2.06 – 1.93 (m, 1H), 1.73 – 1.54 (m, 2H), 1.47 – 1.38 (m, 2H), 1.30 –

1.21 (m, 2H), 1.01 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H), 0.89 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 0.79 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H)。

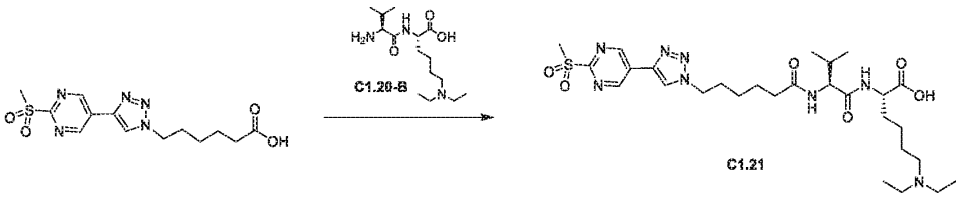
步骤三：

将化合物 6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸 (268 mg, 1 mmol)溶于 DMF（8 mL）中，依次加入 HATU（380 mg, 1 mmol）和三乙胺（322 mg, 2.5 mmol），室温搅拌 20 分钟后加入化合物 C1.20-B（301 mg, 1 mmol），室温继续搅拌 30 分钟。LCMS 检测反应完成后，反应液直接经过 C18 柱反相（乙腈和 0.05%的甲酸水溶液体系）提纯得到目标化合物 (280 mg，收率 51%)为白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 552.3；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.13 (s, 2H), 7.95 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.86 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 4.18 (dd, *J* = 8.8, 6.8 Hz, 1H), 4.02 (dd, *J* = 12.8, 7.2 Hz, 1H), 3.41 (s, 3H), 2.74 – 2.69 (m, 4H), 2.62 – 2.52 (m, 4H), 2.44 – 2.29 (m, 2H), 2.04 – 1.94 (m, 1H), 1.86 – 1.77 (m, 2H), 1.72 – 1.54 (m, 2H), 1.51 – 1.39 (m, 2H), 1.33 – 1.23 (m, 2H), 1.02 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H), 0.87 – 0.82 (m, 6H)。

实施例 C1.21：N^6,N^6-二乙基-N^2-((6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸

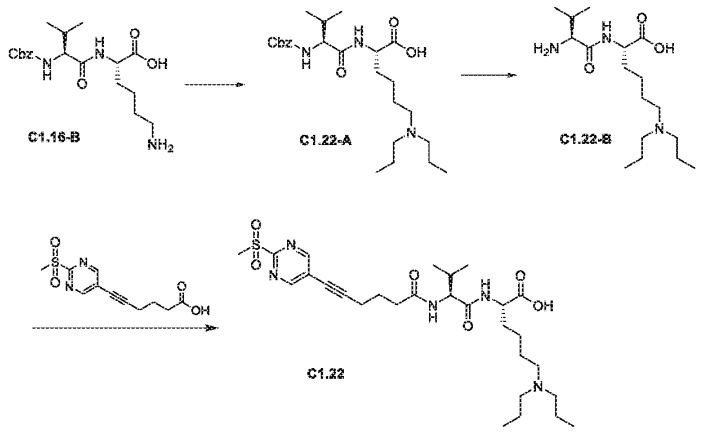


将化合物 6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酸 (500 mg, 1.475 mmol)，溶于 N, N-二甲基甲酰胺 (10 mL)，然后加入 HATU (560 mg, 1.475 mmol)，N,N-二异丙基乙胺 (476 mg, 3.688 mmol)，搅拌 30 分钟，然后加入化合物 C1.20-B (444 mg，1.475 mmol)，反应液室温搅拌 1 小时，LCMS 检测反应完成后，反应液直接经过 C18 柱反相（乙腈和 0.05%的甲酸水溶液体系）提纯得到目标化合物 N^6,N^6-二乙基-N^2-((6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸 (330 mg，收率 34%)为白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 623.4；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.49 (s, 2H), 9.04 (s, 1H), 7.84 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.80 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 4.47 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.14 (dd, *J* = 8.8, 6.6 Hz, 1H), 4.06 – 3.95 (m, 1H), 3.44 (s, 3H), 2.67 – 2.64 (m, 4H), 2.55 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.21 – 2.10 (m, 2H), 2.02 – 1.94 (m, 1H), 1.92 – 1.84 (m, 2H), 1.72 – 1.63 (m, 1H), 1.72 – 1.63 (m, 3H), 1.59 – 1.54 (m, 2H), 1.32 – 1.21 (m, 4H), 1.01 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H), 0.81 (dd, *J* = 9.6, 6.8 Hz, 6H)。

实施例 C1.22：N^6,N^6-二丙基-N^2-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)- L-缬氨酸)-L-赖氨酸



步骤一：

将化合物 C1.16-B（5.0 g，12 mmol）溶在二氯甲烷（100 mL）中，向反应液中加入正丙醛（4.2 g， 72.3 mmol），室温下搅拌反应 10 分钟，再向反应液中加入三乙酰氧基硼氢化钠（12.8 g， 60.25 mmol），反应在室温下搅拌反应 1 小时。LCMS 显示反应完全。向反应液中加入氯化铵饱和水溶液搅拌一个小时，旋干，过滤后滤液用 C18 柱反向分离纯化(乙腈比 0.05%的甲酸水溶液: 5%到 55%)得到目标化合物 C1.22-A (4.57 g, 收率 82.0%)为白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 464.0；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.81 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 7.38 – 7.28 (m, 5H), 5.04 (d, J = 1.7 Hz, 2H), 4.12 – 4.02 (m, 1H), 3.94 – 3.82 (m, 1H), 2.65 – 2.52 (m, 6H), 2.06 – 1.94 (m, 1H), 1.76 – 1.64 (m, 1H), 1.64 – 1.53 (m, 1H), 1.52 – 1.40 (m, 6H), 1.34 – 1.18 (m, 2H), 0.92 – 0.80 (m, 12H)。

步骤二：

室温下，将化合物 C1.22-A（2.0 g，4.32 mmol）溶于甲醇（80 mL）中，然后向反应液中加入 Pd/C（0.16 g），氢气下室温下搅拌反应 12 小时。LCMS 显示反应完成。将反应液过滤，滤液减压浓缩得到目标化合物 C1.22-B（1.2 g, 收率 85.5%)为白色固体。

步骤三：

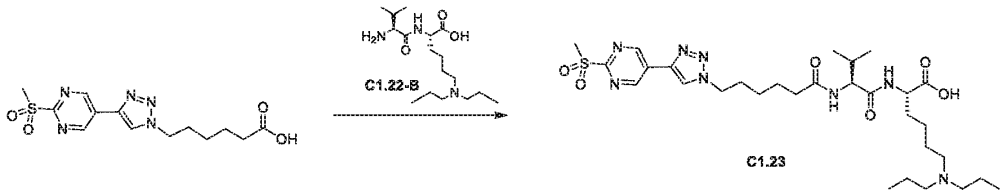
将化合物 6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸 (100 mg, 0.373 mmol)， 溶于 N, N-二甲基甲酰胺 (1 mL), 然后加入 HATU (142 mg, 0.373 mmol)，N,N-二异丙基乙胺 (120 mg, 0.93 mmol)，该体系搅拌 30 分钟，然后加入化合物 C1.22-B (122 mg，0.371 mmol)，反应液室温搅拌 1 小时， LCMS 检测反应完成后，反应液直接经过 C18 柱反相（乙腈和 0.05%的甲酸水溶液体系）提纯得到目标化合物 N^6,N^6-二丙基-N^2-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)- L-缬氨酸)-L-赖氨酸(50 mg，收率 28%)为淡黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 580.0；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.24 (s, 2H), 7.98 – 7.93 (m, 2H), 4.24 – 4.16 (m, 1H), 4.10 (d, J = 5.2

Hz, 1H), 3.41 (s, 3H), 2.79 – 2.64 (m, 6H), 2.55 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.45 – 2.26 (m, 2H), 2.06 – 1.91 (m, 1H), 1.89 – 1.78 (m, 2H), 1.76 – 1.66 (m, 1H), 1.64 – 1.57 (m, 1H), 1.57 – 1.42 (m, 6H), 1.37 – 1.24 (m, 2H), 0.93 – 0.78 (m, 12H)。

实施例 C1.23：N^6,N^6-二丙基-N^2-((6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸

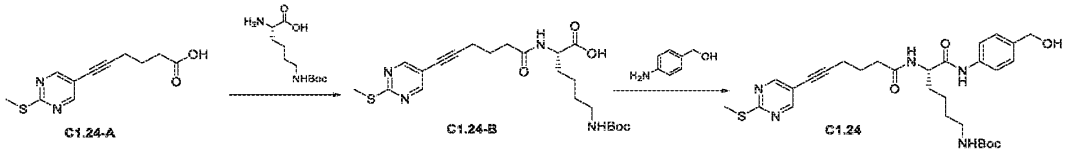


将化合物 6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酸 (500 mg, 1.475 mmol)， 溶于 N, N-二甲基甲酰胺 (10 mL), 然后加入 HATU (560 mg, 1.475 mmol)， N,N-二异丙基乙胺 (476 mg, 3.688 mmol)，该体系搅拌 30 分钟，然后加入化合物 C1.22-B (485 mg，1.475 mmol)，反应液室温搅拌 1 小时， LCMS 检测反应完成后，反应液直接经过 C18 柱反相（乙腈和 0.05%的甲酸水溶液体系）提纯得到目标化合物 N^6,N^6-二丙基-N^2-((6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸 (320 mg，收率 33%)为白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 651.5；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.49 (s, 2H), 9.00 (s, 1H), 7.95 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 4.47 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 4.21 – 4.11 (m, 1H), 4.09 – 4.01 (m, 1H), 3.44 (s, 3H), 2.45 – 2.35 (m, 6H), 2.23 – 2.09 (m, 2H), 1.97 – 1.86 (m, 3H), 1.72 – 1.64 (m, 1H), 1.61 – 1.50 (m, 3H), 1.43 – 1.34 (m, 6H), 1.32 – 1.22 (m, 4H), 0.86 – 0.77 (m, 12H)。

实施例 C1.24：(S)-(6-((4-(羟甲基)苯基)氨基)-5-(6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺基)-6-氧代己基)氨基甲酸叔丁酯



步骤一：

将化合物 C1.24-A（3.70 g，15.7 mmol），二异丙基乙胺（11.0 mL, 62.8 mmol）和 HBTU（8.90 g, 23.6 mmol）溶于 N,N-二甲基甲酰胺（30 mL）中，反应在室温下反应 30 分钟。随后加入化合物 Boc 保护的赖氨酸（3.86 g，15.7 mmol），反应在室温下反应 2 小时。LCMS 检测反应完全。向反应液中加入柠檬酸水溶液（30 mL）调至 PH = 5，用二氯甲烷（50 mL X 3）萃取水溶液，合并有机相并用无水

硫酸钠干燥，抽滤，减压浓缩得到目标化合物 C1.24-B（7.0 g，粗品）为黄色油状物。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 465.1, t_R = 1.751 min.

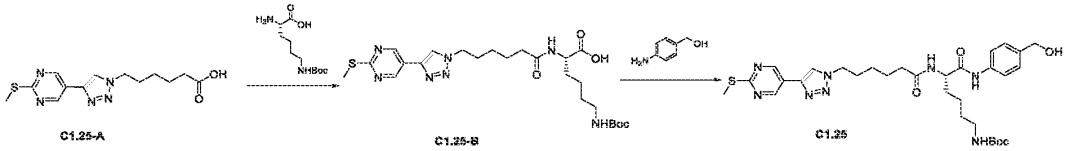
步骤二：

将化合物 C1.24-B（7.00 g，5.60 mmol），二异丙基乙胺（10.7 mL, 60.4 mmol）和 HBTU（8.60 g, 22.7 mmol）溶于 N,N-二甲基甲酰胺（100 mL）中，随后加入对氨基苄醇（3.71 g，30.2 mmol），反应在室温下反应 2 小时。LCMS 检测反应完全。向反应液中加入乙酸乙酯（300 mL），用饱和食盐水（100 mL X 3）洗涤，无水硫酸钠干燥，抽滤，滤液减压浓缩成固体，粗产品经柱层析分离纯化（二氯甲烷：甲醇=10/1)得到目标化合物(S)-(6-((4-(羟甲基)苯基)氨基)-5-(6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺基)-6-氧代己基)氨基甲酸叔丁酯（6.00 g，收率：69.9%）为黄色油状物。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 570.1；

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.24 (s, 1H), 8.46 (s, 2H), 7.51 – 7.47 (m, 2H), 7.31 – 7.23 (m, 3H), 7.02 – 6.95 (m, 1H), 4.83 (br s, 1H), 4.63 – 4.60 (m, 2H), 3.19 – 2.96 (m, 4H), 2.57 (s, 3H), 2.52 – 2.48 (m, 2H), 2.47 – 2.41 (m, 2H), 1.99 – 1.92 (m, 2H), 1.87 – 1.77 (m, 2H), 1.76 – 1.63 (m, 2H), 1.43 (s, 9H)。

实施例 C1.25：(S)-(6-((4-(羟甲基)苯基)氨基)-5-(6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)- 6-氧代己基)氨基甲酸叔丁酯



步骤一：

将化合物 C1.25-A（1.60 g，5.21 mmol），二异丙基乙胺（2.68 mL, 20.8 mmol）和 HBTU（2.97 g, 7.82 mmol）溶于 N,N-二甲基甲酰胺（30 mL），反应在室温下反应 30 分钟。随后加入 Boc 保护的赖氨酸（1.28 g，5.21 mmol），反应在室温下反应 2 小时。LCMS 检测反应完全。向反应液中加入柠檬酸水溶液（30 mL）调至 PH = 5，用二氯甲烷（50 mL X 3）萃取水溶液，合并有机相并用无水硫酸钠干燥，抽滤，减压浓缩得到目标化合物 C1.25-B（3.0 g，粗品）为黄色油状物。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 536.0；

步骤二：

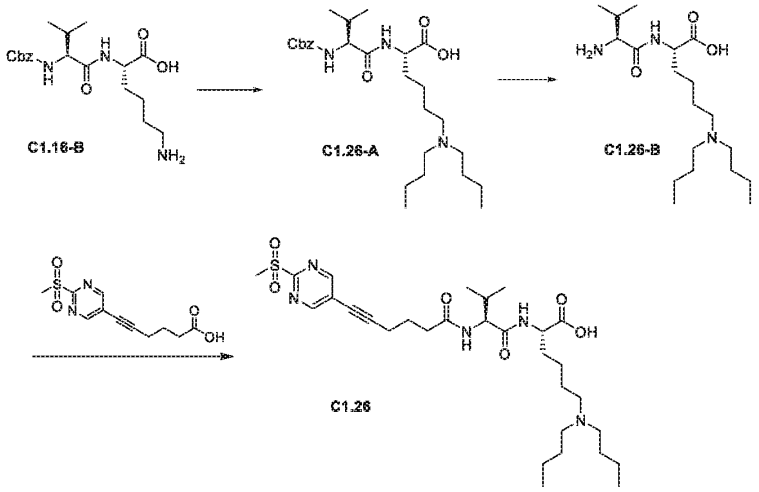
将化合物 C1.25-B（3.00 g，5.60 mmol），二异丙基乙胺（2.89 g, 22.4 mmol）和 HBTU（3.19 g, 8.40 mmol）溶于 N,N-二甲基甲酰胺（30 mL）。随后加入对氨基苄醇（1.38 g，11.2 mmol），反应在室温下反应 2 小时。LCMS 检测反应完全。向反应液中加入乙酸乙酯（200 mL），用饱和食盐水（80 mL X 3）洗涤，无水硫酸钠干燥，抽滤，滤液减压浓缩成固体，粗产品经柱层析分离纯化（二氯甲烷：甲醇=10/1)得到目标化合物(S)-(6-((4-(羟甲基)苯基)氨基)-5-(6-(2-(甲硫基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺

基)- 6-氧代己基)氨基甲酸叔丁酯（2.90 g）为黄色油状物。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 641.1；

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.13 (s, 1H), 8.95 (s, 2H), 7.94 (s, 1H), 7.47 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.24 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.83 – 6.77 (m, 1H), 4.93 – 4.80 (m, 1H), 4.64 – 4.58 (m, 2H), 4.40 – 4.29 (m, 2H), 3.12 – 2.97 (m, 4H), 2.60 (s, 3H), 2.31 – 2.23 (m, 2H), 1.96 – 1.83 (m, 4H), 1.76 – 1.61 (m, 4H), 1.41 (s, 9H), 1.37 – 1.29 (m, 4H)。

实施例 C1.26：N^6,N^6-二丁基-N^2-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)- L-缬氨酸)-L-赖氨酸



步骤一：

将化合物 C1.16-B（10.0 g）溶在二氯甲烷（200 mL）溶液中，向反应液中加入正丁醛（10.4 g），室温下搅拌反应 10 分钟，再向反应液中分批次加入三乙酰氧基硼氢化钠（25.6 g），反应在室温下搅拌反应 1 小时。LCMS 显示反应完全。向反应液中加入氯化铵饱和水溶液搅拌一个小时，旋干，过滤后滤液用 C18 柱反向分离纯化(乙腈比 0.05%的甲酸水溶液: 5%到 55%)得到目标化合物 C1.26-A (4.9 g)为白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 492.7；

^{1}H NMR (400 MHz, CDCl3) δ 7.35 – 7.30 (m, 5H), 5.14 – 5.08 (m, 2H), 4.33 – 4.30 (m, 1H), 4.14 – 4.12 (m, 1H), 2.94 – 2.80 (m, 6H), 2.13 – 2.11 (m, 1H), 1.85 – 1.82 (m, 2H), 1.58 – 1.55 (m, 4H), 1.40 – 1.22 (m, 8H), 0.98 – 0.87 (m, 12H)。

步骤二：

室温下，将化合物 C1.26-A（5.0 g）溶于甲醇（100 mL）溶液中，然后向反应液中加入 Pd/C（10%，1 g），氢气下搅拌反应 12 小时。LCMS 显示反应完成。将反应液过滤，滤液减压浓缩得到目标化合物 C1.26-B（3.68 g)为白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 358.3。

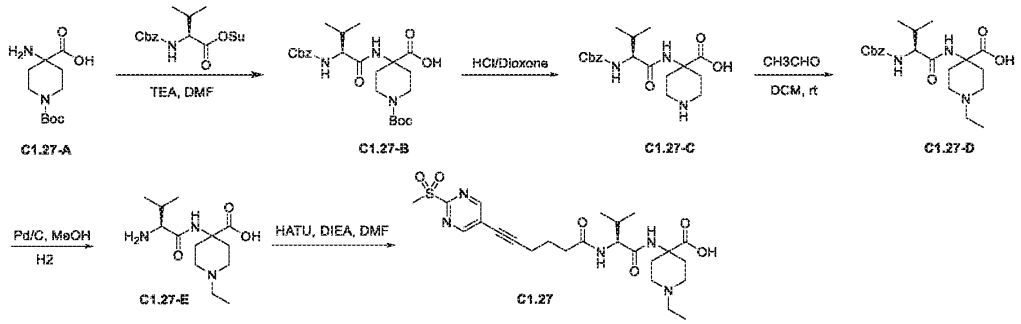
步骤三：

将化合物 6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸 (1.0 g) 溶于 N, N-二甲基甲酰胺 (15 mL), 然后依次加入 N,N-二异丙基乙胺 (1.2 g)，HATU (1.4 g)，反应搅拌 30 分钟，然后加入化合物 C1.26-B (1.3 g)，反应液室温搅拌 1 小时， LCMS 检测反应完成后，反应液，反应液直接经制备色谱 (0.01% 三氟乙酸水溶液, 乙腈)纯化得到目标化合物 N^6,N^6-二丁基-N^2-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)- L-缬氨酸)-L-赖氨酸（C1.26，500 mg）为黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 608.7；

1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.37 (s, 1H), 9.13 (s, 2H), 8.19 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 4.25 – 4.20 (m, 1H), 4.20 – 4.13 (m, 1H), 3.42 (s, 3H), 3.06 – 2.99 (m, 6H), 2.57 – 2.53 (m, 2H), 2.41 – 2.30 (m, 2H), 1.99 – 1.95 (m, 2H), 1.87 – 1.79 (m, 2H), 1.78 – 1.71 (m, 1H), 1.62 – 1.56 (m, 4H), 1.34 – 1.32 (m, 8H), 0.94 – 0.85 (m, 12H)。

实施例 C1.27：(S)-1-乙基-4-(3-甲基-2-(6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺基)丁酰胺基)哌啶-4-羧酸



步骤一：

将化合物 C1.27-A（5.0 g，20.49 mmol）溶在 DMF（100 mL）中，向反应液中加入 N-((苄氧基)羰基)-L-缬氨酸 2,5-二氧吡咯烷-N-羟基酯（7.13 g，20.49 mmol），100℃下搅拌反应 48 小时。LCMS 显示反应完全。反应液用 C18 柱反向分离纯化(乙腈比 0.05%的甲酸水溶液: 5%到 55%)得到目标化合物 C1.27-B (1.3 g, 收率 13.3%)为黄色固体。

LCMS (ESI) $[M-boc]^+$ = 378.2；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.38 – 7.33 (m, 5H), 7.32 – 7.27 (m, 1H), 7.20 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 5.14 – 5.02 (m, 2H), 3.97 – 3.87 (m, 1H), 3.70 – 3.59 (m, 2H), 3.08 – 2.95 (m, 2H), 2.04 – 1.97 (m, 1H), 1.95 – 1.87 (m, 2H), 1.76 – 1.69 (m, 2H), 1.40 (s, 9H), 0.91 – 0.84 (m, 6H)。

步骤二：

室温下，将化合物 C1.27-B（1.3 g，2.71 mmol）溶于乙酸乙酯中（10 mL）溶液中，然后向反应

液中加入二氧六环-HCl（3N，10 mL），室温下搅拌反应 1 小时。LCMS 显示反应完成。将反应液减压浓缩得到目标化合物 C1.27-C（1.06 g, 收率 94.4%)为黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 378.4。

步骤三：

将化合物 C1.27-C（1.06 g，2.81mmol）溶在二氯甲烷（10 mL）中，向反应液中加入乙醛（0.75 g，16.87 mmol），室温下搅拌反应 10 分钟，再向反应液中发批次加入三乙酰氧基硼氢化钠（3g，14.05 mmol），反应在室温下搅拌反应 1 小时。LCMS 显示反应完全。向反应液中加入氯化铵饱和水溶液搅拌一个小时，减压蒸馏除去二氯甲烷，剩余水相经反相分离（乙腈比 0.05%的甲酸水溶液: 5%到 55%)得到目标化合物 C1.27-D (1.13 g, 收率 99.23%)为白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 406.1；

1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.42 – 7.25 (m, 5H), 5.22 – 5.06 (m, 2H), 3.91 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 3.52 – 3.36 (m, 2H), 3.25 – 2.93 (m, 4H), 2.66 – 2.54 (m, 1H), 2.47 – 2.36 (m, 1H), 2.27 – 2.14 (m, 2H), 2.13 – 2.06 (m, 1H), 1.35 – 1.29 (m, 4H), 0.98 – 0.90 (m, 6H)。

步骤四：

室温下，将化合物 C1.27-D（1.13 g，2.78 mmol）溶于甲醇（20 mL）溶液中，然后向反应液中加入 Pd/C（0.5 g），氢气下搅拌反应 12 小时。LCMS 显示反应完成。将反应液过滤，滤液减压浓缩得到目标化合物 C1.27-E （0.58 g, 收率 76.18%)为白色固体。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 272.4。

步骤五：

将化合物 6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸（1 g, 3.73mmol)， 溶于 N, N-二甲基甲酰胺（5 mL), 然后依次加入 N,N-二异丙基乙胺（1.2 g, 9.32 mmol)，HATU (1.42 g, 3.73 mmol)，反应液搅拌 30 分钟，然后加入化合物 C1.27-E (1.01 g，3.73 mmol)，反应液室温搅拌 1 小时， LCMS 检测反应完成后，反应液直接经制备色谱（0.01% 三氟乙酸水溶液，乙腈)纯化得到目标化合物(S)-1-乙基-4-(3-甲基-2-(6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺基)丁酰胺基)哌啶-4-羧酸（C1.27，500 mg, 收率 28.7%）为黄色固体。

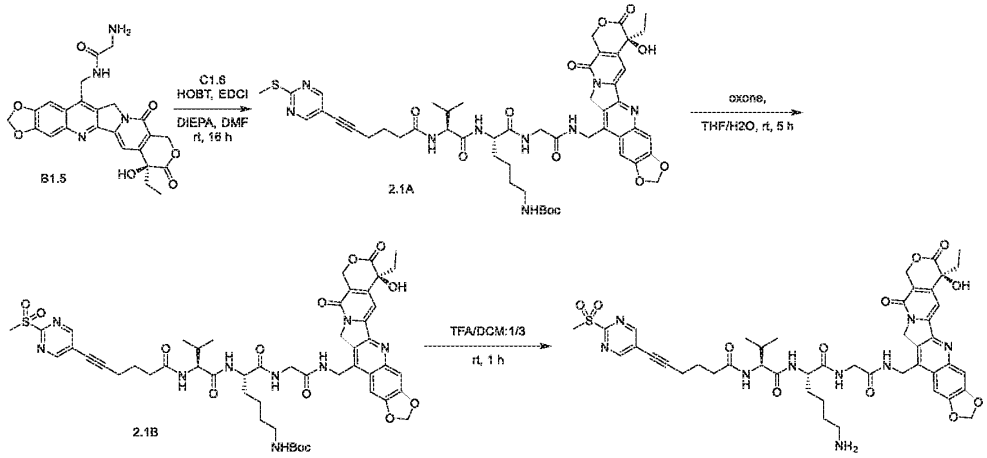
LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 522.5；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.12 (s, 2H), 8.08 (s, 1H), 7.88 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 4.28 – 4.25 (m, 1H), 3.41 (s, 3H), 2.89 – 2.78 (m, 2H), 2.57 – 2.52 (m, 4H), 2.45 – 2.30 (m, 4H), 2.07 – 2.01 (m, 2H), 1.99 – 1.96 (m, 1H), 1.95 – 1.88 (m, 2H), 1.85 – 1.79 (m, 2H), 1.04 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 0.88 – 0.83 (m, 6H)。

二、药物-连接体化合物合成

实施例 2.1：N-((S)-1-(((S)-6-氨基-1-((2-((((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧

代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 （DL-001）



步骤一：

将化合物 C1.6 (50 mg, 0.10 mol), 化合物 B1.5 (71 mg， 0.12 mol)， N,N-二异丙基乙胺 (39 mg, 0.30 mol) 溶于 DMF (5 mL)。然后依次加入 1-羟基苯并三唑(16 mg, 0.12 mmol)和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(23 mg, 0.12 mmol), 上述反应液室温搅拌 16 小时，加入 50mL 乙酸乙酯稀释，有机相用水洗涤三次（25mL x 3），无水硫酸钠干燥，浓缩除去乙酸乙酯得到粗品，粗产品用快硅胶柱层析分离纯化(DCM : MeOH = 100 : 0 到 90 : 10)得到目标化合物 2.1A，(62 mg，黄色固体，收率 58%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1024.8。

步骤二：

将化合物 2.1A (40 mg, 0.04 mmol)溶于四氢呋喃和水的混合溶液（体积比为 1/1；4 mL）中，加入过氧单磺酸钾(246 mg, 0.4 mmol)，反应液在室温下搅拌 5 小时，加入 30mL 乙酸乙酯稀释，有机相用水洗涤三次（25mL x 3），无水硫酸钠干燥，浓缩除去乙酸乙酯得到目标化合物 2.1B (30 mg，黄色固体,收率 74%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1055.9。

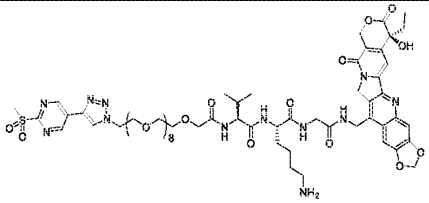
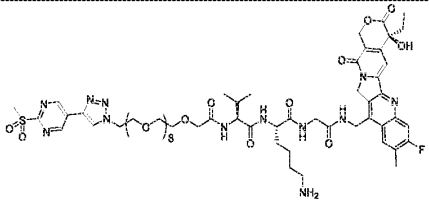
步骤三：

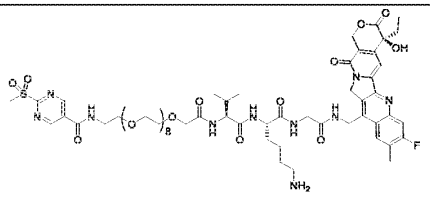
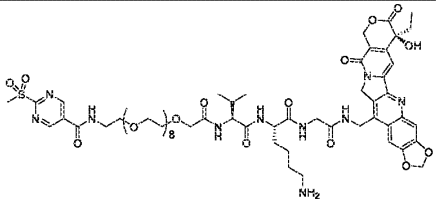
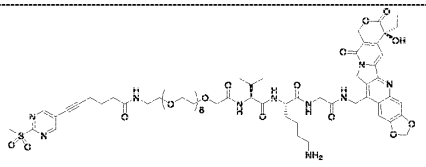
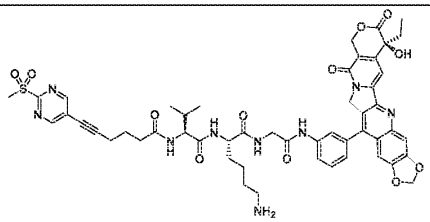
将化合物 2.1B (30 mg, 0.03 mmol) 溶于三氟乙酸和二氯甲烷混合溶液(体积比为 1：3；4 mL)中，反应液在室温下搅拌 1 小时。然后减压浓缩得粗产品，粗产品经制备色谱(0.01% TFAin water, MeCN)纯化得到目标化合物 N-((S)-1-(((S)-6-氨基-1-((2-((((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (9 mg, 白色固体，收率 33%)。

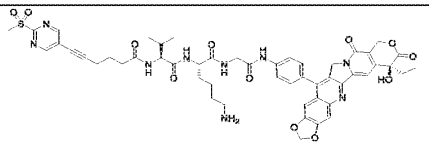
LCMS (ESI) $[M+H]^+$：955.8；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 9.09 (s, 2H), 8.54 (s, 1H), 8.15 (m, 2H), 7.84 (m, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.64 (br s, 3H), 7.53 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 6.30 (d, *J* = 2.9 Hz, 2H), 5.59 – 5.46 (m, 2H), 5.43 (s, 2H), 4.87 – 4.78 (m, 1H), 4.70 – 4.60 (m, 1H), 4.17 – 4.03 (m, 2H), 3.82 – 3.58 (m, 2H), 3.41 (s, 3H), 2.80 – 2.70 (m, 2H), 2.40 – 2.22 (m, 2H), 1.93 – 1.68 (m, 6H), 1.65 – 1.57 (m, 1H), 1.56 – 1.45 (m, 3H), 1.36 – 1.22 (m, 2H), 0.87 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.80 (d, *J* = 5.2 Hz, 6H)。

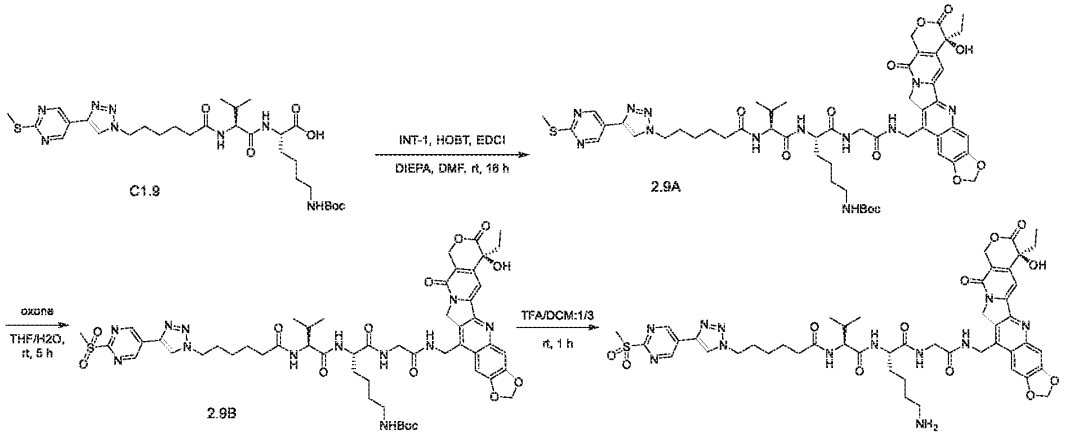
用实施例 2.1 相同的方法和反应条件，用所示的不同起始原料，得到下表中实施例 2.2 到实施例 2.8 所示的目标产物。

实施例	化合物	名称	(m/z): $[M+H]^+$
实施例 2.2	 DL-002 原料：C1.2，B1.5	N-((S)-1-(((S)-6-氨基-1-((2-((((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代-己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代-丁-2-基)-29-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂二十九烷酰胺	1366.9
实施例 2.3	 DL-003 原料：C1.2，B1.4	N-((S)-1-(((S)-6-氨基-1-((2-((((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-己)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-29-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂二十九烷酰胺	1354.9

实施例2.4	 DL-004 原料：C1.1，B1.4	N-((7S,10S)-7-(4-氨基丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)-10-异丙基-3,6,9,12-四氧代-14,17,20,23,26,29,32,35,38-九氧杂-2,5,8,11-四氮杂四十烷-40-基)-2-(甲磺酰基)嘧啶-5-甲酰胺	1330.9
实施例2.5	 DL-005 原料：C1.1，B1.5	N-((7S,10S)-7-(4-氨基丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3] 二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)- 10-异丙基-3,6,9,12-四氧代-14,17,20,23,26,29,32,35,38-九氧杂-2,5,8,11-四氮杂四十烷-40-基)-2-(甲磺酰基)嘧啶-5-甲酰胺	1342.8
实施例2.6	 DL-006 原料：C1.5，B1.5	N-((S)-1-(((S)-6-氨基-1-((2-((((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-29-(6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27-九氧杂二十九烷酰胺	1408.5
实施例2.7	 DL-007 原料：C1.7，B1.8	N-((S)-1-(((S)-6-氨基-1-((2-((3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3] 二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)苯基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-己)氨基)-3-甲基-1-氧代丁	1017.9

		-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔-酰胺	
实施例 2.8	 DL-008 原料：C1.7，B1.9	N-((S)-1-(((S)-6-氨基-1-((2-((4-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3] 二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)苯基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺	1017.8

实施例 2.9：(S)-6-氨基-N-(2-((((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺（DL-009）



步骤一：

将化合物 B1.5 (30 mg), 化合物 C1.9 (48 mg)， N,N-二异丙基乙胺 (23 mg) 溶于 DMF (5 mL)。向上述溶液中加入 1-羟基苯并三唑(9 mg)和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(13 mg)， 反应室温搅拌 16 小时， 加入 50mL 乙酸乙酯稀释，有机相用水洗涤三次（25mL x 3），无水硫酸钠干燥，浓缩除去乙酸乙酯得到粗品，粗产品用快速色谱法分离纯化(DCM : MeOH = 100 : 0 to 90 : 10)得到目标化合物 2.9A (35 mg，淡黄色固体，收率 43%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1095.8

步骤二：

将化合物 2.9A (35 mg)溶于四氢呋喃和水的混合溶液（体积比为 1/1；4 mL）中，加入过氧单磺酸钾(184 mg)，反应液室温下搅拌 5 小时，加入 30mL 乙酸乙酯稀释，有机相用水洗涤三次（25mL x 3），无水硫酸钠干燥，浓缩除去乙酸乙酯得到目标化合物 2.9B (25 mg，淡黄色固体，收率 71%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1126.9。

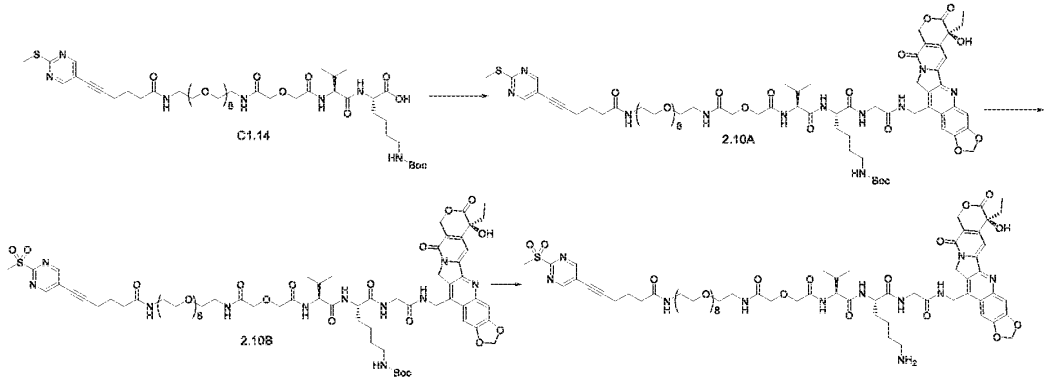
步骤三：

将化合物 2.9B (25 mg) 溶于三氟乙酸和二氯甲烷混合溶液(体积比为 1：3；4 mL)中，反应液在室温下搅拌 1 小时。液浓缩得粗产品，经 prep-HPLC (0.01% TFA in water, MeCN)纯化得到目标化合物(S)-6-氨基-N-(2-((((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺 三氟乙酸盐 (5.1 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1026.9；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.46 (s, 2H), 8.91 (s, 1H), 8.53 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 8.11 – 8.10 (m, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.73 – 7.72 (m, 1H), 7.63 (s, 3H), 7.53 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 6.29 (m, 2H), 5.61 – 5.46 (m, 2H), 5.43 (s, 2H), 4.85 – 4.83 (m, 1H), 4.63 – 4.60 (m 1H), 4.44 (s, 2H), 4.06 – 4.03 (m, 3H), 2.75 (s, 2H), 2.12 – 2.10 (m, 2H), 1.89 – 1.85 (m, 6H), 1.56 – 1.53 (m, 8H), 1.24 (br s, 4H), 0.87 – 0.84 (m, 3H), 0.77 (d, J = 6.1 Hz, 6H).

实施例 2.10：N-((7S,10S)-7-(4-氨基丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)-10-异丙基-3,6,9,12,16-五氧代-14,20,23,26,29,32,35,38,41-九氧杂-2,5,8,11,17-五氮杂四十三烷-43-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺（DL-010）



步骤一：

将化合物 C1.14（112 mg）溶在 N,N-二甲基甲酰胺 （2 mL）中，依次加入三乙胺（32 mg，0.31 mmol），1-羟基苯并三唑(17 mg，0.13 mmol)，1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (24 mg，0.13 mmol)，搅拌 20 分钟，然后将化合物 B1.5 (50 mg) 加入于反应液中，反应液在 40°C 下搅拌过夜。向反应液中加入 10 mL 水，二氯甲烷萃取，无水硫酸钠干燥，抽滤，旋干得到粗品。粗产品用 C18 柱反相分离纯化（乙腈/0.01%FA 的水溶液： 0%-55%）得到白色固体目标化合物 2.10A（75 mg，收率 46%）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1534.0。

步骤二：

将化合物 2.10A（75 mg）溶在四氢呋喃和水（8mL，1:1）溶液中，加入过氧单磺酸钾（211 mg）室温搅拌反应 10 小时。向反应液中加入 10 mL 二氯甲烷，萃取，分液，无水硫酸钠干燥，抽滤旋干得到目标产物 2.10B（50 mg，收率 65%）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1566.2。

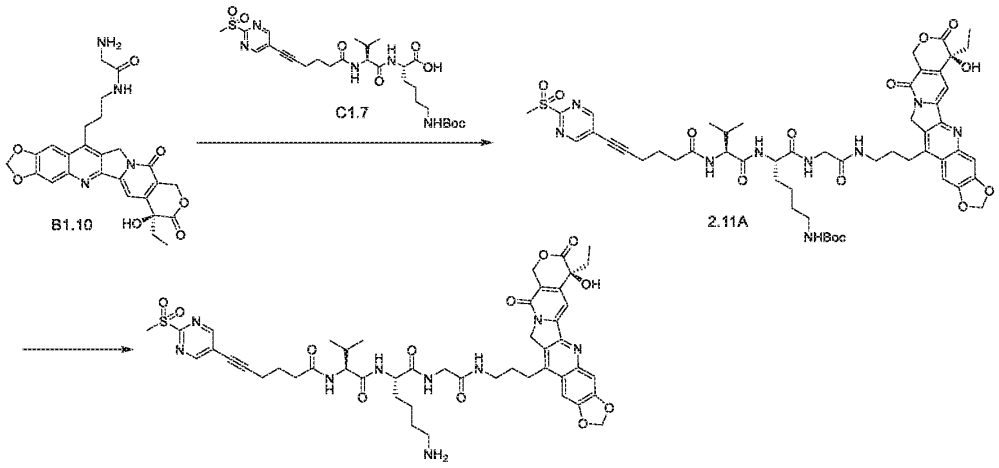
步骤三：

将化合物 2.10B（50 mg）溶在三氟乙酸和二氯甲烷混合溶液（体积比为 1：2；4 mL）中，然后反应液在室温下搅拌 1 小时。将反应液浓缩得粗产品，粗产品经制备色谱（0.01% TFAin water，MeCN）得到目标化合物 N-((7S,10S)-7-(4-氨基丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)-10-异丙基-3,6,9,12,16-五氧代-14,20,23,26,29,32,35,38,41-九氧杂-2,5,8,11,17-五氮杂四十三烷-43-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (10.5 mg，收率 21%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1466.9；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.12 (s, 2H), 8.62 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 8.26 – 8.11 (m, 2H), 8.03 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 7.93 (t, J = 5.3 Hz, 1H), 7.85 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.79 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 7.61 (s, 3H), 7.54 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.31 (d, J = 1.7 Hz, 2H), 5.46 (d, J = 17.2 Hz, 4H), 4.76 (dt, J = 14.8, 8.7 Hz, 2H), 4.20 – 4.15 (m, 4H), 4.00 (s, 3H), 3.95 (d, J = 5.5 Hz, 3H), 3.72 – 3.67 (m, 2H), 3.50 (d, J = 3.9 Hz, 30H), 3.41 (s, 3H), 3.25 – 3.19 (m, 4H), 2.76 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 2.56 (t, J = 4.9 Hz, 2H), 2.27 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.90 (dd, J = 16.1, 7.4 Hz, 2H), 1.84 – 1.78 (m, 2H), 1.63 (s, 1H), 1.53 – 1.48 (m, 2H), 1.30 (d, J = 7.7 Hz, 2H), 0.87 – 0.84 (m, 4H), 0.78 – 0.75 (m, 6H)。

实施例 2.11：N-((S)-1-(((S)-6-氨基-1-((2-((3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3] 二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺（DL-011）



步骤一：

向化合物 B1.10（75 mg）的 N,N-二甲基甲酰胺溶液（3 mL）中依次加入化合物 C1.7（107 mg），三乙胺（45 mg），HOBT（25 mg）和 EDCI（35 mg），在 35 ℃下反应 4 小时。向反应液中加入水（30 mL），乙酸乙酯（30 mL×2）萃取，有机相用无水硫酸钠干燥，浓缩得到目标化合物 2.11A（60 mg ，收率：37%）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1084；

步骤二：

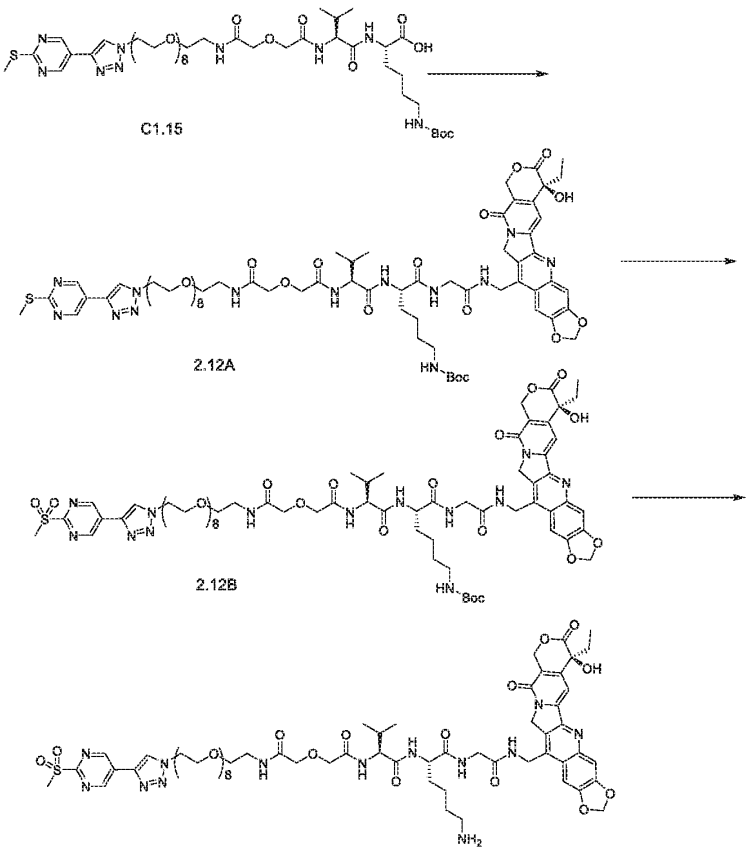
向化合物 2.11A（60 mg）的二氯甲烷溶液（4 mL）中加入三氟乙酸和二氯甲烷混合溶液（体积比为 1：2；4 mL），在室温下搅拌反应 1 小时。将反应液浓缩，粗品经高效液相制备纯化（乙腈/0.05%甲酸的水溶液）得到目标化合物 N-((S)-1-(((S)-6-氨基-1-((2-((3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3] 二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺（9 mg，收率 18%）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：983.9；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.08 (s, 2H), 8.34 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 8.19 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 8.00 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.49 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.28 (d, J = 1.9 Hz, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.24 (s, 2H), 4.25 – 4.07 (m, 2H), 3.74 – 3.70 (m, 3H), 3.25 (d, J = 12.4 Hz, 3H), 3.08 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 2.73 (s, 2H), 2.40 – 2.19 (m, 3H), 2.01 – 1.64 (m, 10H), 1.52 (br s, 4H), 1.34 (br s, 2H), 0.87 (t, J = 7.3 Hz, 3H), 0.83 – 0.75 (m, 6H)。

实施例 2.12：(S)-6-氨基-N-(2-((((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3] 二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-2-异丙基-35-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-4,8-二氧代-6,12,15,18,21,24,27,30,33-九氧杂-3,9-二氮

杂三十五酰胺)己酰胺（DL-012）



步骤一：

将化合物 C1.15（80 mg），化合物 B1.5（37 mg），三乙胺 (23 mg，0.231 mo,) 溶于 DMF (5 mL)。然后再加入 1-羟基苯并三唑(12 mg)和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(17 mg)，反应液室温搅拌 16 小时，加入 50mL 乙酸乙酯稀释，有机相用水洗涤三次（25mL x 3），无水硫酸钠干燥，浓缩除去乙酸乙酯得到粗品，粗产品用快速色谱法分离纯化(DCM :MeOH = 100 : 0 到 90 : 10)得到目标化合物 2.12A (75 mg，收率 65%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1492.0。

步骤二：

将化合物 2.12A (50 mg)溶于四氢呋喃和水的混合溶液（体积比为 1/1；4 mL）中，加入过氧单磺酸钾(202 mg)，反应液在室温下搅拌 5 小时，加入 30mL 乙酸乙酯稀释，有机相用水洗涤三次（25mL x 3），无水硫酸钠干燥，浓缩除去乙酸乙酯得到目标化合物 2.12B (40 mg，收率 80%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1524.1。

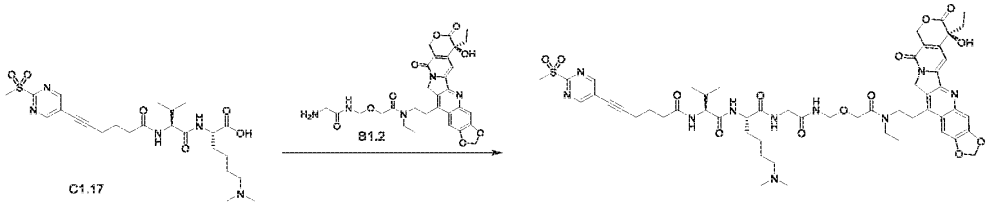
步骤三：

将化合物 2.12B (30 mg)溶在三氟乙酸和二氯甲烷混合溶液(体积比为 1 比 3；4 mL)中,然后反应液

在室温下搅拌 1 小时。将反应液浓缩得粗产品，粗产品经 prep-HPLC(水含 0.01% 三氟乙酸, 乙腈)纯化得到目标化合物(S)-6-氨基-N-(2-((((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3] 二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-2-异丙基-35-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-4,8-二氧代-6,12,15,18,21,24,27,30,33-九氧杂-3,9-二氮杂三十五酰胺)己酰胺 (9 mg, 收率 30%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1423.9。

实施例 2.13：N-((13S,16S)-13-(4-(二甲基氨基)丁基)-3-乙基-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)-17-甲基-4,9,12,15-四氧代-6-氧杂-3,8,11,14-四氮杂十八烷-16-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺（DL-013）

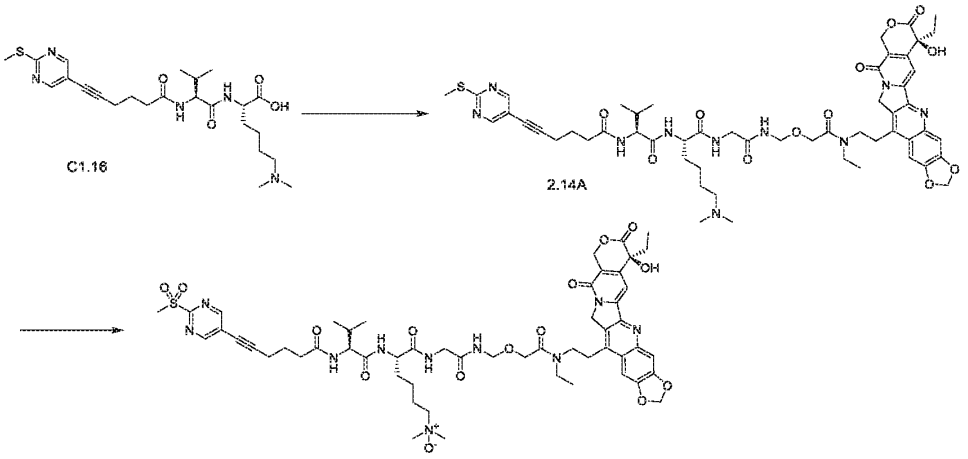


将化合物 C1.17 (50 mg), 化合物 B1.2 (58 mg)，三乙胺 (24 mg) 溶于 N, N-二甲基甲酰胺 (2 mL)。然后依次加入 1-羟基苯并三唑(16 mg)和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(22 mg)，反应液室温搅拌 16 小时。反应液直接经制备色谱(0.01% 甲酸水溶液, 乙腈)纯化得到目标化合物（21 mg, 收率 10%）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1113.0；

^{1}H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.93 (s, 2H), 8.40 – 8.33 (m, 1H), 8.30 – 8.25 (m, 1H), 8.25 – 8.21 (m, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.34 (s, 1H), 6.22 (s, 2H), 5.47 (dd, J = 78.6, 16.4 Hz, 2H), 5.28 – 5.13 (m, 2H), 4.73 – 4.59 (m, 2H), 4.30 – 4.05 (m, 4H), 3.94 – 3.82 (m, 2H), 3.70 – 3.57 (m, 2H), 3.54 – 3.44 (m, 1H), 3.34 (s, 6H), 3.16 – 3.08 (m, 2H), 2.90 (s, 6H), 2.58 – 2.40 (m, 4H), 2.04 – 1.83 (m, 6H), 1.80 – 1.68 (m, 3H), 1.54 – 1.36 (m, 2H), 1.24 – 1.15 (m, 3H), 1.03 – 0.86 (m, 9H)。

实施例 2.14： N-((13S,16S)-13-(4-(N-氧代-N,N-二甲基氨基)丁基)-3-乙基-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)-17-甲基-4,9,12,15-四氧代-6-氧杂-3,8,11,14-四氮杂十八烷-16-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺（DL-014）



步骤一：

将化合物 C1.16 (49 mg), 化合物 B1.2 (71 mg)， N,N-二异丙基乙胺 (39 mg) 溶于 DMF (5 mL)。然后依次加入 1-羟基苯并三唑(16 mg)和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(23 mg), 加完后反应液室温搅拌 16 小时，加入 50mL 乙酸乙酯稀释，有机相用水洗涤三次（25mL x 3），无水硫酸钠干燥，浓缩除去乙酸乙酯得到粗品，粗产品用快硅胶柱层析分离纯化(DCM：MeOH = 100：0 到 90：10)得到目标化合物 2.14A (61 mg，收率 60%)。

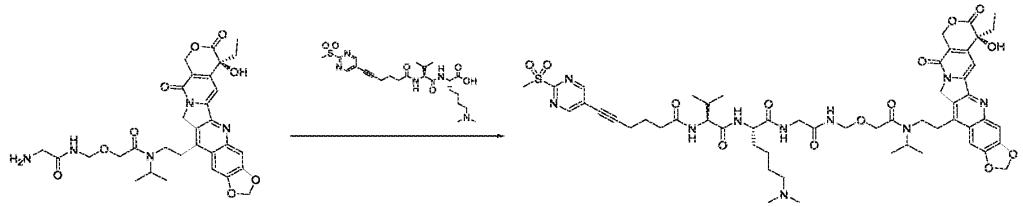
LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1081.6；

步骤二：

将化合物 2.14A (40 mg)溶于四氢呋喃和水的混合溶液（体积比为 1/1；4 mL）中，加入过氧单磺酸钾(227 mg, 0.37 mmol)，反应液在室温下搅拌 5 小时，LCMS 显示反应完毕, 加入 30mL 乙酸乙酯稀释，有机相用水洗涤三次（25mL x 3），无水硫酸钠干燥，浓缩除去乙酸乙酯得到粗品化合物 ，粗产品经制备色谱(0.01% 甲酸水溶液, 乙腈)纯化得到目标化合物 N-((13S,16S)-13-(4-(N-氧代-N,N-二甲基氨基)丁基)-3-乙基-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)-17-甲基-4,9,12,15-四氧代-6-氧杂-3,8,11,14-四氮杂十八烷-16-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (9 mg, 收率 33%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1129.0。

实施例 2.15： N-((13S,16S)-13-(4-(N,N-二甲基氨基)丁基)-3-异丙基-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)-17-甲基-4,9,12,15-四氧代-6-氧杂-3,8,11,14-四氮杂十八烷-16-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺（DL-015）

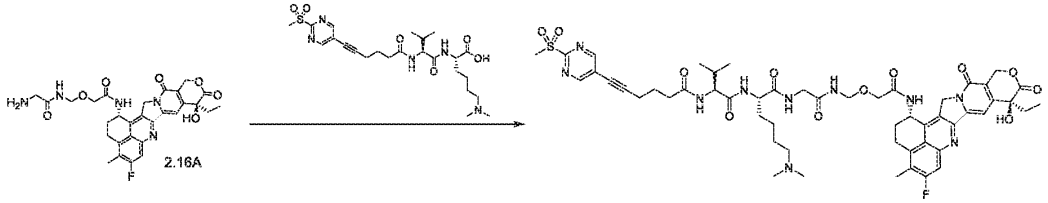


向化合物N^6,N^6-二甲基-N^2-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸（42 mg，C1.17）和化合物(S)-2-((2-氨基乙酰胺基)甲氧基)-N-异丙基-N-(2-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)乙酰胺（50 mg，B1.11），的N,N-二甲基甲酰胺（10 mL）溶液中，依次加入HBTU（31 mg）和二异丙基乙胺（21 mg）。反应在室温下搅拌2小时。反应液过滤后经高效液相制备纯化（乙腈/水含0.05%三氟乙酸）得到目标化合物 N-((13S,16S)-13-(4-(N,N-二甲基氨基)丁基)-3-异丙基-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)-17-甲基-4,9,12,15-四氧代-6-氧杂-3,8,11,14-四氮杂十八烷-16-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺（15.2 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1127.6；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.10 (s, 2H), 8.73 (t, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.23 – 8.17 (m, 1H), 8.10 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.97 – 7.93 (m, 2H), 7.52 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.30 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.36 (s, 2H), 4.66 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 4.33 – 4.21 (m, 4H), 4.20 – 4.13 (m, 2H), 3.76 – 3.74 (m, 2H), 3.40 (s, 3H), 3.40 – 3.38 (m, 1H), 3.30 – 3.21 (m, 2H), 3.04 – 2.95 (m, 2H), 2.76 (s, 3H), 2.74 (s, 3H), 2.39 – 2.31 (m, 2H), 2.00 – 1.74 (m, 6H), 1.68 – 1.49 (m, 4H), 1.37 – 1.27 (m, 2H), 1.23 – 1.16 (m, 6H), 0.89 – 0.82 (m, 9H)。

实施例2.16： N-((10S,13S)-10-(4-(N,N-二甲基氨基)丁基)-1-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de] 吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-14-甲基-1,6,9,12-四氧代-3-氧杂-5,8,11-三氮杂十五烷-13-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺（DL-016）



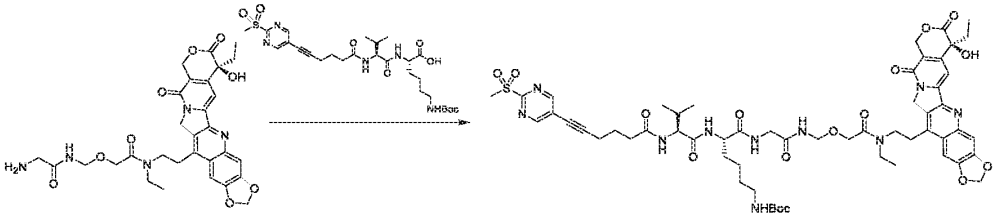
将化合物N6，N6-二甲基-N2-（(6-（2-（甲磺酰基）嘧啶-5-基）十六烷基-5-炔酰基）-L-丙酰基）-L-赖氨酸 (C1.17，52.3 mg) 溶于N, N-二甲基甲酰胺 (2 mL)，然后再依次加入HBTU（38 mg, 0.10 mmol）和N,N-二异丙基乙胺（26 mg, 0.20 mmol），加完后反应液室温搅拌30分钟，然后加入化合物2-氨基-N-((2-(((1S，9S）-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H，12H-苯

并[de]吡喃并[3'，4'：6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-1-基）氨基）-2-氧代乙氧基）甲基）乙酰胺（2.16A，根据CN104755494A中第147-148页报道的相同方法制备的，63 mg), LCMS检测反应完成后，反应液直接经制备色谱(0.01% 三氟乙酸水溶液，乙腈)纯化得到目标化合物N-((10S,13S)-10-(4-(N,N-二甲基氨基)丁基)-1-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de] 吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-14-甲基-1,6,9,12-四氧代-3-氧杂-5,8,11-三氮杂十五烷-13-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺（8.1 mg，收率 7%）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1085.5；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.31 (s, 1H), 9.11 (s, 2H), 8.72 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H), 8.51 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.19 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H), 8.10 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 7.91 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.63 – 5.54 (m, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.20 (s, 2H), 4.68 – 4.58 (m, 2H), 4.26 – 4.12 (m, 2H), 4.01 (s, 2H), 3.73 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H), 3.20 – 3.10 (m, 2H), 3.05 – 2.95 (m, 2H), 2.76 (d, *J* = 4.7 Hz, 6H), 2.55 – 2.53 (m, 2H), 2.42 – 2.28 (m, 6H), 2.21 – 2.13 (m, 2H), 2.02 – 1.77 (m, 6H), 1.76 – 1.62 (m, 2H), 1.62 – 1.51 (m, 3H), 1.37 – 1.21 (m, 2H), 0.90 – 0.80 (m, 9H)。

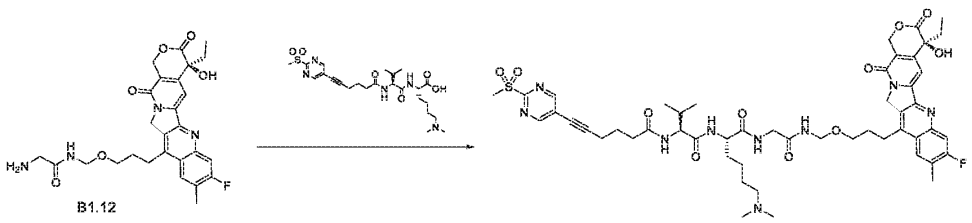
实施例 2.17： 叔丁基 ((S)-3-乙基-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)-13-((S)-3-甲基-2-(6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺基)丁酰胺基)-4,9,12-三氧代-6-氧杂-3,8,11-三氮杂十七烷-17-基)氨基甲酸酯（DL-017）



将化合物C1.7（90.0 mg），二异丙基乙胺（68.0 mg）和HATU（100 mg）溶于N,N-二甲基甲酰胺（5 mL）中。随后加入化合物B1.2（80 mg），室温下反应2小时。LCMS检测反应完全。向反应液中加入乙酸乙酯（50 mL），用饱和食盐水（30 mL X 3）洗涤，无水硫酸钠干燥，抽滤，滤液减压浓缩成固体，粗产品经高效液相制备纯化（乙腈/水含0.05%甲酸）得到黄色固体化合物叔丁基 ((S)-3-乙基-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)-13-((S)-3-甲基-2-(6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺基)丁酰胺基)-4,9,12-三氧代-6-氧杂-3,8,11-三氮杂十七烷-17-基)氨基甲酸酯（2.06 mg，收率 10.6%）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1184.9。

实施例 2.18： N-((11S,14S)-11-(4-(二甲基氨基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺（DL-018）

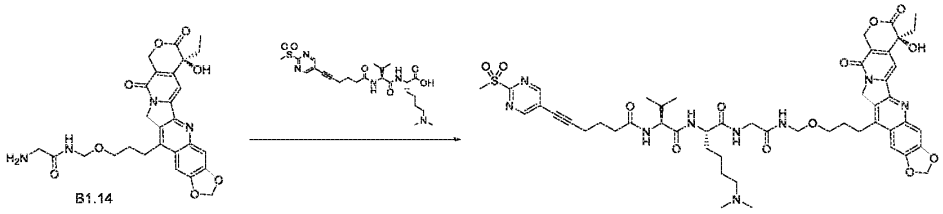


将化合物N^6,N^6-二甲基-N^2-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸（126 mg）（C1.17），B1.12（150 mg），1-羟基苯并三唑（49 mg）， 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐（69 mg）和二异丙基乙胺（156 mg, 1.21 mmol）溶在 N,N-二甲基甲酰胺（10 mL）溶液中，反应在 40 °C 下搅拌 12 小时。LCMS 显示反应完成。反应液过滤经高效液相制备纯化（乙腈/水含 0.05%甲酸）得到黄色固体化合物 N-((11S,14S)-11-(4-(二甲基氨基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺（DL-018）（12 mg，收率 6.0%）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1030.6；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.10 (s, 2H), 8.62 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 8.23 – 8.13 (m, 2H), 8.07 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.95 – 7.83 (m, 2H), 7.31 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.29 (s, 2H), 4.64 – 4.53 (m, 2H), 4.28 – 4.20 (m, 1H), 4.19 – 4.11 (m, 1H), 3.76 – 3.69 (m, 2H), 3.50 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.23 – 3.19 (m, 2H), 2.67 – 2.62 (m, 2H), 2.57 – 2.54 (m, 2H), 2.54 (s, 3H), 2.42 – 2.26 (m, 3H), 2.02 – 1.77 (m, 6H), 1.68 – 1.66 (m, 1H), 1.58 – 1.45 (m, 3H), 1.36 – 1.25 (m, 2H), 0.88 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H), 0.82 (t, *J* = 6.3 Hz, 6H)。

实施例 2.19： N-((11S,14S)-11-(4-(二甲基氨基)丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺（DL-019）



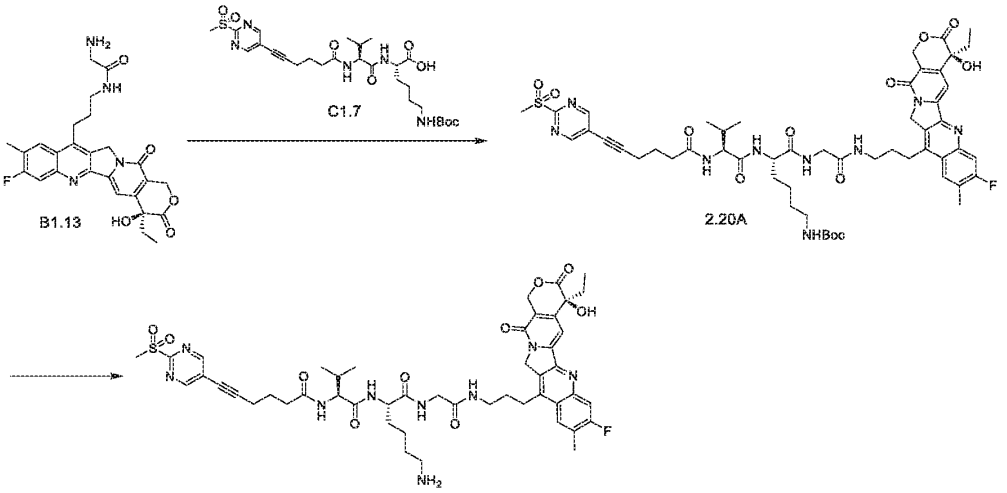
将化合物 B1.14 (100 mg, 0.186 mmol), 化合物 N^6,N^6-二甲基-N^2-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸 (100 mg， 0.191 mmol) 溶于 DMF (2 mL)。然后再加入 1-羟基苯并三唑 (38 mg, 0.280 mmol)和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(53 mg, 0.280 mmol), 然后再加入三乙胺 (56 mg, 0.559mmol) 加完后反应液室温搅拌 16 小时， LCMS 检测反应完成后，将反应液经制备色谱(0.01% TFA in water, MeCN)纯化得到目标化合物 N-((11S,14S)-11-(4-(二甲基氨基)丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并

[1,2-b]喹啉-14-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (20 mg, 收率 10%)为黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1042.5;

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.28 (s, 1H, TFA), 9.10 (s, 2H), 8.64 (br s, 1H), 8.19 (br s, 1H), 8.09 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 5.24 (s, 2H), 4.67 – 4.52 (m, 2H), 4.30 – 4.10 (m, 2H), 3.74 (br s, 2H), 3.50 (br s, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.17 – 3.07 (m, 2H), 3.04 – 2.91 (m, 2H), 2.75 (s, 6H), 2.46 – 2.24 (m, 3H), 2.04 – 1.66 (m, 9H), 1.63 – 1.46 (m, 3H), 1.32 – 1.29 (m, 2H), 0.87 – 0.82 (m, 9H)。

实施例 2.20：N-((S)-1-(((S)-6-氨基-1-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺（DL-020）



步骤一：

向化合物 B1.13（75 mg）的 N,N-二甲基甲酰胺溶液（3 mL）中依次加入化合物 C1.7（107 mg），三乙胺（45 mg），HOBT（25 mg）和 EDCI（35 mg），在 35 ℃下反应 4 小时。向反应液中加入水（30 mL），乙酸乙酯（30 mL×2）萃取，有机相用无水硫酸钠干燥，浓缩得到目标化合物 2.20A（76 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1072.5；

步骤二：

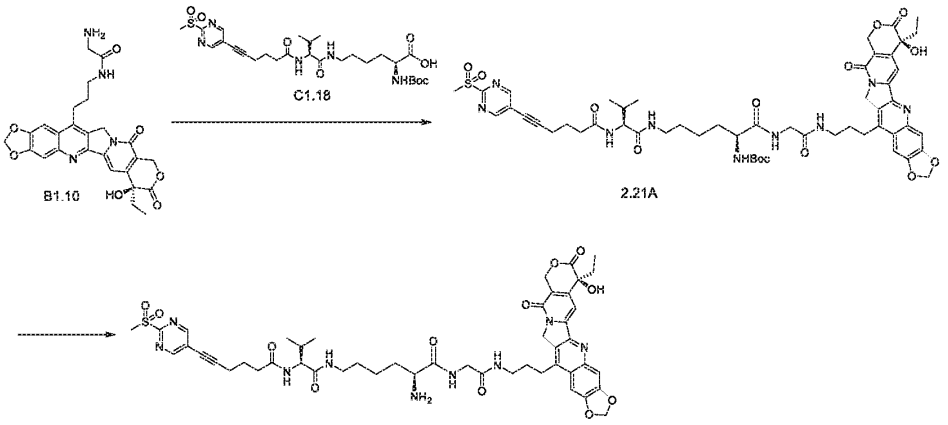
向化合物 2.20A（60 mg， 0.06 mmol）的二氯甲烷溶液（2 mL）中，加入三氟乙酸（1 mL），在室温下搅拌反应 1 小时。LCMS 显示反应完全。将反应液浓缩，经制备色谱(0.01% TFA in water, MeCN)纯化得到目标化合物 N-((S)-1-(((S)-6-氨基-1-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺（43 mg，收率 80%）为黄色

固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ ：972.9；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.09 (s, 2H), 8.24 – 8.17 (m, 2H), 8.12 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.99 – 7.93 (m, 1H), 7.88 – 7.84 (m, 2H), 7.64 (s, 3H, NH2-TFA), 7.31 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.30 (s, 2H), 4.25 – 4.18 (m, 1H), 4.15 – 4.11 (m, 1H), 3.76 – 3.71 (m, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.32 – 3.26 (m, 2H), 3.21 – 3.17 (m, 1H), 2.79 – 2.70 (m, 2H), 2.52 (s, 3H), 2.40 – 2.24 (m, 3H), 1.94 – 1.82 (m, 7H), 1.80 – 1.73 (m, 2H), 1.58 – 1.49 (m, 3H), 1.36 – 1.31 (m, 1H), 1.18 – 1.14 (m, 1H), 0.87 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H), 0.80 – 0.76 (m, 6H)。

实施例 2.21：N-((S)-1-(((S)-5-氨基-6-((2-((3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3] 二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-6-氧代己基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺



步骤一：

将化合物 C1.18（430 mg）溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (5 mL)中，然后加入 EDCI（160 mg），HOBT (115 mg)和三乙胺 （214 mg）。加完毕后反应液室温搅拌 20 分钟，然后加入化合物 B1.10（314 mg），室温搅拌反应 3 小时，LCMS 检测反应完全，加水稀释，乙酸乙酯萃取，有机相浓缩的粗品 2.21A（350 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1084.3；

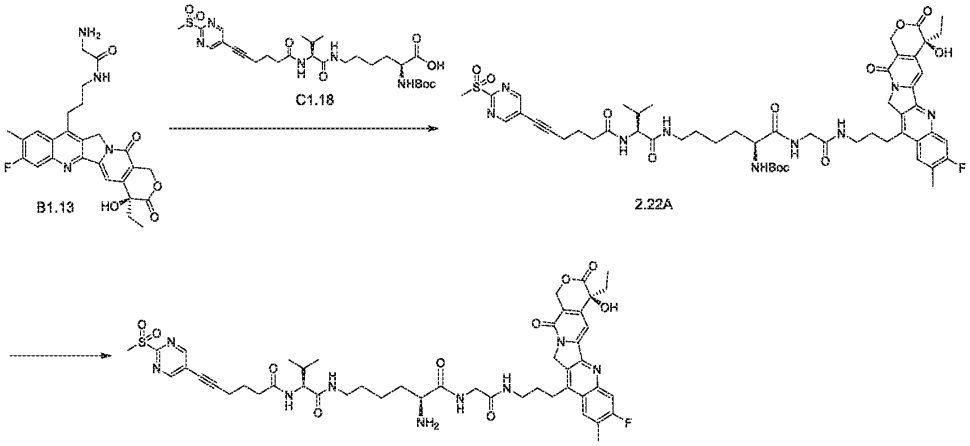
步骤二：

向化合物 2.21A（350 mg）的二氯甲烷溶液（4 mL）中加入三氟乙酸和二氯甲烷混合溶液（体积比为 1：2；4 mL），在室温下搅拌反应 1 小时。将反应液浓缩，粗品经高效液相制备纯化（乙腈/ 0.05% 甲酸的水溶液）得到目标化合物 N-((S)-1-(((S)-5-氨基-6-((2-((3-((S)-7- 乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-6-氧代己基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺（100 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：984.4；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.10 (s, 2H), 8.69 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H), 8.14 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 8.08 (s, 3H, NH2-TFA), 7.95 (t, *J* = 4.9 Hz, 1H), 7.89 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.25 (s, 2H), 4.09 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), 3.83 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.40 (s, 3H), 3.33 – 3.27 (m, 2H), 3.15 – 3.06 (m, 3H), 2.97 – 2.94 (m, 1H), 2.57 – 2.53 (m, 2H), 2.43 – 2.28 (m, 3H), 1.95 – 1.68 (m, 9H), 1.46 – 1.28 (m, 4H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.82 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H)。

实施例 2.22：N-((S)-1-(((S)-5-氨基-6-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基) 丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-6-氧代己基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 DL-022）



步骤一：

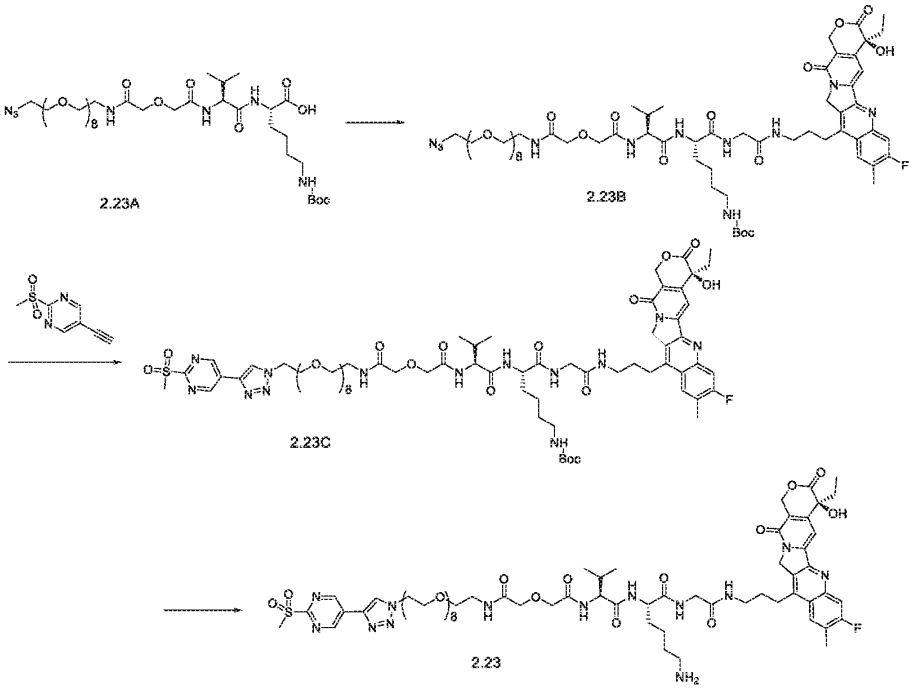
将化合物 C1.18（136 mg，0.23 mmol）溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (5 mL)中，然后加入 EDCI（48 mg，0.25 mmol），HOBT (34 mg, 0.25 mmol)和三乙胺 （64 mg, 0.63 mmol）。加完毕后反应液室温搅拌 20 分钟，然后加入化合物 B1.13（3105 mg，0.19 mmol），室温搅拌反应 3 小时，LCMS 检测反应完全，加水稀释，乙酸乙酯萃取，有机相浓缩的粗品。所得化合物溶于二氯甲烷（4 mL）中， 然后加入三氟乙酸 （2 mL），反应 1 小时后，浓缩，粗品经制备提纯得目标化合物 N-((S)-1-(((S)-5-氨基-6-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基) 丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-6-氧代己基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 （DL-022）（88 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 972.9；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.10 (s, 2H), 8.72 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 8.23 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.17 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 8.11 (s, 3H, NH2-TFA), 7.97 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.93 – 7.86 (m, 2H), 7.32 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.29 (s, 2H), 4.14 – 4.02 (m, 2H), 3.85 – 3.83 (m, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.32 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 3.24 – 3.16 (m, 2H), 3.11 – 2.94 (m, 2H), 2.55 (s, 3H), 2.35 – 2.30 (m, 3H), 1.92 – 1.69 (m, 10H), 1.43 –

1.29 (m, 4H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.82 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H)。

实施例 2.23：(S)-6-氨基-N-(2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基) 丙基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-2-异丙基-35-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-4,8-二氧代-6,12,15,18,21,24,27,30,33-九氧杂-3,9-二氮杂三十五烷酰胺基)己酰胺（DL-023）



步骤一：

向化合物 B1.13（46 mg）的 N,N-二甲基甲酰胺溶液（3 mL）中依次加入化合物 2.23A（100 mg），三乙胺（50 ul），HOBT（16 mg）和 EDCI（23 mg），在 35 ℃下反应 4 小时。向反应液中加入水（30 mL），乙酸乙酯（30 mL×2）萃取，有机相用无水硫酸钠干燥，浓缩得到目标化合物 2.23B（105 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：1358.4；

步骤二：

化合物 2.23B （105 mg），2-甲磺酰基-5-乙炔基嘧啶（45 mg）溶于 DMSO-水（2 ml，4:1）中，向混合物中加入溴化亚铜（50mg）。反应液室温下搅拌 2 小时，然后加入乙酸乙酯（100ml），水洗（100ml x 3），干燥后减压除去有机溶剂，粗产物用硅胶柱层析分离得到目标产物 2.23C（84m mg），MS (*m/z*): 1540.8 $[M + H]^+$；

步骤三：

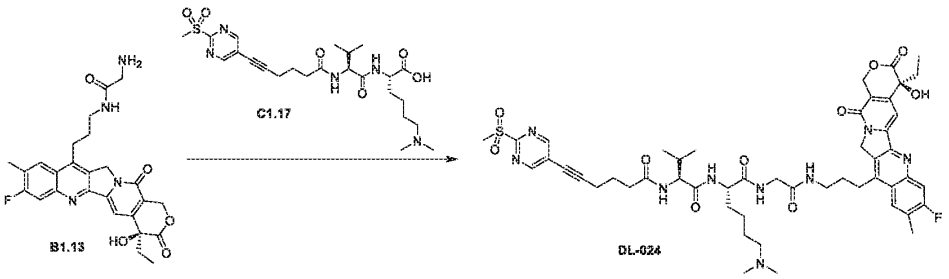
将化合物 2.23C 溶在三氟乙酸和二氯甲烷混合溶液（体积比为 1：2；4 mL）中，然后反应液在室

温下搅拌 30 分钟。LCMS 显示反应完成。将反应液浓缩得粗产品，粗产品经制备色谱（0.01% TFA in water, MeCN）得到目标化合物(S)-6-氨基-N-(2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基) 丙基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-2-异丙基-35-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-4,8-二氧代-6,12,15,18,21,24,27,30,33-九氧杂-3,9-二氮杂三十五烷酰胺基)己酰胺（DL-023, 8 mg，三氟乙酸盐，收率 5%)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1440.8;

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.49 (s, 2H), 8.91 (s, 1H), 8.24 – 8.18 (m, 3H), 8.01 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.96 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 7.90 – 7.84 (m, 2H), 7.63 (s, 3H, TFA salt), 7.32 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.30 (s, 2H), 4.66 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H), 4.21 (dd, *J* = 15.2, 7.9 Hz, 2H), 3.97 (s, 2H), 3.93 (s, 2H), 3.89 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H), 3.75 – 3.72 (m, 2H), 3.56 – 3.54 (m, 2H), 3.54 – 3.38 (m, 30H), 3.33 – 3.13 (m, 5H), 2.75 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.52 (s, 3H), 2.02 – 1.94 (m, 1H), 1.91 – 1.81 (m, 3H), 1.71 – 1.65 (m, 1H), 1.58 – 1.46 (m, 3H), 1.38 – 1.29 (m, 2H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.81 – 0.75 (m, 6H)。

实施例 2.24：N-((S)-1-(((S)-6-(二甲基氨基)-1-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺（DL-024）



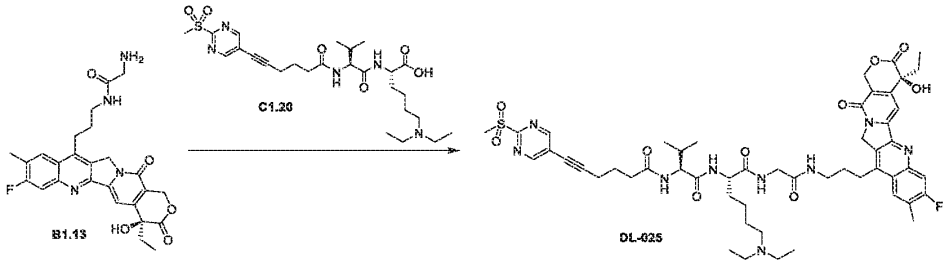
向化合物 B1.13（40 mg，0.081 mmol）和化合物 C1.17（42 mg，0.081mmol）的 N,N-二甲基甲酰胺溶液（2 mL）溶解中依次加入 PyBOP（41 mg，0.081），DIPEA（20 mg，0.16 mmol），反应液在室温下搅拌 2 小时。LCMS 显示反应完全。反应液经高效液相制备纯化（乙腈/ 0.05%三氟乙酸的水溶液）得到化合物 N-((S)-1-(((S)-6-(二甲基氨基)-1-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺（11.54 mg，收率 14%）为黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ =1000.6;

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.42 (s, 1H), 9.08 (s, 2H), 8.27 – 8.18 (m, 2H), 8.14 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 7.96 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H), 7.91 – 7.77 (m, 2H), 7.31 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.29 (s, 2H), 4.15 – 4.12 (m, 1H),

3.81 – 3.65 (m, 3H), 3.41 (s, 3H), 3.33 – 3.25 (m, 2H), 3.22 – 3.15 (m, 2H), 3.03 – 2.95 (m, 2H), 2.77 – 2.71 (m, 6H), 2.38 – 2.23 (m, 3H), 1.92 – 1.81 (m, 7H), 1.78 – 1.73 (m, 2H), 1.62 – 1.56 (m, 3H), 1.38 – 1.29 (m, 2H), 0.92 – 0.84 (m, 3H), 0.84 – 0.72 (m, 6H)。

实施例 2.25：N-((S)-1-(((S)-6-(二乙基氨基)-1-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺（DL-025）

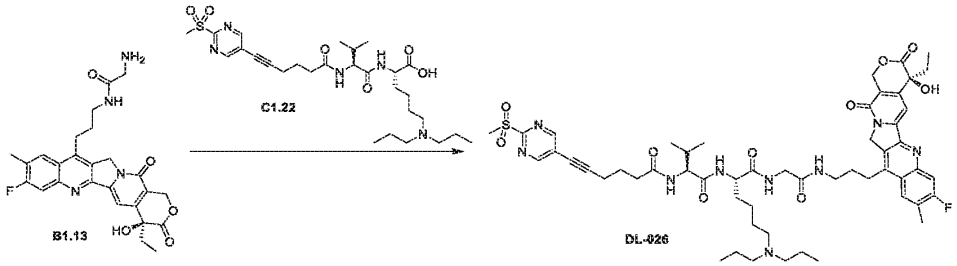


将化合物 C1.20 (30 mg, 0.054 mmol)，化合物 B1.13 (27 mg，0.054 mmol) 溶于 N, N-二甲基甲酰胺 (2 mL)。然后再依次加入 HBTU（22 mg, 0.054 mmol）以及 N,N-二异丙基乙胺（17 mg, 0.135 mmol，加完毕后反应液室温搅拌 30 分钟。LCMS 检测反应完成后，反应液直接经制备色谱(0.01% 三氟乙酸水溶液，乙腈)纯化得到目标化合物 N-((S)-1-(((S)-6-(二乙基氨基)-1-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺（23 mg, 收率 42%）为黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1028.5；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.08 (s, 2H), 9.02 (s, 1H), 8.21 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 8.13 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 7.97 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 7.87 (d, *J* = 10.6 Hz, 2H), 7.31 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.30 (s, 2H), 4.28 – 4.18 (m, 1H), 4.14 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 3.80 – 3.65 (m, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.31 – 3.24 (m, 2H), 3.22 – 3.15 (m, 2H), 3.12 – 3.06 (m, 4H), 3.02 – 2.91 (m, 2H), 2.36 – 2.23 (m, 2H), 1.95 – 1.68 (m, 9H), 1.68 – 1.49 (m, 4H), 1.38 – 1.28 (m, 2H), 1.13 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H), 0.86 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H),0.79 – 0.76 (m, 6H)。

实施例 2.26：N-((S)-1-(((S)-6-(二丙基氨基)-1-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺（DL-026）



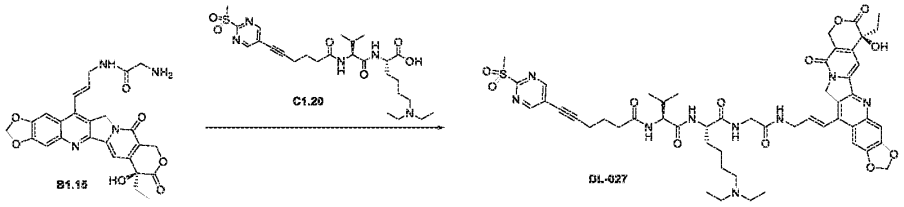
将化合物 C1.22（31 mg, 0.054 mmol，化合物 B1.13 (27 mg，0.054 mmol) 溶于 N, N-二甲基甲酰

胺 (2 mL)。然后再依次加入 HBTU（22 mg, 0.054 mmol）以及 N,N-二异丙基乙胺（17 mg, 0.135 mmol，反应液室温搅拌 30 分钟。LCMS 检测反应完成后，反应液直接经制备色谱 (0.01% 三氟乙酸水溶液, 乙腈)纯化得到目标化合物 N-((S)-1-(((S)-6-(二丙基氨基)-1-((2-((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺（25 mg, 收率 45%）为黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1056.6；

H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.09 (s, 2H), 8.27 – 8.19 (m, 2H), 8.13 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.97 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H), 7.91 – 7.84 (m, 2H), 7.31 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.29 (s, 2H), 4.24 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.13 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 3.73 (dd, *J* = 14.7, 5.9 Hz, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.28 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.19 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.99 (br, 6H), 2.33 – 2.27 (m, 2H), 1.95 – 1.70 (m, 9H), 1.62 – 1.57 (m, 8H), 1.33 – 1.30 (m, 2H), 0.96 – 0.82 (m, 9H), 0.82 – 0.73 (m, 6H)。

实施例 2.27：N-((S)-1-(((S)-6-(二乙基氨基)-1-((2-(((E)-3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)烯丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺

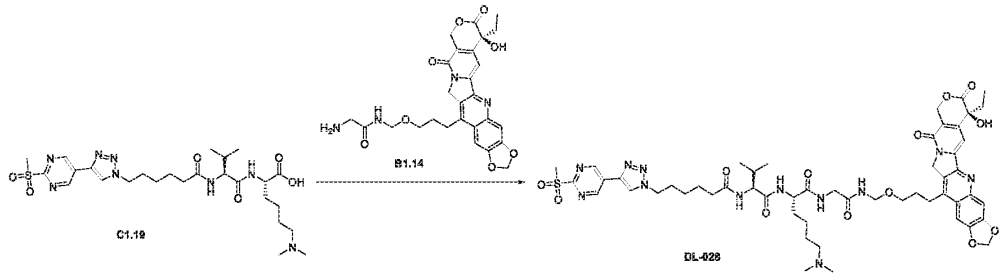


向化合物 B1.15（40 mg，0.074 mmol）和化合物 C1.20（40 mg，0.072 mmol）的 N,N-二甲基甲酰胺溶液（4 mL）溶解中依次加入 HBTU (30 mg，0.079 mmol)、DIPEA（26 mg，0.2 mmol）。反应液室温下反应 1 小时。LCMS 显示反应完全。反应液经高效液相制备纯化（乙腈/ 0.05%三氟乙酸水溶液）得到化合物 N-((S)-1-(((S)-6-(二乙基氨基)-1-((2-(((E)-3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)烯丙基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代己-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 （11.1 mg，收率 14%）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ =1038.6；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.10 (s, 2H), 9.02 (s, 1H, TFA), 8.33 – 8.25 (m, 2H), 8.12 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.68 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 7.52 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.15 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 6.52 – 6.50 (m, 2H), 6.30 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 5.28 – 5.24 (m, 2H), 4.27 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 4.12 (br s, 2H), 3.81 (br s, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.11 – 3.07 (m, 6H), 2.97 (br s, 2H), 2.53 – 2.50 (m, 1H), 2.39 – 2.24 (m, 4H), 1.85 – 1.79 (m, 8H), 1.16 (t, *J* = 6.4 Hz, 6H), 0.88 (t, *J* = 6.4 Hz, 3H), 0.78 (d, *J* = 6.4 Hz, 6H)。

实施例 2.28：(S)-6-(二甲基氨基)-N-(2-(((3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)丙基氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺

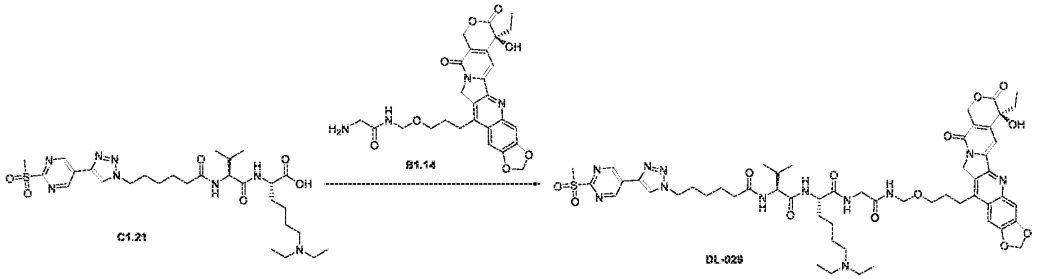


将化合物 C1.19 （40mg，0.06mmol）溶于 N,N-二甲基甲酰胺（1.5 mL），依次加入 HBTU（26 mg，0.06 mmol）、B1.14（36 mg，0.06mmol）和 DIPEA（66 mg，0.17 mmol，室温搅拌反应 1 小时。LCMS 检测反应完成，反应液通过制备（乙腈/0.05%三氟乙酸水溶液）分离纯化得到目标化合物(S)-6-(二甲基氨基)-N-(2-(((3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)丙基氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺（13.88 mg，TFA salt 收率 16%）为米黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1113.7;

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.46 (s, 2H), 9.29 (s, 1H, TFA salt), 8.92 (s, 1H), 8.63 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H), 8.18 (br s, 1H), 8.03 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.28 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.24 (s, 2H), 4.64 – 4.55 (m, 2H), 4.46 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.28 – 4.20 (m, 1H), 4.15 – 4.09 (m, 1H), 3.76 – 3.71 (m, 4H), 3.53 – 3.48 (m, 4H), 3.44 (s, 3H), 3.10 – 3.08 (m, 2H), 2.97 – 2.95 (m, 2H), 2.75 (d, *J* = 4.9 Hz, 6H), 2.20 – 2.09 (m, 2H), 1.92 – 1.83 (m, 5H), 1.68 – 1.65 (m, 1H), 1.63 – 1.50 (m, 5H), 0.90 – 0.74 (m, 9H)。

实施例 2.29：(S)-6-(二乙基氨基)-N-(2-(((3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)丙基氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺



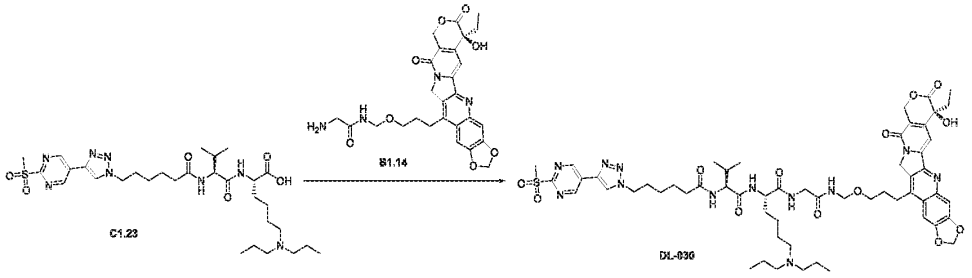
将化合物 C1.21 (58 mg, 0.09 mmol)，化合物 B1.14 (50 mg, 0.09 mmol)溶于 DMF (1 mL),然后再加入 HBTU (35 mg, 0.09 mmol)和 N,N-二异丙基乙胺(30 mg, 0.23 mmol)，加完后反应液室温搅拌 1 小时，

LCMS 检测反应完成后，将反应液经制备色谱(0.01% TFAin water, MeCN)纯化得到目标化合物(S)-6-(二乙基氨基)-N-(2-(((3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)丙基氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺 (14 mg, 收率 13%)为黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1141.7；

1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.46 (s, 2H), 8.98 (s, 1H, TFA), 8.93 (s, 1H), 8.64 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 8.18 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H), 8.03 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.50 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 6.28 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.23 (s, 2H), 4.62 – 4.55 (m, 2H), 4.46 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 4.27 – 4.23 (m, 1H), 4.11 – 4.09 (m, 1H), 3.74 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.49 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.44 (s, 3H), 3.13 – 3.06 (m, 6H), 3.01 – 2.93 (m, 2H), 2.22 – 2.07 (m, 2H), 1.91 – 1.83 (m, 6H), 1.70– 1.51 (m, 5H), 1.33 – 1.21 (m, 6H), 1.16 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H), 0.87 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H), 0.82 – 0.76 (m, 6H)。

实施例 2.30：(S)-6-(二丙基氨基)-N-(2-(((3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)丙基氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺



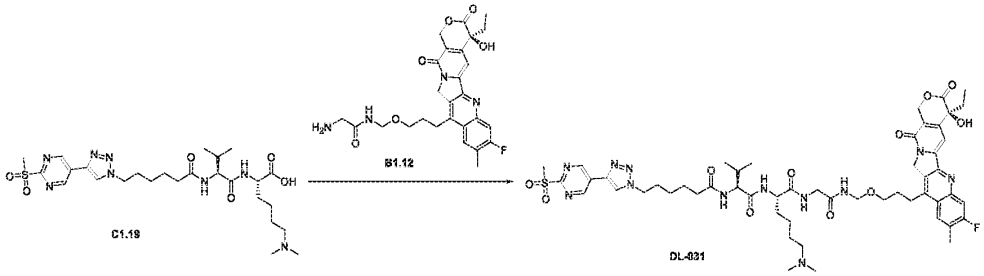
将化合物 C1.23 (61 mg, 0.09 mmol), 化合物 B1.14 (50 mg, 0.09 mmol)溶于 DMF (1 mL),然后再加入 HBTU (35 mg, 0.09 mmol)和 N,N-二异丙基乙胺(30 mg, 0.23 mmol), 加完后反应液室温搅拌 1 小时，LCMS 检测反应完成后，将反应液浓缩得粗产品，粗产品经制备色谱(0.01% TFA in water, MeCN)纯化得到目标化合物(S)-6-(二丙基氨基)-N-(2-(((3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)丙基氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺 (21 mg, 收率 19%)为黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1169.8；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.46 (s, 2H), 9.01 (s, 1H, TFA), 8.93 (s, 1H), 8.64 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 8.19 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 8.02 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.28 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.23 (s, 2H), 4.60 – 4.58 (m, 2H), 4.46 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 4.24 (d, *J* =

6.0 Hz, 1H), 4.13 – 4.09 (m, 1H), 3.74 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.49 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.44 (s, 3H), 3.10 (br s, 2H), 3.02 – 2.95 (m, 6H), 2.19 – 2.15 (m, 2H), 1.88 – 1.86 (m, 6H), 1.71 – 1.69 (m, 1H), 1.61 – 1.56 (m, 8H), 1.28 – 1.26 (m, 6H), 0.88 – 0.83 (m, 9H), 0.81 – 0.78 (m, 6H)。

实施例 2.31：(S)-6-(二甲基氨基)-N-(2-(((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺

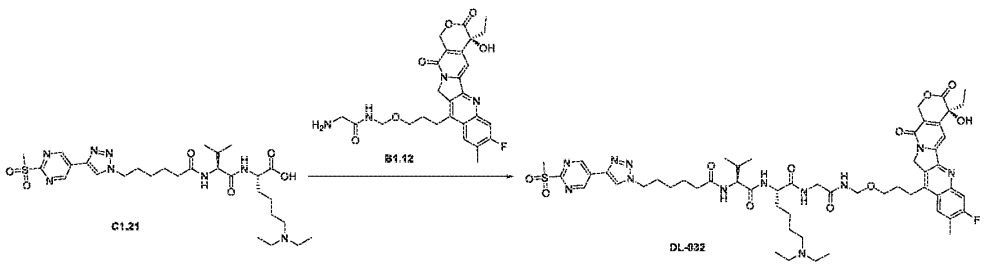


将化合物 C1.19 (113 mg, 0.19 mmol), 化合物 B1.12 (100 mg, 0.19 mmol)溶于 DMF (1 mL), 然后加入 HBTU (72 mg, 0.19 mmol)和 N,N-二异丙基乙胺(61 mg, 0.48 mmol), 加完后反应液室温搅拌 1 小时，LCMS 检测反应完成后，将反应液经制备色谱(0.01% TFA 的水溶液，乙腈)纯化得到目标化合物(S)-6-(二甲基氨基)-N-(2-(((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺 (16 mg, 收率 8%)为白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1101.6；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.46 (s, 2H), 8.93 (s, 1H), 8.63 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 8.20 – 8.28 (m, 2H), 8.04 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.31 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.29 (s, 2H), 4.63 – 4.54 (m, 2H), 4.46 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.29 – 4.19 (m, 1H), 4.15 – 4.08 (m, 1H), 3.73 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 3.50 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.44 (s, 3H), 3.24 – 3.14 (m, 2H), 3.01 – 2.91 (m, 2H), 2.72 (s, 6H), 2.53 (s, 3H), 2.23 – 2.07 (m, 2H), 1.93 – 1.84 (m, 6H), 1.72 – 1.64 (m, 1H), 1.61 – 1.45 (m, 6H), 1.34 – 1.22 (m, 4H), 0.87 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H), 0.82 – 0.76 (m, 6H)。

实施例 2.32：(S)-6-(二乙基氨基)-N-(2-(((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺

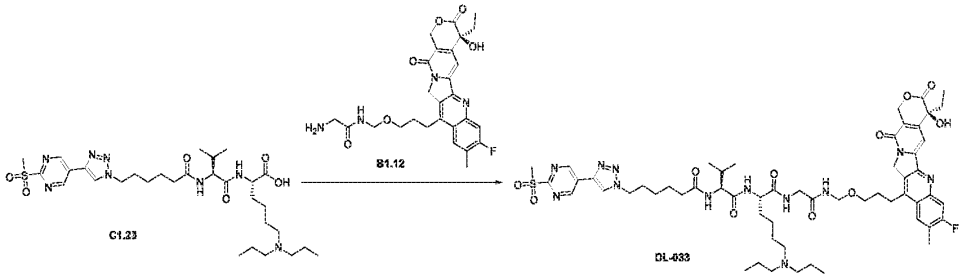


将化合物 C1.21 (59 mg, 0.10 mmol), 化合物 B1.12 (50 mg, 0.10 mmol)，溶于 DMF (1 mL), 然后再加入 HBTU (36 mg, 0.10 mmol)和 N,N-二异丙基乙胺(31 mg, 0.24 mmol), 加完后反应液室温搅拌 1 小时，LCMS 检测反应完成后，将反应液经制备色谱(0.01% 甲酸溶液, 乙腈)纯化得到目标化合物(S)-6-(二乙基氨基)-N-(2-(((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺 (33.8 mg, 收率 32%)为白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1129.7；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.46 (s, 2H), 8.93 (s, 1H), 8.61 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.24 – 8.15 (m, 2H), 8.00 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.85 (d, *J* = 10.5 Hz, 2H), 7.31 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.26 (s, 2H), 4.63 – 4.55 (m, 2H), 4.46 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 4.23 – 4.18 (m, 1H), 4.11 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 3.77 – 3.69 (m, 2H), 3.50 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 3.44 (s, 3H), 3.17 – 3.15 (m, 3H), 2.61 (q, *J* = 6.7 Hz, 4H), 2.22 – 2.10 (m, 2H), 1.92 – 1.84 (m, 6H), 1.68 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 1.57 – 1.48 (m, 3H), 1.39 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 1.30 – 1.22 (m, 4H), 0.97 (t, *J* = 6.9 Hz, 6H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.82 – 0.77 (m, 6H)。

实施例 2.33：(S)-6-(二丙基氨基)-N-(2-(((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺



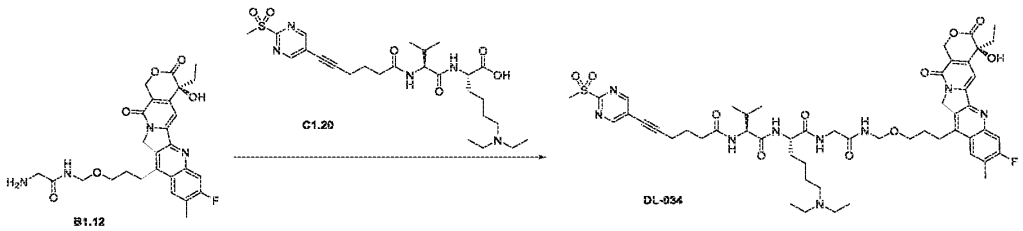
将化合物 C1.23 (62 mg, 0.10 mmol), 化合物 B1.12 (50 mg, 0.10 mmol)溶于 DMF (1 mL), 然后加入 HBTU (36 mg, 0.10 mmol)和 N,N-二异丙基乙胺(31 mg, 0.24 mmol), 加完后反应液室温搅拌 1 小时，LCMS 检测反应完成后，将反应液经制备色谱 (0.01%TFAin water, MeCN) 纯化得到目标化合物(S)-6-(二丙基氨基)-N-(2-(((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]

吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丙基氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺 (35.2 mg, 收率 32%)为黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1157.8；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.46 (s, 2H), 9.05 (s, 1H, TFA), 8.93 (s, 1H), 8.64 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H), 8.20 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 8.03 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 6.54 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.28 (s, 2H), 4.62 – 4.55 (m, 2H), 4.46 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.24 (m, 1H), 4.13 – 4.07 (m, 1H), 3.74 (m, 2H), 3.50 (m, 2H), 3.44 (s, 3H), 3.23 – 3.16 (m, 2H), 3.01 – 2.95 (m, 6H), 2.50 (s, 3H), 2.22 – 2.09 (m, 2H), 1.95 – 1.84 (m, 8H), 1.67 – 1.56 (m, 9H), 1.33 – 1.23 (m, 6H), 0.91 – 0.86 (m, 9H), 0.82 – 0.77 (m, 6H)。

实施例 2.34：N-((11S,14S)-11-(4-(二乙基氨基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺（DL-034）



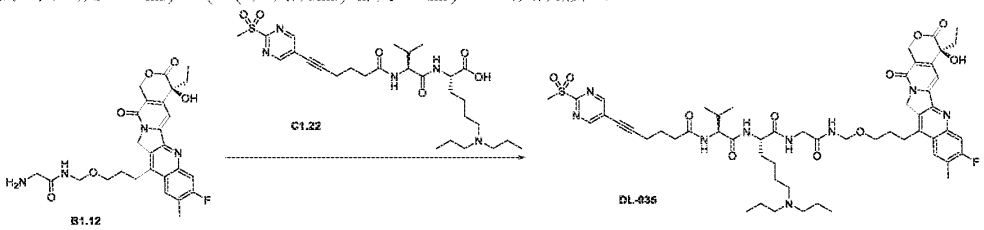
将化合物（S） -2-氨基-N-（(3-（4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧基-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3'，4'：6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-11-基）丙氧基）甲基）乙酰胺（B1.12，30 mg, 0.057 mmol), N6，N6-二乙基-N2-((6-（2-（甲磺酰基）嘧啶-5-基）十六烷基-5-炔酰基）-L-丙酰基）-L-赖氨酸(C1.20，31 mg， 0.057 mmol)溶于 DMF（1 mL）中。然后依次加入 HBTU（22 mg, 0.057 mmol）以及 N,N-二异丙基乙胺（18 mg, 0.143 mmol），加完毕后反应液室温搅拌一小时。 LCMS 检测反应完成后，将反应液经制备色谱(0.01% 的三氟乙酸水溶液，乙腈)纯化得到目标化合物三氟乙酸盐 N-((11S,14S)-11-(4-(二乙基氨基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (3.18 mg, 收率 5%)为黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1058.7；

1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.10 (s, 2H), 8.65 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 8.21 - 8.19 (m, 2H), 8.09 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.28 (s, 2H), 4.64 – 4.56 (m, 2H), 4.29 – 4.22 (m, 1H), 4.15 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 3.74 (d, *J* = 4.6 Hz, 2H), 3.51 – 3.49 (m, 2H), 3.24 – 3.18 (m, 2H), 3.13 – 3.07 (m, 4H), 3.01 – 2.95 (m, 2H), 2.55 (s, 3H), 2.40 – 2.31 (m, 3H),

1.99 – 1.74 (m, 8H), 1.65 – 1.49 (m, 4H), 1.38 – 1.25 (m, 2H), 1.16 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H), 0.89 - 0.79 (m, 9H)。

实施例 2.35：N-((11S,14S)-11-(4-(二丙基氨基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺（DL-035）

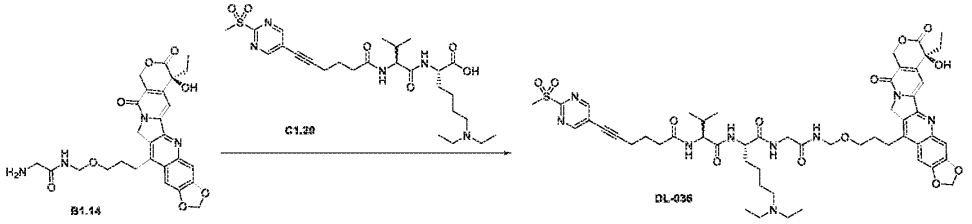


将化合物（S） -2-氨基-N-（(3-（4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧基-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3'，4'：6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-11-基）丙氧基）甲基）乙酰胺（B1.12，30 mg, 0.057 mmol), N2-（(6-（2-（甲磺酰基）嘧啶-5-基）己-5-炔酰基）-L-丙酰基）-N6，N6-二丙基-L-赖氨酸（C1.22，33 mg，0.057 mmol)溶于 DMF（1 mL）中。然后再依次加入 HBTU（22 mg, 0.057 mmol）以及 N,N-二异丙基乙胺（18 mg, 0.143 mmol），加完毕后反应液室温搅拌一小时。 LCMS 检测反应完成后，将反应液经制备色谱(0.01% 的三氟乙酸水溶液，乙腈)纯化得到目标化合物 N-((11S,14S)-11-(4-(二丙基氨基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺（DL-035） (10. 65 mg，收率 16%)为黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1086.7；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.10 (s, 2H), 8.65 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H), 8.28 – 8.16 (m, 2H), 8.08 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.29 (s, 2H), 4.63 – 4.52 (m, 2H), 4.31 – 4.19 (m, 1H), 4.19 – 4.08 (m, 1H), 3.74 (d, *J* = 4.9 Hz, 2H), 3.50 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.24 – 3.18 (m, 2H), 3.03 – 2.94 (m, 6H), 2.55 (s, 3H), 2.46 – 2.24 (m, 3H), 2.05 – 1.67 (m, 8H), 1.66 – 1.51 (m, 8H), 1.36 – 1.22 (m, 4H), 0.91 – 0.80 (m, 15H)。

实施例 2.36：N-((11S,14S)-11-(4-(二乙基氨基)丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺（DL-036）



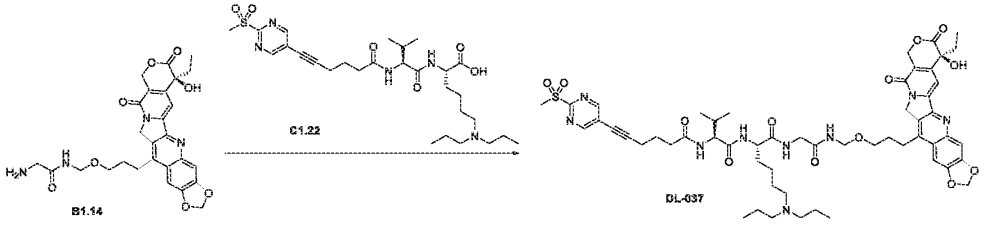
将化合物 C1.20 (40 mg, 0.075 mmol)，化合物 B1.14 (41 mg, 0.075 mmol) 溶于 DMF (1 mL)，然后

再加入 HOBt (15.2 mg, 0.113 mmol)和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (21.5 mg, 0.113 mmol)，然后再加入三乙胺 (23 mg, 0.225mmol) 加完后反应液室温搅拌 16 小时， LCMS 检测反应完成后，将反应液浓缩得粗产品，粗产品经制备色谱(0.01% TFA in water, MeCN) 纯化得到目标化合物 N-((11S,14S)-11-(4-(二乙基氨基)丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (16 mg, 收率 20%)为黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1070.6；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.13 – 9.08 (m, 2H), 9.01 (s, 1H), 8.64 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 8.20 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 8.09 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 5.24 (s, 2H), 4.65 – 4.53 (m, 2H), 4.26 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 4.20 – 4.10 (m, 1H), 3.74 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H), 3.50 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.14 – 3.07 (m, 6H), 2.98 (s, 2H), 2.55 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.41 – 2.29 (m, 2H), 2.03 – 1.89 (m, 2H), 1.89 – 1.77 (m, 7H), 1.61 – 1.56 (m, 2H), 1.32 (s, 2H), 1.16 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H), 0.91 – 0.78 (m, 9H)。

实施例 2.37：N-((11S,14S)-11-(4-(二正丙基氨基)丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺（DL-037）



将化合物 C1.22 (43 mg, 0.074 mmol)，化合物 B1.14 (40 mg，0.075 mmol)，溶于 N, N-二甲基甲酰胺 (1 mL)，然后依次加入 HBTU (28 mg, 0.075 mmol)， N,N-二异丙基乙胺 (24 mg, 0.187 mmol)， 反应液室温搅拌 1 小时， LCMS 检测反应完成后，反应液直接经制备色谱(0.01% 三氟乙酸水溶液，乙腈)纯化得到目标化合物的三氟乙酸盐（8.5 mg, 收率 10%）为黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1098.6；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.10 (s, 2H), 9.03 (s, 1H), 8.64 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 8.19 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 8.08 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.49 (s, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.24 (s, 2H), 4.66 – 4.52 (m, 2H), 4.31 – 4.21 (m, 1H), 4.19 – 4.10 (m, 1H), 3.74 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H), 3.49 – 3.48 (m, 2H), 3.40 (s, 3H), 3.15 – 3.06 (m, 2H), 3.02 – 2.95 (m, 6H), 2.59 – 2.52 (m, 3H), 2.41 – 2.29 (m, 2H), 2.05 – 1.90 (m, 2H), 1.91 – 1.77 (m, 6H), 1.63 – 1.57 (m, 6H), 1.31 – 1.29 (m, 2H), 0.92 – 0.80 (m, 15H).

采用本实施例中同样的操作，反应液直接经制备色谱(0.1% 甲酸水溶液，乙腈)纯化，冻干，得到目标化合物的甲酸盐（32.6 mg, 收率 39%），为白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1098.6；

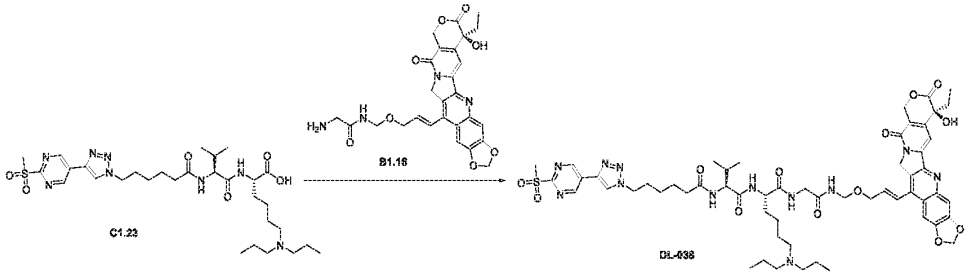
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.09 (s, 2H), 8.56 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 8.17 (s, 1H), 8.14 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.97 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.89 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.45 (s, 1H), 6.28 (s, 2H), 5.48 – 5.35 (m, 2H), 5.24 (s, 2H), 4.64 – 4.54 (m, 2H), 4.23 – 4.07 (m, 2H), 3.79 – 3.66 (m, 2H), 3.50 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 3.40 (s, 3H), 3.14 – 3.08 (t, *J* = 8.2 Hz, 2H), 2.59 – 2.52 (m, 2H), 2.36 – 2.27 (m, 8H), 2.00 – 1.76 (m, 7H), 1.72– 1.62 (m, 1H), 1.58– 1.48 (m, 1H), 1.40 – 1.20 (m, 8H), 0.88 – 0.77 (m, 15H).

取 DL-037 甲酸盐（16mg），通过制备 HPLC 纯化（0.1% 碳酸氢铵水，乙腈），冻干，得游离态的目标化合物（DL-037，10mg，收率 65%），为白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1098.6；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.10 (s, 2H), 8.61 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 8.21 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.04 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.95 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.22 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.26 (s, 2H), 5.48 – 5.35 (m, 2H), 5.16 (s, 2H), 4.63 – 4.51 (m, 2H), 4.25 – 4.10 (m, 2H), 3.82 – 3.63 (m, 2H), 3.49 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.40 (s, 3H), 3.06 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 2.56 – 2.51 (m, 2H), 2.41 – 2.23 (m, 8H), 1.96 – 1.76 (m, 7H), 1.71 – 1.57 (m, 1H), 1.57 – 1.48 (m, 1H), 1.37 – 1.21 (m, 8H), 0.88 – 0.78 (m, 15H).

实施例 2.38：(S)-6-(二丙基氨基)-N-(2-(((((E)-3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)烯丙基)氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺



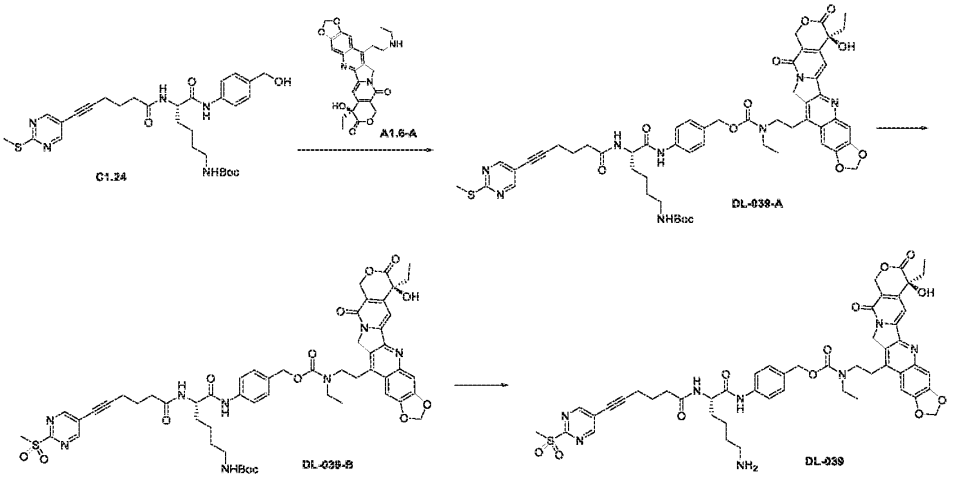
将化合物 B1.16 (30 mg, 0.06 mmol), 化合物 C1.23 (37 mg，0.06 mmol)溶于 DMF (1 mL)。然后再加入 HBTU (21 mg, 0.06 mmol)和 N,N-二异丙基乙胺(16 mg, 0.12 mmol), 加完后反应液室温搅拌 1 小时， LCMS 检测反应完成后，将反应液经制备色谱(0.01% TFA in water, MeCN)纯化得到目标化合物(S)-6-(二丙基氨基)-N-(2-(((((E)-3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)烯丙基)氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-

甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺 (4 mg, 收率 6%)为黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1167.6；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.45 (s, 2H), 8.98 (s, 1H, TFA), 8.92 (s, 1H), 8.74 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H), 8.25 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 8.05 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.82 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.26 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.58 – 6.52 (m, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.30 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.31 (s, 2H), 4.74 – 4.67 (m, 2H), 4.46 (m, 2H), 4.30 (m, 1H), 4.10 (m, 1H), 3.77 (m, 2H), 3.44 (s, 3H), 3.01 – 2.95 (m, 8H), 2.23 – 2.18 (m, 1H), 2.13 (m, 1H), 2.00 (m, 2H), 1.90 – 1.84 (m, 6H), 1.63 – 1.57 (m, 9H), 0.88 (m, 9H), 0.81 – 0.78 (m, 6H)。

实施例 2.39：4-((S)-6-氨基-2-(6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺)己酰胺基)苄基 N-乙基-N-(2-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)胺基甲酸酯



步骤一：

在 0°C 冰浴条件下，向 C1.24（150 mg，0.264 mmol）和 三乙胺（89 mg，0.88 mmol）的二氯甲烷（10 mL）溶液中加入 N，N-琥珀酰亚胺基碳酸酯（DSC，90 mg，0.352 mmol），反应在 0°C 氮气下反应 30 分钟，随后滴加化合物 A1.6-A（82 mg，0.176 mmol），反应在室温下反应 12 小时。LCMS 监测反应完全。反应液减压浓缩成粗产品，经高效液相制备纯化（乙腈/水含 0.05%甲酸）得到黄色油状化合物 DL-039-A（27 mg，收率：14.4%)为黄色油状物。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1059.2；

步骤二：

向化合物 DL-039-A（60 mg，0.057 mmol）的四氢呋喃（5 mL）和水（1 mL）的混合溶液中加入过氧单磺酸钾（Oxone，349 mg，0.567 mmol），反应在室温下搅拌 12 小时。TLC 检测反应完全。向

反应液中加入水（10 mL），用二氯甲烷（10 mL X 3）萃取，有机相经饱和食盐水洗涤，无水硫酸钠干燥，抽滤，减压浓缩得到目标化合物 DL-039-B（60 mg，粗品）为黄色固体。

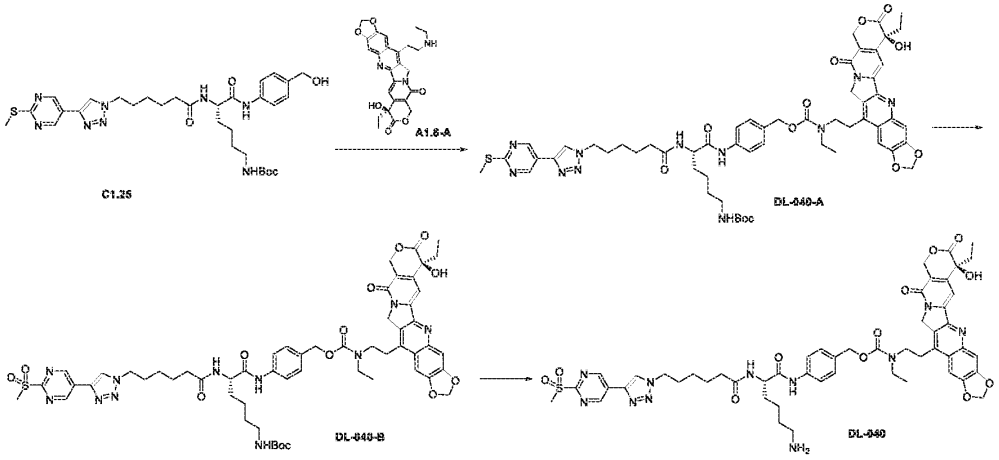
LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1091.0；

步骤三：

将化合物 DL-039-B（60 mg, 0.055 mmol）溶在二氯甲烷（1 mL）溶液中，0°C 下向反应液中加入二氯乙酸（1 mL），反应在室温下搅拌 3 小时。LCMS 显示反应完成。滤液减压浓缩成粗产品，经高效液相制备纯化（乙腈/水含 0.05%三氟乙酸）得到黄色固体化合物 4-((S)-6-氨基-2-(6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺)己酰胺基)苄基 N-乙基-N-(2-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)胺基甲酸酯（2.44 mg，收率 3.69%）。

LCMS (ESI) $[1/2M+H]^+$ = 496.3, t_R = 2.252 min。

实施例 2.40：4-((S)-6-氨基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)己酰胺基)苄基 N-ethyl-N-(2-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)胺基甲酸酯 (DL-040)



步骤一：

在 0°C 冰浴条件下，向 C1.25（300 mg，0.469 mmol）和 三乙胺（126 mg，1.25 mmol）的二氯甲烷（10 mL）中加入 N, N-琥珀酰亚胺基碳酸酯（DSC，160 mg，0.626 mmol），反应在 0°C 反应 30 分钟，随后滴加化合物 A1.6-A（145 mg，0.313 mmol），然后反应在室温下反应 12 小时。LCMS 监测反应完全。反应液减压浓缩成粗产品，经高效液相制备纯化（乙腈/水含 0.05%甲酸）得到黄色油状化合物 DL-040-A（70 mg，收率：19.8%)为黄色油状物。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1130.1。

步骤二：

向化合物 DL-040-A（70 mg，0.062 mmol）的四氢呋喃（5 mL）和水（1 mL）的混合溶液中加入

过氧单磺酸钾（Oxone，381 mg，0.619 mmol），反应在室温下搅拌 12 小时。TLC 检测反应反应完全。向反应液中加入水（10 mL），用二氯甲烷（10 mL x 3）萃取，有机相经饱和食盐水洗涤，无水硫酸钠干燥，抽滤，减压浓缩得到目标化合物 DL-040-B（70 mg，粗品）为黄色固体。LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1162.6, t_R = 1.710 min。

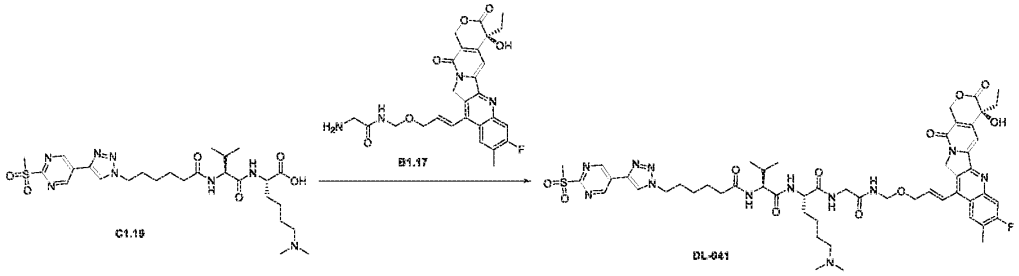
步骤三：

将化合物 DL-040-B（70 mg, 0.060 mmol）溶在二氯甲烷（1 mL）溶液中，0°C 下向反应液中加入二氯乙酸（1 mL），反应在室温下搅拌 3 小时。LCMS 显示反应完成。滤液减压浓缩成粗产品，经高效液相制备纯化（乙腈/水含 0.05%三氟乙酸）得到黄色固体化合物 4-((S)-6-氨基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)己酰胺基)苄基 N-ethyl-N-(2-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)乙基)胺基甲酸酯（5.54 mg，收率 8.66%）。

LCMS (ESI) $[1/2M+H]^+$ = 1062.5, t_R = 4.052 min；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 10.22 (br s, 1H), 9.46 (s, 2H), 8.93 (s, 1H), 8.22 – 8.03 (m, 1H), 7.85 (br s, 3H, NH2-TFA), 7.61 – 7.45 (m, 3H), 7.32 – 7.26 (m, 1H), 7.26 – 7.17 (m, 2H), 6.54 (s, 1H), 6.35 (s, 2H), 5.91 (s, 2H), 5.47 (s, 2H), 5.37 – 5.30 (m, 1H), 5.27 – 5.20 (m, 1H), 5.10 – 5.00 (m, 1H), 4.97 – 4.78 (m, 1H), 4.52 – 4.26 (m, 3H), 3.56 – 3.46 (m, 2H), 3.44 (s, 3H), 2.83 – 2.71 (m, 2H), 2.21 – 2.11 (m, 2H), 1.98 – 1.78 (m, 4H), 1.67 – 1.48 (m, 6H), 1.37 – 1.22 (m, 4H), 1.09 – 0.96 (m, 3H), 0.93 – 0.78 (m, 3H)。

实施例 2.41：(S)-6-(二甲基氨基)-N-(2-(((((E)-3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)烯丙基)氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺(DL-041)

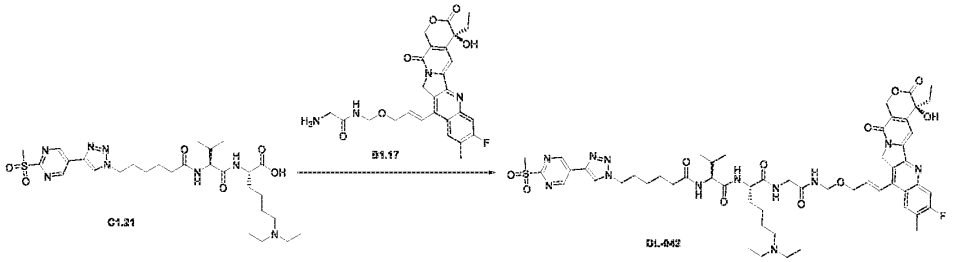


将化合物 B1.17 (30 mg), 化合物 C1.19 (37 mg)溶于 DMF (1 mL)。然后再加入 HBTU (21 mg)和 N,N-二异丙基乙胺(16 mg), 加完后反应液室温搅拌 1 小时， LCMS 检测反应完成后，将反应液经制备色谱(0.01% TFA in water, MeCN)纯化得到目标化合物(S)-6-(二甲基氨基)-N-(2-(((((E)-3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)烯丙基)氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰

胺基)丁酰胺基)己酰胺 (11 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1099.5。

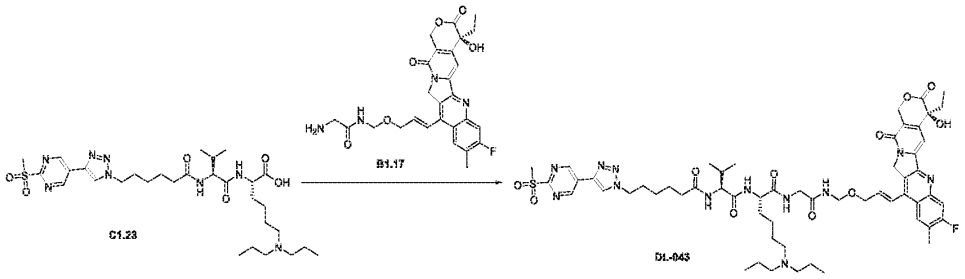
实施例 2.42：(S)-6-(二乙基氨基)-N-(2-(((((E)-3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)烯丙基)氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺(DL-042)



将化合物 B1.17 (30 mg), 化合物 C1.21 (37 mg)溶于 DMF (1 mL)。然后再加入 HBTU (21 mg)和 N,N-二异丙基乙胺(16 mg), 加完后反应液室温搅拌 1 小时， LCMS 检测反应完成后，将反应液经制备色谱(0.01% TFA in water, MeCN)纯化得到目标化合物(S)-6-(二乙基氨基)-N-(2-(((((E)-3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)烯丙基)氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺 (7 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1127.5。

实施例 2.43：(S)-6-(二丙基氨基)-N-(2-(((((E)-3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)烯丙基)氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺(DL-043)

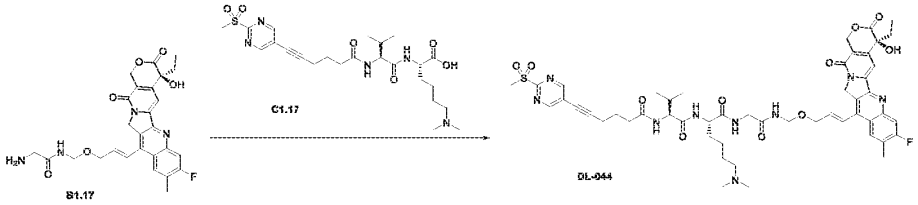


将化合物 B1.17 (17.5 mg, 0.033 mmol)和化合物 C1.23 (22 mg, 0.034 mmol)溶于 N, N-二甲基甲酰胺 (2 mL)中，然后依次加入 HOBT (7 mg, 0.051mmol)，EDCI (10 mg, 0.051mmol)，DIPEA (9 mg, 0.068 mmol)，加毕，反应液室温搅拌 1 小时，反应液直接经制备高效液相色谱 (0.01% 三氟乙酸水溶液，乙腈)纯化，制备液冷冻干燥得到目标化合物(S)-6-(二乙基氨基)-N-(2-(((((E)-3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)烯丙基)氧基)甲基)氨

基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺（7 mg, 收率 18%）为淡黄色固体产品。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1155.5.

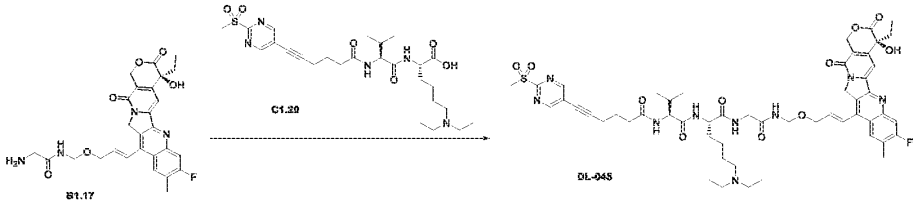
实施例 2.44：N-((11S,14S,E)-11-(4-(二甲基氨基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-1-烯-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(DL-044)



将化合物 B1.17 (60 mg), 化合物 C1.17 (80 mg)溶于 DMF (2 mL)。然后再加入 HBTU (45 mg)和 N,N-二异丙基乙胺(35 mg), 加完后反应液室温搅拌 1 小时， LCMS 检测反应完成后，将反应液经制备色谱(0.01% TFA in water, MeCN)纯化得到目标化合物 N-((11S,14S,E)-11-(4-(二甲基氨基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-1-烯-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (21 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1028.5。

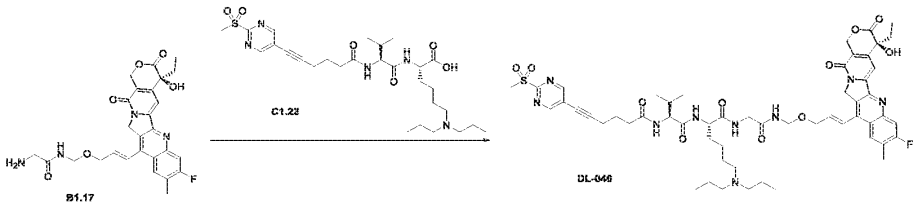
实施例 2.45：N-((11S,14S,E)-11-(4-(二乙基氨基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-1-烯-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(DL-045)



将化合物 B1.17 (60 mg), 化合物 C1.20 (80 mg)溶于 DMF (2 mL)。然后再加入 HBTU (45 mg)和 N,N-二异丙基乙胺(35 mg), 加完后反应液室温搅拌 1 小时， LCMS 检测反应完成后，将反应液经制备色谱(0.01% TFA in water, MeCN)纯化得到目标化合物 N-((11S,14S,E)-11-(4-(二乙基氨基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-1-烯-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (29 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1056.5。

实施例 2.46：N-((11S,14S,E)-11-(4-(二丙基氨基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-1-烯-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺(DL-046)

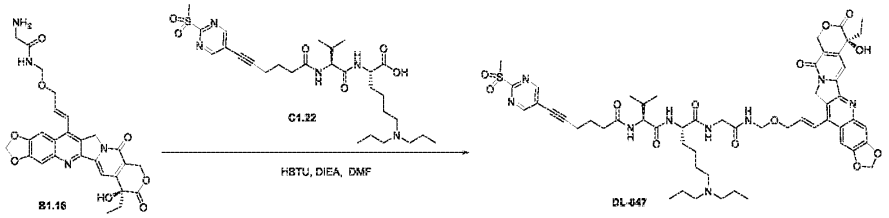


将化合物 B1.17 (60 mg), 化合物 C1.22 (80 mg)溶于 DMF (2 mL)。然后再加入 HBTU (45 mg)和 N,N-二异丙基乙胺(35 mg), 加完后反应液室温搅拌 1 小时， LCMS 检测反应完成后，将反应液经制备色谱(0.01% TFA in water, MeCN)纯化得到目标化合物 N-((11S,14S,E)-11-(4-(二乙基氨基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-1-烯-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (30 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1084.2；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.09 (s, 2H), 8.73 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H), 8.30 – 8.24 (m, 2H), 8.05 (m, 1H), 7.94 – 7.88 (m, 2H), 7.38 - 7.33 (m, 2H), 6.67 – 6.60 (m, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.37 (s, 2H), 4.73 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 4.34 (d, *J* = 4.2 Hz, 2H), 4.26 – 4.20 (m, 1H), 4.17 – 4.13 (m, 1H), 3.86 – 3.69 (m, 4H), 3.40 (s, 3H), 2.41 – 2.30 (m, 8H), 2.02 – 1.94 (m, 2H), 1.89 – 1.85 (m, 2H), 1.82 – 1.77 (m, 2H), 1.74 – 1.63 (m, 2H), 1.60 – 1.50 (m, 2H), 1.47 – 1.39 (m, 8H), 0.90 – 0.86 (m, 6H), 0.85 – 0.80 (m, 9H)。

实施例 2.47：N-((11S,14S,E)-11-(4-(二丙基氨基)丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)-15-甲基-7,10,13-氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-1-烯-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺（DL-047）



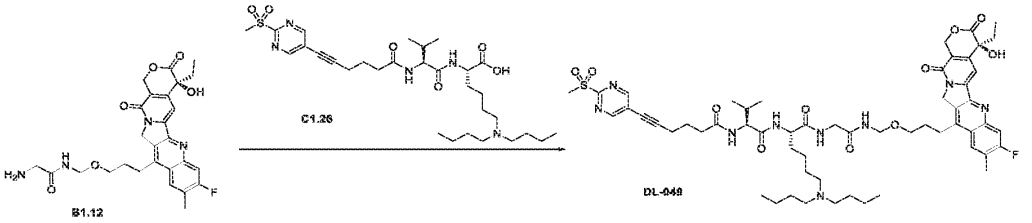
将化合物 B1.16 (45 mg, 0.08 mmol), 化合物 C1.22 (49 mg， 0.08 mmol), 溶于 DMF (1 mL)。然后再加入 HBTU (32 mg, 0.08 mmol)和 N,N-二异丙基乙胺 (27 mg, 0.2 mmol), 加完后反应液室温搅拌 1 小时， LCMS 检测反应完成后，将反应液经制备色谱(0.01% 三氟乙酸的水溶液, 乙腈)纯化得到目标化合物 N-((11S,14S,E)-11-(4-(二丙基氨基)丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)-15-甲基-7,10,13-氧代-4-氧杂-

6,9,12-三氮杂十六烷-1-烯-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺 (DL-047，10 mg)为黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1096.6；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.10 (s, 2H), 9.05 (s, 1H, TFA), 8.75 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H), 8.26 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 8.11 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.93 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.26 – 2.24 (m, 2H), 6.65 – 6.43 (m, 2H), 6.30 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.30 (s, 2H), 4.74 – 4.69 (m, 1H), 4.31 – 4.29 (m, 2H), 4.26 - 424 (m, 1H), 4.19 – 4.12 (m, 1H), 3.79 – 2.76 (m, 1H), 3.40 (s, 3H), 3.02 – 2.95 (m, 8H), 2.55 (m, 2H), 2.39 – 2.32 (m, 2H), 2.01 – 1.93 (m, 2H), 1.92 – 1.77 (m, 5H), 1.62 – 1.58 (m, 6H), 1.36 – 1.30 (m, 2H), 0.91 – 0.83 (m, 15H)。

实施例 2.48：N-((11S,14S)-11-(4-(二丁基氨基)丁基)-1-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺（DL-048）

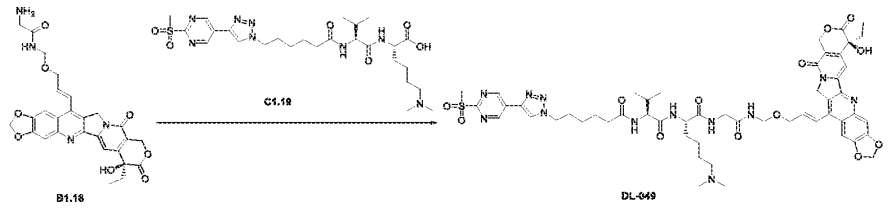


将化合物 C1.26 （50mg，0.08mmol），化合物 B1.12（43mg，0.08mmol）溶于 N,N-二甲基甲酰胺（1.5mL），然后依次加入 DIPEA（26mg，0.21mmol），HBTU（31mg，0.08mmol），室温搅拌反应 1 小时。LCMS 检测反应完成，反应液直接通过高效制备 (0.01% 三氟乙酸的水溶液，乙腈)分离纯化得到目标化合物（13.57mg）为黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1114.6；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.09 (s, 2H), 9.05 (s, 1H, TFA), 8.64 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 8.23 – 8.16 (m, 2H), 8.07 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.93 – 7.85 (m, 2H), 7.32 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.29 (s, 2H), 4.61 - 4.59 (m, 2H), 4.24 – 4.22 (m, 1H), 4.19 – 4.10 (m, 1H), 3.73 – 3.70 (m, 2H), 3.50 (s, 3H), 3.21 – 3.18 (m, 6H), 3.00 – 2.98 (m, 8H), 2.54 (s, 3H), 1.97 – 1.78 (m, 7H), 1.56 – 1.52 (m, 8H), 1.36 – 1.25 (m, 6H), 0.93 – 0.78 (m, 15H)。

实施例 2.49：(S)-6-(二甲基氨基)-N-(2-(((((E)-3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)烯丙基)氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺（DL-049）

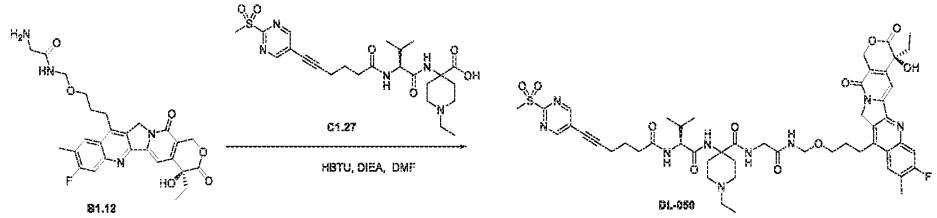


将化合物 B1.16 (45 mg, 0.08 mmol), 化合物 C1.19 (50 mg， 0.08 mmol), 溶于 DMF (1 mL)。然后依次加入 N,N-二异丙基乙胺 (27 mg, 0.2 mmol)，HBTU (32 mg, 0.08 mmol), 加完后反应液室温搅拌 1 小时，LCMS 检测反应完成后，将反应液直接经制备色谱 (0.01% 的甲酸水溶液，乙腈)纯化得到目标化合物 (S)-6-(二甲基氨基)-N-(2-(((((E)-3-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)烯丙基)氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺（DL-049，3 mg)为白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1111.1；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.45 (s, 2H), 8.92 (s, 1H), 8.69 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H), 8.25 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 8.19 (s, 1H, FA), 7.99 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.83 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.27 (m, 2H), 6.59 – 6.48 (m, 2H), 6.29 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.31 (s, 2H), 4.74 – 4.67 (m, 2H), 4.44 (m, 2H), 4.30 (d, *J* = 4.8 Hz, 2H), 4.21 (m, 1H), 4.12 (m, 1H), 3.83 – 3.70 (m, 4H), 3.43 (s, 3H), 2.25 (m, 2H), 2.15 (s, 6H), 2.04 – 1.97 (m, 2H), 1.90 – 1.85 (m, 4H), 1.55 – 1.51 (m, 3H), 1.39 – 1.34 (m, 6H), 0.90 – 0.83 (m, 3H), 0.80 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H)。

实施例 2.50： 1-乙基-N-(2-(((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丙氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-4-((S)-3-甲基-2-(6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺基)丁酰胺基)哌啶-4-甲酰胺（DL-050）

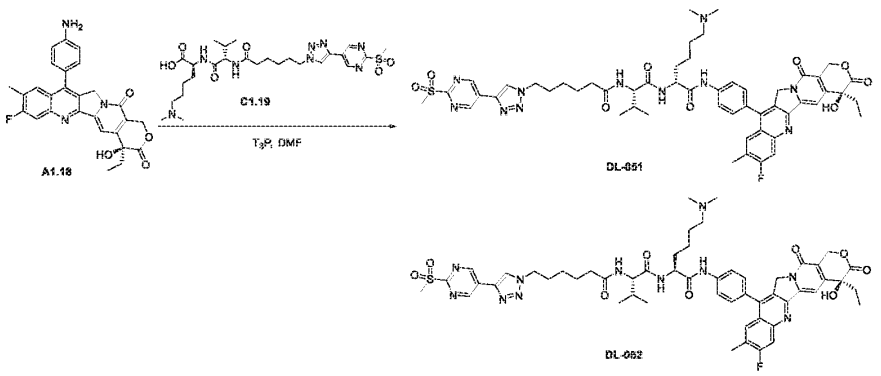


将化合物 B1.12 (50 mg, 0.10 mmol), 化合物 C1.27 (50 mg，0.10 mmol), 溶于 DMF (1 mL)。然后依次加入 N,N-二异丙基乙胺(30 mg, 0.24 mmol)和 HBTU (36 mg, 0.10 mmol)，加完后反应液室温搅拌 1 小时， LCMS 检测反应完成后，将反应液经制备色谱 (0.01% FA in water, MeCN)纯化得到目标化合物 1-乙基-N-(2-(((3-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)丙氧基)甲基)氨基)-2-氧代乙基)-4-((S)-3-甲基-2-(6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺基)丁酰胺基)哌啶-4-甲酰胺（DL-050，10 mg)为白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1028.6；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.08 (s, 2H), 8.42 (s, 1H, FA), 8.18 – 8.15 (m, 4H), 7.98 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.86 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.28 (s, 2H), 4.72 – 4.63 (m, 1H), 4.53 – 4.45 (m, 1H), 4.07 – 4.06 (m, 1H), 3.79 – 3.69 (m, 1H), 3.58 – 3.55 (m, 2H), 3.55 – 3.48 (m, 5H), 3.21 – 3.16 (m, 3H), 2.55 (s, 3H), 2.66 – 2.64 (m, 2H), 2.40 – 2.26 (m, 5H), 1.99 – 1.71 (m, 12H), 0.96 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 0.93 – 0.85 (m, 9H)。

实施例 2.51： (R)-6-(二甲基氨基)-N-(4-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)苯基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺（DL-051）和 (S)-6-(二甲基氨基)-N-(4-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)苯基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺（DL-052）



将化合物 A1.18 (40 mg，0.08 mmol)和 C1.19 (71 mg，0.12 mmol) 溶于 N, N-二甲基甲酰胺 (3 mL)。再加入 T_3P (254 mg, 0.40 mmol, 50%w/w 乙酸乙酯的混合物)，将反应液于室温下搅拌 1 小时。LCMS 检测反应完成后，反应液直接经制备色谱 (0.01% 三氟乙酸水溶液、乙腈) 纯化得到目标化合物(R)-6-(二甲基氨基)-N-(4-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)苯基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺（DL-051，8.1 mg）和 (S)-6-(二甲基氨基)-N-(4-((S)-4-乙基-8-氟-4-羟基-9-甲基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-11-基)苯基)-2-((S)-3-甲基-2-(6-(4-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酰胺基)丁酰胺基)己酰胺（DL-052，8.8 mg）均为白色固体。

DL-051：

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1048.2, t_R = 1.258 min；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.12 (s, 1H), 9.40 (s, 2H), 8.84 (s, 1H), 8.55 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 8.26 (s, 1H), 8.05 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.99 – 7.89 (m, 3H), 7.73 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.57 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.36 (s, 1H), 5.41 (s, 2H), 5.10 (s, 2H), 4.40 (m, 3H), 4.22 – 4.10 (m, 1H), 3.44 (s, 3H), 2.40 (s, 3H), 2.30 – 2.25 (m, 2H), 2.24 – 2.20 (m, 2H), 2.19 – 2.15 (m, 6H), 2.03 – 1.93 (m, 2H), 1.92 – 1.78 (m, 6H), 1.72 – 1.66 (m, 1H),

1.61 – 1.54 (m, 2H), 1.48 – 1.42 (m, 2H), 1.30 – 1.26 (m, 2H), 0.91 – 0.86 (m, 9H)。

DL-052：

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1048.2, t_R = 1.283 min；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.34 (s, 1H), 9.45 (s, 2H), 8.94 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 7.99 – 7.85 (m, 4H), 7.75 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.59 (m, 2H), 7.36 (s, 1H), 6.55 (s, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.10 (s, 2H), 4.52 – 4.42 (m, 3H), 4.25 – 4.17 (m, 1H), 3.44 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 2.30 – 2.13 (m, 8H), 2.05 – 1.97 (m, 2H), 1.95 – 1.81 (m, 7H), 1.60 – 1.55 (m, 2H), 1.50 – 1.44 (m, 2H), 1.33 – 1.28 (m, 4H), 0.95 – 0.83 (m, 9H)。

三、抗体制备与鉴定

实施例 3.1 B7H3 抗原和抗 B7H3 抗体 B7H3-C1 和 B7H3-C2 制备

选取人 2Ig B7H3 的 29-245 位氨基酸（NCBI 蛋白编号 NP_001316557.1）的核酸序列，其中 C 端添加检测 6×His 标签，命名为人 B7H3-2IgG-his；选取人 4Ig B7H3 的 27-461 位氨基酸（Uniprot 蛋白编号 Q5ZPR3-1）的核酸序列，其中 C 端添加纯化 6× His 标签，命名为人 B7H3-4IgG-his；选取猴 B7H3 4Ig 的 27-465 位氨基酸（Uniprot 蛋白编号 F7G5V3）的核酸序列，其中 C 端添加纯化 6x His 标签，命名为猴 B7H3-4IgG-his；B7H3-C1 参考 CN 103687945B 中编号 M30-H1-L4 的抗体；B7H3-C2 参考 CN109069633A 中编号 mAb-C-DUBA 的抗体。

分别合成上述三种 B7H3 抗原的基因，以及密码子优化合成 B7H3-C1 和 B7H3-C2 抗体的基因（上海生工生物技术有限公司），构建到 PTT5 表达载体上，并大量抽提质粒。将抽提制备好的表达载体分别于 HEK293F 中瞬转表达 7 天，表达上清经 ProteinA 化制备获得抗原蛋白和 B7H3-C1 抗体和 B7H3-C2 抗体。

实施例3.2 全人源噬菌体库制备

征集20-30岁左右10名健康男性以及10名健康女性志愿者，抽取约50mL新鲜血液体，通过Ficol抽提新鲜PBMC细胞，然后通过Trizol抽提mRNA进行反转录获得cDNA。通过VH和VK引物对从cDNA中扩增抗体重链及轻链，再通过Overlap PCR获得ScFv片段，通过SfiI酶切连接到pTT-1载体上，通过电转获得全人源ScFv噬菌体库，库容量约$5.2*10^9$。

在1.0L新鲜培养基2YT+100μg/ml Amp+2％葡萄糖中加入1mL文库，菌液起始OD600＜0 .1，在37℃、220rpm的条件下培养。当OD600为0 .6左右时，按细胞:噬菌体 = 1:20的比例加入 M13K07 噬菌体，辅助噬菌粒侵染，在37℃条件静止培养30min，然后在37℃、200rpm条件下培养30min，最后采用4000rpm条件下离心10min，用1.0L等体积的2YT+100μg/mlAmp+50μg/ml Kana重悬，30℃培养16h，用于表达。待表达培养完成后，取菌液于4℃条件下，8000rpm离心30分钟，去上清。高速离心，去掉菌体，上清中加入1/5体积的PEG/NACL，沉淀上清中的Phage，离心后将Phage溶解于PBS中，测phage滴度约为$2*10^{11}$。

实施例 3.3 噬菌体库筛选抗 B7H3 抗体

3.3.1 hB7H3-his/cynoB7H3-his/MCF-7 亲和淘选

第一轮亲和淘洗：将 hB7H3-his 抗原（义翘神州）用 PH 值为 9.6 的碳酸盐缓冲液稀释至终浓度为 5μg /mL，按 100μL/孔加入酶标孔中，包被 8 孔，4℃包被过夜；第二轮亲和淘洗：将 cynoB7H3-

his 抗原（义翘神州）用 PH 值为 9.6 的碳酸盐缓冲液稀释至终浓度为 2μg /mL ，按 100μL/孔加入酶标孔中，包被 4 孔，4℃包被过夜。第三轮亲和淘洗: 胰酶消化 MCF -7 细胞，采用 DMEM+10%FBS 重选，50000 细胞/孔铺于 96 孔细胞板，37℃5% CO2 培养箱中培养过夜。弃包被液或细胞培养液，PBS 洗涤 3 次，每孔加入 300μL 3% OVA-PBS 封闭液，37℃封闭 1 小时； PBS 洗涤 3 次，加入 100μL 噬菌体文库，37℃孵育 0.5-1 小时；吸出未结合的噬菌体，用 PBST 洗涤 6-8 次，PBS 洗涤 2 次；加入 100μL Gly-HCl 洗脱液，37℃孵育 8 分钟，洗脱特异性结合的噬菌体；将该洗脱液转移至 1.5mL 无菌离心管中，迅速用 10μLTris-HCl 中和缓冲液中和；取 10μL 进行梯度稀释，测定滴度，计算淘选回收率，其余洗脱物混合后进行扩增和纯化，用于下一轮亲和淘选，改变淘选条件，每一轮淘选条件如下表 1。

表 1 亲和淘选条件

轮次	抗原包被浓度(μg/mL)	封闭液	文库投入量(cfu)	结合时间(h)	PBST 浓度	PBST 洗涤次数
1	5	OVA-PBS	2×10^{11}	1	0.1%	6
2	2	OVA-PBS	1×10^{11}	0.75	0.25%	8
3	MCF-7 50000 细胞/孔	OVA-PBS	1×10^{11}	0.5	0.5%	8

3.3.2 噬菌体的救援

从淘选洗脱物滴度的平板上，用灭菌牙签从第三轮滴度测定平板上各随机挑选 96 个克隆，接种于 1mL 2×YT-A 中，37℃，230 r/min 振荡培养 8 h。取 100 μL 上述培养物，按 cell：phage = 1：20 的比例加入 M13K07 噬菌体，37℃，静置 15 min，220 r/min 振荡培养 45 min。补加 800 μL 体积的 2×YT-AK，30℃，剧烈振荡培养过夜。第二天 12000 rpm 离心 2min，取上清，用于单克隆 ELISA 鉴定。

3.3.3 阳性噬菌体克隆的鉴定

将人 B7H3-4IgG-his 用 PH 值为 9.6 的碳酸盐缓冲液稀释至终浓度为 1μg /mL，和 2%OVA-PBS 按 100 μL/孔分别加入酶标孔中，4℃包被过夜；弃包被液，PBST 洗涤 3 次，每孔加入 300 μL 5%脱脂牛奶，37℃封闭 1 h；PBST 洗涤 1 次，每孔加入 50 μL 噬菌体培养菌液上清和 50μL 5%脱脂牛奶，37℃，孵育 1 h；PBST 洗涤 5 次，加入辣根过氧化物酶标记的抗 M13 抗体（用 PBS 按 1:10000 稀释），100 μL/孔，37℃作用 1 h；PBST 洗板 6 次。加入 TMB 显色液显色，100 μL/孔，37℃，7min，加入终止液终止反应，50 μL/孔，于 450 nm 下测定吸光度，共筛选到 9 个抗 B7H3 的 scFv 抗体具有独特序列，其中与肿瘤细胞结合最强的 scFv 抗体 1D1 序列如 SEQ ID NO:1 所示、2E3 序列如 SEQ ID NO:2 所示。

实施例 3.4 抗 B7H3 抗体表达

将 1D1 和 2E3 的 ScFv 的 VH 氨基酸序列 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:23 分别加上 IgG1 的恒定区氨基酸序列（SEQ ID NO:43）通过密码子优化及基因合成（上海生工生物技术有限公司），然后构建到 PTT5 载体上，分别命名为 PTT5-01-CH 和 PPT5-02-CH；将 1D1 和 2E3 的 ScFv 的 VL 氨基酸序列 SEQ ID NO:13 和 SEQ ID NO:33 加上 Kappa 恒定区序列（SEQ ID NO:44）通过密码子优化及基因合成（上海生工生物技术有限公司），然后构建到 PTT5 载体上，分别命名为 PTT5-01-CL 和 PTT5-01-CL；通过 PEI max 试剂将抗体 B7H3 抗体表达质粒 PTT5-01-CH/PTT5-01-CL、PTT5-02-CH/PTT5-02-

CL 共转染 HEK293F 细胞进行表达，37℃ 5%CO2 摇床表达 7 天，收集上清液，通过 ProA 磁珠进行纯化，获得抗 B7H3 抗体分别命名为 1D1-01、2E3-02。

实施例 3.5 抗 B7H3 抗体蛋白亲和力检测

通过 ELISA 实验方法检测 B7H3 全人源抗体与人 B7H3-4IgG-his 和猴 B7H3-4IgG-his 蛋白的亲和力。具体实验操作：将人 B7H3-4IgG-his 或猴 B7H3-4IgG-his 蛋白用 PH 值为 9.6 的碳酸盐缓冲液稀释至终浓度为 1μg /mL 按 100 μL/孔分别加入 96 孔酶标孔中，4℃包被过夜；弃包被液，PBST 洗涤 1 次，每孔加入 100 μL PBS（含 2%BSA），37℃封闭 1 小时；然后每孔加入 100 μL PBS（含 2%BSA）稀释好的 B7H3 全人源抗体（10μg 起始，3 倍稀释，2 复孔），37℃，孵育 2h；PBST 洗涤 3 次，加入辣根过氧化物酶标记的抗人 Fc 抗体（用 PBS 按 1:10000 稀释），100 μL/孔，37℃作用 1 小时；PBST 洗板 5 次。加入 TMB 显色液显色，100 μL/孔，37℃，7min，加入终止液终止反应，50 μL/孔，于 450 nm 下测吸光度。根据原始数据计算 EC50 值。

结果见图 1A，1B，2A 和 2B，详细结果如表 1-1 和 1-2 所示，1D1-01、2E3-02 与人 B7H3-4IgG 均具有较高亲和力，分别是 43.56pM 和 17.54pM，其中 2E3-02 强于 B7H3-C1 的亲和力 51.85pM；1D1-01、2E3-02 与猴 B7H3-4IgG 较高结合能力，分别是 35.82 pM 和 27.72pM。

表 1-1. 1D1-01 抗体蛋白亲和力检测结果

抗体	人 B7H3-4IgG-His EC50 (pM)	猴 B7H3-4IgG-His EC50 (pM)
1D1-01	43.56	35.82
B7H3-C1	48.03	166.52

表 1-2. 2E3-02 抗体蛋白亲和力检测结果

抗体	人 B7H3-4IgG-His EC50 (pM)	猴 B7H3-4IgG-His EC50 (pM)
2E3-02	17.54	27.72
B7H3-C1	51.85	3921

实施例 3.6 抗 B7H3 抗体细胞亲和力检测

B7H3 蛋白在多种实体瘤细胞上高表达，通过 FACS 实验方法检测 B7H3 全人源抗体与肿瘤细胞亲和力。具体实验操作：将生长至对数期的 MCF-7 乳腺癌细胞、A549 人非小细胞肺癌以及 PC3 人前列腺癌细胞通过胰酶消化，用含 2%BSA 的 PBS 缓冲液重悬到 5*10^5 细胞每毫升，加入 100uL 细胞悬液至 96 孔板中；用含有 2%BSA 的 PBS 缓冲液稀释 B7H3-C1、B7H3-C2，1D1-01 以及 2E3-02，起始浓度 40μg/mL，3 倍稀释，然后加入 100μL 抗体悬液至 96 孔板中混匀；4℃孵育 1 小时，采用预冷的 PBS 清洗 2 次，每次 300μL/孔，500g 离心 5 分钟；加入 1：50 荧光二抗 APC anti-Human IgG 或者 PE anti-human IgG (购买自 Biolegend) 100μL/每孔，混匀；4℃孵育 0.5 小时，采用预冷的 PBS 清洗 2 次，每次 300μL/孔，500g 离心 5 分钟，用 500μl PBS 重选，采用贝克曼流式细胞仪进行检测平均荧光信号值。将平均荧光信号值计算 EC50 值，结果见图 3A、3B、4A、4B 及图 5，具体数据见表 2-1 和 2-2。

表 2-1. 1D1-01 抗体细胞亲和力检测结果

抗体	MCF-7 肿瘤细胞		A549 肿瘤细胞	
	EC50（nM）	最大 MFI	EC50（nM）	最大 MFI
1D1-01	0.524	94465	0.322	11288

B7H3-C1	1.709	83992	1.865	8273

表 2-2. 2E3-02 抗体细胞亲和力检测结果

抗体	MCF-7 肿瘤细胞		A549 肿瘤细胞		PC-3 肿瘤细胞	
	EC50（nM）	最大 MFI	EC50（nM）	最大 MFI	EC50（nM）	最大 MFI
2E3-02	0.398	77732	0.150	84806	0.063	9729
B7H3-C1	1.360	63194	1.054	47956	0.618	6436
B7H3-C2	0.278	27925	未检测	未检测	0.167	2170

如表 2-1 和 2-2 所示，在 B7H3 高表达肿瘤细胞 MCF-7 上，1D1-01 和 2E3-02 亲和力分别是 0.524nM 和 0.398nM，均远高于 B7H3-C1，同时最大荧光信号值比 B7H3-C1 分别高 12%和 23%，其中 2E3-02 最大荧光信号值比对照抗体 2 高 2.78 倍。在 B7H3 中表达肿瘤细胞 A549 上，1D1-01 和 2E3-02 亲和力分别是 0.322nM 和 0.150nM，均远高于 B7H3-C1，同时最大荧光信号值比 B7H3-C1 分别高 36%和 77%。在 B7H3 低表达肿瘤细胞 PC-3 上， 2E3-02 亲和力 0.06nM 远高于 B7H3-C1 亲和力 0.618nM，也高于 B7H3-C1 亲和力 0.167 nM，同时最大荧光信号值分别是 B7H3-C1 和 B7H3-C2 的 1.51 和 4.48 倍。综合来看，抗 B7H3 抗体 1D1-01 和 2E3-02 比 B7H3-C1、B7H3-C1 均有更好的肿瘤细胞亲和力。

实施例 3.7 抗 B7H3 抗体动态亲和力检测

Fortibio 是常用的动态亲和力检测设备，通过其检测抗 B7H3 抗体与 B7H3 蛋白的动态亲和力。简述方法如下：对人 B7H3-4IgG-His 、人 B7H3-2IgG-His 或猴 B7H3-4IgG-His 采用 PBST 进行系列稀释，得到 200nM、100nM、50nM、25nM、12.5μM、6.25nM、3.125 nM、1.5625 nM 和 0 nM。ProA 生物传感器(Pall 生命科学)在使用前用 PBST 缓冲液预湿。将抗 B7H3 抗体用 PBST 稀释到 5μg/mL 并固化在 ProA 传感器上。然后将固化了抗体的传感器在 PBST 缓冲液中平衡 60s 以获得基线，然后转移到抗原稀释液结合 60s，再在 PBST 中解离 180s。在一个分析循环后，传感器用 10 mM Gly (pH 1.5) 再生。使用 Date analysis 用 1：1 模型分析，确定结合(Ka)和解离(Kd)速率常数并使用其来计算解离平衡常数(KD)。

如表 3 所示，1D1-01、2E3-02 与人 B7H3-4Ig-his 动态亲和力在 4.3E-11M 和 2.4E-10M，均远高于抗体 B7H3-C1 和抗体 B7H3-C2；同时 1D1-01、2E3-02 与猴 B7H3-4Ig-his 动态亲和力在 E-10M，具有良好猴交叉；1D1-01、2E3-02 与人 B7H3-4Ig-his/人 B7H3-2Ig-his 动态亲和力倍数分别是 9.5 和 32.5。

表 3 抗 B7H3 抗体分子的动态亲和力分析

抗体	人 B7H3-4Ig-his 亲和力 KD（M）	人 B7H3-2Ig-his 亲和力 KD（M）	猴 B7H4-4Ig-his 亲和力 KD（M）
1D1-01	4.3E-11	4.1E-10	2.5E-10
2E3-02	2.4E-10	7.8E-09	4.7E-10
B7H3-C1	5.4E-10	4.8 E-08	2.0 E-10
B7H3-C2	1.8E-09	7.1E-08	2.5 E-09

实施例 3.8 抗 B7H3 抗体特异性检测

通过 ELISA 实验方法检测 B7H3 抗体与 B7H3 结合特异性。具体实验操作：将人 B7-1、人 B7-2、人 B7H1-his、人 B7H2-his、人 B7H3-his、人 B7H4-his 蛋白（购买自义翘神州生物技术有限公司）用 PH 值为 9.6 的碳酸盐缓冲液稀释至终浓度为 1μg /mL 按 100 μL/孔分别加入 96 孔酶标孔中，4℃包被

过夜；弃包被液，PBST 洗涤 1 次，每孔加入 100 μL PBS（含 2%BSA），37℃封闭 1 h；然后每孔加入 100 μL PBS（含 2%BSA）稀释好的 B7H3 全人源抗体 10ug/mL， 37℃，孵育 2h；PBST 洗涤 3 次，加入辣根过氧化物酶标记的抗人 Fc 抗体（用 PBS 按 1:10000 稀释），100 μL/孔，37℃作用 1 h；PBST 洗板 5 次。加入 TMB 显色液显色，100 μL/孔，37℃，7min，加入终止液终止反应，50 μL/孔，于 450 nm 下测光密度。1D1-01 和 2E3-02 结果分别如图 6A,6B 所示。如结果所示 1D1-01、2E3-02 与人 B7H3 特异性结合，而不结合人 B7-1、人 B7-2、人 B7H1、人 B7H2、人 B7H4 蛋白。

实施例 3.9 抗 B7H3 抗体内吞活性检测

采用 FACS 方式检测 A549 人非小细胞肺癌细胞对抗 B7H3 抗体被细胞内吞的强弱。将生长至对数生长期的 A549 细胞采用胰酶进行消化，离心收集细胞，预冷 PBS 洗三次；用 PBS（含 1%BSA）重悬细胞，分别加入待检测抗 B7H3 抗体，浓度为 10 μg/mL，4℃孵育 1 小时；离心收集细胞，PBS 洗三次，用 DMEM+10% FBS 重悬细胞，将重悬后细胞分成 4 份，分别在 37℃孵育 0、1、2、4 小时；孵育相完成后，离心收集细胞，预冷 PBS 洗三次，用 50 μL 1%BSA（in PBS）重悬细胞，每孔加入 1μL 荧光二抗 APC anti-Human IgG（Biolegend），混匀，4℃孵育 0.5 小时；离心收集细胞，预冷 PBS 洗三次，用 200 μL PBS 重悬细胞，上机检测。按照公式：内吞率（%）=【1-（该时间点检测样品平均荧光值-该时间点阴性对照样品平均荧光值）/（0 小时检测样品平均荧光值-0 小时阴性对照样品平均荧光值）】*100。1D1-01 和 2E3-02 结果分别如图 7A 和 7B 所示，抗 B7H3 抗体 1D1-01 和 2E3-02 在 A549 肿瘤细胞上具有较强的内吞活性，4 小时能达到 40%左右，与抗体 B7H3-C1 相当。

实施例 3.10 抗 B7H3 抗体表位竞争检测

采用竞争 ELISA 方式检测抗 B7H3 抗体 1D1-01、2E3-02 与抗体 B7H3-C1 是否表位竞争。具体步骤如下：采用 CBS 包被液包被人 B7H3-4Ig-his 抗原，100ng/孔，4 度过夜孵育；去除包被液，用 300 μL PBS 洗孔一次，用 PBS（含 2% BSA）溶液封闭每个孔，100 μL 每孔，37 度孵育 2 小时；弃去除封闭液，将 1D1-01、2E3-02 抗体用 PBS（含 2% BSA）进行稀释，40 μg/mL 起始，2 倍稀释，总共 11 个稀释点，第 12 个点用稀释液代替，2 复孔，50 μL 每孔加入孔中；将生物素标记的 B7H3-C1 稀释至 50 ng/mL，50 μL 每孔加入孔中，25 度孵育 2 小时；用 300 μL PBST 洗孔，重复 3 次，加入用 PBS（含 2% BSA）进行 1：5000 倍数稀释 HRP 抗生物素二抗 100 μL/孔，25 度孵育 1 小时；用 300 μL PBST 洗孔，重复 5 次；每孔加入 100 μL TMB 显色液（安徽湖州英创），室温显色 5 分钟后每孔加入 50 μL H2SO4 终止反应，立即用酶标仪读取 OD450 nm。将原始数据导入 Graph-prism 计算 EC50 值，结果见图 8A 与 8B。结果表明，抗 B7H3 抗体 1D1-01 与抗体 B7H3-C1 存在结合表位竞争；抗 B7H3 抗体 2E3-02 与抗体 B7H3-C1 不存在结合表位竞争。

实施例 3.11 Her3 抗原制备

选取人 Her3 的 1-643 位氨基酸 (NCBI：NP_001973.2)的核酸序列，其中 C 端添加检测 6xHis 标签，命名为人 Her3-his。选取猴 Her3 的氨基酸序列，其中 C 端添加检测 6xHis 标签，命名为猴 Her3-his。选取鼠 Her3 的氨基酸序列，其中 C 端添加检测 6×His 标签，命名为猴 Her3-his。

实施例 3.12 抗 Her3 抗体表达

将抗体 202-2-1 重链可变区（SEQ ID NO:49）加上重链 IgG1 恒定区（SEQ NO:43），抗体 202-2-1 轻链可变区（SEQ NO:50）与 Kappa 恒定区序列（SEQ ID NO:44），抗体 Her3-C3（patritumab ）来

自于第一三共公司，其序列来自 IMGT 数据库 IMGT/mAb-DB ID：964 ，INN 编号：11093，以及来自于 MediaPharma 公司专利 CN 103189392 B（重链 SEQ ID NO:10，轻链 SEQ ID NO:14）的抗体 Her3-C4，通过密码子优化及基因合成，然后分别构建到 PTT5 载体上。通过 PEI max 试剂将抗 Her3 抗体重链和轻链表达质粒分别共转染 HEK293F 细胞进行表达，37℃ 5%CO_2 摇床表达 7 天，收集上清液，通过 ProteinA 磁珠进行纯化，获得抗 Her3 抗体分别命名为：202-2-1（其重链序列为 SEQ ID NO 51，轻链序列为 SEQ ID NO 52），抗体 Her3-C3。

实施例 3.13 抗 Her3 抗体蛋白亲和力检测

通过 ELISA 实验方法检测抗 Her3 抗体与 Her3 蛋白的亲和力。具体实验操作：将人 Her3-his、猴 Her3-his 蛋白以及大鼠 Her3-his 用 PH 值为 9.6 的碳酸盐缓冲液稀释至终浓度为 1μg /mL 按 100 μL/孔分别加入 96 孔酶标孔中，4℃包被过夜；弃包被液，PBST 洗涤 1 次，每孔加入 100 μL PBS（含 2%BSA），37℃封闭 1 小时；然后每孔加入 100 μL PBS（含 2%BSA）稀释好的抗 Her3 抗体（1ug 起始，3 倍稀释，2 复孔），37℃，孵育 2h；PBST 洗涤 3 次，加入辣根过氧化物酶标记的抗人 Fc 抗体（用 PBS 按 1:10000 稀释），100 μL/孔，37℃作用 1 小时；PBST 洗板 5 次。加入 TMB 显色液显色，100 μL/孔，37℃，7min，加入终止液终止反应，50 μL/孔，于 450 nm 下测吸光度。将原始数据导入 Graph-prism 计算 EC50 值，详细结果如表 4 所示，202-2-1 与人 Her3 蛋白以及猴 Her3 蛋白有强的结合与抗体 Her3-C4 相当，均不与大鼠 Her3 蛋白结合。

表 4 抗 Her3 抗体蛋白亲和力检测结果

抗体名称	人 Her3-his EC50 (pM)	猴 Her3-his EC50 (pM)	大鼠 Her3-his EC50 (pM)
202-2-1	20.97	15.91	不结合
Her3-C4	27.72	9.275	不结合

实施例 3.14 抗 Her3 抗体内吞活性检测

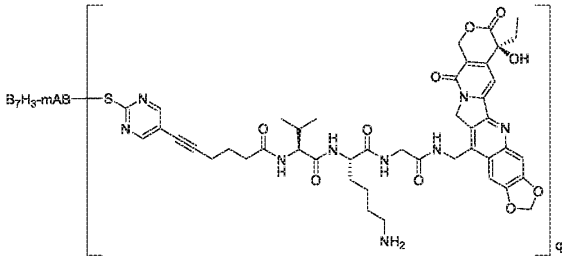
采用 FACS 方式检测 A549-人 Her3（人非小细胞肺癌细胞）对抗 Her3 抗体被细胞内吞的强弱。将生长至对数生长期的 A549-人 Her3 细胞采用胰酶进行消化，离心收集细胞，预冷 PBS 洗三次；用 PBS（含 1%BSA）重悬细胞，分别加入待检测抗 Her3 抗体，浓度为 10 ug/mL，4℃孵育 1 小时；离心收集细胞，PBS 洗三次，用 DMEM+10% FBS 重悬细胞，将重悬后细胞分成 4 份，分别在 37℃孵育 0、1、2、4 小时；孵育相完成后，离心收集细胞，预冷 PBS 洗三次，用 50 uL 1%BSA（in PBS）重悬细胞，每孔加入 1 uL 荧光二抗 APC anti-Human IgG（Biolegend），混匀，4℃孵育 0.5 小时；离心收集细胞，预冷 PBS 洗三次，用 200 uL PBS 重悬细胞，流式细胞仪（贝克曼，型号 CytoFlex）上机检测。按照公式：内吞率（%）=【1-（该时间点检测样品平均荧光值-该时间点阴性对照样品平均荧光值）/（0 小时检测样品平均荧光值-0 小时阴性对照样品平均荧光值）】*100。结果如图 7C 显示，抗 Her3 抗体 202-2-1 在 A549-人 Her3 肿瘤细胞上具有较强的内吞活性 4 小时能达到 26.9%左右，强于抗体 Her3-C4 的 16.6%,与抗体 Her3-C3 相当。但抗 Her3 抗体 202-2-1 内吞先于 Her3-C4/ Her3-C3 达到最大内吞率，具有快于 Her3-C4/ Her3-C3 的内吞速率。

四、包含细胞生物活性分子和连接体的化合物与抗体的偶联

实施例 4.1：B7H3-ADC 的制备

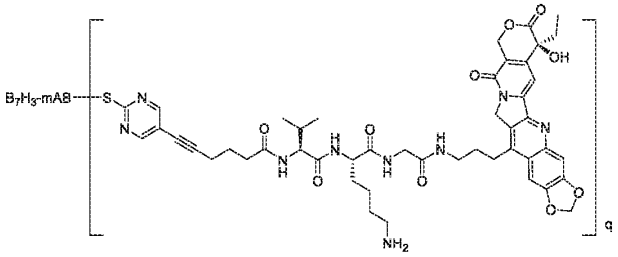
实施例 4.1.1：B7H3-ADC-01 的制备

取 0.3mL B7H3 抗体(2E3-02 抗体)33.5 mg/mL，用 0.25mL 20mM PB+150mM NaCl+20mM 依地酸钠溶液（pH 7.6）稀释，后加入 0.45mL 20mM PB+150mM NaCl 溶液（pH 7.6）混匀，以 1M K_2HPO_4 溶液调 pH 至 7.4，加入 10 mM TCEP（三(2-羧乙基)膦，0.033 ml，0.33μmol）溶液混匀，室温放置 30 min。向上述溶液体系加入 DL001（1.35 mg，20 倍抗体物质摩尔数量）的二甲基亚砜（0.1mL）溶液，混匀，室温静置 2h，完毕后加入 100mM 半胱氨酸 6.1μl 终止反应。最后采用 G-25 凝胶柱将缓冲液置换为 pH6.44 的 20 mM PB 缓冲溶液。得到 DL-001 与 B7H3 抗体的偶联产物 B7H3-ADC-01。质谱法测定 DAR 值为 7.8。



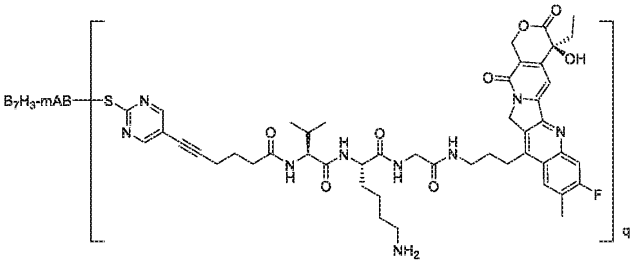
实施例 4.1.2：B7H3-ADC-02 的制备

用化合物 DL-011 代替实施例 4.1.1 的化合物 DL-001，得到 DL-011 与 B7H3 抗体的偶联产物 B7H3-ADC-02。质谱法测定 DAR 值为 7.8。



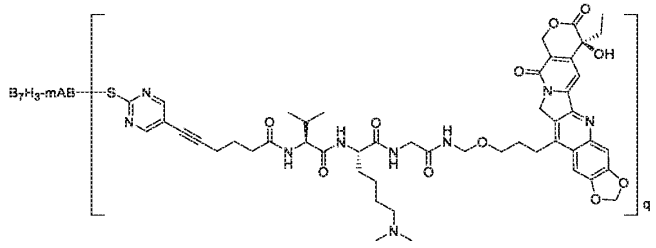
实施例 4.1.3：B7H3-ADC-03 的制备

用化合物 DL-020 代替实施例 4.1.1 的化合物 DL-001，得到 DL-020 与 B7H3 抗体的偶联产物 B7H3-ADC-03。质谱法测定 DAR 值为 7.8。



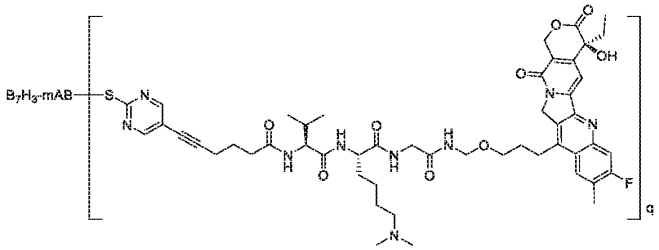
实施例 4.1.4：B7H3-ADC-04 的制备

用化合物 DL-019 代替实施例 4.1.1 的化合物 DL-001，得到 DL-019 与 B7H3 抗体的偶联产物 B7H3-ADC-04。质谱法测定 DAR 值为 7.8。



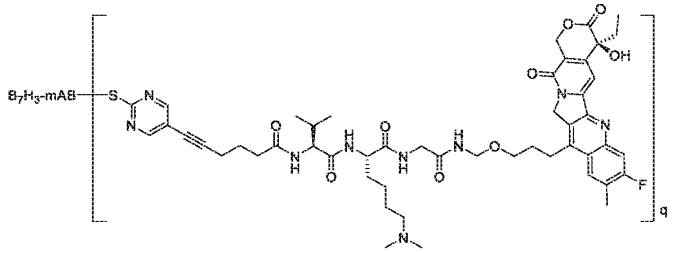
实施例 4.1.5.1：B7H3-ADC-05(DAR8)的制备

用化合物 DL-018 代替实施例 4.1.1 的化合物 DL-001，得到 DL-018 与 B7H3 抗体的偶联产物 B7H3-ADC-05。质谱法测定 DAR 值为 7.8。



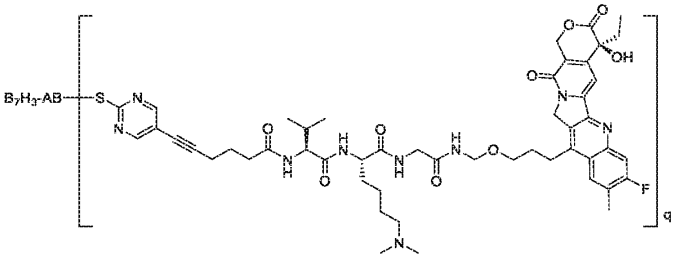
实施例 4.1.5.2：B7H3-ADC-05(DAR4)的制备

用化合物 DL-018 代替实施例 4.1.7.3 的化合物 DL-037，得到 DL-018 与 B7H3 抗体的偶联产物 B7H3-ADC-05（DAR4）。质谱法测定 DAR 值。



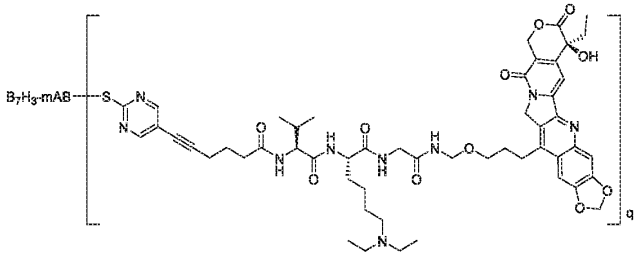
实施例 4.1.5.3：B7H3-C1-ADC-05(DAR4)的制备

用化合物 DL-018 代替实施例 4.1.7.3 的化合物 DL-037，将 2E3-02 抗体替换为抗体 B7H3-C1，得到 DL-018 与 B7H3 抗体的偶联产物 B7H3-C1-ADC-05（DAR4）。质谱法测定 DAR 值。

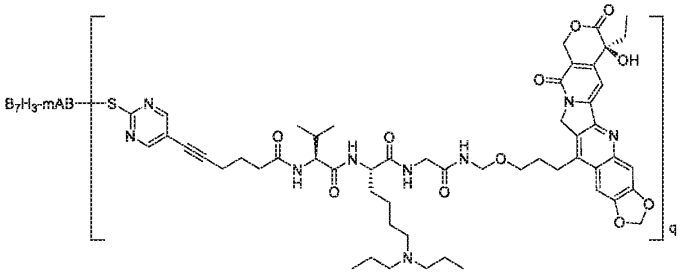


实施例 4.1.6：B7H3-ADC-06 的制备

用化合物 DL-036 代替实施例 4.1.1 的化合物 DL-001，得到 DL-036 与 B7H3 抗体的偶联产物 B7H3-ADC-06。质谱法测定 DAR 值为 7.7。



实施例 4.1.7：B7H3-ADC-07 的制备



4.1.7.1 B7H3-ADC-07(DAR8)样品制备

制备方法 A：用化合物 DL-037 代替实施例 4.1.1 的化合物 DL-001，得到 DL-037 与 B7H3 抗体的偶联产物 B7H3-ADC-07(DAR8)。质谱法测定 DAR 值为 7.7。

制备方法 B：取 25ml 2E3-02 抗体（抗 B7H3，浓度 28.5mg/ml，20mM 醋酸缓冲液），向其中加入 25ml 20mM 醋酸缓冲液稀释，随后添加 1ml 含有 0.25M EDTA 的水溶液并混匀，用 0.5M 磷酸氢二钠水溶液调样品 pH 至 7.6 后加入抗体 4.5 倍当量的 20mM TCEP（三（2-羧乙基）膦盐酸盐）溶液并混匀，室温下反应 90min。最后加入抗体 10 倍当量的溶解在 DMSO 中的 DL-037，混匀后继续室温反应 2h。反应结束后使用 30KDa 的超滤管将样品置换到 pH 为 5.5 的 10mM 组氨酸缓冲液中并去除低分子物质，最后将样品浓缩以获得含有抗 B7H3 抗体 ADC 组合物的溶液 B7H3-ADC-07(DAR8)，质谱法测定 DAR 值为 7.98。

4.1.7.2 B7H3-ADC-07(DAR2)样品制备

取 5ml 2E3-02 抗体（抗 B7H3，浓度 28.5mg/ml，20mM 醋酸缓冲液），向其中加入 5ml 20mM 醋酸缓冲液稀释，随后添加 0.2ml 含有 0.25M EDTA 的水溶液并混匀，用 0.5M 磷酸氢二钠水溶液调样品 pH 至 7.6 后加入抗体 4.5 倍当量的 20mM TCEP（三（2-羧乙基）膦盐酸盐）溶液并混匀，室温下反应 90min。最后加入抗体 2.4 倍当量的溶解在 DMSO 中的 DL-037，混匀后继续室温反应 2h。反应结束后使用 30KDa 的超滤管将样品置换到 pH 为 5.5 的 10mM 组氨酸缓冲液中并去除低分子物质，最后将样品浓缩以获得含有抗 B7H3 抗体 ADC 组合物的溶液 B7H3-ADC-07(DAR2)，质谱法测定 DAR 值为 2.3。

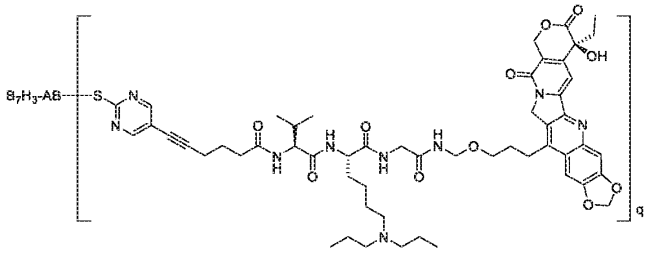
4.1.7.3

(1)B7H3-ADC-07(DAR4) 样品制备

取 5ml 2E3-02 抗体（抗 B7H3，浓度 28.5mg/ml，20mM 醋酸缓冲液），向其中加入 5ml 20mM 醋酸缓冲液稀释，随后添加 0.2ml 含有 0.25M EDTA 的水溶液并混匀，用 0.5M 磷酸氢二钠水溶液调样品 pH 至 7.6 后加入抗体 4.5 倍当量的 20mM TCEP（三（2-羧乙基）膦盐酸盐）溶液并混匀，室温下反应 90min。最后加入抗体 4.8 倍当量的溶解在 DMSO 中的 DL-037，混匀后继续室温反应 2h。反应结束后使用 30KDa 的超滤管将样品置换到 pH 为 5.5 的 10mM 组氨酸缓冲液中并去除低分子物质，最后将样品浓缩以获得含有抗 B7H3 抗体 ADC 组合物的溶液 B7H3-ADC-07(DAR4) ，质谱法测定 DAR 值为 4.1。

(2)B7H3-C1-ADC-07(DAR4) 样品制备

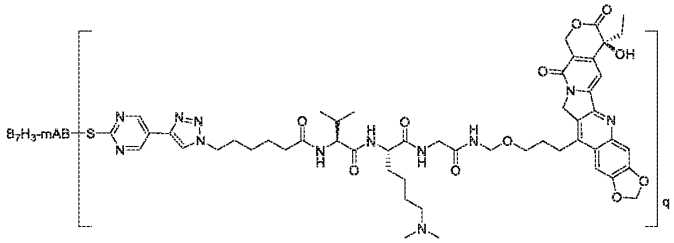
利用 B7H3-ADC-07(DAR4)制备的方法，将 2E3-02 抗体替换为抗体 B7H3-C1，获得抗体 B7H3-C1 的 ADC 组合物的溶液 B7H3-C1-ADC-07(DAR4) ，质谱法测定 DAR 值为 4.9。



4.1.7.4 B7H3-ADC-07(DAR6)样品制备

取 5ml 2E3-02 抗体（抗 B7H3，浓度 28.5mg/ml，20mM 醋酸缓冲液），向其中加入 5ml 20mM 醋酸缓冲液稀释，随后添加 0.2ml 含有 0.25M EDTA 的水溶液并混匀，用 0.5M 磷酸氢二钠水溶液调样品 pH 至 7.6 后加入抗体 4.5 倍当量的 20mM TCEP（三（2-羧乙基）膦盐酸盐）溶液并混匀，室温下反应 90min。最后加入抗体 7.2 倍当量的溶解在 DMSO 中的 DL-037，混匀后继续室温反应 2h。反应结束后使用 30KDa 的超滤管将样品置换到 pH 为 5.5 的 10mM 组氨酸缓冲液中并去除低分子物质，最后将样品浓缩以获得含有抗 B7H3 抗体 ADC 组合物的溶液 B7H3-ADC-07(DAR6)，质谱法测定 DAR 值为 5.4。

实施例 4.1.8：B7H3-ADC-08 的制备



4.1.8.1 B7H3-ADC-08(DAR8)样品制备

用化合物 DL-028 代替实施例 4.1.1 的化合物 DL-001，得到 DL-028 与 B7H3 抗体的偶联产物 B7H3-ADC-08(DAR8)。质谱法测定 DAR 值为 7.3。

同时，用化合物 DL-028 代替实施例 4.1.7 制备方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-028 与 B7H3 抗体的偶联产物 B7H3-ADC-08(DAR8)，质谱法测定 DAR 值，结果如下：

肽链	理论值	实测值	面积	比例	DAR
LC	23335	未检出	0	0	7.321946
LC+DAR1	24368.4	23247.05	70520268	1	
HC	50735	50371.9	409745	0.068972	
HC+DAR1	51768.4	51405.98	151226	0.025456	
HC+DAR2	52801.8	52438.75	482382	0.081199	
HC+DAR3	53835.2	53471.3	4897381	0.824373	

4.1.8.2

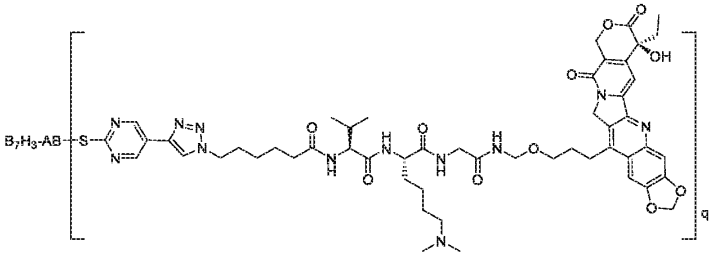
（1）B7H3-ADC-08(DAR4)样品制备

用化合物 DL-028 代替实施例 4.1.7.3 B7H3-ADC-07(DAR4)的制备

的化合物 DL-037，得到 DL-028 与 B7H3 抗体的偶联产物 B7H3-ADC-08(DAR4)，质谱法测定 DAR 值为 4.7。

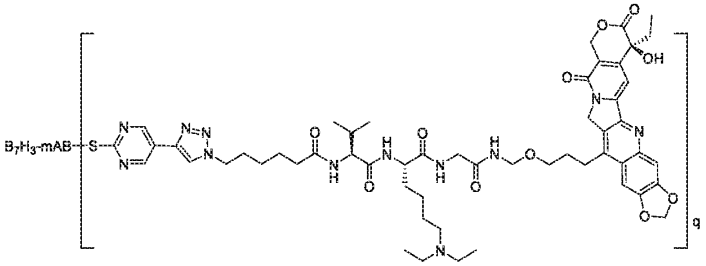
（2）B7H3-C1-ADC-08(DAR4)

用化合物 DL-028 代替实施例 4.1.7.3 B7H3-C1-ADC-07(DAR4) 的制备的化合物 DL-037，得到 DL-028 与 B7H3 抗体的偶联产物 B7H3-C1-ADC-08，质谱法测定 DAR 值为 4.7。



实施例 4.1.9：B7H3-ADC-09 的制备

用化合物 DL-029 代替实施例 4.1.1 的化合物 DL-001，得到 DL-029 与 B7H3 抗体的偶联产物 B7H3-ADC-09。质谱法测定 DAR 值为 7.6。



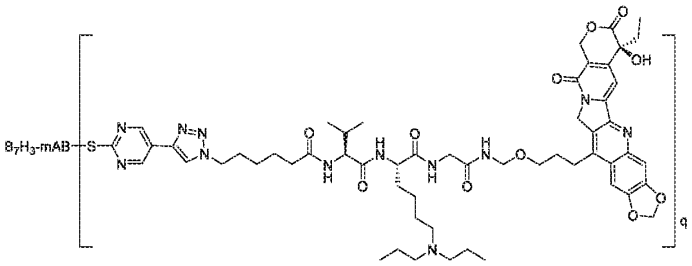
同时，用化合物 DL-029 代替实施例 4.1.7 制备方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-029 与 B7H3 抗

体的偶联产物 B7H3-ADC-09，质谱法测定 DAR 值，结果如下：

肽链	理论值	实测值	面积	比例	DAR
LC	23245	23247.03	6274384	0.094179	7.811641
LC+DAR1	24306	24308.41	60347328	0.905821	
HC	50367	未检出	0	0	
HC+DAR1	51428	未检出	0	0	
HC+DAR2	52489	未检出	0	0	
HC+DAR3	53550	53555.46	10285189	1	

实施例 4.1.10：B7H3-ADC-10 的制备

用化合物 DL-030 代替实施例 4.1.1 的化合物 DL-001，得到 DL-030 与 B7H3 抗体的偶联产物 B7H3-ADC-10。质谱法测定 DAR 值为 7.6。

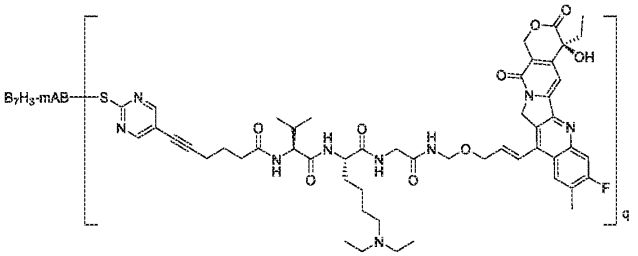


同时，用化合物 DL-030 代替实施例 4.1.7 制备方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-030 与 B7H3 抗体的偶联产物 B7H3-ADC-10，质谱法测定 DAR 值，结果如下：

肽链	理论值	实测值	面积	比例	DAR
LC	23245	未检出	0	0	8
LC+DAR1	24194.4	24336.45	66512554	1	
HC	50367	未检出	0	0	
HC+DAR1	51316.4	未检出	0	0	
HC+DAR2	52165.8	未检出	0	0	
HC+DAR3	53215.2	未检出	11529758	1	

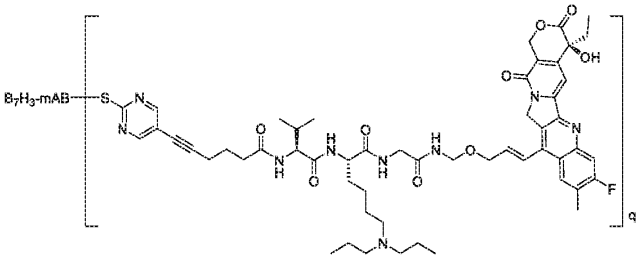
实施例 4.1.11：B7H3-ADC-11 的制备

用化合物 DL-045 代替实施例 4.1.1 的化合物 DL-001，得到 DL-045 与 B7H3 抗体的偶联产物 B7H3-ADC-11。质谱法测定 DAR 值为 7.5。



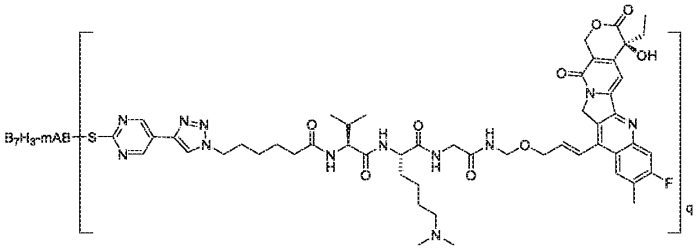
实施例 4.1.12：B7H3-ADC-12 的制备

用化合物 DL-046 代替实施例 4.1.1 的化合物 DL-001，得到 DL-046 与 B7H3 抗体的偶联产物 B7H3-ADC-12。质谱法测定 DAR 值为 7.6。



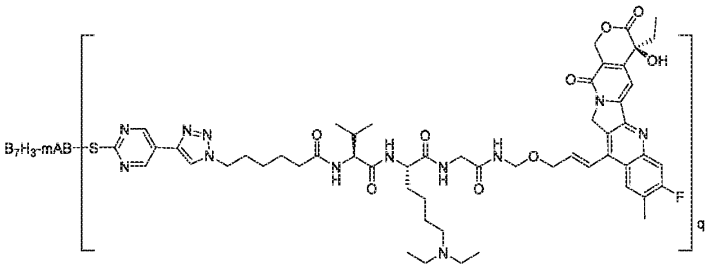
实施例 4.1.13：B7H3-ADC-13 的制备

用化合物 DL-041 代替实施例 4.1.1 的化合物 DL-001，得到 DL-041 与 B7H3 抗体的偶联产物 B7H3-ADC-13。质谱法测定 DAR 值为 7.8。

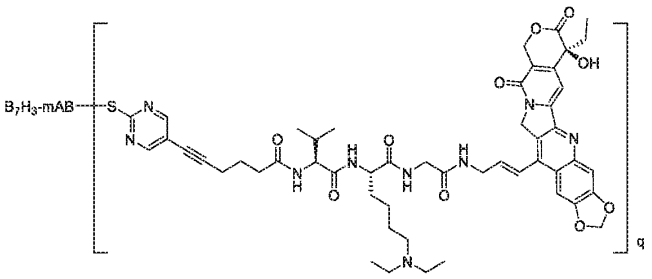


实施例 4.1.14：B7H3-ADC-14 的制备

用化合物 DL-042 代替实施例 4.1.1 的化合物 DL-001，得到 DL-042 与 B7H3 抗体的偶联产物 B7H3-ADC-14。质谱法测定 DAR 值为 7.9。



实施例 4.1.15：B7H3-ADC-15 的制备



4.1.15.1 B7H3-ADC-15(DAR8)样品制备

用化合物 DL-027 代替实施例 4.1.1 的化合物 DL-001，得到 DL-027 与 B7H3 抗体的偶联产物 B7H3-ADC-15(DAR8)。质谱法测定 DAR 值为 7.8。

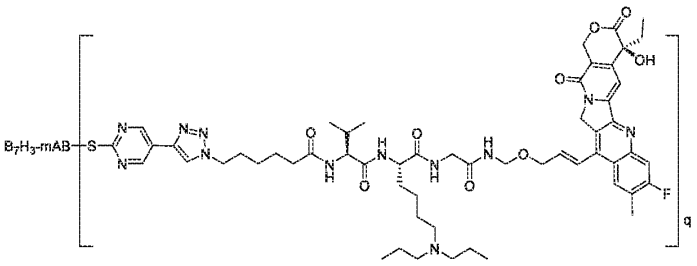
4.1.15.2 B7H3-ADC-15(DAR4)样品制备

用化合物 DL-027 代替实施例 4.1.7.3 B7H3-ADC-07(DAR4)的制备

的化合物 DL-037，得到 DL-027 与 B7H3 抗体的偶联产物 B7H3-ADC-15(DAR4)，质谱法测定 DAR 值为 3.4。

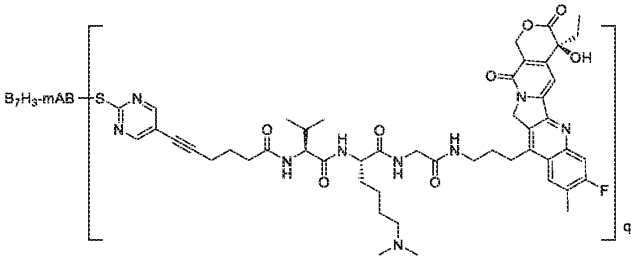
实施例 4.1.16：B7H3-ADC-16 的制备

用化合物 DL-043 代替实施例 4.1.1 的化合物 DL-001，得到 DL-043 与 B7H3 抗体的偶联产物 B7H3-ADC-16。质谱法测定 DAR 值为 7.4。



实施例 4.1.17：B7H3-ADC-17 的制备

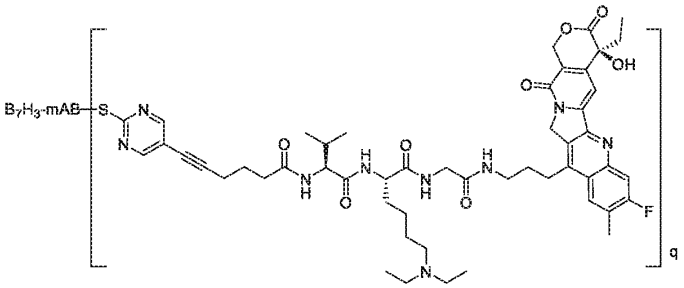
用化合物 DL-024 代替实施例 4.1.7 制备方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-024 与 B7H3 抗体的偶联产物 B7H3-ADC-17，质谱法测定 DAR 值。



实施例 4.1.18：B7H3-ADC-18 的制备

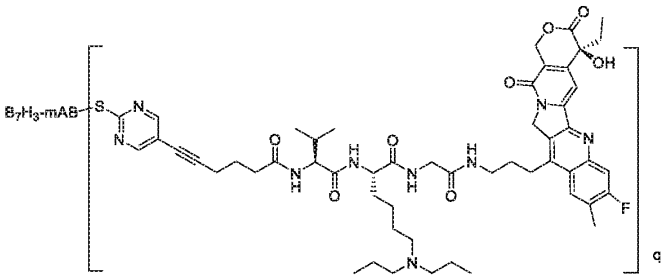
用化合物 DL-025 代替实施例 4.1.7 制备方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-025 与 B7H3 抗体的

偶联产物 B7H3-ADC-18，质谱法测定 DAR 值 8.0。



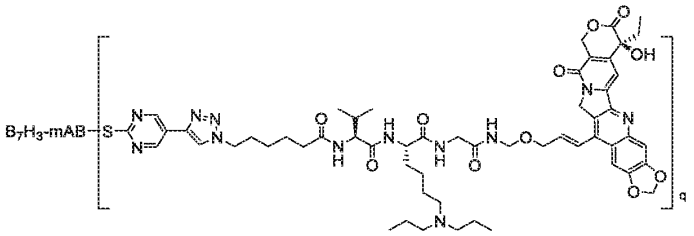
实施例 4.1.19：B7H3-ADC-19 的制备

用化合物 DL-026 代替实施例 4.1.7 制备方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-026 与 B7H3 抗体的偶联产物 B7H3-ADC-19，质谱法测定 DAR 值 8.0。



实施例 4.1.20：B7H3-ADC-20 的制备

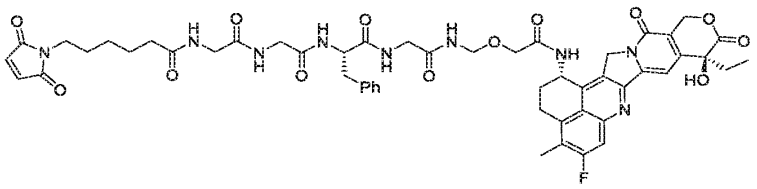
用化合物 DL-038 代替实施例 4.1.7 制备方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-038 与 B7H3 抗体的偶联产物 B7H3-ADC-20，质谱法测定 DAR 值为 7.3。



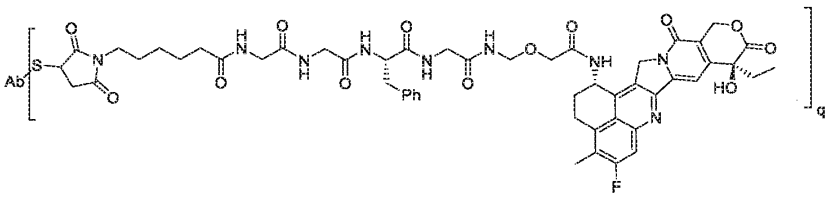
肽链	理论值	实测值	面积	比例	DAR
LC	23245	23247.17	29131808	0.323854	7.306055
LC+DAR1	24331.5	24334.63	60821684	0.676146	
HC	50375	未检出	0	0	
HC+DAR1	51461	未检出	0	0	
HC+DAR2	52547.83	52547.83	159238	0.023119	
HC+DAR3	53633.84	53633.84	6728635	0.976881	

实施例 4.1.21：B7H3-ADC-21 的制备

参照 CN104755494B 制备获得药物-连接体化合物如下，



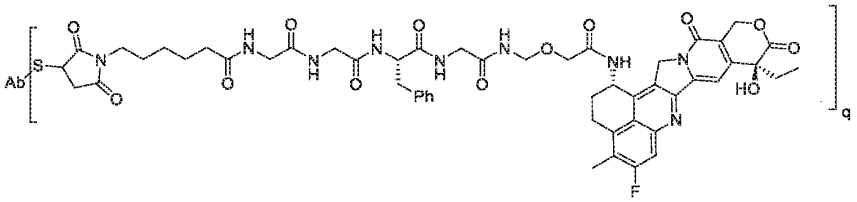
用上述药物-连接体化合物代替实施例 4.1.7.1 制备方法 B 的化合物 DL-037，获得 B7H3-ADC-21（DAR8），其结构如下，并质谱法测定 DAR 值为 7.8。



用上述药物-连接体化合物代替实施例 4.1.7.2 的化合物 DL-037，获得 B7H3-ADC-21（DAR2），其结构如下，并质谱法测定 DAR 值为 2.0。

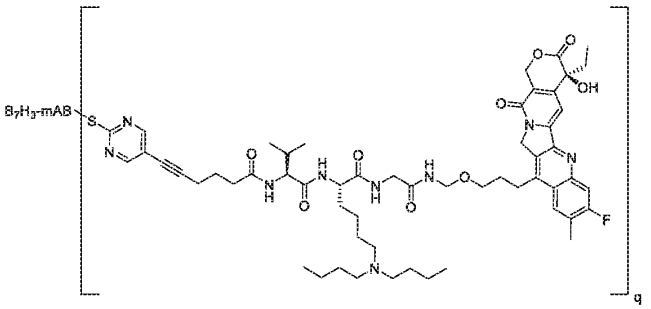
用上述药物-连接体化合物代替实施例 4.1.7.3 的化合物 DL-037，对照卡尼 1 替换 2E3-02 抗体，获得 B7H3-C1-ADC-21（DAR4），其结构如下，并质谱法测定 DAR 值为 4.5。

用上述药物-连接体化合物代替实施例 4.1.7.4 的化合物 DL-037，获得 B7H3-ADC-21（DAR6），其结构如下，并质谱法测定 DAR 值为 5.4。



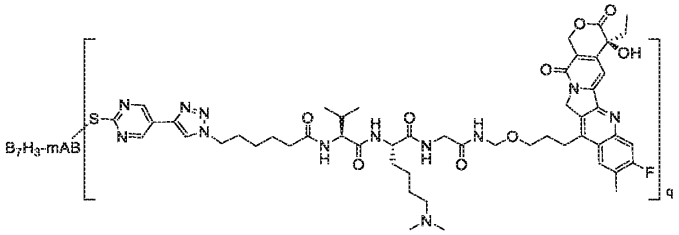
实施例 4.1.22：B7H3-ADC-22 的制备

用化合物 DL-048 代替实施例 4.1.7 制备方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-048 与 B7H3 抗体的偶联产物 B7H3-ADC-22，质谱法测定 DAR 值为 8.0。



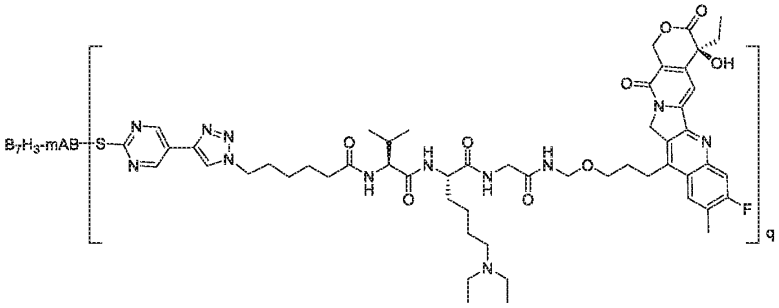
实施例 4.1.23：B7H3-ADC-23 的制备

用化合物 DL-031 代替实施例 4.1.7 制备方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-031 与 B7H3 抗体的偶联产物 B7H3-ADC-23，质谱法测定 DAR 值为 8.0。



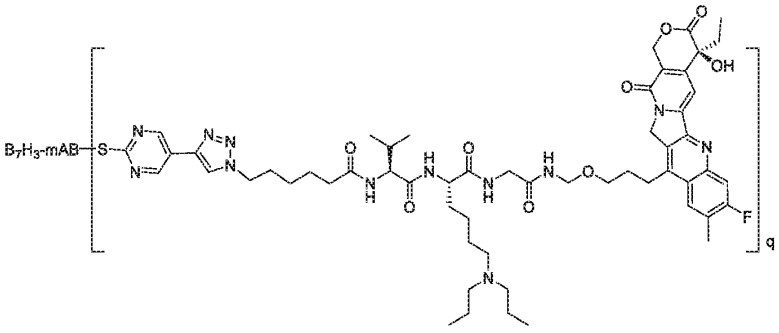
实施例 4.1.24：B7H3-ADC-24 的制备

用化合物 DL-032 代替实施例 4.1.7 制备方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-032 与 B7H3 抗体的偶联产物 B7H3-ADC-24，质谱法测定 DAR 值为 8.0。



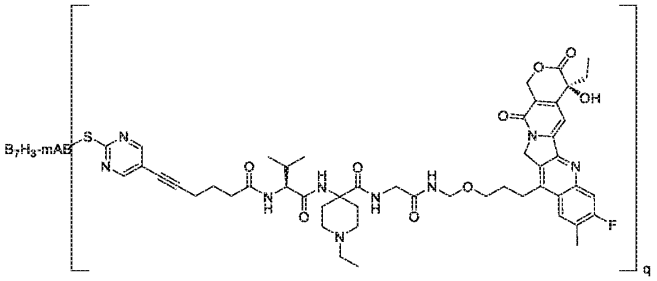
实施例 4.1.25：B7H3-ADC-25 的制备

用化合物 DL-033 代替实施例 4.1.7 制备方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-033 与 B7H3 抗体的偶联产物 B7H3-ADC-25，质谱法测定 DAR 值为 8.0。



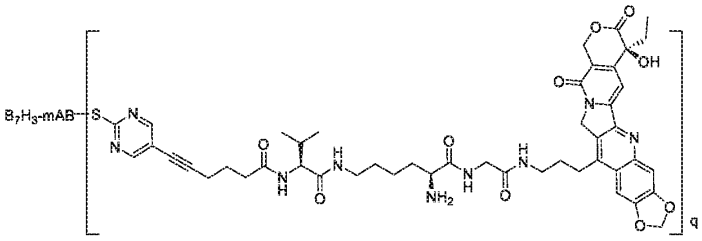
实施例 4.1.27：B7H3-ADC-27 的制备

用化合物 DL-050 代替实施例 4.1.7 制备方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-050 与 B7H3 抗体的偶联产物 B7H3-ADC-27，质谱法测定 DAR 值为 8.0。



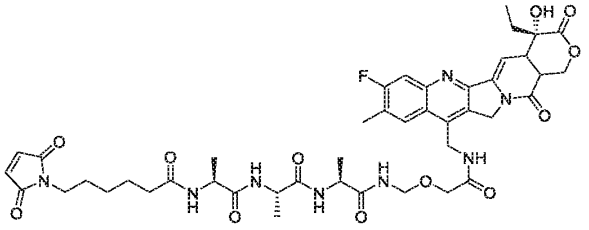
实施例 4.1.28：B7H3-ADC-28 的制备

用化合物 DL-021 代替实施例 4.1.7 制备方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-021 与 B7H3 抗体的偶联产物 B7H3-ADC-28，质谱法测定 DAR 值为 8.0。



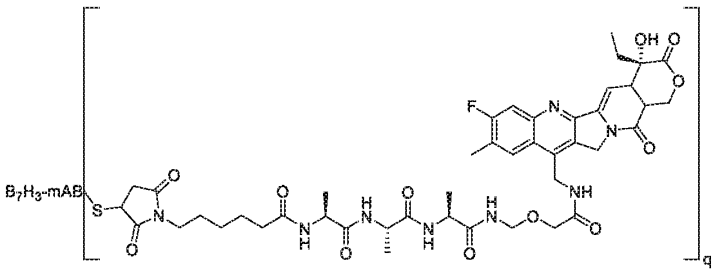
实施例 4.1.29：B7H3-ADC-32 的制备

参照 WO2020219287 实施例 16 制备获得药物-连接体化合物如下，



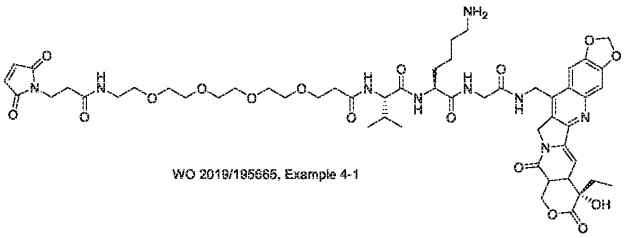
WO 2020/219287, Example 22a

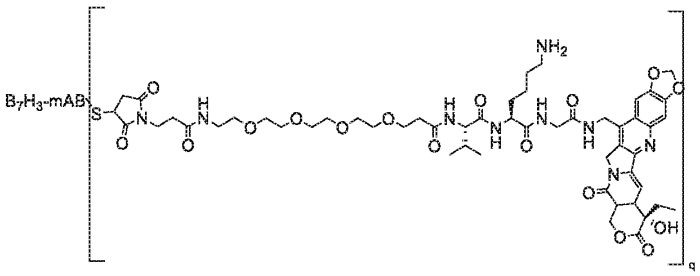
用上述药物-连接体化合物代替实施例 4. 1.7 制备方法 B 的化合物 DL-037，获得 B7H3-ADC-32。质谱法测定 DAR 值为 7.3。



实施例 4.1.30：B7H3-ADC-33 的制备

参照 WO2019195665 实施例 4-1 制备获得药物-连接体化合物如下，





4.1.30.1 B7H3-ADC-33(DAR8)样品制备

用上述药物-连接体化合物代替实施例 4. 1.7 制备方法 B 的化合物 DL-037，获得 B7H3-ADC-33(DAR8)。质谱法测定 DAR 值为 7.4。

4.1.30.2 B7H3-ADC-33(DAR4)样品制备

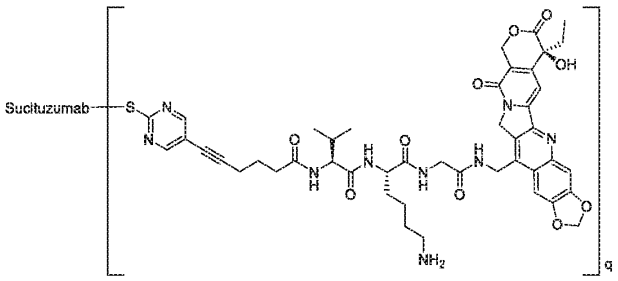
用上述药物-连接体化合物代替实施例 4. 1.7.3 B7H3-ADC-07(DAR4)的制备的化合物 DL-037，获得 B7H3-ADC-33（DAR4）。质谱法测定 DAR 值为 4.9。

注：B7H3-mAB 为 2E3-02 抗体，B7H3-AB 为 B7H3-C1。

4.2：Trop2-ADC 的制备

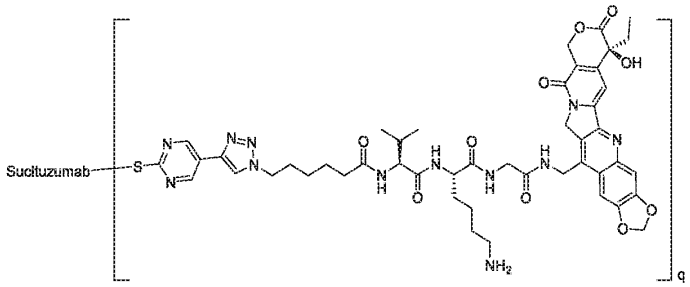
实施例 4.2.1 Trop2-ADC-01（DAR8）的制备

取 0.3mL Sacituzumab 抗体（抗 Trop-2，33.5mg/mL），用 0.25mL 20mM PB+150mM NaCl+20mM 依地酸钠溶液（pH 7.6）稀释，后加入 0.45mL 20mM PB+150mM NaCl 溶液（pH 7.6）混匀，以 1M K_2HPO_4 溶液调 pH 至 7.4，加入 10 mM TCEP（三(2-羧乙基)膦，0.033 ml，0.33μmol）溶液混匀，室温放置 30 min。向上述溶液体系加入 DL001（1.35 mg，20 倍抗体物质摩尔数量）的二甲基亚砜（0.1mL）溶液，混匀，室温静置 2h，完毕后加入 100mM 半胱氨酸 6.1μl 终止反应。最后采用 G-25 凝胶柱将缓冲液置换为 pH6.44 的 20 mM PB 缓冲溶液。得到 DL-001 与 Sacituzumab 抗体的偶联产物 Trop2-ADC-01（DAR8）。质谱法测定 DAR 值为 7.8。



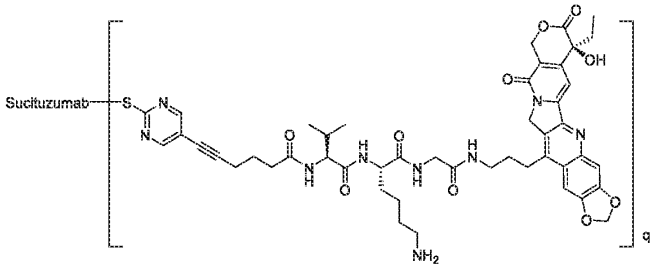
实施例 4.2.2：Trop2-ADC-02（DAR8）的制备

用化合物 DL-009 代替实施例 4.2.1 的化合物 DL-001，得到 DL-009 与 Sacituzumab 抗体的偶联产物 Trop2-ADC-02（DAR8）。质谱法测定 DAR 值为 7.9。



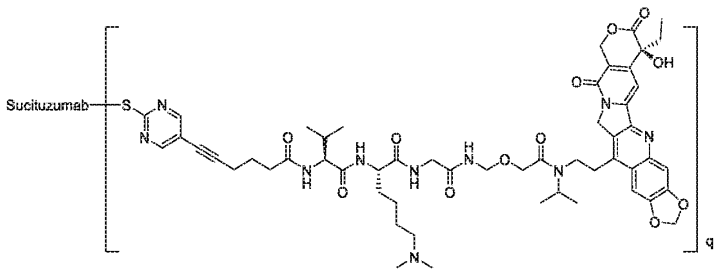
实施例 4.2.3：Trop2-ADC-03（DAR8）的制备

用化合物 DL-011 代替实施例 4.2.1 的化合物 DL-001，得到 DL-011 与 Sacituzumab 抗体的偶联产物 Trop2-ADC-03（DAR8）。质谱法测定 DAR 值为 7.8。



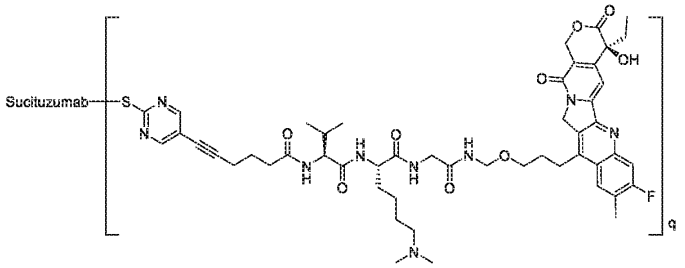
实施例 4.2.4：Trop2-ADC-04（DAR8）的制备

用化合物 DL-015 代替实施例 4.2.1 的化合物 DL-001，得到 DL-015 与 Sacituzumab 抗体的偶联产物 Trop2-ADC-04（DAR8）。质谱法测定 DAR 值为 7.9。



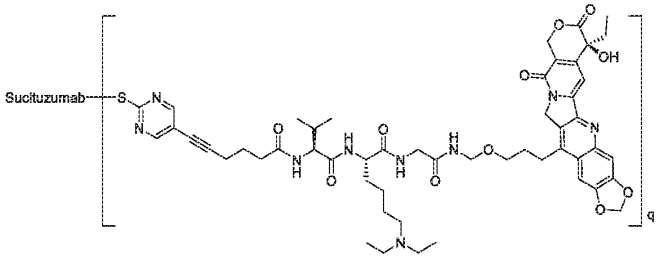
实施例 4.2.5：Trop2-ADC-05（DAR8）的制备

用化合物 DL-018 代替实施例 4.2.1 的化合物 DL-001，得到 DL-018 与 Sacituzumab 抗体的偶联产物 Trop2-ADC-05（DAR8）。质谱法测定 DAR 值为 7.8。



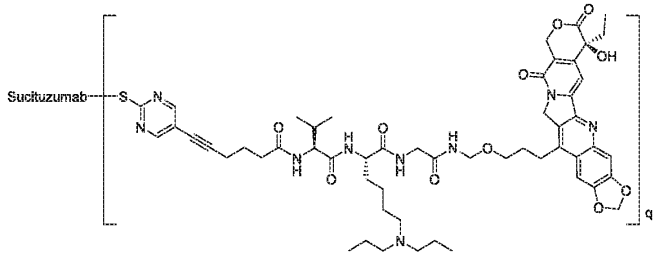
实施例 4.2.6：Trop2-ADC-06（DAR8）的制备

用化合物 DL-036 代替实施例 4.2.1 的化合物 DL-001，得到 DL-036 与 Sacituzumab 抗体的偶联产物 Trop2-ADC-06（DAR8）。质谱法测定 DAR 值为 7.7。



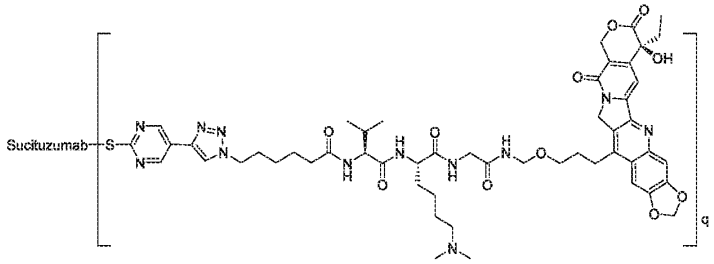
实施例 4.2.7：Trop2-ADC-07（DAR8）的制备

用化合物 DL-037 代替实施例 4.2.1 的化合物 DL-001，得到 DL-037 与 Sacituzumab 抗体的偶联产物 Trop2-ADC-07（DAR8）。质谱法测定 DAR 值为 7.7。



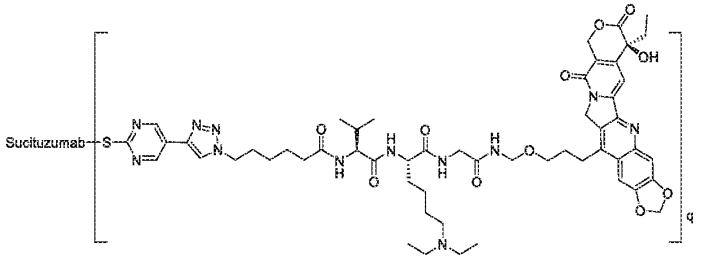
实施例 4.2.8：Trop2-ADC-08（DAR8）的制备

用化合物 DL-028 代替实施例 4.2.1 的化合物 DL-001，得到 DL-028 与 Sacituzumab 抗体的偶联产物 Trop2-ADC-08（DAR8）。质谱法测定 DAR 值为 7.3。



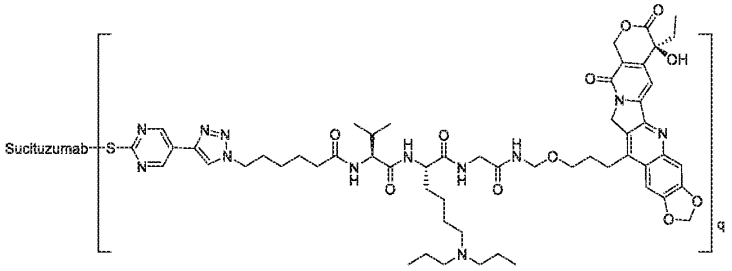
实施例 4.2.9：Trop2-ADC-09（DAR8）的制备

用化合物 DL-029 代替实施例 4.2.1 的化合物 DL-001，得到 DL-029 与 Sacituzumab 抗体的偶联产物 Trop2-ADC-09（DAR8）。质谱法测定 DAR 值为 7.6。



实施例 4.2.10：Trop2-ADC-10（DAR8）的制备

用化合物 DL-030 代替实施例 4.2.1 的化合物 DL-001，得到 DL-030 与 Sacituzumab 抗体的偶联产物 Trop2-ADC-10（DAR8）。质谱法测定 DAR 值为 7.6。

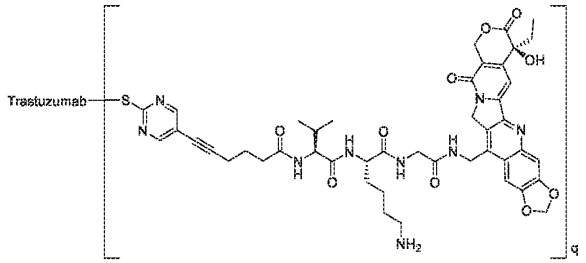


4.3：Her2-ADC 的制备

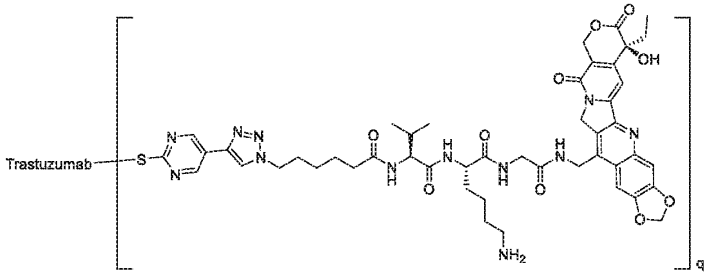
实施例 4.3.1：Her2-ADC-01（DAR8）的制备

在 37°C 条件下，向 Trastuzumab 的 PBS 缓冲溶液（pH=6.5，1ml，10.05mg/ml，0.0677μmol）加入 TCEP（10 mM，三(2-羧乙基)膦，0.033 ml，0.33μmol），溶液混匀，37°C 条件下放置 3 小时。向上述溶液体系加入 DL001（1.35 mg，20 倍抗体物质摩尔数量）的二甲基亚砜（0.1mL）溶液，混匀，室温静置 3h，完毕后加入 100mM 半胱氨酸 6.1μl 终止反应。最后采用 G-25 凝胶柱将缓冲液置换为 pH6.44 的 20 mM PB 缓冲溶液。得到 DL-001 与 Trastuzumab 抗体的偶联产物 Her2-ADC-01（DAR8）。质谱

法测定 DAR 值为 7.9。

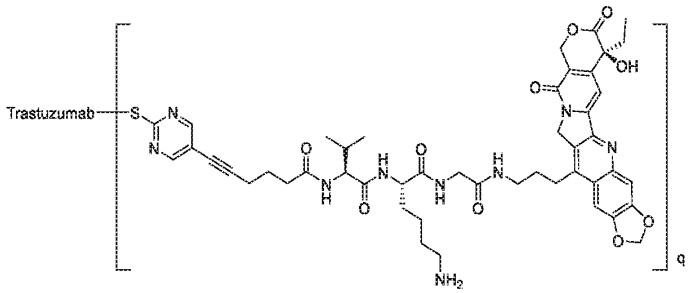


实施例 4.3.2：Her2-ADC-02（DAR8）的制备



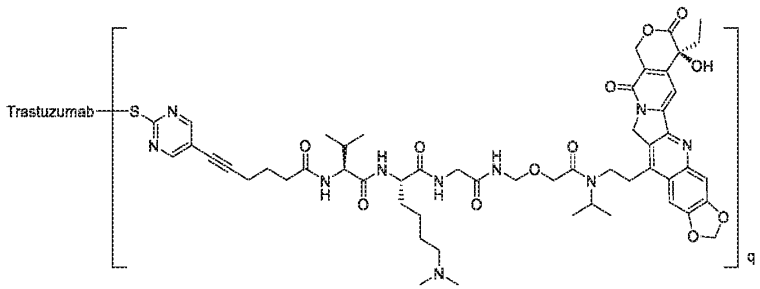
用化合物 DL-009 代替实施例 4.3.1 的化合物 DL-001，得到 DL-009 与 Trastuzumab 抗体偶联的产物 Her2-ADC-02（DAR8）。质谱法测定 DAR 值为 7.9。

实施例 4.3.3：Her2-ADC-03（DAR8）的制备



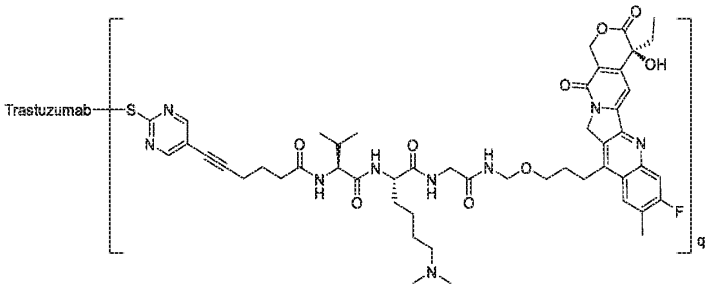
用化合物 DL-011 代替实施例 4.3.1 的化合物 DL-001，得到 DL-011 与 Trastuzumab 抗体偶联的产物 Her2-ADC-03（DAR8）。质谱法测定 DAR 值为 7.8。

实施例 4.3.4：Her2-ADC-04（DAR8）的制备



用化合物 DL-015 代替实施例 4.3.1 的化合物 DL-001，得到 DL-015 与 Trastuzumab 抗体偶联的产物 Her2-ADC-04（DAR8）。质谱法测定 DAR 值为 7.9。

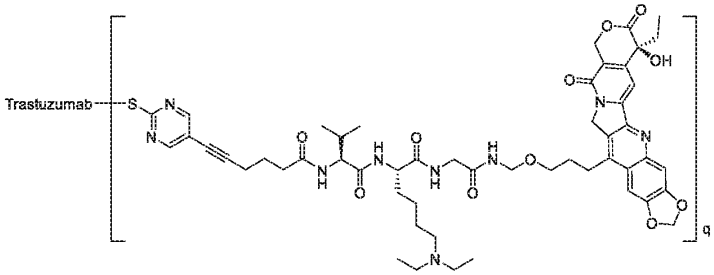
实施例 4.3.5：Her2-ADC-05（DAR8）的制备



用化合物 DL-018 代替实施例 4.3.1 的化合物 DL-001，得到 DL-018 与 Trastuzumab 抗体偶联的产物 Her2-ADC-05（DAR8）。质谱法测定 DAR 值为 7.9。

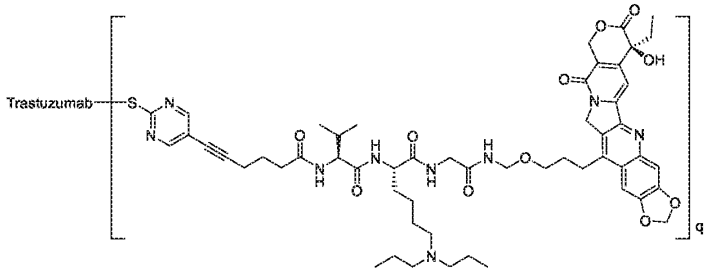
实施例 4.3.6：Her2-ADC-06（DAR8）的制备

用化合物 DL-036 代替实施例 4.3.1 的化合物 DL-001，得到 DL-036 与 Trastuzumab 抗体的偶联产物 Her2-ADC-06（DAR8）。质谱法测定 DAR 值为 7.7。



实施例 4.3.7：Her2-ADC-07（DAR8）的制备

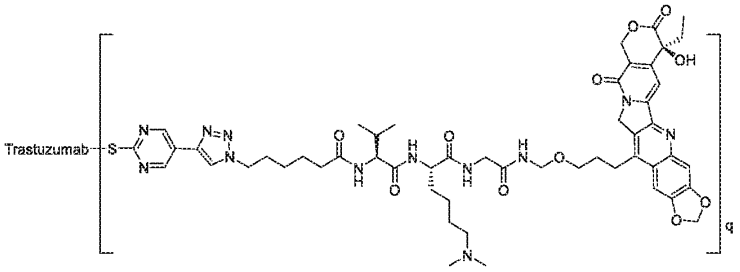
用化合物 DL-037 代替实施例 4.3.1 的化合物 DL-001，得到 DL-037 与 Trastuzumab 抗体的偶联产物 Her2-ADC-07（DAR8）。质谱法测定 DAR 值为 7.7。



实施例 4.3.8：Her2-ADC-08（DAR8）的制备

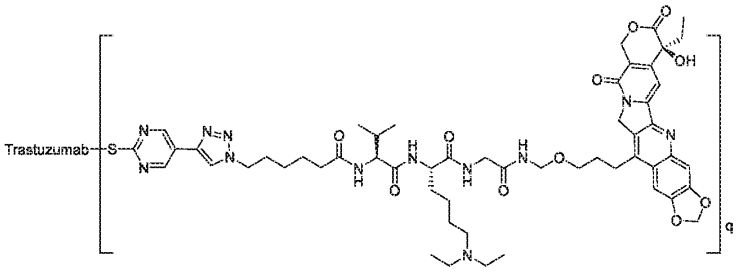
用化合物 DL-028 代替实施例 4.3.1 的化合物 DL-001，得到 DL-028 与 Trastuzumab 抗体的偶联产

物 Her2-ADC-08（DAR8）。质谱法测定 DAR 值为 7.3。



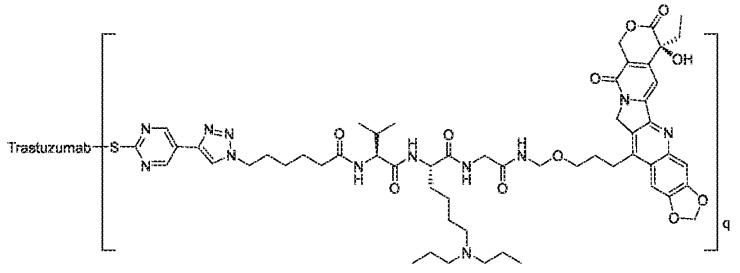
实施例 4.3.9：Her2-ADC-09（DAR8）的制备

用化合物 DL-029 代替实施例 4.3.1 的化合物 DL-001，得到 DL-029 与 Trastuzumab 抗体的偶联产物 Her2-ADC-09（DAR8）。质谱法测定 DAR 值为 7.6。



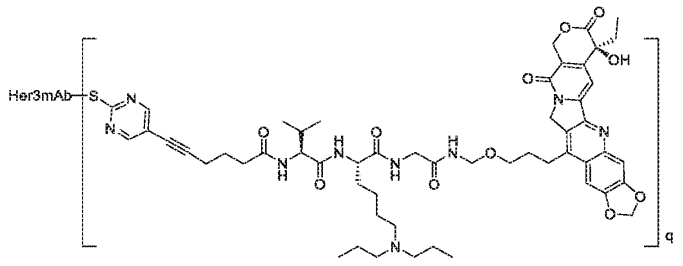
实施例 4.3.10：Her2-ADC-10（DAR8）的制备

用化合物 DL-030 代替实施例 4.3.1 的化合物 DL-001，得到 DL-030 与 Trastuzumab 抗体的偶联产物 Her2-ADC-10（DAR8）。质谱法测定 DAR 值为 7.6。



4.4：Her3-ADC 的制备

实施例 4.4.1：Her3-ADC-07 的制备



4.4.1.1 Her3-ADC-07（DAR8）样品制备

将抗 Her3 抗体 202-2-1 30 mg，用稀释液（20 mM PB+105 mM NaCl，pH 7.7）稀释，加入终浓度为 5mM 的依地酸钠溶液，混匀；加入抗体 4.5 倍当量的 TCEP 溶液，混匀，室温放置 30 分钟；向上述溶液体系加入抗体 10 倍当量的溶解于二甲基亚砜中的 DL-037，混匀，室温静置 2 小时，得到偶联后样品，反应结束后使用 30KDa 的超滤管将样品置换到 pH 为 5.5 的 10mM 组氨酸缓冲液中并去除低分子物质，最后将样品浓缩以获得含有 202-2-1 抗体 ADC 组合物的溶液 Her3-ADC-07（DAR8）。质谱法测定 DAR 值为 7.98。

4.4.1.2 Her3-ADC-07(DAR4)样品制备

将抗 Her3 抗体 202-2-1 30 mg，用稀释液（20 mM PB+105 mM NaCl，pH 7.7）稀释，加入终浓度为 5mM 的依地酸钠溶液，混匀；加入抗体 4.5 倍当量的 TCEP 溶液，混匀，室温放置 30 分钟；向上述溶液体系加入抗体 4.8 倍当量的溶解于二甲基亚砜中的 DL-037，混匀，室温静置 2 小时，得到偶联后样品，反应结束后使用 30KDa 的超滤管将样品置换到 pH 为 5.5 的 10mM 组氨酸缓冲液中并去除低分子物质，最后将样品浓缩以获得含有 202-2-1 抗体 ADC 组合物的溶液 Her3-ADC-07(DAR4)。质谱法测定 DAR 值为 4.5。

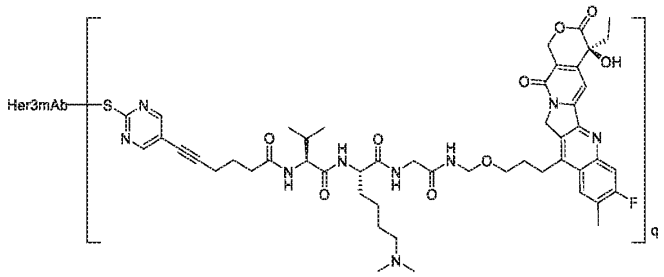
4.4.1.3 Her3-ADC-07(DAR6)样品制备

将抗 Her3 抗体 202-2-1 30 mg，用稀释液（20 mM PB+105 mM NaCl，pH 7.7）稀释，加入终浓度为 5mM 的依地酸钠溶液，混匀；加入抗体 4.5 倍当量的 TCEP 溶液，混匀，室温放置 30 分钟；向上述溶液体系加入抗体 7.2 倍当量的溶解于二甲基亚砜中的 DL-037，混匀，室温静置 2 小时，得到偶联后样品，反应结束后使用 30KDa 的超滤管将样品置换到 pH 为 5.5 的 10mM 组氨酸缓冲液中并去除低分子物质，最后将样品浓缩以获得含有 202-2-1 抗体 ADC 组合物的溶液 Her3-ADC-07(DAR6)。质谱法测定 DAR 值为 5.8。

实施例 4.4.2：Her3-ADC-05 的制备

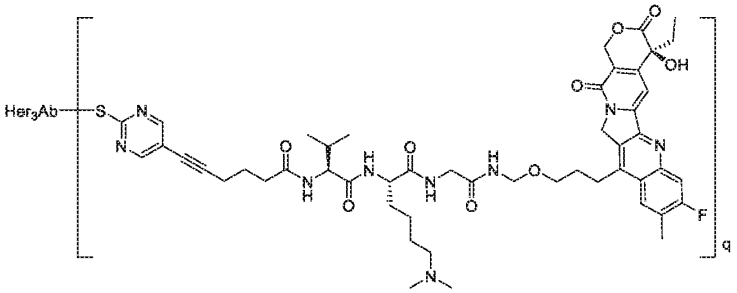
4.4.2.1 Her3-ADC-05(DAR4)样品制备

利用 DL-018 代替实施例 4.4.1.2 的化合物 DL-037，得到 DL-018 与 202-2-1 抗体的偶联产物 Her3-ADC-05(DAR4)。质谱法测定 DAR 值为 4.0。

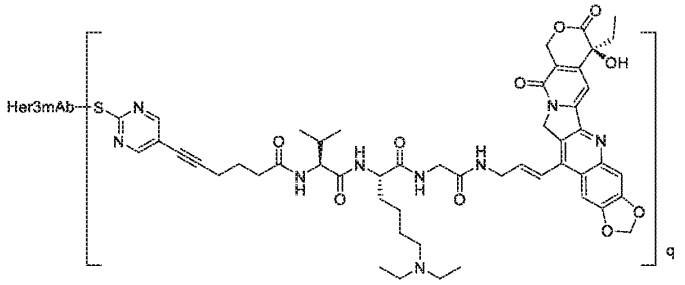


4.4.2.2 Her3-C3-ADC-05(DAR4) (DAR4)样品制备

利用 DL-018 代替实施例 4.4.1.2 的化合物 DL-037，抗体 Her3-C3 代替实施例 4.4.1.2 的抗 Her3 抗体 202-2-1，得到 DL-018 与 Her3-C3 的偶联产物 Her3-C3-ADC-05(DAR4)。质谱法测定 DAR 值为 4.7。



实施例 4.4.3：Her3-ADC-15 的制备



4.4.3.1 Her3-ADC-15(DAR8)样品制备

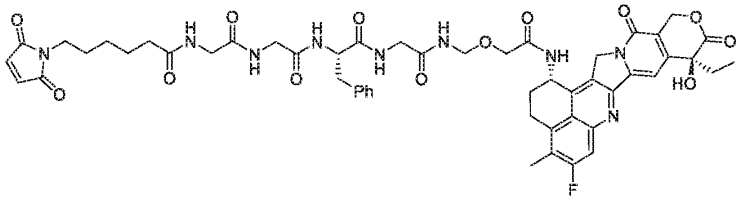
利用 DL-027 代替实施例 4.4.1.1 的化合物 DL-037，得到 DL-027 与 202-2-1 抗体的偶联产物 Her3-ADC-15(DAR8)。质谱法测定 DAR 值为 7.9。

4.4.3.2 Her3-ADC-15(DAR2)样品制备

利用 DL-027 代替实施例 4.1.7.2 的化合物 DL-037，抗 Her3 抗体 202-2-1 代替实施例 4.1.7.2 的 2E3-02 抗体，得到 DL-027 与 202-2-1 抗体的偶联产物 Her3-ADC-15(DAR2)。质谱法测定 DAR 值为 2。

实施例 4.4.4：Her3-ADC-21 的制备

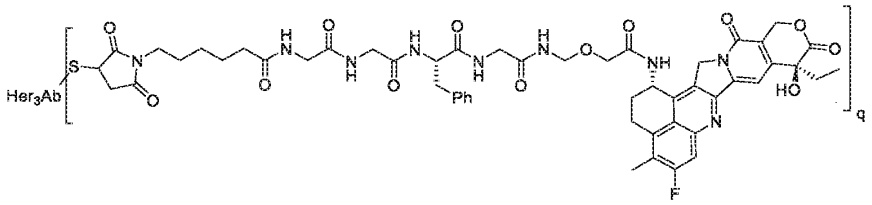
参照 CN104755494B 制备获得药物-连接体化合物如下，



4.4.4.1 Her3-C3-ADC-21(DAR4)样品制备

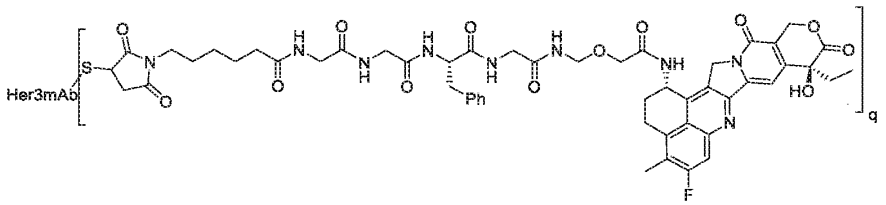
利用上述药物-连接体化合物代替实施例 4.4.1.2 的化合物 DL-037，抗体 Her3-C3 代替实施例

4.4.1.2 的抗 Her3 抗体 202-2-1，得到 Her3-C3-ADC-21(DAR4)。质谱法测定 DAR 值为 4.4。



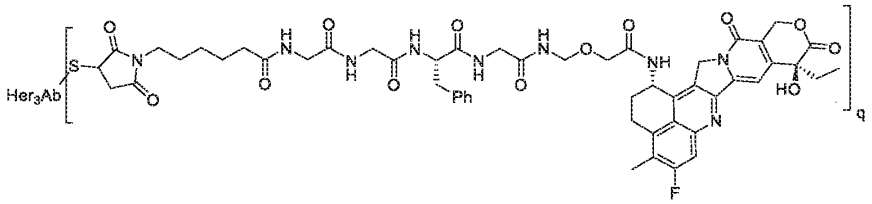
4.4.4.2 Her3-ADC-21(DAR4)样品制备

利用上述药物-连接体化合物代替实施例 4.4.1.2 的化合物 DL-037，得到上述药物-连接体化合物与 202-2-1 抗体的偶联产物 Her3-ADC-21(DAR4)。质谱法测定 DAR 值为 4.1。



4.4.4.3 Her3-C3-ADC-21(DAR8)样品制备

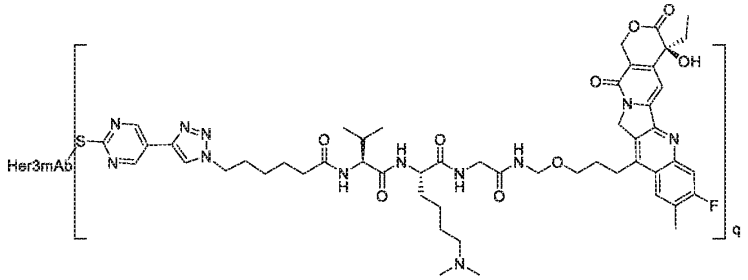
利用上述药物-连接体化合物代替实施例 4.4.1.1 的化合物 DL-037，抗体 Her3-C3 代替实施例 4.4.1.1 的抗 Her3 抗体 202-2-1，得到 Her3-C3-ADC-21(DAR8)。质谱法测定 DAR 值为 9.5。



实施例 4.4.5：Her3-ADC-23 的制备

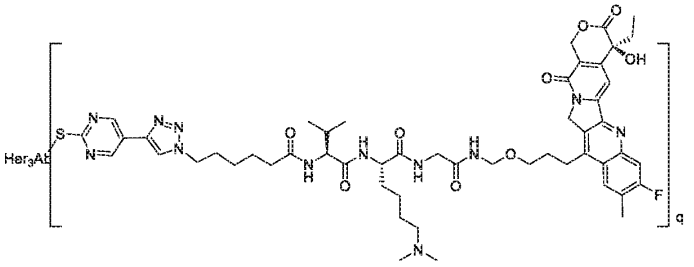
4.4.5.1 Her3-ADC-23(DAR4)样品制备

利用 DL-031 代替实施例 4.4.1.2 的化合物 DL-037，得到 DL-031 与 202-2-1 抗体的偶联产物 Her3-ADC-23(DAR4)。质谱法测定 DAR 值为 4.2.



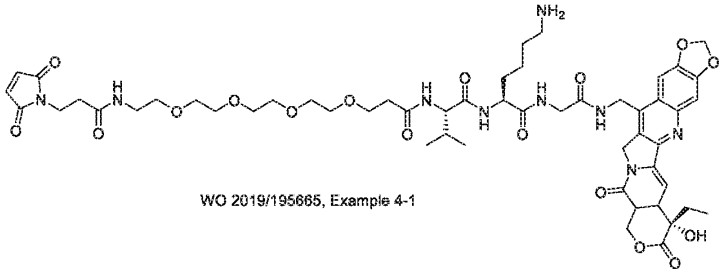
4.4.5.2 Her3-C3-ADC-23(DAR4)样品制备

利用 DL-031 代替实施例 4.4.1.2 的化合物 DL-037，用抗体 Her3-C3 代替 4.4.1.2 的 Her3 抗体 202-2-1，得到 DL-031 与抗体 Her3-C3 的偶联产物 Her3-C3-ADC-23(DAR4)。质谱法测定 DAR 值为 4.9。

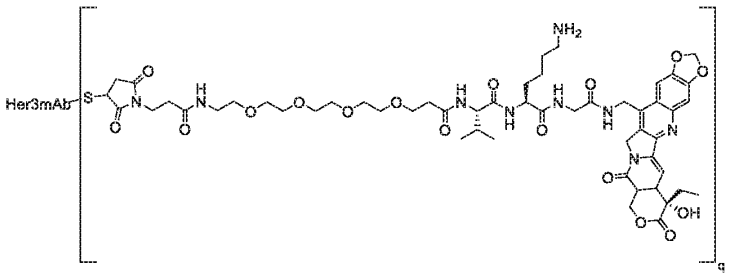


实施例 4.4.6：Her3-ADC-33 的制备

参照 WO2019195665 实施例 4-1 制备获得药物-连接体化合物如下，



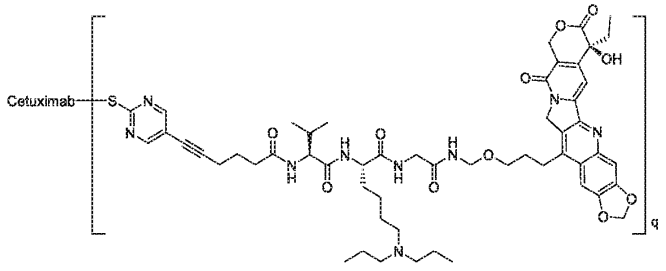
用上述药物-连接体化合物代替实施例 4.4.1.2 的化合物 DL-037，得到上述药物-连接体化合物与 202-2-1 抗体的偶联产物 Her3-ADC-33（DAR4）。质谱法测定 DAR 值为 5.6。



注：Her3mAb 为 202-2-1 抗体，Her3Ab 为抗体 Her3-C3。

4.5：EGFR-ADC 的制备

4.5.1 EGFR-ADC-07 的制备



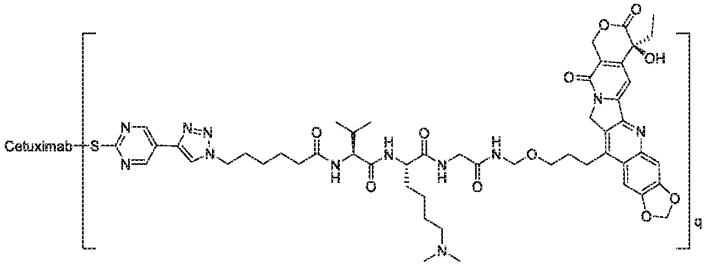
4.5.1.1 EGFR-ADC-07（DAR8）样品制备

用 Cetuximab 抗体代替实施例 4.1.7 制备方法 B 的 2E3-02 抗体，得到 DL-037 与 Cetuximab 抗体的偶联产物 EGFR-ADC-07（DAR8）。质谱法测定 DAR 值为 7.8。

4.5.1.2 EGFR-ADC-07（DAR4）样品制备

用 Cetuximab 抗体代替实施例 4.1.7.3 B7H3-ADC-07(DAR4)制备方法的 2E3-02 抗体，得到 DL-037 与 Cetuximab 抗体的偶联产物 EGFR-ADC-07（DAR4）。质谱法测定 DAR 值为 5.0。

4.5.2 EGFR-ADC-08 的制备



4.5.2.1 EGFR-ADC-08（DAR8）样品制备

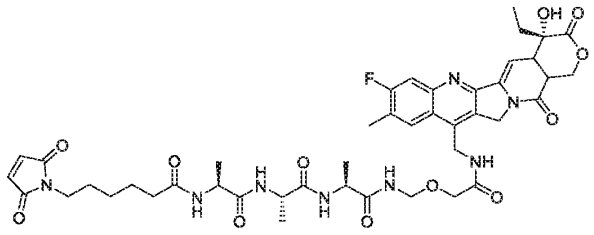
用 Cetuximab 抗体代替实施例 4.1.7 制备方法 B 的 2E3-02 抗体，用 DL-028 代替实施例 4.1.7 制备方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-028 与 Cetuximab 抗体的偶联产物 EGFR-ADC-08（DAR8）。质谱法测定 DAR 值为 7.3。

4.5.2.2 EGFR-ADC-08（DAR4）样品制备

用 Cetuximab 抗体代替实施例 4.1.7.3 B7H3-ADC-07(DAR4)制备方法的 2E3-02 抗体，用 DL-028 代替实施例 4.1.7 制备方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-028 与 Cetuximab 抗体的偶联产物 EGFR-ADC-08（DAR4）。质谱法测定 DAR 值为 4.3。

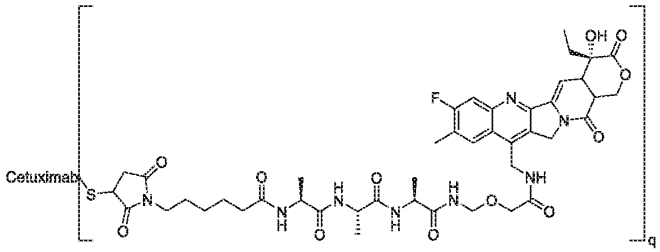
4.5. 3 EGFR-ADC-32（DAR4）样品制备

参照 WO2020219287 实施例 16 制备获得药物-连接体化合物如下，



WO 2020/219287, Example 22a

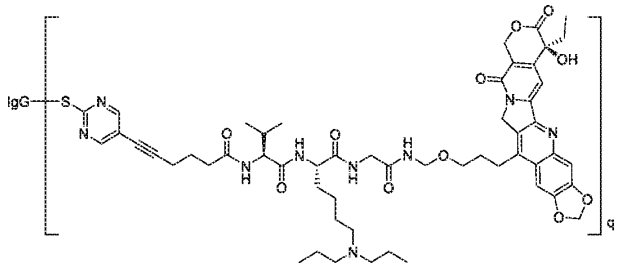
用 Cetuximab 抗体代替实施例 4.1.7.3 B7H3-ADC-07(DAR4)制备方法的 2E3-02 抗体，用上述药物-连接体化合物代替实施例 4.1.7 制备方法 B 的化合物 DL-037，得到上述药物-连接体化合物与 Cetuximab 抗体的偶联产物 EGFR-ADC-32（DAR4）。质谱法测定 DAR 值为 4.9。



4.6： IgG-ADC 的制备

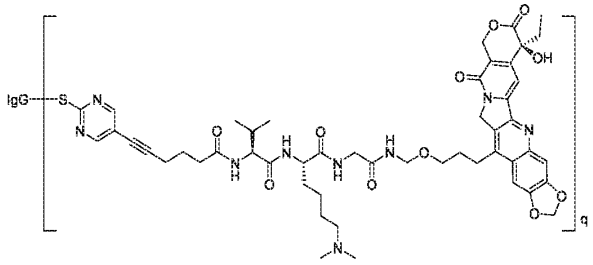
实施例 4.6.1：IgG1-ADC-07 的制备

用 IgG1 同型抗体（抗鸡融菌酶抗体，苏州宜联生物医药有限公司制备）代替实施例 4.1.7 制备方法 B 的 2E3-02 抗体，得到 DL-037 与 IgG1 抗体的偶联产物 IgG1-ADC-07。质谱法测定 DAR 值为 8.0。



实施例 4.6.2：IgG1-ADC-04 的制备

用 IgG1 同型抗体（抗鸡融菌酶抗体，苏州宜联生物医药有限公司制备）代替实施例 4.1.7 制备方法 B 的 2E3-02 抗体，用化合物 DL-019 代替实施例 4.1.7 制备方法 B 的化合物 DL-037，得到 DL-019 与 IgG1 抗体的偶联产物 IgG1-ADC-04。质谱法测定 DAR 值为 7.9。



五、ADC 的鉴定

实施例 5.1. SEC-HPLC 测定

通过 SEC-HPLC 监测偶联反应，对抗体偶联物的 SEC 检测。

仪器型号：Agilent 1200

色谱条件：

色谱柱：TSKgel G3000SWXL，7.8×300mm，5μm

流动相：60mmol/L Na_2HPO_4，40mmol/L NaH_2PO_4，200mmol/L NaCl。

柱温：室温 样品室温度：8℃ 流速：0.8 ml/min

进样量：200μg 检测波长：280nm。

样品处理：用超纯水将样品 B7H3-ADC-07（DAR8）稀释至 10mg/ml，进样体积 20μl。

抗体偶联前后的 SEC 色谱图如图 8 所示，抗体偶联前后，主峰分子量约为 150kD，可知偶联产物仍保持抗体的完整结构。

实施例 5.2．采用质谱法进行偶联后样品的 DAR 值测定之一

色谱条件：

色谱柱：PLRP-S，2.1*50mm,5μm；

流动相 A：0.1%FA /H2O; 流动相 B：0.1%FA/ACN

柱温：30℃ 样品室温度：8℃ 流速：0.6 ml/min 进样量：2μl

时间（min）	1	5	5.1	7	10
流动相 A	90	40	10	90	90
流动相 B	10	60	90	10	10

样品处理：取 B7H3-ADC-07 样品 50 μg，加入 1M DTT2μl，加超纯水至 50μl 稀释至约 1.0 mg/ml 浓度，混匀，室温还原 30min。

LC/MS 型号：Agilent 1290-6545XT Q-TOF

质谱条件：Gas temp：320℃，Drying Gas： Nebulizer ：35 psi；Sheath Gas Temp ：350℃；sheath Gas Flow ：11 l/min；m/z 500~3000。

结果如下所示：

肽链		mAb	DAR1	DAR2	DAR3
LC	理论值	23245	24262.4	25279.8	26297.2
	实测值	23247.41	24265.49	未检出	未检出
HC	理论值	50367	51384.4	52401.8	53419.2
	实测值	未检出	未检出	未检出	53426.64

表中，mAb 表示未偶联的抗体；LC 代表抗体轻链；HC 代表抗体重链；DAR1 代表包含轻链或重链偶联 1 个毒素分子的偶联物；DAR2 代表包含轻链或重链偶联 2 个毒素分子的偶联物；DAR3 代表包含轻链或重链偶联 3 个毒素分子的偶联物；其中，单抗理论分子量以 G0F 糖型计算。下文中 mAb、LC、HC、DAR1、DAR2、DAR3 如上说明。

测定 2E3-02 抗体轻链偶联 0~1 个毒素分子（LC，DAR1 比例分别为 1.0%，99.0%）、重链偶联 0~3 个毒素分子（mAb、DAR1、DAR2、DAR3 的比例分别为 0%，0%，0%，100%），由此计算 B7H3-ADC-07（DAR8）的抗体-药物偶联比（DAR 值）为 7.98。

实施例 5.3 采用质谱法进行偶联后样品的 DAR 值测定之二

利用 5.2 相同的实验条件，对样品 B7H3-ADC-07(DAR2)，B7H3-ADC-07(DAR4)，B7H3- ADC-07(DAR6)进行分子量测定，结果如下：

样品名称	肽链		mAb	DAR1	DAR2	DAR3
B7H3-ADC-07(DAR2)	LC	理论值	23245	24262.4	25279.8	26297.2
		实测值	23247	未检出	未检出	未检出
	HC	理论值	50367	51384.4	52401.8	53419.2
		实测值	50372	51389	52408	53426
B7H3-ADC-07(DAR4)	LC	理论值	23245	24262.4	25279.8	26297.2
		实测值	23247	24265	未检出	未检出
	HC	理论值	50367	51384.4	52401.8	53419.2

		实测值	50372	51389	52408	53426
B7H3-ADC-07(DAR6)	LC	理论值	23245	24262.4	25279.8	26297.2
		实测值	23247	24265	未检出	未检出
	HC	理论值	50367	51384.4	52401.8	53419.2
		实测值	50372	未检出	52408	53426

并计算 DAR 值结果为：B7H3-ADC-07(DAR2)的 DAR 值为 2.3；B7H3-ADC-07(DAR4)的 DAR 值为 4.1；B7H3-ADC-07(DAR6)的 DAR 值为 5.4。

实施例 5.4 LC-MS 测定 Trop2-ADC-01 分子量和药物-抗体比（DAR）

对 Trop2-ADC-01 进行 LCMS 分子量分析。

色谱测定条件：

液相色谱柱：ACQUITU UPLC® Protein BEH C4 1.7μm，2.1mm x 100mm；

流动相 A：0.1%FA/98%H_2O/2%ACN；流动相 B：0.1%FA/2%H_2O/98%ACN；

流速：0.25 mL/min；样品室温度：8 °C；柱温：60 °C；进样量：1μg；

时间(分钟)	1	7	8	9	13
流动相 A (体积%)	90	20	20	90	90
流动相 B (体积%)	10	80	80	10	10

质谱测定条件：

质谱型号：Triple TOF 5600+；

GS1 60；GS2 60；CUR30；TEM600；ISVF5000；DP300；CE10 m/z600-5000。

Trop2-ADC-01 理论分子量及实测分子量

糖型		mAb	DAR1	DAR2	DAR3	DAR4
LC	理论值	23334.0	24209.7	25085.4		
	实测值	未检出	24209.9	未检出	未检出	未检出
HC-G0F	理论值	50734.0	51609.7	52485.4	53361.1	56024.7
	实测值	未检出	未检出	52485.3	53361.2	未检出

表中，mAb 表示单克隆抗体；LC 代表抗体轻链；HC 表示抗体重链；DAR1 表示包含一条抗体轻链/重链和一个细胞生物活性分子的偶联物；DAR2 表示包含一条抗体轻链/重链和两个细胞生物活性分子的偶联物；DAR3 表示包含一条抗体轻链/重链和三个细胞生物活性分子的偶联物；DAR4 表示包含一条抗体轻链/重链和四个细胞生物活性分子的偶联物；糖型表示两条重链上的糖链结构；G0F 表示岩藻糖化无半乳糖。

抗体与化合物 DL-001 偶联后，轻重链分子量均发生变化，其中轻链偶联 1 个细胞生物活性分子、重链偶联 2.9 个细胞生物活性分子，由此推知整个抗体与细胞生物活性分子的偶联比（DAR）为 7.8。

实施例 5.5 LC-MS 测定 Her3-ADC 分子量和药物-抗体比（DAR）

检测：对 Her3-ADC-07（DAR8）进行 LC-MS 分子量和 DAR 值分析，条件如下：

色谱条件：

色谱柱：PLRP-S，2.1*50mm,5μm；

流动相 A：0.1%FA /H2O; 流动相 B：0.1%FA/ACN

柱温：30℃ 样品室温度：8℃ 流速：0.6 ml/min 进样量：2μl

时间（min）	1	5	5.1	7	10
流动相 A	90	40	10	90	90
流动相 B	10	60	90	10	10

样品处理：分别取样品 50 μg，加入 1M DTT2μl，加超纯水至 50μl 稀释至约 1.0 mg/ml 浓度，混匀，室温还原 30min。

LC/MS 型号：Agilent 1290-6545XT Q-TOF

质谱条件：Gas temp：320℃，Drying Gas： Nebulizer ：35 psi；Sheath Gas Temp ：350℃；sheath Gas Flow ：11 l/min；m/z 500~3000。

结果如下所示：

肽链		mAb	DAR1	DAR2	DAR3
LC	理论值	23243.8	24261.2	25278.6	26296
	实测值	未检出	24258	未检出	未检出
HC	理论值	50598.6	51616	52633.4	53650.8
	实测值	未检出	未检出	未检出	53646

上表中，mAb 表示未偶联的单克隆抗体；LC 代表抗体轻链；HC 代表抗体重链；DAR1 代表包含轻链或重链偶联 1 个毒素分子的偶联物；DAR2 代表包含轻链或重链偶联 2 个毒素分子的偶联物；DAR3 代表包含轻链或重链偶联 3 个毒素分子的偶联物；其中，单抗理论分子量以 G0F 糖型计算。下文中 mAb、LC、HC、DAR1、DAR2、DAR3 如上说明。

检测结果显示，Her3-ADC-07（DAR8）上抗体轻链偶联 0~1 个毒素分子（LC，DAR1 比例分别为 0%，100%）、重链偶联 0~3 个毒素分子（mAb、DAR1、DAR2、DAR3 的比例分别为 0%，0%，0%，100%），由此计算 Her3-ADC-07（DAR8）的药物抗体偶联比（DAR 值）为 8.0。

可以理解，本公开的 ADC 都可以通过相同或类似的方法测定分子量和药物-抗体比（DAR）。

六、生物活性分子以及抗体药物偶联的生物活性测定

实施例 6.1：生物活性分子对体外细胞活性的抑制活性检测一

首先培养肿瘤细胞；将本公开的生物活性分子与肿瘤细胞进行共培养，然后添加 CCK8 试剂（东仁化学科技有限公司，Cat:CK04, Lot:JJ744），用酶标仪（厂家：Molecular Devices, 型号：SpectraMax M2）读数（检测波长为 450nm），检测线粒体内的脱氢酶的活性，以评价生物活性分子对细胞增殖的抑制作用。肿瘤细胞来源见表 5。

表 5.

细胞名称	肿瘤类型	来源
NCI-H358	人非小细胞肺癌	ATCC，CRL-5807
HT29	人结肠癌细胞	ATCC，HTB-38
LS174T	人结肠腺癌细胞	ATCC，CL-187
NCI-H322M	人非小细胞肺癌	ATCC
PANC-1	人胰腺癌肿瘤细胞	ATCC，CRL-1469
HCC1806	乳腺癌	南京科佰生物

体外细胞活性检测方法：用对应检测培养基（含 2% FBS）稀释生物活性分子（12 个浓度梯度）。

使用胰酶通过常规方法对肿瘤细胞进行消化，收集管细胞数，用对应的检测培养基（含 2% FBS）重悬。将稀释的生物活性分子加入 96 孔板中，再加入细胞。然后每孔加入 CCK8 试剂 20μL，反应至 4 小时，酶标仪读数（检测波长为 450nm）。实验结果如表 6.1,6.2,6.3,6.4,6.5 所示。

参照 CN104755494B 制备获得 DXD，具体结构如下，

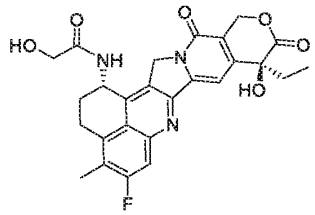


表 6.1 生物活性分子对 NCI-H358 细胞杀伤结果

名称	细胞名称	EC_{50}(nM)
A1.10	NCI-H358	8.11
DXD		39.02

名称	细胞名称	EC_{50}(nM)
A1.8D	NCI-H358	7.919
A1.15a		3.882
DXD		21.43

名称	细胞名称	EC_{50}(nM)
A1.4	NCI-H358	29.91
A1.8		296.4
A1.9		60.79
A1.11		202.9
A1.12		167.1
A1.13		49.19
A1.14		122.6
DXD		148.45±10.87 (n=4)

表 6.2 生物活性分子对 HT29 细胞杀伤结果

名称	细胞名称	EC_{50}(nM)
A1.10	HT29	5.965
DXD		49.47

名称	细胞名称	EC_{50}(nM)
A1.15a	HT29	3.574
A1.15b		47.52
DXD		64.84

名称	细胞名称	EC_{50}(nM)
A1.4	HT29	29.45
A1.8		367.1

A1.9		57.5
A1.11		284.5
A1.12		211.8
A1.13		96.85
A1.14		155.9
DXD		301.875±69.00 (n=4)

表 6.3 生物活性分子对 LS174T 细胞杀伤结果

名称	细胞名称	EC_{50}(nM)
A1.15a	LS174T	19.49
A1.15b		44.62
DXD		82.05

表 6.4 生物活性分子对 NCI-H322M 细胞杀伤结果

名称	细胞名称	EC_{50}(nM)
A1.9	NCI-H322M	30.45
DXD		76.89

表 6.5 生物活性分子对 PANC-1 细胞杀伤结果

名称	细胞名称	EC_{50}(nM)
A1.9	PANC-1	94.54
DXD		966

表 6.6 生物活性分子对 HCC1806 细胞杀伤结果

名称	细胞名称	EC_{50}(nM)
A1.9	HCC1806 (7500 细胞/孔，3 天)	1.9
Dxd		37

测试结果表明，本公开的生物活性分子具有肿瘤细胞杀伤作用。

实施例 6.2：生物活性分子对体外细胞活性的抑制活性检测二

首先培养肿瘤细胞 NUCG-4，PC-9，HT29，NCI-H358，KYSE520，A431 和 A549；将本公开的生物活性分子或片段与肿瘤细胞进行共培养，然后添加 CCK8 试剂（东仁化学科技有限公司，Cat:CK04, Lot:JJ744），用酶标仪（厂家：Molecular Devices、型号：SpectraMax M2）读数（检测波长为 450nm），检测线粒体内的脱氢酶的活性，以评价生物活性分子对细胞增殖的抑制作用。肿瘤细胞来源见表 7。

表 7.肿瘤细胞来源

细胞名称	肿瘤类型	来源
NUCG-4	胃癌	南京科佰
PC-9	肺腺癌	ATCC
HT29	结肠癌	ATCC，HTB-38
NCI-H358	非小细胞肺癌	ATCC，CRL-5807
KYSE520	食管癌	ATCC
A431	人皮肤鳞状癌（人表皮癌）细胞	ATCC
A549	非小细胞肺癌	ATCC

体外细胞活性检测方法：使用胰酶通过常规方法对肿瘤细胞进行消化，收集管细胞数，用对应的检测培养基（含 2% FBS）重悬，将 5000-10000 细胞/孔加至 96 孔板。用 DMSO 稀释的生物活性分子，加入 100uL 至 96 孔板，浓度从 10μM 开始，3 倍稀释（12 个浓度梯度），37°C 5%CO_2 培养 3-4 天，然后每孔加入 CCK8 试剂 20μL，反应至 2-6 小时，酶标仪读数（检测波长为 450nm）。生物活性

分子及其检测结果如表 8 所示。

表 8 A1.9 和 B1.14 的活性测定

细胞	A1.9 EC_{50} nM	B1.14EC_{50} nM	DXD EC_{50} nM
NUCG-4	8.73	184.8	43.32
PC-9	2.06	34.32	16.69
HT29	20.32	367.9	210.5
NCI-H358	46.2	581.2	261.6
A431	5.71	67.97	25.08
A549	65.86	252.3	262.2

测试结果表明，生物活性分子 A1.9 和 B1.14 具有肿瘤细胞杀伤作用，其中 A1.9 在多个肿瘤细胞中均具有强于 Dxd 的肿瘤杀伤作用。A1.9 在 KYSE520 的体外细胞活性的抑制活性检测中，EC50 为 49.62 nM，具有杀伤 KYSE520 的作用。

实施例 6.3：生物活性分子对体外细胞活性的抑制活性检测三

首先培养肿瘤细胞 HT29（来源同上），将本公开的生物活性分子或片段与肿瘤细胞进行共培养，然后添加 CCK8 试剂（东仁化学科技有限公司，Cat:CK04, Lot:JJ744），用酶标仪（厂家：Molecular Devices, 型号：SpectraMax M2）读数（检测波长为 450nm），检测线粒体内的脱氢酶的活性，以评价生物活性分子对细胞增殖的抑制作用。

体外细胞活性检测方法：使用胰酶通过常规方法对肿瘤细胞进行消化，收集管细胞数，用对应的检测培养基（含 2% FBS）重悬，将 5000-10000 细胞/孔加至 96 孔板。用 DMSO 稀释的生物活性分子，加入 100uL 至 96 孔板，浓度从 10μM 开始，3 倍稀释（12 个浓度梯度），37℃ 5%CO_2 培养 3-4 天，然后每孔加入 CCK8 试剂 20μL，反应至 2-6 小时，酶标仪读数（检测波长为 450nm）。生物活性分子及其检测结果如表 9 所示。

表 9 生物活性分子对 HT29 细胞杀伤结果

名称	细胞名称	EC_{50}(nM)
B1.9	HT29	262.2
B1.12		85.87
B1.17		204.8
DXD		22.89

测试结果表明，生物活性分子 B1.9、B1.12 和 B1.17 具有肿瘤细胞杀伤作用。

实施例 6.4：ADC 对体外细胞活性的抑制活性检测

使用胰酶通过常规方法对 HT29 和 NCI-H358 肿瘤细胞进行消化，收集管细胞数，用对应的检测培养基（含 2% FBS）重悬，将 2000-5000 细胞/孔加至 96 孔板。2% FBS 培养基稀释的 ADC 加入 100uL 至 96 孔板，浓度从 150μg/ml 起始，3 倍稀释（12 个浓度梯度）。37℃ 5%CO_2 培养 7 天，然后每孔加入 CCK8 试剂 20μL，反应至 2-6 小时，酶标仪读数（检测波长为 450nm）。ADC 及其检测结果如表 10,表 11 所示。

表 10.部分 ADC 的活性测定

ADC	HT29 (EC_{50}, ng/mL)	NCI-H358 (EC_{50}, ng/mL)
B7H3-ADC-07(DAR8)	23555	21131
B7H3-ADC-05(DAR8)	33135	33490
B7H3-ADC-04(DAR8)	28793	28493

B7H3-ADC-22(DAR8)	24418	20825
B7H3-ADC-12(DAR8)	5032	4068
B7H3-ADC-27(DAR8)	28510	29155
B7H3-ADC-08(DAR8)	31669	34149
B7H3-ADC-23(DAR8)	21074	19578
B7H3-ADC-20(DAR8)	1348	1325
B7H3-ADC-09(DAR8)	22479	20751
2E3-02 抗体	弱	弱
B7H3-ADC-32(DAR8)	32472	30903

测试结果表明，本公开的 ADC 分子具有肿瘤细胞杀伤作用，其中大部分 ADC 具有强于 B7H3-ADC-32(DAR8)的肿瘤细胞杀伤作用。

表 11.部分 ADC 的活性测定

ADC	HT29 (EC_{50}, ng/mL)	NCI-H358 (EC_{50}, ng/mL)
B7H3-ADC-33(DAR8)	18380	20354
B7H3-ADC-15(DAR8)	1181	1015

测试结果表明，本公开的 ADC 分子具有肿瘤细胞杀伤作用，其中 B7H3-ADC-15(DAR8)具有强于 B7H3-ADC-33(DAR8)的肿瘤细胞杀伤作用。

同时对本公开的 ADC 分子 B7H3-ADC-07(DAR8)在 B7H3 阴性细胞 Calu-3 上测试，结果显示杀伤效果弱（IC50>10^7ng/ml）,说明体外在 B7H3 阳性与阴性肿瘤细胞间，本公开的 ADC 分子具有很好的选择靶向性杀伤。

实施例 6.5：检测多种靶点抗体药物偶联物对多种肿瘤细胞的体外抑制活性

A．B7H3 ADC 的多种肿瘤抑制活性测定

ADC 样品：根据实施例制备获得 ADC 样品

体外细胞活性检测方法：使用胰酶通过常规方法对多种肿瘤细胞进行消化，收集管细胞数，用对应的检测培养基（含 2%FBS）重悬，将 2000-5000 细胞/孔加至 96 孔板。2%FBS 培养基稀释的 ADC(见表 12)加入 100uL 至 96 孔板，浓度从 150μg/ml 起始，3 倍稀释（11 个浓度梯度）。37°C 5%CO_2 培养 7 天，然后每孔加入 CCK8 试剂 20μL，反应至 2-6 小时，酶标仪读数（检测波长为 450nm）。实验细胞和检测结果如表 12 所示。

表 12

细胞	B7H3-ADC-07(DAR8)	B7H3-ADC-21(DAR8)
PC-9(EC50, ng/mL)	3618	2377
HT29(EC50, ng/mL)	10433	7442
KYSE520(EC50,ng/mL)	5845	2842
NCI-H358(EC50,ng/mL)	15800	8060
NUCG-4(EC50,ng/mL)	4855	4158
A431(EC50, ng/mL)	7624	2478

测试结果表明，表 12.ADC 具有多种肿瘤细胞杀伤作用。

B．Her3 ADC 的多种肿瘤抑制活性测定

ADC 样品：根据实施例制备获得 ADC 样品 Her3-ADC-07（DAR8）

体外细胞活性检测方法：使用胰酶通过常规方法对 PC-9 和 NCI-H358 肿瘤细胞进行消化，收集管细胞数，用对应的检测培养基（含 2%FBS）重悬，将 2000-5000 细胞/孔加至 96 孔板。2%FBS 培

养基稀释的 ADC 加入 100uL 至 96 孔板，浓度从 150μg/ml 起始，3 倍稀释（11 个浓度梯度）。37℃ 5%CO_2 培养 7 天，然后每孔加入 CCK8 试剂 20μL，反应至 2-6 小时，酶标仪读数（检测波长为 450nm）。实验细胞和检测结果如表 13 所示。

表 13.

细胞	Her3-ADC-07（DAR8）
PC-9(EC_{50}, nM/L)	49.26
NCI-H358(EC_{50}, nM/L)	183.3

测试结果表明，Her3-ADC-07（DAR8）具有肿瘤细胞杀伤作用。

C.EGFR ADC 的肿瘤抑制活性测定

使用胰酶通过常规方法对 KYSE520 肿瘤细胞进行消化，收集管细胞数，用对应的检测培养基（含 2% FBS）重悬，将 2000-5000 细胞/孔加至 96 孔板。2% FBS 培养基稀释的 ADC（如表 14）加入 100uL 至 96 孔板，浓度从 50μg/ml 起始，3 倍稀释（11 个浓度梯度）。37℃ 5%CO_2 培养 5 天，然后每孔加入 CCK8 试剂 20μL，反应至 1-4 小时，酶标仪读数（检测波长为 450nm）。实验细胞和检测结果如表 14 所示。

表 14.

检测组编号	ADC 样品	KYSE520 (EC_{50}, ng/mL)
1	EGFR-ADC-07(DAR8)	11.56
	EGFR-ADC-07(DAR4)	18.17
	EGFR-ADC-32(DAR4)	29.21
2	Her3-ADC-05(DAR4)	19.01
	Her3-C3-ADC-05(DAR4)	32.94

测试结果表明，EGFR- ADC-07、Her3- ADC-05 和 Her3- C3-ADC-05 都具有很强的肿瘤细胞杀伤作用。

综合以上测试结果表明，本申请公开多种靶点（如 B7H3,Her3,EGFR）的 ADC 对多种肿瘤细胞均具有杀伤作用。

D．Trop-2 抗体药物偶联物对体外细胞活性的抑制作用

首先培养肿瘤细胞 HCC1806（Trop-2 阳性细胞系）和 NCI-H23（Trop-2 阴性细胞系）；将本公开的生物活性分子及 ADC 分子与肿瘤细胞进行共培养，然后添加 CCK8 试剂（东仁化学科技有限公司，Cat:CK04, Lot:JJ744），用酶标仪（厂家：Molecular Devices, 型号：SpectraMax M2）读数（检测波长为 450nm），检测线粒体内的脱氢酶的活性，以评价 ADC 对细胞增殖的抑制作用。肿瘤细胞来源见表 15。

表 15.

细胞名称	肿瘤类型	来源
HCC1806	乳腺癌	南京科佰生物
NCI-H23	非小细胞肺癌	康诺泰

体外细胞活性检测：用对应检测培养基（含 2% FBS）稀释生物活性分子或 ADC（12 个浓度梯度）。使用胰酶通过常规方法对肿瘤细胞进行消化，收集管细胞数，用对应的检测培养基（含 2% FBS）重悬。将稀释的生物活性分子或 ADC 加入 96 孔板中，再加入细胞。然后每孔加入 CCK8 试剂 20μL，反应至 4 小时，酶标仪读数（检测波长为 450nm）。实验条件和检测结果如表 16 所示。

表 16.偶联物对 Trop-2 阳性、阴性细胞系杀伤结果

名称	细胞名称	EC_{50}(nM)
Trop2-ADC-01（DAR8）	HCC1806 (7500 细胞/孔，3 天)	2.1
	NCI-H23 (10000 细胞/孔，3 天)	10000
Trop2-ADC-05（DAR8）	HCC1806 (7500 细胞/孔，3 天)	3.4
	NCI-H23 (10000 细胞/孔，3 天)	10000

测试结果表明，本公开的 ADC 分子具有肿瘤细胞杀伤作用。同时在 Trop-2 阳性与阴性细胞间，具有很好的靶向性。

实施例 6.6：不同 DAR 值得抗体药物偶联物对体外细胞活性的抑制作用

ADC 样品：根据实施例制备获得 ADC 样品，

体外细胞活性检测方法：使用胰酶通过常规方法对 NCI-H358 肿瘤细胞进行消化，收集管细胞数，用对应的检测培养基（含 2% FBS）重悬，将 2000-5000 细胞/孔加至 96 孔板。2% FBS 培养基稀释的 ADC 加入 100uL 至 96 孔板，浓度从 150μg/ml 起始，3 倍稀释（11 个浓度梯度）。37°C 5%CO_2 培养 7 天，然后每孔加入 CCK8 试剂 20μL，反应至 2-6 小时，酶标仪读数（检测波长为 450nm）。各组样品和检测结果如表 17 所示。

表 17.

检测组编号	ADC 样品	NCI-H358 (EC_{50}, ng/mL)
1	B7H3-ADC-07(DAR4)	30428
	B7H3-C1-ADC-07(DAR4)	22174
	B7H3-C1-ADC-21(DAR4)	31057
2	Her3-ADC-05(DAR4)	47742
	Her3-C3-ADC-05(DAR4)	65109
	Her3-C3-ADC-21(DAR4)	76365
3	B7H3-ADC-07(DAR6)	27858
	B7H3-ADC-21(DAR6)	20629
4	B7H3-ADC-08(DAR4)	83363
	B7H3-C1-ADC-08(DAR4)	101649
5	Her3-ADC-23(DAR4)	49330
	Her3-C3-ADC-23(DAR4)	弱
6	Her3-ADC-15(DAR2)	5572
	Her3-ADC-15(DAR8)	2562
	Her3-ADC-33(DAR4)	50774
7	B7H3-ADC-15(DAR4)	2931
	B7H3-ADC-33(DAR4)	42071
	2E3-02 抗体	弱

本实例以及实例 6.5 C 测试结果表明，本申请公开的多种 DAR 值（如 4,6,8）的 ADC 对肿瘤细胞均具有杀伤作用。

实施例 6.7：B7H3 抗体药物偶联物体内活性测试

6.7.1 B7H3 抗体药物偶联物对 NCI-HT29 移植瘤药效测试之一

1. 实验材料

受试化合物：B7H3-ADC-21(DAR8)、B7H3-ADC-07(DAR8)、B7H3-ADC-08(DAR8)、B7H3-ADC-05(DAR8)、B7H3-ADC-06(DAR8)、B7H3-ADC-17(DAR8)、B7H3-ADC-18(DAR8)、B7H3-ADC-

19(DAR8)、IgG1-ADC-04(DAR8)。

实验细胞：NCI-HT29 细胞，购自 ATCC；

实验动物：Balb/c nu 裸小鼠，雌性，5-6 周龄，购自维通利华实验动物有限公司。

2. 实验方案

2.1. 细胞处理

NCI-HT29 细胞用含 10 %FBS 的 1640 培养基培养于 15 cm 直径培养皿，达 80-90 %左右融合度时用胰蛋白酶-EDTA 消化，用 PBS 洗两次，然后离心重悬于预冷 PBS 中，细胞计数仪计数，PBS 稀释使细胞浓度为 5×10^7/ml。

2.2. 肿瘤细胞移植

Balb/c nu 小鼠实验室环境适应 2-5 天，于右肋部皮下接种 NCI-HT29 细胞，接种细胞量为 5×10^6/只，接种体积为 0.2 ml（含 50 % Matrigel），待肿瘤生长至 250 mm^3 左右时，进行实验。

2.3. 动物给药与检测

入组的荷瘤裸鼠，按以下方案给药：

表 18

No.	组别	动物数量	给药剂量	给药途径和周期
1	B7H3-ADC-21(DAR8)	5	3 mg/kg	i.v., QW×3
2	B7H3-ADC-07(DAR8)	5	3 mg/kg	i.v., QW×3
3	B7H3-ADC-08(DAR8)	5	3 mg/kg	i.v., QW×3
4	B7H3-ADC-05(DAR8)	5	3 mg/kg	i.v., QW×3
5	B7H3-ADC-06(DAR8)	5	3 mg/kg	i.v., QW×3
6	B7H3-ADC-17(DAR8)	5	3 mg/kg	i.v., QW×3
7	B7H3-ADC-18(DAR8)	5	3 mg/kg	i.v., QW×3
8	B7H3-ADC-19(DAR8)	5	3 mg/kg	i.v., QW×3
9	IgG1-ADC-04(DAR8) (对照组)	5	3 mg/kg	i.v., QW×3

给药周期结束后，继续观察 1-2 周。最后一次瘤体积测量后，分离肿瘤，准确称取肿瘤重量并拍照记录。

2.4. 肿瘤体积及体重测定：

每周测量 2 次瘤体积及体重，计算 TGI%和抑瘤率（TGI）（%），计算公式为：相对肿瘤增殖率 T/C(%)= TRTV / CRTV × 100%（TRTV：治疗组平均 RTV ；CRTV：对照组平均 RTV；RTV=Vt/V0，V0 为分组时该动物的瘤体积，Vt 为治疗后该动物的瘤体积）；相对肿瘤抑制率 TGI%＝(1-T/C)× 100%（T 和 C 分别为治疗组和对照组在某一特定时间点的相对肿瘤体积（RTV）。

肿瘤体积（V）计算公式为：V＝1/2×L 长×L 短 ^{2}, 其中 L 长、L 短分别表示肿瘤长径、短径。

3. 实验结果

具体结果见表 19 和附图 9，本申请 ADC 均显示了对肿瘤生长的抑制作用，特别是 B7H3-ADC-05, B7H3-ADC-06、B7H3-ADC-07, B7H3-ADC-08 和 B7H3-ADC-17 具有很强的抑制肿瘤的效果，B7H3-ADC-18, B7H3-ADC-19 和 B7H3-ADC-21 的抑制肿瘤的效果接近。给药期间，各组动物无明显体重下降和明显的药物毒性。

表 19. NCI-HT29 移植瘤模型数据

	肿瘤体积 mm3						T/C（%）	TGI（%）
样品	给药 Day1	给药 Day4	给药 Day8	给药 Day11	给药 Day15	给药 Day18		
IgG1-ADC-04(DAR8)	244.4	381.0	543.6	1061.2	1285.6	1821.8	-	-
B7H3-ADC-21(DAR8)	244.4	335.4	414.4	781.4	862.2	1233.4	62.70	37.30
B7H3-ADC-08(DAR8)	244.4	268.6	243	418.4	456.6	555.4	19.72	80.28
B7H3-ADC-05(DAR8)	244.4	286.2	221.8	479.6	574	745.2	31.75	68.25
B7H3-ADC-06(DAR8)	245.8	293.6	302.8	482.6	592.2	669	26.83	73.17
B7H3-ADC-07(DAR8)	243.6	276	253.2	414.8	461.8	576.4	21.10	78.90
B7H3-ADC-17(DAR8)	245.4	250.2	304.2	559.2	741	970	45.94	54.06
B7H3-ADC-18(DAR8)	245.2	302.2	413.4	741.4	958.8	1218.6	61.71	38.29
B7H3-ADC-19(DAR8)	245.2	318.6	441.4	784.6	1003.6	1244.6	63.36	36.64

6.7.2 B7H3 抗体药物偶联物对 NCI-HT29 移植瘤药效测试之二

利用 5.3.1 相同的方法测定 B7H3-ADC-21(DAR8)、B7H3-ADC-08(DAR8)、B7H3-ADC-07(DAR8)的移植瘤药效，具体的分组和给药方案如表 20 所示，

表 20 给药方案

组号	组别	动物数量	给药剂量	给药方式	给药频次	给药体积
1	生理盐水	5	-	i.v.	QW×3 w	10 mL/kg
2	B7H3-ADC-21(DAR8)	5	10 mg/kg	i.v.	QW×3 w	10 mL/kg
3	B7H3-ADC-21(DAR8)	5	3 mg/kg	i.v.	QW×3 w	10 mL/kg
4	B7H3-ADC-08(DAR8)	5	3 mg/kg	i.v.	QW×3 w	10 mL/kg

5	B7H3-ADC-07(DAR8)	5	10 mg/kg	i.v.	QW×3 w	10 mL/kg
6	B7H3-ADC-07(DAR8)	5	3 mg/kg	i.v.	QW×3 w	10 mL/kg

获得结果如表 21 所示，和附图 10。

表 21 NCI-HT29 移植瘤模型数据

分组	平均肿瘤体积（mm^3）D1	平均肿瘤体积（mm^3）D18	T/C（%）D18	抑瘤率 TGI（%）D18
生理盐水	232.2±35.1	1281.8±170.0	-	-
B7H3-ADC-21(DAR8) 10 mg/kg	231.8±49.6	679.2±141.7***	53.1	46.92
B7H3-ADC-21(DAR8) 3 mg/kg	232.2±41.4	1081.6±209.7	84.4	15.62
B7H3-ADC-08(DAR8) 3 mg/kg	232.6±37.5	675.8±190.0***	52.6	47.37
B7H3-ADC-07 (DAR8)10 mg/kg	231.6±45.9	363.8±162.4***	28.5	71.54
B7H3-ADC-07 (DAR8)3 mg/kg	231.8±65.0	579.2±281.8***	45.3	54.74

D1：首次给药的第一天； *P < 0.05，**P < 0.01，***P < 0.001。

肿瘤体积结果显示，至试验结束时（D18），B7H3-ADC-21 10 mg/kg 组，B7H3-ADC-08 3 mg/kg 组，B7H3-ADC-07 10 mg/kg、3 mg/kg 组动物肿瘤体积显著低于 Vehicle 对照组（P<0.001），抑瘤率分别为 46.92%，47.37%，71.54%，54.74%；B7H3-ADC-21 3 mg/kg 组肿瘤体积与 Vehicle 组相比未见统计学差异。体重结果显示，至给药结束时（D18），所有受试剂量组给药期间体重均增加，显示各剂量组均耐受良好。

6.7.3 B7H3 抗体药物偶联物对 NCI-H358 移植瘤药效测试

1. 研究目的

评价受试药物在人非小细胞肺癌 NCI-H358 皮下异种移植雌性 Balb/c Nude 小鼠模型中的抗肿瘤作用。

2. 受试物信息

B7H3-ADC-21(DAR8)、B7H3-ADC-05(DAR8)、B7H3-ADC-07(DAR8)、B7H3-ADC-09(DAR8)、B7H3-ADC-10(DAR8)，B7H3-ADC-20(DAR8)。

3. 试验内容

参照本实施例 6.7.1 进行细胞处理 NCI-H358（ATCC，CRL-5807）和肿瘤细胞移植。

3.1 给药及分组

每组的动物数及详细的给药途径、剂量和方案见下表 22：

表 22 给药方案

No.	给药组	动物数量	给药剂量(mg/kg)	给药途径和周期
1	生理盐水	5	3	i.v., QW×3
2	B7H3-ADC-21(DAR8)	5	3	i.v., QW×3
3	B7H3-ADC-05(DAR8)	5	3	i.v., QW×3
4	B7H3-ADC-07(DAR8)	5	3	i.v., QW×3
5	B7H3-ADC-09(DAR8)	5	3	i.v., QW×3
6	B7H3-ADC-10(DAR8)	5	3	i.v., QW×3
7	B7H3-ADC-20(DAR8)	5	3	i.v., QW×3
8	B7H3-ADC-20(DAR8)	5	1	i.v., QW×3

3.2 检测指标

肿瘤体积及体重测定，每周测量 2 次瘤体积（mm^3）及体重，计算相对肿瘤增殖率 T/C(%)和相对肿瘤抑制率 TGI(%)。

肿瘤体积（V）计算公式为：V＝1/2×L 长×L 短 ^{2}；

相对肿瘤增殖率 T/C(%)= TRTV / CRTV × 100%（TRTV：治疗组平均 RTV ；CRTV：对照组平均 RTV；RTV=Vt/V0，V0 为分组时该动物的瘤体积，Vt 为治疗后该动物的瘤体积）；

相对肿瘤抑制率 TGI%=（1-T/C）× 100%（T 和 C 分别为治疗组和对照组在某一特定时间点的相对肿瘤体积（RTV）。

3.3 试验终点

确定给药期结束后，继续观察 1-2 周，随后解剖取瘤，称重并拍照。

3. 实验结果

具体结果见表 23 和附图 11,本申请 ADC 均显示了对肿瘤生长的抑制作用，并且 ADC-20 的 3mg/kg 剂量优于 1mg/kg 剂量的抑制肿瘤效果。给药期间，各组动物无明显体重下降和明显的药物毒性。

表 23. NCI-H358 移植瘤模型数据（肿瘤体积 mm^3）

给药后天数 / 组别	1	3	7	10	14	17	21
生理盐水	234	256	262	294	378	434	604
B7H3-ADC-21(DAR8) 3 mg/kg	234	224	182	176	164	128	126
B7H3-ADC-05 (DAR8)3 mg/kg	233	249	180	130	110	94	87
B7H3-ADC-07 (DAR8)3 mg/kg	234	225	173	120	118	95	95
B7H3-ADC-09(DAR8) 3 mg/kg	233	180	177	139	114	103	97
B7H3-ADC-10(DAR8) 3 mg/kg	233	211	232	197	154	144	125
B7H3-ADC-20(DAR8) 3 mg/kg	233	191	184	172	170	162	202
B7H3-ADC-20(DAR8) 1 mg/kg	234	230	231	238	256	308	411

6.7.4 B7H3 抗体药物偶联物在前列腺癌皮下异种移植 PDX 模型中的药效测试

1. 研究目的

测试 B7H3 抗体药物偶联物在 HuPrime®前列腺癌 PR9586 皮下异种移植 NPG 雄鼠模型中的药效

2. 受试物

B7H3-ADC-07(DAR8)、IgG1-ADC-07（DAR8）

3. 试验内容

3.1 实验小鼠信息

NPG PR9586 模型的小鼠，周龄 6-9 周（肿瘤细胞接种时的小鼠预计周龄），雄性，共 100 只小鼠，购自北京维通达生物技术有限公司。

3.2 构建荷瘤小鼠模型

从 HuPrime®前列腺癌 PR9586(种族为 Western)荷瘤小鼠收取肿瘤组织，切成直径为 2-3mm 的瘤块接种于 NPG 右前肩胛处皮下。

当荷瘤鼠平均肿瘤体积到达约 100-200 （~150）mm^3时，将小鼠按照"3.3 分组及给药"表格进行随机分组。各组内的肿瘤体积的变异系数(CV) 用公式 CV=SD/MTV×100%计算，应小于 40%。分组当天定义为第 1 天。

3.3. 分组及给药

每组的动物数及详细的给药途径、剂量和方案见下表 24。

表 24.实验动物分组

组别	动物数	给药组	剂量(mg/kg)	给药方式	给药周期
1	8	Vehicle（生理盐水）	/	*i.v.*	QW×3weeks
2	8	IgG1-ADC-07（DAR8）	10	*i.v.*	QW×3weeks
3	8	B7H3-ADC-07（DAR8）	1	*i.v.*	QW×3weeks
4	8	B7H3-ADC-07（DAR8）	3	*i.v.*	QW×3weeks
5	8	B7H3-ADC-07（DAR8）	10	*i.v.*	QW×3weeks

注：1. 给药体积为 10 μL/g；2. 分组当天定义为第一天(day 1)，给药在day 1，day8 和day15；3. 给药时注意避光； 4. 分组当天取一只分剩小鼠肿瘤进行FACS检测分析肿瘤细胞表面抗原表达情况，流式结果表明B7H3在PR9586模型中有明显表达。

3.4 实验观察和数据收集

肿瘤细胞接种后，常规监测包括了肿瘤生长及治疗对动物正常行为的影响，具体内容有实验动物的活动性，摄食和饮水情况，体重增加或降低情况，眼睛、被毛及其它异常情况。试验过程中观察到的临床症状均记录在原始数据中。开始给药后，每周测量两次小鼠的体重和肿瘤的大小。肿瘤体积计算公式：肿瘤体积（mm^3）= 1/2 ×（a × b^2）（其中 a 表示长径，b 表示短径）。实验中使用 StudyDirector™（版本号 3.1.399.19，供应商 Studylog System, Inc.）软件收集数据，包括肿瘤的长短径的测量和动物体重的称量，原始数据由天平和游标卡尺测量后直接导入软件，数据的任何变动都将被记录在此软件中。

给药、肿瘤测量及体重称量等全部过程都在生物安全柜或超净工作台中进行。

3.5 数据分析

本实验的主要观察指标为：

相对肿瘤增殖率，T/C(%)，即在某一时间点，治疗组和对照组相对肿瘤体积或瘤重的百分比值。计算公式为：

T/C % = T_{RTV} / C_{RTV} × 100%（T_{RTV}：治疗组平均 RTV ；C_{RTV}：对照组平均 RTV；RTV=V_t/V_0，V_0 为分组时该动物的瘤体积，V_t 为治疗后该动物的瘤体积）；

或 T/C % = T_{TW} / C_{TW} × 100%（T_{TW}：治疗组实验终结时平均瘤重；C_{TW}：对照组实验终结时平均瘤重）。

相对肿瘤抑制率，TGI(%)，计算公式为：

TGI% =(1-T/C)× 100%(T 和 C 分别为治疗组和对照组在某一特定时间点的相对肿瘤体积(RTV)或瘤重（TW））

4. 实验结果

B7H3-ADC-07（DAR8）和 IgG1-ADC-07（DAR8）在 PR9586 模型上的药效结果如图 12，表 25 和表 26 所示：

表 25 在 HuPrime®前列腺癌 PR9586 模型中各组肿瘤体积分析表

实验组	分组后第 22 天			
	肿瘤体积（$\bar{x}$±S）	TGI (%)	T/C (%)	P 值
第 1 组 Vehicle	874.80 ± 135.11(8)	--	--	--
第 2 组 IgG1-ADC-07（DAR8）10 mg/kg	129.30 ± 49.16(8)	85.73	14.27	<0.001
第 3 组 B7H3-ADC-07（DAR8）1 mg/kg	135.42 ± 39.36(8)	84.00	16.00	0.009
第 4 组 B7H3-ADC-07（DAR8）3 mg/kg	92.61 ± 36.73(8)	88.96	11.04	<0.001
第 5 组 B7H3-ADC-07（DAR8）10 mg/kg	104.38 ± 33.65(8)	87.7	12.30	<0.001

注：1. 数据以“平均值 ± 标准误差”表示；2. T/C % = T_{RTV} / C_{RTV} × 100%；TGI% =（1-T/C）× 100%；

表.26 在 HuPrime®前列腺癌 PR9586 模型中各组瘤重分析表

实验组	瘤重 (mg)（$\bar{x}$±s） 分组后第 22 天	TGI（%）	T/C (%)	P 值
第 1 组 Vehicle	473.29 ± 91.75(8)			
第 2 组 IgG1-ADC-07（DAR8）10 mg/kg	52.96 ± 22.85(8)	88.81	11.19	0.002
第 3 组 B7H3-ADC-07（DAR8）1 mg/kg	52.64 ± 19.72(8)	88.88	11.12	0.006
第 4 组 B7H3-ADC-07（DAR8）3 mg/kg	27.90 ± 14.59(8)	94.11	5.89	<0.001
第 5 组 B7H3-ADC-07（DAR8）10 mg/kg	46.40 ± 24.35(8)	90.20	9.80	0.001

注：1. 数据以“平均值 ± 标准误差”表示；2. T/C % = T_{TW} / C_{TW} × 100%; TGI% =（1-T/C）× 100%；

5. 结论

在 PR9586 模型中，肿瘤体积测量结果显示，试验结束时（Day22），B7H3-ADC-07（DAR8） 3 mg/kg 和 10 mg/kg 组动物肿瘤体积均显著（p<0.001）低于 Vehicle（生理盐水）组，B7H3-ADC-07（DAR8）1 mg/kg、3 mg/kg、10 mg/kg 剂量组肿瘤体积抑瘤率（TGI）分别为 84.00%，88.96%，88.7%。动物体重测量结果显示，试验结束时（Day22），B7H3-ADC-07（DAR8）各剂量组给药期间动物体重均增加与对照组无明显差异，显示动物对 B7H3-ADC-07（DAR8）1 mg/kg、3 mg/kg、10 mg/kg 剂量均耐受良好。肿瘤重量测量结果显示，试验结束时（Day22）B7H3-ADC-07（DAR8）3 mg/kg 组与 Vehicle 组相比，动物平均肿瘤重量显著降低，具有统计学意义（P < 0.001），B7H3-ADC-07（DAR8）1 mg/kg、3 mg/kg、10 mg/kg 组的肿瘤重量 TGI 为 88.88%、94.11%（P<0.001）和 90.20%。无论按照肿瘤体积或者肿瘤重量，IgG1-ADC-07（DAR8）组都具有很好的肿瘤抑制效果，TGI 分别为 85.7% 和 88.8%。结果表明本公开提供的抗体药物偶联物及其药物连接物（毒素-linker）即不需要抗体的细胞内吞、也不需要肿瘤细胞表明抗原阳性表达既可以实现抗肿瘤效果。同时实验各组体重与对照组体重无明显区别，本公开的抗体药物偶联物具有良好的安全性。

6.7.5 B7H3 抗体药物偶联物在食管鳞癌皮下异种移植 PDX 模型中的药效学评价

1. 研究目的

测试 B7H3-ADC-07（DAR8）和 IgG1-ADC-07（DAR8）在食管鳞癌 ES0204 皮下异种移植 BALB/c 雌性裸鼠模型中的药效。

2. 受试物

B7H3-ADC-07（DAR8）、IgG1-ADC-07（DAR8）

3. 试验内容

3.1 实验小鼠信息

BALB/c nude for ES0204 模型小鼠，6-9 周（肿瘤细胞接种时的小鼠预计周龄），雌性，共 100 只小鼠（40 只加上 150%富余），购自江苏集萃药康生物科技有限公司。

3.2 构建荷瘤小鼠模型

从食管鳞癌 ES0204（亚型为 ECC，种族为 Asian）荷瘤小鼠收取肿瘤组织，切成直径为 2-3mm 的瘤块接种于 Balb/c 裸小鼠右前肩胛处皮下。

当荷瘤鼠平均肿瘤体积到达约 100-200 （~150）mm^3 时，将小鼠按照“3.3 分组及给药”表格进行随机分组。各组内的肿瘤体积的变异系数(CV) 用公式 CV= SD/MTV×100%计算，应小于 40%。分组当天定义为第 1 天。

3.3. 分组及给药

每组的动物数及详细的给药途径、剂量和方案见下表 27。

表 27.实验动物分组

组别	动物数	给药组	剂量(mg/kg)	给药方式	给药周期
1	8	Vehicle（生理盐水）	/	*i.v.*	QW×3weeks

2	8	IgG1-ADC-07（DAR8）	10	*i.v.*	QW×3weeks
3	8	B7H3-ADC-07（DAR8）	1	*i.v.*	QW×3weeks
4	8	B7H3-ADC-07（DAR8）	3	*i.v.*	QW×3weeks
5	8	B7H3-ADC-07（DAR8）	10	*i.v.*	QW×3weeks

注： 1. 给药体积为 10 μL/g； 2. 分组当天定义为第一天(day 1)，给药在day 1，day8 和day15； 3. 给药时注意避光； 4. 分组当天取一只分剩小鼠肿瘤进行FACS检测分析肿瘤细胞表面抗原表达情况，流式结果表明B7H3在ES0204模型中有明显表达

3.4 实验观察和数据收集

肿瘤细胞接种后，常规监测包括了肿瘤生长及治疗对动物正常行为的影响，具体内容有实验动物的活动性，摄食和饮水情况，体重增加或降低情况，眼睛、被毛及其它异常情况。试验过程中观察到的临床症状均记录在原始数据中。开始给药后，每周测量两次小鼠的体重和肿瘤的大小。肿瘤体积计算公式：肿瘤体积（mm^3）= 1/2 ×（a × b^2）（其中 a 表示长径，b 表示短径）。实验中使用 StudyDirector™（版本号 3.1.399.19，供应商 Studylog System, Inc.）软件收集数据，包括肿瘤的长短径的测量和动物体重的称量，原始数据由天平和游标卡尺测量后直接导入软件，数据的任何变动都将被记录在此软件中。

给药、肿瘤测量及体重称量等全部过程都在生物安全柜或超净工作台中进行。

3.5 数据分析

本实验的主要观察指标为：

相对肿瘤增殖率，T/C(%)，即在某一时间点，治疗组和对照组相对肿瘤体积或瘤重的百分比值。计算公式为：

$T/C\% = T_{RTV} / C_{RTV} \times 100\%$（$T_{RTV}$：治疗组平均 RTV ；$C_{RTV}$：对照组平均 RTV；$RTV=V_t/V_0$，$V_0$ 为分组时该动物的瘤体积，V_t 为治疗后该动物的瘤体积）；

或 $T/C\% = T_{TW} / C_{TW} \times 100\%$（$T_{TW}$：治疗组实验终结时平均瘤重；$C_{TW}$：对照组实验终结时平均瘤重）。

相对肿瘤抑制率，TGI(%)，计算公式为：

TGI%=(1-T/C)× 100%(T 和 C 分别为治疗组和对照组在某一特定时间点的相对肿瘤体积(RTV)或瘤重（TW))

4. 实验结果

B7H3-ADC-07（DAR8）和 IgG1-ADC-07（DAR8）在 ES0204 模型上的药效结果如图 13，表 28 和表 29 所示：

表.28 在 HuPrime®食管鳞癌 ES0204 模型中各组肿瘤体积分析表

实验组	分组后第 22 天			
	肿瘤体积（$\bar{x}\pm S$）	TGI (%)	T/C (%)	P 值

第 1 组 Vehicle	959.89 ± 146.45(8)	-	-	-
第 2 组 IgG1-ADC-07（DAR8）10 mg/kg	182.05 ± 66.12(8)	81.28	18.72	<0.001
第 3 组 B7H3-ADC-07（DAR8） 1 mg/kg	277.49 ± 115.05(8)	75.71	24.29	<0.001
第 4 组 B7H3-ADC-07（DAR8） 3 mg/kg	0.00 ± 0.00(8)	100.00	0.00	<0.001
第 5 组 B7H3-ADC-07（DAR8）10 mg/kg	0.00 ± 0.00(8)	100.00	0.00	<0.001

注：1. 数据以"平均值 ± 标准误差"表示；2. T/C % = T_{RTV} / C_{RTV} × 100%；TGI% =（1-T/C）× 100%；

表 29 在 HuPrime®食管鳞癌 ES0204 模型中各组瘤重分析表

实验组	瘤重 (mg)（$\bar{x}$±s）分组后第 22 天	TGI	T/C (%)	P 值（相较于对照组）
第 1 组 Vehicle	794.41 ± 143.85(8)	--	--	--
第 2 组 IgG1-ADC-07（DAR8）10 mg/kg	38.14 ± 13.37(8)	95.20	4.80	<0.001
第 3 组 B7H3-ADC-07（DAR8） 1 mg/kg	193.65 ± 90.66(8)	75.62	24.38	<0.001
第 4 组 B7H3-ADC-07（DAR8） 3 mg/kg	0.00 ± 0.00(8)	100.00	0.00	<0.001
第 5 组 B7H3-ADC-07（DAR8） 10 mg/kg	0.00 ± 0.00(8)	100.00	0.00	<0.001

注：1. 数据以"平均值 ± 标准误差"表示；2. T/C % = T_{TW} / C_{TW} × 100%; TGI% =（1-T/C）× 100%；

5. 结论

在 ES0204 模型中，肿瘤体积测量结果显示，试验结束时（Day22），B7H3-ADC-07（DAR8） 1 mg/kg、3 mg/kg 和 10 mg/kg 组动物肿瘤体积均显著低于 Vehicle（生理盐水）组（P < 0.001），B7H3-ADC-07（DAR8）1mg/kg、3 mg/kg、10 mg/kg 剂量组肿瘤体积抑瘤率（TGI）分别为 75.71%，100.00%，100.00%，与剂量呈正相关。动物体重测量结果显示，试验结束时（Day22），B7H3-ADC-07（DAR8）各剂量组给药期间动物体重均增加与对照组无明显差异，显示动物对 B7H3-ADC-07（DAR8）1 mg/kg、3 mg/kg、10 mg/kg 剂量均耐受良好。肿瘤重量测量结果显示，试验结束时（Day22）B7H3-ADC-07（DAR8）1mg/kg、3mg/kg、10 mg/kg 组与 Vehicle 组相比，动物平均肿瘤重量均显著降低，具有统计学意义（P < 0.001），肿瘤重量 TGI 为 75.62%，100.00%和 100.00%； IgG1-ADC-07（DAR8）组同样具有很好的肿瘤抑制效果，TGI 分别为 81.3%（肿瘤体积） 和 95.2%（肿瘤重量）。结果表明本公开提供的抗体药物偶联物及其的药物连接物（毒素-linker）即不需要抗体的细胞内吞、也不需要肿瘤细胞表明抗原阳性表达既可以实现抗肿瘤效果。同时实验各组体重与对照组体重无明显区别，本公开的抗体药物偶联物具有良好的安全性。

实施例 6.8：Her3 抗体药物偶联物和 IgG1-ADC 体内活性测试

6.8.1 Her3 抗体药物偶联物对 NCI-H358 移植瘤药效测试

本公开通过评价抗 Her3 抗体 ADC 药物对 Balb/c Nude 小鼠皮下人非小细胞肺癌细胞株 NCI-

H358 细胞（ATCC 来源，Her3 表达阳性率在 10%左右）移植瘤模型的抗肿瘤作用来展示体内药效。

具体步骤如下： Balb/c nu 裸小鼠，雌性，5-6 周龄，购自维通利华实验动物有限公司。NCI-H358 细胞用含 10 %FBS 的 1640 培养基培养于 15 cm 直径培养皿，达 80-90 %左右融合度时用胰蛋白酶-EDTA 消化，用 PBS 洗两次，然后离心重悬于预冷 PBS 中，细胞计数仪计数，PBS 稀释使细胞浓度为 5×10^7/ml。Balb/c nu 小鼠实验室环境适应 7 天，于右肋部皮下接种 NCI-H358 细胞，接种细胞量为 5×10^6/只，接种体积为 0.2 ml（含 50 % Matrigel），待肿瘤生长至 300mm^3 左右时，根据肿瘤大小随机分组，每组 5 只，分别为：抗鸡溶菌酶人 IgG1 同型抗体（阴性对照，苏州宜联生物制备）组、IgG1-ADC-07（DAR8）、Her3-C3-ADC-21（DAR4），Her3-ADC-21（DAR4）以及 Her3-ADC-07（DAR8）剂量组。所有样品均为尾静脉注射，每周 1 次，共给药 3 周。给药后观察并定期测量小鼠肿瘤体积及体重。相对肿瘤增殖率，T/C(%)，即在某一时间点，治疗组和对照组相对肿瘤体积或瘤重的百分比值。相对肿瘤抑制率，TGI(%)，计算公式为：TGI% =（1-T/C）× 100%（T 和 C 分别为治疗组和对照组在某一特定时间点的相对肿瘤体积（RTV）或瘤重（TW））。

结果见表 30 及图 14。

表 30.Her3-ADC-07 对人非小细胞肺癌 NCI-H358 裸小鼠皮下移植瘤的疗效

分组	平均肿瘤体积（mm^3）	平均肿瘤体积（mm^3）	T/C（%）	抑瘤率 TGI（%）	*P* 值（D29）
	D1	D29	D29	D29	
IgG1 5mg/kg	309.0±72.0	1425.0±241.2	-	-	-
IgG1-ADC-07 （ DAR8 ） 5mg/kg	309.4±53.4	725.2±415.1	50.83	49.17	0.203
Her3-C3-ADC-21（DAR4） 1 mg/kg	308.8±67.7	1080.8±741.8	75.89	24.11	0.996
Her3-ADC-21（DAR4） 5 mg/kg	309.6±60.6	346.4±123.8**	24.26	75.74	0.002
Her3-ADC-21（DAR4） 1 mg/kg	309.6±58.6	1000.6±184.1	70.08	29.92	0.214
Her3-ADC-07 （ DAR8 ） 5mg/kg	309.4±43.4	205.4±56.7**	14.40	85.60	0.003
Her3-ADC-07 （ DAR8 ） 1mg/kg	309.6±47.1	339.0±95.8**	23.74	76.26	0.003

由实验结果可知，和 IgG1 组相比，5mg/kg 和 1mg/kg 剂量 Her3-ADC-07（DAR8）对 NCI-

H358 人非小细胞肺癌移植瘤模型的肿瘤生长有显著抑制作用，并且呈现剂量梯度趋势。Her3-ADC-07 1mg/kg 组 TGI 为 76.26%，略强于 Her3-ADC-21 5mg/kg 剂量组的 TGI 75.74%。Her3-ADC-21 1mg/kg 组 TGI 为 29.92%，略强于 Her3-C3-ADC-21 1mg/kg 剂量组的 TGI 24.11%。

令人惊奇的是，和 IgG1 组相比，IgG1-ADC-07 也具有明显的抑制肿瘤作用，说明得到的本公开偶联物（ADC）通过在连接子实现提高了整个 ADC（无论是否具有抗原结合活性或内吞活性）在肿瘤环境中的暴露量，具有更好的肿瘤组织靶向性，从而具有更好的抑制肿瘤（无论是否表达相应抗原）效果。

另外，动物体重结果显示，整个给药期以及恢复期间，各给药组动物耐受良好。

6.8.2. Her3 抗体药物偶联物对 SW480 移植瘤药效测试之一

本公开通过评价抗 Her3 抗体 ADC 药物对 Balb/c Nude 小鼠皮下人结肠癌细胞株 SW480 细胞（ATCC 来源，Her3 表达阳性率在 30%左右）移植瘤模型的抗肿瘤作用来展示体内药效。具体步骤如下： 36 只 Balb/c nu 裸小鼠，雌性，5-6 周龄，购自维通利华实验动物有限公司。SW480 细胞用含 10 %FBS 的 1640 培养基培养于 15 cm 直径培养皿，达 80-90 %左右融合度时用胰蛋白酶-EDTA 消化，用 PBS 洗两次，然后离心重悬于预冷 PBS 中，细胞计数仪计数，PBS 稀释使细胞浓度为 5×10^7/ml。Balb/c nu 小鼠实验室环境适应 7 天，于右肋部皮下接种 SW480 细胞，接种细胞量为 5×10^6/只，接种体积为 0.2 ml（含 50 % Matrigel），待肿瘤生长至 250mm3 左右时，根据肿瘤大小随机分组，每组 5 只，分别为抗鸡溶菌酶人 IgG1 同型抗体（阴性对照，苏州宜联生物）组、IgG1-ADC-07、以及 Her3-ADC-07 剂量组。所有样品均为尾静脉注射，每周 1 次，共给药 3 周。给药后观察并定期测量小鼠肿瘤体积及体重。

1) 相对肿瘤增殖率，T/C(%)，即在某一时间点，治疗组和对照组相对肿瘤体积或瘤重的百分比值。

2) 相对肿瘤抑制率，TGI(%)，计算公式为：TGI%=（1-T/C）×100%（T 和 C 分别为治疗组和对照组在某一特定时间点的相对肿瘤体积（RTV）或瘤重（TW））。

具体结果见表 32 及图 15。由实验结果可知，10mg/kg 和 3mg/kg 剂量 Her3-ADC-07 对 SW480 人结直肠癌移植瘤模型的肿瘤生长有显著一定抑制作用，并且呈现剂量梯度趋势。

表 31：SW480+ Balb/c Nude 小鼠模型药效结果

分组	平均肿瘤体积（mm^3）	平均肿瘤体积（mm^3）	T/C（%）	抑瘤率 TGI（%）	*P* 值 (D18)
	D1	D18	D18	D18	
Ig-G1 10 mg/kg	269.80±32.42	2437.80±378.82	-	-	-
IgG1-ADC-07（DAR8） 10 mg/kg	270.60±33.13	1129.40±856.17**	46.2	53.8	0.007
Her3-ADC-07（DAR8） 10 mg/kg	269.20±31.17	164.80±39.81***	6.8	93.2	0.000
Her3-ADC-07（DAR8） 3 mg/kg	270.20±31.40	939.00±744.80**	38.5	61.5	0.002
Her3-ADC-07 （DAR8） 1 mg/kg	271.60±38.35	2708.80±535.14	110.4	-10.4	0.876

6.8.3. Her3 抗体药物偶联物对 SW480 移植瘤药效测试之二

参考实施例 6.8.2.相同的模型和方法测定 IgG1，IgG1-ADC-07(DAR8),Her3-ADC-07(DAR8), Her3-

C3-ADC-21(DAR8)在人结肠癌细胞株 SW480 细胞（ATCC 来源，Her3 表达阳性率在 30%左右）移植瘤模型的抗肿瘤作用。

具体测试结果见下表 32 及图 16。

表 32.

给药后天数 / 各组肿瘤体积（mm^3）	D1	D4	D8	D11	D15	D18	D22	D25	D29	P 值(vs IgG1)D15	T/C(%)D15	TGI(%)D15
IgG1 10mg/kg	291	483	1084	1874	2407	/	/	/	/	/	/	/
IgG1-ADC-07(DAR8) 10mg/kg	290	315	459	931	1497	1691	1939	/	/	0.035	62.36	37.64
Her3-ADC-07(DAR8) 10mg/kg	291	242	200	169	133	196	168	120	237	0.000	5.53	94.47
Her3-ADC-07(DAR8) 3mg/kg	291	254	361	589	716	967	1190	1315	/	0.000	29.71	70.29
Her3-C3-ADC-21(DAR8) 10mg/kg	292	258	129	125	178	228	360	390	890	0.000	7.36	92.64
Her3-C3-ADC-21(DAR8) 3mg/kg	292	246	525	968	1352	1894	2360	/	/	0.012	55.97	44.03

由测试结果可知，10mg/kg 和 3mg/kg 剂量 Her3-ADC-07 对 SW480 人结直肠癌移植瘤模型的肿瘤生长有显著一定抑制作用，并且呈现剂量梯度趋势。

难以预料的是，Her3-ADC-07(DAR8)3mg/kg 组的抑瘤效果明显强于 Her3-C3-ADC-21(DAR8) 3mg/kg 组，Her3-ADC-07(DAR8)10mg/kg 组的抑瘤效果明显强于 Her3-C3-ADC-21(DAR8) 10mg/kg 组。

令人惊奇的是，和 IgG1 组相比，IgG1-ADC-07 在 SW480 人结直肠癌移植瘤模型中也具有明显的抑制肿瘤作用，并且强于 Her3-C3-ADC-21(DAR8)3mg/kg 组的抑瘤作用，说明得到的本公开偶联物（ADC）通过在连接子实现提高了整个 ADC（无论是否具有抗原结合活性或内吞活性）在肿瘤环境中的暴露量，具有更好的肿瘤组织靶向性，从而具有更好的抑制肿瘤（无论是否表达相应抗原）效果。

另外，动物体重结果显示，整个给药期以及恢复期间，各给药组动物耐受良好。

实施例 6.9 ADC 血浆稳定性测试

通过在孵育 B7H3-ADC-07（DAR8）的人血浆中测定生物活性分子 A1.9 的释放，在孵育 B7H3-C1-ADC-21(DAR4)的人血浆中测定 Dxd 的释放，评价 B7H3-ADC-07（DAR8）在血浆中的稳定性。

样品和组别

表 33

组别	受试物	孵育浓度	体系	检测物	检测时间点

1	B7H3-ADC-07（DAR8）	200 μg/mL	人血浆	A1.9	0 h、4h、24h、2d、3d、7d、10d、14d、17d、21d、28d
5	B7H3-C1-ADC-21(DAR4)	200 μg/mL	人血浆	Dxd	

溶液配制：用 PBS 将 B7H3-ADC-07（DAR8）及 B7H3-C1-ADC-21(DAR4)原液稀释至浓度 2 mg/mL 的工作溶液。用 DMSO 配制合适浓度的内标储备液，然后用乙腈或其他试剂配制合适浓度的含内标的沉淀剂。

样品孵育：各种属（人、食蟹猴、ICR 小鼠）血浆和含 1%BSA 的 PBS 中均加入抑菌剂 ProClin，ProClin 终浓度为 0.1%，无菌操作。分别取 40 μL 受试物工作溶液与 360 μL 人血浆混合，制得浓度为 200 μg/mL 的孵育样品。封板封膜，37 ℃ 5% CO2 培养箱中孵育， 震荡速度 80 次/分钟。于 0 h、 4h、24h、2d、3d、7d、10d、14d、17d、21d、28d 分别转移 20 μL 血浆样品，加入沉淀剂（含内标）200 μL，充分混匀沉淀蛋白。

所有样品经蛋白沉淀后，离心取上清液，加水稀释后使用 LC-MS/MS 进行分析。分析条件为

表 34. 血浆稳定性测试的分析条件

分析物	A1.9				Dxd			
检测方法	LC-MS/MS-6500-001				LC-MS/MS-6500-001			
内标	甲苯磺丁脲（Tolbutamide）				甲苯磺丁脲（Tolbutamide）			
质谱条件	正离子, ESI				正离子, ESI			
流动相	A: 0.1%FA in H2O				A: 0.1%FA in H2O			
	B: 0.1%FA in ACN				B: 0.1%FA in ACN			
色谱柱	Waters ,BEH C18，1.7μm，2.1*50mm				Aglient ,ZORBAX XDB-C18，3.5μm，2.1*50mm			
流速	0.5 mL/min				0.5 mL/min			
液相色谱条件	时间 (min)		泵 B (%)		时间 (min)		泵 B (%)	
	0.4		5		0.4		10	
	1.8		95		1.8		95	
	2.2		95		2.2		95	
	2.21		5		2.21		10	
	2.5		终止		2.5		终止	
检测	化合物	m/z	去簇电压 (v)	碰撞能量 (v)	化合物	m/z	去簇电压 (v)	碰撞能量 (v)
	甲苯磺丁脲（Tolbutamide）	271.0-172.0	50	30	DXD	494.2-375.1	100	45
	A1.9	451.1-407.2	50	25				

获得结果如下表 35 所示：

表 35

时间（天）	释放比例(%)	
	A1.9	DXD
0	0.14	0.348
0.17	0.10	1.786

1	0.11	2.765
2	0.16	3.603
3	0.14	3.763
7	0.19	4.116
10	0.24	5.126
14	0.35	5.786
17	0.40	6.446
21	0.46	7.494
28	0.82	12.659

B7H3-ADC-07（DAR8）在人血浆中稳定性好，孵育 28 天后，释放生物活性分子（A1.9）占总生物活性分子含量的 2%以下。而 B7H3-C1-ADC-21(DAR4)在人血浆中相中释放 Dxd 明显更多。

实施例 6.10 抗体药物偶联物在 HT 29 移植瘤中的中肿瘤组织分布的测试实验

6.10.1 实验内容

步骤一.细胞处理

人结肠癌 HT29 细胞购自 ATCC。HT29 细胞用 15 cm^2 培养皿贴壁培养，培养条件为 1640 培养基中加 10 %胎牛血清，于 37 ℃、含 5 % CO2 空气的培养箱中培养。当细胞呈指数生长期时，胰酶消化、收集细胞，计数，接种。

步骤二. 肿瘤细胞移植

BALB/c Nude 小鼠实验室环境适应 2-5 天，于右肋部皮下接种 HT29 细胞，接种细胞量为 5×10^6/只，接种体积为 0.2 ml（含 50 % Matrigel），待肿瘤生长至 200-300 mm3 左右时，进行实验。

步骤三. 给药及采样

每组的动物数及详细的给药途径、剂量和方案见下表。

表 36

组别	动物数	给药组	剂量 (mg/kg)	给药体积（μL/g）	给药方式	给药周期	采集样本	采样时间点
1	3	生理盐水	/	10	i.v.	单次	肿瘤与血浆	给药后 72 h
2	3	B7H3-ADC-07(DAR8)	10	10	i.v.	单次	肿瘤与血浆	给药后 24 h
3	3	B7H3-ADC-07(DAR8)	10	10	i.v.	单次	肿瘤与血浆	给药后 72 h

步骤四. 肿瘤组织匀浆

取肿瘤组织块于冰上剪碎，称重转移至研磨管中，按 1:5（w/v）加入生理盐水研磨，制备组织匀浆液：2~8 ℃，1800 ×g，离心 10 min，制备组织匀浆上清液，于-15~-25 ℃条件下保存备用。使用前取出于 15~25 ℃放置，平衡至室温后使用。

步骤五. 生物样品分析

A1.9 的分析方法参照实施例 6.9。

B7H3-ADC-07(DAR8)的分析方法

（1）包被：将抗毒素抗体用包被液（0.05M CBS）稀释至 1 μg/mL，以 100 μL/孔加入酶标板，覆膜，2~8 ℃ 静置过夜（大于 12 h）。

（2）洗板：弃去孔内溶液，用 0.05% PBST 洗涤 3 次，300 μL/孔，拍干。

（3）封闭：加入封闭液（2%BSA-1×PBST），300 μL/孔，覆膜，37 °C 孵育 2 h±20 min。

（4）洗板：弃去孔内溶液，用 0.05% PBST 洗涤 3 次，300 μL/孔，拍干。

（5）加样：向酶标板中加入基质溶液、标准曲线样本、质控样本及待测样本，100 μL/孔，覆膜，37°C 孵育 2 h±5 min。每个样品均做两个重复。

（6）洗板：弃去孔内溶液，用 0.05%PBST 洗涤 3 次，300 μL/孔，拍干。

（7）加二抗：将 Goat Anti-Human IgG Fc-HRP 用稀释液（2%BSA-1×PBST）稀释 40000 倍(16 ng/ml)，100 μL/孔，覆膜，37 °C 孵育 1 h±5 min。

（8）洗板：弃去孔内溶液，用 0.05%PBST 洗涤 3 次，300 μL/孔，拍干。

（9）显色：加入 TMB 底物显色液，100 μL/孔，覆膜，15~25 °C 避光显色 2~15 min。

（10）终止：加入终止液（0.5 M H2SO4），100 μL/孔，终止反应。

（11）检测：用酶标仪于检测波长 450 nm（参比波长 620 nm）处读取各孔 OD 值。

实验结果

A1.9 的分布结果如图 17 所示，A1.9 分布于肿瘤相对于血浆具有高达 18 倍的分配比差异，肿瘤组织中 A1.9 占绝大多数。

ADC 的分配结果如图 18 所示，在肿瘤/血清中，ADC 分子具有明显的分配比差异，并具有时间依赖性，证明本公开 ADC 分子或者含有本公开 linker 的 ADC 更倾向于分布在肿瘤组织中。从而导致整个 ADC 分子在相对酸性肿瘤环境中的暴露量，因而具有更好的肿瘤组织靶向性，增加了生物活性分子在瘤内和血液浓度比，降低了 ADC 分子的机理相关的毒性（或者又叫“on-target 安全性“），不同 ADC 之间 on-target 相对安全性的计算公式为：

（第一种 ADC 肿瘤细胞体外 EC50 抑制浓度/第一种 ADC 相同肿瘤细胞模型体内给药剂量）/（第二种 ADC 肿瘤细胞体外 EC50 抑制浓度/在和第一种 ADC 体内效果接近情况下第二种 ADC 相同肿瘤细胞模型体内给药剂量）

具体的，结合上述实施例中的数据，图 10 中 B7H3-ADC-07 3mg/kg 组和 B7H3-ADC-21 10mg/kg 组的效果接近，B7H3-ADC-07 相对于 B7H3-ADC-21 在 HT29 的相对 on-target 安全性为：

(10433 ng/mL /150KDa/3mg/kg)/(7442 ng/mL /150 KDa /10mg/kg)= 4.66

因此 B7H3-ADC-07 相对于 B7H3-ADC-21 在 HT29 的具有 4.66 倍的相对 on-target 安全性。换句话说，由于本公开 ADC 有更好的肿瘤组织靶向性，到达相同体内抑制肿瘤效果的给药剂量更低（例如实施例 6.7.2 B7H3-ADC-08 3 mg/kg 组和 B7H3-ADC-07 3 mg/kg 组均与 B7H3-ADC-21 10 mg/kg 的 TGI 接近）。

实施例 6.11 抗体药物偶联物在肿瘤组织匀浆液、肌肉组织匀浆液中的稳定性测试

研究目的:

本实验研究的目的是模拟 B7H3-ADC-07(DAR8)在肿瘤组织/肿瘤微环境裂解，对 B7H3-ADC-07 在 22RV1 Balb/c nu 裸鼠肿瘤组织匀浆液、Balb/c 小鼠肌肉组织匀浆液、匀浆液基质生理盐水中的稳定性进行体外考察，在 B7H3-ADC-07(DAR8)的孵育体系中测定 A1.9。将肿瘤组织

匀浆液结果与血浆稳定性结果进行对比，评估肿瘤组织/肿瘤微环境中毒素分子的释放效率。

组别:

表 37

	受试物	孵育浓度	体系	检测物	检测时间点
1	B7H3-ADC-07(DAR8)	100 μg/mL	22RV1 Balb/c nu 裸鼠肿瘤组织匀浆液	A1.9	0 h、4 h、24 h、48h
2	B7H3-ADC-07(DAR8)	100 μg/mL	Balb/c 小鼠肌肉组织匀浆液	A1.9	
3	B7H3-ADC-07(DAR8)	100 μg/mL	匀浆液基质（生理盐水）	A1.9	

实验步骤:

1、配制生理盐水（0.85%）

0.85 克氯化钠加上蒸馏水 100 毫升，即 85mg 氯化钠加入 10ml 水

2、配制 B7H3-ADC-07

取 100μL 的 B7H3-ADC-07(DAR8)原液 4 倍稀释，得到浓度 5 mg/ml 的工作液，即 5 μg/μl。

3、组织匀浆液稀释

①原始匀浆为 1:4，以生理盐水 1:2 稀释备用（200μL 匀浆+400μL 生理盐水）。

②再 1:9 稀释后测蛋白浓度，肌肉匀浆为 0.8mg/ml，肿瘤匀浆为 1.2mg/ml，这一步仅为检测用，不用于后续实验。

③调整肿瘤匀浆的蛋白浓度至与肌肉匀浆相同：将①所得的肿瘤匀浆继续 2:1 稀释（600μL 匀浆+300 μL 生理盐水），则最终孵育体系中匀浆液的蛋白浓度都为 8mg/ml 左右，肌肉稀释了 15 倍，肿瘤稀释了 22.5 倍。

4、孵育体系 200μL，

表 38

	受试物	孵育浓度	体系	计算
1	B7H3-ADC-07(DAR8) 5 μg/μl	100 μg/mL	B7H3-ADC-07(DAR8)工作液 4 μL 加入 196 μL 匀浆液或生理盐水	5 μg/μl×4 μL÷0.2ml

5、37℃孵育，到点取 30μL 加入 300μL 沉淀剂，0 h、4 h、24 h、48h。

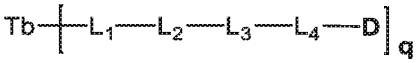
结果与讨论：

结果如图 19A 和图 19B 所示。从毒素分子 A1.9 释放来看，B7H3-ADC-07(DAR8)在肿瘤组织匀浆液中可以释放大量的 A1.9，而在正常组织匀浆液中 A1.9 无明显释放。提示 B7H3-ADC-07(DAR8)的毒素 linker 具有肿瘤组织特异性释放毒素分子的特点。

从而本公开 ADC 有更宽的治疗指数和治疗效果。尽管本公开的具体实施方式已经得到详细的描述，但本领域技术人员将理解：根据已经公布的所有教导，可以对细节进行各种修改和变动，并且这些改变均在本公开的保护范围之内。本公开的保护范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

权利要求

1. 式 XV 所示的配体药物偶联物，



式 XV

或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，

其中：

Tb 为和靶点结合的配体或靶向部分；

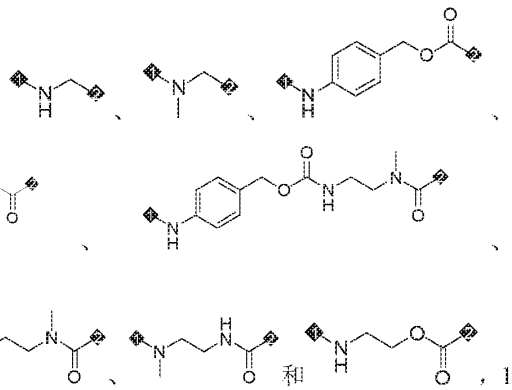
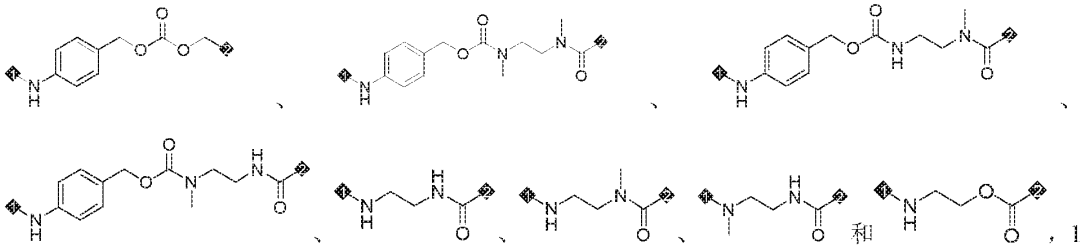
q 为药物配体偶联比；

D 为生物活性分子片段；

L_1 为延伸单元；

L_2 不存在或为连接单元；

L_3 选自氨基酸残基或由 2-10 个氨基酸残基组成的短肽；

L_4 不存在或存在，L_4 存在时，L_4 选自  、  、和 ，1 位与 L_3 相连，2 位与 D 相连。

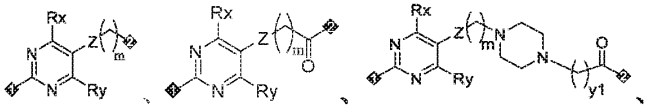
2. 如权利要求 1 所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其特征在于，其满足如下条件中的一个或多个：

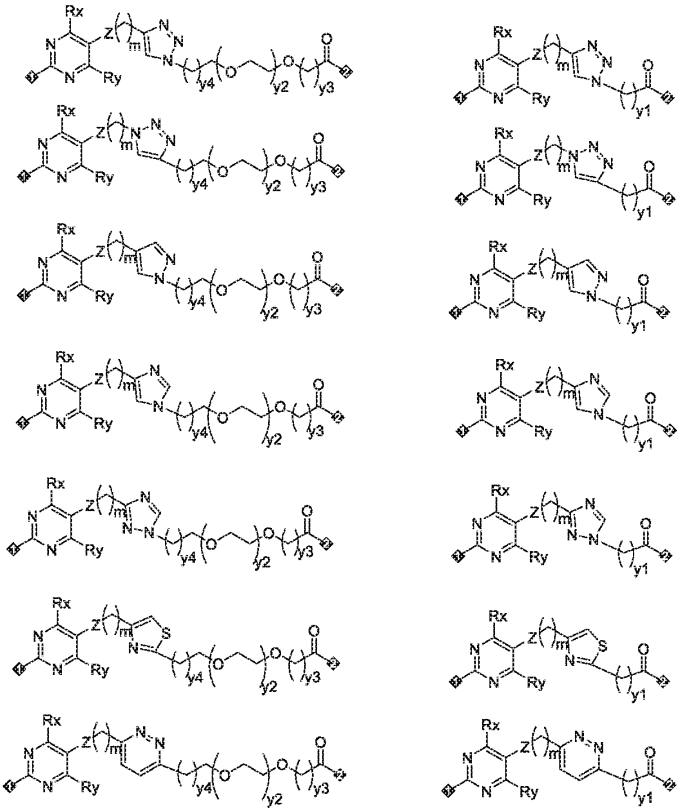
（1）Tb 为抗体或其抗原结合片段；

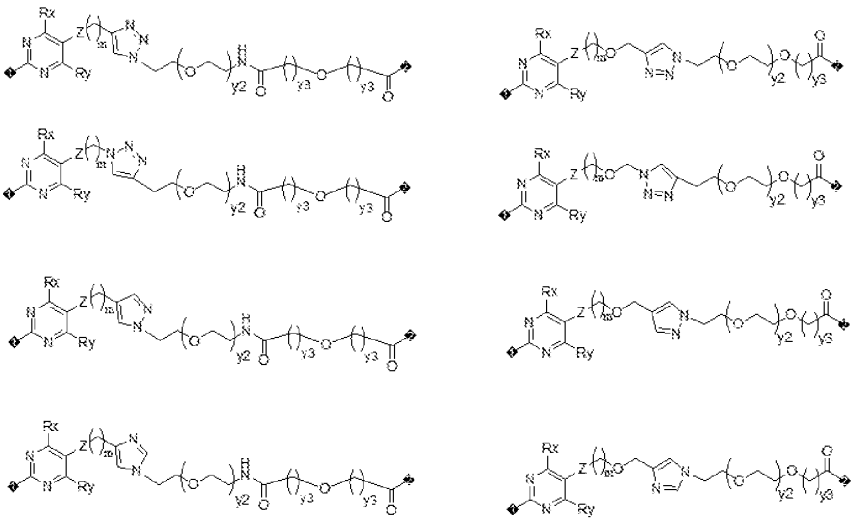
（2）q 选自 0.1-16.0 之间的任意数值；

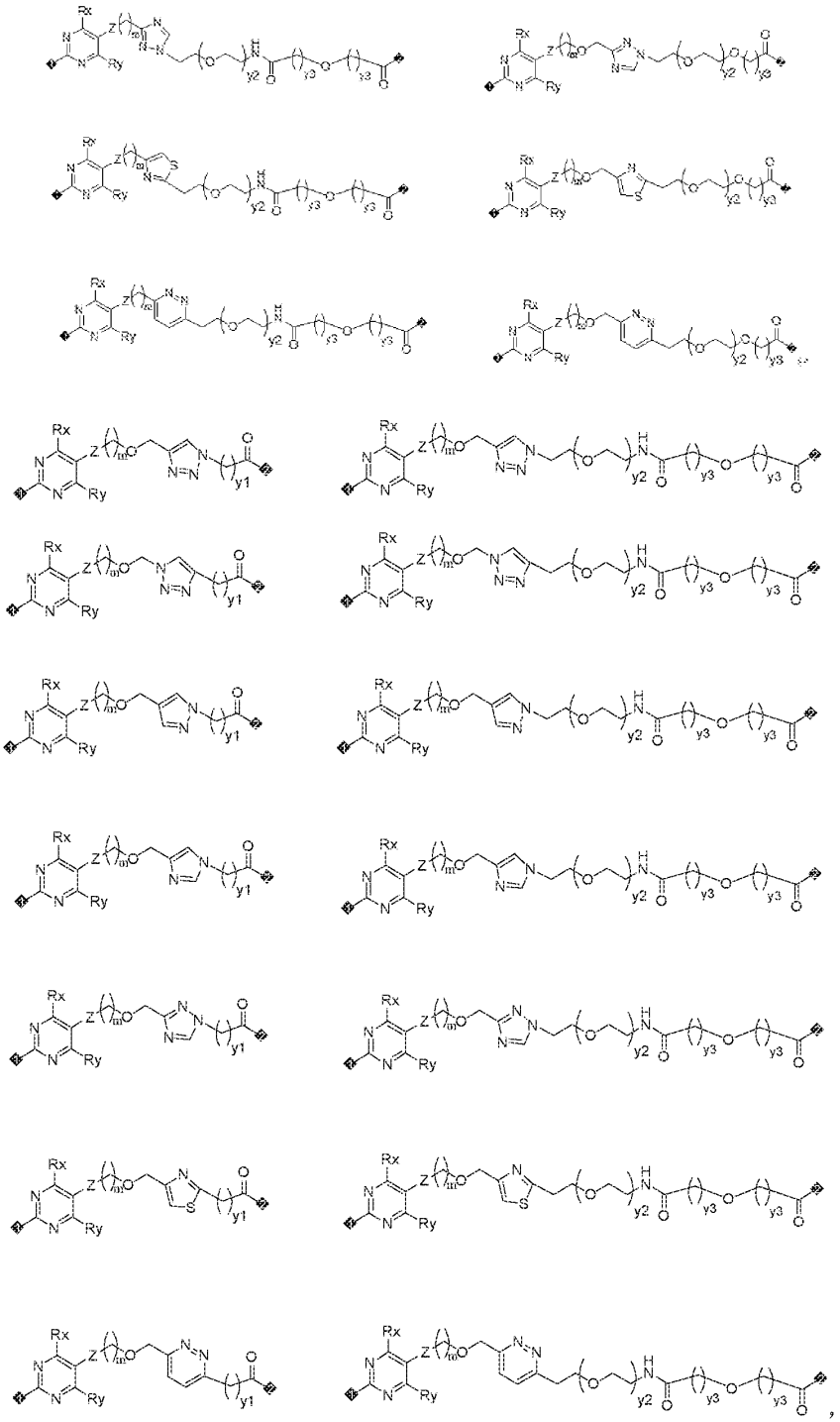
（3）D 为具有抗肿瘤生物活性分子片段；

（4）L_1 选自：









各 Z 独立地选自直接键、碳碳三键、碳碳双键、C6-10 芳基、5-10 元杂芳基、酰胺基、磺酰胺基、亚胺基和 CF_2；

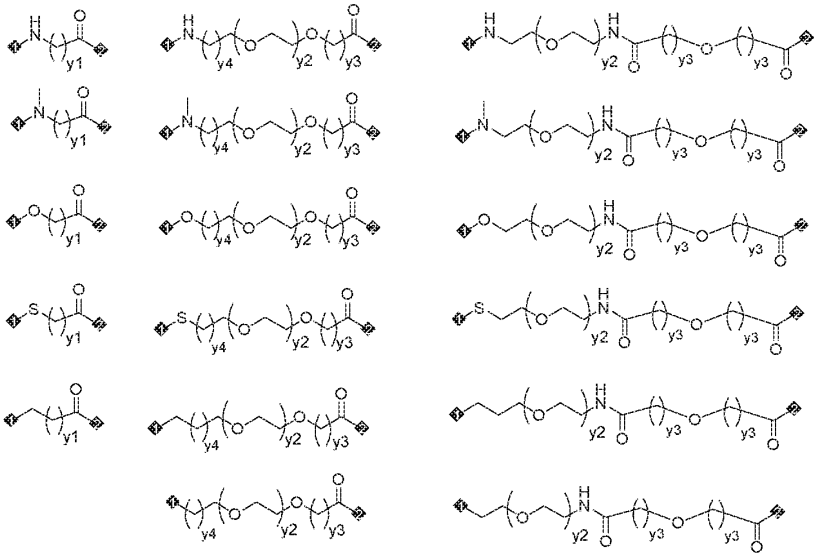
Rx 和 Ry 各自独立地选自 H 和 C1-4 烷基；

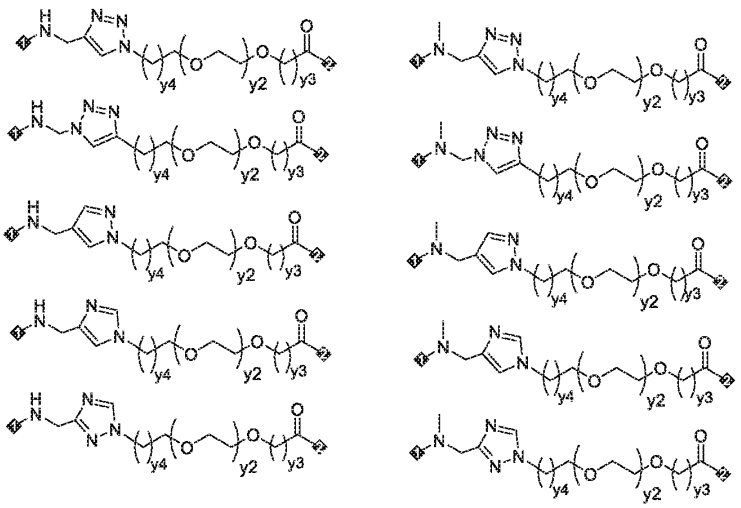
各 m 独立地选自 0、1、2、3、4、5 和 6；

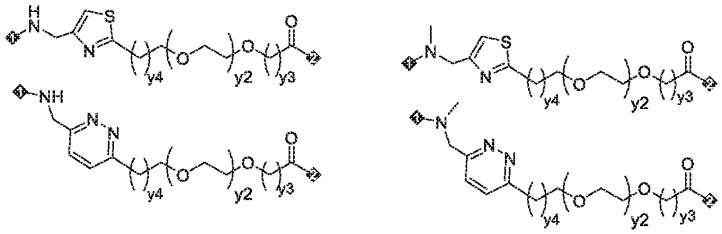
y1、y2、y3 和 y4 各自独立地选自 0-20 之间的任意整数；

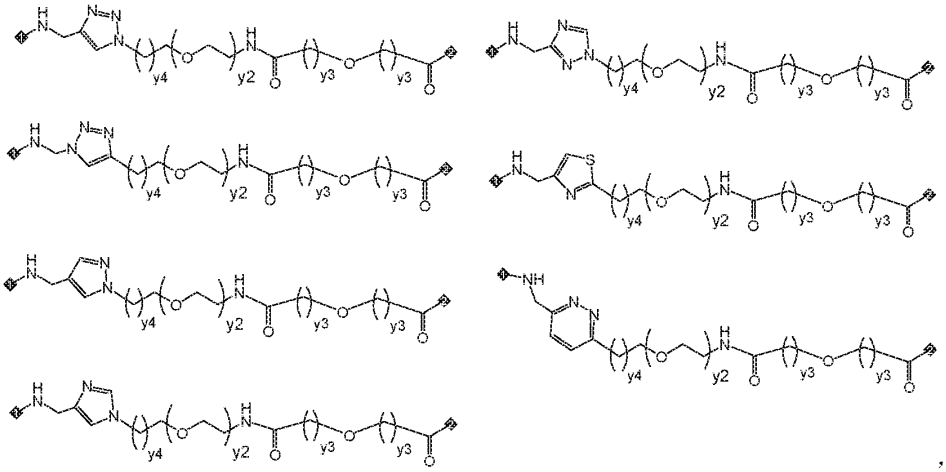
1 位通过 S 原子与 Tb 相连，2 位与 L_2 或 L_3 相连；

（5）L_2 不存在或存在，L_2 存在时，L_2 选自：





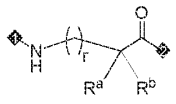




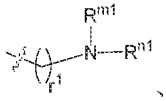
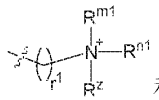
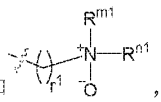
y1、y2、y3 和 y4 各自独立地选自 0-20 之间的任意整数，1 位与 L_1 相连，2 位与 L_3 相连；

（6）L_3 选自氨基酸残基或由 2-10 个氨基酸残基组成的短肽；所述的氨基酸残基选自天然氨基酸残基、非天然氨基酸残基、或选自 AA^1 所示氨基酸残基或其立体异构体；

AA^1 所示氨基酸残基的结构如下所示，



AA^1

其中：R^a、R^b 各自独立地选自 H、  、  和  ，且 R^a、R^b 不同时为 H；

或者，R^a 与 R^b 和与它们共同相连的碳原子一起，形成 4-10 元杂环，所述 4-10 元杂环任选地被一个或多个 R^0 所取代；

r、r^1 各自独立地选自 0 到 20 的任意整数；

R^{m1}、R^{n1} 各自独立地选自 H、C1-6 烷基、C3-6 环烷基和-$COOR^{x1}$；

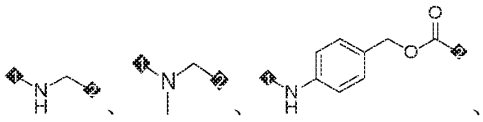
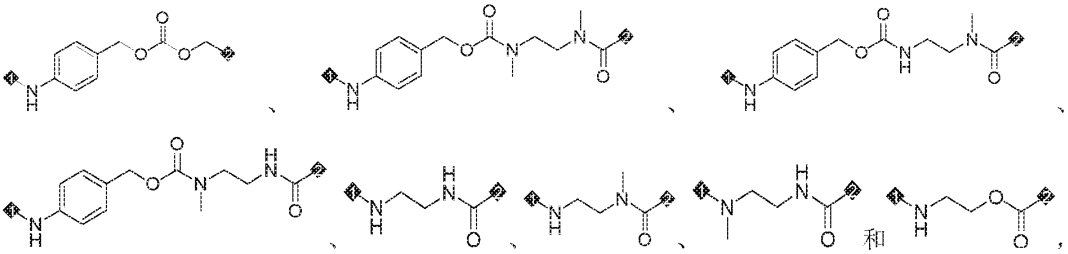
R^{x1} 选自 C1-6 烷基；

或者，R^{m1} 与 R^{n1} 和与它们共同相连的氮原子一起，形成 4-10 元杂环，所述 4-10 元杂环任选地被一个或多个 $R^{0'}$ 所取代；

R^z 选自 C1-6 烷基；

R^0、$R^{0'}$ 各自独立地选自 C1-6 烷基、C3-6 环烷基、-$NR^{m2}R^{n2}$ 和任选被 C1-6 烷基取代的 4-10 元杂环基；

R^{m2}、R^{n2}各自独立地选自H和C1-6烷基；

（7）L_4不存在或存在，L_4存在时，L_4选自  、  和，

1位与L_3相连，2位与D相连。

3.如权利要求2所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其特征在于，其满足如下条件中的一个或多个：

（1）Tb为抗体或其抗原结合片段，其满足如下条件中的一个或多个：

（i）所述抗体或其抗原结合片段包括Fab、Fab'、F(ab')2、Fd、Fv、dAb、互补决定区片段、非人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、全人抗体、前抗、单克隆抗体、双特异性抗体或多特异性抗体；

（ii）Tb为单克隆抗体或其抗原结合片段；

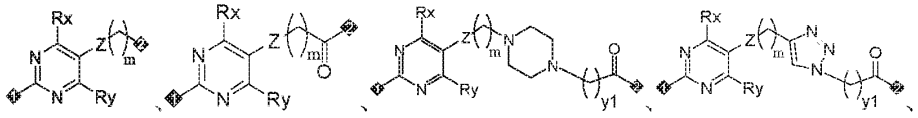
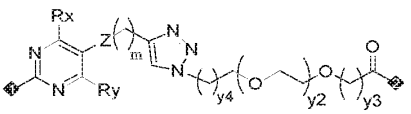
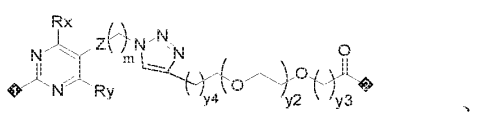
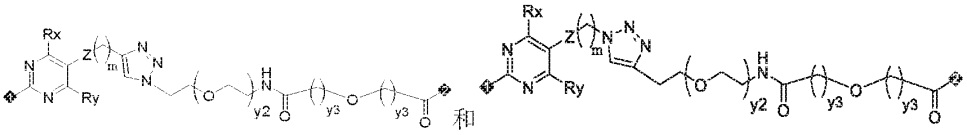
（iii）Tb为具有内吞、不内吞或内吞较弱的抗体或其抗原结合片段；

（iv）Tb为具有结合肿瘤组织中游离抗原和/或肿瘤细胞表面抗原活性的抗体或其抗原结合片段；

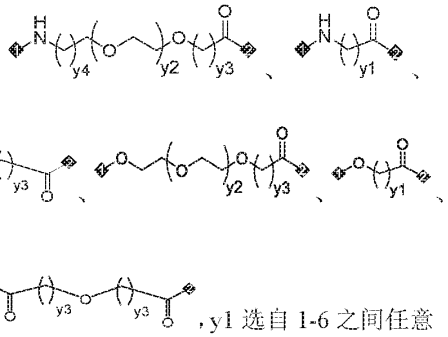
（v）Tb 为不具有结合肿瘤组织中游离抗原和/或肿瘤细胞表面抗原活性的抗体或其抗原结合片段；

（2）q选自0.1、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12和之间的任意数值；

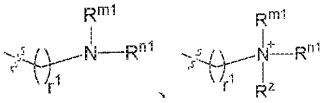
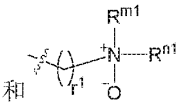
（3）所述的生物活性分子片段中，所述的生物活性分子为DNA拓扑异构酶抑制剂或微管蛋白抑制剂；

（4）L_1选自  、  、  和  ，各Z独立

地选自直接键、碳碳三键、碳碳双键、C6-10 芳基、5-10 元杂芳基和酰胺基；Rx、Ry 各自独立地选自 H 和 C1-4 烷基；各 m 独立地选自 0、1、2、3、4、5 和 6；y1 选自 1-6 之间任意整数；各 y2 独立地选自 0-15 之间任意整数；各 y3 独立地选自 1、2 和 3；各 y4 独立地选自 0 和 1；1 位通过 S 原子与 Tb 相连，2 位与 L_2 或 L_3 相连；

（5）L_2 不存在或存在，L_2 存在时，L_2 选自  ，y1 选自 1-6 之间任意整数，各 y2 独立地选自 0-10 之间任意整数，各 y3 独立地选自 1 和 2，各 y4 独立地选自 0 和 1，1 位与 L_1 相连，2 位与 L_3 相连；

（6）L_3 选自氨基酸残基 Val、D-Val、Cit、Phe、Lys、Lys(Ac)、Leu、Gly、Ala、Asn、Asp、Arg 和 AA^1 或由 2-10 个选自 Val、Cit、Phe、Lys、D-Val、Leu、Gly、Ala、Asn、Asp 和 AA^1 的氨基酸残基组成的短肽；

（7）AA^1 的氨基酸残基中，R^a、R^b 中，任一个为 H，另一个选自  、  和 ；

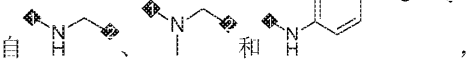
或者，AA^1 的氨基酸残基中，R^a 与 R^b 和与它们共同相连的碳原子一起，形成被 R^0 取代的 5-6 元杂环；

（8）AA^1 的氨基酸残基中，r、r^1 各自独立地选自 0、1、2、3、4 和 5；

（9）AA^1 的氨基酸残基中，R^{m1}、R^{n1} 各自独立地选自 H、甲基、乙基、正丙基、正丁基、-COOCH3、-COOCH2CH3、-COOCH2CH2CH3、-COOCH(CH3)2、-COOC(CH3)3 和-COOCH2CH2CH2CH3；或者，R^{m1} 与 R^{n1} 和与它们共同相连的氮原子一起，形成被 $R^{0'}$ 取代的 5-6 元杂环；

（10）AA^1 的氨基酸残基中，R^z 为甲基；

（11）AA^1 的氨基酸残基中，R^0、$R^{0'}$ 各自独立地选自 C1-6 烷基、$-NR^{m2}R^{n2}$ 和任选被 C1-6 烷基取代的 5-6 元杂环基；

（12）L_4不存在或存在，L_4存在时，L_4选自  ，1位与L_3相连，2位与D相连。

4.如权利要求3所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其特征在于，其满足如下条件中的一个或多个：

（1）Tb为抗B7H3抗体或其抗原结合片段、抗Trop-2抗体或其抗原结合片段、抗Her 2抗体或其抗原结合片段、抗Her3抗体或其抗原结合片段、抗EGFR抗体或其抗原结合片段、或IgG1同型抗体抗鸡融菌酶抗体；

（2）q选自0.1、1、2、3、4、5、6、7、8和之间的任意数值；

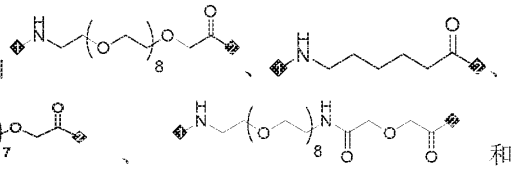
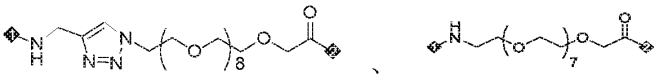
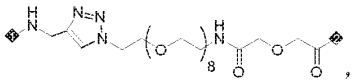
（3）当所述的生物活性分子片段中的生物活性分子为DNA拓扑异构酶抑制剂时，所述的DNA拓扑异构酶抑制剂为喜树碱类生物活性分子；

（4）当所述的生物活性分子片段中的生物活性分子为微管蛋白抑制剂时，所述的微管蛋白抑制剂为MMAF类微管蛋白抑制剂，MMAE类微管蛋白抑制剂；

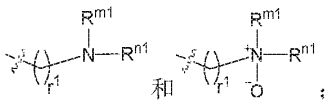
（5）L_1中，各Z独立地选自直接键、碳碳三键和碳碳双键；

（6）L_1中，y1为4、5或6；

（7）L_1中，各y2独立地选自6-10之间任意整数；

（8）L_2不存在或存在，L_2存在时，L_2选自  、  和  ，1位与L_1相连，2位与L_3相连；

（9）L_3选自Val、Cit、Phe、Lys、D-Val、Leu、Gly、Ala、Asn、AA^1、Val-Cit、Cit-Val、Cit-Ala、Val-Ala、Lys-Val、Val-Lys(Ac)、Phe-Lys、Phe-Lys(Ac)、Ala-Ala、Val-AA^1、Ala-AA^1、Gly-AA^1、AA^1-Gly、Ala-Ala-Ala、Ala-Ala-Asn、Ala-Ala-Asp、Val-AA^1-Gly、Ala-AA^1-Gly、Gly-AA^1-Gly、Lys-Ala-Ala-Asn、Lys-Ala-Ala-Asp、Gly-Phe-Gly、Gly-Gly-Phe-Gly、D-Val-Leu-Lys、Gly-Gly-Arg、Ala-Ala-Asn、Gly-Gly-Phe、Val-Lys-Gly、Val-Lys-Gly-Gly、Val-Lys和Lys-Ala-Asn；

（10）AA^1所示氨基酸残基中，R^a、R^b中，任一个为H，另一个选自  ；

或，R^a与R^b和与它们共同相连的碳原子一起，形成被R^0取代的5-6元杂环为被R^0取代的哌啶环或哌嗪环；

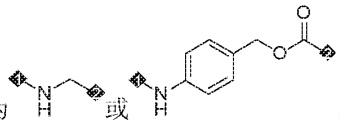
（11）AA^1的氨基酸残基中，r、r^1各自独立地选自 0 和 4；

（12）AA^1的氨基酸残基中，R^{m1}、R^{n1}各自独立地选自 H、C1-6 烷基、C3-6 环烷基和叔丁氧羰基；或者，R^{m1}与R^{n1}和与它们共同相连的氮原子一起，形成被$R^{0'}$取代的哌啶环或哌嗪环；

（13）AA^1的氨基酸残基中，R^0选自 C1-6 烷基和被 C1-6 烷基取代的 5-6 元杂环基，所述 5-6 元杂环基选自哌啶基和哌嗪基；

（14）AA^1的氨基酸残基中，$R^{0'}$选自 C1-6 烷基和-$NR^{m2}R^{n2}$；

（15）AA^1的氨基酸残基中，R^{m2}、R^{n2}为甲基；

（16）L_4不存在或存在，L_4存在时，L_4为  ，1 位与L_3相连，2 位与 D 相连。

5.如权利要求 1-4 中任一项所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其特征在于，其满足如下条件中的一个或多个：

（1）q 选自 2、3、4、5、6、7、8 和之间的任意数值；

（2）Tb 为如下任一方案：

(i)Tb 为抗 Her 2 的抗体或其抗原结合片段，所述的抗 Her 2 的抗体为 anbenitamab，coprelotamab，disitamab，gancotamab，margetuximab，pertuzumab，timigutuzumab，zanidatamab，Trastuzumab，Pertuzumab 或其抗原结合片段；

(ii)Tb 为抗 Trop-2 的抗体或其抗原结合片段，所述的抗 Trop-2 的抗体为 datopotamab，Sacituzumab 或其抗原结合片段；或

（iii）Tb 为抗 EGFR 的抗体或其抗原结合片段，所述的抗 EGFR 的抗体为 demupitamab，depatuxizumab，futuximab，imgatuzumab，laprituximab，losatuxizumab，matuzumab，modotuximab，necitumumab，nimotuzumab，panitumumab，pimurutamab，serclutamab，tomuzotuximab，zalutumumab，Cetuximab 或其抗原结合片段；或

（iv)Tb 为抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段，其中所述抗 B7H3 抗体为 enoblituzumab，mirzotamab，omburtamab，1D1-01，2E3-02 抗体或其抗原结合片段；或

（v）Tb 为抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段，其中所述抗 B7H3 抗体其抗原结合片段包含如下的互补决定区（CDR），其中 CDR 按 kabat 编号系统定义：

(a)序列为 SEQ ID NO:7 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:8 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:9 的 HCDR3；和/或，

序列为 SEQ ID NO:17 的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO:18 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:19 的

LCDR3；

(b)序列为 SEQ ID NO:27 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:28 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:29 的 HCDR3；和/或，

序列为 SEQ ID NO:37 的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO:38 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:39 的 LCDR3；

(c)序列为 SEQ ID NO:7 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:8 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:9 的 HCDR3；和/或，

序列为 SEQ ID NO:37 的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO:38 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:39 的 LCDR3；

或 (d)序列为 SEQ ID NO:27 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:28 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:29 的 HCDR3；和/或，

序列为 SEQ ID NO:17 的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO:18 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:19 的 LCDR3；或

（vi）Tb 为抗 Her3 抗体或其抗原结合片段，其中所述抗 Her3 抗体为 barecetamab，duligotuzumab，elgemtumab，lumretuzumab，patritumab，seribantumab，202-2-1 或其抗原结合片段;或

（vii）Tb 为抗 Her3 抗体或其抗原结合片段，其中所述抗 Her3 抗体或其抗原结合片段包含如下的互补决定区（CDR），其中 CDR 按 kabat 编号系统定义：

序列为 SEQ ID NO:53 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:54 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:55 的 HCDR3；和/或，

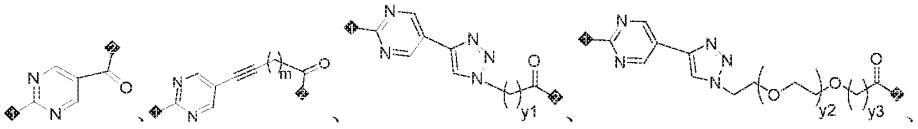
序列为 SEQ ID NO:59 的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO:60 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:21 的 LCDR3；

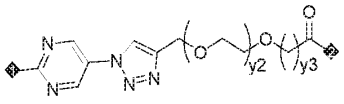
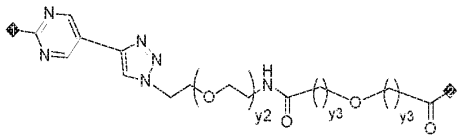
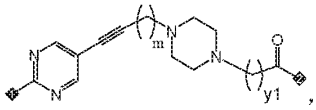
（viii）有肿瘤细胞内吞活性，且有肿瘤组织中游离抗原和/或肿瘤细胞表面抗原结合活性的抗体或其抗原结合片段；

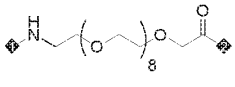
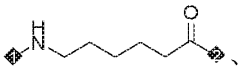
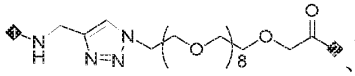
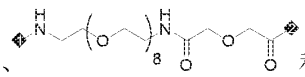
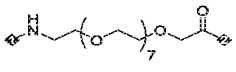
（ix）肿瘤细胞内吞活性较弱或无内吞活性，且有肿瘤组织中游离抗原和/或肿瘤细胞表面抗原结合活性的抗体或其抗原结合片段；

（x）肿瘤细胞内吞活性较弱或无内吞活性，且无肿瘤组织中游离抗原或肿瘤细胞表面抗原结合活性的抗体或其抗原结合片段；例如，Tb 为抗鸡溶菌酶人 IgG1 同型抗体

（xi）结合非内吞抗原的抗体或其抗原结合片段；例如 ALCAM/CD166；

（3）L_1 选自  、、、、

 、  和  ，m 选自 2、3 和 4，y1 选自 1-6 之间任意整数，各 y2 独立地选自 0-10 之间任意整数，各 y3 独立地选自 1 或 2，1 位通过 S 原子与 Tb 相连，2 位与 L_2 或 L_3 相连；

（4）L_2 不存在或存在，L_2 存在时，L_2 选自  、  、  、  和  ，1 位与 L_1 相连，2 位与 L_3 相连；

（5）L_3 选自 AA^1、AA^1-Gly、Val-Cit、Val-AA^1-Gly、AA^1-Ala-Asn 和 Gly-Gly-Phe-Gly；

（6）AA^1 所示氨基酸残基中，R^a 与 R^b 和与它们共同相连的碳原子一起，形成被 R^0 取代的 5-6 元杂环为被 R^0 取代的哌啶环；

（7）AA^1 的氨基酸残基中，r、r^1 中，任一个为 0，另一个为 4；

（8）AA^1 的氨基酸残基中，R^{m1}、R^{n1} 各自独立地选自 H 和 C1-6 烷基；或，R^{m1} 与 R^{n1} 和与它们共同相连的氮原子一起，形成被 $R^{0'}$ 取代的哌啶环；

（10）AA^1 的氨基酸残基中，R^0 选自甲基、乙基和被甲基取代的 5-6 元杂环基，所述 5-6 元杂环基为哌啶基；

（11）AA^1 的氨基酸残基中，$R^{0'}$ 选自甲基和-$NR^{m2}R^{n2}$；

（12）当所述的生物活性分子片段中的生物活性分子为 DNA 拓扑异构酶抑制剂、所述的 DNA 拓扑异构酶抑制剂为喜树碱类生物活性分子时，所述的喜树碱类生物活性分子为喜树碱、DXD、取代基被修饰的喜树碱或取代基被修饰的 DXD。

6.如权利要求 1-4 中任一项所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其特征在于，其满足如下条件中的一个或多个：

（1）q 选自 3、4、5、6、7、8 和之间的任意数值；

（2）Tb 为如下任一方案：

（vi）Tb 为抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段，其中所述抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段包含如下的互补决定区（CDR），其中 CDR 按 kabat 编号系统定义：

(a)序列为 SEQ ID NO:7 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:8 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:9 的

HCDR3；和/或，

序列为 SEQ ID NO:17 的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO:18 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:19 的 LCDR3；

(b)序列为 SEQ ID NO:27 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:28 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:29 的 HCDR3；和/或，

序列为 SEQ ID NO:37 的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO:38 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:39 的 LCDR3；

(c)序列为 SEQ ID NO:7 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:8 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:9 的 HCDR3；和/或，

序列为 SEQ ID NO:37 的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO:38 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:39 的 LCDR3；

或 (d)序列为 SEQ ID NO:27 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:28 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:29 的 HCDR3；和/或，

序列为 SEQ ID NO:17 的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO:18 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:19 的 LCDR3；

且所述抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段包含含有以上含有（a）-(d)中一组重链 CDR 的 VH 和含有（a）-(d)中一组轻链 CDR 的 VL；

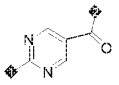
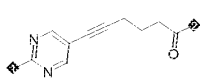
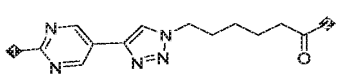
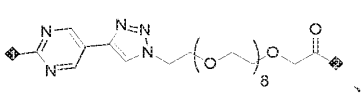
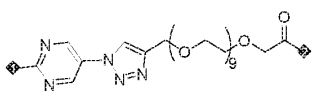
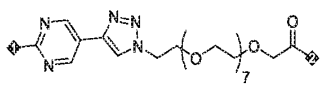
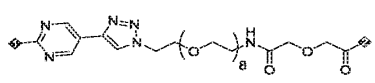
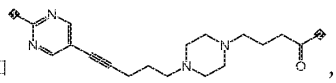
（ii）Tb 为抗 Her3 抗体或其抗原结合片段，

其中所述抗 Her3 抗体或其抗原结合片段包含如下的互补决定区（CDR），其中 CDR 按 kabat 编号系统定义：

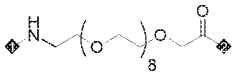
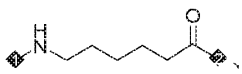
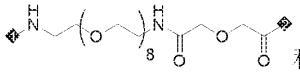
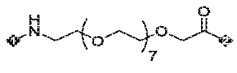
序列为 SEQ ID NO:53 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:54 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:55 的 HCDR3；和/或，

序列为 SEQ ID NO:59 的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO:60 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:21 的 LCDR3；

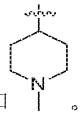
所述抗 Her3 抗体或其抗原结合片段包含以上组重链 CDR 的 VH 和含有以上组轻链 CDR 的 VL；

（3）L_1 选自  、  、  、  、  、  、  和  ，1 位通过 S 原子与 Tb 相连，2 位

与 L_2 或 L_3 相连；

（4）L_2 不存在或存在，L_2 存在时，L_2 选自  、  、  和  ，1 位与 L_1 相连，2 位与 L_3 相连；

（5）L_3 选自 AA^1、Val-AA^1-Gly；

（6）AA^1 的氨基酸残基中，R^6 选自甲基、乙基和  。

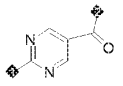
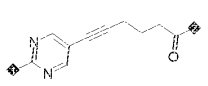
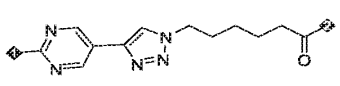
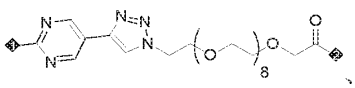
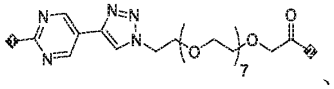
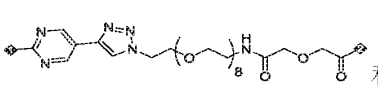
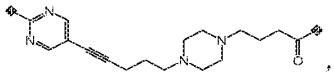
7.如权利要求 1-4 中任一项所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其特征在于，其满足如下条件中的一个或多个：

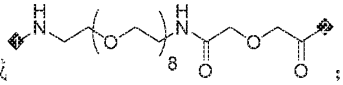
（1）q 选自 4、5、6、7、8 和之间的任意数值；

（2）Tb 为如下任一方案：

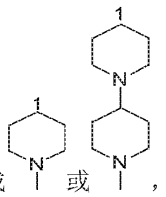
（i）Tb 为抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段包含：SEQ ID NO:3 或 23 所示的 VH，和/或，SEQ ID NO:13 或 33 所示的 VL；

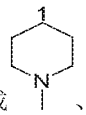
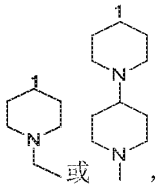
（ii）Tb 为抗 Her3 抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗 Her3 抗体或其抗原结合片段包含：SEQ ID NO:49 所示的 VH，和/或，SEQ ID NO:50 所示的 VL；

（3）L_1 选自  、  、  、  、  、  和  ，1 位通过 S 原子与 Tb 相连，2 位与 L_2 或 L_3 相连；

（4）L_2 不存在或  ；

（5）L_3 选自 Val-AA^1-Gly；

（6）AA^1 所示氨基酸残基中，R^a 与 R^b 和与它们共同相连的碳原子一起，形成  或，1 号碳原子为与 R^a 和 R^b 共同相连的碳原子；

（7）r、r^1 中，r 为 4，r^1 为 0 时，R^{m1}、R^{n1} 各自独立地选自 H 和 C1-6 烷基；r 为 0，r^1 为 4 时，R^{m1}、R^{n1} 各自独立地选自 C1-6 烷基，或，R^{m1} 与 R^{n1} 和与它们共同相连的氮原子一起，形成  、  或 ，1 号碳原子为与 R^a 和 R^b 共同相连的碳原子。

8. 如权利要求 7 所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其特征在于，

（1）q 选自 6、7、8 和之间的任意数值；

（2）Tb 为如下任一方案：

（i）Tb 为抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段包含：SEQ ID NO:3 或 23 所示的 VH，和/或，SEQ ID NO:13 或 33 所示的 VL；

进一步包含：

(a) 人免疫球蛋白的重链恒定区（CH）或其变体；和/或

(b) 人免疫球蛋白的轻链恒定区（CL）或其变体，

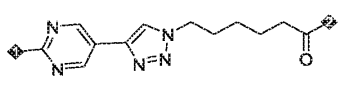
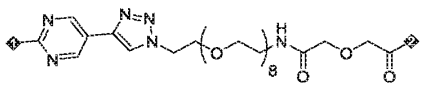
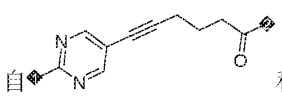
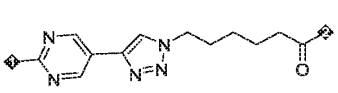
（ii）Tb 为抗 Her3 抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗 Her3 抗体或其抗原结合片段包含：SEQ ID NO:49 所示的 VH，和/或，SEQ ID NO:50 所示的 VL；

进一步包含：

(a) 人免疫球蛋白的重链恒定区（CH）或其变体；和/或

(b) 人免疫球蛋白的轻链恒定区（CL）或其变体；

（3）r、r^1 中，r 为 4，r^1 为 0 时，R^{m1}、R^{n1} 各自独立地选自 H 和 C1-6 烷基；r 为 0，r^1 为 4 时，R^{m1}、R^{n1} 各自独立地选自 C2-6 烷基；

（4）L_1 选自  、  和  ，1 位通过 S 原子与 Tb 相连，2 位与 L_2 或 L_3 相连；例如 L_1 选自  和  ，1 位通过 S 原子与 Tb 相连，2 位与 L_2 或

L_3 相连。

9. 如权利要求 8 所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其特征在于，

（1）Tb 为如下任一方案：

（i）Tb 为抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段包含：

SEQ ID NO:3 所示的 VH，SEQ ID NO:43 所示的 CH 或其变体,和/或，SEQ ID NO:13 所示的 VL，SEQ ID NO:44 所示的 CL 或其变体；

SEQ ID NO:23 所示的 VH，SEQ ID NO:43 所示的 CH 或其变体,和/或，SEQ ID NO:33 所示的 VL，SEQ ID NO:44 所示的 CL 或其变体；

优选地，所述 B7H3 抗体或其抗原结合片段包含：

SEQ ID NO:45 所示的重链，和/或，SEQ ID NO:46 所示的轻链；

SEQ ID NO:47 所示的重链，和/或，SEQ ID NO:48 所示的轻链；

（ii）Tb 为抗 Her3 抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗 Her3 抗体或其抗原结合片段包含：

SEQ ID NO:49 所示的 VH，SEQ ID NO:43 所示的 CH 或其变体,和/或，SEQ ID NO:50 所示的 VL，SEQ ID NO:44 所示的 CL 或其变体；

优选地，所述抗 Her3 抗体或其抗原结合片段包含：

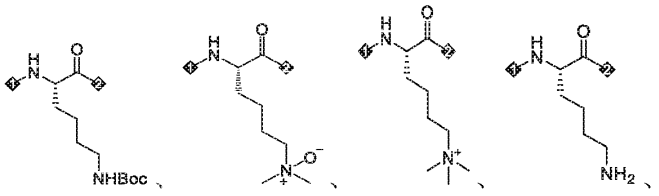
SEQ ID NO:51 所示的重链，和/或，SEQ ID NO:52 所示的轻链；

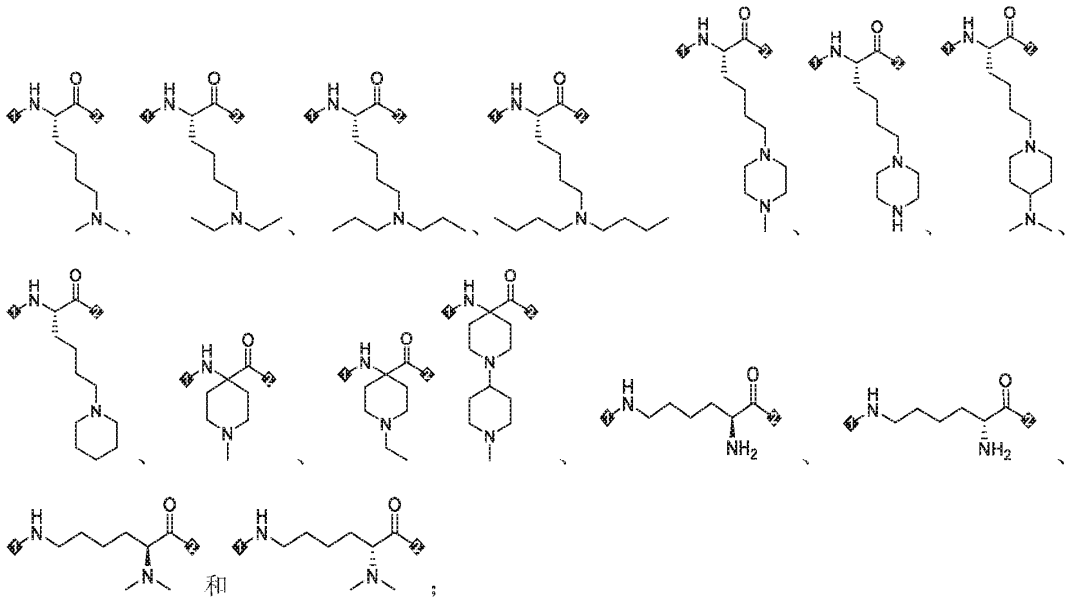
（2）R^{m1}、R^{n1} 各自独立地选自 C1-6 烷基中，所述的 C1-6 烷基选自甲基、乙基和正丙基；或 R^{m1}、R^{n1} 各自独立地选自 C2-6 烷基中，所述的 C2-6 烷基选自乙基和正丙基。

10.如权利要求 1-9 中任一项所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其特征在于，其满足如下条件中的一个或多个：

（1）Tb 为抗体或其抗原结合片段、所述抗体或其抗原结合片段包括单链抗体时，所述的单链抗体为 scFv；

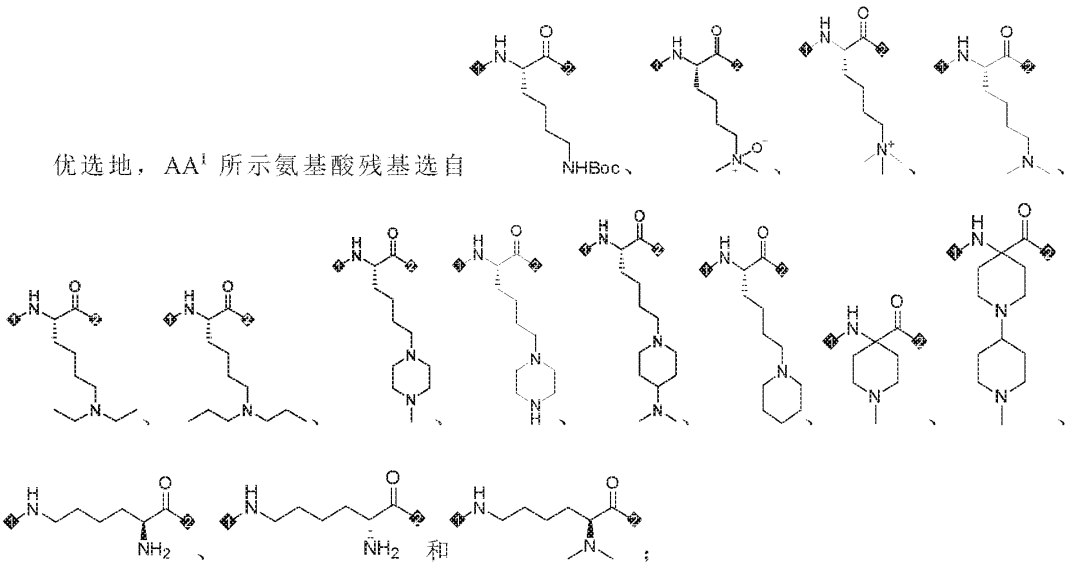
（2）Tb 为具有内吞活性的抗体或其抗原结合片段；

（3）AA^1 所示氨基酸残基选自 



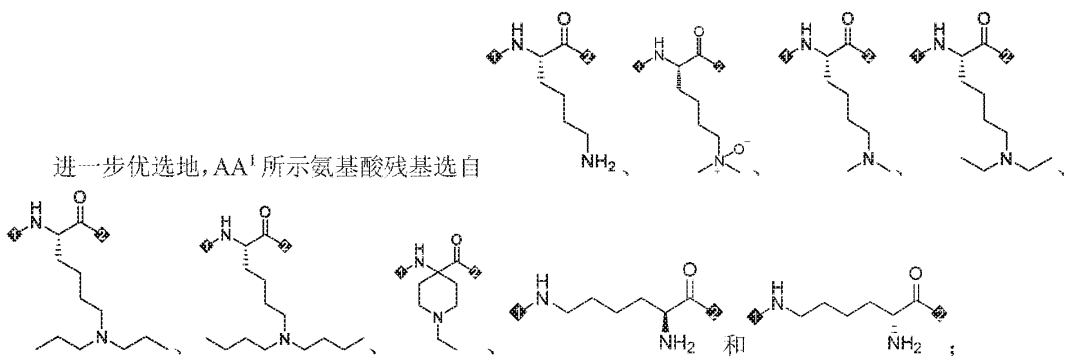
和 ；

优选地，AA^1 所示氨基酸残基选自

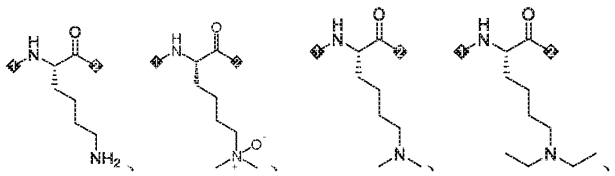
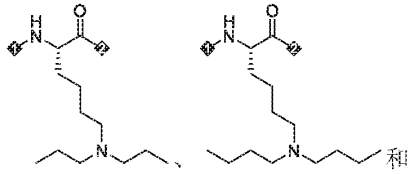
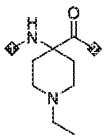


和 ；

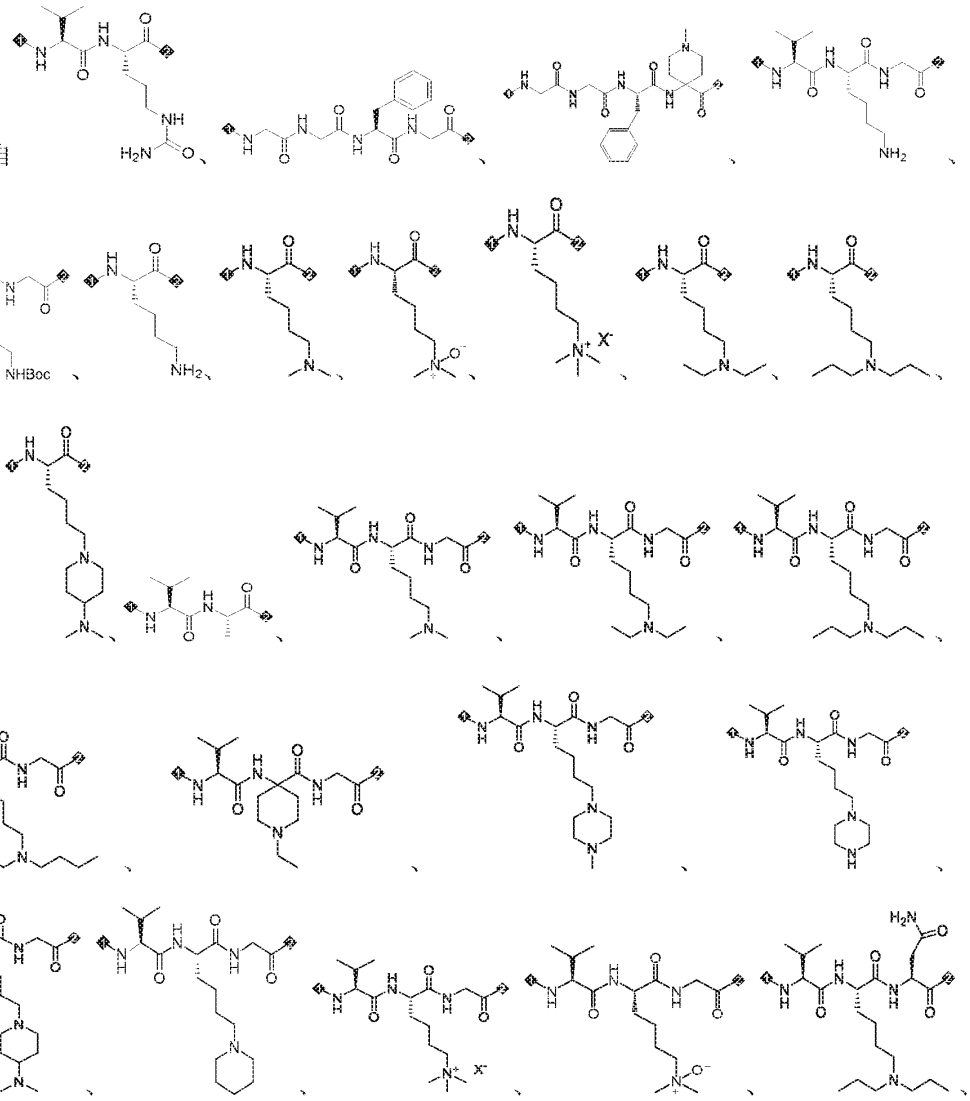
进一步优选地，AA^1 所示氨基酸残基选自

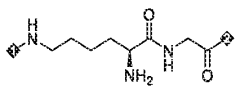
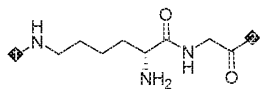
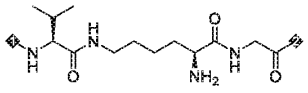
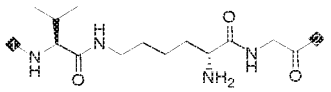
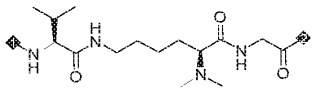
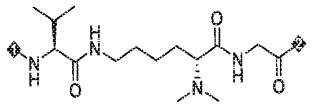
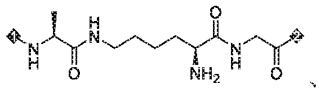
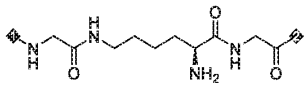
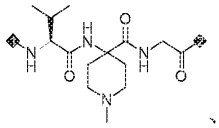
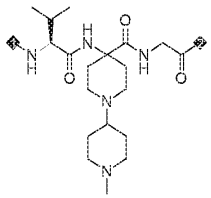
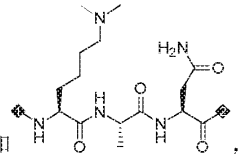
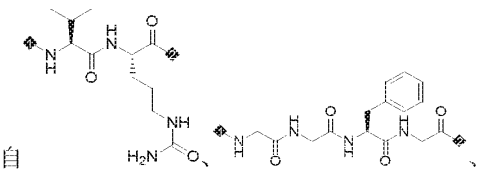


和 ；

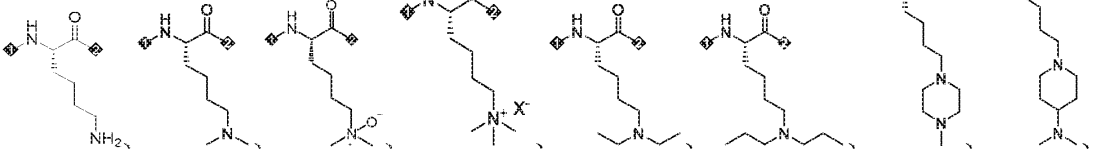
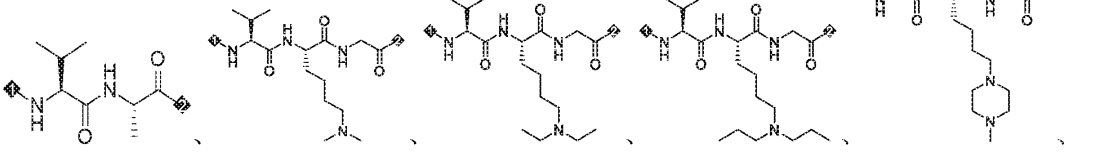
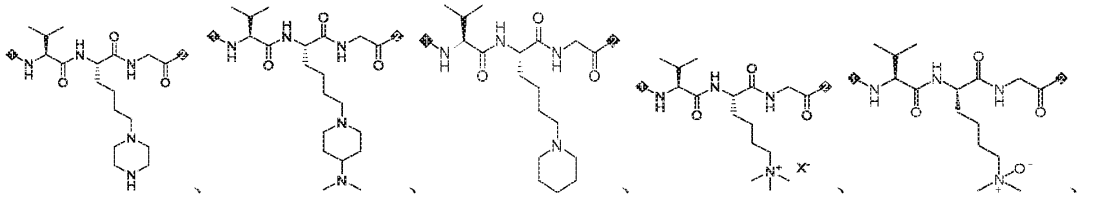
最优选地，AA^1 所示氨基酸残基选自  、  和  。

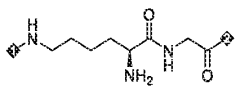
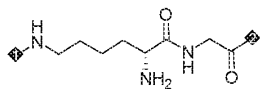
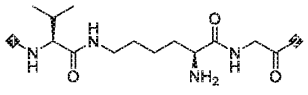
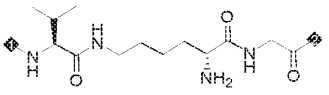
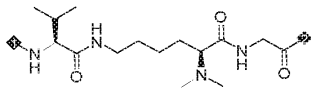
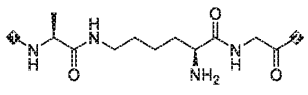
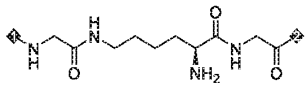
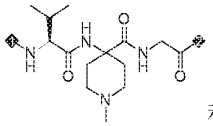
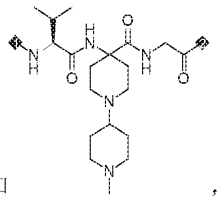
11.如权利要求 1-10 中任一项所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其特征在于，

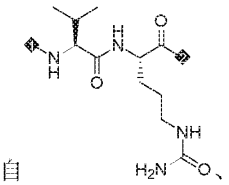
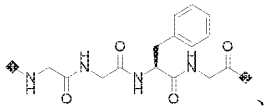
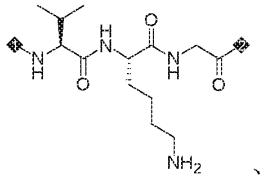
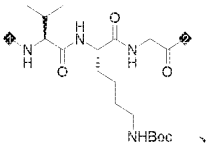
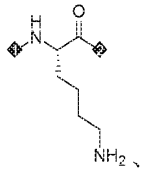
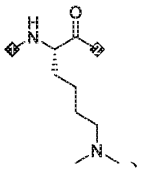
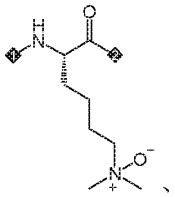
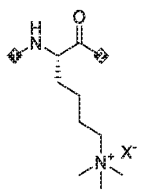
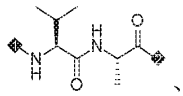
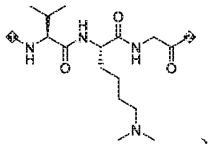
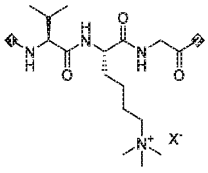
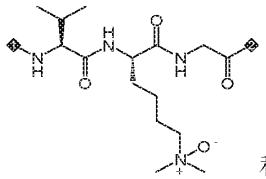
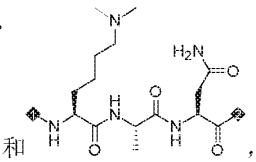
L_3 选自 

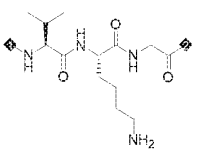
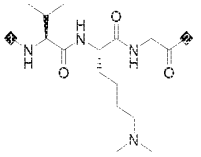
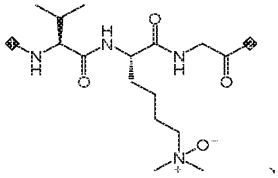
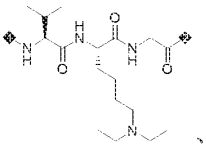
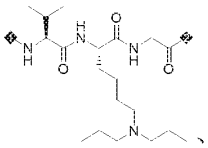
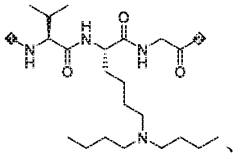
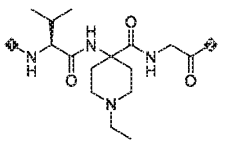
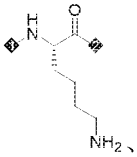

、

、

、

、

、

、

、

、

、

、

和

，X^-选自卤素离子、羧酸根离子、硫酸根离子、硫酸氢根离子和 OH^-，1 位与 L_1 或 L_2 相连，2 位与 L_4 或 D 相连；

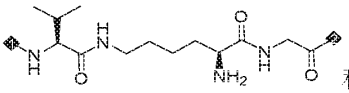
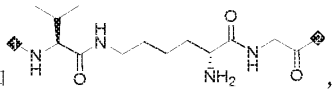
优选地，L_3 选自

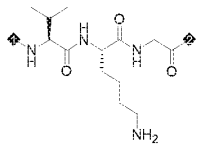
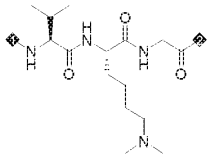
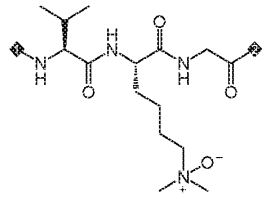
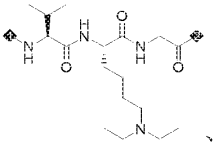
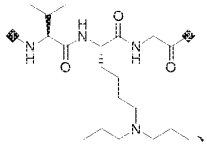
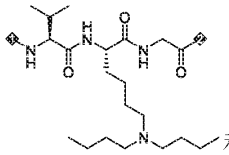
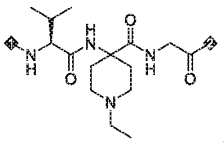




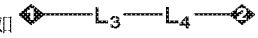
 、  、  、  、  、  、  、  和  ，X^-选自卤素离子、羧酸根离子、硫酸根离子、硫酸氢根离子和OH^-，1 位与 L_1 或 L_2 相连，2 位与 L_4 或 D 相连；

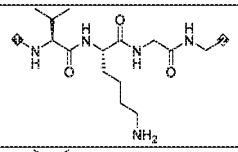
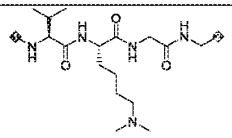
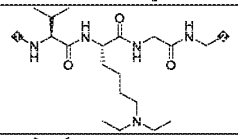
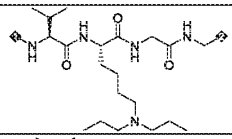
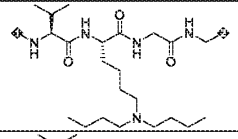
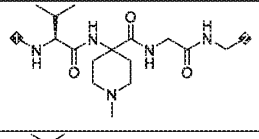
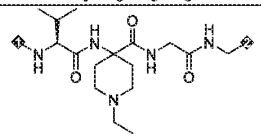
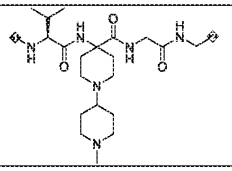
进一步优选地，L_3 选自  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、  和  ，X^-选自卤素离子、羧酸根离子、硫酸根离子、硫酸氢根离子和OH^-，1 位与 L_1 或 L_2 相连，2 位与 L_4 或 D 相连；

还优选地，L_3 选自  、  、  、  、  、  、  、  。

 和  ，1 位与 L_1 或 L_2 相连，2 位与 L_4 或 D 相连；

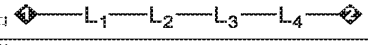
最优选地，L_3 选自  、  、  、  、  、  和  ，1 位与 L_1 或 L_2 相连，2 位与 L_4 或 D 相连；

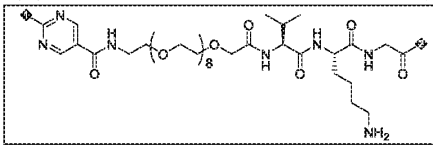
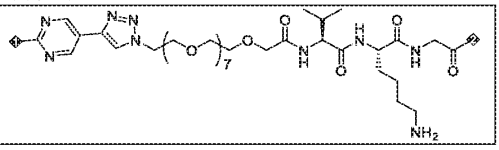
例如  的结构选自以下结构片段：

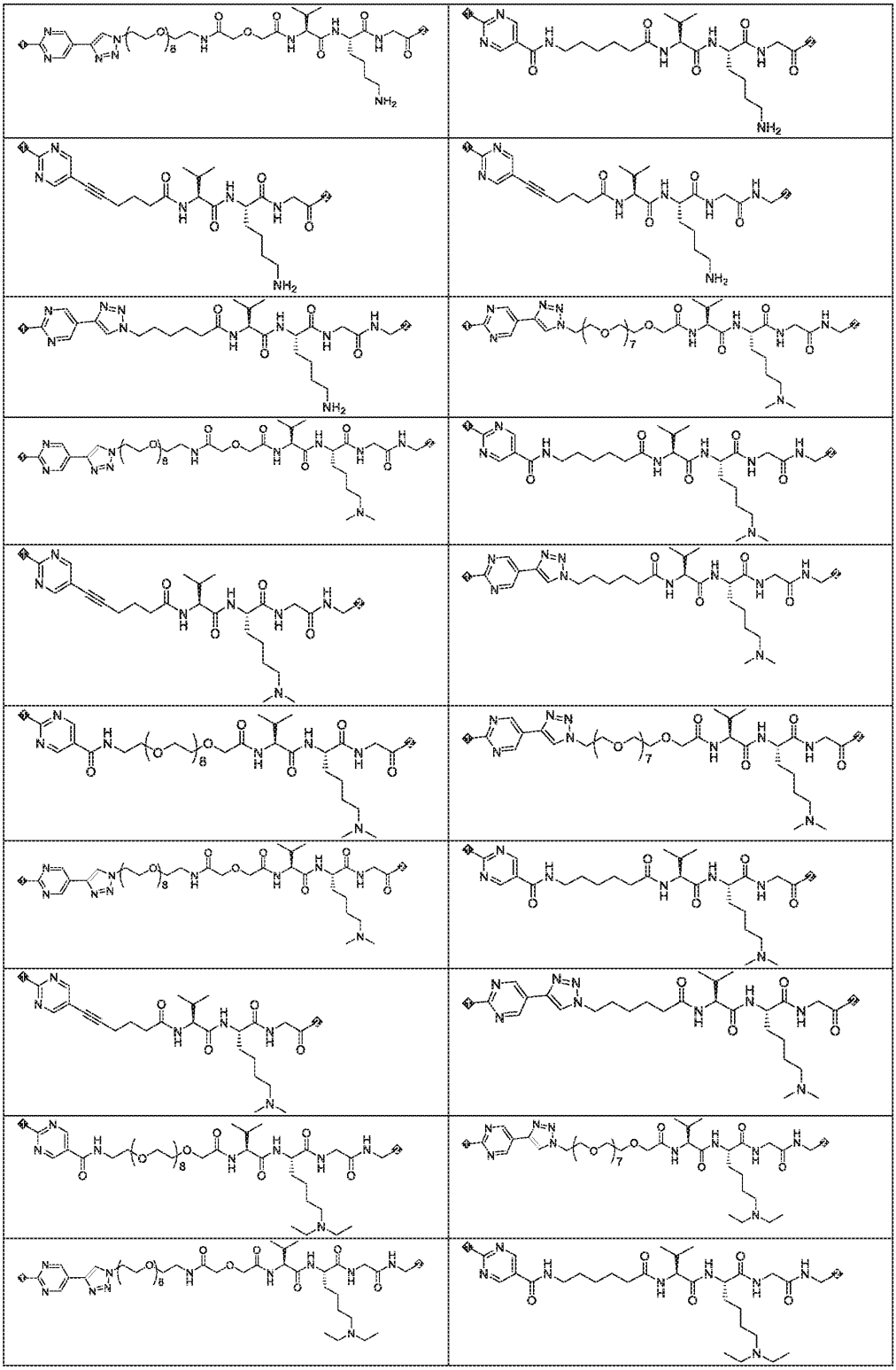
	
	
	
	

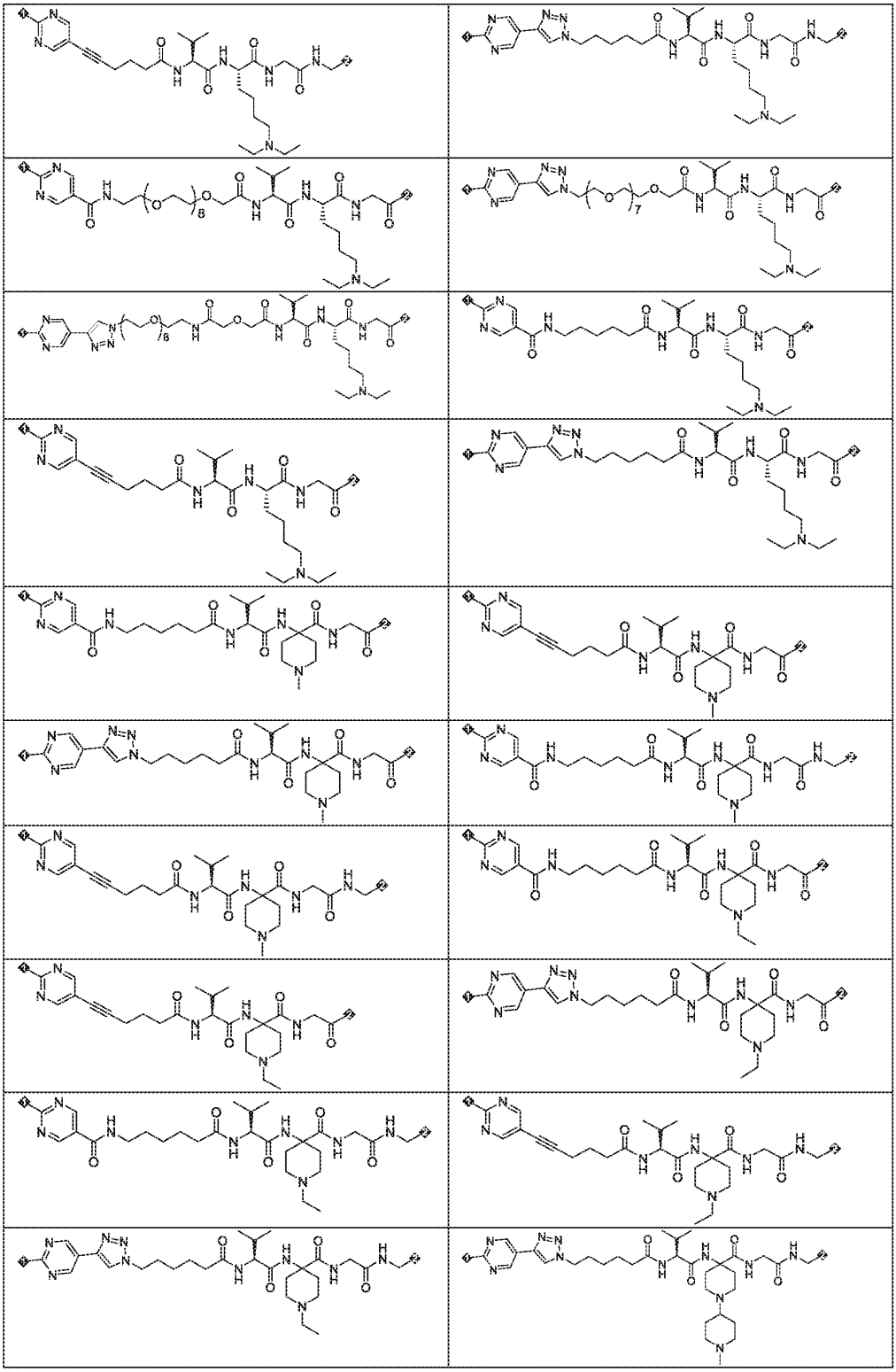
。

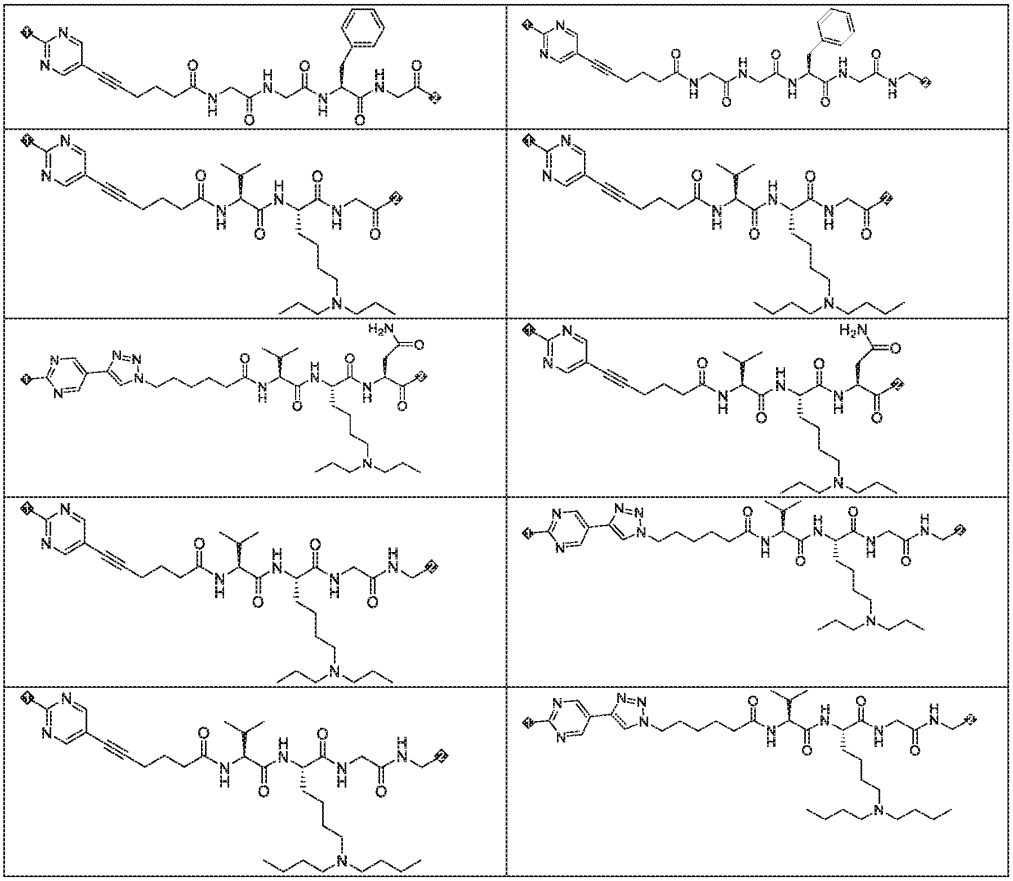
12. 如权利要求 1-11 中任一项所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其特征在于，

其中  的结构选自以下：



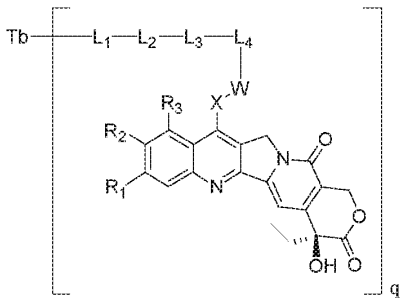




其中，1 位与 Tb 相连，2 位与 D 相连。

13.如权利要求 1-12 中任一项所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其特征在于，

其中，所述配体药物偶联物具有式 I 所式结构：



式 I

其中：Tb、L1、L2、L3、L4 和 q 的定义如权利要求 1-12 中任一项所述；

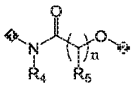
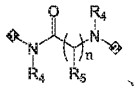
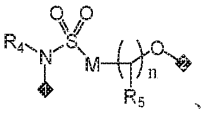
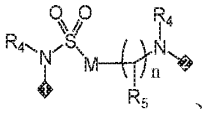
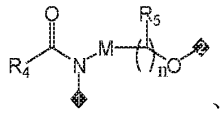
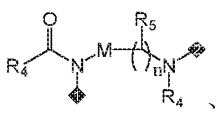
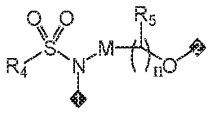
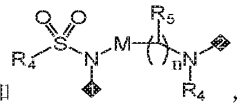
R_1、R_2 各自独立地选自 H、卤素、-OH、任选取代的 C1-6 烷基和任选取代的 C1-6 烷氧基，或者，

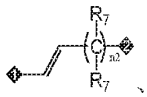
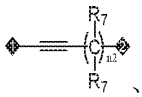
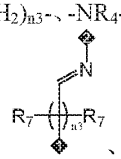
R_1 和 R_2 和与其相连的碳原子一起形成 5-7 元碳环或 5-7 元杂环，所述杂环含有 1 个或多个 O，S，N，羰基，亚砜基或砜基或其任意组合；

R_3 选自 H、卤素、-OH、$-NH_2$、任选取代的 C1-6 烷基和任选取代的 C1-6 烷氧基，或者，

R_3 和 X 和与其相连的碳原子一起形成 5-7 元碳环或 5-7 元杂环，所述杂环含有 1 个或多个 O，S，N，羰基，亚砜基或砜基或其任意组合，或者，

R_3 和 R_2 和与其相连的碳原子一起形成 5-7 元碳环或 5-7 元杂环，所述杂环含有 1 个或多个 O，S，N，羰基，亚砜基或砜基或其任意组合；

W 不存在或存在，W 存在时，W 选自-O-、-S-、$-NR_4-$、  、  、  、  、  、  、  、  、  和，1 位与 X 相连，2 位与 L_4 或 L_3 相连；

X 选自直接键，任选取代的-O-$(CH_2)_{n3}$-、$-NR_4-(CH_2)_{n3}$-、-S-$(CH_2)_{n3}$-、羰基-$(CH_2)_{n3}$-、$-SO_2-(CH_2)_{n3}$-、-$(CH_2)_{n1}$-、  、  、  、C3-6 环烷基、C6-10 芳基、5-10 元杂芳基和 4-10 元杂环基，1 位和母环相连，2 位和 W 或 L_4 相连；所述取代基选自一个或多个 C1-4 烷基、C3-6 环烷基，或者多个 C1-4 烷基和与它们同时相连的碳原子一起形成 C3-6 环烷基；

各 M 独立地选自直接键和$-CR^{5a}R^{5b}-$；

R_4、R_5、R^{5a}、R^{5b}、R_6、R_7 各自独立地选自 H、任选取代的 C1-4 烷基、任选取代的 C1-4 烷氧基和任选取代的 C3-6 环烷基；

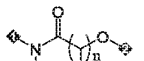
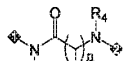
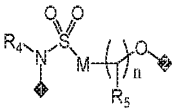
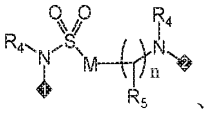
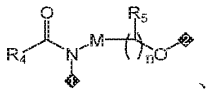
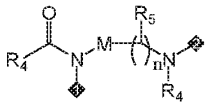
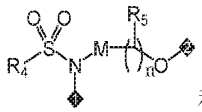
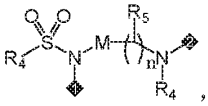
n、n'、n1、n2、n3 各自独立地选自 0 到 6 之间的任意整数；

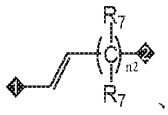
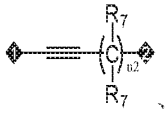
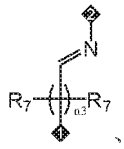
1 位与喜树碱母核相连，2 位与 W 或 L_4 相连。

14.如权利要求 13 所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其特征在于，其满足如下条件中的一个或多个：

（1）R_1、R_2 各自独立地选自 H、卤素、C1-4 烷基；或者，R_1 和 R_2 和与其相连的碳原子一起形成 5-6 元杂环，所述杂环含有 1 个、2 个或 3 个 O，S 或 N 或其任意组合；

（2）R_3 选自 H、C1-4 烷基；或，R_3 和 X 和与其相连的碳原子一起形成 5-6 元碳环；

（3）W 不存在或存在，W 存在时，W 选自-O-、-S-、-NR_4-、  、  、  、  、  、  、  和  ，1 位与 X 相连，2 位与 L_4 或 L_3 相连；

（4）X 选自任选取代的-$(CH_2)_{n1}$-、  、  、  、C6-10 芳基、5-10 元杂芳基和 4-10 元杂环基，1 位和母环相连，2 位和 W 或 L_4 相连；所述取代基选自 1 个或 2 个 C1-4 烷基，或者 2 个 C1-4 烷基和与它们同时相连的碳原子一起形成 C3-6 环烷基；

（5）R_4、R_5 各自独立地选自 H、C1-4 烷基和 C3-6 环烷基；

（6）R^{5a}、R^{5b} 各自独立地选自 H 和 C1-4 烷基；

（7）各 R_7 独立地选自 H 和 C1-4 烷基；

（8）n 选自 1、2 和 3；

（9）n1 选自 1、2、3 和 4；

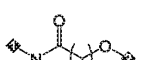
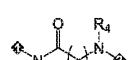
（10）n2 为 1；

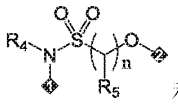
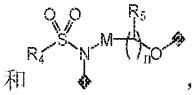
（10）n3 为 0。

15. 如权利要求 13 或 14 所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其特征在于，其满足如下条件中的一个或多个：

（1）R_1 选自 H 和卤素，R_2 选自 H 和 C1-4 烷基；或，R_1 和 R_2 和与其相连的碳原子形成  、  、  或  ，虚线表示所述杂环与苯环稠合的位置；

（2）R_3 为 H；或，R_3 和 X 和与其相连的碳原子一起形成  ，虚线表示所述碳环与苯环和吡啶环稠合的位置；

（3）W 不存在或存在，W 存在时，W 选自-O-、-S-、-NR_4-、  、  、

 和  ，1 位与 X 相连，2 位与 L_4 或 L_3 相连；

（4）各 R_4 独立地选自 H、C1-4 烷基和 C3-6 环烷基，R_5 为 H；

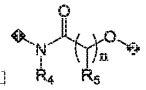
（5）R^{5a}、R^{5b} 各自独立地选自 H 和甲基；

（6）R_7 为 H；

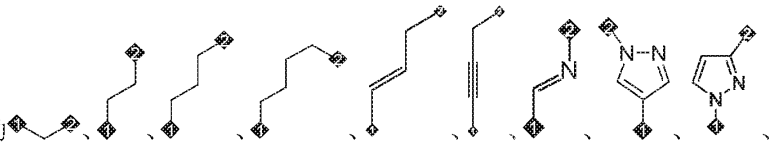
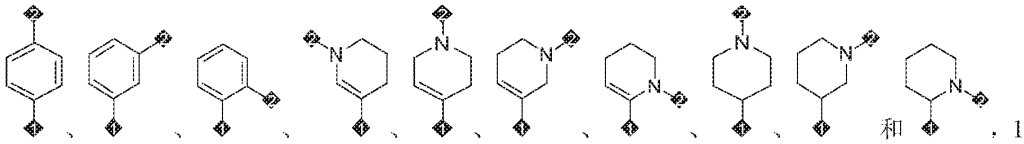
（7）n 为 1。

16. 如权利要求 13-15 中任一项所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其特征在于，其满足如下条件中的一个或多个：

（1）R_1 为 H 或 F，R_2 为 H 或甲基；或，R_1 和 R_2 和与其相连的碳原子一起形成  ，虚线表示所述杂环与苯环稠合的位置；

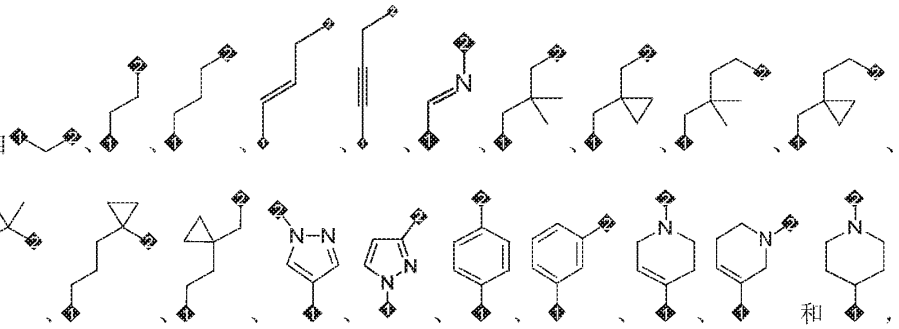
（2）W 选自-O-、-NR_4-和  ，1 位 X 相连，2 位与 L_4 或 L_3 相连；

（3）各 R_4 独立地选自 H、甲基、乙基、正丙基、异丙基、叔丁基和环丙基，R_5 为 H；

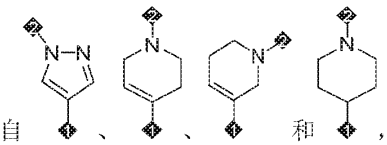
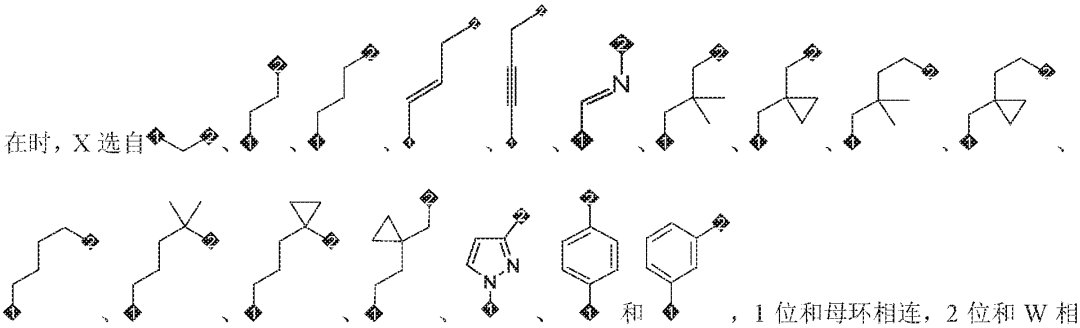
（4）X 选自任选取代的  、  和，1 位和母环相连，2 位和 W 或 L_4 相连；所述取代基选自 1 个或 2 个 C1-4 烷基，或者 2 个 C1-4 烷基和与它们同时相连的碳原子一起形成 C3-6 环烷基；所述的 C1-4 烷基如甲基；所述的 C3-6 环烷基如环丙基。

17. 如权利要求 13-16 中任一项所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其特征在于，

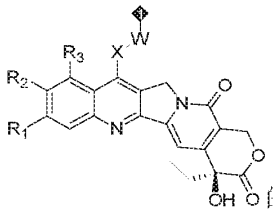
（1）W 选自-O-和-NR_4-；

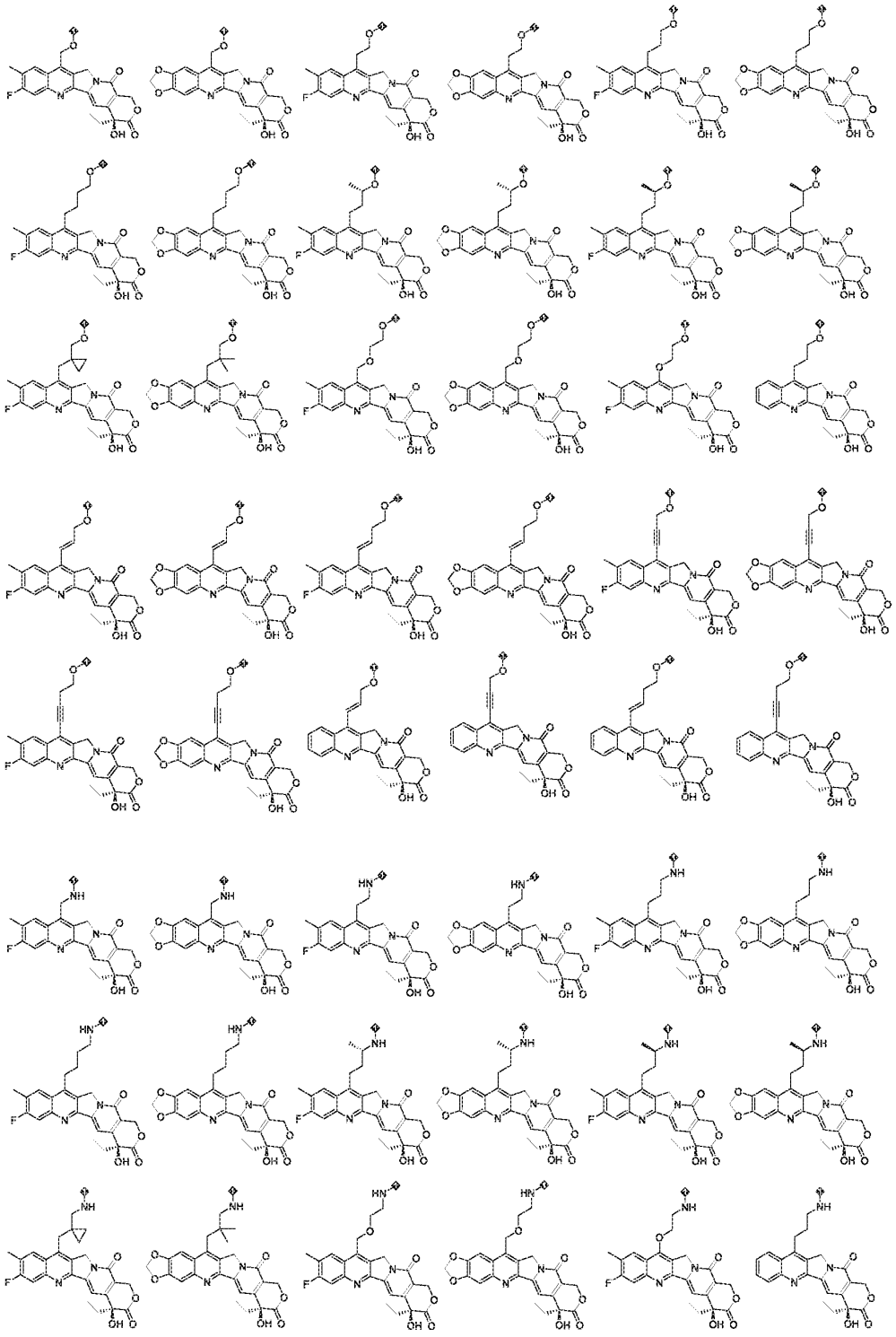
（2）X 选自  和，1 位和母环相连，2 位和 W 或 L_4 相连。

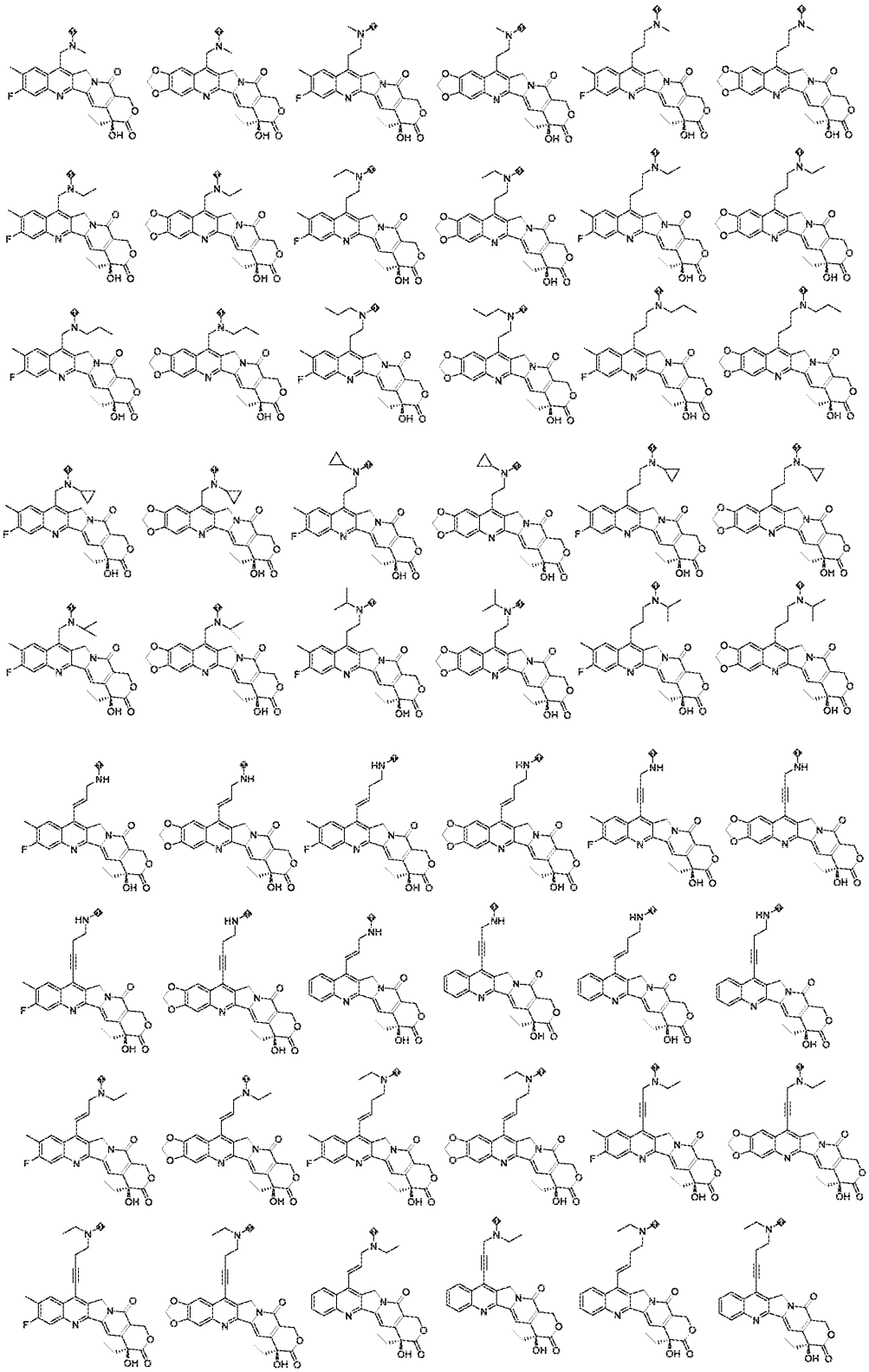
18. 如权利要求 13-17 中任一项所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其特征在于，

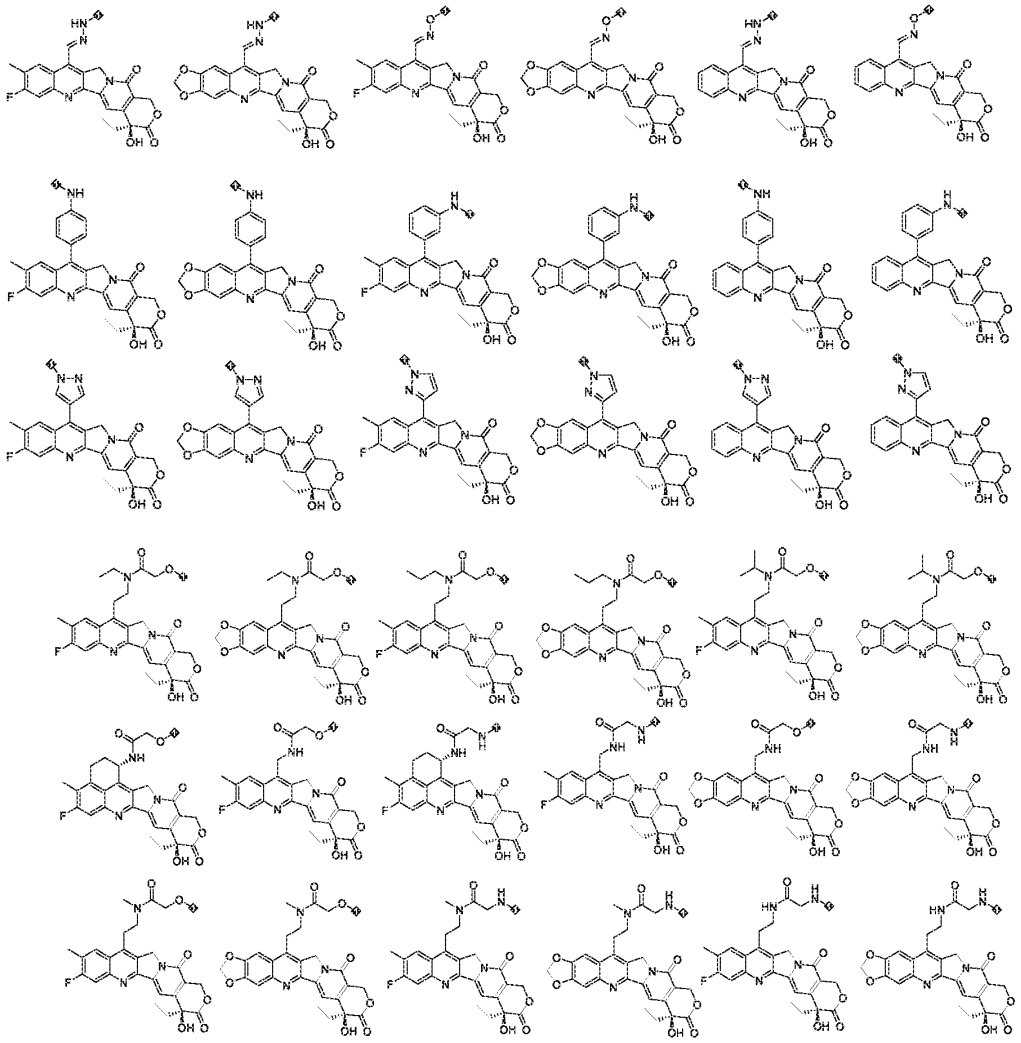
W 不存在时，X 选自  和，1 位和母环相连，2 位和 L_4 相连；W 存在时，X 选自  和，1 位和母环相连，2 位和 W 相连。

19. 如权利要求 13-18 中任一项所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其特征在于，

 的结构选自以下：

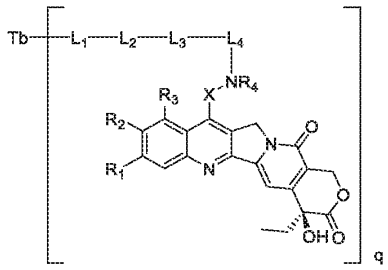






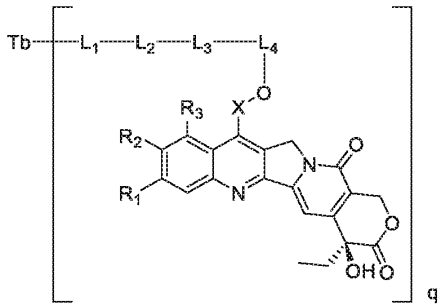
其中，1 位与 L_4 相连；当 L_4 不存在时，1 位与 L_3 相连。

20.如权利要求 13-19 中任一项所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其特征在于，所述的配体药物偶联物具有式 I-1、式 I-2 或式 I-3 所式结构：



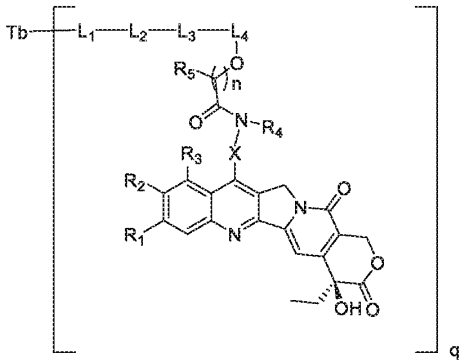
I-1

其中，Tb、L_1、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4 和 q 如权利要求 13-19 中任一项所定义；



I-2

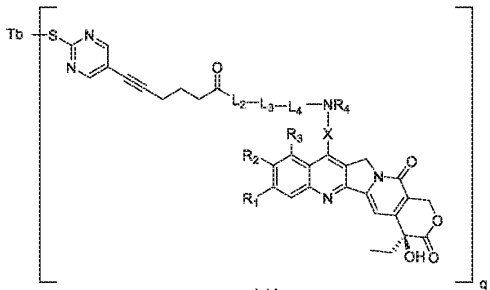
其中，Tb、L_1、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3 和 q 如权利要求 13-19 中任一项所定义；



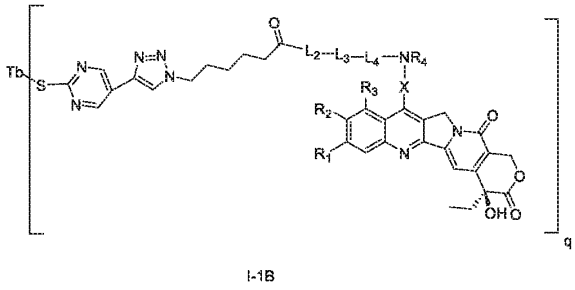
I-3

其中，Tb、L_1、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、n 和 q 如权利要求 13-19 中任一项所定义。

21.如权利要求 13-20 中任一项所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其特征在于，所述配体药物偶联物具有式 I-1A、式 I-1B、式 I-2A、式 I-2B、式 I-3A 或式 I-3B 所式结构：

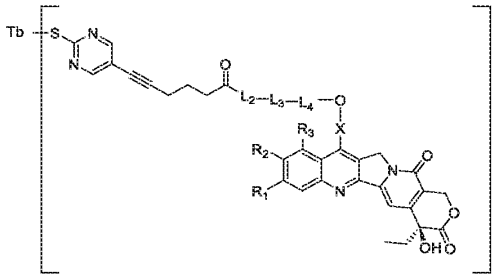


I-1A

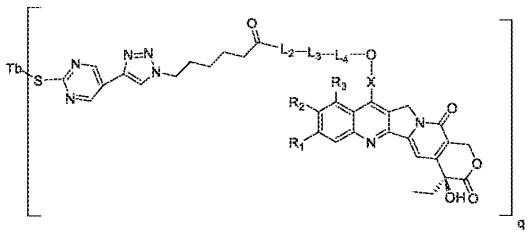


I-1B

其中，Tb、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4和 q 如权利要求 13-19 中任一项所定义；

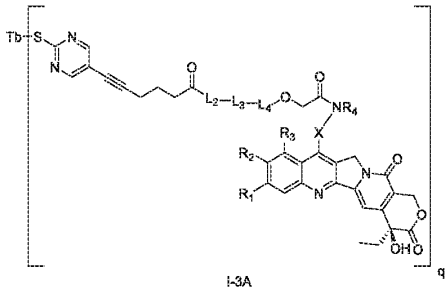


I-2A

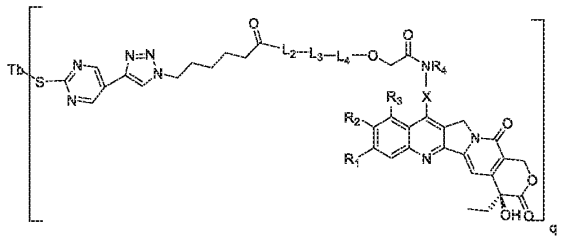


I-2B

其中，Tb、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3和 q 如权利要求 13-19 中任一项所定义；



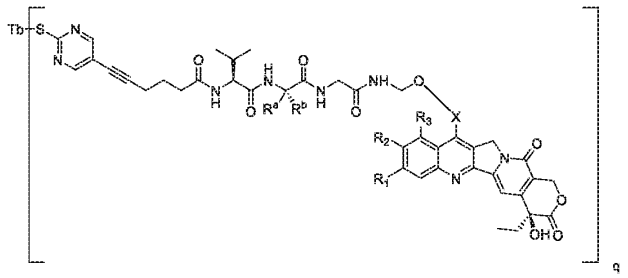
I-3A



I-3B

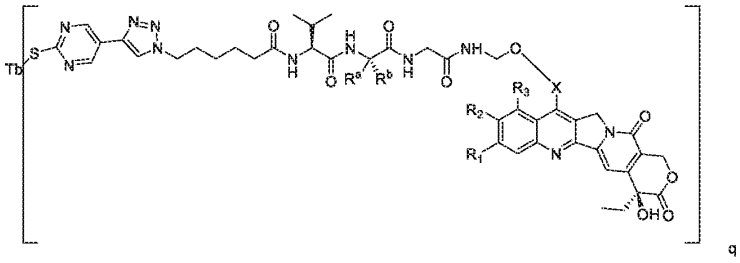
其中，Tb、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4和 q 如权利要求 13-19 中任一项所定义。

22.权利要求 13-21 中任一项所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其特征在于，其中，所述的配体药物偶联物具有式 I-A 或式 I-B 所式结构：



I-A

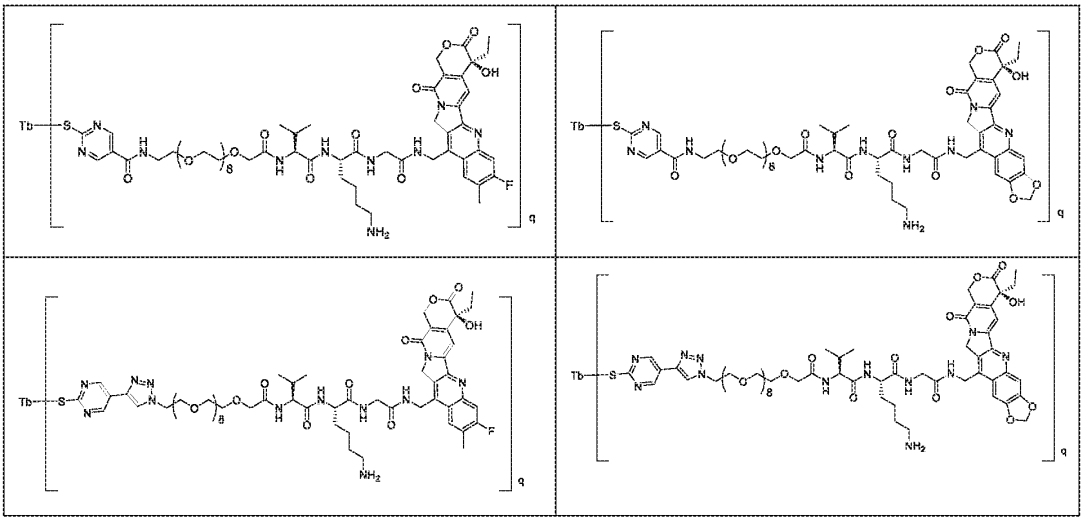
其中，Tb、X、R_1、R_2、R_3、R^a、R^b 和 q 如权利要求 13-19 中任一项所定义；

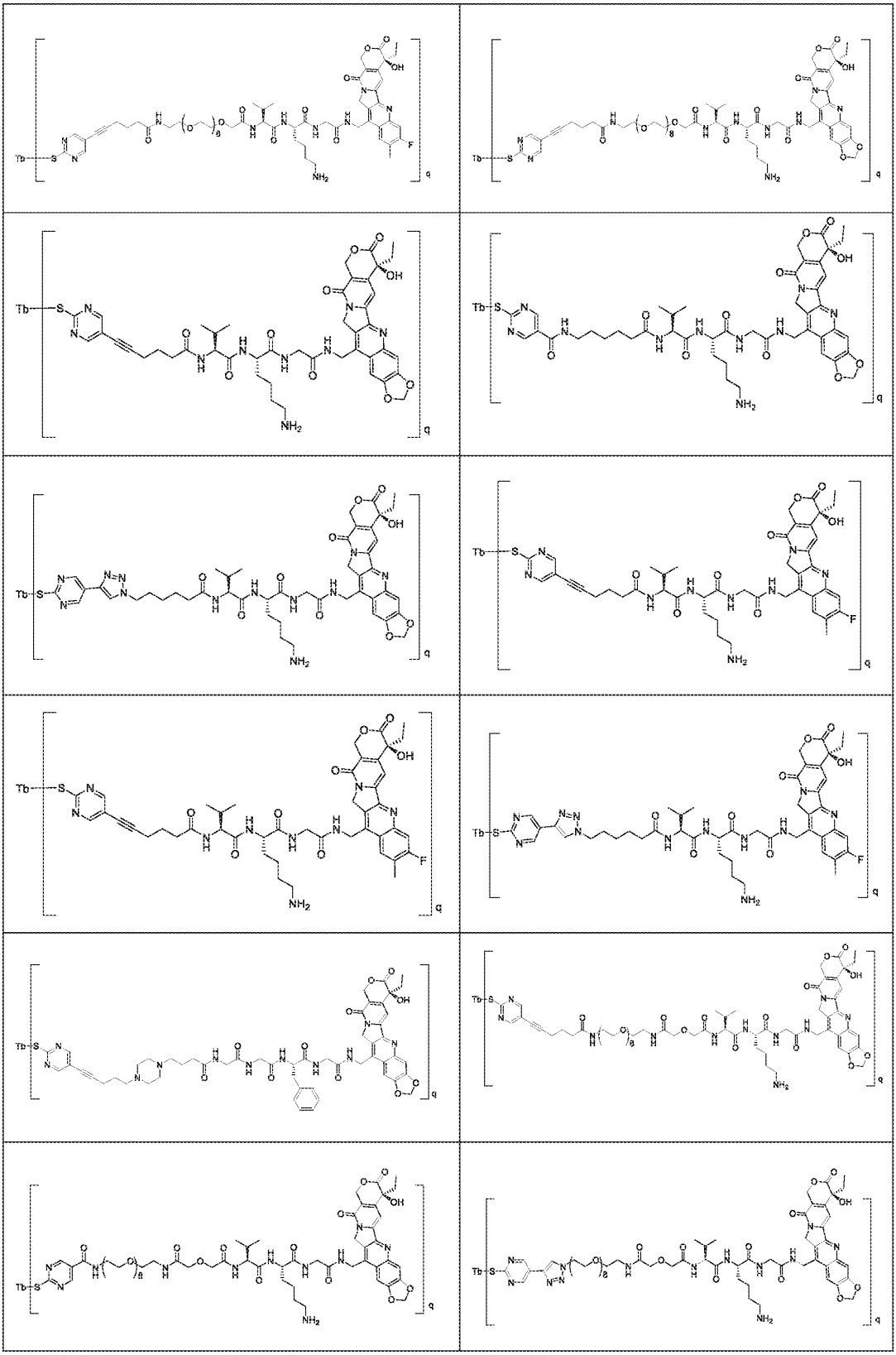


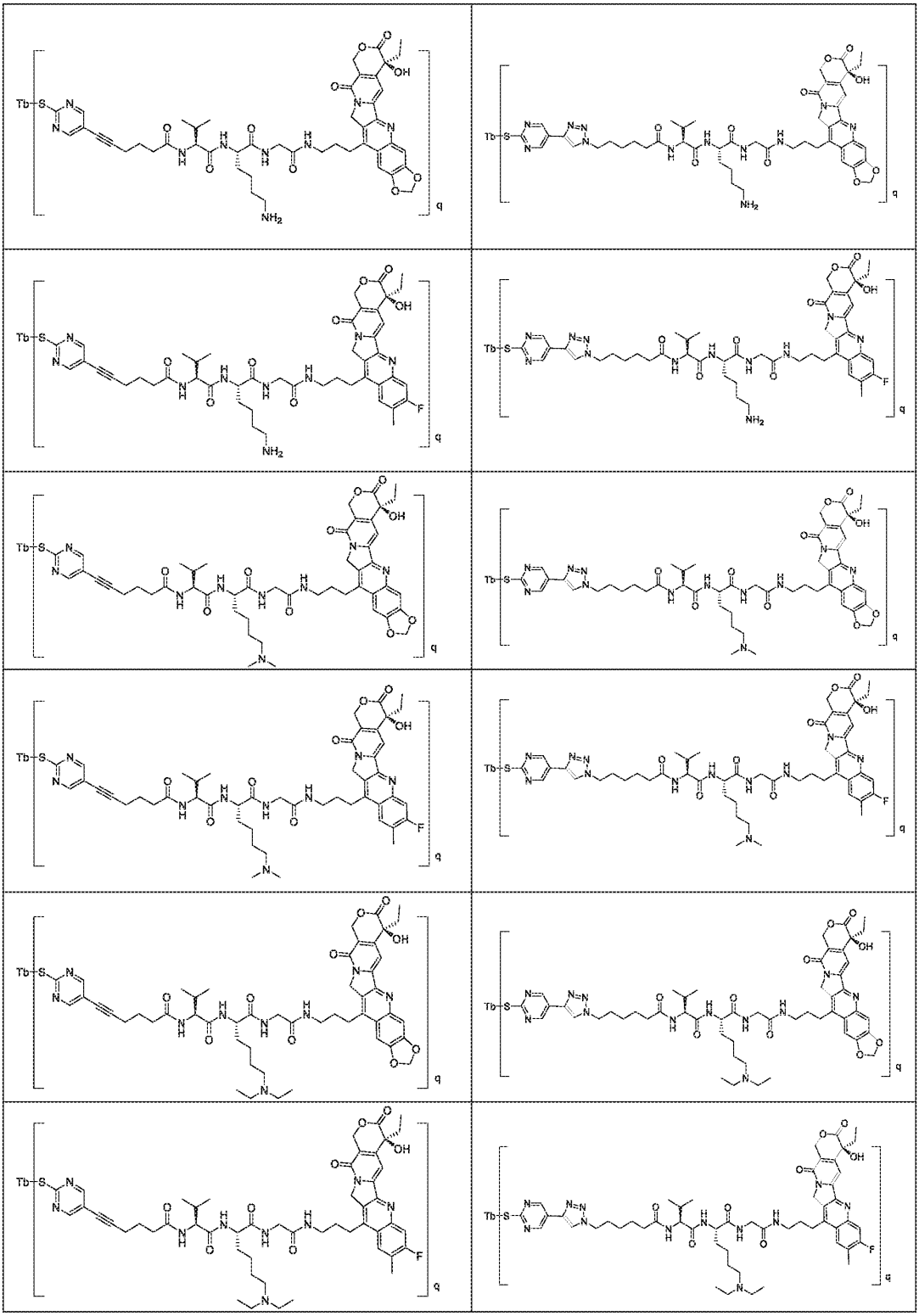
I-B

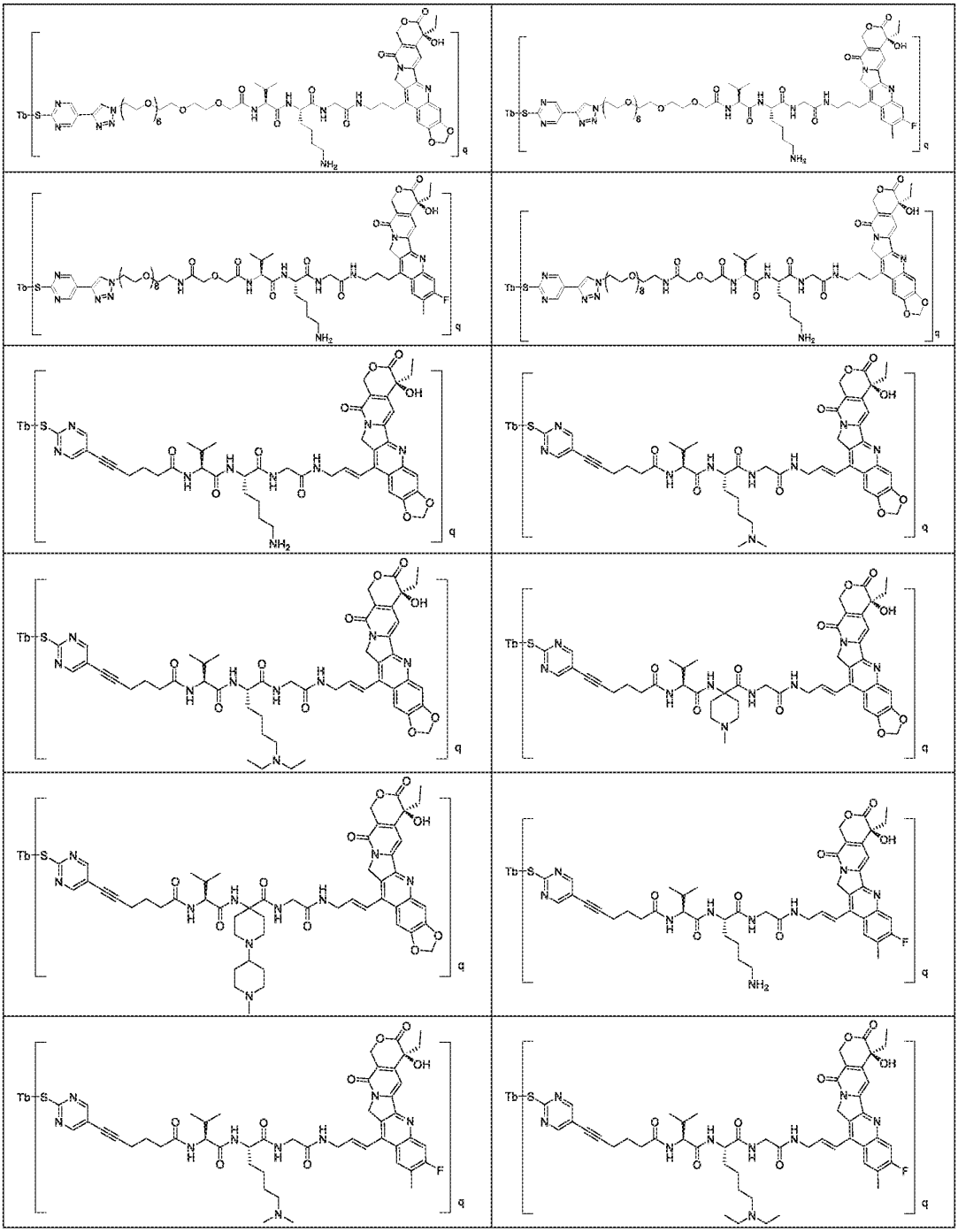
其中，Tb、X、R_1、R_2、R_3、R^a、R^b 和 q 如权利要求 13-19 中任一项所定义。

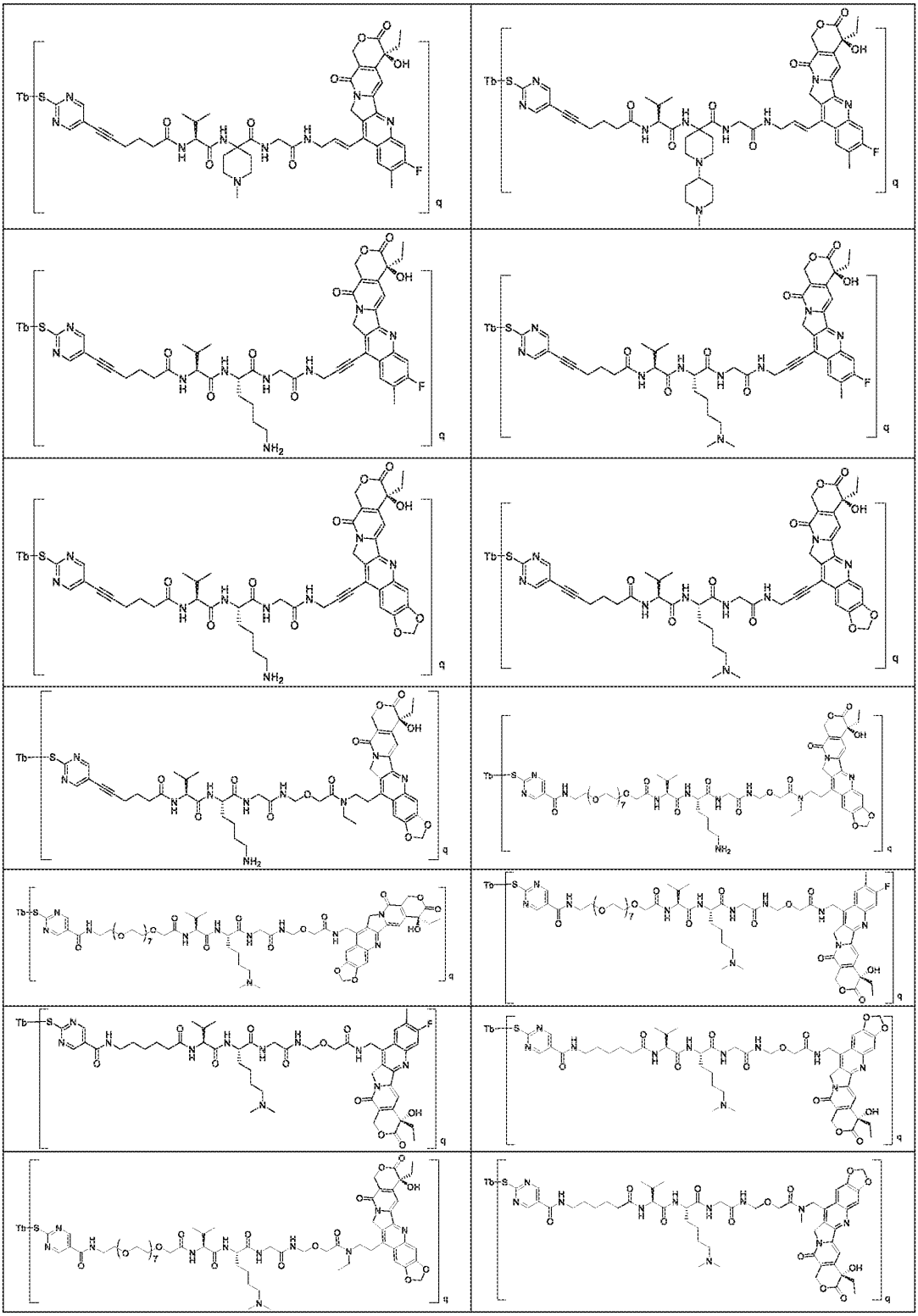
23.权利要求 1-22 中任一项所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其特征在于，其中，所述的配体药物偶联物选自以下：

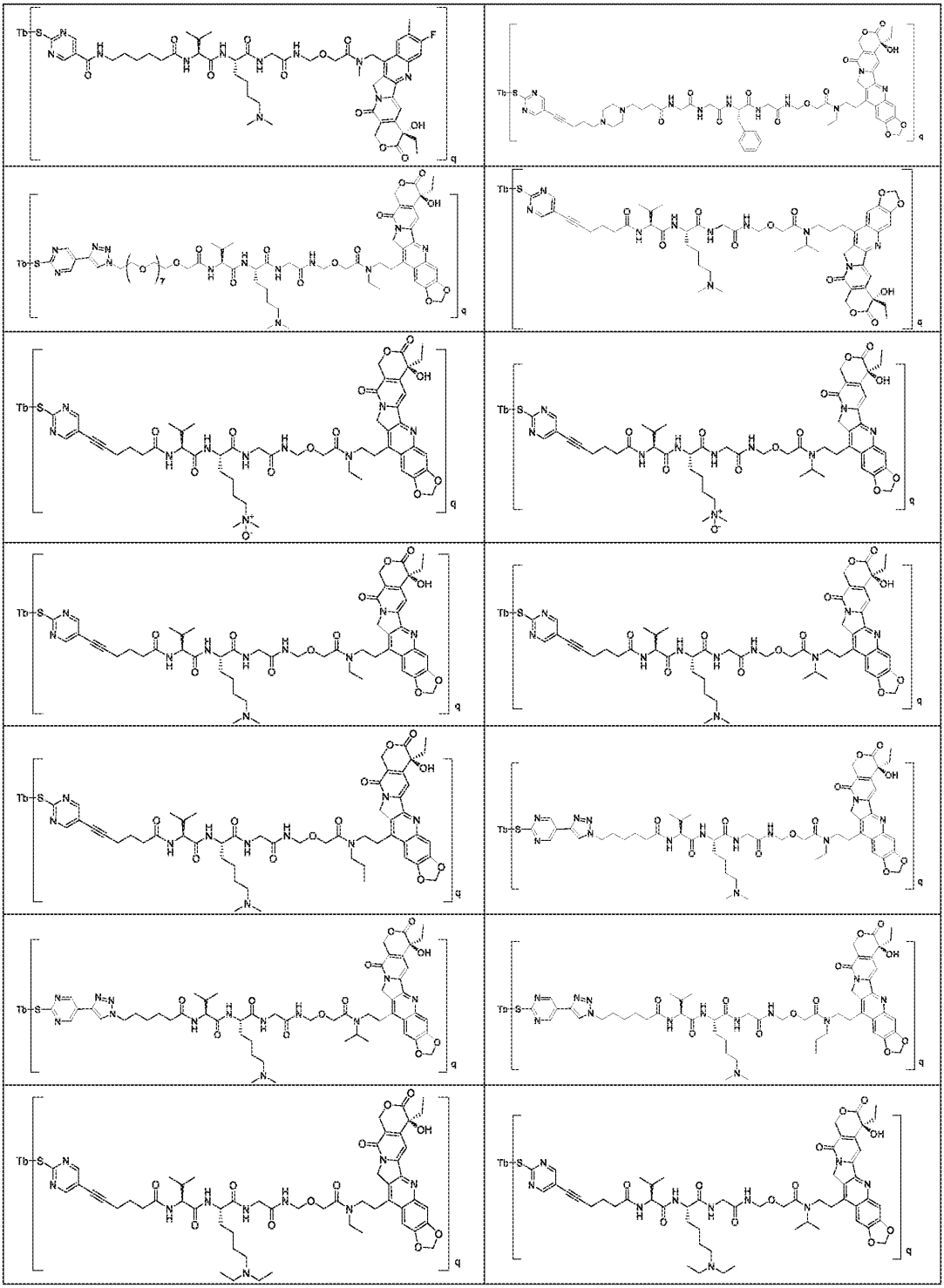


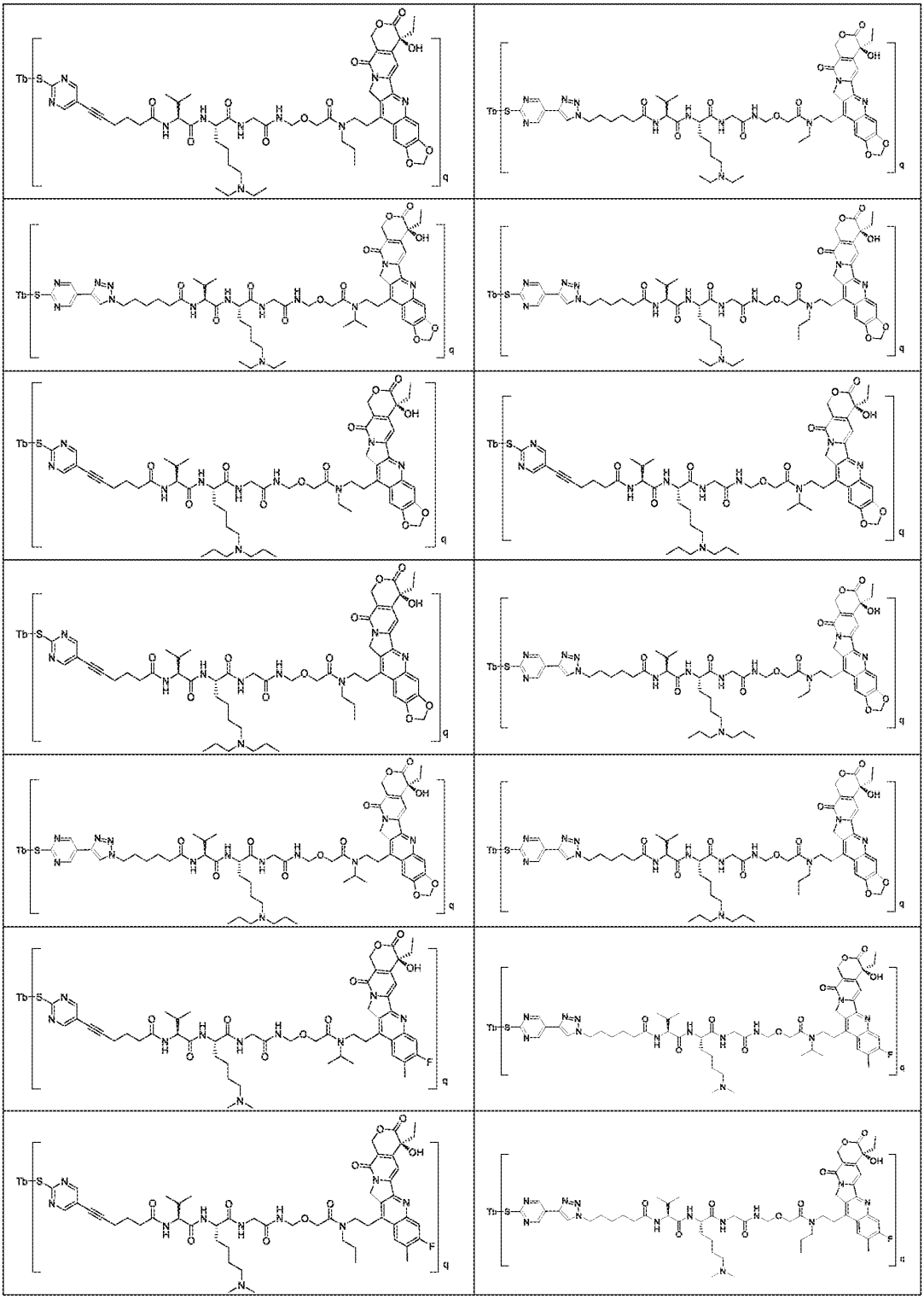


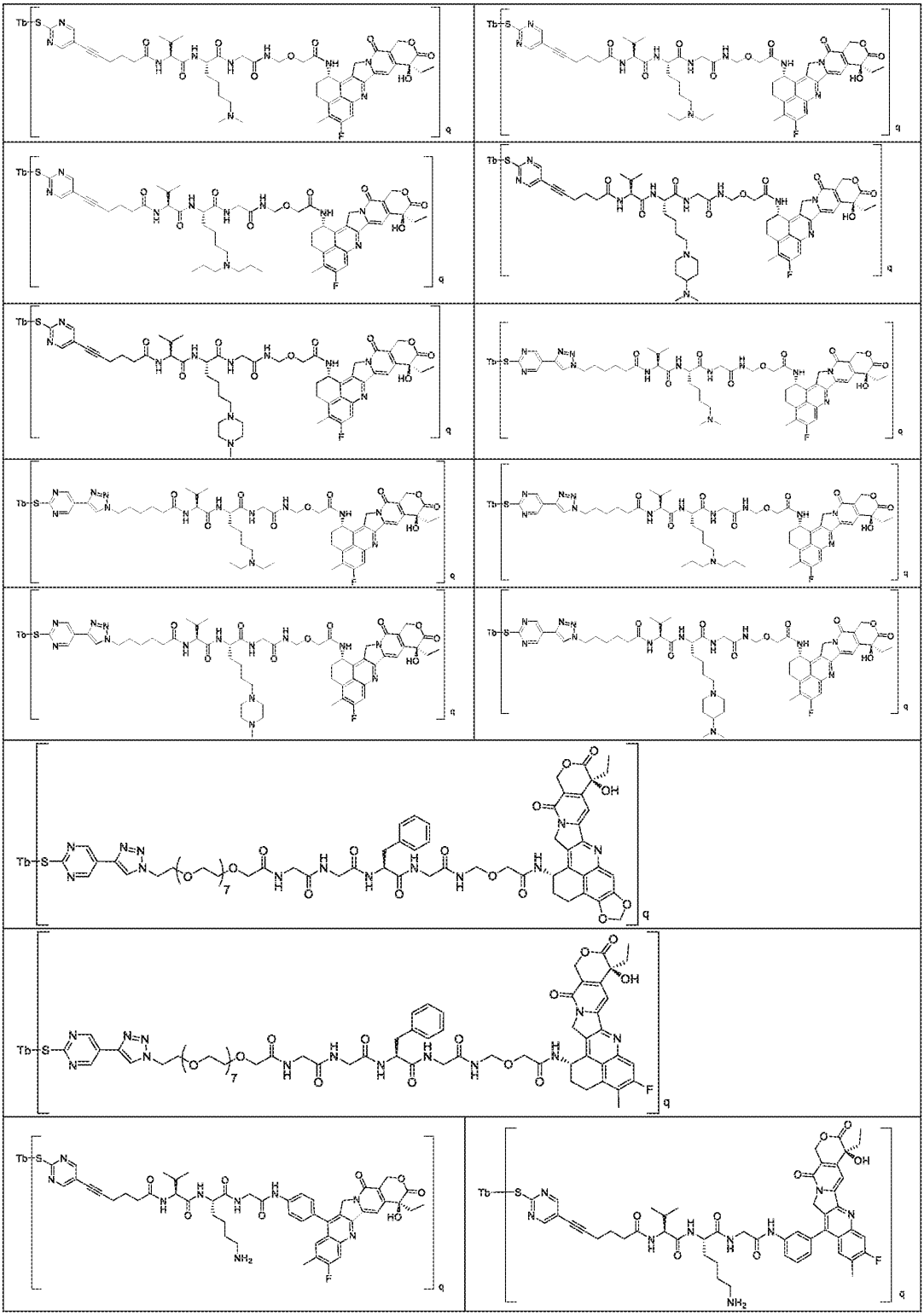


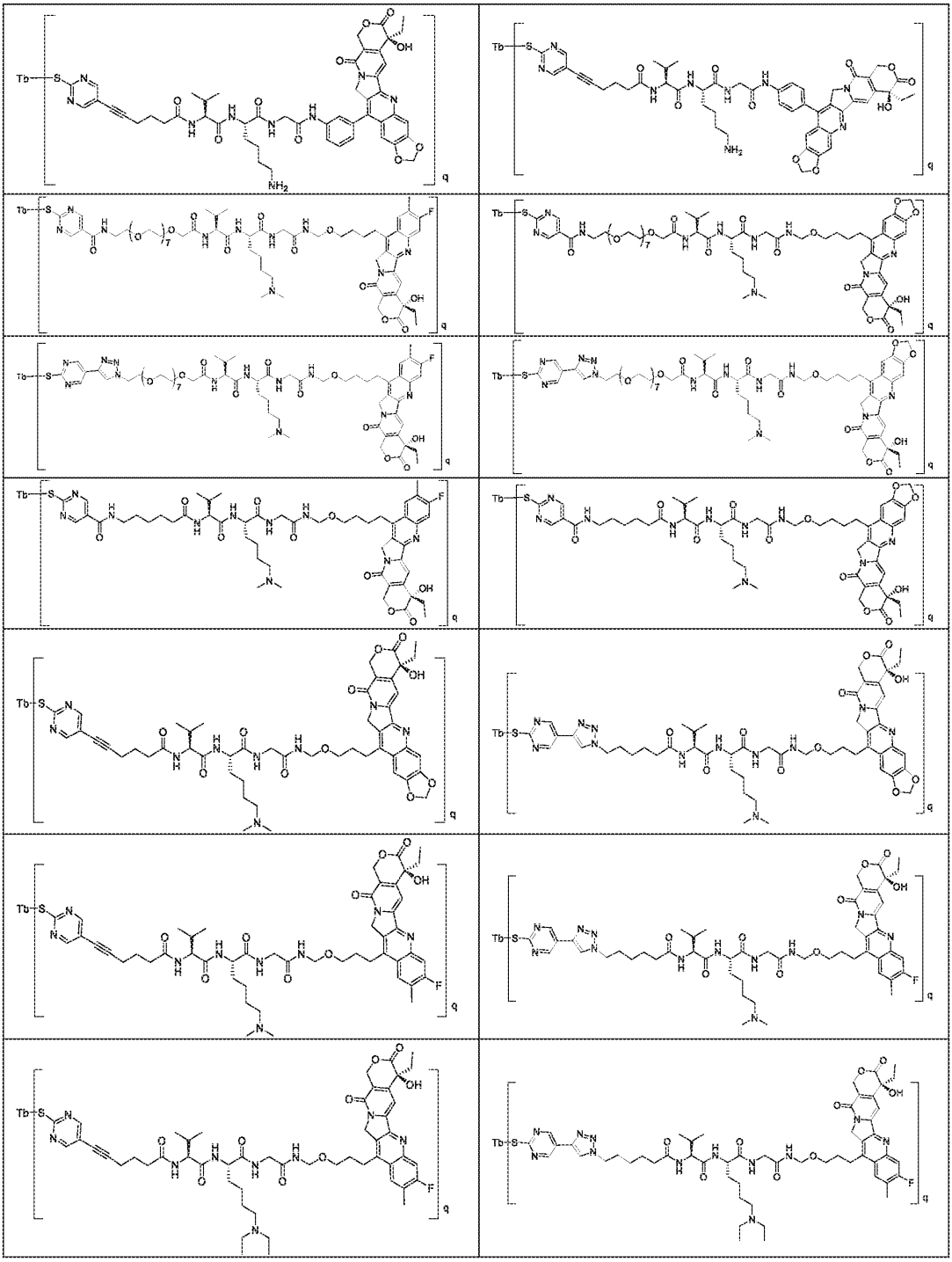


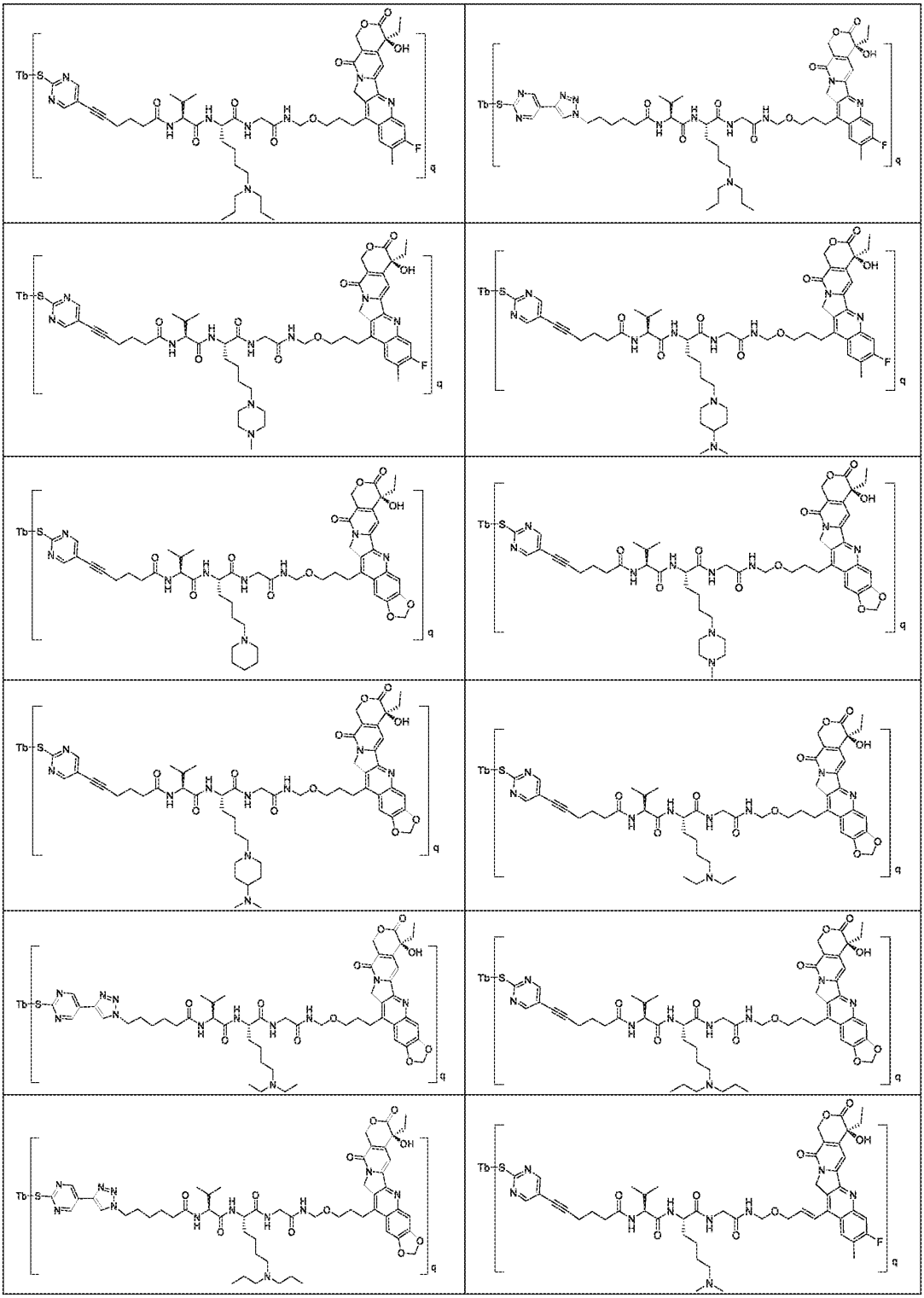


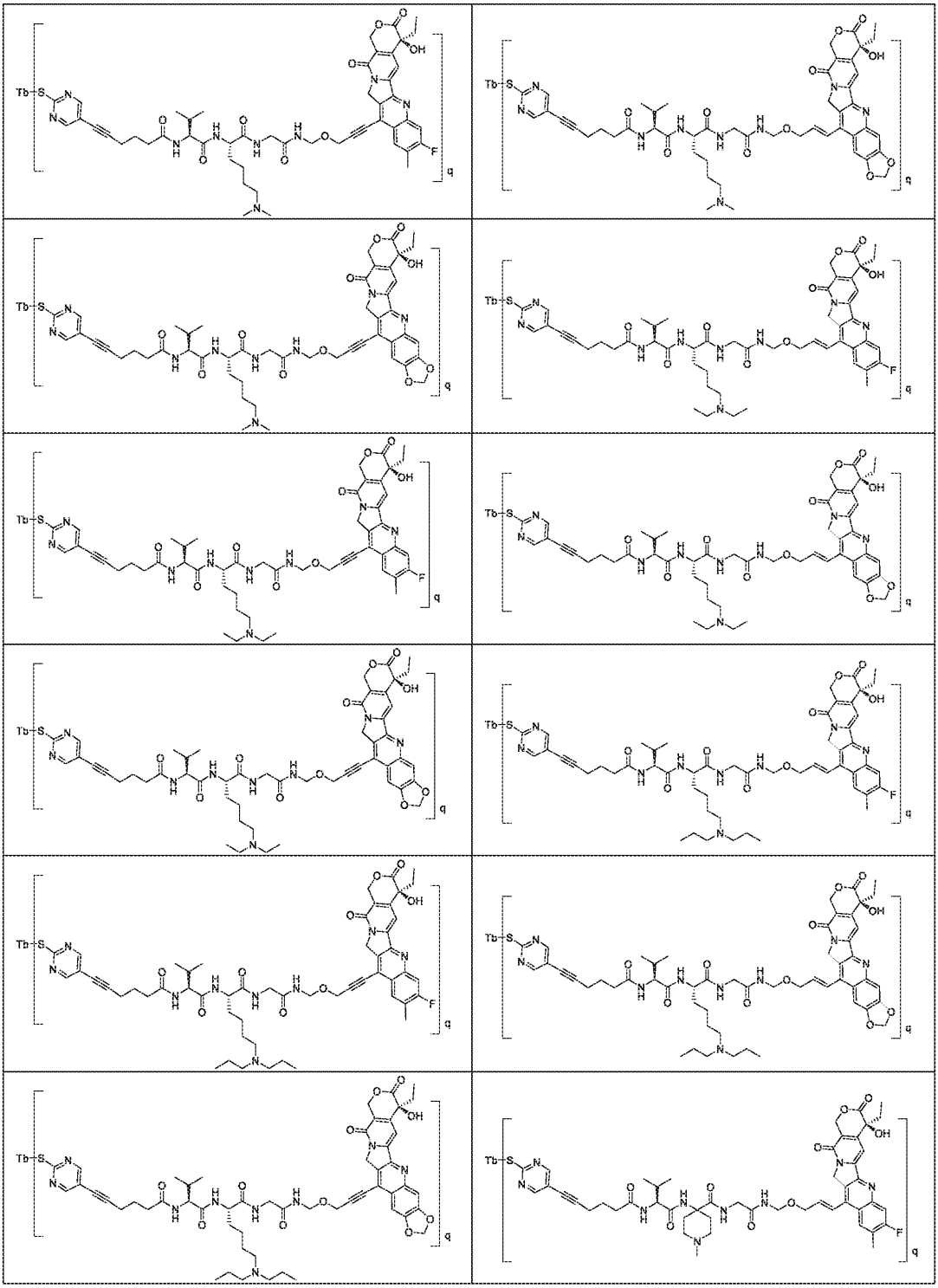


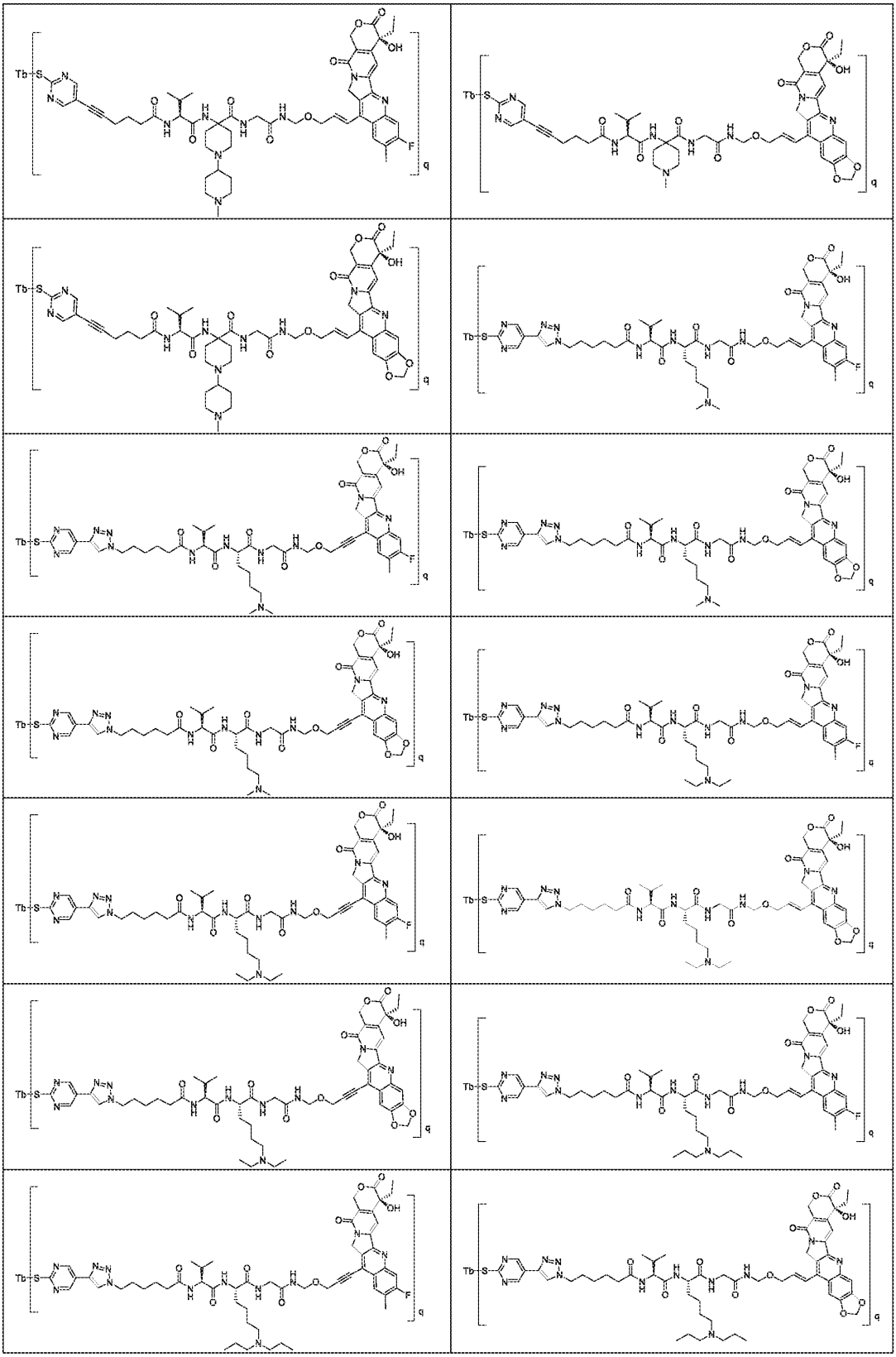


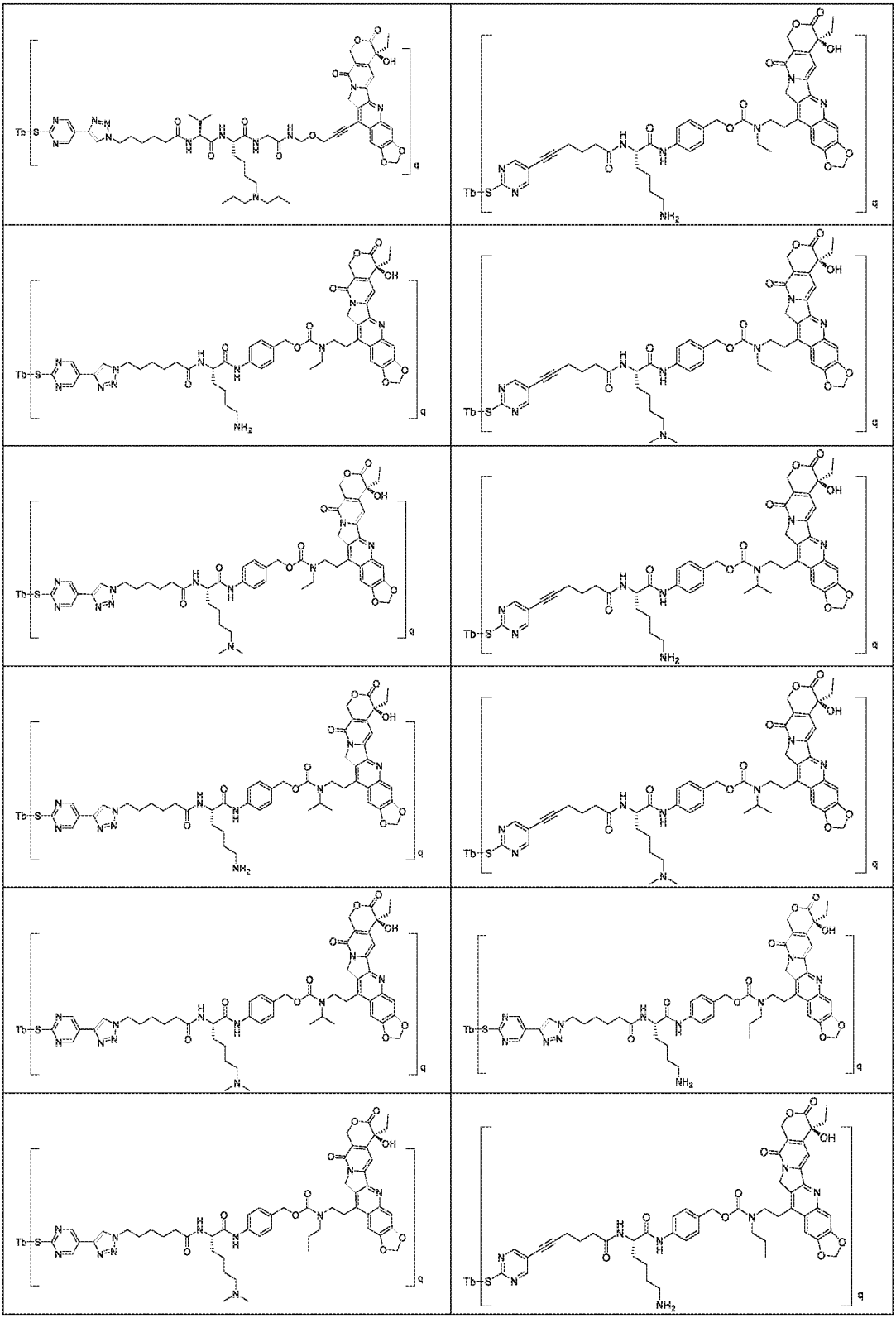


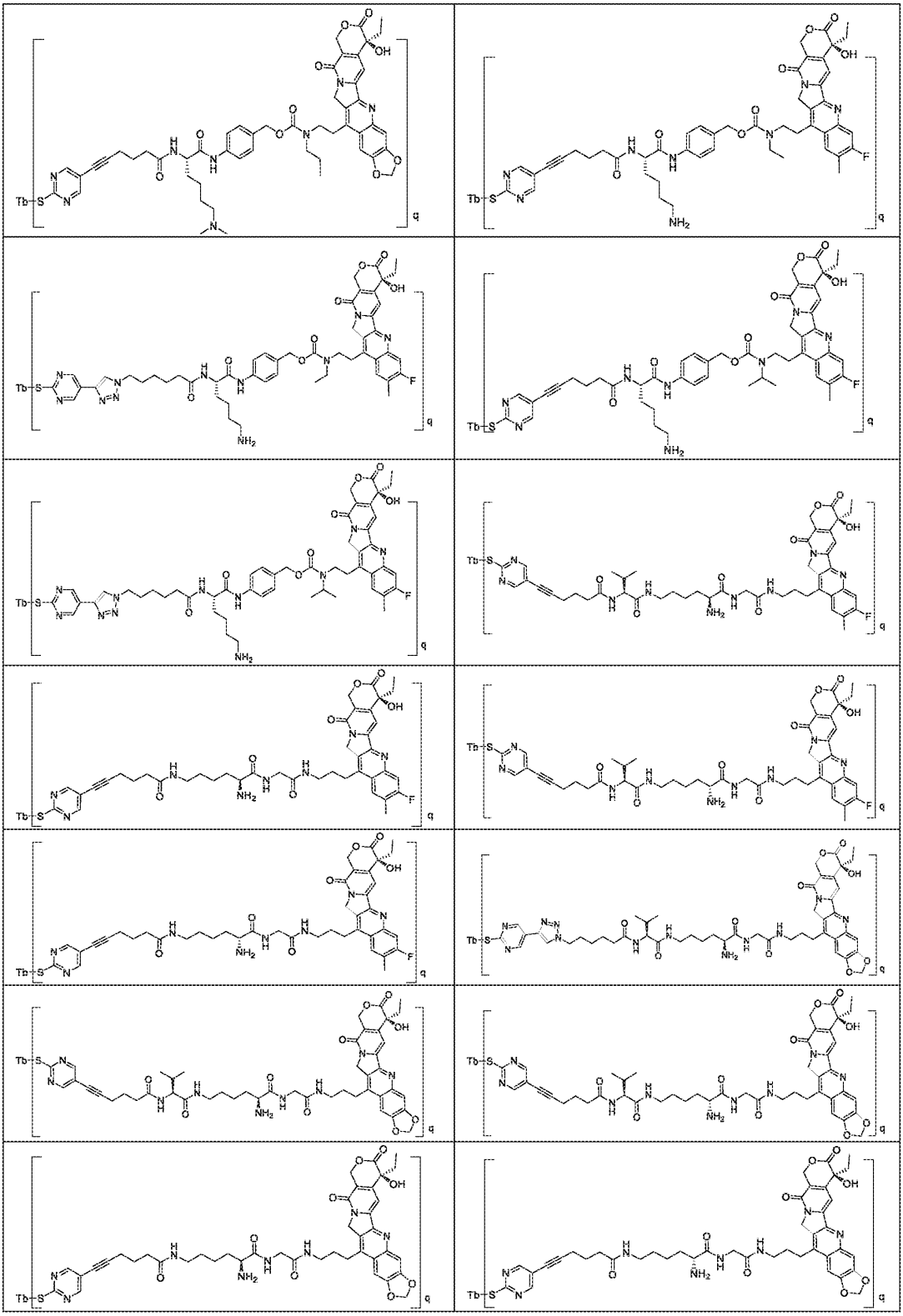


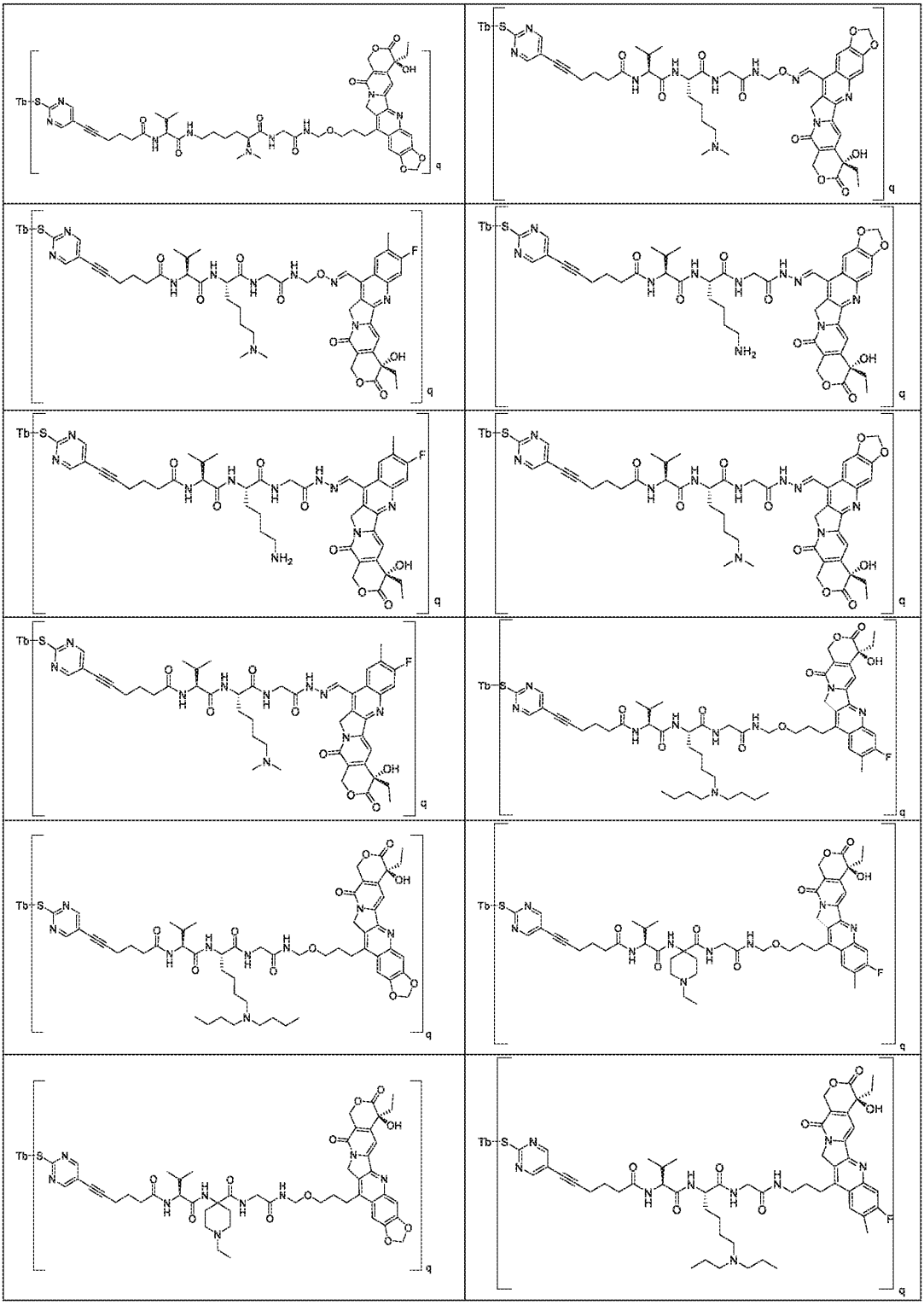


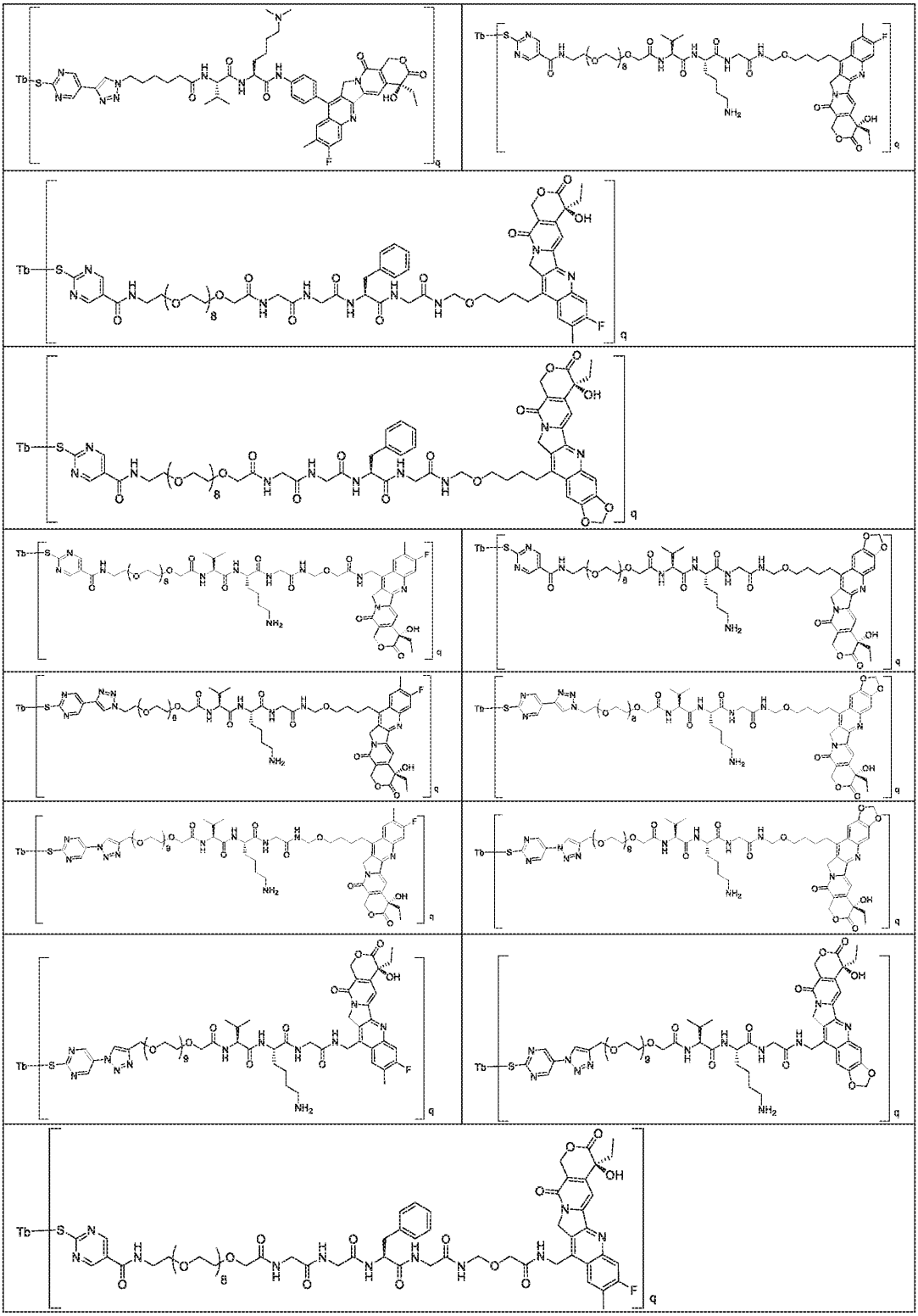


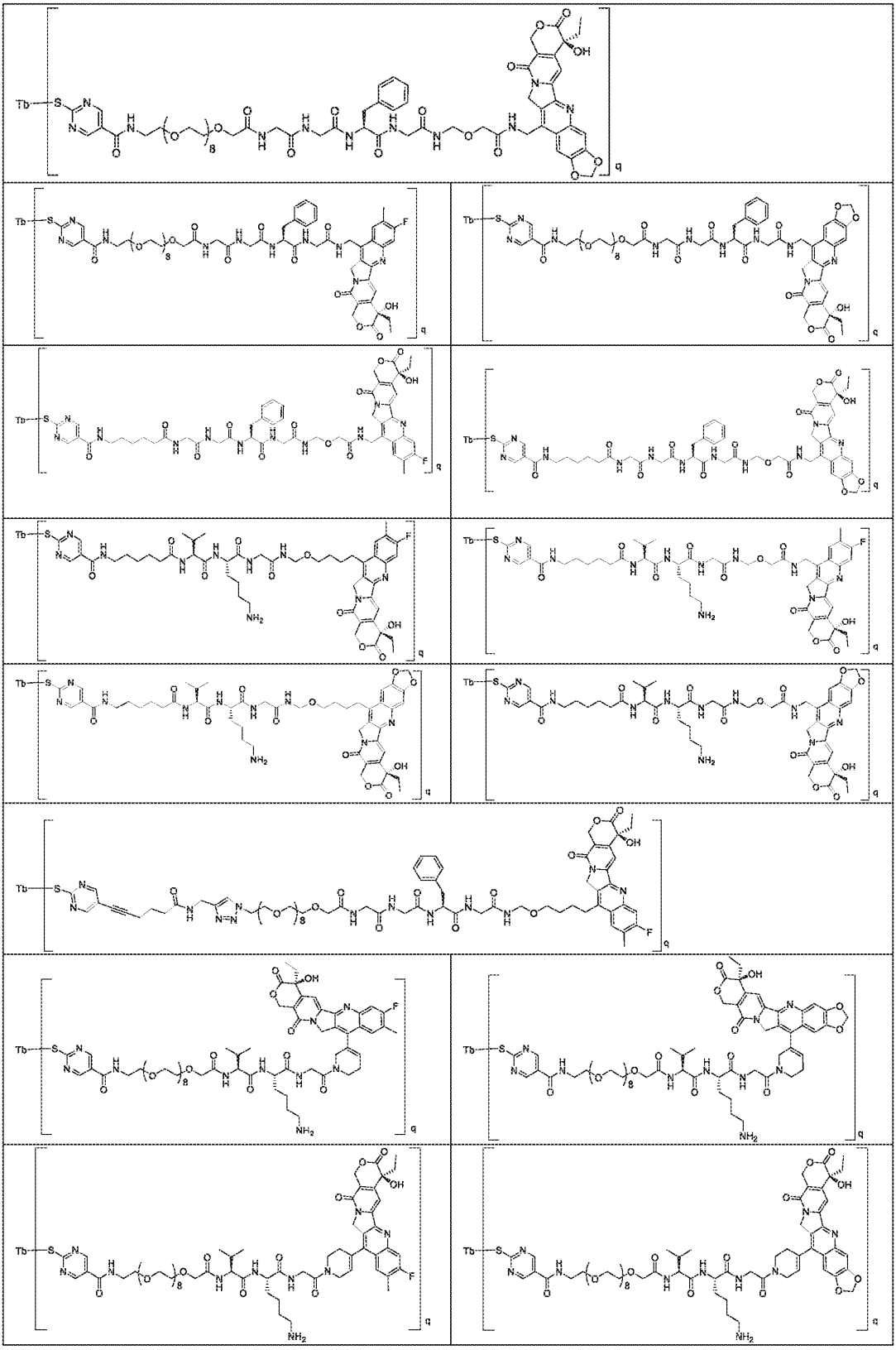


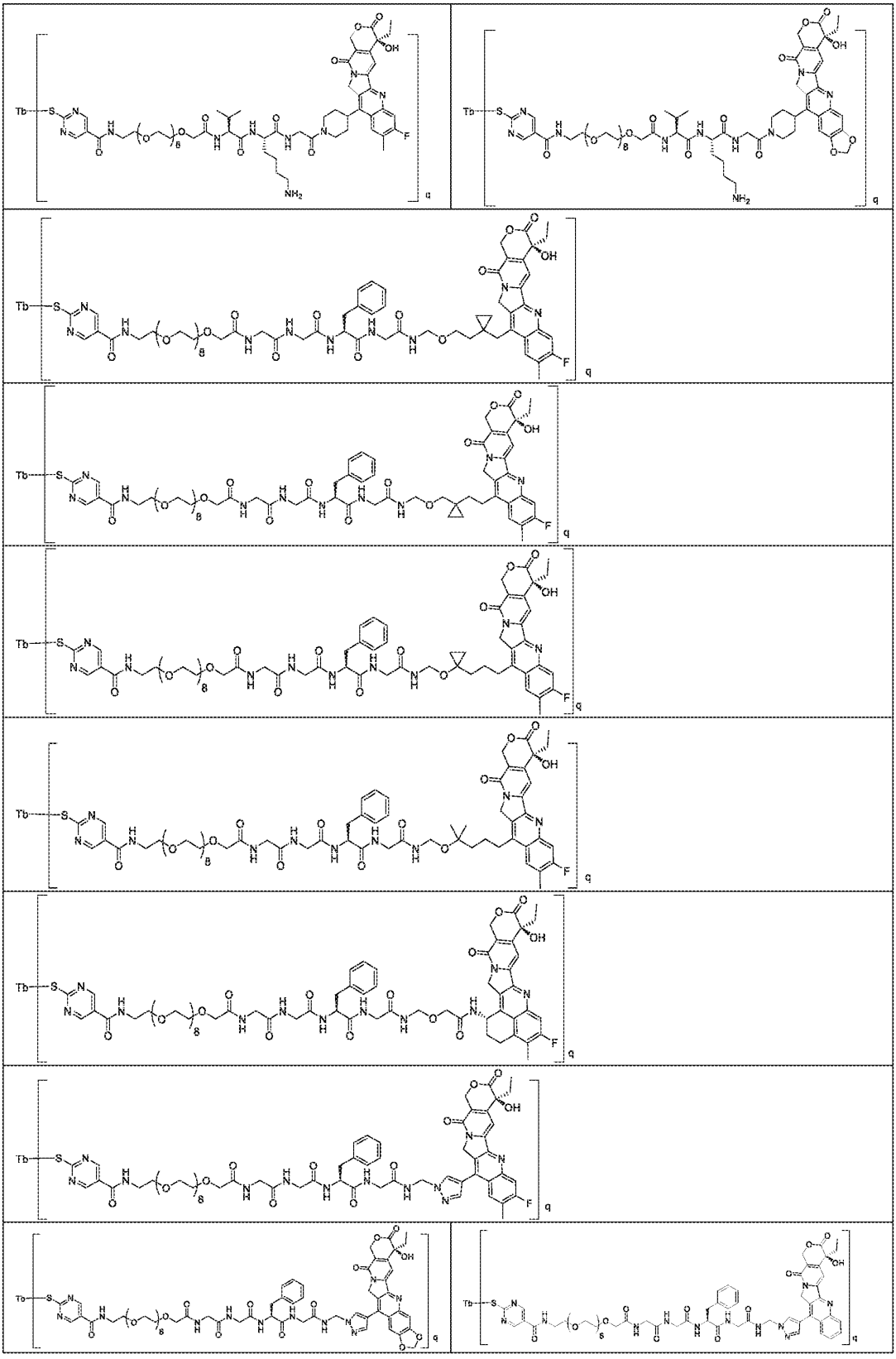


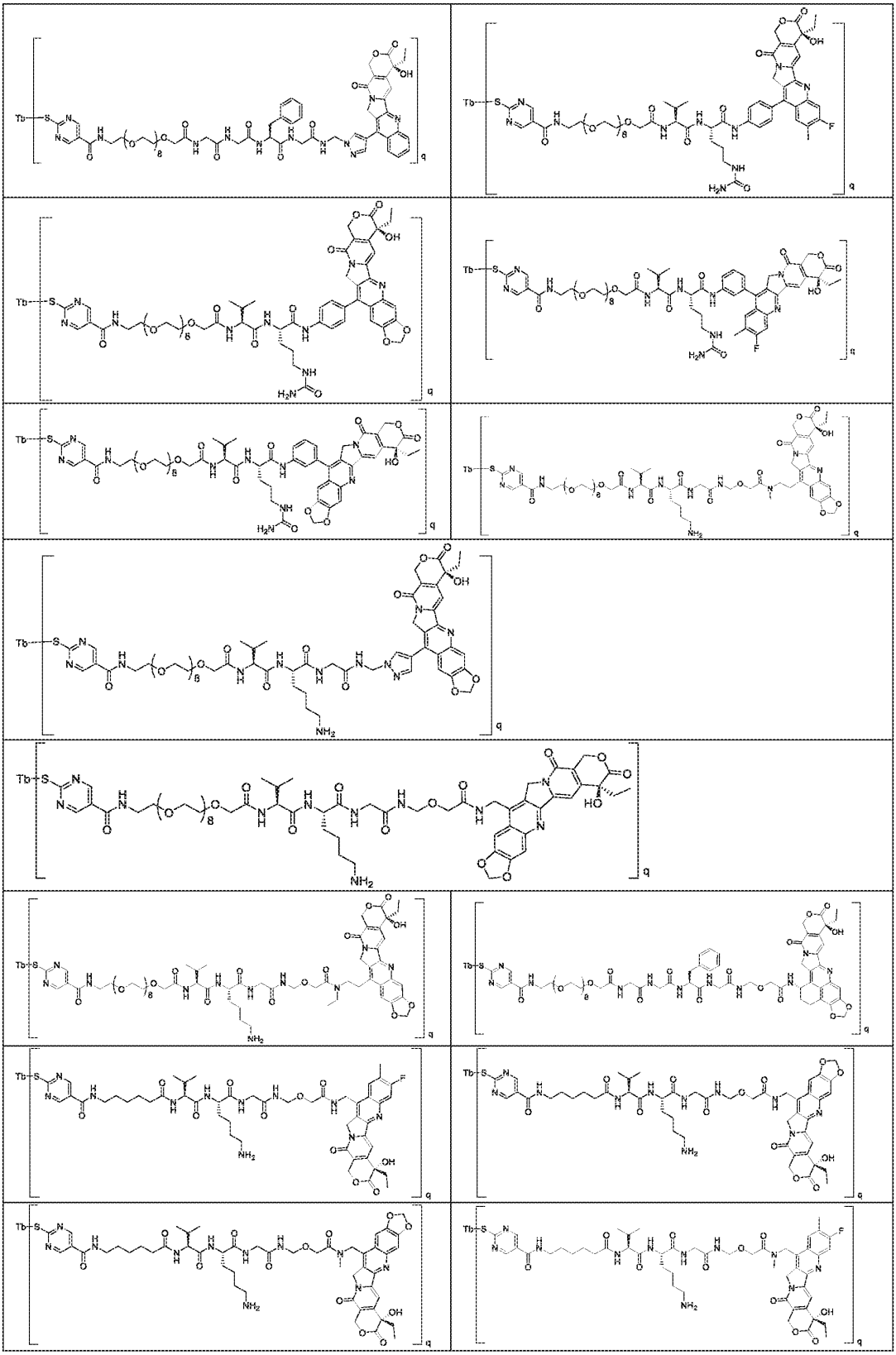


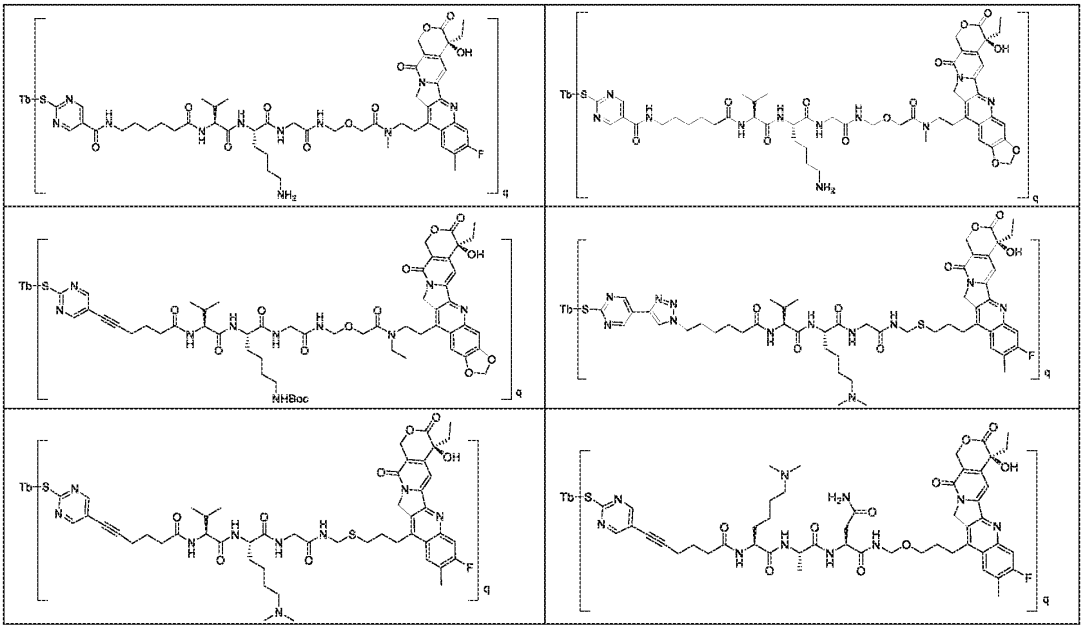






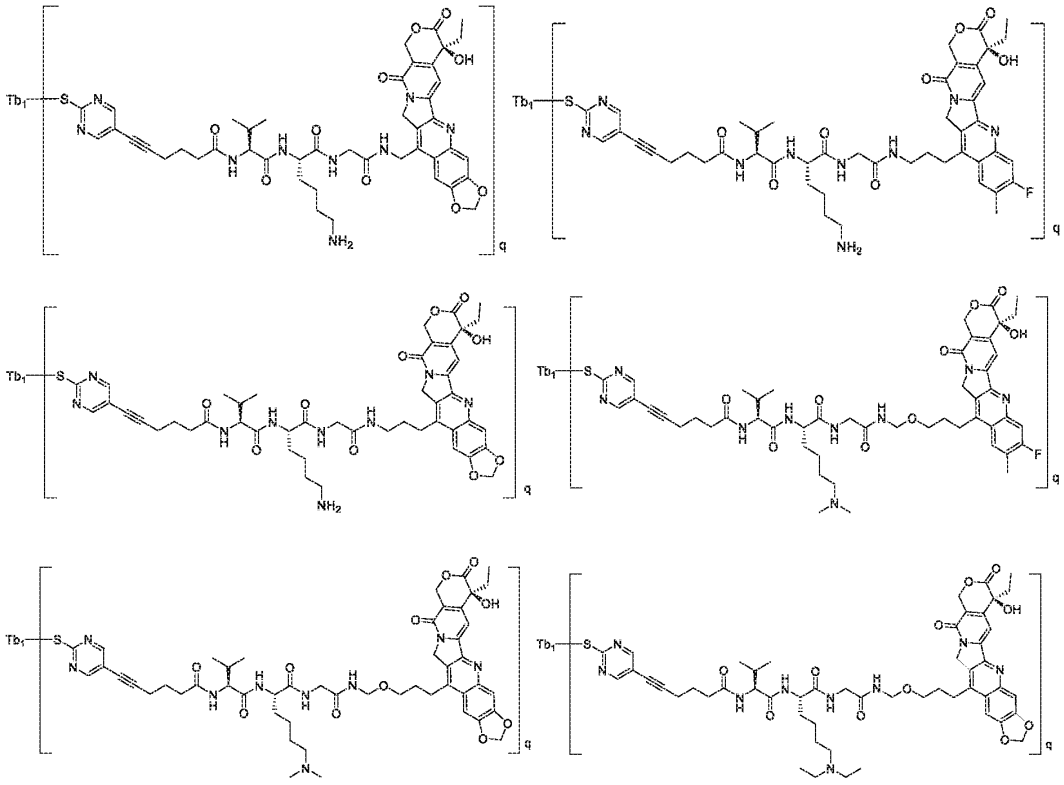


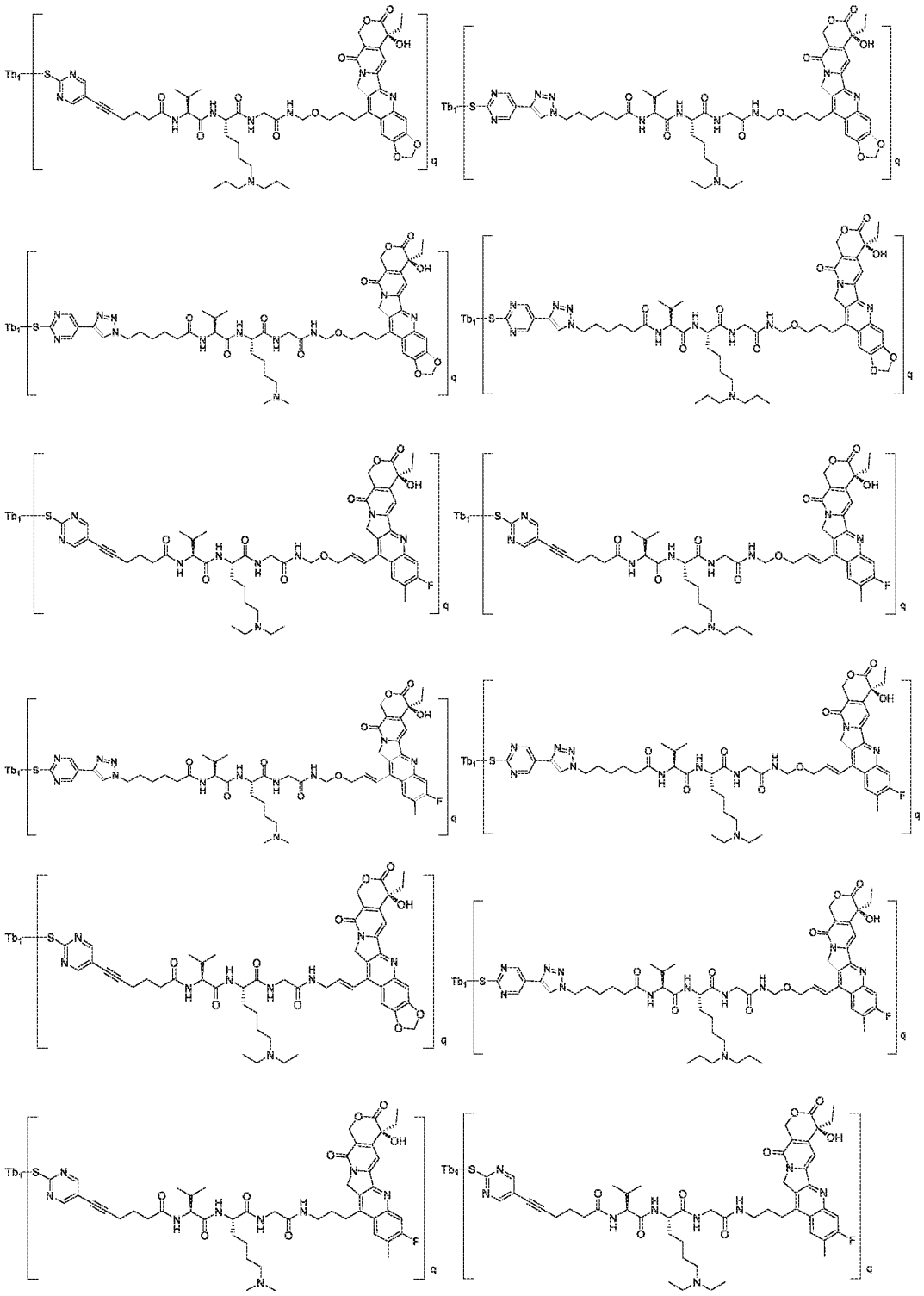


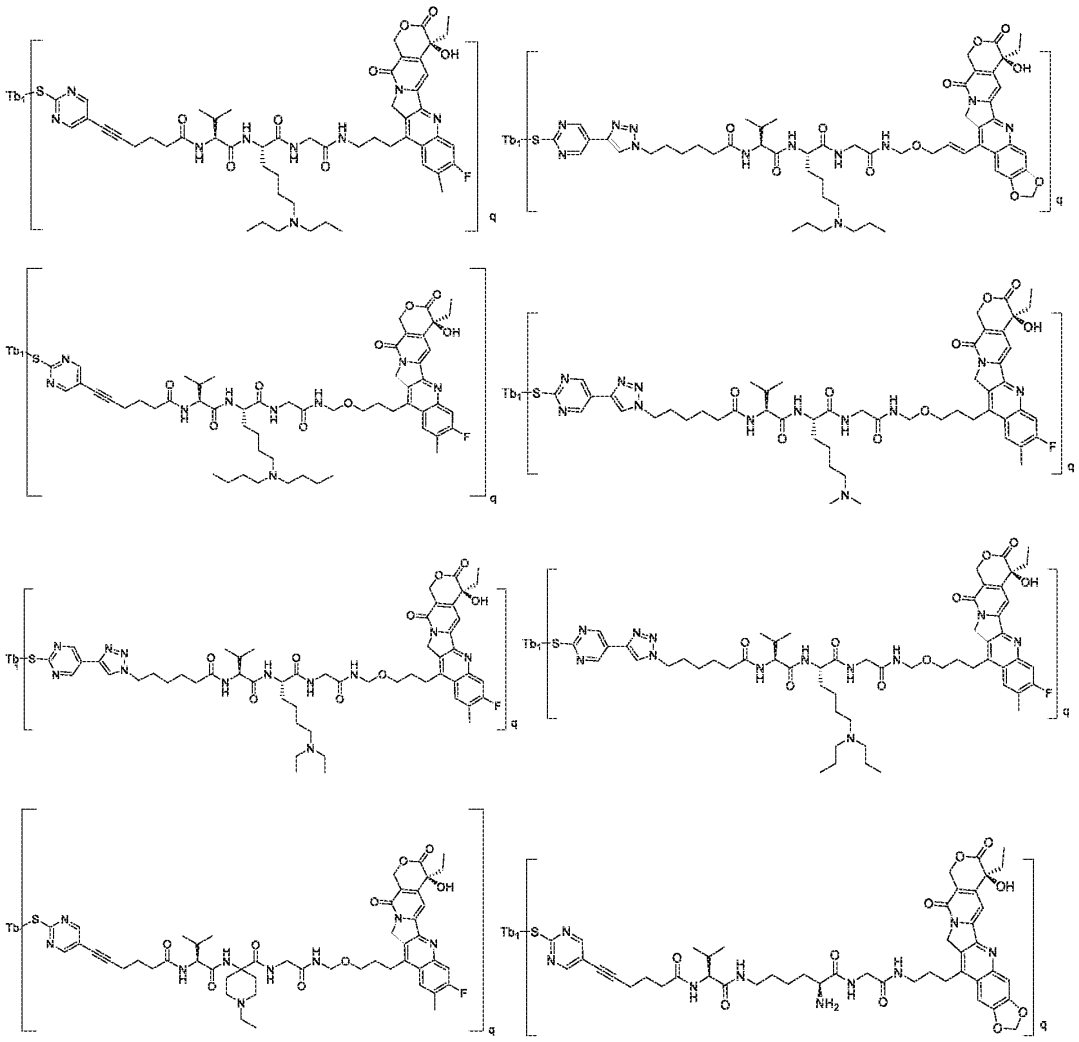


。

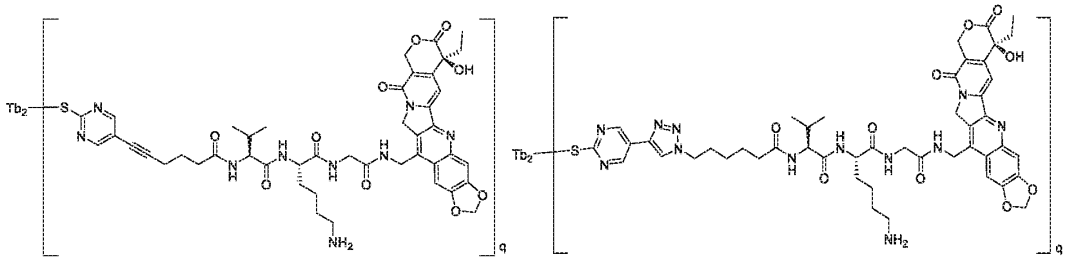
24.权利要求 1-23 中任一项所述的配体药物偶联物或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其特征在于，其中，所述配体药物偶联物选自：

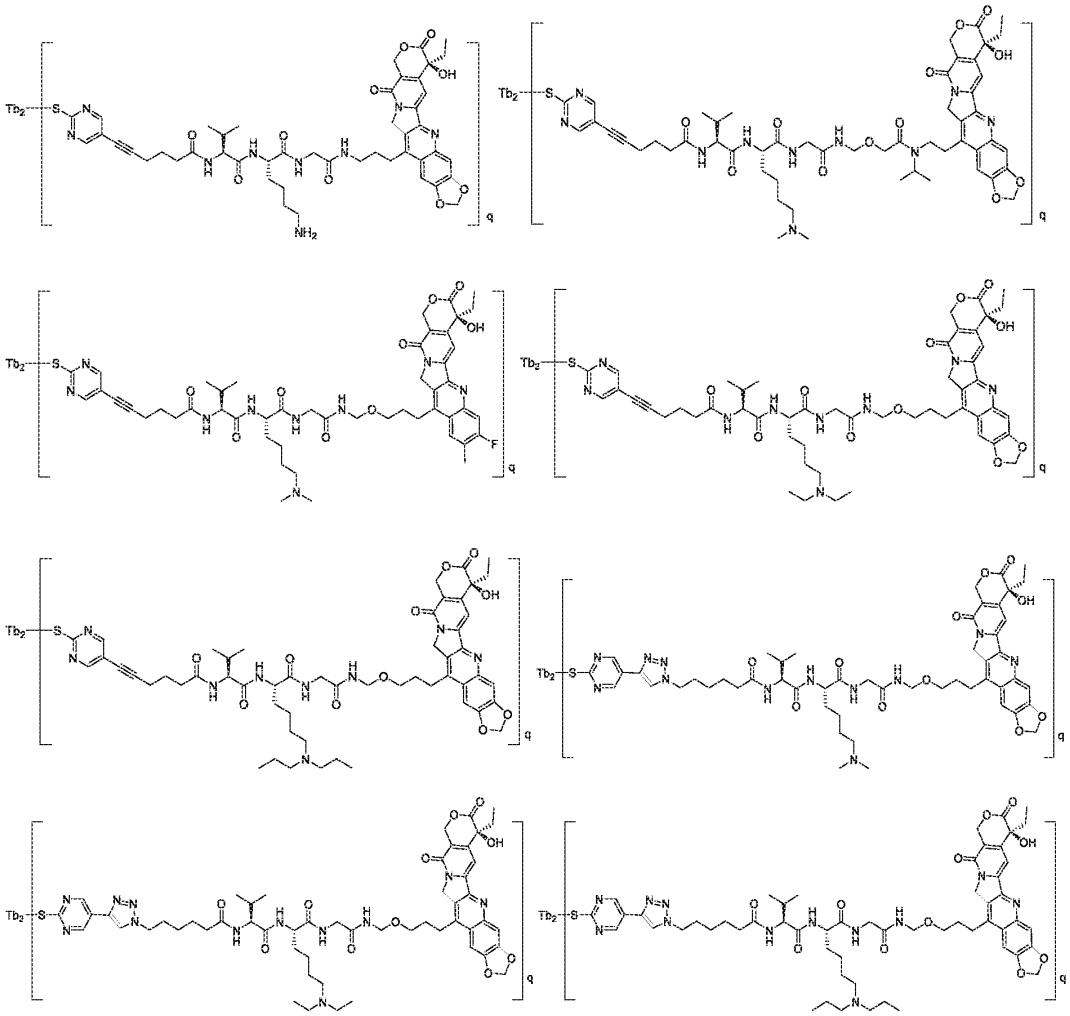




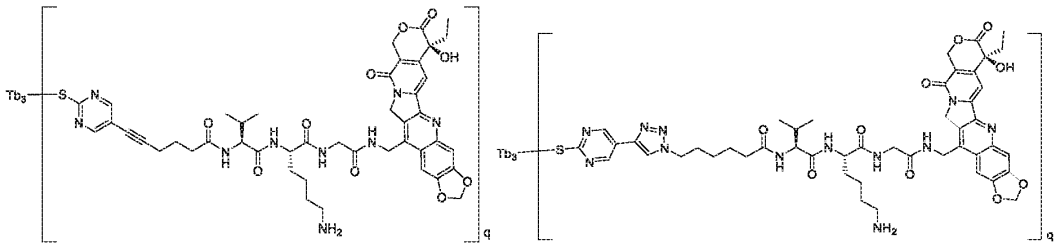


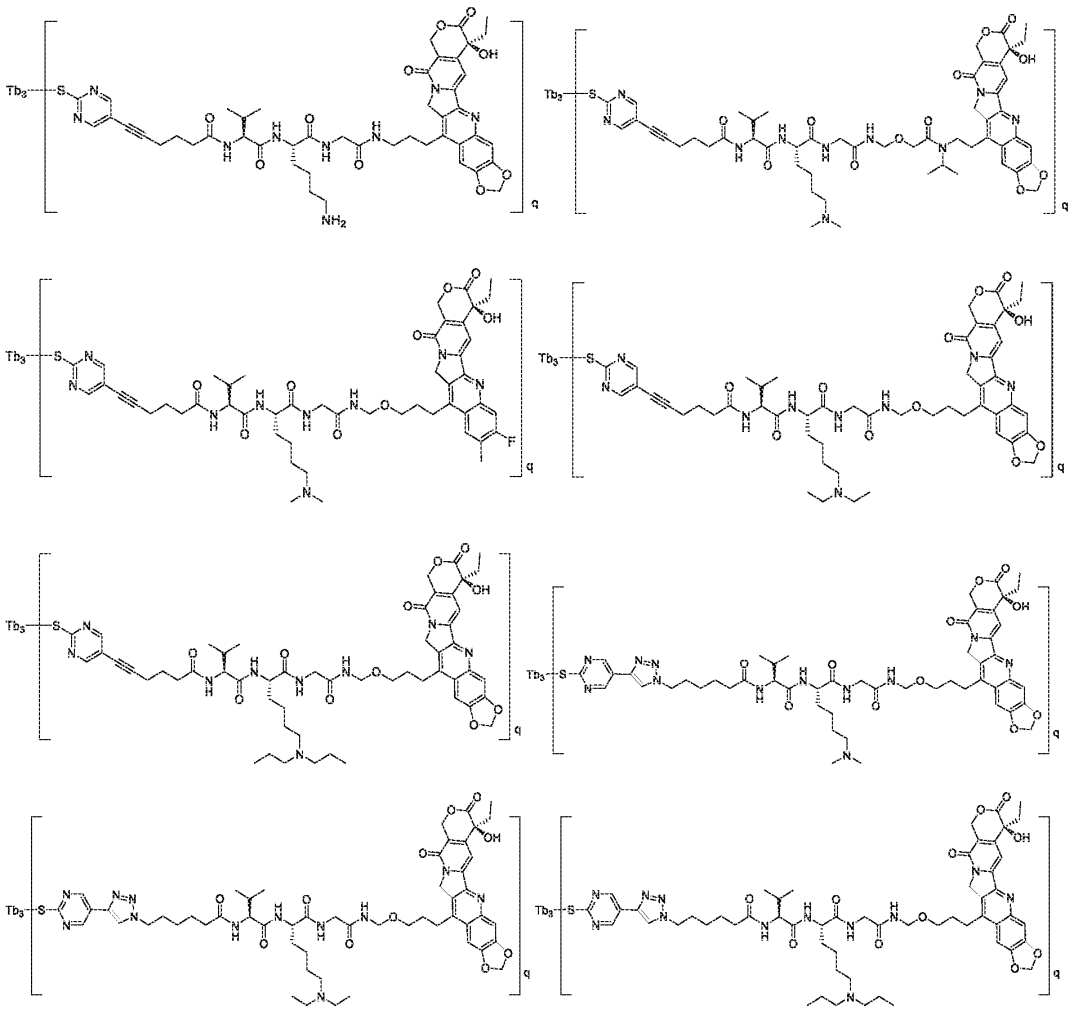
其中，Tb_1 为抗 B7H3 抗体或其抗原结合片段，例如 enoblituzumab，mirzotamab， omburtamab，1D1-01，2E3-02 抗体；q 选自 0.1-16.0 之间的任意数值，优选 2-8 之间的任意数值，更优选地，q 为 2、4、6 或 8；



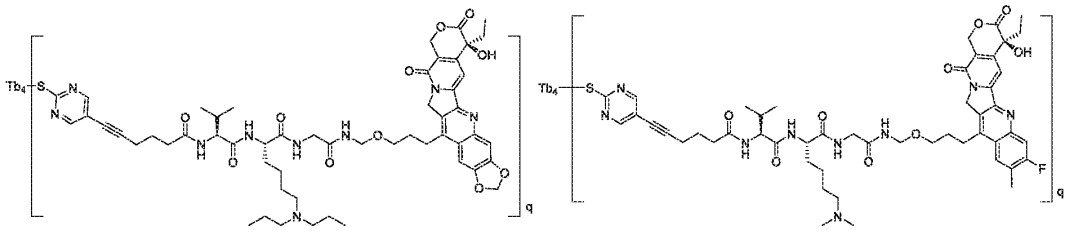


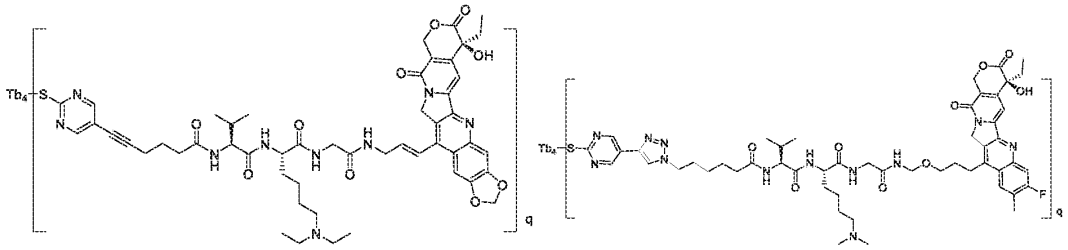
其中，Tb_2 为抗 Trop-2 抗体或其抗原结合片段，例如 datopotamab, sacituzumab；q 选自 0.1-16.0 之间的任意数值，优选 2-8 之间的任意数值，更优选地，q 为 2、4、6 或 8；



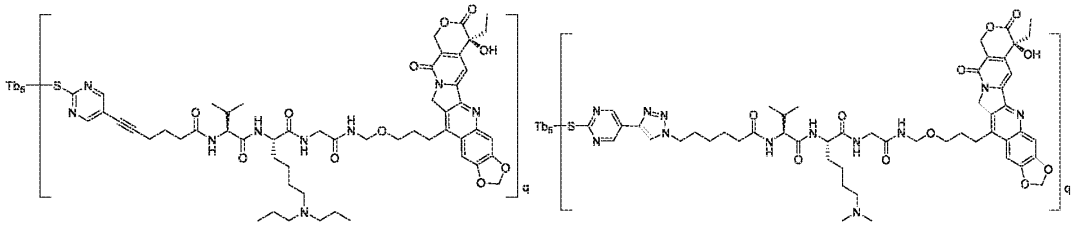


其中，Tb_3为抗Her2抗体或其抗原结合片段，例如anbenitamab，coprelotamab，disitamab，gancotamab，margetuximab，pertuzumab，timigutuzumab，zanidatamab，Trastuzumab；q选自0.1-16.0之间的任意数值，优选2-8之间的任意数值，更优选地，q为2、4、6或8；

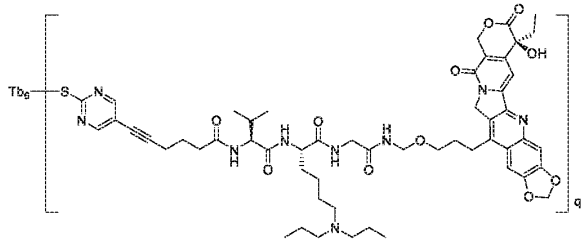




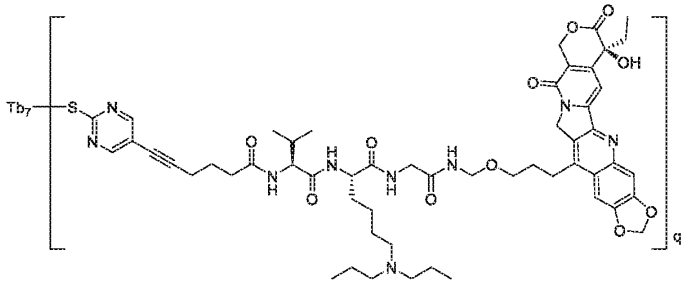
其中，Tb_4 为抗 Her3 抗体或其抗原结合片段，例如 barecetamab，duligotuzumab，elgemtumab，lumretuzumab，patritumab，seribantumab，IMGT/mAb-DB ID：546 所示的抗体；q 选自 0.1-16.0 之间的任意数值，优选 2-8 之间的任意数值，更优选地，q 为 2、4、6 或 8；



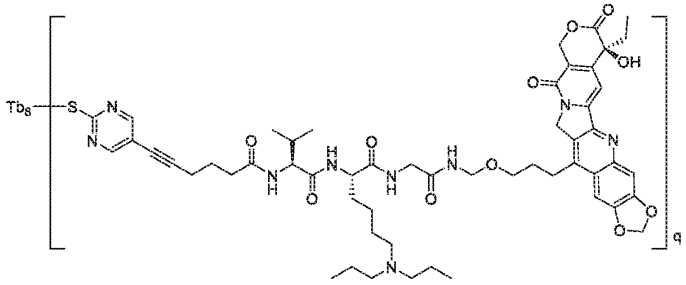
其中，Tb_5 为抗 EGFR 抗体或其抗原结合片段，例如 demupitamab，depatuxizumab，futuximab，imgatuzumab，laprituximab，losatuxizumab，matuzumab，modotuximab，necitumumab，nimotuzumab，panitumumab，pimurutamab，serclutamab，tomuzotuximab，zalutumumab，Cetuximab；q 选自 0.1-16.0 之间的任意数值，优选 2-8 之间的任意数值，更优选地，q 为 2、4、6 或 8；



其中，Tb_6 为无肿瘤细胞内吞活性的且没有肿瘤细胞表面抗原结合活性的抗体，或者具有结合非内吞（例如 ALCAM/CD166）抗原活性的抗体，例如：人体内没有相应细胞表面抗原的 IgG 同型抗体，抗 CD166 的抗体；更具体的，抗鸡溶菌酶人 IgG1 同型抗体；q 选自 0.1-16.0 之间的任意数值，优选 2-8 之间的任意数值，更优选地，q 为 2、4、6 或 8；

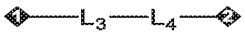


其中，Tb_7 为肿瘤细胞内吞活性较弱或无，但有肿瘤细胞表面抗原结合活性的抗体；例如所述抗体具有结合 B7H3、Her3、GD-2、Trop-2、EGFR、CD19、CD30、GPNMB、CD20、CD79b 和 BCMA 抗原但不具有内吞活性的抗体；q 选自 0.1-16.0 之间的任意数值，优选 2-8 之间的任意数值，更优选地，q 为 2、4、6 或 8；



其中，Tb_8 为具有肿瘤细胞内吞活性的且有肿瘤细胞表面抗原结合活性的抗体，例如 1D1-01，2E3-02 抗体，sacituzumab，pertuzumab，Trastuzumab 或 Cetuximab 抗体；q 选自 0.1-16.0 之间的任意数值，优选 2-8 之间的任意数值，更优选地，q 为 2、4、6 或 8。

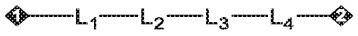
25.一种配体药物偶联物中的连接体，含如下所示片段：



其中，2 位与生物活性分子片段相连；

L_3、L_4 的定义如权利要求 1-24 中任一项所述；

优选地，其结构如下所示：

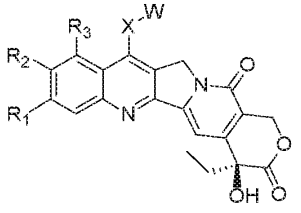


其中，1 位与和靶点结合的配体或靶向部分相连，2 位与生物活性分子片段相连；

L_3、L_4 的定义如权利要求 1-24 中任一项所述；

较佳地，所述的靶点结合的配体或靶向部分和所述的生物活性分子片段的定义分别如权利要求 1-24 中任一项中的 Tb 和 D 所述。

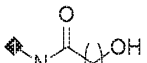
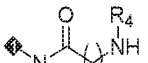
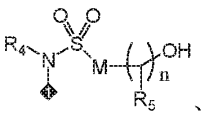
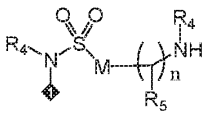
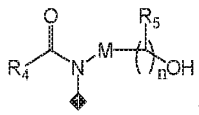
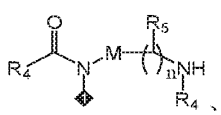
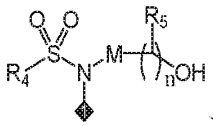
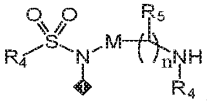
26.式 II 所示的化合物：

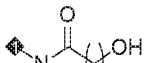
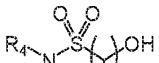
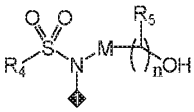


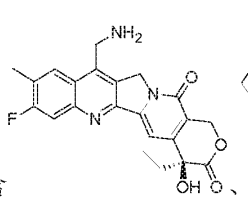
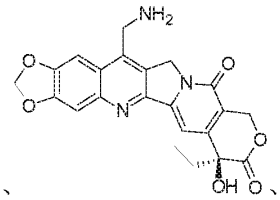
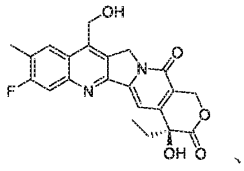
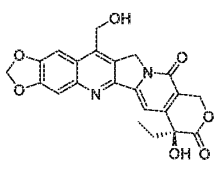
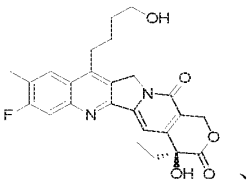
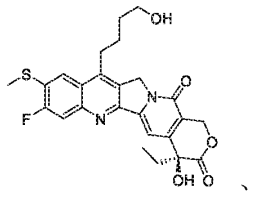
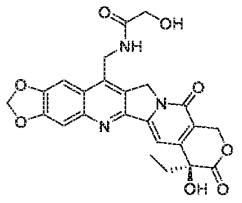
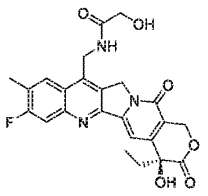
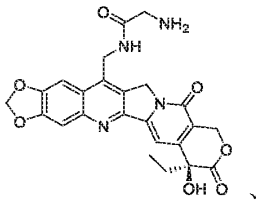
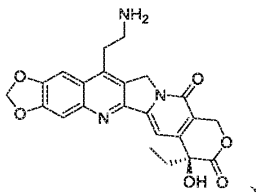
式 II

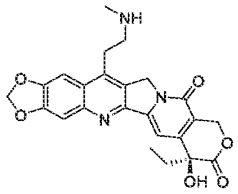
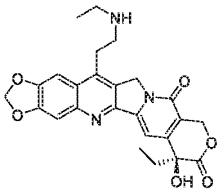
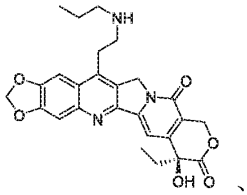
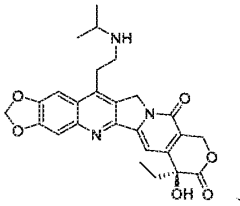
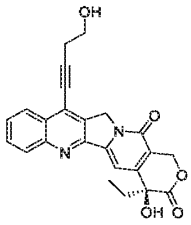
或所述化合物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐、其药学上可接受的溶剂合物或其配体药物偶联物，

其中，R_1、R_2、R_3 和 X 的定义如权利要求 13-24 中任一项所述；

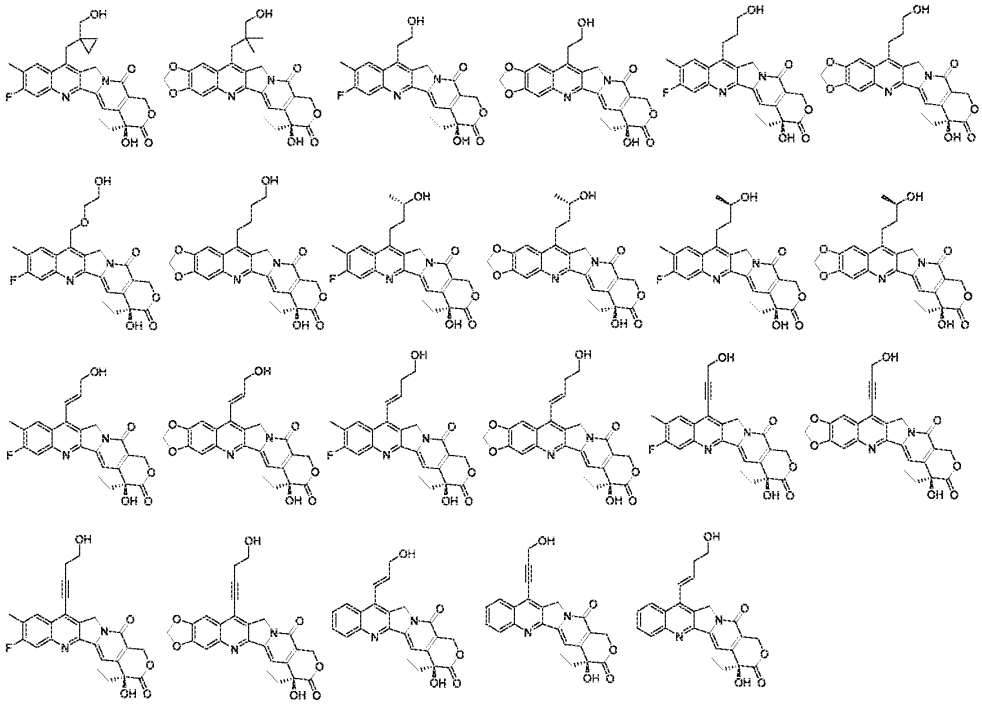
W 不存在或存在，W 存在时，W 选自-OH、-SH、-NHR_4、  、  、  、  、  、  、  、  、  ，1 位与 X 相连；

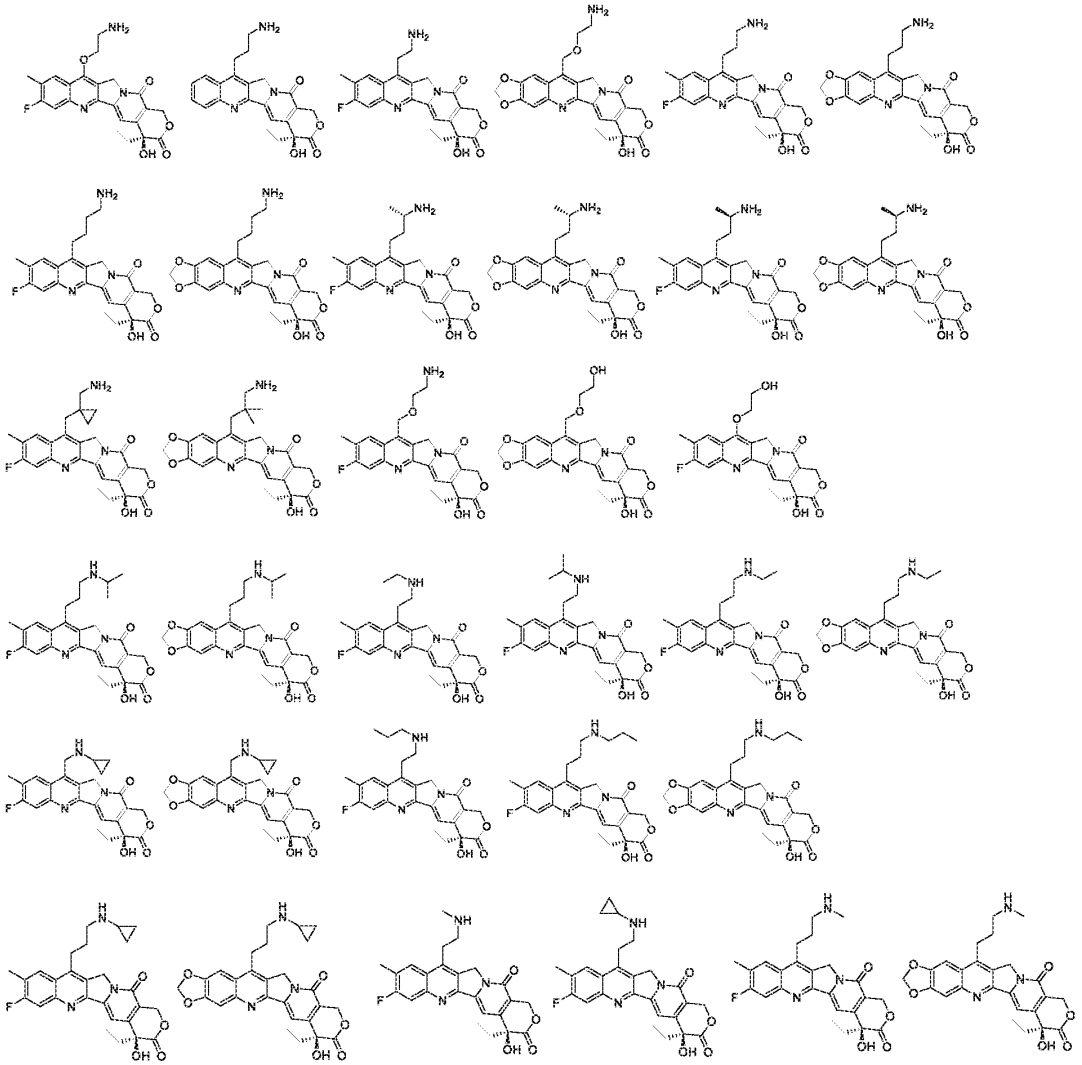
优选地，W 不存在或存在，W 存在时，W 选自-OH、-SH、-NHR_4、  、  、  ，1 位与 X 相连；

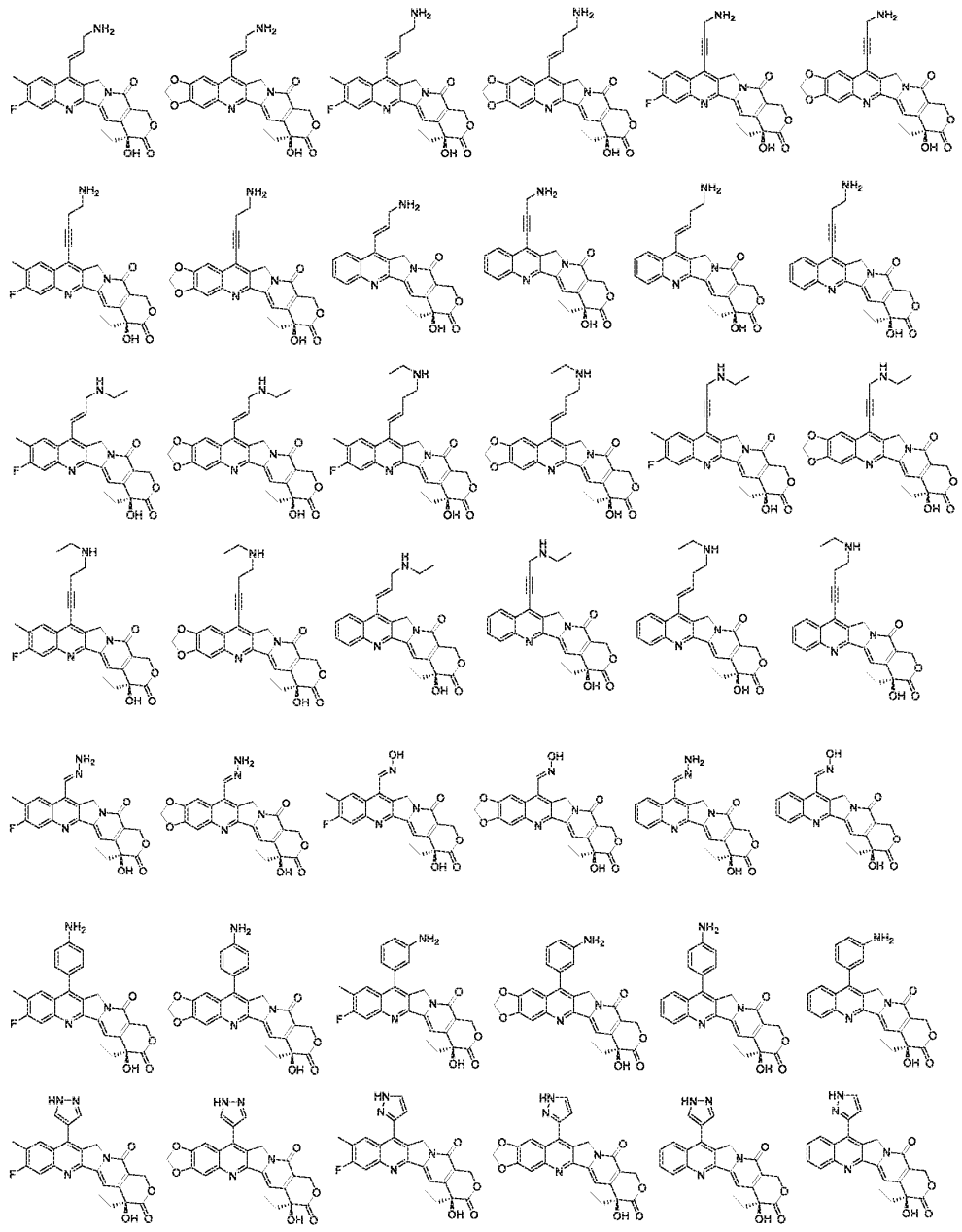
且当 W 不存在时，X 与 H 相连接；其中，当 R_1、R_2 同时为 H，且 X 为-$(CH_2)_{n1}$-，n1 为 1、2、3、4 时，W 不为-OH 或-NHR_4；且式 II 所示化合物不包含  、  、  、  、  、  、  、  、  、  、

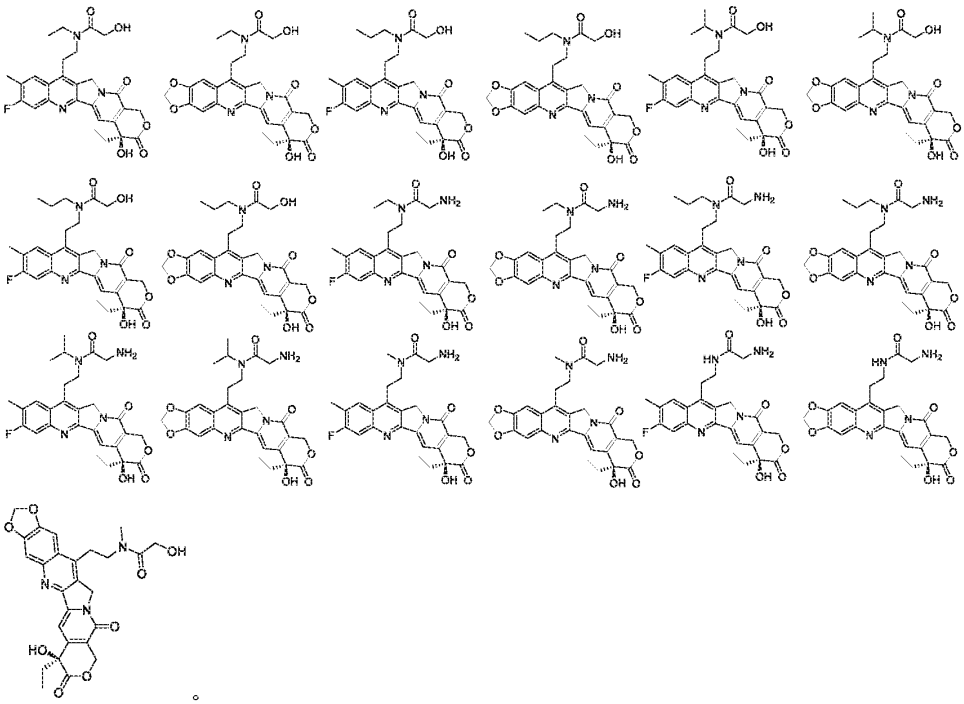

、

、

、

、

。

27.权利要求 26 化合物，其中，式 II 所示化合物选自以下：

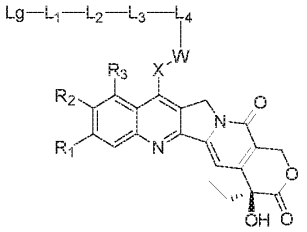








28.式 III 所示的药物连接体偶联物，



式 III

或所述药物连接体偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，

其中：

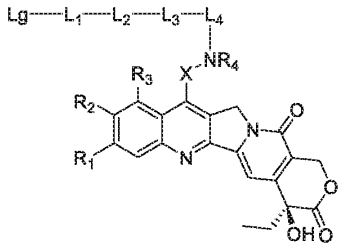
R_1、R_2、R_3、X、L1、L2、L3 和 L4 的定义如权利要求 1-24 中任一项所述；W 的定义如权利要求 13-24 中任一项所述；L1 的 1 位与 Lg 相连；

Lg 为离去基团，Lg 选自卤素、砜基、三级胺盐基（Me_3N^+、Et_3N^+）、重氮盐基、-OMs、$MeSO_2$-和 CF_3SO_3-；

优选地，Lg 选自 F、Cl 和 $MeSO_2$-；三级胺盐基选自 Me_3N^+和 Et_3N^+；

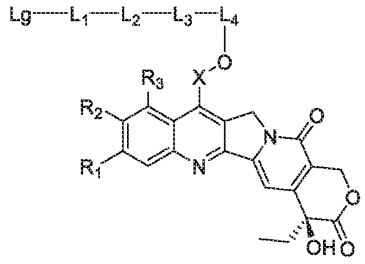
更优选地，Lg 选自 F 和 $MeSO_2$-。

29.权利要求 28 所述的药物连接体偶联物或所述药物连接体偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其特征在于，其具有式 III-(1)、式 III-(2)或式 III-(3)所式结构：



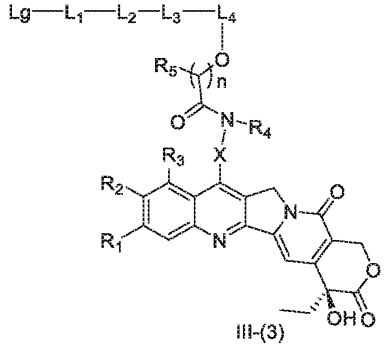
III-(1)

其中，L_1、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4 和 Lg 如权利要求 28 所定义；



III-(2)

其中，L_1、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3 和 Lg 如权利要求 28 所定义，

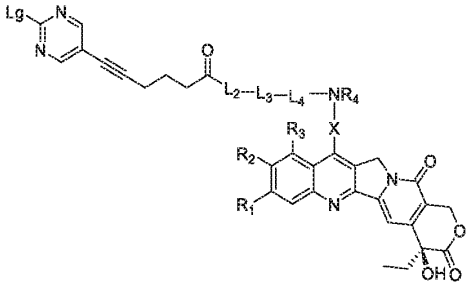


III-(3)

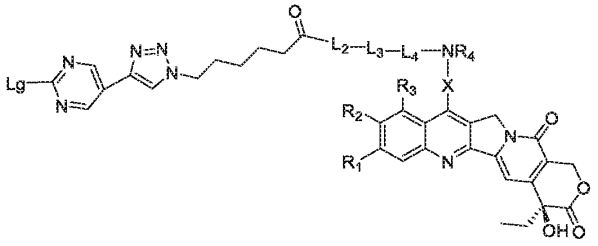
其中，L_1、L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、n 和 Lg 如权利要求 28 所定义。

30.权利要求 28 或 29 所述的药物连接体偶联物或所述药物连接体偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其特征在于，其具有式III-(1A)、III-(1B)、III-(2A)、III-(2B)、III-(3A)或 III-(3B)所式结构；

式 III-(1A)或 III-(1B)所式结构：



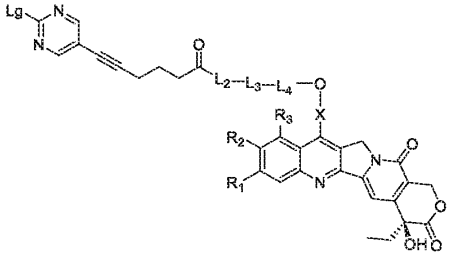
III-(1A)



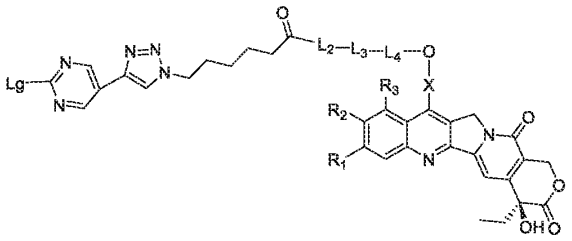
III-(1B)

其中，L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4 和 Lg 如权利要求 28 或 29 所定义；

式 III-(2A)或 III-(2B)所式结构：



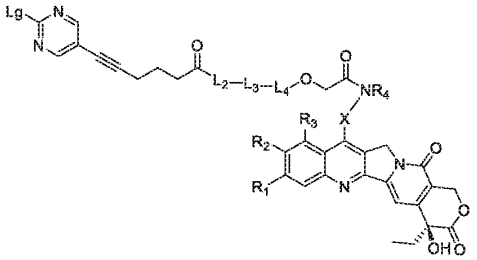
III-(2A)



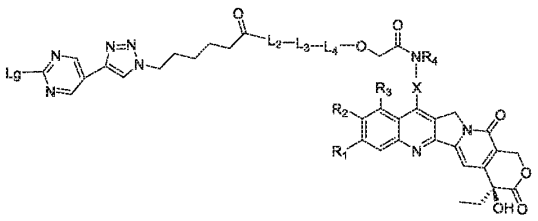
III-(2B)

其中，L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3 和 Lg 如权利要求 28 或 29 所定义；

式 III-(3A)或 III-(3B)所式结构：



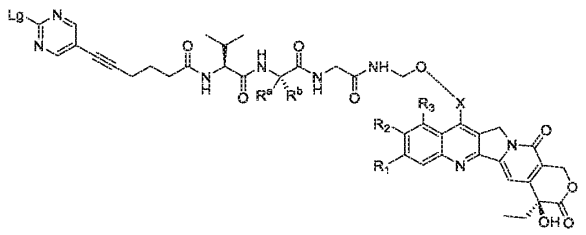
III-(3A)



III-(3B)

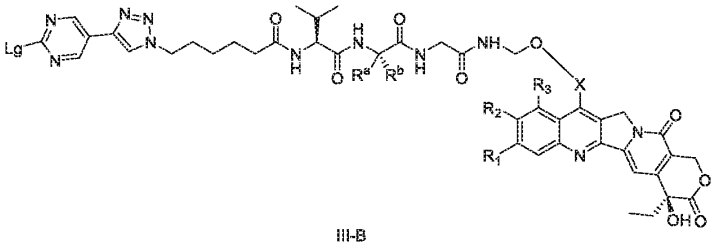
其中，L_2、L_3、L_4、X、R_1、R_2、R_3、R_4 和 Lg 如权利要求 28 或 29 所定义。

31.权利要求 28-30 中任一项所述的药物连接体偶联物或所述药物连接体偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其特征在于，其中，所述药物连接体偶联物具有式 III-A 或式 III-B 所式结构：



III-A

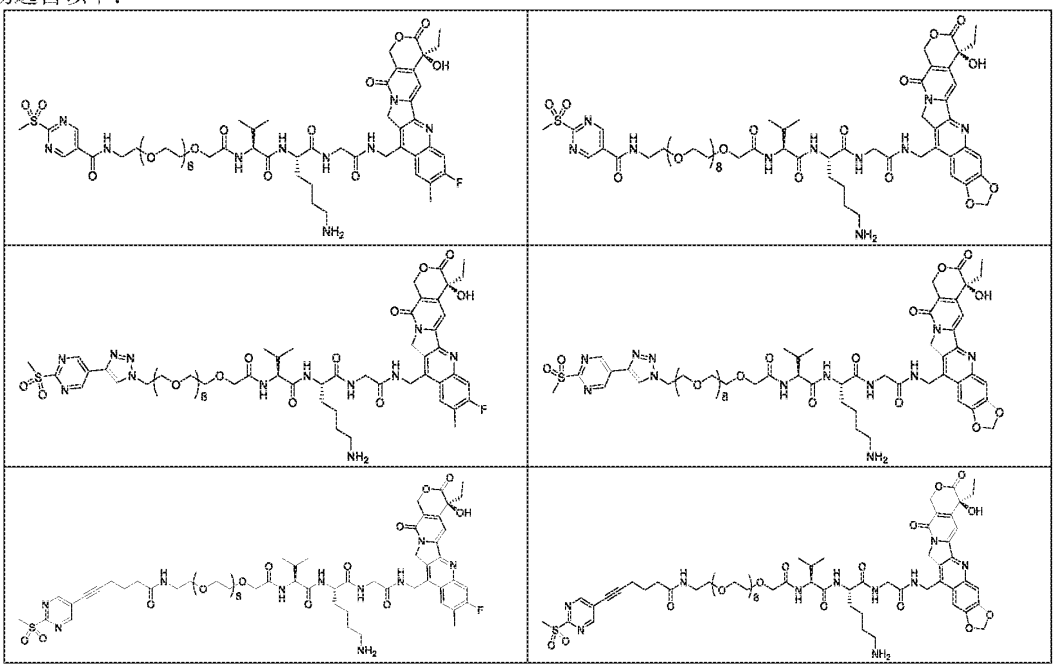
其中，Lg、X、R_1、R_2、R_3、R^a、R^b和 q 如权利要求 28-30 中任一项所定义；

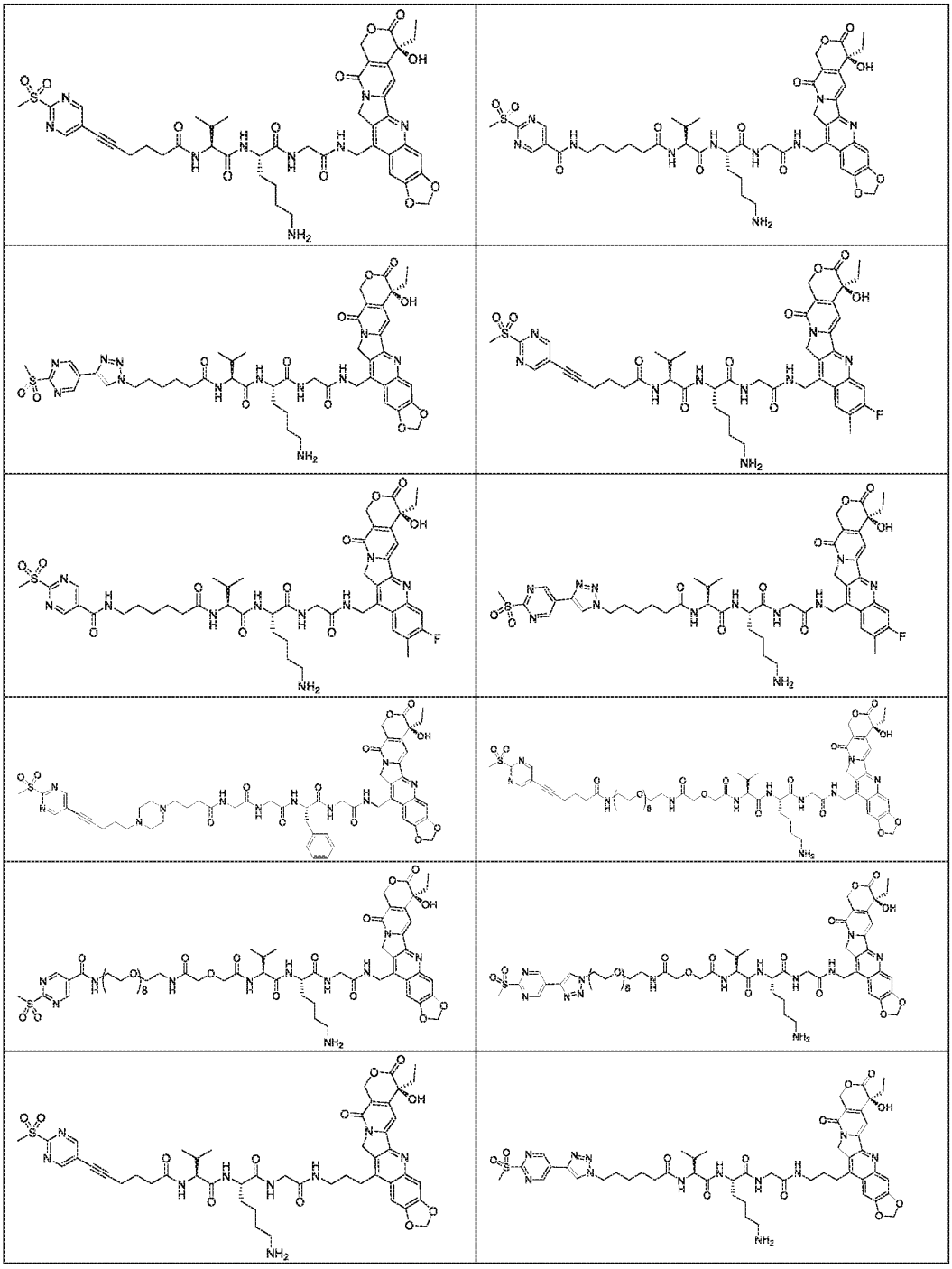


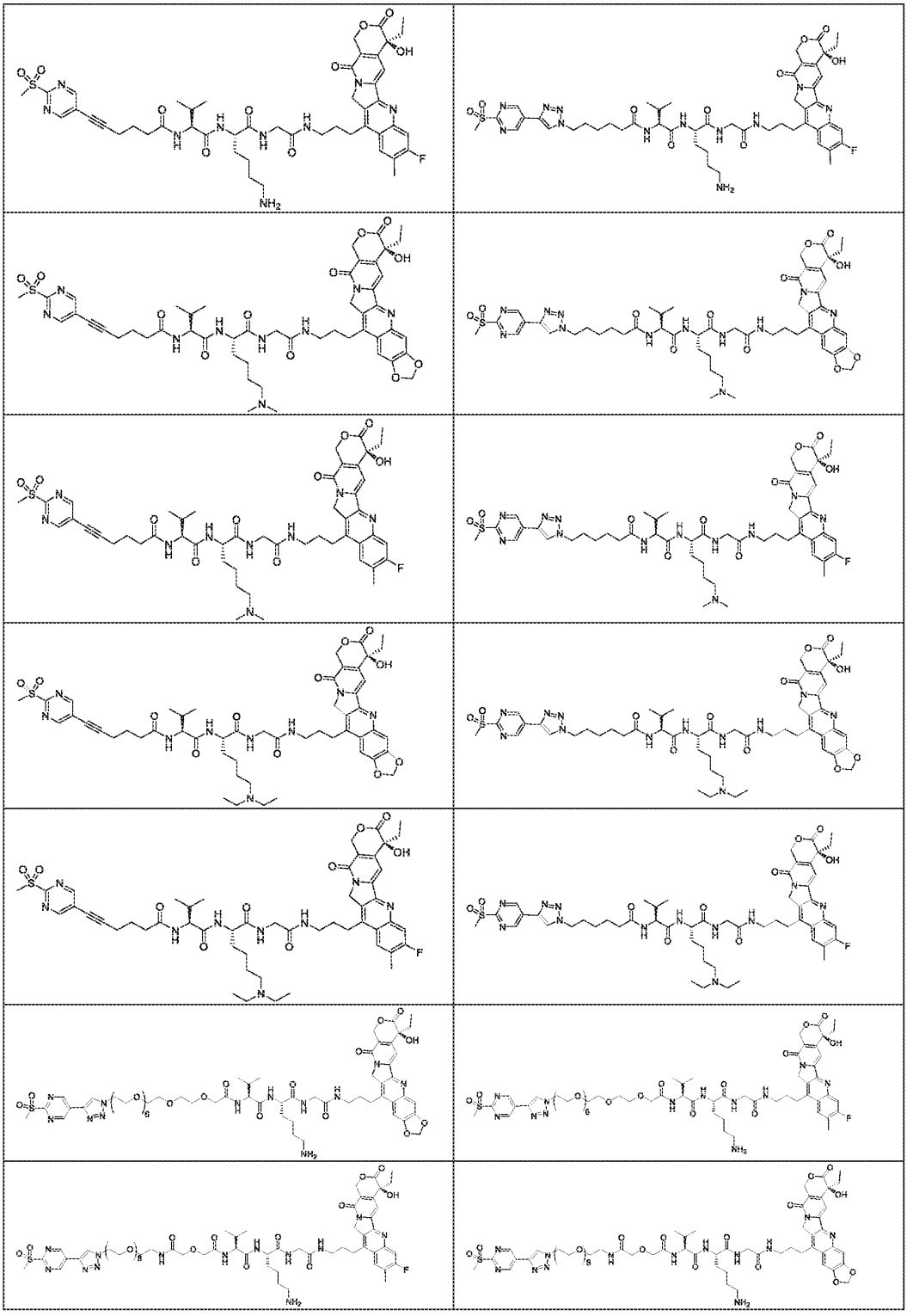
III-B

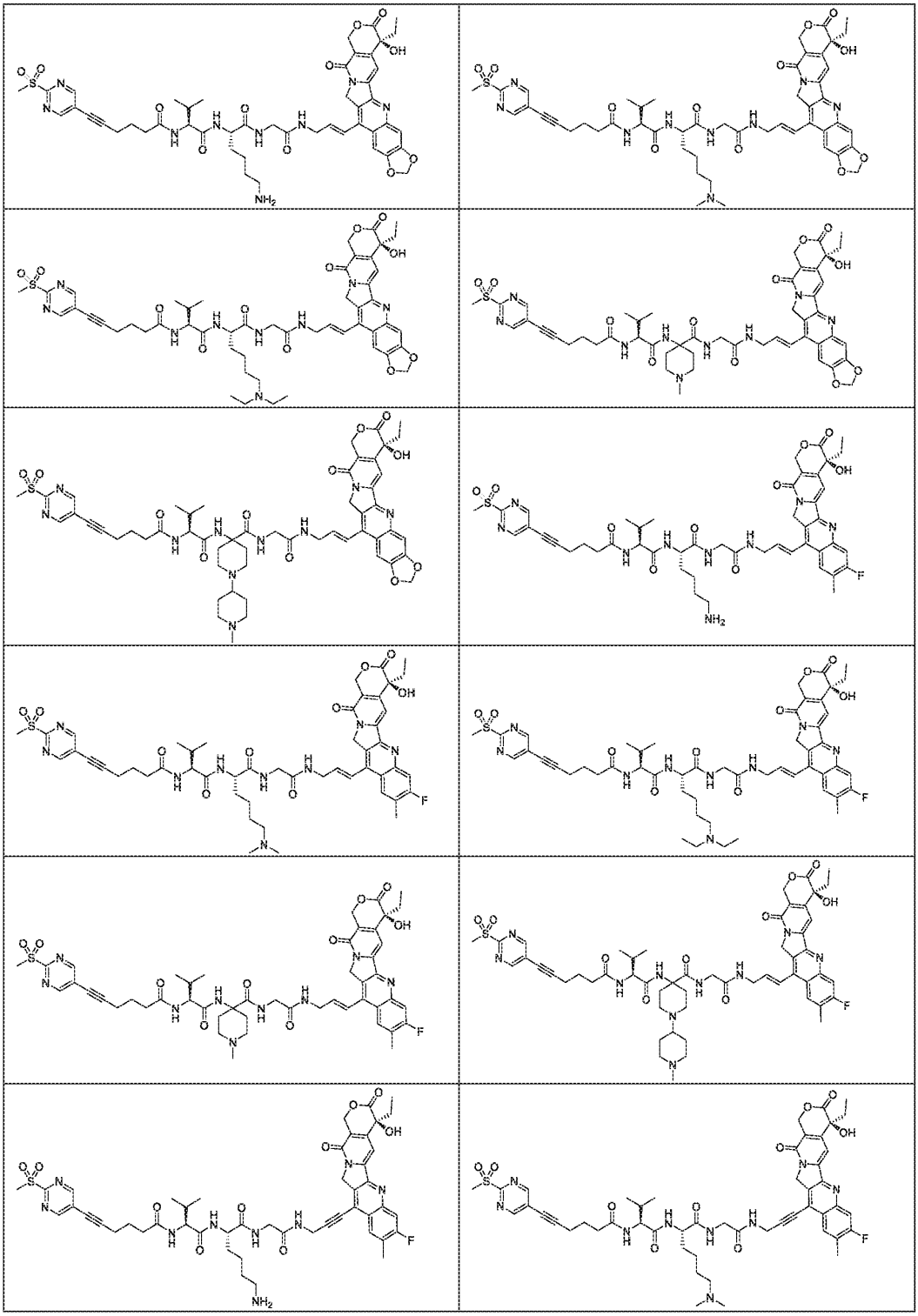
其中，Lg、X、R_1、R_2、R_3、R^a、R^b和 q 如权利要求 28-30 中任一项所定义。

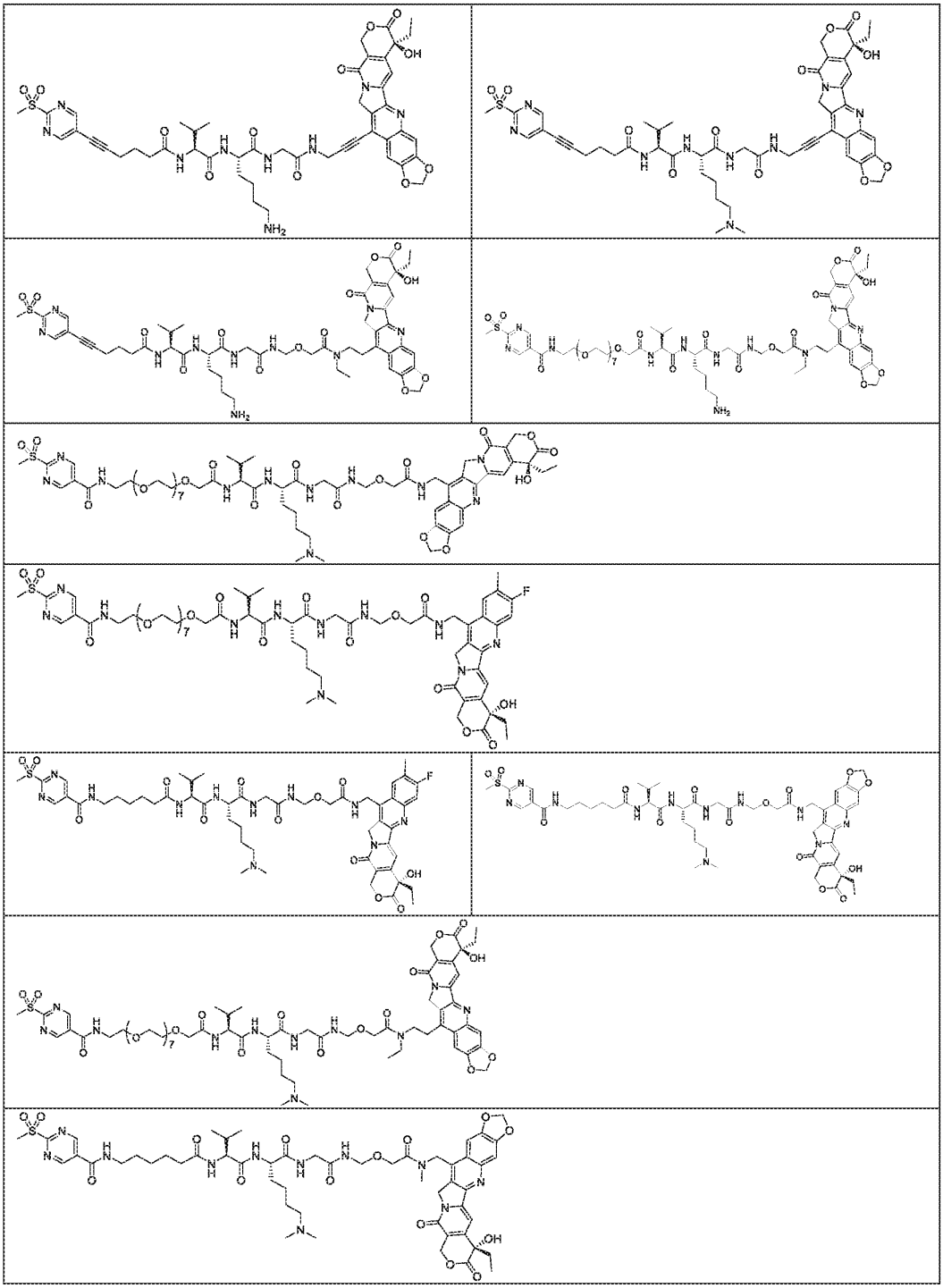
32.权利要求 28-31 中任一项所述的药物连接体偶联物或所述药物连接体偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物，其特征在于，其中，所述药物连接体偶联物选自以下：

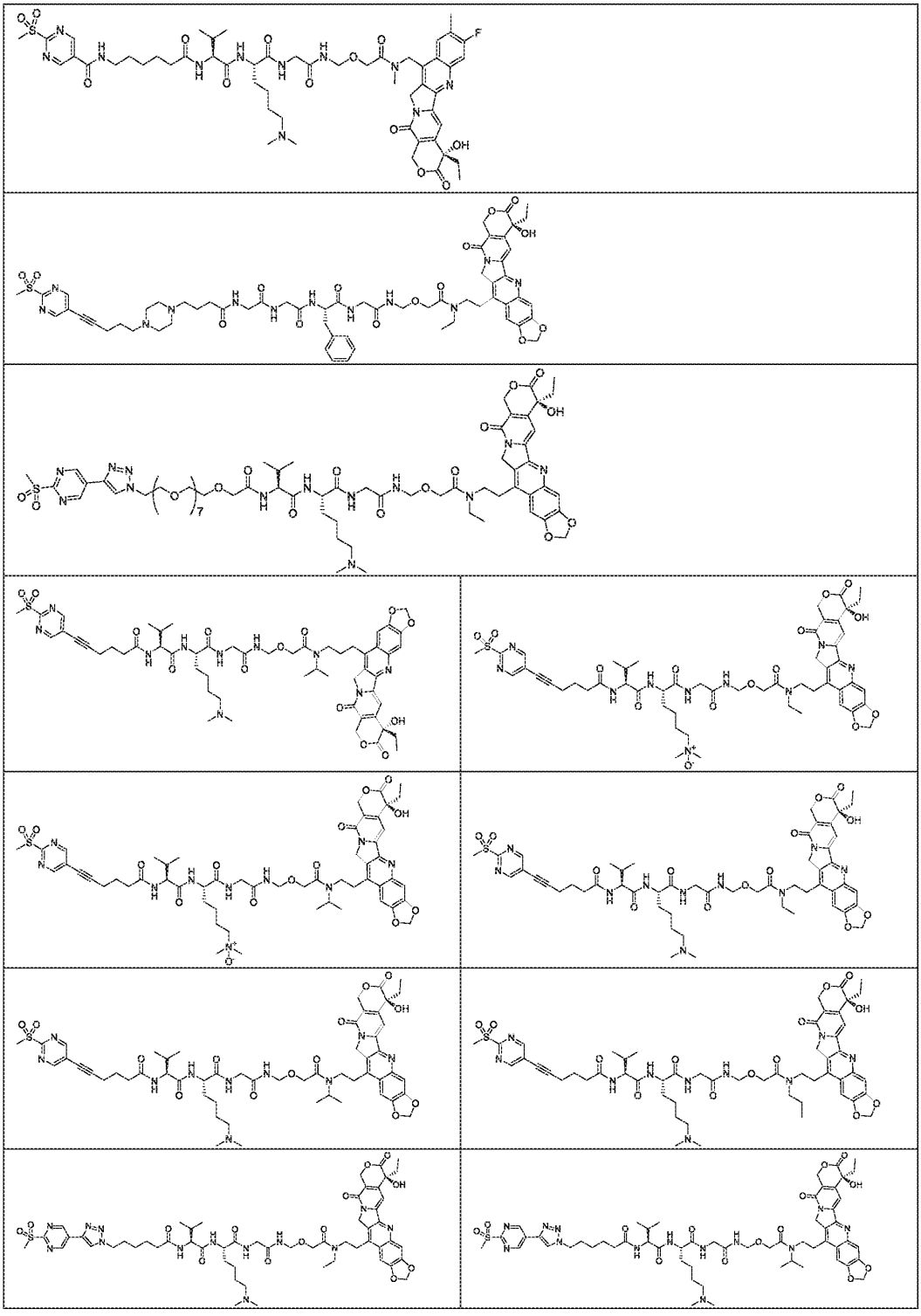


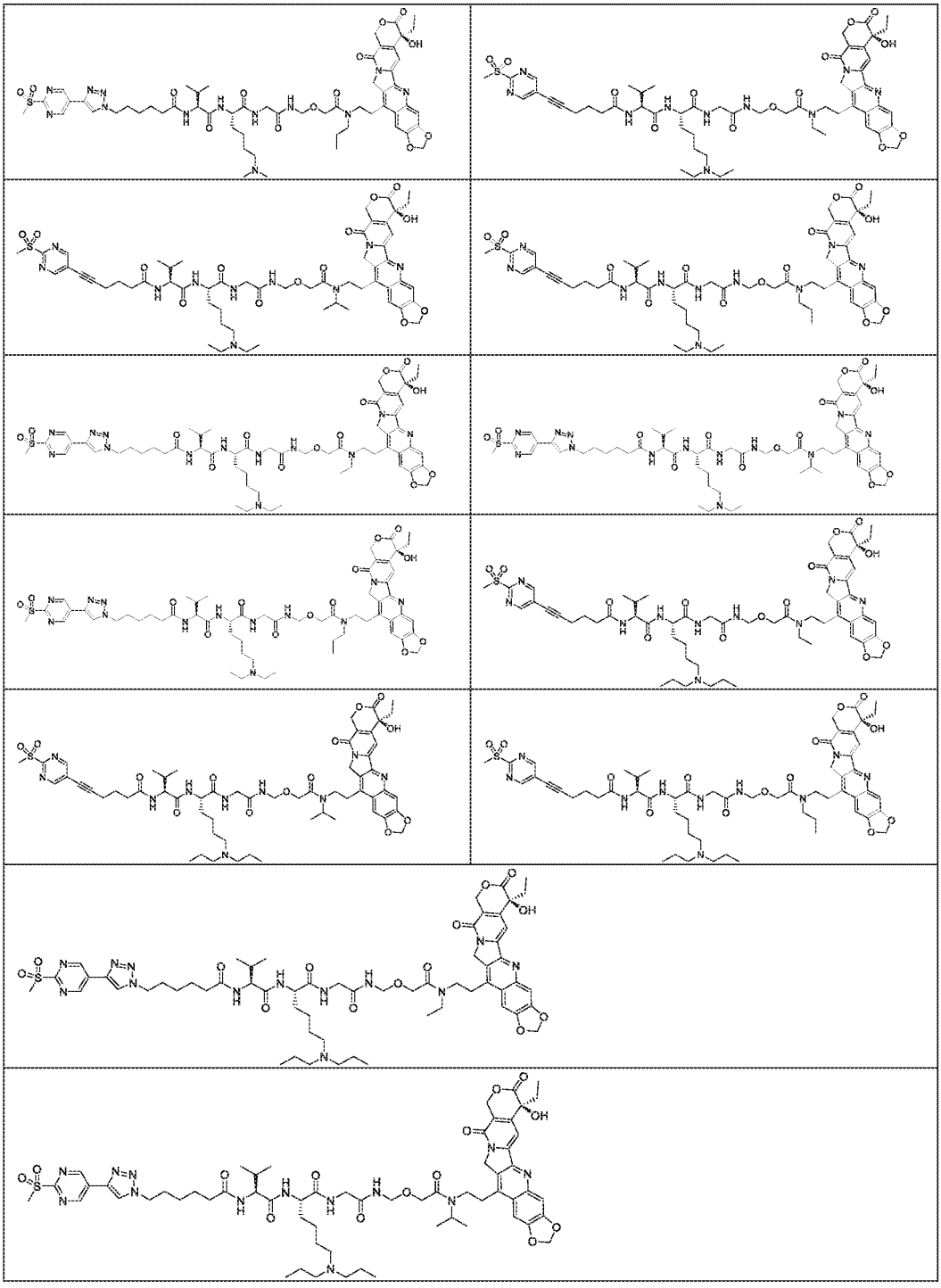


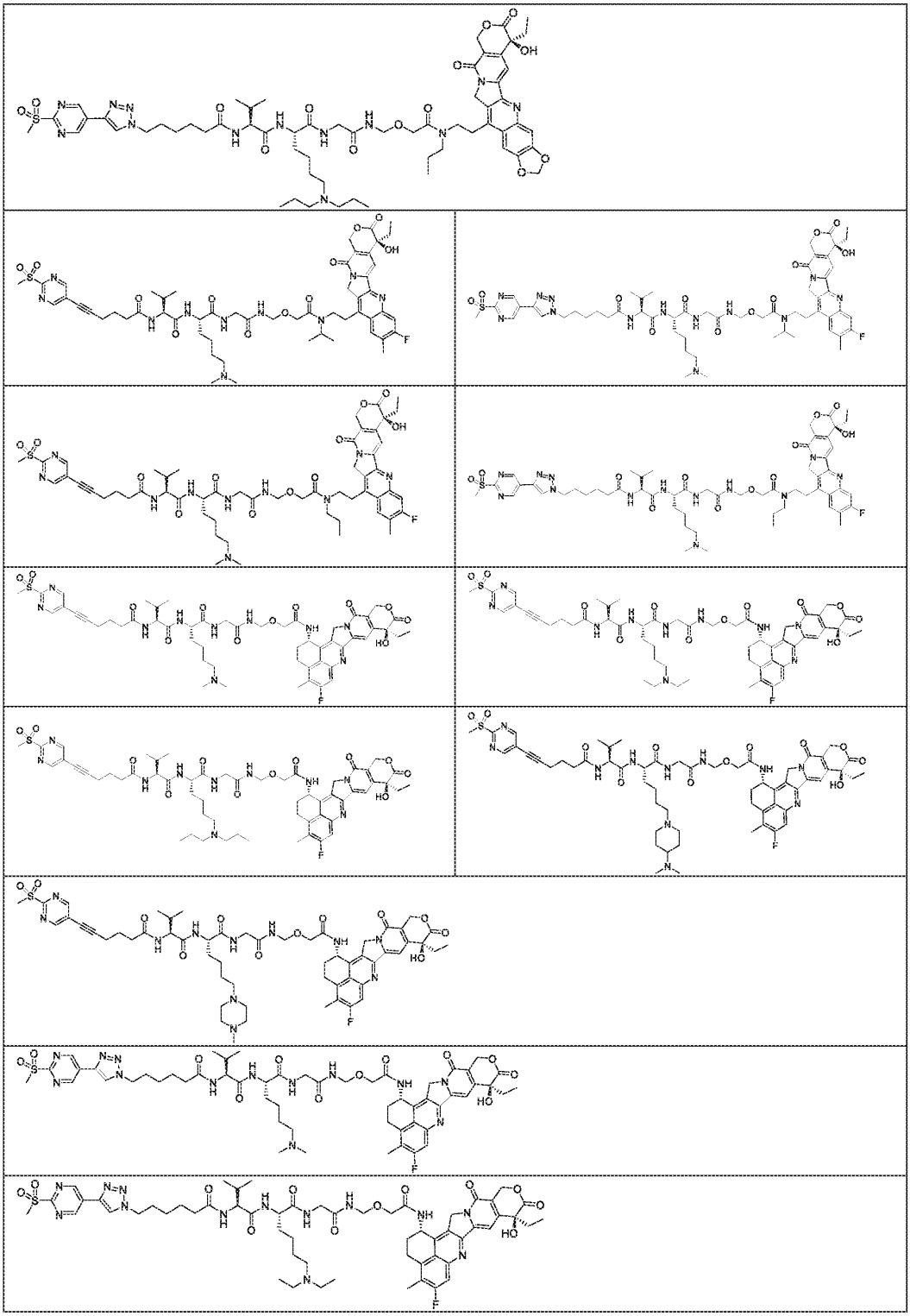


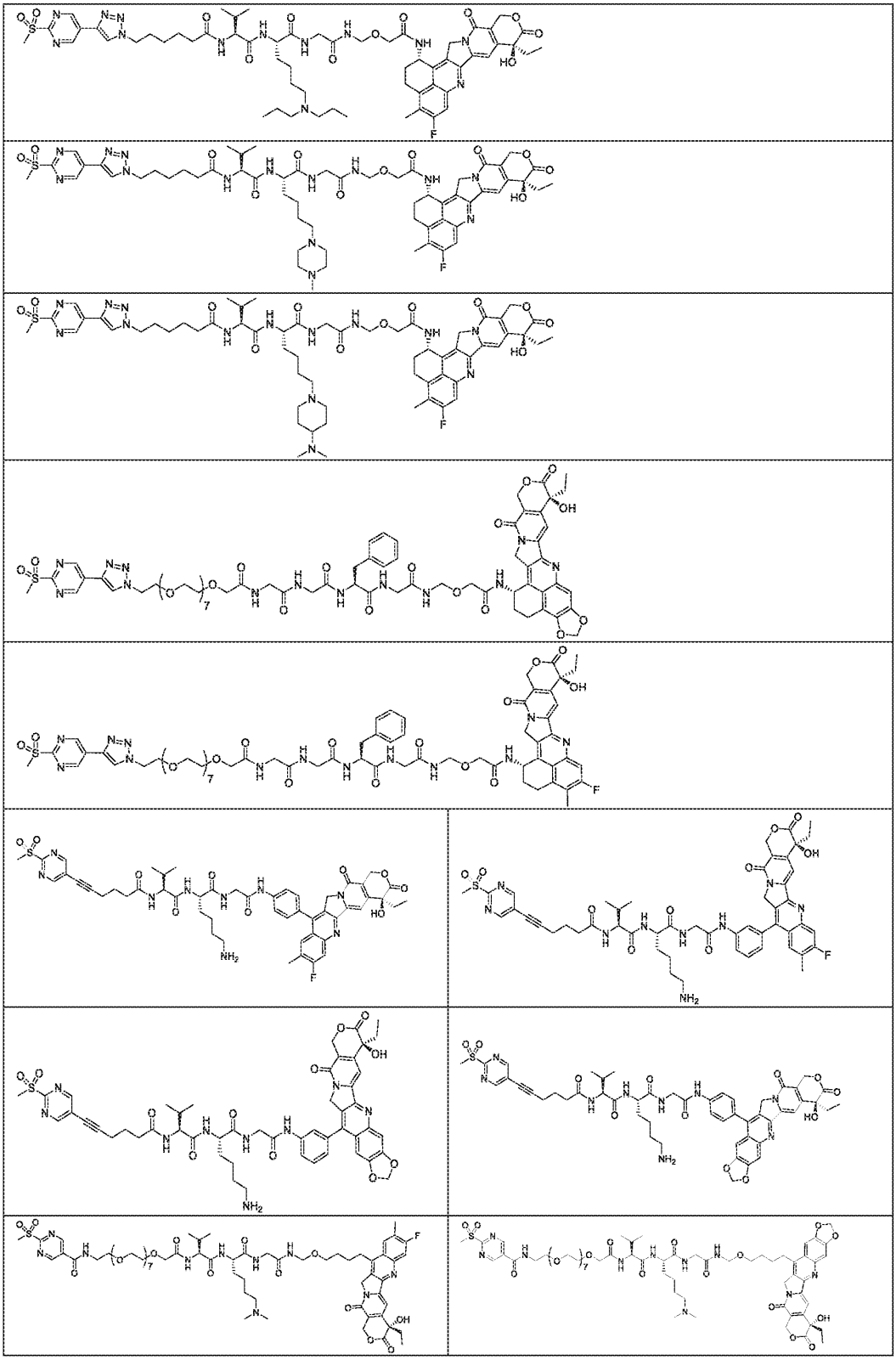


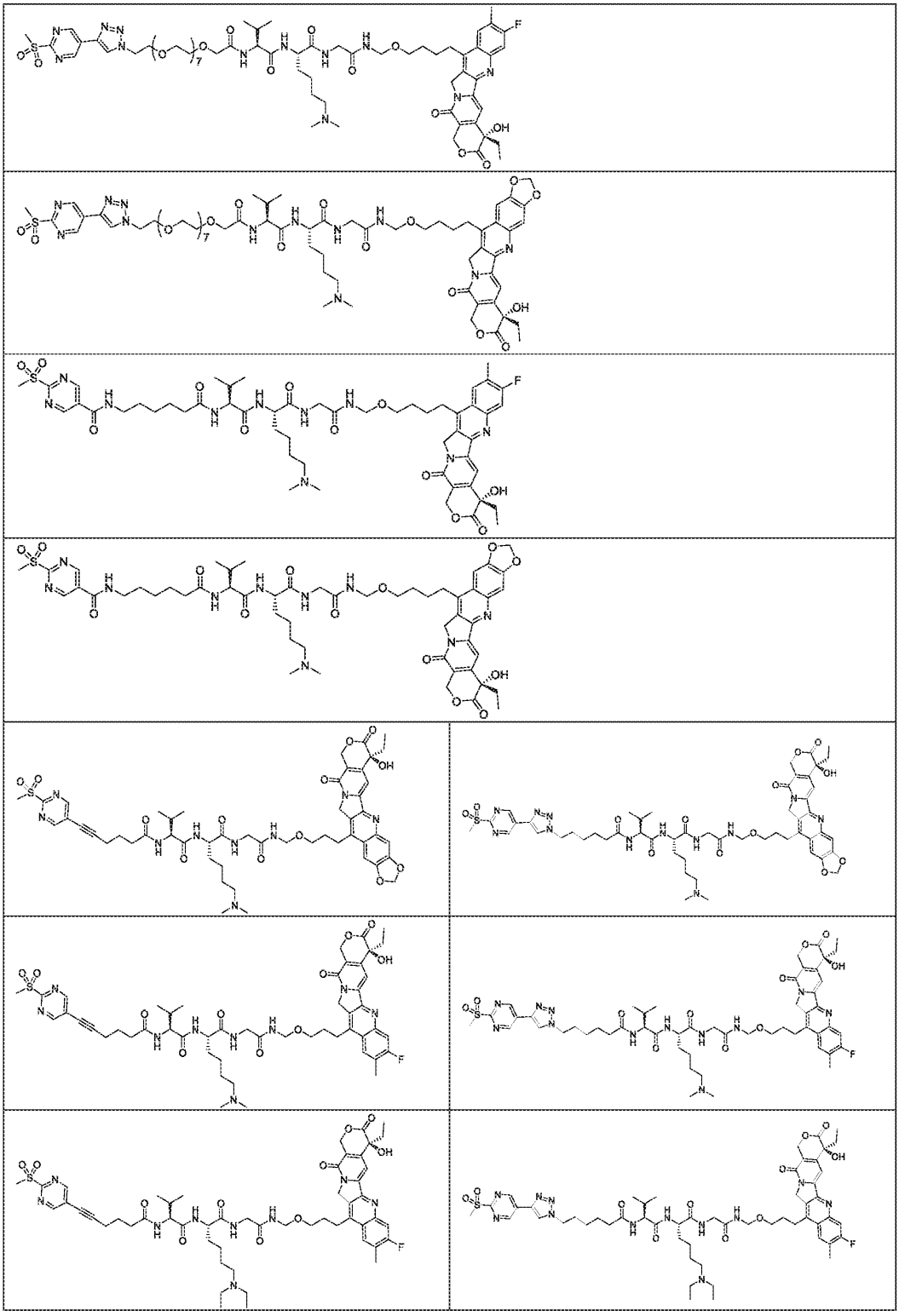


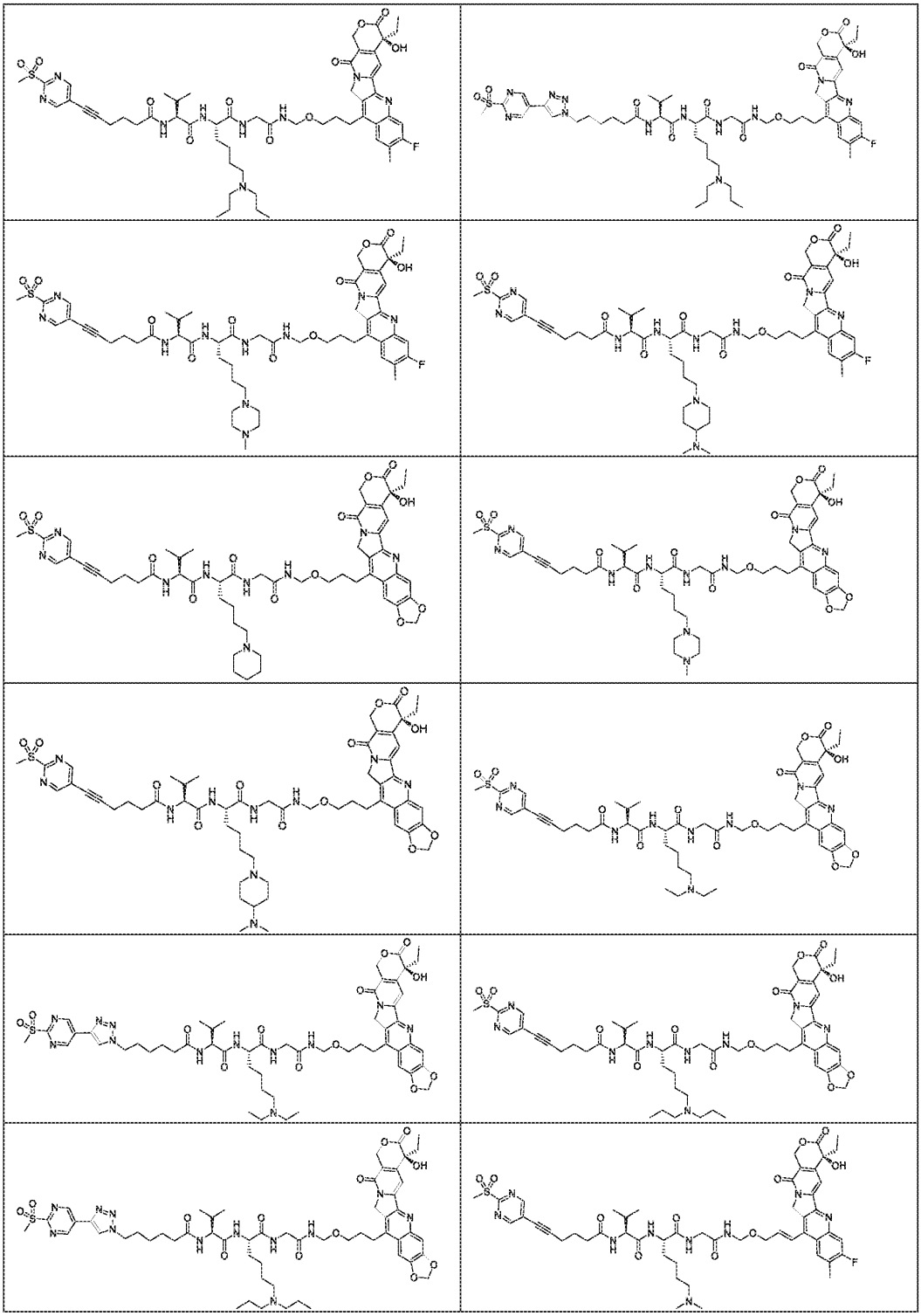


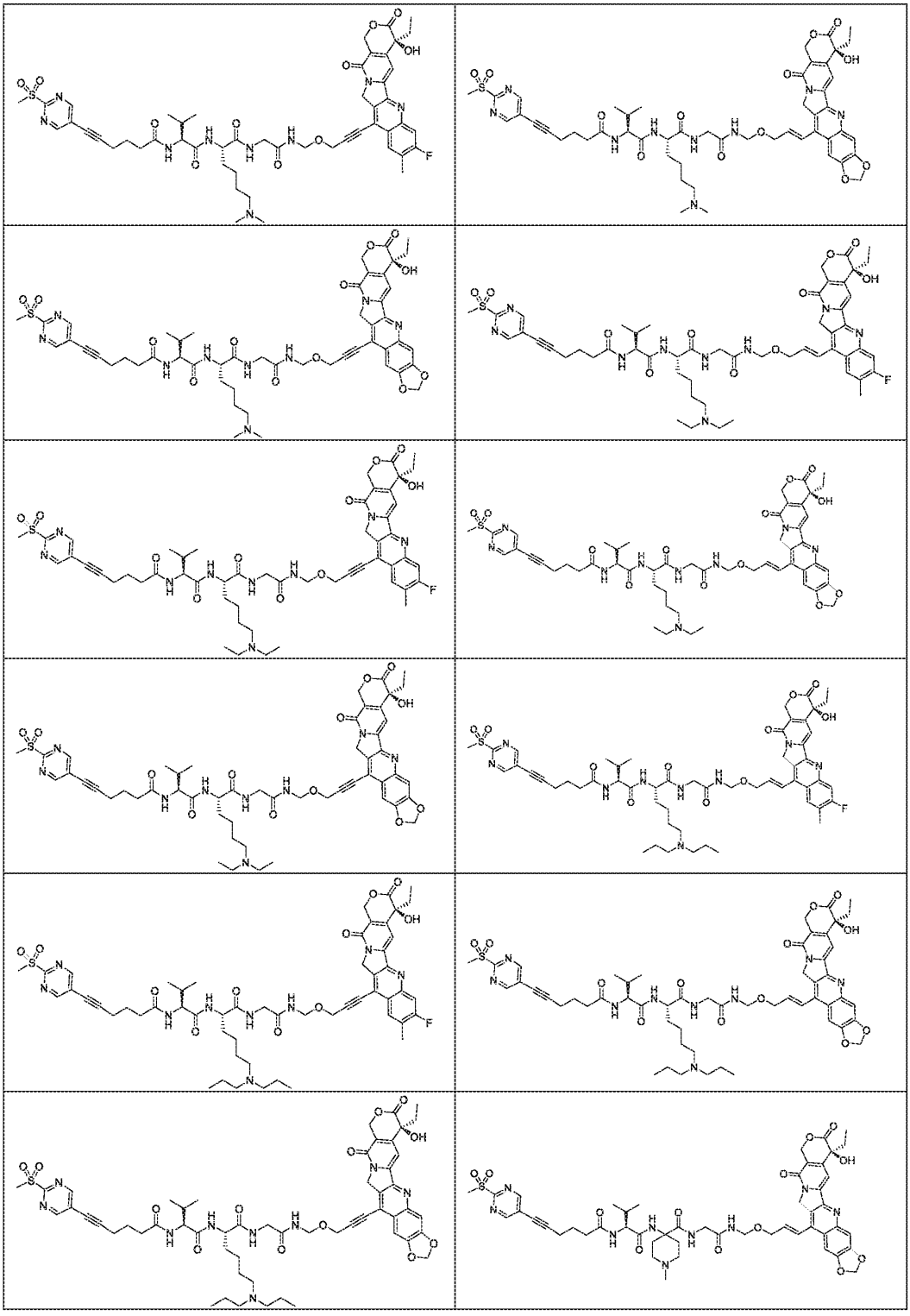


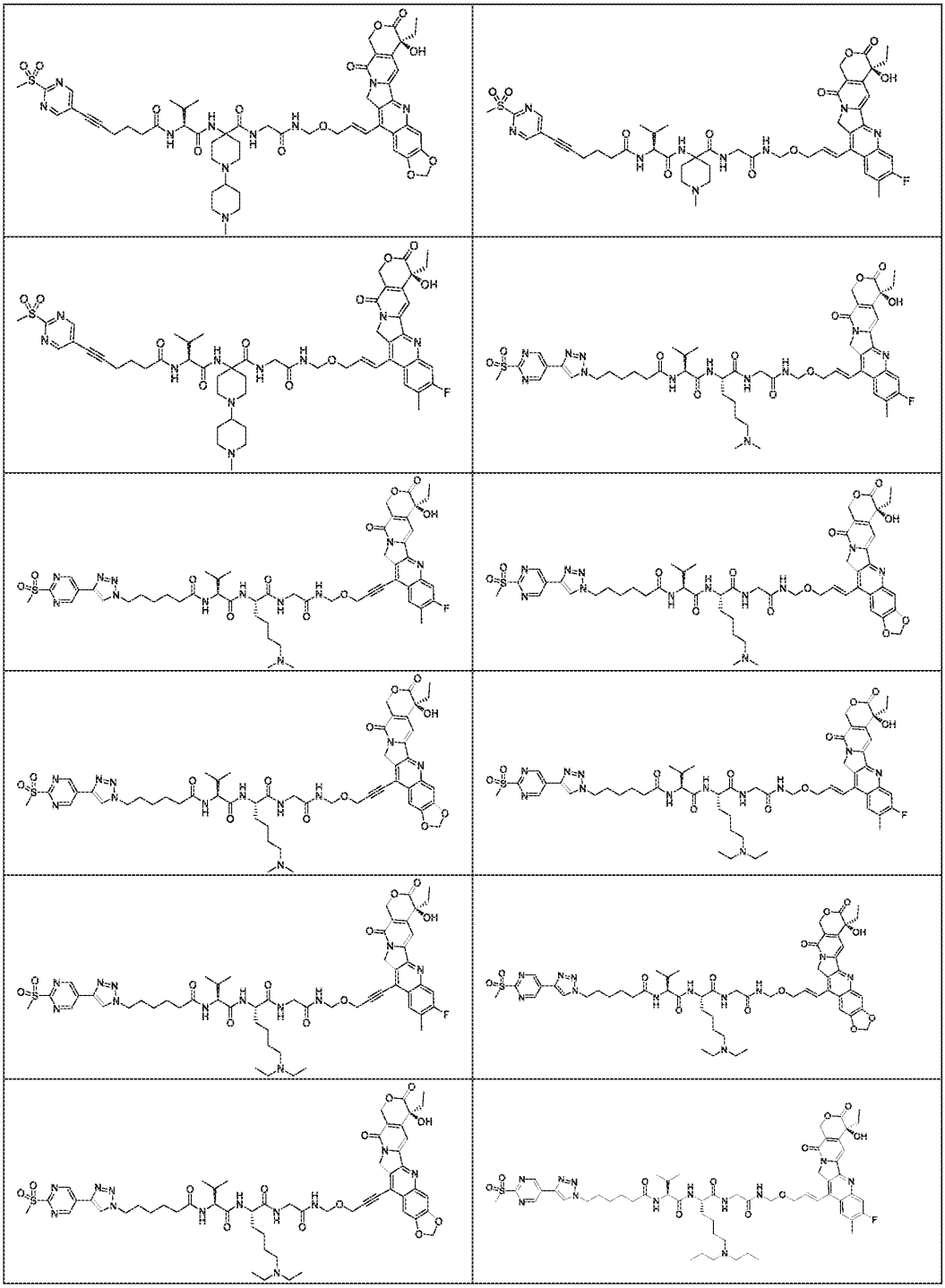


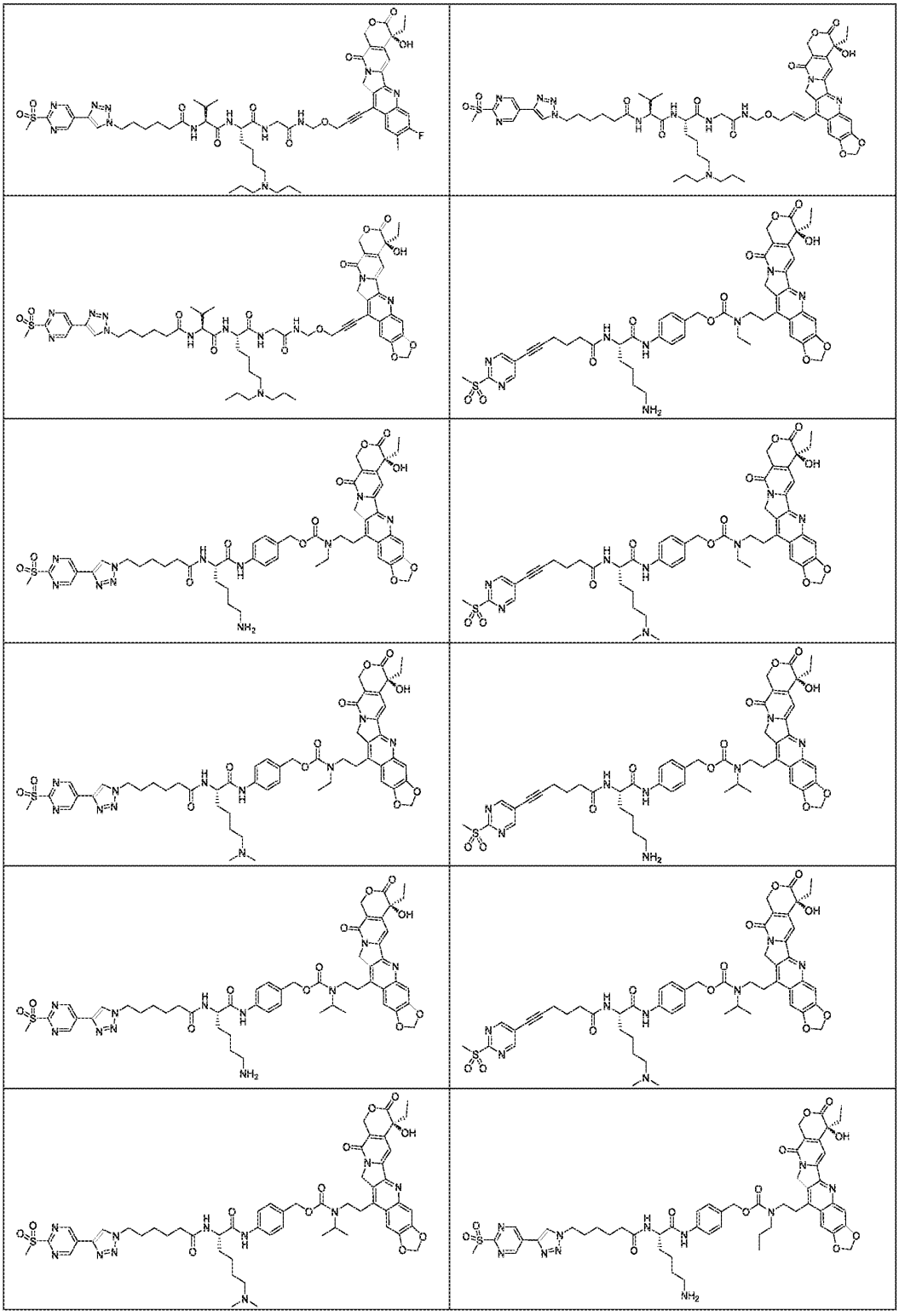


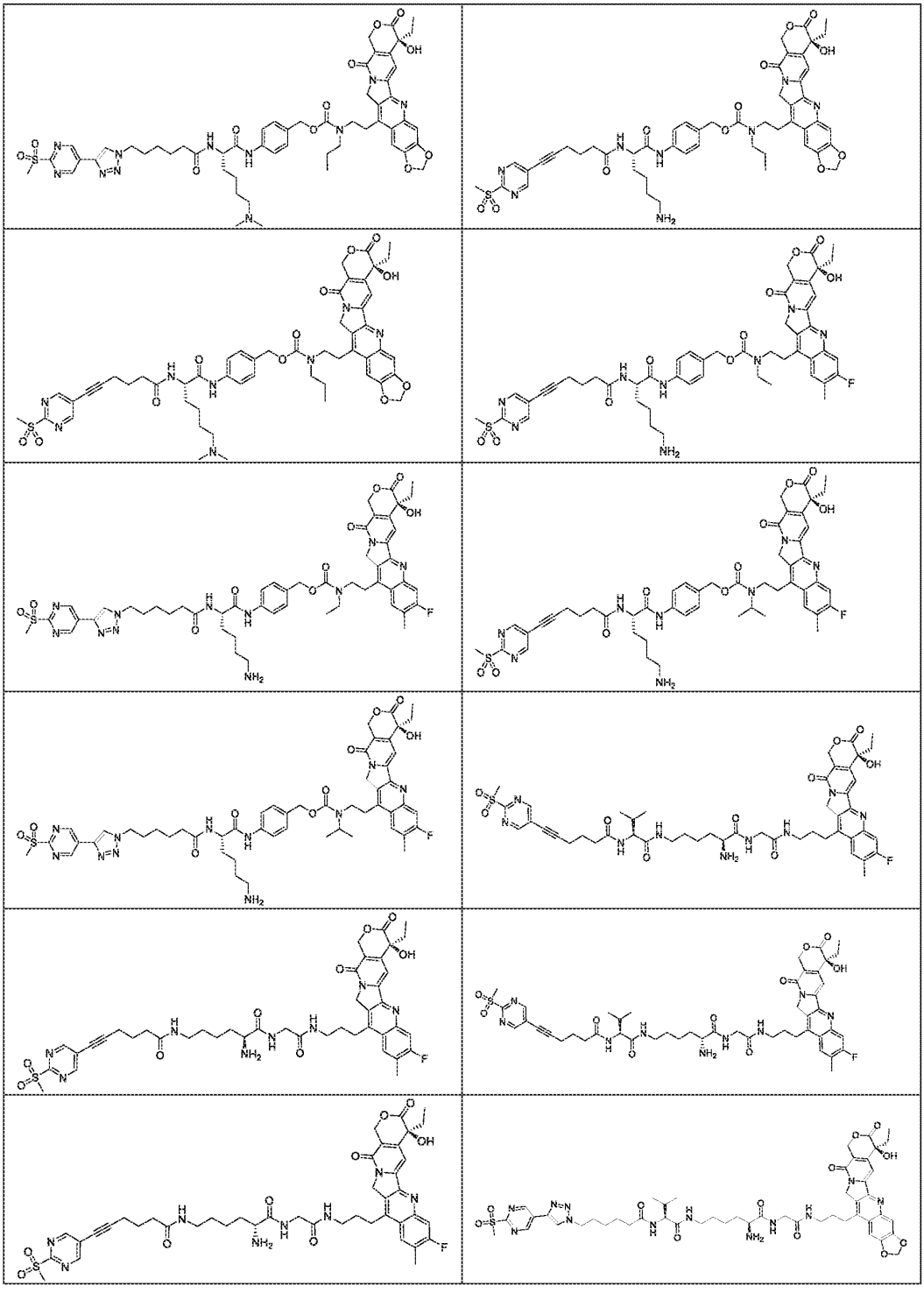


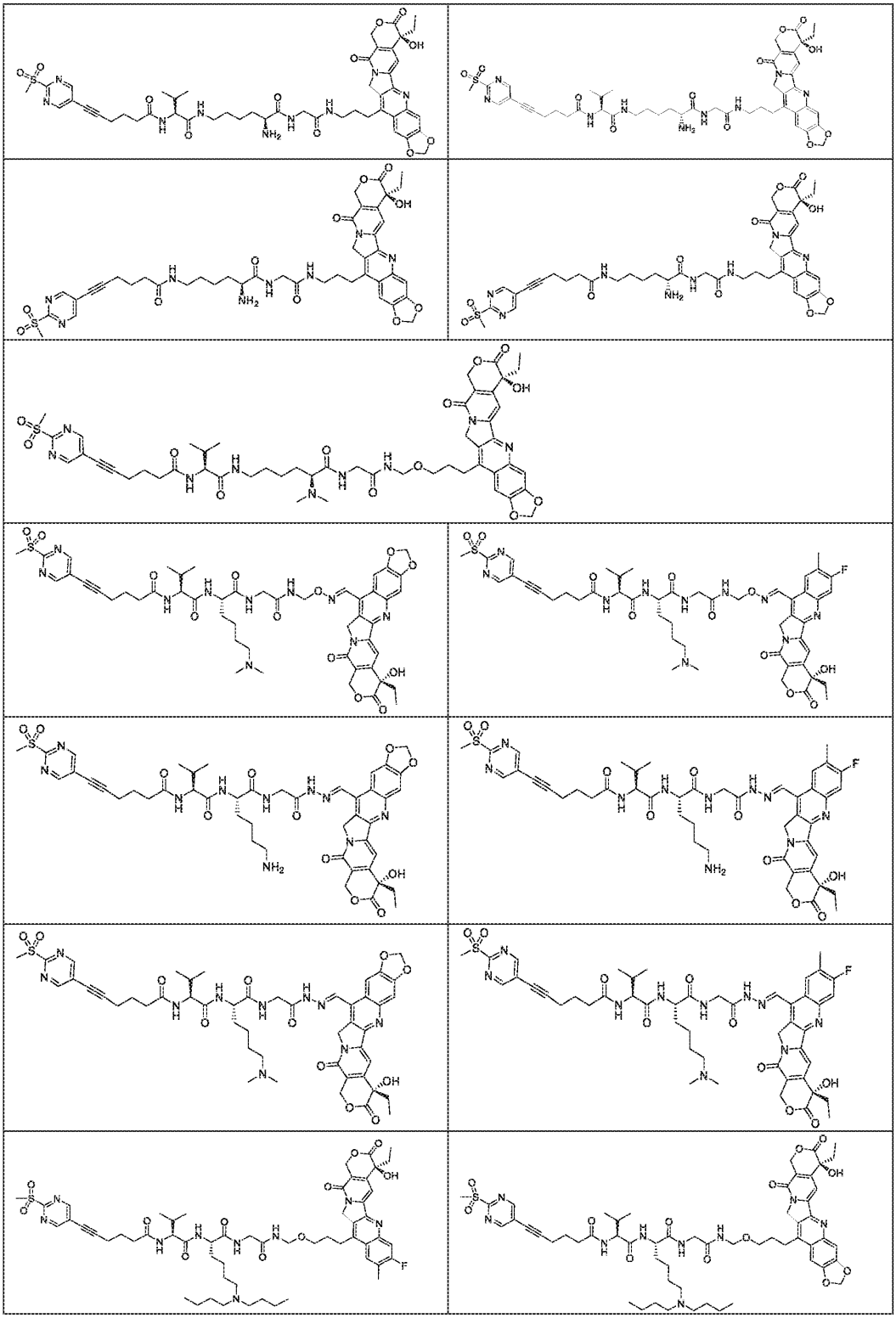


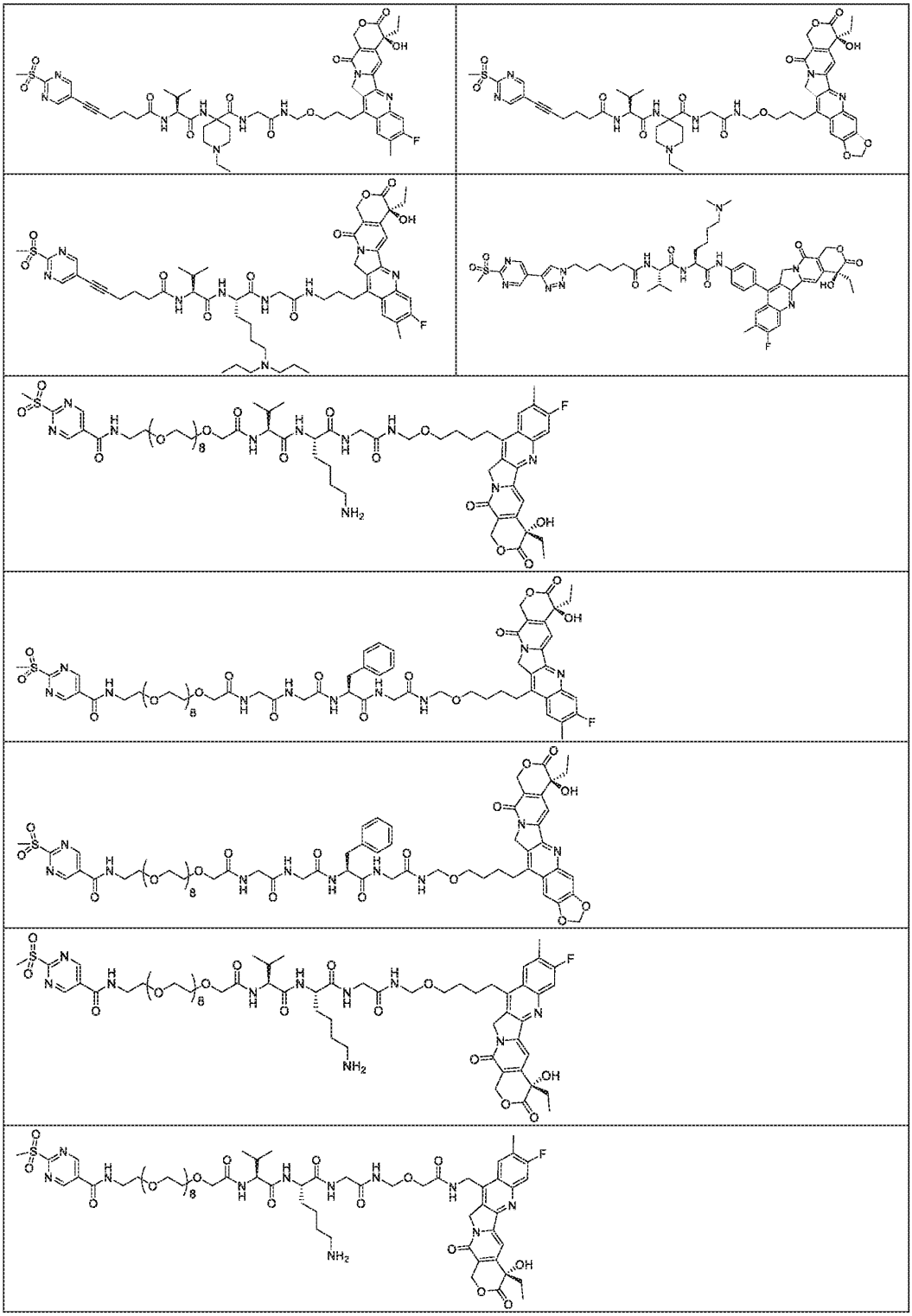


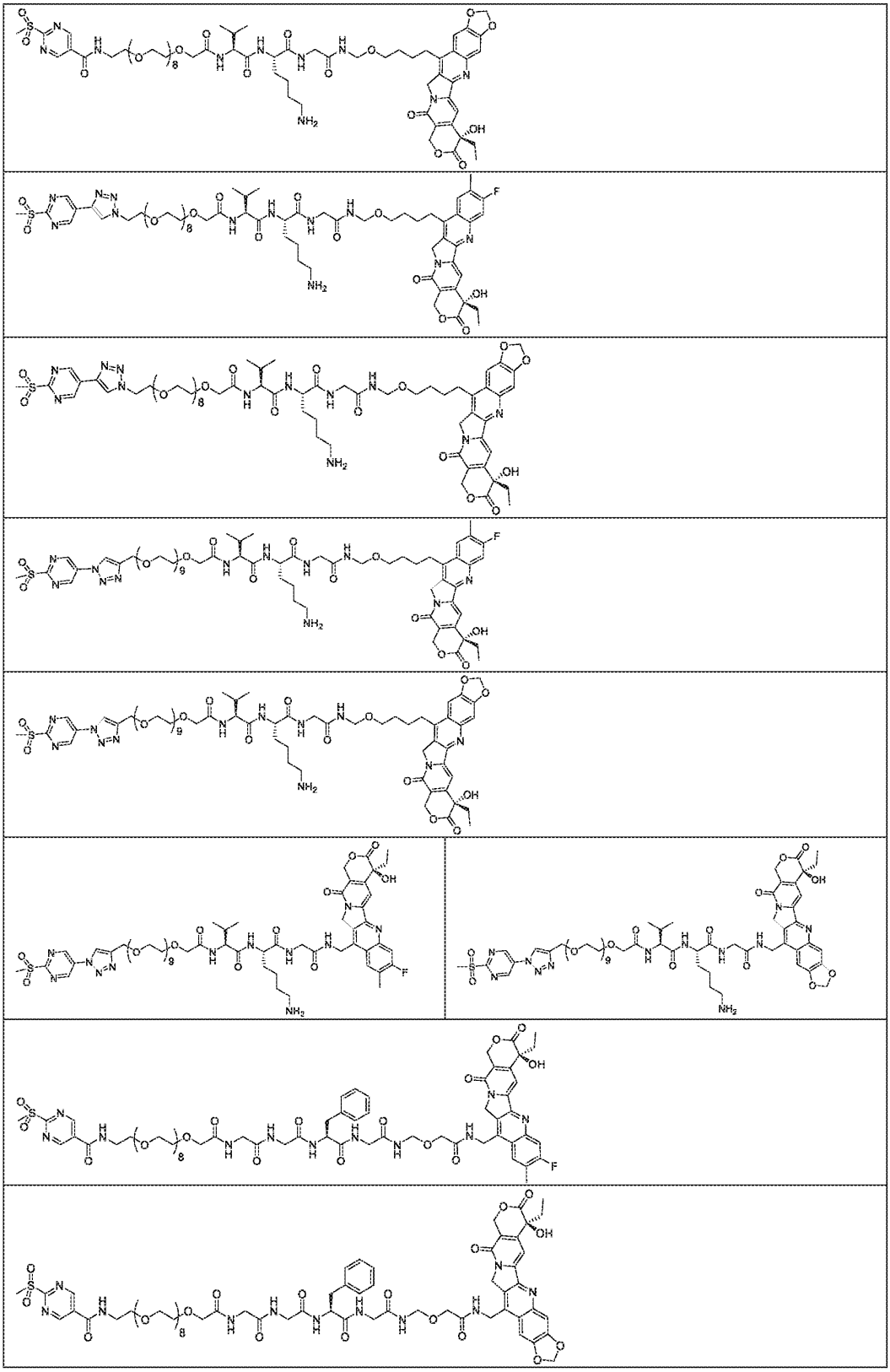


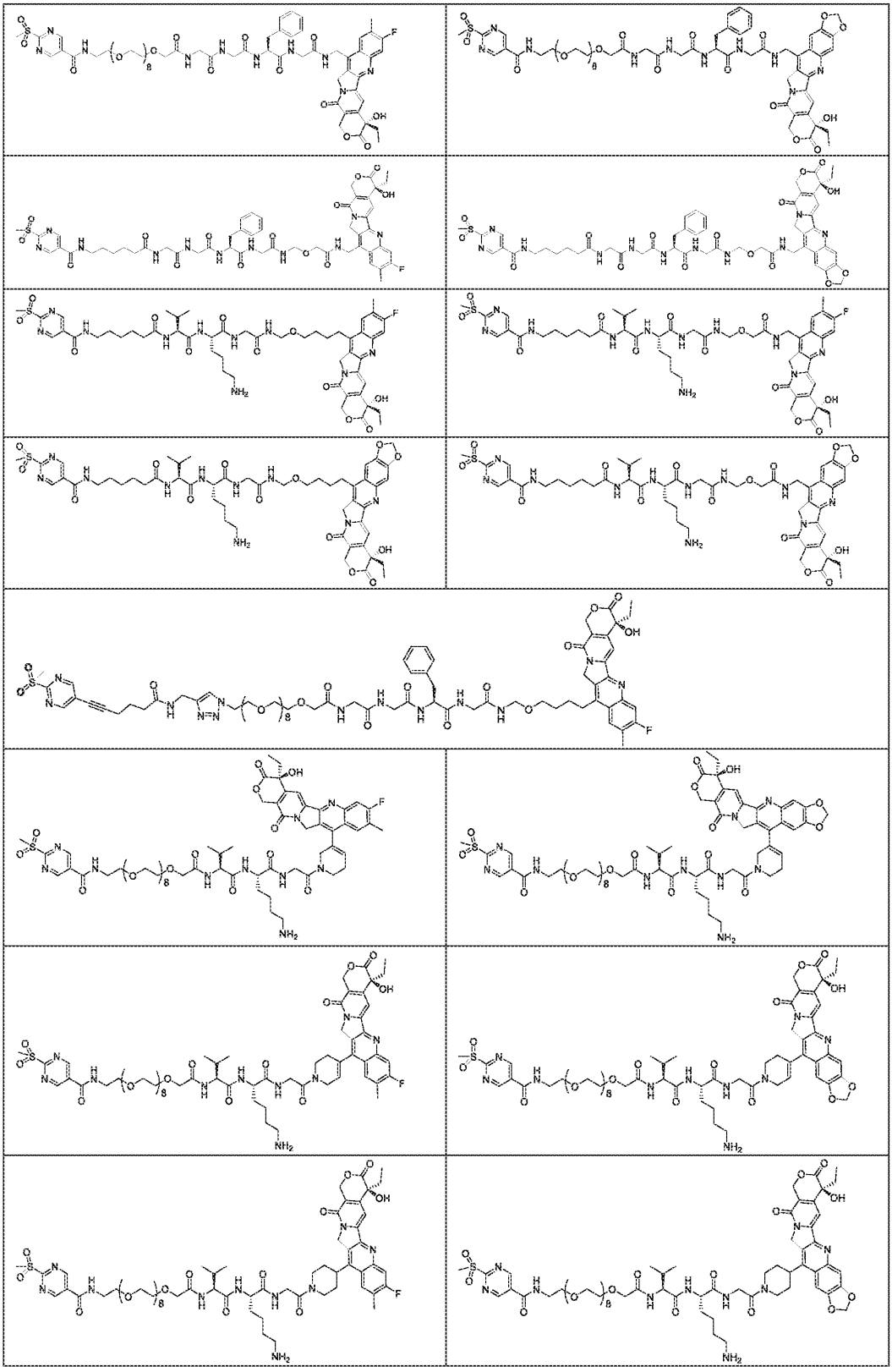


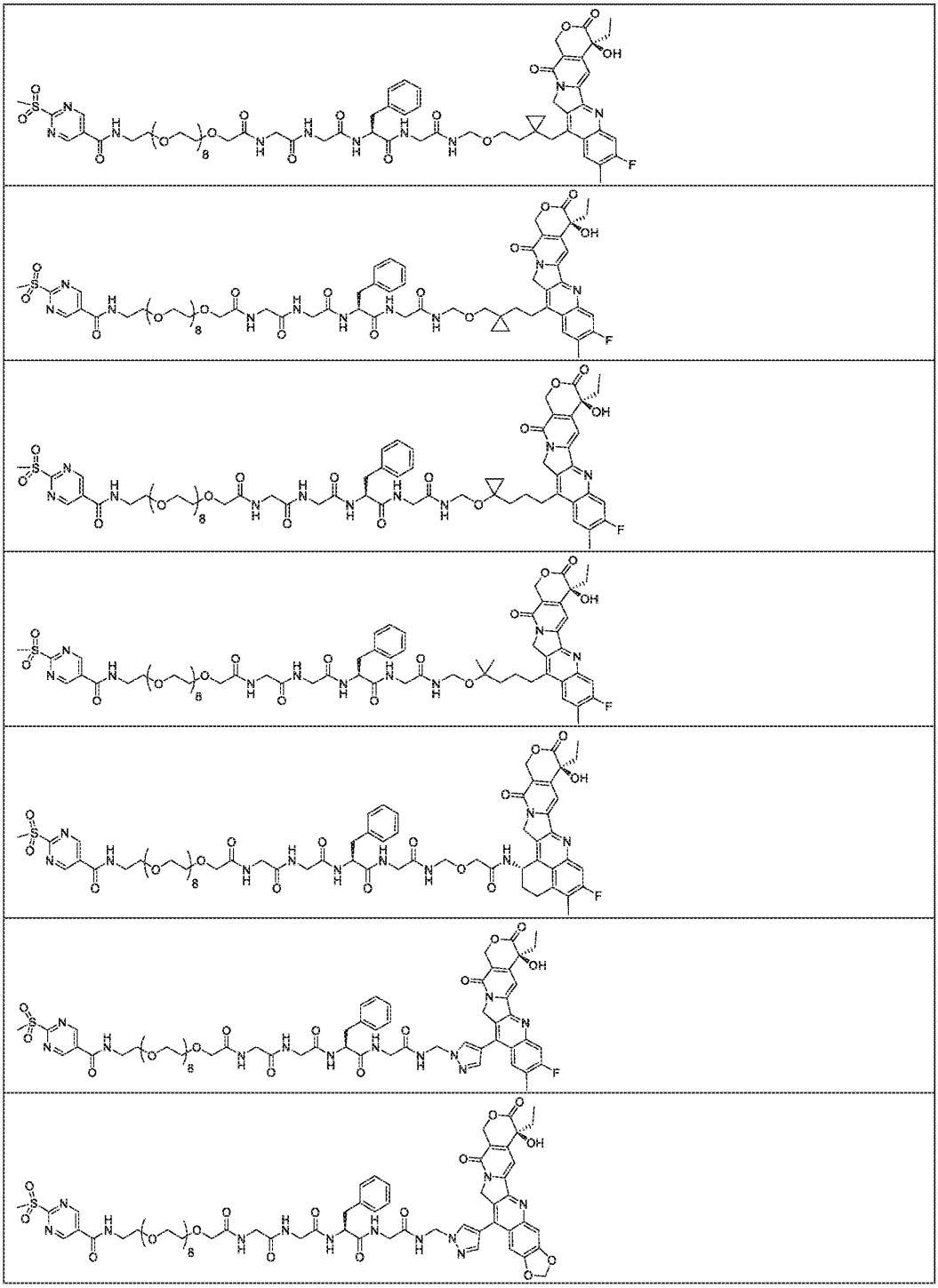


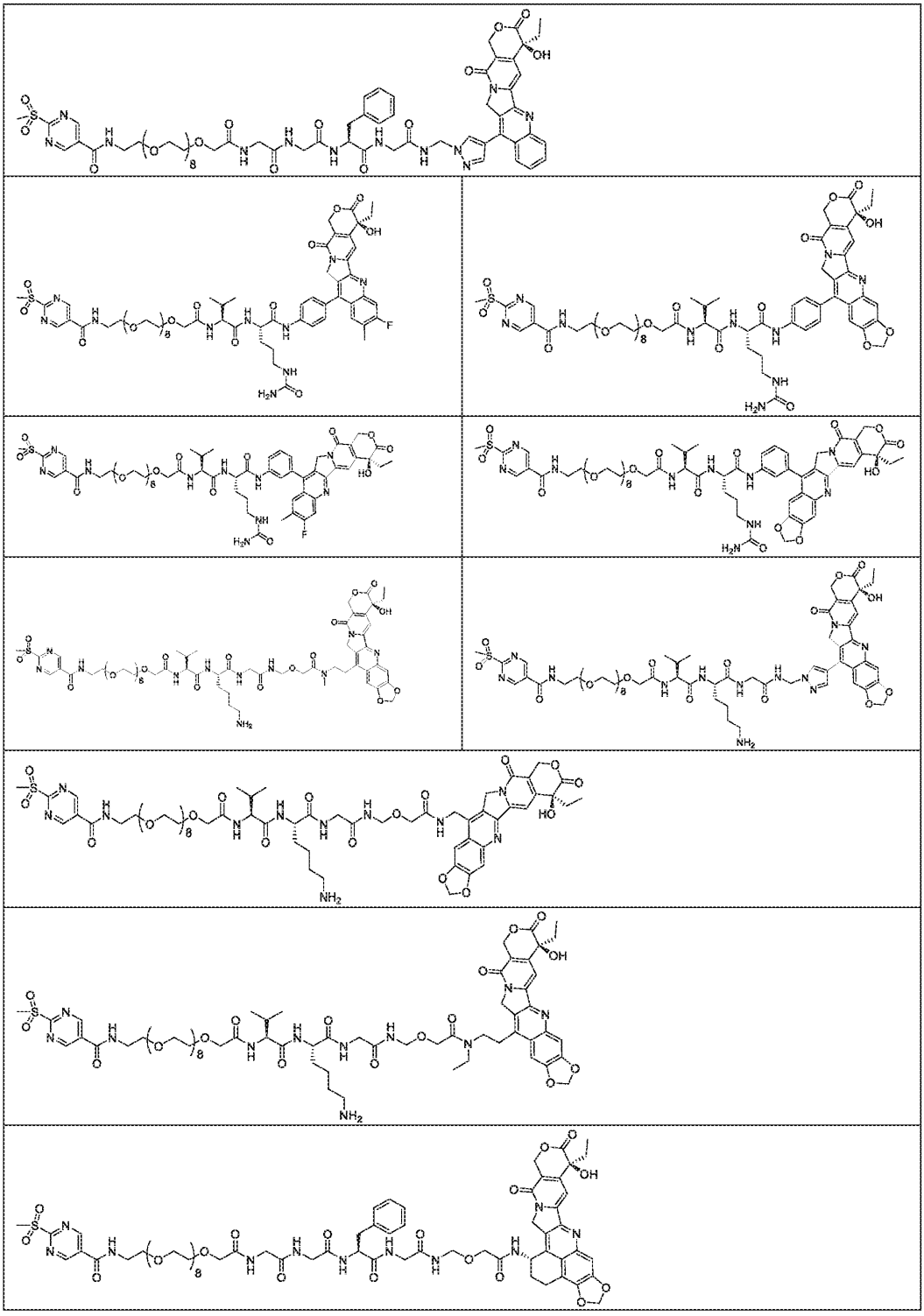


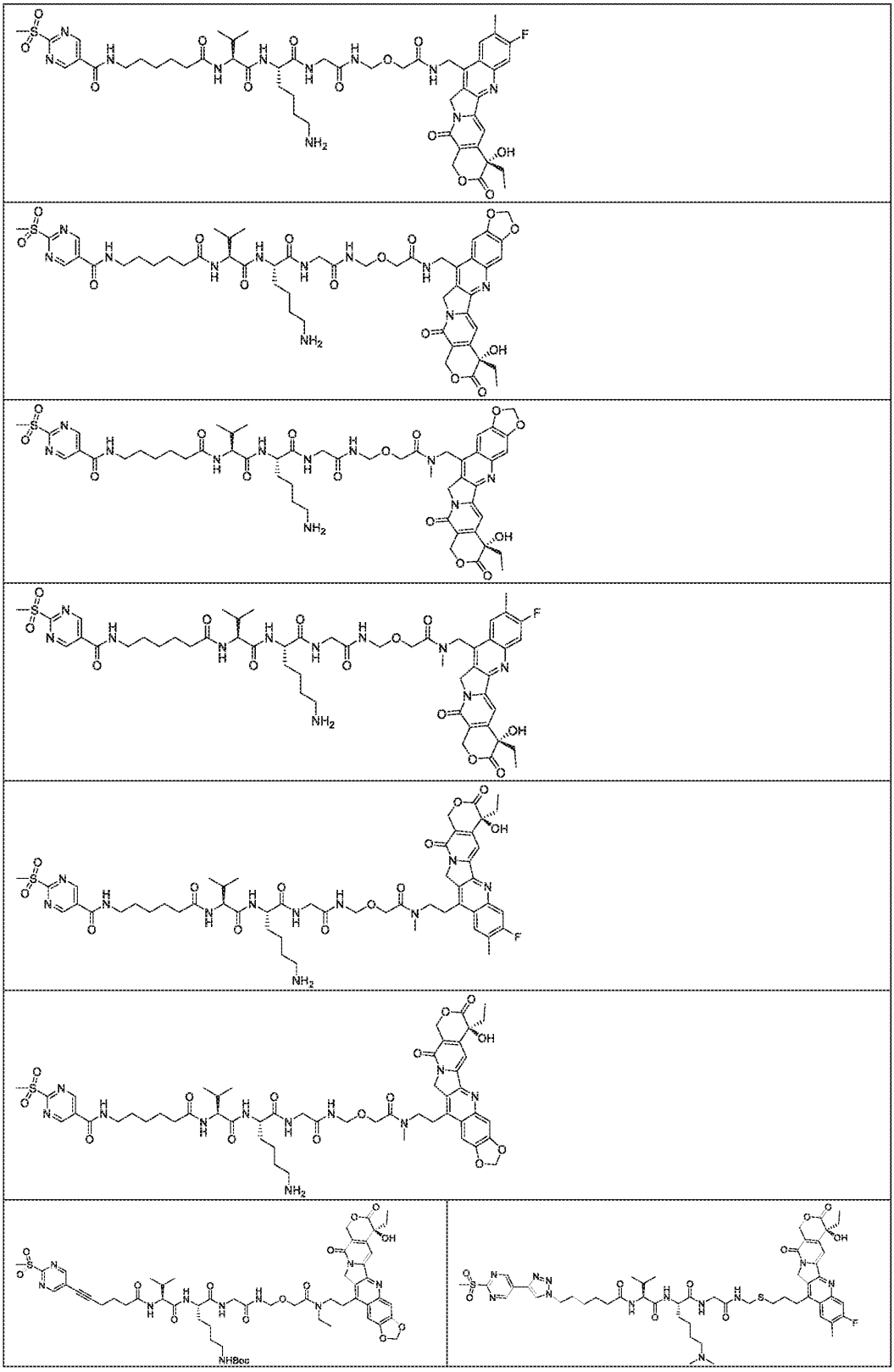


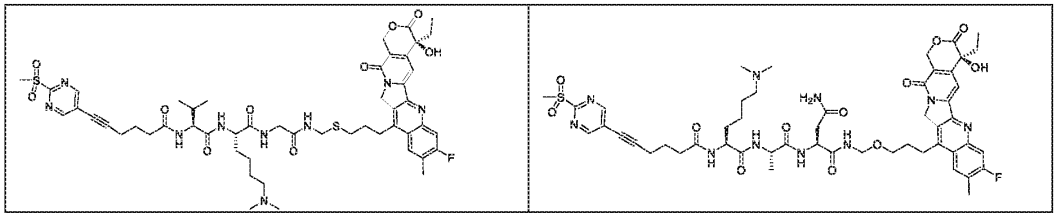






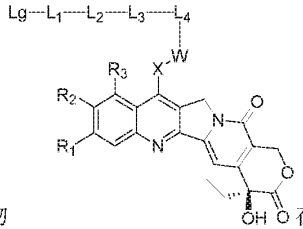






。

33.制备权利要求 28-32 中任一项所述的配体药物偶联物的方法，其包括：

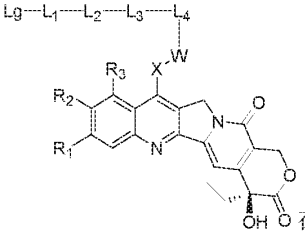
将 Tb 与式 III 所示的药物连接体偶联物  在合适的溶剂和条件下进行偶联反应；

其中：

L_1、L_2、L_3、L_4、Tb 如权利要求 1-24 中任一项所定义；

R_1、R_2、R_3、X、W 如权利要求 13-24 所定义；

Lg 如权利要求 28-32 中任一项所定义。

34.权利要求 33 的方法，其中，所述方法包括将 Tb 与式 III 所示的药物连接体偶联物  在合适的溶剂和条件下进行偶联反应形成 C-S 键的步骤；

优选地，所述 Tb 与所述药物连接体偶联物的物质的量的比为 1:（1-20）；

优选地，所述偶联反应在水和/或有机溶剂中进行；优选地，所述有机溶剂选自 N,N-二甲基甲酰胺、二甲基亚砜、N-甲基吡咯烷酮、腈类(例如乙腈)、醇类(例如甲醇、乙醇)或其任意组合；所述的腈类可为乙腈，所述的醇类可为甲醇、乙醇；

优选地，所述方法进一步包括将偶联产物进行纯化的步骤；优选地，通过层析方法对所述偶联产物进行纯化；优选地，所述层析方法包括离子交换层析、疏水层析、反相层析或亲和层析中的一种或多种。

35. 一种结合 B7H3 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如下的互补决定区 CDR：

(a) SEQ ID NO: 3 或 23 所示的重链可变区 VH 中含有的 HCDR1 或其序列的变体、HCDR2 或其序列的变体、以及 HCDR3 或其序列的变体;和/或

(b) SEQ ID NO:13 或 33 所示的轻链可变区 VL 中含有的 LCDR1 或其序列的变体、LCDR2 或其序列的变体、以及 LCDR3 或其序列的变体;

优选地，所述序列的变体为与其来源 CDR 相比为具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加，例如 1 个、2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加的 CDR；优选地，所述的置换为保守置换。

36. 权利要求 35 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：

(1) VH 和/或 VL，其中按 IMGT 编号系统定义：

(a) 所述 VH 包含：序列为 SEQ ID NO:10 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:11 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:12 的 HCDR3；和/或，

所述 VL 包含：序列为 SEQ ID NO:20 的 LCDR1，序列为 GTF 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:22 的 LCDR3；

(b) 所述 VH 包含：序列为 SEQ ID NO:10 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:11 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:12 的 HCDR3；和/或，

所述 VL 包含：序列为 SEQ ID NO:40 的 LCDR1，序列为 GAS 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:42 的 LCDR3；

(c) 所述 VH 包含：序列为 SEQ ID NO:30 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:31 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:32 的 HCDR3；和/或，

所述 VL 包含：序列为 SEQ ID NO:40 的 LCDR1，序列为 GAS 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:42 的 LCDR3；

或

(d) 所述 VH 包含：序列为 SEQ ID NO:30 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:31 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:32 的 HCDR3；和/或，

所述 VL 包含：序列为 SEQ ID NO:20 的 LCDR1，序列为 GTF 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:22 的 LCDR3；

(2) VH 和/或 VL，其中按 chothia 编号系统定义：

(a) 所述 VH 包含：序列为 SEQ ID NO:4 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:5 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:6 的 HCDR3；和/或，

所述 VL 包含：序列为 SEQ ID NO:14 的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO:15 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:16 的 LCDR3；

(b) 所述 VH 包含：序列为 SEQ ID NO:24 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:25 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:26 的 HCDR3；和/或，

所述 VL 包含：序列为 SEQ ID NO:34 的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO:35 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:36 的 LCDR3；

(c) 所述 VH 包含：序列为 SEQ ID NO:4 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:5 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:6 的 HCDR3；和/或，

所述 VL 包含：序列为 SEQ ID NO:34 的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO:35 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:36 的 LCDR3；

或

(d) 所述 VH 包含：序列为 SEQ ID NO:24 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:25 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:26 的 HCDR3；和/或，

所述 VL 包含：序列为 SEQ ID NO:14 的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO:15 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:16 的 LCDR3；

(3) VH 和/或 VL，其中按 kabat 编号系统定义：

(a) 所述 VH 包含：序列为 SEQ ID NO:7 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:8 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:9 的 HCDR3；和/或，

所述 VL 包含：序列为 SEQ ID NO:17 的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO:18 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:19 的 LCDR3；

(b) 所述 VH 包含：序列为 SEQ ID NO:27 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:28 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:29 的 HCDR3；和/或，

所述 VL 包含：序列为 SEQ ID NO:37 的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO:38 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:39 的 LCDR3；

(c) 所述 VH 包含：序列为 SEQ ID NO:7 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:8 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:9 的 HCDR3；和/或，

所述 VL 包含：序列为 SEQ ID NO:37 的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO:38 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:39 的 LCDR3；

或

(d) 所述 VH 包含：序列为 SEQ ID NO:27 的 HCDR1，序列为 SEQ ID NO:28 的 HCDR2，序列为 SEQ ID NO:29 的 HCDR3；和/或，

所述 VL 包含：序列为 SEQ ID NO:17 的 LCDR1，序列为 SEQ ID NO:18 的 LCDR2，序列为 SEQ ID NO:19 的 LCDR3；

可选地，本公开的抗体或其抗原结合片段包含下述重链可变区 VH 和/或轻链可变区 VL，其中，与前述 IMGT、chothia 或 kabat 定义的 CDR 相比，所述重链可变区 VH 和/或轻链可变区 VL 中至少一个 CDR 含有突变，所述突变为一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合，例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合；优选地，所述的置换为保守置换；

更优选地，所述抗体或其抗原结合片段结合人 B7-H3 和/或猴 B7-H3。

37. 权利要求 35 或 36 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：

(a) SEQ ID NO:3 或 23 所示的 VH，和/或，SEQ ID NO:13 或 33 任一项所示的 VL；

(b) 与(a)中的任一 VH 相比具有至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的 VH；和/或，与(a)中的任一 VL 相比具有至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的 VL；或者

(c) 与(a)中的任一 VH 相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合例如 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合的 VH；和/或，与(a)中的任一 VL 具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合例如 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合的 VL；优选地，所述的置换是保守置换。

38. 权利要求 35-37 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：

(a) SEQ ID NO:3 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:13 所示序列的 VL；

(b) SEQ ID NO:23 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:33 所示序列的 VL；

(c) SEQ ID NO:3 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:33 所示序列的 VL；

(d) SEQ ID NO:23 所示序列的 VH 和 SEQ ID NO:13 所示序列的 VL；

(e) VH 和 VL，与(a)至(d)任一组中的 VH 和 VL 相比，其 VH 具有至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性；和/或，其 VL 具有至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%

的序列同一性；或者

(f) VH 和 VL，与(a)至(d)任一组中的 VH 和 VL 相比，其 VH 具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合例如 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合；和/或，其 VL 具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合例如 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合；优选地，所述的置换是保守置换。

39. 权利要求 35-38 任一项所述抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗体或其抗原结合片段是嵌合抗体、人源化抗体或全人源抗体；

可选地，所述抗体或其抗原结合片段选自 scFv、Fab、Fab'、$(Fab')_2$、Fv 片段、二硫键连接的 Fv(dsFv)、双抗体 (diabody)和多特异性抗体；

可选地，所述 scFv 包含：

(i) SEQ ID NO:1 或 2 所示的序列；

(ii) 与(i)所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合（例如至多 50 个、至多 45 个、至多 40 个、至多 35 个、至多 30 个、至多 25 个、至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个或至多 5 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合；例如 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合）的序列；或

(iii) 与(i)所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的序列；

优选地，(ii)中所述的置换是保守置换。

40. 权利要求 35-39 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进一步包含：

(a) 人免疫球蛋白的重链恒定区 CH 或其变体；和/或

(b) 人免疫球蛋白的轻链恒定区 CL 或其变体，

其中，所述变体与其所源自的野生型序列相比具有至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性；或者，所述变体与其所源自的野生型序列相比具有一个或多个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合例如至多 50 个、至多 45 个、至多 40 个、至多 35 个、至多 30 个、至多 25 个、至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个或至多 5 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合；例如 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个或 10 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合；优

选地，所述的置换是保守置换；

优选地，所述重链恒定区是 IgG 重链恒定区，例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 重链恒定区；和/或，所述轻链恒定区是 κ 或 λ 轻链恒定区；

更优选地，所述抗体或其抗原结合片段包含人 IgG1 重链恒定区；和/或所述抗体或其抗原结合片段包含人 κ 轻链恒定区。

41. 权利要求 40 所述的抗体或其抗原结合片段，其中，

所述重链恒定区包括 SEQ ID NO:43 所示的 CH 或其变体，所述变体与 SEQ ID NO:43 相比具有至多 20 个氨基酸的保守置换例如至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个或至多 5 个氨基酸的保守置换，例如 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个或 10 个氨基酸的保守置换；或者与 SEQ ID NO:43 相比具有至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性；和/或

所述轻链恒定区包括 SEQ ID NO:44 所示的 CL 或其变体，所述变体与 SEQ ID NO:44 相比具有至多 20 个氨基酸的保守置换例如至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个或至多 5 个氨基酸的保守置换，例如 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个或 10 个氨基酸的保守置换，或者与 SEQ ID NO:44 相比具有至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性；

优选地，所述抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO:43 所示的重链恒定区 CH 和 SEQ ID NO:44 所示的轻链恒定区 CL。

42. 权利要求 35-41 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗体包括：

(a) 包括 SEQ ID NO:3 所示的 VH 和 SEQ ID NO:43 所示的 CH 的重链，和，包括 SEQ ID NO:13 所示的 VL 和 SEQ ID NO:44 所示的 CL 的轻链；优选包括 SEQ ID NO:45 所示的重链和 SEQ ID NO:46 所示的轻链；

(b) 包括 SEQ ID NO:23 所示的 VH 和 SEQ ID NO:43 所示的 CH 的重链，和，包括 SEQ ID NO:33 所示的 VL 和 SEQ ID NO:44 所示的 CL 的轻链；优选包括 SEQ ID NO:47 所示的重链和 SEQ ID NO:48 所示的轻链。

43. 多特异性抗体，其包含权利要求 35-42 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，和另外的抗体或其片段或抗体类似物；

优选地，所述多特异性抗体是双特异性抗体或三特异性抗体或四特异性抗体。

44. 分离的核酸分子，其编码权利要求 35-42 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，或权利要求 43 所述的多特异性抗体。

45. 载体，其包含权利要求 44 所述的分离的核酸分子；优选地，所述载体为克隆载体或表达载体。

46. 宿主细胞，其包含权利要求 44 所述的分离的核酸分子或权利要求 45 所述的载体。

47. 制备权利要求 35-42 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，或权利要求 43 所述的多特异性抗体的方法，其包括，在允许所述抗体或其抗原结合片段表达的条件下，培养权利要求 46 所述的宿主细胞，和从培养的宿主细胞培养物中回收所述抗体或其抗原结合片段，或所述多特异性抗体。

48. 一种抗体-药物偶联物，其中抗体为权利要求 35-42 任一项的抗体或其抗原结合片段，或权利要求 43 所述的多特异性抗体，其通过接头与偶联部分连接，所述偶联部分选自：可检测的标记、放射性同位素、荧光物质、发光物质、有色物质、酶、聚乙二醇、核素、核酸、小分子毒素、具有结合活性多肽、蛋白、受体、配体，以及其它抑制肿瘤细胞生长、促进肿瘤细胞凋亡或坏死的活性物质。

49.一种配体药物偶联物，其包含权利要求 1-28 中任一项所述的配体药物偶联物，所述的配体药物偶联物具有两种或多种 q 值；

可选地，所述配体药物偶联物中的药物与抗体的比例（DAR）选自 1-10 中的整数或小数；

优选地，所述配体药物偶联物中的药物与抗体的比例（DAR）选自 1.5-2.5、3.5-4.5、5.5-6.5 和 7.5-8.5；

优选地，所述配体药物偶联物中的药物与抗体的比例（DAR）选自约 2.0、4.0、6.0 和 8.0；

优选地，所述配体药物偶联物中的药物与抗体的比例（DAR）选自 2、2.5、3、3.5、4、4.5,5、5.5、6、6.5、7、7.2、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.7、8.9 和 9。

50.一种药物组合物，其包含物质 A，及任选的一种或多种药用辅料，所述的物质 A 为如权利要求 1-24 中任一项所述的配体药物偶联物、或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物、或如权利要求 26 或 27 所述的化合物、或如权利要求 28-32 任一项药物连接体偶联物、或如权利要求 35-42 任一项所述的抗体或其抗原结合片段、或如权利要求

43 所述的多特异性抗体、或如权利要求 44 所述的核酸分子、或如权利要求 45 所述的载体、或如权利要求 46 所述的宿主细胞、或如权利要求 49 所述的配体药物偶联物；优选还包括药学上可接受的载体和/或赋形剂。

51.一种物质 A 或者权利要求 50 所述的药物组合物在制备治疗和/或预防与细胞活动异常相关的疾病的药物中的用途；所述的物质 A 为如权利要求 1-24 中任一项所述的配体药物偶联物、或所述配体药物偶联物的立体异构体、其前药、其药学上可接受的盐或其药学上可接受的溶剂合物、或如权利要求 26 或 27 所述的化合物、或如权利要求 28-32 任一项所述的药物连接体偶联物、或如权利要求 35-42 任一项所述的抗体或其抗原结合片段、或如权利要求 43 所述的多特异性抗体、或如权利要求 44 所述的核酸分子、或如权利要求 45 所述的载体、或如权利要求 46 所述的宿主细胞或如权利要求 49 所述的配体药物偶联物；所述的与细胞活动异常相关的疾病可为癌症疾病；

优选地，所述癌症疾病选自食管癌、脑瘤、肺癌、鳞状上皮细胞癌、膀胱癌、胃癌、卵巢癌、腹膜癌、胰腺癌、乳腺癌、头颈癌、子宫颈癌、子宫内膜癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、肝癌、肾癌、尿路上皮癌、表皮癌、非霍奇金淋巴瘤、中枢神经系统肿瘤、前列腺癌或甲状腺癌；所述的食管癌例如食管腺癌或食管鳞状细胞癌；所述的肺癌例如小细胞性肺癌、非小细胞性肺癌或肺腺癌；所述的中枢神经系统肿瘤例如神经胶质瘤、多形性胶质母细胞瘤、胶质瘤或肉瘤；所述结肠癌例如人结肠腺癌；

优选地，所述癌症疾病选自结肠癌，结直肠癌，结肠腺癌，肺癌，乳腺癌，前列腺癌，食管鳞癌；

更优选地，所述癌症疾病为与 B7H3 相关的癌症疾病；

更优选地，所述癌症疾病为与 Her3 相关的癌症疾病；

更优选地，所述癌症疾病为与 EGFR 相关的癌症疾病；

更优选地，所述癌症疾病为与 Trop-2 或 Her 2 相关的癌症疾病；

最优选地，所述癌症疾病为乳腺癌或肺癌为非小细胞肺癌。