

抗人 Trop2 抗体-喜树碱类药物偶联物及其医药用途

技术领域

5 本发明涉及生物制药领域，具体涉及一种抗人 Trop2 抗体与喜树碱类药物形成的抗体-药物偶联物，以及该抗体-药物偶联物的制备方法和应用。本发明还涉及可与 Ab 偶联形成抗体-毒素偶联物的连接子-药物化合物。

背景技术

10 人滋养层细胞表面抗原 2 (Human trophoblast cell surface antigen 2, hTROP2) 是由 TACSTD2 基因编码的单次跨膜 I 型细胞膜蛋白，首次由 M.Lipinski 等人研究正常人体及癌变滋养层细胞时发现。在随后的研究过程中，hTROP2 分子也被称为能被将胃癌细胞株免疫而得到的小鼠单克隆抗体 GA733 识别的而肿瘤抗原 GA733-1，以及通过非小细胞肺癌细胞免疫而得到的小鼠单克隆抗体 RS7-3G11 识别的表皮糖蛋白，至 1995 年该基因被克隆后，证实它们为同一种分子。

15 hTROP2 蛋白全长 323 个氨基酸残基，包含 N 末端 26 个氨基酸残基组成的胞内结构域、C 末端 248 个氨基酸组成的胞外结构域，以及 23 个氨基酸残基组成的跨膜结构域。其中，hTROP2 在胞外结构域的第 33、120、168 和 208 位氨基酸残基处有 4 个 N 糖基化位点。TROP2 基因属于 TACSTD 基因家族，与该基因家族的另一个成员人滋养层细胞表面抗原 1 (hTROP1) 约有 50% 的同源性。

20 目前，hTROP2 蛋白的生理学配体和分子功能都尚不明确，但在肿瘤细胞中能够调控钙信号的传导。hTROP2 胞内结构域中具有 PIP2 (4,5-二磷酸磷脂酰肌醇) 结合序列，通过 Ca^{2+} 依赖性激酶的蛋白激酶 C 可将第 303 位丝氨酸残基磷酸化，第 303 位丝氨酸残基的磷酸化会导致 PIP2 被磷脂酶 C (PLC) 水解为 IP3 (三磷酸肌醇) 和 DAG (二酰甘油)，进而能够实现调控细胞内钙信号传导的过程。

25 临床标本免疫组织化学分析表明，hTROP2 在正常组织中仅在某些上皮细胞有限表达，但在宫颈癌、乳腺癌、胃癌、肺癌、前列腺癌、胰腺癌等多种上皮细胞癌症种类中过量表达。有报道显示，hTROP2 的表达水平与肿瘤的侵袭能力、恶性程度以及病人的不良预后密切相关。同时，在肿瘤的起始和发展过程中，hTROP2 可作为前列腺癌干细胞的标志物。目前，使用 Trop-2 作为肿瘤治疗的靶标，抗 Trop-2 的抗体-药物偶联物 (antibody-drug conjugate, ADC) 正在用于多种转移性肿瘤，包括三阴乳腺癌 (triple-negative breast cancer, TNBC)、非小细胞肺癌和小细胞肺癌的治疗。美国临床肿瘤学会 (ASCO) 在 2016 年公布了 IMMU-132 治疗三阴乳腺癌的相关研究，IMMU-132 是一种将单克隆抗体 RS7 和 SN-38 药物连接在一起的抗体偶联药物，RS7 能够特异性靶向 hTROP2，hTROP2 被发现在 80% 以上的三阴性乳腺癌肿瘤细胞中大量表达。

35 喜树碱 (CPT) 是一种 DNA 拓扑异构酶 I (TOPI) 抑制剂，喜树碱衍生物能够抑制拓扑异构酶 I 而实现抗肿瘤作用。拓扑异构酶 I 在 DNA 翻译和转录过程中能够催化单链 DNA 断裂和连接，使 DNA 超螺旋松弛，从而促进复制和转录，而拓扑异构酶 I 抑制剂 SN-38 可以通过阻断 DNA 链再连接造成 DNA 损伤，从而抑制 DNA 复制和转录诱导细胞凋亡。在人源化 RS7 抗体靶向 Trop-2 的 ADC 临床研究中，IMMU-132 使用的是中等稳定的连接子，IMMU-132 在人血清中 SN-38 释放的半衰期约为 24h，在人和小鼠中的消除半衰期约为 11h，消除速率较快，

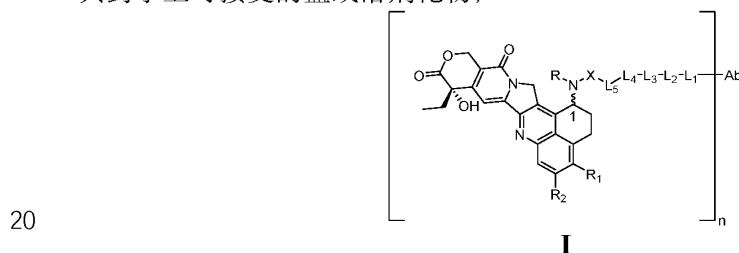
平均滞留时间约为 15.4h, 预示着在临床治疗中, IMM-132 的用药频率会较高。同时, 在诸如 SN-38 等拓扑异构酶抑制剂的使用过程中, IMM-132 常伴有严重的副反应, 如腹泻产生。而使用更为稳定的连接子预计会延长平均滞留时间和降低用药。因此, 进一步研究更为安全有效的靶向 Trop-2 技术迫在眉睫。

5 抗体药物偶联物 (Antibody drug conjugate, ADC) 由抗体 (Antibody)、细胞毒性小分子药物 (Drug) 以及连接抗体和药物的连接子 (Linker) 三部分组成, 小分子药物通过化学偶联的方式结合到抗体蛋白上。ADC 药物通过抗体特异性识别, 引导小分子药物到达癌细胞靶点, 通过内吞效应进入癌细胞, 释放出细胞毒性药物, 从而特异性杀死癌细胞。临床研究证明, ADC 药物在血液中相对稳定且药效高, 并且能够有效降低小分子细胞毒性药物对健康组织的毒害, 是目前抗癌药物研究的热点。Trop-2 作为多种上皮细胞癌症种类中特异高表达的蛋白, 更是一个极佳的 ADC 候选靶点。

发明内容

15 发明人在对 ADC 类药物综合理解的基础上, 公开了一种抗人 Trop2 抗体-药物偶联物及其制备方法, 包含所述偶联物的药物组合物以及所述偶联物或药物组合物的用途。本发明还涉及可与抗人 Trop2 抗体偶联形成抗体-毒素偶联物的连接子-药物化合物。

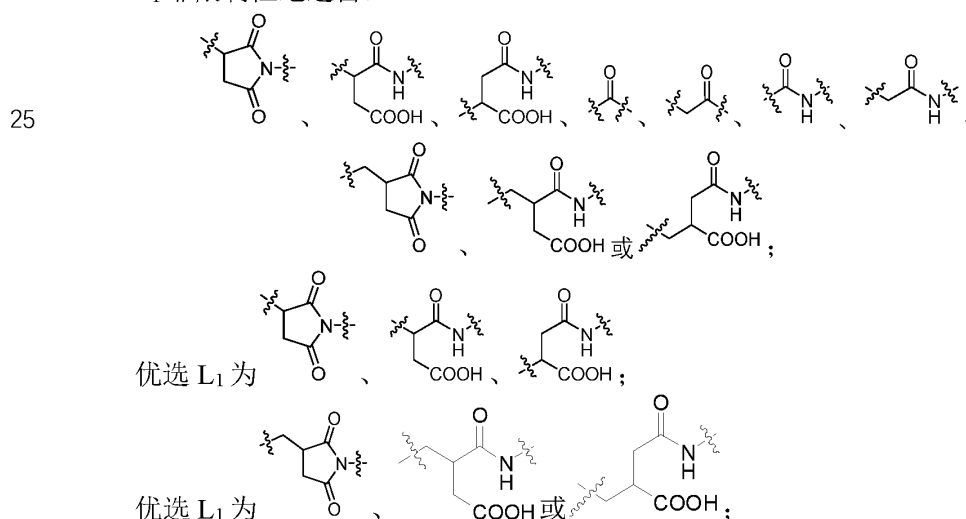
本发明的第一方面公开一种如通式 I 所示的配体-喜树碱类衍生物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物;



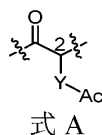
其中:

Ab 为靶向人 Trop2 的抗体或其抗原结合片段;

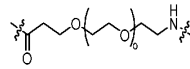
L1 非限制性地选自:



L₂具有如下式 A 所示的结构,



其中 Y 为支架, 选自 C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基或 C3-C8 环烷基; 优选 Y 为 C1-C6 烷基; Ac 为亲水结构单元; 与 Y 相连的 2 号碳具有 R 构型或 S 构型的绝对手性;

L₃ 存在或者不存在, 当存在时, L₃ 选自 PEG 亲水单元: , o 选自 1-10 的整数 (例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10), 优选 2-8 的整数;

L₄ 为酶切单元;

L₅ 为连接单元;

式 I 中与 N 相连的 1 号手性碳原子具有 R 构型或者 S 构型的绝对手性;

R 选自氢原子、氘原子、卤素、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、氘代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基、5-10 元杂芳基、取代 5-10 元杂芳基;

优选 R 选自氢原子或 C1-C6 烷基;

R₁ 选自氢原子、氘原子、卤素、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、氘代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、羧基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基、5-10 元杂芳基、取代 5-10 元杂芳基;

优选 R₁ 选自氢原子或 C1-C6 烷基;

更优选 R₁ 选自 C1-C6 烷基;

R₂ 选自氢原子、氘原子、卤素、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、氘代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、羧基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基、5-10 元杂芳基、取代 5-10 元杂芳基;

优选 R₂ 选自氢原子、卤素或 C1-C6 烷基;

更优选 R₂ 选自卤素;

X 选自 -C(O)-CR_aR_b-(CR₃R₄)_m-O-、-C(O)-CR_aR_b-(CR₃R₄)_m-NH-或 -C(O)-CR_aR_b-(CR₃R₄)_m-S-;

优选 X 选自 -C(O)-CR_aR_b-(CR₃R₄)_m-O-;

R_a 和 R_b 各自独立地选自氢原子、氘原子、卤素、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、卤代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C6-C10 芳基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基、5-10 元杂芳基、取代 5-10 元杂芳基;

优选 R_a 和 R_b 各自独立地选自氢原子、C1-C6 烷基、卤代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基或 C6-C10 芳基 C1-C6 烷基;

或者, R_a、R_b 及其所连接碳原子构成 C3-C8 环烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基; 优选 R_a、R_b 及其所连接碳原子构成 C3-C8 环烷基;

R₃、R₄ 相同或者不同，且分别独立地为氢原子、氘原子、卤素、C1-C6 烷基、卤代 C1-C6 烷基、氘代 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基、羟基、氨基、氰基、硝基、羟 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基；

优选 R₃、R₄ 分别独立地为氢原子或 C1-C6 烷基；

5 或者，R₃、R₄ 及其所连接碳原子构成 C3-C8 环烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基；

m 选自 0-4 的整数（例如 0、1、2、3 或 4），优选为 0、1；n 选自 1-10 的整数（例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10）。

10 在本发明第一方面的一些实施方式中，公开如通式 I 所示的配体-喜树碱类衍生物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其特征在于，Ab 为靶向 TROP2 的抗体或其抗原结合片段。

在本发明第一方面的一些实施方式中，公开如通式 I 所示的配体-喜树碱类衍生物偶联物，或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其特征在于，Ab 的抗体包含：两条 IgG1 重链；两条 κ 轻链。

15 在本发明第一方面的一些实施方式中，公开如通式 I 所示的配体-喜树碱类衍生物偶联物，或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其特征在于，Ab 的抗体的 κ 轻链包含如 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9 所示的 CDR，IgG1 重链包含如 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3 所示的 CDR。

20 在本发明第一方面的一些实施方式中，公开如通式 I 所示的配体-喜树碱类衍生物偶联物，或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其特征在于，Ab 的抗体由重链和轻链组成，所述的轻链包含核酸编码序列分别为 SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28 和 SEQ ID NO: 29 的 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3，所述的重链包含核酸编码序列分别为 SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22 和 SEQ ID NO: 23 的 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3。

25 在本发明第一方面的一些实施方式中，公开如通式 I 所示的配体-喜树碱类衍生物偶联物，或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其特征在于，Ab 的抗体由重链和轻链组成，所述的重链包含序列为 SEQ ID NO: 13 的重链可变区，所述的轻链包含序列为 SEQ ID NO: 14 的轻链可变区。

30 在本发明第一方面的一些实施方式中，公开如通式 I 所示的配体-喜树碱类衍生物偶联物，或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其特征在于，Ab 的抗体由重链和轻链组成，所述的重链可变区包含核酸编码序列为 SEQ ID NO: 33 的重链可变区，所述的轻链可变区包含核酸编码序列为 SEQ ID NO: 34 的轻链可变区。

35 在本发明第一方面的一些实施方式中，公开通式 I 所示的配体-喜树碱类衍生物偶联物，或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其特征在于，Ab 的抗体重链氨基酸序列为 SEQ ID NO: 17，抗体轻链的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 18。

在本发明第一方面的一些实施方式中，公开通式 I 所示的配体-喜树碱类衍生物偶联物，或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其特征在于，Ab 的抗体重链核酸编码序列为 SEQ ID NO: 37，抗体轻链的核酸编码序列为 SEQ ID NO: 38。

40 在本发明第一方面的一些实施方式中，公开通式 I 所示的配体-喜树碱类衍生物偶联物，或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其特征在于，Ab 的抗体包含：两条 IgG1 重链；两条 κ 轻链。

在本发明第一方面的一些实施方式中，公开如通式 I 所示的配体-喜树碱类

衍生物偶联物,或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其特征在于,Ab 的抗体的
κ 轻链包含如 SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12 所示的 CDR,
IgG1 重链包含如 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6 所示的 CDR。

在本发明第一方面的一些实施方式中,公开如通式 I 所示的配体-喜树碱类
5 衍生物偶联物,或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其特征在于,Ab 的抗体由
重链和轻链组成,所述的轻链包含核酸编码序列分别为 SEQ ID NO: 30、SEQ ID
NO: 31 和 SEQ ID NO: 32 的 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3,所述的重链包含核
酸编码序列分别为 SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25 和 SEQ ID NO: 26 的 CDRH1、
CDRH2 和 CDRH3。

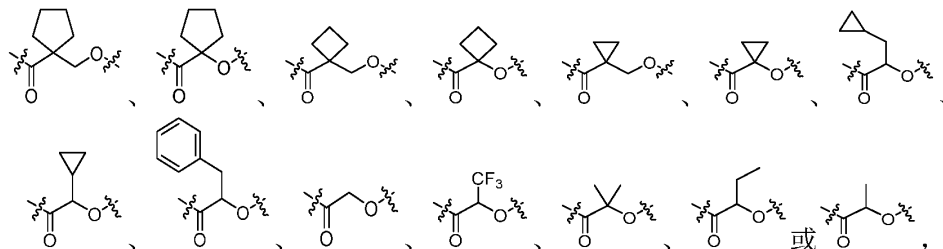
10 在本发明第一方面的一些实施方式中,公开如通式 I 所示的配体-喜树碱类
衍生物偶联物,或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其特征在于,Ab 的抗体由
重链和轻链组成,所述的重链包含序列为 SEQ ID NO: 15 的重链可变区,所述
的轻链包含序列为 SEQ ID NO: 16 的轻链可变区。

在本发明第一方面的一些实施方式中,公开如通式 I 所示的配体-喜树碱类
15 衍生物偶联物,或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其特征在于,Ab 的抗体由
重链和轻链组成,所述的重链可变区包含核酸编码序列为 SEQ ID NO: 35 的重
链可变区,所述的轻链可变区包含核酸编码序列为 SEQ ID NO: 36 的轻链可变
区。

在本发明第一方面的一些实施方式中,公开通式 I 所示的配体-喜树碱类衍
20 生物偶联物,或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其特征在于,Ab 的抗体重链
氨基酸序列为 SEQ ID NO: 19,抗体轻链的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 20。

在本发明第一方面的一些实施方式中,公开通式 I 所示的配体-喜树碱类衍
生物偶联物,或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其特征在于,Ab 的抗体重链
核酸编码序列为 SEQ ID NO: 39,抗体轻链的核酸编码序列为 SEQ ID NO: 40。

25 在本发明第一方面的一些实施方式中,公开如通式 I 所示的配体-喜树碱类
衍生物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其特征在于,所述 X 非限制
性地选自以下结构或其异构体:



在本发明第一方面的一些实施方式中,公开如通式 I 所示的配体-喜树碱
类衍生物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其特征在于:L₄ 非限制性地
选自由氨基酸构成的肽残基,

35 其中任选地,所述氨基酸进一步被选自氘原子、卤素、羟基、氰基、氨基、
硝基、羧基、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基和 C3-C8 环烷基或者
取代 C3-C8 环烷基中的一个或多个取代基所取代;

优选地,所述肽残基为由一个、两个或者多个选自苯丙氨酸(F)、甘氨酸(G)、
缬氨酸(V)、赖氨酸(K)、瓜氨酸(C)、丝氨酸(S)、谷氨酸(E)或者天冬氨酸(D)中的

氨基酸形成的肽残基；

更优选地，所述肽残基为由甘氨酸(G)-甘氨酸(G)-苯丙氨酸(F)-甘氨酸(G)组成的四肽残基。

特别优选地，所述肽残基为-GGFG-。

5 在本发明第一方面的一些实施方式中，公开如通式 I 所示的配体-喜树碱类衍生物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其特征在于：

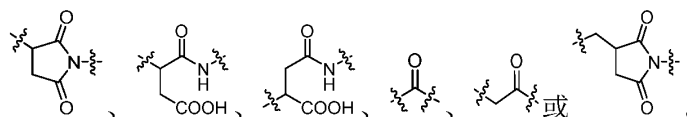
L_5 非限制性地选自 $-NR_5(CR_6R_7)_q-$ 或者化学键， q 选自 0-6 的整数（例如 0、1、2、3、4、5 或 6）；

10 R_5 、 R_6 和 R_7 相同或者不同，且各自独立地选自氢原子、氘原子、卤素、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、氘代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基、5-10 元杂芳基、取代 5-10 元杂芳基；

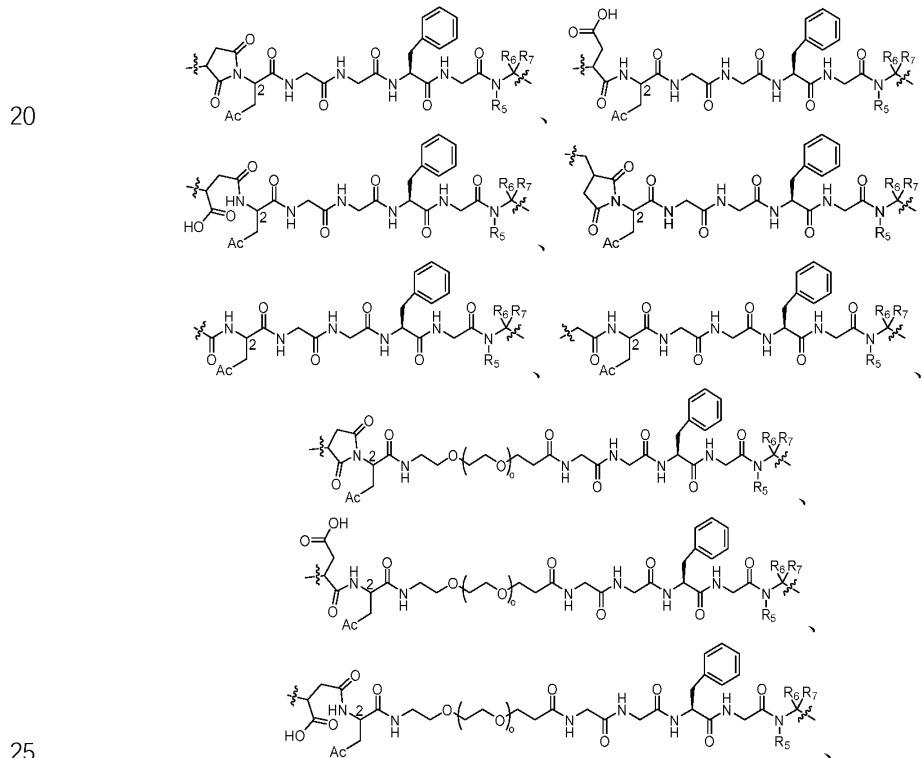
优选地， R_5 、 R_6 和 R_7 各自独立地选自氢原子或 C1-C6 烷基；

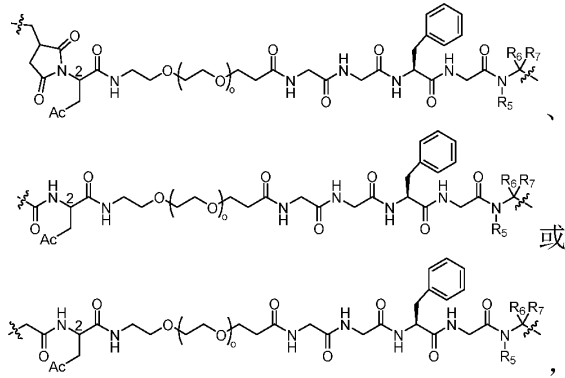
更优选地， R_5 、 R_6 和 R_7 各自独立地选自氢原子。

15 在某些实施方案中， L_1 非限制性地选自：

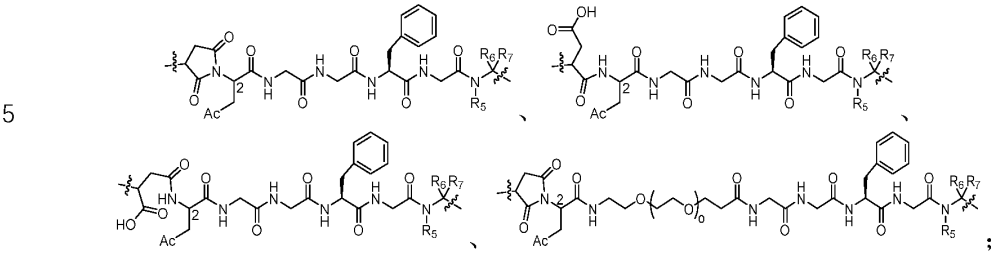


在本发明第一方面的一些实施方式中，公开如通式 I 所示的配体-喜树碱类衍生物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其特征在于：所述连接单元- L_1 - L_2 - L_3 - L_4 - L_5 -非限制性地选自以下结构；





优选为



其中:

Ac 为亲水结构单元;

10 R₅、R₆和R₇相同或者不同,且各自独立地选自氢原子、氘原子、卤素、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、氘代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基、取代 C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基、5-10 元杂芳基、取代 5-10 元杂芳基;

优选地,R₅、R₆和R₇各自独立地选自氢原子或 C1-C6 烷基;

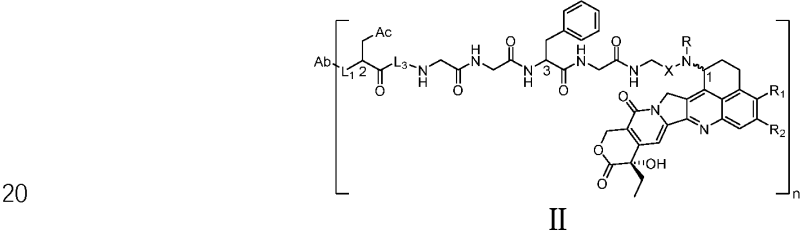
更优选地,R₅、R₆和R₇各自独立地选自氢原子;

15 与 N 相连的 2 号碳原子具有 R 构型或者 S 构型的绝对手性;

左侧波浪线与抗体或其抗原结合片段部分相连,右侧波浪线与 X 相连;

o 选自 1-10 的整数(例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10)。

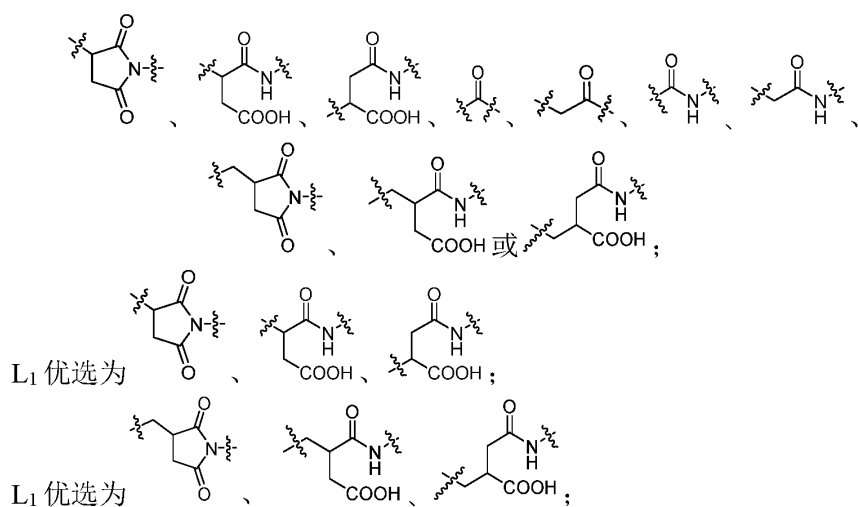
本发明的第二方面公开一种如通式 II 所示的配体-喜树碱类衍生物偶联物,或其药学上可接受的盐或溶剂化物;

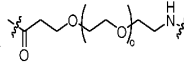


其中:

Ab 为靶向人 Trop2 的抗体或其抗原结合片段;

L₁ 为连接单元与 Ab 连接,非限制性地选自:



5 L₃ 存在或者不存在, 当 L₃ 存在时, L₃ 选自 , o 选自 1-10 的整数 (例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10), 优选 2-8 的整数;

Ac 为亲水结构单元;

1 位、2 位及 3 位手性碳原子具有 R 绝对构型或 S 绝对构型两种手性构型;

10 R 选自氢原子、氘原子、卤素、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、氘代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基、5-10 元杂芳基、取代 5-10 元杂芳基;

优选 R 选自氢原子或 C1-C6 烷基;

15 R₁ 选自氢原子、氘原子、卤素、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、氘代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、羧基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基、5-10 元杂芳基、取代 5-10 元杂芳基;

优选 R₁ 选自氢原子或 C1-C6 烷基;

更优选 R₁ 选自 C1-C6 烷基;

20 R₂ 选自氢原子、氘原子、卤素、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、氘代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、羧基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基、5-10 元杂芳基、取代 5-10 元杂芳基;

优选 R₂ 选自氢原子、卤素或 C1-C6 烷基;

更优选 R₂ 选自卤素;

25 X 选自 -C(O)-CR_aR_b-(CR₃R₄)_m-O-、-C(O)-CR_aR_b-(CR₃R₄)_m-NH-或 -C(O)-CR_aR_b-(CR₃R₄)_m-S-;

优选 X 选自 -C(O)-CR_aR_b-(CR₃R₄)_m-O-;

30 R_a 和 R_b 各自独立地选自氢原子、氘原子、卤素、C1-C6 烷基、氘代 C1-C6 烷基、卤代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基、5-10 元杂芳基、取代 5-10 元杂芳基;

优选 R_a 和 R_b 各自独立地选自氢原子、C1-C6 烷基、卤代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基或 C6-C10 芳基 C1-C6 烷基；

或者, R_a 、 R_b 及其所连接碳原子构成 C3-C8 环烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基；优选 R_a 、 R_b 及其所连接碳原子构成 C3-C8 环烷基；

R_3 、 R_4 相同或者不同, 且分别独立地为氢原子、氘原子、卤素、C1-C6 烷基、卤代 C1-C6 烷基、氘代 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基、羟基、氨基、氰基、硝基、羟 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基；

优选 R_3 、 R_4 分别独立地为氢原子或 C1-C6 烷基；

或者, R_3 、 R_4 及其所连接碳原子构成 C3-C8 环烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基；

m 选自 0-4 的整数 (例如 0、1、2、3 或 4), 优选为 0、1；

n 选自 1-10 的整数 (例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10)。

在本发明的第一方面和第二方面的一些实施方式中, 公开所述的配体-喜树碱类衍生物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物, 其特征在于: 所述 Ac 具有如下式 B 所示结构,



其中:

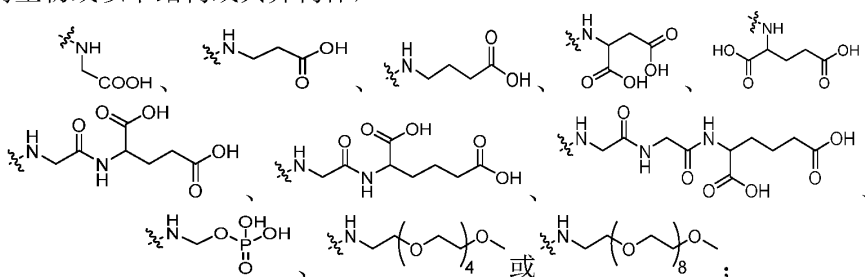
Z 非限制性地选自亲水结构羧基、磷酸、聚磷酸、亚磷酸、磺酸、亚磺酸或聚乙二醇(PEG)中的一种或多种所组成的组；

优选 Z 选自亲水结构羧基、磷酸或聚乙二醇(PEG)；

Y' 为任选的连接氨基和 Z 的支架；优选 Y' 为 C1-C6 亚烷基 (例如亚甲基)；

Ac 通过支架 Y 与结构式 I 中已标示的 2 位碳相连。

在本发明的第一方面和第二方面的一些实施方式中, 公开所述的配体-喜树碱类衍生物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物, 其特征在于: 所述 Ac 非限制性地选自甘氨酸、(D/L)丙氨酸、(D/L)亮氨酸、(D/L)异亮氨酸、(D/L)缬氨酸、(D/L)苯丙氨酸、(D/L)脯氨酸、(D/L)色氨酸、(D/L)丝氨酸、(D/L)酪氨酸、(D/L)半胱氨酸、(D/L)胱氨酸、(D/L)精氨酸、(D/L)组氨酸、(D/L)蛋氨酸、(D/L)天冬酰胺、(D/L)谷氨酰胺、(D/L)苏氨酸、(D/L)天冬氨酸、(D/L)谷氨酸、天然或非天然氨基酸衍生物或以下结构或其异构体,

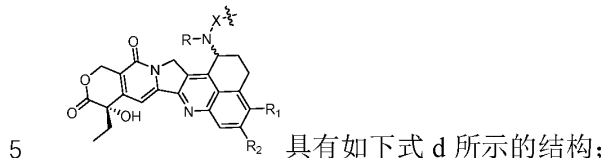
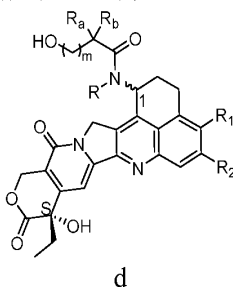


优选 Z 选自亲水结构羧基、磷酸或聚乙二醇(PEG)；

在本发明的第一方面和第二方面的一些实施方式中, 公开所述的配体-喜树

碱类衍生物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其特征在于：所述 Ac 非限制性地选自甘氨酸、磷酸、(D/L)谷氨酸或聚乙二醇亲水结构。

在本发明的第一方面和第二方面的一些实施方式中，公开所述的配体-喜树碱类衍生物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其特征在于：所述



其中：

10 R 选自氢原子、氘原子、卤素、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、氘代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基、5-10 元杂芳基、取代 5-10 元杂芳基；

优选 R 选自氢原子或 C1-C6 烷基；

15 R1 选自氢原子、氘原子、卤素、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、氘代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、羧基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基、5-10 元杂芳基、取代 5-10 元杂芳基；

优选 R1 选自氢原子或 C1-C6 烷基；

更优选 R1 选自 C1-C6 烷基；

20 R2 选自氢原子、氘原子、卤素、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、氘代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、羧基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基、5-10 元杂芳基、取代 5-10 元杂芳基；

优选 R2 选自氢原子、卤素或 C1-C6 烷基；

更优选 R2 选自卤素；

25 Ra 和 Rb 各自独立地选自氢原子、氘原子、卤素、C1-C6 烷基、氘代 C1-C6 烷基、卤代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基、5-10 元杂芳基、取代 5-10 元杂芳基；

30 优选 Ra 和 Rb 各自独立地选自氢原子、C1-C6 烷基、卤代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基或 C6-C10 芳基 C1-C6 烷基；

优选 Ra 和 Rb 各自独立地选自氢原子、C1-C6 烷基、卤代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C6-C10 芳基；优选 Ra 和 Rb 各自独立地选自氢原子、甲基、乙基、三氟甲基、环丙基甲基、苯基；

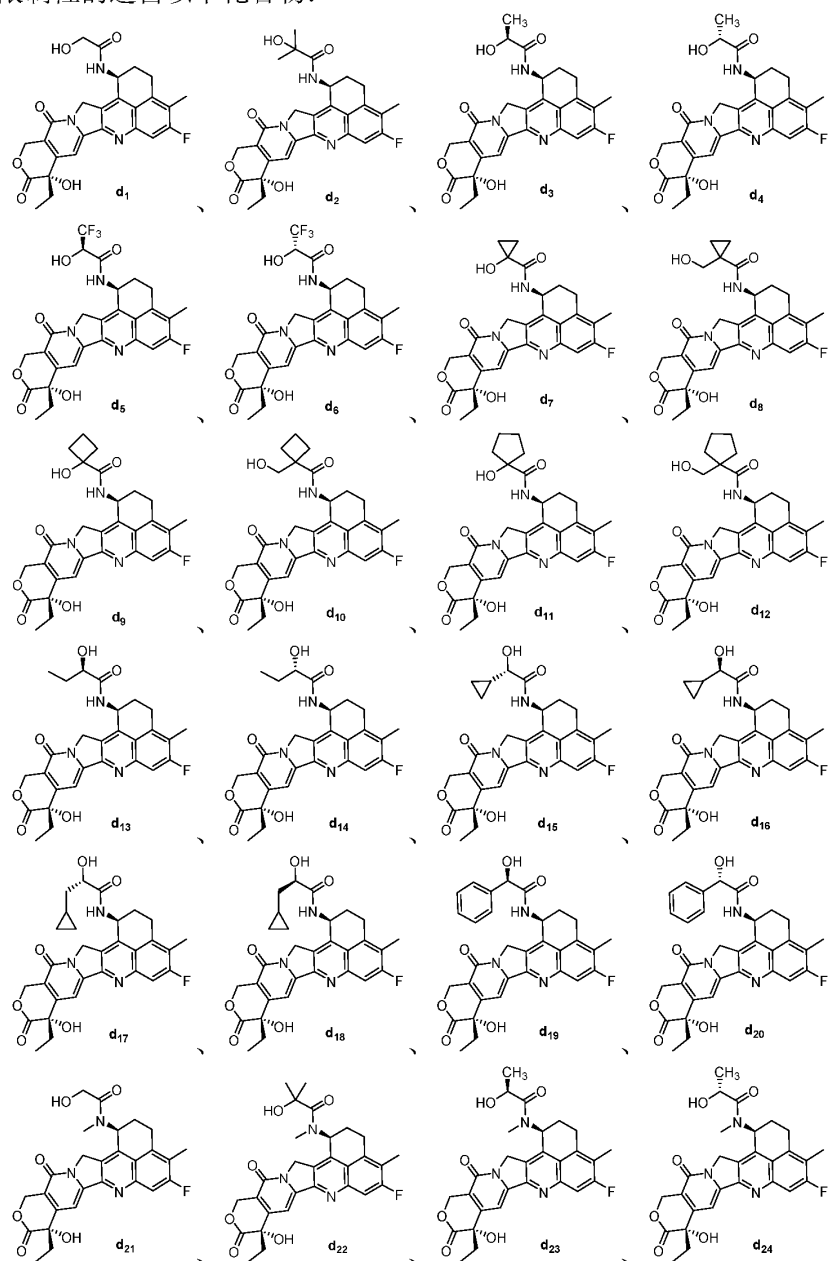
或者，Ra、Rb 及其所连接碳原子构成 C3-C8 环烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷

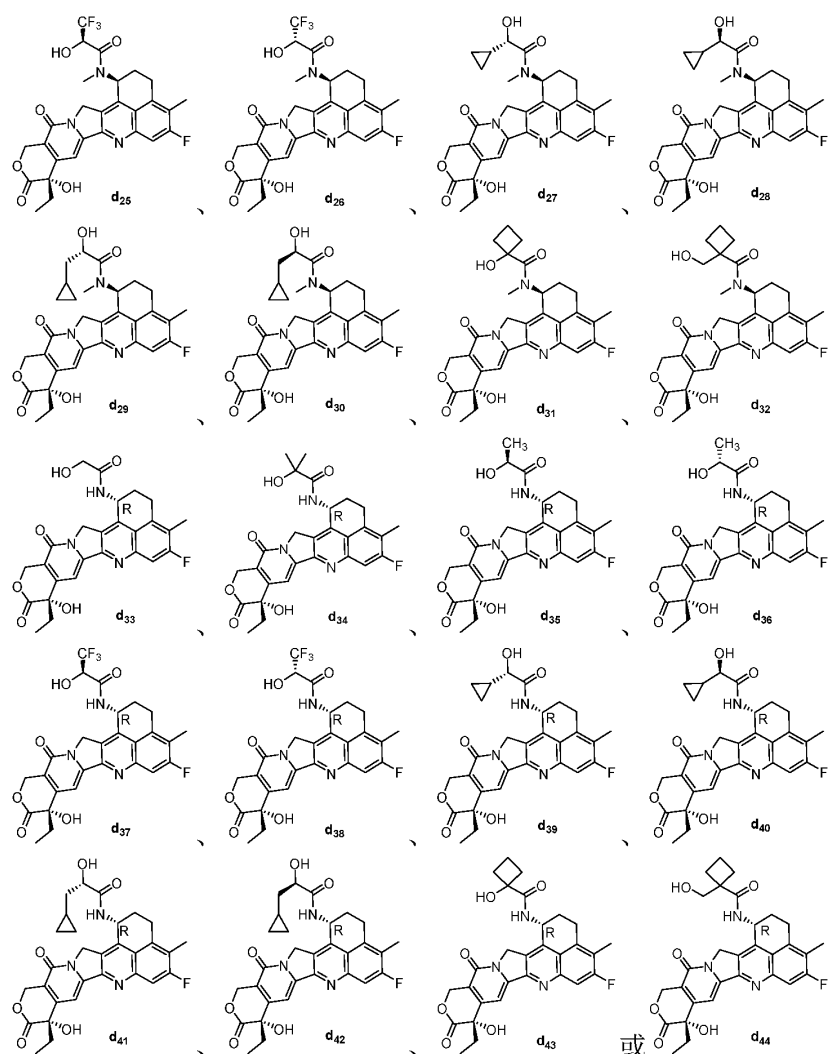
基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基；优选 R_a 、 R_b 及其所连接碳原子构成 C3-C8 环烷基（例如 C3-C5 环烷基）；

1 位手性碳原子具有 R 绝对构型或 S 绝对构型两种手性构型；

m 选自 0 或 1。

- 5 在本发明的第一方面和第二方面的一些实施方式中，公开所述的配体-喜树碱类衍生物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其特征在于：所述结构式 d 非限制性的选自以下化合物：



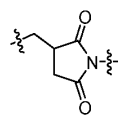


5

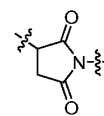
在本发明的某些实施方案中，L₁可以包含丁二酰亚胺基团。在这些实施方案中，配体-药物偶联物在易水解条件下可以发生水解，水解部位即为连接单元的丁二酰亚胺基团。当配体中包含多个连接子-药物时，随水解程度不同，可出现以下情形：

10

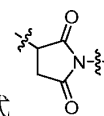
丁二酰亚胺基团完全不水解，即丁二酰亚胺基团均为闭环形式



;

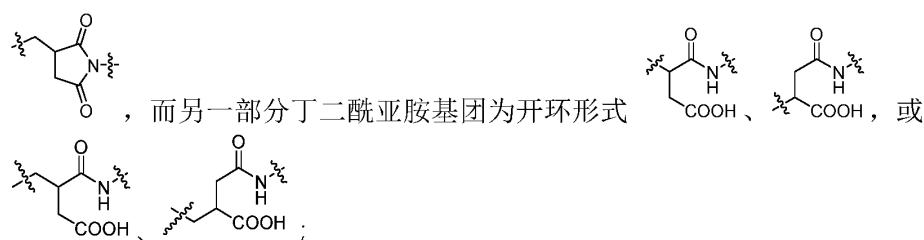


或

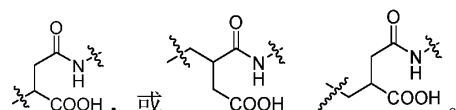


或

丁二酰亚胺基团不完全水解，即部分丁二酰亚胺基团为闭环形式



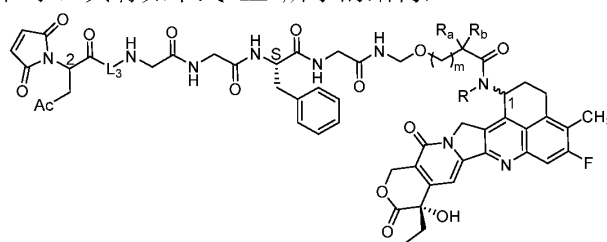
丁二酰亚胺基团完全水解，即丁二酰亚胺基团均为开环形式



5 因此，当 ADC 中同时存在多个含丁二酰亚胺基团的 L_1 （即，Ab 连接有多个含丁二酰亚胺基团的药物-连接子）时，这些丁二酰亚胺基团可以均为闭环形式、部分为开环形式或者全部为开环形式。

可以理解的是，本申请中尽管 ADC 的化学结构式中出现的丁二酰亚胺基团为闭环形式，但实际上涵盖了丁二酰亚胺全部闭环、部分开环和全部开环这三种情形。

10 本发明的第三方面公开一种连接子-药物化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其特征在于：具有如下式 III 所示的结构，



III

15 其中：

R 选自氢原子、氘原子、卤素、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、氘代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基、5-10 元杂芳基、取代 5-10 元杂芳基；

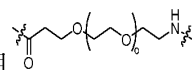
20 R_a 选自氢原子、氘原子、卤素、C1-C6 烷基、氘代 C1-C6 烷基、卤代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基、5-10 元杂芳基、取代 5-10 元杂芳基；

25 R_b 选自氢原子、氘原子、卤素、C1-C6 烷基、氘代 C1-C6 烷基、卤代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基、5-10 元杂芳基、取代 5-10 元杂芳基；

或者， R_a 、 R_b 及其所连接碳原子构成 C3-C8 环烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基；

优选 R_a 和 R_b 各自独立地选自氢原子、C1-C6 烷基、卤代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C6-C10 芳基；优选 R_a 和 R_b 各自独立地选自氢原子、甲基、乙基、三氟甲基、环丙基甲基、苯基；

或者， R_a 、 R_b 及其所连接碳原子构成 C3-C8 环烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基；优选 R_a 、 R_b 及其所连接碳原子构成 C3-C8 环烷基（例如 C3-C5 环烷基）；

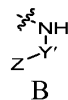
L_3 存在或者不存在，当 L_3 存在时，选自 ， o 选自 1-10 的整数（例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10）；

1 位或 2 位手性碳原子具有 R 绝对构型或 S 绝对构型两种手性；

Ac 为亲水结构单元；

m 选自 0 或 1。

在本发明的第三方面的一些实施方式中，公开所述的连接子-药物化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其特征在于：所述 Ac 具有如下式 B 所示结构，



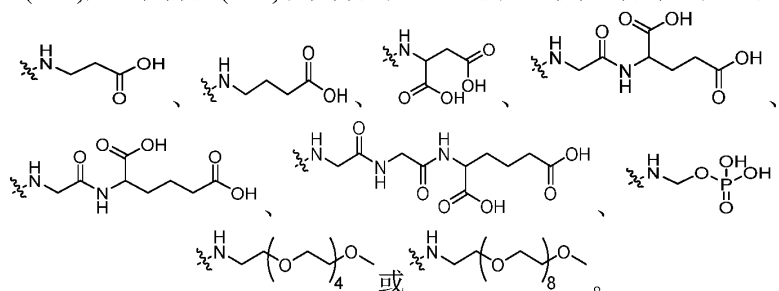
其中：

Z 非限制性地选自亲水结构羧基、磷酸、聚磷酸、亚磷酸、磺酸、亚磺酸或聚乙二醇(PEG)中的一种或多种所组成的组；

Y' 为任选的连接氨基和 Z 的支架；优选 Y' 为 C1-C6 亚烷基（例如亚甲基）；

Ac 通过支架 Y 与结构式 I 中已标示的 2 位碳相连。

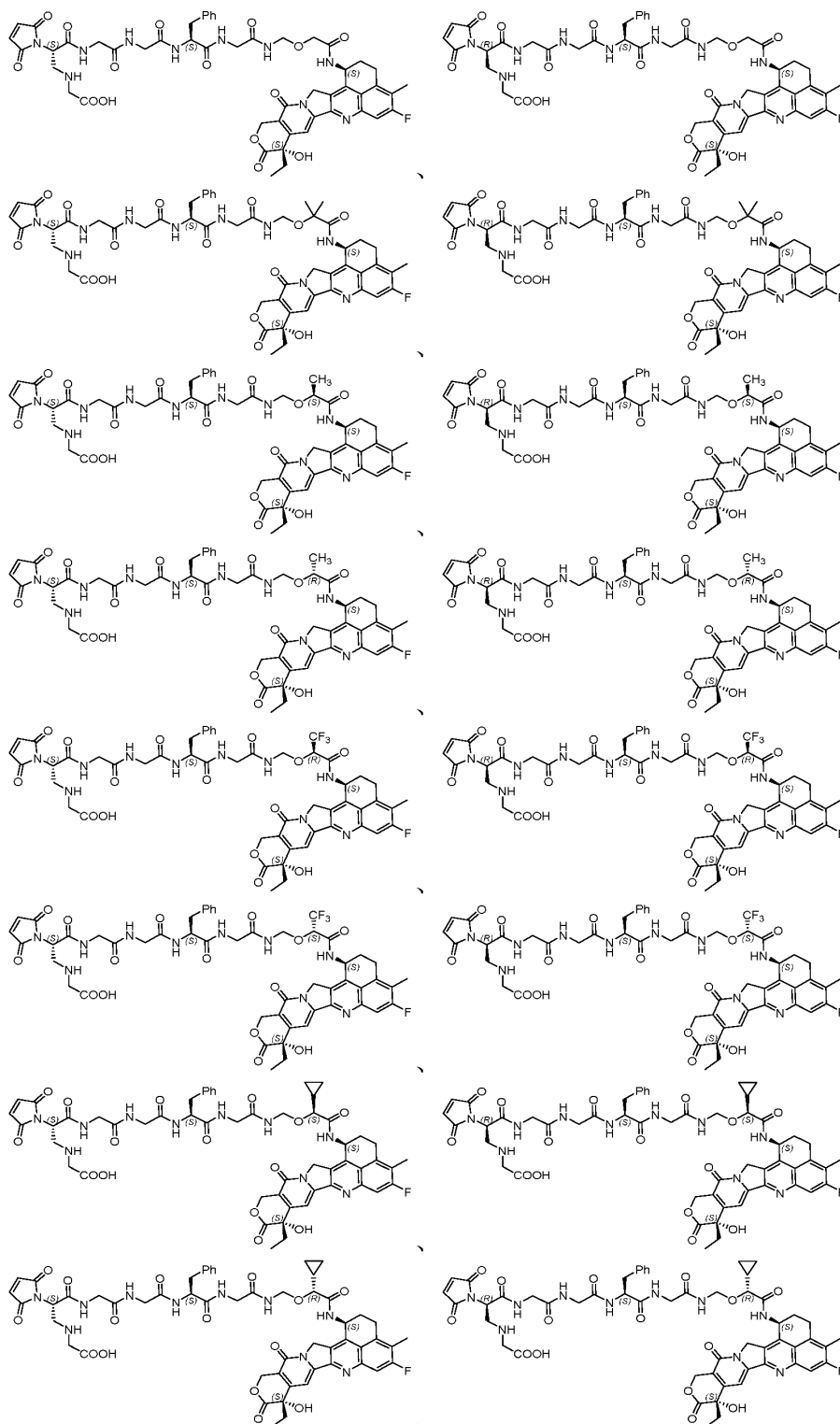
在本发明的第三方面的一些实施方式中，公开所述的连接子-药物化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其特征在于：所述 Ac 非限制性地选自甘氨酸、(D/L)丙氨酸、(D/L)亮氨酸、(D/L)异亮氨酸、(D/L)缬氨酸、(D/L)苯丙氨酸、(D/L)脯氨酸、(D/L)色氨酸、(D/L)丝氨酸、(D/L)酪氨酸、(D/L)半胱氨酸、(D/L)胱氨酸、(D/L)精氨酸、(D/L)组氨酸、(D/L)蛋氨酸、(D/L)天冬酰胺、(D/L)谷氨酰胺、(D/L)苏氨酸、(D/L)天冬氨酸、(D/L)谷氨酸、天然或非天然氨基酸衍生物或以下结构，



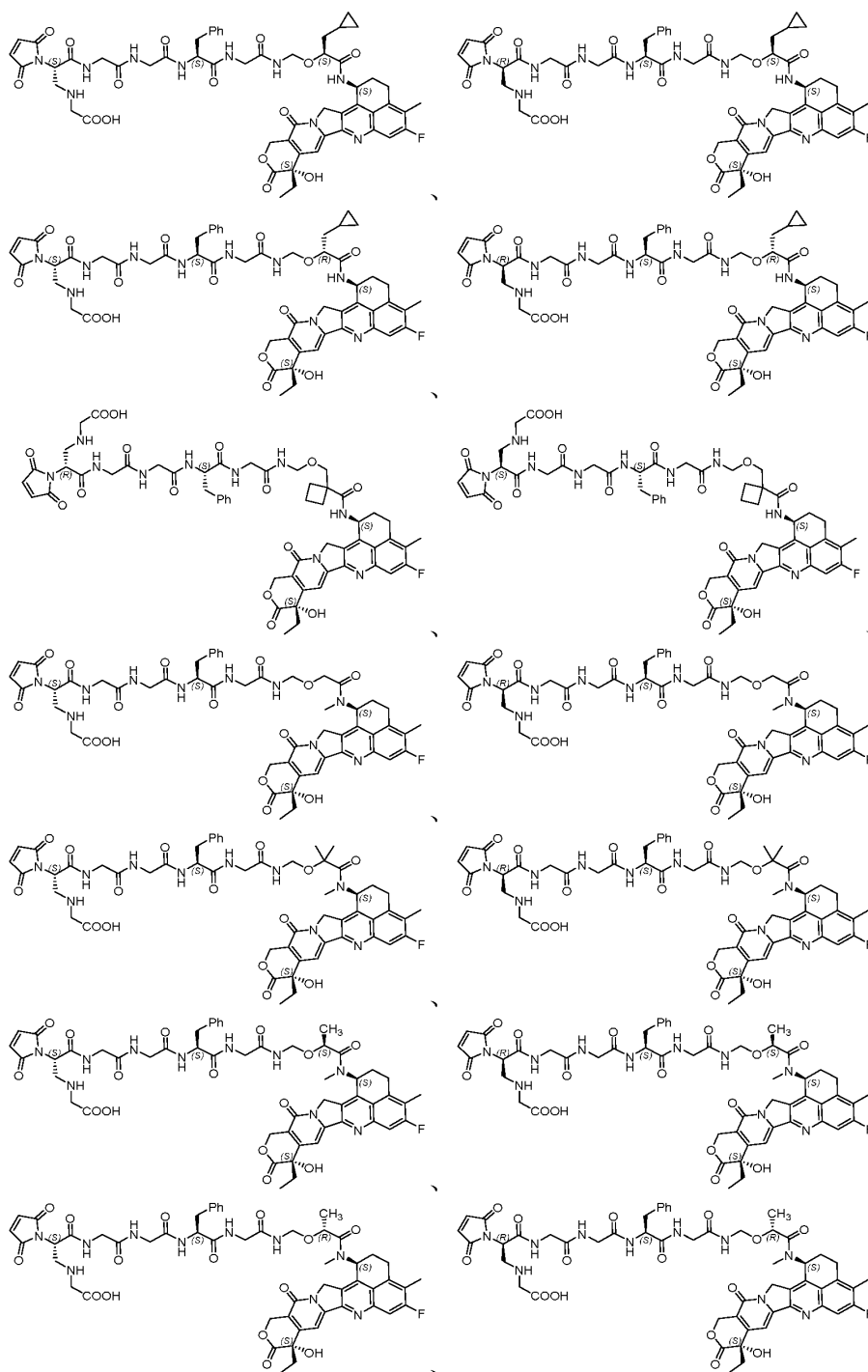
在本发明的第三方面的一些实施方式中，公开所述的连接子-药物化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其特征在于：Ac 非限制性地选自甘氨酸、磷酸、(D/L)谷氨酸或聚乙二醇亲水结构。

在本发明的第三方面的一些实施方式中，公开所述的连接子-药物化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其特征在于：所述连接子-药物化合物非限制性地选自以下结构或其异构体，

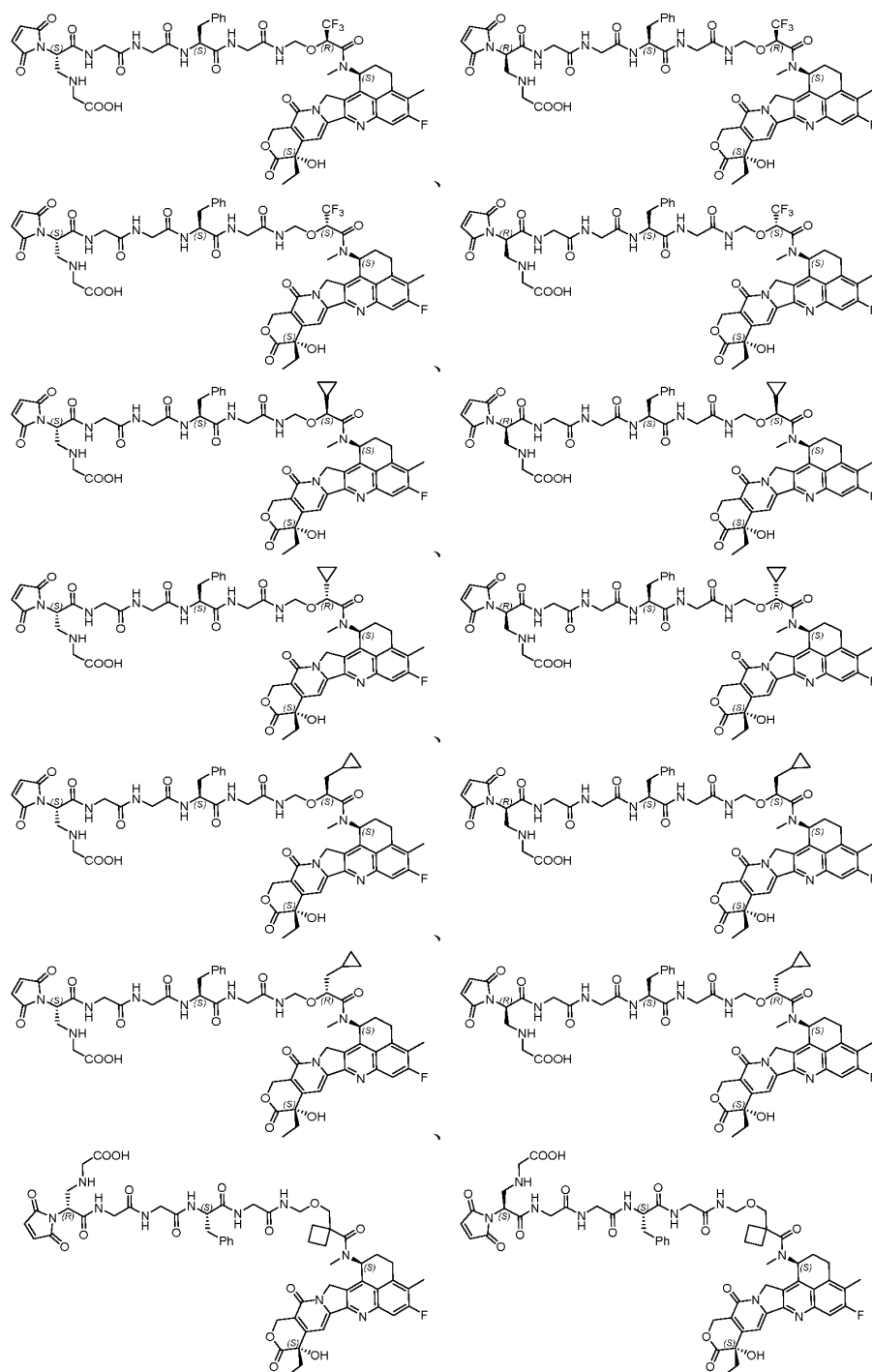
5

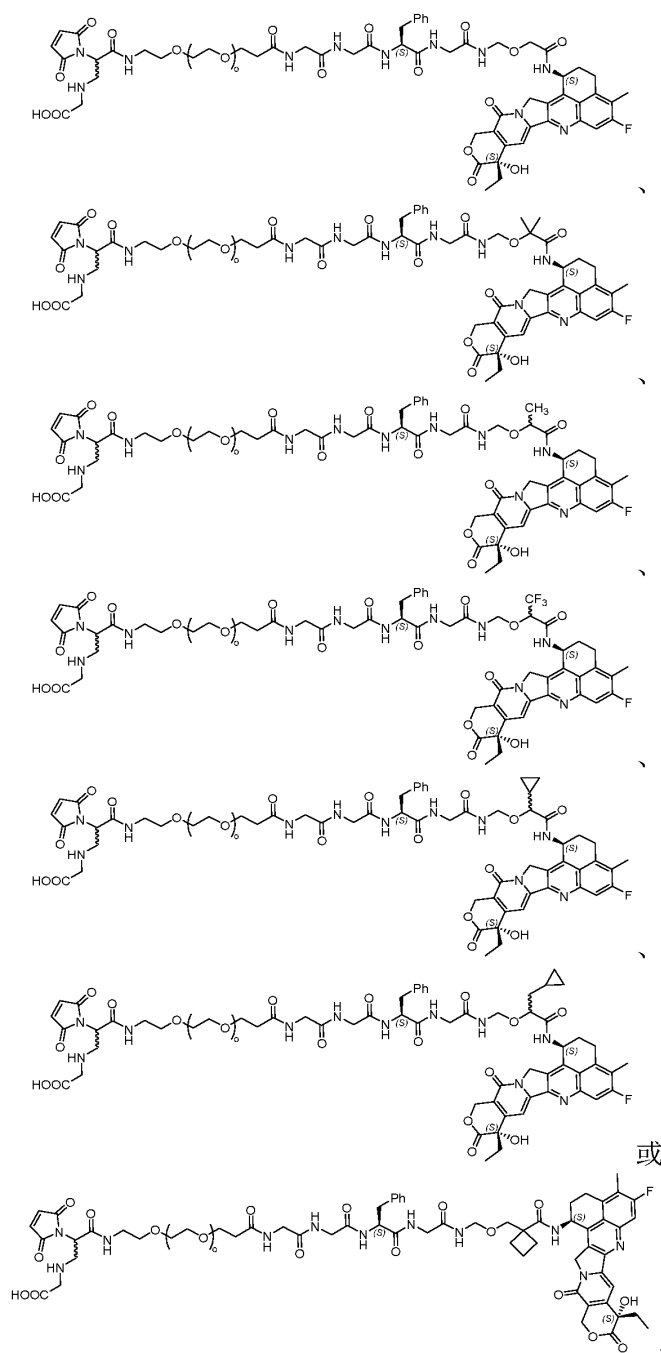


5



5

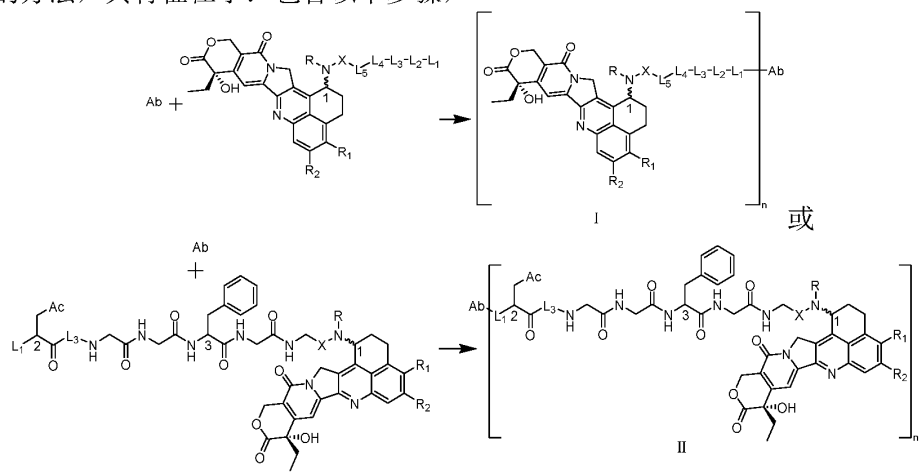




10 其中：o 选自 1-10 的整数（例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10）。

本发明第三方面公开的所述连接子-药物化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物可作为中间体，用于与配体 Ab 偶联形成第一方面、第二方面所述式 I 或式 II 的配体-喜树碱类衍生物偶联物。

本发明的第四方面公开一种制备如第一方面、第二方面所述的通式 I 或通式 II 所示的配体-喜树碱类衍生物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物的方法，其特征在于：包含以下步骤，



5

通过还原的抗体或者其抗原结合片段与连接子-药物化合物偶联反应，得到如通式 I 或通式 II 所示配体-喜树碱类衍生物偶联物；

1 位、2 位或 3 位手性碳原子具有 R 构型或 S 构型的绝对手性；

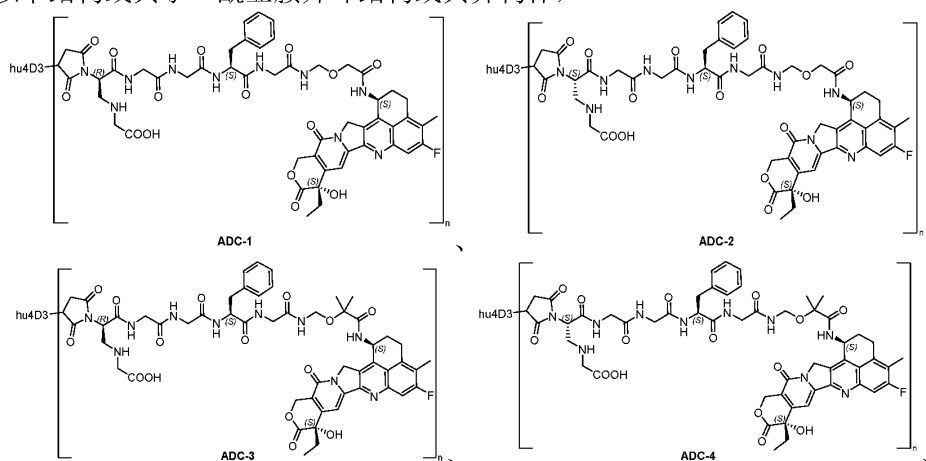
Ab、L₁、L₂、L₃、L₄、L₅、X、R、R₁、R₂ 及 n 如前文所述。

10 本申请还涉及第三方面公开所述的连接子-药物化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物作为中间体在制备配体-喜树碱衍生物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物中的用途。在某些实施方案中，所述配体-喜树碱衍生物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物为本发明的第一方面、第二方面和第四方面的配体-喜树碱衍生物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物。在某些实施方案中，

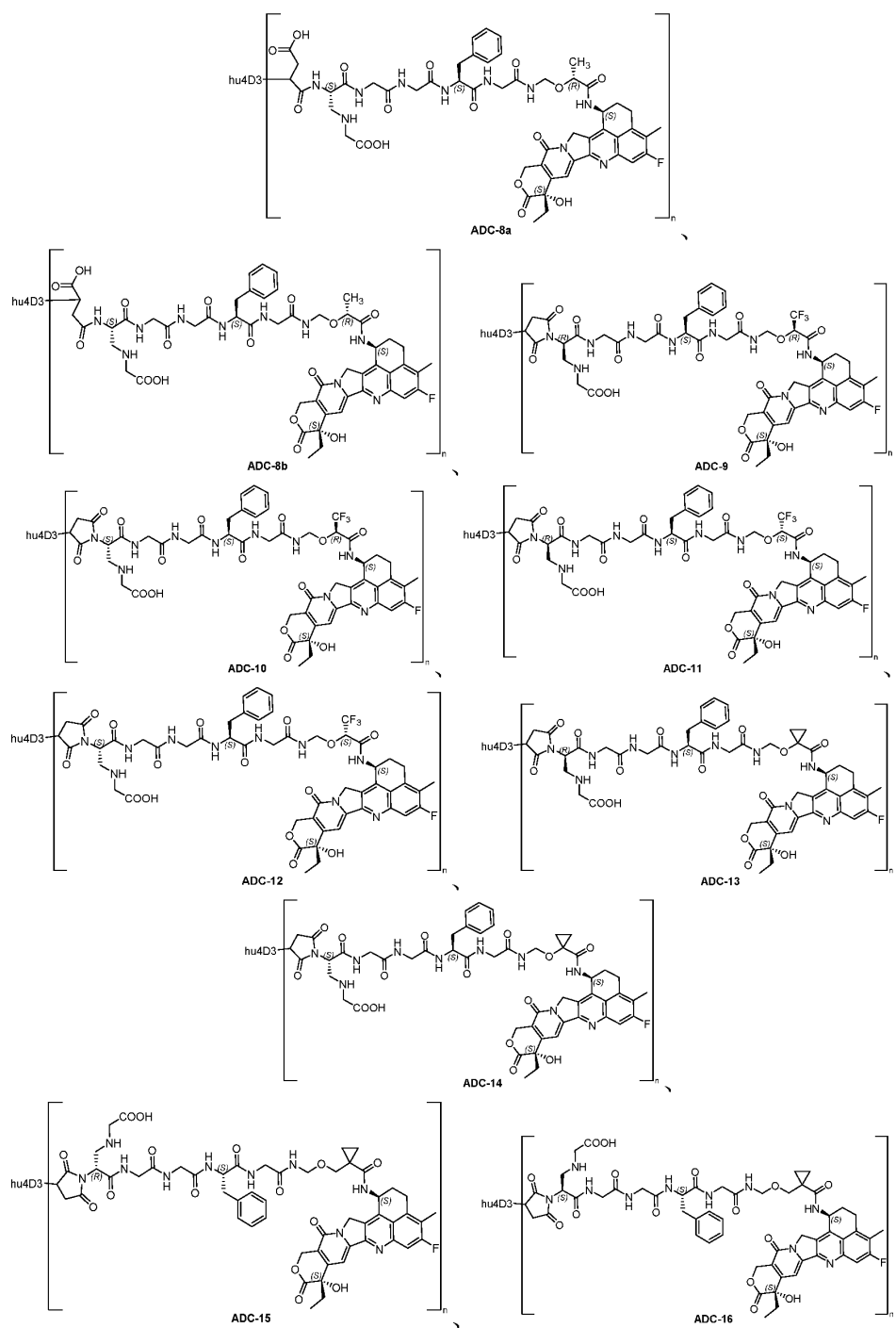
15 所述制备按照第四方面公开的制备方法进行。

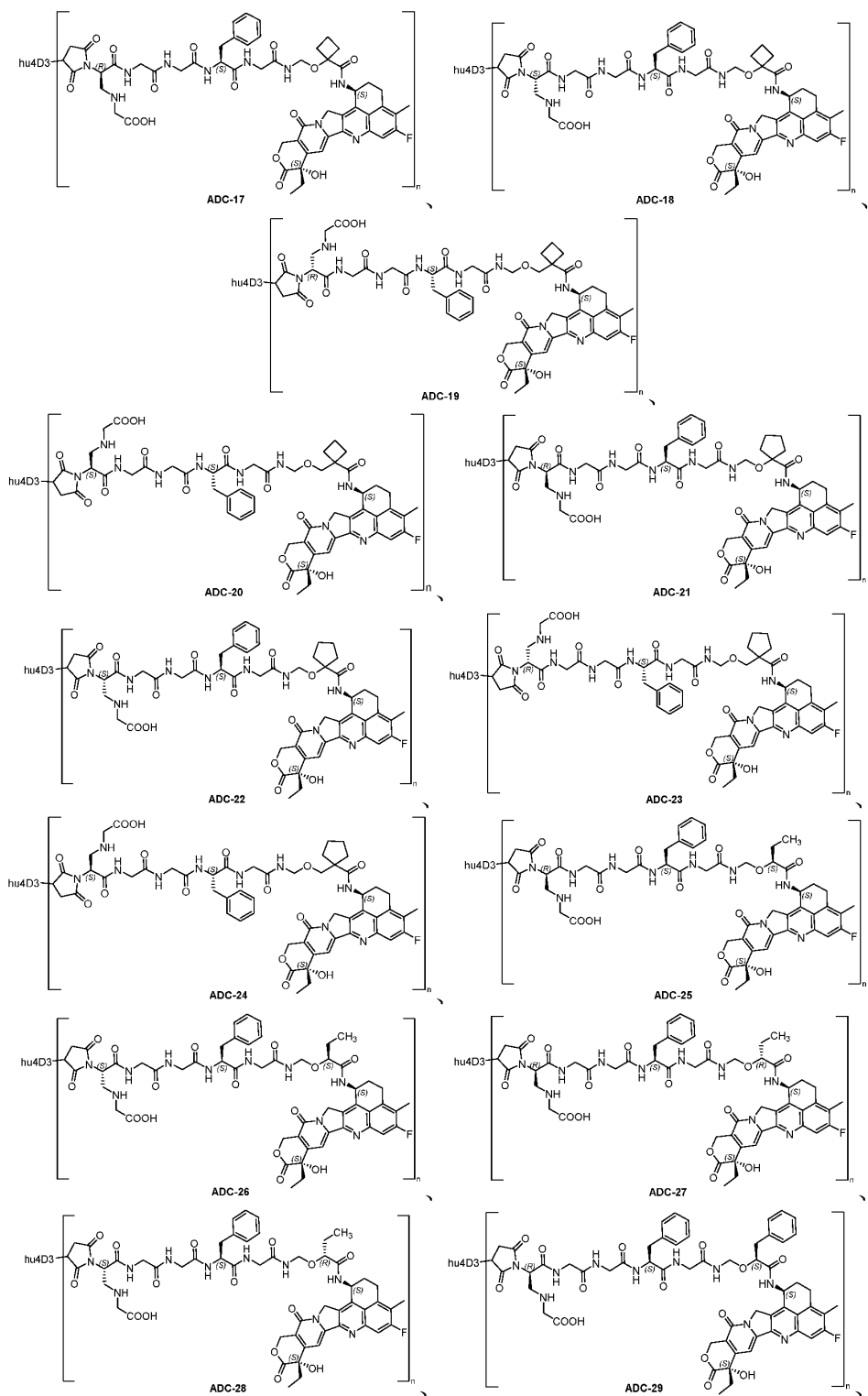
在本发明的第一方面、第二方面和第四方面的一些实施方式中，公开所述的配体-喜树碱衍生物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其特征在于：所述配体-喜树碱衍生物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物非限制性地选自以下结构或其丁二酰亚胺开环结构或其异构体，

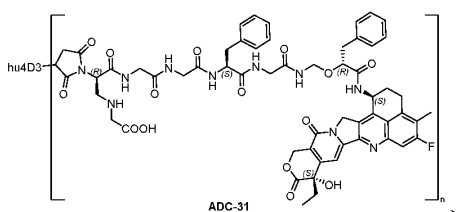
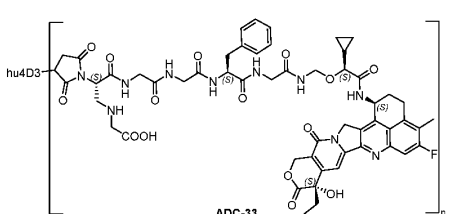
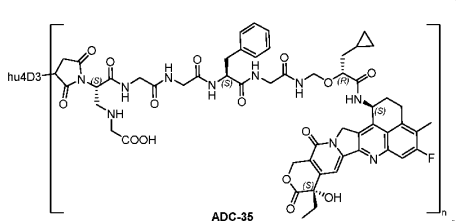
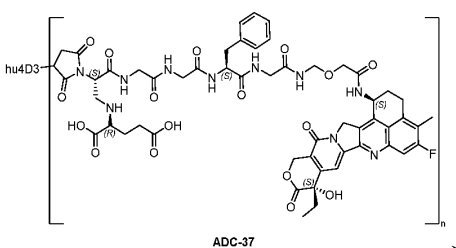
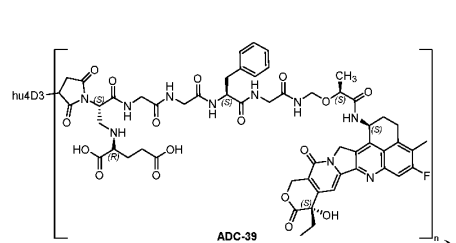
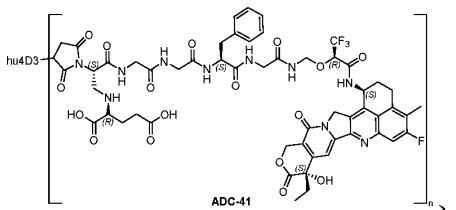
20

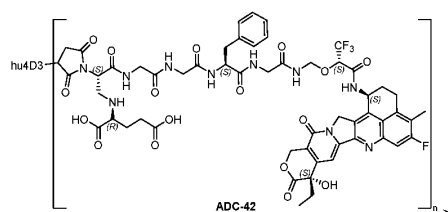
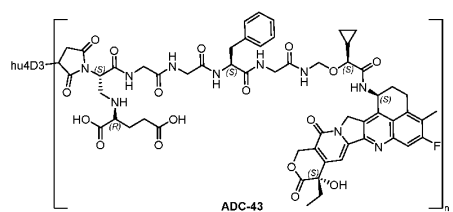
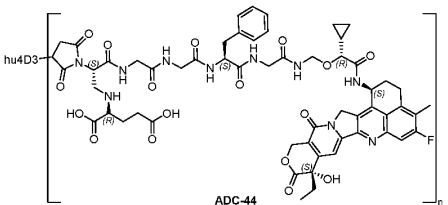
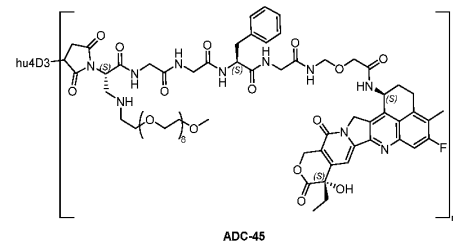
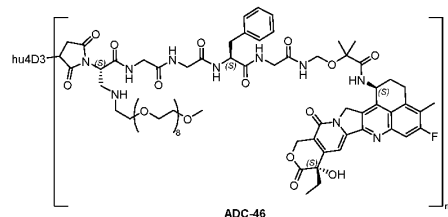
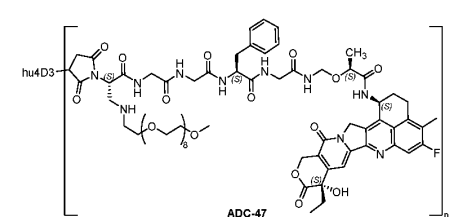
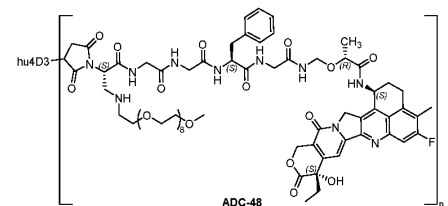
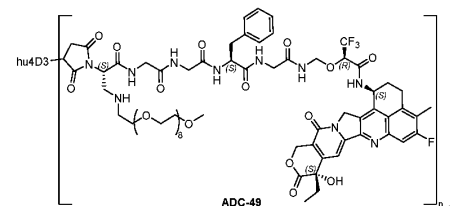
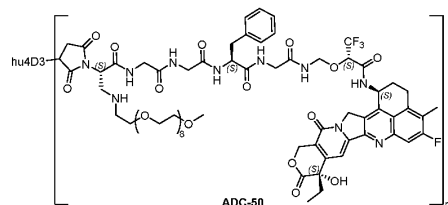
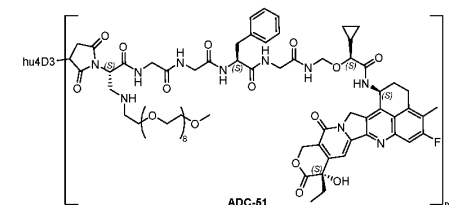




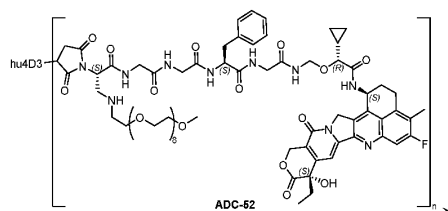
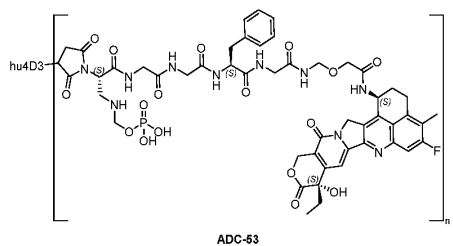


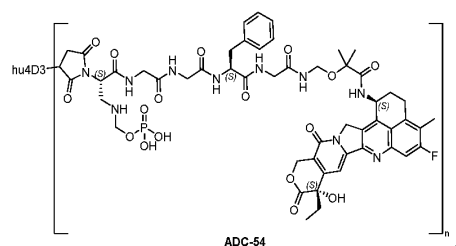
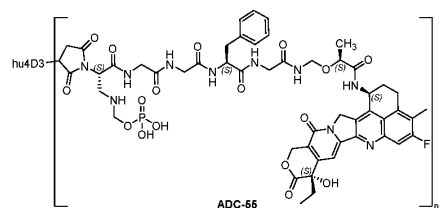
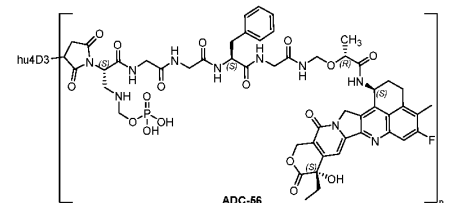
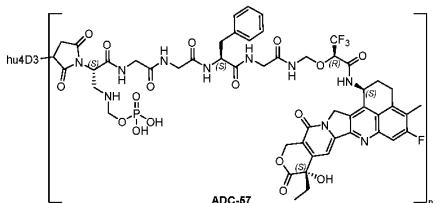
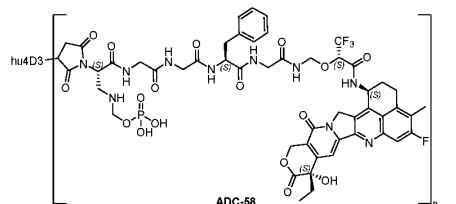
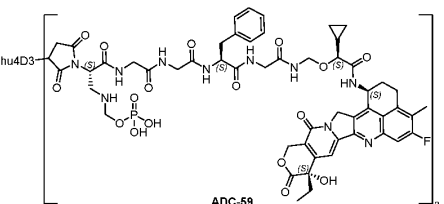
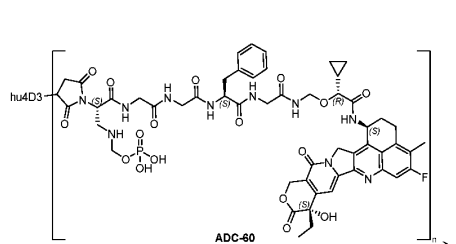
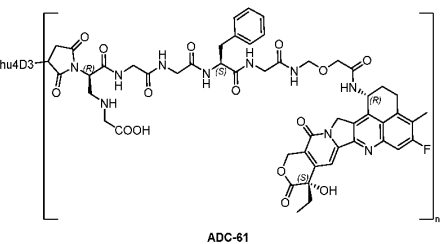
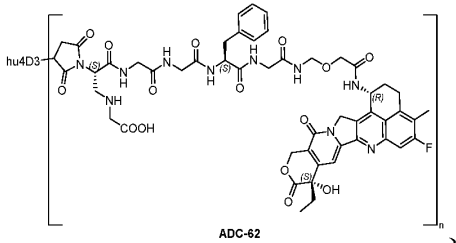
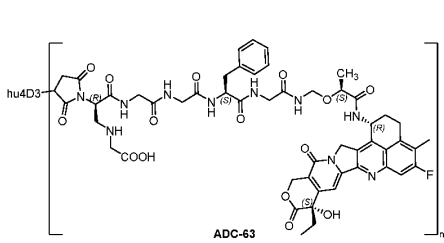
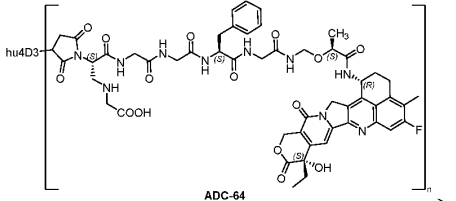
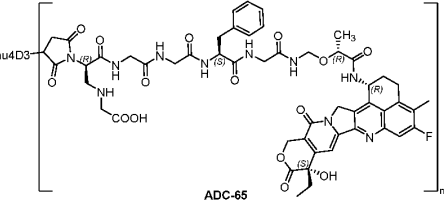


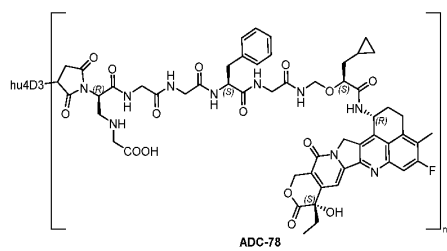
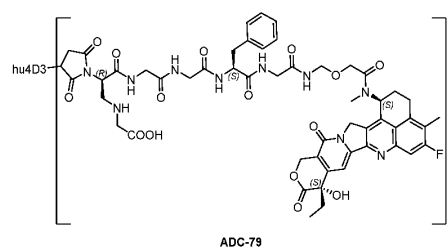
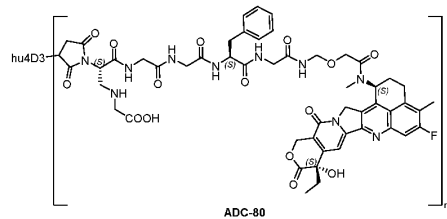
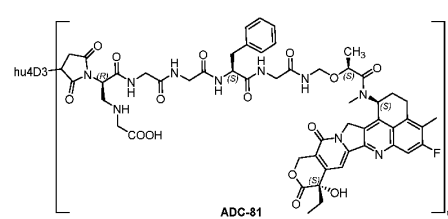
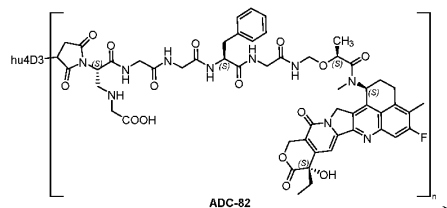
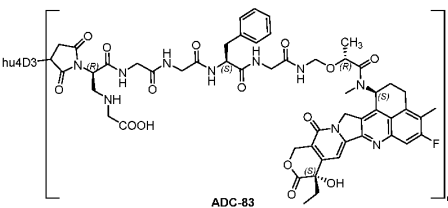
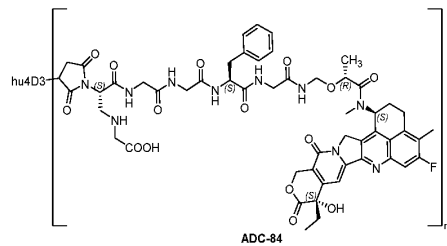
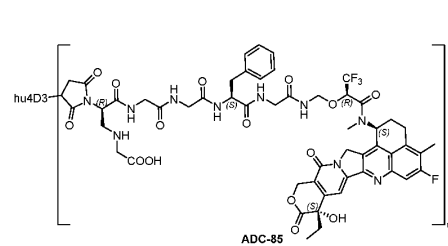
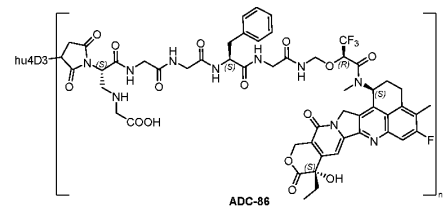
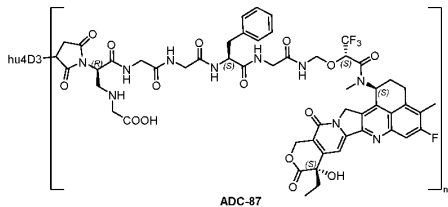
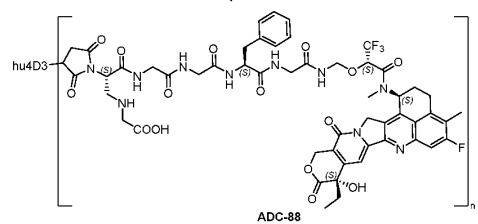


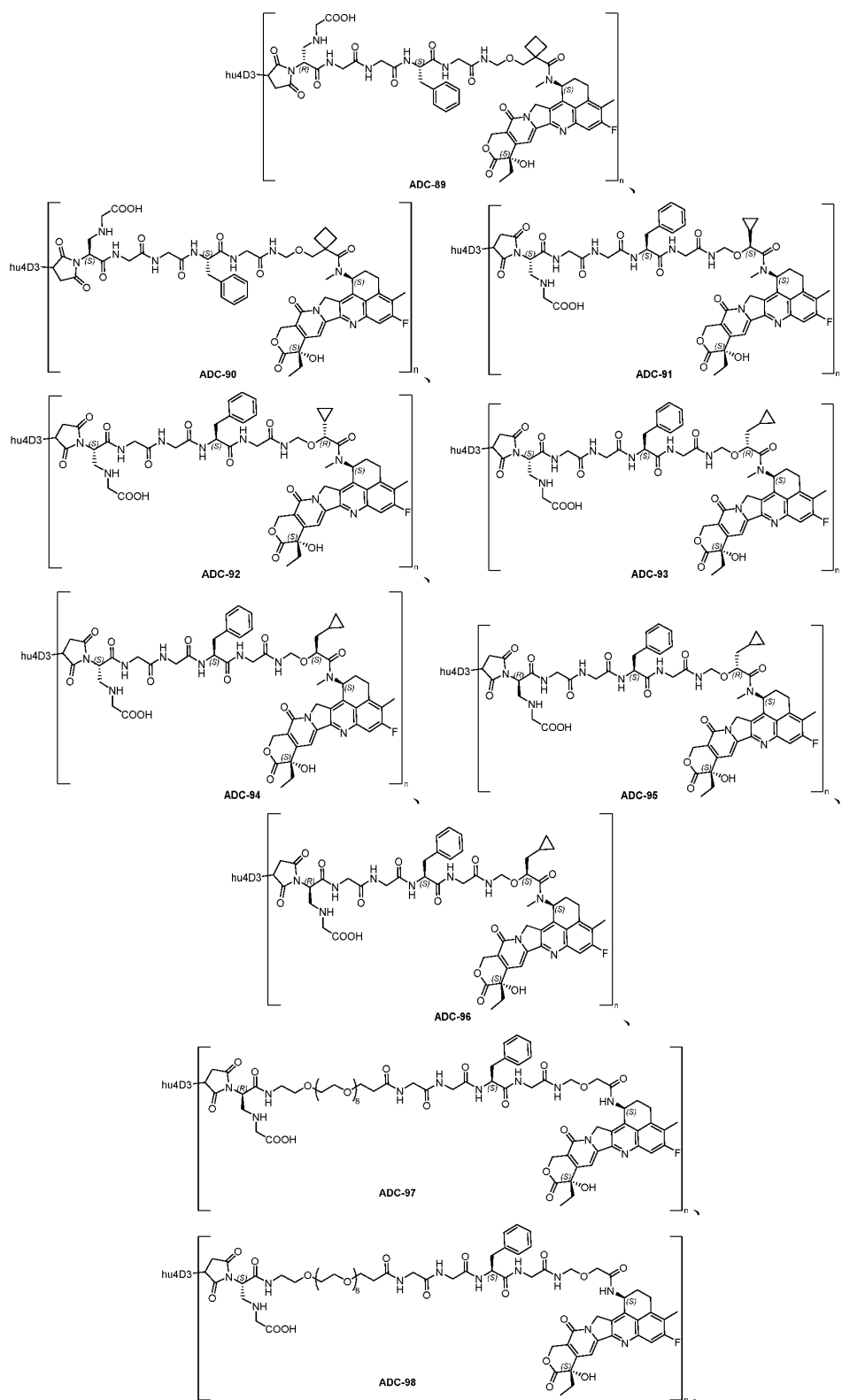


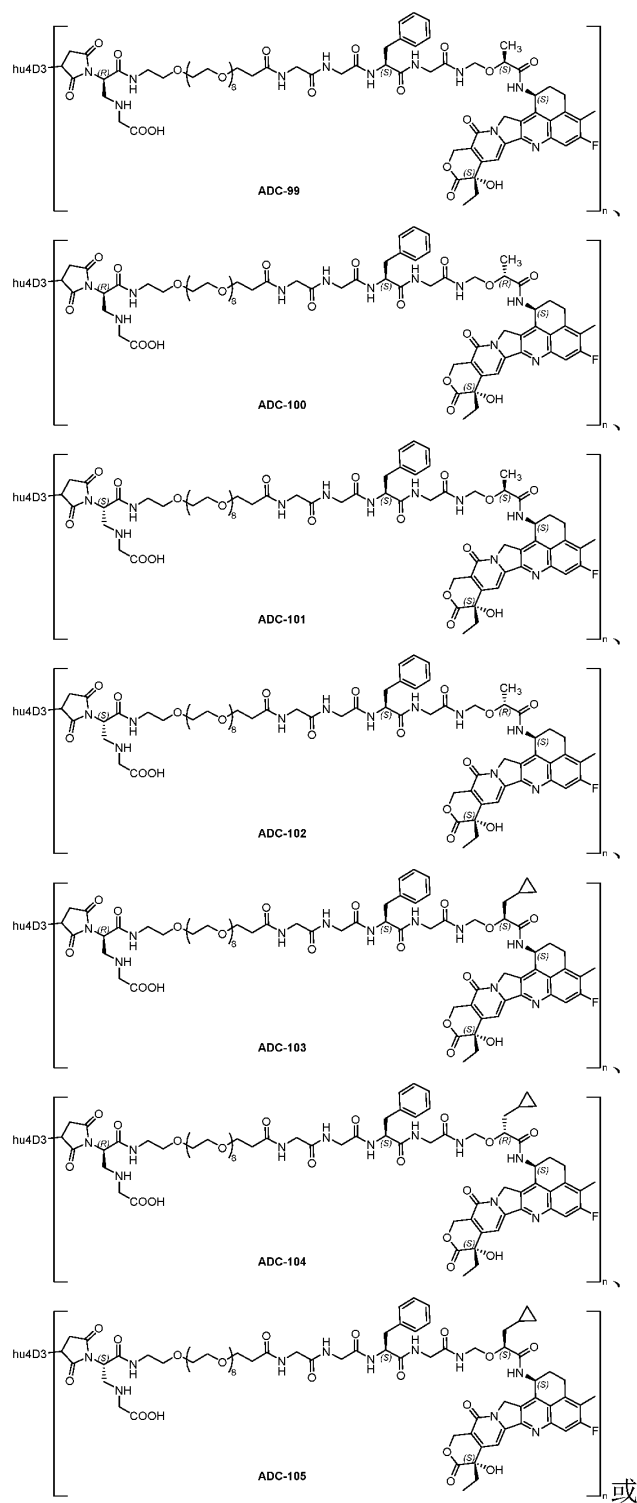
5

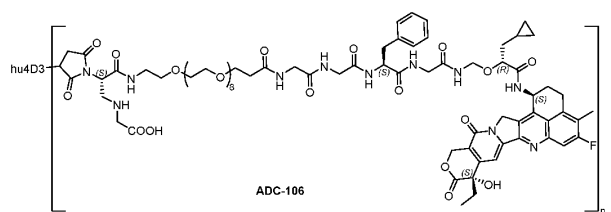










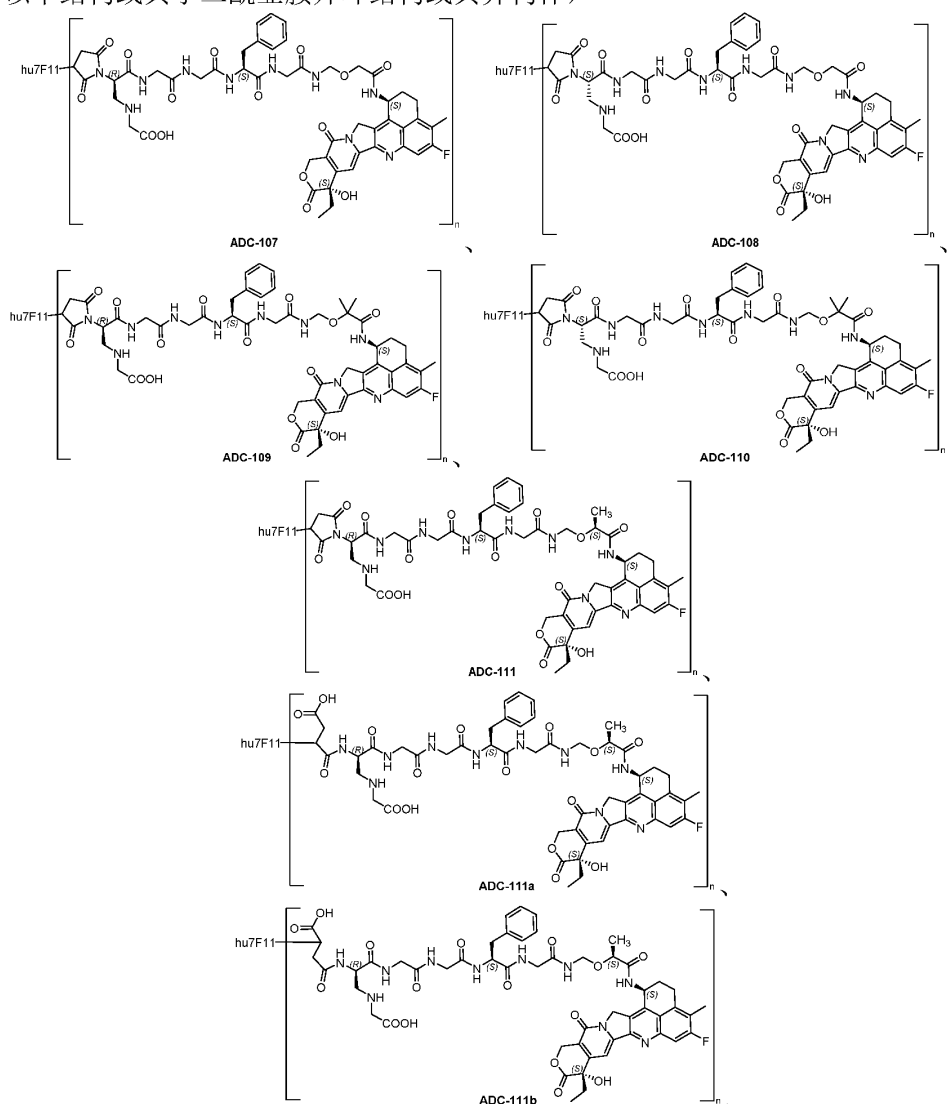


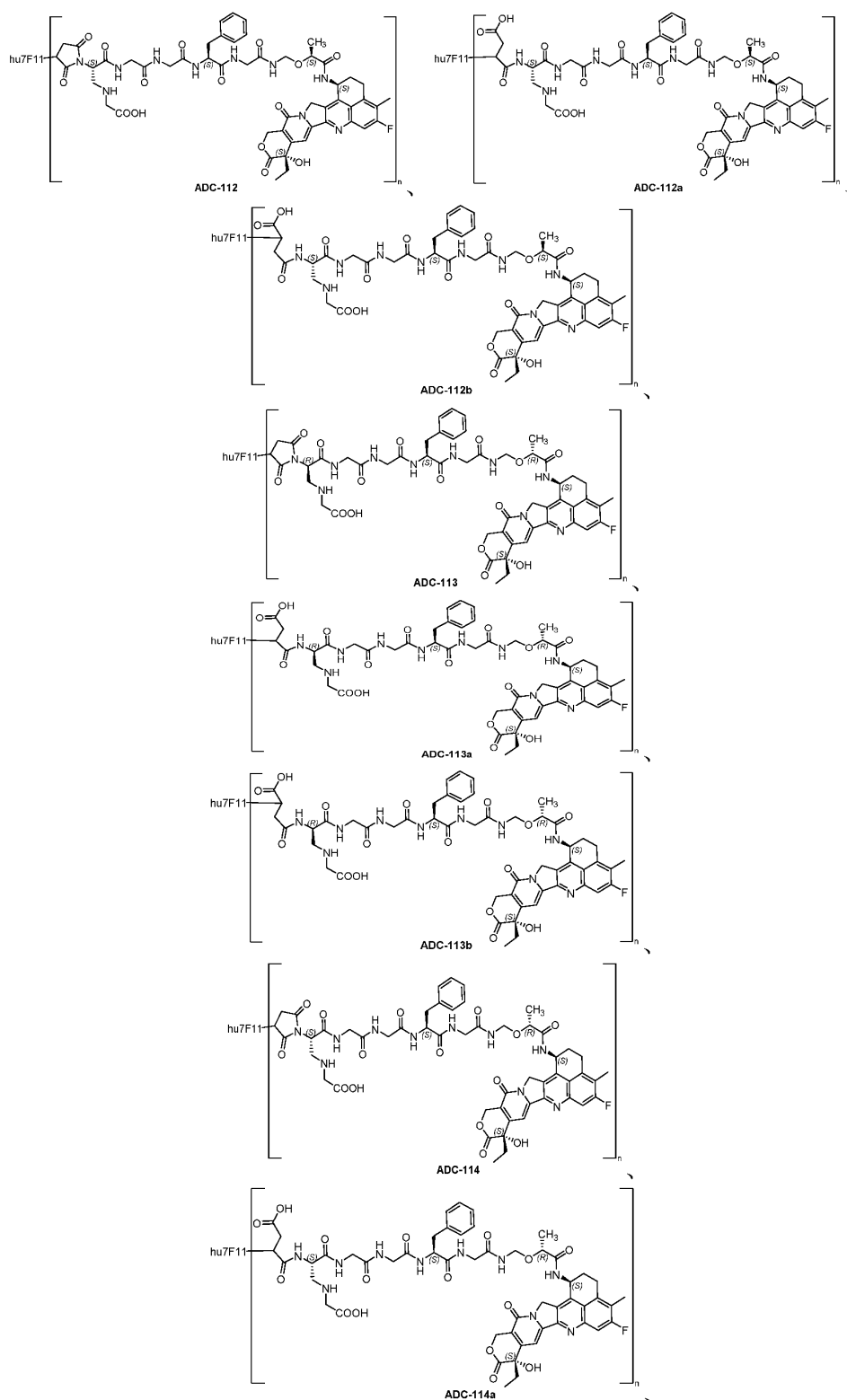
其中：

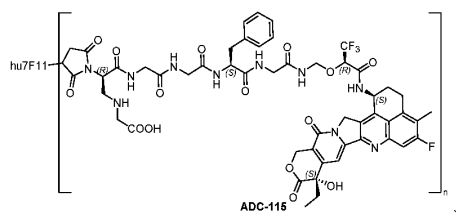
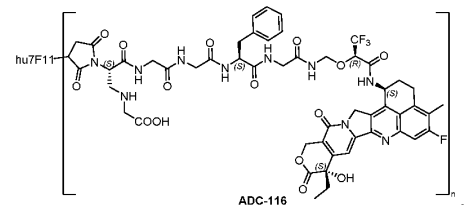
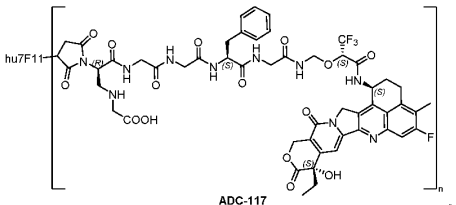
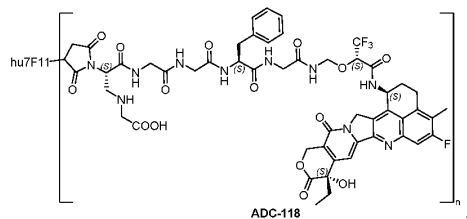
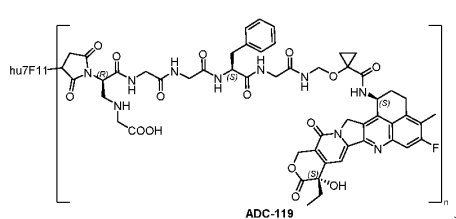
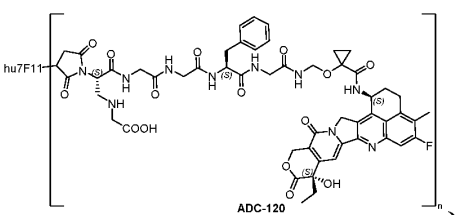
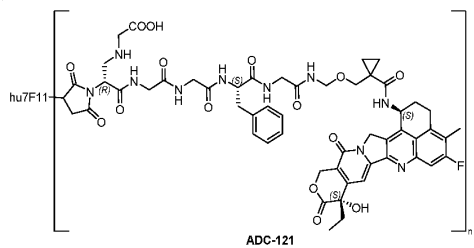
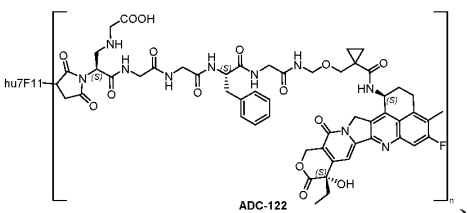
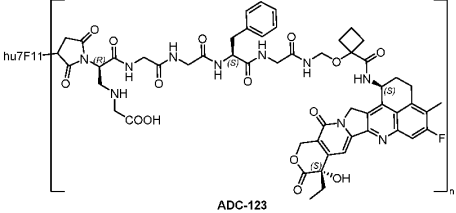
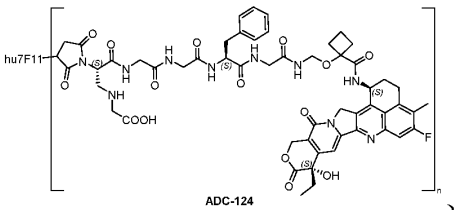
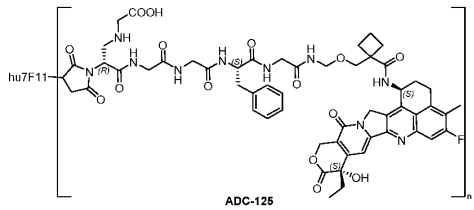
hu4D3 为靶向人 Trop2 的抗体或其抗原结合片段；

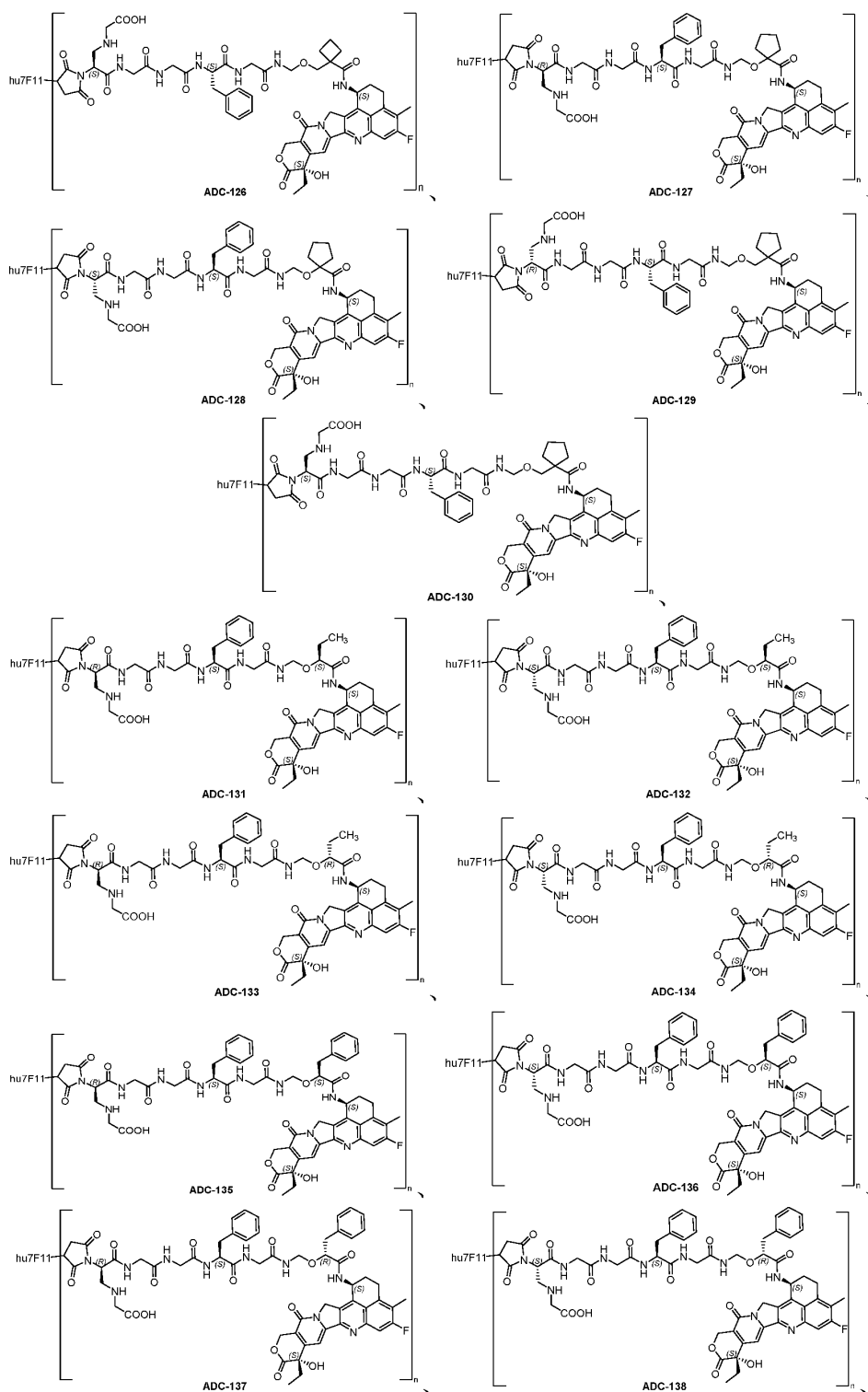
n 选自 1-10 的整数（例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10）。

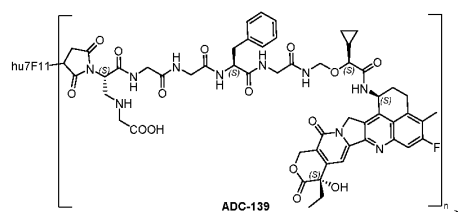
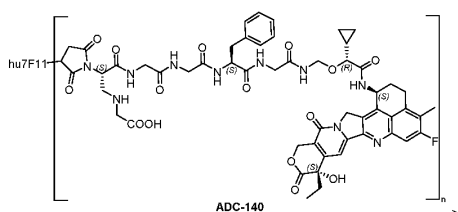
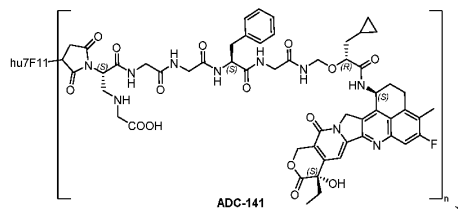
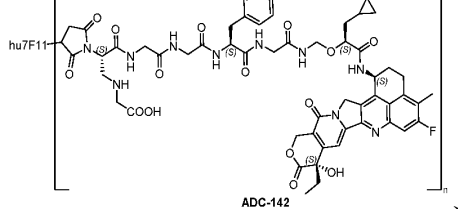
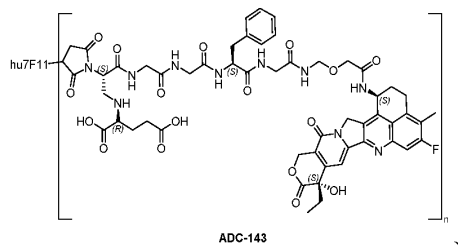
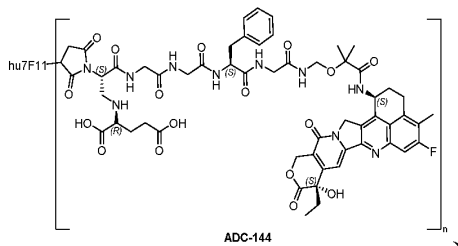
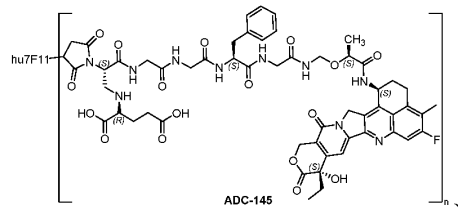
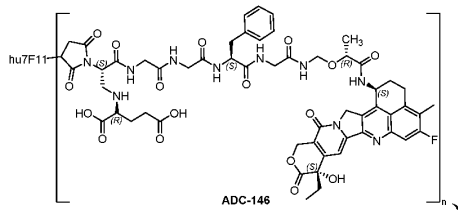
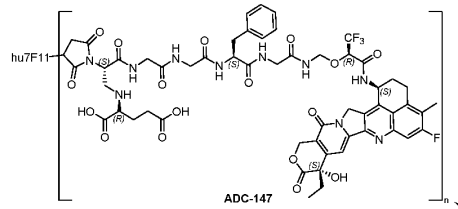
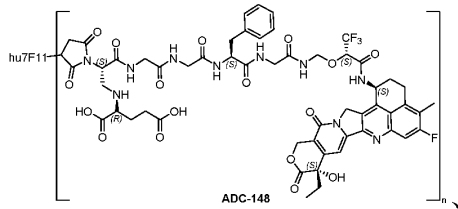
- 5 在本发明的第一方面、第二方面和第四方面的一些实施方式中，公开所述的配体-喜树碱衍生物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其特征在于：所述配体-喜树碱衍生物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物非限制性地选自以下结构或其丁二酰亚胺开环结构或其异构体，



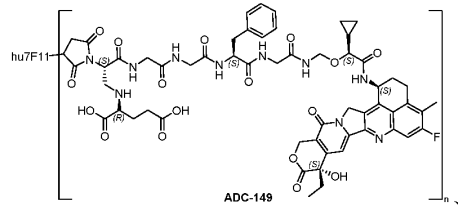
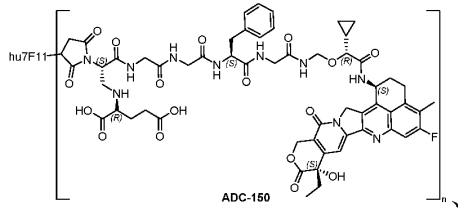


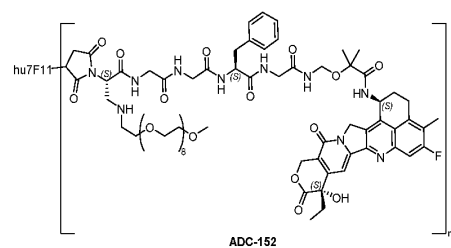
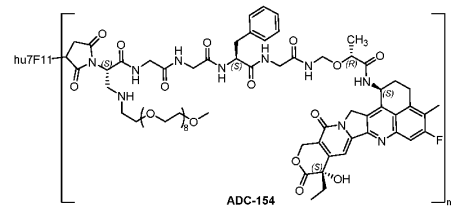
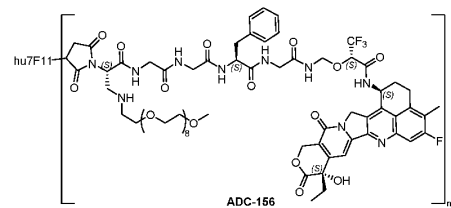
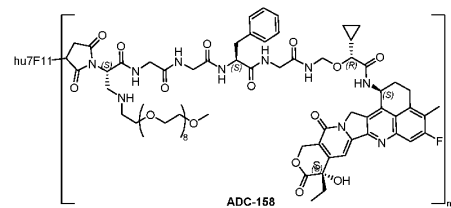
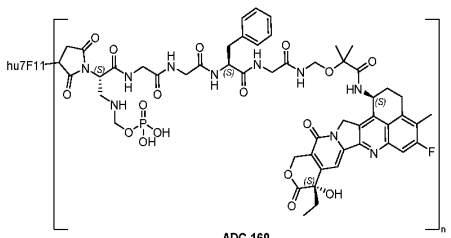
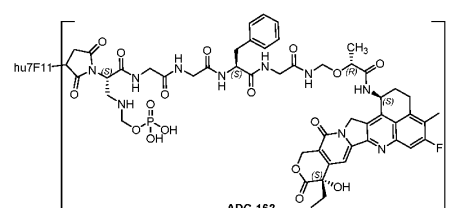
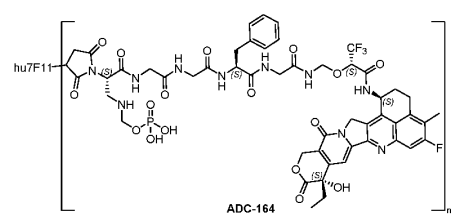


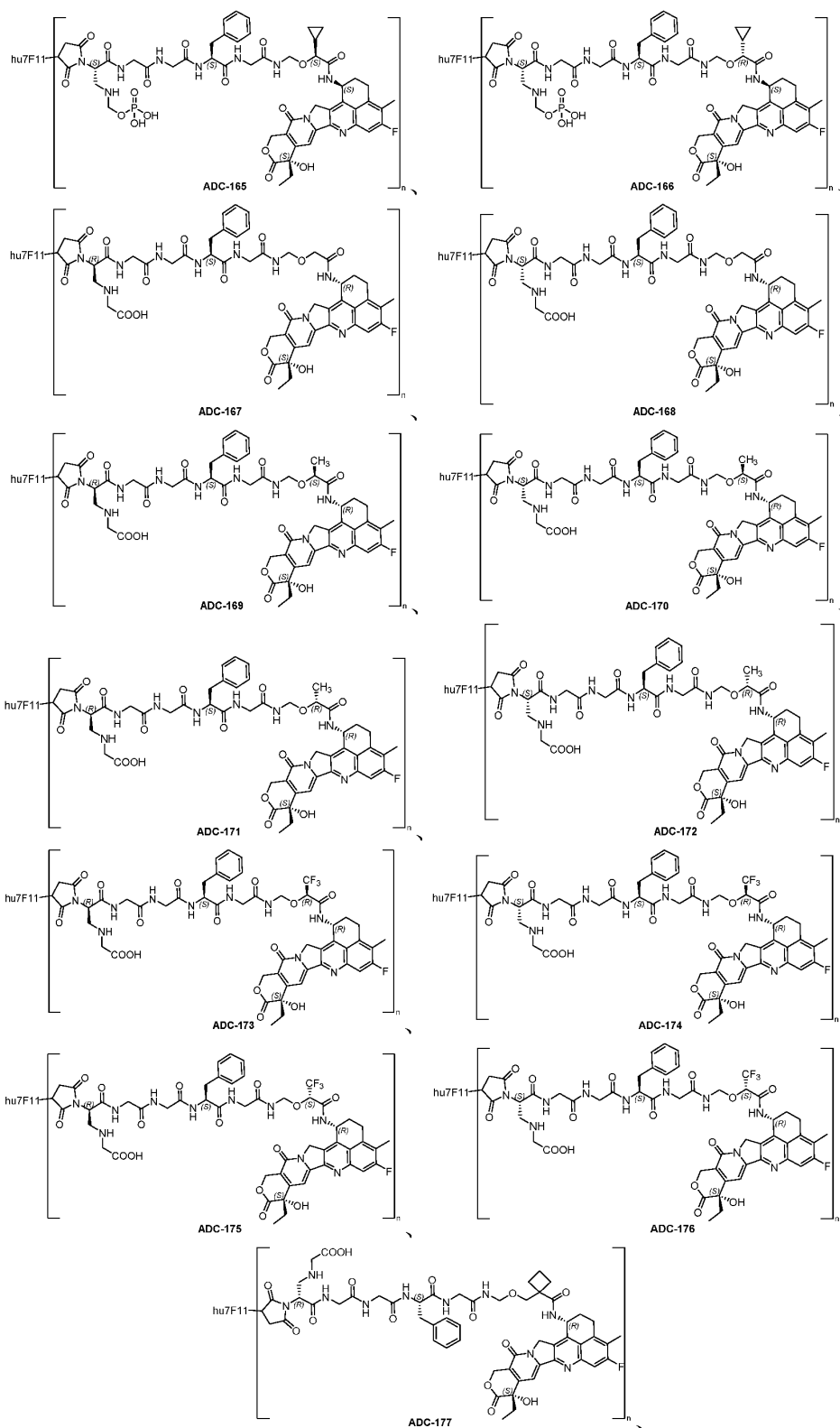


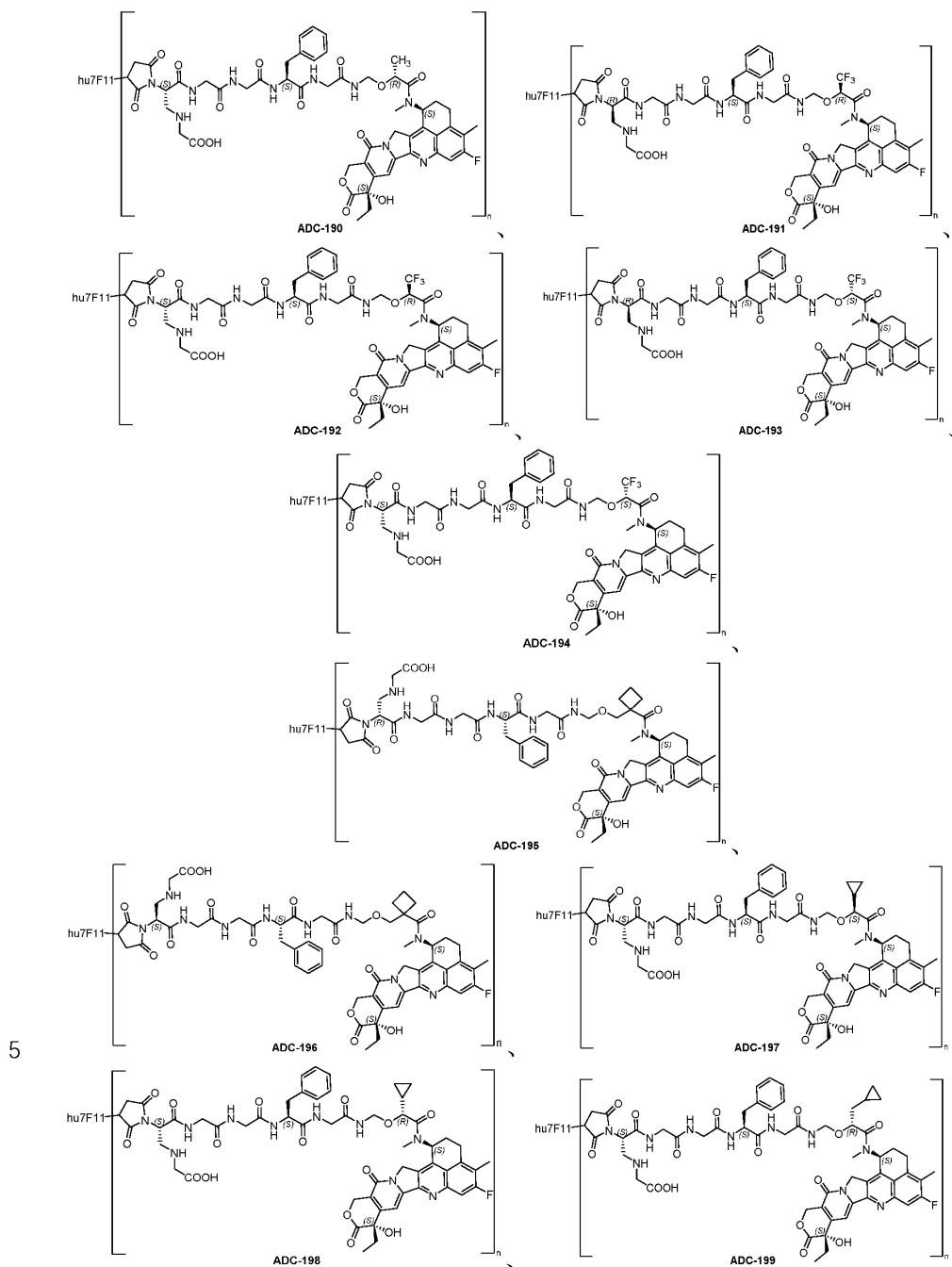


5







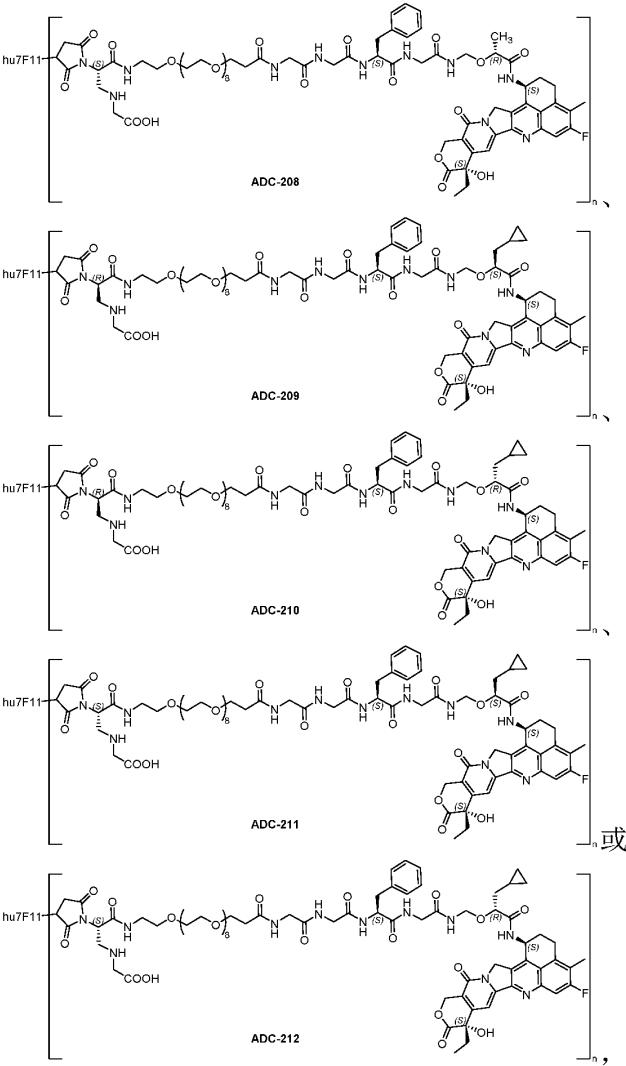




5

10

15



其中：
hu7F11 为靶向人 Trop2 的抗体或其抗原结合片段；
n 选自 1-10 的整数（例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10）。

在本发明的第一方面、第二方面和第三方面的一些实施方式中，公开所述的配体-喜树碱衍生物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物或连接子-药物化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其特征在于：所述药学上可接受的盐包括与结构式中酸性官能团形成的钠盐、钾盐、钙盐或镁盐以及与结构中碱性官能团形成的醋酸盐、三氟乙酸盐、柠檬酸盐、草酸盐、酒石酸盐、苹果酸盐、硝酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、硫酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、乳酸盐、油酸盐、抗坏血酸盐、水杨酸盐、甲酸盐、谷氨酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐或对甲苯磺酸盐。

本发明的第五方面公开一种药物组合物，其包含第一方面、第二方面所述的配体-喜树碱衍生物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物或第三方面所述的连接子-药物化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，以及任选的药学上可接

受的载体。

本发明的第六方面公开一种药物制剂，其包含第一方面、第二方面所述的配体-喜树碱衍生物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物或第三方面所述的连接子-药物化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物。

5 本发明的第七方面公开第一方面、第二方面所述的配体-喜树碱衍生物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物或第三方面所述的连接子-药物化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，或第五方面所述的药物组合物和/或第六方面所述的药物制剂，在制备用于治疗或预防癌症或者肿瘤的药物中的用途；

10 或者，第一方面、第二方面所述的配体-喜树碱衍生物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物或第三方面所述的连接子-药物化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，或第五方面所述的药物组合物和/或第六方面所述的药物制剂，用于治疗或预防癌症或者肿瘤；

优选地，癌症或者肿瘤表达有 TROP2；

15 更优选地，癌症或者肿瘤选自腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫癌、前列腺癌、肾癌、尿道癌、膀胱癌、肝癌、胃癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、食道癌、肺癌、结肠癌、三阴乳腺癌、直肠癌、结直肠癌、骨癌、皮肤癌、甲状腺癌、胰腺癌、黑色素瘤、神经胶质瘤、神经母细胞瘤、多形性胶质细胞瘤、肉瘤、淋巴瘤和白血病等实体瘤或血液瘤。

20 本发明的第八方面公开一种治疗或预防癌症或者肿瘤的方法，包括向有此需要的受试者施用预防或治疗有效量的第一方面或第二方面所述配体-喜树碱衍生物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物或第三方面所述连接子-药物化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，或第五方面所述的药物组合物和/或第六方面所述的药物制剂；

优选地，癌症或者肿瘤表达有 TROP2；

25 更优选地，癌症或者肿瘤选自腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫癌、前列腺癌、肾癌、尿道癌、膀胱癌、肝癌、胃癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、食道癌、肺癌、结肠癌、三阴乳腺癌、直肠癌、结直肠癌、骨癌、皮肤癌、甲状腺癌、胰腺癌、黑色素瘤、神经胶质瘤、神经母细胞瘤、多形性胶质细胞瘤、肉瘤、淋巴瘤和白血病等实体瘤或血液瘤。

30 在本发明的以上各个方面及其实施方式中，

“C1-C6 烷基”以及各种涉及“C1-C6 烷基”的复合基团（例如，“取代 C1-C6 烷基”、“氘代 C1-C6 烷基”）中的“C1-C6 烷基”可以替换为“C1-C20 烷基”、“C1-C12 烷基”或“C1-C10 烷基”；

35 “C3-C8 环烷基”以及各种涉及“C3-C8 环烷基”的复合基团中的“C3-C8 环烷基”可以替换为“C3-C20 环烷基”或“C3-C10 环烷基”；

“C1-C6 烷氧基”以及各种涉及其的复合基团中的“C1-C6 烷氧基”可以替换为“C1-C20 烷氧基”、“C1-C12 烷氧基”或“C1-C10 烷氧基”；

“C6-C10 芳基”以及各种涉及其的复合基团中的“C6-C10 芳基”可以替换为“C6-C12 芳基”；

40 “3-7 元杂环基”以及各种涉及其的复合基团中的“3-7 元杂环基”可以替换为“3-20 元杂环基”、“3-12 元杂环基”或“3-10 元杂环基”。

有益效果

本发明提供的抗人 Trop2 抗体-药物偶联物，是一款人源化抗人 Trop2 抗体

与喜树碱类药物偶联得到的抗体-药物偶联物，与现有的同类型药物相比，具有良好的分子稳定性和良好的临床前药效，预期有优秀的临床治疗效果。

附图说明

- 5 图 1A 说明 SEC-HPLC 检测 DS1062a(DAR=4)聚集情况。
图 1B 说明 SEC-HPLC 检测 ADC-1 聚集情况。
图 1C 说明 SEC-HPLC 检测 ADC-2 聚集情况。
图 1D 说明 SEC-HPLC 检测 ADC-6 聚集情况。
图 1E 说明 SEC-HPLC 检测 ADC-10 聚集情况。
- 10 图 2A 说明 RP-HPLC 检测 DS1062a(DAR=4)药物-抗体偶联比 (DAR)。
图 2B 说明 RP-HPLC 检测 ADC-1 药物-抗体偶联比 (DAR)。
图 2C 说明 RP-HPLC 检测 ADC-2 药物-抗体偶联比 (DAR)。
图 2D 说明 RP-HPLC 检测 ADC-12 药物-抗体偶联比 (DAR)。
图 2E 说明 RP-HPLC 检测 ADC-6 药物-抗体偶联比 (DAR)。
- 15 图 2F 说明 RP-HPLC 检测 ADC-10 药物-抗体偶联比 (DAR)。
图 3A 说明 DS1062a 保持了与 TINA1 抗体对抗原 TROP2 同等亲和力。
图 3B 说明 ADC-1 保持了与 TINA1 抗体对抗原 TROP2 同等亲和力。
图 3C 说明 ADC-2 保持了与 hu4D3 抗体对抗原 TROP2 同等亲和力。
图 3D 说明 ADC-12 保持了与 hu4D3 抗体对抗原 TROP2 同等亲和力。
- 20 图 3E 说明 ADC-6 保持了与 hu4D3 抗体对抗原 TROP2 同等亲和力。
图 3F 说明 ADC-10 保持了与 hu4D3 抗体对抗原 TROP2 同等亲和力。
图 4 说明 ADC 及对应抗体在 BXPC-3 细胞上的药效评价。
图 5A 说明 ADC-6、ADC-10、ADC-12 均在 BXPC3 单瘤模型中的体内药效均优于 DS1062a 和 ADC-1。
- 25 图 5B 说明 ADC-1、ADC-6、ADC-12 和 DS1062a 在 A431+SW620 异质瘤中的体内药效实验结果。
图 6A 说明裸抗 hu4D3、hu7F11 及化合物 **d3**、**d38**、**d39**、**d44** 在人源肿瘤细胞株 N87 的实验模型中的肿瘤抑制体外活性。
- 30 图 6B 说明裸抗 hu4D3、hu7F11 及化合物 **d3**、**d38**、**d39**、**d44** 在人源肿瘤细胞株 SW620 的实验模型中的肿瘤抑制体外活性。
图 6C 说明裸抗 hu4D3、hu7F11 及化合物 **d3**、**d38**、**d39**、**d44** 在人源肿瘤细胞株 HCC827 的实验模型中的肿瘤抑制体外活性。
- 35 图 6D 说明裸抗 hu4D3、hu7F11 及化合物 **d3**、**d38**、**d39**、**d44** 在人源肿瘤细胞株 FaDu 的实验模型中的肿瘤抑制体外活性。
图 6E 说明裸抗 hu4D3、hu7F11 及化合物 **d3**、**d38**、**d39**、**d44** 在人源肿瘤细胞株 A431+SW620 的实验模型中的肿瘤抑制体外活性。
- 40 图 7A 说明 ADC-47、ADC-70、ADC-72、ADC-73、ADC-112、ADC-176、ADC-178、ADC-179 在人源肿瘤细胞株 N87 的实验模型中的肿瘤抑制体外活性。
图 7B 说明 ADC-47、ADC-70、ADC-72、ADC-73、ADC-112、ADC-176、ADC-178、ADC-179 在人源肿瘤细胞株 SW620 的实验模型中的肿瘤抑制体外活性。
- 图 7C 说明 ADC-47、ADC-70、ADC-72、ADC-73、ADC-112、ADC-176、ADC-178、ADC-179 在人源肿瘤细胞株 HCC827 的实验模型中的肿瘤抑制体外

活性。

图 7D 说明 ADC-47、ADC-70、ADC-72、ADC-73、ADC-112、ADC-176、ADC-178、ADC-179 在人源肿瘤细胞株 FaDu 的实验模型中的肿瘤抑制体外活性。

图 7E 说明 ADC-47、ADC-70、ADC-72、ADC-73、ADC-112、ADC-176、ADC-178、ADC-179 在人源肿瘤细胞株 A431+SW620 的实验模型中的肿瘤抑制体外活性。

具体实施方式

缩写和定义

除非另有说明，否则如本文所用的以下术语和短语旨在具有以下含义。当本文中使用的商标名称时，除非上下文中另有指明，否则商标名称包括所述商标名称产品的产品配方、通用药物和活性成分。

除非有相反陈述，本文权利要求书和说明书中使用的术语具有下述含义。

术语“配体”是能识别和结合目标细胞相关的抗原或受体的大分子化合物。配体的作用是将药物呈递给与配体结合的目标细胞群，这些配体包括但不限于蛋白类激素、凝集素、生长因子、抗体或其他能与细胞结合的分子。在本发明实施方式中，配体表示为 Ab，配体可通过配体上的杂原子与连接单元形成连接键，优选为抗体或其抗原结合片段，所述抗体选自嵌合抗体、人源化抗体、全人抗体或鼠源抗体；优选为单克隆抗体。

配体单元是与靶标部分特异性结合的靶向剂。所述配体能够特异性结合至细胞组分或结合至细胞组分或结合至其他感兴趣的靶标分子。靶标部分或靶标通常在细胞表面上。在一些方面中，配体单元的作用是将药物单元递送至配体单元与之相互作用的特定靶细胞群。配体包括但不限于蛋白质、多肽和肽，以及非蛋白质如糖。合适的配体单元包括，例如，抗体，例如全长（完整）抗体及其抗原结合片段。在配体单元是非抗体靶向试剂的实施方式中，其可以是肽或多肽，或非蛋白质分子。这类靶向试剂的示例包括干扰素、淋巴因子、激素、生长因子和集落刺激因子、维生素、营养转运分子、或任何其他细胞结合分子或物质。在一些实施方式中，连接子共价连接至配体的硫原子。在一些方面中，硫原子是半胱氨酸残基的硫原子，其形成抗体的链间二硫键。在另一方面中，硫原子是已经导入配体单元的半胱氨酸残基的硫原子，其形成抗体的链间二硫键。在另一方面中，硫原子是已经导入配体单元的半胱氨酸残基的硫原子（例如，通过定点诱变或化学反应）。在其他方面中，连接子结合的硫原子选自形成抗体的链间二硫键的半胱氨酸残基或已经引入配体单元的半胱氨酸残基（例如，通过定点诱变或化学反应）。在一些实施方式中，按照 Kabat{[Kabat E.A 等，(1991)]《免疫学感兴趣的蛋白质序列》(Sequences of proteins of Immunological Interest)，第五版，NIH 出版物 91-3242}中的 EU 索引编号系统。

如本文所用，“抗体”或“抗体单元”在其所属的范围内，包括抗体结构的任何部分。这一单元可以结合，反应性关联，或者络合一个受体，抗原或者靶向细胞群体具有的其它受体单元。抗体可以是任何蛋白或蛋白类分子，它可以结合、络合或者与待治疗或生物改造的细胞群体的一部分发生反应。本发明中组成抗体药物偶联物的抗体保持其原有野生状态时的抗原结合能力。因此，本发明中的抗体能够专一性地与抗原结合。涉及的抗原包括，例如，肿瘤相关抗原（TAA），细胞表面受体蛋白和其他细胞表面分子，细胞存活调节因子，细胞增殖调节因子，

与组织生长与分化相关的分子（如已知或预知的具有功能性的），淋巴因子，细胞因子，参与细胞循环调节的分子，参与血管生成的分子，以及与血管生成有关的分子（如已知或预知的具有功能性的）。肿瘤相关因子可以是簇分化因子（如CD 蛋白）。

- 5 应用在抗体药物偶联物中的抗体包括，但不局限于，针对细胞表面受体和肿瘤相关抗原的抗体。这样的肿瘤相关抗原是业内所熟知的，可以通过业内熟知的抗体制备方法和信息来制备。为了开发可用于癌症诊断与治疗的有效的细胞水平目标物，研究人员力图找寻跨膜或其他肿瘤相关多肽。这些目标物能够特异性的表达在一种或多种癌细胞表面，而在一种或多种非癌细胞表面表达很少或不表达。
- 10 通常，相对于非癌细胞表面而言，这样的肿瘤相关多肽在癌细胞表面更加过度表达。确认这样的肿瘤相关因子，可大大提高基于抗体治疗癌症的专 一靶向特性。为方便起见，为业内所熟知的抗原相关信息标示如下，包括名称，其他名称，基因库登录号。与肿瘤相关抗原对应的核酸和蛋白序列可参见公开数据库，例如 Genbank。抗体靶向对应的肿瘤相关抗原包括所有的氨基酸序列变种和同种，与
- 15 参考文献中确认的序列具有至少 70%、80%、85%、90%或者 95%的同源性，或者具备与引用文献中的肿瘤相关抗原序列具有完全一致的生物性质和特征。

术语“抑制”或“的抑制”指，减少了可检测的量，或完全阻止。

术语“癌症”指的是以失调的细胞生长为特征的生理病症或疾病。“肿瘤”包括癌细胞。

- 20 术语“自身免疫疾病”是源自针对个体自身的组织或蛋白质的疾病或紊乱。

- 术语“药物”是指细胞毒性药物，药物表示为 d，能在肿瘤细胞内具有较强破坏其正常生长的化学分子。细胞毒性药物原则上在足够高的浓度下都可以杀死肿瘤细胞，但是由于缺乏特异性，在杀伤肿瘤细胞的同时，也会导致正常细胞的凋亡，导致严重的副作用。该术语包括毒素，如细菌、真菌、植物或动物来源的小
- 25 分子毒素或酶活性毒素，放射性同位素（例如 At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³² 和 Lu¹⁷⁶ 的放射性同位素），毒性药物，化疗药物，抗生素和核溶酶，优选为毒性药物。

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

- 30 接头，包括延伸物、间隔物和氨基酸单元，可以通过本领域已知方法合成，诸如 US2005-0238649A1 中所记载的。接头可以是便于在细胞中释放药物的“可切割接头”。例如，可使用酸不稳定接头（例如脲）、蛋白酶敏感（例如肽酶敏感）接头、光不稳定接头、二甲基接头、或含二硫化物接头（Chari 等 Cancer Research 52:127-131,1992）；美国专利 No.5, 208, 020。

- 35 按照在细胞内药物释放的机制，如本文所用，“连接子”或“抗体药物偶联物的连接子”可被分为两类：不可断裂连接子和可断裂连接子。对于含有不可断裂连接子的抗体-药物偶联物，其药物释放机制为：偶联物与抗原结合并被细胞内吞后，抗体在溶酶体中被酶解，释放出由小分子药物，连接子，和抗体氨基酸残基共同组成的活性分子。由此带来的药物分子结构改变并不减弱其细胞毒性，但
- 40 由于活性分子是带电荷的（氨基酸残基），从而导致其不能渗入邻近细胞。因此，此类活性药物不能杀死邻近不表达靶向抗原（抗原阴性细胞）的肿瘤细胞（旁观者效应，bystander effect）（Ducry 等，2010，Bioconjugate Chem. 21: 5-13）。对于含有可断裂连接子的抗体-药物偶联物，其药物释放机制为：偶联物与抗原结合

并被细胞内吞后，在目标细胞内断裂并释放出活性成分(小分子药物本身)。可断裂连接子主要分为：化学敏感型连接子和酶敏感型连接子。化学敏感型连接子可以由于血浆和细胞质或肿瘤微环境性质的不同而选择性的断裂。这样的性质包括 pH 值，谷胱甘肽浓度等。对 pH 值敏感的连接子，在血液的中性或弱碱性环境下相对稳定(pH7.3-7.5)，但是在弱酸性的肿瘤微环境(pH5.0-6.5)和溶酶体(pH4.5-5.0)内将会被水解，例如脲，碳酸酯，缩醛，缩酮类。由于酸断裂连接子有限的血浆稳定性，基于此类连接子的抗体-药物偶联物通常具有较短的半衰期(2-3 天)。这种较短的半衰期在一定程度上限制了 pH 敏感连接子在新一代抗体药物偶联物中的应用。对于谷胱甘肽敏感的连接子，又称二硫键连接子。药物释放是基于细胞内谷胱甘肽的高浓度(毫摩尔范围)与血液中相对较低的谷胱甘肽浓度(微摩尔范围)差异引起的。对于肿瘤细胞而言尤其如此，其低含氧量导致还原酶的活性增强，因而导致更高的谷胱甘肽浓度。二硫键具有热力学稳定性，因此在血浆中具有较好的稳定性。酶不稳定连接子，如肽连接子，能够更好地控制药物释放。肽连接子能够被溶酶体内蛋白酶，如组织蛋白酶(Cathepsin B)等有效地切断。这种肽连接被认为在血浆循环中非常稳定，这是因为细胞外不合宜的 pH 值及血清蛋白酶抑制剂导致蛋白酶通常在细胞外不具备活性。鉴于较高的血浆稳定性和良好的细胞内断裂选择性和有效性，酶不稳定连接子被广泛用作抗体-药物偶联物的可断裂连接子。

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

本公开所用氨基酸三字母代码和单字母代码如 *J. boil. Chem.* 1968, 243, 3558. 中所述。

术语“烷基”指饱和脂肪族烃基团，其为包含 1 至 20 个碳原子的直链或支链基团(即“C1-C20 烷基”)，优选含有 1 至 12 个碳原子的烷基(即“C1-C12 烷基”)，更优选含有 1 至 10 个碳原子的烷基(即“C1-C10 烷基”)，最优选含有 1 至 6 个碳原子的烷基(即“C1-C6 烷基”)。非限制性实例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、仲丁基、正戊基、1,1-二甲基丙基、1,2-二甲基丙基、2,2-二甲基丙基、1-乙基丙基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、正己基、1-乙基-2-甲基丙基、1,1,2-三甲基丙基、1,1-二甲基丁基、1,2-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、1,3-二甲基丁基、2-乙基丁基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、4-甲基戊基、2,3-二甲基丁基、正庚基、2-甲基己基、3-甲基己基、4-甲基己基、5-甲基己基、2,3-二甲基戊基、2,4-二甲基戊基、2,2-二甲基戊基、3,3-二甲基戊基、2-乙基戊基、3-乙基戊基、正辛基、2,3-二甲基己基、2,4-二甲基己基、2,5-二甲基己基、2,2-二甲基己基、3,3-二甲基己基、4,4-二甲基己基、2-乙基己基、3-乙基己基、4-乙基己基、2-甲基-2-乙基戊基、2-甲基-3-乙基戊基、正壬基、2-甲基-2-乙基己基、2-甲基-3-乙基己基、2,2-二乙基戊基、正癸基、3,3-二乙基己基、2,2-二乙基己基，及其各种支链异构体等。更优选的是含有 1 至 6 个碳原子的低级烷基，非限制性实施例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、仲丁基、正戊基、1,1-二甲基丙基、1,2-二甲基丙基、2,2-二甲基丙基、1-乙基丙基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、正己基、1-乙基-2-甲基丙基、1,1,2-三甲基丙基、1,1-二甲基丁基、1,2-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、1,3-二甲基丁基、2-乙基丁

基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、4-甲基戊基、2,3-二甲基丁基等。烷基可以是取代的或非取代的,当被取代时,取代基可以在任何可使用的连接点上被取代,所述取代基优选为一个或多个以下基团,其独立地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基、氧代基。

术语“取代烷基”指烷基中的氢被取代基团取代,除非文中另有说明,烷基的取代基可以是选自下组的多种基团: -卤素、-OR'、-NR'R''、-SR'、-SiR'R''R'''、-OC(O)R'、-C(O)R'、-CO₂R'、-CONR'R''、-OC(O)NR'R''、-NR''C(O)R'、-NR'-C(O)NR''R'''、-NR''C(O)₂R'、-NH-C(NH₂)=NH、-NR'C(NH₂)=NH、-NH-C(NH₂)=NR'、-S(O)R'、-S(O)₂R'、-S(O)₂NR'R''、-NR'S(O)₂R''、-CN 和 -NO₂, 取代基数量为 0 至 (2m'+1), 其中 m' 为该基团中碳原子的总数。R'、R'' 和 R''' 各自独立的指代氢、未取代的 C₁₋₈ 烷基、未取代的 C_{6-C12} 芳基(或 C_{6-C10} 芳基)、由 1-3 个卤素取代的 C_{6-C12} 芳基(或 C_{6-C10} 芳基)、未取代的 C₁₋₈ 烷基、C₁₋₈ 烷氧基或 C₁₋₈ 硫代烷氧基、或未取代的 C_{6-C12} 芳基(或 C_{6-C10} 芳基)-C₁₋₄ 烷基。R' 和 R'' 连接于同一个氮原子时,它们可与该氮原子一起形成 3-, 4-, 5-, 6-或 7-元环。例如, -NR'R'' 包括 1-吡咯烷基和 4-吗啉基。

术语“亚烷基”指饱和的直链或支链脂肪族烃基,其具有 2 个从母体烷的相同碳原子或两个不同的碳原子上除去两个氢原子所衍生的残基,其为包含 1 至 20 个碳原子的直链或支链基团,优选含有 1 至 12 个碳原子,更优选含有 1 至 6 个碳原子的亚烷基。亚烷基的非限制性实例包括但不限于亚甲基(-CH₂-)、1,1-亚乙基(-CH(CH₃)-)、1,2-亚乙基(-CH₂CH₂-)、1,1-亚丙基(-CH(CH₂CH₃)-)、1,2-亚丙基(-CH₂CH(CH₃)-)、1,3-亚丙基(-CH₂CH₂CH₂-)、1,4-亚丁基(-CH₂CH₂CH₂CH₂-)和 1,5-亚丁基(-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-)等。亚烷基可以是取代的或非取代的,当被取代时,取代基可以在任何可使用的连接点上被取代,所述取代基优选独立地任选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基和氧代基中的一个或多个取代基所取代。

术语“烷氧基”指-O-(烷基)和-O-(环烷基),其中烷基或环烷基的定义如上所述。C_{1-C6} 烷氧基的非限制性实例包括: 甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基、环丙氧基、环丁氧基、环戊氧基、环己氧基。烷氧基可以是任选取代的或非取代的,当被取代时,取代基优选为一个或多个以下基团,其独立地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基。

术语“环烷基”指饱和或部分不饱和单环或多环环状烃取代基,环烷基环包含 3 至 20 个碳原子(即“C_{3-C20} 环烷基”),优选包含 3 至 12 个碳原子(即“C_{3-C12} 环烷基”),更优选包含 3 至 10 个碳原子(即“C_{3-C10} 环烷基”),最优选包含 3 至 8 个碳原子(即“C_{3-C8} 环烷基”)。单环环烷基(例如,“C_{3-C8} 环烷基”)的非限制性实例包括环丙基、环丁基、环戊基、环戊烯基、环己基、环己烯基、环己二烯基、环庚基、环庚三烯基、环辛基等;多环环烷基包括螺环、稠环和桥环的环烷基。

术语“杂环基”指饱和或部分不饱和单环或多环环状烃取代基,其包含 3 至 20 个环原子(即“3-20 元杂环基”),其中一个或多个环原子为选自氮、氧或 S(O)_m (其中 m 是整数 0 至 2) 的杂原子,但不包括-O-O-、-O-S-或-S-S-的环部分,其

余环原子为碳。优选包含 3 至 12 个环原子（即“3-12 元杂环基”），其中 1~4 个是杂原子；更优选环烷基环包含 3 至 10 个环原子（即“3-10 元杂环基”）。单环杂环基（例如，3-7 元杂环基）的非限制性实例包括吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、吗啉基、硫代吗啉基、高哌嗪基等。多环杂环基包括螺环、稠环和桥环的杂环基。

5 术语“环烷基烷基”指烷基被一个或多个环烷基取代，优选被一个环烷基取代，其中烷基如上所定义，其中环烷基如上所定义。例如，C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基。

术语“卤代烷基”指烷基被一个或多个卤素取代，其中烷基如上所定义。例如，卤代 C1-C6 烷基。

10 术语“氘代烷基”指烷基被一个或多个氘原子取代，其中烷基如上所定义。例如，氘代 C1-C6 烷基。

术语“C6-C12 芳基”指的是具有 6-12 个碳原子的碳环芳族体系的基团。

术语“C6-C10 芳基”指的是具有 6-10 个碳原子的碳环芳族体系的基团，例如苯基、萘基等。

15 术语“5-10 元杂芳基”是指芳族的杂环，通常为具有 1 至 3 个选自 N、O 或 S 的杂原子的 5-、6-、7-、8-、9-、10-元的杂环；杂芳基环可以任选地进一步稠合或连接于芳族和非芳族的碳环和杂环。所述 5-10 元杂芳基的非限制性的实例为例如吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、哒嗪基、咪唑基、咪唑基、噻唑基、异噻唑基、噻吩基、吡咯基、苯基-吡咯基、呋喃基、苯基-呋喃基、噁唑基、异噁唑基、吡唑基、噻吩基、苯并呋喃基、苯并噻吩基、苯并 1,3-二氧戊环（苯并二噁茂）、异二氢咪唑基、苯并咪唑基、咪唑基、喹啉基、异喹啉基、1,2,3-三唑基、1-苯基-1,2,3-三唑基、2,3-二氢咪唑基、2,3-二氢苯并呋喃基、2,3-二氢苯并噻吩基、苯并吡喃基、2,3-二氢苯并噁唑基、2,3-二氢喹啉基等。

25 术语“取代 C6-C10 芳基”或“取代 5-10 元杂芳基”或“取代 3-7 元杂环基”指的是芳基或者杂芳基或者杂环基中的氢被取代基团取代，除非文中另有说明，芳基或者杂芳基或者杂环基的取代基可以是选自下组的多种基团：-卤素、-OR'、-NR'R''、-SR'、-SiR'R''R'''、-OC(O)R'、-C(O)R'、-CO₂R'、-CONR'R''、-OC(O)NR'R''、-NR''C(O)R'、-NR'-C(O)NR''R'''、-NR''C(O)₂R'、-NH-C(NH₂)=NH、-NR'C(NH₂)=NH、-NH-C(NH₂)=NR'、-S(O)R'、-S(O)₂R'、-S(O)₂NR'R''、-NR'S(O)₂R''、-CN 和 -NO₂，取代基数量为 0 至 (2m'+1)，其中 m' 为该基团中碳原子的总数。R'、R'' 和 R''' 各自独立的指代氢、未取代的 C₁₋₈ 烷基、未取代的 C6-C12 芳基（或 C6-C10 芳基）、由 1-3 个卤素取代的 C6-C12 芳基（或 C6-C10 芳基）、未取代的 C₁₋₈ 烷基、C₁₋₈ 烷氧基或 C₁₋₈ 硫代烷氧基、或未取代的 C6-C12 芳基（或 C6-C10 芳基）-C₁₋₄ 烷基。R' 和 R'' 连接于同一个氮原子时，它们可与该氮原子一起形成 3-、4-、5-、6-或 7-元环。例如，-NR'R'' 包括 1-吡咯烷基和 4-吗啉基。

术语“羟基”指-OH 基团。

术语“卤素”指氟、氯、溴或碘。

40 术语“氨基”指-NH₂。术语“硝基”指-NO₂。

术语“酰胺基”指-C(O)N(烷基)或(环烷基)，其中烷基、环烷基如上所定义。

术语“羧酸酯基”指-C(O)O(烷基)或(环烷基)，其中烷基、环烷基如上所定义。

本发明还包括各种氘化形式的式 I。与碳原子连接的各个可用的氢原子可

独立地被氘原子替换。本领域技术人员能够参考相关文献合成氘化形式的式 I。在制备氘代形式的式 I 时可使用市售的氘代起始物质,或它们可使用常规技术采用氘代试剂合成,氘代试剂的非限制性实例包括:氘代硼烷、三氘代硼烷四氢呋喃溶液、氘代氢化锂铝、氘代碘乙烷和氘代碘甲烷等。

5 术语“抗体”指免疫球蛋白,是由两条相同的重链和两条相同的轻链通过链间二硫键连接而成的四肽链结构。免疫球蛋白重链恒定区的氨基酸组成和排列顺序不同,故其抗原性也不同。据此,可将免疫球蛋白分为五类,或称为免疫球蛋白的同种型,即 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE,其相应的重链分别为 μ 链、 δ 链、 γ 链、 α 链和 ϵ 链。同一类 Ig 根据其铰链区氨基酸组成和重链二硫键的数目和位置的差别,又可分为不同的亚类,如 IgG 可分为 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。轻链通过恒定区的不同分为 κ 链或 λ 链。五类 Ig 中每类 Ig 都可以有 κ 链或 λ 链。本发明所述的抗体优选为针对靶细胞上细胞表面抗原的特异性抗体,非限制性实施
10 例为以下抗体:抗 EGFRvIII 抗体、抗 DLL-3 抗体、抗 PSMA 抗体、抗 CD70 抗体、抗 MUC16 抗体、抗 ENPP3 抗体、抗 TDGF1 抗体、抗 ETBR 抗体、抗 MSLN 抗体、抗 TIM-1 抗体、抗 LRRC15 抗体、抗 LIV-1 抗体、抗 CanAg/AFP 抗体、
15 抗 cladin 18.2 抗体、抗 Mesothelin 抗体、抗 HER2(ErbB2) 抗体、抗 EGFR 抗体、抗 c-MET 抗体、抗 SLITRK6 抗体、抗 KIT/CD117 抗体、抗 STEAP1 抗体、抗 SLAMF7/CS1 抗体、抗 NaPi2B/SLC34A2 抗体、抗 GPNMB 抗体、抗 HER3(ErbB3) 抗体、抗 MUC1/CD227 抗体、抗 AXL 抗体、抗 CD166 抗体、抗 B7-H3(CD276) 抗体、
20 抗 PTK7/CCK4 抗体、抗 PRLR 抗体、抗 EFNA4 抗体、抗 5T4 抗体、抗 NOTCH3 抗体、抗 Nectin 4 抗体、抗 TROP-2 抗体、抗 CD142 抗体、抗 CA6 抗体、抗 GPR20 抗体、抗 CD174 抗体、抗 CD71 抗体、抗 EphA2 抗体、抗 LYPD3 抗体、抗 FGFR2 抗体、抗 FGFR3 抗体、抗 FR α 抗体、抗 CEACAMs 抗体、抗 GCC 抗体、
25 抗 Integrin Av 抗体、抗 CAIX 抗体、抗 P-cadherin 抗体、抗 GD3 抗体、抗 Cadherin 6 抗体、抗 LAMP1 抗体、抗 FLT3 抗体、抗 BCMA 抗体、抗 CD79b 抗体、抗 CD19 抗体、抗 CD33 抗体、抗 CD56 抗体、抗 CD74 抗体、抗 CD22 抗体、抗 CD30 抗体、抗 CD37 抗体、抗 CD138 抗体、抗 CD352 抗体、抗 CD25 抗体或抗 CD123 抗体中一个或多个。

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

术语“载药量”是指式 I 中每个抗体上加载的细胞毒性药物平均数量,也可以表示为药物量和抗体量的比值,药物载量的范围可以是每个抗体(Ab)连接 0-12 个,优选 1-10 个细胞毒性药物(d)。在本发明的实施方式中,载药量表示为 n,示例性的可以为 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 的均值。可用常规方法如 UV/可见光光谱法,质谱,ELISA 试验和 HPLC 特征鉴定偶联反应后每个 ADC 分子的药物品均数量。

本发明的一个实施方式中,细胞毒性药物通过连接单元偶联在抗体链间打开的半胱氨酸巯基-SH 和/或定点突变的半胱氨酸残基的巯基-SH 上,一般地,偶联
40 反应中能与抗体偶联的药物分子数将小于或等于理论上的最大值。

可以用以下非限制性方法控制配体细胞毒性药物偶联物的载量,包括:

- (1) 控制连接试剂和单抗的摩尔比,
- (2) 控制反应时间和温度,

(3) 选择不同的反应试剂。

常规的药物组合物的制备见中国药典。

术语“药学上可接受的盐”或“可药用盐”是指本发明配体-药物偶联物的盐,或本发明中所述的化合物的盐,这类盐用于哺乳动物体内时具有安全性和有效性,且具有应有的生物活性,本发明配体-药物偶联化合物至少含有一个羧基,因此可以与碱形成盐,药学上可接受的盐的非限制性实例包括:钠盐、钾盐、钙盐或镁盐等。

术语“药学上可接受的盐”或“可药用盐”是指本发明抗体-药物偶联物的盐,或本发明中所述的化合物的盐,这类盐用于哺乳动物体内时具有安全性和有效性,且具有应有的生物活性,本发明配体-药物偶联化合物至少含有一个氨基,因此可以与酸形成盐,药学上可接受的盐的非限制性实例包括:盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、柠檬酸盐、乙酸盐、琥珀酸盐、抗坏血酸盐、草酸盐、硝酸盐、梨酸盐、磷酸氢盐、磷酸二氢盐、水杨酸盐、柠檬酸氢盐、酒石酸盐、马来酸盐、富马酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐。

“酸性氨基酸”指氨基酸的等电点小于 7, 酸性氨基酸分子中往往带有一个或多个羧基等酸性基团,在结构中可有效电离为负离子形式而增加亲水性。酸性氨基酸可以为天然的,也可为非天然的氨基酸。

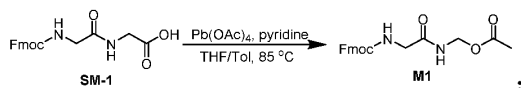
“天然氨基酸”指由生物合成的氨基酸。天然氨基酸一般情况下是 *L*-型的,但也有少数例外,比如甘氨酸,包括天然的和生物体合成的。

“非天然氨基酸”指通过合成手段所获得的氨基酸。

下面结合具体实施例,进一步阐述本发明,应理解,这些实施例只用于说明本发明,而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的试验方法,通常按照常规条件或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则所有的百分数、比例、比率、或份数按重量计。

实施例 1

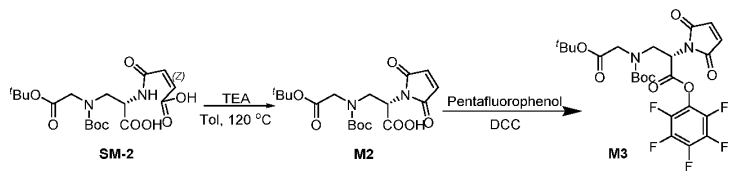
化合物 **M1** 的合成:



于 5000 mL 单口瓶中加入 *N*-苄氧羰基-甘氨酸-甘氨酸(100 g, 282 mmol, 1.0eq), 四乙酸铅(175 g, 395 mmol, 1.4 eq), 2000 mL 干燥四氢呋喃和 670 mL 甲苯, 搅拌均匀, 氮气保护, 加热至 85 °C 反应 2.5 h。TLC 监控, 原料反应完后, 冷却至室温, 过滤, 滤液减压浓缩, 残余物经柱色谱纯化, 得化合物 **M1**(87 g); LC-MS: $[M+NH_4]^+=386.0$ 。

实施例 2

化合物 **M3** 的合成:



于 1000 mL 单口瓶中加入化合物 **SM-2**(按照专利 CN108452321A 公布的方法合成)(40 g, 96 mmol, 1.0 eq), 三乙胺(26.7 mL, 2.0 eq), 甲苯(400 mL), 升温至

120 °C下回流反应 2h。TLC 监测基本完全反应，降温至 50 °C下减压旋除溶剂。用乙酸乙酯(150 mL)，水(40 mL)溶解，冰浴搅拌下用 1M HCl 调 pH 至 2-3，分液。水层用乙酸乙酯再萃取一次，合并有机层，加入无水硫酸钠干燥。过滤后，

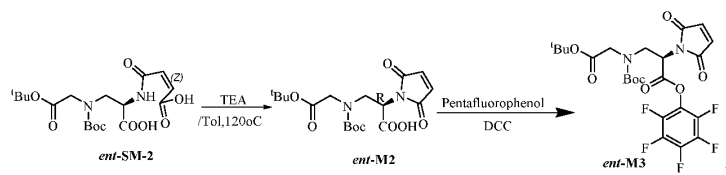
5 浓缩得到淡黄色油状粗品，粗品经柱层析纯化(DCM:MeOH=40:1)，得到化合物

M2(26.6 g); LC-MS: $[M+H]^+=399.3$ 。
于 1000 mL 单口瓶，加入化合物 **M2**(26.5 g, 60.5 mmol, 1.0eq)、五氟苯酚(12.2 g, 66.5 mmol, 1.1 eq)、DCC(13.7 g, 66.5 mmol, 1.1 eq)及 THF(300 mL)，室温反应 30 min(采用 TLC 监测)，过滤滤去不溶物。反应液直接经制备纯化，制备液水泵减压水浴 35 °C 浓缩除去乙腈，冻干得到化合物 **M3**(31.5g)，收率 64%; LC-

10 MS: $[M+H]^+=565.1$ 。

实施例 3

化合物 **ent-M3** 的合成:

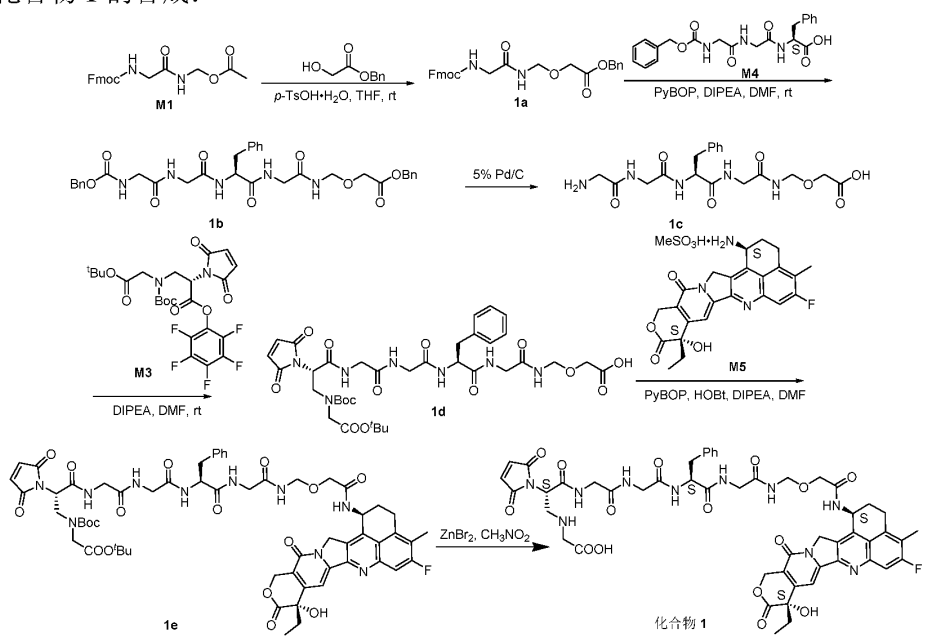


参照实施例 2 合成路线，得到化合物 **ent-M3**(27.8 g); LC-MS: $[M+H]^+=565.2$ 。

15

实施例 4

化合物 **1** 的合成:



第一步: 化合物 **1a**

于 250 mL 单口瓶中，加入 **M1** (6 g, 16.3 mmol)，100 mL THF，对甲苯磺酸一水合物(0.31 g, 1.63 mmol)，搅拌冷却至 0 °C，滴加羟乙酸苄酯 (5.4 g, 32.6 mmol)，滴毕自然升温至室温反应(反应约 2-4 h)，TLC 监控。反应结束，加入饱和 NaHCO_3 溶液，用乙酸乙酯萃取，饱和氯化钠溶液洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，浓缩，残余物经硅胶柱纯化 (PE:EA=10:1-5:1-1:1) 得 **1a** (4 g)，收率 52%;

LC-MS: $[M+H]^+=475.18$ 。

第二步: 化合物 **1b**

于 25 mL 单口瓶, 加入 **1a**(2 g, 4.2 mmol), 10 mL DMF, 0 °C 搅拌, 加入 DBU(766 mg, 5.04 mmol), 反应 1 h, TLC 监测 Fmoc 脱保护完成后, 待用;

5 另取 25 mL 单口瓶中加入 **M4**(参考专利 CN111051330 A 公布的方法制备)(1.73 g, 4.2 mmol), PyBOP(2.61 g, 5.04 mmol), HOBt(680 mg, 5.04 mmol)及 10 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA(830 μ L, 5.04 mmol), 继续搅拌 30 min, 将上述反应液加至反应瓶中, 升至室温反应。HPLC 监测反应结束后, 反应液经制备液相纯化, 得到产品制备液, 制备液经二氯甲烷萃取, 饱和氯化钠溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩, 得到固体 **1b**(1.7 g), 收率 63%; LCMS: $[M+H]^+=648.26$ 。

第三步: 化合物 **1c**

于 25 mL 单口瓶中加入 **1b**(900 mg, 1.39 mmol), 15 mL DMF 溶清后, 加入 900 mg 5%Pd/C, 氢化反应 2 h, 反应完毕, 过滤, 得滤液, 未经纯化直接用于下一步反应。

第四步: 化合物 **1d**

将粗产品 **1c** 置于冰水浴中, 加入 DIPEA(235 μ L, 1.39 mmol), 再加入化合物 **M3**(784 mg, 1.39 mmol), 加毕升至室温反应 1 h。HPLC 监测反应完毕, 反应液经高效液相纯化, 得制备液, 制备液冻干得到 **1d**(504 mg); LC-MS: $[M+H]^+=804.4$ 。

20 第五步: 化合物 **1e**

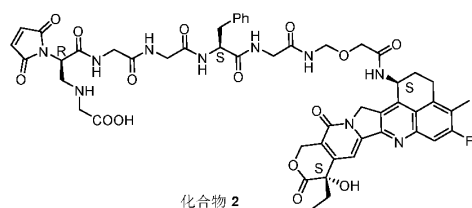
于 50 mL 单口瓶中加入 **1d** (500 mg, 0.62 mmol), **M5**(310 mg, 0.62 mmol), PyBOP(448 mg, 0.86 mmol), HOBt(116 mg, 0.86 mmol)及 15 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA(378 μ L, 2.29 mmol), 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **1e** 的制备液, 制备液冻干得到 **1e**(210 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1221.6$ 。

第六步: 化合物 **1**

于 25 mL 单口瓶中加入 **1e**(100 mg, 0.081 mmol), 溴化锌(368 mg, 1.63 mmol)及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体化合物 **1**(60 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1065.3$ 。

实施例 5

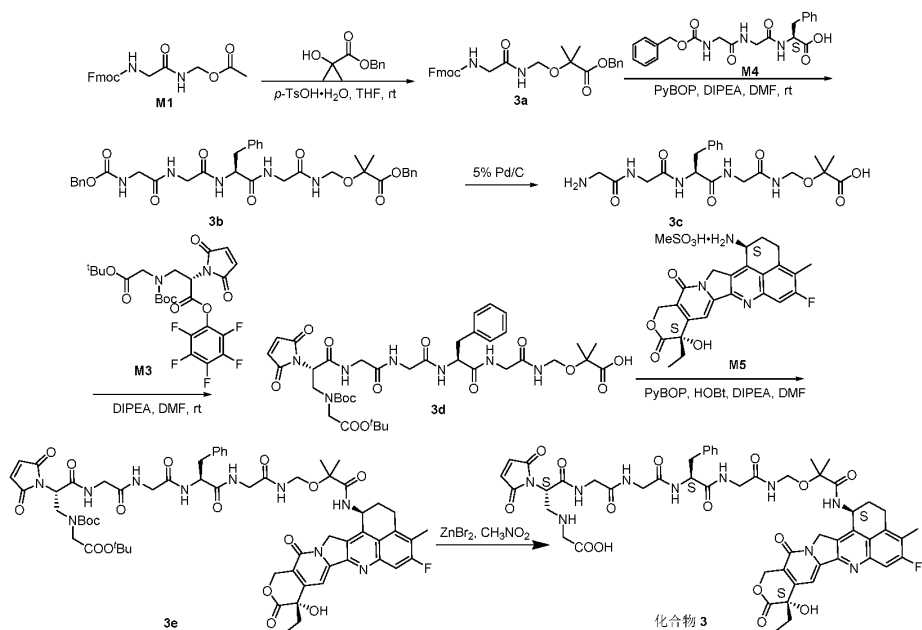
化合物 **2** 的合成:



参照实施例 4 合成路线, 得到化合物 **2**(51 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1065.3$ 。

实施例 6

化合物 **3** 的合成:



第一步：化合物 **3a**

于 250 mL 单口瓶中，加入 **M1** (6 g, 16.3 mmol)，100 mL THF，对甲苯磺酸一水合物 (0.31 g, 1.63 mmol)，搅拌冷却至 0 °C，滴加 2-羟基-2-甲基丙酸苄酯 (6.3 g, 32.6 mmol)，滴毕自然升温至室温反应 (反应约 2-4 h)，TLC 监控。反应结束，加入饱和 NaHCO₃ 溶液，用乙酸乙酯萃取，饱和氯化钠溶液洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，浓缩，残余物经硅胶柱纯化 (PE:EA=10:1-5:1-2:1) 得 **3a** (4.2 g)，收率 52%；LC-MS: [M+H]⁺=503.3。

第二步：化合物 **3b**

于 25 mL 单口瓶，加入 **3a** (2 g, 4.0 mmol)，10 mL DMF，0 °C 搅拌，加入 DBU (760 mg, 5.0 mmol)，反应 1 h，TLC 监测 Fmoc 脱保护完成后，待用；

另取 25 mL 单口瓶中加入 **M4** (1.65 g, 4.0 mmol)，PyBOP (2.59 g, 5.0 mmol)，HOBt (675 mg, 5.0 mmol) 及 10 mL DMF，冰水浴下加入 DIPEA (823 uL, 5.04 mmol)，继续搅拌 30 min，将上述反应液加至反应瓶中，升至室温反应。HPLC 监测反应结束后，反应液经制备液相纯化，得到产品制备液，制备液经二氯甲烷萃取，饱和氯化钠溶液洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩，得到固体 **3b** (1.4 g)，收率 53%；LC-MS: [M+H]⁺=676.2。

第三步：化合物 **3c**

于 25 mL 单口瓶中加入 **3b** (700 mg, 1.04 mmol)，10 mL DMF 溶清后，加入 700 mg 5% Pd/C，氢化反应 1.5 h，反应完毕，过滤，得滤液，未经纯化直接用于下一步反应。

第四步：化合物 **3d**

将粗产品 **3c** 置于冰水浴中，加入 DIPEA (210 uL, 1.25 mmol)，再加入化合物 **M3** (704 mg, 1.25 mmol)，加毕升至室温反应 1 h。HPLC 监测反应完毕，反应液经高效液相纯化，得制备液，制备液冻干得到 **3d** (486 mg)；LC-MS: [M-H]⁻=830.5。

第五步：化合物 **3e**

于 50 mL 单口瓶中加入 **3d** (300 mg, 0.36 mmol)，**M5** (180 mg, 0.36 mmol)，

PyBOP(260 mg, 0.5 mmol), HOBt(67 mg, 0.5 mmol)及 10 mL DMF,冰水浴下加入 DIPEA(219.5 uL, 1.33 mmol), 升至室温反应 3 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **3e** 的制备液, 制备液冻干得到 **3e**(157 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1249.6$ 。

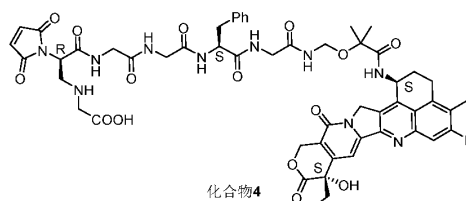
5 第六步: 化合物 **3**

于 25 mL 单口瓶中加入 **3e** (100 mg, 0.08 mmol), 溴化锌(360 mg, 1.6 mmol) 及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体化合物 **3**(64 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1093.1$ 。

10

实施例 7

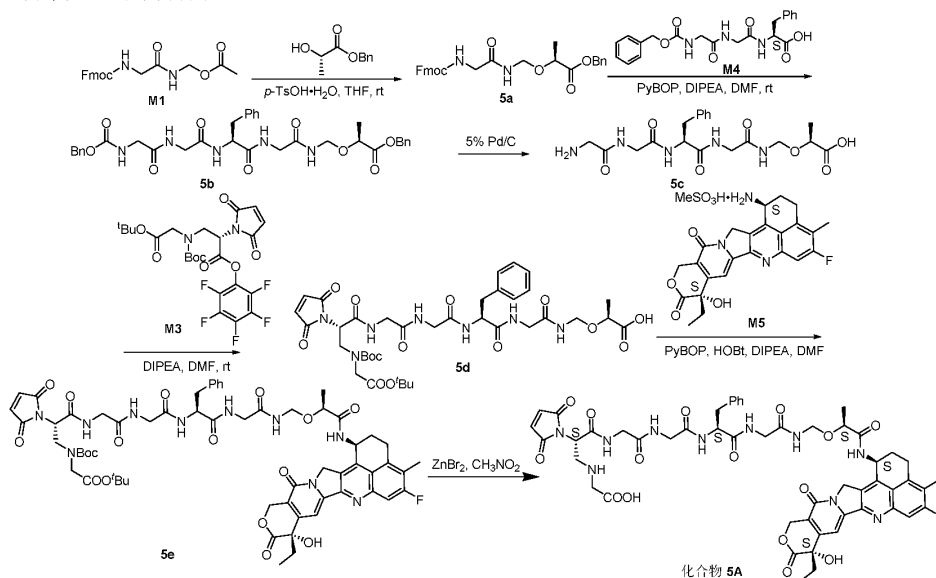
化合物 **4** 的合成:



参照实施例 6 合成路线, 得到化合物 **4**(60 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1093.2$ 。

实施例 8

15 化合物 **5A** 的合成:



第一步: 化合物 **5a**

于 25mL 单口瓶中加入 **M1**(500mg, 1.4mmol, 1.0eq), 对甲苯磺酸一水合物 (26mg, 0.1mmol, 0.1eq)及 10 mL THF, 搅拌均匀后, 降至 0 °C, 再缓慢加入 *L*-乳酸苄酯(1.2 g, 7.0 mmol, 5 eq), 加完后升至室温反应。TLC 监控, 反应结束后, 加入饱和 NaHCO_3 溶液, 用乙酸乙酯萃取, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 残余物经反相柱纯化得 **5a**(400mg);

LC-MS: $[M+NH_4]^+=506.2$ 。

^1H NMR(400 Mz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$):1.39 (3H, d, $J = 6.8$ Hz), 3.78 (2H, t, $J = 4.0$

Hz), 4.17-4.27 (2H, m), 4.42 (2H, d, $J = 4.0$ Hz), 4.72-4.85 (2H, m), 5.11-5.58 (2H, m), 5.43 (1H, s), 7.06 (1H, t, $J = 8.0$ Hz), 7.25-7.33 (6H, m), 7.38 (2H, t, $J = 8.0$ Hz), 7.57 (2H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.75 (2H, d, $J = 8.0$ Hz)。

第二步：化合物 **5b**

5 于 25 mL 单口瓶中加入化合物 **5a**(400 mg, 0.8 mmol, 1.0 eq)和 4 mL DMF, 搅拌均匀后, 降至 0 °C, 再缓慢加入 DBU(137 mg, 0.9 mmol, 1.1 eq), 加完后升至室温反应。TLC 监控, 反应结束, 记为反应液①;

另取 25 mL 单口瓶中加入 **M4**(372 mg, 0.9 mmol, 1.1 eq), PyBOP(852 mg, 1.6 mmol, 2.0 eq)和 3 mL DMF, 室温搅拌 5 分钟, 加入反应液①, 室温反应, HPLC
10 监测。反应完毕, 反应液经高效液相纯化得化合物 **5b**(326mg); LC-MS: $[M+NH_4]^+ = 679.2$ 。

第三步：化合物 **5c**

于 100mL 单口瓶中加入 **5b** (4.0 g, 6.05 mmol, 1.0 eq), DMF(60 mL)溶解, 再加入 5%Pd/C(4 g), 室温氢化反应 4 h(采用 HPLC 监测反应进程)。过滤 Pd/C,
15 滤液未经浓缩, 直接置于冰水浴(约 0 °C)中, 待用。

第四步：化合物 **5d**

将粗产品 **5c** 置于冰水浴中, 加入 DIPEA(1.1 mL, 1.1 eq), 再加入化合物 **M3**(3.4 g, 6.05 mmol), 加毕升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕, 反应液经
20 高效液相纯化, 得制备液, 制备液冻干得到 **5d**(3.15g); LC-MS: $[M-H]^- = 816.3$ 。

第五步：化合物 **5e**

于 100 mL 单口瓶中加入 **5d**(2.07 g, 2.53 mmol, 1.0 eq), **M5**(1.35 g, 2.53 mmol, 1.0 eq), PyBOP(1.98 g, 3.79 mmol, 1.5 eq), HOBt(0.51 g, 3.79 mmol, 1.5 eq)及 DMF(40 mL), 冰水浴下加入 DIPEA(1.05 mL, 1.5 eq), 升至室温反应 2 h(采用
25 HPLC 监测)。反应液直接经制备纯化, 制备液水泵减压水浴 35 °C 浓缩除去乙腈, 冻干得到化合物 **5e**(1.92 g), 收率 61%; LC-MS: $[M+H]^+ = 1235.4$ 。

第六步：化合物 **5A**

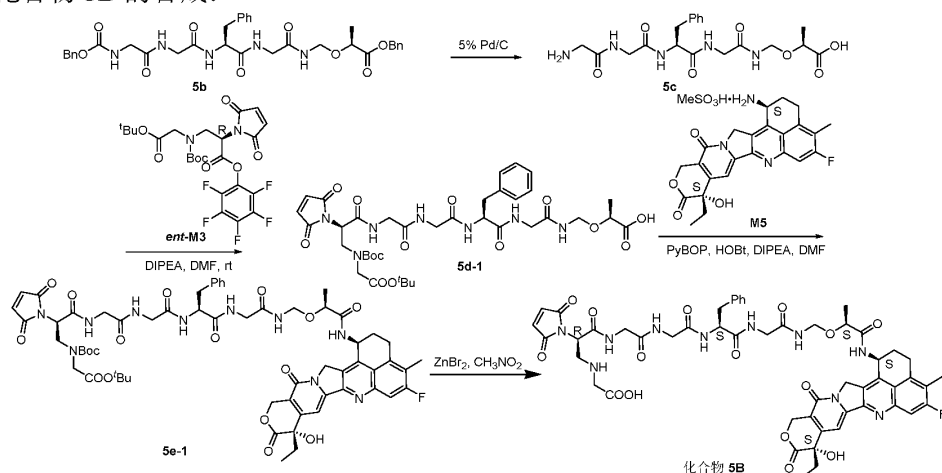
于 100mL 单口瓶中加入化合物 **5e**(1.0 g, 0.8 mmol, 1.0 eq), 35 mL 硝基甲烷, 溶解后再加入溴化锌(3.64 g, 16 mmol, 20.0 eq), 油浴 40 °C(提前预热稳定)反应
30 min, 水泵减压水浴 45 °C 浓缩除去硝基甲烷, 得黄色残余物固体(采用 HPLC 监测)。经酸法制备, 得到化合物 **5A** 的制备液, 制备液经水泵减压水浴 35 °C 浓缩旋除乙腈, 冻干得到化合物 **5A**(786 mg)收率 90%。

LC-MS: $[M+H]^+ = 1079.4$;

^1H NMR (400 MHz, DMSO-

35 d6) δ 9.39 – 9.02 (m, 1H), 8.70 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H), 8.64 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 8.56 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 8.34 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 8.16 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 8.01 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 7.71 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.28 – 7.15 (m, 4H), 7.14 (s, 2H), 5.53 (dd, $J = 14.5, 6.4$ Hz, 1H), 5.49 – 5.34 (m, 2H), 5.22 (d, $J = 18.8$ Hz, 1H), 5.09 (d, $J = 18.7$ Hz, 1H), 5.03 (dd, $J = 9.6, 3.9$ Hz, 1H), 4.73 (dd, $J = 9.9, 6.9$ Hz, 1H), 4.59 (dd, $J = 10.1, 6.5$ Hz, 1H), 4.49 (ddd, $J = 13.2, 8.6, 4.4$ Hz, 1H), 4.14 (dd, $J = 13.3, 6.6$ Hz, 2H),
40 3.93 (s, 2H), 3.84 (dd, $J = 16.5, 6.3$ Hz, 1H), 3.76 (dd, $J = 16.9, 5.7$ Hz, 2H), 3.70 (d, $J = 5.2$ Hz, 2H), 3.60 (dd, $J = 16.7, 5.4$ Hz, 1H), 3.52 (dd, $J = 16.4, 5.1$ Hz, 1H), 3.45 (dd, $J = 12.8, 10.1$ Hz, 1H), 3.25 – 3.15 (m, 1H), 3.14 – 3.05 (m, 1H), 3.01 (dd, $J = 13.7, 4.1$ Hz, 1H), 2.73 (dd, $J = 13.5, 9.8$ Hz, 1H), 2.54 – 2.47 (m, 1H), 2.33 (s, 2H), 2.17 (d, $J = 5.5$ Hz, 2H), 1.91 – 1.79 (m, 2H), 1.33 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H), 0.87 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H)。

实施例 9

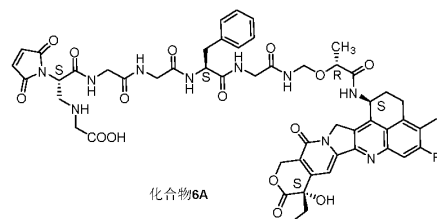
化合物 **5B** 的合成:第一步: 化合物 **5d-1**

- 5 于 25mL 单口瓶中加入化合物 **5b**(300 mg, 0.45 mmol, 1.0 eq), DMF(3 mL), 搅拌溶清, 加入 5%Pd/C(300 mg), 氢气置换三次, 氢化反应 2 h, HPLC 监测反应结束。反应结束后, 过滤除去 Pd/C, 将滤液降温至 0-5℃, 加入 DIPEA(65 mg, 0.5 mmol, 1.1 eq), 再向滤液加入 *ent*-**M3**(255 mg, 0.45 mmol), 加毕, 升至 20±5 °C 反应 1 h, HPLC 监测反应结束。反应结束后, 经 HPLC 制备纯化, 收集产品制备液, 冻干得到化合物 **5d-1**(200 mg), 收率 54%; LC-MS: [M-H]⁻=816.3。
- 10 第二步: 化合物 **5e-1**

- 于 25 mL 单口瓶中加入化合物 **5d-1**(200 mg, 0.24 mmol, 1.0 eq)、**M5**(127 mg, 0.24 mmol, 1.0 eq)、PyBOP(187 mg, 0.36 mmol, 1.2eq)、HOBt(48 mg, 0.36 mmol, 1.2 eq)及 DMF(6 mL), 冰水浴降至 0-5℃, 加入 DIPEA(62 mg, 0.48 mmol, 2.0 eq), 加毕, 升至 20±5 °C 反应 2 h, HPLC 监测反应结束。反应液直接 HPLC 制备纯化, 收集产品制备液, 冻干得到化合物 **5e-1**(162.8 mg); LC-MS: [M+H]⁺=1235.4。
- 15 第三步: 化合物 **5B**

- 于 25 mL 单口瓶中依次加入化合物 **5e-1**(110 mg, 0.089 mmol, 1.0 eq), ZnBr₂ (400 mg, 1.78 mmol, 20.0 eq) 和 CH₃NO₂(10 mL), 加毕, 升至 40 °C 反应 0.5 h, 停止反应, 反应液直接 45 °C 减压旋干后得到黄色固体, 取样 HPLC 监测反应。旋干的固体直接 HPLC 制备纯化, 收集产品制备液, 冻干得到化合物 **5B**(73.4 mg), 收率 76.5%; LC-MS: [M+H]⁺=1079.4。
- 20

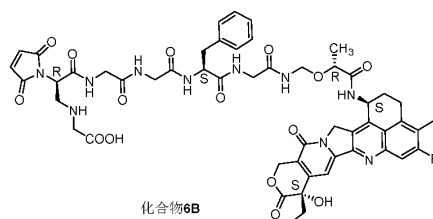
实施例 10

化合物 **6A** 的制备:

25

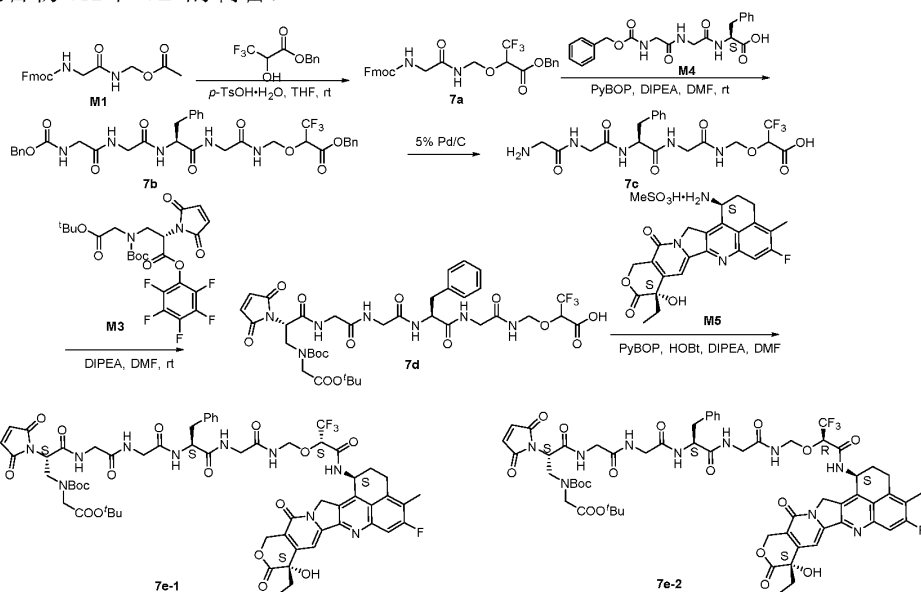
参照实施例 8 合成路线, 得到化合物 **6A**(71 mg); LC-MS:[M+H]⁺=1079.4。

实施例 11

化合物 **6B** 的制备:参照实施例 9 合成路线, 得到化合物 **6B**(59 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1079.4$ 。

5

实施例 12

化合物 **7A** 和 **7B** 的制备:第一步: 化合物 **7a**

于 250 mL 单口瓶中加入 **M1**(10 g, 27.1 mmol), 3, 3, 3-三氟乳酸苄酯(参照专利 WO2020063673A1 公布的方法制备)(12.7 g, 54.3 mmol), 醋酸锌(9.96 g, 54.3 mmol)及 100 mL 甲苯, 加热至 100 °C 反应 4 h。反应完毕, 降至室温, 过滤除去不溶物, 滤液浓缩得粗品。粗品经硅胶柱层析纯化(PE:EA=10:1-5:1-2:1)得到目标物 5.15 g, 收率 35.1%; LC-MS: $[M+H]^+=543.17$ 。

第二步: 化合物 **7b**

于 50 mL 单口瓶中加入 **7a**(5 g, 9.2 mmol)及 15 mL DMF, 溶清后, 冰水浴下, 加入 DBU(1.68 g, 11 mmol), 反应 1 h, 记为反应液①;

另取 50 mL 单口瓶, 加入 **M4**(3.8 g, 9.2 mmol), PyBOP(5.75 g, 11 mmol), HOBt(1.49 g, 11 mmol)及 10 mL DMF, 溶清后, 冰水浴下, 加入 DIPEA(1.82 mL, 11 mmol), 继续反应 30 min, 加入反应液①, 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应进程, 反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得制备液。制备液经二氯甲烷萃取、饱和氯化钠溶液洗涤、无水硫酸钠干燥、过滤、浓缩得到固体 4.1 g, 收率 62.3%; LC-MS: $[M+H]^+=716.25$ 。

第三步: 化合物 **7d**

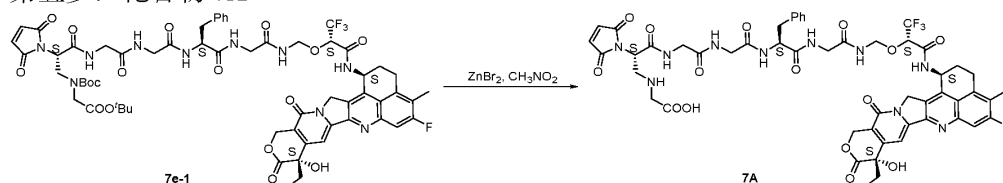
于 25 mL 单口瓶中加入 **7b**(900 mg, 1.26 mmol), 15 mL DMF 溶清后, 加入 900 mg 5%Pd/C, 氢化反应 2h, 反应完毕, 过滤, 将滤液置于冰水浴中, 加入 DIPEA(228 uL, 1.38 mmol), 再加入 **M3**(712 mg, 1.26 mmol), 加毕升至室温反应 1 h。HPLC 监测反应完毕, 反应液经高效液相纯化, 得制备液, 制备液冻干得到产

品 525 mg, 收率 47.9%; LC-MS: $[M-H]^- = 870.33$ 。

第四步: 化合物 **7e**

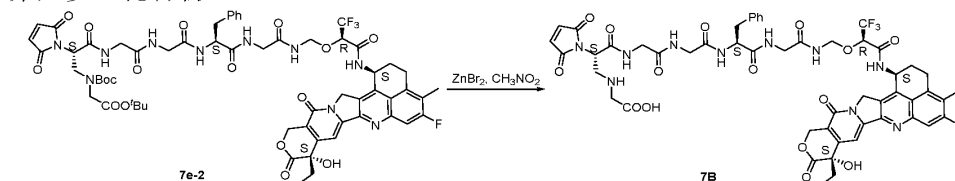
于 50 mL 单口瓶中加入 **7d**(500 mg, 0.57 mmol), **M5**(305 mg, 0.57 mmol), PyBOP(448 mg, 0.86 mmol), HOBt(116 mg, 0.86 mmol)及 15 mL DMF,冰水浴下加入 DIPEA(378 uL, 2.29 mmol), 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **7e-1** 和化合物 **7e-2** 的制备液, 制备液分别冻干得到 150 mg 化合物 **7e-1**, LC-MS: $[M+H]^+ = 1289.46$; 220mg 化合物 **7e-2**, LC-MS: $[M+H]^+ = 1289.46$ 。

第五步: 化合物 **7A**



于 25 mL 单口瓶中加入 **7e-1**(100 mg, 0.077 mmol), 溴化锌(349 mg, 1.55 mmol) 及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体 52 mg; TOF 结果: 1133.3613。

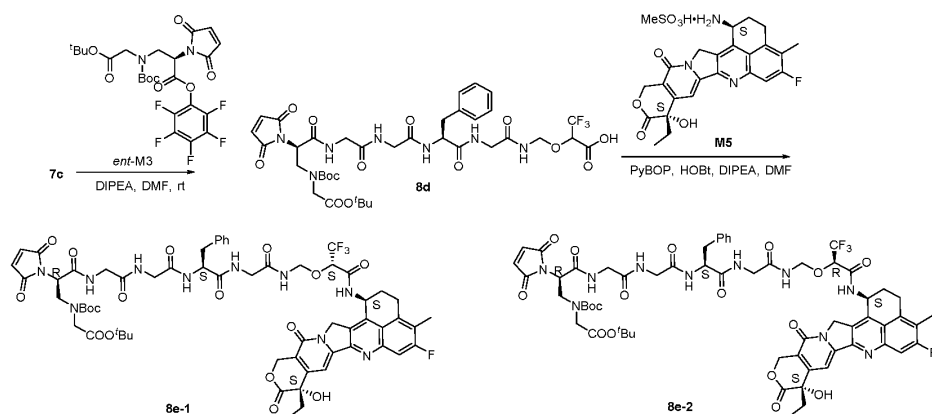
第六步: 化合物 **7B**



于 25 mL 单口瓶中加入 **7e-2**(100 mg, 0.077 mmol), 溴化锌(349 mg, 1.55 mmol) 及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体 63 mg; TOF 结果: 1133.3668。

实施例 13

化合物 **8A** 和 **8B** 的合成:



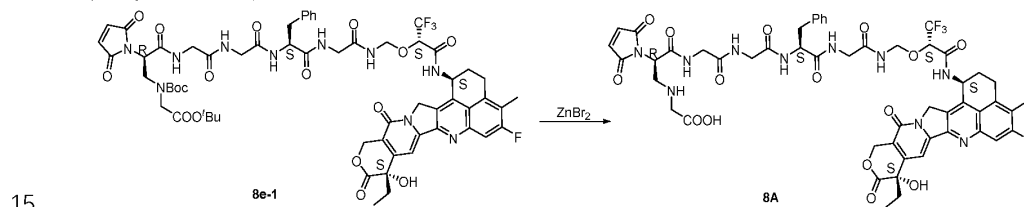
第一步：化合物 8d

于 25 mL 单口瓶中加入 7c(900 mg, 1.83 mmol), 20 mL DMF 溶清后, 加入 DIPEA(303 μ L, 1.83 mmol), 再加入 *ent*-M3(1034 mg, 1.83 mmol), 加毕升至室温反应 1 h。HPLC 监测反应完毕, 反应液经高效液相纯化, 得制备液, 制备液冻干得到产品 613 mg, 收率 38.5%; LC-MS: $[M-H]^-$ =870.32。

第二步：化合物 8e-1 和化合物 8e-2

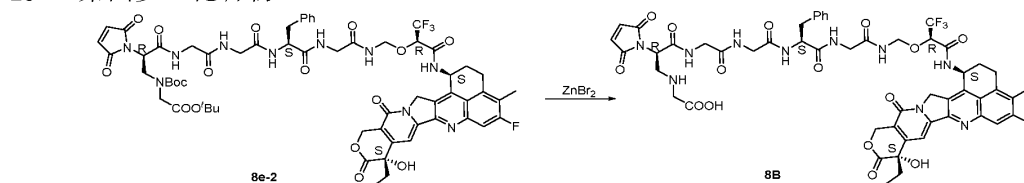
于 50 mL 单口瓶中加入 8d(500 mg, 0.57 mmol), M5(305 mg, 0.57 mmol), PyBOP(448 mg, 0.86 mmol), HOBt(116 mg, 0.86 mmol)及 15 mL DMF,冰水浴下加入 DIPEA(378 μ L, 2.29 mmol), 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 8e-1 和化合物 8e-2 的制备液, 制备液分别冻干得到 140 mg 化合物 8e-1, 210 mg 化合物 8e-2。化合物 8e-1 的 LC-MS: $[M+H]^+$ =1289.47; 化合物 8e-2 的 LC-MS: $[M+H]^+$ =1289.47。

第三步：化合物 8A



于 25 mL 单口瓶中加入化合物 8e-1(100 mg, 0.077 mmol), 溴化锌(349 mg, 1.55 mmol)及 5 mL 硝基甲烷, 40 $^{\circ}$ C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体 50 mg; TOF 结果: 1133.3623。

第四步：化合物 8B

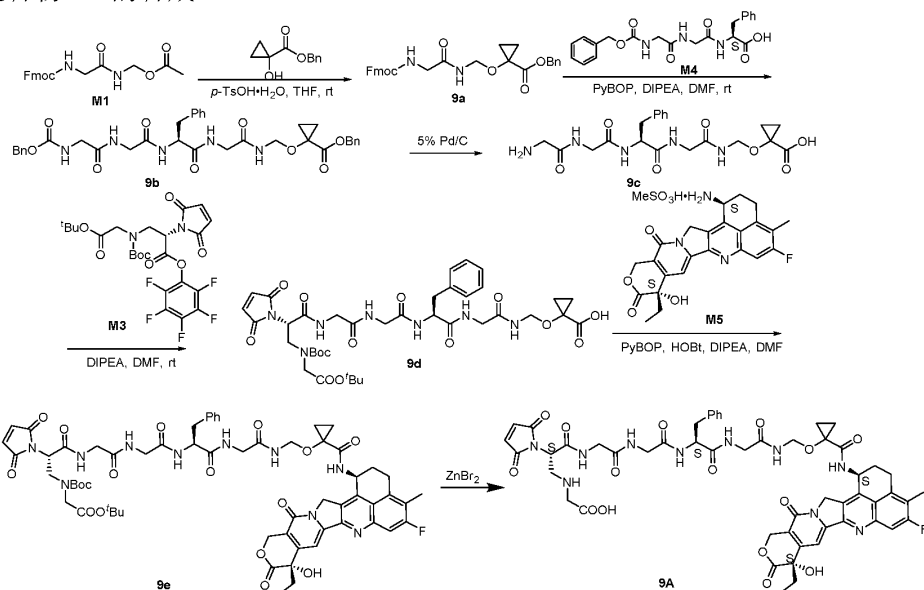


于 25 mL 单口瓶中加入化合物 8e-2(100 mg, 0.077 mmol), 溴化锌(349 mg, 1.55 mmol)及 5 mL 硝基甲烷, 40 $^{\circ}$ C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到

固体 58 mg; TOF 结果: 1133.3653。

实施例 14

化合物 **9A** 的合成:



5 第一步: 化合物 **9a**

于 250 mL 单口瓶中, 加入 **M1**(6 g, 16.3 mmol), 100 mL THF, 对甲苯磺酸一水合物(0.31 g, 1.63 mmol), 搅拌冷却至 0 °C, 滴加 2-羟基-2-环丙基乙酸苄酯(参照专利 US20050020645 A1 公布的方法制备)(6.3 g, 32.6 mmol), 滴毕自然升温至室温反应(反应约 2-4 h), TLC 监控。反应结束, 加入饱和 NaHCO₃ 溶液, 用乙酸乙酯萃取, 饱和氯化钠溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 残余物经硅胶柱纯化(PE:EA=10:1-5:1-2:1)得 **9a** (3.7 g), 收率 45%; LC-MS: [M+H]⁺=501.5。

第二步: 化合物 **9b**

于 25 mL 单口瓶, 加入 **9a**(2 g, 4.0 mmol), 10 mL DMF, 0 °C 搅拌, 加入 DBU(760 mg, 5.0 mmol), 反应 1 h, TLC 监测 Fmoc 脱保护完成后, 待用;
另取 25 mL 单口瓶中加入 **M4**(1.65 g, 4.0 mmol), PyBOP(2.59 g, 5.0 mmol), HOBt(675 mg, 5.0 mmol)及 10 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA(823 uL, 5.04 mmol), 继续搅拌 30 min, 将上述反应液加至反应瓶中, 升至室温反应。HPLC 监测反应结束后, 反应液经制备液相纯化, 得到产品制备液, 制备液经二氯甲烷萃取, 饱和氯化钠溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩, 得到固体 1.5 g, 收率 56%; LC-MS: [M+H]⁺=674.7。

第三步: 化合物 **9c**

于 25 mL 单口瓶中加入 **9b**(900 mg, 1.3 mmol), 10 mL DMF 溶清后, 加入 900 mg 5%Pd/C, 氢化反应 1.5 h, 反应完毕, 过滤, 得滤液, 未经纯化直接用于下一步反应。

25 第四步: 化合物 **9d**

将粗产品 **9c** 置于冰水浴中, 加入 DIPEA(223 uL, 1.3 mmol), 再加入化合物 **M3**(750 mg, 1.3 mmol), 加毕升至室温反应 1 h。HPLC 监测反应完毕, 反应液经高效液相纯化, 得制备液, 制备液冻干得到 **9d**(529 mg); LC-MS: [M-H]⁻=828.4。

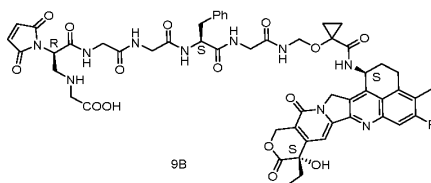
第五步：化合物 **9e**

于 50 mL 单口瓶中加入 **9d** (500 mg, 0.6 mmol), **M5** (300 mg, 0.6 mmol), PyBOP (416 mg, 0.8 mmol), HOBt (108 mg, 0.5 mmol) 及 15 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA (351 μ L, 2.13 mmol), 升至室温反应 3 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **9e** 的制备液, 制备液冻干得到 **9e** (257 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1247.5$ 。

第六步：化合物 **9A**

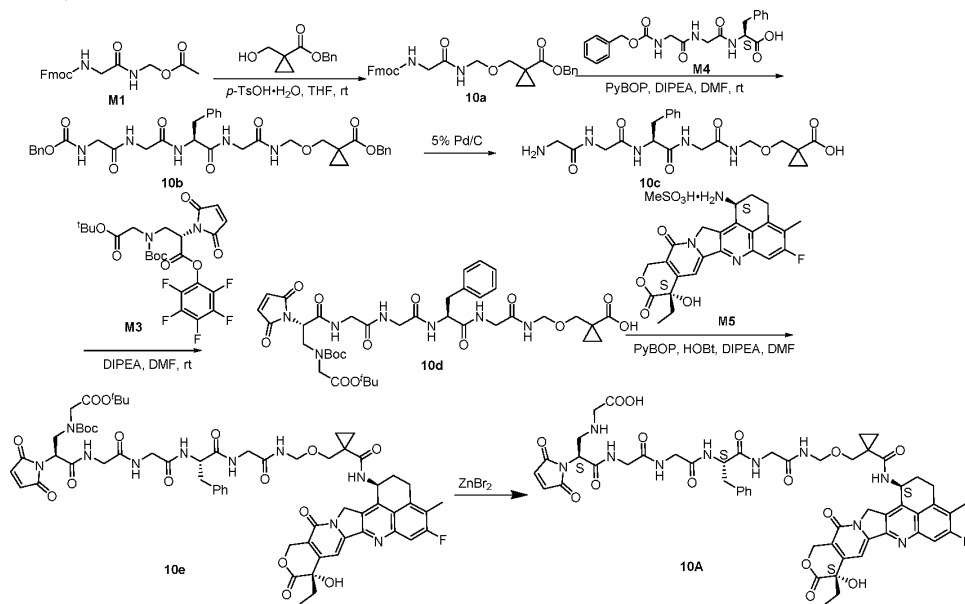
于 25 mL 单口瓶中加入 **9e** (100 mg, 0.08 mmol), 溴化锌 (360 mg, 1.6 mmol) 及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体化合物 **9A** (55 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1091.3$ 。

实施例 15

化合物 **9B** 的合成:

参照实施例 14 合成路线, 得到化合物 **9B** (44 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1091.3$ 。

实施例 16

化合物 **10A** 的合成:第一步：化合物 **10a**

于 250 mL 单口瓶中, 加入 **M1** (6 g, 16.3 mmol), 100 mL THF, 对甲苯磺酸一水合物 (0.31 g, 1.63 mmol), 搅拌冷却至 0 °C, 滴加 3-羟基-2-环丙基丙酸苄酯 (参照专利 WO2013187496A1 公布的方法制备) (6.7 g, 32.6 mmol), 滴毕自然升温至室温反应 (反应约 2-4 h), TLC 监控。反应结束, 加入饱和 NaHCO_3 溶液, 用乙酸乙酯萃取, 饱和氯化钠溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 残余物经硅

胶柱纯化(PE:EA=10:1-5:1-2:1)得 **10a** (4.9 g), 收率 58%; LC-MS: $[M+H]^+=515.4$ 。

第二步: 化合物 **10b**

于 25 mL 单口瓶, 加入 **10a** (4 g, 7.8 mmol), 10 mL DMF, 0 °C 搅拌, 加入 DBU (1.2 g, 8.0 mmol), 反应 1 h, TLC 监测 Fmoc 脱保护完成后, 待用;

5 另取 25 mL 单口瓶中加入 **M4** (3.3 g, 8.0 mmol), PyBOP (5.2 g, 10.0 mmol), HOBt (1.35 g, 10.0 mmol) 及 10 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA (1.65 mL, 10.1 mmol), 继续搅拌 50 min, 将上述反应液加至反应瓶中, 升至室温反应。HPLC 监测反应结束后, 反应液经制备液相纯化, 得到产品制备液, 制备液经二氯甲烷萃取, 饱和氯化钠溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩, 得到固体 2.3 g, 收率 42%; LC-MS: $[M+H]^+=688.8$ 。

第三步: 化合物 **10c**

于 25 mL 单口瓶中加入 **10b** (1.0 g, 1.45 mmol), 15 mL DMF 溶清后, 加入 1.0 g 5% Pd/C, 氢化反应 1.5 h, 反应完毕, 过滤, 得滤液, 未经纯化直接用于下一步反应。

15 第四步: 化合物 **10d**

将粗产品 **10c** 置于冰水浴中, 加入 DIPEA (258 μ L, 1.5 mmol), 再加入化合物 **M3** (837 mg, 1.45 mmol), 加毕升至室温反应 1 h。HPLC 监测反应完毕, 反应液经高效液相纯化, 得制备液, 制备液冻干得到 **10d** (499 mg); LC-MS: $[M-H]^-=842.4$ 。

第五步: 化合物 **10e**

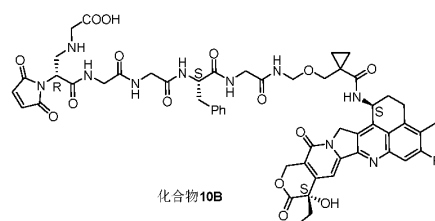
20 于 50 mL 单口瓶中加入 **10d** (400 mg, 0.48 mmol), **M5** (240 mg, 0.48 mmol), PyBOP (250 mg, 0.48 mmol), HOBt (104 mg, 0.48 mmol) 及 15 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA (330 μ L, 2.0 mmol), 升至室温反应 3 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **10e** 的制备液, 制备液冻干得到 **10e** (188 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1261.5$ 。

25 第六步: 化合物 **10A**

于 25 mL 单口瓶中加入 **10e** (100 mg, 0.08 mmol), 溴化锌 (360 mg, 1.6 mmol) 及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体化合物 **10A** (61 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1105.4$ 。

30 实施例 17

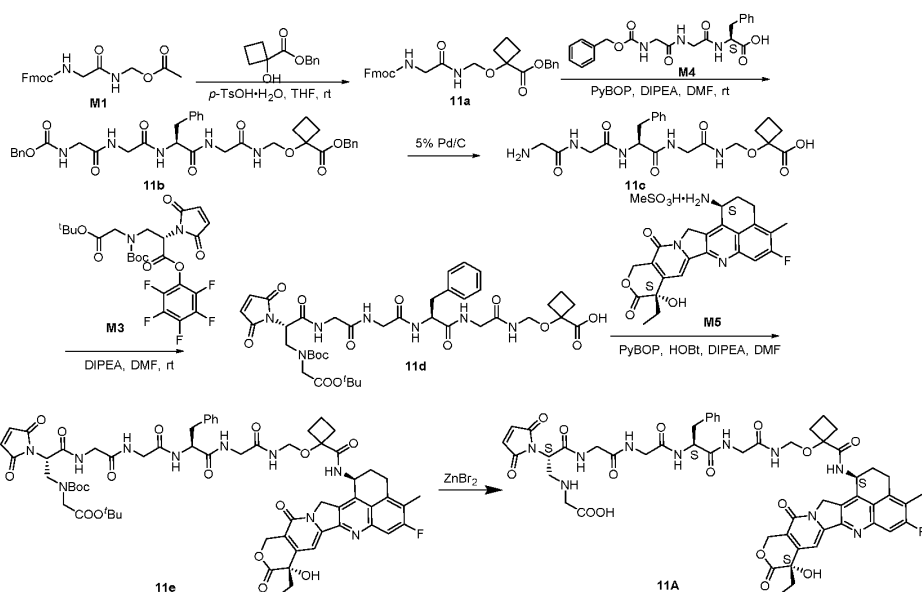
化合物 **10B** 的合成:



参照实施例 16 合成路线, 得到化合物 **10B** (75 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1105.4$ 。

实施例 18

35 化合物 **11A** 的合成:



第一步：化合物 11a

于 250 mL 单口瓶中，加入 **M1**(6 g, 16.3 mmol)，100 mL THF，对甲苯磺酸一水合物(0.31 g, 1.63 mmol)，搅拌冷却至 0 °C，滴加 2-羟基-2-环丁基乙酸苄酯(6.7 g, 32.6 mmol)，滴毕自然升温至室温反应(反应约 2-4 h)，TLC 监控。反应结束，加入饱和 NaHCO₃ 溶液，用乙酸乙酯萃取，饱和氯化钠溶液洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，浓缩，残余物经硅胶柱纯化(PE:EA=10:1-5:1-2:1)得 **11a**(5.1 g)，收率 62%；LC-MS: [M+H]⁺=515.7。

第二步：化合物 11b

于 25 mL 单口瓶，加入 **11a**(4 g, 7.8 mmol)，10 mL DMF，0 °C 搅拌，加入 DBU(1.2 g, 8.0 mmol)，反应 1 h，TLC 监测 Fmoc 脱保护完成后，待用；

另取 25 mL 单口瓶中加入 **M4**(3.3 g, 8.0 mmol)，PyBOP(5.2 g, 10.0 mmol)，HOBt(1.35 g, 10.0 mmol)及 10 mL DMF，冰水浴下加入 DIPEA(1.63 mL, 10.0 mmol)，继续搅拌 40 min，将上述反应液加至反应瓶中，升至室温反应。HPLC 监测反应结束后，反应液经制备液相纯化，得到产品制备液，制备液经二氯甲烷萃取，饱和氯化钠溶液洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩，得到固体 2.3 g，收率 42%；LC-MS: [M+H]⁺=688.3。

第三步：化合物 11c

于 25 mL 单口瓶中加入 **11b**(2.0 g, 2.9 mmol)，25 mL DMF 溶清后，加入 2.0 g 5%Pd/C，氢化反应 3 h，反应完毕，过滤，得滤液，未经纯化直接用于下一步反应。

第四步：化合物 11d

将粗产品 **11c** 置于冰水浴中，加入 DIPEA(516 uL, 3.0 mmol)，再加入化合物 **M3**(1.7 g, 2.9 mmol)，加毕升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕，反应液经高效液相纯化，得到制备液，制备液冻干得到 **11d**(934 mg)；LC-MS: [M-H]⁻=842.4。

第五步：化合物 11e

于 50 mL 单口瓶中加入 **11d** (800 mg, 0.96 mmol)，**M5**(480 mg, 0.96 mmol)，

PyBOP(500 mg, 0.96 mmol), HOBt(208 mg, 0.96 mmol)及 30 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA(660 uL, 4.0 mmol), 升至室温反应 4 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **11e** 的制备液, 制备液冻干得到 **11e**(401 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1261.4$ 。

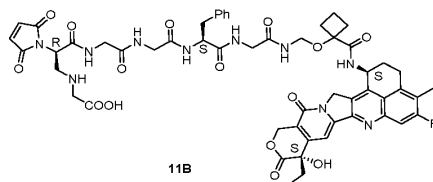
5 第六步: 化合物 **11A**

于 25 mL 单口瓶中加入 **11e** (150 mg, 0.12 mmol), 溴化锌(532 mg, 2.4 mmol)及 10 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体化合物 **11A**(86 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1105.4$ 。

10

实施例 19

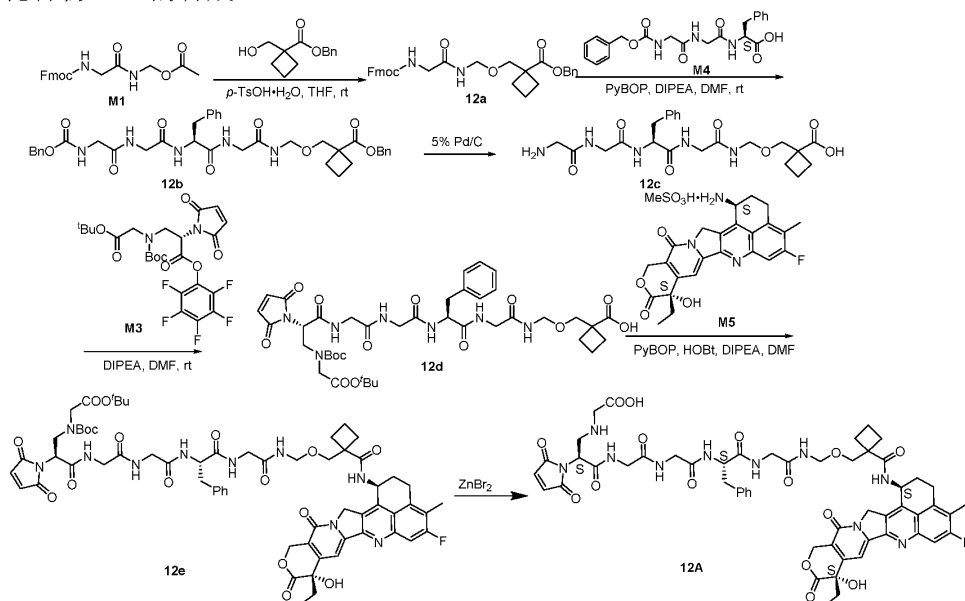
化合物 **11B** 的合成



参照实施例 18 合成路线, 得到化合物 **11B**(50 mg)。LC-MS: $[M+H]^+=1105.4$ 。

实施例 20

15 化合物 **12A** 的合成:



第一步: 化合物 **12a**

于 250 mL 单口瓶中, 加入 **M1**(6 g, 16.3 mmol), 100 mL THF, 对甲苯磺酸一水合物(0.31 g, 1.63 mmol), 搅拌冷却至 0 °C, 滴加 3-羟基-2-环丁基丙酸苄酯(7.2 g, 32.6 mmol), 滴毕自然升温至室温反应(反应约 2-4 h), TLC 监控。反应结束, 加入饱和 NaHCO_3 溶液, 用乙酸乙酯萃取, 饱和氯化钠溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 残余物经硅胶柱纯化(PE:EA=10:1-5:1-2:1)得 **12a** (4.5 g), 收率 52%; LC-MS: $[M+H]^+=529.4$ 。

第二步: 化合物 **12b**

于 25 mL 单口瓶, 加入 **12a**(4 g, 7.6 mmol), 10 mL DMF, 0 °C 搅拌, 加入 DBU(1.2 g, 8.0 mmol), 反应 1 h, TLC 监测 Fmoc 脱保护完成后, 待用;

另取 25 mL 单口瓶中加入 **M4**(3.2 g, 7.6 mmol), PyBOP(4.7 g, 9.0 mmol), HOBt(1.22 g, 9.0 mmol)及 10 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA(1.49 mL, 0.9 mmol), 继续搅拌 30 min, 将上述反应液加至反应瓶中, 升至室温反应。HPLC 监测反应结束后, 反应液经制备液相纯化, 得到产品制备液, 制备液经二氯甲烷萃取, 饱和氯化钠溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩, 得到固体 2.0 g, 收率 37%; LC-MS: $[M+H]^+=702.8$ 。

第三步: 化合物 **12c**

于 25 mL 单口瓶中加入 **12b**(1.0 g, 1.43 mmol), 15 mL DMF 溶清后, 加入 1.0 g 5%Pd/C, 氢化反应 1.5 h, 反应完毕, 过滤, 得滤液, 未经纯化直接用于下一步反应。

第四步: 化合物 **12d**

将粗产品 **12c** 置于冰水浴中, 加入 DIPEA(258 uL, 1.5 mmol), 再加入化合物 **M3**(825 mg, 1.43 mmol), 加毕升至室温反应 1 h。HPLC 监测反应完毕, 反应液经高效液相纯化, 得制备液, 制备液冻干得到 **12d**(522 mg); LC-MS: $[M-H]^-=856.4$ 。

第五步: 化合物 **12e**

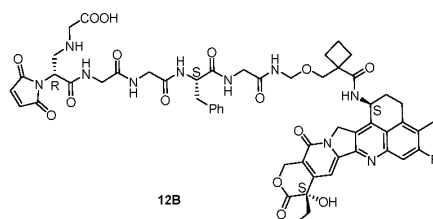
于 50 mL 单口瓶中加入 **12d** (400 mg, 0.47 mmol), **M5**(240 mg, 0.47 mmol), PyBOP(250 mg, 0.47 mmol), HOBt(101 mg, 0.47 mmol)及 15 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA(330 uL, 2.0 mmol), 升至室温反应 3 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **12e** 的制备液, 制备液冻干得到 **12e**(198 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1275.4$ 。

第六步: 化合物 **12A**

于 25 mL 单口瓶中加入 **12e** (100 mg, 0.08 mmol), 溴化锌(360 mg, 1.6 mmol)及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体化合物 **12A**(55 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1119.4$ 。

实施例 21

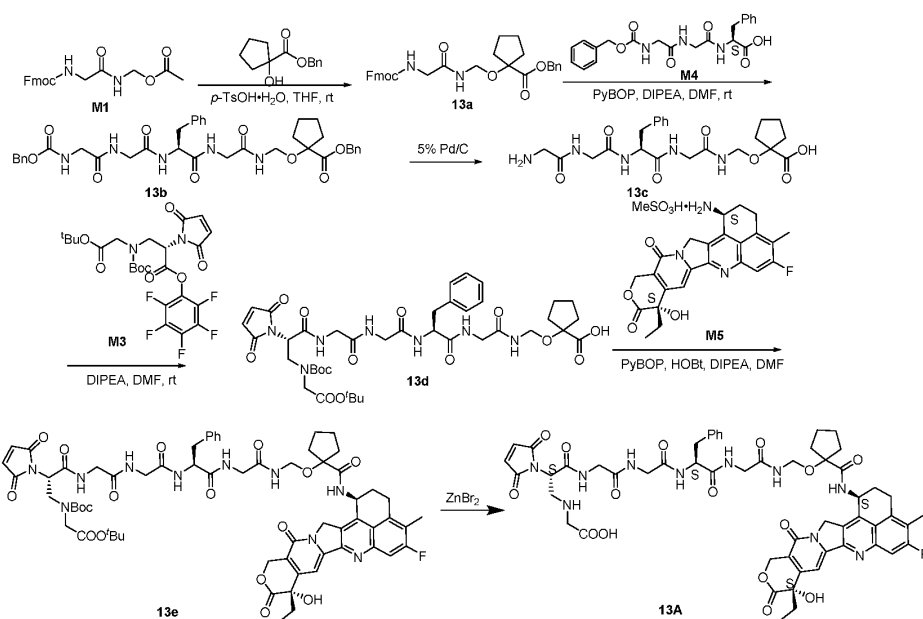
化合物 **12B** 的合成:



参照实施例 20 合成路线, 得到化合物 **12B**(50 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1119.4$ 。

实施例 22

化合物 **13A** 的合成:



第一步：化合物 13a

于 250 mL 单口瓶中，加入 **M1**(6 g, 16.3 mmol)，100 mL THF，对甲苯磺酸一水合物(0.31 g, 1.63 mmol)，搅拌冷却至 0 °C，滴加 2-羟基-2-环戊基乙酸苄酯(7.2 g, 32.6 mmol)，滴毕自然升温至室温反应(反应约 2-4 h)，TLC 监控。反应结束，加入饱和 NaHCO₃ 溶液，用乙酸乙酯萃取，饱和氯化钠溶液洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，浓缩，残余物经硅胶柱纯化(PE:EA=10:1-5:1-2:1)得 **13a** (4.6 g)，收率 53%；LC-MS: [M+H]⁺=529.5。

第二步：化合物 13b

于 25 mL 单口瓶，加入 **13a**(4 g, 7.6 mmol)，10 mL DMF，0 °C 搅拌，加入 DBU(1.17 g, 7.8 mmol)，反应 1 h，TLC 监测 Fmoc 脱保护完成后，待用；

另取 25 mL 单口瓶中加入 **M4**(3.14 g, 7.6 mmol)，PyBOP(4.42 g, 8.5 mmol)，HOBt(1.15 g, 8.5 mmol)及 10 mL DMF，冰水浴下加入 DIPEA(1.39 mL, 0.85 mmol)，继续搅拌 30 min，将上述反应液加至反应瓶中，升至室温反应。HPLC 监测反应结束后，反应液经制备液相纯化，得到产品制备液，制备液经二氯甲烷萃取，饱和氯化钠溶液洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩，得到固体 2.1 g，收率 39%；LC-MS: [M+H]⁺=702.8。

第三步：化合物 13c

于 25 mL 单口瓶中加入 **13b**(1.5 g, 1.87 mmol)，25 mL DMF 溶清后，加入 1.5 g 5%Pd/C，氢化反应 3 h，反应完毕，过滤，得滤液，未经纯化直接用于下一步反应。

第四步：化合物 13d

将粗产品 **13c** 置于冰水浴中，加入 DIPEA(333 uL, 1.93 mmol)，再加入化合物 **M3**(1.1 g, 1.87 mmol)，加毕升至室温反应 1 h。HPLC 监测反应完毕，反应液经高效液相纯化，得到制备液，制备液冻干得到 **13d**(519 mg)；LC-MS: [M-H]⁻=856.6。

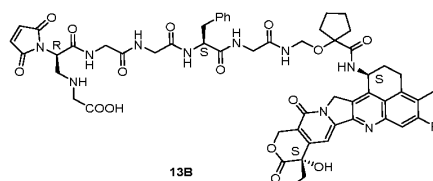
第五步：化合物 **13e**

于 50 mL 单口瓶中加入 **13d** (400 mg, 0.47 mmol), **M5** (240 mg, 0.48 mmol), PyBOP (250 mg, 0.48 mmol), HOBt (103 mg, 0.48 mmol) 及 15 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA (330 μ L, 2.0 mmol), 升至室温反应 4 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **13e** 的制备液, 制备液冻干得到 **13e** (187 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1275.5$ 。

第六步：化合物 **13A**

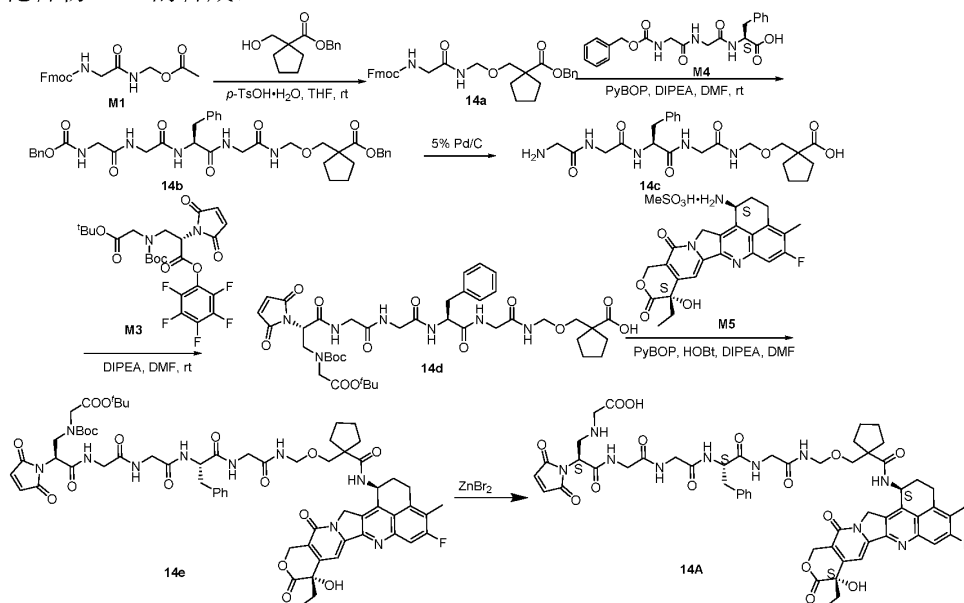
于 25 mL 单口瓶中加入 **13e** (100 mg, 0.08 mmol), 溴化锌 (355 mg, 0.16 mmol) 及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体化合物 **13A** (60 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1119.6$ 。

实施例 23

化合物 **13B** 的合成:

参照实施例 22 合成路线, 得到化合物 **13B** (51 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1119.6$ 。

实施例 24

化合物 **14A** 的合成:第一步：化合物 **14a**

于 250 mL 单口瓶中, 加入 **M1** (6 g, 16.3 mmol), 100 mL THF, 对甲苯磺酸一水合物 (0.31 g, 1.63 mmol), 搅拌冷却至 0 °C, 滴加 3-羟基-2-环戊基丙酸苄酯 (参照专利 WO2009011285A1 公布的方法合成) (7.6 g, 32.6 mmol), 滴毕自然升温至室温反应 (反应约 2-4 h), TLC 监控。反应结束, 加入饱和 NaHCO_3 溶液, 用乙酸乙酯萃取, 饱和氯化钠溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 残余物经硅

胶柱纯化(PE:EA=10:1-5:1-2:1)得 **14a** (4.4 g), 收率 49%; LC-MS: $[M+H]^+=543.6$ 。

第二步: 化合物 **14b**

于 25 mL 单口瓶, 加入 **14a** (4 g, 7.4 mmol), 10 mL DMF, 0 °C 搅拌, 加入 DBU (1.2 g, 8.0 mmol), 反应 1 h, TLC 监测 Fmoc 脱保护完成后, 待用;

5 另取 25 mL 单口瓶中加入 **M4** (3.1 g, 7.4 mmol), PyBOP (4.6 g, 8.8 mmol), HOBT (1.19 g, 8.8 mmol) 及 10 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA (1.49 mL, 9.0 mmol), 继续搅拌 30 min, 将上述反应液加至反应瓶中, 升至室温反应。HPLC 监测反应结束后, 反应液经制备液相纯化, 得到产品制备液, 制备液经二氯甲烷萃取, 饱和氯化钠溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩, 得到固体 2.6 g, 收率 49%; LC-MS: $[M+H]^+=716.4$ 。

第三步: 化合物 **14c**

于 25 mL 单口瓶中加入 **14b** (1.0 g, 1.4 mmol), 15 mL DMF 溶清后, 加入 1.0 g 5% Pd/C, 氢化反应 1.5 h, 反应完毕, 过滤, 得滤液, 未经纯化直接用于下一步反应。

15 第四步: 化合物 **14d**

将粗产品 **14c** 置于冰水浴中, 加入 DIPEA (248 μ L, 1.5 mmol), 再加入化合物 **M3** (808 mg, 1.4 mmol), 加毕升至室温反应 1 h。HPLC 监测反应完毕, 反应液经高效液相纯化, 得制备液, 制备液冻干得到 **14d** (500 mg); LC-MS: $[M-H]^-=870.5$ 。

第五步: 化合物 **14e**

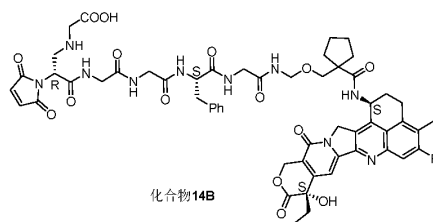
20 于 50 mL 单口瓶中加入 **14d** (400 mg, 0.46 mmol), **M5** (235 mg, 0.46 mmol), PyBOP (245 mg, 0.46 mmol), HOBT (99 mg, 0.46 mmol) 及 15 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA (331 μ L, 2.0 mmol), 升至室温反应 3 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **14e** 的制备液, 制备液冻干得到 **14e** (146 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1289.5$ 。

25 第六步: 化合物 **14A**

于 25 mL 单口瓶中加入 **14e** (100 mg, 0.08 mmol), 溴化锌 (360 mg, 1.6 mmol) 及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体化合物 **14A** (52 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1133.4$ 。

30 实施例 25

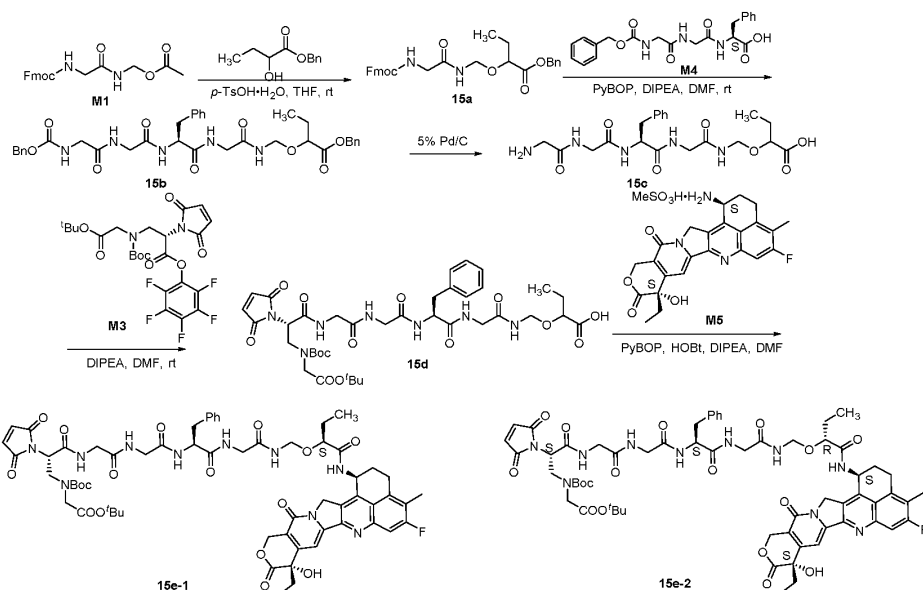
化合物 **14B** 的合成:



参照实施例 24 合成路线, 得到化合物 **14B** (48 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1133.4$ 。

实施例 26

35 化合物 **15A** 和 **15B** 的合成:



第一步：化合物 **15a**

于 250 mL 单口瓶中加入 **M1**(10 g, 27.1 mmol), 2-羟基-丁酸苄酯(参照文献 *Chemical Communications*, 2019, 55(53), 7699-7702. 公布的方法制备)(10.5 g, 54.3 mmol), 醋酸锌(9.96 g, 54.3 mmol)及 100 mL 甲苯, 加热至 100 °C 反应 4 h。反应
 5 完毕, 降至室温, 过滤除去不溶物, 滤液浓缩得粗品。粗品经硅胶柱层析纯化 (PE:EA=10:1-5:1-2:1) 得到目标物 5.67 g, 收率 42%; LC-MS: $[M+H]^+=503.5$ 。

第二步：化合物 **15b**

于 50 mL 单口瓶中加入 **15a**(5 g, 9.95 mmol)及 15 mL DMF, 溶清后, 冰水浴
 10 下, 加入 DBU(1.68 g, 11 mmol), 反应 1 h, 记为反应液①;

另取 50 mL 单口瓶, 加入 **M4**(4.1 g, 10.0 mmol), PyBOP(5.75 g, 11 mmol),
 HOBt(1.49 g, 11 mmol)及 10 mL DMF, 溶清后, 冰水浴下, 加入 DIPEA(1.82 mL,
 11 mmol), 继续反应 40 min, 加入反应液①, 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应
 15 进程, 反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得制备液。制备液经二氯甲烷萃取、
 饱和氯化钠溶液洗涤、无水硫酸钠干燥、过滤、浓缩得到固体 4.6 g, 收率 68%;
 LC-MS: $[M+H]^+=676.7$ 。

第三步：化合物 **15d**

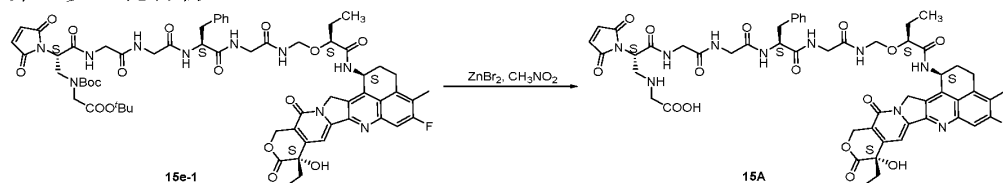
于 25 mL 单口瓶中加入 **15b**(2.0 g, 2.96 mmol), 15 mL DMF 溶清后, 加入 2.0
 g 5%Pd/C, 氢化反应 2h, 反应完毕, 过滤, 将滤液置于冰水浴中, 加入 DIPEA(496
 20 μ L, 3.0 mmol), 再加入 **M3**(1.7 g, 2.96 mmol), 加毕升至室温反应 1 h。HPLC 监
 测反应完毕, 反应液经高效液相纯化, 得制备液, 制备液冻干得到产品 1120.0 mg,
 收率 45%; LC-MS: $[M-H]^-=830.3$ 。

第四步：化合物 **15e**

于 50 mL 单口瓶中加入 **15d**(500 mg, 0.60 mmol), **M5**(321 mg, 0.60 mmol),
 25 PyBOP(469 mg, 0.90 mmol), HOBt(121 mg, 0.90 mmol)及 15 mL DMF, 冰水浴下
 加入 DIPEA(446 μ L, 2.7 mmol), 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应
 液经高效液相纯化, 得化合物 **15e-1** 和化合物 **15e-2** 的制备液, 制备液分别冻干
 得到 138 mg 化合物 **15e-1**, LC-MS: $[M+H]^+=1249.5$; 140 mg 化合物 **15e-2**, LC-

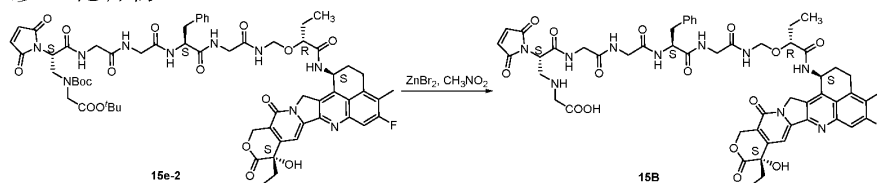
MS: $[M+H]^+=1249.5$ 。

第五步: 化合物 **15A**



于 25 mL 单口瓶中加入 **15e-1**(100 mg, 0.08 mmol), 溴化锌(360 mg, 1.6 mmol) 及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体 59 mg; LC-MS: $[M+H]^+=1093.4$ 。

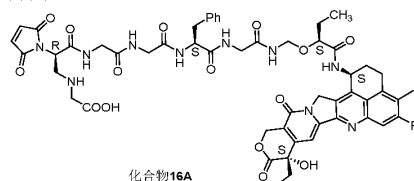
第六步: 化合物 **15B**



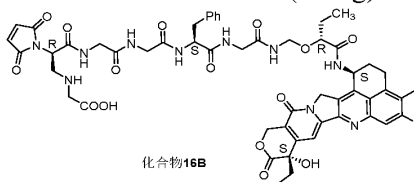
于 25 mL 单口瓶中加入 **15e-2**(100 mg, 0.08 mmol), 溴化锌(360 mg, 1.6 mmol) 及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体 60 mg; LC-MS: $[M+H]^+=1093.4$ 。

实施例 27

化合物 **16A** 和 **16B** 的合成:



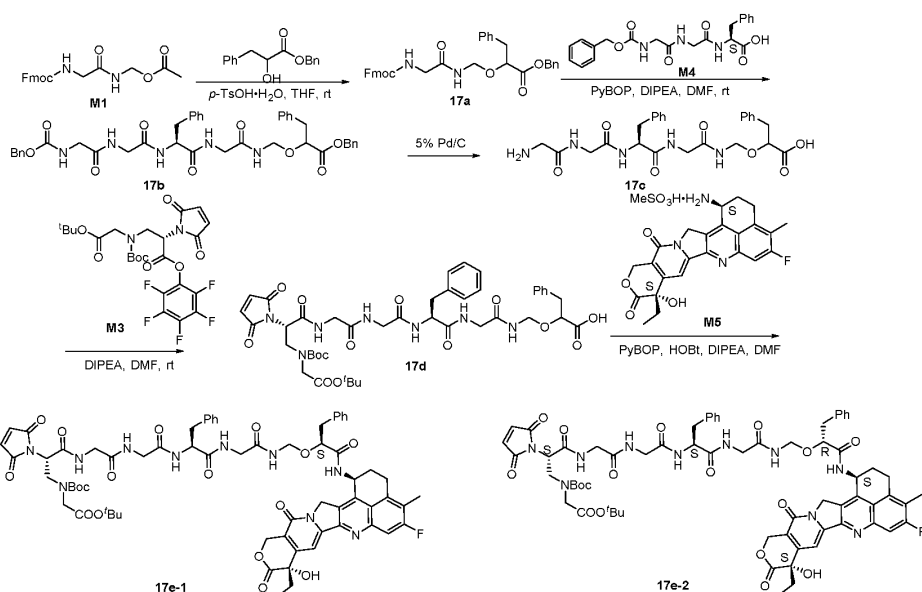
参照实施例 26 合成路线, 得到化合物 **16A**(55 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1093.4$ 。



参照实施例 26 合成路线, 得到化合物 **16B**(54 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1093.4$ 。

实施例 28

化合物 **17A** 和 **17B** 的合成:



第一步：化合物 17a

于 250 mL 单口瓶中加入 **M1**(10 g, 27.1 mmol), 2-羟基-苯丙酸苄酯(参考文献 *Nature Communications*, 2020. 11(1), 56. 公布的方法合成)(14.7 g, 54.3 mmol), 醋酸锌(9.96 g, 54.3 mmol)及 100 mL 甲苯, 加热至 100 °C 反应 4 h。反应完毕, 降至室温, 过滤除去不溶物, 滤液浓缩得粗品。粗品经硅胶柱层析纯化(PE:EA=10:1-5:1-2:1)得到目标物 6.13 g, 收率 40%; LC-MS: $[M+H]^+=565.6$ 。

第二步：化合物 17b

于 50 mL 单口瓶中加入 **17a**(5 g, 8.86 mmol)及 15 mL DMF, 溶清后, 冰水浴下, 加入 DBU(1.53 g, 10 mmol), 反应 1 h, 记为反应液①;

另取 50 mL 单口瓶, 加入 **M4**(3.6 g, 8.86 mmol), PyBOP(5.23 g, 10 mmol), HOBt(1.36 g, 10 mmol)及 10 mL DMF, 溶清后, 冰水浴下, 加入 DIPEA(1.65 mL, 10 mmol), 继续反应 30 min, 加入反应液①, 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应进程, 反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得制备液。制备液经二氯甲烷萃取、饱和氯化钠溶液洗涤、无水硫酸钠干燥、过滤、浓缩得到固体 5.0 g, 收率 77%; LC-MS: $[M+H]^+=738.3$ 。

第三步：化合物 17d

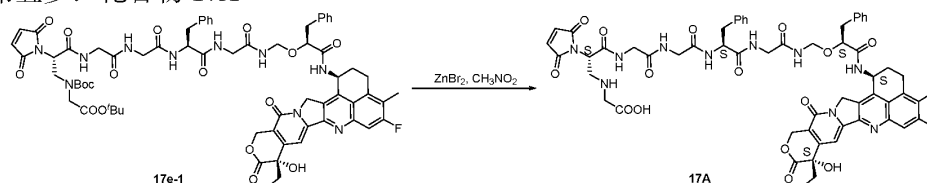
于 25 mL 单口瓶中加入 **17b**(3.0 g, 4.07 mmol), 15 mL DMF 溶清后, 加入 3.0 g 5%Pd/C, 氢化反应 2h, 反应完毕, 过滤, 将滤液置于冰水浴中, 加入 DIPEA(744 μ L, 4.5 mmol), 再加入 **M3**(2.34 g, 4.07 mmol), 加毕升至室温反应 1 h。HPLC 监测反应完毕, 反应液经高效液相纯化, 得制备液, 制备液冻干得到产品 1.2 g, 收率 33%; LC-MS: $[M-H]^-=892.4$ 。

第四步：化合物 17e

于 50 mL 单口瓶中加入 **17d**(500 mg, 0.56 mmol), **M5**(300 mg, 0.56 mmol), PyBOP(438 mg, 0.84 mmol), HOBt(113 mg, 0.84 mmol)及 15 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA(330 μ L, 2.0 mmol), 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **17e-1** 和化合物 **17e-2** 的制备液, 制备液分别冻干得到 156 mg 化合物 **17e-1**, LC-MS: $[M+H]^+=1311.4$; 150 mg 化合物 **17e-2**,

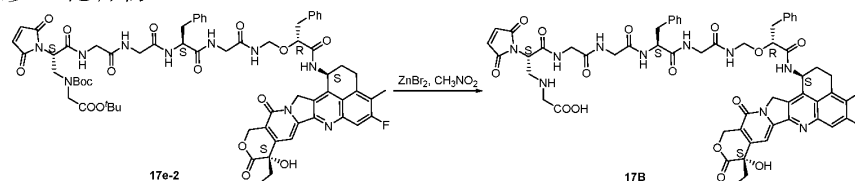
LC-MS: $[M+H]^+=1311.7$ 。

第五步: 化合物 **17A**



于 25 mL 单口瓶中加入 **17e-1**(100 mg, 0.08 mmol), 溴化锌(360 mg, 1.6 mmol) 及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体 43 mg; LC-MS: $[M+H]^+=1155.4$ 。

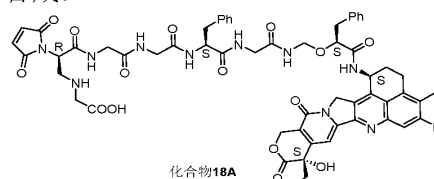
第六步: 化合物 **17B**



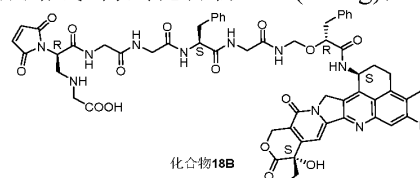
于 25 mL 单口瓶中加入 **17e-2**(100 mg, 0.08 mmol), 溴化锌(360 mg, 1.6 mmol) 及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体 40 mg; LC-MS: $[M+H]^+=1155.4$ 。

实施例 29

化合物 **18A** 和 **18B** 的合成:



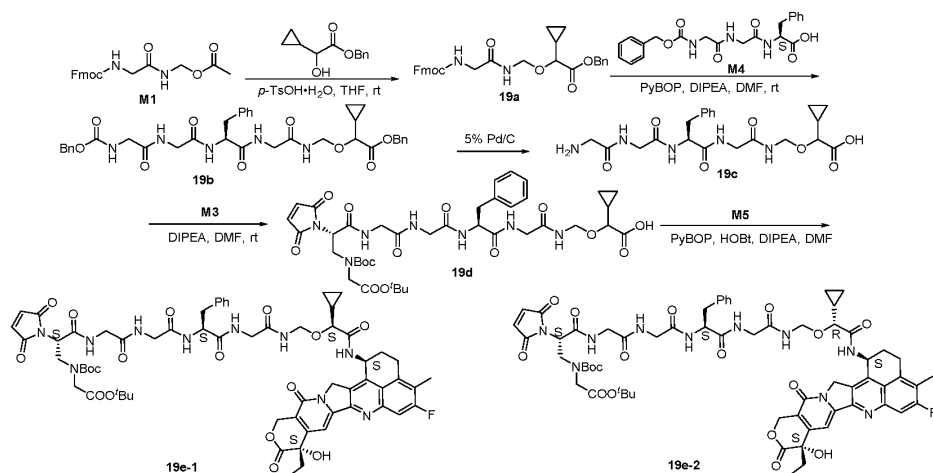
参照实施例 28 合成路线, 得到化合物 **18A**(54 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1155.4$ 。



参照实施例 28 合成路线, 得到化合物 **18B**(55 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1155.4$ 。

实施例 30

化合物 **19A** 和 **19B** 的合成:



第一步：化合物 19a

于 250 mL 单口瓶中加入 **M1**(10 g, 27.1 mmol), 2-环丙基-2-羟基乙酸苄酯(参照专利 WO2020244657A1 公布的方法制备)(11.2 g, 54.3 mmol), 醋酸锌(9.96 g, 54.3 mmol)及 100 mL 甲苯, 加热至 100 °C 反应 4 h。反应完毕, 降至室温, 过滤除去不溶物, 滤液浓缩得粗品。粗品经硅胶柱层析纯化(PE:EA=10:1-5:1-2:1)得到目标物 4.97 g, 收率 36%; LC-MS: $[M+H]^+=515.2$ 。

第二步：化合物 19b

于 50 mL 单口瓶中加入 **19a**(4 g, 7.8 mmol)及 10 mL DMF, 溶清后, 冰水浴下, 加入 DBU(1.42 g, 9.3 mmol), 反应 1 h, 记为反应液①;

另取 50 mL 单口瓶, 加入 **M4**(3.2 g, 7.8 mmol), PyBOP(4.5 g, 8.6 mmol), HOBT(1.16 g, 8.6 mmol)及 10 mL DMF, 溶清后, 冰水浴下, 加入 DIPEA(1.65 mL, 10 mmol), 继续反应 30 min, 加入反应液①, 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应进程, 反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得制备液。制备液经二氯甲烷萃取、饱和氯化钠溶液洗涤、无水硫酸钠干燥、过滤、浓缩得到固体 4.2 g, 收率 78%; LC-MS: $[M+H]^+=688.3$ 。

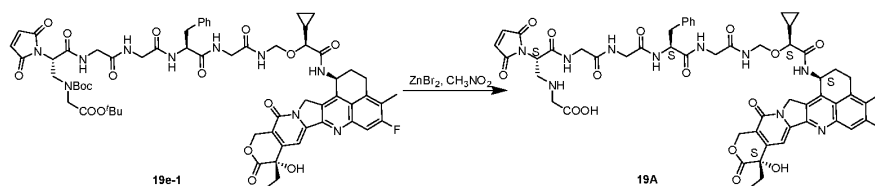
第三步：化合物 19d

于 25 mL 单口瓶中加入 **19b**(1000 mg, 1.45 mmol), 15 mL DMF 溶清后, 加入 1000 mg 5%Pd/C, 氢化反应 2 h, 反应完毕, 过滤, 将滤液置于冰水浴中, 加入 DIPEA(248 uL, 1.5 mmol), 再加入 **M3**(720 mg, 1.45 mmol), 加毕升至室温反应 1 h。HPLC 监测反应完毕, 反应液经高效液相纯化, 得制备液, 制备液冻干得到产品 503 mg, 收率 41%; LC-MS: $[M-H]^-=842.3$ 。

第四步：化合物 19e-1 和 19e-2

于 50 mL 单口瓶中加入 **19d**(500 mg, 0.59 mmol), **M5**(317 mg, 0.59 mmol), PyBOP(339 mg, 0.65 mmol), HOBT(88 mg, 0.86 mmol)及 10 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA(292 uL, 1.77 mmol), 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **19e-1** 和化合物 **19e-2** 的制备液, 制备液分别冻干得到 112mg 化合物 **19e-1**, LC-MS: $[M+H]^+=1261.5$; 131 mg 化合物 **19e-2**, LC-MS: $[M+H]^+=1261.5$ 。

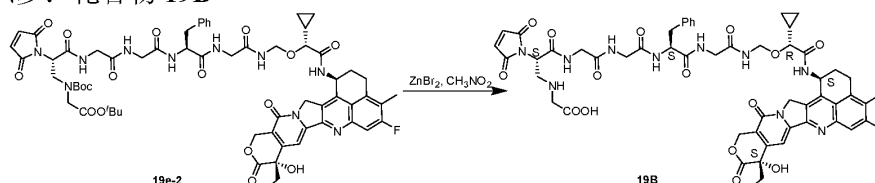
第五步：化合物 19A



于 25 mL 单口瓶中加入 **19e-1** (100 mg, 0.079 mmol), 溴化锌(357 mg, 1.59 mmol)及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体 55 mg; LC-MS: $[M+H]^+=1105.4$ 。

5

第六步: 化合物 **19B**

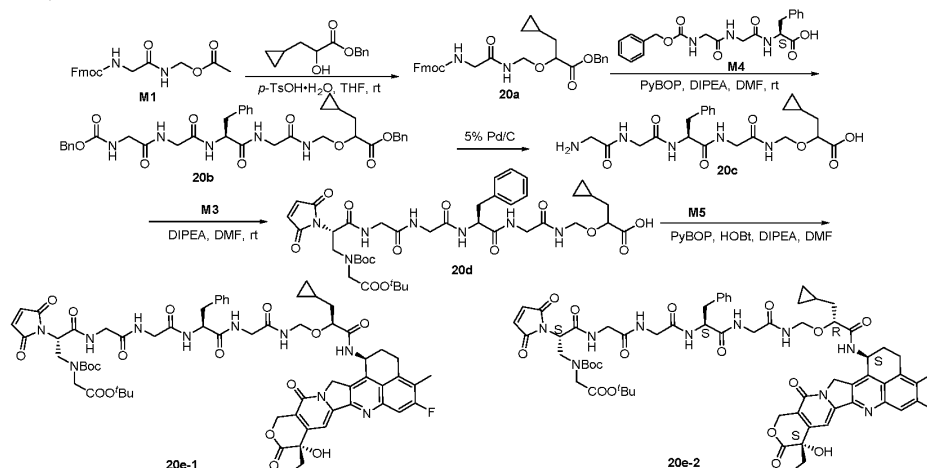


于 25 mL 单口瓶中加入 **19e-2**(100 mg, 0.079 mmol), 溴化锌(357 mg, 1.59 mmol)及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体 58 mg; LC-MS: $[M+H]^+=1105.4$ 。

10

实施例 31

化合物 **20A** 和 **20B** 的合成:

15 第一步: 化合物 **20a**

于 250 mL 单口瓶中加入 **M1**(10 g, 27.1 mmol), 2-羟基-环丙基丙酸苄酯(参照专利 WO2020063676A 公布的方法合成)(12.0 g, 54.3 mmol), 醋酸锌(9.96 g, 54.3 mmol)及 100 mL 甲苯, 加热至 100 °C 反应 4 h。反应完毕, 降至室温, 过滤除去不溶物, 滤液浓缩得粗品。粗品经硅胶柱层析纯化(PE:EA=10:1-5:1-2:1)得到目标物 5.09 g; LC-MS: $[M+H]^+=529.2$ 。

20

第二步: 化合物 **20b**

于 50 mL 单口瓶中加入 **20a**(4 g, 7.6 mmol)及 10 mL DMF, 溶清后, 冰水浴下, 加入 DBU(1.39 g, 9.1 mmol), 反应 1 h, 记为反应液①;

另取 50 mL 单口瓶, 加入 **M4**(3.12 g, 7.6 mmol), PyBOP(4.5 g, 8.6 mmol), HOBt(1.16 g, 8.6 mmol)及 10 mL DMF, 溶清后, 冰水浴下, 加入 DIPEA(1.65 mL, 10 mmol), 继续反应 30 min, 加入反应液①, 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应进程, 反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得制备液。制备液经二氯甲烷萃取、饱和氯化钠溶液洗涤、无水硫酸钠干燥、过滤、浓缩得到固体 4.5 g, 收率 84%; LC-MS: $[M+H]^+=702.3$ 。

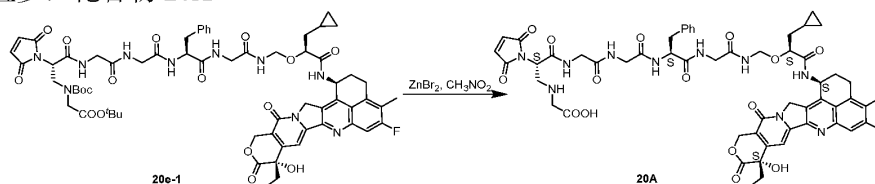
第三步: 化合物 **20d**

于 25 mL 单口瓶中加入 **20b**(1000 mg, 1.42 mmol), 15 mL DMF 溶清后, 加入 1000 mg 5%Pd/C, 氢化反应 2 h, 反应完毕, 过滤, 将滤液置于冰水浴中, 加入 DIPEA(248 μ L, 1.5 mmol), 再加入 **M5**(708 mg, 1.42 mmol), 加毕升至室温反应 1 h。HPLC 监测反应完毕, 反应液经高效液相纯化, 得制备液, 制备液冻干得到产品 443 mg, 收率 36%; LC-MS: $[M-H]^-=856.4$ 。

第四步: 化合物 **20e-1** 和 **20e-2**

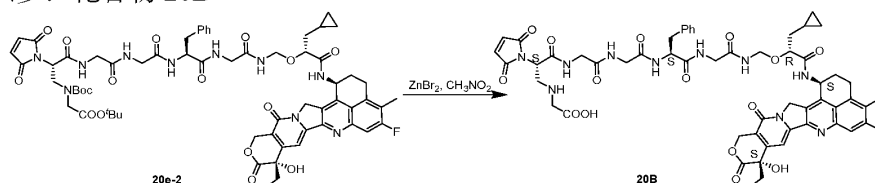
于 50 mL 单口瓶中加入 **20d**(400 mg, 0.47 mmol), 依喜替康甲磺酸盐 (250 mg, 0.47 mmol), PyBOP(223 mg, 0.56 mmol), HOBt(83 mg, 0.56 mmol)及 10 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA(248 μ L, 1.5 mmol), 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **20e-1** 和化合物 **20e-2** 的制备液, 制备液分别冻干得到 103mg 化合物 **20e-1**, LC-MS: $[M+H]^+=1275.5$; 103 mg 化合物 **20e-2**, LC-MS: $[M+H]^+=1275.5$ 。

第五步: 化合物 **20A**



于 25 mL 单口瓶中加入 **8A**(100 mg, 0.078 mmol), 溴化锌(352 mg, 1.57 mmol)及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体 51 mg; LC-MS: $[M+H]^+=1119.4$ 。

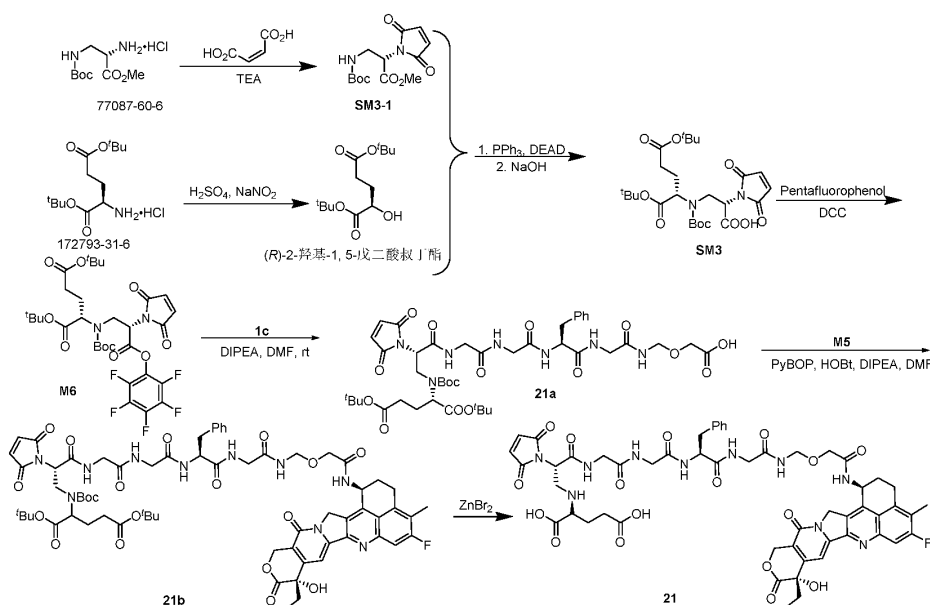
第六步: 化合物 **20B**



于 25 mL 单口瓶中加入 **20e-2**(100 mg, 0.079 mmol), 溴化锌(357 mg, 1.59 mmol)及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体 47 mg; LC-MS: $[M+H]^+=1119.4$ 。

实施例 32

化合物 **21** 的合成:



第一步：化合物 **SM3-1**

于 2000 mL 单口瓶中加入 77087-60-6 (100 g, 458 mmol), 马来酸(53.4 g, 460 mmol), TEA(64 mL, 460 mmol)及 1000 mL 甲苯, 加热至 100 °C 反应 5 h。反应
5 完毕, 降至室温, 过滤除去不溶物, 滤液浓缩得粗品。粗品经硅胶柱层析纯化(PE:EA=100:1-50:1-20:1)得到目标物 75.6 g; LC-MS: [M+H]⁺=299.1。

第二步：化合物(R)-2-羟基-1,5-戊二酸叔丁酯

于 2000 mL 单口瓶中加入 172793-31-6 (100 g, 338 mmol) 及 1000 mL 水, 依次加入亚硝酸钠(35 g, 507 mmol), 浓硫酸(32 mL, 35 mmol), 缓慢升温至室温反
10 应 24 h。反应完毕, 乙酸乙酯 500 mL 萃取三次, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经硅胶柱层析纯化(PE:EA=50:1-30:1-2:1)得到目标物 91.2 g; LC-MS: [M+H]⁺=261.4。

第三步：化合物 **SM3**

于 2000 mL 单口瓶中加入(R)-2-羟基-1,5-戊二酸叔丁酯 (50 g, 192 mmol) 及
15 1000 mL 无水四氢呋喃, 冰水浴降温至 0 °C, 依次加入 PPh₃(87.7 g, 288 mmol), DEAD(50.2 g, 288 mmol)及 **SM3-1**(57.3, 192 mmol), 缓慢升温至室温反应 13 h。反应完毕, 过滤除去不溶物, 滤液浓缩得粗品。粗品经硅胶柱层析纯化(PE:EA=50:1-30:1-1:1)得到产品 68.6 g;

将上述产品溶于 500 mL 甲醇中, 冰水浴冷却至 0 °C, 于该温度下滴加
20 NaOH(64 mL, 190 mmol, 3M/L), 维持该温度下反应 12 h 后, 加入 HCl(6 M/L)调节 pH 为 3, 二氯甲烷 500 mL 萃取五次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩, 所得粗产品经柱层析(DCM/MeOH=50/1-20/1-2/1)纯化, 得到 **SM3** 50.4 g; LC-MS: [M-H]⁻=525.5。

第四步：化合物 **M6**

于 2000 mL 单口瓶, 加入化合物 **SM3**(50 g, 95 mmol, 1.0eq), 五氟苯酚(19.2
25 g, 104.5 mmol, 1.1 eq)、DCC(21.5 g, 104.5 mmol, 1.1 eq)及 THF(600 mL), 室温反应 1 h(采用 TLC 监测), 过滤滤去不溶物。反应液直接经制备纯化, 制备液水泵

减压水浴 35 °C 浓缩除去乙腈, 冻干得到化合物 **M6**(51.9 g), 收率 79%; LC-MS: $[M+H]^+=693.3$ 。

第五步: 化合物 **21a**

于 25 mL 单口瓶中加入 **1c**(1 g, 2.36 mmol), 25 mL DMF 溶清后, 加入 DIPEA(430 μ L, 2.6 mmol), 再加入 **M6**(1177 mg, 2.36 mmol), 加毕升至室温反应 1 h。HPLC 监测反应完毕, 反应液经高效液相纯化, 得制备液, 制备液冻干得到产品 555 mg; LC-MS: $[M-H]^-=931.0$ 。

第六步: 化合物 **21b**

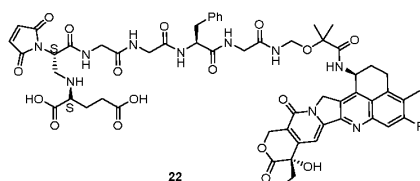
于 100 mL 单口瓶中加入 **21a**(500 mg, 0.54 mmol), 依喜替康甲磺酸盐 **M5**(285 mg, 0.54 mmol), PyBOP(239 mg, 0.6 mmol), HOBt(239 mg, 0.6 mmol)及 10 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA(248 μ L, 1.5 mmol), 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **21b** 的制备液, 制备液冻干得到化合物 231 mg; LC-MS: $[M+H]^+=1349.5$ 。

第七步: 化合物 **21**

于 25 mL 单口瓶中加入化合物 **21b**(200 mg, 0.1488 mmol), 溴化锌(665 mg, 2.96 mmol)及 10 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体 103 mg; LC-MS: $[M+H]^+=1137.5$ 。

实施例 33

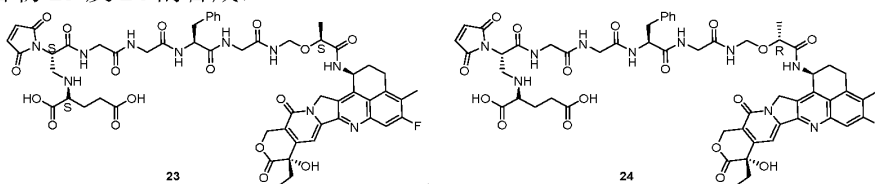
20 化合物 **22** 的合成:



以化合物 **M6** 及 **3c** 为起始原料, 参照实施例 32 的合成路线, 得到化合物 **22**(91 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1165.5$ 。

实施例 34

25 化合物 **23** 及 **24** 的合成:

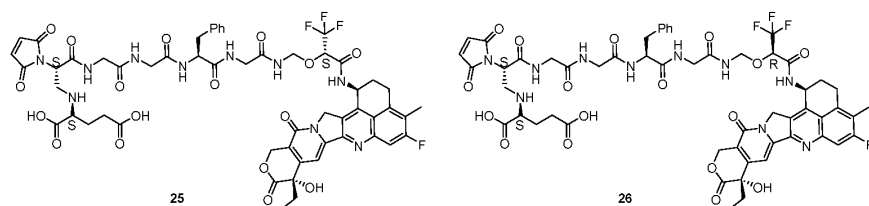


以化合物 **M6** 及 **5c** 为起始原料, 参照实施例 32 的合成路线, 得到 102 mg 化合物 **23**, LC-MS: $[M+H]^+=1151.4$; 得到 99 mg 化合物 **24**, LC-MS: $[M+H]^+=1151.4$ 。

30

实施例 35

化合物 **25** 和 **26** 的合成:

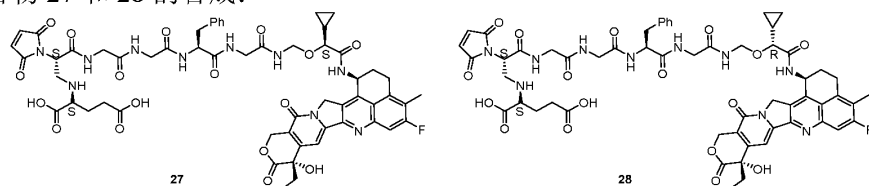


以化合物 **M6** 及 **7c** 为起始原料，参照实施例 32 的合成路线，得到 83 mg 化合物 **25**，LC-MS: $[M+H]^+=1205.7$ ；得到 80 mg 化合物 **26**，LC-MS: $[M+H]^+=1205.7$ 。

5

实施例 36

化合物 **27** 和 **28** 的合成：

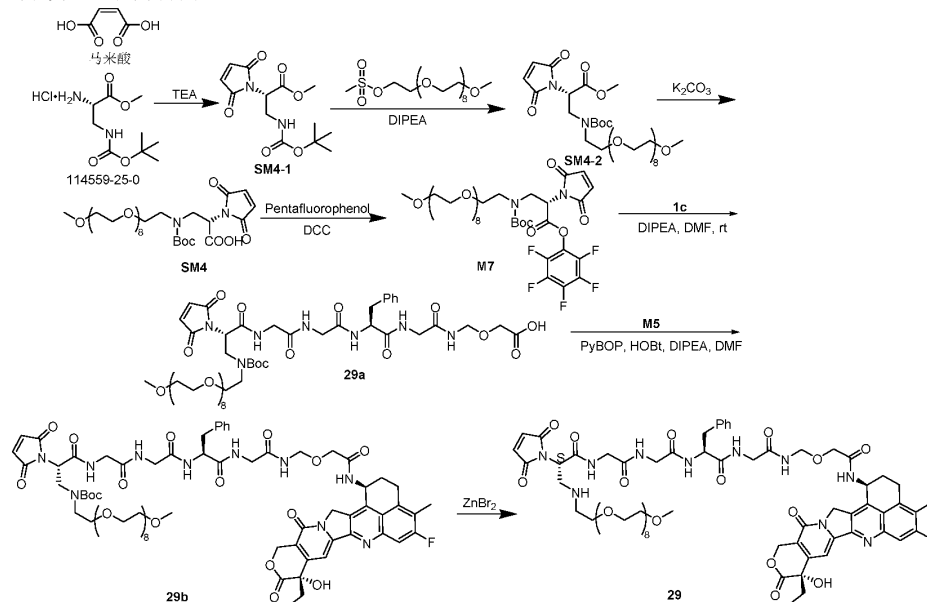


以化合物 **M6** 及 **19c** 为起始原料，参照实施例 32 的合成路线，得到 100 mg 化合物 **27**，LC-MS: $[M+H]^+=1177.5$ ；得到 101 mg 化合物 **28**，LC-MS: $[M+H]^+=1177.5$ 。

10

实施例 37

化合物 **29** 的合成：



第一步：化合物 **SM4-1**

15

于 5000 mL 单口瓶，加入马来酸 (50 g, 431 mmol, 1.0eq)，114559-25-0 (110 g, 431 mmol, 1 eq)、TEA (263 g, 2.16 mol, 5 eq) 及甲苯 (2000 mL)，加热至回流反应 5 h (采用 TLC 监测)，过滤滤去不溶物。反应液直接减压旋转蒸馏除去溶剂，残余物经硅胶柱层析 (PE/EA=50/1-20/1-1/1) 得到 **SM4-1** (64.7 g)，收率 50%；LC-

MS: $[M+H]^+=299.2$ 。

第二步：化合物 **SM4-2**

于 2000 mL 单口瓶中加入 **SM4-1**(64 g, 215 mmol), 1000 mL DMF 溶清后, 加入 DIPEA(71 mL, 430 mmol), 再加入壬乙二醇单甲醚甲磺酸酯(111.5 g, 220 mmol), 加毕升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕, 反应液经硅胶柱层析 (PE/EA=50/1-20/1-1/1) 纯化, 得到产品 59.9 g; LC-MS: $[M+H]^+=709.4$ 。

第三步：化合物 **SM4**

于 2000 mL 单口瓶中加入 **SM4-2**(59 g, 83 mmol), 1000 mL MeOH 溶清后, 加入 K_2CO_3 (11.75 g, 85 mmol), 加毕于室温反应 4 h。HPLC 监测反应完毕, 过滤除去不溶物, 反应液直接经制备纯化, 制备液水泵减压水浴 35 °C 浓缩除去乙腈, 冻干得到化合物 **SM4**(27 g); LC-MS: $[M-H]^-=693.5$ 。

第四步：化合物 **M7**

于 500 mL 单口瓶, 加入化合物 **SM4**(25 g, 36 mmol, 1.0eq)、五氟苯酚(7.3 g, 40 mmol, 1.1 eq)、DCC(8.2 g, 40 mmol, 1.1 eq)及 THF(200 mL), 室温反应 1 h(采用 TLC 监测), 过滤滤去不溶物。反应液直接经制备纯化, 制备液水泵减压水浴 35 °C 浓缩除去乙腈, 冻干得到化合物 **M7**(23.3 g), 收率 93%; LC-MS: $[M+H]^+=695.8$ 。

第五步：化合物 **29a**

于 25 mL 单口瓶中加入 **1c**(1 g, 2.36 mmol), 25 mL DMF 溶清后, 加入 DIPEA(430 μ L, 2.6 mmol), 再加入 **M7**(1640 mg, 2.36 mmol), 加毕升至室温反应 1 h。HPLC 监测反应完毕, 反应液经高效液相纯化, 得制备液, 制备液冻干得到产品 609 mg; LC-MS: $[M-H]^-=1098.5$ 。

第六步：化合物 **29b**

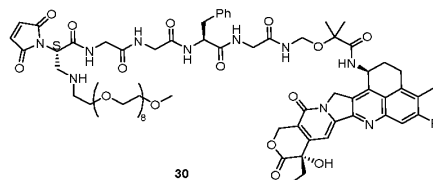
于 100 mL 单口瓶中加入 **29a**(500 mg, 0.45 mmol), 依喜替康甲磺酸盐 **M5**(240 mg, 0.45 mmol), PyBOP(215 mg, 0.54 mmol), HOBt(215 mg, 0.54 mmol)及 10 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA(248 μ L, 1.5 mmol), 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **29b** 的制备液, 制备液冻干得到化合物 187 mg; LC-MS: $[M+H]^+=1517.6$ 。

第七步：化合物 **29**

于 25 mL 单口瓶中加入化合物 **29b**(150 mg, 0.988 mmol), 溴化锌(223 mg, 0.988 mmol)及 10 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体 114 mg; LC-MS: $[M+H]^+=1517.9$ 。

实施例 38

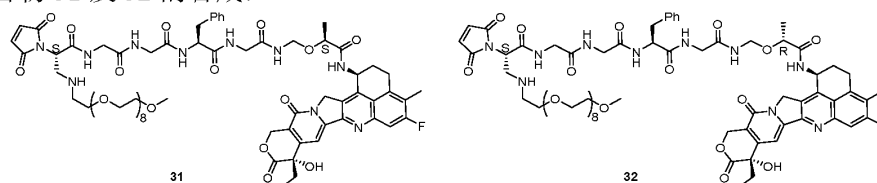
35 化合物 **30** 的合成:



以化合物 **M7** 及 **3c** 为起始原料, 参照实施例 37 的合成路线, 得到化合物 **30**(125 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1445.6$ 。

实施例 39

化合物 **31** 及 **32** 的合成:

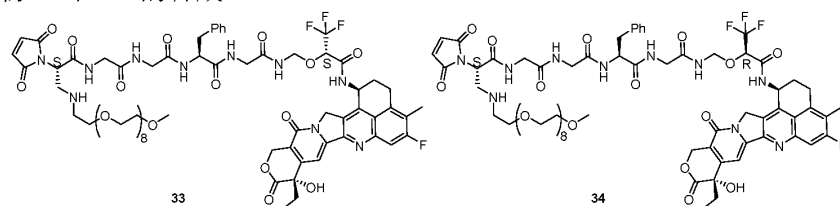


以化合物 **M7** 及 **5c** 为起始原料, 参照实施例 37 的合成路线, 得到 61 mg 化合物 **31**, LC-MS: $[M+H]^+=1431.7$; 得到 63 mg 化合物 **32**, LC-MS:

5 $[M+H]^+=1431.7$ 。

实施例 40

化合物 **33** 和 **34** 的合成:



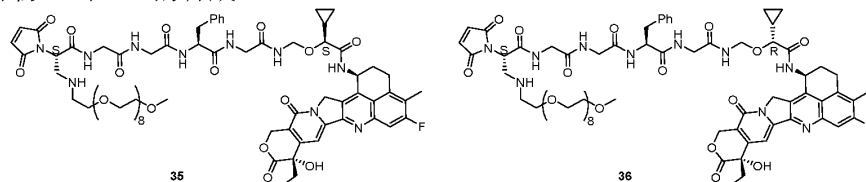
以化合物 **M7** 及 **7c** 为起始原料, 参照实施例 37 的合成路线, 得到 60 mg 化合物 **33**, LC-MS: $[M+H]^+=1485.6$; 得到 58 mg 化合物 **34**, LC-MS:

10

$[M+H]^+=1485.6$ 。

实施例 41

化合物 **35** 和 **36** 的合成:

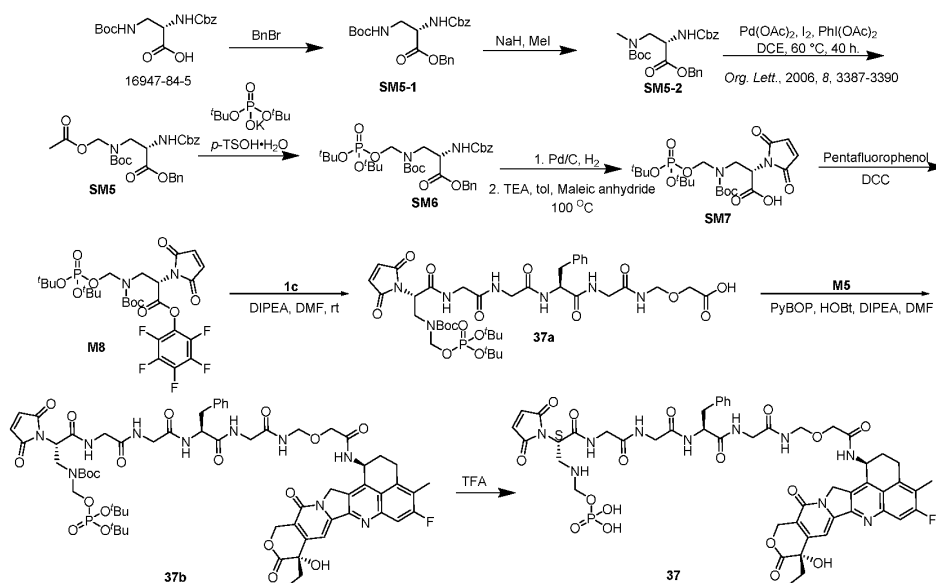


以化合物 **M7** 及 **19c** 为起始原料, 参照实施例 37 的合成路线, 得到 102 mg 化合物 **35**, LC-MS: $[M+H]^+=1457.8$; 得到 102 mg 化合物 **36**, LC-MS: $[M+H]^+=1457.8$ 。

15

实施例 42

化合物 **37** 的合成:



第一步：化合物 **SM5-1**

于 2000 mL 单口瓶，加入化合物 16947-84-5(100 g, 295 mmol, 1.0eq)、DIPEA(50 mL, 300 mmol)，溴化苄(51.3 g, 300 mmol)及 THF(1000 mL)，室温反应 12 h(采用 TLC 监测)，过滤滤去不溶物。反应液直接减压旋转蒸馏除去溶剂，残余物经硅胶柱层析(PE/EA=50/1-20/1-2/1)得到 **SM5-1**(110.1 g)，收率 87%；LC-MS: $[M+H]^+=429.2$ 。

第二步：化合物 **SM5-2**

于 2000 mL 单口瓶，加入化合物 **SM5-1**(100 g, 233.4 mmol, 1.0eq) 及 THF(1000 mL)，冰水浴冷却至 0 °C，分批次加入 NaH(37.4 g, 933.5 mmol)，MeI(132.5 g, 933.5 mmol)，维持 0 °C 下反应 24 h(采用 TLC 监测)，加入饱和 NH_4Cl 水溶液 500 mL 淬灭反应，乙酸乙酯 500 mL 萃取三次，无水硫酸钠干燥有机相，过滤。滤液直接减压旋转蒸馏除去溶剂，残余物经硅胶柱层析(PE/EA=100/1-50/1-10/1)得到 **SM5-2**(37.1 g)；LC-MS: $[M+H]^+=443.3$ 。

第三步：化合物 **SM5**(参照文献 *Org. Lett.*, 2006, 8, 3387-3390.)

于 1000 mL 单口瓶，加入化合物 **SM5-2**(35 g, 79 mmol, 1.0eq) 及 DCE(500 mL)，依次加入二乙酸铈(180 mg, 0.8 mmol)， I_2 (20 g, 79 mmol)，二乙酸碘苯(40.8 g, 126.4 mmol)，升温至 60 °C 下反应 40 h(采用 TLC 监测)，加入饱和硫代硫酸钠水溶液 500 mL 淬灭反应，二氯甲烷 500 mL 萃取三次，无水硫酸钠干燥有机相，过滤。滤液直接减压旋转蒸馏除去溶剂，残余物经硅胶柱层析(PE/EA=100/1-50/1-10/1)得到 **SM5**(28 g)；LC-MS: $[M+H]^+=501.3$ 。

第四步：化合物 **SM6**

于 500 mL 单口瓶，加入化合物 **SM5**(25 g, 50 mmol, 1.0eq)、磷酸二叔丁酯钾盐(13.66 g, 55 mmol, 1.1 eq)、一水合对甲苯磺酸(951 mg, 5 mmol, 0.1 eq)及 THF(200 mL)，室温反应 1 h(采用 TLC 监测)，过滤滤去不溶物。反应液直接经制备纯化，制备液水泵减压水浴 35 °C 浓缩除去乙腈，冻干得到化合物 **SM6**(15.1 g)，收率 46%；LC-MS: $[M+H]^+=651.4$ 。

第五步：化合物 **SM7**

于 250 mL 单口瓶中加入 **SM6**(15 g, 23 mmol)及 100 mL DMF, 溶清后, 冰水浴下, 加入 15 g 5%Pd/C, 氢气置换体系内的气氛三次, 室温下反应 12 h, 过滤除去 Pd/C, 油泵减压旋蒸除去溶剂, 待用;

另取 250 mL 单口瓶, 加入上述粗品及 100 mL 甲苯, 三乙胺(6.4 mL, 46 mmol), 马来酸酐(2.4 g, 24 mmol), 溶清后, 升至 100 °C 反应 2 h。HPLC 监测反应进程, 反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得制备液。制备液经二氯甲烷萃取、饱和氯化钠溶液洗涤、无水硫酸钠干燥、过滤、浓缩得到固体 4.2 g, 收率 36%; LC-MS: $[M+H]^+=507.3$ 。

第六步: 化合物 **M8**

于 100 mL 单口瓶, 加入化合物 **SM7**(4 g, 7.9 mmol, 1.0eq)、五氟苯酚(1.6 g, 8.7 mmol, 1.1 eq)、DCC(1.8 g, 8.7 mmol, 1.1 eq)及 THF(60 mL), 室温反应 1 h(采用 TLC 监测), 过滤滤去不溶物。反应液直接经制备纯化, 制备液水泵减压水浴 35 °C 浓缩除去乙腈, 冻干得到化合物 **M8**(3.7 g), 收率 70%; LC-MS: $[M+H]^+=673.2$ 。

第七步: 化合物 **37a**

于 25 mL 单口瓶中加入 **1c**(1 g, 2.36 mmol), 25 mL DMF 溶清后, 加入 DIPEA(430 μ L, 2.6 mmol), 再加入 **M8**(1.2 g, 2.36 mmol), 加毕升至室温反应 1 h。HPLC 监测反应完毕, 反应液经高效液相纯化, 得制备液, 制备液冻干得到产品 488 mg; LC-MS: $[M-H]^-=911.0$ 。

第八步: 化合物 **37b**

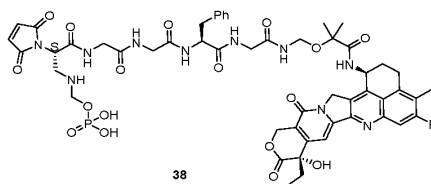
于 100 mL 单口瓶中加入 **37a**(400 mg, 0.44 mmol), 依喜替康甲磺酸盐 **M5**(235 mg, 0.44 mmol), PyBOP(199 mg, 0.5 mmol), HOBT(69 mg, 0.5 mmol)及 10 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA(218 μ L, 1.32 mmol), 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **37b** 的制备液, 制备液冻干得到化合物 201 mg; LC-MS: $[M+H]^+=1329.6$ 。

第九步: 化合物 **37**

于 25 mL 单口瓶中加入化合物 **37b**(130 mg, 0.098 mmol), 溴化锌(221 mg, 0.98 mmol)及 10 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体 96 mg; LC-MS: $[M+H]^+=1117.4$ 。

实施例 43

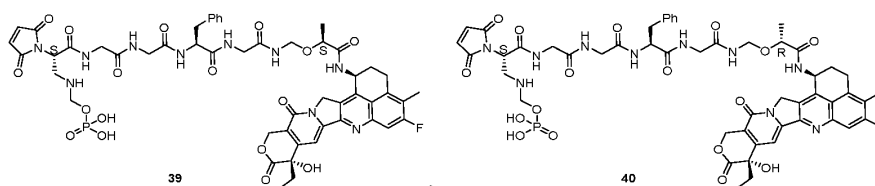
化合物 **38** 的合成:



以化合物 **M8** 及 **3c** 为起始原料, 参照实施例 42 的合成路线, 得到化合物 **38**(51 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1145.6$ 。

实施例 44

化合物 **39** 及 **40** 的合成:

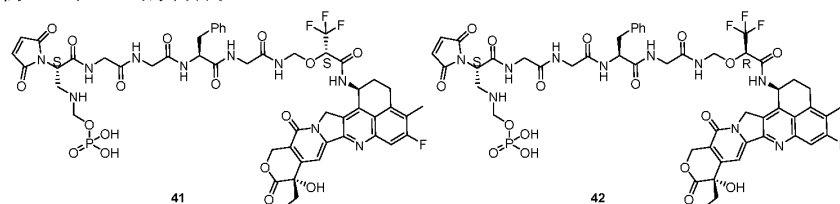


以化合物 **M8** 及 **5c** 为起始原料, 参照实施例 42 的合成路线, 得到 57 mg 化合物 **39**, LC-MS: $[M+H]^+=1131.4$; 得到 60 mg 化合物 **40**, LC-MS: $[M+H]^+=1131.4$ 。

5

实施例 45

化合物 **41** 和 **42** 的合成:

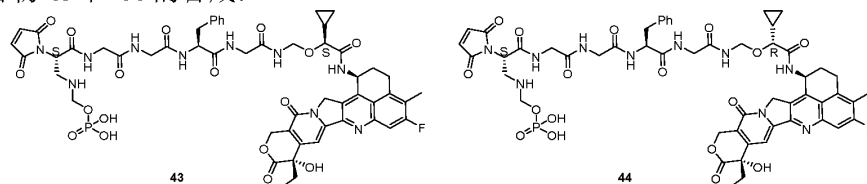


以化合物 **M7** 及 **7c** 为起始原料, 参照实施例 42 的合成路线, 得到 44 mg 化合物 **41**, LC-MS: $[M+H]^+=1185.3$; 得到 44 mg 化合物 **42**, LC-MS: $[M+H]^+=1185.3$ 。

10

实施例 46

化合物 **43** 和 **44** 的合成:

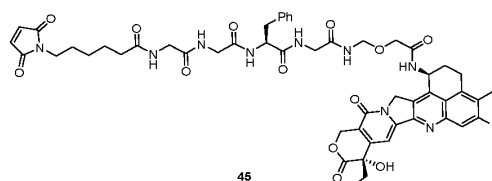


以化合物 **M8** 及 **19c** 为起始原料, 参照实施例 42 的合成路线, 得到 62 mg 化合物 **43**, LC-MS: $[M+H]^+=1157.4$; 得到 59 mg 化合物 **44**, LC-MS: $[M+H]^+=1157.4$ 。

15

实施例 47 (对照例)

化合物 **45** 的合成:

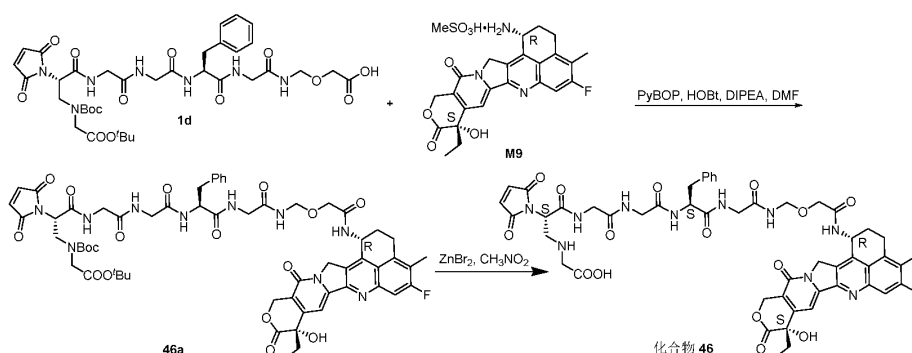


20

化合物 **45** 参照专利“CN104755494A”的实施例 58 提供的方法合成。

实施例 48

化合物 **46** 的合成:



第一步：化合物 46a

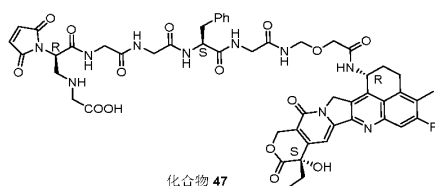
于 50 mL 单口瓶中加入 **1d** (500 mg, 0.62 mmol), **M9** (310 mg, 0.62 mmol), PyBOP (448 mg, 0.86 mmol), HOBt (116 mg, 0.86 mmol) 及 15 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA (378 μ L, 2.29 mmol), 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得制备液, 制备液冻干得到 **46a** (210 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1221.6$ 。

第二步：化合物 46

于 25 mL 单口瓶中加入 **46a** (200 mg, 0.162 mmol), 溴化锌 (736 mg, 3.26 mmol) 及 10 mL 硝基甲烷, 40 $^{\circ}$ C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体化合物 **46** (120 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1065.3$ 。

实施例 49

化合物 **47** 的合成:

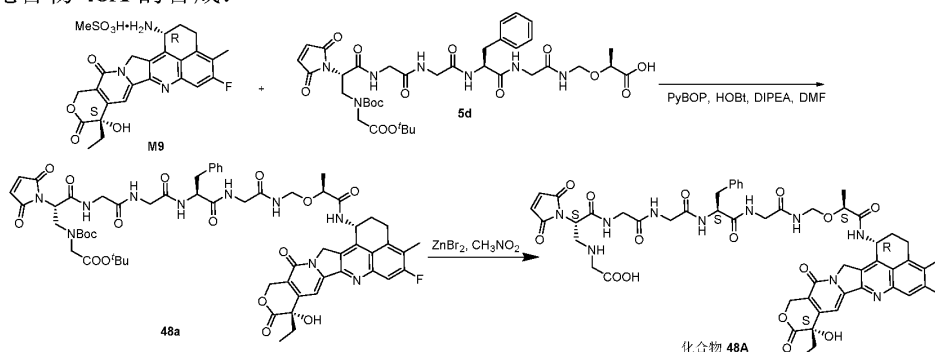


15

参照实施例 48 合成路线, 得到化合物 **47** (81 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1065.3$ 。

实施例 50

化合物 **48A** 的合成:



第一步：化合物 48a

于 100 mL 单口瓶中加入 **5d** (1.66 g, 2.02 mmol, 1.0 eq), **M9** (1.08 g, 2.02 mmol, 1.0 eq), PyBOP (1.58 g, 3.03 mmol, 1.5 eq), HOBt (0.41 g, 3.03 mmol, 1.5 eq) 及

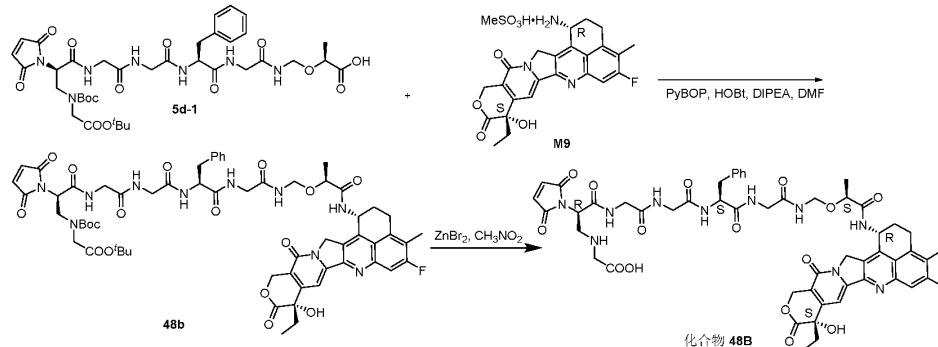
DMF(40 mL), 冰水浴下加入 DIPEA(0.84 mL, 1.5 eq), 升至室温反应 2 h(采用 HPLC 监测)。反应液直接经制备纯化, 制备液水泵减压水浴 35 °C 浓缩除去乙腈, 冻干得到化合物 **48a**(1.54 g), 收率 61%; LC-MS: $[M+H]^+=1235.4$ 。

第六步: 化合物 **48A**

- 5 于 100mL 单口瓶中加入化合物 **48a**(1.0 g, 0.8 mmol, 1.0 eq), 35 mL 硝基甲烷, 溶解后再加入溴化锌(3.64 g, 16 mmol, 20.0 eq), 油浴 40 °C(提前预热稳定)反应 30 min, 水泵减压水浴 45 °C 浓缩除去硝基甲烷, 得黄色残余物固体(采用 HPLC 监测)。经酸法制备, 得到制备液, 制备液经水泵减压水浴 35 °C 浓缩旋除乙腈, 冻干得到化合物 **48A**(786 mg)收率 90%。

10 实施例 51

化合物 **48B** 的合成:



第一步: 化合物 **48b**

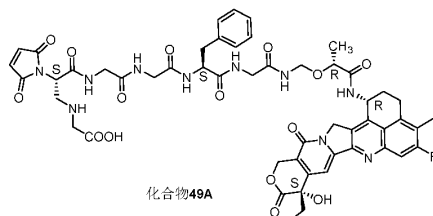
- 15 于 25 mL 单口瓶中加入化合物 **5d-1**(200 mg, 0.24 mmol, 1.0 eq)、**M9**(127 mg, 0.24 mmol, 1.0 eq)、PyBOP(187 mg, 0.36 mmol, 1.2eq)、HOBT(48 mg, 0.36 mmol, 1.2 eq)及 DMF(6 mL), 冰水浴降至 0-5 °C, 加入 DIPEA(62 mg, 0.48 mmol, 2.0 eq), 加毕, 升至 20±5 °C 反应 2 h, HPLC 监测反应结束。反应液直接 HPLC 制备纯化, 收集产品制备液, 冻干得到化合物 **48b**(150.2 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1235.4$ 。

第二步: 化合物 **48B**

- 20 于 25 mL 单口瓶中依次加入化合物 **48b**(100 mg, 0.081 mmol, 1.0 eq), ZnBr₂ (364 mg, 1.62 mmol, 20.0 eq) 和 CH₃NO₂(10 mL), 加毕, 升至 40 °C 反应 0.5 h, 停止反应, 反应液直接 45 °C 减压旋干后得到黄色固体, 取样 HPLC 监测反应。旋干的固体直接 HPLC 制备纯化, 收集产品制备液, 冻干得到化合物 **48B**(70.0 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1079.4$ 。

25 实施例 52

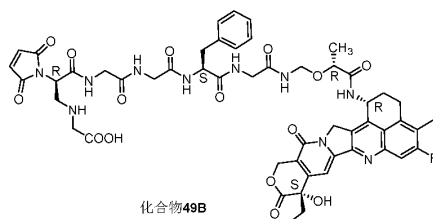
化合物 **49A** 的合成:



参照实施例 50 的路线, 得到化合物 **49A**(71 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1079.4$ 。

实施例 53

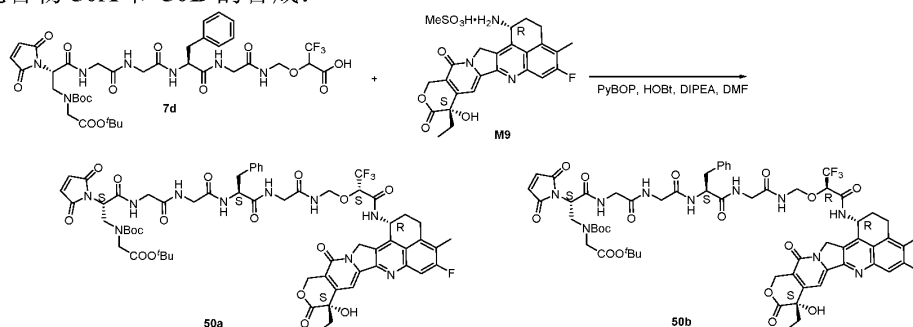
化合物 **49B** 的制备:



参照实施例 51 合成路线,得到化合物 **49B**(65 mg);LC-MS: $[M+H]^+=1079.4$ 。

实施例 54

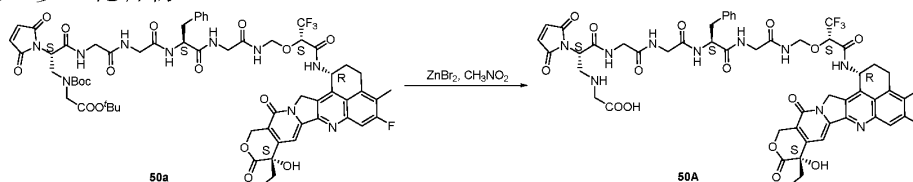
5 化合物 **50A** 和 **50B** 的合成:



第一步: 化合物 **50a** 和 **50b**

于 50 mL 单口瓶中加入 **7d**(500 mg, 0.57 mmol), **M9**(305 mg, 0.57 mmol), PyBOP(448 mg, 0.86mmol), HOBT(116 mg, 0.86 mmol)及 15 mL DMF,冰水浴下加入 DIPEA(378 uL, 2.29 mmol), 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **50a** 和化合物 **50b** 的制备液, 制备液分别冻干得到 170 mg 化合物 **50a**, LC-MS: $[M+H]^+=1289.46$; 202mg 化合物 **50b**, LC-MS: $[M+H]^+=1289.46$ 。

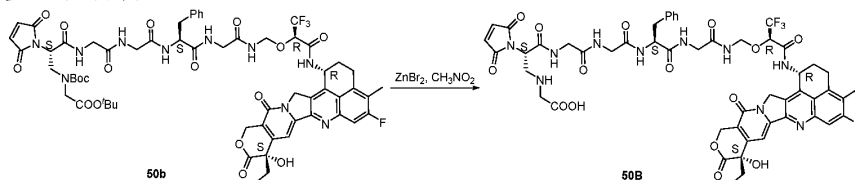
第二步: 化合物 **50A**



15

于 25 mL 单口瓶中加入 **50a**(100 mg, 0.077 mmol), 溴化锌(349 mg, 1.55 mmol) 及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体 44 mg。

20 第三步: 化合物 **50B**

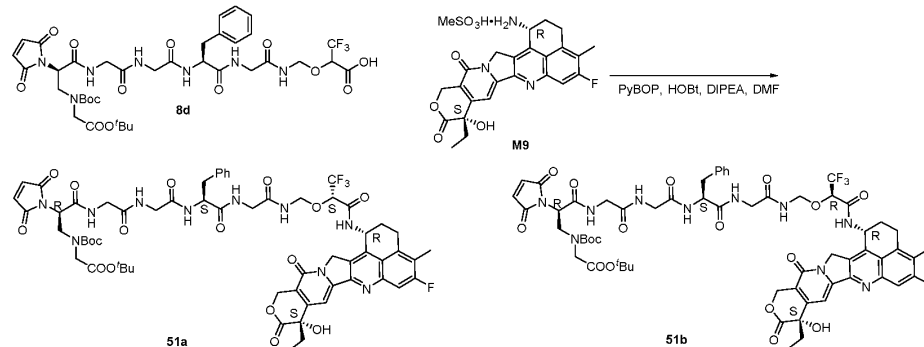


于 25 mL 单口瓶中加入 **50b**(100 mg, 0.077 mmol), 溴化锌(349 mg, 1.55 mmol)

及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体 45 mg。

实施例 55

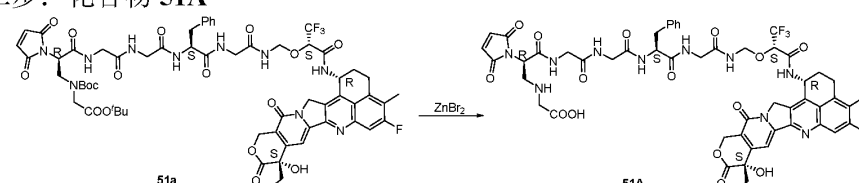
5 化合物 **51A** 和 **51B** 的合成:



第一步: 化合物 **51a** 和化合物 **51b**

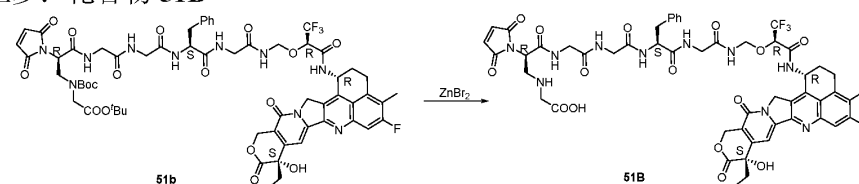
于 50 mL 单口瓶中加入 **8d**(500 mg, 0.57 mmol), **M9**(305 mg, 0.57 mmol), PyBOP(448 mg, 0.86 mmol), HOBT(116 mg, 0.86 mmol)及 15 mL DMF,冰水浴下加入 DIPEA(378 μ L, 2.29 mmol), 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **51a** 和化合物 **51b** 的制备液, 制备液分别冻干得到 190 mg 化合物 **51a**, 186mg 化合物 **51b**。化合物 **51a** 的 LC-MS: $[M+H]^+=1289.47$; 化合物 **51b** 的 LC-MS: $[M+H]^+=1289.47$ 。

第二步: 化合物 **51A**



于 25 mL 单口瓶中加入化合物 **51a**(100 mg, 0.077 mmol), 溴化锌(349 mg, 1.55 mmol)及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体 39 mg。

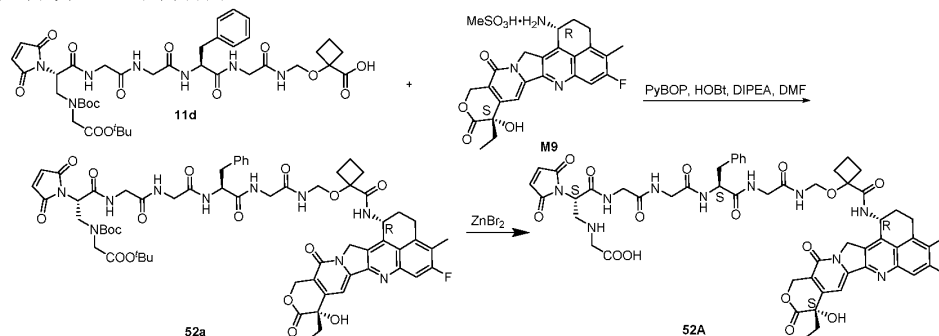
20 第三步: 化合物 **51B**



于 25 mL 单口瓶中加入化合物 **51b**(100 mg, 0.077 mmol), 溴化锌(349 mg, 1.55 mmol)及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体 60 mg。

实施例 56

化合物 **52A** 的合成:



第一步: 化合物 **52a**

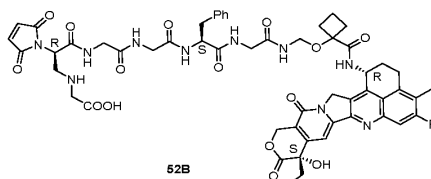
于 50 mL 单口瓶中加入 **11d** (800 mg, 0.96 mmol), **M9**(480 mg, 0.96 mmol),
5 PyBOP(500 mg, 0.96 mmol), HOBT(208 mg, 0.96 mmol)及 30 mL DMF, 冰水浴下
加入 DIPEA(660 μ L, 4.0 mmol), 升至室温反应 4 h。HPLC 监测反应完毕后, 反
应液经高效液相纯化, 得化合物 **52a** 的制备液, 制备液冻干得到 **52a** (388 mg);
LC-MS: $[M+H]^+=1261.4$ 。

第二步: 化合物 **52A**

10 于 25 mL 单口瓶中加入 **52a** (150 mg, 0.12 mmol), 溴化锌(532 mg, 2.4 mmol)
及 10 mL 硝基甲烷, 40 $^{\circ}$ C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶
剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体化合
物 **52A**(79 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1105.4$ 。

实施例 57

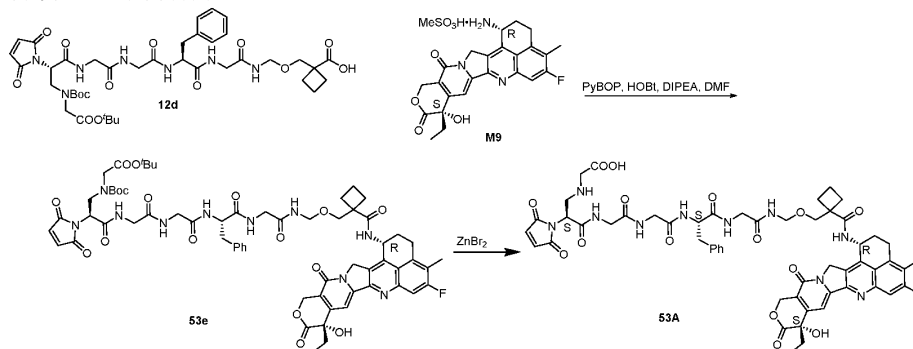
15 化合物 **52B** 的合成



参照实施例 56 合成路线, 得到化合物 **52B**(50 mg)。LC-MS: $[M+H]^+=1105.4$ 。

实施例 58

化合物 **53A** 的合成:



第一步: 化合物 **53a**

20 于 50 mL 单口瓶中加入 **12d** (400 mg, 0.47 mmol), **M9**(240 mg, 0.47 mmol),

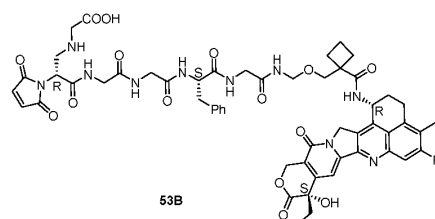
PyBOP(250 mg, 0.47 mmol), HOBt(101 mg, 0.47 mmol)及 15 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA(330 μ L, 2.0 mmol), 升至室温反应 3 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **53a** 的制备液, 制备液冻干得到 **53a** (200 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1275.4$ 。

5 第二步：化合物 **53A**

于 25 mL 单口瓶中加入 **53a** (100 mg, 0.08 mmol), 溴化锌(360 mg, 1.6 mmol) 及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体化合物 **53A**(51 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1119.4$ 。

10 实施例 59

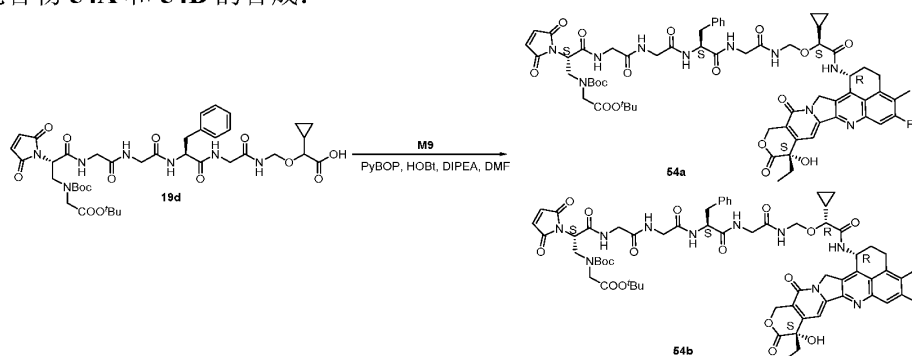
化合物 **53B** 的合成:



参照实施例 58 合成路线, 得到化合物 **53B** (50 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1119.4$ 。

实施例 60

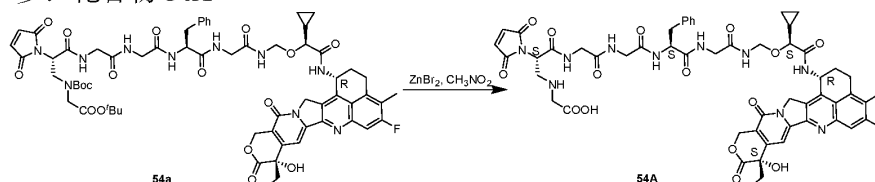
15 化合物 **54A** 和 **54B** 的合成:



第一步：化合物 **54a** 和 **54b**

于 50 mL 单口瓶中加入 **19d**(500 mg, 0.59 mmol), **M9**(317 mg, 0.59 mmol), PyBOP(339 mg, 0.65 mmol), HOBt(88 mg, 0.86 mmol)及 10 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA(292 μ L, 1.77 mmol), 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **54a** 和 **54b** 的制备液, 制备液分别冻干得到 103mg 化合物 **54a**, LC-MS: $[M+H]^+=1261.5$; 111 mg 化合物 **54b**, LC-MS: $[M+H]^+=1261.5$ 。

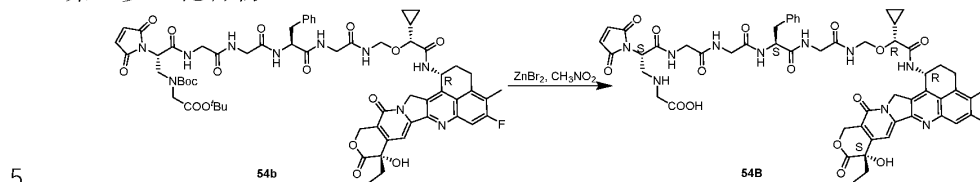
第二步：化合物 54A



25 于 25 mL 单口瓶中加入 **54a** (100 mg, 0.079 mmol), 溴化锌 (357 mg, 1.59 mmol)

及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体 61 mg; LC-MS: $[M+H]^+=1105.4$ 。

第三步: 化合物 **54B**

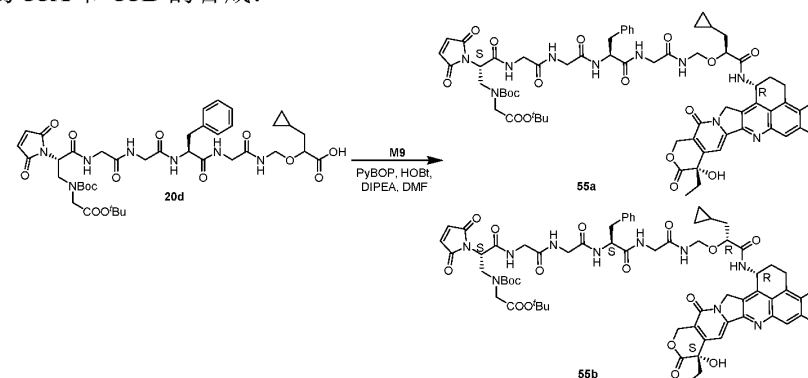


于 25 mL 单口瓶中加入 **54b**(100 mg, 0.079 mmol), 溴化锌(357 mg, 1.59 mmol) 及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体 57 mg; LC-MS: $[M+H]^+=1105.4$ 。

10

实施例 61

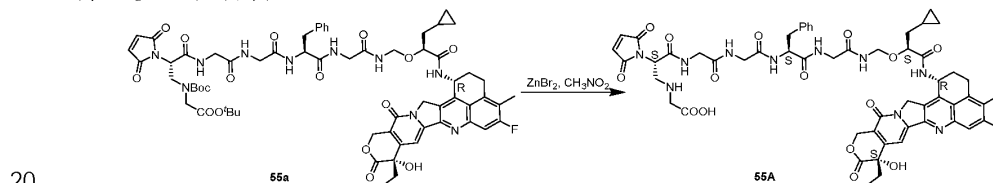
化合物 **55A** 和 **55B** 的合成:



第一步: 化合物 **55a** 和 **55b**

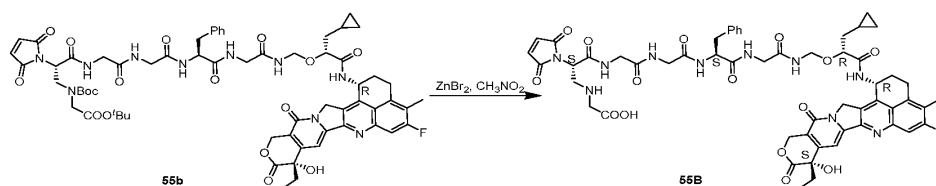
于 50 mL 单口瓶中加入 **20d**(400 mg, 0.47 mmol), **M9** (250 mg, 0.47 mmol), PyBOP(223 mg, 0.56 mmol), HOBT(83 mg, 0.56 mmol) 及 10 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA(248 uL, 1.5 mmol), 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **55a** 和 **55b** 的制备液, 制备液分别冻干得到 100mg 化合物 **55a**, LC-MS: $[M+H]^+=1275.5$; 101 mg 化合物 **55b**, LC-MS: $[M+H]^+=1275.5$ 。

第二步: 化合物 **55A**



于 25 mL 单口瓶中加入 **55a**(100 mg, 0.078 mmol), 溴化锌(352 mg, 1.57 mmol) 及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体 42 mg; LC-MS: $[M+H]^+=1119.4$ 。

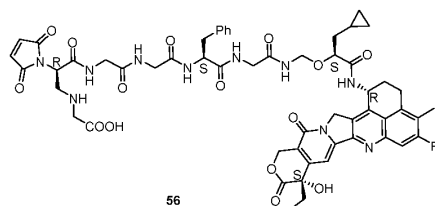
25 第三步: 化合物 **55B**



于 25 mL 单口瓶中加入 **55b**(100 mg, 0.079 mmol), 溴化锌(357 mg, 1.59 mmol) 及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体 45 mg; LC-MS: $[M+H]^+=1119.4$ 。

实施例 62

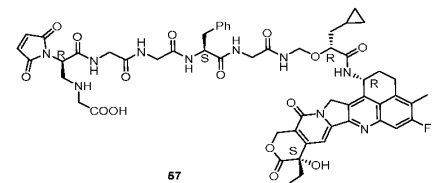
化合物 **56** 的合成:



参照实施例 60 合成路线, 得到化合物 **56**(50 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1119.3$ 。

实施例 63

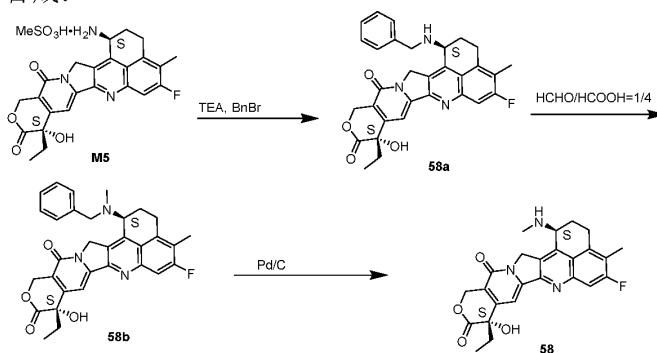
化合物 **57** 的合成:



参照实施例 61 合成路线, 得到化合物 **57**(50 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1119.4$ 。

实施例 64

化合物 **58** 的合成:



第一步: 化合物 **58a** 的合成

向伊喜替康甲磺酸盐 **M5** (15 g, 28 mol, 采用专利申请“EP0737683A1”所公开的方法制备) 中加入 400 mL DMF, 冰水浴冷却至 0°C, 滴加三乙胺, 调节 pH 至 7-8, 冰水浴下滴加溴化苄 (9.6 g, 56 mmol), 升温至室温 (25°C) 下反应 1 小时, TLC 监测反应完全, 反应液减压浓缩, 所得粗产品经制备级高效液相色谱法纯化 (乙腈/纯水体系), 收集目标峰, 减压除去乙腈以后, 冻干, 得到化合物 **58a**。

约 11 g, 黄色固体, 收率约 74%, MS m/z : $[M+H]^+$ 526.3。

第二步: 化合物 **58b** 的合成

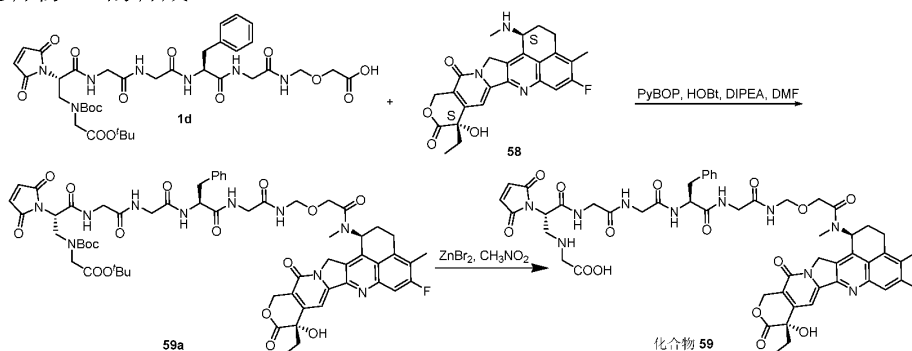
室温下, 于 250 mL 单口瓶中依次加入化合物 **58a** (11 g, 21 mol), 120 mL 甲酸溶解, 向所得亮黄色溶液中加入 30 mL 甲醛 (40%水溶液), 升温至 50℃ 下反应 1 小时后, TLC 监测反应完全, 冷却至室温, 反应液经制备级高效液相色谱法纯化 (乙腈/纯水体系), 收集目标峰, 减压除去乙腈以后, 冻干, 得到化合物 **58b** 约 4.5 g, 黄色粉末状固体, 收率约 40%, MS m/z : $[M+H]^+$ 540.6。

第三步: 化合物 **58** 的合成:

室温下, 于 250 mL 单口瓶中加入化合物 **58b** (2.3 g, 4.3 mol), 加入 100 mL DMF 溶解, 向所得亮黄色溶液中加入 2.3 g 5% Pd/C, 氢气气球置换体系内气氛, 维持室温下反应 1.5 小时后, HPLC 监测反应完全, 过滤除去 Pd/C, 所得反应液浓缩后, 经制备级高效液相色谱法纯化 (乙腈/纯水体系), 收集目标峰, 减压除去乙腈以后, 冻干, 得到化合物 **58** 约 1.0 g, 黄色粉末状固体, 收率约 52%, MS m/z : $[M+H]^+$ 450.5。

实施例 65

化合物 **59** 的合成:



第一步: 化合物 **59a**

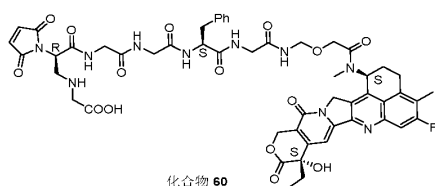
于 50 mL 单口瓶中加入 **1d** (500 mg, 0.62 mmol), **58** (279 mg, 0.62 mmol), PyBOP (448 mg, 0.86 mmol), HOBt (116 mg, 0.86 mmol) 及 15 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA (378 μ L, 2.29 mmol), 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得制备液, 制备液冻干得到 **59a** (166 mg); LC-MS: $[M+H]^+$ = 1235.6。

第二步: 化合物 **59**

于 25 mL 单口瓶中加入 **59a** (100 mg, 0.081 mmol), 溴化锌 (368 mg, 1.63 mmol) 及 10 mL 硝基甲烷, 40℃ 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体化合物 **59** (43 mg); LC-MS: $[M+H]^+$ = 1079.3。

实施例 66

化合物 **60** 的合成:

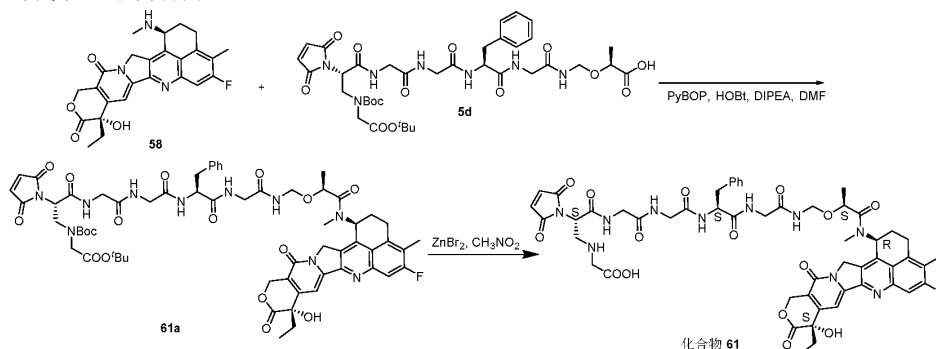


化合物 60

参照实施例 65 合成路线, 得到化合物 60(40 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1079.3$ 。

实施例 67

化合物 61 的合成:



5

第一步: 化合物 61a

于 100 mL 单口瓶中加入 5d(1.66 g, 2.02 mmol, 1.0 eq), 58(0.91 g, 2.02 mmol, 1.0 eq), PyBOP(1.58 g, 3.03 mmol, 1.5 eq), HOBT(0.41 g, 3.03 mmol, 1.5 eq)及 DMF(40 mL), 冰水浴下加入 DIPEA(0.84 mL, 1.5 eq), 升至室温反应 2 h(采用 HPLC 监测)。反应液直接经制备纯化, 制备液水泵减压水浴 35 °C 浓缩除去乙腈, 冻干得到化合物 61a(1.21 g); LC-MS: $[M+H]^+=1249.4$ 。

10

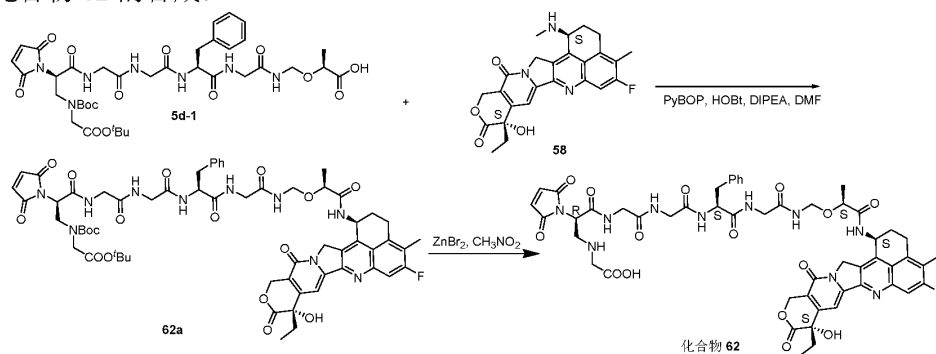
第二步: 化合物 61

于 100mL 单口瓶中加入化合物 61a(1.0 g, 0.8 mmol, 1.0 eq), 35 mL 硝基甲烷, 溶解后再加入溴化锌(3.64 g, 16 mmol, 20.0 eq), 油浴 40 °C(提前预热稳定)反应 30 min, 水泵减压水浴 45 °C 浓缩除去硝基甲烷, 得黄色残余物固体(采用 HPLC 监测)。经酸法制备, 得到制备液, 制备液经水泵减压水浴 35 °C 浓缩旋除乙腈, 冻干得到化合物 61(786 mg), LC-MS: $[M+H]^+=1093.6$ 。

15

实施例 68

化合物 62 的合成:



20

第一步: 化合物 62a

于 25 mL 单口瓶中加入化合物 5d-1(200 mg, 0.24 mmol, 1.0 eq)、58(110.3 mg,

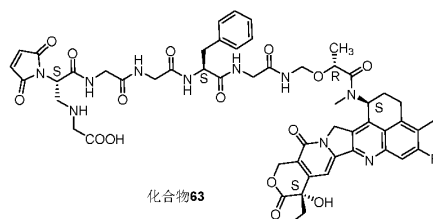
0.24 mmol, 1.0 eq)、PyBOP(187 mg, 0.36 mmol, 1.2eq)、HOBt(48 mg, 0.36 mmol, 1.2 eq)及 DMF(6 mL), 冰水浴降至 0-5℃, 加入 DIPEA(62 mg, 0.48 mmol, 2.0 eq), 加毕, 升至 20±5℃ 反应 2 h, HPLC 监测反应结束。反应液直接 HPLC 制备纯化, 收集产品制备液, 冻干得到化合物 **62a**(120.9 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1249.4$ 。

5 第二步: 化合物 **62**

于 25 mL 单口瓶中依次加入化合物 **62a** (100 mg, 0.081 mmol, 1.0 eq), ZnBr₂ (364 mg, 1.62 mmol, 20.0 eq) 和 CH₃NO₂(10 mL), 加毕, 升至 40℃ 反应 0.5 h, 停止反应, 反应液直接 45℃ 减压旋干后得到黄色固体, 取样 HPLC 监测反应。旋干的固体直接 HPLC 制备纯化, 收集产品制备液, 冻干得到化合物 **62**(61 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1093.4$ 。

实施例 69

化合物 **63** 的制备:

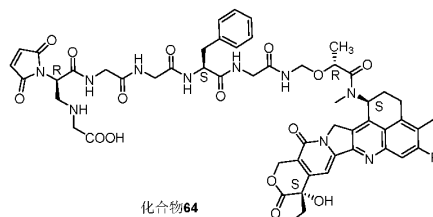


参照实施例 67 的路线, 得到化合物 **63**(60 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1093.4$ 。

15

实施例 70

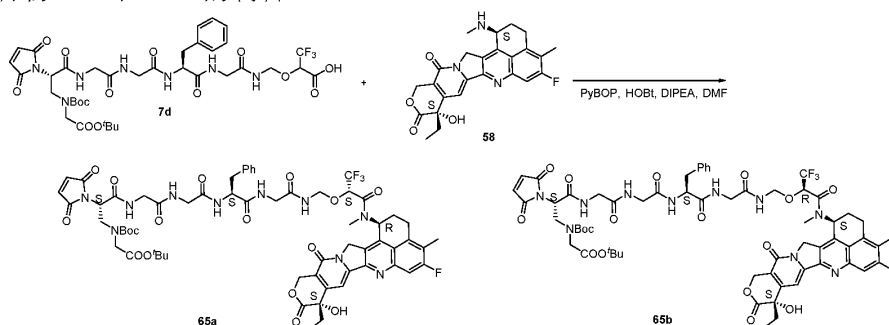
化合物 **64** 的制备:



参照实施例 68 合成路线, 得到化合物 **64**(65 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1093.4$ 。

实施例 71

20 化合物 **65A** 和 **65B** 的制备:



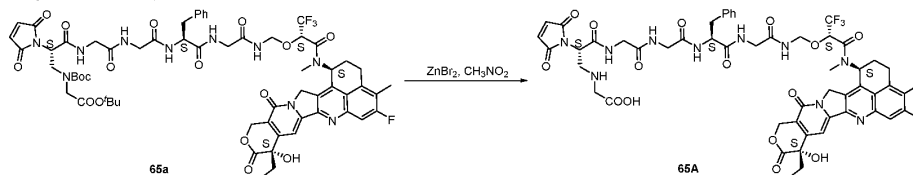
第一步: 化合物 **65a** 和 **65b**

于 50 mL 单口瓶中加入 **7d**(500 mg, 0.57 mmol), **58**(256.8 mg, 0.57 mmol), PyBOP(448 mg, 0.86 mmol), HOBt(116 mg, 0.86 mmol)及 15 mL DMF,冰水浴下加入 DIPEA(378 uL, 2.29 mmol), 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应

25

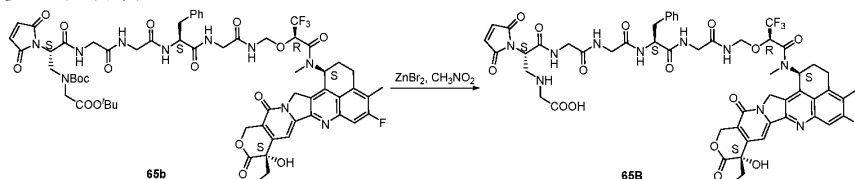
液经高效液相纯化, 得化合物 **65a** 和 **65b** 的制备液, 制备液分别冻干得到 155 mg 化合物 **65a**, LC-MS: $[M+H]^+=1303.4$; 158 mg 化合物 **65b**, LC-MS: $[M+H]^+=1303.6$ 。

第二步: 化合物 **65A**



- 5 于 25 mL 单口瓶中加入 **50a**(100 mg, 0.077 mmol), 溴化锌(349 mg, 1.55 mmol) 及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到制备液, 制备液冻干得到固体 49 mg。

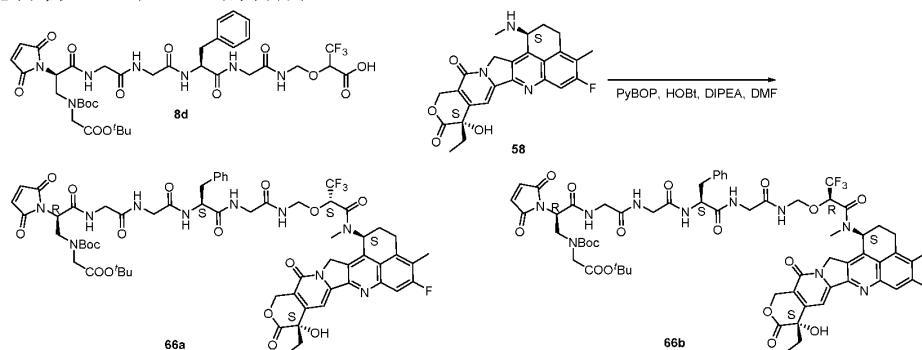
第三步: 化合物 **65B**



- 10 于 25 mL 单口瓶中加入 **65b**(100 mg, 0.077 mmol), 溴化锌(349 mg, 1.55 mmol) 及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到制备液, 制备液冻干得到固体 47 mg。

实施例 72

化合物 **66A** 和 **66B** 的合成:

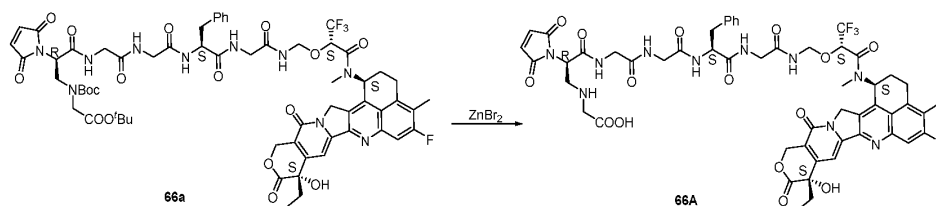


15

第一步: 化合物 **66a** 和化合物 **66b**

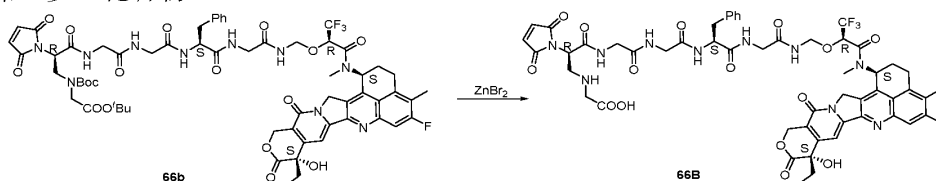
- 20 于 50 mL 单口瓶中加入 **8d**(500 mg, 0.57 mmol), **58**(256.8 mg, 0.57 mmol), PyBOP(448 mg, 0.86 mmol), HOBT(116 mg, 0.86 mmol) 及 15 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA(378 uL, 2.29 mmol), 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **66a** 和化合物 **66b** 的制备液, 制备液分别冻干得到 160 mg 化合物 **66a**, 160 mg 化合物 **66b**。化合物 **66a** 的 LC-MS: $[M+H]^+=1303.7$; 化合物 **66b** 的 LC-MS: $[M+H]^+=1303.6$ 。

第二步: 化合物 **66A**



于 25 mL 单口瓶中加入化合物 **66a**(100 mg, 0.077 mmol), 溴化锌(349 mg, 1.55 mmol)及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体 57 mg, LC-MS: $[M+H]^+=1147.5$ 。

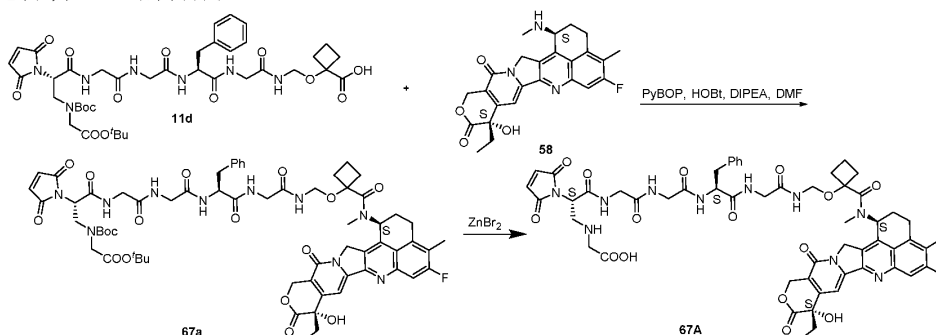
第三步: 化合物 **66B**



于 25 mL 单口瓶中加入化合物 **66b**(100 mg, 0.077 mmol), 溴化锌(349 mg, 1.55 mmol)及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体 57 mg, LC-MS: $[M+H]^+=1147.5$ 。

实施例 73

化合物 **67A** 的合成:



第一步: 化合物 **67a**

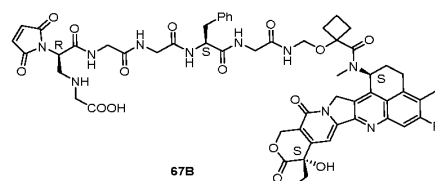
于 50 mL 单口瓶中加入 **11d** (800 mg, 0.96 mmol), **58**(432.5 mg, 0.96 mmol), PyBOP(500 mg, 0.96 mmol), HOBt(208 mg, 0.96 mmol)及 30 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA(660 uL, 4.0 mmol), 升至室温反应 4 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 67a 的制备液, 制备液冻干得到 **67a** (402 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1275.4$ 。

第二步: 化合物 **67A**

于 25 mL 单口瓶中加入 **67a** (100 mg, 0.78 mmol), 溴化锌(356 mg, 1.57 mmol)及 10 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体化合物 **67A**(47 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1119.5$ 。

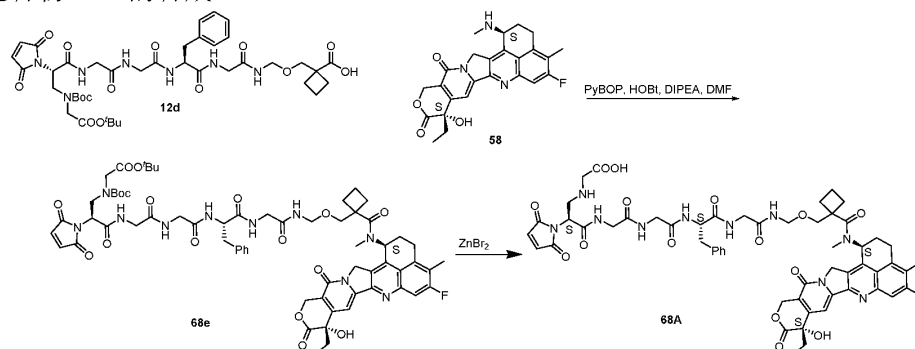
实施例 74

化合物 **67B** 的合成:



参照实施例 73 合成路线, 得到化合物 **67B**(50 mg)。LC-MS: $[M+H]^+$ 1119.4。
实施例 75

5 化合物 **68A** 的合成:



第一步: 化合物 **68a**

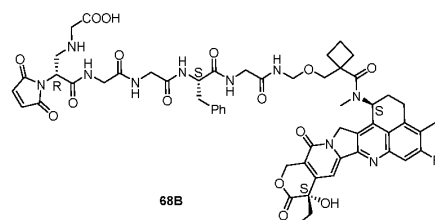
于 50 mL 单口瓶中加入 **12d** (400 mg, 0.47 mmol), **58**(211.7 mg, 0.47 mmol), PyBOP(250 mg, 0.47 mmol), HOBt(101 mg, 0.47 mmol)及 15 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA(330 μ L, 2.0 mmol), 升至室温反应 3 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **68a** 的制备液, 制备液冻干得到 **68a** (177 mg); LC-MS: $[M+H]^+$ =1289.4。

第二步: 化合物 **68A**

于 25 mL 单口瓶中加入 **68a** (100 mg, 0.08 mmol), 溴化锌(360 mg, 1.6 mmol)及 5 mL 硝基甲烷, 40 $^{\circ}$ C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体化合物 **68A**(45 mg); LC-MS: $[M+H]^+$ =1133.4。

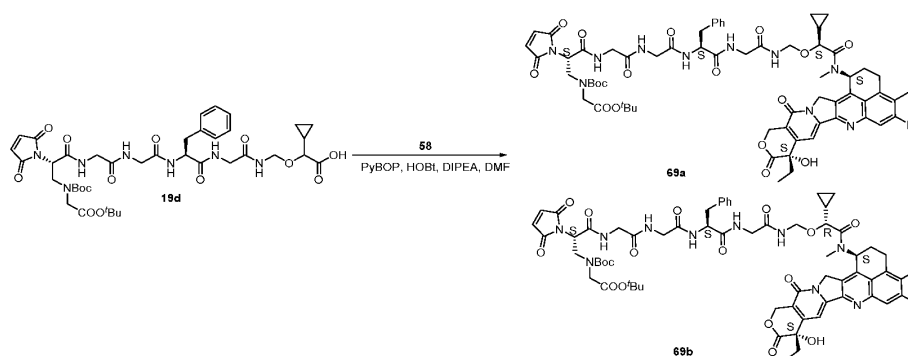
实施例 76

化合物 **68B** 的合成:



参照实施例 75 合成路线, 得到化合物 **68B**(50 mg); LC-MS: $[M+H]^+$ =1133.4。
实施例 77

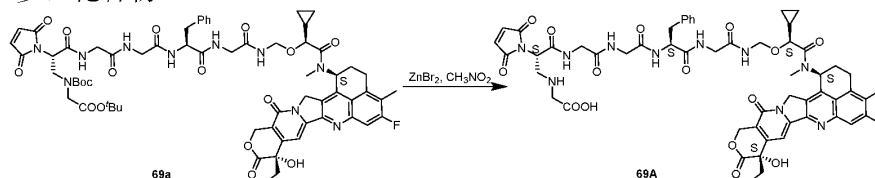
化合物 **69A** 和 **68B** 的合成:



第一步：化合物 **69a** 和 **69b**

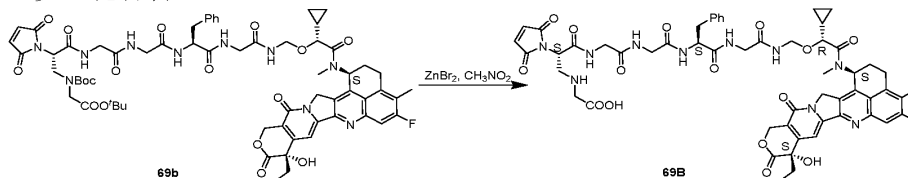
于 50 mL 单口瓶中加入 **19d**(500 mg, 0.59 mmol), **58**(266 mg, 0.59 mmol), PyBOP(339 mg, 0.65 mmol), HOBT(88 mg, 0.86 mmol)及 10 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA(292 μ L, 1.77 mmol), 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **69a** 和 **69b** 的制备液, 制备液分别冻干得到 109mg 化合物 **69a**, LC-MS: $[M+H]^+=1275.5$; 111 mg 化合物 **69b**, LC-MS: $[M+H]^+=1275.7$ 。

第二步：化合物 **69A**



于 25 mL 单口瓶中加入 **69a** (100 mg, 0.078 mmol), 溴化锌(352 mg, 1.56 mmol) 及 5 mL 硝基甲烷, 40 $^{\circ}C$ 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体 53 mg; LC-MS: $[M+H]^+=1119.4$ 。

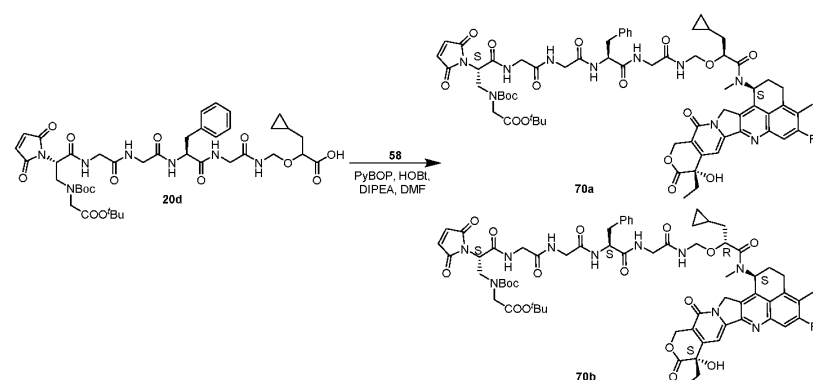
第三步：化合物 **69B**



于 25 mL 单口瓶中加入 **69b**(100 mg, 0.078 mmol), 溴化锌(352 mg, 1.56 mmol) 及 5 mL 硝基甲烷, 40 $^{\circ}C$ 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体 54 mg; LC-MS: $[M+H]^+=1119.4$ 。

实施例 78

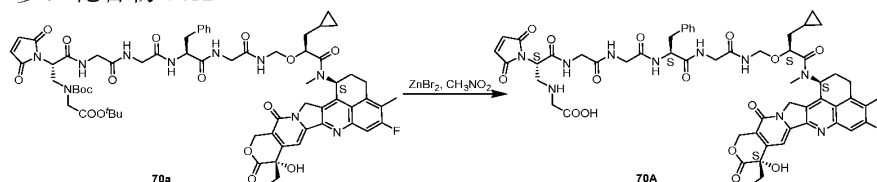
化合物 **70A** 和 **70B** 的合成:



第一步：化合物 **70a** 和 **70b**

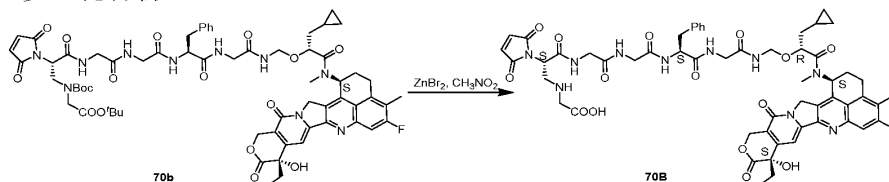
于 50 mL 单口瓶中加入 **20d**(400 mg, 0.47 mmol), **58** (211.7 mg, 0.47 mmol), PyBOP(223 mg, 0.56 mmol), HOBT(83 mg, 0.56 mmol)及 10 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA(248 uL, 1.5 mmol), 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 **70a** 和 **70b** 的制备液, 制备液分别冻干得到 106mg 化合物 **70a**, LC-MS: $[M+H]^+=1289.5$; 101 mg 化合物 **70b**, LC-MS: $[M+H]^+=1289.4$ 。

第二步：化合物 **70A**



于 25 mL 单口瓶中加入 **70a**(100 mg, 0.078 mmol), 溴化锌(352 mg, 1.57 mmol) 及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体 39 mg; LC-MS: $[M+H]^+=1133.4$ 。

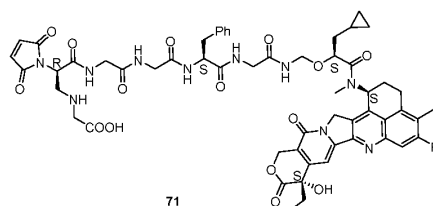
第三步：化合物 **70B**



于 25 mL 单口瓶中加入 **70b**(100 mg, 0.078 mmol), 溴化锌(352 mg, 1.56 mmol) 及 5 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体 35 mg; LC-MS: $[M+H]^+=1133.4$ 。

实施例 79

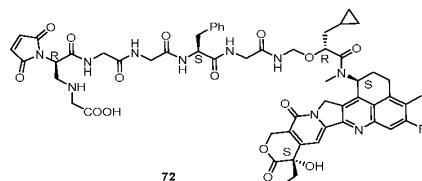
化合物 **71** 的合成:



参照实施例 78 合成路线, 得到化合物 **71**(30 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1133.3$ 。

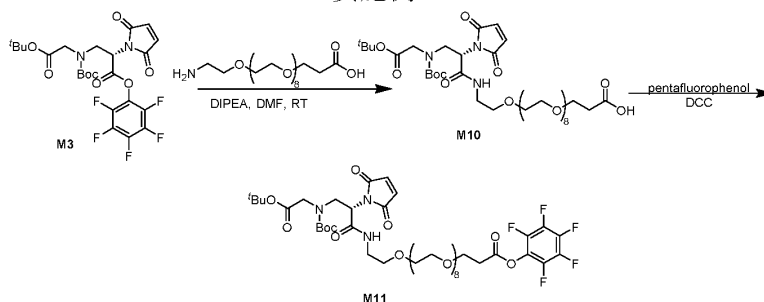
实施例 80

化合物 **72** 的合成:



参照实施例 78 合成路线, 得到化合物 **72**(33 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1133.4$ 。

实施例 81



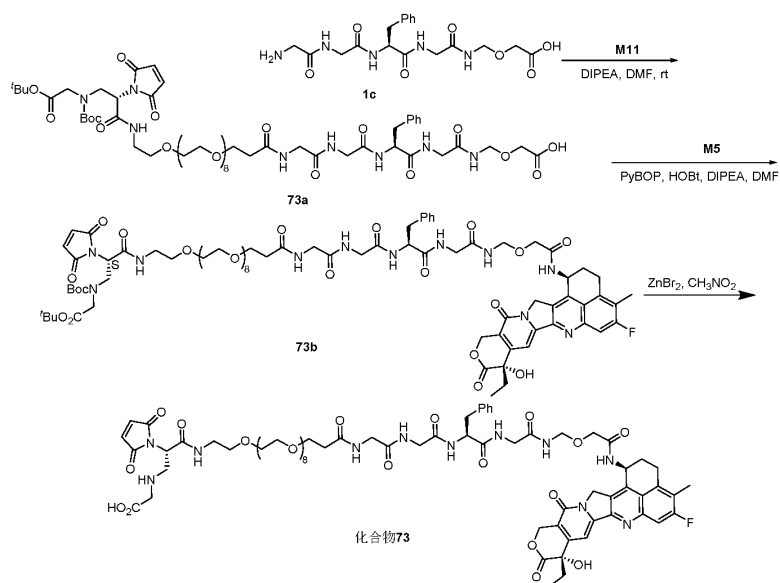
化合物 **M11** 的合成:

于 100 mL 单口瓶, 加入化合物 **M3**(11.0 g, 19.5 mmol, 1.0eq)、DIPEA(2.8 g, 21.4 mmol, 1.1 eq)、27-氨基-4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25-八氧杂二十七烷酸 (9.7 g, 20.5 mmol, 1.05 eq)及 DMF(60 mL), 室温反应 20 min(采用 TLC 监测)。反应液直接经制备纯化, 制备液水泵减压水浴 35 °C 浓缩除去乙腈, 冻干得到化合物 **M10**(13.2 g), 收率 78%; LC-MS: $[M+H]^+=866.5$ 。

于 100 mL 单口瓶, 加入化合物 **M10**(13.0 g, 15 mmol, 1.0eq)、五氟苯酚(3 g, 16.5 mmol, 1.1 eq)、DCC(3.4 g, 16.5 mmol, 1.1 eq)及 THF(30 mL), 室温反应 30 min(采用 TLC 监测), 过滤滤去不溶物。反应液直接经制备纯化, 制备液水泵减压水浴 35 °C 浓缩除去乙腈, 冻干得到化合物 **M11**(14.2g), 收率 92%; LC-MS: $[M+H]^+=1032.5$ 。

实施例 82

化合物 **73** 的合成:



第一步：化合物 **73a** 的合成

向 **M11** (1 g, 0.79 mol) 中加入 10 mL DMF, 冰水浴冷却至 0℃, 加入化合物 **1c** (334 mg, 0.79 mol), **DIPEA** (154 mg, 1.19 mol), 维持该条件下反应 1 h, TLC 监测反应完全, 反应液经制备级高效液相色谱法纯化 (乙腈/纯水体系), 收集目标峰, 减压除去乙腈以后, 冻干, 得到化合物 **73a** 约 1.2 g, MS m/z : $[M+H]^+ = 1271.9$ 。

第二步：化合物 **73b** 的合成

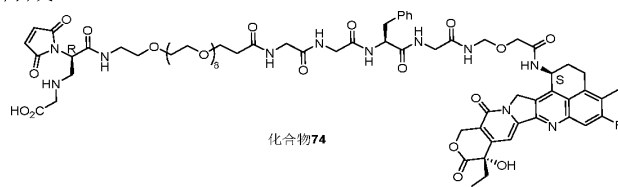
于 25 mL 单口瓶中加入 **73a** (1.2 g, 0.94 mmol), **M5** (500 mg, 0.94 mmol), **PyBOP** (625 mg, 1.2 mmol), **HOBt** (162 mg, 1.2 mmol) 及 15 mL DMF, 冰水浴下加入 **DIPEA** (310 mg, 2.4 mmol), 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得制备液, 制备液冻干得到 **73b** (709 mg); LC-MS: $[M+H]^+ = 1720.8$ 。

第三步：化合物 **73** 的合成:

于 25 mL 单口瓶中加入 **73b** (200 mg, 0.116 mmol), 溴化锌 (523 mg, 2.32 mmol) 及 10 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体化合物 **73** (88 mg); LC-MS: $[M+H]^+ = 1532.6$ 。

实施例 83

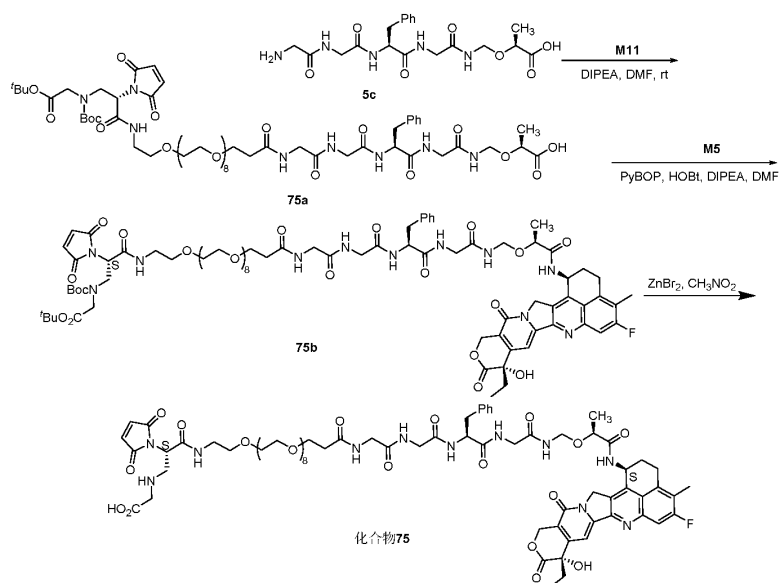
化合物 **74** 的合成:



参照实施例 82 合成路线, 得到化合物 **74** (90 mg); LC-MS: $[M+H]^+ = 1532.6$ 。

实施例 84

化合物 **75** 的合成:



第一步：化合物 75a 的合成

向 **M11** (1 g, 0.79 mol) 中加入 10 mL DMF, 冰水浴冷却至 0℃, 加入化合物 5c (345 mg, 0.79 mol), DIPEA (154 mg, 1.19 mol), 维持该条件下反应 1 h, TLC 监测反应完全, 反应液经制备级高效液相色谱法纯化 (乙腈/纯水体系), 收集目标峰, 减压除去乙腈以后, 冻干, 得到化合物 **75a** 0.9 g, MS m/z: $[M+H]^+$ = 1285.6。

第二步：化合物 75b 的合成

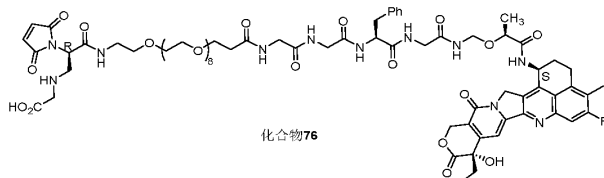
于 25 mL 单口瓶中加入 **75a** (700 mg, 0.54 mmol), **M5** (289 mg, 0.54 mmol), PyBOP (313 mg, 0.6 mmol), HOBT (81 mg, 0.6 mmol) 及 10 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA (155 mg, 1.2 mmol), 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得制备液, 制备液冻干得到 **75b** (304 mg); LC-MS: $[M+H]^+$ = 1734.8。

第三步：化合物 75 的合成：

于 25 mL 单口瓶中加入 **75b** (200 mg, 0.116 mmol), 溴化锌 (523 mg, 2.32 mmol) 及 10 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体化合物 **75** (96 mg); LC-MS: $[M+H]^+$ = 1546.6。

实施例 85

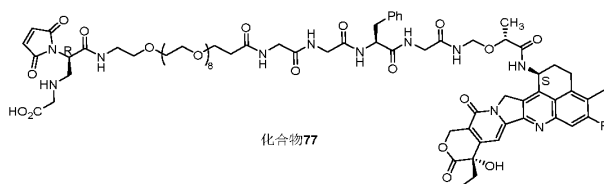
化合物 **76** 的合成：



参照实施例 84 合成路线, 得到化合物 **76** (92 mg); LC-MS: $[M+H]^+$ = 1546.5。

实施例 86

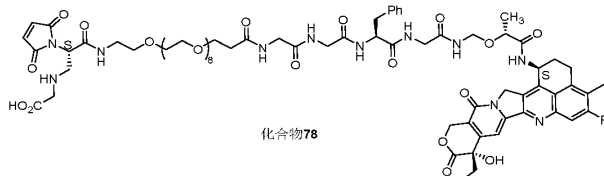
化合物 **77** 的合成：



参照实施例 84 合成路线, 得到化合物 77(87 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1546.5$ 。

实施例 87

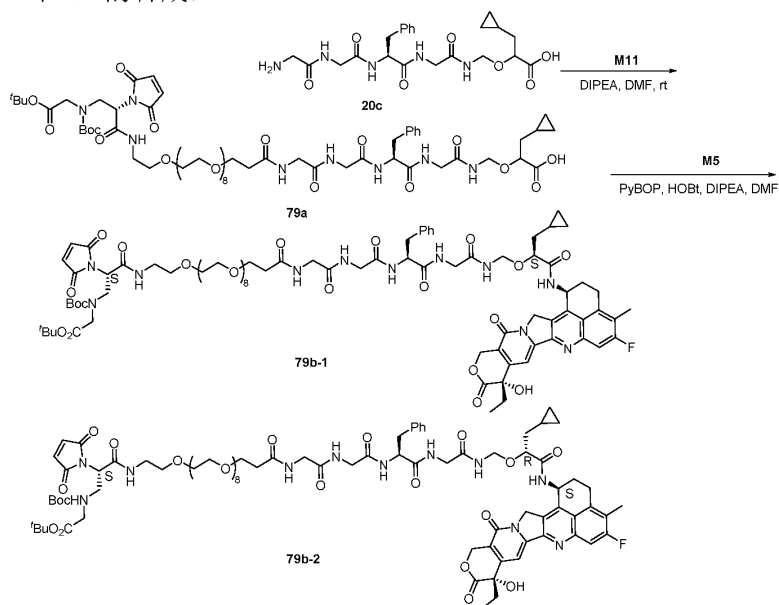
化合物 78 的合成:



参照实施例 84 合成路线, 得到化合物 78(94 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1546.7$ 。

实施例 88

化合物 79 和 80 的合成:



10 第一步: 化合物 79a 的合成

向 M11 (1 g, 0.79 mol) 中加入 10 mL DMF, 冰水浴冷却至 0℃, 加入化合物 20c (377 mg, 0.79 mol), DIPEA (154 mg, 1.19 mol), 维持该条件下反应 1 h, TLC 监测反应完全, 反应液经制备级高效液相色谱法纯化(乙腈/纯水体系), 收集目标峰, 减压除去乙腈以后, 冻干, 得到 783 mg 化合物 79a, MS m/z: $[M+H]^+=1325.8$ 。

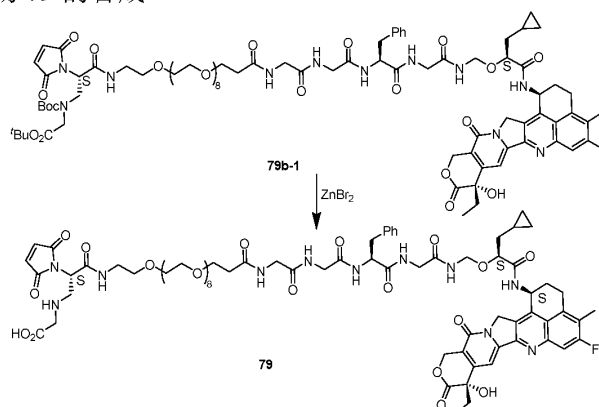
15

第二步: 化合物 79b-1 和 79b-2 的合成

于 25 mL 单口瓶中加入 79a (600 mg, 0.45 mmol), M5(240 mg, 0.45 mmol), PyBOP(261 mg, 0.5 mmol), HOBt(68 mg, 0.5 mmol)及 10 mL DMF, 冰水浴下加入 DIPEA(130 mg, 1 mmol), 升至室温反应 2 h。HPLC 监测反应完毕后, 反应液经高效液相纯化, 得化合物 79b-1 和 79b-2 的制备液, 制备液冻干得到 79b-1(124

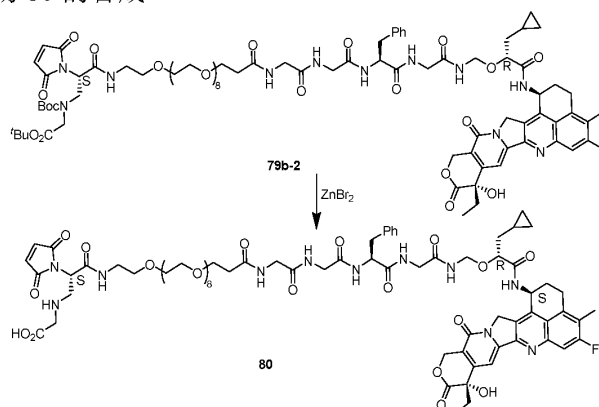
20

mg); LC-MS: $[M+H]^+=1743.0$; 得到 **79b-1**(122 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1743.0$ 。
 第三步: 化合物 **79** 的合成



于 25 mL 单口瓶中加入 **79b-1** (100 mg, 0.057 mmol), 溴化锌(258 mg, 1.15 mmol)及 10 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体化合物 **79**(30 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1586.9$ 。

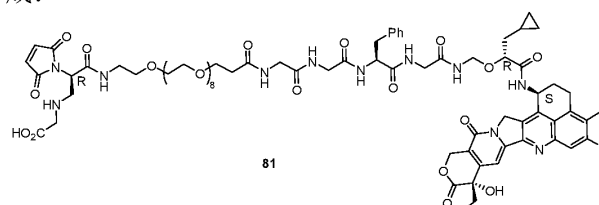
第四步: 化合物 **80** 的合成



于 25 mL 单口瓶中加入 **79b-2** (100 mg, 0.057 mmol), 溴化锌(258 mg, 1.15 mmol)及 10 mL 硝基甲烷, 40 °C 下反应 1 h。HPLC 监测反应完毕后, 减压浓缩除去溶剂, 得粗品。粗品经高效液相纯化, 得到产品制备液, 制备液冻干得到固体化合物 **80**(33 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1587.0$ 。

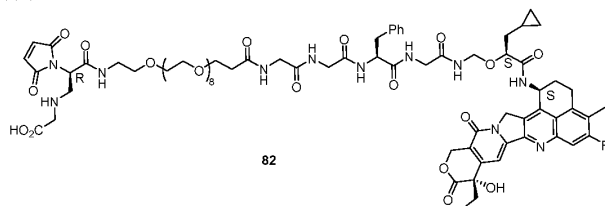
实施例 89

化合物 **81** 的合成:



参照实施例 88 合成路线, 得到化合物 **81**(24 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1586.9$ 。
 实施例 90

化合物 **82** 的合成:



参照实施例 88 合成路线, 得到化合物 **82**(29 mg); LC-MS: $[M+H]^+=1586.9$ 。

实施例 91

5 1) hu4D3 抗体的表达与纯化:

使用 Expi293(上海奥浦迈生物科技股份有限公司)悬浮细胞表达 hu4D3 抗体。转染前一天, 以 0.9×10^6 个/mL 密度将细胞接种于含 300 mL OPM-293 CD05 Medium(81075-001, 上海奥浦迈生物科技股份有限公司)的 1 L 摇瓶中, 37 °C, 5% CO₂, 120 rpm 细胞培养摇床过夜培养。次日, 用 PEI-MAX 进行抗体表达质粒的转染, 其中质粒:PEI-MAX 的质量比为 1:3。转染后第一天按 5%(v/v)加入 OPM-293 ProFeed 补料, 转染后第三天再次按 5%(v/v)加入 OPM-293 ProFeed 补料, 转染后第六天离心收集上清。

收集得到的细胞表达上清, 经 Protein A 亲和层析柱(UniMab 50, 苏州纳微科技股份有限公司), 以 0.05 M 乙酸钠(pH3.6)洗脱, 捕获的抗体用 1 M Tris-HCl(pH8.8)按 0.7/10(v/v)调节至 pH7.0, 再通过凝胶过滤层析柱 SEC(Superdex 200, GE 公司)去除多聚体等杂质, 同时将抗体缓冲液置换成 20 mM PB(pH6.5)。

抗体 hu4D3:

轻链核酸编码序列

SEQ ID NO: 38

20 GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTAGCCTGTCCGCTTCTGTGGGCGATAGAGTGAC
CATCACATGCAGAGCTTCTCAGGATATCAATAAGTATCTGGCTTGGTATCAGCAGAAGC
CTGGAAAGGTGCCTAAGCTGCTGATCTACTCTACATCTACCCTGCAGTCTGGAGTGCCT
TCTAGATTTTCTGGATCTGGCTCTGGCACCATTCTTACACTGACAATCTCTTCTCTGCAG
CCTGAGGATGTGGCTACATATTATTGTCTGCAGTATGATGATCTGTTACCTTTGGCCAG
25 GGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC
CATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTC
TATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAAGT
CCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGC
ACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTC
30 ACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

轻链氨基酸序列

SEQ ID NO: 18

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDINKYLAWYQQKPGKVPKLLIYSTSTLQSGVPSR
FSGSGSGTDFLTITSLQPEDVATYYCLQYDDLFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
35 KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSTLTLSKAD
YEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

其中, 可变区为:

SEQ ID NO: 14

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINKYLAWYQQKPGKVPKLLIYSTSTLQSGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCLQYDDLFTFGQGTKLEIK

其中下划线部分从左向右依次分别为 CDR1 (SEQ ID NO: 7)、CDR2 (SEQ ID NO: 8)、CDR3 (SEQ ID NO: 9)。

5 上述轻链的可变区的核酸编码序列为 SEQ ID NO: 34

GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTAGCCTGTCCGCTTCTGTGGGCGATAGAGTGAC
CATCACATGCAGAGCTTCTCAGGATATCAATAAGTATCTGGCTTGGTATCAGCAGAAGC
CTGGAAAGGTGCCTAAGCTGCTGATCTACTCTACATCTACCCTGCAGTCTGGAGTGCCT
TCTAGATTTTCTGGATCTGGCTCTGGCACCATTATTTACACTGACAATCTCTTCTCTGCAG
10 CCTGAGGATGTGGCTACATATTATTGTCTGCAGTATGATGATCTGTTACCTTTGGCCAG
GGCACCAAGCTGGAGATCAAGC

上述轻链的可变区中的 CDR1 (SEQ ID NO: 7)、CDR2 (SEQ ID NO: 8)、
CDR3 (SEQ ID NO: 9) 的核苷酸编码序列分别为:

15 SEQ ID No.27

CAAGACATTAATAAGTAT

SEQ ID No.28

TCCACATCT

SEQ ID No.29

20 CTGCAGTATGATGATCTATTCACG

重链的核酸编码序列

SEQ ID NO: 37

ATGGGCTGGTCTGGGTGTTCTGTTCTGCTGAGCGTGACCGCCGGCGTGCACTCCC
25 AGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCCGGCGCCTCCGTGAAGC
TGAGCTGTAAGGCCTCCGGCTACACCTTCACCTCCTTCGACATTAAGTGGGTGCGGCA
GGCCCCGAGCAGCGCCTGGAGTGGATGGGCTGGATCTCCCCGGCGACGGCAACAC
CAAGTACTCCCAGAAGTTCAGGGAAGAGCTACCATCACCAGAGATACATCCGCTTCT
ACAGCTTACATGGAGCTGTCTAGCCTGAGATCTGAGGATACAGCTGTGTATTACTGTGT
30 GAGAGGAGAGGCTCTGTACTATTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACAGTG
TCTTCTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCA
CCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGT
GACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGT
CCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGC
35 TTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTG
GACAAGAGAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAAGTACACATGCCACCGTGCCCA
GCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACA
CCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA
AGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA
40 GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCAC
CGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA
AGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA
ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAG

CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC
AATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGC
TCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACG
TCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCT
5 CTCCCTGTCTCCGGGTAA

重链的氨基酸序列

SEQ ID NO: 17

QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTSFDINWVRQAPEQRLEWMGWIFPGDGNTK
YSQKFQGRATITRDTASTAYMELSSLRSED~~TAVYYCVRGEALYYFDY~~WGQGLTVTVSSA
10 STKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YLSVSVTVPS~~SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK~~SCDKTH~~TCPP~~PAPELLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLT~~VLHQDWLNGKEY~~KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK~~TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ~~
15 GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

其中，重链的可变区为：

SEQ ID NO: 13

QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTSFDINWVRQAPEQRLEWMGWIFPGDGNTK
20 YSQKFQGRATITRDTASTAYMELSSLRSED~~TAVYYCVRGEALYYFDY~~WGQGLTVTVSS

其中下划线部分从左向右依次分别为 CDR1 (SEQ ID NO: 1)、CDR2 (SEQ ID NO: 2)、CDR3 (SEQ ID NO: 3)，

上述重链的可变区的核酸编码序列为 SEQ ID NO: 33

25 CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCCCGGCGCCTCCGTGAAG
CTGAGCTGTAAGGCCTCCGGCTACACCTTCACCTCCTTCGACATTA~~ACTGGGTGCGGC~~
AGGCCCCCGAGCAGCGCCTGGAGTGGATGGGCTGGATCTCCCCGGCGACGGCAACA
CCAAGTACTCCCAGAAGTTCAGGGAAGAGCTACCATCACCAGAGATACATCCGCTTC
TACAGCTTACATGGAGCTGTCTAGCCTGAGATCTGAGGATACAGCTGTGTATTACTGTG
30 TGAGAGGAGAGGCTCTGTACTATTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACAGT
GTCTTCTG

上述重链的可变区中的 CDR1 (SEQ ID NO: 1)、CDR2 (SEQ ID NO: 2)、
CDR3 (SEQ ID NO: 3) 的核苷酸编码序列分别为：

35 SEQ ID No.21

GGCTACACCTTCACAAGCTTTGAT

SEQ ID No.22

ATTTTTCCTGGAGATGGTAAT

SEQ ID No.23

40 GTAAGAGGGGAGGCCCTGTATTACTTTGACTAC

2) hu7F11 抗体的表达与纯化：按照类似的方法，对于 hu7F11 抗体进行表
达与纯化。

抗体 hu7F11：

轻链的核酸编码序列

SEQ ID NO: 40

GATATCGTGATGACACAGTCTCCTGATTCTCTGGCCGTGTCTCTGGGCGAAAGAGCTAC
 AATCAACTGTAAGGCTTCTCAGTCTGTGTCTAATGATGTGGTGTGGTACCAGCAGAAGC
 5 CTGGGCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTACGCCTCCAACAGGTACACCGGCGTGCC
 CGACAGGTTCTCCGGCTCCGGCTACGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCCTCCCTG
 CAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTACTGCCAGCAGGACTACTCCTCCCCCTGGACCT
 TCGGCGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCAT
 CTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGA
 10 ATAACCTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATC
 GGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCT
 CAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTG
 CGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA
 GTGTTAG

15 轻链的氨基酸序列

SEQ ID NO: 20

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVSNQDVVWYQQKPGQPPKLLIYYASNRYTGVPD
 RFSGSGYGTDFLTITISLQAEDVAVYYCQQDYSSPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD
 EQLKSGTASVVCLLNFPYAPREKRVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLS
 20 KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

其中，轻链的可变区为：

SEQ ID NO: 16

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVSNQDVVWYQQKPGQPPKLLIYYASNRYTGVPD
 25 RFSGSGYGTDFLTITISLQAEDVAVYYCQQDYSSPWTFGGGTKVEIK

其中下划线部分从左向右依次分别为 CDR1 (SEQ ID NO: 10)、CDR2 (SEQ ID NO: 11)、CDR3 (SEQ ID NO: 12)。

上述轻链的可变区的核酸编码序列为 SEQ ID NO: 36

30 GATATCGTGATGACACAGTCTCCTGATTCTCTGGCCGTGTCTCTGGGCGAAAGAGCTAC
 AATCAACTGTAAGGCTTCTCAGTCTGTGTCTAATGATGTGGTGTGGTACCAGCAGAAGC
 CTGGGCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTACGCCTCCAACAGGTACACCGGCGTGCC
 CGACAGGTTCTCCGGCTCCGGCTACGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCCTCCCTG
 CAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTACTGCCAGCAGGACTACTCCTCCCCCTGGACCT
 35 TCGGCGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAAGC

上述轻链的可变区中的 CDR1 (SEQ ID NO: 10)、CDR2 (SEQ ID NO: 11)、CDR3 (SEQ ID NO: 12) 的核苷酸编码序列分别为：

SEQ ID No.30

40 CAGAGTGTGAGTAATGAT

SEQ ID No.31

TATGCATCC

SEQ ID No.32

CAGCAGGATTATTCCTCTCCGTGGACG

重链的核酸编码序列

SEQ ID NO: 39

5 CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCCGAGGTGAAAAAGCCAGGCGCTTCTGTGAAG
GTGTCTTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTCACCGACCACGTGATCTCCTGGGTGCGCC
AGGCCACCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCCAGATCTACCCCGGCTCCGACAACT
CCTACTACGCCCAAGATTCCAGGGCAGGGTGACTCTGACCGCCGACAAGTCCATCAA
CACCGCCTACATGGAGCTGTCTCCCTGAGGTCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGC
10 GCCAGGGAGGGCTACGGCTACGGCAAGAACGGCGTGGGCTACGCCATGGATTATTGGG
GCCAGGGCACCTGGTGACAGTGTCTTCTGCTAGCACCAAGGGGCCATCGGTCTTCCC
CCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTC
AAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGC
GGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCG
15 TGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCA
CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAAC
TCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTC
TTCCCCCAAACCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCG
TGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACG
20 GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGT
ACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTGCTGACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA
CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA
AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGA
GCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGAC
25 ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACATAAGACCACGCCT
CCCGTGTCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGA
GCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAA
CCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA

重链的氨基酸序列

SEQ ID NO: 19

30 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDHSVWVRQATGQGLEWMGQIYPGSDNS
YYAQKFQGRVTLTADKSINTAYMELSSLRSED~~TAVYYCAREGYGYGKNGVGYAMDYWG~~
QGT~~LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT~~SWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA
35 PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

其中，重链的可变区为：

SEQ ID NO: 15

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDHSVWVRQATGQGLEWMGQIYPGSDNS
YYAQKFQGRVTLTADKSINTAYMELSSLRSED~~TAVYYCAREGYGYGKNGVGYAMDYWG~~

QGTLVTVSS

其中下划线部分从左向右依次分别为 CDR1 (SEQ ID NO: 4)、CDR2 (SEQ ID NO: 5)、CDR3 (SEQ ID NO: 6),

上述重链的可变区的核酸编码序列为 SEQ ID NO: 35

5 CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCCGAGGTGAAAAAGCCAGGCGCTTCTGTGAAG
GTGTCTTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTCACCGACCACGTGATCTCCTGGGTGCGCC
AGGCCACCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCCAGATCTACCCCGGCTCCGACAACCT
CCTACTACGCCCAGAAGTTCCAGGGCAGGGTGACTCTGACCGCCGACAAGTCCATCAA
CACCGCCTACATGGAGCTGTCTCCCTGAGGTCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGC
10 GCCAGGGAGGGCTACGGCTACGGCAAGAACGGCGTGGGCTACGCCATGGATTATTGGG
GCCAGGGCACCTGGTGACAGTGTCTTCTG

上述重链的可变区中的 CDR1 (SEQ ID NO: 4)、CDR2 (SEQ ID NO: 5)、
CDR3 (SEQ ID NO: 6) 的核苷酸编码序列分别为:

15 SEQ ID No.24
GGATACACATTCACTGACCATGTC
SEQ ID No.25
ATTTATCCTGGAAGTGATAATAGT
SEQ ID No.26
20 GCAAGAGAGGGCTATGGTTATGGAAAAACGGAGTTGGCTATGCTATGGAC
TAC

3) hTINA1 抗体的表达与纯化: 按照类似的方法, 对于 hTINA1 抗体进行
表达与纯化。具体参见专利 CN105849126A 中说明书 67/91 页的表 2 中的
25 “hTINA1-H1L1”。

抗体 hTINA1:

轻链核酸编码序列 SEQ ID No.43

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCGTACGG
CGACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGT
30 GACCATCACATGCAAGGCCAGCCAGGACGTGTCCACAGCCGTGGCCTGGTATCAGCAG
AAGCCTGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACAGCGCCAGCTACCGGTACACCGGCG
TGCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACAATCAGCAG
CCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCGGTGTACTACTGCCAGCAGCACTACATCACCCCCCTG
ACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCTCCGTGT
35 TCATCTTCCCCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCT
GCTGAATAACTTCTACCCAGAGAGGCCAAGGTGCAAGTGAAGGTGGACAACGCCCT
GCAGTCCGGGAACCTCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCT
ACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGT
ACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCTCCCCCGTCACCAAGAGCTTCAACA
40 GGGGGGAGTGT

轻链氨基酸序列 SEQ ID No.44

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSTAWYQQKPG
KAPKLLIYSASYRYTGVPSTRFSGSGTDFLTITSLQPEDFAVYYCQHYITPLTFGQGTKL

EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

其中，可变区为：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSR
5 FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQHYITPLTFGQGTKLEIK

重链核酸编码序列 SEQ ID No.41

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGCC
AGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAG
GTGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTACCACCGCCGGCATGCAGTGGGTGCGCC
10 AGGCTCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCTGGATCAACACCCACAGCGGCGTGC
CCAAATACGCCGAGGACTTCAAGGGCAGAGTGACCATCAGCGCCGACACCAGCACCT
CCACAGCCTACCTGCAGCTGAGCAGCCTGAAGTCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTG
CGCCAGAAGCGGCTTCGGCAGCAGCTACTGGTACTTCGACGTGTGGGGCCAGGGCAC
CCTCGTGACCGTCAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCCCCCTGGCACCC
15 TCCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACT
TCCCCGAACCCGTGACCGTGAGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACA
CCTTCCCCGCTGTCTGTCAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGT
GCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGC
AACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGC
20 CCACCCTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCCTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAA
AACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGA
CGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT
GCATAATGCCAAGACAAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGT
CAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA
25 GGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGG
CCAGCCCCGGGAACACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAA
GAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTG
GAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCCGTGCTG
GACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC
30 AGCAGGGCAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAC
CCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGCAA

重链的氨基酸序列 SEQ ID No.42

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTAGMQWVRQ
APGQGLEWMGWINTHSGVPKYAEDFKGRVTISADTSTSTAYLQLSSLKSEDTAVYYCARS
35 GFGSSYWFYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE
PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
40 VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

其中，重链的可变区为：

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTAGMQWVRQAPGQGLEWMGWINTH
SGVPKYAEDFKGRVTISADTSTSTAYLQLSSLKSEDTAVYYCARSFGSSYWFYFDVWGQ
GLTVTVSS

实施例 92

1) 通过偶联 hu4D3 抗体与 payload 制备 hu4D3 抗体-药物偶联物样品:

在经过细胞表达并通过 Protein A 亲和层析与分子筛层析纯化之后, 抗人 Trop2 抗体被置换于 20 mM NaAc-HAc, pH6.0 的缓冲液中, 浓缩或者稀释, 抗人 Trop2 抗体至蛋白浓度为 5 mg/mL。连接子加药物为白色粉末, 使用 DMA 将其溶解至 10 mg/mL 备用。为了打开, 抗人 Trop2 抗体的链间二硫键, 先按照分子比加入 15 倍的 TCEP, 并在室温下反应 2 h。然后按照分子比加入 16 倍

的连接子加药物溶液, 在室温下反应 2h。反应结束后使用 30 KDa 超滤离心管超滤, 将未偶联上抗人 Trop2 抗体的连接子加药物去除, 即得到抗人 Trop2 抗体-药物偶联物样品。

所得到的人 Trop2 抗体-药物偶联物样品将通过 SEC-HPLC 确定单体率, 通过 RP-HPLC 或者 HIC-HPLC 确定载药量。

2) 按照类似的方法, 通过偶联 hu7F11 抗体与 payload 制备 hu7F11 抗体-药物偶联物样品。

实施例 93

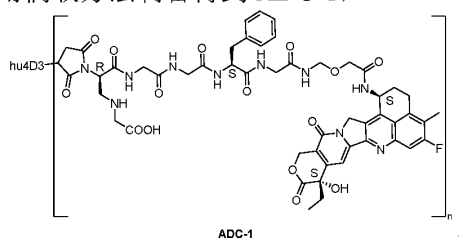
通过偶联 TINA1 抗体与 payload 制备 DS1062a 抗体-药物偶联物样品在经过细胞表达并通过 Protein A 亲和层析与分子筛层析纯化之后, 抗人 Trop2 抗体被置换于 20 mM NaAc-HAc, pH6.0 的缓冲液中, 浓缩或者稀释抗人 Trop2 抗体至蛋白浓度为 5 mg/mL。连接子加药物为白色粉末, 使用 DMA 将其溶解至 10 mg/mL 备用。为了打开抗人 Trop2 抗体的链间二硫键, 先按照分子比加入 8~12 倍的 TCEP, 并在室温下反应 1~2 h。然后按照分子比加入 5~8 倍

的连接子加药物溶液, 在室温下反应 1~2h。反应结束后使用 30 KDa 超滤离心管超滤, 将未偶联上抗人 Trop2 抗体的连接子加药物去除, 即得到抗人 Trop2 抗体-药物偶联物样品。

所得到的人 Trop2 抗体-药物偶联物样品将通过 SEC-HPLC 确定单体率, 通过 RP-HPLC 或者 HIC-HPLC 确定载药量。

实施例 94

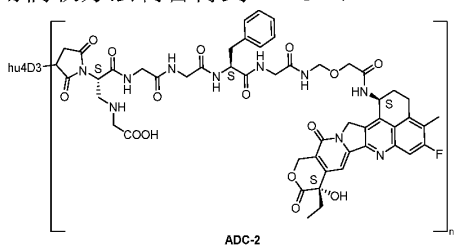
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-1,



30

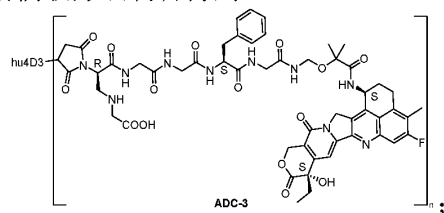
实施例 95

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-2,



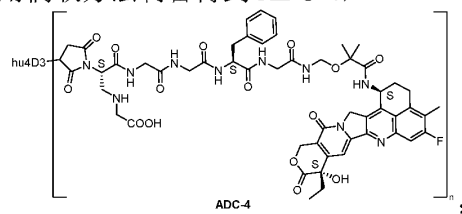
实施例 96

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-3,



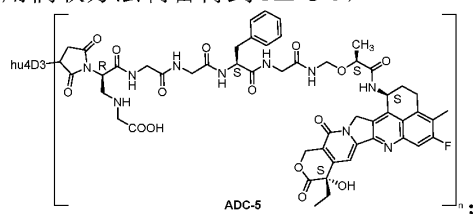
实施例 97

5 按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-4,



实施例 98

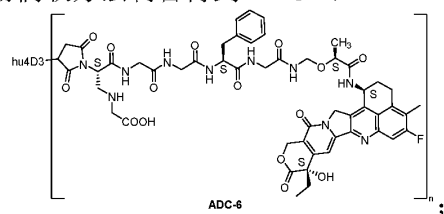
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-5,



10

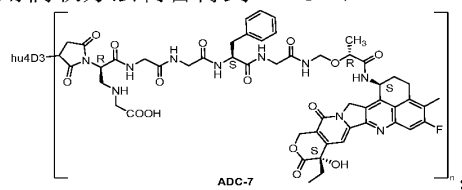
实施例 99

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-6,



实施例 100

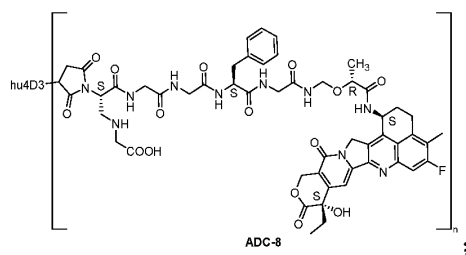
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-7,



15

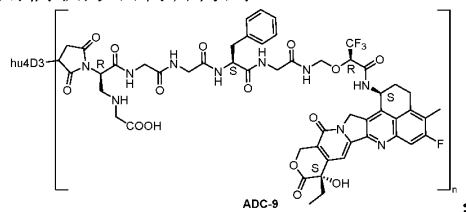
实施例 101

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-8,



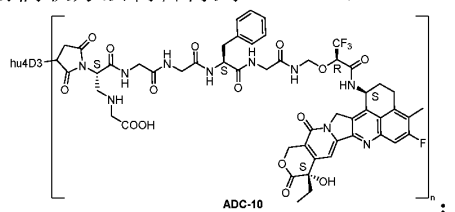
实施例 102

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-9,



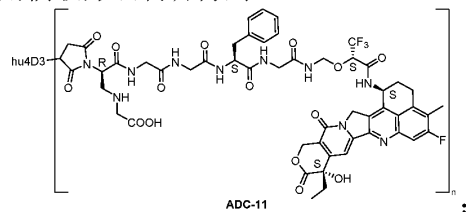
实施例 103

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-10,



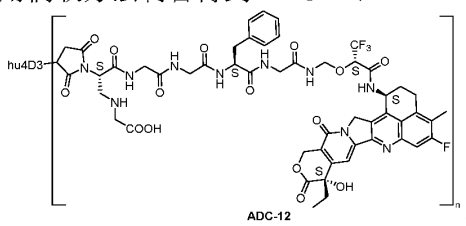
实施例 104

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-11,



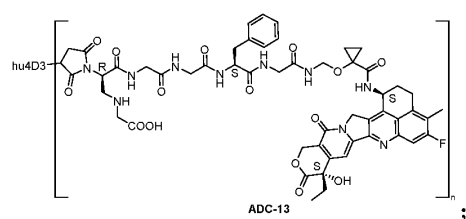
实施例 105

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-12,



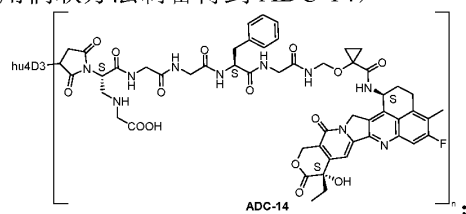
实施例 106

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-13,



实施例 107

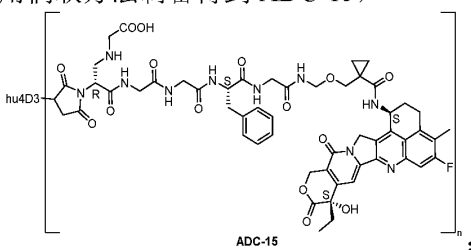
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-14,



5

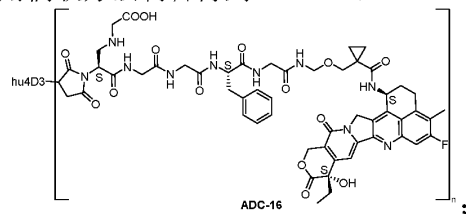
实施例 108

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-15,



实施例 109

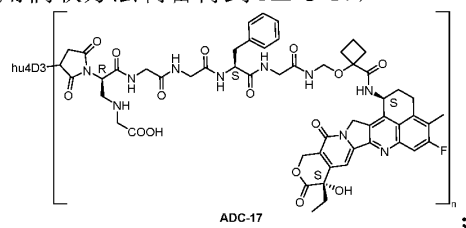
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-16,



10

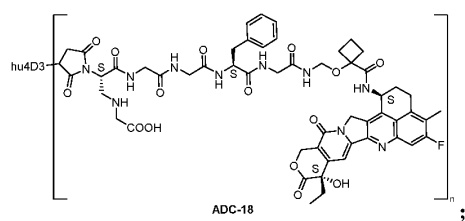
实施例 110

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-17,



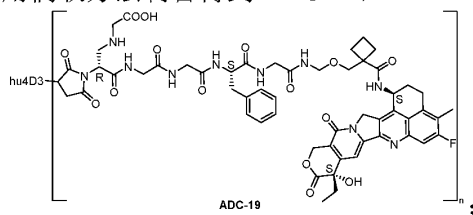
实施例 111

15 按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-18,



实施例 112

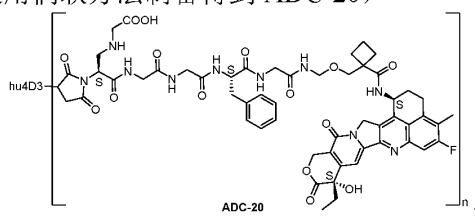
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-19,



5

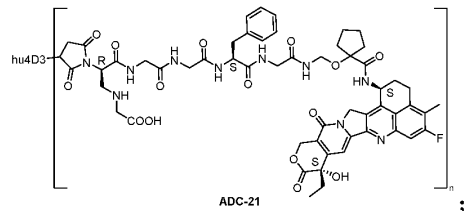
实施例 113

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-20,



实施例 114

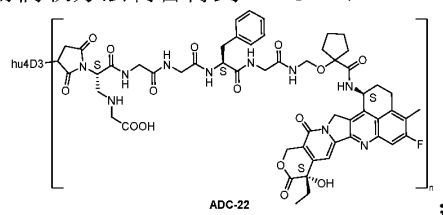
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-21,



10

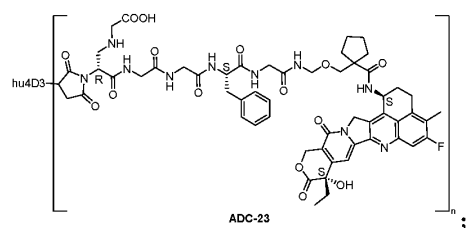
实施例 115

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-22,



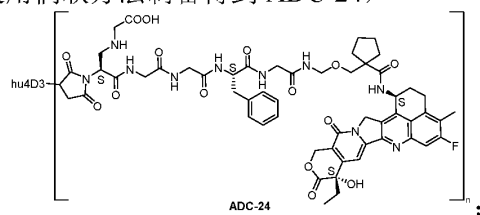
实施例 116

15 按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-23,



实施例 117

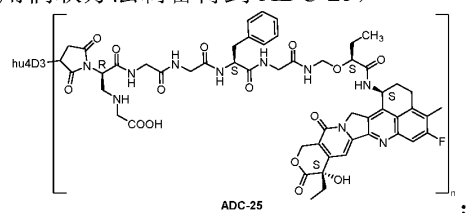
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-24,



5

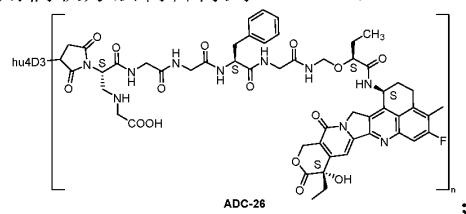
实施例 118

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-25,



实施例 119

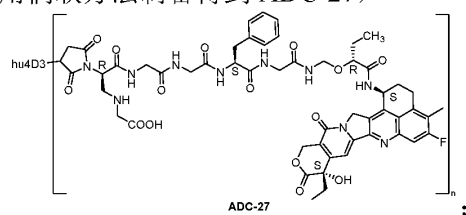
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-26,



10

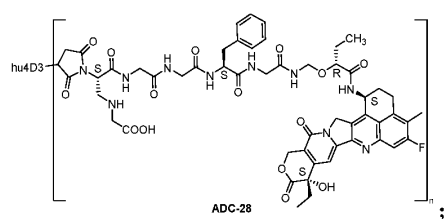
实施例 120

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-27,



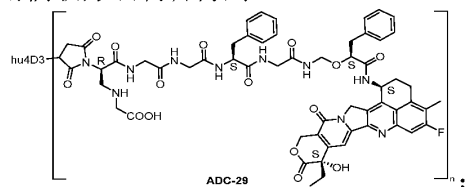
实施例 121

15 按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-28,



实施例 122

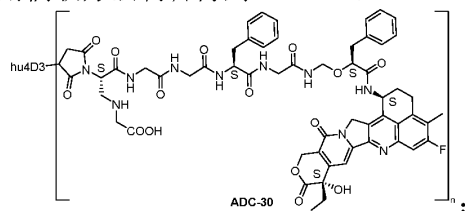
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-29,



5

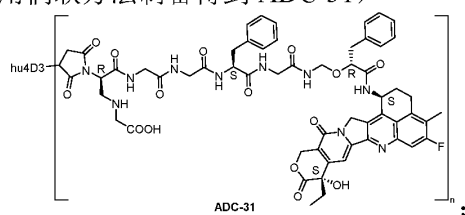
实施例 123

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-30,



实施例 124

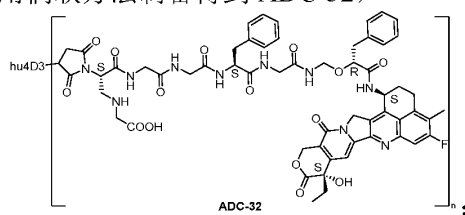
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-31,



10

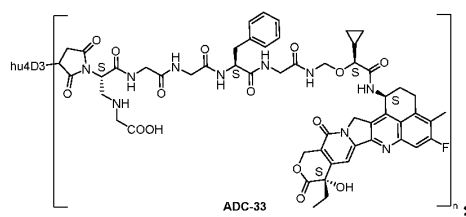
实施例 125

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-32,



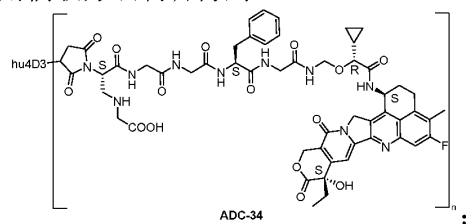
实施例 126

15 按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-33,



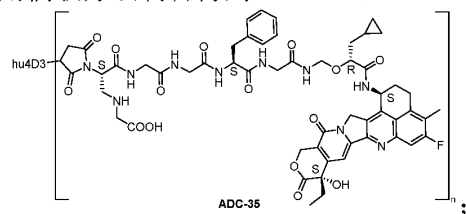
实施例 127

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-34,



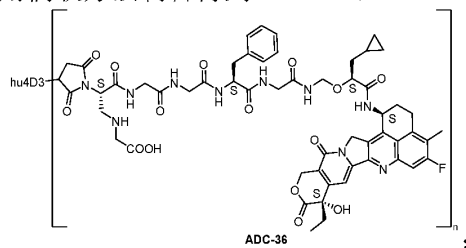
实施例 128

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-35,



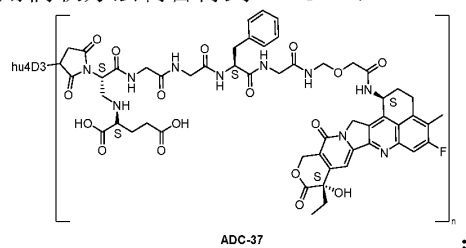
实施例 129

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-36,



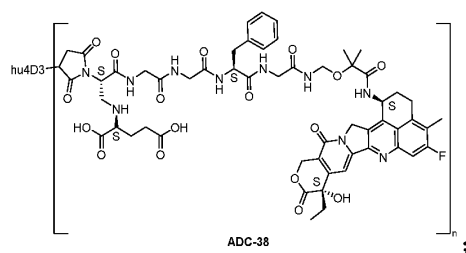
实施例 130

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-37,



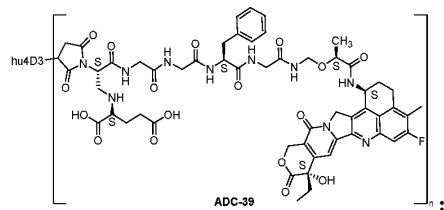
实施例 131

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-38,



实施例 132

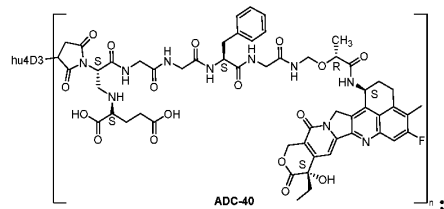
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-39,



5

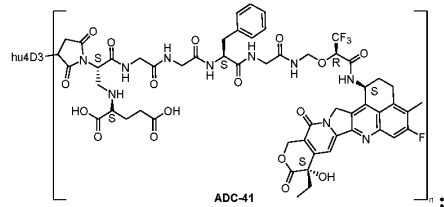
实施例 133

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-40,



实施例 134

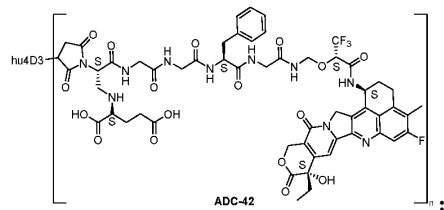
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-41,



10

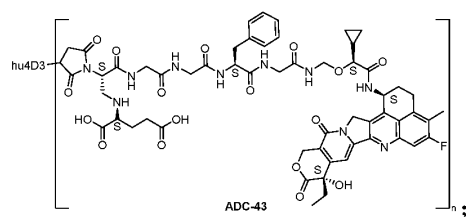
实施例 135

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-42,



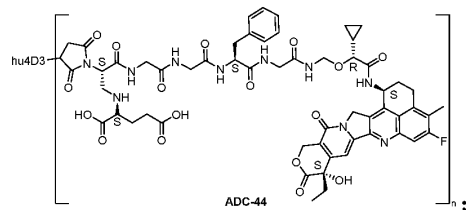
实施例 136

15 按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-43,



实施例 137

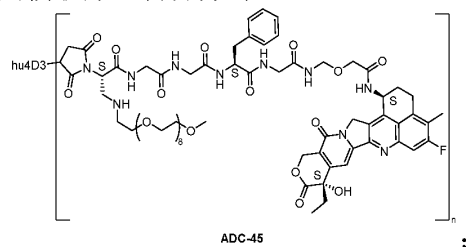
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-44,



5

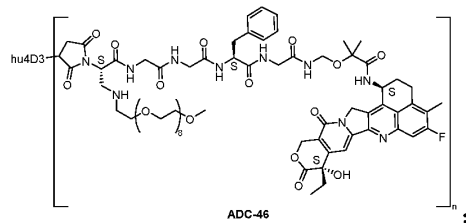
实施例 138

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-45,



实施例 139

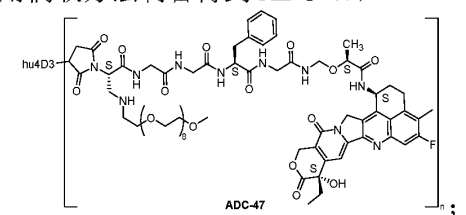
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-46,



10

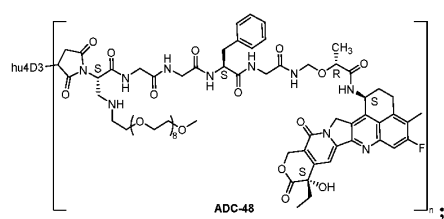
实施例 140

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-47,



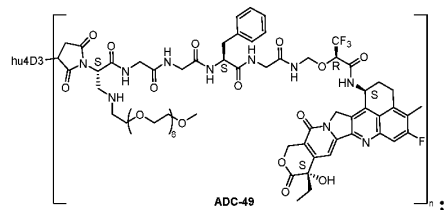
实施例 141

15 按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-48,



实施例 142

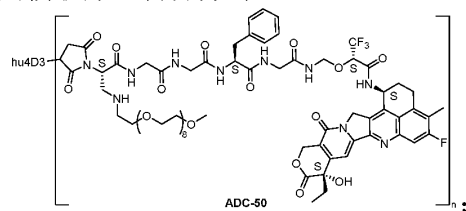
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-49,



5

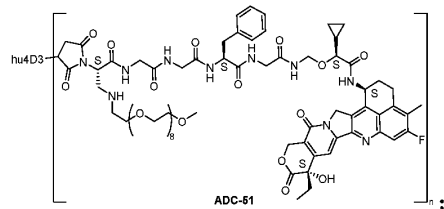
实施例 143

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-50,



实施例 144

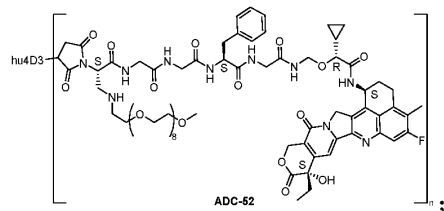
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-51,



10

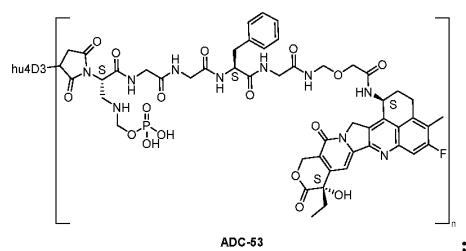
实施例 145

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-52,



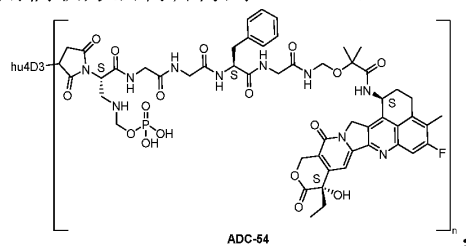
实施例 146

15 按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-53,



实施例 147

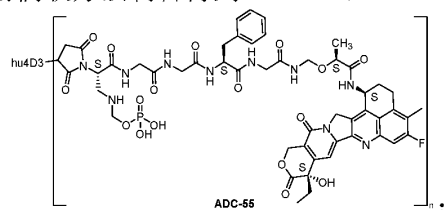
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-54,



5

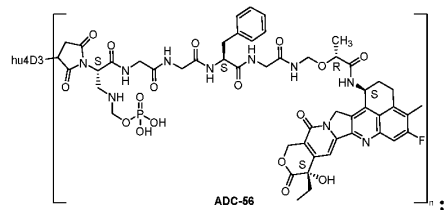
实施例 148

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-55,



实施例 149

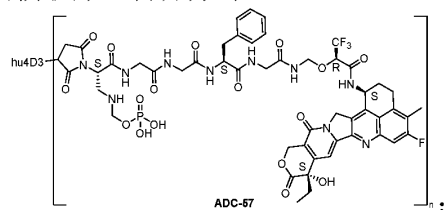
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-56,



10

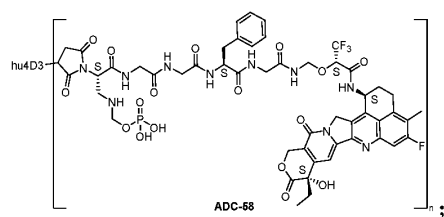
实施例 150

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-57,



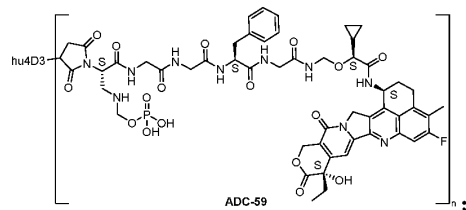
实施例 151

15 按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-58,



实施例 152

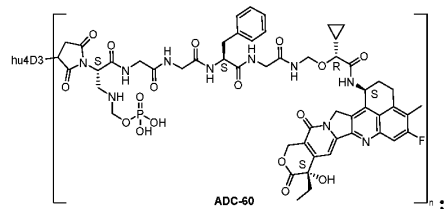
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-59,



5

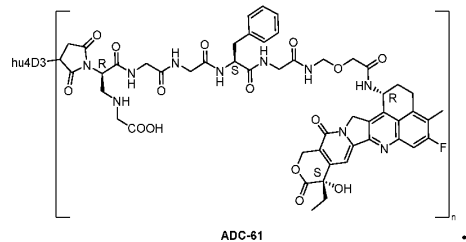
实施例 153

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-60,



实施例 154

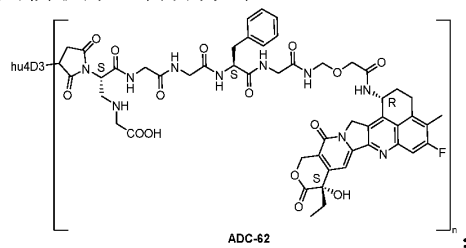
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-61,



10

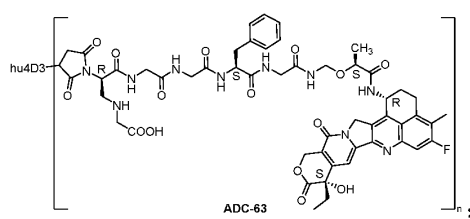
实施例 155

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-62,



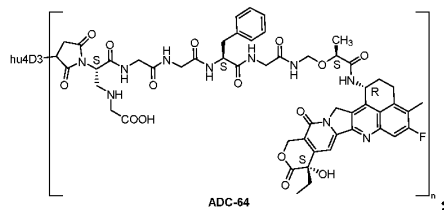
实施例 156

15 按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-63,



实施例 157

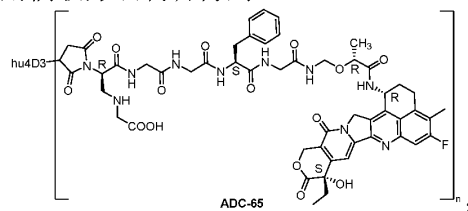
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-64,



5

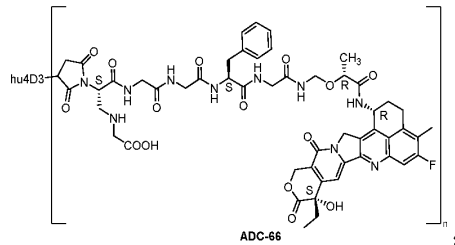
实施例 158

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-65,



实施例 159

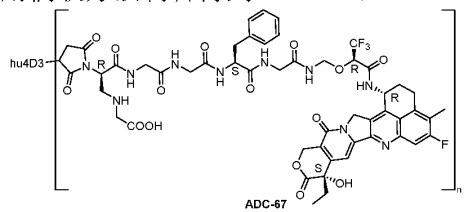
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-66,



10

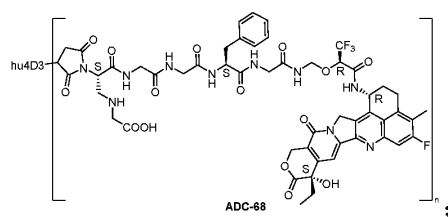
实施例 160

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-67,



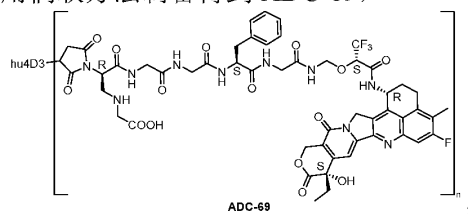
实施例 161

15 按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-68,



实施例 162

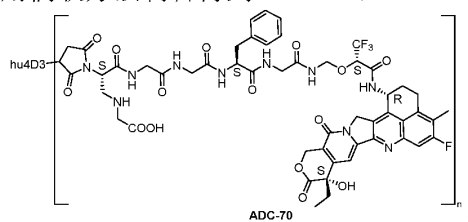
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-69,



5

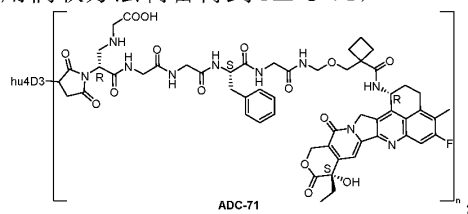
实施例 163

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-70,



实施例 164

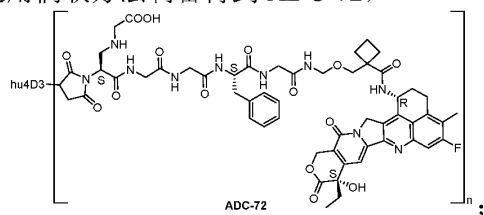
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-71,



10

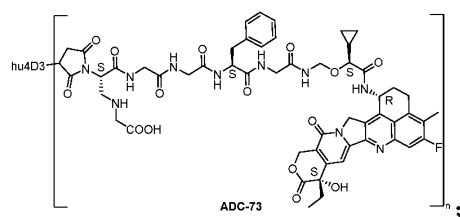
实施例 165

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-72,



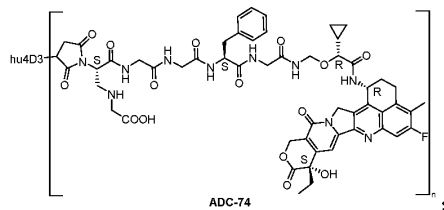
实施例 166

15 按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-73,



实施例 167

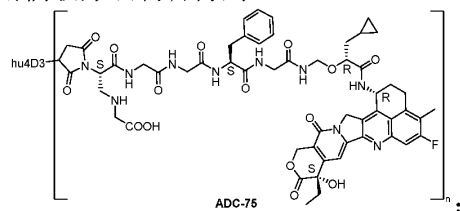
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-74,



5

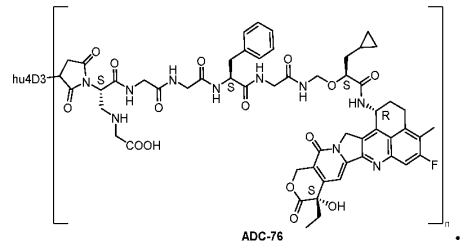
实施例 168

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-75,



实施例 169

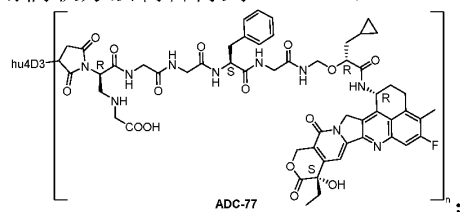
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-76,



10

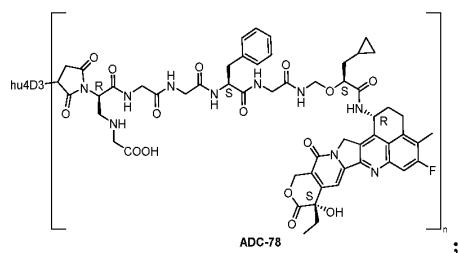
实施例 170

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-77,



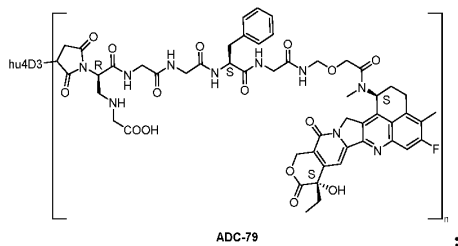
实施例 171

15 按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-78,



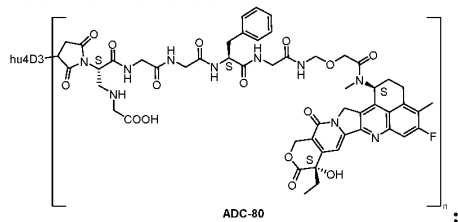
实施例 172

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-79,



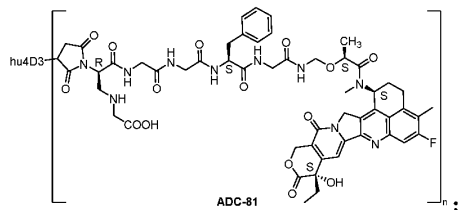
实施例 173

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-80,



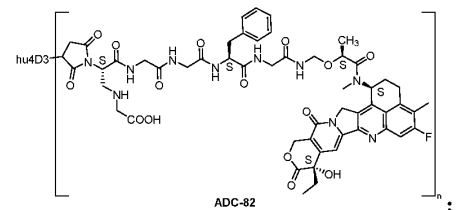
实施例 174

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-81,



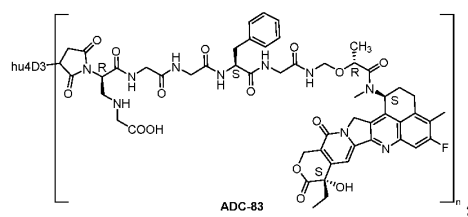
实施例 175

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-82,



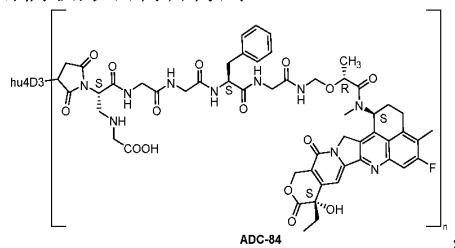
实施例 176

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-83,



实施例 177

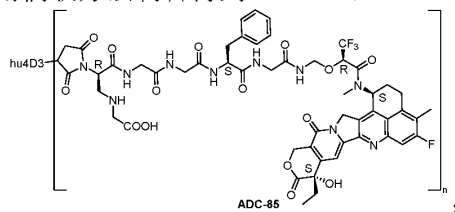
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-84,



5

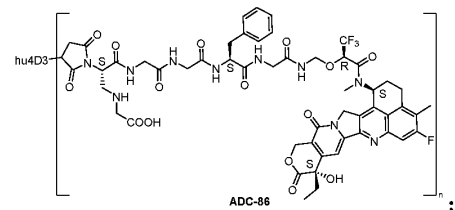
实施例 178

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-85,



实施例 179

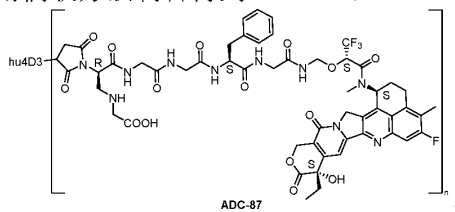
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-86,



10

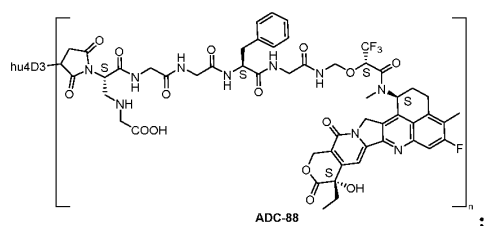
实施例 180

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-87,



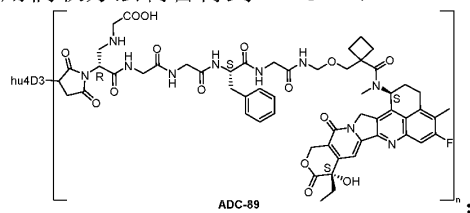
实施例 181

15 按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-88,



实施例 182

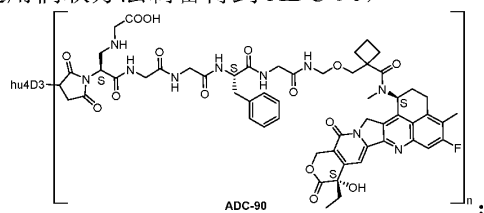
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-89,



5

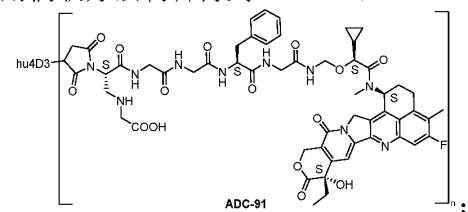
实施例 183

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-90,



实施例 184

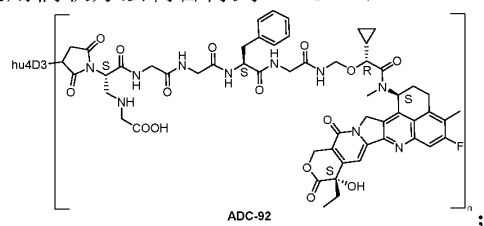
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-91,



10

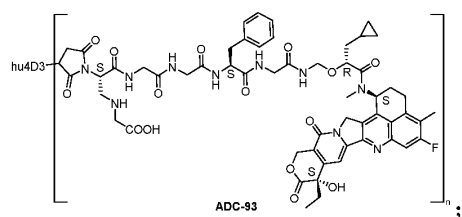
实施例 185

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-92,



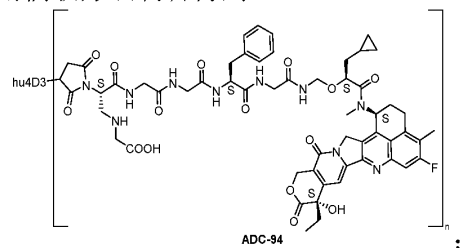
实施例 186

15 按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-93,



实施例 187

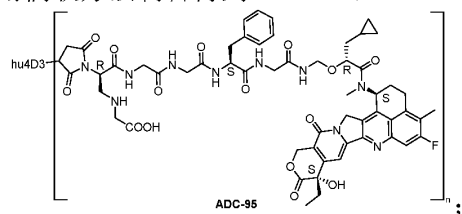
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-94,



5

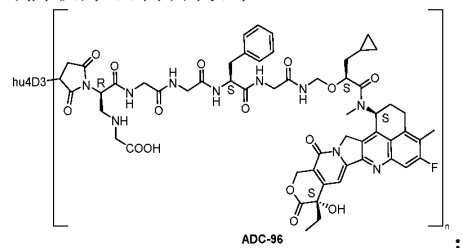
实施例 188

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-95,



实施例 189

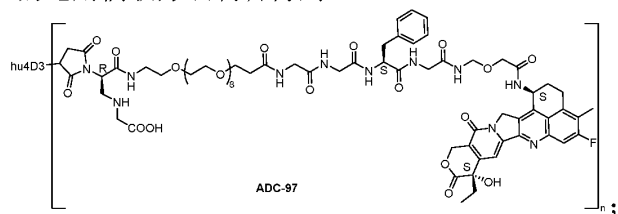
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-96,



10

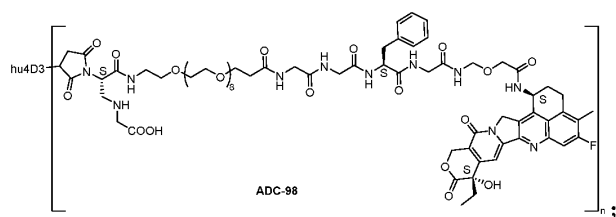
实施例 190

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-97,



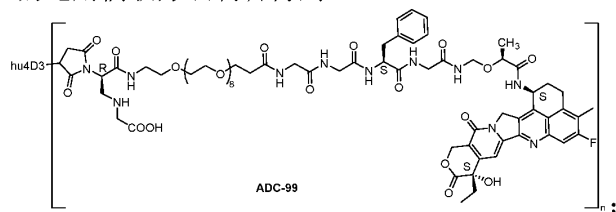
实施例 191

15 按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-98,



实施例 192

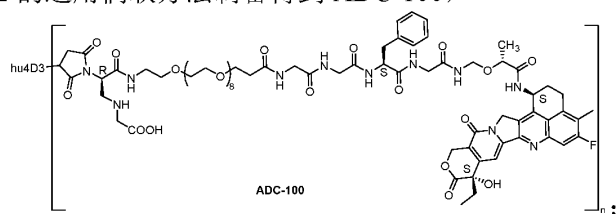
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-99,



5

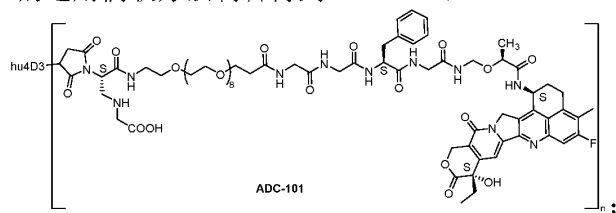
实施例 193

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-100,



实施例 194

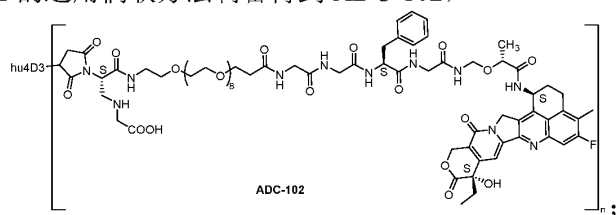
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-101,



10

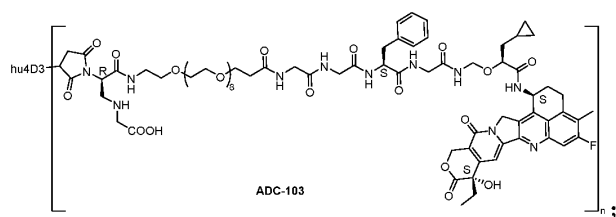
实施例 195

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-102,



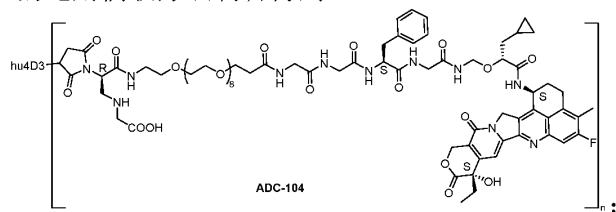
实施例 196

15 按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-103,



实施例 197

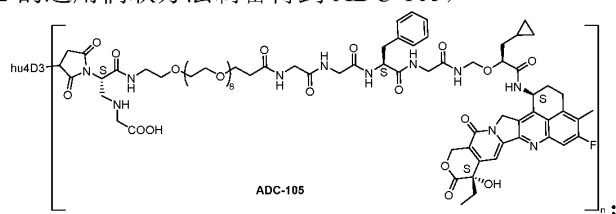
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-104,



5

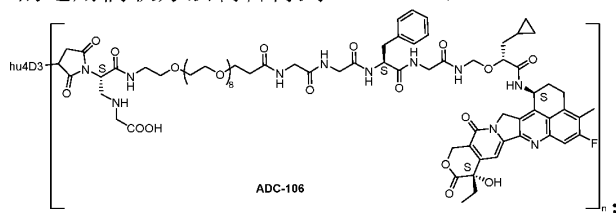
实施例 198

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-105,



实施例 199

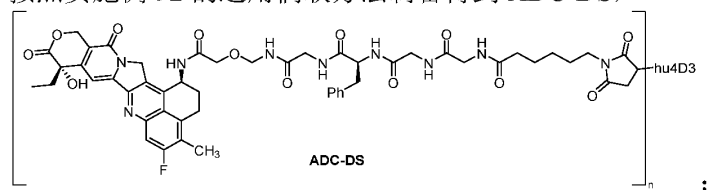
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-106,



10

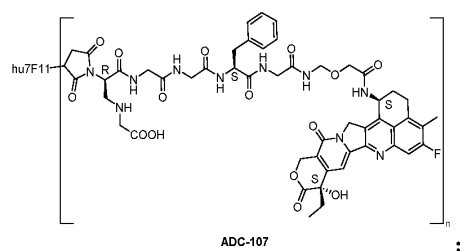
实施例 200

化合物 45 按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-DS,



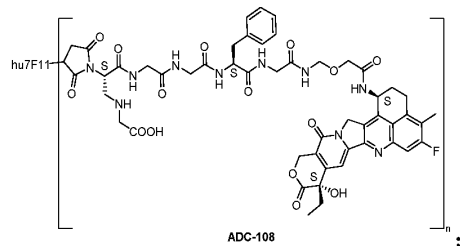
实施例 201

15 按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-107,



实施例 202

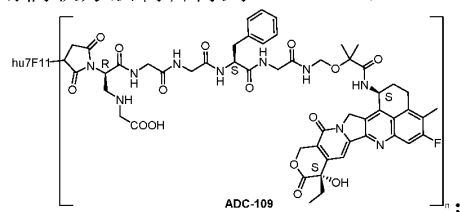
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-108,



5

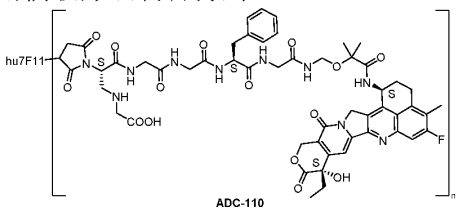
实施例 203

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-109,



实施例 204

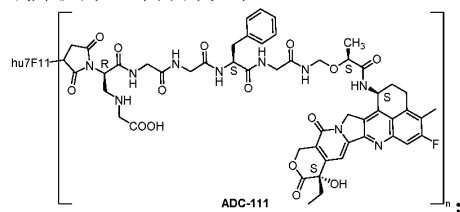
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-110,



10

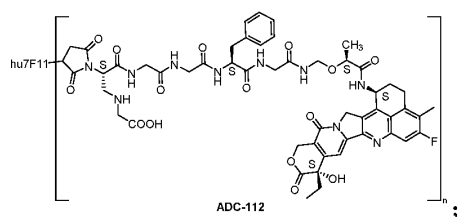
实施例 205

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-111,



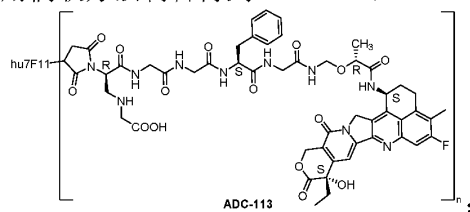
实施例 206

15 按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-112,



实施例 207

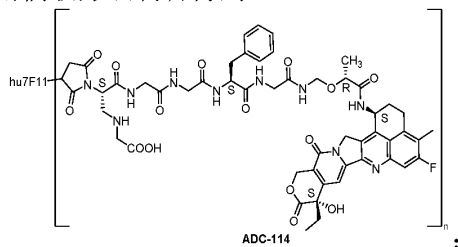
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-113,



5

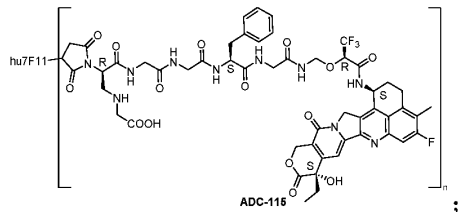
实施例 208

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-114,



实施例 209

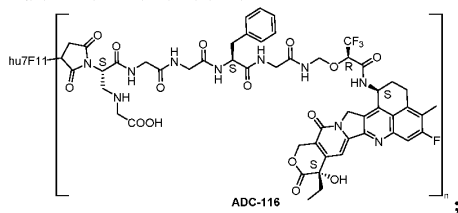
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-115,



10

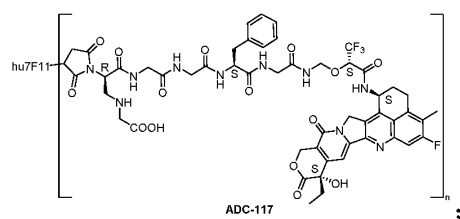
实施例 210

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-116,



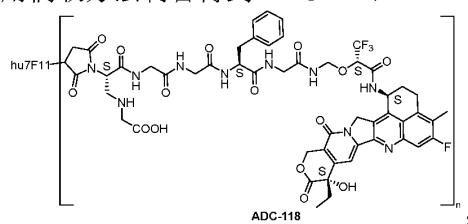
实施例 211

15 按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-117,



实施例 212

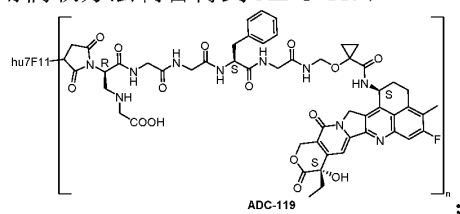
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-118,



5

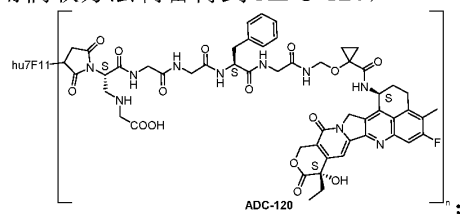
实施例 213

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-119,



实施例 214

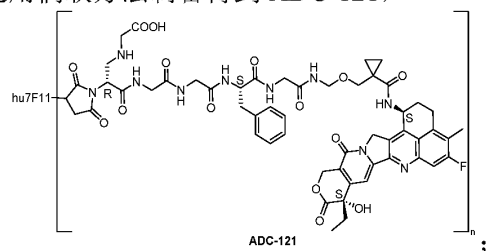
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-120,



10

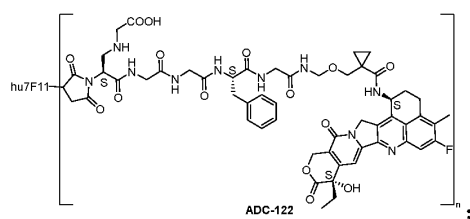
实施例 215

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-121,



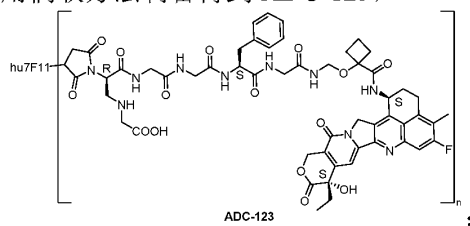
实施例 216

15 按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-122,



实施例 217

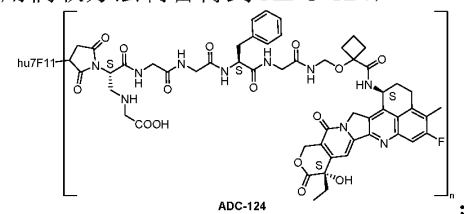
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-123,



5

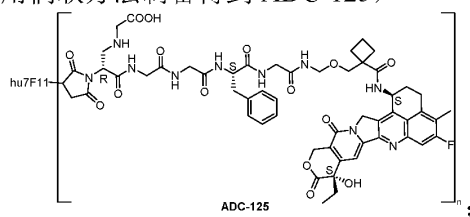
实施例 218

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-124,



实施例 219

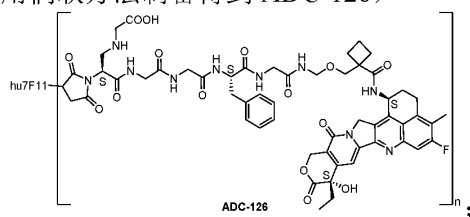
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-125,



10

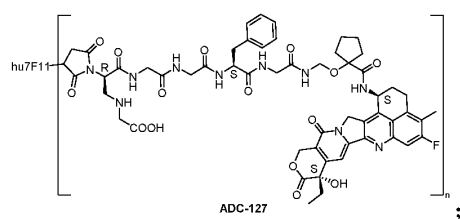
实施例 220

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-126,



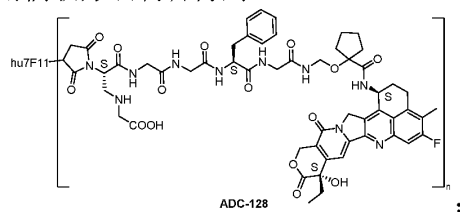
实施例 221

15 按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-127,



实施例 222

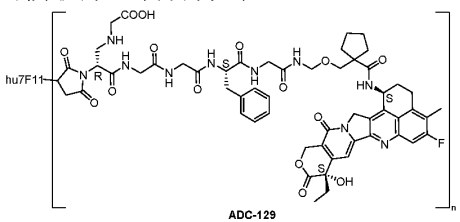
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-128,



5

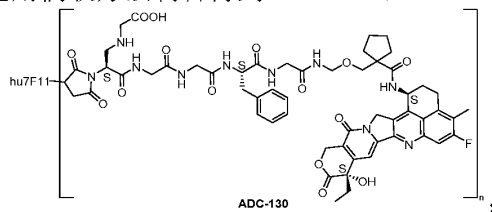
实施例 223

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-129,



实施例 224

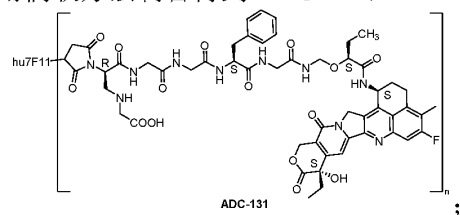
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-130,



10

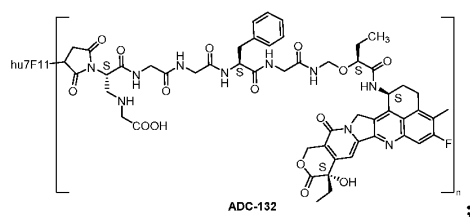
实施例 225

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-131,



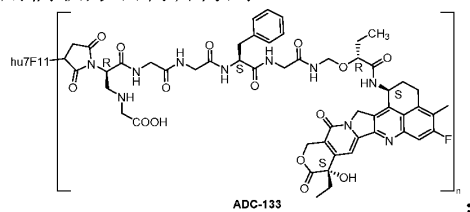
实施例 226

15 按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-132,



实施例 227

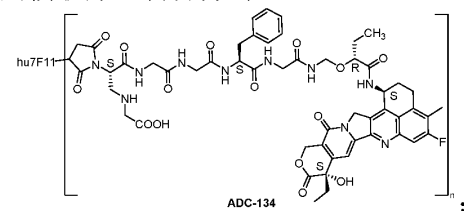
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-133,



5

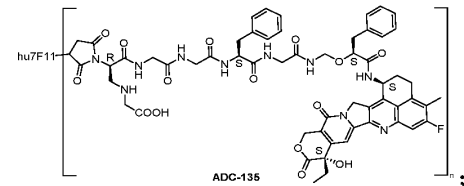
实施例 228

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-134,



实施例 229

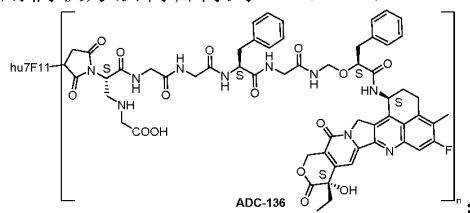
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-135,



10

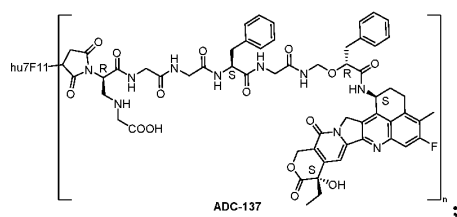
实施例 230

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-136,



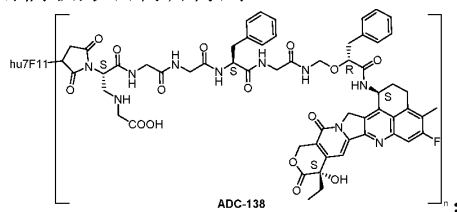
实施例 231

15 按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-137,



实施例 232

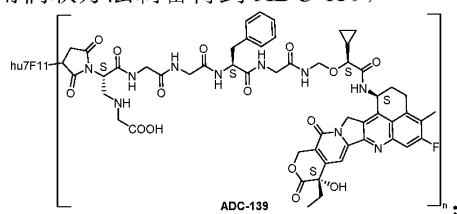
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-138,



5

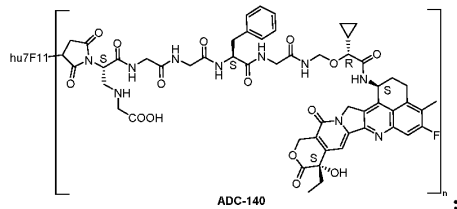
实施例 233

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-139,



实施例 234

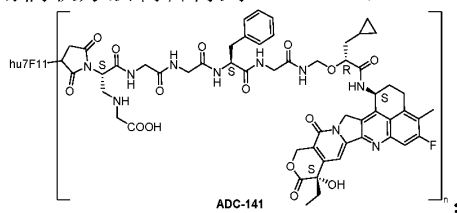
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-140,



10

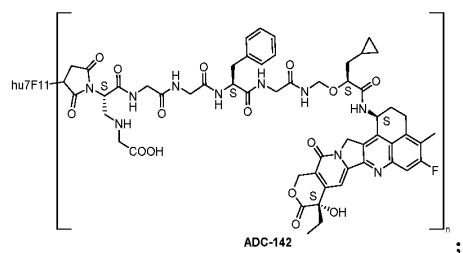
实施例 235

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-141,



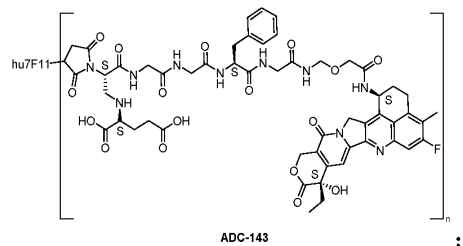
实施例 236

15 按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-142,



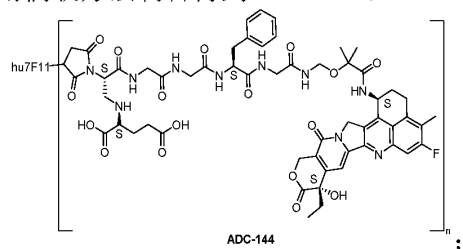
实施例 237

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-143,



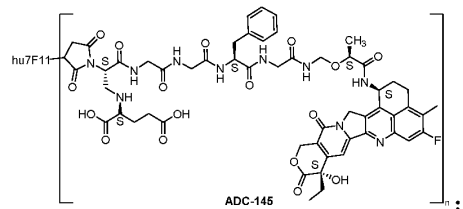
实施例 238

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-144,



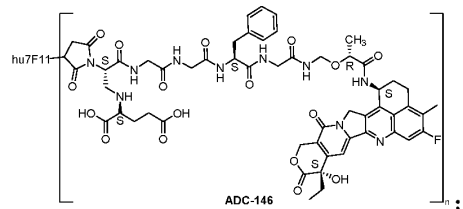
实施例 239

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-145,



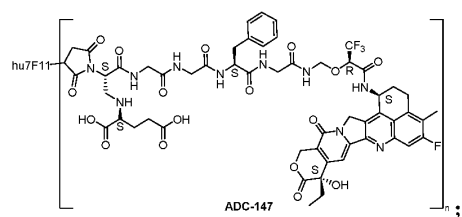
实施例 240

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-146,



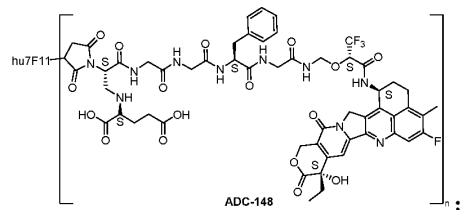
实施例 241

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-147,



实施例 242

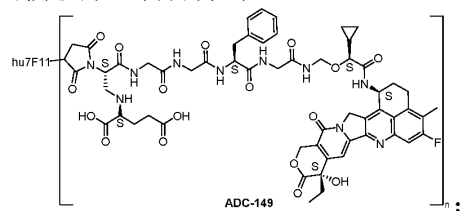
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-148,



5

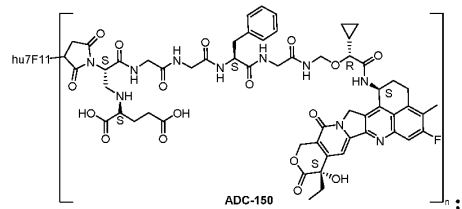
实施例 243

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-149,



实施例 244

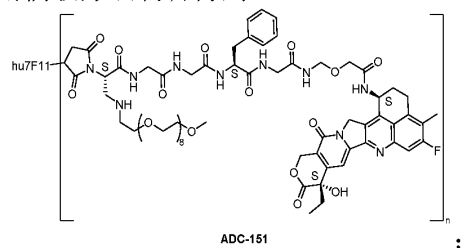
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-150,



10

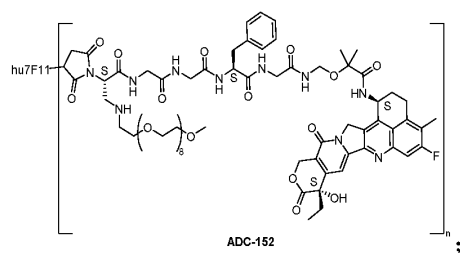
实施例 245

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-151,



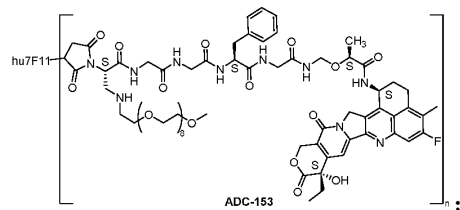
实施例 246

15 按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-152,



实施例 247

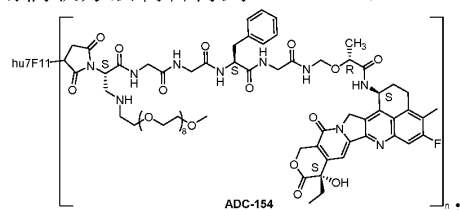
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-153,



5

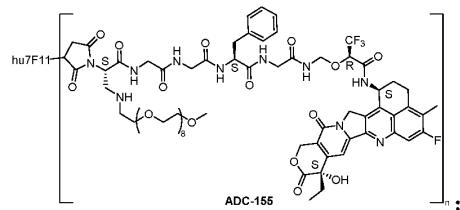
实施例 248

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-154,



实施例 249

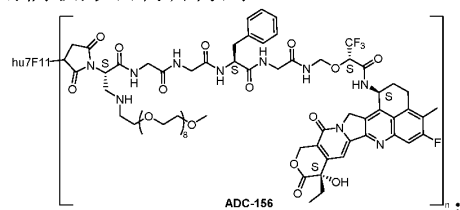
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-155,



10

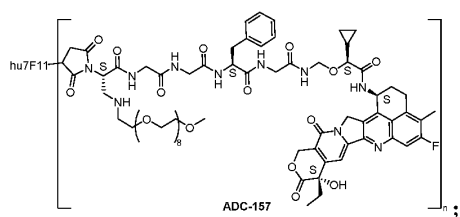
实施例 250

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-156,



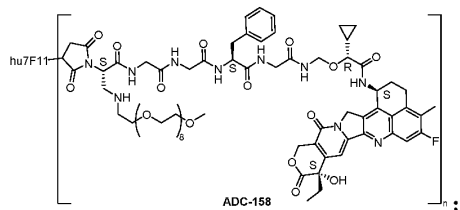
实施例 251

15 按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-157,



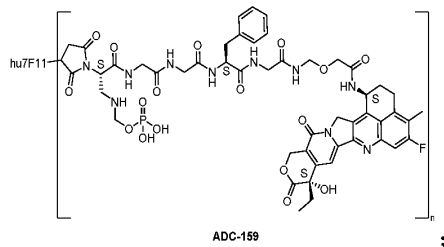
实施例 252

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-158,



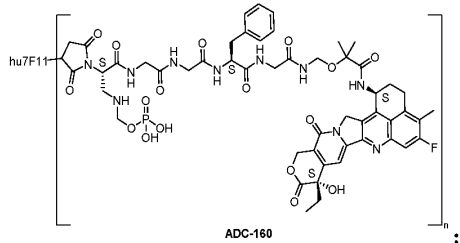
实施例 253

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-159,



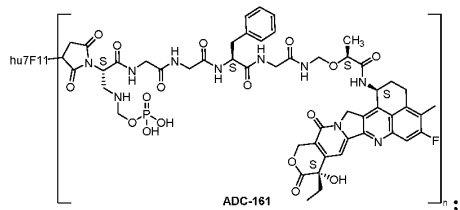
实施例 254

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-160,



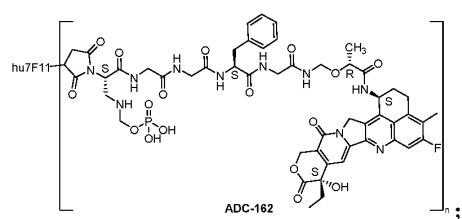
实施例 255

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-161,



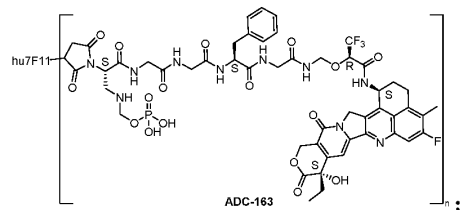
实施例 256

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-162,



实施例 257

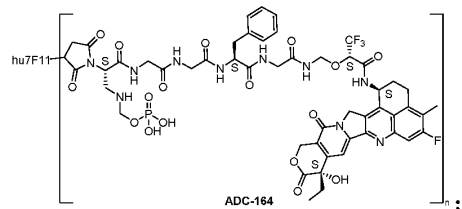
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-163,



5

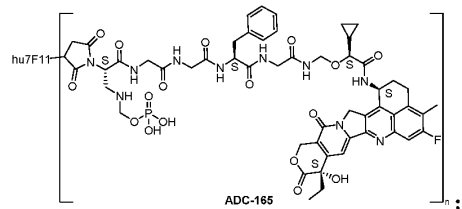
实施例 258

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-164,



实施例 259

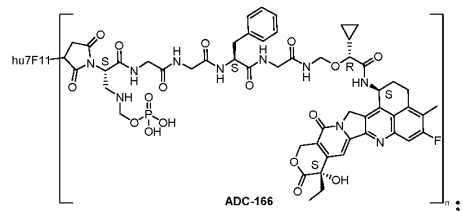
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-165,



10

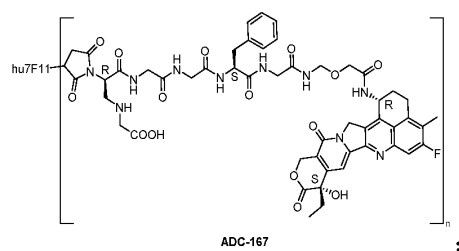
实施例 260

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-166,



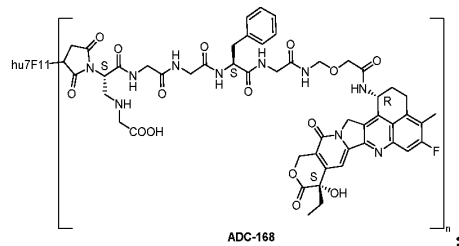
实施例 261

15 按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-167,



实施例 262

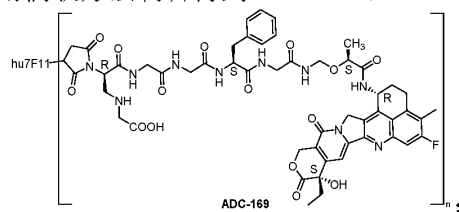
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-168,



5

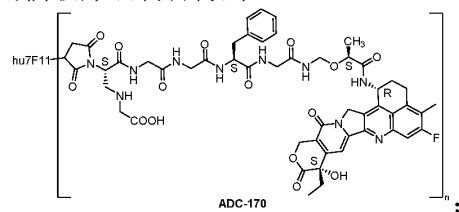
实施例 263

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-169,



实施例 264

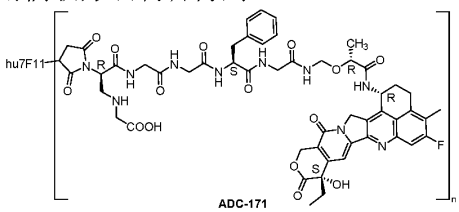
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-170,



10

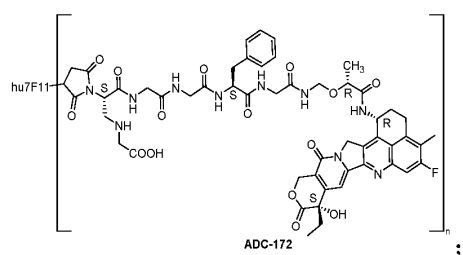
实施例 265

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-171,



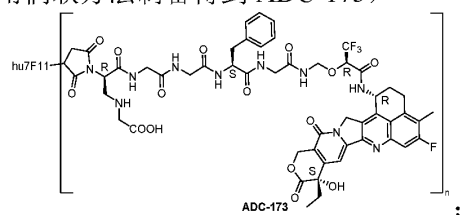
实施例 266

15 按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-172,



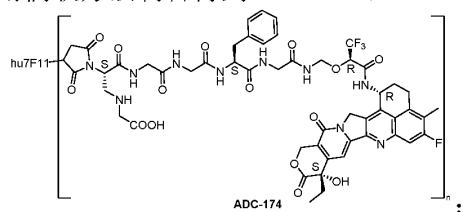
实施例 267

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-173,



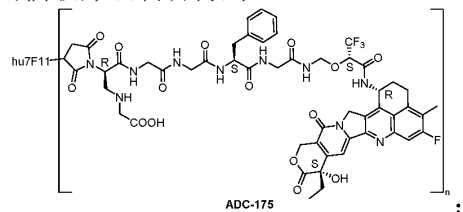
实施例 268

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-174,



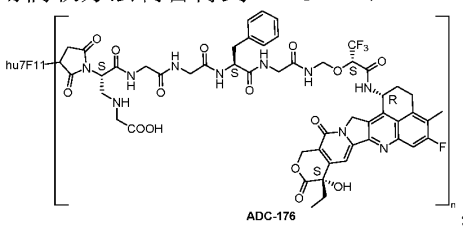
实施例 269

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-175,



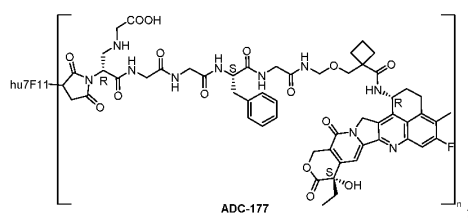
实施例 270

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-176,



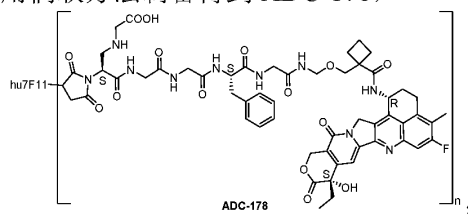
实施例 271

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-177,



实施例 272

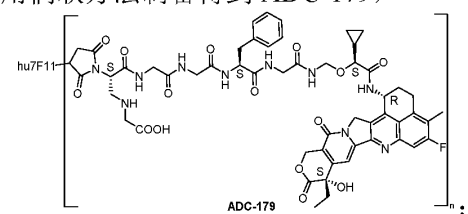
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-178,



5

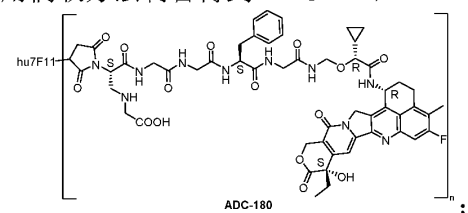
实施例 273

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-179,



实施例 274

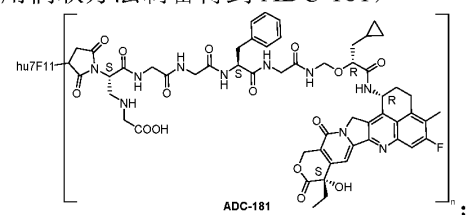
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-180,



10

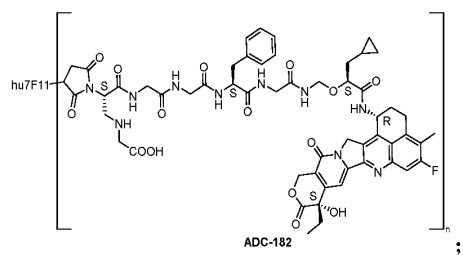
实施例 275

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-181,



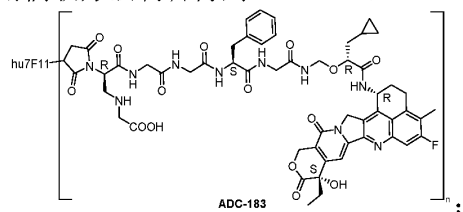
实施例 276

15 按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-182,



实施例 277

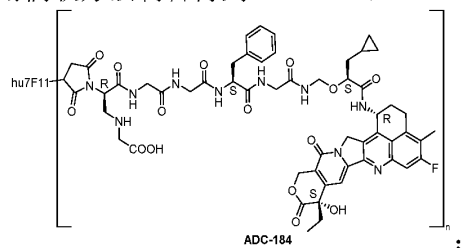
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-183,



5

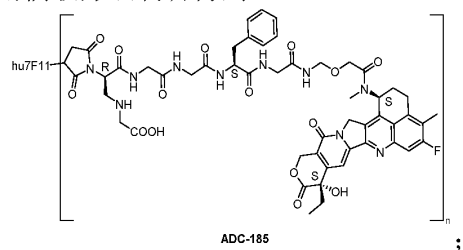
实施例 278

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-184,



实施例 279

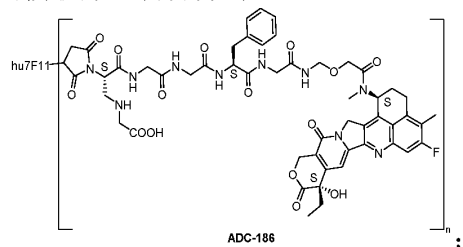
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-185,



10

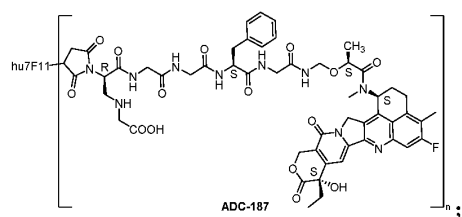
实施例 280

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-186,



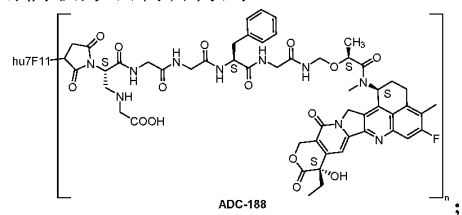
实施例 281

15 按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-187,



实施例 282

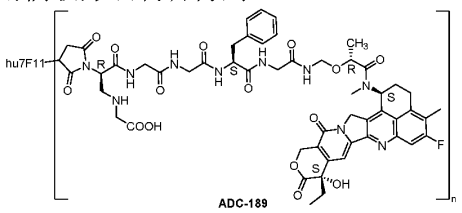
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-188,



5

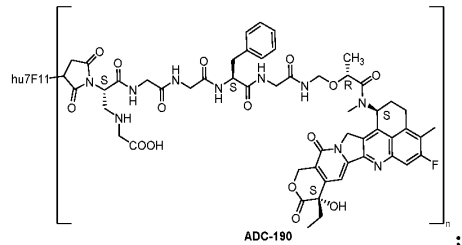
实施例 283

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-189,



实施例 284

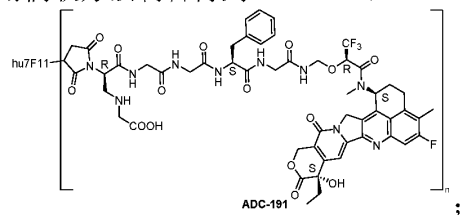
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-190,



10

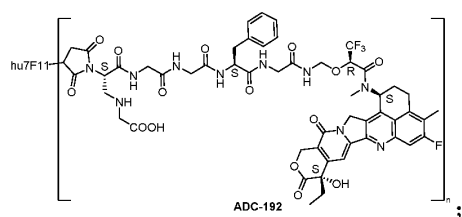
实施例 285

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-191,



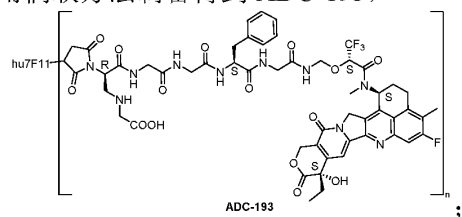
实施例 286

15 按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-192,



实施例 287

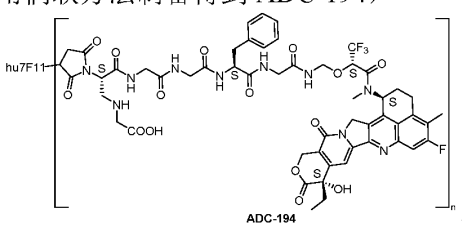
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-193,



5

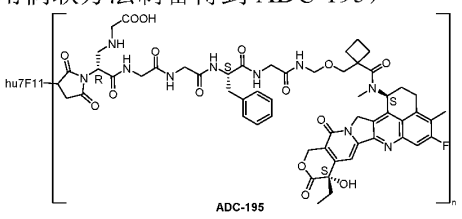
实施例 288

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-194,



实施例 289

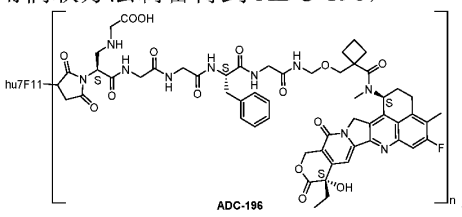
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-195,



10

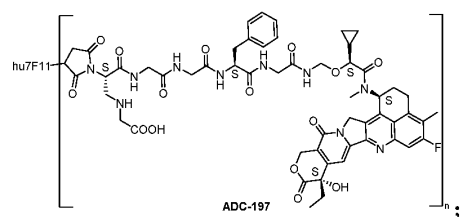
实施例 290

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-196,



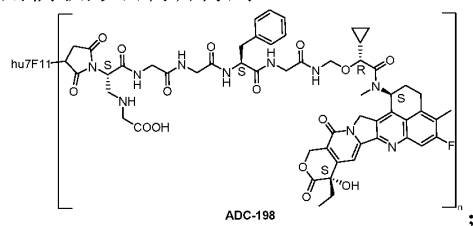
实施例 291

15 按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-197,



实施例 292

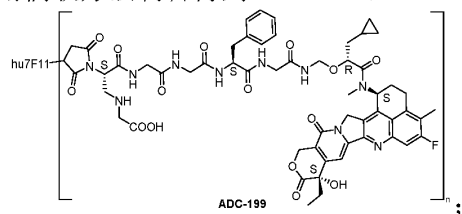
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-198,



5

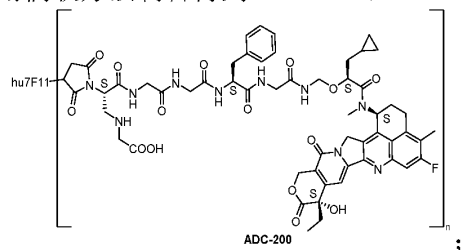
实施例 293

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-199,



实施例 294

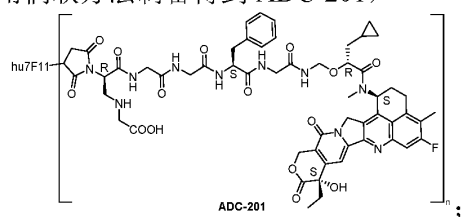
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-200,



10

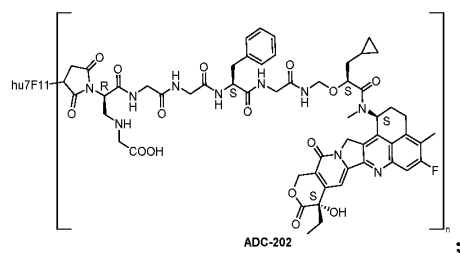
实施例 295

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-201,



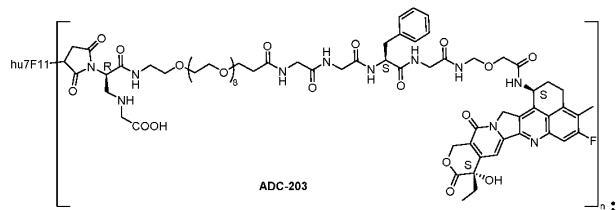
实施例 296

15 按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-202,



实施例 297

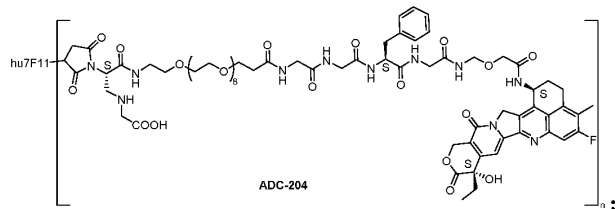
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-203,



5

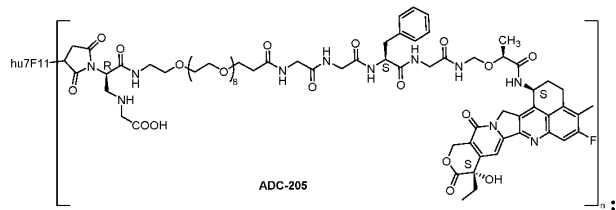
实施例 298

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-204,



实施例 299

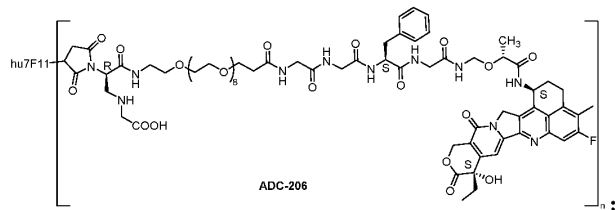
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-205,



10

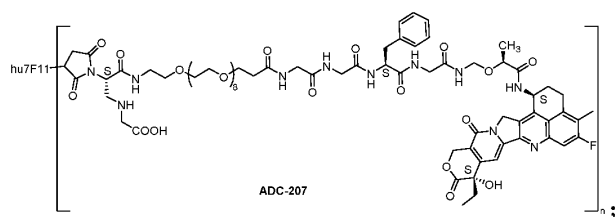
实施例 300

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-206,



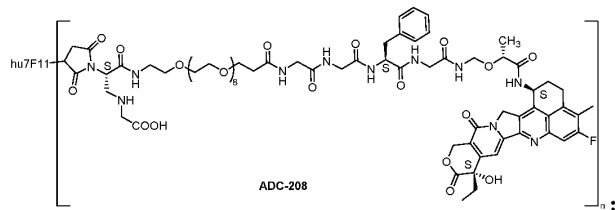
实施例 301

15 按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-207,



实施例 302

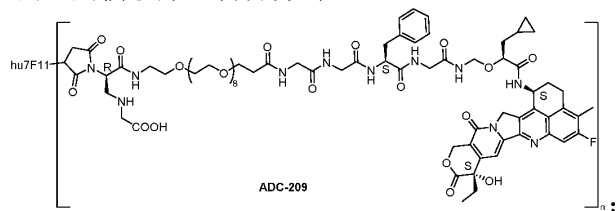
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-208,



5

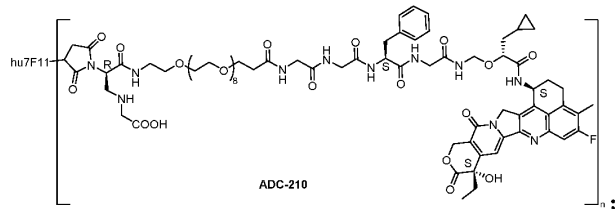
实施例 303

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-209,



实施例 304

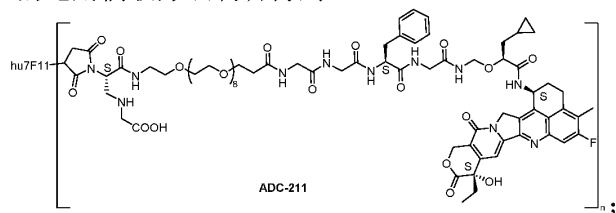
按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-210,



10

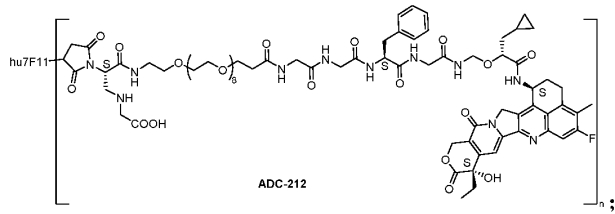
实施例 305

按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-211,



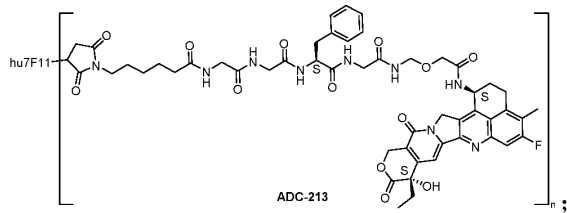
实施例 306

15 按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-212,



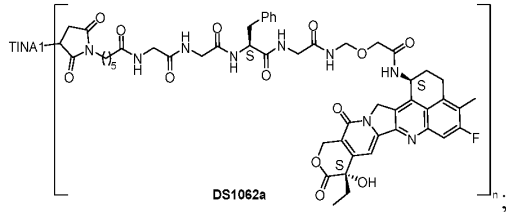
实施例 307

化合物 45 按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 ADC-213,



5 实施例 308

化合物 5A 按照实施例 92 的通用偶联方法制备得到 DS1062a,



其中 TINA1 抗体为靶向 trop2 的抗体, n 选自 4 或 8。

实施例 309

10 使用 SEC-HPLC 方法测定单体率方法 1:

色谱柱: Biocore SEC-300 5 μm, 4.6×300 mm;

厂家: NanoChrom, 货号: B213-050030-04630S;

流动相: 50 mM PB+300 mM NaCl+200 mM Arg+5% IPA, pH=6.5;

表 1: 方法参数

参数	设置
流速	0.3 mL/min
波长	214 nm 和 280 nm
柱温	30 °C
样品盘温度	室温
进样量	20 ug
最大压力	150 bar/15 MPa/2175 PSI
梯度	等度
运行时间	20 分钟

15 使用 SEC-HPLC 方法测定单体率方法 2:

色谱柱: ACQUITY UPLC Protein SEC 4.6x150mm 1.7μm

厂家: waters 货号:186005225

流动相: 50 mM PB+300 mM NaCl+200 mM Arg+5% IPA, pH=6.5

表 2: 方法参数

流速	0.8 mL/min
波长	214 nm 和 280 nm
柱温	30 °C
梯度	等度
运行时间	12 分钟
确认	方法参数确认

5 表 3. 本发明公开配体-药物偶联物(ADC)单体率数据

分子名称	降解%	聚集体%	单体率%
DS1062a (DAR=4)	0.108	3.431	96.461
ADC-1	0	2.956	97.044
ADC-2	0	1.276	98.724
ADC-6	0	1.236	98.764
ADC-10	0	2.530	97.470

结论: 本发明公开的 ADC 具有低降解率, 低聚集率的特点, 具有单体率高的优异性质。

实施例 310

10 使用 RP-HPLC 方法测定药物抗体比例 DAR:

色谱柱名称: Proteomix RP-1000 4.6×100 mm 5 μm 1000A; 厂家: Sepax;

表 4: 方法参数

参数	设置			
流动相	A :0.1%TFA 水溶液; B: 0.1%TFA 乙腈溶液			
流速	0.5 mL/min			
波长	214 nm 和 280 nm			
柱温	65 °C			
样品盘温度	室温			
进样量	25 ug			
最大压力	100bar/10MPa/1450PSI			
梯度	时间 (min)	流速 (mL/min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
	0.0	0.5	75	25
	3	0.5	75	25
	28	0.5	50	50
	30	0.5	5	95
	32	0.5	5	95
	33	0.5	75	25

	40	0.5	75	25
--	----	-----	----	----

表 5: ADC 药物-抗体偶联比 (DAR) 详细数据

样品名	RP-DAR
DS1062a	4.13
ADC-1	7.62
ADC-2	7.51
ADC-12	7.54
ADC-6	7.38
ADC-10	7.62
ADC-70	7.52
ADC-72	7.39
ADC-73	6.95
ADC-176	7.54
ADC-178	7.37
ADC-179	6.75

结论: 本发明公开的 ADC 具有 DAR 值高的优异性质, 在相同剂量 ADC 药物的给药剂量下, 可以显著提高靶点位置的药物浓度。

实施例 311

ADC 血浆稳定性数据:

配置 ADC 与去 IgG 的血浆混合液, 使 ADC 的终浓度为 0.6 mg/mL, 放置于 37 °C 恒温箱中的水浴盒中孵育, 孵育时间设置为 0 天, 3 天, 7 天, 同时设置血浆未孵育对照。孵育后的样品经纯化提取后测定药物抗体比例 DAR, 用来反映 ADC 在血浆中的稳定性。

表 6 ADC 药物的血浆稳定性

名称	DAR			
	血浆未孵育	血浆孵育 0 天	血浆孵育 3 天	血浆孵育 7 天
ADC-6	7.38	7.30	7.25	7.26
DS-1062a (in house, DAR=4)	4.13	4.21	3.75	3.30
DS-1062a (in house, DAR=8)	7.62	7.49	6.59	5.81

结论: 本发明公开的 ADC 血浆稳定性较好, 血浆孵育中未出现 DAR 值的大变化。而对照品 DS-1062a 在血浆孵育过程中 DAR 有显著的下降, 血浆稳定性较差。

实施例 312

ADC 保持了对应的原始抗人 Trop2 抗体 hu4D3 和 hu7F11 对于 TROP2 的亲合力:

用双抗原夹心 ELISA 法对比 hu4D3 与 ADC-6, ADC10, ADC12; TINA1 与 ADC-1 和 DS1062a 对于 TROP2 的相对亲和力。

具体步骤如下：

重组 TROP2-His*6 抗原包板，1%牛血清蛋白封闭后；分别稀释 hu4D3 和对应的 ADC 及 TINA1 和对应的 ADC，分别再以起始浓度 2000 ng/mL，连续 3 倍梯度稀释，共 11 个浓度；样品在包被过的酶标板上孵育一段时间后，再加入羊抗人 Fc-HRP 标记的二抗孵育；最后进行 TMB 显色，硫酸溶液终止，在酶标仪上检测 450 nm 处的吸光值。检测结果以 OD450 nm 对浓度作图。

结论：如附图 3A~3F 显示，偶联后的 ADC 与对应的抗体保持了相似的亲和力，EC50 值无显著差异；说明 hu4D3 偶联毒素后，不影响其与抗原的亲和力。

实施例 313

体外药效检测：

本发明中利用人源肿瘤细胞株（BxPC-3）作为实验模型，以评价 ADC 偶联药物的体外药效。接种一定数目的肿瘤细胞系于 96 孔板中，向细胞中加入梯度稀释的受试抗体及对应的 ADC 药物，处理 5 天，利用 MTS 检测细胞活力，通过计算 IC50 评价受试抗体及 ADC 对肿瘤细胞系的体外抑制效果。抗体药物起始浓度为 500 nM，稀释倍数为 7 倍，共 8 个浓度点，处理 5 天。最终算法按照存活率=(实验组-空白)/(对照组-空白组)×100%，随后利用 Graph Pad Prism 拟合曲线，计算半数抑制浓度(IC50)。

表 7：受试物 Hu4D3 裸抗与 ADC-2、ADC-12、ADC-6、ADC-10, TINA1 裸抗与 DS1062a 在人源肿瘤细胞株 BxPC-3 中的体外药效结果：

Group	名称	IC50(nM)
BxPC-3	hu4D3	>500
	TINA1	>500
	ADC-2	84.87
	ADC-12	2.13
	ADC-6	3.31
	ADC-10	35.92
	DS1062a	307.60

结论：如表 7 及附图 4 所示，在 BxPC-3 细胞中，裸抗 TINA1 与 hu4D3 均未见明显的肿瘤细胞杀伤活性；本发明的 ADC-2、ADC-6、ADC-10 及 ADC-12 相较于 DS1062a 的体外杀伤活性明显更强。

实施例 314

体内药效检测：

本发明中利用 BALB/c 裸鼠皮下接种多种人源肿瘤细胞株（BXPC3，A431+SW620）作为实验模型，以评价 ADC 偶联药物的体内药效。接种一定数目的肿瘤细胞系于 BALB/c 裸鼠皮下中，当肿瘤体积长至 150-300mm³ 时，尾静脉注射抗体及对应的 ADC 药物，每周一次，给药四次，持续观察，每周两次测

瘤，评价受试抗体及 ADC 对肿瘤细胞系的抑制效果。

结论：

在 TROP2 中高表达细胞株 BXP3 的荷瘤小鼠药效实验中， ADC-6、ADC-10、ADC-12 体内药效实验结果优于 DS1062a。

5 在 A431+SW620 异质瘤中， ADC-6 和 ADC-12 体内药效实验结果优于 DS1062a，具有很好的“旁观者效应”(bystander effect)。

实施例 315

Linker-drug 化合物 5A 的体外药效：

1)实验材料：

10 细胞：测试用细胞来源于中国科学院细胞库；

细胞培养基 DMEM： Gibco；

FBS： BOWEST。

2)培养基的配制：

生长培养基(with 10%FBS, Penicillin/streptomycin(100U/mL)；

15 检测培养基(with 1%FBS, Penicillin/streptomycin(100U/mL)。

3)操作：

提前 30 min 开启生物安全柜紫外灯照射，然后后开通风 3 min。将生长培养基、检测培养基、D-PBS 和胰酶放入 37 ℃恒温水浴锅里预热，之后用酒精对表面进行消毒，放入生物安全柜中。将汇合率在 80%左右的细胞放于生物安全柜
20 中，吸掉旧培养基，用 D-PBS 润洗，吸弃，用胰酶消化 2~3 min，后加入生长培养基中和， 1200 rpm 离心 3 min。吸去离心上清，用 4 mL 检测培养基混匀，取 100 uL 计数(其中取出 50 uL 细胞液，加入 50 uL Trypan Blue Stain 并混匀，混匀后计数)。按照预先优化好的细胞铺板密度铺板，80ul/孔铺于 96 孔板中，孔 E11、F11 只加 80 uL 检测培养基，边缘孔加入 150 uL 的 DPBS。铺板 24 h 后加入稀
25 释抗体，每孔 20 uL 和设置对照，第 11 列只加入 20 uL 的检测培养基，每个浓度设置 2 个复孔，加入后于细胞涡旋震荡器上混匀，550 rpm，3 min。

溶液的稀释：用检测培养基在 V 型 96 孔板第一列中配制起始浓度为 5 uM，300 uL 的供试品溶液，后面第 2 到 10 列分别加入 240 uL 的检测培养基，从混匀的第一列中取 60 uL 加入到第二列，用排枪上下混匀 10 次，弃枪头，后面 7 个
30 浓度依次操作。

4)检测：

4 天后取出 MTS 试剂，常温避光解冻后，充分涡旋混匀后，在生物安全柜中，沿孔侧壁按每 100 μL 细胞培养体积加入 20 μL CellTiter One Solution Reagen MTS 试剂，轻轻拍动板面，使 MTS 溶液混合均匀后，放于细胞培养箱中避光静
35 置孵育 2 h。反应结束后，取出 96 孔板，于酶标仪中检测 OD490 nm 吸光值，并进行数据记录、整理、分析和存储。

5)结果：

表 8 化合物 5A 对人非小细胞肺癌细胞 H1975、人非小细胞肺癌细胞 HCC827、人表皮癌细胞 A431、人胃癌细胞 NCI-N87、人原位胰腺腺癌细胞 BXP3-3、人表皮癌细胞 A431+
40 人结肠癌细胞 SW620、人乳腺癌细胞 ZR-75-1、人浆细胞白血病细胞 H929、人多发性骨髓瘤细胞 RPMI8226、人白血病细胞 JJN-3、人乳腺癌细胞 MDA-MB-361、人乳腺癌细胞 SK-BR-3 的体外抑制效果

Group	IC50(nM)	Efficacy%
H1975	970.33	76.78

HCC827	655.60	80.57
A431	438.77	84.97
NCI-N87	1023.92	63.93
BxPC-3	320.09	64.4
A431+SW620	604.87	68.26
ZR-75-1	557.95	54.79
H929	23.94	99.03
RPMI8226	147.00	93.61
JJN-3	36.11	80.59
MDA-MB-361	572.13	62.34
SK-BR-3	732.43	70.9

表 8 说明化合物 5A (Linker-drug) 对以下实体瘤细胞和血液瘤细胞均具有良好的抑制作用。

实施例 316

- 5裸抗及化合物 d₃、d₃₈、d₃₉ 及 d₄₄ 的体外药效实验：
- 1)实验材料
- 细胞：N87, SW620, SW620+A431, Fadu, HCC827 来源于中国科学院细胞库；
- 细胞培养基 DMEM：Gibco；
- FBS：BIOWEST。
- 102)培养基的配制
- 生长培养基(with 10%FBS, Penicillin/streptomycin(100 U/mL)；
- 检测培养基(with 1%FBS, Penicillin/streptomycin(100 U/mL)。
- 3)操作
- 在 96 孔板中，使用适当的细胞密度进行铺板，24 小时后，进行药物加药。
- 1524 小时后用检测培养基稀释药物（1 uM 起始，5 倍稀释，9 个浓度，第十列添加检测培养基用来作为空白对照），将稀释好的药物加入对应的细胞孔中然后用微孔板震荡器（型号：MX100-4A）震荡 3 min，震速 550 rpm/min，震荡完放入二氧化碳培养箱孵育 3 天。
- 4)检测
- 204 天后取出 MTS 试剂，常温避光解冻后，充分涡旋混匀后，在生物安全柜中，沿孔侧壁按每 100 μL 细胞培养体积加入 20 μL CellTiter One Solution Reagen MTS 试剂，轻轻拍动板面，使 MTS 溶液混合均匀后，放于细胞培养箱中避光静置孵育 2 h。反应结束后，取出 96 孔板，于酶标仪中检测 OD490 nm 吸光值，并进行数据记录、整理、分析和存储。
- 255)结果

表 9 裸抗及化合物 d₃、d₃₈、d₃₉ 及 d₄₄ 的体外药效实验

IC ₅₀ (nM)					
Group	N87	SW620	SW620+A431	Fadu	HCC827
hu4D3	>500	>500	>500	>500	>500
hu7F11	>500	>500	>500	>500	>500

d ₃	1.613	0.543	2.809	0.531	0.778
d ₃₈	0.058	<0.005	0.079	<0.005	0.001
d ₃₉	0.466	<0.005	0.468	0.110	0.092
d ₄₄	0.197	0.014	0.182	0.029	0.038

结论：如表 9 和附图 6A-6E 所示，本发明的小分子药物在多种人源肿瘤细胞株（N87、SW620、Fadu、HCC827）以及 SW620+A431 异质瘤的实验模型中均表现出优异的肿瘤抑制体外活性。

5

实施例 317

抗体-药物偶联物（ADC）的体外药效检测：

利用多种人源肿瘤细胞株（N87、SW620、Fadu、HCC827）以及 SW620+A431 异质瘤的实验模型评价 ADC 偶联药物的体外药效。

10 接种一定数目的肿瘤细胞于 96 孔板中，向细胞中加入梯度稀释的受试抗体及对应的 ADC 药物，处理 5 天，利用 Alamar Blue 或 MTS 检测细胞活力，通过计算 IC₅₀ 评价受试 ADC 对肿瘤细胞系的抑制效果。抗体药物起始浓度为 500 nM，稀释倍数为 7 倍，共 8 个浓度点，处理 5 天。最终算法按照存活率=(实验组-空白)/(对照组-空白组)×100%，随后利用 Graph Pad Prism 拟合曲线，计算半数抑制浓度(IC₅₀)。结果见表 10 和附图 7A-7E。

15

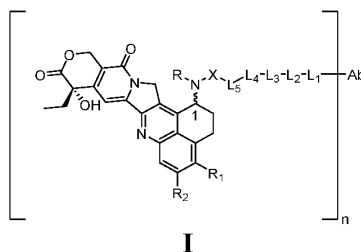
表 10 抗体-药物偶联物（ADC）的体外药效检测：

IC ₅₀ (nM)					
group	N87	SW620	SW620+A431	Fadu	HCC827
ADC-6	4.053	17.093	0.719	3.160	1.334
ADC-70	4.061	4.137	1.147	0.862	1.630
ADC-72	1.478	5.311	0.506	0.994	0.860
ADC-73	0.635	0.142	0.235	0.181	0.263
ADC-112	0.417	1.073	0.353	0.244	0.151
ADC-176	1.047	1.264	0.962	0.298	0.392
ADC-178	0.276	0.795	0.259	0.176	0.147
ADC-179	0.283	0.378	0.227	0.118	0.146

结论：本发明制备的抗体-药物偶联物在多种人源肿瘤细胞株（N87、SW620、Fadu、HCC827）以及 SW620+A431 异质瘤的实验模型中均表现出优异的肿瘤抑制活性。SW620+A431 异质瘤的实验数据表明本发明制备的抗体-药物偶联物能够较好的发挥旁观者效应。

权 利 要 求

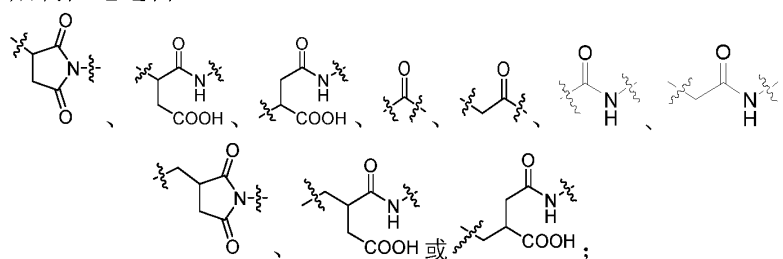
1. 一种如通式 I 所示的配体-喜树碱类衍生物偶联物，或其药学上可接受的盐或溶剂化物；



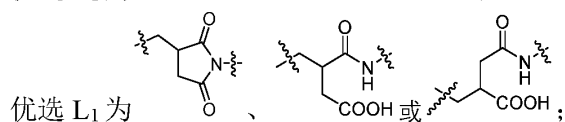
其中：

Ab 为靶向人 Trop2 的抗体或其抗原结合片段；

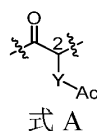
L1 非限制性地选自：



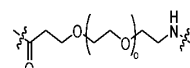
优选 L1 为



L2 具有如下式 A 所示的结构，



其中 Y 为支架，选自 C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基或 C3-C8 环烷基；优选 Y 为 C1-C6 烷基；Ac 为亲水结构单元；与 Y 相连的 2 号碳具有 R 构型或 S 构型的绝对手性；

L3 存在或者不存在，当存在时，L3 选自 PEG 亲水单元：，o 选自 1-10 的整数，优选 2-8 的整数；

L4 为酶切单元；

L5 为连接单元；

式 I 中与 N 相连的 1 号手性碳原子具有 R 构型或者 S 构型的绝对手性；

R 选自氢原子、氘原子、卤素、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、氘代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基、5-10 元杂芳基、取代 5-10 元杂芳基；

优选 R 选自氢原子或 C1-C6 烷基；

R₁ 选自氢原子、氘原子、卤素、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、氘代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、羧基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基、5-10 元杂芳基、取代 5-10 元杂芳基；

优选 R₁ 选自氢原子或 C1-C6 烷基；

更优选 R₁ 选自 C1-C6 烷基；

R₂ 选自氢原子、氘原子、卤素、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、氘代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、羧基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基、5-10 元杂芳基、取代 5-10 元杂芳基；

优选 R₂ 选自氢原子、卤素或 C1-C6 烷基；

更优选 R₂ 选自卤素；

X 选自 -C(O)-CR_aR_b-(CR₃R₄)_m-O-、-C(O)-CR_aR_b-(CR₃R₄)_m-NH-或-C(O)-CR_aR_b-(CR₃R₄)_m-S-；

优选 X 选自 -C(O)-CR_aR_b-(CR₃R₄)_m-O-；

R_a 和 R_b 各自独立地选自氢原子、氘原子、卤素、C1-C6 烷基、氘代 C1-C6 烷基、卤代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C6-C10 芳基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基、5-10 元杂芳基、取代 5-10 元杂芳基；

优选 R_a 和 R_b 各自独立地选自氢原子、C1-C6 烷基、卤代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基或 C6-C10 芳基 C1-C6 烷基；

或者，R_a、R_b 及其所连接碳原子构成 C3-C8 环烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基；优选 R_a、R_b 及其所连接碳原子构成 C3-C8 环烷基；

R₃、R₄ 相同或者不同，且分别独立地为氢原子、氘原子、卤素、C1-C6 烷基、卤代 C1-C6 烷基、氘代 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基、羟基、氨基、氰基、硝基、羧基 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基；

优选 R₃、R₄ 分别独立地为氢原子或 C1-C6 烷基；

或者，R₃、R₄ 及其所连接碳原子构成 C3-C8 环烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基；

m 选自 0-4 的整数，优选为 0、1；n 选自 1-10 的整数。

2. 根据权利要求 1 所述如通式 I 所示的配体-喜树碱类衍生物偶联物，或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其特征在于，Ab 为靶向人 Trop2 抗体或其抗原结合片段。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述如通式 I 所示的配体-喜树碱类衍生物偶联物，或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其特征在于，Ab 的抗体包含：IgG1 重链，κ 轻链，所述 IgG1 重链和 κ 轻链所组成的抗体特异性识别人 TROP2 蛋白。

4. 根据权利要求 1-3 任一项所述如通式 I 所示的配体-喜树碱类衍生物偶联物，或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其特征在于，其特征在于，Ab 的抗体

的 κ 轻链包含如 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9 所示的 CDR, IgG1 重链包含如 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3 所示的 CDR。

5. 根据权利要求 1-4 任一项所述如通式 I 所示的配体-喜树碱类衍生物偶联物, 或其药学上可接受的盐或溶剂化物, 其特征在于, Ab 的抗体由重链和轻链组成, 所述的轻链包含核酸编码序列分别为 SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28 和 SEQ ID NO: 29 的 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3, 所述的重链包含核酸编码序列分别为 SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22 和 SEQ ID NO: 23 的 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3。

6. 根据权利要求 1-5 任一项所述如通式 I 所示的配体-喜树碱类衍生物偶联物, 或其药学上可接受的盐或溶剂化物, 其特征在于, Ab 的抗体由重链和轻链组成, 所述的重链包含序列为 SEQ ID NO: 13 的重链可变区, 所述的轻链包含序列为 SEQ ID NO: 14 的轻链可变区。

7. 根据权利要求 1-6 任一项所述如通式 I 所示的配体-喜树碱类衍生物偶联物, 或其药学上可接受的盐或溶剂化物, 其特征在于, Ab 的抗体由重链和轻链组成, 所述的重链可变区包含核酸编码序列为 SEQ ID NO: 33 的重链可变区, 所述的轻链可变区包含核酸编码序列为 SEQ ID NO: 34 的轻链可变区。

8. 根据权利要求 1-7 任一项所述如通式 I 所示的配体-喜树碱类衍生物偶联物, 或其药学上可接受的盐或溶剂化物, 其特征在于, Ab 的抗体重链氨基酸序列为 SEQ ID NO: 17, 抗体轻链的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 18。

9. 根据权利要求 1-8 任一项所述如通式 I 所示的配体-喜树碱类衍生物偶联物, 或其药学上可接受的盐或溶剂化物, 其特征在于, Ab 的抗体重链核酸编码序列为 SEQ ID NO: 37, 抗体轻链的核酸编码序列为 SEQ ID NO: 38。

10. 根据权利要求 1-3 任一项所述如通式 I 所示的配体-喜树碱类衍生物偶联物, 或其药学上可接受的盐或溶剂化物, 其特征在于, Ab 的抗体的 κ 轻链包含如 SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12 所示的 CDR, IgG1 重链包含如 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6 所示的 CDR。

11. 根据权利要求 1-3、10 任一项所述如通式 I 所示的配体-喜树碱类衍生物偶联物, 或其药学上可接受的盐或溶剂化物, 其特征在于, Ab 的抗体的 κ 轻链包含核酸编码序列分别为 SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31 和 SEQ ID NO: 32 的 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3, Ab 的抗体的重链包含核酸编码序列分别为 SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25 和 SEQ ID NO: 26 的 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3。

12. 根据权利要求 1-3、10-11 任一项所述如通式 I 所示的配体-喜树碱类衍生物偶联物, 或其药学上可接受的盐或溶剂化物, 其特征在于, Ab 的抗体由重链和轻链组成, 所述的重链包含序列为 SEQ ID NO: 15 的重链可变区, 所述的轻链包含序列为 SEQ ID NO: 16 的轻链可变区。

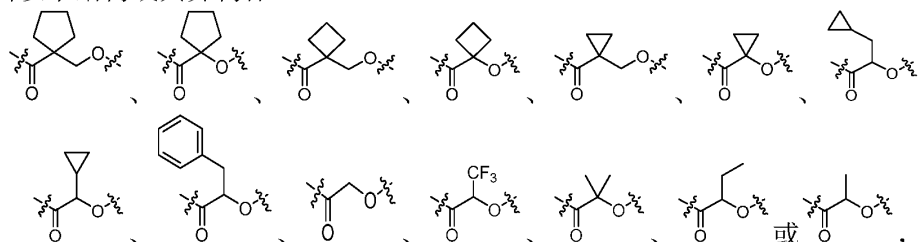
13. 根据权利要求 1-3、10-12 任一项所述如通式 I 所示的配体-喜树碱类衍生物偶联物, 或其药学上可接受的盐或溶剂化物, 其特征在于, Ab 的抗体由重链和轻链组成, 所述的重链可变区包含核酸编码序列为 SEQ ID NO: 35 的重链可变区, 所述的轻链可变区包含核酸编码序列为 SEQ ID NO: 36 的轻链可变区。

14. 根据权利要求 1-3、10-13 任一项所述如通式 I 所示的配体-喜树碱类衍生物偶联物, 或其药学上可接受的盐或溶剂化物, 其特征在于, Ab 的抗体重链氨基酸序列为 SEQ ID NO: 19, 抗体轻链的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 20。

15. 根据权利要求 1-3、10-14 任一项所述如通式 I 所示的配体-喜树碱类衍

生物偶联物，或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其特征在于，Ab 的抗体重链核酸编码序列为 SEQ ID NO: 39，抗体轻链的核酸编码序列为 SEQ ID NO: 40。

16. 根据权利要求 1-15 中任一项所述如通式 I 所示的配体-喜树碱类衍生物偶联物, 或其药学上可接受的盐或溶剂化物, 其特征在于, 所述 X 非限制性地选自以下结构或其异构体:



其中左侧波浪线与喜树碱衍生物部分相连, 右侧波浪线与 L_5 相连。

17. 根据权利要求 1-16 中任一项所述如通式 I 所示的配体-喜树碱类衍生物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物, 其特征在于: L₄ 非限制性地选自自由氨基酸构成的肽残基,

其中任选地, 所述氨基酸进一步被选自氘原子、卤素、羟基、氰基、氨基、硝基、羧基、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基和 C3-C8 环烷基或者取代 C3-C8 环烷基中的一个或多个取代基所取代;

优选地,所述肽残基为由一个、两个或者多个选自苯丙氨酸(F)、甘氨酸(G)、缬氨酸(V)、赖氨酸(K)、瓜氨酸(C)、丝氨酸(S)、谷氨酸(E)或者天冬氨酸(D)中的氨基酸形成的肽残基;

更优选地,所述肽残基为由甘氨酸(G)-甘氨酸(G)-苯丙氨酸(F)-甘氨酸(G)组成的四肽残基。

18. 根据权利要求 1-17 中任一项所述如通式 I 所示的配体-喜树碱类衍生物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物, 其特征在于:

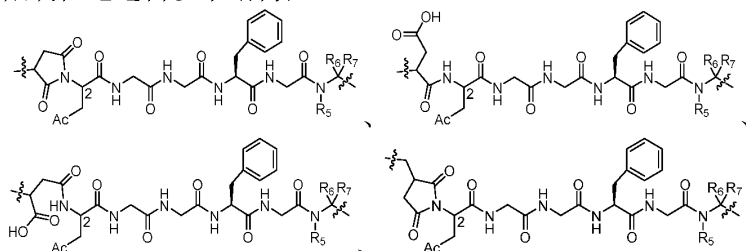
L₅ 非限制性地选自-NR₅(CR₆R₇)_q-或者化学键, q 选自 0-6 的整数;

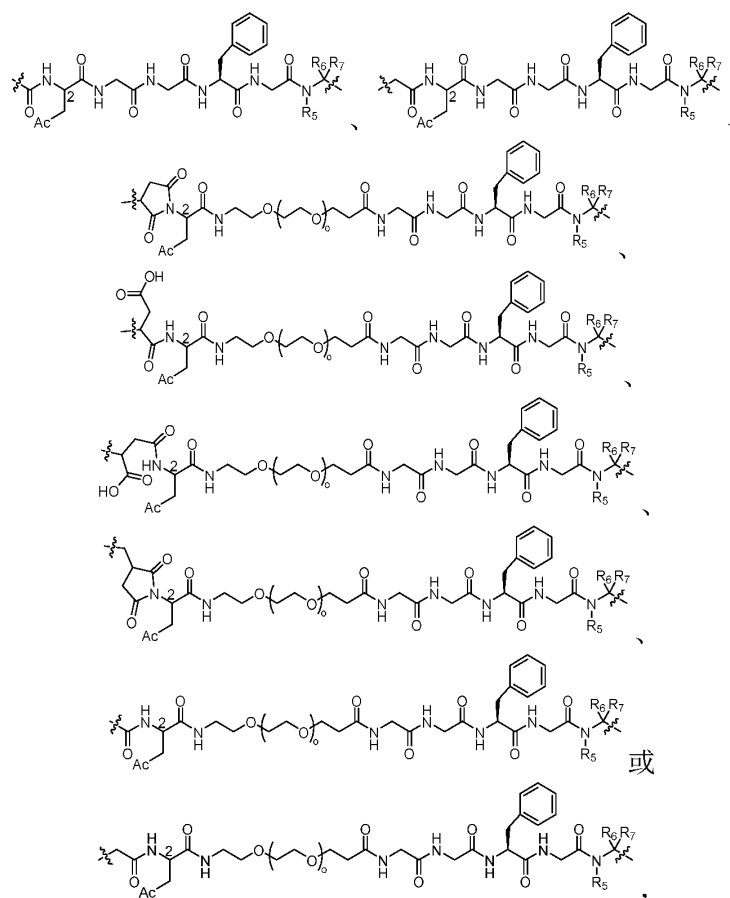
R₅、R₆ 和 R₇ 相同或者不同，且各自独立地选自氢原子、氘原子、卤素、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、氘代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基、5-10 元杂芳基、取代 5-10 元杂芳基；

优选地, R₅、R₆和R₇各自独立地选自氢原子或C1-C6烷基;

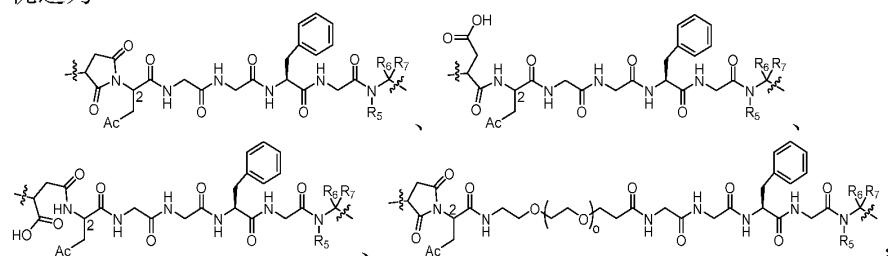
更优选地，R₅、R₆和R₇各自独立地选自氢原子。

19. 根据权利要求 1-18 中任一项所述如通式 I 所示的配体-喜树碱类衍生物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物, 其特征在于: 所述连接单元-L₁-L₂-L₃-L₄-L₅-非限制性地选自以下结构;





优选为



其中：

Ac 为亲水结构单元；

R₅、R₆和R₇相同或者不同，且各自独立地选自氢原子、氘原子、卤素、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、氘代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基、5-10 元杂芳基、取代 5-10 元杂芳基；

优选地，R₅、R₆和R₇各自独立地选自氢原子或 C1-C6 烷基；

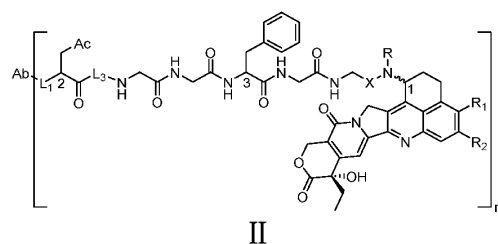
更优选地，R₅、R₆和R₇各自独立地选自氢原子；

与 N 相连的 2 号碳原子具有 R 构型或者 S 构型的绝对手性；

左侧波浪线与抗体或其抗原结合片段部分相连，右侧波浪线与 X 相连；

o 选自 1-10 的整数。

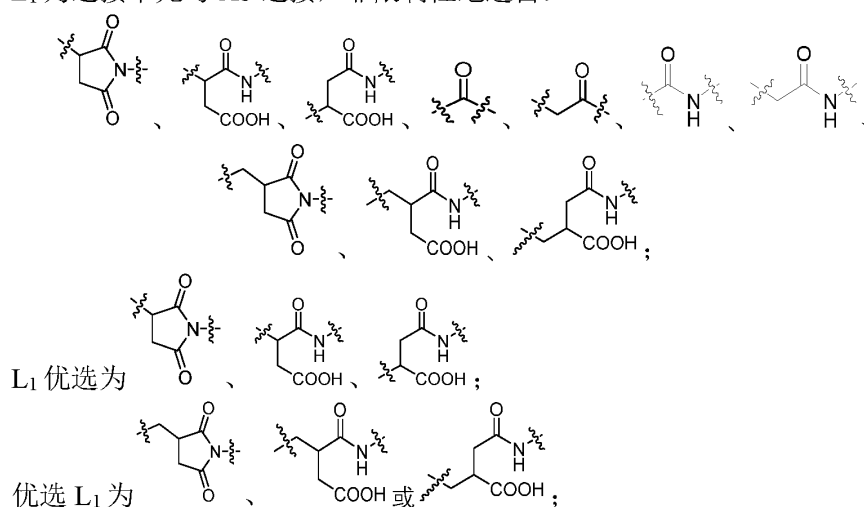
20. 一种如通式 II 所示的配体-喜树碱类衍生物偶联物, 或其药学上可接受的盐或溶剂化物;

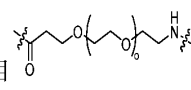


其中:

Ab 为靶向人 Trop2 的抗体或其抗原结合片段;

L₁ 为连接单元与 Ab 连接, 非限制性地选自:



L₃ 存在或者不存在, 当 L₃ 存在时, L₃ 选自 , o 选自 1-10 的整数, 优选 2-8 的整数;

Ac 为亲水结构单元;

1 位、2 位及 3 位手性碳原子具有 R 绝对构型或 S 绝对构型两种手性构型;

R 选自氢原子、氘原子、卤素、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、氘代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基、5-10 元杂芳基、取代 5-10 元杂芳基;

优选 R 选自氢原子或 C1-C6 烷基;

R₁ 选自氢原子、氘原子、卤素、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、氘代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、羧基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基、5-10 元杂芳基、取代 5-10 元杂芳基;

优选 R₁ 选自氢原子或 C1-C6 烷基;

更优选 R₁ 选自 C1-C6 烷基;

R_2 选自氢原子、氘原子、卤素、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、氘代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、羧基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基、5-10 元杂芳基、取代 5-10 元杂芳基；

优选 R_2 选自氢原子、卤素或 C1-C6 烷基；

更优选 R_2 选自卤素；

X 选自 $-C(O)-CR_aR_b-(CR_3R_4)_m-O-$ 、 $-C(O)-CR_aR_b-(CR_3R_4)_m-NH-$ 或 $-C(O)-CR_aR_b-(CR_3R_4)_m-S-$ ；

优选 X 选自 $-C(O)-CR_aR_b-(CR_3R_4)_m-O-$ ；

R_a 和 R_b 各自独立地选自氢原子、氘原子、卤素、C1-C6 烷基、氘代 C1-C6 烷基、卤代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基或 5-10 元杂芳基、取代 5-10 元杂芳基；

优选 R_a 和 R_b 各自独立地选自氢原子、C1-C6 烷基、卤代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基或 C6-C10 芳基 C1-C6 烷基；

或者， R_a 、 R_b 及其所连接碳原子构成 C3-C8 环烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基；优选 R_a 、 R_b 及其所连接碳原子构成 C3-C8 环烷基；

R_3 、 R_4 相同或者不同，且分别独立地为氢原子、氘原子、卤素、C1-C6 烷基、卤代 C1-C6 烷基、氘代 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基、羟基、氨基、氰基、硝基、羟 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基；

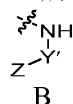
优选 R_3 、 R_4 ，分别独立地为氢原子或 C1-C6 烷基；

或者， R_3 、 R_4 及其所连接碳原子构成 C3-C8 环烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基或 3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基；

m 选自 0-4 的整数，优选为 0、1；

n 选自 1-10 的整数。

21. 如权利要求 1-20 任一项中所述的配体-喜树碱类衍生物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其特征在于：所述 Ac 具有如下式 B 所示结构，



其中：

Z 非限制性地选自亲水结构羧基、磷酸、聚磷酸、亚磷酸、磺酸、亚磺酸或聚乙二醇(PEG)中的一种或多种所组成的组；

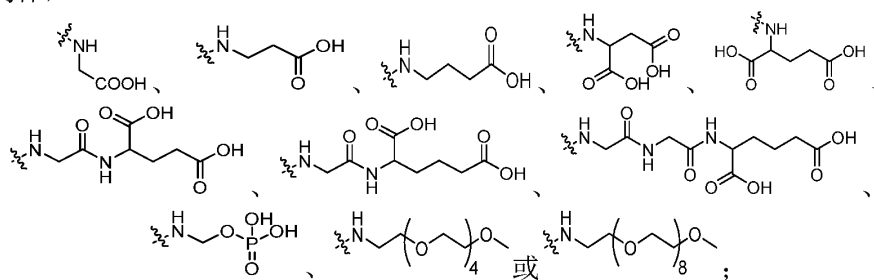
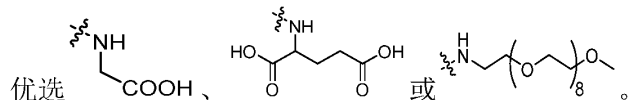
优选 Z 选自亲水结构羧基、磷酸或聚乙二醇(PEG)；

Y' 为任选的连接氨基和 Z 的支架；优选 Y' 为 C1-C6 烷基；

Ac 通过支架 Y 与结构式 I 中已标示的 2 位碳相连。

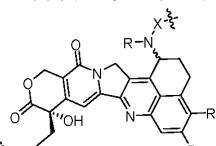
22. 如权利要求 1-21 中任一项所述的配体-喜树碱类衍生物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其特征在于：所述 Ac 非限制性地选自甘氨酸、(D/L)丙氨酸、(D/L)亮氨酸、(D/L)异亮氨酸、(D/L)缬氨酸、(D/L)苯丙氨酸、(D/L)脯氨酸、(D/L)色氨酸、(D/L)丝氨酸、(D/L)酪氨酸、(D/L)半胱氨酸、(D/L)胱氨酸、(D/L)精氨酸、(D/L)组氨酸、(D/L)蛋氨酸、(D/L)天冬酰胺、(D/L)谷氨酰胺、(D/L)苏氨酸、(D/L)天冬氨酸、(D/L)谷氨酸、天然或非天然氨基酸衍生物或以下结构或其

异构体,

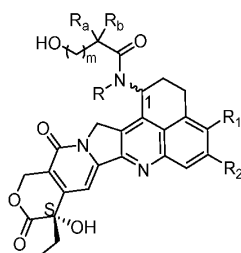


23. 根据权利要求 1-22 中任一项所述配体-喜树碱类衍生物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物, 其特征在于: 所述 Ac 非限制性地选自甘氨酸、磷酸、(D/L)谷氨酸或聚乙二醇亲水结构。

24. 根据权利要求 1-23 中任一项所述配体-喜树碱类衍生物偶联物或其药学



上可接受的盐或溶剂化物, 其特征在于: 所述



d

其中:

R 选自氢原子、氘原子、卤素、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、氘代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基、5-10 元杂芳基、取代 5-10 元杂芳基;

优选 R 选自氢原子或 C1-C6 烷基;

R₁ 选自氢原子、氘原子、卤素、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、氘代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、羧基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基、5-10 元杂芳基、取代 5-10 元杂芳基;

优选 R₁ 选自氢原子或 C1-C6 烷基;

更优选 R₁ 选自 C1-C6 烷基;

R₂ 选自氢原子、氘原子、卤素、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、氘代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、羧基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基、5-10 元杂芳基、取代

5-10 元杂芳基；

优选 R_2 选自氢原子、卤素或 C1-C6 烷基；

更优选 R_2 选自卤素；

R_a 和 R_b 各自独立地选自氢原子、氘原子、卤素、C1-C6 烷基、氘代 C1-C6 烷基、卤代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基、5-10 元杂芳基、取代 5-10 元杂芳基；

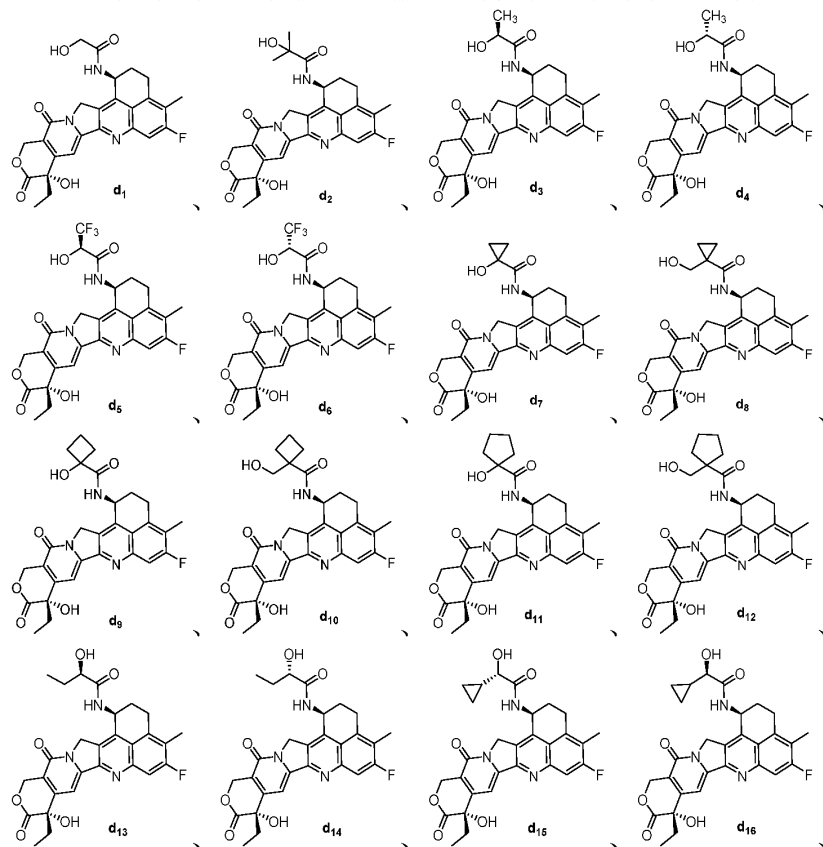
优选 R_a 和 R_b 各自独立地选自氢原子、C1-C6 烷基、卤代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C6-C10 芳基；

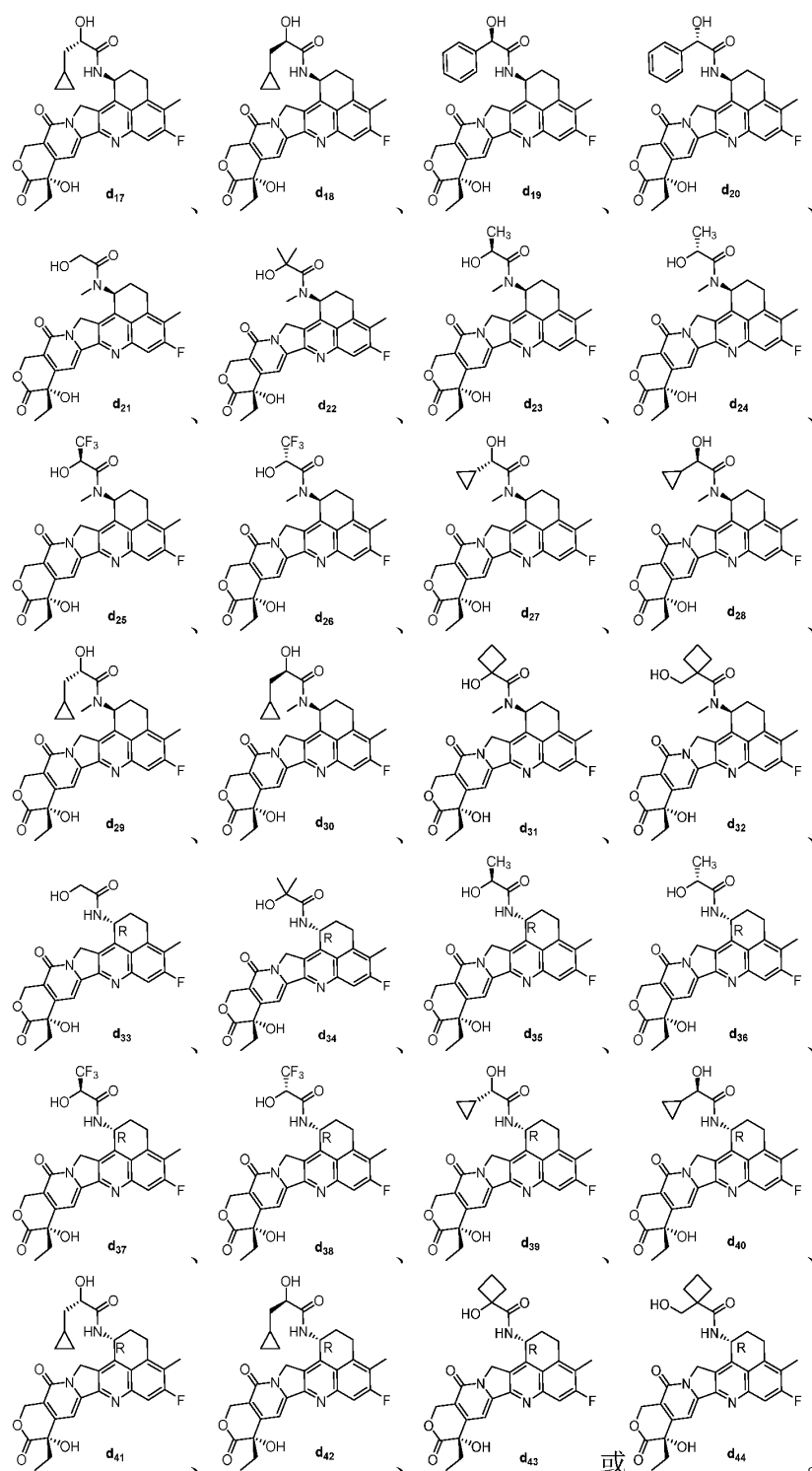
或者， R_a 、 R_b 及其所连接碳原子构成 C3-C8 环烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基；优选 R_a 、 R_b 及其所连接碳原子构成 C3-C8 环烷基；

1 位手性碳原子具有 R 绝对构型或 S 绝对构型两种手性构型；

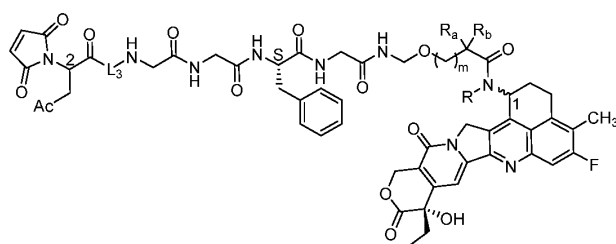
m 选自 0 或 1。

25. 如权利要求 1-24 中任一项所述配体-喜树碱类衍生物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其特征在于：所述结构式 d 非限制性的选自以下化合物；





26. 一种连接器-药物化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物, 其特征在于: 具有如下式 III 所示的结构,



III

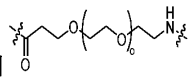
其中:

R 选自氢原子、氘原子、卤素、C1-C6 烷基、取代 C1-C6 烷基、氘代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基、5-10 元杂芳基、取代 5-10 元杂芳基;

R_a 选自氢原子、氘原子、卤素、C1-C6 烷基、氘代 C1-C6 烷基、卤代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基、5-10 元杂芳基、取代 5-10 元杂芳基;

R_b 选自氢原子、氘原子、卤素、C1-C6 烷基、氘代 C1-C6 烷基、卤代 C1-C6 烷基、C3-C8 环烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基、C6-C10 芳基、取代 C6-C10 芳基、5-10 元杂芳基、取代 5-10 元杂芳基;

或者, R_a、R_b 及其所连接碳原子构成 C3-C8 环烷基、C3-C8 环烷基 C1-C6 烷基、3-7 元杂环基、取代 3-7 元杂环基;

L₃ 存在或者不存在, 当 L₃ 存在时, 选自 , o 选自 1-10 的整数;

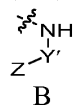
1 位或 2 位手性碳原子具有 R 绝对构型或 S 绝对构型两种手性;

Ac 为亲水结构单元;

m 选自 0 或 1;

优选地, 所述连接子-药物化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物用于与配体 Ab 偶联形成权利要求 1-25 中任一项所述式 I 或式 II 的配体-喜树碱类衍生物偶联物。

27. 根据权利要求 26 所述的连接子-药物化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物, 其特征在于: 所述 Ac 具有如下式 B 所示结构,



其中:

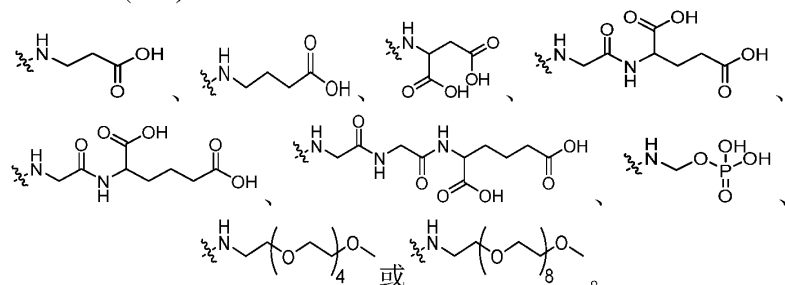
Z 非限制性地选自亲水结构羧基、磷酸、聚磷酸、亚磷酸、磺酸、亚磺酸或聚乙二醇(PEG)中的一种或多种所组成的组;

Y' 为任选的连接氨基和 Z 的支架;

Ac 通过支架 Y 与结构式 I 中已标示的 2 位碳相连。

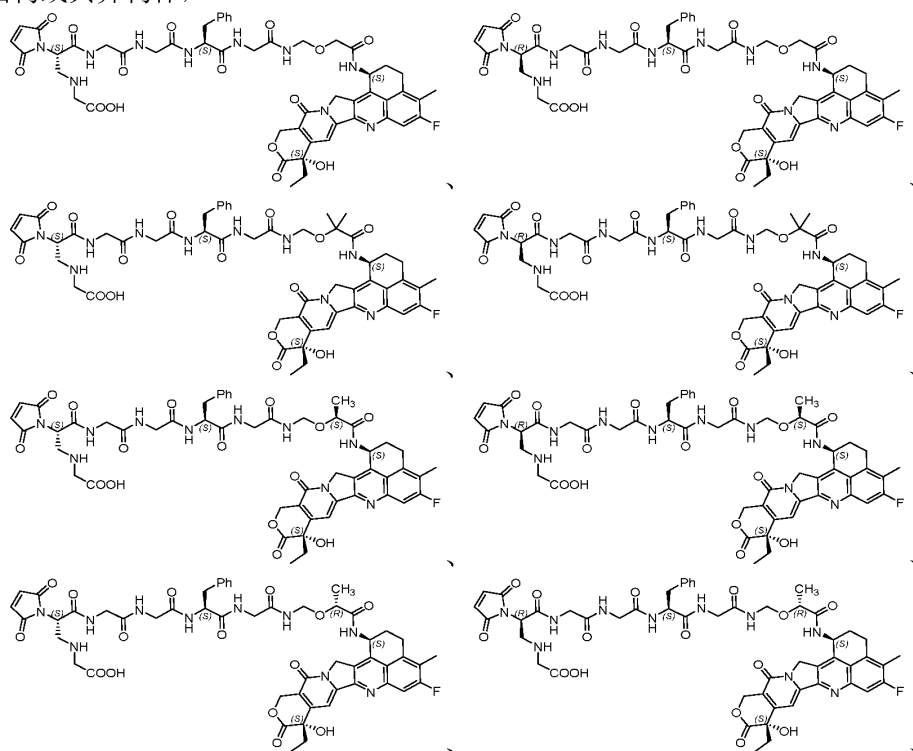
28. 如权利要求 26 或 27 中任一项所述的连接子-药物化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物, 其特征在于: 所述 Ac 非限制性地选自甘氨酸、(D/L)丙氨酸

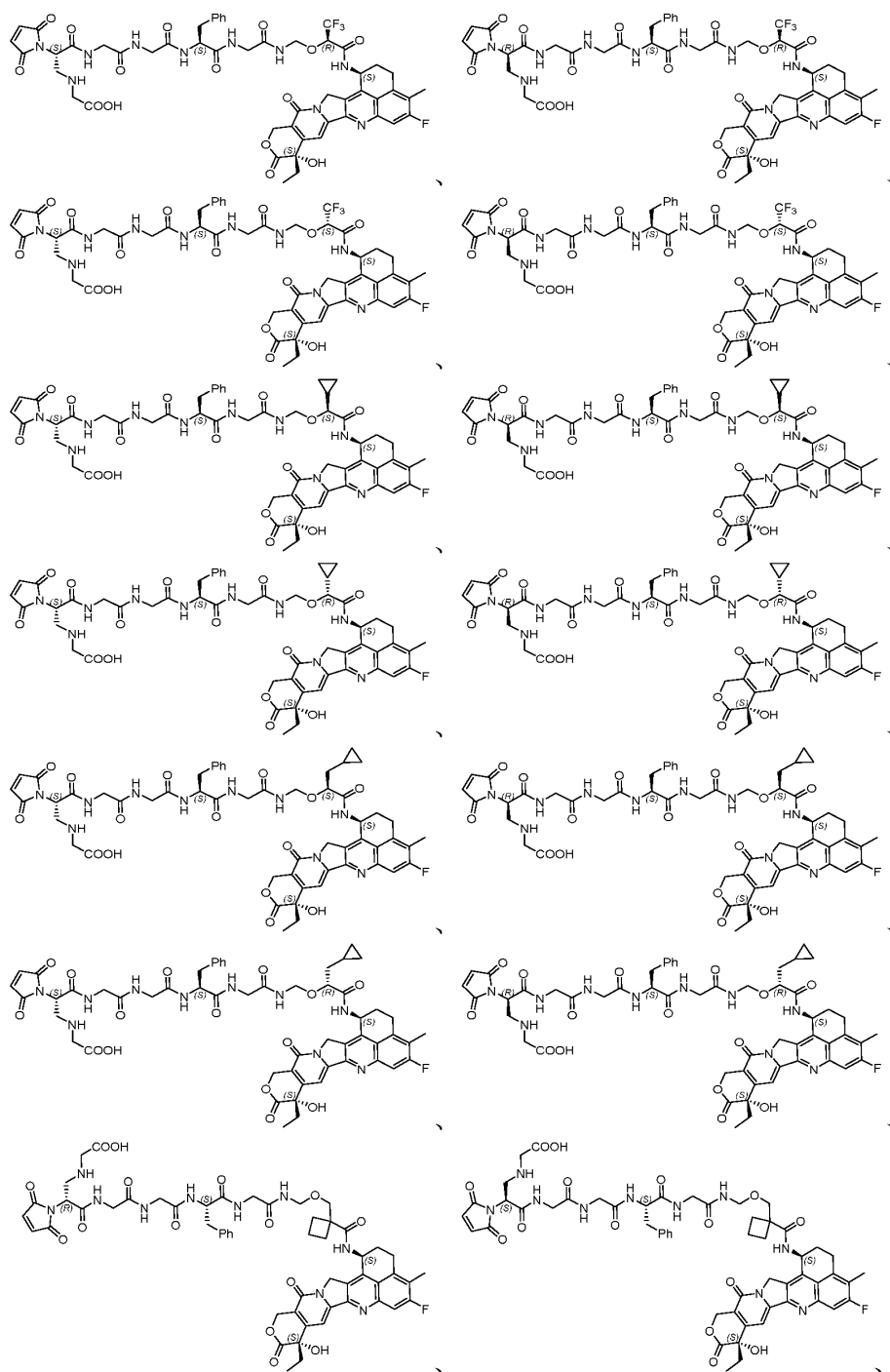
酸、(D/L)亮氨酸、(D/L)异亮氨酸、(D/L)缬氨酸、(D/L)苯丙氨酸、(D/L)脯氨酸、(D/L)色氨酸、(D/L)丝氨酸、(D/L)酪氨酸、(D/L)半胱氨酸、(D/L)胱氨酸、(D/L)精氨酸、(D/L)组氨酸、(D/L)蛋氨酸、(D/L)天冬酰胺、(D/L)谷氨酰胺、(D/L)苏氨酸、(D/L)天冬氨酸、(D/L)谷氨酸、天然或非天然氨基酸衍生物或以下结构，

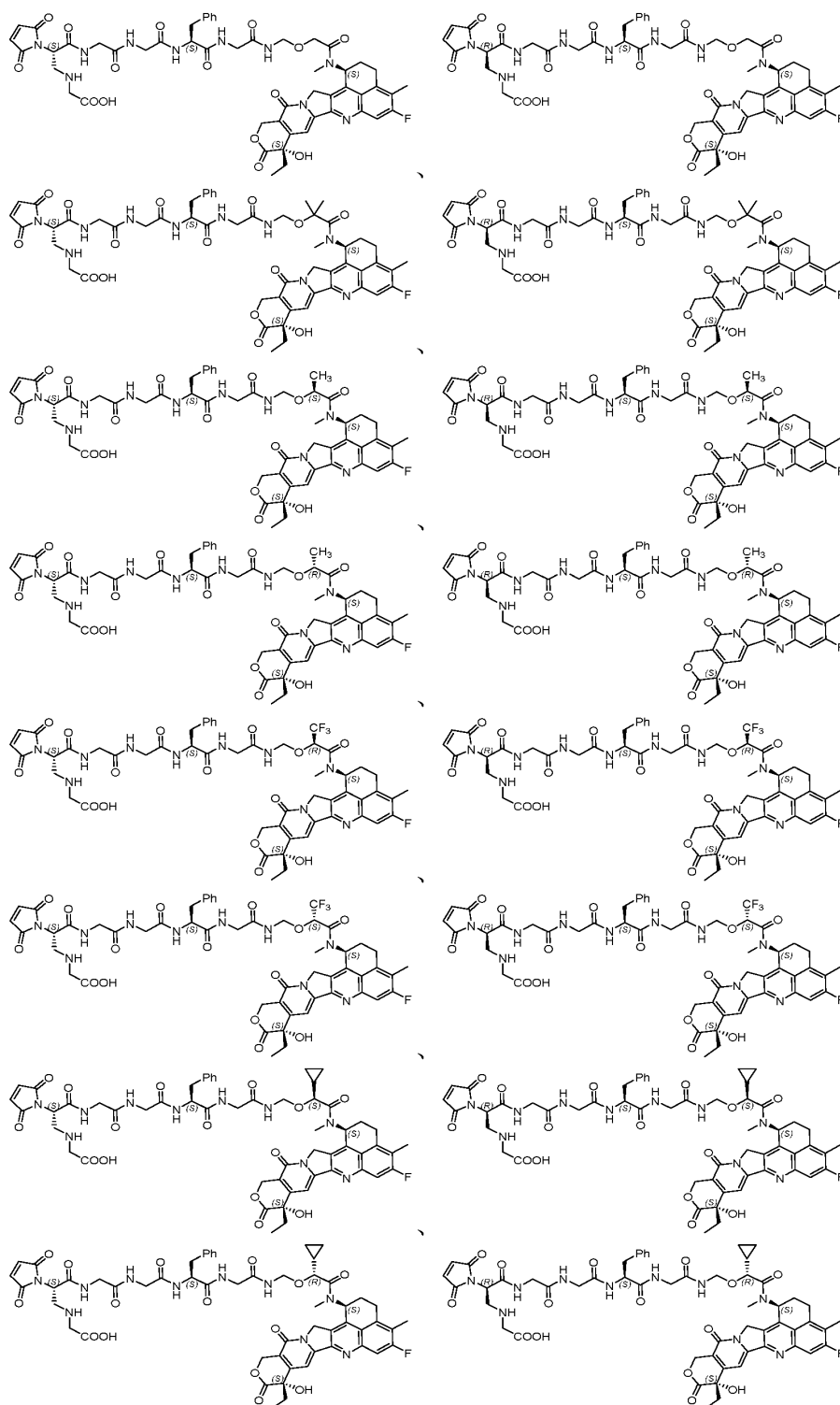


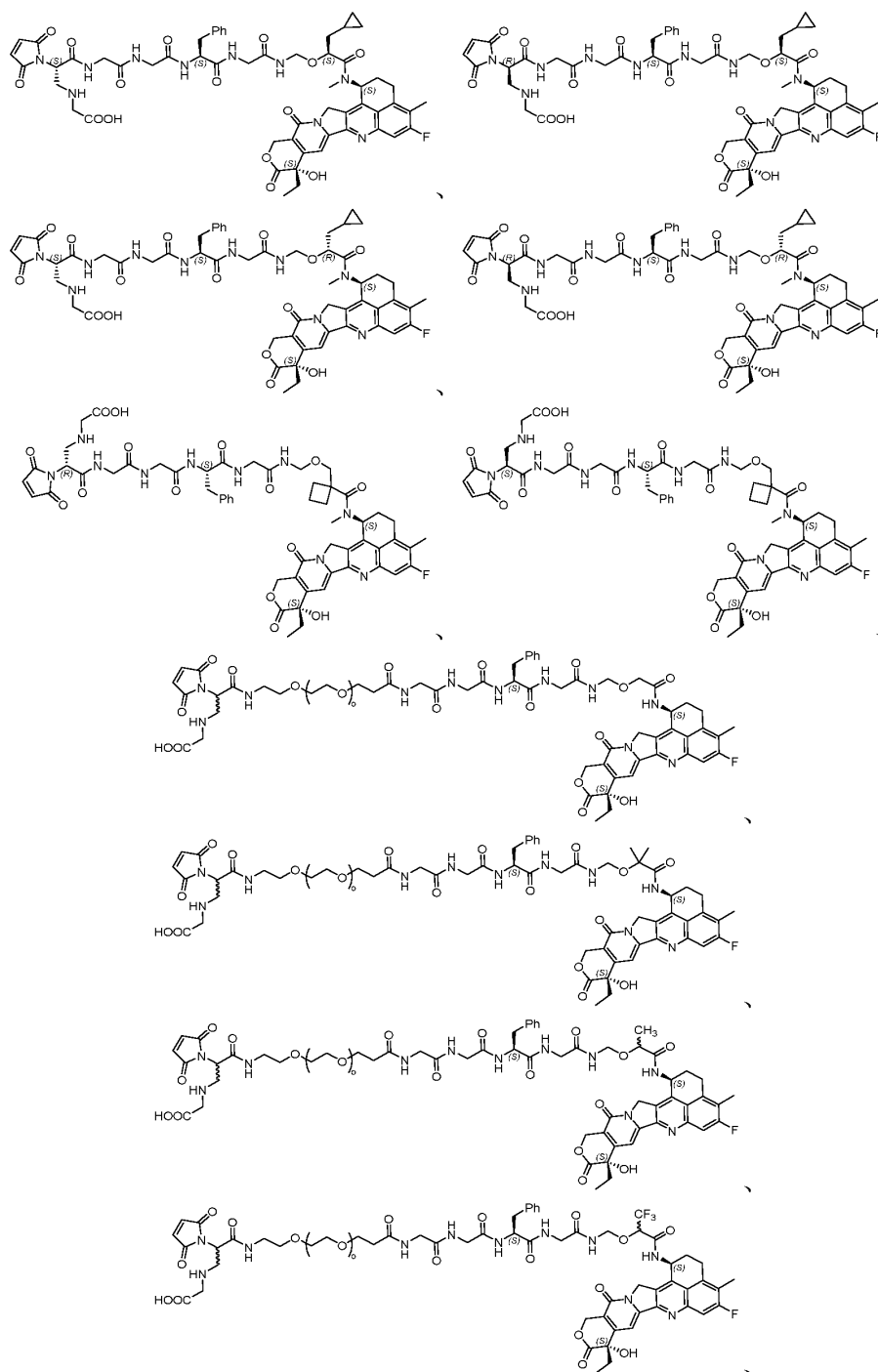
29. 如权利要求 26-28 中任一项所述连接子-药物化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其特征在于：Ac 非限制性地选自甘氨酸、磷酸、(D/L)谷氨酸或聚乙二醇亲水结构。

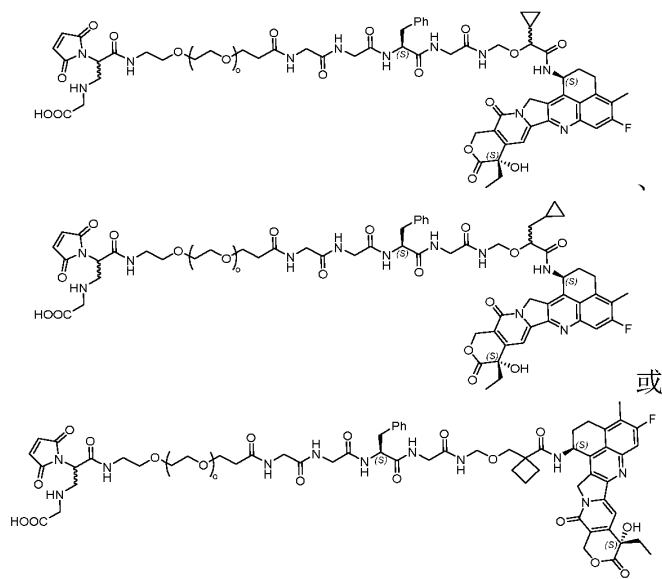
30. 如权利要求 26-29 中任一项所述连接子-药物化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其特征在于：所述连接子-药物化合物非限制性地选自以下结构或其异构体，





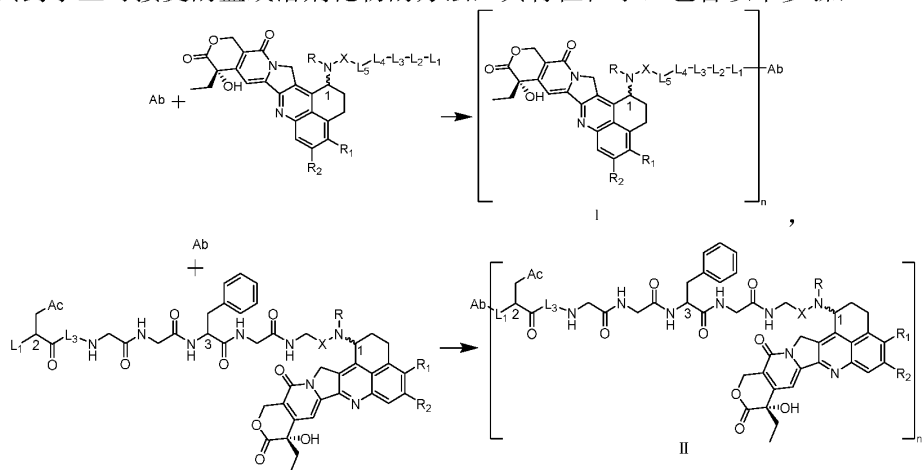






其中：o 选自 1-10 的整数。

31. 一种制备如通式 I 或通式 II 所示的配体-喜树碱类生物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物的方法，其特征在于：包含以下步骤，

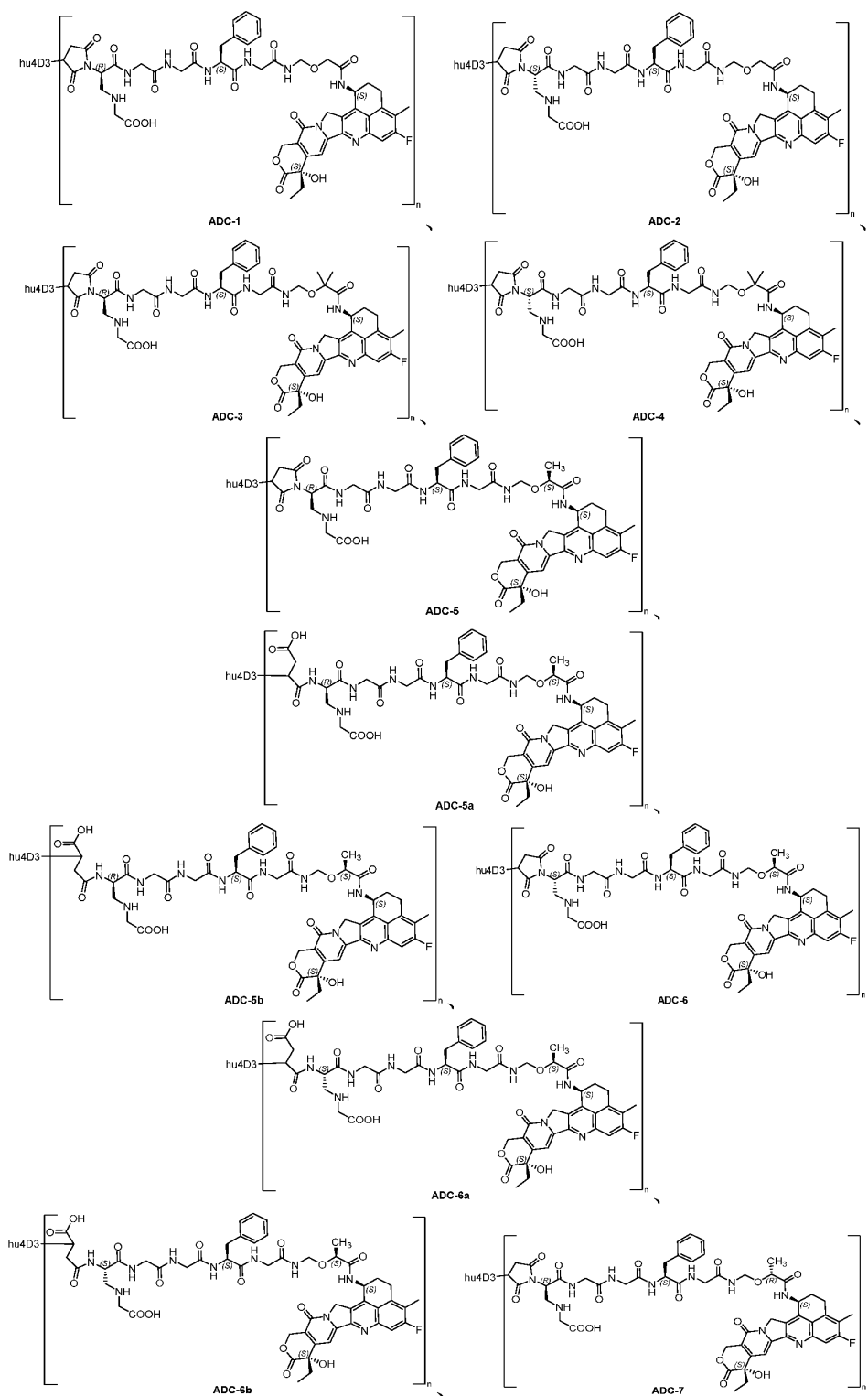


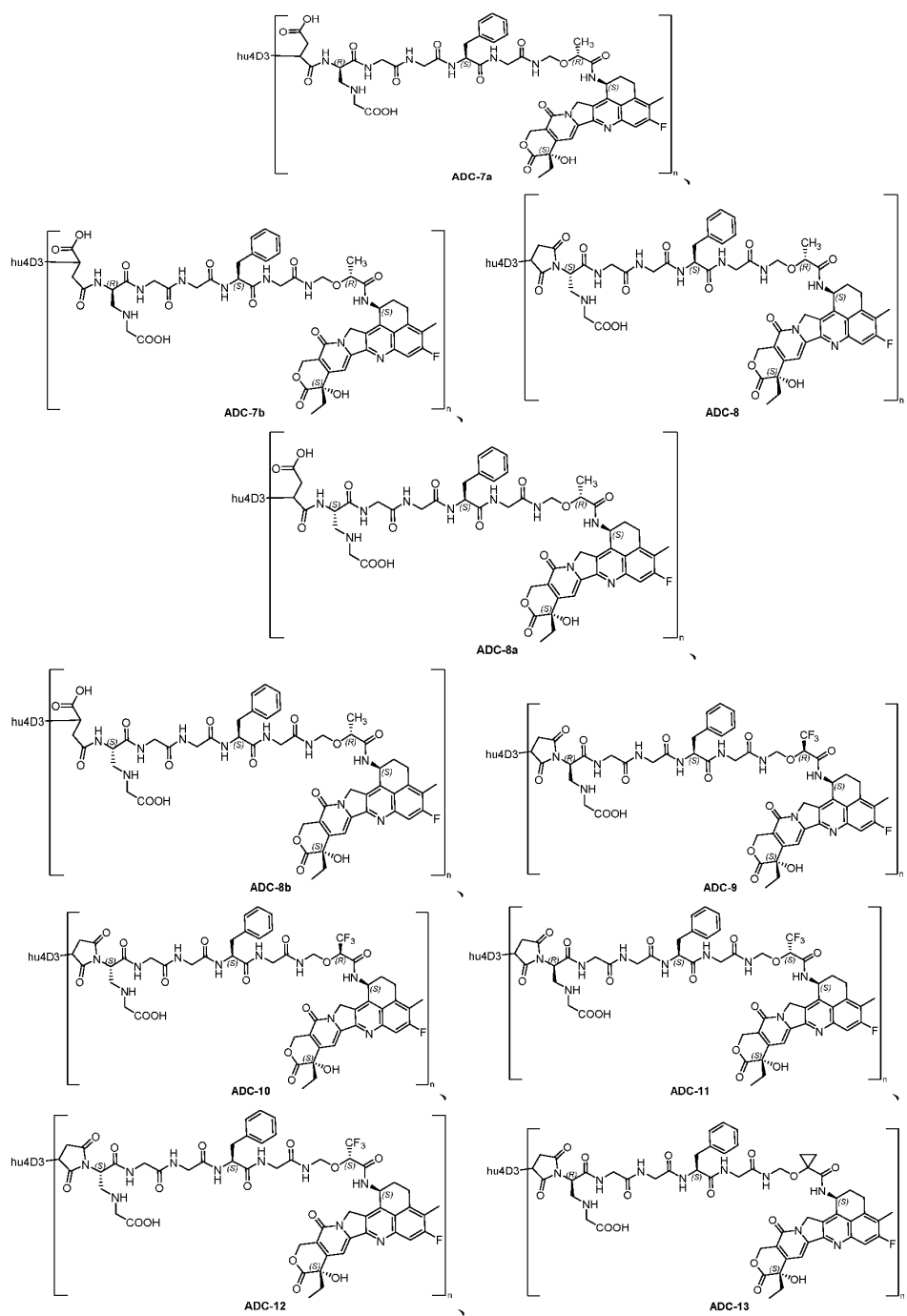
通过还原的抗体或者其抗原结合片段与连接子-药物化合物偶联反应，得到如通式 I 或通式 II 所示配体-喜树碱类生物偶联物；

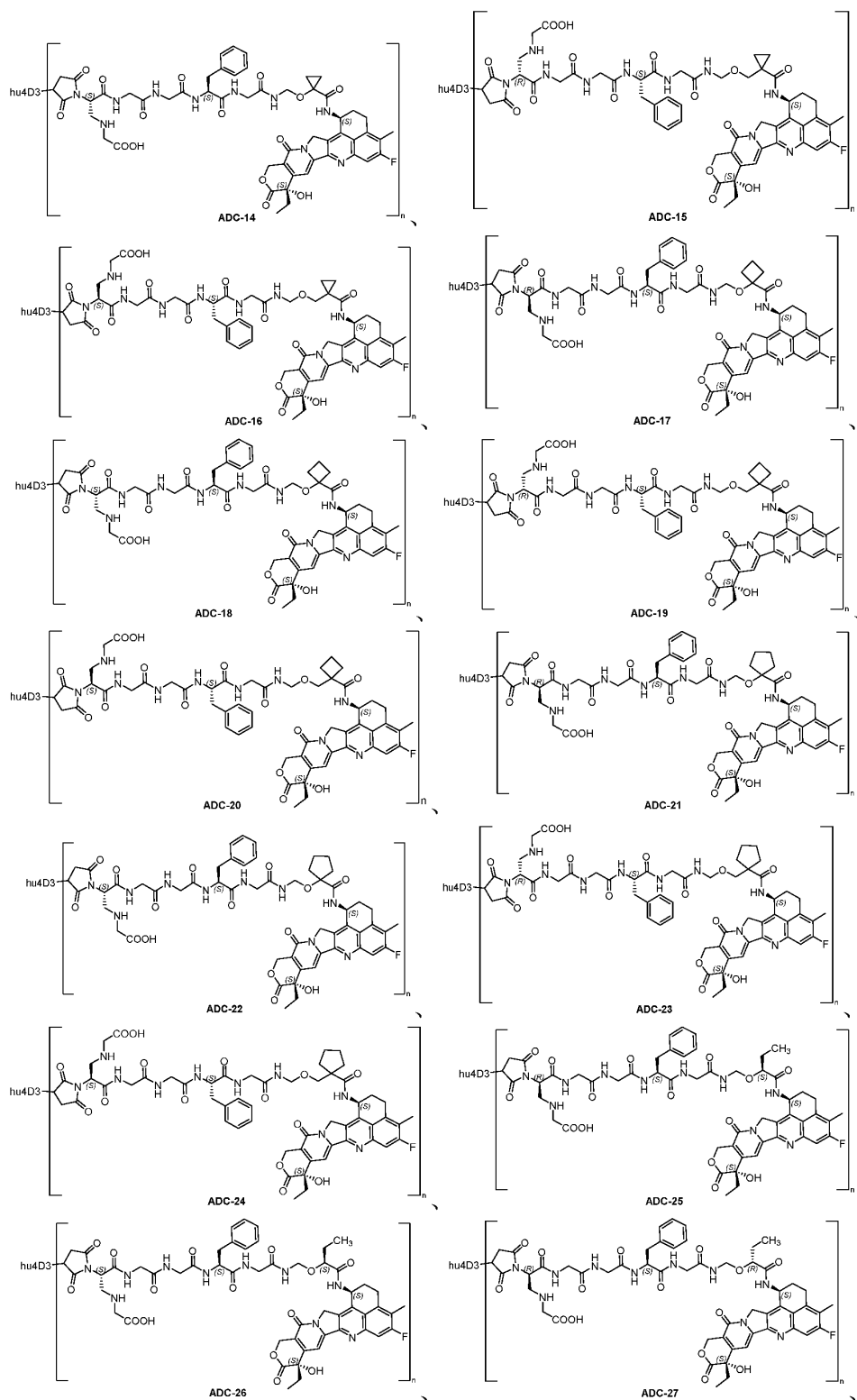
1 位、2 位或 3 位手性碳原子具有 R 构型或 S 构型的绝对手性；

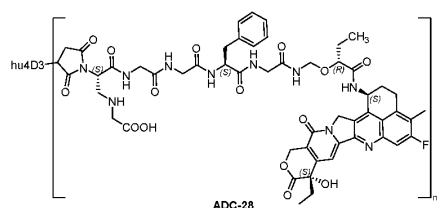
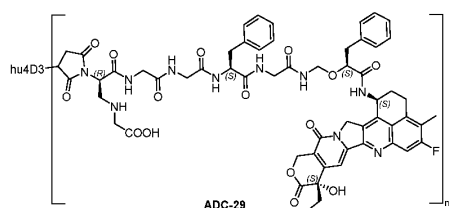
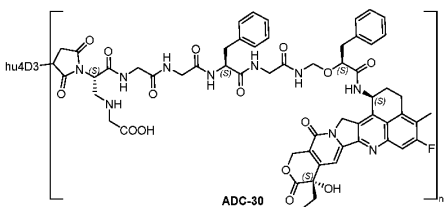
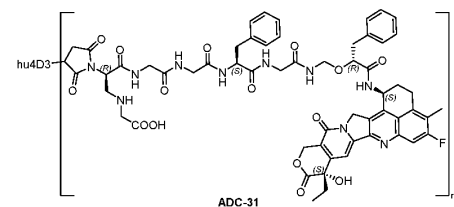
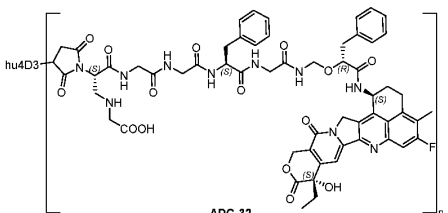
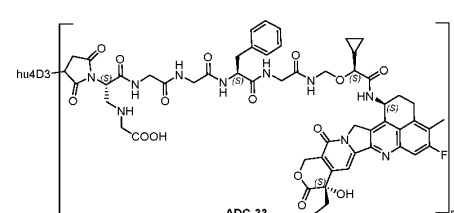
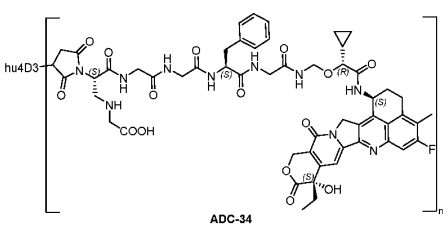
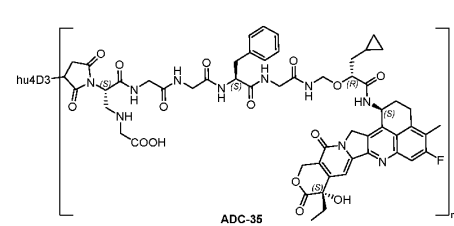
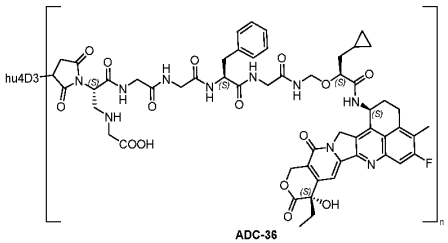
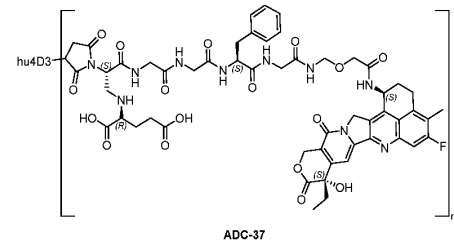
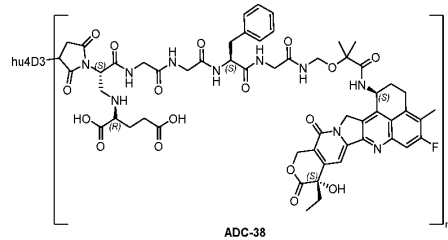
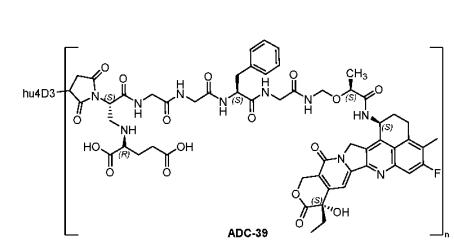
Ab、L₁、L₂、L₃、L₄、L₅、X、R、R₁、R₂ 及 n 如权利要求 1-30 任一项中所述。

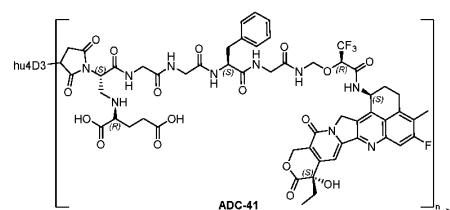
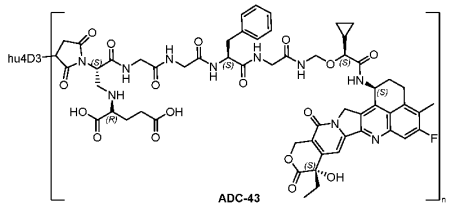
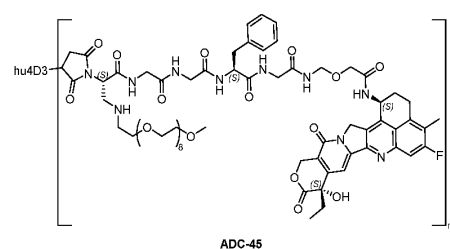
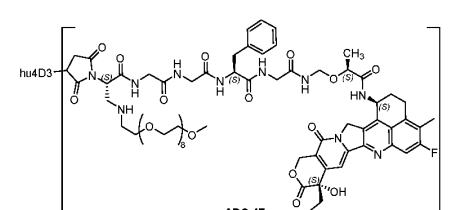
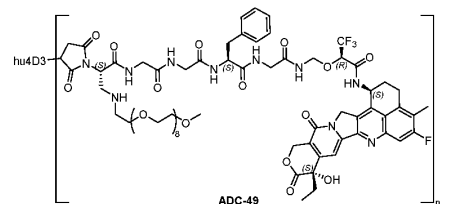
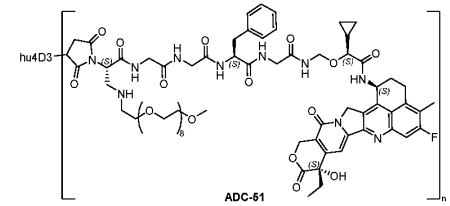
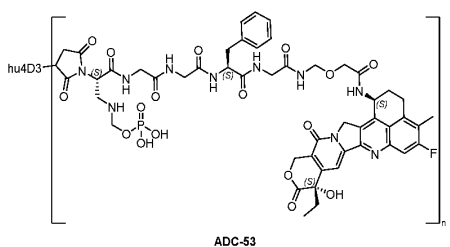
32. 根据权利要求 1-25 中任一项所述配体-喜树碱生物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物或权利要求 31 所述的方法，其特征在于：所述配体-喜树碱生物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物非限制性地选自以下结构或其丁二酰亚胺开环结构或其异构体，

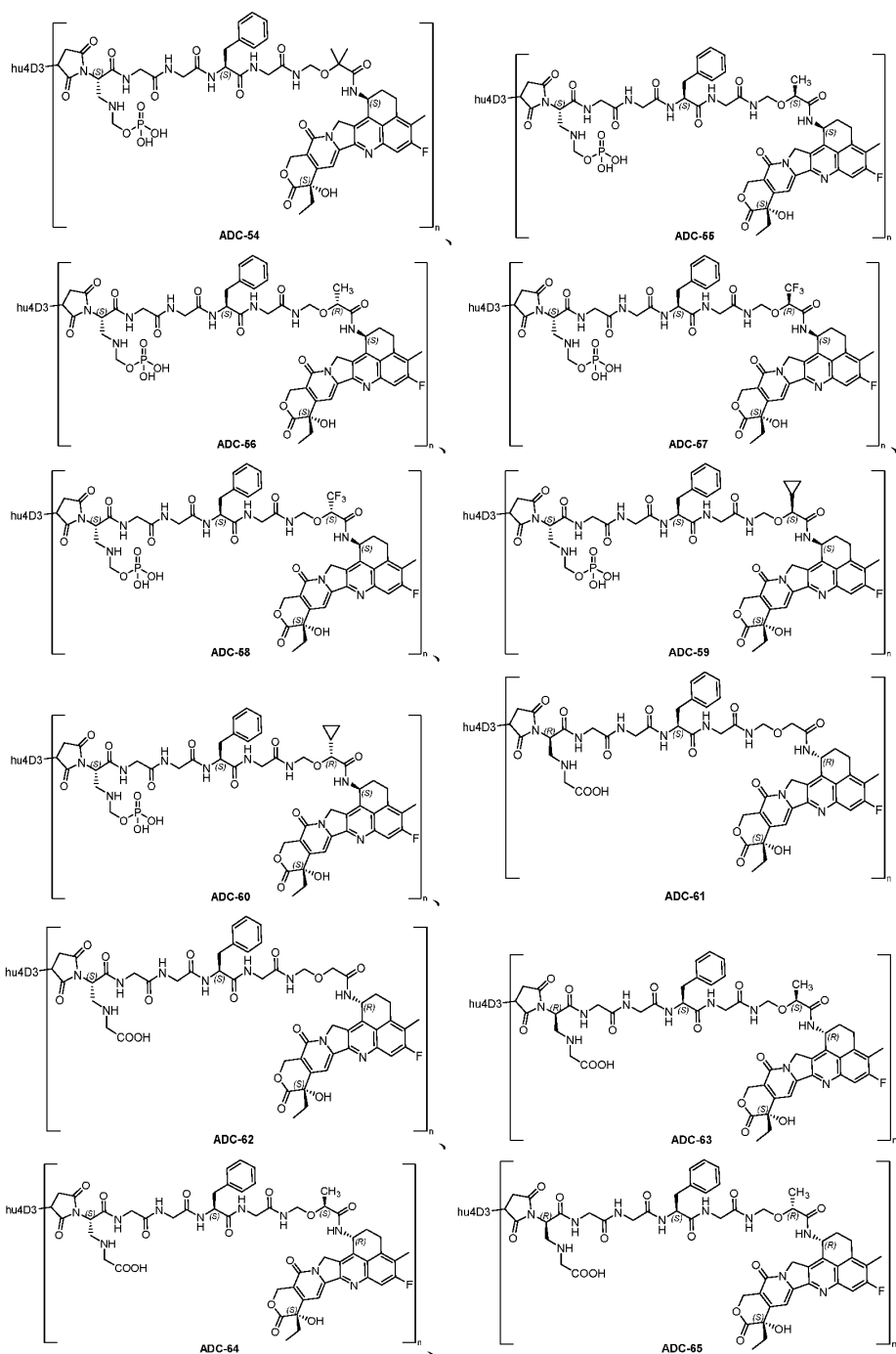


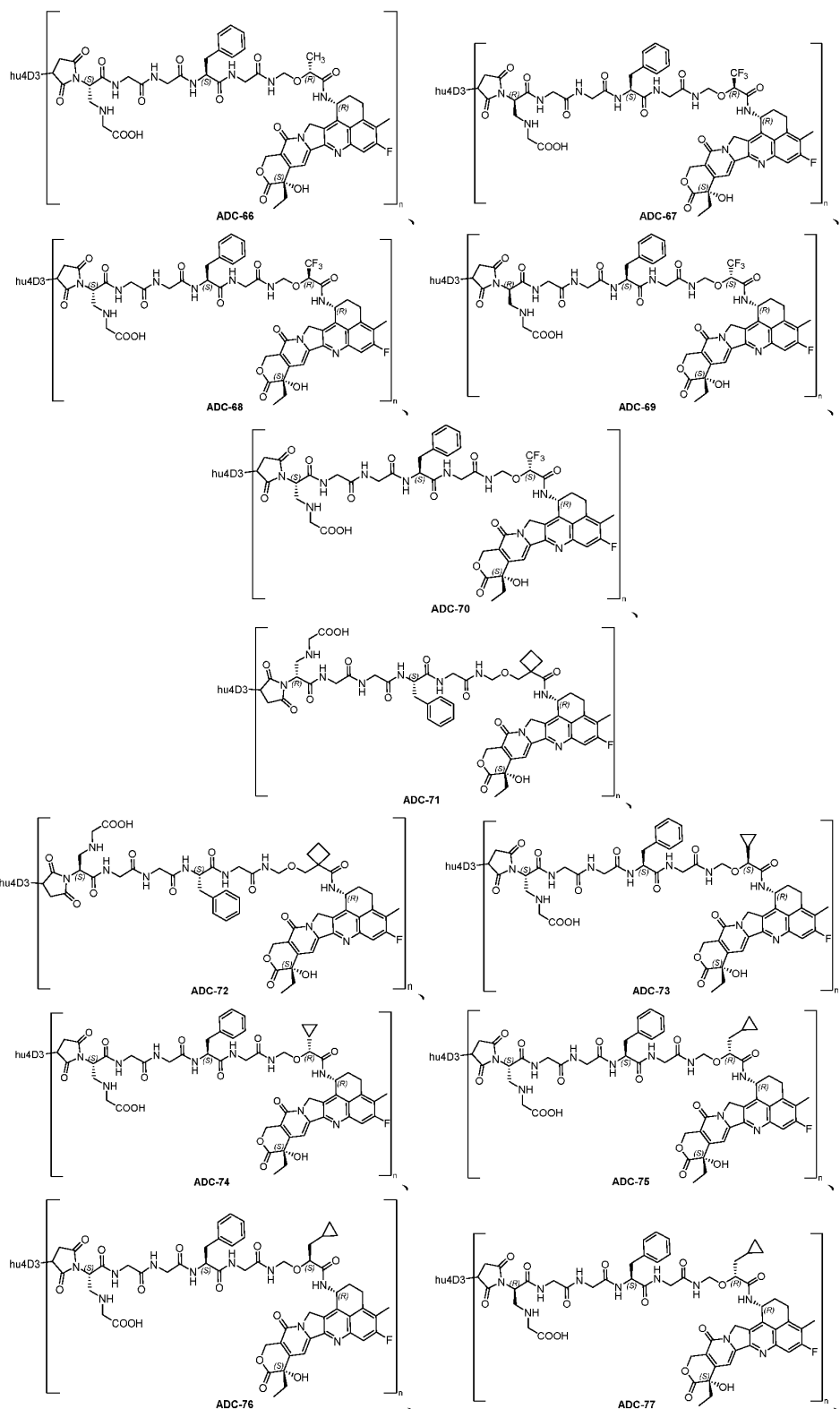


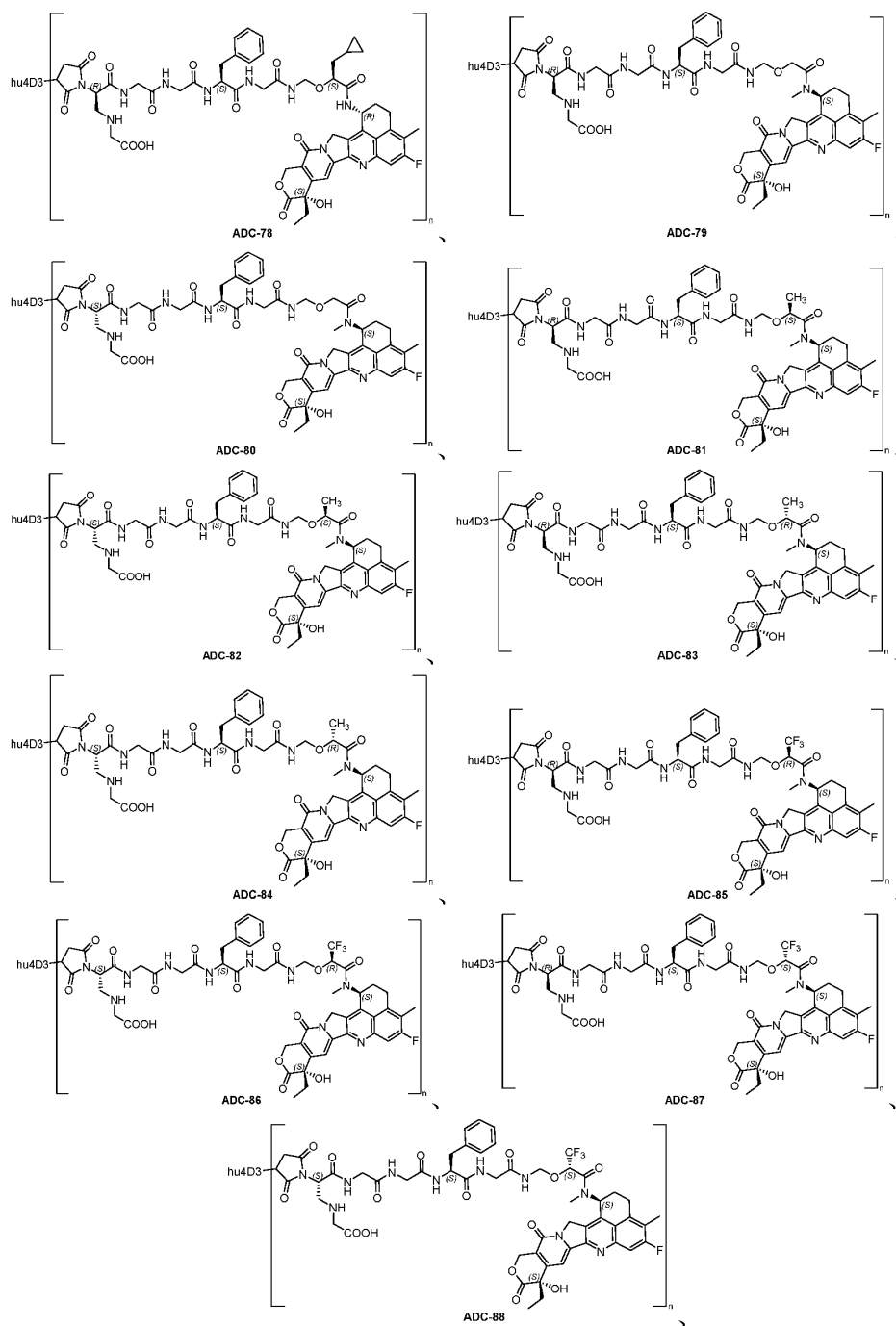


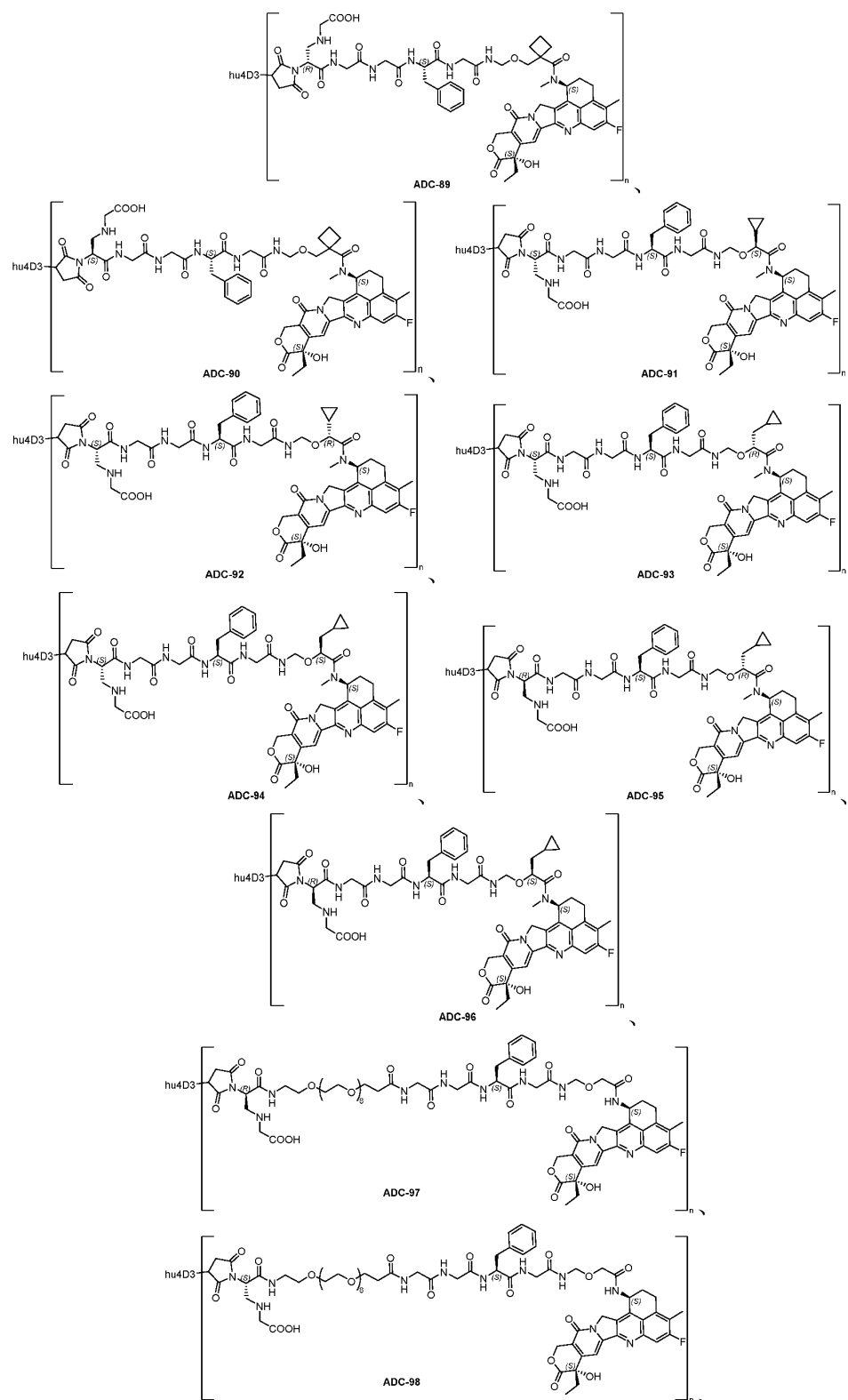


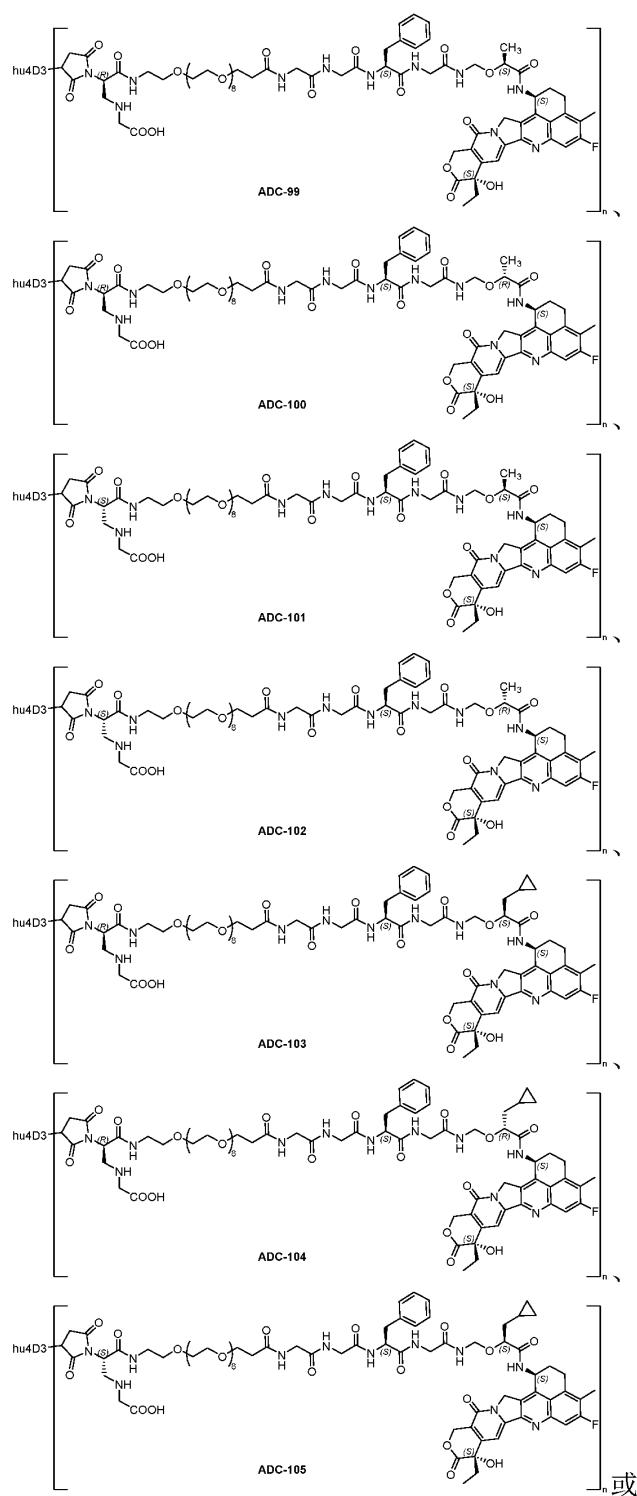


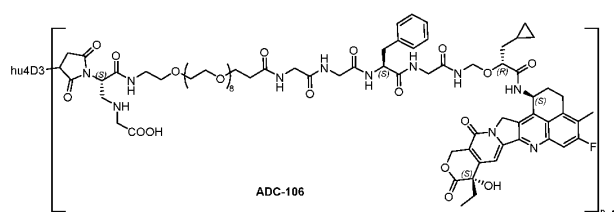










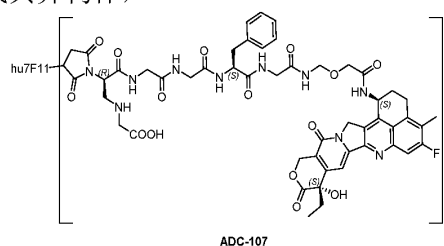
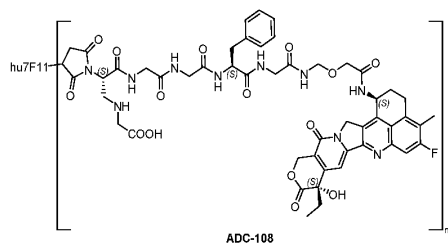
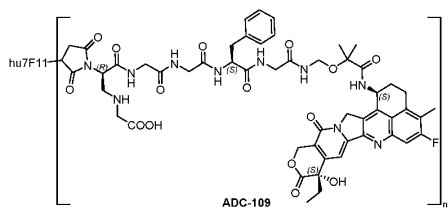
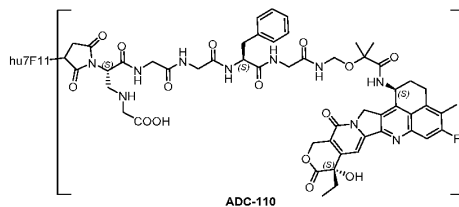
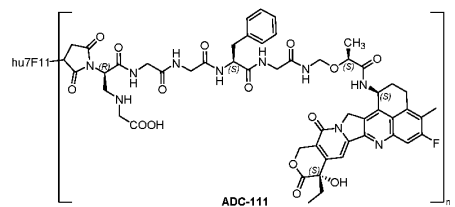
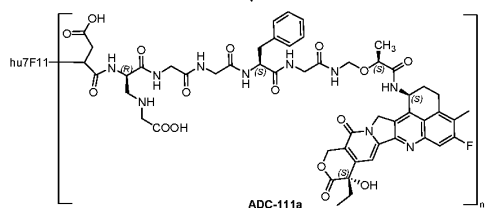


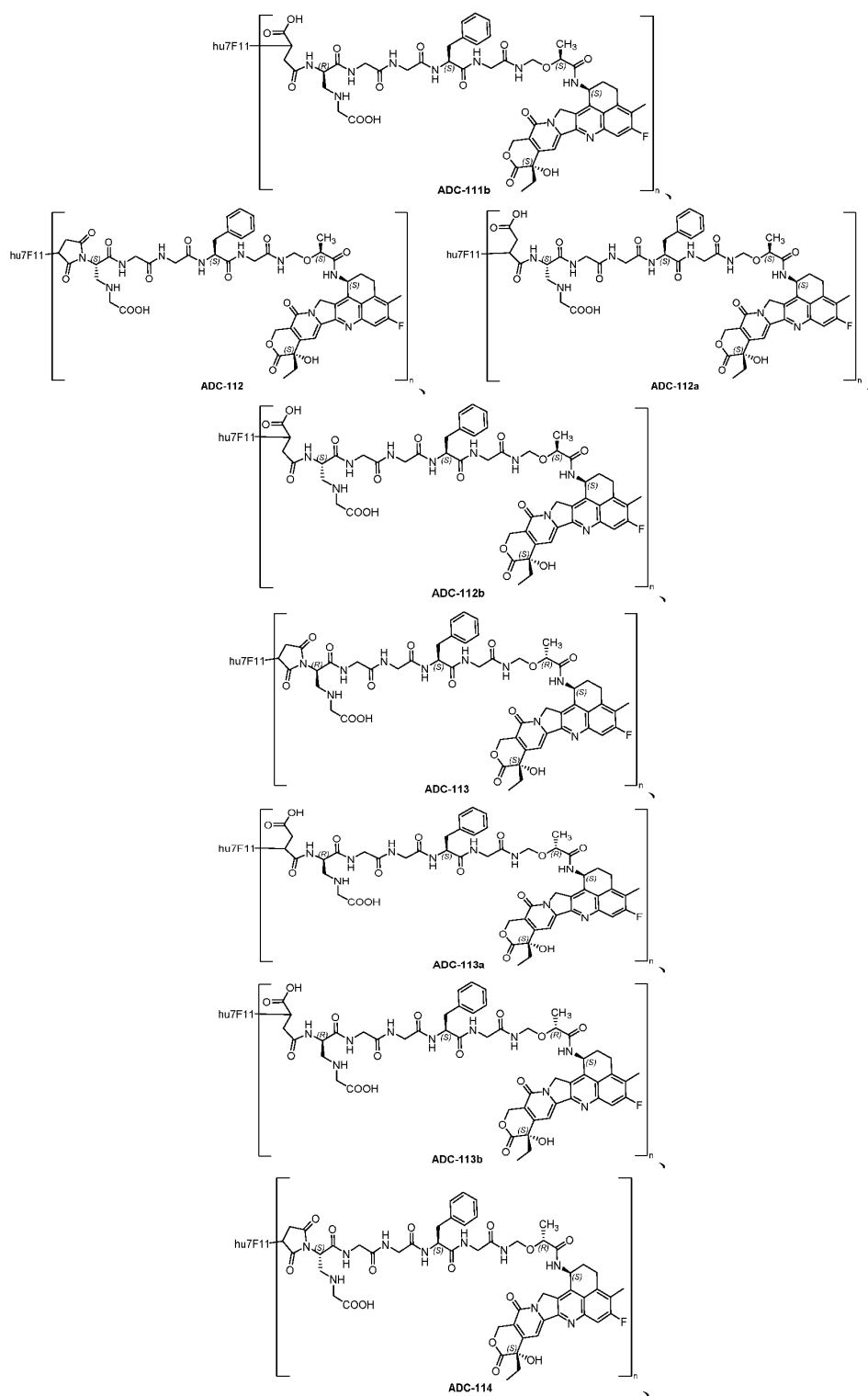
其中：

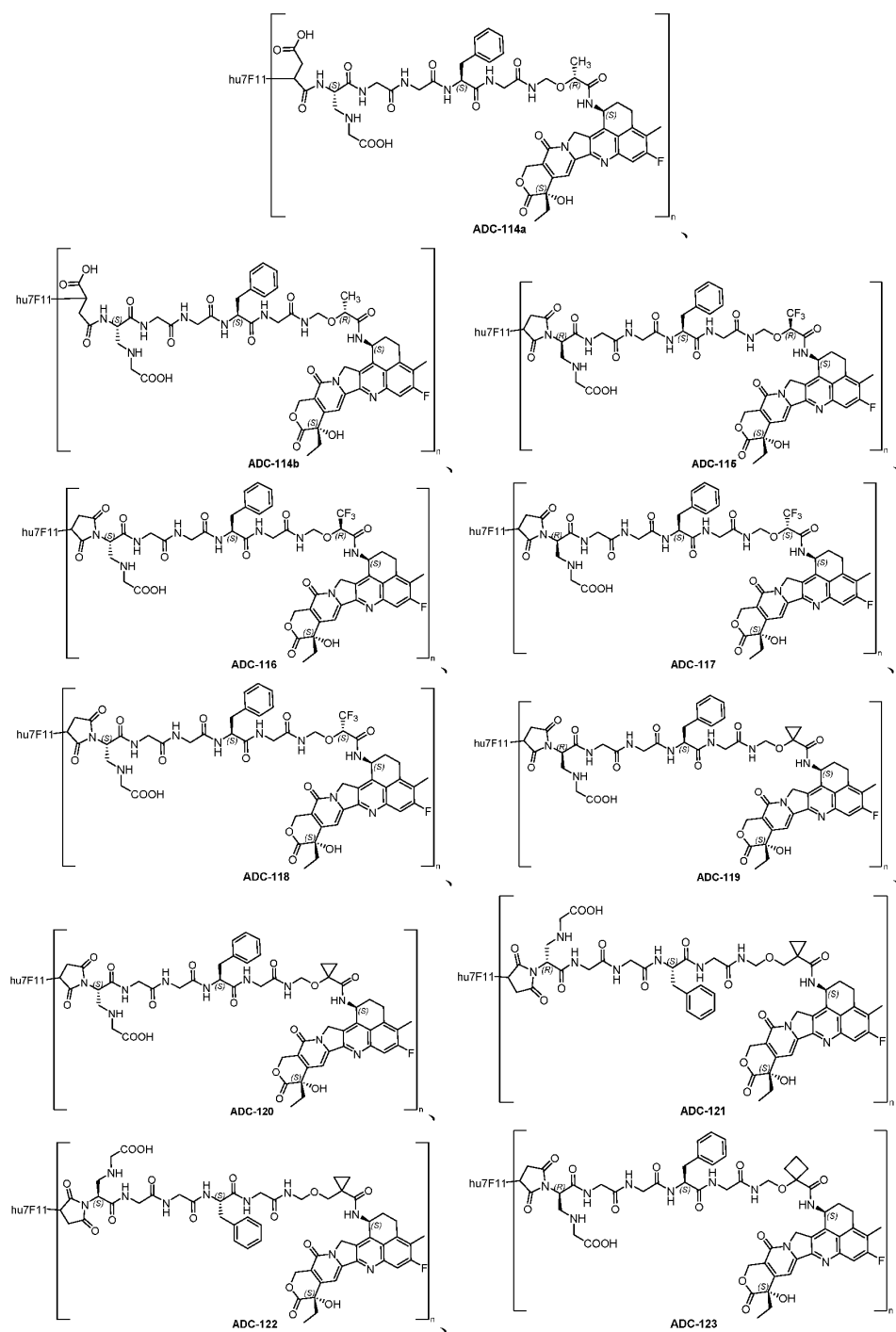
hu4D3 为靶向人 Trop2 的抗体或其抗原结合片段；

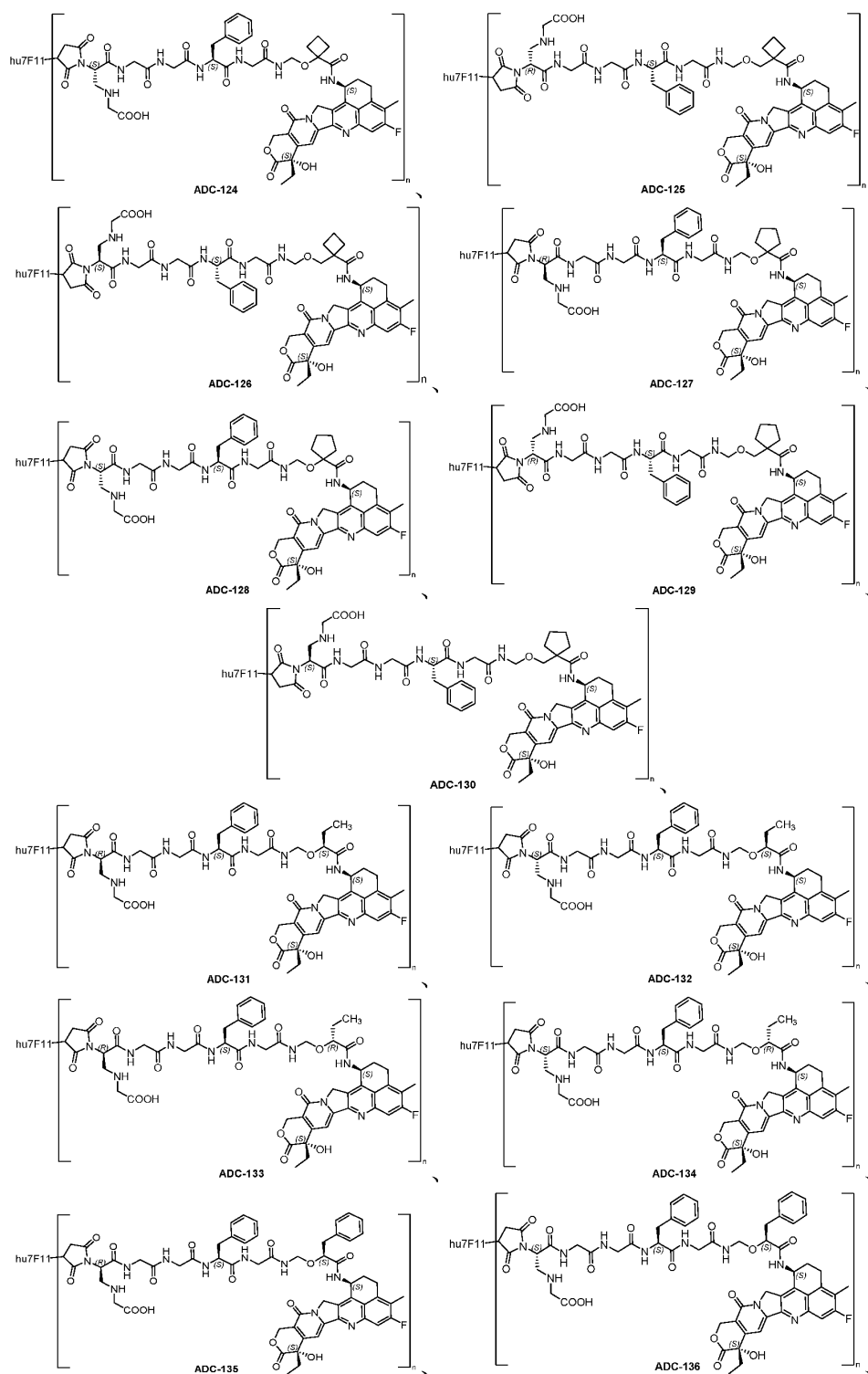
n 选自 1-10 的整数。

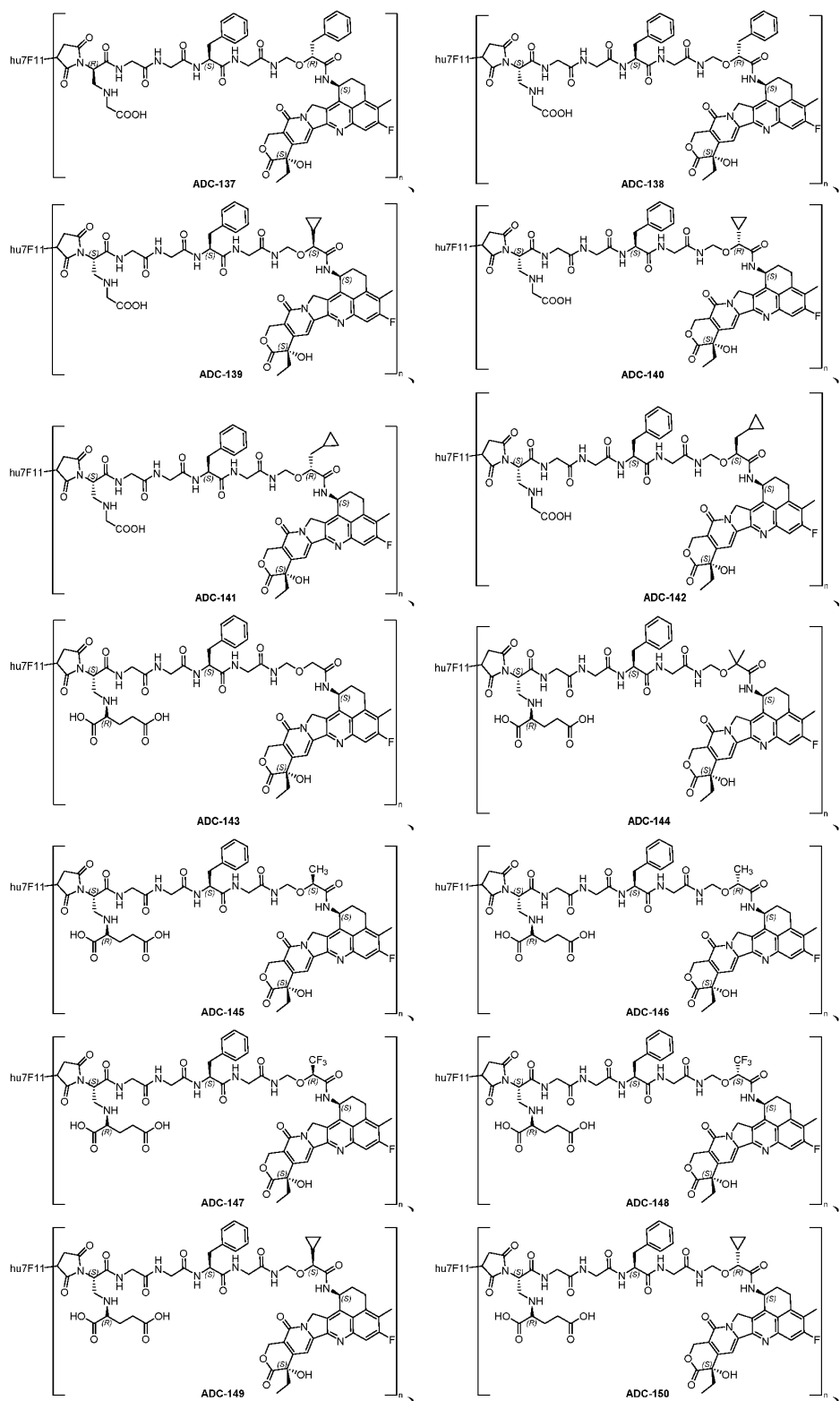
33. 如权利要求 1-25 中任一项所述配体-喜树碱衍生物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物或权利要求 31 所述的方法，其特征在于：所述配体-喜树碱衍生物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物非限制性地选自以下结构或其丁二酰亚胺开环结构或其异构体，

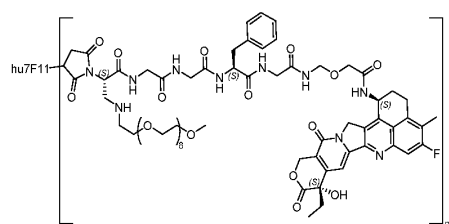




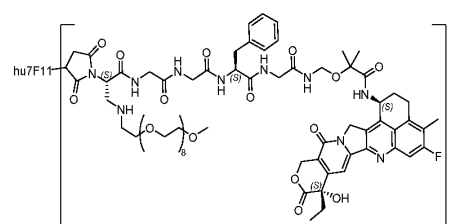




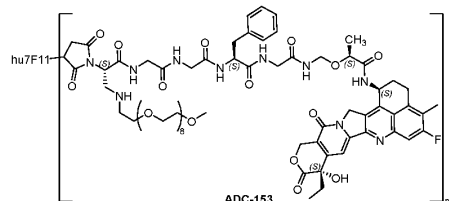




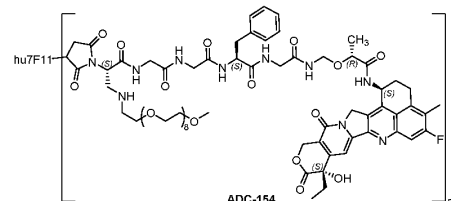
ADC-151



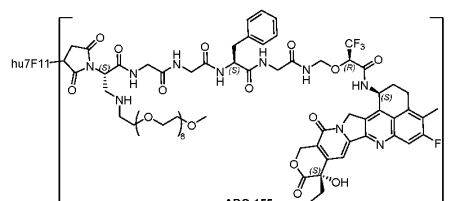
ADC-152



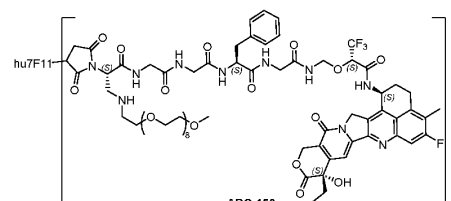
ADC-153



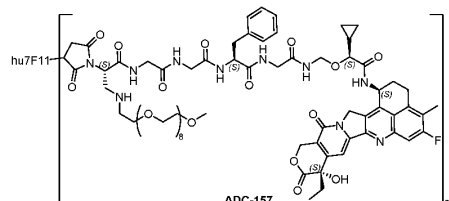
ADC-154



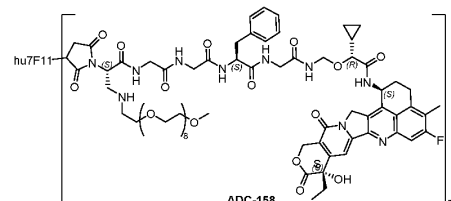
ADC-155



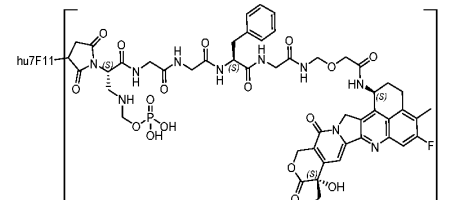
ADC-156



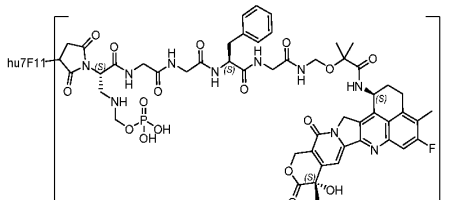
ADC-157



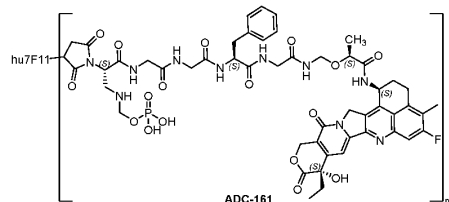
ADC-158



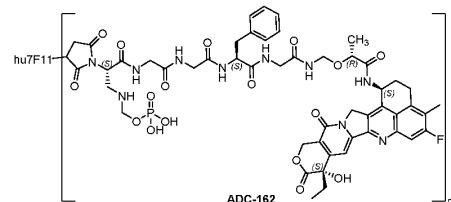
ADC-159



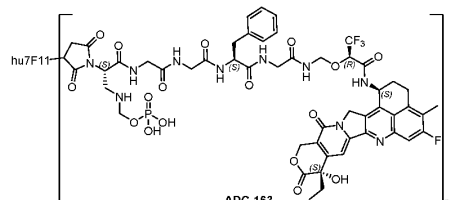
ADC-160



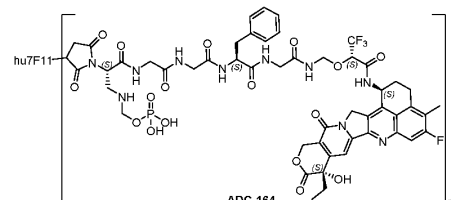
ADC-161



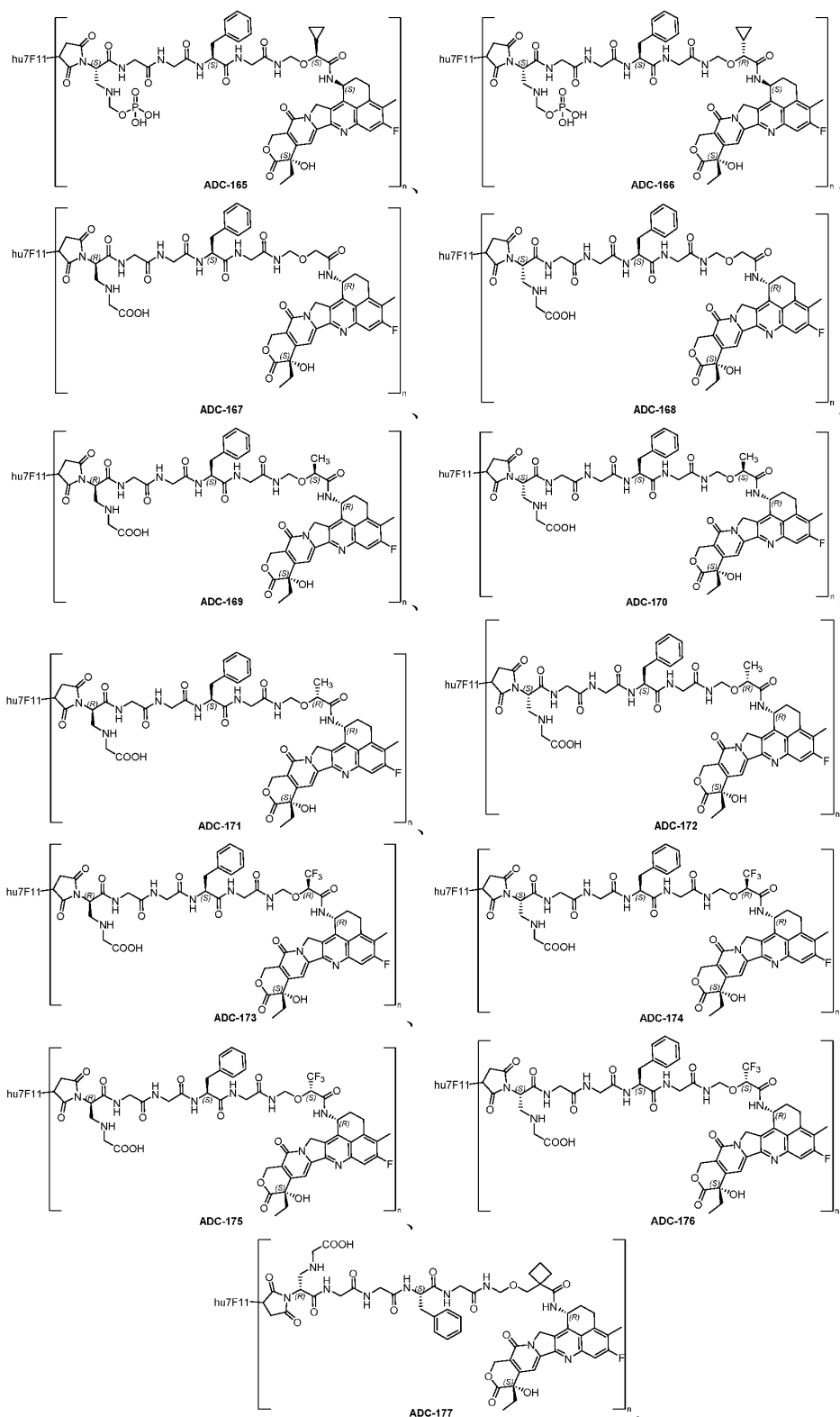
ADC-162

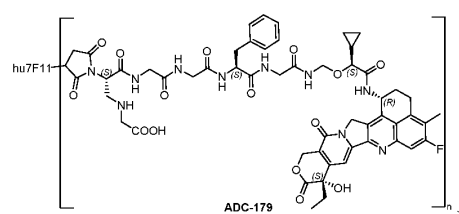
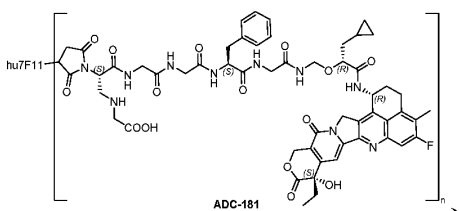
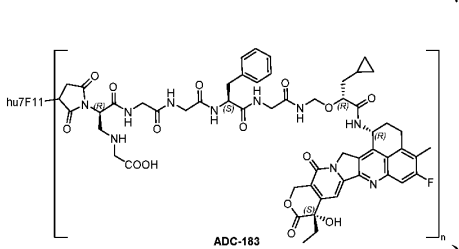
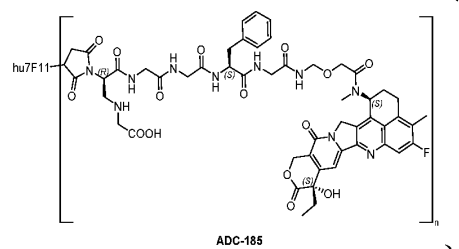
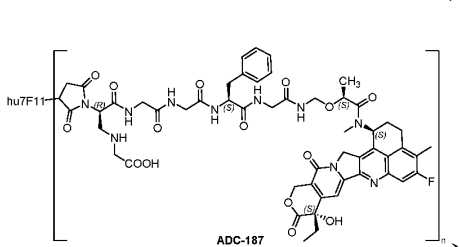
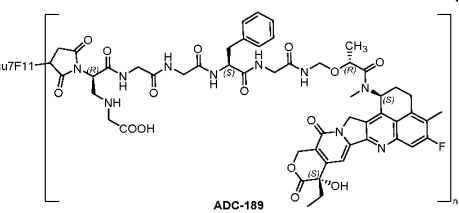


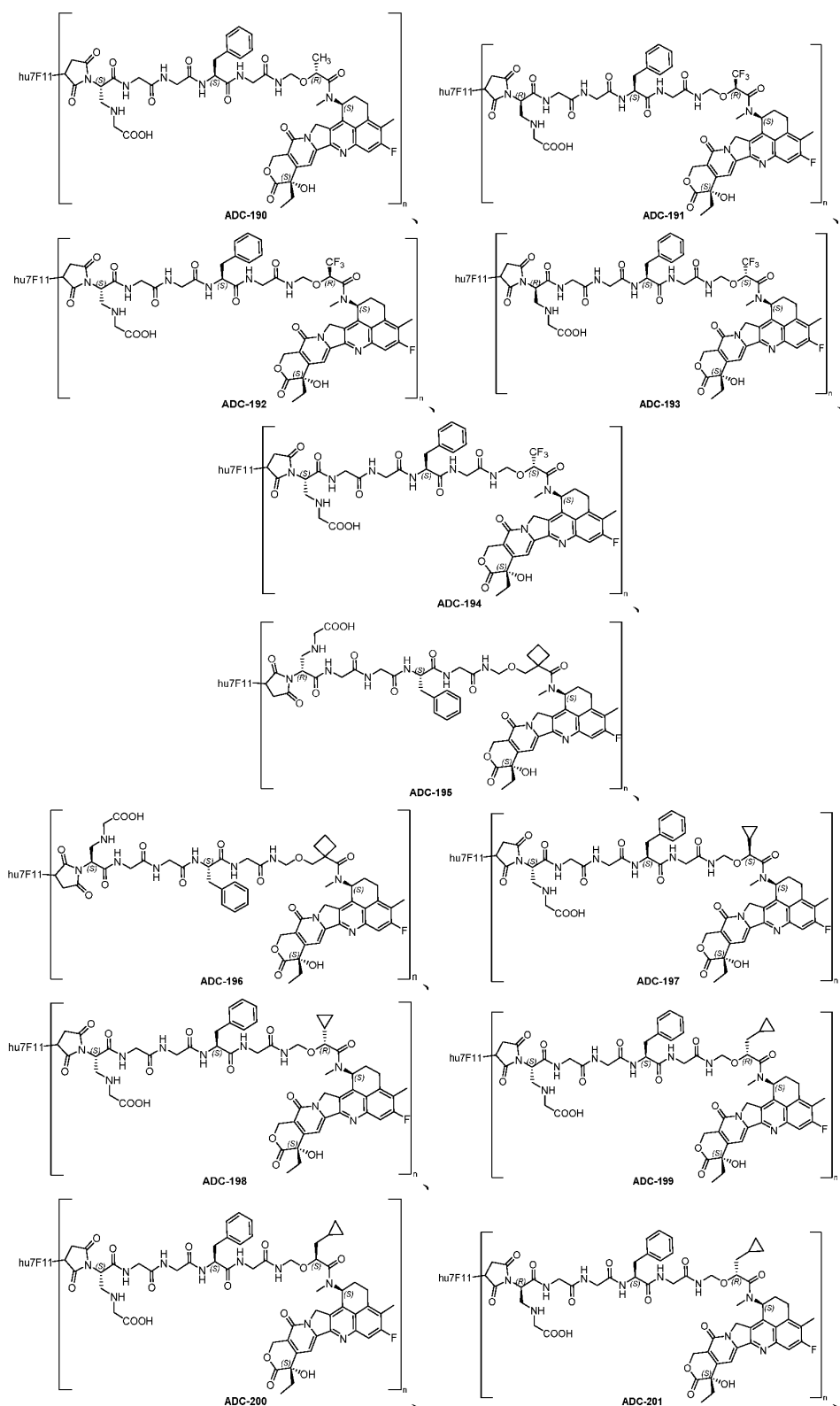
ADC-163

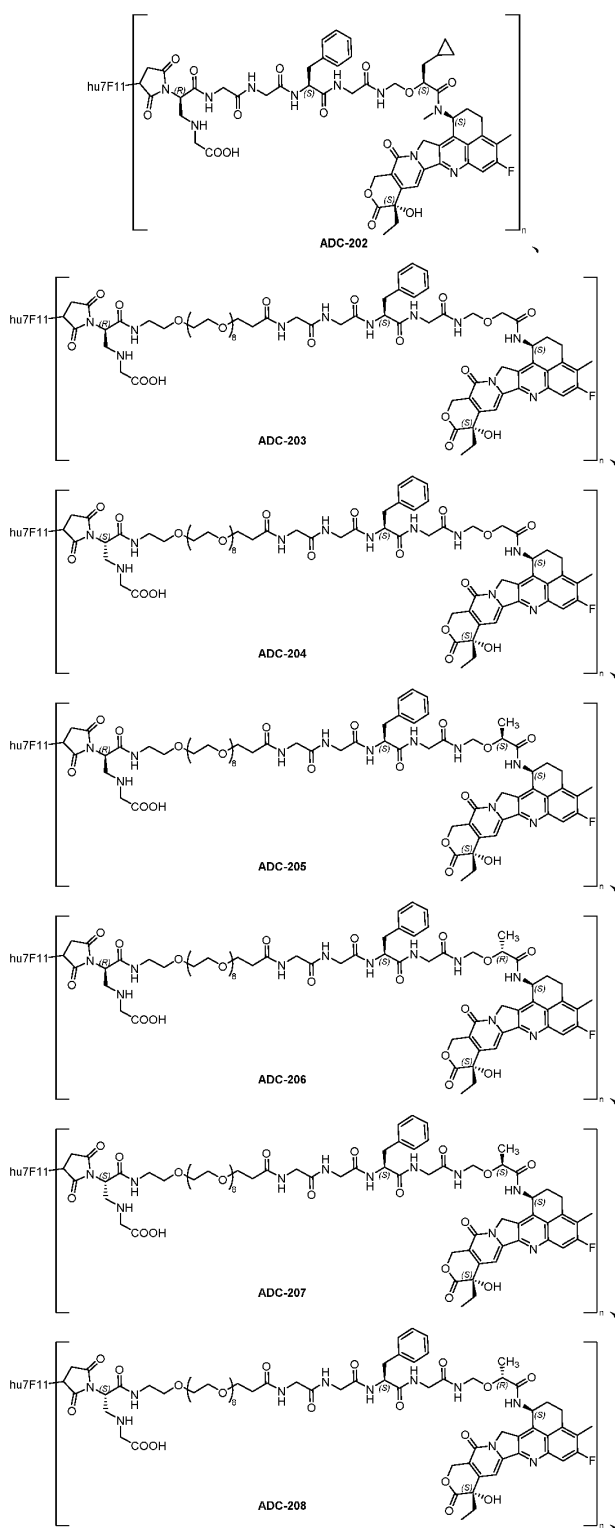


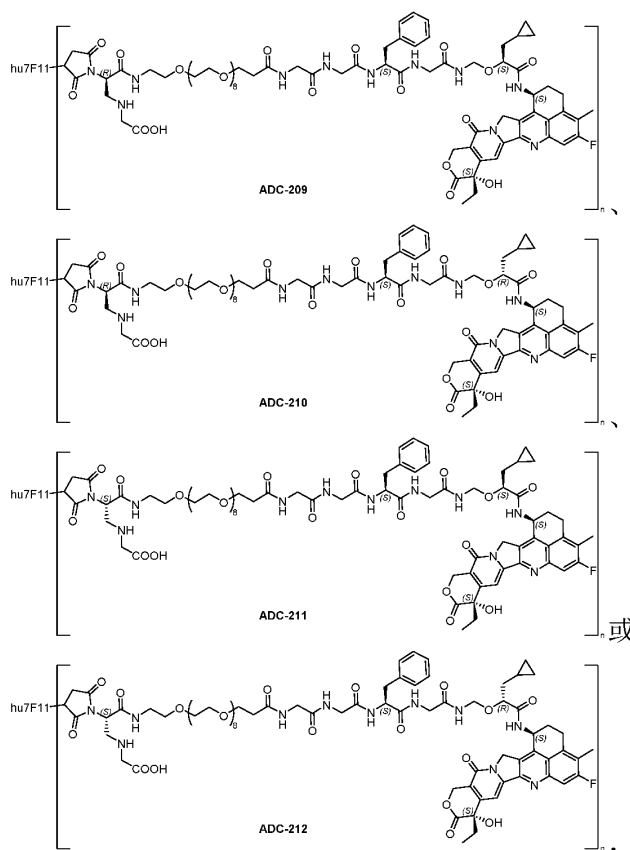
ADC-164











其中：

hu7F11 为靶向人 Trop2 的抗体或其抗原结合片段；

n 选自 1-10 的整数。

34. 根据权利要求 1-25 或 32-33 中任一项所述配体-喜树碱衍生物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物或根据权利要求 26-30 中任一项所述连接子-药物化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其特征在于：所述药学上可接受的盐包括与结构式中酸性官能团形成的钠盐、钾盐、钙盐或镁盐以及与结构中碱性官能团形成的醋酸盐、三氟乙酸盐、柠檬酸盐、草酸盐、酒石酸盐、苹果酸盐、硝酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、硫酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、乳酸盐、油酸盐、抗坏血酸盐、水杨酸盐、甲酸盐、谷氨酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐或对甲苯磺酸盐。

35. 一种药物组合物，其包含权利要求 1-25 或 32-33 中任一项所述配体-喜树碱衍生物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物或权利要求 26-30 中任一项所述连接子-药物化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，以及任选的药学上可接受的载体。

36. 一种药物制剂，其包含权利要求 1-25 或 32-33 中任一项所述配体-喜树碱衍生物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物或权利要求 26-30 中任一项所述连接子-药物化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物。

37. 权利要求 1-25 或 32-33 中任一项所述配体-喜树碱衍生物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物或权利要求 26-32 中任一项所述连接子-药物化合物

或其药学上可接受的盐或溶剂化物，或权利要求 35 所述的药物组合物和/或权利要求 36 所述的药物制剂，在制备用于治疗或预防癌症或者肿瘤的药物中的用途；

或者，权利要求 1-25 或 32-33 中任一项所述配体-喜树碱衍生物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物或权利要求 26-30 中任一项所述连接子-药物化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，或权利要求 34 所述的药物组合物和/或权利要求 36 所述的药物制剂，用于治疗或预防癌症或者肿瘤；

优选地，癌症或者肿瘤表达有 TROP2；

更优选地，癌症或者肿瘤选自腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫癌、前列腺癌、肾癌、尿道癌、膀胱癌、肝癌、胃癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、食道癌、肺癌、结肠癌、三阴乳腺癌、直肠癌、结直肠癌、骨癌、皮肤癌、甲状腺癌、胰腺癌、黑色素瘤、神经胶质瘤、神经母细胞瘤、多形性胶质细胞瘤、肉瘤、淋巴瘤和白血病等实体瘤或血液瘤。

38. 一种治疗或预防癌症或者肿瘤的方法，包括向有此需要的受试者施用预防或治疗有效量的权利要求 1-25 或 32-33 中任一项所述配体-喜树碱衍生物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物或权利要求 26-30 中任一项所述连接子-药物化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，或权利要求 35 所述的药物组合物和/或权利要求 36 所述的药物制剂；

优选地，癌症或者肿瘤表达有 TROP2；

更优选地，癌症或者肿瘤选自腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫癌、前列腺癌、肾癌、尿道癌、膀胱癌、肝癌、胃癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、食道癌、肺癌、结肠癌、三阴乳腺癌、直肠癌、结直肠癌、骨癌、皮肤癌、甲状腺癌、胰腺癌、黑色素瘤、神经胶质瘤、神经母细胞瘤、多形性胶质细胞瘤、肉瘤、淋巴瘤和白血病等实体瘤或血液瘤。